



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2015년 2월

2015년 2월
석사학위논문

석사학위논문

사람 구강암세포 KB에서 bavachin에 의한 세포성장 억제

사람 구강암세포 KB에서 bavachin에 의한 세포성장 억제

조선대학교 대학원

치의학과

박 병 수

박 병 수

사람 구강암세포 KB에서
bavachin에 의한 세포성장 억제

Cell growth inhibition by bavachin
in KB human oral cancer cells

2015년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

박 병 수

사람 구강암세포 KB에서
bavachin에 의한 세포성장 억제

지도교수 오 지 수

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함

2014년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

박 병 수

박병수의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 수 관 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 도 경 (인)

위 원 조선대학교 교수 오 지 수 (인)

2014년 11월

조선대학교 대학원

목 차

표목차	ii
도목차	iii
ABSTRACT	iv
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	3
1. 실험재료	3
2. 세포주와 세포배양	3
3. 세포성장 억제실험	3
4. DAPI 염색에 의한 세포핵 형태 관찰	4
5. DNA fragmentation 분석	4
6. Immunoblotting	4
7. 실험자료의 통계학적 검정	5
III. 실험결과	6
1. 세포성장에 영향을 미치는 bavachin의 효과	6
2. DAPI 염색에 의한 세포핵 형태 관찰	6
3. DNA fragmentation 분석	7
4. Bavachin에 의한 caspase의 활성화	7
IV. 총괄 및 고안	8
V. 결론	10
VI. 참고문헌	11
VII. 사진부도 설명	14
VIII. 사진부도	16

표 목 차

Table 1. Anti-proliferative effect of bavachin in KB cells 6

도 목 차

Fig. 1. Concentration- and time-dependent effects of bavachin on the cell viability in KB human oral cancer cells	16
Fig. 2. Induction of apoptosis by bavachin in KB cells	17
Fig. 3. Fragmentation of internucleosomal DNA by bavachin in KB cells	18
Fig. 4. Proteolytic cleavage of caspase-3 by bavachin treatment in KB cells ...	19
Fig. 5. Proteolytic cleavage of caspase-7 by bavachin treatment in KB cells ...	20
Fig. 6. Proteolytic cleavage of caspase-8 by bavachin treatment in KB cells ...	21
Fig. 7. Proteolytic cleavage of caspase-9 by bavachin treatment in KB cells ...	22

ABSTRACT

Cell growth inhibition by bavachin in KB human oral cancer cells

Park, Byung-Soo

Advisor: Prof. Oh, Ji-Su, D.D.S., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Psoralea corylifolia is widely distributed over southeastern Asian countries and has been used as traditional Chinese medicine. Bavachin, one of the main constituents of *Psoralea corylifolia*, possess various biological activities in common such as inhibiting platelet aggregation, anti-oxidation and anti-bacterial activity. However, the anti-cancer activity of bavachin has not yet been well defined. In this study, therefore, the cytotoxic activity of bavachin and the mechanism of cell death exhibited by bavachin were examined in KB human oral cancer cells.

The cytotoxic effect of bavachin on cell growth in KB cells was examined by inhibition of cell growth (MTT assay). In addition, the cell death mechanism by bavachin was examined using DAPI staining, DNA fragmentation analysis and immunoblotting.

1. Treatment of bavachin in KB cells induced the inhibition of cell growth in a concentration- and a time-dependent manner as determined by MTT assay.
2. Treatment of bavachin induced the nuclear condensation in KB cells.
3. Treatment of bavachin induced the DNA fragmentation in KB cells.

4. The proteolytic processing of caspase-3, -7, -8 and -9 was increased by bavachin treatment in KB cells.

These results suggest that bavachin can induce the suppression of cell growth and cell apoptosis in KB human oral cancer cells, and therefore, that it may have potential properties for anti-cancer drug discovery.

Key Words: Bavachin, Anti-cancer therapy, Apoptosis, Cell death,
KB human oral cancer cells

I. 서 론

생약(crude drugs)이란 의약품의 일종이며, 천연으로 산출되는 자연물을 그대로 또는 간단한 가공처리를 하여 의약품으로 사용하거나 의약품의 원료로 삼는 약을 말한다[1]. 유효 성분의 종류와 함량이 일정하지 않아서 일정한 효과가 보장되기 힘들다는 생약의 단점에도 불구하고, 생약이 널리 사용될 뿐만 아니라 앞으로 더욱 생약의 이용이 증가될 추세에 있는 것은 유효 성분이 이미 밝혀져 있더라도 아직 합성하는 방법이 개발되지 못한 경우나 이미 알려진 의약품으로는 치료법이 없는 데 생약으로는 치료가 가능한 경우 등이 있기 때문이다[1,2]. 최근 들어, 이러한 생약들로부터 다양한 질병치료를 위한 새로운 유효 성분과 치료 의약품을 개발하기 위한 노력이 세계적으로 활발하게 진행되고 있다. 그 예로서 Taxol, Oncovin 또는 Captothecin 같은 약물들이 개발되어 졌으며, 이 약물들은 인체 내에서 암의 화학적 치료제로서 가능성이 있는 것으로 보고되고 있다[3-6].

Apoptosis란 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 방식의 한 형태로, 정상적인 세포를 갱신하거나 이상이 생긴 세포를 제거하여 진행세포의 항상성과 조직성장의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다[7-9]. 항암물질의 대부분은 세포사의 일종인 apoptosis를 야기하여 암세포 증식을 억제함으로써 암의 화학적 치료제 역할을 하기 때문에, 이러한 항암물질을 사용하여 발생하는 암세포의 apoptosis는 암 치료법의 결과에 대한 중요한 지표가 되었다[5,6,10,11].

보골지(*Psoralea fructus*)는 콩과(*Leguminosae*)에 속하는 파고지(*Psoralea corylifolia*)의 성숙한 과실을 일컫는 것으로, 우리말로는 개암풀 열매라 하며, 그 형태가 콩팥 모양으로 조금 납작하고 바깥 면은 흑색 또는 회갈색으로 그물 모양의 작은 무늬가 있다[12]. 보골지는 신장 및 생식 기능을 개선하고 소염작용과 진통작용, 관상동맥 확장작용과 항균작용이 우수한 약재로 알려져 있다[12,13]. 또한 보골지는 수지, 정유, bakuchiol, psoralen, angelicin, bavachin, bavachinin 및 isobavachin 등이 함유되어 있고, 껍질에는 psoralidin, corylifolin 등을 주요성분으로 포함하고 있다[12-14]. 보골지 성분 중 bavachin은 페놀성 화합물로서 혈소판 응집 억제, 항산화 작용 및 항균 작용 등의 효과가 보고되고 있다[12-14]. 그러나 bavachin의 항암효과에 관한 자료는 매우 부족하며, 특히 구강암에서 bavachin의 효과에 대해서는 알려진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 사람 구강암세포주 KB 세포를 이용하여 보골지 성분 중 bavachin의 구강암 세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히고자 하며, 아울러 bavachin에 의한 구강암 치료의 효용성을 제시 하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

Bavachin은 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Dallas, TX, USA)에서 구입하여 사용하였고, N-methylthiotetrazole(MTT)와 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)는 Sigma(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였으며, ECL detection kit는 Amersham Biosciences Corp.(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. Anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-8, anti-cleaved caspase-9 및 anti-cleaved PARP 항체는 Cell Signaling Technology, Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

사람 구강암세포 KB는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 제공받아 실험에 이용하였다.

2. 세포주와 세포배양

사람 구강암세포 KB는 5% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA), 항생제(100u/ml penicillinm, 100 μ g/ml streptomycin) 및 1% non-essential amino acids(NEAA, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)가 함유된 37°C의 성장배지 minimal essential medium(MEM, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 하에서 배양하면서 실험에 이용하였다[15].

3. 세포성장 억제실험(MTT 분석)

Bavachin에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해, 24well plate에 5 X 10³cells/well의 KB 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, bavachin을 다양한 농도와 시간에서 처리하여 37°C에서 반응시킨 후, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다[16]. MTT 분석은 bavachin을 처리한 KB 세포에 MTT 용액(MTT 최종농도 0.5 μ g/ μ l)을 37°C에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl 이 함유된 isopropanol로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

4. DAPI 염색에 의한 세포핵 형태 관찰

Bavachin에 의한 KB 세포 증식억제가 apoptosis 유도와의 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI 염색을 이용한 세포핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. 10cm 배양접시에 5×10^5 개의 KB 세포를 접종하여 24시간 배양한 후, bavachin $3\mu\text{M}$ 과 $10\mu\text{M}$ 을 각각 처리하여 72시간 동안 37°C 에서 배양하였다. 배양한 KB 세포를 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution을 이용하여 상온에서 10분 동안 고정된 후 DAPI 용액을 이용하여 15분 동안 염색하였다. 염색한 KB 세포를 형광현미경(IX71, Olympus, Japan)을 이용하여 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

5. DNA fragmentation 분석

세포사멸의 기전 중 apoptosis의 지표가 되는 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. Bavachin에 의한 세포 DNA fragmentation 효과를 관찰하기 위해, 10cm 배양접시에 5×10^5 개의 KB 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, bavachin $10\mu\text{M}$ 을 처리하여 72시간 동안 37°C 에서 배양한 후, 세포를 수집하여 lysis buffer(0.1M NaCl, 0.001M EDTA, 0.3M Tris-HCl(pH, 7.5), 0.2M sucrose)를 이용한 통상의 phenol-chloroform extraction법으로 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 2% agarose gel에서 전기영동(50volts , 90분) 하였으며, ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

6. Immunoblotting

세포 apoptosis의 지표가 되는 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9(Anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-8 및 anti-cleaved caspase-9) 분석을 위해 immunoblotting을 시행하였다 [17]. 10cm 배양접시에 5×10^5 개의 KB 세포를 접종하고 24시간 배양한 후, bavachin $10\mu\text{M}$ 을 처리하여 72시간 동안 37°C 에서 배양한 후 세포를 수집하였다. 세포를 4°C 의 PBS로 2회 세척한 후, 4°C 의 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.5mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, $5\mu\text{g/ml}$ aprotinin 및 $5\mu\text{g/ml}$ leupeptin 이 포함된 PBS)에서 30분 반응시켰다. 세포 용해물을 $12,500 \times g$ 에서 20분간 원심 분리한 후, 단백질 시료를 정량하였다. 단백질 시료를 2배의 SDS sample

buffer(60mM Tris-HCl(pH, 6.8), 4% SDS, 25% glycerol, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 넣고 100℃에서 5분간 변성 시킨 후, 12% SDS-polyacrylamide gel에 120volt에서 2시간 전기영동 한 다음, 단백질 transfer를 이용하여 nitrocellulose membrane(Millipore Co., Billerica, MA, USA)으로 이동시켰다. Membrane을 5% fat-free dry milk-PBST buffer(PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간 동안 blocking하였고, PBST buffer로 15분간 3회 세척하였다. 일차항체로 anti-caspase-3, anti-caspase-7, anti-caspase-8 및 anti-caspase-9 (anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-8, anti-cleaved caspase-9) 항체를 1,000배 희석하여 사용하였으며, anti-β-actin 항체는 2,000배 희석하여 사용하였다. 이차항체로 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG를 5,000배 희석하여 사용하였으며, ECL detection kit를 사용하여 X-ray 필름에 현상한 후 분석하였다.

7. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean ± SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05 미만(p<0.05)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 또한 본 연구의 통계적 검정은 SPSS ver. 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

III. 실험 결과

1. 세포 성장에 영향을 미치는 bavachin의 효과

KB 세포에서 bavachin에 의한 세포 성장 억제 효과를 조사하기 위해 MTT 분석을 시행하였다. Bavachin을 0.1, 0.3, 1, 3 및 10 μ M의 다양한 농도로 24, 48 및 72 시간 동안 KB 세포에 투여한 후 MTT 검사를 시행한 결과, bavachin 처리 24시간의 경우에는 대조군과 비교하였을 때 세포 성장 억제의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 1). 또한 bavachin 처리 48시간과 72시간의 경우에서 bavachin 0.1, 0.3 및 1 μ M의 농도에서도 대조군과 비교하였을 때 세포 성장 억제의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 1). 그러나 bavachin 처리 48시간과 72시간의 경우, bavachin 3 μ M과 10 μ M에서는 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 세포 성장 억제 효과를 볼 수 있었으며, 이 효과는 시간과 농도에 의존적임을 확인할 수 있었다(Fig. 1). KB 세포 성장 억제에 대한 bavachin의 IC_{50} (최대 억제량의 50%를 유발시키는 농도)은 bavachin 처리 24시간과 48시간의 경우에는 결정할 수 없었으며, 72시간에서는 약 6.15 μ M이었다(Table 1).

Table 1. Anti-proliferative effect of bavachin in KB cells

Time	IC_{50} (μ M)
24 hours	ND
48 hours	ND
72 hours	6.15 \pm 0.73

The IC_{50} values represent the mean \pm SEM for three experiments. ND; not detected.

2. DAPI 염색에 의한 세포핵 형태 관찰

Bavachin 처리에 따른 KB 세포의 성장억제가 세포 apoptosis 유발과 상관성이 있는지 조사하기 위하여 0, 3 및 10 μ M의 bavachin을 처리한 배지에서 72시간 동안 배양한 후, DAPI 염색을 통해 세포핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. 세포핵에

특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하고 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, Fig. 2A에 나타난 바와 같이 bavachin을 처리하지 않은 대조군 KB 세포에서는 대부분의 세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나, bavachin 3 μ M과 10 μ M을 처리한 세포에서는 apoptosis 발생 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 다수 관찰되었다(Fig. 2A). Apoptosis가 발생하지 않은 정상세포를 100%로 기준하여 apoptotic body를 비율로 나타내어 비교한 결과, bavachin을 처리하지 않은 대조군 KB 세포에서는 약 2.7%, bavachin 3 μ M과 10 μ M을 처리한 세포에서는 각각 약 28.7%와 64.9%로, bavachin 농도가 증가함에 따라 apoptotic body의 비율이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2B).

3. DNA fragmentation 분석

Bavachin에 의한 KB 세포의 성장억제 기전을 확인하기 위하여 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. Bavachin 0과 10 μ M을 처리한 배지에서 72시간 동안 처리한 KB 세포의 DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과, 대조군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, bavachin 10 μ M을 처리한 실험군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 있었다(Fig. 3).

4. Bavachin에 의한 caspase의 활성화

Caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9이 세포 apoptosis의 지표가 되므로[18-22], bavachin을 처리한 KB 세포에서 cleaved caspase-3, cleaved caspase-7, cleaved caspase-8 및 cleaved caspase-9 발현분석을 위해 immunoblotting을 시행하였다. Bavachin을 처리한 KB 세포의 단백질을 추출하여 확인한 결과, 대조군에서는 procaspase-3, procaspase-7, procaspase-8 및 procaspase-9의 단백질 가수분해(proteolytic cleavage) 현상을 볼 수 없었으나, bavachin 10 μ M을 72시간 동안 처리한 실험군에서는 단백질 가수분해 현상을 뚜렷이 볼 수 있었다(Fig. 4-7).

IV. 총괄 및 고안

최근, 생약을 이용하여 항암제를 포함한 다양한 의약품을 개발하기 위한 노력이 세계적으로 다양한 산업 분야에서 커지고 있다[23-27]. 그 중 항암물질은 특정 암세포에서 여러 기전을 통해 암세포 성장을 억제하거나 암세포 사멸을 유발하는 것으로 알려져 있으며[28,29], 암세포 성장억제 기전들은 세포의 종류와 자극의 종류에 의존하여 중요한 역할을 담당하며, 최소한의 부작용으로 암세포를 사멸시킬 수 있어야 한다[28,29]. 암세포 사멸을 일으키는 중요한 방법 중 하나인 apoptosis는 외인성의 death receptor-의존적 경로 또는 내인성의 미토콘드리아-의존적 경로를 따라 일어나는 것으로 보이며, 이는 암의 화학적 치료제에 의해서 일어나기도 한다[18,19]. 보골지는 소염, 진통 및 항균 관련 생약으로 우리나라에서 전통적으로 사용되어져 온 민간요법제 중 하나이며, 보골지 성분 중 bavachin은 혈소판 응집 억제, 항산화 작용 및 항균 작용 등이 있다고 보고되고 있다[12-14]. 그러나 bavachin의 항암효과에 관한 자료는 매우 부족하며, 특히 구강암에서 bavachin의 효과에 대해서는 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 사람 구강암 세포주 KB 세포를 이용하여 bavachin의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히고자 하였다.

세포성장 억제효과를 조사하기 위한 MTT 분석에서 bavachin은 시간과 농도에 의존적으로 KB 구강암 세포의 성장을 억제시켰다(Fig. 1). 이는 시간과 농도에 의존적으로 암세포 사멸을 유도하는 항암효과를 지닌 여러 생약 유래 물질 (*Echinacea* root, *Toona sinensis*, *Willow bark*)에서의 연구결과와 유사한 것이었다 [30-32]. 더욱이 다른 생약 유래 물질과 비교하여 상대적으로 낮은 농도의 bavachin에서도 충분히 KB 구강암 세포의 사멸을 유도하였다[30-32]. 이러한 결과는 bavachin이 구강암 세포 성장억제에 대한 특이적인 효과를 가지고 있다는 것을 시사하며, 또 bavachin의 항암치료제로서의 잠재적인 가치를 시사하고 있다.

암세포 성장억제 과정에서 apoptosis의 유도는 생약 유래 물질로부터 항암물질의 개발에 유용한 전략이 된다[33]. 그러므로 과학자들은 생약을 포함한 다양한 천연물로부터 암세포들의 apoptosis를 유도하는 연구들을 시행하고 있다. 본 연구에서도 bavachin에 의한 KB 세포 성장억제 기전에 apoptosis가 포함되는지를 확인하기 위하여, DAPI 염색을 이용한 세포핵의 형태학적 변화 관찰 및 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하

고 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, bavachin을 처리하지 않은 대조군 KB 세포에서는 대부분의 세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나, bavachin 3 μ M과 10 μ M을 처리한 세포에서는 bavachin 처리 농도의 증가에 따른 세포 밀도의 감소와 더불어 apoptosis 발생 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 다수 관찰되었다(Fig. 2). 또한 apoptosis 유발의 또 다른 직접적인 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 조사한 결과, bavachin을 처리하지 않은 대조군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, bavachin 처리 실험군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 있었다(Fig. 3). 이는 암세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 추출물들이 DNA fragmentation을 유도하는 apoptosis 과정에 의해 암세포를 사멸시킨다는 연구결과 [30-32]와 일치하는 것으로서, bavachin에 의해 유도되는 KB 구강암 세포 성장억제 과정에는 endonuclease가 활성화되어 세포핵의 DNA가 fragmentation 되는 apoptosis 기전이 포함되는 것으로 사료된다.

Cysteine protease인 caspase의 세포 내 활성화는 다양한 자극에 의해 유도된 apoptosis를 개시하고 실행하는데 중요한 역할을 한다[20-22]. 사람의 세포에서 확인된 caspase 아형 중에 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9 등이 apoptosis 유도의 실행 caspase로 알려져 있으며, 이들은 각각 다양한 자극에 의해 apoptosis가 일어날 때 proteolytic cleavage 현상이 일어난다[20-22]. 본 연구에서 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9의 proteolytic cleavage 현상을 확인하기 위해 이들의 항체를 이용하여 immunoblotting을 시행한 결과, bavachin 처리 실험군에서 caspase들의 proteolytic cleavage 현상을 볼 수 있었다(Fig. 4-7). 이러한 실험결과들은 bavachin에 의해 유도되는 KB 구강암 세포 성장억제 과정에 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9를 통한 외인성의 death receptor-의존적 경로와 내인성의 미토콘드리아-의존적 경로를 경유하는 apoptosis가 포함되어 있음을 시사한다. 그러나 bavachin가 유도하는 구강암 세포 성장억제에 관한 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하여야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, 보골지의 주요 성분 중 하나인 bavachin은 사람 구강암 세포주 KB 세포의 apoptosis를 유도하여 구강암 세포성장을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과로, bavachin을 이용한 암세포 성장억제에 관한 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

사람 구강암 세포주 KB 세포를 이용하여 보골지의 주요 성분 중 하나인 bavachin의 구강암 세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히기 위해, KB 세포에서 bavachin을 이용하여 MTT 분석, DAPI 염색에 의한 세포핵 형태 분석, DNA fragmentation 분석 및 immunoblotting 등을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Bavachin은 KB 구강암 세포의 성장을 시간과 농도에 의존적으로 억제하였다.
2. KB 구강암 세포에서 bavachin은 핵의 응집과 파쇄를 유도하였다.
3. Bavachin은 KB 구강암 세포의 DNA fragmentation을 유도하였다.
4. KB 구강암 세포에서 bavachin은 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9의 proteolytic cleavage를 유도하였다.

본 연구의 결과로서 보골지의 주요 성분 중 하나인 bavachin은 사람 구강암 세포주 KB 세포의 apoptosis를 유도하여 구강암 세포성장을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과로, bavachin을 이용한 암세포 성장억제에 관한 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 참고 문헌

1. Choi EJ, Jang SR, Kang OJ, Bang WS: Antimicrobial activity of *Psoralea corylifolia*, *Schisandra chinensis*, and *Spatholobus suberectus* extracts. Kor J Food Sci Technol 45:495 - 500, 2013.
2. Shin JH, Cha GY, Kim HJ, JH Hwang, Han KH, Seol HJ, Shin TS, Oh SJ, Kim JD: Examination of anti-obesity effect of regional special natural products of *Anthrisci radix*, *Psoraleae semen*, *Siegesbeckiae herba* and *Corni fructus*. KSBB J 24:549 - 555, 2009.
3. Pezutto JM: Plant-derived anticancer agents. Biochem Pharmacol 53:121 - 133, 1997.
4. van Poppel G, van den Berg H: Vitamins and cancer. Cancer Lett 114:195 - 202, 1997.
5. Christou L, Hatzimichael E, Chaidos A, Tsiara S, Bourantas KL: Treatment of plasma cell leukemia with vincristine, liposomal doxorubicin and dexamethasone. Eur J Haematol 67:51 - 53, 2001.
6. Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC: Advances in cancer therapy with plant based natural products. Curr Med Chem 8:1467 - 1486, 2001.
7. Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. Science 281:1308 - 1312, 1998.
8. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. Nature 407:770 - 776, 2000.
9. Kaufmann SH, Hengartner MO: Programmed cell death: alive and well in the new millennium. Trends Cell Biol 11:526 - 534, 2001.
10. Smets LA: Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. Anti-Cancer Drug 1994:3 - 9.
11. Paschka AG, Butler R, Young CYF: Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. Cancer Lett 130:1 - 7, 1998.
12. Cheng CC, Chen YH, Chang WL, Yang SP, Chang DM, Lai JH, Ho LJ: Phytoestrogen bavachin mediates anti-inflammation targeting I κ B kinase-I κ B α -NF- κ B signaling pathway in chondrocytes *in vitro*. Eur J Pharm

- 636:181 - 188, 2010.
13. Zhang Y, Chen Z: Separation of isomeric bavachin and isobavachalcone in the *Fructus Psoraleae* by capillary electrophoresis - mass spectrometry. *J Sep Sci* 35:1644 - 1650, 2012.
 14. Chen X, Yang Y, Zhang Y: Isobavachalcone and bavachinin from *Psoraleae Fructus* modulate Ab42 aggregation process through different mechanisms *in vitro*. *FEBS Lett* 587:2930 - 2935, 2013.
 15. Mo SY, Kim J, Cho SH, Park JT, Yu SK, Kim DK: Analysis of microRNA expression in KB human oral cancer cells. *Oral Biol Res* 38:73 - 82, 2014.
 16. Kwon JI, Kim GY, Park KY, Ryu CH, Choi YH: Induction of apoptosis by linoleic acid is associated with the modulation of Bcl-2 family and Fas/FasL system and activation of caspases in AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J Med Food* 11:1 - 8, 2008.
 17. Kim JY, Kim HS, Kang HS, Choi JS, Yokozawa T, Chung HY: Antioxidant potential of dimethyl lithospermate isolated from *Salvia miltiorrhiza* (red sage) against peroxynitrite. *J Med Food* 11:21 - 28, 2008.
 18. Kaufmann SH, Earnshaw WC: Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256:42 - 49, 2000.
 19. Reed JC: Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* 7:314 - 319, 2001.
 20. Datta R, Kojima H, Yoshida K, Kufe D: Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem* 272:20317 - 20320, 1997.
 21. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175 - 184, 1997.
 22. Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1 - 16, 1997.
 23. Hu H, Ahn NS, Yang X, Lee YS, Kang KS: *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *Int J Cancer* 102:250 - 253, 2002.

24. Lee SM, Li ML, Tse YC, Leung SC, Lee MM, Tsui SK: Paeoniae Radix, a chinese herbal extract, inhibit hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway. *Life Sci* 71:2267 - 2277, 2002.
25. Cheng YL, Lee SC, Lin SZ, Chang WL, Chen YL, Tsai NM, Liu YC, Tzao C, Yu DS, Harn HJ: Anti-proliferative activity of Bupleurum scrozonrifolium in A549 human lung cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 222:183 - 193, 2005.
26. Park DI, Lee JH, Moon SK, Kim CH, Lee YT, Cheong J, Choi BT, Choi YH: Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by aqueous extract from Platycodon grandiflorum in human lung carcinoma cells. *Pharmacol Res* 51:437 - 443, 2005.
27. Tan ML, Suaiman SF, Najimuddin N, Smian MR, Tengku Muhammad TS: Methanolic extract of Pereskia bleo (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *J Ethnopharmacol* 96:287 - 294, 2005.
28. Hoshino T, Hara A, Inoue M, Honda J, Imai Y, Oizumi K, Yokoyama MM: Flow cytometric measurement of NK cell cytotoxicity. *J Clin Lab Immunol* 36:39 - 43, 1991.
29. Tian Z, Chen S, Zhang Y, Huang M, Shi L, Huang F, Fong C, Yang M, Xiao P: The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine* 13:181 - 186, 2006.
30. Yang HL, Chang WH, Chia YC, Huang CJ, Lu FJ, Hsu HK, Hseu YC: Toona sinensis extracts induces apoptosis via reactive oxygen species in human premyelocytic leukemia cells. *Food Chem Toxicol* 44:1978 - 1988, 2006.
31. Chicca A, Adinolfi B, Martinotti E, Fogli S, Breschi MC, Pellati F, Benvenuti S, Nieri P: Cytotoxic effects of Echinacea root hexanic extracts on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 110:148 - 153, 2007.
32. Hostanska K, Jurgenliemk G, Abel G, Nahrstedt A, Saller R: Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. *Cancer Detect Prev* 31:129 - 139, 2007.
33. Hu W, Kavanagh JJ: Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol* 4:721 - 729, 2003.

VII. 사진부도 설명

Fig. 1. Concentration- and time-dependent effects of bavachin on the cell viability in KB human oral cancer cells. (A) Concentration-dependent effect of bavachin on the cell viability in KB cells. The KB cells were treated with various concentrations of bavachin or without bavachin for 24 (circle), 48 (square) and 72 hours (triangle). (B) Time-dependent effect of bavachin on the cell viability in KB cells. The KB cells were treated with 0.1 (circle), 0.3 (square), 1 (triangle), 3 (diamond) and 10 μM (hexagon) bavachin for 0 - 72 hours. The cell viabilities were determined by the MTT assays. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of $A_{570\text{nm}}$ of bavachin treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control and *** $P < 0.001$ vs. control (the control cells measured in the absence of bavachin).

Fig. 2. Induction of apoptosis by bavachin in KB cells. (A) Changes in nuclear morphology by bavachin. The cells were treated with 0, 3 or 10 μM bavachin for 72 hours. Representative fluorescence photomicrographs show the nuclei morphology of KB cells. The arrows indicate chromatin condensation, reduced nuclear size and nuclear fragmentation typically observed in apoptotic cells. (B) The percentage of apoptotic cells was calculated as the ratio of apoptotic cells to total cells.

Fig. 3. Fragmentation of internucleosomal DNA by bavachin in KB cells. The cells were treated with 0 or 10 μM bavachin for 72 hours and nuclear DNA was subjected to agarose gel electrophoresis.

Fig. 4. Proteolytic cleavage of caspase-3 by bavachin treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-3 by bavachin was measured in KB cells.

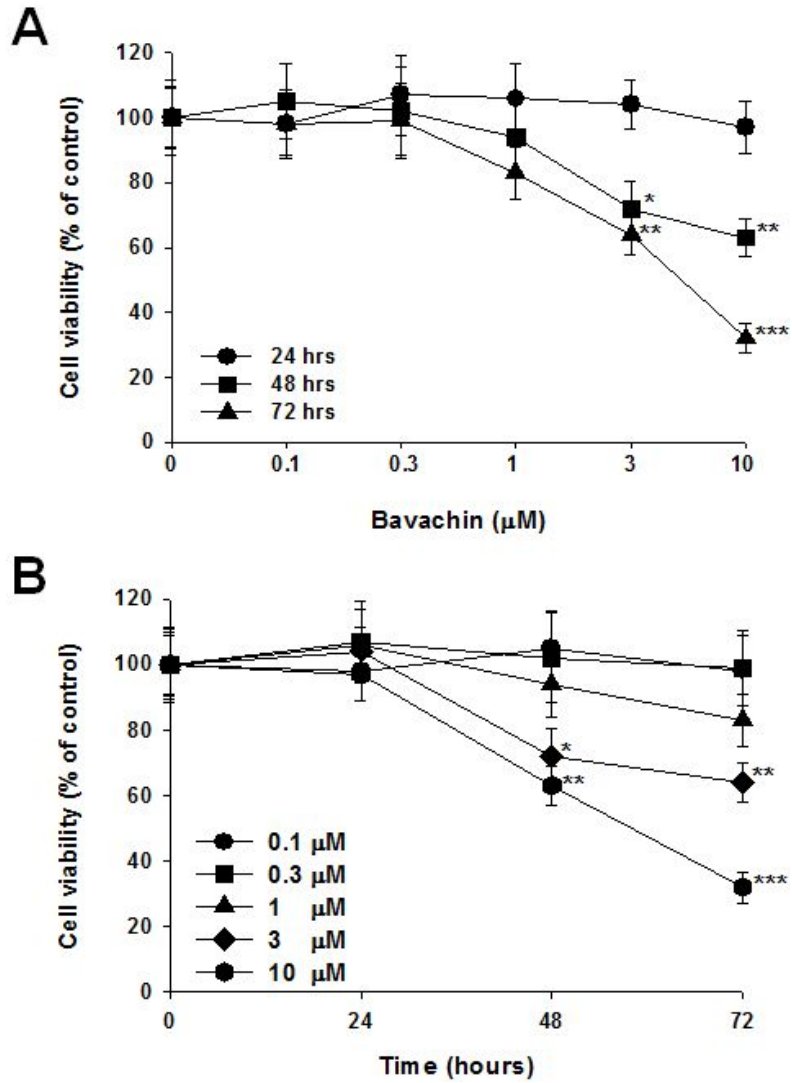
The cells were treated with 0 or 10 μM bavachin for 72 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in "MATERIALS AND METHODS". (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β -actin normalization.

Fig. 5. Proteolytic cleavage of caspase-7 by bavachin treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-7 by bavachin was measured in KB cells. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β -actin normalization.

Fig. 6. Proteolytic cleavage of caspase-8 by bavachin treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-8 by bavachin was measured in KB cells. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β -actin normalization.

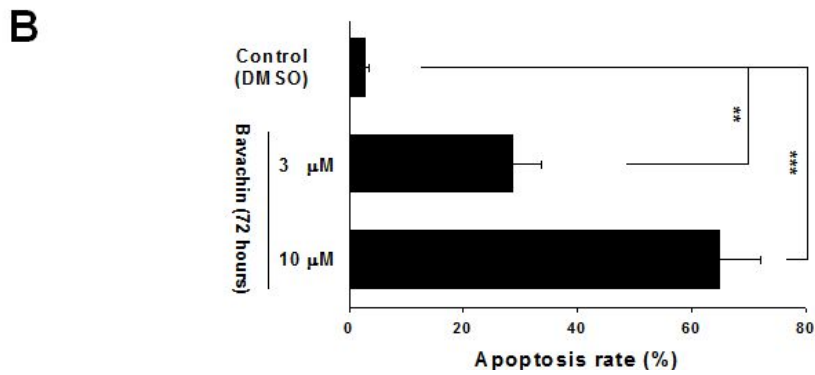
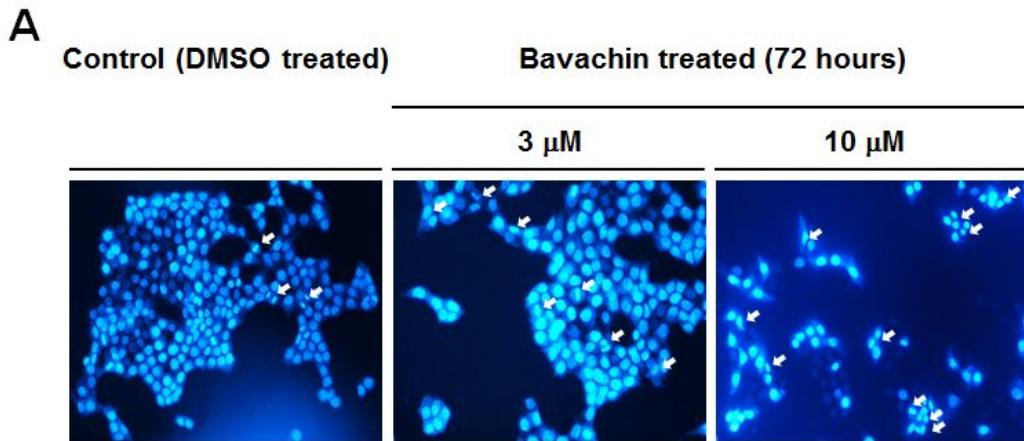
Fig. 7. Proteolytic cleavage of caspase-9 by bavachin treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-9 by bavachin was measured in KB cells. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β -actin normalization.

VIII. 사진부도(Fig. 1)



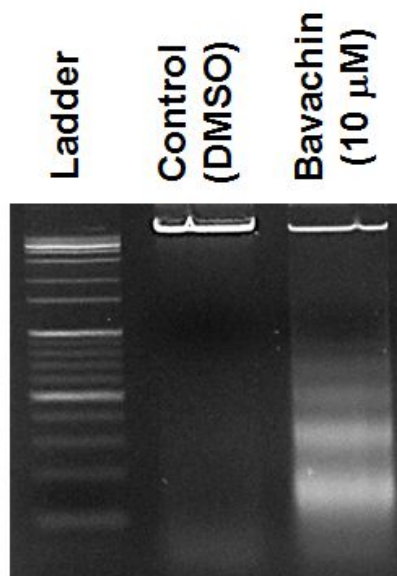
VIII. 사진부도(Fig. 2)

Nuclear staining with DAPI

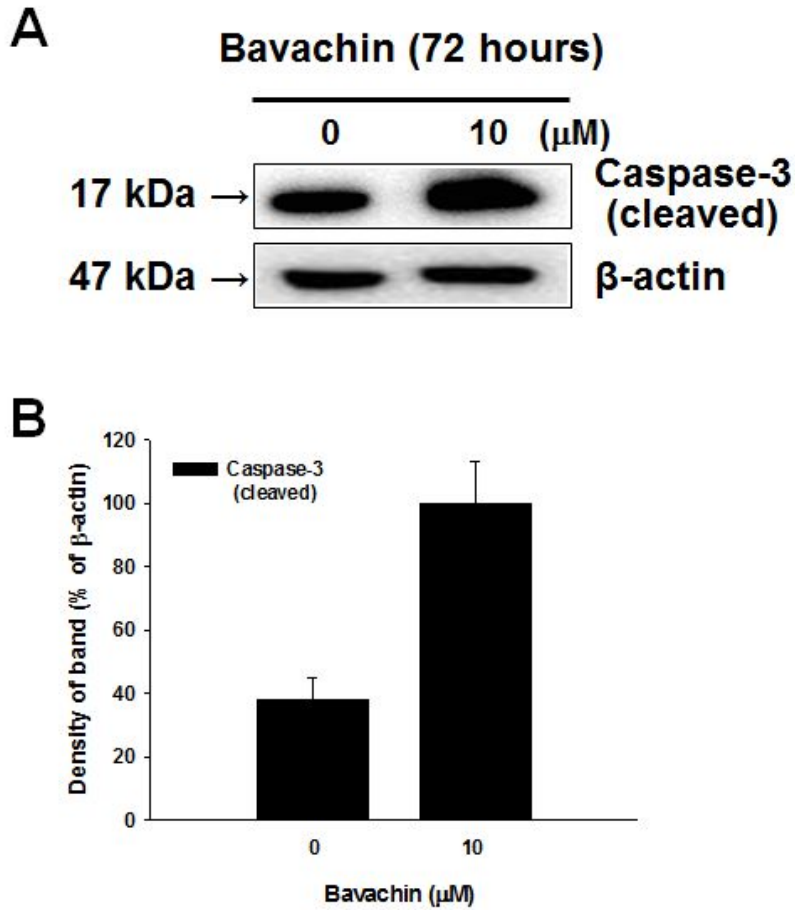


VIII. 사진부도(Fig. 3)

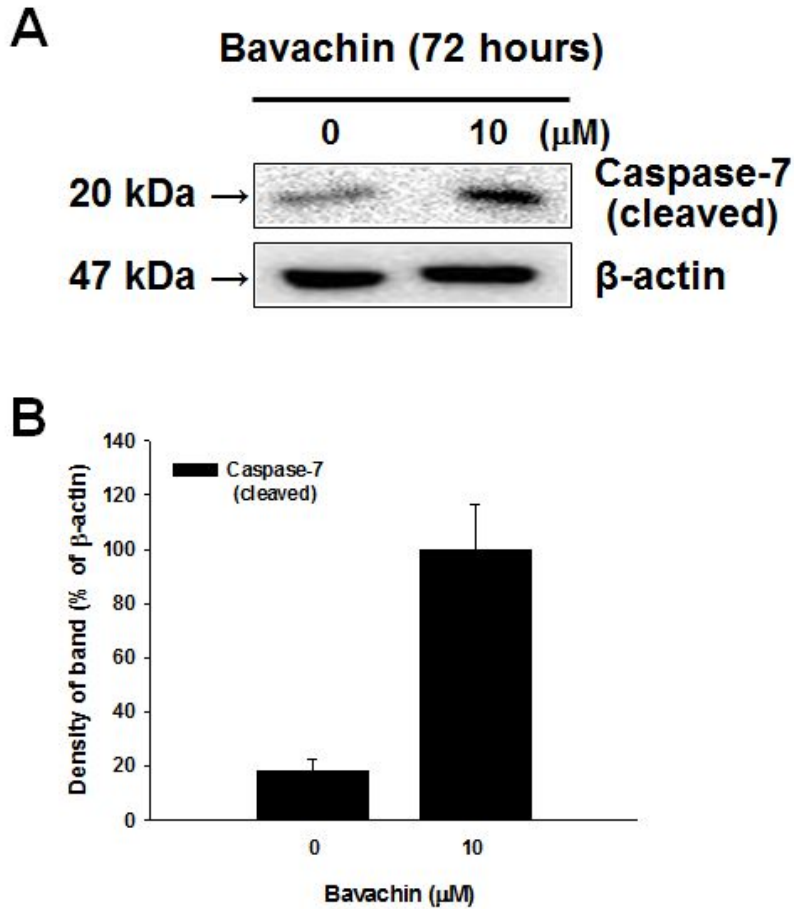
DNA fragmentation



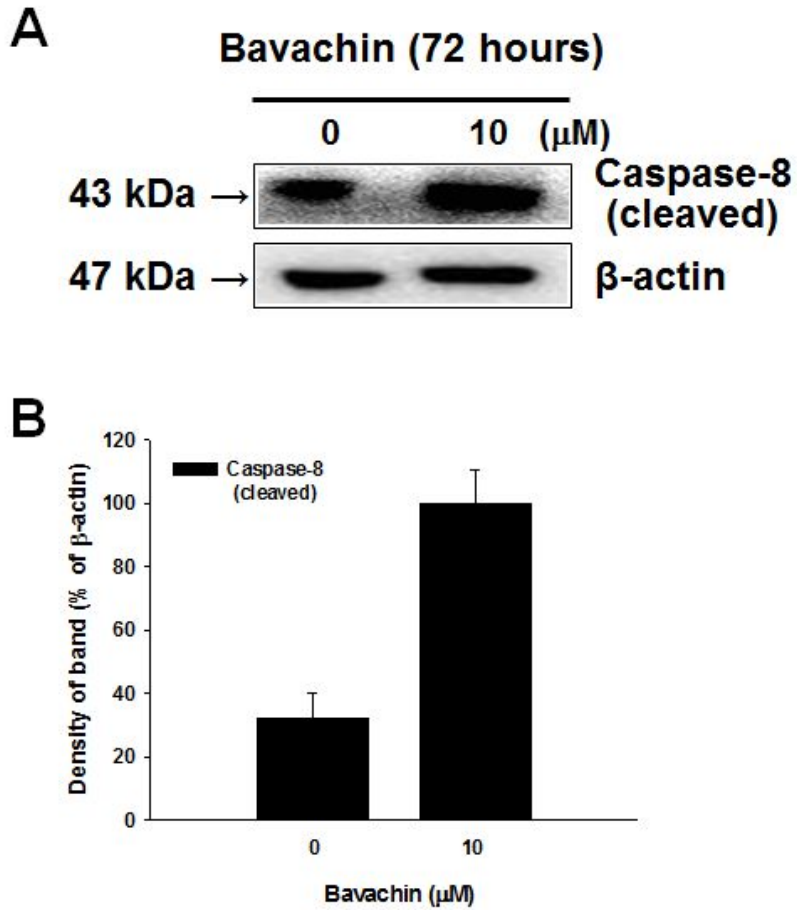
VIII. 사진부도(Fig. 4)



VIII. 사진부도(Fig. 5)



VIII. 사진부도(Fig. 6)



VIII. 사진부도(Fig. 7)

