creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

[UCI]I804:24011-200000264
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2015년 8월
박사학위논문

Dendropanax morbifera Lev. 메탄올 추출물에 의한 사람 구강암 세포 KB의 apoptosis 유도

조선대학교 대학원

치의생명공학과

조 선 호

2015년 8월 박사학위논문 *Dendropanax morbifera* Lev 메탄올 추출물에 의한 사람 구강암 세포 KB의 apoptosis 유도 조 선 호

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Dendropanax morbifera Lev. 메탄올 추출물에 의한 사람 구강암 세포 KB의 apoptosis 유도

Induction of Apoptosis by *Dendropanax morbifera* Lev. Methanol Extract in KB Human Oral Cancer Cells

2015년 8월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

조 선 호

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Dendropanax morbifera Lev. 메탄올 추출물에 의한 사람 구강암 세포 KB의 apoptosis 유도

지도교수 김 도 경

이 논문을 이학박사학위신청 논문으로 제출함.

2015년 4월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

조 선 호

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

조선호의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 흥 중 인

위 원 전남대학교 교 수 김 종 근 인

위 원 조선대학교 교 수 김 춘 성 인

위 원 조선대학교 교 수 유 선 경 인

위 원 조선대학교 교 수 김 도 경 인

2015년 6월

조선대학교 대학원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT ····· ⅳ

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험재료 및 방법 ····· 3
1. 실험재료 ····· 3
2. 식물재료와 추출 ····· 3
3. 세포주와 세포배양 ····· 3
4. 세포성장 억제실험(MTT 분석) ····· 3
5. DAPI 염색 ····· 4
6. DNA fragmentation 분석 ····· 4
7. Immunoblotting ····· 4
8. 실험자료의 통계학적 검정 ····· 5

Ⅲ. 실험결과 ····· 6
1. 세포성장에 영향을 미치는 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)의 효과 ····· 6
2. DAPI 염색에 의한 세포핵 관찰 결과 ····· 8
3. DNA fragmentaion 분석 ····· 8
4. *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)에 의한 caspase의 활성 ····· 11
5. DMME에 의한 PARP를 통한 apoptosis 매개 ····· 11

Ⅳ. 총괄 및 고안 ····· 17

Ⅴ. 결 론 ····· 20

Ⅵ. 참고문헌 ····· 21

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. Anti-proliferative effect of *Dendropanax morbifera* extract in KB cells ····· 6

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Fig. 1. Concentration- and time-dependent effects of *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) on the cell viability in KB cells ····· 7

Fig. 2. Induction of apoptosis by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) in KB cells ····· 9

Fig. 3. Fragmentation of internucleosomal DNA by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) in KB cells ····· 10

Fig. 4. Proteolytic cleavage of caspase-3 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 12

Fig. 5. Proteolytic cleavage of caspase-7 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 13

Fig. 6. Proteolytic cleavage of caspase-8 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 14

Fig. 7. Proteolytic cleavage of caspase-9 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 15

Fig. 8. Activation of cleaved PARP by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 16

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Induction of Apoptosis by *Dendropanax morbifera* Lev. Methanol Extract in KB Human Oral Cancer Cells

Cho, Seon-Ho
Advisor: Prof. Kim, Do Kyung, Ph.D.
Department of Biodental Engineering,
Graduate School of Chosun University

Dendropanax morbifera is evergreen broad-leaved arboreous tree belongs to the araliaceae. The country of origin is mainly the South Korea. The scientific name is *Dendropanax morbifera* that component is based compound polyacetylenes. Recently, many researchs have been conducted about anti-cancer effects using *Dendropanax morbifera* in liver cancer, lung cancer, cervical cancer, and so on. However, the effects of *Dendropanax morbifera* on oral cancer is not clearly established. Therefore, the main goal of this study was to investigate the effect of *Dendropanax morbifera* extract on cell growth and apoptosis induction in oral cancer cells.

To determine the effects of *Dendropanax morbifera* on cell growth and apoptosis induction in oral cancer cells, it was examined by inhibition of cell growth (MTT assay), nuclear staining with DAPI, DNA fragmentation analysis determination of caspase activation and immunoblotting in KB human oral cancer cells.

The results were as follows.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1. *Dendropanax morbifera* methanol(DMME) extract induced the inhibition of cell growth depended on the *Dendropanax morbifera* extract treatment time and concentration in KB cells.
2. DMME observed the changing nuclear size and nuclear condensation in KB cells.
3. DMME induced the DNA fragmentation in KB cells.
4. DMME promoted proteolytic cleavages of procaspase-3, -7, -8 and -9 with the increases in the amount of cleaved caspase-3, -7, -8 and -9.
5. Cleaved PARP was increased by DMME in KB cells.

These results suggest that *Dendropanax morbifera* can induce the suppression of cell growth through the cell apoptosis pathways in KB human oral cancer cells, and that it many have potential properties for anti-cancer drug discovery.

KEY WORDS: *Dendropanax morbifera,* Anti-cancer therapy, Apoptosis, Cell death, KB human oral cancer cells.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ. 서 론

세계적으로 생물유래 천연물질은 제약 산업의 중추적인 역할을 하고 있다. Taxol(주목나무 유래), Silymarin(대계 유래), Artemisinin(개똥쑥 유래) 성분은 약의 합성에 이용된다[1]. 이외에도 천연물에서 항암물질을 찾는 노력은 현재에도 활발히 진행되고 있으며, 그 예로써 방기뿌리(roots of *Stephania tetrandra*) 유래 Tetrandrine는 간암세포인 HepG2에서, 감초(*licorice*) 유래 Isoliquiritigenin는 HepG2와 폐암세포인 A549에서, 소귀나무(*Myrica rubra*) 유래 Prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate는 유방암세포인 MCF-7에서 세포사멸을 유도한다고 보고되었다[1].

세포는 apoptosis라고 불리는 세포사멸기전을 가지고 있다. 세포사멸기전은 크게 세포 외부로부터 시작되는 외인성 세포사멸과 세포 내부에서 시작되는 내인성 세포사멸로 분류된다[2]. 다세포 생물은 세포의 항상성을 조절하기 위해 apoptosis를 이용한다[2]. 그 특징으로는 세포질의 응축, DNA의 분절이 있으며, 세포 내의 게놈 DNA가 핵산내부분해효소(endonuclease)에 의하여 180-200bp 크기의 올리고뉴클레오좀으로 잘린다[3]. 그리고 원형질막이 파괴되지 않아서 염증 반응을 일으키지 않는다[3].

화학요법은 악성종양 세포를 사멸시켜 환자의 생존을 연장할 수 있으나, 부작용으로 정상세포에 대한 독성을 나타낼 수 있다[4]. 예를 들어, 광범위하게 처방되는 항암제인 doxorubicin은 심장 및 신장독성과 연관되어 있다[4]. 따라서 정상세포에 대한 독성을 선택적으로 감소시키고 암세포를 선택적으로 사멸시켜 암치료를 향상시킬 수 있는 전략이 필요하며, 이를 위해서는 천연물 연구를 활발히 진행하여야 한다.

황칠나무는 두릅나무과에 속하는 상록활엽교목이며, 완도, 해남, 제주도 등 주로 우리나라 남부 지역에서 자생한다[5]. 학명은 *Dendropanax morbifera*이며 목본(Dendro) 전능약(panax)라는 의미가 있다. 황칠액의 주성분은 정유성분이며 수액은 도료로 이용하고 수지는 거풍습과 활혈의 약효가 있다는 보고가 있다[5]. 황칠나무에 대한 최초 연구는 1937년 황칠 정유 성분에 대한 것으로 황칠 정유의 주성분은 2중 결합이 2개 있는 쌍환성 세스퀘테르펜이며, 그 외에 알코올과 에테르 등의 성분을 함유하고 있다고 보고되었다[6]. 그리고 또 다른 성분으로는 polyacetylenes계 화합물로써 식물의 외상으로 분비되는 항균성 물질로 보고되었다[7]. 최근 황칠나무 추출물을 이용하여 간암, 폐암, 자궁경부암 등 항암효과에 대해서 활발한 연구가 진행되고 있으나[8-11], 구강암 세포에서 황칠에

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

의한 항암효과에 관한 연구는 매우 부족하다.

따라서 본 연구에서는 사람 구강암 세포주 KB를 이용하여 황칠나무 추출물의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히고자 하며, 아울러 황칠나무에 의한 구강암 치료의 효용성을 제시 하고자 한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

N-methylthiotetrazole(MTT)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, ECL detection kit는 Amersham Biosciences Corp.(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. Anti-cleaved caspase-3, -7, -8, -9와 anti-cleaved PARP 항체는 Cell Signaling Technology, Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였고, DAPI 염색물질은 Simga(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

사람 구강암 KB 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 제공받아 실험에 이용하였다.

2. 식물재료와 추출

전남 완도군 보길면 원산의 *Dendropanax morbifera* 지엽(에스플랜트, 대전, 대한민국)을 사용하였다. *Dendropanax morbifera* 지엽을 1mm 크기로 분쇄한 후, 94% 메탄올(대정화금, 시흥, 대한민국)을 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 whatman 여과지(0.45um)를 이용하여 여과한 후, rotary evaporator(N-1100, Eyela, Japan)를 이용하여 40℃의 진공상태로 증발시켰다. 증발건조 후, 농축된 추출물을 -40℃에서 1일 동안 동결건조 하였으며, 4°C에서 보관하며 사용하였다.

3. 세포주와 세포배양

KB 세포는 5% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 및 1% Nonssential amino acids(NEAA, Gibco, Newyork, NY, USA)가 함유된 37°C의 Minimum Essential Mediun(MEM, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 성장배지 하에서 배양하면서 실험에 이용하였다.

4. 세포성장 억제실험(MTT 분석)

Dendropanax morbifera 메탄올 추출물(DMME)에 의한 세포성장 억제효과를 관찰

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

하기 위해, 24well plate에 5 × 10^3cells/well의 KB세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, DMME를 다양한 농도와 시간에서 처리하여 37℃에서 반응시킨 후, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다. MTT 분석은 KB 세포에 MTT 용액(MTT 최종농도 0.5㎍/㎕)을 37℃에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl이 함유된 isopropanol로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

5. DAPI 염색

DMME에 의한 KB 세포 증식억제가 apoptosis 유도와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI 염색을 진행 후 형태를 관찰하였다. 먼저 24well plate에 5 × 10^3cells/well에 KB 세포를 접종하여 24시간 배양한 후, DMME 30㎍/㎕과 100㎍/㎕의 농도로 각각 처리하여 48시간 동안 37℃에서 배양하였다. 배양한 KB 세포를 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution을 이용하여 상온에서 10분 동안 고정한 후, 4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI)용액을 이용하여 15분 동안 염색하였다. 염색한 KB 세포를 형광현미경(IX71, Olympus, Japan)을 이용하여 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

6. DNA fragmentation 분석

세포사멸의 기전 중 apoptosis의 지표가 되는 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. DMME에 의한 세포 DNA fragmentation 효과를 관찰하기 위해, 10cm 배양접시에 5 X 10^5개의 KB 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, DMME(100㎍/ml)를 처리하여 1일 또는 2일 동안 37℃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 추출법으로 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 2% agarose gel에서 전기영동(50volts, 90분) 하였으며, ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

7. Immunoblotting

세포 apoptosis의 지표가 되는 anti-cleaved caspase-3, -7, -8, -9와 anti-cleaved PARP 항체 분석을 위해 immunoblotting을 시행하였다. 10cm 배양접시에 5 X 10^5개의 KB 세포를 접종하고 24시간 배양한 후, DMME(100㎍/ml)를 처리하여 1일 또는

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2일 동안 37℃에서 배양한 후 세포를 수집하였다. 세포를 4℃의 PBS로 2회 세척한 후, 4℃의 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.5mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5㎍/ml aprotinin 및 5㎍/ml leupeptin이 포함된 PBS)에서 30분 반응시켰다. 세포 용해물을 12,500 x *g*에서 20분간 원심분리한 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-cleaved caspase-3, -7, -8, -9와 anti-cleaved PARP 항체를 1,000배 희석하여 사용하였으며, anti-β-actin 항체는 2,000배 희석하여 사용하였다. 이차항체로 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)를 5,000배 희석하여 사용하였으며, ECL detection kit를 사용하여 X-ray 필름에 현상한 후 분석하였다.

8. 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.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ. 실험결과

1. 세포성장에 영향을 미치는 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물 (DMME)의 효과

KB 세포에서 DMME에 의한 세포성장 억제효과를 조사하기 위해 MTT 분석을 시행하였다. DMME를 1, 3, 10, 30, 100, 300 및 1,000㎍/ml의 다양한 농도로 1일, 2일동안 KB 세포에 투여한 후 MTT 검사를 시행한 결과, DMME 처리 1일, 2일의 경우에서 DMME 3㎍/ml 까지의 농도에서는 대조군과 비교하였을 때 세포성장 억제의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 1). 그러나 DMME 처리 1일, 2일 경우, DMME 10, 30, 100, 300 및 1,000㎍/ml에서는 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 세포성장 억제효과를 볼 수 있었으며, 이 효과는 시간과 농도에 의존적임을 확인할 수 있었다(Fig. 1). KB 세포성장 억제에 대한 DMME의 IC_{50}(최대 억제량의 50%를 유발시키는 농도)은 DMME 처리 1일째는 약 300㎍/ml 이었고, 2일째는 약 70㎍/ml이었다(Table 1).

Table 1. Anti-proliferative effect of *Dendropanax morbifera* extract in KB cells

Time	IC_{50} (㎍/㎖)
24 hours	301.2 ± 36.1
48 hours	69.3 ± 7.9

The IC_{50} values represent the mean ± SEM for three experiments.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

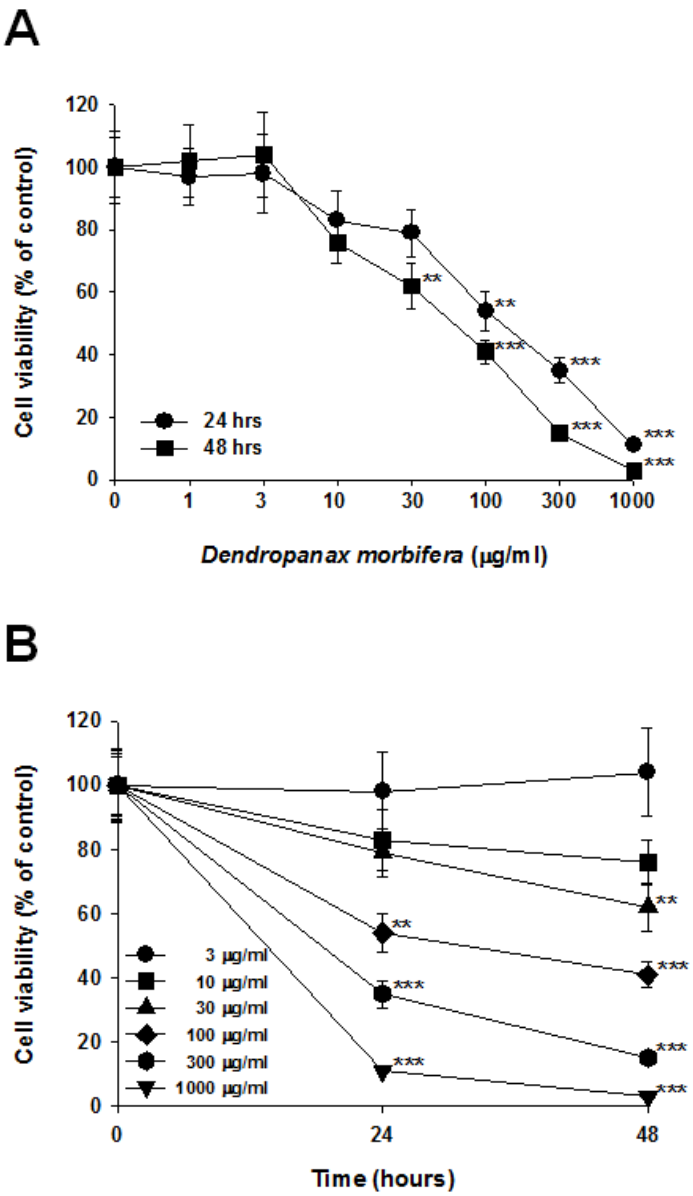

Fig. 1. Concentration- and time-dependent effects of *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) on the cell viability in KB cells. (A) Concentration-dependent effect of DMME on the cell viability in KB cells. The KB cells were treated with various concentrations of DMME or without DMME for 24 (circle) and 48 (square). (B) Time-dependent effect of DMME on the cell viability in KB cells.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

The KB cells were treated with 3 (circle), 10 (square), 30 (triangle), 100 (diamond), 300 ㎍/㎖ (hexagon) and 1,000 ㎍/㎖ (inverted triangle) DMME for 24 or 48 hours. The cell viabilities were determined by the MTT assays. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of $A570_{nms}$ of DMME treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean ± SEM of four experiments. $^{**}P<0.01$ vs. control and $^{***}P<0.001$ vs. control (the control cells measured in the absence of DMME).

2. DAPI 염색에 의한 세포핵 관찰 결과

Dendropanax morbifera 메탄올 추출물(DMME) 처리에 따른 KB 세포의 성장억제가 세포의 apoptosis 유발과 상관성이 있는지 조사하기 위하여 0, 30 및 100㎍/ml의 DMME를 처리한 배지에서 48시간 동안 배양 한 후, DAPI 염색을 통해 세포핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. DAPI 염색을 실시하고 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, Fig.2A에 나타낸 바와 같이 DMME를 처리하지 않은 대조군 KB 세포에서는 대부분의 세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나, DMME를 30 및 100㎍/ml을 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, DMME를 처리하지 않은 대조군 KB 세포에서는 약 0.8%, DMME를 30과 100㎍/ml를 처리한 세포에서는 각각 약 24%와 57%로, DMME 농도가 증가함에 따라 apoptotic body의 비율이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2B).

3. DNA fragmentation 분석

DMME에 의한 KB 세포의 성장억제 기전을 확인하기 위해 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. DMME 100㎍/ml을 2일 처리한 KB 세포의 DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과, 대조군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, DMME를 100㎍/ml 처리한 2일 실험군에서는 DNA fragmentation 현상을 뚜렷하게 볼 수 있었다(Fig. 3).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

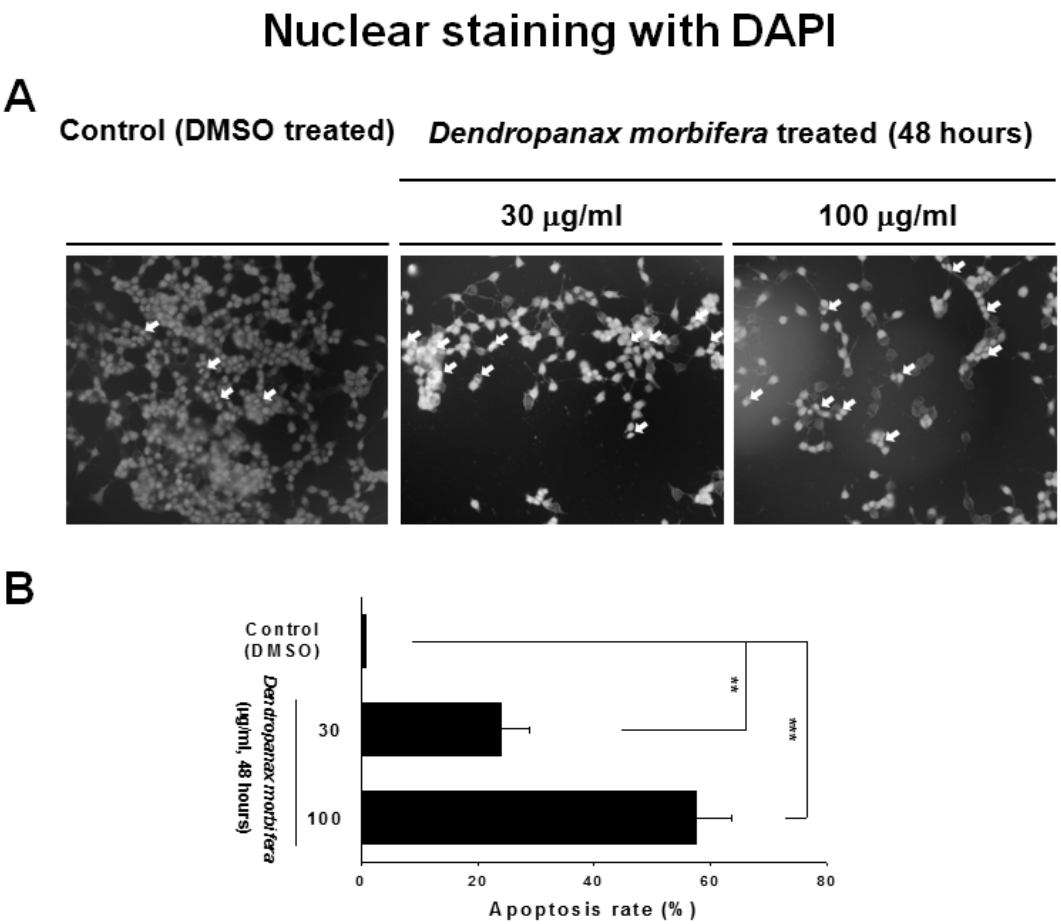

Fig. 2. Induction of apoptosis by *Dendropanax morbifera* methanol extract (DMME) in KB cells. (A) Changes in nuclear morphology by DMME. The cells were treated with 0, 30 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. Representative fluorescence photomicrographs show the nuclei morphology of KB cells. The arrows indicate 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.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

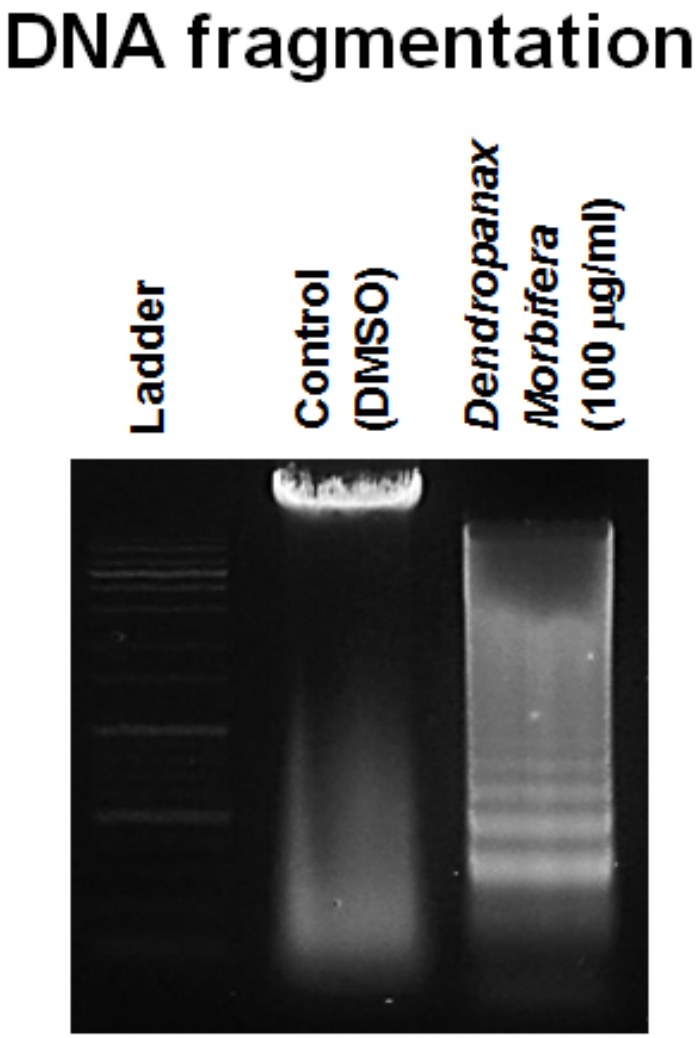

Fig. 3. Fragmentation of internucleosomal DNA by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) in KB cells. The KB cells were treated with 0 and 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours, and nuclear DNA (5㎍) was subjected to agarose gel electrophoresis.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)에 의한 caspase의 활성

Anti-cleaved caspase-3, -7, -8 및 caspase-9가 세포 apoptosis의 지표가 되므로 DMME를 처리한 KB 세포에서 anti-cleaved caspase-3, -7, -8, -9 발현분석을 위해 immunoblotting을 시행하였다. DMME 100㎍/ml을 처리한 KB 세포를 2일간 처리한 후 단백질을 추출하여 확인한 결과, 시험한 4가지 anti-cleaved caspase에서 단백질 가수분해 현상이 나타남을 알 수 있었다(Figs. 4-7).

5. DMME에 의한 PARP를 통한 apoptosis 매개

DMME이 KB세포에서 apoptosis를 유도하는지 확인을 위해서, 단백질 수준에서 PARP 발현을 측정할 수 있는 immunoblotting을 수행하였다. 대조군에서보다 DMME 처리군에서 cleaved PARP가 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

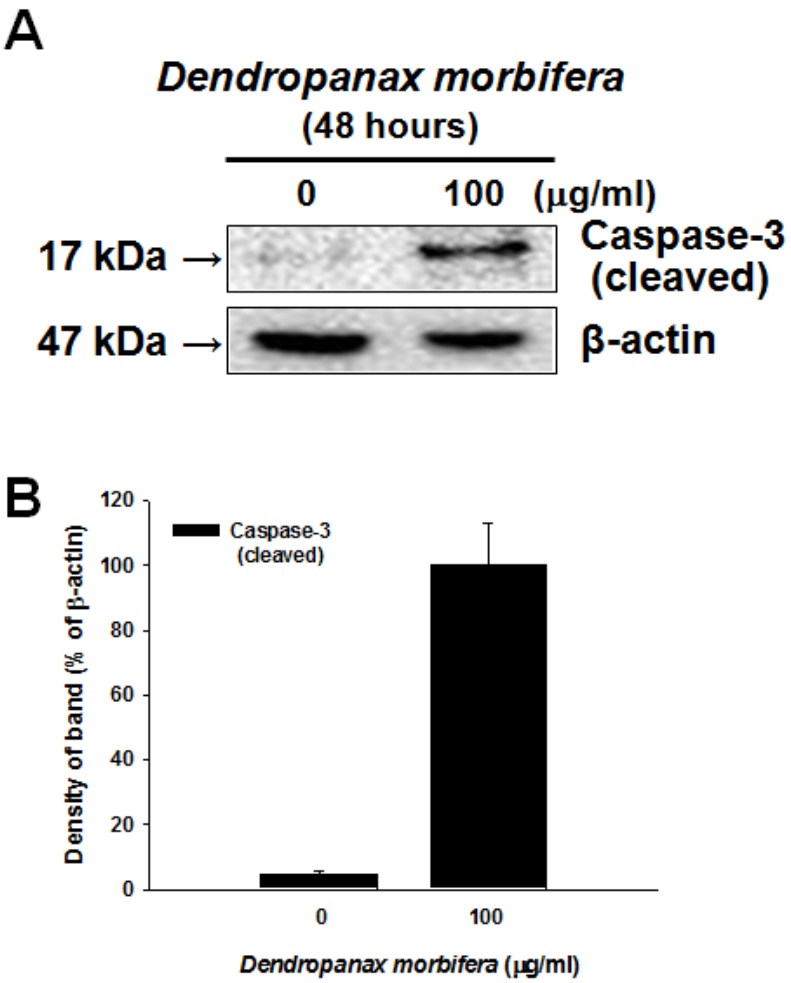

Fig. 4. Proteolytic cleavage of caspase-3 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-3 by DMME was measured in KB cells. The cells were treated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in "MATERIALS AND METHODS". (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

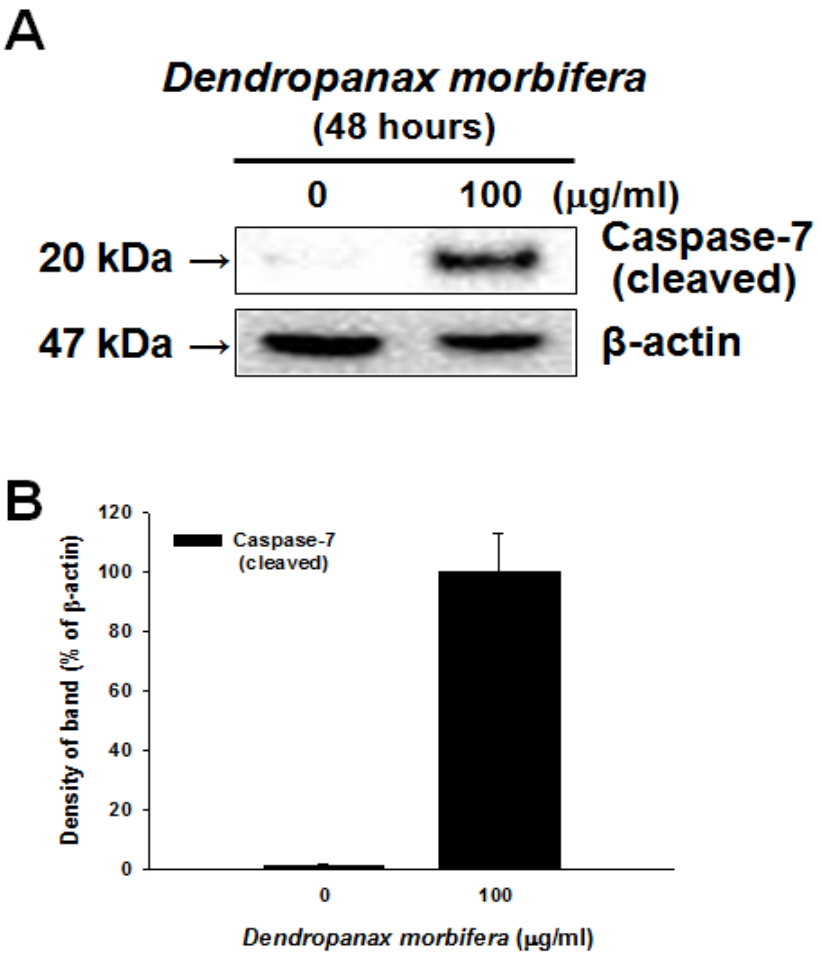

Fig. 5. Proteolytic cleavage of caspase-7 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-7 by DMME was measured in KB cells. The cells were treated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in "MATERIALS AND METHODS". (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

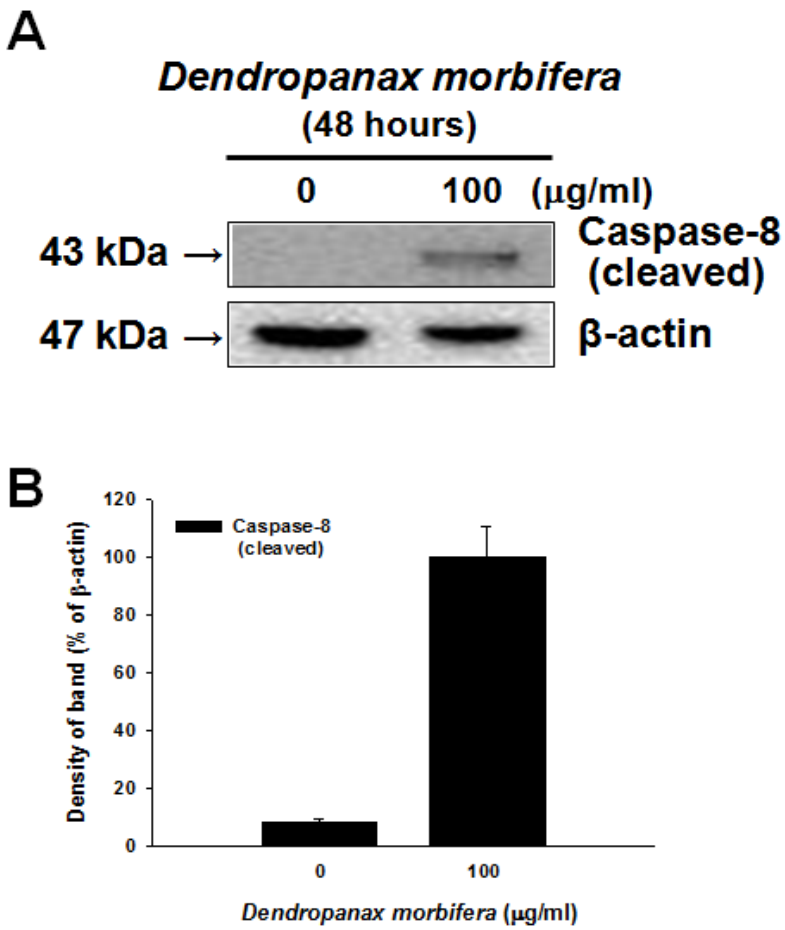

Fig. 6. Proteolytic cleavage of caspase-8 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-8 by DMME was measured in KB cells. The cells were treated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in "MATERIALS AND METHODS". (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

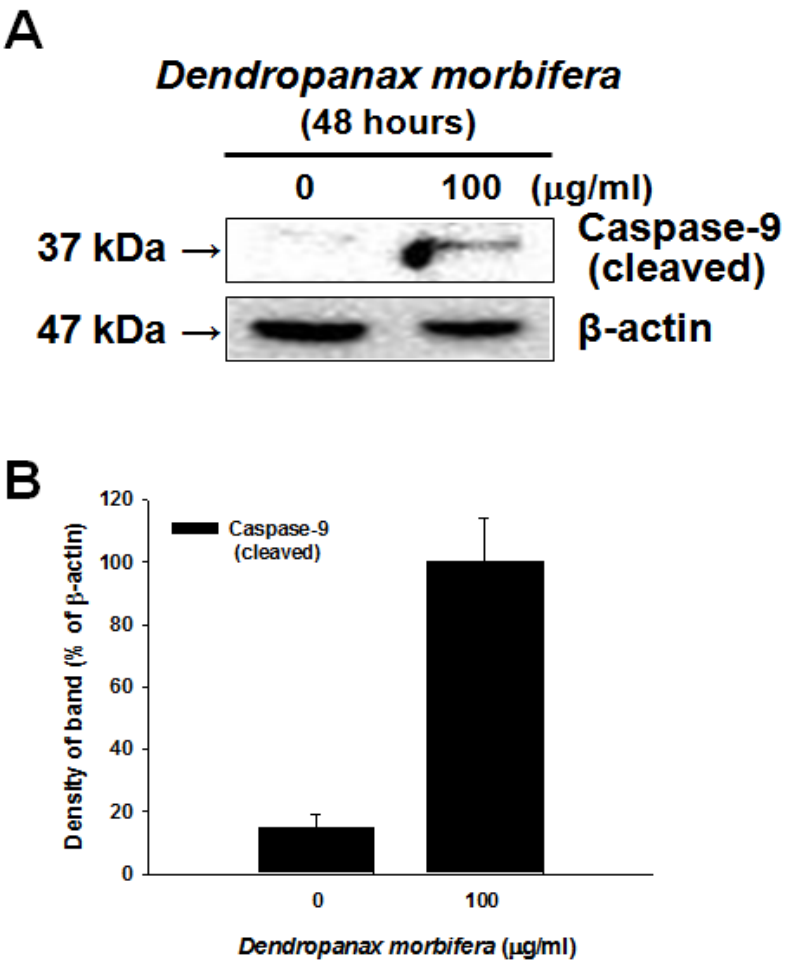

Fig. 7. Proteolytic cleavage of caspase-9 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-9 by DMME was measured in KB cells. The cells were treated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in "MATERIALS AND METHODS". (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

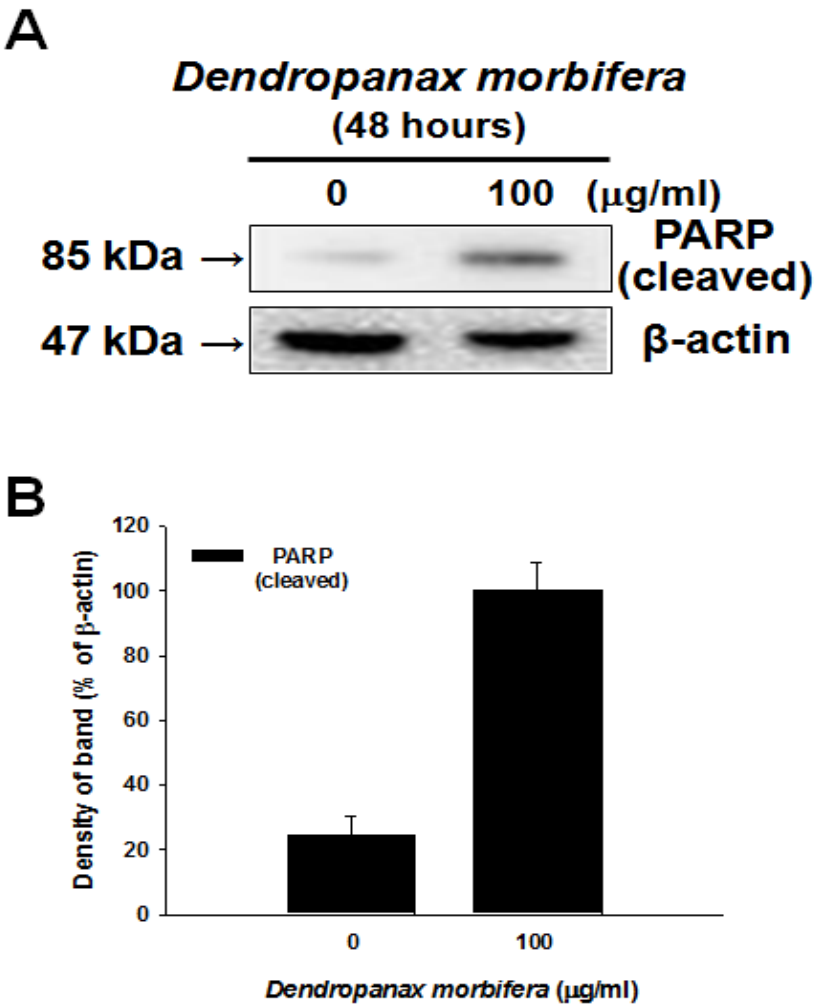

Fig. 8. Activation of cleaved PARP by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) The activity of cleaved PARP by DMME was measured in KB cells. The KB cells were stimulated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours, harvested and lyzed using a cell lysate buffer. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 총괄 및 고안

현재 천연물 유래의 항암제 개발은 전 세계적으로 대표적인 관심 분야이다. 그 예로 미국은 National Cancer Institute(NCI)의 주도하에 1,550속, 3,390종의 식물로부터 114,000개 추출물을 대상으로 항암제 개발을 위한 검색을 하였으며, 특히 백합과 일일초(*Vinca rosea*)로부터 vinca alkaloid의 부분 합성에 성공하여 vincristine, vinblastine, leurosine, leurosidine 등과 같은 다수의 항암물질을 개발하였다[12]. 그 중 vincristine은 소아와 성인의 급성 림프구성 백혈병의 항암화학요법치료 약물로 사용되며, 기전은 세포분열기에 방추사 형성을 방해하여 세포를 파괴한다[13]. 주목과 나무인 Taxus brevifolia에서 추출한 diterpene구조를 가진 Taxol 역시 식물유래 항암제로써 항암작용에 대한 연구결과가 다수 보고되고 있다[14]. 이처럼 항생제의 약 78%와 항암화합물의 약74%가 천연물이거나 그 유도체인 것으로 확인되면서 천연물 의약품의 중요성이 점차 부각되고 있다[12].

우수한 화학요법 항암제 및 항암요법이 개발되어 암의 치료율은 향상되었으나, 암세포 제거에 초점을 맞춘 암치료 방식으로 인해 환자의 삶의 질은 저하됨에 따라 개선해야 할 필요성이 대두되고 있다. 화학요법제의 부작용은 조혈기능 억제, 메스꺼움 및 구토, 점막궤양 및 탈모증 등이 있다[15]. 이러한 이유로 항암제는 정상세포를 사멸시키는 부작용이 없어야 하며, 암세포만 특이적으로 apoptosis를 유도하여 세포사멸을 유도 하는 것이 가장 이상적인 방법이다.

황칠나무는 두릅나무과 황칠나무속에 속하는 상록활엽수로써, 전남의 해남, 완도, 보길도 등의 서남해안 지역 및 제주도의 한라산 일대에 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 황칠의 주성분은 polyacetylenes계 화합물로써 식물의 외상에 의하여 자극을 받으면 분비되는 항균성 물질인 것으로 보고되었다[6-7]. 최근 황칠나무 추출물을 이용하여 간암, 폐암, 자궁경부암 등 항암효과에 대해서 활발한 연구가 진행되고 있지만, 구강암에서 황칠나무의 효능에 대한 연구는 매우 부족하다[8-11]. 따라서 본 연구에서는 사람 구강암 세포인 KB를 이용하여 황칠나무(*Dendropanax morbifera)*추출물의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히고자 하였다.

세포성장 억제효과를 조사하기 위한 MTT 실험에서, *Dendropanax morbifera*는 시간과 농도에 의존적으로 KB 세포의 성장을 억제시켰다(Fig. 1). 이는 시간과 농도에 의

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

존적으로 암세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 추출물들(*Peucedanum japonicum Thunb.* Roots, Ginsenoside Rg3, *Sasa quelpaertensis* Nakai)에서의 연구결과와 일치하는 것이었다[16-18]. *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물은 다른 추출물들과 비슷한 농도에서 KB 세포의 성장을 억제하였다[16-18]. 이러한 결과는 *Dendropanax morbifera*가 암세포 성장을 억제하고 항암치료제로써 잠재적인 가치를 가지고 있다는 것을 시사한다.

Apoptosis는 세포분열과 세포사멸 사이에서 항상성을 유지시켜주는 중요한 역할을 한다[16-17]. 암세포에서 apoptosis의 유도는 천연물들로부터 항암제로의 개발에 가장 유용한 전략이다[19]. 따라서 많은 연구자들이 식물의 추출물을 포함한 많은 천연물들로부터 암세포들의 apoptosis를 유도하는 연구들을 시행하고 있다. 본 연구에서도 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)에 의한 KB 세포 성장억제 기전에 apoptosis가 포함되는지를 확인하기 위하여, DAPI 핵 염색을 수행하였다. KB세포에 DMME를 처리하고 고정한 후, DAPI 염색을 진행하였다. 형광현미경으로 관찰한 결과 DMME를 처리한 KB세포에서 핵의 응축과 분절을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 DMME를 2일 처리한 KB 세포의 DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과, 대조군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, DMME 처리 2일 실험군에서는 DNA fragmentation 현상을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 암세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 추출물들이 DNA fragmentation을 유도하는 apoptosis 과정에 의해 암세포를 사멸시킨다는 연구결과[16-18]와 일치하는 것으로써, DMME에 의해 유도되는 KB 세포 성장억제 과정에는 apoptosis 기전이 포함되는 것으로 사료된다.

Caspase라 불리는 세포 내 cysteine protease들의 활성은 다양한 자극에 의해 유도된 apoptosis를 개시하고 실행하는데 중요한 역할을 하며, 포유동물 세포에서 확인된 caspase 중에 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9 등이 apoptosis에 의한 세포사멸의 effector caspase로 알려져 있다[20-22]. Caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9은 각각 17kDa, 20kDa, 43kDa 및 37kDa의 불활성 proenzyme으로 합성되며, 다양한 자극에 의해 apoptosis가 일어날 때 proteolytic cleavage 현상이 일어난다[20-22]. 본 연구에서 proenzyme들의 발현분석을 위해 immunoblotting을 시행한 결과, *Dendropanax morbifera* 처리 실험군에서 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9의 proteolytic cleavage 현상을 볼 수 있었다(Fig. 4-7). PARP는 세포 apoptosis(death receptor-mediatied extrinsic apoptotic

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

pathway)의 중요한 조절인자 중의 하나이다[23]. 본 연구에서 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME) 처리 실험군에서 PARP의 proteolytic cleavage 현상을 볼 수 있었다.(fig. 8). 이러한 결과들은 DMME에 의해 유도되는 KB 세포의 성장억제 과정에 caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9 및 PARP에 의존적인 apoptosis가 포함되어 있음을 시사한다. 그러나 DMME가 유도하는 암세포 성장억제에 관한 세포 및 분자적 기전 연구는 더 추구하여야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, *Dendropanax morbifera*는 사람 구강암 KB 세포의 apoptosis를 유도하여 암세포 성장을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과로, *Dendropanax morbifera*는 암세포 성장억제에 관한 또 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

V. 결 론

사람 구강암 세포인 KB를 이용하여 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히기 위해, KB 세포에서 DMME를 이용하여 MTT 분석, DAPI 핵 염색, DNA fragmentation 분석 및 immunoblotting 등을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DMME는 KB 세포의 성장을 시간과 농도에 의존적으로 억제하였다.
2. DMME를 처리한 KB 세포 실험군에서 핵의 응집과 파쇄를 확인할 수 있었다.
3. DMME를 처리한 KB 세포 실험군에서 DNA fragmentation 현상을 확인할 수 있었다.
4. DMME를 처리한 KB 세포 실험군에서 procaspase-3, procaspase-7, procaspase-8 및 procaspase-9의 proteolytic cleavage 현상을 확인할 수 있었다.
5. DMME를 처리한 KB 세포 실험군에서 PARP의 proteolytic cleavage 현상을 확인 할 수 있었다.

본 연구의 결과로서 사람 구강암 KB 세포에서 *Dendropanax morbifera*는 apoptosis를 유도하여 암세포 성장을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과로, *Dendropanax morbifera*를 이용한 암세포 성장억제에 관한 또 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참 고 문 헌

1. Amritpal Singh Saroya: Herbalism. Phytochemistry and Ethnopharmacology. CRC Press, Science Publishers, New Hampshire, pp. v, 68, 113, 175, 2011.
2. Igney FH, Krammer PH: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer 2:277-288, 2002.
3. Kim SY, Lee YJ, Park EH, Yi HK, Jo DS, Kim JS, Hwang PH: Capsaicin induced apoptosis and the enhanced anticancer effect of anticancer drugs in cancer cells. Korean J Pediatr 51:307-314, 2008.
4. Safdie FM, Dorff TA, Quinn DD, Fontana LI, Wei MN, Lee CH, Cohen PS, Longo VD: Fasting and cancer treatment in humans. Aging 1:988-1007, 2009.
5. Choi SK: Growth Characteristics of *Dendropanax morbifera* Lev. in Wando area of Korea. Korean J Corp Sci 48:434-437, 2003.
6. Kim HR, Chung HJ: Chemical Characteristics of the Leaves and the Seeds of Korean Dendropanax(*Dendropanax morbifera* Lev.). J Korean Soc Agric Chem Biotechnol. 43:63-66, 2000.
7. Lim KP, Jung WY, Hong DH: Studies on the Technical Development of the Traditional Korean Golden Varnish(Hwangchil)(III) - Main Component Analysis of Korea Golden Varnishes Traditonally Refined from the Exudates of *Dendropanax morbifera* Lev. J Korean Wood Sci Technol 26:73-80, 1998.
8. Hyun TK, Kim MO, Lee HK, Kim YJ, Kim EK, Kim JS: Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Leveille. Food chem 141:1947-1955, 2013.
9. Lee JW, Park C, Han MH, Hong SH, Lee TK, Lee SH, Kim GY, Choi YH: Induction of human leukemia U937 cell apoptosis by an ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Lev. through the caspase-dependent

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

pathway. Oncol Rep 30:1231-1238, 2013.

10. Jin CY, Yu HY, Park C, Han MH, Hong SH, Kim KS, Lee YC, Chang YC, Cheong JH, Moon SK, Kim GY, Moon HI, Kim WJ, Lee JH, Choi YH: Oleifolioside B-mediated autophagy promotes apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. Int J Oncol 43(6):1943-1950, 2013.
11. Yu HY, Jin CY, Kim KS, Lee YC, Park SH, Kim GY, Kim WJ, Moon HI, Choi YH, Lee JH: Oleifolioside A Mediates Caspase-Independent Human Cervical Carcinoma HeLa Cell Apoptosis Involving Nuclear Relocation of Mitochondrial Apoptogenic Factors AIF and EndoG. J Aqric Food Chem 60:5400-5406, 2012.
12. Kwon SW: Research and Development Trends of Botanical drugs. Biotech Policy Research Center, Korea, pp. 38, 44, 2012.
13. Seo JW, Kim DH, Yun JS, Kim SH, Choi BY, Oh JM, Kwon KI: Pharmacodynamic Modeling of Vincristine in Lymphoma Patients. Kor J Clin Pharm 21:145-155, 2011.
14. Awh OD, Yoo DW, Im SM: Studies on the Biological Behaviors of Taxol Derivatives. Korean J Nucl Med 31:440-451, 1997.
15. Kim HS, Hong SB, Sung HJ, Moon GA, Yoon YS: Effect of deer blood on Reduction of the Side Effects of Chemotherapeutic Drugs. Kor J Phamacon 34:145-149, 2003.
16. Jun NJ, Kim SC, Song EU, Jang KC, Lee DS Cho SK: Isolation of Anticancer Compounds from *Peucedanum japonicum* Thunb. Roots. Korean J Plant Res 27:215-222, 2014.
17. Lee SG, Kim BS, Nam JO: Ginsenoside Rg3 Induces Apoptosis in B16F10 Melanoma Cells. Korean J Life Sci 24:1001-1005, 2014.
18. Kim JH, Kim MY: Antiproliferative and Apoptotic Effects of *Sasa quelpaertensis* Nakai in Human Cancer Cells. Journal of Life Science 24:903-909, 2014.
19. Hu W, Kavanagh JJ: Anticancer therapy targeting the apoptotic

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

pathway. Lacet Oncol 4:721-729, 2003.

20. Datta RH, Kojima HI, Yoshida KU, Kufe DD: Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. J Biol Chem 272:20317-20320, 1997.
21. Liu XG, Zou HA, Slaughter CE, Wang XG: DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to tigger DNA Fragmentation during Apoptosis. Cell 89:175-184, 1997.
22. Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J 326:1-16, 1997.
23. Shon HJ, Kim IR, Kim YH, Kim GC, Kwak HH, Park BS: Apoptotic Effect of Co-treatment with Curcumin and Cisplatin on SCC25 Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line. Intern J Oral Biol 39: 159-167, 2014.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2015년 8월
박사학위논문

Dendropanax morbifera Lev. 메탄올 추출물에 의한 사람 구강암 세포 KB의 apoptosis 유도

조선대학교 대학원

치의생명공학과

조 선 호

2015년 8월 박사학위논문 *Dendropanax morbifera* Lev 메탄올 추출물에 의한 사람 구강암 세포 KB의 apoptosis 유도 조 선 호

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Dendropanax morbifera Lev. 메탄올 추출물에 의한 사람 구강암 세포 KB의 apoptosis 유도

Induction of Apoptosis by *Dendropanax morbifera* Lev. Methanol Extract in KB Human Oral Cancer Cells

2015년 8월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

조 선 호

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Dendropanax morbifera Lev. 메탄올 추출물에 의한 사람 구강암 세포 KB의 apoptosis 유도

지도교수 김 도 경

이 논문을 이학박사학위신청 논문으로 제출함.

2015년 4월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

조 선 호

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

조선호의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 흥 중 인

위 원 전남대학교 교 수 김 종 근 인

위 원 조선대학교 교 수 김 춘 성 인

위 원 조선대학교 교 수 유 선 경 인

위 원 조선대학교 교 수 김 도 경 인

2015년 6월

조선대학교 대학원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT ····· ⅳ

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험재료 및 방법 ····· 3
1. 실험재료 ····· 3
2. 식물재료와 추출 ····· 3
3. 세포주와 세포배양 ····· 3
4. 세포성장 억제실험(MTT 분석) ····· 3
5. DAPI 염색 ····· 4
6. DNA fragmentation 분석 ····· 4
7. Immunoblotting ····· 4
8. 실험자료의 통계학적 검정 ····· 5

Ⅲ. 실험결과 ····· 6
1. 세포성장에 영향을 미치는 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)의 효과 ····· 6
2. DAPI 염색에 의한 세포핵 관찰 결과 ····· 8
3. DNA fragmentaion 분석 ····· 8
4. *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)에 의한 caspase의 활성 ····· 11
5. DMME에 의한 PARP를 통한 apoptosis 매개 ····· 11

Ⅳ. 총괄 및 고안 ····· 17

Ⅴ. 결 론 ····· 20

Ⅵ. 참고문헌 ····· 21

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. Anti-proliferative effect of *Dendropanax morbifera* extract in KB cells ····· 6

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Fig. 1. Concentration- and time-dependent effects of *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) on the cell viability in KB cells ····· 7

Fig. 2. Induction of apoptosis by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) in KB cells ····· 9

Fig. 3. Fragmentation of internucleosomal DNA by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) in KB cells ····· 10

Fig. 4. Proteolytic cleavage of caspase-3 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 12

Fig. 5. Proteolytic cleavage of caspase-7 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 13

Fig. 6. Proteolytic cleavage of caspase-8 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 14

Fig. 7. Proteolytic cleavage of caspase-9 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 15

Fig. 8. Activation of cleaved PARP by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells ····· 16

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Induction of Apoptosis by *Dendropanax morbifera* Lev. Methanol Extract in KB Human Oral Cancer Cells

Cho, Seon-Ho
Advisor: Prof. Kim, Do Kyung, Ph.D.
Department of Biodental Engineering,
Graduate School of Chosun University

Dendropanax morbifera is evergreen broad-leaved arboreous tree belongs to the araliaceae. The country of origin is mainly the South Korea. The scientific name is *Dendropanax morbifera* that component is based compound polyacetylenes. Recently, many researchs have been conducted about anti-cancer effects using *Dendropanax morbifera* in liver cancer, lung cancer, cervical cancer, and so on. However, the effects of *Dendropanax morbifera* on oral cancer is not clearly established. Therefore, the main goal of this study was to investigate the effect of *Dendropanax morbifera* extract on cell growth and apoptosis induction in oral cancer cells.

To determine the effects of *Dendropanax morbifera* on cell growth and apoptosis induction in oral cancer cells, it was examined by inhibition of cell growth (MTT assay), nuclear staining with DAPI, DNA fragmentation analysis determination of caspase activation and immunoblotting in KB human oral cancer cells.

The results were as follows.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1. *Dendropanax morbifera* methanol(DMME) extract induced the inhibition of cell growth depended on the *Dendropanax morbifera* extract treatment time and concentration in KB cells.
2. DMME observed the changing nuclear size and nuclear condensation in KB cells.
3. DMME induced the DNA fragmentation in KB cells.
4. DMME promoted proteolytic cleavages of procaspase-3, -7, -8 and -9 with the increases in the amount of cleaved caspase-3, -7, -8 and -9.
5. Cleaved PARP was increased by DMME in KB cells.

These results suggest that *Dendropanax morbifera* can induce the suppression of cell growth through the cell apoptosis pathways in KB human oral cancer cells, and that it many have potential properties for anti-cancer drug discovery.

KEY WORDS: *Dendropanax morbifera,* Anti-cancer therapy, Apoptosis, Cell death, KB human oral cancer cells.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ. 서 론

세계적으로 생물유래 천연물질은 제약 산업의 중추적인 역할을 하고 있다. Taxol(주목나무 유래), Silymarin(대계 유래), Artemisinin(개똥쑥 유래) 성분은 약의 합성에 이용된다[1]. 이외에도 천연물에서 항암물질을 찾는 노력은 현재에도 활발히 진행되고 있으며, 그 예로써 방기뿌리(roots of *Stephania tetrandra*) 유래 Tetrandrine는 간암세포인 HepG2에서, 감초(*licorice*) 유래 Isoliquiritigenin는 HepG2와 폐암세포인 A549에서, 소귀나무(*Myrica rubra*) 유래 Prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate는 유방암세포인 MCF-7에서 세포사멸을 유도한다고 보고되었다[1].

세포는 apoptosis라고 불리는 세포사멸기전을 가지고 있다. 세포사멸기전은 크게 세포 외부로부터 시작되는 외인성 세포사멸과 세포 내부에서 시작되는 내인성 세포사멸로 분류된다[2]. 다세포 생물은 세포의 항상성을 조절하기 위해 apoptosis를 이용한다[2]. 그 특징으로는 세포질의 응축, DNA의 분절이 있으며, 세포 내의 게놈 DNA가 핵산내부분해효소(endonuclease)에 의하여 180-200bp 크기의 올리고뉴클레오좀으로 잘린다[3]. 그리고 원형질막이 파괴되지 않아서 염증 반응을 일으키지 않는다[3].

화학요법은 악성종양 세포를 사멸시켜 환자의 생존을 연장할 수 있으나, 부작용으로 정상세포에 대한 독성을 나타낼 수 있다[4]. 예를 들어, 광범위하게 처방되는 항암제인 doxorubicin은 심장 및 신장독성과 연관되어 있다[4]. 따라서 정상세포에 대한 독성을 선택적으로 감소시키고 암세포를 선택적으로 사멸시켜 암치료를 향상시킬 수 있는 전략이 필요하며, 이를 위해서는 천연물 연구를 활발히 진행하여야 한다.

황칠나무는 두릅나무과에 속하는 상록활엽교목이며, 완도, 해남, 제주도 등 주로 우리나라 남부 지역에서 자생한다[5]. 학명은 *Dendropanax morbifera*이며 목본(Dendro) 전능약(panax)라는 의미가 있다. 황칠액의 주성분은 정유성분이며 수액은 도료로 이용하고 수지는 거풍습과 활혈의 약효가 있다는 보고가 있다[5]. 황칠나무에 대한 최초 연구는 1937년 황칠 정유 성분에 대한 것으로 황칠 정유의 주성분은 2중 결합이 2개 있는 쌍환성 세스퀘테르펜이며, 그 외에 알코올과 에테르 등의 성분을 함유하고 있다고 보고되었다[6]. 그리고 또 다른 성분으로는 polyacetylenes계 화합물로써 식물의 외상으로 분비되는 항균성 물질로 보고되었다[7]. 최근 황칠나무 추출물을 이용하여 간암, 폐암, 자궁경부암 등 항암효과에 대해서 활발한 연구가 진행되고 있으나[8-11], 구강암 세포에서 황칠에

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

의한 항암효과에 관한 연구는 매우 부족하다.

따라서 본 연구에서는 사람 구강암 세포주 KB를 이용하여 황칠나무 추출물의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히고자 하며, 아울러 황칠나무에 의한 구강암 치료의 효용성을 제시 하고자 한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

N-methylthiotetrazole(MTT)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, ECL detection kit는 Amersham Biosciences Corp.(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. Anti-cleaved caspase-3, -7, -8, -9와 anti-cleaved PARP 항체는 Cell Signaling Technology, Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였고, DAPI 염색물질은 Simga(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

사람 구강암 KB 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 제공받아 실험에 이용하였다.

2. 식물재료와 추출

전남 완도군 보길면 원산의 *Dendropanax morbifera* 지엽(에스플랜트, 대전, 대한민국)을 사용하였다. *Dendropanax morbifera* 지엽을 1mm 크기로 분쇄한 후, 94% 메탄올(대정화금, 시흥, 대한민국)을 이용하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 whatman 여과지(0.45um)를 이용하여 여과한 후, rotary evaporator(N-1100, Eyela, Japan)를 이용하여 40℃의 진공상태로 증발시켰다. 증발건조 후, 농축된 추출물을 -40℃에서 1일 동안 동결건조 하였으며, 4°C에서 보관하며 사용하였다.

3. 세포주와 세포배양

KB 세포는 5% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 및 1% Nonssential amino acids(NEAA, Gibco, Newyork, NY, USA)가 함유된 37°C의 Minimum Essential Mediun(MEM, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 성장배지 하에서 배양하면서 실험에 이용하였다.

4. 세포성장 억제실험(MTT 분석)

Dendropanax morbifera 메탄올 추출물(DMME)에 의한 세포성장 억제효과를 관찰

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

하기 위해, 24well plate에 5 × 10^3cells/well의 KB세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, DMME를 다양한 농도와 시간에서 처리하여 37℃에서 반응시킨 후, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다. MTT 분석은 KB 세포에 MTT 용액(MTT 최종농도 0.5㎍/㎕)을 37℃에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl이 함유된 isopropanol로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

5. DAPI 염색

DMME에 의한 KB 세포 증식억제가 apoptosis 유도와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI 염색을 진행 후 형태를 관찰하였다. 먼저 24well plate에 5 × 10^3cells/well에 KB 세포를 접종하여 24시간 배양한 후, DMME 30㎍/㎕과 100㎍/㎕의 농도로 각각 처리하여 48시간 동안 37℃에서 배양하였다. 배양한 KB 세포를 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution을 이용하여 상온에서 10분 동안 고정한 후, 4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI)용액을 이용하여 15분 동안 염색하였다. 염색한 KB 세포를 형광현미경(IX71, Olympus, Japan)을 이용하여 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

6. DNA fragmentation 분석

세포사멸의 기전 중 apoptosis의 지표가 되는 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. DMME에 의한 세포 DNA fragmentation 효과를 관찰하기 위해, 10cm 배양접시에 5 X 10^5개의 KB 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, DMME(100㎍/ml)를 처리하여 1일 또는 2일 동안 37℃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 추출법으로 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 2% agarose gel에서 전기영동(50volts, 90분) 하였으며, ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

7. Immunoblotting

세포 apoptosis의 지표가 되는 anti-cleaved caspase-3, -7, -8, -9와 anti-cleaved PARP 항체 분석을 위해 immunoblotting을 시행하였다. 10cm 배양접시에 5 X 10^5개의 KB 세포를 접종하고 24시간 배양한 후, DMME(100㎍/ml)를 처리하여 1일 또는

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2일 동안 37℃에서 배양한 후 세포를 수집하였다. 세포를 4℃의 PBS로 2회 세척한 후, 4℃의 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.5mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5㎍/ml aprotinin 및 5㎍/ml leupeptin이 포함된 PBS)에서 30분 반응시켰다. 세포 용해물을 12,500 x *g*에서 20분간 원심분리한 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-cleaved caspase-3, -7, -8, -9와 anti-cleaved PARP 항체를 1,000배 희석하여 사용하였으며, anti-β-actin 항체는 2,000배 희석하여 사용하였다. 이차항체로 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)를 5,000배 희석하여 사용하였으며, ECL detection kit를 사용하여 X-ray 필름에 현상한 후 분석하였다.

8. 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.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ. 실험결과

1. 세포성장에 영향을 미치는 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물 (DMME)의 효과

KB 세포에서 DMME에 의한 세포성장 억제효과를 조사하기 위해 MTT 분석을 시행하였다. DMME를 1, 3, 10, 30, 100, 300 및 1,000㎍/ml의 다양한 농도로 1일, 2일동안 KB 세포에 투여한 후 MTT 검사를 시행한 결과, DMME 처리 1일, 2일의 경우에서 DMME 3㎍/ml 까지의 농도에서는 대조군과 비교하였을 때 세포성장 억제의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 1). 그러나 DMME 처리 1일, 2일 경우, DMME 10, 30, 100, 300 및 1,000㎍/ml에서는 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 세포성장 억제효과를 볼 수 있었으며, 이 효과는 시간과 농도에 의존적임을 확인할 수 있었다(Fig. 1). KB 세포성장 억제에 대한 DMME의 IC_{50}(최대 억제량의 50%를 유발시키는 농도)은 DMME 처리 1일째는 약 300㎍/ml 이었고, 2일째는 약 70㎍/ml이었다(Table 1).

Table 1. Anti-proliferative effect of *Dendropanax morbifera* extract in KB cells

Time	IC_{50} (㎍/㎖)
24 hours	301.2 ± 36.1
48 hours	69.3 ± 7.9

The IC_{50} values represent the mean ± SEM for three experiments.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

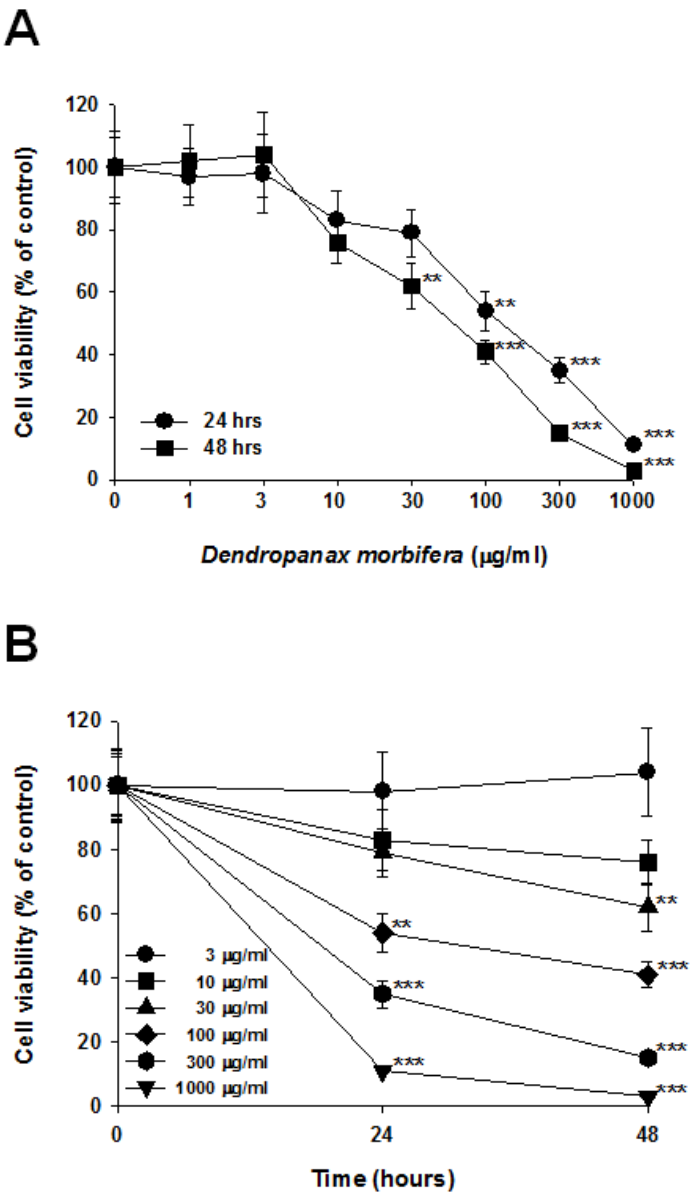

Fig. 1. Concentration- and time-dependent effects of *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) on the cell viability in KB cells. (A) Concentration-dependent effect of DMME on the cell viability in KB cells. The KB cells were treated with various concentrations of DMME or without DMME for 24 (circle) and 48 (square). (B) Time-dependent effect of DMME on the cell viability in KB cells.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

The KB cells were treated with 3 (circle), 10 (square), 30 (triangle), 100 (diamond), 300 ㎍/㎖ (hexagon) and 1,000 ㎍/㎖ (inverted triangle) DMME for 24 or 48 hours. The cell viabilities were determined by the MTT assays. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of $A570_{nms}$ of DMME treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean ± SEM of four experiments. $^{**}P<0.01$ vs. control and $^{***}P<0.001$ vs. control (the control cells measured in the absence of DMME).

2. DAPI 염색에 의한 세포핵 관찰 결과

Dendropanax morbifera 메탄올 추출물(DMME) 처리에 따른 KB 세포의 성장억제가 세포의 apoptosis 유발과 상관성이 있는지 조사하기 위하여 0, 30 및 100㎍/ml의 DMME를 처리한 배지에서 48시간 동안 배양 한 후, DAPI 염색을 통해 세포핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. DAPI 염색을 실시하고 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, Fig.2A에 나타낸 바와 같이 DMME를 처리하지 않은 대조군 KB 세포에서는 대부분의 세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나, DMME를 30 및 100㎍/ml을 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, DMME를 처리하지 않은 대조군 KB 세포에서는 약 0.8%, DMME를 30과 100㎍/ml를 처리한 세포에서는 각각 약 24%와 57%로, DMME 농도가 증가함에 따라 apoptotic body의 비율이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2B).

3. DNA fragmentation 분석

DMME에 의한 KB 세포의 성장억제 기전을 확인하기 위해 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. DMME 100㎍/ml을 2일 처리한 KB 세포의 DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과, 대조군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, DMME를 100㎍/ml 처리한 2일 실험군에서는 DNA fragmentation 현상을 뚜렷하게 볼 수 있었다(Fig. 3).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

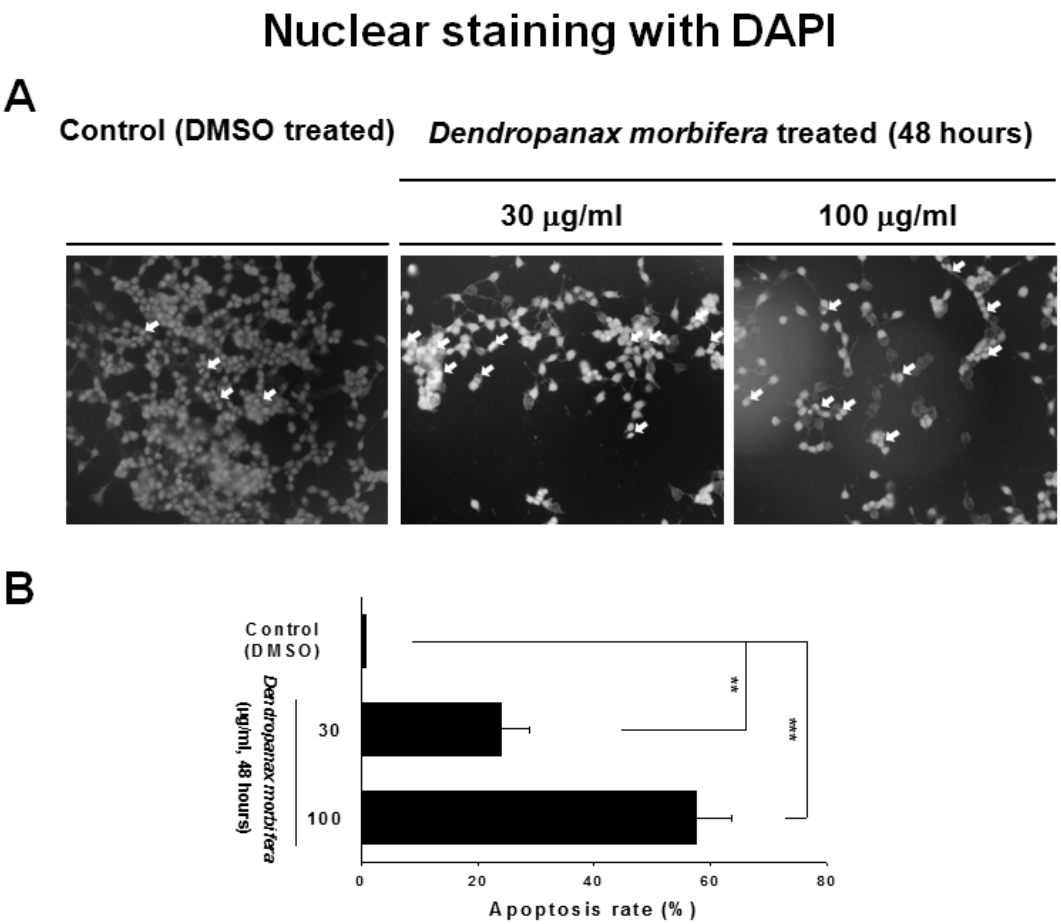

Fig. 2. Induction of apoptosis by *Dendropanax morbifera* methanol extract (DMME) in KB cells. (A) Changes in nuclear morphology by DMME. The cells were treated with 0, 30 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. Representative fluorescence photomicrographs show the nuclei morphology of KB cells. The arrows indicate 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.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

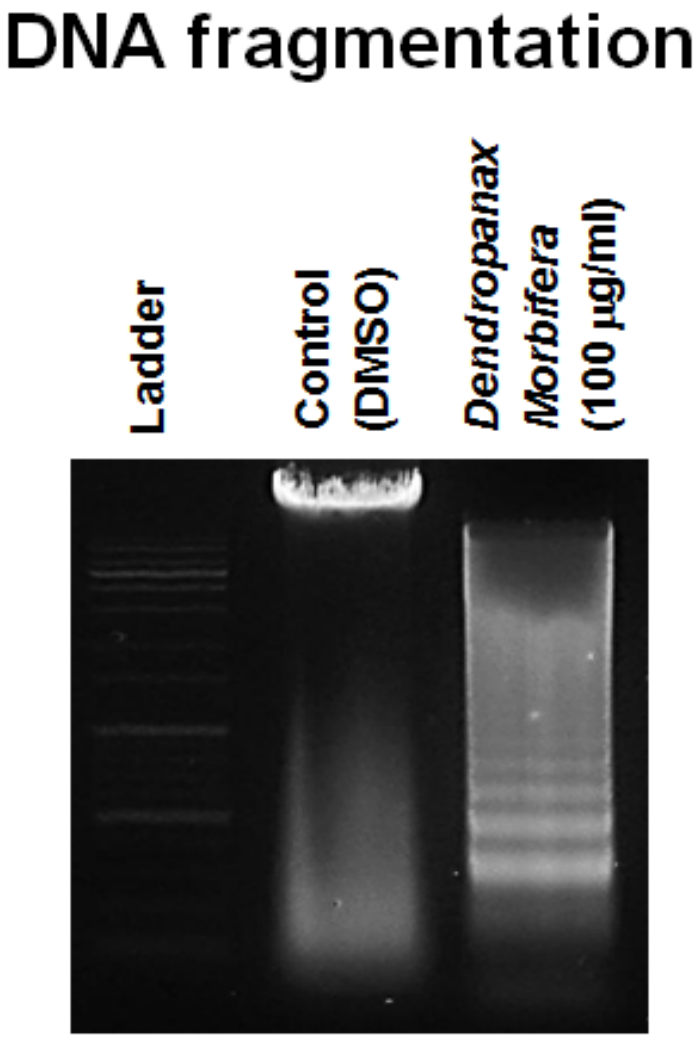

Fig. 3. Fragmentation of internucleosomal DNA by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) in KB cells. The KB cells were treated with 0 and 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours, and nuclear DNA (5㎍) was subjected to agarose gel electrophoresis.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)에 의한 caspase의 활성

Anti-cleaved caspase-3, -7, -8 및 caspase-9가 세포 apoptosis의 지표가 되므로 DMME를 처리한 KB 세포에서 anti-cleaved caspase-3, -7, -8, -9 발현분석을 위해 immunoblotting을 시행하였다. DMME 100㎍/ml을 처리한 KB 세포를 2일간 처리한 후 단백질을 추출하여 확인한 결과, 시험한 4가지 anti-cleaved caspase에서 단백질 가수분해 현상이 나타남을 알 수 있었다(Figs. 4-7).

5. DMME에 의한 PARP를 통한 apoptosis 매개

DMME이 KB세포에서 apoptosis를 유도하는지 확인을 위해서, 단백질 수준에서 PARP 발현을 측정할 수 있는 immunoblotting을 수행하였다. 대조군에서보다 DMME 처리군에서 cleaved PARP가 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

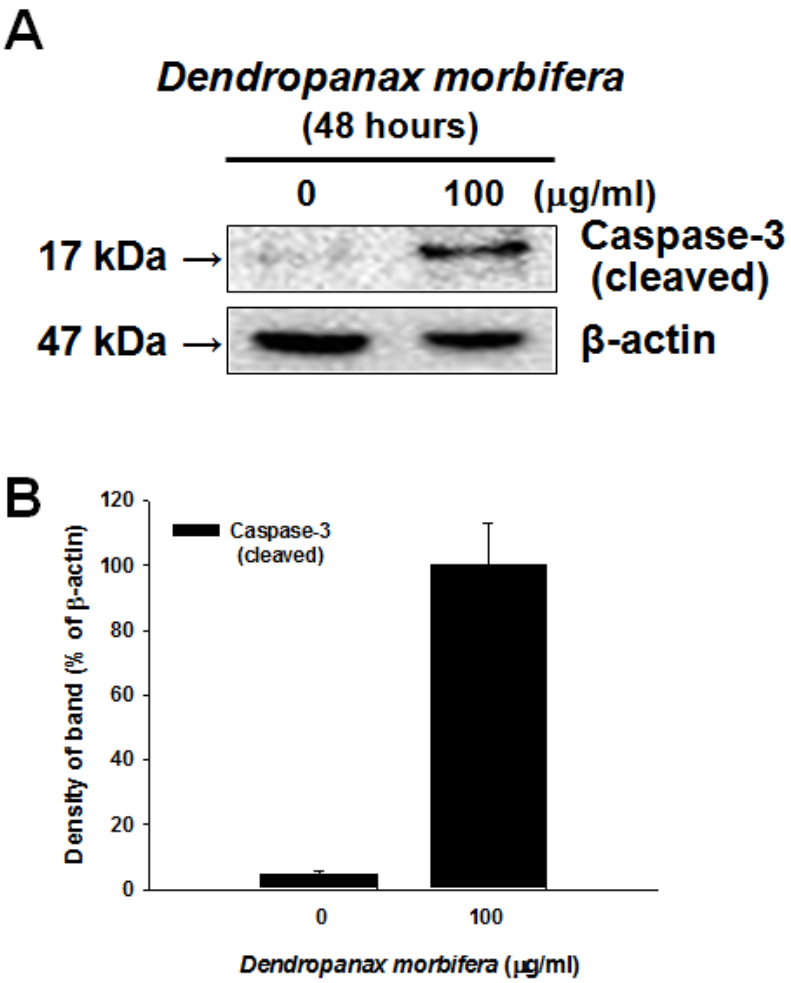

Fig. 4. Proteolytic cleavage of caspase-3 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-3 by DMME was measured in KB cells. The cells were treated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in "MATERIALS AND METHODS". (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

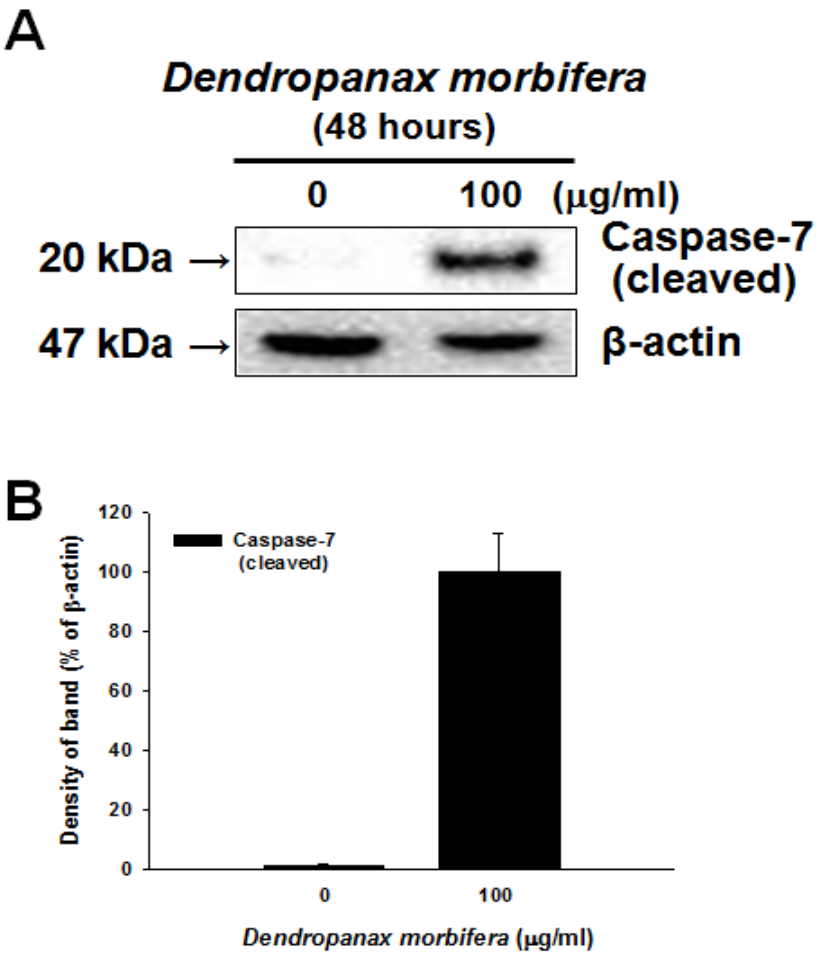

Fig. 5. Proteolytic cleavage of caspase-7 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-7 by DMME was measured in KB cells. The cells were treated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in "MATERIALS AND METHODS". (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

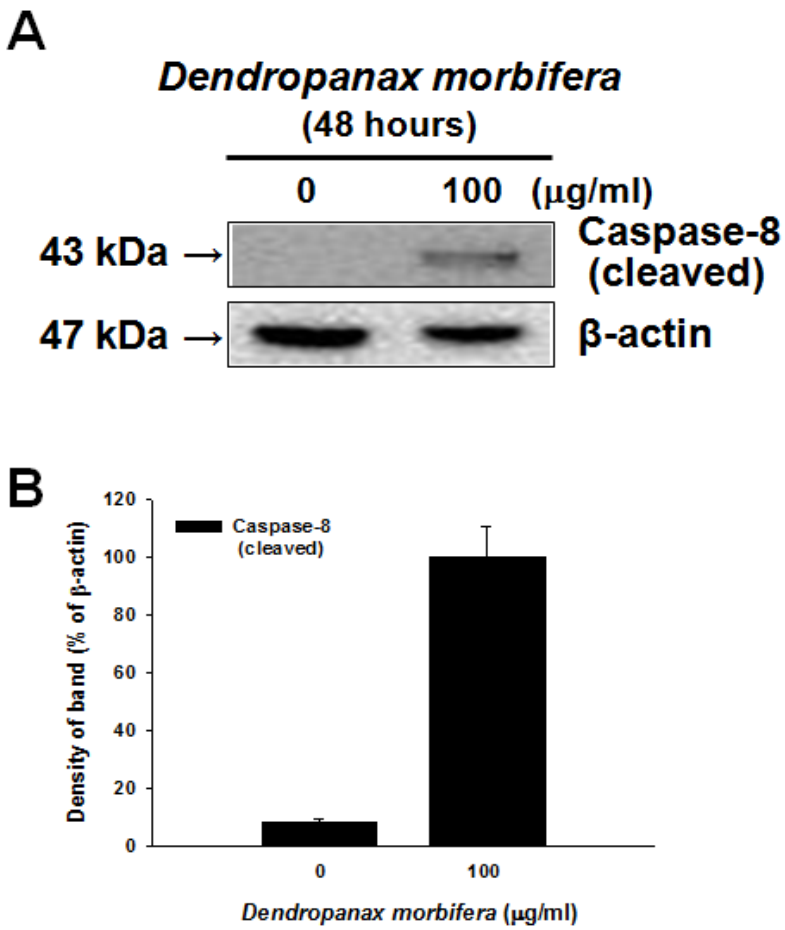

Fig. 6. Proteolytic cleavage of caspase-8 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-8 by DMME was measured in KB cells. The cells were treated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in "MATERIALS AND METHODS". (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

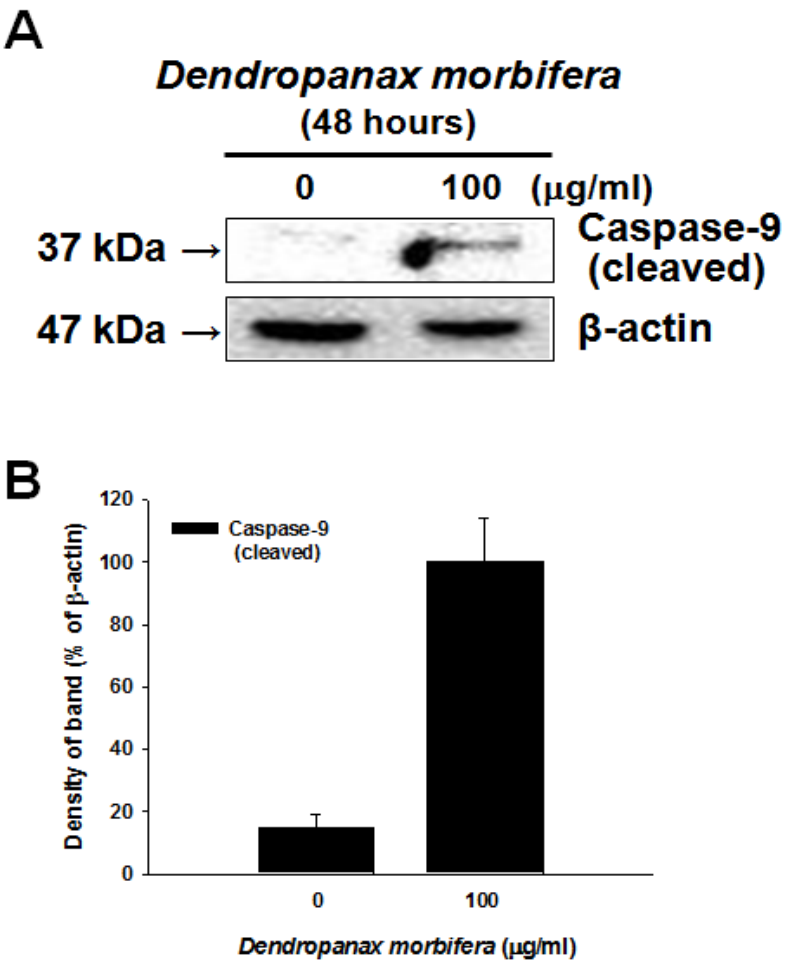

Fig. 7. Proteolytic cleavage of caspase-9 by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-9 by DMME was measured in KB cells. The cells were treated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in "MATERIALS AND METHODS". (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

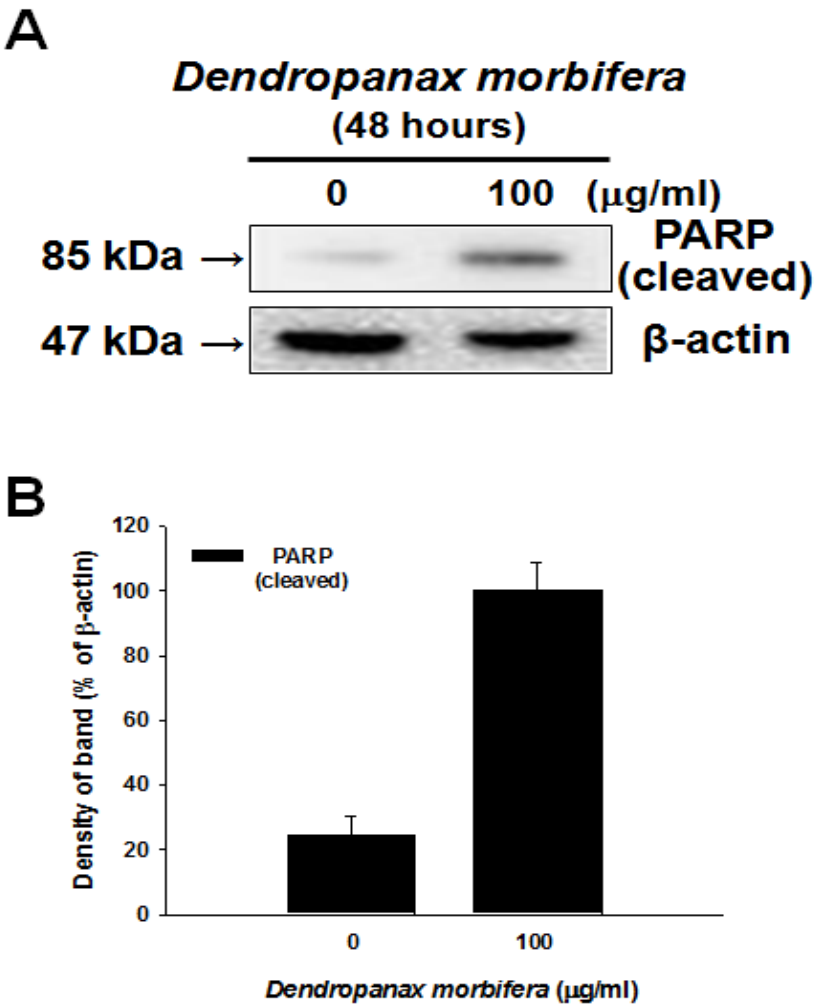

Fig. 8. Activation of cleaved PARP by *Dendropanax morbifera* methanol extract(DMME) treatment in KB cells. (A) The activity of cleaved PARP by DMME was measured in KB cells. The KB cells were stimulated with 0 or 100 ㎍/㎖ DMME for 48 hours, harvested and lyzed using a cell lysate buffer. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 총괄 및 고안

현재 천연물 유래의 항암제 개발은 전 세계적으로 대표적인 관심 분야이다. 그 예로 미국은 National Cancer Institute(NCI)의 주도하에 1,550속, 3,390종의 식물로부터 114,000개 추출물을 대상으로 항암제 개발을 위한 검색을 하였으며, 특히 백합과 일일초(*Vinca rosea*)로부터 vinca alkaloid의 부분 합성에 성공하여 vincristine, vinblastine, leurosine, leurosidine 등과 같은 다수의 항암물질을 개발하였다[12]. 그 중 vincristine은 소아와 성인의 급성 림프구성 백혈병의 항암화학요법치료 약물로 사용되며, 기전은 세포분열기에 방추사 형성을 방해하여 세포를 파괴한다[13]. 주목과 나무인 Taxus brevifolia에서 추출한 diterpene구조를 가진 Taxol 역시 식물유래 항암제로써 항암작용에 대한 연구결과가 다수 보고되고 있다[14]. 이처럼 항생제의 약 78%와 항암화합물의 약74%가 천연물이거나 그 유도체인 것으로 확인되면서 천연물 의약품의 중요성이 점차 부각되고 있다[12].

우수한 화학요법 항암제 및 항암요법이 개발되어 암의 치료율은 향상되었으나, 암세포 제거에 초점을 맞춘 암치료 방식으로 인해 환자의 삶의 질은 저하됨에 따라 개선해야 할 필요성이 대두되고 있다. 화학요법제의 부작용은 조혈기능 억제, 메스꺼움 및 구토, 점막궤양 및 탈모증 등이 있다[15]. 이러한 이유로 항암제는 정상세포를 사멸시키는 부작용이 없어야 하며, 암세포만 특이적으로 apoptosis를 유도하여 세포사멸을 유도 하는 것이 가장 이상적인 방법이다.

황칠나무는 두릅나무과 황칠나무속에 속하는 상록활엽수로써, 전남의 해남, 완도, 보길도 등의 서남해안 지역 및 제주도의 한라산 일대에 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 황칠의 주성분은 polyacetylenes계 화합물로써 식물의 외상에 의하여 자극을 받으면 분비되는 항균성 물질인 것으로 보고되었다[6-7]. 최근 황칠나무 추출물을 이용하여 간암, 폐암, 자궁경부암 등 항암효과에 대해서 활발한 연구가 진행되고 있지만, 구강암에서 황칠나무의 효능에 대한 연구는 매우 부족하다[8-11]. 따라서 본 연구에서는 사람 구강암 세포인 KB를 이용하여 황칠나무(*Dendropanax morbifera)*추출물의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히고자 하였다.

세포성장 억제효과를 조사하기 위한 MTT 실험에서, *Dendropanax morbifera*는 시간과 농도에 의존적으로 KB 세포의 성장을 억제시켰다(Fig. 1). 이는 시간과 농도에 의

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

존적으로 암세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 추출물들(*Peucedanum japonicum Thunb.* Roots, Ginsenoside Rg3, *Sasa quelpaertensis* Nakai)에서의 연구결과와 일치하는 것이었다[16-18]. *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물은 다른 추출물들과 비슷한 농도에서 KB 세포의 성장을 억제하였다[16-18]. 이러한 결과는 *Dendropanax morbifera*가 암세포 성장을 억제하고 항암치료제로써 잠재적인 가치를 가지고 있다는 것을 시사한다.

Apoptosis는 세포분열과 세포사멸 사이에서 항상성을 유지시켜주는 중요한 역할을 한다[16-17]. 암세포에서 apoptosis의 유도는 천연물들로부터 항암제로의 개발에 가장 유용한 전략이다[19]. 따라서 많은 연구자들이 식물의 추출물을 포함한 많은 천연물들로부터 암세포들의 apoptosis를 유도하는 연구들을 시행하고 있다. 본 연구에서도 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)에 의한 KB 세포 성장억제 기전에 apoptosis가 포함되는지를 확인하기 위하여, DAPI 핵 염색을 수행하였다. KB세포에 DMME를 처리하고 고정한 후, DAPI 염색을 진행하였다. 형광현미경으로 관찰한 결과 DMME를 처리한 KB세포에서 핵의 응축과 분절을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 DMME를 2일 처리한 KB 세포의 DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과, 대조군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, DMME 처리 2일 실험군에서는 DNA fragmentation 현상을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 암세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 추출물들이 DNA fragmentation을 유도하는 apoptosis 과정에 의해 암세포를 사멸시킨다는 연구결과[16-18]와 일치하는 것으로써, DMME에 의해 유도되는 KB 세포 성장억제 과정에는 apoptosis 기전이 포함되는 것으로 사료된다.

Caspase라 불리는 세포 내 cysteine protease들의 활성은 다양한 자극에 의해 유도된 apoptosis를 개시하고 실행하는데 중요한 역할을 하며, 포유동물 세포에서 확인된 caspase 중에 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9 등이 apoptosis에 의한 세포사멸의 effector caspase로 알려져 있다[20-22]. Caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9은 각각 17kDa, 20kDa, 43kDa 및 37kDa의 불활성 proenzyme으로 합성되며, 다양한 자극에 의해 apoptosis가 일어날 때 proteolytic cleavage 현상이 일어난다[20-22]. 본 연구에서 proenzyme들의 발현분석을 위해 immunoblotting을 시행한 결과, *Dendropanax morbifera* 처리 실험군에서 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9의 proteolytic cleavage 현상을 볼 수 있었다(Fig. 4-7). PARP는 세포 apoptosis(death receptor-mediatied extrinsic apoptotic

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

pathway)의 중요한 조절인자 중의 하나이다[23]. 본 연구에서 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME) 처리 실험군에서 PARP의 proteolytic cleavage 현상을 볼 수 있었다.(fig. 8). 이러한 결과들은 DMME에 의해 유도되는 KB 세포의 성장억제 과정에 caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9 및 PARP에 의존적인 apoptosis가 포함되어 있음을 시사한다. 그러나 DMME가 유도하는 암세포 성장억제에 관한 세포 및 분자적 기전 연구는 더 추구하여야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, *Dendropanax morbifera*는 사람 구강암 KB 세포의 apoptosis를 유도하여 암세포 성장을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과로, *Dendropanax morbifera*는 암세포 성장억제에 관한 또 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

V. 결 론

사람 구강암 세포인 KB를 이용하여 *Dendropanax morbifera* 메탄올 추출물(DMME)의 암세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히기 위해, KB 세포에서 DMME를 이용하여 MTT 분석, DAPI 핵 염색, DNA fragmentation 분석 및 immunoblotting 등을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DMME는 KB 세포의 성장을 시간과 농도에 의존적으로 억제하였다.
2. DMME를 처리한 KB 세포 실험군에서 핵의 응집과 파쇄를 확인할 수 있었다.
3. DMME를 처리한 KB 세포 실험군에서 DNA fragmentation 현상을 확인할 수 있었다.
4. DMME를 처리한 KB 세포 실험군에서 procaspase-3, procaspase-7, procaspase-8 및 procaspase-9의 proteolytic cleavage 현상을 확인할 수 있었다.
5. DMME를 처리한 KB 세포 실험군에서 PARP의 proteolytic cleavage 현상을 확인 할 수 있었다.

본 연구의 결과로서 사람 구강암 KB 세포에서 *Dendropanax morbifera*는 apoptosis를 유도하여 암세포 성장을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과로, *Dendropanax morbifera*를 이용한 암세포 성장억제에 관한 또 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참 고 문 헌

1. Amritpal Singh Saroya: Herbalism. Phytochemistry and Ethnopharmacology. CRC Press, Science Publishers, New Hampshire, pp. v, 68, 113, 175, 2011.
2. Igney FH, Krammer PH: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer 2:277-288, 2002.
3. Kim SY, Lee YJ, Park EH, Yi HK, Jo DS, Kim JS, Hwang PH: Capsaicin induced apoptosis and the enhanced anticancer effect of anticancer drugs in cancer cells. Korean J Pediatr 51:307-314, 2008.
4. Safdie FM, Dorff TA, Quinn DD, Fontana LI, Wei MN, Lee CH, Cohen PS, Longo VD: Fasting and cancer treatment in humans. Aging 1:988-1007, 2009.
5. Choi SK: Growth Characteristics of *Dendropanax morbifera* Lev. in Wando area of Korea. Korean J Corp Sci 48:434-437, 2003.
6. Kim HR, Chung HJ: Chemical Characteristics of the Leaves and the Seeds of Korean Dendropanax(*Dendropanax morbifera* Lev.). J Korean Soc Agric Chem Biotechnol. 43:63-66, 2000.
7. Lim KP, Jung WY, Hong DH: Studies on the Technical Development of the Traditional Korean Golden Varnish(Hwangchil)(III) - Main Component Analysis of Korea Golden Varnishes Traditonally Refined from the Exudates of *Dendropanax morbifera* Lev. J Korean Wood Sci Technol 26:73-80, 1998.
8. Hyun TK, Kim MO, Lee HK, Kim YJ, Kim EK, Kim JS: Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Leveille. Food chem 141:1947-1955, 2013.
9. Lee JW, Park C, Han MH, Hong SH, Lee TK, Lee SH, Kim GY, Choi YH: Induction of human leukemia U937 cell apoptosis by an ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Lev. through the caspase-dependent

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

pathway. Oncol Rep 30:1231-1238, 2013.

10. Jin CY, Yu HY, Park C, Han MH, Hong SH, Kim KS, Lee YC, Chang YC, Cheong JH, Moon SK, Kim GY, Moon HI, Kim WJ, Lee JH, Choi YH: Oleifolioside B-mediated autophagy promotes apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. Int J Oncol 43(6):1943-1950, 2013.
11. Yu HY, Jin CY, Kim KS, Lee YC, Park SH, Kim GY, Kim WJ, Moon HI, Choi YH, Lee JH: Oleifolioside A Mediates Caspase-Independent Human Cervical Carcinoma HeLa Cell Apoptosis Involving Nuclear Relocation of Mitochondrial Apoptogenic Factors AIF and EndoG. J Aqric Food Chem 60:5400-5406, 2012.
12. Kwon SW: Research and Development Trends of Botanical drugs. Biotech Policy Research Center, Korea, pp. 38, 44, 2012.
13. Seo JW, Kim DH, Yun JS, Kim SH, Choi BY, Oh JM, Kwon KI: Pharmacodynamic Modeling of Vincristine in Lymphoma Patients. Kor J Clin Pharm 21:145-155, 2011.
14. Awh OD, Yoo DW, Im SM: Studies on the Biological Behaviors of Taxol Derivatives. Korean J Nucl Med 31:440-451, 1997.
15. Kim HS, Hong SB, Sung HJ, Moon GA, Yoon YS: Effect of deer blood on Reduction of the Side Effects of Chemotherapeutic Drugs. Kor J Phamacon 34:145-149, 2003.
16. Jun NJ, Kim SC, Song EU, Jang KC, Lee DS Cho SK: Isolation of Anticancer Compounds from *Peucedanum japonicum* Thunb. Roots. Korean J Plant Res 27:215-222, 2014.
17. Lee SG, Kim BS, Nam JO: Ginsenoside Rg3 Induces Apoptosis in B16F10 Melanoma Cells. Korean J Life Sci 24:1001-1005, 2014.
18. Kim JH, Kim MY: Antiproliferative and Apoptotic Effects of *Sasa quelpaertensis* Nakai in Human Cancer Cells. Journal of Life Science 24:903-909, 2014.
19. Hu W, Kavanagh JJ: Anticancer therapy targeting the apoptotic

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

pathway. Lacet Oncol 4:721-729, 2003.

20. Datta RH, Kojima HI, Yoshida KU, Kufe DD: Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. J Biol Chem 272:20317-20320, 1997.
21. Liu XG, Zou HA, Slaughter CE, Wang XG: DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to tigger DNA Fragmentation during Apoptosis. Cell 89:175-184, 1997.
22. Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J 326:1-16, 1997.
23. Shon HJ, Kim IR, Kim YH, Kim GC, Kwak HH, Park BS: Apoptotic Effect of Co-treatment with Curcumin and Cisplatin on SCC25 Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line. Intern J Oral Biol 39: 159-167, 2014.