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]I804:24011-200000264938
조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2015년 8월
박사학위논문

FaDu 두경부 암세포에서 바디나물 수용성 추출물의 세포사멸효과

조선대학교 대학원

치의학과

신 승 민

2015년 8월 박사학위논문 FaDu 두경부 암세포에서 바디나물 수용성 추출물의 세포사멸효과 신 승 민

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

FaDu 두경부 암세포에서 바디나물 수용성 추출물의 세포사멸효과

2015년 8월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

신 승 민

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

FaDu 두경부 암세포에서 바디나물 수용성 추출물의 세포사멸효과

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2015년 4월

조선대학교 대학원

치의학과

신 승 민

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

신승민의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 정 재 헌 (인)

위 원 연세대학교 교 수 차 인 호 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 춘 성 (인)

위 원 조선대학교 교 수 오 지 수 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 수 관 (인)

2015년 6월

조선대학교 대학원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT ····· iii

I. 서론 ····· 1

II. 재료 및 방법 ····· 4

Ⅲ. 결과 ····· 8

Ⅳ.고찰 ····· 18

Ⅴ. 결론 ····· 22

참고문헌 ····· 24

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Figure 1. Partitioning scheme of n-hexane, ethyl acetate, n-butyl alcohol and aqueous fraction obtained from the crude methanol extract of *Angelica decursiva* ····· 8

Figure 2. The dose-dependent effect of the n-hexane, ethyl actetate, n-butyl alchohol and aqueous fraction on the growth of FaDu head and neck squamous cell carcinoma ····· 10

Figure 3. Detection of aqueous extract of *Angelica decursiva* by Agilent 1100 series HPLC system ····· 11

Figure 4. Effect of the aqueous fraction extract of *Anglica decursiva* on cell viability in FaDu head and neck squamous cell carcinoma ····· 13

Figure 5. (A) Fragmentation of inter-nucleosomal DNA by the aqueous extract of *Angelica decursiva* treatment in FaDu head and neck squamous cell carcinoma. (B) cell morphology ····· 15

Figure 6. The expression levels of caspase dependent proteins by the aqueous extract of *Angelica decursiva* in FaDu head and neck squamous cell carcinoma ····· 17

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Apoptotic effect of aqueous extract from *Angelica decursiva* in FaDu head and neck squamous cell carcinoma

Shin, Sueng-Min
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. *Angelica decursiva* is a common wild plant that is indigenous to china, Japan and Korea. The roots of *Angelica decursiva Fr. Et Sav (Umbelliferae)* have been frequently used in traditional medicine as anti-inflammatory, antitussive, analgesic agents and expectorant, especially for treating cough, asthma, bronchitis and upper respiratory tract infections. However, it has been unknown the anti-cancer effect of the *Angelica decursiva* in oral cancer cells.

In this study, to explore its anti-cancer effect on FaDu head and neck squamous cell carcinoma, we examined whether aqueous extract of *Angelica decursiva* could inhibite the cell proliferation in FaDu head and neck squamous cell carcinoma. To understand whether its cell

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

death is related with apoptosis pathway, we performed DNA fragmentation, western blot analysis. The aqueous extract of *Anglica decursiva* induced apoptotic cell death in FaDu head and neck squamous cell carcinoma in a does-dependent manner, as determined by MTT assay and DNA fragmentation analysis. The formation of a DNA ladder was observed by treatment of the aqueous extract of *Anglica decursiva*.

In addition, western blot analysis showed that aqueous extract of *Anglica decursiva* decreased the pro-caspase 9, pro-caspase 7 and activated cleaved PARP .

Taken together, these results suggested that the aqueous extract of *Anglica decursiva* induced cell apoptosis in FaDu head and neck squamous cell carcinoma and may have utility as a future anti-cancer therapy.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

I. 서 론

최근 천연물로부터 항암제를 포함한 새로운 약물들의 개발로 의학에 대한 관심이 세계적으로 커지고 있으며, 안전성이 검증된 여러 약용식물 및 식품, 야채, 과일 등과 같은 천연물을 이용하여 의약품 또는 기능성 식품으로 개발하려는 노력이 활발하게 진행되고 있다(1-3). 천연물은 의약으로서 이미 오래전부터 임상적으로 사용되어 왔기 때문에 그 안전성과 효능에 대한 정보가 이미 어느 정도 확보되어 있고, 기존의 의약품 개발에 비해 성공 가능성이 높으며, 개발기간과 비용을 헌신적으로 감축시킬 수 있다는 이점이 있어 이미 선진 국가에서는 고부가가치의 천연물 산업 분야의 연구개발에 역점을 두고 있는 추세이다(4, 5). 그 예로 미국의 경우, 국립 암 연구소에서 카레의 노란 색소 성분인 커큐민, 콩의 이소플라본, 토마토의 라이코펜 등을 암의 예방제로 개발되어 대장암, 유방암, 전립선암에 대한 임상시험을 진행하고 있으며(6), Taxol, Captothecin과 같은 약품들이 개발되어 암의 치료제로서 가능성이 있는 것으로 보고되고 있다(7).

우리나라에서 오래전부터 의약품으로 사용되어져 온 전통 약제 중 하나인 바디나물(*Angelica decursiva*)은 쌍떡잎식물 산형화목 미나리과의 여러해살이풀로 대한약전 외 한약(생약) 규격에 기재된 전호의 기원 식물이다. 바디나물(*Angelica decursiva)*은 일본, 중국 뿐만 아니라 우리나라의 강원도 등 전국 각지의 산과 들에 습기가 많은 곳에서 자라며 가장자리가 깊게 패어 들어간 톱니모양으로 꽃은 짙은 자주색이나 흰색으로 줄기와 잎 사이에 피는데 잎은 향과 맛이 뛰어나 이른 봄에 나물로 쓰이고 뿌리는 오래전부터 전통적인 한방 치료제로 사용되고 있다(8, 9). 바디나물(*Angelica decursiva)*의 성분으로 뿌리에 courmarin 유도체의 decursin, nodakenin이 함유되어 있고, α-pinene, 4-vinylguaiacol, spongesterol, mannitol 등의 정유성분이 함유되어 있다고 보고되고 있다(10). 바디나물

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(*Angelica decursiva)*의 약리작용으로 관상 동맥의 혈류량을 증가시키며, 항궤양 작용, 항경련 작용, 항알레르기 작용, 피부진균 등에 일정한 항균 효과가 있으며 풍열에 의한 두통, 신진대사 촉진, 피로회복, 식욕증진, 근육경련, 호흡곤란, 거담작용, 폐열 및 담열 제거, 발한작용, 각막 혼탁 제거, 진해제, 진통제, 해열제, 혈당감소, 관절염 치료, 계절의 변화에 의해 발생 하는 유행성 바이러스의 치료 등에 효과가 있다고 보고되어 있으나 (11, 12) 항암효과에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

암의 발생은 노령화로 인해 계속해서 증가하고 있으며, 장기별 암 발생 기준으로 7위, 남자 환자 기준에서는 5위를 차지하고 있는 구강암 중 두경부 암은 타액선, 인두, 후두를 포함 하며 상피세포암종(squamous epidermal carcinoma)이 87%로 가장 흔하고 그 밖에 침샘에서 발생하는 선양낭성암(adenoid cystic carcinoma), 점액표피양암(mucoepdermoid carcinoma), 선암(adenocarcinoma) 등이 있다(13). 두경부 암은 다른 암에 비해서 그 발생 기전 등 분자생물학적 접근이 되어 있지 않은 암 중 하나로 원인인자로는 흡연, 음주, 만성자극, 인간 유두종 바이러스 감염, 식습관과 영양결핍, 유전적 감수성이 거론되고 있으며 음주와 흡연을 동시에 할 경우 정상에 비해 1.5 배 높은 발생률을 보이고 있다(14). 치료법으로는 수술적 치료와 항암화학요법, 방사선 치료 등이 있으나 소화기계 합병증, 면역력 저하, 골수기능저하등과 같은 심각한 부작용이 나타나며(15, 16) 다른 부위의 암과는 달리 대부분 육안으로 판별이 가능하며 조기진단이 비교적 다른 암에 비해 용이하여 최근에는 천연 물질이나 합성물질을 사용하여 암의 성장을 제한하는 연구가 많이 되어 있음에도 불구하고 다른 암에 비해 구강암에서의 세포사멸을 유도하는 화학적 요법에 대한 연구가 부족한 실적이기 때문에 구강암 예방에 많은 연구가 필요한 것이 현실이다. 최근에는 지금까지 이용되고 있는 화학요법의 부작용을 줄이기 위한 노력의 일환으로 진통, 이뇨 강장, 거담, 해열 또는 항염 효과가 있다고 알려진 약용식물의 성분을 추출, 정제하여 두경부 암 세포주에 처리하여 항암 활성효과를 확인하는 연구들이 활발히 진행 중이며(17), 기존의

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

화학요법에 사용되어왔던 항암제와 함께 이러한 약용식물을 병용하여 항암활성 효과 증강 및 부작용 억제효과들이 보고되고 있다.

본 연구에서는 여러 가지 자생식물 중에서 오래전부터 여러 가지 약리효과로 인해 민간요법으로 사용하는 약제 중 하나인 바디나물(*Angelic decursiva*)을 메탄올을 이용하여 추출하여 얻은 수용성 추출물로 FaDu 두경부 암세포에서 암세포 성장 억제 효과와 세포성장 억제 기전을 밝히고자 하며, 아울러 단순한 효능의 분석에 그치지 않고 암세포 사멸에 대한 정확한 발생기전을 연구하여 구강암 치료의 효율성을 제시하고자 한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

바디나물(*Angelica decursiva*)을 ㈜동의한방제약에서 구입하여 100% 메탄올로 24시간 추출하였다. 추출 후 용매분획 하여 수용성층을 동결건조시켜 물에 녹여 세포 배양액에 희석하여 사용하였다. pro-caspase-9, -7, PARP (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 actin (abcam)을 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

2. 바디나물 추출물의 제조

바디나물(*Angelica decursiva*) 500 g 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 가루로 만든 후 4 ℓ의 100% 메탄올을 넣어 24시간 동안 추출 하였다. 같은 방법으로 2회 반복 추출 후 여과지로 여과한 뒤 감압 농축하여 50 g을 얻었다. 위에서 얻은 바디나무 추출물 50 g을 400 ㎖의 증류수로 현탁 한 후 동량의 n-hexane, ethyl acetate, n-butyl alcohol 순으로 각각 3회 용매 분획하여 수용성 층을 동결건조 하여 10 g의 수용성 추출물을 얻었다. 수용성 추출물은 다시 증류수에 현탁하여 실험에 사용 하였다. 용매분획 추출방법은 Figure 1에 나타내었다.

3. 세포 배양

두경부 암세포(FaDu, ATCC No, CCL17)는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제(100 ㎍/㎖ penicillin, 100 Unit streptomysin)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 사용 하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 바디나물 수용성 추출물의 High-performance liquid chromatography (HPLC) 분석

바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물 1 g을 증류수 5 ㎖에 녹인 후 0.45 ㎛ syringe filter로 filter하여 분석에 사용하였다. 분석시스템은 Agilent 1100 series HPLC system(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 CAPCELL PAK C18 AQ[10 mmI.D. x 250 mm(SHISEIDO Inc, Tokyo, Japan)] 컬럼을 사용하였다. HPLC 이동상 용매로 solvent A는 water, solvent B는 100% methanol을 사용하였고, 이동상의 조건은 2.5 ㎖/min의 유속으로 0-20 min까지 5%, 50 min까지 50%, 55 min까지 95%, 65 min까지 5% methanol 조건으로 총 65 min동안 분석을 수행하였다. HPLC에 분리된 성분은 210 nm, 230 nm, 254 nm, 280 nm의 UV detector에서 검출하였다.

5. MTT assay

바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물에 대한 FaDu 두경부 암세포의 생존율을 조사하기 위하여 12 well culture plate에 3×10^5 cells/well 세포를 seeding 하고 12시간 후에 바디나물(*Angelica decursiva)*로 부터 용매 분획(n-hexane, ethyl acetate, n-butyl alcohol)하여 얻은 추출물과 수용성 추출물을 다양한 농도로 (10 ㎎/㎖, µg, 20 ㎎/㎖, 30 ㎎/㎖, 40 ㎎/㎖, 50 ㎎/㎖) 1 ㎕씩 각각 처리하였다. 24시간 후 처리한 12 well plate에 있는 배양액을 제거 한 후 950 ㎕ DMEM 배양액과 50 ㎕의 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2 (MTT) 용액을 첨가하였다. MTT용액이 첨가된 12 well plate를 37℃의 5% CO_2 배양기에서 4시간 반응시켰다. 배양액을 제거하고 DMSO 1 ㎖ 첨가하여 녹인 후 96 well culture plate에 100 ㎕를 분주 하고 phosphate buffer saline을 100 ㎕를 희석하여 Microplate Autoreader ELISA (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 570 ㎚에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 확인하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. DNA fragmentation assay

DNA 분절 현상을 조사하기 위해 3×10^5 FaDu 두경부 암세포를 12 well plate에 배양하여 12시간 후 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물을 다양한 농도로 (10 ㎎/㎖, 20 ㎎/㎖, 30 ㎎/㎖, 40 ㎎/㎖, 50 ㎎/㎖) 1 ㎕씩 각각 처리하여 24시간 후 1500 rpm으로 5분 동안 원심분리 하여 세포를 수집 하였다. 수집된 세포를 500 ㎕ lysis buffer로 용해시켜 57℃ incubator에 1 시간 동안 반응 시킨 후 12,000 rpm으로 5 분 동안 원심분리 하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 동량의 phenol:chloroform: isoamylalchol(25:24:1) solution을 넣고 상온에서 5 분 동안 반응 한 뒤 원심분리 하여 genomic DNA을 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 2배의 100% ethanol과 1/10의 3M sodium acetate를 넣어 -20℃에서 1시간 반응 한 뒤 원심분리 하여 genomic DNA를 농축시켰다. Genomic DNA를 70% ethanol로 1회 wash한 후 원심분리 하여 genomic DNA에 3차 증류수로 용해시켜 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel을 이용하여 100 voltage에서 1시간 전기영동 하여 UV transilluminator (Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 genomic DNA 분절을 관찰하였다.

7. Western blot analysis

3×10^5 FaDu 두경부 암세포를 12 well plate 에 배양 후 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물을 다양한 농도로(10 ㎎/㎖, 20 ㎎/㎖, 30 ㎎/㎖, 40 ㎎/㎖, 50 ㎎/㎖) 1㎕씩 각각 처리하여 24시간 후 1500 rpm으로 5 분 동안 원심분리 하여 세포를 수집 한 후 phosphate buffer saline로 두 번 세척하고, protein lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리한 후 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockgord, IL, USA)을 이용하여 정량하였다. 20 ㎍ 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 loading 한 후 150 voltage에서 1 시간 동안 전기영동 하였다. Gel 상에서 분리 된 단백질은 western blot analysis을 수행하기 위해 polyvinylidene fluoride (PVDF)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

membrane 에 transfer 한 후, blocking solution (5% BSA in TBS containing 0.1% Tween-20)을 이용하여 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체 pro-caspase-7, -9, PARP (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)과 actin (Abcam, Inc)을 TBST (TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 1:1000 비율로 희석한 후 4℃ 에서 16시간 동안 반응하였다. TBST (TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 세 번 세척 후 2차 항체 anti-rabbit (Amersham Biociences, UK)는 TBST (TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 1:1,000 비율로 희석하여 1시간 반응 후 ECL kit (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 western blot analysis를 수행하였다

8. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean ± SEM으로 나타내었고, 각 실험 군 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.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ. 결 과

1. 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물 추출 과정

바디나물(*Angelica decursiva*) 500 g을 분쇄하여 가루로 만든 후 4 ℓ의 100% 메탄올을 넣어 24시간 동안 추출 하였다. 같은 방법으로 2회 반복 추출 후 여과지로 여과한 뒤 감압 농축하여 50 g을 얻었다. 위에서 얻은 바디나무 추출물 50 g을 400 ml의 증류수로 현탁 한 후 동량의 n-hexane, ethyl acetate, n-butyl alcohol 순으로 각각 3회 용매 분획하여 수용성 층을 동결건조 하여 10 g의 수용성 추출물을 얻었다(Fig 1).

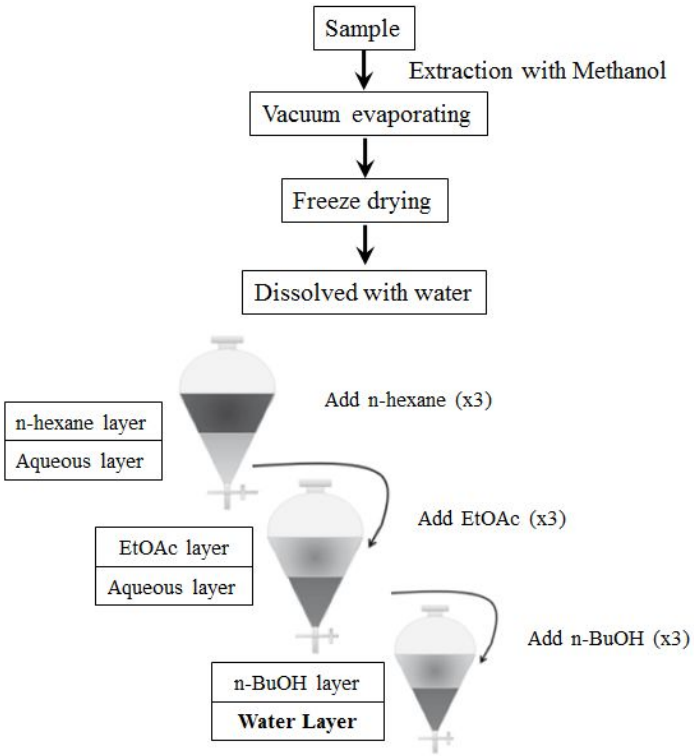

Figure 1. Partitioning scheme of n-hexane, ethyl acetate, n-butyl alcohol and aqueous fraction obtained from the crude methanol extract of *Angelica decursiva*.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 바디나물(*Angelica decursiva*) 용매 분획별 추출물이 FaDu 세포 성장 억제에 미치는 효과

FaDu 두경부 암세포에 바디나물 (*Angelicus decusiva*) 메탄올 추출물로부터 n-hexane, ethyl acetate, n-butyl alcohol을 이용하여 용매 분획한 추출물과 분획 후 수용성 추출물에서의 세포성장 억제 효과를 확인하기 위해 추출물을 다양한 농도 (10 ㎎/㎖, 20 ㎎/㎖, 30 ㎎/㎖, 40 ㎎/㎖, 50 ㎎/㎖)를 각각 1 ㎕씩 처리하여 24시간 후 MTT assay 을 수행하였다. 그 결과 n-hexane, ethyl acetate, n-butyl alcohol 용매 분획 추출물에서 세포성장이 10 ㎎/㎖ 처리한 well에서부터 세포성장이 50% 이하로 감소됨을 확인 할 수 있었으며, 수용성 추출물에서도 농도 의존적으로 세포성장이 감소됨을 확인하였다. n-hexane 용매 분획 추출물에서 세포성장이 가장 많이 감소되었고, 그 다음 ethyl acetate, n-butyl alcohol 용매 분획 추출물 그리고 수용성 추출물 순으로 세포성장 억제 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 2).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

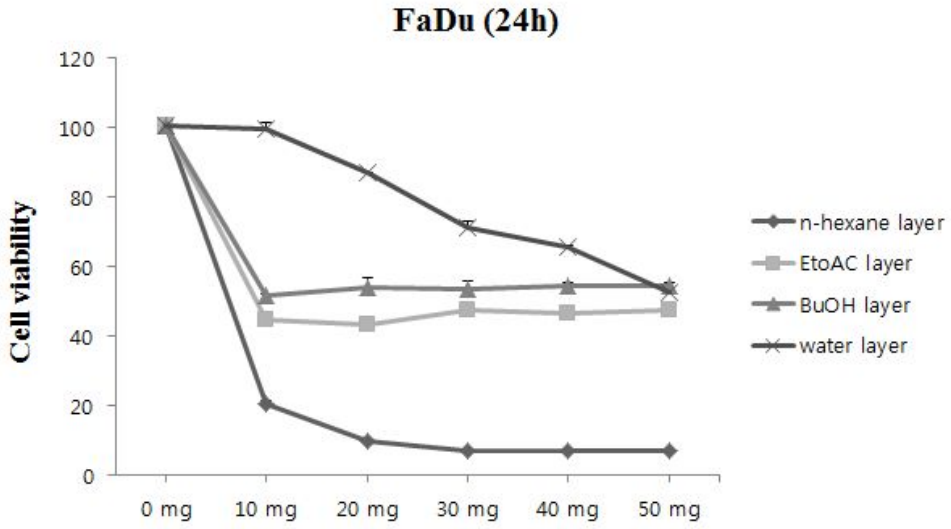

Figure 2. The dose-dependent effect of the n-hexane, ethyl actetate, n-butyl alchohol and aqueous fraction on the growth of FaDu head and neck squamous cell carcinoma. Cells were treated with various concentration of FaDu head and neck squamous cell carcinoma. Cells viabilities were determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ration of 570 nm. Results were expressed as percent of the control.

3. 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물을 HPLC 분획

바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물 200 ㎎/㎖을 water와 methanol 두가지 이동상 용매를 이용하여 2.5 ㎖/min의 유속으로 65 min 분석한 결과 210 nm, 230 nm, 254 nm, 280 nm의 UV에서 다양한 성분의 peak가 확인되었다(Fig 3).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

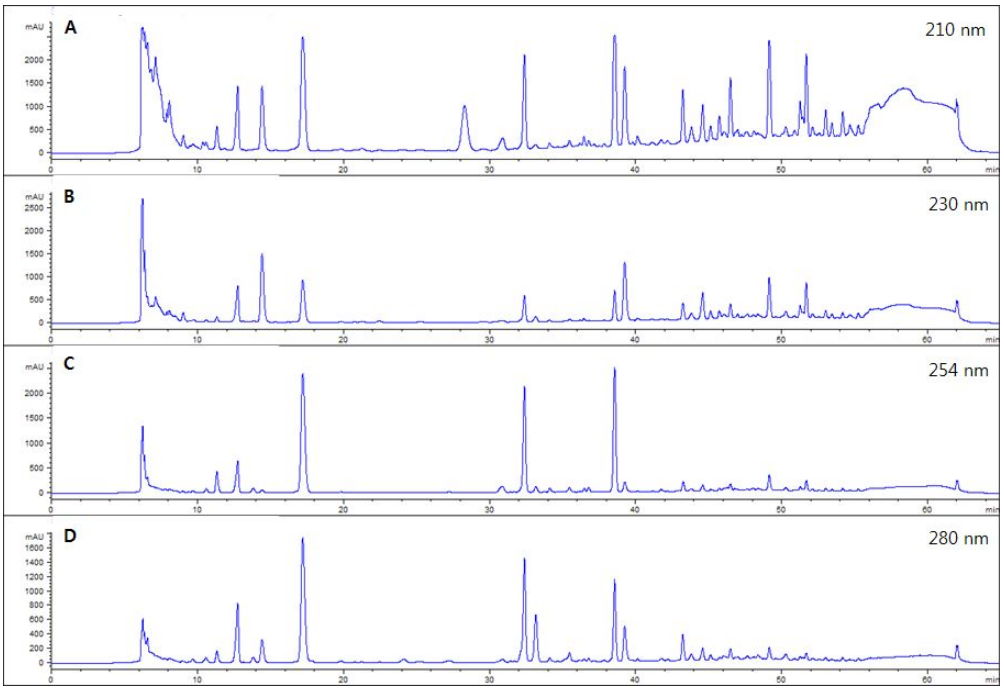

Figure 3. Detection of aqueous extract of *Angelica decursiva* by Agilent 1100 series HPLC system. The agilent HPLC chromatogram of the aqueous extract of *Angelica decursiva* was detected at 210 nm(A), 230 nm(B), 254 nm(C), 280 nm(D). Separation of the aqueous extract was achieved at 45°C on a CAPCELL PAK C18 AQ column with dimensions 10 mm. x 250 mm using a one step linear gradient and flow rate of 2.5 ml/min. Mobile phase A (water) and B (100% Methanol) ratio where changed run time was 65minutes.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물이 FaDu 세포 성장 억제에 미치는 효과

FaDu 두경부 암세포에 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물에 의한 IC_{50} 및 세포성장 억제 효과를 조사하기 위해 수용성 추출물을 다양한 농도 (10 ㎎/㎖, 20 ㎎/㎖, 30 ㎎/㎖, 40 ㎎/㎖, 50 ㎎/㎖)를 각각 1 ㎕씩 처리하여 24시간 후 MTT assay 을 수행하였다. 그 결과 FaDu 두경부 암세포에서 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물이 농도의존적으로 세포성장을 감소함을 확인하였으며 50 ㎎/㎖ 농도에서 1 ㎕처리한 세포에서 약 50% 정도 세포성장이 감소함을 확인 한 결과 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물의 IC_{50} 반수치사량이 50 ㎎/㎖임을 확인하였다(Fig 4).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

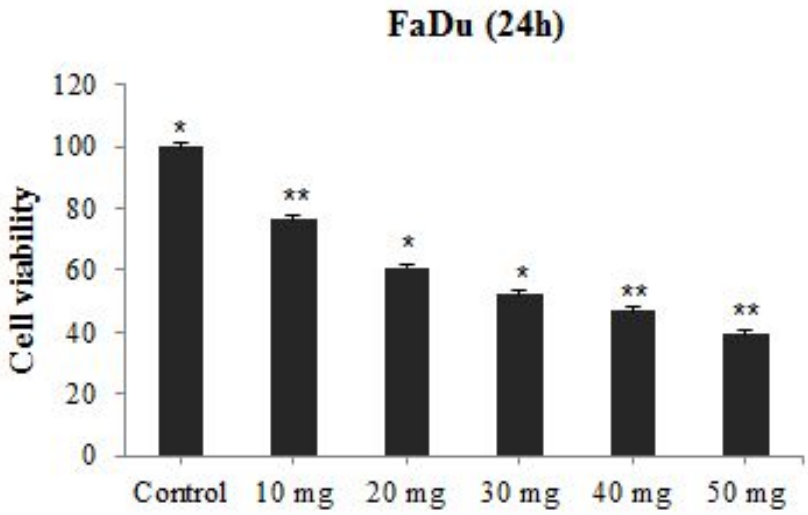

Figure 4. Effect of the aqueous fraction extract of *Anglica decursiva* on cell viability in FaDu head and neck squamous cell carcinoma. Cells were treated with various concentration of the aqueous extract of *Angelica decursiva* in FaDu head and neck squamous cell carcinoma. Cells viabilities were determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ration of 570 nm. Results were expressed as percent of the control. Each data point represents the mean±SEM for three experiments. *P < 0.05, **P < 0.01 as determined by the Student's t-test compared to the control.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물에 의한 FaDu 두경부 암세포 genomic DNA의 분절화 및 세포변화

바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물에 의한 FaDu 두경부 암세포의 세포성장 억제 기전인 apoptosis의 형태학적 변화 DNA fragmentation 및 세포 형태 변화를 확인하기 위해 다양한 농도 (10 ㎎/㎖, 20 ㎎/㎖, 30 ㎎/㎖, 40 ㎎/㎖, 50 ㎎/㎖)를 각각1 ㎕씩 처리하여 24시간 동안 배양 한 후 세포를 수집하여 genomid DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과, 수용성 추출물을 처리하지 않은 대조군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, 수용성 추출물을 10 ㎎/㎖ 처리 한 것에서 부터 50 ㎎/㎖까지 처리한 것에서 DNA fragmentation 현상을 확인 할 수 있었으며(Fig 5A), 농도 의존적으로 세포의 형태가 변화함을 육안으로 확인할 수 있었다(Fig 5B).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

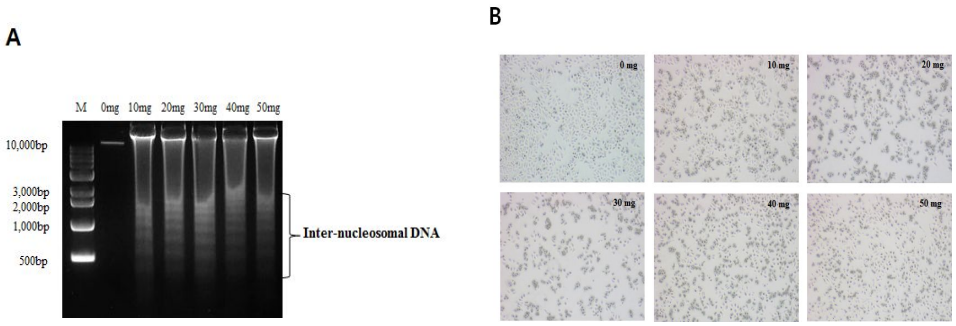

Figure 5. (A) Fragmentation of inter-nucleosomal DNA by the aqueous extract of *Angelica decursiva* treatment in FaDu head and neck squamous cell carcinoma. (B) cell morphology. Fragmentation of internucleosomal DNA and cell morphology by aqueous extract in FaDu head and neck squamous cell carcinoma. The cells were treated with various concentration of the aqueous extract of *Angelica decursiva* for 24h and nuclear DNA was subjected to agarose gel electro-phoresis.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물이 capase의존성에 의한 FaDu 세포 사멸 유도

바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물이 FaDu 두경부 암세포의 성장억제를 일으키는 분자적 기전을 확인하기 위하여 세포사멸에 중요한 인자로 알려져 있는 caspase의 활성화를 확인 하였다. Caspase-9, caspase-7 및 PARP는 세포 apoptosis의 지표가 되므로 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물을 24시간 처리한 FaDu 두경부 암세포에서 procaspase-7 및 procaspase-9의 발현분석을 위해 western blot을 시행하였으며, 농도 의존적으로 procaspase-7, procaspase-9의 단백질 가수분해 되는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 caspase 활성화가 유도됨으로서 PARP의 절단이 일어나 세포가 사멸되는 것을 알 수 있었다(Fig 6).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

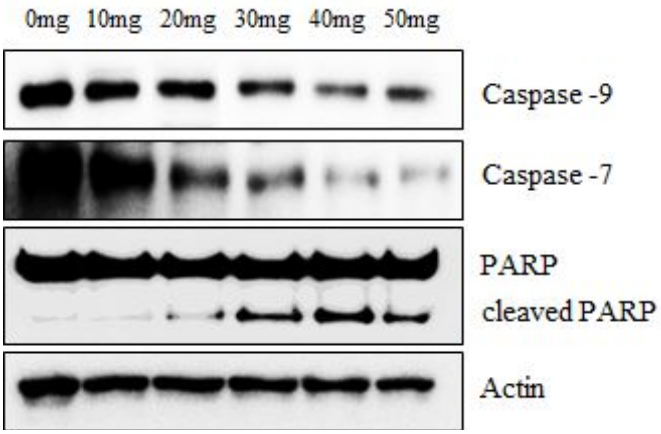

Figure 6. The expression levels of caspase dependent proteins by the aqueous extract of *Angelica decursiva* in FaDu head and neck squamous cell carcinoma. Cells were seeded at 3×10^5 and then treated with various concentration of the aqueous extract of *Angelica decursiva* for 24 h. Caspase-9, -7 and PARP, cleaved PAPR were determined by western blot analysis. Whole lysates were seperated by 12% SDS-PAGE. The amount of protein normalized by a comparison with the actin levels.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 고 찰

최근, 각종 질병과 암의 예방 및 치료용 물질을 천연물에서 찾고자 하는 노력이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 있는 가운데 우리 주변에서 자생하는 천연물로부터 다양한 생리활성 효과와 항암제를 포함한 약물들의 개발로 동양의학에 대한 관심이 세계적으로 커지고 이에 따른 연구가 활발히 진행되고 있으며(1-5) 기초적인 효능 연구에 집중되고 있다. 그 중 화학요법제는 암세포에서 다양한 세포성장 억제 효과 및 세포사멸 기전을 통해 암세포 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다(19, 20). 암 세포 성장 억제 기전은 세포의 종류와 자극의 종류에 따라 중요한 역할을 담담하고 있으나 기존에 천연항암제 및 합성항암제의 단점으로 알려진 암세포의 내성 발현과 환자에 대한 부작용을 극복하기 위해 많은 실험을 수행하고 있다. 그러나 이러한 천연물을 기원으로 하는 추출물 중에서도 일부 식물의 경우 낮은 효율과 약물의 세포독성 때문에 개발이 제한되고 있다(21, 22). 그러나 차후 연구방법은 최소한의 부작용으로 암세포를 사멸시킬 수 있으며 단순한 효능의 분석에 그치지 않고 정확한 기전 연구를 바탕으로 한 임상 적용 및 시장 유통이 될 수 있는 산업적 적용이 가능한 연구가 필요하다. 두경부 암의 90% 이상이 상피세포 암이며, 발생기전은 신체의 다른 부위에서 발생되는 상피세포암 과 유사하나 정확하게 암 발생기전이 알려져 있지 않다(23). 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 면역요법으로 interferon, interleukin 등이 보고되고 있으나 비싼 비용과 그 에 따른 결과도 만족스럽지 못해 구강암에는 이용되지 못하고 있다.

바디나물(*Angelica decursiva*)는 오래전부터 우리나라에서 전통 민간

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

요법제로 사용되어 왔으며(9,10) 항궤양 작용, 항경련 작용, 항알레르기 작용, 항균 효과 및 진해제, 진통제, 해열제 등에 여러 약리작용으로 질병에 효과가 있다고 보고되어 있으나(11,12) 항암효과에 대해서는 알려진 것이 전혀 없다. 따라서 본 연구에서는 국내에 자생하고 있는 바디나물(*Angelica decursiva*)을 FaDu 두경부 암세포에 처리하여 세포성장 억제와 세포 사멸에 의한 항암효과 및 분자적 기전을 밝히고자 연구하였다. 기존에 실험에 사용된 바디나물 추출물은 다양한 용매로부터 분획하여 정제 한 용매 추출물을 사용 하였으나(24), 본 연구에서는 기존의 방법인 용매 분획으로부터 분획 한 후 수용성 추출물을 사용하여 이에 따른 세포성장 억제효과 및 세포성장 억제기전을 밝혔다(Fig 1). 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물의 세포성장 억제효과를 조사하기 위하여 용매 분획 추출과정을 거쳐 얻은 수용성 추출물을 FaDu 두경부 암세포에 처리 후 MTT assay 기법을 이용하여 세포성장 억제효과를 확인하였다. 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물은 농도 의존적으로 FaDu 두경부 암세포의 성장을 억제시켰으며, 50 ㎎/㎖에서 세포의 성장을 약 50% 정도 억제시키는 효과를 보였다(Fig 4). 이는 농도 의존적으로 암세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 추출물에서의 연구결과와 일치하는 것으로(25, 26) 더욱이 다른 추출물과 비교 하였을 때 용매 추출물이 아닌 수용성 추출물로 FaDu 두경부 암세포의 성장을 억제 하였다는 점에서 특이적인 효과를 가지고 있다는 것으로 시사할 수 있다. Apoptosis는 세포성장과 사멸 사이에 있어 항성성을 유지시켜주는 중요한 역할을 하며(27), 암세포에서 천연물을 이용한 apoptosis의 유도는 항암제 개발에 가장 유용한 전략이며 많은 연구에서 천연물을 이용한 암세포의 apoptosis를 유도하는 연구를 시행 하고 있다. 본 연구에서도 바디 나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물에 의한 FaDu 두경부 암세포의 성장억제 효과가 apoptosis에 의한 것인지 알아보기 위해 먼저 DNA 분절을 확인하였다. DNA 분절 현상은 세포사멸의 대표적 현상으로 Ca_2+ 의존성 endonuclease가 활성화 되어 chromatin의 linker DNA가 절단되어

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

nucleosomal DNA 분절을 이루게 된다. 이러한 현상을 agarose gel에서 ladder 형태로 관찰할 수 있다(28). 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물을 FaDu 두경부 암세포에 처리하지 않은 군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, 10 ㎎/㎖에서부터 50 ㎎/㎖을 처리한 군에서는 DNA fragmentation 현상을 뚜렷한 ladder로 관찰 할 수 있었다(Fig 5A). 이는 암세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 추출물들이 DNA fragmentation을 유도하는 apoptosis 과정에 의해 암세포 사멸 기전과 일치하는 것으로서(25, 26, 29), 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물에 의해 유도되는 FaDu 두경부 암세포 성장 억제 과정도 apoptosis 기전이 포함되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해서 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물의 FaDu 두경부 암세포 성장 억제가 전형적인 apoptosis의 사포사멸에 의한 결과임을 확인하기 위해 apoptosis의 분자적 기전인 caspase라 불리는 세포내 cysteine protease들의 활성을 western blot analysis를 수행하여 확인하였다. caspase는 다양한 자극에 의해 유도된 apoptosis를 개시하고 실행하는데 중요한 역할을 하며 caspase 중에 caspase-3, caspas-7 및 caspase-9 등이 apoptosis에 의한 세포사멸의 effector caspase로 알려져 있다. 본 연구에서 proenzyme들의 발현을 확인하기 위해 wstern blot analysis를 수행한 결과, 바디나물 수용성 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적으로 procaspase-7, procaspase-9 proteolytic cleavage 현상을 확인 할 수 있었다. 더욱이 미토콘드리아 의존성 caspase 기작에 의해 최종적으로 PARP가 절단되어 FaDu 세포 성장이 억제됨을 확인하였다(Fig 6). 위와 같은 결과를 토대로 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물을 FaDu 두경부 암세포에 처리하면 apoptosis의 특징적 경로중 하나로 알려져 있는 미토콘드리아 caspase family 의존성에 의해 세포성장 억제 및 세포사멸 과정을 유도하는 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구에서는 기존의 알려져 있는 천연물에서 유래된 천연 항암제 및 합성 항암제의 단점으로 알려진 암세포의 내성 발현과 부작

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

용을 극복하기 위해 여러 가지 항암제 보다 특이적으로 수용성 추출물이라는 점에서 약물의 세포 독성을 감소시키고 항암 효과는 증대시키는 항암 물질을 개발하기 위해 국내 자생하는 바디나물(*Angelica decursiva*)수용성 추출물을 이용하여 FaDu 두경부 암세포에 적용하여 연구하였다. 그 결과 FaDu 두경부 암세포에 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 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.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅴ. 결 론

바디나물(*Angelica decursiva*)의 성분으로는 courmarin 유도체의 decursin, nodakenin이 함유되어 있으며, 오래전부터 의약품으로 사용되어져 온 전통 약제 중 하나로서 민간요법으로 진해제, 진통제, 해열제 또는 감기약 등으로 사용되어져 왔다(8-12). 그러나 현재 암세포에 대한 세포성장 억제에 대한 항암효과에 대한 연구는 미흡한 상태이다. 본 연구에서 FaDu 두경부 암세포를 이용하여 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물의 세포 성장 억제에 미치는 효과와 세포사멸에 대한 분자적 기전을 규명하고자 용매 분획 과정을 거쳐 수용성 추출물을 획득하고, 이를 HPLC를 통해 성분 분획을 확인하고, MTT assay, DNA fragmentation, western blot을 수행 한 결과 다음과 같은 결과를 확인 하였다.

Ⅰ. 바디나물(*Angelica decursiva*) 메탄올 추출물을 n-hexane, ethyl acetate, n-butyl alcohol 을 이용하여 용매 분획 한 것의 추출물과 수용성 추출물을 다양한 농도로 FaDu 두경부 암세포에 처리하였을 때 용매 분획 추출물 10 ㎎/㎖에서 FaDu 세포의 성장을 50% 이하로 억제 시켰으며 수용성 추출물에서는 농도 의존적으로 세포 성장이 감소됨을 확인 하였다.

Ⅱ. 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물 내에 성분을 agilent HPLC chromatogram을 이용하여 확인 하였으며, 수용성 추출물을 50 ㎎/㎖ 처리한 FaDu 두경부 암세포에서 성장을 50% 억제함을 확인 하였다.

Ⅲ. 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물을 FaDu 두경부 암세포의 핵에 존재하는 genomic DNA를 분절화 시킴으로서 세포사멸을 유도하였으며 세포 내 미토콘드리아 외막에 존재하는 apoptosis 개시 단백질의 활성화를 통하여 caspase-9, -7의 활성화를 유도하고 PARP의 절단에 의해 세포사멸이 유도됨을 확인하였으며 이러한 결과는 미토콘드리아 의

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

존성 caspase 신호전달과정에 의한 분자적 기전이 일어남을 확인하였다.

위의 결과로 토대로 바디나물(*Angelica decursiva*) 수용성 추출물을 이용하여 FaDu 두경부 암세포 성장억제에 대한 분자적 기전을 확인 하였고, 더 나아가 구강암세포에 항암활성을 갖는 단일 및 복합성분을 분리하고 동물실험을 이용하여 기존에 알려져 있는 구강암 치료제 비하여 수용성 추출물이라는 특이성을 가지고 약물의 세포 독성을 감소시키고 항암효과를 증대시키는 새로운 천연 항암제 개발에 대한 기초 연구에 중요한 초석이 될 것으로 사료된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

1. Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC: Advances in cancer therapy with plant based natural products. Curr. Med. Chem 8:1467-1486, 2001.

2. Pezutto JM: Plant-derived anticancer agents Bioche. Pharmacol 53:121-133, 1997.

3. Van poppel G, Van den Berg H: Vitamins and cancer. Cancer Lett 114:195-202,1997.

4. 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 scrozonerifolium in A549 human lung cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Lett 222:183-93, 2005.

5. 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 grandiforum in human lung carcinama cells. Pharmacol Res 51:437-43, 2005.

6. Park SY, Lee SH, Park OJ, Kim YM: Apoptotic effects of curcumin and EGCG via Akt-p53 signaling pathway in HCT116 colon cancer cells. Journal of life science 21:89-95, 2011.

7. Tan ML, Suaiman SF, Najimuddin N, Smian MR, Tengku Muhammad TS: Methanolic extract of Pereskia bleo (Kunth) DC.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinama, T47-D cell line. J Ethnopharmacol 96:287-94, 2005.

8. Park WS, Lee CH: Study on biophoton emission from roots of *Angelica sinensin D., Angelica acutioba K., and Angelica pubescens M.* Kor. J. Herbology 22(3):39-45, 2007.

9. Lim HR, Shin SW: Study on the essential oils from the roots of *Angelica decursiva* and *Peucedanum praeruptorum.* Kor. J. Phamacogn 43(4):291-96, 2012.

10. Yook CS: A study on coumarins of Angelica decursiva. Kor. J. Pharmacogn 6(3):149-150, 1975.

11. Rao MR, Liu WB, Liu PQ: Effects of praeruptorin C on vascular hypertrophy, [Ca2+]i, collagen content and NO in renovascular and spontaneously hypertensive rats. *Yao Xue Xue Bao* 36(3):165-9, 2001.

12. Ji Y, Rao MR: Effects of Peucedanum praeruptorum extractum on blood pressure, left ventricular hypertrophy and hemodynamic changes in left ventricular hypertrophied hypertensive rats. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 16(11):676-8, 1996.

13. Schliephake H: Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer-a review. Int J Oral Maxillofac Surg 32:233-245, 2003.

14. Hopper C, Kübler A, Lewis H, Tan I.B, Putnam G: mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

carcinoma. Int J Cancer 111:138-146, 2004.

15. Yamachika E, Habte T, Oda D: Artemisinin: an alternative treatment for oral squamous cell carcinoma. Anticancer Res 24:2153-2160, 2004.

16. Capuani S, Gili T, Bozzali M, Russo S, Porcari P, Cametti C, D'Amore E, Colasanti M, Venturini G, Maraviglia B, Lazzarino G, Pastore FS: L-DOPA preloading increases the uptake of borophenylalanine in C6 glioma rat model : A new strategy to improve BNCT efficacy. Int J Radiat Oncol 72:562-7, 2008.

17. 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.

19. Hoshino T, Hara A, Inoue M, Honda J, Imai Y, Oizumi K, Yokoyama MM: Flowcytometric measurement of NK cell cytotoxicity. J Clin Lab Immunol 36:39-43, 1991.

20. 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 13:181-6, 2006.

21. Yang MS, Ha YL, Nam SH, Choi SU, Jang DS: Screening of domestic plants with antibacterial actibity. Agric. Chem. Biotechnology

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

38:584-589, 1995.

22. Lee CH, Lee HK, Park KK, Park CH, Lee BY, Sung RS, Lee SH: Use of Resources a Plant for Biotechnology Industry development. Research Center for Bioresource and Health at Chungbuk National University, 2002.

23. Bodin I, Jäghagen EL, Isberg A: Intraoral sensation before and after radiotherapy and surgery for and pharynegal cancer. Head and Neck 26:923-929, 2004.

24. Lee SY, kim CS, Cho SH, Chun HS, Kim JK, Kim DK: The effects of *Angelica decursiva* extract in the inhibition of cell proliferation and in the induction of apoptosis in osteogenic sarcoma cells. Journal of Medicinal Plants Research 3(4):241-45, 2009.

25. 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 44:1978-88, 2006.

26. 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 31:129-39, 2007.

27. Kaufmann SH, Hengartner MO: Programmed cell death : aliveand well in the new millennium. Trends Cell Biol 11:526-34, 2001.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

28. Hyun JH, Kim E, Kang JI, Kim SC, Yoo ES, Kang HK: Apoptosis Induction of HL-60 Keukemia cells by extract of Crinum asiaticum. J. Pharm. Soc. Korea 52:1-6, 2008.

29. 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 110:148-53, 2007.