





2016년 2월

박사학위논문

이중이시 누니마우신 중양 모델을 이용한 전호 수용성 추출물의 항양력과 분자

박

보

람

[UCI]I804:24011-200000265449

2016년 2월 박사학위논문

# 이종이식 누드마우스 종양 모델을 이용한 전호 수용성 추출물의 항암효과 분석

조선대학교 대학원

치의학과

박 보 람



# 이종이식 누드마우스 종양 모델을 이용한 전호 수용성 추출물의 항암효과 분석

Analysis of anti-cancer effects of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer on subcutaneous xenograft nude mouse tumor model

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

박 보 람

Collection @ chosun



# 이종이식 누드마우스 종양 모델을 이용한 전호 수용성 추출물의 항암효과 분석

# 지도교수 김 춘 성

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2015년 10월

조선대학교 대학원

치의학과

박 보 람





박보람의 박사학위 논문을 인준함



2015년 12월

조선대학교 대학원





# 목 차

ABSTRACT
I. 서 론1
II. 실험재료 및 방법
1. 실험재료 및 시약
2. 전호 수용성 추출물(ASAL) 분리
3. High-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 전호 수용성
추출물(ASAL)의 분석
4. 세포배양
5. 세포독성 시험
6. 세포사멸 관련 단백질 발현 변화
7. 세포사멸의 형태학적 변화
8. 이종이식 누드마우스 종양 모델을 이용한 종양 억제 효과 13
9. 간이독성 평가
10. 통계학적 검정
Ⅲ. 실험결과
1. 전호 수용성 추출물(ASAL)의 HPLC 분석15
2. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 초대 연골세포의 세포 독성 평가
3. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB, FaDu 구강암 세포주의 세포성장
억제 효과

- i -





4.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB, FaDu 구강암 세포주의 핵 내
	DNA 분절화
5.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB, FaDu 구강암 세포주의 세포사멸
	단백질 발현
6.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB 이종이식 누드마우스 종양
	모델의 종양성장 억제 효과
7.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB 이종이식 누드마우스 종양 모델
	조직의 세포사멸 단백질 발현
8.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB, FaDu 구강암 세포주의 세포사멸
	관련 분자적 기전
9.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 폐암 세포주의 세포성장 억제
	효과
10.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 폐암 세포주의 핵 내 DNA
	분절화
11.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 폐암 세포주의 세포사멸
	단백질 발현 43
12.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 이종이식 누드마우스 종양
	모델의 종양성장 억제 효과
13.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 이종이식 누드마우스 종양
	모델 조직의 세포사멸 단백질 발현
14.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 폐암 세포주의 세포사멸 관련
	분자적 기전 54
15.	전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 누드마우스의 혈액학적, 생·화학적
	검사 59

- ii -





IV. 총괄 및 고안	62
V.결론	66
참고문헌	68







# 표목차

- Table 1. Instrument and operating condition for high-performance liquidchromatography (HPLC) analysis8
- Table 2. Inhibitory effects of Anthriscus sylvestrisHoffmann aqueouslayer (ASAL) on the tumor growth of KB subcutaneousxenograft nude mouse tumor model30
- Table 3. Inhibitory effects of Anthriscus sylvestrisHoffmann aqueouslayer (ASAL) on the tumor growth of A549 subcutaneousxenograft nude mouse tumor model50
- Table 4. Hematology values of nude mouse treated orally withAnthriscus sylvestrisHoffmann aqueous layer (ASAL) for 28days60
- Table 5. Serum biochemistry values of nude mouse treated orally withAnthriscus sylvestrisHoffmann aqueous layer (ASAL) for 28days61

- iv -





## 도목차

- Fig. 1. Isolation and partition from the *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) ---------6

- v -





- vi -

Collection @ chosun



- Fig. 15. Phosphorylation of p53 by treatment of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) in A549 lung cancer cells ...... 55







## ABSTRACT

Analysis of anti-cancer effects of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer on subcutaneous xenograft nude mouse tumor model

> Bo – Ram Park Advisor : Prof. Chun Sung Kim, ph. D. Department of Dentistry, Graduate School of Chosun University

**Objective**: The anti-cancer effect of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) investigated by subcutaneous injection of KB human oral cancer cell and A549 human lung cancer cell of xenograft nude mouse models.

**Materials and Methods** : Cell viability and cytotoxicity effects were evaluated by MTT assay after ASAL treatment for 24 h. For western blot analysis, primary antibodies such as phospho-p53 (Ser 15), phospho-ERK 1/2, EGFR, phospho-EGFR (Tyr 992), phospho-EGFR (Tyr 1045), phospho-EGFR (Tyr 1068), Bcl-2, cleaved caspase-3, cleaved caspase-7, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9 and poly ADP ribose polymerase (PARP) were used *in vitro* and *in vivo*. KB oral cancer cells and A549 lung cancer cells cultured and subcutaneous injected them to nude mouse. ASAL was administrated to xenograft nude mouse tumor model orally every day. It has been raised and treated up to 17 days and 30 days. Their body weight, tumor weight and tumor volumes were measured every other day a week.

- viii -

Collection @ chosun



Hematology and serum biochemistry were performed for the safety assessment of ASAL in *vivo*.

**Results**: ASAL significantly inhibited cell growth in KB, FaDu oral cancer cell lines and A549 lung cancer cells in dose-dependent manners without toxicity in NIH/3T3 fibroblast and primary rat chondrocyte cells. ASAL-treatment cells showed inhibition of ERK 1/2 phosphorylation in the KB and FaDu oral cancer cell lines. It also significantly inhibited EGFR phosporylation (Tyr 1068) in the A549 lung cancer cells. Moreover, ASAL inhibited protein expression level of anti-apoptotic factor Bcl-2. In contrast, activated cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 and poly ADP ribose polymerase (PARP) in the KB and A549 cells. KB subcutaneous xenograft nude mouse tumor models (ASAL; 400 mg/kg) and A549 subcutaneous xenograft nude mouse tumor models (ASAL; 80 mg/kg, ASAL ; 200 mg/kg) ASAL treatment groups of were suppressed 40%, 45.6% and 59.4% tumor inhibition rate compared to non-treatment group, respectively. In addition, tumor tissues of ASAL treatment groups, poly ADP ribose polymerase (PARP) cleavage was significantly increased compared to non-treatment groups. No significant differences in body weight, hematology and serum biochemistry between control and ASAL (500 mg/kg) group were found.

**Conclusion**: These results indicated that ASAL may be suppress of cell proliferation and subcutaneous xenograft nude mouse tumor growth by inducing the intrinsic and extrinsic apoptotic pathway. Furthermore, it can be a basis development of water soluble anti-cancer drug.

**Key Words** : *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL), KB, A549, Anti-cancer effect, Subcutaneous xenograft nude mouse tumor models.

- ix -



CHOSUN UNIVERSITY

I. 서 론

천연물은 자연계에서 얻어지는 식물, 동물, 광물 및 미생물과 이들의 대사산물을 포함하는 매우 넓은 의미의 개념으로서, 오랫동안 축적된 한방에 관한 지식이나 민간 에서 사용한 천연물 관련 지식을 기반으로 식량자원 뿐만 아니라 약용자원으로서의 역할을 해왔다(1). 또한 천연물은 의약용 소재로 사용한 역사가 오래되어 풍부한 임상적 경험을 가지고 있고, 부작용이 적어 오늘날 사용하고 있는 의약물의 약 50% 정도가 천연물에서 유래된 것으로 알려져 있다(2, 3).

천연물은 그 자체의 생합성 및 대사과정을 거쳐 생성되는 탄수화물, 지방, 단백질 등의 1차 대사산물과 이로부터 생합성 되는 2차 대사산물인 플라보노이드(flavonoid), 알칼로이드(alkaloid). 커큐민(curcumin) 및 리그난(lignan) 등의 많은 성분을 포함하고 있으며, 이러한 성분은 다양한 활성 효능이 있는 것으로 보고되고 있다(4-6). 식물의 잎과 줄기 및 과일 등에 수용성 배당체로 존재하는 플라보노이드는 항산화, 항염증, 면역촉진, 항바이러스 등에 효능이 있는 것으로 보고되고 있으며(7-9), 플라보노이드의 대표적인 퀘르세틴(quercetin)은 HepG2 간암세포에서 세포 내 DNA의 분절과 세포 내 활성산소종의 생성 증가를 통하여 세포사멸을 유도한다고 보고되고 있다(10). 또 다른 연구에서는 플라보노이드가 다량 함유 되어있는 백합과에 속하는 청미래덩굴(Smilax china)의 에탄올 추출물이 A549 폐암세포와 AGS 위암세포에 대해 세포주기 억제 및 세포의 성장을 억제함을 보고하였다(11). 알칼로이드는 특이적이고 강한 생리작용을 가지며, 현재까지 약 250종 이상의 알칼로이드 성분이 밝혀져 다양한 의약품 소재로서 개발되고 있다(12, 13). 이 중 백합과 일일초로부터 추출되는 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine) 및 주목나무에서 추출되는 파크리탁셀(paclitaxel)은 이미 임상에서 항암제로 개발되어 널리 이용되고 있다(14-16). 2차 대사산물로 곡류, 콩류, 채소류, 과일류 등에 다량 함유 되어있는 리그난(lignan)은 항산화, 항간염, 항바이러스 및 항암 효과에 탁월하다고 알려져 있다(17, 18). 오미자에 포함된 리그난 물질의 생리활성을 나타 내는 Gomisin A는 A549 폐암세포, Huh7 간암세포, Du145 전립선암세포에서 암세포의 성장과 전이 억제에 대해 동물실험을 수행하여 항암제로서 이용 가능성을 확인 한 바 있다(19). 이 외 천연물에서 얻어진 많은 성분들의 다양한 효능이 보고되어 천연물은 항암제로서 중요한 원천 소재로 쓰이고 있으며, 천연물 소재 신약 개발의 가치가 나날 이 높아지고 있다.

- 1 -



암은 전 세계적으로 발생률이 높은 질병으로 우리나라에서 사망원인 1위를 차지하고 있으며, 식습관의 서구화와 고령화로 해마다 발병률과 사망률이 높아지고 있다. 구강암 (oral cancer)은 전체 악성종양 중 여섯 번째로 발병률이 높으며 개발도상국에서는 발병률이 더 높은 것으로 보고되고 있다(20). 치료법으로는 방사선 요법 및 광범위 절제수술요법을 우선적으로 하는 것이 일반적인 치료법이나, 저작, 연하, 발음 등의 기능적 장애와 안모변형 등을 초래하여 일차적인 치료법으로 항암화학요법에 대한 상대적인 중요성이 한층 높아지고 있다(21, 22). 구강암은 다른 부위에 비해 진단이 쉬우며, 진단학적 기술의 발달과 수술 및 재건 술의 발달에도 불구하고 구강암으로 인한 생존율의 뚜렷한 향상은 보이지 않고 있다(23). 이는 악성도가 높아 조기 사망하는 경우가 많고, 인체의 중요 장기와 인접하고 있어 다른 암으로 전이 유발이 많다(24). 그리고 항암제에 대한 약리적 효과를 나타내지 못하기 때문에 일차적인 치료방법으로 항암화학요법치료에 사용될 만한 항암제가 없기 때문이다. 최근에는 폐암 치료제로 개발된 항암제인 이레사(Ireassa)의 주성분인 제피티닙(gefitinib)을 이용하여 종양의 DNA 복구 능력을 차단시키면서 방사선에 대한 종양의 감수성을 높여 방사선 요법과 약물을 함께 사용하여 외과적인 수술 없이도 구강암을 효과적으로 치료 할 수 있다는 연구 결과가 보고된 바 있다(25, 26).

폐암(lung cancer)은 신체 조건상 구강과 매우 인접하고 있어 구강암에서부터 암의 전이가 잘 되며, 통계청 자료에 의하면 국내에서 암 사망률 제 1위의 질환으로 알려져 있다(27). 최근 10년 동안 다른 암에 비하여 증가 속도가 빠르며 앞으로도 폐암 발생 및 사망률은 지속적으로 증가하여 20~30년 후에는 현재의 두 배 이상까지 증가될 것이라 추정된다. 폐암에 대한 치료는 크게 수술 요법, 방사선 요법 및 항암 화학요법 등으로 구분할 수 있으나 대부분의 경우 수술 요법, 방사선 요법과 병행하여 항암 화학약물을 추가로 투여하여 치료효과를 보고 있다(28, 29). 비소세포 폐암의 대표적인 항암제로 시스플라틴(cisplatin), 비노렐빈(vinorelbine), 탁솔(Taxol), 젬시타빈(gemcitabin) 등이 있으며, 소세포 폐암에는 빈크리스틴(vincristin), 싸이톡산(cyclophosphamide), 아드리아마이신(adriamycin) 등이 임상에서 사용되고 있으며, 수술 요법 및 방사선 요법과 병용한 항암제 투여에 의하여 삶의 질과 생존율은 크게 증가하였다(30). 그러나 반복적인 항암제 사용에 의해 암세포에 내성이 생겨 계속적으로 다른 약제로 바꿔서 투여해야하는 문제점과 골수기능 장애, 탈모, 신경계 이상 등의 부작용이 문제점으로 대두되고 있다(31). 이러한 문제점을 극복하기 위해 최근에는 특정한 생물학적 기전을 억제하여 치료효과 상승 및 부작용을 감소시키고자 하는 새로운 개념의 치료법으로

- 2 -



분자 표적 치료가 개발되었다(32). 또한 많은 약제들이 폐암 치료를 위한 임상 시험 진행 중에 있으며, 그 중 제피티닙은 비소세포 폐암에서 분자 표적 치료제로서 가장 먼저 미국 식품 의약청에서 승인을 받아 이미 임상에 적용되어 환자들에게 도움을 주고 있다(33). 그러나 암은 매우 복잡한 경로로 발전하기 때문에 특정 표적인자만을 선택적으로 억제하는 이러한 분자표적치료제는 특정 유전자의 돌연변이 상태에 따라 선택적인 치료효과를 나타내는 단점이 있다. 또한 현재 사용되고 있는 항암제는 물에 대해 용해도가 낮거나 불용성이기 때문에 추가적으로 유기용매를 필요로 하여 이에 대한 부작용이 문제가 되고 있다. 캄토테신(camptothecin)은 희수나무에 추출되는 알칼로이드로서 종양 조직 내에서 Topoisomerase-1 효소를 저해함으로써 강력한 항암 효과를 나타내는 물질로 21세기의 대표적인 항암제로 여겨져 위암, 결장암, 방광암, 유방암, 소세포폐암, 백혈병에 대해서 뛰어난 효과를 입증 한 바 있다(34, 35). 그러나 캄토테신의 불용성 때문에 투여에 어려움이 따라 임상 시험이 진행되지 못했으며, 약물을 녹이기 위해 사용되는 유기용매에 따른 다양한 부작용이 또한 문제가 되었다. 그러나 최근 캄토테신의 고질적인 문제였던 불용성 문제를 해결하여 물리 · 화학적으로 안정한 제제의 이점과 뛰어난 항암효과를 가진 캄토벨(camtobell)을 개발함으로써 문제 해결에 성공하였다(36). 따라서 항암제의 물에 대한 불용성 문제와 유기용매에 따른 부작용 문제점을 해결하기 위해 기존의 약효를 가지고 있으며, 부작용이 적어 기존의 약제를 대체할 수 있는 약효성분을 천연물에서부터 검색하여 천연물 유래 수용성 항암제 신약 개발의 연구가 활발히 이루어져야 되는 시점이다.

오래전부터 우리나라에서 의약품으로 사용한 전통 한방약제 중 전호(Anthriscus sylvestris Hoffmann)는 우리나라 전역의 산이나 들에서 자생하는 산형과에 속하는 미나리과의 여러해살이풀로. 개화기는 5~6월이며, 결실기는 7~8월이다. 높이는 1m에 이르며, 줄기는 곧게 서서 여러 개의 가지를 치며 온몸이 밋밋하고 털이 없어 이를 '토전호' 또는 '아삼이라고 부르기도 한다. 우리나라에서 전호는 흑산도를 중심으로 경상도 및 전라도의 남부지역에서 많이 재배되고 울릉도 지역에서도 재배되거나 자생 되고 있으며, 일본, 중국, 시베리아, 동유럽 등에 분포되어 있다(37, 38). 전호는 겨울 동안 눈 속에서 싹을 틔어 눈이 녹으면 가장 먼저 수확되는 울릉도의 대표적인 봄나물 로서 어린잎은 독특한 향과 쌉싸래한 맛이 있어 각광 받는 나물이다. 뿌리부분은 한약 재로 사용되어 왔으며, 여러 가지 효능으로 현재에도 유망재배 약용식물자원 중의 하나로 꼽히고 있다. 전호는 한의학적으로 혈액순환을 좋게 하고, 어혈을 풀어주며, 열을 내리고, 통증을 멎게 하는 효능이 있다고 알려져 있다. 또한 근육통, 타박상, 수술

- 3 -





후 통증, 뱀에게 물린 독을 푸는 데 사용하는 것으로 기록되어 있다(39). 전호의 주성분 으로는 Anthricin (Deoxypodophyllotoxin), Lignin, Anthriscinol 등이 있고, 그 밖에 Isoanthricin, Podophyllotoxin, Angeloyl podophyllotoxin, Morelensin, Yatein, 7-hydro xyyatein, Anhydropodorhizol, Arctigenin,bursehernin 등을 비롯한 리그난 계열의 물질, Praeruptorins A, B, C, E, Qianth coumarin D, Acetyl angeloyl khellactone, Acetyl tigloyl khellactone, Decursin, Nodakenin 등의 큐마린 계열 물질 및 알칼로이드 계열 등 많은 성분을 함유하고 있다(40). 큐마린 계열인 Acetyl angeloyl khellactone과 Acetyl tigloyl khellactone의 혼합물은 평활근의 수축을 억제하며 동맥으로 흐르는 혈류 량을 증가시키며, Anthfalcarindiol, Angeloyl podophyllotoxin, Morelensin, Bursehernin 은 암 세포주에 대한 세포독성 있다고 보고된 바 있다(41, 42). 특히 전호에 다량 함유 되어 있는 리그난 계열 물질 중 Anthricin(Deoxypodophyllotoxin)은 PC-3 전립선 암 세포, HeLa 자궁경부암 세포 및 SGC-7901 위암세포 등 다양한 암세포에서 세포형태 변화, 세포주기 억제 및 세포사멸 관련 단백질 발현 등에 의해 항암 효능이 있다고 보고되었다(43, 44).

본 연구에서는 기존 항암제의 암의 내성과 부작용을 극복하기 위하여 오래전부터 민간요법으로 사용하여 풍부한 임상적 경험을 가지고 있는 약용 소재 천연물인 전호 (*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)로부터 수용성 추출물을 분리하였으며, 이는 기존의 항암제의 물의 불용성과 유기용매에 대한 부작용 문제점을 해결 할 수 있을 것이라 사료된다. 더불어 구강암 세포 및 폐암 세포에 대한 세포성장 억제 효과 및 분자적 기전을 확인하고, 구강암 및 폐암 이종이식 누드마우스 종양 모델을 이용하여 종양 성장을 억제함으로써 새로운 천연물 유래 수용성 항암제 신약 개발에 중요한 초석이 되며, 새로운 항암제로서 이용 가능성을 모색할 수 있는 기반을 마련하고자 한다.

- 4 -





### 1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 전호는 100% 메탄올 추출 후, 용매분획 한 수용층을 동결건조 시켜 물에 녹여 사용하였다. 세포 배양액에는 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, Rockville, MD)과 1% 항생제(penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml) (Sigma Aldrich, USA)를 희석하여 사용하였다. 1차 항체 phospho-Erk 1/2, phospho-p53 (Ser 15), EGFR, phospho-EGFR (Tyr 992), phospho-EGFR (Tyr 1045), phospho-EGFR (Tyr 1068), Bcl-2, cleaved caspase-3, cleaved caspase-7, cleaved-caspase-8 (p43-p41), cleaved-caspas-9, poly ADP ribose polymerase (PARP) antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 *β*-actin antibody (abcam)을 사용하였으며, 2차 항체는 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody (Santa cruz Biotechnology, Inc, USA)를 사용하였다.

# 2. 전호 수용성 추출물(*Anthriscus sylvestris* Hoffman aqueous layer, ASAL) 분리

본 실험에 사용된 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)는 전라남도 흑산도에서 자생된 식물로 2014년 봄에 채취한 전호를 구입하였다. 채취한 전호의 잎과 줄기는 제거하고 뿌리만 얻어 이물질을 제거한 후, 자연건조 하여 실험에 사용하였다. 전호 뿌리 500 g을 분쇄기를 이용하여 잘게 분쇄한 후, 5 ℓ의 100% 메탄올을 첨가하여 56℃ incubator에서 48시간 동안 온침 추출하였다. 불순물들은 여과지로 여과한 뒤, 감압농축기로 농축하여 용매를 증발시키고 50 g의 추출물을 얻었다. 50 g의 추출물을 다시 멸균수를 첨가하여 최종부피가 200 mℓ이 되도록 희석하여 용해시키고, 용해액에 *n*-haxane, ethyl acetate, *n*-buthanol 순으로 각각 3회씩 동량으로 분획하여 수용층을 획득하였다(Fig. 1). 최종 수용층은 -80℃에서 24~48시간 동결건조 시켰으며, 분말화 상태로 -20℃에서 냉동 보관하였다. 분말화 된 ASAL을 g당 1 mℓ의 멸균수로 녹여 다음 실험을 수행하였다.

- 5 -







Fig. 1. Isolation and partition from the *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL). Extraction and solvent fractionation of ASAL using *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-buthanol.

- 6 -





# 3. High-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 전호 수용성 추출물(ASAL)의 분석

분석을 위한 시료로 분말 화 된 ASAL을 멸균수 1 ml당 250 mg 농도로 용해하여 0.45 µm syringe filter로 여과한 후, 분석용 HPLC로 분석을 수행하였다. 분석시스템은 Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 CAPCELL PAK C18 AQ [10 mmI.D. x 250 mm (SHISEIDO Inc, Tokyo, Japan)]칼럼을 사용하였다. HPLC 이동상 용매로 slovent A는 멸균수, solvent B는 100% 메탄올을 사용하여 1분당 5 ml의 유속으로 용출하였다(Table 1). HPLC 분획 물질은 210 nm, 230 nm, 250 nm, 280 nm의 UV spectrum에서 각각의 피크를 검출 하였다.

- 7 -





Table 1. Instrument and operating conditions for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

Items	Conditions			
HPLC System	Agilent 1100 series			
Calumn	CAPCELL PAK C18 Cat. No. 92075			
Column	TYPE : AQ 5 um, SIZE : 10 mm I.D. $ imes$ 250 mm			
Flow rate	5 ml/min			
Injection volume	100 μℓ			
Mobile phase	5 ml/min			
Gradient	Time [min]	% A	% B	
	5.00	95.0	5.0	
	65.00	30.0	70.0	
	66.00	5.0	95.0	
	69.00	5.0	95.0	
	70.00	95.0	5.0	
	80.00	95.0	5.0	





### 4. 세포배양

#### 4-1. 사람 유래 구강암 세포주 세포배양

KB, FaDu 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. KB, FaDu 세포는 10% fatal bovine serum (FBS, GIBCO, Rockvile, MD, USA) 및 1% 항생제(100 µg/ml penicillin, 100 Unit streptomysin) (Sigma Aldrich, Michigan, USA)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, GIBCO, Rockville, MD, USA)을 사용하였으며, 37℃의 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

#### 4-2. 사람 유래 폐암 세포주 세포배양

A549 세포는 ATCC에서 구입하였다. 10% FBS와 1% 항생제가 함유된 RPMI-1640 medium (GIBCO, Rockville, MD, USA)을 사용하였으며, 37℃의 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

#### 4-3. 생쥐 유래 배아 치은 섬유아세포주 세포배양

NIH/3T3 세포는 ATCC에서 구입하였다. 10% FBS와 1% 항생제가 함유된 DMEM medium을 사용하였으며, 37℃의 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

#### 4-4. 흰쥐 유래 초대 연골세포 분리 및 세포배양

생후 5일 된 흰쥐에 CO<sub>2</sub>를 투여하여 마취하고, 무릎 관절 부위를 노출시켜 관절 부위를 채취하였다. 채취한 관절부위를 인산 완충 용액으로 3회 세정하고, 세포외기질을 제거하기 위하여 1% collagenase type II (Sigma Aldrich, Michigan, USA)와 0.25% trysin-EDTA (GIBCO, Rockvile, MD, USA)용액을 첨가하여 37℃의 5% CO<sub>2</sub> 조건하 에서 2시간 동안 교반하였다. 교반 후, 인산 완충 용액으로 세정하면서 근육 조직과 기타 조직을 완전히 제거하고, 연골 부분만 남겼다. 이를 1,300 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 pellet층을 취하였다. 이를 인산 완충 용액에 현탁 시킨 뒤, 2번 더 동일한 과정을 반복하여 연골 조직으로부터 분리된 단일 연골세포를 획득하였다. 세포 배양은 10% FBS와 1% 항생제가 함유된 DMEM/F-12 medium (GIBCO, Rockville, MD, USA)을 사용하였으며, 37℃의 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

- 9 -





## 5. 세포독성 시험

ASAL에 대한 세포독성은 MTT assay [3-(4,5-Dimethylthiazol 2-yl)-2,5diphenyltertrazolium bromide] 방법으로 실험하였다. 12 well cell culture plate에 3×10<sup>5</sup> 세포 수를 seeding하고 12시간 후에 ASAL을 다양한 농도 (0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.25 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1.75 mg/ml, 2.0 mg/ml)로 처리 하였다. 24시간 반응 후 12 well plate에 있는 배양액을 제거하고 인산 완충 용액으로 가법게 세정한 후, 950 µl 세포 배양액에 50 µl의 MTT 용액(Sigma Aldrich, Michigan, USA)을 첨가하여 빛이 투과되지 않도록 호일로 덮고 37℃의 5% CO<sub>2</sub> 배양 기에서 4시간 반응하였다. 4시간 반응 후, 배양액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, Michigan, USA)를 1 ml 첨가하여 formazan이 용해되도록 교반기에서 20분간 용해하였다. 용해 된 세포와 배양액을 96 well culture plate에 100 µl를 분주 하고 인산 완충 용액 100 µl를 희석하여 Microplate Autoreader ELISA (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 이용하여 562 nm 흡광도에서 세포 생존을을 측정하였다. 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan으로 분해된 양을 나타냈다. 이를 각 well의 viable cell 수와 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.







## 6. 세포사멸 관련 단백질 발현 변화

ASAL에 대한 세포사멸 관련 단백질 발현 정도를 알아보기 위해 12 well cell culture plate에 3×10<sup>5</sup> 세포 수를 seeding하고 24시간 반응하였다. ASAL을 KB, FaDu 구강암 세포주와 A549 폐암 세포주에 1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml을 처리하였고, NIH/3T3 섬유아세포주는 최고농도인 2.0 mg/ml을 처리 하였다. 24시간 처리 후 12 well plate에 있는 배양액을 제거하고 인산 완충 용액으로 가볍게 한 번 세정 후, 0.25% Trypsin-EDTA을 이용하여 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 1,500 rpm으로 5분 동안 원심 분리하고, pellet을 취하여 Protein lysis buffer (iNtRON Biotechnology, Inc., Korea)를 첨가해 단백질을 분리하였다. 종양 모델에서 적출한 조직은 Protein lysis buffer 1 ml를 첨가하고 조직 분쇄기를 이용하여 조직을 완전히 분쇄 한 후, 이를 12,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 pellet을 취하였다. 단백질 분리는 Protein lysis buffer를 분주하고, 10~20 회 정도 강하게 tapping 한 후, ice에서 30분 반응하고 12,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 pellet을 제외한 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 단백질을 얻었다. 분리 된 단백질을 BCA protein assay kit (Sigma Aldrich, Michigan, USA)을 이용하여 단백질을 정량화 하였다. 20 μg의 단백질을 8%, 12% SDS-PAGE에 1× running buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS)를 이용하여 loading 한 후 120 voltage로 2시간 동안 전기영동 하였다. 젤 상에서 분리된 단백질은 western blot analysis를 수행하기 위해 먼저 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore Corparation, Bedford, MA, USA)을 메탄올에 5분간 적신 후. PVDF membrane 위에 전기영동을 수행한 젤을 올렸다. 이를 transfer buffer (25 mM Tris, 0.2M glycine, 20% methanol)를 이용하여 400 mA로 1시간 30분 동안 transfer 하였다. 젤에서 PVDF membrane으로 transfer된 membrane을 blocking solution (5% BSA in TBS-T containing 0.1% Tween-20)을 이용하여 1시간 동안 반응하였다. 1차 항체 phospho-Erk 1/2, phospho-p53 (Ser 15), EGFR, phospho-EGFR (Tyr 992), phospho-EGFR (Thr 1045), phospho-EGFR (Tyr 1068), Bcl-2, cleaved caspase-3, cleaved caspase-7, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9, PARP  $rac{1}{2}$   $\beta$ -actin antibody 를 blocking solution과 1:1000 비율로 희석한 후, 4℃ 조건 하에 overnight로 반응 하였다. 1차 항체를 overnight 한 후, 1× TBS-T (pH 7.6)를 이용하여 3번 세정 하고, 2차 항체 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody는 blocking solution과 1:1,000 비율로

- 11 -





회석하여 1시간 반응 시켰다. 2차 항체 반응시킨 PVDF membrane을 1× TBS-T (pH 7.6)를 이용하여 3번 세정한 후, 면역반응 단백질은 화학발광시스템 Micro Chemi (Dong-il shimadzu Corp, Korea)에서 ECL kit (Millipore Corparation, MA, USA)을 사용하여 단백질 발현 변화를 확인하였다.

### 7. 세포사멸의 형태학적 변화

세포사멸의 형태학적 변화 중에 하나로 알려져 있는 inter-nucleosomal DNA의 분절을 확인하기 암세포를 12 well cell culture plate에 3×10<sup>5</sup> 세포 수를 seeding하였다. 24 시간 후, ASAL을 KB, FaDu 구강암 세포주는 각 세포의 반수치사량 농도인 1.0 mg/ml, A549 폐암 세포주는 반수치사량 농도인 1.5 mg/ml을 처리하였다. 24시간 처리 후, 12 well plate에 있는 배양액을 제거하고 인산 완충 용액으로 가볍게 세정한 후, 0.25% Trypsin-EDTA을 이용하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포를 500 μl genomic DNA lysis buffer (20 mM EDTA, 10 mM Tris (pH8.0), 200 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 100 µg/ml proteinase k)로 용해시켜 57℃ incubator에 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 반응 후, 12,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 담고 동량의 phenol:chloroform:isoamylalchol (25:24:1) (Sigma Aldrich, Michigan, USA) 용액을 넣고 상온에서 5분 동안 반응하였다. 반응 후 12,000 rpm으로 5분 동안 원심분리 하여 genomic DNA가 포함된 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 2배의 100% 에탄올과 1/10의 3M sodium acetate (pH 7.0)를 넣어 -20℃에서 1시간 반응하였다. 1시간 후, 12,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 genomic DNA를 농축시켰다. 농축된 genomic DNA는 70% 에탄올로 1번 세정한 후, 원심 분리하여 상층액을 제거 하고 pellet을 건조하였다. 건조된 pellet을 멸균수 20 때로 용해시켜 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel을 이용하여 UV transilluminator (Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)에서 genomic DNA 분절을 관찰하였다.

- 12 -





## 8. 이종이식 누드마우스 종양 모델을 이용한 종양 억제 효과

ASAL의 종양 억제 효과를 측정하기 위해 동물 모델로는 체중 20~25 g. 6~8주령 의 누드마우스를 샘타코(Samtako Bio, Inc., Osan, Korea)에서 구입하여 실험에 사용 하였다. 동물은 하나의 케이지 당 3마리씩 수용하고, 실험동물용 고형 사료와 멸균수를 자유로이 섭취하도록 하였으며, 실험실 환경은 온도 23 ± 3℃, 상대습도 50 ± 15%, 환기 횟수 10~20회/hr, 12시간 명암 주기로 유지하였다. 본 연구의 접종 할 암세포인 구강암 세포주 KB와 폐암 세포주 A549를 정상군과 실험군으로 나누고, 마취 후에 누드마우스의 어깨와 넓적다리 피하부위에 1×10<sup>7</sup> cells/mouse 세포수를 인산완충용액 으로 현탁하여 0.1 ml씩 주사하여 종양 모델을 만들었다. KB 이종이식 누드마우스 종양 모델은 정상 군과 실험 군으로 2개의 군으로 나누어 각 군당 3마리씩 배정하였다. 정상군은 kg당 400 mg의 멸균수를 경구투여 하였고, 실험군은 kg당 400 mg의 ASAL을 경구 투여 하였다. A549 이종이식 누드마우스 종양 모델은 정상군과 2개의 실험군 으로 3개의 군으로 나누어 각 군당 3마리씩 배정하였다. 정상군은 kg당 200 mg의 멸균 수를 경구투여 하였고, 실험군에는 kg당 80 mg, kg당 200 mg의 ASAL을 경구투여 하여 실험을 수행하였다. 체중 및 종양 크기 측정은 실험 개시일 및 개시 후 2일 간격으로 시험물질 투여 전에 버니어캘리퍼스로 측정하여 기록하였으며, KB 이종이식 누드마우스 종양 모델은 ASAL 경구 투여 시작일 부터 17일 째, A549 이종이식 누드마우스 종양 모델은 30일 째 되는 날 마우스를 희생시켰다. 희생 후, 피하에 존재하는 종양을 적출 하여 무게와 크기 및 종양 억제 효과를 판정하였다. 계산은 아래 공식을 이용하여 환산하였다.

- · 종양의 크기(V, mean tumor volume)
  = (장축 길이 × 단축 길이<sup>2</sup>) / 2
- 종양 억제 효율 (TVI, tumor vloume inhivition rate) = 1-(ASAL 처리군의 종양 부피 평균값 / 정상군의 종양부피 평균값) × 100

- 13 -





### 9. 간이독성 평가

ASAL의 간이독성 평가를 위해 누드마우스를 정상군과 실험군의 2군으로 나누고, 각 군당 5마리씩 배정하여 진행하였다. 누드마우스는 이종이식 누드마우스 종양 모텔 과 같은 사육환경 조건으로 유지하였다. 정상군은 kg당 500 mg의 멸균수를 경구투여 하였으며, 실험군은 kg당 500 mg의 ASAL을 28일간 경구투여하고, 29일째 희생하여 혈액학적, 생·화학적 검사를 실시하였다. 부검 시, 마우스의 심장에서 혈액을 채취하여 EDTA가 함유된 bottle에 혈액을 채취하고 가볍게 흔들어 EDTA와 섞이도록 하여 아이스에 넣어 보관 하였다. 혈액학적 검사로는 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈, 적혈구 용적률, 혈소판, 림프구, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염구를 측정하였으며, 생·화학적 검사로 알부민, 혈청 GPT, 혈청 GOT, 빌리루틴, 콜레스테롤, 총 단백질을 측정하여 반복투여에 따른 간이독성평가를 실시하였다. 측정항목의 단위는 Table 4에 나타내었다.

#### 10. 통계학적 검정

모든 실험은 3회 이상 반복하였으며, 실험 성적은 평균 ± 표준 편차로 계산하여 측정하였다. 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA (Oneway analysis of varienced) 로 검증 후에 student t-test를 하였으며, p-value가 0.05 미만(\*, p<0.05)과 0.01 미만 (\*\*, p<0.01)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

- 14 -





## Ⅲ. 결 과

## 1. 전호 수용성 추출물(ASAL)의 HPLC 분석

ASAL을 멸균수를 이용하여 ml 당 250 mg으로 용해하여 이동상 용매인 멸균수와 100% 메탄올을 이용하여 분당 5 ml의 유속으로 분석하였다(Table 1). ASAL의 검출에 적합한 UV 파장을 선정하기 위해 여러 개의 파장대인 210 nm, 230 nm, 250 nm, 280 nm로 각각 검출하였으며, 각각의 UV 파장에서 여러 가지 성분의 피크가 검출 되었다. 230 nm과 250 nm의 피크에서 비슷한 양상을 나타냈지만, 250 nm의 피크에서 더 높게 검출되었다. 210 nm와 280 nm에서는 230 nm와 250 nm의 파장에서 보다 다양한 피크가 검출 되었으며, 더 높은 mAU를 보였다. 이러한 피크는 ASAL에 다양한 성분이 함유되어 있음을 시사한다(Fig. 2).



Collection @ chosun





**Retension time (min)** 

Fig. 2. High-performance liquid chromatography analysis (HPLC) of Anthriscus sylvestris Hoffmann (ASAL). The HPLC aqueous layer chromatogram of the ASAL detected at (A) 210 nm, (B) 230 nm, (C) 250 nm, (D) 280 nm. Separation of the ASAL 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 5 ml/min. Mobile phase A is an water and mobile phase B is 100% methanol ratio where changed run time was 80minutes. Gradient elution separation of ASAL. The initial mobile phase is 95.0% A and 5.0% B. The percentage of mobile phase B increases in 5 steps.

- 16 -





## 2. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 초대 연골세포의 세포 독성 평가

흰쥐의 초대 연골세포에서 ASAL의 세포독성을 평가하기 위하여 다양한 농도(0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2.0 mg/ml, 5.0 mg/ml)로 24시간 처리하여 세포독성을 관찰하였다. ASAL을 0.5 mg/ml에서 5.0 mg/ml까지 처리한 세포에서 농도 의존적으로 유의할 만한 차이가 없었으며(Fig. 3), 이는 ASAL이 정상세포인 초대 연골세포에 미치는 독성이 없음을 시사한다. ASAL의 암세포에 대한 세포성장 억제 효과를 확인하기 위하여 세포독성이 전혀 없는 범위인 2.0 mg/ml 까지를 최고 농도로 설정하여 본 실험을 진행 하였다.







120



Concentration of ASAL (mg)

Fig. 3. Cytotoxicity effects of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) on rat primary chondrocyte cells. The cytotoxicity effects of ASAL on cell viability in rat primary chondrocyte cell was treated with various concentrations (0.5 mg/ml-5.0 mg/ml) of ASAL alone for 24 h, and viability was assessed by MTT assay. percentage of cell viability was calculated as a ration of 562 nm. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments.

- 18 -



# 3. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB, FaDu 구강암 세포주의 세포 성장 억제 효과

ASAL에 의한 NIH/3T3 치은 섬유아세포주의 세포독성 평가와 KB, FaDu 구강암 세포주의 세포성장 억제 및 반수치사량을 관찰하기 위해 ASAL을 다양한 농도 (0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.25 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1.75 mg/ml, 2.0 mg/ml) 로 24시간 처리 후, MTT assay를 수행하였다. 초대 연골세포의 결과와 마찬가지로 NIH/3T3 치은 섬유아세포주에 ASAL을 2.0 mg/ml 까지 처리한 세포에서 세포 생존율 의 변화가 없었으며, 이는 NIH/3T3 치은 섬유아세포주에 ASAL이 미치는 세포독성이 없음을 판단할 수 있다. 반면 NIH/3T3 섬유아세포주와 같은 농도로 KB, FaDu 구강암 세포주에 ASAL을 처리했을 때, 0.25 mg/ml 처리한 KB, FaDu 구강암 세포주에서 약 20 %의 세포성장이 억제되었으며, 농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 억제 효과가 증가함을 나타내었다. 구강암 세포주에서 ASAL의 세포성장 억제가 약 50% 정도 감소되는 반수 치사량이 KB 구강암 세포는 1.0 mg/ml이었으며, FaDu 구강암 세포는 1.0 mg/ml 임을 알 수 있었다(Fig. 4).







Concentration of ASAL (mg)

Fig. 4. Effects of Anthriscus sylvestris Hoffmann aqueous layer (ASAL) on cell viability and cell death in NIH/3T3 fibroblast and KB, FaDu oral cancer cells. The effect of ASAL on cell viability in KB, FaDu oral cancer cells and NIH/3T3 fibroblast were treated with various concentrations (0.1 mg/ml-2.0 mg/ml) of ASAL alone for 24 h, and cell viability was assessed by MTT assay. ASAL reduced cell viability in KB, FaDu oral cancer cells in a dose-dependent manner. The percentage of cell viability was calculated as a ration of 562 nm. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments.

- 20 -





# 4. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB, FaDu 구강암 세포주의 핵 내 DNA 분절화

ASAL에 대해 KB, FaDu 구강암 세포주의 반수치사량이 약 1.0 mg/ml임을 확인한 바 (Fig. 4), ASAL에 의한 KB, FaDu 구강암 세포주의 세포사멸의 핵 내 형태학적 변화인 DNA 분절화를 ASAL 1.0 mg/ml 처리 후에 관찰하였다. 세포사멸의 기전은 대표적으로 사망-수용기 경로(death-receptor pathway)와 사립체 경로(mitochondrial pathway)가 잘 규명되어 있다. 사립체 경로는 사립체로부터 시토크롬 *c* (cytochrome *c*)가 유출된 후, 단계적인 caspases의 활성화를 통해 세포 생존에 필요한 여러 효소를 억제하거나 파괴시킴으로써 최종적으로 endonuclease가 활성화되어 핵 내 DNA 분절(fragmentation)을 일으키게 된다(45). ASAL을 KB, FaDu 구강암 세포주의 반수치사량인 약 1.0 mg/ml을 24시간 처리하여 genomic DNA를 전기영동 하였다. ASAL을 처리하지 않은 정상군 에서는 DNA 분절화에 의한 사다리 모양이 나타나지 않았으나, ASAL을 1.0 mg/ml 처리한 대조군에서는 DNA 분절화가 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 5). 이는 KB, FaDu 구강암 세포주에서 ASAL에 의한 세포성장 억제가 세포사멸 기전에 의하여 일어난다는 것을 시사한다.



Collection @ chosun





B



- 22 -

Collection @ chosun


Figure 5. DNA fragmentation induced by *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) on KB, FaDu oral cancer cells. (A) The KB, (B) FaDu oral cancer cells were treated with or without ASAL. And then, genomic DNA were isolated, Quantification the electronic porosis on 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide. After that time, genomic DNA ASAL observed using a UV transilluminator. DNA fragmentation was induced in 1.0 mg/ml ASAL treated KB, FaDu oral cancer cells, which indicates cellular apoptosis. M = 1kb DNA marker; Con' = without ASAL; ASAL = with 1.0 mg/ml ASAL, 24 hr incubation.

- 23 -





## 5. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB, FaDu 구강암 세포주의 세포 사멸 단백질 발현

KB, FaDu 구강암 세포주의 성장 억제를 일으키는 분자적 기전 중 세포사멸의 지표 로 알려져 있는 caspase family 단백질의 하위 단계를 보기 위해 세포 내 caspase-3 protease의 기질 단백질인 PARP의 절단 정도를 western blot을 통해 관찰하였다. PARP는 핵 안에 존재하면서 손상된 DNA의 복구에 관련된 단백질로서 caspase-3 protease에 의해 116 kDa 크기의 단백질이 절단되어 85 kDa의 단편으로 변화하는데 이 절단을 관찰하는 것으로 세포사멸이 유도되었음을 알 수 있다(46). KB, FaDu 구강암 세포주에 ASAL을 1.0 mg/ml을 처리하고. NIH/3T3 치은 섬유아세포주에 ASAL을 2.0 mg/ml의 농도로 24시간 처리한 후, 단백질 발현을 정도를 비교하였다. NIH/3T3 치은 섬유아세포주에서 ASAL 처리하지 않은 군과 ASAL 2.0 mg/ml 처리한 군의 비교해 보았을 때, cleaved PARP 단백질 활성이 유도되는 현상을 관찰할 수 없었다. 이는 NIH/3T3 치은 섬유아세포주에 ASAL에 의한 세포사멸이 유도되지 않음을 시사한다. KB, FaDu 구강암 세포주에서는 ASAL을 처리한 군에서 PARP의 절단이 일어나 cleaved PARP 단백질 발현이 활성화되어 확연히 증가되었다(Fig. 6A). Cleaved PARP 단백질 발현 정도를 통해서 KB 구강암 세포주에서는 ASAL을 처리하지 않은 군에 비해 ASAL을 처리한 군에서 약 30배 정도, FaDu 구강암 세포주에서는 약 40배 정도 ASAL에 의해 세포사멸이 유도되고 있음을 측정할 수 있다. 반면 ASAL에 의해 NIH/3T3 치은 섬유아세포주에서는 세포사멸이 유도되지 않았다(Fig. 6B).

- 24 -







B



- 25 -

Collection @ chosun



Fig. 6. Effects of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) on cell apoptosis and PARP activity in NIH/3T3 fibroblast and KB, FaDu oral cancer cells by western blot analysis. (A) Western blot analysis for the expression of cleaved PARP in KB, FaDu oral cancer cells and NIH/3T3 fibroblast treated with ASAL (KB, FaDu oral cancer cells : 1.0 mg/ml, NIH/3T3 fibroblast cells : 2.0 mg/ml) for 24 h, using  $\beta$ -actin as protein loading control. Significant cleaved PARP (85 kDa) was observed at 24 h after the treatment of ASAL in KB, FaDu oral cancer cells. (B) Summary of densitometric analysis normalized to control. The results represent the data of three assays (means  $\pm$  SD). \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 versus the control.

- 26 -





## 6. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB 이종이식 누드마우스 종양 모델의 종양 억제 효과

In vitro 실험 결과를 근거로 하여, in vivo 실험에서 ASAL의 종양 억제 효과를 결정하기 위하여 누드마우스를 이용한 이종이식 연구를 시행하였다. 정상적인 누드 마우스에 KB 구강암 세포주를 마우스 피하에 주사하여 종양을 이식 한 결과, 모든 실험동물에서 성공적으로 종양이 발생되었다. 이식한 종양이 육안으로 인지 가능한 종양 결절이 생기기까지는 평균 약 7일이 소요되었다. 종양 형성 후, 시간이 경과함에 따라 모든 누드마우스에서 종양의 발생과 성장이 관찰되었으며, 2일 간격으로 종양의 크기를 측정하여 종양성장곡선으로 나타내었다. 실험 개시일 부터 실험 종료일 까지 정상군은 멸균수를, 실험군은 ASAL을 kg당 400 mg씩 경구투여 하였으며, 정상군과 실험군 모두 종양의 크기가 지속적으로 증가하는 양상을 보였으나 11일 째부터 정상군 과 실험군의 종양 크기의 차이를 쉽게 알 수 있었다. 실험 종료일 17일 째 비교 시, 정상군에 비해 ASAL을 경구투여 한 실험군의 종양 크기의 증가 비율이 약 2배 정도 작은 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 7A). 실험 종료 후에 정상군과 실험군의 종양 적출 전의 마우스와 적출 후 종양의 크기 비교 시, 정상군에 비해 실험군의 종양의 크기가 작은 것을 육안 상으로 뚜렷하게 관찰할 수 있었다(Fig. 7B). ASAL을 17일간 경구투여하고 증식한 종양의 크기를 측정한 결과, 정상군의 경우 실험 개시일 측정한 종양의 크기가 85.25 ± 1.43 mi에서 실험 종료 후 종양의 크기 측정 시 507.75 ± 2.21 mi로 약 6배 정도 종양의 크기가 증가하였으며, ASAL을 kg당 400 mg을 경구투여 한 실험군의 경우 종양의 크기가 85.50 ± 1.81 때에서 242.05 ± 2.13 때으로 약 3배 정도 증가 되었다. 정상군과 실험군의 증가 비율이 실험군에서 약 3배 정도 낮게 형성되었다. 종양의 무게는 실험 종료 후 측정하였으며, 정상군은 0.830 ± 0.48 g, 실험군은 0.335 ± 0.70 g 으로 정상군에 비해 실험군이 약 2.5배 정도 적었다. ASAL의 종양성장 억제 효과는 종양의 크기 및 무게를 확인하여 종양성장 억제 효과를 계산 하였으며, 정상군에 비해 ASAL을 kg당 400 mg을 경구투여 한 실험군에서 약 40.0%의 종양성장 억제 능력을 나타내었다(Table 2).

- 27 -







#### Days after tumor cell implantation

B

KB s.c xenograft tumor model



- 28 -



Figure 7. Anti-cancer effects of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) on tumor growth in an KB subcutaneous xenograft nude mouse tumor models. (A) KB s.c xenograft nude mouse models were administered 400 mg/kg once daily orally for up to 17 days. Tumor volumes were measured every other day a week using a caliper and calculated as  $(width)^2 \times length/2$ . Tumor volume between control and ASAL treated group was statistically significantly different at P < 0.05 by two way ANOVA. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. (B) Images of KB s.c xenograft nude mouse tumor models and xenograft tumors obtained from mouse. Tumors were resected from the mice on 17 day.

- 29 -





Table 2. Inhibitory effects of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) on the tumor growth of KB subcutaneous xenograft nude mouse tumor models.

Group and dose	Tumor size (mm)		Tumor Weight (g)	TIR (%)
	Begin	End	Tunior Weight (g)	111( (>0)
Control	85.25±1.43*	507.75±2.21*	0.830±0.48**	_
ASAL (400 mg/kg)	85.50±1.81*	242.05±2.13*	0.335±0.70	40.0 %

Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3); \* p < 0.05 versus control, \*\* p < 0.01 versus control. Significant difference was calculated by on-way ANOVA.







## 7. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB 이종이식 누드마우스 종양 모델의 조직의 세포사멸 단백질 발현

KB 구강암 세포주에서 ASAL의 처리에 의해 세포사멸 표지 단백질인 PARP의 단백질이 절단되어 cleaved PARP 단백질 발현이 현저하게 증가됨으로써 세포사멸이 유도됨을 확인한 결과(Fig. 6), KB 이종이식 누드마우스 종양 모델에서 채취한 종양의 조직으로부터 단백질을 분리하여 세포사멸에 관한 단백질 발현을 분석하였다. Pro-caspase-9은 세포사멸의 초기 시행자로서 세포사멸의 진행과정 중에 절단되어 cleaved caspase-9으로 활성화되어 하류의 pro-caspase-3. 7을 활성 이량체인 cleaved caspase-3. 7. 즉 세포사멸의 실행인자를 만든다. ASAL이 caspase의 활성을 유도하는지를 검증하기 위하여 kg당 400 mg의 멸균수를 경구 투여한 정상군과 ASAL을 kg당 400 mg을 경구 투여 한 실험군의 종양 조직에서 분리한 단백질로 이들 caspase와 PARP 항체를 사용하여 단백질의 발현 변화를 비교하였다. ASAL을 kg당 400 mg을 경구 투여 실험 군이 정상군에 비해 cleaved caspase-3, cleaved caspas-7, cleaved caspase-9의 단백질의 발현이 증가하였고, caspase-3가 실행됨에 따라 PARP가 절단되어 cleaved PARP 단백질의 발현이 증가되었다(Fig. 8A). ASAL 처리에 의한 단백질 발현의 정도 를 ASAL을 처리하지 않은 군의 단백질 발현을 그래프로 비교하였을 때, cleaved caspase-9은 약 13배, cleaved caspase-7은 약 6배, cleaved caspase-3은 약 8배, cleaved PARP은 약 10배 증가됨을 비교할 수 있었다(Fig. 8B). 이는 KB 이종이식 누드마우스 종양 모델에 ASAL의 경구투여로 인한 종양억제 효과가 세포사멸 과정을 통하여 종양성장이 억제됨을 시사 할 수 있다.

- 31 -







B



- 32 -

Collection @ chosun



Fig. 8. Effects of Anthriscus sylvestris Hoffmann aqueous layer (ASAL) on the expression of cleaved caspase-3, 7, 9, PARP and cleaved PARP in an KB subcutaneous xenograft nude mouse tumor model tissue. (A) Protein samples extracted from the tumors were tested for expression of cleaved caspase-3, 7, 9, PARP and cleaved PARP proteins by western blot analysis.  $\beta$ -actin served as loading control. These protein expression changes are implicated in the apoptotic pathway. (B) Summary of densitometric analysis normalized to control. The results represented the data of three assays (means  $\pm$  SD). \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01versus the control.







## 8. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 KB, FaDu 구강암 세포주의 세포 사멸 관련 분자적 기전

ASAL에 대한 KB, FaDu 구강암 세포주의 세포사멸에 관한 분자적 기전을 확인 하기 위해 western blot을 수행하였다. 세포 생존에 관여하는 신포전달 단백질인 Erk 1/2 MAP kinases가 ASAL의 처리에 의해서 인산화 되어 처리하지 않은 군에 비해 단백질의 발현이 KB 세포주에서는 약 9배, FaDu 세포주에서는 약 8배로 확연히 감소 되어 세포성장을 억제하였다. 또한 미토콘드리아의 투과성을 조절하여 세포사멸에 관여하는 세포사멸 억제 인자인 Bcl-2의 단백질의 발현에서도 KB 세포주는 약 7배, FaDu 세포주에서는 약 8배로 단백질의 발현이 감소되었다. Bcl-2의 발현이 감소됨에 따라 cleaved caspase-9, cleaved caspase-3가 활성화되어 최종적으로 핵 내 PARP의 절단을 유도하여 세포사멸이 유도됨을 알 수 있다. ASAL의 처리에 의해 KB 구강암 세포주의 경우 cleaved caspase-9에서 약 9배, cleaved caspase-3에서 약 4배 정도 단백질 발현이 증가되었으며, FaDu 구강암 세포주의 경우 cleaved caspase-9에서 약 8배, cleaved caspase-3에서 약 11배 정도 단백질의 발현이 증가됨을 확인하고, 발현 정도의 차이는 그래프 상으로 비교하였다(Fig. 9). 최종적으로 세포사멸에 관여 하는 기질 단백질인 PARP의 절단으로 인하여 KB, FaDu 구강암 세포주에서 세포사멸 이 유도되어 세포성장을 억제하였다(Fig. 6). 이와 같은 결과는 ASAL이 KB, FaDu 구강암 세포주에서 세포성장에 관여하는 Erk 1/2 MAP kinases의 인산화 억제로 인한 caspase 의존성 분자적 기전에 의해 세포사멸이 유도됨을 시사한다.

- 34 -





А



- 35 -





B

Phospho-Erk = Control = ASAL 150 150 150 50 0 KB FaDu NIH3T3



- 36 -

Collection @ chosun







- 37 -





Figure 9. Molecular Mechanisms of apoptosis related proteins by treatment sylvestris Hoffmann (ASAL) in NIH/3T3 of Anthriscus aqueous layer fibroblast and KB, FaDu oral cancer cells. (A) Cells were seeded at  $3 \times 10^5$  and then treated with concentration of the ASAL for 24 h. Phospho-Erk, Bcl-2, Caspase-3, 7, 9 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. (B) Summary of densitometric analysis normalized to control. The results represent the data of three assays (means  $\pm$  SD). \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 versus the control.





### 9. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 폐암 세포주의 세포성장 억제 효과

ASAL에 의한 NIH/3T3 치은 섬유아세포주의 세포독성 평가와 A549 폐암 세포주의 세포성장 억제 및 반수치사량을 관찰하기 위해 ASAL을 다양한 농도 (0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.25 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1.75 mg/ml, 2.0 mg/ml)로 24시간 처리 후, MTT assay를 수행하였다. NIH/3T3 치은 섬유아세포주에 ASAL을 2.0 mg/ml 까지 처리한 세포에서 세포 생존율의 변화가 없었으며, 이는 NIH/3T3 치은 섬유아 세포주에 ASAL이 미치는 세포독성이 없음을 판단할 수 있다. 반면 NIH/3T3 섬유아 세포주와 같은 농도로 A549 폐암 세포주에 ASAL을 처리했을 때, 0.75 mg/ml 처리한 A549 폐암 세포주에서 약 30 %의 세포성장이 억제 되었으며, 농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 세포성장이 억제되어 최고 농도로 설정 한 2.0 mg/ml 처리한 A549 폐암 세포주에는 약 70% 세포성장이 억제됨을 나타내었다. A549 폐암 세포주에서 ASAL의 세포성장 억제가 50% 정도 감소되는 반수 치사량은 1.5 mg/ml임을 알 수 있다(Fig. 10).

- 39 -







Fig. 10. Effects of Anthriscus sylvestris Hoffmann aqueous layer (ASAL) on cell viability and cell death in NIH/3T3 fibroblast and A549 lung cancer cells. The effect of ASAL on cell viability in A549 lung cancer cells and NIH/3T3 fibroblast were treated with various concentrations (0.1 mg/ml-2.0 mg/ml) of ASAL alone for 24 h, and cell viability was assessed by MTT assay. ASAL reduced cell viability in A549 lung cancer cells in a dose-dependent manner. The percentage of cell viability was calculated as a ration of 562 nm. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments.

- 40 -





# 10. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 폐암 세포주의 핵 내 DNA 분절화

ASAL에 대해 A549 폐암 세포주의 반수 치사량이 약 1.5 mg/ml임을 확인한 바(Fig. 10), ASAL에 의한 A549 폐암 세포주의 세포사멸의 핵 내 형태학적 변화인 DNA 분절화를 ASAL 처리 후에 관찰하였다. ASAL을 A549 폐암 세포주의 반수치사량인 1.5 mg/ml을 처리하여 24시간 동안 반응 한 후, genomic DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과, ASAL을 처리하지 않은 정상군에서 DNA 분절화에 의한 DNA 사다리 모양이 나타나지 않았다. 반면 ASAL을 1.5 mg/ml 처리한 대조군에서는 DNA 분절화가 일어났으며(Fig. 11), 이는 ASAL에 의한 세포 성장 억제가 세포사멸 기전에 의하여 일어난다는 것을 알 수 있다.

- 41 -







Fig. 11. DNA fragmentation induced by Anthriscus sylvestris Hoffmann aqueous layer (ASAL) on A549 lung cancer cells. The A549 lung cancer cells were treated with or without ASAL. And then, genomic DNA were isolated, Quantification the electronic porosis on 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide. After that time, genomic DNA ASAL observed using a UV transilluminator. DNA fragmentation was induced in 1.5 mg/ml ASAL treated A549 lung cancer cells which indicates cellular apoptosis. M = 1kb DNA marker; con' = without ASAL; ASAL = with 1.5 mg/ml ASAL, 24 hr incubation.

- 42 -



### 11. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 폐암 세포주의 세포 사멸 단백질 발현

A549 폐암 세포주의 성장 억제를 일으키는 분자적 기전에 세포사멸의 지표인 PARP의 절단 정도를 western blot을 통해 관찰하였다. A549 폐암 세포주에 ASAL을 1.5 mg/ml 을 처리하고, NIH/3T3 치은 섬유아세포주에 ASAL을 2.0 mg/ml의 농도로 24시간 처리 한 후, 단백질 발현을 정도를 비교하였다. NIH/3T3 치은 섬유아세포주에서 ASAL 처리하지 않은 군과 ASAL 2.0 mg/ml 처리한 군의 비교해 보았을 때, cleaved PARP 단백질 활성이 유도되는 현상을 관찰 할 수 없었으며, 이는 세포사멸이 유도되지 않음 을 시사한다. 반면 A549 폐암 세포주에서는 ASAL을 처리한 군에서 PARP의 절단이 일어나 cleaved PARP 단백질 발현이 확연히 증가되었다(Fig. 12A). Cleaved PARP 단백질 발현을 통해서 A549 폐암 세포주에서는 ASAL을 처리하지 군에 비해 ASAL 을 처리한 군에서 약 30배 정도 세포사멸이 유도되고 있음을 나타내었고, NIH/3T3 섬유아세포주에는 ASAL이 세포사멸에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다(Fig. 12B).

- 43 -











Collection @ chosun



Fig. 12. Effects of Anthriscus sylvestris Hoffmann aqueous layer (ASAL) on cell apoptosis and PARP activity in NIH/3T3 fibroblast and A549 lung cancer cells by western blot analysis. (A) Western blot analysis for the expression of cleaved PARP in A549 lung cancer cells and NIH/3T3 fibroblast treated with ASAL (A549 lung cancer cells : 1.5 mg/ml, NIH/3T3 fibroblast cells : 2.0 mg/ml) for 24 h, using  $\beta$ -actin as protein loading control. Significant cleaved PARP (85 kDa) was observed at 24 h after the treatment of ASAL in A549 lung cancer cells. (B) Summary of densitometric analysis normalized to control. The results represent the data of three assays (means  $\pm$  SD). \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 versus the control.

- 45 -





### 12. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 이종이식 누드마우스 종양 모델의 종양성장 억제 효과

In vitro 실험 결과를 근거로 하여, in vivo 실험에서 ASAL의 종양 억제 효과를 결정하기 위하여 정상적인 누드마우스에 A549 폐암 세포주를 마우스 피하에 주사하여 종양을 이식하였다. 모든 실험동물에서 성공적으로 종양이 발생되었으며, 이식한 종양 이 육안으로 인지 가능한 종양 결절이 생기기까지는 평균 약 7일이 소요되었다. 종양 형성 후, 시간이 경과함에 따라 모든 누드마우스에서 종양의 발생과 성장이 관찰 되었으며, 2일 간격으로 종양의 크기를 측정하여 종양성장 곡선으로 나타내었다. 실험 개시일 부터 실험 종료일 까지 정상군은 멸균수를 kg당 200 mg를 경구 투여하였으며. 실험군은 ASAL을 kg당 80 mg과 kg당 200 mg을 매일 경구 투여하여 종양의 크기를 측정한 결과, 정상군과 실험군 모두 종양의 크기가 지속적으로 증가하는 양상을 보였다. 15일 째부터는 정상군과 실험군의 종양 크기 차이를 쉽게 알 수 있었으며, 실험 종료일 30일 째 비교 시, 정상군에 비해 ASAL을 kg 당 80 mg 경구투여 한 실험군에서는 약 1.5 배, kg 당 200 mg 경구투여 한 실험군에서는 약 2배 정도 종양 크기의 증가 비율이 낮은 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 13A). 실험 종료 후, 정상군과 2군의 실험군에서 종양 적출 전의 마우스와 적출 후 종양의 크기를 비교 하였을 때, 정상군에 비해 2군의 실험군에서 모두 종양의 크기가 작은 것을 육안 상으로 관찰 할 수 있었다. 종양의 크기 비교 시, 정상군에 비해 ASAL을 kg 당 80 mg 경구투여 한 실험군에서 좀 더 작았으며, ASAL을 kg 당 200 mg 경구 투여 한 실험 군에서는 가장 작었다. 이는 농도 의존적으로 종양의 크기가 줄어들었음을 나타낸다(Fig. 13B). ASAL을 30일간 경구 투여하고 증식한 종양의 크기를 측정한 결과, 정상군의 경우 실험 개시일 측정한 종양의 크기가 85.10 ± 1.43 mi에서 실험 종료 후 종양의 크기 측정 시 1706.10 ± 2.25 mi로 약 20배 종양의 크기가 증가하였다. ASAL을 kg당 80 mg을 경구투여 한 실험군의 경우 종양의 크기는 58.09 ± 2.50 ㎜에서 816.10 ± 2.13 ㎜으로 약 14배 정도 증가되었 으며, ASAL을 kg당 200 mg 경구 투여 한 실험군의 종양의 크기는 94.81 ± 1.80 ml 에서 906.70 ± 1.26 빼으로 약 9.5배 정도 증가되었다. 실험 개시일 측정한 종양의 크기와 실험 종료 후 종양의 크기 측정 비교 시, ASAL을 kg당 200 mg 경구 투여 한 실험군 의 종양의 크기가 가장 작게 형성되었다. 종양의 무게는 실험 종료 후 측정하였으며, 정상군은 0.830 ± 0.48 g, ASAL을 kg당 80 mg 경구 투여 한 실험군은 0.496 ± 0.70 g,

- 46 -





ASAL을 kg당 200 mg을 경구 투여 한 실험군은 0.906 ± 0.82 g으로 정상군에 비해 실험군이 약 1.3 ~ 1.5배 정도 작았다. ASAL의 종양성장 억제 효과는 종양의 크기 및 무게를 확인하여 종양성장 억제 효과를 계산하였으며, 정상군에 비해 ASAL을 kg 당 80 mg 경구 투여 한 실험군에서 약 45.6%, ASAL을 kg당 200 mg 경구 투여 한 실험군에서는 약 59.4%의 종양성장 억제 능력을 나타내었다(Table 3).



Days after tumor cell implantation



Collection @ chosun



B



A549 s.c xenograft tumor model

- 48 -





Fig. 13. Anti-cancer effects of from Anthriscus sylvestris Hoffmann aqueous layer (ASAL) on tumor growth in A549 subcutaneous xenograft nude mouse tumor models. (A) A549 s.c xenograft nude mouse models were administered 80 mg/kg and 200 mg/kg orally for up to 30 days. Tumor volumes were measured every other day a week using a caliper and calculated as  $(width)^2 \times \text{length}/2$ . Tumor volume between control and ASAL treated group was statistically significantly different at P < 0.05 by two way ANOVA. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. (B) Images of KB s.c xenograft nude mouse tumor models and xenograft tumors obtained from mouse. Tumors were resected from the mice on 30 day.

- 49 -





Table 3. Inhibitory effects of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer(ASAL) on the tumor growth of A549 subcutaneous xenograft nude mouse models.

Group and dose	Tumor size (mm)		Tumor Weight (g)	TID (%)
	Begin	End	i unoi weight (g)	
Control	85.10±1.43*	1706.10±2.25	$0.840 \pm 0.48^{*}$	
ASAL (80 mg/kg)	58.09±2.50*	816.10±2.13	$0.496 \pm 0.70$	45.6%
ASAL (200 mg/kg)	94.81±1.80*	906.70±1.26*	0.606±0.82	59.4%

Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3); \* p < 0.05 versus control, \*\* p < 0.01 versus control. Significant difference was calculated by on-way ANOVA.







## 13. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 이종이식 누드마우스 종양 모델 조직의 세포사멸 단백질 발현

ASAL에 대해 A549 폐암 세포주에서 세포사멸 표지 단백질인 PARP의 단백질이 절단되어 cleaved PARP 단백질 발현이 현저하게 증가함으로 인해 세포사멸이 유도된 결과(Fig. 12), A549 이종이식 누드마우스 종양 모델에서 채취한 종양의 조직으로부터 단백질을 분리하여 세포사멸에 관한 단백질 발현을 분석하였다. Pro-caspase-8은 세포 사멸의 초기시행자로서 세포사멸의 진행과정 중에 절단되어 cleaved caspase-8으로 활성화 되어 하류의 pro-caspase-3를 활성 이량체인 cleaved caspase-3로 세포사멸 실행인자를 만든다. ASAL이 caspase의 활성을 유도하는지를 검증하기 위하여 kg당 200 mg의 멸균수를 경구 투여 한 정상군과 kg당 200 mg ASAL을 경구 투여 한 실험군 의 종양 조직에서 분리한 단백질로 이들 caspase와 PARP 항체를 사용하여 단백질의 발현 변화를 비교하였다. ASAL을 kg당 200 mg을 경구 투여 실험군이 정상군에 비해 cleaved caspase-3, cleaved caspas-8의 단백질의 발현이 증가하였고, caspase-3가 실행됨에 따라 PARP가 절단되어 cleaved PARP 단백질의 발현이 증가되었다(Fig. 14A). ASAL 처리에 의한 단백질 발현의 정도를 그래프로 비교하였을 때, cleaved caspase-8은 약 8배, cleaved caspase-3은 약 8배, cleaved PARP은 약 10배 증가하였 으며(Fig. 8B), 이는 A549 이종이식 누드마우스 종양 모델에 ASAL의 경구 투여로 인한 종양억제 효과가 세포사멸 과정을 통하여 종양성장이 억제됨을 시사한다.

- 51 -











Collection @ chosun



Fig. 14. Effects of Anthriscus sylvestris Hoffmann aqueous layer (ASAL) on the expression of cleaved caspase–3, 8 and Cleaved PARP in an A549 subcutaneous xenograft nude mouse tumor model tissue. (A) Protein samples extracted from the tumors were tested for expression of cleaved caspase–3, 7, 9, PARP and cleaved PARP proteins by Western blot analysis.  $\beta$ -actin served as loading control. These protein expression changes are implicated in the apoptotic pathway. (B) Summary of densitometric analysis normalized to control. The results represent the data of three assays (means  $\pm$  SD). \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01versus the control.

- 53 -





## 14. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 A549 폐암 세포주의 세포사멸 관련 분자적 기전

ASAL에 대한 A549 폐암 세포주의 세포사멸에 관한 분자적 기전을 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 암 발생에 관여하는 종양 억제 유전자인 p-53의 인산화에 의해 ASAL의 처리한 군에서 단백질의 발현이 처리 하지 않은 군에 비해 현저하게 증가 하였으며(Fig. 15A), 이를 그래프로 비교하였을 때 약 13배 정도 증가하였다(Fig. 15B). 폐암 세포종을 포함한 많은 상피세포 종양 표면에는 표피성장인자 수용체 (epidermal growth factor receptor, EGFR)와 EGF 성장인자가 존재한다. 이는 비정상 적으로 활성화되어 있고, EGFR-tyrosine kinase의 활성화로 인해 지속적인 세포 증식. 주변 조직에 대한 침범, 전이, 혈관 형성을 일으키며 세포생존을 증가시킨다고 밝혀져 있다(47). ASAL을 처리한 실험군에서 phospho-EGFR (Tyr 1068)이 인산화되어 ASAL을 처리하지 않은 군에 비해서 단백질 발현이 현저히 감소되었으며(Fig. 16A). 그래프로 비교하였을 때 약 9배 이상 감소됨을 비교할 수 있었다(Fig. 16B). A549 폐암 세포에서 ASAL의 성장억제를 일으키는 기전을 규명하기 위해 내인성과 외인성 세포사멸 경로의 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 caspase-3, caspase-8 및 caspase-9의 변화를 확인 하였다. ASAL을 1.5 mg/ml 처리 한 A549 폐암 세포주 에서 caspase-8, 9의 활성화를 증가시켰으며, 활성화 된 caspase-8, 9은 표적기질에 따라 아미노산 배열 중 caspase-3를 활성화시켜 최종적으로 PARP를 절단하여 세포 사멸을 유도하였다(Fig. 17A). ASAL을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포의 단백질 발현 정도를 그래프로 비교하였을 때, cleaved caspase-9은 ASAL을 처리하지 않은 군에 비해 약 15배, cleaved caspase-8은 약 12배, cleaved caspase-3는 약 10배 정도 증가되었으며(Fig. 17B), 최종적으로 PARP가 절단되어 세포사멸을 유도되어 세포성장이 억제되었다Fig. 12). 이와 같은 결과는 ASAL이 A549 폐암 세포주에서 EGF Receptor tyrosine 1068 인산화 억제를 유도하여 caspase 의존성 분자적 기전에 의해 세포사멸이 유도됚을 시사한다.

- 54 -







В





Fig. 15. Phosphorylation of p53 by treatment of Anthriscus sylvestris Hoffmann aqueous layer (ASAL) in A549 lung cancer cells. (A) Western blot analysis for expression of phospho-p53 (Ser 15) in A549 lung cancer cell treated with 1.5 mg/ml for 24h, using  $\beta$ -actin as protein loading control. The expression of Phospho-p53 (Ser 15) significantly increased in ASAL treatment. These protein expression changes are implicated in the apoptotic pathway. (B) Summary of densitometric analysis normalized to control. The results represent the data of three assays (means  $\pm$  SD). \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 versus the control.

- 55 -





Α





Fig. 16. Inhibitory activity of Anthriscus sylvestris Hoffmann aqueous layer (ASAL) on epidermal growth factor receptor (EGFR) in A549 lung cancer cells. (A) Activity of Erk and its downstream effectors as assessed by western blotting in A549 lung cancer cell treated with 1.5 mg/ml for 24h, using  $\beta$ -actin as protein loading control. The expression of phospho-EGFR (Tyr 1068) significantly decreased in ASAL treatment. (B) Summary of densitometric analysis normalized to control. The results represent the data of three assays (means ± SD). \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 versus the control.

- 56 -

Collection @ chosun



A



B



**Cleaved caspase-3** 



- 57 -





Fig. 17. Molecular Mechanisms of apoptosis related proteins by treatment of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) in A549 lung cancer cells. (A) cells were seeded at  $3 \times 10^5$  and then treated with concentration of the *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) for 24 h. cleaved caspase–3, 8, 9, PARP and 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. (B) Summary of densitometric analysis normalized to control. The results represent the data of three assays (means  $\pm$  SD). \* *P* < 0.05 and \*\* *P* < 0.01 versus the control.

- 58 -




# 15. 전호 수용성 추출물(ASAL)에 대한 누드마우스의 혈액학적, 생·화학적 검사

정상적인 누드마우스에 멸균수과 ASAL을 kg당 500 mg의 고용량으로 28일 동안 반복 경구투여 하는 동안 정상군과 실험군의 모든 마우스에서 시험물질 투여로 인한 일반 증상이 관찰되지 않았으며, 사망동물 또한 발생하지 않았다. 부검 시 채취한 혈액에 대하여 혈액학적 지표를 분석한 결과, 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈, 혈소판, 적혈구 용적률, 림프구, 단핵구, 호중성, 호산구, 호염구의 모든 군 간에 유의할 만한 차이가 나타나지 않았다. 또한 생·화학적 지표 분석 결과, 간의 합성 능력 지표인 총 단백질과 알부민 모두에서 정상대조군과 차이를 보이지 않았으며, 지질대사의 지표인 콜레스테 롤에도 영향을 미치지 않았다. 이외의 혈중 생·화학적 수치의 혈청 GPT, 혈청GOT, 빌리루틴에서도 유의할 만한 결과는 나타나지 않았다. 이와 같은 혈액학적, 생·화학적 검사 결과를 바탕으로 ASAL의 고용량에서도 마우스의 전신적인 건강에 유의할 만한 소견은 없었으며(Table 4), 이는 ASAL의 누드마우스에 대한 안정성을 시사한다.

- 59 -





Table 4. Hematology values of nude mouse treated orally with *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) for 28 days.

Control (n=5) ASAL (n=5)

Group	백혈구	적혈구	혜모글로빈	적혈구 용정률	혈소관	림프구	단핵구	호중구	호산구	호염구
	10 <sup>3</sup> /1117	10 <sup>3</sup> /mm²	g/dl	%	10 <sup>3</sup> /mm <sup>4</sup>	%	%	%	%	%
Control	1.2±	9.7±	14.2±	46.6±	617.5±	47.6±	1.4±	44.8±	4.8±	0.1±
	0.17	0.14	1.35	1.35	98.3	6.54	0.33	6.41	1.50	0.01
ASAL	1.2±	9.1±	45.1±	45.1±	647.3±	39.1±	1.7±	53.3±	5.1±	0.4±
	0.24	1.04	4.50	4.50	110.0	5.81	0.34	8.37	1.10	0.05

Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3); \* p < 0.05 versus control, \*\* p < 0.01 versus control. Significant difference was calculated by on-way ANOVA.







Table 5. Serum biochemistry values of nude mouse treated orally with *Anthriscus sylvestris* Hoffmann aqueous layer (ASAL) for 28 days.

Control	(n=5)
ASAL	(n=5)

Group	알부민	혈청 GPT	혈청 GOT	빌리루틴	콜레스테롤	총 단백질
	g/dl	U/L	U/L	mg/dl	mg/dl	g/dl
Control	$\begin{array}{c} 1.47 \pm \\ 0.04 \end{array}$	21.27± 1.81	31.20± 1.83	0.01± 0.01	77.77± 6.37	4.29± 0.05
ASAL	1.48± 0.19	23.40± 3.91	33.43± 1.62	0.01± 0.01	75.80± 4.01	4.63± 0.09

Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3); \* p < 0.05 versus control, \*\* p < 0.01 versus control. Significant difference was calculated by on-way ANOVA.





### Ⅳ. 총괄 및 고안

전 세계적으로 과학 기술의 발전, 물질적인 풍요와 함께 의료 수준도 급격히 향상 되었지만 이에 따른 환경 오염, 스트레스의 증가, 식생활의 서구화 등으로 인해 발암성 물질 및 자극에 쉽게 노출됨으로서 암의 발생률과 사망률 또한 증가하고 있다. 20세기 에 들어서 암에 대한 관심이 높아지면서 암의 치료나 약물에 대한 연구가 활발히 이루 어지고 있으며, 항암제 시장은 심혈관계, 신경계 질환과 더불어 전 세계에서 세 번째로 큰 시장규모를 차지하고 있다. 그러나 현재 대부분의 암 치료는 방사선을 이용하거나 합성화학약품으로 알칼리화제(alkylating agents), 대사길항제(antimetabolites), 항생물질 (antibiotics)등을 이용하며, 이들은 대부분 면역기능과 조혈기능에 심각한 이상을 초래 하는 강한 독성을 보여 효과적인 치료에 많은 문제점을 보이고 있다. 또한 항암제는 암세포의 성장을 효과적으로 억제하기도 하지만, 때로는 정상 세포에 대해서 독성을 나타내기도 한다. 따라서 최근 부작용을 최소화시킴으로서 정상세포에는 무해하며 암 세포의 세포사멸을 유도시키기 위한 연구의 일환으로 다양한 약용식물의 생리 활성 물질 을 분리·정제하고 이들의 항암효능을 분석한 천연물 신약 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(47, 48). 1981년부터 2012년까지 개발된 신약 중 천연물에서 유래하였거나 천연물 유래 물질을 바탕으로 합성된 화합물은 전체의 52%로 나타났으며, 1940년대에 서 2012년까지 개발된 항암제 중 천연물로부터 확보되었거나 천연물 유래 물질을 기반 으로 합성된 화합물은 전체의 60%로 나타나 천연물이 의약품, 특히 항암제 개발을 위한 자원으로서 중요한 역할을 차지하고 있다. 현재 임상에서 많이 사용되고 있는 항암제 중 paclitaxel, vinblastine, vincristine 등도 모두 천연물로부터 유래된 것이며, 이러한 개발은 높은 투자 효율성을 가진 고부가가치 산업으로 대두되고 있다(49, 50).

예로부터 약용식물로서 이용되어 온 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)는 두통, 감기, 백일해, 천식 등의 민간요법 치료제로 오래전부터 사용되어 왔으며, 최근에는 항염증, 항균작용 및 항암 효과가 있다고 보고하였다(51, 52). 여러 논문 결과에서 전호 로부터 쿠마린, 플라보노이드 및 리그난 계열의 성분들을 분리하여 보고 한 바 있으며 (53), 이 중 전호를 메탄올을 이용하여 추출하여 분리 및 정제 하여 얻은 리그난 계열 의 deoxypodophyllotixin이라는 성분이 우수한 항암효과가 있음을 여러 연구에서 보고 하였다. HeLa 자궁경부암 세포, MCF-7, MDA-MB-231 유방암세포에서 세포사멸을

- 62 -





유도하여 암 예방제로서 유용하게 이용될 수 있다고 보고되고 있으며(54), SGC-7901 위암세포에서 세포주기인 G2/M기 세포주기 억제 및 세포사멸 관련 단백질의 발현을 통해 세포성장을 억제함을 확인 한 동시에 동물 실험을 수행하여 종양성장 억제 효과에 대한 연구를 보고 한 바 있다(55). 그러나 deoxypodophyllotixin은 물에 대한 용해도가 떨어져 이를 용해하기 위해서 알코올류, 염화메틸렌, 클로로포름 등의 유기용매를 사용 하여 추출하는 것이 이상적이라고 보고되어지고 있으며, 선행연구에서는 이를 유기 용매에 용해하여 실험을 진행하고 있다. 또한 현재까지 보고 된 연구에서 전호로부터 항암효과 검색에 사용된 암세포들은 위암, 전립선암, 대장암, 유방암 등에 주로 국한 되어 연구 되고 왔으며, 구강암 및 폐암에 대한 연구는 거의 보고되어 있지 않다.

본 연구에서 사용 된 전호 추출물은 전호로부터 분리한 수용성 추출물로서 물에 대한 용해도가 매우 좋으며, 이러한 수용성 추출물에 대해 우수한 항암효과를 지님을 발견하였다. 더불어 구강암 및 폐암세포에서 세포성장 억제 효과 및 그 분자적 기전을 밝히고, 구강암 및 폐암 이종이식 종양 동물모델을 이용한 전호 수용성 추출물 (ASAL)의 경구투여에 대한 종양성장 억제 효과를 나타내었다.

전호의 항암효과에 대한 선행 실험에서는 전호로부터 메탄올, 부탄올, 에틸아세테이트 등과 같은 용매로 추출하여 DMSO 등의 유기용매를 사용하여 실험을 수행하였으며, 본 실험에 사용된 추출물은 메탄올 추출 후 수용층에서 얻은 추출물을 물로 용해하여 실험을 수행한 차이가 있다. 이전 실험에서 전호를 메탄올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 등의 다양한 용매를 이용하여 분획한 후, 그 분획의 추출물을 PC-3 전립선 암세포에 처리하여 세포성장 억제를 확인 한 바 있다. PC-3 전립선 암세포에 대해 메탄올과 클로르포름 분획에서 얻은 추출물은 대조군에 비해 약 4배 이상의 세포성장 억제효과를 보였으며, 에틸아세테이트 분획에서는 역 2배 정도의 세포성장 억제 효과 를 보였다. 그러나 수용층 분획에서는 다른 용매 분획에서 보다 세포성장 억제효과가 매우 낮았으며 약 0.5배 정도의 세포 성장 억제를 보였다(56). 이와 비교 하였을 때, 구강암 및 폐암세포에서 ASAL은 수용층에서 높은 세포성장 억제 효과를 보였으며, 수용성 추출물이라는 점으로서 가치는 더 우수할 것으로 사료된다. 최근 구강암의 항암 효과에 대해 다양한 천연물을 이용한 연구가 보고되고 있으며, 콩, 진달래꽃, 활 나무, 쑥 등의 추출물이 구강암 세포인 KB 세포주에 대해 유의한 세포독성을 나타냄을 보고 한 바 있다(57, 58). 이러한 연구를 바탕으로, ASAL을 구강암 세포주에 적용하여 세포 성장 억제 및 종양성장 억제 효과를 확인하였다. 이전 연구에서는 전호로부터 세포와 동물 실험을 통해 이에 미치는 세포독성 및 안정성에 대해 확인한 바 없으며, 본 논문

- 63 -



에서는 먼저 정상 세포인 흰쥐의 초대 배양 연골세포와 마우스의 치은 섬유아세포에서 ASAL을 처리하여 세포독성을 평가 한 결과, 최고 농도인 5.0 mg/ml까지 세포생존율에 아무런 변화가 없었다(Fig. 3, 4, 10). 또한 누드마우스에 ASAL을 kg 당 500 mg씩 30일 동안 매일 경구 투여하여 누드마우스의 혈액학적, 생·화학적 검사에서도 유의할 만한 차이가 없었으며, ASAL이 누드마우스에서 kg 당 500 mg까지 무해한 것으로 판단되었다(Table 4). ASAL의 세포독성 및 안정성 확인 후, ASAL을 KB, FaDu 구강암 세포주에 처리하여 세포성장 억제 효과를 보았다. KB, FaDu 구강암 세포주에서 모두 농도 의존적으로 세포성장 억제 효과를 보였으며(Fig. 4), 핵 내 DAN 분절화 및 세포 사멸 관련 단백질 발현을 통해 세포사멸이 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 5, 6). 구강암은 다른 암으로 전이 유발이 많으며, 신체 구조상 구강과 가까이 존재하여 전이 유발이 많은 암 중 하나가 폐암이다. 또한 최근에 폐암 치료제로 개발된 항암제인 제피티닙이 구강암에서도 항암효과가 있음을 보고하여 구강암과 폐암을 연관하여 연구할 필요성이 크다고 할 수 있다(25, 26). 구강암과 마찬가지로 A549 폐암 세포주에서도 ASAL의 처리에 의해 농도 의존적으로 세포성장 억제 효과를 보였으며(Fig. 10), 핵 내 DNA 분절화 및 세포 사멸 관련 단백질 발현 변화를 통해 세포사멸이 유도됨을 알 수 있다 (Fig. 11, 12). 이러한 in vitro 실험의 결과를 토대로, KB 구강암 이종이식 누드마우스 종양 모델을 만들어 종양 성장 억제 효과를 확인 한 바, 정상군을 기준으로 kg당 400 mg의 ASAL을 경구투여 한 실험군에서 약 40.0%의 종양성장을 억제시켰다 (Fig. 7, Table 2). A549 폐암 이종이식 누드마우스 종양 모델에서는 kg당 80 mg의 ASAL을 경구투여 한 실험군에서는 45.6%, kg당 200 mg의 ASAL을 경구 투여 한 실험군에서는 약 59.4%의 종양 성장을 저해하였다(Fig. 13, Table 3). 기존의 전호를 이용한 동물실험은 유기용매를 사용하여 주입한 연구 보고가 있으며(44), 전호의 수용성 추출물에 대해서 동물 실험을 수행한 연구는 보고 된 바 없다. 이러한 세포 성장 및 종양성장 억제의 분자적 기전에 있어 이전의 여러 연구에서는 EGFR 같은 growth factor receptor tyrosine kinase가 활성화되어 세포의 증식, 성장, 분화를 조절 하는데 중요한 역할을 한다고 보고되고 있으며(59), Extracellular signal regulated kinase (Erk)가 활성화되어 핵 내의 cyclin D1 활성을 유도하여 G1 기에서 S 기로 세 포주기가 바뀌면서 DNA 합성을 일으켜 세포의 증식, 생존 및 분화 등의 성장 발달과 암 발생과도 연관이 된다고 보고 한 바 있다(60). 따라서 EGFR 및 Erk 신호전달체계 의 억제는 암을 치료하기 위한 하나의 표적이 될 수 있다. 본 실험결과에서 KB, FaDu 구강암세포에 ASAL을 처리에 의한 E가 신호전달체계 억제를 확인 한 결과, ASAL을

- 64 -



처리하지 않은 군과 비교 시, ASAL을 처리한 군에서 Phospho-Erk 단백질이 인산화 되어 발현이 현저하게 감소하였다(Fig. 7). 또한 A549 폐암세포에서 EGFR 및 Phospho-EGFR (Tyr 992 / Tyr 1045 / Tyr 1068)의 단백질 발현을 확인 한 결과, Phospho-EGFR (Tyr 1068)의 단백질의 인산화 발현이 현저하게 감소하였으며(Fig 16), 종양 억제 단백질인 Phospho-p53 단백질이 인산화 되어 단백질 발현이 증가하였 다(Fig. 15). 이러한 결과를 종합해 보면, ASAL이 KB, FaDu 구강암세포에서는 Erk 1/2 MAP kinases의 인산화에 의한 caspase 의존성 기전에 의한 세포사멸을 유도함을 알 수 있으며, A549 폐암세포에서는 EGF Receptor tyrosine 1068 인산화 억제에 의한 caspase 의존성 기전에 의한 세포사멸을 유도함으로써 암세포의 성장이 억제되는 것으 로 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통하여 기존 항암제에 비해 ASAL은 부작용을 최소화하고 물에 대해 용해도가 좋으며, 구강암 및 폐암세포의 성장 억제 효과가 있을 뿐만 아니 라 이종이식 누드마우스 종양 모델에서 종양 성장 억제 효과에 탁월하다. 이러한 결과 에 따라 향후 천연물에서 얻은 수용성 추출물을 이용한 항암제 신약 개발의 연구에 이용 가능할 것으로 기대되며, 더 나아가 항암활성을 나타내는 물질을 단일 순수화합 물 및 복합 성분을 분리하고 그 물질의 항암활성 작용기전을 규명하는 연구가 계속 되어야 할 것으로 사료된다.

- 65 -





Collection @ chosun

### V. 결 론

전호 (Anthriscus sylvestris Hoffmann)는 알칼로이드, 쿠마린 및 리그난 계열 등의 많은 성분이 함유되어 있으며, 오래전부터 건조된 뿌리를 이용하여 두통, 감기, 백일해, 천식 등의 민간요법 치료제로 사용되어 왔다. 그러나 현재 암세포에 대한 세포성장 억제 및 종양 억제의 항암효과에 대한 연구는 미흡한 상태이며, 임상에서 사용되는 대부분의 항암제가 지용성 물질이라는 점에 따라 용해도 문제와 용매에 대한 독성이 개발과정의 큰 문제로 자리하고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 천연물 유래 수용성 항암제 신약 개발이 절실히 필요하다. 본 연구에서는 전호의 수용성 추출물을 획득하여 구강암 및 폐암 세포에서 세포성장 억제 및 그 분자적 기전을 확인하고, 이종이식 누드 종양 모델을 이용하여 종양성장 억제 효과를 확인하였다.

1. 전호 메탄올 추출물을 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol의 용매분획 과정을 거쳐 수용성 추출물을 획득하고, agilent HPLC chromatogram을 이용해 수용성 추출물 내의 다양한 성분을 피크로 분석하였다.

2. 전호 수용성 추출물을 흰쥐의 초대 배양 연골세포에 처리하여 5.0 mg/ml까지 세포 독성이 전혀 없었으며, 누드마우스를 이용한 혈액학적·생화학적 검사에서도 유의할 만한 차이점을 보이지 않았다. 이는 전호 수용성 추출물의 독성에 대한 안전성을 시사 한다.

3. 전호 수용성 추출물을 KB, FaDu 구강암세포에 다양한 농도로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 세포 성장이 억제되었으며, 핵 내에 존재하는 genomic DNA를 분절화 시킴으로서 세포사멸을 유도하였다. 이러한 세포사멸은 ERK 1/2 MAP kinases의 인산화 억제에 의한 caspase 의존성 세포사멸이 유도되는 분자적 기전이다.

4. 전호 수용성 추출물을 A549 폐암세포에 다양한 농도로 처리하였을 때, 농도 의존적 으로 세포성장이 억제되었으며, 핵 내에 존재하는 genomic DNA를 분절화 시킴으로서 세포사멸을 유도하였다. 이러한 세포사멸은 종양 성장 억제 유전자인 p53 (Ser15)의

- 66 -



인산화를 증가시켜 세포성장을 억제하였으며, EGFR receptor tyrosine 1068의 인산화 억제에 의한 caspase 의존성 세포사멸이 유도되는 분자적 기전이다.

5. 전호 수용성 추출물이 KB 구강암 이종이식 누드마우스 종양 모델에서 약 40%의 종양성장을 억제하였으며, A549 폐암 이종이식 누드마우스 종양 모델에서는 약 59.4% 의 종양성장을 억제하였다. 또한 종양의 조직에서 단백질의 변화를 확인 한 결과, caspase 의존성 세포사멸이 유도되는 것을 알 수 있었다.

본 연구의 결과로서, 전호 수용성 추출물이 구강암 및 폐암 세포에서 세포사멸을 유도함으로서 세포 성장을 억제하였으며, 더불어 구강암 및 폐암 이종이식 누드마우스 종양 모델에서 종양 억제 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구의 결과로 기존 항암제의 용해도 문제와 용매의 독성 및 부작용을 최소화 할 수 있는 수용성 추출물이 라는 특이성을 갖는 새로운 천연물 유래 수용성 항암제 연구에 중요한 초석이 될 것으로 사료된다.

- 67 -





## 참고문헌

1. Cannell R. How to Approach the Isolation of a Natural Product, in Natural Products Isolation, *Methods in Biotechnology*. 1988;4:1–51.

2. Puni V, Saint-Dic D, Daghfal S, Kanwar JR. Microbial-based therapy of cancer; a new twist to age old practice, *Cancer Biol Ther.* 2004;3:708-714.

3. Reddya B, Odhava KD. Bhoolab, Natural products for cancer prevention; a global perspective, *Pharmacology & Therapeutics*. 2003;99:1–13.

4. Geissman, Ed. T.A. The Chemistry of Flavonoids Compounds, Science. 1962;139.

5. Yasukawa KY, Ikeya H, Mitsuhashi M, Iwasaki M, Aburada S, Nakagawa M, Takeuchi M Takido. Gomisin A inhibits tumor promotion by 12–O -tetra-decanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin, *Oncology*. 1992;49:68–71.

6. Stefania Nobili, Donatella Lippi, EwaWitort Martino Donnini. Letizia Bausi, Enrico Mini, Sergio Capaccioli. Natural compounds for cancer treatment and prevention, *Pharmacological Research*. 2009;59:365–78.

7. Patil SL, Mallaiah SH, Patil RK. Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation, *J Med Phys.* 2013;38(2):87–92.

8. Sun L, Li E, Wang F, Wang T, Qin Z, Niu S, Qiu C. Quercetin increases macrophage cholesterol efflux to inhibit foam cell formation through activating PPAR  $\gamma$  -ABCA1 pathway, *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;1;8(9):10854–60.

- 68 -





9. Seo MJ, Lee YJ, Hwang JH, Kim KJ, Lee BY. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling. *J Nutr Biochem.* 2015;26(11):1308–16.

10. Lee RH, Cho JH, Jeon YJ, Bang W, Cho JJ, Choi NJ, Seo KS, Shim JH, Chae JI. Quercetin induces antiproliferative activity against Human hepatocellular carcinoma (HepG2) Cells by suppressing specificity protein 1 (Sp1), *Drug Dev Res.* 2015;76(1):9–16.

11. Son DY, Kim YJ. Antioxidant and anticancer properties of hot water and ethanol extracts from the roots of Smilax china L, *Korean J Food Preserv*. 2013;20(5):691–698.

12. Liou CM, Tsai SC, Kuo CH, Ting H, Lee SD. Cardiac Fas-dependent and mitochondria-dependent apoptosis after chronic cocaine abuse, *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):5988-6001.

13. Chang KC, Lee DU. Vasodilatory effect of the alkaloid component from the roots of *Cynanchum wilfordi* hemely, *Korean Journal of Life Science* 2000;10(6);584–590.

14. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Ahmed T, Weiselberg LR, Preliminary results of M–VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium, *J Urol*1985;133(3):403–7.

15. Darcy JP Bates, Bethany L Salerni, Christopher H Lowrey, Alan Eastman. Vinblastine sensitizes leukemia cells to cyclin-dependent kinase inhibitors, inducing acute cell cycle phase-independent apoptosis, *Cancer Biol Ther.* 2011;12(4):314–325.

16. Masayuki Fukui, Noriko Yamabe, Bao Ting Zhu. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in *vitro* and in *vivo*,

- 69 -





Eur J Cancer. 2011;46(1):1882-1891.

17. Choi YW, Takamatsu S, Khan SI, Srinivas PV, Ferreira D, Zhao J, Khan IA, .Schisandrene, a dibenzocyclooctadiene lignan from Schisandra chinensis: structure-antioxidant activity relationships of dibenzocyclooctadiene lignans, *J Nat Prod.* 2006;69(3):356–9.

18. Yasukawa K, Ikeya Y, Mitsuhashi H, Iwasaki M, Aburada M, Nakagawa S, Takeuchi M, Takido M. Gomisin A inhibits tumor promotion by 12–O–tetradecanoylphorbol–13–acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin, *Oncology*. 1992;49(1):68–71.

19. Kim DY, Yu HJ, Yoon MS, Park JH, Jang SH, Lee HM. Gomisin A Inhibits Tumor Growth and Metastasis through Suppression of Angiogenesis, *Journal of Life Science* 2012;22(9):1224–1230.

20. Parken DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J cancer*. 1988;41:184–97.

21. Yamachika E, Habte T, Oda D. Artemisinin: an alternative treatment for oral squamous cell carcinom, *Anticancer Res.* 2004;24:2153–2160.

22. 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.* 2008;72:562–567.

23. Lam L, Logan RM, Luke C, Rees GL. Retrospective study of survival and treatment pattern in a cohort of patients with oral and oropharyngeal tongue cancers from 1987 to 2004, *Oral Oncol.* 2007;43(2):150–158.

- 70 -





24. Shingaki S, Takada M, Sasai K, Bibi R, Kobayashi T, Nomura T, Saito C. Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas, *Am J Surg.* 2003;185(3):278–84.

25. Wirth LJ, Haddad RI, Lindeman NI, Zhao X, Lee JC, Joshi VA, Norris CM Jr, Posner MR. Phase I study of gefitinib plus celecoxib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck, *J Clin Oncol.* 2005;23(28):6976–6981.

26. Wirth LJ, Haddad RI, Lindeman NI, Zhao X, Lee JC, Joshi VA, Norris CM Jr, Posner MR. Enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer, *Int J Cancer.* 2003;107(6):1030–1037.

27. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin.* 2012; 62(1):10–29.

28. Belani CP, Choy H, Bonomi P, Scott C, Travis P, Haluschak J, Curran WJ Jr. Combined chemoradiotherapy regimens of paclitaxel and carboplatin for locally advanced non-small-cell lung cancer: a randomized phase II locally advanced multi-modality protocol, *J Clin Oncol.* 2005;23(25):5883–5891.

29. Trodella L, Granone P, Valente S, Turriziani A, Macis G, Corbo GM, Margaritora S, Cesario A, D'Angelillo RM, Gualano G, Ramella S, Galetta D, Cellini N. Phase I trial of weekly gemcitabine and concurrent radiotherapy in patients with inoperable non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol* 2002;20(3):804–810.

30. Hirose T, Mizutani Y, Ohmori T, Ishida H, Hosaka T, Ando K, Shirai T, Okuda K, Ohnishi T, Horichi N, Kubota H, Adachi M. The combination of cisplatin and vinorelbine with concurrent thoracic radiation therapy for locally advanced stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer, *Cancer Chemother Pharmacol.* 

- 71 -



#### 2006;58(3):361-367.

31. Jaiswal G, Jaiswal S, Kumar R, Sharma A. Field cancerization: concept and clinical implications in head and neck squamous cell carcinoma, *J Exp Ther Oncol.* 2013;10(3):209–14.

32. Schmitz S, Ang KK, Vermorken J, Haddad R, Suarez C, Wolf GT, Hamoir M, Machiels JP. Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck: current knowledge and future direction, *Cancer Treat Rev.* 2014;40(3):390–404.

33. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy, *Science* 2004;304(5676):1497–1500.

34. Morris EJ, Geller HM. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase–I: evidence for cell cycle–independent toxicity, *J Cell Biol.* 1996;134(3):757–770.

35. Sharma NK, Kumar A, Kumari A, Tokar EJ, Waalkes MP, Bortner CD, Williams J, Ehrenshaft M, Mason RP, Sinha BK. Nitric Oxide Down-Regulates Topoisomerase I and Induces Camptothecin Resistance in Human Breast MCF-7 Tumor Cells, *PLoS One*. 2015;10(11):1–20.

36. Kim YK, Koo NY, Yun PY. Anticancer effects of CKD-602 (Camtobell®) via G2/M phase arrest in oral squamous cell carcinoma cell lines, *Oncol Lett.* 2015;9(1):136–142.

37. Hendrawati O, Woerdenbag HJ, Hille J, Quax WJ, Kayser O. Seasonal variations in the deoxypodophyllotoxin content and yield of *Anthriscus sylvestris* L. (Hoffm.) grown in the field and under controlled conditions, *J Agric Food Chem*.

- 72 -



#### 2011;59(15):8132-8139.

 38. Darbyshire SJ, Hoeg R, Haverkort J. The biology of canadian weeds, 111, Anthriscus sylvestris (L) Hoffm, Can J Plant Sci. 1999;79:671-682.
39. Hendrawati O, Hille J, Woerdenbag HJ, Quax WJ, Kayser O. In vitro regeneration of wild chervil (Anthriscus sylvestris L.), In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2012;48(3):355-361.

40. Ko SH, Do SH, Kwon YS, Kim CM. A study on the chemical components from the roots of Anthriscus sylvestris, *Kor, J Pharmacogn.* 1992;23(4):225–228.

41. Lim YH, Leem MJ, Shin DH, Chang HB, Hong SW, Moon EY, Lee DK, Yoon SJ, Woo WS. .Cytotoxic constituents from the roots of Anthriscus sylvestris, *Arch Pharm Res* 1999;22:208–212.

42. Hwang DI. Evaluation of the anti-obesity activity and mechanism of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm for the development of functional ingredients, Department of Food Science and Biotechnology *Andon National University*.

43. Shin SY, Yong YJ, Lee YH. Effect of Deoxypodophyllotoxin isolated from *Anthriscus sylvestris* Roots on the expression of cell cycle-regulatory proteins in HeLa Cells, *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2010;53(3):304–309.

44. Wang YR, Xu Y, Jiang ZZ, Guerram M, Wang B, Zhu X, Zhang LY. Deoxypodophyllotoxin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in SGC-7901 cells and inhibits tumor growth *in vivo, Molecules*. 2015;20:1661–1675.

45. Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway, *Cell.* 2008;135(7):1311–1323.

- 73 -





46. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase, *Cell*. 1995;81(5):801-809.

47. Morgillo F, Bareschino MA, Bianco R, Tortora G, Ciardiello F. Primary and aquired resistance to anti-EGFR targetd drugs in cancer therapy, *Differentiation* 2007;75:788–799.

48. Hsieh YJ, Huang HS, Leu YL, Peng KC, Chang CJ, Chang MY. Anticancer activity of Kalanchoe tubiflora extract against human lung cancer cells in vitro and in vivo. *Environ Toxicol.* 2015.

49. Nurcahyanti AD, Wink M. Cytotoxic potentiation of vinblastine and paclitaxel by L-canavanine in human cervical cancer and hepatocellular carcinoma cells, *Phytomedicine*. 2015;22(14):1232–1237.

50. Barbuti AM, Chen ZS. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy, *Cancers (Basel)*. 2015;7(4):2360–2371.

51. Lim HR, Shin SW. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from the roots of *Anthriscus sylvestris, Yakhak Hoeji.* 2012;56(5):320–325.

52. Jin M, Moon TC, Quan Z, Lee E, Kim YK, Yang JH, Suh SJ, Jeong TC, Lee SH, Kim CH, Chang HW. The naturally occurring flavolignan, deoxypodophyllotoxin, inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS expression through the NF-kappaB activation in RAW264.7 macrophage cells, *Biol Pharm Bull.* 2008;31(7):1312–1315.

53. Jeong GS, Kwon OK, Park BY, Oh SR, Ahn KS, Chang MJ, Oh WK, Kim JC,

- 74 -





Min BS, Kim YC, Lee HK. Lignans and coumarins from the roots of Anthriscus sylvestris and their increase of caspase-3 activity in HL-60 cells. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(7):1340–1343.

54. Jung CH, Kim H, Ahn J, Jung SK, Um MY, Son KH, Kim TW, Ha TY. Anthricin Isolated from Anthriscus sylvestris (L.) Hoffm. Inhibits the Growth of Breast Cancer Cells by Inhibiting Akt/mTOR Signaling, and Its Apoptotic Effects Are Enhanced by Autophagy Inhibition, *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013.

55. Wang YR, Xu Y, Jiang ZZ, Guerram M, Wang B, Zhu X, Zhang LY. Deoxypodophyllotoxin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in SGC-7901 cells and inhibits tumor growth in vivo, *Molecules*. 2015;20(1):1661-1675.

56. Cho HJ, Yu SN, Kim KY, Sohn JH, Oh HC, Ahn SC. Screening and purification of an Anti-prostate cancer compoun, Deoxypodophyllotoxin, from *Anthriscus sylvestris* Hoffm, *Journal of Life Science* 2009;19:9–14.

57. Lee SL, Kim JG. Inhibitory effects of Doen-jang (Korean fermented soybean paste) and soybean extracts on the growth of KB cells, *Kor, J, Env, Hith.* 2005;31(5):444–450.

58. Park SW, Kim SG, Kim MJ. Antioxidative activity and cytotoxicity on human KB cell of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz, Flower, *Korean J, Food Preserv.* 2006;13(4):501–505.

59. Lee KY. Targeted therapy of lung cancer, *J Korean Med Assoc.* 2008;51(5):483-491.

60. Yu SA, Kim SC, Jo MS, Suh DS, Kim KH, Yoon MS. Anti-proliferative effect in epithelial ovarian cancer cells by MEK inhibitor AZD6244, *Korean J obstet* 

- 75 -





gynecol. 2010;53(3):243-253.

- 76 -

