



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#) 

2013년 2월

박사학위논문

깨풀 추출물이 구강암 세포주의  
생존률 및 COX-2 발현에  
미치는 영향

조선대학교 대학원

보건학과

김 동 순

깨풀 추출물이 구강암 세포주의  
생존률 및 COX-2 발현에  
미치는 영향

Anti-proliferating effect of *Acalypha australis* Extracts on  
survivability and reveal of COX-2  
on the KB oral carcinoma cell lines

2013 년 2 월 25 일

조선대학교 대학원

보건학과

김 동 순

깨풀 추출물이 구강암 세포주의  
생존률 및 COX-2 발현에  
미치는 영향

지도교수    최 성 우

이 논문을 보건학 박사학위신청 논문으로 제출함

2012년 10월

조선대학교 대학원

보 건 학 과

김 동 순

# 김동순의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 박 종 인

위 원 광주대학교 교수 권기한 인

위 원 서남대학교 교수 김혜연 인

위 원 조선대학교 교수 한미아 인

위 원 조선대학교 교수 최성우 인

2012년 12월

조선대학교 대학원

# 목 차

ABSTRACT	iii
I. 서 론	1
II. 연구 방법	3
A. 실험재료	3
1. 깨풀의 수집	3
2. KB 구강암 세포	3
3. 시약	3
B. 실험방법	3
1. 열수추출	4
2. 메탄올추출	4
3. 구강암 세포주 KB 배양과 화학적 처리	5
4. MTS assay	5
5. Western blot analysis	5
C. 분석방법	6
III. 실험결과	7
A. 구강암 세포 생존율	7
1. 열수 추출 후 MTS assay 결과	7
2. 메탄올 추출 후 MTS assay 결과	8
3. 메탄올 추출 후 깨풀의 저농도 처리 MTS assay 결과	9
4. Western blot	10
IV. 고찰	12
V. 요약 및 결론	14
참고문헌	15

## 표 목 차

표 1. 깨풀 열수 추출물의 KB cells 세포 생존율.....	7
표 2. 깨풀 메탄올 추출물의 KB cells 세포 생존율.....	8
표 3. 저농도에서 깨풀 메탄올 추출물의 KB cells 세포 생존율.....	9

## 그림목차

Fig 1. Effects of hot-water extracts of <i>Acalypha australis</i> on the anti-cancer activity of the human oral cavity carcinoma KB cells.....	8
Fig 2. Effects of methanol extracts of <i>Acalypha australis</i> on the anti-cancer activity of the human oral cavity carcinoma KB cells.....	9
Fig 3. Effects of methanol extracts of <i>Acalypha australis</i> on the anti-cancer activity of the human oral cavity carcinoma KB cells.....	10
Fig 4. Inhibitory effects of classified methanol extracts of <i>Acalypha australis</i> the COX-2 protein expression of the human oral cavity carcinoma KB cells.....	11

ABSTRACT

Anti-proliferating effect of *Acalypha australis* Extracts on  
survivability and reveal of COX-2  
on the KB oral carcinoma cell lines

Kim, Dong Soon

Advisor : Prof. Choi, Seong-Woo. M.D., Ph.D

Department of Health Science

Graduate School of Chosun University

This research conducts how *Acalypha Australis* effects an oral cancer cell line. A result of cell death was occurring after an injection of hot water extract and methanol extract of *Acalypha Australis* to the KB Cell in an oral cancer cell line. These cell death analysis were conducted by MTS Assay, Western Blot Analysis. In results, hot water extract of *Acalypha Australis* had no influence in cell deaths. However, the methanol extract did. It was disposed in concentrated amounts of 50, 100, 125, 150, 200, 250, 500 $\mu$ g/ml. The results of the cancer cell deaths were as follows: after 24 hours - 95%, 57%, 53%, 52%, 30%, 28%, 9%, after 48 hours - 87%, 51%, 35%, 32%, 25%, 15%, 5%, and after 72 hours - 72%, 48%, 29%, 20%, 12%, 10%, 4%. This study suggests that the methanol extract of *Acalypha Australis* can control the possibilities of curing oral cancer. This significant study holds much importance in a development of oral cancer treatment because the methanol extract of *Acalypha Australis* has much less side effects than chemotherapy for cancer treatment.

Key Words: *Acalypha Australis*, oral cancer, KB Cell, methanol extract



# I. 서론

구강암은 발생하는 부위에 따라 혀에 설암, 입술에 구순암, 입천장에 구개암 등으로 구분된다. 구강암은 전체 암에 약 5%의 비중을 차지하며 이중 약 90%가 편평상피세포 암종으로 인접조직으로 침투하거나 전이하는 빈도가 높아 예후가 불량한 암으로 알려져 있다(Mayers EN & Suen JY. 1989). 구강암의 발생률은 인종이나 사회경제적, 지역에 따라 많은 차이가 있다(Arbes SJ Jr, etc 1999; Shiboski CH, etc 2000). 선진국에서는 전체 암에 비해 5%보다 적지만 개발도상국이나 후진국에서는 많이 발생하는 것으로 보고되었다(Parken DM, etc 1980). 예전에는 중년에게 많은 암이었지만 최근 들어서는 흡연, 음주 등의 원인으로 젊은 층에서도 많이 나타나고 있다(Liewellyn CD, etc 2004; Liewellyn CD, etc 2001; Vecchia CL, etc 1997).

구강암은 임상적으로 국소적 침윤 및 경부 임파절 전이를 주로 하며, 원격전이가 비교적 적어 수술이나 방사선 치료 같은 국소요법이 치료의 근간을 이루어왔다. 그러나 구강암으로 인한 생존률은 향상되지 않는 것으로 보고되고 있다(O'Brien CJ, etc 1986; Lam L, etc 2007; Silverman S Jr. 2001). 최근에는 복합화학요법, 방사선요법 및 광범위 절제수술요법 등의 병용요법이 연구되고 있다. 특히 1960년대에 bleomycin과 5-FU(fluorouracil)를 이용한 항암화학요법이 시행되었고 1980년대부터는 cisplatin 등의 약제가 구강암을 포함한 두경부 암종에 효과적으로 작용한다는 보고가 알려지면서 구강암에 대한 항암화학요법은 그 역할이 증가되는 추세이다. 그러나 이러한 항암제의 효능과 함께 나타날 수 있는 골수기능저하나 소화기계 합병증, 신장 독성 및 면역억제 등 부작용이 아직 해결해야 할 과제로 남아있다(이종환과 김명진. 1998; Peterson LJ, etc 1992).

또한, 이러한 구강암의 치료법은 저작, 연하, 발음, 어깨의 불편함 등의 기능적 장애와 안면 외모변형 등을 초래하여 환자의 삶의 질을 떨어뜨릴 수 있다(Chandu A, etc 2005). 따라서 기존 약물의 약효를 가지고 있으면서, 부작용이 적어 기존의 약제를 대체할 수 있는 약효성분을 천연물에서부터 검색하여 신약으로 개발하려는 노력이 항암제를 포함한 여러 난치성 질환치료제 분야에서 활발하게 진행되고 있다. 수십 종의 천연 약용식물을 대상으로 하여 항암효과를 검색하여 그 결과가 보고된 바 있으며(Lee YY, etc 1991) 식물에서 추출된 성분의 항암효과에 대한 보고(Lee JS, etc 1998; Bomser J, etc 1996; Wickramaratne DBM, etc 1995; Mallery SR, etc 2007; Manoharan

S, etc 2006) 및 식물 혼합 추출물에서의 항암 활성 등이 보고되고 있다(Kim JH, etc 1994; Konkimalla VB, etc 2007). 그 중 *Taxus brevifolia* L., *Catharanthus roseus* G. Don, *Podophyllum peltatum* L과 *Camptotheca acuminata* Decne로부터 추출된 paclitaxel (Taxol®), vincristine (Oncovin®), podophyllotoxin과 camptothecin 등이 현재 임상적으로 유용한 화학요법제로서 사용되고 있다(Pezzuto JM. 1997).

구강암 세포주의 항암효과에 대한 선행연구로는 바디나물(*Angelica decursiva*)이 KB 구강암세포에서 시간과 농도에 의존적으로 세포사멸을 유도한다고 보고하였고(이명화, 2011), 김성곤(2003)의 연구에서 황벽나무의 주성분인 berberine이 구강암 세포에 대해 증식억제 효과를 보였다. 또한, 백선피와 복령은 항암제와 같이 처리하였을 때 항암제에 대한 민감도를 올려준다고 보고 되었다(설현철, 2012).

깨풀(*Acalypha australis*)은 우리나라 전역의 들이나 밭에 야생하고 있으며 대극과의 1년생 초본으로 30~50cm 정도로 곧게 자라고 6~8월에 꽃이 핀다. 한방에서는 전초를 철현채라 하여 해열, 이뇨, 변비, 장염, 피부염증의 치료에 사용하고 있다(이창복, 1980; 김재길, 1984; 강소신의학원, 1985). 깨풀은 청열, 이수, 살충, 지혈의 효능이 있고 세균성 하리, 해수토혈, 혈변, 자궁출혈, 복창, 피부염, 창상출혈을 치료하며 물로 달인 액은 적리균, 황색포도상구균, 콜레라균, 탄저균에 대하여 항균작용이 있다(배기환, 2000). 깨풀이 구강암에 대해 항암 효과에 대해 알려진 바는 거의 없다. 따라서 저자는 깨풀이 구강암 세포주에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

## II. 연구방법

### A. 실험재료

#### 1. 깨풀의 수집

깨풀은 부산광역시 강서구 일대에서 채취하여 전초를 음지에서 충분히 건조시킨 후 본 실험의 재료로 사용하였다.

#### 2. KB 구강암 세포

구강암 세포주(KB human oral cancer cells)는 American Tissue Culture Collection(Manassas, VA)에서 구입하여 본 실험에 사용하였다.

#### 3. 시약

본 실험에 사용한 메탄올 시약은 1급 시약을 사용하였다. 또한, LPS(Lipopolysaccharide), 5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) 및 1% penicillin과 streptomycin 등은 Sigma사(USA)로부터 구입하였다. 더불어 10% fetal bovine serum (FBS), 1% 항생제(Gibco, USA), minimum essential medium (MEM)과 serum free media 등은 Gibco사(USA)의 시약을 구입하여 본 실험에 사용하였다.

### B. 실험방법

먼저 깨풀의 건조 시료 100g을 각각 열수 추출과 메탄올 추출을 실시하였다. 이후 KB 구강암 세포주의 세포 생존율을 알아보기 깨풀의 열수 추출물과 메탄올 추출물을 이용하여 MTS assay를 실시하였다. 깨풀 추출물이 세포 내 염증관련 인자들의 protein 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 protein을 분리하여 western blot을 수행하였다.

## 1. 열수 추출

깨풀의 건조 시료 100g과 증류수 1.3L를 이용하여 약탕기(대웅, DWP-5000M)에서 3시간 동안 가열하여 열수 추출을 하였다. 추출이 끝나고 나면, 부직포 여과지를 이용하여 압착 여과하였다. 여과된 추출물을 50 ml 튜브로 나누어 담고, 4,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 여분의 분말 찌꺼기를 침전시켰다. 원심분리 후, 상층액을 두 겹의 여과지(Whatman No. 1)를 이용하여 감압 여과하였다. 감압 여과된 추출물을 회전증발농축기를 이용하여 농축한 후, 동결건조기를 이용하여 동결 건조하였다. 동결건조가 끝난 후 곱게 분쇄하여 실험에 사용하도록 하였다.

## 2. 메탄올 추출

99% 메탄올 1 L에 깨풀 건조 시료 100g을 24시간 침지시켰다. 이 때 2~3시간 단위로 교반하여 시료가 골고루 섞이도록 하면서 추출을 유도하였다. 추출 후 두 겹의 여과지를 이용하여 감압 여과한 후 1차적인 메탄올 추출액을 만들었다. 여과된 추출액을 회전증발농축기를 이용하여 감압 농축하였다. 이 때 water bath의 온도는 35~37°C를 유지하며 메탄올을 제거하여 농축하도록 하였다. 추출 농축액을 chloroform과 1:1의 비율로 혼합하여 강하게 vortexing 한 후 4,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 엽록소 및 여분의 잔여 미세 시료를 층 분리하였으며, 하층의 chloroform이 무색이 될 때까지 3회 이상 반복적으로 과정을 수행하였다. 원심분리를 통하여 엽록소를 완전히 제거한 후 상층액만을 수거하여 회전 증발 농축시켰다. 증발 농축시킬 때 소량의 메탄올을 넣어 농축 효율을 증대시켰다. 농축 추출액을 동결건조한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다.

또한, ethyl acetate 처리를 위하여 상기 방법으로 동일하게 처리한 후 chloroform층이 무색이 되면, 상층액만을 새로운 튜브로 옮긴 후 ethyl acetate와 1:1의 비율로 혼합한 후 4,000rpm에서 2분간 원심 분리하였다. 상층액만을 새로운 용기로 옮겨 담고, 원심분리 후 남겨진 하층부에 다시 ethyl acetate를 처리하여 앞의 방법으로 반복하여 상층부만을 기존에 옮겨 담은 용액이 있는 용기로 수합하였다. 이 과정을 총 3회 반복하여 ethyl acetate를 이용한 폴리페놀화합물을 완전히 얻어내도록 하였다. 옮겨져서 수합된 상층부액을 회전 감압 농축기를 이용하여 감압 농축하여 ethyl acetate를 완전히 날려버리면서 methanol로 치환시키면서 감압 농축하였다. 용매가 완전히 제거되고 얻어진 고체 화합물의 질량을 측정하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 100mg

/ml이 되도록 희석하여 사용하도록 하였다.

### 3. 구강암 세포주 KB 배양과 화학적 처리

구강암 세포는 5% fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml penicillin 및 100 U/ml streptomycin 등을 첨가한 Dulbeccos' modified Eagles medium(DMEM)으로 5% CO<sub>2</sub>의 상태에서 배양하였다.

### 4. MTS assay

KB 구강암 세포주의 세포 생존율을 알아보기 위해 MTS assay를 실시하였다. 깨풀 추출물을 이용한 viability 측정은 Cell Titer 96 A Queous One Solution Cell Proliferation Assay Kit(Promega, Madison, WI)로 제작사의 실험 매뉴얼에 따라 측정하였다. 구강암 세포들은 96-well plate에 분주하고 깨풀 추출물의 농도별 처리 후에 24, 48, 72시간 후에 시간 경과에 따른 세포생존율 반응을 조사하였다. MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-20yl)-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) solution을 첨가하여 ELISA microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 492 nm와 690 nm에서 흡광도와 변화를 측정하여 대조구에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조구와 실험구의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

### 5. Western blot analysis

깨풀 추출물이 세포 내 염증관련 인자들의 protein 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RadioImmunoPrecipitation(RIPA)시약을 이용하여 protein을 분리하여 western blot을 수행하였다. 단백질 상층액을 sodium dodesyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel(PAGE)에 전기영동 한 후 단백질을 PVDF membrane (Bio-rad)에 semi-dry 방법을 이용하여 blotting하였다. 단백질이 이동된 PVDF membrane을 5% non-fat-milk가 포함된 Tris buffered saline(TBS)-T으로 1시간 처리하여 비특이적인 반응을 방지하였다. 1차 항체로 각각 iNOS (Upstate, USA), COX-2(Cayman, USA), Actin (Santa Cruz, USA)를 2시간 처리하였다. 2시간 후에 TBS-T buffer로 membrane을 15분간 3회 세척하였고 membrane을 horseradish peroxidase 와 결합된 적절한 IgG (H&L)항체와 1시간 동안 반

응시키고 최종적으로 enhanced chemiluminescent (ECL) substrate kit (Amesham bioscience)를 이용하여 각각의 항체에 반응하는 단백질 band를 확인하였다.

### C. 분석방법

각각의 실험들은 3번 반복하여 실험하였으며, 실험결과는 평균값으로 계산하여 측정하였다. 실험결과의 통계분석은 Student's t-test를 이용했으며, p값이 0.05 이하인 경우에 실험결과가 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

### III. 실험결과

#### A. 구강암 세포 생존률

깨풀이 구강 편평 세포 암 종 KB세포에 대한 세포 독성을 갖는지 알아보기 위하여 농도별로 24시간, 48시간, 72시간 동안 처리한 후 MTS assay를 수행하였다.

##### 1. 열수 추출 후 MTS assay 결과

깨풀 추출물의 세포 독성에 대해 알아보기 위해 KB cells에 깨풀 열수 추출물을 농도 의존적(0, 125, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$ )으로 처리하여 24시간, 48시간, 72시간 후에 구강암 세포의 생존율을 측정하였다(표 1). 농도별로 24시간에는 농도 125 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 전혀 반응이 없었고 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 94%, 74%의 세포생존율을 나타내었다. 48시간에는 농도별로 각각 98%, 90%, 87%의 세포생존율 보였고, 72시간에는 125 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 오히려 103%로 늘었으며 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 98%, 82%의 세포생존율을 보였다(Fig 1).

<표 1> 깨풀 열수 추출물의 KB cells 세포 생존율

시간 깨풀 농도	24h	48h	72h
0 $\mu\text{g/ml}$	100%	100%	100%
125 $\mu\text{g/ml}$	100%	98%	103%
250 $\mu\text{g/ml}$	98%	90%	98%
500 $\mu\text{g/ml}$	74%	87%	82%

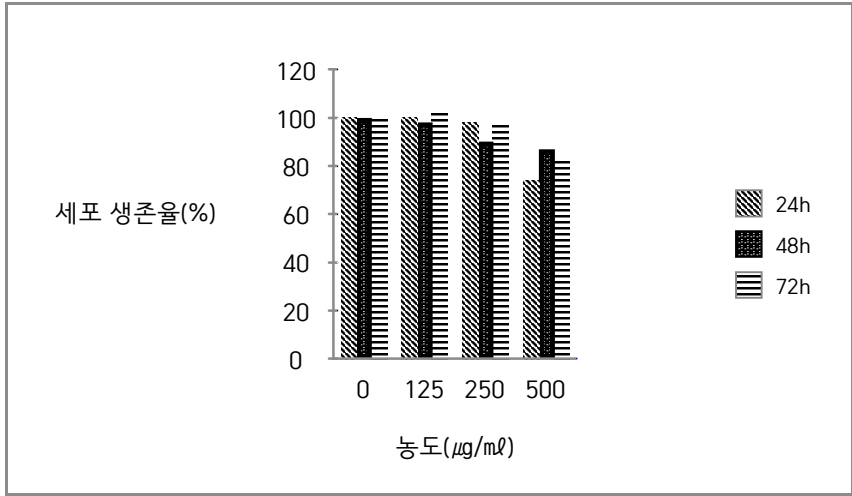


Fig 1 : Effects of hot-water extracts of *Acalypha australis* on the anti-cancer activity of the human oral cavity carcinoma KB cells.

## 2. 메탄올 추출 후 MTS assay 결과

〈표2〉와 같이 깨풀 추출물의 세포의 독성에 대해 알아보기 위하여 KB cells에 깨풀 메탄올 추출물을 농도 의존적(0, 125, 250, 500 µg/ml)으로 처리하여 24시간, 48시간, 72시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다(표2). 농도별로 24시간에 농도 125, 250µg/ml에서 각각 53%, 28%의 세포생존율을 보였고 500µg/ml에서는 9%의 세포생존율을 보였다. 48시간에는 농도별로 각각 35%, 14%, 5%의 세포생존율을 보였으며, 72시간에는 각각 29%, 10%, 4%의 세포생존율로 매우 큰 변화가 있었다(Fig 2).

〈표 2〉 깨풀 메탄올 추출물의 KB cells 세포 생존율

시간 깨풀 농도	24h	48h	72h
0 µg/ml	100%	100%	100%
125 µg/ml	53%	35%	29%
250 µg/ml	28%	15%	10%
500 µg/ml	9%	5%	4%



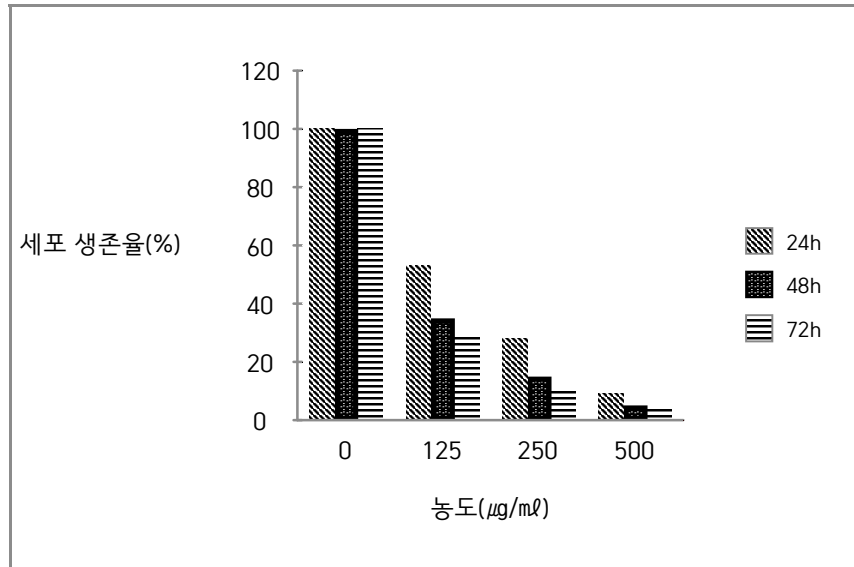


Fig 2 : Effects of methanol extracts of *Acalypha australis* on the anti-cancer activity of the human oral cavity carcinoma KB cells.

### 3. 메탄올 추출 후 깨풀의 저농도 처리 MTS assay 결과

시료를 다시 저농도 (50, 100, 150, 200μg/ml)로 처리하였다(표3). 농도별로 24시간에는 각각 95%, 57%, 52%, 30%로 나타났고 48시간에는 각각 87%, 51%, 32%, 25%로 나타났으며, 72시간에는 각각 72%, 48%, 20%, 12%로 나타났다(Fig 3).

<표 3> 저농도에서 깨풀 메탄올 추출물의 KB cells 세포 생존율

시간 깨풀 농도	24h	48h	72h
0 μg/ml	100%	100%	100%
50 μg/ml	95%	87%	72%
100 μg/ml	57%	51%	48%
150 μg/ml	52%	32%	20%
200 μg/ml	30%	25%	12%

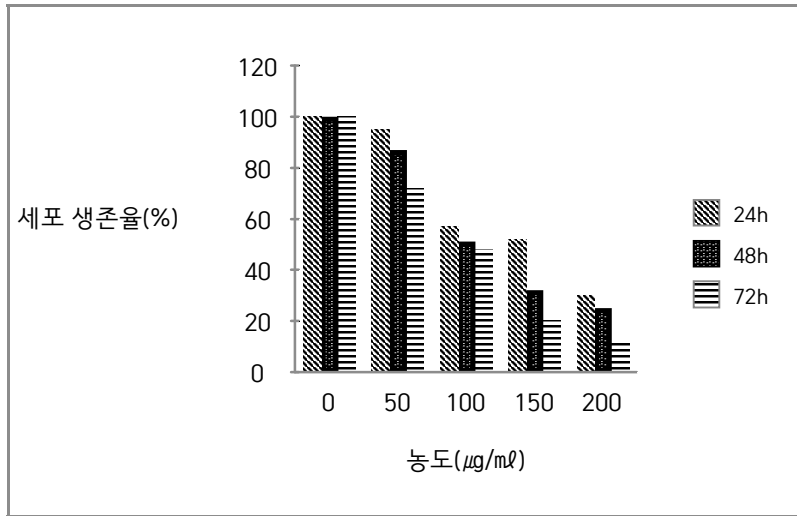


Fig 3 : Effects of methanol extracts of *Acalypha australis* on the anti-cancer activity of the human oral cavity carcinoma KB cells.

#### 4. Western blot

깨풀 메탄올 추출물을 세포주에 처리하고 이로부터 단백질을 추출하여 전기영동장치를 이용한 단백질 분리과정을 통해 얻은 띠의 두께를 분석한 결과, iNOS는 전혀 영향이 없었고 COX-2의 생성은  $\beta$ -actin의 발현에 영향에 미치지 않고 농도에 관계없이 농도 억제함을 확인했다(Fig 3).

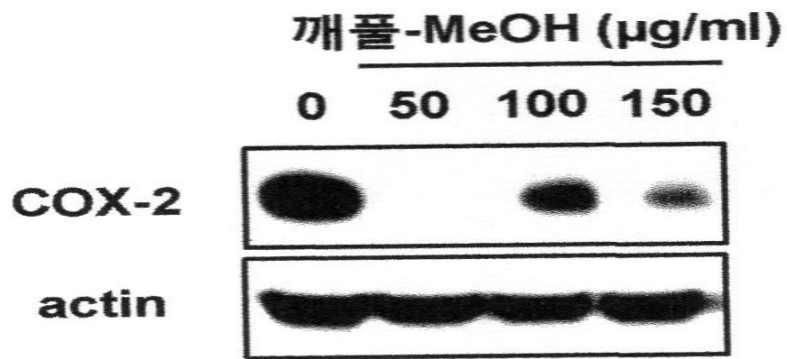


Fig 4 : Inhibitory effects of classified methanol extracts of *Acalypha australis* the COX-2 protein expression of the human oral cavity carcinoma KB cells.

## IV. 고찰

구강암은 전체 암발생율에 비해 발생정도가 낮지만 높지 않은 발생에도 불구하고 예후가 좋지 않고 항암제에 대한 감수성, 심각한 기능장애, 심미적인 문제, 근치의 어려움(이영훈 등, 2000) 등으로 치료법에 대한 관심이 점점 높아가고 있는 실정이다.

현재, 매우 발달된 화학요법으로 암을 치료하고 있는데 이 항암화학요법은 암세포의 여러 대사경로에 개입하여 작용을 한다. 그 방법으로는 DNA의 복제, 전사, 번역과정 차단, 핵산전구체 합성의 방해를 통한 활성 저지, 세포분열 저해 등의 방법으로 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 약제를 통해 종양에서의 약물에 민감한 세포집단에 작용, 관해를 유도한다.(이영훈 등, 2000; 이종환과 김명진, 1998; 김정희 등, 1999) 이런 cisplatin과 5-fluorouracil의 항암요법이 효과적이라고 알려지고 있으며 60~90%까지 반응율이 나타난다고 보고되어있다(명훈과 김명진, 1999). 그러나 이러한 화학요법은 탈모증, 골수 기능저하, 오심, 신독성, 면역력저하 등 부작용으로 인한 문제가 많이 생겨 제한을 받고 있다. 그래서 부작용을 최소화 하는 치료를 하기위한 약물병용요법의 연구(Kish JA etc, 1982)와 신약개발에 꾸준한 연구를 하고 있다. 그래서 항암효과가 입증되면서 부작용이 적은 천연약용식물의 연구가 진행되고 있는데 식물의 성분을 추출하거나 정제하여 암세포에 작용하는 항암효과 정도를 확인하는 실험을 하고 있다(Lee DK etc, 1998).

또한, 한방에서 사용된 약물이 복합적으로 작용을 하여 체내 생체항상성조절에 유효하다고 알려져 왔으며 이러한 약용식물은 예전부터 사용되어 오면서 여러 차례 임상적 사용을 거쳐 인체독성이 적으면서 약효는 우수하게 나타나고 있다고 할 수 있다. 현대에는 양방과 한방이 서로가 가지고 있는 장·단점을 상호 보완하여 치료를 하는 협진을 통한 새로운 치료요법이 연구되어 실시되고 있다(오환용 등, 1996).

이미 구강암 연구가 이루어진 천연 약용식물은 민들레(이명호와 한두석, 1998), 활나물(박종윤과 한두석, 2002), 애엽(조민정과 민경진, 2007), 작약(박현숙 등, 2007), 콩(이성림과 김종규, 2005), 진달래꽃(박승우 등, 2006), 정력자·까마중·지실(이영훈 등, 2000), 소목(이종수 등, 2007) 등의 추출물이 구강암 세포인 KB cell의 세포고사에 효과가 있음이 보고되어 있으며 최근에는 마전자(김동순, 2010), 구맥(김민선, 2010), 삼백초(강후원, 2010), 소테나무껍질(김유숙, 2010), 접시꽃 뿌리(이현진, 2010), 통초(정선희,

2010) 등의 실험연구도 발표되었다.

깨풀은 우리나라 전역에 분포되어 있어서 구하기가 쉽고 오염되지 않게 채취가 가능하기 때문에 과학적으로 약효가 입증되기만 하면 일반적으로 사용할 수 있을 것이라 생각하고 연구를 하였다.

항암 반응을 알아보기 위해 구강암 세포주인 KB cells에 깨풀의 열수추출물과 메탄올 추출물을 처리하여 실험을 수행하였다. 그 결과 열수추출물은 KB 세포 고사에 영향이 크게 미치지 않았으나 메탄올 추출물은 농도에 관계없이 최고 96%까지 억제하였다.

NO는 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생합성되며 혈압조절이나 혈액응고, 신경전달 등 여러 가지 생리적 역할을 한다. 그러나 세포의 자극으로 활성화되어 iNOS의 영향으로 합성된 대량의 NO는 대식세포의 세포독성에 중요한 역할을 하며 염증반응에 관여하여 유전자변이나 조직손상, 순환부전, 신경이 손상되는 등을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Stuehr DJ etc, 1991; McCartney-Francis N etc, 1993).

또한, 대식세포에서 발현된 단백질 Cyclooxygenase-2(COX-2)는 arachidonic acid로부터 PGE<sub>2</sub>를 생합성하는데 관여하여 염증과 암, 퇴행성 질환에 중추적인 역할을 한다. 본 연구에서 NOS의 생성에 관여하는 조효소로 알려진 COX-2의 발현을 관측해 보았다. 또 모든 세포가 일정하게 가진 단백질로 알려진  $\beta$ -actin을 측정하여 각 농도 별로 단백질의 양이 일정함을 확인했다.

실험 결과 열수추출물에서는 항암 반응이 없고 메탄올 추출물에서 항암 효과가 있는 것으로 보아 분자량 3,000이하의 저분자 물질이 유의적인 효과가 있는 물질임을 시사한다. 열수추출물이 항암 반응에 효과가 없어 손쉽게 상용을 할 수는 없지만 메탄올 추출에는 많은 효과가 있어 식품가공공정을 거쳐 기능성 식품의 형태나 약제로 가공하여 구강암 치료제로 사용가능할 수 있을 것이다. 저농도에서도 효과가 탁월하여 그 의미가 크다.

연구의 제한점으로는 이 실험은 정제 및 분리 실험을 실시하지 못하여 깨풀의 어떤 성분이 항암효과를 보였는지 알 수가 없어 차후 분리 정제 실험의 필요성이 강하게 요구되는 바이다. 더불어 구강암 이외 다른 암에도 효과가 있는지 연구가 필요하다 할 수 있다.

## V. 요약 및 결론

1. 깨풀 추출물의 열수추출물이 구강암 세포인 KB 세포에 대한 세포생존율 측정에서 농도 의존적(0, 125, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$ )으로 처리하여 그 결과 농도별로 24시간에는 아무 변화가 없었고 48시간에는 98%, 90%, 87% 세포가 생존하였으며 72시간에는 125 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 오히려 103%로 늘었고 250 $\mu\text{g/ml}$ , 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 각각 98%, 82% 생존율을 보였다.

2. 깨풀 추출물의 메탄올 추출물이 구강암 세포인 KB 세포에 대한 세포생존율 측정에서 125 $\mu\text{g/ml}$ , 250 $\mu\text{g/ml}$ , 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의존적(0, 125, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$ )으로 처리하여 24, 48, 72시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 농도별로 24시간에는 53%, 28%, 9% 세포가 생존하였으며 48시간에는 35%, 15%, 5%의 세포가 생존하였고 72시간에는 29%, 10%, 4%의 생존율을 보였다.

3. 깨풀 추출물의 메탄올 추출물이 구강암 세포인 KB 세포에 대한 세포생존율 측정하는데 좀더 낮은 농도(50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/ml}$ )에서 처리하여 24, 48, 72시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 농도별로 24시간에는 95%, 57%, 52%, 30%의 생존율을 보였고 48시간에는 87%, 51%, 32%, 25%의 세포가 생존하였으며 72시간에는 72%, 48%, 20%, 12%의 생존율을 보였다.

이상의 실험 결과로 깨풀의 메탄올 추출물이 구강암 세포주의 실험에서 농도의존적으로 암세포를 억제하는 효과가 있어서 구강암 치료 가능성을 고려해 볼 수 있다. 그러나 깨풀의 어떤 성분이 구강암 치료에 효과가 있었는지, 구강암 세포주가 아닌 사람의 구강암에도 이와 같은 효과가 있을 지에 대한 더욱 자세한 추적 연구가 필요하다.

## 참고문헌

- 강소신의학원. 중약대사전, 상해과학기술출판 소학관, p. 3765~3766, 1985
- 강후원. 삼백초(Saururus chinensis)로부터 AMPK활성화 화합물의 분리와 구조 분석. 조선대학교 대학원 석사학위 논문. 2010
- 김동순. 마전자(Strychnos nux-vomica)추출물이 구강암 세포주(KB cell)증식억제에 미치는 영향. 조선대학교 대학원 석사학위 논문. 2010
- 김민선. 구맥이 인체 구강암 세포주에 미치는 영향에 관한 연구. 조선대학교 대학원 석사학위 논문. 2010
- 김성근. Berberine이 KB세포의 증식에 미치는 효과. 전북대학교 대학원 박사학위 논문. 2003.
- 김유숙. 소태나무 껍질 추출물이 구강암 세포주의 증식억제에 미치는 영향. 조선대학교 대학원 석사학위 논문. 2010
- 김재길. 원색천연약물대사전, 남산당, p.338, 1984
- 김정희, 현진원, 김여갑. 천연 약용식물 추출물의 구강상피세포암 세포주에 대한 항암 효과. 응용약물학회지 1999;7(2):153-157.
- 명훈, 김명진. 구강편평상피세포암 세포주와 골육종 세포주에서 Taxol과 Cisplatin의 항암효과에 대한 연구. 대한구강악안면외과학회지. 1999;25(3):236-241.
- 박승우, 김상교, 김미정. 진달래꽃 추출물의 항산화 효과 및 인체 KB cell에 대한 세포독성. 한국식품저장유통학회지. 2006;13(4):501-505.
- 박종운, 한두석. 농길리 추출물이 배양 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성. 원광치의학. 2002;11(1):303-315.
- 박현숙, 민경진, 차춘근, 송진욱, 손진창. 작약 추출물의 구강병원균에 대한 항균성 및 구강암 세포 증식 억제효과. 한국환경보건학회지. 2007;33(1):21-29.
- 배기환. 한국의 약용식물. 교학사. p. 271, 2000
- 설현철. 백선피와 복령에 의한 KB세포주에서 항암제 내성억제효과. 경희대학교 대학원 박사학위 논문. 2012.
- 오환용, 고승오, 신효근, 김오환. 인계대 암세포주 성장 저해에 미치는 영지의 항암효과. 대한구강악안면외과학회지. 1996;22(3):437-450
- 이명호, 한두석. 포공령 물추출물이 배양 인체 구강유상피암종세포에 미치는 항암효과.

- 원광생체재료 · 매식. 1998;7(2):79-91.
- 이성립, 김종규. 한국 전통 된장 및 콩 추출물의 KB 세포에 대한 증식 억제효과. 한국 환경보건학회지. 2005;31(5):444-50.
- 이명화. KB 구강암세포에서 *Angelica decursiva* 추출물의 세포사멸 활성. 조선대학교 대학원 석사학위 논문. 2011.
- 이영훈, 김여갑, 김정희. 구강암에 대한 약용식물추출물의 항암효과에 관한 연구. 대한 구강외과학회지. 2000;16(1):53-8.
- 이종수, 김정희, 김여갑. 소목 추출물의 구강암 및 골육종 세포주에 대한 항암작용에 관한 연구. 대한구강악안면외과학회지. 2007;33(6):583-90.
- 이종환, 김명진. 구강편평세포암 세포주에서의 cisplatin과 5-fluorouracil의 항암감수성의 측정. 대한구강악안면외과학회지. 1998;24(2):165~171.
- 이창복. 대한식물도감, 향문사 p. 509, 1980
- 이현진. 접시꽃 뿌리 추출물의 인체 구강암 KB세포주 증식억제에 대한 영향. 조선대학교 대학원 석사학위 논문. 2010
- 정선희. 통초(*Tetrapanax papyriferum*)의 추출물이 인체 구강암 KB 세포주에 미치는 영향. 조선대학교 대학원 석사학위 논문. 2010
- 조민정, 민경진. 들깨잎과 쑥 추출물의 구강병 원인균에 대한 항균 및 KB 세포 증식 억제효과. 한국환경보건학회지. 2007;33(2):115-122.
- Arbes SJ Jr, Olshan AF, Caplan DJ, Schoenbach VJ, Slade GD, Symons MJ. Factors contributing to the poorer survival of black Americans diagnosed with oral cancer (United states). *Cancer Causes and Control*. 1999;10:513-2.
- Bomser J, Madhavi DL, Singletary K, Smith MAL. In vitro anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Med* 1996;62:212-216.
- Chandu A, Sun KCV, DeSilva RN, Smith ACH. The assessment of quality of life in patients who have undergone surgery for oral cancer: A preliminary report. *Oral Maxillofac Surg*. 2005;63:1606-12.
- Kim JH, Lee SJ, Han YB, Kim JB. Identification of active component isolated from *Croton tiglium* and *Coptis japonica* aqueous mixture(CP2) and studies of its cytotoxic effect. *Yakhak Hoeji* 1994;38:31-37.
- Kish JA, Drelichman A, Jacobs J. Clinical trial of cisplatin and 5-fluorouracil infusion as initial treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck.



- Cancer Treat Res 66: 471-474, 1982.
- Konkimalla VB, Suhas VL, Chandra NR, Gebhart E, Efferth T. Diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:317-329.
- 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;43:150-8.
- Lee DK, Kim BS, Lee SG, Gwon HJ, Moon EY, Hwang HS, Seong SK, Lee MS, Lim MJ, Sung HJ, Shin DH, Yoon SJ, Yang CH. Momordin inhibit both AP-1 function and cell proliferation. *Anticancer Research* 18: 119-124, 1998.
- Lee JS, Kim JH, Kim YG. Studies on the effects of ginseng saponins on oral cancer and normal cells. *Kyung Hee Dental J* 1998;20:117-128.
- Lee YY, You KH, Kim SY, Ahn BZ. Augmentation of the cytotoxic effects of anticancer drugs by (+)- $\alpha$ -turmerone and extracts of the lithosperma and scutellaria roots against human leukemia cell lines. *Yakhak Hoeji* 1991;35:203-215.
- Liewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people -a comprehensive literature review. *Oral Oncol.* 2001;37:401-18.
- Liewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol.* 2004;40:304-13.
- Mallery SR, Stoner GD, Larsen PE, Fields HW, Rodrigo KA, Schwartz SJ, Tian Q, Dai J, Mumper RJ. Formulation and in-vitro and in-vivo evaluation of a mucoadhesive gel containing freeze dried black raspberries: implications for oral cancer chemoprevention. *Pharm Res* 2007;24:728-737.
- Manoharan S, Kavitha K, Senthil N, Renju GL. Evaluation of anticarcinogenic effects of clerodendron inerme on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med J* 2006;47:1038-1043.
- Mayers EN. Suen JY. *Cancer of the Head and Neck*. 2nd ed., New York. Churchill Livingstone. 1989
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM.

- Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1993 178(2):749-54, 1993
- O'Brien CJ, Smith JW, Soong SJ, Urist MM, Maddox WA. Neck dissection with and without radiotherapy : Prognostic factors, patterns of recurrence and survival. *Am J Surg.* 1986;152:456-63.
- Parkin DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J cancer.* 1988; 41: 184-97.
- Peterson LJ, Indresano AT, Marciani RD, Roser SM. Principles of Oral and Maxillofacial Surgery Philadelphia, J B. Lippincott, 1992.
- Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. *Biochem Pharmacol* 1997;53:121-133.
- Shiboski CH, Shiboski SC, Silverman S Jr. Trends in oral cancer rates in the United states, 1973-1996. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28:249-56
- Silverman S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers: The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc.* 2001;132:7s-11s.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Natjan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 88(17):7773-7
- Vecchia CL, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of Oral Cancer. *Oral Oncology* 1997;33:302-12.
- Wickramaratne DBM, Mar W, Chai H, Castillo JJ, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD: Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Med* 1995;61:80-81.