[UCI]I804:24011-200000263875

2013년 2월
석사학위논문

할미꽃 추출물에 의한 구강편평암 KB 세포의 apoptosis 유도

조선대학교 대학원

치 의 학 과

강 병 원

2013년 2월 석사학위논문 할미꽃 추출물에 의한 구강편평암 KB 세포의 apoptosis 유도 강 병 원

할미꽃 추출물에 의한 구강편평암 KB 세포의 apoptosis 유도

Induction of Apoptosis by extract of *Pulsatilla Koreana* in KB human oral squamous cell carcinoma

2013년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

강 병 원

할미꽃 추출물에 의한 구강편평암 KB 세포의 apoptosis 유도

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2012년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

강 병 원

강병원의 석사학위 논문을 인준함.

위원장 조선대학교 교 수 김 도 경 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 수 관 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 춘 성 (인)

2012년 11월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT ····· iii

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 3

Ⅲ. 결과 ····· 6

Ⅳ. 고찰 ····· 13

Ⅴ. 결 론 ····· 16

참고문헌 ····· 17

도 목 차

Fig. 1. Effect of pulsatilla koreana on KB cell proliferation in dose dependent manner. ····· 7

Fig. 2. Effect of pulsatilla koreana on KB cell proliferation in time- and dose-dependent manner ····· 8

Fig. 3. Induction of DNA fragmentation by pulsatilla koreana in KB cells ····· 9

Fig. 4. Activation of caspase-3 by treatment of pulsatilla koreana extract in KB cells ····· 11

Fig. 5. Activation of caspase-7 by treatment of pulsatilla koreana extract in KB cells ····· 12

ABSTRACT

Induction of Apoptosis by extract of *Pulsatilla Koreana* in KB human oral squamous cell carcinoma

Kang, Byung-Won
Advisor: Prof. Kim, Su-Gwan, D.D.S., Ph.D.
Department of Dentistry,
Graduate School of Chosun University

The root extract of *pulsatilla koreana* has been used as antibacterial and anti-inflammatory analgesic agents in traditional medicine in Korea. In the present study we investigated the proliferation effect of human oral cancer KB cell treated with *pulsatilla koreana* extract. We analyzed the effects of this plant on proliferation and on expression of cell apoptosis related molecules with using the KB human oral cancer cells. A cell proliferation test was performed by MTT assay on 24 well plate, the treatments of *pulsatilla koreana* extract dramatically reduced cell viabilities in a dose and time-dependent manner. In addition, the typical apoptosis patterns were detected with DNA fragmentation and western blot. Western blot data showed that activation of caspase-3 and -7 was increased after 24 h and 12 h treatment of *pulsatilla koreana* extract, respectively.

We also confirmed the DNA fragmentation by treatment of *pulsatilla koreana* extract in KB human oral cancer cells. Therefore, these results suggested that *pulsatilla korean* may have beneficial effects on the proliferation of oral cancer cells through activation of apoptosis.

Key Words: Apoptosis, Oral cancer, Pulsatilla koreana

Ⅰ. 서 론

할미꽃(*Pulsatilla Koreana*)이라 불리는 백두옹은 미나리아제비과(*Ranunculaceae*)에 속하는 다년생 초본으로서 우리나라의 중부 평야, 산야의 양지, 초원에 자생하고 있으며 중국지역에도 분포되어 있다. 잎은 뿌리에서 뭉쳐서 나며, 새의 털처럼 깊게 갈라지는데 꽃은 적자색으로 4~5월에 피고, 흰색의 긴털이 붙어있다(Park et al., 1996; Bae 2004). 할미꽃은 아름다워 조경, 분식 등에 이용하고 뿌리는 hederagenin glucoside 화합물인 사포닌이 풍부해서 옛날부 터 한방에서는 진통, 지혈, 소염, 건위, 익혈, 풍상, 산기, 수렴, 이질, 지사, 신경통 등에 약재로 사용할 뿐만 아니 라 뿌리의 살충효과를 이용하여 구충제로도 이용하는 등 용도가 다양한 식물이다. 백두옹의 약리작용에 관한 연구로는 백두옹의 메탄올 추출물이 alloxan 투여에 의해 현저하게 증가하는 혈당량과 혈청 총 콜레스테롤량을 정상치로 회복시켜 준다는 보고가 있고, 백두옹에 함유된 아네모닌이란 성분은 적은 양 에서는 심장 박동의 진폭을 축소시키고, 많은 양에서는 심장을 정지 시키는 작용이 있다고 밝혀있다(Namba 1974; Lee et al., 2000; Lee et al., 2012; Bang et al., 2005).

많은 한약재들이 한약제제의 원료로서 뿐만 아니라 건강기능성 식품의 재료나 일반인들에게 민간요법용으로 사용되어 왔으나, 이의 효능에 대한 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하여 상대적으로 그 활용도가 낮았다.

최근 국내외적으로 천연물을 이용한 식품이나 의약품 개발에 관한 관심이 증가되고 있으며, 또한 생리활성 물질 뿐 아니라 다양한 암의 치료를 위한 항암 물질의 원료로도 이용되고 있을 만큼 응용 분야도 다양하며(Min et al., 2001; Brooker et al., 1981; Lim SY et al., 2007; Park SJ et al., 2004; Kwon YM et al., 2002). 이처럼 우리나라 자생식물들과 각종 약용식물에 대한 효능 연구가 활발히 진행되어 지고 있으나 그 수준이 기초적인 효능연구에 집중되고 있다. 그러나 차후 연구방법은 단순한 효능의

분석에 그치지 않고 정확한 기전 연구를 바탕으로 한 임상 적용 및 시장 유통이 될 수 있는 산업적 적용이 가능한 연구가 필요하다. 구강암의 90%이상이 상피세포 암이며, 발생기전은 신체의 다른 부위에서 발생되는 상피세포암과 유사하나 정확하게 암 발생기전이 알려져 있지 않다. 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 면역요법의 개발이 한창이여서 인터페론(interferon), 인터루킨(interleukin) 등이 출현하고 있으나 비용도 비싸고 결과도 만족할 만한 정도는 못되어 구강암에는 이용되지 못하고 있다. 최근에는 지금까지 이용되고 있는 화학요법의 부작용을 줄이기 위한 노력의 일환으로 진통, 이뇨 강장, 거담, 해열 또는 항염 효과가 있다고 알려진 약용식물의 성분을 추출, 정제하여 구강암 세포주에 처리하여 항암 활성효과를 확인하는 연구들이 활발히 진행중이며, 기존의 화학요법에 사용되어왔던 항암제와 함께 이러한 약용식물을 병용하여 항암활성 효과 증강 및 부작용 억제효과들이 보고되고 있다.

본 연구자는 이미 본격적인 기능성 물질 탐색을 위하여 500여 가지 국내 자생 추출물을 확보하여 구강암 세포주에 추출물을 처리하여 항암 활성효과를 스크리닝 하였다. 본 연구에서는 할미꽃 추출물로부터 구강암세포주에 처리한 후 세포 증식억제를 확인하기 위해 세포독성 테스트(MTT assay) 을 수행하여 결과를 확인한 결과 할미꽃 추출물에 의해 구강암 세포가 현저하게 증식이 억제됨을 확인하였다. 암세포 증식의 억제가 세포사멸에 의한 것인지 확인하기 위해 DNA fragmentation assay 를 수행하였으며 세포사멸과정에서 특이적으로 활성화되는 caspase -3,- 7의 단백질 변화를 확인하였다. 위와 같은 결과를 통해서 추출물에 의한 단순한 항암효능의 분석에 그치지 않고 정확한 발생기전을 연구한다면 치료를 위한 신약개발에 유효할 것으로 생각된다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

할미꽃 뿌리는 한국 야생화 연구소(전라남도 구례군)에서 분양받아 에탄올로 추출하고, 필요시 반복 추출하여 동결건조 시킨 것을 Dimethyl Sulfoxide (DMSO; Calbiochem, USA)에 녹인 후 배양액을 희석하여 사용하였다.

2. 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용한 구강편평세포암종 KB 세포는 ATCC(Manassa, VA, USA)로부터 분양받았다. KB세포를 10% fetal bovine serum(FBS)와 100 ㎍/㎖ streptomycin, 100 units/㎖ penicillin, 1 × MEM non-essential amono acid solution이 함유된 Minimum Essential Medium (MEM)에서 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

3. MTT assay

할미꽃 뿌리 추출물에 대한 KB세포의 생존율을 조사하기 위하여 24 well culture plate에 5×10^4 cells/well 세포를 seeding 하고 24시간 후에 할미꽃 뿌리 추출물을 시간별(3 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간)과 농도별(10㎍, 50㎍, 100㎍, 200㎍)로 처리하였고, 대조군으로 DMSO 1㎕를 처리하였다. 시간 및 농도별로 할미꽃 뿌리 추출물을 처리 한 24 well plate에 있는 배양액을 제거 한 후 450㎕ MEM 배양액과 50㎕ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2(MTT) 용액를 첨가하였다. MTT 용액이 첨가된 24 well plate을 37℃, 5% CO_2 배양기에서 3시간 반응시킨 후 배양액을 제거하고 acid-isopropanol (0.04M HCL in isopropanol)을 500㎕ 첨가하여 녹인 후 96 well culture plate에 100㎕를 첨가 후 Microplate Autoreader

ELISA (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 570㎚에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 확인하였다.

4. DNA Fragmentaion

DNA 분절 현상을 조사하기 위해 2×10^6 KB 세포를 T-175 Flask 에 배양 후 할미꽃 뿌리 추출물을 50㎍/㎖ 농도로 처리하여 12 시간, 24 시간에서 1500 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 세포를 수집 한 후 500㎕ lysis buffer로 용해시켜 37℃ incubator에 2 시간 동안 반응 시킨 후 12,000rpm으로 5 분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮긴 후 동량의 phenol/chloroform/isoamylalchol을 넣은 후 -20℃에서 1 시간 동안 보관한 뒤 15,000rpm으로 20분 동안 원심분리 하여 genomic DNA을 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel을 이용하여 50 voltage에서 2 시간동안 전기영동하여 UV transilluminator(Spectronics Corporation Westbury, NY, USA) 하에서 genomic DNA 분절을 관찰하였다.

5. Western blotting

5×10^6 KB 세포를 T-175 Flask 에 배양 후 할미꽃 뿌리 추출물을 50㎍/㎖ 농도로 처리하여 12 시간, 24 시간에서 1500rpm으로 5분 동안 원심분리하여 세포를 수집 한 후 phosphate buffer saline(PBS)로 두 번 세척하고, protein lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리한 후 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockgord, IL, USA)을 이용하여 정량하였다. Immunoblotting을 위해 100㎍ 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 loading 한 후 120 voltage에서 2 시간 동안 전기영동 하였다. gel 상에서 분리 된 단백질은 immunoblotting 을 수행하기 위해 polyvinylidene fluoride (PVDF)

membrane 에 transfer 한 후, blocking solution(5% nonfat dried milk in TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체 anti-cleaved caspase-3,-7(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)를 TBST(TBS containing 0.1% Tween -20)를 이용하여 1:1000 비율로 희석한 후 4℃ 조건하에 16 시간 동안 반응 하였다. TBST(TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 세 번 세척 후 2차 항체 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody (Amersham Biociences, UK)는 TBST(TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용 하여 1:5,000 비율로 희석하여 1 시간 반응 후 ECL kit(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA) 을 이용하여 immuno-blotting 을 수행하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 할미꽃 뿌리 추출물에 의한 KB 세포 증식 억제

KB 세포에서 할미꽃 뿌리 추출물의 의한 세포증식 억제 효과를 조사하기 위해 추출물을 농도별 또는 시간별로 처리 한 후 MTT assay 을 수행하였다. 그 결과 KB 세포에서 할미꽃 뿌리 추출물의 농도에 따른 효과를 보면 할미꽃 뿌리 추출물을 처리 후 24 시간 뒤 10㎍/㎖ 농도에서는 20%의 감소효과를 보였고 50㎍/㎖에서 61%의 감소와 100㎍/㎖에서는 90% 이상 감소를 보였으며 할미꽃 뿌리 추출물의 IC_{50} 값이 50㎍/㎖ 임을 확인하였다(Fig 1). 또한 할미꽃 뿌리 추출물을 10㎍/㎖, 50㎍/㎖, 100㎍/㎖의 다양한 농도로 3, 6, 12, 24 시간 처리 후 MTT assay를 수행 한 결과, 3 시간부터 50㎍/㎖ 처리한 세포에서는 64%의 감소를 보였고, 100㎍/㎖ 처리한 세포에서는 처리 후 94%의 감소를 보임으로써 세포의 성장이 할미꽃 뿌리 추출물를 처리 후 빠른 시간에 급격히 세포증식이 억제됨을 확인하였다(Fig 2). 그러나 대조군으로 사용한 DMSO에서는 세포증식이 억제되지 않음을 확인하였다.

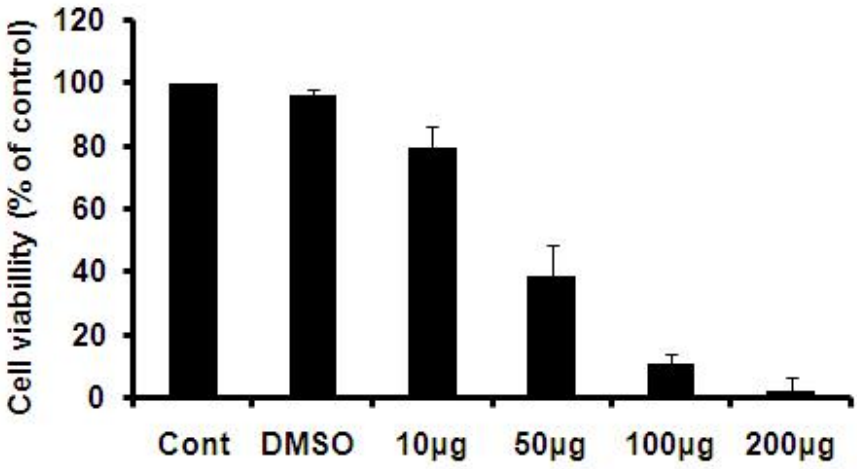

Fig. 1. **Effect of pulsatilla koreana on KB cell proliferation in dose dependent manner.** Inhibition of cellular growth by extract of pulsatilla koreana extract treatment in a dose-dependent manner. KB cells seeded to well of 24 well plates in the presence of normal serum containing media at 5×104 cells/well. Twenty four hours later, cells were treated with various concentration(10, 50, 100 and 200 ㎍/㎖) of extract of pulsatilla koreana extract further 24 hrs. Then MTT assay was performed as explained in "Material and Methods".

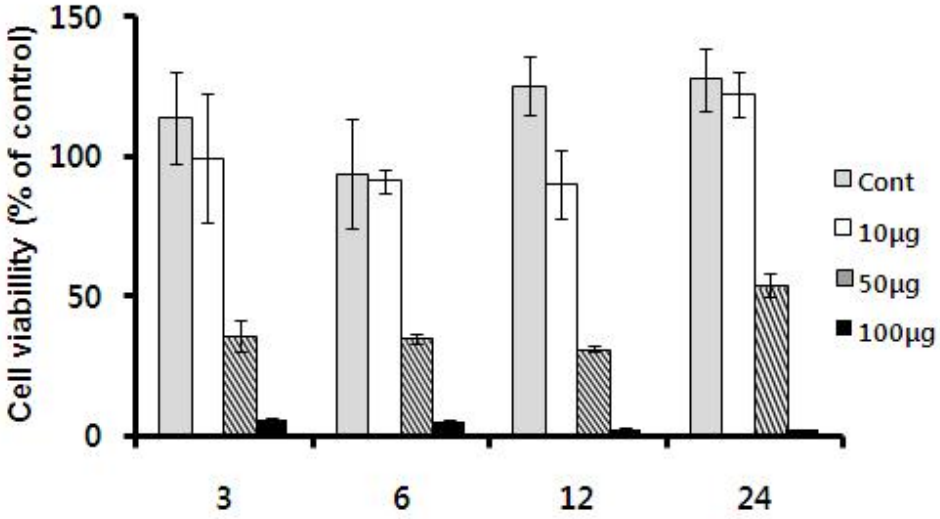

Fig. 2. **Effect of pulsatilla koreana on KB cell proliferation in time- and dose-dependent manner.** Inhibition of cellular growth by extract of pulsatilla koreana extract treatment in a time- and dose-dependent manner. KB cells seeded to well of 24 well plates in the presence of normal serum containing media at 5×104 cells/well. Twenty four hours later, cells were treated with various concentration(10, 50, and 100 ㎍/㎖) of extract of pulsatilla koreana extract for the indicated time. Then MTT assay was performed as described in explained in "Material and Methods".

2. 할미꽃 뿌리 추출물에 의한 KB 세포의 apoptosis

할미꽃 뿌리 추출물에 의한 KB세포의 증식억제가 apoptosis에 의해서 나타나는 것임을 확인하기 위해 50㎍/㎖ 농도로 12시간, 24 시간 동안 처리한 후 DNA 분절을 확인한 결과 12 시간, 24 시간 모두에서 DNA 분절이 나타남을 확인하였으며 이는 apoptosis 에 의해 세포사멸이 유도됨으로서 KB 세포의 성장을 억제함을 확인하였다(Fig 3).

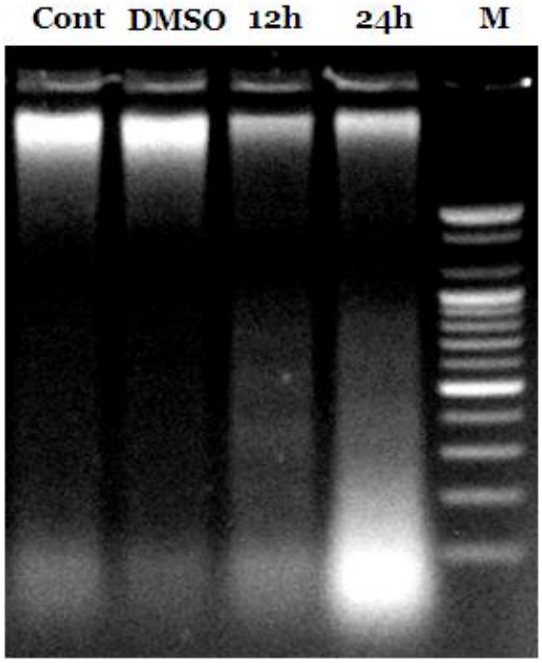

Fig. 3. Induction of DNA fragmentation by *pulsatilla koreana* in KB cells. DNA fragmentation assay was examined to confirm of apoptosis after treatment of pulsatilla koreana extract(50 ㎍/㎖) for 12 and 24 hrs, respectively. Genomic DNA was prepared as described in Materials and Methods and analyzed by 2% agarose electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

3. 할미꽃 뿌리 추출물이 capase-3, -7 의 활성화에 미치는 영향

KB 세포에서 할미꽃 뿌리 추출물의 세포사멸 유도의 분자유전학기전을 규명하기 위해 내인성과 외인성 세포사멸 경로의 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 caspase-3,-7의 발현정도를 확인 하였다. 할미꽃 추출물(50㎍/㎖) 12 시간 처리 후부터 caspase-3의 발현의 활성화가 시작되어 24 시간에서 활성화가 강하게 증가됨을 확인하였다(Fig 4). 또한 caspase-7 의 활성도 24 시간 처리 후에서 강하게 증가됨을 확인하였다(Fig 5). 반면에 대조군으로 사용한 DMSO에서는 caspase-3와-7 활성이 전혀 나타나지 않음을 확인하였다.

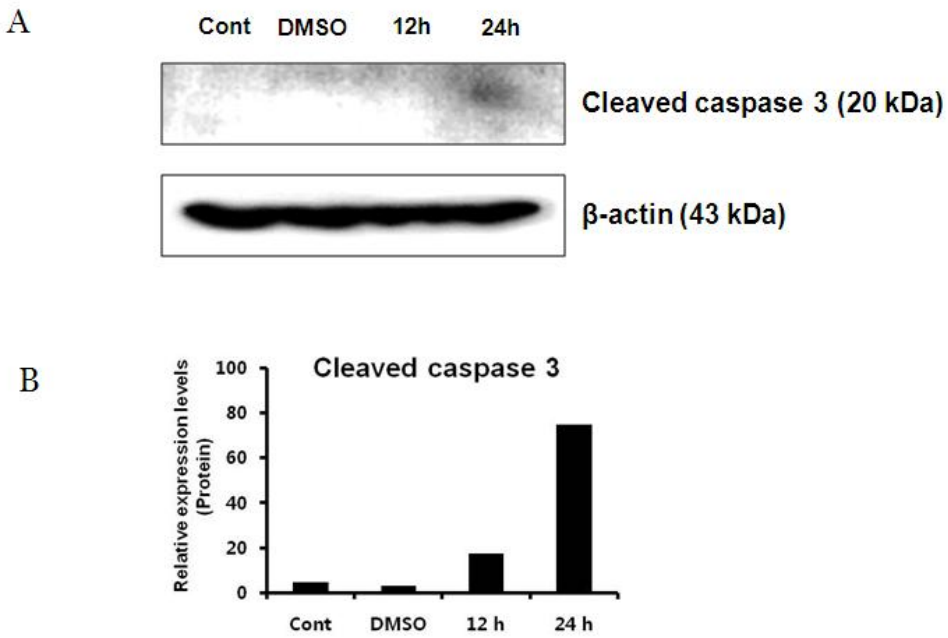

Fig. 4. **Activation of caspase-3 by treatment of pulsatilla koreana extract in KB cells.** Western blot analysis of cleaved caspase-3 in KB cells. The cells were treated with 50㎍/㎖ of pulsatilla koreana extract for the indicated time periods. The cell lysate was prepared and analyzed to western blot analysis using antibody against caspase-3 as described in "Materials and Methods"(A). Quantitative analyses of the blots in "A" (B).

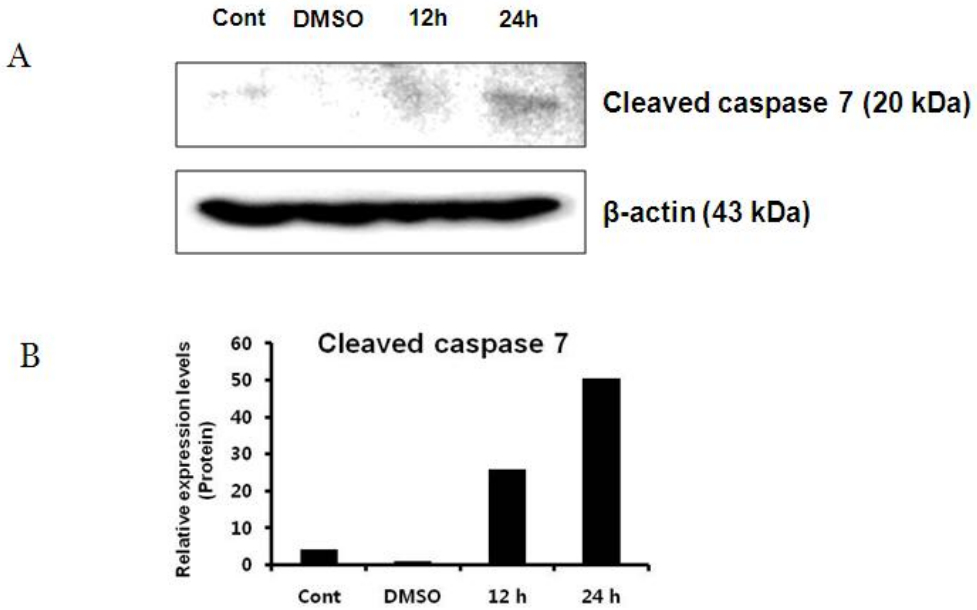

Fig. 5. **Activation of caspase-7 by treatment of pulsatilla koreana extract in KB cells.** Western blot analysis of cleaved caspase-7 in KB cells. The cells were treated with 50㎍/㎖ of pulsatilla koreana extract for the indicated time periods. The cell lysate was prepared and analyzed to western blot analysis using antibody against caspase-7 as described in "Materials and Methods"(A). Quantitative analyses of the blots in "A" (B).

Ⅳ. 고 찰

항암치료에 있어서 기존의 항암제는 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 미치기 때문에 백혈구를 비롯한 적혈구 파괴 및 세균감염, 자연출혈, 탈모, 메스꺼움, 구토 식욕감퇴, 체중감소 등의 부작용을 유발하는 문제가 나타내고, 초기에는 효과를 나타내지만 약제 내성이 발현해 재발하고 면역력이 극도로 악화돼 결국 치료에 실패하는 중요한 요인이 되고 있다. 이러한 항암제의 부작용 및 내성을 극복하기 위해 새로운 항암제를 개발하고 있으며 특히 전통적인 민간요법에서 사용되어지고 있는 약용식물에 대한 관심이 증가하고 있다. 우리 주변에서 흔히 자생하는 식물소재들의 다양한 생리활성 물질 및 인간에게 유용한 물질을 발굴하기 위한 노력이 활발해 지고 있으며 현재까지 천연물 유래의 항암제 중 가장 널리 사용되고 있는 것은 주목류에서 생산되는 탁솔(Taxol) 로서 구강암, 유방암, 난소암의 치료에 사용되고 있다. 탁솔류는 세포 분열시 마이크로튜블리(microtubule)를 안정화시켜 암세포의 세포 분열을 정지시킴으로써 항암효과를 나타나게 된다. 최근에는 많은 사람들이 마시고 있는 녹차, 홍차 등에서 추출한 polyphenol계 화합물 역시 항암, 항염증 작용을 하여 우리 몸에 유익한 다양한 작용을 나타낸다. polyphenol계 화합물은 천연의 estrogenic 화합물이며 암세포 사멸을 촉진시키며 암 조직 성장에 필수적인 신생혈관(angiogenesis)을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 최근에 여러 연구자들이 약용식물을 이용한 추출물을 가지고 기존에 항암제의 단점으로 알려진 내성 발현과 환자에 대한 부작용을 극복하기 위해 많은 실험이 수행되어지고 있다. 그러나 이러한 자생식물 추출물 중에서도 일부 식물의 경우 낮은 효율과 약물의 독성 때문에 전 임상 단계에서 개발이 제한되고 있다(Yang et al., 1995; Lee et al., 2002). 본 실험에서 사용되어진 할미꽃은 항암효과, 소염작용, 등에 효과를 나타내고 것으로 알려져 있다.(Bae 2004; Chung et al 2000 ; Lee et al., 2002).

본 연구에서는 주변에서 흔히 자생하는 할미꽃 뿌리를 이용하여 구강편평

암 세포주인 KB 세포의 세포증식 억제 및 세포사멸에 의한 분자유전학적기전에 대해 연구하였다. 할미꽃 뿌리의 KB 세포증식 대한 억제 효과는 MTT assay를 이용하여 확인하였다. KB 세포에 추출물을 농도별로 처리한 결과 처리 후 24 시간 뒤 50㎍/㎖의 농도를 기준으로 세포의 성장을 61% 이상 저해시키는 효과를 보였다(Fig 1A). 또한 추출물의 농도에 따른 시간별 처리 후 세포의 증식률은 50㎍/㎖ 농도에서 3 시간부터 64%의 감소를 보여, 세포의 증식을 빠른 시간 내에 저해시키는 것을 보였고 100㎍/㎖ 처리 후 3 시간부터 94% 이상 세포의 성장을 급격히 감소시키는 것을 확인하였다(Fig 1B). 최근 다른 신약 추출물에 대한 연구결과에서 보다 더욱 빠르게 세포증식을 억제하는데 효과적임을 확인하였다(Yoon et al., 2009; Hyun et al., 2008). 또한 할미꽃 뿌리 추출물의 KB 세포 증식 억제 효과가 apoptosis 유도 작용에 의한 것인지 알아보기 위해 우선 DNA 분절을 확인해 보았다. DNA 분절 현상은 세포사멸의 대표적 현상으로 Ca^{2+} 의존성 endonuclease가 활성화 되어 chromatin의 linker DNA가 절단되어 nucleosomal DNA 분절을 이루게 된다. 이러한 현상을 agarose gel에서 ladder 형태로 관찰할 수 있다(Zimmermann KC et al., 2001; Hyun et al., 2008). 할미꽃 뿌리 추출물을 KB 세포에 50㎍/㎖ 농도로 12 시간 및 24 시간 동안 처리하여 DNA ladder를 확인한 결과, Fig. 2에서와 같이 12 시간, 24 시간 모두에서 뚜렷한 DNA ladder를 관찰 할 수 있었고 반면 대조군으로 사용된 DMSO 처리 시 어떠한 분절화 현상도 나타내지 않음을 볼 수 있었다. 이러한 결과를 통해서 할미꽃 뿌리 추출물의 구강암 세포 증식 억제가 전형적인 apoptosis의 사포사멸에 의한 결과임을 확인하였다. 이러한 apoptosis의 분자유전학적기작을 확인하기 위해 caspase-3/-7 단백질 활성을 조사한 결과 할미꽃 뿌리 추출물 처리 후 caspase-3/-7 모두 활성이 증가되는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로 할미꽃 뿌리 추출물을 구강편평암 세포주인 KB 세포에 처리하면 apoptosis의 특징적인 경로에 의해 세포의 증식억제 및

세포사멸과정을 유도하는 것으로 생각된다.

결론적으로, 이 연구에서는 기존의 알려진 항암제 보다 강한 효능을 보이는 항암 물질을 개발하기 위해 새로운 할미꽃 추출물의 효능을 구강암 세포주인 KB 세포에 적용하여 연구하였다. 그 결과 구강암 세포에 할미꽃 추출물을 50㎍/㎖ 농도로 처리하게 되면 세포의 증식을 빠른 시간 내에 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 apoptosis라는 세포사멸을 유도해 효과적인 항암 후보물질이 될 수 있으며, 구강암에 특이적인 항암제로서 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

할미꽃 추출물은 한국에서 전통적으로 항미생물, 항염증치료에 사용되어져 왔다. 본 연구에서는 할미꽃 추출물을 이용하여 구강암성장에 미치는 연향을 조사하고 그 기전을 밝히기 위해 연구를 수행하였다. 이를 밝히기 위해 세포성장 억제에 미치는 영향을 연구하기위해 MTT assay를 수행하였고 그 기전연구를 위해 DNA fragmentation과 western blot을 각각 수행하여 다음과 같은 결론을 얻게 되었다.

1. KB 세포에서 할미꽃 추출물의 농도에 따른 효과를 보면 할미꽃 추출물을 처리 후 50㎍/㎖에서 61%의 감소와 100㎍/㎖에서는 90% 이상 감소를 보임
2. 할미꽃 추출물의 농도 별 처리와 함께 3, 6, 12, 24시간 후 MTT assay를 한 결과, 3시간부터 50㎍/㎖ 처리한 세포에서는 64%의 감소를 보였고, 100㎍/㎖ 처리한 세포에서는 처리 후 94%의 감소를 보임
3. 할미꽃 추출물에 의한 KB세포의 apoptosis 유도를 알아보기 위해 할미꽃 추출물 50㎍/㎖을 12시간, 24시간 동안 처리한 후 DNA fragmentation을 확인한 결과 12시간, 24시간 모두에서 DNA 분절을 확인
4. KB 세포에서 할미꽃 추출물이 apoptosis에 의한 세포사를 유도하는지 조사하기 위해 apoptosis를 활성화 시키는 단백질인 caspase 3와 7의 발현을 확인

위의 결과들을 종합해 보면 할미꽃 추출물은 구강암세포의 성장을 세포사멸기전을 통하여 억제하며 이는 향 후 항암제의 가능성을 제시할 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

Bae JH: Antimicrobal effect of pulsatilla koreana extracts on Food-Borne pathogens. The Korean Nutrition Society 38: 655-661, 2004.

Bang SC, Lee JH, Song GY, Kim DH, Yoon MY, Ahn BZ: Antitumor activity of Pulsatilla koreana saponins and their structure-activity relationship. Chem Pharm Bull (Tokyo) 53:1451-1454, 2005.

Brooker SG, Cooper RC, Cambie RC: New Zealand medicinal plants. Heineman Publishers, Auckland, New Sealand 1981.

Chung HJ: Antioxidative and antimicrobial activities of *Opuntia ficus indica var*. saboten. Kor J Food & Cookery Science 16:160-166, 2000.

Cheon SA, ChoI BK, Kim SY,and Lee EB: The anti-inflammatory and analgesic actions of the root of pulsatilla koreana. The Journal of Applied Pharmacology 8:207-212, 2000.

Chon YC, Hwang DH, Kim GS, Kim SA, Ahn SG, Yoon JH: Indirubin Derivatives induces Apoptosis in Oral Squamous Carcinoma KB cells. Kor J Oral Maxillofac Pathol 31: 61-68, 2007.

Hong SW, Jung KH, Lee HS, Choi MJ, Zheng HM, Son MK, Lee GY, Hong SS: Apoptotic and anti-angiogenic effects of Pulsatilla koreana extract on hepatocellular carcinoma. Int J Oncol 40:452-460, 2012.

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

Kim HJ, Kim HT, Bae CI, Oh GJ, Park SK, Chung SG and Cho EH: Studies on the hypoglyvemic constituent of pulsatillae radix (I). Yakhak HoeJi 41:709-713, 1997.

Kwon YM, Lee JH and Lee MW: Phenolic compounds from barks of Ulmus macrocarpa and its antitoxidative activities. Korean Journal of Pharmacognosy 33:404-410, 2002.

Landis SH, Murray T, Bolden S and Wingo PA: Cancer statistics, 1999. CA Cancer J Clin 49;8-31, 1999.

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

Lee EB, Jeong CS, Cheon SA, Choe BK, Li D: The Anti-inflammatory and Anaigesic Actions of the fractions from pulsatilla koreana root extract. Korean Journal Phamarcogn 31:174-184, 2000.

Lee SH, Lee E, Ko YT: Anti-inflammatory effects of a methanol extract from Pulsatilla koreana in lipopolysaccharide-exposed rats. BMB Rep 45:371-376, 2012.

Lee YC, Oh SW and Hong HD: Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts. Korean J. Food Sci. Technol 34:700-709, 2002.

Lim SY: Effect of extracts from root bark of Ulmus parvifolia

on inhibition of growth and DNA synthesis of human cancer cells. Journal of Life Science 17:1232-1236, 2007.

Min YK, Kim HY, Lee JY: Isolation of Antimicrobial Substance from Schizandra chinensis Baillon and Antimicrobial Effect. Kor J Food Sci and Technol 33:389-394, 2001.

Namba T: The encydopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines) with color pictures. Vol. I. pp.57, Hoikusha. Osaka, Japan. 1993.

Oh CH: In vitro photodynamaic therapy using hydroxybacteriochlorine on oral cancer cell. Kor J Oral Maxillofac Pathol 31:77-82, 2007

Park GH, Moon JH, Ma SJ, Lee YH: Natural prodects organic chemistry: Isolation and characterization of 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic Acid and 3,4-Dihydroxycinnamic Acid with anstimicrobial activity from root of pulsatilla koreana. Agricultural Chemistry and Biotechnology 41:191-196, 1996.

Park SJ, Yoo HJ, Choi HS, Seo BY, Yang SH, Kim YH, Jeong JY. and Lee KN: Effects of Saururus chinensis Bail extracts on anticancer activity and cadmium induced cytotoxicity. The Korean Journal of Oriental Preventive Medicine 8: 81-98, 2004.

Parkin DM, Pisani P and Ferlay J: Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 49;33-64, 1999.

Yang MS, Ha YL, Nam SH, Choi SU and Jang DS: Screening of domestic plants with antibacterial actibity. Agric. Chem. Biotechnology 38:584-589, 1995.

Yoon YK, Lee SE, Lee DJ, Rho MC, Sung JS, Park CB and Jang YJ: Anti-cancer activity of korean local plant extracts inducing apoptosis in various carcinoma cells. Kor. J. Pharmacogn 40:6-12, 2009.

Zimmermann KC, Bonson C and Green DR: The machinery of programmed cell death. Pharmacol. Ther 92:57-70, 2001.