

2013년

2013년 8월  
박사학위논문

8월

박사학위논문

구강암평편세포 KB에서 산초나무  
추출물에 의한 세포치사 유도

조영승

# 구강암평편세포 KB에서 산초나무 추출물에 의한 세포치사 유도

조선대학교 대학원

치 의 학 과

조 영 승

구강암평편세포 KB에서 산초나무  
추출물에 의한 세포치사 유도

Induction of apoptosis related to caspases  
by extract of *Zanthoxylum schinifolium*  
*Siebold & Zucc* in KB human oral  
squamous carcinoma cells

2013년 8월 23일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

조 영 승

구강암평편세포 KB에서 산초나무  
추출물에 의한 세포치사 유도

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2013년 4월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

조 영 승

# 조영승의 박사학위 논문을 인준함

위원장    전남대학교    교 수    오    희    균    (인)

위    원    조선대학교    교 수    김    수    관    (인)

위    원    조선대학교    교 수    김    병    옥    (인)

위    원    조선대학교    교 수    김    명    수    (인)

위    원    조선대학교    교 수    김    춘    성    (인)

2013년 6월

조선대학교 대학원

# 목 차

ABSTRACT .....	iii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
III. 결과 .....	8
IV. 고찰 .....	16
V. 결론 .....	19
참고문헌 .....	21

## 도 목 차

Figure. 1. Concentration-Dependent inhibition of cell viability by <i>Zanthoxylum schinifolium</i> Siebold & Zucc extract .....	9
Figure 2. Apoptosis induced by <i>Zanthoxylum schinifolium</i> Siebold & Zucc extract in KB cells .....	11
Figure 3. Proteolytic cleavage caspase-3, 7, 9 and PARP by <i>Zanthoxylum schinifolium</i> Siebold & Zucc extract treatment in KB cells. ....	13
Figure 4. <i>Zanthoxylum schinifolium</i> Siebold & Zucc extract induced apoptosis in KB cells. ....	15

## ABSTRACT

# Induction of apoptosis related to caspases by extract of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & *Zucc* in KB human oral squamous carcinoma cells

Cho, Young Seung

Advisor : Prof. Su-Gwan Kim, Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

*Sancho* (*Zanthoxylum schinifolium*) Siebold & Zucc (in Korean) is a deciduous shrub belong to the *Sancho* species of the Rutaceae family, and is distributed in Korea, China, and Japan. It has been widely used in Korea not only as condiment, but also as a medicinal material for the treatment of vomiting, diarrhea, abdominal pain, ascariasis, and dermal diseases for a long time. However, the anticancer effect of *Zanthoxylum schinifolium* has not been studied. In the present study, we investigated for anticancer activity in KB human oral squamous carcinoma cell treated with *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc extract. We analyzed the effects of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc extract on proliferation and on expression of cell apoptosis

related caspase dependent molecules in KB cells. Cell proliferation test was performed by MTT assay, the treatments of *Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc* extract significantly reduced cell viabilities in a dose-dependent manner ( $IC_{50}$  value : 423  $\mu\text{g/ml}$ ) in KB cells, but not in normal cells. To verify the apoptosis processing, DNA fragmentation assay, caspase activation and FACS analysis were performed by treatment of *Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc* extract in KB human oral squamous carcinoma cells. The formation of a DNA ladder was observed starting at the 24 h treatment. In western blotting analysis, the *Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc* extract induced the proteolytic processing of caspase-3, -9, and PARP. Furthermore, the FACS analysis by an Annexin V-PI staining showed that the *Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc* extract induced 85% of cell death after 24 h treated cells. These results suggest that the extract form *Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc* is potential candidate for oral squamous carcinoma cells therapy and that caspase families are the key signalling molecules in the extract-induced cell death in KB cells.



# I. 서 론

구강암은 입안의 혀, 밑바닥, 볼 점막, 잇몸, 입천장, 입술, 위아래 턱뼈 등에 발생하며 이를 총칭하여 구강암이라고 한다. 구강암의 종류로는 편평 상피세포암종이 (squamous epidermal carcinoma) 87% 로 가장 흔하고 그 밖에 침샘에서 발생하는 선양낭성암 (adenoid cystic carcinoma), 점액표피양암 (mucoepidermoid carcinoma), 선암 (adenocarcinoma) 등이 있다(1). 원인인자로는 흡연, 음주, 만성적 자극, human papilloma virus(HPV) 감염 등이 있으며, 음주와 흡연을 함께 할 경우에는 정상에 비해 1.5배 높은 구강암 발생률을 보이고 있다 (2). 최근 발표된 중앙암등록본부 자료에 의하면 2009년도에 192,561건의 암이 발생되었는데, 그 중 구강암은 남녀를 합쳐서 연 1,401건으로 전체 암 발생의 0.7%를 차지하였고 남녀의 성비는 1.8 : 1 로 남자에게서 더 많이 발생되었다고 보고 하였다.

구강암은 다른 부위에 발생하는 암과는 달리 대부분 육안으로 판별이 가능하며 조기진단이 비교적 다른 암에 비해 용이하며 화학방사선요법 혹은 유전자 치료법의 대상으로 훌륭한 모델이 될 수 있음에도 불구하고 그 발생기전 등 분자생물학적 접근이 되어있지 않은 암 중의 하나로 알려져 있다 (3). 현재까지 구강암 치료는 방사선요법과 5-fluorouracil, cisplatin, bleomycin등의 항암제를 병행하여 치료하고 있으나 소화기계 합병증, 면역력 저하, 골수기능저하등과 같은 심각한 부작용이 나타나고 있다 (4-6). 최근 들어, 각종 질병의 예방 및 치료용 천연생리활성 물질을 약용식물에서 찾고자 하는 노력이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 있는 가운데 자국의 약용작물 보호와 맞물려 새로운 천연생리활성 물질의 탐색 및 활용을 위한 연구개발 노력이 급격히 증대되고 있다.

이에 따라 최근에 정부 및 산하기관에서는 우리나라에 자생하는 많은 약용식물에 대한 효능 연구에 많은 투자를 하고 있으며 체계적인 연구에 의해서 암세포에서 약용식물의 효능을 발표하고 있다 (7). 그러나 현재까지는 국내에 자생하는 약용식물을 다양한 용매를 이용하여 추출한 후 기초적인 효능 연구에만 집중하고 있어 약용식물이 암세포에서 어떠한 분자적 기작에 의해 나타나는지에 대한 연구가 미흡하다 (8). 따라서 이를 단순한 효능의 분석에 그치지 않고 정확한 분자적 기전 연구를 바탕으로 한 임상적용 및 현 시장에서 바로 산업적으로 적용될 수 있는 연구가 필요할 시기라고 사료된다 (9-13).

산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 는 운향과에 속하는 낙엽관목으로 높이가 3-4m에 달하고 줄기와 가지에 탁엽이 변해서 된 가시가 불규칙하게 나 있고 잎은 13-21개 정도의 잔잎으로 이루어진 겹잎형태로 이루어져 있으며 잎에서 특유의 향기가나고 잎 가장자리에는 톱니형태의 돌기가 나있다. (14) 산초나무는 열매에서 추출한 정유물질은 주로 식. 약용으로 사용하고 있다. 주성분으로 alpha-pinene, beta-selinene, limonene, citronellal, beta-phellandrene, cineol, 그리고 auraptene 과 같은 성분 등이 보고되어 있다 (15). 이러한 성분들은 이미 민간요법에서 기침, 가래, 천식을 치료하며 살균작용, 구충작용, 소염작용을 하는 것으로 알려져 있으며 특히 auraptene은 항염증작용, 항산화작용, 암세포증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (16)

진핵세포에서 세포사멸은 일반적으로 우리 몸 안에 입력되어 있는 생체 프로그램으로 비정상세포, 손상된 세포, 노화된 세포가 체계적인 분자 신호전달 체계에 의해 세포가 스스로 자살해 사멸하거나 화상과 타박, 독극물 등의 자극에 의해 일어나는 세포의 죽음이 있고, 세포의 사고사 또는 돌연사에 의해 세포 밖에서 수분이 유입됨으로써 세포가 팽창하여 죽은

세포괴사의 두 가지 형태로 구별 되어진다 (17). 세포사멸은 세포치사를 억제하는 단백질 또는 반대로 세포치사를 유도하는 단백질들의 활성의 변화에 의해 일어나며, 이러한 단백질들의 활성변화 중 에서 기본적으로 알려져 있는 것으로 caspases 단백질이 존재한다 (18). 건강한 세포에서 세포사멸의 외형적 형태로는 초기 염색사의 응축과 더불어 세포막 안쪽으로 노출되는 phosphatidylserine (PS) 막지질이 세포막 바깥쪽으로 노출되며 이는 annexin-V와 같은 염색약을 세포에 직접 처리하여 유세포 분석기를 통해 세포치사를 확인할 수 있다 (19). 또한 chromosomal DNA가 분해되지 않는 단일한 형태를 띠는 정상세포에서와는 달리 세포치사가 일어난 세포에서는 chromosomal DNA 가 laddering 되기 때문에 세포의 genomic DNA 를 뽑아 아가로즈상에서 전기영동을 수행하여 세포치사 여부를 확인 할 수 있다 (20).

본 연구에서는 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*)가 급성림프구암세포 및 유방암세포의 세포성장 억제효능이 있는 것으로 보고되어진 바구강암세포에서도 세포성장 억제효능을 확인 및 그에 대한 기전을 규명 하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

세포배양에서 사용한 Dulbecco's Modified Eagles's Medium은 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS), (penicillin-streptomycin, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. N-methylthiotetrazole(MTT)은 Sigma(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, ECL detection kit는 Amersham Biosciences Corp.(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. anti-caspase-3, anti-caspase-7, anti-caspase-9, PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) 및 anti- $\beta$  actin은 Cell Signaling Technology, Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

### 2. 산초나무 추출물의 제조

실험에 사용한 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*)는 전남 구례 야생화연구소에서 분양받아 사용하였으며 분쇄하여 가루로 만들어 0.1 kg 에 2L의 메탄올을 첨가하여 추출 하였다. 그 후 2회 반복 시행하여 얻은 추출물은 여과지로 여과하고 감압 농축하여 총 3 g의 추출물을 얻어 사용하였다.

### 3. 세포 배양

사람의 구강점막에서 조직을 채취하여 primary culture 한 정상세포 (human fibroblast cell)와 구강암세포(KB, ATCC No, CCL17)는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제

(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  penicillin, 100 Unit streptomycin)가 함유된 37°C의 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)과 F-12 배지가 3:1로 혼합된 성장배지를 사용하였다.

#### 4. MTT assay

산초나무(*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해 37°C의 성장배지 하에서 배양된 Human fibroblast 정상세포와 KB 구강암세포를 수집하여 12 well plate에 접종하고, 12시간 후 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물을 여러가지 농도 (100~500  $\mu\text{g}$ )로 24시간 동안 처리하여 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다. MTT 분석은 KB 세포에 MTT 용액을 37°C에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl이 함유된 isopropanol로 세포를 용해하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

#### 5. DNA fragmentation assay

구강암세포에 420  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물을 24시간 처리하여 세포를 수집한 후 lysis buffer(100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 300 mM Tris-HCl, 200 mM sucrose, 0.5% SDS, 0.5 mg/ml proteinase K, pH 7.5)에 현탁 하고 원심분리 하여 상층액을 수집하였다. 여기에 동일 양의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (PCI)을 첨가하여 DNA를 순수분리 한 후, 에탄올을 이용하여 DNA를 침전시켰다. 이 후 DNase-free RNase를 첨가하여 한 시간 동안 방치하여 RNA를 제거 시키고 1.5%의 agarose에 전기영동하여 확인하였다.

## 6. Western blot analysis

산초나무(*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물에 의한 세포성장 억제기전을 확인하기 위해 western blot을 시행하였다. 10 cm 배양 접시에 KB세포를 접종하고 추출물을 처리하여 세포를 수집하였다. 세포를 4°C의 PBS로 2회 세척한 후, 4°C의 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 ug/ml aprotinin, 5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin)에서 30분간 반응 시켰다. 세포 용해물을 14000  $\times$  g에서 20분간 원심분리 한 후, 단백질을 정량하여 SDS sample buffer(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 넣고 100°C에서 5분 동안 변성 시킨 후, SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하여 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이 후 Membrane을 5% skim milk 에서 2시간동안 반응 시키고 TBST buffer를 이용하여 15분간 3회 세척 하였다. 일차 항체로 anti-caspase 3 antibody (1:2000), anti-caspase 7 antibody(1:2000), anti-caspase 9 antibody(1:2000), anti- PARP antibody(1:2000) 및 anti- $\beta$ -actin antibody(1:2000)을 사용 하였으며, 이차항체로는 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG(1:5000)를 사용하여 ECL detection kit와 함께 LAS imaging system으로 western blot 을 수행하였다.

## 7. Annexin V/propidium iodide (PI) double staining flow cytometry

Annexin V는 phosphatidylserine (PS) 과 높은 결합력을 갖는 칼슘의 존재 인지질 결합 단백질로서 세포외막의 PS 노출에 대한 민감한 표지제이기 때문에 apoptosis 측정에 매우 유용하게 사용된다. 또한 annexin V

와 PI 을 동시에 처리하면 세포사멸에 대한 apoptosis 와 necrosis 여부를 판단할 수 있으므로, 본 실험에서는 annexin V와 PI을 KB 세포에 동시에 처리하였다.

#### 8. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean  $\pm$  SEM으로 나타내었고, 각 실험은 3회 이상 반복하여 수행하였다.

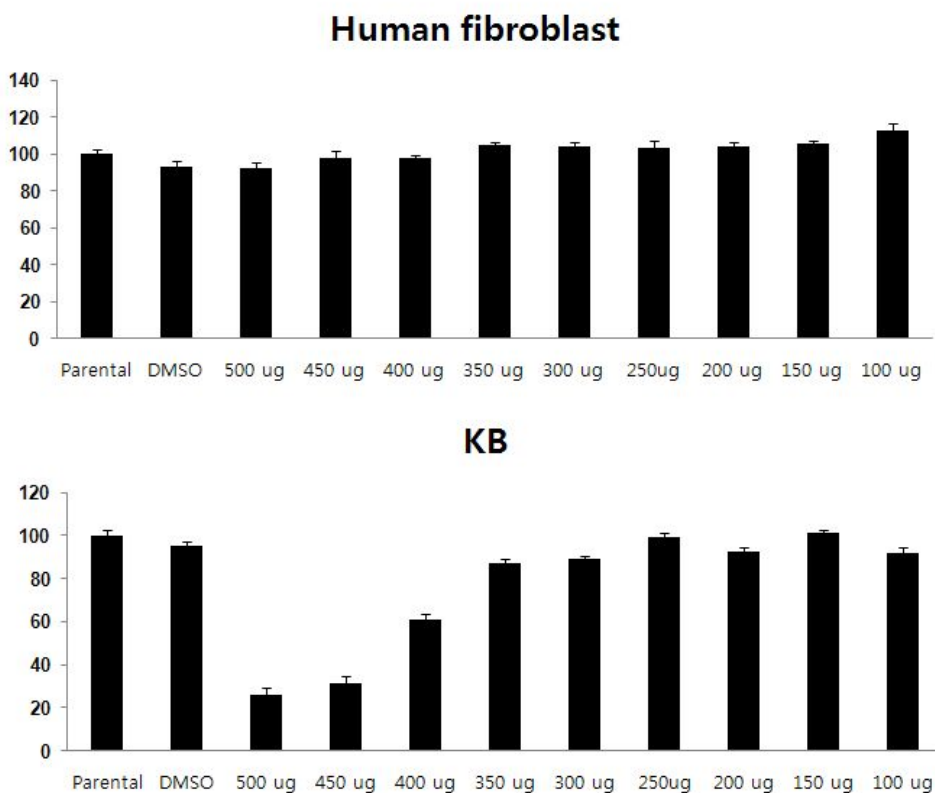
### Ⅲ. 결 과

#### 1. 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc)

추출물이 구강암 세포 KB의 세포성장 억제에 미치는 영향

산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물에 의한 구강암세포 KB의 세포성장 억제효능을 확인하기 위해 MTT assay를 실행하여 분석 하였다. 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물이 정상세포에서 세포독성을 나타내는지 확인하기 위해 정상세포인 human fibroblast 세포에 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 및 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 추출물을 처리한 결과 세포 성장률 변화가 거의 없음을 보여주었다. 이러한 결과 정상세포에서는 추출물의 세포독성이 없음을 확인하였다 (Fig. 1A). 반면 구강암세포에서 추출물의 세포성장 억제를 확인하기 위해 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 및 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 24시간동안 KB세포에 처리한 후 MTT assay를 수행한 결과 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물을 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 처리한 세포는 세포성장 영향 미치지 못하였으나 400, 450 및 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  추출물을 처리한 세포는 각각 60, 40 및 20%의 세포성장률을 확인하였다 (Fig. 1B). 이러한 결과는 KB세포가 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물의 농도 의존적으로 세포성장 억제 효과가 있음을 보여준다.

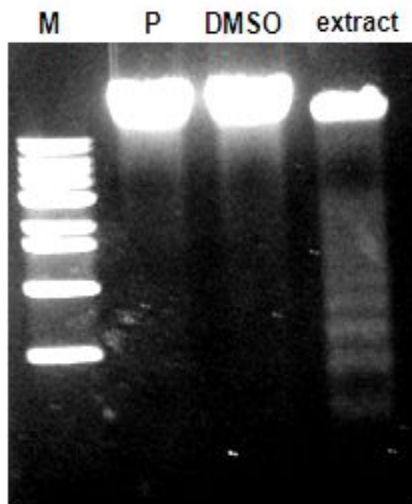




**Figure 1.** Concentration-Dependent inhibition of cell viability by *Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc* extract in KB cells. The cells were treated with various *Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc* extract concentrations in KB cells, and is expressed as a percentage of the control cell growth in the untreated *Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc* extract. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM for three experiments.

## 2. 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물에 의한 KB세포 DNA의 분절화

세포사멸의 대표적인 기전인 DNA의 분절화를 확인하기 위해 KB세포에 420  $\mu\text{g/ml}$ 의 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물을 24시간 동안 처리 하고 핵 내의 genomic DNA를 추출하여 전기영동을 통하여 확인하였다. 그 결과 산초나무 추출물을 24시간 처리한 세포에서 DNA의 분절화 현상이 나타남을 확인하였다. 이는 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물이 KB세포의 세포사멸을 유도 할 수 있음을 확인 하였다(Fig. 2).



**Figure 2. Apoptosis induced by *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc extract in KB cells.** Fragmentation of internucleosomal DNA by treatment of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc extract. The cells were treated with 420  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc extract for the indicated time periods and nuclear DNA was subjected to agarose gel electrophoresis. (M : 1 kb DNA marker; P : parental)

### 3. 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물에 의한 caspase family 단백질 활성화

산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물이 KB세포의 성장억제를 일으키는 기전을 확인하기 위해 세포사멸에 가장 중요한 인자로 알려져 있는 활성화 caspase의 변화를 확인하였다. KB세포에 420  $\mu\text{g/ml}$ 의 산초나무 추출물을 24시간 처리하고 세포를 수집한 후 caspases 항체를 이용하여 western blot 을 수행하였다. 그 결과 추출물을 처리한 24시간 후에 활성화된 caspase-9, 7, 3가 유도됨을 확인 하였다 (Fig. 3A). 또한 이러한 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물에 의한 caspase의 활성화에 의해 PARP의 cleavage 됨을 확인하였다. 이것은 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물이 미토콘드리아 의존적 세포치사 기전을 통해 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

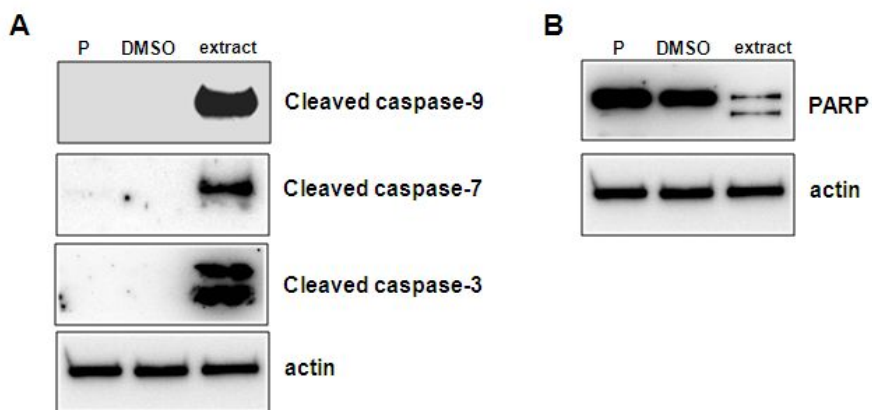
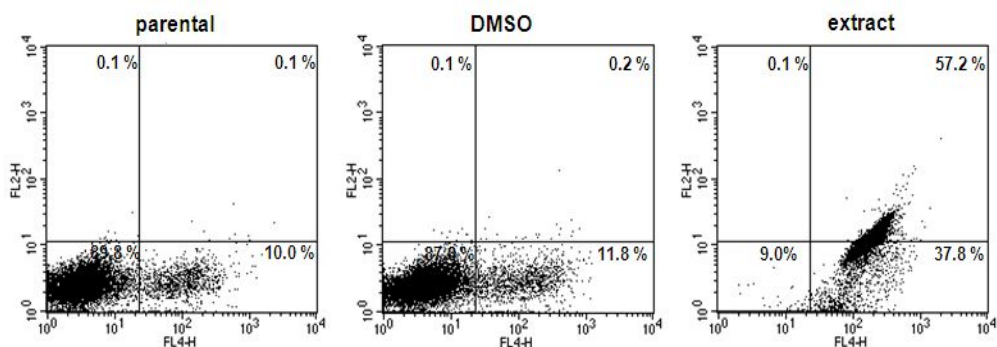


Figure 3. Proteolytic cleavage caspase-3, 7, 9 and PARP by *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc extract treatment in KB cells. *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc induced activity of procaspase-3, 7, 9 (A) and PARP cleaved (B) was measured in the KB cells. The cells were treated with 420  $\mu\text{g/ml}$  of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc extract for the indicated time periods.

#### 4. 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물에 의한 apoptosis 유도

KB 세포에서 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물이 세포사멸에 영향을 미치는지 annexin V/PI 염색을 통해 확인하였다. KB 세포에 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물 420  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 24 시간 처리하여 배양하였다. Annexin V/PI 염색을 통한 세포사멸 확인 실험에서 추출물을 처리한 KB 세포에서 early apoptosis (lower right quadrant) 가 정상세포와 DMSO 를 처리한 세포보다 26% 증가함을 확인하였고 late apoptosis (upper right quadrant) 도 정상세포와 DMSO를 처리한 세포보다 약 57% 증가함을 확인하였다. 이를 통해 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물이 구강암세포의 성장을 억제 하는데 탁월한 효과가 나타남을 확인하였다 (Fig. 4).



**Figure 4.** *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc extract induced apoptosis in KB cells. Cells were treated with 420  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of extract for 24 h. The cells stained using Annexin V/PI. The apoptotic cells were then analyzed by FACS analysis. This was determined by FACS analysis showing the percentage of early (lower right quadrant) and late (upper right quadrant) apoptotic cells.

## IV. 고 찰

본 연구에서는 기존의 급성림프구암이나 유방암의 항암치료제로 보고되어져 있는(21-25) 국내에 자생하는 약용식물인 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*)로부터 추출물을 확보하여 구강암에서 가장 많이 발병하는 편평상피세포암종 (squamous epidermal carcinoma)인 KB세포를 이용하여 추출물에 의한 세포성장 억제 효과 및 분자적 기전 확립을 위해 세포성장 억제에 관여하는 단백질의 발현 및 세포수준에서 세포치사에 의해 나타나는 형태 변화를 조사하였다. 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물을 정상세포인 huamn fibroblast에 다양한 농도로 처리했을 때 세포독성의 변화가 없음을 MTT assay 을 수행하여 확인하였다. 반면에 KB구강암세포에서는 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서부터 세포성장이 확연히 억제됨을 확인하였다 (Fig. 1A, B). 구강암세포의 증식억제는 세포주기의 진행억제 및 세포치사 유도에 의해서 이루어진다. 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물에 의한 구강암세포 KB의 증식 억제가 세포치사에 의한 것인지를 확인하기 위해 DNA fragmentation assay를 수행 하였으며,그 결과 apoptosis의 대표적인 현상인 chromosomal DNA의 분절화 (Fig. 2)가 일어났다. 또한 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물이 세포치사에 영향을 미치는지 annexin-V와 같은 염색약을 세포에 직접 처리하여 유세포 분석기를 통해 세포치사를 확인 하였으며 (Fig. 4) 이러한 결과를 토대로 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물은 세포치사에 의해 KB 세포의 증식을 억제함을 알 수 있었다. 최근 연구보고에 의하면 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 잎에서 methylene chloride 용매를 이용하여 추출물을 얻은 후



이를 급성 림프구암세포주인 Jurket T 세포와 유방암 세포주인 MDA 361 과 MDA 438 세포에 추출물을 처리 한 결과 세포증식이 억제됨을 확인하였고 또한 미토콘드리아에서 cytochrome C 가 방출되고 caspase-3 가 활성화된 후 PARP 를 절단하여 세포치사를 유도하는 분자적 기전을 보고하였다 (26-28). 또한 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 과피에서 dichloromethane 과 멸균수를 이용하여 추출물을 얻어 이를 간암세포주인 HepG2 세포에 추출물을 처리 한 결과 활성화 산소 증가로 인해 세포치사가 유도됨을 보고 하였다 (29). 이와 같이 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 을 가지고 다양한 용매를 이용하여 추출물을 얻어 이를 세포에 처리하였을 때 여러 가지 분자기전에 의해 세포치사가 유도 되었으며 이러한 실험결과를 토대로 본 실험에서는 caspase 의존성 세포치사에 의한 실험을 수행하였다.

세포치사를 유발시키는 세포 내 신호전달 기전에서 중요한 기전 중 하나는 caspases의 활성화이다. Caspases 단백질은 효소 활성부위에 모두 cysteine을 가지고 있는 단백질 분해효소로서 지금까지 14가지가 알려져 있다 (30-32). Caspase family 단백질은 세포내에서 불활성화 된 pro-enzyme으로 존재하다가 세포사멸 신호에 의해 스스로 또는 다른 caspases에 의해 활성화 된다. Caspase-9 은 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome c에 의해 활성화 되고, cytochrome c의 방출은 bcl-2 family 단백질 변화에 의해 미토콘드리아 막 투과성이 증가 된다 (33, 34). 본 연구에서도 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물이 caspase-9의 활성화를 증가시킴을 확인하였고, 또한 활성화된 caspase-9 은 표적기질에 따라 아미노산 배열 중 DEVD를 인식해서 절단하는 CPP32-like caspase 로 알려져 있는 caspase-3를 활성화 시켰으며 활성화된 caspase-3는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 기능적 활성화

에 의한 세포치사를 유도 하였다 (Fig. 3). 이러한 결과를 토대로 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물에 의한 세포치사는 미토콘드리아 의존성 신호전달과정에 의해서 세포치사가 일어나고 있음을 유추할 수 있었다.

본 연구의 결과로 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물이 구강암세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있으며 또한 정상세포인 human fibroblast 에서 세포성장의 변화가 없음을 확인하였고 세포독성과 부작용이 적은 항암제를 개발할 수 있는 가능성을 제시하였다. 이러한 결과를 토대로 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물을 이용한 유효 단일성분 동정 및 동물실험 등의 연구수행이 필요할 것으로 사료 된다.

## V. 결 론

산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물은 주로 식. 약용으로 사용하고 있다. 주성분으로는 alpha-pinene, beta-selinene, limonene, citronellal, beta-phellandrene, cineol, 그리고 auraptene 과 같은 성분 등이 보고되어 있다. 이러한 성분들은 이미 민간요법에서 기침, 가래, 천식을 치료하며 살균작용, 구충작용, 소염작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 auraptene은 항염증작용, 항산화작용, 암세포증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다. 그러나 사람 구강암세포에 대한 세포성장 억제에 대한 연구는 전혀 이뤄지지 않은 바, 본 연구에서는 사람 구강 편평세포암종 KB세포를 이용하여 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물의 구강암세포 성장 억제에 미치는 효과와 암세포 성장억제에 대한 분자적 기전을 규명하고자 MTT assay, DNA fragmentation, western blot 및 유세포 분석 (FACS) 등을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물은 농도 의존적으로 구강암세포인 KB세포의 성장을 현저하게 억제 시켰다.
2. 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc) 추출물은 구강암 세포의 핵 내 존재하는 chromosomal DNA를 분절화 시킴으로서 세포치사를 유도하였다.
3. 구강암세포의 세포치사는 chromosomal DNA 의 분절화에 의해 세포 치사가 유도 되었으며 살아있는 세포내에서도 annexin-V와 같은 염색약을 처리하여 유세포 분석 (FACS) 으로 세포치사가 유도됨을 확인하였다.

4. 구강암세포의 세포치사는 세포내 caspase-3, 7, 9의 활성화를 유도하고 PARP의절단되어 세포치사를 유도됨을 확인하였으며 이러한 결과는 미토콘드리아 의존성 신호전달과정에 의해서 세포치사가 일어나고 있음을 확인하였다.

위의 결과를 토대로 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium Siebold & Zucc*) 추출물을 이용하여 구강암세포 성장억제에 대한 분자적 기전을 확인 하였고, 더 나아가 구강암세포에 항암활성을 갖는 단일 및 복합성분을 분리하고 동물실험을 이용하여 구강암 치료제 개발에 대한 기반 연구에 중요한 초석이 될 것으로 생각한다.

## 참고문헌

1. Schliephake, H., Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer-a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32, 233-245, 2003.
2. Hopper, C., Kübler, A., Lewis, H., Tan, I.B., Putnam, G., mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 111, 138-146, 2004
3. Bodin, I., Jäghagen, EL., Isberg, A. Intraoral sensation before and after radiotherapy and surgery for and pharyngeal cancer. *Head and Neck* 26, 923-929, 2004.
4. Yamachika, E., Habte, T., Oda, D., Artemisinin: an alternative treatment for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 24, 2153-2160, 2004.
5. Crown, J., O'Leary, M., Ooi, W.S., Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* 2, 24-32, 2004.
6. Datta, R., Kojima, H., Yoshida, K., and Kufe, D., Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 20317-20320, 1997.

7. Mukherjee, A.K, Basu, S., Sarkar, N, Ghosh, A.C. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr. Med. Chem.* 8, 1467–1486, 2001.
8. Pezutto, J.M. Plant-derived anticancer agents *Bioche. Pharmacol.* 53, 121–133, 1997.
9. Smets, L.A. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 5, 3–9, 1994.
10. Konishi T, Shimada Y, Nagao T, Okabe H, Konoshima T. Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*. *Biol Pharm Bull.* 25(10):1370–2, 2002.
11. Lim SS, Kim JR, Lim HA, Jang CH, Kim YK, Konishi T, Kim EJ, Park JH, Kim JS. Induction of detoxifying enzyme by sesquiterpenes present in *Inula helenium*. *J Med Food.* 10(3):503–10, 2007.
12. Chen CN, Huang HH, Wu CL, Lin CP, Hsu JT, Hsieh HP, Chuang SE, Lai GM. Isocotunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett.* 8:246(1-2):237–52, 2007.

13. Cheng, M. J., C. H. Yang, W. Y. Lin, I. L. Tsai and I. S. Chen. Chemical constituents from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium*. *Journal of Chinese Chemical Society* 49, 125–128, 2002.
14. Jo, Y. S., D. T. L. Huong, K. H. Bae, M. K. Lee and Y. H. Kim. Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica* 68, 84–85, 2002.
15. Chang, C. T., S. L. Doong, I. L. Tsai and I. -S. Chen. Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry* 45, 1419–1422, 1997.
16. Tsai, I. L., W. Y. Lin, C. M. Teng, T. Ishikawa, S. L. Doong, M. W. Huang, Y. C. Chen and I. S. Chen. . Coumarins and antiplatlet constituents from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica* 66, 618–623, 2000.
17. Tsai, I. L., W. Y. Lin, C. T. Chang and I. -S. Chen. Peroxycoumarins from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. *Journal of Chinese Society* 45, 99–101, 1998.
18. Mun S. I., H. S. Ryu and J. S. Choi. Inhibition effects of *Zanthoxylum schinifolium* and its active principle on liquid peroxidation and liver damage in carbon tetrachloride-treated mice. *Hanguk Sikpum Yongyang Kwahak Hoechi* 26, 943–951, 1997.

19. Mun, S. I., H. S. Ryu, H. J. Lee and J. S. Choi. Further screening for antioxidant activity of vegetable plants and its active principles from *Zanthoxylum schinifolium*. *Hanguk Yonggyang Siklyong Hakhoechi* 23, 466-471, 1994.
20. Shoff S. M., Grummer M., Yatvin M. B., Elson C. E., Concentration- dependent increase of murine P388 abd B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. *Cancer Res.*, 51, 37-42, 1991.
21. Yu S. G., Hildebrandt L. A., Elson C. E., Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, supresses the frowth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice.*J. Nutr.*, 11, 2763-2767, 1995.
22. Carnesecchi S., Schneider Y., Ceraline J., Duranton B., Gosse F., Seiler N., Raul F., Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 298, 197-200, 2001.
23. Buhagiar J. A., Podesta M. T., Wilson A. P., Micallef M. J., Ali S., The induction of apoptosis in human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer *Tetraclinis articulata*. *Anticancer Res.*, 19, 5435-5443, 1999.
24. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controlling cellular



- suicide: role of Bcl-2 and caspases. *CMLS* 54:427-445, 1998.
25. Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J Biol Chem* 273(12):7141-7147, 1998.
  26. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22(8):229-306, 1997.
  27. Green, D.R, Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1308-1312, 1998.
  28. Kaufmann, S.H, Earnshaw, W.C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* 256, 42-49, 2000.
  29. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-777, 2000.
  31. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet.* 11: 101-105, 1995.
  32. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis and therapy. *J. Pathol.* 187:127-137, 1999.
  33. Baik, S. Y., K. H. Koh, S. M. Beak, S. H. Pa and J. A. Kim. The

essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 28, 802-807, 2005.

34. Elinos-Baez, C. H., F. Leon and F. Santos. Effects of coumarin and 7 OH-coumarin on Bcl-2 and Bax expression in two human lung cancer lines in vitro, *Cell Biology International* 29, 703-708, 2005.