

黃連이 구강암 세포에서의 세포자멸사에 미치는 영향

이재근¹⁾ · 박숙자³⁾ · 김상찬^{2,3)} · 지선영¹⁾

¹⁾ 대구한의대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

²⁾ 대구한의대학교 한의과대학

³⁾ 한방신약개발팀 (BK21 Team)

Coptidis Rhizoma Extract induces Apoptotic Cell Death in YD-10B Cell

Jae-Geun Lee · Sook-Jahr Park · Sang-Chan Kim · Seon-Young Jee

Objectives : The aim of this study was conducted that CRE (*Coptidis Rhizoma* Extract) induces apoptosis in YD-10B cells, human oral squamous carcinoma cell line.

Methods : In this study, YD-10B cells were exposed to CRE (0.03-0.30 mg/ml), for 6-24 hours. We measured the effects of CRE on the changes of cell viability and cell membrane, TUNEL assay of CRE-treated YD-10B cell.

Results : In this study, CRE caused a decrease of viability in YD-10B cells, human oral squamous carcinoma cell line. When YD-10B cells were treated with CRE, cells showed dose-dependent manner apoptotic cell death.

Conclusions : These results suggest that CRE may be potential therapeutic approach in the clinical management of oral squamous cell carcinoma.

Key words : *Coptidis Rhizoma*, YD-10B cell, Apoptotic cell death

서 론

세포자멸사(apoptosis)는 원래 가지고 있던 세포 사멸의 경로가 활성화되어 그 세포가 자발적으로

죽음으로써 개체의 항상성 유지와 손상된 세포의 제거를 효율적으로 수행하는 자발적이고 능동적인 죽음의 기전이다¹⁾. 세포자멸사가 여러 가지 원인에 의해 통제되지 못할 경우 종양, 퇴행성 신경질환, 당뇨, 심혈관질환 등을 유발하기도 한다²⁻⁸⁾.

Apoptosis와 관련된 종양연구에서 가장 중요한 점은, apoptosis가 종양의 형성과 치료에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다는 것에 대한 인식이다³⁾.

교신저자 : 지선영, 대구 수성구 상동 165
대구한의대학교 부속 대구한방병원 안이비인후피부과
(Tel : 053-770-2130, E-mail : jeesy@dhu.ac.kr)
• 접수 2009/06/30 • 수정 2009/07/22 • 채택 2009/08/03

실제로 항암제는 대부분 목적세포들을 apoptosis로 유도 매개하는 것이 밝혀져 있다⁹⁾. 즉, 종양의 치료에서 중요목표 중의 하나는 종양세포에 특이적인 세포자멸사를 유도하는 것이다¹⁰⁾.

구강암은 구강종양 중 악성종양을 일컫는 말로서 발생 위치에 따라 구순암, 구강저암, 구개암 등으로 구분한다¹¹⁾. 구강은 점막, 근육, 골, 타액선 등의 조직으로 구성되어 구강암의 종류도 다양할 뿐 아니라, 부위에 따른 임상적 소견도 다양하다. 구강암의 발생률은 인종, 지역 및 사회경제적 여건에 따라 많은 차이가 있는데¹²⁾ 선진국에서는 구강암이 전체 암의 5%보다 적게 발생하지만, 개발도상국가에서는 경부암과 위암 다음 세 번째로 많이 발생하는 것으로 보고되고 있다¹³⁾. 1995년 유럽에서는 구강암 환자가 전체 암 발생률의 2% 정도였으며, 전체 사망자의 1% 정도를 차지한 것으로 보고되었다¹⁴⁾.

과거에는 일반적으로 구강암은 나이가 많은 사람에게서 호발하는 경향을 보였으나, 최근 들어 흡연 및 음주의 증가로 인해 젊은 층의 구강암 환자가 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다¹⁵⁻⁷⁾. 구강암의 치료법은 수술, 방사선요법 또는 항암화학요법 등이 있으며 진전된 구강암의 경우에는 수술과 더불어 항암화학요법, 방사선요법 등을 병용함으로써 재발률을 감소시키고 생존률을 향상시킬 수 있으나¹⁸⁾ 이런 구강암의 치료법은 저작, 연하, 발음, 어깨의 불편함 등의 기능적 장애와 안모변형 등을 초래하여 환자의 삶의 질을 떨어뜨릴 수 있다¹⁹⁾. 또한 구강암은 다른 부위에 비해 진단이 쉬우며, 진단학적 기술의 발달과 수술 및 재건술의 발달에도 불구하고 구강암으로 인한 생존률의 뚜렷한 향상은 보이지 않는 것으로 보고되고 있다^{20,21)}.

이에 저자는 黃連에는 항염증, 항산화, 항균, 청열해독작용²²⁻²⁶⁾이 있음에 근거하여, 黃連 추출물이 YD-10B cell (human oral squamous cell carcinoma)의 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보

고자 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 재료

RPMI-1640과 fetal bovine serum은 BioWhittaker (Walkersville, MD, USA)와 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. MTT와 기타 다른 reagent는 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. CRE의 제조

CRE은 대원약품사(Daegu, Korea)에서 구입한 黃連 (*Coptidis Rhizoma*) 200 g을 2 l의 물로 3시간 추출한 후에 여과농축하여 동결건조하였다. CRE의 최종 수율은 17.82%이었으며 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입한 DMSO에 녹여 0.2 μ m filter (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)로 여과하여 사용하였다.

3. 세포배양

Human 유래 oral squamous cell carcinoma cell line인 YD-10B cell은 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin과 100 mg/ml streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지에서 37°C의 온도와 5%의 CO₂가 유지되는 환경에서 배양하였다. 1×10⁶개의 YD-10B cells을 100 ϕ plastic dish에 배양하여 (80% 이상의 confluency를 유지) 24시간 배지를 고갈한 뒤, YD-10B cell에 지정된 시간동안 CRE를 농도별로 처치하였다.

4. MTT 세포생존율 측정

96 well plate의 well당 5×10^4 개의 YD-10B cells을 배양하여 confluence가 80% 이상이 된 경우 24시간 배지를 고갈한 다음, CRE를 농도별 (0.03-0.30 mg/ml)로 처리하여 CRE의 세포생존율을 측정하였다. 세포배양후 생존한 세포를 0.5 mg/ml의 MTT로 처리한 후 4시간 incubation하였다. 그 후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals에 200 μ l의 DMSO를 가하여 용해하였다. 흡광도는 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다. 세포생존율은 어떠한 처리도 가하지 않은 control cell과의 비율로 나타내었다 [즉, viability (% control) = 100 (absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

5. Cell lysates의 준비

Cell은 10 mM의 Tris (pH 7.4), 100 mM의 NaCl, 30 mM의 sodium pyrophosphate, 1 mM의 EGTA, 0.5%의 Triton X-100, 10%의 glycerol, 1 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoride와 100 μ M의 sodium orthovanadate를 함유한 buffer로 녹였다. Cell lysates는 매 5분마다 vortexing하면서 30분간 얼음에 방치한 후, 15,000 \times g에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고 상등액을 취하여 total cell lysate로 사용하였다.

6. Immunoblot analysis

SDS-PAGE 전기영동과 immunoblot analysis는 Kim 등²⁷⁾의 방법에 따라 시행하였다. 단백질을 12% gel의 전기영동으로 분리하고, 이것을

nitrocellulose paper로 이전하였다. Nitrocellulose paper에 Actin (Zymed Laboratory, San Francisco, CA, USA), caspase-9, caspase-3 (Pharmin- gen, San Diego, CA, USA) 등의 antibody를 가하여 배양하였다. 면역반응성 단백질은 ECL chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 발색하였다.

7. PARP cleavage

세포핵추출은 Kim 등²⁷⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉, cell을 ice-cold PBS로 2회 세척한 후 PBS를 가하여 수거한 다음 microtubes에 보관하였다. 그 후 cells을 2,000 \times g에서 5분간 원심분리하고, 10 mM의 HEPES (pH 7.9), 10 mM의 KCl, 0.1 mM의 EDTA, 0.5%의 Nonidet P-40, 1 mM의 DTT와 0.5 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoride를 함유한 저장액의 buffer를 가하여 세포를 rupture시켰다. Cell lysates를 얼음 위에 10분간 방치한 다음 7,200 \times g로 5분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하였다. Crude nuclei를 함유한 pellets에 20 mM의 HEPES (pH 7.9), 400 mM의 NaCl, 1 mM의 EDTA, 10 mM의 DTT와 1 mM의 PMSF를 함유한 추출 buffer를 50 μ l를 가하여 현탁시킨 후, 얼음에 30분간 방치하였다. 그 후 15,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후, nuclear fractions을 함유한 상층액을 얻었다. Nuclear fractions 50 μ l을 7.5% SDS-polyacrylamide gels을 사용하여 분해시키고, nitrocellulose membranes에 이전하였다. 이 membranes을 5%의 BSA를 함유한 PBS tween으로 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하여 blocking하였다. 그 후 anti-PARP antibody (1:2000)로 실온에서 배양하였다. 발색은 ECL chemiluminescence detection kit를 사용하여 발색하였다.

8. TUNEL assay

YD-10B cell을 4 well chamber slide의 well 당 1×10^5 개의 농도가 되게 배양하고 CRE를 농도별로 24시간 처리하였다. Cell은 PBS로 2회 washing한 후에 4% paraformaldehyde로 고정하여 TUNEL assay에 사용하였다. TUNEL assay는 *In Situ* cell death detection kit-POD (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 kit에 포함된 protocol에 맞게 분석하였다. 즉, paraformaldehyde로 고정된 cell을 0.3% H_2O_2 를 사용하여 blocking시키고 0.1% triton X-100/0.1% sodium citrate로 permeabilisation 상태로 만든 후에 TdT-enzyme이 처리된 용액으로 labeling하였다. PBS로 2회 washing한 후에 Converter-peroxidase (POD)로 37°C에서 30분간 처리하고 DAB로 발색하여 light microscope로 관찰하였다.

9. Flow cytometric analysis

붉은색 형광염색약인 PI와 초록색 형광염색약인 FITC annexin V (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 apoptotic cell을 분석하였다. 1×10^6 개의 cell을 10 cm^2 plastic plate에 깔고 70-80%의 confluency를 유지하였다. 먼저 cell에 24시간 배지고갈을 하고, 다음 24시간 동안 CRE를 농도별로 처리하였다. 부착된 cell을 trypsin을 처리하여 회수하였고 부유 cells과 trypsin처리 cell은 모두 70% ethanol로 resuspension하여 -20°C에서 overnight하여 고정시켰다. 고정된 cell은 1×10^6 개/ml의 농도로 PBS에 suspension 시킨 후, FITC annexin V와 PI를 처리하여 얼음 위에서 20분간 반응시켜 flow cytometer (Particle Analysis System, Partec GmbH, Minster, Germany)로 분석하였다.

10. 統計分析

실험 결과는 mean±SD로 나타내었으며, 처치군 간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Newman-Kleuls test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

결 과

1. CRE가 YD-10B cell의 세포생존율에 미치는 영향

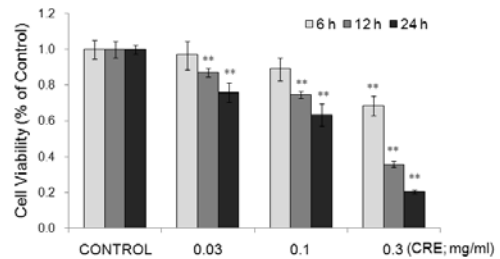


Fig. 1. The effects of CRE on the changes of cell viability.

YD-10B cells were exposed to CRE (0.03-0.30 mg/ml), for 6-24 h. Cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean±SD with eight separate experiments

*: significant compared with untreated control at the same treated time, ** $P < 0.01$

CRE가 YD-10B cell의 생존율에 미치는 영향을 분석하기 위하여, YD-10B cell에 24시간 serum을 고갈한 후, CRE를 0.03-1.0 mg/ml의 농도로 6-24시간 처리하였다. 결과 6시간에 CRE 0.03, 0.1, 0.3 mg/ml은 대조군에 비교하여 96.93%, 89.06%, 68.51%의 세포생존율을 나타내었으며, 12시간에서는 87.16%, 74.57%, 35.65%의 생존율을, 24시간에서 75.89% 63.20%, 20.38%의 생존율을 각각

나타내어, 농도 및 시간의 증가에 따른 유의성 있는($p < 0.01$) 세포생존율의 저하를 나타내었다 (Fig. 1).

2. CRE가 YD-10B cell의 cell membrane 변화에 미치는 영향

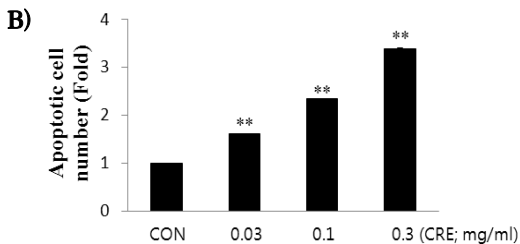
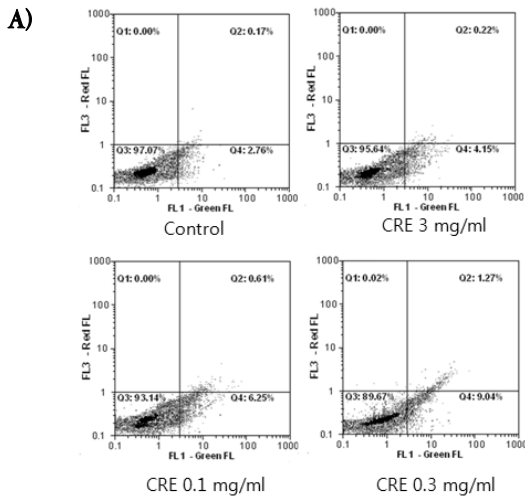


Fig. 2. Flow cytometric profile of green versus red fluorescence of YD-10B cell stained with FITC Annexin V and PI.

YD-10B cells were treated with CRE for 12 h. The population was separated into three groups: live cells showing only a low level of fluorescence, apoptotic cells showing green fluorescence and necrotic cells showing both red and green fluorescence (A), and the fold increase of apoptotic death cell was calculated (B). Data represents the mean \pm SD of six separate experiments.

** : Significant at $P < 0.01$ compared with vehicle treated.

PS는 cell membrane의 cytoplasmic surface에 위치하는 막지질로 세포자멸사의 진행과정에서 세포막의 변화에 의해 flips 현상을 보인다. 세포외막으로 이동된 PS는 human anticoagulant인 annexin V와 강한 affinity를 가지기 때문에 형광물질인 FITC를 부착한 annexin V를 제조하여 apoptotic cell을 관찰하는데 사용한다.

CRE가 0.03-0.30 mg/ml의 농도에서 유도한 세포사가 세포자멸사에 의한 것인지를 알아보고자, 붉은색 형광염색약인 PI와 초록색 형광염색약인 FITC annexin V를 사용하여 apoptotic cell을 분석하였다. FACS analysis 결과 CRE의 농도가 증가할수록 세포외막으로 돌출된 PS와 결합한 FITC annexin V의 증가로 세포자멸사의 분율이 점차 증가하였으며(Fig. 2), 이는 CRE가 유도하는 세포사에는 세포사멸이 연관되어 있음을 나타내는 결과이다.

3. CRE가 YD-10B cell의 DNA 분절에 미치는 영향

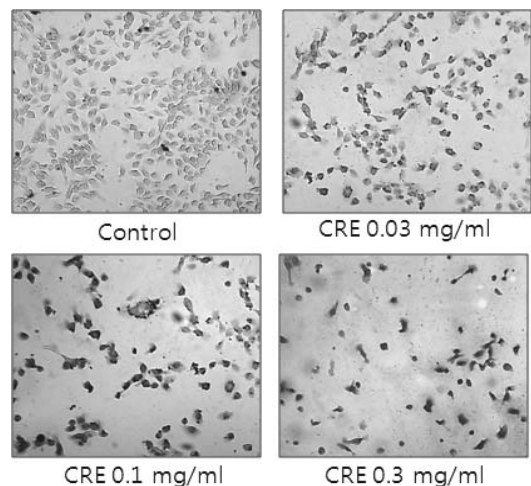


Fig. 3. TUNEL assay of CRE-treated YD-10B cell. YD-10B cells treated with 0.03-0.30 mg/ml of CRE for 12 h. The TUNEL assay confirms that the CRE treatment induces apoptotic cell death. The dark violet spots are condensed nuclei.

CRE가 YD-10B cell을 0.03-0.30 mg/ml의 농도에서 유도한 세포자멸사에 있어서 세포의 형태학적 특징인 DNA분절을 관찰하기 위하여 TUNEL assay를 실시하였다.

대조군에서는 TUNEL 염색에 양성인 YD-10B cell이 많이 나타나지 않았으나, CRE를 처치한 경우에는 TUNEL stain에 양성인 세포가 농도에 따라 증가하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 FACS 분석의 결과와 더불어 CRE가 YD-10B cell을 세포자멸사로 유도한다는 것을 나타낸다.

고 찰

黃連 (*Coptidis Rhizoma*)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한 多年生 草本인 黃連 (*Coptis chinensis* FRANCH), 三角葉黃連 (*C. deltoidea* C.Y. CHENG et HSIAO) 또는 雲連 (*C. teetoides* C.Y. CHENG) 및 日本產 黃連 (*C. japonica* MAKINO var. *dissecta* NAKAI)의 根莖을 건조한 것으로, 性은 寒 無毒하고, 味는 苦하며, 주로 心, 肝, 胃, 大腸經에 작용한다. 黃連은 淸熱 燥濕, 淸心除煩, 瀉火解毒하는 효능으로, 濕熱痞滿, 嘔吐, 瀉利, 黃疸, 高熱神昏, 心火亢盛, 心煩不寐, 血熱吐衄, 目赤, 吞酸, 牙痛, 消渴, 癰腫疔瘡를 치료하며, 外用하여서는 濕疹, 濕瘡, 耳道流膿 등을 치료한다²⁶⁾.

黃連에 대한 연구는 주로 항염증, 항산화, 항균 등에서 많이 이루어졌다. 항염증에 관한 연구로, 정 등²²⁾은 黃連의 ethylacetate, chloroform, butanol 분획이 LPS로 활성화된 BV2 microglial cell에서의 nitric oxide생성을 유의하게 억제함을 보고하였다. 조 등²⁸⁾은 LPS를 뇌실에 주입하여 plasma corticosterone 및 직장의 온도변화를 관찰한 후 黃連은 염증스트레스를 완화시키지 못함을 보고하였다.

黃連의 항산화에 관한 연구로, 김²⁴⁾은 黃連 추출물이 자외선의 370-210 nm영역에서 자외선 차단효과를 나타내며, 또한, 58%의 superoxide dismutase 유사활성, 83.3%의 tyrosinase 저해활성을 나타내어 외용제제로서의 사용가능성을 제시하였다.

또한 黃連의 항균에 관한 연구로, 최 등²⁵⁾은 黃連 추출물이 그람 양성 및 음성의 魚病細菌에 대하여 항균효과를 가짐을 보고하였고, 또한, tetracycline에 내성을 나타내는 균주에도 감수성을 나타냄을 밝혔다.

세포자멸사는 외부의 자극이나, 내적인 변화에 의해서 원래 계획되어 있던 세포사멸의 경로가 활성화되어 그 세포가 자발적으로 죽음으로써 개체의 항상성 유지와 손상된 세포의 제거를 효율적으로 수행하는 자발적이고 능동적인 죽음의 기전이다¹⁾. 이러한 세포자멸사는, 세포의 발생, 분화, 성장 및 노화 등의 전 과정을 통하여 세포의 생존과 사멸은 균형을 이루며, 개체의 항상성을 유지하게 한다^{3,22)}.

세포자멸사가 여러 가지 원인에 의해 통제되지 못할 경우, cancer, auto-immune lymphoproliferative syndrome, AIDS, ischemia와 Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease 등과 같은 neurodegenerative disease, 심혈관질환, 당뇨 등을 유발하기도 한다²⁻⁸⁾. 세포자멸사와 관련된 종양 연구에서 가장 중요한 점은, 세포자멸사가 종양의 형성과 치료에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다는 것에 대한 관점이다^{3,9,10)}.

실제로 항암제, 방사선요법, immunotherapy 등과 같이 종양치료에 이용되는 것들은 대다수 목적 종양세포들을 세포자멸사로 유도하는 것이 밝혀져 있다^{9,10)}. 즉, 세포자멸사는 모든 다세포 기관의 정상 발달과 항상성에 필수적인 자연적 세포사를 말한다³⁰⁾. 그러므로, 과다 또는 과소한 세포사멸은 생물학적 부작용을 초래하게 된다⁴⁾. 즉 류마티스성 관절염과 암종은 과소사멸의 잘 알려진 예이며, 허

혈성 심근질환, AIDS 그리고 퇴행성 신경질환 (Alzheimer병, 파킨슨씨병)등은 과도한 세포사멸의 예이다^{4,5,31}.

한편, 구강암은 선진국에서는 전체 암의 5%보다 적게 발생하지만, 개발도상국가에서는 경부암과 위암 다음 세 번째로 많이 발생하는 것으로 보고되고 있다¹³. 1995년 유럽에서는 구강암 환자가 전체 암 발생률의 2%정도였으며, 전체 사망자의 1% 정도를 차지한 것으로 보고되었다¹⁴.

과거에는 일반적으로 구강암은 나이가 많은 사람에게서 호발하는 경향을 보였으나, 최근 들어 흡연 및 음주의 증가로 인해 젊은 층의 구강암 환자가 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다¹⁵⁻¹⁷.

현재까지 알려진 구강암의 원인으로는 흡연, 씹는 담배, 후추, 음주 등이 있으며, 기타 원인들로는 불량한 구강위생, 義齒나 치아로 인한 기계적 자극, 인체유두종 (human papilloma virus), 매독, 편평태선과 구강의 점막하 선유화증 등이 있다^{16,17}. 그리고 가죽공업 등의 직업적 요인과 비타민 결핍 등이 보고되고 있으나 가장 큰 요인은 구강암의 90% 이상에서 관련성이 있는 흡연과 음주이며, 또 상호작용 효과가 매우 크다^{16,17,32}.

우리나라에서의 구강암 발생률에 대해 살펴보면, 2000-2002년에 7대 광역시 및 제주도 지역의 암 발생률 통계를 따르면 인구 10만명당 남자는 1.4명, 여자는 0.7명이 발병하는 것으로 나타났으며, 전체 암 중에서 남자는 0.52%, 여자는 0.33%의 비율을 나타냈다³³.

성별 분포에서는 조와 김³⁴은 2.5:1, 김 등³⁵은 1.95:1의 비율로 남성이 여성보다 더 많이 걸리는 것으로 나타났다. 현대의학의 발전으로 인한 인간의 평균수명 연장, 현대 산업문명이 낳은 여러 가지 유해자극과 발암물질, 식이 습관의 변화 등으로 인하여 구강암의 발생률은 계속 증가될 것이라 전망된다³⁶.

근래 구강암연구에 대하여 다양한 한약재를 이

용한 연구가 진행되었는데 콩, 진달래꽃, 葶藶子, 까마중, 蒲公英, 활나물[農吉利], 쑥, 芍藥, 白蘞 (Ampelopsis radix) 등의 추출물이 구강암세포인 KB cell에 대하여 유의한 세포독성을 나타냄이 보고되어 있으며³⁷⁻⁴⁴, 이 등³⁹은 지실 및 덩대이나무 추출물이 cisplatin 2 $\mu\text{g/ml}$ 과의 병용치치로 유의성 있는 항암활성의 증가를 나타냄을 보고하였다. 특히 이 등⁴⁵은 Tea-tree의 휘발성 물질이 치은섬유 모세포 (HGF)에는 비교적 독성이 약하며, 구강편평상피암세포 (KB cell)에서는 HGF보다 더 적은 농도에서도 높은 세포독성을 나타내며, KB cell에 대한 이러한 세포독성은 세포사멸에 의한 것임을 밝혔다.

또한, 한약재를 이용한 *in vivo* 연구로서 팽⁴⁶은 녹차추출물이 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA)의 반복적 도포로 유발된 햄스터의 협낭 구강암에 있어서 제한적이지만 암발생억제효과가 있음을 밝혔으며, 송⁴⁷은 대두 성분 중의 하나인 genistein이 7.12-DMBA의 반복적 도포로 유발된 햄스터의 협낭 구강암에 있어서 미세혈관의 생성을 억제하므로 종양의 발생억제 및 예방효과가 있을 것으로 보고하였다.

특히 이 등⁴⁸은 蘇木 추출물이 KB cell에 대하여 IC₅₀가 9.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 유의하게 세포독성을 유발하며 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 telomerase의 활성을 50% 정도 억제하며, 분획별로는 dichloromethane 분획이 유의함을 밝혔다.

이에 저자는 CRE이 human oral squamous cell carcinoma cell인 YD-10B cell의 세포사멸사에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

먼저 세포생존을 실험에서 CRE를 6-24시간 처치한 결과 대조군에 비교하여 농도 및 시간의 증가에 따른 유의성 있는 세포생존율의 저하를 나타내었다.

이러한 세포사와 세포사멸사와의 관련성을 관찰하기 위하여 YD-10B cell에 CRE를 처치한 후 PI

와 FITC annexin V를 사용하여 세포막 변화를 FACS로 관찰하였다. 실험결과 CRE의 농도가 증가할수록 세포외막으로 돌출된 PS와 결합한 FITC annexin V가 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 CRE가 유도하는 세포사는 세포사멸이 연관되어 있음을 나타내는 결과이다.

또한, 세포자멸사의 또 다른 특징의 하나인 DNA분절을 관찰하기 위하여 TUNEL assay를 실시한 결과, 대조군보다 CRE를 처치한 경우에서 DNA의 분절이 증가하였다. 이러한 결과는 FACS analysis의 결과와 더불어 CRE가 YD-10B cell을 세포자멸사로 유도한다는 것을 나타낸다.

이상의 연구결과를 종합하여 보면, CRE는 미토콘드리아를 경유하는 세포자멸사를 유도함을 알 수 있다.

결 론

黃連 추출물 (CRE)을 YD-10B cell (human oral squamous cell carcinoma)에 처치하여, 이들의 세포사멸을 MTT assay, Flow cytometric analysis, TUNEL assay, ELISA kit, Immunoblot analysis 등으로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CRE는 시간 (6-24시간) 및 농도 (0.03-0.30 mg/ml) 의존적으로 유의한 세포사를 유발하였다.
2. FACS, TUNEL assay결과, CRE는 농도의존적으로 세포자멸사를 유도하였다.

이상의 연구결과는 구강암의 치료 및 예방에, 黃連 추출물은 세포자멸사의 유도 목적으로 활용될 수 있는 가능성을 제시한다. 앞으로 구강암의 예방 및 치료에 황련과 다른 단미제제와의 관련성

등 더 많은 연구가 필요하다고 판단된다. 현재의 구강암의 치료 및 예방에 외용제로 황련 추출물을 활용할 수 있는 가능성을 제시한다.

참 고 문 헌

1. Geoffrey M Cooper. 세포학. 서울:한우리. 2000;599-636.
2. 김철현, 이경희, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규. 폐암 세포에서 proteasome inhibitor에 의한 apoptosis의 기전. 결핵 및 호흡기질환. 2003;54(4):403-14.
3. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.
4. Nagata S. Fas-mediated apoptosis. Adv Exp Med Biol. 1996;406:119-24.
5. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. Sci Am. 1996;275(6):80-7.
6. 김대근. 위장관 질환과 세포사멸. 대한소화기학회지. 2002;39:79-87.
7. Jana S, Paliwal J. Apoptosis: potential therapeutic targets for new drug discovery. Curr Med Chem. 2007;14(22):2369-79.
8. Hunter AM, Laccase EC, Komeluk RG. The Inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. Apoptosis. 2007;12(9):1543-68.
9. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Exp Cell Res. 2000;256(1):42-9.
10. Petak I, Houghton JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. Pathol Oncol Res. 2001;7(2):95-106.

11. 노석선. 원색안이비인후과학. 대전:주민. 2003; 656-7.
12. 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;10:513-23.
13. Parken DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J cancer*. 1988;41:184-97.
14. Bary F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Euro J cancer*. 2002;38:99-166.
15. Liewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people : a casecontrol study. *Oral Oncology*. 2004;40:304-13.
16. Liewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people-a comprehensive literature review. *Oral Oncology*. 2001;37:401-18.
17. Vecchia CL, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of Oral Cancer. *Oral Oncology*. 1997;33:302-12.
18. 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.
19. Chandu A, Sun KCV, De Silva 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.
20. 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;43:150-58.
21. 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.
22. 정효원, 박용기. 황련 추출물의 분획화 및 BV2 microglial cells에서 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide 생성억제효과 검증. *대한본초학회지*. 2007;22(2):73-8.
23. 박용기, 정효원, 김창민, 최재수, 김영식. 황련(黃連)의 주성분인 Berberine의 뇌신경소교세포로부터 LPS에 의해 유도되는 염증매개물질 생성억제효과. *대한본초학회지*. 2007;22(4):117-25.
24. 김일출, 갈근, 복령 및 황련의 항산화성 및 미백효과. *한국유화학회지*. 2008; 25(2):219-25.
25. 최혜승, 김이청, 이주석, 조미라, 서창호, 박수일. 천연 생약재 열수 및 알코올 추출물의 어병 세균에 대한 항균력. *한국어병학회지*. 2004;17(1):39-55.
26. 전국한의대본초학교수. *본초학*. 서울:영림사. 1992:180-1.
27. Kim SC, Byun SH, Yang CH, Kim CY, Kim JW, Kim SG. Cytoprotective effects of Glycyrrhizae radix extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome c-mediated

- PARP cleavage). *Toxicology*. 2004;197(3): 239-51.
28. 조은호, 이태희. LPS에 의해 유발된 염증(炎症) 스트레스에 대한 황련(黃連)과 부자(附子)의 효과. *대한본초학회지*. 2006;21(2):77-85.
 29. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):342-8.
 30. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 1993;14(2):133-51.
 31. 손윤희, 조현정, 김미경, 정은정, 남경수. 단삼 에탄올추출물이 유방암 예방 및 전이에 미치는 영향. *생약학회지*. 2007;38(1):62-6.
 32. 김규상. 구강암-후두암과 편도암 등. *산업보건*. 2008;241:6-13.
 33. 한국지역암등록본부협의회. 한국 8개 지역암등록본부 자료를 활용한 2000-2002년 한국인 국가 암통계 추정. *예방의학회지*. 2008;41(6): 380-6.
 34. 조준현, 김진수. 구강암 환자에 대한 임상통계학적 분석. *대한악안면성형재건외과학회지*. 1998;20:33-44.
 35. 김명윤, 김진수, 이상한, 김진욱, 장현중. 최근 8년간 구강암 환자에 대한 임상통계학적 연구. *대한구강악안면외과학회지*. 2007;33:660-8.
 36. 류선열, 박문성. 구강암 환자에 대한 후향적 연구. *대한구강악안면외과학회지*. 1996;22(4): 643-58.
 37. 이성림, 김종규. 한국 전통 된장 및 콩 추출물의 KB 세포에 대한 증식 억제효과. *한국환경보건학회지*. 2005;31(5):444-50.
 38. 박승우, 김상교, 김미정. 진달래꽃 추출물의 항산화 효과 및 인체 KB cell에 대한 세포독성. *한국식품저장유통학회지*. 2006;13(4):501-5.
 39. 이영훈, 김여갑, 김정희. 구강암에 대한 약용식물추출물의 항암효과에 관한 연구. *대한구강외과학회지*. 2000;16(1):53-8.
 40. 이명호, 한두석. 포공령 물추출물이 배양 인체 구강유상피암종세포에 미치는 항암효과. *원광생체재료·매식*. 1998;7(2):79-92.
 41. 박중윤, 한두석, 농길리. 추출물이 배양 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성. *원광치의학*. 2002;11(1):303-15.
 42. 조민정, 민경진. 들깨잎과 쑥 추출물의 구강병 원인균에 대한 항균 및 KB 세포 증식 억제효과. *한국환경보건학회지*. 2007;33(2):115-22.
 43. 박현숙, 민경진, 차춘근, 송진옥, 손진창. 작약 추출물의 구강병원균에 대한 항균성 및 구강암 세포 증식 억제효과. *한국환경보건학회지*. 2007;33(1):21-9.
 44. 서경성, 김여갑. 천연약제 Momordin의 구강암(KB) 세포주에 대한 항암작용기전에 관한 연구. *대한구강악안면외과학회지*. 2001;27(3): 209-13.
 45. 이영수, 차정단, 김광석, 반석호, 전재규, 장기완. Tea-tree 휘발성 물질의 구강편평상피암세포에 대한 세포사멸유도. *대한구강보건학회지*. 2007;31(3):340-6.
 46. 팽준영. 녹차추출물이 햄스터 협낭 구강암에 미치는 암화학예방효과. *서울대학교대학원. 치의학석사논문*. 2002.
 47. 송승일. 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene으로 유도된 햄스터 협낭 구강암 발암과정에서 genistein의 혈관형성 억제에 관한 연구. *서울대학교대학원. 치의학석사논문*. 2002.
 48. 이종수, 김정희, 김여갑. 소목 추출물의 구강암 및 골육종 세포주에 대한 항암작용에 관한 연구. *대한구강악안면외과학회지*. 2007;33(6): 583-90.