

Studies on the Anticancer Effect of Apigenin in KB Cell Xenograft Nude Mouse Model

Jin-Seok Lee[†], Hyeong-Seok Seo[†], So-Jung Kim, Hyeong-Jin Kim, Jin Kim, Seung-Ho Lee, Young-Seok Park, Byung-Kwon Park, Byeong-Soo Kim, Sang-Ki Kim and Ji-Youn Jung*

Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea

Received July 19, 2010 / Accepted October 20, 2010

Apigenin (4', 5, 7-trihydroxyflavone), a common dietary flavonoid abundantly present in fruits and vegetables, has shown remarkable anti-proliferative effects against various malignant cell lines. To observe the anti-proliferative effects, oral cavity cancer cell lines, 6×10^3 cells/well (96 well plate) of KB oral cavity tumor cells were plated and 24 hr later treated with apigenin for one day, after which MTT assay was performed. Apigenin induced cell death in a dose-dependent manner after incubation. Cell viability was significantly decreased in the group treated with 100 μ M apigenin for 24 hr ($p < 0.05$) compared to the control group. To assess apoptosis, the nuclei of KB cells were stained with DAPI. The presence of chromatin condensation in the apigenin treated cells was detected on a fluorescent microscope ($\times 200$). We investigated the *in vivo* growth inhibitory effects of apigenin on oral cavity cancer KB tumor xenograft subcutaneously implanted in male nude mice. Apigenin was administered to mice by gavage at doses of 25 and 50 mg/kg/day in 0.2ml of PBS. Tumor volume was significantly decreased in 25 and 50 mg/kg apigenin-administration groups compared to the control group. For apoptosis analysis, TUNEL staining was performed. A significant increase in TUNEL positive cells was found in the 25 mg/kg apigenin administration group compared to the non- apigenin administration group. Histopathological changes were not observed. These results indicate that apigenin inhibits oral cavity cancer cell growth through the induction of apoptosis.

Key words : Apigenin, oral cavity tumor cells, flavonoids, apoptosis

서 론

구강암은 인종, 지역별로 차이는 있으나 인간에게 발생하는 악성 종양의 약 3-5% 정도를 차지하는 것으로 통계학적으로 알려져 있어 역학적으로 매우 중요하게 다루어야 할 악성암이다[16]. 현재 구강암에 대한 주된 치료 방법은 외과적 수술과 방사선 요법인데, 인접 조직으로의 침습이 많아 전이 재발이 많은 구강암의 특성 때문에 항암 요법이 병행되기도 하는데, 심한 부작용과 더불어 타 암종에 비해 반응률이 낮고, 종양의 성장과 미세 전이를 효과적으로 억제하지 못하며 이것이 오히려 수술의 시기를 지연시키고 예후를 악화시키는 경우를 초래하게 된다. 이러한 이유로 전신적 부작용이 적으면서 효과적으로 항암 작용을 나타낼 수 있는 새로운 치료 요법 연구가 꼭 필요한 실정이나 기초적인 연구가 활발하지 않다[12]. 현재 우리나라에서 구강암은 위암과 간암 등 다른 암종과 비교해 보았을 때 많은 비율을 차지하지는 않는다. 그러나 구강암은 전암병소인 백반증이나 홍반증이 동반되며 다른 암종과는 달리 진행과정을 육안으로 관찰하기 용이하므로 전형적인 다단계의 발암모델로 연구되고 있다. 또한 임상증상 및 임상자료의 수집이 쉽고 방사선 치료나 화학요법 이전의 조직을 쉽게

채득할 수 있으며, 항암화학요법이나 암치료의 결과를 쉽게 추적 관찰 할 수 있어, 구강암은 다른 암종과는 달리 다단계에 따른 암의 진행연구에 최적의 발암연구 모델이라 할 수 있다[9,19]. 성공적인 구강암 치료를 위해서는 종양 생물학에 대한 이해와 항암 기능이 있는 여러 안전한 천연물질의 효과를 연구하는 것이 필요하다.

플라보노이드는 식물계에 널리 분포되어 있는 폴리페놀 화합물로서 채소류, 과일류, 종실류 등에 들어있다. 플라보노이드는 flavan핵 구조를 가진 저분자량의 폴리페놀화합물로 페놀이 3개의 A, B 및 C환의 기본구조로 구성되어있는 di-phenyl-pro-pane (C_6 , C_3 , C_6)의 골격을 지니고 있다[6,11]. 지금까지 알려진 플라보노이드는 약 4,000여 종류가 있으며 주요한 플라보노이드로서 flavonols, flavones, flavonones, flavanols and thocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols 및 chalcones 등 많은 종류가 있다. 플라보노이드는 식물성 성분으로 다양한 구조적 특성을 가지고 있으며 벤젠환의 탄소기에 -OH기와 탄소의 2와 3 위치에 2중결합, 탄소 4번 위치에 카르보닐기와 A와 B환에 결합되어 있는 -OH기에 의하여 항산화 활성을 갖는다. 사람은 식품으로서 플라보노이드를 섭취하고 있으나 흡수와 대사에 대하여 잘 알려져 있지 않다. 그러나 오랫동안 식품으로 섭취하였으므로 독성이 없으며 소화관에서 흡수된 후 대사되어 우리의 건강에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다[18]. 플라보노이드는 항암[4], 항산화[2] 작용이 있

*Corresponding author

Tel : +82-41-330-1526, Fax : +82-41-330-1529

E-mail : wangza@Kongju.ac.kr

다고 보고되었는데 항암성과 항돌연변이성을 갖는 플라보노이드는 flavonols계의 quercetine, kaempferol, myricetin이 있으며, flavonone계의 apigenin, luteolin 그리고 limonin, nomilin 등이 알려져 있다[7,8]. 그리고 플라보노이드 중에서 apigenin은 *in vitro*와 *in vivo*에서 암세포 성장 억제작용 뿐 아니라[5,17] 항염, 항산화 작용을 보인다[10].

Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone)은 일반적인 방향족 화합물의 하나로서 파슬리, 양파, 오렌지, 차, 카모마일, 밀, 그리고 몇몇 조미료 등 많은 열매와 식물에 분포하고 있으며, 독성이 없는 것으로 알려져 있다[3]. Apigenin은 유방암 및 대장암 등 여러 가지 인체 암 세포주에서 세포성장 저해, 세포주기 억제 및 세포사를 유도한다[20,21].

본 연구는 천연물질인 apigenin을 세포성장실험과 TUNEL (apoptosis)을 통한 결과를 바탕으로 구강암 세포를 이식한 누드마우스에 경구투여 하여 종양성장억제 효과가 있는지 확인하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 시험물질

본 연구에서는 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양받은 KB 구강암세포주를 사용하였다. 이들 세포주의 세포배양액은 RPMI-1640 (Hyclone Laboratoris Inc, USA)에 5% fetal bovine serum (Gibco), 1% streptomycin/penicillin (Gibco)를 첨가하여 사용하였다. 이들 KB 구강암세포주는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 시험물질은 Sigma (St Louis, MO, USA)사로부터 구입한 apigenin을 본 시험에 사용하였다.

MTT assay

KB 구강암세포주를 96 well plate에 6×10^3 cells/well로 분주한 후, 24시간 동안 배양시킨 다음 세포주에 apigenin을 6.25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M의 농도로 처리하였다. 이 후 각각의 well에 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]용액 (5 mg/ml, Sigma-Aldrich)을 20 μ l 첨가하여 2시간 동안 37°C에서 배양하고, 이후 상층액을 제거한 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)를 100 μ l/well로 첨가하여 shaker에서 5분간 흔들어 준 후 ELISA-reader (Bio-Rad Laboratories Inc, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DAPI staining

KB 구강암세포주를 12 well plate에 4×10^4 cells/ml로 분주한 후, 24시간 동안 배양시킨 다음 KB 구강암세포주에 apigenin을 12.5 μ M, 25 μ M의 농도로 처리하여 24시간 배양한 후 PBS로 조심스럽게 세척 한 후에 4% paraformaldehyde를 1 ml/well첨가하여 10-20분간 배양 하였다. PBS로 다시 세척

후 PBS로 10배 희석한 DAPI stain 용액을 500 μ l/well 처치하였다. 처치 후 암실에서 형광현미경으로 관찰하였다.

실험동물

6주령의 nude mice (nu/nu) 수컷은 ㈜오리엔트에서 구입하였다. 모든 동물은 1주일간의 순화 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 마우스 15마리를 3개의 실험군으로 분류하여 실험 하였으며, 실험군은 그룹 당 5마리씩 설정하였다. Apigenin을 PBS에 suspension시켜 매일 정해진 시간에 21일간 경구로 투여하였으며, 물질의 용량은 대조군(PBS), 저용량(25 mg/kg), 고용량(50 mg/kg)로 설정하여 투여하였다.

사육환경

입수된 동물은 케이지에 5마리씩 분류한 후 온도 23±5°C, 상대습도 40±10%, 조명시간 12시간(08:00 점등, 20:00 소등)으로 제어된 환경 조건에서 사육되었다. 사육환경 모니터링을 위하여 온·습도는 주기적으로 측정하였으며 기타 환경은 정기적으로 점검하여 일정한 표준치를 유지하였다. 마우스는 폴리카보네이트제 케이지에서 케이지 당 5두씩 사육하였다. 동물의 개체식별은 문신법을 사용하였으며, tag 표시법에 의해서 사육 상자를 구분하였다. 사육 상자는 시험기간, 시험명, 시험책임자명을 기재한 label을 첨부하였다.

Xenografts

KB 구강암세포주 5×10^5 cells/200 μ l를 누드 마우스의 복강피하에 접종하여 종양조직을 만든 후, 종양조직을 1 mm³ 크기로 절편한 후 다시 누드 마우스의 복강피하에 이식하는 작업을 두 번 반복한 후 물질을 투여하였다.

종양사이즈 측정

실험에 사용한 누드 마우스의 KB 구강암세포주 종양 사이즈가 균별로 일정하게 나오도록 군분류 한 후 apigenin을 3주 동안 투여하고 투여기간 동안 종양사이즈와 누드 마우스의 일반적인 상태 및 체중을 측정하였다. 종양사이즈 측정은 주 2회(화, 금), 3주 동안 vernier calipers (Mitutoyo, Japan)로 측정하였으며, 계산에 사용된 공식은 [(length+width)×0.5]³이다.

동물부검

Apigenin 투여 3주 후 모든 그룹의 마우스를 diethyl ether로 마취 후 경추탈골을 이용하여 안락사하고, 멸균된 수술용 가위와 핀셋을 이용하여 부검을 실시하였다. 부검은 종양조직을 채취하여 무게를 측정하였으며 그 후 회복하여 간과 비장을 채취하여 10% 중성 포르말린 용액에 1주일간 고정하였다.

조직병리학적 검사

적출한 장기는 10% 중성 포르말린 용액에 1주일 동안 충분

히 고정시킨 후 고정된 조직을 85, 95, 100% ethanol, xylene을 단계별로 사용하여 탈수와 투명화 과정을 거쳤고 포매하여 5 μm의 절편을 만들어 hematoxylin & eosin 및 TUNEL 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

통계학적 처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 사용하여 나타내고 각 구간 비교는 one-way ANOVA에 이은 t-test 분석을 실시하였다. 대조군과 비교하여 P값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

Apigenin이 KB 구강암세포주의 성장에 미치는 영향

KB 구강암세포주를 seeding 후 24시간 동안 배양시킨 다음 apigenin을 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM의 농도로 24시간 동안 처리하였다. 대조군은 지속적으로 세포성장이 일어나는데 비해 apigenin 처리군에서는 12.5 μM에서부터 농도 의존적으로 세포의 성장이 지연되며 부유하는 세포들이 증가됨을 보였다 (Fig. 1). 이 결과를 바탕으로 apigenin이 KB 구강암 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 6주된 누드 마우스에 KB 구강암세포주를 이식한 후 주 2회 종양사이즈를 측정하였다 (Fig. 2). 종양 부피는 대조군과 대조하여 저용량(25 mg/kg)의 apigenin 투여군에서 유의적으로 감소하였다. 암세포 주입 후 8일경까지 대조군과 apigenin 투여군의 특별한 차이는 보이지

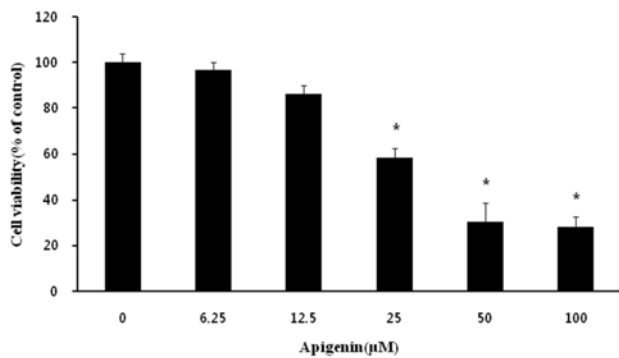


Fig. 1. Effect of apigenin on the cell viability in KB cells. KB cells were treated with apigenin for 24 hr, and the cell viability was determined by MTT assay as described in Methods.

Table 1. Effect of apigenin on the tumor inhibition rate in KB oral cavity tumor

Apigenin (mg/kg)	Pre-experiment		Post-experiment		Inhibited rate (%)	
	n	Size (mm ³)	n	Size (mm ³)		
KB cell	0	5	938.46	5	6231.99	
	25	5	729.50	5	3929.17	36.95
	50	5	781.46	5	4957.41	20.45

Data are expressed as the percent relative to control.

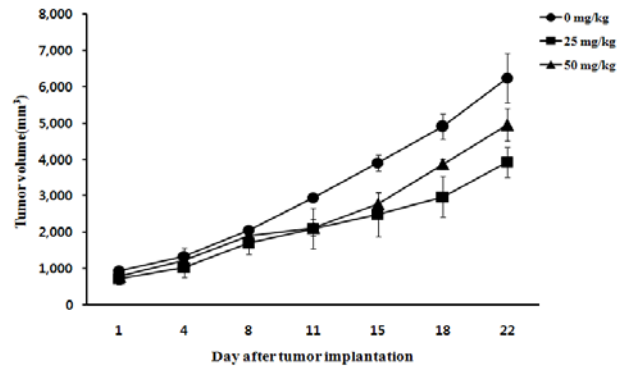


Fig. 2. Effect of apigenin on the KB oral cavity tumor growth. Mice were treated with apigenin for 3 weeks. Each value was expressed as Mean±SE of 5 mice.

않았다. Apigenin 투여군에서 11일경 이후부터 고용량(50 mg/kg)군 보다 저용량(25 mg/kg)군에서 더 많은 종양성장 억제제를 나타나기 시작하여, 22일경에 apigenin 투여군의 종양 성장억제율이 저용량(25 mg/kg) 36.95%, 고용량(50 mg/kg) 20.45%를 나타내었다(Table 1). 부검 후 종양무게를 측정한 결과 저용량(25 mg/kg)군이 고용량(50 mg/kg)군 보다 21.09% 만큼 종양성장을 억제하였다(Table 2).

세포자멸사의 검출

Apigenin이 구강암 세포주인 KB cell에서 세포사를 유도하는지를 알아보기 위해 apigenin (24 hr)처리 후 DAPI 염색을 통하여 apoptosis를 확인하였다(Fig. 3). MTT assay결과에서 농도 의존적으로 세포의 성장이 감소한 것과 동일하게 DAPI 염색에서도 농도 의존적으로 apoptosis의 증가가 발견되었다. Apigenin이 KB 구강암세포주에서 apoptosis를 일으킨다는 것을 확인 후 *in vivo* 실험에서도 TUNEL 염색을 통하여 apoptosis를 확인해 보았다(Fig. 4). TUNEL염색에서는 inhibition

Table 2. Effect of apigenin on the tumor weight in the KB oral cavity tumor

Apigenin (mg/kg)	n	Tumor weight (g)	Inhibited rate (%)	
KB cell	0	5	1.83	
	25	5	0.92	49.82
	50	5	1.31	28.73

Data are expressed as the percent relative to control.

rate와 동일하게 저용량(25 mg/kg)군이 고용량(50 mg/kg)군보다 apoptosis의 발현이 더 많았다.

조직병리학적 소견

Apigenin 처치군의 간조직을 육안적으로 관찰한 결과 간소엽의 중심정맥을 중심으로 간세포가 방사형으로 뻗어 있고,

간실질의 세포 경계가 명확하게 나타나며, 간세포의 핵이 크고 뚜렷하게 나타나는 정상적인 간조직의 구조를 유지하고 있었다(Fig. 5A, B, C). 대조군과 apigenin 처치군의 신장조직을 육안적으로 관찰한 결과 대조군의 사구체와 같이 apigenin 처치군의 사구체에서도 정상적인 사구체의 구조를 유지하고 있었다(Fig. 5D, E, F). 종양조직간에도 대조군과 동일하게 처

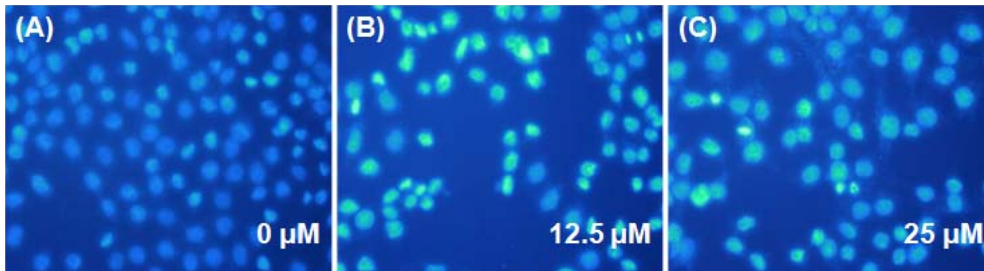


Fig. 3. Effect of apigenin on the chromatin condensation in KB cells. KB cells were treated with apigenin for 24 hr and stained with DAPI.

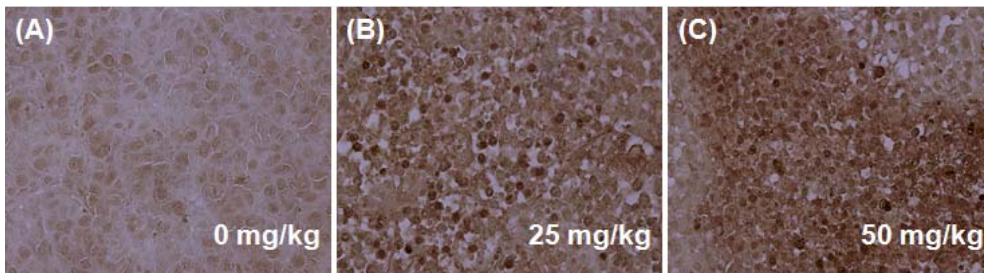


Fig. 4. Effect of apigenin in the apoptosis in KB oral cavity tumor. Nude mice were administrated with apigenin for 3 weeks.

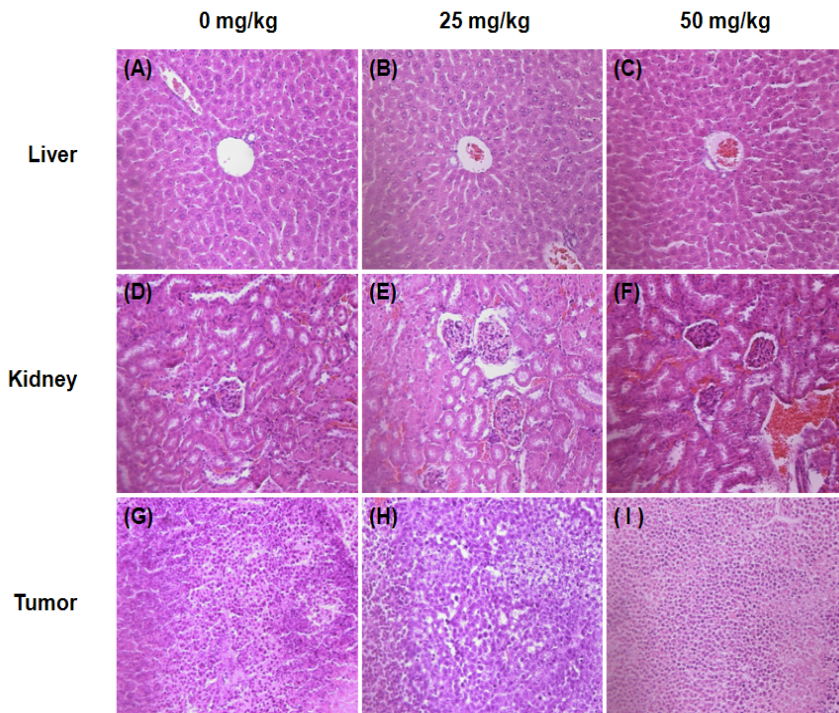


Fig. 5. Histological observation of apigenin treated to nude mice (H&E). Nude mice were administrated with apigenin for 3 weeks.

치군의 종양에서도 육안적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 5G, H, I).

고 찰

최근 아시아뿐만 아니라 서양에서도 천연물을 이용한 생약의 소비량이 증가되고 있다. 이와 함께 천연물에 대한 관심이 증가하였지만, 천연물질 성분의 효용성에 대한 증거가 매우 부족한 실정이다. 그리하여 WHO에 의해 이에 대한 연구가 진행되고 있다.

Apigenin은 식물과 과일에 널리 분포하는 가장 일반적인 방향족 화합물로서 독성이 낮고 정상 세포와 암세포에 있어 다른 효과를 보이는데 즉 약제로서 효용성을 가지는 용량에서 정상 동물에는 영향을 주지 않으면서 암세포의 세포사를 유도하기 때문에 매우 매력적인 약제이다[15].

Apigenin의 세포성장 저해를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 선행연구에 따르면 CaSKi, HeLa, C33A 등 3종류의 자궁경부암 세포주에 apigenin을 다양한 농도로 24, 48, 72시간 동안 처치한 결과 농도 및 처리 시간 의존적으로 세포 성장을 저해함을 확인하였다[15]. MDA-MB-231 유방암 세포주에서도 apigenin을 다양한 농도로 24시간 동안 처치한 결과 농도 의존적으로 세포 성장을 저해함을 확인하였다[1]. 본 연구에서도 KB 구강암세포주에 apigenin을 다양한 농도(6.25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M)로 24 시간 동안 처치한 결과 12.5 μ M에서부터 농도 의존적으로 세포 성장을 저해함을 확인하였다(Fig. 1).

6주된 누드 마우스에 폐암 세포주인 A549 cell에서 apigenin을 3 mg/kg을 투여하여 대조군과 비교하였을 때 종양 성장을 억제하였다[14]. 췌장암 세포주인 MiaPaCa-2 cell을 이식한 4주된 BALB/c 마우스에 apigenin 50 mg/kg을 3주 동안 투여한 실험에서도 대조군에 비하여 종양 성장 억제를 나타내었으며, gemcitabin을 병용처리 하였을 때 apigenin 단독처리군 보다 종양 성장 억제가 더 많이 있어왔다[13]. 본 연구에서도 KB 구강암세포주에서 apigenin은 성장 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2).

KB 구강암세포주에서 apigenin이 apoptosis 유발여부를 알아보기 위하여 DAPI염색을 수행한 결과 농도 의존적으로 apoptosis가 증가 되었음을 확인하였다(Fig. 3). 유방암 세포주인 MDA-MB-231 cell을 이식한 5주된 누드 마우스의 apigenin 25 mg/kg, 50 mg/kg 처치군에서 apoptosis는 용량 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다[1]. 본 연구에서도 종양사이즈의 성장 억제율과 동일하게 apigenin 25 mg/kg에서 apoptosis가 더 많이 일어나는 것을 확인 하였다(Fig. 4).

Apigenin 투여 시 생체 내에서의 독성유무를 판단하기 위하여 일반적으로 물질의 독성을 나타내는 지표장기인 간과 신장을 채취하여 조직병리학적 검사를 실시하였다. 그 결과

apigenin 처치군과 대조군의 조직학적 관찰에서 조직현미경학적 차이를 보이지 않아 apigenin이 누드 마우스에서 50 mg/kg까지는 무해한 것으로 판단되었다(Fig. 5).

본 실험에서는 고용량(50 mg/kg)보다 저용량(25 mg/kg)에서 좀 더 효과적으로 종양 성장을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2). Apigenin은 여러 논문들에서 항암효능이 있다고 알려져 있는데, 본 실험의 KB 구강암 세포주에서도 대조군에 비하여 apigenin 처치군에서 종양 성장 억제가 통계학적으로 유의적인 감소가 나타난 것으로 보았을 때 apigenin이 KB 구강암세포주에서도 종양 성장을 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2008-331-E00378)이며, 이에 감사 드립니다.

References

- Chen, D., K. R. Landis-Piowar, M. S. Chen, and Q. P. Dou. 2007. Inhibition of proteasome activity by the dietary flavonoid apigenin is associated with growth inhibition in cultured breast cancer cells and xenografts. *Breast Cancer Res.* **9**, R80.
- Chen, J. W., Z. Q. Zhu, T. X. Hu, and D. Y. Zhu. 2002. Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects. *Acta. Pharmacol. Sin.* **23**, 667-672.
- Duthie, G. and A. Crozier. 2000. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **3**, 447-451.
- Fiala, E. S., B. S. Reddy, and J. H. Weisburger. 1985. Naturally occurring anticarcinogenic substances in foodstuffs. *Annu. Rev. Nutr.* **5**, 295-321.
- Fotsis, T., M. S. Pepper, E. Aktas, S. Breit, S. Rasku, H. Adlercreutz, K. Wahala, R. Montesano, and L. Schweigerer. 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *Cancer Res* **57**, 2916-2921.
- Herrmann, K. 1975. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Fd. Technol.* **11**, 433-448.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman, and D. P. Venema. 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1591-1598.
- Hertog, M. G., E. J. Feskens, P. C. Hollman, M. B. Katan, and D. Kromhout. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**, 1007-1011.
- Hong, W. K., S. M. Lippman, L. M. Itri, D. D. Karp, J. S. Lee, R. M. Byers, S. P. Schantz, A. M. Kramer, R. Lotan, and L. J. Perers. 1990. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* **323**, 795-801.

10. Kim, H. P., I. Mani, L. Iversen, and V. A. Ziboh. 1998. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **58**, 17-24.
11. Kuhnsu, J. 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet* **24**, 117-191.
12. Lee, E. J., M. J. Kim, and H. Myoung. 2007. Change of the invasiveness with selective COX-2 inhibition in an oral squamous cell carcinoma cell line, KB; Preliminary in vitro study. *J. Korean Oral Maxillofac. Surg.* **33**, 103-108.
13. Lee, S. H., J. K. Ryu, K. Y. Lee, S. M. Woo, J. K. Park, J. W. Yoo, Y. T. Kim, and Y. B. Yoon. 2008. Enhanced anti-tumor effect of combination therapy with gemcitabine and apigenin in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* **259**, 39-49.
14. Liu, L. Z., J. Fang, Q., Zhou, X. Hu, X. Shi, and B. H. Jiang. 2005. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. *Mol. Pharmacol.* **68**, 635-643.
15. Oh, E. K., H. J. Kim, S. M. Bae, M. Y. Park, Y. W. Kim, T. E. Kim, and W. S. Ahn. 2008. Apigenin-induced apoptosis in cervical cancer cell lines. *Korean J. of Obstetrics and Gynecology* **51**, 874-881.
16. Park, S. W., S. G. Lee, S. H. Song, D. S. Heo, B. J. Park, D. W. Lee, K. H. Kim, and M. W. Sung. 2003. The effect of nitric oxide on cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in head and neck cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **107**, 729-738.
17. Plaumann, B., M. Fritsche, H. Rimpler, G. Brandner, and R. D. Hess. 1996. Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene* **13**, 1605-1614.
18. Ratty, A., K. and N. P. Das. 1988. Effects of flavonoids in nonenzymatic lipid peroxidation : structure-activity relationship. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **39**, 69-79.
19. Sacks, P. G. 1996. Cell, tissue and organ culture as in vitro models to study the biology of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Metastasis Rev.* **15**, 27-51.
20. Wang, C. and M. S. Kuzer. 1997. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutr. Cancer* **28**, 236-247.
21. Wang, W., L. Heideman, C. S. Chung, J. C. Pelling, K. J. Koehler, and D. F. Birt. 2000. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog* **28**, 102-110.

초록 : 구강암 세포주를 이중 이식한 누드마우스에서 apigenin의 경구투여에 따른 항암효능에 관한 연구

이진석[†] · 서형석[†] · 김소정 · 김형진 · 김진 · 이성호 · 박영석 · 박병권 · 김병수 · 김상기 · 정지윤*
 (공주대학교 특수동물학과)

Apigenin은 과일과 야채에 들어있는 플라보노이드로 다양한 악성 세포에 항증식효과를 보여준다. 세포성장 저해효과를 확인하기 위하여 KB 구강암세포주를 96 well plate에 6×10^3 cells/well로 분주하고 24시간 후에 apigenin을 24시간 동안 처리하여 MTT assay를 수행하였다. Apigenin은 배양 후 용량 의존적으로 세포사를 유도하였다. Apigenin 100 μ M을 24시간 동안 처리하고 대조군과 세포성장을 비교하였을 때 유의적인 감소를 확인하였다. KB 구강암세포주에서의 apoptosis를 확인하기 위해 DAPI 염색을 수행하였다. Apigenin을 처리한 세포에서 핵의 응축이 존재함을 형광현미경으로 확인하였다. 우리는 누드마우스에 KB 구강암세포주를 이식하여 세포 성장 억제 효과를 알아보았다. Apigenin을 마우스에 25, 50 mg/kg을 0.2 ml의 PBS에 녹여 경구투여 하였다. 종양 사이즈는 대조군과 25, 50 mg/kg apigenin 투여군을 비교하였을 때 유의적으로 감소하였다. Apoptosis 분석을 위해 TUNEL염색을 수행하였다. 25 mg/kg apigenin 투여군과 대조군을 비교하였을 때 apoptosis의 유의적인 증가를 확인하였다. 육안적 소견을 위한 H&E 염색은 이상이 없었다. 본 연구는 apigenin이 구강암세포주 성장 억제를 apoptosis의 유도를 통하여 확인하였다.