

관중 메탄올추출물이 구강암세포주에 미치는 영향

장분실^{1*} · 오세준^{1*} · 신지애¹ · 이행은¹ · 전재규² · 조성대^{1**}

¹전북대학교 치의학전문대학원 구강병리학교실, ²구강생체과학 연구소

Effect of Methanol Extract of *Dryopteris Crassirhizoma* in Human Oral Cancer Cells

Boonsil Jang^{1*}, Se-Jun Oh^{1*}, Ji-Ae Shin¹, Hang-Eun Lee¹, Jae-Gyu Jeon², and Sung-Dae Cho^{1**}

¹Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Institute of Oral Bioscience,
Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

²Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Institute of Oral Bioscience,
Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received May 12, 2014/Revised June 10, 2014/Accepted August 18, 2014)

ABSTRACT - *Dryopteris crassirhizoma* is one of the naturally occurring substance wood ferns and is known for having anti-inflammatory, antiviral and anthelmintic activities. However, there is less report about its anticancer effect in human cancer cell lines. In the present study, the effect of methanol extract of *dryopteris crassirhizoma* (MEDC) on apoptosis in human oral cancer cell lines (MC3 and HN22 cells) was investigated. MEDC inhibited cell viability and induced apoptosis. MEDC significantly increased Bak and truncated Bid proteins in MC3 cells and elevated only truncated Bid compared to the control while other Bcl-2 family proteins were not altered. MEDC has anticancer activity by inducing apoptotic cell death through the regulation of either Bak or Bid. These findings suggest that its extract possibly may be used for treating oral cancer.

Key words : *Dryopteris crassirhizoma*, Apoptosis, Oral cancer, Bak, Bid

구강암은 세계에서 6번째로 가장 흔한 암으로 세계 건강문제에 중요한 부분을 차지하고 있고¹⁾, 최근 5년 동안 구강암환자의 생존율은 약 56%로 낮은 생존률의 암종에 속하기 때문에 치료법에 대한 연구가 매우 중요한 현실이다²⁾. 구강암 치료법에는 수술적 치료와 항암화학요법, 방사선 치료 등이 있는데, 대부분의 환자들은 구강암의 진행 억제에 통한 예방법이 효과를 나타낼 수 없는 구강암 발병 후에 발견되어 치료를 진행하게 된다³⁾. 하지만, 천연 물질이나 합성물질을 사용하여 암의 성장을 제한하는 연구가 많이 되어 있음에도 불구하고, 다른 종양에 비해 구강암에서의 세포사멸을 유도하는 화학적 요법에 대한 연구가 부족한 실적이기 때문에 구강암 예방에 많은 연구가 필요한 것이 현실이다^{4,5)}.

천연유래물질 중의 하나인 관중은 양치식물 고사리목인

반 상록수 식물로 아시아에서 널리 사용되어 왔으며 뿌리와 줄기는 한방약재로 쓰이는데 한국, 중국, 일본에 광범위하게 존재한다⁶⁾. 뿌리는 일반적으로 살충작용이 있으며 해독, 해열, 지혈작용과 자궁수축작용, 감기바이러스억제 작용 등이 있으며 예로부터 기생충 감염, 감기, 암을 치료하기 위한 전통적인 한방치료제로 사용되어왔다⁷⁾. 관중은 항산화작용과 항 바이러스작용 및 항균작용, 항암작용을 한다⁸⁾. 또한 최근 연구에 따르면 관중이 충치 유발 균인 *streptococcus mutans*의 성장을 억제하여 충치예방효과가 있다고 보고되었다⁹⁾. 하지만, 관중에 의한 구강암 예방효능에 대한 연구는 보고된 바가 없다. 이에 본 연구는 관중메탄올 추출물을 이용하여 사람 구강암세포주인 MC3세포와 HN22세포에서 관중 메탄올추출물의 증식억제 효능 및 관련 분자표적을 확인하고자 하였다.

**Both authors are equally contributed.

*Correspondence to: Sung-Dae Cho, Department of Oral Pathology, School of Dentistry and Institute of Oral Bioscience, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
Tel: 82-63-270-4027; Fax: 82-63-270-4025
E-mail: efiwdsc@chonbuk.ac.kr

재료 및 방법

세포배양과 연구재료

본 실험에 사용된 사람 구강암 세포주인 MC3 세포와

HN22 세포는 각각 Fourth Military Medical University (Xi'an, China)와 단국대학교(Cheonan, Korea)로 부터 분양 받았다. MC3 세포와 HN22 세포는 모두 10% FBS와 100 U/ml의 penicillin과 streptomycin가 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 계대 배양하여 사용하였다. Bak과 Bid 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)으로부터 제공받았고 Actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. 또한, 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)는 Sigma Aldrich Chemical co (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 관중 메탄올 추출물은 전북대학교 예방치학교실 전재규 교수님으로부터 제공받았고, 용매는 0.1% DMSO를 사용하였다.

세포 생존률(viability) 측정

MC3세포와 HN22세포를 6-well plate에 각각 2.3×10^5 /ml, 2.0×10^5 /ml 조건으로 세포를 파종한 다음, 세포가 50~60% 됐을 때 0.1% DMSO로 용매대조군을 처리하였고, 처치군은 5% FBS가 포함된 DMEM에 녹인 관중 메탄올 추출물로 48시간 처리한 후 Neubauer's chamber (hemocytometer)를 사용하여 세포의 수를 측정하였다. 세포는 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하였고 trypsin처리 후 800rpm, 3분 조건으로 원심 분리하여 세포를 걸러냈다. 남아있는 세포에 PBS를 1 ml 넣고 피펫으로 섞어준 후 hemocytometer를 사용하여 전체 세포의 수를 세었다. 모든 실험은 세번 반복 실험하였다.

DAPI staining

관중에 의해 사멸된 세포의 핵에 형광염색을 이용하여 세포의 형태학적 변화를 보기 위해 DAPI 염색을 시행하였다. MC3세포와 HN22세포에 관중을 농도별 처리한 다음, 48시간 후에 trypsin으로 세포를 걸러내고 100% 에탄올로 고정하여 -20°C에 24시간 보관하였다. 다음날 PBS에 현탁한 DAPI solution (2 µg/ml)으로 염색 후 슬라이드에 부착한 후 형광현미경으로 세포의 형태를 검사하였다.

Western blot 분석법

MC3세포와 HN22세포는 60 mm² 와 10 cm² dish에 분주하고 DMSO와 관중을 농도별로 처리하였다. 세포는 Lysis buffer와 DC 단백질 분석법(Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 정량하였다. 단백질 샘플들은 SDS-polyacrylamide 겔로 전기 영동하여 분리하였고 PVDF membrane (Bio-RAD)을 이용하여 이동시켰다. Membrane을 5% skim milk에 상온에서 90분간 고정시켰고 1차 항체인 Bak, Bid 와 actin은 4°C에서 overnight으로 배양하였다. TBST로 세척 후 HRP를 결합한 2차 항체를 상온에서 90분간 배양하였다. 항체에 결합한 단백질은 ECL용액

(Santa Cruz Biotechnology)을 사용하여 검출하였다.

통계분석

모든 실험결과는 최소 3회 반복 측정하여 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 실험결과 자료의 통계분석은 t-test를 사용하여 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

관중의 MC3 세포와 HN22 세포에서 세포증식 억제 효과

구강암 세포주인 MC3세포와 HN22세포에서 관중의 세포증식억제 효능을 확인하기 위해 세포 계수법으로 실험하였다(Fig. 1). 관중을 MC3세포에 4(µg/ml), 8(µg/ml), 12(µg/ml), 16(µg/ml)의 농도로, HN22세포에는 10(µg/ml), 20(µg/ml), 40(µg/ml)의 농도로 각각 48시간 동안 처리하였다. 세포계수 결과, MC3세포에서는 4(µg/ml), 8(µg/ml), 12(µg/ml), 16(µg/ml)의 농도 처리하였을 때 대조군에 비해 살아있는 MC3세포의 수가 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하는 것을 확인하였고, HN22세포에서는 20(µg/ml), 40(µg/ml)의 농도 처리하였을 때 대조군에 비해 살아있는 HN22 세포의 수가 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하는 것을 확인하였다. 이는 MEDC를 MC3세포와 HN22세포주에 처리했을 때, 농도의존적으로 MC3세포와 HN22세포증식을 억제시키는 효과적인 물질임을 확인 할 수 있었다. 또한 관중 메탄올 추출물(MEDC)이 전립선암세포에서 세포사멸을 유도하며 세포주기를 조절하여 항암효과가 있다는 보고에서 보듯이 관중이 구강암세포의 증식을 억제하는 가능성이

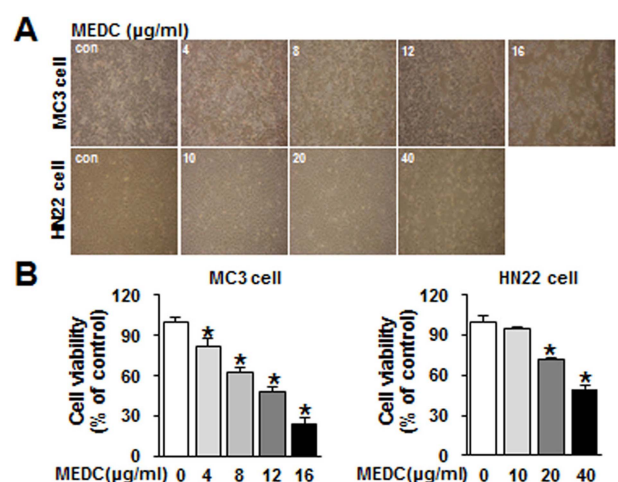


Fig. 1. Effect of methanol extract of MEDC on the viability of MC3 and HN22 cells. (A) Microscopy images of cell viability in MC3 (up) and HN22 cells (down). (B) The graph was representative of three independent experiments of MC3 (left) and HN22 cells (right). The bar is mean ± SD. * $p < 0.05$ compared to DMSO-treated group.

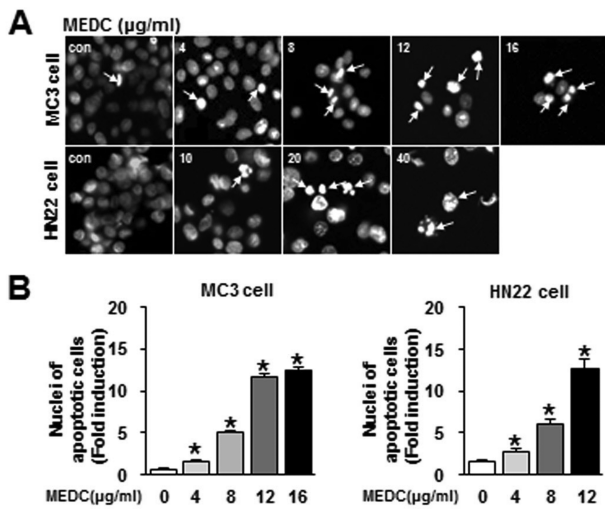


Fig. 2. The effect of MEDC on nuclear condensation and fragmentation in MC3 and HN22 cells. (A) Fluorescence microscopy images of DAPI-stained MC3 (up) and HN22 cells (down) showing the appearance of apoptotic morphology. (B) The graph was representative of three independent experiments of DAPI-stained MC3 (left) and HN22 cells (right). The bar is mean ± SD. **p* < 0.05 compared to DMSO-treated group.

있다고 사료된다¹⁰).

관중에 의한 구강암세포주인 MC3세포와 HN22세포의 세포사멸 유도

세포사멸이 일어나면 세포 핵의 형태와 투과성이 변화하는데 DAPI염색법을 통해 이러한 변화를 비교함으로써 세포사멸을 구분해낼 수 있다. 특히, 세포사멸이 진행되는 세포의 경우, DAPI염색의 투과성이 증가함으로써 핵축과 핵분절의 현상을 쉽게 관찰할 수 있다고 알려져 있다¹¹. 이번 연구에서도 관중에 의한 구강암세포주인 MC3와 HN22 세포에서 세포사멸을 유도하는지를 알아보기 위해 DAPI 염색을 통하여 확인하였다(Fig. 2). 구강암세포주인 MC3 세포와 HN22세포에 MEDC를 각각 4(μg/ml), 8(μg/ml), 12(μg/ml), 16(μg/ml)의 농도와 10(μg/ml), 20(μg/ml), 40(μg/ml)의 농도로 각각 48시간 동안 처리하였다. 농도 의존적으로 세포의 성장이 감소한 것과 동일하게 DAPI 염색에서도 농도 의존적으로 핵분절이 유의성있게 증가되었다. 이는 관중 처리에 의한 구강암세포의 성장 억제는 세포사멸유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

관중에 의한 세포 내 신호전달 경로 조절

세포사멸의 한 형태인 아포토시스(apoptosis)는 세포 밖에서 또는 세포 내에서 단백질 및 유전자 조절에 의해 이루어진다¹². 특히, BCL-2 family에 속하는 몇 가지 인자들은 세포사멸을 유발하는데 대표적인 유전자로 알려져 있다¹³. BCL-2 family 단백질 중 Bak은 proapoptotic단백

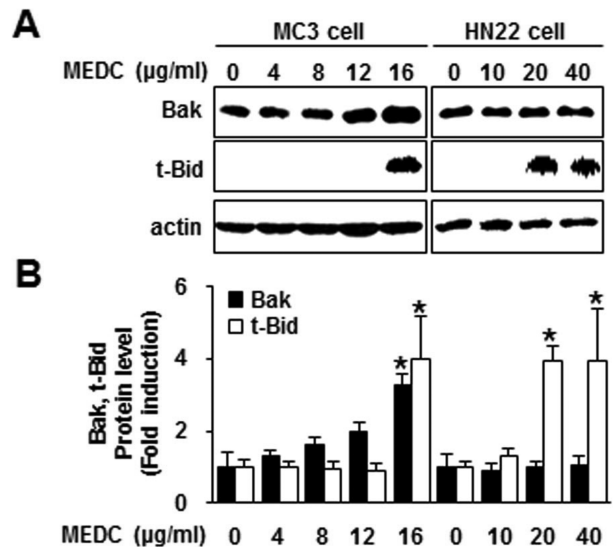


Fig. 3. MEDC regulates Bcl-2 family protein in MC3 and HN22 cells (A) The effect of MEDC on the regulation of Bak protein MC3 cells (left) and increased of truncate Bid protein HN22 cells (right). (B) The protein levels were analyzed by Western blot analysis and the graph was representative of three independent experiments and bar is mean ± SD. **p* < 0.05 compared to DMSO-treated group.

질로서 정상시에는 monomer로 존재하다가 세포사멸 신호가 전달되면 구조적 변화가 일어나 dimer를 형성하여 미토콘드리아 외 막에 영향을 주며 궁극적으로 세포사멸이 일어난다고 알려져 있다¹⁴. 또다른 BCL-2 family 단백질인 Bid는 BH3 only 단백질로 정상시에는 아무 작용이 없다가 세포사멸 신호에 의해 활성화된 caspase-8에 의해 일부가 잘려져 truncated Bid로 변환되어 Bcl-XL에 작용하여 세포사멸을 유도한다¹⁵. 이에 본 연구에서도 관중에 의해 MC3세포와 HN22세포에서 세포 내 신호전달 조절 단백질의 관여 여부를 알아보았다. 관중을 농도 별로 처리하였을 때 세포 내 신호경로를 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다. 관중을 MC3세포에 4(μg/ml), 8(μg/ml), 12(μg/ml), 16(μg/ml)의 농도로, HN22세포에는 10(μg/ml), 20(μg/ml), 40(μg/ml)의 농도로 각각 48시간 동안 처리한 결과(Fig. 3A)에 나타난 바와 같이 MC3세포에서는 Bak의 발현이 농도 의존적으로 증가하였고, HN22세포에서는 Bid의 발현에 영향을 주어 truncation을 유도하였다. 하지만, Bak과 Bid 이외의 다른 Bcl-2 family에는 영향을 주지 못했다(data not shown).

이 결과들을 종합해 볼 때, MC3 세포에서는 관중 메탄올추출물이 Bak에 의해 세포사멸을 유도하고 HN22 세포에서는 Bid의 truncation을 유도하여 세포사멸을 유도하는 것으로 판단되며, 본 연구는 구강암의 예방 및 치료를 위한 중요한 항암후보물질로서의 관중 메탄올추출물의 가능성을 제시하였다.

요 약

천연유래물질 중의 하나인 관중은 양치식물 고사리목으로 항 염증 작용, 항 바이러스 작용 및 구충작용과 자궁 수축 작용 같은 효능이 있다고 알려져 있지만, 종양에서의 구강암 예방효능에 대한 연구는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 사람 구강암세포주인 MC3와HN22세포에서 관중 메탄올추출물의 증식억제 효능 및 관련 분자표적을 확인하고자 하였다. 관중메탄올추출물은 세포증식을 유의성 있게 억제하고, Western blot분석법, DAPI염색법 결과에서 알 수 있듯이 세포사멸을 유도하는 것으로 나타났다. 또한, MC3세포에서는 Bak의 발현을 농도의존적으로 증가시켰고, HN22세포에서는 Bid의 발현에 영향을 주어 truncation을 유도하였다. 하지만, Bak과 Bid 이외의 다른 Bcl-2 family에는 영향을 주지 못했다. 따라서, 이러한 결과를 종합해 볼 때, 관중메탄올추출물은 구강암에서 암 예방효능을 가진 잠재성 있는 천연추출물이 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Warnakulasuriya, S.,: Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* **45**, 309-316. (2009).
2. Papadimitrakopoulou, V.A., et al.,: Cisplatin, fluorouracil, and L-leucovorin induction chemotherapy for locally advanced head and neck cancer: the M.D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer J Sci Am.* **3**, 92-99. (1997).
3. Shen, J., et al.,: Enhancement of cisplatin induced apoptosis by suberoylanilide hydroxamic acid in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol.* **73**, 1901-1909. (2007).
4. Koehn, F.E. and G.T. Carter.,: The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* **4**, 206-220. (2005).
5. Butler, M.S.,: The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod.* **67**, 2141-2153. (2004).
6. Lee, H.B., J.C. Kim, and S.M. Lee.,: Antibacterial activity of two phloroglucinols, flavaspidic acids AB and PB, from *Dryopteris crassirhizoma*. *Arch Pharm Res.* **32**, 655-659. (2009).
7. Chang, X., et al.,: Phenolic constituents from the rhizomes of *Dryopteris crassirhizoma*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **54**, 748-750. (2006).
8. Magalhaes, L.G., et al.,: In vitro schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol Res.* **106**, 395-401. (2010).
9. Ban, S.H., et al.,: Influences of *Dryopteris crassirhizoma* extract on the viability, growth and virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Molecules.* **17**, 9231-9244. (2012).
10. Chang, S.H., et al.,: *Dryopteris crassirhizoma* has anti-cancer effects through both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways and G0/G1 phase arrest in human prostate cancer cells. *J Ethnopharmacol.* **130**, 248-254. (2010).
11. Yu, H.J., et al.,: Apoptotic effect of dibenzylideneacetone on oral cancer cells via modulation of specificity protein 1 and Bax. *Oral Dis.* **19**, 767-774. (2013).
12. Igney, F.H. and P.H. Krammer.,: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* **2**, 277-288. (2002).
13. Leber, B., J. Lin, and D.W. Andrews.,: Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis.* **12**, 897-911. (2007).
14. Jin, Z. and W.S. El-Deiry.,: Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* **4**, 139-163. (2005).
15. Labi, V., et al.,: BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ.* **13**, 1325-1338. (2006).