International Journal of Oral Biology, Vol. 42, No. 2 June 30 2017, p. 47-54
Copyright ⓒ 2017, *The Korean Academy of Oral Biology*
*http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2017.42.2.047*
*pISSN 1226-7155, eISSN 2287-6618*

**International Journal of Oral Biology**

# Water Extracts of *Anthriscus sylvestris* Leaf induces Apoptosis in FaDu Human Hypopharynx Squamous Carcinoma Cells

**Jung Eun Yang[1,†], Seul Ah Lee[2,†], Sung Min Moon[3], Seul Hee Han[2], Yun Hee Choi[2], Su-Gwan Kim[3], Do Kyung Kim[3], Bo-Ram Park[4] and Chun Sung Kim[2,*]**

*[1]Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju, 501-759, Republic of Korea*
*[2]Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju, 501-759, Republic of Korea*
*[3]Oral Biology Research Institute, Chosun University, 375 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju, 501-759, Republic of Korea*
*[4]Department of Dental Hygiene, Chodang University, Muan-ro, Muan-eup, Muan 534-701, Republic of Korea*

*(received May 04, 2017; revised May 26, 2017; accepted May 27, 2017)*

***Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. is a perennial herb found widely distributed in various regions of Korea, Europe, and New Zealand. The root of *A. sylvestris* have been extensively used in the treatment for antitussive, antipyretic, cough remedy in Oriental medicine, but the physiologically active function of the leaf of *A. sylvestris* is as yet unknown. In this study, we investigated the anti-cancer activity and the mechanism of cell death of water extracts of leaf of *Anthriscus sylvestris* (WELAS), on human FaDu hypopharyngeal squamous carcinoma cells. Our data showed that WELAS treatment inhibited cell viability in a concentration- and time-dependent manner. In addition, the treatment of WELAS markedly induced apoptosis in FaDu cells, as determined by the viability assay, DAPI stain and FACS analysis. WELAS also increased the proteolytic cleavage of procaspase-3, -9 and PARP (poly(ADP-ribose) polymerase). In addition, exposure to WELAS decreased the expression of Bcl-2 (an anti-apoptotic factor), but increased the expression of Bax (a pro-apoptotic factor), suggesting that mitochondria-dependent apoptotic pathways are mediated in WELAS-induced apoptosis. Taken together, these results indicate that water extracts of leaf of *A. sylvestris* inhibits cell growth and induces apoptosis via the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in FaDu human hypopharyngeal squamous carcinoma cells. Therefore, we propose that the water extracts of leaf of *A. sylvestris* is a novel chemotherapeutic drug, having growth inhibitory properties and induction of apoptosis in human oral cancer cells.**

**Key words: Oral cancer, *Anthriscus sylvestris*, Apoptosis**

[†]These authors contributed equally to this study
*Correspondence to: Chun Sung Kim, Ph. D., Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju, 501-759, Republic of Korea
Tel: +82-62-230-7088, Fax: +82-62-232-6896
E-mail: address:cskim2@chosun.ac.kr
ORCID : 0000-0001-8612-3420

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서 론

암(Cancer)은 우리나라에서 사망원인 1위의 질병으로, 2016년에 발표된 보건복지부 중앙암등록본부 자료에 의하면 우리나라에서 새로 발생한 암 환자는 2014년에 217,057명으로 2010년 205,680명에 비해 4년 동안 약 12,000명이 증가하였다. 그 중 구강암은 암 발병률이 약 2%로 매우 적은 비중을 차지하나, 발생 부위에 따라 구강 내 기능을 저

하시키고 말하는 기능이 떨어지며 인체의 중요 장기와 인접하고 있어 전이의 위험도가 높은 질병에 속한다[1]. 구강암은 입술, 혀, 치주, 하인두 등 얼굴과 목의 거의 모든 부위에 발병되는 암을 통칭하며, 90% 이상이 상피세포암이다[2]. 구강암은 전암병소인 백반증이나 홍반증이 동반되며 암의 진행과정이 육안으로 관찰이 용이하여 암 치료의 결과를 쉽게 추적할 수 있으므로 암의 진행연구 모델로 많이 사용되고 있으나, 정확한 발생기전은 알려져 있지 않다[3]. 가장 광범위하게 사용되고 있는 치료 방법은 수술이나 방사선 치료와 같은 국소요법이지만, 종양의 성장과 전이를 효과적으로 억제하지 못해 cisplatin 같은 항암제를 병행해왔다. 그러나 항암제 병행요법에는 소화기계 합병증, 면역력의 저하, 골수 기능 저하 등의 심한 부작용에 의해 사용에 제한을 받고 있어, 대체 방법으로써 항암제의 부작용을 최대로 감소시키면서 항암제의 효과를 유지시킬 수 있는 천연물 유래 항암제 개발에 많은 노력을 기울이고 있다[4]. 많은 천연물은 이미 민간요법에서 치료제로 사용해오던 것으로 그 안전성이 어느 정도 인정 되어 있어 기존의 의약품 개발보다 고부가가치가 높은 천연물 산업에 연구가 집중이 되고 있으며 현재까지도 많은 천연물의 항암연구가 진행되고 있다[5-7].

예로부터 민간요법으로 사용해오던 식물들이 함유하고 있는 다양한 약효성분이 알려지고 있는바, 항암제를 포함한 여러 난치성 질환치료제 분야에서 식물유래 신약 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다[6-8]. 그 예로, *Taxus brevifolia* L.에서 분리 추출 된 paclitaxel(Taxol®), *Catharanthus roseus* G. Don에서 분리 추출 된 vincristine (Oncovin®)과 *Podophyllum peltatum* L.로부터 분리 추출 된 podophyllotoxin 등이 현재 임상적으로 유용한 항암 화학요법제로서 사용되고 있다[9]. 또한 식물류에 가장 널리 분포되어 있는 플라보노이드와 b-carotene 그리고 포도, 블루베리 등에 많이 함유되어 있는 resveratrol, 울금의 뿌리 줄기에서 분리 정제한 curcumin 등이 여러 암에서 항암효과가 있는 것으로 보고되고 있으며 약물 개발을 위해 임상시험이 진행 중에 있다[10-12]. 이렇듯 우리가 일상에서 섭취하고 있으며 생체 독성이나 부작용이 적을 것으로 생각되는 식품, 천연식물 등에서 항암효과를 나타내는 유효성분을 분리·정제하고, 항암기전을 밝히는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 그러나 아직까지 효능 및 약리작용은 확인 되고 있지만, 그 기전 알려지지 않고 있는 천연물이 많은 것으로 확인되고 있다.

본 연구에서 사용된 전호(*Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.)는 미나리과의 여러해살이풀로 유럽, 아프리카, 뉴질랜드뿐만 아니라 우리나라의 흑산도, 제주도 등 전국 각지의 산과들의 습기가 많은 곳에서 자생하며, 대한약전 외 한약(생약)규격에 기재되어 있는 식물이다. 전호의 잎은 식품의 원재료나 나물로 쓰이며 뿌리는 오래전부터 감기를 비롯한 열이 나는 증세 또는 천식 등에 전통적인 한방 치료제로 사용되어 왔다. 주로 전통적인 한약 재료로 쓰여오던 전호의 뿌리에는 Anthricin (deoxypodophyllotoxin)이 가장 많이 함유되어 있다고 보고되고 있으며, 그 외에도 Isoanthritine, a-Pinene 및 d-Limonene와 많은 flavolignan 성분이 함유되어 있다고 보고되고 있다[13,14]. 특히, 전호뿌리의 주성분인 Anthricin은 전립선 암세포에 처리하였을 때 미토콘드리아의 항상성을 파괴하여 세포사멸을 유도하며, 위암세포에 처리하였을 때 G2/M기 단계를 차단하여 위암세포 성장 억제 및 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되어있다[15,16]. 그러나 이러한 전호뿌리의 항암활성이 암세포의 종류마다 다르며, 그 기전이 정확히 알려져 있는 실정이다. 더 나아가, 본 연구에서 밝히고자 하는 전호 잎의 약리적인 효능 중 특히 항암활성은 아직까지 전혀 알려지지 않고 있다.

본 연구에서는 우리나라 자생식물인 전호의 잎 성분을 열수 추출하여 이 추출물에 의한 사람 유래 하인두 편평암세포 FaDu에서의 세포 성장억제 효과 및 그 억제 기전을 밝히고자 한다. 따라서 이러한 전호 잎 추출물에 대한 구강암 억제 효능과 그 기전의 확립을 통해 구강암 치료를 위한 천연물 신약 개발 등과 같은 임상적 응용을 위한 기초를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

전호잎(Leaf of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.)은 2015년에 전라남도 흑산도 지역에서 채취한 전호잎을 구입하여 열수추출한 후 동결건조 시켜 물에 녹여 사용하였다. 1차 항체인 Cleaved caspase-9 및 -3, PARP, Bcl-2, Bax와 β-actin은 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 전호잎(Leaf of *A. sylvestris*) 추출물 제조 방법

구입한 전호잎 100g을 95℃의 물에서 1시간 동안 추출하고 거름종이를 이용하여 추출액을 거르고 감압 농축하였다. 이를 동결건조 하여 분말로 만든 후 증류수에 100mg/ml로 녹여 filtering한 후 -20℃에 보관하였으며 실험에 사용할 때는 여러 가지 농도로 세포배양액에 희석하여 사용하였다.

### 세포 배양

실험에 사용된 사람 유래 하인두 편평암세포 FaDu는

ATCC에서 구입하여 사용하였으며, 배양에 사용된 배지는 Minimum essential medium(MEM, Welgene, Gyeongsan-si, Korea)에 10% fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 units/ml)이 첨가된 배지를 이용하여 5% $CO_2$, 37℃ incubator에서 배양하였다.

### 세포 생존 효과 검증

전호잎(Leaf of *A. sylvestris*) 열수추출물에 대한 FaDu 세포의 생존억제 효과는 MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol 2-yl)-2,5- diphenyltertrazolium bromide] assay를 통해 분석하였다. 12 well cell culture plate에 $2\times10^5$ cells/well세포를 seeding하고, 24시간 후 추출물을 다양한 농도(0.1, 1, 2.5, 5mg/ml)로 처리한 다음 24, 36, 48시간 동안 각각 배양하였다. 반응 후 배양액을 제거하고 인산 완충 용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 가볍게 세정한 다음, 450㎕ MEM 배양액과 50㎕ MTT(5㎎/㎖) 용액을 첨가하여 37℃의 5% $CO_2$배양기에서 4시간 반응하였다. 4시간 후 배양액을 제거하고 살아있는 세포에 의해 형성된 formazan 염을 DMSO 500㎕를 첨가하여 교반기에서 완전히 용해시키고 Epoch Bioteck ELISA reader(Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 570㎚ 흡광도에서 세포 생존율을 측정하였다. 결과 분석은 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도를 생존율 100%로 하고 시료를 처리한 실험군의 흡광도를 대조군에 비교하여 백분율(%)로 표시하였으며, 시료의 농도와 세포의 생존율의 관계를 그래프로 작성하여 $IC_{50}$을 얻었다.

### Live & Dead assay

Live & Dead Viability/Cytotoxicity kit(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)는 살아있는 세포와 죽은 세포를 형광염색하여 세포 생존을 분석하는 실험으로 live-dye인 Calcein-AM은 살아있는 세포의 esterase에 의해 분해되어 녹색 형광을 나타내며, dead-dye인 Ethd-1(Ethidium bromide homodimer-1)는 plasma membrane이 손상된 죽은 세포에 침투하여 핵산에 결합하면서 붉은 형광을 나타낸다. 4 well chamber slide(SPL, Pocheon, Korea)의 각 well에 $1\times10^5$cells/ml세포를 seeding하고 24시간 배양 후 1㎎/㎖과 2.5㎎/㎖의 추출물을 각각 처리하여 48시간 동안 반응하였다. 반응 후 배양액을 제거하고 PBS로 가볍게 세정한 다음, PBS에 Calcein-AM과 Ethd-1의 1:1 혼합액을 각 well에 200㎕씩 첨가하여 호일로 감싸 차광한 후 37℃ incubator에서 30분간 반응하였다. 염색약을 제거하고 mounting하여 형광현미경(Eclipse TE2000; Nikon Instruments, Melville, NY, USA)을 이용하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 관찰하였다. Histogram은 각 4분기로 나누어 녹색과 적색의 형광을 나타내는 세포를 각각 counting하여 적색 형광을 띄는 죽은 세포를 백분율(%)로 나타내었다.

### DAPI stain

DAPI stain은 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)라는 분자가 DNA에 결합하여 cyan색의 형광을 나타내는 것으로, 핵의 형태와 염색질의 분절화를 확인할 수 있다. 4 well chamber slide(SPL, Pocheon, Korea)의 각 well에 $1\times10^5$cells/ml 세포를 seeding하고 24시간 배양 후 1㎎/㎖과 2.5㎎/㎖의 추출물을 각각 처리하여 48시간 동안 반응하였다. PBS로 가볍게 세정한 다음 4% paraformaldehyde에 10분간 고정하고 DAPI(Roche Diagnostics, Bromma, Sweden)를 첨가하여 10분간 염색하였다. PBS로 가볍게 세정한 후 mounting 하여 cover glass를 덮어 형광현미경(Eclipse TE2000; Nikon Instruments, Melville, NY, USA) 하에서 핵의 형태와 염색질의 분절화를 관찰하였으며, 핵이 응축되어 크기가 작고 염색질이 조각나 있거나 막 투과성이 비정상적으로 증가되어 핵 염색이 진하게 되었을 때 세포사멸이 일어난 세포로 판단하였다. Histogram은 각 4분기로 나누어 정상세포와 세포사멸이 일어난 세포를 counting하여 사멸된 세포를 백분율(%) 나타내었다.

### 유세포 분석

전호잎(Leaf of *A. sylvestris*) 열수추출물에 대한 FaDu 세포의 세포사멸을 분석하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. 유세포 분석은 세포사멸 시 세포 외막으로 노출되는 phosphatidylserine(PS)과 높은 결합력을 갖는 Annexin-V을 이용하여 분석하는 실험법으로 Annexin-V의 염색이 많이 될수록 세포사멸이 많이 일어남을 알 수 있으며, 7-AAD와 동시에 염색하였을 시 세포사멸과 세포괴사 여부를 판단할 수 있다. FaDu 세포를 seeding하고 24시간 배양 후 1㎎/㎖과 2.5㎎/㎖의 추출물을 각각 처리하여 48시간 동안 반응시킨 뒤, PBS로 가볍게 세정한 후 Trypsin-EDTA를 첨가하여 5분간 incubation하였다. 배양액을 첨가하여 Trypsin-EDTA 반응을 중지시킨 후 세포를 모아 1,200rpm에서 원심분리하여 차가운 PBS로 두 번 세척하였다. 세척 후 Annexin-V와 7-AAD를 Annexin-V Binding buffer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 1:1로 혼합하여 세포에 첨가하고 37℃ incubator에서 10분간 반응시키고 FC500 flow cytometry analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 세포사멸을 측정, 분석하였다.

### 단백질 면역 발색법

세포사멸에 관련된 단백질 발현을 확인하기 위해 FaDu 세포를 6 well cell culture plate에 $4\times10^5$cells/well로 seeding하

고, 24시간 배양 후 1㎎/㎖과 2.5 ㎎/㎖의 시료를 각각 처리하여 48시간 동안 반응하였다. 반응 후 PBS로 두 번 세정하고, protein lysis buffer(iNtron, Sungnam, Korea)를 이용하여 단백질 분리한 후 BCA Protein Assay Kit(Pierce, Rockgord, IL, USA)을 이용하여 단백질을 정량하였다. 20ug 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 분리한 후 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane에 옮겼다. Membrane은 5% blocking solution(5% Bovine Serum Albumin in TBS containing 0.1% Tween-20)에서 30분 동안 blocking하고, 일차항체인 cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, cleaved PARP, Bcl-2, Bax, β-actin을 TBS-T에 1:1000으로 희석하여 4℃ 조건하에서 overnight 반응 하였다. 그 후, TBS-T로 15분씩 세 번 세척한 후 이차항체인 anti-rabbit IgG를 1:5000으로 희석하여 1시간 반응 한 다음 TBS-T로 15분씩 세 번 세척하였다. 결과 분석은 ECL kit(Millpore, Bedford, MA)을 이용하여 MicroChemi 4.2(DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Jerusalem, Israel)를 통해 protein band를 가시화하였다. 각 밴드는 Image J를 이용하여 그래프화 하였다.

### 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 Mean±SD으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 Graphpad prism 5.0을 이용하여 tukey t-test를 하였으며, $p$ value가 0.05 미만($p$<0.05)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것을 간주하였다.

## 결 과

### 전호잎(Leaf of *A. sylvestris*) 열수추출물에 의한 사람 하인두 편평암세포 FaDu의 생존 억제효과

전호잎 열수추출물이 사람 하인두 편평암세포인 FaDu 세포생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 전호잎 열수추출물을 0.1, 1, 2.5, 5㎎/㎖의 다양한 농도로 24, 36시간 그리고 48시간 동안 각각 처리하여 MTT assay를 수행한 결과, 24시간에서는 대조군과 비교하였을 때 세포 생존억제 효과의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 1). 그러나 전호잎 열수추출물을 36시간과 48시간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 유의적으로 세포 생존이 억제되었으며, 2.5㎎/㎖의 전호잎 추출물을 36시간 처리하였을 때 26%, 5㎎/㎖의 농도에서는 50%의 생존억제 효과를 보였다. 또, 전호잎 추출물을 48시간 처리하였을 때 0.1㎎/㎖에서 43%, 1㎎/㎖에서 54%, 2.5㎎/㎖에서 58% 그리고 5㎎/㎖에서 74%로 농도-의존적으로 세포 생존이 억제되었다(Fig. 1). 이 실험결과에서 FaDu 암세포 생존이

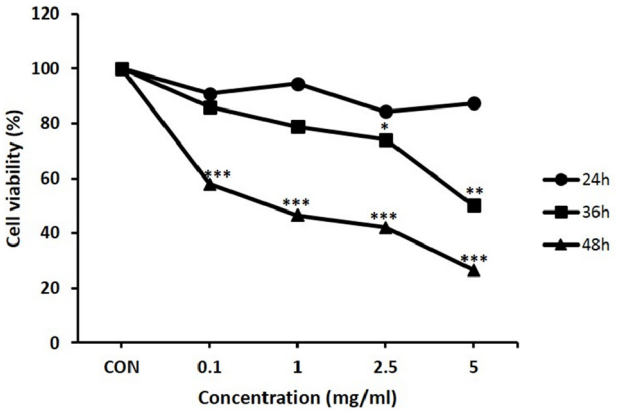


**Fig. 1. Inhibition of cell viability by WELAS in dose- and time-dependent in FaDu cells.** Cells were treated with various concentration (0.1-5 ㎎/㎖) of the WELAS in FaDu cells for 24, 36 and 48h. Cells viabilities were determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ration of A570 nm. Results were expressed as percent of the control. Each data point represents the mean+-SD of three independent experiments. * $p$<0.05, ** $p$<0.01, *** $p$<0.001

전호잎 열수추출물에 의해 농도와 시간에 의존적으로 억제됨을 확인하였으며, 이후 모든 실험은 1㎎/㎖과 2.5㎎/㎖을 48시간 동안 처리하여 수행하였다.

### 세포 염색을 이용한 전호잎(Leaf of *A. sylvestris*) 열수추출물에 의한 사람 하인두 편평암세포 FaDu의 세포사멸 형태 관찰

전호잎 열수추출물에 의한 암세포 생존 억제 효과가 세포사멸과 연관성이 있는지 확인하기 위해 Live & Dead assay와 DAPI stain을 실시하였다. FaDu 암세포에 전호잎 추출물을 1㎎/㎖과 2.5㎎/㎖로 48시간 처리한 후 live-day인 Calcein-AM과 dead-dye인 Ethd-I를 동시에 염색하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 염색을 통해 관찰하였다. 실험 결과, 대조군(0%)보다 1㎎/㎖을 처리한 실험군에서 약 9.8%, 2.5㎎/㎖의 추출물을 처리한 실험군에서 13.1%로 전호잎 추출물의 농도-의존적으로 세포사멸이 일어났음을 확인하였다(Fig. 2A). 또, 세포사멸이 일어난 핵의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 DAPI stain을 수행한 결과, 대조군에서는 세포핵의 형태가 비교적 뚜렷하게 염색이 되었으나, 1㎎/㎖과 2.5㎎/㎖을 처리한 실험군에서 농도-의존적으로 염색질 응축과 핵이 깨져 염색이 되어 있음을 확인하였다(Fig. 2B). 세포 사진을 4분기로 나누어 counting하여 얻은 그래프로 대조군(1.1%)과 비교할 때, 1㎎/㎖을 처리한 실험군은 15%로 대략 14배, 2.5㎎/㎖을 처리한 실험군은 37%로 대략 34배 가량 세포사멸이 증가하였으며, 이는 전호잎 열수추출물의 농도가 증가함에 따라 apoptotic body의 비율이 증가함을 알 수 있다(Fig. 2B).

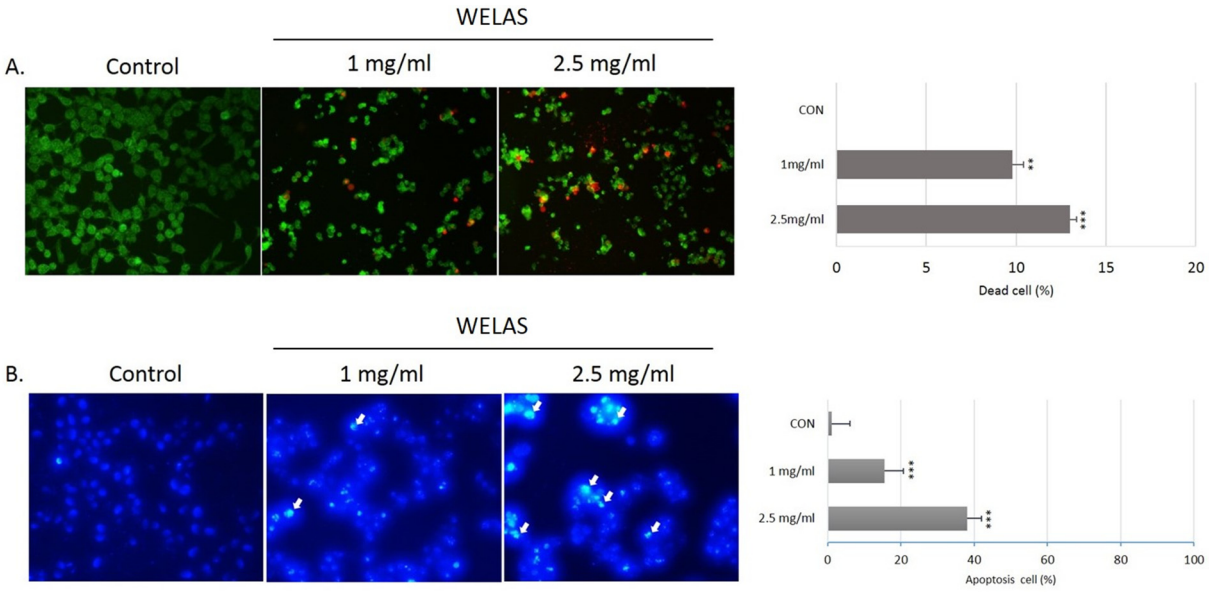


**Fig. 2. Induction of apoptosis in FaDu cells treated with WELAS.** The cells were treated with 1 ㎎/㎖, 2.5 ㎎/㎖ WELAS for 48 hours. (A) Cell viability of FaDu cells by WELAS. The live cells were stained by Calcein AM (green color) and the dead cells were stained by Ethd-I (red color). Stained cells were observed by fluorescence microscopic analysis and imaged (X100). (B) Changes in nuclear morphology by WELAS. Arrows show the chromatin condensation and reduced nuclear size of FaDu cell by WELAS treatment. The percentage of apoptotic cells was calculated as the ratio of apoptotic cells to control FaDu cells. ** $p$<0.05, *** $p$<0.001

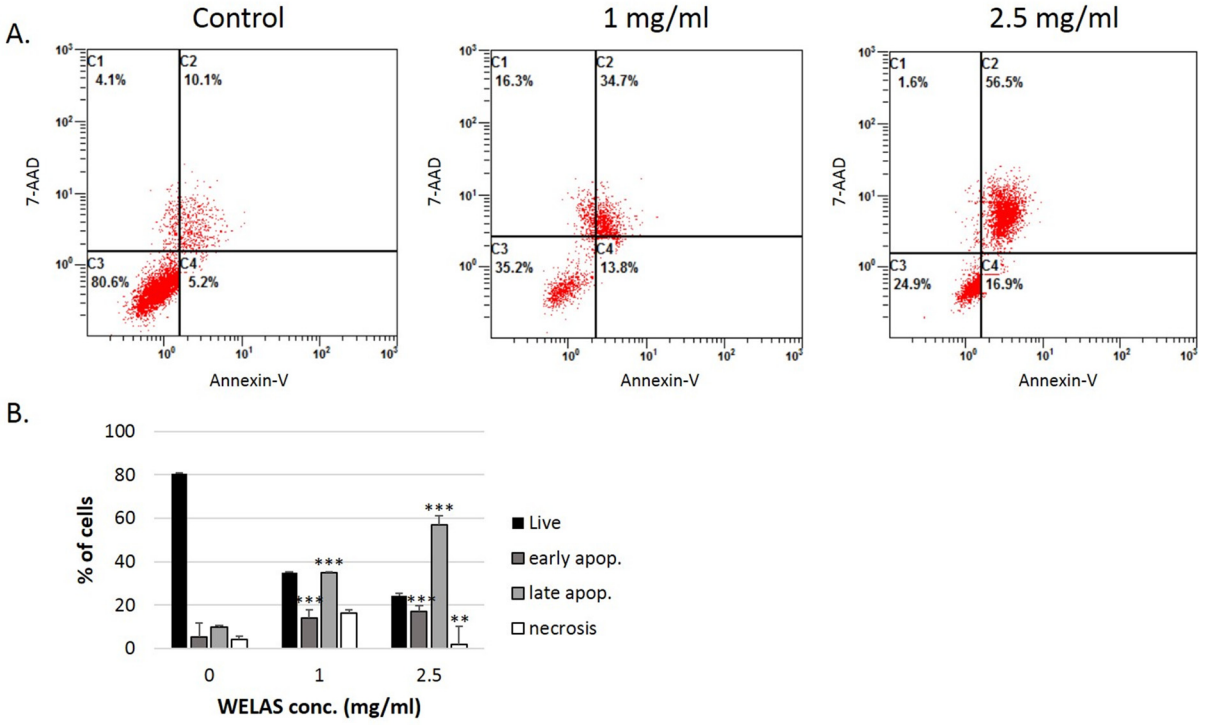


**Fig. 3. Increase of early and late apoptotic cells in FaDu cells treated with WELAS.** The cells were treated with 1 ㎎/㎖, 2.5 ㎎/㎖ WELAS for 48 hours. The cells stained with Annexin-V/7-AAD. The apoptotic cells were analyzed by FACS analysis. (A) Dot plots represented four independent section (C1; necrosis cells, C2; late apoptosis & necrosis cells, C3; live cells, C4; early apoptosis cells). The X axis shows the intensity of Annexin-V fluorescence. The percentage of each sections are shown in (B). Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. ** $p$<0.01, *** $p$<0.001

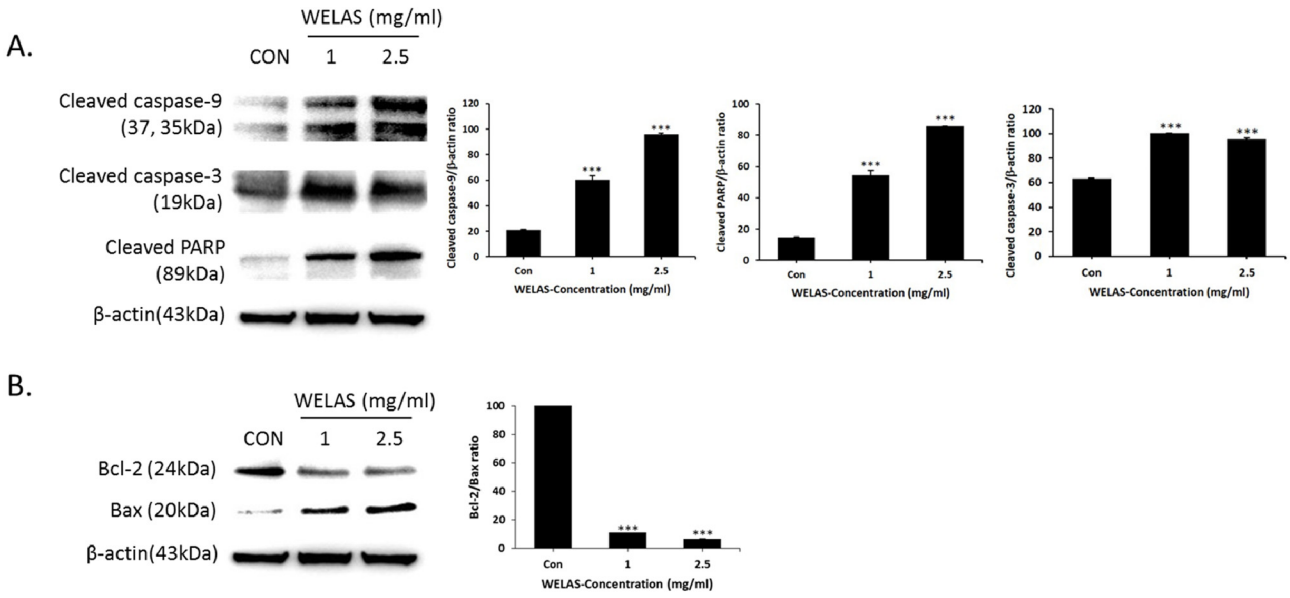


**Fig. 4. The expression levels of apoptosis-related proteins in FaDu cells treated with WELAS.** The FaDu cells were treated with 1 ㎎/㎖, 2.5 ㎎/㎖ WELAS for 48 hours. Whole lysates were separated on 12% SDS-PAGE and transferred to membranes. Membranes were probed with the indicated antibodies against Cleaved caspase-3, -9, -PARP (A) and against Bcl-2, Bax (B). The amount of protein normalized by a comparison with the actin levels. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiments. *** $p$<0.001

### 유세포분석을 이용한 전호잎(Leaf of *A. sylvestris*) 열수추출물에 의한 FaDu의 세포사멸

전호잎 열수추출물이 FaDu 암세포의 세포사멸에 미치는 영향을 조사하기 위해 Annexin-V와 7-AAD를 염색하여 유세포분석을 통해 세포사멸 단계에 있는 세포수를 정량하였다. FaDu 암세포에 전호잎 열수추출물을 1 ㎎/㎖과 2.5㎎/㎖로 48시간 처리한 결과, 사멸초기단계(early apoptosis, C4)의 비율이 대조군은 5.2%이였고 1㎎/㎖에서 13.8%, 2.5㎎/㎖에서 16.9%로 증가하였으며, 사멸후기단계(late apoptosis, C2)는 대조군에서 10.1%이였고 1㎎/㎖에서 34.7%, 2.5㎎/㎖에서 56.5%로 증가하였다. 전체 세포사멸 비율(early apoptosis + late apoptosis)은 대조군이 15.3%인 반면 1㎎/㎖의 추출물을 처리한 실험군은 48.5%로 대조군과 비교하여 약 3.1배 증가하였으며, 2.5 ㎎/㎖을 처리한 실험군에서 73.4%로 약 4.8배 증가함을 확인하였다(Fig. 3A,B). 이러한 결과는 전호잎 열수추출물에 의한 FaDu 암세포의 성장억제가 농도-의존적으로 증가함을 확인하였다.

### 전호잎(Leaf of *A. sylvestris*) 열수추출물에 의한 세포사멸 단백질 발현 확인

전호잎 열수추출물에 의한 FaDu 암세포의 세포사멸 기전을 확인하기 위해 caspase 활성을 western blotting을 통하여 확인하였다. Caspase는 세포사멸의 지표로서 세포의 손상 또는 스트레스 신호가 올 경우 단백질 가수분해(proteolytic cleavage)가 일어나면서 DNA 분절화를 유도하여 세포사멸을 발생시킨다. FaDu 암세포에 전호잎 열수추출물 1㎎/㎖과 2.5㎎/㎖로 48시간 처리한 결과, cleaved caspase-9과 cleaved caspase-3의 활성이 농도-의존적으로 증가하였으며, PARP의 분절이 일어남을 확인하였다(Fig. 4A). 또한, 미토콘드리아 막에서 세포사멸 조절에 관여하는 Bcl-2 family 단백질들의 발현을 Western blot을 수행하여 확인한 결과, 전호잎 열수추출물을 처리한 군에서 anti-apoptotic 인자인 Bcl-2의 단백 발현이 감소하였으며 pro-apoptotic 인자인 Bax의 단백 발현이 증가됨을 확인하였다(Fig. 4B).

## 고 찰

최근 약리학적인 면에서 약용식물의 역할이 대두되면서 우리 주변에서 흔히 자생하는 식물의 다양한 생리활성 물질과 항암물질을 발굴하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[5,6,17]. 그러나 이러한 생리활성 소재를 이용한 약물로의 발견과 개발은 아직까지 미비한 실정이며 일부 식물의 경우 낮은 효율과 천연물의 성분복잡성 때문에 임상으로 이용하기에는 아직 많은 연구가 필요하다. 암 세포성장 억제 기전은 세포의 종류와 자극의 종류에 따라 다양하나 현재 약용식물의 항암 기초 연구가 위암, 간암, 대장암 등에 주로 국한되어 있어 다양한

암에서의 항암기전 연구도 역시 필요하다[17,18]. 구강암은 90%가 상피세포암이며 타 악성 종양에 비해 발현빈도는 낮으나 악성도가 높아 5년 생존율이 50%에 그치고 있다[2,19]. 구강암은 특히나 인체 중요 장기와 인접하고 있어 그 위험도가 높으며, 치료를 위해 시행하는 광범위한 외과적 절제술 역시 치료 후 기능적, 심미적 손상이 수반된다. 그러므로 절제 부위를 최소화하며 장애를 줄이기 위한 방법으로 수술 이전의 치료법으로 항암제요법이 있으나 기존의 항암제는 암세포의 내성 발현과 환자에 대한 부작용에 의해 그 사용에 제한을 받고 있어, 차후 연구에는 최소한의 부작용으로 암세포의 성장을 억제시키며 그 정확한 기전을 밝혀 임상으로 적용이 가능한 연구가 필요하다. 따라서, 본 연구에서는 민간요법으로 오랫동안 사용해왔던 약용식물 중 전호(*Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.)의 잎을 열수 추출하여 사람 유래 하인두 편평암세포 FaDu를 대상으로 성장 억제 효과와 그 기전을 분석하였다.

전호잎(Leaf of *A. sylvestris*) 열수추출물에 대한 FaDu 암세포의 생존억제 효과를 확인하기 위해 전호잎 열수추출물을 FaDu 암세포에 다양한 농도로(0.1, 1, 2.5, 5 ㎎/㎖) 24, 36시간 그리고 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 24시간에는 농도간의 생존억제 효과의 차이를 확인 할 수 없었으나, 36시간부터는 농도-시간-의존적으로 세포생존이 억제됨을 확인하였다(Fig. 1). 전호잎 열수추출물에 의한 FaDu 암세포 생존억제 효과가 세포사멸에 의한 것인지 알아보기 위해 Live & Dead assay와 DAPI stain을 수행하였다. 살아있는 세포에 의해 live-dye가 분해되면 녹색 형광을 띄고 세포사멸이 일어나 막이 손상된 죽은 세포는 dead-dye가 막을 투과하여 핵산에 결합하면서 붉은 형광을 띈다. 1㎎/㎖과 2.5㎎/㎖의 전호잎 열수추출물을 48시간 처리한 결과 농도-의존적으로 붉은 형광이 많아지는 것을 형광현미경을 통해 확인하였다. 또한, 세포핵 형태 염색을 위한 DAPI stain 분석에서도 세포사멸의 특징인 핵의 수축과 염색질 분절의 관찰을 통해 전호잎 열수추출물에 의한 FaDu 암세포의 세포사멸을 재확인하였다(Fig. 2). 이는 항암효과를 지닌 다른 여러 추출물의 암세포 성장억제 연구결과와 일치하는 것으로, 오이풀 열수추출물을 대장암세포주인 HCT-116와 RKO 세포에 처리하자 농도(0~400ug/ml)와 시간(24h, 48h) 의존적으로 암세포의 성장을 억제시켰으며, DAPI stain 분석을 통해 세포사멸을 확인하였다[20]. 또한, 오수유의 에탄올 추출물을 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에 처리하자 농도(0~60ug/ml)의존적으로 세포 생존율을 억제시켰으며 DAPI stain과 DNA fragmentation 분석을 통해 세포사멸을 확인하였다[21]. 암세포의 세포사멸 유도는 항암제 개발에 가장 유용한 전략으로 많은 연구에서 천연물을 이용한 항암 효능 및 기전이다. 그러므로 전호잎 열수추출물에 의한 FaDu 암세포의 세포사멸 정도를 정확히 분석하기 위해 Annexin-V와 7-AAD 염색을 하여 유세포분석을 수행하였다. 그 결과, 사멸초기단계에 있는 세포의 비율이 대조군(5.2%)과 비교할 때 1㎎/㎖을 처리한 실험군은 13.8%, 2.5㎎/㎖을 처리한 실험군에서는 16.9%로 농도-의존적으로 증가하였으며, 사멸후기단계 역시 대조군 10.1%에 비해, 1㎎/㎖은 34.7%, 2.5㎎/㎖은 56.5%로 뚜렷하게 증가함을 확인하였다(Fig. 3). 대부분 천연추출물의 경우 암세포의 사멸단계에 있어 사멸초기단계에 영향을 미치지만 전호잎 열수추출물의 경우 사멸초기단계뿐만 아니라 후기단계에도 많은 영향을 미치므로 구강암세포에서 세포사멸 유도가 매우 효과적임을 알 수 있다[20,21]. 세포사멸이 일어날 때 Caspase의 활성이 개시되며 proteolytic cleavage 현상이 일어난다[22,23]. 그러므로 전호잎 열수추출물에 의한 FaDu의 세포사멸의 분자적 기전으로 cleaved caspase-3과 cleaved caspase-9의 발현을 확인하기 위해 Western blotting을 수행한 결과, 전호잎 열수추출물을 처리한 실험군에서 cleaved caspase-3, -9의 발현이 농도-의존적으로 증가함을 확인하였으며, PAPR의 cleavage 현상을 확인하였다(Fig. 4). 이와 같은 세포사멸이 내인성 미토콘드리아 의존성 pathway에 의한 것인지 확인하기 위해 Bcl-2와 Bax의 단백발현을 확인한 결과, anti-apoptotic 분자인 Bcl-2의 단백발현이 농도-의존적으로 감소하였으며, pro-apoptotic 분자인 Bax의 단백발현이 증가함을 확인하였다(Fig. 4). 위의 결과는 다른 여러 추출물들에 의한 다양한 암세포의 세포사멸이 미토콘드리아 caspase에 의존적으로 일어난다는 다른 보고들과 일치함을 알 수 있다[20,21].

결론적으로, 본 연구에서는 기존의 천연 및 합성 항암제의 부작용을 최소화하기 위해 국내 자생하는 전호잎의 열수추출물을 이용하여 사람 유래 하인두 편평암세포 FaDu에서 세포 생존억제와 그 기전을 연구하였다. 그 결과, FaDu 암세포에서 전호잎 열수추출물의 처리는 미토콘드리아 caspase 의존성 세포사멸을 통해 암세포의 성장을 억제시킬 수 있음을 확인하였으며, 이는 효과적인 천연 항암 후보물질로써 검색이 가능할 뿐만 아니라 구강암에 효과적인 항암제로서 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2017년도 재단법인 조선대학교 치과대학교육문화재단 학술연구기금의 지원을 받아 연구되었음

## Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## References


1. Lee JS, Seo HS, Kim SJ, Kim HJ, Kim J, Lee SH, Park YS, Park BK, Kim BS, Kim SK, Jung JY. Studies on the Anticancer effect of Apigenin in KB cell xenograft nude mouse model. J Life Sci 2010;20:1519-1524. doi:10.5352/JLS.2010.20.10.1519.
2. Silverman S, Gorsky M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer: California and national data-1973 to 1985. J Am Dent Assoc 1990;120:495-499.
3. Sacks PG. 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 1996;15:27-51.
4. Links M. Lewis C. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. Drugs 1999;57:293.
5. Cheng YL, Lee SC, Lin SZ, Chang WL, Chen YL, Tsai NM, Liu YC, Tzao C, Yu DS, Harn HJ. Anti-proliferative activity of Bupleurum scrozonerifolium in A549 human lung cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Lett 2005;222:183-193. doi:10.1016/j.canlet.2004.10.015.
6. Park DI, Lee JH, Moon SK, Kim CH, Lee YT, Cheong J, Choi BT, Choi YH. Induction of apoptosis and inhibition to telomerase activity by aqueous extract from Platycodon grandiforum in human lung carcinoma cells. Parmacol Res 2005;51:437-443. doi:10.1016/j.phrs.2004.11.003.
7. Lee YH, Kim YG. Kim JH. Studies on anti-oral cancer activities of medicinal plant extracts. J Kor Assoc Oral Maxillofac Surg 2000;26:53-58.
8. Lee JS, Kim YG, Kim JH. Studies on anticancer effects of extract caesalpinia sappan on oral carcinoma and osteosarcoma cells. J Kor Assoc Oral Maxillofac Surg 2001;27:281-288.
9. Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. Biochem Pharmcol. 1997;53:121-133.
10. Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. Cancer Res 1997;57:2916-2921.
11. Kwon JK, Park YS, Park BK, Kim BS, Kim SK, Jung JY. Resveratrol induces apoptosis through PI3K/Akt and p53 signal pathway in MDA-MD-231 breast cancer cells. Korean J Food Sci Technol 2012;44:452-459. doi:10.9721/KJFST.2012.44.4.452.
12. Dasiram JD, Ganesan R, Kannan J, Kotteeswaran V, Sivalingam N. Curcumin inhibits growth potential by G1 cell cycle arrest and induces apoptosis in p53-mutated COLO 320DM human colon adenocarcinoma cells. Biomed Pharmacother 2017;86:3737-380. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.034.
13. Olaru OT, Nitulescu GM, Ortan A, Dinu-Pirvu C. Ethnomedicinal, Phytochemical and Pharmacological profile of Anthriscus sylvestris as an alternative source for anticancer lignans. Molecules 2015;20:15003-15022. doi:10.3390/molecules200815003.
14. Chen H, Jiang HZ, Li YC, Wei GQ, Geng Y, Ma CY. Antitumor constituents from Anthriscus Sylvestris (L.) Hoffm. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:2803-2807.
15. Kim KY, Cho HJ, Yu SN, Kim SH, Yu HS, Park YM, Mirkheshti N, Kim SY, Song CS, Chatterjee B, Ahn SC. Interplay of reactive oxygen species, intracellular Ca(2+) surge and loss of mitochondrial homeostasis in the apoptotic ablation of prostate cancer cells by deoxypodophyllotoxin. J Cell Biochem 2013;114:1124-1134. doi:10.1002/jcb.24455.
16. Wang YR, Xu Y, Jiang ZZ, Guerram M, Wang B, Zhu X, Zhang LY. Deoxypodophyllotoxin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in SGC-7901 cells and inhibits tumor growth in vivo. Molecules 2015;20:1661-1675. doi:10.3390/molecules20011661.
17. Park JG, Hyun JW, Lim KH, Shin JE, Won YJ, Yi YD, Shin KH, Chang IM, Woo WS. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants. Kor J Pharmacognosy 1993;24:223-230.
18. Yang YM, Hyun JW, Lim KH, Sung MS, Kang SS, Paik WH, Bae KW, Cho H, Kim HJ, Woo ER, Park H, Park JG. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants an various plants (Ⅲ). Kor J Pharmacognosy 1996;27:105-110.
19. Hsu S, Singh B, Schuster G. Induction of apoptosis in oral cancer cells: agents and mechanisms for potential therapy and prevention. Oral oncol 2004;40:461-473. doi:10.1016/j.oraloncology.2003.09.012.
20. Liu MP, Lia M, Dai C, Chen JF, Yang CJ, Liu M, Chen ZG, Yao MC. Sanguisorba officinalis L synergistically enhanced 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells by promoting a reactive oxygen species-mediated, mitochondria-caspase-dependent apoptotic pathway. Sci Rep 2016;6:34245. doi:10.1038/srep34245.
21. Park SY, Park C, Park SH, Hong SH, Kim GY, Hong SH, Choi YH. Induction of apoptosis by ethanol extract of Evodia rutaecarpa in HeLa human cervical cancer cells via activation of AMP-activated protein kinase. Bioscience Trends 2016;10:467-76. doi:10.5582/bst.2016.01170.
22. Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. Cell Death Differ 2011;18:1441-1449. doi:10.1038/cdd.2011.30.
23. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: Activation, Specificity, and Regulation. J Biol Chem 2009;284: 21777-21781. doi:10.1074/jbc.R800084200.