

Anti-proliferative and Anti-telomerase Activity of *Curcuma* Rhizome Extract on Oral Squamous Cell Carcinoma and Osteosarcoma Cells

Kyung Jin Kim and Jeong Hee Kim*

Department of Oral Biochemistry College of Dentistry, Kyung Hee University

(Received November 14, 2007; Accepted December 3, 2007)

Anti-proliferation of methanol extract of *Curcuma* rhizome on oral squamous cell carcinoma (KB) and osteosarcoma (HOS) cells were investigated. In order to elucidate the involvement of telomerase inhibitory activity as a part of anti-proliferative effect of *Curcuma* rhizome on cancer cells, we measured telomerase activity in *Curcuma* rhizome extract-treated cancer cells. The concentration inhibited cell proliferation to 50% (IC_{50}) of the methanol extract of *Curcuma* rhizome against oral squamous cell carcinoma (KB) cells and osteosarcoma (HOS) cells were 21.30 $\mu\text{g/ml}$ and 39.3 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The methanol extract of *Curcuma* rhizome showed inhibitory telomerase inhibitory effect which is required for cancer cell immortality. Therefore, it seems that the anticancer effect of methanol extract of *Curcuma* rhizome is at least partially due to telomerase inhibitory effect. Five fraction samples were prepared according to its polarity differences and analyzed anti-proliferative effects of each fraction samples on oral squamous cell carcinoma and osteosarcoma cells. Anticancer effect was observed in dichloromethane, and ethylacetate fractions. The highest anticancer effect was found in dichloromethane fraction which had IC_{50} value of 23.3 $\mu\text{g/ml}$ and 10.5 $\mu\text{g/ml}$ against oral squamous cell carcinoma (KB) cells and osteosarcoma (HOS) cells, respectively.

Key words:

*Corresponding author: Jeong Hee Kim, Tel.: +82-2-961-0915, Fax.: +82-2-960-1457, E-mail: jhkimh@khu.ac.kr.

서 론

구강암의 발생률은 전체 악성종양 중 여섯 번째로 발병률이 높으며 개발도상국에서는 발병률이 더욱 높다 (Boring *et al.*, 1992). 구강암은 다른 암에 비하여 악성도가 높고 조기 사망하는 경우가 많다. 또한 구강암 환자의 경우 현저한 기능의 감소와 심미적 손상으로 인해 심리적인 충격이 크고, 발생부위가 인체의 중요장기와 인접하고 있어 상대적인 중요성은 한층 높다고 할 수 있을 것이다. 구강암은 치주, 협점막, 입술, 혀, 타액선, 및 인두의 전 부위 등의 구강 내에서 발병되는 암을 통칭하며, 구강암의 90% 이상이 편평세포암종이다 (Silverman and Gorsky, 1990). 발생기전은 신체의 다른 부위에서 발생되는 편평세포암종과 유사하다고 생각되나 정확한 기전은 알려져 있지 않다.

구강암은 임상적으로 국소적 침윤 및 경부 임파절 전이를 주로 하며, 원격전이보다 비교적 적어 수술이나 방사선 치료 같은 국소요법이 치료의 근간을 이루어 왔다. 최근에는 복합화학요법, 방사선 요법 및 광범위 절제수술요법 등의 병용요법이 연구되고 있으며, 특히 화학요법의 역할이 점차 증가되고 있다 (Lee and Kim, 1993). 구강암을 포함한 두경부 영역의 종양의 치료에 가장 널리 사용되는 화학요법제는 cisplatin 등이 있다 (Kish *et al.*, 1984; Al-Sarraf *et al.*, 1987; Lee and Kim, 1998). 하지만 이러한 화학요법제는 소화기계 합병증, 신장독성 및 면역력 저하 등의 심각한 부작용을 초래하여 그 적용범위 등에 제한을 받고 있다 (Peterson *et al.*, 1992). 따라서 기존의 약효를 가지고 있으며, 부작용이 적어 기존의 약제를 대체할 수 있는 약효성분을 천연물에서부터 검색하여 신약으로 개발하려는 노력이 항암제를 포함한 여러 난치성 질환치료제 분야에서 활발하게 진행되고 있다. 최근 구강암을 대상으로 천연 약용식물 추출물의 항암작용을 검색

한 결과도 보고되고 있다 (Lee *et al.*, 2000; Mallery *et al.*, 2007; Manoharan *et al.*, 2006). 천연물질에서 개발된 항암요법제들이 임상에서 사용되어지고 있는데 그 예로서 *Taxus brevifolia* L., *Catharanthus roseus* G. Don, *Podophyllum peltatum* L., 과 *Camptotheca acuminata* Decne로부터 추출된 paclitaxel (Taxol®), vincristine (Oncovin®), podophyllotoxin과 camptothecin등이 있다 (Pezzuto, 1997). 울금 (鬱金, *Curcuma longa*)은 다년생 초본으로 근경 (curcuma rizhome)을 약재로 사용한다. 구성성분으로는 황색색소인 curcumin과 essential oil등으로 이루어져 있으며 울금 추출물뿐만 아니라 각 구성성분에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다(Kojima *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2006; Tohda *et al.* 2006).

Telomere란 진핵세포의 염색체 말단에 반복되는 염기서열을 가진 특수 구조로 염색체의 퇴화나 융합, 재배열 등에 의한 상실로부터 보호하여 염색체의 안정성을 유지시켜주며 DNA 복제 완성에 필수적 기능을 수행하는 부위이다. 인간에 있어 telomere는 5'-(TTAGGG)*n*-3'의 배열을 가지며 telomere의 길이는 telomere를 연장시키거나 감소시키는 세포내 과정들의 균형에 의하여 조절되며 RNA를 포함하는 핵단백질 복합체인 telomerase에 의하여 특이적으로 연장될 수 있다 (Blackburn, 1991). Telomerase는 암세포의 불멸에 필수적인 효소이다. 정상세포의 경우 telomerase가 비활성화되어 복제될 때마다 염색체 말단, 즉 telomere의 길이가 짧아지게 되며, telomere의 길이가 한계점 이하로 짧아지게 되면 이것이 신호가 되어 세포의 분열이 더 이상 일어나지 않게 된다. 하지만 암세포의 경우 telomerase의 활성이 지속되어 분열을 계속하게 된다 (Allsopp *et al.*, 1992; Rhyu, 1995). 구강암을 포함한 두경부암에서도 telomerase의 활성이 검출되는데 경미한 이형성증(dysplasia)에서는 telomerase의 활성이 나타나지 않았으나, 백반증(leukoplakia)에서는 중등도의 telomerase의 활성이, 구강암에서는 높은 활성이 검출되어 telomerase 활성과 발암과의 관련성을 시사하고 있다 (Miyoshi *et al.*, 1999; Mutirangura *et al.*, 1996). 암세포의 불멸화에 telomerase의 활성이 필수적이며 정상세포에서는 거의 활성이 검출되지 않으므로 telomerase 저해제 개발은 암세포 특이적 항암제 개발이 될 가능성이 높으리라 생각된다 (Zimmermann and Martens, 2007; Olausson *et al.*, 2006). 따라서 구강암에서도 telomerase 활성에 대한 연구와 telomerase 저해제 개발을 통한 항암제 개발 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는 울금의 추출물의 구강편평세포암종 및 골육종 세포주에 대한 항암효과를 검색하고 작용 기전 규명의 일환으로 telomerase 활성저해효과를 검색하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

약용식물 메탄올 추출물 및 분획의 제조

본 연구에 사용된 울금은 경동시장에서 구입하여 다음과 같이 제조하였다. 먼저 구입한 약용식물을 작게 분쇄한 후 둥근 플라스크에 약 100 g을 넣고 70% methanol로 80°C로 가열하여 환류하면서 3시간 이상 추출하였다. 이를 상온으로 온도를 낮추고 거름종이를 이용하여 추출액을 거르고 남은 시료를 다시 위와 같은 방법으로 1회 반복하여 추출하고 거름액을 합쳐서 감압 농축하였다. 이를 증류수에 녹여 동결건조기(Labconco, FreeZone 6, USA)를 이용하여 동결 건조하여 분말로 만든 후 이를 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)에 1 mg/ml가 되게 녹여 -70°C에 보관하였고, 이를 사용할 때는 세포 배양배지 또는 PBS에 여러 가지 농도로 희석하여 사용하였다.

분획시료의 제조는 다음과 같이 실시하였다. 먼저 동결 건조된 메탄올 추출물 시료를 증류수에 녹인 후 동량의 n-hexane, dichloromethane (CH₂Cl₂), ethylacetate (EtOAc), 및 n-butanol(BuOH)를 순서대로 가하여 각 2회씩 추출하였으며, 각 유기용매 추출 분획은 진공기화기에서 건조하고 수층 분획은 동결건조기에서 냉동 건조하여 분획 시료를 제조하였다.

세포배양

본 연구에 사용한 세포주는 KB(human oral epidermoid carcinoma, ATCC CCL-17) 및 HOS(human osteogenic sarcoma, ATCC CRL-1543)이며 각각 Eagle's MEM with non-essential amino acid 배지(GibCo, BRL, USA)에서 10% fetal bovine serum (BioWhittaker, USA), streptomycin/penicillin (GibCo, BRL, USA)과 2 mM L-glutamine (BioWhittaker, USA)을 넣고 37°C에서 5% CO₂/95% 조건에서 배양하였다.

세포독성 측정 실험

세포독성 측정 실험은 MTT 분석법을 이용하였다. 적정수의 세포를 96 well plate에 접종한 후 배양하고 시료를 가하여 48시간 동안 배양하였다. MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA)는 인산완충식염수(phosphate buffered saline: PBS)에 5 mg/ml로 녹여 0.2 μm 여과지로 거른 뒤 -20°C에 분주하여 보관하였고 필요시 녹여 사용하였다. MTT를 10 μl를 가하고 4시간 동안 배양 후 각 well의 배양액을 제거하고 형성된 formazan 염을 0.04N HCl이 함유된 isopropanol 100 μl를 넣고 가볍게 진탕하여 완전히 용해시킨 후, ELISA reader (Model 550, Bio-rad, USA)로 570 nm의 파장 (reference: 655 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도를 세포의 100% 생존율로 하고 시료를 가한 후의 세포의 생존 정

도를 대조군의 생존율에 대한 백분율로 구하였다. 시료의 농도와 세포의 생존율관계를 그래프로 작성하여 50% 세포생존을 나타내는 시료의 농도 (IC₅₀)를 얻었다.

Telomerase 저해활성 측정

Telomerase 저해활성은 Telomeric Repeat Amplification Assay Protocol (TRAP) 기법으로 측정하였다. 상기의 방법으로 세포를 배양 후 12-well plate 에 구강편평세포암종 (KB) 세포주를 2.0×10⁵ cells/well 의 밀도로 접종하여 배양하고 시료를 처리한 후 일정시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하고, PBS로 세척하여 CHAPS lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1 mM benzamidine, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5% w/v CHAPS, 10% w/v Glycerol)로 용해시켰다. 이 세포 용해액을 얼음에 30분 동안 방치 후, 원심 분리하여 상층을 취하여 시료를 준비하였다. 각 시료의 단백질 농도를 Bradford 방법으로 측정하였다. 동량의 단백질량이 되게 시료를 취하여 *Taq* DNA polymerase (Perkin Elmer, USA)와 TS primer(5'-AATCCGTCGAGCAGA GTTGA-CGACATGGAGAAGATCTGG-3'), CX primer(5'-CCCTTACCCTTACCCTAATGTGGTGGTGAAGCTGTAGC-3')를 사용하여 20 mM Tris-HCl, 0.15 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20, 6 mM KCl, 1 mM EGTA, 100 μg/ml BSA, pH 8.3의 반응 완충액에서 다음과 같이 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 94°C에서 5분 동안 방치한 후, 다시 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 90초의 cycle을 30회 반복하고 72°C에서 5분 동안 DNA extension을 실시하였다.

PCR 결과생성물을 12% polyacrylamide gel에서 TBE buffer(45 mM Tris-HCl, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 전개한 후, SYBR Green(FMC Bio-products, USA)으로 염색하여 가시화하고, densitometer (Gel-Doc 1000, GS-700 Imaging densitometer, Biorad, USA)를 이용하여 각 시료에서 생성된 DNA band의 density를 측정하였다.

결 과

울금의 메탄올 총 추출물에서 구강 상피암 (KB) 세포주에 대하여 항암 활성을 측정하였다(Fig. 1, A and B). 울금 추출물을 0, 4, 20, 및 100 μg/ml 농도로 세포 배양배지에 첨가하고 48 hr 후에 세포생존 정도를 측정하였다. 그 결과 시료를 처리하지 않은 대조군 100%에 비교하여 시료를 처리한 경우 각각 77, 51 및 19% 였다. 세포의 증식을 50% 억제하는 약물농도 (IC₅₀ 값)는 21.3 ± 8.0 μg/ml이었다. 동일한 방법으로 시료를 처리한 후 골육종 세포주의 세포 증식을 측정한 결과 0, 4, 20, 및

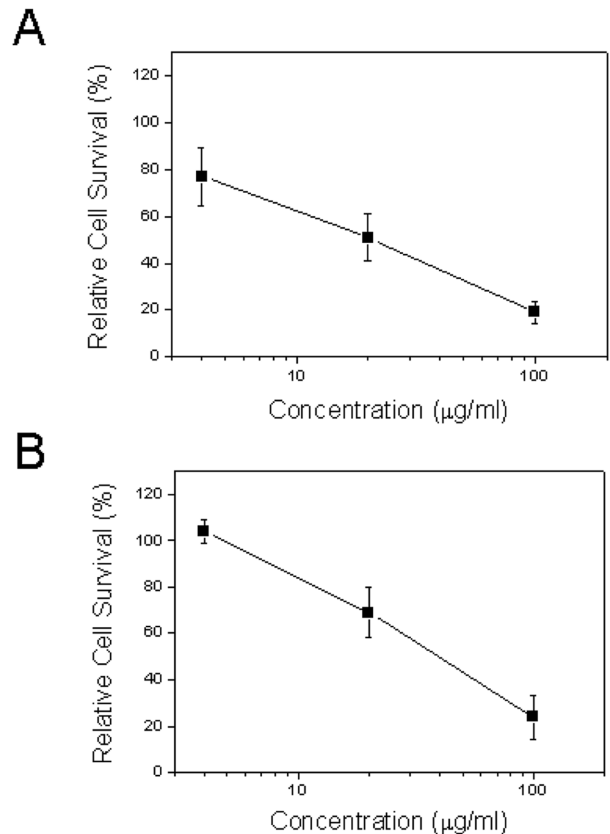


Fig. 1. Anticancer effect of methanol extract of *Curcuma* rhizome on oral squamous cell carcinoma, KB (A) and osteosarcoma, HOS (B) cells.

100 μg/ml 농도에서 104, 69, 및 24%의 세포 생존율을 나타내었고 IC₅₀ 값은 39.3±9.5 μg/ml 이었다.

울금 추출물의 항암작용 기전을 규명하기 위하여 울금 추출물의 telomerase 저해 활성을 측정하였다. 먼저 실험에 사용한 KB 및 HOS 세포의 telomerase 활성을 측정한 결과 telomerase 활성이 검출되었다. 울금 추출물을 각 세포의 배양배지에 첨가하여 24 시간 동안 배양한 후 telomerase 저해 활성을 측정하였다(Fig. 2 and 3). 구강편평세포암종(KB) 세포주에 대한 울금 추출물의 telomerase 활성저해효과는 울금 추출물 농도 증가에 의존적으로 나타났다(Fig. 2). 울금의 메탄올 총추출물의 구강편평세포암종(KB) 세포에 대한 telomerase 활성은 0, 20, 50, 100, 150 및 250 μg/ml 농도에서 각각 100.0, 103.4, 94.1, 49.2, 33.1 및 11.0% 였다(Fig. 2). 골육종세포주 HOS에 대한 telomerase 활성저해효과는 동일 시료 농도 범위에서 각각 100.0, 92.4, 93.2, 92.4, 78.0 및 64.4% 였다(Fig. 3). 낮은 농도에서는 telomerase의 활성이 거의 저해되지 않았으나 시료의 농도가 증가함에 따라 감소되는 현상을 나타내었다. Telomerase 활성을 50% 저해하는 농도는 KB 세포의 경우 약 100 μg/ml 이며, HOS 세포의 경우 250 μg/ml 이상이었다. 본 결과는 상기의 세포증식능 억제 결과

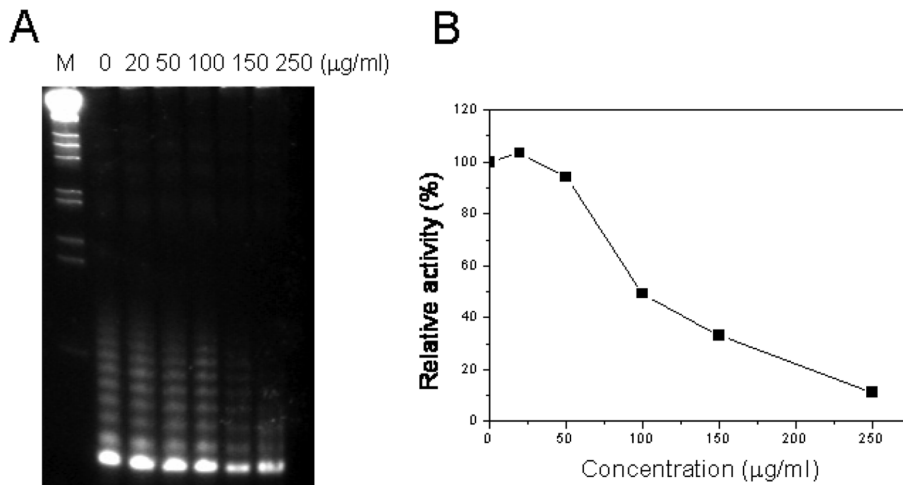


Fig. 2. Effect of methanol extract of *Curcuma* rhizome on telomerase in oral squamous cell carcinoma, KB cells. Telomerase Repeat Amplification Protocol Assay (TRAP) was performed to analyze the telomerase activity inhibitory effect of *Curcuma tuber* as described in materials and methods. Quantitative presentation of A is shown in B. M. Molecular weight marker.

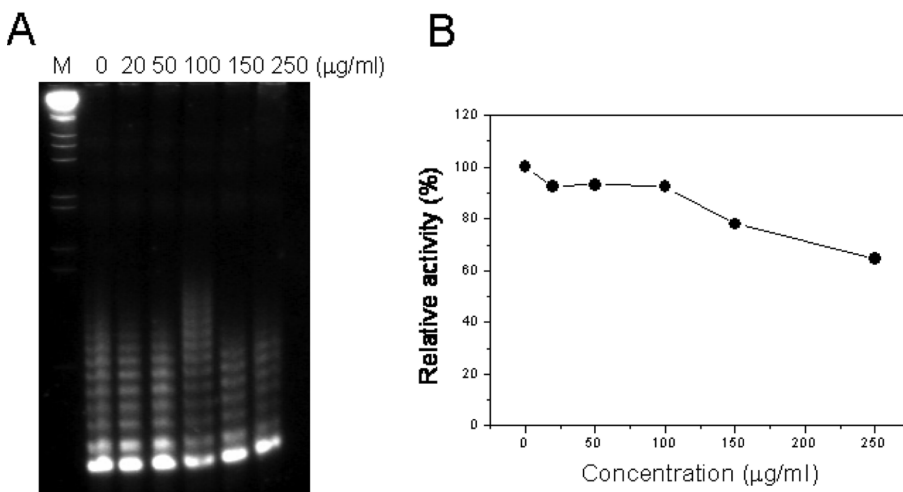


Fig. 3. Effect of methanol extract of *Curcuma* rhizome on telomerase in osteosarcoma, HOS cells. Telomerase Repeat Amplification Protocol Assay (TRAP) was performed to analyze the telomerase activity inhibitory effect of *Curcuma tuber* as described in materials and methods. Quantitative presentation of A is shown in B.

에서 울금 추출물의 KB 세포에 대한 세포증식능 억제 효과가 HOS 세포에 대한 효과에 비하여 높게 나타난 결과와 서로 일치하고 있다. 하지만 50% 세포증식억제농도인 IC₅₀ 값과 50% telomerase 활성저해농도를 비교하여 볼 때 울금 총추출물의 항암작용은 telomerase 저해 활성 뿐만 아니라 다른 작용 기전도 함께 작용하는 것으로 생각된다.

울금의 메탄올 추출물의 분획시료를 제조하고 이들 분획시료에 대하여 구강암 및 골육종 세포주를 이용하여 세포증식능 억제활성을 검색하였다. 분획시료는 울금의 메탄올 추출물을 이용하여 용매의 극성도에 따라 n-hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol 및 수층 분획시료로 나누어 제조하였다 각 제조된 분획시료와 총 추출물

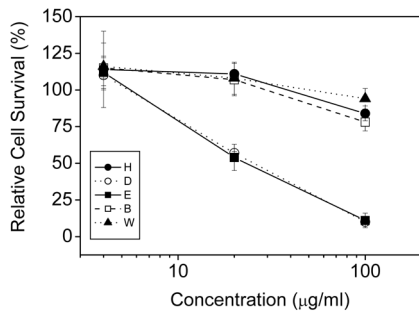
을 박층크로마토그래피법으로 분석하였다(Fig. 4). 메탄올 총추출물 중 상당부분이 ethylacetate 또는 dichloromethane 분획으로 이전되었다. 박층에서 높은 부분까지 전개가 된 구성성분이 ethylacetate 또는 dichloromethane 분획에서 발견되었다. 극성이 높은 수층 및 butanol층에서는 소량의 성분만이 검출되었다. 극미량의 성분이 비극성 용매인 hexane 분획으로 이전되었다.

각 분획 시료의 구강 상피 세포암 및 골육종 세포주에 대한 세포성장 억제 활성을 측정하였다(Fig. 5). 그 결과 dichloromethane 및 ethylacetate 분획 시료가 구강편평세포암종 세포주 KB 및 골육종 세포주 HOS에 세포 독성을 나타내었다. 구강편평세포암종의 경우 dichloromethane 및 ethylacetate 분획 시료를 처리한 경우 세포성장 50%



Fig. 4. Thin layer chromatography of various fractions of methanol extract of *Curcuma* rhizome T; total extract, H; n-hexane fraction, D; dichloromethane fraction, E; ethylacetate fraction, B; butanol fraction, and W; water fraction.

A



B

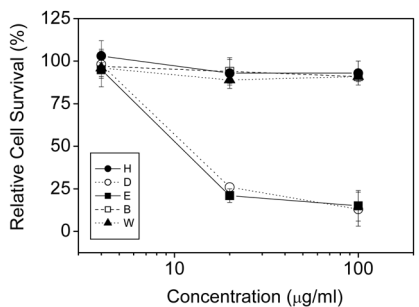


Fig. 5. Anticancer effect of various fraction samples of methanol extract of *Curcuma* rhizome against oral squamous cell carcinoma, KB (A) and osteosarcoma, HOS (B) cells. ● ; n-Hexane, ○ ; dichloromethane, ■ ; Ethylacetate, □ ; butanol, ▲ ; water fractions.

억제 농도인 IC₅₀ 값이 각각 25.4 및 23.3 µg/ml이었으며 골육종세포주의 경우 IC₅₀ 값이 각각 11.7 및 10.53 µg/

ml이었다. 두 세포주 모두에서 ethylacetate 분획시료가 좀 더 높은 세포 증식 억제효과를 나타내었다. 그 외 다른 분획 시료를 처리한 경우에는 유의성 있는 세포독성이 관찰되지 않았다.

고 찰

전통 약용 식물에서 임상 적용 가능성이 높고 부작용이 적은 새로운 악성 종양 등의 난치병 치료약물을 개발하려는 연구는 최근 들어 활발히 진행되고 있다. 전통 약용식물에서 항암효과 검색에 사용된 암세포들은 위암, 간암, 대장암 등의 암과 혈액암에 주로 국한이 되어 연구되어 왔으며 구강암에 대한 연구는 비교적 드문 편이다. 구강 편평세포암종 및 악골에 발생하는 골육종의 발현 빈도는 타 부위 악성 종양에 비해 낮으나 악성도가 높고 5년 생존률이 낮으며 치료를 위한 외과적 수술시 현저한 기능적, 심미적 손상이 불가피하여 완치된 후에도 사회심리학적 장애를 수반하게된다 (Mutirangura *et al.*, 1996). 그러므로 악안면골을 포함한 두경부에 발생된 암을 치료할 때 광범위한 외과적 절제술뿐만 아니라 치료 후 장애를 최소화시킬 수 있는 치료 방법의 개발이 요구되고 있다.

Telomere는 그리스어로 말단을 뜻하는 *telos*와 부분을 의미하는 *mere*가 복합된 단어로 진핵세포의 염색체 말단에서 발견되며 T와 G 염기가 많은 짧은 염기 서열이 반복되는 구조를 가진 부분으로서, 염색체의 안정성을 높이고 DNA의 복제를 완성하는 중요한 기능이 있다. 세포가 분열할 때마다 telomere는 짧아지며, 그 길이는 telomerase에 의하여 특이적으로 연장될 수 있다. 인체의 정상적인 체세포에서는 telomerase는 비활성화 되어있으며, 따라서 세포분열이 거듭됨에 따라 telomere의 길이는 짧아지게 된다 (Rhyu, 1995). 따라서 장기간에 걸친 telomere의 길이의 감소는 인체 세포의 노화에도 관여하는 것으로 알려져 있다.

대부분의 인체의 암종에서 telomere의 길이 유지에 필수적인 telomerase가 발견되어 암종의 무한한 세포증식에 기여하므로 telomerase는 항암제 개발의 좋은 표적이 될 수 있다. 암종의 telomere는 정상세포의 telomere에 비하여 상대적으로 짧으며, 정상세포에서 telomerase의 활성은 아주 낮거나 거의 검출되지 않는데 비하여, 암종에서의 telomerase의 활성은 높으므로 telomerase 저해제는 상대적으로 정상세포에 비하여 암종에 더욱 큰 영향을 미칠 것으로 예상된다(Akiyama *et al.*, 2002; Zimmermann and Martens, 2007).

천연물에서 telomerase 저해 활성은 약용식물에서 분리된 diterpenoid 화합물인 oridonin 및 methylenedioxy lignan 등에서 발견되었다(Giridharan *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004). 또한 telomerase의 구성성분인 hTERT를

저해하는 BIBR1532 및 hTR의 template 부위에 결합하는 thio-phosphoramidate oligonucleotide인 GRN163L등이 개발단계에 있으며, 머지않은 미래에 제 1상 임상시험에 들어가리라 예상된다(Kelland, 2005).

본 연구에서는 전래의 약용식물로서 다양한 약리 효능을 가지고 있는 울금(鬱金 *Curcuma rhizome*)을 선정하여 구강편평세포암종 및 골육종 세포주를 대상으로 세포 증식억제효과를 확인하고, 이러한 암세포 증식효과의 기전 탐색의 목적으로 현재 주목받고있는 telomerase 저해 활성에 대한 울금 추출물의 효과를 검색하였다. 세포 증식능 억제 활성 측정을 위한 방법으로 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 생존세포의 mitochondrial enzyme에 의한 tetrazolium의 환원을 측정하는 방법으로 정상 세포 역시 tetrazolium을 환원시킬 수 있다는 한계에 대한 보고에도 불구하고 측정 세포주에 대한 약제의 선별 검사, 상승효과에 대한 병합화학 요법의 검사, 생화학적 조절에 대한 방법을 모색할 때 아주 유용하게 사용되고 있는 방법이다(Suto *et al.*, 1989). 울금 추출물은 사용된 암 세포주 모두에서 농도의존적인 세포 증식억제 활성을 나타내었다. 울금 추출물의 telomerase 억제 활성을 관찰한 결과 두 암세포주에서 서로 다른 결과를 얻었다. 구강편평세포암종 세포주인 KB 세포에서는 농도의존적인 telomerase 저해 활성을 나타내었으나 골육종 세포주에서는 높은 농도(250 µg/ml)에서 중 정도의 저해활성을 나타내었다. 이는 울금 추출물의 암세포에 대한 세포 독성을 유도하는 기전이 서로 다를 가능성을 시사한다.

또한 울금 추출물의 세포증식능 억제 활성의 IC₅₀ 값이 (21.3 µg/ml for KB and 39.3 µg/ml for HOS) telomerase 저해 활성의 IC₅₀ 값보다(~100 µg/ml for KB and > 250 µg/ml for HOS) 낮은 점을 볼 때 울금의 암세포에 대한 작용 기전은 telomerase 저해 활성이 다른 항암작용 기전과 함께 작용함을 시사한다. 일반적으로 telomerase의 저해제가 초기 telomere의 크기에 의존적이고 따라서, 그 효능을 나타내기까지 lag phase가 있다. 이러한 이유 때문에 telomerase 저해제는 항암치료의 보조제로서의 사용이 권유된 바 있다 (Akiyama *et al.*, 2002).

울금의 성분 중 어느 성분이 암세포 증식능 억제 활성을 유도하는 지 관찰하기 위하여 울금 추출물을 극성도에 따라 5분획으로 나누어 각 분획의 암세포 증식능 억제 활성을 측정하고 실험에 사용된 dichloromethane 분획 및 ethylacetate 분획 시료가 유의성 있는 암세포 증식능 억제 활성을 나타내었다. 분획시료에서 얻은 결과를 울금 총추출물에서 얻은 결과를 비교해보면 KB 세포주의 경우는 IC₅₀ 값의 변화가 거의 없었으며, HOS 세포주의 경우 IC₅₀값의 유의성있는 감소가 관찰되었다. KB 세포의 경우 총추출물에서 혼합된 성분간의 상승효과가 있었으리라 예상된다. HOS 세포의 경우 세포독성을 나타내는 성분이 상대적으로 정제되어 IC₅₀값이 줄어든 것

으로 생각된다. 이 결과는 앞서 언급한 두 세포주에서 울금에 대한 세포독성 작용기전이 다를 가능성을 뒷받침하는 결과라 할 것이다.

본 결과에서 울금은 총 추출물 및 분획 성분에서 암세포에 대한 세포독성을 나타내었다. 우수한 암세포에 대한 독성을 나타내는 분획에 대해서는 향후 단일 화합물로 분리하여 각 성분 별 항암 활성을 측정하고 또한 성분들을 배합하였을 때의 활성을 측정하여야 할 것이다. 또한 울금추출물 및 분획시료의 두 세포주에서의 작용 기전에 대한 분자 수준의 규명이 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 논문은 서울시의 Seoul Research and Business Development Program (10524)에서 일부 지원을 받았으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Akiyama, M., Hideshima, T., Munshi, N. C., Anderson, K. C.: Telomerase inhibitors as anticancer therapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2: 567-575, 2002.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. and Harley, C.B.: Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10114-10118, 1992.
- Al-Sarraf, M., Pajak, T. F., Marcial, V. A., Mowry, P., Cooper, J. S., Stetz, J., Ensley, J. F. and Velez-Garcia, E.: Concurrent radiotherapy and chemotherapy with cisplatin in inoperable squamous cell carcinoma of the head and neck. An RTOG study. *Cancer* 59: 259-265, 1987.
- Blackburn, E.H.: Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569-573, 1991.
- Boring, C. C., Squires, T. S. and Tong, T.: Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 42: 19-38, 1992.
- Giridharan, P., Somasundaram, S. T., Perumal, K., Vishwakarma, R. A., Karthikeyan, N. P., Velmurugan, R., Balakrishnan, A.: Novel substituted methylenedioxy lignan suppresses proliferation of cancer cells by inhibiting telomerase and activation of c-myc and caspases leading to apoptosis. *Br. J. Cancer* 87: 98-105, 2002.
- Kang, S. C., Lee, C. M., Choi, H., Lee, J. H., Oh, J. S., Kwak, J. H. and Zee, O. P.: Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. *Phytother Res* 20: 1017-1019, 2006.
- Kelland, L. R.: Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics--current status and future prospects. *Eur. J. Cancer* 41: 971-979, 2005.
- Kish, J.A., Weaver, A., Jacobs, J., Cummings, G. and Al-Sarraf, M.: Cisplatin and 5-fluorouracil infusion in patients

- with recurrent and disseminated epidermoid cancer of the head and neck. *Cancer* 53: 1819-1824, 1984.
- Kojima, H., Yanai, T. and Toyota, A.: Essential oil constituents from Japanese and Indian *Curcuma aromatica* rhizomes. *Planta. Med.* 64: 380-381, 1998.
- Lee, J. H. and Kim, M. J.: Chemosensitivity of cisplatin and 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma cell lines. *J. Kor. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 24: 165-171, 1998.
- Lee, S. C. and Kim, Y. G.: *Oral and Maxillofacial Oncology*, Jisung, Seoul, 1993.
- Lee, Y. H., Kim, Y. G. and Kim, J. H.: Studies on anti-oral cancer activities of medicinal plant extracts. *J. Kor. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 26: 53-58, 2000.
- Liu, J. J., Wu, X. Y., Lul, H. L., Pan, X. L., Peng, J. and Huang, R. W.: Anti-proliferation effect of oridonin on HL-60 cells and its mechanism. *Chin. Med. Sci. J.* 19: 134-137, 2004.
- Mallery, S. R., Stoner, G. D., Larsen, P. E., Fields, H. W., Rodrigo, K. A., Schwartz, S. J., Tian, Q., Dai, J. and Mumper, R. J.: Formulation and *in-vitro* and *in-vivo* evaluation of a mucoadhesive gel containing freeze dried black raspberries: implications for oral cancer chemoprevention. *Pharm. Res.* 24: 728-737, 2007.
- Manoharan, S., Kavitha, K., Senthil, N. and Renju, G.L.: Evaluation of anticarcinogenic effects of clerodendron inerme on 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med. J.* 47: 1038-1043, 2006.
- Miyoshi, Y., Tsukinoki, K., Imaizumi, T., Yamada, Y., Ishizaki, T., Watanabe, Y., Sasakura, Y., Lin, Y., Hosaka, M. and Kubota, Y.: Telomerase activity in oral cancer. *Oral Oncol.* 35: 283-289, 1999.
- Mutirangura, A., Supiyaphun, P., Trirekapan, S., Sriuranpong, V., Sakuntabhai, A., Yenrudi, S. and Voravud, N.: Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 56: 3530-3533, 1996.
- Olaussen, K. A., Dubrana, K., Domont, J., Spano, J. P., Sabatier, L. and Soria, J. C.: Telomere and telomerase as targets for anticancer drug development. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 57: 191-214, 2006.
- Peterson, L. J., Indresano, A. T., Marciani, R. D. and Roser, S. M.: *Principles of oral and maxillofacial surgery*. J. B. Lippincott, Philadelphia, 1992.
- Rhyu, M. S.: Telomeres, telomerase, and immortality. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 884-894, 1995.
- Silverman, S. J. and Gorsky, M.: Epidermiologic and demographic update in oral cancer: California and national data-1973 to 1985. *J. Am. Dent. Assoc.* 120: 495-499, 1990.
- Suto, A., Kubota, J. and Shimoyama, Y.: MTT assay with reference to the clinical effect of chemosensitivity. *J. Surg. Oncol.* 42: 28-32, 1989.
- Tohda, C., Nakayama, N., Hatanaka, F. and Komatsu, K.: Comparison of anti-inflammatory activities of six *Curcuma* Rhizomes: A possible Curcuminoid-independent pathway mediated by *Curcuma phaeocaulis* extract. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 3: 255-260, 2006.
- Zimmermann, S. and Martens, U. M.: Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy. *Cell Mol. Life Sci.* 64: 906-921, 2007.