

Anti-cancer Activity of Anthricin through Caspase-dependent Apoptosis in Human Hypopharyngeal Squamous Carcinoma Cell

Won Gi Kim^{1,†}, Seul Ah Lee^{2,†}, Sung Min Moon², Jin-Soo Kim³, Su-Gwan Kim³, Yong Kook Shin⁴, Do Kyung Kim³ and Chun Sung Kim^{2,*}

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju, 501-759, Republic of Korea

²Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju, 501-759, Republic of Korea

³Oral Biology Research Institute, Chosun University, 375 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju, 501-759, Republic of Korea

⁴School of integrated Oriental Medical Bioscience, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon, Chungbuk, 27136, Republic of Korea

(received October 26, 2016; revised November 11, 2016; accepted November 12, 2016)

Anthricin (Deoxyphodophyllotoxin), a naturally occurring flavolignan, has well known anti-cancer properties in several cancer cells, such as prostate cancer, cervical carcinoma and pancreatic cancer. However, the effects of Anthricin are currently unknown in oral cancer. We examined the anti-cancer effect and mechanism of action of Anthricin in human FaDu hypopharyngeal squamous carcinoma cells. Our data showed that Anthricin inhibits cell viability in a dose- and time-dependent manner (IC₅₀ 50 nM) in the MTT assay and Live & Dead assay. In addition, Anthricin treated FaDu cells showed marked apoptosis by DAPI stain and FACS. Furthermore, Anthricin activates anti-apoptotic factors such as caspase-3, -9 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), suggesting that caspase-mediated pathways are involved in

Anthricin- induced apoptosis. Anthricin treatment also leads to accumulation of the pro-apoptotic factor Bax, followed by inhibition of cell growth. Taken together, these results indicate that Anthricin-induced cell death of human FaDu hypopharyngeal squamous carcinoma cells is mediated by mitochondrial-dependent apoptotic pathway. In summary, our findings provide a framework for further exploration on Anthricin as a novel chemotherapeutic drug for human oral cancer.

Key words: Oral cancer, Anthricin, Deoxyphodophyllotoxin, 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.

서론

두경부암은 입술, 구강, 코, 하인두, 후두, 갑상선과 경부의 연부조직 등 얼굴과 목의 거의 모든 부위에 발생하는 암을 말하며, 유병률이 전체 암 중에서 여섯 번째로 비교적 발병률이 높다 [1]. 세계적으로 매년 26 만 명 이상의 새로운 두경부암 환자가 발생하며, 12 만 명 이상 사망한다 [2]. 주로 음주와 흡연, 식습관이 유의한 위험인자로 알려져 있으며, 이 외에 인간유두종바이러스 (human papilloma virus, HPV)도 두경부 편평세포암에서

흡연여부와 관계없이 위험인자로 보고되었다 [3]. 구강암은 육안으로 쉽게 판별이 가능하여 조기진단이 비교적 다른 암에 비해 용이함에도 불구하고 악성도가 높아 진단 후 5년 생존율이 50%로 치명적이다. 특히 하인두암은 눈에 보이는 범위이상으로 공격적인 침범, 경부 림프절의 전이, 이차암의 병변도 빈발하여 두경부암 중 가장 예후가 나쁘며, 다양한 연구와 치료제의 개발에도 불구하고 지난 20년간 생존율이 30% 전후를 벗어나지 못한 상태이다. 현재 항암제는 두경부암에 선택적으로 항암효과가 나타나지 않으며 소화기계 합병증, 면역력 저하 등의 심각한 부작용이 나타나고 있으므로 분자생물학적인 접근을 통해 치료율을 높이려는 시도가 많아지고, 암의 증식, 전이에 관여하는 특정분자를 선택적으로 인지하여 치료하는 분자표적치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Anthricin은 천연 flavolignan으로 국내 자생 식물인 전호(*Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.)의 뿌리와 할미꽃(*Pulsatilla Koreana*) 뿌리에 가장 많이 함유되어 있다 [4,5]. Anthricin의 약리작용은 항증식 [6], 항암과 항혈관 생성 [7], 항알레르기 [8] 등의 효과가 있으며, 특히 전립선암세포 [9], 자궁경부암세포 [10], 림프종 [11] 등 항암 활성 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 전립선암에서 Anthricin은 미토콘드리아의 항상성을 파괴하여 세포사멸을 유도하며, 자궁경부암세포에서는 세포 성장주기에 관여하는 G2/M 지연을 통해 세포 성장을 억제하여 caspase 의존적 세포사멸에 이르게 한다고 보고되어 있다 [9]. 또, 췌장암 4기 환자 50명을 대상으로 Anthricin과 Saponin D가 함유된 SB 주사 임상실험 결과, 약을 투여한 군의 15개월 이상 생존율이 54%인 반면 약을 투여하지 않은 대조군 환자의 생존율은 10% 내외였다는 보고도 있다 [12]. 많은 연구진들의 Anthricin 항암 활성 분자적 기전을 연구한 결과 Anthricin은 암세포의 성장과 증식을 직접적으로 억제하거나 혈관신생형성 억제를 통하여 암세포의 영양공급을 차단하여 암의 전이를 막는다고 보고하였다 [7,13]. 이와 같이 Anthricin은 다양한 암에서 서로 다른 기전을 통하여 세포사멸을 유도하는 것을 확인 할 수 있다. 그러나 구강암에서 Anthricin의 항암 활성 연구는 전무한 상태다.

본 연구에서는 Anthricin이 다양한 암 세포에서 서로 다른 기작을 통해 세포사멸을 유도함을 근거하여, 사람 하인두 편평암세포 FaDu 세포에서 암세포 성장 억제 효과와 그 기전을 밝히고자 하며, 아울러 암세포 사멸에 대한 정확한 발생기전을 연구하여 구강암 치료의 효율성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 이용된 Anthricin은 Sigma에서 구입하여 DMSO에 녹인 후 세포 배양액에 1:1000으로 희석하여 DMSO가 1%가 넘지 않도록 사용하였다. 1차 항체인 cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, cleaved PARP, Bax, β -actin은 cell signaling technology(Danvers, MA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 세포 배양

실험에 사용된 사람 하인두 편평암세포 FaDu(ATCC No, CCL17)는 10% fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 units/ml)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Welgene, Gyeongsan-si, Korea)을 이용하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다.

3. 세포 증식 효과 검증

Anthricin에 대한 FaDu 세포의 생존율은 MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol 2-yl)-2,5-diphenyltertrazolium bromide] assay를 통해 분석하였다. 12 well cell culture plate에 2×10^5 cells/well세포를 seeding하고 15시간 후 Anthricin을 다양한 농도(0.1, 1, 10, 2.5, 50 nM)로 1 μ l씩 각각 처리한 다음 24, 36, 48시간 동안 배양하였다. 반응 후 배양액을 제거하고 인산 완충 용액으로 가볍게 세정한 다음 450 μ l DMEM 배양액과 50 μ l MTT(5 mg/ml) 용액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 반응하였다. 4시간 후 배양액을 제거하고 살아있는 세포에 의해 형성된 formazan을 용해시키기 위해 DMSO를 500 μ l 첨가하여 교반기에서 20분간 용해하였다. 용해된 배양액을 96 well cell culture plate에 100 μ l를 분주하여 Epoch Biotech ELISA reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 570 nm 흡광도에서 세포 생존율을 측정하였으며, 각 실험군의 viable cell 수는 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4. Live & Dead assay

Live & Dead Viability/Cytotoxicity kit(Molecular Probes, Eugene, OR)는 살아있는 세포와 죽은 세포를 형광 염색으로 구분하여 분석하는 실험으로 live-dye인 Calcein-AM은 살아있는 세포의 esterase에 의해 분해되어 녹색 형광을 나타내며, dead-dye인 Ethd-1(Ethidium bromide homodimer-1)은 plasma membrane이 손상된 죽은 세포에 침투하여 핵산에 결합하면서 붉은 형광을 나타낸다. 4 well chamber

slide(SPL, Pocheon, Korea)의 각 well에 2×10^5 cells/ml세포를 500 μ l씩 seeding하고 15시간 배양 후 25 nM과 50 nM의 Anthricin을 각각 처리하여 36시간 동안 반응하였다. 반응 후 배양액을 제거하고 인산 완충 용액으로 가볍게 세정한 다음, Calcein-AM과 Ethd-1를 인산 완충 용액에 1:1로 혼합하여 각 well에 200 μ l씩 첨가하여 호일로 감싸 차광한 후 37°C incubator에서 30분간 반응하였다. 염색약을 제거하고 mounting하여 형광현미경(Eclipse TE2000; Nikon Instruments, Melville, NY)을 이용하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 관찰하였다.

5. DAPI stain

DAPI stain은 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)라는 분자가 DNA에 결합하여 cyan색의 형광을 나타내는 것으로, 핵의 형태와 세포사멸의 특징인 염색질의 분절화를 확인할 수 있다. 4 well chamber slide(SPL, Pocheon, Korea)의 각 well에 2×10^5 cells/ml세포를 500 μ l씩 seeding하고 15시간 배양 후 25 nM과 50 nM의 Anthricin을 각각 처리하여 36시간 동안 반응하였다. 인산 완충 용액으로 가볍게 세정한 다음 4% paraformaldehyde에 10분간 고정하고 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI; Roche Diagnostics)를 첨가하여 10분간 염색하였다. 이어 mounting 하여 cover glass를 덮어 형광현미경(Eclipse TE2000; Nikon Instruments, Melville, NY) 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.

6. 유세포분석

Annexin-V는 세포사멸 시 세포 외막으로 노출되는 phosphatidylserine(PS)과 높은 결합력을 갖는 칼슘의존성 인지질 결합 단백질로 세포사멸 측정에 매우 유용하게 사용되며 Annexin-V와 7-AAD를 동시에 염색하였을 시 세포사멸과 세포괴사 여부를 판단할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 Anthricin에 대한 FaDu 세포의 세포사멸을 분석하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. FaDu 세포를 seeding 후 Anthricin을 36시간 반응시킨 뒤, 인산 완충 용액으로 가볍게 세정하였으며, Trypsin-EDTA를 첨가하여 5분간 incubation하였다. 배양액을 첨가하여 세포를 모아 1200 rpm에서 원심분리한 후 차가운 인산 완충 용액으로 두 번 세척하였다. 세척 후 Annexin-V와 7-AAD를 Annexin-V Binding buffer에 1:1로 혼합하여 세포에 첨가

하고 37°C incubator에서 10분간 반응하였으며 FC500 flow cytometry analyzer(Beckman Coulter, Brea, CA)를 이용하여 세포사멸을 측정, 분석하였다.

7. 단백질 면역 발색법

하인두 편평암세포 FaDu를 6 well cell culture plate에 4×10^5 cells/well로 seeding하고 15시간 배양 후 25 nM, 50 nM의 Anthricin을 처리하여 36시간 동안 반응하였다. 반응 후 인산 완충 용액으로 두 번 세정하고, protein lysis buffer(iNtron, Sungnam, Korea)를 이용하여 단백질 분리한 후 BCA Protein Assay Kit(Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 단백질을 정량하였다. 30 μ g 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리한 후 젤 상에 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride(PVDF)에 이동하였다. Membrane은 5% blocking solution(5% nonfat dried milk in TBS containing 0.1% Tween-20)을 이용하여 30분 동안 blocking하고, cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, cleaved PARP, Bax, β -actin을 1:1000으로 희석하여 4 °C 조건하에서 overnight 하였다. 그 후, TBS-T로 10분 간격으로 세 번 세척한 후 anti-rabbit IgG를 1:5000으로 희석하여 1시간 반응 후 ECL kit(Millipore, Bedford, MA)을 처리하였다. 분석에는 MicroChemi 4.2(DNR Bio-Imaging Systems Ltd, USA)를 이용하여 protein band를 가시화하였다. 각 밴드는 Image J를 이용하여 그래프화 하였다.

8. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 Mean \pm SEM으로 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

1. Anthricin에 의한 사람 하인두 편평암세포 FaDu의 성장 억제효과

Anthricin에 의한 사람 하인두 편평암세포종인 FaDu 세포의 성장 억제효과를 확인하기 위해 다양한 농도(0.1, 1, 10, 25, 50 nM)로 24, 36시간 그리고 48시간 동안 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 실험결과 25 nM의 Anthricin을 24시간 동안 처리하였을 때 약 42%, 36과 48시간에는 각각 66%, 74%로 세포 성장이 감소함을 확인하였으며, 50 nM에서 24시간 동안 처리하였을 때 세포성장이 50% 감소하였으며, 36과 48시간에는 70% 이상 세포성장이 억제됨을 확인하였다(Fig. 1). 이 실험

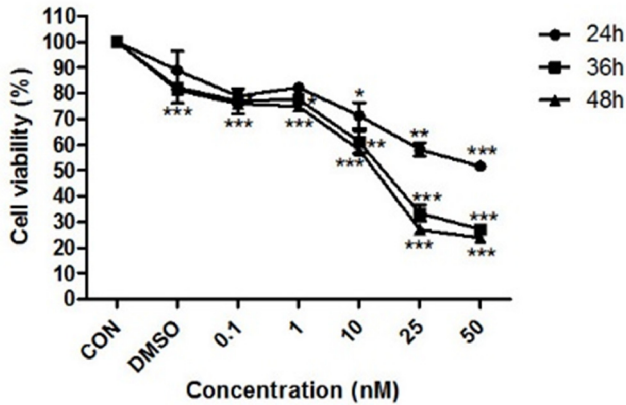


Fig. 1. Inhibition of cell viability by Anthriscin in dose- and time-dependent in FaDu cells. Cells were treated with various concentration (0.1-50 nM) of the Anthriscin in FaDu cells for 24, 36 and 48 h. Cells viabilities were determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated 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

결과에서 FaDu 암세포 성장이 Anthriscin에 의해 시간이 증가함에 따라 농도-의존적으로 억제됨을 확인하였다. 이후 모든 실험은 25 nM과 50 nM의 Anthriscin을 36시간 동안 처리하여 수행하였다.

2. Live-Dead cell staining을 이용한 Anthriscin의 사람 하인두 편평암세포 FaDu의 세포사멸

Anthriscin이 사람 하인두 편평암세포종인 FaDu 세포의 세포사멸에 영향을 주는지 확인하기 위해 Live & Dead assay kit를 통하여 분석하였다. Live-dye인 Calcein-AM은 살아있는 세포의 esterase에 의해 분해되어 녹색 형광을 띄며, dead-dye인 Ethd-I는 membrane이 손상된 죽은 세포에 침투하여 핵산과 결합하면서 붉은 형광을 나타낸다. 25 nM과 50 nM의 Anthriscin 처리된 FaDu 세포를 염색

하여 확인한 결과, 대조군보다 Anthriscin이 처리된 실험군에서 붉게 염색된 세포가 많이 있는 것을 형광현미경으로 확인하였다(Fig. 2).

3. DAPI stain을 이용한 Anthriscin의 사람 하인두 편평암세포 FaDu의 세포사멸

Live & Dead assay 결과에서 Anthriscin이 FaDu 암세포에서 세포사멸에 관여한다는 결과를 확인하였고, 사멸된 세포핵의 변화를 확인하기 위해 DAPI staining을 수행하였다. DAPI는 세포 내 핵을 염색하는 형광물질로, 세포사멸이 발생하였을 때 나타나는 핵의 수축, DNA의 분절화를 형광현미경으로 관찰 할 수 있으며, 이를 통하여 세포 내 세포사멸의 발생 정도를 확인할 수 있다. Anthriscin이 36시간 처리된 FaDu 세포를 DAPI로 염색한 결과 대조군(3%)과 비교하여 25 nM을 처리한 실험군에서 대략 9배(27%), 50 nM을 처리한 실험군에서 13배(39%)의 사멸된 세포가 농도-의존적으로 뚜렷하게 증가됨을 확인하였다(Fig. 3).

4. 유세포분석을 이용한 Anthriscin의 사람 하인두 편평암세포 FaDu의 세포사멸

세포사멸 및 그 기전 분석을 위해 FaDu 암세포에서 Anthriscin 25 nM과 50 nM을 36시간 처리하여 Annexin-V와 7-AAD를 동시에 염색 후 유세포분석을 수행하였다. 실험결과 대조군보다 25 nM의 Anthriscin을 처리한 실험군에서 후기 세포사멸(late apoptosis, C2)이 63.9%로 6.3배 이상 증가하였으며, 50 nM을 처리한 실험군에서는 후기 세포사멸이 66.1%로 6.6배 증가하였다(Fig. 4A). 전체 세포사멸 비율(early apoptosis + late apoptosis)은 대조군이 15.3%인 반면 25 nM의 Anthriscin을 처리한 실험군에서 66.5%로 대조군과 비교하여 약 4.5배 증가하였다. 또한, 50 nM을 처리한 실험군에서 69.2%로 약 5배 증가

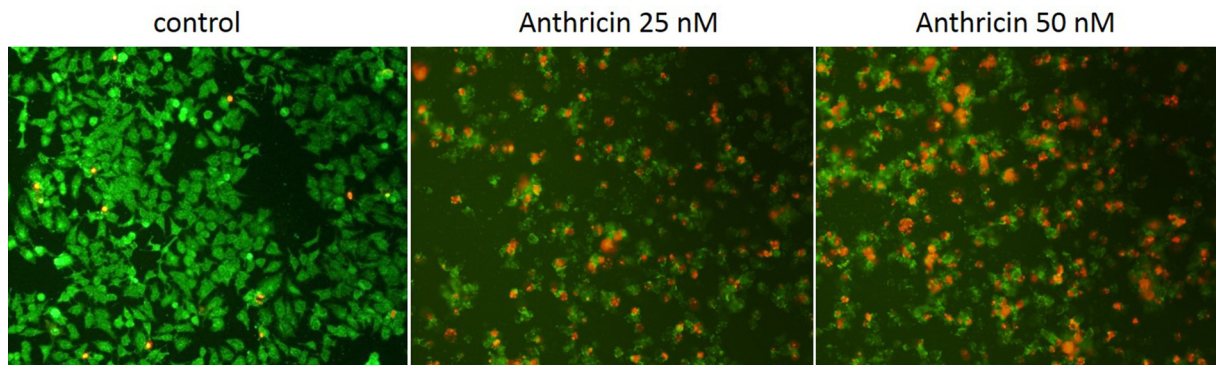


Fig. 2. Effect of Anthriscin on viability of FaDu cells by Live & Dead assay. Cells were treated with 25 nM, 50 nM of Anthriscin for 36 hours. The live cells were stained by Calcein AM (green color) and the dead cells were stained by Ethd-I (red color). The stained cells were observed by fluorescence microscopic analysis and imaged (X100). Data were performed triplicate experiments.

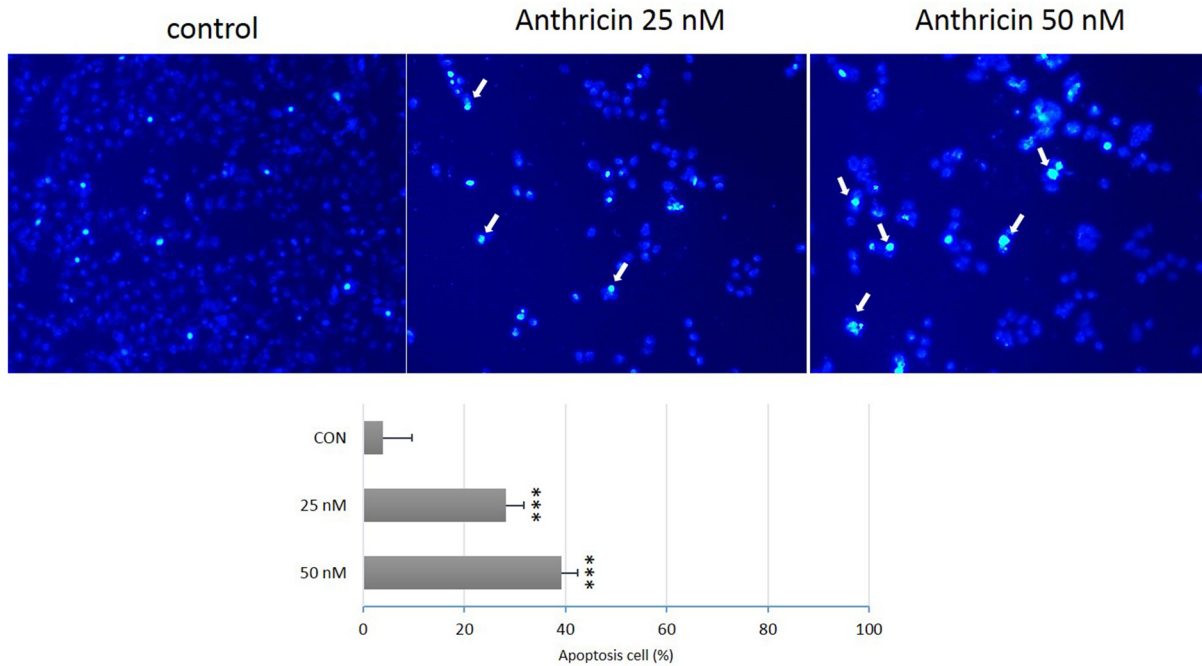


Fig. 3. Apoptotic morphological changes of Anthriscin-treated FaDu cells. Anthriscin-treated cells for 10 min were fixed with 4% PFA and stained with DAPI for 20 min. Stained cells were observed by fluorescence microscopic analysis and imaged (Control X40, Anthriscin treat X100). Arrows show the chromatin condensation and fragmentation of FaDu cell by Anthriscin treatment. Each data point represents the mean+SD of three independent experiments. *** p<0.001

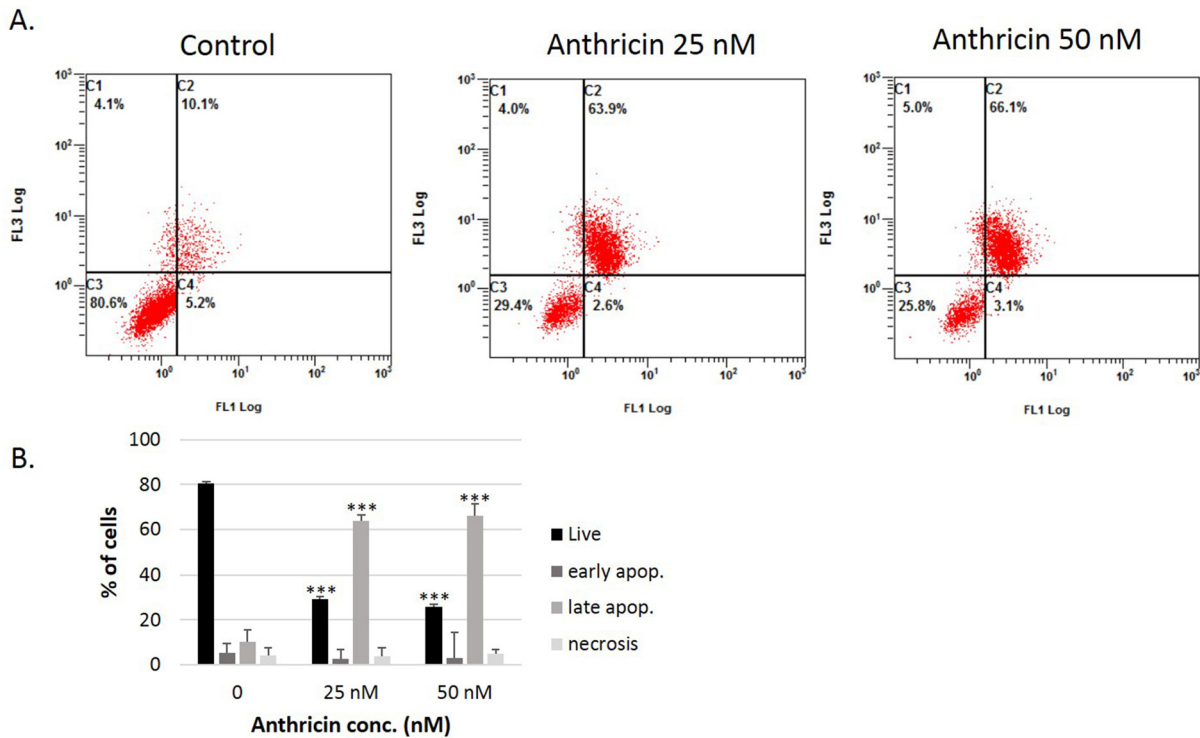


Fig. 4. Increase of early and late apoptotic cells in Anthriscin-treated FaDu cells. The cells were treated with 20 nM, 50 nM of Anthriscin for 36 hours. The cells stained with Annexin-V/7-AAD. The apoptotic cells were analyzed by FACS analysis. (A) Dot plots represented four independent section (C1; Necrosis cells, C2; late apoptosis 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<0.001

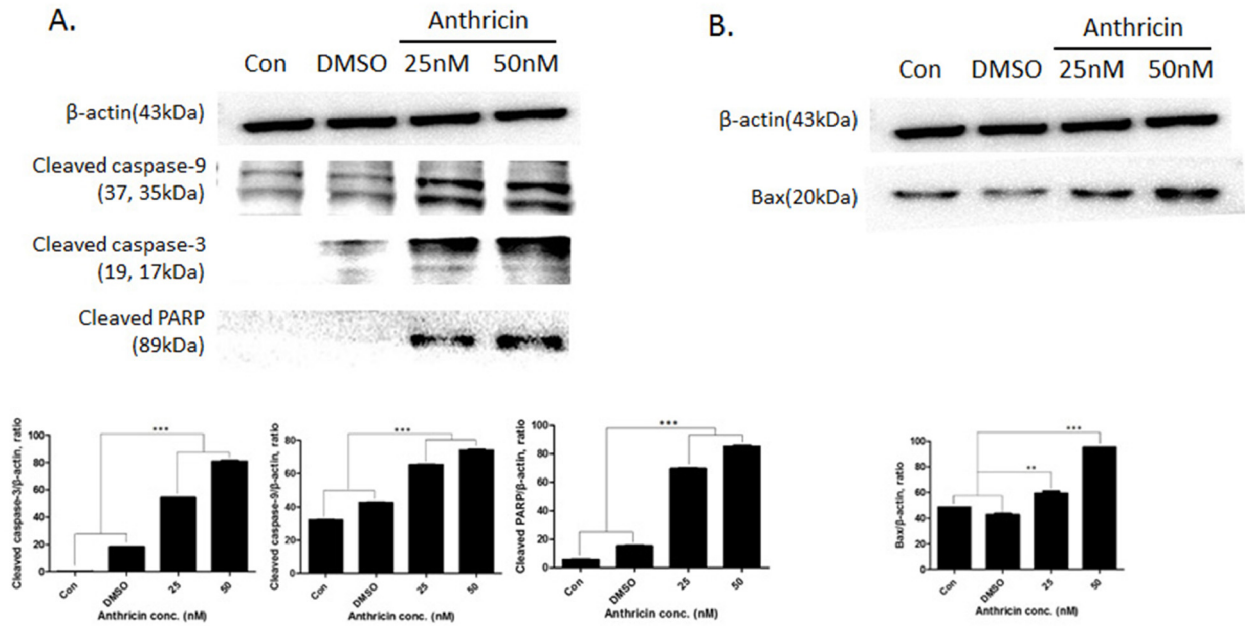


Fig. 5. The expression levels of apoptosis-related proteins in Anthriscin-treated FaDu cells. The FaDu cells were treated with 20 nM, 50 nM of Anthriscin for 36 hours. Whole lysates were separated by 12% SDS-PAGE, followed by Western blot analysis. Antibodies against Cleaved caspase-9, 3, PARP(A) and against Bax(B) were used. The amount of protein normalized by a comparison with the actin levels. Each data point represents the mean \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

함을 확인하였다(Fig. 4B). 이 결과로 Anthriscin에 의한 FaDu 암세포의 성장억제가 세포사멸과 관련이 있음을 확인하였다(Fig. 4).

5. 하인두 편평암세포 FaDu의 사멸에 관여하는 단백질 발현 확인

Anthriscin에 의한 FaDu 암세포 성장억제에 관여하는 세포사멸 분자적 기전을 규명하기 위해 세포사멸의 경로 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 caspase의 활성화를 확인하였다. Caspase는 세포의 손상 또는 스트레스 신호가 올 경우 cleavage가 일어나면서 활성을 가지게 되며, 활성화된 caspase(cleaved caspase)는 DNA 분절화를 유도하여 세포사멸 발생시키므로, 세포사멸 분석의 지표가 된다. Western blot 실험결과 Anthriscin을 36시간 처리한 FaDu 암세포에서 cleaved caspase-9과 cleaved caspase-3의 활성이 농도-의존적으로 증가하였고, 이어 PARP의 절단이 일어나 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다(Fig 5A). 또한, 미토콘드리아 외막에 존재하는 세포사멸 유도 인자인 Bax 단백질 발현을 Western blot을 수행하여 확인한 결과, Anthriscin에 의해 농도-의존적으로 Bax의 발현이 증가됨을 확인하였다(Fig. 5B). 본 실험 결과를 통하여 Anthriscin에 의한 사람 하인두 편평암세포 FaDu의 세포사멸이 미토콘드리아에 의존적으로 발생함을 알 수 있다 (Fig. 5).

고찰

항암제는 악성종양을 치료하기 위해서 사용되는 화학요법제의 총칭이다. 대부분의 항암제는 암세포의 각종 대사 경로에 개입하며 주로 핵산의 합성을 억제하여 항암활성을 나타내는 약제로 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직세포(골수, 위장관, 모근세포 등)에도 손상을 입히기 때문에 골수 기능저하, 위장장애, 탈모증 등 여러 가지 부작용을 나타낸다. 그리하여 최근에는 부작용도 줄이며 항암활성을 가지는 약용식물에 대한 관심이 높아졌으며, 우리 주변에서 흔히 자생하는 식물에서 분리한 다양한 생리활성을 갖는 물질과 그 물질에서 항암활성 효과를 발굴하기 위한 노력이 활발하다 [14,15].

Anthriscin은 전국 각지의 산과 들에 습기가 많은 곳에서 자라는 전초와 할미꽃의 뿌리에 가장 많이 함유되어 있는 성분으로, 항암 뿐만 아니라 항알레르기, 항염증 등 다양한 약리활성에 대해 연구가 되어있으나 [7,8,16] 구강암에서 구강암세포 성장 억제에 대한 연구는 없다. 따라서, 본 연구에서 Anthriscin에 의한 사람 하인두 편평암세포 FaDu의 성장 억제효과 및 분자적 기전에 대하여 연구하였다. Anthriscin을 FaDu 암세포에 다양한 농도로(0.1, 1, 10, 25, 50 nM) 24, 36시간 그리고 48시간 동안 처리한 후 MTT

assay 기법을 이용하여 세포성장 억제효과를 확인하였다. 그 결과, 시간이 증가함에 따라 농도-의존적으로 세포성장을 억제하였으며, 24시간 후 50 nM에서 세포성장을 50% 억제하였고, 36시간과 48시간에 70% 이상 세포 성장을 억제하는 효과를 확인하였다(Fig. 1). 추가적으로, Anthricin에 의한 FaDu 암세포의 생존 세포 수와 죽은 세포 수를 평가하기 위해 Live & Dead 염색법을 수행하였다. 살아있는 세포는 esterase 활성이 높고 세포막이 온전하여 live-dye의 비형광물질이 살아있는 세포의 esterase에 의해 분해되면서 녹색을 띠게 되고, 죽은 세포는 esterase 활성이 낮고 손상된 세포막으로 투과된 Ethd-1가 핵산과 결합하면서 붉은 형광을 나타낸다. 25 nM과 50 nM의 Anthricin을 36시간 처리하여 확인한 결과 대조군보다 더 붉게 염색되는 것을 형광현미경으로 확인하였다(Fig. 2). 이는 Anthricin이 HeLa 세포에서 성장 억제효과(IC₅₀ > 200 nM)보다 사람 하인두 편평암세포 FaDu의 세포 성장 억제효과(IC₅₀ = 50 nM)에서 더 효과적으로 성장을 억제함을 확인하였다 [10].

세포사멸은 주변의 환경이나 영향으로 세포가 스스로 사멸하는 현상으로 암세포에만 특이적으로 세포사멸을 유도한다면 항암제의 부작용을 최소화 하면서 가장 유력한 항암효과를 기대할 수 있다. Anthricin에 의한 FaDu 암세포의 성장 억제가 세포사멸에 의한 것인지 알아보기 위해 DAPI와 유세포분석을 수행하였다. DAPI 실험 결과 정상군과 비교하여 농도-의존적으로 apoptotic 세포가 뚜렷하게 증가하였으며(Fig. 3), 유세포분석 역시 25 nM과 50 nM의 Anthricin을 36시간 동안 처리한 결과, 후기 세포사멸의 세포 비율이 15.3%에서 66.5%, 69.2%로 뚜렷하게 증가함을 확인하였다(Fig. 4). 위의 결과는 위암세포인 SGC-7901세포에서 75 nM Anthricin을 48시간 동안 처리하였을 때 전체 세포사멸 비율이 53%인 결과와 비교하였을 때 구강암에서 세포사멸 유도가 보다 더 효과적임을 확인하였다 [17]. 이와 같은 실험 결과를 통해 Anthricin에 의한 하인두 편평암세포 FaDu의 성장 억제효과는 세포사멸에 의해 일어나는 것으로 사료되며, 세포사멸의 분자적 기전에 관여하는 단백질들의 발현을 확인하였다. 실험결과 cleaved caspase-9과 cleaved caspase-3의 발현이 대조군에 비해 농도-의존적으로 증가함을 확인하였으며, 최종적으로 PARP의 절단을 확인하였다. 이와 같은 세포사멸이 미토콘드리아 의존성 세포사멸인지 확인하기 위해 pro-apoptosis factor인 Bax의 발현을 확인한 결과 Bax의 발현이 대조군에 비해 농도-의존적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 5). 위의 결과는 SGC-7901 위암세포와 MCF-7, MDA-MB-231 유방암 세포에서 Anthricin을 처리했을 때 미토콘드리아 caspase 의존성 세포사멸 분자적 기전과 일치함을 알 수 있다 [17,18].

또 다른 연구보고에 따르면, Anthricin은 HeLa의 자궁경 부암세포와 A549의 폐암세포 등 다양한 암세포에서 G2/M기의 세포주기 억제 분자적 기전에 의하여 암세포 성장을 억제한다고 보고 되어있다 [10,17,19]. 따라서, 향후 연구로 사람 하인두 편평암세포 FaDu에서 Anthricin에 의한 세포 성장 억제의 분자적 기전 확립과 이를 바탕으로 임상적 실험이 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 조선대학교 치과병원 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics. 2001. CA Cancer J Clin. 2001;51:15-36.
- Maggioni D, Biffi L, Nicolini G, Garavello W. Flavonoids in oral cancer prevention and therapy. Eur J Cancer Prev. 2015;24:517-528. doi:10.1097/CEJ.000000000000109.
- Hopper C, Kübler A, Lewis H, Tan IB, Putnam G. mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2004;111:138-146.
- Synytsya A, Mickova K, Synytsya A, Jablonsky I, Spevacek J, Erban V. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* structure and potential prebiotic activity. Carbohydr Polym. doi:10.1016/j.carbol.2008.11.021.
- Yong Y, Shin SY, Lee YH, Lim Y. Antitumor activity of deoxypodophyllotoxin isolated from *Anthriscus sylvestris*: induction of G2/M cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19:4367-4371. doi:10.1016/j.bmcl.2009.05.093.
- Ikeda R, Nagao T, Okabe H, Nakano Y, Matsunaga H, Katano M, Mori M. Antiproliferative constituents in umbelliferae plants. III. Constituents in the root and the ground part of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1998;46:871 - 874.
- Kim Y, Kim SB, You YJ, Ahn BZ. Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana*. Planta Medica. 2002;68:271 - 274. doi:10.1055/s-2002-23140.
- Lin CX, Son MJ, Ju HK, Moon TC, Lee E, Kim SH, Kim MJ, Son JK, Lee SH, Chang HW. Deoxypodophyllotoxin,

- a naturally occurring lignan, inhibits the passive cutaneous anaphylaxis reaction. *Planta Medica*. 2004;70:474 - 476. doi:10.1055/s-2004-818981.
9. 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*. 2012;114:1124-1134. doi:10.1002/jcb.24455.
 10. Shin SY, Yong Y, Kim CG, Lee YH, Lim Y. Deoxypodophyllotoxin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells. *Cancer Lett*. 2010;287:231 - 239. doi:10.1016/j.canlet.2009.06.019.
 11. Jeong GS, Kwon OK, Park BY, Oh SR, Ahn KS, Chang MJ, Oh WK, Kim JC, Min BS, Kim YC, Lee HK. Lignans and coumarins from the roots of *Anthriscus sylvestris* and their increase of caspase-3 activity in HL-60 cells. *Biol Pharm Bull*. 2007;30:1340 - 1343.
 12. Moon KS, Ji JY, Cho YJ, Lee JH, Choi MS, Kim EE. Therapeutic effects of SB natural anticancer drug in 50 patients with stage IV pancreatic cancer. *J Cancer Treatment and Research*. 2015;3:42-46. doi:10.11648/j.jctr.20150303.14.
 13. Wang Y, Wang B, Guerram M, Sun L, Shi W, Tian C, Zhu X, Jiang Z, Zhang L. Deoxypodophyllotoxin suppresses tumor vasculature in HUVECs by promoting cytoskeleton remodeling through LKB-AMPK dependent Rho A activation. *Oncotarget*. 2015;6:29497-29512. doi:10.18632/oncotarget.4985.
 14. 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 scrozonrifolium* 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.
 15. Park DI, Lee JH, Moon SK, Kim CH, Lee YT, Cheong J, Choi BT, Choi YH. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by aqueous extract from *Platycodon grandiflorum* in human lung carcinoma cells. *Pharmacol Res*. 2005;51:437-443. doi:10.1016/j.phrs.2004.11.00.
 16. Lee SH, Son MJ, Ju HK, Lin CX, Moon TC, Choi HG, Son JK, Chang HW. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase by deoxypodophyllotoxin in mouse bone marrow-derived mast cells. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27:786-788.
 17. 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.
 18. Jung CH, Kim H, Ahn J, Jung SK, Um MY, Son KH, Kim TW, Ha TY. Anthricin Isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. inhibits the growth of Breast cancer cells by inhibiting Akt/mTOR signaling, and its apoptosis effects are enhanced by autophagy inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:9. doi:10.1155/2013/385219.
 19. Sang CY, Xu XH, Qin WW, Liu JF, Huui L, Chen SW. DPMA, a deoxypodophyllotoxin derivative, induces apoptosis and anti-angiogenesis in non-small cell lung cancer A549 cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;15: 6650-6655. doi:10.1016/j.bmcl.2013.10.048.