

# 사람 구강암세포에서 퀘세틴에 의한 항암 및 항전이 효과에 관한 융합연구

강해미<sup>1,6</sup>, 길종진<sup>2</sup>, 박봉수<sup>3,6</sup>, 강현경<sup>4</sup>, 김인령<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실 박사과정

<sup>2</sup>부산대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실 박사과정

<sup>3</sup>부산대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실 교수

<sup>4</sup>신라대학교 보건복지대학 치위생학과 부교수

<sup>5</sup>부산대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실 조교수

<sup>6</sup>BK21 플러스 구강보건과학기술전문인력양성사업단

## Convergence study on anticancer and antimetastasis effect by quercetin in human oral cancer cells

Hae-Mi Kang<sup>1,6</sup>, Jong-Jin Kil<sup>2</sup>, Bong-Soo Park<sup>3,6</sup>, Hyun-Kyung Kang<sup>4</sup>, In-Ryoung Kim<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>PhD student, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University

<sup>2</sup>PhD student, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University

<sup>3</sup>Full professor, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University

<sup>4</sup>Associate professor Department of Dental Hygiene, Silla university

<sup>5</sup>Assistant professor, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University

<sup>6</sup>BK21 PLUS Project, School of Dentistry, Pusan National University

요 약 본 연구는 천연 플라보노이드계 물질인 퀘세틴을 사람 구강암세포주인 HSC-2 세포에 처리한 후 나타나는 항암 및 항전이 효과를 보기 위함이다. 연구 결과를 통하여 퀘세틴은 HSC-2 세포의 세포생존율 과 세포증식율이 감소하였으며, 이 세포 사멸의 경로는 세포 자살 프로그램인 세포자멸사의 경로를 통하여 일어나는 것임을 확인하였다. 또한 세포사멸에 큰 영향을 주지 않았던 농도인 퀘세틴 100  $\mu$ M 처리군부터 HSC-2 세포의 이동력 과 침습력을 억제하는 효과가 있음을 확인 하였다. 따라서 본 연구자는 종합적인 실험 결과를 통하여 구강암 세포에 있어서 200  $\mu$ M 이상의 퀘세틴 처리는 세포자살 프로그램을 가동하여 세포사멸을 유도하고, 100  $\mu$ M 이상의 퀘세틴 처리는 세포의 이동과 침습을 억제하여 항암, 항전이 활성을 일으키는 것을 밝혔다. 그러므로 퀘세틴은 구강암에 있어 전이를 억제하고 암을 치료하기 위한 항암제로서 충분한 가치가 있음을 시사한다.

주제어 : 융합, 세포자멸사, 상피간엽전환, 전이, 구강암, 퀘세틴

**Abstract** This study was conducted to investigate the anticancer and antitumor effects of quercetin, which is a natural flavonoid substance in human oral cancer cell line HSC-2 cells. The results of this study showed that quercetin reduces the cell viability and the cell proliferation rate, and it led to the evidences of cell death through apoptosis pathway. Also, lower concentration quercetin over 100  $\mu$ M were inhibited the cell migration and invasion. In the present study, we conclude that quercetin treatment of more than 200  $\mu$ M induces apoptosis by activating programmed cell death and quercetin treatment of 100  $\mu$ M or more inhibits the cell migration and invasion rate in oral cancer cells. Therefore, this study suggests that quercetin is of sufficient value as an anticancer drug to inhibit metastasis and to treat cancer.

**Key Words** : Convergence, Apoptosis, Epithelial-mesenchymal transition, Metastasis, Oral cancer, Quercetin

\*This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University

\*Corresponding Author : In-Ryoung Kim (biowool@pusan.ac.kr)

Received July 20, 2018

Revised September 28, 2018

Accepted October 20, 2018

Published October 28, 2018

## 1. 서론

구강암은 전체 암 발생률 중 약 3-4%로 비교적 낮은 비율을 차지하고 있지만, 그 수치가 매년 증가하는 추세이다[1]. 구강암 환자의 90% 이상이 편평상피암종으로 [2], 현대 수술 기술의 비약적인 발전에도 불구하고 구강암의 5년 생존율은 여전히 낮게 나타나고 있다[3]. 특히 구강암은 재발률이 높고, 경부 림프를 통한 전이 또한 빈번하게 일어나며[4], 전이의 여부에 따라 치료방법과 예후에 큰 영향을 미친다[5]. 전이란 암세포가 원발성 암에서 떨어져 나가 혈액이나 림프를 통해 다른 기관에서 적응하여 자라나는 현상을 말하며 [6], 상피-간엽 전환(The epithelial-mesenchymal transition, EMT)은 상피암종의 종양 침윤 및 전이에 중요한 역할을 한다[7]. 따라서 두경부 영역에 암이 발생하게 되는 경우, 외과적 수술이 까다롭고 수술 후 안모와 저작기능에 많은 변화를 주기 때문에 치료에 큰 어려움이 있다. 현재 임상에서 사용되고 있는 대부분의 항암제는 항암활성에 대한 효과는 입증되었지만, 여러 부작용이 함께 나타나는 경우가 많으며 구강암과 관련하여서는 그 효과가 미미한 실정이다 [8]. 따라서 부작용 없이 구강암 세포만을 표적으로 하는 효과적인 항암제를 개발하는 것이 구강암 치료에 있어 가장 시급한 논점이라 할 수 있다.

최근 천연플라보노이드를 이용한 항암제 개발에 대한 관심이 높아짐에 따라 다양한 종양 모델에서 천연 물질이 가지는 항암활성에 대한 효과를 입증하기 위한 실험들이 활발하게 진행되고 있다[9,10]. 퀴세틴 (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone)은 주로 적포도주, 홍차, 과일이나 식물 등에 풍부하게 함유 되어있는 천연 플라보노이드 계열의 하나로 직접적으로 유리라디칼을 제거함으로써 세포내에서 강력한 항산화 작용을 할 뿐만 아니라 다양한 종양 모델에서 항암, 항염증 효과를 나타내는 물질이다 [11,12]. 세포자멸사 (apoptosis)는 배발생, 인체의 항상성 및 항암에 있어 중요한 역할을 하는 세포자살 프로그램 이다[13]. 퀴세틴은 세포자멸사 유도를 통하여 항암 활성 효과를 가지며 특히 암세포의 세포주기를 정지시켜 세포자멸사를 유도함으로써 전립선, 폐, 유방암과 같은 다양한 종양 세포의 증식률을 억제 시킨다는 보고가 있다[14,15]. 또 다른 논문에서 퀴세틴이 유도하는 세포자멸사가 caspase-cascade의 활성을 통한 미토콘드리아 매개 세포자멸 경로를 통하여 이루어진다는 보고 또

한 발표된 바 있다 [16]. 하지만 사람 구강암 세포주에서 퀴세틴이 가지는 항암활성에 대한 효과와 항전이 효과와 관련한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 기존에 보고된 논문들의 실험 결과를 기반으로 사람 구강암세포주인 HSC-2 세포에서 퀴세틴이 가지는 항암 활성과 항전이 효과에 대한 객관적인 평가를 통하여 새로운 구강암 치료제 개발을 위한 기초 연구 자료를 제공할 목적으로 수행되었다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1. 재료 및 방법

#### 2.1.1 재료

본 실험에 사용된 HSC-2 세포 주는 전북대학교의 구강병리학교실 조성대 교수님으로부터 제공받았으며, 10% 소태아 혈청 (FBS), 1% 페니실린 (GIBCO-BRL, Rockville, MD, USA), 4 mM L-글루타민, 1.5 g/l 탄산나트륨, 4.5 g/l 글루코스가 함유된 Essential Medium/Earle's Balanced Salt Solution (MEM/EBSS) 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 와 37°C의 온도가 유지된 인큐베이터에서 배양하였다. 실험에 사용된 시약인 퀴세틴은 (St. Louis, MO, USA) DMSO에 100 μM 농도로 희석하여 -20°C 에서 냉동 보관하여 사용하였다.

#### 2.1.2 세포 생존율 측정 (Cell viability assay)

HSC-2 세포의 증식 속도를 고려하여 96-well plat 에 (1×10<sup>4</sup> cells/well) 분주한 뒤, 24 시간 동안 배양한 다음 퀴세틴을 0-500 μM 농도의 범위로 처리하였다. 배지를 제거하고 MTT solution 100 μM (500 mg/ml)을 각 well 에 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 4 시간 배양하였다. MTT 를 환원시켜 형성된 보라색 포르마잔 결정을 DMSO 150 μL 을 가하여 용해시킨 후 10 분간 반응시켰다. 세포의 흡광도는 ELISA reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 측정하였다.

#### 2.1.3 세포 증식률 측정 (Colony formnig assay)

HSC-2 세포를 6-well (3×10<sup>2</sup> cells/well)에 배양하여 퀴세틴을 저농도로 (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μM) 처리한 후 37°C 인큐베이터에서 7 일간 배양하였다. 배지를 제거한 후 100% 메탄올로 고정한 후 0.5% 크리스탈 바이올렛

로 10 분간 염색한 후 증류수로 3 회 세척하였다. 형성된 colony 는 집계한 후 계수화 하였다.

#### 2.1.4 DAPI 염색

HSC-2 세포를 60 mm dish ( $3 \times 10^5$  cells/well)에 배양한 후 퀴세틴을 0, 100, 200, 300  $\mu\text{M}$  농도로 처리하였다. 24 시간 후 퀴세틴 처리한 세포를 4% 포르말데하이드 용액에 고정한 후 PBS 로 세척하였다. 1  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 염색약을 세포에 적용시킨 후  $37^\circ\text{C}$  의 인큐베이터에서 10 분간 배양한 다음 PBS 로 세척한 후 핵에 나타나는 형태의 변화를 형광현미경 (Carl Zeiss, Goettingen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

#### 2.1.5 세포 이동 및 침습력 측정(Wound healing and invasion assay)

HSC-2 세포를 6-well 에 ( $8 \times 10^4$  cells/well) 배양한 후 멸균된 200  $\mu\text{L}$  팁을 사용하여 well 의 중앙에 스크래치 낸 후 PBS 로 세척하였다. 그 후 100  $\mu\text{M}$  농도의 퀴세틴을 처리한 다음  $37^\circ\text{C}$  의 인큐베이터에서 24 시간 동안 배양하였다. 세포간 거리는 Image J software 를 이용하여 측정된 후 그래프화 하였다. 8.0  $\mu\text{m}$  크기의 폴리카복시네이트 membrane 의 Trans-well (Corning Costar, Cambridge, Massachusetts) chamber 에 Matrigel 을 30  $\mu\text{L}$  의 두께로 코팅한 다음 인큐베이터에서 24 시간 배양하였다. HSC-2 ( $1.5 \times 10^5$  cells/200  $\mu\text{L}$ ) 세포를 upper chamber 분주한 후 10% 소태아 혈청이 포함된 배지(750 mL)가 담긴 lower chamber 에 넣은 후 인큐베이터에서 24 시간 배양하였다. 메탄올에 고정한 세포를 헤마톡실린-에오신으로 15 분간 염색한 후 자일렌을 이용하여 투명화 과정을 거친 후 마운팅 하였다. 염색된 세포는 현미경을 이용하여 관찰하였다 (Olympus, Tokyo, Japan).

#### 2.1.6 단백질 전기영동 (Western blot analysis)

배양한 HSC-2 세포를 차가운 PBS 로 2 회 세척한 후 Solubilizing buffer [50 mM Tris-Cl, Cl (pH 7.6), 0.5% Triton X-100, 2 mM PMSF, 2  $\mu\text{l/ml}$  aprotinin and 2  $\mu\text{l/ml}$  leupeptin] 에  $4^\circ\text{C}$  에서 2 시간 동안 반응시켰다.  $4^\circ\text{C}$ , 13,200 rpm 으로 30 분간 원심분리 한 후 Bradford protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 사용하여 단백질을 정량 하였다. 12.5% SDS-polyacrylamide del electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하여 전기영동 한

후 Electrotransfer system 을 이용하여 Membrane (PVDF)으로 이동시키고 blocking buffer (5% skim milk)로 상온에서 2 시간 반응시켰다. 1 차 항체는 1:1,000 으로 희석하여 24 시간 반응시켰으며, 각 항체에 대한 이차 항체는 1:5,000 으로 상온에서 2 시간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 현상하고 Alpha Imager HP (Alpha Innotech, Santa Clara, USA)를 사용하여 관찰하였다.

#### 2.1.7 통계 분석

결과 분석을 위한 통계 처리는 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences version 17.0, Chicago, IL, USA) program 을 이용하여 분산분석 (ANOVA) 하였다. 분석된 데이터는 one-way ANOVA 를 실시하였으며 사후분석으로 Dunnett's multiple-comparison test 로 유의성을 검증하였다.

### 3. 결과

#### 3.1.1 HSC-2세포에 대한 퀴세틴의 세포 생존율 감소효과.

사람 구강암세포주인 HSC-2 세포에 대한 퀴세틴의 세포독성 효과를 확인하기 위하여 MTT 측정법을 시행하였다. 다양한 농도의 (0, 50, 100, 150, 200, 300, 500  $\mu\text{M}$ ) 퀴세틴을 HSC-2 세포에 24 시간동안 적용시킨 결과 퀴세틴 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소 (0  $\mu\text{M}$ , 100%; 50  $\mu\text{M}$ , 88.76%; 100  $\mu\text{M}$ , 86.68%; 150  $\mu\text{M}$ , 75.36%; 200  $\mu\text{M}$ , 58.12%; 300  $\mu\text{M}$ , 42.46%; 500  $\mu\text{M}$ , 37.57%) 하는 것을 확인 하였다 (Fig. 1A). 위의 MTT 결과를 바탕으로 이 후 진행된 실험에서의 퀴세틴 농도를 0, 100, 200, 300  $\mu\text{M}$  로 결정하였다. 퀴세틴을 처리한 후 세포의 모양을 현미경으로 관찰한 결과 퀴세틴을 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때, 퀴세틴 농도 의존적으로 세포의 모양이 변화하고 세포배양 접시에서 떨어져 부유하는 것을 관찰하였다 (Fig. 1B). 따라서 위의 결과를 통하여 퀴세틴은 HSC-2 세포의 생존율을 감소시키며 특히 200  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서 유의한 결과를 보였다.

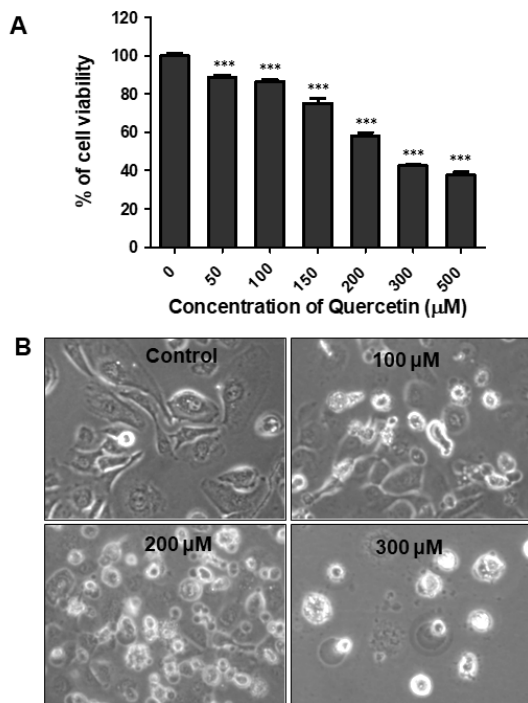


Fig. 1. Quercetin reduces cell viability in HSC-2 cells. (A) HSC-2 cells were treated with various concentrations of quercetin(0-500 μM) for 24 and cell viability was determined with an MTT assay. (B) Morphology of quercetin-treated HSC-2 cells were observed using the microscopy. (\*\*p < 0.001 for the difference between the control and the treatment groups for each group.)

### 3.1.2 HSC-2 세포에 대한 퀘세틴의 세포증식 억제 효과.

세포에 독성을 나타내지 않는 수준인 저 농도 (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μM)의 퀘세틴을 HSC-2 세포에 7일 동안 적용시킨 후 세포증식 억제 효과를 관찰한 결과 퀘세틴 농도 의존적으로 세포의 증식이 억제 (0 μM, 100%; 0.1 μM, 100.62%; 0.5 μM, 79.28%; 1 μM, 68.90%; 5 μM, 44.53%; 10 μM, 34.39%) 되었다. 극도로 낮은 농도인 0.1, 0.5 μM에서는 세포증식 억제에 큰 변화를 나타내지 않았지만, 퀘세틴 농도 1 μM 이상에서부터는 육안으로 관찰하기에도 확연한 세포의 증식의 억제를 확인하였다 (Fig. 2A). Fig. 2B는 위의 결과를 수치화 시켜 그래프로 나타낸 결과이다. 따라서, 다음의 결과를 통하여 낮은 농

도의 퀘세틴이 HSC-2 세포의 증식을 억제하는 효과가 입증 되었다.

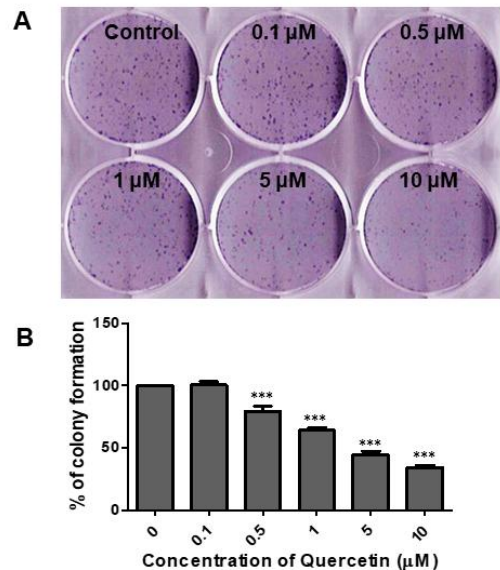


Fig. 2. Quercetin inhibits the cell proliferation in HSC-2 cells. (A) HSC-2 cells were treated with various concentration (0.1-10 μM) of quercetin for 7 days and were observed using colony forming assay. (B) Quantification of colony number described in A. (\*\*p < 0.001 for the difference between the control and the treatment groups for each group.)

### 3.1.3 퀘세틴이 HSC-2 세포의 세포사멸에 미치는 영향.

퀘세틴에 의한 세포 생존율의 감소가 세포자멸사에 의한 것인지를 확인하기 위하여 형광현미경을 사용하여 세포에 나타나는 핵의 형태의 변화를 관찰한 결과, 퀘세틴 처리군이 농도 의존적으로 DNA의 응축과 절편화, 아포토좀의 형성과 같은 다양한 형태학적 변화들이 관찰되었다 (Fig. 3A). 특히 퀘세틴 농도 200 μM 이상에서부터 확연한 세포자멸의 증거를 관찰할 수 있었으며 실험 결과는 수치화 (0 μM, 2.37%; 100 μM, 8.53%; 200 μM, 29.70%; 300 μM, 61.80%) 하여 그래프로 나타내었다 (Fig. 3B). 또한 단백질 수준에서 세포자멸사의 증거들을 확인하기 위하여 단백질 전기영동분석법을 이용하여 세포사멸관련 단백질들의 발현량을 관찰하였다. 그 결과, pro-apoptotic 단백질인 Bak의 발현은 퀘세틴 농도 의존

적으로 증가하였으며 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현은 퀘세틴 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 또한 caspase-3의 발현이 증가하였고 caspase-3의 분절 형태 (cleaved form, Cl-caspase-3)의 발현이 퀘세틴 처리 이후 확연하게 증가하였으며 PARP의 발현 양상 역시 같은 경향성 (cleaved form, Cl-PARP)을 보였다. 단백질 정량에 대한 대조군으로  $\beta$ -actin을 사용하였다.

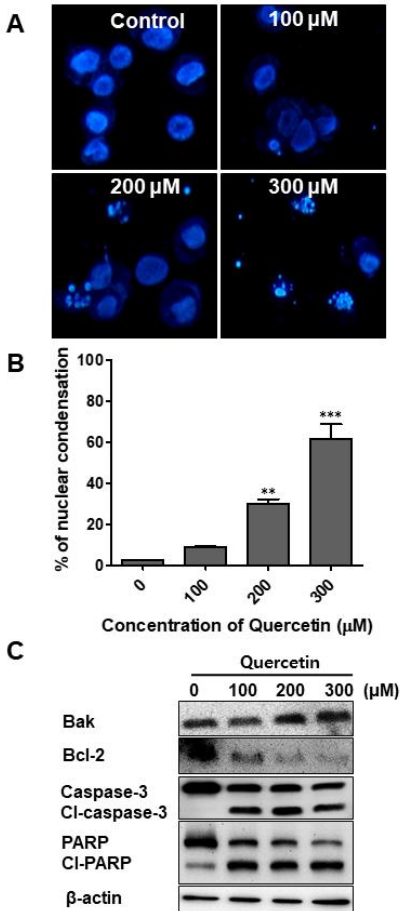


Fig. 3. Quercetin induced morphological changes and apoptosis through the caspase-cascade in HSC-2 cells. (A) Apoptotic nuclei manifested condensed and fragmented DNA brightly stained by hoechst staining. (B) The percentage of apoptosis cells were calculated and shown in histograms. (\*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  for the difference between the control and the treatment groups for each group.) (C) Western blot assay of quersetin treated HSC-2 cells.

### 3.1.4 HSC-2 세포에 대한 퀘세틴의 세포 이동성 및 침습력 억제 효과

퀘세틴에 의한 HSC-2 세포의 이동력 억제 효과를 확인하기 위하여 wound healing assay를 시행한 결과 퀘세틴을 처리하지 않은 대조군의 경우 24시간 이후 세포의 이동과 증식으로 인하여 세포 간 간격이 확연하게 줄어들 것을 확인 할 수 있었다 (0  $\mu$ M, 82.85%). 반면에 퀘세틴을 100  $\mu$ M 농도로 처리한 그룹의 경우 세포의 이동력이 억제되어 세포간 간격에 큰 변화가 나타나지 않았

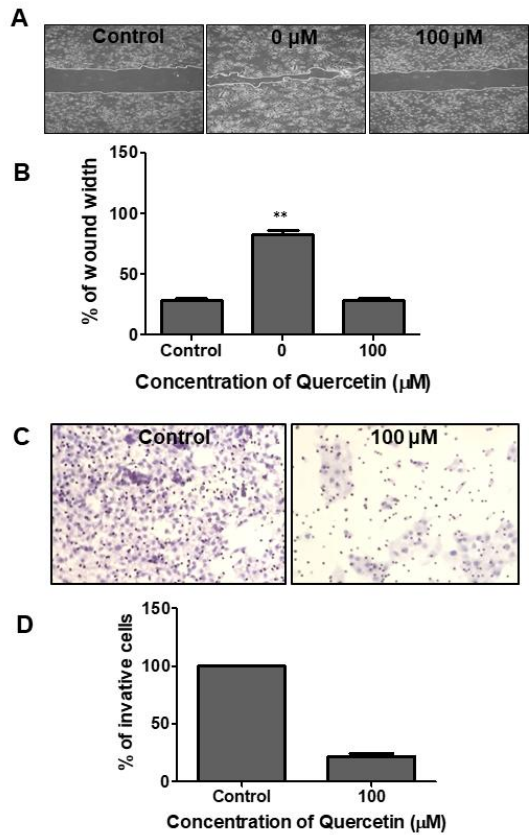


Fig. 4. Quercetin inhibits the cell metastasis and regulates EMT-related marker. (A) A wound healing assay was used to detect the migration ability of the quercetin-treated HSC-2 cells. (B) The percentage of wound width was measured and shown in histograms. (C) Trans-well assay was employed to examine the invasion ability of the quercetin-treated HSC-2 cells. (\*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  for the difference between the control and the treatment groups for each group.)

다 (Control, 28.67%; 100  $\mu$ M, 29.19%) (Fig. 4A). 또한, 세포의 침습력 억제 효과를 확인하기 위하여 시행한 invasion assay 에서 퀴세틴을 처리하지 않은 대조군은 HSC-2 세포의 침습으로 인하여 많은 세포가 염색 (Control, 100%) 된 반면, 퀴세틴을 100  $\mu$ M 농도로 처리한 그룹의 경우 침습력이 확연하게 억제 (100  $\mu$ M, 21.74%) 되었다 (Fig. 4C). Fig. 4B 와 Fig 4D 는 위의 실험결과를 수치화 하여 그래프로 나타낸 것이다. 또한 상피-간엽전환 관련 단백질 발현의 변화를 관찰하기 위해 시행한 전기영동에서 E-cadherin 의 발현이 퀴세틴 처리에 의해 약간 증가하는 경향을 보였으며, N-cadherin, snail, Slug 의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 전기영동을 통한 단백질발현의 변화를 정량화 하여 그래프로 나타내었다 (Fig. 5B). 단백질 정량에 대한 대조군으로  $\beta$ -actin 을 사용하였다 (Fig. 5A).

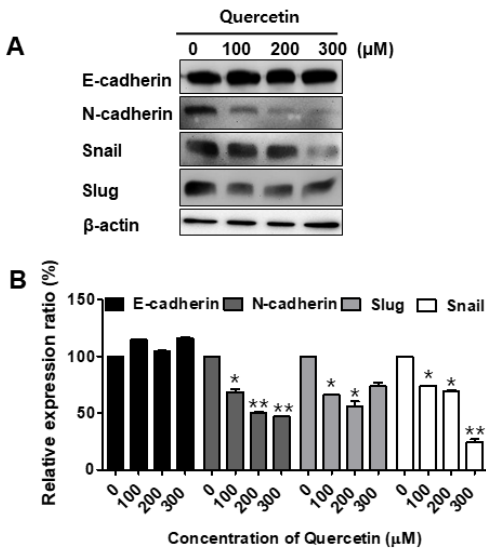


Fig. 5. (A) The expression of EMT makers, including E-cadherin, N-cadherin, Slug and Snail, was determined using western blot analysis.  $\beta$ -actin served as a loading control. (B) Density of protein expression level by western blot results.

#### 4. 고찰 및 결론

세포자멸사 (apoptosis) 란 세포가 일련의 과정을 통하여 스스로 죽어가는 현상으로 다양한 분자적 기전에

의해 활성화 된다 [4]. 세포자멸사는 인간의 초기 발생과정에서 몸의 형태를 만드는데 관여하지만, 성인에서는 정상세포가 노화되거나 기능을 상실하게 되는 경우 또는 돌연변이로 인하여 이상이 생긴 세포를 제거하는 역할을 하고 있다 [17]. 따라서 이러한 세포자멸 과정은 암의 발생과 치료에 있어 매우 중요한 요소라고 할 수 있다. 본 연구에서는 사람 구강암세포주인HSC-2 세포에 퀴세틴을 처리하여 세포에 나타나는 독성을 평가하였다. 그 결과 퀴세틴 농도 의존적으로 세포생존율이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 1A). 세포 독성에 대한 IC 50 값은 퀴세틴 농도 200  $\mu$ M 이상으로 측정되었다. 또한 HSC-2 세포의 퀴세틴에 대한 세포 증식 억제효과를 확인하기 위하여 시행한 세포 군집 형성 실험에서 세포 독성에 영향을 주지 않는 저 농도의 퀴세틴에서 HSC-2 세포의 증식률이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며 이 결과를 통해 세포독성을 일으키지 않는 낮은 농도의 퀴세틴은 구강암 세포인 HSC-2 의 증식률을 억제 시킨다 것을 증명할 수 있었다. 세포자멸사가 시작되면 인접한 세포들 사이에 틈이 생기고 세포의 유전물질인 DNA가 규칙적으로 절단되면서 단편화 되게 된다. 조각난 세포 조각인 아포토좀은 최종적으로 대식세포에 의해 포식됨으로서 세포는 죽음에 이르게 된다 [18]. 본 논문에서는 형광현미경을 사용하여 HSC-2 세포에 나타나는 다양한 세포자멸사의 증거를 확인하였고 특히 퀴세틴 농도 200  $\mu$ M 이상에서 세포자멸사로 인한 핵의 형태학적 변화가 확연하게 나타나는 것을 관찰하였다. 세포자멸사의 내인성 경로에 의해 조절되며 대표적으로 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2와 pro-apoptotic 단백질인 Bak의 상호작용에 의해 조절된다고 알려져 있다 [19]. Bcl-2 단백질에 의해 세포사멸 신호가 개시되면 미토콘드리아에서 cytochrome c 단백질이 방출되고 이는 caspase-cascade 의 연쇄적인 활성화를 유도함으로써 세포자멸사를 진행시킨다 [20]. 따라서 본 논문에서는 세포자멸사의 내인성 경로에서 활성화되는 단백질들의 발현을 전기영동법을 이용하여 확인하였다. 그 결과 pro-apoptotic 단백질인 Bak의 발현이 농도 의존적으로 증가하였으며 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소하였다. 증가한 Bak 단백질에 의해 활성화된 caspase-3와 PARP 단백질의 분절된 형태 (cleaved-caspase-3 와 cleaved PARP)의 발현이 퀴세틴 처리에 의해 증가하였으며 위의 실험결과를 종합한 결과, 퀴세틴에 의한 HSC-2 세포의

죽음은 세포자멸사의 내인성 경로를 통하여 일어나는 것임을 확인할 수 있었다.

전이는 암의 치료와 환자의 향후 생존율과 밀접한 연관성이 있다 [21]. 특히 구강암의 경우 치료가 까다롭고 전이와 재발로 인한 사망률이 매우 높은 중앙에 속하므로 항암제를 이용한 전이 억제에 관한 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 논문에서는 HSC-2 세포에 대한 퀴세틴의 전이 억제 효과를 확인하기 위하여 세포 이동성 및 침습력에 대한 실험을 진행하였다. 그 결과 퀴세틴을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 100  $\mu$ M 퀴세틴을 처리한 그룹에서 세포의 이동력이 확연하게 억제되는 것을 확인할 수 있었고, Trans-well을 이용한 세포 침습력 측정 실험에서 역시 퀴세틴을 처리한 그룹에서 세포의 침투가 확연하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 세포의 이동력, 침습력과 밀접한 연관성이 있는 단백질에는 대표적으로 E-cadherin, N-cadherin, Snail, Slug 등이 있다 [22,23]. 상피 기원의 암세포에서 E-cadherin의 발현이 감소하면 세포 골격을 이루는 단백질의 상피세포가 간엽 표현형 세포로 전환되게 되는데 이것을 상피-간엽 전환(Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 이라고 한다 [7]. 이는 암세포의 운동성을 증가시키고 다른 조직으로의 침윤을 용이하게 하여 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [24]. 따라서 본 연구에서는 HSC-2 세포에 퀴세틴을 처리하여 세포의 이동과 침습력에 어떠한 영향을 주는지를 알아보기 위하여 실험을 진행하였으며 그 결과, 약물의 독성으로 세포가 죽지 않는 적정 농도인 100  $\mu$ M 에서 세포의 이동성이 억제되었으며 침습력 역시 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 다음의 결과를 상피-간엽전환 관련 단백질들의 발현을 통해 다시 한번 확인해 본 결과 E-cadherin의 발현이 대조군과 비교했을 때 약간 증가하는 경향을 보였으며 N-cadherin의 발현은 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 Snail과 Slug의 발현 역시 퀴세틴 처리에 의해 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 위의 결과를 종합하면, 본 연구자는 HSC-2 세포에 대하여 퀴세틴이 유도하는 다양한 세포자멸의 증거들을 통하여 퀴세틴에 의한 세포사가 세포자멸의 내인성 경로를 통하여 일어난다는 것을 확인하였으며, 세포독성을 나타내지 않는 낮은 농도의 퀴세틴은 HSC-2세포의 이동성을 억제하며 조직으로의 침습 역시 억제 시킨다는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로 다양한 신호 경로의 기전을 확인하는 추가적인

실험과 동물실험이 진행된다면 퀴세틴을 구강암에 치료에 적용 가능한 효과적인 항암물질로 활용할 수 있을 것이라 생각한다.

## REFERENCES

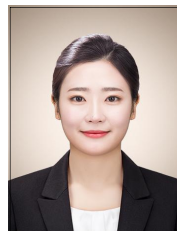
- [1] S. Franceschi, E. Bidoli, R. Herrero & N. Munoz (2000). Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncology*, 36(1), 106-115.  
DOI : 10.1016/S1368-8375(99)00070-6
- [2] J. H. Han, E. K. Kim, S. H. Lim & C. H. Kim (2012). Literature Review on the Incidence and Risk Factor of Oral Cancer. *J Dent Hyg Sci*, 12(5), 451-458.
- [3] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu & E. Ward (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 60(5), 277-300.  
DOI : 10.3322/caac.20073
- [4] R. C. Budd (1997). An overview of apoptosis. *Coron Artery Dis*, 8(10), 593-597.
- [5] M. Okura, T. Aikawa, N. Y. Sawai, S. Iida & M. Kogo (2009). Decision analysis and treatment threshold in a management for the N0 neck of the oral cavity carcinoma. *Oral Oncology*, 45(10), 908-911.  
DOI : 10.1016/j.oraloncology.2009.03.013
- [6] L. J. Talbot, S. D. Bhattacharya & P. C. Kuo (2012). Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol*, 3(2), 117-136.
- [7] Y. U. Kim, K. J. Kim, E. P. Heo (2015). The Epithelial-Mesenchymal Transition and E-cadherin and Vimentin Expression in Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Ann Dermatol*, 53(2), 96-105.
- [8] J. J. Monsuez, J. C. Charniot, N. Vignat & J. Y. Artigou (2010). Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *Int J Cardiol*, 144(1), 3-15.  
DOI : 10.1016/j.ijcard.2010.03.003
- [9] J. H. Nho, M. O. Sim, H. K. Jung, M. J. Lee, J. H. Jang, D. E. Jung, S. T. K. Sung, B. K. An & H. W. Cho (2018). Anti-colorectal Cancer and Anti-oxidant Activities of Rubiae radix Ethanol Extract in vitro. *Korean J. Plant Res*, 31(2), 102-108
- [10] J. H. Kim & E. J. Kim (2016). Effect of Anti-oxidant, Anti-inflammatory and Anti-invasive of PMA-induced Matrix Metalloproteinase (MMP-2) and MMP-9 Activities of Water Extract and Solvent Fractions of Saururus Chinensis. *Journal of Life Science*, 26(5), 584-591.



- DOI : 10.5352/JLS2016.26.5.584
- [11] G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo & F. Capasso (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 65(4), 337-353  
DOI : 10.1016/S0024-3205(99)00120-4
- [12] H. M. Kubisch, J. Wang, T. M. Bray & J. P. Phillips (1997). Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta-cells against oxidative stress. *Diabetes*, 46(10), 1563-1566.  
DOI : 10.2337/diacare.46.10.1563
- [13] B. S. Park, J. J. Kil, H. M. Kang, S. B. Yu, D. B. Park, J. A. Park & I. R. Kim (2018). Luteolin Induces Apoptosis via Mitochondrial Pathway and Inhibits Invasion and Migration of Oral Squamous Cell Carcinoma by Suppressing Epithelial-Mesenchymal Transition Induced Transcription Factors. *International Journal of Oral Biology*, 43(2), 69-76.  
DOI : 10.11620/IJOB.2018.43.2.069
- [14] J. A. Choi, J. Y. Kim, J. Y. Lee, C. M. Kang, H. J. Kwon, Y. D. Yoo, T. W. Kim, Y. S. Lee & S. J. Lee (2001). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol*, 19(4), 837-844  
DOI : 10.3892/ijo.19.4.837
- [15] H. Yang, T. C. Hsia, H. M. Kuo, P. D. Chao, C. C. Chou, Y. H. Wei & J. G. Chung (2006). Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metab Dispos*, 34(2), 296-304.  
DOI : 10.1124/dmd.105.005280
- [16] M. Yoshizumi, K. Tsuchiya, K. Kirima, M. Kyaw, Y. Suzaki & T. Tamaki (2001). Quercetin inhibits Shc- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c-Jun N-terminal kinase activation by angiotensin II in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 60(4), 656-665.
- [17] J. L. Fernandez-Luna (2007). Apoptosis regulators as targets for cancer therapy. *Clinical & Translational Oncology*, 9(9), 555-562.  
DOI : 10.1007/s12094-007-0103-7
- [18] S. Elmore (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516  
DOI : 10.1080/01926230701320337
- [19] L. Ouyang, Z. Shi, S. Zhao, F. T. Wang, T. T. Zhou, B. Liu & J. K. Bao (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, 45(6), 487-498.  
DOI : 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x
- [20] J. K. Brunelle & A. Letai (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*, 122(Pt 4), 437-441.  
DOI : 10.1242/jcs.031682
- [21] C. Garrido, L. Galluzzi, M. Brunet, P. E. Puig, C. Didelot & G. Kroemer (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 13(9), 1423-1433.  
DOI : 10.1038/sj.cdd.4401950
- [22] A. Voulgari & A. Pintzas (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*, 1796(2), 75-90.  
DOI : 10.1016/j.bbcan.2009.03.002
- [23] R. Kalluri & R. A. Weinberg (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420-1428.  
DOI : 10.1172/JCI39104
- [24] X. Li, X. Zhao, W. Song, Z. Tian, L. Yang, Q. Niu, Q. Zhang, M. Xie, B. Zhou & Y. Xu (2018). Pseudolaric Acid B Inhibits Proliferation, Invasion and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Pancreatic Cancer Cell. *Yonsei medical journal*, 59(1), 20-27.  
DOI : 10.3349/ymj.2018.59.1.20

강 해 미(Kang, Hae Mi)

[정회원]



- 2015년 2월 : 신라대학교 치위생학과 (치위생학사)
- 2017년 2월 : 부산대학교 의학과 (치의학석사)
- 2017년 2월 ~ 현재 : 부산대학교 의학과 박사과정

- 관심분야 : 구강해부학, 구강조직학, 세포생물학
- E-Mail : khaemi90@naver.com

길 중 진(Kil, Jong Jin)

[정회원]



- 2008년 2월 : 부산대학교 의학과(치의학사)
- 2017년 2월 : 부산대학교 의학과 (치의학석사)
- 현재 : 원우치과 원장
- 관심분야 : 치의학, 구강해부학

- E-Mail : kiljj82@naver.com



박 봉 수(Park, Bong Soo) [정회원]



- 1987년 2월 : 부산대학교 치의학과 (치의학석사)
- 1990년 8월 : 부산대학교 치의학과 (치의학박사)
- 1994년 3월 ~ 현재 : 부산대학교 치의학전문대학원 교수

· 관심분야 : 해부학, 조직학, 치아형태학, 골생물학  
· E-Mail : parkbs@pusan.ac.kr

강 현 경(Kang, Hyun Kyung) [정회원]



- 2004년 2월 : 고신대학교 보건관리학과 (보건학석사)
- 2008년 2월 : 고신대학교 대학원 의학과 (의학박사)
- 2013년 2월 : 동아대학교 대학원 산업경영공학과 (공학박사수료)

· 2005년 3월 ~ 2010년 2월 : 동주대학교 치위생과 조교수  
· 2010년 2월 ~ 현재 : 신라대학교 치위생학과 부교수  
· 관심분야 : 임상치위생학, 치주학, 예방치학, 치면세마  
· E-Mail : icando@silla.ac.kr

김 인 령(Kim, In Ryoung) [정회원]



- 2002년 8월 : 부산대학교 생물학과 (생물학석사)
- 2008년 8월 : 부산대학교 생물학과 (생물학박사)
- 2004년 3월 ~ 2017년 2월 : 부산대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실 조교

· 2017년 3월 ~ 현재 : 부산대학교 치의학전문대학원 조교수  
· 관심분야 : 세포생물학, 구강조직학, 치아형태학  
· E-Mail : biowool@pusan.ac.kr