ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2023** Vol. 33. No. 6. 498~505 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2023.33.6.498

Anti-tumor Effect of a Combination of Hongyoung Ethanol Extract and Cisplatin in YD-10B Oral Cancer Cells

Eun-Jung Kim[1]*, Sung-Hee Hwang[2] and Sangwook Park[1]

[1]*Department of Biomedical Laboratory Science, Sangji University, Wonju 220-702, Korea*
[2]*Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 26339, Korea*

Received March 16, 2023 /Revised April 25, 2023 /Accepted May 3, 2023

Solanum tuberosum Linnaeus cv Hongyoung, which represents red potato, was developed in Korea. Hongyoung is known to have anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-viral, and anti-tumor properties, but no research has been conducted on the growth inhibition and apoptosis effects of hongyoung in YD-10B oral cancer cells. In this study, the combined treatment of hongyoung ethanol extract (HEE) and cisplatin were examined to determine its ability to inhibit cancer cell growth, induce apoptosis, and inhibit matrix metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9 cancer metastasis. The cell viability was investigated using a 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H- tetrazolium monosodium salt (MTS) assay, and the ability to induce apoptosis was analyzed using an FACS analyzer. The mRNA expression and protein activity of MMP-2 and MMP-9 were measured via RT-PCR and zymography. The YD-10B oral cancer cells showed an increase in growth inhibition as the concentration of HEE increased. The combination of 200 μM cisplatin and 500 μg/ml HEE reduced the growth of the YD-10B oral cancer cells by more than 50% compared to cisplatin alone. When phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-treated YD-10B oral cancer cells were co-treated with 200 μM cisplatin and 500 μg/ml HEE, both the mRNA expression and protein activity of the MMP-2 and MMP-9 decreased. In addition, the percentage of the sub-G1 phase, which indicates apoptosis ability, more than doubled when treated in combination with 200 μM cisplatin and 500 μg/ml HEE than when cisplatin alone was used. The results of this study therefore suggest the possibility of using a combination of HEE and cisplatin in the development of effective drugs to treat oral cancer.

Key words : Anti-tumor effect, cisplatin, combination, hongyoung, YD-10B oral cancer cells

서 론

암은 다양한 원인의 복잡한 상호 연관성을 통한 다단계의 발생 과정을 거치며, 지속적으로 불균형적인 세포 분화, 세포사멸 및 증식 과정의 이상에 의해 비정상적인 과잉 성장에 의해 유발되는 질병이다[17]. 구강암은 다른 암과는 달리 조기발견과 치료가 쉽고 효과를 육안으로 관찰할 수 있어 암 예방 및 치료효과를 관찰하기 위한 가장 좋은 부위라고 할 수 있다[1, 34]. 최근에는 부작용이 심한 기존 항암제를 대체할 수 있는 연구 분야에 관한 관심이 증가하고 있으며 이로 인해 식용할 수 있는 천연물 추출물을 이용하여 병용 투여함으로써 항암 효과를 높이는 것에 관한 관심이 높아지고 있다[3, 12, 18, 35-37].

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatium (II))은 구강암 및 다양한 고형암 치료에 있어효과적인 화학 항암제로 단독 또는 다른 약물과 병용하여 이용하고 있다[7, 8, 10, 11, 19, 20, 26, 38]. 이는 DNA 이중가닥 내 퓨린 염기와 공유결합하여 DNA 손상을 일으켜 결국에는 DNA 복제를 억제하고, 세포 주기 정지 또는 세포자멸사를 유도하여 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[7, 25]. 그러나 cisplatin은 높은 항암 작용에도 불구하고 여러 장기에서 약물 내성 및 독성을 유발하기 때문에 치료에 어려움을 나타내고 있다. 최근 연구에 따르면 cisplatin의 약물 내성은 Nrf2 신호전달경로, epithelial-mesenchymal transition (EMT) 과정 및 자가포식(autophagy) 등이 관련되어 있으며[5, 31, 39], cisplatin의 생체 축적으로 인한 장기 독성은 세뇨관 손상으로 인한 신장기능 감소, 산화 스트레스로 인한 간 손상, 활성산소종 (ROS)의 과잉 생산으로 인한 신경독성 및 달팽이관에서 ROS 과잉 생산으로 인한 이독성 등이 유발된다고 보고되고 있다[9, 24, 27, 33].

감자 (*Solanum tuberosum* Linnaeus)는 가지과에 속하는

***Corresponding author**
Tel : +82-33-738-7683, Fax : +82-33-738-7681
E-mail : jung0724@sangji.ac.kr
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.

여러해살이 식물로 세계에서 네 번째로 많이 생산되는 구황작물의 하나이며 원산지는 페루, 칠레와 볼리비아등 남미 안데스 지역으로 알려져 있다[4, 23]. 현재 세계적으로 널리 재배되고 있는 감자는 괴경색이 백색이나 연황색을 띠고 있지만, 최근 들어서는 자주색, 적색등의 유색 감자들의 재배가 늘어가고 있으며[2, 14, 29], 국내에서도 붉은색을 나타내는 유색 감자인 홍영이 개발되어 다양한 연구들이 진행되어 오고 있다[13, 16, 22, 30]. 홍영이 적색을 띠는 이유는 폴리페놀의 일종인 안토시아닌(anthocyanin) 성분 때문이며, 항산화 및 항염증의 성질을 나타내고 있는 것으로 잘 알려져 있다. 또한, 항바이러스 효과와 함께 항암 활성 효과도 높은 것으로 알려져 있다[6, 15, 28, 32]. 하지만 아직 YD-10B 구강암세포에서의 홍영에 의한 성장억제 및 세포사멸 효과 연구는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 YD-10B 구강암세포를 사용하여 먼저 홍영에 의한 암세포 성장억제능력을 조사하고 다음으로는 다양한 고형암 치료를 위해 많이 사용되고 있는 항암제인 cisplatin과 홍영을 부작용을 줄일 수 있는 저농도로 병용 투여하여 암세포 증식억제, 암전이 억제 및 세포사멸유도 효과를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

홍영 에탄올 추출물 조제

본 실험에서 사용한 홍영은 농촌진흥청에서 통상실시권을 실시하는 왕산종묘(강릉, 한국)에서 구입하였다. 구입한 홍영은 껍질을 제거하고, 괴경을 3 mm 수준으로 자른 후, 시료 100 g에 80% 에탄올 1,000 ml을 첨가하여 24시간 동안 상온 추출하였다. 잔류물은 동일한 방법으로 2회 반복해 추출하였으며, 추출된 용액은 모두 합하여 여과하였다. 여과된 용액은 60℃ rotary vacuum evaporator (EYELA N-1300, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후, 동결건조기 (EYELA FDU-1200, Tokyo, Japan)로 동결건조하였다. 동결건조한 홍영 에탄올 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 100 mg/ml 농도로 준비하여 사용하였다.

세포 및 시약

YD-10B구강암세포주는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포는 RPMI-1640 (Gibco-BRL Life technologies Inc., Grand Island, NY, USA)배지에 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL), 1% penicillin/strepto

mycin(Gibco-BRL)을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하였다. Cisplatin (Sigma-Aldrich)은 DMSO로 50 mM 농도로 준비하여 사용하였다. 그리고 특별한 언급이 없는 시약은 모두Sigma-Aldrich사의 최고 순도 등급 제품을 사용하였다.

세포 생존율 측정

세포 생존율을 조사하기 위해, cell counting kit-8 (CCK-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하여 측정하였다. YD-10B 구강암세포를 96-well plate에 well당 2×10^4개로 seeding하고 12시간 동안 배양한 후, 홍영 에탄올 추출물과 cisplatin을 단독 또는 병용 처리하였다. 그리고 추가로 37℃, 5 % CO_2 조건의 배양기에서 24, 48 그리고 72시간 동안 배양하였다. 그 이후 CCK-8 용액을 세포 배양액에 10 μl/well을 첨가하고 1시간 동안 37℃ 배양기에서 반응하여 microplate reader (Molecular Devices, Sunnydale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

세포로부터 TRIzol 시약(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 1 μg의 RNA를 가지고 ReverTra ACE PCR RT master mix kit (TOYOBO Co., Osaka, Japan)을 이용하여 PCR를 수행하였다. 본 실험에서는 MMP-2 , MMP-9 및 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers (Table 1)을 사용하였고, housekeeping 유전자인 GAPDH 유전자를 internal control로 사용하였다. 증폭된 PCR 생성물은 0.5 μg/ml ethidium bromide (Sigma-Aldrich)가 포함된 1.5% agarose (Sigma-Aldrich) gel에 전기영동하여 UV light 상에서 확인하였다.

Table 1. Primer sets for RT-PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (℃)	PCR product size (bp)
MMP-2	F: GCGACAAGAAGTATCGCTTC R: TGCCAAGGTCAATGTCAGGA	58	390
MMP-9	F: CCATTTCGACGATGACGAGTT R: CTTGTCGCTGTCAAAGTTCGAG	58	530
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGT R: GAAGATGGTGATGGGATTTC	58	226

Gelatin Zymography

홍영 에탄올 추출물과 cisplatin을 단독 또는 병용 처리한 YD-10B (5×10^5) 구강암세포를 24시간 동안 배양한 후, 상층액을 모아 centriprep YM-10 (Millipore, Billerica, MA, USA)을 사용하여 농축하였다. 20 μg 농도의 단백질은 non-reducing sample buffer (0.5 M Tris-Cl pH 6.8, 5% SDS, 20% glycerol, 1% bromphenol blue)와 함께 혼합하여 0.1% gelatin이 포함된 10% SDS-PAGE에서 전기영동하였다. 전기영동 후, washing buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM $CaCl_2$, 2.5% triton X-100, 1.0 uM $ZnCl_2$)로 SDS을 제거하고 incubation buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl, 0.02% NaN_3)로 37℃에서 18시간 동안 반응하였다. Gel은 coomassie brilliant blue (7% glacial acetic acid, 40% methanol, 0.25% coomassie blue)로 1시간 동안 염색한 후, destaining solution (7% glacial acetic acid, 40% methanol)으로 탈색하여 white band을 확인하였다.

세포주기 측정

Sub-G1, G1, S 및 G2/M 단계의 세포수를 측정하기 위해, FACS 분석기를 사용하여 세포주기를 분석하였다. YD-10B (5×10^5) 구강암세포를 500 μg/ml 농도의 홍영 에탄올 추출물과 200 μM cisplatin을 단독 또는 병용처리하여 48시간 동안 배양하였다. 세포를 trypsin 처리하고 PBS로 세척 한 후, 70% 에탄올을 사용하여 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고 100 μg/ml RNase를 첨가하여 30분 동안 반응한 후, 50 μg/ml Propidium Iodide로 염색하여 CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Life Sciences, CA, USA)를 이용하여 세포주기를 확인하였다.

Statistical Analysis

세포 생존율 효과, RT-PCR, Gelatinase 활성 그리고 세포주기 분석은 Student's *t*-test를 실시하였다. 실험결과는 3회 반복 실험을 통하여 mean ± SD로 나타내었으며, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 유의한 결과를 얻었다.

결과 및 고찰

YD-10B 구강암세포에서 홍영 에탄올 추출물 단독 처리에 의한 생존율 분석

YD-10B 구강암세포에서 홍영 에탄올 추출물을 0, 0.5, 0.75, 1.0 및 1.5 mg/ml의 다양한 농도로 처리하여 24, 48 그리고 72시간 동안 배양한 후, MTS 방법을 이용하여 세포의 생존율을 분석하였다. 대조군과 비교한 결과, 각각 24, 48 그리고 72시간 배양했을 때, 0.5 mg/ml에서는 82.24 %, 77.60% 그리고 86.88%, 0.75 mg/ml에서는 65.87%, 73.30% 그리고 50.46%, 1.5 mg/ml에서는 20.34%, 21.37% 그리고 17.87%의 생존율을 보였다. 이와 같은 결과를 통하여, 홍영 에탄올 추출물은 0.5 mg/ml의 농도까지는 큰 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 그리고 0.75 mg/ml 농도에서는 72시간, 1.0 mg/ml 농도에서는 48, 72시간 그리고 1.5 mg/ml 농도에서는 24, 48 그리고 72시간 처리에서 50% 이상의 성장억제를 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이는 기존에 보고된 유색감자 홍영 추출물이 전립선암(LNCaP), 결장암(SW-620), 신장암(ACHN), 백혈병(MOLT-4F) 세포주에서 보였던 항암 활성과 비슷하게 높은 항암 효과이다[30].

YD-10B 구강암세포에서 홍영 에탄올 추출물과 cisplatin의 병용처리에 의한 생존율 분석

YD-10B 구강암세포에서 250, 500 그리고 1,000 μg/ml의 홍영 에탄올 추출물과 200, 400 μM의 cisplatin을 병용처리하여 48시간 동안 배양한 후, 세포의 생존율을 조사하였다. 대조군과 비교한 결과, 200 μM cisplatin의 병용처리에 의해서는 73.51%, 43.17% 그리고 18.30%, 400 μM cisplatin의 병용처리에 의해서는 39.71%, 18.53% 그리고 18.14%의 생존율을 보였다. 그리고 단독 처리에서 거의 독성을 보이지 않는 500 μg/ml 홍영 에탄올 추출물과 200 μM cisplatin을 병용 처리했을 때는 대조군과 비교하여 50% 이상의 세포 생존율 감소를 관찰하였다(Fig. 2). 이와 같은 결

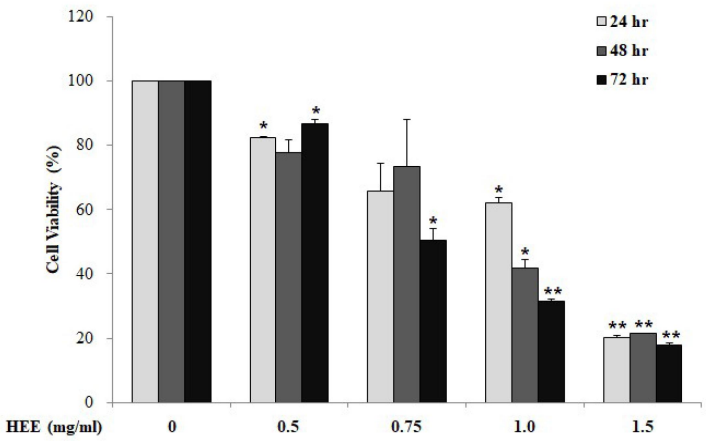

Fig. 1. Cell viability effect of hongyoung ethanol extract (HEE) in YD-10B oral cancer cells. The cells were treated with different concentrations of HEE for 24, 48 and 72 hr. Data represent the mean ± S.D. through three independent experiments (*; $p<0.05$ compared with untreated control, **; $p<0.01$ compared with untreated control).

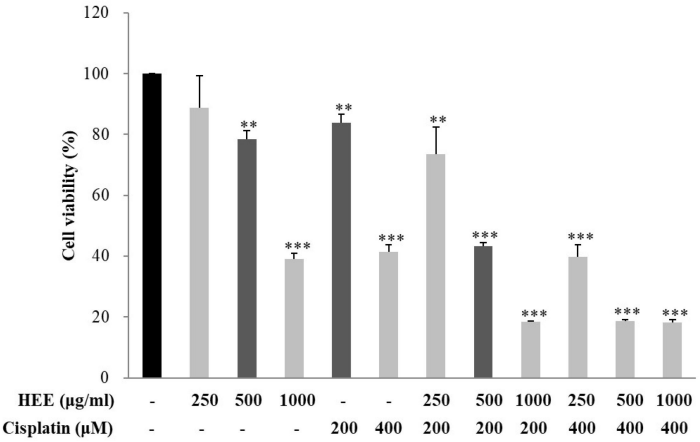

Fig. 2. Cell viability effect of cisplatin combined with hongyoung ethanol extract (HEE) in YD-10B oral cancer cells. The cells were treated at different concentrations of cisplatin combined with HEE for 48 hr. Data represent the mean ± S.D. through three independent experiments (**; p<0.01 compared with untreated control, ***; p<0.001 compared with untreated control).

과를 바탕으로, 병용 처리에 의해서 YD-10B 구강암세포의 성장억제 효과가 보임을 알 수 있었다. 이는 cisplatin과 천연물 추출물의 병용투여가 암세포 증식 억제 효과를 보인다는 기존 보고들을 뒷받침하고 있다[10, 19, 26].

홍영 에탄올 추출물과 cisplatin의 단독 또는 병용처리에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 암전이 억제 효과

YD-10B 세포에서 500 μg/ml 농도의 홍영 에탄올 추출물과 200 μM농도의 cisplatin을 단독 또는 병용처리하여 MMP-2 발현억제 효과는 대조군과 비교한 결과, cisplatin 단독처리에서는 16.9%, 홍영 단독처리에서는 3.1%, cisplatin과 홍영 에탄올 추출물의 병용처리에서는 31.0%를 보였다. 그리고 MMP-9의 발현억제 효과를 대조군과 비교한 결과, cisplatin 단독처리에서는 0.5%, 홍영 에탄올 추출물 단독처리에서는 1.3%, cisplatin과 홍영 에탄올 추출물의 병용처리에서는 74.4%를 나타냈다(Fig. 3). 이러한 결과를 통하여 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해, 병용처리한 세포에서는 MMP-2과 MMP-9 유전자 발현이 유의하게 감소하였으며 무엇보다 MMP-9 유전자 발현에 대한 억제 효과가 매우 높음을 확인할 수 있었다. 또한 YD-10B 구강암세포에서 홍영 에탄올 추출물과 cisplatin의 병용처리에 의한 MMP-2/-9 활성를 통한 암전이 억제에 미치는 효과를 조사하기 위해, 500 μg/ml 농도의 홍영 에탄올 추출물과 200 μM 농도의 cisplatin을 단독 또는 병용처리하여 YD-10B 구강암세포를 혈청 없는 배지에서 배양하였다. 그리고 24시간 동안 배양한 후, 배지의 상층액을 gelatin zymography법을 통해 MMP-2 및 MMP-9 단백질의 활성을 분석하였다. MMP-9 활성 억제 효과는 대조군과 비

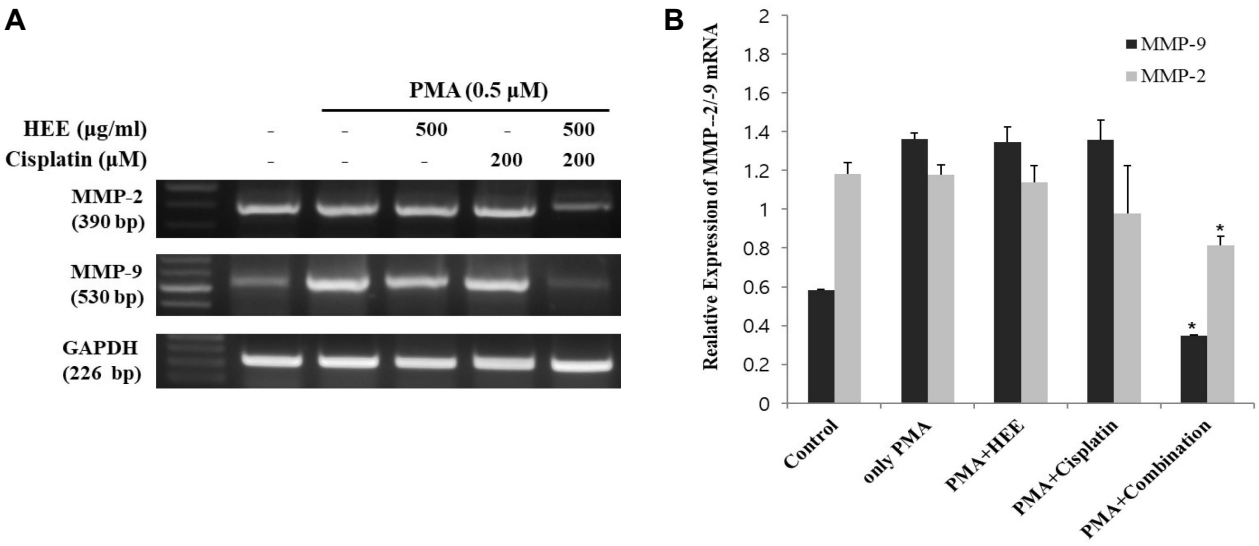

Fig. 3. Effect of cisplatin combined with hongyoung ethanol extract (HEE) on MMP-2/-9 mRNA expression in PMA-treated YD-10B oral cancer cells. The cells were treated with cisplatin or HEE at the indicated concentration 2 hr prior to PMA (0.5 μM) stimulation. (A) After 24 hr, the level of MMP-2/-9 mRNA were determined by RT-PCR. GAPDH was used as an internal control. (B) The relative expression of MMP-2/-9 mRNA were analyzed with band intensity using GelQuant. NET program (*; p<0.05 compared with untreated control).

교한 결과, cisplatin 단독 처리에서는 33.6%, 홍영 에탄올 추출물 단독처리에서는 21.5%, cisplatin과 홍영 에탄올 추출물의 병용처리에서는 51.8%를 보였다. 그리고 MMP-2의 활성억제 효과를 대조군과 비교한 결과, cisplatin 단독처리에서는 10.0%, 홍영 에탄올 추출물 단독 처리에서는 11.9%, cisplatin과 홍영 에탄올 추출물의 병용처리에서는 41.2%를 나타냈다(Fig. 4). 이러한 결과를 통하여 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해, 병용 처리한 세포에서는 MMP-9과 MMP-2 단백질 활성이 유의하게 감소하였으며 무엇보다 MMP-9 단백질 활성에 대한 억제 효과가 높음을 확인할 수 있었다. 이는 기존의 cisplatin과 천연물 추출물의 병용투여에 의한 YD-10B 구강암세포에서 나타낸 MMP-2/-9에 대한 연구와 유사한 결과이다[18].

홍영 에탄올 추출물과 cisplatin의 단독 또는 병용처리에 의한 세포주기에 미치는 영향

YD-10B 구강암세포에서 500 μg/ml의 홍영 에탄올 추출물과 200 μM의 cisplatin을 병용 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 세포 주기분석을 통해 암세포사멸 유도 능력을 조사하였다. 대조군과 비교한 결과, 병용처리에 의해서는 Sub-G1의 비율이 2배 이상 증가하였고, 유의하게 G1기는 증가하고 S기는 감소하였다(Fig. 5). 이와 같은 결과를 통하여, 병용 처리했을 때 암세포사멸 효과가 나타남을 확인할 수 있었으며 이는 기존에 보고된 cisplatin과 *Trichosanthes kirilow* 또는 Berberine 등의 병용투여 시 암세포에서의 Sub-G1 증가 또는 세포주기 정지에 대한 연구 결과들을 뒷받침하고 있다[10, 19].

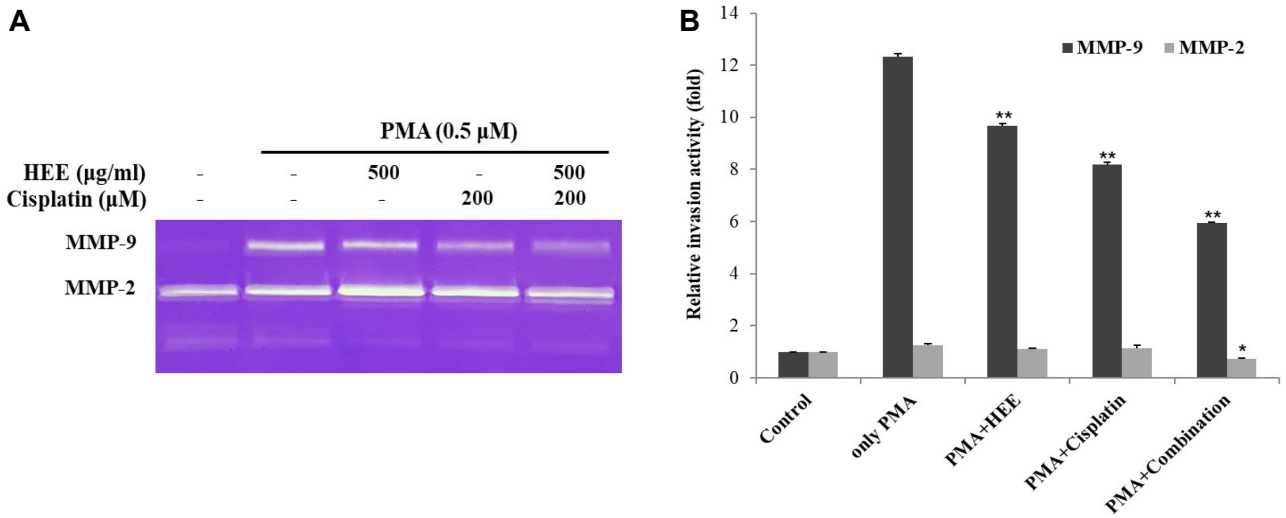

Fig. 4. Effect of cisplatin combined with hongyoung ethanol extract (HEE) on the activity of MMP-2/-9 in PMA-treated YD-10B oral cancer cells. The cells were treated with cisplatin or HEE at the indicated concentration 2 hr prior to PMA (0.5 μM) stimulation. (A) After 24 hr, the activity of the MMP-2/-9 protein were determined by gelatin zymography in conditioned media. (B) The relative expression of MMP-2/9 protein were analyzed with band intensity using GelQuant. NET program (*; p<0.05 compared with untreated control, **; p<0.01 compared with untreated control).

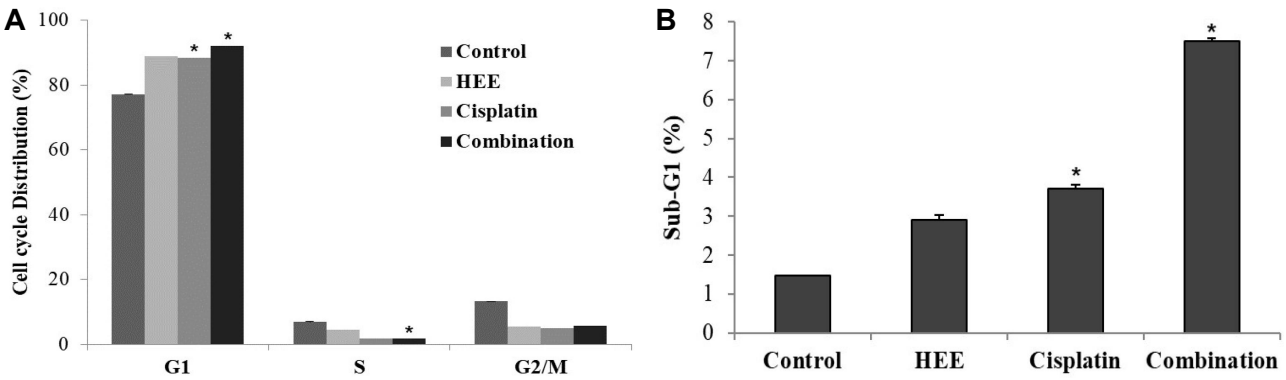

Fig. 5. Apoptosis-inducing effect by cisplatin combined with hongyoung ethanol extract (HEE) in YD-10B oral cancer cells. The cells were treated with 200 μM cisplatin or 500 μg/ml HEE for 48 hr. (A) The cell cycle distribution was measured by a CytoFLEX Flow cytometer. (B) The percentages of sub-G1 phase (apoptotic cells) were plotted. (*; p<0.05 compared with untreated control).

본 연구는 홍영 에탄올 추출물과 cisplatin의 YD-10B 구강암 세포에서의 단독 및 병용처리를 통한 암세포 성장억제, 세포사멸 및 암전이 억제 능력을 확인하였다. 홍영 에탄올 추출물과 cisplatin의 병용처리는 50% 이상의 높은 암세포 성장억제 효과를 나타냈으며, MMP-2 및 MMP-9의 유전자 발현 및 단백질 활성 감소를 통한 높은 암전이 억제 활성을 확인하였다. 또한, 홍영 에탄올 추출물과 cisplatin의 병용처리로 G1기는 증가하고 S기는 감소하였으며, 세포사멸 능력을 나타내는 Sub-G1기의 비율은 2배 이상 증가함을 관찰하였다. 종합적으로, 이와 같은 연구결과는 YD-10B 구강암세포에서 cisplatin과 홍영 에탄올 추출물의 병용요법이 약물내성과 부작용을 줄일 수 있는 저용량에서의 cisplatin의 항암 효과를 확인하였으며 향후 이와 같은 병용 처리에 대한 추가적인 효능 및 기전 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 상지대학교 교내 연구비 지원으로 수행하였습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Abati, S., Bramati, C., Bondi, S., Lissoni, A. and Trimarchi, M. 2020. Oral cancer and prevention: a narrative review on the relevane of early diagnosis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **17**, 1-14.
2. Brown, C. R., Wrolstad, R., Durst, R., Yang, C. P. and Clevidence, B. 2003. Breeding studies in potatoes containing high concentrations of anthocyanins. *Amer. J. Potato Res.* **80**, 241-250.
3. Chen, Y. H., Hao, L. J., Hung, C.-p., Chen, J. W., Leu, S. F. and Huang, B. M. 2013. Apoptotic effect of cisplatin and cordycepin on OC3 human oral cancer cells. *J. Chin. Med.* **20,** 624-632.
4. Cho, H. M., Park, Y. E., Cho, J. H. and Kim, S. Y. 2003. Historical review of land race potatoes in korea. *J. Kor. Soc. Hort. Scr.* **44**, 838-845.
5. Cho, J. M., Manandhar. S., Lee, H. R., Park, H. M. and Kwak, M. K. 2008. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytoxicity mediated by anticancer cisplatin. *Cancer Lett.* **260**, 96-108.
6. Choung, M. G. and Lim, J. D. 2012. Antioxidant, anticancer and immune activation of anthocyanin fraction from rubus coreanus miquel fruits (Bokbunja). *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **20**, 259-269.
7. Dasari, S., Njiki, S., Mbemi, A., Yedjou, S. G. and Tchounwou, P. B. 2022. Pharmacological effects of cisplatin combination with natural products in cancer chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1-25.
8. Farghadani, R. and Naidu, R. 2022. Curcumin as an enhancer of therapeutic efficiency of chemotherapy drugs in breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1-19.
9. Febles, N. K., Bauer, M. A., Ding, B., Zhu, X., Gallant, N. D. and Frisina, R. D. 2022. A combinatorial approach to protect sensory tissue against cisplatin-induced ototoxicity. *Hear. Res.* **415**, 1-11.
10. Gao, X., Zhang, C., Wang, Y., Zhang, P., Zhang, J. and Hong, T. 2021. Berberine and cisplatin exhibits synergistic anticancer effects on osteosarcoma MG-63 cells by inhibiting the MAPK pahtway. *Molecules* **26,** 1-14.
11. Ghavami, G., Muhammadnejad, S., Amanpour, A. and Sardari, S. 2020. Bioactivity screening of mulberry leaf and two flavonoids in combination with cisplatin on human gastric adenocarcinoma cells. *Iran. J. Pharm. Res.* **19**, 371-382.
12. Huang, C. and Yu, Y. 2019. Synergistic cytotoxicity of β-elemene and cisplatin in gingival squamous cell carcinoma by inhibition of STAT3 signaling pathway. *Med. Sci. Monit*. **23**, 1507-1513.
13. Jang, H. L. and Yoon, K. Y. 2012. Biological activites and total phenolic content of ethanol extracts of white and flesh colored *solanum tuberosum* L. potatoes. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41,** 1035-1040.
14. Jeong, J. C., Kim, S. J., Hong, S. Y., Nam, J. H., Sohn, H. B., Kim, Y. H. and Mekapogu, M. 2015. Growing environment influence the anthocyanin content in purple- and red-fleshed potatoes during tuber development. *Kor. J. Breed. Sci.* **41**, 51-55.
15. Kang, B. T., Kwon, D. H., Choi, W. J., Kim, S. H. and Park, D. C. 2008. Antioxidant and antiviral activities of polyphenolics in plum wine. *Kor. J. Food Preserv.* **15**, 891-896.
16. Kang, S. C. and Choung, M. G. 2008. Comparative study on biological activites of colored potatoes, honyoung and jayoung cultivar. *Kor. J. Crop Sci.* **53**, 233-238.
17. Kashyap, A. K. and Dubey, A. K. 2022. Molecular mechanisms in cancer development. *Understanding Cancer* 79-90.
18. Kim, E. J. 2020. Anticancer effects of cisplatin in combination with *paeonia japonica* in YD-10B cells. *Kor. Cont. Associ.* **20**, 124-130.
19. Ku, J. M., Hong, S. H., Kim, H. I., Kim, M. J., Kim, S. K., Kim, M., Choi, S. Y., Park, J., Kim, H. K., Kim, H. J. and Seo, H. S. 2020. Synergistic anticancer effect of combined use of *Trichosanthe kirilowii* with cisplatin and pemetrexed enhances apoptosis of H1299 non-small cell lung cancer cells via modulation of ErbB3. *Phytomedicine* **66**, 1-17.
20. Lee, C., Ryu, H. W., Kim, S., Kim, M., Oh, S. R., Ahn, K. S. and Park, J. 2020. Verminoside from *Pseudolysimachion rotundumvar. subintegrum* sensitizes cisplatin-resistant cancer cells and suppresses metastatic growth of

human breast cancer. *Sci. Rep.* **10**, 1-12.
21. Lee, J. E., Choi, J. Y., Han, C. W., Chol, J. Y., Park, S. H. and Kim, S. Y. 2017. A review on experimental research about anticancer drug combined treatment with herbal medicine for killing or inhibiting proliferation of cancer cells in Korea. *J. Cancer* **25**, 391-412.
22. Lee, S. H., Oh, S. H., Hwang, I. G., Kim, H. Y., Woo, K. S., Woo, S. H., Kim, H. S., Lee, J. and Jeong, H. S. 2016. Antioxidant contents and antioxidant activities of white and colored potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Prev. Nutr. Food Sci.* **21**, 110-116.
23. Lee, Y. J., Jeong, J. C., Yoon, Y. H., Hong, S. Y., Kim, S. J., Jin, Y. I., Nam, J. H. and Kwon, O. K. 2012. Evaluation of quality characteristics and definition of utilization category in korean potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *Kor. J. Crop Sci.* **57**, 271-279.
24. Liao, Y., Lu, X., Lu, C., Li, G., Jin, Y. and Tang, H. 2008. Selection of agents for prevention of cisplatin-induced hepatotoxicity. *Pharmacol. Res.* **57**, 125-131.
25. Lippert, B. 2006. Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug; *Wiley-VCH: New York , NY, USA*.
26. Mollaei, H., Hoshyar, R., Abedini, M. R. and Safarlizadeh, R. 2019. Crocin enhancement cisplatin-induced chemosensitivity in human cervical cancer cell line. *Int. J. Cancer Manag.* **12,** 1-6.
27. Nematbakhsh, M., Ashrafi, F., Pezeshki, Z., Fatahi, Z., Kianpoor, F., Sanei, M. H. and Talebi, A. 2012. A histopathological study of nephrotoxicity, hepatoxicity or testicular toxicity. *J. Nephropathol*. **1,** 190-193.
28. Park, J. S., Chon, S. U., Moon, E. W. and Jeong, C. Y. 2016. Effects of polyphenol and anthocyanin contents of punica granatum fruit parts on their antioxidant and anticancer activities. *Kor. J. Food Preserv.* **23**, 553-559.
29. Park, Y. E., Cho, J. H., Cho, H. M., Yi, J. Y., Seo, H. W. and Chung, M. K. 2009. A new potato cultivar 'Hongyoung', with red skin and flesh color, and high concentrations of anthocyanins. *Kor. J. Breed. Sci.* **41**, 502-506.
30. Park, Y. E., Jeong, J. C., Cho, H. M., Hwang, Y. S., Lee, H. J., Choi, S. S. N., Lee, S. J., Park, E. S., Ko, E. A., Kim, N. S., Lim, J. D. and Choung, M. G. 2008. Antimutagenic effect and cytotocicity to human cancer cell lines of colored potato extracts. *Kor. J. Crop Sci.* **53**, 75-84.
31. Ranasinghe, R. and Eri, R. 2018. Modulation of the CCR6-CCL20 axis: a potential therapeutic target in inflammation and cancer. *Medicina* **54**, 1-12.
32. Salehi, B., Rad, J. S., Cappellini, F., Reiner, Z., Zorzan, D., Imran, M., Sener, B., Kilic, M., Shazly, M. E., Fahmy, N. M., Sayed, E. A., Martorell, M., Tonelli, C., Petroni, K., Docea, A. O., Calina, D. and Maroyi, A. 2020. The therapeutic potential of anthocyanins: current approaches based on their molecular mechanism of action. *Front. Pharmacol.* **11**, 1-10.
33. Salman, M., Naseem, I., Hassan, I., Khan, A. A. and Alhazza, I. M. 2015. Riboflavin arrests cisplatin-induced neurotoxicity by ameliorating cellular damage in dorsal root ganglion cells. *Bio. Med. Res. Int.* **2015**, 603543.
34. Son, S. H. and Kim, E. J. 2017. Autophagy and oral cancer. *J. Life Sci.* **27**, 958-964.
35. Toshiki, X., Akinobu, O., Takayuki, K., Hiroyuki, F., Akifumi, O., Yukinobu, Y., Yoichi, H., Yoshitaka, H. and Yoshiaki, K. 2014. Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment enhances apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cell Oncol.* **37**, 119-129.
36. Xin, L., Shu, G., Xiong, X. K., Peng, B. Y., Huang, J. M., Cehn, M. F. and Wang, F. Y. 2019. Combination of quercetin and cisplatin enhances apoptosis in OSCC cells by downregulating xIAP through the NF-kB pathway. *J. Cancer* **10**, 4509-4521.
37. Xue, D., Pan, S. T., Zhou, X., Ye, F., Zhou, Q., Shi, F., He, F., Yu, H. and Qiu, J. 2020. Plumbagin enhances the anticancer efficacy of cisplatin by increasing intracellular ROS in human tongue squamous cell carcinoma. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **21,** 1-21.
38. Zhai, Q. L., Hu, X. D., Xiao, J. and Yu, D. Q. 2018. Astragalus polysaccharide may increase sensitivity of cervical cancer HeLa cells to cisplatin by regulating cell autophagy. *China J. Chin. Mater Medica.* **43**, 805-812.
39. Zhang, X., Qi, Z., Yin, H. and Yang, G. 2019. Interaction between p53 and Ras signaling controls cisplatin resistance via HDAC4- and HIF-1a-mediatd regulation of apoptosis and autophagy. *Theranostics* **9**, 1096-1114.

초록 : YD-10B 구강암세포에서 홍영 에탄올 추출물과 시스플라틴 병용에 의한 항암 효과

김은정[1]* · 황성희[2] · 박상욱[1]
([1]상지대학교 임상병리학과, [2]상지대학교 제약공학과)

붉은색을 나타내는 홍영감자(*Solanum tuberosum* Linnaeus)는 국내에서 개발되었다. 이는 항산화, 항염증, 항바이러스 및 항암효과를 갖고 있는것으로 알려져 있으나, 아직까지는 YD-10B 구강암세포에서의 홍영에 의한 성장억제 및 세포사멸 효과 연구는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 시스플라틴과 홍영 에탄올 추출물의 병용처리에 의한 암세포 성장억제, 세포사멸 유도 및 MMP-2/-9 암전이 억제 능력을 확인하였다. 세포생존율 측정은 MTS법에 의해 조사하였고, 세포사멸 유도 능력은 FACS 분석기를 이용하여 분석하였고, MMP-2/-9의 유전자 발현과 단백질 활성은 RT-PCR과 Zymography법을 통하여 측정하였다. 결과로는, 홍영 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 구강암 세포 성장억제 효과가 증가함을 보였다. 시스플라틴 단독처리보다 200 μM의 시스플라틴과 500 μg/ml의 홍영 에탄올 추출물 병용처리로 YD-10B 구강암세포의 성장이 50% 이상 감소하였다. PMA 처리된 YD-10B 구강암 세포에서 500 μg/ml의 홍영 에탄올 추출물과 200 μM의 시스플라틴을 병용처리 하였을 때, MMP-2/-9의 mRNA 발현과 단백질 활성들이 모두 감소하였다. 또한, 시스플라틴 단독처리보다 200 μM의 시스플라틴과 500 μg/ml의 홍영 에탄올 추출물 병용처리로 세포사멸 능력을 나타내는 Sub-G1의 세포비율이2배 이상 증가하였다. 따라서, 본 연구결과는 시스플라틴과 홍영 에탄올 추출물의 병용처리가 구강암의 효과적인 항암제로서의 가능성을 시사하고 있다.