

## 소목 추출물의 구강암 및 골육종 세포주에 대한 항암작용에 관한 연구

이종수<sup>1</sup> · 김정희<sup>2</sup> · 김여갑<sup>1</sup>경희대학교 치과대학 치의학과 구강악안면외과학교실, <sup>2</sup>구강생화학교실 및 구강생물학연구소**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:583-590)

## ANTICANCER EFFECTS OF CAESALPINIA SAPPAN EXTRACTS ON ORAL CARCINOMA AND OSTEOSARCOMA CELLS

Jong-Su Lee<sup>1</sup>, Jeong Hee Kim<sup>2</sup>, Yeo Gab Kim<sup>1</sup><sup>1</sup>Dept. of Oral Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Kyung Hee University<sup>2</sup>Dept. of Oral Biochemistry, School of Dentistry and Institute of Oral Biology, KyungHee University

Anticancer effect of methanol extract of *Caesalpinia sappan L.* on oral carcinoma (KB) and osteosarcoma (HOS) cells were investigated in this study. In order to elucidate the anticancer mechanism of *Caesalpinia sappan L.*, we analyzed telomerase inhibitory effect of the methanol extract of *Caesalpinia sappan L.* In addition, we prepared 5 fraction samples according to its polarity differences and analyzed anticancer effects on oral carcinoma and osteosarcoma cells. Following results are obtained in this study.

1. 50% cell proliferation inhibitory value (IC<sub>50</sub>) of the methanol extract of *Caesalpinia sappan L.* against oral carcinoma (KB) cells and osteosarcoma (HOS) cells were 9.0  $\mu\text{g/ml}$  and 10.9  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.
2. The methanol extract of *Caesalpinia sappan L.* showed inhibitory effect of telomerase which is required for cancer cell immortality. Therefore, it seems that the anticancer effect of methanol extract of *Caesalpinia sappan* is at least partially due to telomerase inhibitory effect.
3. Five fraction samples were prepared according to its polarity and 88.7% of ingredient of total methanol extract was transferred to ethylacetate fraction. Thin layer chromatography analysis showed that dichloromethane fraction contained ingredient with relatively high polarity and ethylacetate fraction contained similar ingredient found in total methanol extract.
4. Anticancer effect was observed in n-hexane, dichloromethane, and ethylacetate fractions. The highest anticancer effect was found in dichloromethane fraction which had IC<sub>50</sub> value of 4.4  $\mu\text{g/ml}$  and > 4.0  $\mu\text{g/ml}$  against oral carcinoma (KB) cells and osteosarcoma (HOS) cells, respectively.

**Key words:** *Caesalpinia sappan* extract, Oral carcinoma, Osteosarcoma, Telomerase

## I. 서 론

구강암은 타 부위에 발생하는 암에 비하여 악성도가 높아서 치명률이 높을 뿐만 아니라 발생 부위에 따라서 현저한 기능의 감소와 심미적 손상으로 인해 심리적인 충격이 크고, 발생 부위가 인체의 중요장기와 인접하고 있어 보다 적극적이고 효과적인 치료법이 요구된다. 구강암은 치주, 협점막, 입술, 혀, 타액선, 및 인두의 전 부위 등의 구강 내와 인두에서 발생하는 암을 통칭하며, 구강암의 90% 이상이 상피세포암이다<sup>1)</sup>. 발생

기전은 신체의 다른 부위에서 발생하는 상피세포암과 유사하다고 생각되나 정확한 기전은 알려져 있지 않다.

구강암은 임상적으로 국소적 침윤 및 경부 임파절 전이를 주로 하며, 원격전이가 비교적 적어 수술이나 방사선 치료 같은 국소요법이 치료의 근간을 이루어 왔다. 항암제는 암세포의 각종 대사경로중 주로 DNA에 직접 작용하여 DNA의 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나, 핵산 전구체의 합성을 방해하여 세포 분열을 저해함으로써 암세포에 대한 세포독성을 나타내게 된다. 이들 약제는 역형성세포(逆形成細胞: anaplastic cell)에 친화성을 가지고 있으며 종양을 파괴한다<sup>2)</sup>. 최근에는 복합화학요법, 방사선 요법 및 광범위 절제수술요법 등의 병용요법이 연구되고 있다. 특히 1960년대에 이르러 bleomycin과 5-fluorouracil을 이용한 항암화학요법이 시행되었고, 1980년대부터 cisplatin 등의 약제가 구강암을 포함한 두경부 암종에 효과적이라는 보고<sup>3,5)</sup>가 있는 후로 화학요법의 역할이 점차 증가되고 있다. 하지만 이러한 화학요법체는 소화기계 합병증, 신장 독

**김여갑**

서울 동대문구 회기동 1 번지

경희대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

**Yeo Gab Kim**

Dept. of OMFS, School of Dentistry, Kyung Hee University

1 Hoeki-dong Dongdaemun-gu, Seoul, 130-701, Korea

Tel: 82-2-958-9365 Fax: 82-2-966-4572

E-mail: kyukab@khu.ac.kr

성 및 면역력의 저하 등의 심각한 부작용을 초래하여 그 적용 범위에 제한을 받고 있다<sup>6)</sup>. 따라서 기존 약물의 약효를 가지고 있으면서, 부작용이 적어 기존의 약제를 대체할 수 있는 약효성분을 천연물에서부터 검색하여 신약으로 개발하려는 노력이 항암제를 포함한 여러 난치성 질환치료제 분야에서 활발하게 진행되고 있다. 수십 종의 천연약용식물을 대상으로 하여 항암효과를 검색하여 그 결과가 보고된 바 있으며<sup>7,8)</sup> 식물에서 추출된 성분의 항암효과에 대한 보고<sup>9,13)</sup> 및 식물 혼합 추출물에서의 항암활성 등이 보고되고 있다<sup>14,15)</sup>. 1940년대 체계적인 화학요법제로서 nitrogen mustard를 사용하면서 천연물 혹은 그의 부산물을 이용한 항암요법제들이 개발되어 사용되어지고 있다. 그 중 *Taxus brevifolia* L., *Catharanthus roseus* G. Don, *Podophyllum peltatum* L., 과 *Camptotheca acuminata* Decne로부터 추출된 paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), vincristine (Oncovin<sup>®</sup>), podophyllotoxin과 camptothecin 등이 현재 임상적으로 유용한 화학요법제로서 사용되고 있다<sup>16)</sup>. 본 연구에서 사용된 소목(蘇木; *Caesalpinia sappan* L.)은 콩과 (Leguminosae) 식물로서 대만, 중국 등지에서 자생하며, 나무의 심부를 건조하여 약재로 사용한다. 소목의 주성분은 브라질린(brazilin), 사파닌(sappanin) 및 정유(volatile oil) 등이며<sup>17,18)</sup> 동의보감에는 피가 돌게 하고 어혈을 풀어주는 효과가 있다고 알려져 있다. 소목의 추출물을 이용한 많은 생리활성에 대한 연구가 진행되어왔으며, 항경련작용<sup>19)</sup>, 혈관확장작용<sup>20)</sup>, 항보체작용<sup>21)</sup>, 면역강화작용<sup>22)</sup>, 간보호작용<sup>23)</sup>, 및 항염증작용<sup>24)</sup> 등이 보고되었다.

Telomere란 진핵세포의 염색체 말단에 반복되는 염기 서열을 가진 특수 구조로 염색체의 퇴화나 융합, 재배열 등에 의한 상실로부터 보호하여 염색체의 안정성을 유지시켜주며 DNA 복제 완성에 필수적 기능을 수행하는 부위이다<sup>25)</sup>. 인간에 있어 telomere는 5'-(TTAGGG)*n*-3'의 배열을 가지며 telomere의 길이는 telomere를 연장시키거나 감소시키는 세포내 과정들의 균형에 의하여 조절되며<sup>26)</sup> RNA를 포함하는 핵단백질 복합체인 telomerase에 의하여 특이적으로 연장될 수 있다<sup>27,28)</sup>. Telomerase는 암세포의 불멸화에 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<sup>27,29-31)</sup>. 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<sup>32,33)</sup>. 암세포의 불멸화에 telomerase의 활성이 필수적이라면 이를 저해하는 항암제의 개발은 흥미로운 일이며, 최근 telomerase를 targetdmgkmsms 항암제 및 암치료요법의 개발이 많은 관심을 끌고 있다<sup>34,6)</sup>. 특히 telomerase 저해제는 정상세포에 거의 영향을 미치지 않으므로 부작용이 적은 항암제 개발 가능성이 높으리라 생각되어지고 있다. 따라서

구강암에서도 telomerase 활성에 대한 연구와 telomerase 활성저해제 개발을 통한 항암제 개발 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는 소목의 추출물의 구강상피세포암 및 골육종 세포주에 대한 항암효과를 검색하고 그 작용 기전을 규명하고자 telomerase 활성저해효과를 검색하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 약용식물 메탄올 추출물 및 분획의 제조

본 연구에 사용된 소목(蘇木)은 경동시장에서 구입하여 다음과 같이 제조하였다. 먼저 구입한 약용식물을 작게 분쇄한 후 등근 플라스크에 약 100g을 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 거른액을 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 1,000 µg/µl 가 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 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 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.

### 2. 세포배양

본 연구에 사용한 세포주는 KB (human oral epidermoid carcinoma, ATCC CCL-17)과 HOS (human osteogenic sarcoma, ATCC CRL-1543)을 각각 Eagle's MEM with non-essential amino acid 배지 (GibCo, BRL, USA) 또는 Dulbecco's modified eagle's medium (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% CO<sub>2</sub>/95% 공기의 조건하에서 배양하였다.

### 3. 세포독성측정실험

세포독성측정실험은 MTT 분석법을 이용하였다<sup>37)</sup>. 적정 수의 세포를 96 well plate에 접종한 후 배양하고 시료를 가하여 48 시간 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 사용하였

다. MTT를 10  $\mu$ l를 가하고 4시간 동안 배양 후 각 well의 배양액을 제거하고 형성된 formazan 염을 0.04N HCl이 함유된 isopropanol 100  $\mu$ l를 넣고 가볍게 진탕하여 완전히 용해시킨 후, ELISA reader (Model 550, Bio-rad, USA)로 570nm의 파장 (reference: 655 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

결과의 분석은 다음과 같이 하였다. 먼저 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도를 세포의 100% 생존율로 하였다. 세포 배양배지에 여러 농도의 메탄올 추출물시료 및 분획 시료를 가한 후 상기의 세포배양조건에서 48시간 배양 후의 세포의 생존정도를 세포독성측정실험에 기술한 방법으로 측정하였다. 이때 얻어지는 흡광도를 구하여 시료를 처리시의 세포의 생존정도를 대조군의 생존율에 대한 백분율로 구하고 시료의 농도와 세포의 생존율관계를 그래프로 작성하여 50% 세포생존을 나타내는 시료의 농도 (IC<sub>50</sub>)를 얻었다.

4. 박층 크로마토그래피법

시료를 모세관에 묻혀서 박층크로마토그래피판에 점적한 후 건조시켜 전개액 (클로로포름 : 메탄올 = 5:1)으로 포화된 챔버에 넣어 전개시킨다. 전개 후 박층크로마토그래피판을 꺼내어 건조 후 자외선조사기로 조사하여 발광되는 성분확인 및 전개 정도를 확인하고, 박층크로마토그래피판을 발색제인 anis-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 충분히 적신 후 약 1분간 가열하여 발색시켜 가시화하였다.

5. Telomerase 저해활성 측정

Telomerase 저해활성은 Telomeric Repeat Amplification Assay Protocol (TRAP) 기법으로 측정하였다<sup>38)</sup>. 상기의 방법으로 세포를 배양 후 12-well plate 에 구강암 (KB) 또는 골육종 (HOS) 세포를 2.0×10<sup>5</sup> cells/well 의 밀도로 접종하여 배양하고 시료를 처리한 후 일정시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하고, PBS로 세

척하여 CHAPS lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 0.1mM benzamidine, 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5% w/v CHAPS, 10% w/v Glycerol)로 용해시켰다. 이 세포용해액을 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' -AATC-CGTCGAGCAGAGTTGACGACATGGAGAAGATCTGG-3'), CX primer (5' -CCCTTACCCTTAC CCTTACCCTAATGTGGTG-GTGAAGCTGTAGC-3')를 사용하여 20 mM Tris-HCl, 0.15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween 20, 6 mM KCl, 1mM EGTA, 100  $\mu$ g/ml BSA, pH 8.3의 반응 완충액에서 다음과 같이 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 실시하였다. 94°C에서 5분동안 방치한 후, 다시 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 90초의 cycle을 30회 반복한 후, 나머지 DNA extension을 충분히 하기 위하여 72°C에서 5분 동안 방치하였다.

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

III. 결 과

소목의 메탄올 총추출물에서 구강암 (KB) 및 골육종 (HOS) 세포주에 대하여 항암 활성을 측정하였다 (Fig. 1, A and B). 소목추출물을 0, 4, 20, 및 100  $\mu$ g/ml 농도로 세포 배양배지에 첨가한 후 48 hr 동안 세포를 배양한 후의 생존 정도를 측정하여 항암 활성을 측정하였다. 소목의 메탄올 총추출물의 구강암 (KB) 세포에 대한 세포증식정도는는 0, 4, 20, 및 100  $\mu$ g/ml 농도에서

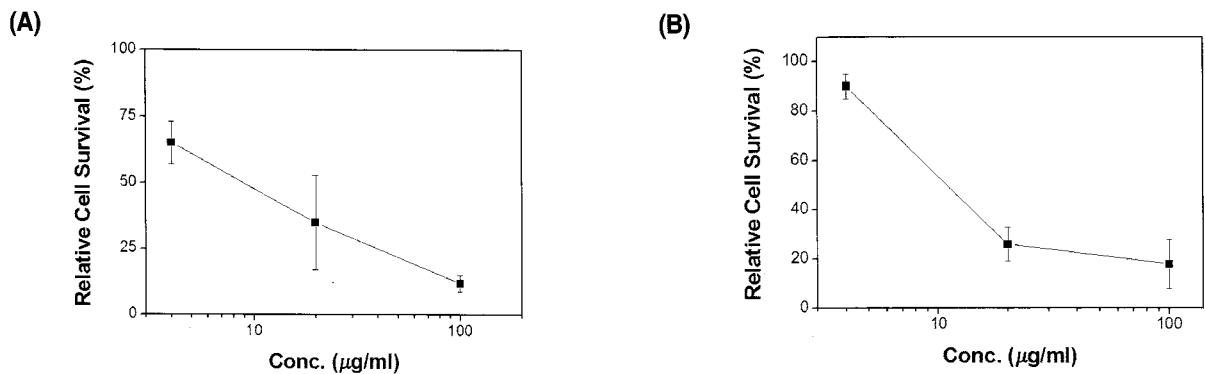


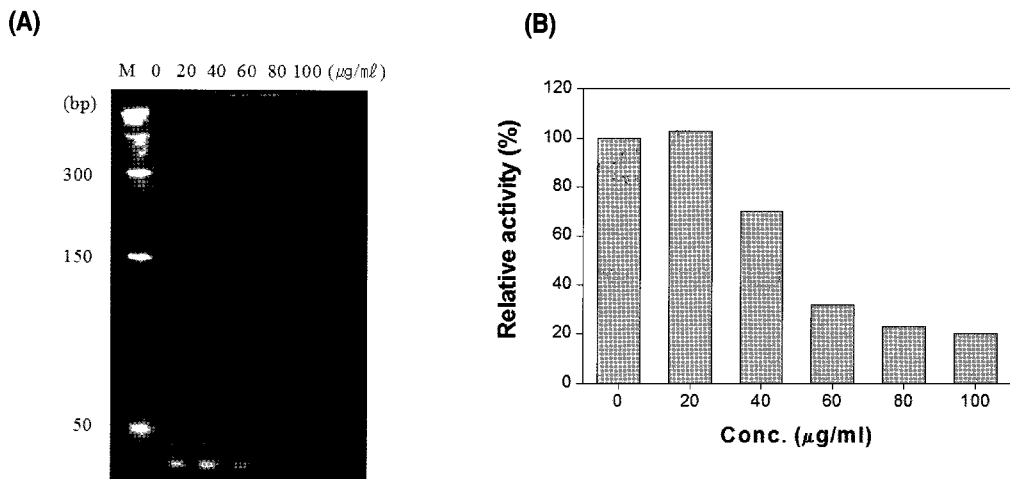
Fig. 1. Anticancer effect of methanol extract of *C. sappan L.* on oral epidermoid carcinoma, KB (A) and osteosarcoma, HOS (B) cells.

각각 100, 90, 26 및 18% 였다.

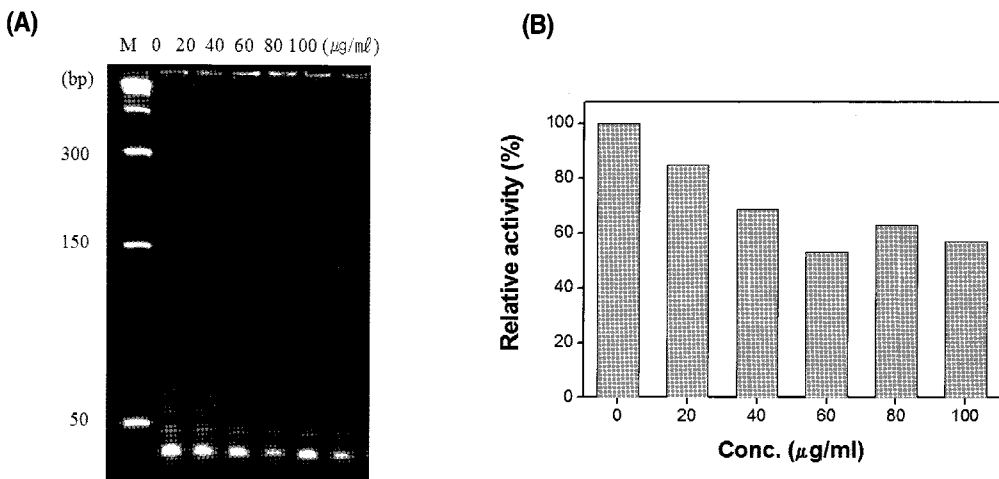
소목의 메탄올 총추출물의 골육종 (HOS) 세포에 대한 세포 증식정도는 각각 100, 65, 35 및 12% 였다. 얻어진 값에서부터 세포의 증식을 50% 억제하는 약물농도 (IC<sub>50</sub> 값)를 구하였다. 소목 추출물의 구강암 세포주(KB)에 대한 IC<sub>50</sub> 값이 9.0 µg/ml 이었으며, 골육종세포주에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 10.9 µg/ml로 소목 추출물은 두 암세포주 모두에 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다.

이러한 소목추출물의 항암작용 기전을 규명하기 위하여 소목추출물의 telomerase 저해 활성을 측정하였다. 먼저 각 암세포주의 telomerase 활성을 측정한 결과 각 세포주에서 모두 telomerase 활성이 검출되었다. 소목 추출물을 구강암 및 골육종세포주의 배양배지에 첨가한 후 24 시간 동안 배양한 후

telomerase 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 2, 3과 같다. 구강암 (KB) 세포주에 대한 소목추출물의 telomerase 활성저해효과는 소목추출물 농도 증가에 의존적으로 나타났다. 소목의 메탄올 총추출물의 구강암 (KB) 세포에 대한 telomerase 활성은 0, 20, 40, 60, 80 및 100 µg/ml 농도에서 각각 100, 103, 70, 32, 23 및 20% 였다. 50% telomerase 활성저해농도는 약 50 µg/ml 이었다. 골육종세포주에 대한 telomerase 저해활성은 농도 의존적이었으나 그 저해정도는 구강암세포주에 비하여 약간 낮게 나타났다. 소목의 메탄올 총추출물의 골육종 (HOS) 세포에 대한 telomerase의 활성은 0, 4, 20, 40, 60, 80 및 100 µg/ml 농도에서 각각 100, 85, 69, 53, 63 및 57% 였다. 50% telomerase 활성저해농도는 100 µg/ml 이상이었다. 따라서 본 결과로 소목 메탄올 총추출물



**Fig. 2.** Effect of methanol extract of *C. sappan L.* on telomerase in oral epidermoid carcinoma (KB) cells. Telomerase Repeat Amplification Protocol Assay (TRAP) was performed to analyze the telomerase activity inhibitory effect of *C. sappan L.* as described in materials and methods. Electrophoresis result of TRAP is shown in A and quantitation result of A is shown in B.



**Fig. 3.** Effect of methanol extract of *C. sappan L.* on telomerase in osteosarcoma (HOS) cells. Telomerase Repeat Amplification Protocol Assay (TRAP) was performed to analyze the telomerase activity inhibitory effect of *C. sappan L.* as described in materials and methods. Electrophoresis result of TRAP is shown in A and quantitation result of A is shown in B.

은 telomerase 저해활성을 통하여 항암효과를 나타내는 것으로 보인다. MTT를 이용한 세포독성측정결과에서 구강암세포주에서 보다 높은 항암활성을 나타낸 결과와 구강암세포주에서

telomerase 저해활성이 높게 나타난 결과는 서로 일치하고 있다. 하지만 50% 세포증식억제농도인 IC<sub>50</sub> 값과 50% telomerase 활성저해농도를 비교하여 볼 때 소목 총추출물의 항암작용은 telomerase 저해활성 뿐만아니라 다른 작용 기전도 함께 작용하는 것으로 생각된다.

소목의 메탄올 추출물의 분획시료를 제조하고 이들 분획시료에 대하여 구강암 및 골육종 세포주를 이용하여 항암활성을 검색하였다. 분획시료는 소목의 메탄올 추출물 10g을 이용하여 용매의 극성도에 따라 n-hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol 및 수층 분획시료로 나누어 제조하였으며, 그 회수율 및 구성비는 Table 1과 같다. 전체적인 회수율은 96.5% 이었으며, n-hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol 및 수층 분획시료의 구성비는 각각 0.6, 1.3, 88.7, 4.4 및 5.0%으로 ethylacetate 분획의 구성비가 가장 높았다. 박층 크로마토그래피법으로 총추출물 구성성분의 분획시료로의 이전을 분석하였다 (Fig. 4).

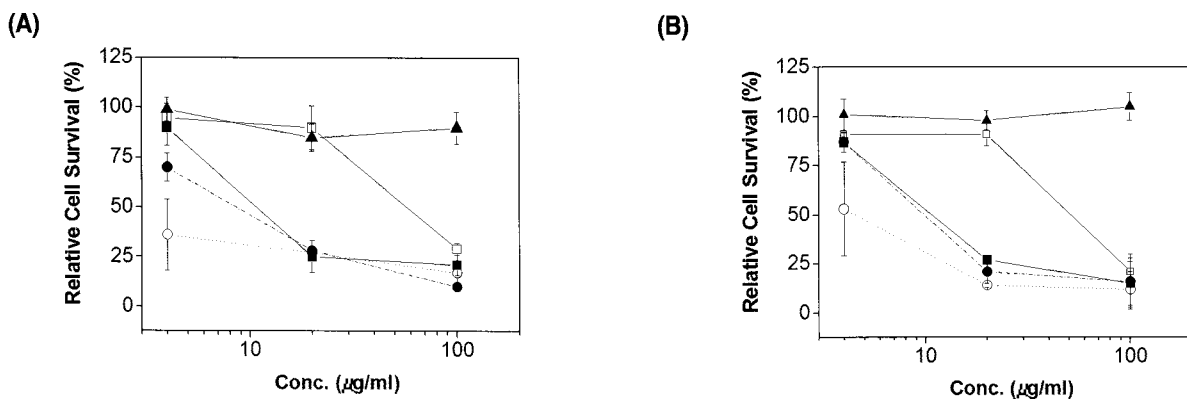
Table 1에서 나타난 결과와 마찬가지로 메탄올 총추출물의 대부분의 성분이 ethylacetate 분획으로 이전되었다. Dichloromethane 분획에서 극성이 높은 성분이 관찰되었으며 butanol 분획에서는 ethylacetate 분획에서와 비슷한 성분이 소량 관찰되었다. 극성이 높은 수층 및 극성이 낮은 n-hexane 분획으로는 구성성분의 전이가 거의 이루어지지 않았다.



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

**Table 1.** Fraction samples prepared from total methanol extract of *Caesalpinia sappan L.*

분획	회수량(mg)	회수율(%)	구성비
Hexane	55.6	0.56	0.6
Dichloromethane	126.8	1.27	1.3
Ethylacetate	8,555.1	85.6	88.7
Butanol	430.0	4.3	4.4
Water	480.0	4.8	5.0
Total	9,647.5	96.5	100



**Fig. 5.** Anticancer effect of various fraction samples of methanol extract of *C. sappan L.* against oral epidermoid carcinoma, KB (A) and osteosarcoma, HOS (B) cells. ●: n-Hexane, ○: dichloromethane, ■: Ethylacetate, □: butanol, ▲: water fractions.

분획시료의 구강암 및 골육종세포주에 대한 항암효과를 측정하였다 (Fig. 5). 상기에서와 같이 각 분획시료를 0, 4, 20, 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 세포배양배지에 첨가한 후 48시간 동안 배양하여 세포의 생존정도를 측정하여 분석하였다. 구강암 (KB) 세포주에 대한 각 분획시료의 세포성장 50% 억제 농도인  $\text{IC}_{50}$  값을 측정된 결과 n-hexane 분획이 8.5  $\mu\text{g/ml}$ , dichloromethane 분획이 4.0  $\mu\text{g/ml}$  이하, ethylacetate 분획이 10.8  $\mu\text{g/ml}$ , butanol 분획이 57.4  $\mu\text{g/ml}$  그리고 수층분획이 100  $\mu\text{g/ml}$  이상이였다. 극성이 높은 구성성분을 포함하는 dichloromethane 분획이 가장 낮은  $\text{IC}_{50}$  값을 나타내어 가장 항암효과가 높게 나타났으며, 가장 높은 구성비를 나타낸 ethylacetate 분획이 그 다음의 항암활성을 나타내었다. 골육종세포주에 대한 각 분획시료의  $\text{IC}_{50}$  값을 측정된 결과 n-hexane 분획이 9.7  $\mu\text{g/ml}$ , dichloromethane 분획이 4.4  $\mu\text{g/ml}$ , ethylacetate 분획이 10.7  $\mu\text{g/ml}$ , butanol 분획이 51.3  $\mu\text{g/ml}$  그리고 수층분획이 100  $\mu\text{g/ml}$  이상이였다. 구강암세포주에서와 유사하게 dichloromethane 분획이 가장 낮은  $\text{IC}_{50}$  값을 나타내어 가장 항암효과가 높게 나타났으며, n-hexane 분획이 그 다음의 효과를 나타내었다.

#### IV. 고 찰

약리학적인 면에서의 천연 추출물의 역할은 두드러지며 그 중에서도 항암 효과는 특히 명백하다. 그러나 이러한 약물의 발견과 개발은 아직도 부족한 실정이며 구조적 복잡성을 지닌 천연추출물을 이용한 약물을 임상적으로 이용하기 위해서는 많은 연구가 뒤따라야 할 것이다.

전통 약물에서 임상 적용 가능성이 높고 부작용이 적은 새로운 약성 종양 등의 난치병 치료약물을 개발하려는 연구는 최근 들어 더욱 활발히 진행되고 있다. 전통 약물에서 항암효과 검색에 사용된 암세포들은 위암, 간암, 대장암 등의 암과 혈액암에 주로 국한이 되어 연구되어 왔으며<sup>39,40</sup> 구강암에 대한 연구는 비교적 드문 편이다. 구강암 및 악골에 발생하는 골육종의 발현 빈도는 타 부위 약성 종양에 비해 낮으나 악성도가 높고 5년 생존률이 낮으며<sup>41</sup> 치료를 위한 외과적 수술시 현저한 기능적, 심미적 손상이 불가피하여 완치된 후에도 사회심리적인 장애를 수반하게 된다. 그러므로 악안면골을 포함한 두경부에 발생된 암을 치료할 때 광범위한 외과적 절제술뿐만 아니라 치료 후 장애를 최소화시킬 수 있는 치료 방법의 개발이 절실한데 이중 두경부 영역에서의 복합화학요법에 대한 효과가 현재까지 불투명한 실정이나 외과적 처치 이전에 부가요법으로서 수술부위 축소 등의 효과로 수술 후 기능장애를 최소화할 수 있다는 이점이 있다<sup>42</sup>. 이런 복합화학요법의 지속적인 연구와 임상 경험을 통하여 밝혀진 장점에도 불구하고 화학 약제의 독성 문제 및 개별 암세포의 감수성 문제 등이 여전히 남아있다. 구강암의 치료시 각 암세포의 항암제에 대한 감수성이 각기 다르다는 점을 고려할 때 항암활성이 보고된 천연약용식물의 추출물에 대하여 구강암 및 골육종에 대한 항암효과를 검색하는 것이 의미 있는 일이라 할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 오랜 기간 동안 동양권에서 사용되어왔던 전래의 약용식물 중에서 다양한 약리 효능을 가지고 있으며 *in vitro* 실험에서 항암효과가 검색된 바 있는<sup>8)</sup> 소목(蘇木: *Caesalpinia sappan L.*)을 선정하여 구강암 및 골육종 세포주를 대상으로 항암 활성을 검색하였으며 한편 항암 기전의 일부로서 현재 주목받고 있는 telomerase 저해활성에 대한 소목 추출물의 효과를 검색하였다.

암세포가 가진 특성 중 대표적인 것은 세포의 노화과정의 의하여 분화의 제한을 보이지 않는 불멸성이라고 할 수 있다. 암세포의 불멸성에 대한 특정 유전자 검색을 위한 연구와 그 결과에 대한 보고가 있었으나 실제 종양을 이용한 연구에서는 그 보편성에 대한 결과가 미미하다.

Blackburn 등이<sup>25)</sup> 염색체 말단 복제의 문제점 (end replication problem) 에 대해 보고한 이후 telomere-telomerase system의 종양 지표에 관한 연구가 상당 수준 이루어지고 있다. Telomere는 그리스어로 말단을 뜻하는 telos와 부분을 의미하는 mere가 복합된 단어로 진행세포의 염색체 말단에 특이한 반복구조를 가진 구조로서, 염색체의 안정성을 높이고 DNA의 복제 완성에 필수적인 기능을 가지고 있다. Telomere라 불리는 염색체 말단 부위는 항상 변화하며 길어졌다 짧아졌다를 반복하며, 장기간에 걸친 telomere의 길이의 변화는 인간 세포의 노화에도 관여하는 것으로 알려져 있다. Telomere의 정확한 구성은 1970년대 밝혀졌으며 원생동물의 일종인 *Tetrahymena*의 telomere에서 TTGGGG의 염기가 여러 번 반복됨을 발견하였고 이후 동물, 식물 및 미생물의 telomere가 연구되었으며 대부분 *Tetrahymena*와 마찬가지로 T와 G 염기가 많은 짧은 염기 서열이 반복되었다.

1980년대 초반 telomere에서 반복된 염기 서열의 수가 생물체 간 뿐 아니라 한 생물체 내에서도 시간에 따라 그 수가 변화함을 밝혔다. Blackburn<sup>25)</sup>은 이러한 반복된 염기 서열 수에 대한 변화는 DNA 말단 부위 복제와 관련 있을 것으로 생각하였으며 1972년 Watson<sup>43)</sup>은 염색체의 말단부위까지 모두 복제할 수 없기 때문에 말단부는 복제되지 않은 채로 남아있을 것으로 생각하였다. 실제 세포가 분열할 때마다 telomere는 짧아지며 새로 합성된 telomere 단위체를 부착함으로써 그 길이가 늘어나게 되는데 이러한 역할을 수행하는 효소로서 telomerase의 존재를 확인하였다<sup>26)</sup>. Telomere의 길이는 telomerase에 의하여 특이적으로 연장될 수 있으며<sup>27)</sup>, 인체의 정상적인 체세포에서는 telomerase는 비활성화 되어있으며, 세포분열이 거듭됨에 따라 telomere의 길이는 짧아지게 된다<sup>44,45)</sup>. 암은 여러 유전자에 돌연변이가 일어나 정상적인 복제와 이동에 대한 통제를 벗어남으로써 발생한다. 이론적으로 telomerase가 결핍된 세포는 계속적으로 분화하면서 telomere가 사라지고 세포가 소멸되지만, 암세포가 telomerase를 만들면 telomere를 계속 보유하고 무한히 분열할 수 있게 된다.

Telomerase는 일반적으로 발생배세포의 종세포에서 만들어 지는데 인체가 완성되면 많은 체세포의 telomerase는 제거되고, 그 세포가 분화할수록 telomere는 짧아지고 임계치에 도달하면

어떤 신호에 의해서 세포 분화를 중단시킨다. 하지만 암유발 돌연변이에 의해서 제어신호가 파괴되면 세포는 정상적인 노화과정을 피하여 계속적으로 분화하게 되고 이런 조건에서 telomerase가 만들어지면 세포는 telomere를 완전히 잃지 않고 유지되면서 암세포의 영구성을 획득하게 된다. 따라서 이런 이론적 근거를 바탕으로 telomerase는 항암제 개발에 새로운 표적으로 사용되고 있다<sup>34,36)</sup>. 더욱이 telomerase는 정상세포의 성장 및 분화에 거의 영향을 미치지 않기 때문에 telomerase에 특이적으로 작용하는 항암제는 낮은 부작용 및 높은 치료효과를 가져오리라 기대된다.

본 연구에서는 오랜 기간 동안 동양권에서 전통 약물로 사용되어 오면서 심각한 부작용을 나타내지 않는 전래의 약용식물 중에서 다양한 약리 효능을 가진 소목을 선정하여 구강암 및 골육종 세포주를 대상으로 항암활성을 검색하였으며 나아가 항암 기전의 일부로서 telomerase 저해 활성에 대한 효과를 검색하였으며 소목 추출물의 분획을 확인하고 개개의 항암 활성을 연구하였다. 그 결과 소목 추출물의 구강암 및 골육종 세포주에 대한 항암활성은 시료의 농도 증가에 따라 의존적으로 증가하여 타 연구와 유사한 결과를 얻었다. 본 연구에서 시료의 항암활성 측정을 위한 방법으로 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 종양세포 초기 배양에서 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 유용하다<sup>46)</sup>.

한편 그 기전의 일부라 여겨지는 telomerase 활성도 저해에 관한 연구에서 세포주에 따라 다소간의 차이는 있었으나 시료의 농도 증가에 의존적으로 telomerase의 상대적 활성도가 저해되는 의미있는 결과를 얻었다. 소목 메탄올 추출물을 극성도에 따라 5분획으로 나누어 제조한 결과와 각각의 분획의 항암활성도 측정에서는 총추출물의 88.7%가 ethylacetate 분획으로 전이되었으며, ethylacetate 분획이 TLC에 의한 총추출물의 구성 성분을 비교한 결과 총추출물과 유사한 구성 성분이 관찰되었으나, 항암활성이 가장 높은 분획은 극성이 높은 구성 성분이 관찰된 dichloromethane 분획이었다.

Telomerase 활성도가 종양 자체의 병태학적 특성이나 예후를 예측할 수 있는 지표로 사용될 수 있는가에 대한 연구가 진행되어야 하겠지만 향후 본 연구를 토대로 종양의 크기나 암기(cancer stage)에 따른 천연 약용식물의 항암 활성 및 telomerase 활성 저해 효과 검색을 위한 연구의 기초가 될 수 있으리라 사료되며 현재 *in vitro*에서 항암효과를 나타내었으나 향후 *in vivo*에서의 실험을 통하여 *in vivo*에서의 항암활성을 확인할 필요가 있다고 사료된다. 또한 본 결과에서 우수한 항암활성이 나타난 분획에 대해서는 항암활성을 나타내는 물질을 단일 순수 화합물로 분리하고 그 물질의 항암활성 작용기전을 규명하는 실험이 계속되어야 할 것이다.

## V. 결 론

본 연구에서는 소목 (*Caesalpinia sappan L.*)의 메탄올 추출물의 구강암 및 골육종 세포주에 대한 항암활성을 검출하고 telomerase 저해 활성을 측정하여 항암작용의 기전을 분석하고자 하였다. 또한 메탄올 총 추출물의 분획 시료를 제조하여 이들의 구강암 및 골육종 세포주에 대한 항암활성을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 소목의 메탄올 추출물의 구강암 (KB) 및 골육종 (HOS) 세포주에 대한 50% 세포 증식억제 농도인 IC<sub>50</sub> 값은 각각 9.0  $\mu\text{g/ml}$  및 10.9  $\mu\text{g/ml}$ 이다.
2. 소목의 메탄올 추출물은 구강암 및 골육종 세포주에서 telomerase 활성 저해 효과가 있는 것으로 나타났으며, 소목의 구강암에 대한 항암활성은 telomerase 활성 저해로 인한 것으로 사료된다.
3. 소목의 메탄올 추출물을 극성도에 따라 n-hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol 및 수층의 5분획으로 나누어 제조하였으며 메탄올 총추출물의 88.7%가 ethylacetate 분획으로 전이되었다. 분획 시료의 박층크로마토그래피 분석결과 dichloromethane 분획에서는 극성이 높은 구성성분이 관찰되었으며, ethylacetate 분획에서는 메탄올 총추출물과 유사한 구성성분이 관찰되었다.
4. 분획시료 중 n-hexane, dichloromethane 및 ethylacetate 분획에서 항암활성이 관찰되었으며, 항암활성이 가장 높은 분획은 구강암 및 골육종 세포주에 대해 IC<sub>50</sub> 값이 각각 4.4 및 4.0  $\mu\text{g/ml}$  이상을 나타낸 dichloromethane 분획이었다.

## 참고문헌

1. 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.
2. Lee SC, Kim YG. Oral and Maxillofacial Oncology. Seoul, Jisung. 1993.
3. Kish JA, Weaver A, Jacobs J, Cummings G, Al-Sarraf M: Cisplatin and 5-fluorouracil infusion in patients with recurrent and disseminated epidermoid cancer of the head and neck. Cancer 1984;53:1819-1824.
4. Al-Sarraf M, Pajak TF, Marcial VA, Mowry P, Cooper JS, Stetz J, Ensley JF, Velez-Garcia E: Concurrent radiotherapy and chemotherapy with cisplatin in inoperable squamous cell carcinoma of the head and neck. An RTOG study. Cancer 1987;59:259-265.
5. Lee JH, Kim MJ: Chemosensitivity of cisplatin and 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma cell lines. J Kor Assoc Oral Maxillofac Surg 1998;24:165-171.
6. Peterson LJ, Indresano AT, Marciani RD, Roser SM. Principles of oral and maxillofacial surgery. Philadelphia, J.B.Lippincott. 1992.
7. Lee YY, You KH, Kim SY, Ahn BZ: Augmentation of the cytotoxic effects of anticancer drugs by ( $\pm$ )-ar-turmerone and extracts of the lithosperma and scutellaria roots against human leukemia cell lines. Yakhak Hoeji 1991;35:203-215.
8. 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.

9. Lee JS, Kim JH, Kim YG: Studies on the effects of ginseng saponins on oral cancer and normal cells. *Kyung Hee Dental J* 1998;20:117-128.
10. Bomser J, Madhavi DL, Singletary K, Smith MAL: *In vitro* anti-cancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Med* 1996;62:212-216.
11. Wickramaratne DBM, Mar W, Chai H, Castillo JJ, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD: Cytotoxic constituents of *Bursera peruviana*. *Planta Med* 1995;61:80-81.
12. Mallery SR, Stoner GD, Larsen PE, Fields HW, Rodrigo KA, Schwartz SJ, Tian Q, Dai J, Mumper RJ: Formulation and *in-vitro* and *in-vivo* evaluation of a mucoadhesive gel containing freeze dried black raspberries: implications for oral cancer chemoprevention. *Pharm Res* 2007;24:728-737.
13. Manoharan S, Kavitha K, Senthil N, Renju GL: Evaluation of anticarcinogenic effects of clerodendron inerme on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med J* 2006;47:1038-1043.
14. Kim JH, Lee SJ, Han YB, Kim JB: Identification of active component isolated from *Croton tiglium* and *Coptis japonica* aqueous mixture (CP2) and studies of its cytotoxic effect. *Yakhak Hoeji* 1994;38:31-37.
15. Konkimalla VB, Suhas VL, Chandra NR, Gebhart E, Efferth T: Diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:317-329.
16. Pezzuto JM: Plant-derived anticancer agents. *Biochem Pharmacol* 1997;53:121-133.
17. Saitoh T, Sakashita S, Nakata H, Shimokawa T, Kinjo JE, Yamahara J, Yamasaki M, Nohara T: 3-Benzylchroman derivatives related to brazilin from *Sappan Lignum*. *Chem Pharm Bull* 1986;34:2506-2511.
18. Namikoshi M, Nakata H, Yamada H, Nagai M, Saitoh T: Homoisoflavonoids and related compounds. II. Isolation and absolute configuration of 3, 4-dihydroxylated homoisoflavans and brazilins from *Caesalpinia sappan L.* *Chem Pharm Bull* 1987;35:2761-2773.
19. Baek NI, Jeon SG, Ahn EM, Hahn JT, Bahn JH, Jang JS, Cho SW, Park JK, Choi SY: Anticonvulsant compounds from the wood of *Caesalpinia sappan L.* *Arch Pharm Res* 2000;23:344-348.
20. Xie YW, Ming DS, Xu HX, Dong H, But PP: Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* involvement of endogenous nitric oxide. *Life Sci* 2000;67:1913-1918.
21. Oh SR, Kim DS, Lee IS, Jung KY, Lee JJ, Lee HK: Anticomplementary activity of constituents from the heartwood of *Caesalpinia sappan*. *Planta Med* 1998;64:456-458.
22. Choi SY, Yang KM, Jeon SD, Kim JH, Khil LY, Chang TS, Moon CK: Brazilin modulates immune function mainly by augmenting T cell activity in halothane administered mice. *Planta Med* 1997;63:405-408.
23. Moon CK, Park KS, Kim SG, Won HS, Chung JH: Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl3-induced toxicity. *Drug Chem Toxicol* 1992;15:81-91.
24. Hikino H, Taguchi T, Fujimura H, Hiramatsu Y: Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of *Haematoxylon campechianum* wood. *Planta Med* 1977;31:214-220.
25. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991;350:569-573.
26. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10114-10118.
27. Harley CB, Kim NW. Telomerase and cancer. *Important Advances in Oncology*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 1996:57-67.
28. Harley CB, Villeponteau B: Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:249-255.
29. Rhyu MS: Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:884-894.
30. Greider CW, Blackburn EH: Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* 1996;274:92-97.
31. Shay JW, Wervin H, Wright WE: Telomere shortening may contribute to aging and cancer: a perspective. *Mol Cell Diff* 1994;2:1-21.
32. Miyoshi Y, Tsukinoki K, Imaizumi T, Yamada Y, Ishizaki T, Watanabe Y, Sasakura Y, Lin Y, Hosaka M, Kubota Y: Telomerase activity in oral cancer. *Oral Oncology* 1999;35:283-289.
33. Mutirangura A, Supiyaphun P, Triekapan S, Sriuranpong V, Sakuntabhai A, Yenrudi S, Voravud N: Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 1996;56:3530-3533.
34. Zimmermann S, Martens UM: Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:906-921.
35. Kelland LR: Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics--current status and future prospects. 2005;41:971-979.
36. Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC: Telomere and telomerase as targets for anticancer drug development. 2006;57:191-214.
37. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989;119:203-210.
38. Kim NW, Piatyszyk MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-2015.
39. 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.
40. 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 and various plants (III). *Kor J Pharmacognosy* 1996;27:105-110.
41. Meyers EN, Suen JY. *Cancer of the head and neck* 2nd ed. New York, Churchill Livingstone. 1989.
42. Weaver A, Flemming S, Kish J, Vandenberg H, Jacob J, Crissman J, Al-Warraf M: cisplatin and 5-fluorouracil as induction therapy for advanced head and neck cancer. *Am J Surg* 1982;144:445-448.
43. Watson J: Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature New Biol* 1972;239:197.
44. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP: Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997;88:657-666.
45. Wong DTW, Todd R, Tsuji T, Donoff RB: Molecular biology of human oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7:319-328.
46. Suto A, Kubota J, Shimoyama Y: MTT assay with reference to the clinical effect of chemosensitivity. *J Surg Oncol* 1989;42:28-32.