

구강암종 세포주에서 은행잎 추출물(EGb 761)에 의한 세포고사 기전

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹ 기도점액연구소²

장정현¹ · 윤주현^{1,2} · 최은창¹ · 이근환¹ · 조창일¹ · 김경수^{1,2}

Mechanism of Apoptosis Induced by *Ginkgo Biloba* Extract(EGb 761) in Oral Cavity Cancer Cell Lines

Jung Hyun Chang, MD¹, Joo-Heon Yoon, MD,^{1,2} Eun Chang Choi, MD,¹
Kun Wayn Lee, MD,¹ Chang Il Cho, MD¹ and Kyung-Su Kim, MD^{1,2}

¹Department of Otorhinolaryngology; ²The Airway Mucus Institute, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : According to our previous study *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) induces inhibition of cell proliferation and apoptosis in SCC 1483 oral cavity cancer cells. On the other hand, in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells, activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) is the key event in the inhibition of inflammation by EGb 761. Therefore, we have investigated whether MAPK pathway is involved in the apoptotic process by EGb 761 in oral cavity cancer cell lines or not. **Subjects and Method** : In SCC 1483 oral cavity cancer cell lines, Western blot analysis, Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis, and transient transfection using MAPK-dominant negative constructs were used. **Results** : When SCC 1483 oral cavity cancer cell lines were treated with the concentration of 250 μ g/ml EGb 761, activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and apoptosis were noted. This apoptosis was inhibited by the treatment with ERK inhibitor (PD 98059). In the transiently transfected cells by MAPK/ERK kinase 1 (MEK1)-dominant negative construct, phosphorylations of ERK and p90 ribosomal S 6 protein kinase (RSK1) were inhibited which led to the inhibition of apoptosis by EGb 761. The inhibition of apoptosis was also noted in the transfected cells by RSK1 dominant negative construct and cAMP response element binding protein (CREB)-dominant negative construct. **Conclusion** : In conclusion, the apoptosis of SCC 1483 oral cavity cancer cell lines by EGb 761 is linked to the activation of ERK and it can happen via ERK MAPK/RSK1/CREB signal transduction pathway. (Korean J Otolaryngol 2006;49:1181-7)

KEY WORDS : Mouth neoplasms · *Ginkgo biloba* · Apoptosis.

서 론

은행잎 추출물 중 EGb 761은 아세톤과 물을 이용한 추출과정, 지방 친화성분의 제거, 활성물질 강화, 폴리페놀 성분 제거 등의 복잡한 추출과정을 거쳐 만들어진다. 이 추출물의 주요성분은 flavonoid 성분과 비 flavonoid 성분으로 크게 구분되며, 상제성분은 약 24%의 flavonoid glycoside, 6%의 terpene trilactone(diterpenoid 성분인 ginkgolide와 sesquiterpene 성분인 bilobalide), 7%의 proanthocyanidin, 소량의 저분자 유기산 등으로 구성된다.¹⁾ 이

논문접수일 : 2006년 6월 2일 / 심사완료일 : 2006년 7월 21일
교신저자 : 김경수, 135-720 서울 강남구 도곡동 146-92
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 2019-3463 · 전송 : (02) 3463-4750
E-mail : ydrhinol@yumc.yonsei.ac.kr

러한 EGb 761이 관심을 끌게 된 것은 1965년 Dr. Willmar Schwabe가 뇌혈관 질환, 말초 순환장애 등의 치료에 효과가 있다고 보고하면서 부터이다.²⁾ 이후 EGb 761의 효능에 대해 많은 보고들이 있었는데, 뇌 및 말초혈관의 혈류량 저하, 감각신경 질환, 기억력 및 인지능 저하 등의 질환에 효과가 있는 것뿐만 아니라 신생혈관 억제기능, 항산화 기능, 세포 독작용, COX-2 및 iNOS의 억제작용, 유전자 조절기능 등의 작용으로 세포증식 억제 효과를 보인다고 알려져 있다.^{1,3,4)}

EGb 761과 구성 성분에 의한 세포증식 억제는 사람 유방암종 세포주인 MDA-231 세포주와 대장암 세포주에서 보고되었다.⁴⁻⁶⁾ 한편 SCC 1483 사람 구강암종 세포주의 경우, 250 μ g/ml의 용량에서부터 50% 이상의 세포증식 억제를 보였고 용량에 따라 증식 억제가 증가하였으며 이

러한 성장억제는 DNA의 계단모양 조각화 및 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)의 분할 등의 결과로 세포고사에 의한다고 하였다.^{7,8)} 이러한 결과로 EGb 761이 구강암중 세포주에 대해 세포고사를 유도하며 caspase에 대한 비특이 억제제인 z-VAD-fmk를 EGb 761과 같이 투여한 결과 세포고사가 억제되며 Western blot 분석상 PARP의 분할이 일어나지 않아 EGb 761에 의한 세포고사의 하위 기전(downstream mechanism)에 caspase cascade가 관여함이 밝혀졌다.⁸⁾ 그러나 EGb 761에 의한 구강암중 세포주의 세포고사가 caspase cascade 외에 어떤 신호전달 경로를 거치는가에 대해서는 알려진 바가 없다.

EGb 761의 작용기전에 관한 연구로 쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 EGb 761과 그 성분인 quercetin을 투여한 실험결과에 의하면 이들 성분에 의해 lipopolysaccharide에 의해 증가된 iNOS 양이 감소하며 이 기전에 mitogen activated protein kinase(MAPK), redox-sensitive transcription factor, nuclear factor- κ B(NF- κ B), activator protein 1(AP-1) 등이 신호전달 체계에 관여하였다.⁶⁾ 이런 연구결과를 토대로 EGb 761에 의한 사람 구강암중 세포주의 세포고사 신호전달 체계에 MAPK가 관여할 가능성이 있다고 하겠다.

이에 본 연구의 목적으로 첫째, EGb 761에 의한 SCC 1483 사람 구강암중 세포주의 세포고사에 MAPK 신호전달 경로(signal transduction pathway)가 관여하는가를 알고자 하였고 둘째, MAPK 신호전달 경로가 관여한다면 이에 속하는 extracellular signal-regulated kinase(ERK), p38 MAPK, c-Jun N-terminal kinase(JNK) 계통 중 어느 kinase의 활성화에 의해 세포고사가 일어나는가를 알고자 하였으며 셋째, EGb 761에 의해 활성화된 MAPK에 의해 핵내 kinase와 전사인자의 활성화가 일어나는가를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

구강암중 세포주의 배양

사람 후구삼각(retromolar trigone)의 구강암에서 기원한 SCC 1483 사람 구강암중 세포주(a generous gift from Dr. J Shah, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York, USA)를 minimum essential medium(MEM)과 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, penicillin(50 μ g/ml), streptomycin(50 μ g/ml) 등으로 조성된 배지에서 배양하였다.

재 료

EGb 761은 유유산업(Seoul, Korea)에서 기증 받아 사용하였다. Phospho p44/42 mitogen activated protein(MAP) kinase(Thr-202/Tyr-204) 항체, phospho p38 MAP kinase(Thr-180/Tyr-182) 항체, phospho-stress activated protein kinase(SAPK)/c-Jun NH2-terminal kinase MAP kinase(Thr-183/Tyr-185) 항체, phospho-RSK1(Ser-380) 항체, phospho-cAMP response element binding protein(CREB)(Ser-133) 항체 등은 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, PD 98059와 α -tubulin 항체는 Calbiochem(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

Western blot 분석

각 실험 이후 radioimmunosorbent assay buffer(1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 이용하여 cell lysate를 얻었다. 단백질의 양은 bicinonic acid protein assay-bovine serum albumin 법을 이용하여 측정 후 각 lane당 단백질 30 μ g을 넣어 전기영동하였다.

전기영동은 8% SDS-polyacrylamide gel을 이용하였고, 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 전이시킨 다음 이 막을 10% milk in Tris-buffered saline(TBST)로 4°C에서 밤새 반응시킨 후 2% 탈지분유가 포함된 TBST를 이용하여 p-ERK(1 : 1,000), p-p38 MAPK(1 : 1,000), p-JNK 항체(1 : 1,000), p-CREB 항체(1 : 1,000), p-RSK1 항체(1 : 1,000) 등을 각각 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 세척을 시행한 후 막은 TBST에 1 : 5,000으로 희석한 horse radish peroxidase 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 한 시간 동안 처리하고 수 차례의 세척 후 enhanced chemiluminescence(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)와 autoradiography를 이용하여 밴드를 확인하였다. 한편 동일한 막을 deprobing한 다음, 같은 방법을 이용하여 α -tubulin 항체와 반응시켰다.

Fluorescence-activated cell sorter(FACS) 분석

6-well plate에 SCC 1483 세포를 well당 4×10^5 세포로 분주하여 16시간 동안 배양한 다음 각 실험조건에 맞추어 배양하였다. 부유세포 및 부착세포를 채취한 다음 TACS Annexin V-FITC kit(Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 핵염색 및 annexin V를 부착하였다. 방법으로 propidium iodide(PI, 20 μ g/ml)로 핵염색을 하고 annexin V-FITC를 세포에 결합시킨 다음

flow cytometry(Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA)를 이용하여 10,000개의 세포를 측정하였다. 측정된 세포중 Annexin V-positive/PI-positive인 세포와 Annexin V-positive/PI-negative인 세포의 수를 구하여 세포고사된 세포수를 정한 다음 이를 전체 세포수로 나누어 세포고사율을 측정하였다. 실험은 3회 이상 시행하였으며 통계 검증은 one-way ANOVA를 이용하여 대조군과 비교하여 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

Dominant negative mutant의 일시적 주입법(transient transfection)

MEK1 dominant negative mutant(*pcDNA5-MEK1DN*)를 함유한 plasmid는 Dr. Jian-Dong Li(House Ear Institute, Los Angeles, CA, USA)에서 기증 받았다. 이 plasmid를 lipofectamin(Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조사에서 권장하는 방법으로 SCC 1483 세포주에 전달감염시킨 후 이를 16시간 배양한 다음 실험에 사용하였다.

결 과

EGb 761에 의한 MAPK 활성화

구강암종 세포주인 SCC 1483 세포주를 배양하여 EGb 761 250 $\mu\text{g/ml}$ 을 투여한 후 ERK, p38 MAPK, JNK 등의 MAPK family 중 어느 kinase가 활성화되는가를 Western blot 분석으로 알아보았다. EGb 761 투여 5분 후 p-ERK가 발현되었고 10분에 최대로 발현된 후 시간경

과에 따라 감소하였다(Fig. 1). 그러나 p-JNK와 p-p38은 발현되지 않았다. 이상의 결과로 MAPK가 EGb 761에 의해 활성화되며 MAPK family 중 ERK가 활성화됨을 알 수 있었다.

ERK억제에 의한 EGb 761의 세포고사 유도 억제

ERK의 활성화가 세포고사에 연관됨을 입증하기 위해 SCC 1483 세포주를 배양하여 ERK의 억제제(PD98059)를 1시간 동안 전처리한 후 EGb 761 250 $\mu\text{g/ml}$ 를 24시간 투여하였다. Western blot 분석 결과 PD98059와 EGb 761를 처리하지 않은 대조군과 비교 시 EGb 761만을 처리한 경우 p-ERK의 활성화가 유도되었으나, PD98059를 전처리한 군에서는 ERK의 활성화가 감소하였다(Fig. 2A). 각 군에 대해 FACS 분석을 하여 세포고사 정도를 비교한

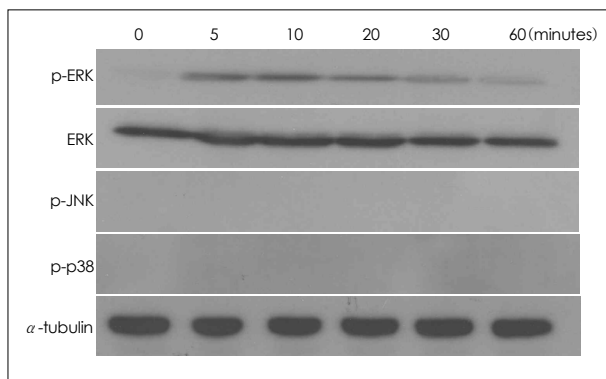


Fig. 1. Activation of MAPK by EGb 761. SCC 1483 were treated with EGb 761 250 $\mu\text{g/ml}$ for 0, 5, 10, 20, 30 and 60 minutes and Western blot analysis for p-ERK was performed each time. EGb 761 induces the activation of p-ERK.

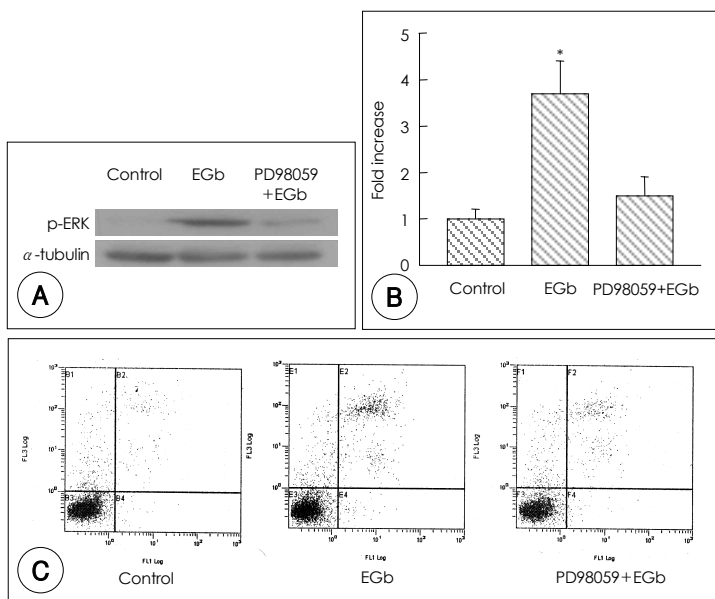


Fig. 2. Inhibition of EGb 761-induced apoptosis by ERK inhibitor. SCC 1483 cells were treated with ethanol (control), 250 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761, pre-treated with 10 μM PD98059 and 250 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761 for 24 hours. Western blot analysis (A) and flow cytometry (B, C) were performed as described in Subjects and Method. A : EGb 761 induces the activation of p-ERK, but this activation is inhibited by ERK inhibitor such as PD98059 (PD98059 +EGb). B : EGb 761 treatment induces apoptosis of SCC 1483 cells, but the pre-treatment with PD98059 abrogated the effect of EGb 761 to the control level. C : Dot plots of apoptosis. * $p < 0.05$.

결과 EGb 761만을 투여한 경우 대조군에 비해 유의하게 세포고사가 증가하였으나, PD98059를 처치하여 ERK를 억제한 경우 EGb 761에 의한 세포고사가 억제되어 ERK의 활성화가 세포고사에 관여함을 확인할 수 있었다(Fig. 2B and C).

MEK1 dominant negative-세포에서 EGb 761에 의한 세포고사 유도의 억제

EGb 761에 의한 세포고사가 MEK1 억제에 의해 억제됨을 확인하기 위해 MEK1에 대한 dominant negative(DN) mutant 유전자를 SCC 1483 세포에 전달감염시킨 다음 250 μ g/ml EGb 761을 24시간 동안 투여한 후 Western blot analysis과 flow cytometry를 시행하였다. EGb 761에 의해 p-ERK와 ERK의 하위 신호전달경로인 p-

RSK1이 활성화되었으나 MEK1 DN-전달감염 세포에서는 p-ERK와 p-RSK1의 활성화가 모두 억제되었다(Fig. 3A). SCC 1483 세포주의 경우 EGb 761의 투여로 세포고사가 유도되었으나 MEK1 DN-전달감염 세포에서는 EGb 761에 의한 세포고사가 유의하게 대조군 범위로 억제되었다(Fig. 3B and C). 이러한 결과로 EGb 761에 의한 세포고사에 MEK1 활성화에 의한 ERK의 활성화가 관련됨을 확인할 수 있었으며 RSK1이 하위 신호전달경로에 관여할 가능성을 알 수 있었다.

RSK1 DN-세포에서 EGb 761에 의한 세포고사 유도의 억제

ERK가 활성화되어 이후 RSK1을 활성화시켜 SCC 1483 세포주의 세포고사를 유도하는가를 알기 위해 RSK1 DN

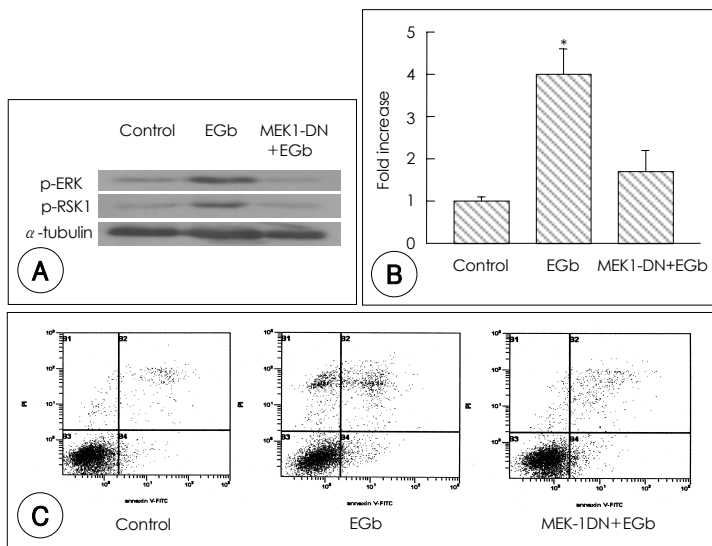


Fig. 3. Inhibition of EGb 761-induced apoptosis on MEK1-dominant negative cells. SCC 1483 cells were transiently transfected with MEK1-dominant negative (MEK1-DN) construct. A : EGb 761 induces the activation of p-ERK and p-RSK1, however, this activation is inhibited in MEK1-DN cells. B : EGb 761 treatment induces apoptosis of SCC 1483 cells, but this apoptosis by EGb 761 on SCC1483 cells is abrogated in MEK1-DN cells (MEK1-DN+EGb) to the control level. C : Dot plots of apoptosis. *p<0.05.

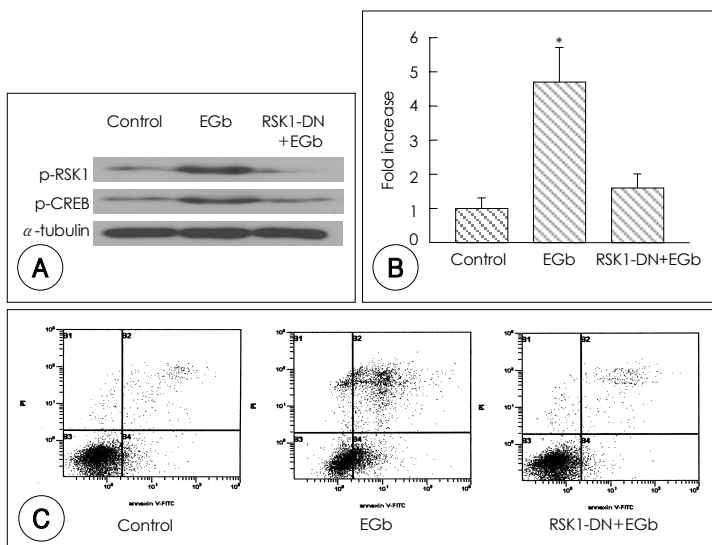


Fig. 4. Inhibition of EGb 761-induced apoptosis on RSK1-DN cells. SCC 1483 cells were transiently transfected with RSK1-DN construct. A : EGb 761 induces the activation of p-RSK1 and p-CREB, which is inhibited in RSK1-DN cells. B : EGb 761 treatment induces apoptosis of SCC 1483 cells, which is abrogated in RSK1-DN cells (RSK1-DN+EGb) to the control level. C : Dot plots of apoptosis. *p<0.05.

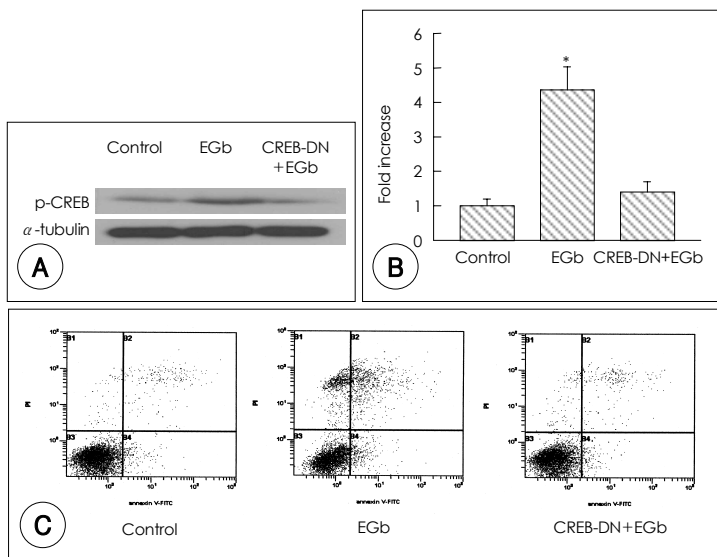


Fig. 5. Inhibition of EGb 761-induced apoptosis on CREB-DN cells. SCC 1483 cells were transiently transfected with CREB-DN construct. A : EGb 761 induces the activation of CREB, which is inhibited in CREB-DN cells. B : EGb 761 treatment induces apoptosis of SCC 1483 cells, which is abrogated in CREB-DN cells (CREB-DN+EGb) to the control level. C : Dot plots of apoptosis. *p<0.05.

mutant 유전자를 SCC 1483 세포에 전달감염시킨 다음 250 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761을 24시간 동안 투여한 후 Western blot analysis와 flow cytometry를 시행하였다. EGb 761에 의해 p-RSK1과 p-CREB이 활성화되었으나 RSK1 DN-전달감염 세포에서는 활성도가 억제되었다(Fig. 4A). 또한 EGb 761 투여에 의해 대조군과 비교 시 유의하게 세포고사가 유도되었으나 RSK1 DN-전달감염 세포에서는 EGb 761 투여에 의한 세포고사가 억제되었다(Fig. 4B and C). 이상의 결과로 ERK 활성화에 이은 RSK1 활성도가 EGb 761에 의한 세포고사의 신호전달 경로임을 알 수 있었다.

CREB DN-세포에서 EGb 761에 의한 세포고사 유도의 억제

RSK1의 활성화에 의해 핵내 전사인자인 CREB이 활성화되어 세포고사를 유도하는가를 알기 위해 CREB DN mutant 유전자를 SCC 1483 세포에 전달감염시킨 다음 250 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761을 24시간 동안 투여한 후 Western blot analysis와 flow cytometry를 시행하였다. EGb 761에 의해 p-CREB이 활성화되었으나 CREB DN-전달감염 세포에서는 활성도가 억제되었다(Fig. 5A). 또한 대조군과 비교 시 EGb 761 투여에 의해 유의하게 세포고사가 유도되었으나 CREB DN-전달감염 세포에서는 EGb 761 투여에 의한 세포고사가 억제되었다(Fig. 5B and C). 이상의 결과로 RSK1 활성화에 의한 핵내 전사인자인 CREB이 활성화되어 사람 구강암종 세포주에서 EGb 761에 의한 세포고사가 유도됨을 알 수 있었다.

고 찰

EGb 761은 과거 경험의학에서 많이 사용되었으나 최근 이의 약리작용, 기전연구, 임상연구 등이 활발하게 진행되어 현대의학에서도 많이 사용되고 있다. EGb 761은 경험 의학에서 오랫동안 사용되어 다른 약제와 비교 시 안정성이 만족할 만하고 전립선암, 대장암, 유방암에 있어 암예방제로 사용되어 좋은 효과를 보인다고 보고되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 이전 연구결과에 의하면 은행잎 추출물인 EGb 761을 SCC 1483 세포주에 투여 시 세포증식 억제와 세포고사가 유도되며 이 과정에 caspase cascade가 관여한다.⁸⁾ 한편 세포고사는 caspase cascade 외에도 Bcl-2 family, mitochondrial apoptosis, p53 tumor suppressor gene, 여러 kinase와 phosphatase 등에 의해 일어나며 이러한 여러 기전은 서로 유기적으로 연결되어 있어 한 세포에서도 여러 경로를 통해 세포고사가 일어나게 된다.⁹⁾ 본 연구를 시작하게 된 동기는 EGb 761에 의한 사람 구강암종 세포주의 세포고사에 기존의 caspase cascade 외에 다른 경로의 세포고사 기전이 가능할 수 있다는 가정 하에서였다. 이러한 가정을 세우게 된 다른 이유로 EGb 761의 작용 기전에 MAPK가 관여한다는 연구결과에 의해서이다. 즉, EGb 761이 흰쥐에서 lipopolysaccharide에 의한 tumor necrosis factor- α 와 iNOS의 생성을 억제하며 이 과정에 MAPK, NF- κ B, AP-1 등이 관여한다고 하여 MAPK가 EGb 761의 세포고사 작용 기전의 하나일 수 있다고 생각하여 본 연구를 시작하게 되었다.^{6,10)}

연구 결과로 SCC 1483 세포주를 배양하여 250 $\mu\text{g/ml}$

EGb 761을 투여한 후 p-ERK, p-JNK, p-p38 MAPK 등의 MAPK 신호전달경로를 Western blot 분석으로 관찰한 결과 p-ERK가 발현되고 p-JNK와 p-p38 MAPK는 발현되지 않았다. 또한 ERK억제제(PD98059)를 전처리한 후 EGb 761 250 $\mu\text{g/ml}$ 을 투여한 결과 p-ERK의 활성화가 감소하고 FACS 분석상 세포고사가 감소함을 확인하였다. 이러한 결과로 EGb 761에 의한 세포고사 작용 이전에 MAPK 신호전달경로가 관여하며 ERK MAPK를 거치는 과정을 택함을 알 수 있었다. 이처럼 ERK MAPK가 EGb 761의 항암작용에서 신호전달경로로 관여함을 증명하기 위해 ERK의 상위 신호전달경로인 MEK1에 대한 DN construct를 SCC 1483 세포주에 전달감염시켜 이를 이용하여 실험하였다. 결과상 MEK1 억제에 의해 ERK 활성화가 억제되며 EGb 761에 의해 유도되는 세포고사가 감소하므로 ERK MAPK가 EGb 761에 의한 사람 구강암종 세포주의 세포고사 신호전달에 관여함을 증명할 수 있었다. 이처럼 EGb 761의 신호전달경로에 ERK MAPK가 관여하는 것은 lipopolysaccharide에 의한 tumor necrosis factor- α 와 iNOS의 생성 억제에 MAPK가 관여한다는 기전과 일치하는 결과였다.^{6,10)}

ERK MAPK를 경유하여 신호전달이 일어나게 되면 그 하위 신호전달경로로 RSK1의 인산화가 일어나며 이 RSK1에 의해 CREB, c-FOS, CCAAT/enhancer binding protein, NF- κB 등의 전사인자가 인산화되어 활성화된다.¹¹⁾ 이에 EGb 761의 항암작용이 ERK MAPK/RSK1/CREB의 기전으로 신호전달이 일어나는가를 알아보려고 하였다. EGb 761 처리 후 RSK1과 CREB의 발현을 본 결과 Western blot 분석상 모두 EGb 761에 의해 유도됨을 알 수 있었다. MEK1에 대한 DN 연구상 RSK1의 발현이 억제되었고, RSK1에 대한 DN 연구상 하위 신호전달경로인 CREB의 발현이 억제되어 ERK MAPK-RSK1-CREB의 전달계가 순차적으로 관여함을 알 수 있었으며 RSK1과 CREB의 억제에 의해 EGb 761에 의해 유도되는 세포고사가 EGb 761 처리에도 불구하고 감소하는 결과를 보여 RSK1과 CREB가 EGb 761의 세포고사 기전에 관여함을 알 수 있었다. 이런 결과로서 EGb 761에 의한 사람 구강암종 세포주의 세포고사에 ERK MAPK/RSK1/CREB 신호전달경로가 관여함을 알 수 있었다.

일반적으로 ERK MAPK가 활성화되는 경우 Bad의 인산화를 억제하여 결국 세포고사가 억제된다고 한다.⁹⁾ 또한 본 연구결과에서처럼 CREB가 활성화될 경우, 대부분의 경우 세포고사를 억제한다고 한다.¹²⁾ 이러한 결과들은 ERK

MAPK와 CREB의 활성화가 사람 구강암종 세포주의 세포고사와 연관된다는 본 연구결과와는 상반된 결과이다. 이처럼 상반된 결과가 가능한 이유로 세포에 따른 EGb 761의 특이성을 들 수 있다. SCC 1483 세포주의 경우 EGb 761에 의해 세포고사가 유도되며 이 기전의 하나로 caspase cascade의 활성화를 들 수 있다. 그러나 중추신경계의 경우 EGb 761과 그 구성분에 의해 오히려 caspase cascade가 억제되어 세포고사가 억제된다.^{1,13,14)} 이처럼 EGb 761의 작용이 세포에 따라 같은 경로를 이용해도 세포 특이적으로 세포고사를 유도하거나 억제할 수가 있다. 이러한 다른 예로 MAPK를 이용하더라도 구강암종 세포주에서는 세포고사를 유도하나 쥐 간세포와 Kupffer 세포에서는 항산화제로 작용하여 염증반응을 억제하게 된다.¹⁵⁾ 여러 예에서 나타나듯 EGb 761의 작용은 세포 특이적으로 발생하므로 ERK 경로가 활성화되고 CREB가 인산화되어 일반적으로 세포고사가 억제되지 않고 세포고사를 유도할 가능성을 들 수 있다. 이것을 뒷받침하는 다른 경우로 ERK MAPK 활성화 자체가 세포고사를 야기할 수 있다는 것이다. 이러한 예로 쥐 늑막세포인 RPM 세포주의 경우 석면과 과산화수소에 의해 세포고사가 일어나며 이 과정에 ERK 경로가 활성화된다고 한다.¹⁶⁾ 본 연구결과도 이와 일치하며 RPM 세포주처럼 세포에 따라서는 ERK 경로 활성화가 세포고사를 유도할 수 있으리라 생각한다. 그러나 ERK MAPK와 CREB 활성화 이후 과연 어떤 하위기전이 작용하여 세포고사가 유도되는가, 그리고 MAPK 활성화와 caspase cascade의 연관성 여부에 대해서는 추가연구가 필요하다고 본다.

EGb 761이 SCC 1483 세포주에 대해 세포고사를 유도하며 이 세포고사에 caspase cascade가 관여한다는 이전 연구결과로 EGb 761을 구강암에 대한 화학적 암억제제 또는 암예방제로 사용할 수 있다는 이론적 근거를 제공하였다고 본다. 본 연구결과는 이러한 연구결과를 뒷받침하며 EGb 761에 의한 사람 구강암종 세포주의 세포고사가 하나의 경로로 이루어지지 않고 다양한 경로를 택할 수 있다는 것을 보여준다 하겠다. EGb 761의 작용기전에 cyclooxygenase-2를 억제한다는 보고가 있으므로 이에 의한 세포고사 가능성에 대한 연구가 필요하리라 생각하며,¹⁷⁾ 본 연구에 사용된 사람 구강암종 세포주가 암 억제 유전자인 p53을 보유한 세포이므로 EGb 761에 의한 p53 유전자의 변화도 세포고사 기전의 하나로 가능성이 있으므로 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.¹⁸⁾

결 론

EGb 761에 의한 SCC 1483 사람 구강암종 세포주의 세포고사는 MAPK 신호전달경로에 속하는 ERK의 활성화가 관여하며 이는 ERK MAPK/RSK1/CREB 경로에 의해 일어남을 알 수 있었다.

중심 단어 : 구강암종 · 은행잎 추출물 · 세포고사.

REFERENCES

- 1) Smith JV, Luo Y. *Studies on molecular mechanism of Ginkgo biloba extract. Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64 (4):465-72.
- 2) Michel PF. *The doyen of trees: The Ginkgo biloba. Presse Med* 1986; 15 (31):1450-4.
- 3) DeFeudis FV. *Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier; 1991. p.1-8.*
- 4) Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, et al. *Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. Carcinogenesis* 2000;21 (5): 959-63.
- 5) Papadopoulos V, Kapsis A, Li H, Amri H, Hardwick M, Culty M, et al. *Drug-induced inhibition of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and cell proliferation in human breast cancer cells. Anticancer Res* 2000;20 (5A):2835-47.
- 6) Wadsworth TL, Koop DR. *Effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. Chem Biol Interact* 2001;137 (1):43-58.
- 7) Gohil K, Moy RK, Farzin S, Maguire JJ, Packer L. *mRNA expression profile of a human cancer cell line in response to Ginkgo biloba extract: Induction of antioxidant response and the Golgi system. Free Radic Res* 2000;33 (6):831-49.
- 8) Kim KS, Rhee KH, Yoon JH, Lee JG, Lee JH, Yoo JB. *Ginkgo biloba extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. Oral Oncology* 2005;41 (4):383-9.
- 9) Blatt NB, Glick GD. *Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. Bioorg Med Chem* 2001;9 (6):1371-84.
- 10) Wadsworth TL, McDonald TL, Koop DR. *Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. Biochem Pharmacol* 2001;62 (7):963-74.
- 11) Cho KN, Choi JY, Kim CH, Baek SJ, Chung KC, Moon UY, et al. *Prostaglandin E2 induces MUC8 gene expression via a mechanism involving ERK MAPK/RSK1/cAMP response element binding protein activation in human airway epithelial cells. J Biol Chem* 2005;280 (8):6676-81.
- 12) Persengiev SP, Green MR. *The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. Apoptosis* 2003;8 (3):225-8.
- 13) Bate C, Salmona M, Williams A. *Ginkgolide B inhibits the neurotoxicity of prions or amyloid-beta 1-42. J Neuroinflammation* 2004;1 (1):4.
- 14) Massieu L, Moran J, Christen Y. *Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons. Brain Res* 2004;1002 (1-2):76-85.
- 15) Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. *Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. Hepatology* 1998;27 (5): 1265-74.
- 16) Jimenez LA, Zanella C, Fung H, Janssen YM, Vacek P, Charland C, et al. *Role of extracellular signal-regulated protein kinases in apoptosis by asbestos and H2O2. Am J Physiol* 1997;273 (5 pt 1):1029-35.
- 17) Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. *Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. Life Sci* 2001;68 (8):921-31.
- 18) Kim KS, Li SL, Bertolami CN, Cherrick HM, Park NH. *State of p53, Rb and DCC tumor suppressor gene in human oral cancer cell lines. Anticancer Res* 1993;13 (5A):1405-13.