

구강암종 세포주에서
은행잎 추출물(EGb 761)의
세포고사 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

이 광 현

구강암종 세포주에서
은행잎 추출물(EGb 761)의
세포고사 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

이 광 현

구강암종 세포주에서
은행잎 추출물(EGb 761)의
세포고사 효과

지도 김 경 수 교수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 광 현

이광현의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 자상한 지도편달을 아끼지 않으신 김경수 교수님께 진심으로 감사드립니다.

또한, 바쁘신 가운데도 많은 관심을 가지고 연구기간 중 여러모로 조언하여 주신 윤주현 교수님, 김 진 교수님께 감사드립니다. 아울러 이번 연구를 여러모로 도와주신 정명현 교수님의 모든 교실원 및 의국원 여러분과 연구실 선생님께 감사의 뜻을 전합니다.

끝으로 항상 물심양면으로 많은 도움을 주시는 부모님과 이 논문이 완성되기까지 격려해주고 내조해준 아내에게 고마운 마음을 전하며, 논문을 완성한 기쁨을 아들 원석, 딸 유정리와 함께 나누고 싶습니다.

2004년 6월

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 구강암종 세포주 배양 및 세포증식 분석	6
2. 유세포 측정분석과 DNA ladder 분석	6
3. Western blot 분석	7
4. Caspase cascade 억제 실험	8
III. 결 과	9
1. EGb 761 농도에 따른 SCC 1483 세포의 증식 억제	9
2. EGb 761 투여 시간에 따른 SCC 1483 세포의 세포고사	9
3. EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포고사 확인	10
4. Caspase 억제제에 의한 세포고사 억제	12
IV. 고 찰	14
V. 결 론	17
참고문헌	18
영문요약	23

그림 차례

Fig. 1. Apoptosis of SCC 1483 cells by EGb 761 according to the treatment time	10
Fig. 2A. DNA fragmentation of SCC 1483 cells by EGb 761	11
Fig. 2B. Cleavage of PARP by EGb 761	11
Fig. 3. Inhibition of cleavage of PARP by z-VAD-fmk	13

표 차례

Table 1. Inhibition of SCC 1483 cells proliferation according to the concentrations of EGb 761	9
Table 2. Inhibition of apoptosis of SCC 1483 cells by co-treatment of EGb 761 and z-VAD-fmk	12

국문요약

구강암종 세포주에서 은행잎 추출물(EGb 761)의 세포고사 효과

은행잎 추출물인 EGb 761은 세포증식 억제효과를 보여 대장암과 전립선암에 대한 암예방제로 사용되고 있다. 구강암은 적절한 치료 후에도 이차 원발암이나 재발이 많아 예후가 좋지 않은 암이다. 이에 EGb 761이 구강암종 세포주에 대해 세포증식 억제와 세포고사를 유도하는가를 보고 이의 기전을 알아보려고 하였다.

사람 구후삼각에서 기원한 SCC 1483 구강암종 세포주를 이용하여 50%이상의 세포증식 억제를 보이는 EGb 761의 최소농도(IC₅₀)를 세포증식 분석으로 알아보았다. 이 농도를 이용하여 투여시간별 세포고사 여부를 유세포 측정분석법으로 실험하였고, 세포고사 확인을 위하여 DNA ladder 분석과 PARP에 대한 Western blot 분석을 하였다. PARP 분할에 caspase cascade가 관여하므로 caspase 억제제(z-VAD-fmk)를 이용하여 EGb 761에 의한 세포고사의 억제를 관찰하였다.

EGb 761은 SCC 1483 세포에 대해 250 µg/ml의 용량에서부터 50%이상의 세포증식 억제를 보였다. 이 용량으로 24시간동안 투여한 경우 약 2.6배의 세포고사가 관찰되었고 시간에 따라 세포고사는 증가하였다. EGb 761을 250 µg/ml의 용량으로 24시간 동안 투여한 경우 DNA 조각화와 PARP 단백질의 분할이 관찰되었다. z-VAD-fmk를 EGb 761과 같이 투여한 경우 EGb 761에 의한 세포고사가 억제되었고 PARP 단백질의 분할이 일어나지 않음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 은행잎 추출물인 EGb 761이 구강암종 세포주에 대해 세포증식 억제와 세포고사를 보이며 이러한 세포고사에는 caspase

cascade가 관여함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 EGb 761이 구강암에 대하여 암예방제로서 사용될 가능성이 있다고 생각하였고 향후 임상적 이용을 위한 실험과 기전에 대한 추가연구 등이 필요하다고 본다.

핵심되는 말 : 은행잎 추출물, 구강암, 세포고사, caspase cascade

구강암종 세포주에서 은행잎 추출물(EGb 761)의 세포고사 효과

<지도교수 김 경 수>

연세대학교 대학원 의학과

이 광 현

I. 서 론

은행잎은 동양의학에서 수천년간 약제로 사용되어 왔으며 특히 심장과 폐 질환의 치료제로서 이용되었다.¹ 이러한 은행잎이 서양의학에서 관심을 끌게 된 것은 1965년 Dr Willmar Schwabe가 은행잎 추출물을 이용하여 순환장애, 뇌혈관 질환 등의 치료에 효과를 보았다고 발표한 것을 시발점으로 하여, 이후 은행잎 추출물(*Ginkgo biloba* extract)은 식품첨가물의 범주를 넘어 약제로 개발되어 현재 30개국 이상의 나라에서 다양한 이름의 약제로 판매되고 있다.²

은행잎 추출물중 EGb 761이라 명명된 물질은 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, 상세성분은 약 24%의 flavonoid glycoside, 6%의 terpene trilactone (diterpenoid 성분인 ginkgolide와 sesquiterpene 성분인 bilobalide), 7%의 proanthocyanidin, 소량의 저분자 유기산 등으로 구성된다.³

EGb 761의 작용에 대해서 뇌 및 말초혈관 혈류량 저하, 감각신경 질환, 기억력 및 인지능 저하 등의 질환에 대해 광범위하게 연구되었는데 이런 질환들에 대한 약리작용은 EGb 761 구성성분의 독립작용이 아닌 복합작용으로 알려져 있다.²

최근 연구에 의하면 EGb 761은 세포증식 억제 효과를 보이는데, 세포증식 억제는 항산화 기능, 신생혈관 억제기능, 세포 독작용, 유전자 조절기능 등의 기능이 독자적으로 또는 복합적으로 이루어져 억제 효과를 보인다고 한다.³ 항산화 기능은 스트레스나 방사선, 화공약품, 약물, 노화 등에 의한 발암기전시 생성되는 자유기(free radical) 및 관련된 반응성 산소류(reactive oxygen species)를 직접적으로 제거하는 기능으로 증식이 억제된다.⁴⁻⁷ 또한 항산화효소인 HO-1, SOD, GPx 등의 발현을 증가시켜 세포증식을 억제하며,⁸⁻¹⁰ 발암기전으로 여겨지는 COX-2 및 iNOS의 증가에 대해 이를 억제하는 작용으로도 증식이 억제된다.^{11,12} 다른 기전으로 DNA topoisomerase I과 II를 억제하여 DNA 손상을 감소시키며,¹³ 암생성시 증가되는 신생혈관에 대한 억제 기능¹⁴ 등의 여러 기전으로 세포증식을 억제하게 된다.

현재 암 치료에 있어 수술 치료 외에 방사선 치료나 항암제와의 복합 치료요법이 개발되어 좋은 성적을 내고 있으나 구강암의 경우 아직까지 사망률이 높은 실정이다. 이런 높은 사망률을 보이는 이유로는 진단시 주변 조직으로 파급된 진행암인 경우가 많아 예후가 불량하고, 근치적 수술 이후라도 재발이나 이차 원발암(second primary cancer)이 이비인후과 영역의 다른 암 (후두암, 상악동암)보다 상대적으로 많아 예후가 좋지 않다.¹⁵ 구강암의 이러한 속성상 구강암에 대한 근치적 수술, 방사선 치료, 항암제 치료 등의 복합요법 후에 암을 억제할 수 있는 화학적 암억제제 또는 암예방제(chemopreventive agents)의 투여가 구강암 환자의 생존율을 높이는데 중요한 역할을 하게 된다.¹⁶

그러므로 구강암 치료에 있어 효과적이고 안정적인 암예방제의 개발이 시급한 실정이다. 은행잎 추출물인 EGb 761의 경우 경험의학이나 현대의학에서 많이 사용되고 있어 안정성 면에서 만족할 만하고 최근 연구에 의하면 대장암이나 전립선암의 경우 암예방제로 사용되어 좋은 효과를 보인다.^{11,13} 그러나 EGb 761이 구강암에 대해서 암예방제로서의 가치에 관한 연구가 미흡한 실정이다.

이에 본 연구의 목적으로 EGb 761이 구강암종 세포주인 SCC 1483 세포에 대해 성장 억제작용이 있는가를 알아보고 성장 억제가 세포

고사에 의한 가를 관찰하며 이 세포고사가 어떤 기전으로 일어나는 가를 알고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 구강암종 세포주 배양 및 세포증식 분석

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

SCC 1483 세포를 well당 2000개씩 분주하여 96 well plate에서 16 시간 동안 배양한 다음 무혈장 상태에서 0, 50, 100, 200, 250, 500 µg/ml 등의 EGb 761(a generous gift from Yuyu Co., Seoul, Korea)을 48시간 동안 투여한 후 세포증식 분석(CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation assay: Promega, Madison, WI, USA)을 시행하였다. 방법으로 kit에 포함된 tetrazolium 합성물 2 ml와 phenazine ethosulfate 100 µl를 섞은 후 well당 20 µl의 혼합용액을 첨가하였다. 이후 1시간 동안 5% CO₂, 37°C의 조건하에 96 well plate를 배양한 후 spectrophotometer (490 nm 파장)로 optical density (O.D.)를 측정하였다.

2. 유세포 측정분석과 DNA ladder 분석

6 well plate의 각 well에 5×10^5 의 SCC 1483 세포를 분주한 후 배양하여 세포가 50-60% 정도 합류를 이루었을 때 이전 실험에서 결정된 농도인 250 µg/ml의 EGb 761을 24시간 및 48시간동안 처치한 다음 부유세포 및 plate에 붙어있는 세포를 채취하였다. 이후 인산 완충 용액(phosphate buffered saline)로 세포를 세척한 다음 TACS Annexin V-FITC kit (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 propidium iodide (PI)으로 핵을 염색하고, FITC-Annexin V를 고사된 세포에 결합시켰다. 이후 Becton

Dickinson FACSVantage SE (San Diego, CA, USA)를 이용하여 10,000개의 세포에 대해 flow cytometry를 시행한 다음, 결과상 그래프의 우상방(Annexin V 양성과 PI 양성)과 우하방(Annexin V 양성과 PI 음성)의 세포수를 측정하였다. 이 수치를 전체 세포로 나누어 이를 백분율로 구하여 세포고사로 정하였다. 대조군으로 EGb 761을 처리하지 않은 세포에 대하여 동일한 방법으로 0, 24, 48시간에 대해 실험을 하여 세포고사를 측정하였다. 통계 검증은 Mann-Whitney test를 이용하여 유의수준은 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

DNA 조각화 여부는 세포를 위와 같은 방법으로 배양한 다음 EGb 761 250 $\mu\text{g/ml}$ 을 24시간 동안 투여한 세포 및 투여하지 않은 세포군으로 구분하였다. 이후 각 군에 대해 부유세포 및 부착세포를 모두 채취하여 용해 완충액 (100 mM Tris-HCl pH7.4, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl)으로 세포를 용해하였다. 용해된 세포를 phenol, chloroform, isopropanol 등을 이용하여 genomic DNA를 얻어 2% agarose gel에 120 V로 1시간 동안 전기영동하여 DNA 조각화 여부를 관찰하였다.

3. Western blot 분석

여러 조건으로 배양된 세포를 radioimmunoprecipitation assay buffer (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)을 이용하여 cell lysate를 만든 다음, 단백질의 양을 bovine serum albumin을 이용한 bicinchonic acid protein assay로 측정한 후 단백질 30 μg 씩을 각 lane에 넣어 전기영동하였다.

전기영동은 6% SDS-polyacrylamide gel을 이용하였고 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 전이시킨 다음 이 막을 TBST로 희석한 10% non-fat dry milk로 4°C에서 12시간 반응시킨 후 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 항체 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA)(1:1000 농도)로 4 °C에서 밤새 반응시켰다. 이후 TBST로 세척한 다음 horseredish peroxidase가 접합된 이차항체로 1시간 동안 처리한 다음 세척하였다. 이후 enhanced

chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)와 autoradiography를 이용하여 밴드를 관찰하였다.

4. Caspase cascade 억제 실험

세포가 50-60% 정도 합류를 이루었을 때 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 EGb 761을 24시간 동안 투여한 군, EGb 761과 caspase cascade 억제제인 10 μM 의 benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone (z-VAD-fmk) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 함께 투여한 군, 아무 처치도 하지 않은 대조군 등의 세 군으로 구분하여 부유세포 및 plate에 붙어있는 세포를 채취하였다. 이후 유세포 측정 분석과 PARP 항체로 Western blot 분석을 하여 세포고사를 관찰하였다.

III. 결 과

1. EGb 761 농도에 따른 SCC 1483 세포의 증식 억제

SCC 1483 세포에 대해 0, 50, 100, 200, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 등의 EGb 761을 48시간 동안 투여한 다음 세포증식 분석을 시행하였다. Spectrophotometer로 측정된 O.D.는 대조군 1.12 ± 0.16 , 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 1.03 ± 0.09 , 100 $\mu\text{g/ml}$ 는 0.94 ± 0.14 , 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 0.88 ± 0.21 , 250 $\mu\text{g/ml}$ 는 0.54 ± 0.07 , 500 $\mu\text{g/ml}$ 는 0.45 ± 0.06 등이었다. 세포증식 억제율을 알기 위해 $\{1 - (\text{각 투여군의 평균 O.D.} / \text{대조군의 평균 O.D.})\} \times 100$ 의 공식으로 백분율을 구하였다. 50, 100, 200, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 투여군 각각의 평균 세포증식 억제율은 8%, 16%, 21%, 52%, 60%로 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 EGb 761부터 50% 이상의 증식 억제를 보였다(Table 1).

Table 1. Inhibition of SCC 1483 cells proliferation according to the concentrations of EGb 761.

EGb 761 ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (mean %)
50	8
100	16
200	21
250	52
500	60

2. EGb 761 투여 시간에 따른 SCC 1483 세포의 세포고사

SCC 1483 세포에 대해 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 EGb 761을 24시간, 48시간 동안 투여한 후 유세포 측정분석을 이용하여 세포고사를 측정하였다. 결과로 EGb 761 투여하지 않은 경우 투여 전(0시간)에 세포고사된 세포의 백분율은 $8.6 \pm 1.2\%$, 24시간에는 $9.7 \pm 1.1\%$, 48시간은 $10.6 \pm 1.5\%$ 로 대조군 각 시간대에서는 상호간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

EGb 761을 24시간 동안 투여한 경우 세포고사가 $25.7 \pm 2.0\%$, 48시간은 $31.6 \pm 0.8\%$ 였다. 이러한 결과로 EGb 761을 $250 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 투여한 경우 대조군에 비해 약 2.6배, 48시간 동안 투여한 경우는 약 3배의 세포고사가 발생하였으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$)(Fig. 1).

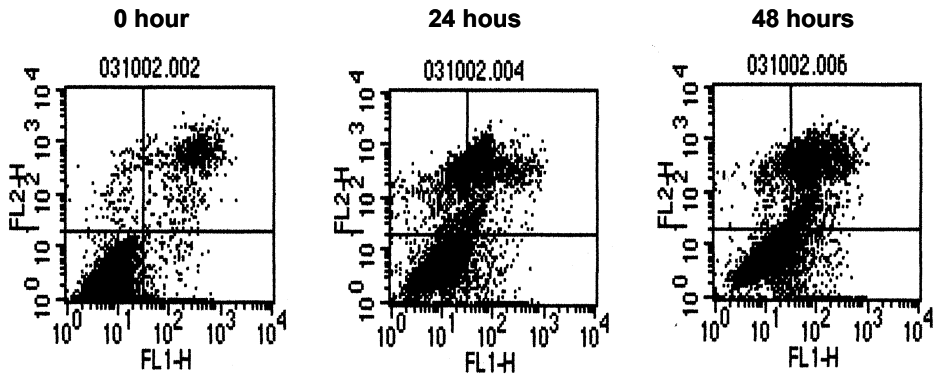


Fig. 1. Apoptosis of SCC 1483 cells by EGb 761 according to the treatment time. SCC 1483 cells were incubated with $250 \mu\text{g/ml}$ EGb 761 for 24 and 48 hours and flow cytometry using Annexin V-FITC was performed. Compared with control (0 hour), the apoptotic cells of 24 hours incubation show approximately 2.6-fold increase and those of 48 hours incubation show approximately 3.1-fold increase.

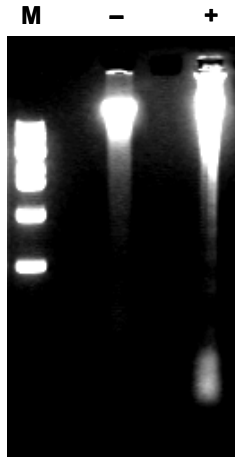
3. EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포고사 확인

EGb 761을 $250 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 투여한 SCC 1483 세포에 대해 DNA를 추출하여 전기영동한 결과 DNA의 조각화가 관찰되어 EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포고사를 확인하였다(Fig. 2A).

또한 EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포고사를 확인하는 다른

방법으로 PARP의 분할 여부를 보고자 Western blot 분석을 시행하였다. 결과상 대조군에서는 약 116 kDa 크기의 PARP가 관찰되었고, EGb 761을 투여한 경우 116 kDa의 밴드와 89 kDa의 밴드가 관찰되어 PARP의 분할이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 2B).

Fig. 2 A.



B.



Fig. 2. A. DNA fragmentation of SCC 1483 cells by EGb 761. SCC 1483 cells were incubated with 250 μ g/ml EGb 761 for 24 hours. Afterward, genomic DNA was extracted and the electrophoresis was done. Compared with control (-), genomic DNA of EGb 761-added cells (+) show the fragmented ladder pattern. **B. Cleavage of PARP by EGb 761.** SCC 1483 cells were incubated with 250 μ g/ml EGb 761 for 24 hours and the cell lysate was made, and Western blot analysis with anti-PARP antibody was performed. Compared with control (-), the cells

treated with EGb 761 (+) show the cleavage of PARP as 116 kDa and 89 kDa.

4. Caspase 억제제에 의한 세포고사 억제

PARP 분할에 caspase cascade가 관여하므로 caspase 억제제인 z-VAD-fmk를 투여하여 EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포고사가 억제되는 가를 보고자 하였다. SCC 1483 세포에 대해 250 µg/ml의 EGb 761을 24시간 동안 투여한 후 유세포 측정분석을 이용하여 세포고사를 측정하였다. 결과상 EGb 761과 z-VAD-fmk 모두를 투여하지 않은 대조군의 경우 세포고사가 8.7±1.3%에서 발생하였고, EGb 761만을 투여한 경우 20.0±2.1%, EGb 761과 z-VAD-fmk를 같이 투여한 경우는 10.5±1.6%의 세포고사가 각각 관찰되었다. 이러한 결과로 caspase 억제제를 투여한 경우 유의하게 EGb 761에 의한 세포고사가 억제됨을 알 수 있었다(p<0.05)(Table 2).

또한 EGb 761에 의한 PARP 분할이 caspase 억제제에 의해 정상화되는 가를 확인하기 위해 Western blot 분석을 시행한 결과 EGb 761에 의해 관찰되던 약 89 kDa의 밴드가 z-VAD-fmk와 EGb 761을 같이 투여할 경우 관찰되지 않고 분할되지 않은 116 kDa의 밴드만 관찰되었다(Fig. 3).

이러한 결과로 SCC 1483 세포에 대한 EGb 761의 세포고사 작용에는 caspase cascade가 관여함을 알 수 있었다.

Table 2. Inhibition of apoptosis of SCC 1483 cells by co-treatment of EGb 761 and z-VAD-fmk.

	Apoptosis (%)
Control	8.7±1.3
EGb only	20.0±2.0
EGb + z-VAD-fmk	10.5±1.6

value : mean±S.D.

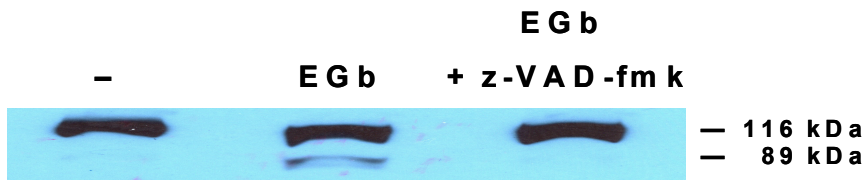


Fig. 3. Inhibition of cleavage of PARP by z-VAD-fmk. SCC 1483 cells were incubated with 250 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761 and were co-incubated with 250 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761 and 10 μM z-VAD-fmk for 24 hours. After then, the cell lysates were made and Western blot analysis with anti-PARP antibody was performed. Compared with control (-), the cells treated only with EGb 761 (EGb) show the cleavage of PARP as 116 kDa and 89 kDa. However, the cells treated both with EGb 761 and z-VAD-fmk (EGb + z-VAD-fmk) show uncleaved PARP as 116 kDa.

IV. 고 찰

식물 추출물을 이용한 암 예방 치료제로서 효과가 있는 것으로 알려진 물질로 인삼 사포닌, 마늘에서 추출한 알리신 성분, *Rhizoma zedoariae*에서 추출한 elemene, 은행잎에서 추출한 EGb 761 등이 있다.¹⁷ 이중 EGb 761은 임상적으로 췌장암과 대장암에 효과가 있는 것으로 밝혀져 있고,^{18,19} 체르노빌 핵발전소 사고로 인한 염색체이상 유발성(clastogenic activity)을 감소시킨다고 한다.²⁰

본 연구결과에서 은행잎 추출물인 EGb 761은 SCC 1483 구강암종 세포주에 대해 250 µg/ml의 용량에서부터 50% 이상의 세포증식 억제 효과를 보였고 용량에 따라 증식 억제가 증가하였다. 사람 유방암종 세포주인 MDA-231 세포주에 대해 EGb 761의 성분중 proanthocyanidin을 제거한 IPS 200과 terpenoid 성분중 하나인 ginkgolide B 등을 투여한 연구결과상 투여 용량 및 시간 증가에 따라 세포 증식을 억제하여 본 연구결과와 일치하는 결과를 보였다.²¹ EGb 761이나 그 구성성분에 의해 세포증식이 억제되는 다른 예로, 대장암 세포주에서 quercetin과 kaempferol과 같은 flavonoid 성분이 암치료에 유효하며,¹¹ 전립선암에 대해서는 kaempferol이 암 발생 위험도를 감소시키고,¹³ flavonoid glycoside의 하나인 rutin은 aflatoxin B1과 N-nitrosodimethylamine에 의한 간암을 억제한다고 한다.²²

EGb 761이 세포증식에 미치는 영향에 대한 연구들^{8,9,23}에서 사용된 용량은 100 µg/ml-500 µg/ml으로 본 연구결과에서 유효한 것으로 나타난 250 µg/ml은 이 범주에 포함되는 용량이다. 또한 백서에 대한 연구에서 EGb 761을 구강으로 투여할 경우 급성 독성을 나타내는 LD_{50} 은 7.73 g/kg였고, 쥐와 백서에게 정맥내로 주사할 경우 LD_{50} 은 1.1 g/kg였으며, 복강내로 주사할 경우 LD_{50} 은 백서에서 1.9 g/kg, 쥐에서는 2.1 g/kg였다.²⁴ 사람 몸무게 중 혈장은 4.4%를 차지하며 체중이 70 kg인 경우를 예로 들면 44 ml/kg의 혈장을 지니게 된다. 이를 토대로 250 µg/ml를 환산하면 11 mg/kg을 혈액내로 투여한 것이므로 백서나 쥐에서 정맥내 투여량과 비교시 약 1/100의 양으로 매우 안전하다 하겠다.

임상적으로 EGb 761은 급성 독작용보다 장기간 복용으로 유발되는 만성 독작용이 더욱 중요하다. 쥐와 개에 대해 매일 400-500 mg/kg의 용량으로 26-27주 동안 투여시 장기에 부작용이 보이지 않았고 간과 신장에도 부작용이 관찰되지 않았다.²⁵ 본 연구에 사용된 250 µg/ml을 체중 70 kg를 기준으로 환산하면 투여량이 11 mg/kg이므로, EGb 761을 장기간 복용시 신경계, 선조직과 눈 등에 최대 20배 정도가 축적된다는 보고²⁵를 감안할 경우 최대 220 mg/kg의 용량이 정맥내로 투여된 것과 같으므로 동물실험에서의 결과와 비교시 장기간 투여에도 안전한 용량이라고 생각한다.

EGb 761은 여러 성분이 복합되어 있는 복합제이므로 불필요한 성분을 줄여 투여 용량을 줄이고 최소한의 성분 투여에 의해 부작용을 극소화 시킬 수 있는 방법으로 성분별 투여가 있다. 성분별 투여의 예로 MDA-231 세포주에 대해 IPS 200은 2-200 µg/ml, ginkgolide B는 0.2-20 µg/ml의 농도에서 세포증식을 억제하여 본 연구에서 사용된 250 µg/ml보다 낮은 농도에서 세포증식이 억제되었다.²¹ 이러한 결과에서 나타나듯이 약제에 대한 각 세포의 감수성을 감안하더라도 성분별 투여가 장점을 보이므로 향후 성분별 투여에 의한 세포증식 억제에 대한 연구가 필요하리라 본다.

세포고사(apoptosis)는 특정 유전자의 발현, mRNA와 단백질의 합성, caspase와 핵산내부 가수분해효소(endonuclease)의 활성화 등이 단계적으로 일어나는 능동적인 세포주기 특이 과정으로 DNA의 조각화와 유세포 측정분석 등을 통해 세포고사를 확인하게 된다.²⁶ 연구결과상 EGb 761을 250 µg/ml의 농도로 24시간동안 투여할 경우 약 2.6배의 세포고사가 발생하였고 이러한 세포고사는 시간경과에 따라 증가하였다. 또한 같은 농도로 24시간 동안 투여한 경우 DNA를 추출하여 전기영동 한 결과 DNA 조각들의 계단상 모양이 관찰되었다. 이러한 유세포 측정분석 결과 및 DNA의 조각화는 세포고사에 대한 표식자로, EGb 761에 의한 세포증식 억제가 세포고사에 의해 일어남을 나타낸다 하겠다. EGb 761에 의한 세포고사의 상위 기전(upstream mechanism)은 아직 확실히 밝혀지지 않은 상태로 본 연구에 이용된 SCC 1483 세포가 cyclooxygenase-2와 암억제 유전자인 p53을 표현

하는 세포이므로^{27,28} 이들의 변화도 하나의 가능성이 될 수 있으며 향후 이에 대한 추가연구가 필요하리라 생각한다.

PARP는 약 116 kDa 크기의 핵단백질로 NAD⁺를 기질로 하여 여러 핵단백질의 유전암호해독 후 변화(posttranslational modification)에 작용한다. 이런 결과로 DNA에 대한 poly (ADP-ribose) nuclear protein의 결합을 억제하고, chromatin 구조의 응축을 억제하며 DNA 복구를 가능하게 하여 유전자 안정성을 유지하게 한다. 이 단백질의 분할은 생체의 실험상 여러 ICE 유사 caspase에 의해, 생체 실험상 caspase-3의 주된 분할 표적이 되어 분할이 발생한다.^{29,30} 분할은 Asp214와 Gly215 사이에서 일어나 N-말단 (24 kDa)과 C-말단 (89 kDa)의 두 조각으로 나뉘게 된다. 이런 분할에 의해 PARP가 불활성화되어 세포고사가 일어나게 된다.³¹ 본 연구결과에서 PARP의 분할에 의한 89 kDa 크기의 조각이 Western blot 분석에서 관찰되어 EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포증식 억제는 세포고사에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 EGb 761이나 구성성분이 백혈병 세포와 HL-60 세포에서 PARP를 분할시켜 세포고사를 일으킨다는 보고^{32,33}와 일치하였다.

PARP 단백질은 caspase-3의 주된 표적중 하나로 이에 의해 분할이 발생하므로,^{29,30} 본 연구에서는 caspase-1과 -3에 연관된 단백질 분해효소에 대한 비특이 억제제³⁴인 z-VAD-fmk를 EGb 761과 같이 투여하여 EGb 761에 의한 세포고사의 억제 여부와 PARP 단백질의 분할 억제를 관찰하였다. z-VAD-fmk를 같이 투여하여 유세포 측정분석을 한 결과 세포고사가 억제되어 대조군과 차이를 보이지 않았고, Western blot 분석 상 PARP의 분할이 일어나지 않아 EGb 761에 의한 세포고사의 하위 기전(downstream mechanism)에 caspase cascade가 관여함을 알 수 있었다.

이상의 결과로 은행잎 추출물인 EGb 761을 구강암종 세포주인 SCC 1483 세포에 250 µg/ml의 용량으로 24시간 동안 투여시 대조군에 비해 유의하게 세포증식 억제와 세포고사를 보이며 이러한 세포고사에는 caspase cascade가 관여함을 알 수 있었다.

V. 결 론

본 연구의 결과를 토대로 은행잎 추출물인 EGb 761이 구강암에 대하여 암예방제로서 사용될 가능성이 있다고 생각하였고 향후 임상적 이용을 위한 실험과 기전에 대한 추가연구 등이 필요하다고 본다.

참 고 문 헌

1. Deng QS. Chinese medicine: the dawn, the founders and the first pharmacopeia. *Drug News Perspect* 1988;1:57-58.
2. DeFeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier; 1991. p.1-8.
3. DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;17:405-417.
4. Gardes-Albert M, Ferradini C, Sekaki A, Droy-Lefaix MT. Oxygen-centered free radicals and their interactions with EGb 761 or CP 202. In: Ferradini C, Droy-Lefaix MT, Christen Y, editors. *Advances in Ginkgo biloba extract research: Ginkgo biloba extract (EGb 761) as a free-radical scavenger*. Paris: Elsevier; 1993. p.1-11.
5. Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix MT, Packer L. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1649-1655.
6. Packer L, Marcocci L, Haramaki N, Kobuchi H, Christen Y, Droy-Lefaix MT. Antioxidant properties of Ginkgo biloba extract EGb 761 and clinical implications. In: Packer L, Traber MG, Xin W, editors. *Natural Antioxidants: molecular mechanism and health effects*. Illinois: AOCS Press; 1996. p.472-487.
7. Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:748-755.
8. 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;33:831-849.

9. Chen JX, Zeng H, Chen X, Su CY, Lai CC. Induction of heme oxygenase-1 by Ginkgo biloba extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysophosphatidylcholine-induced damage. *Pharmacol Res* 2001;43:63-69.
10. Song W, Guan HJ, Zhu XZ, Chen ZL, Yin ML, Cheng XF. Protective effect of bilobalide against nitric oxide-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:415-420.
11. Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis* 2000;21:959-963.
12. 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. *Life Sci* 2001;6:4768-4775.
13. Griffiths K, Morton MS, Denis I. Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer. *Eur Urol* 1999;35:443-455.
14. Monte M, Davel LE, de Lustig ES. Inhibition of lymphocyte induced angiogenesis by free radical scavengers. *Free Radical Biol Med* 1994; 17:259-266.
15. Levine PA, Hood RJ. Neoplasms of the oral cavity. In: Bailey BJ, Calhoun KH, editors. *Head & neck surgery-Otolaryngology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott;2001. p.1311-1325.
16. Contreras Vidaurre EG, Bagan Sebastian JV, Gavalda C, Torres Cifuentes EF. Retinoids: application in premalignant lesions and oral cancer. *Med Oral* 2001;6:114-123.
17. Zheng S, Yang H, Zhang S, Wang X, Yu L, Lu J, Li J. Initial

- Study on naturally occurring products from traditional Chinese herbs and vegetables for chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* 1997;27:106–112.
18. Hauns B, Haring B, Kohler S, Mross K, Robben-Bathe P, Unger C. Phase II study with 5-fluorouracil and Ginkgo biloba extract (GBE 761 ONC) in patients with pancreatic cancer. *Arzneimittelforschung* 1999; 49:1030–1034.
 19. Hauns B, Haring B, Kohler S, Mross K, Unger C. Phase II study of combined 5-fluorouracil pretreated patients with advanced colorectal cancer. *Phytother Res* 2001;15:34–38.
 20. Emerit I, Oganessian N, Sarkisian T, Arutyunyan R, Pogolian A, Asrian K, Levy A, Cernjavski L. Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. *Radiat Res* 1995;144:198–205.
 21. Papadopoulos V, Kapsis A, Li H, Amri H, Hardwick M, Culty M, Kasprzyk PG, Carlson M, Moreau JP, Drieu K. Drug-induced inhibition of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Anticancer Res* 2000;20:2835–2847.
 22. Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Lett* 1996;109:185–191.
 23. Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, Khan I, Netzer WJ, Xu H, Butko P. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12197–12202.
 24. Drieu K. Preparation and definition of Ginkgo biloba extract. In: Funfgeld EW, editor. *Rokan, Ginkgo biloba: Recent results in*

- pharmacology and clinic. Berlin: Springer-Verlag;1988. p.32-36.
25. DeFeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier; 1991. p.143-146.
 26. Smets. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs* 1994;5:3-9.
 27. Kim MS, Li SL, Bertolami CN, Cherrick HM, Park NH. State of p53, Rb and DCC tumor suppressor genes in human oral cancer cell lines. *Anticancer Res* 13 1993;13:1405-1413.
 28. Lotan R, Sacks PG, Lotan D, Hong WK. Differential effects of retinoic acid on the in vitro growth and cell-surface glycoconjugates of 2 human head and neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1987;40:224-22.
 29. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407:810-816.
 30. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995;81:801-809.
 31. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 1998;273:33533-33539.
 32. Wang Y, Perchellet EM, Tamura M, Hua DH, Perchellet JP. Induction of poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage by antitumor triptycene bisquinones in wild-type and daunorubicin-resistant HL-60 cell lines. *Cancer Lett* 2002;188:73-83.
 33. Antoku K, Liu Z, Johnson DE. Inhibition of caspase proteases by CrmA enhances the resistance of human leukemic cells to

- multiple chemotherapeutic agents. *Leukemia* 1997;11:1665-1672.
34. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miler DK. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis *Nature* 1995;376:37-43.

Abstract

Apoptotic effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761)
in a oral squamous carcinoma cell line

Kwang-Hyeon Rhee

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung-Su Kim)

EGb 761, extracted from *Ginkgo biloba* leaves, may act as a chemopreventive agent for colorectal and prostate cancer. The aim of this study was to investigate the antiproliferative effect and proapoptotic effect of EGb 761 on oral cavity cancer cells.

SCC 1483 oral cavity cancer cell line derived from a human retromolar trigone carcinoma was used. The concentration of EGb 761 to reduce cell viability by more than 50% (IC₅₀) and the treatment time to induce apoptosis were examined. DNA ladder assay and Western blot analysis with anti-PARP antibody for the confirmation of apoptosis were used. Caspase inhibitor (z-VAD-fmk) was used to investigate the inhibition of apoptosis induced by EGb 761.

IC₅₀ of EGb 761 was 250 µg/ml in SCC 1483 cells. Apoptosis was observed after 24 hours incubation with 250 µg/ml EGb 761 and was increased with the increment of time. DNA fragmentation and cleavage of PARP were noted in SCC 1483 cells, which were incubated in 250 µg/ml EGb 761 for 24 hours. This apoptosis and the cleavage of PRAP were not observed in SCC 1483 cells, co-incubated with EGb 761 and z-VAD-fmk.

These results showed that EGb 761 induces apoptosis of SCC 1483 cells and caspase cascade is involved in this apoptosis. Therefore, it is strongly suggested that EGb 761 might be used as chemopreventive agent on oral cavity cancer and the further studies on this fact will be required.

Key Words : *Ginkgo biloba* extract, oral cavity cancer, apoptosis, caspase cascade