

구강암종에서 은행잎 추출물
(EGb 761)
구성 성분에 의한 항암작용

연세대학교 대학원
의 학 과
강 주 완

구강암종에서 은행잎 추출물
(EGb 761)

구성 성분에 의한 항암작용

지도 김 경 수 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2008년 6월

연세대학교 대학원

의 학 과

강 주 완

강주완의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2008 년 6 월

감사의 글

주위의 많은 도움이 없었더라면 저 혼자만의 힘으로 지금까지 올 수 없었을 거라고 생각합니다. 짧은 지면을 통해 고마웠던 많은 사람들과 그에 대한 감사의 마음을 표현하기는 부족하겠지만, 간략하게나마 감사의 마음을 표합니다.

먼저 연구주제의 선정에서부터 논문작성까지 열과 성을 다해 지도 해주신 김경수 선생님께 감사드립니다. 또한 부족한 부분을 지적해 주시고 더 나은 모양으로 가다듬어 주신 윤주현 선생님과 윤채옥 선생님께도 역시 감사드립니다.

그리고 누구보다 저를 낳아주시고 길러주신 존경하는 부모님, 언제나 곁에서 힘이 되어주었던 사랑하는 아내 그리고 즐거운 일상의 통로가 되어준 동료, 선후배, 친구들에게도 감사드립니다.

마지막으로 학위수여식 즈음에는 세상을 만날 쌍둥이에게 사랑과 감사를 전하며, 감사의 글은 짧게 적었지만 감사의 마음만은 길게 간직하겠습니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	4
1. 구강암종 세포주의 배양	4
2. 재료	4
3. 세포증식 분석	4
4. 유세포 측정분석 (flow cytometry)	5
5. Poly (ADP-ribose) polymerase 분할 검사 (western blot 분석)	5
6. Caspase-3 활성도 검사	6
III. 결과	7
1. EGb 761 구성 성분에 의한 구강암종 세포주의 증식 억제	7
2. EGb 761 성분별 투여에 따른 SCC-1483 세포의 세포고사 확인	9
3. 여러 구강암종 세포주에서 EGb 761과 구성성분에 의한 세포고사 비교	10
4. Kaempferol 과 quercetin에 의한 caspase-3 의존성 세포고사	14
IV. 고찰	16
V. 결론	20
참고문헌	21
영문요약	25

그림 차례

Fig. 1 Inhibition of cell proliferation by components of EGb 761	7
Fig. 2A. Apoptosis of SCC-1483 cells by kaempferol	9
Fig. 2B. Apoptosis of SCC-1483 cells by quercetin	9
Fig. 2C. Bar graph of apoptosis of SCC-1483 cells induced by kaempferol and quercetin	9
Fig. 3A. Apoptosis in various oral cavity cancer cells by kaempferol, quercetin, mixture of kaempferol and quercetin, and EGb 761 ..	12
Fig. 3B. Bar graph of apoptosis in various oral cavity cancer cells by kaempferol, quercetin, mixture of kaempferol and quercetin, and EGb 761	12
Fig. 3C. PARP cleavage by kaempferol, quercetin, and EGb 761	13

Fig. 4A. Inhibition of PARP cleavage by z-VAD-fmk
in SCC-1483 cells treated with kaempferol
and quercetin 15

Fig. 4B. Inhibition of caspase-3 activity
by z-VAD-fmk 15

표 차례

표 1. EGb 761 성분별 투여에 따른 구강암종 세포의 증식률 비교	8
표 2. 여러 구강암종 세포주에서 EGb 761과 구성 성분에 의한 세포고사 비율	11

국문요약

구강암종에서 은행잎 추출물 (EGb 761) 구성 성분에 의한 항암작용

EGb 761은 항산화기능, 항산화효소 증강기능, cyclooxygenase-2 및 inducible nitric oxide synthase 억제, 신생혈관 억제능 등을 보이며 대장암과 전립선암 등에서 항암작용이 있다고 한다. 최근 연구에 의하면 구강암종 세포주에서도 세포고사 작용을 보인다고 한다. 그러나 EGb 761의 구성 성분 중 어느 성분이 구강암종 세포주의 세포고사를 야기하는지에 대해서는 알려진 바가 없다. 이에 첫째, 구강암종 세포주에서 EGb 761의 어떤 구성 성분이 세포증식을 억제하는지 알아보고 둘째, 구강암종 세포의 성장억제가 세포고사에 의한 것인가를 확인하며 셋째, 구성 성분에 의한 세포고사 유도가 EGb 761과 마찬가지로 caspase-3 의존성인가를 보고자 하였다. EGb 761의 성분으로 ginkgolide A, ginkgolide B, bilobalide, kaempferol, quercetin 등을 투여한 결과 kaempferol과 quercetin은 40 μ M 부터 세포증식을 유의하게 억제하였고 세포증식 억제는 유세포 측정분석상 세포고사에 의함을 알 수 있었다. SCC-1483, SCC-25와 SCC-QLL1 등의 모든 구강암종 세포주에서 세포고사를 유도하였으며, PARP 분할도 유도하여 kaempferol과 quercetin 성분에 의해 구강암종 세포주에서 세포고사가 유도됨을 확인하였다. 또한 각각을 20 μ M씩 혼합하여 처치하는 경우에 가장 강력하게 세포고사를 유도하였으며 EGb 761과 비교 시 10배 이하의 용량에서 세포고사 유도가 가능하였다. 그러나 세포에 따라 세포고사의 정도는 상이하였다. 또한, kaempferol과 quercetin에 의한 세포고사 유도는 caspase-3 의존성임을 알 수 있었다. 결론적으로 향후 EGb 761의 임상 적용에서 kaempferol과 quercetin 등의 구성 성분 투여가 효과적이며 향후 세포고사 유도 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

핵심되는 말 : 은행잎 추출물, 구성성분, 구강암, 항암작용

구강암종에서 은행잎 추출물 (EGb 761) 구성 성분에 의한 항암작용

<지도교수 김경수>

연세대학교 대학원 의학과

강 주 완

I. 서론

은행은 동양의학에서 오랫동안 약제로 사용되어져 왔으며, 최근 서양의 학에서는 은행잎 추출물 (*Ginkgo biloba* extract)의 형태로 사용되고 있다. 보다 안전하고 효과적인 사용을 위해서 은행잎 추출물의 표준화가 필수적이므로, 독일과 프랑스의 경우 표준화된 은행잎 추출물로 EGb 761이 승인되었다. EGb 761의 주요 성분으로는 약 24%의 flavonoid glycosides (kaempferol, quercetin, luteolin 등), 6%의 terpene trilactones (diterpenoid인 ginkgolide와 sesquiterpene인 bilobalide), 5ppm 미만의 ginkgolic acid 등이 있다.¹

EGb 761은 뇌 및 말초혈관 혈류량 저하, 감각신경 질환, 기억력 및 인지능 저하 등의 질환에서 치료제로 광범위하게 사용되고 있으며,^{1,2} 최근 연구에서는 대장암이나 유방암 세포에 대해 세포증식 억제 효과가 있는 것으로 알려졌다.²⁻⁴ 이러한 항암작용의 기전으로 다양한 이론들이 제시되고 있다. 먼저, 자유기 (free radical) 및 관련된 반응성 산소류 (reactive oxygen species)를 직접적으로 제거하는 항산화 기전, 전산화 단계의 금속이온을 킬레이팅시키는 기전, 항산화효소인 heme oxygenase-1(HO-1),

superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx)등의 발현을 증가시키는 기전, glutathiones과 같은 항산화대사물질을 증가시키는 기전 등의 다양한 항산화 기능을 통해 항암작용을 나타낸다.⁵⁻⁸ 또한, 발암기전으로 여겨지는 COX-2 및 iNOS의 증가에 대해 이를 억제하는 작용,^{3,4} DNA topoisomerase I과 II를 억제하여 DNA 손상을 억제하는 기능⁹, 신생혈관에 대한 억제 등 여러 기전을 통해 암을 억제하게 된다.¹⁰

최근 연구에 의하면 EGb 761 250 µg/ml을 구강암종 세포주에 투여 시 세포증식 억제를 보이며 이러한 세포증식 억제는 세포고사에 의한 것임이 밝혀졌으며, 위 실험에서 사용한 용량은 백서를 이용한 안정성 실험 결과에 비하여 비교적 안전한 용량임을 확인할 수 있었다.¹¹ 그러나, EGb 761은 여러 성분이 복합되어 있는 복합제이므로, 필요한 성분을 선택적으로 사용함으로써 투여 용량을 줄이고 최소한의 성분 투여에 의해 부작용을 극소화시킬 수 있을 것으로 생각되었다. 성분별 투여의 예로 유방암 세포주인 MDA-231에 대해 EGb 761의 성분중 하나인 IPS 200은 2-200 µg/ml, ginkgolide B는 0.2-20 µg/ml의 농도에서 세포증식을 억제하였다.¹² 이처럼 약제에 대한 각 세포의 감수성을 감안하더라도 성분별 투여가 전체 약제를 투여하는 것보다 장점을 보이므로, 성분별 투여에 의한 세포증식 억제에 대한 연구가 필요하리라 생각한다.

이에 본 연구의 목적으로 첫째, 사람 구강암종 세포주에 EGb 761의 구성 성분을 투여하여 세포고사를 유도하는 성분을 규명하고 둘째, 성분별 투여에 의한 세포고사가 EGb 761 투여와 비교 시 효과적인가를 밝히며 셋째, EGb 761에 의한 세포고사가 caspase의 활성화에 의한 것처럼 성분별 투여에 의한 세포고사 또한 caspase-3 활성화에 의해 일어나는 가를 알고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 구강암종 세포주의 배양

SCC-1483, SCC-25, SCC-QLL1 등의 사람 구강암종 세포주(a generous gift from Dr. J Shah, 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 $\mu\text{g/ml}$), streptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$) 등으로 조성된 배지에서 배양하였다.

2. 재료

EGb 761은 유유산업 (Seoul, Korea)에서 기증받아 사용하였다. EGb 761의 성분으로는 terpenoid 성분인 bilobalide, ginkgolide A, ginkgolide B와 flavonoid 성분인 kaempferol, quercetin를 사용하였고, caspase cascade 억제제로 benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone (z-VAD-fmk)를 사용하였는데 이들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

3. 세포증식 분석

SCC-1483 세포를 well당 2000개씩 분주하여 96 well plate에서 12-16 시간 배양한 다음 무혈장상태에서 quercetin, kaempferol, bilobalide, ginkgolide A와 B를 각각 24시간 동안 투여한 다음 세포증식 분석 (CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation assay: Promega, Madison, WI, USA)을 시행하여 EGb 761의 어떤 구성성분에 의해 SCC-1483 세포의 증식이 유의하게 억제되는 가를 관찰하고 또한 성장을 50% 이상 억제하는 최소 농도(IC₅₀)를 결정하였다.

4. 유세포 측정분석 (flow cytometry)

세포가 50-60% 정도 합류를 이루었을 때 위에서 결정된 최소농도의 EGb 761 구성성분을 24 시간동안 처치한 다음 부유세포 및 plate에 붙어 있는 세포를 얻었다. 이후 인산 완충용액(phosphate buffered saline)에 세포를 세척하고 세척된 세포를 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 유세포분석을 시행한 다음, 우상방 (Annexin V 양성과 PI 양성)과 우하방(Annexin V 양성과 PI 음성)의 세포수를 계측하였다. 이 수치를 전체 세포로 나누어 이를 백분율로 구하여 세포고사로 정하였다. 이 결과를 대조군과 비교하여 세포고사가 일어나는 가를 관찰한다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 평균값에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법 (repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

5. Poly (ADP-ribose) polymerase 분할 검사(western blot 분석)

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 μ g씩을 각 lane에 넣어 전기영동하였다. 전기영동은 6% SDS-polyacrylamide gel을 이용하였고 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 전이시킨 다음 이 막을 0.05% Tween-20이 함유된 Tris-buffered saline(TBST)으로 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 horseradish peroxidase가 접합된 이차항체로 1시간 동안 처치한 다음 세척하였다. 이후 enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)와 autoradiography를 이용하여 밴드를 관찰하였다. 한편 nitrocellulose 막을 deprobing한 다음 같은 방법을 이용하여 α -tubulin 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 반응을 시켰다.

6. Caspase-3 활성화도 검사

세포를 10 cm plate에서 plate당 10^6 개씩 분주하여 16시간 동안 배양한 다음 10 μ M z-VAD-fmk를 전처리하거나 전처리하지 않은 상태로 40 μ M의 kaempferol이나 quercetin을 각각 투여하여 24시간 동안 배양한 후 caspase-3 활성화도를 검사하였다. CaspACE Assay System (Promega Co.)을 사용하였는데 방법을 요약하면, 세포를 ice-cold PBS로 세척한 후 세포용해 용액 1 ml을 넣어 세포를 용해시켰다. 이후 수차례 얼렸다 녹이는 동작을 반복한 후 얼음에 15분간 배양한 다음 4 °C에서 15000 x g로 20분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 액에 DEVD-pNA (2 μ l)를 넣고 37 °C에서 4시간 동안 배양한 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 평균값에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법(repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

III. 결과

1. EGb 761 구성 성분에 의한 구강암종 세포주의 증식 억제

EGb 761 구성 성분 중 ginkgolide A, ginkgolide B, bilobalide, kaempferol, quercetin 등을 각각 20, 40, 80 μM 의 농도로 SCC-1483 세포에 대해 24시간 동안 투여한 다음 세포증식 억제 정도를 알아보았다. 대조군인 아무 성분도 처치하지 않은 세포와 비교한 결과 20 μM 에서는 5종의 구성 성분 모두에서 50% 이상의 세포증식 억제를 보이지 않았다. 40 μM 부터 kaempferol과 quercetin은 50% 이상 세포증식을 억제하여 80 μM 에서는 더욱 강하게 세포증식 억제를 보였다. 그러나 다른 성분들은 유의한 세포증식 억제를 보이지 않았다 (표 1, Fig. 1). 이러한 결과를 토대로 이후 실험에서는 kaempferol과 quercetin을 이용하였다.

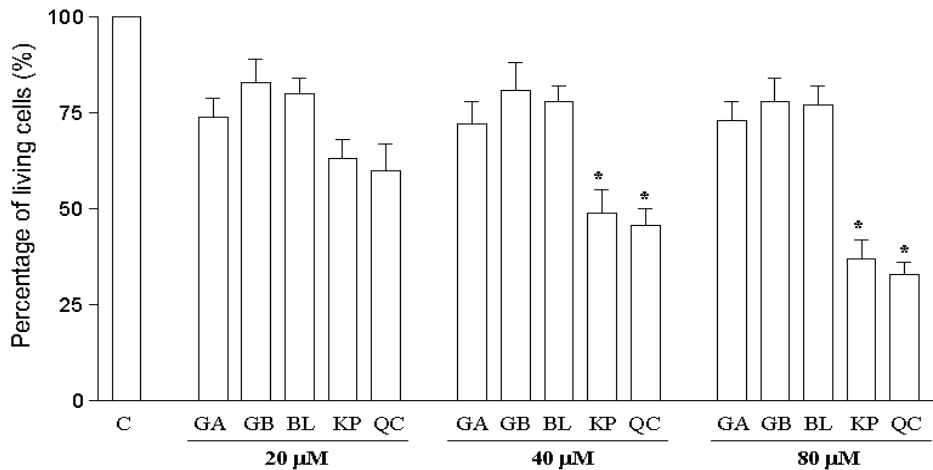


Fig. 1. Inhibition of cell proliferation by components of EGb 761. SCC-1483 oral cavity cancer cells were treated with various concentrations of ginkgolide A (GA), ginkgolide B (GB), bilobalide (BL), kaempferol (KP), and quercetin (QC) for 24 hours and cell proliferation assay was done. From 40 μM concentration, kaempferol and quercetin show the significant inhibition of cell proliferation compared with the negative control (C). *: inhibition of cell proliferation more than 50% compared with the control.

표 1. EGb 761 성분별 투여에 따른 구강암종 세포의 증식률 비교 (%)

	20 μ M	40 μ M	80 μ M
Ginkgolide A	74 \pm 5	72 \pm 6	73 \pm 5
Ginkgolide B	83 \pm 6	81 \pm 7	78 \pm 6
Bilobalide	80 \pm 4	78 \pm 4	77 \pm 5
Kaempferol	63 \pm 5	49 \pm 6	37 \pm 5
Quercetin	60 \pm 7	46 \pm 4	33 \pm 3

* 대조군의 세포증식을 100%로 하였을 경우의 백분율임.

* Value : mean \pm standard deviation

2. EGb 761 성분별 투여에 따른 SCC-1483 세포의 세포고사 확인

SCC-1483 세포에 대해 kaempferol과 quercetin 여러 농도를 24 시간동안 투여한 다음 Annexin V와 PI를 이용하여 double staining을 시행한 후 유세포 측정분석을 시행하여 세포고사를 측정하였다. 결과로 kaempferol의 경우 대조군을 1로 하였을 때 20 μM 에서 1.8 ± 0.3 배, 40 μM 에서 3.5 ± 0.6 배, 80 μM 에서 5.5 ± 0.8 배의 세포고사를 보여 40 μM 부터 유의한 세포고사를 보였다 ($p < 0.05$). quercetin의 경우 20 μM 에서 2.1 ± 0.2 배, 40 μM 에서 4.4 ± 0.8 배, 80 μM 에서 6.2 ± 0.7 배의 세포고사를 보여 40 μM 부터 유의한 세포고사를 보였다 ($p < 0.05$)(Fig. 2). 그러나 kaempferol과 quercetin 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

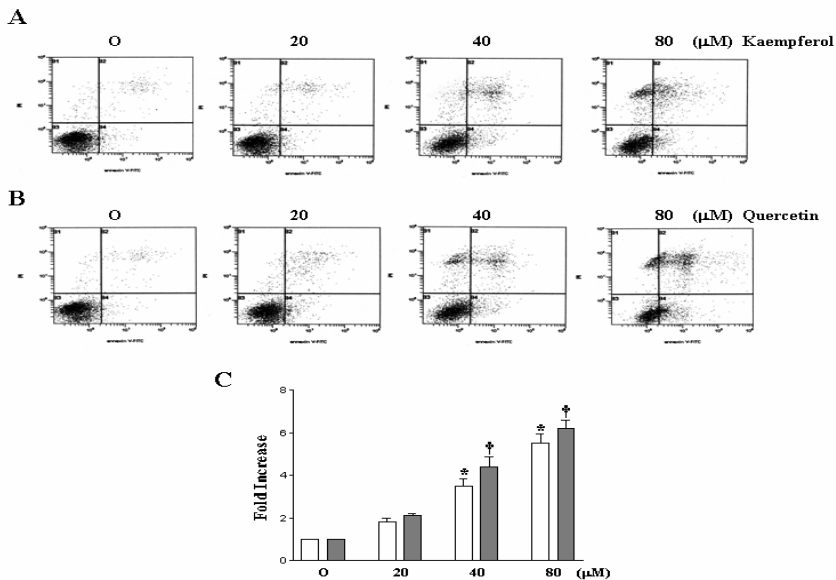


Fig. 2. Apoptosis of SCC-1483 cells by kaempferol and quercetin. A, B. Dot plots of apoptosis by kaempferol (A) and quercetin (B). Cells were respectively treated with various concentrations of kaempferol and quercetin for 24 hours and apoptosis was examined with FACS analysis. Apoptosis induced by kaempferol and quercetin are observed from 40 μM concentration. C. Bar graph of apoptosis induced by kaempferol (blank) and quercetin (dotted). *, † $p < 0.05$ compare with each control.

3. 여러 구강암종 세포주에서 EGb 761과 구성 성분에 의한

세포고사 비교

Kaempferol, quercetin 등의 구성성분별 투여가 EGb 761 투여와 비교 시 얼마나 효과적인가를 비교하기 위해 40 μ M kaempferol, 40 μ M quercetin, 각 20 μ M의 kaempferol과 quercetin 혼합군, 250 μ g/ml EGb 761 등 4 경우를 각각 투여하여 세포고사 정도를 알아보았다. 또한, SCC-1483 세포주 이외에 다른 구강암종 세포주에서도 세포고사가 나타나는 것을 알기 위해 SCC-25, SCC-QLL1 등의 구강암종 세포주에 대해서도 같은 실험을 진행하였다.

결과로 구강암종 세포주 3 종 모두에서 투여한 성분에 의해 유의하게 세포고사가 유도되었다 ($p < 0.05$)(표 2)(Fig. 3A, B). 그러나 각 세포에서 투여 성분에 의한 반응 정도는 상이하서 SCC-1483 세포와 SCC-25 세포에서는 kaempferol과 quercetin 혼합군, quercetin, kaempferol, EGb 761의 순으로 세포고사가 강하게 유도되었고, SCC-QLL1의 경우는 kaempferol과 quercetin 혼합군, EGb 761, quercetin, kaempferol의 순으로 세포고사가 유도되었다 (표 2)(Fig. 3A, B).

세포고사를 확인하는 다른 방법으로 PARP의 분해를 SCC-1483, SCC-25, SCC-QLL1 세포에서 western blot 분석을 이용하여 조사하였다. 결과 상 모든 세포에서 40 μ M kaempferol, 40 μ M quercetin, 250 μ g/ml EGb 761에 의해 116 kD의 PARP가 각각 116 kD과 89 kD으로 분할되는 것을 확인하여 각 성분에 의해 세포고사가 유도됨을 알 수 있었다 (Fig. 3C).

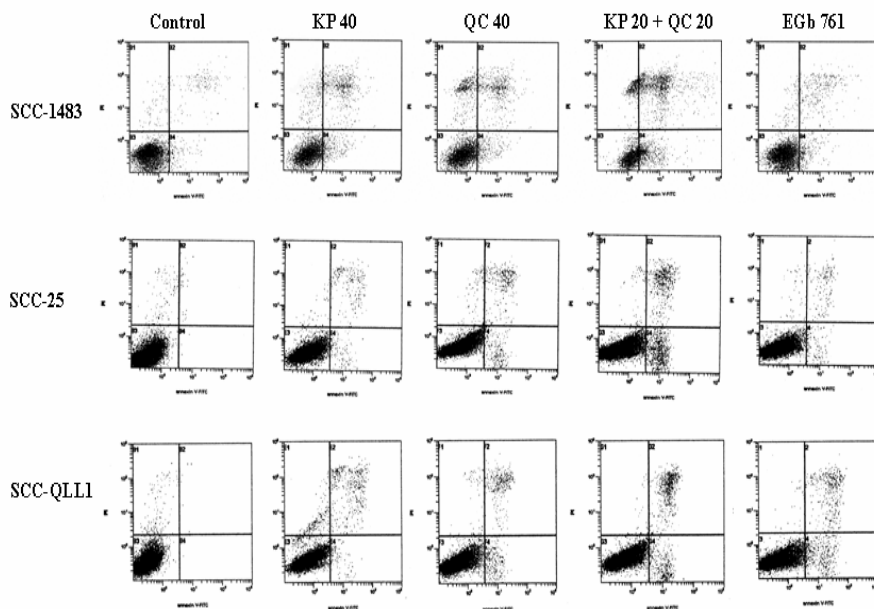
표 2. 여러 구강암종 세포주에서 EGb 761과 구성 성분에 의한 세포고사 비율

	SCC-1483	SCC-25	SCC-QLL1
Kaempferol (40 μ M)	3.8 \pm 0.5	4.0 \pm 0.7	3.1 \pm 0.3
Quercetin (40 μ M)	4.6 \pm 0.7	5.1 \pm 0.6	4.5 \pm 0.6
Kaempferol (20 μ M) + Quercetin (20 μ M)	5.2 \pm 0.8	5.8 \pm 0.5	6.2 \pm 0.7
EGb 761 (250 μ g/ml)	3.0 \pm 0.4	3.2 \pm 0.5	5.4 \pm 0.7

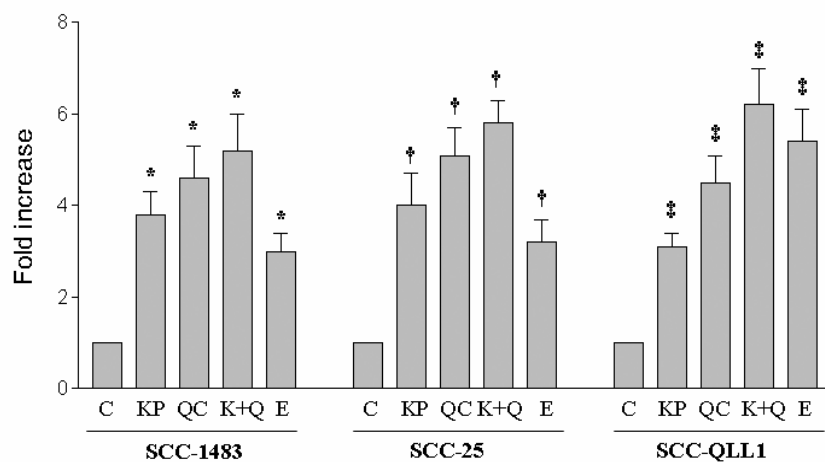
* 세포고사 비율은 각 세포의 대조군을 1로 한 비율이며, 세포고사는 Annexin V와 PI를 double staining 한 후 유세포 측정분석을 이용하여 조사하였음

* Value : mean \pm standard deviation

A



B



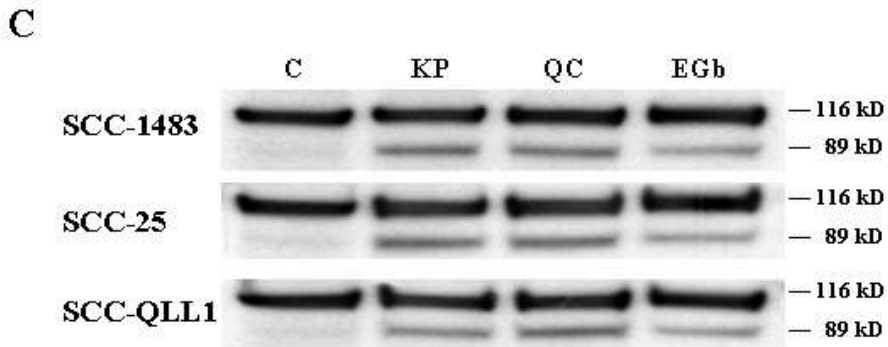


Fig. 3. Apoptosis in various oral cavity cancer cells by kaempferol, quercetin, mixture of kaempferol and quercetin, and EGb 761. A. SCC-1483, SCC-25, and SCC-QLL1 oral cavity cancer cells were respectively treated with 40 μ M kaempferol (KP40), 40 μ M quercetin (QC40), mixture of 20 μ M kaempferol and 20 μ M quercetin (KP20+QC20), and EGb 761 for 24 hours and apoptosis was examined using flow cytometry after Annexin V/PI double staining. In all cells, apoptosis is significantly induced by EGb 761 and its components compared with the control ($p < 0.05$), but the amount of apoptosis is different according to the cell type. B. Bar graph of apoptosis by kaempferol (KP), quercetin (QC), the mixture of kaempferol and quercetin (K+Q), and EGb 761 (E). C. PARP cleavage by kaempferol, quercetin, and EGb 761. In all cell lines, kaempferol (KP), quercetin (QC), and EGb 761 (EGb) induce the cleavage of PARP. * $p < 0.05$ compared with the control of SCC-1483 cells, [†] $p < 0.05$ compared with the control of SCC-25 cells, [‡] $p < 0.05$ compared with the control of SCC-QLL1 cells.

4. kaempferol과 quercetin에 의한 caspase-3 의존성 세포고사

기존 연구에서 EGb 761에 의한 세포고사에 caspase-3가 관여함이 증명되었다.¹¹ 이에 EGb 761의 구성 성분인 kaempferol과 quercetin에 의한 세포고사에도 caspase-3가 관여하는 가를 알기 위해 SCC-1483 세포주에서 caspase cascade 억제제인 10 μ M z-VAD-fmk를 전처리하여 PARP의 분할이 어떻게 변화하는 가를 관찰하였다. 결과로 z-VAD-fmk를 전처리함으로써 kaempferol과 quercetin에 의해 분할되었던 PARP가 분할되지 않아 caspase cascade가 kaempferol과 quercetin의 세포고사 기전에 관여함을 알 수 있었다 (Fig. 4A).

다음 단계로 caspase-3의 활성도를 조사하여 caspase-3 의존성 여부를 알고자 하였다. 아무 처치를 하지 않은 대조군을 1로 하여 활성도의 비율을 조사한 결과, kaempferol 처치군에서 z-VAD-fmk를 전처리하지 않은 경우 6.5 ± 0.7 배, z-VAD-fmk를 전처리한 경우 1.6 ± 0.2 배였고 quercetin 처치군에서 z-VAD-fmk를 전처리하지 않은 경우 7.1 ± 0.6 배, z-VAD-fmk를 전처리한 경우 1.5 ± 0.3 배를 보였다 (Fig. 4B). 즉, kaempferol과 quercetin에 의해 caspase-3가 활성화되며 이러한 caspase-3의 활성화는 z-VAD-fmk에 의해 억제되는 것을 알 수 있어 kaempferol과 quercetin에 의한 세포고사가 caspase-3 의존성임을 알 수 있었다.

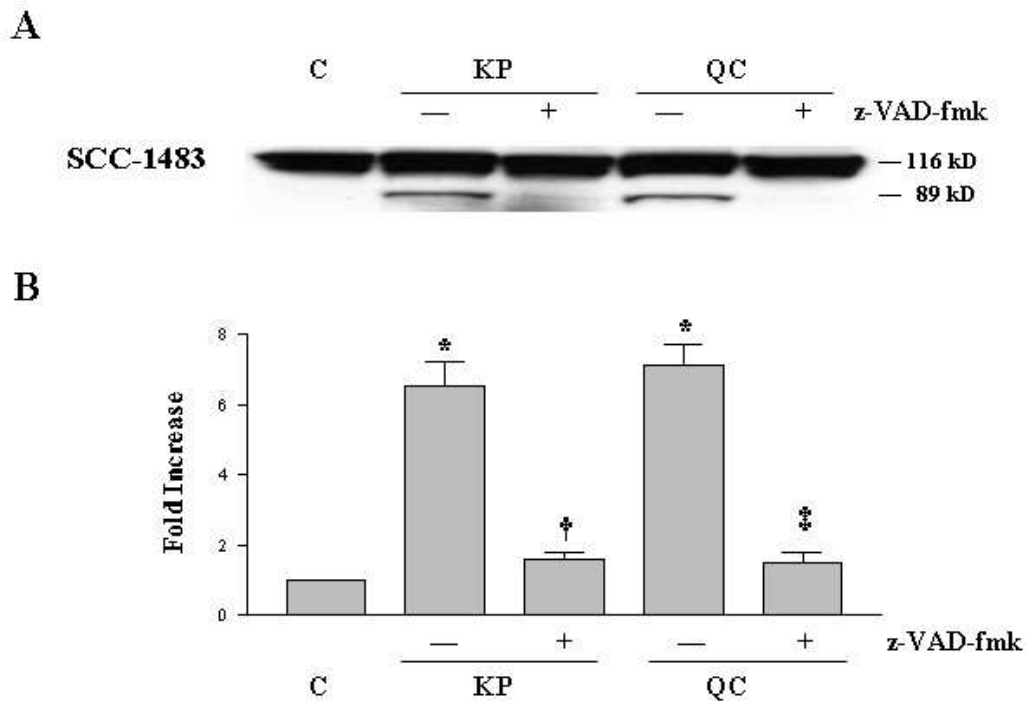


Fig. 4. Caspase-3 dependent apoptosis by kaempferol and quercetin in SCC-1483 cells. A. Inhibition of PARP cleavage by z-VAD-fmk. SCC-1483 cells were incubated respectively with 40 μ M kaempferol or quercetin with or without pretreatment by 10 μ M z-VAD-fmk. PARP cleavage was examined by western blot analysis. Compared with the control (C), the cells (-) treated with kaempferol (KP) or quercetin (QC) show the cleavage of PARP as 116 kD and 89 kD. However, the cells (+) pretreated with z-VAD-fmk show uncleaved PARP as 116 kDa. B. Inhibition of caspase-3 activity by z-VAD-fmk. Compared with the control (C), the cells (-) treated with kaempferol (KP) or quercetin (QC) respectively show the increase of caspase-3 activity. However, the cells (+) pretreated with z-VAD-fmk show the significant decrease of caspase-3 activity. * $p < 0.05$ compared with the control, † $p < 0.05$ compared with the cells with kaempferol treatment and without the pretreatment of z-VAD-fmk, ‡ $p < 0.05$ compared with the cells with quercetin treatment and without the pretreatment of z-VAD-fmk.

IV. 고찰

현재까지 밝혀진 EGb 761의 생화학적, 약리학적 작용으로 자유기 제거로 인한 항산화 작용, 항 platelet activating factor (PAF) 작용에 의한 뇌혈류량 증가, endothelium-derived relaxing factor (EDRF) 증가 작용을 통한 혈액순환 촉진과 신경 적응성(neuronal plasticity)의 증가 등이 있으며, 이러한 EGb 761의 기초 작용을 바탕으로 노화에 의한 인지기능의 장애나 말초 혈류장애, 이명이나 현훈 등의 임상치료에 사용되고 있다.^{1,2} 최근에 EGb 761에 의한 암세포증식 억제 효과와 세포고사에 대한 효과가 보고되어 있으며, 5-FU와 EGb 761을 동시에 투여한 결과 췌장암과 대장암에 좋은 효과가 있는 것으로 보고되었다.^{13,14} 또한 SCC-1483 구강암종 세포주에 대한 연구에서도 EGb 761이 250 µg/ml의 용량에서부터 50% 이상의 세포증식 억제를 보이며 세포고사를 유도한다고 하였다.¹¹ 쥐와 백서를 이용한 EGb 761의 안정성 연구에서 정맥내로 주사할 경우의 LD50은 1.1 g/kg였으며,¹⁵ 따라서 구강암종에 대한 연구에서 사용한 EGb 761 250 µg/ml은 사람의 경우 11mg/kg을 혈액내로 투여한 것이므로, 백서나 쥐에투여한 양과 비교시 약 1/100 정도로 비교적 안전한 양임을 알 수 있다.¹¹ 또한 장기 투여의 경우에도 쥐와 개에게 EGb 761을 매일 400-500 mg/kg의 용량으로 26-27주 동안 투여하였을때, 장기에 부작용이 보이지 않았고 간과 신장에도 부작용이 관찰되지 않았다.¹⁶ 이러한 보고들과 장기간 동양의학에서 사용되어진 점으로 보아 비교적 안전한 약물이라 할 수 있다.

그러나 EGb 761은 여러 성분이 섞여 있는 복합제이므로, 유효성분만을 사용한다면 다양한 성분에 의한 부작용을 낮추고 적은 양으로도 더욱 효과적인 역할을 하리라 본다. 일례로 대장암 세포주에서 quercetin과

kaempferol과 같은 flavonoid 성분이 암치료에 유효하며,³ 전립선암에 대해서는 kaempferol이 암 발생 위험도를 감소시키고,⁹ flavonoid glycoside의 하나인 rutin은 aflatoxin B1과 N-nitrosodimethylamine에 의한 간암을 억제한다고 한다고 보고되었다.¹⁷ 이런 측면에서 EGb 761의 성분들에 의한 구강암 세포주에서의 세포고사 효과를 관찰하여 더욱 안전하고 효과적인 항암물질을 발굴하고자 하였다.

본 연구 결과로 terpenoid 성분인 ginkgolide A, ginkgolide B, bilobalide와 flavonoid 성분인 kaempferol, quercetin을 SCC-1483 세포에 처리하여 kaempferol과 quercetin이 40 μ M부터 세포증식을 50%이상 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 유세포 측정분석을 한 결과 kaempferol과 quercetin 모두에서 40 μ M의 농도부터 세포고사를 유도함을 알 수 있었다. 그리고 이러한 결과가 다른 구강암종 세포주에서도 발생하는 것을 알기 위해 SCC-25와 SCC-QLL1에 대해서 세포고사 유도를 검사하였다. 그 결과 SCC-25와 SCC-QLL1 구강암종 세포주에서도 kaempferol과 quercetin이 세포고사를 유도함을 확인할 수 있었다. 한편, 40 μ M kaempferol, 40 μ M quercetin, 20 μ M kaempferol과 20 μ M quercetin의 혼합물, 250 μ g/ml EGb 761에 의한 세포고사 효과를 비교한 결과, 모든 세포에서 20 μ M kaempferol과 20 μ M quercetin의 혼합물이 세포고사를 가장 강력하게 유도하였다. 농도를 환산해보면 kaempferol 40 μ M은 11.5 μ g/ml, quercetin 40 μ M은 13.5 μ g/ml이므로 EGb 761 250 μ g/ml보다 10배 이상 적은 용량이어서 이들을 사용하는 것 혹은 이 둘을 20 μ M씩 혼합하여 사용하는 것이 세포고사 유도에서 더욱 효과적이고 안전함을 알 수 있었으며 향후 임상 적용에 유용한 결과라 하겠다. 그러나 세포에 따라 세포고사 유도 정도는 상이하야 세포특이적으로 이러한 세포고사가 유도됨을 알 수 있었다. 여러 구강암종 세포주에서 kaempferol과

quercetin, EGb 761에 의한 PARP 분할을 관찰하였으며, PARP의 분할을 확인하여 세포고사가 유도됨을 확인하였다.

Quercetin은 flavonol과에 속하며, 주로 과일이나 나무 껍질 특히 양파, 적포도주, 녹차, 맥아즙 등에 많이 함유되어 있으며,¹⁸ 항궤양과 위장관 보호작용을 나타내며, 비만세포, 염기성구, 중성구 등의 탈과립을 억제하여 항염증, 항알레르기 작용을 한다.^{19,20} 또한 tyrosine kinase와 nitric oxide synthase를 억제하여 염증 매개체인 NF- κ B의 활동을 조절하며, 최근에는 항바이러스와 항암작용도 하는 것으로 밝혀졌다.²¹⁻²⁴ 임상적으로는 항응고 작용은 미미하였으며,²⁵ 만성 전립선염 증후군의 경우에는 증상 개선효과가 있다고 한다.²⁶ 일반적인 하루 용량은 200-1200 mg으로 섭취된 quercetin의 25%가 체내로 순환되며 반감기는 25시간이다.²⁷ 지금까지 대장암과 백혈병에 항암작용을 보인다는 보고가 있었지만, 구강암에 대한 보고는 없었으며 본 연구가 이에 대한 것을 밝힌 것은 의의가 있다고 생각한다.²²⁻²⁴

Kaempferol은 flavonoid의 하나로 항산화 기능을 보이며, 주로 딸기류에 많이 함유되어 있다.^{18,28,29} Kaempferol은 quercetin에 비해 알려진 바가 많지 않으며 본 연구를 통해 구강암에 대한 암억제 가능물질로 밝혀진 것은 의의가 있다고 생각한다.

Caspase는 세포고사에 필수적으로 관여하는 단백효소로써, 구조물질, 핵단백(nuclear proteins), 신호전달 단백질(signaling proteins) 등의 다양한 세포 내용물들을 분할시켜 세포고사를 유도한다. 그중에서도 DNA 회복에 관여하는 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)와 DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)의 분할을 촉진시켜 세포고사에 이르게 한다.³⁰ 기존연구에서 EGb 761에 의한 구강암종의 세포고사 유도에 caspase-3가 관여한다고 보고 하였다.¹¹ 이에 구성 성분인 kaempferol과 quercetin도

EGb 761처럼 caspase-3 의존성인가를 알고자 하였다. 연구결과로 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk에 의하여 PARP 분할이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 z-VAD-fmk에 의해 caspase-3의 활성도가 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 kaempferol과 quercetin에 의해 caspase-3가 활성화되어 세포고사가 유도되며 이러한 세포고사는 EGb 761에 의한 세포고사와 마찬가지로 caspase-3 의존성임을 확인할 수 있었다. 추가적으로 Brusselmans 등은 kaempferol과 quercetin이 전립선암세포(LNCaP)와 유방암세포(MDA-MB-231)에서 지방산 합성의 활성을 저하시키고, 이로 인한 지질 생성 저하가 세포괴사를 일으킨다고 보고한 바 있다.³¹ 또한 PARP의 분할 산물을 확인함으로써 세포고사가 caspase를 통해 일어남을 보고하였으며, 이 결과는 본 연구결과와 일치하였다.³¹ 그러나 비암성 섬유아세포(nonmalignant fibroblast)에서는 kaempferol과 quercetin이 지질의 생성을 억제하나, 암세포에서와는 달리 세포고사를 유도하지 않는 것을 확인할 수 있다고 하였다.³¹ 다른 연구에서 구강암세포와 구강암의 증식에 지방산 합성의 증가가 확인되어,^{32,33} 본 실험의 결과인 구강암세포의 증식억제가 지방산 합성 억제에 의한 기전이 작용한 것이라고 추정할 수 있으며, 향후 이에 대한 추가 실험이 필요하다고 본다.

V. 결론

본 연구를 통하여 EGb 761의 성분 중 kaempferol과 quercertin이 여러 구강암종 세포주에 대해 EGb 761보다 유의하게 낮은 농도에서 세포 고사를 유도함을 확인할 수 있었으며, 이러한 작용은 caspase-3 의존성임을 알 수 있었다. 이러한 결과로 향후 EGb 761의 임상적용에서 kaempferol과 quercertin 등의 구성 성분 투여가 효과적일 수 있으며 향후 세포고사 유도 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Jacobs BP, Browner WS: Ginkgo biloba : a living fossil. Am J Med 2000;108:341-2.
2. DeFeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.1-8.
3. 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;21:959-63.
4. 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;68:921-31.
5. Smith JV, Luo Y. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. J Alzheimers dis 2003;5:287-300
6. 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;33:831-49.
7. 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;43:63-9

8. 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;21:415-20
9. Griffiths K, Morton MS, Denis L. Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer. *Eur Urol* 1999;35:443-55
10. Monte M, Davel LE, de Lustig ES. Inhibition of lymphocyte induced angiogenesis by free radical scavengers. *Free Radical Biol Med* 1994;17:259-66
11. 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 Oncol* 2005;41:383-9.
12. 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;20:2835-47.
13. 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;49:1030-4
14. Hauns B, Haring B, Kohler S, Mross K, Unger C. Phase II study of combined 5-fluorouracil/Ginkgo biloba extract (GBE 761 ONC) therapy in 5-fluorouracil pretreated patients with advanced colorectal cancer. *Phytother Res* 2001;15:34-8
15. 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.32-6.

16. DeFeudis FV. Ginkgo biloba extract (EGb 761): pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier; 1991. p.143-6.
17. 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;109:185-91.
18. de Vries JH, Jenssen PL, Hollman PC, van Staveren WA, Katan MB. Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. *Cancer Lett* 1997;114:141-4.
19. Alarcon de la Lastra C, Martin MJ, Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacol* 1994;48:56-62.
20. Martin MJ, La-Casa C, Alarcon-de-la-Lastra C, Cabeza J, Villegas I, Motilva V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. *Z Naturforsch[C]* 1998;53:82-8.
21. Middleton E Jr, Anne S. Quercetin inhibits lipopolysaccharide-induced expression of endothelial cell intracellular adhesion molecule-1. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:435-6.
22. Sato M, Miyazaki T, Kambe F, Maeda K, Seo H. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human synovial cells. *J Rheumatol* 1997;24:1680-4.
23. Hollman PC, van Trijp JM, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett* 1997;114:139-40.
24. Stavric B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin Biochem* 1994;27:245-8.

25. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, de Takats PG, Anderson D, et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetine: pharmacokinetics and evidence for tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 1996;2:659-68.
26. Shoskes DA, Zeitlin SI, Shahed A, Rajfer J. Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective double-blind, placebo-controlled trial. *Urology* 1999;54:960-3.
27. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1276-82.
28. DuPont MS, Day AJ, Bennett RN, Mellon FA, Kroon PA. Absorption of kaempferol from endive, a source of kaempferol-3-glucuronide, in humans. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:947-54.
29. Hakkinen SH, Karenlampi SO, Mykkanen HM, Torronen AR. Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *J Agric Food Chem* 2000;48:2960-5.
30. Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 1999;71:163-210.
31. Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem* 2005;280:5636-45.
32. Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, et al. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2004;40:728-35.
33. Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, et al. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999;21:325-9.

Abstract

Anticancer effect by *Ginkgo biloba*
extract (EGb 761) in oral cavity cancer cells

Ju Wan Kang

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung-Su Kim)

EGb 761, extracted from *Ginkgo biloba* leaves, has been proven to suppress colorectal and prostate cancer. Previous studies have suggested that various mechanisms are involved in the chemopreventive effects of EGb761 such as antioxidant effects, inhibition of COX-2, and inhibitory effects on angiogenesis. Furthermore, the antiproliferative effects of EGb761 were recently demonstrated in oral cavity cancer cell lines. Since EGb761 is a composition of various components, it is essential to identify which component is responsible for its anticancer effects in oral cavity cancers.

In the present study, we investigated which component of EGb 761 has antiproliferative effects on oral cavity cancer cell lines and whether each component induces cellular apoptosis. Additionally, we investigated which signal pathways are involved in the apoptotic effect of each EGb 761 component. Oral cavity cancer cells (SCC-1483)

were treated with different components of EGb 761 including ginkgolides A and B, bilobalide, kaempferol, and quercetin at various concentrations.

The results of cell proliferation assay showed that kaempferol and quercetin significantly inhibited cellular proliferation at a concentration of 40 μ M. FACS analysis showed that the antiproliferative effects of each component were due to increased apoptosis. Kaempferol and quercetin induced apoptosis in all oral cancer cell lines (SCC-1483, SCC-25 and SCC-QLL1) and showed cleavage of PARP.

Cotreatment of 20 μ M of kaempferol and 20 μ M of quercetin was the most potent in inducing apoptosis than any other treatment: the concentrations of the 2 components were less than one-tenth of that known to be effective for EGb 761. Although the antiproliferative effects of kaempferol and quercetin cotreatment varied among different oral cavity cell lines, apoptosis was shown to be caspase-3 dependent. In conclusion, our results suggest that the EGb 761 components kaempferol and quercetin effectively induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells, and further studies for componential applications are needed.

Key Words : *Ginkgo biloba* extract, component,
oral cavity cancer, anti-cancer effect