

매스틱의 구강암세포 성장 억제효과

김지혜¹, 최중혁¹, 정윤숙¹, 조민정¹, 이영은², 박동욱², 송근배¹¹경북대학교 치의학전문대학원 예방치과학교실, ²대구보건대학교 치위생과

Anticancer effect of mastic on human oral cancer cells

Ji-Hye Kim¹, Jung-Hyuck Choi¹, Youn-Sook Jung¹, Min-Jeong Cho¹,
Young-Eun Lee², Dong-Ok Park², Keun-Bae Song¹¹Department of Preventive Dentistry, Kyungpook National University School of Dentistry,²Department of Dental Hygiene, Daegu Health College, Daegu, Korea

Received: March 11, 2016

Revised: August 30, 2016

Accepted: September 9, 2016

Corresponding Author: Keun-Bae Song
Department of Preventive Dentistry,
Kyungpook National University School of
Dentistry, 2177 Dalgubeol-daero, Jung-gu,
Daegu 41940, Korea
Tel: +82-53-660-6870
Fax: +82-53-423-2947
E-mail: kbsong@knu.ac.kr

Objectives: Mastic is a resinous extract from the stem and main leaves of *Pistacia lentiscus*, grown only in the Chios island of Greece. Mastic has antibacterial, anti-inflammatory, anticancer, and anti-ulcer activities. Although mastic has been widely studied, its inhibitory effect against cancer cells, especially oral cancer cells, has not been elucidated. The purpose of this study was to assess the anticancer effects of mastic on human oral cancer YD-10B cells.

Methods: YD-10B cells were cultured in 0, 1, 2, 5, and 10 µg/mL mastic for 24 h. Cell count, viability, morphology, colony-forming assay, and DAPI staining were analyzed.

Results: Mastic treatment of YD-10B cells resulted in a dose-dependent inhibition of cell growth, and almost all the cells in the 10 µg/mL culture were dead ($P < 0.05$). Mastic treatment induced a morphological change and nuclear fragmentation in the YD-10B cells, and inhibited colony formation of YD-10B cells in a dose-dependent manner.

Conclusions: These results indicate that mastic exhibited anticancer effects on the YD-10B cells through changes in cell morphology and apoptosis.

Key Words: Apoptosis, Mastic, Oral cancer

서론

구강암은 구강 및 인두부에 발생하는 악성종양을 말하며¹⁾, 19세기 이후 전 세계적으로 빈발하고 있다²⁾. 구강암을 치료하는 방법은 외과적으로 종양을 절제하거나 방사선 조사로 종양의 크기를 감소시키는 방법, 항암제의 사용 등이 있지만^{3,4)}, 기능적 장애와 안면 외모변형 등과 같은 부작용을 초래한다⁵⁾. 최근에는 이러한 부작용을 최소화하기 위해 항암효과를 지니는 천연추출물을 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있다. Canto와 Devesa⁶⁾는 채소나 과일을 섭취함으로써 구강암 발생을 감소시킬 수 있다고 하였으며, 아시아 국가에서는 후추와 같은 향신료 등도 구강암에 영향을 미

친다고 보고되고 있다⁷⁾. 국내 연구에서도 항균제, 항염증치료에 많이 사용되는 황련의 주 성분인 berberine이 구강암 KB 세포의 사멸을 유도함으로써 항암작용을 나타낸다는 사실을 확인한 바 있으며⁸⁾, 오배자 추출물이 구강암세포의 세포사멸을 유도한다는 보고도 있다⁹⁾. 이밖에도 양파, 과일, 메밀 및 약초 등에서 유래한 플라보노이드의 유효성분인 quercetin 및 식물 이차대사물인 rutin과 천궁추출물이 구강암에 대해 항암활성을 가지는 것으로 나타났다^{10,11)}. 이처럼 임상적으로 구강질환에 생약제제가 많이 활용되고 있으며, 구강암에도 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다.

다양한 식물추출물들 중 매스틱은 1988년 세계에서 가장 권위 있는 의학잡지 중 하나인 New England Journal of Medicine지에

위염을 유발하는 것으로 알려진 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)에 대해 강한 항균효과를 나타낸다고 발표된 이래 전 세계의 주목을 받았으며, 지금도 가장 뜨거운 관심을 모으고 있는 건강식품 소재 중 하나이다¹²⁾. 매스틱은 Anacardiaceae 과에 속하는 *Pistacia lentiscus* 나무의 줄기나 잎에서 채취된 수액 추출물로서¹³⁻¹⁵⁾, 그리스 및 지중해 연안 사람들은 5,000년 전부터 위장관계통의 질환이나 통증조절에 사용해 왔다¹⁶⁾. 매스틱은 *H. pylori* 외에 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 같은 세균과 *Candida albicans*와 같은 진균류에서도 항세균 및 항진균 효과를 나타낸다^{17,18)}. 2006년 터키의 Aksoy 등¹⁹⁾은 매스틱 껍의 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)와 *mutans streptococci* (MS)에 대한 항미생물 효과를 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 보고하였으며, Biria 등²⁰⁾도 매스틱 껍 사용 후 타액 내 MS 및 *Lactobacillus* (LB) 집락 수 감소를 확인하였다. 매스틱의 항암효과에 대한 연구들은 매스틱이 caspase 의존적인 경로를 통해 대장암의 apoptosis를 유발한다는 사실을 실험실 연구를 통해 확인한 Balan 등²¹⁾의 보고와, NF- κ B 유전자의 조절을 통해 매스틱이 전립선암 억제 효과를 나타낸다고 밝힌 He 등²²⁾의 연구가 있다. 그러나 아직까지 매스틱과 항암효과에 대한 연구는 전 세계적으로 소수에 지나지 않으며, 특히 치의학 분야에서 구강암과 관련된 매스틱 연구는 Li 등²³⁾의 연구 이외에는 전무한 실정이다. 기존의 구강암 치료 방법이 여러 부작용을 보이고 있는 바 본 연구에서는 여러 식물추출물 중 다양한 분야에서 그 치료 효과가 입증된 매스틱을 활용하여 구강암에 대해 항암 효과를 나타내는지 확인하고 이를 토대로 부작용이 적은 구강암 치료제 개발을 위한 기초자료를 제시하고자 한다.

연구재료 및 방법

1. 연구재료

본 실험에 사용된 매스틱은 (주)호치로부터 그리스산 매스틱을 분말형태로 지원받았으며(The Chios Mastiha Growers Association, Chios, Greece), dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma Aldrich, MO, USA)에 10 mg/ml 농도로 녹인 후, fetal bovine serum (FBS)이 들어있지 않은 RPMI-640 (Corning, Manassas, USA)배지에, 1, 2, 5, 10 μ g/ml 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 세포배양

Human 유래 oral squamous cell carcinoma cell line, YD-10B cell을 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받았다. 분양받은 세포는 10% FBS (Corning, Manassas, USA), 1% penicillin/streptomycin (Corning, Manassas, USA)이 포함된 RPMI 1640을 이용하여 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였으며, 100 mm plate 상에서 세포가 plate의 80-90% 증식하면 trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (disodium salt buffered; Corning, Manassas, USA)를 이용하여 새로운 plate에 계대배양 하였다.

3. 세포 형태 관찰

96 well plate의 각 well에 5×10^3 개 세포를 분주하고 37°C, 5% incubator에서 plate 바닥에 세포들이 부착하도록 하였다. 이후 배지를 매스틱이 1, 2, 5, 10 μ g/ml 농도로 함유된 RPMI 1640 배지 100 μ l로 교체하였다. 처리 24시간 후 광학 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 400배의 배율로 세포의 형태 변화를 관찰하고 이를 카메라로 촬영하여 영상으로 기록하였다. 관찰 부위는 무작위로 선정하고 각 농도별 3번 반복을 원칙으로 하였다.

4. MTT assay

세포형태 관찰과 동일한 방법으로 세포를 처리한 후, 세포 배양액을 제거하고 Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Alfa Aesar, Heysham, England) 용액을 최종농도가 0.5 mg/ml가 되도록 넣어 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이후 세포 배양액을 제거하고, Dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma Aldrich, MO, USA)를 분주하여 dark blue crystals을 용해시켰으며, Microplate Autoreader ELISA (ASYS, Austria)를 사용하여 570 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

5. 집락형성법(Colony-forming assay)

6-well plate에 구강암 세포를 각 well 당 1.5×10^3 개씩 배양하여 안정화 시킨 후, 매스틱을 1, 2, 5, 10 μ g/ml 농도로 7일 동안 처리하였다. 각 시료들은 4% paraformaldehyde (Reagent Duxsan, Ansan-si, Korea)로 고정하고, 필터링한 0.5% (w/v) crystal violet을 이용하여 10분 동안 염색하였다. PBS로 2번 반복하여 세척해주고, 물기를 제거한 후 상온에서 건조시켰다. Colony는 50개 이상의 세포들로 이루어진 그룹을 의미하며, 현미경 상에서 crystal violet으로 염색된 colony들은 대조군과 비교하여 관찰하였다.

6. DAPI staining

4-well slide plate에 세포를 1×10^4 개씩 분주하여 하룻밤 동안 안정화시킨 후, 매스틱을 1, 2, 5, 10 μ g/ml 농도로 24시간 처리하였다. 각 well의 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척해 준 뒤, 4% paraformaldehyde를 1 ml/well 첨가하여 10분 동안 고정하였다. 다시 PBS로 2회 세척 후 ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes™, Oregon, USA)를 slide가 덮일 정도로 분주하여 암실에서 형광현미경(Nikon, Tokyo, Japan) 이용하여 200배에서 관찰하였다.

7. 통계분석

수집된 모든 자료는 통계분석용 소프트웨어인 SPSS 22.0 프로그램(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였으며, 통계적 유의성 판정을 위한 유의수준은 5%로 설정하였다. 매스틱 농도별 세포 수 및 생존율 분석은 샘플수가 30개 미만이고 정규분포를 따르지 않아 비모수 검정인 Kruskal-Wallis test를 이용하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 인정되는 경우($P < 0.05$), 순위변수 생

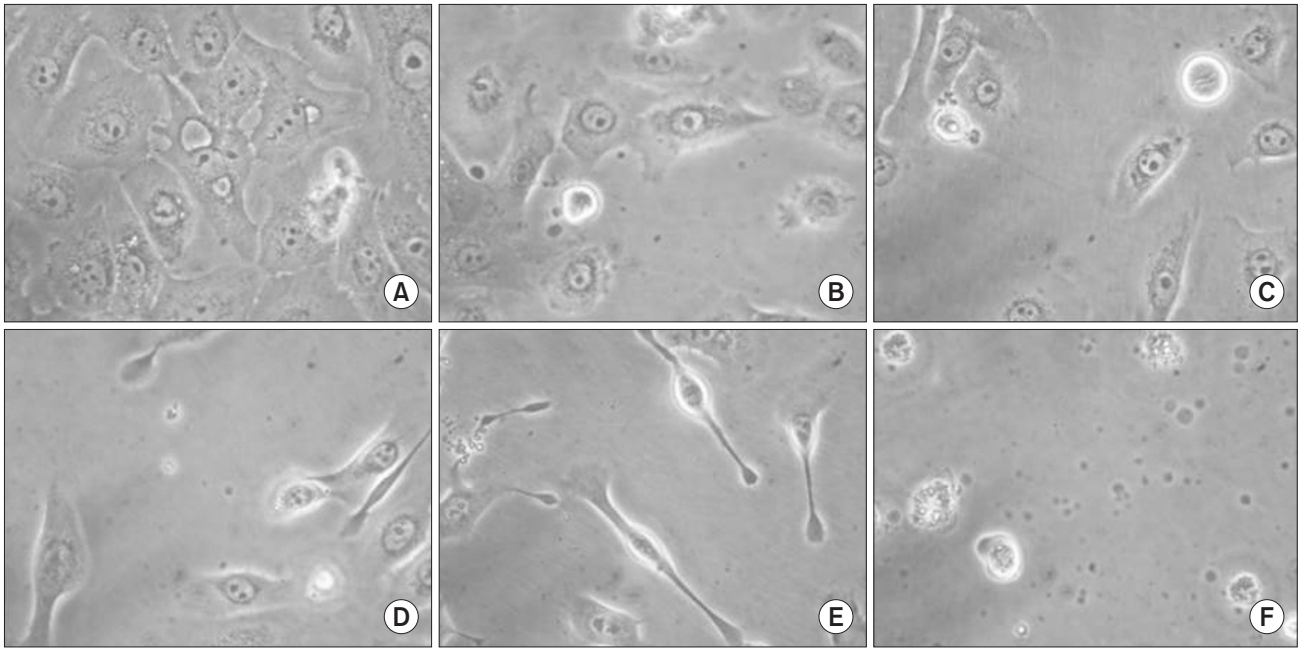


Fig. 1. Morphology changes of human oral cancer YD-10B cells by mastic. (A-F) $\times 400$; (A) control; (B) DMSO; (C) mastic 1 $\mu\text{g/ml}$; (D) mastic 2 $\mu\text{g/ml}$; (E) mastic 5 $\mu\text{g/ml}$; (F) mastic 10 $\mu\text{g/ml}$.

성 후 Tukey test로 사후검정을 실시하였다.

연구 성적

1. 매스틱에 의한 구강암 세포의 형태변화

매스틱 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 경우 농도 의존적으로 세포수가 감소하고, 세포 형태도 대조군과는 다른 양상을 나타내었다. 특히 매스틱 2 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군부터 현저한 세포 형태 변화가 관찰되었으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 세포수가 눈에 띄게 감소하고, 대부분의 세포가 부유 상태를 나타냈다(Fig. 1).

2. 매스틱에 의한 구강암 세포 생존율 분석

매스틱을 용해한 DMSO 처리군과 대조군은 생존율에 별다른 차이를 보이지 않은 반면, 매스틱을 처리한 군은 농도 의존적으로 세포 활성이 저하되었다($P < 0.05$). 특히 매스틱 처리 농도가 가장 낮은 1 $\mu\text{g/ml}$ 부터 대조군보다 유의한 세포 활성 저하를 보였으며, 매스틱 처리 농도가 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가함에 따라 세포활성 저하 정도도 유의하게 증가하는 양상을 보였다($P < 0.05$)(Fig. 2).

3. 매스틱이 구강암세포 사멸에 미치는 영향

매스틱 처리 농도가 증가함에 따라 세포막의 투과성이 증가하여 DAPI 형광 염색 정도가 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 매스틱 처리 최고 농도인 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 DAPI 형광 염색 정도가 대조군에 비해 눈에 띄게 밝게 나타났다. 또한 매스틱 처리 농도가 증가함에 따라 핵의 형태가 온전하지 않고 파괴된 양상을 보여주고 있으며, 매스틱 5 $\mu\text{g/ml}$ 처리군과 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 더 뚜

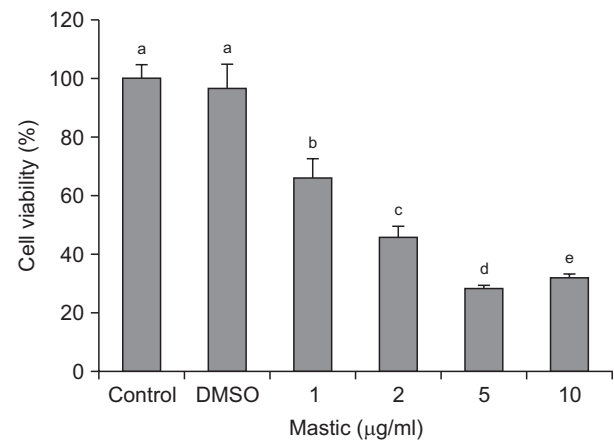


Fig. 2. The effect of mastic in the viability of human oral cancer YD-10B cells. The values are presented as mean \pm standard deviation. Bars with same letter means there are no significant differences among mastic concentrations by Tukey test using ranks ($P > 0.05$).

렷하게 관찰되었다(Fig. 3).

4. 집락형성법을 통한 매스틱의 구강암 세포 성장억제 효과

대조군과 매스틱을 용해한 용매제 DMSO를 처리한 군에서는 유사한 정도의 집락 크기와 개수를 나타내었으나, 매스틱을 처리한 경우에는 매스틱 농도가 증가함에 따라 구강암세포의 집락 형성 정도가 감소하였다. 매스틱 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만, 매스틱 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 농도가 증가함에 따라 대조군에 비해 집락의 크기와 그 개수가 농도 의존적으

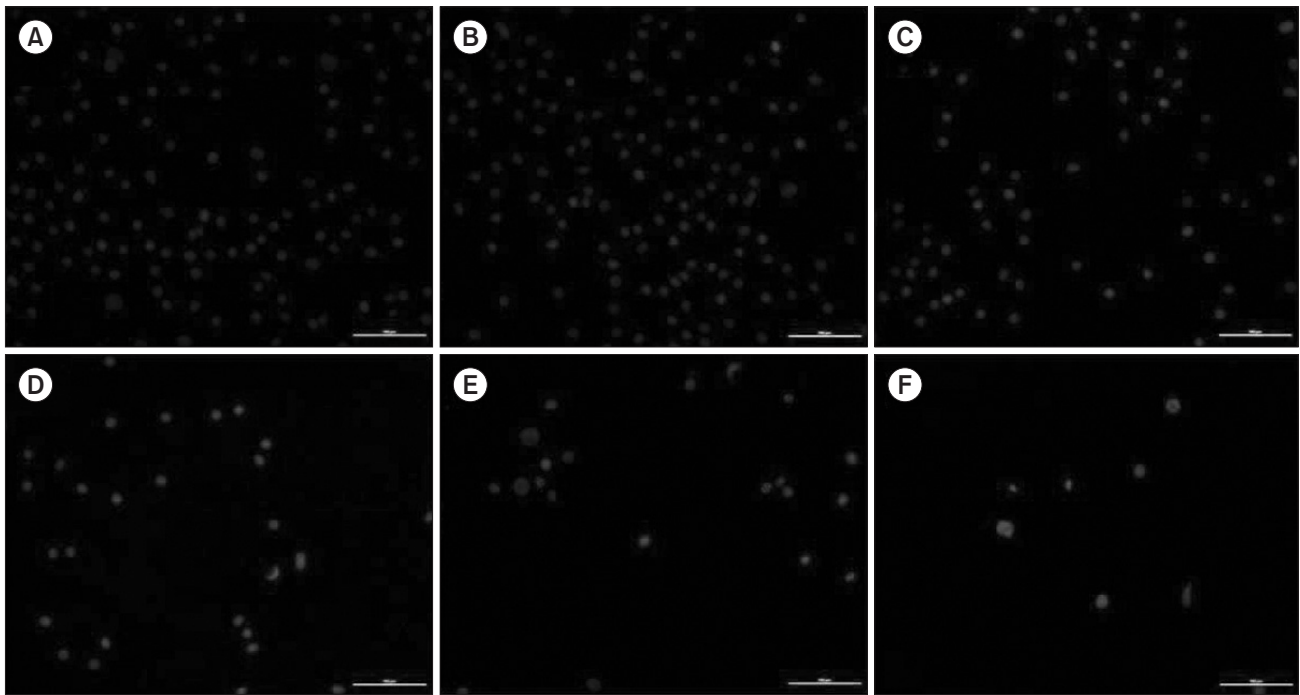


Fig. 3. The apoptosis effect of mastic on YD-10B cells by DAPI staining. (A-F) $\times 200$; (A) control; (B) DMSO; (C) mastic 1 $\mu\text{g/ml}$; (D) mastic 2 $\mu\text{g/ml}$; (E) mastic 5 $\mu\text{g/ml}$; (F) mastic 10 $\mu\text{g/ml}$.

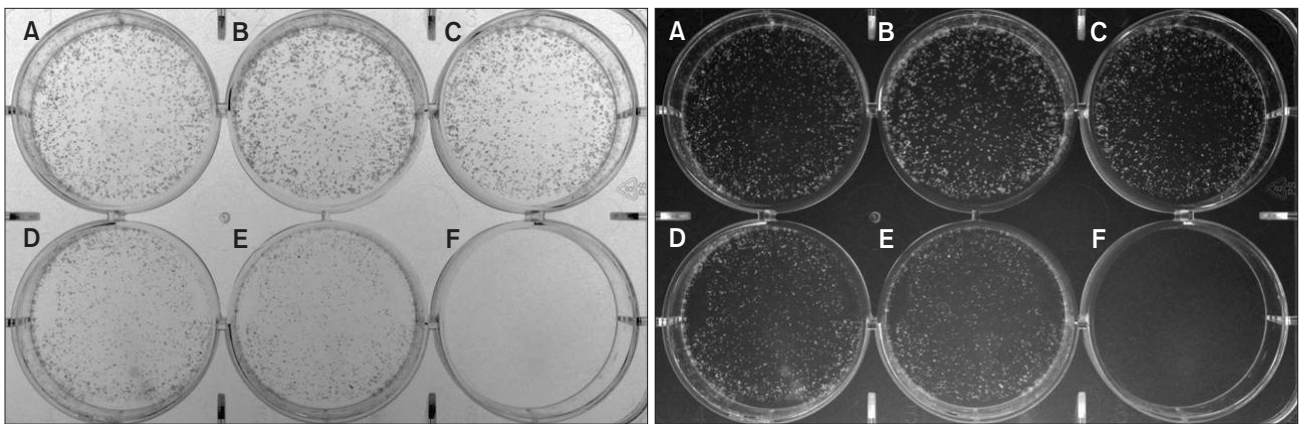


Fig. 4. The effect of growth inhibition on YD-10B cells by clonogenic assay. (A) control; (B) DMSO; (C) mastic 1 $\mu\text{g/ml}$; (D) mastic 2 $\mu\text{g/ml}$; (E) mastic 5 $\mu\text{g/ml}$; (F) mastic 10 $\mu\text{g/ml}$.

로 감소하였으며, 특히 매스틱 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 육안으로는 집락을 관찰하기 어려울 정도로 크기 및 개수가 감소하였다(Fig. 4).

고 안

현대사회는 생활수준이 향상됨에 따라 건강 및 수명연장에 대한 관심이 증대하고, 부작용이 거의 없는 식품을 통해 질병을 예방하고 건강을 유지하고자 하는 욕구가 증가하고 있다. 이러한 시대적 흐름에 따라 자연적으로 생약이나 천연추출물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다²⁴⁾. 여러 천연추출물 중 매스틱은 고대부터

소화기계 질환을 치료하는 약물로 사용된 이래 항미생물, 항염증, 항암효과 등 다양한 분야에서 그 효과가 입증되고 있다^{17-23,25)}. 그러나 지금까지 전 세계적으로 매스틱과 구강질환과 관련된 연구는 소수의 연구에 그치고 있으며, 구강암과 관련한 연구는 전무한 실정이다. 이에 본 연구에서는 대표적인 구강암인 편평상피세포암종으로부터 분리한 YD-10B 세포에 대해 매스틱이 항암활성을 나타내는지 확인하고자 하였다.

먼저 매스틱의 항암제로서의 가능성을 확인하기 위해 MTT assay 방법을 통해 세포 생존율을 측정함으로써 매스틱이 구강암 세포의 세포사멸을 유도하는지 평가하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이

매스틱 처리 농도가 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가함에 따라 세포 증식이 농도 의존적으로 억제 되는 것을 확인하였으며, 이는 기존에 사용되고 있는 항암제 중 하나인 taxol보다 더 낮은 농도인 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 매스틱이 구강편평세포암종의 성장을 억제한다고 보고한 Li 등²³⁾의 연구와 일치하였다.

구강 편평상피세포암종은 상피세포의 사멸이 적절하게 이루어지지 않고 과증식하여 발생하므로, 암 발생을 억제하기 위해서는 세포사멸을 적절하게 촉진하는 과정이 필요하다. 따라서 대부분의 항암제는 중앙 세포의 세포사멸을 유도시킴으로써 항암활성을 나타낸다²⁶⁾. 본 연구에서도 매스틱이 YD-10B세포의 사멸과 연관성이 있는지 확인하기 위하여 현미경으로 세포의 형태를 관찰하고, DAPI 염색으로 확인한 결과, 매스틱 농도가 증가함에 따라 세포의 형태가 대조군과는 다른 양상을 보이는 세포의 수가 증가하고, 그 정도도 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이와 더불어 매스틱 농도가 증가함에 따라 DAPI에 염색된 세포수가 증가하고, 염색된 정도도 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 보통 세포사멸이 일어나면 세포핵의 형태와 세포막 투과성에 변화가 생겨, 형광(light intensity)이 증가하게 되므로 정상 세포와 사멸된 세포를 구별할 수 있게 된다. 따라서 매스틱 농도 증가와 함께 DAPI 형광이 증가하였다는 것은 매스틱이 세포사멸에 영향을 미치는 것은 물론 농도가 높아짐에 따라 세포사멸을 더 효율적으로 유도한다는 것을 의미한다.

본 연구에서는 안전하고 효과적인 항암 물질을 개발하기 위하여 구강암 YD-10B 세포에 매스틱을 처리하여 그 효과를 검증하였으며, 그 결과 매스틱 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 24시간 동안 처리하는 경우 세포의 증식을 억제시킬 수 있을 뿐만 아니라 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다. 이상의 결과들을 통해 매스틱은 구강암에 대해 효과적인 항암물질로 발전할 수 있으리라 기대되며, 본 연구는 이를 증명한 기초 연구라는데 의의가 있다하겠다. 그러나 매스틱이 세포사멸을 유도한다는 사실은 증명하였지만, 세포사멸을 유도하는 기전을 정확하게 밝히지는 못하였다. 구강암 이외에 여러 암종에서 매스틱이 NF-kB와 caspase 경로에 영향을 미친다고 보고되고 있으므로²⁷⁾, 향후 연구에서는 다양한 실험기법을 이용하여 이들 경로를 중심으로 항암효과를 나타내는 정확한 기전을 밝히는 것이 필요하겠다. 또한 실험이 세포 수준에서만 이루어졌기 때문에 사람에게 적용할 수 있는 약물로 사용하기 위해서는 향후 동물 실험 및 임상실험이 추가적으로 수행되어야 할 것이다.

결론

본 연구에서는 그리스의 키오스섬에서 자생하는 *Pistacia lentiscus* 나무의 추출물인 매스틱이 구강암 세포의 증식과 사멸에 미치는 영향을 평가하고자 하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 매스틱 처리군에서 세포 수의 감소와 형태 변화가 관찰되었으며, 특히 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 대부분의 세포가 부유 상태를 나타내는 등 현저한 세포형태의 변화를 보였다.

2. MTT 분석 결과, 매스틱을 처리한 군은 아무것도 처리

하지 않은 군에 비해 농도 의존적으로 세포 활성이 저하되었다 ($P < 0.05$).

3. 매스틱 처리 농도가 증가함에 따라 구강암세포의 집락 형성 정도가 감소하였다.

4. DAPI 염색 결과, 매스틱 처리 농도가 증가함에 따라 DAPI 형광 염색 정도가 농도 의존적으로 증가하였으며, 핵의 형태도 파괴되는 양상을 보였다.

이상의 결과들을 종합해 보았을 때, 매스틱은 구강암 세포의 성장 억제 효과를 가지며, 소화기계통 질병 치료제와 항세균제로서 뿐만 아니라 항암제로도 활용할 수 있으리라 기대된다.

References

1. Silverman S JR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers: The outcome, the trends, the challenge. J Am Dent Assoc 2001;132:7s-11s.
2. Subramanian S, Sankaranarayanan R, Bapat B, Somanathan T, Thomas G, Mathew B, et al. Cost effectiveness of oral cancer screening: Results from a cluster randomized controlled trial in India. Bull World Health Organ 2009;87(3):200-206.
3. O'Brien CJ, Smith JW, Soong SJ, Urist MM, Maddox WA. Neck dissection with and without radiotherapy: Prognostic factors, patterns of recurrence and survival. Am J Surg 1986;152(4):456-463.
4. Lam L, Logan RM, Luke C, Rees GL. Retrospective study of survival and treatment pattern in a cohort of patients with oral and oropharyngeal tongue cancers from 1987-2004. Oral Oncol 2007;43(2):150-158.
5. Chandu A, Sun KC, DeSilva RN, Smith AC. The assessment of quality of life in patients who have undergone surgery for oral cancer: A preliminary report. J Oral Maxillofac Surg 2005;63(11):1606-1612.
6. Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. Oral Oncol 2008;38(6):610-617.
7. Papageorge MB. Etiology of oral cancer in the young patient: Is tongue cancer becoming the other cancer in women? Oral Maxillofac Surg Clin North Am 2007;19(2):163-171.
8. Park JJ. Induction of apoptosis by berberine in KB human oral cancer cells [master's thesis]. Gwangju:Chosun University;2013. [Korean].
9. Lee HI. Chinensis Galla extract induces apoptotic cell death via caspase activation in YD-10B cell [master's thesis]. Daegu:Daegu Hanny University;2009. [Korean].
10. Kim SY. Anticancer effects of quercetin and rutin on KB human [dissertation]. Gwangju:Chosun University;2011. [Korean].
11. Lee DS. Effects of Cnidium officinale MAKINO extracts on the KB human oral cancer cells [master's thesis]. Gwangju:Chosun University;2011. [Korean].
12. Huwez FU, Thirlwell D, Cockayne A, Ala'Aldeen DA. Mastic gum kills *Helicobacter pylori*. N Engl J Med 1998;339(26):1946.
13. Derwucg E, Manar A, Bebzauze Z, Boukir A. GC/MS analysis and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. World appl Sci J 2010;8(10):1267-1276.
14. Paraschos S, Mitakou S, Skaltsounis AL. Chios gum mastic: A review of its biological activities. Curr Med Chem 2012;19(14):2292-2302.
15. Triantafyllou A, Bikineyeva A, Dikalova A, Nazarewicz R, Lerakis S, Dikalov S. Anti-inflammatory activity of chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress. Nutr J 2011;10(1):64.

16. Baily LH. The standard cyclopedia of horticulture. New York: The Macmillan Company; 1935:2638-2649.
17. Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis AL, Chinou IB, Mitaku S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Planta Med* 1999;65(8):749-752.
18. Iauk L, Ragusa S, Rapisarda A, Franco S, Nicolosi VM. *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts: Preliminary report. *J Chemother* 1996;8(3):207-209.
19. Aksoy A, Duran N, Koksall F. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans* and mutans streptococci. *Arch Oral Biol* 2006;51(6):476-481.
20. Biria M, Eslami G, Taghipour E, Akbarzadeh Baghban A. Effects of three mastic gums on the number of mutans streptococci, lactobacilli and pH of the saliva. *J Dent (Tehran)* 2014;11(6):672-679.
21. Balan KV, Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche JH, et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated *in vitro* with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phytomedicine* 2007;14(4):263-272.
22. He ML, Li A, Xu CS, Wang SL, Zhang MJ, Gu H, et al. Mechanisms of antiproliferative cancer by gum mastic: NF- κ B signal as target. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28(3):446-452.
23. Li S, Cha IH, Nam W. Chios mastic gum extracts as a potent antitumor agent that inhibits growth and induces apoptosis of oral cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12(7):1877-1880.
24. Sun T, Tanumihardjo SA. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *J Food Sci* 2007;72(9):159-165.
25. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Hafezi S, Nabavi SM, Eslami Sh. Anti-inflammatory and antioxidant activities of gum mastic. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010;14(9):765-769.
26. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256(1):42-49.
27. Giaginis C, Theocharis S. Current evidence on the anticancer potential of chios mastic gum. *Nutr Cancer*. 2011;63(8):1174-1184.