



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2019 년 8월
석사 학위 논문

Metformin 유도체 HL156A의 약물 다제내성 암세포 억제기전 규명

조선대학교 대학원

치의생명공학과

정 연 수

2019 년 8월

석사 학위 논문

Metformin 유도체 HL156A의 약물
다제내성 암세포 억제기전 규명

조선대학교 대학원

치의생명공학과

정 연 수

Metformin 유도체 HL156A의 약물 다제내성 암세포 억제기전 규명

Metformin derivative HL156A, reverses multidrug
resistance through inhibiting HOXC6/ERK1/2 signaling
in human multidrug-resistant cancer cells

2019년 8월 23일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

정 연 수

Metformin 유도체 HL156A의 약물 다제내성 암세포 억제기전 규명

지도교수 안 상 건

이 논문을 이학석사학위 신청 논문으로 제출함

2019년 4월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

정 연 수

정연수의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 최 한 철



위 원 조선대학교 교수 유 재 식



위 원 조선대학교 교수 안 상 건



2019년 5월

조선대학교 대학원

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS.....	i
LIST OF FIGURES.....	iii
ABBREVIATIONS.....	iv
ABSTRACT.....	v
I. 서론.....	1
II. 실험재료 및 방법.....	4
2.1. Cell culture and reagents.....	4
2.2. Cell proliferation assay (MTT assay).....	4
2.3. Soft agar colony formation assay.....	5
2.4. Wound healing motility assay.....	5
2.5. Migration assay (Transwell assay).....	6
2.6. Cell cycle analysis.....	6
2.7. Annexin V-FITC / Propidium iodide(PI) double staining (Flow cytometry assay).....	7
2.8. Annexin V-FITC / Propidium iodide(PI) double staining (Fluorescence microscopy assay).....	7
2.9. Western blot analysis.....	8
2.10. RNA isolation and RT-PCR analysis.....	8
2.11. Quantitative real-time PCR.....	9
2.12. HOAC6 Transfection.....	10
2.13. siRNA interference assay.....	10
2.14. Rhodamine accumulation assay.....	10

2.15. Chorioallantoic membrane(CAM) assay.....	11
2.16. Statistical analysis.....	11
III. 실험결과.....	12
3.1. HL156A의 세포증식 억제효과.....	12
3.2. HL156A가 세포주기에 미치는 영향.....	17
3.3. HL156A의 migration과 invasion 억제효과.....	20
3.4. HL156A의 세포 사멸 효과.....	22
3.5. H0XC6와 MDR1의 발현에 HL156A가 미치는 영향.....	24
3.6. H0XC6, MDR1, ERK1/2의 경로 확인.....	27
3.6. HL156A의 세포내 약물 축적유도 및 약물 민감도 증가.....	29
3.6. HL156A가 angiogenesis에 미치는 영향.....	32
IV. 고찰 및 결과.....	34
V. 참고문헌.....	38
VII. ACKNOWLEDGMENTS.....

LIST OF FIGURES

Figure 1. Structure of HL156A.....	3
Figure 2. Effects of HL156A and Metformin on cell viability of human multidrug resistant cancer cell lines in time- and concentration-dependent manners.....	13
Figure 3. HL156A inhibited colony formation and induced cell cycle arrest at G2 /M phase in multi-drug resistant cancer cell lines.....	18
Figure 4. HL156A suppressed cell migration and invasion in FaDu/PTX, MCF7/ADR cell lines.....	21
Figure 5. Induced-apoptosis in human multi-drug resistant cancer cell by HL156A.....	23
Figure 6. Suppression of MDR1 expression by HL156A in FaDu/PTX and MCF7ADR cells.....	25
Figure 7. Hoxc6-ERK1/2-MDR1 pathway in FaDu/PTX and MCF7ADR cells.....	28
Figure 8. Accumulation of rhodamine 123 in FADU/PTX and MCF7/ADR cells.....	30
Figure 9. HL156A inhibits angiogenesis in CAM model.....	33

ABBREVIATIONS

ADR	Adriamycin
AIF	Apoptosis-inducing factor
AKT	Protein kinase B
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
CDK	Cyclin-dependent kinase
CIS	Cisplatin
CAM	Chorioallantoic membrane
DOX	Doxorubicin
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinases
FBS	Fetal bovine serum
IGF	Insulin-like factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR	Multidrug resistant
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-di methyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF κ B	Nuclear factor kappa B
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Propidium iodide
PTX	Paclitaxel
RT	Room temperature
SD	Standard deviation

ABSTRACT

Metformin derivative HL156A, reverses multidrug resistance through inhibiting HOXC6/ERK1/2 signaling in human multidrug-resistant cancer cells

Jeong Yun Soo

Advisor: Prof. Ahn, Sang-gun, PhD

Department of Biodental Engineering,

Graduate School of Chosun University

Multidrug-resistant is a significant clinical problem in the treatment of cancer and this resistance has been linked to the cellular expression of multidrug-efflux transporters. The aim of this study was to examine the effects and mechanisms of the new metformin derivative HL156A in human multidrug-resistant cancer cell lines (FADU/PTX, MCF7/ADR and SNU/CIP). HL156A significantly suppressed cell growth and colony formation in a concentration-dependent manner and caused G2/M phase arrest by inhibiting the expression of Cdk1/cyclin B1. HL156A also reduced wound closure/migration and induced cell death in multidrug-resistant cancer cells. We found that HL156A inhibited the expression of MDR1 through inhibiting of HOXC6-ERK1/2 signaling pathway. In addition, treatment of non-lethal dose 20 μ M HL156A increased their sensitivity to paclitaxel or doxorubicin in FADU/PTX and MCF7/ADR. Furthermore, the anti-angiogenesis activity of HL156A was verified in chicken chorioallantoic membranes (CAMs). HL156A significantly inhibited angiogenesis in a CAM assay. These results suggest the potential value of the new metformin derivative HL156A as a candidate for a therapeutic modality for the treatment of multidrug resistance cancers.

1. 서론

암은 높은 사망률과 매년 증가하는 세계적으로 중요한 질병 중 하나이다. 암 치료는 주로 수술, 방사선 요법, 항암화학 요법 및 면역학적 요법의 사용 또는 이들은 병용 치료를 하며, 특히 암 전이에 항암화학 요법이 일반적으로 적용한다. 그럼에도 불구하고 장기간의 화학 요법은 대부분 약물에 내성을 보이며 종종 전혀 무관한 여러 항암제에 내성을 보이는 다제내성 (MDR)과 연관되어 있으며, 이로 인해 항암제 사용 제한과 항암제 내성 암 재발을 통해 치료의 한계를 가져온다 [1]. 따라서 다제내성 (MDR)은 임상 결과 향상을 위한 암 연구의 명확한 표적이 되고 있다.

여러 연구에서 apoptosis의 억제, DNA 손상의 복구, 세포주기의 변화를 포함한 다제내성과 관련된 몇 가지 메커니즘을 제안했다 [3]. 그 중에서도 약물 수송 단백질 (ABC (ATP-binding cassette) transporter)의 과발현이 전형적인 메커니즘이다 [2]. ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG의 7 가지 하위 패밀리가 약물 운송 단백질 (ABC transporter)로 분류된다. 그 중 P-glycoprotein (P-gp, ABCB1)은 multidrug-resistance 1 (MDR1) 유전자에 의해 암호화 된 170 kDa의 막 단백질이다 [1]. P-gp에 영향을 받는 항암 치료제는 vinca alkaloids 계열의 vinblastine과 vincristine, taxanes 계열의 paclitaxel, anthracyclines 계열의 doxorubicin과 daunorubicin 그 외에 mithramycin 과 mitomycin C 등 다양한 항암 치료제들이 보고되었다. P-gp는 ATP를 이용하여 약물을 세포 내에서 세포 밖으로 배출하여 세포 내 약물의 축적을 억제한다. 다제내성 종양에서 P-gp 발현의 증가는 궁극적으로 세포 내 약물의 농도를 감소시키고 항암제의 세포 독성 효과를 억제한다 [4-6].

NF- κ B는 MDR-1의 조절 단백질로, MDR-1 유전자의 프로모터 부위에 결합하여 MDR-1 발현을 활성화시킨다 [7-8]. 또한 PI3K-Akt, Wnt / β -catenin pathway와 MAPK signaling이 MDR-1 발현을 유도하는 것으로 보고되었다 [9-10]. 그러나 MDR-1의 정확한 기전은 여러 관련된 기전으로 풀어야 할 숙제로 남아 있다. MDR-1 유전자 조절은 암 치료에 대한 약물 내성의 장애를 극복 할 수 있는 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

Homeobox 유전자 (HOX 유전자)는 배아 발달에 필수적이다. 포유동물은 HOXA, HOXB, HOXC, HOXD 등 4개의 클러스터에 39개의 HOX 유전자를 가지고 있으며, 각각의 HOX 유전자들은 세포 사멸, 세포 분화 및 세포 증식의 조절에 관여하는 전사인자이다. HOX 유전자는 폐, 유방, 전립선, 난소 및 백혈병과 같은 다양한 종양에서 비정상적으로

로 발견되며 [15-19], 종양의 성장 및 발달에 관여한다 [11-12]. 최근 연구에 따르면 HOXA1의 knockdown은 유방암에서 세포 증식 억제와 사멸을 유도하고 [13] HOXA5 저해는 Akt / p27을 조절하여 자궁경부암의 진행을 억제한다 [14].

Homeobox 계열에서 HOXC6는 전립선 암, 유방암, 위암, 두경부 편평상피암 등 다양한 암에서 과발현 됨이 보고되었다 [20-22]. HOXC6의 knockdown은 대장암과 자궁경부암 그리고 신경교종 세포에서 암 세포의 증식을 억제시키는 반면 [23-25], HOXC6의 과발현은 식도 편평상피암과 위암 그리고 자궁경부암 등 여러 암세포에서 암의 진행과 전이를 촉진시킨다 [26-28]. 본 연구실에서는 두경부 편평상피암에서 HOXC6 유전자가 MDR1의 전사에 관여함을 밝혀냈다 [29]. 앞에서 언급했듯이 HOXC6는 암의 증식, 전이 및 약물 내성에 중요한 역할을 한다. 따라서 본 연구에서는 다제내성 암세포인 FaDu/PTX와 MCF7/ADR에서 약물 내성을 극복하기 위한 HOXC6-MDR1 메커니즘에 초점을 두었다.

Metformin (N,N-Dimethylimidodicarbonimidic diamide)은 제 2형 당뇨병 환자에게 가장 일반적으로 사용되는 Biguanide 계열 치료제이다. 간에서 포도당 생성을 억제하고 근육 등의 말초조직에서 인슐린 저항성을 개선하고 혈당을 낮춘다. 흥미롭게도 당뇨병 환자에서 Metformin은 암 발병률을 줄일 수 있음이 보고되어있다 [30-32]. Metformin은 정확한 기전은 여전히 불분명하지만 Akt 및 mTOR와 같은 여러 다른 요인과의 상호 작용을 통해 포도당 및 지질 대사, 염증 조절, 세포 증식 및 사멸을 조절하는 AMPK 활성화제로 잘 알려져 있다 [33]. Metformin에 의한 AMPK의 활성화는 mammalian target of rapamycin (mTOR)를 억제함으로써 종양의 성장을 억제한다 [56]. mTOR 경로는 종양의 증식, 혈관신생을 조절하며 metformin으로 인해 억제됨으로서 항암 효과를 가진다. 또한 Akt 및 mTOR 경로의 억제를 촉진하는 종양 억제제인 p53의 활성화를 유도하여 세포의 세포주기 차단 및 세포사멸을 유도한다 [34-35]. Metformin은 human epithelial growth factor-2 (HER-2)와 vascular endothelial cell growth factor (VEGF)의 억제를 통해서도 종양의 성장을 억제한다 [57]. Metformin은 다양한 기전을 통해 종양을 억제할 수 있음에도 불구하고 친수성 때문에 세포 내 침투하는데 제한적이며 항암제로서의 사용에는 한계가 있다 [37].

HL156A는 이러한 문제를 극복 할 수 있는 Metformin의 새로 합성된 유도체이다. HL156A는 높은 생체이용률을 가지고 있으며 또한 metformin과 같이 AMPK 활성화를 유도한다. 기존 연구에서 HL156A는 복막 및 간 섬유화를 억제하는 항섬유화 효과가 있고

[38]. 또한, Lipopolysaccharides (LPS) 유발 염증에 대한 보호 효과가 있다 [39]. HL156A는 고포도당조건에 의해 활성화된 Smad3 의존 경로뿐만 아니라 EMT를 저해 할 수 있다고 보고되었다 [41]. 최근의 연구에서, 아교모세포종(glioblastoma)에서 HL156A와 Temozolomide의 조합은 암 줄기세포의 증식을 억제하고 동물 모델에서 생존율을 증가시켰다 [40]. 그러나 약물내성 세포에 대한 HL156A의 효과는 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 약물내성 세포 (FaDu/PTX 및 MCF7 / ADR) 증식과 전이 능력에 대한 HL156A의 영향을 조사 하였다. 또한, HL156A 치료와 HOXC6 / MDR1 경로 사이의 상관관계는 HL156A가 약물내성 암 치료의 치료제가 될 가능성이 있음을 보여 주었다.

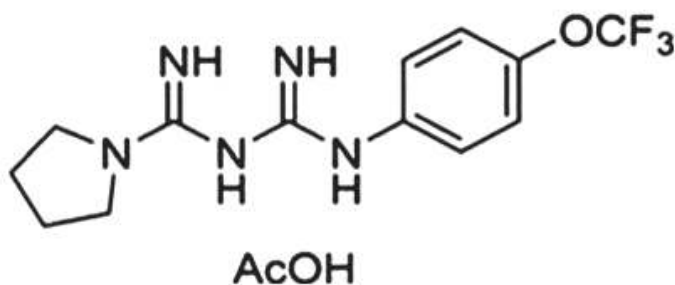


Figure 1. Structure of HL156A

II. 실험재료 및 방법

2.1. Cell culture and reagent

Adriamycin 내성 유방암 세포 MCF7/ADR 과 Paclitaxel 내성 구강암 세포 FaDu/PTX 의 세포배양에는 10% Fetal bovine serum (FBS)와 100 units/mL Penicillin과 100 μ g/mL Streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (Welgene, Inc., Korea)을 사용하였고, 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

Adriamycin과 Paclitaxel은 Sigma chemical co.(St. Louis, Mo, USA)의 것을 사용하였으며 ERK1/2 inhibitor인 U0126은 Promega Corporation co.(Madison, WI, USA)를 사용하였다. HL156A는 Hanall Biopharma Inc. (Seoul, Korea)가 디자인하고 합성한 phenyl biguanide의 유도체이며 HL156A 합성의 상세한 절차는 이전연구에 설명되어있다.

2.2. Cell proliferation assay (MTT assay)

HL156A에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해 24 well plate에 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포를 각각 5×10^4 cells로 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 24 시간 배양 후 각 well에 약물을 처리하지 않은 그룹과 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M 로 다양한 농도의 HL156A를 처리하였다. 각각 24 시간과 48 시간 동안 5% CO₂, 37°C incubator에서 반응시킨 후 세포성장 억제효과를 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay로 분석하였다. 반응이 끝난 후 PBS washing을 2번 반복하였고 500 μ g/mL MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 각각의 well에 넣어 4 시간 동안 처리하였다. 4 시간 후 MTT solution을 제거하고 PBS washing 2 번 반복 후 40 μ M HCl이 함유된 Isopropanol로 녹여내어 ELISA reader(Beckman Coulter, Inc., Wals-Siezenheim, Austria)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. Soft agar colony formation assay

6 well에 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포를 각각 2×10^6 cells을 seeding하여 5% CO₂ , 37°C incubator에서 배양하였다. 24 시간 배양 후 well에 20 uM, 40 uM의 농도로 HL156A를 처리하였다. 24 시간 후 1% Soft agar와 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin이 포함된 DMEM 배지(Welgene)에 1:1로 혼합하여 6 well에 0.5%의 base layer를 1 mL 씩 분주하였다. 배양이 끝난 세포를 PBS washing 2 번 반복 후 Trypsin-0.05 mM EDTA Solution (Welgene, .Inc, .Korea)으로 세포를 수집하여 세포 수를 Hemocytometer로 계산하여 0.6% soft agar와 세포 (1×10^4 cells)가 포함된 배양액을 1:1로 혼합시켰다. base layer 위에 0.3% cell layer 1 mL 씩 넣어준 후 5% CO₂ , 37°C incubator에서 14 일 동안 Colony 형성을 관찰하였다. Colony 형성 후 PBS washing하여 4% Paraformaldehyde solution으로 15 분 동안 실온에서 고정하였고 20% Methanol에 희석된 0.005% Crystal violet 1 mL을 넣어 실온에서 20 분 동안 염색 후 현미경 (1X2-SLP; Olympus)을 이용하여 관찰하였다.

2.4. Wound healing motility assay

FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포를 6 well plate에 well당 2×10^5 cells로 분주한 후 5% CO₂ , 37°C incubator에서 24 시간 배양하였다. 24 시간 후 well에 200p tip을 사용하여 스크래치를 내어 PBS로 2번 washing 후 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin이 포함된 DMEM 배지(Welgene)에 HL156A (0, 20, 40 uM/L) 약물을 처리하였다. 24 시간 배양 후 현미경 (1X2-SLP; Olympus)을 이용하여 x100 배율로 4 random microscopic fields per well로 계산하였다.

2.5. Migration assay (Transwell assay)

세포의 migration은 pore사이즈가 8 mm인 2 chamber migration assay로 실험하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포를 6 well plate에 배양하여 PBS washing 후 trypsin-0.05 mM EDTA solution을 사용하여 수집하고 세포 수를 Hemocytometer로 계산하였다. 12 well Transwell culture chamber의 upper에는 serum이 없는 DMEM 배지(Welgene) 500 uL에 2×10^5 cells를 잘 풀어서 넣어준 후 lower에는 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin이 포함된 DMEM 배지(Welgene)을 700 uL 넣고 incubation하였다. Migration 시간이 지난 후 membrane에 붙어있는 세포를 분석하기 위해 PBS washing 2 번 반복하였고 4% Paraformaldehyde solution에 2 분 동안 실온에서 고정하였다. 고정이 끝난 후 PBS washing 2 번, 20% Methanol에 희석된 0.05% Crystal violet 염색 10 분 동안 실온에서 시행하였고 염색 후 PBS washing 2번 반복하여 slide glass에 올려 현미경 (1X2-SLP; Olympus)을 이용하여 분석하였다.

2.6. Cell cycle analysis

세포주기 분석은 Flow cytometry assay를 사용하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포를 6 well에 HL156A를 20 uM과 40 uM의 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 24시간 후 PBS washing하여 trypsin-EDTA solution으로 세포를 수집한 후, 1000 rpm으로 3 분 동안 centrifuge하여 상층액을 제거하였다. PBS washing 후 4°C에서 70% 에탄올로 30 분 동안 고정하였다. 고정이 끝난 후 cold PBS로 3 번 washing하여 50 uL의 1 mg/mL PI와 1 unit DNase-free RNase가 포함된 1 mL PBS에 37°C에서 30분 동안 처리하였다. PI에 의해 염색된 세포는 FACScan analyzer (Beckman coulter Inc., Fullerton, LA, USA)로 세포주기를 분석하였다.

2.7. Annexin V-FITC / Propidium iodide (PI) double staining (Flow cytometry assay)

세포의 사멸을 측정하는 Annexin V-FITC / PI 염색은 Flow cytometry assay를 이용하여 분석하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포를 6 well에 HL156A를 20 μM 과 40 μM 의 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 24 시간 후 PBS washing, trypsin-EDTA solution으로 세포를 수집한 후 1000 rpm에 3 분 동안 centrifuge하여 상층액을 제거하였다. 세포의 pallet에 100 μL 1X 5 μL Annexin V-FITC (Thermo Fisher Scientific, massachusetts, USA)와 1 μL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI (Thermo Fisher Scientific, massachusetts, USA)를 Annexin-binding buffer (10 mM/L HEPES, 140 mM/L NaCl, 2.5 mM/L CaCl_2 , pH 7.4) (Thermo Fisher Scientific, massachusetts, USA) 에 혼합시켜 working solution을 만들어 각각의 약물이 처리되지 않은 세포와 약물이 처리된 세포에 100 μL 를 넣어 잘 풀어준 후 실온에서 호일로 덮어 15 분 동안 반응시켰다. 염색이 끝난 후 400 μL 의 1X Annexin-binding buffer를 추가하여 Fluorescence 530 nm와 >575 nm의 FACScan analyzer (Beckman coulter Inc., Fullerton, LA, USA)을 사용하여 flow cytometry 방법으로 측정하였다.

2.8. Annexin V-FITC / Propidium iodide(PI) double staining (Fluorescence microscopy assay)

세포사멸 측정하는 Annexin V-FITC/PI 염색을 Fluorescence microscopy assay를 이용하여 분석하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포를 4 well glass slide (Thermo Fisher Scientific, massachusetts, USA)에 5×10^3 cells 로 5% CO_2 , 37°C에서 배양하여 HL156A를 20 μM 과 40 μM 로 처리하였다. 약물처리가 끝난 후 PBS washing 1번 Annexin-binding buffer (10 mM/L HEPES, 140mM/L NaCl, 2.5mM/L CaCl_2 , pH 7.4) (Thermo Fisher Scientific, massachusetts, USA)로 washing 후 100 μL 1X 5 μL Annexin V-FITC (Thermo Fisher Scientific, massachusetts, USA)와 1 μL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI (Thermo Fisher Scientific, massachusetts, USA)를 Annexin-binding buffer (10 mM/L HEPES, 140 mM/L NaCl, 2.5 mM/L CaCl_2 , pH 7.4) (Thermo Fisher Scientific, massachusetts, USA)에 혼합시켜 working solution을 만들어 약물이 처리

되지 않은 세포와 약물이 처리된 세포에 각각 500 uL씩 넣고 실온에서 호일로 덮어 15 분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 working solution을 제거하여 PBS washing 후 봉 입하였다. 염색이 끝난 세포는 Fluorescence microscope (IX-71; Olympus)를 이용하여 분석하였다.

2.9. Western blot analysis

Total cell lysate 는 Protease inhibitor cocktail과 Phosphatase inhibitor가 포함된 RIPA buffer (50 mM/L Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM/L NaCl, 0.5% Sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mM/L EDTA)를 이용하여 세포에서 단백질을 분리하였다. Cell lysate (30 μ g)을 SDS-PAGE에 크기에 따라 분리한 후, Nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)에 이동시켰다. Membrane은 5% Skim milk로 1 시간 동안 교반시킨 후 측정하려는 1차 항체를 첨가하여 4°C에서 overnight으로 반응시켰다. 항체는 pCDK1(sc101654), Cyclin B1(sc245), MDR1(sc55510), HOXC6(sc376330)의 Santacruz 항체와 PARP-1(9542S), AIF(5318P), ERK1/2(9102S), P-ERK1/2(9101S)의 Cell signalling 항체를 사용하였으며 1차 항체의 반응이 끝난 후 HRP-conjugated-linked anti-mouse IgG 또는 HRP-linked anti-rabbit IgG를 1:5000의 비율로 넣고 교반하였다. 반응이 끝난 단백질은 ImmobilonTMwestern chemiluminescent HRP substrate (Millipore)을 사용하여 Luminescent image analyzer(LAS-1000; Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

2.10. RNA isolation and RT-PCR analysis

특정 유전자 발현을 알아보하고자 6 well plate에 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포를 2×10^6 cells로 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 24 시간 동안 배양 후 각각의 well에 HL156A를 0 - 40 uM의 농도로 처리하였다. 반응이 끝난 후 PBS washing 하여 Trizol reagent (Invitrogen) 500 uL를 사용하여 E-tube에 옮겼다. Tube에 100 uL의 Chloroform을 넣고 15 초 동안 Vortex 후 실온에서 5 분 동안 incubation 하였다. Incubation이 끝난 후 4°C에서 12,000 rpm으로 10 분 동안 centrifuge 하였다. 상층액을 새로운 E-tube에 옮겨 isopropanol과 혼합하여 실온에서 10 분 동안

incubation 후 동일한 조건으로 centrifuge를 하였다. Centrifuge가 끝난 후에 상층액은 버리고 RNA pallet에 70% 에탄올로 2 번 washing과정을 거쳐 total RNA를 추출하였다. 분리된 RNA를 정량 후 cDNA 제작을 위해 Oligo dT primer와 Moloney-Murine Leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase, RNase inhibitor, dNTP, 5X buffer를 이용하여 2 μ g의 RNA에서 cDNA로 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 Table 1에 나열된 유전자를 중심으로 RT-PCR을 수행하였다. 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C 10 분 반응을 거쳐 94 $^{\circ}$ C 30 초, 60 $^{\circ}$ C 30 초, 72 $^{\circ}$ C 1 분으로 30 cycles을 수행하였다. 각 PCR산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 UV하에서 확인하였다.

2.11. Quantitative real-time PCR

약물을 처리하지 않은 그룹과 HL156A를 20 μ M과 40 μ M로 처리한 세포를 이용하여 RNA에서 cDNA로 제작한 후 SYBR Premix Ex Taq II (T11 RNaseH Plus)을 이용하여 Real-time PCR을 시행하였다. PCR은 qTOWER³ Real-Time PCR Thermal Cycler (Analytik Jena AG, Thuringia, Germany)로 분석하였다. DEPC-treated water와 cDNA와 10 μ L Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (2x; Applied Biosystems), Gene-specific primer를 첨가하여 총량은 20 μ L로 반응시켰다. Table 1에 나열된 유전자를 중심으로 반응 조건은 Denaturation 95 $^{\circ}$ C 10 분 반응시킨 후 95 $^{\circ}$ C 20 초, 58 $^{\circ}$ C 20 초, 70 $^{\circ}$ C 20 초로 40 cycles을 수행하였다.

Table 1.

GENE	Sense	Antisense
HOXC6	CACCGCCTATGATCCAGTGAGGCA	GCTGGAACCTGAACACGACATTCTC
MDR1	GACTGTCAGCTGCTGTCTGGGCAA	GCCAAGACCTCTTCAGCTACTGC
GAPDH	AGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC	GCATTGGGATGATCTTGAGGCTG

2.12. HOXC6 Transfection

6 well plate에 세포배양 24 시간 후 E-tube에 opti-MEM serum medium (Gibco) 100 uL에 2 μ g pcDNA4/myc-his-HOXC6와 4 uL FuGENE HD Transfection reagent (Promega Corporation, Madison, WI, USA)를 혼합하여 상온에서 15 분 동안 incubation 하였다. Incubation이 끝난 후 각각의 well에 넣고 5% CO₂ , 37°C incubator에서 48 시간 배양하였다. Transfection 후 total cell lysate하여 SDS-PAGE로 분리하여 Western-blot으로 분석하였다.

2.13. siRNA interference assay

6 well plate에 세포배양 24 시간 후 E-tube 2 개에 opti-MEM serum medium (Gibco) 150 uL씩 넣고 한 개의 tube에 HOXC6 siRNA는 AccuTarget™Genome-wide predesigned siRNA (Bioneer, Korea)를 넣고 다른 하나의 tube에 Lipofectamine 2000 RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen)을 넣어 섞은 후 실온에서 5 분 동안 incubation하였다. Incubation 후 두 개의 solution을 한 개의 tube에 혼합하여 실온에서 15 분 동안 incubation 하였다. Incubation 후에 각각의 well에 넣어 48 시간 동안 5% CO₂ , 37°C incubator에서 48 시간 동안 반응시켰다. 48 시간 후 total cell lysate하여 SDS-PAGE로 분리하여 Western-blot으로 분석하였다.

2.14. Rhodamine accumulation assay

12 well plate에 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포를 24 시간 동안 배양 후 각각의 well에 HL156A를 0-40 uM의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. PBS 2 번 washing 후 12 uM의 Rhodamine123(Rho123)을 well당 넣고 5% CO₂ , 37°C incubator에서 30 분 동안 처리하였다. ice-cold PBS로 2 번 washing하여 n-butanol로 녹여내어 ELISA reader (Beckman Coulter, Inc., Wals-Siezenheim, Austria)를 사용하여 fluorescence를 측정하였다.

2.15. Chorioallantoic membrane(CAM) assay

수정란을 구입하여 70% 에탄올로 소독한 후에 37°C 90% 습도가 유지되는 배양기에 넣고 7일 동안 배양하였다. 7 일 후 수정란을 직경 2 cm정도로 연 후 핀셋으로 막을 제거하고 60 mm plate로 덮어 37°C 90% 습도가 유지되는 배양기에서 1 일 더 배양하였다. 1 일 뒤 24 시간 동안 약물 처리한 세포를 수정란 한 개당 1×10^7 cells로 PBS에 희석하여 떨어뜨렸다. 동일한 조건의 배양기에 넣고 3 일 배양한 후 혈관신생 정도를 관찰하였다.

2.16. Statistical analysis

데이터는 EXCEL 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 구한 후 t-test를 이용하여 상호작용을 검증하였다. 이 연구의 통계학적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

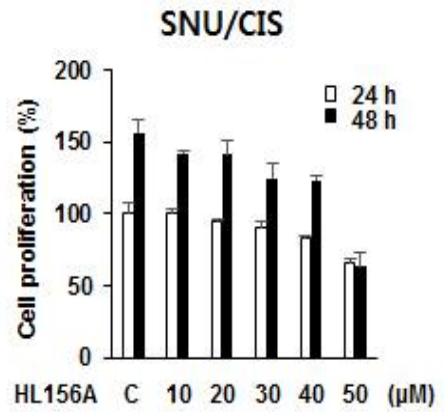
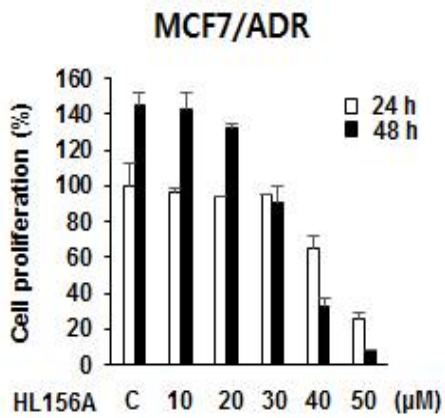
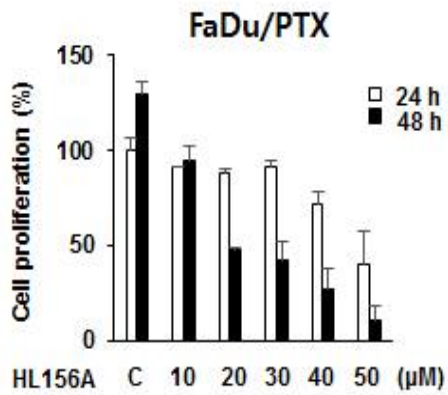
III. 실험결과

3.1. HL156A의 세포증식 억제효과

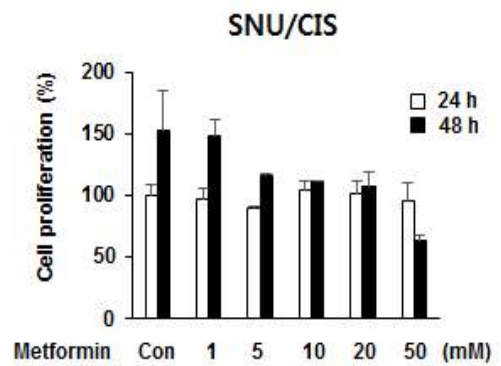
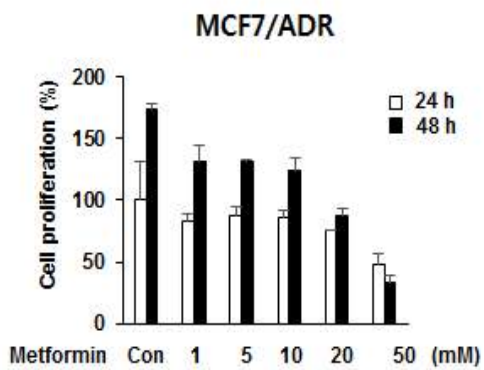
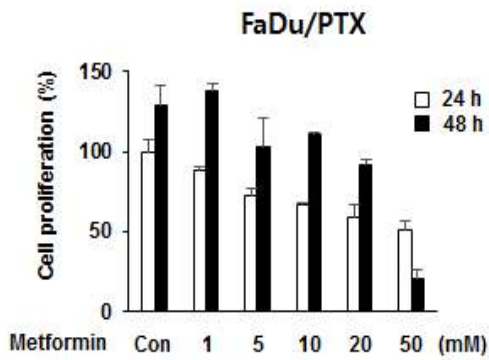
약물 내성 세포의 증식에 대한 HL156A의 효과를 조사하기 위해, paclitaxel에 내성을 가진 구강암 세포 FaDu/PTX 세포와 doxorubicin에 내성을 가진 유방암 세포 MCF7/ADR 세포, cisplatin에 내성을 가진 위암 세포 SNU/CIS 세포에서 HL156A의 농도 (0 - 50 μ M)로 24 시간과 48 시간동안 처리하였다. HL156A는 FaDu/PTX 세포, MCF7/ADR 세포와 SNU/CIS 세포 모두에서 세포의 증식을 농도와 시간에 의존하여 감소시키는 것을 확인하였다. 24 시간 처리 시 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 HL156A는 40 μ M의 농도에서 증식이 억제됨을 확인하였다. SNU/CIS 세포에서 HL156A 처리 시 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포 보다 높은 농도인 50 μ M에서 증식이 억제됨을 확인하였다 (Fig. 2A). Metformin의 약물 내성세포에서 약물의 효과를 확인하기 위해 1 - 50 mM의 농도로 24 시간과 48 시간동안 처리하였다. 그 결과 Metformin의 유도체인 HL156A보다 높은 농도에서 증식이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 2B).

또한 부모 세포인 FaDu 세포와 MCF7 세포 그리고 SNU 세포에 HL156A를 처리한 결과 약물 내성세포뿐만 아니라 부모 세포인 FaDu 세포, MCF7 세포, SNU 세포에서 세포의 증식을 현저히 감소시키는 것을 확인하였다. Metformin은 부모 세포인 FaDu 세포, MCF7 세포 그리고 SNU 세포에서 HL156A보다 높은 농도에서 세포의 증식이 억제됨을 확인하였다 (Fig. 2C). 따라서 HL156A는 유도체인 Metformin보다 낮은 농도에서 약물 내성 세포의 증식을 억제하는 것을 관찰하였다.

A



B



C

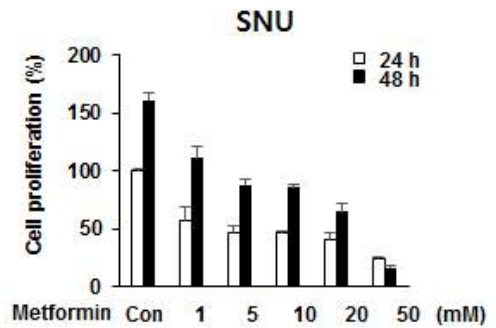
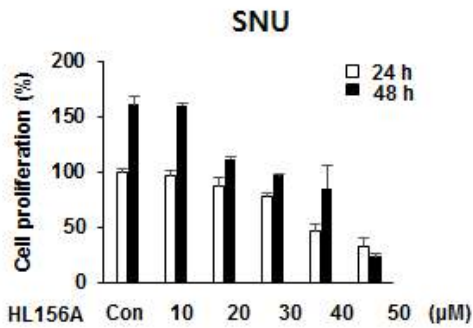
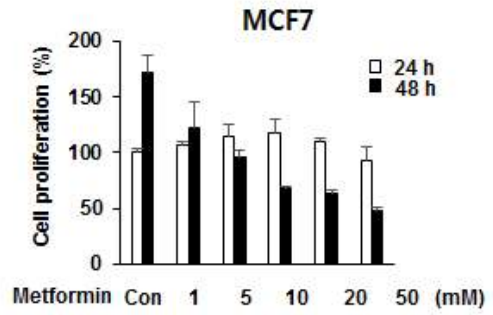
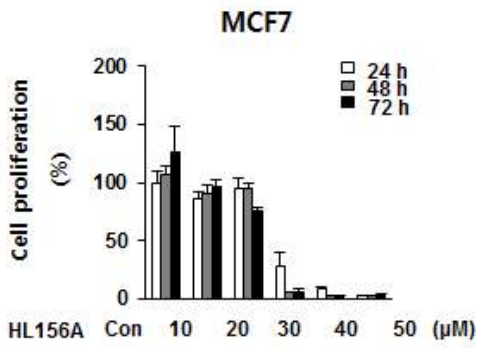
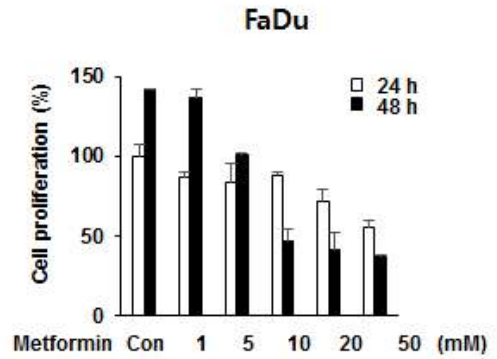
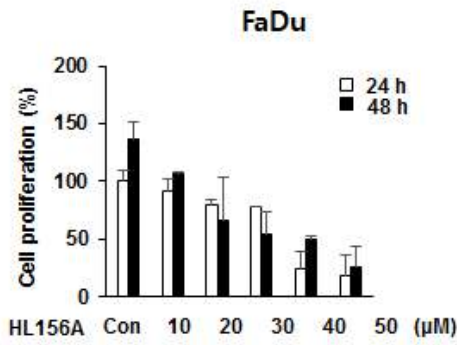


Figure 2. Effects of HL156A and Metformin on cell viability of human multidrug resistant cancer cell lines with time- and concentration-dependent manners.

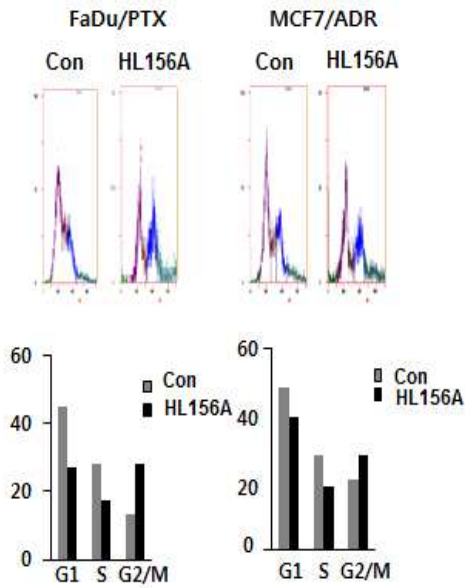
(A) Cell proliferation of the human multidrug-resistant cancer cell lines FaDu/PTX, MCF7/ADR and SNU/Cis after treatment with HL156A (10–50 μ M) for 24 hrs and 48 hrs. (B) Cell proliferation of the human multidrug-resistant cancer cell lines FaDu/PTX, MCF7/ADR and SNU/Cis after treatment with Metformin (1–50 mM) for 24 hrs and 48 hrs. (C) Cell proliferation of FadU, MCF7 and SNU cancer cell lines after treatment with HL156A (10–50 μ M) or Metformin (1–50 mM) for 24hrs and 48 hrs. Cell proliferation was analyzed by MTT assay system. The data are compared as the means \pm SD of the results from three separate experiments (* P <0.05 and ** P <0.01).

3.2. HL156A가 세포주기에 미치는 영향

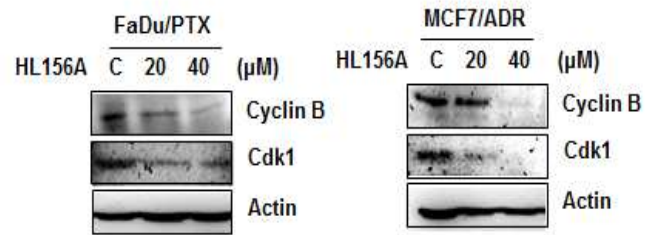
HL156A가 세포주기에 미치는 영향을 조사하기 위해 Flow cytometry를 사용하여 분석하였다. Fig. 3A에 나타낸 바와 같이, HL156A 처리는 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포 모두 G2 / M phase에서 증가를 한 반면 G1과 S기에서 상대적으로 감소하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 24 시간 동안 20-40 μ M의 농도로 HL156A를 처리하여 phospho-CDK1과 cyclin B의 발현을 확인한 결과 농도에 의존하여 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 3B).

세포 증식에 대한 HL156A의 영향을 추가로 확인하기 위해, soft agar colony formation assay를 수행하였다. colony의 수는 HL156A를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 40 μ M의 농도로 처리하였을 때 HL156A는 clonogenicity을 FaDu/PTX 세포에서 34%, MCF7/ADR 세포에서 48%로 현저하게 감소시킴을 확인하였다 (Fig. 3C). 따라서 G2 / M 세포주기의 진행에 대한 HL156A의 효과가 세포 성장의 억제와 관련이 있음을 시사한다.

A



B



C

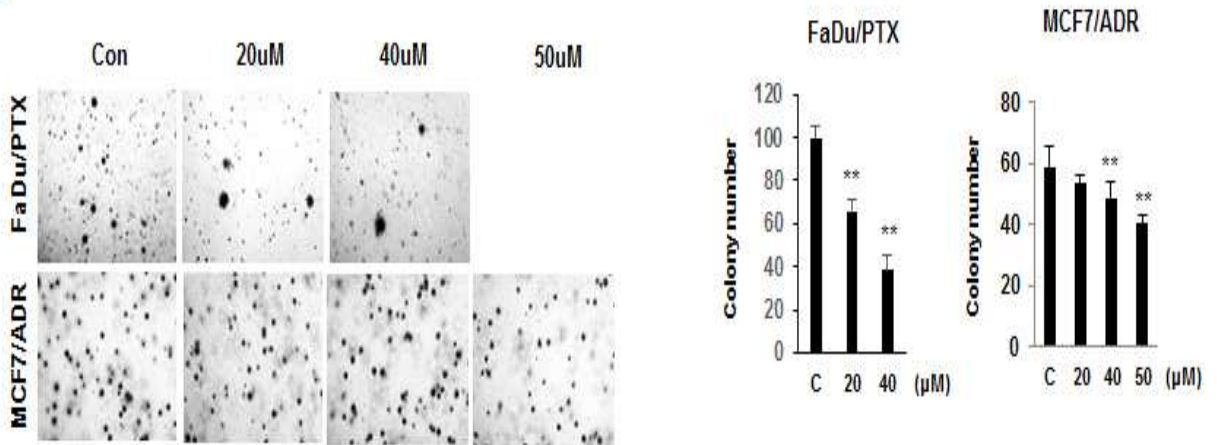


Figure 3. HL156A inhibited colony formation and induced cell cycle arrest at G2/M phase in multidrug resistant cancer cell lines.

(A) Cell cycle assessed by flow cytometry after cells were exposed with 40 μ M of HL156A for 24 hrs. (Flow cytometry evaluated cell cycle distribution after cells were exposed with HL156A 40 μ M concentration for 24 hrs). (B) Immunoblotting of cell cycle-related protein in Fadu/PTX, MCF7/ADR cells after treatment with 20 μ M or 40 μ M of for 24 hrs. Whole cell lysates were subjected to western blotting and detected with phosphorylated CDK1 and cyclin B antibodies. B-actin was used as an internal control.(C and D) Effects of HL156A on colony formation of Fadu/PTX and MCF7/ADR cell lines. The number of colonies was determined after 14 days treatment with HL156A at indicated concentration cells were fixed and stained by crystal violet at the end of the experiment. Colony images were taken by an inverted microscope at 40X magnification. Microplate area scan at OD 550 nm was used for determining of colony quantification.

3.3. HL156A의 migration과 invasion 억제효과

암의 중요한 특성 중 하나는 migration과 invasion이다. HL156A가 세포의 migration을 조절 하는지를 조사하기 위해 wound healing assay를 수행하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에 HL156A를 24 시간 동안 처리하여 세포의 migration을 확인한 결과 40 μM 의 농도에서 세포의 이동이 현저히 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 4A).

또한 HL156A가 세포의 invasion을 억제하는지 여부를 조사하기 위해, 시험 관내 Matrigel Transwell chamber assay를 수행하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에 HL156A를 20 μM 과 40 μM 의 농도로 24 시간 동안 처리 시, HL156A를 처리한 세포의 invasion이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 4B). HL156A를 40 μM 의 농도로 처리한 결과 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 약 34%와 43%로 감소하였다 (Fig. 4C). 따라서 HL156A는 약물 내성 세포인 FaDu/PTX 와 MCF7/ADR 에서 세포의 이동과 전이를 억제함을 확인하였다.

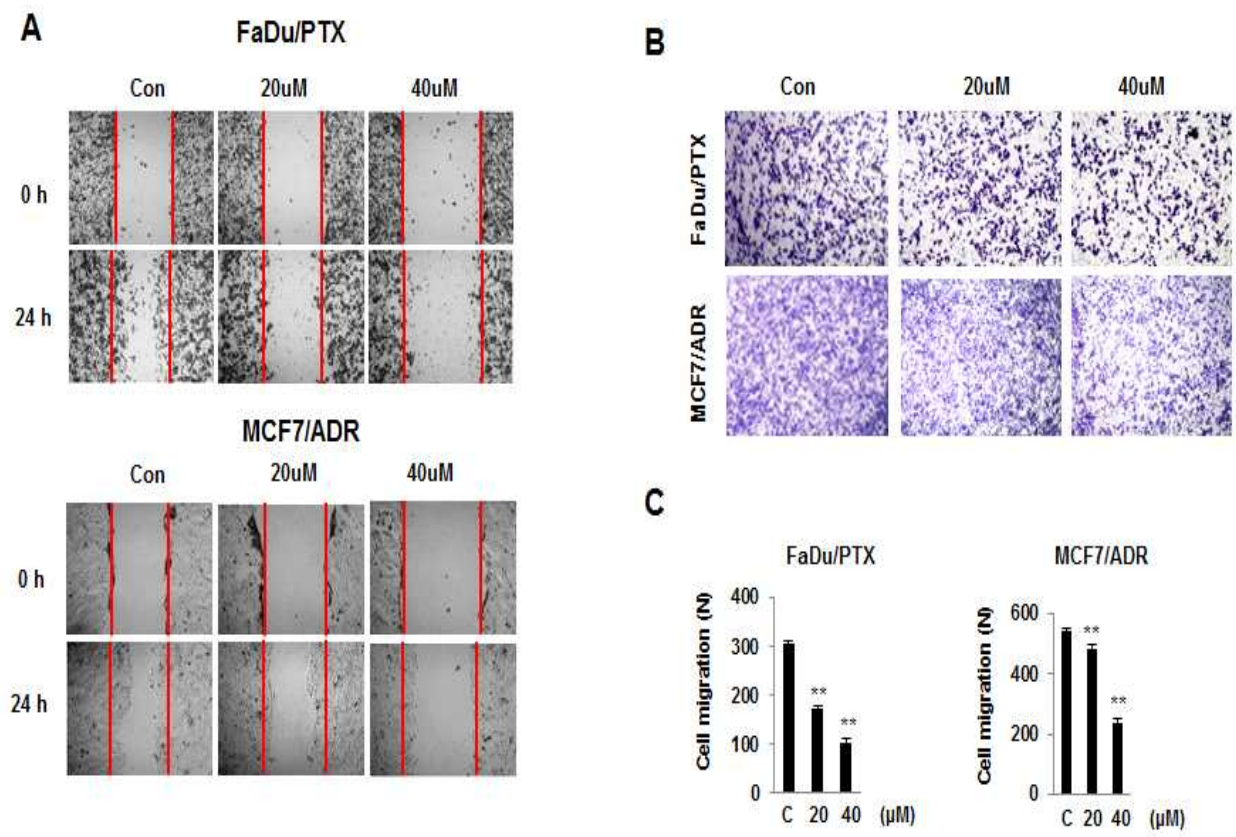


Figure 4. HL156A suppressed cell migration and invasion in Fadu/PTX, MCF7/ADR cell lines.

(A) Wound-healing assay demonstrates the closure rate of cells exposed with HL156A. Image of wound-closure ratio at indicated concentrations and time-points. (B and C) Effects of HL156A on cell invasion ability using Transwell assay as described in Materials and Methods section. Cells were treated with 20 uM or 40 uM of HL156A and incubated for 24 hrs. The charts gave the quantitative measurement of migration percentage. The results represented the average of three independent experiments.

3.4. HL156A의 세포 사멸 효과

HL156A가 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 apoptosis를 유도하는지 조사하기 위해 Annexin V-FITC / PI 이중 염색을 하여 Flow cytometry로 세포의 사멸을 분석하였다. Fig. 5A에 나타난 바와 같이, HL156A (20 μ M 또는 40 μ M)로 24 시간 동안 처리한 결과, FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 각각의 대조군에서 94%와 87%의 세포가 생존하는 것을 확인하였다. FaDu/PTX 세포에서 20 μ M의 농도로 HL156A를 처리 시 90%의 live세포와 7.2%의 사멸 세포를 확인하였으며 40 μ M의 농도로 HL156A를 처리 시 65%의 live세포와 25%의 사멸 세포를 확인하였다. MCF7/ADR 세포에서 20 μ M의 농도로 HL156A를 처리 시 81%의 live세포와 8.3%의 사멸세포를 확인하였으며 40 μ M의 농도로 HL156A를 처리 시 71%의 live세포와 20.4%의 사멸 세포를 확인하였다.

또한 Annexin v-FITC / PI 이중 염색을 하여 fluorescence microscope를 이용하여 분석하였다. 그 결과 약물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 40 μ M HL156A를 처리 시 사멸된 세포가 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 5B).

Western blot 분석에서 the inactive form poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)가 HL156A로 처리 된 세포에서 농도에 의존하여 감소하는 것을 확인하였으며 AIF의 발현이 HL156A의 농도에 따라 감소함으로써 AIF 비의존성 사멸임을 확인하였다 (Fig. 5C). 따라서 HL156A는 약물 내성세포인 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 세포의 사멸을 유도하는 것을 관찰하였다.

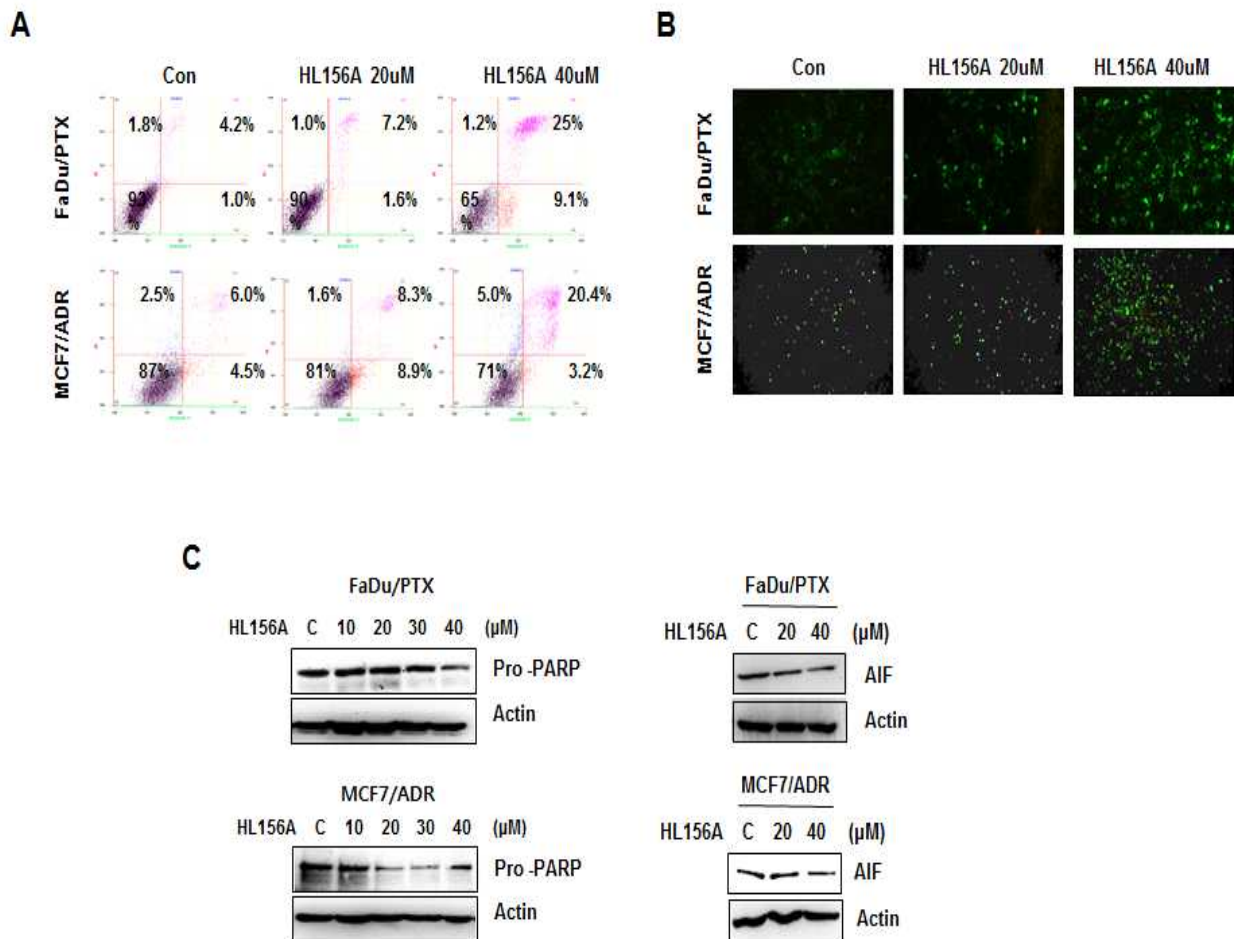


Figure 5. Induced-apoptosis in human multidrug resistant cancer cell by HL156A.

(A) cell apoptosis assessed by flow cytometry analysis in FaDu/PTX and MCF7/ADR cell lines after incubated with HL156A (20 μ M or 40 μ M) for 24 hrs (B) Detection of Annexin V/PI positive apoptotic cells under fluorescence microscope. (C) Total cell lysates were subjected to western blotting using antibodies against Pro-PARP and AIF.

3.5. HL156A가 HOXC6와 MDR1의 발현에 미치는 영향

이전 연구에서 paclitaxel 내성 구강암 세포인 FaDu/PTX 세포에서 HOXC6는 MDR1의 전사를 조절하여 약물 내성을 극복할 수 있음이 보고되었으며 ERK는 암의 성장과 분화 그리고 사멸에 관여하는 중요한 단백질로 약물내성 유방암과 대장암에서 MDR1의 발현이 MAPK 경로 의존적임이 보고되었다 [9-10,28]. 이에 따라 HL156A가 HOXC6와 MDR1 그리고 phospho-ERK1/2의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. RT-PCR 분석을 통해 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 HL156A의 농도에 의존하여 MDR1의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. qRT-PCR분석에서도 MDR1의 발현이 HL156A 처리에 의해 농도에 의존하여 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 6A). Western blot분석에서도 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 MDR1의 발현은 HL156A의 농도에 의존하여 감소하였으며 HOXC6의 감소도 확인하였다. 또한 phospho-ERK1/2의 발현도 감소함을 확인하였다 (Fig. 6B). 따라서 HL156A는 MDR1과 HOXC6 그리고 phospho-ERK1/2 발현의 억제를 유도하는 것을 확인하였다.

HL156A에 의해 HOXC6와 MDR1 그리고 phospho-ERK1/2의 발현이 억제됨을 확인하였으며 HOXC6, MDR1 그리고 ERK의 연관성을 조사하기 위해 HOXC6의 과발현을 유도하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 HOXC6 과발현 결과 HOXC6와 MDR1 그리고 phospho-ERK1/2의 발현이 모두 증가함을 확인하였다 (Fig.6D). 따라서 HOXC6가 MDR1과 ERK1/2의 발현에 관여하는 것을 확인하였다.

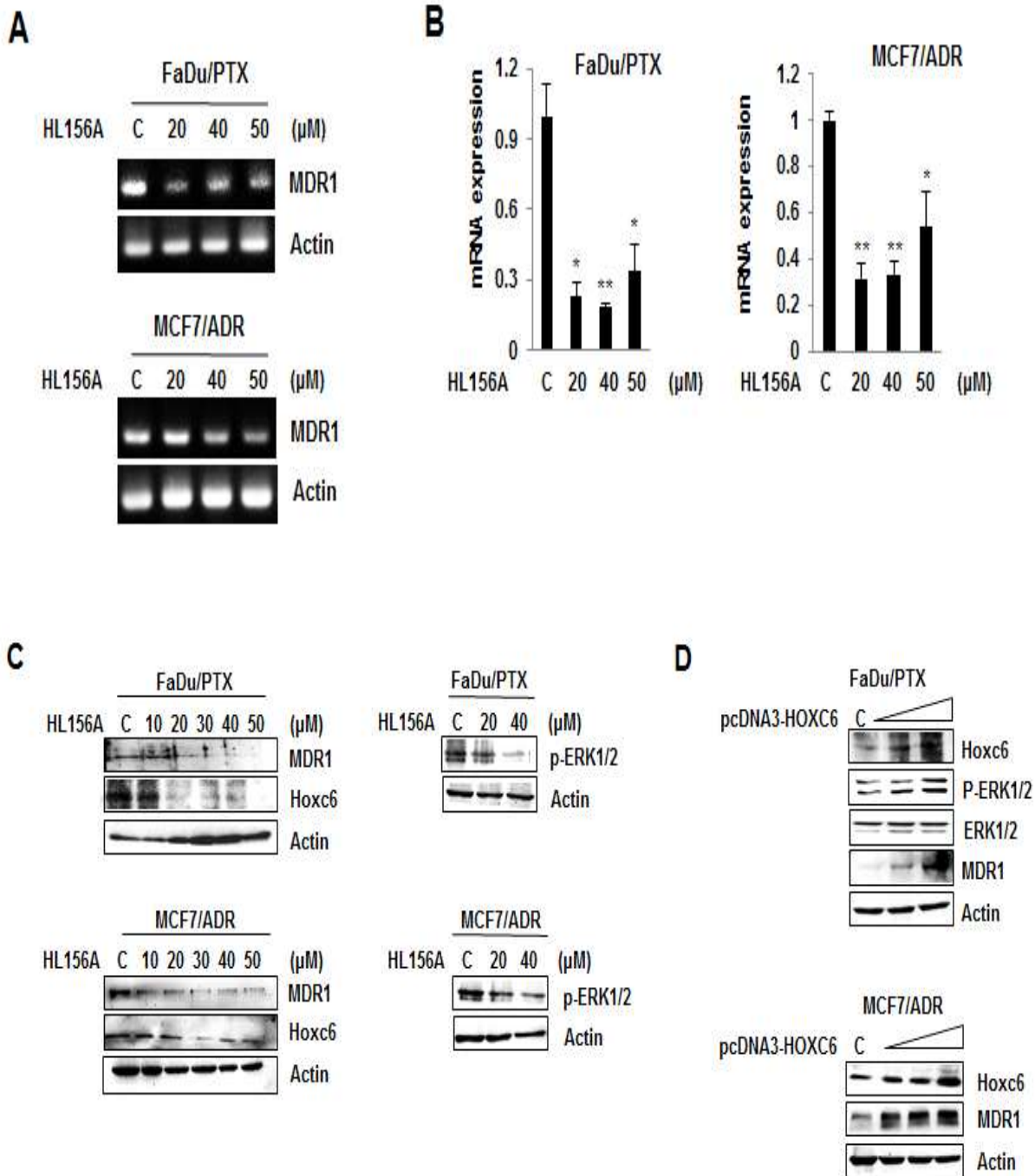


Figure 6. Suppression of MDR1 expression by HL156A in FaDu/PTX and MCF7ADR cells.

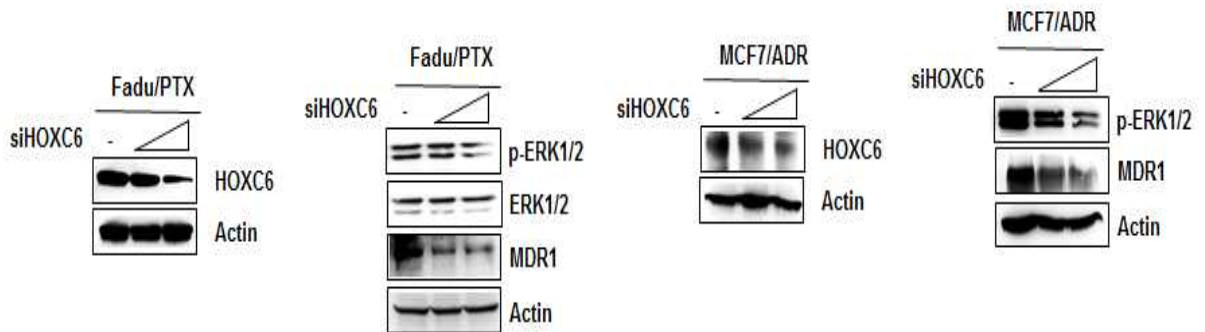
(A and B) The mRNA expression levels in FaDu/PTX and MCF7/ADR cells was determined by qRT-PCR analysis. Cell were treated with HL156A (0, 20, 40 and 50 μ M) for 24 h. (C) The effect of HL156A on MDR1, Hoxc6 and p-ERK1/2 expression of FaDu/PTX and MCF7/ADR cells after treatment with HL156A at indicated concentration for 24 h. (D) The effect of Hoxc6 overexpression on Hoxc6, MDR1 and phospho-ERK1/2 expression. Hoxc6 was overexpressed in Fadu/PTX and MCF7/ADR cell by using pcDNA3-Hoxc6 vector. Total cell lysates were immunoblotted with antibodies against MDR1, Hoxc6 and phospho-ERK1/2.

3.6. HOXC6와 MDR1 ERK1/2의 경로 확인

HOXC6의 과발현 결과 MDR1과 ERK1/2의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. HOXC6의 siRNA를 이용하여 HOXC6와 MDR1 그리고 ERK1/2의 직접적인 연관성을 조사하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 HOXC6의 siRNA결과 HOXC6의 감소와 MDR1의 감소 그리고 phospho-ERK1/2의 감소를 확인하였다 (Fig.7A).

HOXC6와 MDR1 그리고 ERK1/2의 경로를 확인하기 위해 HOXC6 과발현과 ERK inhibitor 인 U0126을 사용하여 연관성을 조사하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 HOXC6의 발현은 U0126 처리 시 큰 변화는 없었으며 HOXC6 과발현과 U0126을 함께 처리 하였을 때 HOXC6의 발현은 증가하는 것을 확인하였다. phospho-ERK1/2는 HOXC6 과발현 결과에서 증가하였으며 U0126과 HOXC6 과발현을 함께 처리 시 U0126만 처리하였을 때와 비교하여 증가하는 것을 확인함으로써 HOXC6가 ERK1/2의 조절에 관여하고 있음을 확인하였다. MDR1의 결과 U0126 처리 시 감소를 확인하였으며 HOXC6의 과발현에서 MDR1의 발현은 증가하였다. U0126과 HOXC6의 과발현을 함께 처리 시 HOXC6의 과발현만 유도하였을 때와 비교하여 감소를 확인함으로써 ERK1/2가 MDR1의 발현에 직접적으로 관여하고 있음을 확인하였다 (Fig 7B). 따라서 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 HOXC6는 ERK1/2의 발현을 직접적으로 조절함으로써 MDR1의 발현에 관여함을 시사한다.

A



B

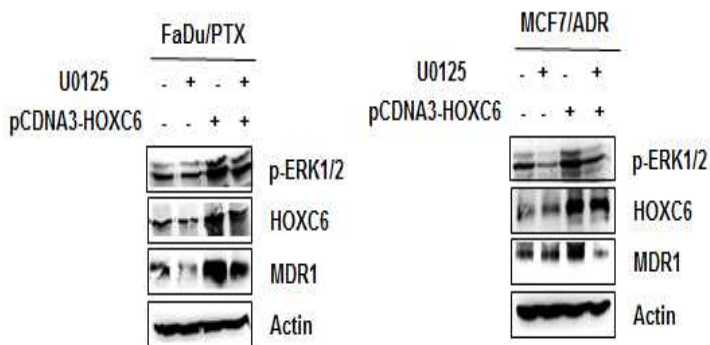


Figure 7. Hoxc6-ERK1/2-MDR1 pathway in FaDu/PTX and MCF7ADR cells.

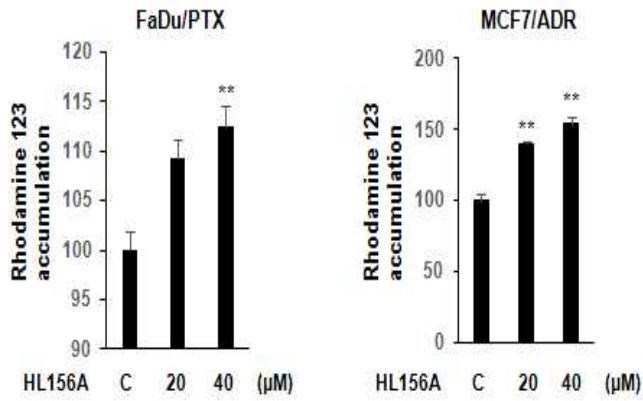
(A) The effect of Hoxc6-siRNA transfection on Hoxc6, MDR1 and phospho-ERK1/2 expression. FaDu/PTX and MCF7/ADR cells were Hoxc6-siRNA transfection for 48 h. (B) The effect of Hoxc6 overexpression or ERK1/2 inhibitor on Hoxc6, MDR1 and phospho-ERK1/2 expression.

3.7. HL156A의 세포내 약물 축적유도 및 약물 민감도 증가

P-gp는 세포 밖으로 약물을 유출시키는 펌프로 잘 알려져 있으며 HL156A에 의한 MDR1 발현의 억제가 세포 밖으로의 약물 유출을 억제하는지 조사하기 위해 Rhodamine 123 accumulation assay를 시행하였다. FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 HL156A를 처리 시 Rhodamine123의 축적이 약물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 약 15% 정도와 50% 정도 증가하였다 (Fig 8A). 그 결과 HL156A에 의한 MDR1의 억제는 세포 내 약물의 축적을 유도하는 것을 확인하였다.

FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 각각의 세포에 paclitaxel과 doxorubicin을 세포의 증식에 영향을 미치지 않는 20 μ M의 HL156A와 병용 처리하여 약물의 효과를 확인하였다. Colony formation assay를 시행하여 조사한 결과 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포 모두에서 HL156A과 Paclitaxel 또는 Doxorubicin의 병용 처리 시 colony 수가 현저히 감소하였다 (Fig 8B). 따라서 HL156A에 의한 MDR1의 억제는 세포 내 약물 축적을 유도할 뿐만 아니라 약물의 민감도를 증가시키는 것을 확인하였다.

A



B

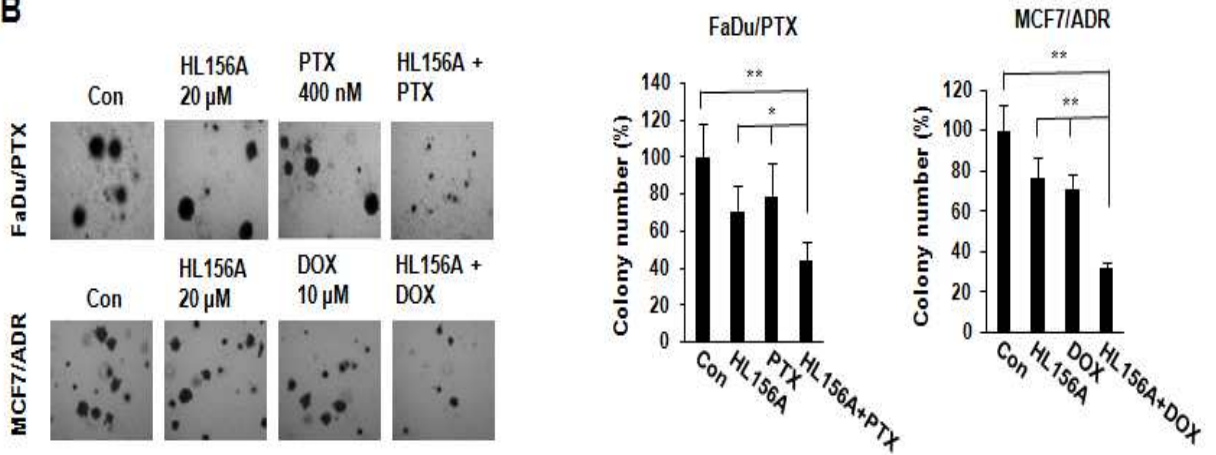


Figure 8. Accumulation of rhodamine 123 in FADU/PTX and MCF7/ADR cells.

(A) FaDu/PTX and MCF7/ADR cells were treated with HL156A at indicated concentrations for 24 hrs before incubated with 12 μ M Rhodamine 123 for 30 minutes. Data are expressed as % of fluorescent dye accumulation in control cells exposed only to rhodamine 123, arbitrarily set at 100%, and are the means \pm SEM of three independent assays. *, $p < 0.05$ when compared to control cells. (C-D) Evaluation of the colony formation of HL156A and paclitaxel or doxorubicin treated cells. Colony formation was assessed 14 days after treatment at various concentrations, and cells were stained with crystal violet at the end of the experiment. Images were taken with an inverted microscope at $\times 40$ magnification. Colony quantification was determined by microplate area scan at OD 550 nm.

3.8. HL156A가 angiogenesis에 미치는 영향

Angiogenesis는 암의 특성 중 하나이며 고형종양은 대부분 혈관신생에 의존적이다. HL156A가 angiogenesis에 미치는 영향을 조사하기 위해 Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) assay를 시행하였다. 40 μ M의 HL156A를 24 시간 동안 처리한 세포를 유정란에 넣고 3 일 배양하여 확인한 결과 약물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 tumor 주변의 angiogenesis가 유의하게 감소하는 것을 확인하였다 (Fig 9A). FaDu/PTX 세포에서 약 30% 정도 감소하였으며 MCF7/ADR 세포에서 약 45% 정도 감소하는 것을 확인하였다 (Fig 9B). 따라서 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 HL156A는 angiogenesis를 유의하게 억제하는 것을 확인하였다.

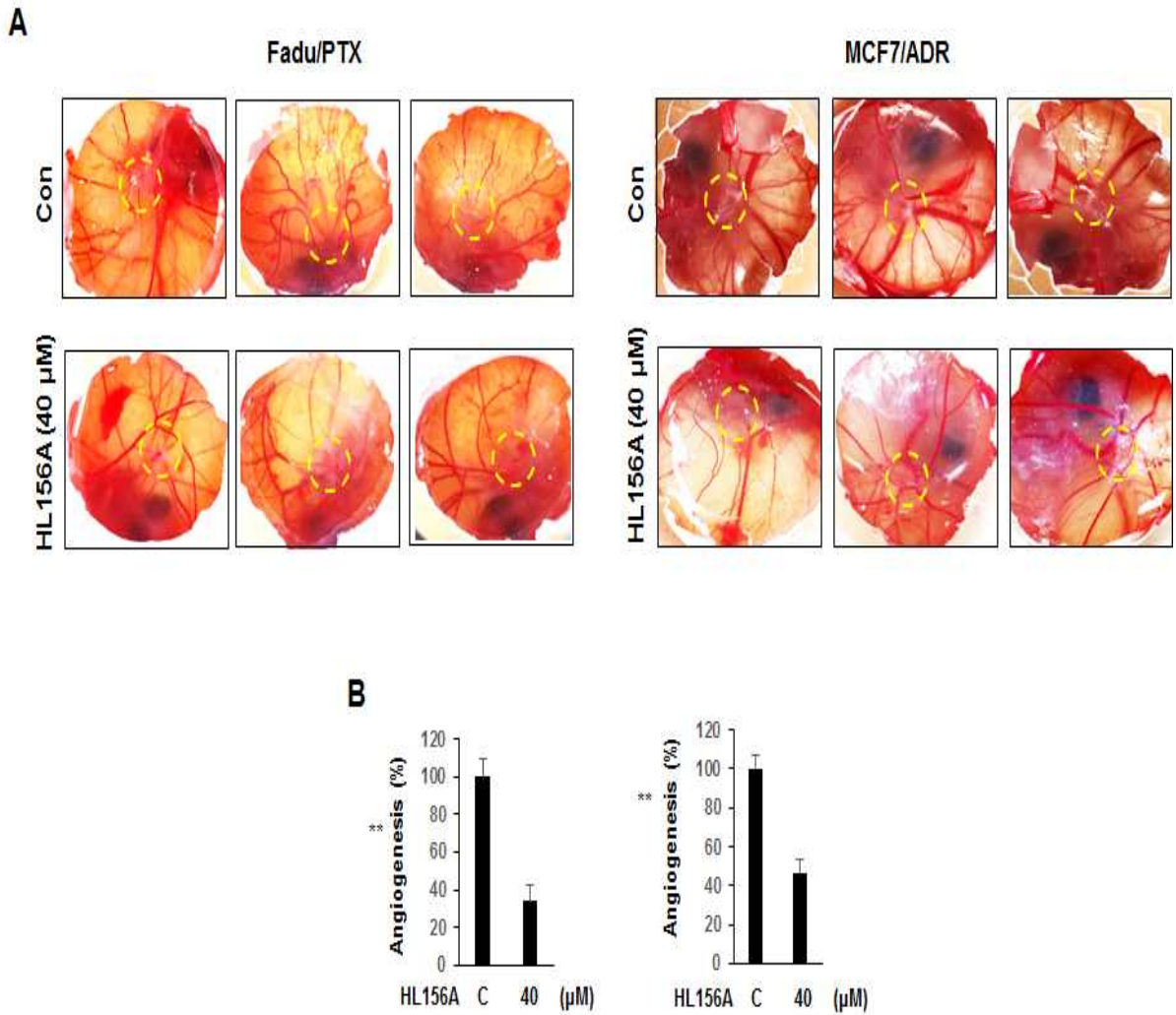


Figure 9. HL156A inhibits angiogenesis in CAM model.

(A) The fertilized eggs were implanted with 40 uM HL156A- treated FaDu/PTX or MCF7/ADR (1×10^7 cells) cells and incubated in a humidified incubator at 37 ° C for an additional of 3 days. (B) The graphs show the quantitative evaluation of the angiogenesis.

IV. 고찰 및 결론

이전 연구들에서 Metformin은 당뇨병 환자들에서 암 발병률이 감소할 뿐만 아니라 유방암, 췌장암, 난소암, 전립선암, 구강암 등 다양한 유형의 암에서 증식과 전이를 억제하고 보고되었으나 [30-32], Metformin의 항암효과에 관한 정확한 경로는 아직까지 불분명하다. Metformin은 친수성으로 인해 세포 내에 들어가지 못하기 때문에 metformin의 조직 전달은 제한적이며 항암제로서의 사용에는 한계가 있다 [37]. Metformin 유도체인 HL156A는 이러한 단점을 극복하고 높은 생체 이용 가능성을 보여 주고 있다. Metformin은 이전 여러 연구에서 유방암 (0.5 - 10 mM/L), 췌장암 (1 - 5 mM/L), 난소암 (5 - 50 mM/L), 구강암 (5 - 20 mM/L)의 농도에서 세포의 증식 억제를 유도하였으나 [44-47], HL156A는 구강암 (≤ 40 uM/L)에서 metformin보다 125-500배 낮은 농도에서 세포 증식을 억제시켰다 [42]. 아교모세포종(glioblastoma)에서도 HL156A는 metformin보다 낮은 농도에서 증식을 억제시켰으며 이종 이식모델에서 HL156A는 30 mg/kg의 용량으로 metformin 500 mg/kg과 비교하여 강한 생체 내 종양 억제 효과를 보였다 [40]. 본 연구에서는 HL156A가 구강암세포와 유방암세포 그리고 위암 세포에서 Metformin보다 효율적으로 암 세포 증식을 억제하는 것을 확인하였다.

최근 연구에서 Metformin은 다제내성 유방암세포에서 doxorubicin 과 병용처리 시 세포 성장 억제에 시너지효과를 확인하였으며, 또한 유방암 세포와 간암 세포에서 각각 2-deoxyglucose 와 5-Fu 와의 병행 처리 시에도 유사한 효과가 보고되었다 [48-50]. 이는 Metformin이 약물 내성세포에서 항암제에 대한 민감도를 증가시켜 주고 있음을 추정해 볼 수 있다. 따라서 본 연구는 항암제 내성 세포에서 새로운 metformin의 유도체인 HL156A의 효과를 확인하고자 하였다.

본 연구에서 Metformin 유도체인 HL156A는 구강암 세포 FaDu 세포와 유방암 세포 MCF7 세포 그리고 위암 세포 SNU 세포에서 세포의 성장, 증식을 억제하는 것을 확인하였다. 또한 HL156A는 Paclitaxel에 내성을 가진 구강암 세포 FaDu/PTX 세포와 Doxorubicin에 내성을 가진 유방암 세포 MCF7/ADR 세포에서 IC_{50} 인 40 uM/L에서 효율적으로 세포의 증식을 억제하였으며 Cisplatin에 내성을 가진 위암 세포 SNU/CIS 세포에서 HL156A는 50 uM/L의 농도에서 증식을 유의하게 억제하였다. 또한 암의 중요

한 특성인 이동과 전이를 확인한 결과 HL156A는 다제내성 구강암과 유방암에서 세포 이동과 전이를 유의하게 억제하였으며, colony 형성을 또한 유의하게 억제하였다. HL156A가 처리된 세포에서 세포 주기를 분석한 결과 G2/M phase에서 현저하게 억제하였고, 이들 결과와 동일하게 HL156A는 G2 phase의 조절인자인 Cyclin B와 Cyclin-dependent kinase 1(CDK1)의 발현을 감소시켰다. 이 결과 구강암 세포와 유방암 세포에서 HL156A가 세포주기에 미치는 영향이 세포 증식과 사멸에 관련이 있음을 시사한다. HL156A는 농도에 의존하여 세포의 사멸을 유도하는 것을 확인하였다. 본 연구자는 HL156A에 의한 세포사 기전을 조절하는 과정에서 HL156A에 의해 AIF가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. AIF는 세포에서 미토콘드리아에 존재하다가 세포사멸이 일어나면 방출되어 핵으로 이동, Caspase에 비 의존적으로 DNA 분절과 핵 응축을 유발하여 caspase에 비 의존적으로 사멸을 유발한다 [51]. 본 연구에서는 다제내성 구강암과 유방암에서의 HL156A가 Pro-Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 억제를 확인하였다. 따라서 HL156A는 다제내성 구강암과 유방암에서 caspase 의존적 또는 비 의존적으로 세포사 유도에 관여함을 확인할 수 있었다. 그러나 HL156A의 다제내성 암에서의 세포 사멸기전 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

다제내성(MDR)은 항암화학요법을 사용하는 암 치료에 있어 가장 어려운 문제이자 치료 실패의 주된 원인이다. MDR1은 다제 내성에서 가장 중요한 조절인자로서 전사인자인 HOXC6는 구강암에서 MDR1의 전사를 조절하여 약물 내성을 감소시킬 수 있음이 밝혀졌다.[29] 흥미롭게도 본 연구에서는 HL156A가 HOXC6를 억제를 통해 ERK1/2와 MDR1을 억제하고 있음을 발견했다. MAPK/ERK 경로는 세포의 증식과 분화, 전이, 항암제 내성 그리고 혈관신생과 밀접한 관련이 있으며 대장암과 유방암 등에서 ERK1/2는 MDR1의 발현을 조절하며 ERK1/2의 경로의 억제 시 세포의 증식, 종양세포의 전이, 혈관신생을 억제할 수 있음이 보고되었다 [52-53].

HOXC6와 MDR1 그리고 ERK1/2와의 직접적인 연관성을 확인하기 위해 HOXC6의 과발현을 유도하여 MDR1과 ERK1/2의 발현을 확인하였다. 구강암과 유방암에서 HOXC6의 과발현 시 MDR1과 ERK1/2의 발현은 증가하였으며, siRNA를 사용하여 HOXC6를 knock-down 시 MDR1과 ERK1/2의 발현이 억제됨이 확인되었다. 또한 HOXC6의 과발현과 ERK inhibitor를 사용하여 이들 단백질간의 상호연관성을 조사한 결과, ERK inhibitor 단독 처리에 의해 MDR의 발현이 감소하였으나, HOXC6 발현에는 큰 변화가

나타나지 않음으로써, ERK 가 MDR1 의 발현에 관여함을 확인하였다. 반면, HOXC6 의 과발현과 ERK inhibitor 의 병용 처리 시 ERK1/2 와 MDR1 에서 ERK inhibitor 단독 처리 시 보다 약간의 감소가 있으나 대조군에 비해 증가함을 확인하였다. 그 결과 HOXC6 가 ERK 의 발현을 직접적으로 조절함으로써 MDR1 의 발현을 조절함을 확인하였다. 이에 따라 HL156A 에 의한 MDR1 의 억제가 세포내 약물의 축적을 유도하는지 여부를 확인하였다. 그 결과 HL156A 는 농도에 의존하여 다제내성 구강암과 유방암에서 약물의 축적을 유도하였으며 Paclitaxel 과 doxorubicin 에 약물 민감도를 증가시키는 것을 발견하였다. 따라서 HL156A 의 MDR1 억제는 세포 내 약물의 축적을 유도하여 약물의 민감도를 증가시키며 이러한 MDR1 의 발현은 HOXC6 와 ERK1/2 의 경로에 기인함을 시사한다.

또한 혈관신생(angiogenesis)는 새로운 혈관을 형성하여 종양의 성장, 침습, 전이에 필수적인 암의 특징 중 하나이다. 고형 종양(Solid tumor)의 증식은 혈관신생에 의존적이다. 혈관신생이 없을 시 2mm 이상 성장할 수 없으므로 그 이상 성장하기 위해서는 산소와 영양분을 위해 새로운 혈관신생은 필수적이다. 또한 angiogenesis 는 성장뿐만 아니라 전이에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 이전 연구에서 동물모델에서의 angiogenesis 의 억제는 종양의 증식과 전이를 억제시킴이 보고되었다 [54]. 따라서 Angiogenesis 의 억제는 암 치료에 있어 항암효과를 더욱 증진시킬 가능성을 가지고 있다. 본 연구에서는 HL156 의 혈관신생 형성에 미치는 영향을 조사하기 위해 Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay 를 이용하였다. 그 결과 HL156A 처리 하지 않은 대조군에 비해 종양의 크기와 혈관의 신생정도가 각각 30% 와 45% 로 현저히 감소하였다. 따라서 HL156A 가 ERK1/2 의 억제를 통해 혈관신생을 억제하며 종양의 증식 또한 억제할 수 있음을 보여주고 있다.

Metformin 과 HL156A 는 AMPK 의 활성화제로 잘 알려져 있으며 HL156A 의 경우 Metformin 보다 더 높은 AMPK 의 활성을 유도하는 것이 보고되어있다 [38-43]. 최근연구결과 다제내성 유방암에서 Metformin 은 doxorubicin 과 병용 처리 시 AMPK 의 활성화는 mTOR 의 억제를 기전을 통해 약물 내성을 극복하고 종양의 억제에 관여하고 있음이 보고되었으나 [50] 또 다른 연구에서는 다제내성 유방암에서 Metformin 은 AMPK 의 활성화와 무관하게 약물내성을 극복하였다. 약물 내성 기전에 대한 metformin 의 작용 및 효과는 논란의 여지가 있지만, metformin 에 대한 작용은

세포의 유전적 배경에 따라 달라질 수 있다 [55]. 본 연구자는 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 약물 내성을 극복하기 위해 이전 연구들에서 알려진 HOXC6를 목표로 약물 내성을 극복 여부를 확인하였고 그 결과 HL156A는 FaDu/PTX 세포와 MCF7/ADR 세포에서 약물내성을 효과적으로 억제 할 수 있음을 발견하였다. 그러나 다제내성 암에서의 HL156A의 생체 내 효과는 더 많은 연구가 필요하다.

종합적으로 본 연구 결과 Metformin 유도체 HL156A가 paclitaxel 내성 구강암 세포와 doxorubicin 내성 유방암 세포에서 HOXC6를 억제를 통해 ERK1/2와 MDR1을 억제함으로써 약물 내성을 극복할 수 있음을 시사한다. 또한 Metformin 유도체 HL156A가 다제내성 구강암과 유방암에서 새로운 치료제로서 사용이 가능할 것을 제안한다.

V. 참고문헌

1. Ullah, M. F. Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 9, 1-6 (2008).
2. Clynes, M. Cellular models for multiple drug resistance in cancer. *In Vitro Cell Dev Biol - Animal* 29, 171-179 (1993).
3. Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48-58 (2002).
4. Leonard, G. D., Fojo, T. & Bates, S. E. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 8, 411-424 (2003).
5. Thomas, H. & Coley, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 10, 159-165 (2003).
6. Hodges, L. M. et al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet. Genomics* 21, 152-161 (2011).
7. Chen, Q., Bian, Y. & Zeng, S. Involvement of AP-1 and NF- κ B in the up-regulation of P-gp in vinblastine resistant Caco-2 cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 29, 223-226 (2014).
8. Huang, J. et al. The Cytotoxic Effect of the Benzene Metabolite Hydroquinone is Mediated by the Modulation of MDR1 Expression via the NF- κ B Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 37, 592-602 (2015).
9. Katayama, K., Noguchi, K. & Sugimoto, Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *New Journal of Science* (2014). doi:10.1155/2014/476974
10. Aldonza, M. B. D. et al. Suppression of MAPK Signaling and Reversal of mTOR-Dependent MDR1-Associated Multidrug Resistance by 21 α -Methylmelianodiol in Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* 10, e0127841 (2015).
11. Lappin, T. R., Grier, D. G., Thompson, A. & Halliday, H. L. HOX GENES: Seductive Science, Mysterious Mechanisms. *Ulster Med J* 75, 23-31 (2006).
12. Samuel, S. & Naora, H. Homeobox gene expression in cancer: insights from

- developmental regulation and deregulation. *Eur. J. Cancer* 41, 2428-2437 (2005).
13. Liu, J., Liu, J. & Lu, X. H0XA1 upregulation is associated with poor prognosis and tumor progression in breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine* 17, 1896-1902 (2019).
 14. Wang, Z., Yu, C., & Wang, H. H0XA5 inhibits the proliferation and induces the apoptosis of cervical cancer cells via regulation of protein kinase B and p27. *Oncology reports*, 41, 1122-1130 (2019).
 15. Abe, M. et al. Disordered expression of H0X genes in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 15, 797-802 (2006).
 16. Hur, H., Lee, J.-Y., Yun, H. J., Park, B. W. & Kim, M. H. Analysis of H0X gene expression patterns in human breast cancer. *Mol. Biotechnol.* 56, 64-71 (2014).
 17. Chen, J. L. et al. Deregulation of a Hox protein regulatory network spanning prostate cancer initiation and progression. *Clin. Cancer Res.* 18, 4291-4302 (2012).
 18. Alharbi, R. A., Pettengell, R., Pandha, H. S., & Morgan, R. The role of H0X genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*, 27, 1000-1008 (2013).
 19. Kelly, Z. L., Michael, A., Butler-Manuel, S., Pandha, H. S. & Morgan, R. G. H0X genes in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 4, 16 (2011).
 20. Ramachandran, S. et al. Loss of H0XC6 expression induces apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 24, 188-198 (2005).
 21. Hussain, I. et al. Bisphenol-A induces expression of H0XC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1849, 697-708 (2015).
 22. Zhang, Q. et al. Upregulated Hoxc6 expression is associated with poor survival in gastric cancer patients. *Neoplasma* 60, 439-445 (2013).
 23. Ji, M. et al. Silencing homeobox C6 inhibits colorectal cancer cell proliferation. *Oncotarget* 7, 29216-29227 (2016).
 24. Zhang, F. et al. H0XC6 gene silencing inhibits epithelial-mesenchymal transition and cell viability through the TGF- β /smad signaling pathway in

cervical carcinoma cells. *Cancer Cell International* 18, 204 (2018).

25. Yan, T.-F. et al. Knockdown of HOXC6 inhibits glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest by targeting WIF-1 in vitro and vivo. *Pathol. Res. Pract.* 214, 1818-1824 (2018).

26. Chen, S.-W. et al. HOXC6 promotes gastric cancer cell invasion by upregulating the expression of MMP9. *Mol Med Rep* 14, 3261-3268 (2016).

27. Wang, Y. et al. HOXC6 promotes cervical cancer progression via regulation of Bcl-2. *FASEB J.* 33, 3901-3911 (2019).

28. Tang, L. et al. HOXC6 promotes migration, invasion and proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells via modulating expression of genes involved in malignant phenotypes. *PeerJ* 7, e6607 (2019).

29. Kim, K.-J. et al. Transcriptional regulation of MDR-1 by HOXC6 in multidrug-resistant cells. *Oncogene* 32, 3339-3349 (2013).

30. Bowker, S. L., Majumdar, S. R., Veugelers, P. & Johnson, J. A. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 29, 254-258 (2006).

31. Currie, C. J., Poole, C. D. & Gale, E. a. M. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia* 52, 1766-1777 (2009).

32. Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R. & Morris, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330, 1304-1305 (2005).

33. Ben Sahra, I., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.-F. & Bost, F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol. Cancer Ther.* 9, 1092-1099 (2010).

34. Del Barco, S. et al. Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget* 2, 896-917 (2011).

35. Howell, J. J. et al. Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab.* 25, 463-471 (2017).

36. Jacobs, D. B., Hayes, G. R., Truglia, J. A. & Lockwood, D. H. Effects of

metformin on insulin receptor tyrosine kinase activity in rat adipocytes. *Diabetologia* 29, 798-801 (1986).

37. Daugan, M., Dufaÿ Wojcicki, A., d' Hayer, B. & Boudy, V. Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacol. Res.* 113, 675-685 (2016).

38. Lee, H. S. et al. AMP-activated protein kinase activator, HL156A reduces thioacetamide-induced liver fibrosis in mice and inhibits the activation of cultured hepatic stellate cells and macrophages. *Int. J. Oncol.* 49, 1407-1414 (2016).

39. Ju, K. D. et al. HL156A, a novel AMP-activated protein kinase activator, is protective against peritoneal fibrosis in an in vivo and in vitro model of peritoneal fibrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 310, F342-350 (2016).

40. Choi, J. et al. Inhibiting stemness and invasive properties of glioblastoma tumorsphere by combined treatment with temozolomide and a newly designed biguanide (HL156A). *Oncotarget* 7, 65643-65659 (2016).

41. Tsogbadrakh, B. et al. HL156A, a novel pharmacological agent with potent adenosine-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator activity ameliorates renal fibrosis in a rat unilateral ureteral obstruction model. *PLoS ONE* 13, e0201692 (2018).

42. Lam, T. G., Jeong, Y. S., Kim, S.-A. & Ahn, S.-G. New metformin derivative HL156A prevents oral cancer progression by inhibiting the insulin-like growth factor/AKT/mammalian target of rapamycin pathways. *Cancer Sci.* 109, 699-709 (2018).

43. Kim, S.-A., Lam, T. G., Yook, J.-I. & Ahn, S.-G. Antioxidant modifications induced by the new metformin derivative HL156A regulate metabolic reprogramming in SAMP1/k1 (-/-) mice. *Aging (Albany NY)* 10, 2338-2355 (2018).

44. Sikka, A., Kaur, M., Agarwal, C., Deep, G. & Agarwal, R. Metformin suppresses growth of human head and neck squamous cell carcinoma via global inhibition of protein translation. *Cell Cycle* 11, 1374-1382 (2012).

45. Phoenix, K. N., Vumbaca, F. & Claffey, K. P. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ERalpha negative MDA-MB-435 breast cancer model. *Breast Cancer Res. Treat.* 113, 101-111 (2009).

46. Wang, L.-W. et al. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 14, 7192-7198 (2008).
47. Zheng, Y., Zhu, J., Zhang, H., Liu, Y. & Sun, H. Metformin inhibits ovarian cancer growth and migration in vitro and in vivo by enhancing cisplatin cytotoxicity. *Am J Transl Res* 10, 3086-3098 (2018).
48. Ling, S. et al. Metformin reverses multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma Bel-7402/5-fluorouracil cells. *Mol Med Rep* 10, 2891-2897 (2014).
49. Xue, C. et al. Targeting P-glycoprotein function, p53 and energy metabolism: Combination of metformin and 2-deoxyglucose reverses the multidrug resistance of MCF-7/Dox cells to doxorubicin. *Oncotarget* 8, 8622-8632 (2017).
50. Li, Y., Wang, M., Zhi, P., You, J. & Gao, J.-Q. Metformin synergistically suppress tumor growth with doxorubicin and reverse drug resistance by inhibiting the expression and function of P-glycoprotein in MCF7/ADR cells and xenograft models. *Oncotarget* 9, 2158-2174 (2018).
51. Kitazumi, I. & Tsukahara, M. Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J.* 278, 427-441 (2011).
52. Katayama, K., Yoshioka, S., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J. & Sugimoto, Y. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2092-2102 (2007).
53. Liu, S. et al. PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Oncotarget* 8, 99901-99912 (2017).
54. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27-31 (1995).
55. Davies, G. et al. Metformin inhibits the development, and promotes the resensitization, of treatment-resistant breast cancer. *PLoS ONE* 12, e0187191 (2017).
56. Rena, G., Hardie, D. G. & Pearson, E. R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60, 1577-1585 (2017).
57. Ersoy, C. et al. The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels

in obese type 2 diabetic patients. Diabetes Res. Clin. Pract. 81, 56-60 (2008).