



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

2023년 8월
박사학위 논문

사람 두경부 편평세포암종 FaDu에서
cimifugin의 항암효과 분석

조선대학교 대학원

치의생명공학과

박 중 현

사람 두경부 편평세포암종 FaDu에서 cimifugin의 항암효과 분석

Anticancer effects of cimifugin in FaDu human head and
neck squamous cell carcinoma

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

박 중 현

사람 두경부 편평세포암종 FaDu에서 cimifugin의 항암효과 분석

지도교수 김 도 경

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

박 종 현

박종현의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 흥 중 印

위 원 전남대학교 교 수 김 종 근 印

위 원 조선대학교 교 수 유 선 경 印

위 원 조선대학교 교 수 김 재 성 印

위 원 조선대학교 교 수 김 도 경 印

2023년 6월

조선대학교 대학원

목 차

도목차	iii
ABSTRACT	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험재료	4
2. 세포 및 세포 배양	4
3. 세포 성장 억제 분석(MTT 분석)	5
4. Cell live & dead assay 분석	5
5. Hematoxylin & Eosin 염색	5
6. 세포핵 형태 관찰	6
7. Caspase-3/-7 활성 분석	6
8. 세포 사멸 관련 단백질 발현 변화 분석	6
9. 실험자료의 통계학적 검정	7
III. 실험결과	8
1. FaDu 세포에서 cimifugin에 의한 농도의존적 세포독성 증가	8
2. FaDu 세포에서 cimifugin에 의한 농도의존적 세포 생존율 감소	10
3. Cimifugin에 의한 FaDu 세포의 형태학적 변화 증가	12
4. Cimifugin에 의한 FaDu 세포의 염색질 응축현상 증가	14
5. FaDu 세포에서 cimifugin에 의한 caspase-3/-7의 활성 증가	16
6. FaDu 세포에서 cimifugin에 의한 외인성 및 내인성 세포사멸	18

7. FaDu 세포에서 PI3K/Akt 신호전달 경로로 매개된 cimifugin에 의한
세포 사멸 22

IV. 고찰 24

V. 참고문헌 28

도 목 차

Figure 1. Chemical structure of cimifugin.	3
Figure 2. Cimifugin decreases the viability of FaDu cells, but dose not affects that of L929 cells used as a normal cells.	9
Figure 3. The survival rate is decreased by cimifugin in FaDu cells, but not in L929 cells used as a normal cells.	11
Figure 4. The formation of apoptotic bodies is increased in the FaDu cells treated with cimifugin, but is not observed in L929 cells used as a normal cells.	13
Figure 5. The number of FaDu cells with condensed chromation is increased by cimifugin.	15
Figure 6. The activity of caspase-3/-7 is increased by cimifugin in FaDu cells.	17
Figure 7. Cimifugin upregulates the expression of FasL and cleaved caspase-8, which are involved in death receptor-mediated extrinsic apoptosis in FaDu cells.	19
Figure 8. Cimifugin induces a mitochondria-dependent intrinsic apoptosis that is mediated by the upregulation of pro-apoptotic factors and the down-regulation of anti-apoptotic factors in FaDu cells.	20

Figure 9. Cimifugin increases cell death through the cleavage of caspase-3 and its down-stream pro-apoptotic factor, poly (ADP ribose) polymerases, by both caspase-8 and -9 in FaDu cells. 21

Figure 10. Cimifugin-induced apoptosis is mediated by the inactivation of mitogen-activated protein kinases, NF- κ B and Akt cellular signaling pathways in FaDu cells. 23

Figure 11. Schematic diagram of cimifugin-induced apoptosis pathways. 27

ABSTRACT

Anticancer effects of cimifugin in FaDu human head and neck squamous cell carcinoma

Jong - Hyun Park

Advisor : Prof. Do Kyung Kim, Ph.D.

Department of Bidental Engineering

Graduate School of Chosun University

Head and neck squamous cell cancer (HNSCC) is a common cancer that are affecting various parts of the head and neck, and its treatment typically involves surgery, radiation therapy, chemotherapy, or a combination of these approaches. However, these treatments often cause side effects, including facial deformities, dry mouth, nausea, and loss of taste, highlighting the need for effective chemotherapeutic agents that induce cancer-specific apoptosis with fewer side effects. Flavonoids are natural substances that exhibit biological safety and pharmacological effects, making them an interesting option for the development of anticancer drugs with minimal side effects. Cimifugin is a physiologically active substance derived from *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk, with known anti-allergy and anti-inflammatory effects, but its potential anticancer effects against HNSCC have not yet been explored. Therefore, the main goal of this study was to investigate the effect of cimifugin on cell growth and apoptosis induction in FaDu human head and neck squamous cell carcinoma.

Cimifugin significantly increased FaDu cell death while not affecting the viability of the L929 mouse fibroblast cell line. Treatment with cimifugin for 24 hours resulted in morphological changes, nuclear condensation, and an increase in

the apoptotic population, which are typical characteristics of apoptosis. FasL, an apoptosis inducer, was significantly increased in a dose-dependent manner in FaDu cells, confirming that death receptor-mediated apoptosis was mediated through the activation of caspase-8. Furthermore, cimifugin activated Bid, a cell death factor, into tBid by the activated caspase-8, increasing expression of Bax and Bad, and reducing expression of Bcl-2 and Bcl-xL, which are cell death inhibitors. By reducing the mitochondria membrane potential and secreting cytochrome *c* into the cytoplasm, it was confirmed that FaDu cell death was mediated by mitochondria dependent intrinsic apoptosis through caspase-9 activation. Finally, it was confirmed that stepwise activation of caspase-3 and poly (ADP ribose) polymerase (PARP) was mediated by death receptor-mediated apoptosis and mitochondria dependent intrinsic apoptosis, caspase-8 and caspase-9, respectively. In particular, cimifugin-induced apoptosis of FaDu cells not only inhibited phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) including ERK1/2 and p38 but also was regulated by Akt and nuclear factor (NF)- κ B cell signaling pathways.

These findings suggest that cimifugin inhibits cell proliferation and induces apoptotic cell death in FaDu human head and neck squamous cell carcinomas through both the death receptor-mediated (extrinsic) apoptotic pathway and the mitochondria-dependent (intrinsic) apoptotic pathway. These results indicate that cimifugin could be a candidate for a chemical treatment with biological safety and excellent anticancer effects for the treatment of HNSCC.

I. 서론

두경부 편평세포암(Head and neck squamous cell cancer, HNSCC)은 일반적으로 구강, 인두, 후두, 침샘, 부비강 및 비강의 점막 내벽에서 발생한다(1). 두경부 편평세포암은 전 세계적으로 전체 암 관련 사망의 4%를 차지하고 사망률이 높으며(2), 두경부의 비정상적인 궤양이나 통증, 인후통, 호흡곤란, 연하시 불편함, 턱뼈 아래 또는 침샘 주변의 붓기, 얼굴 근육 마비 등을 일으키는 일반적인 임상 증상이 알려져 있다(3). 최근 연구에 따르면 두경부 편평세포암의 약 75%에서 알코올, 무연 담배, 씹는 담배의 소비가 주요 위험 요인이라고 보고되고 있으며(4,5). 최근에는 인체 유두종바이러스(human papillomavirus, HPV)가 유발하는 구인두암의 비중이 증가하고 있다(6).

두경부 편평세포암 환자의 치료에는 수술, 방사선 치료, 화학 요법 또는 이들의 조합이 포함된다(7,8). 수술은 두경부 편평세포암 환자에서 가장 흔한 치료 방법이지만, 수술 후에는 많은 부작용을 나타낸다. 예를 들어, 저작이나 연하 기능의 변화, 언어에 미치는 영향, 얼굴 기형 등이 있다(9). 비수술적 치료로는 방사선 치료 등이 있으며 이러한 치료는 발적, 자극, 구강 염증 등의 부작용을 동반할 수 있으며, 침샘의 파괴로 인한 구강 건조증이나 미각 상실로 인한 식욕 저하로 영양불균형이 발생할 수 있다(10). 또한, 화학 요법은 두경부 편평세포암 치료에 있어서 치료 효과를 증대시킬 수 있지만, 암세포의 사멸뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 미칠 수 있어 메스꺼움, 구토를 포함한 구내염, 설사, 골수 기능 장애 등 많은 부작용을 동반한다(11).

의학 분야의 급속한 발전에도 불구하고 두경부 편평세포암으로 진단된 환자의 5년 생존율과 사망률은 지난 40년간 크게 개선되지 않았으며(12), 이러한 이유로 두경부 편평세포암 환자들에게 부작용이 적으면서 암세포 특이적 사멸을 효과적으로 유도할 수 있는 새로운 치료의 개발이 요구되고 있다. 따라서, 최근 연구는 부작용이 적으면서 항암 효과가 뛰어난 천연물에 초점을 맞추고 있다(13).

방풍(*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkin) 뿌리에 풍부하게 함유된 쿠마린(coumarin)인 cimifugin(Figure 1)은 진통 효과뿐만 아니라 항혈소판 응집, 해열 및 항염증 활성 효과 등이 보고되었다(14,15). 그러나 두경부 암에서 cimifugin에 의한 항암활성과 세포 apoptosis 및 전이 억제 등에 관한 자료는 부족하다. 따라서 본 연구에서는 사람 두경부 편평세포암종 FaDu 세포를 이용하여 cimifugin에 의한 두경부 암세포 성장 억제에 미치는 효과와 세포 성장 억제 기전을 밝히고, 또한 두경부암 치료에서 cimifugin의 효용성을 평가하고자 하였다.

Cimifugin

- Molecular formula $C_{16}H_{18}O_6$
- Molecular weight 306.31
- CAS No. 37921-38-3

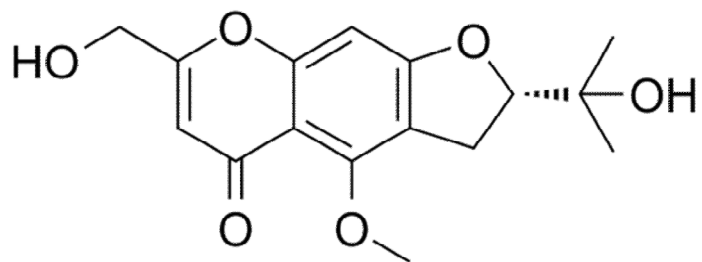


Figure 1. Chemical structure of cimifugin.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

Cimifugin은 Sigma-Aldrich, Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해 후 사용하였다. Fas ligand(FasL, 48kDa), cleaved caspase-3 (17 and 19kDa), cleaved caspase-8(18kDa), cleaved caspase-9 (37kDa), poly (ADP ribose) polymerase(PARP, preform 116kDa 및 cleaved form 85kDa), phospho-ERK1/2(42 및 44kDa), total-Erk1/2(42 및 44kDa), phospho-p38 (38kDa), total-p38(38kDa) 및 β -actin(45kDa)은 Cell signaling Technology Inc. (Denver, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. B-cell lymphoma 2(Bcl-2, 26 kDa), B-cell lymphoma extra-large(Bcl-xL, 26kDa), Bcl-2-associated X protein(Bax, 21kDa), Bcl-2-associated death promoter(Bad, 23kDa), phospho-Akt(60 및 56kDa), total Akt (62kDa) 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Dallas, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다. Phospho-NF- κ B(65kDa)와 total-NF- κ B(65kDa)는 Life Technologies(Carlsbad, CA, USA)제품을 사용하였다.

2. 세포 및 세포배양

사람 두경부 편평 세포암종 FaDu 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입했으며, minimum essential medium (MEM, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 생쥐 정상 결합조직 L929 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Republic of Korea)에서 구입하였다. L929는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였으며, 모든 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL, USA)과 1% 항생제(Penicillin G sodium 10,000units/mL, streptomycin sulfate 10,000 μ g/mL)를 첨가하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C의 온도 및 100% 습도조건에서 5% CO₂를 공급하면서 배양하였다.

3. 세포 성장 억제 분석(MTT 분석)

Cimifugin의 세포 생존을 검증은 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) assay로 측정하였다. 96-well culture plate(2×10^4 cells/well)에 배양 후 배양된 세포를 cimifugin 10, 20, 40, 80 또는 $160 \mu\text{M}$ 로 37°C 에서 24시간 동안 처리하여 용량 의존적 효과를 확인하였다. 규정된 조건 하에서 배양한 후, 세포를 $20 \mu\text{L}$ 의 5 mg/mL MTT 용액에서 4시간 동안 배양하였다. 이어서 배양액을 제거하고, MTT 결정을 $200 \mu\text{L/well}$ DMSO에 용해시켰다. 그 후 분광광도계를 사용하여 570 nm 에서 흡광도를 측정하였으며, 실험은 독립적으로 세 번 반복하였다. 세포 생존율은 다음 식을 사용하여 계산하였다: % 성장 억제 = $[(1 - \text{처리된 OD 추출물}) / (\text{OD 음성 대조군})] \times 100$

4. Cell live & dead assay 분석

살아있는 세포를 녹색 형광으로 염색하기 위한 녹색 calcein AM과 죽은 세포를 적색 형광으로 염색하기 위한 ethidium homodimer-1로 구성된 Cell live & dead assay(ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 수행하였다. 간략하게, L929 및 FaDu 세포를 8-well 챔버 슬라이드(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)에서 2×10^4 cell/mL의 농도로 배양 후, 배양된 L929 및 FaDu 세포를 75 및 $150 \mu\text{M}$ cimifugin으로 24시간 동안 처리하였다. 처리 후 배지를 제거하고 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)으로 2회 세척하였다. 녹색 calcein AM 및 ethidium homodimer-1($1 \mu\text{L/mL}$)로 실온의 어두운 곳에서 30분 동안 염색 후, 형광현미경(Eclipse TE2000, Nikon Instruments, Melville, NY, USA)으로 관찰하였다.

5. Hematoxylin & Eosin 염색

세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 시행하였다. L929 및 FaDu 세포를 5×10^4 cells/mL의 농도로 24시간 동안 배양

한 다음 75 및 150 μ M 농도의 cimifugin을 처리하여 24시간 동안 배양 후, 4% paraformaldehyde 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 고정하고 염색 한 다음 세포를 현미경(Eclipse TE2000, Nikon Instruments, Melville, NY, USA)으로 관찰하였다.

6. 세포핵 형태 관찰

Apoptosis 현상인 핵이 응축된 세포를 검출하기 위해 4',6-Diamidino-2-phenylindole(DAPI)염색을 시행하였다. 간략하게, FaDu 세포를 8-well 챔버 슬라이드에서 2×10^4 cell/mL의 농도로 배양 후, 배양된 FaDu 세포를 75 및 150 μ M cimifugin으로 24시간 동안 처리하였다. FaDu 세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 4% paraformaldehyde로 고정하고, 1mg/mL DAPI(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 20분 동안 염색하였다. FaDu 세포의 핵은 형광 현미경(Eclipse TE2000, Nikon Instruments, Melville, NY, USA)을 사용하여 관찰하였다.

7. Caspase-3/-7 활성 분석

NucView 488 caspase-3/-7 기질 용액(Biotium Inc., Hayward, CA, USA)을 사용하여 caspase-3/-7 활성을 분석하였다. FaDu 세포를 8-well 챔버 슬라이드에서 5×10^4 cells/mL의 농도로 배양 후, 배양된 FaDu 세포를 75 및 150 μ M cimifugin으로 24시간 동안 처리하였다. 배지를 1 μ M NucView 488 용액이 포함된 PBS로 교체한 후, 30분 동안 실온에서 세포를 배양하고 형광현미경으로 세포를 관찰하였다.

8. 세포 사멸 관련 단백질 발현 변화 분석

1×10^6 cell/mL 농도의 FaDu 세포를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 가습 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 cimifugin으로 24시간 동안 처리된 FaDu 세포를 회수하고 Protease

및 Phosphatase inhibitor cocktails(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)가 포함된 세포 용해 완충액(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)을 사용하여 용해하고, 용해물을 4℃에서 10분 동안 14,000 ×g에서 원심분리하였다. 추출한 단백질을 이용하여 전기영동한 후, western blotting을 시행하였다. 면역반응성은 ECL 시스템(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 단백질 발현 변화를 필름을 통해 확인하였다.

9. 실험자료의 통계학적 검정

실험 결과는 평균과 표준 오차로 표현하였고, 각 실험군 간의 차이를 검정하기 위해 분산 분석(analysis of variance) 후에 독립 *t*-검정(student's *t*-test)을 실시하였으며, *p*-value가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판단하였다. 본 연구의 통계적 검정은 SPSS ver. 22.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

III. 실험결과

1. FaDu 세포에서 cimifugin에 의한 농도의존적 세포독성 증가

Cimifugin에 의한 세포독성은 MTT 분석을 사용하여 평가하였다. Figure 2A와 같이 10, 20, 40, 80 또는 160 μ M의 cimifugin을 생쥐 정상 결합조직 L929 세포에 24시간 동안 처리하였을 때 cimifugin을 처리하지 않은 대조군($100 \pm 0.8\%$)과 비교하여 각각 $107.7 \pm 4.0\%$, $107.1 \pm 8.9\%$, $113.5 \pm 3.4\%$, $110.5 \pm 1.3\%$ 및 $102.1 \pm 3.7\%$ 를 나타내었으며, 통계적으로 유의성을 관찰할 수 없었다(Figure 2A). Cimifugin 10, 20, 40, 80 또는 160 μ M 농도를 FaDu 세포에 24시간 동안 처리하였을 때 cimifugin을 처리하지 않은 대조군($100 \pm 2.0\%$)과 비교하여 각각 $86.7 \pm 2.5\%$, $82.8 \pm 2.3\%$, $73.9 \pm 3.6\%$, $59.4 \pm 1.1\%$ 및 $47.9 \pm 1.5\%$ 로 농도 의존적으로 유의하게 세포 성장이 감소하였다(Figure 2B). 이는 cimifugin이 FaDu 세포에서 농도 의존적으로 세포 독성 효과를 나타낸다는 것을 시사한다.

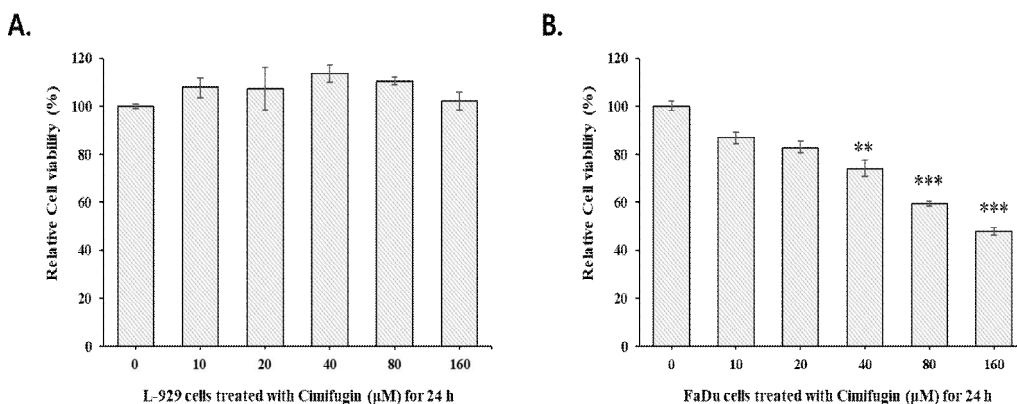


Figure 2. Cimifugin decreases the viability of FaDu cells, but dose not affects that of L929 cells used as a normal cells. L929 and FaDu cells were treated with 10 ~ 160 μM cimifugin for 24 h. Thereafter, MTT assay was performed to measure the cytotoxicity. The data presented are the mean ± standard deviation of three independent experiments. Results are mean ± standard deviation of experiments (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control).

2. FaDu 세포에서 cimifugin에 의한 농도의존적 세포 생존율 감소

L929 세포와 FaDu 세포를 8-well 챔버 슬라이드에 배양하고 다양한 농도의 cimifugin(75 및 150 μ M)을 24시간 동안 처리하였다. 살아있는 세포를 녹색 형광으로 염색하기 위해 세포투과성 calcein-AM을 사용하였고, 죽은 세포를 적색 형광으로 염색하기 위해 ethidium homodimer-1을 사용하였다. Cimifugin이 처리된 L929 세포는 막 투과성 calcein-AM에 의해 녹색 형광으로 염색되었으나(Figure 3A), 75 및 150 μ M cimifugin 처리 후 살아있는 FaDu 세포의 상대적 비율은 각각 $71.5 \pm 5.1\%$ 및 $35.1 \pm 4.6\%$ 로 크게 감소하였다(Figure 3B). 이 결과는 cimifugin이 농도 의존적으로 FaDu 세포의 세포사멸을 유발하지만, 정상 세포로 사용된 L929 세포의 세포 생존에 영향을 미치지 않음을 보여주고 있다.

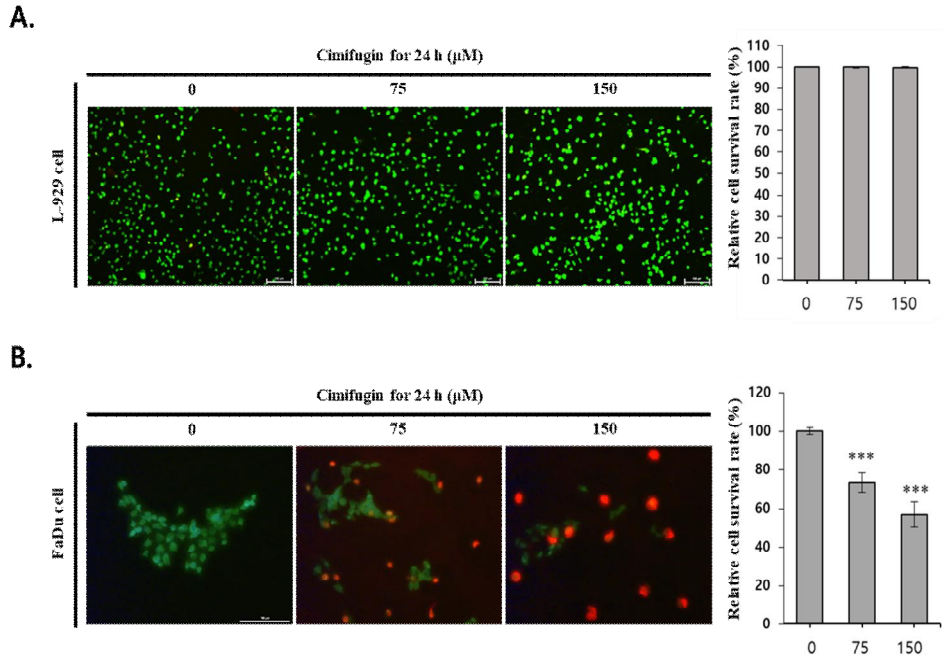


Figure 3. The survival rate is decreased by cimifugin in FaDu cells, but not in L929 cells used as a normal cells. Live & dead assay was performed using green calcein-AM and ethidium homodimer-1 to stain live and dead cells, respectively, in L929 and FaDu cells treated with 75 and 150 μM cimifugin for 24 h. Fluorescence microscopy images of the cells were captured using Eclipse TE2000 microscope (Nikon Instruments, Melville, NY). The presented data are the mean \pm standard deviation of the results of three independent experiments (** $p < 0.001$ compared to the control).

3. Cimifugin에 의한 FaDu 세포의 형태학적 변화 증가

L929 세포와 FaDu 세포에 cimifugin(75 및 150 μ M)을 24시간 동안 처리하고 H&E 염색을 수행하여 전형적인 apoptosis 현상인 세포 사체 apoptotic body 형성 및 형태학적 변화를 확인하였다. Figure 4A에 나타낸 바와 같이, L929 세포는 대조군과 비교하여 apoptosis 현상인 세포 사체 형성이 나타나지 않았다. 반면 FaDu 세포의 수는 cimifugin에 의해 농도 의존적으로 감소하였을 뿐만 아니라 세포 사체의 대표적인 형태적 특징인 외막의 팽창과 수축을 보이는 FaDu 세포의 수가 농도 의존적으로 증가하였다(Figure 4B). 이러한 결과는 cimifugin에 의한 FaDu 세포 독성 증가 및 세포 생존을 감소와 세포 사체 형성을 특징으로 하는 apoptosis와의 연관성을 제시하고 있다.

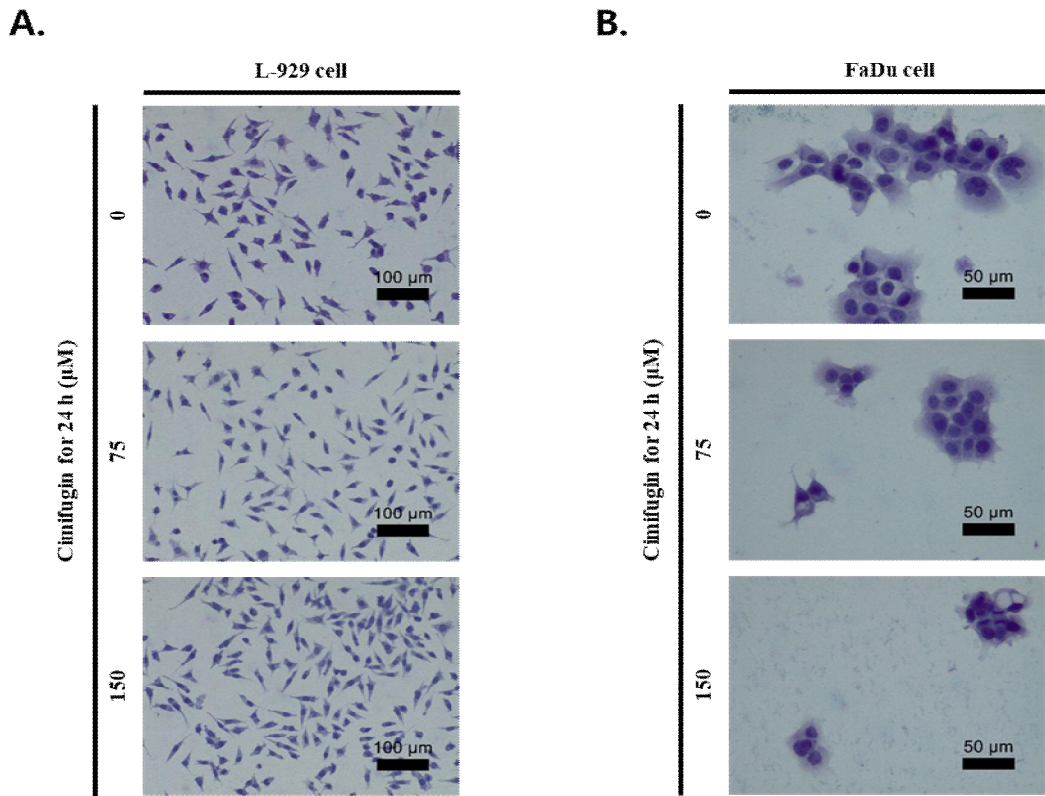


Figure 4. The formation of apoptotic bodies is increased in the FaDu cells treated with cimifugin, but is not observed in L929 cells used as a normal cells. Hematoxylin and Eosin staining was performed to investigate the apoptotic body formation and morphological alterations in both L929 cells and FaDu cells treated with 75 and 150 μM cimifugin for 24 h. Microscopy images of the cells were captured (Eclipse TE2000; Nikon Instruments, Melville, NY).

4. Cimifugin에 의한 FaDu 세포의 염색질 응축현상 증가

Cimifugin에 의해 유도된 FaDu 세포의 성장 억제가 apoptosis와 관련이 있는지 그 여부를 평가하기 위해 FaDu 세포에 75 및 150 μ M cimifugin을 24시간 동안 처리한 후 FaDu 세포의 염색질 응축 여부를 확인하였다. Figure 5에 나타낸 바와 같이, 대표적 apoptosis의 특징인 염색질이 응축된 핵을 가진 FaDu 세포의 수는 대조군에 비해 cimifugin 처리 세포에서 유의하게 높았다. 이러한 결과는 FaDu 세포에서 cimifugin에 의한 세포독성 증가 및 세포 생존율 감소는 apoptosis에 의해 매개되고 있음을 시사하고 있다.

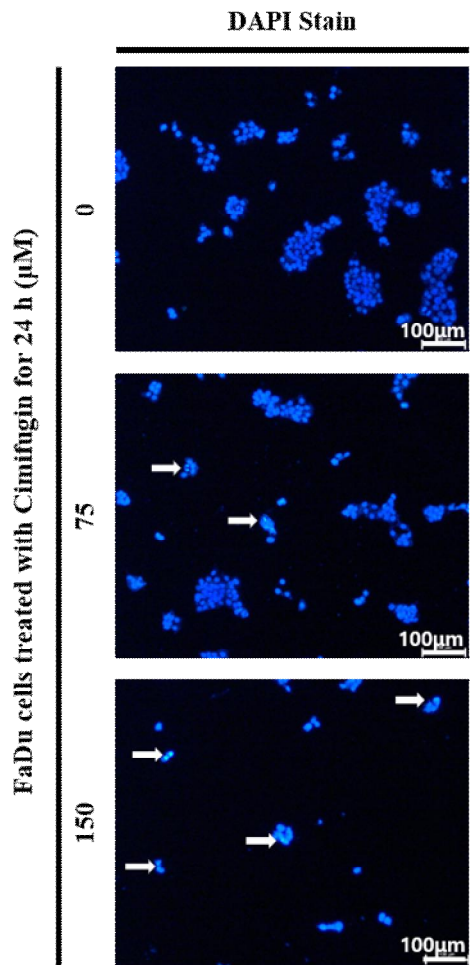


Figure 5. The number of FaDu cells with condensed chromatin is increased by **cimifugin**. FaDu cells were treated with 75 and 150 μM cimifugin for 24 h, followed by nuclear staining using DAPI. Fluorescence microscopy images were captured, and cells with chromatin-condensed nuclei were identified by white arrows (Eclipse TE2000; Nikon Instruments, Melville, NY).

5. FaDu 세포에서 cimifugin에 의한 caspase-3/-7의 활성 증가

Cimifugin이 caspase-3/-7의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 FaDu 세포에 75 및 150 μ M cimifugin을 24시간 동안 처리한 후 세포막 투과성 기질 용액을 이용한 caspase-3/-7 활성 분석을 수행하였다. Figure 6에 나타낸 바와 같이, cleaved caspase-3/-7에 의해 세포 투과성 형광 기질이 절단되어 녹색 형광을 나타내는 FaDu 세포의 수가 대조군에 비해 cimifugin 처리에 의해 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 cimifugin에 의해 유도된 FaDu 세포 사멸이 caspase-3/-7의 활성화에 의존한다는 것을 시사한다.

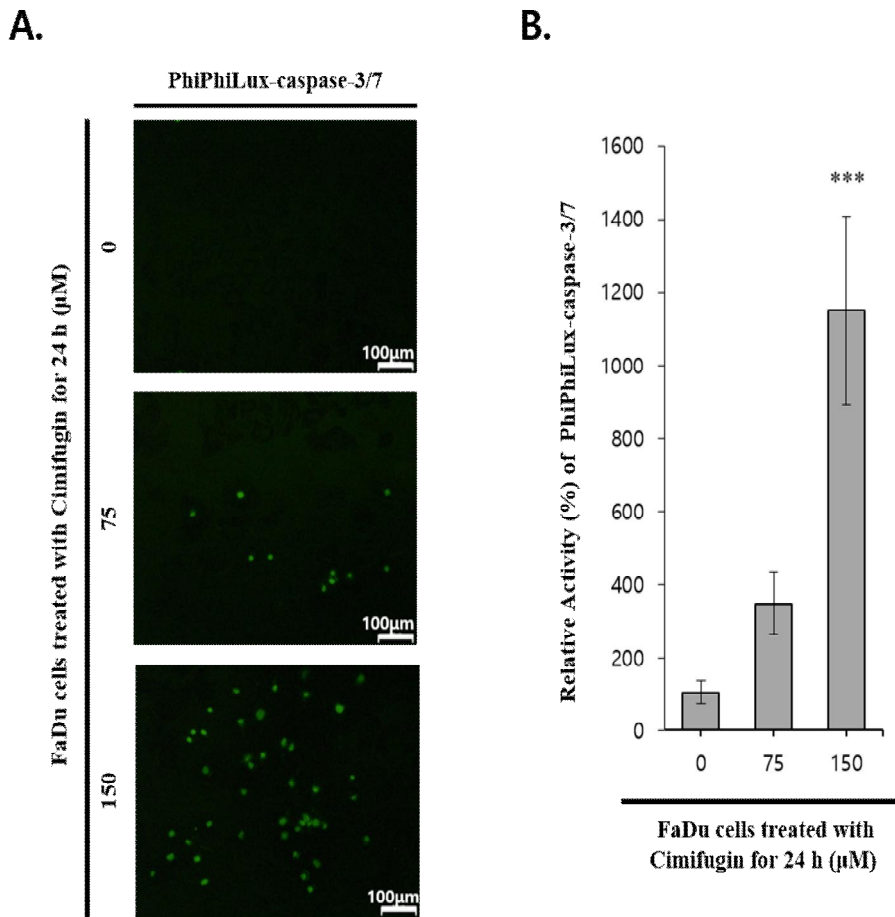


Figure 6. The activity of caspase-3/-7 is increased by cimifugin in FaDu cells. The caspase-3 activity assay using the cell-permeable fluorogenic substrate caspase-3/-7 substrate solution (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), was performed to verify the activation of caspase-3 in FaDu cells treated with cimifugin and fluorescence microscopy images of the cells were captured (Eclipse TE2000; Nikon Instruments, Melville, NY). Results are mean \pm standard deviation of experiments (***) $p < 0.001$ compared to the control).

6. FaDu 세포에서 cimifugin에 의한 외인성 및 내인성 세포사멸

Cimifugin에 의해 유도된 FaDu 세포의 사멸 경로를 확인하기 위해 FaDu 세포에 75 및 150 μ M cimifugin을 24시간 동안 처리한 후 FaDu 세포에서 단백질을 추출하여 western blot analysis를 수행하였다. Figure 7에 나타난 바와 같이, cimifugin을 처리한 FaDu 세포에서 용량 의존적으로 세포사멸 수용체 매개 외인성 세포사멸(death receptor-mediated (extrinsic) apoptosis)와 관련된 대표적인 세포사멸 유도 리간드(ligand)인 FasL의 발현이 유의하게 증가하였다. 이어서 FasL의 하위 표적 세포사멸 인자(pro-apoptotic factor)인 비활성화 caspase-8의 절단을 통해 활성화된 caspase-8의 발현이 유의하게 증가하였다(Figure 7). 이러한 결과는 cimifugin에 의해 유도된 FaDu 세포의 사멸이 세포사멸 유도 리간드에 의해 유발되는 세포사멸 수용체 매개 외인성 세포사멸 경로와 관련이 있음을 나타낸다. 따라서, 미토콘드리아 의존성 세포사멸(mitochondria-dependent (intrinsic) apoptosis)과 관련된 세포사멸 억제인자(anti-apoptotic factor) 및 세포사멸 인자의 변화를 조사하였다. Cimifugin 처리된 FaDu 세포에서 막 전위의 감소와 밀접한 관련이 있는 Bax 및 Bad와 같은 세포사멸 인자의 발현이 증가되었다(Figure 8). 이어서 cimifugin은 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome c에 의해 비활성화 caspase-9의 절단을 통해 활성화된 caspase-9의 발현을 증가 시켰다(Figure 8). 이후, 각각 외인성 및 내인성 세포사멸 경로에 위치한 활성화된caspase-8 및 caspase-9의 하위 표적 세포사멸 인자인 비활성화 caspase-3의 절단을 확인하기 위해, 각각 caspase-3와 이의 하위 표적 분자인 PARP의 발현 변화를 분석 하였다. Cimifugin으로 처리한 FaDu 세포에서 활성화된 caspase-3와 하위 표적 분자인 PARP의 발현은 농도 의존적으로 증가하였다(Figure 9). 이러한 결과는 cimifugin에 의해 유도된 FaDu 세포 성장억제가 세포사멸 수용체 매개 외인성 및 미토콘드리아 의존성 내인성 세포사멸 경로를 통하여 세포사멸을 유도하고 있음을 시사한다.

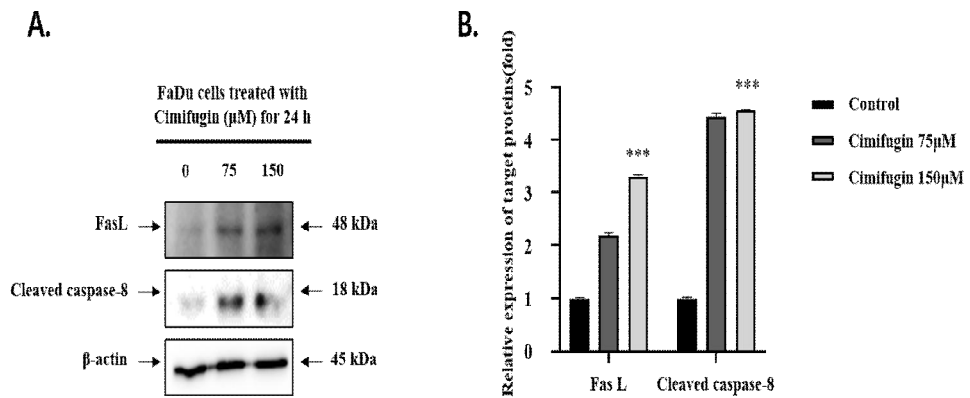
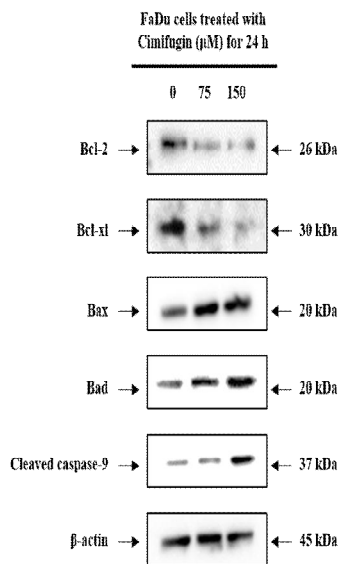


Figure 7. Cimifugin upregulates the expression of FasL and cleaved caspase-8, which are involved in death receptor-mediated extrinsic apoptosis in FaDu cells. FaDu cells were treated with 75 and 150 μM cimifugin for 24 h. Thereafter, total protein were extracted and analyzed by westernblot using antibodies of pro-apoptotic factors related to extrinsic apoptosis such as FasL and cleaved caspase-8. Results are mean \pm standard deviation of experiments (** $p < 0.001$ compared to the control).

A.



B.

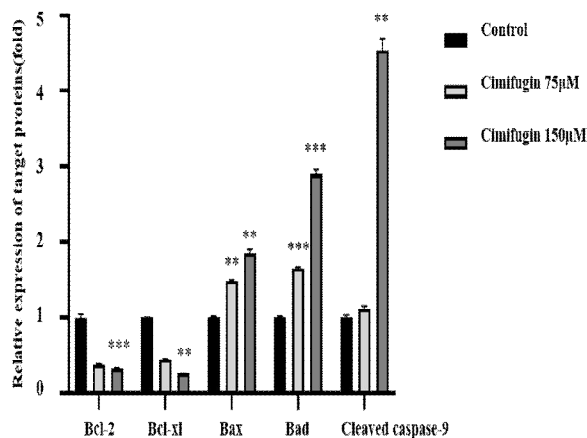


Figure 8. Cimifugin induces a mitochondria-dependent intrinsic apoptosis that is mediated by the upregulation of pro-apoptotic factors and the down-regulation of anti-apoptotic factors in FaDu cells. FaDu cells were treated with 75 and 150 μM cimifugin for 24 h. Thereafter, total protein were extracted and analyzed by westernblot using specific antibodies related to pro-apoptotic factors involved in mitochondria dependent intrinsic apoptosis. Results are mean \pm standard deviation of experiments (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control).

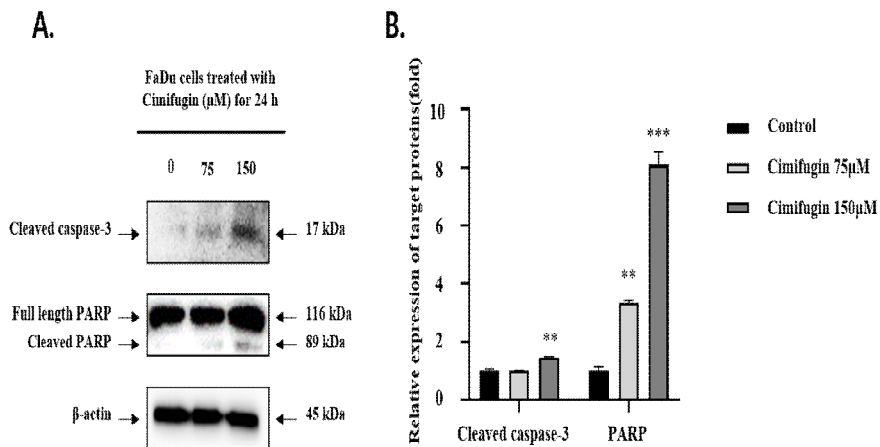


Figure 9. Cimifugin increases cell death through the cleavage of caspase-3 and its down-stream pro-apoptotic factor, poly (ADP ribose) polymerases, by both caspase-8 and -9 in FaDu cells. FaDu cells were treated with 75 and 150 μM cimifugin for 24 h. Thereafter, total protein were extracted and analyzed by westernblot using antibodies of cleaved caspase-3 and PARP. Results are mean \pm standard deviation of experiments (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control).

7. FaDu 세포에서 PI3K/Akt 신호전달 경로로 매개된 cimifugin에 의한 세포 사멸

Cimifugin을 처리한 FaDu 세포에서 mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 변이를 확인하기 위해 western blotting을 수행하였다. Figure 10에 나타낸 바와 같이, ERK1/2 및 p38의 인산화는 75 및 150 μ M cimifugin 처리한 FaDu 세포에서 농도 의존적으로 억제되었다. 이러한 결과는 cimifugin에 의해 유도된 FaDu 세포 성장 억제 효과가 MAPK 세포 신호전달 경로의 변화와 밀접하게 연관되거나 조절된다는 것을 시사한다. 세포 증식 및 세포 생존과 관련된 Akt의 인산화는 75 및 150 μ M cimifugin을 처리한 FaDu 세포에서 농도 의존적으로 감소하였다(Figure 10). 이러한 결과는 FaDu 세포 증식의 억제와 apoptosis를 포함하는 cimifugin-유도 세포 성장 억제 및 세포사멸 효과가 MAPK 및 PI3K/Akt 조절을 통해 매개됨을 시사한다.

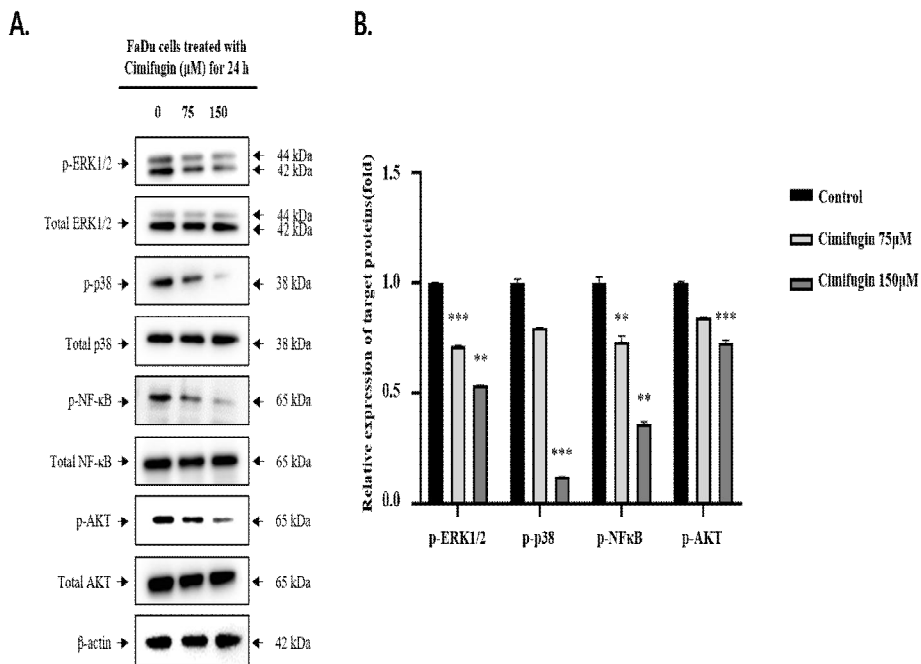


Figure 10. Cimifugin-induced apoptosis is mediated by the inactivation of mitogen-activated protein kinases, NF- κB and Akt cellular signaling pathways in FaDu cells. Cimifugin-induced cell anti-proliferation and apoptosis is mediated by the suppression of MAPK, NF- κB and Akt in FaDu cells. Results are mean \pm standard deviation of experiments (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control).

IV. 고찰

두경부 편평세포암 환자의 치료는 저작 기능 장애와 구강 안면 외모 변화로 인한 심리적 문제 등의 부작용으로 인해 삶의 질이 저하될 수 있다(10). 이에 따라 암세포 특이적인 사멸을 유도하면서 부작용을 최소화할 수 있는 항 종양 활성이 뛰어난 화학요법 시약의 개발이 필요하다. 최근에는 약초나 천연물로부터 분리된 화합물이 항암 효과를 가지는 것으로 입증되어, 이와 관련된 연구가 활발히 이루어지고 있다(16).

본 연구에서 cimifugin의 생물학적 안전성을 확인하기 위해 정상세포인 L929 세포를 사용하여 세포독성을 평가하였다. 결과적으로 cimifugin은 정상 세포에서는 세포독성을 보이지 않았으며(Figure 2), 이는 cimifugin이 부작용이 거의 없다는 것을 시사한다. 반면, FaDu 세포에서의 cimifugin에 의한 세포독성은 40~160 μ M에서 유의하게 증가하였다(Figure 2). 이러한 결과는 cimifugin이 암세포에 대한 특이적인 독성을 가지며, 부작용이 거의 없는 암 치료를 위한 유망한 화학요법 물질로 작용할 수 있음을 시사한다. 또한, 생물학적 안전성과 암세포에 대한 독성의 특이성을 확인하기 위해 Cell live & dead assay를 사용하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 구분하여 분석하였다. 결과적으로 cimifugin은 L929 세포에서는 적색 형광의 강도를 증가시키지 않았지만, FaDu 세포에서는 적색 형광으로 염색된 죽은 세포의 수를 증가시키면서 전체 세포 수를 감소시켰다(Figure 3). 이 결과는 cimifugin이 부작용이 거의 없고 암세포 특정 사멸을 유도할 수 있기 때문에 두경부암 치료를 위한 잠재적인 화학 요법 물질 후보가 될 수 있음을 제안하고 있다.

일반적으로 apoptosis는 세포 사멸체 형성, 핵 응축, 염색체 DNA 단편화와 같은 세포형태학적 변화를 동반하는 세포 사멸 과정으로, 세포 생존과 성장, 발달, 면역반응 등에 중요한 역할을 한다(17). 따라서 세포의 형태학적 변화를 조사하기 위해 cimifugin의 존재 또는 부재 하에서 H&E 염색과 DAPI 염색을 수행했다. L929 세포에서는 cimifugin 처리에 따른 세포 사멸체 형성 및 세포질 수축의 변화가 나타나지 않았으나, FaDu 세포에서는 사멸체 형성 및 세포질 수축의 증가가

관찰되었다(Figure 4). 또한, DAPI 염색을 통해 핵의 응축 현상도 cimifugin의 농도에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 5). 본 연구에서 cimifugin은 FaDu 세포에서 apoptosis의 전형적인 특징인 세포 사체와 염색질 응축의 형태학적 변화를 유도하였으며 이러한 결과들은 cimifugin이 FaDu 세포의 apoptosis를 유도함을 시사한다.

최근 암 치료에 있어서 중요한 과제 중 하나는 부작용을 최소화하면서 암세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있는 항암 활성이 높은 화학요법 시약의 개발이며, 이를 위해 천연물과 약초에서 유래된 화합물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(13). 최근 연구는 apoptosis 신호전달 경로의 조절을 통해 암세포 특이적인 apoptosis를 유도하는 방법에 초점을 맞추고 있다(18). 일반적으로 apoptosis는 세포사멸 수용체 매개 외인성 사멸 경로와 미토콘드리아 의존적 내인성 사멸 경로로 나누어지며, 각각의 경로에서 caspase-8과 caspase-9가 활성화되어 caspase-3의 활성화를 유도하여 apoptosis를 유도한다(19). 본 연구에서 cimifugin은 FaDu 세포에서 FasL의 발현과 caspase-8의 활성화를 증가시켰다(Figure 7). 또한, cimifugin은 anti-apoptotic factor인 Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현을 하향 조절하고, 미토콘드리아 의존성 내인성 세포사멸 경로 관련 세포사멸 인자인 Bax와 Bad의 발현을 증가시켰다(Figure 8). 이와 함께, cimifugin이 처리된 FaDu 세포에서 caspase-3 및 PARP의 활성화가 유도되었다(Figure 9). 따라서 이러한 결과는 cimifugin에 의해 유도된 FaDu 세포에서 apoptosis는 FasL의 상향 조절에 의해 유발된 세포사멸 수용체 매개 외인성 및 미토콘드리아 의존적 내인성 세포사멸 경로에 의해 매개됨을 나타낸다.

MAPK는 암세포의 증식, 분화, 세포사멸, 혈관신생 및 암 전이와 긴밀한 관련되어 있으며, ERK1/2와 p38은 MAPK 신호전달 경로와 관련이 있다는 것은 많은 연구에서 밝혀져있다(20,21). 이전 연구들에서는 MAPK 신호전달 경로가 미토콘드리아에서 cytochrome c의 방출을 억제하여 caspase-3 및 caspase-9의 활성화를 직간접적으로 억제할 수 있다는 것이 보고된 바 있다(22,23). 또한, 암세포에서는 MAPK 신호전달 경로가 활성화되는데, 이 신호전달 경로의 비활성화

는 항종양 효과에 기여할 수 있다는 것이 보고된 바 있다(24-26). 따라서, 본 연구에서는 FaDu 세포에서 cimifugin 처리에 의한 MAPK들의 발현 변화를 분석하였다. 본 연구에서는 cimifugin 처리한 FaDu 세포에서 ERK1/2와 p38의 인산화가 농도 의존적으로 억제되었다는 것을 관찰하였다(Figure 10). 또한, Akt 신호전달은 세포사멸 인자인 Bad와 Bax의 감소 또는 세포사멸 억제 인자인 Bcl-2와 Bcl-xL의 증가를 통해 암세포의 apoptosis를 조절한다(27,28). 따라서, Akt 신호전달의 비정상적인 활성화는 종양형성을 가속화할 수 있으며(29-31), 이는 Akt의 표적 억제가 발암을 억제하고 apoptosis를 유도할 수 있음을 나타낸다. 본 연구에서도 cimifugin 처리한 FaDu 세포에서 Akt의 인산화가 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Figure 10).

결론적으로, 본 연구의 결과로 방풍 뿌리의 주요 성분 중 하나인 cimifugin은 사람 두경부 편평세포암 FaDu 세포에서 세포사멸 수용체 매개 외인성 및 미토콘드리아 의존적 내인성 세포사멸 경로를 통해 apoptosis를 유도할 수 있음을 확인하였다 (Figure 11). 또한 이러한 결과는 cimifugin에 의한 두경부 편평세포암 치료의 효용성을 시사하고 있다.

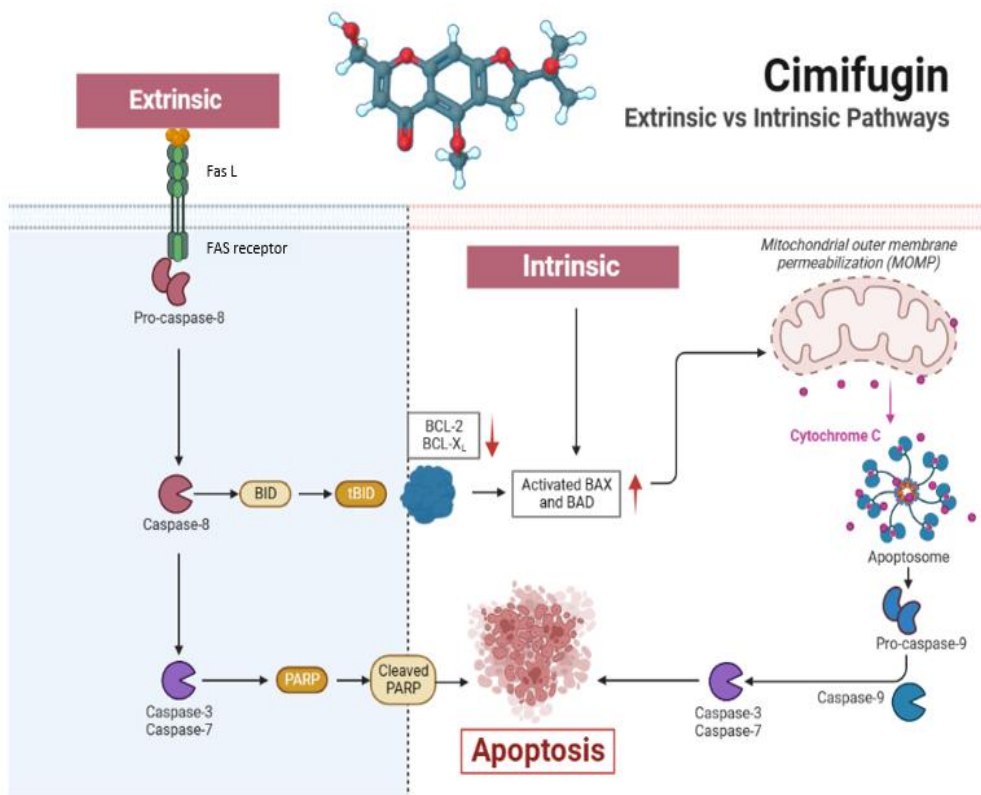


Figure 11. Schematic diagram of cimifugin-induced apoptosis pathways.

V. 참고문헌

1. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22.
2. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(1):24-35.
3. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):709-20.
4. Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlabein H, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*. 2011;47(8):725-31.
5. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988;48(11):3282-7.
6. Benson E, Li R, Eisele D, Fakhry C. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2014;50(6):565-74.
7. Cohen EE, LaMonte SJ, Erb NL, Beckman KL, Sadeghi N, Hutcheson KA, et al. American Cancer Society Head and Neck Cancer Survivorship Care Guideline. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(3):203-39.
8. Nekhlyudov L, Lacchetti C, Siu LL. Head and Neck Cancer Survivorship Care Guideline: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement Summary. *J Oncol Pract*. 2018;14(3):167-71.
9. Kerawala CJ. Complications of head and neck cancer surgery - prevention and management. *Oral Oncol*. 2010;46(6):433-5.
10. Epstein JB, Thariat J, Bensadoun RJ, Barasch A, Murphy BA, Kolnick L, et al. Oral complications of cancer and cancer therapy: from cancer treatment to survivorship. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(6):400-22.

11. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(4):261-9.
12. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1488-94.
13. Sertel S, Plinkert PK, Efferth T. Natural products derived from traditional chinese medicine as novel inhibitors of the epidermal growth factor receptor. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2010;13(10):849-54.
14. Han B, Dai Y, Wu H, Zhang Y, Wan L, Zhao J, et al. Cimifugin Inhibits Inflammatory Responses of RAW264.7 Cells Induced by Lipopolysaccharide. *Med Sci Monit.* 2019;25:409-17.
15. Liu A, Zhao W, Zhang B, Tu Y, Wang Q, Li J. Cimifugin ameliorates imiquimod-induced psoriasis by inhibiting oxidative stress and inflammation via NF-kappaB/MAPK pathway. *Biosci Rep.* 2020;40(6).
16. Efferth T, Li PC, Konkimalla VS, Kaina B. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2007;13(8):353-61.
17. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95-118.
18. Jia LT, Chen SY, Yang AG. Cancer gene therapy targeting cellular apoptosis machinery. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(7):868-76.
19. Green DR, Llamby F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12).
20. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012;66(2):105-43.
21. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):537-49.
22. Yuan L, Wei S, Wang J, Liu X. Isoorientin induces apoptosis and

- autophagy simultaneously by reactive oxygen species (ROS)-related p53, PI3K/Akt, JNK, and p38 signaling pathways in HepG2 cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2014;62(23):5390-400.
23. Liu Z, Wu H, Jiang K, Wang Y, Zhang W, Chu Q, et al. MAPK-Mediated YAP Activation Controls Mechanical-Tension-Induced Pulmonary Alveolar Regeneration. *Cell Rep.* 2016;16(7):1810-9.
 24. Blasco RB, Francoz S, Santamaria D, Canamero M, Dubus P, Charron J, et al. c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell.* 2011;19(5):652-63.
 25. Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(7):385-400.
 26. Young A, Lyons J, Miller AL, Phan VT, Alarcon IR, McCormick F. Ras signaling and therapies. *Adv Cancer Res.* 2009;102:1-17.
 27. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;91(2):231-41.
 28. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008;27(48):6194-206.
 29. Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):10983-5.
 30. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(12):2168-78.
 31. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene.* 2008;27(41):5497-510.