



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
석사학위 논문

저산소증-유도인자-1 α -중심
암 대사 조절에 의한
피리디늄계 이온성 액체의
암 특이적 세포독성

조선대학교 대학원

화 학 과

서 범 찬

저산소증-유도인자-1 α -중심
암 대사 조절에 의한
피리디늄계 이온성 액체의
암 특이적 세포독성

Cancer-specific cytotoxicity of pyridinium-based ionic liquids by
regulating hypoxia-inducible factor-1 α -centric cancer metabolism

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

화 학 과

서 범 찬

저산소증-유도인자-1 α -중심
암 대사 조절에 의한
피리디늄계 이온성 액체의
암 특이적 세포독성

지도교수 이 종 대

이 논문을 이학석사학위신청 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

화 학 과

서 범 찬

서범찬의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 손 홍 래 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 호 중 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 종 대 (인)

2023년 5월

조선대학교 대학원

목 차

목 차	i
LIST OF FIGURES	iii
LIST OF TABLES	iv
ABSTRACT	v
저산소증-유도인자-1 α -중심 암 대사 조절에 의한 피리디늄계 이온성 액체의 암 특이적 세포독성	
1. 서 론	1
2. 실험	3
3. 결 과	11
3-1 암세포에서의 세포 생존율과 HIF 활성을 억제하는 Pyridinium계 이온성 액체	11
3-2 산소 의존성 HIF-1 α 분해를 통해 HIF-1 α 표적 유전자의 발현을 억제하는 [C ₇ DMAP]Br	13
3-3 [C ₇ DMAP]Br에 의한 미토콘드리아 호흡 억제를 통해 세포 내 산소 함량 증가	15
3-4 [C ₇ DMAP]Br에 의한 미토콘드리아 전자전달계 복합 체 I의 활성 억제	18

3-5 [C ₇ DMAP]Br에 의한 저산소증-유도 해당과정의 억제	19
4. 고찰	21
5. 결론	24
6. 참고 문헌	25

LIST OF FIGURES

- Scheme 1** Pyridium- 및 N,N-dimethylaminopyridinium계 이온성 액체의 합성
- Figure 1** Pyridinium계 이온성 액체가 HCT116 세포에서 저산소증-유도 HIF-1 α 축적에 미치는 영향
- Figure 2** HCT116 세포에서 HIF-1 α 표적 유전자의 저산소-유도발현과 CoCl₂ 유도 HIF-1 α 축적에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향
- Figure 3** HCT116 세포 내 산소 농도에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향
- Figure 4** HCT116 세포 내 산소 소비율과 미토콘드리아의 ATP 생성에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향
- Figure 5** HCT116 세포 내 산소 소비율과 미토콘드리아의 ATP 생성에 [C₇Py]Br가 미치는 영향
- Figure 6** HCT116 세포의 미토콘드리아 기능에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향
- Figure 7** 미토콘드리아 전자전달계 복합체 I의 활성화에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향
- Figure 8** 미토콘드리아 전자전달계 복합체 II/III 및 IV 활성화에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향
- Figure 9** 저산소증-유도 해당과정에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향

LIST OF TABLES

- Table 1** Quantitative real-time polymerase chain reaction에 사용한 유전자의 primer sequence
- Table 2** Real-time ATP XF-분석, 미토콘드리아 호흡 분석 및 미토콘드리아 ETC 복합체 활성 분석에 사용한 약물의 기능과 처리 농도
- Table 3** 암세포 및 정상 세포에 pyridinium계 이온성 액체가 세포 생존율 및 HIF-1 α 활성화에 미치는 영향

ABSTRACT

Cancer-specific cytotoxicity of pyridinium-based ionic liquids by regulating hypoxia-inducible factor-1 α -centric cancer metabolism

Seo Beom Chan

Advisor : Prof. Lee Jong Dae , Ph.D.

Department of Chemistry,

Graduate School of Chosun University

Owing to their unique properties and biological activities, ionic liquids (ILs) have attracted research interest in pharmaceuticals and medicine. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α is an attractive cancer drug target involved in cancer malignancy in the hypoxic tumor micro-environment. Herein, we report the inhibitory activity of ILs on the HIF-1 α pathway and their mechanism of action. Substitution of a dimethylamino group on pyridinium reduced hypoxia-induced HIF-1 α activation. It selectively inhibited the viability of the human colon cancer cell line HCT116, compared to that of the normal fibroblast cell line WI-38. These activities were enhanced by increasing the alkyl chain length in the pyridinium. Under hypoxic conditions, dimethylaminopyridinium reduced the accumulation of HIF-1 α and its target genes without affecting the *HIF1A* mRNA level in cancer cells. It suppressed the oxygen consumption rate and ATP production by directly inhibiting electron transfer chain complex I, which led to enhanced intracellular oxygen content and oxygen-dependent degradation of HIF-1 α under hypoxia. These results indicate that dimethylaminopyridinium suppresses the mitochondria and HIF-1 α -dependent glucose metabolic pathway in hypoxic cancer cells. This study provides insights into the anticancer activity of pyridinium-based ILs through the regulation of cancer metabolism, making them promising candidates for cancer treatment.

1. 서 론

이온성 액체는(IL) 질소나 인 등을 포함하는 유기 양이온과 무기 또는 유기 음이온을 포함하는 염이며, 기존의 휘발성이 있던 유기용매의 새로운 대안으로 떠오르는 물질이다.^{1,2} 이온성 액체는 비휘발성, 높은 열 및 화학적 안정성, 이온 전도성, 그리고 생물학적 활성과 같은 고유한 특성을 보여 실험실 및 산업 규모의 여러 분야에서 관심을 받고 있다.^{3,4} 이런 가치 있는 특성에도 불구하고, 합성 과정과 독성 및 환경적인 안전에 대한 우려가 있다. 이온성 액체는 수용성이지만 생분해성이 좋지 않기 때문에 해양 생태계와 토양 생태계에 쉽게 축적될 수 있으며, 이는 환경과 생물에 잠재적인 위협을 초래할 수 있다.⁵ 이온성 액체가 생명체에 미치는 위험한 영향은 이온성 액체가 미세조류, 식물, 미생물, 무척추동물과 척추동물에 대해 독성을 보인다는 것이다.⁶ 이온성 액체의 독성은 화합물의 구조, 농도 및 노출 시간에 기인한다.⁶ 이온성 액체가 생명체에 독성을 보이는 정확한 메커니즘을 파악하기는 어렵지만, 세포의 핵막을 파괴하고, 결과적으로 살아있는 세포의 죽음을 초래한다는 연구 결과가 발표되었다.^{6,7}

음이온의 종류와 치환된 *alkyl chain*의 길이에 의해 결정되는 이온성 액체의 구조 또한 이들의 생물학적 활성을 결정하는 주요 요인이다.⁶ 예를 들어, [NTf₂]⁻ 음이온을 갖는 이온성 액체는 피부 독성을 보이며, *matrinium*계 양이온을 포함한 이온성 액체는 향상된 항암 활성을 보여 주었다.⁸ 지난 20년 동안, 이온성 액체에 적용하기 위한 *pyridinium*, *imidazolium*, *ammonium*, *guanidinium*, 그리고 *phosphonium*과 같은 다양한 유기 양이온이 개발되었다.¹ 이러한 양이온과 유기 또는 무기 음이온의 조합은 세포 생물학, 재료과학 및 의학 화학을 포함하는 분야에서 응용할 수 있는 다양한 유형의 이온성 액체를 제공한다. 최근에는, 이들의 의약품 및 의학 분야에서 많은 응용이 되고 있다.⁹ 예를 들어, 이온성 액체는 세포막의 투과성을 높이고 수용성이 낮은 약물의 용해도를 개선함으로써 약물 전달 분야에서 적용되고 있다.^{10,11} 추가로, 다양한 병원성 세균 종에 대한 이온성 액체의 항균 활성에 관한 연구가 보고되었다.⁵

많은 연구에 따르면 이온성 액체는 대장¹², 유방¹³, 간¹⁴, 폐¹⁵, 뇌¹⁶를 포함한 다양한 종류의 암에 대해 항암 작용을 한다. *Pyridinium*, *piperidinium*, *pyrrolidinium*, 그리고 *imidazolium* 양이온을 포함한 여러 이온성 액체는 세포주기 정지, 세포 사멸, 자가포식을 유도함으로써 대장암 세포(HCT116), 유방암 세포(MFC7), 교모세포종 세포(U-251)의 성장을 억제한다.¹⁷ 여러 종류의 이온성 액체 중에서 *pyridinium*계 이온성 액체는 인간

자궁경부암 세포(HeLa), 녹색 원숭이 신장상피세포(BGM), 인간 태줄-무한증식세포(EA-Hy926)의 성장을 억제한다.¹⁸ 또한 monocationic 이온성 액체는 dicationic 이온성 액체보다 암세포에 대해 더 강력한 세포독성 활성을 보인다.¹⁸ 위 연구들은 이온성 액체가 암세포 성장을 억제할 가능성을 보여주었지만, 항암 활성의 기초가 되는 정확한 분자 메커니즘은 분명하게 나타내지 못했다. 따라서 이온성 액체가 항암 효과를 유발하는 방법에 대한 이해는 제약적 응용에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있다. 그리고 정상 세포와 조직에는 독성이 덜 작용하고 암세포에만 선택적으로 작용하는 표적항암제로서의 특성이 있는 이온성 액체를 개발하는 것이 중요하다.

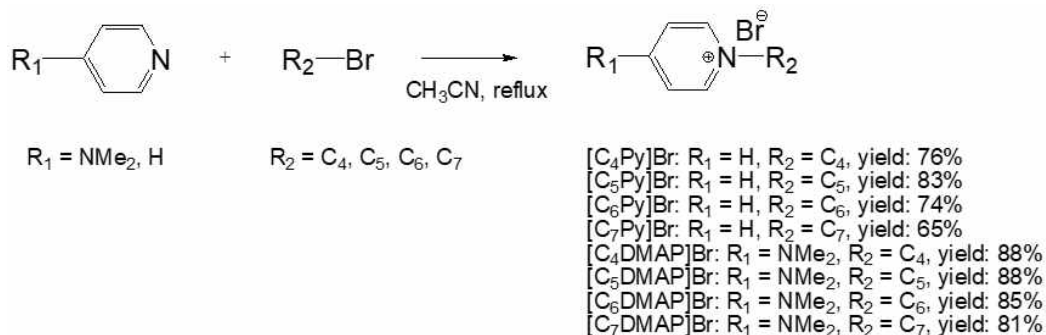
저산소증은 암의 중요한 특성이며^{19,20} 암이 발생한 조직에서의 국소적인 저산소증은 암세포의 통제되지 않은 빠른 성장으로 인해 나타나는 독특한 특징이다.²¹ 산소가 부족한 환경에서 저산소증 유도인자(HIF)-1 α 는 혈관신생, 전이, 증식, 대사 및 약물 내성을 조절한다.²² 반대로, 산소 농도가 일반적인 환경에서는 Prolyl hydroxylase (PHD) 매개 hydroxylation 및 ubiquitin/proteasome 시스템이 산소 의존적인 방식으로 HIF-1 α 를 분해한다.²³ 그러나 저산소증 하에서 HIF-1 α 는 산소 부족으로 인해 급격하게 안정화되며, 이는 혈관 내피 성장인자(VEGF), erythropoietin (EPO), Heme 산소화 효소-1 (HO-1), 포도당 전달체-1 (GLUT1)을 포함한 표적 유전자의 전사를 활성화한다.²⁴ 최근 연구에서 HIF-1 α 표적 유전자의 mRNA 발현을 저산소증에서 등급을 매겨 환자 종양을 분석했다.²⁵ 이 연구는 저산소증이 다양한 암 유형에서 증가하고 있으며, 두경부암, 폐암, 자궁경부암이 저산소증이 가장 심한 암이라고 보고했다.²⁵ HIF-1 α 경로는 다양한 암 유형의 예방 및 치료를 위한 매력적인 표적으로 인식되고 있으며, HIF 억제제를 개발하기 위해서 많은 연구가 진행되고 있다.^{26,27}

위 연구들에서 단서를 얻어, LW6, IDF-11774, LW1564와 같은 저산소증-암세포에 대한 항암 활성을 보이는 신생 물질을 식별하는 것에 집중했다.²⁸⁻³⁰ 최근 연구는 저산소증에서 항암 활성을 갖는 물질을 식별하는 과정 중 alkyipyridinium이 암세포에서 저산소증 매개 신호 경로를 억제한다는 것을 발견했다. 이번 연구에서는 저산소증에서 HIF-1 α 활성화 억제와 암세포 생존율을 포함한 alkyipyridinium 양이온의 새로운 항암 활성을 다루고 다양한 암세포에서 작용하는 메커니즘을 명확히 하는 것을 목표로 했다. 이 연구의 결과는 pyridinium 양이온이 저산소증 매개 HIF-1 α 신호 전달에 미치는 영향과 암세포에서 그들의 작용 메커니즘을 명확히 할 수 있을 것이다.

2. 실험

General considerations

모든 조작은 표준 Schlenk line을 통해 질소 또는 아르곤 기체를 이용하여 진행하였다. Acetonitrile과 dichloromethane은 Samchun Pure Chemical Company, Ltd. (Seoul, Korea)에서 구매하였고, sodium/benzophenone을 사용하여 건조한 후 사용하였다. 초자, 주사기, 자석 젓개, 바늘 등은 오븐에서 밤새 건조 후 사용하였다. Pyridine, 4-dimethylaminopyridine (DMAP), 1-bromobutane, 1-bromopentane, 1-bromohexane, 1-bromoheptane 은 Sigma-Aldrich Chemicals (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에서 구매하였다. 원소 분석은 Carlo Erba Instruments CHNS-O EA 1108 analyzer를 이용하여 수행하였다. 샘플의 IR 스펙트럼은 KBr disks를 사용하여 Agilent Cary 600 Series Fourier Transform (FT)-IR spectrometer (Victoria, Australia)를 통해 기록하였다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 각각 300.1 및 75.4 MHz에서 작동하는 JEOL-JNM-AL300 spectrometer를 통해 기록하였다. 모든 ^1H 및 ^{13}C chemical shift는 lock solvent (99.5% CDCl_3)의 고정 피크를 기준으로 측정된 다음 Me_4Si (TMS 0.00ppm)를 기준으로 정해졌다. 문헌의 절차에 따라 1-butyl, 1-pentyl, 1-hexyl, 그리고 1-heptylpyridinium bromide와 N,N -dimethylaminopyridinium bromide를 합성하였다.³¹⁻³³



Scheme 1. Pyridinium- 및 N,N -dimethylaminopyridinium계 이온성 액체의 합성

Pyridinium- 및 N,N-dimethylaminopyridinium-계 이온성 액체의 합성

General procedure : Pyridine (0.81 mL, 10.0 mmol)을 50 mL의 acetonitrile에 녹이고 acetonitrile에 1-bromobutane (1.3 mL, 12.0 mmol)을 녹인 용액을 상온에서 10분간 적가한다. 혼합물을 24시간 동안 reflux 후, rotary evaporator를 이용하여 용매를 제거하면 pale yellow 색의 투명한 액체가 얻어진다. 얻어진 화합물은 $[C_4Py]Br$ 30°C의 저압에서 이틀간 건조한다. Yield: 76% (1.64g). 1H NMR (DMSO- d_6 , ppm) δ 0.83 (t, 3H, $-CH_3$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 1.21 (sextet, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_3$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 1.84 (quintet, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 4.79 (t, 2H, $-N^+CH_2-$ $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 8.21 (t, 2H, Py, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 8.68 (dd, 1H, Py, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 9.44 (d, 2H, Py, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , ppm) δ 11.83 (CH_3), 20.08, 25.52, 28.75 ($-CH_2-$), 58.35 ($N_{Py}-CH_2-$), 128.54, 145.24, 146.12 (Py).

N-Pentylpyridinium bromide ($[C_5Py]Br$): $[C_4Py]Br$ 와 같은 방법으로 합성하였다. Pyridine 0.81 mL (10.0 mmol)와 1.50 mL (12.0 mmol)의 1-bromopentane을 사용하여 pale yellow 색의 투명한 액체를 얻었다. Yield: 83% (1.91 g). 1H NMR (DMSO- d_6 , ppm) δ 0.60 (t, 3H, $-CH_3$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 1.09 (sextet, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_3$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 1.83 (quintet, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 2.09 (quintet, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 4.80 (t, 2H, $-N^+CH_2-$ $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 8.23 (t, 2H, Py, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 8.69 (dd, 1H, Py, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 9.47 (d, 2H, Py, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , ppm) δ 11.83 (CH_3), 19.66, 25.52, 28.75 ($-CH_2-$), 58.35 ($N_{Py}-CH_2-$), 125.98, 142.67, 143.86 (Py).

N-Hexylpyridinium bromide ($[C_6Py]Br$): $[C_4Py]Br$ 와 같은 방법으로 합성하였다. Pyridine 0.81 mL (10.0 mmol)와 1.68 mL (12.0 mmol)의 1-bromohexane을 사용하여 pale yellow 색의 투명한 액체를 얻었다. Yield: 74% (1.81 g). 1H NMR (DMSO- d_6 , ppm) δ 0.63 (t, 3H, $-CH_3$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 1.07 (m, 4H, $-CH_2-CH_2-CH_3$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 1.83 (quintet, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 2.09 (quintet, 2H, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 4.80 (t, 2H, $-N^+CH_2-$ $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 8.23 (t, 2H, Py, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 8.69 (dd, 1H, Py, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz), 9.47 (d, 2H, Py, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , ppm) δ 11.98 (CH_3), 19.89, 23.00, 28.60, 28.87 ($-CH_2-$), 58.49 ($N_{Py}-CH_2-$), 126.38, 142.80, 143.68 (Py).

***N*-Heptylpyridinium bromide ([C₇Py]Br):** [C₄Py]Br와 같은 방법으로 합성하였다. Pyridine 0.81 mL (10.0 mmol)와 1.89 mL (12.0 mmol)의 1-bromoheptane을 사용하여 pale yellow 색의 투명한 액체를 얻었다. Yield: 65% (1.68 g). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 0.70 (t, 3H, -CH₃, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.13 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₃, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.86 (quintet, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 2.08 (quintet, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 4.78 (t, 2H, -N⁺CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 8.21 (t, 2H, Py, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 8.68 (dd, 1H, Py, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 9.43 (d, 2H, Py, ³J_{H-H} = 5.0 Hz). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 12.28 (CH₃), 20.21, 23.72, 26.53, 27.07, 29.27 (-CH₂-), 59.02 (N_{Py}-CH₂-), 126.27, 143.30, 143.83 (Py).

***N*'-Butyl-*N,N*-dimethylaminopyridinium bromide ([C₄DMAP]Br):** [C₄Py]Br와 같은 방법으로 합성하였다. 1.22 g (10.0 mmol)의 *N,N*-dimethylaminopyridine과 1.3 mL (12.0 mmol)의 1-bromobutane을 사용하여 하얀색 고체를 얻었다. Yield: 88% (2.20 g). M.p.: 38 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 0.86 (t, 3H, -CH₃, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.21 (sextet, 2H, -CH₂-CH₂-CH₃, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.71 (quintet, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 3.18 (s, 3H, -NCH₃), 4.22 (t, 2H, -N⁺CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 7.06 (d, 2H, DMAP, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 8.42 (d, 2H, DMAP, ³J_{H-H} = 5.0 Hz). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 13.87 (CH₃), 19.16, 32.87 (-CH₂-), 40.28 (N-CH₃), 56.68 (N_{Py}-CH₂-), 108.19, 142.54, 156.25 (DMAP).

***N*'-Pentyl-*N,N*-dimethylaminopyridinium bromide ([C₅DMAP]Br):** [C₄Py]Br와 같은 방법으로 합성하였다. 1.22 g (10.0 mmol)의 *N,N*-dimethylaminopyridine과 1.5 mL (12.0 mmol)의 1-bromopentane을 사용하여 하얀색 고체를 얻었다. Yield: 88% (2.40 g). M.p.: 36 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 0.83 (t, 3H, -CH₃, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.19 (sextet, 2H, -CH₂-CH₂-CH₃, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.29 (quintet, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.72 (quintet, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 3.18 (s, 3H, -NCH₃), 4.20 (t, 2H, -N⁺CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 7.06 (d, 2H, DMAP, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 8.40 (d, 2H, DMAP, ³J_{H-H} = 5.0 Hz). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 14.29 (CH₃), 22.08, 28.02, 30.54 (-CH₂-), 40.28 (N-CH₃), 56.95 (N_{Py}-CH₂-), 108.18, 142.52, 156.26 (DMAP).

***N*-Hexyl-*N,N*-dimethylaminopyridinium bromide ([C₆DMAP]Br):** [C₄Py]Br와 같은 방법으로 합성하였다. 1.22 g (10.0 mmol)의 *N,N*-dimethylaminopyridine과 1.68 mL (12.0 mmol)의 1-bromohexane을 사용하여 하얀색 고체를 얻었다. Yield: 85% (2.44 g). M.p.: 35 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 0.81 (t, 3H, -CH₃, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.21 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.72 (quintet, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 3.18 (s, 3H, -NCH₃), 4.22 (t, 2H, -N⁺CH₂- ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 7.06 (d, 2H, *DMAP*, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 8.42 (d, 2H, *DMAP*, ³J_{H-H} = 5.0 Hz). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 14.31 (CH₃), 22.40, 25.50, 30.84, 31.10 (-CH₂-), 40.31 (N-CH₃), 56.91 (N_{Py}-CH₂-), 108.18, 142.54, 156.25 (*DMAP*).

***N*-Heptyl-*N,N*-dimethylaminopyridinium bromide ([C₇DMAP]Br):** [C₄Py]Br와 같은 방법으로 합성하였다. 1.22 g (10.0 mmol)의 *N,N*-dimethylaminopyridine과 1.89 mL (12.0 mmol)의 1-bromoheptane을 사용하여 하얀색 고체를 얻었다. Yield: 81% (2.44 g). M.p.: 32 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 0.83 (t, 3H, -CH₃, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.23 (m, 8H, -CH₂-CH₂-CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 1.74 (quintet, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 3.20 (s, 3H, -NCH₃), 4.23 (t, 2H, -N⁺CH₂- ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 7.08 (d, 2H, *DMAP*, ³J_{H-H} = 5.0 Hz), 8.42 (d, 2H, *DMAP*, ³J_{H-H} = 5.0 Hz). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, ppm) δ 14.37 (CH₃), 22.44, 22.79, 25.82, 28.60, 30.89, 31.39, 31.57 (-CH₂-), 40.30 (N-CH₃), 56.93 (N_{Py}-CH₂-), 108.18, 142.53, 156.25 (*DMAP*).

Cell line and cell culture

Bioevaluation Center of the Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB에서 HCT116 세포를 얻었다. HCT116 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Welgene, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, KOREA)에서 배양되었고 5%의 fetal bovine serum (FBS; Welgene), 100 μm/mL streptomycin, 그리고 100 U/mL의 penicillin (Gibco, Carlsbad, CA, USA)을 함유하고 있다. Mia-paca-2 세포는 10% FBS, 100 μg/mL streptomycin 및 100 U/mL penicilin (Gibco)을 포함하는 DMEM에서 배양되었다. 세포는 5% CO₂가 포함된 37°C 인큐베이터에서 배양되었다. 저산소 상태의 경우, 세포는 2% O₂, 5% CO₂, 그리고 93% N₂로 구성된 hypoxia chamber에서 배양되었다 (Astec, Fukuoka, Japan).

Cell viability assay

세포 생존율은 핵 염색을 위해 Methylene blue assay를 사용한 후 결정하였다.³⁴ 저산소(5% O₂) 조건에서 72시간 동안 이온성 액체와 같이(0.39-100 μM, two-fold serial dilutions) 세포를 배양한 후 10% formalin solution으로 고정하고 0.5% methylene blue 용액으로 염색하였다. 착색된 methylene blue는 0.5% HCl을 사용하여 뽑아냈다. 600 nm에서의 흡광도는 Synergy H1 multi-mode plate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 측정하였다. 각 IL은 배지에 첨가되기 전 증류수에 녹인 후 사용하였다.

Reporter gene assay

제조사에 지침에 따라 pGL4.42 [luc2P/HRE/Hygro] vector (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 HRE-luciferase reporter gene을 발현하는 세포를 준비하였다. 형질 주입(transfection) 후, 세포는 저산소 환경에서 12시간 동안 각 ILs (0.39, 1.56, 6.25, 25, or 100 μM)로 처리하였다. 발광효소의 활성은 dual-luciferase system (Promega)을 사용하여 측정하였으며, Synergy H1 multi-mode plate reader를 사용하여 검출되었다.

Western blot analysis

[C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5, or 10 μM)를 사용하여 HCT116 세포를 6시간 동안 처리한 후, protease inhibitor cocktail (GenDEPOT, Katy, TX, USA)과 phosphatase inhibitor cocktail (GenDEPOT)을 포함하는 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer로 용해하였다. 단백질 정량화는 PierceTM BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. 같은 양의 단백질을 sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (8%)를 사용하여 분리하고, poly-vinylidene difluoride 막으로 전달한 후, 5% skim milk로 차단하였다. 사용한 주요 항체는 HIF-1α (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)와 β-actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)이다. 2차 항체는 mouse IgG HRP 연결 항체 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)이다. 단백질은 LuminataTM Crescendo Western HRP Substrate (Merck)와 iBright CL1500 imaging system (ThermoFisher Scientific)을 사용

하여 시각화하였다.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

세포를 [C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5. or 10 μM)로 4시간(*HIF1A*) 또는 12시간(pyruvate dehydrogenase kinase 1 (*PK1*)과 *GLUT1*)동안 처리한 후, 전체 RNA는 TRI Reagent[®] (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 추출하였다. AccuPower[®] CycleScript RT PreMix (dT₂₀) (Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 상보적인 DNA를 합성하기 위해 전체 RNA의 1 μg을 사용하였다. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)은 QuantStudio 1 Real-time PCR system (ThermoFisher Scientific)에서 SensiFAST[™] SYBR[®] LO-ROX Kit (Biolin Memphis, TN, USA)를 사용하여 수행하였다. *PK1*, *GLUT1*, *HIF1A*, 그리고 ribosomal protein L13a (*RPL13A*)에 대한 primer sequences는 Table 1에 표기하였다. *RPL13A*를 internal control로 사용하였다.

Hypoxia detection

Image-iT hypoxia reagent (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 세포 내 산소분압을 측정하여 저산소증 상태를 확인하였다. HCT116 세포는 [C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5, or 10 μM)로 저산소 환경에서 12시간 동안 배양되었다. 세포는 저산소증을 감지하기 위한 hypoxia probe (1 μg/mL)와 세포핵을 찾기 위한 Hoechst 33342 (1 μg/mL)로 염색하였다. 각 이미지는 Leica DMI8 microscope (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany)를 사용하여 분석하였으며, Synergy H1 multi-mode plate reader를 사용하여 상대적인 형광을 측정하였다.

Real-time ATP XF-analysis

산소 소비율 (OCR)과 ATP 생산은 Seahorse XFe24 analyzer (Agilent Technologies, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 세포는 2 mM glutamine, 10 mM glucose, 그리고 1 mM pyruvate를 포함한 XF medium (Agilent Technologies)으로 2회 세척 후, non-CO₂ incubator에서 1시간 동안 미리 [C₇DMAP]Br (2.5, 5, or 10 μM)로 처리하였다. 기초 OCR을 측정한 후, oligomycin (1.5 μM), 그리고 rotenone/anyimycin A (0.5 μM)을 순차

적으로 주입하였다. 이후 검사는 [C₇DMAP]Br를 전처리 없이 [C₇DMAP]Br (2.5, 5, or 10 μM)의 직접 주입으로 시행하였다. 이후, oligomycin (1.5 μM)과 rotenone/antimycin A (0.5 μM)을 순차적으로 주입하였다. 각 복합체 억제제의 기능에 대한 정보를 Table 2에 요약하였다.

Mitochondrial respiratory analysis

미토콘드리아 기능은 XFe24 analyzer와 XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies)를 사용하여 측정하였다. 세포는 10 mM glucose, 1 mM pyruvate, 그리고 2 mM glutamine을 포함한 XF medium (pH 7.4)를 사용하여 세척 후, non-CO₂ incubator에서 1시간 전에 [C₇DMAP]Br (2.5, 5, or 10 μM)로 처리하였다. 기저 산소 소비율을 측정 한 후, oligomycin (1.5 μM), 2,4-dinitrophenol (DNP) (200 μM), rotenone (0.5 μM), 그리고 antimycin A (0.5 μM)을 순차적으로 주입하였다. 각 복합체 억제제의 기능에 대한 정보를 Table 2에 요약하였다.

Mitochondria electron transport chain (ETC) complex activity assay

HCT116 세포를 실험 전에 mitochondrial assay solution (MAS) buffer [220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 2 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, and 0.2% (w/v) bovine serum albumin]로 2회 세척하고 MAS buffer containing 10 μM digitonin와 4 mM ADP로 permeabilize 하였다. 복합체의 활성은 XFe24 analyzer를 사용하여 측정하였다. 사전에 세포를 rotenone (2 μM)이나 rotenone (2 μM) / antimycin A (2 μM)로 처리하여 복합체 II/III or IV의 활성을 측정하였다. 기본 활성을 측정하고 특정 복합체 기질과 [C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5, or 10 μM), 그리고 특정 복합체 억제제를 순차적으로 주입하였다. 각 복합체의 기질과 억제제는 다음과 같다: 복합체 I 기질: malate (1 mM)와 pyruvate (10 mM), 억제제 rotenone (2 μM); 복합체 II/III 기질: succinate (10 mM), 억제제 antimycin A (2 μM); 복합체 IV 기질: ascorbate (10 mM)와 *N,N,N',N'*-tetramethyl-1,4-phenylenediamine (TMPD, 100 μM), 억제제 azide (10 mM). 각 복합체의 억제제와 기질의 정보를 Table 2에 요약하였다.

Glucose uptake assay

HCT116 세포를 [C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5, or 10 μM)와 GLUT1 억제제인 BAY-876 (10 μM) (Selleckchem, Houston, TX, USA)로 저산소 환경에서 12시간 동안 처리하였다. 포도당 흡수 활성은 제조업체의 지침에 따라 Synergy H1 multi-mode plate reader를 사용하여 Glucose Uptake-Glo™ Assay (Promega)를 수행 후 측정하였다.

Glycolysis assay

세포의 해당과정은 XFe24 analyzer와 XF Glycolysis Stress Test Kit (Agilent Technologies)를 사용하여 측정하였다. HCT116 세포를 [C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5, or 10 μM)로 저산소 환경에서 12시간 동안 처리하였다. 세포를 2 mM glutamine이 보충된 XF medium로 2회 세척하고, non-CO₂ incubator에서 1시간 동안 배양하였다. 초기 ECAR 수치를 측정 후, glucose (10 mM), oligomycin (1.5 μM), 그리고 2-deoxy-D-glucose (2-DG, 50 mM)를 순차적으로 주입하였다.

Table 1. Quantitative real-time polymerase chain reaction^a에 사용한 유전자의 primer sequence

Genes	Primer sequence (5' to 3') ^b	Amplicon size (bp)	Accession number	Primer efficiency ^c	R ²
PDK1	F: CAGGACAGCCAATACAAGTGG R: CATTACCCAGCGTGACATGAA	150	NM_002610.5	112.6%	0.98
GLUT1	F: TTGCAGGCTTCTCCAAGTGGAC R: CAGAACCAGGAGCACAGTGAAG	113	NM_006516.4	106.4%	0.98
HIF1A	F: CGTTCCTTCGATCAGTTGTC R: TCAGTGGTGGCAGTGGTAGT	143	NM_0012430 84.2	96.8%	0.99
RPL13A	F: CATAGGAAGCTGGGAGCAAG R: GCCCTCCAATCAGTCTTCTG	159	NM_012423.4	95.7%	0.99

^a mRNA 발현은 Comparative Ct(ΔΔCt) method 방법을 이용하여 정량화하였으며, internal control 로 RPL13A를 사용했다.

^b 모든 primers는 custom-design으로 합성되었다.

^c Primer 효율과 R²는 QuantStudio™ Design & Analysis Software (ThermoFisher Scientific)에 의해 결정되었다.

Table 2. Real-time ATP XF-분석, 미토콘드리아 호흡 분석 및 미토콘드리아 ETC 복합체 활성 분석에 사용한 약물의 기능과 처리 농도^{35,36}

Compound	Function	Final Concentration
Oligomycin	ATP synthase (Complex V) inhibitor	1.5 μ M
Rotenone	Mitochondrial respiratory Complex I inhibitor	0.5 μ M
Antimycin A	Mitochondrial respiratory Complex III inhibitor	0.5 μ M
DNP	Uncouplers (cause maximal mitochondrial respiration)	200 μ M
Pyruvate	NADH-linked (Complex I) substrate	10 mM
Malate	Increase oxaloacetate, equilibrate fumarate	1 mM
Succinate	Q-linked (Complex II or Complex III) substrate	10 mM
TMPD	Artificial substrate measure Complex IV	100 μ M
Ascorbate	Maintain reduced form of TMPD	10 mM
Azide	Cytochrome oxidase-linked (Complex IV) inhibitor	20 mM

3. 결과

3.1 암세포에서의 세포 생존율과 HIF 활성을 억제하는 pyridinium계 이온성 액체

저산소 조건에서 배양한 HCT116 대장암 세포의 HIF-1 활성화 및 세포 생존율을 결정함으로써 이온성 액체(이하 "IL"라 함)의 항암 능력을 결정하였다. 세포는 72시간 동안 각 IL로 처리하였다. 합성한 IL 중, [C₄Py]Br, [C₅Py]Br, [C₆Py]Br 및 [C₇Py]Br을 포함한 pyridinium계 IL은 60 μ M 농도까지 세포의 생존에 영향을 미치지 않았다(Table 3). Pyridine에 dimethylamino기의 치환은 세포 생존 억제 활성을 유도하였고, [C₄DMAP]Br, [C₅DMAP]Br, [C₆DMAP]Br, 및 [C₇DMAP]Br의 IC₅₀는 각 51.63, 24.38, 0.68, 그리고 3.65다. 결과에서 세포 생존에 대한 억제 효과를 유도하기 위해 dimethylamino 작용기가 필요함을 예상할 수 있다. 또한 dimethylaminopyridinium의 치환된 alkyl chain의 길이가 길어질수록 억제 활성이 높아지는 것을 확인하였다. 이와는 대조적으로, 합성한 모든 IL은 정상 섬유아세포 WI-38의 생존에 영향을 미치지 않았고, 순수한 DMAP는 암이나 정상 세포에서 어떠한 활성도 나타내지 않았다(Table 3).

다음으로, HCT116 세포에서 HRE-luciferase reporter gene을 발현하는 HIF 전사 활성을 측정하여 HIF-1 α 의 활성화에 대한 pyridinium계 IL의 효과를 조사하였다. 저산소 상태에서 HCT116 대장암 세포를 배양하면 HIF의 전사 활성도가 유의미하게 유도된다. 이런 조건에서 dimethylamino 작용기가 없는 pyridinium계 IL로의 처리는 HIF 전사 활성에 영향을 미치지 않았다(Table 3). 세포 생존율 결과와 일치하게 dimethylaminopyridinium계 IL은 저산소증에 의해 유발된 HIF의 활성화를 상당히 억제했다. 이들의 억제 효과는 alkyl chain의 길이가 길어질수록 강화되었다. [C₄DMAP]Br, [C₅DMAP]Br, [C₆DMAP]Br, 및 [C₇DMAP]Br의 IC₅₀는 각 8.90, 1.19, 0.58, 그리고 0.56이다(Table 3). 순수한 DMAP는 HIF의 전사 활성에 어떤 영향도 미치지 않았다.

이어, 저산소 상태에서 HIF-1 α 의 축적에 대한 IL의 영향을 확인하였다. 저산소 상태에서 HCT116 세포를 배양했고, 그 결과 HIF-1 α 의 축적이 눈에 띄게 증가하였다(Fig. 1a). 같은 조건에서 HCT116 세포를 10 μ M 농도의 IL로 처리했을 때, 저산소증에 의한 HIF-1 α 의 축적은 pyridinium계 IL에 의해서는 변화되지 않았다(Fig. 1a). 반대로 dimethylaminopyridinium계 IL은 HIF-1 α 의 축적을 억제했고 억제 활성은 alkyl chain 길이가 늘어날수록 향상됐다(Fig. 1a). 이들 IL 중 [C₇DMAP]Br가 1.25-10 μ M에서 HIF-1 α 의 축적에 대해 가장 강력한 억제 활성을 보였다(Fig. 1b).

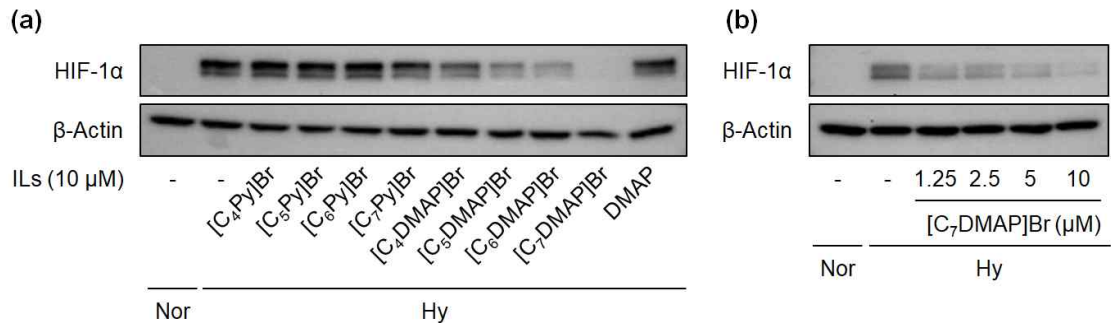


Figure 1. Pyridinium계 이온성 액체가 HCT116 세포에서 저산소증-유도 HIF-1 α 축적에 미치는 영향. (a) Pyridinium계 이온성 액체 (10 μ M)로 처리한 세포의 HIF-1 α 축적, (b) 저산소증에서 [C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5, or 10 μ M)로 처리한 세포의 HIF-1 α 축적

Table 3. 암세포 및 정상 세포에 pyridinium계 이온성 액체가 세포 생존율 및 HIF-1 α 활성화에 미치는 영향

Abbreviation	Structure	Name	HCT116 cell viability IC ₅₀ (μ M)	HCT116 cell HRE-Luc IC ₅₀ (μ M)	WI-38 cell viability IC ₅₀ (μ M)
[C ₄ Py]Br		<i>N</i> -Butylpyridinium bromide	> 60	> 60	> 60
[C ₅ Py]Br		<i>N</i> -Pentylpyridinium bromide	> 60	> 60	> 60
[C ₆ Py]Br		<i>N</i> -Hexylpyridinium bromide	> 60	> 60	> 60
[C ₇ Py]Br		<i>N</i> -Heptylpyridinium bromide	> 60	> 60	> 60
[C ₄ DMAP]Br		<i>N</i> '-Butyl- <i>N,N</i> -dimethylaminopyridinium bromide	51.63 \pm 2.60	8.90 \pm 0.82	> 60
[C ₅ DMAP]Br		<i>N</i> '-Pentyl- <i>N,N</i> -dimethylaminopyridinium bromide	24.38 \pm 2.68	1.19 \pm 0.19	> 60
[C ₆ DMAP]Br		<i>N</i> '-Hexyl- <i>N,N</i> -dimethylaminopyridinium bromide	6.08 \pm 0.60	0.57 \pm 0.11	> 60
[C ₇ DMAP]Br		<i>N</i> '-Heptyl- <i>N,N</i> -dimethylaminopyridinium bromide	3.65 \pm 0.24	0.56 \pm 0.22	> 60
DMAP		<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin	> 60	> 60	> 60

3.2. 산소 의존성 HIF-1 α 분해를 통해 HIF-1 α 표적 유전자의 발현을 억제하는 [C₇DMAP]Br

계속해서 *PDK1*과 *GLUT1*을 포함한 HIF 표적 유전자 발현에 대한 [C₇DMAP]Br의 영향을 확인하였다. 저산소 환경에서 12시간 동안 HCT116 세포를 배양하면 *PDK1*과 *GLUT1* mRNA 발현이 모두 증가한다(Fig. 2a). [C₇DMAP]Br를 이용한 처리는 *PDK1*과 *GLUT1* 모두의 저산소증-유도 mRNA 발현을 감소시켰다(Fig. 2a). 반대로, 저산소 환경에서 4시간 동안 HCT116 세포를 배양했을 때, *HIF1A*의 mRNA 발현은 변화가 없었고, [C₇DMAP]Br를 이용해도 아무 영향이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 2b). 결과를 통해 [C₇DMAP]Br가 세포 내의 유전 정보에 영향을 주지 않고, 전사 후의 조절을 통해 저산소 유도 HIF-1 α 의 축적을 억제한다는 것을 예상할 수 있다. HIF-1 α 의 축적에 대한 [C₇DMAP]Br의 억제 메커니즘을 확인하기 위해 [C₇DMAP]Br가 HIF-1 α 의 PHD inhibitor-CoCl₂에 의해 유도된 축적에 미치는 영향을 조사했다. HCT116 세포를 200 μ

M CoCl₂ 환경에서 6시간 동안 배양하면 HIF-1 α의 축적이 증가한다(Fig. 2c). 저산소증에 의해 유도된 HIF-1 α의 축적에 대한 효과와는 달리 [C₇DMAP]Br은 CoCl₂에 의해 유도된 HIF-1 α의 축적을 억제하지 않는다(Fig. 2c). 결과를 통해 산소 의존적인 조절이 [C₇DMAP]Br에 의한 HIF-1 α 축적 억제에 관여함을 알 수 있다.

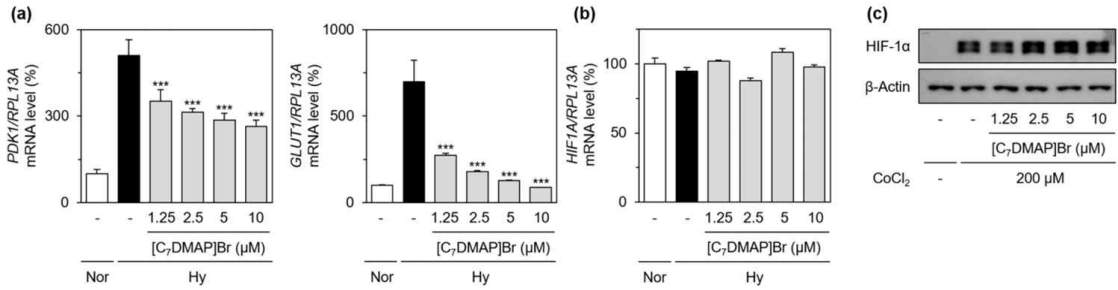


Figure 2. HCT116 세포에서 HIF-1 α 표적 유전자의 저산소-유도발현과 CoCl₂ 유도 HIF-1 α 축적에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향. (a) *PDK1*과 *GLUT1* mRNA의 발현, (b) *HIF1A*의 mRNA 발현, (c) CoCl₂에 유도-축적된 HIF-1 α

다음으로, green fluorescence hypoxia detection probe를 사용하여 세포 내 산소 농도를 결정하였다. HCT116 세포를 8시간 동안 저산소 환경에서 [C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5, or 10 μM), Hoechst 33342 (1 μg/mL), hypoxia probe (0.5 μM)로 처리 및 배양하면, 세포질에서 녹색 형광의 강도가 증가하고, 이 형광은 산소에 의해 소실되었다. HCT116 세포에 [C₇DMAP]Br를 사용한 처리는 저산소증 유도 형광을 유의미하게 감소시켰다(Fig. 3). 이는 [C₇DMAP]Br를 이용한 처리가 세포 내 산소 농도를 증가시켰음을 나타내며, [C₇DMAP]Br가 세포 내 산소 수준을 높임으로써 HIF-1 α의 축적을 억제한다는 것을 보여준다.

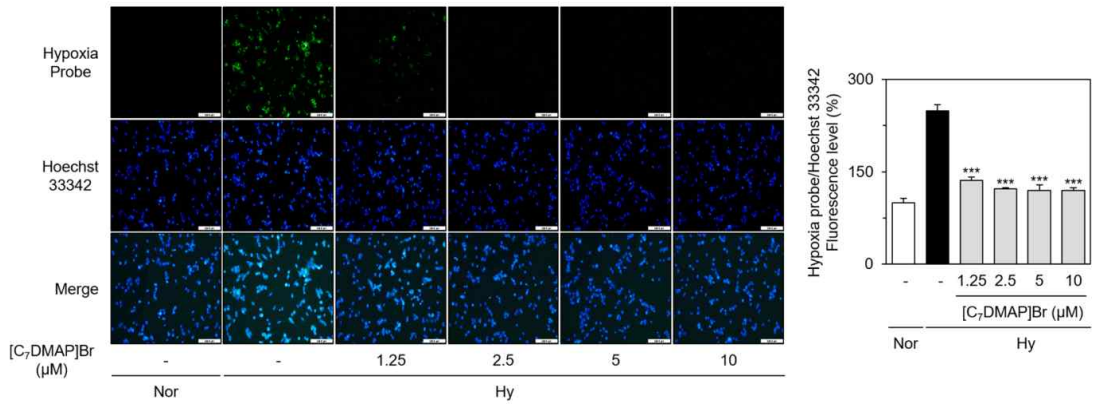


Figure 3. HCT116 세포 내 산소 농도에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향. (a) HCT116 세포에서의 형광 발현, (b) 두 형광물질의 양적 비율, scale bar가 높을수록 저산소증이다.

3.3 [C₇DMAP]Br에 의한 미토콘드리아 호흡 억제를 통해 세포 내 산소 함량 증가

세포 내 산소 함량 조절의 기초가 되는 메커니즘을 결정하기 위해 HCT116 세포에서 미토콘드리아의 호흡과 ATP 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 1시간 동안 표기된 농도의 [C₇DMAP]Br로 미리 처리한 결과, HCT116 세포에서 염기성 산소 소비율(OCR) 및 미토콘드리아 ATP 생성이 현저하게 감소하였다(Fig. 4a). 이후, [C₇DMAP]Br를 배양한 HCT116 세포에 직접 첨가하였을 때 OCR 및 ATP 생산이 즉시 감소하였다(Fig. 4b). 그러나 dimethylamino 작용기가 없는 [C₇Py]Br를 사용한 처리는 사전 처리와 직접 주입 모두 미토콘드리아 OCR 및 ATP 생성 억제에 영향을 주지 않았다(Fig. 5). 결과적으로 미토콘드리아 호흡의 억제 활성을 유도하기 위해서는 pyridinium계 양이온에 dimethylamino기 치환이 필요함을 알 수 있다.

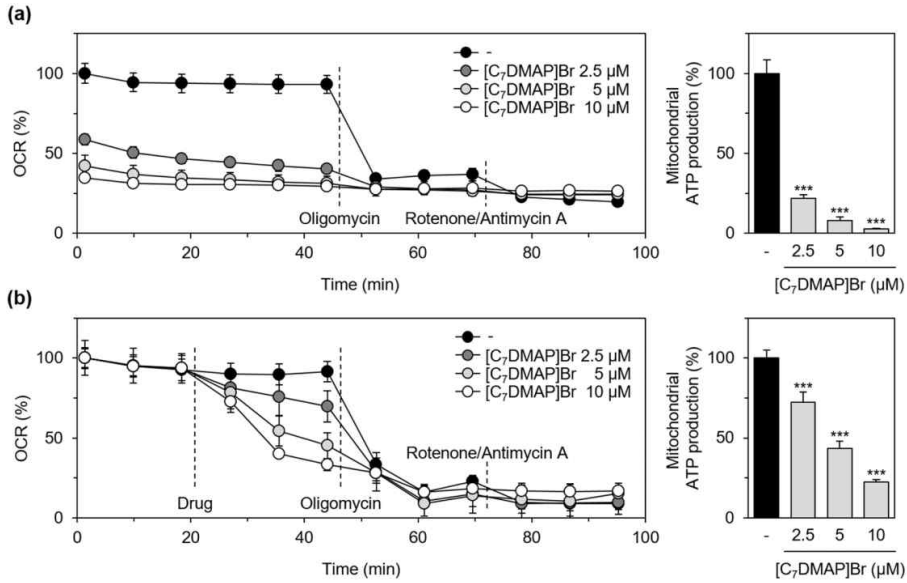


Figure 4. HCT116 세포 내 산소 소비율과 미토콘드리아의 ATP 생성에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향. (a) 사전에 [C₇DMAP]Br를 처리하여 배양 후 기초 OCR 측정 및 ATP 생산 측정, (b) 배양한 HCT116 세포에 직접 [C₇DMAP]Br 주입 후 OCR 측정 및 ATP 생산 측정.

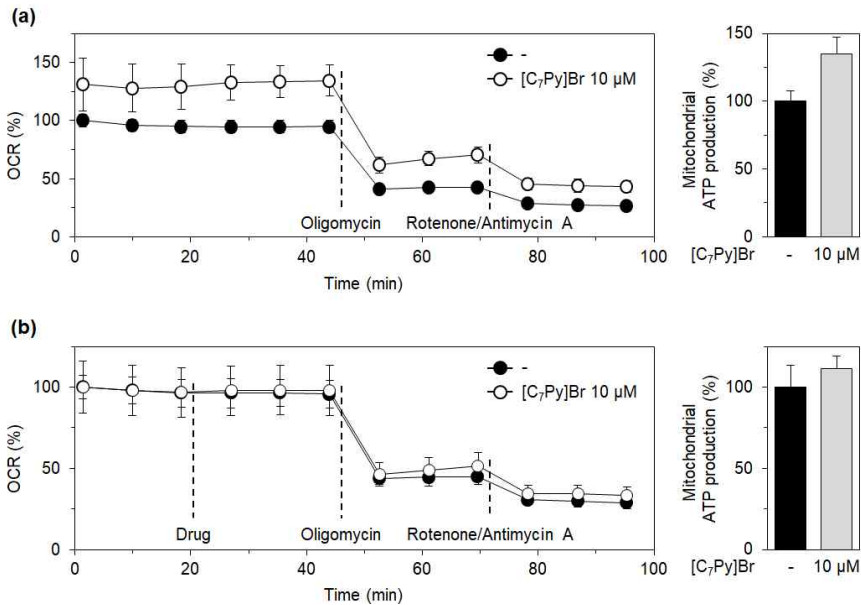


Figure 5. HCT116 세포 내 산소 소비율과 미토콘드리아의 ATP 생성에 [C₇Py]Br가 미치는 영향. (a) 사전에 10 μM [C₇Py]Br를 처리하여 배양 후 기초 OCR 측정 및 ATP 생산 측정, (b) 배양한 HCT116 세포에 직접 10 μM [C₇Py]Br 주입 후 OCR 측정 및 ATP 생산 측정.

산 측정, (b) 배양한 HCT116 세포에 직접 [C₇Py]Br를 주입 후 OCR 측정 및 ATP 생산 측정.

이후, cell mitochondria stress test를 수행하여 미토콘드리아 호흡의 다양한 매개변수를 확인하였다. OCR을 측정하기 위해 HCT116 세포를 oligomycin, uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) 및 rotenone/antimycin A로 순차적으로 처리하였다(Fig. 6a). [C₇DMAP]Br (2.5, 5, or 10 μM)를 사용하여 1시간 동안 HCT116 세포를 처리하면 기본 호흡과 DNP에 의해 유도된 최대 미토콘드리아 호흡이 감소하고 미토콘드리아의 ATP 생성 역시 감소한다(Fig. 6b). 위 내용을 통해 [C₇DMAP]Br가 미토콘드리아 호흡을 직접적으로 억제하여 세포 내 산소 수준을 상승시킨다는 것을 알 수 있다.

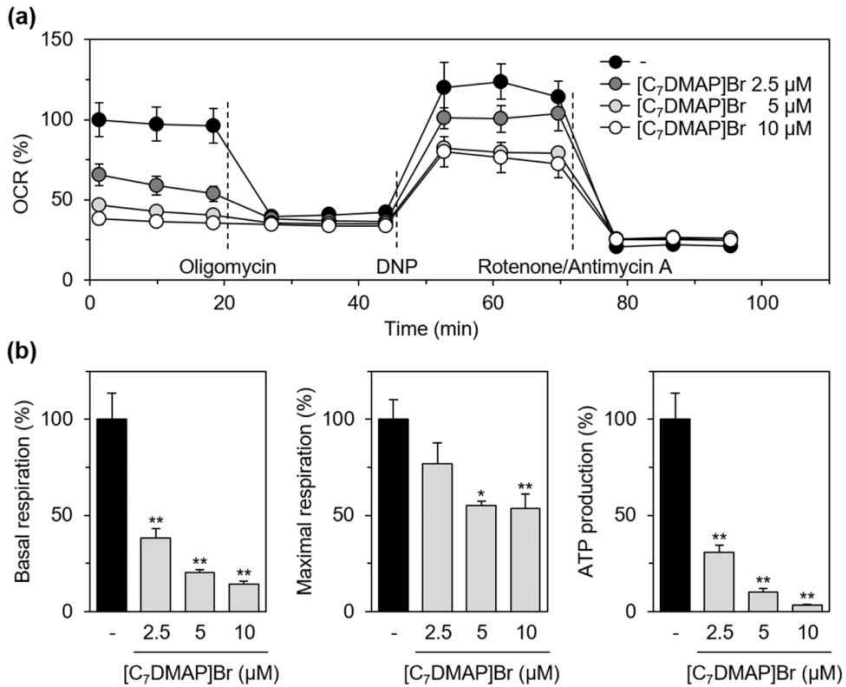


Figure 6. HCT116 세포의 미토콘드리아 기능에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향. (a) 미리 [C₇DMAP]Br로 처리한 HCT116 세포 내 산소 소비율, (b) 약물 처리한 HCT116 세포의 기본 호흡, 최대 호흡, 그리고 ATP 생산 측정.

3.4. [C₇DMAP]Br에 의한 미토콘드리아 전자전달계 복합체 I의 활성 억제

미토콘드리아 호흡 억제 효과의 기초 메커니즘을 명확히 하기 위해 [C₇DMAP]Br가 HCT116 세포의 미토콘드리아 전자전달계 복합체 활성에 미치는 영향을 조사했다. 복합체 I의 활성은 기질인 malate 및 pyruvate의 주입 이후 즉시 증가하고 복합체 I 억제제인 rotenone 주입은 활성화를 완전히 억제하였다. 동일 조건에서 [C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5, or 10 μM)로 처리하면 복합체 I 활성이 억제된다(Fig. 6). 그러나 복합체 I 활성을 억제한 [C₇DMAP]Br의 농도(5 μM)는 특정 기질인 succinate와 ascorbate/TMPD에 의해 유도된 복합체 II/III 및 복합체 IV에는 억제 효과를 나타내지 않는다(Fig. 8a 및 b). 결과적으로 [C₇DMAP]Br에 의한 미토콘드리아 OCR의 감소는 복합체 II/III 또는 복합체 IV의 활성과는 관계없이 복합체 I의 직접적인 억제에 매개됨을 알 수 있다. 종합하면, [C₇DMAP]Br는 암세포의 생존 능력을 억제하고, 미토콘드리아 전자전달계의 복합체 I 활성화를 직접적으로 억제함으로써 HIF-1 α의 활성화를 억제하여 항암 효과가 있음을 유추할 수 있다.

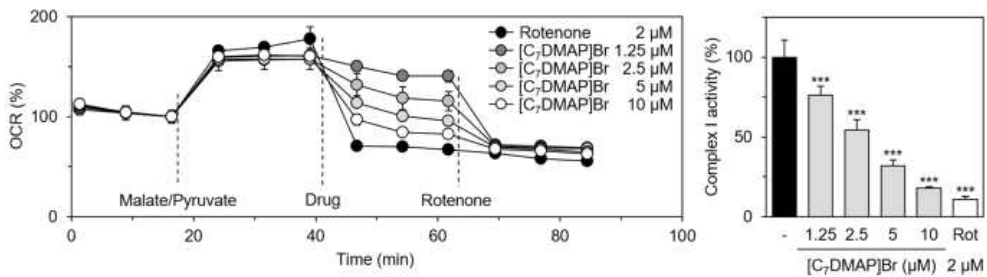


Figure 7. 미토콘드리아 전자전달계 복합체 I의 활성에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향. 미토콘드리아 복합체 I의 활성 억제는 복합체 I 기질 처리 후, [C₇DMAP]Br를 주입하여 측정하였다.

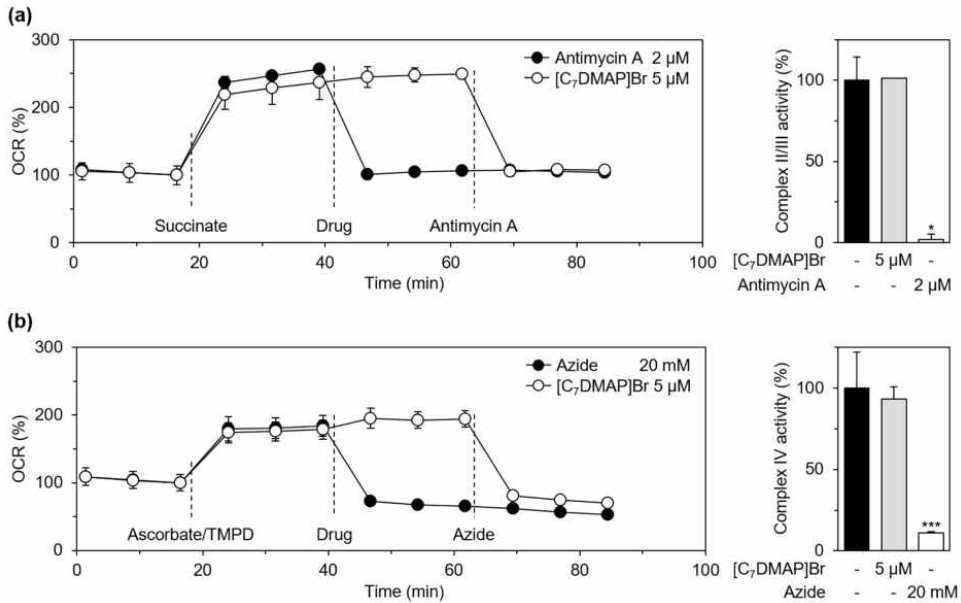


Figure 8. 미토콘드리아 전자전달계 복합체 II/III 및 IV 활성에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향. 미토콘드리아 복합체의 활성 억제는 각 복합체의 기질 처리 후, [C₇DMAP]Br를 주입하여 측정하였다.

3.5. [C₇DMAP]Br에 의한 저산소증-유도 해당과정의 억제

저산소증-유도 해당 대사에서의 포도당 흡수율을 측정해서 미토콘드리아의 기능 조절에 [C₇DMAP]Br가 미치는 영향을 조사했다. 저산소 환경에서 12시간 동안 HCT116 세포를 배양하면 포도당 소비가 증가한다(Fig. 9a). 동일 조건에서 [C₇DMAP]Br (1.25, 2.5, 5, or 10 μM)로 처리하면 저산소증에 의해 유도된 포도당 흡수가 감소한다. 그리고 일반적인 산소 수준에서와 유사한 포도당 흡수를 10 μM에서 보인다. GLUT1 억제제인 BAY-876은 저산소 상태에서 포도당 섭취를 강력하게 억제한다. 이를 통해 [C₇DMAP]Br 처리에 의한 포도당 섭취 억제가 GLUT1 억제제 BAY-876과는 달리 저산소증에 특이적이라는 것을 알 수 있다. 해당 작용에 관련된 암 대사에 대한 저산소증 특이 억제 효과를 확인하기 위해 Glycolysis stress test를 수행하여 세포 외 산성화도 (ECAR)을 측정하였다. ECAR을 측정하기 위해 HCT116 세포를 glucose, oligomycin 및 2-DG로 순차적으로 처리하였다(Fig. 9b). 상기 조건에서 HCT116 세포를 저산소 상태에서 12시간 동안 [C₇DMAP]Br로 처리하면 해당 분해 수준과 해당 용량이 감소하며(Fig.

9b 및 9c), 이 결과는 $[C_7\text{DMAP}]Br$ 가 저산소 상태에서 포도당 대사를 억제함을 나타낸다. 결과적으로 $[C_7\text{DMAP}]Br$ 가 저산소 상태에서 해당 대사 및 미토콘드리아 호흡을 억제하여 암세포 생존에 대한 효과적인 억제 활성을 보이는 것을 확인하였다.

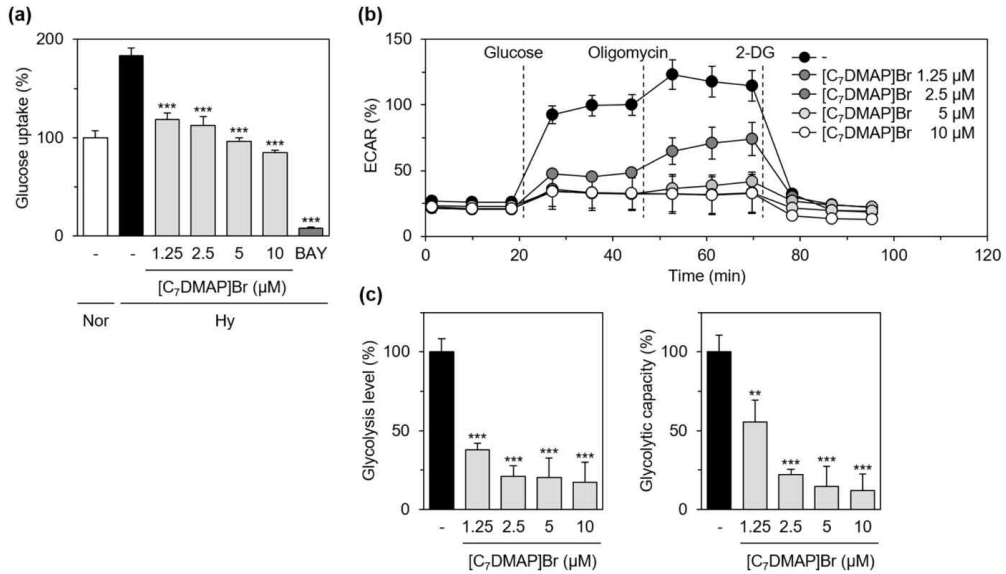


Figure 9. 저산소증-유도 해당과정에 $[C_7\text{DMAP}]Br$ 가 미치는 영향. (a) 저산소 환경에서 HCT116 세포를 $[C_7\text{DMAP}]Br$ (1.25, 2.5, 5, or 10 μM)와 BAY-876 (BAY, 10 μM)로 처리하여 12시간 동안 배양 후 포도당 흡수 측정, (b) $[C_7\text{DMAP}]Br$ 로 처리한 HCT116 세포에 약물 주입 후 ECAR 측정, (c) $[C_7\text{DMAP}]Br$ 로 처리한 HCT116 세포의 해당 분해 수준과 해당 용량의 측정.

4. 고찰

이온성 액체(이하 'IL'라 함)를 항암제로 적용하기 위해서는 항암 활성과 IL에 의해 유발되는 독성 사이의 상세한 메커니즘을 이해하는 것이 중요하다. 이온성 액체의 독성 연구는 혈장 막의 붕괴가 IL 매개 독성의 주요 원인이며, 대부분 mM 범위에서 양이온에 치환된 alkyl chain 길이와 관련이 있음을 보여준다.^{7,37,38} 이번 연구에서 합성한 4-7개의 탄소 원자로 구성된 alkyl chain을 가진 60 μM 의 pyridinium계 IL 중 어느 것도 정상 WI-38 세포의 생존 능력에 영향을 미치지 않았고, dimethylamino기가 없는 alkylpyridinium은 암세포의 생존력과 HIF-1 α 활성화에 억제 활성을 보이지 않았다. 연구를 통해 알게 된 정보에서 IL의 독성은 양이온에 치환된 alkyl chain 길이를 적절하게 조절함으로써 제어할 수 있음을 추론할 수 있었다. 또한 nM에서 μM 범위의 농도에서 IL의 항암 활성은 mM 범위의 농도에서 발생하는 독성과는 별도로 고려되어야 한다.

많은 연구에서 양이온에 치환된 alkyl chain 길이가 IL의 항암 활성과 긍정적인 상관관계가 있다는 것을 보고하였다.^{39,40} 이번 연구에서도 암세포의 생존에 대한 *N,N*-dimethylaminopyridinium의 억제 활성이 치환된 alkyl chain 길이가 늘어남에 비례하여 강화됨을 입증하였다. 또한, 저산소증-유도 HIF-1 α 축적에 대한 alkyl chain 길이의 영향은 암세포의 생존 가능성에 대한 영향과 유사했다. 이런 결과는 alkylpyridinium의 친유성-의존 수동 막 투과성을 통해서 설명할 수 있다.⁴¹ 추가로 복합체 I의 직접적인 억제에 의한 HIF-1 α 축적 억제를 위해 pyridinium에 dimethylamino기가 필요하다는 것을 발견했다. 특히 detergent digitonin에 의한 막 투과 조건에서 짧은 alkyl chain으로 치환된 dimethylaminopyridinium계 IL은 복합체 I에 대한 억제 활성을 유도하지 않았으며, 이는 dimethylamino기와 긴 alkyl chain 모두 복합체 I의 억제에 필요하다는 결과를 뒷받침하였다.

암세포는 정상적인 세포에 비해 혈장과 미토콘드리아의 막 통과 잠재력이 현저하게 향상된 것으로 알려졌다.⁴² 이러한 암세포의 특성 때문에 친유성-양이온성 화합물은 암세포 내부의 음성적인 전하에 축적되는 경향이 있다.⁴³ 전형적인 혈장 막 전위(30-40 mV)와 비교했을 때 미토콘드리아의 막 전위(120-180 mV)가 더 높으며, 이는 세포질에 친유성-양이온 화합물이 10-100배 더 축적되도록 한다.⁴³ 이런 암세포의 독특한 특성을 바탕으로 triphenylphosphonium (TPP), dequalinium, MKT-077, F16, Rhodamine 123 등 다

양한 미토콘드리아 표적 화합물이 개발되었다.⁴⁴ 그중에서도 TPP는 미토콘드리아에 대한 친화력이 높은 물질이다. TPP가 치환된 친유성-양이온 화합물은 영상, 약물 전달 및 미토콘드리아 기능의 조절을 위해 미토콘드리아를 표적으로 하도록 설계 및 합성되었다.⁴³

산소 농도가 정상적인 경우에도 포도당의 흡수와 이용이 강화되는 것이 특징인 Warburg 효과는 암세포의 일반적인 대사 특성으로 광범위하게 연구되었다.⁴⁵ 최근 연구들에서 새로운 항암치료 전략으로 암 자체의 대사 경로 조절이 떠올랐다.⁴⁶ 암 대사를 대상으로 하는 약물은 세포독성 약물의 독성, 표적 치료제에 대한 내성, 면역 치료제에 대한 낮은 반응 등을 극복할 수 있을 것으로 기대된다.⁴⁷ 저산소증은 대부분의 암 미세 환경에서 일반적인 특징이며 암세포 대사와 밀접한 관련이 있다는 것이 널리 알려져 있다.⁴⁸ 저산소증 암 미세 환경에서 암세포와 스트로마 세포의 HIF-1 α 중심 전사 반응은 해당과정 관련, 유전자의 발현을 증가시킴으로써 암세포의 대사 재프로그래밍을 유도하는 주요 반응기이다.²⁰ 여기에 alkylpyridinium이 저산소증 유도 HIF-1 α 축적과 표적 GLUT1의 mRNA 발현을 감소시켜 저산소증 유도 포도당 흡수를 감소시키는 것을 보여주었다. 이 발견은 alkylpyridinium이 저산소 상태에서 HIF-1 α 와 관련된 암 대사를 조절함으로써 항암 활성을 보이는 것을 시사한다. 이번 연구 결과는 미토콘드리아 호흡의 억제가 alkylpyridinium이 HIF-1 α 축적을 억제하는 근본적인 메커니즘이라는 것을 뒷받침한다.

암 환경에서는 산소 부족으로 인해 미토콘드리아 기능이 비활성화되는 것으로 알려졌다. 그러나 최근의 연구에 따르면 인간과 생쥐의 종양 성장을 위해서 미토콘드리아의 대사가 필요한 것으로 나타났다.⁴⁹ 종양 세포의 통제되지 않은 증식은 해당과정을 통한 빠른 ATP 생성 외에도 아미노산, 뉴클레오타이드, 지질을 포함한 고분자의 생성의 증가를 요구한다.⁵⁰ 고분자를 합성하는 동안 미토콘드리아의 TCA 회로는 ETC의 기질로서 NADH와 FADH₂를 제공한다.⁵¹ 미토콘드리아를 표적으로 하는 몇 가지 약물이 보고되었는데, TCA 회로에서 α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH)의 저해제인 CPI-613은 체장암과 급성 골수성 백혈병을 치료하기 위한 임상 3상에서의 항암 활성에 대해 평가를 받았다.⁵² 또한, Metformin과 BAY87-2243은 미토콘드리아에서 ETC의 억제를 통해 항암 활성을 나타낸다.^{53,54} 이러한 결과는 alkylpyridinium에 관한 이번 연구의 결과와 일치하며 ETC에서 이러한 복합체 I의 억제는 HIF-1 α 안정화의 감소로 이어진다. 그리고 복합체 I를 억제함으로써 유도된 세포 내 산소 함량의 증가 정도가 저산소 상태에서 HIF-1 α 를 분해하기에 충분하다는 연구의 결과를 뒷받침한다.

미토콘드리아 조절제는 약물 내성을 극복하여 약물 민감도를 증가시키는 이점을 나타냈다. BCL-2 억제제 venetoclax는 만성 림프구성 백혈병(CLL)에서 약물 내성을 유도하는 미토콘드리아 OXPHOS를 강화시킨다.⁵⁵ Venetoclax와 복합체 III 억제제 Antimycin A 및 복합체 V 억제제 oligomycin의 조합은 CLL에서 venetoclax 감수성을 향상시켰다.⁵³ 그리고 BTK 억제제 ibrutinib에 대한 약물 내성은 OXPHOS로의 대사 재프로그래밍 및 mantle cell lymphoma (MCL)의 glutamine 분해 경로와 관련이 있으며, 여기서 복합 I 억제제는 ibrutinib 내성 MCL 세포의 증식을 약화시킨다.⁵⁶

종양 환경의 저산소증은 방사선 치료와 화학 요법에 대한 내성에도 밀접한 관련이 있다. 저산소증 하에서 glutathione peroxidase와 superoxide dismutase 같은 해독 효소는 활성 산소종의 제한된 가용성과 다양한 암세포의 방사선 치료 저항성에 관련된 DNA의 손상을 초래한다.⁵⁷ 저산소증에 의한 자가포식과 해당과정의 대사는 방사선 치료에 대한 내성에 영향을 미친다.^{58,59} 화학 요법의 경우 HIF-1 α 는 다재내성(MDR1) 및 유방암 저항 단백질을 포함하는 ABC 수송체(ATP-binding cassette transporter)의 발현 유도자로 확인되었다.^{60,61} 저산소증 하에서 상기 유전자의 발현이 증가하면 암세포에서 항암제의 활발한 유출이 증가한다. 이러한 결과를 통해 HIF-1 α 경로의 조절은 저산소 암 미세 환경에서 방사선 치료 및 화학 요법에 대한 내성을 극복할 수 있다고 강력하게 제안한다. 지속적인 sorafenib 치료는 hepG2 cell xenograft 쥐 모델에서 HIF-1 α 축적의 향상을 통해 종양 내에서 저산소증을 유도하여 간세포 암에서 sorafenib 내성을 유도하였다.⁶² HIF-1 α 의 발현을 억제하는 curcumin analog EF24와 sorafenib의 조합은 HCC에서 sorafenib 내성을 극복했다. HCC의 저산소 상태는 sorafenib 내성 외에도 좋지 않은 예후 및 재발 위험 증가와 밀접한 관련이 있다.^{63,64} 따라서, HIF-1 α 의 활성화를 조절하는 미토콘드리아 표적화제는 저산소성 암 미세 환경에서 약물 내성 및 암 악성도를 조절하는 항암제를 개발하기 위한 전략으로 이용될 수 있다.

5. 결 론

암세포의 저산소증 영역에서 HIF-1 α -중심 암 대사 조절에 의한 항암제로써 pyridinium계 이온성 액체를 활용하는 방법을 제안했다. 합성한 pyridinium계 이온성 액체 중, [C₇DMAP]Br가 HIF-1 α 활성화에 가장 강력한 억제 활성을 보였다. [C₇DMAP]Br가 HIF-1 α 축적을 억제하는 근본적인 분자 메커니즘은 미토콘드리아에서 ETC 복합체 I의 직접적인 억제와 세포 내 산소 함량 매개 분해이다. 또한, 미토콘드리아에 작용하는 [C₇DMAP]Br는 포도당 흡수와 미토콘드리아 생체 에너지 생산을 억제하여 저산소증 암 특이 대사를 조절하는 잠재적 항암제로써의 가능성을 보여주었다. 그리고 이번 연구 결과는 암 치료제로써 pyridinium계 이온성 액체의 적용에 대한 중요한 정보를 제공한다. Pyridinium계 이온성 액체가 ETC 복합체 I를 억제하는 것에 대한 세부적인 분자 메커니즘을 명확하게 하기 위해서는 추가 연구가 필요하다. 그리고 pyridinium계 이온성 액체의 생체 내 효능과 안정성에 관한 향후 연구는 암 치료에서 그들의 치료 잠재력을 위해 평가될 것이다.

6. 참고 문헌

1. Singh, S.K., Savoy, A.W., 2020. Ionic liquids synthesis and applications: an overview. *J. Mol. Liq.* 297, 112038.
2. Vekariya, R.L., 2017. A review of ionic liquids: applications towards catalytic organic transformations. *J. Mol. Liq.* 227, 44-60.
3. Greer, A.J., Jacquemin, J., Hardacre, C., 2020. Industrial applications of ionic liquids. *Molecules* 25, 5207.
4. Patel, D.D., Lee, J.-M., 2012. Applications of ionic liquids. *Chem. Rec.* 12, 329-355.
5. Flieger, J., Flieger, M., 2020. Ionic liquids toxicity-benefits and threats. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6267.
6. Magina, S., Barros-Timmons, A., Ventura, S.P.M., Evtuguin, D.V., 2021. Evaluating the hazardous impact of ionic liquids - challenges and opportunities. *J. Hazard. Mater.* 412, 125215.
7. Kumari, P., Pillai, V.V.S., Benedetto, A., 2020. Mechanisms of cation of ionic liquids on living cells: the state of the art. *Biophys. Rev.* 12, 1187-1215.
8. Wang, Z., Zhang, Z., Lu, B., Li, Y., Liang, Y., Yuan, J., Zhao, M., Wang, B., Mai, C., Zhang, J., 2019. Novel-bio-renewable matrinium-based ionic liquids derived from Chinese herb medicine: synthesis, physicochemical properties and biological activity. *J. Mol. Liq.* 296, 111822.
9. Egorova, K.S., Gordeev, E.G., Ananikov, V.P., 2017. Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine. *Chem. Rev.* 117, 7132-7189.
10. Monti, D., Egiziano, E., Burgalassi, S., Chetoni, P., Chiappe, C., Sanzone, A., Tampucci, S., 2017. Ionic liquids as potential enhancers for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.* 516, 45-51.
11. Williams, H.D., Sahbaz, Y., Ford, L., Nguyen, T.H., Scammells, P.J., Porter, C.J., 2014. Ionic liquids provide unique opportunities for oral drug delivery: Structure optimization and in vivo evidence of utility. *Chem. Commun. (Camb.)* 50, 1688-1690.
12. Frade, R.F.M., Matias, A., Brance, L.C., Afonso, C.A.M., Duarte, C.M.M., 2007. Effect of ionic liquids on human coln carcinoma HT-29 and CaCo-2 cell lines. *Green. Chem.* 9,

873-877.

13. Kumar, V., Malhotra, S.V., 2009. Study on the potential anti-cancer activity of phosphonium and ammonium-based ionic liquids. *Bioorg.Med. Chem. Lett.* 19, 4643-4646.
14. Bakshi, K., Mitra, S., Sharma, V.K., Jayadev, M.S.K., Sakai, V.G., Mukhopadhyay, R., Gupta, A., Ghosh, S.K., 2020. Imidazolium-based ionic liquids cause mammalian cell death due to modulated structures and dynamics of cellular membrane. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1862, 183103.
15. Chen, H.-L., Kao, H.-F., Wang, J.-Y., Wei, G.-T., 2014. Cytotoxicity of imidazole ionic liquids in human lung carcinoma A549 cell line. *J. Chin. Chem. Soc.* 61, 763-769.
16. Kaushik, N.K., Attri, P., Kaushik, N., Choi, E.H., 2012. Synthesis and antiproliferative activity of ammonium and imidazolium ionic liquids against T98G brain cancer cells. *Molecules* 17, 13727-13739.
17. Kuczak, M., Musial, M., Malarz, K., Rurka, P., Zorebski, E., Musiol, R., Dzida, M., Mrozek-Wilczkiewicz, A., 2022. Anticancer potential and through study of the cytotoxicity mechanism of ionic liquids that are based on the trifluoromethanesulfonate and bis(trifluoromethylsulfonyl)imide anios. *J. Hazard. Mater.* 427, 128160.
18. Perez, S.A., Montalban, M.G., Carissimi, G., Licence, P., Villora, G., 2020. In vitro cytotoxicity assessment of monocationic and dicationic pyridinium-based ionic liquids on HeLa, MCF-7, BGM and EA.hy926 cell lines. *J. Hazard. Mater.* 385, 121513
19. Harris, A.L., 2002. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 38-47.
20. Petrova, V., Annicchiarico-petruzzelli, M., Melino, G., Amelio, I., 2018. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis* 7, 10.
21. Muz, B., de la puente, P., Azab, F., Azab, A.K., 2015. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl.)* 3, 83-92.
22. Semenza, G.L., 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148, 399-408.
23. Chan, D.A., Sutphin, P.D., Yen, S.E., Giaccia, A.J., 2005. Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6415-6426.
24. Semenza, G.L., 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721-732.

25. Bhandari, V., Hoey, C., Liu, L.Y., Lalonde, E., Ray, J., Livingstone, J., Lesurf, R., Shiah, Y.J., Vujcic, T., Huang, X., Espiritu, S.M.G., Heisler, L.E., Yousif, F., Huang, V., Yamaguchi, T.N., Yao, C.Q., Sabelnykova, V.Y., Fraser, M., Chua, M.L.K., van der Kwast, T., Liu, S.K., Boutros, P.C., Bristow, R.G., 2019. Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types. *Nat. Genet.* 51, 308-318.
26. Ban, H.S., Uto, Y., Nakamura, H., 2021. Hypoxia-inducible factor (HIF) inhibitors: a patent survey (2016-2020). *Expert Opin. Ther. Pat.* 31, 387-397.
27. Fallah, J., Rini, B.I., 2019. HIF inhibitors: Status of current clinical development. *Curr. Oncol. Rep.* 21, 6.
28. Lee, K., Ban, H.S., Naik, R., Hong, Y.S., SOn, S., Kim, B.K., Xia, Y., Song, K.B., Lee, H.S., Won, M., 2013. Identification of malate dehydrogenase 2 as a target protein of the HIF-1 inhibitor LW6 using chemical probes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 10286-10289.
29. Ban, H.S., Kim, B.K., Lee, H., Kim, H.M., Harmalkar, D., Nam, M., Park, S.K., Lee, K., Park, J.T., Kim, I., Lee, K., Hwang, G.S., Won, M., 2017. The novel hypoxia-inducible factor-1 α inhibitor IDF-11774 regulates cancer metabolism, thereby suppressing tumor growth. *Cell Death. Dis.* 8, e2843.
30. Kim, I., Kim, M., Park, M.K., Naik, R., Park, J.H., Kim, B.K., Choi, Y., Chang, K.Y., Won, M., Ban, H.S., Lee, K., 2020. The disubstituted adamantyl derivative LW1564 inhibits the growth of cancer cells by targeting mitochondrial respiration and reducing hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α accumulation. *Exp. Mol. Med.* 52, 1845-1856.
31. Bonhote, P., Dias, A.P., Papageorgiou, N., Kalyanasundaram, K., Gratzel, M., 1996. Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts. *Inorg. Chem.* 35, 1168-1178.
32. Wasserscheid, P., Welton, T., 2008. *Ionic liquids in synthesis.* Wiley Online Library.
33. Welton, T., 1999. Room-Temperature Ionic LIquids. *Solvents for Synthesis and Catalysis.* *Chem. Rev.* 99, 2071-2084.
34. Felice, D.L., Sun, J., Liu, R.H., 2009. A modified methylene blue assay for accurate cell counting. *J. Funct. Foods* 1, 109-118.
35. Divakaruni, A.S., Paradyse, A., Ferrick, D.A., Murphy, A.N., Jastroch, M., 2014. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods*

Enzymol. 547, 309-354.

36. Salabei, J.K., Gibb, A.A., Hill, B.G., 2014. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis. *Nat. Protoc.* 9, 421-438.
37. Goncalves, A.R.P., Paredes, X., Cristino, A.F., Santos, F.J.V., Queiros, C., 2021. Ionic liquids-a review of their toxicity to living organisms. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5612.
38. Stolte, S., Matzke, M., Arning, J., Bösch, A., Pitner, W.-R., Welz-Biermann, U., Jastorff, B., Ranke, J., 2007. Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. *Green. Chem.* 9, 1170-1179.
39. Latała, A., Nęzi, M., Stepnowski, P., 2009. Toxicity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids towards algae. *Chlorella vulgaris*, *Oocystis submarina* (green algae) and *Cyclotella meneghiniana*, *Skeletonema marinoi* (diatoms). *Green. Chem.* 11, 580-588
40. Musiał, M., Zorębski, E., Malarz, K., Kuczak, M., Mrozek-Wilczkiewicz, A., Jacquemin, J., Dzida, M., 2021. Cytotoxicity of ionic liquids on normal human dermal fibroblasts in the context of their present and future applications. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9, 7649-7657.
41. Correia, D.M., Fernandes, L.C., Fernandes, M.M., Hermenegildo, B., Meira, R.M., Ribeiro, C., Ribeiro, S., Reguera, J., Lancers-Mendez, S., 2021. Ionic liquids-based materials for biomedical applications. *Nanomater. (Basel)* 11, 2401.
42. Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., Ouari, O., Lopez, M., Joseph, J., Zielonka, J., Dwinell, M.B., 2018. A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds. *Redox Biol.* 14, 316-327.
43. Zielonka, J., Joseph, J., Siokra, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., Kalyanaraman, B., 2017. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: synthesis, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications. *Chem. Rev.* 117, 10043-10120.
44. Cho, H., Cho, Y.Y., Shim, M.S., Lee, J.Y., Lee, H.S., Kang, H.C., 2020. Mitochondria-targeted drug delivery in cancers. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866, 165808.
45. Liberti, M.V., Locasale, J.W., 2016. The warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem. Sci.* 41, 211-218.

46. Lemberg, K.M., Gori, S.S., Tsukamoto, T., Rais, R., Slusher, B.S., 2022. Clinical development of metabolic inhibitors for oncology. *J. Clin. Invest* 132.
47. Kouidhi, S., Ben Ayed, F., Benammar Elgaaied, A., 2018. Targeting tumor metabolism: a new challenge to improve immunotherapy. *Front. Immunol.* 9, 353.
48. Eales, K.L., Hollinshead, K.E., Tennant, D.A., 2016. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5, e190.
49. Vasan, K., Werner, M., Chandel, N.S., 2020. Mitochondrial metabolism as a target for cancer therapy. *Cell metab.* 32, 341-352.
50. Jones, R.G., Thompson, C.B., 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 23, 537-548.
51. Martinez-Reyes, I., Chandel, N.S., 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.* 11, 102.
52. Missiroli, S., Perrone, M., Genovese, I., Pinton, P., Giorgi, C., 2020. Cancer metabolism and mitochondria: finding novel mechanisms to fight tumours. *EBioMedicine* 59, 102943.
53. Ellinghaus, P., Heisler, I., Unterschemmann, K., Haerter, M., Beck, H., Greschat, S., Ehrmann, A., Summer, H., Flamme, I., Oehme, F., Thierauch, K., Michels, M., Hess-Stumpp, H., Ziegelbauer, K., 2013. BAY 87-2243, a highly potent and selective inhibitor of hypoxia-induced gene activation has antitumor activities by inhibition of mitochondrial complex I. *Cancer Med* 2, 611-624.
54. Wheaton, W.W., Weinberg, S.E., Hamanaka, R.B., Soberanes, S., Sullivan, L.B., Anso, E., Glasauer, A., Dufour, E., Mutlu, G.M., Budigner, G.S., Chandel, N.S., 2014. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife* 3, e02242.
55. Guieze, R., Liu, V.M., Rosebrock, D., Jourdain, A.A., Hernandez-Sanchez, M., Martinez Zurita, A., Sun, J., Ten Hacken, E., Baranowski, K., Thompson, P.A., Heo, J.M., Cartun, Z., Aygun, O., Iorgulescu, J.B., Zhang, W., Notarangelo, G., Livitz, D., Li, S., Davids, M.S., Biran, A., Fernandes, S.M., Brown, J.R., Lako, A., Ciantra, Z.B., Lawlor, M.A., Keskin, D.B., Udeshi, N.D., Wierda, W.G., Livak, K.J., Letai, A.G., Neuberg, D., Harper, J.W., Carr, S.A., Piccioni, F., Ott, C.J., Leshchiner, I., Johannessen, C.M., Doench, J., Mootha, V.K., Getz, G., Wu, C.J., 2019. Mitochondrial reprogramming underlies resistance to BCL-2 inhibition in lymphoid malignancies. e313 *Cancer Cell* 36, 369-384.

56. Zhang, L., Yao, Y., Zhang, S., Liu, Y., Guo, H., Ahmed, M., Bell, T., Zhang, H., Han, G., Lorence, E., Badillo, M., Zhou, S., Sun, Y., Di Francesco, M.E., Feng, N., Haun, R., Lan, R., Mackintosh, S.G., Mao, X., Song, X., Zhang, J., Pham, L.V., Lorenzi, P.L., Markszałek, J., Heffernan, T., Draetta, G., Janes, P., Futreal, A., Nomioe, K., Wang, L., Wang, M., 2019. Metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation identifies a therapeutic target for mantle cell lymphoma. *Eaau1167 Sci. Transl. Med* 11.
57. Bouleftour, W., Rowinski, E., Louati, S., Sotton, S., Wozny, A.S., Moreno-Acosta, P., Mery, B., Rodriguez-Lafrasse, C., Magne, N., 2021. A review of the role of hypoxia in radioresistance in cancer therapy. *Med. Sci. Monit.* 27, e934116.
58. Feng, H., Wang, J., Chen, W., Shan, B., Guo, Y., Xu, J., Wang, L., Guo, P., Zhang, Y., 2016. Hypoxia-induced autophagy as an additional mechanism in human osteosarcoma radioresistance. *J. Bone Oncol.* 5, 67-73.
59. Kunkel, M., Moergel, M., Stockinger, M., Jeong, J.H., Fritz, G., Lehr, H.A., Whiteside, T.L., 2007. Overexpression of GLUT-1 is associated with resistance to radiotherapy and adverse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral. Oncol.* 43, 796-803.
60. Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., Colagan, S.P., 2002. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 62, 3387-3394.
61. Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E., Sarkadi, B., Sorrentino, B.P., Schuetz, J.D., 2004. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.* 279, 24218-24225.
62. Liang, Y., Zheng, T., Song, R., Wang, J., Yin, D., Wang, L., Liu, H., Tian, L., Fang, X., Meng, X., Jiang, H., Liu, J., Liu, L., 2013. Hypoxia-mediated sorafenib resistance can be overcome by EF24 through Von Hippel-Lindau tumor suppressor-dependent HIF-1 α inhibition in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57, 1847-1857.
63. Yuen, V.W., Wong, C.C., 2020. Hypoxia-inducible factors and innate immunity in liver cancer. *J. Clin. Invest* 130, 5052-5062.
64. Zhang, B., Tang, B., Gao, J., Li, J., Kong, L., Qin, L., 2020. A hypoxia-related signature for clinically predicting diagnosis, prognosis and immune microenvironment of hepatocellular carcinoma patients. *J. Transl. Med* 18, 342.