ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2024** Vol. 34. No. 7. 476~484 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2024.34.7.476

Isoalantolactone Inhibits the Formation of Multicellular Tumor Spheroids Derived From Human Hepatocellular Carcinoma Hep3B Cells Through the Induction of ROS-dependent Apoptosis

Min Yeong Kim[1,2], Byunwoo Son[3], Sang-Hyup Lee[4], Sang Eun Park[3], Su Hyun Hong[1,2], Sang Hoon Hong[3], Eunjeong Kim[5], Yung Hyun Choi[1,2*] and Hyun Hwangbo[1,2*]

[1]*Basic Research Laboratory for the Regulation of Microplastic-Mediated Diseases and Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47227, Korea*
[2]*Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea*
[3]*Department of Internal Medicine, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea*
[4]*Department of Korean Medical Classics, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea*
[5]*BK21 Plus KNU Creative BioResearch Group, School of Life Sciences, College of National Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea*

Received May 30, 2024 /Revised June 18, 2024 /Accepted July 5, 2024

Although two-dimensional (2D) monolayer cell culture models are still widely used as the optimal models for anticancer activity research, three-dimensional (3D) multicellular tumor spheroid (3D MTS) models that can better approximate the tumor environment can offer an alternative to bridge the gap between in vitro and animal model studies. Isoalantolactone is among the sesquiterpene lactones found in medicinal plants, including the roots of Elecampane (Inula helenium L.), and is known to have various pharmacological activities, including anticancer activity. In this study, we investigated whether the anticancer activity of isoalantolactone observed in 2D models could be reproduced in a 3D MTS model derived from human hepatocellular carcinoma (HCC) Hep3B cells. According to our results, isoalantolactone inhibited the formation of MTSs in a manner dependent on the treatment concentration, which was accompanied by an increase in reactive oxygen species (ROS) generation. In particular, as isoalantolactone treatment and the culture time increased, the area of proliferating cells was replaced by cells in which apoptosis was induced. Additionally, in MTSs, isoalantolactone increased the expression of death-receptor-related proteins and the activity of caspase-3, and it decreased the expression of the Bax/Bcl-2 expression ratio and total poly(ADP-ribose) polymerase. However, when the production of ROS was artificially blocked, all these changes caused by isoalantolactone were attenuated and the cell survival rate of MTS cells was restored. Therefore, the results of this study suggest that the induction of apoptosis in Hep3B cell-derived MTSs by isoalantolactone is achieved through the activation of extrinsic and intrinsic pathways and is ROS-dependent.

Key words : Apoptosis, Hep3B cells, isoalantolactone, ROS, tumor spheroid

서 론

주로 개발도상국에서 흔히 진단되는 것으로 알려진 간암은 일부 유럽 국가와 미국을 비롯한 많은 국가에서 발생률이 증가하고 있다[33, 43]. 원발성 간암(primary liver cancer)의 가장 흔한 유형인 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)은 일반적으로 만성적으로 손상된 간 조직에서 발생하며 사망률과 이환율이 매우 높다[4, 34]. 간세포암 발병의 주요 병인 인자로는 바이러스 간염(viral hepatitis), 알코올성 및 비알코올성 간질환(alcoholic and non-alcoholic liver disease), 간지방간염(hepatic steatohepatitis) 및 기타 독성 화학물질 등이 포함된다. 현재 간세포암종의 임상 치료로는 수술적 절제, 방사선치료, 화학요법 등이 적용되고 있으나 화학적 약물치료는 낮은 반응률과 약물 내성, 심각한 부작용을 유발할 수 있다[6, 18]. 따라서 간세포암종의 발생과 진행, 예후를 조절할 수 있는 새로운 전략이 절실히 필요하며, 많은 연구자들은 천연화합물로부터 간세포암종을 치료할 수 있는 효과적인 항암제를

***Corresponding authors**
Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-893-3333
E-mail : choiyh@deu.ac.kr (Yung Hyun Choi)
Tel : +82-51-890-3316, Fax : +82-51-893-3333
E-mail : hhyun@deu.ac.kr (Hyun Hwangbo)
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

찾는 방법을 모색해 오고 있다.

항암 활성을 가지는 천연물 중, 락톤 고리(lactone ring)를 포함하는 크고 다양한 sesquiterpene lactone 계열에 속하는 isoalantolactone은 한약재로 널리 사용 중인 목향(木香: Elecampane, *Inula helenium* L.)을 포함한 다양한 약용 식물에 함유된 주요 활성 성분 중 하나로서 다양한 약리 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다[41]. Isoalantolactone은 또한 여러 유형의 암세포에서 세포사멸(apoptosis), 세포주기 정지(cell cycle arrest) 및 자가포식(autophagy) 등을 유도하여 항암 활성을 발휘하는 것으로 밝혀지고 있다. 특히 인간 췌장암 세포에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 isoalantolactone에 의한 암세포의 세포사멸 유도에는 핵심적인 역할을 하였음을 Khan 등[16]에 의해 보고된 이후, 다양한 암세포에서도 유사한 결과들이 보고되었다[2, 5, 8, 14, 15, 21, 32, 39]. Hepa1c1c7 및 BPRc1와 같은 간암세포에서 isoalantolactone의 항암 활성이 있을 가능성이 Lim 등[22]에 의해 처음 제시되었으며, HepG2 간암세포에서 isoalantolactone에 의한 세포사멸 유도가 caspase-의존적이면서 ROS의 유도를 통해 이루어 짐이 Wu 등[39]에 의해 보고되었다. 본 연구실에서도 HCC Hep3B 세포에서 ROS 의존적 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 경로의 활성을 통해 isoalantolactone이 세포사멸을 유도하였음을 보고한 바 있다[17].

In vitro 2차원 단층 배양 기반 모델(two-dimensional (2D) monolayer culture-based model)은 현재까지 다양한 전임상 항암 약물의 효능 평가에 광범위하게 사용되고 있지만, 종양의 자연적 구조, 세포 간 상호 작용 또는 생체 내 종양 덩어리의 미세 환경을 적절하게 재현하지 못한다는 한계점을 가지고 있다[1, 13]. 실제로 이 모델에서 얻은 결과는 때때로 생체 내 효능을 예측하지 못했으며 생체 내 분석 결과와 일치하지 않는 경우가 많았다[11, 12]. 이를 극복하기 위하여 3차원 다세포 종양 spheroid 모델(three-dimensional (3D) multicellular tumor spheroid, 3D MTS)은 2D 모델의 한계를 극복하기 위한 대안으로 대두되고 있다. 이 모델의 장점은 원래의 종양 조직과 유사하게 생체 내 종양 조직의 복잡한 조직을 모방할 수 있는 잠재력을 가지고 있기 때문이다[3, 27]. 특히 항암 활성의 평가에서 3D MTS 모델은 생체 내 이종이식 모델(*in vivo* xenograft model)과 2D 모델의 중간 평가 모델로서 유용성이 매우 크다[27, 29]. 따라서 본 연구에서는 HCC Hep3B 세포에서 유래된 3D MTS 모델에서 2D 모델에서 관찰된 isoalantolactone의 항암 활성이 재현될 수 있는지를 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 세포 생존율 분석

본 연구에 사용한 HCC Hep3B 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 선행 방법에 준하여 10%의 fetal bovine serum (WelGENE Inc., Gyeongsan, Republic of Korea)과 항생제(antibiotic mixtures)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (WelGENE Inc.)을 이용하여 37°C 및 5% CO_2의 조건에서 배양하였다[17]. Isoalantolactone (Purity 99.99%, Fig. 1A)은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Chemical Co.)에 용해시켜 20 mM의 stock solution을 만들었으며, 배지에 적정 농도로 희석하여 세포에 처리하였다. 다양한 농도의 isoalantolactone이 48시간 동안 처리된 Hep3B 세포의 세포생존율을 분석하기 위해서는 Cell Counting Kit 8 (CCK-8, Abcam, Inc., Cambridge, UK)을 이용하였다. 이를 위하여 처리가 끝난 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)으로 수세 후 trypsin (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 처리로 수확하고, 계수하고, 96-well plate (5×10^3 세포/well)에 plating하였다. 이후 제조사가 제시한 실험 방법에 따라 microplate reader (VERSA Max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조군 대비 흡광도의 변화를 세포 생존율로 제시하였다.

세포사멸 평가를 위한 유세포분석

Propidium iodide (PI, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 염색 및 Fluorescein Isothiocyanate-Annexin V Apoptosis Detection Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 isoalantolactone이 처리된 Hep3B 세포의 세포사멸 유도 정도를 정량적으로 분석하였다[30]. 이를 위하여 10 μM의 isoalantolactone이 포함되었거나 포함되지 않은 배지에서 48시간 동안 배양된 세포를 모아 PBS로 세척 후 제조사의 지침에 따라 PI 단독 또는 annexin V/PI로 이중 염색을 하였다. 유세포 분석기(Becton Dickinson)를 사용하여 PI로 염색된 세포는 세포사멸 지표인 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도 산출에 사용하였고, annexin V/PI로 염색한 세포는 annexin V-양성 세포(annexin V-positive cells)를 세포사멸 유도 집단으로 설정하기 위해 사용하였다. 아울러 다양한 조건에서 형성된 Hep3B-3D spheroid를 구성하고 있는 각 세포의 세포사멸 수준을 정량화하기 위하여 배양 6일째, 선행 방법에 준하여 상등액 배지를 제거하고 0.05% trypsin이 함유된 ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA, Thermo Fisher Scientific)로 10분간 반응시켜 spheroid를 단일 세포들로 해리시켰다[9]. 해리된 세포들을 annexin V/PI로 이중 염색 후 유세포 분석기를 이용하여 세포사멸 유도 정도를 측정하였다.

Spheroid 형성

Hep3B 세포를 이용한 3D MTS 모델을 구축하기 위하여 Corning® 96-well spheroid microplate (Corning Inc., Corning,

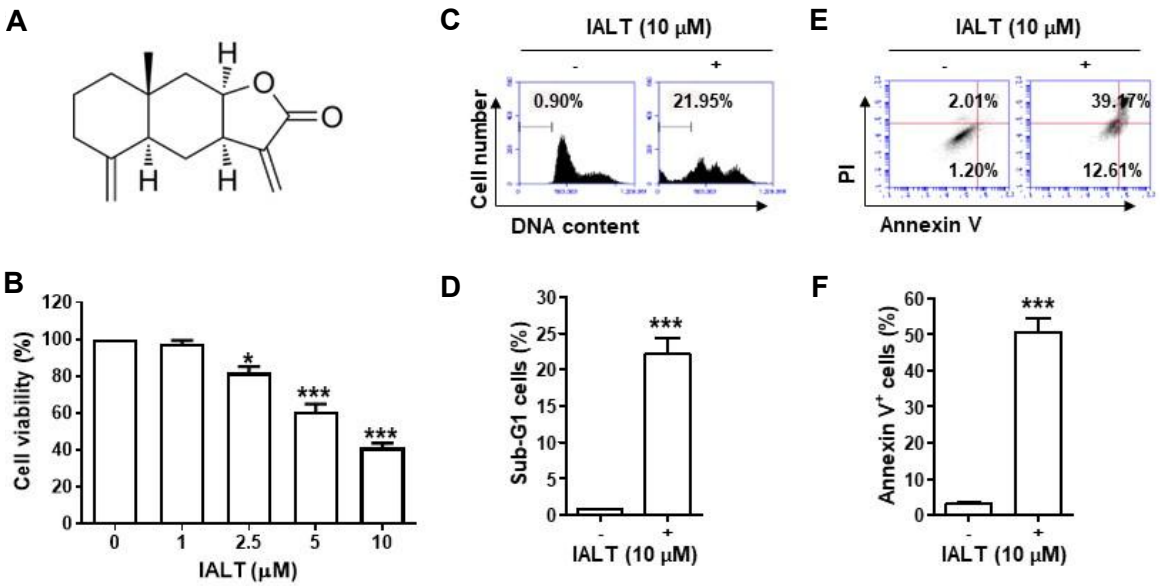

Fig. 1. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by isoalantolactone in Hep3B cells. (A) Chemical structure of isoalantolactone. (B-F) Cells were cultured in medium containing the indicated concentrations of isoalantolactone (IATL) for 48 hr. (B) After isoalantolactone treatment, cell viability was measured by the CCK-8 assay. (C-F) Quantitative analysis of isoalantolactone-induced apoptosis was performed by flow cytometry using PI and annexin V/PI staining. (C and E) Representative profiles of flow cytometry results are presented. (D and F) The frequencies of apoptotic cells were expressed as percentages of cells in sub-G1 phase (D) and annexin V-positive cells (F). (B, D and F) Data were expressed as the mean ± SD ($^{*}p<0.05$ and $^{***}p<0.001$ compared to untreated cells).

NY, USA)에 제조사의 방법에 준하여 Hep3B 세포(7×10^3 cells/well)를 부착시키고 37℃ 및 5% CO_2의 조건에서 3일 동안 배양하였다. 이후 3D spheroid의 형성 과정을 관찰하기 위하여 24시간 간격으로 6일 동안 위상차 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 이미지를 획득하였으며, spheroid의 크기는 Image J software (version 1.52a; NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 계산하였다[17]. Spheroid 배양 과정에서 2일마다 새로운 배지를 교체해 주었으며, spheroid 형성에 미치는 isoalantolactone의 영향 및 ROS의 역할을 조사하기 위해서는 제시한 농도의 isoalantolactone을 단독 또는 ROS 생성 저해제인 *N*-acetyl-l-cysteine (NAC, Sigma-Aldrich Chemical Co.)이 함께 함유된 배지로 교체하였다.

Spheroid에서 세포사멸 유도의 검출

Isoalantolactone에 의한 3D spheroid 형성 손상이 세포사멸 유도와 연관이 있는지를 조사하기 위하여 단편화된 chromatin DNA를 말단을 인식하는 terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) apoptosis detection kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 6일째에 다양한 조건에서 형성된 spheroid를 제조사의 방법에 따라 -20℃에서 10분 동안 methanol로 고정하고 PBS로 세척 후 kit에 함유된 glycol과 resin으로 구성된 잘 알려진 수용성 화합물(Tissue-Tek OCT)에 embedding하였다. 이어서 Cryostat (Leica CM1900, Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 얻은 spheroid 절편을 세척하고 Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific)이 함유된 PBS에 투과시켰다. 다시 절편을 PBS로 세척하고 TUNEL 키트 제조사의 실험 방법에 따라 반응시킨 후 핵의 위치를 PI로 염색하고 형광현미경(Carl Zeiss) 하에서 형광 강도를 관찰하였다[17].

Spheroid에서 ROS 생성의 검출

상기와 같은 조건에서 형성된 3D spheroid에서 생성된 ROS의 수준을 비교하기 위해 정상 또는 isoalantolactone이 함유된 배지에서 형성된 spheroid를 10 μM 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 37℃에서 20분간 반응시키고 실온에서 3.7% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Chemical Co.)로 고정시켰다. 고정된 spheroid를 다시 PBS로 세척 후 세포 내 DCF-DA 형광 강도의 이미지를 형광현미경으로 관찰하였다[17]. 또한, spheroid에서 분리된 세포들을 DCF-DA로 염색 후 DCF 형광 신호를 유세포 분석법으로 정량화하였다.

Spheroid에서 단백질 발현의 검출

NAC가 있거나 없는 조건에서 형성된 3D spheroid를 수집하고 PBS로 세척 후 protease inhibitor cocktails가 함유된 NP-40 Protein Detergent (Thermo Fisher Scientific)를 사용

하여 세포 용해물을 획득하였다[35]. 세포 용해물의 단백질 농도를 Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정 후, 동량의 총 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리하고 Immobilon®-P polyvinylidene fluoride membrane (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)으로 전이시켰다. 이어서 membrane에 검출 대상 단백질의 항체 및 horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체와 반응시키고 SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific) 및 Fusion Solo S Image system (Vilber Lourmat, Torcy, France)을 이용하여 해당 단백질의 발현을 가시화시켰다. 본 연구에 사용된 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), Abcam, Inc. 및 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

Spheroid에서 caspase-3 활성의 측정

Caspase-3 Colorimetric Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 NAC가 있거나 없는 조건에서 형성된 3D spheroid의 caspase-3 활성을 측정하였다. 이를 위하여 처리가 끝난 spheroid를 상기와 같은 방법으로 해리시킨 후 제조사의 지시에 따라, caspase-3의 기질인 colorimetric substrate (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide, DEVD-pNA)와 반응시킨 후 생성된 pNA를 microplate reader를 사용하여 485/530 nm의 흡광도에서 판독하였다. 각 처리군의 caspase-3 활성은 대조군의 흡광도에 대한 상대 값으로 제시하였다.

통계 분석

실험 결과의 통계 분석을 위해 GraphPad Prism Statistical Software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 사용하였다. 모든 실험값은 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 표현하였다. 통계 분석을 위해 one-way analysis of variance와 Tukey's post-test를 사용하여 그룹 간의 차이를 조사하였으며, *p*-value가 0.05 미만의 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

Isoalantolactone에 의한 Hep3B 세포의 증식 억제 및 세포사멸 유도

Hep3B 세포의 증식에 미치는 isoalantolactone의 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도의 isoalantolactone이 있거나 없는 배지에서 48시간 배양된 Hep3B 세포를 모아 CCK-8 분석을 수행하였다. Fig. 1B의 결과에서 알 수 있듯이 isoalantolactone의 처리 농도가 증가할수록 처리 농도 의존적으로 Hep3B 세포의 생존율이 유의적으로 억제되었으며 이러한 경향성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석에 의한 선행 연구 결과와 유사하였다[17]. 그리고 감수성에 대한 약간의 차이는 있었지만, 난소암세포, 담낭암세포, 자궁내막암세포, 대장암세포 등을 포함한 다양한 암세포에서의 결과와 유사하였다[14, 20, 25, 40].

선행 연구에서 밝혀진 바와 같이 isoalantolactone에 의한 암세포의 증식 억제는 세포사멸과 밀접한 연관성을 가지기 때문에 본 연구에서도 이를 확인하였다. Fig. 1C의 세포주기 분석에 의한 결과에 따르면, 세포사멸이 일어난 세포 집단에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포가 10 μM의 isoalantolactone 처리군에서 대조군에 비하여 약 24배 증가하였다. 그리고 초기 및 후기 세포사멸 유도 집단으로 인식되는 annexin V-양성 세포의 빈도 또한 대조군에 비하여 약 16배 이상 증가하였다. 이러한 결과들은 선행 연구에서 나타난 결과에서와 유사하게[5, 8, 14, 17, 20, 21, 24, 32, 39, 40] isoalantolactone에 의한 세포 생존율의 억제는 세포사멸에 따른 결과임을 의미한다.

Isoalantolactone에 의한 3D spheroid의 형성 억제 및 세포사멸 유도

3D MTS 모델을 이용한 isoalantolactone의 항암 활성을 조사하기 위하여 Hep3B 세포에서 파생된 종양 spheroid의 형성에 미치는 isoalantolactone의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 다양한 농도의 isoalantolactone이 처리된 배지에서 6일 동안 자란 spheroid의 부피 변화를 조사하였으며, 정상 배지에서의 spheroid의 형성 과정은 Phung 등[31]에 의한 결과와 유사하였다. 그리고, Fig. 2A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이, 정상 배지에서 자란 spheroid와 비교하여 최고 5 μM의 isoalantolactone이 처리된 spheroid에서는 3일째까지 대조군의 형태 및 부피와 유사하였다. 그러나 배양 4일째부터 부피 감소가 되기 시작하여 5일 및 6일 배양된 spheroid에서는 유의적인 부피 성장의 감소가 관찰되었다. 특히 전형적인 종양 3D MTS 모델에서 관찰되는 조밀하게 포장된 증식성 세포(proliferating cells) 영역[7, 37]이 5 μM의 isoalantolactone이 처리된 spheroid에서 4일째 이후 거의 사라졌다. Murad 등[28]은 HCC 세포에서 유래한 3D spheroid에서 관찰되는 이러한 변화를 spheroid의 구조적 분열(mechanochemical disruption)에 따른 비종양형 표현형(non-tumorigenic phenotype)으로 변환되어 생체 내에서 종양이 퇴행하는 과정이라고 정의한 바 있다.

Isoalantolactone에 의한 이러한 spheroid의 구조적 붕괴가 세포사멸 유도와 관련이 있는지를 세포사멸의 마지막 단계에서 DNA 단편화를 검출하는 TUNEL 분석법[26]으로 조사하였다. Fig. 2C에 제시한 결과처럼, 정상 배지에서 형성된 spheroid에서 핵의 위치를 나타내는 PI 염색은 spheroid 전체에 광범위하게 염색이 되었으며, TUNEL 형광 강도는 매우 낮았으나, 5 μM의 isoalantolactone이 처리

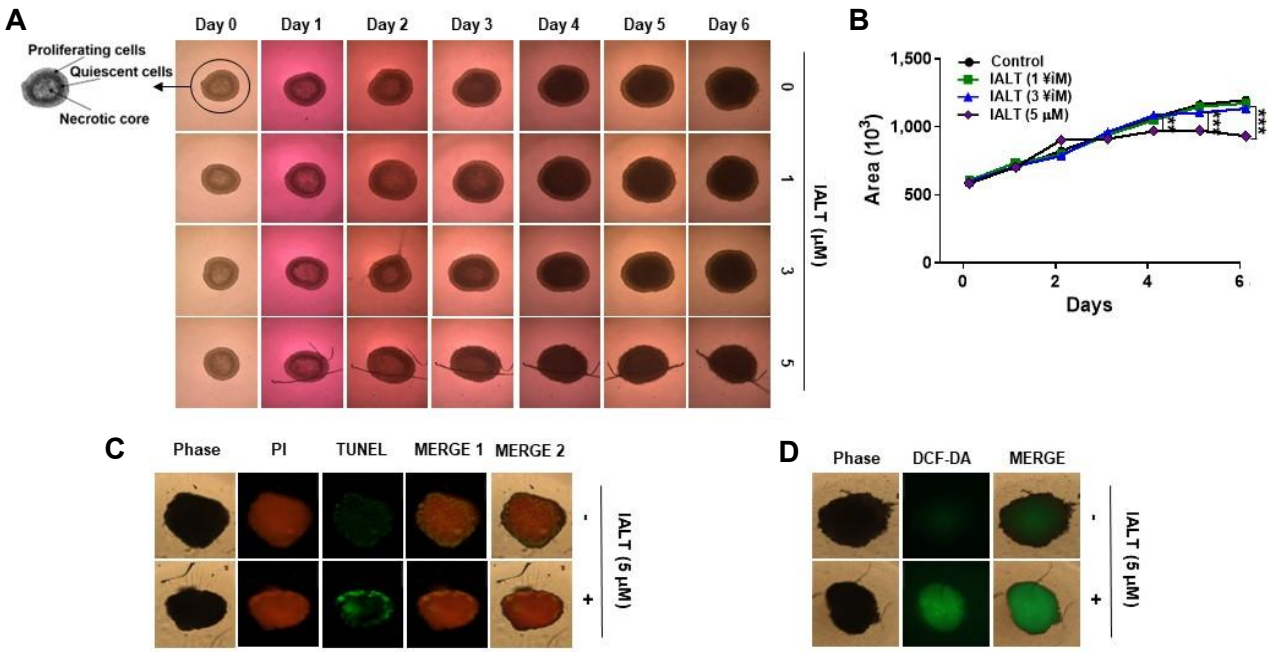

Fig. 2. Inhibition of formation, induction of apoptosis, and generation of ROS by isoalantolactone in MTSs derived from Hep3B cells. Spheroids were formed for 3 days and treated with the indicated concentrations of isoalantolactone for 6 days. (A) Images of representative spheroids obtained by a phase-contrast microscopy at each indicated time were presented. (B) Spheroid size was calculated using Image J software. Data were expressed as the mean ± SD ($^{**}p$<0.01 and $^{***}p$<0.001 compared to untreated spheroids). (C and D) Spheroids were stained with PI and TUNEL apoptosis detection kit (C) or DCF-DA (D) and Representative fluorescence images were acquired under a fluorescence microscope.

된 spheroid에서 TUNEL 형광 강도는 주로 증식성 세포 영역에서 강하게 발현되었으며 괴사 영역(necrotic core)에서는 상대적으로 매우 약하게 검출되었다. 아울러 ROS의 생성 정도를 조사한 결과에서(Fig. 2D) ROS 생성 지표인 DCF 형광 강도가 대조군에 비하여 isoalantolactone이 처리된 spheroid에서 전체적으로 높게 관찰되었다. 이들 결과는 선행 연구들의 결과와 유사하게[5, 8, 14, 17, 21, 24, 39, 44] isoalantolactone에 의한 세포사멸 유도에 ROS 생성이 관여함을 의미한다.

Isoalantolactone에 의한 3D spheroid의 형성 억제에 미치는 ROS의 영향

다음은 isoalantolactone에 의한 3D spheroid 세포사멸 유도에 미치는 ROS의 역할을 확인하기 위하여 ROS 생성 억제제인 NAC가 isoalantolactone에 의한 spheroid 형성 억제에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3A 및 3B의 결과는 spheroid 형성에서 각 시기별 spheroid 모양 및 부피 변화의 결과를 제시한 것으로서, NAC 단독 처리군에서는 spheroid 형성과 부피 변화에 유의적인 변화가 없었지만, isoalantolactone에 의한 spheroid 형성 붕괴는 NAC가 존재할 경우 현저하게 억제되었다. 특히 NAC가 존재하는 경우, isoalantolactone에 의해 사라진 증식성 세포 영역이 대조군 spheroid에서처럼 온전한 모양이 유지되면서 전체적인 모양 및 부피가 대조군 세포와 유사하였다. 아울러 증식성 세포 영역 부분에서 강하게 발현하였던 TUNEL 형광 강도가 NAC가 존재하는 조건에서는 현저하게 억제되었다(Fig. 3C). 이러한 결과를 정량적으로 평가하기 위하여 대조군, NAC 및 isoalantolactone이 단독 및 동시 처리된 조건에서 형성된 spheroid를 단일 세포로 해리시킨 후, DCF-DA 염색에 따른 유세포분석을 수행하였다. Fig. 4A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이, isoalantolactone이 단독 처리된 spheroid에서는 대조군에 비하여 ROS의 생성이 16배 정도 증가하였지만, NAC는 이러한 ROS의 생성을 현저하게 차단하였다. 아울러 isoalantolactone이 처리된 spheroid에서 분리된 annexin V-양성 세포의 빈도 또한 NAC의 존재 하에서는 유의적으로 감소하였다(Fig. 4C, 4D). 이러한 결과는 Hep3B 세포의 2D 조건에서처럼[17] 3D MTS 모델에서도 isoalantolactone에 의한 세포사멸 유도가 ROS 의존적인 현상임을 의미한다.

Isoalantolactone에 의한 3D spheroid의 형성 억제와 관련된 세포사멸 조절인자의 발현 변화에 미치는 ROS의 영향

이어서 isoalantolactone에 의한 spheroid 형성 과정에서 세포사멸 유도에 관여하는 인자들의 발현 변화와 ROS 생성 차단이 이들 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 잘 알려진 바와 같이 전형적인 세포사멸의 유도 경로는 세포사

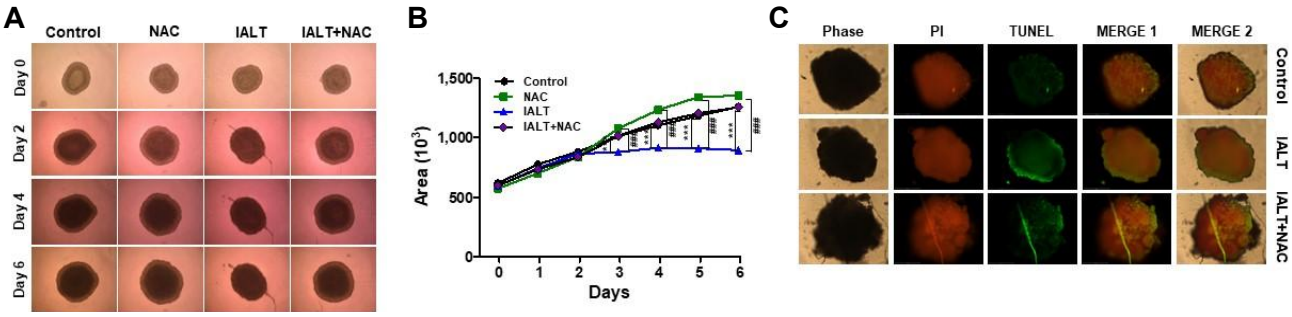

Fig. 3. Effect of ROS in inhibiting formation and inducing apoptosis by isoalantolactone in MTSs derived from Hep3B cells. Spheroids were formed for 3 days and treated with 5 μM isoalantolactone or pretreated with or without 20 mM NAC for 1 h and then treated with 5 μM isoalantolactone for the indicated days (A and B) or 6 days (C). (A) Images of representative spheroids obtained by a phase-contrast microscopy at each indicated time were presented. (B) Spheroid size was calculated using Image J software. Data were expressed as the mean ± SD ($^{***}p$<0.001 compared to untreated spheroids; $^{\#\#\#}p$<0.001 compared to 5 μM isoalantolactone-treated spheroids). (C) Representative fluorescence images of spheroids stained with PI and TUNEL apoptosis detection kit were acquired by fluorescence microscopy.

멸 수용체(death receptor, DR)가 관여하는 외인성 경로와 미토콘드리아 손상이 원인인 내인성 경로로 크게 구별된다[36, 42]. 인간 식도암세포에서 수행된 Lu 등[24]의 결과에 의하면, isoalantolactone은 대표적인 DR 중의 하나인 DR5의 발현을 증가시켰으며, DR5의 발현을 인위적으로 차단하였을 경우, isoalantolactone의 세포사멸 효과가 완화되었다. 그들의 결과는 isoalantolactone에 의해 암세포의 세포사멸에 외인성 세포사멸 경로가 관여함을 보여주는 대표적인 예이다. 그리고 isoalantolactone에 의한 Hep3B 세포의 세포사멸 유도에도 DR5뿐만 아니라 DR4의 발현도 증가하여[17], 외인성 세포사멸 경로가 isoalantolactone의 세포사멸 유도에 관여함이 입증되었다. 본 연구의 결과에 의하면 isoalantolactone이 처리된 spheroid에서도 DR4 및 DR5의 발현과 함께 Fas ligand와 결합하여 외인성 세포사멸의 개시를 초래하는 세포 표면의 사멸 수용체인 Fas의 발현[10, 23]도 증가되어(Fig. 4E) 이들 결과를 잘 뒷받침하여 준다.

한편, 미토콘드리아와 연관된 내인성 경로의 활성화는 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome *c*의 유리가 결정적으로 관여하며, cytochrome *c*의 유리는 세포사멸을 촉진하거나 억제하는 Bcl-2 family에 속하는 단백질들의 발현 변화 의존적으로 조절된다[36, 42]. Bcl-2 family에 속하는 단백질 중에서 Bax는 대표적인 세포사멸 유도 인자로서 그들의 발현 증가는 미토콘드리아 기공 형성(mitochondrial pore formation)을 유도하여 미토콘드리아 막 안정성을 방해함에 따라 cytochrome *c*의 유출을 촉진시키는 반면, Bcl-2와 같은 단백질은 이와 반대 역할을 한다[19, 42]. 유방암세포를 포함한 몇몇 암세포에서 isoalantolactone 유도 세포사멸에는 세포질에서 cytochrome *c*의 발현이 증대되었으며, 본 연구의 결과와 같이(Fig. 4E), 선행 결과에서도 Bcl-2에 대한 Bax의 상대적인 발현 증가가 동반되었다[2, 17, 21]. 아울러, 외인성 경로나 내인성 경로의 개시는 caspase cascade의 활성화를 통하여 세포사멸을 종결 짓는데[36, 42], 이러한 caspase 의존적 세포사멸의 종결은 caspase-3 및 caspase-7과 같은 효과기 caspase들의 활성에 의하여 세포 내 생존에 관여하는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)를 포함한 단백질들의 분해를 통하여 완성된다[19, 36]. 본 연구의 결과에서도 isoalantolactone이 처리된 spheroid에서 caspase-3이 활성화되었으며, 비록 단편화된 PARP의 발현은 관찰되지 않았지만, 총 PARP 단백질의 발현이 감소하였다(Fig. 4E). 이는 Hep3B 유래 spheroid에서 isoalantolactone에 의한 세포사멸에는 외인성 경로와 내인성 경로가 모두 관여함을 의미한다. 그러나 ROS의 생성을 차단한 경우, isoalantolactone에 의한 이러한 세포사멸 조절 인자들의 발현이나 활성 변화뿐만 아니라 spheroid에서 분리한 세포들의 세포 생존율 감소도 억제되었다(Fig. 4E-4G). 이는 isoalantolactone에 의한 spheroid의 견고성 저해가 ROS 의존적 외인성 경로와 내인성 경로의 동시 활성화에 따른 세포사멸 유도에 의한 것임을 보여주는 결과이다.

본 연구의 결과는 HCC Hep3B 세포 유래 3D MTS 모델에서 isoalantolactone에 의한 항암 활성이 ROS 의존적이었다는 2D 모델의 결과들을 잘 지지해 준다[5, 8, 14-17, 32]. 비록 이러한 결과가 Hep3B 세포를 이용한 이종이식 모델에서도 재현되는지는 확인이 되어야 하겠지만, 2D 모델에서의 결과가 3D MTS 모델에서도 확인이 되었음에 그 의미가 크다. 그러나 본 연구에서는 isoalantolactone에 의한 항암 활성에 관여하는 다양한 세포 내 신호전달 관련 연구는 수행되지 못하였다. 현재까지 2D 모델에서 알려진 isoalantolactone에 의한 세포사멸 유도에는 extracellular signal-regulated kinase 및 mitogen-activated protein kinase 경로가 관여하거나[14, 21, 25, 32, 40], 자가 포식성 세포

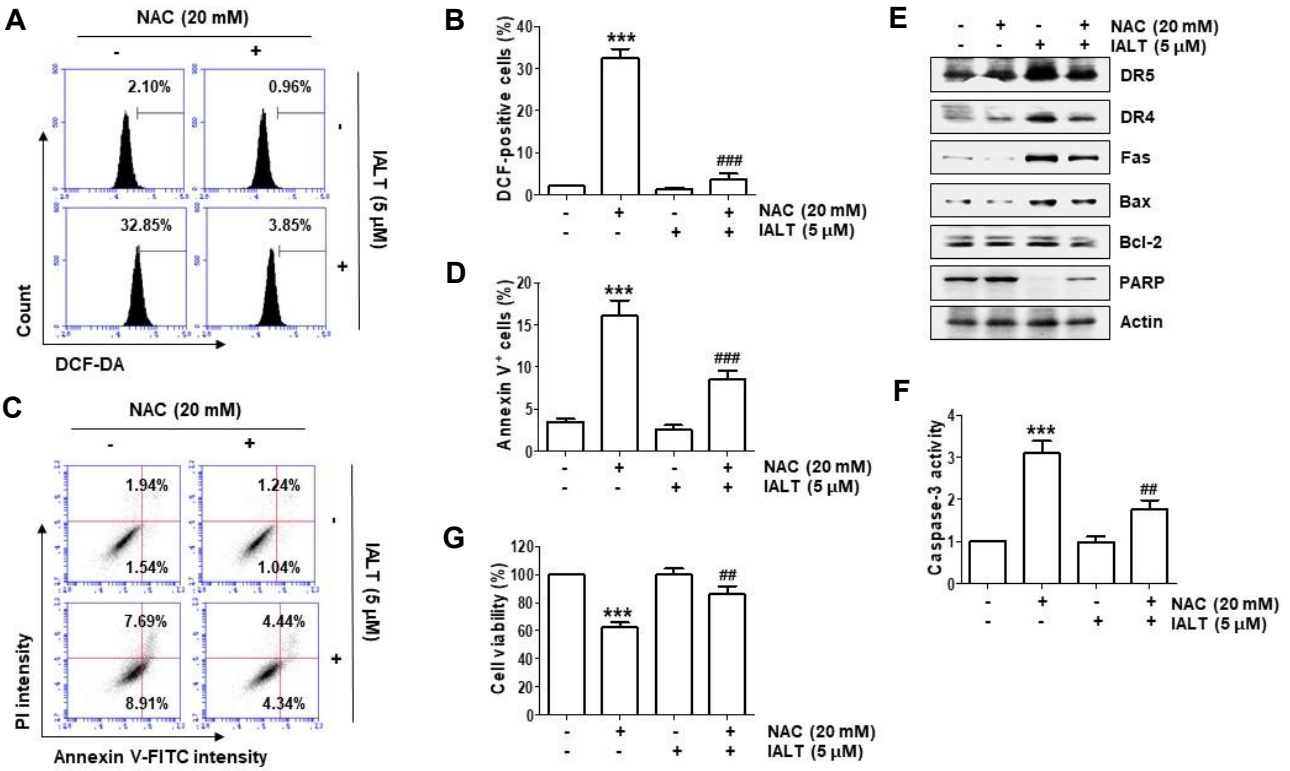

Fig. 4. The role of ROS in changes in the expression of apoptosis regulatory proteins, increased caspase-3 activity, and reduced cell survival by isoalantolactone in MTSs derived from Hep3B cells. Spheroids were formed for 3 days and treated with 5 μM isoalantolactone or pretreated with or without 20 mM NAC for 1 hr and then treated with 5 μM isoalantolactone for 6 days. Spheroids were dissociated into single cells with trypsin and then stained with DCF-DA (A and B) or annexin V/PI (C and D). (A and B) The levels of ROS production were determined using flow cytometry and representative profiles were shown (A), and the percentages of DCF-positive cells were shown as bars (B). (C and D) The frequencies of annexin V-positive cells were determined using flow cytometry and representative profiles were shown (A), and the percentages of apoptotic cells were indicated by bars (B). (E) Total spheroid lysates were prepared and the expression of the indicated proteins was detected by Western blot analysis using the ECL detection system. (F) Caspase-3 activity was measured using colorimetric substrates. (G) Cell viability of cells isolated from spheroids was assessed by MTT assay. (B, D. F and G) Data were expressed as the mean ± SD ($^{***}p<0.001$ compared to untreated spheroids; $^{\#\#}p<0.01$ and $^{\#\#\#}p<0.001$ compared to 5 μM isoalantolactone-treated spheroids).

죽음(autophagic cell death) 및 소포체 스트레스(endoplasmic reticulum stress) 등과 같은 다양한 세포 내 조절 과정의 부조화에 의하여 이루어지고 있다고 보고되었다[5, 20, 38]. 따라서 이종이식 모델에서의 연구와 함께 세포 내 신호 조절계의 역할이 추후 규명되어야 하며, 본 연구의 결과는 이를 위한 기초 자료로서의 활용성이 클 것이다.

감사의 글

이 성과는 정부(과학기술정보통신부 및 교육부)의 재원으로 한국연구재단 및 한국기초과학지원연구원 국가연구시설장비진흥센터의 지원을 받아 수행된 연구임 (No.RS-2023-00213236 및 2020R1A6C101A201).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Bordanaba-Florit, G., Madarieta, I., Olalde, B., Falcón-Pérez, J. M. and Royo, F. 2021. 3D cell cultures as prospective models to study extracellular vesicles in cancer. *Cancers* **13**, 307.
2. Cai, H., Meng, X., Li, Y., Yang, C. and Liu, Y. 2014. Growth inhibition effects of isoalantolactone on K562/A02 cells: Caspase-dependent apoptotic pathways, S phase arrest, and downregulation of Bcr/Abl. *Phytother. Res.* **28**, 1679-1686.
3. Castro, F., Pereira, C. L., Macedo, M. H., Almeida, A.,

Silveira, M. J., Dias, S., Cardoso, A. P., Oliveira, M. J. and Sarmento, B. 2021. Advances on colorectal cancer 3D models: The needed translational technology for nanomedicine screening. *Adv. Drug. Deliv. Rev*. **175**, 113824.
4. Chakraborty, E. and Sarkar, D. 2022. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma (HCC). *Cancers (Basel)* **14**, 2798.
5. Chen, W., Li, P., Liu, Y., Yang, Y., Ye, X., Zhang, F. and Huang, H. 2018. Isoalantolactone induces apoptosis through ROS-mediated ER stress and inhibition of STAT3 in prostate cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 309.
6. Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. B. and Sarkar, D. 2021. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Adv. Cancer Res.* **149**, 1-61.
7. Cui, X., Hartanto, Y. and Zhang, H. 2017. Advances in multicellular spheroids formation. *J. R. Soc. Interface*. **14**, 20160877.
8. Di, W., Khan, M., Rasul, A., Sun, M., Sui, Y., Zhong, L., Yang, L., Zhu, Q., Feng, L. and Ma, T. 2014. Isoalantolactone inhibits constitutive NF-κB activation and induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in osteosarcoma U2OS cells through mitochondrial dysfunction. *Oncol. Rep.* **32**, 1585-1593.
9. Djordjevic, B. and Lange, C. S. 2006. Cell-cell interactions in spheroids maintained in suspension. *Acta. Oncol*. **45**, 412-420.
10. Green, D. R. 2022. The death receptor pathway of apoptosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **14**, a041053.
11. Hamilton, G. and Rath, B. 2019. Applicability of tumor spheroids for *in vitro* chemosensitivity assays. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol*. **15**, 15-23.
12. Han, S. J., Kwon, S. and Kim, K. S. 2021. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell Int.* **21**, 152.
13. Heredia-Soto, V., Redondo, A., Kreilinger, J. J. P., Martínez-Marín, V., Berjón, A. and Mendiola, M. 2020. 3D culture modelling: An emerging approach for translational cancer research in sarcomas. *Curr. Med. Chem*. **27**, 4778-4788.
14. Hu, F. and Yang, P. 2022. Isoalantolactone exerts anticancer effects on human HEC-1-B endometrial cancer cells via induction of ROS mediated apoptosis and inhibition of MEK/ERK signalling pathway. *Acta. Biochim. Pol*. **69**, 453-458.
15. Huang, H., Li, P., Ye, X., Zhang, F., Lin, Q., Wu, K. and Chen, W. 2021. Isoalantolactone increases the sensitivity of prostate cancer cells to cisplatin treatment by inducing oxidative stress. *Front. Cell. Dev. Biol.* **9**, 632779.
16. Khan, M., Ding, C., Rasul, A., Yi, F., Li, T., Gao, H., Gao, R., Zhong, L., Zhang, K., Fang, X. and Ma, T. 2012. Isoalantolactone induces reactive oxygen species mediated apoptosis in pancreatic carcinoma PANC-1 cells. *Int. J. Biol. Sci*. **8**, 533-547.
17. Kim, M. Y., Lee, H., Ji, S. Y., Kim, S. Y., Hwangbo, H., Park, S. H., Kim, G. Y., Park, C., Leem, S. H., Hong, S. H. and Choi, Y. H. 2021. Induction of apoptosis by isoalantolactone in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells through activation of the ROS-dependent JNK signaling pathway. *Pharmaceutics* **13**, 1627.
18. Kulik, L. and El-Serag, H. B. 2019. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **156**, 477-491.
19. Lalier, L., Vallette, F. and Manon, S. 2022. Bcl-2 family members and the mitochondrial import machineries: The roads to death. *Biomolecules* **12**, 162.
20. Li, J., Zhu, P., Chen, Y., Zhang, S., Zhang, Z., Zhang, Z., Wang, Y., Jiang, X., Lin, K., Wu, W., Mo, Z., Sze, S. C. W. and Yung, K. K. L. 2022. Isoalantolactone induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy in colorectal cancer cells. *Front. Pharmacol.* **13**, 903599.
21. Li, Z., Qin, B., Qi, X., Mao, J. and Wu, D. 2016. Isoalantolactone induces apoptosis in human breast cancer cells *via* ROS-mediated mitochondrial pathway and downregulation of SIRT1. *Arch. Pharm. Res.* **39**, 1441-1453.
22. Lim, S. S., Kim, J. R., Lim, H. A., Jang, C. H., Kim, Y. K., Konishi, T., Kim, E. J., Park, J. H. and Kim, J. S. 2007. Induction of detoxifying enzyme by sesquiterpenes present in *Inula helenium*. *J. Med. Food*. **10**, 503-510.
23. Liu, Y., Li, X., Zhou, X., Wang, J. and Ao, X. 2022. FADD as a key molecular player in cancer progression. *Mol. Med.* **28**, 132.
24. Lu, Z., Zhang, G., Zhang, Y., Hua, P., Fang, M., Wu, M. and Liu, T. 2018. Isoalantolactone induces apoptosis through reactive oxygen species-dependent upregulation of death receptor 5 in human esophageal cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **352**, 46-58.
25. Lv, X., Lin, Y., Zhu, X. and Cai, X. 2023. Isoalantolactone suppresses gallbladder cancer progression *via* inhibiting the ERK signalling pathway. *Pharm. Biol*. **61**, 556-567.
26. Mirzayans, R. and Murray, D. 2020. Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies? *Int. J. Mol. Sci*. **21**, 9090.
27. Mitrakas, A. G., Tsolou, A., Didaskalou, S., Karkaletsou, L., Efstathiou, C., Eftalitsidis, E., Marmanis, K. and Koffa, M. 2023. Applications and advances of multicellular tumor sheroids: Challenges in their development and analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 6949.
28. Murad, H. Y., Bortz, E. P., Yu, H., Luo, D., Halliburton, G. M., Sholl, A. B. and Khismatullin, D. B. 2019. Phenotypic alterations in liver cancer cells induced by mechanochemical disruption. *Sci. Rep*. **9**, 19538.
29. Namekawa, T., Ikeda, K., Horie-Inoue, K. and Inoue, S. 2019. Application of prostate cancer models for preclinical study: Advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells. *Cells* **8**, 74.
30. Park, C., Cha, H. J., Kim, D. H., Kwon, C. Y., Park, S. H., Hong, S. H., Bang, E., Cheong, J., Kim, G. Y. and Choi, Y. H. 2023. Fisetin protects C2C12 mouse myoblasts from oxidative stress-induced cytotoxicity through regulation of the Nrf2/HO-1 signaling. *J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 591-599.
31. Phung, Y. T., Barbone, D., Broaddus, V. C. and Ho, M.

2011. Rapid generation of *in vitro* multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy. *J. Cancer* **2**, 507-514.
32. Rasul, A., Di, J., Millimouno, F. M., Malhi, M., Tsuji, I., Ali, M., Li, J. and Li, X. 2013. Reactive oxygen species mediate isoalantolactone-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Molecules* **18**, 9382-9396.
33. Sagnelli, E., Macera, M., Russo, A., Coppola, N. and Sagnelli, C. 2020. Epidemiological and etiological variations in hepatocellular carcinoma. *Infection* **48**, 7-17.
34. Samant, H., Amiri, H. S. and Zibari, G. B. 2021. Addressing the worldwide hepatocellular carcinoma: Epidemiology, prevention and management. *J. Gastrointest. Oncol.* **12**, S361-S373.
35. Singh, K. and Gautam, P. K. 2023. Macrophage infiltration in 3D cancer spheroids to recapitulate the TME and unveil interactions within cancer cells and macrophages to modulate chemotherapeutic drug efficacy. *BMC Cancer* **23**, 1201.
36. Singh, P. and Lim, B. 2022. Targeting apoptosis in cancer. *Curr. Oncol. Rep*. **24**, 273-284.
37. Vadivelu, R. K., Kamble, H., Shiddiky, M. J. A. and Nguyen, N. T. 2017. Microfluidic technology for the generation of cell spheroids and their applications. *Micromachines* **8**, 94.
38. Weng, Z., Gao, H., Hu, J., Fan, Y., Wang, H. and Li, L. 2016. Isoalantolactone induces autophagic cell death in SKOV3 human ovarian carcinoma cells *via* upregulation of PEA-15. *Oncol. Rep*. **35**, 833-840.
39. Wu, Z. C., Hui, X. G., Huo, L., Sun, D. X., Peng, W., Zhang, Y., Li, X. B., Ma, T., Li, W. H., Liang, J. and Sun, Z. Q. 2022. Antiproliferative effects of isoalantolactone in human liver cancer cells are mediated through caspase-dependent apoptosis, ROS generation, suppression of cell migration and invasion and targeting Ras/Raf/MEK signalling pathway. *Acta. Biochim. Pol.* **69**, 299-304.
40. Xie, Z., Xu, J., Xiao, D., Lei, J. and Yu, J. 2023. Dual regulation of Akt and glutathione caused by isoalantolactone effectively triggers human ovarian cancer cell apoptosis. *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **55**, 62-71.
41. Xu, L., Sun, Y., Cai, Q., Wang, M., Wang, X., Wang, S. and Ni, Z. 2023. Research progress on pharmacological effects of isoalantolactone. *J. Pharm. Pharmacol*. **75**, 585-592.
42. Yang, Y., An, Y., Ren, M., Wang, H., Bai, J., Du, W. and Kong, D. 2023. The mechanisms of action of mitochondrial targeting agents in cancer: Inhibiting oxidative phosphorylation and inducing apoptosis. *Front. Pharmacol.* **14**, 1243613.
43. Younossi, Z. M., Wong, G., Anstee, Q. M. and Henry, L. 2023. The global burden of liver disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1978-1991.
44. Zhang, C., Huang, L., Xiong, J., Xie, L., Ying, S., Jia, Y., Yao, Y., Song, X., Zeng, Z. and Yuan, J. 2021. Isoalantolactone inhibits pancreatic cancer proliferation by regulation of PI3K and Wnt signal pathway. *PLoS One* **16**, e0247752.

초록 : ROS 의존적 세포사멸 유도를 통한 isoalantolactone의 인간 간세포암종 Hep3B 세포 유래 다세포 종양 spheroid 형성의 억제

김민영[1,2] · 손변우[3] · 이상엽[4] · 박상은[3] · 홍수현[1,2] · 홍상훈[3] · 김은정[5] · 최영현[1,2*] · 황보현[1,2*]

([1]동의대학교 미세플라스틱 매개 질환 제어 기초연구실(BRL) 및 항노화연구소, [2]동의대학교 한의과대학 생화학교실, [3]동의대학교 한의과대학 한방내과, [4]동의대학교 한의과대학 원전학교실, [5]경북대학교 자연과학대학 생물학과)

항암 활성 연구를 위한 최적의 모델로서 2-D culture 모델은 여전히 널리 사용되고 있으나, 종양 환경에 더 잘 근접할 수 있는 3D MTS 모델은 시험관 내 모델 연구와 동물 모델 연구 간의 격차를 해소하기 위한 대안이 될 수 있다. Isoalantolactone은 목향(木香: Elecampane, *Inula helenium* L.)을 포함한 약용 식물에서 발견되는 sesquiterpene lactone 중의 하나로서 항암 활성을 포함한 다양한 약리학적 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 HCC Hep3B 세포에서 유래된 2D 모델에서 관찰된 isoalantolactone의 항암 활성이 3D MTS 모델에서도 재현될 수 있는지를 조사하였다. 우리들의 결과에 의하면 isoalantolactone은 처리 농도 의존적으로 MTSs 형성을 억제하였으며, ROS 생성의 증가를 동반하였다. 특히 isoalantolactone 처리 및 배양 시간이 증가하면서 증식성 세포 영역이 세포사멸이 유발된 세포로 대체되었다. 또한, MTSs에서 isoalantolactone은 DR 관련 단백질들의 발현과 caspase-3의 활성을 증가시켰고, Bax/Bcl-2 발현 비율 및 총 PARP 단백질의 발현은 감소시켰다. 그러나 ROS의 생성을 인위적으로 차단하였을 경우, isoalantolactone에 의한 이러한 변화들이 모두 차단되면서 MTSs 구성 세포들의 세포 생존율을 회복시켰다. 따라서 본 연구의 결과는 isoalantolactone에 의한 Hep3B 세포 유래 MTSs의 세포사멸 유도는 외인성 및 내인성 경로의 활성화를 통하여 이루어지며 이는 ROS 의존적임을 시사한다.