



Original Article / 원저

선복화의 2D 및 3D 세포배양모델에서 HT-1080 인간 섬유육종 세포의 세포주기정지 및 자가포식 유도 효과

김민영¹, 최영현^{1,2,3}, 홍수현^{1,2,3*}

¹동의대학교 항노화연구소, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실,
³동의대학교 한의학연구소

Inulae Flos Induces Cell Cycle Arrest and Autophagy of HT-1080 Human Fibrosarcoma Cells in 2D and 3D Cell Culture Model

Min Young Kim¹, Yung Hyun Choi^{1,2,3}, Su Hyun Hong^{1,2,3*}

¹Anit-Aging Research Center, Dong-eui University
²Department of Biochemistry, Dong-eui University Collge of Korean Medicine
³Research Institute of Korean Medicine, Dong-eui University

ABSTRACT

Objective : Inulae Flos (IF) has been used to treat arthritis, sever furuncle, fear and palpitation, vomiting, stroke, asthma and cough in Korean Medicine. Although the anticancer activity of IF has been reported, the molecular mechanism is still not well understood. In this study, we investigated the growth inhibitory activity of an ethanol extract of IF in HT-1080 human fibrosarcoma cells and its underlying mechanisms using two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culture system.

Methods : HT-1080 cells were cultured with IF for 9 days in 3D cell culture. To check an inhibition of cell proliferation by IF, MTT assay was performed. DNA contents were measured using flow cytometry. Western blotting was used to evaluate the regulation of cell cycle- and autophagy-related proteins. Acridine orange staining was performed to confirm autophagy, and DCF-DA staining was performed to confirm the occurrence of ROS.

Results : IF controlled a spheroid formation and decreased a cell viability in 3D cell culture. IF-induced cell proliferation inhibition was associated with a distinct increase of S and G2/M phase cell distribution in 2D cell culture. In addition, IF significantly induced autophagy and generated reactive oxygen species (ROS). Interestingly, IF-induced cell cycle arrest and autophagy were recovered after pre-treatment of N-acetyl-L-cysteine, ROS scavenger.

Conclusion : Our results indicate that IF induced ROS-mediated cell cycle arrest and autophagy and it may potentially useful for human fibrosarcoma treatment.

Key words : Autophagy, cell cycle arrest, Inulae Flos, Reactive oxygen species, three-dimensional cell culture

I. 서론

최근 2D 세포 배양법의 단점을 극복하면서 생체와 유사한 환경에서의 세포 실험을 위해 3D 세포배양법의 활용이 증가하고 있다. 3D 세포 배양에서 세포는 2D 세포 배양에 비해서 조직과 유사한 구조로 성장하므로 세포 증식, 분화, 운동성 및 스트레스 반응과 같은 복잡한 생물학적 과정을 연구하게 적합하다고 알려져 있다¹⁾. 2D 세포 배양을 하면 세포가 단층으로 편평하고 길게 자라는 반면, 3D 세포 배양을 하면 세포는 응집되어 구형(spheroid)을 이루게 되어 생체와 유사한 유전자 및 단백질 발현 양상을 보인다²⁾. 하지만 3D 세포 배양은 배양 시간이 오래 걸리고, 세포에 따라 배양 조건 설정이 어려우며, 비용이 많이 들고 재현성이 떨어지는 단점이 있다. 최근 3D 세포 배양법이 발전함에 따라 항암제 효과 검증, 조직 재생 능력 조사, 개인 맞춤 약물 개발 등으로의 활용을 넓혀가고 있는 실정이다³⁾.

본 연구에 사용된 선복화(*Inulae Flos*)는 국화과에 속한 금불초(*Inula Britannica* var. *japonica*)의 꽃을 말린 것으로, 이명으로는 금불초, 금전화, 하국, 야유화 등이 있다⁴⁾. 선복화는 전통적으로 건담, 행수, 진해, 건위하는 효과가 있어 기침, 가래, 딸꾹질, 트림, 천식, 만성기관지염, 소화불량 등에 사용되어 왔다^{5,6)}. 최근 실험적 연구에서 항염증, 항산화 효과가 보고되고 있고 이는 선복화에 함유되어 있는 patulitrin, neptitrin, kaempferol과 같은 플라보노이드에 의한 효과로 알려져있다^{7,8)}. 다른 연구에서는 선복화 추출물 투여가 염산과 에탄올로 유도된 위궤양을 보호하였으며, 알러지성 천식에서 PI3K/AKT/MEK/ERK 신호전달기전을 통해 염증 및 점액분비를 감소시켰다^{9,10)}. 또한, 유방암, 폐암, 대장암 및 자궁경부암에서의 항암 효과도 실험적으로 밝혀졌다^{6,7,11,12)}. 선복화의 독성 실험에서 고용량 단회투여는 안전한 것으로 나타났지만, 일부 실험에서 독성과 혈소판 감소증과 같은 부작용이 보고되기도 하여 배합 처방으로 임상에서 사용될 때

주의가 필요하다^{5,8)}.

본 연구에서는 실험적으로 여러 종양에서 항암 효과를 보인 선복화의 에탄올 추출물을 사용하여 HT-1080 인간 섬유육종 세포에서의 항암 효과를 조사해보았다. 기존에 주로 활용되는 2D 세포 배양 방법이 아닌 3D 세포 배양 방법을 활용하기 위해 HT-1080 세포를 기질을 사용하지 않고 바닥이 둥근 plate에서 성장시키는 3D 세포 배양 조건을 설정하였고, 이 때 선복화 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 조사하여 보았다. 또한, 세포 성장 억제와 관련된 기전 연구를 위해 2D 세포 배양으로 선복화 추출물에 의한 HT-1080 세포의 세포 성장 억제가 세포주기 정지 및 자가포식과 관련성이 있음을 발견하였기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Dimethylsulfoxide (DMSO), crystal violet, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA), N-acetylcysteine (NAC), acridine orange (AO)는 Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) 용액은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였고, Cycletest™ plus DNA reagent kit는 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였다. 세포주기 및 자가포식 관련 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, 나머지 1차 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 선복화 에탄올 추출물의 준비

본 연구에 사용된 선복화(*Inula Flos*)는 (주)대한생약 (Imsil, Korea)에서 구입하여 흐르는 물에 세척한 후 그늘에서 24시간 동안 건조시켰다. 상기 선복화에 70% 주정을 용매로 이용하여 30분간 초음파 추출 및 15분

*Corresponding author: Su Hyun Hong, Department Molecular Biology, College of Korean Medicine, Dong-eui university, 52-57 Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-890-3334, Fax : +82-51-890-3333, E-mail : hongsh@deu.ac.kr

•Received : May 4, 2024 / Revised : May 22, 2024 / Accepted : May 29, 2024

휴지기 과정을 8회 반복하여 시행하였다. 필터를 사용하여 상층액만 분리하여 건조하고, 동결건조시켜 남아있는 주정을 모두 제거하여 분말 형태의 선복화 70% 에탄올 추출물을 수득하였다. 획득된 상기 분말은 100 mg/ml 농도로 DMSO에 용해시킨 후 이를 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

3. 세포배양

본 연구에 사용된 HT-1080 세포는 사람 폐육종 세포주인 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양받았다. HT-1080 세포는 RPMI-1640 배지(Welgene, Daegu, Korea)에 1% penicillin-streptomycin (Gibco, USA)과 10% 소태아혈청(FBS, Gibco, USA)을 포함하여 37° C로 5% CO₂가 공급되는 세포배양기에서 배양하였다.

4. 3D 세포 배양법에서의 구형 형태 관찰 및 세포 생존율 측정

선복화 추출물이 HT-1080 세포가 3D 세포배양법을 통해 구형을 형성할 때 세포 증식에 미치는 영향을 파악하기 위하여 Cell Counting Kit-8 (CCK8, Dojindo Laboratories, JAPAN)를 사용하였다. HT-1080 세포를 Corning®96 Well Spheroid Microplates에 7x10³ cells/ml씩 분주하고, 72시간 동안 37° C로 5% CO₂가 공급되는 세포배양기에서 구형(spheroid)을 형성시켰다. 그 후 상기 선복화 추출물을 75, 150 µg/mL 농도로 각 well에 200 µl로 처리한 후 6일 동안 배양하였다. 배지는 이를 간격으로 교체하고 이 때 같은 농도의 선복화 추출물을 처리하였고, 구형의 형태를 매일 현미경(Call Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다. 세포 생존율을 측정하기 위해 CCK 용액을 첨가하여 2시간 동안 배양하고, 배양액을 분광광도계 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 460 nm에서 측정하였다.

5. 세포주기분석

선복화 추출물이 세포 주기 진행을 억제하는지를 알아보기 위하여 유세포분석기(BD Biosciences)로 세포 주기 분포를 측정하였다. 간략하게, HT-1080 세포(2x10⁵cells/ml)를 6 well plate에 분주하고, 상기 선복화 추출물을 50, 100, 150 µg/mL 및 DMSO 0.15% 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. Cycletest™ plus DNA reagent kit를 회사의 지침에 따라 적용시킨 후

유세포분석기를 사용하여 세포 주기를 분석하였다.

6. 단백질 발현 변화 관찰

선복화 추출물을 정해진 농도와 시간으로 처리한 후 HT-1080세포를 PBS로 수세한 후 단백질을 정량하였다. 그 후 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였다. Polyvinylidene difluoride membrane으로 전이시킨 다음, 5% skim milk를 30분간 각 항체를 처리하여 4°C에서 하룻밤동안 반응시킨 후 PBS-T (PBS with Tween 20)를 사용하여 10분간 3번 세척하였다. 그 후 2차 항체를 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 PBS-T로 다시 10분간 3번 세척하고 암실에서 ECL 용액을 뿌려서 형광발색을 시킨단백질 밴드를 chemiluminescence system (Fusion Solo system, Vilber Lourmat, Collégien, France)를 이용하여 시각화하였다.

7. 아크리딘 오렌지(acridine orange, AO) 염색

선복화 추출물에 의해 자가포식이 유도되었는지를 시각적으로 판단하기 위하여 AO 염색을 시행하였다. HT-1080 세포를 6 well에 분주하고 24시간 안정화시킨 후 선복화 추출물과 DMSO를 24시간 동안 처리하였다. 시약이 처리된 HT-1080 세포에 AO를 10 µg/mL농도로 처리하여 15분 동안 반응시킨 후 PBS로 2회 세척하고 3.7% paraformaldehyde로 고정하였다. 염색된 세포는 형광현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다. 또한, 정량적 변화를 관찰하기 위하여 AO가 염색된 세포를 유세포분석기(BD Biosciences)를 통해 형광 발색 정도를 측정하였다.

8. 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 형광 염색

선복화 추출물에 의해 발생한 ROS의 변화량을 시각적으로 확인하기 위하여 형광 염색법을 시행하였다. 6 well에 안정화시킨 HT-1080 세포에 선복화 추출물을 3시간 동안 처리한 후 H₂DCF-DA를 10 µM농도로 15분 동안 처리한 후 형광현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다. NAC (10 mM)은 ROS 발생량을 측정하기 위한 양성 대조군으로 1시간 선처리하였다.

9. 통계

실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표시되었으며,

GraphPad Prism 5.03 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 처리군 사이의 통계적 유의성을 one-way analysis of variance와 Tukey's post hoc 테스트로 확인하였다. p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적 유의성을 나타내었다.

III. 결과

1. 3D 세포 배양법에서 선복화 추출물이 HT-1080 세포 증식에 미치는 영향

HT-1080 세포의 3D 세포 배양법으로 구형 형성을 시키는 방법의 조건 설정을 위해 본 연구는 96-well ultra low attachment plate를 사용하였다. Plate에 분주하는 HT-1080 세포의 양과 시간을 결정하기 위해 수차례 실험을 진행하여, 7×10^3 cells/ml의 세포를 넣어준 뒤 48시간 동안 정도 배양하면 세포가 모여서 적절한 형태의 구형을 형성하는 것을 알게 되었다. 이에 선복화 추출물은 세포를 분주한 지 3일째 되는 날 75 및 150 ug/ml의 농도로 처리하였다. 그 후 세포가 3일에 한번씩 배지를 교체해주면서 선복화 추출물을 같은 농도로 처리하여 세포가 구형 형태로 자라는 것을 6일동안 확인하였다. Fig. 1A에서 보여지는 바와 같이, 선복화 추출물을 처리하지 않은 군에서는 구형이 잘 응집된 채로 성장하는 반면에 선복화 추출물을 처리한 경우에는 세포의 응집이 느슨해지면서 구형의 크기가 커지는 경향을 보였다. 선복화 추출물에 의한 세포 생존율의 변화를 알아보기 위해 세포를 배양시킨 지 9일째 되는 날에 CCK 분석법을 시행하였다. 선복화 추출물의 처리는 HT-1080 세포의 증식을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 이상의 결과는 3D 세포 배양법에서 선복화 추출물을 처리하면 구형 형성을 방해하고 세포의 성장을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

2. 선복화 추출물이 세포주기 진행에 미치는 영향

3D 세포 배양법에서 나타난 선복화 추출물의 세포 성장 억제가 세포주기 진행에도 관련이 있는지를 알아보기 위하여 2D 세포 배양법으로 선복화 추출물을 50, 100 및 150 ug/ml의 농도로 24시간 동안 처리하여 세포주기 조절인자의 발현 변화를 조사하였다. 유세포분석기를 이용하여 선복화 추출물이 농도별로 처리된 세포의 핵 내 DNA 양을 상대적으로 비교하여 각각의 세포주기에 분포된 세포의 수를 분석하였다. 그림

2에서 나타난 바와 같이, 선복화 추출물이 처리되지 않은 군에서는 G1/G0기에 속하는 세포가 57.86%로 가장 많았고, S기와 G2/M기에 속한 세포는 각각 17.04%와 25.10%였다. 그러나 선복화 추출물의 처리 농도가 증가할수록 G1/G0기에 속한 세포의 수는 확연히 떨어지고, S기와 G2/M에 속한 세포의 수는 농도 의존적으로 증가하였다. 이러한 결과는 선복화 추출물 처리에 의한 HT-1080 세포의 성장 억제가 세포주기 조절과 연관이 있는 것을 보여준다.

3. 선복화 추출물의 세포주기 관련 단백질 발현에 미치는 영향

선복화 추출물에 의해 나타난 세포주기 분포 변화를 Western blotting을 통하여 관련 단백질들의 발현이 조절되는지를 관찰하였다. 사이클린은 cyclin-dependent kinase (CDK)와 복합체를 형성하여 세포주기를 조절한다¹³⁾. 그림 3A에서 나타난 바와 같이, 사이클린 B1은 선복화 추출물의 농도가 증가할수록 뚜렷하게 증가하는 경향을 보였다. 반면, 사이클린 E는 선복화 추출물을 150 ug/ml의 농도로 처리하였을 때 급격하게 감소하였다. 사이클린 G1의 경우 50 ug/ml 농도에서 증가하기 시작하여 150 ug/ml 농도에서 급격하게 증가하였다. Rb는 대표적인 종양 억제 유전자로 인산화된 Rb는 E2F와 분리되어 G1기에서 S기로 세포주기가 진행되도록 한다¹⁴⁾. 그림 3B에서 보이듯이, 농도 의존적으로 Rb와 E2F의 발현을 감소하였다. 세포주기의 음성 조절자인 CDK 억제자로 알려진 p53, p27, p21은 농도 의존적으로 증가하였다. G2기에서 M기로 세포주기의 진행은 cell division cycle 25c (cdc25c)의 인산화에 의한 cdc2와 사이클린 B의 복합체에 의해서 조절된다¹⁵⁾. 선복화 추출물 처리는 cdc25c의 발현을 확연히 감소시켰고 이로 인해 사이클린과 CDK의 결합이 이루어지지 않아 G2/M기로 세포주기 진행되지 않았음을 알 수 있다. 이상의 결과들은 선복화 추출물을 HT-1080 세포에 처리하면 세포주기 조절에 관여하는 여러 단백질들을 유기적으로 변화시켜 S기와 G2/M기에 세포주기 분포가 증가하는 것을 나타낸다.

4. 선복화 추출물의 자가포식 유도 효과

HT-1080 세포에 선복화 추출물을 처리하면 세포질 내에 다수의 공포가 형성되는 것이 발견되었다. 이 공포가 자가포식(autophagy)과 관련 있는가를 조사하기 위해 자가포식과 연관 있는 단백질들의 발현 변화를

조사하였다. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)는 자가포식소체(autophagosome)의 이중막이 형성될 때 지질화되면서 LC3II로 변환되는 자가포식 유도를 확인하기 위한 핵심 단백질로 활용된다¹⁶⁾. 선복화 추출물을 HT-1080 세포에 농도별 및 시간별로 처리하면 LC3 단백질의 변화가 확연하게 증가하였다. 또한 자가 포식 유도되면 증가하는 것으로 알려져 있는 p62와 autophay-related gene (ATG) 7의 발현은 높아졌으며, 자가포식 작용을 억제하는 mTOR의 인산화는 감소하였다. 음성 대조군으로 사용된 DMSO는 이상의 단백질의 변화에 영향을 주지 않았다(Fig. 4A). Acridine orange (AO)는 세포를 투과할 수 있는 초록색 형광물질로 자가용해소체(autolysosome)와 같은 산성 소포 기관에서 붉은색으로 색이 변하게 된다. 이런 특징으로 인해 자가포식의 유도를 확인하는 쉽고 신뢰성 있는 검사법으로 널리 활용되고 있다¹⁷⁾. Fig. 4B에서 보여지는 바와 같이, 선복화 추출물을 처리하면 농도의존적으로 붉은 색으로 변한 AO의 발현이 증가되었다. 또한, 이를 정량적으로 측정하기 위해 AO로 염색한 세포를 유세포 분석기로 분석하였을 때도 선복화 추출물의 처리는 AO의 붉은색을 증가시켰고, 음성 대조군으로 사용된 DMSO는 AO의 변색에 영향을 주지 않았다. 이러한 실험 결과는 선복화 추출물을 HT-1080 세포에 처리하면 자가포식을 뚜렷하게 유도함을 보여주는 결과이다.

5. 선복화 추출물에 의해 발생한 ROS가 자가포식 유도와 세포주기 정지에 미치는 영향

많은 선행 연구들에서 한약재 추출물 및 그 유효성분들이 HT-1080 세포 내의 ROS 발생을 증가시킨다는 보고가 있었다¹⁸⁻²⁰⁾. 이에 선복화 추출물을 HT-1080 세포에 처리하였을 때도 세포 내 ROS 발생이 유도되는지를 알아보기 위해 DCF-DA로 염색하여 형광 현미경을 통해 관찰하였다. 선복화 추출물을 3시간 동안 처리하면 DCF-DA에 의해 초록색을 염색되는 ROS의 발생이 확연히 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 ROS 소거제로 사용되는 NAC의 처리로 소실되었다(Fig. 5A). NAC의 처리는 선복화 추출물에 의해 증가되었던 LC3II와 p62의 발현을 되돌렸으며(Fig. 5B), OA 염색으로 증가하였던 붉은색도 NAC의 처리에 의해 감소하였다(Fig. 5C). 흥미롭게도, NAC의 처리는 세포주기 조절인자들인 cdc25c, cyclin B1, E2F4의

발현을 대조군의 유사한 수준으로 회복시켰으며, 세포주기 정지도 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 선복화 추출물에 의해 유도된 자가포식과 세포주기 정지가 ROS 발생과 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

IV. 고찰

선복화 추출물 및 포함되어 있는 생리활성 물질이 여러 암 세포에서 세포 성장을 억제하고 세포사멸을 일으킨다는 보고는 있었지만 세포주기를 조절하고 자가포식을 일으킨다는 연구는 아직 없었다. 이에 이번 연구에서는 HT-1080 사람 폐육종세포에서 선복화 추출물의 효과 및 관련 기전에 대한 연구를 진행하였다. 세포에서 다양한 스트레스 자극이나 복제로 인해 DNA 손상이 발생되면 DNA 손상 관문이 활성화되어 세포주기의 정지가 나타난다²¹⁾. 세포주기의 진행은 사이클린과 CDK의 결합에 의해서 조절된다¹³⁾. 세포주기 정지는 세포내 DNA 손상이 수선하기 어려운 상태임을 나타낸다²²⁾. 종양억제유전자인 p53이 활성화되면 하위 경로에 있는 p27과 p21의 활성화시키고 이는 정상적인 세포주기가 진행되는 것을 억제한다²³⁾.

이전 연구들에서 약물에 의해서 세포주기 변화가 유도된 경우 S기나 G2/M기에 한정되어 나타나는 경우가 많이 보고되었으나, 선복화 추출물에 의해서 두 세포주기 정지가 동시에 나타났다. S기 정지가 좀 더 낮은 농도에서부터 뚜렷하게 나타나서 지속적으로 증가하면서 G2/M기 세포도 농도의존적으로 증가하는 흥미로운 결과가 도출되었다. 이로 인해 세포주기를 조절하는 사이클린을 비롯한 단백질들의 발현이 다양하게 나타났다. CDK 억제자인 p53, p27, p21의 발현은 농도가 증가할수록 확연하게 높아지는 것으로 보아 사이클린과 CDK의 결합체 형성을 억제하여 세포주기 진행을 방해하는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서는 선복화 추출물을 농도별로 처리하여 세포주기 분포 변화를 측정해보았는데 선복화 추출물 처리시간을 3, 6, 12, 24 시간으로 시간별로 처리하여 세포주기 분포 변화 및 관련 단백질의 발현 양상을 조사해보면 시간에 따른 변화가 좀 더 명확하게 파악될 수 있을 것이라고 생각된다.

세포주기 정지와는 별개로 이번 실험에서 선복화 추출물이 자가포식을 확연하게 유도하는 것을

관찰하였다. 자가포식은 대사성 항상성을 유지하고 단백질과 세포소기관의 정상적인 조절을 위해 세포내 물질들을 포획하고 분해하고 재사용하는 과정이다²⁴. 자가포식과 p53은 기능적으로 중요하게 연결되어 있다. DNA 손상, 산화적 스트레스 등에 반응하여 증가한 p53은 자가포식을 활성화시키고, 자가포식은 다시 p53의 발현을 증가시키는 선순환고리를 형성한다²⁵. 인간 상피세포에서 p53에 의해 활성화된 자가포식은 발암적 변형과 종양 형성을 억제한다. p53은 세포질에 분포되어 있을 경우 자가포식을 억제제로서도 작용하고, ATG7이 p53의 활성을 억제하고 p53은 세포자멸사를 유도하기도 한다^{26,27}. 본 실험에서 선복화 추출물 100 ug/ml의 농도에서부터 p53의 발현 변화와 자가포식이 뚜렷하게 유도되는 것으로 보아 p53이 자가포식을 촉진하고 자가포식이 p53의 활성을 증가시키는 작용을 하는 것으로 보여진다. 선복화 추출물을 시간별로 처리하여 p53의 인산화 정도 및 핵으로의 전이를 추가로 조사하여 선복화 추출물의 시간에 따른 세포주기 정지 및 자가포식과의 시간적 연관성을 명확히 하는 연구가 추후 진행되어야 할 것으로 생각된다.

이번 연구에서 설정한 기질을 사용하지 않고 plate에서 HT-1080 세포를 배양하는 3D 세포 배양법을 확립하였다. 하지만, 아직까지 3D 세포 배양으로 형성된 구형의 세포의 형태를 해석하고, 관련 유전자의 발현을 연구하고 재현성을 높이는 연구가 부족하여 지속적인 연구가 필요하다. 이번 연구에서 시행된 방법을 바탕으로

다른 세포들에 활용하는 기초 자료로 활용한다면 여러 질환의 후보 물질의 효과를 검증함에 있어서 동물 실험을 대체할 수 있는 방법으로 유용할 것으로 생각된다.

V. 결론

HT-1080 세포를 3D 세포 배양법으로 구형을 형성하는 조건을 구축하였고 선복화 추출물이 세포의 증식을 억제하는 것을 관찰하였다. 선복화 추출물은 HT-1080 세포에 처리하면 S기 및 G2/M기의 세포분포가 확연히 증가하였고 이와 관련되어 있는 세포주기 조절 단백질들의 변화가 나타났다. 또한 선복화 추출물은 자가포식을 유도하여 HT-1080 세포의 세포질에 다수의 공포를 형성하였다. NAC에 의한 세포질내 ROS의 발생 조절에 의해 자가포식 유도가 감소하고, S기 및 G2/M기에서의 세포분포가 감소하는 것으로 보아 선복화 추출물에 의한 세포질내 ROS 발생이 주요 기전으로 작용함을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단에서 시행한 기초연구사업 (No. 2022R1A2C1003573) 및 2023학년도 동의대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었습니다.

Figure & Figure legends

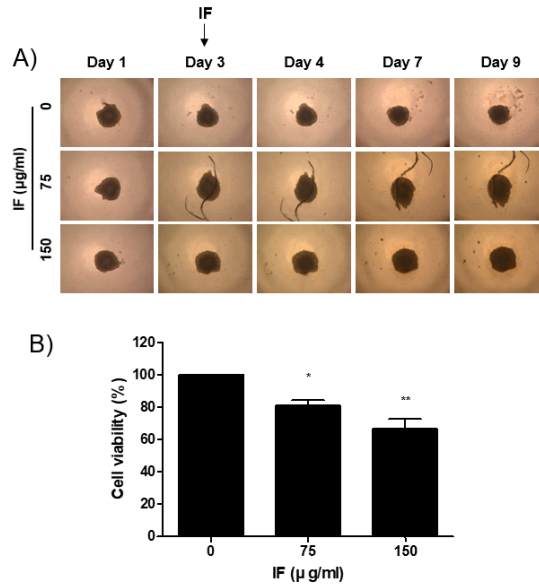


Fig.1. IF inhibited spheroid formation of HT-1080 human fibrosarcoma cells. HT1080 (7×10^3) cells were plated onto Corning®96 Well Spheroid Microplates, then, incubated for 72 h in a CO₂ incubator at 37° C. Afterwards, IF was added to each well. (A) The cell morphologic changes were observed using an inverted microscope (magnification,x50). (B) Cytotoxicity was measured by a CCK-8 assay. The results were presented the mean \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). IF, Inula Flos.

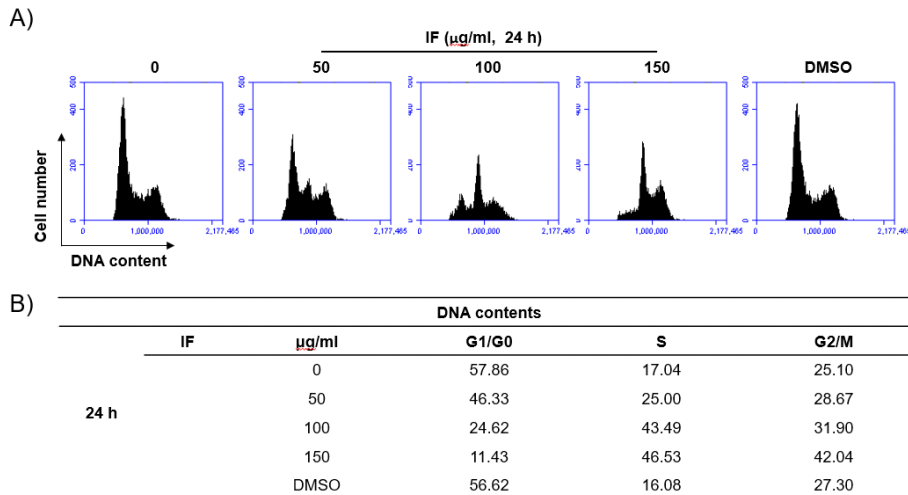


Fig. 2. IF induced S-phase and G2/M cell cycle arrest in HT-1080 human fibrosarcoma cells. (A) The cells were fixed and stained with Cycle TEST PLUS DNA REAGENT Kit. The DNA contents of cells were analyzed using a flow cytometer. (B) Table showed cell cycle distribution.

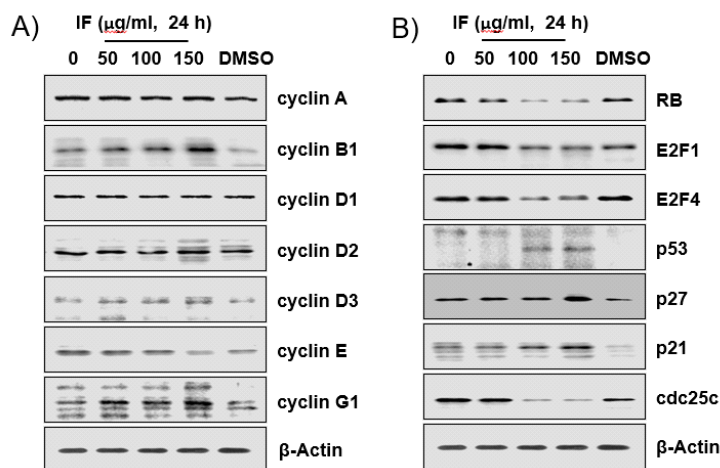


Fig. 3. IF modulated the expression of cell cycle related proteins in HT-1080 cells. (A–B) After incubation with IF for 24 h, the cells were lysed and the cellular proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were then probed with the indicated antibodies and the bands were visualized using an ECL detection system. β -actin was used as an internal control.

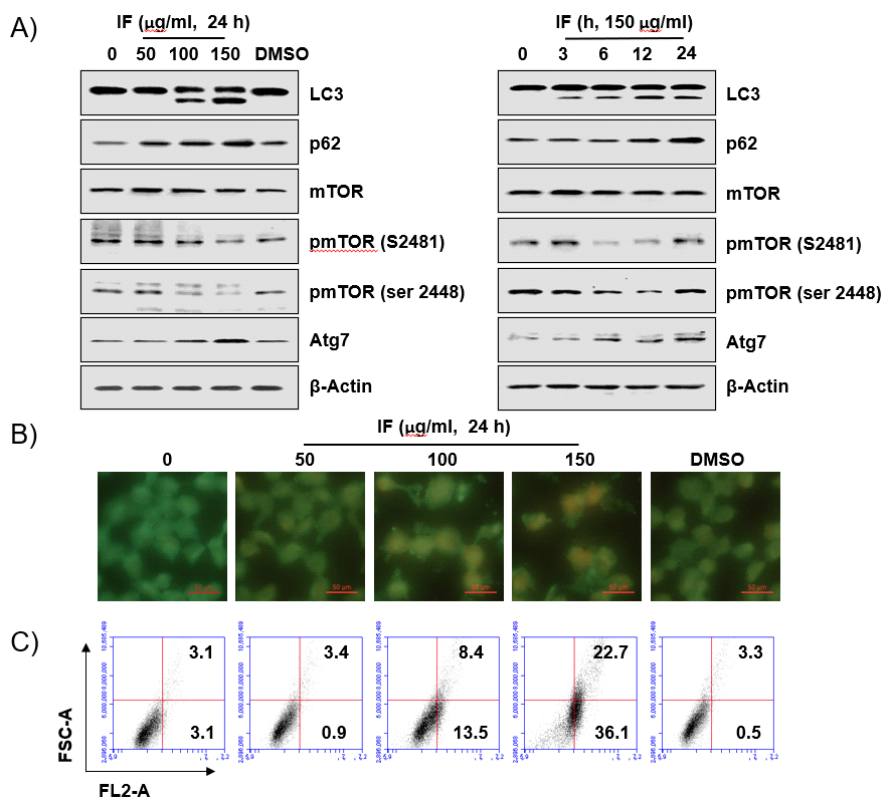


Fig. 4. IF induced autophagy. (A) The cells were treated with the indicated concentrations and time. After incubation with IF for 24 h, the cells were lysed and the cellular proteins were then separated in SDS-polyacrylamide gels, after which they were transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were then probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. β -actin was used as an internal control. (B-C) The cells were treated with indicated concentration of IF for 24 h. Acridineorange (AO) was then added at a concentration of 1 μ g/ml for a period of 15 min. (B) The stained cell was photographed with fluorescence using a fluorescence microscope (Magnification, $\times 200$). (C) The cell were washed with PBS, and quantified by flow cytometry.

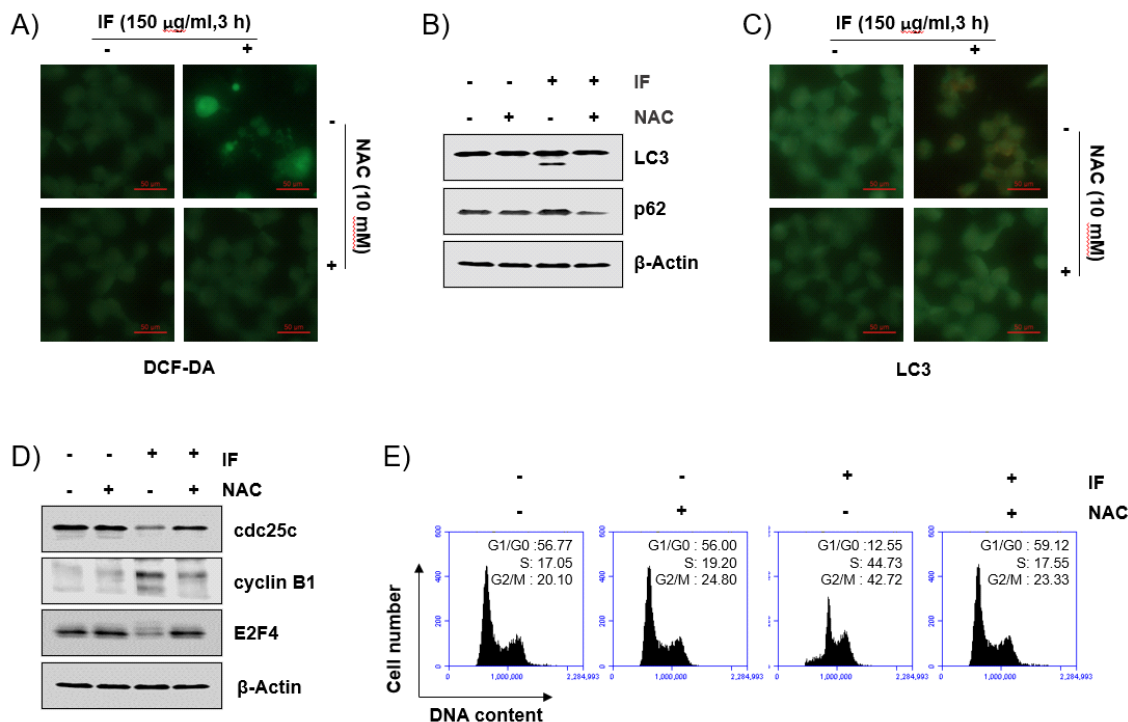


Fig. 5. IF-mediated autophagy and cell cycle arrest were prohibited by N-acetylcysteine (NAC). Cells were pretreated with 10 mM NAC, a ROS scavenger for 1 h and then treated with IF for 24 h. (A) To determine ROS production, cells were stained with 10 μ M DCF-DA. The stained cell was photographed with fluorescence using a fluorescence microscope (Magnification, $\times 200$). (B) The expressions of LC3 and p62 were determined by Western blot analysis. (C) The stained cell with AO was photographed with fluorescence using a fluorescence microscope (Magnification, $\times 200$). (D) The expressions of cdc25c, cyclin B1 and E2F4 were determined by Western blot analysis. (E) The DNA contents of cells were analyzed using a flow cytometer.

References

1. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol.* 2015;230:16–26.
2. Roper SJ, Linke F, Scotting PJ, Coyle B. 3D spheroid models of paediatric SHH medulloblastoma mimic tumour biology, drug response and metastatic dissemination. *Sci Rep.* 2021;11:4259.
3. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12:207–18.
4. Korean Medicinal Herb. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DR, Bu YM. Yeong-Rim Publishing Co. Ltd. 2004, pp.495–6.
5. Kwon DH, Kim MY, Hwangbo H, Ji SY, Park C et al. Safety Evaluation of Ethanol Extract of Inulae Flos : Single-dose Oral Toxicity Study in Mice. *Herbal Formula Science*, 2020;28(2):169–77.
6. Cha MR, Kim JY, Hwang JH, Park HR. Cytotoxic Activity of the Inula japonica Extracts Against Several Human Cancer Cell Lines In Vitro. *Kor. J. Pharmacogn.* 2006;37(3):130–5.
7. Nho JH, Jung DE, Jung HK, Lee MJ, Jang JH et al., Inhibitory Effect of an Ethanol Extract of Inulae Flos on Nitric Oxide Production, Oxidative Stress and Human Colorectal Cancer Cell Lines, *Korean J. Medicinal Crip Sci.* 2018;26(1):19–25.
8. Yang L, Wang X, Hou A, Zhang J, Wang S, Man W et al., A review of the botany, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the Flos Inulae. *J Ethnopharmacol.* 2021;276:114125.
9. Kim YS, Lee JH, Song J, Kim H. Gastroprotective Effects of Inulae Flos on HCl/Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Rats. *Molecules.* 2020;25(23):5623.
10. Li J, Guo X, Luo Z, Wu D, Shi X, Xu L et al., Chemical constituents from the flowers of Inula japonica and their anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol.* 2024;318:117052.
11. Qi RY, Guo C, Peng XN, Tang JJ. Sesquiterpenoids from Inula britannica and Their Potential Effects against Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Molecules.* 2022;27(16):5230.
12. Ding Y, Wang T, Chen T, Xie C, Zhang Q. Sesquiterpenoids isolated from the flower of Inula japonica as potential antitumor leads for intervention of paclitaxel-resistant non-small-cell lung cancer. *Bioorg Chem.* 2020;101:103973.
13. Park C, Lee WH, Choi BT, Kim KC, Lee YT, Choi YH. Induction of S phase Arrest of the Cell Cycle by Oak Smoke Flavoring (Holyessing) in Human Prostate Carcinoa Cell. *Koream K. Oriental Physiology & Pathology.* 2003;17(5):1309–14.
14. England K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ.* 2022;29(5):946–60.
15. Shen Y, Sherman JW, Chen X, Wang R. Phosphorylation of CDC25C by AMP-activated protein kinase mediates a metabolic checkpoint during cell-cycle G2/M-phase transition. *J Biol Chem.* 2018;293(14):5185–99.
16. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(12):2503–18.
17. Thomé MP, Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Migliavaca CB, Onzi GR, Felipe KB, Lenz G. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J Cell Sci.* 2016;129(24):4622–32.
18. Chen J, Na E, Lim SY. Effect of Fractions from Lycopodium lucidum Turcz. Leaves on Genomic DNA Oxidation and Matrix Metalloproteinase Activity. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2022;25(10):1778–84.
19. Lee JI, Seo Y. Chromanols from Sargassum siliquastrum and their antioxidant activity in HT 1080 cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2011;59(6):757–61.
20. Lee KJ, Hwang SJ, Choi JH, Jeong HG. Saponins derived from the roots of Platycodon grandiflorum inhibit HT-1080 cell invasion and MMPs activities: regulation of NF-kappaB activation via

- ROS signal pathway. *Cancer Lett.* 2008;268(2): 233–43.
21. Lee H, Kim DH, Kim JH, Park SK, Jeong JW, Kim MY et al., Urban Aerosol Particulate Matter Promotes Necrosis and Autophagy via Reactive Oxygen Species–Mediated Cellular Disorders that are Accompanied by Cell Cycle Arrest in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(2):149.
22. Lezaja, A.; Altmeyer, M. Inherited DNA lesions determine G1 duration in the next cell cycle. *Cell Cycle* 2018;17(1):24–32.
23. Wang Y, Wu H, Dong N, Su X, Duan M, Wei Y et al., Sulforaphane induces S–phase arrest and apoptosis via p53–dependent manner in gastric cancer cells. *Sci Rep.* 2021;11(1):2504.
24. Cao W, Li J, Yang K, Cao D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull Cancer.* 2021;108(3):304–22.
25. White E. Autophagy and p53. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(4):a026120.
26. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1): 92.
27. Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G. Autophagy regulation by p53. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):181–5.