



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](#)

이학석사 학위논문

간암세포에서 필버톤의
항암 활성 효과에 대한 연구

**Anti-cancer effects of filbertone
in hepatocellular carcinoma (HCC) cells.**

울산대학교 대학원
식품영양학과
한예진

간암세포에서 필버톤의
항암 활성 효과에 대한 연구

지도교수 안병용

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2024 년 02 월

울 산 대 학 교 대 학 원
식 품 영 양 학 과
한 예 진

한예진의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 유리나 인

심사위원 안병용 인

심사위원 장유미 인

울 산 대 학 교 대 학 원

2024 년 02 월

목 차

국문요약.....	7
1. 서 론	9
2. 재료 및 방법	19
2.1. 시약	19
2.2. 세포 배양	19
2.2.1. 정상 간세포	19
2.2.2. 간암세포	20
2.3. 세포 생존율 측정	20
2.4. 세포 증식률 측정	21
2.5. RNA 분리 및 정량 방법	21
2.6. 역전사효소 반응 (Reverse transcription)	22
2.7. 중합효소 연쇄반응	22
2.8. 세포 단백질 추출 및 단백질 전기영동	22
2.9. RNA 염기서열분석 (RNA sequencing analysis).....	23
2.9.1. RNA preparation, Library preparation, and RNA-seq	23
2.9.2. Analysis of Differentially Expressed Genes and Molecular Pathways in liver.....	23

2.10. 통계분석	24
3. 연구 결과	26
3.1. Filbertone reduces cell viability of hepatocarcinoma (HCC) cells in dose-dependent manner	26
3.2. Filbertone have no cytotoxicity effects in AML12 hepatocytes (Normal cell)	29
3.3. Filbertone reduces activation of <i>STAT3-SOCS3</i> independently of MAPKs signaling pathways	31
3.4. Discovery of Novel Signaling Pathways in Anticancer Effects through RNA-seq Data	34
3.5. The effects of filbertone on the <i>CYP26A1</i> and <i>CYP26B1</i> expression in HepG2 cells	37
3.6. Filbertone regulates the cell cycle genes in HCCs	40
3.7. Anti-proliferative activity of filbertone in HCCs	42
4. 고찰 및 결론	44
5. 참고 문헌	46
영문 요약	51

List of Tables

Table 1. List of human primer sequences used for qRT-PCR..... 25

Table 2. Top 20 RNA-seq data related cell cycle genes 35

List of Figures

Figure 1. The chemical structure of filbertone (5-Methylhept-2-en-4-one).....	27
Figure 2. Filbertone does-dependently reduces cell viability in HCC cells (HepG2, Huh7).....	28
Figure 3. Cell viability assay of filbertone in normal cells (AML12).....	30
Figure 4. Filbertone has no effects on the MAPKs signaling pathway in HepG2 cells.....	32
Figure 5. Filbertone reduces activation of STAT3-SOCS3 in HepG2 cells.....	33
Figure 6. Analysis of Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of filbertone in the liver tissue.....	36
Figure 7. Filbertone reduces Cytochrome P450 family mRNA expression in HepG2 cells.....	38
Figure 8. Filbertone reduces WEE1 in HepG2 cells.....	41
Figure 9. Filbertone inhibits cell proliferation in HCC cells.....	43

Abbreviations

Abbreviations	Full name
α -syn	α -synuclein
AFL	Alcoholic liver disease
ALP	Alkaline phosphatase
AML12	Alpha mouse liver 12
BSA	Bovine serum albumin
CKD	Chronic kidney disease
CYP26A1	Cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1
CYP26B1	Cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal bovine serum
FFA	Free fatty acid
GSEA	Gene set enrichment analysis
HBV	Hepatitis B virus

HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C virus
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
VAD	Vitamin A deficiency

국 문 요 약

간암은 전 세계에서 6번째로 가장 많이 진단되는 암으로 주요 암 사망 원인 3위를 차지하며 예후가 매우 좋지 못한 암이다. 이 통계가 지속된다면 2040년까지 간암 유병률은 55 % 이상 증가할 것으로 예상된다. 간암의 가장 큰 문제는 대부분의 간암 환자에서 이미 병기가 진행되어 발견되는 경우가 많아 효과적인 치료가 어려우며, 전체 암 중 5년 생존율이 가장 낮다는 점이다. 초기에 발견하여 수술적 요법으로 국소 치료를 하거나 간이식을 통한 종양의 완전한 제거는 근치적 치료가 가능하기에 가장 이상적인 치료이지만, 간의 전이나 간문맥 침범을 동반한 진행성 간암 환자에게는 수술적 요법이 불가능하므로 전신 항암치료제를 적용해야 한다. FDA에서 1차 치료제로 승인된 전신 항암치료제인 소라페닙과 렌마티닙은 receptor tyrosine kinase (RTK) 를 억제하는 tyrosine kinase inhibitor (TKI) 이다. 이들은 수명 연장 효과를 나타내지만, 2~3개월에 불과하고 부작용이 따르며 내성이 잘 나타나므로 객관적인 반응을 보이는 환자는 10~30% 에 불과하다. 또한 간암 환자의 70 % 이상은 간경변증이 동반되어 간 기능이 많이 저하된 상태이므로 적절한 용량의 항암제를 투여할 수 없는 경우가 많다. 따라서 효과적인 치료 결과를 기대하기 어려울뿐더러 항암제로 인한 간 기능의 악화가 초래될 수 있다. 따라서 이러한 한계점을 극복하기 위한 많은 연구가 계속해서 진행되고 있다. 식물유래 화합물질은 인체에 안전하고 반응이 안정적이며 유익한 생리 활성을 나타내는 물질로 밝혀져 있다. 그중 헤이즐넛의 향기 성분인 필버톤은 in vitro 및 in vivo에서 항산화, 비만 및 비만증 개선 등 긍정적인 효과를 나타내는 연구 결과들이 보고되어 있다. 그러나 필버톤의 항암 활성은 확인되지 않았기에 항암 보조제 또는 치료제로서의 가능성을 확인할 필요성이 있다. 본 연구에서는 인간

간암 세포인 HepG2와 Huh7에 각각 필버톤을 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 농도 의존적으로 생존율이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 같은 조건에서 정상 간세포 AML12에 필버톤을 처리하였을 때 독성이 나타나지 않았다. 이를 통해 필버톤은 간암 세포에 선택적인 독성을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 세포 수준에서 필버톤의 항암 활성에 대한 분자적 메커니즘을 확인하고자 western blot을 수행하였다. 소라페닙의 표적으로 알려진 MAPKs 신호전달경로와 down stream에 해당하며, 세포증식을 표적으로 하는 STAT3, SOCS3의 발현을 확인하였다. 그 결과, 필버톤은 MAPKs 신호전달경로와 상관 없이 STAT3와 SOCS3의 활성을 억제하는 것으로 확인되었다. 따라서 STAT3와 SOCS3의 활성 억제를 통해 필버톤의 항암 활성에 대한 새로운 분자적 메커니즘을 발견하기 위해 필버톤을 처리한 간세포를 사용하여 RNA-sequencing을 진행하였다. RNA-seq 데이터를 통해 Gene set enrichment analysis (GSEA) 분석을 수행한 결과, 세포증식과 관련된 신호전달이 하향 조절됨을 확인하였다. 또한 RNA-seq 데이터에서 |fold change|>1.6 기준으로 분석하였을 때 다른 장기에 비해 간에서 특이적으로 발현되며 레티노산 대사에 관여하는 효소인 CYP26A1과 세포 증식과 관련된 WEE1이 상위 20위에 해당하였다. 따라서 필버톤을 처리한 HepG2를 사용하여 qRT-PCR을 수행하였으며, 이를 통해 CYP26A1, CYP26B1 그리고 WEE1의 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 더불어 세포 수준에서 필버톤의 세포 증식 억제능을 확인하고자 HepG2 세포에 시간 조건을 추가하여 필버톤을 처리한 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 농도가 증가하고 처리 시간이 길수록 세포 증식률이 감소함을 확인하였다. 종합하면, 본 연구에서는 세포 증식 억제를 통한 필버톤의 항암 활성을 확인하였으며, 간세포암을 해결할 수 있는 보조제 또는 치료제로써 사용될 수 있다고 사료된다. 앞으로 STAT3의 활성을 감소시키는 기전을 밝힐 추가적인 연구가 이뤄져야 한다.

Keyword: Anti-cancer effects, Cytochrome P-450, Filbertone, Hazelnut, Hepatocellular carcinoma (HCC), Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), Phytochemical, Signal transducer

and activator of transcription 3 (STAT3).

1. 서론

1.1 간세포암 (Hepatocellular carcinoma)

간암은 간에서 발생한 모든 악성종양을 총칭한다. 크게 전이성 간암 (Liver metastases) 과 간 내에서 발생하는 원발성 간암 (Primary cancer) 으로 나뉘며, 원발성 간암은 간세포에서 기원한 간세포암종 (Hepatocellular carcinoma) 과 담관 세포에서 기원한 담관 세포 암종 (Cholangiocarcinoma) 으로 구분된다 [1]. Hepatocellular carcinoma (HCC) 는 원발성 간암의 80 % 이상을 차지하기 때문에 [2, 3] 일반적으로 간세포암을 간암이라고 일컫는다. HCC는 전 세계에서 6번째로 가장 많이 진단되는 암으로 주요 암 사망 원인 3위를 차지하며 예후가 매우 좋지 못한 암이다 [4]. 2021 통계청에서 발표한 사망 원인 통계에 따르면 주요 사망원인별 사망률 1위는 악성 신생물로 인구 10만 명당 161.1명이며 전년 대비 1.0명 (0.6 %) 증가하였고, 2위인 심장질환 사망률 61.5명에 비해 2.5배 더 높았다. 2021년 암사망률은 폐암 (36.8명), 간암 (20.0명), 대장암 (17.5명), 위암 (14.1명), 췌장암 (13.5명) 순으로 간암은 2위를 기록하였으며, 경제 생산활동 인구에 해당하는 40~50대 연령층에서 간암이 암사망률 1위를 차지하였다. 더불어 전 세계적으로 간암 유병률은 2020년에서 2040년 사이에 55 % 이상 증가할 것으로 예상된다 [2, 3]. 간암의 가장 큰 문제는 많은 간암 환자에서 이미 병기가 진행되어 발견되는 경우가 많아 효과적인 치료가 어려우며, 전체 암 종류 중 5년 생존율이 가장 낮다는 점이다 [5]. 또한 근치적 치료를 목표로 수술적 치료로 종양을 제거하는 것이 가장 이상적이지만, 간 전이가 있거나 간문맥 침범을 동반한 국소 진행성 간암 환자에게는 수술적 치료가 불가능하므로 Tyrosine kinase inhibitor (TKI) 및 Immune checkpoint inhibitor (ICI) 를 사용하여 전신 항암치료제를 적용해야 한다 [6]. 현재 진행성 간암의 대표적인 전신

항암치료제로는 미국 Food and drug Administration (FDA) 에서 1차 치료제로 승인된 Sorafenib과 Lenvatinib이 있으며, 이들은 다양한 Receptor tyrosine kinase (RTK) 를 억제하여 간암의 진행을 막는 TKI로 알려져 있다 [7]. 이 중 간암의 대표적인 표적 치료제인 Sorafenib은 진행성 간암 환자의 수명 연장 효과를 나타내는 보존적 치료제이다. 하지만 Sorafenib의 수명 연장 효과는 2~3개월에 불과하며, 유전적 변이로 선천적 또는 후천적 내성을 나타내어 오히려 암세포의 증식을 초래하는 것으로 나타났다 [8]. 또한 TKI 치료제에 객관적인 반응을 보이는 환자는 10~30 % 에 불과하므로 예후가 매우 나쁘다. 더불어 간암 환자의 약 70 % 이상에서 간경변증이 동반되므로 조기 진단이 쉽지 않고, 간기능부전과 백혈구 및 혈소판 감소, 혈액학적 이상 등 간의 기능이 많이 저하된 상태이다. 이는 적절한 용량의 항암제를 투여할 수 없기에 효과적인 치료 결과를 기대하기 어려우며, 항암제로 인한 독성으로 인해 간 기능을 더욱 악화시킬 수 있다 [3]. 따라서 여전히 예후가 좋지 않은 간암의 예방과 전신 항암치료제의 한계를 극복하기 위한 새로운 치료 전략이 필요하다 [9].

1.2. 비알코올성 지방간질환 (Non-alcoholic fatty liver disease)

건강한 간에는 5 % 의 지방이 존재한다. 여기서 지방이 간 무게의 5 % 이상 축적되면 이를 지방간 (Fatty liver) 이라고 정의된다 [10]. 지방간은 과도한 음주, 비만, 당뇨병, 고지혈증 등으로 유발되지만 피임약, 여성호르몬, 스테로이드를 포함하여 여러 약제를 오래 복용한 경우에도 지방간이 나타나며, 급격한 체중감소와 체중감소를 위한 수술 시에도 지방간이 발생할 수 있다 [11]. 이처럼 지방간이 유발되는 원인은 다양하며, 크게 원인에 따라 알코올성 지방간 (Alcoholic fatty liver disease) 과 비알코올성 지방간 질환 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 으로 분류된다 [12]. 전 세계에서 가장 흔한 만성 간질환 중 하나인 비알코올성 지방간 질환 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 은 알코올성 지방간 (AFLD) 과 조직학적 소견은 동일하지만, 유의한 알코올 또는 약물의

사용이나 다른 원인이 없는 상태에서 간 내 지방증이 증가되는 질환으로 정의된다. NAFLD는 간 지방증 (Simple steatosis), 비알코올성 지방간염 (Non-alcoholic Steatohepatitis), 간경변증 (Cirrhosis), 간세포암 (Hepatocellular carcinoma) 에 이르는 넓은 스펙트럼의 만성 간질환이며 [13] 심혈관질환 (Cardio vascular disease) 의 발생 위험이 큰 것으로 알려져있다 [14]. NAFLD의 위험인자로는 비만과 대사증후군과 연관성이 크며 [15], 제2형 당뇨병 [16], 이상지질혈증 [17, 18] 등을 제시하고 있다. 또한 갑상선 기능 저하증 [19], 다낭성 난소 증후군 [20], 신체활동의 감소 및 근감소증 [21, 22] 도 NAFLD의 위험도를 증가시킨다. 최근 메타분석에 따르면, 1990년대부터 2019년까지 전 세계적으로 NAFLD의 유병률은 약 30 % 이며, 2019년 기준 전 세계 성인의 약 4분의 1이 NAFLD에 해당하는 것으로 보고되었다 [23]. 또한 국내 소아청소년인 7~18세의 비만율이 2008년 8.4 % 에서 2016년 14.3 % 로 증가 추세를 보이며, 이는 비만율 증가에 따라 연력에 상관없이 NAFLD의 유병률이 더욱 빠르게 증가할 것으로 보인다 [24]. NAFLD의 임상적인 결과는 매우 다양하지만 3년 동안 진행된 전향적 코호트 연구에 따르면 단순 지방증 환자의 20 % 이상이 NASH로 이행되었으며 [25, 26], 만성적인 염증으로 인해 콜라겐의 침착, 신생 혈관 생성으로 인한 섬유증과 간 경변을 확인하였다 [27]. 현재까지 NAFLD를 해결하기 위해 생활 습관 교정에 집중하며 [28] 아직 정확한 바이오 마커와 효과적인 치료법은 없다 [29]. 최근에는 비알코올성 지방간질환 (NAFLD) 을 대사 이상 관련 지방간 질환인 Metabolic dysfunction-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) 라는 이름으로 새롭게 명명되었다. 기존의 NAFLD 라는 명칭은 과도한 알코올 섭취를 하지 않는 만성 간질환 환자를 뜻하였으나, 이는 비알코올성을 지나치게 강조하여 대사적인 요인을 무시할 수 있기에 진단을 위한 명확한 기준을 개발하기 위해 제시되었다 [30-32]. 이를 통해 NAFLD에서 대사 장애를 우선적으로 해결해야 한다는 점을 강조한다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 NAFLD라는 명칭을 사용하였다.

1.3. 변화하는 간세포암의 원인

간세포암은 주로 간경변증인 상태에서 발생한다. Global HCC BRIDGE 연구에 따르면 2005년부터 2012년까지 북미, 유럽 및 일본에서 HCC의 가장 일반적인 위험 요인은 C형 간염 바이러스였고, 중국과 한국 및 대만에서는 B형 간염 바이러스가 주된 원인이었다 [33]. 최근의 항바이러스 치료 및 백신 접종으로 전 세계 일부 지역에서는 이러한 바이러스와 관련된 HCC의 발생률이 감소하는 추세가 나타났으나, Global Burden of Disease 연구에서는 네덜란드, 영국, 미국 등 사회·경제 수준이 높은 국가에서 전반적으로 HCC 발생률이 증가하였다 [34]. 미국에서는 이미 간이식 환자들에서 NAFLD가 HCC의 주요 원인으로 나타났으며, 이러한 추세는 NAFLD에서 진행된 HCC에 대한 위험성이 증가한 것을 보여준다 [29, 35]. 또한 NAFLD와 관련된 HCC는 연간 9% 증가했으며, NAFLD에서 이행된 HCC 환자들은 다른 요인으로 유발된 HCC 환자들보다 사망위험이 1.2배 높다고 확인되었다 [36]. NAFLD는 섬유화의 진행이나 간경변증이 동반되지 않더라도 HCC의 발생 빈도가 다른 간질환에 비해 높다 [37]. 더불어 최근 NAFLD로 인해 만성 B형 간염 (Chronic hepatitis B, CHB) 환자의 HCC 발병 위험이 3배 증가하였음이 보고되었으며, 간 steatosis가 아닌 대사장애를 동반한 NAFLD가 CHB 환자의 간암에 중요한 역할을 했다는 연구 결과가 보고되었다 [38]. 최근 우리나라에서도 비바이러스성, 비알콜성 지방간 질환 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 으로 인한 간세포암이 증가하고 있다 [38, 39]. 따라서 이러한 현상들은 비만, 당뇨, 대사증후군으로 유발된 지방간 질환에서 간세포암으로의 넓은 범위를 가진 NAFLD 스펙트럼에 적용할 수 있는 새로운 치료법의 필요성을 보여준다.

1.4 헤이즐넛과 필버톤 (Hazelnut and Filbertone)

견과류는 총 혈장 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤 감소 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그중 헤이즐넛은 지방산 조성 중 단일 불포화 지방산 (Monounsaturated fatty acids) 이 가장

많아 LDL 산화를 막고 염증성 마커를 개선함으로써 항동맥경화 작용과 심혈관질환을 예방할 수 있다고 보고되었으며, 다양한 생리 활성 물질인 토코페롤 (Tocopherol), 피토스테롤 (Phytosterol), L-아르지닌 (L-arginine), 셀레늄 (Selenium) 등이 풍부하다고 알려져 있다 [40]. 또한 adipogenesis와 관련된 유전자의 발현을 감소시킴으로써 지방 합성을 억제하여 항비만 효과를 나타낸 것으로 보고되었다 [41]. 헤이즐넛 나무 열매 (Corylus maxima and C.avellana) 의 주된 향기 성분인 필버톤 (Filbertone, (5-Methylhept-2-en-4-one)) 은 헤이즐넛 오일에서 발견되었으며, 구조식은 $C_8H_{14}O$, M.W., 126.22g/mol 이다 [42]. 향료 및 추출물 제조자 협회 (FEMA) 에서 안전한 화학 물질로 확인되었으나, 필버톤의 생리활성에 대한 연구는 여전히 부족하다. 현재까지 보고된 필버톤의 효과는 LPS 처리에 의해 활성화된 소교세포 (Microglia) 가 분비하는 염증 인자 MCP-1, TNF- α , IL-1 β 발현을 감소시켜 항산화 효과를 나타내고, MAPKs, NF- κ B 신호전달경로를 억제한다는 연구 결과가 보고되었다 [43]. 또한 필버톤은 cAMP 신호전달경로를 활성화하여 지방 축적과 체중을 감소시키고, HFD 쥐의 혈장에서 염증성 사이토카인 레벨의 감소가 확인되었다 [44]. 더불어 필버톤은 Alkaline phosphatase (ALP) 활성을 통해 α -syn 축적을 감소시켜 Parkinson's disease (PD) 병리를 완화할 수 있다는 결과가 보고되었고 [45], 근육 지질 대사와 에너지 균형 조절의 기능을 나타내었다 [46]. 하지만 필버톤은 비만으로 유도된 비알콜성 지방간 질환과 이에 따른 간세포암 억제 효과는 알려지지 않았다. 따라서 지금까지 밝혀진 필버톤의 효과를 미루어 보아, 본 연구에서는 필버톤의 항암 활성의 가능성을 확인하고자 하였다.

1.5. 영양 유전체 분석 (Nutrigenomics)

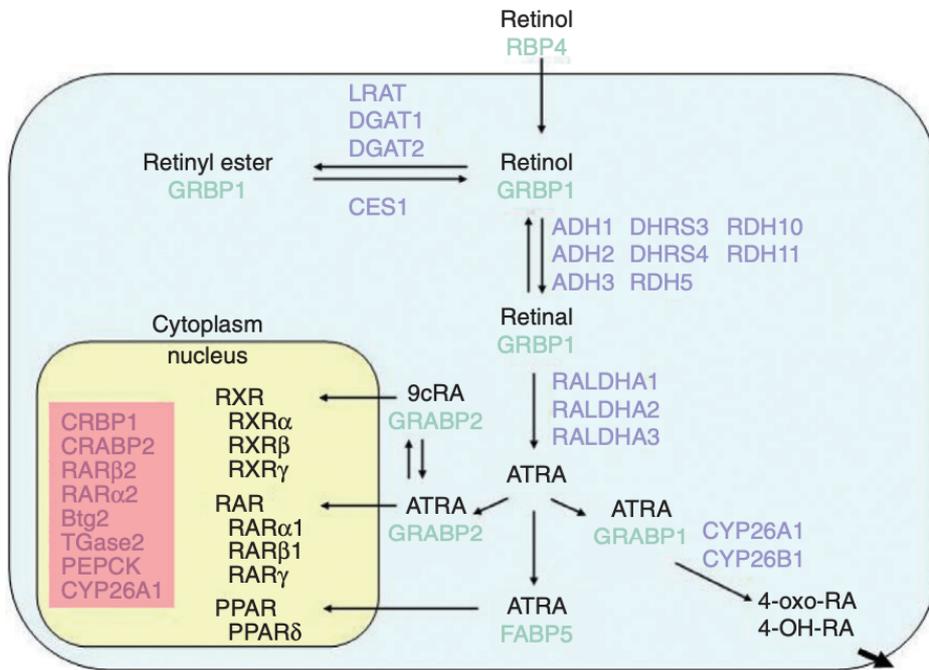
본 연구는 RNA 염기서열분석 (RNA sequencing) 을 기반으로 한 전사체 분석을 통해 필버톤의 항암 활성을 확인하였다. 여러 분석 방법 중 Gene-Set Enrichment Analysis (GSEA) 를 통해 RNA-seq 프로파일과 관련된 유전자의 생물학적 정보를 이용하여

필버튼 처리군과 대조군 간의 유전자 발현값 차이 (difference analysis genes) 로 유의한 유전자 집합 (Gene-set) 을 찾았으며, 그 결과 필버튼의 처리는 세포주기 경로와 유의하게 관련되어 있음을 나타내었다. 따라서 이러한 결과를 통해 치료가 어려운 간세포암을 해결하기 위한 새로운 접근 방식을 모색하는데 도움이 될 것으로 기대된다.

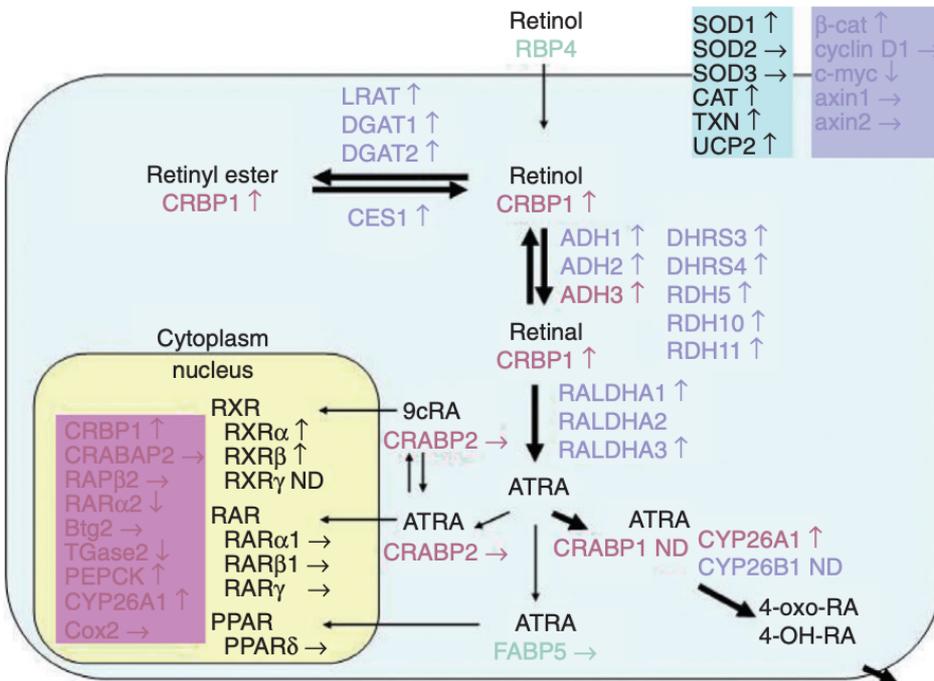
1.6. 레티노산 대사 (Retinoic acid Metabolism)

비타민 A (retinol) 는 에너지 균형조절, 시각기능 향상, 세포 면역, 세포사멸, 세포증식, 지방세포분화를 통한 지방형성 등 다양한 생물학적 과정을 조절하며 태아발달, 정자생성에도 중요한 역할을 한다 [47-52]. 또한, retinol은 100년 동안 면역조절기능에서 중요한 기능을 하는 영양소로 알려져있다 [53]. 포유류는 비타민 A를 생체 내에서 완전히 합성할 수 없으므로 β -carotenes나 비타민 A의 식이 섭취에 의한 영양 흡수에 의존해야 한다 [54]. 따라서 지용성 비타민 A가 풍부한 동물성 식품의 섭취가 부족하거나 채소와 과일 위주의 식생활을 지속할 경우 비타민 A의 만성적인 결핍 (VAD) 상태가 되며 이는 시각기능과 면역 기능의 저하, 성장 저해, 빈혈 등 신체기능의 저하로 이어진다 [55]. 여전히 저소득 국가와 개발도상국에서 비타민 A 결핍은 큰 문제이며 세계보건기구 (WHO) 에서는 임신부와 영유아의 비타민 A의 충분한 보충이 이뤄질 경우에 해당 국가의 어린이 사망률이 24 % 감소할 것으로 보고되었다 [56]. 간세포와 혈관 내피세포 사이 공간에 상주하는 간 성장세포 (HSCs) 는 체내에 필요한 retinol의 80% 를 저장하는 저장소이며, 필요시엔 공급해주는 공급원 기능을 한다 [57]. 그러나 간 손상 시 HSCs는 활성화가 되어 근섬유아세포 (myofibroblast like cells) 와 비슷한 세포로 transformation이 되면서 간 섬유화 (liver fibrosis) 가 발생한다 [58]. 결국, HSCs는 저장된 RA를 잃게 되고, 결국 간의 VAD 상태로 이어진다. 식품으로 섭취된 retinol은 chylomicron을 통해 간으로 운반되어 retinol binding protein (RBP) 과 결합 후 STRA6 수용체를 통해 세포질로 흡수된다 [59]. 흡수된 retinol은 lecithin retinol acyltransferase (LRAT) 에 의해 retinyl ester로 전환되거나, 두 가지의

산화 단계를 거쳐 간에서 all-trans-retinal (ATRA) 로 산화된다. 첫 번째 단계에서는 retinal dehydrogenase family (RDH5, RDH1 and RDH11), alcohol dehydrogenase (ADH1, ADH1B and ADH1C), membrane-bound short-chain dehydrogenases/reductases (DHRS3 and DHRS4) 에 의해 retinol과 retinal 간 평형상태를 유지한다. 두 번째 비가역적 단계에서는 retinaldehyde dehydrogenase 1 family에 속하는 A1,A2,A3 (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3) 에 의해 retinol 이 all-trans-retinoic acid (ATRA) 로 산화된다 [60]. 비가역적인 단계로 합성된 ATRA는 이전의 retinol로 전환되지 않으며, 과도한 ATRA가 평형상태를 이루기 위해서는 Cytochrome p450 family인 *CYP26A1*, *CYP26B1*에 의해 산화되어 제거되어야 한다 [61]. 새롭게 합성된 ATRA는 cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP1 and CRABP2) 에 결합 후, 핵으로 들어간 ATRA는 retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RAR/RXR) heterodimer와 결합하면서 표적 유전자의 전사가 활성화된다 [62]. 이러한 전사 활성화를 통해 세포 분화, 증식 및 세포 자살을 조절할 수 있다고 알려져 있다. 이전 연구결과에 따르면 RARs/RXRs 기능 장애에 따른 RA 감소로 인해 HCC 및 NAFLD 등 여러 간 질환이 유발된다는 결과가 입증되었으며 [63], 간 손상과 RA의 수준이 유의하게 반비례 관계를 나타내었다 [57]. 따라서 간 조직에서 RA는 간세포암을 유발에 중요한 분자로 보여진다 [64].



Schematic figure 1. Retinol metabolism in liver.



Schematic figure 2. Retinol metabolism in NAFLD.

1.7. 시토크롬 p450 (Cytochrome P450 family)

Cytochrome P450은 여러 조직에서 발견되고 포유류의 간에서 가장 높은 수준으로 존재한다. Cytochrome P450 family인 Cytochrome P450 26A1 (*CYP26A1*) 은 retinoic acid (RA) 대사와 콜레스테롤, 스테로이드 이외의 지질 합성에 관여하는 효소로서 간에서 높은 수준으로 발현되며 *CYP26B1*도 간 조직 및 면역세포에서 발현된다 [65, 66]. 현재 *CYP26A1*과 *CYP26B1*은 여러 암에서 보고되었으며, 대장암에서 *CYP26C1*은 발현되지 않았으나 *CYP26A1*, *CYP26B1*이 유의하게 발현된 것을 확인하였다 [67]. 또한, 구강암과 인두암의 발병 위험 증가와 관련되어 치료적 바이오 마커로 사용될 수 있음을 보여주었으며, *CYP26A1*은 액틴 번들링 단백질로서 세포 이동에 기계적 역할을 하여 암세포의 전이와 침습에 관여하는 fascin을 상향조절하여 유방암 세포의 악성으로 촉진할 수 있음을 보여주었다 [68, 69]. 게다가 *CYP26A1*의 과발현은 두경부와 자궁경부 악성종양과 두경부의 편평 상피종양을 유발할 수 있다고 확인되며 즉, *CYP26A1*가 종양유전자 (Oncogene) 의 성질을 나타냈다 [70]. 추가적으로 현재 all-trans-retinoic acid (ATRA) 는 폐암을 포함하여 여러 암세포 치료를 위한 약물로 사용되고 있다 [71, 72]. 본 연구에서는 인간 간암세포 HepG2에서 필버톤을 처리한 후 *CYP26A1*과 *CYP26B1*의 발현이 감소됨을 mRNA 수준에서 확인하였다. 따라서 필버톤이 retinoic acid 대사를 조절하여 세포 증식을 억제하고, 이를 통해 항암 활성이 나타난 것으로 보여진다.

1.8. STAT3

간세포에서 IL-6/STAT3 pathway의 활성화는 혈장 인슐린 증가 시 혈당을 조절하며 [73], 간이 손상된 상태에서 일시적으로 활성화되어 간 보호 기능을 한다 [74]. 또한 초기 염증 반응에 관여하여 Interleukin-6 (IL-6) 와 Epidermal Growth Factor (EGF) 의 조절을 통해 급성 단계 유전자를 조절하는 것으로 확인되었다 [75]. *STAT3*가 발견된 이후 많은 연구가 이루어졌고, 초기 태아발생부터 성장과 분화과정에 관여한다는 것이 밝혀졌으며, 암 유발, 전

이, 항암제 내성 및 면역 회피 등에 관여한다는 것이 확인되었다 [76]. 연구 결과에 따르면 *STAT3*는 암세포에서 활성이 지속되며, *STAT3*의 과발현은 간암 환자들의 종양 크기 증가, 혈관 침습, 간 경변 등을 유발하여 예후가 좋지 않다는 것이 확인되었다 [77-80]. 따라서 다양한 암 발생의 핵심 요인으로 알려진 *STAT3*를 표적으로 하는 암 치료 전략이 보고되었으며 [81] 특히 HCC의 잠재적 치료 대상으로 주목받고 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

세포 배양에 사용된 dulbecco's Modified Eagle 's Medium (DMEM, high glucose) 와 fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA solution, phosphate-buffered saline (PBS)은 Welgene (Gyeongsan, Korea) 에서 구입하였다. 세포에 처리된 Filbertone ((E)-5-methyl-hept-2-en-4-one, 98%) 는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) 에서 구입했으며, Dimethyl sulfoxide 99.8% (DMSO) 와 chloroform은 SAMCHUN PURE CHEMICAL CO, LTD (Gyeonggi-do, Korea) 에서 구입하였다. MTT 분석에 사용된 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) 는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포 단백질 추출과 전기영동에 사용한 ECL은 (CYANAGEN, Italy) 에서 구입하였다. Tris은 VWR chemicals (pennsylvania, USA)에서 구입하였고, NaCl 은 SAMCHUN PURE CHEMICAL CO, LTD (Gyeonggi-do, Korea), 0.1% Tween-20은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) 로부터 구입하였다. mRNA 분석에 사용된 primer는 bioneer (Deajeon, Korea) 로부터 구입하였다.

2.2. 세포 배양

2.2.1. 간세포

정상 간세포주 (Hepatocyte) 인 AML12 cells는 penicillin-streptomycin (10,000 units/mL sodium penicillin G, 10,000 µg/mL streptomycin) 와 10% FBS 가 들어간 media (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose)) 에서 5%, CO₂, 37 °C 수분이 유지되는 인큐베이터 환경에서 키웠다. Media는 2일에 한 번씩 교체하였으며, 성장한 세포는 4 x 10⁵ cells/ mL로 24 well plate 에 분주하여 실험에 사용하였다.

2.2.2. 간암 세포

인체 간암 세포주 (Human hepatocellular carcinoma cell line) 인 HepG2, Huh7는 penicillin-streptomycin (10,000 units/mL sodium penicillin G, 10,000 µg/mL streptomycin) 와 10% FBS 가 들어간 media (dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose)) 에서 5%, CO₂, 37 °C 수분이 유지되는 인큐베이터 환경에서 키웠으며, media는 2일에 한 번씩 교체하였다.

2.3. 세포 생존율 측정

AML12 세포 (2x10⁴ cells/mL) 를 48 well plate에 seeding 하고 밤새 배양하였다. 인간 간암세포 HepG2 (2x10⁵ cells/mL) 와 Huh7 (2x10⁴ cells/mL) 를 48 well plate에 seeding 하고 밤새 배양하였다. 다음으로 배지를 제거한 후, 필버톤을 (0 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM) 농도별로 희석한 시료를 250 µL/well 씩 처리하고 5%, CO₂, 37 °C 수분이 유지되는 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액 (0.5 mg/mL) 250 µL를 각 well에 첨가하여 5%, CO₂, 37 °C 가습 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 MTT 용액을 제거한 후 formazan 결정을 녹이기 위해 DMSO 300 µL를 각각의 well에 첨가하여 20분동안 교반하였다. Formazan 결정을 충분히 녹인 후 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 다음 식에 대입하여 세포 생존율을 구하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Control absorbance} - \text{sample absorbance}}{\text{Control absorbance}} \times 100$$

2.4. 세포 증식률 측정

인간 간암세포 HepG2 (8×10^5 cells/mL) 를 24 well plate에 seeding 하고 밤새 배양하였다. 다음으로 배지를 제거하고, 필버톤 (0 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M) 농도별로 희석한 시료를 500 μ L/well 씩 처리하고 5 %, CO₂, 37 °C 수분이 유지되는 인큐베이터에서 24, 48, 72 시간 동안 배양하였다. 설정한 각각의 시간에 따라 배지를 제거하고 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액 (5 mg/mL) 250 μ L를 각 well 에 첨가하여 5 %, CO₂, 37 °C 가습 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 MTT 용액을 제거한 후 formazan 결정을 녹이기 위해 DMSO 300 μ L를 각각의 well에 첨가하여 20분동안 교반하였다. Formazan 결정을 충분히 녹인 후 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값으로 세포 증식률을 구하여 필버톤의 세포 증식률을 확인하였다.

2.5. RNA 분리 및 정량 방법

HepG2 세포의 배지를 제거한 후 DPBS (without calcium chloride, without magnesium chloride, pH 7.0~7.6, 271~299 mOsm/kg H₂O) 1 mL/well 넣어 두 번 washing 하였다. 이후 TRIzol 을 사용하여 1 mL/well 씩 분주하여 세포를 용해하였다. 용해된 세포를 모아 1.5 mL microtube (Axygen, USA) 에 옮긴 후 chloroform (0.2 mL/tube)을 첨가해 1분간 vortexing (Scientific industries, USA) 을 한 후 microcentrifuge (Labogene, Denmark)를 사용하여 RNA pellet을 분리하였다. RNA의 무결성을 높이기 위해 70 % EtOH로 두 번 washing 하였으며 70 % EtOH 를 완벽히 제거한 후 RNase free water 에 녹였다. 분리한 RNA는 BioDrop μ LITE Spectrophotometer (Biochrom Ltd, UK) 를 이용하여 RNA 정량을 수행하였고 1 ng total RNA 를 정량하였다.

2.6. 역전사효소 반응 (Reverse transcription)

mRNA (messenger RNA) 를 cDNA (complementary DNA) 로 합성하기 위해 1 ng으로 정량한 total RNA와 Recombinant RNase inhibitor (40 U/ μ L, TaKaRa), Reverse transcriptase (200 U/ μ L, enzynomics), dNTP (10 mM, Promega), 5X M-MLV RT buffer (Promega), Random primer (150 ng/ μ L, TaKaRa) 를 사용하여 준비했으며, 최종 볼륨은 RNase free water로 25 μ L를 맞추었다. 이후 Thermal Cycler Dice (TP600) ver.3.00 (TaKaRa, Japan) 을 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 protocol은 다음과 같다.

* 37°C (60 min), 72°C (10 min), 4°C (5 min).

2.7. 중합효소 연쇄반응

Reverse transcription (RT) 반응으로 합성한 cDNA를 주형으로 하여 mRNA를 검출하고자 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 진행하였다. 합성된 cDNA를 주형가닥으로 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa Bio Inc, Japan) 및 primer (Bioneer, Korea) 를 첨가한 뒤, Quantstudio 3 Real-time PCR 기기 (Life Technologies Holdings Pte Ltd., Singapore) 를 이용하여 증폭시켰다. 각 시료들의 유전자 발현량은 *RPLP0* (36B4)의 발현량으로 보정하였다.

2.8. 세포 단백질 추출 및 단백질 전기영동

HepG2 cells를 PBS에 세척하여 RIPA buffer에 용해시킨 후 세포 단백질을 용해하였다. 용해된 단백질 농도는 micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher scientific) 를 사용하여 정량하였다. 동일한 양의 단백질 (20~30 μ g) 을 8~10 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 에 전기 영동 하였고, nitrocellulose transfer membrane (NC membrane) (GVS, Korea) 으로 옮겼다. 5 % (W/V) skim milk (BD Difco)로 1시간 동안 blocking 후, TBS-T

(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20) 로 10분씩 총 세 번 washing 하였다. 이후 1차 antibody인 anti-p-STAT3 (1:5,000, Cell signaling, #9131S), anti-STAT3 (1:4,000, Santacruz, #SC-482), anti-SOCS3 (1:5,000, Cell signaling, #2923S), anti-p-p44/42 (Erk1/2) (1:5,000, Cell signaling, #9101), anti-p44/42 (ERK) (1:5,000, Cell signaling, #9102), anti-p-p38 (1:5,000, Cell signaling, #4631), anti-p38 (1:5,000, Cell signaling, #8690), anti-p-SAPK/JNK (1:5,000, Cell signaling, #9251), anti-SAPK/JNK (1:5,000, Cell signaling, #9252) 는 4 °C 에서 overnight 하였으며 TBS-T로 15분씩 3번 washing 한 후 과산화효소 (peroxidase) 가 부착된 2차 antibody를 실온에서 1시간 반응시켰다. 단백질 밴드는 증강 화학 발광법 (ECL) 을 사용하여 나타난 단백질 밴드를 확인하였다. 단백질 검출과 정량은 Fusion Solo S (Vilber, France) 를 사용하였고, 단백질 양은 β -actin (1:10,000, Sigma, #A2066) 으로 보정하였다.

2.9. RNA 염기서열분석 (RNA sequencing analysis)

2.9.1. RNA preparation, library preparation, and RNA-Seq

실험에서 사용된 Total RNA (1 ug)는 DNase로 처리하여 Illumina 의 Truseq Stranded Total RNA Kit (San Diego, CA, USA) 를 사용하여 라이브러리로 변환되었다. RNA 중 ribosomal RNA를 제거하기 위해 Ribo-Zero Removal Kit (Illumina) 를 사용하였다. 나머지 RNA는 정제되고 조각내어진 후 역전사되며, 어댑터가 연결된 후 마지막으로 PCR을 통해 DNA fragments가 증폭되었다. 이렇게 만들어진 RNA-seq 라이브러리는 Illumina NovaSeq 6000 장비에서 paired-end 150 bp read 길이로 시퀀싱되었다. 마지막으로 Illumina 의 BaseSpace 를 사용하여 bcl 파일을 FASTQ 파일로 변환하여 데이터 파일형식이 변환되고 샘플이 분리되었다.

2.9.2. Analysis of Differentially Expressed Genes and Molecular Pathways in liver.

필터본이 처리된 간조직에서 RNA sequencing 데이터를 분석하기 위해서 먼저 Trimmomatic ver. 0.39를 사용하여 낮은 품질의 sequencing 리드를 필터링하고, 남은

데이터를 *Mus_musculus.GRCm39* 기준의 유전체에 매핑하기 위해 HISAT2 (ver. 2.2.1) 를 활용했다. 이후 SAM tools로 유일한 리드를 선택하고, feature Count (Subread v2.0.3) 를 통해 유전자 발현을 측정했다. 발현이 낮은 유전자를 제거한 후 DESeq2 package (R v4.2.2) 를 사용하여 발현 데이터를 normalize 하였다 [29]. 이후 limma package (v3.54.1) 를 이용하여 p-value 0.05 이하, $|\log_2(\text{Fold change})| > 1.6$ 이상인 유전자들을 차이가 있는 발현 유전자로 선정했다.

2.10. 통계분석

본 실험의 분석 결과는 3회 반복하여 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 표시하였으며, 실험군과 대조군 간 비교는 GraphPad PRISM 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) 를 사용하여 통계 분석을 수행했다. 또한 모든 값은 일원배치분산 분석인 One-way ANOVA (analysis of variance) 를 사용하여 통계 처리 후 사후 검증은 Tukey: Compare all pairs of columns 를 사용하며 $p < 0.05$ 수준에서 유의함을 보여주었으며, 통계적 유의성은 별표로 표기하였다.

Table

Table 1. List of human primer sequences used for qRT- PCR.

Genes	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
<i>RPLP0</i>	CAG GTG TTC GAC AAT GGC AG	CAC TGG CAA CAT TGC GGA C
<i>CYP26A1</i>	CTG GCT GCC TCT CTA ACC TG	GAT CAC CGG CAC GTA GCA TT
<i>CYP26B1</i>	ACC TGC CCT TCA GTG GCT A	GCT GCT CTC AAT GAG GAG GT
<i>WEE1</i>	ATG TGC GAC AGA CTC CTC AAG	TCA CTG GCT TCC ATG TCT TCA

3. 연구 결과

3. 1. Filbertone reduces cell viability of hepatocarcinoma (HCC) cells in dose-dependent manner.

필버톤 (그림 1) 이 기초적인 항암 활성을 나타내는지 확인하기 위해 간암 세포를 사용하여 생존율을 측정하였다. 인간 간암 세포인 HepG2와 Huh7에 필버톤을 각각 농도별로 (0 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M) 48시간 동안 처리하였다. 필버톤 처리에 의해 인간 간암 세포 HepG2과 Huh7의 생존율이 농도 의존적으로 감소된 것을 확인할 수 있다 (그림 2).

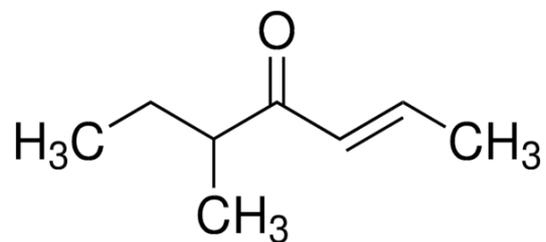


Figure 1. The chemical structure of filbertone (5-Methylhept-2-en-4-one).

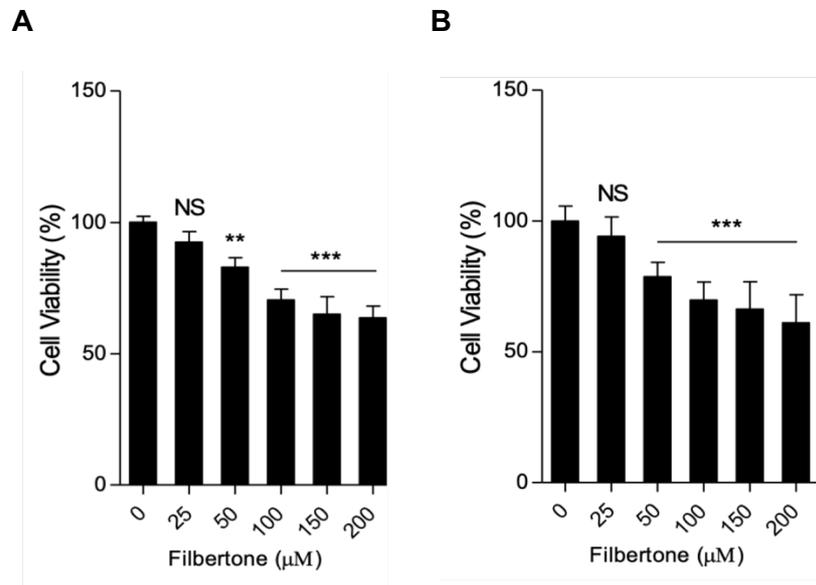


Figure 2. Filbertone does-dependently reduces cell viability in HCC cells.

(A) HepG2, (B) Huh7 cells were cultured in 24-well plate for 24 h and then were treated with different concentrations of filbertone (0 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM) for 48 h. The cell viability was analyzed by MTT assay. The percentage was calculated by comparing the O.D. 570 nm. Data represent means ± SD (n=4). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns: not significant compared with the controls.

3. 2. Filbertone have no cytotoxicity effects in AML12 hepatocytes (Normal cell).

필버톤이 마우스 정상 간세포 AML12의 생존율에 미치는 영향을 확인하였다. 필버톤은 인간 간암 세포인 HepG2와 Huh7에 처리된 동일한 조건의 농도 (0 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM) 로 48시간 동안 처리하였다. 하지만 마우스 정상 간세포 AML12의 생존율은 필버톤 처리에 따른 유의적인 차이가 없음을 확인할 수 있다 (그림 3). 이는 필버톤이 정상 간세포에는 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다.

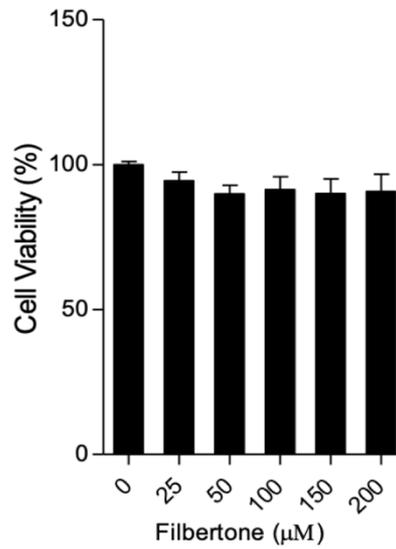


Figure 3. Cell viability assay of filbertone on normal cells.

AML12 cells were cultured in a 48-well plate for 48 h and then were treated with different concentrations of filbertone (0 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM) for 48 h. The cell viability was analyzed by MTT assay. The percentage was calculated by comparing the O.D. 570 nm. Data represent means \pm SD (n=4). Data compared with the controls.

3. 3. Filbertone reduces activation of *STAT3-SOCS3* independently of MAPK signaling pathways.

간암의 대표적인 표적 치료제 소라페닙의 타겟에 해당하는 MAPK pathway에 대한 필버톤의 효과를 확인하고자 하였다. 또한 최근 HCC의 위험요인으로 계속해서 증가하고 있는 비알코올성 지방간질환 (NAFLD) 문제를 이해하기 위해 간암 세포 (HCC) 로 전환되는 과정에서 *STAT1*과 *STAT3* 신호전달 차이에 초점을 맞추는 연구가 보고되었다. *STAT1* 신호전달은 CD8+ T cell을 모집하여 NASH와 fibrosis를 유도하여 HCC로 진행되지만, NAFLD에서 진행된 HCC는 *STAT3* 활성화를 통해 NASH와 fibrosis로의 과정 없이 HCC로 전환되는 사실이 확인되었다 [82]. 더불어 본 연구에서는 high-glucose인 상태를 고에너지 상태 또는 HFD의 상태로 동일하게 보았으며, high-glucose에서 *JAK2/STAT3*가 활성화 된다는 선행연구결과를 확인하였다 [83]. 이를 통해, western blot을 수행하여 필버톤 처리에 따른 *STAT3*와 MAPKs의 expression과 *STAT3*의 down stream에 해당하는 *SOCS3*의 gene expression을 protein 수준에서 확인하였다. 그 결과로, HepG2에서 필버톤의 처리에 따라 MAPKs protein expression은 변화가 없으나 (그림 4), *STAT3*의 활성은 농도 의존적으로 억제된 것을 확인하였다 (그림 5). 따라서, 필버톤은 MAPKs 신호 전달 경로와는 상관없이 *STAT3*의 활성을 직접적으로 억제한다는 것을 확인하였다.

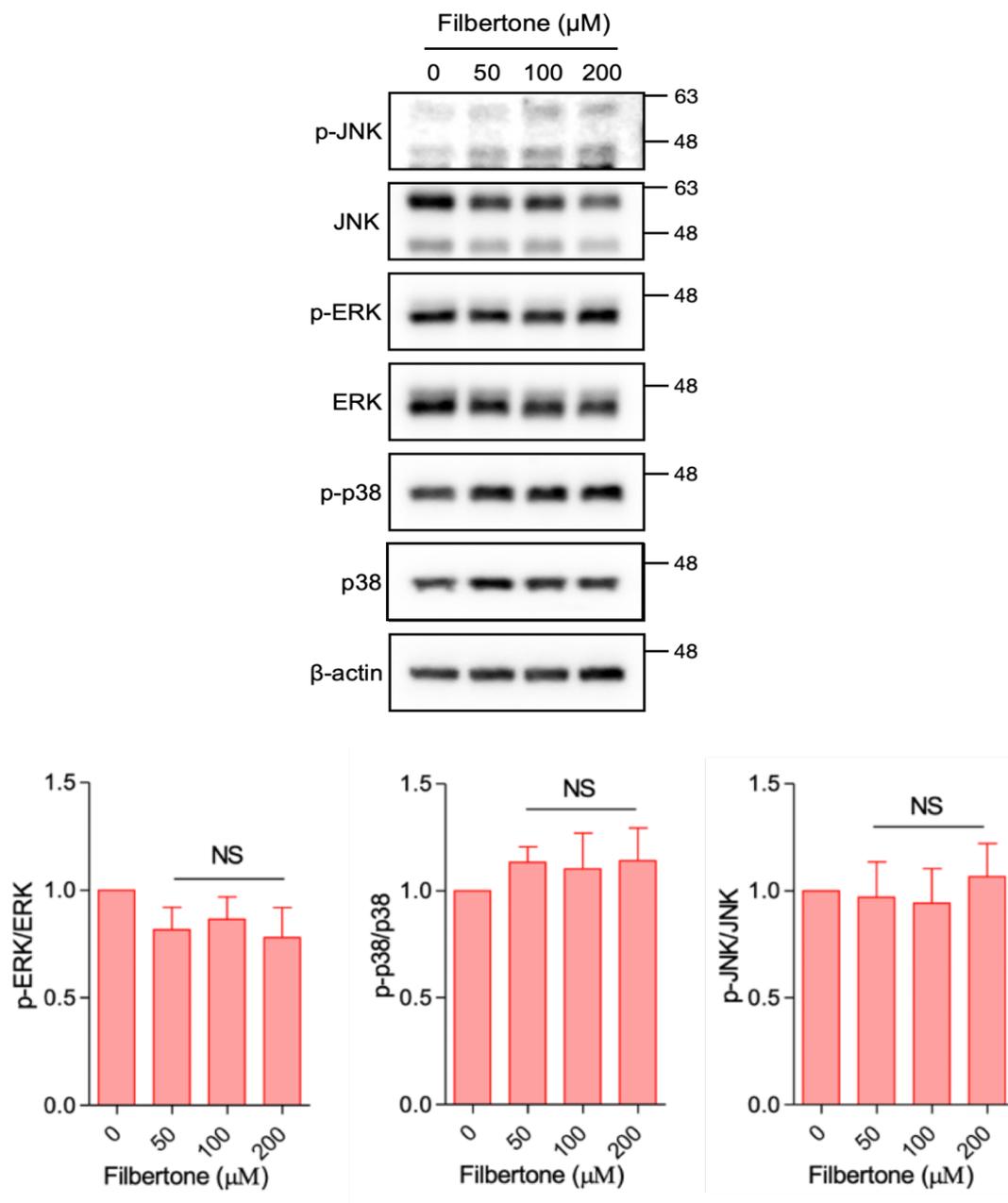


Figure 4. Filbertone has no effects on the MAPKs signaling pathway in HepG2 cells.

HepG2 cells were cultured in 12-well plate for 24 h and then were treated with different concentrations of filbertone (0 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM) for 48 h. The MAPKs gene expression levels were determined by western blotting with specific antibodies. *β-actin* was used as an internal control. Data represent means ± SD (n=3). ns: not significant compared with the 0 μM.

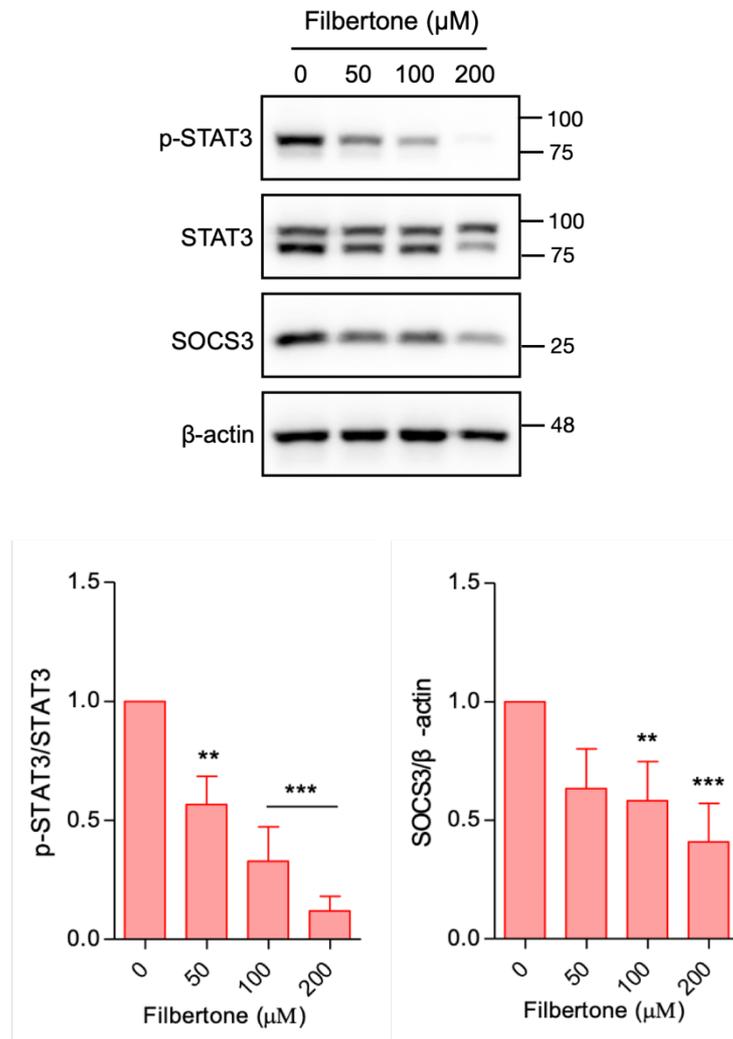


Figure 5. Filbertone reduces activation of *STAT3-SOCS3* in HepG2 cells.

HepG2 cells were cultured in 12-well plate 24 h and then were treated with different concentrations of filbertone (0 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM) for 48 h. Expression of proliferation factors protein levels of *p-STAT3* and *SOCS3* was measured using a western blot. *β-actin* was used as an internal control. Data represent means ± SD (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with the 0 μM.

3. 4. Discovery of Novel Signaling Pathways in Anticancer Effects through RNA-seq Data.

필버톤의 항암 활성과 관련하여 새로운 신호전달경로를 확인하기 위해 필버톤을 처리한 마우스 간세포를 사용하여 도출된 RNA-sequencing data를 분석하였다. $|\text{Fold change}| > 1.6$ 기준으로 cut off 하였을 때, 세포 증식과 관련된 Gene들이 상위 20위를 차지하였다 (표 2). 또한 RNA-seq data를 통해 Gene set enrichment analysis (GSEA) 분석을 수행하였고, 이를 통해 필버톤이 세포 증식과 관련된 pathways를 하향조절 한다는 결과가 도출되었다 (그림 6).

	ID	Gene symbol	Fold Change
1	3371	Cyp26a1	7.851
2	12682	Obp2a	4.437
3	15677	Ripor2	4.024
4	8838	Hamp2	3.642
5	162	Acot3	3.397
6	4258	Egr1	3.088
7	19944	Vmn2r20	3.021
8	11411	Mmd2	3.010
9	17722	St6galnac4	2.944
10	10471	Lingo4	2.929
11	8343	Gna14	2.890
12	5930	Gm12718	2.740
13	3648	Defb1	2.544
14	9163	Hscb	2.540
15	20151	Wfdc2	2.515
16	9348	Ift43	2.480
17	10581	Lrp11	2.471
18	20143	Wee1	2.435
19	8546	Gramd1b	2.344
20	659	Ankmy1	2.290

Table 2. Top 20 RNA-seq data related cell cycle genes.

RNA-sequencing was performed in hepatoma cellular treated with filbertone compared with control (PBS with DMSO-treated). The data indicates fold change.

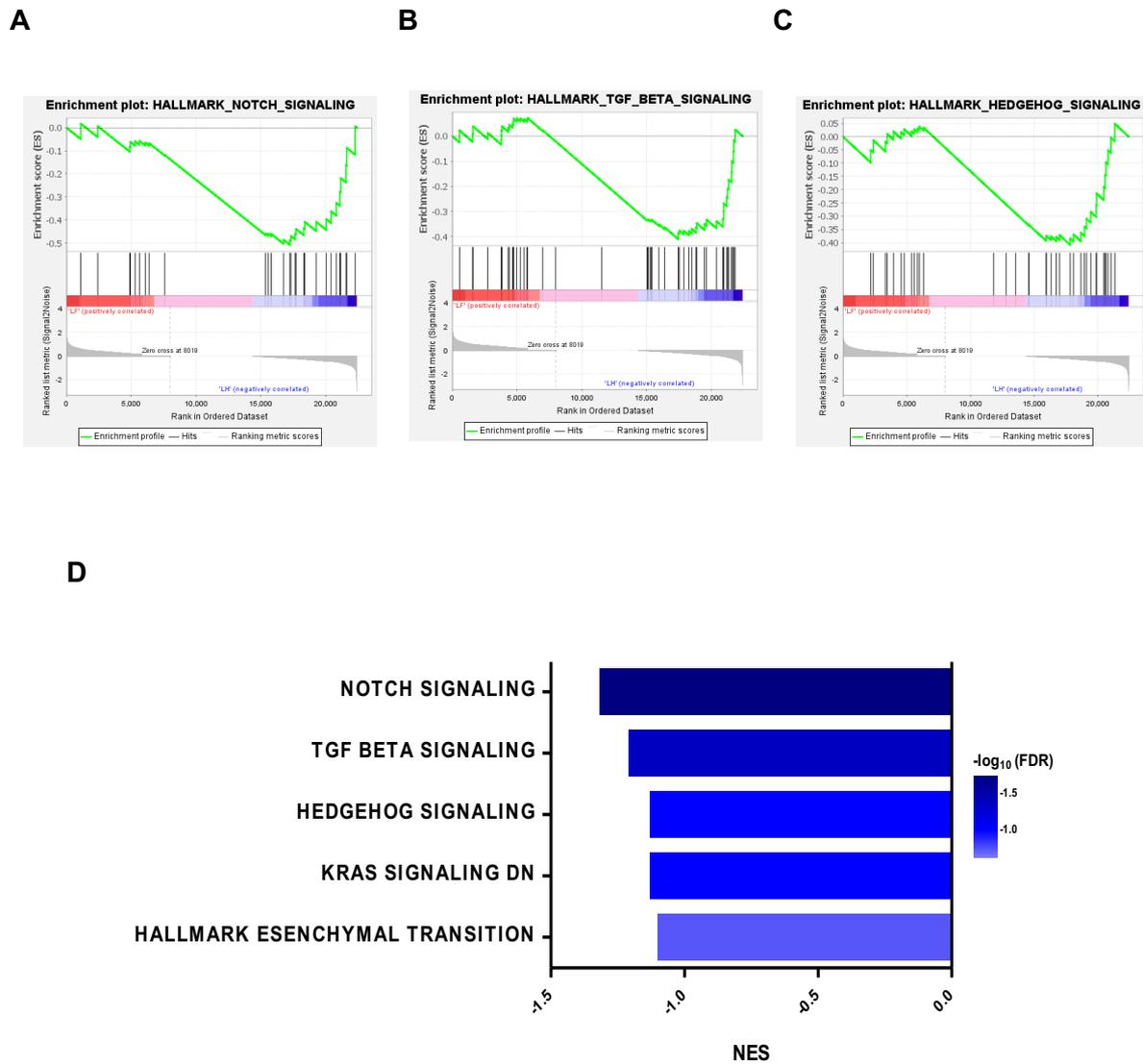


Figure 6. Analysis of Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of filbertone in the liver tissue.

Gene set enrichment analysis (GSEA) depicts the differentially expressed genes (DEGs) identified between the HFD and filbertone groups. (A) NOTCH signaling pathway, (B) TGF- β signaling pathway, (C) HEDGEHOG signaling pathway, (D) Visualization of Functional Enrichment result.

3. 5. The effects of filbertone on the *CYP26A1* and *CYP26B1* expression in HepG2 cells.

필버톤을 처리한 간세포를 사용하여 도출된 RNA-seq data에서 $|\text{fold change}| > 1.6$ 기준으로 분석하였을 때, retinoic acid 대사 유전자 발현의 변화가 크다는 점을 확인하였다. 선행된 연구에서 retinoic acid 대사 조절이 CD8+T cell을 매개하여 HCC 진단과 예후를 결정하고 치료제로서의 잠재력이 확인되었으며 [84], 현재 retinoic acid의 활성 대사체인 ATRA (9-cis RA, 13-cis-RA) 가 급성 골수병 백혈병 (acute promyelocytic leukemia) 치료에 임상적으로 사용되고 있다고 보고되었다 [85]. 또한 ‘The Human Protein Atlas’를 통해 *CYP26A1*의 발현이 간에서 특이적으로 높게 발현되는 것을 확인하였다 (그림 7A). 이를 통해 STRA를 비활성 대사체로 전환하는 Cytochrome P450 환원효소 (reductase)인 *CYP6A1*과 *CYP26B1*의 발현에 미치는 필버톤의 영향을 확인하기 위해 간암 세포 HepG2를 사용하여 필버톤을 농도별로 (0 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM) 48시간동안 처리 한 후 qRT-PCR을 수행하여 각각의 gene expression level을 확인하였다 (그림 7B). 이를 통해 필버톤을 처리한 군에서 *CYP6A1*과 *CYP26B1*의 발현이 감소하였으며, 이 결과는 필버톤이 retinoic acid 대사체의 조절을 통해 세포 증식을 억제하여 항암 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

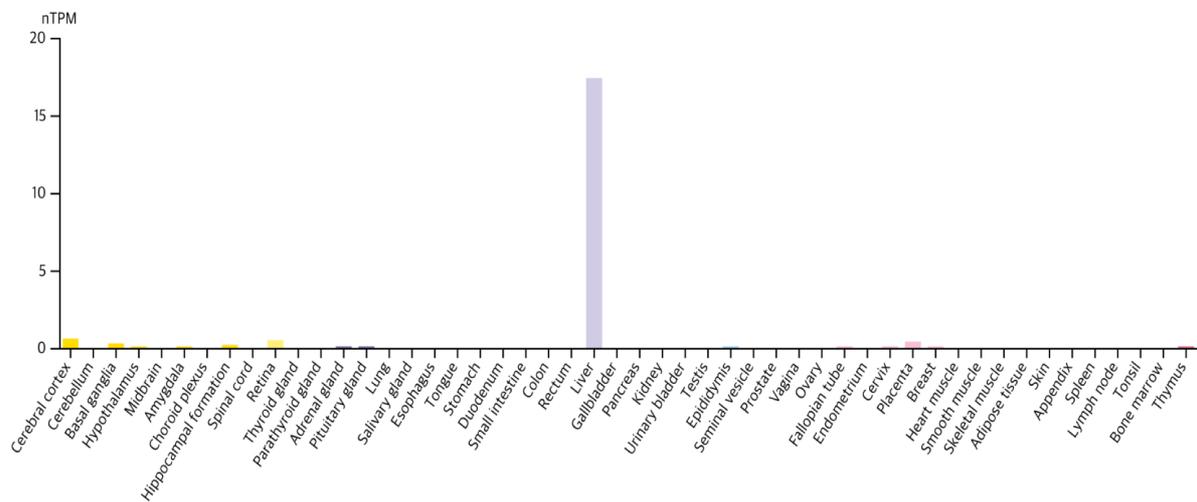
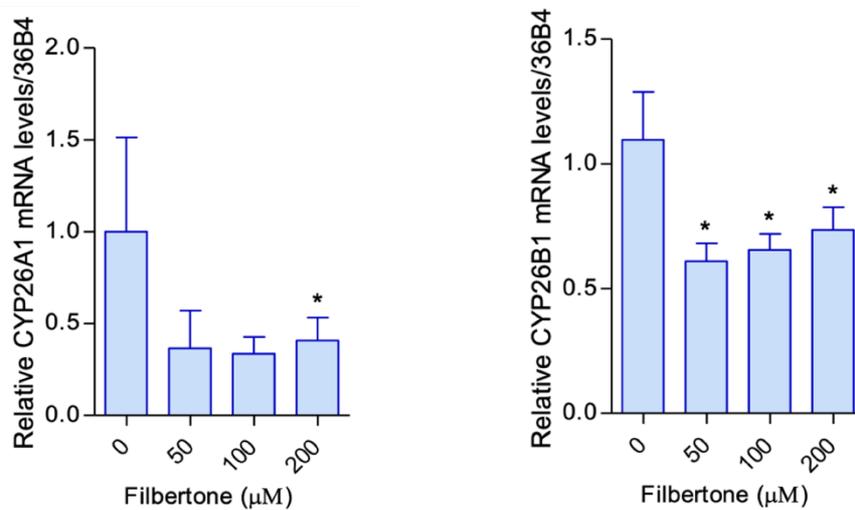
A**B**

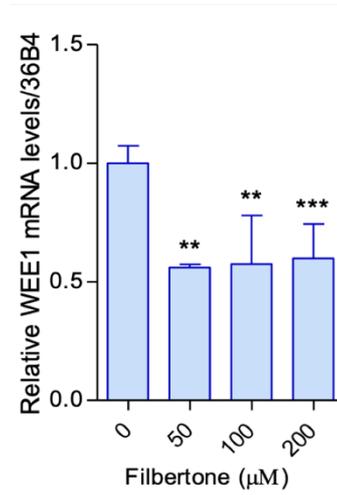
Figure 7. Filbertone reduces Cytochrome P450 family mRNA expression in HepG2 cells.

(A) The Human Protein Atlas data. The consensus dataset consists of normalized expression (nTPM) levels for 55 tissue types, created by combining the HPA and GTEx transcriptomics datasets using the internal normalization pipeline. Color coding is based on tissue groups, each consisting of tissues with functional features in common. (B) HepG2 cells were cultured in 48-well plate for 24 h and then were

treated with different concentrations of filbertone (0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) for 48 h. qRT-PCR determined the mRNA expression levels of *CYP26A1* and *CYP26B1*. *RPLP0* (36B4) was used as an internal control. Data represent means \pm SD (n=3). *p<0.05 compared with the 0 μ M.

3.6. Filbertone regulates the cell cycle genes in HCCs.

필버톤이 retinoic acid 대사 조절을 통해 암세포 증식을 억제한다는 가능성을 확인한 뒤, cell cycle 조절에 영향을 미치는지 확인하였다. 필버톤을 처리한 간세포의 RNA-seq 데이터에서 $|\text{fold change}| > 1.6$ 을 기준으로 수행한 분석에서 상위 20위에 속한 *WEE1*의 gene expression level을 확인하였다. 본 연구에서는 *WEE1*에 대한 필버톤의 효과를 확인하기 위해 간암 세포 HepG2를 사용하여 필버톤을 농도별로 (0 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM) 48시간 동안 처리 한 후, qRT-PCR를 수행하여 mRNA 수준에서의 gene expression level과 (그림 8A) western blot을 수행하여 protein 수준에서 gene expression level을 확인하였다 (그림 8B). 필버톤을 처리한 군과 처리하지 않은 군을 비교하였을 때, *WEE1*의 expression이 mRNA와 protein 수준에서 모두 감소하였음을 확인하였다 (그림 8B). 따라서 필버톤이 간암 세포의 RA 대사 조절을 통해 cell cycle을 조절하여 암세포의 증식 억제 효과를 가진다고 보여진다.



A

B

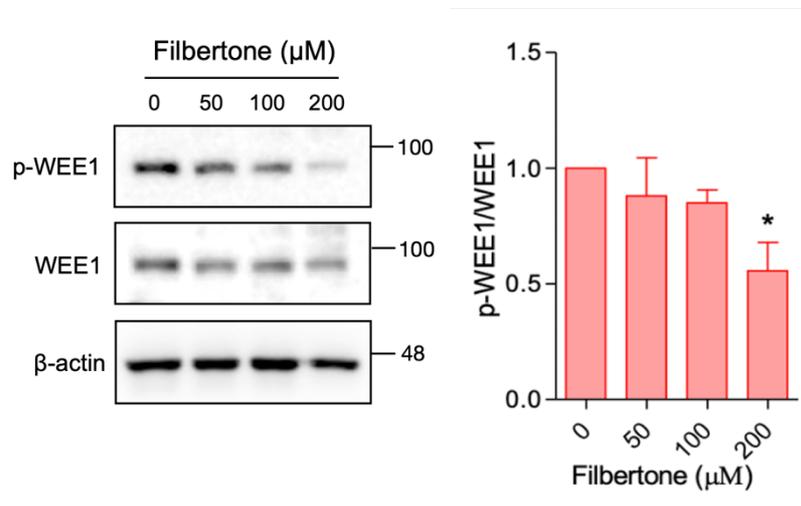


Figure 8. Filbertone reduces *WEE1* in HepG2 cells.

HepG2 cells were cultured in 48-well plate for 24 h and then were treated with different concentrations of filbertone (0 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM) for 48 h. (A) qRT-PCR determined the mRNA expression level of *WEE1*. *RPLP0* (36B4) was used as an internal control. (B) The protein expression level of *WEE1* was determined by western blot. Data represent means ± SD (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with the 0 μM.

3. 7. Anti-proliferative activity of filbertone in HCCs.

필버톤이 간암 세포의 증식 억제를 통해 항암 활성을 나타내는지 확인하고자 인간 간암 세포인 HepG2를 선택하여 심화된 실험을 진행하였다. 필버톤을 농도별로 (0 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M), 시간대별 (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) 로 처리하였다. 이를 통해 농도가 증가하고 처리 시간이 길수록 HepG2의 증식률이 감소함을 확인하였다 (그림 9). 따라서 간암 세포에서 보여지는 필버톤의 항암 활성이 세포 증식 억제를 통한 활성이라는 것을 간접적으로 확인하였다.

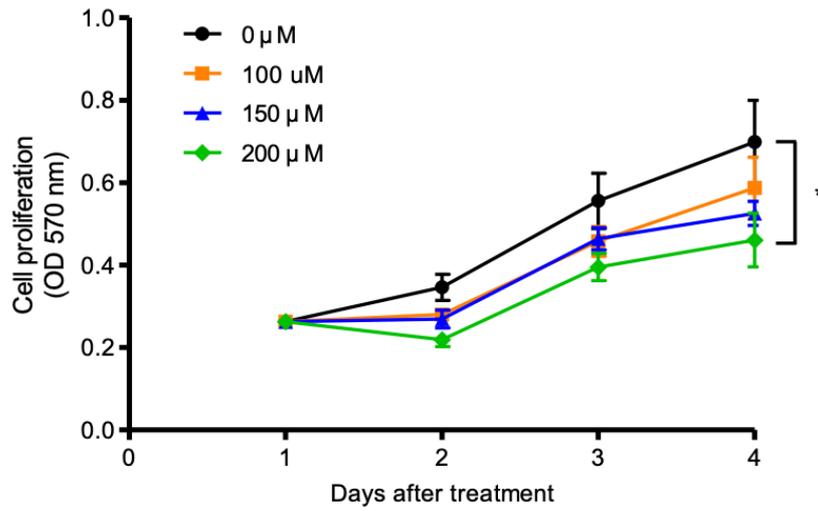


Figure 9. Filbertone inhibits cell proliferation in HCC cells.

HepG2 cells were cultured in 24-well plate for 24 h and then were treated with different concentrations of filbertone (0 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM) for 0 h, 24 h, 48 h, and 72 h. The proliferation of HepG2 cells was measured using the MTT assay. Data are presented as the mean ± SD (n=3). *p<0.05 compared with 0 μM.

4. 고찰 및 결론

비알코올 지방간 질환 (NAFLD) 은 비만 및 당뇨병 인구의 증가와 함께 전 세계적으로 유병률이 급격하게 증가하고 있으며, 국내 유병률은 약 30% 정도로 추정된다. 만성으로 진행되면 간경변증이나 간세포암종과 같은 말기 간질환으로 진행하거나 심혈관 질환의 발생 위험이 높다. 서구화된 식생활과 불량한 생활 습관, 신체 활동 부족으로 인한 비만과 당뇨병 환자의 증가를 고려한다면, NAFLD 의 유병률도 지속적으로 증가하여 간암의 주요 원인이 될 수 있음을 예측된다. 본 연구는 Filbertone 의 기초적인 항암 활성을 확인하기 위해 MTT assay 를 진행하였으며, 이를 통해 인간 간암 세포인 HepG2 세포와 Huh7 세포에서는 선택적으로 세포독성을 나타내지만, 정상 간세포인 AML12 에는 세포 독성이 없었다. 간암의 대표적인 표적 치료제인 소라페닙의 타겟이며, 기존에 알려진 분자적인 항암 메커니즘에 해당하는 MAPKs 신호 전달 경로와 STAT3, SOCS3 를 western blot 을 수행하여 gene expression 을 확인하였다. Western blot 결과를 통해 필버톤이 간암세포에서 MAPKs 와는 상관없이 STAT3 와 SOCS3 의 활성을 감소시킴을 확인하였다. STAT3 는 NAFLD 에서 간 섬유화 및 간경변증의 진행 없이 HCC 진행에 관여하며, high-glucose 인 상태에서 STAT3 의 활성화로 암이 유발한다는 선행된 연구 결과를 통해 새로운 항암 활성 메커니즘을 찾고자 필버톤을 처리한 간세포를 사용하여 RNA-sequencing 을 진행한 data 를 활용하였다. RNA-seq 데이터에서 |Fold change|>1.6 기준으로 분석한 결과 세포 증식 관련 유전자와 레티노산 대사 관련 유전자들이 상위 20 위에 속하였다. 이에 따라 *CYP26A1* 과 간의 상관관계를 확인하고자 Human protein atlas 프로그램을 사용하여 *CYP26A1* 이 다른 장기에 비해 간에서 특이적으로 발현되는 것을

확인하였다. 이후 qRT-PCR 과 western blot 을 수행하여 레티노산 대사 효소 (*CYP26A1*, *CYP26B1*) 세포 증식 관련 유전자 (*WEE1*) 의 mRNA 와 protein 수준에서 gene expression level 을 확인한 결과, filbertone 처리에 의해 *CYP26A1*, *CYP26B1*, *WEE1* 유전자의 expression level 이 감소한 것을 확인하였다. 또한 Gene set enrichment analysis, GSEA 분석한 결과, 세포 증식과 관련된 4 가지 신호 전달 경로 (Notch signaling pathway, TGF- β signaling, Hedgehog signaling, Hallmark esenchymal transition signaling pathway) 가 하향 조절되었음을 확인하였다. 결론적으로, 본 연구에서는 filbertone 이 간암 세포에서 세포 증식 억제를 통해 항암 활성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 따라서 필버톤은 지금까지 사용되고 있는 간암 치료제의 부작용을 낮추며, 간암을 예방 또는 치료할 수 있는 천연 식물유래 물질이 될 수 있음을 제시한다. 앞으로 추가 연구를 통해 STAT3 의 활성을 조절하는 자세한 분자적인 메커니즘을 확인해야 하며, 더불어 항암 활성에 대한 새로운 신호 전달 경로의 발견을 뒷받침할 메커니즘을 밝혀내야 한다.

5. 참고 문헌

1. De Siervi, S. and C. Turato, *Liver Organoids as an In Vitro Model to Study Primary Liver Cancer*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(5): p. 4529.
2. McGlynn, K.A., J.L. Petrick, and H.B. El-Serag, *Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma*. Hepatology, 2021. **73 Suppl 1**(Suppl 1): p. 4-13.
3. Rungay, H., et al., *Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040*. Journal of Hepatology, 2022. **77**(6): p. 1598-1606.
4. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021. **71**(3): p. 209-249.
5. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2022*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2022. **72**(1): p. 7-33.
6. Cheng, A.L., et al., *Challenges of combination therapy with immune checkpoint inhibitors for hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2020. **72**(2): p. 307-319.
7. Faivre, S., L. Rimassa, and R.S. Finn, *Molecular therapies for HCC: Looking outside the box*. J Hepatol, 2020. **72**(2): p. 342-352.
8. Doycheva, I. and P.J. Thuluvath, *Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: An Update of a Rapidly Evolving Field*. J Clin Exp Hepatol, 2019. **9**(5): p. 588-596.
9. Kudo, M., et al., *Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial*. The Lancet, 2018. **391**(10126): p. 1163-1173.
10. Wang, H., et al., *Experimental models of fatty liver diseases: Status and appraisal*. Hepatology Communications, 2023. **7**(7): p. e00200.
11. Ghevariya, V., et al., *Knowing what's out there: awareness of non-alcoholic fatty liver disease*. Frontiers in medicine, 2014. **1**: p. 4.
12. Gawrieh, S., et al., *Burden of fatty liver and hepatic fibrosis in persons with HIV: A diverse cross-*

- sectional US multicenter study*. Hepatology, 2023. **78**(2): p. 578-591.
13. Shah, P.A., R. Patil, and S.A. Harrison, *NAFLD-related hepatocellular carcinoma: The growing challenge*. Hepatology, 2023. **77**(1): p. 323-338.
 14. Silva, A.C., P. Nogueira, and M.V. Machado, *Hepatic steatosis after liver transplantation: a systematic review and meta-analysis*. Liver Transplantation, 2023. **29**(4): p. 431-448.
 15. Younossi, Z.M., *Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective*. J Hepatol, 2019. **70**(3): p. 531-544.
 16. Anstee, Q.M., S. McPherson, and C.P. Day, *How big a problem is non-alcoholic fatty liver disease?* Bmj, 2011. **343**: p. d3897.
 17. Katsiki, N., D.P. Mikhailidis, and C.S. Mantzoros, *Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update*. Metabolism, 2016. **65**(8): p. 1109-1123.
 18. Assy, N., et al., *Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients*. Dig Dis Sci, 2000. **45**(10): p. 1929-34.
 19. Guo, Z., et al., *Association of non-alcoholic fatty liver disease with thyroid function: A systematic review and meta-analysis*. Dig Liver Dis, 2018. **50**(11): p. 1153-1162.
 20. Kumarendran, B., et al., *Polycystic ovary syndrome, androgen excess, and the risk of nonalcoholic fatty liver disease in women: A longitudinal study based on a United Kingdom primary care database*. PLoS Med, 2018. **15**(3): p. e1002542.
 21. Kim, J.A. and K.M. Choi, *Sarcopenia and fatty liver disease*. Hepatol Int, 2019. **13**(6): p. 674-687.
 22. Lee, Y.H., et al., *Sarcopaenia is associated with NAFLD independently of obesity and insulin resistance: Nationwide surveys (KNHANES 2008-2011)*. J Hepatol, 2015. **63**(2): p. 486-93.
 23. Le, M.H., et al., *2019 Global NAFLD Prevalence: A Systematic Review and Meta-analysis*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2022. **20**(12): p. 2809-2817.e28.
 24. Oh, K., et al., *Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 20th anniversary: accomplishments and future directions*. Epidemiol Health, 2021. **43**: p. e2021025.
 25. Wong, V.W., et al., *Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years*. Gut, 2010. **59**(7): p. 969-74.
 26. Vernon, G., A. Baranova, and Z.M. Younossi, *Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults*. Aliment Pharmacol Ther, 2011. **34**(3): p. 274-85.

27. *EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. *Obes Facts*, 2016. **9**(2): p. 65-90.
28. Francque, S. and L. Vonghia, *Pharmacological Treatment for Non-alcoholic Fatty Liver Disease*. *Adv Ther*, 2019. **36**(5): p. 1052-1074.
29. Chalasani, N., et al., *The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases*. *Hepatology*, 2018. **67**(1): p. 328-357.
30. Huang, D.Q., et al., *Global epidemiology of cirrhosis — aetiology, trends and predictions*. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2023. **20**(6): p. 388-398.
31. Eslam, M., et al., *MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease*. *Gastroenterology*, 2020. **158**(7): p. 1999-2014.e1.
32. Ng, C.H., D.Q. Huang, and M.H. Nguyen, *NAFLD versus MAFLD: prevalence, outcomes and implications of a change in name*. *Clin Mol Hepatol*, 2022. **28**: p. 790-801.
33. Park, J.W., et al., *Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study*. *Liver Int*, 2015. **35**(9): p. 2155-66.
34. Liu, Z., et al., *The trends in incidence of primary liver cancer caused by specific etiologies: Results from the Global Burden of Disease Study 2016 and implications for liver cancer prevention*. *J Hepatol*, 2019. **70**(4): p. 674-683.
35. Younossi, Z., et al., *Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2019. **17**(4): p. 748-755.e3.
36. Younossi, Z.M., et al., *Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009*. *Hepatology*, 2015. **62**(6): p. 1723-30.
37. Yasui, K., et al., *Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011. **9**(5): p. 428-33; quiz e50.
38. Ioannou, G.N., *Epidemiology and risk-stratification of NAFLD-associated HCC*. *Journal of Hepatology*, 2021. **75**(6): p. 1476-1484.
39. Lee, Y.B., et al., *Association of Metabolic Risk Factors With Risks of Cancer and All-Cause Mortality in Patients With Chronic Hepatitis B*. *Hepatology*, 2021. **73**(6): p. 2266-2277.
40. Orem, A., et al., *Hazelnut-enriched diet improves cardiovascular risk biomarkers beyond a lipid-*

- lowering effect in hypercholesterolemic subjects. *Journal of Clinical Lipidology*, 2013. **7**(2): p. 123-131.
41. Wang, J., et al., *Novel anti-obesity peptide (RLLPH) derived from hazelnut (Corylus heterophylla Fisch) protein hydrolysates inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes by regulating adipogenic transcription factors and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation*. *J Biosci Bioeng*, 2020. **129**(3): p. 259-268.
42. Puchl'ová, E. and P. Szolcsányi, *Filbertone: A Review*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018. **66**(43): p. 11221-11226.
43. Mutsnaini, L., et al., *Filbertone Protects Obesity-induced Hypothalamic Inflammation by Reduction of Microglia-mediated Inflammatory Responses*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2021. **26**(1): p. 86-92.
44. Moon, Y., et al., *Filbertone Ameliorates Adiposity in Mice Fed a High-Fat Diet via Activation of cAMP Signaling*. *Nutrients*, 2019. **11**(8).
45. Park, J., et al., *Activation of ROS-PERK-TFEB by filbertone ameliorates neurodegenerative diseases via enhancing the autophagy-lysosomal pathway*. *J Nutr Biochem*, 2023. **118**: p. 109325.
46. Kim, H. and B. Ahn, *Filbertone, (2E)-5-methyl-2-hepten-4-one, regulates thermogenesis and lipid metabolism in skeletal muscle of a high-fat diet fed mice*. *Applied Biological Chemistry*, 2023. **66**(1): p. 24.
47. Schug, T.T., et al., *Opposing Effects of Retinoic Acid on Cell Growth Result from Alternate Activation of Two Different Nuclear Receptors*. *Cell*, 2007. **129**(4): p. 723-733.
48. Pino-Lagos, K., Y. Guo, and R.J. Noelle, *Retinoic acid: A key player in immunity*. *BioFactors*, 2010. **36**(6): p. 430-436.
49. Noy, N., *The one-two punch*. *Adipocyte*, 2013. **2**(3): p. 184-187.
50. Gewiss, R., T. Topping, and M.D. Griswold, *Cycles, waves, and pulses: Retinoic acid and the organization of spermatogenesis*. *Andrology*, 2020. **8**(4): p. 892-897.
51. Lin, Y.-W., et al., *Cellular retinoic acid binding protein 1 protects mice from high-fat diet-induced obesity by decreasing adipocyte hypertrophy*. *International Journal of Obesity*, 2020. **44**(2): p. 466-474.
52. McIlroy, G.D., et al., *Fenretinide treatment prevents diet-induced obesity in association with major alterations in retinoid homeostatic gene expression in adipose, liver, and hypothalamus*. *Diabetes*, 2013. **62**(3): p. 825-36.
53. Green, H.N. and E. Mellanby, *VITAMIN A AS AN ANTI-INFECTIVE AGENT*. *British Medical Journal*,

1928. **2**(3537): p. 691-696.
54. *Vitamin A*, in *Vitamins in Animal and Human Nutrition*. 2000. p. 15-90.
55. Sommer, A. and F.R. Davidson, *Assessment and control of vitamin A deficiency: the Annecy Accords*. *The Journal of nutrition*, 2002. **132**(9): p. 2845S-2850S.
56. Imdad, A., et al., *Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from 6 months to 5 years of age*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010(12).
57. Trasino, S.E., et al., *Obesity Leads to Tissue, but not Serum Vitamin A Deficiency*. *Scientific Reports*, 2015. **5**(1): p. 15893.
58. Natarajan, S.K., et al., *Retinoid metabolism in the small intestine during development of liver cirrhosis*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **24**(5): p. 821-9.
59. Kawaguchi, R., et al., *Vitamin A Transport Mechanism of the Multitransmembrane Cell-Surface Receptor STRA6*. *Membranes*, 2015. **5**(3): p. 425-453.
60. Stevison, F., et al., *Chapter Eleven - Role of Retinoic Acid-Metabolizing Cytochrome P450s, CYP26, in Inflammation and Cancer*, in *Advances in Pharmacology*, J.P. Hardwick, Editor. 2015, Academic Press. p. 373-412.
61. Ross, A.C. and R. Zolfaghari, *Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism*. *Annu Rev Nutr*, 2011. **31**: p. 65-87.
62. Gronemeyer, L.a., *THE NUCLEAR RECEPTOR FactsBook*. 2002, ACADEMIC PRESS: Gulf Professional Publishing.
63. Melis, M., et al., *Retinoids in the Pathogenesis and Treatment of Liver Diseases*. *Nutrients*, 2022. **14**(7).
64. Pettinelli, P., et al., *Altered hepatic genes related to retinol metabolism and plasma retinol in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *PLOS ONE*, 2018. **13**(10): p. e0205747.
65. Zhong, G., et al., *The retinoic acid hydroxylase Cyp26a1 has minor effects on postnatal vitamin A homeostasis, but is required for exogenous atRA clearance*. *J Biol Chem*, 2019. **294**(29): p. 11166-11179.
66. Ray, W.J., et al., *CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 18702-8.
67. Brown, G.T., et al., *The expression and prognostic significance of retinoic acid metabolising enzymes in colorectal cancer*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90776.
68. Osanai, M., N. Sawada, and G.H. Lee, *Oncogenic and cell survival properties of the retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1*. *Oncogene*, 2010. **29**(8): p. 1135-44.

69. Lin, S., et al., *How does fascin promote cancer metastasis?* The FEBS Journal, 2021. **288**(5): p. 1434-1446.
70. Osanai, M. and G.H. Lee, *The retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1 upregulates fascin and promotes the malignant behavior of breast carcinoma cells.* Oncol Rep, 2015. **34**(2): p. 850-8.
71. Arrieta, Ó., et al., *Retinoic acid reduces chemotherapy-induced neuropathy in an animal model and patients with lung cancer.* Neurology, 2011. **77**(10): p. 987-95.
72. Freemantle, S.J., M.J. Spinella, and E. Dmitrovsky, *Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance.* Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7305-15.
73. Inoue, H., et al., *Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production.* Cell metabolism, 2006. **3**(4): p. 267-275.
74. Bode, J.G., et al., *Hepatic acute phase proteins—regulation by IL-6-and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling.* European journal of cell biology, 2012. **91**(6-7): p. 496-505.
75. Quesnelle, K.M., A.L. Boehm, and J.R. Grandis, *STAT-mediated EGFR signaling in cancer.* Journal of cellular biochemistry, 2007. **102**(2): p. 311-319.
76. Levy, D.E. and C.-k. Lee, *What does Stat3 do?* The Journal of clinical investigation, 2002. **109**(9): p. 1143-1148.
77. Liang, C., et al., *Clinicopathological significance and prognostic role of p-STAT3 in patients with hepatocellular carcinoma.* OncoTargets and therapy, 2018: p. 1203-1214.
78. Jiang, R., et al., *Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3.* Hepatology, 2011. **54**(3): p. 900-909.
79. Calvisi, D.F., et al., *Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC.* Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1117-1128.
80. Zheng, H., Y. Tan, and R.X. Cheng, *Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance.* World Journal of Gastroenterology, 2001. **7**(1): p. 33.
81. Yu, H., M. Kortylewski, and D. Pardoll, *Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment.* Nature reviews immunology, 2007. **7**(1): p. 41-51.
82. Geh, D., Q.M. Anstee, and H.L. Reeves, *NAFLD-Associated HCC: Progress and Opportunities.* J Hepatocell Carcinoma, 2021. **8**: p. 223-239.

83. Chen, K., et al., *Ginkgolide B Suppresses TLR4-Mediated Inflammatory Response by Inhibiting the Phosphorylation of JAK2/STAT3 and p38 MAPK in High Glucose-Treated HUVECs*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. **2017**: p. 9371602.
84. He, W., et al., *Metformin reduces hepatocarcinogenesis by inducing downregulation of Cyp26a1 and CD8(+) T cells*. *Clin Transl Med*, 2023. **13**(11): p. e1465.
85. Sanz, M.A., et al., *Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet*. *Blood*, 2019. **133**(15): p. 1630-1643.
86. 통계청. 2021년 사망원인통계 (<http://kostat.go.kr>) 2020.

영 문 요약

Liver cancer is a major health concern globally, ranking as the sixth most diagnosed cancer and the third leading cause of cancer-related deaths. If current trends persist, liver cancer cases are projected to increase by over 55% by 2040. One of the major challenges in liver cancer is late-stage detection, resulting in limited treatment options and a very low 5-year survival rate among liver cancer patients. While localized approaches like surgery or liver transplantation offer radical treatments, systemic chemotherapy becomes necessary for advanced cases involving extrahepatic spread or portal vein invasion. FDA-approved systemic therapies like Sorafenib and Lenvatinib, functioning as tyrosine kinase inhibitors, offer limited extensions in survival, often accompanied by side effects, and show modest effectiveness, particularly in patients with compromised liver function due to cirrhosis, limiting their use. Moreover, over 70% of liver cancer patients have concomitant liver cirrhosis, which complicates administering appropriate doses of anticancer drugs and may exacerbate liver function deterioration. This highlights the need for continued research to overcome these limitations.

Natural compounds derived from plants have been found to exhibit safe, stable, and beneficial physiological activities. Among these, filbertone, a hazelnut-derived aromatic component, has shown positive effects in antioxidation, obesity, and obesity-related improvements both in vitro and in vivo. However, as filbertone's anticancer activity remains unexplored, investigating its potential as an adjunct or therapeutic agent for cancer treatment is necessary. This study treated human liver cancer cells HepG2 and Huh7 with filbertone and conducted MTT assays, revealing a dose-dependent decrease in cell viability. Additionally, when subjected to the same conditions, normal liver cells AML12 showed no toxicity upon filbertone treatment, indicating selective toxicity of filbertone against liver cancer cells. This prompted a molecular investigation of filbertone's anticancer activity at the cellular level using western blotting, revealing filbertone's ability to suppress *STAT3* and *SOCS3* independent of the MAPK

signaling pathway targeted by Sorafenib. Subsequently, RNA-sequencing of filbertone-treated liver cells was performed to uncover new molecular mechanisms underlying filbertone's anticancer activity through the inhibition of *STAT3* and *SOCS3* activities. Gene set enrichment analysis revealed downregulation of cell proliferation-related pathways. Notably, specific enzymes involved in retinoic acid metabolism, *CYP26A1*, and cell proliferation-associated *WEE1* were among the top 20 genes specifically expressed in the liver compared to other organs, showing significant downregulation upon filbertone treatment, confirmed by qRT-PCR using HepG2 cells. Moreover, time-dependent assays with HepG2 cells treated with filbertone demonstrated a dose-dependent decrease in cell proliferation rates.

In summary, this study confirms filbertone's anti-cancer effects through the inhibition of cell proliferation, suggesting its potential as an adjunct or therapeutic agent for liver cancer. Further research elucidating mechanisms that decrease *STAT3* activity is crucial for future investigations.

Keyword: Anti-cancer effects, Cytochrome P-450, Filbertone, Hazelnut, Hepatocellular carcinoma (HCC), Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), Phytochemical, Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3).

감사의 글

석사 과정을 진행하면서 저의 학위논문이 잘 마무리될 수 있도록 소중한 많은 도움들이 있었기에 이 글을 빌려 감사의 인사를 드리고자 합니다.

우선 존경하는 안병용 교수님, 저희의 학위논문이 잘 마무리될 수 있도록 애써 주시고, 끝까지 이끌어 주셔서 진심으로 감사드립니다. 늘 배움과 경청의 태도를 가지신 교수님을 보며 연구에 대한 열정과 애정을 키웠고, 교수님의 가르침 덕분에 크게 성장할 수 있었습니다. 그리고 귀한 시간 내어 논문 심사 위원장을 맡아 주신 유리나 교수님, 교수님께 받은 RNA-seq 데이터를 잘 활용하여 학위논문을 잘 마무리 할 수 있었고 앞으로의 나날을 위한 깊은 격려와 조언에 감사드립니다. 또한 밝고 온화한 미소를 가지신 장유미 교수님, 더 좋은 논문 작성을 위한 교수님의 조언과 격려에 진심으로 감사드립니다.

오늘날의 저를 있게 해준 사랑하는 우리 가족, 든든한 가족이 있어서 무사히 졸업을 할 수 있었습니다. 어머니께서 주신 아낌없는 사랑 덕분에 부족함 없이 클 수 있었고, 마음속에서 언제나 든든한 버팀목이 되어 주신 아버지를 생각하며 힘든 시기를 이겨낼 수 있었습니다. 이 세상의 소중하고 값진 것들을 느끼며 살아갈 수 있게 해주신 나의 부모님께 이 영광을 돌립니다.

그리고 늘 밝은 웃음과 작은 것에도 감사하는 수민이를 보며 긍정적인 마음가짐을 배웠고, 작은 것도 완벽하게 지키며 무엇이든 열심히 하는 수정이를 보며 연구자의 자세를 배울 수 있었습니다. 이 자리를 함께 지켜준 동료들에게도 고마움을 전합니다. 그리고 밤낮으로 함께 고민하고 애써주는 민지의 모습을 보며 책임감과 포기하지 않는 마음가짐을 가지게 되었습니다. 함께 일하며 정말 큰 힘이 되었고 민지에게 진심 어린 고마움을 전합니다. 그리고 실험실 옆방인 형모를 보며 실험에 있어서 고찰하는 태도를 배울 수 있었습니다. 그리고 깊고 착한 배려심에 고마움을 전합니다.

인턴 생활을 거쳐 석사 과정 동안 우리의 손으로 하나씩 채워간 실험실이기에 정말 애정하고 소중한 공간이지만 노력한 만큼 원하는 결과를 얻었던 지난날과 비교하면 실험실은 너무나 가혹하고 모순적인 공간이었습니다. 실패의 연속과 계속된 좌절에 내려놓고 싶은 순간들도 많았으나 매번 ‘무너지지만 말자’라는 짧은 문장을 되뇌며 이 악물고 열심히 달려올 수 있었습니다. 여기에서 얻은 힘을 통해 사회에 공헌하고자 하는 사명감과 책임감을 가지고 존경받는 연구자가 되도록 항상 배움의 자세를 가지고 늘 정진하고 노력하겠습니다.

앞으로 많은 배움을 행할 소울 씨를 응원하고, 나의 든든한 연결점인 안병용 교수님, 수민, 수정, 민지, 형모의 멋진 앞날을 응원하며 감사의 글을 마무리하겠습니다.