creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

dCollection

[UCI]I804:48009-200000364464

이학석사 학위논문

다발골수종세포에서 에스쿨레틴에 의한 세포 증식 및 생존 억제에 관한 분자 메커니즘 연구

Molecular Mechanism Study on Inhibition of Cell Proliferation and Survival by Aesculetin in Multiple Myeloma Cells

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

유 호 민

다발골수종세포에서 에스쿨레틴에 의한 세포 증식 및 생존 억제에 관한 분자 메커니즘 연구

지 도 교 수 조 재 철

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2021 년 02 월

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

유 호 민

유호민의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 최 윤 숙

심사위원 조 재 철

심사위원 허 숙 경

울 산 대 학 교 대 학 원

2021 년 02 월

국문요약

배경: 다발골수종은 B 림프구의 최종 분화단계인 형질세포에서 발생하는 질환으로, 정상적인 항체대신 비정상적인 M 단백질을 과도하게 생성하는 것이 특징이다. 임상적 증상으로는 고칼슘혈증, 골병변, 빈혈 등을 일으키며, 현재 다발골수종의 치료방법으로는 항암화학요법과 조혈모세포이식이 있다. 에스쿨레틴(Aesculetin)은 물푸레나무, 인진쑥 등에서 추출한 추출물로써 다양한 고형암에서 항산화 효과가 있다고 알려져 있다. 이 실험은 다발골수종 세포들에 에스쿨레틴을 처리했을 때 나타나는 효과를 확인하기 위하여 진행하였다.

방법: 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에 에스쿨레틴을 처리한 후 MTS, BrdU assay 를 이용해 세포증식 및 세포생존율을 확인하였다. 세포사는 Annexin V 염색을 통해 확인하였고, 세포주기와 미토콘드리아 막 전위는 유세포 분석기를 이용하여 확인하였다. 이와 관련한 단백질을 면역침강법과 웨스턴 블로팅으로 확인하였다.

결과: RPMI-8226 세포의 양성 표지분자 (CD38, CD138)와 음성 표지분자 (CD19, CD34)를 확인하여 다발골수종 세포주임을 입증하였고, RPMI-8226 세포에 에스쿨레틴을 농도 별로 처리하여 72 시간 뒤 IC_{50} 값 10uM 의 결과를 도출하였다. 유세포 분석을 통한 세포사멸을 비교한 결과, 에스쿨레틴의 농도가 높아질수록 세포사멸이 유도되는 것을 확인하였고, 세포자멸사와 관련된 단백질인 Bax, Bak, Bcl-xl, Bcl-2 의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이후, 세포자멸사가 어떠한 경로를 통해 일어나는지 확인하기 위해 caspase 활성도와 미토콘드리아 막전위를 확인한 결과, 에스쿨레틴의 농도가 높아질수록 caspase 활성도가 증가하고, 미토콘드리아 막전위는 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 에스쿨레틴에 의해 일어나는 세포사가 내인성 경로를 통해 일어난다는 것을 확인하였다. 또한, 세포주기를 확인한 결과 에스쿨레틴에 의해 G0/G1 구간의 정지를 확인하였고, 관여하는 단백질의 발현정도 또한 에스쿨레틴에 의해 조절되는 것을 확인하였다. 마지막으로 STAT3 경로가 에스쿨레틴에 의해

일어나는 세포사에 관여하는지 확인하기 위해 면역침강법으로 확인한 결과, 에스쿨레틴의 농도 의존적으로 P-STAT3, STAT3 의 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

결론: 에스쿨레틴은 다발골수종 세포주에서 세포자멸사와 세포증식 억제 효과를 보여, 향후 다발 골수종의 새로운 치료제로서의 가능성이 있다.

목 차

국문요약 i

목 차 iii

List of Figures v

I. 서 론 1

II. 실험재료 및 방법 3

1. 시약 & 항체 3

2. 세포 배양 4

3. 세포 표지자에 대한 유세포 분석기 분석 연구 4

4. 세포 생존율 분석 연구 4

5. 세포 증식률 분석 연구 4

6. 세포 사멸에 대한 유세포 분석기 분석 연구 5

7. Caspase 활성도에 대한 유세포 분석기 분석 연구 5

8. 미토콘드리아 막전위에 대한 유세포 분석기 분석 연구 5

9. 싸이토크롬 *C*에 대한 세포질 추출 분석 연구 6

10. 세포주기 분석에 대한 유세포 분석기 분석 연구 6

11. Western blot 분석 연구 6

12. 통계 분석 7

III. 결과 ····· 8

1. 에스쿨레틴은 다발골수종 세포에서 세포독성을 유도한다. ····· 8
2. 에스쿨레틴은 caspase 의 활성화를 통해 RPMI-8226 세포에서 세포사멸을 유도한다. ····· 12
3. 에스쿨레틴은 RPMI-8226 세포에서 미토콘드리아 경로의 활성화를 통해 세포사멸을 유도한다. ····· 14
4. 에스쿨레틴은 RPMI-8226 세포의 세포증식 억제 및 G0/G1 세포주기 정지를 유발한다. ····· 16
5. 에스쿨레틴은 RPMI-8226 세포에서 STAT3 의 발현을 억제한다. ····· 18

IV. 고 찰 ····· 21

V. 참고문헌 ····· 23

영문요약 ····· 29

List of Figures

Figure 1. Molecular structure of Aesculetin. 9

Figure 2. Characterization of major surface marker in multiple myeloma cell line. 10

Figure 3. Aesculetin induces cytotoxity in RPMI-8226 cells. 11

Figure 4. Aesculetin causes toxicity in RPMI-8226 cells through caspase activation. 13

Figure 5. Aesculetin induces activation of the mitochondrial pathway in RPMI-8226 cells. 15

Figure 6. Aesculetin inhibits cell proliferation of RPMI-8226 cells and induces G0/G1 cell cycle arrest. 17

Figure 7. Aesculetin regulates the expression of cell cycle related proteins in RPMI8226 cells. 17

Figure 8. Aesculetin inhibits STAT3 expression in RPMI-8226 cells. 19

Figure 9. Mechanism schematic diagram showing the effect of Aesculetin in multiple myeloma. 20

서 론

다발골수종은 조혈계에 발생하는 암이며, 모든 암의 1%, 모든 혈액 악성 종양의 10%를 차지하는 비교적 발병률이 높은 혈액암이다 [1-2]. 국내에서 인구 10 만 명당 2.5 명 정도 발생하며, 전 세계적으로 다발골수종으로 진단되는 평균연령은 69 세이다. 약 70%는 65 세 이상, 40%는 75 세 이상으로 점차 고령화가 진행될수록 발병률은 증가하는 추세이다. 다발골수종의 진행단계는 국제 골수종 연구그룹 기준에 따라 단클론 감마병증과 무증상 다발골수종 단계가 선행된다 [3-5]. 다발골수종은 다양한 유형의 면역 기능 장애를 동반하는 M 단백질을 생성하는 형질세포의 증식을 특징으로 한다. 형질세포의 축적은 혈액세포의 생성을 방해하고 빈혈, 골수부전, 출혈장애, 용해성 골병변, 고칼슘혈증, 신장기능 부전 등 여러 합병증과 관련이 있다 [6-8].

다발골수종의 현재 치료법으로는 다발골수종 세포의 증식을 억제하는 종양 억제 효과와 면역기능 향상을 통해 종양세포를 제거하는 면역조절효과를 가진 면역억제제 탈리도마이드 (thalidomide), 레날리도마이드 (lenalidomide), 포말리도마이드 (Pomalidomide) 와 함께 병용하여 사용하는 코르티코스테로이드계 덱사메타손 (Dexamethasone), 프로테아좀 억제제인 볼테조밉 (Bortezomib), 카필조밉 (Carfilzomib)이 있다 [9-11]. 그 외에도 CD38 또는 SLAMF7 을 표적으로 하는 Monoclonal antibody 및 히스톤탈아세틸효소 억제제의 다양한 조합 치료방법들이 존재한다. 하지만 치료의 많은 발전으로 환자의 생존기간을 연장시켰음에도 불구하고 여전히 높은 재발율로 인해 완전한 치료가 불가능한 상태로 남아있다 [12-13].

에스쿨레틴은 쿠마린의 유도체로 개똥쑥, 인진쑥, 물푸레나무를 포함한 약용식물에서 유래된 천연화합물이다 [14]. 에스쿨레틴은 근섬유세포에서 ERK 경로 활성화를 통한 항산화 효과와 아토피 피부질환에서 염증성 사이토카인의 발현을 억제하여 항 염증 효과를 나타낸다는 보고가 있다 [15-16]. 기타 구강암

[17], 유방암 [18], 췌장암 [19], 대장암 [20], 자궁경부암 [21], 위암 [22], 폐암 [23] 등 다양한 고형암에서 항바이러스, 항암 효과를 가진다고 알려져 있다. 에스쿨레틴은 최근 혈액암 중 하나인 급성 골수성백혈병 세포주에서 미토콘드리아 매개 세포사멸 유도 및 유도인자 발현에 대해 보고되었다 [24-25]. 하지만 다발골수종에 대한 에스쿨레틴의 효과는 아직 알려진 바 없다. 그러므로 다발골수종 세포에서 에스쿨레틴에 대한 효능을 평가하기 위해 연구를 진행하였다 [26-28].

재료 및 연구방법

1. 시약 & 항체

Aesculetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)은 구입하여, dimethylsulfoxide (Wak-chemie Medical GmbH)에 녹여 -20℃에 보관하였다. 약물의 구조는 Figure. 1 에 나타내었다. Anti-human CD38-PE, anti-human CD138-FITC 는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, 독일)에서 구입하였고, anti-human CD19-FITC, anti-human CD34-PE, FITC, PE Mouse IgG-isotype control, Annexin V-FITC 는 BD Bioscience (San Diego, CA, 미국)에서 구입하였다. FITC-LEHD-FMK 는 eBioscience (Atlanta, GA, 미국)에서 구입하였다. Celltiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 는 promega (Madison, WI, 미국)에서 구입하였다. $DiOC_6(3)$ (3,3′-Dihexyloxacarbocyanine Iodide)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였고, Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents 는 Thermo fisher (Waltham, MA, 미국)에서 구입하였다. Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit 는 Roche Diagnostics (Mannheim, 독일)에서 구입하였다. Propidium iodide(PI)/RNase staining buffer 는 BD pharmingen (San Diego, CA, 미국)에서 구입하였다. Western ECL substrates 는 BIO-RAD (Hercules, CA, 미국)에서 구입하였다. anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-9, anti-cleaved PARP-1, anti-BCL-xl, anti-BAK, anti-Bax, anti-MCL-1, anti-c-myc, anti-CDK4, anti-CDK6, anti-P-STAT3, anti-CyclinD3, anti-$p21^{cip1}$, anti-$p27^{kip1}$, anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP, anti-Mouse IgG(H+L)-HRP 는 cell signaling technology (Beverly, MA, 미국)에서 구입하였다. anti-β-actin, anti-CDK2, anti-STAT3 anti-cytochrome *C*, anti-BCL-2 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, 미국)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

본 연구에 사용한 세포는 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 이다. 세포의 면역 표현형은 Figure 2 에 나타냈다. RPMI-8226 세포는 RPMI1640 배지 (GibcoBRL, Grand Island, NY, 미국)에 소태아혈청 (GibcoBRL) 10%와 페니실린-스트렙토마이신 1%를 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양하였고, 세포가 70~80% 정도 자랐을 때 계대배양 하였다.

3. 세포 표지자에 대한 유세포 분석 연구

RPMI-8226 세포를 수확하여 phosphate buffered saline (PBS)로 2 회 세척한다. 그 후, anti-human CD38-PE, anti-human CD138-FITC, anti- human CD19-FITC, anti-human CD34-PE, FITC, PE Mouse IgG-isotype control 을 4℃에서 30 분 동안 염색한다. PBS 로 2 회 세척하고, 세포를 PBS 에 부유시켜 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포를 분석한다.

4. 세포 생존율 분석

96 well plate 에 RPMI-8226 세포를 $1x10^4$ cells/well 로 seeding 하고, 에스쿨레틴을 처리하여 72 시간 동안 37℃, 5% CO2 배양기에 배양하였다. 이후, 96 well plate 에 옮긴 후, 각 well 마다 Celltiter 96® Aqueous One Solution 을 처리하여 4 시간 37℃, 5% CO2 배양기에 배양하였다. 흡광도는 PowerWave XS2 Microplate 분광 광도계 (BioTek, Winooski, VT, 미국)를 사용하여 490 nm 에서 측정하였다.

5. 세포 증식률 분석 연구

24 well plate 에 RPMI-8226 세포를 $5x10^4$ cells/well 로 seeding 하고, 에스쿨레틴을 처리하여 48 시간 동안 37℃, 5% CO2 배양기에 배양하였다. Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, 독일)를 구입하여 사용하였다. 세포를 수확하기 24 시간 전, BrdU labeling reagent 를 전

처리한 후, 37℃, 5% CO2 배양기에 배양하였다. 72 시간 지난 후, 세포를 걷어내어 Washing buffer 로 2 회 세척한다. 그 후 Fix Denat 를 넣고 상온에서 30 분 교반하였다. α-BrdU-POD 를 넣어준 후, 상온에서 2 시간 교반한다. Washing buffer 로 2 회 세척한 후, Substrate solution 을 넣어 주고 96 well plate 에 옮긴다. 흡광도는 SpectraMax® ABS Plus Microplate Reader (MOLECULAR DEVICES, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 370nm 에서 측정하였다.

6. 세포 사멸에 대한 유세포 분석기 분석 연구

24 well plate 에 RPMI-8226 세포를 $5x10^4$ cells/well 로 seeding 하였다. 그리고 에스쿨레틴을 처리하여 72 시간 동안 37℃, 5% CO2 배양기에 배양하였다. 이 후, 세포를 걷어내어 PBS 로 2 회 세척한다. Annexin V (BD pharmingen)를 실온에서 15 분 동안 염색하여 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포를 분석한다.

7. Caspase 활성도에 대한 유세포 분석기 분석 연구

96 well plate 에 RPMI-8226 세포를 $1x10^4$ cells/well 로 seeding 하였다. 그리고 에스쿨레틴을 처리하여 72 시간 동안 37℃, 5% CO2 배양기에 배양하였다. 각 well 에 FITC-LEHD-FMK 를 처리하고 빛을 차단하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 1 시간 염색하였다. 그 후, 세포를 걷어내어 PBS 로 2 회 세척하고, PBS 에 부유시켜 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포를 분석한다.

8. 미토콘드리아 막 전위 (MMP)에 대한 유세포 분석기 분석 연구

60mm dish 에 RPMI-8226 세포를 $5x10^4$ cells/ml 로 seeding 하고, 에스쿨레틴을 처리하여 72 시간 동안 37℃, 5% CO2 배양기에 배양하였다. 각 well 마다 $DiOC_6(3)$를 처리하고 빛을 차단하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 30 분 염색하였다. $DiOC_6(3)$는 세포 침투성 표지자로 미토콘드리아의 막 전위에 따라 미토콘드리아의

세포질에 축적된다. 그 후, 세포를 수확하여 PBS 로 2 회 세척하고 PBS 에 부유시켜 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포를 분석한다.

9. 싸이토크롬 *C* 에 대한 세포질 추출 준비

에스쿨레틴을 농도 별로 72 시간 처리한 세포를 수확하여 PBS 로 세척한다. 차가운 Cytoplasmic Extraction Reagent (CER) I 과 단백질분해효소 억제제를 처리하여 얼음에 10 분간 배양한다. 그리고 CERII를 처리하여 얼음에 1 분간 배양한 후, 5 분동안 16,000g 원심분리를 하여 상등액만 분리해, gel loading 한다. 이를 anti-cytochrome *C* 로 immunoblotting 하여 확인한다.

10. 세포주기 분석에 대한 유세포 분석기 분석 연구

100mm dish 에 RPMI-8226 세포를 $5x10^4$ cells/ml 로 seeding 하고, 에스쿨레틴을 처리하여 72 시간 동안 37℃, 5% CO2 배양기에 배양하였다. 이후, 세포를 걷어내어 PBS 로 2 회 세척하고, 4℃ 75% 에탄올을 처리하여 하룻밤 고정시킨다. 고정된 세포를 PBS 2 회 세척한 후, 세포에 Propidium iodide(PI)/RNase staining buffer (BD pharmingen, San Diego, CA, 미국) 시약을 처리하고 실온에서 15 분 동안 빛을 차단한 상태에서 염색하였다. 염색된 세포를 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포를 분석한다.

11. Western blot 분석 연구

RPMI-8226 세포에 에스쿨레틴을 농도 별로 처리한 후, RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1mM PMSF), 단백질분해효소 억제제 혼합제 (AEBSF 1mM, Arotinin 800mM, Bestatin 50μM, E64 15μM, Leupeptin 20μM, Pepstatin A 10μM)를 이용해 용해시킨다. 용해된 단백질은 Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 분석 시약 (Thermo fisher, Waltham, MA, 미국)으로 정량 하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE 로 분리하여

Nitrocellulose membrane 으로 이동시켰다. 항체와 단백질의 비특이적인 결합을 막기 위해 5% 무지방 탈지유 (BD Difco, Bedford, MA, 미국) in Phosphate buffered saline with tween20 (PBST)로 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 1 차 항체를 5% 무지방 탈지유 in PBST 에 희석시켜 4℃에 하루 동안 반응시켰다. 시간을 두고 PBST 로 세척한 후, 2 차 항체를 PBST 에 희석하여 상온에서 1 시간 반응시켰다. 그 후, PBST 로 세척하여 western ECL blotting 기질 (Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)로 탐지하였다.

12. 통계 분석

GraphPad prism7.0 소프트웨어 (GraphPad, San Diego, CA, 미국)를 이용하여 분석하였고, 모든 결과는 세번 이상의 독립적인 실험에 의한 평균 ± 표준 오차(SEM)를 사용하여 통계처리 하였다. 또한, 모든 값은 Tukey's range test 에 따른 one way ANOVA 에 의해 분석되었다. 차이는 $p<0.05$ {95% confidence intervals}로 유의함을 보여주었다.

결 과

1. 에스쿨레틴은 다발골수종 세포에서 세포독성을 유도한다.

에스쿨레틴이 (Fig. 1) 다발골수종 세포에서 세포독성을 일으킬 수 있는지 확인하기 위해 다발골수종 세포인 RPMI-8226 세포에 에스쿨레틴을 처리하였다. 동시에 RPMI-8226 세포가 다발골수종 세포임을 증명하기 위해 양성 표지분자인 CD38, CD138 (Fig. 2A)와 음성 표지분자인 CD19, CD34 (Fig. 2B)를 확인하였다. 에스쿨레틴을 농도별로 처리 후, RPMI-8226 세포의 생존율이 에스쿨레틴의 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 또한, 세포독성이 세포자멸사와 관련 있는지 확인하기 위해 Annexin V 염색을 통해 유세포 분석기로 확인하였다. 그 결과, Annexin V 양성 세포가 에스쿨레틴 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 3B). 이를 통해 에스쿨레틴이 다발골수종 세포주에서 세포자멸사와 연관된 세포독성을 가진다는 것을 확인하였다.

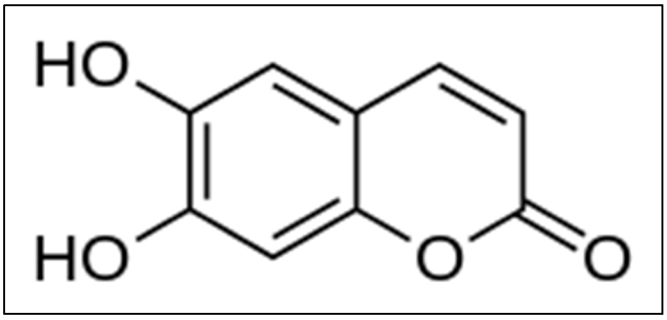

Figure 1. Molecular structure of Aesculetin.

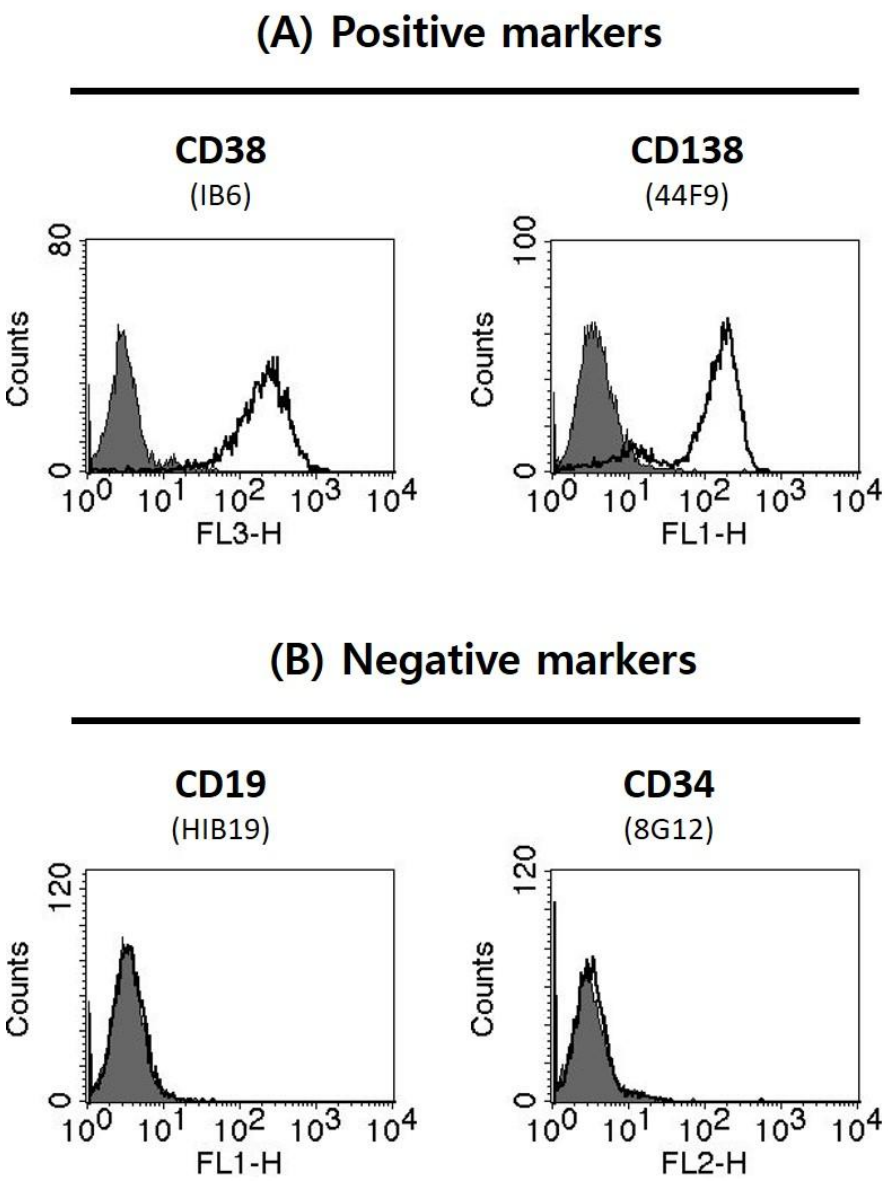

Figure 2. Characterization of major surface marker in multiple myeloma cell line. Positive marker (CD38, CD138), Negative marker (CD19, CD34); Filled histogram represents the isotype control mouse IgG1; open histogram represents each antigen.

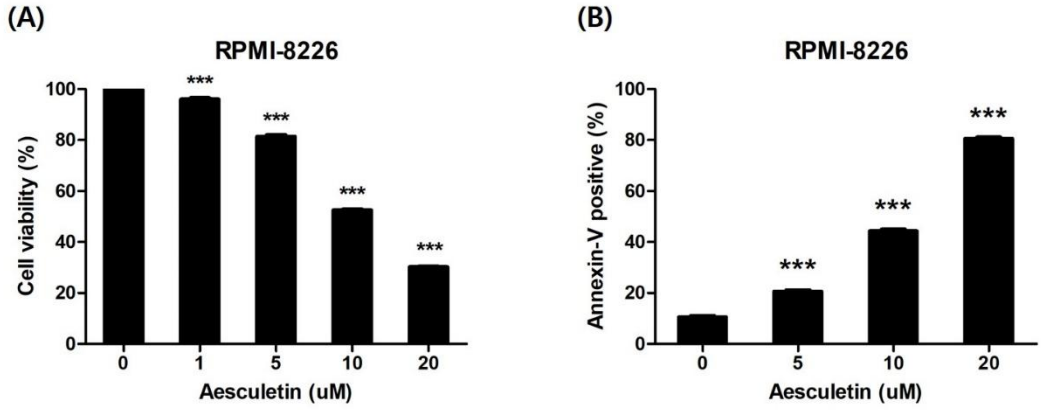

Figure 3. Aesculetin induces cytotoxity in RPMI-8226 cells.

(A) RPMI-8226 cells were treated with Aesculetin 0, 1, 5, 10, 20 μM for 72h, the cell viability was analyzed by MTS. (B) Flow cytometric analysis of the cell death after Aesculetin 0, 5, 10, 20 μM treatment for 72h. Data are represented mean ± SEM.; ***, $p<0.001$. *Significantly different from control cells.

2. 에스쿨레틴은 Caspase 의 활성화를 통해 RPMI-8226 세포에서 세포사멸을 유도한다.

에스쿨레틴에 의한 다발골수종 세포주 RPMI-8226 세포의 세포독성이 세포자멸사 기전으로 일어난다는 것을 단백질 분석을 통해 확인하였다. 그 결과, 에스쿨레틴 농도 의존적으로 cleaved caspase-3, -7, -9 와 Poly ADP-ribose polymerase-1(PARP-1)의 단백질 발현이 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 4A). 또한, FITC-LEHD-FMK 을 염색을 통해 확인하였을 때도, 에스쿨레틴의 농도 의존적으로 caspase-9 의 활성이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 4B). 이를 통해 에스쿨레틴에 의한 다발골수종 세포사가 세포자멸사 기전에 의해 일어나며 caspase pathway 의존적으로 나타나는 것을 확인하였다.

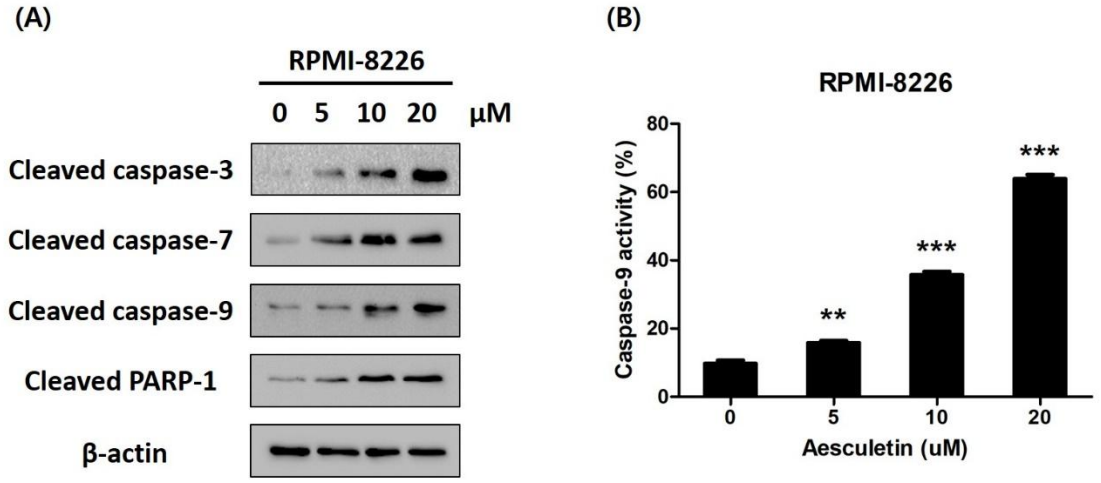

Figure 4. Aesculetin causes toxicity in RPMI-8226 cells through caspase activation.

(A) Whole cell extracts were probed by western blot for cleaved caspase-3, -7, -9, and PARP-1. β-actin was shown as a loading control. (B) Caspase-9 enzymatic activity was measured in multiple myeloma cells by flow cytometry. The experiments were repeated three times and data are represented mean ±SEM.; **, $p<0.01$,***, $p<0.001$. *Significantly different from control cells

3. 에스쿨레틴은 RPMI-8226 세포에서 미토콘드리아 경로의 활성화를 통해 세포사멸을 유도한다.

에스쿨레틴에 의한 다발골수종의 세포사가 미토콘드리아와 어떤 관련이 있는지를 확인하기 위해 미토콘드리아의 막 전위를 측정하였다. 에스쿨레틴을 농도 별로 처리한 다음, $DiOC_6(3)$로 염색하였다. 그 결과, 에스쿨레틴 농도 의존적으로 $DiOC_6(3)$ 양성 세포가 감소하는 것을 RPMI-8226 세포에서 확인하였다 (Fig. 5A). anti-apoptotic 단백질인 BCL-2 와 BCL-xL 의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였고, pro-apoptotic 단백질인 Bax 와 Bak 이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 5B). 또한, 세포질로 방출된 싸이토크롬 *C* 를 단백질 발현 정도로 확인하였을 때도 에스쿨레틴 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 5C). 이를 통해 에스쿨레틴에 의한 다발골수종 세포 사멸은 미토콘드리아 막 전위에 의해 영향을 받아 일어나는 것임을 확인하였다.

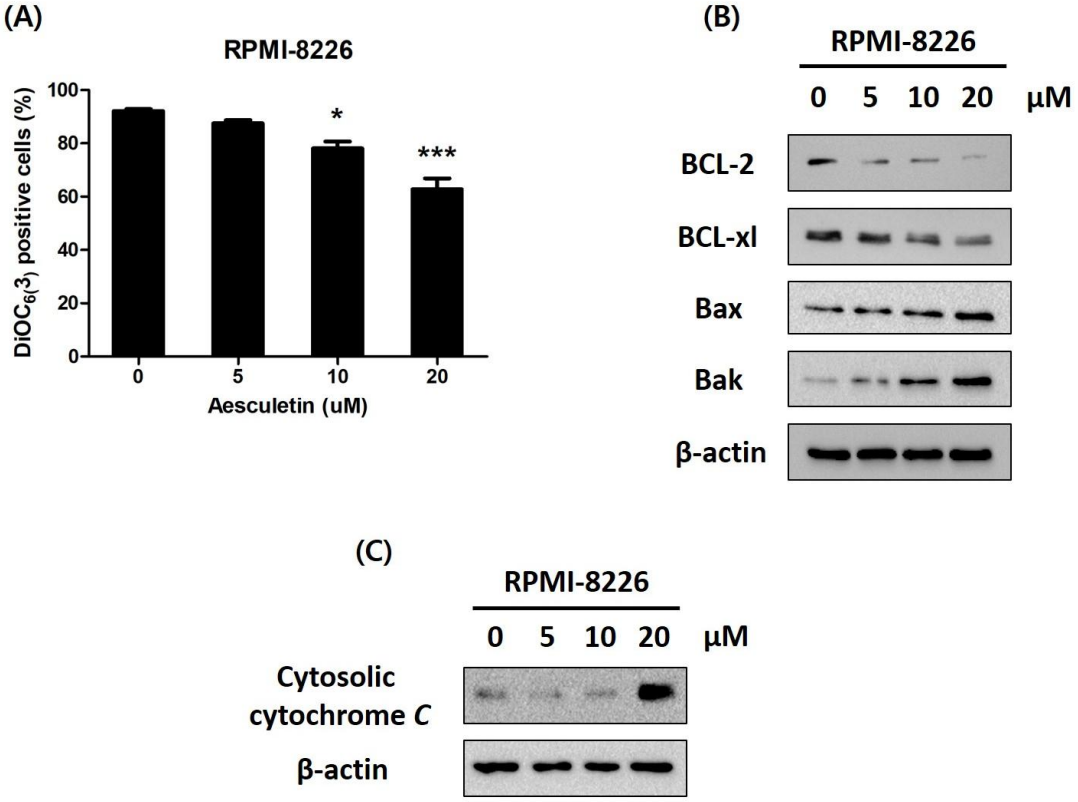

Figure 5. Aesculetin induces activation of the mitochondrial pathway in RPMI-8226 cells.

(A) Decrease in the fluorescent intensity of $DiOC_6(3)$ is shown in cells with a loss of the mitochondrial membrane potential. Aesculetin-treatment induced depolarization of mitochondrial membrane in multiple myeloma cell. (B) The anti-apoptotic proteins, BCL-2, BCL-xl were decreased and pro-apoptotic protein, Bax and Bak were increased dose-dependently. It evaluated by western blot. The membrane was stripped and reprobed with anti-β-actin mAb to confirm equal loading. (C) The cytochrome *C* release from the mitochondria to the cytosol in Multiple Myeloma cells after Aesculetin treatment for 72h. The membrane was stripped and reprobed with anti-β-actin mAb to confirm equal loading.

4. 에스쿨레틴은 RPMI-8226 세포의 세포증식 억제 및 G0/G1 세포주기 정지를 유발한다.

에스쿨레틴이 다발골수종 세포에서 세포증식에 영향을 주는지 확인하기 위해 RPMI-8226 세포에 에스쿨레틴을 처리하였다. 에스쿨레틴을 처리 후 RPMI-8226 세포의 세포증식률이 약물의 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6A). 다발골수종 세포에서 에스쿨레틴에 의해 세포증식이 억제되는 것을 세포주기 분석을 통해서도 확인하였다. 그 결과, 에스쿨레틴의 농도 의존적으로 G0/G1 구간이 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 6B). 세포주기 G0/G1 구간에 관여하는 단백질인 CDK2, CDK4, CDK6 는 감소하고, 사이클린 의존성 인산화효소 억제제인 $p21^{cip1}$, $p27^{kip1}$ 은 단백질 발현이 증가하였다 (Fig. 7A, B). 위의 결과를 통해 다발골수종 세포에서 에스쿨레틴이 세포주기 구간 중 G0/G1 구간을 정지시켜 세포 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도한다는 것을 확인하였다.

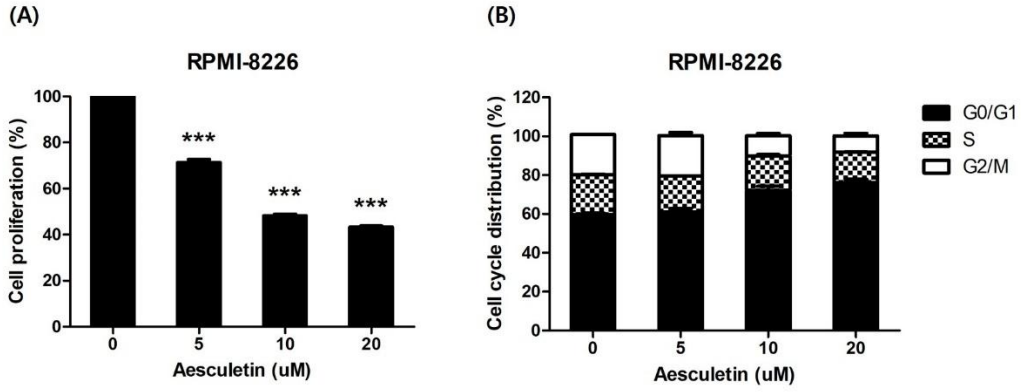

Figure 6. Aesculetin inhibits cell proliferation of RPMI-8226 cells and induces G0/G1 cell cycle arrest.

(A) RPMI-8226 cells were treated with Aesculetin 0, 5, 10, 20 μM for 72h, the cell proliferation was analyzed by BrdU assay. (B) The indicated concentrations of Aesculetin were applied to RPMI-8226 cells for 72h. Representative graphs and quantitative cell cycle analysis after flow cytometry. Data are represented mean ±SEM.; ***, $p<0.001$. *Significantly different from control cells.

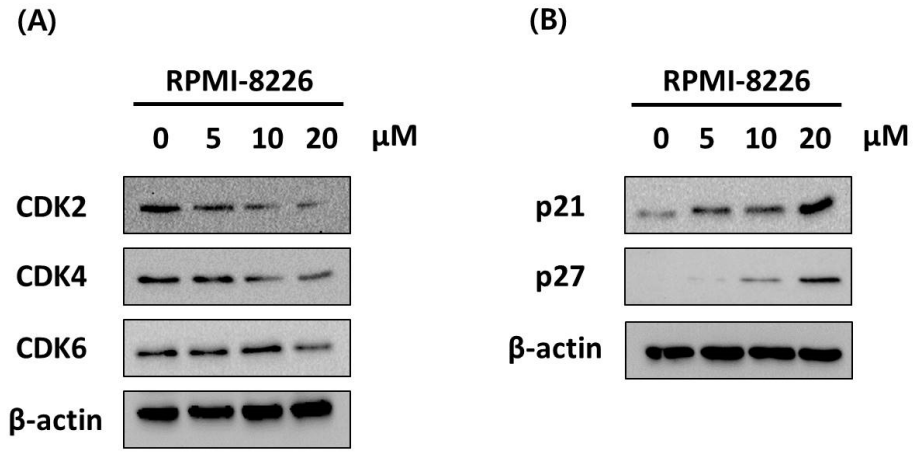

Figure 7. Aesculetin regulates the expression of cell cycle related proteins in RPMI8226 cells.

(A, B) Expression levels of the G0/G1 phase related protein CDK2, CDK4, CDK6, $p21^{cip1}$, $p27^{kip1}$ were detected by western blot. The membrane was stripped and reprobed with anti-β-actin mAb to confirm equal loading.

5. 에스쿨레틴은 RPMI-8226 세포에서 STAT3 의 발현을 억제한다.

다발골수종 세포주 RPMI-8226 세포에서 에스쿨레틴의 농도가 높아질수록 활성화된 Signal transducer and activator of transcription 3(STAT3)의 발현이 감소하는 것을 면역침강법을 통해 확인하였다 (Fig. 8A). 또한, STAT3 경로와 관련된 단백질인 c-Myc, BCL-xl, Mcl-1, Cyclin D3 도 마찬가지로 에스쿨레틴 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 8B). 이를 통해 에스쿨레틴에 의한 세포증식 억제와 세포사멸에 STAT3 경로가 관여한다는 것을 확인할 수 있었다.

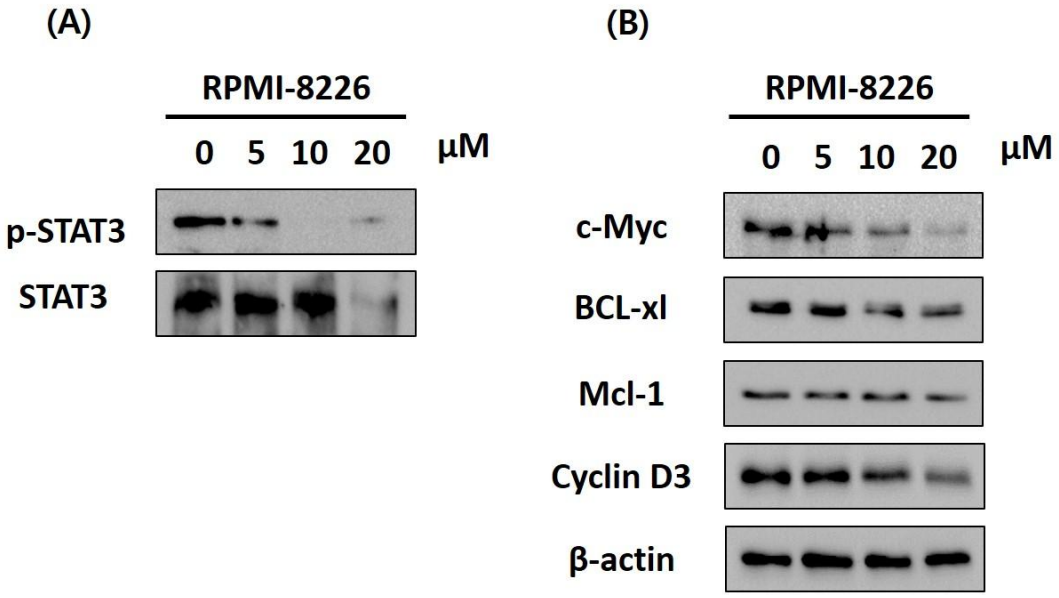

Figure 8. Aesculetin inhibits STAT3 expression in RPMI-8226 cells.

(A) Whole cell extracts were probed by immunoprecipitation for STAT3, P-STAT3. (B) Whole cell extracts were probed by western blot for c-Myc, BCL-xl, Mcl-1, Cyclin D3. β-actin was shown as a loading control.

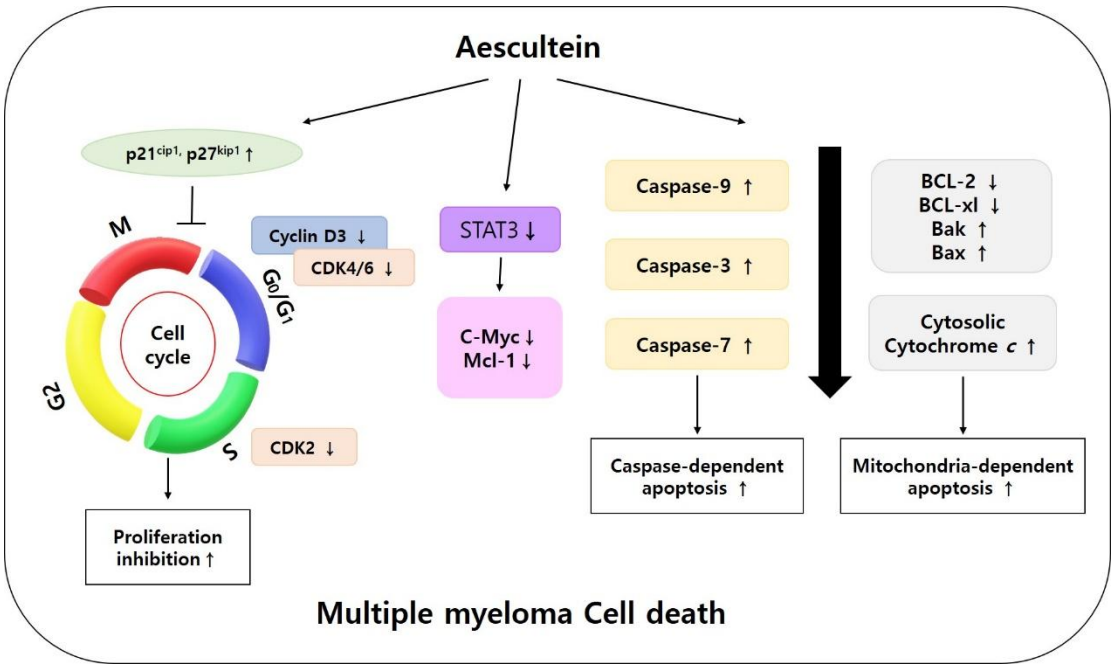

Figure 9. Mechanism schematic diagram showing the effect of Aesculetin in multiple myeloma.

Treatment of Aesculetin on multiple myeloma cells affects caspase-dependent apoptosis by increasing cleaved caspase-3, -7, -9, PARP-1. In addition, it induces mitochondria-dependent apoptosis through decreasing BCL-xl, BCL-2 and increasing Bax, Bak. It inhibits the cell cycle by increasing $p21^{cip1}$, $p27^{kip1}$ and decreasing CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin D3. Aesculetin inhibits the expression of STAT3 and also decreases STAT3-related proteins Mcl-1 and c-Myc. In summary, Aesculetin induces apoptosis of multiple myeloma cells and inhibits proliferation through cell cycle inhibition.

고 찰

다발골수종은 최근 히스톤 디 아세틸라아제 억제제, 암면역치료, 종양항원 표적 단클론성항체, 면역체크포인트 차단제, 세포치료제 등 여러 신약들이 개발되어 다양한 분야에 임상연구가 활발히 진행되고 있다 [29]. 하지만 여전히 기존 치료제에 대한 의존도가 높고 내성과 재발에 대한 문제가 있어, 치료 효과는 더 좋으면서 부작용은 덜한 새로운 약물에 대한 요구가 꾸준히 있어 왔다 [30]. 이를 바탕으로 본 연구는 기존 치료제를 보완할 수 있는 새로운 천연물 치료제로 에스쿨레틴을 선택하여 가능성을 확인하였다.

천연물인 에스쿨레틴은 항산화제 [15], 항염증제 [16], 항균제 [31] 및 고형암에서 항종양치료제로 많이 연구되어 왔다 [17-23]. 최근 기계론적 연구에서 에스쿨레틴은 β-catenin 의 Lys345, Asn387, Lys312 및 Gly307 잔기와 직접 결합하면서 β-catenin-Tcf 복합체의 형성을 방해함으로써 잠재적 Wnt-β-catenin 경로 억제제로 보고된 바 있다 [32]. 또 다른 연구로는 주로 세포사멸 관련 DR5 단백질의 상향 조절 및 면역세포화학을 통해 에스쿨레틴의 항 증식효과 관련 연구가 보고되었다 [33]. 이러한 선행연구를 바탕으로 천연물인 에스쿨레틴이 다발골수종 세포주 RPMI-8226 세포의 세포 증식률과 생존율의 감소를 유도할 수 있음을 기대하였다.

STAT3 는 STAT 의 7 개의 구성원 중 하나로 세포증식, 세포생존, 염증, 면역 및 다양한 생물학적 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 [34]. STAT3 의 지속적인 활성화는 CyclinD1, c-Myc 의 발현을 상향조절하여 암과 같은 질환에서 세포주기 진행을 가속화하며, 다발골수종은 이러한 STAT3 의 과발현이 특징이다 [35-36].

실험결과에 따르면 에스쿨레틴은 RPMI-8226 세포에서 농도의존적으로 세포생존율을 감소시켰으며 (Fig. 3), 이러한 세포생존율 감소가 세포자멸사의 주요 단백질인 caspase 와 미토콘드리아 경로의 활성화를 통해 일어나는 것을 확인하였다 (Fig. 4 와 Fig. 5). 또한 에스쿨레틴을 RPMI-8226 에 처리함으로써

세포증식률과 세포주기 관련 단백질을 조절하여 G0/G1 단계의 정지를 유발하였다 (Fig. 6). 더욱이 STAT3 의 과발현이 특징인 다발골수종에서 에스쿨레틴이 STAT3 를 Target 하여 감소시킨다는 결과는 이후 연구에 중요한 단서가 될 수 있을 것이다. 또한 이번 연구를 통해 얻은 결과를 바탕으로 앞으로 실험은 STAT3 의 경로를 확인한 것을 기반으로 siRNA 를 이용하여 다발골수종 세포주와 STAT3 인자의 관계에 대해 심화된 실험을 진행할 것이다. 더 나아가 *In vivo* 상에서 이종이식모델을 통한 에스쿨레틴의 안정성과 유효성 평가가 필요하다. 또한, 현재 다발골수종의 치료에 사용되는 약물과 병용 효과를 연구함으로써 임상적 활용가능성을 확인할 것이다.

참고문헌

1. M Hallek , H Haller [Multiple myeloma] Internist (Berl). 2019 Jan;60(1):1-2.

2. Mattia D'Agostino , Mario Boccadoro , Eric L Smith Novel Immunotherapies for Multiple Myeloma Curr Hematol Malig Rep. 2017 Aug;12(4):344-357.

3. Daniele Derudas , Francesca Capraro , Giovanni Martinelli , Claudio Cerchione How I manage frontline transplant-ineligible multiple myeloma Hematol Rep. 2020 Sep 21;12(Suppl 1):8956.

4. Dickran Kazandjian Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy Semin Oncol. 2016 Dec;43(6):676-681.

5. Paola Storti , Valentina Marchica , Nicola Giuliani Role of Galectins in Multiple Myeloma Int J Mol Sci. 2017 Dec 17;18(12):2740.

6. Hideto Tamura , Mariko Ishibashi , Mika Sunakawa , Koiti Inokuchi Immunotherapy for Multiple Myeloma Cancers (Basel). 2019 Dec 12;11(12):2009.

7. Stefania Ciolli Multiple myeloma Clin Cases Miner Bone Metab. 2012 Sep;9(3):150-2. Epub 2012 Dec 20.

8. Lee Smith , Orla McCourt , Malgorzata Henrich , Bruce Paton , Kwee Yong , Jane Wardle , Abigail Fisher Multiple myeloma and physical activity: a scoping review BMJ Open. 2015 Nov 27;5(11):e009576.

9. Shumaila Muhammad Iqbal , Kathryn Stecklein , Joseph Sarow , Michael Krabak , Jens Hillengass, Philip McCarthy Elotuzumab in Combination with

Lenalidomide and Dexamethasone for Treatment-resistant Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis With Multiple Myeloma Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2019 Jan;19(1):e33-e36.

10. Edvan de Queiroz Crusoé , Flávia Cristina Fernandes Pimenta , Angelo Maiolino , Nelson Siqueira de Castro , Huiling Pei , Damila Trufelli , Mariana Fernandez , Luciana Barreto Herriot Results of the daratumumab monotherapy early access treatment protocol in patients from Brazil with relapsed or refractory multiple myeloma Hematol Transfus Cell Ther. 2020 Sep 14;S2531-1379(20)30123-1.

11. Hans C Lee , Claudio Cerchione How I treat relapsed and/or refractory multiple myeloma Hematol Rep. 2020 Sep 21;12(Suppl 1):8955.

12. Hideto Tamura Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple myeloma Int J Hematol. 2018 Mar;107(3):278-285.

13. Alexander Zheleznyak , Monica Shokeen , Samuel Achilefu Nanotherapeutics for multiple myeloma Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2018 Nov;10(6):e1526.

14. Kwok-nam Leung , Pui-yin Leung, Lai-ping Kong, Po-ki Leung Immunomodulatory effects of esculetin (6,7-dihydroxycoumarin) on murine lymphocytes and peritoneal macrophages Cell Mol Immunol. 2005 Jun;2(3):181-8.

15. Min Ho Han , Cheol Park , Dae-Sung Lee , Su-Hyun Hong , Il-Whan Choi , Gi-Young Kim , Sung Hyun Choi , Jung-Hyun Shim , Jung-Il Chae , Young Hyun Yoo , Yung Hyun Choi Cytoprotective effects of esculetin against oxidative stress are associated with the upregulation of Nrf2-mediated

NQO1 expression via the activation of the ERK pathway Int J Mol Med. 2017 Feb;39(2):380-386.

16. Na-Hee Jeong , Eun-Ju Yang , Meiling Jin , Jong Yeong Lee , Young-Ae Choi , Pil-Hoon Park , Sang-Rae Lee , Sun-Uk Kim , Tae-Yong Shin , Taeg Kyu Kwon , Yong Hyun Jang , Kyung-Sik Song , Sang-Hyun Kim Esculetin from Fraxinus rhynchophylla attenuates atopic skin inflammation by inhibiting the expression of inflammatory cytokines Int Immunopharmacol. 2018 Jun;59:209-216.

17. Jin Hyoung Cho , Jae-Cheon Shin , Jung-Jae Cho , Yung Hyun Choi , Jung-Hyun Shim , Jung-Il Chae Esculetin (6,7-dihydroxycoumarin): a potential cancer chemopreventive agent through suppression of Sp1 in oral squamous cancer cells Int J Oncol. 2015 Jan;46(1):265-71.

18. Hong-Tai Chang , Chiang-Ting Chou , You-Sheng Lin , Pochuen Shieh , Daih-Huang Kuo , Chung-Ren Jan , Wei-Zhe Liang Esculetin, a natural coumarin compound, evokes Ca(2+) movement and activation of Ca(2+)-associated mitochondrial apoptotic pathways that involved cell cycle arrest in ZR-75-1 human breast cancer cells Tumour Biol. 2016 Apr;37(4):4665-78.

19. Rashi Arora , Sharad Sawney , Vikas Saini , Chris Steffi , Manisha Tiwari , Daman Saluja Esculetin induces antiproliferative and apoptotic response in pancreatic cancer cells by directly binding to KEAP1 Mol Cancer. 2016 Oct 18;15(1):64.

20. Yong J Choi , Chang M Lee , See-Hyoung Park , Myeong J Nam Esculetin induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer LoVo cells Environ Toxicol. 2019 Oct;34(10):1129-1136.

21. Jin Yang , Yu-Ling Xiao, Xian-Ran He, Guo-Fu Qiu, Xian-Ming Hu Aesculetin-induced apoptosis through a ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in human cervical cancer cells J Asian Nat Prod Res. 2010 Mar;12(3):185-93.

22. Hui Pan , Bao-Hui Wang , Wang Lv , Yan Jiang , Lei He Esculetin induces apoptosis in human gastric cancer cells through a cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition pore associated with ROS Chem Biol Interact. 2015 Dec 5;242:51-60.

23. Hua Li , Qi Wang , Yunli Wang , Ze Xu , Zhong Han Esculetin inhibits the proliferation of human lung cancer cells by targeting epithelial-to-mesenchymal transition of the cells Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) . 2019 Sep 30;65(7):95-98.

24. Jian Gong , Wei-Guo Zhang, Xiao-Fen Feng, Mei-Juan Shao, Chao Xing Aesculetin (6,7-dihydroxycoumarin) exhibits potent and selective antitumor activity in human acute myeloid leukemia cells (THP-1) via induction of mitochondrial mediated apoptosis and cancer cell migration inhibition J BUON. Nov-Dec 2017;22(6):1563-1569.

25. Virginia Rubio , Eva Calviño , Ana García-Pérez , Angel Herráez , José C Diez Human acute promyelocytic leukemia NB4 cells are sensitive to esculetin through induction of an apoptotic mechanism Chem Biol Interact. 2014 Sep 5;220:129-39.

26. Ya He , Chen Li , Qiaoya Ma , Songsheng Chen Esculetin inhibits oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury Biochem Biophys Res Commun. 2018 Jun 18;501(1):139-144.

27. Virginia Rubio , Ana I García-Pérez , Angel Herráez , José C Diez Different roles of Nrf2 and NFKB in the antioxidant imbalance produced by esculetin or quercetin on NB4 leukemia cells Chem Biol Interact. 2018 Oct 1;294:158-166.

28. F Borges , F Roleira, N Milhazes, L Santana, E Uriarte Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity Curr Med Chem. 2005;12(8):887-916.

29. Meral Beksac , Sevinc Balli , Dilara Akcora Yildiz Drug Targeting of Genomic Instability in Multiple Myeloma. Front Genet 2020 Apr 9;11:228.

30. Pieter Sonneveld , Annemiek Broijl Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma Haematologica. 2016 Apr;101(4):396-406.

31. Tran Dang Xuan, Gu Gangqiang, Truong Ngoc Minh, Tran Ngoc Quy, Tran Dang Khanh An Overview of Chemical Profiles, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Commercial Vegetable Edible Oils Marketed in Japan. 2018 Feb 10;7(2):21..

32. Anand, J.R.; Rijhwani, H.; Malapati, K.; Kumar, P.; Saikia, K.; Lakhar, M. Anticancer activity of esculetin via-modulation of Bcl-2 and NF-κB expression in benzo[a]pyrene induced lung carcinogenesis in mice. Biomed. Prev. Nutr. 2013, 3, 107–112.

33. Chengyuan Liang , Weihui Ju , Shaomeng Pei , Yonghong Tang , Yadong Xiao Pharmacological Activities and Synthesis of Esculetin and Its Derivatives: A Mini-Review Molecules. 2017 Mar 2;22(3):387.

34. Linlin Yang , Bowen Wu, Zhaoxing Wu, Ying Xu, Ping Wang, Mengyuan Li , Rongzhen Xu , Yun Liang CAMKIIγ is a targetable driver of multiple myeloma

through CaMKIIγ/ Stat3 axis Aging (Albany NY) . 2020 Jul 13;12(13):13668-13683.

35. Chen Q, Lv J, Yang W, Xu B, Wang Z, Yu Z, Wu J, Yang Y, Han Y. Targeted inhibition of STAT3 as a potential treatment strategy for atherosclerosis. Theranostics. 2019 Aug 14;9(22):6424-6442.

36. Haeri Lee , Ae Jin Jeong , Sang-Kyu Ye Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy BMB Rep. 2019 Jul;52(7):415-423.

영문요약

Background: Multiple myeloma (MM) is a disease that occurs in plasma cells, the final stage of differentiation of B lymphocytes, and is characterized by excessive production of abnormal M protein instead of normal antibodies. Clinical symptoms include hypercalcemia, bone lesions, and anemia. Currently, treatment methods for multiple myeloma include chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. Aesculetin is an extract extracted from the ash tree and injin mugwort and is known to have anticancer effects in various solid cancers. This experiment was conducted to confirm the effect of treatment with Aesculetin on multiple myeloma cells.

Method: RPMI-8226 cells, a multiple myeloma cell line, were treated with Aesculetin, and then cell proliferation and cell viability were confirmed using MTS and BrdU assays. Cell death was confirmed by Annexin V staining, and cell cycle and mitochondrial membrane potential were confirmed using flow cytometry. Proteins related to this were confirmed by immunoprecipitation and Western blotting.

Results: Positive marker molecules (CD38, CD138) and negative marker molecules (CD19, CD34) of RPMI-8226 cells were identified to prove that they are multiple myeloma cell lines. The result of IC50 value of 10uM was derived. As a result of comparing apoptosis through flow cytometry, it was confirmed that apoptosis was induced as the concentration of Aesculetin increased. Confirmed. Subsequently, as a result of checking caspase activity and mitochondrial membrane potential to determine through which pathway apoptosis occurs, it was confirmed that caspase activity increase and mitochondrial membrane potential decreased as the concentration of Aesculetin increased. It was confirmed that the cell death caused by this occurs through an endogenous pathway. In addition, as a result of checking the cell cycle, it was confirmed that the G0/G1 section was stopped by Aesculetin,

and the expression level of the protein involved was also regulated by Aesculetin. Finally, as a result of immunoprecipitation to confirm whether the STAT3 pathway is involved in cell death caused by Aesculetin, it was confirmed that the expression of P-STAT3 and STAT3 decreased depending on the concentration of Aesculetin.

Conclusion: Aesculetin has shown the effect of inhibiting apoptosis and cell proliferation in multiple myeloma cell line, and has the potential as a new treatment for multiple myeloma in the future.

Key word : Multiple myeloma (MM), Aesculetin, Apoptosis, Caspase activation, Mitochondrial pathway, Proliferation, Cell cycle arrest, STAT3.