creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

의학박사 학위논문

다형성 교모세포종에서 할미꽃 추출 사포닌 D의 항암 기전과 temozolomide와의 병용 효과에 관한 연구

2020년 2월

서울대학교 대학원
의학과 해부학 전공
홍 준 만

다형성 교모세포종에서 할미꽃 추출 사포닌 D의 항암 기전과 temozolomide와의 병용 효과에 관한 연구

지도교수 황 영 일

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2019년 10월

서울대학교 대학원

의학과 해부학 전공

홍 준 만

홍준만의 박사 학위논문을 인준함

2020 년 1월

위 원 장 이 왕재 (인)

부위원장 최동일 (인)

위 원 백우진 (인)

위 원 강병철 (인)

위 원 예상규 (인)

Molecular Mechanism involved in Anti-cancer Effect of Saponin D isolated from *Pulsatilla koreana* and Its Combination Effect with Temozolomide in Glioblatoma Multiforme cancer cell lines

by

Jun-Man Hong

A thesis submitted to the Department of Medicine in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Anatomy at Seoul National University College of Medicine

January 2020

Approved by Thesis Committee:

Professor _____ **Chairman**

Professor _____ **Vice chairman**

Professor _____

Professor _____

Professor _____

국문 초록

할미꽃 뿌리에서 추출한 사포닌 D는 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 다양한 암세포의 세포사멸을 유도하고, autophagic flux를 억제하는 것으로 보고되었다. 또한, 췌장암 말기 환자를 대상으로 한 임상시험에서도 사포닌 D는 부작용 없이 환자의 생존율을 높인 것으로 보고되었다.

한편, 다형성 교모세포종(Glioblastoma Multiforme, GBM)은 진단 후 1~2년 내에 사망할 정도로 생존율이 낮고 치료하기 어려운 뇌종양이다. GBM에 대한 표준 치료 방법은 수술적 제거를 원칙으로 하면서 동시에 방사선 치료와 항암제 치료를 병행하는 것이다. 이때 항암제로 널리 사용되는 것이 구강 복용용 알킬화 약물(alkylating agent)인 temozolomide (TMZ)인데, 이에 대한 내성과 부작용이 문제가 되고 있다. 부작용을 줄이고 내성을 극복하기 위한 전략으로 여러 종류의 약제를 병행하여 사용하는 것이 시도되고 있다. 대표적으로 autophagic flux 억제제들이 TMZ와 함께 사용되어 효과를 나타내지만, 이 또한 부작용이 있다.

한국 할미꽃 사포닌 D (SB365)는 다양한 암세포에서 항암효과에 관한 연구가 되어 있지만, GBM에서의 항암효과에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다. 하지만, SB365가 GBM에서 autophagic flux를 억제할 수 있다면 TMZ와 함께 사용하여 효과적인 치료효과를 낼 수 있을 것으로 예상할 수 있다. 본 연구에서는 GBM 세포에 대한 SB365의 항암효과를 확인하고자 하였다. 동시에, autophagic flux 억제제로서 TMZ와 함께 투여 시 협력작용을 나타내는지 확인하고자 하였다.

본 연구에는 두 종류 GBM 세포, 즉 TMZ에 민감한 U87-MG와 TMZ에 내성을 보이는 T98G를 사용하였다. 이 두 세포에 SB365를 1~20 μM로 24, 48, 72시간 동안 처리 후 세포증식을 측정하였다. 그 결과, SB365는 두 세포에서 모두 세포증식을 억제하였다. SB365의 세포독성 기전을 확인하기 위하여 기존에 SB365의

세포독성 기전으로 알려진 세포사멸을 분석하였다. GBM 세포에 SB365를 처리한 후 72시간에 Annexin V 염색을 통한 세포막의 플립, 7-AAD 염색을 통한 세포막 침투성 증가, caspase-3 활성화, BCL-2와 BAX 등 BCL-2 family의 발현 정도, DAPI 염색을 통한 핵 모양 등으로 세포사멸을 확인한 결과, SB365는 세포사멸을 유도하였던 다른 암세포에서와 달리, GBM 세포에서는 caspase-비의존적 세포 죽음을 유도하여 세포독성을 나타냈다. Caspase-비의존적 세포 죽음을 유도한다고 알려진 기전 중에는 autophagic flux 억제가 있다. 기존에 중국 할미꽃 사포닌 D가 autophagic flux를 억제한다는 보고가 있었기 때문에, 이와 분자구조가 같은 SB365가 GBM 세포에서 autophagic flux를 억제하는지 확인하였다. GBM 세포에 SB365를 처리한 후 24시간 이내에 오토파지 관련 단백질인 LC3, Beclin-1, p62의 발현과 함께 오토파지 시그날인 AKT와 mTOR의 인산화를 확인하였다. 그 결과, 오토파지 유도 시그날에는 큰 변화가 없었지만, autophagic flux는 6시간에 억제되었다. Autophagic flux 억제는 리소좀의 기능 이상과 밀접한 연관이 있다. 대표적으로, 리소좀 막 침투성(lysosome membrane permeabilization, LMP) 증가로 인한 pH 증가는 리소좀 내 가수분해 효소를 불활성화시켜 오토파고좀을 분해할 수 없게 하고, 결국 autophagic flux가 억제된다. 따라서 SB365로 LMP가 유도되어 리소좀 내 pH가 증가되는지 acridine orange로 염색해서 확인한 결과, SB365 처리 후 autophagic flux가 억제되었던 시간인 6시간부터 세포 내 pH가 점차 감소하였다. LMP가 유도되면 리소좀에서 카텝신 B와 D가 세포질로 빠져 나와 미토콘드리아를 손상시킨다고 알려져 있다. SB365에 의해 유도되는 LMP가 실제로 카텝신 B와 D를 통해서 미토콘드리아를 손상시키는지 알아보기 위해 카텝신 B와 D에 대한 억제제를 이용하여 세포증식을 확인하였고, JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 확인하였다. 그 결과, SB365는 카텝신 B를 일부 매개로 MMP 감소와 세포독성을 유도하였음을 확인하였다. 손상된 미

토콘드리아는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생산할 뿐만 아니라 축적하여 세포독성을 유도할 수 있다고 알려져 있다. SB365에 의해 손상된 미토콘드리아에서 ROS가 발생하여 세포독성을 유도하였는지 확인하기 위하여 SB365와 함께 항산화제인 N-acetyl-cysteine (NAC)을 처리하여 세포증식을 확인하였다. 그 결과, SB365로 억제된 세포증식을 NAC이 약 70% 회복하였다.

한편, GBM 세포에서 SB365가 TMZ의 독성을 효과적으로 증가시킬 수 있는지 *in vitro*와 *in vivo*에서 확인한 결과, 독성효과를 부가적으로 증가시켰다.

정리하면, SB365는 GBM 세포에서 LMP를 유도하였는데, 이로 인해 autophagic flux가 억제되어 오토파고좀이 축적되었고, 카뎁신 B를 매개로 한 미토콘드리아의 손상을 통해 ROS가 축적되어 CICD를 유도하였다. 또한, SB365는 TMZ의 세포독성 효과를 부가적으로 증가시켰다. 이와 같은 결과는 SB365가 GBM에 대한 새로운 치료제나 TMZ에 대한 보조 치료제로서의 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

주요어: 할미꽃 사포닌 D, SB365, 다형성 교모세포종, temozolomide, autophagic flux 억제, 리소좀 막 침투화, 미토콘드리아 막 전위

학번: 2014-30591

목 차

국문 초록 i

목차 iv

그림 및 표 목록 v

약어 목록 vi

서론 1

재료 및 방법 16

결과 22

고찰 45

참고문헌 52

Abstract in English 67

그림 및 표 목록

Figure 1 3

Figure 2 3

Figure 3 8

Figure 4 23

Figure 5 25

Figure 6 27

Figure 7 28

Figure 8 31

Figure 9 33

Figure 10 35

Figure 11 36

Figure 12 39

Figure 13 41

Figure 14 44

Table 1 4

약어 목록

ASD: Akebia saponin D

CICD: Caspase-independent cell death

CTSB: Cathepsin B

CTSD: Cathepsin D

DAMPs: Damage-associated molecular pattern molecules

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EGFR: Epithelial growth factor receptor

GBM: Glioblastoma multiforme

HtrA2: High-temperature requirement protein A2

LMP: Lysosomal membrane permeabilization

MGMT: O^6-methylguanine-DNA methyltransferase

MMP: Mitochondrial membrane potential

MOMP: Mitochondrial outer membrane permeabilization

NAC: N-acetyl-cysteine

Rapa: Rapamycin

RIP: Receptor-interacting protein

ROS: Reactive oxygen species

SB365: *Pulsatilla koreana* saponin D

TMZ: Temozolomide

서론

1. 할미꽃

할미꽃(pasque flower)은 우리 나라를 포함한 아시아와 유럽, 북미 지역이 원산지인 쌍떡잎 여러해살이 풀로 미나리아재비과 풀사틸라속으로 분류된다. 풀사틸라속에는 대한민국의 고유한 할미꽃 종(학명)인 '*Pulsatilla koreana*'를 포함하여 세계 여러 지역에 약 33종이 있다. 속명 '*Pulsatilla*'는 '소리내다' 또는 '치다'는 뜻인 라틴어 '*pulso*'의 축소형으로, 종처럼 생긴 꽃 모양에서 유래되었다. 일반적으로 부르는 이름인 할미꽃 외에도 바람꽃(wind flower), 초원의 할미꽃(Prairie crocus), 부활절 꽃(Easter flower), 초원의 아네모네(Meadow anemone)라고 부르기도 한다.

대부분의 할미꽃은 직접 섭취 시 매우 독성이 강해서 설사, 구토, 경련을 일으키며[1], 저혈압과 혼수상태에 빠지게도 할 수 있다[2]. 하지만, 할미꽃 추출물은 전통적으로 말라리아와 아메바성 이질[3], 월경 전 증후군과 부고환염 치료 뿐만 아니라 진정제, 진해제로도 쓰였다[4]. 또한, 지질 다당류로 염증을 유발한 흰쥐 모델[5]과 덱스트란 황산나트륨(dextran sulfate sodium)으로 대장염을 유발한 마우스 모델[6]에서 할미꽃 추출물은 항염증 효과를 보였고, 구강 세균에 대해서 항균효과를 보였다[7]. 또한, 할미꽃에서 추출한 데옥시포토필로톡신(deoxypodophyllotoxin)은 사람 혈관 신생을 억제하고, 항암효과를 보였다[8].

이처럼 할미꽃은 오래전부터 질병 치료를 위한 다양한 연구를 통해 그 효과가 검증되었고, 할미꽃에서 추출한 단일 유효성분의 연구도 계속되고 있다. 할미꽃의 유효성분에는 다양한 사포닌, 라눈쿨린, 아네모닌, 프로토아네모닌과 트리터펜 등이 있는데[9-11], 항암 효능에 관하여 사포닌이 가장 많이 연구되었다.

2. 사포닌

2.1. 사포닌의 구조

사포닌은 많은 식물들에 존재하는 성분이며, 어원은 그리스어인 'Sapona'로, 영어로는 'Soap'이다[12]. 즉, 비누라는 뜻으로 사포닌이 비누처럼 몸 안의 기름기를 씻어내는 역할을 한다고 생각되어 붙여진 이름이다. 화학적으로, 사포닌은 아글리콘(aglycone)(비극성)과 당(극성)이 결합된 배당체(glycoside)이다(Figure 1). 즉, 구조적으로 극성과 비극성이 모두 있기 때문에 수용액 내에서 비누와 같은 효과를 보인다[13]. 사포닌 분자의 아글리콘(비당 부분)은 사포제닌(sapogenin)이라고도 한다. 사포제닌의 존재 형태에 따라서 사포닌은 트리터펜 글리코시드(triterpene glycosides), 스테로이드 글리코시드(steroid glycosides), 또는 스테로이드 알칼로이드 글리코시드(steroid alkaloid glycosides)로 나뉜다[12]. 사포닌은 일반적으로 사포제닌에 한 개 또는 두 개의 당 사슬이 부착된 형태로 되어있다. 모노데스모사이딕(monodesmosidic) 사포닌에는 D-글루코오스, L-람노오스, D-갈락토오스, L-아라비노오스, D-자일로오스 또는 D-푸코오스 같은 당 사슬이 한 개 있고, 일반적으로 이 당 사슬은 C-3에 부착된다[14]. 비스데스모사이딕(bisdesmosidic) 사포닌에는 당 사슬이 두 개 있는데, 하나는 C-3에 에스테르 결합으로 부착되고, 다른 하나는 C-28에 에스테르 결합으로 부착되거나(트리터펜 사포닌), C-24에 에스테르 결합으로 부착된다(퓨로스타놀 사포닌)(Figure 2). 이처럼, 사포닌의 구조는 당사슬의 개수, 종류 뿐만 아니라, 다양한 사포제닌, 하이드록실, 하이드록시메틸, 카복실, 아실 그룹 등 다양한 치환기의 구성 등에 의해서 다양하게 분류된다[15] (Table 1).

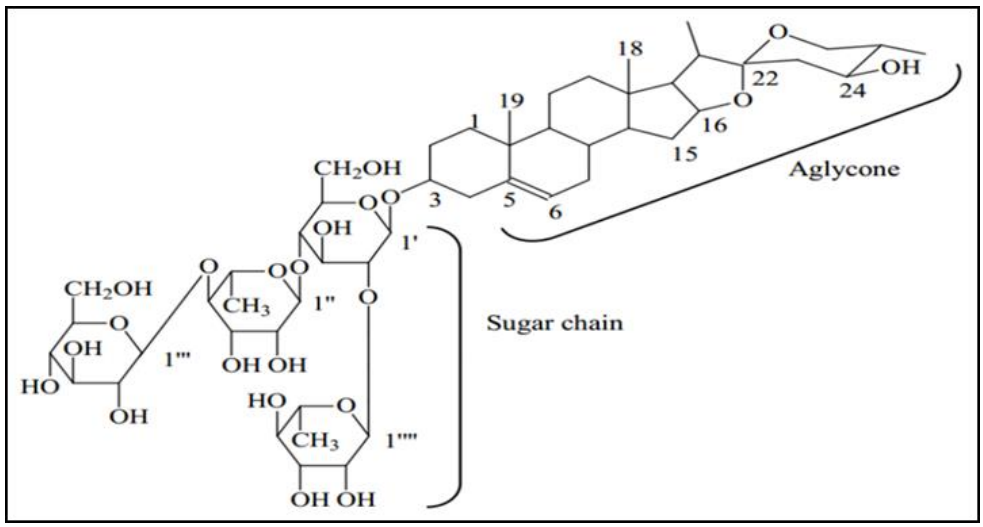

Figure 1. The chemical structure of steroid saponin [16]

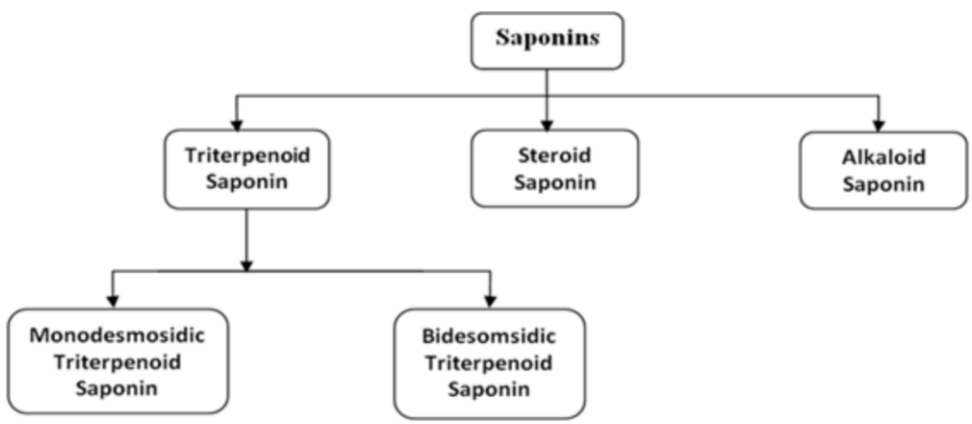

Figure 2. Categories of saponins [16]

Table 1. Examples for mono and disdesmosidic triterpenoid saponins [16]

Saponin structure	Aglycone	Type of sugar moiety	Type of Glycoside
Rha . Ara . Ole		Disaccharide	Monodesmosidic
Xyl . Rha . Ara . Ole	Triterpenoid:	Trisaccharide	Monodesmosidic
Glu . Rib . Rha . Ara . Ole	Ole: Oleanolic acid	Tetrasaccharide	Monodesmosidic
Glu . Glu . Ole . Glu		Di & monosaccharide	Bidesmosidic
Are . Hed		Monosaccharide	Monodesmosidic
Glu . Ara . Hed	Triterpenoid	Disaccharide	Monodesmosidic
Xyl . Rha . Ara . Hed	Hed: Hederagenin	Trisaccharide	Monodesmosidic
Glu . Xyl . Rha . Ara . Hed		Tetrasaccharide	Monodesmosidic
Ara . Hed . Glu . Glu . Rha		Mono & trisaccharide	Bidesmosidic
Rha . Ara . Hed . Glu . Glu . Rha		Di & trisaccharide	Bidesmosidic

Rha: α -L-rhamnopyranozyl **Ara: α-L-arabinopyranozyl** **Xyl: β -D-xylopyranozyl**

Glu: β -D-glucopyranozyl **Rib: β -D-ribopyranozyl**

2.2. 사포닌의 기능

사포닌은 달고, 쓴맛을 보이며[17, 18], 물의 표면장력을 낮추어 거품을 일으키고, 기름을 분해하며[19], 의학적 또는 약학적인 기능[20], 용혈[21], 항균, 살충[22] 등 다양한 기능이 있다. 때문에, 사포닌은 음료와 제과 뿐만 아니라 화장품[19]과 약품[22] 등에 광범위하게 사용되고 있다.

2.3. 사포닌 D의 추출

사포닌 D는 다음과 같은 공정을 통해 할미꽃이나 천속단(川續斷) 등의 식물에서 추출된다.

대상 식물을 50% 메탄올에 녹여 원심 분리한 상층액을 물과 혼합한 후 n-헥산으로 탈지방을 시킨다. 수용액 층은 n-부탄올과 혼합한 후 n-부탄올 층을 얻어서 건조시킨다. Sephadex LH-20 컬럼을 이용해서 크로마토그래피로 분리 후 실리카 갤 컬럼과 고성능 액체 크로마토그래피로 정제한다[23].

2.4. 사포닌 D의 종류와 기능

식물에서 분리한 사포닌 D는 대표적으로 아케비아 사포닌 D와 할미꽃 사포닌 D가 있고, 질병 치료에 관한 다양한 연구가 되어왔다.

먼저, 천속단(川續斷, *Dipsacus asper Wall*) 뿌리에서 추출한 아케비아 사포닌 D (Akebia saponin D; ASD)는 골다공증 치료제로 사용되고, 백혈병[24], 알츠하이머[25], 심혈관 질환[26], 골절[27] 등의 질환 모델에서 치료 효과를 나타냈다. ASD는 버팔로(buffalo) 흰쥐 간세포에서 오토파지를 유도하여, 올레산으로 유도되는

지방 소립 축적을 예방하고, 비 알콜성 지방간 모델에서도 간 손상을 예방하였다[28]. 하지만, ADS의 한 가지 문제점은 경구 투여 시 장 투과성이 낮고, 위장과 간에서 분해되기 때문에 생체 이용률이 단지 0.13%에 불과해 사용하는데 효율이 낮다는 것이다[29].

한편, 한국 할미꽃에서 8개의 루판 계열과 9개의 올리난 계열의 사포닌이 추출되었다. 그 중에 사포닌 D (SB365)는 A-549 (폐암), SK-OV-3 (난소암), SK-MEL-2 (흑색종), HCT-15 (대장암) 등 다양한 사람 암세포주를 이용한 동물실험에서 추출된 할미꽃 사포닌들 중 가장 항암효과가 높았다. 또한, SB365는 항암제인 Taxol과 doxorubicin 보다 효율적이었다[30]. 게다가, 면역 저하 마우스를 이용한 연구에서도 SB365는 몸무게 감소 또는 정상 조직에 독성 없이, Huh-7 (간암), MKN-45 (위암), PANC-1 (췌장암), HT-29 (대장암) 등 사람 암세포주 주입 후의 종양 성장을 현저히 억제하였다[31-34]. 또한, 췌장암 4기 환자를 대상으로 한 임상시험에서, SB365는 부작용 없이 생존율을 증가시켰다[35].

한편, SB365는 Huh-7 (간암), MKN-45 (위암), PANC-1 (췌장암), HT-29 (대장암), HCC827 (폐암) 등 암세포에서 Bax/Bcl-2 비율 증가와 caspase-3 활성화 등의 현상을 보이며, 세포사멸을 유도한다고 보고된 바 있다[31-34, 36]. 또한, 중국 할미꽃 사포닌 D가 HeLa (자궁경부암), K562 (백혈병), B16-F10 (흑색종), A549 (폐암), MCF-7 (간암) 등 다양한 사람 암세포주에서 autophagic flux를 억제하였을 뿐만 아니라, 이 효과를 통하여 HeLa 세포에서 5-fluorouracil, camptothecin, etoposide 등 항암제의 항암효과를 *in vitro* 상에서 협력적으로 증가시켰다고 보고된 바 있다[37].

한국과 중국 할미꽃 외에도 *Pulsatilla P. cernua* [38], *P. patens*, *P. vulgaris* [39] 등이 있는데, 이들에서 추출한 사포닌 D는 모두 그 구조가 같다. 앞서 말한 것처럼, *P. koreana*와 *P. chinensis*의 사포닌 D는 다양한 암세포에서 연구되었지만[37, 40], 다른 사포닌 D에 대해서는 아직 연구가 이루어지지 않았다. 하지만, 할미꽃의 종

류가 달라도 할미꽃에서 추출된 사포닌 D의 구조는 모두 같기 때문에, 연구되지 않은 다른 종의 할미꽃 사포닌 D도 암세포에서 동일한 세포 독성효과를 보일 것으로 추정할 수 있다.

한편, 아케비아 사포닌 D와 할미꽃 사포닌 D는 분자 구조에 차이가 있는데, 모두 헤데라게닌 사포제닌에 3개의 당이 결합하고 있는 구조이지만, 당의 결합 위치가 다르다. 아케비아 사포닌 D는 헤데라게닌의 C3에 O-α-L-arabinopyranosyl, C28에 β-D-glucopyranoside-(1→6)-β-D-glucopyranoside가 결합된 트리터페노이드 (C47H76O18)[41]이지만, 할미꽃 사포닌 D는 헤데라게닌의 C3에 O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-α-L-arabinopyranoside가 결합된 트리터페노이드이다(C47H76O17)[42]. 다시 말해서, 아케비아 사포닌 D는 C3에 당이 1개, C28에 당이 2개 붙은 구조이고, 할미꽃 사포닌 D는 C3에 당이 3개 붙은 구조이다(Figure 3).

이렇게 분자구조는 다르지만, 이 두 사포닌 D는 모두 암세포에서 세포사멸을 유도한다[24, 31-34]. 하지만, 아케비아 사포닌 D는 흰쥐 간세포에서 오토파지를 유도하였고[28], 중국 할미꽃 사포닌 D는 몇몇 암세포에서 autophagic flux를 억제하여[37], 서로 반대되는 작용을 보였다. 각각의 사포닌 D가 세포가 달라서 서로 반대되는 작용을 한 것인지, 구조가 달라 서로 다르게 작용한 것인지 증명하기 위한 추가적인 연구가 필요하다.

종합하면, 한국 할미꽃 사포닌 D는 할미꽃에 존재하는 사포닌들, 다른 종의 할미꽃 사포닌 D뿐만 아니라 다른 식물의 사포닌 D보다 암세포에 대한 세포독성과 부작용에 대한 많은 연구로 그 효과가 검증된 천연물 유래 항암 물질 후보이다. 하지만, 다형성 교모세포종에서 SB365의 효과는 아직까지 알려지지 않았다.

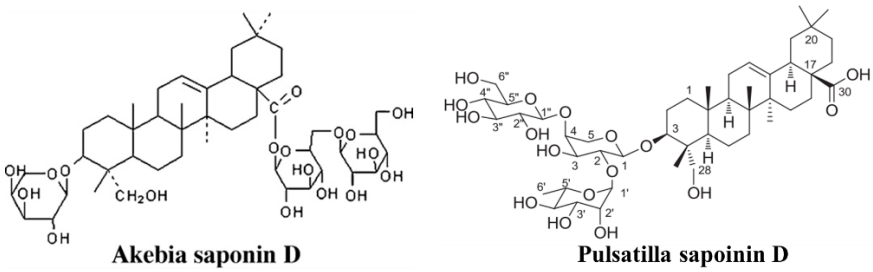

Figure 3. The chemical structure of Akebia saponin D and *Pulsatilla* saponin D [43, 44]

3. 다형성 교모세포종

3.1. 다형성 교모세포종의 특징과 치료

다형성 교모세포종(Glioblastoma multiforme, GBM)은 가장 흔한 악성 뇌종양으로, 환자의 평균 생존 기간은 2년 미만이다[45]. 면역 요법을 포함한 여러 치료 방법이 설계되어 시도되고 있지만[46], 여전히 새로 진단된 GBM의 표준 치료법은 최대 범위 내에서 외과적 절제술을 시행하고 이어서 화학 요법과 방사선 요법을 병용하는 것이다[46, 47]. 화학 요법에 대표적으로 사용되는 약물은 temozolomide 이다[48].

3.2. Temozolomide의 작용기전과 부작용

Temozolomide (TMZ)는 경구용 알킬화제로 DNA의 구아닌 O^6 위치에 메틸화를 유도한다. 이렇게 메틸화된 O^6-구아닌은 비정상적으로 티민과 쌍을 이루고, 불일치 수리 시스템이 DNA 이중 나선을 절단하여 결국 암세포의 세포사멸을 유도한다[49]. 또한, 이 약물은 뇌혈관장벽을 잘 통과하기 때문에 GBM 치료에 적합하다[50]. 하지만, GBM 세포에서 p53, p21, 또는 O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 등의 발현으로 TMZ에 대한 내성을 보이기도 하기 때문에, 모든 환자들에게 항상 좋은 것만은 아니다[51]. 더욱이 TMZ는 유전독성, 태아독성, T 세포와 NK 세포의 림프구 감소증 등 다양한 부작용을 나타낼 수 있다[52].

효과적인 GBM 치료를 위해 TMZ의 내성과 부작용을 극복하기 위한 추가적인 연구가 필요하다.

3.3. TMZ와 autophagic flux 억제제와의 병용 요법

일반적으로, 약물의 독성과 부작용을 줄이기 위해서 서로 다른 약물들을 병용한다[53]. GBM 환자들이 TMZ 치료와 방사선 치료를 받으면 GBM 세포 내 오토파지가 유도되는데, hydrochloroquine과 같은 autophagic flux 억제제를 병용하면 TMZ의 효과를 협력적으로 증가시킬 수 있다는 보고가 있다[54]. 그러나 이러한 병용 치료는 빈혈, 뾰루지 낭포, 용혈, 혈소판, 면역 세포 감소와 같은 다양한 부작용을 일으킬 수 있다[54].

비록 TMZ와 autophagic flux 억제제의 병용이 부작용은 있었지만, 협력작용을 보였기 때문에, 다른 부작용이 없는 autophagic flux 억제제 후보를 병용하는 추가적인 연구가 필요하다.

4. GBM 세포주

U87-MG와 T98G 세포는 대표적인 GBM 세포주이다. 이 두 세포는 human type 4 glioma 세포로서[55], GBM 연구에서 가장 많이 사용될 뿐만 아니라[56], 특히 TMZ에 대한 상반되는 민감성을 보인다. U87-MG 세포는 TMZ에 민감하고, 반대로 T98G 세포는 TMZ에 민감하지 않다. T98G 세포는 TMZ에 의해 유도되는 구아닌 O^6 위치의 메틸 그룹을 제거할 수 있는 MGMT를 발현하기 때문에[57] 약물에 대한 내성을 보인다. 임상적으로도 MGMT를 발현하는 GBM 환자의 생존기간은 MGMT 유전자의 메틸화로 그 기능을 잃은 환자보다 약 2년 정도 짧다[58].

이 두 세포에서 동일한 세포독성을 보이는 물질이 있다면, TMZ에 대한 내성을 극복하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

5. 암세포에서의 다양한 세포 죽음 기전

세포 죽음에 관한 기전에 관해서 그 동안 많은 연구가 있었다. 일반적으로, 포유류 세포에서 세포 죽음은 세포사멸(Type I), 오토파지 관련 세포 죽음(Type II), 괴사(Type III) 등 세 가지로 분류된다[59].

하지만, 최근에는 위 대표적인 3가지 세포 죽음의 기전 외에도, caspase-비의존적 세포 죽음[60], anoikis [61], cornification [62], entosis [63], excitotoxicity [64], mitotic catastrophe [65], netosis [66], paraptosis [67], parthanatos [68], pyronecrosis [69], pyroptosis [70] 등 일반적이지 않은 세포 죽음에 관한 연구가 계속되고 있다.

5.1. 세포사멸의 특징

세포사멸(Type I 세포 죽음)은 감염, 손상, 또는 돌연변이 된 세포를 제거하는 죽음의 경로이다[71, 72]. 세포 예정사라고도 하며, caspases와 nucleases 같은 효소들을 활성화시키고, 세포막 수포화, 세포 수축, 핵과 DNA 분절, 염색체 응축, 세포 내막 플립, 미토콘드리아 막 침투성 증가 등 다양한 현상을 동반한다. 세포사멸의 대부분은 PUMA, BAX와 같은 세포사멸 유도 단백질과 Bcl-2와 Bcl-XL 같은 세포사멸을 막는 단백질들에 의해 조절된다[73]. 세포사멸은 조직과 세포의 항상성 유지에 중요하며, AIDS, 신경 퇴행성 장애, 암 등의 질병과도 연관이 있다[71].

5.2. 오토파지 관련 세포 죽음의 특징

오토파지 관련 세포 죽음(Type II 세포 죽음)은 오토파지의 이상으로 인한 죽음

의 경로이다. 형태 상으로 세포 내 많은 액포가 있는 것이 특징이며, 세포사멸과 구별된다. 세포가 영양분 결핍 상황에 노출되었을 때 정상적으로는 오토파지를 통해 세포 내 불필요한 구성 요소나 손상된 미토콘드리아와 소포체 등 세포소기관을 분해하고 제거하여 필요한 에너지원으로 재생산함으로써 다양한 스트레스를 극복하는 기능을 수행한다[74].

오토파지 과정은 다음과 같다. 먼저 다양한 스트레스로 인해 주로 PI3K/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) 시그날의 활성 감소[75]와 Beclin-1을 포함한 class III PI3K 복합체, 다양한 ATG 단백질, ULK1 복합체, PI3P 복합체 등의 발현이 증가되어 오토파고좀 형성을 개시한다[76]. Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-I은 세포질에서 포스파티딜에탄올아민과 결합하여 LC3-II로 전환되며, 오토파고좀 막을 형성한다. 오토파고좀이 생성되면서, 내부에 소기관 또는 유비퀴틴화 된 단백질-결합 p62 등을 가둔다. 오토파고좀은 리소좀과 결합하여 오토리소좀을 형성하고, 리소좀 내 존재하던 가수분해효소에 의해서 오토리소좀은 아미노산으로 분해되는 “self-eating”, 즉, 자기 소모 과정을 나타낸다[77]. 이 오토파지의 모든 과정을 autophagic flux라고 한다[78]. Autophagic flux는 몇몇 약물에 의해 조절될 수 있다. Rapamycin (mTOR 억제제)은 오토파고좀 형성 개시를 유도하고[79], 반대로 3-methyl adenine (class III PI3K 억제제)은 오토파고좀 형성 개시를 억제한다[80]. 또한, bafilomycin A1 (v-ATPase 억제제)은 오토파고좀 분해를 억제한다[81].

한편, 오토파지가 과도하게 일어나거나 억제된다면 세포 죽음이 유도될 수 있다. 먼저, 과도한 오토파지는 세포 내 정상적인 미토콘드리아나 세포소기관들까지 분해하거나, 세포 내 불필요한 오토파고좀 축적으로 세포 죽음을 유도한다[82]. 또한, 정상적인 오토파지를 억제하면, 세포 내 손상된 세포소기관 또는 독성 물질의 축적과 오토파고좀의 축적으로 세포 죽음이 유도된다[83].

5.3. 괴사의 특징

괴사(Type III 세포 죽음)는 삼투압 충격, 열, 고농도 과산화수소 같은 극심한 물리 화학적 스트레스에 의한 세포 죽음이다. 세포 내 ATP가 비가역적으로 급격히 감소하면 에너지 불충분 상태에 이르게 되고, 소기관들이 부풀어 오르고 세포막이 파괴되어 damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) 같은 세포질 내용물들이 세포 외부로 방출되는 형태이다[84].

한편, 일반적인 괴사는 조절되지 않는 세포 죽음이지만, 최근에 네크롭토시스라는 예정된 괴사가 밝혀졌다[85]. 네크롭토시스는 괴사처럼 세포막 파괴와 세포 외부로 DAMPs 방출을 유도하지만, receptor-interacting protein (RIP)1과 RIP3, mixed-lineage kinase domain-like protein 같은 단백질의 활성에 의해 세포 죽음이 조절될 수 있는 것이 괴사와의 차이점이다[85, 86].

5.4. Caspase-비의존적 세포 죽음의 특징

Caspase-비의존적 세포 죽음(caspase-independent cell death; CICD)은 말 그대로 세포 죽음에서 caspase의 활성 없이 세포가 죽는 형태로, 위에서 설명한 세포사멸 외에 오토파지 관련 세포 죽음과 괴사 또한 이에 속한다고 할 수 있다[60]. CICD는 세포사멸과 일부 유사한 부분이 있지만 형태학적, 생화학적으로 구분된다. 또한, 고전적인 미토콘드리아를 통한 세포사멸과는 다르게 세포의 종류에 따라 다양한 CICD의 경로가 있다. 먼저, 미토콘드리아 내막에 존재하는 세포사멸 유도인자(apoptosis inducing factor; AIF), 엔도뉴클레아제G (endonuclease G; EndoG) 또는 고온 필요조건 단백질 A2 (high-temperature requirement protein A2; HtrA2)/Omi 등이 미토콘드리아 막 침투성(mitochondrial outer membrane permeabilization; MOMP) 증가

로 인하여 세포질로 빠져나와 CICD를 유도할 수 있다. AIF는 미토콘드리아에 위치하며 NADH 옥시다아제 활성을 보이는 플라빈 단백질이다. MOMP가 유도되면 AIF는 미토콘드리아에서 핵으로 이동해 크로마틴 응축과 고분자중량(50-kb) DNA 단편화를 유도한다[87]. 또한, EndoG는 미토콘드리아 내막의 엔도뉴클레아제로 미토콘드리아의 DNA 합성, 수리와 연관이 있다. MOMP가 유도되면 EndoG가 미토콘드리아에서 빠져 나와 핵으로 이동하고, DNA를 분해한다[88]. 또한, HtrA2/Omi는 미토콘드리아 내막에 존재하는 세린 프로테아제로 샤페론 기능을 보인다[89]. MOMP가 유도되면 HtrA2/Omi가 미토콘드리아에서 빠져 나와 세린 프로테아제 기능으로 CICD를 유도할 수 있다[90].

한편, 카텝신 B와 D도 CICD를 유도할 수 있다. 카텝신은 주로 리소좀 내 존재하는 단백질 분해효소로 구조와 역할에 따라 세린, 시스테인 또는 아스파틸 분해효소로 나뉘고, 모두 낮은 pH에서 활성을 나타낸다[91]. 카텝신은 오토파지와 내포작용 등으로 세포 내 항상성 유지와 생존에 중요한 역할을 하지만, 리소좀 막 침투성(lysosomal membrane permeabilization; LMP) 증가로 리소좀에서 카텝신 B와 D가 세포질로 빠져나오면, Bid 비의존적으로 미토콘드리아를 손상시켜[30] CICD를 유도할 수 있다[92].

마지막으로, 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)도 CICD와 관련이 있다. ROS는 미토콘드리아 내막에 존재하는 전자전달계의 NADH:유비퀴논 산화환원효소(Complex I)와 유비퀴놀:사이토크롬 c 산화환원효소(Complex III)에서 주로 생산된다[93]. 미토콘드리아 ROS의 생산 증가 또는 축적은 세포 내 PARP-1 활성화, LMP 유도로 인한 카텝신 B 방출, 미토콘드리아 손상, AIF 방출 등을 유도하여 CICD를 유도할 수 있다[94].

기존에 알려진 SB365의 세포독성 기전은 다양한 암세포에서 세포사멸을 유도한다고 보고된 바 있고, SB365와 분자구조가 같은 중국 할미꽃 사포닌 D가 몇몇

암세포에서 autophagic flux를 억제한다고 보고된 바 있다. 이처럼 SB365는 세포 종류에 따라 세포사멸 또는 오토파지 관련 세포 죽음 등 서로 다른 세포 죽음을 유도할 수 있기 때문에, 또 다른 경로를 통한 세포 죽음을 유도할 가능성을 배재할 수 없다.

6. 연구 가설 및 목적

많은 암세포주에 대한 SB365의 효과가 *in vitro*와 *in vivo*를 통하여 연구되었지만, GBM 세포에 대해서는 아직 연구되지 않았다. SB365가 GBM 세포에서도 autophagic flux를 억제할 수 있다면, GBM 치료에 있어서 chloroquine과 hydrochloroquine을 대체하여 TMZ와 병용할 수 있는 약물이 될 수 있을 것이다.

이 연구의 목적는 GBM세포인 U87-MG와 T98G세포에서 SB365 단독 효과뿐 아니라 TMZ와 병용 시의 효과를 *in vitro*와 *in vivo*에서 확인하는 것이다.

재료 및 방법

1. 약물

SB365는 SB Pharmaceutical Co. LTD (Gongju, Korea)에서 공급받았다. SB365와 TMZ (T2577, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 100 mM 농도로 보관하였다. 배양액 내 최종 DMSO 농도는 0.4%를 초과하지 않았고, 이 농도에서 DMSO는 GBM 세포에 독성을 보이지 않았다. 카텝신 B 억제제 II (219385, Calbiochem, San Diego, CA, USA), 카텝신 D 억제제인 pepstatin A (P5318, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), N-acetyl cysteine (NAC) (A7250; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)은 1 mg/ml 농도로 물에 녹여, 사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

2. 세포주와 배양조건

GBM 세포주는 TMZ에 민감한 U87-MG와 TMZ에 내성을 보이는 T98G를 사용하였다. 또한, 다른 종의 암세포주로 HT-29 (대장암)와 Huh-7 (간암)을 사용하였다. 모든 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였고, 최소배지(Minimum Essential Medium Eagle, MEM, LM 007-09)에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, S 001-07), 1% 항생제(penicillin/streptomycin, LS 202-02), 1% 비필수 아미노산(LS 005-01)(모든 시약은 Welgene, Daegu, Korea에서 구입하였음)을 추가 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

3. Cell counting Kit-8 검사를 통한 세포독성 분석

SB365 또는 TMZ의 세포독성 분석을 위해서 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; EZ-3000, Dojindo, Kumamoto, Japan) 검사를 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 간단히 기술하자면, U87-MG (5×10^3 cells/well) 또는 T98G (2×10^3 cells/well) 세포를 96 well에 분주 후 16시간 배양하였다. 다양한 농도의 SB365와 TMZ를 함께 혹은 각각 배양액에 첨가 후 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거 후 1x CCK-8 용액(v/v 10% CCK-8 stock solution in PBS) 100 μl를 넣었다. 1-3시간 추가 배양 후 분광광도계(Spectra max plus 384, Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IC50은 CCK-8 검사 결과를 토대로, the Quest Graph™ IC50 Calculator, a four parameter logistic regression model을 이용하여 최소 반응 값을 0으로 두고 계산하였다[95].

4. 세포사멸 분석

U87-MG (7.5×10^4 cells/well) 또는 T98G (3×10^4 cells/well) 세포를 6-well에 분주 후 37°C, CO_2 배양기에서 16시간 동안 배양하였다. SB365와 TMZ를 배양액에 함께 또는 각각 첨가 후 24, 48, 72시간 동안 추가 배양하였다. 세포를 FACS 튜브에 옮긴 후 FACS 완충액(0.5% BSA (0332, Amresco, Solon, OH, USA) in PBS)으로 수세하였다. 이어서 세포를 FACS 완충액 100 μl에 재부유 시킨 후 Annexin V (556419, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) 2 μl를 추가하여 상온에서 15분 동안 흔들어 주었다. 분석 직전에 7-AAD (559925, BD Pharmingen) 1 μl를 FACS 완충액에 추가한 후 FACS Calibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)로 분석하였다.

세포핵 모양을 확인하기 위하여 배양액(U87-MG, 10 μM; HT-29, 5 μM; Huh-7, 15 μM)에 SB365를 첨가한 후 72시간 동안 세포를 배양하였다. 세포를 모은 후 다중-L-리신이 코팅된 multi-spot 슬라이드 위에 분주하였다. 상온에서 1시간 동안 건조하여 세포를 슬라이드에 붙인 후 PBS로 두 번 수세하고 4% paraformaldehyde로 20분 동안 상온에서 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 수세 후 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 염색하여 세포핵 모양을 관찰하였다.

5. Western blot

세포를 차가운 RIPA 완충액(50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% sodium deoxychloride, 0.1% SDS, 1% triton X-100, 2 mM EDTA, 1% protease inhibitors)에 용해하였다. 용해물을 18,000 x g로 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 분리한 후 bicinchoninic acid 방법으로 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 20 μg을 EP 튜브에 담고(caspase-3는 100 μg), RIPA 완충액과 5× SDS loading dye (S2002, Biosesang, Sungnam, Korea)를 섞어주어 최종 부피를 20 μl로 맞추었다. 단백질을 가열블록에서 95°C로 가열한 후, SDS-PAGE 겔에서 전기영동 하였다(stacking gel: 50 v, separating gel: 120 v). 크기별로 분리된 단백질을 400 mA로 4°C에서 1시간 동안 니트로 섬유소막으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 니트로 섬유소막은 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 blocking 완충액(5% 탈지분유, 0.05% Tween 20 in PBS)에서 1시간 동안 처리하였다. 일차 항체를 blocking 완충액에 희석 후 4°C에서 overnight 동안 타겟 단백질에 결합시켰다. 니트로 섬유소막을 PBST로 수세 후 이차 항체를 상온에서 1시간 동안 타겟 단백질에 결합된 일차항체에 결합시켰다. 단백질 밴드는 Enzyme-linked chemiluminescence detection kit (DG-WF200; DoGEN, Seoul, Korea)로 시각화하였다. 일차 항체로는 rabbit anti human LC3B (NB 600-1384, Novus

Biologicals, Minneapolis, MN, USA, 1:5,000), rabbit anti human beclin-1 (ab2557, Abcam, Cambridge, MA, USA, 1:5,000), mouse anti human p62 (ab56416, Abcam, 1:10,000), rabbit anti human caspase 3 (9662, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA, 1:1000), p-AKT (9271, Cell Signaling Technology, 1:1,000), AKT (9272, Cell Signaling Technology, 1:1,000), p-mTOR (2971, Cell Signaling Technology, 1:1,000), mTOR (2972, Cell Signaling Technology, 1:1,000), mouse anti human β-actin (3700, Cell Signaling Technology, 1:5,000)을 사용하였고, 이차 항체로는 goat anti mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) (SC-2005, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:5,000), anti-rabbit IgG-HRP (SC-2030, Santa Cruz Biotechnology, 1:5,000)를 사용하였다.

6. 리소좀 막 안정성 분석

리소좀 막 안정성을 분석하기 위하여, U87-MG 세포를 acridine orange (A8097, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 3 μg/mL로 37°C에서 20분간 염색하였다. 이 염색 시약은 리소좀이 정상인 세포에서는 응집하여 붉은 형광을 방출하지만, 리소좀에 이상이 있는 세포에서는 단체량의 양이 증가해 녹색 형광을 방출한다[96]. FACSCalibur의 blue light (488 nm)를 받아 세포에서 방출되는 붉은 형광(FL3; 650 nm)과 녹색 형광(FL1; 510–530 nm)을 측정하여 리소좀 막 안정성을 분석하였다.

7. 미토콘드리아 막 전위 분석

U87-MG 세포를 JC-1 (T3168; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 2.5 μM로 37°C에서 20분 동안 염색하고, FACS 분석하였다. JC-1은 친유성, 양이온 염료이다. JC-1은 미토콘드리아로 들어가 막전위에 의해 응집되고, 미토콘드리아 내부에 축적

된다. FACS 분석 시 단량체와 응집체는 각각 녹색과 붉은 형광을 방출하는데, 미토콘드리아 막전위가 높을수록 붉은 형광은 증가하고, 녹색 형광은 감소한다 [97].

8. SB365와 TMZ의 병용 효과에 관한 연구

U87-MG 세포에 SB365 (4.59, 6.43, 9, 12.6, 17.64 μM)와 TMZ (32, 45, 63, 88.2, 123.5 μM)를 단독 또는 1:7 비율로 함께 처리하였다. 72시간 후 CCK-8 검사를 하였고, Chou-Talalay method [98]와 CompuSyn software (CompuSyn Inc., Paramus, NJ)를 이용하여 병용지수(combination index; CI)를 계산하였다. 계산된 두 약물의 CI가 1보다 작으면 협력작용, 1과 같으면 부가적 작용, 1보다 크면 길항작용을 의미한다.

9. 이종이식 동물모델

본 연구에서 수행한 동물실험은 동물실험 윤리위원회의 승인을 받았다(SNU-150521-3-2). 7주령 수컷 Balb/c 누드 마우스를 OrientBio (Seongnam, Korea)에서 구매하였다. 소태아혈청이 없는 배지에 U87-MG 세포를 부유 후 Matrigel HC (354248; BD Biosciences)와 1:1 비율(volume)로 섞고, 마우스의 양쪽 옆구리에 주입하였다(5×10^6 cells/100 μL/flank). 종양의 부피가 100–200 mm^3에 도달하면, 그룹 간에 종양 크기가 차이 나지 않도록 대조군, SB365, TMZ, SB365 + TMZ로 그룹을 나눴다. SB365 (5 mg/kg)를 이틀에 한 번씩 종양 내 주사하였고, TMZ (2.5 mg/kg) 또는 vehicle (≤3% DMSO)을 함께 또는 단독으로 매일 복강 내 주사하였다. 첫 주사일 (day 0)을 기준으로 21일간 약물을 마우스에 주사하였고, 22일째 실험을 종료하였다. 몸무게와 종양의 부피를 이틀에 한번씩 측정하였다. 종양의 크기를 calipers로

측정하였고, 그 부피를 다음과 같은 공식을 이용하여 구하였다.

부피 (V) = 길이 (L) × 폭 $(W)^2 \times 0.5$.

10. 통계처리

통계적 유효성을 검증하기 위하여 Mann–Whitney U test를 사용하였다. 통계 분석 프로그램은 Statistical Package for the Social Sciences software ver. 12 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 통계적 유의성은 *p*-value가 0.05 이하일 때 인정하였다.

결과

1. *In vitro*에서 SB365는 다형성 교모세포종 세포주의 세포증식을 억제하였다.

다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme, GBM) 세포주인 U87-MG와 T98G에 SB365를 처리한 후 24, 48, 72시간에 세포증식을 분석하였다. 먼저, U87-MG 세포에서 SB365 처리 후 24시간에는 SB365 농도에 상관없이 대조군과 비교하여 세포증식에 큰 차이가 없었다. 하지만, 48시간에는 SB365 20 μM 농도에서 대조군 대비 세포증식이 약 30% 감소하였다. 72시간에는 2.5, 20 μM에서 세포증식이 각각 25%, 80% 감소하였다($p < 0.001$)(Figure 4A).

T98G 세포에서는 SB365 처리 후 24시간에 10 μM 농도에서 대조군 대비 세포증식이 약 10% 감소하였는데, 20 μM의 경우 완전한 억제효과를 보였다. 48시간에는 10 μM에서 약 20%, 20 μM에서 완전한 억제효과를 보였다. 72시간에는 5 μM에서도 세포증식을 약 20% 감소시켰고, 10 μM에서 약 40%, 20 μM에서 완전한 억제효과를 보였다($p < 0.001$) (Figure 4B).

2. SB365는 Annexin V 양성 GBM 세포의 비율을 증가시켰다.

기존에 몇몇 암세포에서 SB365는 세포사멸을 유도한다고 보고된 바 있다[31-34, 36]. 따라서 GBM 세포에서도 SB365로 인해 억제된 세포증식이 세포사멸 때문인지 확인하고자 하였다.

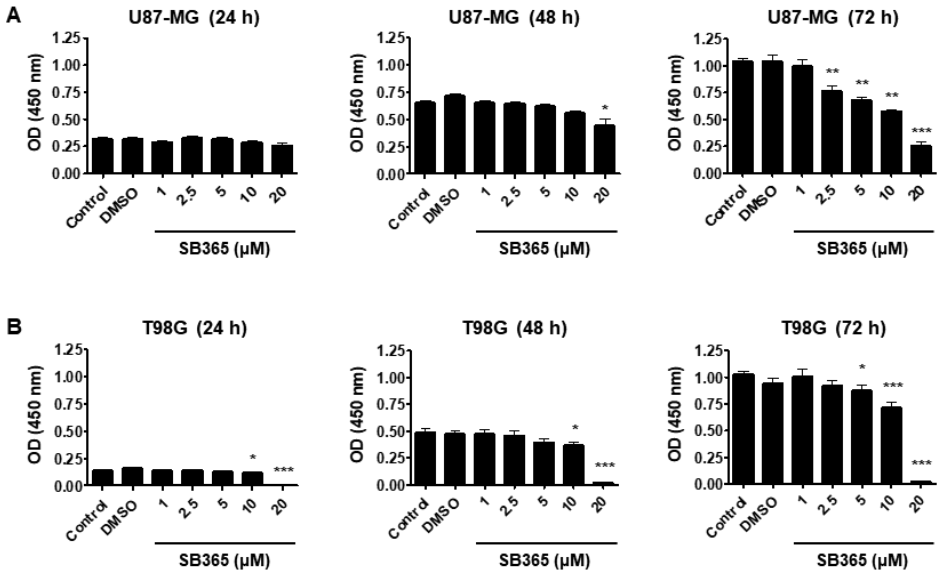

Figure 4. SB365 exerted a cytotoxic effect on GBM cells. (A, B) SB365 inhibited the proliferation of (A) U87-MG and (B) T98G cells. The cells in 96-well plates were treated with SB365 at the indicated concentrations for 24, 48, or 72 h in quadruplicate, and subjected to CCK 8 assay. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs the control.

먼저, GBM 세포에 SB365 1-20 μM을 처리한 후 24, 48, 72시간에 세포사멸의 현상 중 하나인 세포막 플립을 Annexin V 염색으로, 후기 세포사멸 또는 세포 죽음 현상 중 하나인 세포막 투과성 증가를 7-AAD 염색으로 확인하였다. 그 결과, U87-MG 세포에 SB365를 24시간 처리하였을 때는 Annexin V 양성 세포의 비율에 큰 변화가 없었다. 그러나, 48시간에는, SB365 20 μM 농도에서 Annexin V 양성 세포의 비율이 유의하게 증가하였다. 72시간에 Annexin V 양성 세포는 SB365 2.5–20 μM에서 용량-의존적으로 증가하였다(Figure 5A).

T98G에서는 SB365를 24, 48시간 처리하였을 때 10, 20 μM 농도에서 Annexin V 양성 세포 비율이 증가하였고, 72시간에는 5–20 μM에서 용량-의존적으로 증가하였다(Figure 5B).

세포사멸의 초기에는 세포 내막의 포스파티딜 세린이 외막으로 노출되어 Annexin V가 결합한다. 세포사멸이 더 진행되면 세포 내로 7-AAD의 유입이 가능해지고, 7-AAD는 핵의 DNA와 결합한다[99]. 따라서, 일반적으로 세포사멸이 일어나고 있는 세포의 Annexin V와 7-AAD 염색 양상은 초기 세포사멸의 경우 Annexin V (+) 7-AAD (-), 후기 세포사멸의 경우 Annexin V (+) 7-AAD (+)이다. 하지만, SB365 처리된 GBM 세포에서 Annexin V와 7-AAD 염색 양상은 SB365 농도에 상관없이 Annexin V (+) 7-AAD (-) 세포의 비율은 낮았고, Annexin V (+) 7-AAD (+) 세포의 비율은 높았다(Figure 5C).

3. SB365는 GBM에서 caspase-비의존적 세포 죽음을 유도하였다.

GBM 세포에서 SB365 처리 후 Annexin V와 7-AAD 염색 양상이 세포사멸의

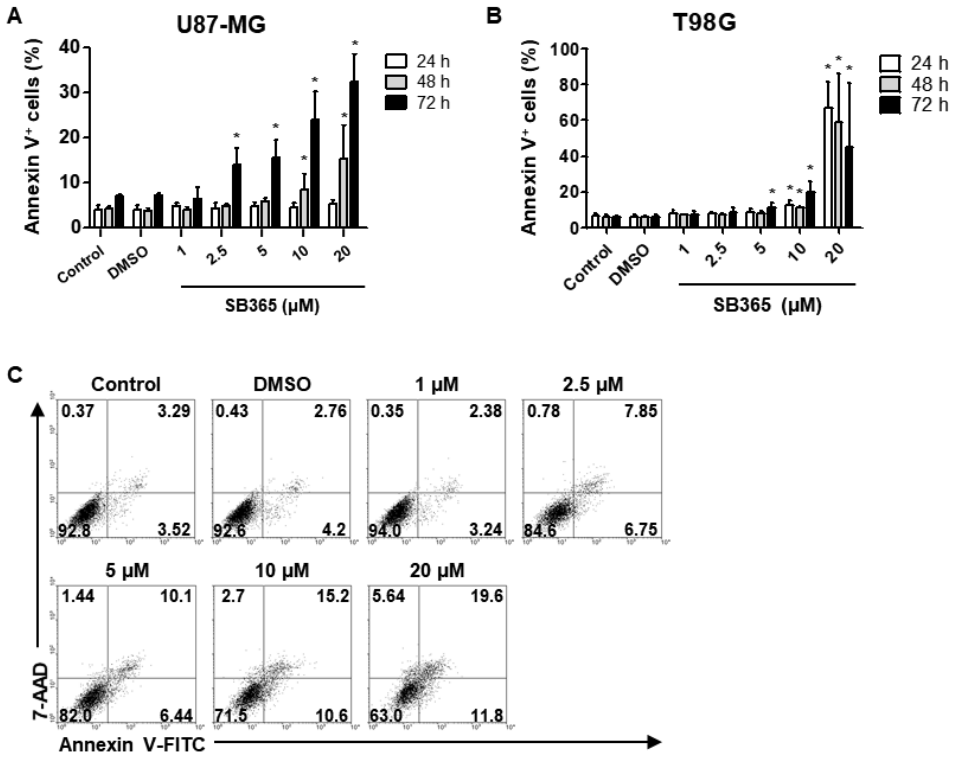

Figure 5. SB365 increased the frequency of the Annexin V-positive cells. (A) U87-MG and (B) T98G cells in six-well plates were treated as above, stained with Annexin V and 7-AAD, and subjected to FACS analysis. The frequency of Annexin V-positive cells. (C) A representative FACS profile after 72 hours in U87-MG cells. Experiments were performed independently in triplicate. * $p < 0.05$ vs the control.

전형적인 모습을 보이지 않았기 때문에, 이 세포에서의 죽음은 세포사멸에 의한 것이 아닐 가능성이 있을 것으로 생각하였다. 따라서, SB365 처리 후 세포막 플립 외 세포사멸의 다른 현상을 추가로 확인하였다.

Caspase-3는 내인성과 외인성 세포사멸의 caspase-cascade 중 마지막 caspase로서 세포사멸 시 활성화된다[100]. 따라서, 기존에 SB365에 의해서 caspase-3 활성화가 유도된다고 알려진 대장암 세포주(HT-29)와 간암 세포주(Huh-7)[31, 32]를 양성 대조군으로 사용하여 GBM 세포주와 함께 SB365의 반수억제 농도(IC50) (U87-MG: 8.9 μM, T98G: 14.1 μM, HT-29: 5.1 μM, Huh7: 13.1 μM) (Figure 6A)와 근접한 농도(U87-MG: 10 μM, T98G: 15 μM, HT-29: 5 μM, Huh7: 15 μM)의 SB365로 처리한 후 72시간에 caspase-3 활성화를 확인하였다. 그 결과, SB365는 양성 대조군인 HT-29와 Huh-7 세포에서 caspase-3 활성화를 유도하였지만, U87-MG와 T98G 세포에서는 caspase-3 활성화에 큰 변화를 주지 않았다(Figure 6B). 이 결과는 SB365가 caspase 비의존적 세포 죽음을 유도한다는 것을 의미한다.

4. GBM 세포에서 SB365는 Bcl-2, Bax, 핵 모양에 큰 변화를 주지 않았다.

세포사멸 시 BCL-2 family인 Bcl-2가 감소하고, Bax는 증가하는 것으로 알려져 있다[101]. U87-MG 세포에 SB365 1-10 μM을 처리한 후 Bcl-2와 Bax의 발현을 확인하였다. 그 결과 대조군 대비 큰 변화는 없었다(Figure 7A).

또 다른 세포사멸 현상으로 세포핵이 분절되는 것으로 알려져 있다[102]. U87-MG, HT-29, Huh-7 세포를 DAPI로 염색한 후 핵 모양을 관찰한 결과, SB365를 처리한 HT-29와 Huh-7 세포에서는 고배율 화면당 1-4개의 비율로 세포핵 분절이

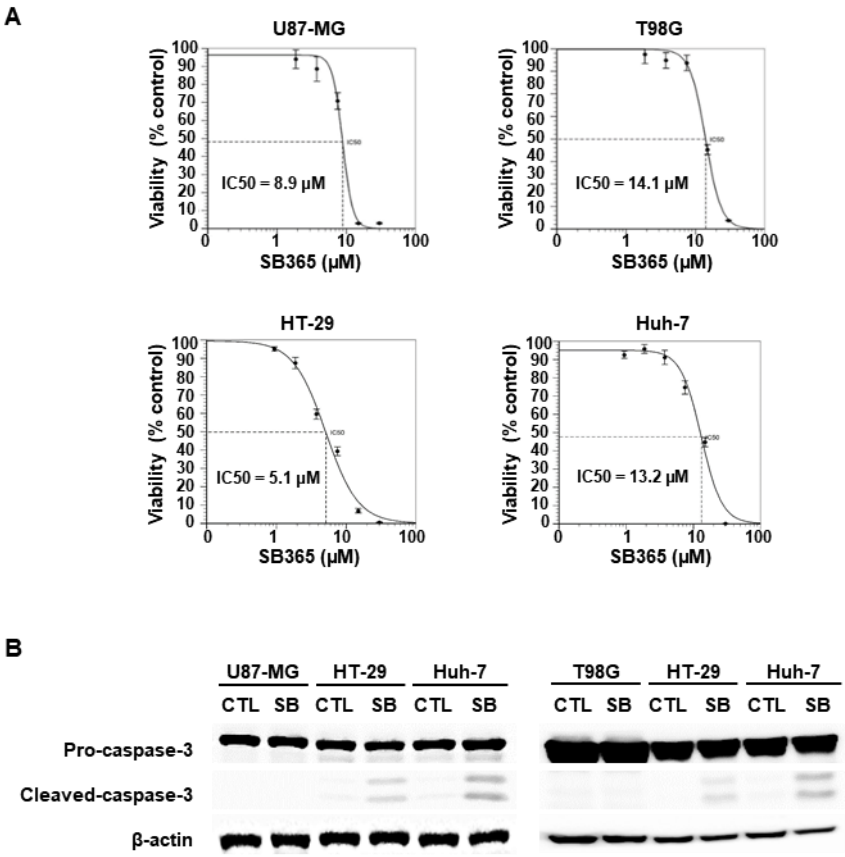

Figure 6. SB365 induced caspase-independent death in GBM cells. (A) The calculated IC50 values of SB365 on U87-MG, T98G, HT-29 and Huh-7 cells were 8.9, 14.1, 5.1 and 13.2 μM, respectively. (B) U87-MG, T98G, HT-29 (1×10^5/well), and Huh-7 (1×10^5/well) cells in six-well plates were treated with 10, 15, 5, and 15 μM SB365, respectively. Cell lysates were subjected to western blotting of caspase-3 cleavage.

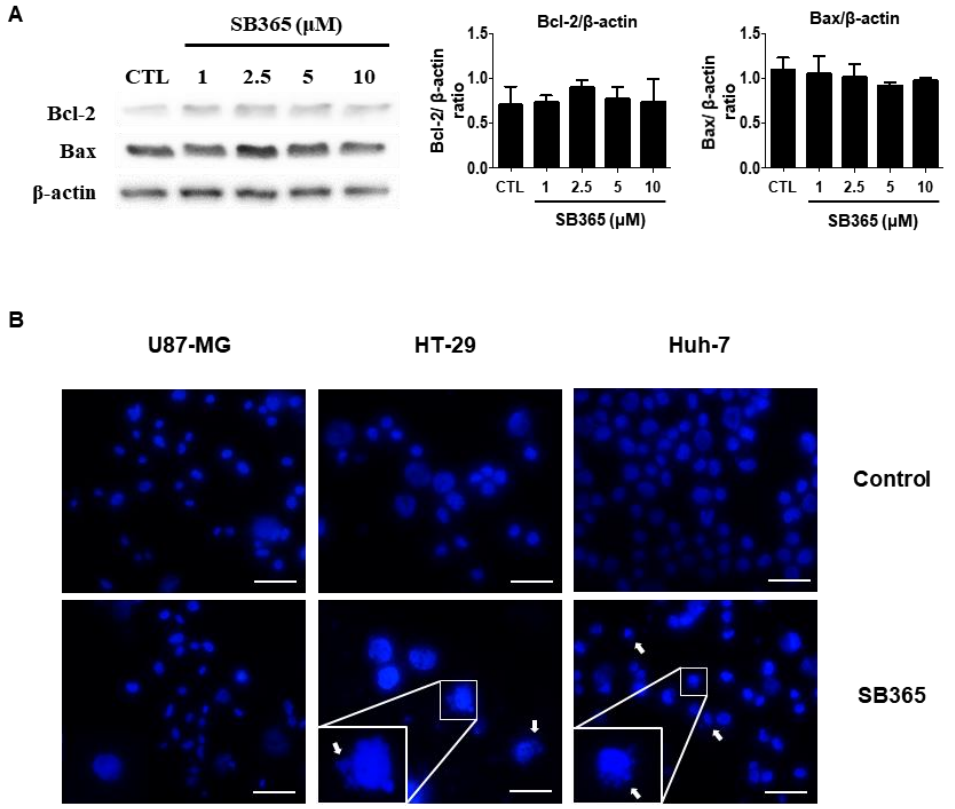

Figure 7. SB365 did not changes with Bcl-2, Bax and nuclear morphology. (A) U87-MG cells in six-well plates were treated with 1-10 μM SB365 for 72 h. Cell lysates were subjected to western blotting of Bcl-2 and Bax, followed by densitometry. (B) SB365 induced nuclear fragmentation in HT-29 and Huh-7 cells, but not in U87-MG cells. U87-MG, HT-29, and Huh-7 cells in six-well plates were treated with 10, 5, and 15 μM SB365 for 72 h, respectively. And adhered to an eight-well multispot slide, and stained with DAPI (blue). Arrows indicate fragmented nuclei. Images were acquired using a fluorescence microscope (x 400). The scale bar represents 50 μm. CTL, control group; SB, SB365-treated group.

관측되었지만 U87-MG 세포에서는 세포핵 분절 없이, 둥글고, 타원형의 핵 모양이 관측되었다(Figure 7B).

종합하면, SB365는 GBM 세포에서 세포사멸이 아닌, caspase-비의존적 세포 죽음(caspase-independent cell death, CICD)을 유도하였다.

5. GBM 세포에서 SB365는 autophagic flux를 억제하였다.

앞서 SB365가 CICD를 유도하였는데, 이를 유도할 수 있는 대표적인 기전 중 하나가 오토파지 억제이다[103]. 오토파지는 세포의 손상을 예방하는 역할을 하는데[104], 기존에 중국 할미꽃 사포닌 D가 HeLa, K562, A549, MCF-7 세포에서 autophagic flux를 억제한다고 보고된 바 있다[37]. 따라서 GBM 세포에서도 중국 사포닌 D와 분자구조가 같은 SB365가 autophagic flux를 억제하여 세포 죽음을 유도하였을 가능성이 있다.

Autophagic flux는 오토파고좀의 형성 개시부터 분해까지의 모든 과정을 말하는데[78], 리소좀 내 분해효소의 불활성화로 인해 오토파고좀이 분해되지 못 하면, LC3-II와 p62가 세포 내에 축적된다[105]. 따라서, 증가된 LC3-II/LC3-I 비율과 p62는 autophagic flux 억제의 지표로 여겨진다[105]. 본 연구에서도 SB365가 GBM 세포에서 autophagic flux를 억제하는지 LC3-II/LC3-I 비율과 p62 발현을 통해 확인하고자 하였다. U87-MG 세포에 SB365 10 μM을 처리한 후 24시간 내 LC3-II/LC3-I의 비율과 p62를 확인한 결과, 각각 3시간과 6시간에 증가하기 시작하였다(Figure 8A). 이 결과는 SB365가 U87-MG 세포에서 autophagic flux를 억제하였다는 것을 의미한다.

한편, 기존에 중국 할미꽃 사포닌 D가 HeLa 세포에서 mTOR의 활성화를 억

제한다고 보고된 바 있다[37]. Akt와 mTOR의 활성 억제 시 오토파지가 유도되는 것으로 알려져 있다[106]. 다시 말해서 중국 할미꽃 사포닌 D는 autophagic flux를 억제하지만, 동시에 오토파지를 유도하기도 하는 이중적인 역할을 한다. GBM 세포에서도 SB365가 autophagic flux를 억제하는 시점에 오토파지를 유도하는 시그날인 Akt, mTOR의 활성화를 억제하는지 함께 확인하였다. 그 결과, U87-MG 세포에 SB365 10 μM을 처리한 후 24시간 내에 Akt와 mTOR 활성화에는 큰 변화가 없었다(Figure 8A). 또한, 오토파지가 유도되면 증가하는 단백질인 Beclin-1의 발현[76]도 확인한 결과, 큰 변화가 없었다(Figure 8A). 이러한 결과는 SB365가 오토파지를 유도하지는 않았다는 것을 의미한다.

한편, GBM 세포에 SB365를 처리한 후 6시간부터 24시간까지 autophagic flux가 억제되었는데(figure 8A), 앞선 실험 결과에서 SB365 처리에 의한 세포 죽음은 처리 후 72시간에 본격적으로 나타났으며, 지속적인 autophagic flux 억제가 세포 죽음을 유도할 수 있다는 보고가 있다[107]. 따라서, GBM 세포에서 SB365로 인한 autophagic flux 억제가 72시간까지 지속되는지 확인하였다. 그 결과, U87-MG와 T98G 세포에서 모두 SB365는 24시간부터 72시간까지 지속적으로 autophagic flux를 억제하였다(Figure 8B). 이 결과로 SB365에 의한 세포 죽음은 autophagic flux 억제와 관련이 있을 것으로 추정된다.

6. SB365는 GBM 세포에서 오토파고좀 축적을 통해 세포 죽음을 유도하였다.

GBM 세포를 대상으로 한 이전 연구에서 valproic acid에 의한 autophagic flux 억제가 세포 내 오토파고좀 축적을 유도하였고, 이는 다시 GBM 세포의 죽음을

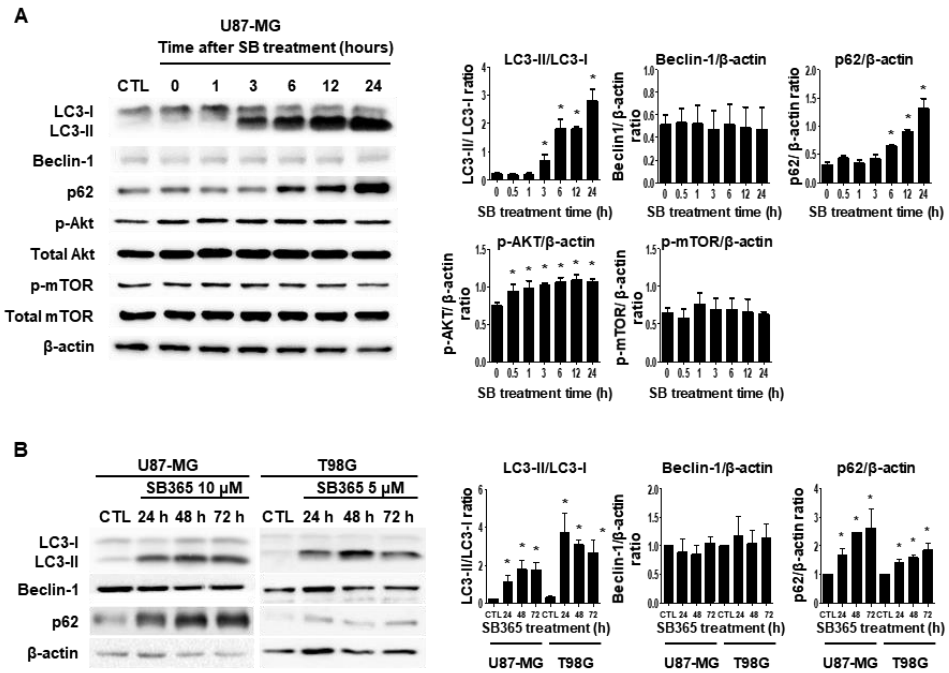

Figure 8. SB365 inhibited autophagic flux in GBM cells. (A) Western blot analysis of autophagy-related proteins and signals within 24 h of treatment with SB365. U87-MG cells in a six-well plate were treated with 10 μM SB365 for the indicated times. Cell lysates were subjected to western blotting for LC3-I, LC3-II, beclin-1, p62, p-Akt, and p-mTOR and the LC3-II/LC3-I, beclin-1/β-actin, p62/β-actin, p-Akt/β-actin, and p-mTOR/β-actin ratios were calculated. (B) Western blot analysis of autophagy-related proteins with 24, 48, and 72 h of treatment with SB365 in U87-MG and T98G cells. And the LC3-II/LC3-I, beclin-1/β-actin, and p62/β-actin ratios were calculated. * $p < 0.05$ vs the control.

유도하였다는 보고가 있다[108]. 만약 SB365에 의해 야기된 autophagic flux 억제와 이로 인한 세포 내 오토파고좀 축적이 세포 죽음의 원인이라면, 세포 내 오토파고좀 축적을 추가로 증가시켰을 때 세포 죽음이 증가할 것으로 생각하였다.

이를 확인하기에 앞서, 오토파지를 유도하는 rapamycin [79]을 SB365와 함께 처리하여 세포 내 오토파고좀 축적을 증가시켜 보았다. 먼저, U87-MG 세포에 rapamycin 25 pM을 처리하면, 대조군 대비 LC3-II/LC3-I ratio가 증가하고, p62는 감소하였다(Figure 9A). 이 결과는, rapamycin이 기존에 알려진 바와 같이 U87-MG 세포에서 오토파지를 유도하였다는 것을 의미하였다. 또한, SB365를 rapamycin과 함께 처리하면 SB365 단독 처리 대비 LC3-II/LC3-I ratio가 증가하였고, p62는 변화가 없었다(Figure 9A). 이 결과는 SB365와 rapamycin을 함께 처리하면 rapamycin이 오토파고좀 형성을 증가시키지만, SB365가 분해되는 것을 억제하여 오토파고좀의 축적을 증가시켰다는 것을 의미하였다.

이렇게 증가된 세포 내 오토파고좀 축적이 SB365 단독 처리보다 세포 죽음을 증가시키는지 확인하고자 CCK-8 검사를 시행하였다. 그 결과, rapamycin (25, 50, 100 pM)은 SB365 10 μM의 세포증식 억제효과를 증가시켰다(Figure 9B). 이는 SB365에 의한 세포 내 오토파고좀 축적이 세포 죽음을 유도하였다는 것을 의미하였다.

7. SB365는 리소좀 중성화를 유도하였다.

한편, autophagic flux의 억제는 리소좀의 중성화나 리소좀 막 침투성(lysosomal membrane permeabilization, LMP) 증가 등으로 리소좀 내 분해 효소가 불활성화되면 나타날 수 있기 때문에[109], GBM 세포에서 SB365 처리 후 나타나는

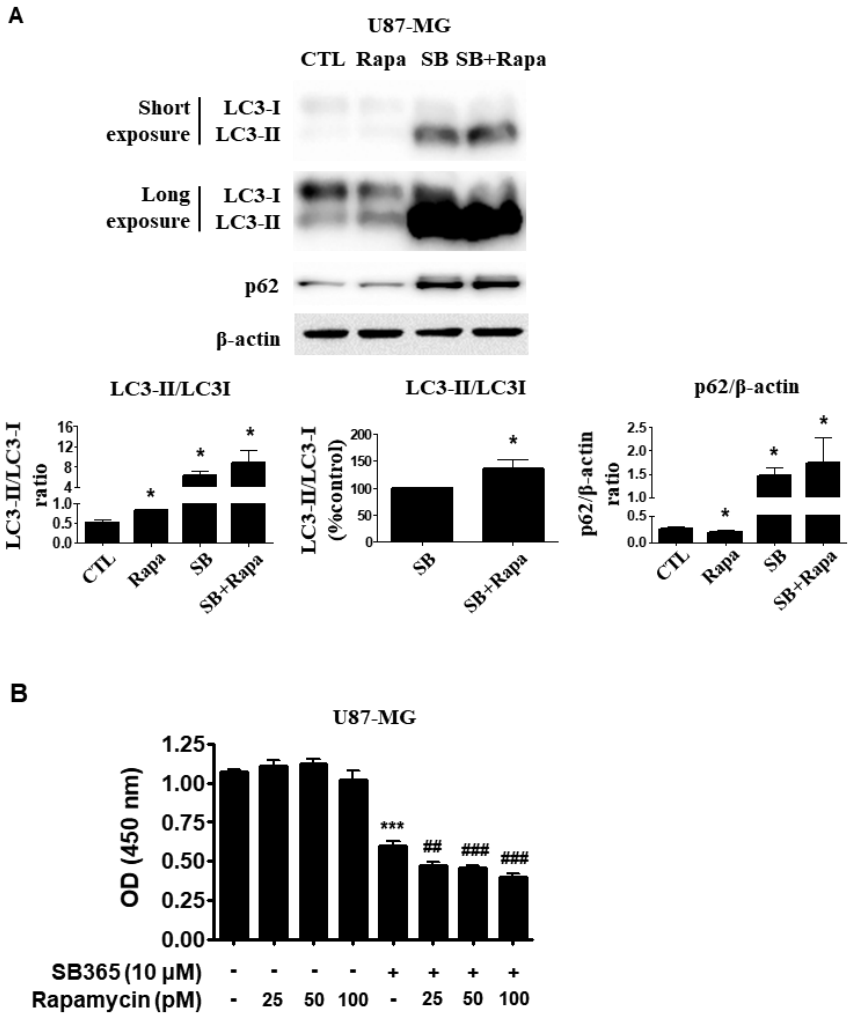

Figure 9. SB365 induced cell death by accumulation of autophagosome in GBM cells. (A) U87-MG cells were pre-treated with 25 pM rapamycin for 1 hours, and/or 10 μM SB365 treated for 72 hours, and LC3-II/LC3-I, and p62 expression were analyzed by western blotting. (B) U87-MG cells were pre-treated with rapamycin (25, 50, and 100 pM) for 1 hours and/or 10 μM SB365 treated for 72 hours, and subjected to CCK-8 assay. The experiment was performed independently in triplicate. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs the control; ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ vs the SB365 group.

autophagic flux 억제가 리소좀 안정성 변화에 의한 것인지 확인하기 위하여 SB365 처리된 세포를 acridine orange 염색 후 FACS 분석을 시행하였다. 그 결과, acridine orange 양성 세포의 비율이 SB365 처리 후 6시간 만에 대조군 대비 약 65%로 감소하였고, 이후 점점 더 감소하는 경향을 보였다(p = 0.05)(Figure 10). 이 결과는, SB365가 GBM 세포에서 리소좀 pH 중성화를 유도하였다는 것을 의미한다.

8. SB365는 카텝신 B를 매개로 미토콘드리아 막 전위 감소와 세포 죽음을 일부 유도하였다.

앞서 SB365가 GBM 세포에서 리소좀 pH 중성화를 유도하였는데, 이 현상은 SB365가 LMP를 유도해 나타난 것일 가능성이 있다. LMP 발생 시 리소좀 내 pH는 중성화 되고[110], 카텝신 B와/또는 카텝신 D가 세포질로 누출되어 미토콘드리아를 손상시킬 뿐만 아니라 결국 세포를 죽게 만든다[110-112]. 따라서, SB365의 효과가 LMP를 통한 것이라면 카텝신을 억제하였을 때 세포독성을 감소시킬 수 있을 것이라고 생각되었다. GBM 세포에서 카텝신 B 또는 카텝신 D 억제제의 존재 하에 SB365의 세포증식 억제효과를 확인하였다. 그 결과, 카텝신 B 억제제 II 5 μM은 SB365에 의해 억제되었던 세포증식을 40%이상 회복하였지만(p = 0.05)(Figure 11A), 카텝신 D 억제제(pepstatin A)는 전혀 회복하지 못 하였다(Figure 11B).

SB365의 세포독성은 카텝신 B를 매개하였는데, 알려진 바와 같이 카텝신 B가 미토콘드리아를 손상시켰는지 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 확인하였다. U87-MG 세포에서 SB365가 LMP 유도 후 카텝신

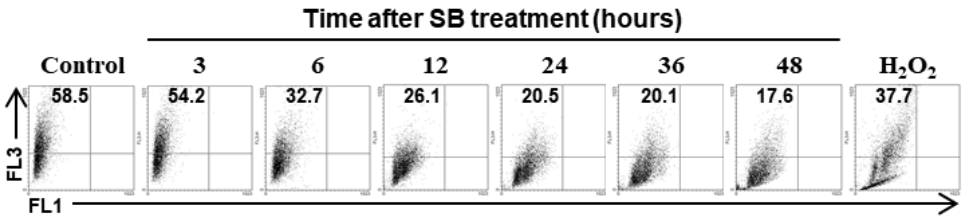

Figure 10. SB365 deteriorated lysosomal stability in GBM cells. SB365 induced lysosomal pH neutralization in U87-MG cells. Cells were treated with 10 μM SB365 for the indicated times, stained with 3 μg/mL acridine orange for lysosomal stability measurement. Cells treated with 0.5 mM H_2O_2 for 2 h constituted the positive control. The experiment was performed independently in triplicate. * $p < 0.05$ vs the control.

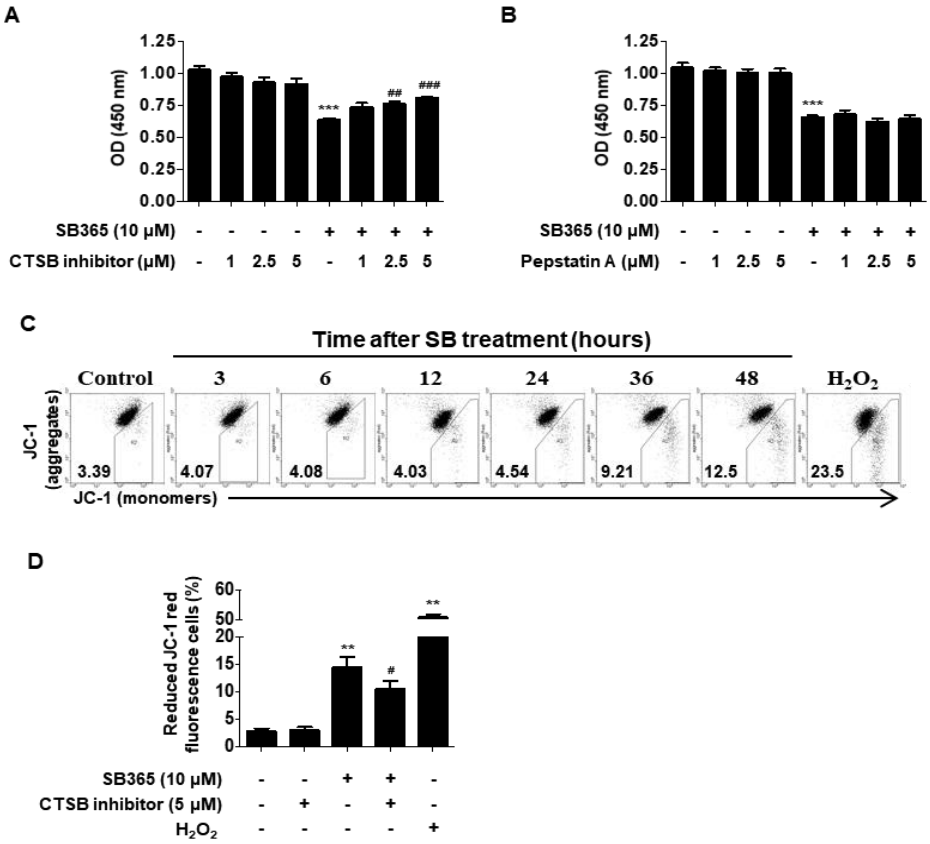

Figure 11. SB365 partially induced cell death via cathepsin B in U87-MG cells, not cathepsin D. U87-MG cells were cultured in 96-well plates, treated with 10 μM SB365 for 72 h in the presence of the indicated concentrations of (A) cathepsin B inhibitor, (B) pepstatin A (cathepsin D inhibitor), and subjected to CCK-8 assay. (C) SB365 induced mitochondrial depolarization in U87-MG cells. Cells were treated with 10 μM SB365 for the indicated times, and cells were stained with 2.5 μM JC-1 for 20 min for MMP measurement, harvested, and analyzed by flow cytometry. (D) Cathepsin B inhibitor partially recovered SB365 induced MMP deterioration. U87-MG cells were treated with 10 μM SB365 for 72 h in the presence of 5 μM cathepsin B inhibitor, stained with JC-1, and MMP was analyzed by FACS. Quadruplicate samples were analyzed independently in triplicate. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs the control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ vs the SB365 group. CTSB, cathepsin B.

B가 빠져나올 것을 고려하여(Figure 10), SB365 10 μM을 3, 6, 12, 24, 36, 48시간 처리한 후 JC-1으로 20분간 염색하고, FACS로 분석하였다. SB365 처리 후 MMP가 감소한 세포의 평균 비율은 36시간에는 대조군 대비 약 6%, 48시간에는 약 9%로 증가하였다($p = 0.01$)(Figure 11C). 또한, 72시간에는 카뎁신 B 억제제가 SB365에 의해 MMP가 감소된 세포의 비율을 약 30% 회복하였다(Figure 11D). 이 결과는 SB365가 LMP를 유도하여 카뎁신 B를 매개로 세포 죽음을 일부 유도하였다는 것을 의미한다.

9. SB365는 주로 ROS를 매개로 세포 죽음을 유도하였다.

Autophagic flux 억제[113, 114]와 MMP 감소[115]가 ROS 생성을 증가하여, 결국 세포 죽음을 유도한다고 알려져 있다. SB365가 autophagic flux를 억제하고, MMP를 감소시켰기 때문에 ROS가 생성되어 세포 죽음을 매개하였을 가능성이 있을 것으로 생각하였다. 이를 확인하기 위하여 항산화제인 N-acetyl cysteine (NAC)이 SB365의 세포독성 효과를 회복시키는지 알아보았다. GBM 세포에 SB365를 처리한 후 1시간에 NAC을 농도별로(U87-MG: 0.625, 1.25, 2.5, 5 mM, T98G: 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25 mM) 첨가하였고, 72시간 추가 배양 후 CCK-8 검사를 시행하였다. 그 결과, SB365에 의해 억제된 U87-MG 세포의 세포증식을 NAC 0.625 mM은 ~30%, NAC 2.5 mM은 50% 회복하였다(Figure 12A). 하지만, NAC 5 mM은 SB365에 의해 억제된 세포증식을 회복하지 못하였다. 다시 말해, U87-MG 세포에서 SB365에 의해 억제되는 세포증식을 ROS 억제가 일부 회복시켰다.

비록 적은 수준이지만, T98G 세포에서도 NAC은 유사한 효과를 나타냈다(Figure 12B).

앞서 U87-MG 세포에 SB365를 처리한 후 1시간에 NAC을 처리하였는데, 배양액에서 NAC은 불안정하여 72시간까지 온전히 작용하지 못 했을 가능성이 있다[116]. 따라서 SB365에 의해 ROS가 발생하는 시점에 NAC을 첨가해 준다면, 발생하지 않은 시점에 첨가해준 것 보다 세포독성을 회복하는 비율이 더 클 것으로 생각되었다. SB365 처리 후 36시간부터 MMP가 감소하였는데(Figure 11C), 이때부터 ROS 발생이 증가되었을 것으로 생각되어 U87-MG 세포에 SB365를 처리한 후 1, 24, 48시간에 NAC 2.5 mM을 첨가하여 배양 후 72시간에 CCK-8 검사를 시행하였다. 그 결과, NAC은 1시간과 24시간에 첨가되었을 때 SB365의 독성을 약 50% 회복한 것에 비해 48시간에 첨가되었을 때는 약 70%로 1, 24시간에 첨가되었을 때보다 더 높게 회복하였다(Figure 12C).

종합하면, SB365는 GBM 세포에서 주로 ROS를 매개로 세포 죽음을 유도하였다.

10. *In vitro*에서 SB365는 TMZ의 세포독성을 부가적으로 증가시켰다.

기존에 GBM 표준 치료제인 TMZ의 항암효과를 autophagic flux 억제제인 hydroxychloroquine [54]이 증가시킨다고 보고된 바 있다. 앞서 SB365가 GBM 세포에서 autophagic flux를 억제하였는데, SB365도 hydroxychloroquine처럼 TMZ의 항암효과를 증가시킬 수 있을 것으로 생각되었다. GBM 세포에 SB365 10 μM과TMZ를 함께 또는 단독으로 처리하였고, 추가로 72시간 배양 후 CCK-8 검사를 시행하였다. 그 결과, 먼저 U87-MG 세포에 TMZ (6.25, 12.5, 25, 50 μM)를 단독 처리하였을 때, 25, 50 μM에서 대조군 대비 세포증식을 각각 37%, 46% 억제하였다(*p*

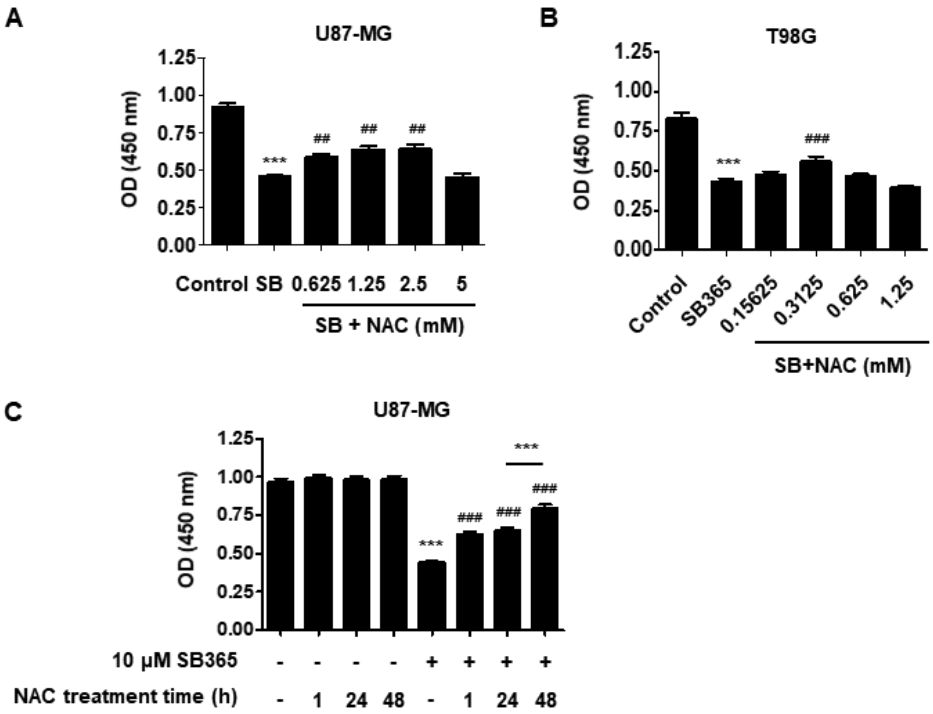

Figure 12. SB365 induced cell death via ROS in GBM cells. (A) U87-MG and (B) T98G cells, NAC was added to the culture medium 1 h after SB365 treatment at the indicated concentrations for 72 h and subjected to CCK-8 assay. (C) U87-MG cells were cultured in 96-well plates, treated with 10 μM SB365. Then 2.5 mM NAC was added to the culture medium 1, 24 or 48 h after SB365 treatment and subjected to CCK-8 assay at 72 h. Quadruplicate samples were analyzed independently in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs the control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ vs the SB365 group. NAC, N acetyl cysteine.

< 0.001). 그런데, SB365 10 μM을 TMZ (6.25, 12.5, 25, 50 μM)와 함께 처리하였을 때는 TMZ를 단독으로 처리한 것에 비해 세포증식을 더욱 억제하였다(각각 46%, 48%, 56%, 63%)(p = 0.016)(Figure 13A).

T98G 세포에서도 U87-MG 세포에서와 유사한 효과를 나타냈다(Figure 13B).

종합하면, GBM 세포에서 SB365를 TMZ와 병용 시 TMZ 단독 처리 대비 세포독성이 증가했다.

SB365와 TMZ를 병용 시 세포독성이 증가하였는데, 두 약물이 어떤 병용효과를 통해 증가되었는지 확인하고자 하였다. 두 약물의 병용효과가 협력적 효과인지, 부가적 효과인지, 길항적 효과인지 분석하는 대표적인 방법으로는 Chou-Talalay 방법과 Isobologram 방법이 있다[98]. SB365와 TMZ의 병용으로 증가된 세포독성 효과가 협력적인 것인지 또는 부가적인 것인지 확인하고자 위의 두 가지 방법으로 분석하였다. U87-MG 세포에 SB365와 TMZ의 IC50인 각각 8.9 μM (Figure 6B), 63 μM (Figure 13C)을 기준으로 두 약물의 농도를 위 아래로 2개씩 √2의 배수가 되도록 설정하였다. 설정된 농도는, SB365는 4.59, 6.43, 9, 12.6, 17.64 μM였고, TMZ는 32, 45, 63, 88.2, 123.5 μM였다. 두 약물을 단독 또는 함께 처리한 후 72시간에 CCK-8 검사 결과를 토대로 Chou-Talalay 방법을 통해 병용지수(combination index, CI)를 구하였다. 그 결과, CI는 0.5 ~ 1.5 였다(Figure 13D, left). 또한, Isobologram을 통한 분석에서도 두 약물의 부가적인 효과로 예측되는 선을 기준으로 Fa=0.9 그룹은 기준 이하, Fa=0.75, Fa=0.5 그룹은 기준과 일치하는 결과를 나타냈는데(Figure 13D, Right), 이 결과는 두 약물이 부가적인 효과를 나타냈다는 것을 의미한다.

종합하면, GBM 세포에서 SB365는 TMZ의 세포독성을 부가적으로 증가시켰다.

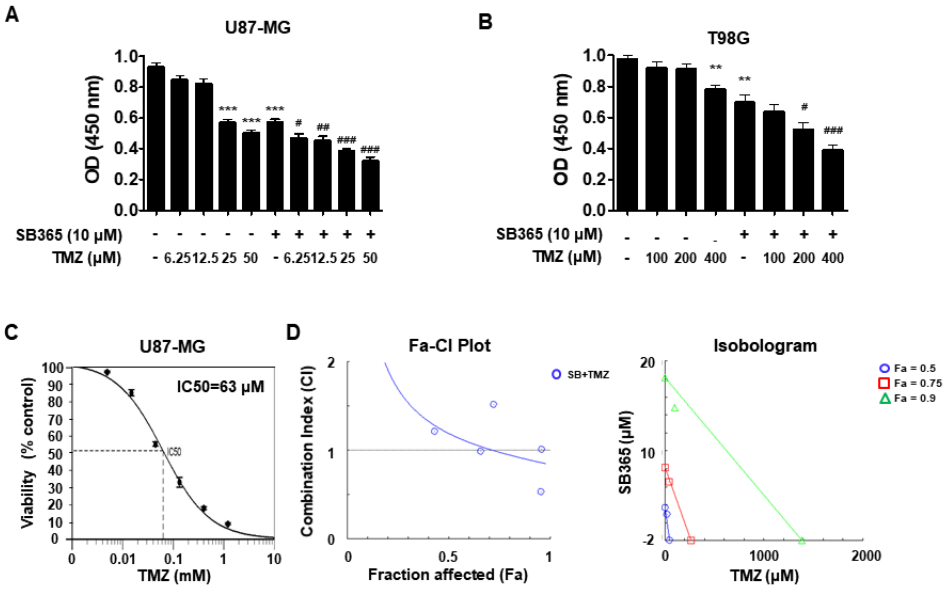

Figure 13. SB365 augmented the cytotoxic effect of TMZ on GBM cells. (A) U87-MG cells and (B) T98G cells were cultured in 96-well plates, treated with the indicated concentrations of TMZ in the absence and/or presence of 10 μM SB365, and subjected to CCK-8 assay. Quadruplicate samples were analyzed independently in triplicate. (C) The calculated IC50 values of TMZ on U87-MG was 63 μM. (D) Left column: Fa-CI plot. Blue values (SB+TMZ) indicate 1 > CI, 'synergism'; 1 = CI, 'additive'; 1 < CI, 'antagonism'. Right column: Isobologram: The green, red and blue lines indicate where the theoretical additive line is for a particular Fa value (green, Fa = 0.9, red Fa = 0.75 and blue Fa = 0.5). * $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$ vs the control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ vs the SB365 group. TMZ, temozolomide.

11. U87-MG 이종이식 마우스 모델에서 SB365는 TMZ와 함께 종양 성장을 현저히 억제하였다.

In vitro 결과를 토대로 *in vivo*에서도 SB365와 TMZ가 부가적인 항암 효과를 나타내는지 확인하였다.

먼저, 주입할 약물의 농도를 정하기 위하여 기존에 보고된 논문들을 토대로 선행연구를 시행하였다. U87-MG 세포를 누드 마우스의 양쪽 옆구리에 접종하였다. 종양의 부피가 100–200 mm^3에 도달하였을 때, SB365 (1 또는 10 mg/kg, 격일로, 종양 내)와 TMZ (1.25 mg/kg, 매일, 복강 내)를 함께 또는 각각 22일간 주사하였다. 그 결과, 그룹간 몸무게의 변화는 없었고(Figure 14A), SB365 1 mg/kg 그룹과 TMZ 1.25 mg/kg 그룹의 종양 크기도 대조군과 큰 차이가 없었다. 하지만, SB365 10 mg/kg 그룹은 주입 시작 후 6일부터 대조군 대비 종양 크기가 감소하여 12일에는 완전히 사라졌다($p = 0.046$)(Figure 14B).

위 결과를 토대로, SB365는 1 mg/kg과 10 mg/kg 사이의 농도인 5 mg/kg으로 설정하였고, TMZ는 농도를 두배 높인 2.5 mg/kg으로 설정하여 위 실험을 다시 시행하였다. 그 결과, 그룹 간 몸무게에 큰 차이 없이(Figure 14C), SB365와 TMZ는 종양의 성장을 대조군과 비교하여 유의하게 억제하였다($p = 0.011$)(Figure 14D). 또한, SB365와 TMZ 병용은 TMZ 또는 SB365를 단독으로 주입한 그룹에 비해 종양의 성장을 크게 감소시켰다($p = 0.046$)(Figure 14D). 그룹 간에 종양의 크기를 정확히 비교하기 위하여, 실험 종료 시 종양을 떼어 무게를 측정하였다. 그 결과, SB365와 TMZ를 단독으로 주입한 그룹은 대조군보다 종양의 크기와 무게가 유의하게 감소하였고, SB365와 TMZ를 함께 주입한 그룹은 각각의 약물을 단독으로 주입한 그룹에 비해 종양의 크기와 무게가 현저히 감소하였다(Figure 14E, F). 이 결과는, U87-MG 세포를 이용한 이종 동물모델에서 SB365는 종양의 성장을 억제하였

고, TMZ의 효과 또한 증가시켰다는 것을 의미한다.

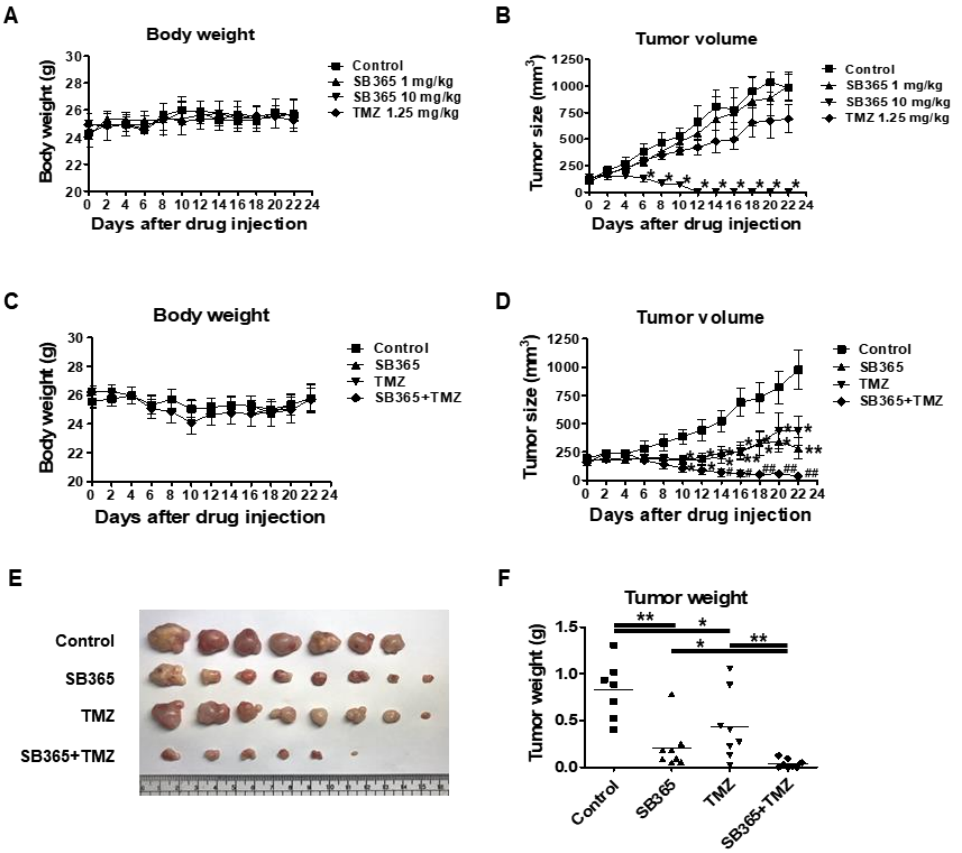

Figure 14. Combination of SB365 with TMZ additively suppressed the growth of U87-MG tumors in a mouse xenograft model. U87-MG cells were subcutaneously inoculated into both flanks of nude mice. (A, B) When the tumor reached a volume of ~100–200 mm^3, mice were intratumorally administered with 1 or 10 mg/kg SB365 every other day and/or with 1.25 mg/kg TMZ intraperitoneally daily for 22 days. The control received vehicle (<3% DMSO). (A) Body weight and (B) tumor size were measured every other day. (C-F) The same experiments were performed as in (A, B) with 5 mg/kg SB365 and/or with 2.5 mg/kg TMZ. (C) Body weight and (D) tumor size were measured. The mice were euthanized, and (E) the tumors were extracted and (F) weighed. n = 8 per group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs the control.

고찰

본 연구에서는 GBM 세포인 U87-MG와 T98G세포에서 SB365 단독 효과뿐만 아니라 TMZ와 병용 시 효과를 *in vitro*와 *in vivo*에서 확인하고자 하였다. SB365는 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme, GBM) 세포주인 U87-MG와 T98G에서 용량-의존적으로 세포독성을 나타냈다. 먼저, SB365는 GBM 세포에서 리소좀 막 침투성(lysosome membrane permeabilization, LMP)을 증가시켜 리소좀 pH 중성화를 유도하고, autophagic flux를 억제하였다. 이어서 리소좀에서 세포질로 빠져 나온 카뎁신 B를 매개로 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 감소시키며 ROS를 증가시켜 결국 세포 죽음을 유도하였다. SB365는 temozolomide (TMZ) 와 병용 시 *in vitro*와 *in vivo*에서 부가적인 효과를 나타냈다. SB365는 다른 암세포에서 세포사멸을 유도했던 것과 다르게, GBM 세포에서는 caspase-비의존적 세포 죽음(caspase-indepedent cell death, CICD)을 유도하였다.

기존에 SB365는 췌장암 환자의 피부를 통해 종양 내 직접 주입되었는데[35], 본 연구에서도 이를 모방하여, *in vivo* 실험 시 SB365를 구강 투여 또는 복강 내 주입[31-34] 대신 마우스의 종양에 직접 주입하였다.

GBM 세포에서 SB365의 세포독성 효과는 기존에 간, 폐, 대장, 췌장암 세포에서의 효과처럼 농도-의존적으로 나타났다[31-34, 36](Figure 4).

한편, SB365는 기존에 알려진 것처럼 대장암과 간암세포에서는 caspase-3 활성화와 핵 절편화를 유도하였지만, GBM 세포에서는 큰 효과가 없었고(Figure 6), Bcl-2와 Bax의 발현 또한 영향을 주지 않았다(Figure 7). 세포사멸이 유도되면 내인적 또는 외인적 경로를 통한 caspase-3 활성화[117], Bcl-2 감소, Bax 증가 등 현상이 나타난다[101]. 하지만 SB365를 처리 후 GBM 세포에서는 이러한 현상들이 나타나지 않았기 때문에, SB365는 GBM 세포에서 세포사멸이 아닌 CICD를 유도

한 것으로 판단하였다.

한편, SB365처럼 CICD를 유도하는 약물은 세포사멸에 내성을 보이는 암치료를 위해 사용되거나[118] 또는 세포사멸을 유도하는 항암제와 병용하여 사용된다면 치료에 효과적일 것으로 생각된다[119]. 하지만, 특정 항암제와 CICD를 유도하는 약물을 병용 시 예상치 못한 작용으로 길항 효과를 보일 수도 있기 때문에[120] 약물 간 작용 기전 검토와 사용에 주의가 필요하다.

중국 할미꽃 사포닌 D가 몇몇 암세포주에서 autophagic flux를 억제한다고 보고된 바 있는데[37], SB365도 분자구조가 같기 때문에 GBM 세포에서 autophagic flux를 억제하였을 것으로 생각하였다. 확인해본 결과, autophagic flux 억제 시 분해되지 못한 오토파고좀 성분인 LC3-II와 p62가 세포 내 축적되는데, GBM 세포에 SB365를 처리한 후 6시간에 LC3-II/LC3-I ratio와 p62의 양이 증가하였고(Figure 8A), 이는 72시간까지 높게 유지되었다(Figure 8B). 따라서, SB365는 GBM 세포에서 autophagic flux를 억제한다. 기존에 chloroquine [112]과 thymoquinone [110]이 GBM 세포에서 autophagic flux를 억제하여 CICD를 유도한다고 보고된 바 있다. SB365도 GBM 세포에서 autophagic flux를 억제하여 CICD를 유도하였을 가능성이 있다[107].

한편, 오토파지는 주로 PI3K/Akt/mTOR 시그날이 억제되면 유도된다[75]. 기존에 SB365도 간암세포[31]와 위암세포[32]에서 PI3K/Akt/mTOR 시그날을 억제한다고 보고된 바 있다[106]. 또한, HeLa 세포에서 autophagic flux를 억제하는 중국 할미꽃 사포닌 D는 mTOR 활성을 억제하여 오토파지를 유도한다고 보고된 바 있다[37]. U87-MG 세포에서도 SB365가 autophagic flux를 억제할 뿐만 아니라 오토파지를 유도하는지 확인해본 결과, SB365를 처리한 후 24시간 내 Akt와 mTOR 활성에는 큰 변화가 없었을 뿐만 아니라 오토파지 유도 시 발현이 증가하는 Beclin-1 [76]도 변화가 없었다(Figure 8A). 즉, GBM 세포에서 SB365는 오토파지를

유도하지는 않았다.

SB365는 GBM 세포에서 mTOR를 억제하지 않았다(Figure 8A). 하지만, SB365는 위암세포에서 mTOR를 억제하였고[32], SB365와 분자구조가 같은 중국 할미꽃 사포닌 D도 HeLa 세포에서 mTOR를 억제하였다고 보고된 바 있다. 위암세포에서 SB365의 mTOR 억제 기전은 티로신 인산화효소인 c-Met의 알로스테릭 자리에 결합하여 PI3K/Akt/mTOR 시그날 활성을 억제하는 것인데[32], HeLa 세포에서도 c-Met 억제를 통해 mTOR를 억제하였을 가능성이 있지만 확인되지는 않았다. 할미꽃 사포닌 D가 위암 세포와 HeLa 세포에서 mTOR를 억제하였음에도 불구하고 분자구조가 같은 SB365가 GBM 세포에서는 같은 효과를 내지 못한 이유가 있을 것으로 생각되었다. GBM 세포는 상피세포 성장인자 수용체(epithelial growth factor receptor, EGFR)의 과발현, EGFR vIII의 돌연변이, PI3K의 돌연변이 등으로 인하여 PI3K/Akt/mTOR 시그날이 활성화 되어 있다[121]. 따라서, GBM 세포에서 SB365가 c-Met을 억제하는지는 확인하지 못했지만, 억제한다고 하여도 과발현 된 EGFR을 통해 PI3K/Akt/mTOR 시그날이 활성화되기 때문에[122] SB365가 위암세포나 HeLa 세포에서와 달리 GBM 세포에서는 mTOR를 억제하지 못하였을 가능성이 있다.

한편, U87-MG 세포에 SB365와 오토파지 유도제인 rapamycin [79]을 함께 처리하였을 때, SB365를 단독 처리한 것 보다 오토파고좀 축적이 증가하였고(Figure 9A), 세포증식이 더욱 억제되었다(Figure 9B). 이 결과는 SB365에 의해 축적된 오토파고좀이 세포 죽음을 유도하였다는 것을 의미한다.

본 실험에서 SB365를 처리했을 때 autophagic flux 억제(Figure 8)와 리소좀 중성화가 동시에 나타났다(Figure 10). 위 두 효과가 같은 시간에 나타났지만, 리소좀 pH가 중성화되면 리소좀 내 분해효소들의 활성이 억제되어 오토파고좀을 분해하지 못해 autophagic flux는 억제되는 것으로 알려져 있기 때문에[109], SB365에

의한 리소좀 중성화가 autophagic flux 억제의 원인으로 작용하였을 것으로 추정된다.

한편, 리소좀 중성화는 몇 가지 요인에 의해 유도될 수 있다. 먼저, 리소좀 막 결합 단백질인 v-ATPase가 억제될 경우에 리소좀 내 H+ 농도를 높이지 못해서 리소좀 중성화가 유도된다[123]. 또한, 약 염기성 약물[124]이 리소좀 내 갇혀 pH를 높이거나, ROS [125] 또는 삼투압을 조절하는 약물[126]에 의해서 LMP가 유도되면 리소좀 중성화가 유도된다. SB365가 v-ATPase를 억제하는지, ROS를 유도하는지, 삼투압을 조절하는지 알려지지 않았다. 하지만, SB365는 양극성 분자 구조[43]로 세포막에 대한 투과와 침투성이 높을 것으로 생각되고, 기존에 SB365와 같은 oleanane-계열 사포닌[30]이 세포막의 침투성 증가[127]와 LMP[128]를 유도한다고 보고된 바 있어서, GBM 세포에서 SB365에 의한 리소좀 중성화는 LMP 때문일 것으로 생각된다.

LMP 발생 시 리소좀 내에 카뎁신 B 또는 D가 세포질로 방출되어 세포독성을 나타내는데[92], 본 연구에서 SB365에 의해 억제된 세포증식을 카뎁신 B 억제제가 일부 회복하였다(Figure 11A). 이 결과는 SB365가 LMP를 유도하여 리소좀 내 카뎁신 B를 세포질로 방출시켰다는 것을 의미한다.

본 연구에서 카뎁신 B 억제제는 SB365에 의해 유도되는 세포 죽음을 회복하였지만(Figure 11A), 카뎁신 D 억제제는 그러지 못하였다(Figure 11B). 이와 유사하게, 사람 비소세포성 폐암 세포[129]와 과활성화된 T 세포[130]에 paclitaxel, epothilone B, discodermolide를 처리했을 때도 카뎁신 B와 D 억제제 중 하나만 세포증식을 회복하였다. 카뎁신 B와 D의 분자량이 비슷한 것을 고려할 때[92], LMP 발생 시 이 두 물질이 동시에 리소좀에서 빠져 나왔을 것으로 생각되지만, 카뎁신 B만 빠져 나왔을 가능성도 배제할 수 없다[92]. 또는, 세포의 종류에 따라 작용하는 카뎁신이 다를 가능성도 있다[131].

SB365는 GBM 세포에서 카뎁신 B를 매개로 세포 죽음을 유도하였는데, 카뎁신 B의 작용 기전을 알아보고자 하였다. LMP로 인해 리소좀에서 빠져 나온 카뎁신 B는 미토콘드리아 손상을 통해 MMP를 감소시켜 세포 죽음을 유도할 수 있다[92]. GBM 세포에서 SB365를 처리한 후 36시간과 48시간에 MMP가 감소된 세포의 비율이 각각 5.8%와 9.1% 였다(Figure 11C). 하지만, SB365 처리 후 48시간까지 독성이 나타나지 않았던 점을 고려하면(Figure 4), 36시간과 48시간에 감소한 MMP가 SB365에 의해 유도되는 세포 죽음을 직접 이끌지는 않았을 것으로 생각된다.

SB365 처리 후 6시간에 LMP가 유도되었고(Figure 10), 이어서 카뎁신 B가 세포질로 빠져 나와 미토콘드리아를 손상시켜 SB365 처리 후 36시간에 MMP가 감소하였다(Figure 11C). 이처럼 LMP가 유도된 후 MMP가 즉시 감소되지 않고 30시간 후 감소되었는데, 아마도 카뎁신 B가 리소좀에서 LMP 후 바로 빠져 나왔지만 미토콘드리아를 손상시키는데 시간이 필요하였거나[132], LMP가 유도되어도 카뎁신 B가 빠져 나오는데 시간이 필요하였을 것으로 생각된다[133].

한편, MMP 감소가 발생하면 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome c는 caspase-3/9를 활성화시키고, EndoG는 DNA를 분해하며, AIF는 염색체 응축을 유도하는 등 세포사멸의 현상이 나타난다[134]. 하지만, 본 실험에서는 caspase-3 활성화, 염색체 응축 또는 핵 분절 등 세포사멸 현상이 나타나지 않았다(Figure 6, 7). 따라서, SB365가 GBM 세포에서 cytochrome c, EndoG, AIF를 통하여 세포 죽음을 유도하지 않았으며, 다른 요인을 통하여 세포 죽음을 유도하였을 것으로 생각되었다.

미토콘드리아 기능 저하로 인해 생성되는 또 다른 물질로 ROS가 있다. GBM 세포에서 SB365는 autophagic flux를 억제하였는데(Figure 8), autophagic flux가 억제되면 ROS의 축적이 유도될 수 있다[113, 114]. 축적된 ROS는 리소좀 막 침투성을 증가시키고, 리소좀 프로테아제들의 방출을 유도하여 MMP를 감소시키는데,

결국 ROS 생성을 증가시켜 악순환이 이어진다[135]. 따라서, ROS가 SB365에 의해 유도되는 세포 죽음을 매개할 것으로 추정하였다. SB365 처리 후 1시간과 24시간에 항산화제인 NAC을 첨가하면, SB365에 의한 세포증식 억제가 약 50% 회복되었고, SB365 처리 후 48시간에 NAC을 첨가하면 약 70% 회복되었다(Figure 12C). 이 결과로 ROS가 SB365에 의해 유도되는 세포 죽음의 주된 요인임을 알 수 있었다.

한편, U87-MG 세포에서 5 mM (Figure 12A), 10 mM (data not shown) NAC과 T98G 세포에서 0.625 mM NAC은 SB365에 의해 억제되는 세포증식을 회복하지 못하였다(Figure 12B). 또한, U87-MG 세포에 SB365를 처리한 후 세포증식을 회복하였던 농도(0.625-2.5 mM)의 NAC을 SB365 처리 전에 첨가하면 SB365의 세포증식 억제 효과를 오히려 증가시켰다. 이는 아마도 항산화제가 세포 내 증식에서 생리적 기능을 수행하는 ROS까지 제거하였기 때문일 수 있다[136].

지금까지 GBM 치료에 있어서 TMZ의 효능을 증가시키기 위하여 다른 약물들과 혼합하는 시도들이 있었다. 예를 들면, TMZ는 chloroquine, hydroxychloroquine, bafilomycin A1과 같은 autophagic flux 억제제와 혼합하여 협력적인 효과를 보인다고 보고된 바 있다[54]. SB365도 GBM 세포에서 autophagic flux를 억제하였기 때문에 TMZ와 병용 시 협력적인 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각되었다. GBM 세포에서 SB365와 TMZ의 병용은 *in vitro*에서 부가적인 세포독성 효과(Figure 13)와 *in vivo*에서 종양 성장 억제 효과를 보여 주었다(Figure 14). 그러므로, TMZ와 협력적으로 종양 성장을 억제하지만 부작용이 있는 chloroquine, hydroxychloroquine, 또는 bafilomycin A1를 대체하여 SB365가 TMZ와 병용하여 사용될 수 있을 것으로 생각된다[54, 137]. 한가지 우려되는 점은, SB365가 임상개발을 위해 중대한 결점으로 생각되는 용혈 활성을 양[127]과 토끼[138]의 적혈구에서 나타냈다는 것이다[127]. 하지만, SB365가 기존에 췌장암 말기 환자를 대상으

로 한 임상실험에서는 큰 부작용 없이 항암효과를 보였기 때문에[35], 동물과 사람의 용혈 활성에 대한 차이에 대해서는 좀 더 연구가 필요해 보인다.

SB365는 TMZ에 내성인 T98G 세포와 TMZ에 민감한 U87-MG 세포에서 모두 세포 죽음을 유도하였고(Figure 4B), TMZ의 독성 효과를 부가적으로 증가시켰다 (Figure 13B).

한편, T98G 세포에서 SB365가 MGMT의 발현을 감소시켜서 TMZ에 대한 민감성을 높인 것인지 확인하지 못하여 차후 확인해 볼 필요성이 있다.

결론적으로, SB365는 GBM 세포에서 LMP를 유도하였는데, 이로 인해 autophagic flux가 억제되어 오토파고좀이 축적되었고, 카뎁신 B를 매개로 한 미토콘드리아 손상을 통해 ROS가 축적되어 CICD를 유도하였다. 또한, SB365는 TMZ의 세포독성 효과를 부가적으로 증가시켰다. 그러므로, SB365는 TMZ에 내성인 GBM 치료를 위해 TMZ와 병용하여 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Tilford, G.L., *Edible and medicinal plants of the West*. 1997: Mountain Press Publishing.
2. Yarnell, E. and K. Abascal, *Botanical treatments for depression: Part 2-Herbal corrections for mood imbalances.* Alternative & Complementary Therapies, 2001. **7**(3): p. 138-143.
3. Bae, K., *The medicinal plants of Korea.* Kyo-Hak Publishing, Seoul, 2000. **364**.
4. Griffith, V.J., P. Judd, and D. Bellamy, *The Oxford book of health foods*. 2003, Oxford University Press.
5. Lee, S.H., E. Lee, and Y.T. Ko, *Anti-inflammatory effects of a methanol extract from Pulsatilla koreana in lipopolysaccharide-exposed rats.* BMB Rep, 2012. **45**(6): p. 371-6.
6. Kim, S.-J., *Pulsatilla koreana Ameliorates Ddextran Sulfate Sodium-induced Ccolitis in Mice.* Biomedical Science Letters, 2015. **21**(2): p. 115-121.
7. Chung, S.-W., C.-H. Chung, S.-B. Lim, J.-K. Kim, and E.-H. So, *The antimicrobial effect of Pulsatilla koreana extracts to oral micro-organism.* The Journal of the Korean Academy of Periodontology, 2000. **30**(3): p. 661-674.
8. Kim, Y., S.B. Kim, Y.J. You, and B.Z. Ahn, *Deoxypodophyllotoxin: The cytotoxic and antiangiogenic component from Pulsatilla koreana.* Planta Medica, 2002. **68**(3): p. 271-274.
9. Ye, W.-C., B.-X. Ou, N.-N. Ji, S.-X. Zhao, T. Ye, M.A. Mc Kervey, and P. Stevenson, *Patensin, a saponin from Pulsatilla patens var. multifida.* Phytochemistry, 1995. **39**(4): p. 937-939.
10. Ye, W.-C., N.-N. Ji, S.-X. Zhao, J.-H. Liu, T. Ye, M. McKervey, and P. Stevenson, *Triterpenoids from Pulsatilla chinensis.* Phytochemistry, 1996. **42**(3): p. 799-802.
11. Zhang, X., A. Liu, and L. Xu, *Determination of ranunculin in Pulsatilla chinensis and synthetic ranunculin by reversed phase HPLC.* Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica, 1990. **25**(12): p. 932-935.

12. Wina, E., S. Muetzel, and K. Becker, *The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production - A review.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(21): p. 8093-8105.

13. Oleszek, W.A., *Chromatographic determination of plant saponins.* Journal of Chromatography A, 2002. **967**(1): p. 147-162.

14. Podolak, I., A. Galanty, and D. Sobolewska, *Saponins as cytotoxic agents: a review.* Phytochemistry Reviews, 2010. **9**(3): p. 425-474.

15. Patra, A.K. and J. Saxena, *The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production.* Nutrition Research Reviews, 2009. **22**(2): p. 204-219.

16. El Aziz, M., A. Ashour, and A. Melad, *A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination.* J Nanomed Res, 2019. **8**(1): p. 6-12.

17. Kitagawa, I., *Licorice root. A-natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine.* Pure and Applied Chemistry, 2002. **74**(7): p. 1189-1198.

18. Heng, L., J.P. Vincken, G. van Koningsveld, A. Legger, H. Gruppen, T. van Boekel, J. Roozen, and F. Voragen, *Bitterness of saponins and their content in dry peas.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006. **86**(8): p. 1225-1231.

19. Price, K., I. Johnson, G. Fenwick, and M. Malinow, *The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs.* Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 1987. **26**(1): p. 27-135.

20. Attele, A.S., J.A. Wu, and C.S. Yuan, *Ginseng pharmacology - Multiple constituents and multiple actions.* Biochemical Pharmacology, 1999. **58**(11): p. 1685-1693.

21. Oda, K., H. Matsuda, T. Murakami, S. Katayama, T. Ohgitani, and M. Yoshikawa, *Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants.* Biological Chemistry, 2000. **381**(1): p. 67-74.

22. Sparg, S.G., M.E. Light, and J. van Staden, *Biological activities and distribution of plant saponins.* Journal of Ethnopharmacology, 2004. **94**(2-3): p. 219-243.

23. Bang, S.C., Y. Kim, J.H. Lee, and B.Z. Ahn, *Triterpenoid saponins from the roots of Pulsatilla koreana.* J Nat Prod, 2005. **68**(2): p. 268-72.

24. Jeong, S.I., B. Zhou, J.B. Bae, N.S. Kim, S.G. Kim, J. Kwon, D.K. Kim, T.Y. Shin, H.

Jeon, J.P. Lim, H. Kim, H.K. Kim, and C.H. Oh, *Apoptosis-inducing Effect of Akebia Saponin D from the Roots of Dipsacus asper Wall in U937 Cells.* Archives of Pharmacal Research, 2008. **31**(11): p. 1399-1404.

25. Zhou, Y.Q., Z.L. Yang, L. Xu, P. Li, and Y.Z. Hu, *Akebia saponin D, a saponin component from Dipsacus asper Wall, protects PC 12 cells against amyloid-beta induced cytotoxicity.* Cell Biology International, 2009. **33**(10): p. 1102-1110.
26. Li, C.M., Y.L. Gao, J.W. Tian, Y.L. Xing, H.B. Zhu, and J.Y. Shen, *Long-term oral Asperosaponin VI attenuates cardiac dysfunction, myocardial fibrosis in a rat model of chronic myocardial infarction.* Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(5): p. 1432-1438.
27. Peng, L.H., C.H. Ko, S.W. Siu, C.M. Koon, G.L. Yue, W.H. Cheng, T.W. Lau, Q.B. Han, K.M. Ng, K.P. Fung, C.B.S. Lau, and P.C. Leung, *In vitro & in vivo assessment of a herbal formula used topically for bone fracture treatment.* Journal of Ethnopharmacology, 2010. **131**(2): p. 282-289.
28. Gong, L.L., G.R. Li, W. Zhang, H. Liu, Y.L. Lv, F.F. Han, Z.R. Wan, M.B. Shi, and L.H. Liu, *Akebia Saponin D Decreases Hepatic Steatosis through Autophagy Modulation.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2016. **359**(3): p. 392-400.
29. Shen, J.Y., Y. Jin, H.L. Tian, Y. Wang, X.L. Yang, Z.L. Yang, C.R. Guo, and F. Li, *Enhancement of oral bioavailability of akebia saponin D by destroying self-micelles and inhibiting multidrug resistance-associated protein mediated efflux.* Rsc Advances, 2016. **6**(76): p. 72439-72446.
30. Bang, S.C., J.H. Lee, G.Y. Song, D.H. Kim, M.Y. Yoon, and B.Z. Ahn, *Antitumor activity of Pulsatilla koreana saponins and their structure-activity relationship.* Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2005. **53**(11): p. 1451-1454.
31. Hong, S.W., K.H. Jung, H.S. Lee, M.J. Choi, M.K. Son, H.M. Zheng, and S.S. Hong, *SB365 inhibits angiogenesis and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma through modulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.* Cancer Science, 2012. **103**(11): p. 1929-1937.
32. Hong, S.W., K.H. Jung, H.S. Lee, M.K. Son, H.H. Yan, N.S. Kang, J. Lee, and S.S.

Hong, *SB365, Pulsatilla saponin D, targets c-Met and exerts antiangiogenic and antitumor activities.* Carcinogenesis, 2013. **34**(9): p. 2156-2169.

33. Son, M.K., K.H. Jung, S.W. Hong, H.S. Lee, H.M. Zheng, M.J. Choi, J.H. Seo, J.K. Suh, and S.S. Hong, *SB365, Pulsatilla saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the AKT/mTOR signalling pathway.* Food Chemistry, 2013. **136**(1): p. 26-33.

34. Son, M.K., K.H. Jung, H.S. Lee, H. Lee, S.J. Kim, H.H. Yan, Y.L. Ryu, and S.S. Hong, *SB365, Pulsatilla saponin D suppresses proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells.* Oncology Reports, 2013. **30**(2): p. 801-808.

35. Moon KS, J.J., Cho YJ, Lee JH, Choi MS, Kim EE. , *Therapeutic effects of SB natural anticancer drug in 50 patients with stage IV pancreatic cancer.* J Cancer Treat Res, 2015. **3**(3): p. 42-46.

36. Jang, W.J., B. Park, G.S. Jeong, S.S. Hong, and C.H. Jeong, *SB365, Pulsatilla saponin D, suppresses the growth of gefitinib-resistant NSCLC cells with Met amplification.* Oncology Reports, 2014. **32**(6): p. 2612-2618.

37. Zhang, Y.L., J.L. Bao, K. Wang, X.J. Jia, C. Zhang, B.R. Huang, M.W. Chen, J.B. Wan, H.X. Su, Y.T. Wang, and C.W. He, *Pulsatilla Saponin D Inhibits Autophagic Flux and Synergistically Enhances the Anticancer Activity of Chemotherapeutic Agents Against HeLa Cells.* American Journal of Chinese Medicine, 2015. **43**(8): p. 1657-1670.

38. Zhang, Q.W., W.C. Ye, C.T. Che, and S.X. Zhao, *[Triterpene saponins from Pulsatilla cernua].* Yao Xue Xue Bao, 2000. **35**(10): p. 756-9.

39. Laska, G., A. Sienkiewicz, M. Stocki, J.K. Zjawiony, V. Sharma, A. Bajguz, A. Piotrowska-Niczyporuk, M. Jacob, and S. Khan, *Phytochemical screening of Pulsatilla species and investigation of their biological activities.* Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 2019. **88**(1).

40. Mimaki, Y., M. Kuroda, T. Asano, and Y. Sashida, *Triterpene saponins and lignans from the roots of Pulsatilla chinensis and their cytotoxic activity against HL-60 cells.* Journal of natural products, 1999. **62**(9): p. 1279-1283.

41. Higuchi, R. and T. Kawasaki, *Seed saponins of Akebia quinata Decne. II. Hederagenin 3, 28-O-bisglycosides.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1972. **20**(10): p. 2143-

2149.

42. Kim, Y., S.-C. Bang, J.-H. Lee, and B.-Z. Ahn, *Pulsatilla saponin D: The antitumor principle fromPulsatilla koreana.* Archives of pharmacal research, 2004. **27**(9): p. 915-918.

43. Kim, M., E. Lim, and M. Jung, *First total synthesis of natural pulsatilla saponin D via highly stereospecific glycosylation.* Tetrahedron, 2013. **69**(26): p. 5481-5486.

44. Yu, X., L.N. Wang, L. Ma, R. You, R. Cui, D. Ji, Y. Wu, C.F. Zhang, Z.L. Yang, and H. Ji, *Akebia saponin D attenuates ibotenic acid-induced cognitive deficits and pro-apoptotic response in rats: involvement of MAPK signal pathway.* Pharmacol Biochem Behav, 2012. **101**(3): p. 479-86.

45. Morgan, E.R., A. Norman, K. Laing, and M.D. Seal, *Treatment and outcomes for glioblastoma in elderly compared with non-elderly patients: a population-based study.* Curr Oncol, 2017. **24**(2): p. e92-e98.

46. Paolillo, M., C. Boselli, and S. Schinelli, *Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies.* Brain Sci, 2018. **8**(1): p. https://doi.org/10.3390/brainsci8010015.

47. Wang, Z., G. Yang, Y.Y. Zhang, Y. Yao, and L.H. Dong, *A comparison between oral chemotherapy combined with radiotherapy and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma: A systematic review and meta-analysis.* Medicine (Baltimore), 2017. **96**(44): p. e8444.

48. Stupp, R., P.Y. Dietrich, S.O. Kraljevic, A. Pica, I. Maillard, P. Maeder, R. Meuli, R. Janzer, G. Pizzolato, R. Miralbell, F. Porchet, L. Regli, N. de Tribolet, R.O. Mirimanoff, and S. Leyvraz, *Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide.* Journal of Clinical Oncology, 2002. **20**(5): p. 1375-1382.

49. D'Atri, S., L. Tentori, P.M. Lacal, G. Graziani, E. Pagani, E. Benincasa, G. Zambruno, E. Bonmassar, and J. Jiricny, *Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis.* Molecular Pharmacology, 1998. **54**(2): p. 334-341.

50. Ostermann, S., C. Csajka, T. Buclin, S. Leyvraz, F. Lejeune, L.A. Decosterd, and R. Stupp, *Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide*

in malignant glioma patients. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(11): p. 3728-3736.

51. Bocangel, D.B., S. Finkelstein, S.C. Schold, K.K. Bhakat, S. Mitra, and D.M. Kokkinakis, *Multifaceted resistance of gliomas to temozolomide.* Clinical Cancer Research, 2002. **8**(8): p. 2725-2734.

52. Gilbert, M.R., M. Wang, K.D. Aldape, R. Stupp, M.E. Hegi, K.A. Jaeckle, T.S. Armstrong, J.S. Wefel, M. Won, D.T. Blumenthal, A. Mahajan, C.J. Schultz, S. Erridge, B. Baumert, K.I. Hopkins, T. Tzuk-Shina, P.D. Brown, A. Chakravarti, W.J. Curran, Jr., and M.P. Mehta, *Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial.* J Clin Oncol, 2013. **31**(32): p. 4085-91.

53. Bozic, I., J.G. Reiter, B. Allen, T. Antal, K. Chatterjee, P. Shah, Y.S. Moon, A. Yaqubie, N. Kelly, D.T. Le, E.J. Lipson, P.B. Chapman, L.A. Diaz, Jr., B. Vogelstein, and M.A. Nowak, *Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy.* Elife, 2013. **2**: p. e00747.

54. Rosenfeld, M.R., X.B. Ye, J.G. Supko, S. Desideri, S.A. Grossman, S. Brem, T. Mikkelson, D. Wang, Y.Y.C. Chang, J. Hu, Q. McAfee, J. Fisher, A. Troxel, S.F. Piao, D.F. Heitjan, K.S. Tan, L. Pontiggia, P.J. O'Dwyer, L.E. Davis, and R.K. Amaravadi, *A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme.* Autophagy, 2014. **10**(8): p. 1359-1368.

55. Gupta, A. and T. Dwivedi, *A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016.* J Neurosci Rural Pract, 2017. **8**(4): p. 629-641.

56. Xie, Y., T. Bergstrom, Y.W. Jiang, P. Johansson, V.D. Marinescu, N. Lindberg, A. Segerman, G. Wicher, M. Niklasson, S. Baskaran, S. Sreedharan, I. Everlien, M. Kastemar, A. Hermansson, L. Elfineh, S. Libard, E.C. Holland, G. Hesselager, I. Alafuzoff, B. Westermark, S. Nelander, K. Forsberg-Nilsson, and L. Uhrbom, *The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes.* Ebiomedicine, 2015. **2**(10): p. 1351-1363.

57. Kokkinakis, D.M., D.B. Bocangel, S.C. Schold, R.C. Moschel, and A.E. Pegg, *Thresholds of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase which confer significant*

resistance of human glial tumor xenografts to treatment with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea or temozolomide. Clinical Cancer Research, 2001. **7**(2): p. 421-428.

58. Hegi, M.E., A. Diserens, T. Gorlia, M. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E.C. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, and R. Stupp, *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.* New England Journal of Medicine, 2005. **352**(10): p. 997-1003.

59. Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino, *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.* Cell Death and Differentiation, 2009. **16**(1): p. 3-11.

60. Tait, S.W.G. and D.R. Green, *Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut.* Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6452-6461.

61. Reginato, M.J., K.R. Mills, J.K. Paulus, D.K. Lynch, D.C. Sgroi, J. Debnath, S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge, *Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis.* Nature Cell Biology, 2003. **5**(8): p. 733-740.

62. Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino, *The cornified envelope: A model of cell death in the skin.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005. **6**(4): p. 328-340.

63. Overholtzer, M., A.A. Mailleux, G. Mouneimne, G. Normand, S.J. Schnitt, R.W. King, E.S. Cibas, and J.S. Brugge, *A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion.* Cell, 2007. **131**(5): p. 966-979.

64. Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera, *Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. **4**(7): p. 552-565.

65. Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, and B. Zhivotovsky, *Death through a tragedy: mitotic catastrophe.* Cell Death and Differentiation, 2008. **15**(7): p. 1153-1162.

66. Steinberg, B.E. and S. Grinstein, *Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death.* Sci STKE, 2007. **2007**(379): p. pe11.

67. Sperandio, S., I. de Belle, and D.E. Bredesen, *An alternative, nonapoptotic form of*

programmed cell death. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14376-81.

68. David, K.K., S.A. Andrabi, T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Parthanatos, a messenger of death.* Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 1116-28.

69. Willingham, S.B., D.T. Bergstralh, W. O'Connor, A.C. Morrison, D.J. Taxman, J.A. Duncan, S. Barnoy, M.M. Venkatesan, R.A. Flavell, M. Deshmukh, H.M. Hoffman, and J.P. Ting, *Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC.* Cell Host Microbe, 2007. **2**(3): p. 147-59.

70. Brennan, M.A. and B.T. Cookson, *Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis.* Mol Microbiol, 2000. **38**(1): p. 31-40.

71. Thompson, C.B., *Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease.* Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-1462.

72. Golstein, P., *Cell death in us and others.* Science, 1998. **281**(5381): p. 1283-1283.

73. Wei, M.C., W.-X. Zong, E.H.-Y. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer, *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.* Science, 2001. **292**(5517): p. 727-730.

74. Carloni, S., G. Buonocore, and W. Balduini, *Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury.* Neurobiology of Disease, 2008. **32**(3): p. 329-339.

75. Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation.* Annual Review of Cell and Developmental Biology, Vol 27, 2011. **27**: p. 107-132.

76. Wang, C.R., X.J. Wang, Z.J. Su, H.J. Fei, X.Y. Liu, and Q.X. Pan, *The novel mTOR inhibitor Torin-2 induces autophagy and downregulates the expression of UHRF1 to suppress hepatocarcinoma cell growth.* Oncology Reports, 2015. **34**(4): p. 1708-1716.

77. Xie, Z.P. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: Core machinery and adaptations.* Nature Cell Biology, 2007. **9**(10): p. 1102-1109.

78. Klionsky, D.J., F.C. Abdalla, H. Abeliovich, R.T. et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.* Autophagy, 2012. **8**(4): p. 445-544.

79. Gu, J., W. Hu, Z.P. Song, Y.G. Chen, D.D. Zhang, and C.Q. Wang, *Rapamycin Inhibits Cardiac Hypertrophy by Promoting Autophagy via the MEK/ERK/Beclin-1 Pathway.* Front Physiol, 2016. **7**: p. 104.

80. Wu, Y.T., H.L. Tan, G. Shui, C. Bauvy, Q. Huang, M.R. Wenk, C.N. Ong, P. Codogno, and H.M. Shen, *Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase.* J Biol Chem, 2010. **285**(14): p. 10850-61.

81. Mauvezin, C. and T.P. Neufeld, *Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion.* Autophagy, 2015. **11**(8): p. 1437-1438.

82. Levine, B. and J.Y. Yuan, *Autophagy in cell death: an innocent convict?* Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(10): p. 2679-2688.

83. Klose, J., M. Stankov, M. Kleine, W. Ramackers, M. Jager, J. Klempnauer, M. Winkler, H. Bektas, G. Behrens, and F. Vondran, *Inhibition of Autophagic Flux by Salinomycin Results in Anti-Cancer Effect in Hepatocellular Carcinoma Cells.* Journal of Hepatology, 2014. **60**(1): p. S82-S82.

84. Hotchkiss, R.S., A. Strasser, J.E. McDunn, and P.E. Swanson, *Cell death.* New England Journal of Medicine, 2009. **361**(16): p. 1570-1583.

85. Degterev, A., Z.H. Huang, M. Boyce, Y.Q. Li, P. Jagtap, N. Mizushima, G.D. Cuny, T.J. Mitchison, M.A. Moskowitz, and J.Y. Yuan, *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury.* Nature Chemical Biology, 2005. **1**(2): p. 112-119.

86. Cho, Y., S. Challa, D. Moquin, R. Genga, T.D. Ray, M. Guildford, and F.K.M. Chan, *Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation.* Cell, 2009. **137**(6): p. 1112-1123.

87. Yu, S.W., H.M. Wang, M.F. Poitras, C. Coombs, W.J. Bowers, H.J. Federoff, G.G. Poirier, T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor.* Science, 2002. **297**(5579): p. 259-263.

88. Li, L.Y., L. Luo, and X.D. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria.* Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-99.

89. Vande Walle, L., M. Lamkanfi, and P. Vandenabeele, *The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview.* Cell Death and Differentiation, 2008. **15**(3): p. 453-460.

90. Blink, E., N.A. Maianski, E.S. Alnemri, A.S. Zervos, D. Roos, and T.W. Kuijpers, *Intramitochondrial serine protease activity of Omi/HtrA2 is required for caspase-independent cell death of human neutrophils.* Cell Death and Differentiation, 2004. **11**(8): p. 937-939.

91. Turk, V., V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk, and D. Turk, *Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers.* Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2012. **1824**(1): p. 68-88.

92. Zhang, Y., N.D. Yang, F. Zhou, T. Shen, T. Duan, J. Zhou, Y. Shi, X.Q. Zhu, and H.M. Shen, *(-)-Epigallocatechin-3-Gallate Induces Non-Apoptotic Cell Death in Human Cancer Cells via ROS-Mediated Lysosomal Membrane Permeabilization.* Plos One, 2012. **7**(10): p. e46749.

93. Zorov, D.B., M. Juhaszova, and S.J. Sollott, *Mitochondrial Reactive Oxygen Species (Ros) and Ros-Induced Ros Release.* Physiological Reviews, 2014. **94**(3): p. 909-950.

94. Wang, L.H., L.P. Liu, Y. Shi, H.W. Cao, R. Chaturvedi, M.W. Calcutt, T.H. Hu, X.B. Ren, K.T. Wilson, D.B. Polk, and F. Yan, *Berberine Induces Caspase-Independent Cell Death in Colon Tumor Cells through Activation of Apoptosis-Inducing Factor.* Plos One, 2012. **7**(5).

95. Khinkis, L.A., L. Levasseur, H. Faessel, and W.R. Greco, *Optimal design for estimating parameters of the 4-parameter hill model.* Nonlinearity Biol Toxicol Med, 2003. **1**(3): p. 363-77.

96. Pierzynska-Mach, A., P.A. Janowski, and J.W. Dobrucki, *Evaluation of Acridine Orange, LysoTracker Red, and Quinacrine as Fluorescent Probes for Long-Term Tracking of Acidic Vesicles.* Cytometry Part A, 2014. **85a**(8): p. 729-737.

97. Salvioli, S., A. Ardizzoni, C. Franceschi, and A. Cossarizza, *JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess ΔΨ changes in intact cells:*

implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. FEBS Letters, 1997. **411**(1): p. 77-82.

98. Chou, T.C., *Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method.* Cancer Research, 2010. **70**(2): p. 440-446.

99. Vermes, I., C. Haanen, and C. Reutelingsperger, *Flow cytometry of apoptotic cell death.* Journal of Immunological Methods, 2000. **243**(1-2): p. 167-190.

100. Khan, K.H., M. Blanco-Codesido, and L.R. Molife, *Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway.* Critical Reviews in Oncology Hematology, 2014. **90**(3): p. 200-219.

101. Kang, K.A., M.J. Piao, Y.J. Hyun, A.X. Zhen, S.J. Cho, M.J. Ahn, J.M. Yi, and J.W. Hyun, *Luteolin promotes apoptotic cell death via upregulation of Nrf2 expression by DNA demethylase and the interaction of Nrf2 with p53 in human colon cancer cells.* Exp Mol Med, 2019. **51**(4): p. 40.

102. Lu, Z.G., C.M. Zhang, and Z.H. Zhai, *Nucleoplasmin regulates chromatin condensation during apoptosis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(8): p. 2778-2783.

103. Yan, Y.M., K. Jiang, P. Liu, X.B. Zhang, X. Dong, J.C. Gao, Q.T. Liu, M.P. Barr, Q. Zhang, X.K. Hou, S.S. Meng, and P. Gong, *Bafilomycin A1 induces caspase-independent cell death in hepatocellular carcinoma cells via targeting of autophagy and MAPK pathways.* Scientific Reports, 2016. **6**.

104. Carloni, S., G. Buonocore, and W. Balduini, *Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury.* Neurobiol Dis, 2008. **32**(3): p. 329-39.

105. Jiang, P. and N. Mizushima, *LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells.* Methods, 2015. **75**: p. 13-8.

106. Jung, C.H., C.B. Jun, S.-H. Ro, Y.-M. Kim, N.M. Otto, J. Cao, M. Kundu, and D.-H. Kim, *ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery.* Molecular biology of the cell, 2009. **20**(7): p. 1992-2003.

107. Morgan, M.J., G. Gamez, C. Menke, A. Hernandez, J. Thorburn, F. Gidan, L. Staskiewicz, S. Morgan, C. Cummings, and P. Maycotte, *Regulation of autophagy and chloroquine sensitivity by oncogenic RAS in vitro is context-dependent.* Autophagy,

2014. **10**(10): p. 1814-1826.

108. Fu, J., C.-J. Shao, F.-R. Chen, H.-K. Ng, and Z.-P. Chen, *Autophagy induced by valproic acid is associated with oxidative stress in glioma cell lines.* Neuro-oncology, 2009. **12**(4): p. 328-340.

109. Vallecillo-Hernández, J., M.D. Barrachina, D. Ortiz-Masiá, S. Coll, J.V. Esplugues, S. Calatayud, and C. Hernández, *Indomethacin Disrupts Autophagic Flux by Inducing Lysosomal Dysfunction in Gastric Cancer Cells and Increases Their Sensitivity to Cytotoxic Drugs.* Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 3593.

110. Racoma, I.O., W.H. Meisen, Q.E. Wang, B. Kaur, and A.A. Wani, *Thymoquinone Inhibits Autophagy and Induces Cathepsin-Mediated, Caspase-Independent Cell Death in Glioblastoma Cells.* Plos One, 2013. **8**(9): p. e72882.

111. Noguchi, S., S. Shibutani, K. Fukushima, T. Mori, M. Igase, and T. Mizuno, *Bosutinib, an SRC inhibitor, induces caspase-independent cell death associated with permeabilization of lysosomal membranes in melanoma cells.* Veterinary and Comparative Oncology, 2018. **16**(1): p. 69-76.

112. Geng, Y., L. Kohli, B.J. Klocke, and K.A. Roth, *Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent.* Neuro-Oncology, 2010. **12**(5): p. 473-481.

113. Bray, K., R. Mathew, A. Lau, J.J. Kamphorst, J. Fan, J. Chen, H.Y. Chen, A. Ghavami, M. Stein, R.S. DiPaola, D.N. Zhang, J.D. Rabinowitz, and E. White, *Autophagy Suppresses RIP Kinase-Dependent Necrosis Enabling Survival to mTOR Inhibition.* Plos One, 2012. **7**(7): p. e41831.

114. Klose, J., M.V. Stankov, M. Kleine, W. Ramackers, D. Panayotova-Dimitrova, M.D. Jager, J. Klempnauer, M. Winkler, H. Bektas, G.M.N. Behrens, and F.W.R. Vondran, *Inhibition of Autophagic Flux by Salinomycin Results in Anti-Cancer Effect in Hepatocellular Carcinoma Cells.* Plos One, 2014. **9**(5): p. e95970.

115. Li, N.Y., E. Oquendo, R.A. Capaldi, J.P. Robinson, Y.D.D. He, H.K. Hamadeh, C.A. Afshari, R. Lightfoot-Dunn, and P.K. Narayanan, *A Systematic Assessment of Mitochondrial Function Identified Novel Signatures for Drug-Induced Mitochondrial Disruption in Cells.* Toxicological Sciences, 2014. **142**(1): p. 261-273.

116. Siddiqui, M.R., S.M. Wabaidur, M.S. Ola, Z.A. AlOthman, M.Z. Rafiquee, and M.A. Khan, *High-Throughput UPLC-MS Method for the Determination of N-Acetyl-l-Cysteine: Application in Tissue Distribution Study in Wistar Rats.* J Chromatogr Sci, 2016. **54**(7): p. 1244-52.

117. Song, J.H., D.K. Song, B. Pyrzynska, K.C. Petruk, E.G. Van Meir, and C.H. Hao, *TRAIL triggers apoptosis in human malignant glioma cells through extrinsic and intrinsic pathways.* Brain Pathology, 2003. **13**(4): p. 539-553.

118. Mohammad, R.M., I. Muqbil, L. Lowe, C. Yedjou, H.Y. Hsu, L.T. Lin, M.D. Siegelin, C. Fimognari, N.B. Kumar, Q.P. Dou, H. Yang, A.K. Samadi, G.L. Russo, C. Spagnuolo, S.K. Ray, M. Chakrabarti, J.D. Morre, H.M. Coley, K. Honoki, H. Fujii, A.G. Georgakilas, A. Amedei, E. Niccolai, A. Amin, S.S. Ashraf, W.G. Helferich, X. Yang, C.S. Boosani, G. Guha, D. Bhakta, M.R. Ciriolo, K. Aquilano, S. Chen, S.I. Mohammed, W.N. Keith, A. Bilsland, D. Halicka, S. Nowsheen, and A.S. Azmi, *Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer.* Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S78-S103.

119. Tait, S.W. and D.R. Green, *Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut.* Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6452.

120. Yamaguchi, H., J.L. Hsu, C.T. Chen, Y.N. Wang, M.C. Hsu, S.S. Chang, Y. Du, H.W. Ko, R. Herbst, and M.C. Hung, *Caspase-Independent Cell Death Is Involved in the Negative Effect of EGF Receptor Inhibitors on Cisplatin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells.* Clinical Cancer Research, 2013. **19**(4): p. 845-854.

121. Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 361-70.

122. Zhang, Y., M. Xia, K. Jin, S. Wang, H. Wei, C. Fan, Y. Wu, X. Li, X. Li, G. Li, Z. Zeng, and W. Xiong, *Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities.* Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 45.

123. Nakashima, S., Y. Hiraku, S. Tada-Oikawa, T. Hishita, E.C. Gabazza, S. Tamaki, I. Imoto, Y. Adachi, and S. Kawanishi, *Vacuolar H+-ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1.* Journal of Biochemistry, 2003. **134**(3): p. 359-364.

124. Poole, B. and S. Ohkuma, *Effect of Weak Bases on the Intralysosomal Ph in Mouse Peritoneal-Macrophages.* Journal of Cell Biology, 1981. **90**(3): p. 665-669.

125. Cai, X.Y., Y.L. Liu, Y.Q. Hu, X.Z. Liu, H.Y. Jiang, S.H. Yang, Z.W. Shao, Y. Xia, and L.M. Xiong, *ROS-mediated lysosomal membrane permeabilization is involved in bupivacaine-induced death of rabbit intervertebral disc cells.* Redox Biology, 2018. **18**: p. 65-76.

126. Yi, Y.P., X. Wang, G. Zhang, T.S. Fu, and G.J. Zhang, *Phosphatidic acid osmotically destabilizes lysosomes through increased permeability to K+ and H+.* General Physiology and Biophysics, 2006. **25**(2): p. 149-160.

127. Gauthier, C., J. Legault, K. Girard-Lalancette, V. Mshvildadze, and A. Pichette, *Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. **17**(5): p. 2002-2008.

128. Gilabert-Oriol, R., K. Mergel, M. Thakur, B. von Mallinckrodt, M.F. Melzig, H. Fuchs, and A. Weng, *Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins.* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013. **21**(8): p. 2387-2395.

129. Broker, L.E., C. Huisman, S.W. Span, J.A. Rodriguez, F.A.E. Kruyt, and G. Giaccone, *Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells.* Cancer Research, 2004. **64**(1): p. 27-30.

130. Michallet, M.C., F. Saltel, M. Flacher, J.P. Revillard, and L. Genestier, *Cathepsin-dependent apoptosis triggered by supraoptimal activation of T lymphocytes: A possible mechanism of high dose tolerance.* Journal of Immunology, 2004. **172**(9): p. 5405-5414.

131. Boya, P. and G. Kroemer, *Lysosomal membrane permeabilization in cell death.* Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6434-6451.

132. Boya, P., K. Andreau, D. Poncet, N. Zamzami, J.L. Perfettini, D. Metivier, D.M. Ojcius, M. Jaattela, and G. Kroemer, *Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion.* J Exp Med, 2003. **197**(10): p. 1323-34.

133. Bewley, M.A., H.M. Marriott, C. Tulone, S.E. Francis, T.J. Mitchell, R.C. Read, B.

Chain, G. Kroemer, M.K. Whyte, and D.H. Dockrell, *A cardinal role for cathepsin d in co-ordinating the host-mediated apoptosis of macrophages and killing of pneumococci.* PLoS Pathog, 2011. **7**(1): p. e1001262.

134. Tait, S.W.G., G. Ichim, and D.R. Green, *Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death.* Journal of Cell Science, 2014. **127**(10): p. 2135-2144.

135. Zhao, M., F. Antunes, J.W. Eaton, and U.T. Brunk, *Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis.* European Journal of Biochemistry, 2003. **270**(18): p. 3778-3786.

136. Diebold, L. and N.S. Chandel, *Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells.* Free Radic Biol Med, 2016. **100**: p. 86-93.

137. Kanzawa, T., I.M. Germano, T. Komata, H. Ito, Y. Kondo, and S. Kondo, *Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells.* Cell Death and Differentiation, 2004. **11**(4): p. 448-457.

138. Chen, Z., H. Duan, X. Tong, P. Hsu, L. Han, S.L. Morris-Natschke, S. Yang, W. Liu, and K.H. Lee, *Cytotoxicity, Hemolytic Toxicity, and Mechanism of Action of Pulsatilla Saponin D and Its Synthetic Derivatives.* J Nat Prod, 2018. **81**(3): p. 465-474.

Abstract

Molecular Mechanism involved in Anticancer Effect of Saponin D isolated from *Pulsatilla koreana* and Its Combination Effect with Temozolomide in Glioblatoma Multiforme cancer cell lines

Jun-Man Hong
Anatomy
The Graduate School
Seoul National University

Saponin D from the roots of *Pulsatilla* has been reported to induce apoptosis and inhibit autophagic flux in several cancer cell lines. Besides, clinical trials in patients with stage IV pancreatic cancer showed increased survival without side effects.

Glioblastoma multiforme (GBM) is a brain tumor that is hard to treat so that most patients die within 1 to 2 years after diagnosis. The standard treatment for GBM is a surgical removal combined with radiation and chemotherapy. Temozolomide (TMZ), an oral alkylating agent, is widely used for chemotherapy of GBM. However, drug resistance and side effects have become a problem. As a strategy for reducing side effects and overcoming resistance, combinations with other drugs are in trial. Autophagic flux inhibitors have shown an effect when used in combination with TMZ, but with some side effects.

Pulsatilla koreana saponin D (SB365) has been studied for its anticancer effects in various

cancer cells but not in GBM cells. If SB365 inhibits autophagic flux in GBM cells, it would be a valid candidate for combination therapy with TMZ. This study aimed to investigate the anticancer effect of SB365 in GBM cells, not only singly but also in combination with TMZ as a putative autophagic flux inhibitor.

Two GBM cell lines were used for the study; U87-MG (TMZ-sensitive) and T98G (TMZ-resistant). Results showed that 1-20 μM SB365 inhibited cell proliferation 72 hours after treatment. However, when stained with 7-AAD and Annexin V and analyzed by flow cytometry, the cells did not show typical apoptotic features with far less frequent early apoptotic Annexin V^+ and 7-AAD^- cells. Furthermore, GBM cells treated with 10 μM SB365 did not show any typical features of apoptosis such as caspase-3 activation, an increase of Bax and a decrease of Bcl-2 expression, and nuclear fragmentation and condensation. Thus, SB365 was supposed to induce caspase-independent cell death in GBM cells, unlike in other cancer cells where it induces apoptosis.

Autophagic flux inhibition is one of the usual mechanisms that induce caspase-independent cell death. Previously, *Pulsatilla chinensis* saponin D has been reported to inhibit autophagic flux in HeLa cells. Because the molecular structure of SB365 is the same as that of *Pulsatilla chinensis* saponin D, the same effect of SB365 was expected. When GBM cells were treated with SB365, cells showed autophagic flux inhibition after 6 hours, as revealed by increased expression of the autophagy-related proteins LC3, Beclin-1, and p62, as well as an increase of LC3-II/LC3-I ratio. However, the phosphorylation of autophagy signals such as AKT and mTOR did now show any changes. These results indicated that SB365 did not induce autophagic flux in GBM cells, but inhibited flux inhibition.

Autophagic flux inhibition is closely related to lysosomal dysfunction. It is known that lysosomal neutralization induces inactivation of lysosomal enzymes, resulting in the failure of

autophagosome degradation, and thus autophagic flux inhibition. To investigate whether SB365 induced LMP in GBM cells, the cells treated with SB365 were stained with acridine orange. As a result, intracellular pH gradually decreased from 6 to 48 hours of treatment, indicating that lysosomal neutralization occurred in GBM cells by SB365.

Frequently, lysosomal neutralization occurs due to lysosomal membrane permeabilization (LMP). When it occurs, cathepsins B and D leak from the lysosome and damage the mitochondria. To evaluate whether SB365 induced LMP in GBM cells, two experiments were performed. First, cells were treated with SB365 in the presence of an inhibitor against cathepsin B or cathepsin D, and the effect on cell growth was evaluated by CCK-8 assay. Results showed that cathepsin B inhibitor, but not the cathepsin D inhibitor, recovered the suppressed cell growth by SB365 for about 40%. That indicated that cathepsin B leaked out of the lysosome and contributed to the cell death caused by SB365 in some way. Secondly, cells were stained with JC-1, and mitochondrial membrane potential (MMP) was analyzed, which showed a decreased value. Besides, the cathepsin B inhibitor reduced the frequency of cells with deteriorated MMP. Results from these experiments in combination indicated breakage of the lysosomal membrane in GBM cells by SB365 and following leakage of cathepsin B, which partially contributed to the cell death by way of mitochondrial damage at least in part.

When autophagic flux inhibition and mitochondrial damage occur, reactive oxygen species (ROS) accumulates, which exerts a harmful effect on cells. To evaluate whether this was the case in GBM cells treated with SB365, cells were treated with SB365 in the absence and presence of an antioxidant N-acetyl-cysteine (NAC). When the cell proliferation was analyzed CCK-8 assay, NAC recovered about 70% of the cell proliferation inhibited by SB365.

Meanwhile, *in vitro* and *in vivo* studies were performed to investigate whether SB365 could effectively increase the toxicity of TMZ in GBM cells. As a result, SB365 additively increased

the cytotoxicity of TMZ.

In conclusion, SB365 induced LMP in GBM cells, which resulted in the inhibition of autophagic flux and the accumulation of autophagosomes, and the accumulation of ROS through the damage of mitochondria, all of which ultimately led to CICD. These results suggest that SB365 could be a candidate for a new treatment for GBM or adjuvant for TMZ treatment.

Key words: *Pulsatilla* saponin D, SB365, glioblastoma multiforme, temozolomide, autophagic flux inhibition, lysosomal membrane permeabilization, mitochondrial membrane potential

Student Number : 2014-30591