



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](#)



석사학위논문

교모세포종 세포주에서 Clotrimazole의 TRAIL 매개 세포자멸사 증가 효과

계명대학교 대학원
의학과

김수경

김수경

지도교수 백원기

2020년

2020년 2월

2월



교모세포종 세포주에서 Clotrimazole의 TRAIL 매개 세포자멸사 증가 효과

지도교수 백 원 기

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2020년 2월

계명대학교 대학원
의 학 과

김 수 경

김수경의 석사학위 논문을 인준함

주 심 서 민 호

부 심 백 원 기

부 심 서 성 일

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 2 0 년 2 월

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	3
3. 성 적	7
4. 고 찰	16
5. 요 약	18
참고문헌	19
Abstract	25
국문초록	27

List of Figures

Figure 1. Clotrimazole reduces cell viability in glioblastoma cell lines	11
Figure 2. Clotrimazole sensitizes glioblastoma cells to TRAIL-mediated cell death	12
Figure 3. Clotrimazole enhances TRAIL-induced apoptosis in U251MG cells	13
Figure 4. Clotrimazole upregulates the expression of DR5	14
Figure 5. Clotrimazole sensitizes TRAIL-induced apoptosis through upregulation of DR5	15

1. 서 론

교모세포종(Glioblastoma)은 모든 뇌종양의 약 60%를 차지하는 악성 뇌종양으로(1), 강한 침습력과 광범위한 혈관신생이 특징이며 치료 후 생존율이 약 12-15개월로 예후가 좋지 않다(2). 현재 기본적인 치료방법으로 절제술, 방사선치료, 알킬화제 temozolomide 약물 요법이 있다(3). 교모세포종의 치료요법들은 계속해서 개선되고 있지만 교모세포종 환자의 생존율을 높이기 위해서 새로운 치료제의 연구가 필요하다(4,5).

Tumor necrosis factor(TNF)-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL, Apo-2L)는 종양괴사인자(TNF)계열에 속하는 cytokine이다. TRAIL은 281개의 아미노산으로 구성되어 type II 막 관통 단백질 특성을 가지며 인간의 소장, 대장, 태반과 골수 및 림프조직에 분포되어 있다(6,7). TRAIL은 암세포에 선택적으로 세포자멸사(apoptosis)를 유도하지만 정상세포에는 독성을 거의 나타내지 않아 항암제로 연구 되고 있다(8). TRAIL이 결합하는 수용체는 5종류로, 세포자멸사 유도 수용체인 TRAIL-R1(DR4), TRAIL-R2(DR5)와 세포를 보호하는 수용체인 decoy receptor DcR1(TRAIL-R3), DcR2(TRAIL-R4) 그리고 수용성 수용체인 osteoprotegerin(OPG, TNFRSF11B)가 존재한다(9). TRAIL의 세포자멸사 신호전달 경로로는 먼저 TRAIL이 DR4 및 DR5와 결합하여 fas-associated death domain(FADD)과 응집되고, 이어서 FADD의 death effector domain(DED)에 procaspase-8과 procaspase-10이 결합하여 death inducing signaling complex(DISC)가 형성됨이 알려졌다(6), 활성화된 caspase-8 및 caspase-10에 의해 세포자멸사가 유도된다. TRAIL 세포자멸사 유도 기전은 caspase 활성화 정도에 따라 두 가지 type으로 분류할 수 있다. Caspase-8 및 caspase-10이 높은 수준으로 활성화 되는 type I 세포는 effector caspase인 caspase-3, caspase-6 및 caspase-7 신호를 통하여 미토콘드리아에 영향을 미치지 않는 외인성 경로로 유도되는 반면 caspase-8

및 caspase-10이 낮은 수준으로 활성화 되는 type II 세포는 세포자멸사 신호 증폭을 위해 Bcl-2 계열 pro-apoptotic 단백질인 BH3 interacting-domain death agonist(Bid)가 truncated Bid(tBid)로 활성화 되어 미토콘드리아를 통한 내인성 경로로 세포자멸사가 유도된다(10,11). 교모세포종은 대부분 DR4와 DR5의 발현이 있음에도 불구하고 TRAIL 내성을 가진다고 알려져 있다(8). TRAIL 내성을 극복하기 위한 방법으로 교모세포종이 이식된 누드마우스에 TRAIL과 temozolomide를 병용 투여하여 누드마우스의 생존율을 증가시킨 연구 결과가 있으며(12), TRAIL 내성 암세포에 항암제와 TRAIL의 병용 처리로 TRAIL 감수성을 유도 하는 방법은 개발률이 높은 교모세포종 치료에 도움이 될 것으로 생각되고 있다(13).

Clotrimazole은 진균 감염 질병 치료제인 이미다졸계 항진균제이며 20년 이상 칸디다 질염, 건선, 무좀 등의 치료제로 사용되고 있다(14,15). Clotrimazole의 진균 질병 치료 기전은 진균 막 주성분인 에르고스테롤의 생합성을 차단하는 것으로, 진균의 성장을 억제한다(16). 선행 연구에 의하면 clotrimazole은 대장암, 뇌종양, 유방암, 피부암 등 다양한 암에서 성장 억제 효과를 보이는 것으로 보고된 바 있다(17-23). Clotrimazole은 교모세포종에서 해당작용 억제를 통하여 세포주기단계 sub G1기를 정지시켜 세포자멸사를 유도한다고 보고된 바 있으며(19), clotrimazole과 유사한 이미다졸계 항진균제인 miconazole은 세포자멸사 유도과 DR5가 관련이 있다는 보고가 있다(24).

이 연구는 TRAIL 내성 암세포인 교모세포종에서 clotrimazole이 TRAIL 내성 극복을 유도할 수 있는지 알아보려고 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포배양 및 시약:

U251MG 및 T98G 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지에서 5% CO₂, 37 °C 조건에서 배양하였다. Clotrimazole은 Sigma-Aldrich(St.Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me)fluoromethyl ketone(z-VAD-fmk)와 TRAIL은 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다.

일차항체 항 poly(ADP-ribose)polymerase(PARP)(1 : 2000), 항 cleaved caspase-3(1 : 2000), 항 DR5(1 : 2000)는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA), 항 β -actin은 Sigma-Aldrich(St.Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며 항 procaspase-3(1 : 2000), 항 BAX(1 : 1000), 항 Bcl-2(1 : 1000)는 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, TX, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2.2. 생존 세포 수 산정:

세포를 회수하여 trypan blue를 0.2% 첨가한 후 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 생존 세포 수를 산정하였다. 각각의 실험을 독립적으로 3회 반복 실험하여 생존 세포 수의 평균값과 표준편차를 측정하였다.

2.3. Colony formation:

U251MG 세포를 6 well plate에 4×10^4 cells/mL로 부착시킨 후 TRAIL 과 clotrimazole을 농도별로 24시간 처리한 후 2-3일 간격으로 배지를 교체 하고 5% CO₂ , 37 °C 조건에서 배양하였다. 세포를 7일간 배양한 후 배양 액을 버린 뒤 세포를 차가운 100% 메탄올로 5분간 고정시킨 후 1% crystal violet용액으로 염색한 다음 증류수로 3번 세척 후 실온에서 건조하였다.

2.4. 세포주기 및 DR5 세포표면 발현 분석:

시약 처리한 세포를 회수하여 차가운 70% 에탄올로 4 °C에서 30분간 고정하였다. 고정된 세포는 3,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 세포를 회수 하고 phosphate buffered saline(PBS)로 두 번 세척한 후 상층액을 제거하였다. Propidium iodide(PI)용액(2.5 mg/mL PI, 5 mg/mL RNase A, 0.1% NP40, 0.1% trisodium citrate)으로 세포를 부유시킨 후 빛을 차단하여 20 분간 반응시켰다. 이를 BD FACSCanto II 유세포 분석기(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 DNA 함량에 따라 세포 주기를 분석하였다. DR5의 세포표면 발현 분석을 위해 세포를 회수하여 3,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 PBS로 한 번 세척 하였다. 2% FBS가 함유된 PBS에 1 : 50으로 희석한 DR5 항체를 세척 된 세포와 1시간동안 반응시켰다. 3,000 rpm으로 5분 원심 분리 후 상층액을 제거하고 2% FBS가 첨가된 PBS로 한번 세척하였다. Fluorescein isothiocyanate(FITC) 항체를 2% FBS가 첨가된 PBS와 1 : 50으로 희석하여 30분 반응시킨 후 3,000 rpm으로 5분 원심 분리하여 상층액을 제거하여 다시 2% FBS가 첨가된 PBS로 부유시킨 후 BD FACSCanto II 유세포 분석기(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 DR5의 세포표면 발현을 분석하였다.

2.5. Western blot 분석:

배양된 세포를 PBS로 세척한 후 회수하고 세포용해완충액과 단백질 분해효소 억제제 및 인산가수분해효소 억제제 혼합액[lysis buffer(20 mM Tris-HCL, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% Glycerol, 1% Triton X-100), phosphatase inhibitor, protease inhibitor(Millipore, Burlington, MA, USA)]을 넣고 얼음 위에서 15분 반응시킨 후 원심 분리하여 단백질 상층액을 취하였다. Bicinchoninic acid(BCA)단백질 분석 키트(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 이용하여 분리한 단백질의 농도를 측정 한 후 각 50 μ g의 단백질 샘플을 만들어 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 전기영동한 후 nitrocellulose membrane(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)로 단백질을 이동시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% skim milk가 첨가된 TBS-T용액(20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)에 1시간 이상 blocking 후 Immobilon Western(Millipore, Burlington, MA, USA)용액으로 발광시켜 암실에서 X-ray 필름으로 감광시킨 후 특정 단백질의 발현을 검출하였다.

2.6. Reverse transcription polymerase chain reaction

(RT-PCR):

세포의 배지를 걷어내고 차가운 PBS로 한 번 세척 후 TRIzol reagent(Molecular Research center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. Total RNA 3 μ g을 cDNA 합성 용액(M-MLV RT 5 \times buffer, 10 mM dNTPs, 0.45 μ L/mL RNase inhibitor, 0.3 μ L/mL M-MLV reverse transcriptase)(Promega, Fitchburg, WI, USA)과 50 pmol/ μ L oligo dT(Bioneer, 대전, 한국)를 넣어 역전사(reverse transcription)하여 cDNA로 합성 후 C 1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 유전자를 증폭하였다. 증

폭된 PCR 샘플을 Ecodye Nucleic Acid Staining Solution(Biofact, 대전, 한국)을 첨가한 1.2% agarose gel에 10분간 전기영동 하여 GelDoc-It imaging system(UVP, Upland, CA, USA)을 이용하여 messenger RNA(mRNA)발현 정도를 확인하였다. 사용한 primer들의 염기서열은 다음과 같다. DR5는 forward : 5' - AAG ACC CTT GTG CTC GTT GT - 3', reverse : 5' - GAC ACA TTC GAT CTC ACT CCA - 3', glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)는 forward : 5' - CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA - 3', reverse : 5' - CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT - 3' 이다.

2.7. Small interfering RNA(siRNA) transfection:

U251MG 세포를 6 well plate에 항생제가 첨가되지 않은 배지를 사용하여 부착한 후 Lipofectamine 2000 reagent(Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 이용하여 DR5 siRNA를 50 nM의 농도로 형질 주입 하였다. 형질 주입 24시간 후 새로운 배양액과 함께 TRAIL과 clotrimazole을 함께 처리 하고 세포를 회수하여 생존 세포 수 산정과 Western blot을 시행하였다. Scrambled control siRNA는 Genolution(서울, 한국) 그리고 DR5 siRNA는 Santa cruz Biotechnology(Dallas, TX, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2.8. 자료 처리 및 통계학적 검정:

결과들의 통계 분석은 Microsoft Office Excel 2013(Microsoft, Raymond, WA, USA)을 사용하여 분석하였다. 측정된 자료는 평균과 표준편차로 표기 하였으며 유의성은 대조군에 대해 각 조건의 결과를 Student's *t*-test로 검증하였다. *p*값이 0.05 미만일 경우 유의하다고 판단하였다.

3. 성 적

3.1. Clotrimazole에 의한 TRAIL 유도 세포사멸 증가

교모세포종 세포주 U251MG 및 T98G 세포에서 clotrimazole의 세포독성 효과를 확인하기 위하여 clotrimazole을 10 - 40 μ M 농도로 24시간 처리하여 세포 생존율을 확인한 결과, U251MG 및 T98G 모두에서 감소하였다 (Figure 1). Clotrimazole에 의해 TRAIL의 감수성을 증가시킬 수 있는지 확인하고자 U251MG 및 T98G 세포에 clotrimazole 20, 40 μ M 과 TRAIL 25 ng/mL 농도로 24시간 단독 또는 병용 처리 후 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 두 세포 모두 TRAIL 단독 처리에 비하여 clotrimazole과 병용 처리 시 세포사멸이 보다 더 증가함을 확인하였다. 동일한 농도의 clotrimazole을 처리 시 T98G 세포 보다 U251MG 세포에서 더 유의한 결과가 확인되어 U251MG로 실험을 진행하였다. U251MG 세포에 TRAIL과 clotrimazole을 단독 또는 병용 처리하여 광학 현미경으로 관찰 후 생존 세포 수를 산정한 결과 TRAIL과 clotrimazole을 병용 처리한 조건에서 세포 생존율이 유의하게 감소하였다(Figure 2A&B). 이상의 결과들로 보아 TRAIL 단독 처리보다 clotrimazole 병용 처리 시 세포사멸이 증가함을 확인할 수 있었다. TRAIL과 clotrimazole의 병용 처리 시 나타나는 세포증식 억제 효과를 colony formation으로 확인하였다. U251MG 세포에 TRAIL 단독과 clotrimazole 병용 처리 24시간 후 배지를 교체하고 일주일간 5% CO₂ 및 37 °C 조건에서 배양한 결과 TRAIL 단독 처리보다 clotrimazole 병용 처리 시 세포 증식이 유의하게 억제됨을 확인할 수 있었다(Figure 2C). 이 결과들로 보아 clotrimazole은 TRAIL의 세포사멸 효과를 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

3.2. TRAIL과 clotrimazole 병용 치료에 의한 세포자멸사

앞서 교모세포종 세포주에서 TRAIL과 clotrimazole 병용 치료에 의해 나타나는 세포사멸이 세포자멸사인지를 알아보려고 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk를 이용하여 세포 생존을 변화를 확인하였다. U251MG 세포에 TRAIL 25 ng/mL과 clotrimazole 20 μ M 및 z-VAD-fmk 50 μ M을 24시간 단독 또는 병용 처리 하여 광학 현미경으로 관찰한 결과 TRAIL과 clotrimazole을 병용 처리 시 감소된 세포 생존이 z-VAD-fmk 처리 시 회복됨을 확인하였다(Figure 3A). 이어서 유세포 분석기로 세포주기를 분석한 결과, TRAIL과 clotrimazole의 병용 처리 시 34.7%로 증가한 sub G1기가 z-VAD-fmk 처리 시 6.3%로 감소하였다(Figure 3B). 동일한 조건으로 TRAIL, clotrimazole 및 z-VAD-fmk를 처리한 세포를 회수하고 trypan blue로 염색하여 세포 생존 수 변화를 조사한 결과 TRAIL과 clotrimazole의 병용 처리 시 감소했던 생존율이 z-VAD-fmk 처리 시 유의하게 회복됨을 확인하였다(Figure 3C). TRAIL, clotrimazole 및 z-VAD-fmk를 병용 처리 하여 세포자멸사의 주요 단백질인 PARP, procaspase-3, cleaved caspase-3의 발현양을 확인하기 위해 Western blot을 실시하였다. 그 결과 TRAIL과 clotrimazole 병용 처리 시 cleaved PARP와 cleaved caspase-3의 단백질 발현이 증가하였으며 이에 z-VAD-fmk 처리 시 증가되었던 cleaved PARP와 cleaved caspase-3의 단백질 발현이 감소함을 확인하였다(Figure 3D). 이 결과들을 보아 U251MG 세포에서 TRAIL과 clotrimazole 병용 처리 시 강하게 나타난 세포성장 억제 효과는 세포자멸사 유도에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

3.3. Clotrimazole의 DR5 발현 증가 효과

DR5는 TRAIL과 결합하여 세포자멸사 신호 전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 clotrimazole에 의한 TRAIL 세포사멸 효과 증가에 DR5가 관련이 있는지 조사하였다. Clotrimazole을 10 - 40 μ M 농도로 24 시간 처리하여 DR5 단백질 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 clotrimazole 농도 의존적으로 DR5의 단백질 발현이 증가하였다(Figure 4A). Clotrimazole에 의해 증가된 DR5의 단백질 발현이 전사 수준에 의한 결과인지 알아보기 위해 RT-PCR을 시행하였다. U251MG 세포에 clotrimazole을 24시간 처리하고 DR5 mRNA의 변화를 조사한 결과, DR5 mRNA 발현은 변화가 없었다(Figure 4B). 이를 보아 clotrimazole에 의한 DR5 단백질 발현 증가는 전사 후 단계를 통하여 DR5 발현에 작용함을 유추할 수 있었다. 발현이 증가된 DR5 단백질의 세포표면 발현 정도를 알아보고자 clotrimazole 40 μ M 농도로 24시간 처리하여 유세포 분석기로 분석한 결과, 대조군에 비하여 clotrimazole 처리 후 DR5의 세포 표면 발현이 증가됨을 확인하였다(Figure 4C). 이 결과들을 보아 clotrimazole이 TRAIL의 감수성을 증가시키는데 DR5의 발현증가와 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

3.4. Clotrimazole의 DR5를 통한 TRAIL 감수성 증가 효과

앞선 실험 결과들에서 clotrimazole이 TRAIL의 감수성을 증가시키는 기전에 clotrimazole 유도 DR5 발현 증가가 관련이 있는지 알아보고자 DR5 유전자 발현을 siRNA로 억제하여 그 영향을 확인해 보았다. U251MG 세포에 DR5 siRNA를 형질주입 하고 24시간 후 TRAIL과 clotrimazole을 병용 처리하였다. 먼저 광학 현미경으로 세포를 관찰한 결과 DR5의 발현이 억제된 상황에서 TRAIL과 clotrimazole을 병용 처리 시 감소하였던 세포가 회복됨을 관찰하였다(Figure 5A&B). 세포자멸사 주요 단백질인 PARP, procaspase-3, cleaved caspase-3의 발현을 알아본 결과 TRAIL과

clotrimazole 병용 처리에 의하여 증가된 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3의 단백질이 DR5 siRNA에 의해 DR5의 발현이 억제되었을 때 감소하였다(Figure 5C). 이 결과들을 보아 TRAIL과 clotrimazole 병용 처리 시 caspase 활성을 통한 세포자멸사가 유도되며 이 기전에 DR5가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

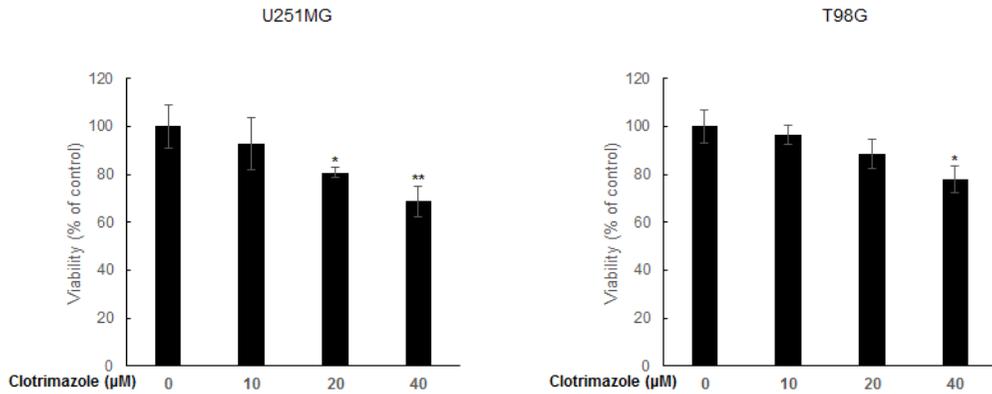


Figure 1. Clotrimazole reduces cell viability in glioblastoma cell lines. U251MG and T98G cells were treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) in control and various concentrations (0 – 40 μM) of clotrimazole for 24 hr. The viable cells were counted by hemocytometer using trypan blue staining. Error bars are shown as means ± standard deviation (SD) from three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with control cells.

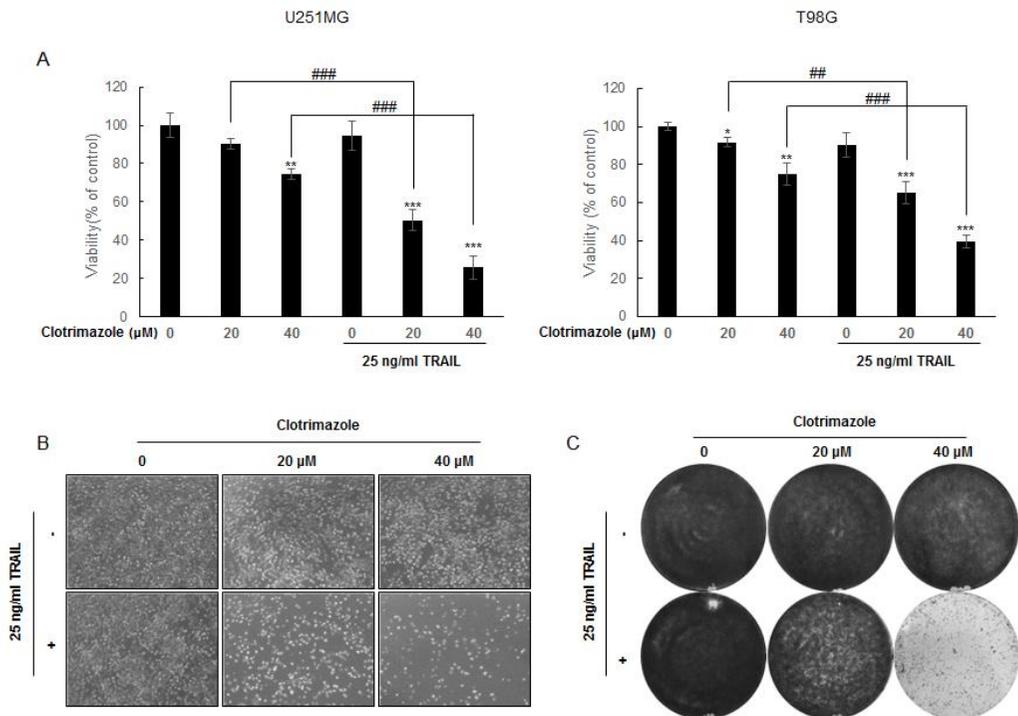


Figure 2. Clotrimazole sensitizes glioblastoma cells to TRAIL-mediated cell death. U251MG and T98G cells were treated with indicated concentrations of TRAIL and clotrimazole for 24 hr. (A) Cell viability was measured by trypan blue staining. Data are shown as means \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, compared with control cells. ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ were compared to the TRAIL plus clotrimazole treated cells. (B) U251MG cells were treated with indicated concentrations of TRAIL and clotrimazole. Cells morphology were photographed by light microscope ($\times 50$). (C) U251MG cells were seeded at low density into 6 well plates and treated with indicated concentrations of TRAIL and clotrimazole. After 7 days, the plates were stained with 1% crystal violet and photographed.

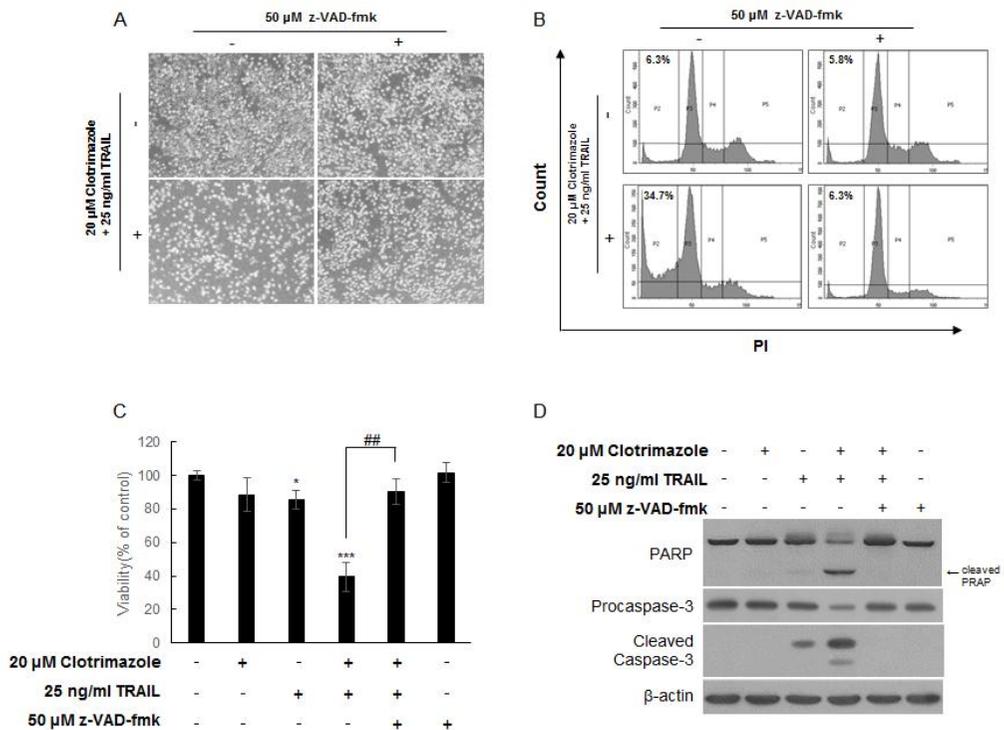


Figure 3. Clotrimazole enhances TRAIL-induced apoptosis in U251MG cells. Cells were treated with indicated concentrations of clotrimazole, TRAIL and z-VAD-fmk for 24 hr. (A) Cells morphology were photographed. (\times 50). (B) U251MG cells were stained with PI and measured cell cycle by flow cytometry. (C) Cells were stained with trypan blue and viability was measured by hemocytometer. Data are shown as means \pm standard deviation (SD) from three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with control cells. ## indicates $p < 0.01$ compared to treatment with the TRAIL and clotrimazole combination treatment versus TRAIL, clotrimazole and z-VAD-fmk treatment. (D) The protein expression level of PARP, procaspase-3, cleaved caspase-3 were measured by Western blotting. β -actin was used as a loading control.

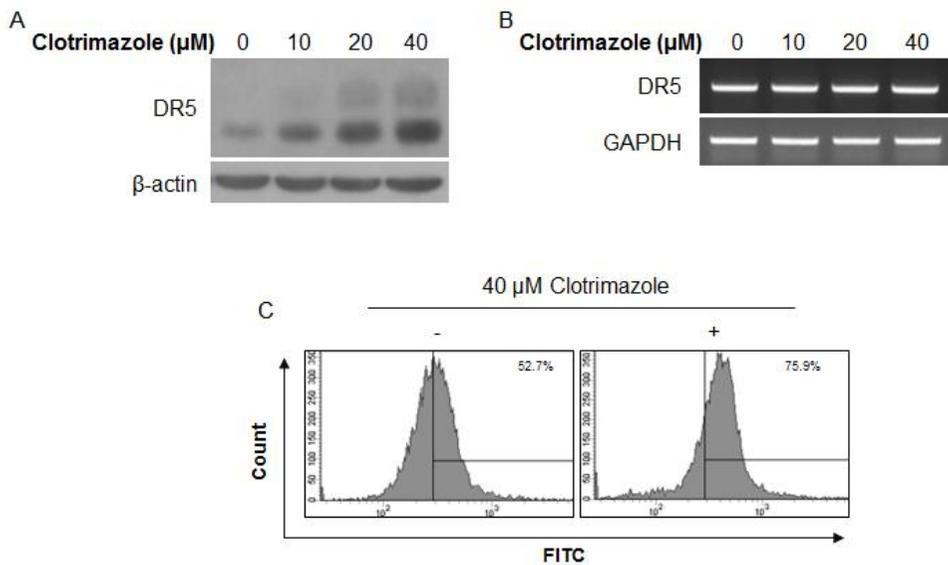


Figure 4. Clotrimazole upregulates the expression of DR5. U251MG cells were treated with clotrimazole for 24 hr. (A) Cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and probed with anti-DR5 antibody. β -actin was used as a loading control. (B) DR5 mRNA expression level was measured by RT-PCR. (C) U251MG cells were incubated with anti-DR5 antibody and stained with FITC for DR5 surface analysis by flow cytometry.

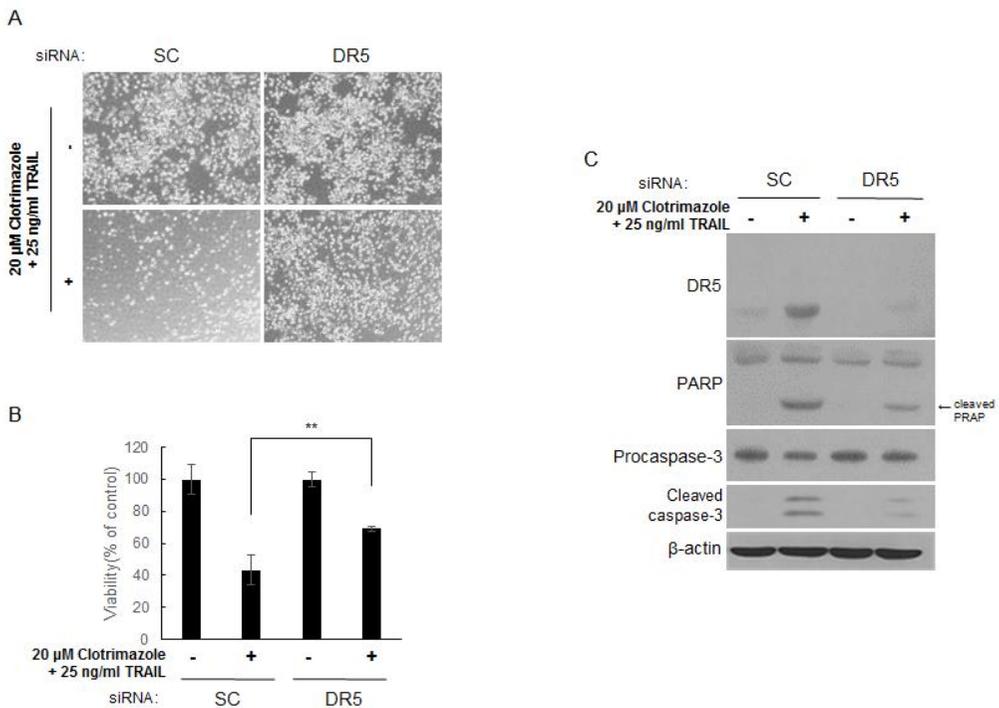


Figure 5. Clotrimazole sensitizes TRAIL-induced apoptosis through upregulation of DR5. U251MG cells were transiently transfected with DR5 siRNA or scrambled control (SC) siRNA. After 24 hr, cells were treated with indicated concentration of TRAIL and clotrimazole for 24 hr. (A) Cells morphology were photographed ($\times 50$). (B) The viable cells were counted. Data represent mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$ compared to the TRAIL plus clotrimazole treated scrambled control siRNA. (C) DR5 was silenced by DR5 siRNA in U251MG cells. After transfection for 24 hr, the cells were treated with indicated concentrations of TRAIL and clotrimazole for 24 hr followed by Western blotting using corresponding antibodies. β -actin was used as a loading control.

4. 고 찰

Clotrimazole은 이미다졸계 항진균제로 칸디다 질염, 건선 및 무좀 치료제로 사용된다(14). Clotrimazole은 진균 감염 이외에 겸상 적혈구 빈혈증의 원인인 칼슘이 활성화 된 칼륨통로를 억제하여 적혈구의 탈수를 감소시키며, 시험관 내 실험에서 말라리아 기생충의 성장 억제효과에 대해 알려져 있다(25,26). 최근 보고에 따르면 clotrimazole이 대장암, 뇌종양, 유방암, 피부암 세포주에서 성장 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있으나 그 기전에 대해서 밝혀져 있지 않다(17-19,21,23). Clotrimazole은 암세포에서 세포주기 정지 및 세포자멸사를 유도하며, 원형질막의 이온수송 조절 및 당분해 대사의 강력한 억제제로 작용한다고 보고되어 항암제로써 clotrimazole의 가능성을 보여준다(16,19,20).

TRAIL은 인간의 다양한 조직에서 발견되는 종양괴사인자계열의 cytokine으로 DR5 수용체와 결합하여 암세포에 세포자멸사를 유도한다. TRAIL은 암세포의 세포자멸사를 유발하지만 정상세포에는 독성이 거의 없어 항암제로써 주목받고 있다. TRAIL 수용체 중 세포자멸사 유도 도메인이 결여되어 있는 DcR1, DcR2는 TRAIL 내성 암세포에서 과발현 되어있으며 세포자멸사 도메인이 존재하는 DR4, DR5 발현 증가 유도는 TRAIL 효과 증진 및 TRAIL 내성기전에 관여한다고 알려져 있다. TRAIL 내성 극복을 위해 기존의 항암제의 문제점인 정상세포에 대한 세포독성이 나타나지 않을 정도의 농도의 항암제와 TRAIL을 병용 처리 하여 TRAIL 내성을 극복하는 방법에 대한 연구가 보고되고 있어(8,27-32), 이 연구에서는 항진균제인 clotrimazole이 교모세포종에서 TRAIL 내성 극복을 통해 세포자멸사를 증가시킬 수 있을지 알아보았다.

교모세포종 세포주 U251MG에서 clotrimazole의 세포독성을 확인한 결과 선행 연구와 같이 세포독성이 약하게 나타남을 확인하였으며 TRAIL과 clotrimazole을 함께 처리 시 세포자멸사가 유의적으로 증가함을 확인하였다. 또 다른 교모세포종 세포주인 T98G 세포에서도 TRAIL에 clotrimazole

을 병용 처리 시 세포독성이 유의적으로 증가하였다. 이를 보아 교모세포종에서 clotrimazole은 TRAIL 감수성을 증가시킴을 알 수 있다. TRAIL은 주로 caspase 활성을 통한 세포자멸사를 유도한다고 알려져 있다(11). Pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk를 TRAIL 및 clotrimazole과 병용 처리 시 증가된 세포독성이 감소하였고, 세포자멸사 표지 단백질인 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3의 단백질 발현이 z-VAD-fmk를 함께 처리 시 발현양이 감소됨을 보아 TRAIL과 clotrimazole 병용 처리 시 나타내는 생존세포 감소는 caspase 의존적으로 유도되는 것으로 확인하였다.

최근 연구에서 교모세포종에서 DR5가 발현된다고 보고된 바 있으며(33), clotrimazole과 유사한 이미다졸계 항진균제인 miconazole은 신장암에서 DR5의 증가를 통하여 세포자멸사를 유도한다고 보고된 바 있어 clotrimazole이 DR5를 증가시킬 수 있는 가능성을 보여주었다(24). U251MG 세포에서 clotrimazole 농도 의존적으로 DR5의 단백질과 세포표면 수준에서의 발현이 증가하였다. 그러나 mRNA 발현 수준에는 영향이 없는 것을 보아 clotrimazole에 의한 DR5 단백질 발현 증가는 전사 후 단계에서 이루어짐을 유추 할 수 있었으며, DR5가 clotrimazole에 의한 TRAIL 유도 세포자멸사 기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다. TRAIL과 clotrimazole을 병용 처리 시 나타나는 세포자멸사 유도 기전에 증가된 DR5가 직접적으로 관련이 있는지 DR5 siRNA를 처리하여 보았을 때 TRAIL과 clotrimazole 병용 처리에 의한 세포자멸사의 효과가 억제되었고, 세포자멸사 표지 단백질인 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3의 단백질 발현 또한 감소하여 TRAIL과 clotrimazole 병용 처리의 효과가 DR5 siRNA 처리에 의해 상쇄되었음을 알 수 있었다. 이것은 TRAIL과 clotrimazole 병용 처리 시 세포자멸사가 유도되며 clotrimazole에 의해 증가된 DR5의 발현이 관련 있는 것을 보여주고 있다.

이 결과들을 요약하여 볼 때, clotrimazole이 DR5의 단백질 발현 증가를 유도하며 증가된 DR5 단백질이 TRAIL에 대한 세포의 감수성을 증가 시키는 것으로 생각된다. 앞으로 clotrimazole의 TRAIL 병용 치료제로써 가능성에 대해 추후 연구가 더 필요할 것이다.

5. 요약

Clotrimazole은 항진균제로써, 진균의 막 주성분인 에르고스테롤의 합성을 차단하여 주로 칸디다 질염과 건선 등 진균 감염 질환 치료제로 사용되고 있다. 최근 clotrimazole은 다양한 암세포에서 항암효과가 보고되어 있으며, 교모세포종에서 해당작용 억제를 통하여 세포주기를 정지시켜 세포자멸사를 유도한다고 보고된 바 있다. TRAIL은 종양괴사인자계열 cytokine으로 type II 막 관통 단백질의 특성을 가진다. 인간의 다양한 조직에 발현되어 있으며 DR4 및 DR5와 결합하여 암세포에 선택적으로 세포자멸사를 유도한다.

이 연구에서는 TRAIL 내성 암세포인 교모세포종에서 clotrimazole의 TRAIL 감수성 증가효과 대하여 조사하였다. Clotrimazole은 U251MG 세포에서 TRAIL의 세포생존을 감소 효과를 증가시켰으며, 이 효과는 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk를 병용 처리 시 상쇄되었다. Clotrimazole 농도 의존적으로 DR5의 단백질 발현과 세포표면의 발현이 증가 하였으며 DR5 siRNA를 이용하여 DR5의 단백질 발현을 억제하였을 때 TRAIL과 clotrimazole 병용 처리 효과가 상쇄되었으며 증가된 cleaved PARP, cleaved caspase-3의 단백질 발현이 감소하였다. 이 결과들로 보아 TRAIL의 내성을 가진 교모세포종 세포주에서 clotrimazole이 DR5의 발현 유도를 통하여 TRAIL의 감수성을 증가시키는 것을 알 수 있다.

참고문헌

1. Rock K, McArdle O, Forde P, Dunne M, Fitzpatrick D, O'Neill B, et al.: A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme—the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival?. Br J Radiol 2012; 85: e729–33.
2. Affronti ML, Heery CR, Herndon JE, 2nd, Rich JN, Reardon DA, Desjardins A, et al.: Overall survival of newly diagnosed glioblastoma patients receiving carmustine wafers followed by radiation and concurrent temozolomide plus rotational multiagent chemotherapy. Cancer 2009; 115: 3501–11.
3. Das S, Marsden PA: Angiogenesis in glioblastoma. N Engl J Med 2013; 369: 1561–3.
4. Ghosh D, Nandi S, Bhattacharjee S: Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. Clin Transl Med 2018; 7: 33.
5. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al.: Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cel 2010; 17: 98–110.
6. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A: Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the

- tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996; 271: 12687-90.
7. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al.: Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995; 3: 673-82.
 8. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, et al.: Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Inves* 1999; 104: 155-62.
 9. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-43.
 10. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al.: Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997; 277: 818-21.
 11. Wang S, El-Deiry WS: TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 2003; 22: 8628-33.
 12. Saito R, Bringas JR, Panner A, Tamas M, Pieper RO, Berger MS, et al.: Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model. *Cancer Res* 2004; 64: 6858-62.
 13. Almasan A, Ashkenazi A: Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling,

- biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 337-48.
14. Sawyer PR, Brogden RN, Pinder KM, Speight TM, Avery GS: Clotrimazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs* 1975; 9: 424-47.
 15. Crowley PD, Gallagher HC: Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J Appl Microbiol* 2014; 117: 611-7.
 16. Kadavakollu S, Stailey C, Kunapareddy CS, White S: Clotrimazole as a Cancer Drug: A Short Review. *Med Chem* 2014; 4: 722-4.
 17. Zhao X, Song JD: Clotrimazole induced apoptosis in human colon cancer cell line CCL229. *Ai Zheng* 2002; 21: 630-5.
 18. Meira DD, Marinho-Carvalho MM, Teixeira CA, Veiga VF, Da Poian AT, Holandino C, et al.: Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Mol Genet Metab* 2005; 84: 354-62.
 19. Liu H, Li Y, Raisch KP: Clotrimazole induces a late G1 cell cycle arrest and sensitizes glioblastoma cells to radiation in vitro. *Anticancer Drugs* 2010; 21: 841-9.
 20. Marcondes MC, Sola-Penna M, Zancan P: Clotrimazole potentiates the inhibitory effects of ATP on the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase. *Arch Biochem Biophys* 2010; 497: 62-7.

21. Furtado CM, Marcondes MC, Sola-Penna M, de Souza ML, Zancan P: Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis. *PLoS One* 2012; 7: e30462.
22. Wang J, Jia L, Kuang Z, Wu T, Hong Y, Chen X, et al.: The in vitro and in vivo antitumor effects of clotrimazole on oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2014; 9: e98885.
23. Adinolfi B, Carpi S, Romanini A, Da Pozzo E, Castagna M, Costa B, et al.: Analysis of the Antitumor Activity of Clotrimazole on A375 Human Melanoma Cells. *Anticancer Res* 2015; 35: 3781-6.
24. Yuan SY, Shiau MY, Ou YC, Huang YC, Chen CC, Cheng CL, et al.: Miconazole induces apoptosis via the death receptor 5-dependent and mitochondrial-mediated pathways in human bladder cancer cells. *Oncol Rep* 2017; 37: 3606-16.
25. Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL: Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* 1993; 92: 520-6.
26. Tiffert T, Ginsburg H, Krugliak M, Elford BC, Lew VL: Potent antimalarial activity of clotrimazole in in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 331-6.
27. Sophonnithprasert T, Nilwarangkoon S, Nakamura Y, Watanapokasin R: Goniotalamin enhances TRAIL-induced apoptosis in colorectal cancer cells through DR5 upregulation and cFLIP downregulation. *Int*

- J Oncol 2015; 47: 2188-96.
28. Wang SS, Feng L, Hu BG, Lu YF, Wang WM, Guo W, et al.: miR-133a Promotes TRAIL Resistance in Glioblastoma via Suppressing Death Receptor 5 and Activating NF-kappaB Signaling. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017; 8: 482-92.
 29. Das S, Nayak A, Siddharth S, Nayak D, Narayan S, Kundu CN: TRAIL enhances quinacrine-mediated apoptosis in breast cancer cells through induction of autophagy via modulation of p21 and DR5 interactions. *Cell Oncol* 2017; 40: 593-607.
 30. Yang X, Li Z, Wu Q, Chen S, Yi C, Gong C: TRAIL and curcumin codelivery nanoparticles enhance TRAIL-induced apoptosis through upregulation of death receptors. *Drug Deliv* 2017; 24: 1526-36.
 31. Jeon MY, Min KJ, Woo SM, Seo SU, Choi YH, Kim SH, et al.: Maritoclax Enhances TRAIL-Induced Apoptosis via CHOP-Mediated Upregulation of DR5 and miR-708-Mediated Downregulation of cFLIP. *Molecules* 2018; 23: 3030
 32. Dilshara MG, Jayasooriya R, Molagoda IMN, Jeong JW, Lee S, Park SR, et al.: Silibinin sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by upregulating DR5 through ROS-induced endoplasmic reticulum stress-Ca(2+)-CaMKII-Sp1 pathway. *Oncotarget* 2018; 9: 10324-42.
 33. Kuijlen JM, Mooij JJ, Platteel I, Hoving EW, van der Graaf WT, Span MM, et al.: TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma

multiforme. J Neurooncol 2006; 78: 161-71.

Clotrimazole Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Glioblastoma Cells

Kim, Su Gyong

Department of Microbiology
Graduate School

Keimyung University

(Supervised by Professor Baek, Won Ki)

(Abstract)

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a cytokine belonging to the TNF family that can selectively induce apoptosis in cancer cells. TRAIL resistance is known in various cancer cells, including glioblastoma, and numerous studies have been conducted to overcome TRAIL resistance. Clotrimazole is an antifungal agent that is used to treat various fungal infections. It has been recently reported that clotrimazole exerts anticancer effects on various cancer cells. The present study aimed to investigate whether clotrimazole enhances TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells. It was observed that clotrimazole enhanced TRAIL-induced cytotoxicity, which increased the expression of apoptotic proteins, cleaved PARP and cleaved caspase-3. Clotrimazole increased the expression of DR5 protein

but not that of DR5 mRNA. The combined effect of clotrimazole and TRAIL was inhibited by treatment with DR5 siRNA, suggesting that the clotrimazole-induced increase in DR5 expression was important for the TRAIL sensitizing effect of clotrimazole. These data suggested that clotrimazole can increase TRAIL sensitivity by inducing the expression of DR5 in glioblastoma cell lines.

교모세포종 세포주에서 Clotrimzole의 TRAIL 매개 세포자멸사 증가 효과

김 수 경

계명대학교 대학원

의학과 미생물학 전공

(지도교수 백 원 기)

(초록)

Tumor necrosis factor(TNF)-related apoptosis inducing ligand(TRAIL)은 종양괴사인자 계열 cytokine으로 선택적으로 암세포에 세포자멸사를 유도하는 효과가 있으나, 교모세포종을 비롯한 다양한 암세포에서 TRAIL 내성이 알려져 TRAIL 내성 극복을 위한 많은 연구가 진행되고 있다. Clotrimazole은 항진균제로 다양한 진균 감염의 치료제로 사용되고 있으며 최근 clotrimazole의 항암효과가 보고되고 있다. 이 연구에서는 TRAIL 내성 교모세포종 세포주 U251MG를 이용하여 clotrimazole이 TRAIL 내성 극복을 통해 세포자멸사를 증가시키는지 알아보았다. Clotrimazole과 TRAIL의 병용 처리는 단독 처리 보다 세포 생존율을 감소시켰으며 이 생존율의 감소는 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk 처리 시 억제되어 clotrimazole 병용 처리가 세포자멸사를 증가시킴을 알 수 있었다. Clotrimazole 처리는 DR5 단백질의 발현을 농도 의존적으로 증가 시켰다. Clotrimazole에 의해

증가된 세포자멸사가 DR5 단백질 발현 증가와 관련이 있는지 DR5 siRNA를 처리하여 확인하였을 때 cleaved PARP와 cleaved caspase-3 활성이 감소된 것을 보아 발현 유도된 DR5가 TRAIL과 clotrimazole의 병용 효과와 관련 있음을 알 수 있었다. 이 결과들을 볼 때 clotrimazole은 교모세포종 세포주에서 TRAIL 감수성 증가 효과가 있으며, 이는 DR5 발현 유도를 통하여 이루어지는 것으로 생각된다. 향후 TRAIL 내성 극복 병용 치료제로서 clotrimazole에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.