

## Anticancer Activity of Bispidinone Derivative by Induction of Apoptosis

Man Gi Lee<sup>2,\*</sup> and Ryong Kwon<sup>1,†,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Chemistry, Inje University, Gimhae 50834, Korea

<sup>2</sup>Department of Sports Healthcare, Inje University, Gimhae 50834, Korea

The present study was carried out to investigate the possibility that bispidinone derivative makes anticancer drug availability to human cervical carcinoma cell. The B8 has the lowest IC<sub>50</sub> value among B8, B9 and B10 which are bispidinone analogue with bromide. According to cytotoxic test through WST-8 assay, B8 shows the most magnificent cytotoxicity effectiveness with 76 μM of IC<sub>50</sub> value. In human cervical carcinoma cell treated with B8, it noticeably controlled cellular multiplication by increase of concentration and time. Furthermore, morphological changes like cellular shrink, disruption and nuclear condensation, feature of apoptosis, are observed. Annexin V-FITC/PI double staining assay test proved that B8 can cause apoptosis. Moreover, after treatment with 76 μM of B8, flow cytometry analysis shows that increase of active oxygen species are induced and membrane potential in mitochondria is decreased. Manifestation of Bcl-2 family and caspase cascades protein provides evidence that B8 induces apoptosis through mitochondria and caspase-related pathway. Taken together, we suggested that B8 reduced membrane potential in mitochondria and induce apoptosis through the pathway depended on mitochondria and caspase.

**Key Words:** Bispidinone, Apoptosis, Mitochondria membrane potential, Reactive oxygen species, Anticancer activity

### 서 론

세포 사멸은 세포가 죽음에 이르는 방법 중의 하나로 필요하지 않은 세포나 이상이 있는 세포를 제거하여 생명의 생리적 균형을 유지하게 한다. 세포사멸은 크게 내부 경로(intrinsic pathway)와 외부 경로(extrinsic pathway)에 의해 아주 세밀하게 조절되는 두 가지 메커니즘을 가지고 있는데, 내부 경로의 경우 저산소증이나 DNA의 손상 등에 의해 발생한다(Ziegler and Kung, 2008). 또한 내부 경로와 관련된 미토콘드리아의 중요한 역할 중 하나는 DNA가 손상을 받았을 경우 미토콘드리아 막(Mitochondria membrane potential, MMP)이 붕괴되어 세포질로 cytochrome c가 방출되고 이것은 Apaf-1 (apoptotic protease activating

factor 1) protein과 결합하여 apoptosome을 형성한다(Wang and Youle, 2009). Apoptosome의 형성은 procaspase를 caspase (caspase-3, -7, -9)로 활성화시키는 역할을 하여 apoptosis가 일어나게 되며 그 외에도 여러 가지 단백질의 생성은 Bcl-2 family, Bax에 의해 조절된다(Pathak et al., 2009). 외부 경로(extrinsic pathway)의 경우 death signal이 fas death receptor 통해 procaspase-8을 caspase-8로 활성화시키고 계속적으로 caspase-3을 활성화하여 세포 사멸이 일어나게 된다(Lobrich and Jeggo, 2007).

한편 과산화수소(hydrogen peroxide: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)나 초과산화이온(superoxide anion: O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 수산화 라디칼(hydroxyl radical: ·OH)과 같은 활성산소(reactive oxygen species, ROS)들은 세포 생존과 죽음을 조절하는 세포 내 신호 전달 경로에서 중요한 역할을 한다(Mine et al., 2001; LeBras et al., 2005).

Received: October 29, 2020 / Revised: December 24, 2020 / Accepted: December 28, 2020

\*Professor, \*\* Researcher.

†Corresponding author: Ryong Kwon. Department of Biomedical Chemistry, Inje University, Gimhae 50834, Korea. Tel: +82-10-3044-7412, Fax: +82-55-320-3219, e-mail: kwon7450@naver.com

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

산화적 스트레스와 세포 사멸 간에 밀접한 관계가 있음이 보고되었다(Fleury et al., 2002). 활성산소가 많이 존재하면 세포 사멸이 일어나고 작게 존재하면 세포의 생존과 증식을 향상시킨다(Murray, 1994; Pucci et al., 2000). 세포 사멸의 유도에 미토콘드리아의 역할이 중요하다(Limon et al., 2000). 활성산소는 미토콘드리아 막 전위를 감소시키고 cytochrome c를 방출하여 caspase들을 활성화시켜서 세포 사멸이 일어나게 한다(Chan et al., 2003; Jiang et al., 2012).

천연 알칼로이드인 sparteine과 구조적으로 유사한 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-ones (bispidines)은 항부정맥과 무통각, 항균활성 등과 같은 생물학적 중요성 때문에 입체화학이 이것의 합성에 많은 관심을 가진다(Jaiprakash et al., 2014). 또한, bispidines은  $\kappa$  opioid 수용체에 높은 친화력과 선택성을 나타내는 것이 밝혀졌다(Aline et al., 2019). Bispidines의 특이한 구조는 이론적인 관점에서 뿐만 아니라, 특히 2,4,6,8-tetraaryl-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one (bispidinone)은 4개 aryl 기의 존재 때문에 많은 관심을 가진다. 방사성 구리 동위원소에 대한 진단( $^{64}\text{Cu}$ ) 또는 치료( $^{67}\text{Cu}$ )를 위한 chelate 리간드로서 bispidines이 많이 이용되고 있다(Kraus et al., 2009). Bispidinone의 항암활성에 대한 작용기전과 관련된 생물학적 특성은 많이 연구되지 않았다.

본 연구에서 다양한 알칼로이드 분자 구조를 갖는 bispidinone 화합물(mother compounds)에서 벤젠의 ortho, meta, para 자리에 브롬으로 치환하여 합성한 B8, B9, B10 중 B8 (2,4,6,8-tetrakis(2-bromophenyl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one)의 독성이 가장 강하다는 것을 확인하였다(Table 1). 따라서 본 연구에서는 B8에 의해 유도되는 세포사멸 현상과 자세한 작용기전을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

### 화학제품

Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)와 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고 Annexin-FITC kit와 세포사멸에 대한 세포주기 분석의 PI/RNase 염색용액은 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), Eagle's minimum essential medium (EMEM), penicillin-streptomycin, Fetal bovine serum (FBS)은 HyClone Laboratories, Inc. (Logan, UT, USA), 그리고 cell counting Kit-8은 Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Osaka, Japan)에서 얻었으며 trypsin-EDTA는 Gibco-BRL (Invitrogen Co.,

USA)에서 구매하였다.

### 세포배양

American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 얻은 HeLa cells을 Fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin 넣어 만든 EMEM으로 37°C (5% CO<sub>2</sub>)의 습한 환경에서 배양하였다.

### Bispidinone 용액들의 제조

2,4,6,8-tetrakis(2-bromophenyl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one (B8)과 2,4,6,8-tetrakis(3-bromophenyl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one (B9), 2,4,6,8-tetrakis(1-bromophenyl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one (B10)은 Dr. D. H. Park의 실험실에서 얻었으며, bispidinone 용액은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 만들었고 추가 희석은 실험 직전에 실행하였다.

### 세포의 생존 및 증식 분석

HeLa cells을 96-well plate의 각 well에 배지 mL당  $5 \times 10^4$ 의 값으로 계산하여 접종 후 배양하는 동안 media를 갈아 주었으며 B8을 다양한 농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 또한 CCK-8 시약 10  $\mu\text{L}$ 를 각 well에 넣어 추가로 2시간 동안 배양하였고 세포 생존율은 WST-8를 사용하여 측정하였으며, 살아있는 세포의 optical density는 multi-microplate reader (synergy HT, Bio-Tek<sup>®</sup>)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. HeLa cells의 proliferation assay의 경우 96-well plate에 mL의 배지당  $5 \times 10^4$ 으로 seeding하고 B8을 76  $\mu\text{M}$  농도로 처리 후 다양한 시간 변화에 대한 흡광도를 측정하였으며, 각각의 실험은 3회 이상 반복하였다.

### 세포사멸의 형태학적 분석

HeLa cells을 6-well plate에  $2 \times 10^5$  cell/well 농도로 넣은 후 밤새 부착시키고, cells에 24시간, 48시간 동안 B8(약 75  $\mu\text{M}$ )과 함께 처리하였다. 처리되지 않은 wells은 대조군으로서 DMSO (<0.1%)와 동등한 양을 넣고 측정하였다. 또한 세포에 대한 검사와 형태학적 변화는 Nikon Phase Contrast-2와 ELWD 0.3 invert microscope로 촬영하였다.

### Annexin V-FITC/PI를 이용한 세포사멸 분석

HeLa 세포를 60 mm-dish에  $1 \times 10^5$  세포/mL의 농도로 가하여 24시간 배양한 후에 76  $\mu\text{M}$ 의 B8을 포함한 새로운

배지로 각각 교체한 후 각기 다른 시간대에 따라 트립신 처리(trypsinization)를 이용하여 세포를 모은다. 그리고 원심분리기를 이용하여 세포 부유액을 인산완충용액(PBS)으로 세척한 후 세포 펠렛(pellet)을 100  $\mu$ L의 결합완충용액(binding buffer)에 부유시킨 다음 5  $\mu$ L의 annexin V-FITC와 10  $\mu$ L의 PI (50  $\mu$ g/mL)를 가한 후 실온(15~25 $^{\circ}$ C)의 어두운 곳에서 15분간 염색하였다. 그리고 이 세포들은 488 nm의 파장에서 FACScalibur 유세포분석기(FACScalibur-기기모델, BD Bioscience)를 이용하여 측정하고 BD Instruments에서 제공된 프로그램으로 분석하였다.

### 세포 내 활성산소 측정

활성산소 종의 생성은 형광 지시약인 2,7-dichlorodihydrofluorescein ( $H_2$ DCFDA)를 사용하여 측정하였다.  $H_2$ DCFDA는 ROS의 생성을 통해 높은 녹색 형광물질인 2,7-dichlorofluorescein (DCF)로 산화한다. B8 (76  $\mu$ M)과 함께 처리하거나 처리하지 않은 HeLa cells ( $1 \times 10^5$  cells in a 60 mm dish)을 트립신 처리 후 원심분리하여 수집하였다. 시료를 차가운 PBS로 세척하고 37 $^{\circ}$ C, 암실에서 30분 동안 2  $\mu$ L의  $H_2$ DCFDA를 처리하여 염색하였다. 상대적 형광강도는 FACScalibur flow cytometer으로 측정하였고, 520 nm의 흡광

도와 FL-1 channel (green)로 맞추어 Cell Quest pro software로 분석하였다.


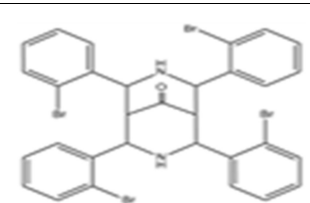
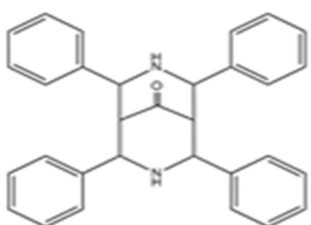
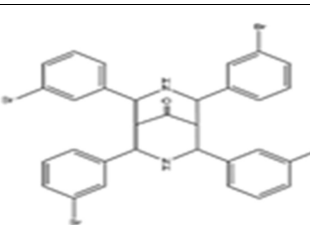

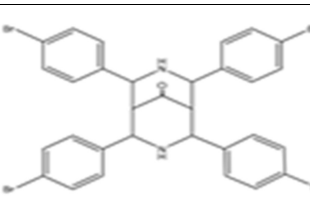
### 미토콘드리아 막 전위( $\Delta\Psi_m$ )의 측정

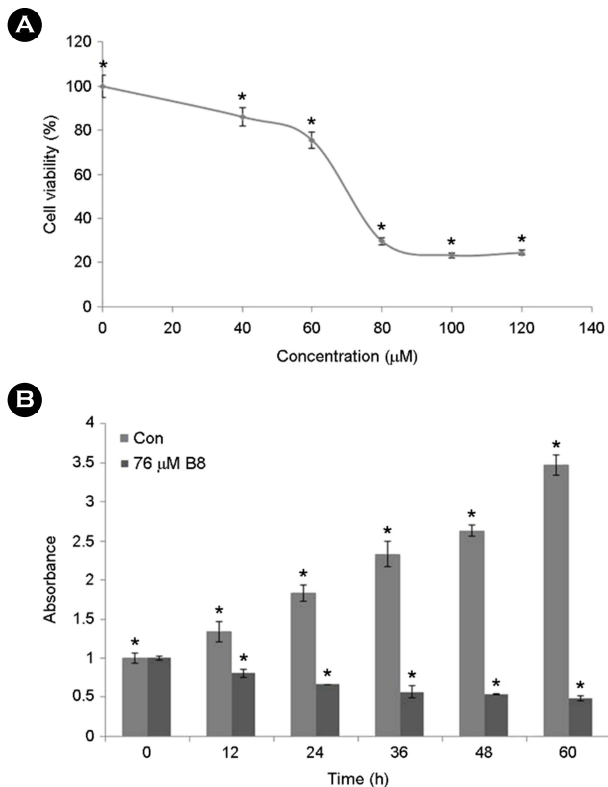
미토콘드리아 막 전위의 변화는 형광 probe인 rhodamine 123 (RH-123; Molecular Probes)을 이용하여 측정하였다. B8 (76  $\mu$ M)을 처리하거나 처리하지 않은 HeLa cells ( $1 \times 10^5$  cells in 60 mm dish)에 트립신 처리 후 원심분리하여 수집하였다. 시료를 차가운 PBS로 세척하고, rhodamine intensities를 5  $\mu$ L 넣고 염색한 후 FACScalibur flow cytometer에서 측정값을 FL-1 channel로 맞춰 관찰하고 cell Quest pro software로 분석하였다.

### 추출물 제조 및 western blot 분석

B8 (76  $\mu$ M)을 HeLa cells에 함께 처리하거나 처리하지 않은 HeLa cells ( $1 \times 10^5$  cells in 150 mm dish)의 총 세포 추출물과 세포질 분획은 PBS 처리 후 원심분리하여 수집하였다. 추출물을 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 25,000 g에서 원심분리하여 만들어진 상등액의 단백질 함량은 Bradford 단백질 분석으로 측정하였다. 모든 세포 추출물(25  $\mu$ g)을 전기영동하여 nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Keene,

**Table 1.** Evaluation of cytotoxicity of bispidinone derivatives

Bispidinone	Bispidinone analogue	Number	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
		B8	76
		B9	>80
		B10	>80



**Fig. 1. Effect of B8 on cytotoxicity and proliferation of HeLa cells.** (A) HeLa cells were treated with 0, 40, 80 μM of B8 for 48 h. (B) HeLa cells were treated with 76 μM of B8 for various times (0, 12, 24, 36, 48, 60 h). Cell viability was measured by WST-8 assay. Results are expressed as mean ± SD, n=3. \*P<0.05, significantly different from the control at the same level.

NH, USA) 상으로 옮겼다. Bcl-2, procaspase-8, procaspase-9, β-actin (1: 1,000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), procaspase-3 (1: 300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 그리고 Bax (1: 1,000, BD Biosciences Pharmingen)가 primary polyclonal antibodies로 사용되었다.

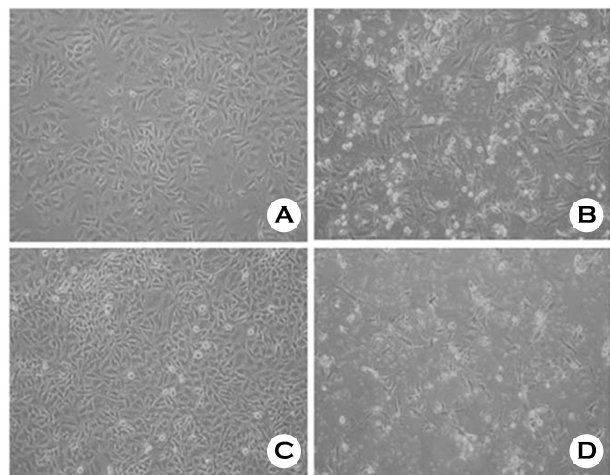
### 통계 분석

각 실험은 3번 반복 실험한 데이터의 평균은 ± SD 값으로 표현하였다. One-way analysis로 통계적 분석을 하였고, P<0.05에서 유의한 차이를 보였다. Microsoft Excel 2016 (Roselle, IL, USA)로 통계 분석하고 도표를 그렸다.

## 결 과

### Bispidinone 유도체들의 세포독성 효과

다양한 알칼로이드 분자 구조를 갖는 bispidinone 화합

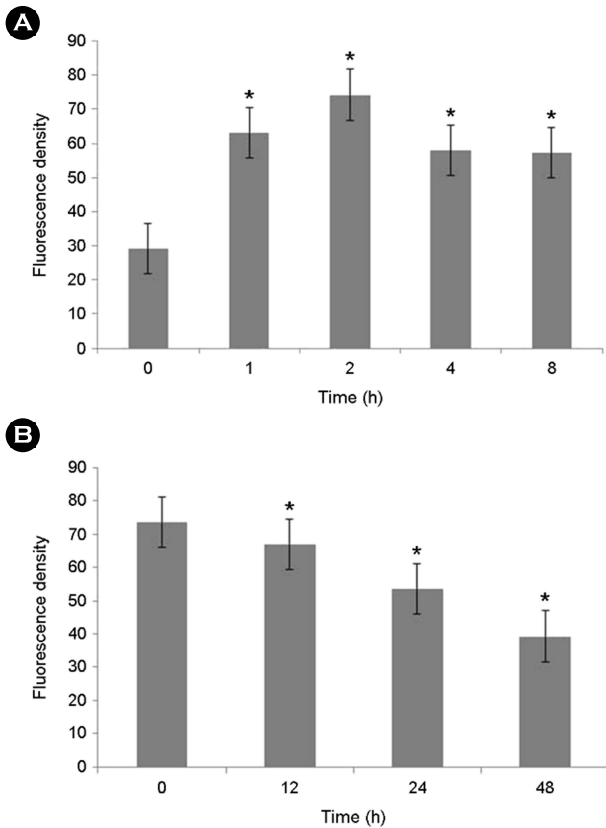


**Fig. 2. Induction of morphological change in HeLa cells treated with B8.** HeLa cells were untreated with B8 for 24 h (A) and 48 h (C). HeLa were treated with B8 (76 μM) for 24 h (B) and 48 h (D). Magnification, x160. All the experiments were performed in triplicate and gave similar results.

물(mother compounds)에서 벤젠의 ortho, meta, para 자리에 브롬으로 치환하여 합성한 B8, B9, B10 중 B8 (2,4,6,8-tetrakis(2-bromophenyl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one)의 독성이 가장 강하다는 것을 WST-8 분석을 통하여 확인하였다(Table 1). 농도(40, 60, 80, 그리고 120 μM)가 증가하도록 설정하여 48 h 동안 배양하면 대조군에 비해 농도가 증가함에 따라 세포의 생존능력이 감소하였다(Fig. 1A). B8이 큰 세포독성 효과를 보여주었으며 IC<sub>50</sub> 값이 76 μM임을 확인하였다. HeLa cells에 B8을 처리하였을 때 같은 농도에서 시간에 따른 세포 증식을 확인을 위해 0~60 h 까지 12시간 간격으로 설정하고 IC<sub>50</sub> 값인 76 μM로 농도를 같게 했을 때의 결과(Fig. 1B)를 확인하였다. 대조군은 시간이 증가함에 따라 세포의 증식이 활발히 일어나는 반면 B8을 처리한 경우 증식하지 않고 점차 감소하는 경향을 보였다.

### B8에 의한 HeLa cells의 형태학적 변화 관찰

세포의 형태학적 변화는 세포 사멸의 중요한 특징을 나타내기 때문에 B8을 처리한 HeLa cells과 처리하지 않은 HeLa cells의 변화를 현미경으로 관찰하였다. B8을 처리하지 않은 HeLa cells을 culture plates에서 24, 48 h 동안의 변화를 관찰하였을 때 24 h에서의 대조군(Fig. 2A)과 48 h의 대조군(Fig. 2C)은 세포 사멸과 관련된 형태가 많이 보이지 않았고 가지를 뺀으며 잘 자라는 반면에, B8을

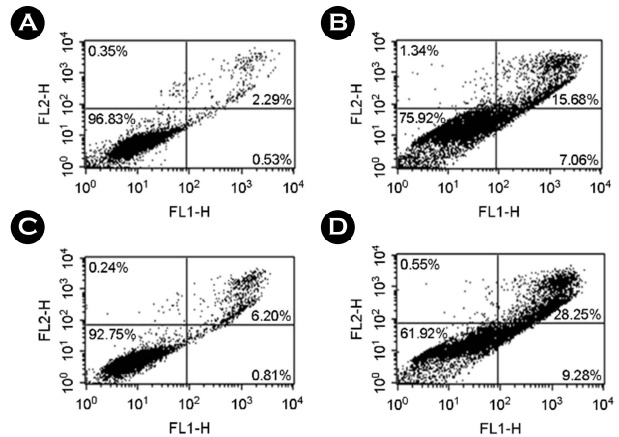


**Fig. 3. The effect of B8 on ROS generation and MMP level on HeLa cells.** (A) Cells treated with B8 were incubated with DCF-DA. And the intracellular levels of ROS were determined by measuring the level of DCF fluorescence. (B) Cells were incubated with 76  $\mu$ M of B8 for varying lengths of time (0–48 h) and then analyzed by JC-1 derived fluorescence. Results are the mean  $\pm$  SD, n=3. \* $P$ < 0.05, means significantly differ from the control at the same level.

76  $\mu$ M의 농도로 24 h 동안 처리하였을 때(Fig. 2B) 일부의 HeLa cells이 plates에서 떨어져 부유하고 있었으나 세포 사멸의 특징이 뚜렷하게 보이지 않았다. 48 h 동안 B8을 76  $\mu$ M의 농도로 처리했을 때(Fig. 2D)의 경우 세포 사멸의 형태학적 특징인 세포들이 수축되고 파괴되는 모습과 많은 세포가 동그란 모양으로 부유하고 있음을 보였다.

#### B8에 의한 ROS와 MMP levels의 변화

B8에 의하여 유도되는 ROS level의 변화를 확인하기 위하여 B8을 76  $\mu$ M의 농도로 처리하여 0, 1, 2, 4, 8 h 동안의 변화를 세포 투과성 염료인 H<sub>2</sub>DCF-DA 형광 염료를 사용하여 측정하였다(Fig. 3A). B8을 처리하였을 때 H<sub>2</sub>DCF-DA의 평균 형광값은 29.27 $\pm$ 1.69 (0 h)에서 74.24 $\pm$ 1.64 (2 h)로 증가하였고 4시간 후 감소하는 경향을 보였다. 이로 인해

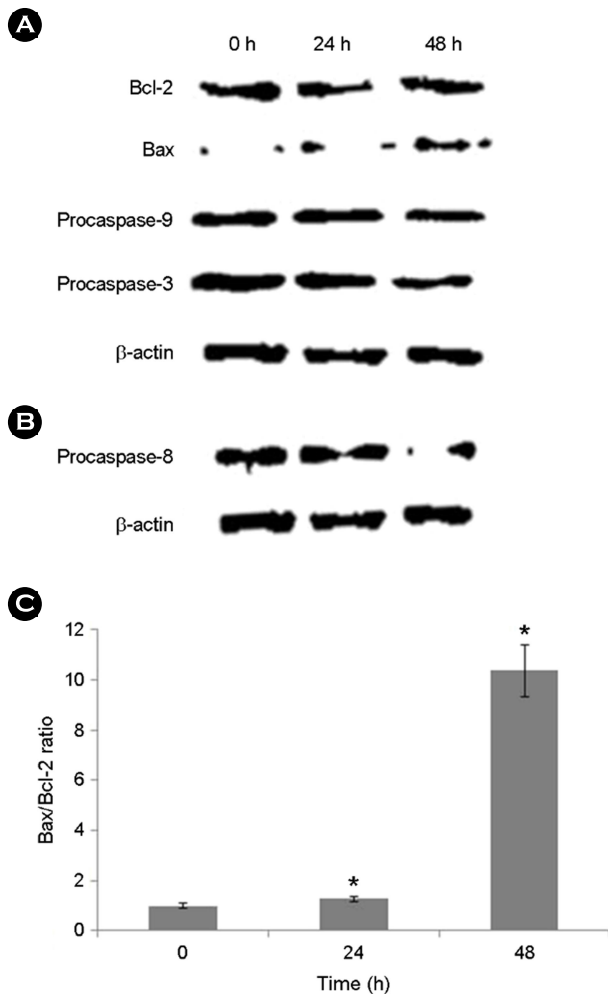


**Fig. 4. B8 induced apoptosis in HeLa cells.** Untreated with B8 for 24 h (A) and 48 h (C), or treated with B8 (76  $\mu$ M) for 24 h (B) and 48 h (D). Data were obtained by flow cytometric analysis of Annexin V-FITC/PI double-staining assay. All the experiments were performed in triplicate and gave similar results.

B8이 ROS의 생성에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. ROS의 생성은 미토콘드리아 막 전위의 붕괴와 연관되어 있고 미토콘드리아 막의 탈분극 또한 세포사멸의 중요한 특징으로 여겨지는데, rhodamine 123 dye의 형광 특성을 이용해 생체물질이나 그것을 둘러싸는 주변 환경의 성질을 조사하기 위해 사용하여 MMP의 손실 여부를 확인하였다 (Fig. 3B). 그 결과 76  $\mu$ M의 B8을 처리한 후 평균 rhodamine 123의 형광이 73.67 $\pm$ 1.98 (0 h)에서 66.94 $\pm$ 1.64 (12 h), 53.45 $\pm$ 1.87 (24 h) 및 39.25 $\pm$ 1.60 (48 h)로 점차 감소하여 B8이 처리된 HeLa cells에서 미토콘드리아가 세포 사멸에 관여함을 보였다.

#### B8에 의한 세포 사멸 유도 여부 확인

B8에 의한 세포 사멸의 유도 여부를 알아보기 위하여 Annexin V-FITC / PI 이중 염색 분석법을 사용하여 HeLa cells에 B8을 처리하지 않은 세포와 76  $\mu$ M의 농도로 처리한 cells에 대한 24, 48 h 동안의 변화를 관찰하였다(Fig. 4). Fig. 4에 나와 있는 가로축은 Annexin V-FITC, 세로축은 PI를 의미하며 가운데의 중심을 기준으로 오른쪽 아래, 위가 각각 세포사멸 구간(early apoptotic cells (Annexin V<sup>positive</sup>/PI<sup>negative</sup>)과 late apoptotic cells (Annexin V<sup>positive</sup>/PI<sup>positive</sup>)이며 왼쪽 위와 아래는 각각 necrosis (Annexin V<sup>negative</sup>/PI<sup>positive</sup>)와 live cells (Annexin V<sup>negative</sup>/PI<sup>negative</sup>)을 의미한다. 24 h 동안 B8을 처리하지 않은 대조군(Fig. 4A)은 B8을 처리한 HeLa cells (Fig. 4C)에 비해 세포사멸 구간이 약 20%



**Fig. 5. Induction of protein activation in B8-induced apoptosis on HeLa cells.** HeLa cells were treated with 76  $\mu$ M B8 for 0, 24 and 48 h. the expression of proteins was analyzed by western blotting. (A) Protein expression levels of Bcl-2, Bax, procaspase-9, procaspase-3. (B) Protein expression of levels of procaspase-8. (C) Ratio of Bax/Bcl-2. Results are expressed as mean  $\pm$  SD, n=3. \* $P$ <0.05, significantly different from the control at the same level.

증가하는 것을 보였으며, 48 h 동안 B8을 처리하지 않은 대조군(Fig. 4B)과 B8을 처리한(Fig. 4D) 것의 세포사멸 구간 차이는 약 30% 증가하였다. 이로 인해 HeLa cells에서 B8이 세포 사멸을 유도함을 알 수 있었다.

#### Western blot 분석

세포 사멸과 관련되는 단백질들의 발현을 조사하여 B8이 어떤 메커니즘을 통해 세포 사멸을 유도하는지를 western blot analysis을 사용하여 확인하였다(Fig. 5). Fig. 5A에서 Bcl-2와 관련된 단백질은 mitochondrial-mediated

pathway가 원활하게 일어나기 위해 중요한 역할을 한다 (Gross et al., 1999). Anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 발현은 시간이 지남에 따라 감소했으며, pro-apoptotic protein인 Bax의 발현은 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였고, procaspases-3, 9의 발현 또한 증가하였다. Bax/Bcl-2 비율을 확인한 결과 48 h에서 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5C). Fig. 5A의 결과에 의하면 세포 사멸은 내부 경로로 일어남을 확인하였고, 또한 procaspase-8의 발현(Fig. 5B)이 감소하는 경향을 보임으로써 B8은 Fas signaling apoptosis 경로를 통하여 세포 사멸을 유도할 가능성도 있음을 확인하였다.

## 고 찰

최근에 bispidinone에 대한 암 치료법과 관련된 자료가 발표되었고 이것의 세포독성 효과는 많이 알려져 있으므로 암을 치료하기 위한 방법으로 쓰일 수 있을 것으로 생각한다(Predebon et al., 2019). Bispidinone에 있는 알칼로이드 중 비타민 A나 흰개미의 페로몬 등의 생물활성을 가지는 디테르펜(diterpene)은 신체에서 혈액 순환을 개선 시켜주며, 심리 안정, 강력한 항산화 작용과 항암 작용을 하는 등 다양한 약리 작용과 정서를 안정시키는데 도움을 주는 것으로 보고되어 있고 루핀 등과 같은 강력한 생리 작용을 주는 특성을 가지는 알칼로이드가 존재하기 때문에 생물학적으로 관심을 많이 가지게 되었다. B8은 다른 bispidinone 유도체들(B9, B10)보다 낮은 농도에서 HeLa cells의 증식을 억제하여 B8이 어떤 경로를 거쳐 세포가 죽음에 이르는지에 대한 사실을 다양한 방법을 사용하여 세포사멸 유도 경로를 확인하였다(Kiechle and Zhang, 2002; Otsuki et al., 2003).

HeLa cells의 형태학적 분석에 의하여 B8에 의해 세포 크기가 줄어들었으며 수축과 분열 같은 세포사멸 유형이 관찰되었다. ROS의 생성과 MMP를 측정하기 위해 rhodamine 123 염색법을 사용했다. Rh-123 형광물질은 mitochondrial potential에 따라 색이 변하는 성질을 사용하여 측정하였다. 측정된 결과 B8이 세포 사멸을 유도했으며, 이는 세포 간 ROS의 생성과 MMP의 유의한 감소를 매개함을 보였다. 그리고 Annexin V-FITC / PI 이중염색 분석법을 사용한 결과 B8에 의해 세포 사멸이 일어남을 확인할 수 있었다.

HeLa cells에서 B8이 어떤 경로를 통해 세포 사멸을 일으키는지 알아보기 위해 western blot analysis을 하였다.

세포사멸 경로에서 중요한 역할을 담당하는 단백질에는 Bax와 Bcl-2가 있으며, Bax (pro-apoptotic protein)는 세포질로 cytochrome c의 방출을 극대화시키고 Bcl-2 (anti-apoptotic protein)는 방출을 억제시키는 역할을 담당한다. 본 연구에서 Bcl-2의 발현이 점차적으로 감소하고 Bax의 발현이 증가하는 것을 확인하였고 Bcl-2 family protein이 세포 사멸을 조절하는 열쇠 역할을 하고 있음을 증명하였다. 또한 미토콘드리아 내부에 있는 cytochrome c는 Apaf-1과 caspase-9로 인해 apoptosome의 형성을 극대화시키고, caspase-3의 활성을 증가시켜 세포 사멸을 일으킨다(Fulda and Debatin, 2006; Saitoh et al, 2004; Ghobrial et al., 2005). B8은 ROS의 생성을 증가시키고 미토콘드리아 막 전위를 감소시켜 세포 사멸을 촉진시켰다. B8에 의해 caspase cascades가 활성화되어 미토콘드리아가 관여되는 경로를 통하여 세포 사멸이 유도됨을 알 수 있었다. 또한 B8은 procaspase-8의 발현을 감소시켜 외부 경로를 통해 세포 사멸을 일으킬 수 있는 가능성도 확인하였다.

#### ACKNOWLEDGEMENT

None.

#### CONFLICT OF INTEREST

No a conflict of interest exist in other authors or my institution.

#### REFERENCES

Aline MN, Amandine R, Maryame SY, Loïc JC. 2,4-Substituted bispidines as rigid hosts for versatile applications: from  $\kappa$ -opioid receptor to metal coordination. *Dalton Trans.* 2019. 48: 16476-16492.

Chan WH, Wu CC, Yu JS. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptosis biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J of Cellular Biochem.* 2003. 90: 327-338.

Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* 2002. 84: 131-141.

Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006. 25: 4798-4811.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *C.A. Cancer J Clin.* 2005. 55: 178-194.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999. 13: 1899

-1911.

Jiang CP, et al. Pro-apoptotic effect of tectorigenin on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *World J Gastroenterol.* 2012. 18: 1753-1764.

Jaiprakash NS, Abhay SZ, Firoz AK, Indrajeet G, Zahid Z. Synthesis and biological activity of substituted-4,5,6,7-tetrahydrothieno pyridines: a review. *Mini Rev Med Chem.* 2014. 14: 988-1020.

Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta.* 2002. 326: 27-45.

Kraus W, Emmerling F, Comba P. Hexadentate bispidine derivatives as versatile bifunctional chelate agents for copper (II) radioisotopes. *Bioconjug Chem.* 2009. 20: 347-359.

LeBras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol.* 2005. 20: 205-220.

Limon HV, Hai-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000. 5: 415-418.

Lobrich M, Jeggo PA. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nature Reviews.* 2007. 7: 861-869.

Mine EI, Gunger K, Emine S. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica Chimica Acta.* 2001. 305: 75-80.

Murray A. Cell cycle checkpoints. *Curr Opin Cell Biol.* 1994. 6: 872-876.

Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods from Morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem.* 2003. 38: 275-339.

Pathak S, Sharma C, Jayaram HN, Singh N. Apoptotic signaling induced by benzamide riboside an *in vitro* study. *Mol Cell Biochem.* 2009. 328: 67-73.

Predebon MJ, Bond DR, Brzozowski J, Jankowski H, Deane F, Tarleton M, Shaw AA, McCluskey A, Bowyer MC, Weidenhofer J, Scarlett CJ. The Bispidine Derivative 3,7-Bis-[2-(S)-amino-3-(1H-indol-3-yl)-propionyl]-1,5-diphenyl-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one Dihydrochloride Induces an Apoptosis-Mediated Cytotoxic Effect on Pancreatic Cancer Cells *In Vitro*. *Molecules.* 2019. 24: 524-539.

Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 2000. 2: 291-299.

Saitoh M, Nagai K, Nakagawa K, Yamamura T, Yamamoto S, Nishizaki T. Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of

AMP-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol.* 2004. 67: 2005-2011.

Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Ann Rev Genet.* 2009. 43: 95-118.

Ziegler DS, Kung AL. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2008. 20: 97-103.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2020.26.4.336>

**Cite this article as:** Lee MG, Kwon R. Anticancer Activity of Bispidinone Derivative by Induction of Apoptosis. *Biomedical Science Letters.* 2020. 26: 336-343.