

구강편평상피세포암종에서 shikonin에 의한 상피간엽이행 억제

박단비*, 박봉수*, 강해미, 유수빈, 김인령†

부산대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실

접수: 2019년 12월 9일/ 수정접수: 2019년 12월 22일/ 게재 승인: 2019년 12월 23일/ 출간: 2019년 12월 31일

구강암은 주변 근육이나 골조직으로의 침습과 경부 림프절로 전이가 빈번히 일어나며, 전이가 일어난 환자의 5년 생존율은 약 40%로, 환자의 예후 개선을 위해 전이를 억제하는 항암제의 개발이 필요한 실정이다. 상피간엽이행 (EMT)이 일어난 세포에서는 이동성과 침습성이 증가하고, 암세포가 새로운 기관으로 전이가 일어나게 된다. 따라서, EMT를 억제하는 것은 암세포의 전이를 억제하는 치료 방법으로 고려 되고 있다. Shikonin은 지치에서 분리 정제된 물질로 항염증 효과가 널리 알려져 있다. 최근 shikonin은 다양한 암세포에서 세포자멸사 및 세포주기정지를 유도하고, 폐 및 위암세포의 전이성을 상실시키는 것이 밝혀졌다. 하지만 여전히 shikonin이 구강암에서 항전이 효과는 아직 불분명하다. 따라서 본 연구에서는 shikonin이 처리된 구강암 세포주에 대한 EMT 억제의 억제 효과를 확인 하였다.

본 연구에서 사용된 구강암 세포주 CAL-27로 세포생존율 및 세포증식율, 세포이동 및 침습, 단백질 및 유전자의 발현을 확인하였다. CAL-27 세포는 shikonin 처리에 의해 생존율 및 증식율이 억제되었다. 또한, shikonin은 wound-healing 및 transwell invasion assay를 통해 CAL-27 세포의 이동 및 침습을 억제 하는 것을 확인 하였다. Shikonin은 CAL-27 세포에서 epithelial marker 인 E-cadherin 의 protein 발현을 증가 시켰으며, mesenchymal marker 인 N-cadherin, Snail 및 Slug 의 protein 및 RNA 발현을 감소 시켰다. 따라서, shikonin은 구강암세포주인 CAL-27의 상피간엽이행을 억제 함을 알 수 있었으며, 본 연구 결과는 shikonin이 항전이성을 가지는 항암제로서의 가능성을 시사한다.

주제어: Shikonin, 상피간엽이행, 세포이동, 세포침습, OSCC

* These authors contributed equally to this work.

† 교신저자 : 김인령

50612 경남 양산시 물금읍 부산대하로 49 부산대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실

Tel: 82-51-510-8244; Fax: 82-51-510-8241; E-mail: biowool@pusan.ac.kr

서론

구강편평상피세포암종(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)은 구강 암에서 가장 흔한 빈도로 나타나며, 구강 암의 약 90%가 편평상피세포에서 기인한다¹⁾. OSCC는 국소 재발, 2차 원발성 종양, 국소 또는 원격 전이가 일어날 확률이 최대 47%이며, 주변 근육이나 골조직으로의 침습과 경부 림프절 전이가 빈번하여 전이가 일어났을 시 환자의 예후가 좋지 않다^{2,3,4)}. 구강암의 치료로는 일반적으로 초기 구강암에서는 외과적 치료를 시행하나, 전이가 진행된 구강암에서는 항암병용요법과 방사선치료가 외과적 치료와 함께 시행된다⁵⁾. 구강암 발생 위치가 해부학적으로 기능적 심미적 손상을 초래함으로써 외과적 수술법은 환자의 정신적 사회적 문제까지 고려되어야 하는 실정이다⁶⁾. 상피간엽이행 (Epithelial-Mesenchymal transition, EMT)은 상피세포 형태에서 간엽세포 형태로 변하는 것으로 종양의 발생 과정과 악성종양으로의 진행 그리고 암세포의 전이를 조절하는 기전이다⁷⁾. EMT는 암의 전이를 유발하는 중요한 과정으로 환자의 예후를 악화시키는 전이를 억제하기 위해서는 EMT 억제의 유도가 필요하다⁸⁾. Shikonin(4-naphthoquinone)은 나트로퀴닌계 물질로서 지치 (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc)의 뿌리에서 추출한 물질이다. 지치는 중의 및 한의학에서 염증 치료에 사용되어온 약재로 발진, 홍역, 축농증, 부스럼, 화상치료등에 효과가 있으며 현재까지도 사용되고 있다⁹⁾. 최근 shikonin구조에 각각의 작용기가 다른 다양한 형태로 합성되었으며, 이러한 합성물질로 항산화, 상처치유, 항염증, 항균, 항암에 이르기까지 여러 효과를 가지는 것으로 보고 되고 있다^{10,11,12,13)}. Shikonin의 항암 효과에 대해서는 현재도 많은 연구가 이루어지고 있으며, 주로 암세포의 성장의 억제와 apoptosis의 유도, 세포 주기의 정지의 효과 등이 보고되었다^{14,15,16,17,18)}.

또한 암세포의 전이의 억제에 대해서도 연구가 진행되고 있는데, 폐암세포에서 c-Met의 억제를 통한 EMT의 감소, 위암세포에서 TLC/NF- κ B 경로의 억제를 통해 암세포의 이동성과 침습성이 감소된 것이 보고되었다^{19,20)}. 구강암세포에서 shikonin이 apoptosis 및 autophagy 유도한다는 연구 결과는 있지만, 아직까지 OSCC 세포에서 shikonin이 EMT에 미치는 영향과 그 기전이 확인된 바는 없다^{17,21)}. 그러므로 본 연구의 목적은 shikonin이 구강편평상피세포암종에서 EMT 억제를 유발하여 OSCC 세포의 이동성 및 침습성에 영향을 주는지를 평가하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 shikonin 처리

인간 구강편평상피세포암종(OSCC) 세포주 CAL-27은 American Tissue Culture collection에서 구매하였다. CAL-27은 10 % FBS (Hyclone)과 1% penicilin-streptomysin (GIBCO-BRL, Rockville, Maryland)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 이용하여, 5 % CO₂ 와 37°C의 환경에서 배양하였다. Shikonin은 (Calbiochem, La Jolla, CA)에서 구입했으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용해 100 mM로 aliquot하여 -80°C에 보관하고 실험을 시행할 때 희석하여 사용하였다.

세포 생존율 분석

96-well plate에 CAL-27 (1.5X10⁴ cells/well) 세포를 분주하고, 다양한 농도 (10~50 μ M)의 shikonin을 처리하였다. 24시간 후 배지를 제거하고, 0.5 mg/ml 농도의 MTT 용액 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-

diphenyltetrazolium bromide)을 100 μ l씩 각 well에 분주하여 37°C에서 4시간 동안 처리하였다. DMSO로 형성된 formazan crystal을 녹인 후 ELISA reader (Tecan, Mänedorf, Switzerland)를 이용하여 620 nm의 파장으로 측정하였다.

세포 증식률 측정 (집락형성법)

6-well plate에 CAL-27 (3×10^5 cells/well) 세포를 분주하여 0-10 μ M 농도의 shikonin을 처리하고 7일간 배양하였다. 7일후 형성된 세포의 colony는 100 % methanol을 이용하여 10분간 고정처리 하였고, 1% crystal violet을 10분간 상온에서 염색한 후 증류수로 3회 세척하여 건조시켰다. 이후 광학 현미경으로 colony의 수를 세어 그래프로 나타내었다.

세포 이동성 분석

CAL-27 세포(1×10^6 cells/well)를 6-well plate에 분주하여 하루 동안 5 % CO₂ 와 37°C의 환경에서 배양하였다. 세포가 90-100 %로 채워졌을 때 1000 μ l pipette tip으로 중앙에 창상선을 만들고 PBS로 2회 세척한 후 shikonin 의 농도가 0, 10, 30 μ M 이 되도록 하여 48시간 동안 처리하였다. 24시간 단위로 디지털화된 이미지를 도립현미경 (Olympus CX-41, Tokyo, Japan) 및 디지털 카메라(Nikon Coolpix A300, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 이동한 세포의 면적을 대조군을 기준 1로 환산하여 비율을 나타내었다.

세포 침습성 분석

8.0 μ m pore size transwell (corning Costar, Cambridge, MA, USA)에 matrigel (200 μ g/ml)를 20 μ l 코팅하고 4시간동안 37°C 인큐베이터에서 건조시켰다. CAL-27 (1×10^5 /200 μ l)세포는 serum-free 배지에 아무것도 처리하지 않은 대조

군과 30 μ M의 농도의 shikonin을 희석하여 upper chamber 에 넣고, lower chamber에는 10% FBS가 포함된 배지 800 μ l 가해주었다. 48시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 배양한 후, 세포는 methanol으로 10분간 고정 하고, hematoxylin & eosin 염색을 각각 10분간 실시하여 도립현미경 (Olympus CX-41, Tokyo, Japan)으로 관찰하고 디지털 카메라(Nikon Coolpix A300, Tokyo, Japan)를 이용하여 이미지를 디지털화 하였다.

Western blot 분석

CAL-27 세포를 Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Cell signaling)를 이용하여 1시간동안 아이스에서 용해시킨 후, 13,200 rpm에서 30분간 원심분리하여 단백질을 분리하였다. Bradford protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 용해된 단백질의 농도를 정량화 하였고, 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 로딩하고, PVDF membrane에 옮겼다. Membrane 은 5% skim milk로 1시간동안 blocking 하고 난 뒤 1차 항체를 적용하여 2시간동안 반응시켰다. 각 membrane은 Tris-NaCl-EDT (TNE) buffer 로 60분간 5회 세척한 후 2차 항체를 처리하여 다시 TNE로 세척하는 과정을 거쳤다. 세척이 끝난 membrane은 supersignal West Femto (Pierce, Rockford, Illinois)과 Alphamager® HP System (Alpha Innotech; Santa Clara, USA) 이용하여 단백질의 발현을 확인하고 이미지를 디지털화 하였다.

Real time-PCR

CAL-27 세포주에서 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, DEU)를 이용하여 total RNA를 추출하였고, NanoDrop 2.0 spectrophotometer

(Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여 RNA의 농도를 측정했다. M-MLV cDNA Synthesis Kit (Enzymomics, Dajeon, KOR)를 이용해 합성된 cDNA는 Snail (Snail-F, 5'-GTTTACCTTCCAGCAGCCCT-3'; Snail-R 5'-TCCCAGATGAGCATTGGCAG-3'), Slug (Slug-F, 5'-ACCTATTCTACGTTCTCTGGGCT-3'; Slug-R 5'-CCGATTTCCAGACTGGTCATCA-3') 및 GAPDH (GAPDH-F, 5'-CACCATCTTCCAGGAGCGAG-3'; GAPDH-R 5'-AAATGAGCCCCAGCCTTC TC-3')의 primer를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다.

통계

모든 실험결과는 mean ± SD로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검사는 ANOVA와 Student's t-test를 실시하였으며, p 값이 0.05 미만 (p < 0.05)인 경우에 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 본 연구의 통계적 검정은 GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

결과

Shikonin에 의한 CAL-27 세포의 생존율과 증식율

Shikonin이 CAL-27 세포의 생존율에 미치는 효과를 확인하기 위해, CAL-27 세포에 shikonin을 24시간 동안 농도 별로 (0~50 μM) 처리하여 MTT assay를 실시하였다. 세포의 생존율은 30 μM의 농도로 처리한 세포에서 대조군에 비해 55%의 생존율을 나타내었으며, 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 1). 본 실험의 MTT 결과를

바탕으로 이후 실험의 shikonin처리 농도를 결정하였다. 집락형성법을 시행하여 shikonin이 CAL-27 세포의 증식률에 미치는 효과를 알아보았다. Shikonin은 농도 별로 (0~10 μM) 7일간 처리하였으며, 이후 crystal violet염색을 통해 세포 집락의 개수를 확인하였다. 대조군에 비해 shikonin 처리군에서 집락의 개수가 뚜렷하게 감소하였다. 본 연구에서 shikonin을 처리한 세포의 증식률이 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

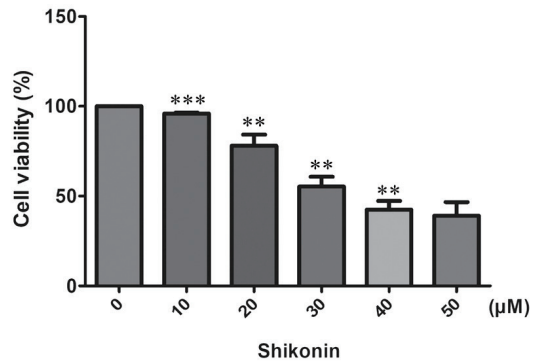


Fig 1. Effect of shikonin on the cell viability in CAL-27 OSCC cells. CAL-27 cells were treated with shikonin (0~50 μM) for 24 hours and cell viability was determined by using MTT assay. The data represents the mean ± SD (n=3). *** p < 0.001, ** p < 0.01

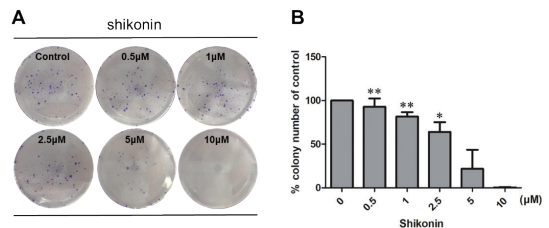


Fig 2. Effect of shikonin on cell proliferation. (A) CAL-27 cells were treated with shikonin (0~10 μM) for 7 days and stained with crystal violet. (B) The number of colonies was converted into a percentage and show in histogram. Each data represents the mean ± SD (n=3). ** p < 0.01, * p < 0.05.

Shikonin의 세포 이동성과 침습성 억제 효과

Shikonin에 의한 세포 이동성 변화를 확인하기 위해 wound healing 실험을 하였다. CAL-27 세포에 창상을 형성한 후, shikonin (10, 30 μ M)을 처리하였다. 24, 48시간동안 처리 후 창상의 넓이를 측정하였고, 세포가 이동한 면적의 넓이를 구하여 그래프로 나타내었다. 24시간 동안 처리한 군과 48시간 동안 처리한 군을 비교하였을 때, 세포가 이동한 면적은 대조군과 비교하여 10 μ M과 30 μ M에서 각각 0.8과 0.7, 0.6과 0.5로 시간 의존적, 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3A). 세포의 이동과 달리 침습성이 있는 세포는 기저막을 뚫고 통과할 수 있는 특징이 있다. 따라서 세포 침습성의 변화를 알아보기 위해 trans-well에 기저막 역할을 하는 materigel을 첨가하여, 48시간동안 materigel을 통과한 세포의 개수를 비교하였다. Shikonin을 처리한 세포는 대조군에 비해 materigel을 통과한 세포의 수가 확연히 감소하였다 (Fig. 3B)

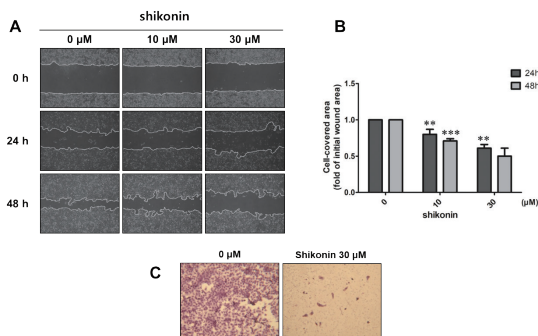


Fig 3. Effect of shikonin on cell migration and invasion. (A) CAL-27 cells were examined the effect of cell migration using wound-healing assay for treated with shikonin. (B) The fold of the initial wound area is shown in the histogram and each data represents the mean \pm SD of three experiments. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$. (C) Trans-well invasion assay was used to examine the invasion ability of shikonin-treated cells.

Shikonin의 EMT 관련 단백질과 mRNA의 발현 조절

EMT 유도 과정에서 상피세포인자 (epithelial marker)와 간엽세포인자 (mesenchymal marker)는 서로 상보적으로 작용하여, 상피세포인자는 감소하고, 간엽세포인자는 증가한다²². Shikonin을 농도 별로 처리한 CAL-27 세포에서 EMT에 관련된 단백질의 변화를 보기 위해 western blot 분석으로 측정하였다. 상피세포인자인 E-cadherin 단백질의 발현은 증가하였고, 간엽세포인자인 N-cadherin과 Slug 단백질의 발현은 감소하였다 (Fig. 4A). Shikonin을 처리한 세포에 간엽세포인자인 Snail과 Slug primer를 이용해 RT-PCR을 시행하였다. Snail과 Slug의 mRNA의 발현은 용량의존적으로 감소하였으며, 10 μ M에서 각 0.52와 0.17 수준으로 감소하였다. 본 실험 결과에서 shikonin이 CAL-27 세포의 EMT를 유도하는 단백질과 mRNA의 발현 수준을 감소시키고, 상피세포인자의 수준은 증가시킨다는 것을 나타내었다. 결과적으로 shikonin이 CAL-27 세포의 EMT를 억제시킨다는 것을 알 수 있었다.

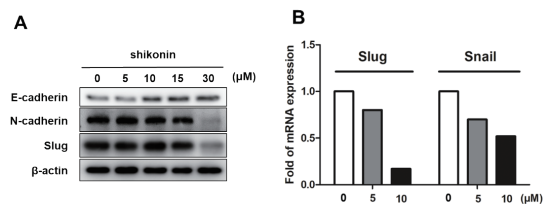


Fig 4. Effect of shikonin on expression of EMT-related protein and mRNA. Cells were treated with different concentration of shikonin for 24 h. (A) The expression level of EMT-related markers, such as E-cadherin, N-cadherin, Slug was verified by western blot analysis (B) and quantitative PCR.

총괄 및 고안

OSCC는 다발성 종양으로 발전할 가능성이 높고 진단 전에 전이될 확률이 높다²³⁾. 구강암의 경우 치료가 까다롭고 주변 근육이나 골조직, 경부 림프절로의 전이되거나 항암 치료 후에도 잦은 재발로 예후가 좋지 못하여, 치료과정 중 다른 암으로의 전이 및 재발 억제가 중요하게 여겨지고 있다^{24,25)}. Shikonin은 유방암, 방광암, 전립선 암세포 등 여러 논문에서 항암제로의 효과에 연구가 진행되었고 그것을 입증했지만^{26,27,28)}, OSCC에서 EMT의 억제를 통한 전이억제효과에 대해서는 여전이 불투명한 상태이다. 많은 연구에서 천연 화합물은 다양한 유형의 암에 대항하기 위해 사용될 수 있는 생물학적으로 유리한 특성을 가지고 있다고 보고되었다²⁹⁾. 본 연구에서는 천연물질에서 분리되어 합성된 shikonin이 OSCC에서 EMT 억제를 통한 세포의 이동성 및 침습성에 영향을 미치는지 확인하였다. 먼저, 세포의 생존율과 증식률을 확인하여 세포에 독성과 증식 억제 여부를 확인하였다. 약물반응을 수치화 하는 방법 중 세포의 절반을 최대로 억제하는 농도를 사용하는데 이를 IC50이라고 칭한다³⁰⁾. CAL-27세포에서 shikonin에 의한 IC50 (Half maximal inhibitory concentration)은 의 50 μ M 이상의 농도로 확인되었다. 또한 동일한 세포에서 세포 독성에 영향을 주지 않는 저 농도의 shikonin 을 설정한 후 세포의 집락형성 실험으로 증식율을 확인하였을 때 낮은 농도에서도 세포 CAL-27세포의 증식율을 억제 시킨다 것을 증명할 수 있었다.

세포의 이동성과 침습성이 증가하는 것은 전이의 특징이며, 암 치료에 의한 환자의 예후와 밀접한 연관성이 있다. 본 연구에서는 shikonin에 의한 전이성의 억제를 알아보기 위해 세포의 이동성 및 침습성에 대한 실험을 진행하였다. 30 μ M 의 shikonin은 CAL-27 세포의 이동율을 명확하게 억제하였고 matrigel을 코팅한 Trans-well 을 통과

하는 세포의 수도 확연하게 감소되는 것을 확인하였다. 상피세포가 장벽으로서의 역할을 하지 못하고 간엽세포의 특징을 가져 이동 하고 기저막을 뚫고 나가는 침습력을 가지게 되는데 상피-간엽 전환 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT)이라고 한다³¹⁾. 이와 연관성이 있는 유전자 중 epithelial marker로는 대표적으로 E-cadherin, mesenchymal marker로는 N-cadherin 이들을 조절하는 전사인자로는 Snail, Slug 등이 있다³²⁾. E-cadherin의 발현이 감소하면 상피성암세포는 간엽성 세포로 전환하면서 운동성이 생겨 세포의 침윤이 용이하게 되어 전이가 일어나는 것으로 알려져 있다³³⁾. Shikonin 이 처리된 CAL-27 세포에서 E-cadherin 단백질의 발현이 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 점차 증가하는 패턴을 보였으며, mesenchymal marker 인 N-cadherin 단백질의 발현은 감소하는 것을 확인하였다. 또한 real-time PCR을 통해 N-cadherin의 전사인자인 Snail과 Slug 또한 shikonin에 의해 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 종합하자면, 본 연구에서는 CAL-27 세포에서 shikonin에 의한 다양한 세포 이동 및 침습억제의 증거들을 통해 이 물질의 항전이 능력을 알아보았다. 본 연구 결과를 바탕으로 shikonin에 의한 다양한 기전을 확인한다면 shikonin이 구강편평상피세포암종에서 항전이능을 가진 효과적인 항암물질로 개발 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Rivera C (2015) Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8:11884-94
- Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PV, Liyanage RL, Dias KD, Tilakaratne WM (2012) Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 113:518-25. doi:10.1016/j.oooo.2011.11.001
- Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz PS, Santos TC (2013) Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci* 21:460-7. doi:10.1590/1679-775720130317
- Wang B, Zhang S, Yue K, Wang XD (2013) The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. *Chin J Cancer* 32:614-8. doi:10.5732/cjc.012.10219
- Omura K (2014) Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 19:423-30. doi:10.1007/s10147-014-0689-z
- 류선열, 박문성 (1996) 구강암 환자에 대한 후향적 연구. *대한구강악안면외과학회지* 22:643-58
- Savagner P (2010) The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Annals of oncology* 21:vii89-vii92. doi: 10.1093/annonc/mdq292
- Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA (2018) EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer* 18:128
- Chen X, Yang L, Oppenheim JJ, Howard MZ (2002) Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. *Phytother Res* 16:199-209. doi:10.1002/ptr.1100
- Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto T (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports* 1:61-63
- Assimopoulou A, Boskou D, Papageorgiou V (2004) Antioxidant activities of alkannin, shikonin and *Alkananna tinctoria* root extracts in oil substrates. *Food Chemistry* 87:433-38. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.12.017
- Lee Y-S, Lee D-Y, Kim YB, Lee S-W, Cha S-W, Park H-W, Kim G-S, Kwon D-Y, Lee M-H, Han S-H (2015) The mechanism underlying the antibacterial activity of Shikonin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015. doi:10.1155/2015/520578
- Papageorgiou V, Assimopoulou A, Ballis A (2008) Alkannins and shikonins: a new class of wound healing agents. *Current medicinal chemistry* 15:3248-67. doi: 10.2174/092986708786848532
- Huang WR, Zhang Y, Tang X (2014) Shikonin inhibits the proliferation of human lens epithelial cells by inducing apoptosis through ROS and caspase-dependent pathway. *Molecules* 19:7785-97. doi:10.3390/molecules19067785
- Jing H, Sun W, Fan J, Zhang Y, Yang J, Jia J, Li J, Guo J, Luo S, Zheng Y (2016) Shikonin induces apoptosis of HaCaT cells via the mitochondrial, Erk and Akt pathways. *Mol Med Rep* 13:3009-16. doi:10.3892/mmr.2016.4917
- Ko H, Kim SJ, Shim SH, Chang H, Ha CH (2016) Shikonin Induces Apoptotic Cell Death via Regulation of p53 and Nrf2 in AGS Human Stomach Carcinoma Cells. *Biomol Ther (Seoul)* 24:501-9. doi:10.4062/biomolther.2016.008
- Min R, Tong J, Wenjun Y, Wenhui D, Xiaojian Z, Jiakai H, Jian Z, Wantao C, Chenping Z (2008) Growth inhibition and induction of apoptosis in human oral squamous cell carcinoma Tca-8113 cell lines by Shikonin was partly through the inactivation of NF-kappaB pathway. *Phytother Res* 22:407-15. doi:10.1002/ptr.2340
- Tian R, Li Y, Gao M (2015) Shikonin causes cell-cycle arrest and induces apoptosis by regulating the EGFR-NF-kappaB signalling pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biosci Rep* 35. doi:10.1042/BSR20150002
- Hsieh YS, Liao CH, Chen WS, Pai JT, Weng MS (2017) Shikonin Inhibited Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cells via Suppression of c-Met-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *J Cell Biochem* 118:4639-51. doi:10.1002/

- jcb.26128
20. Liu JP, Liu D, Gu JF, Zhu MM, Cui L (2015) Shikonin inhibits the cell viability, adhesion, invasion and migration of the human gastric cancer cell line MGC-803 via the Toll-like receptor 2/nuclear factor-kappa B pathway. *J Pharm Pharmacol* 67:1143-55. doi:10.1111/jphp.12402
 21. Oh S-H, Park S-J, Yu S-B, Kim Y-H, Kim I-R, Park B-S (2015) Mechanism Underlying Shikonin-induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest on SCC25 Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line. *International Journal of Oral Biology* 40:51-61. doi:10.11620/ijob.2015.40.1.051
 22. Zeisberg M, Neilson EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation* 119:1429-37. doi:10.1172/JCI36183
 23. Janes SM, Watt FM (2006) New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 6:175-83. doi:10.1038/nrc1817
 24. Lai W-W, Hsu S-C, Chueh F-S, Chen Y-Y, Yang J-S, Lin J-P, Lien J-C, Tsai C-H, Chung J-G (2013) Quercetin inhibits migration and invasion of SAS human oral cancer cells through inhibition of NF- κ B and matrix metalloproteinase-2/-9 signaling pathways. *Anticancer research* 33:1941-50. doi:0250-7005/2013
 25. Chien M-H, Ying T-H, Hsieh Y-S, Chang Y-C, Yeh C-M, Ko J-L, Lee W-S, Chang J-H, Yang S-F (2012) *Dioscorea nipponica* Makino inhibits migration and invasion of human oral cancer HSC-3 cells by transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase-2 through modulation of CREB and AP-1 activity. *Food and chemical toxicology* 50:558-66. doi:10.1016/j.fct.2011.12.016
 26. Wang Y, Zhou Y, Jia G, Han B, Liu J, Teng Y, Lv J, Song Z, Li Y, Ji L (2014) Shikonin suppresses tumor growth and synergizes with gemcitabine in a pancreatic cancer xenograft model: Involvement of NF- κ B signaling pathway. *Biochemical pharmacology* 88:322-33. doi:10.1016/j.bcp.2014.01.041
 27. Guo X, Zhang X, Zhang S (1991) Clinical trial on the effects of shikonin mixture on later stage lung cancer. *Zhong xi yi jie he za zhi Chinese journal of modern developments in traditional medicine* 11:598-9, 80.
 28. Hou Y, Guo T, Wu C, He X, Zhao M (2006) Effect of shikonin on human breast cancer cells proliferation and apoptosis in vitro. *Yakugaku Zasshi* 126:1383-86. doi:10.1248/yakushi.126.1383
 29. Rates SMK (2001) Plants as source of drugs. *Toxicol* 39:603-13. doi:10.1016/S0041-0101(00)00154-9
 30. Sebaugh J (2011) Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics* 10:128-34. doi:10.1002/pst.426
 31. Kalluri R (2009) EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation* 119:1417-19. doi:10.1172/JCI39675
 32. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420-8. doi:10.1172/JCI39104
 33. Cavallaro U, Christofori G (2001) Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1552:39-45. doi:10.1016/S0304-419X(01)00038-5

ABSTRACT**Shikonin inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma**

Dan-Bi Park*, Bong-Soo Park*, Hae-Mi Kang, Su-Bin Yu, In-Ryoung Kim

Department of Oral Anatomy, Pusan National University School of Dentistry

Oral cancer invades the surrounding muscles and bone tissue and metastasizes to the cervical lymph nodes. The 5-year survival rate of patients with metastases is about 40%, and it is necessary to develop anti-cancer drugs that suppress metastasis to improve the prognosis of patients. In epithelial-mesenchymal transition (EMT), the squamous cancer cells have mobility, which increases the invasiveness and metastasis to new organs. Therefore, EMT inhibition is considered a therapeutic method for inhibiting the metastasis of cancer cells. Shikonin has been isolated and purified from *Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc* and is widely known for its anti-inflammatory effect. Recently, shikonin has been shown to induce apoptosis and cell cycle arrest in various cancer cells and to inhibit the metastatic properties of lung and gastric cancer cells. However, the effects of shikonin on oral cancer are still unclear. Therefore, we investigated the effect of EMT inhibition on shikonin-treated oral cancer cell line, CAL-27 cells. Shikonin treatment inhibited the viability and proliferation of CAL-27 cells. In addition, shikonin inhibited their migration and invasion in wound-healing and transwell invasion assays. Shikonin increased the protein expression of E-cadherin, an epithelial marker in CAL-27 cells, and decreased the protein and RNA expression of mesenchymal markers like N-cadherin, Snail, and Slug. Therefore, shikonin inhibited the epithelial-mesenchymal metastasis of oral cancer cell line CAL-27, suggesting that it may be an anticancer agent with an anti-metastatic effect.

Keywords: Shikonin, EMT, migration, invasion, OSCC