



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0054565
(43) 공개일자 2022년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 15/08 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0048489(분할)
(22) 출원일자 2022년04월19일
심사청구일자 2022년04월19일
(62) 원출원 특허 10-2019-0167710
원출원일자 2019년12월16일
심사청구일자 2019년12월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동
803호
임화선
서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호
함지연
서울특별시 성북구 고려대로 38-1, 402호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 8 항

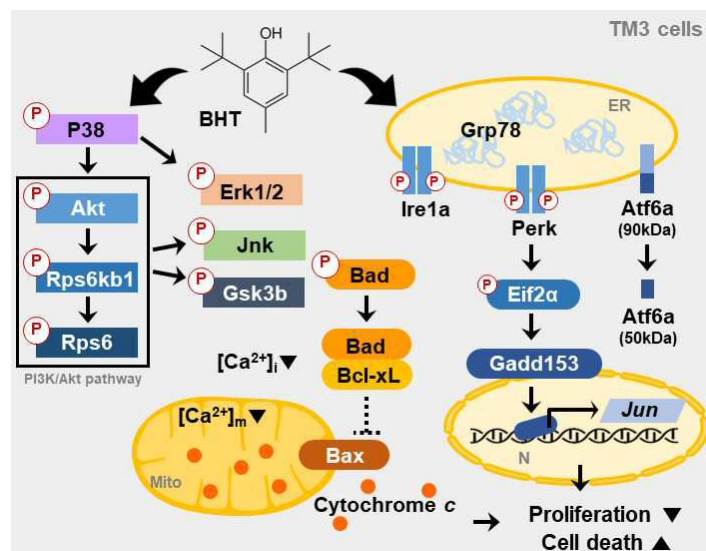
(54) 발명의 명칭 부틸히드록시아니솔, 부틸히드록시톨루엔 또는 이들의 혼합물을 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT) 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 고환 세포주의 증식을 억제하고, 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 고환 세포주의 비정상적 증식에 의한 남성 생식기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품, 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61P 15/08 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345303639

과제번호 2016R1D1A1B03934186

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구

연구과제명 sideroxylin의 역할 규명 부인암 예방 및 치료를 위하여 병솔꽃나무 (*Callistemon lanceola*)에서 추출한

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT)을 유효성분으로 포함하고,

라이디히(Leydig) 세포의 과증식에 의해 유발되며, 라이디히 세포 종양, 고환염, 부고환염, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택되는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 BHT는 MAPK 신호전달기전을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 BHT는 소포체 스트레스를 유도하는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT)을 유효성분으로 포함하고,

라이디히(Leydig) 세포의 과증식에 의해 유발되며, 라이디히 세포 종양, 고환염, 부고환염, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택되는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 BHT는 MAPK 신호전달기전을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 BHT는 소포체 스트레스를 유도하는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항의 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 라이디히 세포의 증식 능력을 억제시키는 방법.

청구항 8

제1항의 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 라이디히 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT) 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및

남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 고환에는 테스토스테론과 같은 스테로이드 호르몬을 합성하는 것을 주요 기능으로 하는 간질 세포인 라이디히 세포(Leydig cell)와 정세관에서 정자형성과정을 통해 생식 세포를 발달시키는 세르톨리 세포(Sertoli cell)가 존재한다. 칼슘이온에 의해 활성화되는 신호전달 경로는 라이디히 세포에서는 스테로이드신생성과 관련이 있으며, 세르톨리 세포에서는 정자 배출과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Lyon *et al.*, Biol Reprod, 2017).
- [0003] 정자형성과정이 일어나는 동안, 세포질 내 칼슘이온의 농도가 증가하면 세르톨리 세포의 사멸이 일어나며 남성 불임이 유발될 수 있는 것으로 알려져 있다(Liz *et al.*, Free Radic Biol Med, 2013). 이처럼, 고환에서 칼슘 항상성의 유지는 수정 능력이나 스테로이드합성 또는 정자형성과정과 같은 역할을 수행하는데 있어 매우 중요하다(Sullivan *et al.*, Mol Cell Endocrinol, 1984; Ogunbayo *et al.*, Toxicol In Vitro, 2008).
- [0004] 한편, 부틸히드록시아니솔(BHA) 및 부틸히드록시톨루엔(BHT)은 합성 페놀류 항산화제로서 지방의 산패를 막는 성질이 있어 식품 보존제로서 널리 사용되어 왔다. 이들 물질은 전사수준에서 스테로이드 합성을 저해한다고 알려진 바 있으며, BHT의 경우 호르몬에 민감한 기관들에서 항-에스트로겐, 항-안드로겐 활성 효과가 보고된바 있으며(Yang *et al.*, Environ Sci Technol, 2018; Pop *et al.*, Toxicol In vitro, 2016; Pop *et al.*, J Appl Toxicol, 2018), BHA의 경우 설치류의 Steroid 5 Alpha-Reductase 1 (Srd5a1)와 경쟁적 저해제 또는 사람과 쥐 모두에서 Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2 (HSD11B2)에 대한 선택적 저해제로 작용될 수 있음이 보고된바 있다(Guo *et al.*, Neurosci Lett, 2017; Li *et al.*, Pharmacology 2016).
- [0005] 이처럼, BHA 및 BHT에 대한 다양한 기능 및 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 이들의 남성 생식기 질환 치료 효과는 보고된바 없다.
- [0006] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 남성 생식기 질환 치료 물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, BHA 또는 BHT가 고환 세포주의 증식을 억제하고, 세포의 사멸효과를 향상시키는 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT) 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT) 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 고환 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 고환 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT) 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT) 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 고환 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 고환 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 고환 세포주의 증식을 억제하고, 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 고환 세포주의 비정상적 증식에 의한 남성 생식기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품, 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 BHA 또는 BHT의 처리가 고환 세포주의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 2는 BHA 또는 BHT의 처리가 고환 세포주의 칼슘항상성 저해에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 3은 BHA 또는 BHT의 처리가 고환 세포주 내 미토콘드리아성 단백질의 양 또는 인산화 양상에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 4는 BHA 처리에 의한 고환 세포주 내 미토콘드리아 탈분극 유도 및 BHT에 의한 라이디히 세포 내 DNA 분절화 유도 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 5는 BHA 또는 BHT의 처리에 따른 소포체 스트레스 유도 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 6은 BHA 또는 BHT 처리에 따른 고환 세포주 내 mRNA 발현 수준 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 7은 BHA 또는 BHT가 고환 세포주 내 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 8은 BHA와 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 고환 세포주 내 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 9는 BHT와 신호전달기전 억제제 병용처리가 고환 세포주의 증식, MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 10은 BHA 또는 BHT의 처리가 in vivo 환경을 모방한 TM3, TM4 회전타원체 형성에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
 도 11은 BHA의 고환 세포주 내 작용 기전을 나타낸 것이다.
 도 12는 BHT의 고환 세포주 내 작용 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0019] 본 발명에서는 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT)에 의한 고환 세포주의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 11-12).

[0020] 본 발명은 일 관점에서 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 다른 관점에서 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0023] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0024] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기

담체는 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 것을 특징으로 할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 할 수 있고, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 용액, 현탁액, 에멀전, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6722호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 식품을 의미한다.

[0028] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있고, 과립제, 정제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 겔, 차, 젤리, 각종 음료수, 드링크제, 알코올 음료 등으로 제조될 수 있으며, 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다.

[0029] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 인체를 비롯한 동물 신체에 투여하기 적합한 임의의 생약 형태, 더욱 구체적으로는 경구 투여에 통상적인 임의의 형태, 예를 들어 식품 또는 사료, 식품 또는 사료의 첨가제 및 보조제, 강화된 식품 또는 사료, 정제, 환제, 과립, 캡슐 및 발포 배합물 등과 같은 고체 형태 또는 용액, 현탁액, 유화액, 음료, 페이스트 등과 같은 액체형태 일 수 있고, 영양제, 비타민, 전해질, 감미제, 착색제, 유기산, 방부제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분들을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물이 고환 세포주의 증식과 관련된 PI3K/AKT, MAPK 신호전달 기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물이 소포체 스트레스를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물이 미토콘드리아 기능장애 및 칼슘항상성 저해를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 BHA, BHT 또는 이들의 혼합물이 스테로이드 생합성, 세포주기, 호르몬 수용체 및 정자 형성과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 남성 생식기 질환은 고환 세포주의 비정상적 증식에 의한 것이라면 모두 가능하며, 예를 들어 라이디히(Leydig) 세포 종양, 세르톨리(Sertoli) 세포 종양, 고환염, 부고환염, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0036] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0038] 본 발명은 다른 관점에서, BHA, BHT 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물을 이용하여 고환 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명은 또 다른 관점에서, BHA, BHT 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물을 이용하여 고환 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

- [0041] [실시예]
- [0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0044] <실험 방법>
- [0045] 실험 재료
- [0046] 후보 조성물질인 BHA 및 BHT는 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 이에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-Erk1/2, P38 MAPK, Jnk, Rps6ka1, AKT, Rps6kb1, Rps6, Gsk3 β , Eif2 α , Bax, Bak, Bad, Bcl-xL Cytochrome c 단백질 및 total-Erk1/2, P38 MAPK, Jnk, Rps6ka1, AKT, Rps6kb1, Rps6, Gsk3 β , Eif2 α 에 대한 항체를 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. p-Perk, t-Perk, Chop, α -tubulin (Tuba) 그리고 Pcnal는 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구매하였다. 또한, 신호전달 억제제로서 PI3K 억제제인 LY294002, ERK1/2 억제제인 U0126 및 JNK 억제제인 SP600125를 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.
- [0048] 세포배양
- [0049] TM3(immature mouse leydig cell), TM4 (immature mouse sertoli cell) 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.
- [0051] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석
- [0052] 마우스 고환 세포주의 증식 능력에 BHA와 BHT가 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 3×10^3 개의 세포와 배지 100 μ l를 96 well에 분주하고 BHA 및 BHT를 용량의존적으로 (0, 10, 20, 50, 75, 100 μ M) 처리하여 24시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 후, 10 μ M BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37 $^{\circ}$ C/5% CO $_2$ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 라이디히 세포와 세르톨리 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어주었다. 마지막으로 100 μ l의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응시키고 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.
- [0054] 면역형광법
- [0055] 3×10^4 개의 라이디히 세포 및 세르톨리 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μ l와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 BHA 및 BHT를 100 μ M으로 24시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, Santa Cruz Biothecnology사에서 구입하여 2 μ g/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이 후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)가 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A-11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간동안 배양하였고, 이후, 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 세포 내 타겟 단백질뿐만 아니라 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0057] Propidium iodide (PI)를 이용한 세포주기 분석

[0058] BHA, BHT의 마우스 고환 세포주의 세포주기의 정지 효과를 확인하기 위하여 BD Biosciences사의 Propidium iodide (PI) 시약을 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 1×10^5 세포를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, BHA 및 BHT를 용량의존적으로 (0, 10, 20, 50, 75, 100 μ M) 처리하여 24시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 2번 워싱을 진행하고 70%의 에탄올로 고정시켜 4°C에 하루 동안 보관하였다. 다음으로 PBS로 2번 워싱을 진행하고 10 mg/ml의 RNase A 5 μ L, 50 mg/ml PI 5 μ L을 PBS에 함께 혼합하여 실온에 30분 동안 빛을 차단한 채 염색하였다. 이후, PBS를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮기고, 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 세포주기의 변화를 측정하였다.

[0060] Fluo-4 AM 염색을 통한 세포질 내 칼슘농도 변화 측정

[0061] 세포질 내 칼슘농도를 측정하기 위해 Fluo-4 AM을 사용하여 측정하였다. 1×10^5 개의 라이디히 및 세르틀리 세포를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, BHA 또는 BHT를 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포를 Fluo-4 staining solution에 풀어준 후 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 PBS로 워싱한 후 다시 원심분리로 세포 pellet을 얻었고, 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0063] Rhod-2 AM 염색을 통한 미토콘드리아 기질 내 칼슘 농도 측정

[0064] 세포질 내 칼슘농도를 측정하기 위해 Rhod2-AM을 사용하여 측정하였다. 1×10^5 개의 마우스 고환 세포주를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, BHA 또는 BHT를 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포를 Rhod2 staining solution에 풀어준 후 빛을 차단시켜 4°C 냉장상태 내에서 30분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 HBSS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺) 500 μ L로 세포 pellet을 풀어준 후 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 10분 배양하였으며, 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0066] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0067] 마우스 고환 세포에 BHA, BHT 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 고환 세포주로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95°C에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음, chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약, ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0069] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0070] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 1×10^5 개의 마우스 고환 세포를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, BHA를 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 JC-1 staining solution에 풀어준 후 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하

였다.

[0072] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석

[0073] 3×10^4 개의 마우스 라이디히 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μ l와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 BHT 100 μ M을 24시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 한번 헹구내고 0.1% sodium citrate에 0.1% Triton X-100가 함유된 용액을 사용하여 아이스 위에서 2분간 인큐베이션 시켰다. 다음으로 In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche)에 포함된 TUNEL staining mixture를 사용하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 PBS로 헹구고 DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0075] 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응

[0076] BHA 및 BHT를 처리한 라이디히 및 세르톨리 세포를 Trizol reagent를 통해 제조사의 매뉴얼 대로 RNA 추출을 수행하였다. cDNA는 total RNA 1 μ g과 AccuPower premix로 합성하였으며, 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma-Aldrich)과 StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)로 측정하였다. 타겟 유전자의 발현은 C_T값으로 계산하였으며, GAPDH 발현을 기준으로 표준화하였다. PCR 조건은 95°C로 3분 진행한 후, 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초 조건을 40회 증폭하였다.

[0078] 회전타원체(Spheroid)의 형성

[0079] 라이디히 및 세르톨리 세포를 high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에 10%의 소태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)를 넣어 만든 배지에 풀어 10 ml의 단세포화물(single-cell suspension)으로 만든 후, 100-mm 조직배양 접시 뚜껑에 세포방울(cell drops) 당 6000개의 세포의 농도로 25 μ l 씩 분주하였다. 건조를 방지하기 위해 배양접시에 PBS 10 ml를 분주하고, 세포가 분주된 배양접시 뚜껑을 뒤집어 덮었다. 세포방울들을 2~3일간 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후 Leica DM2500으로 형성된 회전타원체를 찍은 후, 이미지 분석을 진행하였다. 통계적 처리를 위해, 3개의 다른 이미지들이 사용되었다.

[0081] 통계분석

[0082] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0084] **<결과 및 고찰>**

[0085] BHA 및 BHT의 마우스 TM3 (라이디히 세포)와 TM4 (세르톨리 세포)에 대한 증식 억제 효과

[0086] BHA 및 BHT가 마우스 고환 세포인 TM3와 TM4 세포에 대해 항증식 효과를 보이는지 알아보기 위해, BrdU를 이용한 세포증식 분석을 진행하였다 (도 1). BHA의 경우, 마우스 라이디히 세포(TM3)와 세르톨리 세포(TM4)에 모두 항증식 효과를 보였으며 100 μ M까지 처리하였을 때, 세포 증식률이 50%(TM3), 35%(TM4)까지 감소하는 결과를 보였다 (도 1A). BHT의 경우, TM3에서만 특이적으로 항증식 효과를 보였고, 역시 100 μ M의 농도에서 48%가량 세포증식 능력이 감소됨을 보였다 (도 1D). 초록색 형광을 띄는 PCNA 단백질은 세포증식의 마커로서, 면역형광법을 통해 상대적인 발현량을 비교하였다. 앞선 결과와 동일하게, PCNA의 발현이 대조군에 비해 BHA 처리시 약 62%(TM3), 80%(TM4) 감소하였으며 ($p < 0.001$), BHT를 처리한 그룹에서는 79% 가량 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.01$) (도 1B, 1E). 마지막으로, 세포주기 양상을 PI 염색을 통해 분석한 결과, BHA 또는 BHT 용량의존적 처리시 sub-G1의 세포 수가 약 1.6~2배 증가하거나 G0/G1의 세포수 감소를 확인하였다 (도 1C, 1F). 이러한 결과를 통해 BHA는 마우스 고환 세포주에서 세포 증식을 억제하고 세포주기의 정지를 일으

키며, BHT는 TM3에 특이적으로 세포 증식을 억제한다는 것을 확인하였다.

- [0088] BHA 또는 BHT에 의해 유도된 TM3, TM4 세포의 미토콘드리아 기능 장애 및 미토콘드리아성 단백질 발현 변화 분석
- [0089] 칼슘항상성에 대한 BHA 또는 BHT의 영향에 대해 알아보기 위해, Fluo4-AM과 Rhod2-AM 염색을 통해, 세포질 또는 미토콘드리아 내 상대적인 칼슘 이온 농도에 대해 측정하였다 (도 2). BHA 또는 BHT를 마우스 라이디히 세포 (TM3)에 용량의존적으로 (0, 10, 20, 50, 75, 100 μ M) 처리하였을 때, 세포질 내 칼슘 농도는 대조군(100%)에 비해 48.5%(BHA), 74.5%(BHT)까지 감소하였으며, 미토콘드리아 기질 내 칼슘 이온 농도 역시 76.4%(BHA), 68.1%(BHT)까지 유의적으로 감소하는 경향을 보였다 ($p < 0.001$) (도 2A, 2C, 2E, 2F). 이와는 반대로, BHA를 용량의존적으로 마우스 세르톨리 세포(TM4)에 처리하였을 때, 세포질 및 미토콘드리아 내 상대적인 칼슘이온 농도는 각각 1.85, 3.93배까지 유의적으로 증가하였다 (도 2B, 2D). 또한, 미토콘드리아성 세포자멸사에 관여하는 여러 미토콘드리아성 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 먼저 BHA 처리시, 라이디히 세포 및 세르톨리 세포 모두에서 프로아포토틱 단백질인 Bax, Bak, cytochrome *c*의 단백질이 1.4배까지 유의적으로 증가하였으며, 안티아포토틱 단백질인 Bcl-xL의 양 및 Bad의 인산화가 감소하였다 (도 3A-3D). 이어서, TM3에 BHT를 용량의존적으로 (0, 20, 50, 100 μ M) 처리하였을 때에도, Bak을 제외하고 프로아포토틱 단백질(Bax, cytochrome *c*)은 발현량이 1.5~1.6배 증가하고, 안티아포토틱 단백질(Bad, Bcl-xL)은 20~30% 가량 감소하는 경향을 보였다 (도 3E). 이외에도 BHA 처리 시 두 고환 세포주에서 미토콘드리아 탈분극이 유도되었으며, BHT 처리시 라이디히 세포에서 DNA분절화가 유도된 것을 붉은 형광으로 표시하는 면역형광법을 통해 확인하였다 (도 4). 이러한 결과를 통해 BHA 및 BHT는 마우스 고환 세포주에서 칼슘 항상성을 저해하고 미토콘드리아성 세포자멸사를 유도한다는 것을 확인하였다.
- [0091] BHA 또는 BHT 처리에 따른 마우스 라이디히 세포 및 세르톨리 세포 내 소포체 스트레스 유도 효과 분석
- [0092] BHA 및 BHT 처리시 라이디히 세포와 세르톨리 세포에서 소포체 스트레스가 유도되는지의 여부를 확인하기 위해 웨스턴 블랏을 시행하였다 (도 5). 먼저, BHA를 TM3와 TM4 세포에 용량의존적으로 (0, 20, 50, 100 μ M) 처리하였을 때, 두 세포 모두에서 소포체 스트레스의 초기 신호인 Perk 단백질의 인산화가 1.6배(TM3), 1.8배(TM4)까지 점진적으로 증가한 것을 확인하였다 (도 5A). 뒤이어, 하위 신호로 알려진 Eif2 α 의 인산화 및 Chop의 단백질 양도 대조군에 비해 1.5배에서 2.8배까지 유의적으로 증가한 것을 확인하였다 (도 5B-C). BHT를 TM3 세포에 처리하였을 때에는 위처럼 Perk, Eif2 α 의 인산화 및 Chop의 증가 뿐만 아니라 다른 초기 신호로 알려진 Grp78, active Atf6 α , Ire1 α 의 단백질 발현 또한 유의적으로 증가하였다 (도 5D-E). 이러한 결과를 통해 BHA 및 BHT는 마우스 고환 세포주 내에서 소포체 스트레스를 유도한다는 것을 확인하였다.
- [0094] BHA 및 BHT에 따른 라이디히 세포와 세르톨리 세포 내 mRNA 발현 조절 효과 분석
- [0095] 마우스 라이디히 세포 및 세르톨리 세포 내 BHA 및 BHT 처리시 mRNA의 발현 수준변화를 확인하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 먼저 100 μ M의 BHA 처리 시, 스테로이드 신생성에 관련된 효소를 암호화하는 유전자들인 Star, Hsd17b1, Srd5a1, Srd5a3의 발현이 대조군에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인하였다 (도 6A). 또한, 전사인자로서 생식세포의 발달이나 호르몬 조절에 관여한다고 알려진 Jun, Junb, Jund의 유전자 발현도, 라이디히 세포에서 Jund의 발현을 제외하고는 모두 유의적으로 감소하였다. 이외에 Ins13, Inbha, Ar의 유전자 발현은 조직별로 다른 양상을 보였다.
- [0096] 100 μ M의 BHT를 마우스 라이디히 세포에 처리하였을 때, Ccnd1, Cdk4, Ccne1과 같이 세포주기 진행에 관련된 유전자들은 각각 58%, 21%, 54%씩 감소하고, 이를 막는 P21은 9배 가량 증가하여, 앞선 세포주기분석 실험과 상응하는 결과를 보였다. 하지만, 스테로이드 신생성과 관련된 유전자인 Star, Cyp19a1, Hsd17b1은 대조군에 비해 BHT 처리시 증가하는 경향을 보였지만, Srd5a1과 Srd5a3는 감소하는, 각기 다른 경향을 보였다 (도 6B). 또한, Lhr의 발현은 1.2배 가량 약간 증가한 반면, Egfr 및 Jud의 발현은 대조군에 비해 각각 50%, 20% 감소하였다.
- [0098] BHA 및 BHT 처리시 TM3, TM4 세포 내 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 기전의 변화 양상 분석

[0099] BHA 및 BHT 처리에 따른 마우스 고환 세포주 내 MAPK 및 PI3K/AKT pathway 신호전달 기전을 파악하기 위해 웨스턴 블랏을 수행하였다. 먼저, BHA를 용량의존적으로 (0, 20, 50, 100 μ M) 마우스 라이디히그 및 세르톨리 세포에 처리시 Rps6ka1을 제외하고는 두 세포주 모두 MAPK 신호전달 경로(Erk1/2, P38, Jnk)의 인산화가 증가함을 확인하였다 (도 7A). Rps6ka1의 인산화는 라이디히 세포에서 최대 1.49배까지 증가했지만, 세르톨리 세포에서는 0.53배까지 감소하였다. Pi3k/Akt 신호전달 경로의 경우, 라이디히 세포에서는 BHA 처리에 따라 Akt의 감소부터 하위 신호인 Rps6kb1, Rps6가 각 29%, 19%, 69%씩 유의적으로 감소하였다 (도 7B). 반대로 세르톨리 세포에서는 BHA 처리에 따라 Akt와 Rps6kb1만 약간 증가하고, Rps6에서는 유의적인 변화가 없었다 (도 7B). BHA와는 반대로 BHT 처리시 라이디히 세포 내 Pi3k/Akt 신호전달 경로의 단백질들의 인산화가 모두 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 7C). Rps6ka1의 발현량이 대조군에 비해 19% 정도 약간 감소하는 경향을 보인 외에는 Erk1/2, Jnk, P38의 인산화 경향이 1.4 ~ 3.2배 가량 증가함을 확인하였다 (도 7D). 이러한 결과를 통해, BHA 또는 BHT는 MAPK 신호전달 경로를 활성화 시키고, PI3K/AKT 신호전달 경로를 조절한다는 것을 확인하였다.

[0101] 신호전달기전 억제제와 BHA 또는 BHT 병용처리시 TM3, TM4 세포의 증식 및 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 기전의 변화 양상 분석

[0102] 세포내 BHA와 BHT가 미치는 영향에 대한 기전을 좀 더 확실히 하기 위해, 신호전달 기전 억제제와 병용처리를 하여 추가 실험을 진행하였다. 마우스 고환 세포에 대한 BHA의 항증식 효과에 대해서는 U0126 (Erk1/2 억제제)와 SP600125 (Jnk 억제제) 처리시 시너지 효과를 보였다 (도 8A). BHA에 의해 유도된 Erk1/2의 인산화는 U0126, SP600125와의 병용 처리시 억제되었으며, JNK의 인산화는 세 가지의 억제제와의 병용 처리에 의해 모두 억제되었다 (도 8B). BHA에 의해 감소된 Akt와 Rps6 단백질의 불활성화는 U0126, SP600125 처리시 회복되는 양상을 보였다 (도 8C). 또한, Rps6kb1의 인산화는 LY294002 (Akt 억제제)에 의해 완전히 억제되었고, SP600125 병용 처리에 의해 TM3 세포에서 원래대로 회복되는 양상을 보였다 (도 8C). TM4 세포에서도 U0126과 SP600125 처리시 Akt경로의 신호전달 단백질들의 발현 수준이 회복되는 양상을 보였다.

[0103] BHT의 경우, U0126과 SP600125와의 병용처리는 마우스 라이디히 세포의 증식을 억제하는데 시너지 효과를 보였으며, SB203580 (P38 억제제)을 같이 처리하였을 때에는 세포 증식이 약간 회복되는 양상을 보였다 (도 9A). 신호전달 경로의 경우, PI3K/AKT 경로에서 LY294002 및 SB203580에 의해 인산화가 억제되는 결과를 보였으며, Rps6의 경우 U0126과 SP600125 처리시 원래의 수준을 회복하는 양상을 보였다 (도 9B). 반대로, BHT에 의해 유도되었던 JNK의 활성화는 U0126과 SB203580과 함께 처리 시 더욱 활성화 되는 양상을 보였으며, LY294002 처리시에는 원래 수준으로 회복하려는 양상을 보였다 (도면 9C). BHT에 의한 P38의 인산화는 SB203580을 제외한 어떠한 억제제와 병용 처리를 하여도 본래의 인산화 수준으로 회복되는 양상을 보이지 않았다 (도 9C).

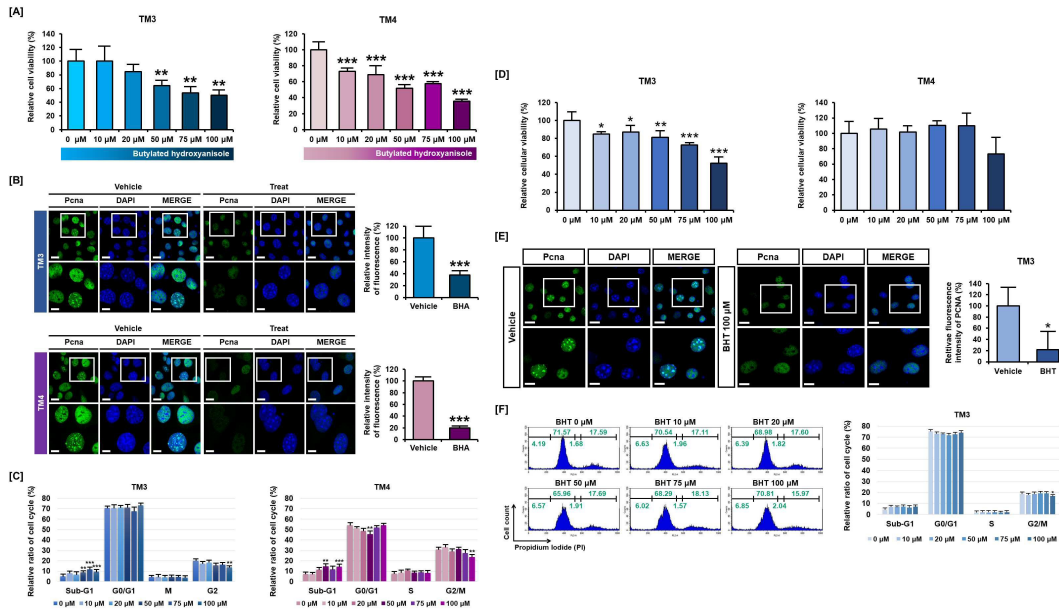
[0105] BHA 및 BHT의 처리가 in vivo 환경을 모방한 TM3, TM4 회전타원체 형성에 미치는 영향 분석

[0106] 3D in vivo 환경을 모방한 시스템인 회전타원체 배양 방법을 이용하여, BHA 및 BHT의 회전타원체 형성이 미치는 영향을 확인하였다. BHA (100 μ M)를 처리한 배지에서 TM3와 TM4의 회전타원체의 형성은 대조군을 처리한 배지에서 형성된 회전타원체보다 크기가 각 30%(TM3), 19%(TM4) 감소하였고, 밀도 역시 각 45% (TM3), 73%(TM4)씩 감소하였다 (도면 10A-B). BHT (100 μ M)의 경우, TM4는 대조군과 처리군에서 유의적인 차이가 없었던데 반해, TM3로 만든 회전타원체에서는 크기가 약 10% 감소하였고, 밀도는 21% 감소하였다 (도면 10C-D). 이를 통해, in vitro에서 수행했던 결과처럼 in vivo를 모방한 환경에서도 BHA와 BHT가 TM3 또는 TM4 세포에 대해 세포증식억제 및 사멸효과가 있음을 간접적으로 증명하였다.

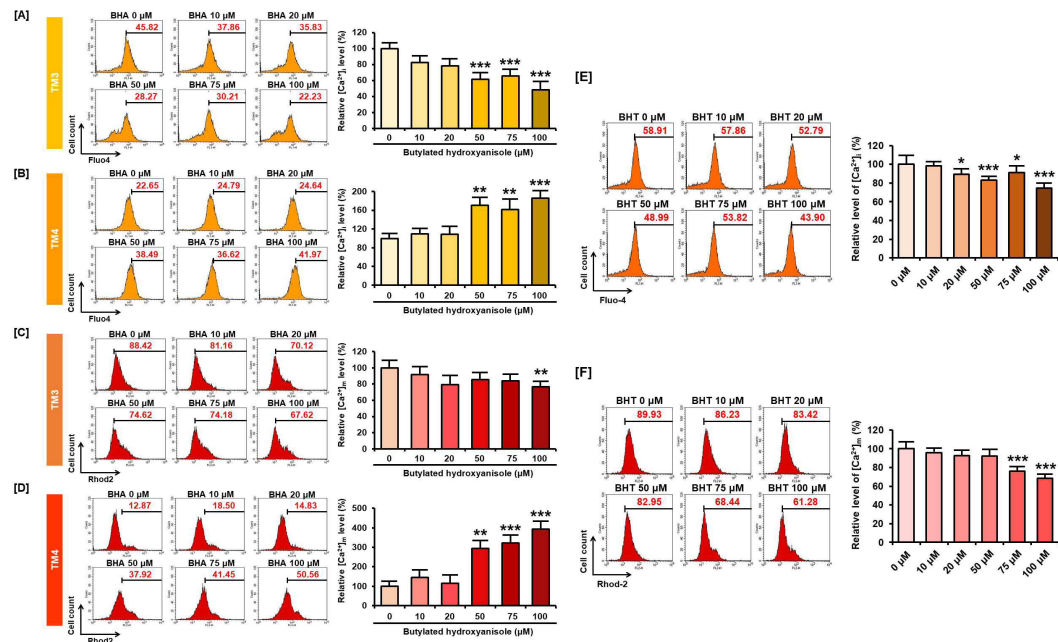
[0108] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

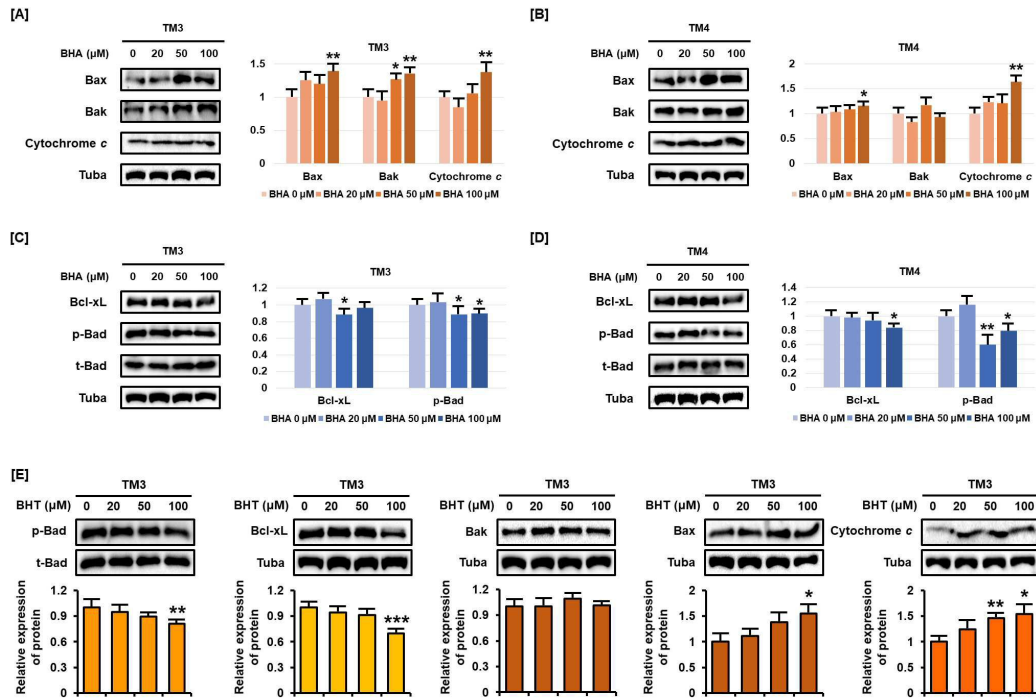
도면1



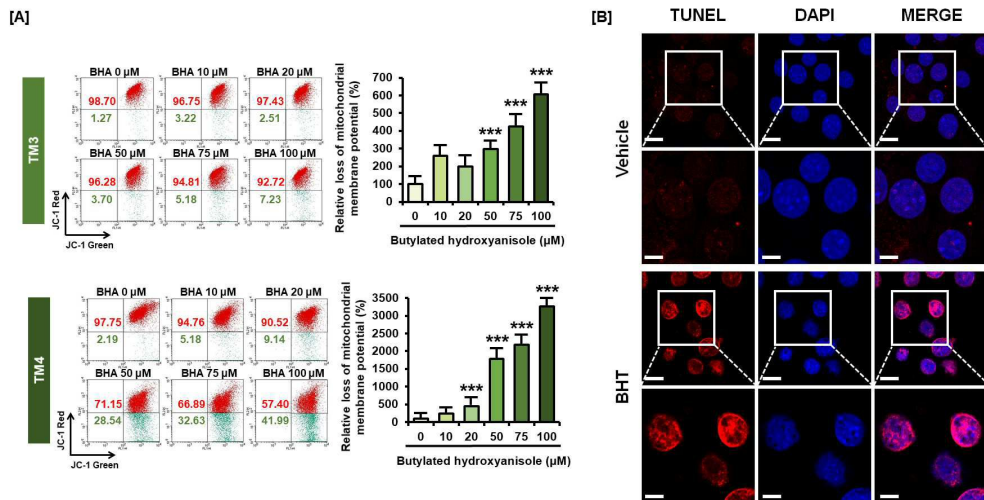
도면2



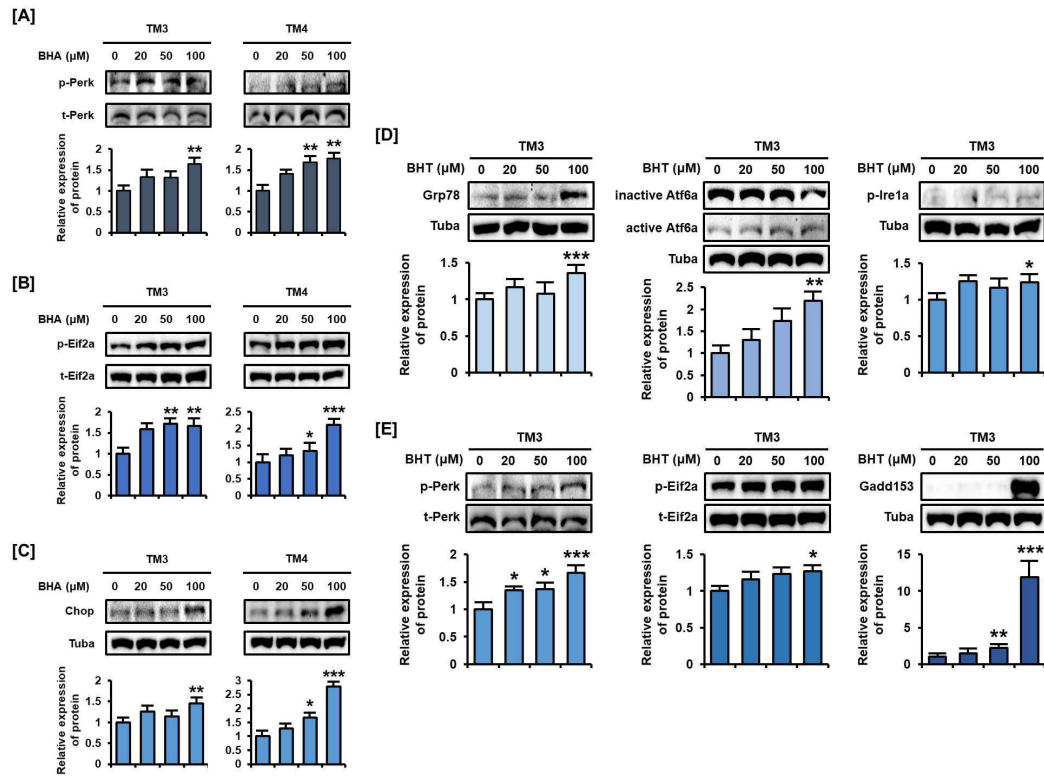
도면3



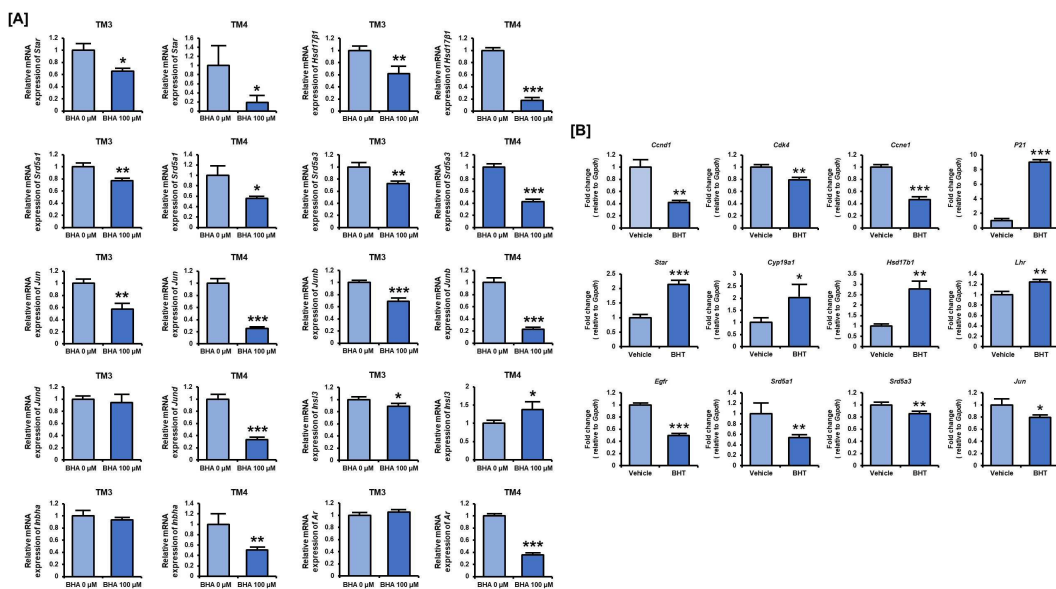
도면4



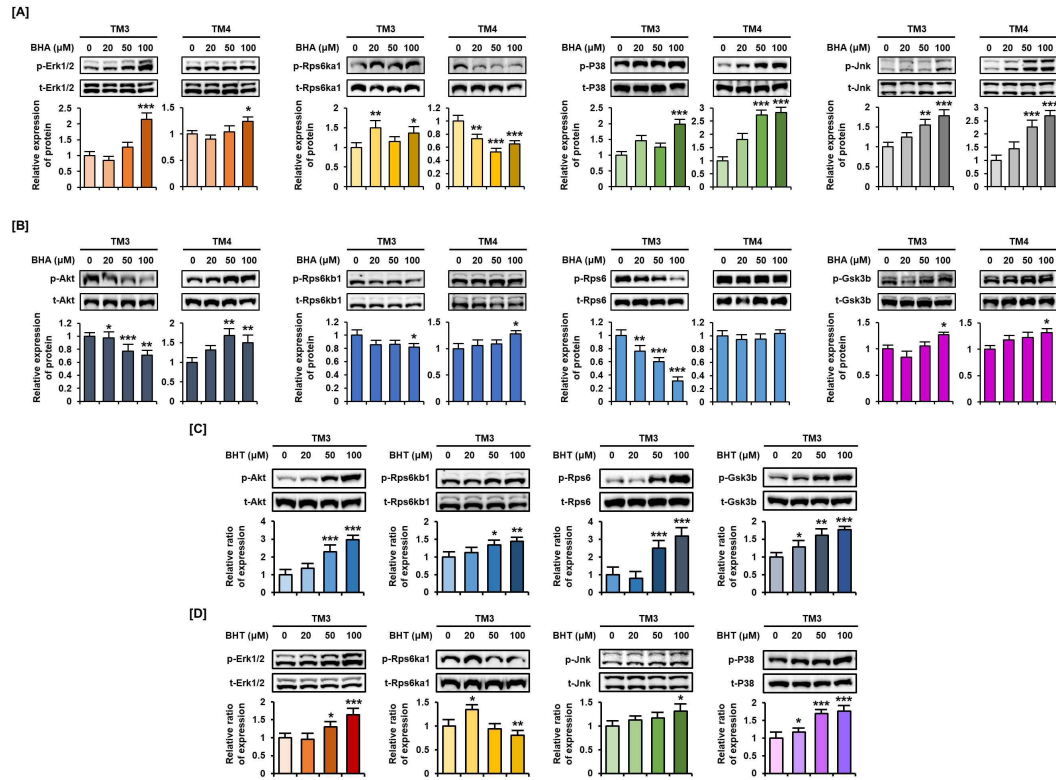
도면5



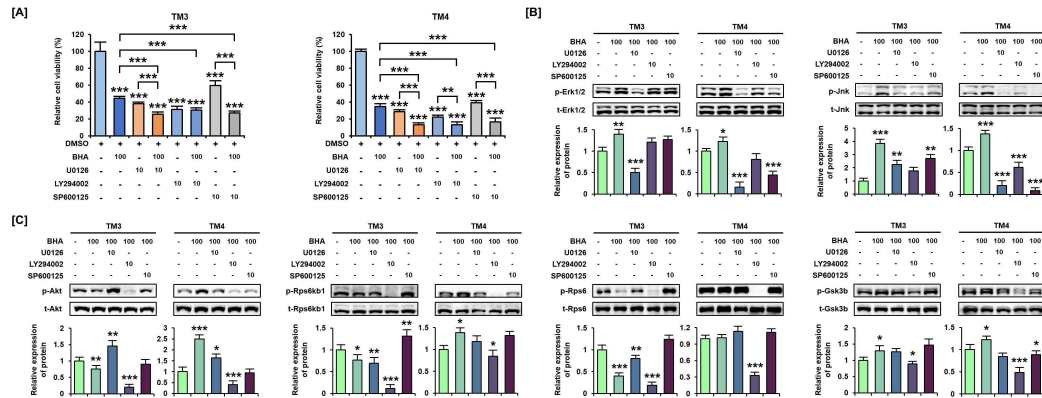
도면6



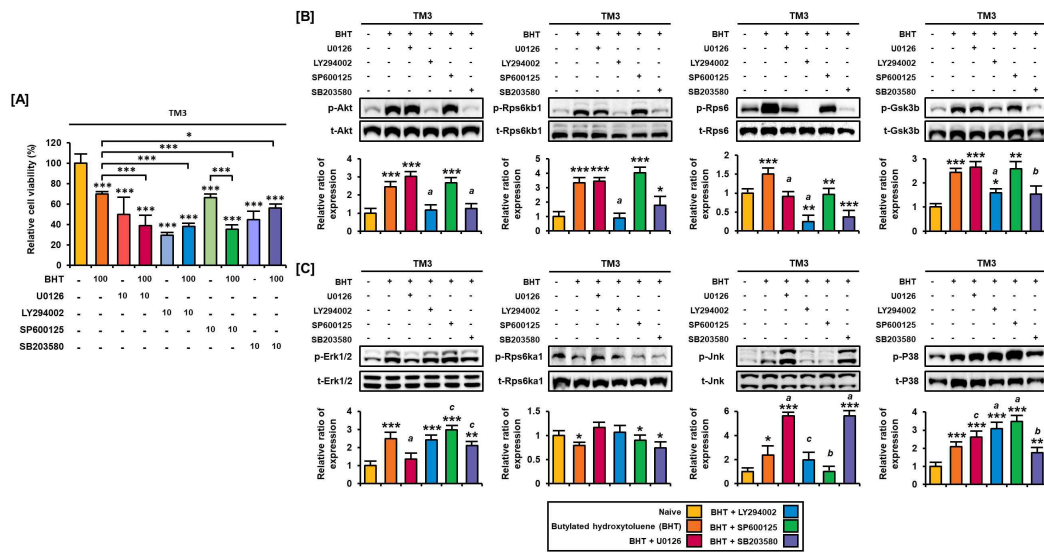
도면7



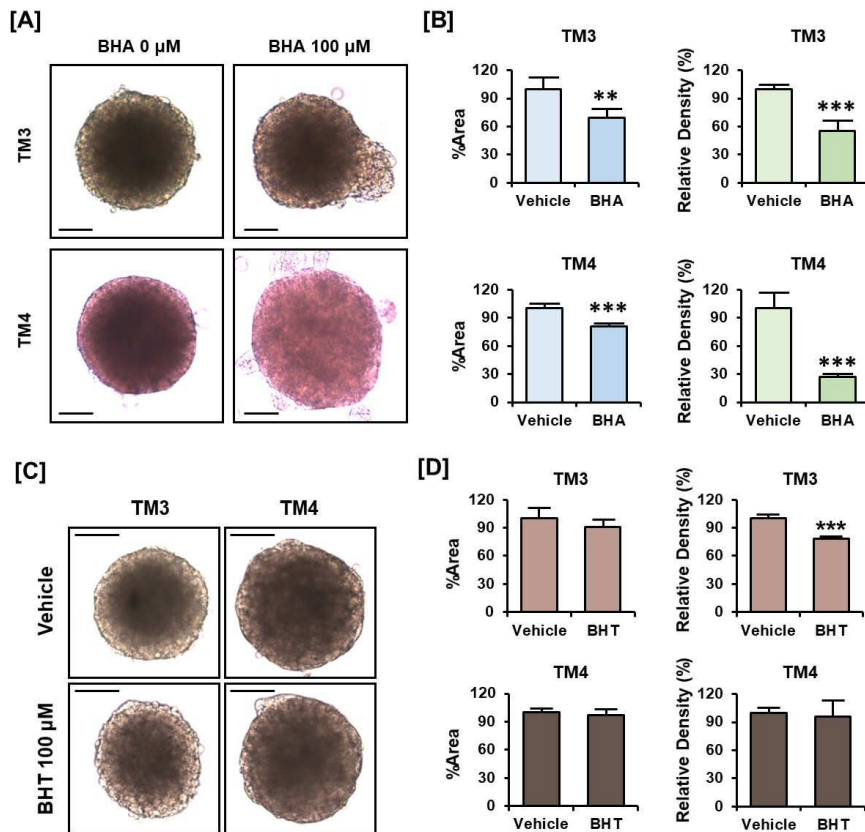
도면8



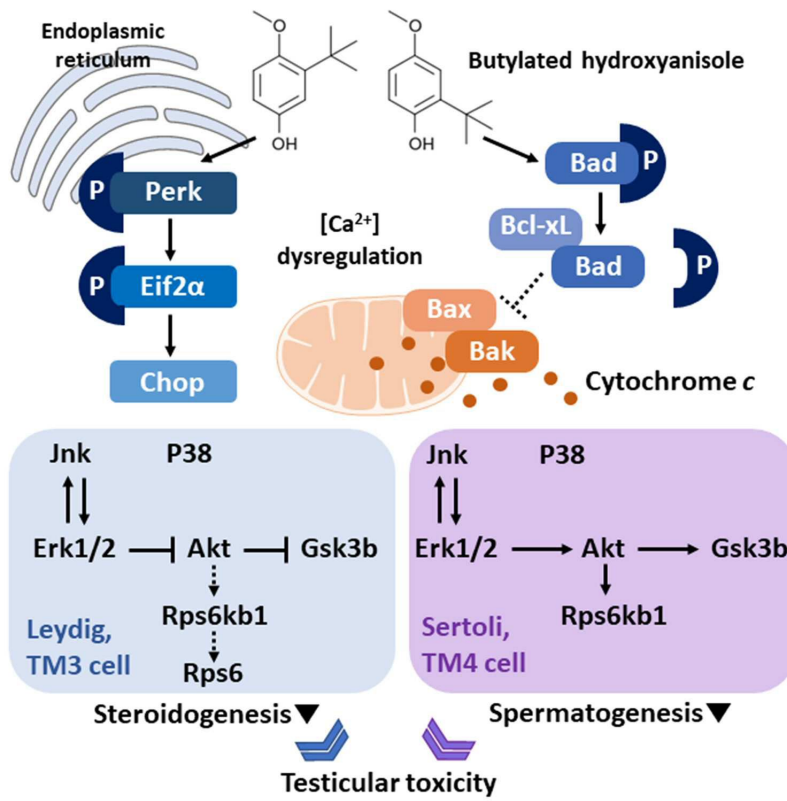
도면9



도면10



도면11



도면12

