



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0132212
(43) 공개일자 2018년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/122 (2006.01) *A61K 31/282* (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0068762

(22) 출원일자 2017년06월02일

심사청구일자 2017년06월02일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

송권화

충청남도 천안시 동남구 문암1길 68, 105동 1402호

임화선

서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 10 항

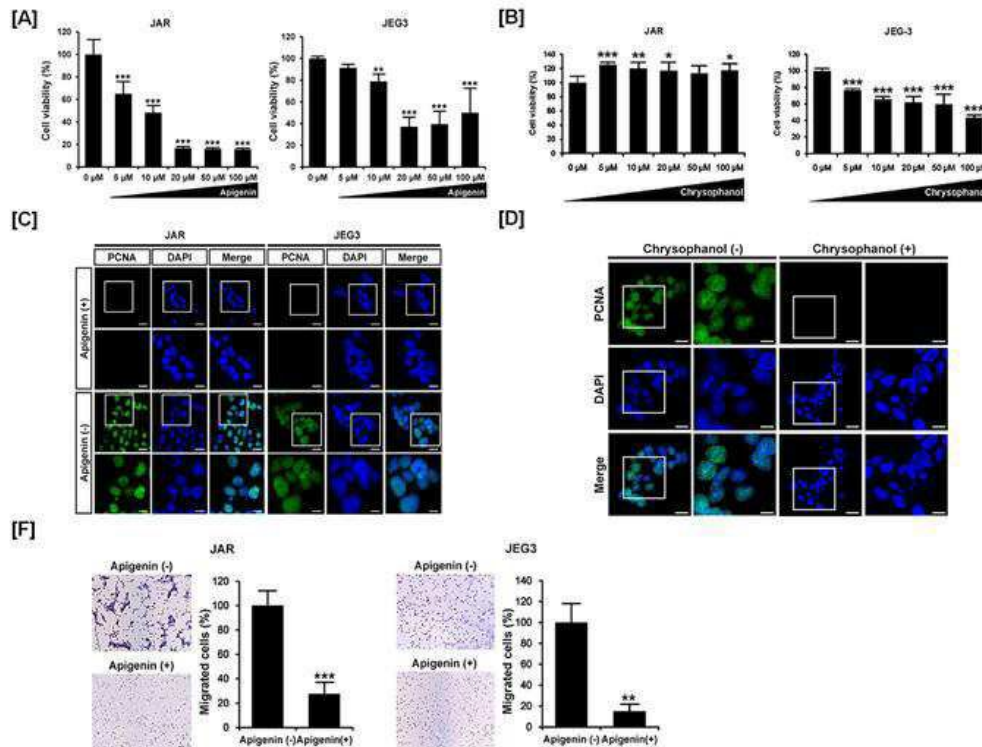
(54) 발명의 명칭 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 용모막암 세포 내 증식 및 이주성을 억제하고 용량 의존적으로 용모막암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, PI3K/AKT 또는 ERK1/2 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제 또는 시스플라틴 및 파클리탁셀과 같은 항암화학치료제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 생명과학, 의학 등 다양한 산업 분야에 널리 활용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/122 (2013.01)

A61K 31/282 (2013.01)

A61K 31/337 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자

양창원

광주광역시 북구 설죽로 585, 104동 504호

박선우

서울특별시 강동구 양재대로 1340, 421동 305호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016940776

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원-기본연구

연구과제명 [이지바로]염증성 태반 형성 억제를 위한 아연 이온 수송체의 역할 규명 및 후생유전학적 변화 연구

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0810010016

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 이공학개인지초연구지원-기본연구

연구과제명 염증성 조산 치료를 위한 태아 유래 중간엽 줄기세포 치료제 효과 검증

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.09.07 ~ 2017.09.06

명세서

청구범위

청구항 1

아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 ERK1/2 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 ERK1/2 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 용모막암 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 용모막암 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 용모막암 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 아피제닌, 크리스파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 아피제닌, 크리스파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 아피제닌, 크리스파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 용모막암은 임신성 영양막 질환중 가장 악성의 질병으로 주로 임신 초기에 포상기태로부터 발병하는 경우가 다수이며(V.C.Mak *et al.*, Carcinogenesis, 2016; L.Duffy *et al.*, Journal of clinical medicine research, 2015), 영양막 조직에서 유래된 악성 종양인 용모암은 임신기에 20,000~40,000 명 당 1명의 비율로 나타나는 것으로 보고된바 있다(Soper *et al.*, Gynecol Oncol, 2004). 또한, 용모암은 혈관침투성이 매우 높으며 폐나 질 같은 타기관으로의 전이가 빈번하게 일어나는 것으로 알려져있다 (Geramizadeh and Rad, Indian J Pathol Microbiol, 2012).
- [0003] 일반적인 용모막암의 치료 방법은 EMA-CO라고 불리는 화학적치료법을 실시하는 것이다. 하지만 용모막암 환자의 15-25%는 이러한 화학적 치료법에 대해 저항성 및 나쁜 예후를 나타낸다(Powles *et al.*, Br J Cancer, 2007). 따라서 용모막암에 나타나는 항암제 내성을 극복하기 위해 더욱 효과적인 치료제 개발을 통한 접근법이 필요함 실정이다.
- [0004] 크리스파놀은 에모딘, 알로에-에모딘, 레인 등을 포함하는 안트라퀴논 계열의 식물추출물이다 (Aichner and Ganzera., Talanta, 2015). 안트라퀴논 유래물은 주로 중국 전통 약초인 대황에서 추출되며, 대황 추출물은 암 세포의 사멸을 유도하고 이동성을 억제하는 것으로 알려져 있으며(Campbell *et al.*, Anticancer Res, 2002; Ma *et al.*, Environ Toxicol, 2015), 대황 뿌리에 가장 많이 함유된 에모딘은 전립선암, 유방암, 자궁경부암 등의 다양한 암에서 항암 효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있으나(Zhang *et al.*, Cancer Res, 1995; Cai *et al.*, J Agric Food Chem, 2004; Cha *et al.*, Cancer Res, 2005; Yaodian *et al.*, Cancer Cell Int, 2013), 대황작물 내 높은 함유량에도 불구하고 크리스파놀의 암 발달 억제에 대한 효과는 알려진바 없다.
- [0005] 아피제닌은 양파, 오렌지, 파슬리와 같은 채소나 과일에 포함되어있는 플라보노이드로서 항염증, 항산화, 항암 효과를 가진 식물 추출물로 보고되고 있다. 특히 유방암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 난소암, 전립선암 등에서 성장 저해 및 항암의 효과가 연구된 바 있다 (D.Patel *et al.*, International journal of oncology, 2007; S.M.Ju *et al.*, Evidence-based complementary and alternative medicine, 2015; X.Tong *et al.*, Anti-cancer agents in medicinal chemistry, 2013). 또한, 아피제닌은 전립선암 세포주 내 인슐린 유사 성장인자와 인슐린 수용체 기질의 인산화를 감소시켜 세포 주기의 진행을 억제하고, 인슐린 유사 성장인자 결합 단백질을 증가시켜, 인슐린유사 성장인자의 세포 내 신호 전달기전을 조절하는 것으로 알려져 있다.
- [0006] 이처럼, 크리스파놀과 아피제닌의 다양한 약리적 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 용모막암 내에서 아피제닌이나 크리스파놀을 이용한 치료기전에 관한 연구는 보고된 바 없다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 용모막암 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 용모암 세포주 JAR, JEG-3 세포를 이용하여 크리스파놀 또는 아피제닌에 의한 세포 증식과 이주성 억제 및 세포 사멸 유도 효과를 확인하고, 크리스파놀 또는 아피제닌이 용모막암 세포주 내 AKT 및 ERK1/2 단백질을 중심으로 하는 신호전달체계를 조절한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명은 또한, 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 용모막암 세포 내 증식 및 이주성을 억제하고 용량 의존적으로 용모막암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, PI3K/AKT 또는 ERK1/2 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제 또는 시스플라틴 및 파클리탁셀과 같은 항암화학치료제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 생명과학, 의학 등 다양한 산업 분야에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 용모막암 세포주에 아피제닌, 크리소파놀 처리에 따른 세포증식 및 이주능력 감소를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 용모막암 세포주에 아피제닌, 크리소파놀 처리에 따른 세포주 사멸 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 아피제닌, 크리소파놀 투여에 따른 미토콘드리아 막 전위 조절 양상 및 활성산소 생성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 아피제닌, 크리소파놀의 투여에 따른 PI3K/AKT, ERK1/2 인산화 패턴 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 용모막암 세포 내 아피제닌, 크리소파놀과 PI3K, ERK1/2 신호전달기전 억제제 처리에 따른 세포 증식 변화 양상 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 용모막암 세포 내 아피제닌, 크리소파놀과 함께 PI3K, ERK1/2 억제제 병용처리에 따른 신호전달 단백질 인산화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 크리소파놀과 기존 항암화학치료제를 이용한 용모암 내 치료 효율을 나타낸 것이다.
- 도 8은 용모막암 세포 내 아피제닌에 의한 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.
- 도 9는 용모막암 세포 내 크리소파놀에 의한 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 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.
- [0020] 본 발명에서는 아피제닌 및 크리소파놀의 용모막암 세포 내 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 8, 9).
- [0021] 본 발명은 일 관점에서 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명은 다른 관점에서 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0025] 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 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 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.
- [0027] 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.
- [0028] 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.
- [0029] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있고, 과립제, 정제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 껌, 차, 젤리, 각종 음료수, 드링크제, 알코올 음료 등으로 제조될 수 있으며, 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다.
- [0030] 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.
- [0032] 본 발명에 있어서, 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 아피제닌, 크리소파놀 또는 이들의 혼합물이 활성 산소(ROS)를 증가시키고, 미토콘드리아의 막 전위를 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, PI3K/AKT 또는 ERK1/2 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0035] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고 용모막암 치료제로 사용되는 화학치료제를 더 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 용모막암 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] **실험방법**
- [0045] 실험동물 및 세포배양
- [0046] 용모막암 세포주인 JEG-3, JAR 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 MEM 배지 (JEG-3) 및 2.05 mM L-Glutamine이 함유된 RPMI-1640 배지 (JAR)에 10%의 소태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.
- [0048] 실험 재료
- [0049] 후보 조성물질인 아피제닌, 크리소파놀은 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 크리소파놀에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6에 대한 항체를 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 이 외, PCNA 항체는 각각 Santa Cruz Biotechnology사에서 구매하였다. 또한, 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다. 또한, 항암화학요법에 사용되는 cisplatin과 paclitaxel은 Sigma에서 구매하여 사용하였다.
- [0051] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석
- [0052] 용모막암 세포의 증식 능력에 아피제닌과 크리소파놀이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5×10^3 개의 세포와 배지 100 μ l를 96 well에 분주하고 아피제닌, 크리소파놀을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) 처리하여 48시간 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% CO₂ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양한다. JAR, JEG-3 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이 후 3차례 씻어준다. 마지막으로 100 μ l의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응하여 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.
- [0054] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

- [0055] 아피제닌, 크리소파놀에 의한 용모막암 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저, 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 아피제닌, 크리소파놀을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20 μ M) 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1× binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음으로, 200 μ L의 1× binding buffer로 세포현탁 배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μ L 넣고 Annexin V 5 μ L, PI 5 μ L를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후, 1× binding buffer를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.
- [0057] 면역형광법
- [0058] 3×10^4 개의 JAR, JEG-3 세포를 10% FBS가 포함 된 MEM 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 아피제닌 (20 μ M), 크리소파놀 (20 μ M)을 48시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μ g/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4°C에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 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 배양하였다. JAR, JEG-3 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 JAR, JEG-3 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.
- [0060] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석
- [0061] 3×10^4 개의 JAR, JEG-3 세포를 10% FBS가 포함 된 MEM 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 아피제닌 (20 μ M), 크리소파놀 (20 μ M)을 48시간 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.
- [0063] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정
- [0064] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 5×10^5 개의 JAR, JEG-3 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 아피제닌, 크리소파놀을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20 μ M) 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 JC-1 staining solution 에 풀어준 후 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분 간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.
- [0066] DCFH-DA를 이용한 세포내 ROS 측정
- [0067] JEG-3 세포 내 ROS 생성에 크리소파놀이 미치는 영향을 확인하기 위하여 peroxide 존재하에 2', 7' -

dichlorofluorescein (DCF)로 변환되어 형광을 띠는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma)를 사용하였다. JEG-3 세포를 트립신을 통해 떼어내고 원심분리를 통해 세포 pellet을 얻었다. 이후 PBS로 한번 워싱하고 10 μ M의 DCFH-DA를 37°C 인큐베이터 내에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 이후 세포를 PBS에 의해 두 번 워싱하고 크리소파놀을 용량 의존적으로 (0, 5, 10, 20 μ M) 1시간 동안 37°C 인큐베이터 내에서 인큐베이션 하였다. 처리된 세포는 PBS로 다시 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 DCF 형광 강도를 분석하였다.

[0069] 단백질 발현분석(웨스턴 블롯)

[0070] JAR, JEG-3 세포에 아피제닌, 크리소파놀 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 JAR, JEG-3 세포로부터 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) 시약을 사용하여 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0072] 통계분석

[0073] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0075] 결과 및 고찰

[0076] 아피제닌과 크리소파놀이 용모막암 세포의 증식력, 이주력 및 사멸에 미치는 영향 분석

[0077] 아피제닌과 크리소파놀에 의해 용모막암 세포주 JAR, JEG-3 세포의 변화양상을 분석하기 위하여 먼저 아피제닌과 크리소파놀을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) 첨가한 배지에 48시간 배양하였으며 이후 세포 증식 양상을 분석한 결과, 아피제닌은 두 가지 용모막암 세포주에서 20 μ M의 농도까지 용량의존적으로 세포의 증식력을 감소시키는 것을 확인하였다(도 1A). 하지만 크리소파놀은 JEG-3 세포의 증식력만 처리되는 농도에 따라 단계적으로 감소시키며 JAR 세포주에서는 그 효과가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다 (도 1B). 이후, 면역형광기법을 바탕으로 20 μ M 아피제닌과 20 μ M 크리소파놀을 48시간 처리한 후 용모막암 세포 내 증식마커인 PCNA를 형광 염색하였다. 그 결과 대조군의 JAR와 JEG3 세포주 내에서는 PCNA 각각 세포의 핵에 과다발현을 이루는 것을 확인할 수 있었지만 아피제닌 처리에 따라 발현이 약화되는 것을 확인할 수 있었다 (도 1C). 이는 크리소파놀을 처리함에 따라서 역시 JEG-3세포주 내에서 동일한 패턴으로 PCNA의 발현이 감소됨을 확인하였다 (도 1D). 이를 통해 아피제닌과 크리소파놀이 용모막암 세포의 증식을 억제시킴을 검증할 수 있었다. 뿐만 아니라, 20 μ M 아피제닌을 사용하여 transwell membrane을 이동한 JAR와 JEG3의 세포수를 확인한 결과 대조군에 비해 아피제닌의 농도가 높아질수록 용모막암 세포의 이주능력이 감소하는 것을 확인하였다(도 1F).

[0079] 아피제닌, 크리소파놀 적용에 따른 용모막암 세포주의 사멸 효과 분석

[0080] 아피제닌과 크리소파놀에 의해 용모막암 세포 내 사멸된 세포의 수를 측정하기 위하여 아피제닌을 용량의존적으로 처리하여 48시간 인큐베이션 시킨 후 Annexin V 및 propidium iodide(PI)으로 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 사멸한 세포의 수를 측정하였다(도 2A, 2B). 그 결과, 아피제닌은 JAR와 JEG-3 세포 내 작용하여 용량의존적으로 사멸 세포의 수를 증가시키는 것으로 나타났다(도면 2A). 하지만 크리소파놀은 세포 증식력 관련 실험과 유사하게 JEG-3세포의 사멸은 용량의존적으로 증가시켰지만 JAR 세포에서는 세포사멸유도 효과가 나타나지 않았다(도 2B). 또한, 각 식물 유래 추출물에 의해 사멸된 용모막암 세포주 내 DNA 분절화(DNA fragmentation)의 발생여부를 확인하기 위하여 tetramethyl-rhodamine-dUTP 표지화를 통한 TUNEL assay를 실시하였다. 그 결과, 아피제닌은 JAR와 JEG-3 세포주의 핵 내 DNA 분절화에 따른 붉은 형광을 유도하고(도 2C), 크리소파놀 역시 세포사멸을 나타내었던 JEG-3 세포 내 DNA의 분절화를 유도함을 확인하였다(도 2D). 이를 통해 아피제닌과 크리소파놀은 용모막암 세포주 내 DNA 분절화를 통해 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

- [0082] 아피제닌과 크리소파놀에 의한 옴모막암 세포 내 미토콘드리아 막 투과성 변화 및 활성산소 조절 분석
- [0083] 아피제닌, 크리소파놀에 의해 미토콘드리아 막 전위 변화를 확인하기 위하여 각 해당물질을 옴모막암 세포주에 처리하여 48시간 인큐베이션 시킨 다음 JC-1 염색 이후 FACS 분석을 실시하였으며, 이를 통해 옴모막암 세포 내 미토콘드리아 막 전위가 아피제닌, 크리소파놀에 의해 용량의존적으로 감소한다는 것을 확인하였다(도 3A, 3B). 뿐만 아니라, 크리소파놀에 의해 JEG-3 세포 내 산화 스트레스가 유발되는지 확인하기 위해 DCF 형광 관찰을 통해 세포 내 활성산소(ROS) 생성 정도를 측정하였으며, 그 결과, 크리소파놀을 처리한 JEG-3 세포 내 DCF 형광이 용량의존적으로 증가함을 확인하였다(도 3C).
- [0085] 아피제닌과 크리소파놀에 의한 옴모막암 세포 내 신호전달기전 조절 양상 분석
- [0086] 옴모막암 세포 내 아피제닌, 크리소파놀(JEG-3)에 의해 유도되는 세포의 증식 억제 및 세포 사멸에 영향을 미치는 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 증식과 연관된 PI3K, ERK1/2 신호전달물질의 인산화 양상을 용량, 시간 의존적으로 확인하였다 (도 4). 아피제닌의 경우 옴모막암 세포주 JAR, JEG-3 세포에 용량의존적으로 작용하여 AKT-P70S6K-S6 단백질의 인산화를 감소시키고 ERK1/2-P90RSK 단백질의 인산화를 활성화시킨다는 것을 확인하였다(도 4A). 크리소파놀의 경우 JEG-3 세포를 사멸시킴에 있어 ERK1/2-P90RSK 외에도 AKT-P70S6K를 용량의존적으로 활성화시키는 것을 확인하였다(도 4B). 뿐만 아니라 크리소파놀을 시간의존적으로 JEG-3 세포에 처리하였을 때 ERK1/2-P90RSK 단백질은 단시간 내에 인산화를 이루며, AKT-P70S6K 단백질은 시간이 경과함에 따라 인산화 경향도 증가하는 양상으로 나타났다(도 4C). 이를 통해 아피제닌과 크리소파놀은 옴모막암 세포내에서 PI3K, ERK1/2 신호전달기전을 조절한다는 것을 확인하였다.
- [0088] 아피제닌, 크리소파놀과 신호전달기전 억제제를 통한 세포증식 변화 양상 분석
- [0089] 용량/시간의존적 분석을 통해 선별된 아피제닌, 크리소파놀 조절 신호전달분자가 옴모막암 세포의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 옴모막암 세포 내 LY294002 (PI3K 억제제) 20 μ M 또는 U0126 (ERK1/2 억제제) 10 μ M을 아피제닌 20 μ M, 크리소파놀 20 μ M과 병용처리 하였다(도 5). 그 결과, 아피제닌에 의해 감소한 JAR 세포의 증식은 LY294002, U0126을 병용하여 처리함으로써 추가적으로 세포 증식이 감소하는 것으로 나타났으며, JAR와 JEG-3 두 세포 모두 각각의 신호전달기전 억제제를 단독으로 각 세포에 처리하였을 때와는 달리 세포 증식 억제 효과가 효율적으로 개선됨을 확인하였다(도 5A, 5B). 또한, 크리소파놀에 의해 감소된 JEG-3의 세포 생존력은 LY294002 또는 U0126과 병용처리 되었을 때 유의적으로 회복됨을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 ERK1/2 및 AKT 신호전달체계가 옴모막암 세포에서 아피제닌, 크리소파놀의 항증식효과에 밀접하게 관련되며, PI3K, MAPK 신호전달기전을 조절하는 억제제와 병용 처리 시 세포 증식효과가 더욱 증대된다는 것을 확인하였다.
- [0091] 아피제닌, 크리소파놀과 AKT, ERK1/2 신호전달기전 억제제 혼합물을 통한 옴모막암 세포 내 신호전달물질 인산화 패턴 분석
- [0092] 옴모막암 세포 내에서 아피제닌, 크리소파놀에 의해 조절되는 정확한 분자적 메커니즘을 규명하기 위하여 옴모막암 세포 내 LY294002 20 μ M 및 U0126 10 μ M을 37°C/CO₂ 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하고 이후 20 μ M의 아피제닌, 크리소파놀을 각각 30분 동안 처리하여 단백질 추출 이후 웨스턴 블롯을 통해 타겟 분자의 인산화를 분석하였다(도 6). 그 결과, 아피제닌에 의해 감소된 AKT의 인산화는 아피제닌과 LY294002를 병용 처리함에 따라 더욱이 억제되는 양상을 보임을 확인하였고, P70S6K와 S6 역시 단독으로 처리한 아피제닌보다 LY294002와 병용 처리하였을 때 인산화가 더욱 약화되는 양상을 보임을 확인하였다(도 6A). 하지만 아피제닌에 의해 증가되었던 ERK1/2와 P90RSK의 인산화는 JAR 세포에서는 LY294002와 U0126을 함께 처리하였을 때 더욱 억제되었고, JEG-3 세포에서는 U0126에 의해서만 ERK1/2의 인산화가 억제되는 양상을 보임을 확인하였다. 크리소파놀과 신호전달억제제의 병용처리 조건 아래 JEG-3 세포 내에서는 ERK1/2 단백질의 인산화는 PI3K/AKT 신호전달 경로를 억제함에 따라 감소하는 양상을 보임을 확인하였다(도 6B). ERK1/2의 하위경로로 알려진 P90RSK의 인산화는 U0126 처리에 의해서만 억제되지 않았으나 LY294002와 함께 처리하였을 때는 크리소파놀 단독으로 처리하였을 때와 비교하여 억제됨을 확인하였다. LY294002는 크리소파놀에 의해 유도된 AKT의 인산화를 억제하였으며, P70S6K의 인산화는 U0126에 의해서 감소하였으며, LY294002에 의해서는 증가하는 양상을 띠었다. 이러한

결과를 통해 크리소파놀에 의해 활성화되는 ERK1/2와 AKT 신호전달경로가 서로 상호작용하며 항암효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

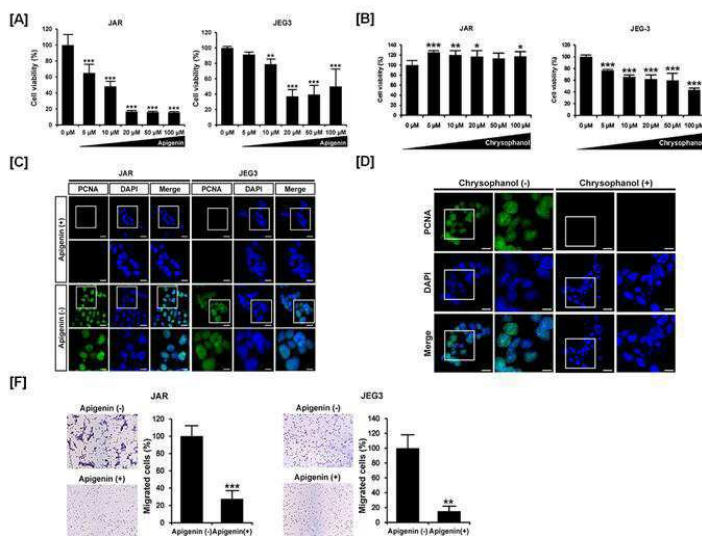
[0094] 크리소파놀과 항암화학요법에 의한 용모막암 세포의 증식 양상 비교 분석

[0095] 크리소파놀을 용모막암 치료를 위한 항암제로서 개발하기 위해 기존에 사용되고 있는 항암화학치료제 시스플라틴과 파클리탁셀을 단독 또는 크리소파놀과 병용 처리하여 JEG-3 세포의 증식 능력을 비교 분석하였다(도 7). 그 결과, 크리소파놀은 시스플라틴 (50 μ M) 또는 파클리탁셀 (20 μ M) 단독으로 처리하였을 때와 비교할 때 대등한 세포 증식 억제 효과가 있는 것을 확인하였으며, 특히 크리소파놀과 시스플라틴을 병용처리 하였을 때는 JEG-3 세포 증식 억제 효과가 더욱 강화됨을 확인할 수 있었다. 이를 통해 크리소파놀이 용모막암 치료제로서 또는 기존 항암제 치료에 있어 보조치료제로서 개발 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

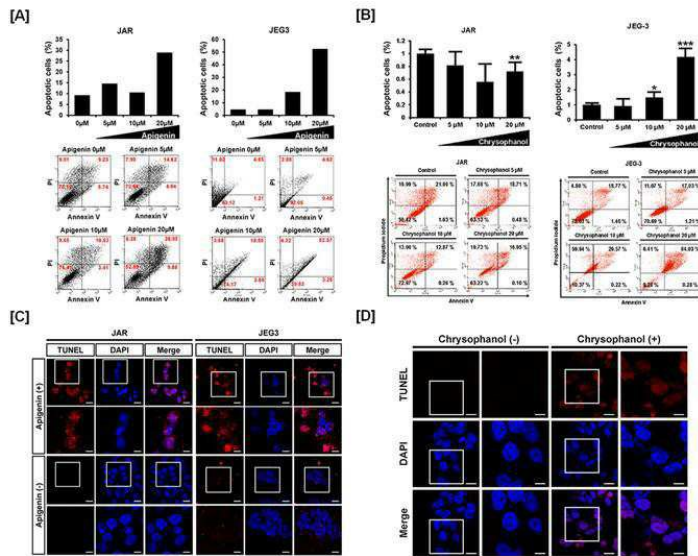
[0097] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

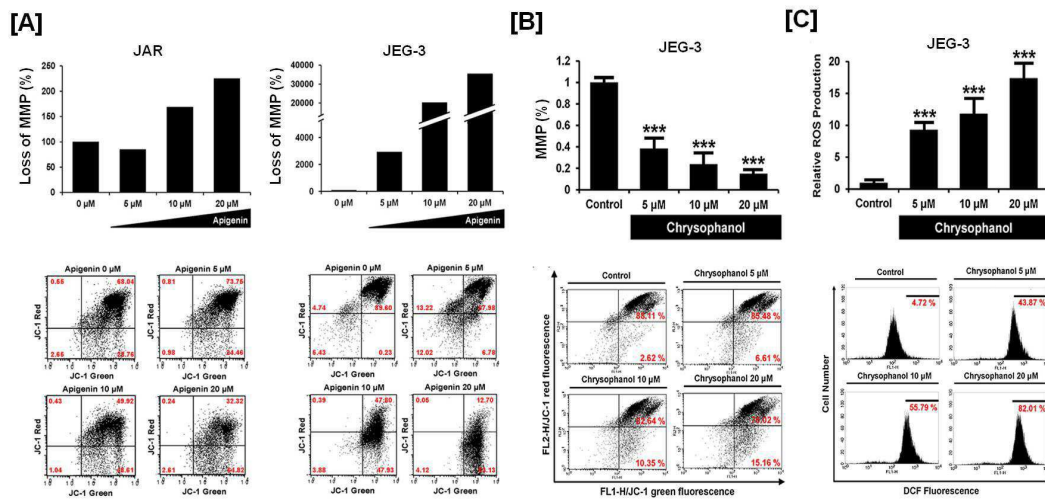
도면1



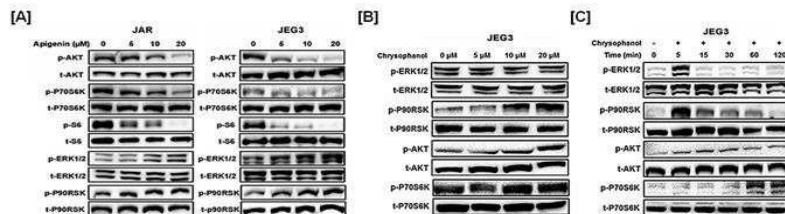
도면2



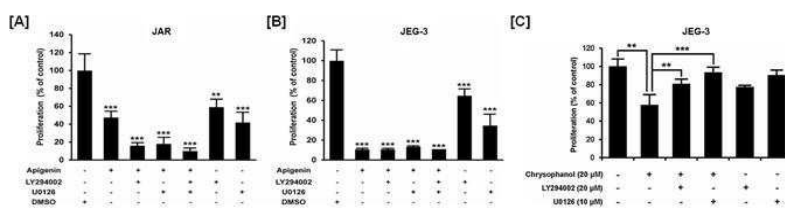
도면3



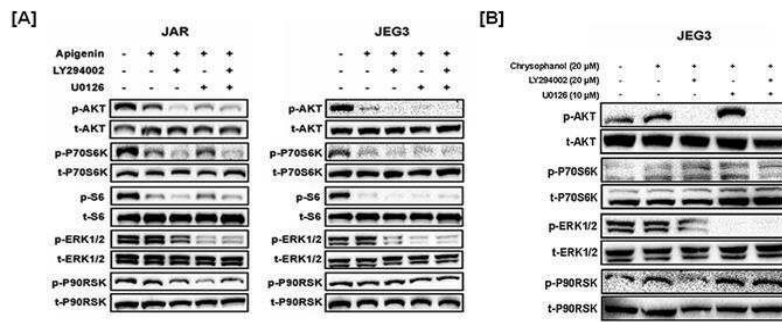
도면4



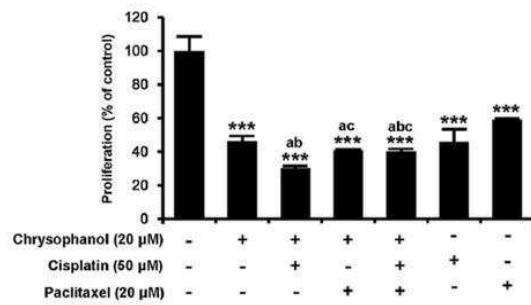
도면5



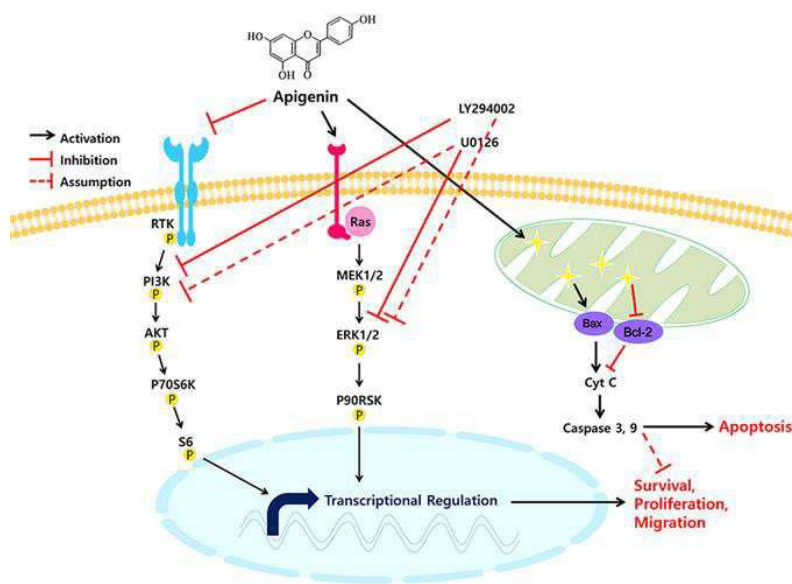
도면6



도면7



도면8



도면9

