(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0025892
(43) 공개일자 2014년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/56 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0092353
(22) 출원일자 2012년08월23일
심사청구일자 2012년08월23일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김영상
부산광역시 수영구 연수로315번길 16, 107동 1902호(망미동, 더샵아파트)
강경화
부산광역시 남구 용소로19번길 62-6, 503호(대연동)
김세권
부산광역시 동래구 사직로 80, 125동 1402호(사직동, 쌍용예가아파트)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 4 항

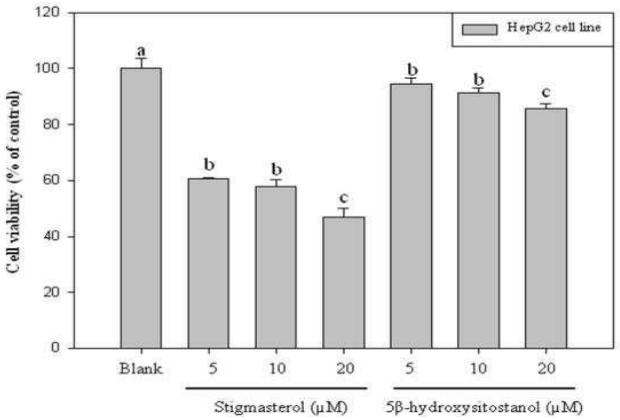
(54) 발명의 명칭 **나비쿨라 인서타로부터 분리된 스티그마스테롤 및 5 베타-히드록시시토스타놀을 함유하는 간암의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 간암의 예방 또는 치료 효과를 나타내는 나비쿨라 인서타(*Navicula incerta*)로부터 분리된 피토스테롤(phtytosterol)의 신규한 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 나비쿨라 인서타로부터 분리된 스티그마스테롤(stigmasterol) 및 5베타-히드록시시토스타놀(5β-hydroxysitostanol)을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀은 간암 세포의 세포사멸 유도인자와 관련된 유전자 발현을 상향 조절하고, 세포사멸 억제인자와 관련된 유전자 발현을 하향 조절함으로써, 간암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	M2010-01
부처명	국토해양부
연구사업명	해양생명공학기술개발사업
연구과제명	해양생물 유래 생리활성 펩타이드의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화
기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교
연구기간	2011.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

스티그마스테롤(stigmasterol) 또는 5베타-히드록시시토스타놀(5β-hydroxysitostanol)을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 스티그마스테롤(stigmasterol) 또는 5베타-히드록시시토스타놀(5β-hydroxysitostanol)은 나비쿨라 인서타(*Navicula incerta*)로부터 분리된 것을 특징으로 하는 간암의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 2항에 있어서,

상기 스티그마스테롤 또는 5베타-히드록시시토스타놀은 간암 세포의 카스파제(caspase)-8,9, Bax, p53, p21, FAS 및 FASL로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 발현을 상향 조절하는 것을 특징으로 하는 간암의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 2항에 있어서,

상기 스티그마스테롤 또는 5베타-히드록시시토스타놀은 간암 세포의 Bcl-2 및 XIAP로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 발현을 하향 조절하는 것을 특징으로 하는 간암의 예방 및 치료용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 간암의 예방 또는 치료 효과를 나타내는 나비쿨라 인서타(*Navicula incerta*)로부터 분리된 스티그마스테롤(stigmasterol) 및 5베타-히드록시시토스타놀(5β-hydroxysitostanol)의 신규한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간암은 전 세계적으로 가장 치명적인 암의 하나로, 우리나라를 비롯하여 아시아 지역에 있는 국가에서 특히 많이 발생하여 심각한 문제가 되고 있다. 간암은 전 세계에서 다섯 번째로 빈번하게 발생되는 질환이며, 이로 인해 사망하는 사람들의 수는 세 번째로 많다. 간암의 증상은 질병이 진행될 때까지 눈에 띄게 나타나지 않아 조기 발견이 어렵고, 이에 따라 치료율 및 생존율이 낮다는 문제점이 있다.

[0003] 지금까지 암을 치료하기 위해 많은 방법들이 시도되고 있으며, 암 치료법은 약물 요법, 수술 요법, 방사선 요법 등으로 구별할 수 있다. 약물 요법의 경우 항암제를 경구 또는 정맥 투여하게 되는데, 약물이 일단 혈류를 통해 전신에 퍼졌다가 병소에 도달하게 되므로 병소에는 미량만이 집적된다. 따라서, 병소에 적정량을 집적시키기 위해서는 다량의 약물을 투여해야 하고 이로 인한 부작용이 심각한 문제로 대두되고 있다. 또한, 대체로 효과가 좋은 항암제가 통증이나 발열 등의 부작용이 더 크다는 문제점이 있다. 특히, 방사선 요법의 경우 암세포 주변의 정상세포가 손상될 수 있으며 이로 인한 합병증 발생 등 그 안전성에 있어서 더욱 문제가 되고 있다.

[0004] 이에, 부작용이 비교적 적고 안전한 천연물 의약품이 아시아와 세계 전 지역에서 대안적인 의약품으로 관심이 증가되고 있는 추세이다. 특히, 항암 치료 물질은 주로 천연물 또는 천연물로부터 분리된 합성 유도체로부터 유래 되었다. 그런데 천연물에서부터 간암 치료제를 개발하려는 그 동안의 수많은 노력에도 불구하고 실제로 치료제로 현재 사용 중이거나 임상시험을 수행 중인 예는 소수에 불과하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-0388787

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명자들은 나비쿨라 인서타(*Navicula incerta*)로부터 분리한 스티그마스테롤(stigmasterol) 및 5베타-히드록시시토스타놀(5β-hydroxysitostanol)이 간암 세포의 세포사멸 유도인자와 관련된 유전자 발현을 상향 조절하고, 세포사멸 억제인자와 관련된 유전자 발현을 하향 조절함으로써, 궁극적으로 간암의 치료를 가능하게 한다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 나비쿨라 인서타로부터 분리한 스티그마스테롤 및/또는 5베타-히드록시시토스타놀을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 나비쿨라 인서타(*Navicula incerta*)로부터 분리된 스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는 감암의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 나비쿨라 인서타로부터 분리된 5베타-히드록시시토스타놀(5β-hydroxysitostanol)을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀은 인간 간암 세포의 카스파제(caspase)-8,9, Bax, p53, p21, FAS 및 FASL로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 발현을 상향 조절할 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀은 인간 간암 세포의 Bcl-2 및 XIAP로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 발현을 하향 조절할 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 나비쿨라 인서타(*Navicula incerta*)로부터 분리된 스티그마스테롤(stigmasterol) 및 5베타-히드록시시토스타놀(5β-hydroxysitostanol)은 간암 세포의 세포사멸 유도인자인 카스파제(caspase)-8,9, Bax, p53, p21, FAS 및 FASL 유전자 발현을 상향 조절하고, 세포사멸 억제인자인 Bcl-2 및 XIAP 유전자 발현을 하향 조절함으로써, 간암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 천연물로부터 분리된 합성 유도체를 사용하여 생체 안정성이 우수하기 때문에 종래의 간암 치료제들에 비해 독성으로 인한 각종 부작용을 유발하지 않으므로 간암을 예방 또는 치료할 수 있는 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명에 따른 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀의 간암 세포의 생존력 분석 결과 그래프이다. 각 바(bar)에 기재된 숫자들은 던컨의 다중검정에 의한 유의적인 차이가 있음을 나타낸다($P<0.05$).

도 2는 본 발명에 따른 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀의 간암 세포의 형태 분석 결과이다. (a)는 현미경(100 배율)을 통해 세포의 형태를 관찰한 결과이고, (b)는 Hoechst 33342 염색 후 형광현미경(400 배율)을 통해 세포의 형태를 관찰한 결과이다.

도 3a 및 3b는 각각 본 발명에 따른 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀의 간암 세포의 주기 분석 결과 그래프이다.

도 4a 및 4b는 본 발명에 따른 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀이 처리된 간암 세포 유전자의 RT-PCR 분석 결과이다. β-actin은 대조물질로 사용하였다.

도 5는 본 발명에 따른 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀이 처리된 간암 세포 유전자의 웨스턴 블럿

분석 결과이다. β-tubulin은 대조물질로 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 나비쿨라 인서타(*Navicula incerta*)로부터 분리된 스티그마스테롤(stigmasterol) 및 5베타-히드록시시토스타놀(5β-hydroxysitostanol)을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방 및 치료용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0016] 나비쿨라 인서타는 미세조류의 하나이다. 이러한 나비쿨라 인서타로부터 분리된 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀은 피토스테롤(phtytosterol)에 속하는 물질이다. 피토스테롤은 혈관 세포 내의 콜레스테롤 수치를 감소시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 피토스테롤은 폐암, 전립선암, 대장암의 HT-29 세포 및 U937 인간 단핵구 세포에서의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 피토스테롤이 간암과 관련된 세포의 세포사멸을 유도하는 효과에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다.

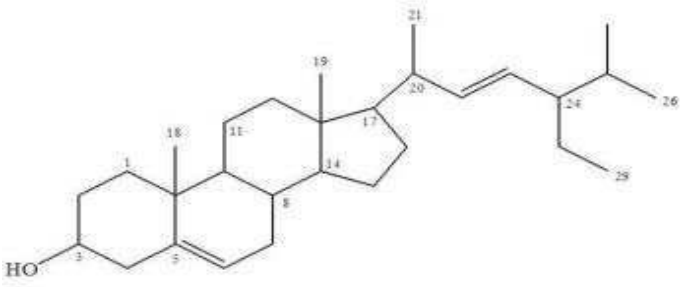
[0017] 이에, 본 발명에서는 이러한 피토스테롤의 종류인 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀이 인간 간암 세포인 HepG2 세포의 사멸을 유도하여 간암 치료에 효과가 있다는 사실을 최초로 규명하였다.

[0018] 본 발명의 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀을 나비쿨라 인서타로부터 분리하는 방법은 다음과 같다.

[0019] 균주번호 KMMCC B-001인 나비쿨라 인서타를 대량으로 배양한 후, 동결건조하여 분말로 만든다. 분말의 나비쿨라 인서타를 삼각플라스트에 넣고 여기에 메탄올을 넣고 하루 동안 냉침하여 분획물 1을 획득한다. 여과지를 이용하여 추출한 메탄올을 여과하고, 남은 분말을 메탄올과 디클로로메탄올의 혼합용매를 이용하여 하루 동안 냉침하여 분획물 2를 획득한다. 여과지를 이용하여 추출한 혼합용매를 여과하고, 남은 분말을 디클로로메탄을 이용하여 하루 동안 냉침한 후에 추출하여 분획물 3을 획득한다. 분획물 2를 디클로로메탄과 아세톤의 혼합용매를 이용하여 컬럼크로마토그래피를 수행함으로써 11개의 분획물을 얻는다(2.1~11). 상기 분획 물 중 분획물 2.3과 2.4의 혼합물을 헥산과 에틸아세테이트의 혼합용매를 이용하여 컬럼크로마토그래피를 수행함으로써 흰색 고체의 스티그마스테롤을 획득한다. 또한, 분획물 2.5를 헥산과 에틸아세테이트의 혼합용매를 이용하여 컬럼크로마토그래피를 수행함으로써 흰색 고체 형태의 5베타-히드록시시토스타놀을 획득한다.

[0020] 상기의 방법으로 나비쿨라 인서타로부터 분리된 스티그마스테롤은 측쇄에 이중결합을 지니고 있으며, 세 개의 사이클로헥산 고리와 하나의 사이클로펜탄 고리를 포함하고 있다는 점에서 콜레스트롤과는 구별된다. 스티그마스테롤은 유방암, 난소암, 전립선암, 결장암 등의 암을 억제하는 효과가 우수한 것으로 보고되고 있으며, 콜레스테롤 수치를 저하시키는 작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 스티그마스테롤의 구조를 화학식 1에 나타내었다.

[0021] [화학식 1]

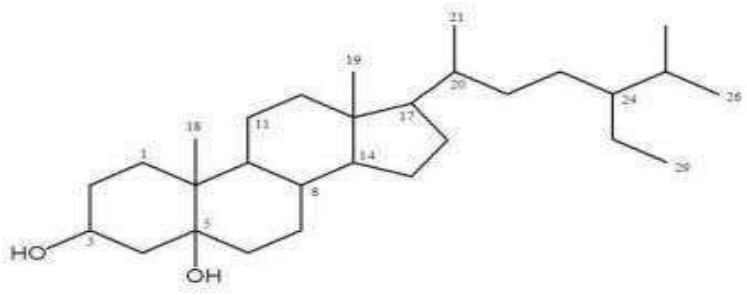


Stigmasta-5,22-dien-3-ol

[0022]

[0023] 또한, 상기의 방법으로 나비쿨라 인서타로부터 분리된 5베타-히드록시시토스타놀은 스티그마스테롤과는 달리 이중결합을 지니고 있지 않는 대신, C-5 위치에 추가로 히드록실기를 포함하고 있다. 5베타-히드록시시토스타놀의 구조를 화학식 2에 나타내었다.

[0024] [화학식 2]



Stigmasta-3,5-diol

[0025]

[0026] 그러나 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀이 간암과 관련된 세포의 세포사멸을 유도하는 효과가 있다는 사실은 아직 보고된 바가 없다.

[0027] 이에, 본 발명자들은 본 발명에 따른 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀의 간암 치료 효과를 다음과 같이 확인하였다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 따르면, 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀에 대한 인간 간암 세포인 HepG2 세포의 생존력을 MTT 환원 분석을 통해 확인하였다. 그 결과, HepG2 세포의 생존력은 상기 두 물질의 농도가 증가할수록 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(실험예 1 참조).

[0029] 본 발명의 일실시예에 따르면, 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀에 대한 HepG2 세포의 형태를 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 상기 두 물질의 농도가 증가할수록 부착된 HepG2 세포의 수(살아있는 세포의 수)가 현저하게 줄어드는 것은 물론, 그 형태 또한 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 또한, HepG2 세포를 염색한 후 형광현미경으로 관찰한 결과, 상기 두 물질의 농도가 증가할수록 부착된 HepG2 세포의 핵이 현저하게 응축되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 세포사멸의 전형적인 변화이다(실험예 2 참조).

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면, 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀에 대한 HepG2 세포의 주기를 FACS 기기를 통해 DNA의 양을 측정함으로써 확인하였다. 그 결과, 상기 두 물질의 농도가 증가할수록 HepG2 세포 주기의 G2/M기가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 상기 두 물질이 HepG2 세포의 분열 주기의 순환을 억제하여 HepG2 세포를 G2/M기에 머물게 함으로써 그 증식을 억제함을 보여주는 것이다(실험예 3 참조).

[0031] 본 발명의 일실시예에 따르면, RT-PCR과 웨스턴 블럿 분석을 수행하여 HepG2 세포의 특정 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과, 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀이 세포사멸 유도인자인 카스파제(caspase)-8,9, Bax, p53, p21, FAS 및 FASL 유전자 발현을 상향 조절하고, 세포사멸 억제인자인 Bcl-2 및 XIAP 유전자 발현을 하향 조절함으로써, 간암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하였다(실험예 4 및 5 참조).

[0032] 따라서, 본 발명에 따른 나비쿨라 인서타로부터 분리된 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀은 감암 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0033] 이에, 본 발명에 따른 나비쿨라 인서타로부터 분리된 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀은 간암의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 스티그마스테롤 및/또는 5베타-히드록시시토스타놀을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0035] 상기에서 "약학적으로 유효한 양"이란 상기 생리활성성분이 동물 또는 사람에게 투여되어 목적하는 생리학적 또는 약리학적 활성을 나타내기에 충분한 양을 말한다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 투여 대상의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0036] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다.

[0037] 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨,

에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여를 위한 다양한 형태로 제형화 될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 현탁액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0039] 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화 될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활탁제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 조성물은 방부제, 수화제, 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제와 같은 보조제와 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화 될 수 있다.

[0041] 이하, 본 발명을 실시예 및 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] **<실시예 1>**

[0043] **나비쿨라 인서타로부터 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀의 분리**

[0044] 균주번호 KMMCC B-001인 나비쿨라 인서타를 대량으로 배양한 후, 동결건조하여 분말로 만들었다. 분말의 나비쿨라 인서타를 5L 삼각플라스크에 담고, 메탄올 3L를 넣어 하루 동안 냉침하였다(분획물 1). 여과지를 이용하여 추출한 메탄올을 여과하고, 남은 분말을 메탄올과 디클로로메탄을 1:1 비율로 혼합한 혼합용매 3L를 이용하여 하루 동안 냉침하였다(분획물 2). 여과지를 이용하여 추출한 혼합용매를 여과하고, 남은 분말을 디클로로메탄 3L를 이용하여 하루 동안 냉침한 후에 추출하였다(분획물 3).

[0045] 분획물 2(20.313g)를 디클로로메탄과 아세톤(30:1 비율부터 1:2 비율까지)을 이용하여 컬럼크로마토그래피를 수행함으로써 11개의 분획물을 얻었다(분획물 2.1~2.11).

[0046] 분획물 2.3과 2.4의 혼합물을 헥산과 에틸아세테이트(10:1 비율부터 5:1 비율까지)를 이용하여 컬럼크로마토그래피를 수행함으로써 17.2mg의 흰색 고체 형태의 스티그마스테롤을 획득하였다.

[0047] 분획물 2.5를 헥산과 에틸아세테이트(10:1 비율부터 5:1 비율까지)를 이용하여 컬럼크로마토그래피를 수행함으로써 55.8mg의 흰색 고체 형태의 5베타-히드록시시토스타놀을 획득하였다.

[0048]

[0049] **<실시예 2>**

[0050] **세포의 배양**

[0051] 인간 간암 세포인 HepG2 세포는 10cm^2 디쉬(dish)에 FBS 10%가 혼합되어 있는 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 그리고 배지를 스트렙토마이신/페니실린 100㎍/㎖의 농도로 희석하고, 5%의 CO_2를 주입하여, 70~80% 정도 세포가 자라면 트립신-EDTA 용액을 사용하여 주당 1~2회 계대배양하였다.

[0052] **<실험예 1>**

[0053] **세포의 생존력 분석**

[0054] 세포의 생존력은 살아있는 세포에서만 활성을 갖는 미토콘드리아 탈수소 효소(mitochondrial dehydrogenase)의 탈수소 효소 작용에 의하여 무색의 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]가 청색의 포르마잔(formazan)으로 생성되는 것에 기초한 MTT 환원 분석에 의해 측정되었다.

[0055] HepG2 세포를 96-웰 플레이트(well plate)에 2×10^4 세포/웰의 농도로 24시간 동안 배양한 후, 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀을 각 농도별(5, 10, 20㎛M)로 처리하였다. 24시간 후에 MTT 용액 100㎛L를 처리하고, 4시간 후에 DMSO 용액을 처리하여 포르마잔 결정이 형성되는 양을 multidetection microplate reader를 이용하여 550nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0056] 도 1에 나타난 바와 같이, HepG2 세포의 생존력은 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀의 농도가 증가할수록 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 스티그마스테롤 5, 10, 20㎛L를 24시간 처리한 경우 HepG2 세포의 생존은 각각 40, 43, 54% 억제되었다. 5베타-히드록시시토스타놀 5, 10, 20㎛L를 24시간 처리한 경우 HepG2 세포의 생존은 각각 6, 9, 15% 억제되었다.

[0057] **<실험예 2>**

[0058] **세포의 형태 분석**

[0059] HepG2 세포를 12-웰 플레이트에 2×10^4 세포/웰의 농도로 24시간 동안 배양한 후, 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀을 각 농도별(5, 10, 20㎛M)로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. PBS로 씻어주고, 4%(v/v) 포름알데히드 용액을 PBS에 녹여 플레이트에 첨가한 후, 1시간 동안 실온 방치하였다. 고정된 세포를 현미경으로 관찰하였다.

[0060] 도 2a에 나타난 바와 같이, 부착된 HepG2 세포의 수(살아있는 세포의 수)는 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀의 농도가 증가할수록 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀에 의해 부착된 HepG2 세포의 형태가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

[0061] 또한, 12-웰 플레이트에 HepG2 세포를 분주하고, 24시간 배양하였다. 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀을 각 농도별(5, 10, 20㎛M)로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. PBS로 씻어주고, 4%(v/v) 포름알데히드 용액을 PBS에 녹여 플레이트에 첨가한 후, 1시간 동안 실온 방치하여 HepG2 세포를 고정하였다. Hoechst 33342 염색 시약을 처리하고 1시간 동안 실온에 방치하였다. 염색된 세포를 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0062] 도 2b에 나타난 바와 같이, 부착된 HepG2 세포의 핵이 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀의 농도가 증가할수록 현저하게 응축되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 변화는 세포사멸의 전형적인 변화라고 할 수 있다.

[0063] **<실험예 3>**

[0064] **세포의 주기 분석**

[0065] HepG2 세포를 $6cm^2$ 디쉬에 배양한 후, 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀을 각 농도별(5, 10, 20㎛M)로 처리하여 배양하였다. 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI)로 HepG2 세포를 염색한 후, FACS 기기를 이용하여 염색된 DNA의 양을 측정하여 세포 주기를 관찰하였다.

[0066] 도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이, 세포 주기의 G2/M기는 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀의 농도가 증가할수록 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀의 처리 농도가 20㎛M일 때, G2/M기는 각각 26.87%와 25.83%인 것을 관찰할 수 있었다. 즉, 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀이 HepG2 세포의 분열 주기의 순환을 억제하여 HepG2 세포를 G2/M기에 머물게 하는 것을 나타내는 것이며, 그 결과 HepG2 세포의 증식을 억제함을 확인할 수 있었다.

[0067] **<실험예 4>**

[0068] **RT-PCR 분석**

[0069] 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀이 각 농도별(5, 10, 20μM)로 처리된 HepG2 세포에 트리졸을 처리하고, 농도 별로 튜브에 모았다. 각 튜브에 200㎕의 클로로포름을 첨가하여 혼합한 후에 12,000xg 로 15분 동안 원심분리를 진행하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 동량의 이소프로판올을 첨가하였다. 10분 동안 실온에 방치한 후에 12,000xg로 10분간 원심분리를 하였다. RNA 펠렛이 모이면 상등액을 제거하고 에탄올을 첨가하여 RNA 펠렛을 분산시키고 원심분리를 진행하였다. 에탄올을 제거하고 DEPC(diethyl pyrocarbonate)가 처리된 증류수를 첨가하여 55℃에서 10분간 RNA를 용해시켰다. 용해시킨 RNA를 -20℃에 보관하였다.

[0070] HepG2 세포의 특정 mRNA 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

[0071] DEPC가 처리된 증류수에 녹아있는 RNA 13㎕와 올리고(dT) 2㎕를 PCR 튜브에 넣고, 이를 유전자 증폭기에서(thermal cycler)에서 70℃로 5분간 변성시켰다. RT-PCR용 마스터믹스(mastermix) 용액을 튜브에 넣고 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 특정 RNA에 해당하는 프라이머를 결합시키고, 유전자 증폭기를 이용해 유전자를 증폭시켰다. 증폭시킨 RNA를 1% 아가로오스 겔(agarose gel)을 이용하여 전기영동 시켰다. 각 프라이머의 밴드를 UV로 확인하였다. 이때, 특정 RNA에 해당하는 프라이머의 서열은 표 1과 같다.

표 1

[0072]

프라이머	서열	
Bax	정방향	5′ -TGC-CAG-CAA-ACT-GGT-GCT-CA-3′
	역방향	5′ -GCA-CTC-CCG-CCA-CAA-AGA-TG-3′
caspase-8	정방향	5′ -CAT-CCA-GTC-ACT-TTG-CCA-GA-3′
	역방향	5′ -GCA-TCT-GTT-TCC-CCA-TGT-TT-3′
caspase-9	정방향	5′ -AAG-ACC-ATG-GCT-TTG-AGG-TG-3′
	역방향	5′ -CAG-GAA-CCG-CTC-TTC-TTG-TC-3′
p21	정방향	5′ -CTG-TCA-CAG-GCG-GTT-ATG-AA-3′
	역방향	5′ -TGT-GCT-CAC-TTC-AGG-GTC-AC-3′
p53	정방향	5′ -GCG-CAC-AGA-GGA-AGA-GAA-TC-3′
	역방향	5′ -CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GC-3′
FAS	정방향	5′ -TTG-CTG-GCA-CTA-CAG-AAT-GC-3′
	역방향	5′ -AAC-AGC-CTC-AGA-GCG-ACA-AT-3′
FASL	정방향	5′ -CAC-TAC-CGC-TGC-CAC-CCC-3′
	역방향	5′ -CCA-GAG-AGA-GCT-CAG-ATA-CGT-TG-3′
XIAP	정방향	5′ -GAA-GAC-CCT-TGG-GAA-CAA-CA-3′
	역방향	5′ -CGC-CTT-AGC-TGC-TCT-TCA-GT-3′
Bcl-2	정방향	5′ -ATA-CCT-GGG-CCA-CAA-GTG-AG-3′
	역방향	5′ -TGA-TTT-GAC-CAT-TTG-CCT-GA-3′
β-actin	정방향	5′ -GCC-ACC-CAG-AAG-ACT-GTG-GAT-3′
	역방향	5′ -TGG-TCC-AGG-GTT-TCT-TAC-TCC-30′

[0073] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 스티그마스테롤이 세포사멸 유도인자인 카스파제(caspase)-8,9, Bax, p53, p21, FAS 및 FASL 유전자 발현을 상향 조절하고, 세포사멸 억제인자인 Bcl-2 및 XIAP 유전자 발현을 하향 조절하는 것을 확인할 수 있었다.

[0074] 또한, 5베타-히드록시시토스타놀이 카스파제-8, Bax 및 FASL 유전자 발현을 상향 조절 하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 스티그마스테롤이 아폽토시스(apoptosis)를 유도하는 유전자를

상향조절하고, 억제하는 유전자를 하향조절하여 아폽토시스를 일으키고 간암세포인 HepG2세포의 세포사멸을 유도할 수 있음을 알 수 있었으며, 또한, 5베타-히드록시시토스타놀은 농도에 따른 세포독성이 없고, 세포사멸을 유도하는 유전자를 상향 조절하여 세포의 아폽토시스(apoptosis)를 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

[0075] **<실험예 5>**

[0076] **웨스턴 블럿 분석**

[0077] HepG2 세포의 특정 mRNA 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블럿 분석(western blotting assay)을 수행하였다.

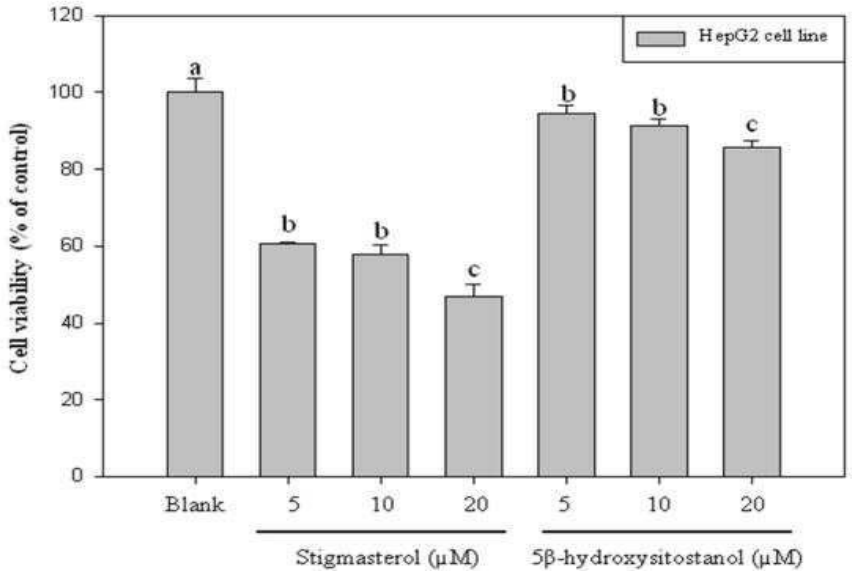
[0078] HepG2 세포를 1×10^{4} 세포/㎖의 농도로 $10cm^{2}$ 디쉬에 24시간 동안 배양하였다. 각 디쉬에 스티그마스테롤과 5베타-히드록시시토스타놀을 각 농도별(5, 10, 20㎛)로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 단백질을 분리하기 위해 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer)로 세포를 녹인 후 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 SDS 전기영동 장치를 이용하여 분자량별로 분리하였다. 그리고 원하는 단백질에 해당하는 항체를 부착하고, ECL 용액을 사용하여 LAS-3000에서 단백질 밴드를 확인하였다.

[0079] 도 6에 나타낸 바와 같이, 스티그마스테롤 및 5베타-히드록시시토스타놀이 세포사멸 유도인자인 카스파제-8, 9 유전자 발현을 상향 조절하는 것을 확인할 수 있었다.

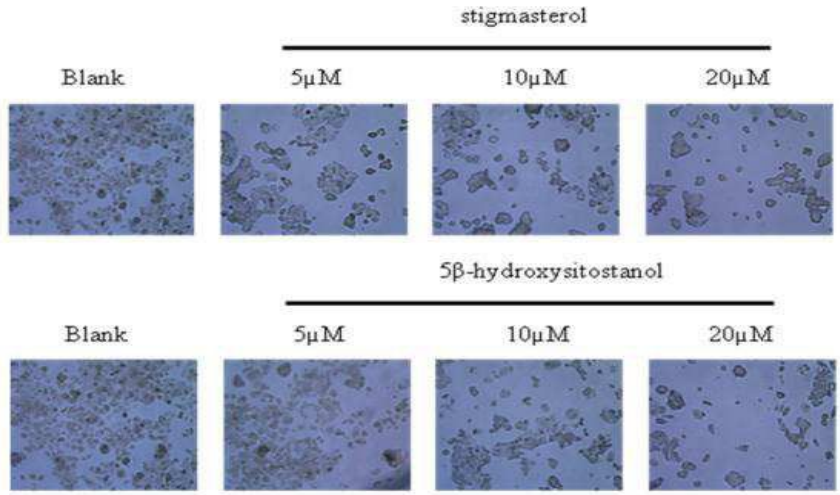
[0080] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

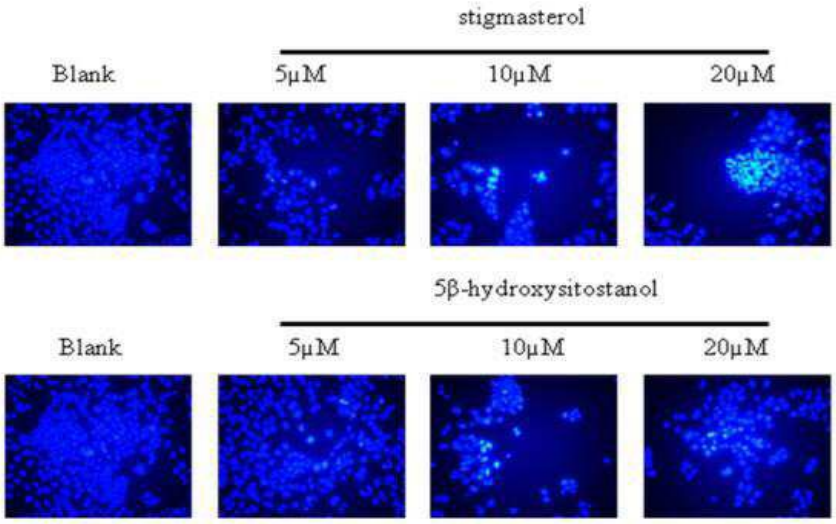
도면1



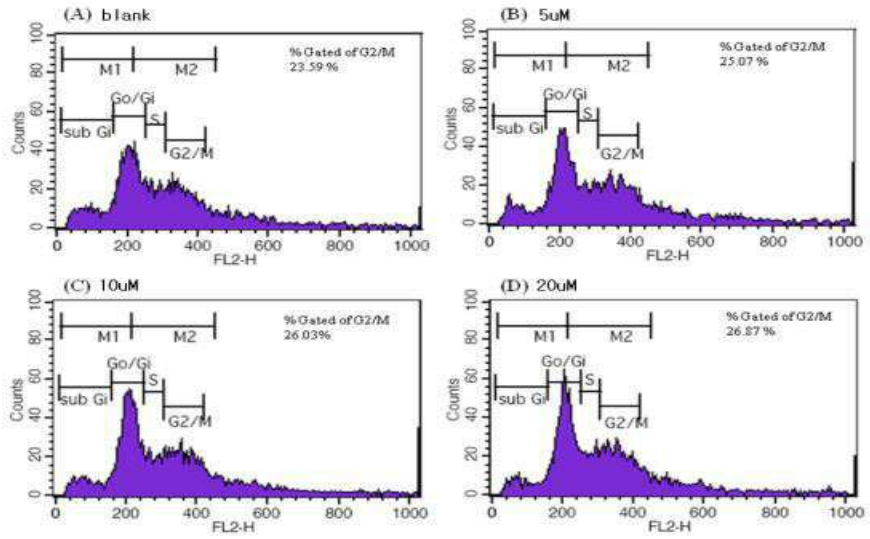
도면2a



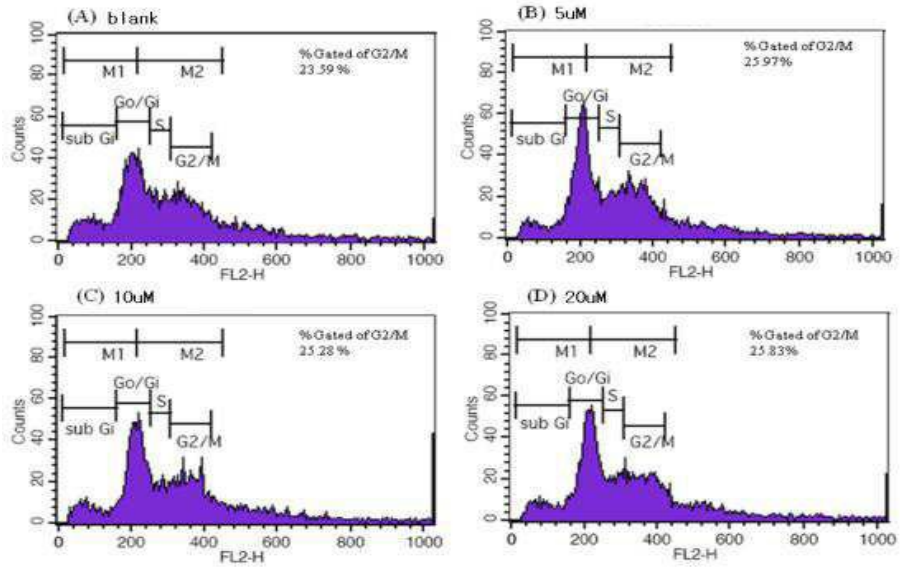
도면2b



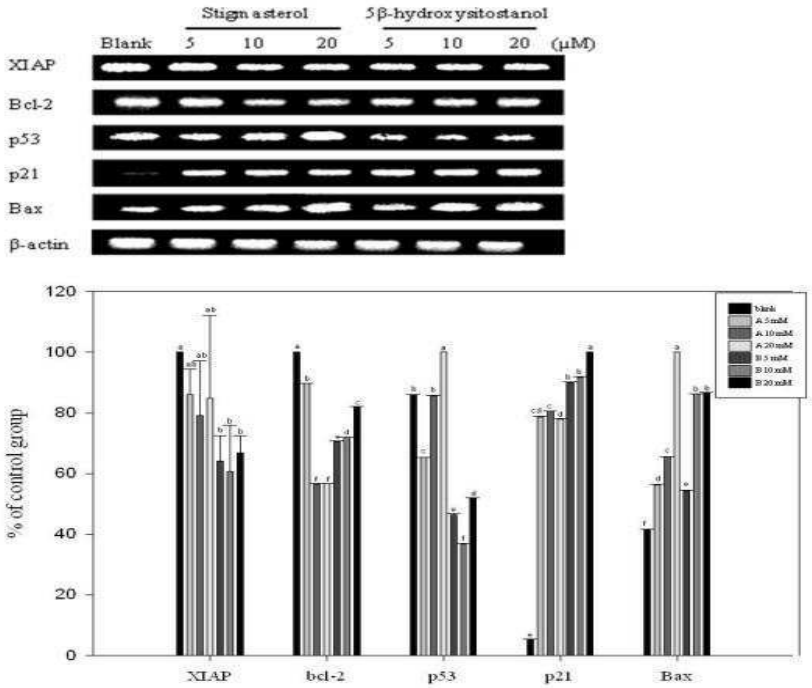
도면3a



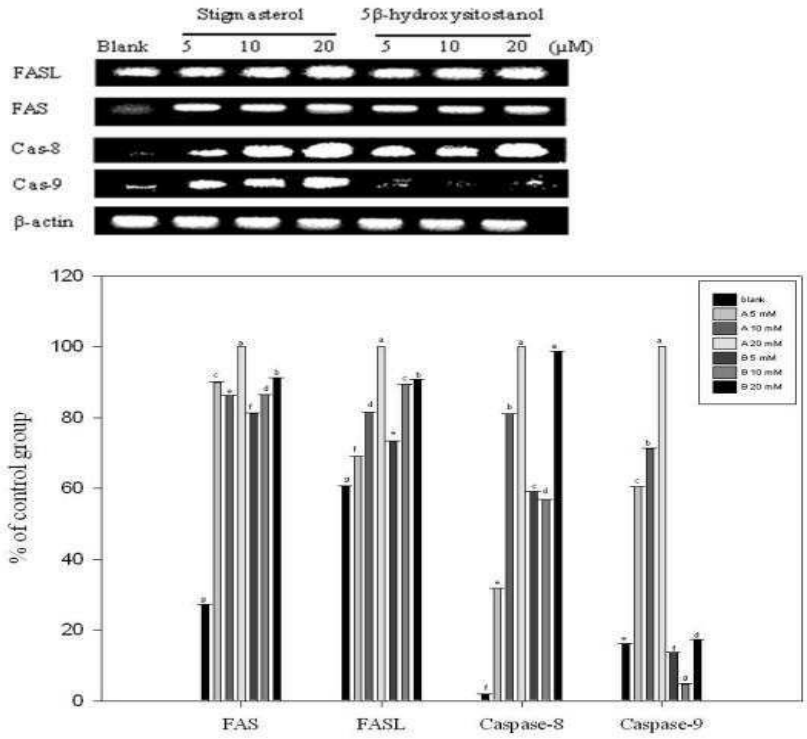
도면3b


(A) blank
%Gated of G2/M
23.59%
M1
M2
Go/Gi
S
sub Gi
G2/M
Counts
FL2-H
(B) 5uM
%Gated of G2/M
25.97%
(C) 10uM
%Gated of G2/M
25.28%
(D) 20uM
%Gated of G2/M
25.83%

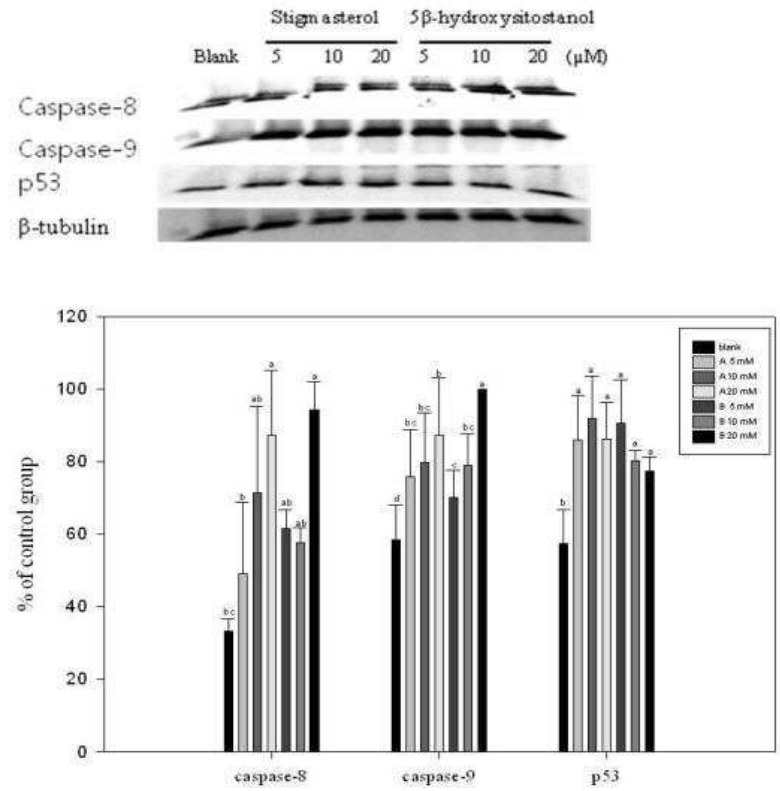
도면4a


Stigmasterol
5β-hydroxysitostanol
Blank
5
10
20
5
10
20
(μM)
XIAP
Bcl-2
p53
p21
Bax
β-actin
% of control group
XIAP
bcl-2
p53
p21
Bax

도면4b


Stigmasterol
5β-hydroxysitostanol
Blank
5
10
20
5
10
20
(μM)
FASL
FAS
Cas-8
Cas-9
β-actin
120
100
80
60
40
20
0
% of control group
FAS
FASL
Caspase-8
Caspase-9

도면5


Stigmasterol
5β-hydroxysitostanol
Blank
5
10
20
5
10
20
(μM)
Caspase-8
Caspase-9
p53
β-tubulin
120
100
80
60
40
20
0
% of control group
caspase-8
caspase-9
p53