(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0157900
(43) 공개일자 2023년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4035 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 15/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4035 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0060664
(22) 출원일자 2023년05월10일
심사청구일자 2023년05월10일
(30) 우선권주장
1020220057308 2022년05월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호
임화선
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 124동 901호
함지연
경기도 수원시 장안구 정자천로13번길 130-14, 203호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 10 항

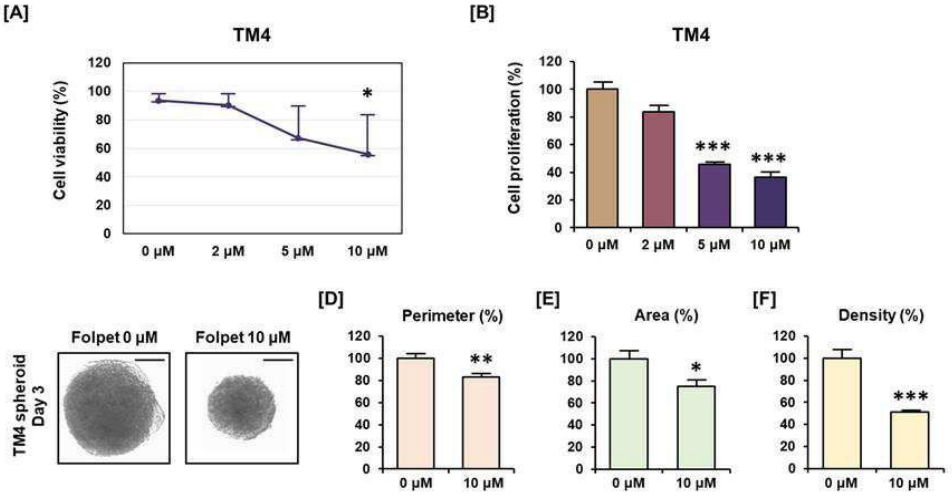
(54) 발명의 명칭 **폴펫을 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 폴펫을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 폴펫을 유효성분으로 포함하는 조성물은 비정상적으로 증식된 정소 세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 정소 세포의 비정상적 증식에 의한 남성 생식기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품, 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 15/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711157986
과제번호 2021R1A2C2005841
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기 지표 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711155899
과제번호 2021R1C1C1009807
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 멜라토닌에 의한 엑소좀 유래 운반 RNA 소편 기반 자궁내막증 개선 메커니즘 규명
기 여 율 50/100
과제수행기관명 성균관대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴펫이 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폴펫이 Erk 1/2, Jnk, P38 신호전달 경로를 활성화하고 Rps6 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폴펫이 세포 내 칼슘 항상성을 조절하는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

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

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 남성 생식기 질환은 라이디히(Leydig) 세포 또는 세르톨리(Sertoli) 세포의 과증식에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 남성 생식기 질환은 라이디히 세포 종양, 세르톨리 세포 종양, 고환염, 부고환염, 전립선 비대증, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

폴펫을 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 정소 세포의 증식 능력을 억제시키는 방법.

청구항 10

폴펫을 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 정소 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폴펫을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 고환염, 음낭수종, 고환암 등의 남성 생식기관 질환은 정소 세포의 비정상적 증식, 과도한 염증반응으로 인해 발병하는 질병이다. 정소 세포인 라이디히 세포(Leydig cell)와 세르톨리 세포 (Sertoli cell)는 남성 호르몬을 만들어 내고 정자를 생산하는 핵심 세포로서, 손상이 발생하는 경우 생식 세포의 사멸, 세포 주기 조절 단백질 감소, 세포내 활성 산소 증가에 따른 불임이 야기될 수 있다 (Rindone, G.M., *et al.*, Reproduction, 2018. 156(2): p. 93-101. / Kirk, D. and U. Mittwoch, Humangenetik, 1975. 26(2): p. 105-11. / Pan, B., *et al.*, Cancer Med, 2016. 5(11): p. 3214-3222).

[0003] 상기 남성 생식기관 질환 중 고환암은 국내 10만 명당 0.45명이 발병하는 드문 암이고 병기가 낮은 경우 90%이상의 완치율을 보이지만, 20-40세 사이의 청장년층에서 발병률이 전 세계적으로 증가하고 있으며 정상 남성보다 불임을 일으킬 확률이 세배 이상 높으며 (Scott M., *et al.* , Urologic Clinics of North America, 2015. 42(3): p.269-275), 고환암 환자는 통증이 없기 때문에 진행된 병기에서 발견하는 경우가 많고, 림프절을 따라 전이가 쉽게 일어나는 것으로 알려져있다 (Mariotto A.B., *et al.*, CA Cancer J Clin 2014; 64: pp. 252-271).

[0004] 한편, 폴펫(dinitramine)은 프탈이미드 종류의 농업용 진균제로서 농산물 질병을 관리하기 위해 사용되는 성분으로 알려져있으며, 방향화 효소인 CYP19A1의 스테로이드 결합 주머니에 결합할 수 있으며, JEG-3 세포 내 에스트로겐 합성을 경쟁적로 억제하는 성질이 있는 것으로 알려져 있으나, 현재까지 남성 생식기 질환 치료 효과에 대해서는 보고된 바 없다.

[0005] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 남성 생식기 질환 치료 물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 폴펫이 비정상적으로 증식된 정소 세포의 증식을 억제하고, 세포사멸을 유도하는 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 정소 세포의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 정소 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 정소 세포의 증식 능력을 억제시키는 방

법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 정소 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 폴펫을 유효성분으로 포함하는 조성물은 비정상적으로 증식된 정소 세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 정소 세포의 비정상적 증식에 의한 남성 생식기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품, 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 폴펫이 정소 세포(세르톨리 세포)의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 폴펫이 정소 세포 내 세포주기 정지 및 세포 사멸 유도 효과에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 폴펫이 정소 세포 내 미토콘드리아 기능 장애 및 칼슘항상성 조절에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 폴펫에 의한 정소 세포의 세포질 내 칼슘 이온 농도 조절 및 소포체 스트레스 활성화 효과에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 폴펫에 의한 정소 세포 내 산화스트레스 유도 및 MAPK 신호전달경로 활성화에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 정소 세포 내 NAC 처리에 의한 폴펫-유도 세포증식 억제 및 세포사멸 유도의 완화 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 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.

[0018] 본 발명은 일 관점에서 폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 다른 관점에서 폴펫을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0022] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미나, 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.

[0023] 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, 에멀젼, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0024] 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.

[0025] 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.

[0026] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있고, 과립제, 정제, 환제, 현탁액, 에멀젼, 시럽제, 껌, 차, 젤리, 각종 음료수, 드링크제, 알코올 음료 등으로 제조될 수 있으며, 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다.

[0027] 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.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 폴펫이 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 폴펫이 Erk 1/2, Jnk, P38 신호전달 경로를 활성화하고 Rps6 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 폴펫이 세포 내 칼슘 항상성을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 폴펫이 소포체 스트레스를 유도하는 것을 특징으로할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 폴펫이 정소 세포의 증식을 억제하고 세포주기 억제를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 폴펫이 정소 세포주에서 미토콘드리아 기능 장애와 칼슘 항상성을 저해하며, 세포질 내 칼슘 이온 농도를 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 폴펫이 정소 세포주에서 DNA 분절화를 억제시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 폴펫이 정소 세포주의 세포 사멸 효과를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 폴펫이 스테로이드 생합성, 세포주기, 호르몬 수용체 및 정자형성과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 남성 생식기 질환은 라이디히(Leydig) 세포 또는 세르톨리(Sertoli) 세포의 과증식에 의해 유발되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0039] 이때, 상기 남성 생식기 질환은 라이디히 세포 종양, 세르톨리 세포 종양, 고환염, 부고환염, 전립선 비대증, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0040] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명은 다른 관점에서, 폴펫을 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 정소 세포의 증식 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.

[0043] 본 발명은 또 다른 관점에서, 폴펫을 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 정소 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0045] [실시예]

[0046] 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.

[0048] **<실험 방법>**

[0049] 실험 재료

[0050] 후보 조성물질인 폴펫는 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 폴펫에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 Grp78, Chop, Tuba에 대한 항체를 Santa cruz biotechnology사로부터 구매하였으며, phospho-Eif2a, Erk1/2, Jnk, P38, Rps6 단백질 및 total-Eif2a, Erk1/2, Jnk, P38, Rps6에 대한 항체를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다.

[0052] 세포배양

[0053] 세르톨리 세포주 TM4 (immature mouse sertoli cell) 세포는 국세포주은행 (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.

[0055] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0056] 마우스 세르톨리 세포주의 증식 능력에 폴펫이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5 × 10^3개의 세포와 배지 100 ㎕를 96 well에 분주하고 폴펫을 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10 μM) 처리하여 24시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 10 μL BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 세르톨리 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어주었다. 마지막으로 100 μl의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응하여 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다. 세포 생존능의 경우 트립판 블루 염색을 통하여 수행하였으며, 살아있는 세포를 죽은세포와 살아있는 세포를 합한 수로 나누어 계산하였다.

[0058] 스페로이드 형성 분석

[0059] 스페로이드 형성 능력을 평가하기 위해, TM4 세포를 10% FBS-DMEM 배지에 2.4 × 10^5 cells/ml 농도로 희석하여, 비히클(DMSO) 또는 폴펫을 10 μM 처리하였다. 배양 접시의 뚜껑에 25 μl씩 drop을 분주하고, 뒤집어 PBS를 채운 dish에 덮어37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 6일까지 배양하였다. 분석을 위해 적어도 3개의 다른 스페로이드 이미지가 Leica DM2500으로 촬영되었으며, Image J software로 분석을 시행하였다.

[0061] Propidium iodide (PI)를 이용한 세포주기 분석

[0062] 폴펫의 마우스 세르톨리 세포주의 세포주기의 정지 효과를 확인하기 위하여 BD Biosicences사의 Propidium iodide (PI) 시약을 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 3 × 10^4 세포를 6 well에 분주하고 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 폴펫을 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10 μM) 처리하여 24시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 2번 워싱을 진행하고 70%의 에탄올로 고정시켜 4℃에 하루 동안 보관하였다. 다음으로 PBS로 2번 워싱을 진행하고 10 mg/ml의 RNase A 5 μL, 50 mg/ml PI 5 μL을 PBS에 함께 혼합하여 실온에 30분 동안 빛을 차단한 채 염색하였다. 이후 PBS를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분

석하여 세포주기의 변화를 측정하였다.

[0064] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0065] 폴펫에 의한 정소 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 3 × 10^4 세포를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 폴펫을 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10 μM) 처리하여 24시간 동안 37℃/5% CO_2 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 μL의 1× binding buffer으로 세포현탁 배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μL 넣고 Annexin V 5 μL, PI 5 μL를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후 1× binding buffer를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0067] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0068] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 3 × 10^4 개의 정소 세포를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 폴펫을 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 37℃/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℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0070] Fluo-4 AM 염색을 통한 세포질 내 칼슘농도 변화 측정

[0071] 세포질 내 칼슘농도를 측정하기 위해 Fluo-4 AM을 사용하여 측정하였다. 3 × 10^4 개의 세르톨리 세포를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 폴펫을 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 Fluo-4 staining solution에 풀어준 후 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 PBS로 워싱한 후 다시 원심분리로 세포 pellet을 얻었다. 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0073] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0074] 마우스 세르톨리 세포에 폴펫을 용량의존적(0, 2, 5, 10 μM)으로 24시간 또는 30분 처리한 다음 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95℃에서 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.

[0076] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석

[0077] 3 × 10^4개의 마우스 세르톨리 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 폴펫를 10 μM 또는 1 mM의 NAC로 24시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 한번 헹궈내고

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℃/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.

[0079] 통계분석

[0080] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0082] **<결과 및 고찰>**

[0083] 폴펫의 TM4 (세르톨리 세포)에 대한 증식 억제 효과

[0084] 마우스 세르톨리 세포주인 TM4의 세포 생존력은 폴펫을 24시간 동안 용량의존적(0-10 μM)으로 처리함에 따라 93.7%에서 55.8%까지 감소하였다 (도 1A). 또한, 동일 조건에서 세포 증식능은 5 μM에서 46%, 10 μM에서 37%까지 유의적으로 억제되는 것으로 나타났다(도 1B). 게다가 폴펫은 TM4 세포의 스페로이드 형성 또한 현저하게 억제하였으며(도 1C), 배양 3일차에 스페로이드의 둘레길이, 면적이 폴펫 처리에 따라 각 83%, 75%까지 감소하는 것으로 나타났고(도 1D, E), 스페로이드의 밀도 또한 대조군에 비해 절반 가까이 감소하는 것으로 나타났다(도 1F). 이러한 결과를 통해, 폴펫은 TM4 세포의 세포 생존능과 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0086] 폴펫의 TM4 세포 내 세포주기 정지 및 세포사멸 유도 효과

[0087] 폴펫의 세포주기 정지에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Propidium iodide (PI)를 염색하였다. Sug-G1에 해당하는 세포군은 10 μM의 폴펫 처리에 따라 대조군에 비해 3.3배 가량 증가하였으며(도 2A-B), 이와는 반대로 G0/G1기에 해당하는 세포군은 폴펫 처리에 따라 20%가량 감소하는 양상을 보였다. 또한, Annexin V와 PI염색을 통해 초기 및 후기 세포자멸사 세포를 구분하여 확인하였다(도 2C-D). TM4 세포의 초기 세포자멸사군은 10 μM의 폴펫 처리에 따라 대조군에 비해 두 배 가까이 증가하였으며, 후기 세포자멸사군은 1.5배가량 증가함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, 폴펫이 TM4 세포의 세포주기 진행을 막고 세포자멸사를 효과적으로 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0089] 폴펫의 TM4 세포 내 미토콘드리아 기능장애 및 칼슘항상성 와해 효과

[0090] 미토콘드리아의 건강 마커라고 할 수 있는, 미토콘드리아 막전위를 JC-1 염색을 통해 측정한 결과, TM4 세포 내 폴펫 처리에 따라 막전위가 무너지는 양상을 보임을 확인하였다(도 3A). 10 μM의 폴펫처리에 따라 대조군에 비해 막전위 와해 비율이 15.6배 증가하였고(도 3A), 세포질 내 칼슘이온 농도 또한 300% 가까이 증가하는 것으로 나타났다(도 3B). 이를 통해 폴펫이 세포질 내 미토콘드리아 막전위 와해 및 칼슘 농도를 효과적으로 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0092] 폴펫의 TM4 세포의 세포질 내 칼슘 이온 농도 조절 및 소포체 스트레스 활성화 효과

[0093] 칼슘 킬레이터를 병용 처리하여 폴펫에 의해 유도된 칼슘 이온 농도의 증가가 완화되는지 확인하기 위해, 1 μM의 2-APB 또는 2 μM의 BAPTA를 폴펫(10 μM)과 함께 병용처리 하였다. 2-APB의 병용처리는 칼슘이온 농도를 425%에서 277%로 감소시켰으며, BAPTA의 경우에는 200% 수준으로 완화시키는 경향을 보였다(도 4A). 추가적으로, 웨스턴 블랏 분석을 통해 폴펫이 TM4 세포 내 소포체 스트레스 경로를 활성화시키는지 여부를 확인하였다(도 4B-D). 그 결과, 폴펫을 용량의존적(0, 2, 5, 10 μM)으로 24시간 처리할 경우, TM4 세포 내 소포체 스트레스 개시 마커인 Grp78 단백질의 발현이 3배까지 점진적으로 증가함을 확인하였다(도 4B). 또한, Eif2a의 인산화 및 하위 신호전달인자인 Chop의 단백질 발현은 각각 2.5배 및 3배까지 증가하는 것으로 나타났다(도 4C-D). 이러한 결과를 통해, 폴펫이 TM4 세포 내 ER 칼슘 결핍을 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0095] 폴펫의 TM4 세포 내 산화 스트레스 유도 및 MAPK 신호전달경로 활성화 효과

[0096] 폴펫이 TM4의 세포 내 미토콘드리아 기능 장애를 유발함을 확인한 후, 활성산소종(ROS)의 발생 유무를 조사하였다. 그 결과, 폴펫을 용량의존적(0, 2, 5, 10 μM)으로 TM4 세포에 처리시, 대조군에 비해 활성산소종 발생 비율이 상대적으로 560%까지 증가하는 양상을 보임을 확인하였다(도 5A). 또한, 산화 스트레스와 연관이 있다고 알려진 MAPK 신호전달경로의 양상을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과, Erk1/2, Jnk 및 P38 단백질의 인산화는 폴펫 처리 30분 후 용량의존적으로 증가하는 양상을 띄었으며, 대부분 대조군에 비해 10 μM의 농도에서 4배에서 5배까지 증가하였다(도 5B-D). 이와는 반대로 단백질 합성과 관련된 Rps6 단백질의 인산화는 10 μM의 폴펫 처리에 따라 64%가량 감소하는 경향을 나타냄을 확인하였다(도 5E).

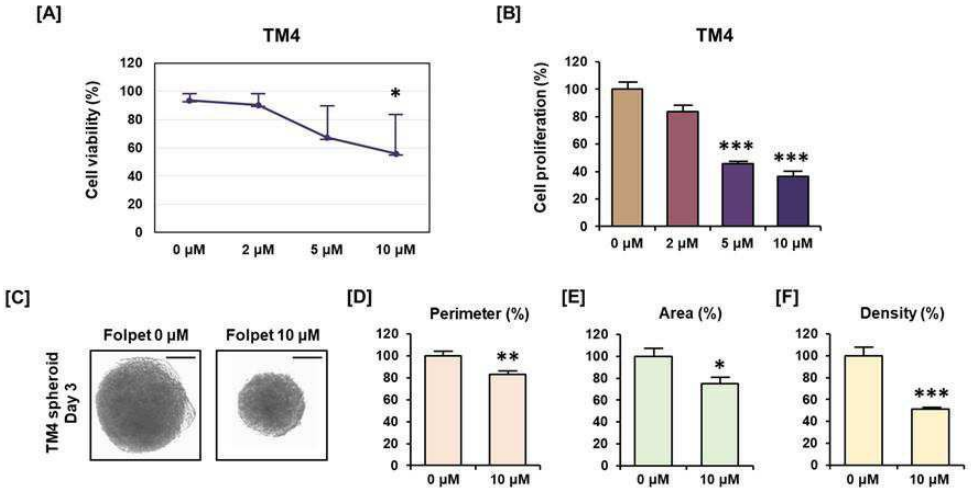
[0098] TM4 세포 내 NAC 처리에 의한 폴펫-유도 세포증식 억제 및 세포사멸 유도의 완화 효과

[0099] ROS scavenger인 NAC를 이용하여, 폴펫에 유도된 활성산소종 증가를 억제하였을 시, 세포 증식과 사멸에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과, 1 mM의 NAC와 10 μM의 폴펫을 병용처리시, 폴펫 처리에 의해 유도된 활성산소종의 양이 정상 수준으로 다시금 회복되는 양상을 보임을 확인하였다(도 6A). 또한, 폴펫에 의해 감소된 세포증식능도 NAC와의 병용처리를 통해서 30%에서 68% 정도로 회복하는 양상을 보임을 확인하였다(도 6B). 또한, 공초점 현미경을 통해 10 μM의 폴펫 처리에 의해, 세포자멸사의 마커인 DNA 분절화가 효과적으로 유도됨을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, NAC와 폴펫의 병용처리시 DNA 분절화를 감소시킴을 확인하였고(도 6C), 폴펫에 의해 유도된 산화 스트레스가 TM4 세포의 증식과 사멸에 영향을 끼친다는 점을 확인하였다.

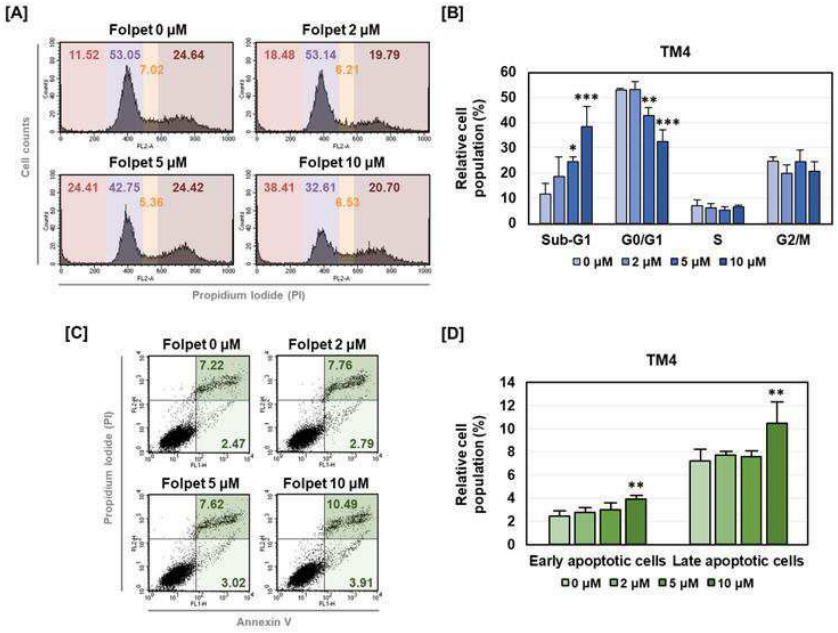
[0101] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

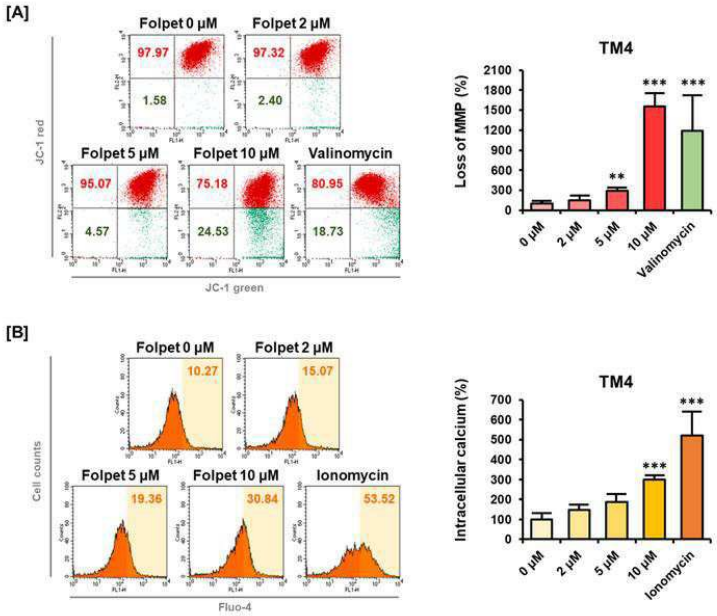
도면1



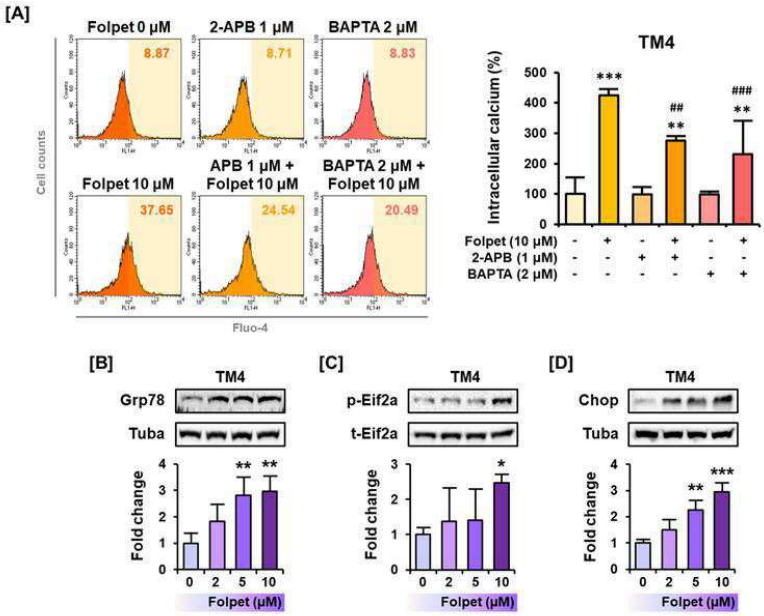
도면2


[A]
Folpet 0 μM
Folpet 2 μM
Folpet 5 μM
Folpet 10 μM
Cell counts
Propidium Iodide (PI)
[B]
TM4
Relative cell population (%)
Sub-G1
G0/G1
S
G2/M
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM
[C]
Propidium Iodide (PI)
Annexin V
[D]
TM4
Relative cell population (%)
Early apoptotic cells
Late apoptotic cells
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM

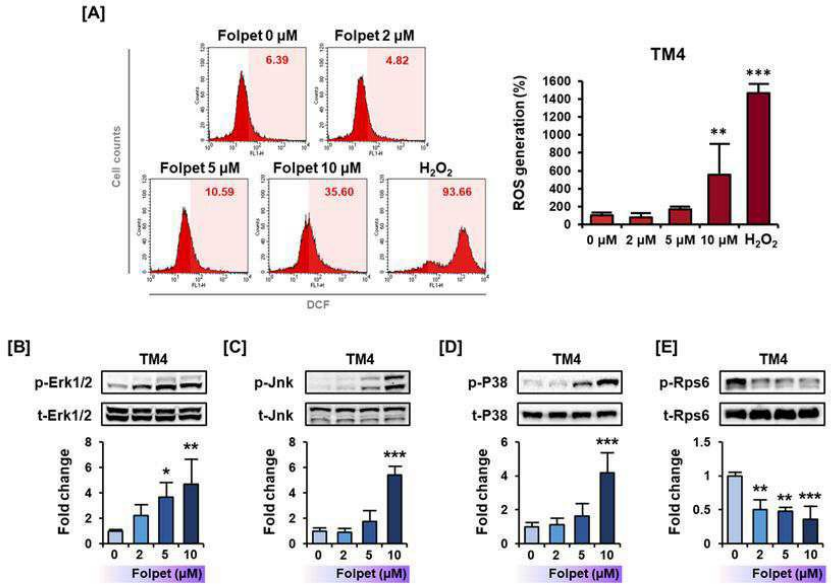
도면3


[A]
Folpet 0 μM
Folpet 2 μM
Folpet 5 μM
Folpet 10 μM
Valinomycin
JC-1 red
JC-1 green
TM4
Loss of MMP (%)
0 μM
2 μM
5 μM
10 μM
Valinomycin
[B]
Folpet 0 μM
Folpet 2 μM
Folpet 5 μM
Folpet 10 μM
Ionomycin
Cell counts
Fluo-4
TM4
Intracellular calcium (%)
0 μM
2 μM
5 μM
10 μM
Ionomycin

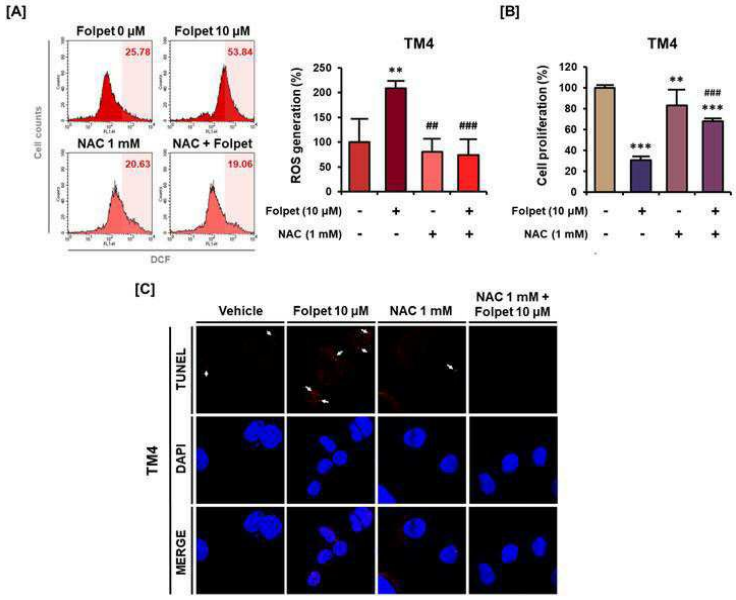
도면4


[A]
Folpet 0 μM
2-APB 1 μM
BAPTA 2 μM
8.87
8.71
8.83
Folpet 10 μM
APB 1 μM + Folpet 10 μM
BAPTA 2 μM + Folpet 10 μM
37.65
24.54
20.49
Cell counts
Fluo-4
TM4
Intracellular calcium (%)
Folpet (10 μM)
2-APB (1 μM)
BAPTA (2 μM)
[B]
TM4
Grp78
Tuba
Fold change
Folpet (μM)
[C]
TM4
p-Eif2a
t-Eif2a
Fold change
Folpet (μM)
[D]
TM4
Chop
Tuba
Fold change
Folpet (μM)

도면5


[A]
Folpet 0 μM
Folpet 2 μM
6.39
4.82
Folpet 5 μM
Folpet 10 μM
H2O2
10.59
35.60
93.66
Cell counts
DCF
TM4
ROS generation (%)
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM H2O2
[B]
TM4
p-Erk1/2
t-Erk1/2
Fold change
Folpet (μM)
[C]
TM4
p-Jnk
t-Jnk
Fold change
Folpet (μM)
[D]
TM4
p-P38
t-P38
Fold change
Folpet (μM)
[E]
TM4
p-Rps6
t-Rps6
Fold change
Folpet (μM)

도면6


[A]
Folpet 0 μM
Folpet 10 μM
NAC 1 mM
NAC + Folpet
25.78
53.84
20.63
19.06
Cell counts
DCF
TM4
ROS generation (%)
Folpet (10 μM)
NAC (1 mM)
[B]
TM4
Cell proliferation (%)
Folpet (10 μM)
NAC (1 mM)
[C]
Vehicle
Folpet 10 μM
NAC 1 mM
NAC 1 mM + Folpet 10 μM
TM4
TUNEL
DAPI
MERGE