



등록특허 10-2088995



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월13일

(11) 등록번호 10-2088995

(24) 등록일자 2020년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0662 (2013.01)

C12N 2500/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0010975

(22) 출원일자 2019년01월29일

심사청구일자 2019년01월29일

(56) 선행기술조사문헌

J. Nat. Prod. 2011, 74, 2526-2531*

KR1020130099707 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

조광원

광주광역시 남구 서문대로 780, 111동 1302호(주월동, 제석산 호반 힐하임)

오원근

서울특별시 관악구 봉천로 387, 210동 801호(봉천동, 두산아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 3 항

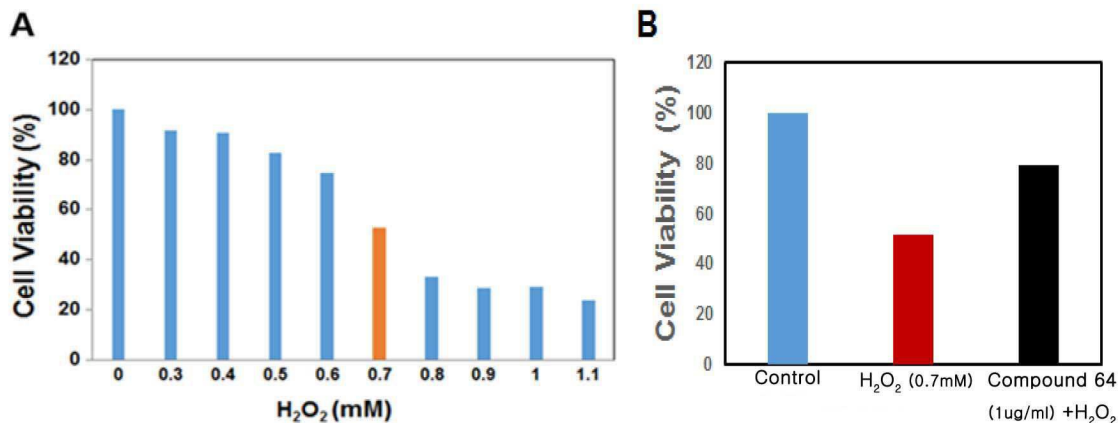
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 엔트-카우란 디테르펜계 화합물을 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스로부터 줄기세포 보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원(Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one) 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스로부터 줄기세포 보호용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 화합물은 산화 스트레스로부터 줄기세포를 보호하고, 줄기세포의 사멸을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 줄기세포와 관련된 다양한 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/999 (2013.01)

(72) 발명자

임경민

광주광역시 동구 백서로166번길 9-2, 102호(서석동)

나가라잔 마하라잔

광주광역시 동구 지산로57번길 5-11, 1층 903호(지산동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJT200669

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발(R&D)

연구과제명 해양바이오 지역특화 선도기술 개발(해조류 유래 식/의약 소재 개발)

기 여 율 1/2

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2018.04.01 ~ 2019.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1D1A1B03034527

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 세포 노화의 기전 분석 및 제어 방안 모색

기 여 율 1/2

주관기관 조선대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

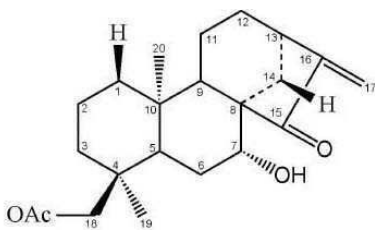
청구항 1

하기 화학식 1의 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원 (Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one) 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스로부터 줄기세포 보호용 조성물로서,

상기 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원 화합물의 농도는 0.2~1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고,

상기 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원 화합물은 산화적 스트레스에 의해 유도되는 줄기세포의 아포토시스(apoptosis)를 억제하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 보호용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)인 것을 특징으로 하는 줄기세포 보호용 조성물.

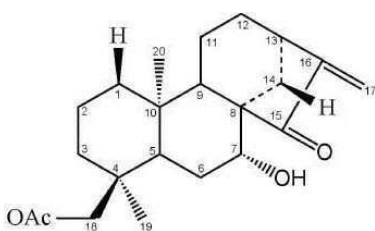
청구항 5

삭제

청구항 6

하기 화학식 1의 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원 (Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one) 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염을 0.2~1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포의 인 비트로 확장(expansion) 방법.

[화학식 1]



청구항 7

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 엔트-카우란 디테르펜계 화합물을 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스로부터 줄기세포 보호용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대극과에 속하는 크로톤 속(genus) 식물은 800종으로 구성되어 있으며, 주로 열대 지역에 분포되어 있다. 이 중 31 종은 베트남에서 재배되거나 야생에서 자란다. 이들 중 크로톤 톤킨렌시스(*Croton tonkinensis*)는 베트남 북부에서 자라는 열대 관목이다. 베트남에서는 이 식물의 말린 잎을 예로부터 화상, 농양, 농가진, 복통, 소화불량, 위장 및 십이지장 궤양, 말라리아를 치료하기 위한 전통약제로 사용하여 왔다. 또한, 두드러기, 나병, 건선, 트리코모나스(*Trichomonas*)에 기인한 질염 및 생식기 탈출증 치료에도 사용되어 왔다. 또한, 크로톤 톤킨렌시스 조 추출물은 스테롤, 장쇄알킬알코올, 글루코사이드, 플라보노이드 등을 포함한다. 이들 성분 중 보고에 의하면 이러한 엔트-카우란 디테르펜(ent-kauran diterpene)계 화합물은 결장암, 간암세포에서 AMP-활성에 기인한 단백질 인산화효소를 조절하여 세포사멸을 유도하고, NF- κ B 활성을 억제하여 항염증 효과가 있으며, 골아세포의 분화를 촉진한다고 알려져 있다.

[0003] 줄기세포(stem cells)는 시급한 의학적 필요를 가지는 난치성 질환(intractable diseases)에 대한 임상적 시도에 활용되고 있다. 자가 또는 이종 세포 이식에 의한 단일방향 세포재생을 목표로 하는 세포 대체 치료 전략과 같은 줄기세포 치료법을 위해서는 안전성 및 효과성뿐만 아니라, 임상 프로토콜 및 윤리적, 사회적 및 비용-경제적 효율성 등 수많은 중요 이슈들이 다각도로 모색되어야 한다.

[0004] 전통적인 줄기세포 배양 과정 동안에 포함된 물리적 및/또는 화학적 과정(예를 들어, 반복 파이프팅, 트립신 처리)으로 인해 유발되는 산화적 스트레스는 줄기세포 배양에서 극복되어야 할 문제 중 하나이다. 산화적 스트레스는 반응성이 매우 강한 활성산소(O_2^- , H_2O_2 , OH 및 1O_2)에 의하여 야기되며, 상기 산화적 스트레스 유도된 활성산소의 축적은 세포 사멸을 유도하고, 줄기세포의 증식 및 분화능의 감소를 초래하게 된다.

[0005] 전 세계적으로 천연물로부터 항산화 활성을 가지는 성분을 분리하여 안전하고 강력한 항산화제를 만들려는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 포도, 콩, 딸기류의 과실, 은행잎, 인삼 추출물 등의 다양한 천연 항산화 물질에 대한 연구와 보고가 이어지고 있다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1731800호에는 '디테르펜류를 유효성분으로 포함하는 결핵 치료용 약학 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1410332호에는 '중간엽 기질세포 배양용 항산화 조성물 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 엔트-카우란 디테르펜계 화합물을 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스로부터 줄기세포 보호용 조성물에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 크로톤 톤킨렌시스(*Croton tonkinensis*) 추출물로부터 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원(Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one) 화합물을 분리·정제하였고, 상기 화합물이 과산화수소에 의한 산화적 스트레스 조건에서 중간엽 줄기세포에 대한 우수한 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 엔트-카우란 디테르펜(ent-kauran diterpene)계 화합물을 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스로부터 줄기세포 보호용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 엔트-카우란 디테르펜(ent-kauran diterpene)계 화합물을 포함하는 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포의 인 비트로 확장(expansion) 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 엔트-카우란 디테르펜계 화합물인 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원(Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one)은 산화 스트레스 조건으로부터 줄기세포를 보호하고, 줄기세포의 사멸을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 줄기세포와 관련된 다양한 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 다양한 농도의 과산화수소(H_2O_2)를 처리한 후 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(human bone marrow mesenchymal stem cells, 이하 hBM-MSCs)의 세포 생존율을 확인한 결과(A)와 본 발명의 화합물(compound 64)을 1 $\mu g/ml$ 의 농도로 전처리한 후 과산화수소 처리 시 세포 생존율을 확인한 결과(B)이다. compound 64: Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one.

도 2는 hBM-MSCs에서 본 발명의 화합물(compound 64)을 다양한 농도로 전처리한 후 과산화수소 처리에 따른 세포 생존율을 확인한 결과이다. * $p < 0.05$, $n = 7$.

도 3은 hBM-MSCs에서 본 발명의 화합물(compound 64)을 1 $\mu g/ml$ 의 농도로 전처리한 후 다양한 농도의 과산화수소 처리에 따른 세포 생존율을 확인한 결과이다. * $p < 0.05$, $n = 6$.

도 4는 본 발명에 따른 화합물의 hBM-MSCs의 세포사멸 억제능을 확인한 결과로, 아넥신 V(annexin V)와 PI(Propidium Iodide)로 염색한 hBM-MSCs를 FACS(Fluorescence activated cell sorter) 분석한 결과이다. I: necrotic cell, II: late apoptotic cell, III: viable cell, IV: early apoptotic cell, C.T: compound 64 treated.

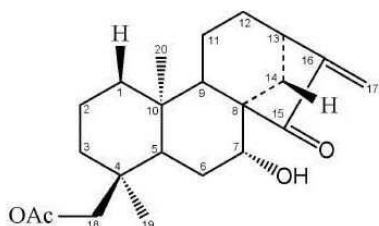
도 5는 본 발명에 따른 화합물의 세포사멸 억제능을 단백질 수준에서 확인하기 위해 웨스턴 블랏을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엔트-카우란 디테르펜(ent-kauran diterpene)계 화합물을 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스로부터 줄기세포 보호용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에 조성물에 있어서, 상기 엔트-카우란 디테르펜계 화합물은 하기 화학식 1의 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원(Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one) 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

화학식 1



[0014]

[0015] 본 발명의 상기 화합물은 크로톤 톤킨렌시스(*Croton tonkinensis*) 추출물로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 당업계의 공지된 화합물의 합성 방법을 통해 제조할 수도 있다.

[0016] 용어 '생리학적으로 허용되는 염'은 바람직하게는, 본 발명의 의미에서, 본 발명에 따른 화합물과 적어도 하나의 생리학적으로 허용되는 산 또는 염기와 염을 포함한다. 상기 생리학적으로 허용되는 산의 예는 염산, 브롬화수소산, 황산, 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 카본산, 포름산, 아세트산, 옥살산, 석신산, 타르타르산, 만델산, 푸마르산, 말레산, 락트산, 시트르산, 글루탐산, 사카르산, 모노메틸세바스산, 5-옥소프롤린, 헥산-1-설폰산, 니코틴산, 2, 3 또는 4-아미노벤조산, 2,4,6-트리메틸벤조산, α -리포산, 아세틸 글리신, 히푸르산, 인산, 아스파르트산이다. 상기 생리학적으로 허용되는 염기의 예는 알칼리 금속염 및 알칼리 토금속염, 특히 (일)나트륨염 또는 (이)나트륨염, (일)칼륨염 또는 (이)칼륨염, 마그네슘염 또는 칼슘염, 뿐만 아니라 암모늄

염 $[\text{NH}_x\text{R}_{4-x}]^+$ (여기서, x는 0, 1, 2, 3 또는 4이고, R은 분지되거나 분지되지 않은 C_{1-4} 잔기를 나타낸다)이 특히 바람직하다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 따른 줄기세포 보호용 조성물에 있어서, 상기 줄기세포는 바람직하게는 골수(bone marrow) 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 용어 '중간엽 줄기세포'는 골수와 제대혈에서 채취되는 성체줄기세포의 하나로 체내에 대략 100만개가 존재하는 것으로 알려졌으며, 섬유모세포의 모양(방추형 모양)을 띄고 있으며, 부착되는 특징이 있고, 시험관에서는 무한정 증식이 가능하며, 혈액줄기세포(hematopoietic stem cell)와 달리 골세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포 및 섬유아세포 계통에 속하는 분화된 기질 세포가 될 수 있는 특징이 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 따른 줄기세포 보호용 조성물에 있어서, 상기 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원 화합물의 농도는 산화적 스트레스로부터 줄기세포를 보호할 수 있는 범위로, 바람직하게는 0.2~1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도일 수 있고, 더욱 바람직하게는 0.5~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명에 따른 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원 화합물은 항산화 활성을 통해 산화적 스트레스에 의해 유도되는 줄기세포의 아포토시스(apoptosis)를 억제하는 것으로, 용어 '항산화(anti-oxidation)'는 체내에서 일어나는 여러 산화작용을 방지하는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명은 또한, 엔트-카우란 디테르펜(ent-kauran diterpene)계 화합물을 포함하는 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포의 인 비트로 확장(expansion) 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 엔트-카우란 디테르펜계 화합물은 상기 화학식 1의 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원(Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one) 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 방법은 상술한 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원 화합물을 유효성분으로 포함하기 때문에, 중복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해서 그 기재를 생략한다.

[0024] 본 발명의 인 비트로 확장 방법은 배양 배지에 포함된 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원 화합물의 항산화 활성을 통해 줄기세포 배양 시에 유발되는 산화적 스트레스에 따른 줄기세포의 사멸을 억제하여 효과적으로 세포를 확장(또는 증식)시킬 수 있는 방법이다.

[0025] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 재료 및 방법

[0027] 1. 화합물 분리 및 동정

[0028] 본 발명의 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원(Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one) 화합물은 크로톤 톤킨렌시스(*Croton tonkinensis*) 추출물로부터 분리, 정제 및 동정된 것으로, 서울대학교 오원근 교수로부터 제공받아 사용하였다.

[0029] 2. 세포 배양

[0030] 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포(human bone marrow mesenchymal stem cells, 이하 hBM-MSCs)는 CEFO(Cell Engineering for Origin, 한국)에서 구매하였으며, 상기 중간엽 줄기세포는 다른 자극 보조제 또는 비타민의 공급 없이 성장 보충제, L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 인간 골수유래 중간엽 줄기세포 배지(Gibco, 미국)에서 배양하였다. 상기 중간엽 줄기세포는 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 배양기에서 배양하면서, 7번 계대배양한 후 하기 실험에 사용하였다.

[0031] 3. MTT 어세이

[0032] 과산화수소에 의한 hBM-MSCs의 세포 독성 및 본 발명의 화합물 전처리에 따른 hBM-MSCs의 세포 사멸 보호 효과는 MTT 분석을 통해 측정하였다. 간단하게, 2.5×10^3 hBM-MSCs 세포를 96-웰 플레이트에 준비하고, 하룻 밤 배양한 다음, 과산화수소를 세포에 처리하고 1시간 추가 배양 후 MTT 분석을 수행하거나, 화합물을 전처리하고 12 시간 배양한 후, 과산화수소를 세포에 처리하고 1시간 추가 배양한 후 분석하였다.

[0033] 4. 웨스턴 블롯

[0034] 프로테아제(protease) 및 디포스파타제 저해제(dephosphatase inhibitor)가 포함된 RIPA 버퍼(Santa Cruz Biotechnology, 미국) 50 μ l를 hBM-MSCs에 처리하고 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 16,000 xg에서 20분 동안 원심분리시켜 총 단백질을 추출하였다. 그 후, cleaved-caspase 3, p53 및 GAPDH 특이 항체를 이용하여 단백질 추출물을 대상으로 면역블롯팅을 수행하였다. 발색된 블롯은 Image J 프로그램을 사용하여 정량하였다.

[0035] 5. 통계 분석

[0036] 모든 데이터는 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 그룹간 통계학적 비교는 독립적 t-test를 사용하였다. 0.05 이하의 p 값을 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[0037] 실시예 1. 산화적 스트레스로부터 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원(Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one) 화합물의 hBM-MSCs 보호능 분석 - MTT 검정

[0038] 본 발명자는 산화적 스트레스 조건에서 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원 화합물(이하, compound 64)의 줄기세포 보호 효과를 분석하였다.

[0039] 먼저, 과산화수소(H₂O₂)에 의한 hBM-MSCs의 세포 독성을 확인하기 위해, 0.3 ~ 1.1 mM의 과산화수소를 1시간 동안 처리한 후 hBM-MSCs의 생존율을 분석하였다. 그 결과, 0.7 mM의 과산화수소 처리군에서 53%의 세포 생존율이 확인되어(도 1A), 상기 농도를 산화 스트레스 처리 조건으로 설정한 후, compound 64의 세포 보호 효과를 실험하였다. 1 μ g/ml의 compound 64를 hBM-MSCs에 처리하고 12시간 동안 배양한 후, 0.7 mM의 과산화수소를 처리하여 산화적 스트레스를 유발시킨 후 세포 생존율을 분석하였다. 그 결과, 과산화수소 처리 조건에서 감소되었던 생존율이 본 발명의 화합물을 전처리한 조건에서 다시 회복되는 것이 확인되었다(도 1B).

[0040] 또한, compound 64의 hBM-MSCs에 대한 세포 보호 효과의 최적 농도를 확인하기 위해, 0.5, 1, 2 및 4 μ g/ml의 compound 64를 hBM-MSCs에 전처리한 후, 0.7 mM의 과산화수소를 처리하여 산화적 스트레스를 유발시킨 후 세포 생존율을 분석하였다. 그 결과, 과산화수소만 처리된 줄기세포의 생존율과 비교하여 0.5 및 1 μ g/ml의 compound 64를 처리한 줄기세포에서 우수한 생존율이 확인되었다(도 2). 특히, 고농도(2 및 4 μ g/ml)의 compound 64를 처리한 줄기세포에서 생존율이 다시 감소되는 것으로 보아, compound 64의 최적 농도는 0.5 ~ 1 μ g/ml인 것으로 판단되었다. 또한, compound 64의 전처리 농도를 1 μ g/ml로 고정하고, 과산화수소를 500 ~ 1,500 mM의 다양한 농도로 처리한 결과, 과산화수소만 처리된 줄기세포의 생존율과 대비하여 compound 64를 전처리한 줄기세포에서 모두 세포 생존율이 우수한 것으로 확인되었다(도 3). 상기의 결과를 통해, 본 발명의 compound 64 화합물이 산화적 스트레스에 의해 유도되는 줄기세포의 사멸을 효과적으로 보호할 수 있음을 알 수 있었다.

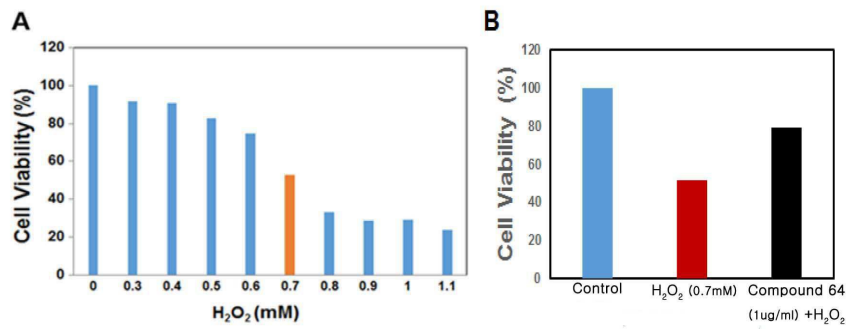
[0041] 실시예 2. 산화적 스트레스로부터 엔트-18-아세톡시-7 α -하이드록시카우라-16-엔-15-원(Ent-18-acetoxy-7 α -hydroxykaur-16-en-15-one) 화합물의 hBM-MSCs 보호능 분석 - FACS 및 웨스턴 블롯

[0042] 본 발명자는 compound 64 화합물의 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과를 FACS 및 웨스턴 블롯을 통해 관찰하였다. 먼저 FACS 분석을 위해, Compound 64와 과산화수소를 처리한 hBM-MSCs를 Annexin V와 PI로 이중염색하였다. 아포토시스(apoptosis)가 시작되면 초기에 포스파티딜세린(phosphatidylserine)이 막 안에서 밖으로 재배치되는데 이 때, Annexin V-FITC가 밖으로 재배치된 포스파티딜세린과 결합하게 되고, 아포토시스로 인해 막이 완전히 상실되면 PI가 세포 내로 들어가 DNA에 삽입되므로, 형광을 측정하여 세포사멸의 정도를 분석하였다. FACS 결과의 분석은 FlowJo 소프트웨어를 이용하였다. FACS 분석 결과, Compound 64를 전처리한 hBM-MSCs에서는 과산화수소만 처리한 hBM-MSCs와 비교하여 전체 아포토시스 세포의 수 및 late 아포토시스 세포의 수에서 현저한 감소가 확인되어, anti-apoptosis 효과가 있음을 알 수 있었다(도 4).

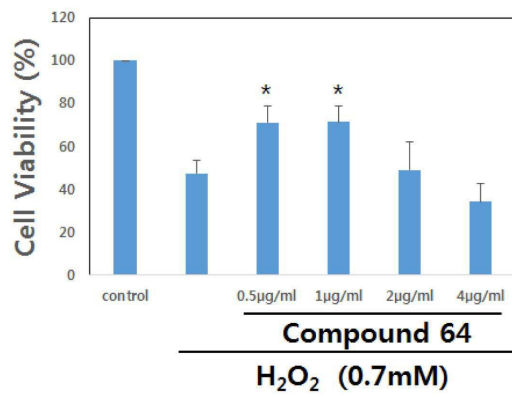
[0043] 또한, Compound 64의 줄기세포 보호 효과를 단백질 수준에서 확인하기 위해 p53 및 cleaved caspase-3를 대상으로 웨스턴 블롯을 수행하였다. GAPDH 단백질을 항존 단백질로 하여, p53 및 cleaved caspase-3 단백질의 발현 수준을 정량화하였다. 그 결과, p53 단백질은 과산화수소만 처리한 hBM-MSCs에서 발현량이 증가되었지만, Compound 64와 과산화수소를 같이 처리한 hBM-MSCs에서는 발현 수준이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, cleaved-caspase-3 단백질 또한 p53과 일치하는 양상으로 관찰되었다(도 5). 상기의 결과를 통해, 본 발명의 Compound 64 화합물이 산화적 스트레스에 의해 유도되는 줄기세포의 아포토시스(apoptosis)를 효과적으로 억제하여 줄기세포에 대한 보호 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

도면

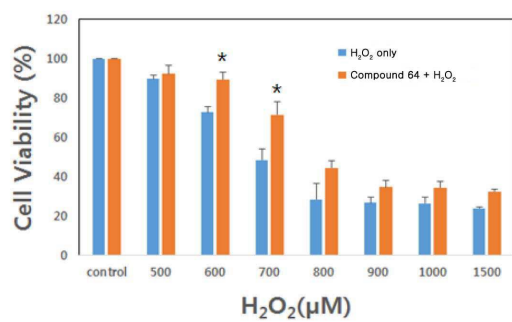
도면1



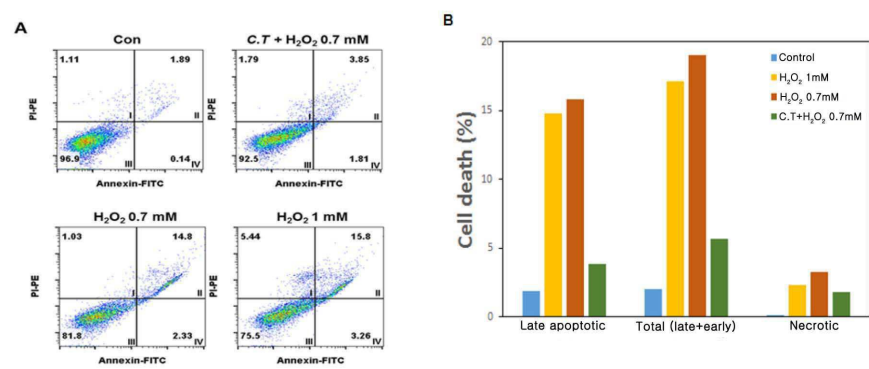
도면2



도면3



도면4



도면5

