



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월18일
(11) 등록번호 10-1879975
(24) 등록일자 2018년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0015667
(22) 출원일자 2017년02월03일
심사청구일자 2017년02월03일
(56) 선행기술조사문헌
US20070099826 A1
Journal of Pharmacological Sciences 131
(2016) 93-100(2016.04.19.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 동남구 문암1길 68, 105동 1402
호
임화선
서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 곽희찬

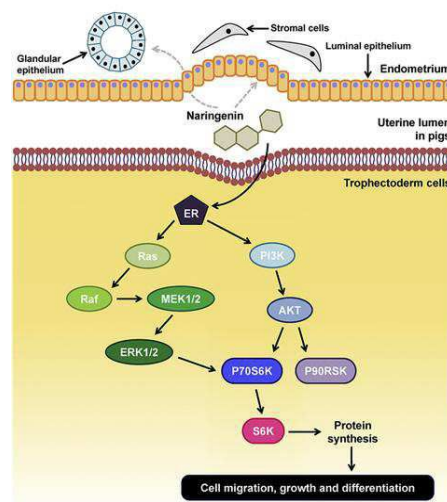
(54) 발명의 명칭 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 조성물은 천연물을 원료로 하는바 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달경로 내 단백질의 발현 활성화를 통해 영양외배엽 세포의 이주 및 증식 능력을 향상시킴으로써 착상 효율을 크게 증가시킬 수 있는바, 임신 촉진제, 여성 불임증을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 114065032SB020

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 [협동] 모돈의 산차별 유전자발현 네트워크 분석 및 번식능력 증대기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.25 ~ 2016.09.24

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

나린제닌을 유효성분으로 포함하는 영양외배엽 세포의 착상 촉진용 약학적 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 영양외배엽 세포의 이주 및 증식 능력을 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 고령화 사회와 함께, 출산을 하는 산모의 나이가 높아지면서 불임이 증가하고 있다. 또한, 산업화로 인한 환경오염과 여성의 사회진출 등으로 인해 여성이 받는 스트레스가 증가하면서, 임신율이 크게 낮아지고 있는 실정이다. 일반적으로 알려진 여성 불임의 원인으로는 배란장애, 수정란의 이송장애 및 착상장애 등이 있다. 배란장애와 수정란의 이송장애에 의한 불임 문제는 시험관아기시술법(IVF)을 통해 대부분 해결되고 있으나, 착상장애에 의한 불임은 아직까지 명확한 해결 방법이 없는 실정이다.

[0003] 성공적인 임신을 유지시키기 위해서는 배아의 발달, 착상, 태반형성, 호르몬 조절, 모체와 태아 간 영양소 및 가스의 교환이 필요시 된다 (Spencer TE *et al.*, Reproduction, 128(6):657-668, 2004).

- [0004] 돼지의 영양외배엽 세포(porcine trophectoderm cells, pTr cells)는 임신 초기 다양한 조직영양소에 따른 배아의 발달 및 분화, 착상 과정, 태반형성 과정을 이해하기 위해 구축된 *in vitro* 모델로서 태아-태반의 발생생물학적 과정을 이해하기 위한 연구에 사용되고 있다 (Jaeger LA *et al.*, Endocrinology, 146(9):3933-3942, 2005).
- [0005] 수정 이후 10 일에서 12 일 사이 돼지 영양외배엽 세포의 증식과 이주 능력은 자궁 내강상피 세포에 비침습적 착상을 통해 상피용모막태반 발달을 이루기 위한 필수적인 과정이다 (Geisert RD *et al.*, Adv Anat Embryol Cell Biol, 216:137-163, 2015).
- [0006] 착상 전 기간(perimplantation period) 중 수태산물로부터 분비되는 에스트로겐은 프로스타글란딘 F_{2α}의 분비를 막음으로써 황체용해(luteolysis)를 막고 자궁 내막 조직을 리모델링하여 착상을 위한 자궁 환경을 형성한다 (Bazer FW and Johnson GA, Differentiation, 87(1-2):52-65, 2014).
- [0007] 한편, 나린제닌(naringenin)은 폴리페놀계 화합물로서 항산화, 항암, 당대사, 면역시스템을 조절하는 물질로 알려져있으며 에스트로겐 수용체와 반응하여 자궁을 발달시키는 역할을 한다(Breinholt VM *et al.*, Basic Clin Pharmacol Toxicol, 94(1):30-36, 2004; and Zierau O *et al.*, Mol Cell Endocrinol, 294(1-2):92-99, 2008). 또한, 나린제닌은 인간 태반 내 발생된 감염을 감소시킴으로써 NF-κB 신호전달과정 조절을 통해 염증으로 인해 유발된 조산을 조절하는 것으로 알려져 있지만(Lim R *et al.*, Mol Hum Reprod, 19(7):451-462, 2013), 현재까지 나린제닌을 이용한 착상 촉진 기전에 관한 연구는 보고된 바 없다.
- [0008] 또한, 종래 동물의 수정란 착상 또는 임신 촉진용 조성물 관련 연구로는 MMP-9(metalloproteinase-9)을 이용하여 약 25%의 임신율 증가 및 착상을 증가를 유도한 내용이 보고된바 있으나(특허문헌 1) 천연 식물성 화합물 유래 관련 물질과 연관하여서는 연구 내용이 전무한 실정이다.
- [0009] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 임신 초기 착상 효율을 증진시킬 수 있는 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 돼지 영양외배엽 세포를 사용하여 나린제닌에 의한 세포 증식 및 이주 능력 증가 효과를 확인하고, 나린제닌이 영양외배엽 세포 내 PI3K/AKT와 ERK1/2 MAPK 신호전달경로를 활성화시킨다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2010-0049153호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 영양외배엽 세포의 이주 및 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물을 제공한다.

- [0018] 본 발명은 또한, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 영양외배엽 세포의 이주 및 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 조성물은 천연물을 원료로 하는바 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달경로 내 단백질의 발현 활성화를 통해 영양외배엽 세포의 이주 및 증식 능력을 향상시킴으로써 착상 효율을 크게 증가시킬 수 있는바, 임신 촉진제, 여성 불임증을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 돼지 영양외배엽 세포의 이주성 향상 효과와 관련된 나린제닌에 의한 세포 증식 기전을 나타낸 것이다.
- 도 2는 나린제닌이 돼지 영양외배엽 세포의 세포 이주 능력에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것으로, 좌측은 트랜스웰 막을 이동한 영양외배엽 세포의 수를 측정한 결과이며, 우측은 트랜스웰 막을 이용한 세포 이동성을 분석한 결과이다.
- 도 3은 나린제닌이 돼지 영양외배엽 세포의 신호 전달 기전에 미치는 영향을 나타낸 것으로, (A) AKT, (B) ERK1/2의 용량의존적 단백질 인산화 증가 효과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 돼지 영양외배엽세포 내 나린제닌에 의한 AKT 및 ERK1/2 단백질의 인산화 양상을 면역형광기법을 이용하여 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 나린제닌의 시간의존적 투여에 따른 돼지 영양외배엽 세포 내 신호 전달 기전 변화를 분석한 결과를 나타낸 것으로, (A) AKT, (B) ERK1/2, (C) P70S6K, (D) P90RSK의 시간의존적 단백질 인산화 증가 효과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 PI3K 억제제와 나린제닌의 혼합조성물을 이용하여 PI3K 신호전달 조절 인산화효소의 발현을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 ERK1/2 억제제와 나린제닌의 혼합조성물을 이용하여 ERK1/2 MAPK 신호전달 조절 인산화효소의 발현을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 나린제닌 및 PI3K, ERK1/2 억제제 혼합조성물에 따른 돼지 영양외배엽세포의 이주 능력을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 나린제닌 및 PI3K, ERK1/2 억제제 혼합조성물에 따른 돼지 영양외배엽세포의 이동성 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 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.
- [0025] 본 발명에서는 돼지 영양외배엽 세포의 이주성 향상 효과와 관련된 나린제닌에 의한 세포 증식 기전을 밝혔다(도 1).
- [0026] 본 발명은 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 조성물은 약학적 조성물 식품 조성물을 포함한다.
- [0029] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0030] 본 발명에 있어서, "임신"은 수정란이 자궁 내벽에 착상하여 모체로부터 영양을 공급받으며 태아로 발육하는 과

정으로, 정상적인 임신과정은 수정, 착상 및 태아발달의 순서로 진행된다.

- [0031] 상기 "수정"은 여성의 난소에서 배란된 난자가 수란관의 상부에서 정자와 만나면 수정란이 형성되는 것을 의미한다. 난자는 배란 후 1~2일, 정자는 자궁 내에서 2~3일 동안 살아남아서 수정할 수 있는 능력을 가지며, 정자의 경우 사정된 후 1주일까지 살아 있기도 한다. 정자는 사정된 후 2~3시간이면 수란관을 따라 난소 가까이까지 이르기 때문에, 일반적으로 정자가 먼저 수란관 상부에 도달해 있다가 난소에서 배란된 난자가 이곳에 이르면 여러 정자 중 하나만이 난자와 결합하여 수정란을 형성한다.
- [0032] 상기 "착상"은 수란관 상부에서 정자와 난자가 만나 형성된 수정란이 난할을 거듭하면서 자궁으로 이동하여 포배의 상태로 자궁 내벽에 파묻히는 현상을 의미한다. 수정란이 착상된 이후를 임신이라고 한다. 자궁에 착상한 수정란은 자궁 내벽으로부터 영양을 공급받으면서 약 9개월 동안 자란 후 태어나게 된다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나린제닌은 영양외배엽 세포의 착상을 촉진시키는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 이때, 상기 영양외배엽 세포는 포유동물 유래의 세포일 수 있으며, 상기 포유동물은 설치목(예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 및 기니피그), 우제목(예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소, 사슴, 기린 및 영양), 기제목(예를 들어, 말, 당나귀, 코뿔소 및 맥), 식육목(예를 들어, 개, 고양이, 호랑이, 늑대, 여우, 사자, 치타, 표범, 너구리, 오소리, 퓨마, 재규어 및 샴쌍이), 토끼목(토끼 및 우는 토끼), 식충목(예를 들어, 고슴도치, 두더지 및 솔레노돈) 및 영장목(예를 들어, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 보노보노, 일본원숭이, 붉은털원숭이)일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나린제닌은 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 활성화시키는 효과를 가지고 있어, 영양외배엽 세포의 이주 및 증식 능력 향상을 통해 착상 효율을 증가시키는 효과를 가진다.
- [0037] 상기 조성물은 나린제닌을 단독으로 포함하거나, 임신 촉진에 효과가 있는 물질을 유효성분으로 더 포함할 수 있고, 상기 유효성분 외에도 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 추가성분, 즉, 약제학적으로 허용되거나 영양학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 보다 상세하게는 상기 나린제닌을 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다.
- [0039] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 통상의 것을 모두 사용 가능하고, 일 예로 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 칼슘카보네이트, 텍스트린, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 성분들은 유효성분 즉, 나린제닌에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 조성물은 임신 촉진용으로서 단독으로 사용될 수 있고, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제등과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 나린제닌의 일일 투여량은 0.01 내지 10000 mg/kg이며, 바람직하게는 1 내지 20mg/kg이고, 하루 1회 내지 3회에 나눠 투여하는 것이 바람직하다.
- [0042] 또한, 본 발명은 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물을 제공한다.
- [0043] 본 발명에 따른 조성물은 임신 촉진을 목적으로 하는 건강기능식품에 포함될 수 있으며, 본 발명의 유효성분을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 합성 또는 추출물로부터 분리된 것을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 또한 상기 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 조절하여 사용 될 수 있다.
- [0044] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 또는 건강기능식

품을 모두 포함한다.

- [0045] 본 발명의 식품 보조 첨가제는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로 텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에르트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0046] 상기 외에 본 발명에 따른 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명에 따른 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0048] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.
- [0049] 상기 불임증은 여성 불임증(Female infertility)일 수 있다.
- [0050] 상기 여성 불임증은 난자의 비착상(Nonimplantation of ovum), 무배란과 관련된 여성 불임증(Female infertility associated with anovulation), 자궁관에서 기원한 여성 불임증(Female infertility of tubal origin), 자궁관의 선천 이상과 관련된 경우(Associated with congenital anomaly of tube), 자궁관의 폐쇄(Tubal block), 자궁관의 폐색(Tubal occlusion), 자궁관의 협착(Tubal stenosis), 자궁에서 기원한 여성 불임증(Female infertility of uterine origin), 자궁의 선천 이상과 관련된 경우(Associated with congenital anomaly of uterus), 자궁목에서 기원한 여성 불임증(Female infertility of cervical origin), 남성 요인과 관련된 여성 불임증(Female infertility associated with male factors), 기타 요인에서 기원한 여성 불임증(Female infertility of other origin) 및 상세불명의 여성 불임증(Female infertility, unspecified)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 "난자 비착상(Nonimplantation of ovum)"은 여성 불임증의 대표적인 원인이다. 착상시, 수정란이 세포분열을 하면서 이동하여 자궁속에 들어와 배반포 단계에 이르면 자궁내막에 파묻혀 자리를 잡게 된다. 그러나, 배아가 착상할 자궁내막의 두께가 충분치 않거나 손상으로 인해 경직될 경우 착상이 되기가 어려워 우며 자궁벽의 유착등으로 공간이 부족할 경우 유산되는 경우가 많다. 자연유산, 계류유산, 임신중절수술, 자궁내막염, 골반결핵 및 자궁내 장치등으로 유발된 자궁내 염증에 의해 자궁내막이 유착되거나, 자궁근종 폴립 등으로 자궁형태변형이나 자궁내막에 면역학적 과민반응이 생기거나, 선천적 자궁기형 호르몬 분비이상으로 자궁내막형성이 불완전할 경우 착상에 장애가 발생한다. 난자 비착상은 인공수정, 시험관 기술 실패의 가장 큰 원인으로 지목되고 있다.
- [0052] 상기 약학적 조성물 또는 식품 조성물은 상술한 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 약학적 제제 또는 식품 제제를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 조성물과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0054] 본 발명은 또한, 상기 나린제닌을 포함하는 조성물을 이용하여 영양외배엽 세포의 이주 및 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.
- [0056] [실시예]
- [0057] 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.
- [0059] **실시예**
- [0060] **<실험 방법>**
- [0061] 1. 실험동물 및 세포배양
- [0062] 수정 이후 12일째 되는 임신한 암태지로부터 수태산물을 분리하였으며 이로부터 영양외배엽 세포주를 동정하여 일차 배양하여 이후의 실험을 진행하였다. 돼지 영양외배엽 세포의 단층배양을 위해서 DME/F12 1:1 배지에 10%

의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 항생제인 ZellShield를 함께 혼합하여 사용하였다.

2. 실험 재료

후보 조성물질인 나린제닌은 Sigma로부터 구매하여 사용하였으며, 나린제닌에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6 단백질을 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

3. Transwell을 이용한 세포 이주 능력 측정

돼지 영양외배엽 세포의 세포 이주 능력에 나린제닌이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 1×10^5 개의 돼지 영양외배엽 세포와 DME/F12 1:1 배지 100 μ l를 8-mm Transwell inserts (Corning, Inc., Corning, NY, USA)에 분주하고 나린제닌을 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M의 농도별로 처리하여 12시간 동안 배양한 다음, 메탄올로 10분간 trans-membrane을 이동한 세포를 고정하여, 건조 및 헤마톡실린 (catalog number: HHS32, Sigma Aldrich, Inc.) 염색을 30분 동안 수행하고, 씻어주었다. 슬라이드 글라스에 membrane을 올려주고 Permout solution으로 고정하여 세포 이주 능력을 광학현미경 DM3000 (Leica)로 관찰, 촬영 및 계산하였다.

4. 세포 이주성 및 세포-세포 간 상호능력 분석

돼지 영양외배엽 세포의 세포 이주 능력 및 세포-세포 간 상호능력에 있어 나린제닌이 미치는 영향을 확인하기 위하여 Ibidi migration culture dish (Ibidi, Germany)를 사용하였으며, 2×10^5 cells/ml의 돼지 영양외배엽 세포 70 μ l를 분주하여 배양한 뒤, FBS 기아 상태로 24시간 추가로 배양하였다. Migration culture dish에 inserts를 제거해주고 나린제닌 (20 μ M) 및 나린제닌과 LY294002 (20 μ M), U0126 (20 μ M), LY294002와 U0126를 함께 20시간 동안 처리하였으며 세포 이주 능력을 광학 현미경 DM3000 (Leica)로 관찰, 촬영 및 계산하였다.

5. 면역형광법

3×10^4 개의 영양외배엽 세포를 10% FBS가 포함된 DME/F12 1:1 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 나린제닌 20 μ M을 30분 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 1:200으로 희석된 p-AKT, p-ERK1/2 항체를 처리하였으며 대조군에는 rabbit IgG를 처리하여 4°C에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-rabbit IgG Alexa 488 (catalog number: A-11008, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 영양외배엽 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 영양외배엽 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.

6. 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

돼지 영양외배엽 세포에 나린제닌 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 영양외배엽 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.

7. 통계분석

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

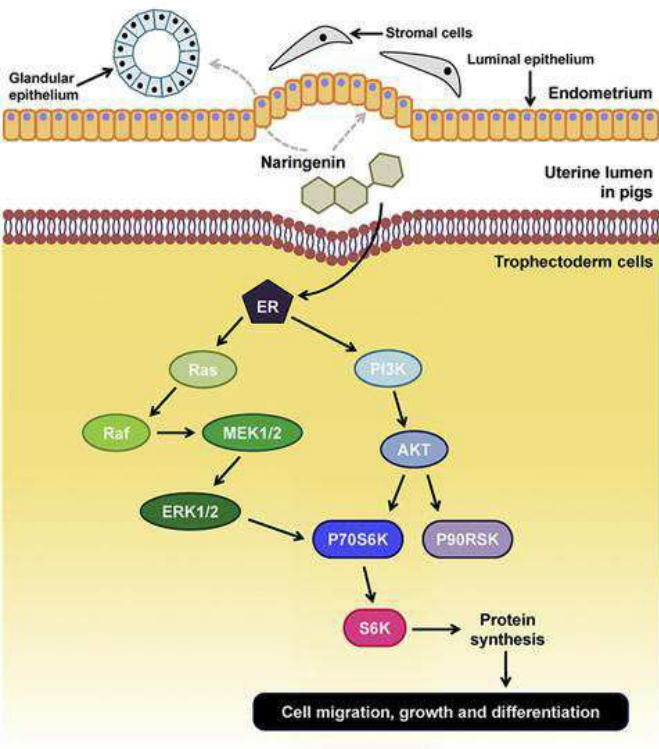
<실험 결과>

1. 나린제닌이 돼지 영양외배엽세포의 세포 이주 능력에 미치는 영향

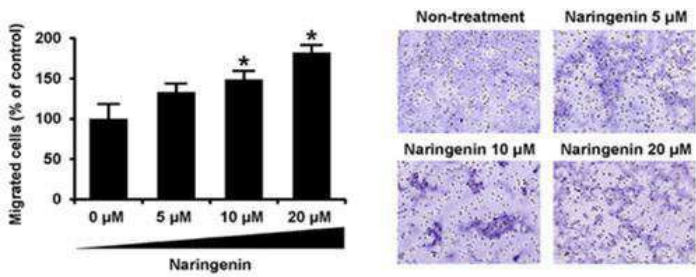
- [0084] Transwell membrane을 이용한 돼지 영양외배엽 세포의 이주 능력을 확인하기 위하여 나린제닌을 용량의존적으로 인큐베이션 하였으며 transwell membrane을 이동한 영양외배엽세포의 수를 측정한 결과 20 μ M 나린제닌을 처리한 돼지 영양외배엽 세포의 이주 능력이 대조군의 세포주보다 약 182% 향상한 것을 확인할 수 있었다 (도 2).
- [0086] **2. 나린제닌이 돼지 영양외배엽세포의 신호전달기전에 미치는 영향**
- [0087] 돼지 영양외배엽 세포에 나린제닌을 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M의 농도별로 처리한 다음 영양외배엽 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 웨스턴블롯을 수행한 결과 AKT와 ERK1/2 단백질의 인산화가 용량의존적으로 증가함을 나타내었다. 이로써 나린제닌에 따른 돼지 영양외배엽 세포의 이주성 향상이 PI3K, ERK1/2 MAPK 신호전달 메커니즘에 의해 조절되는 것임을 유추할 수 있었다(도 3).
- [0088] 또한, 나린제닌에 의한 두 가지 단백질의 인산화 양상을 면역형광기법으로 영양외배엽세포를 염색하여 확인한 결과 AKT, ERK1/2의 인산화가 모두 영양외배엽 세포의 세포질에서 유도되는 것으로 나타났다(도 4).
- [0090] **3. 나린제닌의 시간의존적 투여에 따른 영양외배엽세포 내 신호전달기전 변화 분석**
- [0091] 용량의존적 투여 결과에 따라 20 μ M 농도의 나린제닌을 0, 5, 15, 30, 60, 120분에 맞춰 시간의존적으로 투여한 단백질을 추출하여 PI3K 및 ERK1/2 MAPK 신호전달 과정의 주요 신호전달매개 단백질인 AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK 단백질의 인산화 양상을 확인한 결과 네 가지 단백질 모두 20 μ M 나린제닌을 30분까지 인큐베이션 하였을 때 대조군에 비해 증가하는 양상을 나타내는 것을 확인하였다(도 5).
- [0093] **4. 나린제닌이 돼지 영양외배엽세포의 PI3K/AKT, ERK1/2 MAPK 신호전달경로에 미치는 영향 확인**
- [0094] 돼지 영양외배엽 세포 내 나린제닌에 의한 PI3K, ERK1/2 MAPK 신호전달경로 조절양상을 확인하기 위하여 PI3K 경로 억제제인 LY294002와 ERK1/2경로 억제제인 U0126을 나린제닌과 함께 용량의존적으로 영양외배엽 세포에 처리함에 따라 나린제닌에 의해 활성화되었던 AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6 단백질의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다 (도 6, 7).
- [0096] **5. 나린제닌과 PI3K, ERK1/2 신호전달경로 억제제 혼합물을 통한 돼지 영양외배엽세포의 이주능력 분석**
- [0097] 나린제닌에 의해 증가하였던 돼지 영양외배엽 세포의 이주능력이 PI3K, ERK1/2 신호전달경로 조절에 따라 변화하는 양상을 확인하기 위하여 나린제닌과 LY294002, U0126을 혼합하여 영양외배엽 세포를 인큐베이션 시킨 후, transwell membrane 및 Ibidi migration culture dish를 사용하여 돼지 영양막 세포의 이주성을 확인하였다. 그 결과, 나린제닌에 의해 증가하였던 영양막 세포의 이주성이 PI3K 및 ERK1/2 경로를 억제함에 따라 감소하는 양상을 확인할 수 있었다 (도 8, 도 9). 결론적으로, 나린제닌이 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 경로를 활성화 시키는 역할을 수행하며, 이에 따라 돼지 영양막 세포의 이주성이 크게 향상됨을 확인하였다.
- [0099] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 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

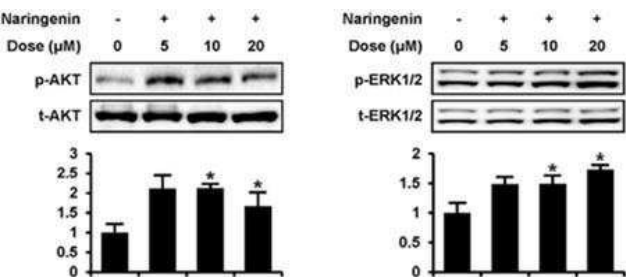
도면1



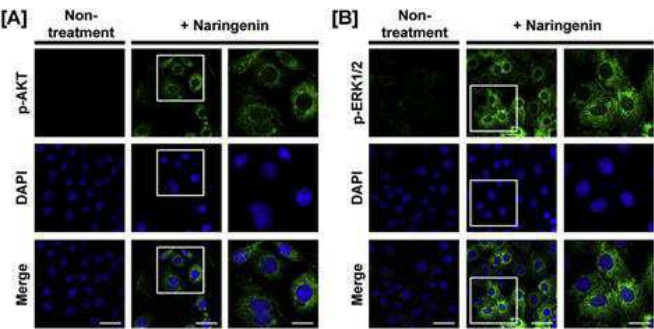
도면2



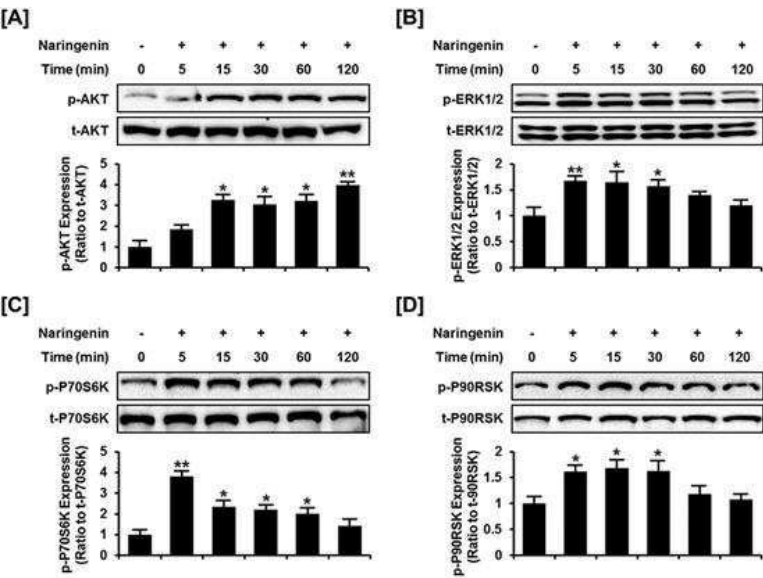
도면3



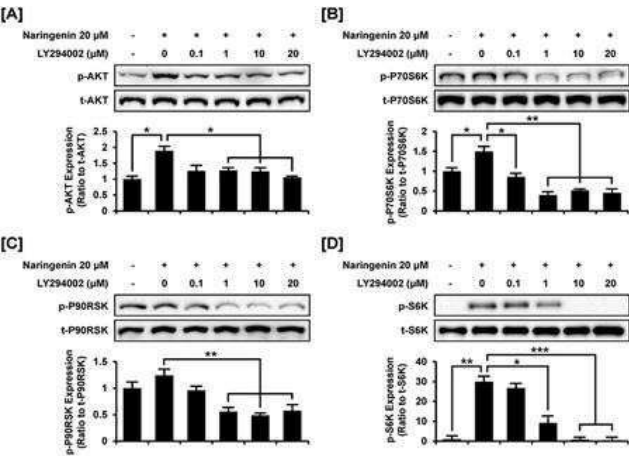
도면4



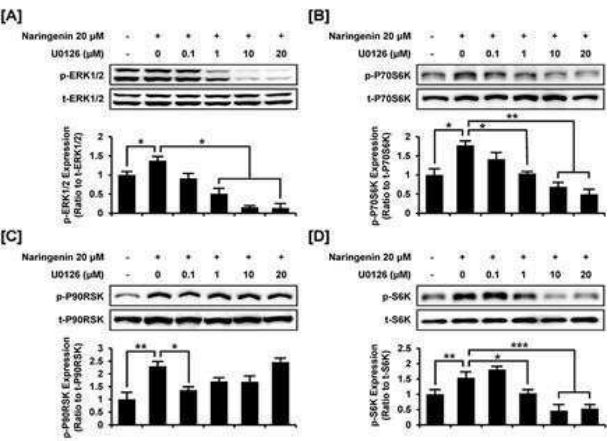
도면5



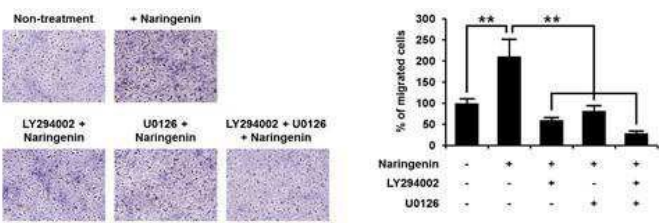
도면6



도면7



도면8



도면9

