



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0086501
(43) 공개일자 2020년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/235 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61P 15/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/235 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0002756
(22) 출원일자 2019년01월09일
심사청구일자 2019년01월09일

(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
양창원
광주광역시 북구 설죽로 585, 104동 504호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 7 항

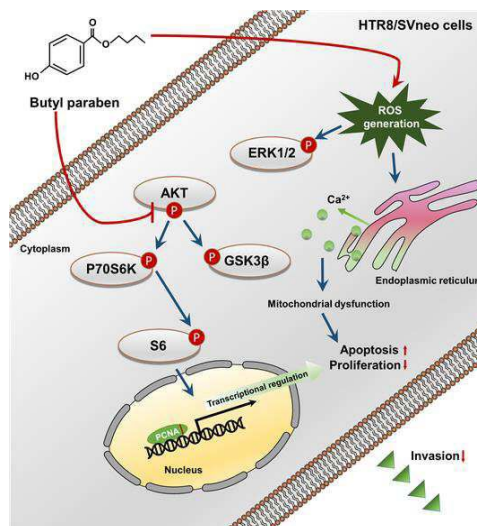
(54) 발명의 명칭 부틸파라벤을 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 부틸파라벤(butyl paraben)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 조성물은 임신 초기 모체의 자궁내막으로 침투하는 영양막 세포 내 PI3K/AKT, MAPK 신호전달메커니즘을 조절하는 하위 신호전달물질의 인산화를 억제함으로써 영양막 세포의 증식 및 침투성을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 영양막 세포의 비정상적 발달에 의해 발명하는 임신성 영양막 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61P 15/02 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C0929

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 액체생체검사 기반 난소암 조기 진단, 재발 예측 및 항암제 내성 관련 엑소좀 바이오마커

발굴 및 검증

기 여 율 1/1

주관기관 가톨릭관동대학교

연구기간 2017.04.10 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

부틸파라벤(butyl paraben)을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 부틸파라벤이 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

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

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 임신성 영양막 질환은 융모막암(choriocarcinoma), 포상기태(hydatidiform mole) 및 융모선종(villous adenoma)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

부틸파라벤(butyl paraben)을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 따른 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하여 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법.

청구항 7

제1항에 따른 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하여 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 부틸파라벤(butyl paraben)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 융모막암, 포상기태와 같은 임신성 영양막 질환은 영양막 세포의 비정상적인 증식, 과도한 이동성과 침투성으로 인해 발병하는 질병이다. 특히 융모막암은 임신성 영양막 질환중 가장 악성의 질병으로 주로 임신 초기에 포상기태로부터 발병하는 경우가 대다수이며(VCMak et al, Carcinogenesis, 2016; LDuffy et al, Journal of clinical medicine research, 2015), 영양막 조직에서 유래된 악성 종양인 융모막암은 임신기에 20,000~40,000

명 당 1명의 비율로 나타나는 것으로 보고된바 있다(Soper et al, Gynecol Oncol, 2004). 또한, 융모막암은 혈관침투성이 매우 높으며 폐나 질 같은 타기관으로의 전이가 빈번하게 일어나는 것으로 알려져있다 (Geramizadeh and Rad, Indian J Pathol Microbiol, 2012).

[0003] 일반적인 융모막암의 치료 방법은 EMA-CO라고 불리는 화학적치료법을 실시하는 것이다. 하지만, 융모막암 환자의 15-25%는 이러한 화학적 치료법에 대해 저항성 및 나쁜 예후를 나타낸다(Powles et al, Br J Cancer, 2007). 따라서 융모막암에 나타나는 항암제 내성을 극복하기 위해 더욱 효과적인 치료제 개발을 통한 접근법이 필요한 실정이다.

[0004] 파라벤은 화장품, 식품, 음료 및 의약품 등에 함유되어 방부제로 사용되는 알킬 에스터 화합물로서 항미생물성 효과를 가지며, 에스트로겐의 활성을 모방하여 내분비계를 조절하는 것으로 알려져 있다 (Zhang et al., Toxicol Appl Pharmacol, 2013). 특히 부틸파라벤은 메틸파라벤, 에틸파라벤 등 다른 파라벤 계열에 비해 에스트로겐성 활성이 강한 것으로 보고되고 있다(Daughton and Ternes, Environ Health Perspect, 1999).

[0005] 이처럼, 부틸파라벤에 의한 다양한 약리적 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 여성 생식 또는 임신 관련 질환과 관련하여 부틸파라벤의 효능에 대해 알려진 바는 진부하며, 특히 영양막 세포의 증식, 이동성, 침투성 등 영양막 세포의 비정상적 발달과 관련된 특성을 조절함으로써 임신성 영양막 질환을 치료하는 효과에 대해서는 알려진바 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 임신성 영양막 질환 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 부틸파라벤이 영양막 세포 증식과 이주성 및 침투성 억제, 세포 사멸 유도 효과가 있음을 확인하고, 부틸파라벤이 영양막 세포 내 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 억제한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 조성물은 임신 초기 모체의 자궁내막으로 침투하는 영양막 세포 내 PI3K/AKT, MAPK 신호전달메커니즘을 조절하는 하위 신호전달물질의 인산화를 억제함으로써 영양막 세포의 증식 및 침투성을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 영양막 세포의 비정상적 발달에 의해 발명하는 임신성 영양막 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 영양막 세포주 증식에 부틸파라벤이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 영양막 세포주의 세포사멸에 부틸파라벤이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 영양막 세포 내 부틸파라벤 처리에 따른 활성산소 생성 및 칼슘이온 농도 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 영양막 세포 내 부틸파라벤 처리에 따른 미토콘드리아 막 전위 감소 효과를 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 영양막 세포주에 부틸파라벤 처리 시 세포 침투성 억제 효과를 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 영양막 세포 내 부틸파라벤 처리에 의한 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달 경로 억제 효과를 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 영양막 세포 내 부틸파라벤, PI3K/AKT 및 ERK1/2 억제제 병용처리에 따른 신호전달 단백질의 인산화 양상을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8는 영양막 세포 내 부틸파라벤에 의한 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 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.
- [0019] 본 발명에서는 부틸파라벤의 영양막 세포 내 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 8).
- [0020] 본 발명은 일 관점에서 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명은 다른 관점에서 부틸파라벤을 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 영양막 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 슬레노돈) 및 영장목(예를 들어, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 보노보노, 일본원숭이, 붉은털원숭이)일 수 있다.
- [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, 폴리아크릴레이트, 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, 산화 방지제, 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.
- [0031] 본 발명에 따르면, 상기 부틸파라벤은 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따르면, PI3K/AKT 또는 ERK1/2 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따르면, 상기 임신성 영양막 질환은 융모막암(choriocarcinoma), 포상기태(hydatidiform mole) 및 융모선종(villous adenoma)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 에토포사이드, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고 융모막암, 포상기태, 융모선종 등을 포함한 임신성 영양막 질환의 치료제로 사용되는 화학치료제를 더 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물을 이용하여 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물을 이용하여 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.
- [0039] 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.
- [0040] **실시예**
- [0041] **<실험 방법>**
- [0042] **실험동물 및 세포배양**
- [0043] HTR8/SVneo 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 2.05 mM L-Glutamine이 함유된 RPMI-1640 배지에 5%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다. 실험을 위해 단층배양된 세포는 100mm 배양접시에 약 70%차지할 정도로 배양하였다. 부틸파라벤을 처리하기 전 24시간 동안 세포는 starvation 되었으며 DMSO가 vehicle로 사용되었다.

[0045] **실험 재료**

[0046] 후보 조성물질인 부틸파라벤은 Selleckchem사로부터 구매하여 사용하였으며, 부틸파라벤에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, S6, P70S6K, GSK3 β , ERK1/2, P90RSK 단백질 및 total-AKT, S6, P70S6K, GSK3 β , ERK1/2, P90RSK, IRE1 α , cytochrome C에 대한 항체를 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 이 외, PCNA, GRP78, GADD153, ATF6 α , TUBA에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology사에서 구매하였다. LY294002는 Cell Signaling Technology사로부터, U0126은 Enzon Life Science사로부터 구매하였다.

[0048] **BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석**

[0049] 영양막 세포의 증식 능력에 부틸파라벤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5×10^3 개의 세포와 배지 100 μ L를 96 well에 분주하고 부틸파라벤 용량의존적으로 (0, 50, 100, 200, 400 μ M) 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 이후, 10 μ M BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 용모암 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어주었으며, 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.

[0051] **면역형광법**

[0052] 3×10^4 개의 영양막 세포를 5% FBS가 포함된 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 부틸파라벤 200 μ M을 24시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μ g/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4 $^{\circ}$ 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. HTR8/SVneo 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 HTR8/SVneo 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.

[0054] **Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석**

[0055] 부틸파라벤에 의한 영양막 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, 부틸파라벤을 용량의존적으로 (0, 50, 100, 200 μ M) 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1 $\times$ binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음으로 200 μ L의 1 $\times$ binding buffer으로 세포현탁배양하여 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 $\times$ binding buffer를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0057] **단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)**

[0058] 영양막 세포에 부틸파라벤을 처리한 다음 영양막 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95 $^{\circ}$ 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 단백

질의 발현을 분석하였다.

[0060] **DCFH-DA를 이용한 세포내 ROS 측정**

[0061] HTR8/SVneo 세포 내 ROS 생성에 부틸파라벤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 peroxide 존재 하에 2', 7' -dichlorofluorescein (DCF)로 변환되어 형광을 띠는 2', 7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma)를 사용하였다. HTR8/SVneo 세포를 트립신을 통해 떼어내고 원심분리를 통해 세포 pellet을 얻었다. 이후 PBS로 한 번 워싱하고 10 μ M의 DCFH-DA를 37°C 인큐베이터 내에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이후 세포를 PBS에 의해 두 번 워싱하고 부틸파라벤을 용량 의존적으로 (0, 50, 100, 200 μ M) 1시간동안 37°C 인큐베이터 내에서 인큐베이션하였다. 처리된 세포는 PBS로 다시 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 DCF 형광 강도를 분석하였다.

[0063] **세포내 칼슘이온 농도 측정**

[0064] HTR8/SVneo 세포 내 칼슘이온 농도에 부틸파라벤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 먼저 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70~80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이 후, 부틸파라벤을 용량의존적 (0, 50, 100, 200 μ M)으로 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 Fluo-4 AM (Invitrogen)을 37°C 인큐베이터 내에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 염색된 세포는 PBS로 한 번 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0066] **JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정**

[0067] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 5×10^5 개의 영양막 세포를 6 well에 배양하고 70~80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 부틸파라벤을 용량의존적으로 (0, 50, 100, 200 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 인큐베이션하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0069] **세포 침투성 분석**

[0070] 영양막 세포의 세포 침투성에 있어 부틸파라벤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 Migration culture dish에 Matrigel을 코팅하여 부틸파라벤 200 μ M를 24시간 동안 처리하였다. 이후 메탄올로 세포를 10분간 고정한 후, 헤마톡실린 용액 (Sigma)으로 30분간 염색시켰다. 세포가 통과하지 않은 위쪽 막은 면봉을 이용해 워싱하였으며 이후 슬라이드 글라스 위에 마운팅 미디엄 (Sigma)과 함께 마운팅한 후 세포 침투 능력을 광학현미경 DM3000 (Leica)로 관찰, 촬영 및 계산하였다.

[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] **영양막 세포의 증식성에 부틸파라벤이 미치는 영향 분석**

[0077] 부틸파라벤에 의한 임신 초기 영양막 세포주(HTR8/SVneo)의 변화양상을 분석하기 위하여 먼저 부틸파라벤 용량 의존적으로 (0, 50, 100, 200, 400 μ M) 첨가한 배지에 48시간 배양하였으며 이 후 세포 증식 양상을 분석한 결과 영양막 세포의 증식력이 부틸파라벤에 의해 단계적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (도 1A). 영양막 세포의

증식은 100 μ M의 부틸파라벤에 반응하여 42% ($P < 0.001$), 200 μ M의 부틸파라벤에 반응하여 66% ($P < 0.001$) 감소하였다. 이후, DNA 증식에 필수적인 단백질인 PCNA에 대한 항체를 사용하여 면역형광기법을 수행하였다 (도 1B). 그 결과, 컨트롤 그룹에 비해 200 μ M 부틸파라벤을 24시간 처리한 영양막 세포의 핵 내에서는 PCNA의 발현이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 이를 정량화하였을 때, 부틸파라벤은 대조군에 비해 약 69% 정도 PCNA의 발현을 감소시켰다. 이를 통해 부틸파라벤이 영양막 세포의 증식을 억제시킨다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0079] 영양막 세포의 사멸에 부틸파라벤이 미치는 영향 분석

[0080] 부틸파라벤의 영양막 세포에 대한 세포사멸 유도 효과를 분석하기 위해, 영양막 세포에 부틸파라벤을 용량 의존적 (0, 50, 100, 200 μ M)으로 48시간 인큐베이션 후 Annexin V 및 PI 염색을 통해 세포사멸이 일어나는 영양막 세포의 수를 FACS를 사용하여 측정하였다. Annexin V 염색에 양성인 세포군을 사멸이 일어난 세포로 상정하였으며 그 결과, 200 μ M의 부틸파라벤을 처리하였을 때 대조군에 비하여 270% ($P < 0.001$) 가량 세포 사멸이 증가함을 확인하였다 (도 2A). 또한 GRP78, eIF2 α , GADD153, ATF6 α , IRE1 α 등 소포체 스트레스 관련 단백질의 발현을 분석한 결과 영양막 세포내 부틸 파라벤의 투여에 따라 각 단백질의 발현이 용량의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다 (도 2B). 또한 칼슘 이온 증가에 따라 미토콘드리아에서 방출되는 단백질인 Cytochrome C 역시 부틸파라벤 처리에 따라 발현이 증가하였다. 본 결과를 통해 부틸파라벤이 영양막 세포의 사멸을 유도하며 이는 소포체 스트레스를 매개로 함을 확인할 수 있었다.

[0082] 부틸파라벤에 의한 영양막 세포 내 산화 스트레스 조절 기전 분석

[0083] 부틸파라벤에 의해 HTR8/SVneo 세포 내 산화 스트레스가 유발되는지 확인하기 위해 DCF 형광 관찰을 통해 세포 내 활성산소(ROS) 생성 정도를 확인하였다. DCF 형광은 세포내 과산화수소 발생에 따 증가한다. 그 결과, 부틸파라벤을 처리한 HTR8/SVneo 세포 내 DCF 형광은 용량의존적 (0, 50, 100, 200 μ M)으로 증가함을 확인하였다 (도 3A). 최고 농도인 200 μ M의 부틸파라벤에 의해 DCF 형광은 약 5배 증가하였다 ($P < 0.001$). 세포내 활성산소의 증가는 소포체에서 칼슘 이온의 방출을 촉진하며 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. 따라서, Fluo-4 염색을 통해 세포내 칼슘이온 농도의 변화를 분석하였으며 그 결과, 부틸파라벤에 의해 용량의존적으로 세포내 칼슘이온 농도가 증가함을 확인하였다 (도 3B). 200 μ M의 부틸파라벤은 대조군에 비해 세포내 칼슘이온 농도를 약 2.1배 ($P < 0.001$) 증가시켰다. 이러한 결과는 부틸파라벤이 세포내 칼슘이온 농도의 증가로 이어지는 활성산소의 증가를 유도함을 암시한다.

[0084] 세포내 미토콘드리아의 형태학적 변화는 산화 스트레스에 의해 발생하는 세포 사멸의 대표적인 기전이다. 부틸파라벤에 의한 세포내 산화 스트레스 유도에 따라 세포내 미토콘드리아 막전위가 변화하는지 분석하기 위해 JC-1 염색을 수행하였다. 영양막 세포 내 부틸파라벤 투여에 따라 용량의존적으로 세포내 미토콘드리아 막 전위가 감소함을 나타내었다 (도 4). 200 μ M의 부틸파라벤은 대조군에 비해 약 17.1배 ($P < 0.001$) 미토콘드리아의 막 전위를 감소시키는 것으로 나타났다. 본 결과를 통해 부틸파라벤이 세포 내 산화 스트레스를 유도하며 이는 미토콘드리아의 막 전위에까지 영향을 미침을 확인할 수 있었다.

[0086] 영양막 세포 내 부틸파라벤 처리에 따른 세포 침투성 변화 분석

[0087] 영양막 세포가 적절한 침투성을 갖는 것은 정상적인 태반 발달에 필수적인 요소이다. 영양막 세포의 침투성에 부틸파라벤이 미치는 영향에 대해 확인해보기 위해 Matrigel을 코팅한 Transwell에 HTR8/SVneo 세포를 분주한 후 부틸파라벤 (200 μ M)가 함유된 배지에서 12시간 인큐베이션 하였다. 그 결과, 부틸파라벤에 의해 영양막 세포의 침투성이 약 51% 감소하였다 (도 5A). 뿐만 아니라 ibidi plate를 통해 두 구역 사이의 공간을 메우기 위해 영양막 세포가 얼마나 빠르게 이동하는지 측정하였으며 대조군에 비해 부틸파라벤이 처리된 영양막 세포의 이동성은 현저히 떨어지는 것으로 나타났다 (도 5B). 이는 부틸파라벤이 영양막 세포의 과한 침투를 억제할 수 있음을 암시한다.

[0089] PI3K/AKT와 MAPK 신호전달 경로에 부틸파라벤이 미치는 영향 분석

[0090] 영양막 세포 내 부틸파라벤에 의해 유도되는 세포의 증식 억제 및 세포 사멸에 영향을 미치는 신호전달메커니즘

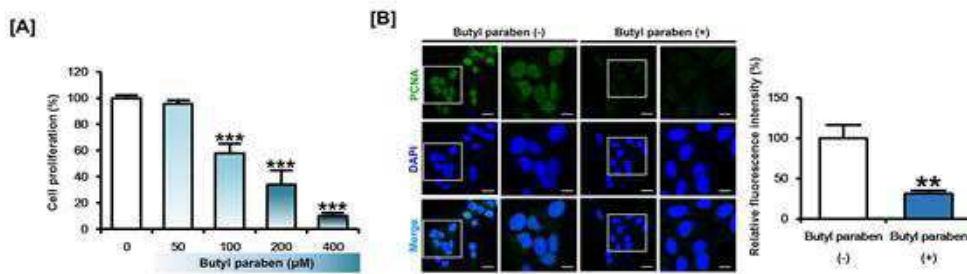
을 확인하기 위하여 증식과 연관된 ERK1/2 MAPK 및 AKT의 인산화 양상을 부틸파라벤과 PI3K/AKT 특이적 억제제 (LY294002), ERK1/2 특이적 억제제 (U0126)과의 병용 처리 후 웨스턴블롯을 이용하여 분석하였다 (도 6). 그 결과, 부틸파라벤은 영양막 세포 내에서 AKT, P70S6K, GSK3 β , S6 등 PI3K/AKT 신호전달 경로에 포함된 단백질의 인산화를 억제할 뿐만 아니라 ERK1/2 단백질의 활성화는 증가시킴을 확인할 수 있었다. P90RSK의 발현은 부틸파라벤에 의해 큰 영향을 받지 않았다. 뿐만 아니라, PI3K/AKT 및 ERK1/2 신호전달 경로의 활성을 억제하였을 때 서로의 신호전달 경로 활성화에 영향을 미치는 것으로 보아 부틸파라벤에 의해 조절받는 신호전달 경로는 복잡한 교차 효과를 나타냄을 암시한다. 20 μ M의 LY294002 처리는 부틸파라벤에 의해 감소한 P70S6K, S6의 인산화를 더욱 감소시켰으며 20 μ M의 U0126 처리는 부틸파라벤에 의해 억제된 AKT, P70S6K의 인산화를 증가시켰다.

[0091] 또한, LY294002 또는 U0126과 부틸파라벤의 병용 처리는 부틸파라벤에 의한 항증식효과 및 세포사멸 유도 효과를 더욱 강화하는 결과를 보였다 (도 7A, 7B). 이러한 효과는 영양막 세포 내 막전위 역시 LY294002 또는 U0126 병용 처리에 의해 더욱 감소하는 것으로 나타났다 (도 7C). 세포 증식은 부틸파라벤과 LY294002의 처리에 의해 26% ($P < 0.001$), 부틸파라벤과 U0126 처리에 의해 39% 감소하였다 ($P < 0.001$). 또한 세포사멸 측면에 있어 LY294002와 U0126과의 병용처리는 부틸파라벤 단독 처리에 비해 각각 약 5.1배, 7.1배 ($P < 0.001$) 증가하였다. 또한 LY294002와 U0126과 부틸파라벤의 병용처리는 부틸파라벤 단독 처리에 비해 각각 약 3.8배, 221.3배 ($P < 0.001$) 미토콘드리아 막전위 감소를 증가시켰다. LY294002 단독 처리에 비해 부틸파라벤의 첨가는 세포 증식을 더욱 감소시키고 세포사멸 및 미토콘드리아 막전위 감소를 증가시켰다. 이러한 결과는 부틸파라벤에 의해 조절되는 PI3K/AKT 신호전달 경로가 영양막 세포의 생리학적 특성 변화에 있어 중요함을 암시한다.

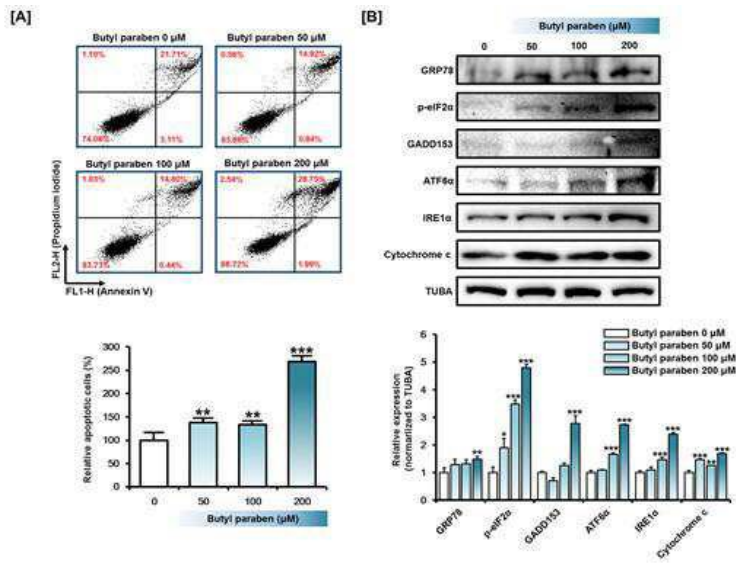
[0093] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

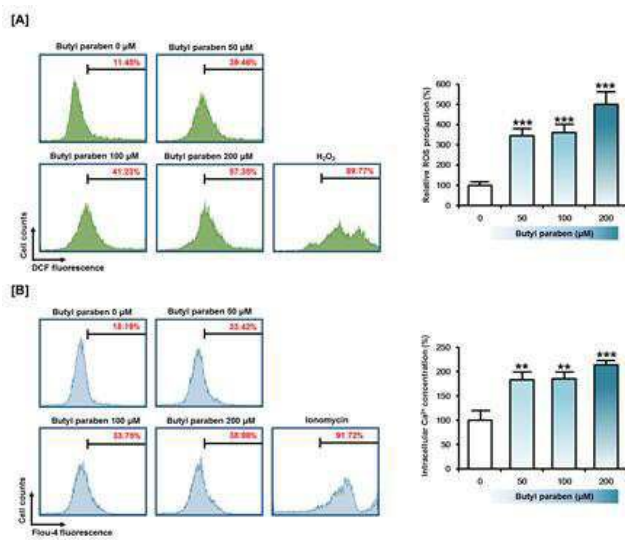
도면1



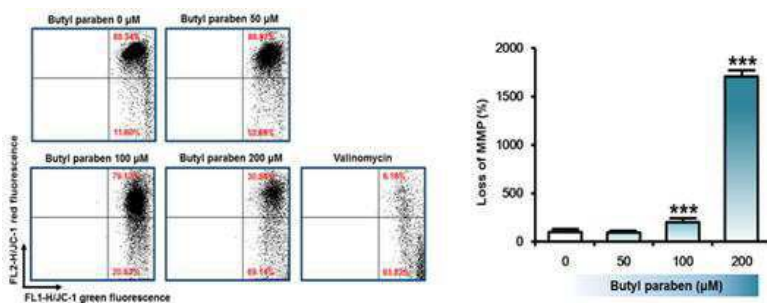
도면2



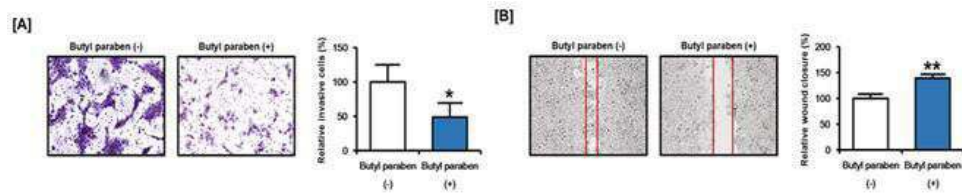
도면3



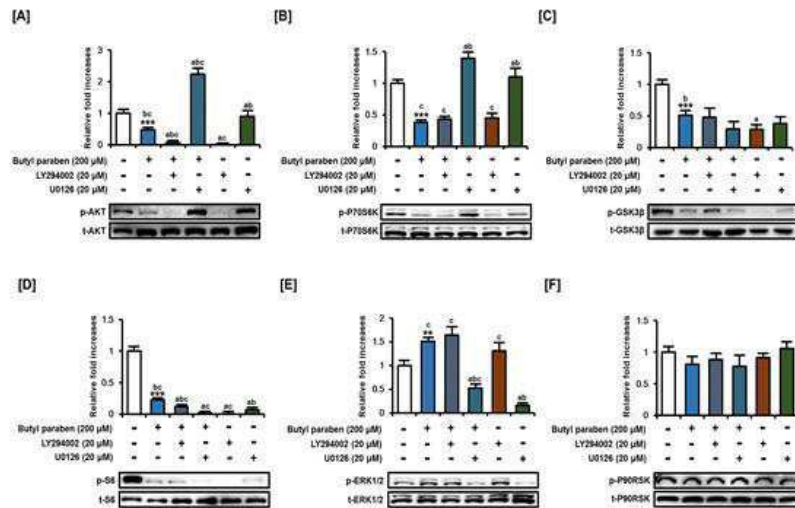
도면4



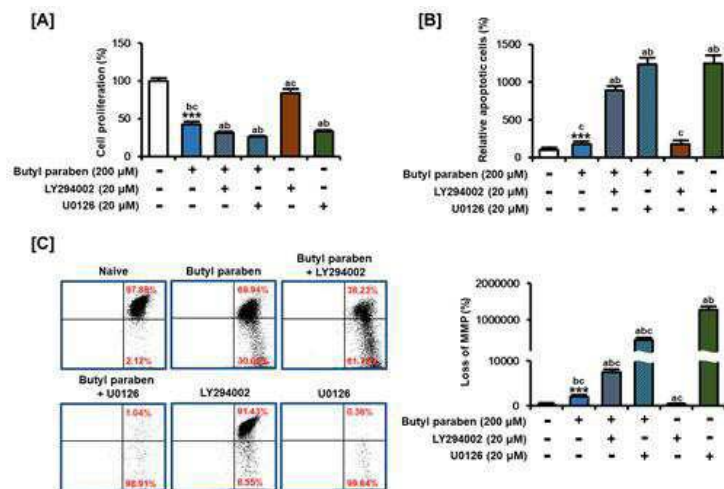
도면5



도면6



도면7



도면8

