(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0136679
(43) 공개일자 2018년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/282 (2006.01) *A61K 31/337* (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0075710
(22) 출원일자 2017년06월15일
심사청구일자 2017년06월15일

(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 12 항

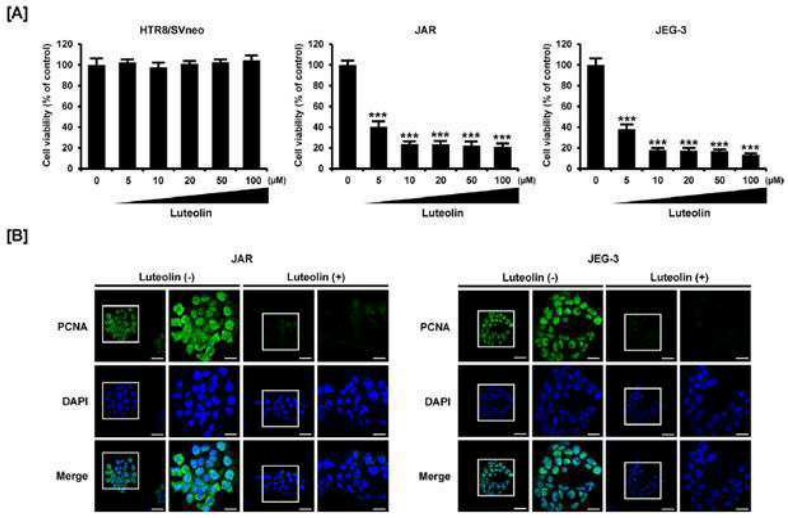
(54) 발명의 명칭 **루테올린을 포함하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 융모막암 세포 내 증식 및 이주성을 억제하고 용량 의존적으로 융모막암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, PI3K/AKT 또는 ERK1/2 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제 또는 에토포사이드, 시스플라틴 및 파클리탁셀과 같은 항암화학치료제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 생명과학, 의약학 등 다양한 산업 분야에 널리 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/282 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)
A61K 31/357 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016940776
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원-기본연구
연구과제명 [이지바로]염증성 태반 형성 억제를 위한 아연 이온 수송체의 역할 규명 및 후생유전학적 변화 연구
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C0810010016
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 이공학개인기초연구지원-기본연구
연구과제명 염증성 조산 치료를 위한 태아 유래 중간엽 줄기세포 치료제 효과 검증
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.07 ~ 2017.09.06

명 세 서

청구범위

청구항 1

루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 루테올린이 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 루테올린이 SREBP1 단백질의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

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

청구항 5

제1항에 있어서,

에토포사이드, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 루테올린이 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 루테올린이 SREBP1 단백질의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 ERK1/2 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

에토포사이드, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항의 융모막암 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 이용하여 융모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 융모막암 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항의 융모막암 예방 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 이용하여 융모막암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 융모막암은 임신성 영양막 질환중 가장 악성의 질병으로 주로 임신 초기에 포상기태로부터 발병하는 경우가 대다수이며(V.C.Mak *et al.*, Carcinogenesis, 2016; L.Duffy *et al.*, Journal of clinical medicine research, 2015), 영양막 조직에서 유래된 악성 종양인 융모암은 임신기에 20,000~40,000 명 당 1명의 비율로 나타나는 것으로 보고된바 있다(Soper et al., Gynecol Oncol, 2004). 또한, 융모암은 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] 플라보노이드는 다양한 식물에 함유되어 있으며 세포 내 생화학적 메커니즘 및 유전자 발현 조절을 통해 항염증, 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려져있다(Russo *et al.*, Biochem Pharmacol, 2012). 루테올린은 플라보노이드 계열의 천연 식물 추출물로서 셀러리, 파슬리, 브로콜리 등 다양한 채소에서 추출되며 위암, 전립선암, 폐암 등에서 성장 저해 및 항암 효과가 연구된바 있다(Lu *et al.*, J Transl Med, 2015: Chiu *et al.*, Prostate, 2008: Chen *et al.*, Life Sci, 2013).

[0005] 한편, AKT 단백질은 P70S6K, GSK3β, mTOR 등을 하위 신호단백질로 가지며 암세포의 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, Cancer Biol Med, 2015: Xu *et al.*, Cell Death Dis, 2016). 특히 mTOR는 세포 내 지질 대사 항상성 유지를 관장하는 SREBP 단백질을 활성화함으로써 에너지 저장, 세포막 구성요소, 신호전달물질로서의 역할을 수행하는 지질 생합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며 (Menedez and Lupu, Nat Rev Cancer, 2007), SREBP는 다양한 암종의 세포에서 정상세포에 비해 활성화되는 것으로 보고되고 있는바 항암 연구의 새로운 표적단백질로 대두되고 있다 (Li *et al.*, Mol Cancer Ther, 2014).

[0006] 이처럼, 루테올린 및 mTOR-SREBP 경로에 의한 다양한 약리적 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 융모막암 내에서 루테올린을 이용한 치료기전 및 융모막암의 생존에 미치는 mTOR-SREBP 경로의 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 융모막암 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 융모막암 세포주 JAR, JEG-3 세포를 이용하여 루테올린에 의한 세포 증식과 이주성 억제 및 세포 사멸 유도 효과를 확인하고, 루테올린이 융모막암 세포주 내 PI3K/AKT 및 ERK1/2 단백질을 중심으로 하는 신호전달체계를 조절한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 융모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 융모막암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 융모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 융모막암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 융모막암 세포 내 증식 및 이주성을 억제하고 용량 의존적으로 융모막암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, PI3K/AKT 또는 ERK1/2 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제 또는 에토포사이드, 시스플라틴 및 파클리탁셀과 같은 항암화학치료제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 생명과학, 의약학 등 다양한 산업 분야에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 융모막암 세포주의 증식에 루테올린이 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸다.

도 2는 융모막암 세포주에 루테올린 처리에 따른 세포사멸 유도효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 융모막암 세포주에서 루테올린의 용량의존적 처리에 의한 신호전달물질의 인산화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 융모막암 세포주에서 루테올린의 시간의존적 처리에 의한 신호전달물질의 인산화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 융모막암 세포 내 루테올린과 PI3K, ERK1/2, mTOR 신호전달기전 억제제 처리에 따른 세포 증식 변화 양상 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 융모막암 세포 내 루테올린과 PI3K, ERK1/2, mTOR 신호전달기전 억제제 처리에 따른 신호전달 단백질 인산화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 루테올린에 의한 융모막암 세포내 SREBP 관련 유전자의 발현 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 루테올린에 의한 융모막암 세포내 SREBP1, SREBP2의 발현 위치를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 융모막암 세포내 지질대사 조절 유전자의 루테올린에 의한 발현 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 루테올린과 기존 항암화학치료제를 이용한 융모막암 내 치료 효율을 나타낸 것이다.

도 11은 융모막암 세포 내 루테올린에 의한 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 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.

[0020] 본 발명에서는 루테올린의 융모막암 세포 내 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 11).

[0021] 본 발명은 일 관점에서 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0022] 본 발명은 다른 관점에서 루테올린을 유효성분으로 포함하는 융모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0024] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0025] 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.

[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, 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.

[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, 에멀젼, 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.

[0032] 본 발명에 있어서, 루테올린이 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 루테올린이 SREBP1 단백질의 활성을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, PI3K/AKT 또는 ERK1/2 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 에토포사이드, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고 융모막암 치료제로 사용되는 화학치료제를 더 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 융모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 융모막암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0041] [실시예]

[0042] 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.

[0044] **실험방법**

[0045] 실험동물 및 세포배양

[0046] 임신 초기 영양막 세포주인 HTR8/SVneo, 임신성 융모막암 세포주인 JAR, JEG-3 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 2.05 mM L-Glutaimine이 함유된 RPMI-1640 배지 (HTR8/SVneo, JAR) 및 MEM 배지 (JEG-3) 에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.

[0048] 실험 재료

[0049] 후보 조성물질인 루테올린은 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 루테올린에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, GSK3β, mTOR, P70S6K, P90RSK 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, GSK3β, mTOR, P70S6K, P90RSK에 대한 항체를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다. 이 외, PCNA 항체는 Santa Cruz Biotechnology 사에서 구매하였다. 또한, 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126 및 mTOR 억제제인 rapamycin을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다. 또한 항암화학요법에 사용되는 etoposide, cisplatin, paclitaxel은 Sigma에서 구매하여 사용하였다.

[0051] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0052] 융모막암 세포의 증식 능력에 루테올린이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5×10^3개의 세포와 배지 100 ㎕를 96 well에 분주하고 루테올린을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 이후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 융모막암 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온

에서 90분 인큐베이션 시킨 후 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.

[0054] 면역형광법

[0055] 3×10^4 개의 융모막암 세포를 10% FBS가 포함 된 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 루테올린 20 μM을 48시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μg/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4℃에서 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. JEG-3 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 JEG-3 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.

[0057] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석

[0058] 3×10^4 개의 융모막암 세포를 10% FBS가 포함 된 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 루테올린 20 μM을 48시간 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% CO_2 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 PBS로 헹구고 DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0060] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0061] 루테올린에 의한 융모막암 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, 루테올린을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20 μM) 처리하여 48시간 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 세포현탁배양하여 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.

[0063] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0064] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 5×10^5 개의 융모막암 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 루테올린을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20 μM) 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 JC-1 staining solution 에 풀어준 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를

사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0066] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0067] 융모막암 세포에 루테올린 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 융모막암 세포로부터 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 전기영동을 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음 chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약 및 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0069] mRNA 발현 분석 (qPCR)

[0070] 융모막암 세포에 루테올린 20 μM을 처리한 다음 Trizol reagent (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이후, 1 μg의 RNA를 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma)과 StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 측정하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분동안 인큐베이션 후 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 3분 조건을 40회 증폭하였으며 *GAPDH* 발현량에 기반하여 정규화하였다.

[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] 융모막암 세포의 증식에 대한 루테올린의 영향 분석

[0077] 루테올린에 의해 정상적인 임신 초기 영양막 세포주(HTR8/SVneo) 및 임신성 융모막암 세포주(JAR, JEG-3)의 변화양상을 분석하기 위하여 먼저 루테올린을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 첨가한 배지에 48시간 배양하였으며 이후 세포 증식 양상을 분석한 결과 융모막암 세포의 증식력이 루테올린에 의해 단계적으로 감소됨을 확인하였다(도 1A). 하지만, 정상 영약막 세포주인 HTR8/SVneo 세포의 생존력에는 루테올린이 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이후, DNA 증식에 필수적인 단백질인 PCNA에 대한 항체를 사용하여 면역형광기법을 수행하였다(도 1B). 그 결과, 컨트롤 그룹에 비해 20 μM 루테올린을 48시간 처리한 융모막암 세포의 핵 내에서는 PCNA의 발현이 현저히 감소함을 확인하였는바, 이를 통해 루테올린이 융모막암 세포의 증식을 억제시킨다는 사실을 확인하였다.

[0079] 루테올린에 의한 융모막암 세포의 사멸유도 효과

[0080] 루테올린의 융모막암 세포에 대한 세포사멸 유도 효과를 분석하기 위해, 융모막암 세포에 20 μM 루테올린을 48시간 인큐베이션 이후 TUNEL assay를 수행하였다. 그 결과 대조군의 융모막암 세포 내에서는 DNA 분절화(DNA fragmentation)가 거의 발생하지 않았지만 루테올린 처리에 따라 그 정도가 심화됨을 확인하였다(도 2A). 또한 융모막암 세포에 Annexin V 및 PI 염색을 통해 세포사멸이 일어나는 융모막암 세포의 수를 FACS를 사용하여 측정한 결과 루테올린 20 μM을 처리하였을 때 대조군에 비하여 488% (JAR), 703% (JEG-3)의 세포 사멸이 일어남을 확인하였다(도 2B, 2C). 또한, 미토콘드리아의 탈분극을 JC-1 염색 이후 FACS를 이용하여 측정한 결과 융모막암 세포에 루테올린 20 μM을 처리하였을 경우 대조군에 비하여 146.6% (JAR), 677% (JEG-3) 가량 미토콘드리아의 막 전위 감소가 나타남을 확인하였다(도 2D, 2E). 이를 통해 루테올린이 융모막암 세포로부터 DNA 분절화 및 미토콘드리아 막 전위 변화를 통해 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

[0082] 루테올린에 의한 융모막암 세포 내 신호전달기전 조절 양상 분석

[0083] 융모막암 세포내 루테올린에 의해 유도되는 세포의 증식 억제 및 세포 사멸에 영향을 미치는 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 증식과 연관된 ERK1/2 MAPK 및 AKT의 인산화 양상을 루테올린 용량의존적 (도 3)으로 웨스턴블롯을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 루테올린은 융모막암 세포내에서 AKT 및 P70S6K의 인산화를 용량의존적으로 억제하였으며, ERK1/2의 인산화는 루테올린에 의해서 용량의존적으로 유도됨을 확인하였다. 또한, 루테올린에 의한 GSK3β와 P90RSK의 인산화 양상은 두 가지 융모암 세포 사이에서 서로 다른 경향을 보였다. 또한, 융모암 세포에 루테올린을 시간의존적으로 처리하여 AKT, GSK3β, ERK1/2의 인산화를 분석한 결과 용량의존적 결과와 마찬가지로 루테올린은 AKT 신호전달기전을 비활성화시키고, ERK1/2 기전을 활성화시키는 것으로 나타났다(도 4).

[0085] 루테올린과 신호전달기전 억제제를 통한 융모막암 세포의 증식 변화 양상 분석

[0086] 루테올린 조절 신호전달분자가 융모막암 세포의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 융모막암 세포 내 LY294002 (PI3K 억제제) 20 μM, U0126 (ERK1/2 억제제) 10 μM, 또는 rapamycin (mTOR 억제제) 10 μM을 루테올린 20 μM과 병용처리 하였다. JAR 세포 내에서는 루테올린이나 신호전달 단백질 억제제를 단독으로 처리하였을 때보다 병용처리 하였을 경우 세포 증식 억제 효과가 강화됨을 확인하였다(도 5A). 하지만, JEG-3 세포의 경우 U0126과 루테올린을 병용처리 하였을 때만 단독으로 처리하였을 때보다 세포 증식이 보다 억제됨을 확인하였다(도 5B). 이러한 결과는 융모막암 세포에 대한 루테올린의 항증식 효과에 PI3K/AKT 및 ERK1/2 신호전달경로가 밀접하게 관련되어있으며, 이는 두 가지 융모막암 세포에서 서로 다른 세포내 메커니즘을 매개로 함을 암시한다.

[0088] 루테올린과 AKT, ERK1/2 신호전달기전 억제제 혼합물을 통한 JEG-3 세포 내 신호전달물질 인산화 패턴 분석

[0089] 융모막암 세포에 항증식효과를 갖는 루테올린의 정확한 세포내 기전을 파악하기 위해 융모막암 세포 내에 LY294002, U0126, 또는 rapamycin을 1시간동안 먼저 인큐베이션 시키며 신호전달기전을 막은 후 루테올린 20 μM을 처리하여 AKT, GSK3β, ERK1/2의 인산화 양상을 확인하였다. 그 결과, 루테올린에 의해 감소한 AKT의 인산화는 ERK1/2 또는 mTOR 억제에 의해 회복되지 않았으며(도 6A), JEG-3 세포에서는 특이적으로 모든 신호전달기전 억제제를 루테올린과 병용처리 하였을 경우 GSK3β의 인산화가 더욱 감소함을 확인하였다(도 6B). 또한, 융모막암 세포내 LY294002를 루테올린과 병용처리 하였을 경우에는 ERK1/2의 인산화가 루테올린 단독 처리하였을 때보다 강화됨을 확인하였다(도 6C). 이러한 결과는 융모암 세포에 미치는 루테올린의 영향이 PI3K/AKT 신호전달기전의 비활성화와 ERK1/2 신호전달기전의 활성화와 관련이 있음을 암시한다.

[0091] 루테올린이 융모막암 세포 내 SREBP 매개 지질 대사 조절에 미치는 영향

[0092] 융모막암 세포내에서 루테올린이 PI3K/AKT/mTOR 신호전달기전이 매개하는 지질생성 메커니즘에 관여하는지 확인하기 위해 루테올린을 처리한 융모막암 세포에서 RNA를 추출하여 지질대사 항상성을 조절하는 *SREBP1*, *SREBP2*, *SCAP*의 mRNA 수준에서의 발현을 확인하였다(도 7A). 그 결과 루테올린 20 μM을 처리하였을 경우 대조군에 비해 *SREBP1*, *SREBP2*, *SCAP*의 mRNA 발현이 감소함을 확인하였다. 뿐만 아니라, 루테올린 용량의존적으로 mTOR의 인산화 및 SREBP1의 발현이 감소하였으며 SREBP2 단백질의 발현에는 영향을 주지 않음을 확인하였다(도 7B-D).

[0093] 또한, SREBP1, SREBP2의 세포내 발현은 각각의 항체를 이용한 면역형광기법을 통해 재검증하였으며(도 8) SREBP에 의해 전사 수준에서 조절 받는 지질 생합성 관련 유전자 (*FASN, ACACA, PPARγ, DBI, SCD, HMGCR, HMGCS1, FDFT1, MVK, SQLE*)들의 mRNA 수준에서의 발현이 루테올린에 의해 조절받는지 여부를 측정하였다(도 9). 그 결과, 대부분 유전자들의 발현이 루테올린에 의해 유의적으로 감소됨을 확인하였다.

[0095] 루테올린과 항암화학요법에 의한 융모막암 세포의 증식 양상 비교 분석

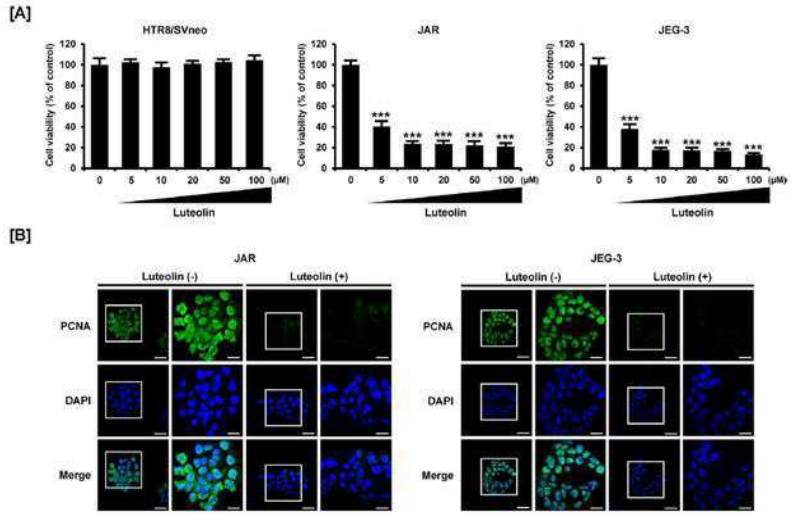
[0096] 융모막암 치료에 있어 기존에 사용되는 에토포사이드, 시스플라틴, 파클리탁셀과 루테올린의 항증식효과를 비교하기 위하여 각각의 항암화학요법과 루테올린을 병용처리하였다(도 10). 그 결과, JAR 세포의 경우, 에토포사이드 또는 루테올린 단독으로 처리하였을 때보다 병용처리하였을 때 항증식효과가 강화됨을 확인한 반면, JEG-3

세포에서는 JAR 세포에 비하여 에토포사이드 및 파클리탁셀의 항증식 효과가 미비하였으며 시스플라틴에 대해서는 저항성을 가진다는 것을 확인하였다. 하지만, 루테올린과 병용처리하였을 때는 각각의 항암화학요법에 대한 항증식 효과가 강화됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 루테올린이 융모막암 치료제로서 또는 기존 항암화학요법에 대한 보조치료제로서 개발 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

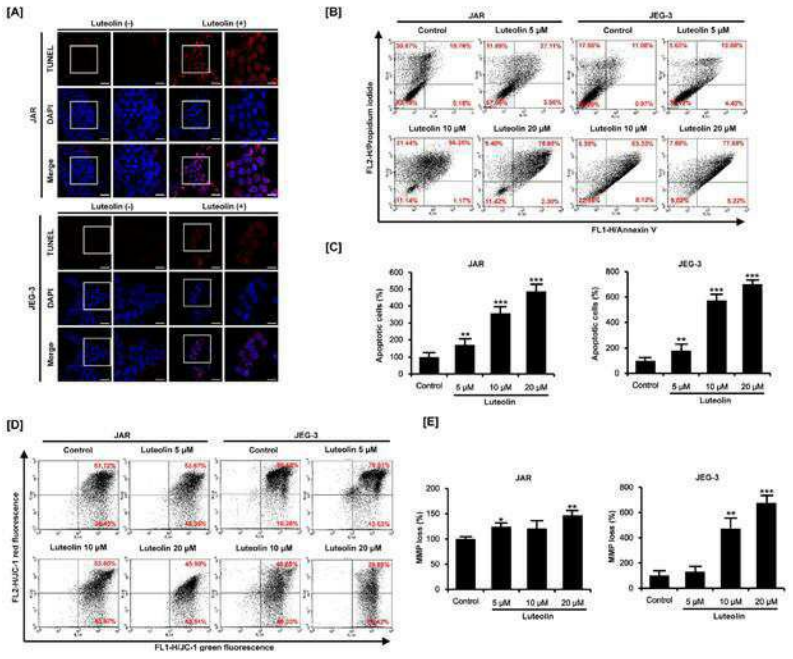
[0098] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

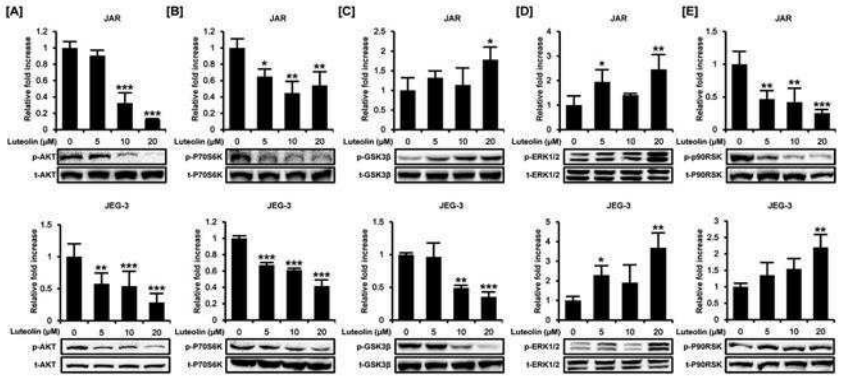
도면1



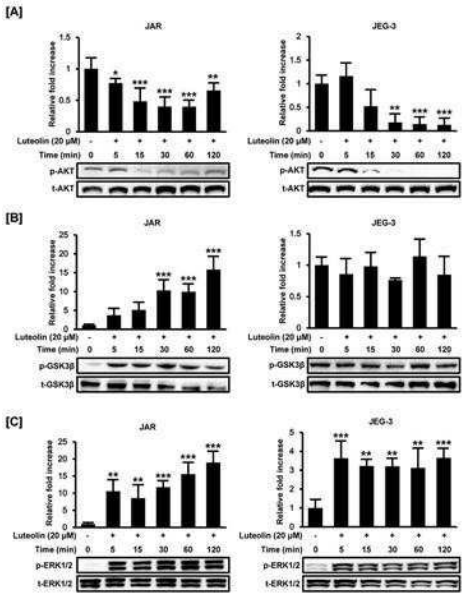
도면2



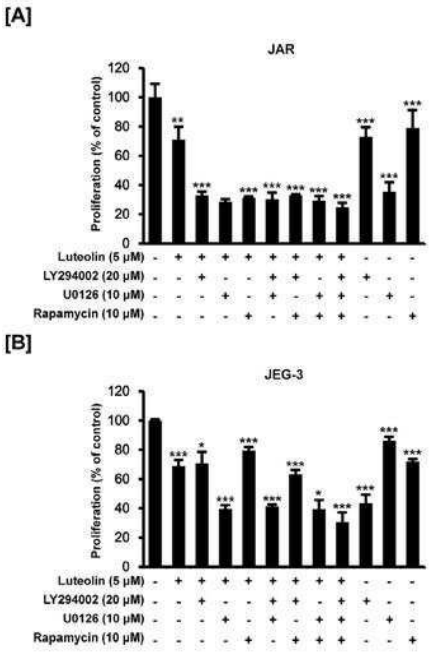
도면3


[A]
JAR
[B]
JAR
[C]
JAR
[D]
JAR
[E]
JAR
JEG-3
JEG-3
JEG-3
JEG-3
JEG-3
Relative fold increase
Luteolin (μM) 0 5 10 20
p-AKT
t-AKT
p-P70S6K
t-P70S6K
p-GSK3β
t-GSK3β
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-p90RSK
t-P90RSK

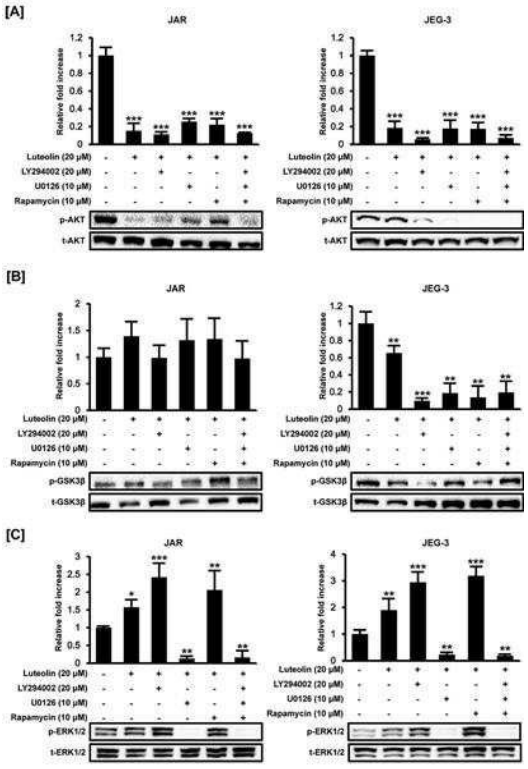
도면4


[A]
JAR
JEG-3
[B]
JAR
JEG-3
[C]
JAR
JEG-3
Relative fold increase
Luteolin (20 μM)
Time (min) 0 5 15 30 60 120
p-AKT
t-AKT
p-GSK3β
t-GSK3β
p-ERK1/2
t-ERK1/2

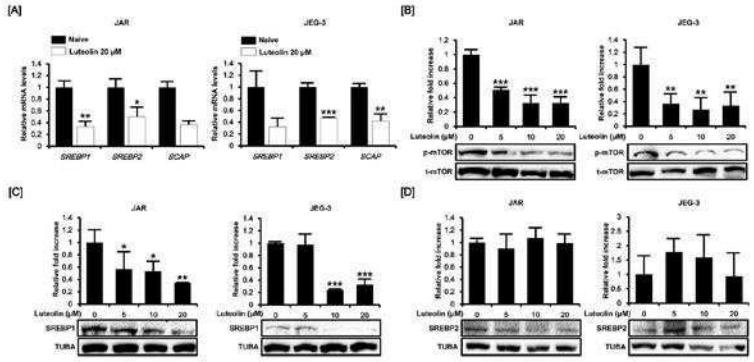
도면5


[A]
JAR
Proliferation (% of control)
Luteolin (5 μM)
LY294002 (20 μM)
U0126 (10 μM)
Rapamycin (10 μM)
[B]
JEG-3
Proliferation (% of control)
Luteolin (5 μM)
LY294002 (20 μM)
U0126 (10 μM)
Rapamycin (10 μM)

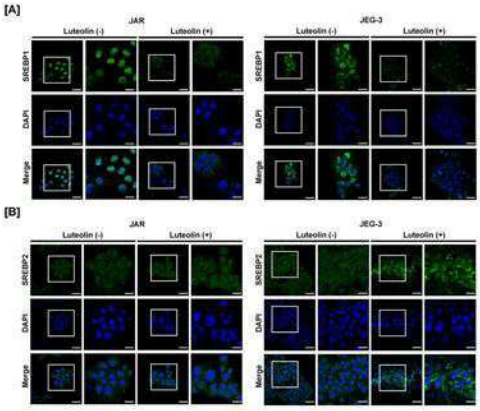
도면6


[A]
JAR
JEG-3
Relative fold increase
p-AKT
t-AKT
[B]
JAR
JEG-3
Relative fold increase
p-GSK3β
t-GSK3β
[C]
JAR
JEG-3
Relative fold increase
p-ERK1/2
t-ERK1/2

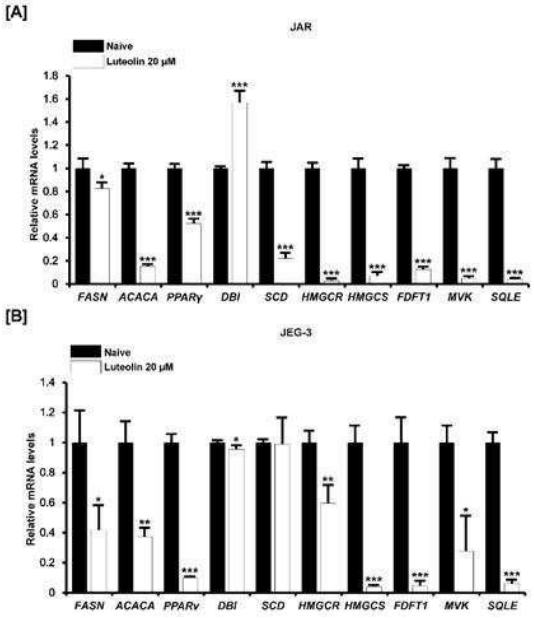
도면7


[A]
JAR
JEG-3
Naive
Luteolin 20 μM
Relative mRNA levels
SREBP1
SREBP2
SCAP
[B]
JAR
JEG-3
Relative fold increase
Luteolin (μM)
p-mTOR
t-mTOR
[C]
JAR
JEG-3
SREBP1
TUBA
[D]
JAR
JEG-3
SREBP2
TUBA

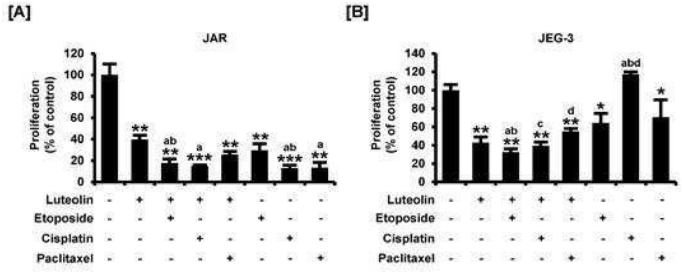
도면8


[A]
JAR
JEG-3
Luteolin (-)
Luteolin (+)
SREBP1
DAPI
Merge
[B]
JAR
JEG-3
SREBP2
DAPI
Merge

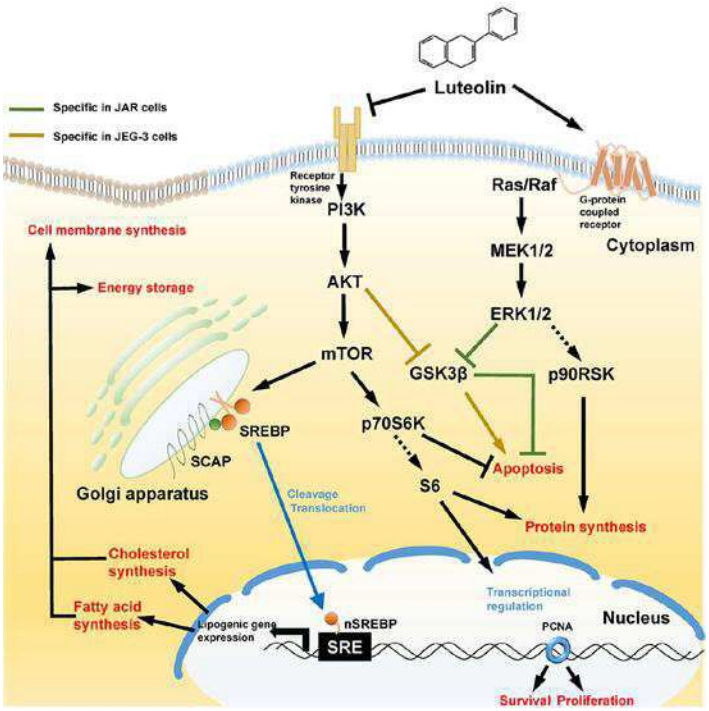
도면9


[A]
JAR
Naive
Luteolin 20 μM
Relative mRNA levels
FASN
ACACA
PPARγ
DBI
SCD
HMGCR
HMGCS
FDFT1
MVK
SQLE
[B]
JEG-3
Naive
Luteolin 20 μM
Relative mRNA levels
FASN
ACACA
PPARγ
DBI
SCD
HMGCR
HMGCS
FDFT1
MVK
SQLE

도면10


[A]
JAR
Proliferation (% of control)
Luteolin
Etoposide
Cisplatin
Paclitaxel
[B]
JEG-3
Proliferation (% of control)
Luteolin
Etoposide
Cisplatin
Paclitaxel

도면11


Luteolin
Specific in JAR cells
Specific in JEG-3 cells
Receptor tyrosine kinase
PI3K
Ras/Raf
G-protein coupled receptor
Cytoplasm
MEK1/2
ERK1/2
AKT
mTOR
GSK3β
p90RSK
p70S6K
Apoptosis
S6
Protein synthesis
Cell membrane synthesis
Energy storage
SREBP
SCAP
Golgi apparatus
Cleavage
Translocation
Cholesterol synthesis
Fatty acid synthesis
Lipogenic gene expression
nSREBP
SRE
Transcriptional regulation
PCNA
Nucleus
Survival Proliferation