



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0118063
(43) 공개일자 2023년08월10일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A23K 20/132</i> (2016.01) <i>A23K 50/00</i> (2016.01)
 <i>A23K 50/30</i> (2016.01) <i>A61K 31/4045</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A23K 20/132</i> (2016.05)
 <i>A23K 50/00</i> (2016.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0100424(분할)
 (22) 출원일자 2023년08월01일
 심사청구일자 2023년08월01일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2020-0140054
 원출원일자 2020년10월27일
 심사청구일자 2020년10월27일</p> | <p>(71) 출원인
 국민대학교산학협력단
 서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)</p> <p>고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 임화선
 서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 61호 (여의도동, 여의도시범아파트)</p> <p>송권화
 충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호 (쌍용동, 현대아이파크)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인태백</p> |
|--|--|

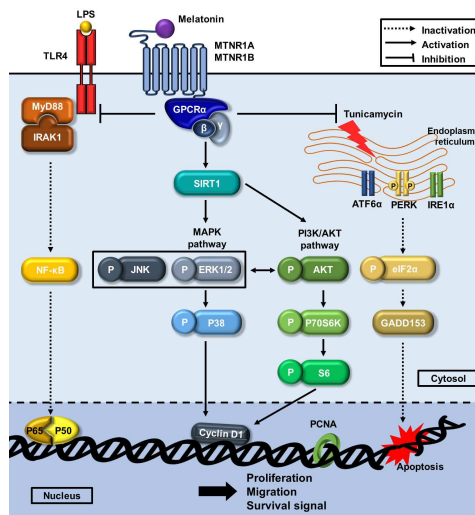
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 **멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 착상 및 임신 촉진용가축 사료첨가제**

(57) 요약

본 발명은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하며, 가축의 착상 및 임신을 촉진시키기 위한 사료첨가제에 관한 것으로, 상기 멜라토닌은 돼지의 자궁내막 상피세포와 영양외배엽 세포의 증식을 유도하고, 착상관련 유전자들의 발현을 증가시켜 가축의 착상을 촉진시키고, 세포 사이의 상호작용을 증진시켜 수태산물의 착상시 발생하는 이주능을 향상시켜 가축의 임신을 촉진시키는 효과를 나타내는 것이 확인되었으며, 임신기 동안 염증 반응 또는 내·외부 요인에 의한 소포체 스트레스를 억제하는 효과를 나타내어 임신성 질환을 예방하는 효과가 확인됨에 따라, 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 조성물을 가축의 착상 및 임신 촉진용 사료 첨가제로 제공할 수 있다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

A23K 50/30 (2016.05)

A61K 31/4045 (2013.01)

Y02P 60/50 (2020.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711107883
과제번호	2018R1C1B6009048
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	엑소좀 유래 운반 RNA 소편을 이용하여 모체 영양불량에 의한 태반 형성, 태아 프로그래밍의 후성유전학적 기전 규명 및 임신기 영양 평가를 위한 플랫폼 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국민대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 가축의 임신기 동안 소포체 스트레스에 의해 유발되는 임신성 질환 예방용 가축 사료첨가제로써,

상기 임신성 질환은 전치태반, 자궁내 성장제한, 태아성장제한, 임신성 고혈압, 조산 및 사산으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 가축 사료첨가제.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 가축은 돼지, 말, 소, 양, 염소, 개, 가금류 및 어류로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 가축 사료첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하며, 가축의 착상 및 임신을 촉진시키기 위한 사료첨가제에 관한 기술이다.

배경 기술

[0002] 성공적인 임신을 유지시키기 위해서는 배아의 발달, 자궁 내막의 발달, 착상, 태반형성, 호르몬 조절, 모체와 태아 간 영양소 및 가스의 교환이 필요시 된다. 임신 초기 태아는 자궁내막에 착상하기 위해 구형태의 배반포에서 필라멘트 모양으로 형태학적 변화를 겪으며, 성공적인 비침투성 태반을 형성한다.

[0003] 착상 전 기전 중 수태산물로부터 분비되는 에스트로젠은 프로스타글란딘F 2 α 의 분비를 막음으로써, 황체용해(luteolysis)를 막고 자궁 내막 조직을 리모델링하여 착상을 위한 자궁 환경을 형성한다.

[0004] 여성 생식기관 내 소포체 스트레스에 의한 세포사멸은 비정상적인 생식기관의 발달과 임신을 방해하는 요소로 작용하는데, 특히 소포체 스트레스는 마우스 내 비정상적 태반을 야기하고 여성에게는 태아 성장 지연과 임신중독증, 유산을 유발한다. 감염에 의한 TLR4 신호전달 경로의 활성화는 프로스타글란딘 합성 기능 장애를 초래하여 자궁 평활근 수축을 유도해 조산을 유발하며, 심한 경우 유산에 이르게 되므로, 임신 중 염증완화는 임신 유지에 중요하다.

[0005] 따라서 성공적인 착상을 위해서는 자궁내막 세포가 충분히 증식, 분화 및 발달되어야 할 뿐만 아니라, 소포체 스트레스를 감소시킬 수 있어야 한다.

[0006] 돼지의 경우, 침습(invasion)을 통하여 착상이 이루어지는 사람 및 마우스와 다르게 hatching 이후 영양외배엽 세포(pTr)의 신장(elongation)을 거쳐 자궁내막상피세포에 부착하여 착상되는 데, 신장된 영양외배엽 세포가 자궁내막으로부터 분비되는 조직영양소(histotroph)와 상호작용을 통하여 자궁내막(endometrium)에 안착하여 착상이 이루어진다.

[0007] 또한, 돼지의 경우 자궁내막 상피세포가 착상 이후 임신기간 동안 태반형성과정에도 관여하며 지속적으로 임신을 유지시키는 데 중요한 역할을 담당한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0030428호 (2015.03.20. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 가축의 착상을 유도하고, 내·외부의 요인에 따른 임신성 질환을 예방하여 가축의 임신을 촉진 및 유지시키기 위해 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 조성물을 가축용 사료첨가제로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 착상 및 임신 촉진용 가축 사료첨가제를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하며, 임신 초기 가축의 자궁내막 상피세포 및 영양외배엽 세포 발달 촉진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 멜라토닌은 돼지의 자궁내막 상피세포와 영양외배엽 세포의 증식을 유도하고, 착상관련 유전자들의 발현을 증가시켜 가축의 착상을 촉진시키고, 세포 사이의 상호작용을 증진시켜 수태산물의 착상 시 발생하는 이주능을 향상시켜 가축의 임신을 촉진시키는 효과를 나타내는 것이 확인되었으며, 임신기 동안 염증 반응 또는 내·외부 요인에 의한 소포체 스트레스를 억제하는 효과를 나타내어 임신성 질환을 예방하는 효과가 확인됨에 따라, 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 조성물을 가축의 착상 및 임신 촉진용 사료 첨가제로 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1A 및 도 1B는 돼지 자궁 내막에서 멜라토닌 수용체(MTNR1A, MTNR1B)의 mRNA 발현 변화를 확인한 qRT-PCR 결과로, 정상적인 발정주기에 비해 임신 초기 착상이 이뤄지는 시기에 발현이 증가함을 확인한 것이며, 도 1C 및 도 1D는 멜라토닌 생산 효소의 발현 변화를 확인한 결과로, 정상 발정주기 대비 자궁 내막에서 임신 초기 그 발현 증가를 확인한 것이다.

도 2는 MTNR1A, MTNR1B mRNA 발현 위치를 돼지 자궁 내막 조직에서 in situ hybridization 분석을 통하여 확인한 결과로, 임신 초기 MTNR1A, MTNR1B의 발현이 자궁 내막 조직의 내강상피세포(LE, luminal epithelium), 선상피세포(GE, glandular epithelium) 뿐만 아니라 자궁 내막에 착상을 위해 가까워지는 영양막세포(Tr, trophoblast)에서도 발현이 강하게 나타남을 확인한 결과이다.

도 3은 돼지 영양외배엽 세포와 자궁 내막 세포에서 멜라토닌이 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 3A는 멜라토닌을 용량의존적으로 처리하였을 때 영양막 세포와 자궁 내막 세포에서 세포의 증식이 향상됨을 나타낸 결과이며, 도 3B는 멜라토닌에 의한 세포주기 변화를 측정된 결과로 G2/M기가 증가함에 따라 세포가 빠르게 분열하는 결과를 확인한 결과이며, 도 3C는 세포증식 마커로 알려진 PCNA의 발현을 멜라토닌 처리에 따라 영양막세포와 자궁 내막 세포에서 면역형광염색법을 통하여 분석한 결과 멜라토닌에 의하여 PCNA 단백질의 발현이 세포의 핵에서 증가하는 것을 확인한 결과이다.

도 4는 돼지 영양외배엽 세포와 자궁 내막 세포의 이주능에 멜라토닌이 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 5는 멜라토닌에 의한 착상 관련 유전자의 발현 변화를 확인한 결과이다.

도 6은 돼지 영양외배엽 및 자궁 내막 세포 내 멜라토닌의 용량의존적 투여에 의한 타겟 인산화효소 발현을 확인한 결과이다.

도 7은 PI3K 및 MAPK 억제제와 멜라토닌의 혼합조성물에 의한 영양외배엽 및 자궁내막세포 내 단백질 인산화효소 발현 변화를 확인한 결과이다.

도 8은 영양외배엽 세포 및 자궁내막 상피세포에서 소포체 스트레스 유도과 멜라토닌의 효과를 확인한 결과이다.

도 9는 돼지 영양외배엽 세포 및 자궁내막 상피세포에서 염증 유도와 멜라토닌의 효과를 확인한 결과로, 도 8A는 영양외배엽 세포(pTr)의 세포 증식효과를 확인한 결과이며, 도 8B는 자궁내막 상피세포(pLE)의 세포 증식효과를 확인한 결과이며, 도 8C는 영양외배엽 세포(pTr)에서 멜라토닌이 TLR4 수용체 하위 염증 단백질인 p-NF- κ B, p-IRAK4, 및 MyD88 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이며, 도 8D는 자궁내막 상피세포(pLE)에서

멜라토닌이 TLR4 수용체 하위 염증 단백질인 p-NF- κ B, p-IRAK4, 및 MyD88 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 10은 멜라토닌에 의하여 증가한 SIRT1 유전자 발현 및 조절 효과를 확인한 결과로, 도 10A 및 도 10B는 멜라토닌에 의하여 영양막 세포와 자궁 내막 세포에서 멜라토닌 수용체 MTNR1A, MTNR1B의 mRNA 발현을 qRT-PCR을 통하여 확인한 결과 멜라토닌에 의하여 수용체가 증가하는 양상을 확인한 결과이며, 도 10C는 멜라토닌의 하위 조절인자로 알려져 있는 SIRT1의 발현을 확인한 결과 멜라토닌의 처리에 따라 증가하는 것으로 확인한 결과이며, 도 10D는 멜라토닌에 의해 세포주에서 증가한 SIRT1이 임신 초기 자궁 내막 조직에서의 발현을 확인하고자 발정주기, 임신초기 시 돼지 자궁 내막 조직에서 mRNA 발현을 확인한 결과이며 임신 초기 그 발현이 증가함을 확인한 결과이며, 도 10E는 SIRT1의 mRNA 발현 위치를 확인하고자 in situ hybridization 분석을 실시하여 임신 초기 영양막세포와 자궁 내막 조직에서 발현이 강하게 나타남을 확인한 결과이며, 도 10F-G는 SIRT1의 억제제를 사용하였을 때 영양막 세포와 자궁 내막 세포의 증식을 확인한 결과로 SIRT1 억제제 EX527에 의하여 각 세포의 증식이 억제됨을 확인한 결과이다.

도 11은 멜라토닌과 SIRT1 조절에 의한 영양외배엽 세포와 자궁내막 세포 증식 및 이주능 변화를 확인한 결과로, 도 11A는 SIRT1 억제제와 멜라토닌의 병용 처리시 SIRT1 억제제에 의하여 감소되었던 세포의 증식이 회복되는 양상을 확인한 결과이며, 도 11B는 SIRT1 억제제에 의하여 증가하였던 영양외배엽세포와 자궁 내막 세포의 간격이 멜라토닌을 처리함에 따라 다시금 서로 상호작용에 의하여 줄어드는 양상 즉, 이주능의 증가를 확인한 결과이며, 도 11C 및 도 11D는 SIRT1 억제제와 멜라토닌의 병용처리시 SIRT1 억제제에 의하여 감소하였던 세포의 이주능이 다시금 증가하는 양상을 Transwell을 이용하여 확인한 결과이다.

도 12는 멜라토닌과 SIRT1 조절에 의한 영양외배엽 세포, 자궁내막 세포 신호전달기전을 확인한 결과이다.

도 13은 siSIRT1과 멜라토닌에 의해 조절되는 세포 이주능 변화를 확인한 결과이다.

도 14는 제브라피쉬에서 멜라토닌에 의한 산란효율 향상 및 항염증 효과를 확인한 결과로, 도 14A는 제브라피쉬 성체에 염증 유발 물질인 LPS를 처리한 후 4주간 멜라토닌을 처리했다는 모식도이며, 도 14B는 각 성체에서 산란된 egg를 살펴본 결과 LPS 처리시 control, 멜라토닌 단독 처리군에 비하여 산란된 egg가 손상됨을 현미경으로 확인한 결과 및 이에 반하여 LPS에 노출된 성체에 멜라토닌을 포함한 물에서 사육한 결과 건강한 egg를 산란함에 따라 멜라토닌의 항염증 반응에 의해 제브라피쉬의 산란효율을 개선시킨다는 결과이며, 도 14C는 각 그룹간 수정된 egg의 수를 control 대비 나타낸 결과로 LPS에 노출 시 수정된 egg도 감소되었다 멜라토닌에 4주간 노출되었을 경우 다시금 control과 같이 회복됨을 나타낸 결과이며, 도 14D는 동일한 조건에서 산란된 egg가 24시간 후 정상적으로 성장되는 여부를 측정한 결과이다.

도 15는 멜라토닌이 영양외배엽세포와 자궁 내막 세포에서 작용하는 메커니즘을 요약한 대표 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016]

본 발명은 가축의 임신 촉진 및 성공적인 임신 유지를 위한 방법을 연구하던 중 돼지의 임신 초기 자궁내막 조직에서 멜라토닌 수용체의 발현이 증가되는 것을 확인하였으며, 실제로 멜라토닌이 임신기의 영양외배엽 세포 및 자궁내막 세포의 성장 및 신호전달을 조절하는 효과를 확인함에 따라 본 발명을 완성하였다.

[0018]

본 발명은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 착상 및 임신 촉진용 가축 사료첨가제를 제공할 수 있다.

[0019]

상기 멜라토닌은 임신 초기 가축의 자궁내막 상피세포 및 영양외배엽 상피세포의 증식 및 세포 이주능을 향상시키는 것일 수 있다.

[0020]

보다 상세하게는 상기 멜라토닌은 PI3K 및 MAPK 메커니즘을 조절하여 영양외배엽 세포(pTr)와 자궁내막 세포(pLE)의 증식 및 세포 이주능을 조절할 수 있으며, 영양외배엽 세포(pTr)와 자궁내막 세포(pLE)의 SIRT1 유전자의 발현을 증가시켜 세포의 증식 및 이주능을 향상시킬 수 있다.

[0021]

본 발명의 실시예에 따르면, 임신 초기 영양외배엽 세포(pTr)와 자궁내막 세포(pLE)에 0, 1, 5, 10, 20 및 50 μ M 농도의 멜라토닌을 처리하여 세포 증식을 확인한 결과, 도 3과 같이 돼지 영양외배엽 세포와 자궁내막 세포

의 증식이 멜라토닌의 처리량에 비례하여 증가하였으며, 멜라토닌 50 μ M 농도에서 각각 170% 및 220%이상 세포 증식이 증가하는 것이 확인되었다.

- [0022] 또한 멜라토닌이 상기 세포의 이주능에 미치는 영향을 확인하기 위해 영양외배엽 세포와 자궁내막 세포에 0, 10, 25 및 50 μ M 농도의 멜라토닌을 처리하고 μ -culture dish에서 세포 이동성을 확인한 결과, 도 4와 같이 멜라토닌 농도의존적으로 영양외배엽 세포와 자궁내막 세포 간의 세포이동성이 증가되는 것을 확인함에 따라, 멜라토닌은 임신 초기 영양외배엽 세포와 자궁내막 세포의 증식을 향상시키고, 착상을 위해 임신 초기 영양외배엽 세포와 자궁내막 세포의 세포-세포 간 상호작용을 촉진시키는 효과를 나타내는 것이 확인되었다.
- [0023] 한편, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 0, 10, 20 및 50 μ M 농도의 멜라토닌을 투여한 영양외배엽 세포와 자궁내막 상피세포의 단백질을 추출하여 웨스턴블롯을 수행한 결과, 도 6과 같이 영양외배엽 세포 및 자궁내막 상피세포의 증식 및 이주능 조절관련 신호전달 기전인 PI3K 및 MAPK 메커니즘의 주요 신호전달매개 단백질인 AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK 및 P38 단백질의 인산화 증가가 확인되었으며, PI3K 억제제 wortmannin, ERK1/2 억제제 U0126, JNK 억제제 SP600125 및 P38 억제제 SB203580에 의해 멜라토닌 투여에 의해 증가되었던 AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK 및 P38 단백질의 인산화가 억제되는 것이 확인됨에 따라, 멜라토닌의 세포 증식 및 이주능은 PI3K 및 MAPK 메커니즘에 의해 조절되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0024] 상기 멜라토닌은 가축 자궁 내막 발달, 착상효율 증진 및 태반형성을 향상시키는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 멜라토닌은 가축의 임신기 동안 소포체 스트레스 또는 염증에 의해 유발되는 임신성 질환을 예방하는 것일 수 있다.
- [0026] 보다 상세하게는 멜라토닌은 임신 초기 소포체 스트레스를 야기시키는 조절 유전자인 IRE1 α , ATF6 α , p-PERK, p-eIF2 α 및 GADD153의 발현을 억제시키며, 염증을 유발시키는 TLR4 신호전달 경로인 p-NF- κ B, p-IRAK4, 및 MyD88의 증가를 저해하여 임신 기간 중 염증 또는 소포체 스트레스에 의한 임신성 질환을 예방할 수 있다.
- [0027] 상기 임신성 질환은 전치태반, 자궁 내 성장제한, 태아성장제한, 임신성 고혈압, 조산 및 사산으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 가축은 돼지, 말, 소, 양, 염소, 개, 가금류 및 어류로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 돼지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 또한, 본 발명은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하며, 임신 초기 가축의 자궁내막 상피세포 및 영양외배엽 세포 발달 촉진용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0031] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0033] <실시예 1> 발정주기 및 임신 초기 돼지 자궁내막에서 멜라토닌 수용체와 멜라토닌 생산 효소의 발현 변화 확인
- [0034] 돼지의 발정주기 및 임신 초기 동안 자궁내막 조직을 대상으로 멜라토닌 수용체인 MTNR1A 및 MTNR1B와 멜라토닌 생산 효소인 AANAT 및 ASMT의 mRNA 발현 양상을 확인하기 위해 실시간 PCR을 수행하였다.
- [0035] 발정주기 및 임신 주기 별 동정한 자궁 내막 조직을 Trizol reagent (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이 후, 1 μ g의 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 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 인큐베이션 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 3분 조건을 40회 증폭하였으며 GAPDH 발현량에 기반하여 정규화하였다.
- [0036] 그 결과, 도 1과 같이 비임신기와 비교하였을 때 MTNR1A, MTNR1B, AANAT 및 ASMT의 발현이 임신 초기에 증가하는 것을 확인하였다. 또한 도 2와 같이 임신 초기에 MTNR1A 및 MTNR1B의 발현이 자궁내막 내강상피세포(luminal epithelium, LE)와 선상피세포(glandular epithelium, GE)에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0037] 상기 결과로부터 멜라토닌의 생산과 자궁내막에서 멜라토닌의 수용이 임신기에 중요한 역할을 하는 것이 확인되었다.

[0039] <실시예 2> 돼지의 자궁내막 세포와 영양외배엽 세포의 증식에 멜라토닌이 미치는 영향 확인

[0040] 임신 초기 영양외배엽 세포(porcine trophectoderm cells, pTr)와 자궁내막 세포(porcine endometrial luminal epithelial cells, pLE)에 0, 1, 5, 10, 20 및 50 μM 농도의 멜라토닌을 처리하여 세포 증식 분석(cell proliferation assay)을 수행하였다.

[0041] 영양외배엽 세포 및 자궁내막 세포의 증식 능력에 멜라토닌이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 3×10^3 개의 세포와 배지 100 μl 를 96 well에 분주하고 멜라토닌을 용량의존적으로 (0, 1, 5, 10, 20, 50 μM) 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 이 후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37 $^{\circ}\text{C}$ /5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양한다. 전립선암 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이 후 3차례 씻어준다. 마지막으로 100 μl 의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응하여 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0042] 그 결과, 도 3과 같이 돼지 영양외배엽 세포와 자궁내막 세포의 증식이 멜라토닌의 처리량에 비례하여 함께 증가하는 것을 확인하였으며, 멜라토닌 50 μM 농도에서 각각 170% 및 220% 이상 세포 증식이 증가하는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 세포주기 분석에서 G2/M 기를 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였다.

[0043] 또한, 세포 증식 인자인 PCNA를 면역형광기법으로 돼지 영양막 세포와 자궁내막 상피 세포를 확인한 결과, 도 3C와 같이 멜라토닌에 의해 PCNA의 발현이 유도되는 것을 확인하였다.

[0045] <실시예 3> 돼지의 자궁내막 세포와 영양외배엽 세포의 이주능에 멜라토닌이 미치는 영향 확인

[0046] 임신 초기 영양외배엽 세포(pTr)와 자궁내막 내강상피세포(pLE)의 이주능을 확인하기 위해, 각 세포에 대한 이주능 분석(migration assay)를 수행하였다.

[0047] 영양외배엽 세포와 자궁 내막 세포의 세포 이주성에 있어 멜라토닌이 미치는 영향을 확인하기 위하여 Migration culture dish에 FBS 기아 조건으로 배양한 1×10^5 개의 영양외배엽 세포와 자궁 내막 세포를 8-mm transwell inserts (Corning, Inc., Corning, NY, USA)에 분주하고 멜라토닌을 처리하여 6시간 동안 배양한 다음, 메탄올로 10분간 trans-membrane을 이동한 세포를 고정하여, 건조 및 헤마톡실린 (Sigma Aldrich, Inc.) 염색을 30분간 수행하고, 씻어주었다. 슬라이드 글라스에 막을 올려주고 퍼마운트 용액(Permunt solution)으로 고정하여 세포 이주 능력을 광학현미경 DM3000 (Leica)로 관찰, 촬영, 계산하였다.

[0048] 그 결과, 도 4와 같이 두 세포 모두에서 멜라토닌에 의한 이주능이 증가하는 것이 확인되었다.

[0049] 또한, 상기 결과를 확인함에 따라, μ -culture dish를 사용하여 멜라토닌이 pTr, pLE 세포 사이의 상호작용에 있어 세포의 이동성에 어떠한 영향을 미치는지 확인한 결과, 멜라토닌은 pTr과 pLE 세포 사이의 이동성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0050] 상기 결과로부터 멜라토닌이 임신 초기 영양외배엽 세포와 자궁 내막 상피세포가 착상을 위한 세포-세포 간 상호작용을 증진시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0052] <실시예 4> 멜라토닌 투여에 따른 임신 초기 착상 관련 유전자 발현 변화 확인

[0053] 멜라토닌이 임신 초기 모돈 내 태아-모체 간 상호작용을 증진시키는 유전자들의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

[0054] 0, 10, 50 및 100 μM 농도의 멜라토닌을 영양외배엽 세포 및 자궁내막 내강상피세포에 처리한 후 PCR 분석을 수행하여 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[0055] 그 결과, 도 5와 같이 멜라토닌은 각 세포에서 착상에 관여하는 유전자 ADIPOR1, ADIPOR2, CCND1, IGFR, PCNA 및 VEGFR의 mRNA 발현을 모두 증가시켰다.

- [0056] 상기 결과로부터 멜라토닌은 임신 초기 모체-태아 간 착상에 관여하는 것이 확인되었다.
- [0058] <실시예 5> 멜라토닌 투여에 따른 신호전달기전 변화 확인
- [0059] 영양외배엽 세포(pTr)와 자궁내막 내강상피세포(pLE)에서 멜라토닌 투여에 따른 신호전달기전 변화를 확인하기 위해, 0, 10, 20 및 50 μ M 농도의 멜라토닌을 영양외배엽 세포 및 자궁내막 상피세포에 처리하여 배양한 후 세포의 단백질을 추출하여 PI3K 및 MAPK 메커니즘의 주요 신호전달매개 단백질인 AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK 및 P38 단백질의 인산화 수준을 확인하였다.
- [0060] 그 결과, 도 6과 같이 대조군과 비교하여 멜라토닌이 처리된 영양외배엽 세포 및 자궁내막 상피세포에서 AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK 및 P38 단백질의 인산화 수준이 멜라토닌 용량의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0061] 또한, 멜라토닌 투여가 돼지영양막 및 자궁내막 상피세포 내 PI3K, MAPK 신호전달경로 조절에 미치는 영향을 확인하기 위해, PI3K 억제제 보르트만닌 (wortmannin, 1 μ M), ERK1/2 억제제 U0126 (20 μ M), JNK 억제제 SP600125 (20 μ M) 및 P38 억제제 SB203580 (20 μ M)을 전처리하여 타겟 신호전달기전을 억제시킨 후, 멜라토닌 (50 μ M)를 처리하고 상기 단백질들의 인산화 수준을 확인하였다.
- [0062] 그 결과, 도 7과 같이 멜라토닌 추가 처리에도 멜라토닌에 의해 활성화되었던 AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK 및 P38단백질의 인산화가 감소하는 것이 확인되었다.
- [0063] 상기 결과로부터 멜라토닌에 의하여 증가하였던 세포 증식은 PI3K 및 MAPK 조절에 의한 것임이 확인되었다.
- [0065] <실시예 6> 멜라토닌이 돼지 영양막세포 및 자궁내막 상피세포의 소포체 스트레스에 미치는 영향 확인
- [0066] 임신 초기 멜라토닌이 소포체 스트레스에 미치는 영향을 확인하기 위해, 소포체 스트레스 유도물질인 튜니카마이신(tunicamycin) 0.25 μ M/mL 농도로 단독 또는 5, 10, 25 및 50 μ M 농도의 멜라토닌과 혼합하여 임신 초기 영양외배엽세포와 자궁내막 내강상피세포에 처리하였다.
- [0067] 그 결과, 도 8A와 같이 튜니카마이신이 처리된 세포에서는 세포 증식이 30%로 감소하였으나, 튜니카마이신과 멜라토닌 혼합물이 처리된 세포에서는 60% 이상으로 세포 증식이 회복되었다.
- [0068] 또한, 도 8B 내지 도 8F와 같이 튜니카마이신이 처리된 세포에서는 소포체 스트레스 유발시 발현되는 ATF6 α , IRE1 α , p-PERK, p-eIF2 α , GADD153 단백질의 발현이 증가되었으나, 튜니카마이신과 멜라토닌 혼합물이 처리된 세포에서는 상기 단백질의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0069] 상기 결과로부터 멜라토닌이 임신 초기 돼지의 영양외배엽 세포 및 자궁내막 상피세포에서 소포체 스트레스를 감소시키는 효과가 있음이 확인되었다.
- [0071] <실시예 7> 멜라토닌이 돼지 영양외배엽 세포 및 자궁내막 내강상피세포의 염증에 미치는 영향 확인
- [0072] 멜라토닌이 영양외배엽 세포(pTr)와 자궁내막 내강상피세포(pLE)의 염증에 미치는 영향을 확인하기 위해, 염증 유도물질인 LPS (lipopolysaccharide)을 영양외배엽 세포 및 자궁내막 내강상피 세포에 처리하여 염증을 유발시킨 결과, 도 9A 및 9B와 같이 세포 증식이 각각 50% 및 70% 까지 감소하였으나, LPS와 멜라토닌 혼합물이 처리군에서 세포증식이 회복되는 효과를 확인하였다.
- [0073] 또한, 도 9C 및 9D와 같이 TLR4 수용체 하위 염증 단백질인 p-NF- κ B, p-IRAK4 및 MyD88 단백질의 발현이 증가되었으나, 멜라토닌 혼합물이 처리된 세포에서는 상기 단백질의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0074] 상기 결과로부터 LPS에 의해 유도된 염증반응을 멜라토닌이 억제시키는 것이 확인되었으며, 이를 통하여 임신 초기 염증으로 인해 발생될 수 있는 조산, 자궁 내 태아성장 발달 지연 등의 문제를 개선시킬 수 있음이 확인되었다.
- [0076] <실시예 8> 멜라토닌에 의한 영양외배엽세포 및 자궁내막 세포 내 멜라토닌 수용체와 SIRT1 발현 분석 및 조절

확인

- [0077] 0, 10, 50 및 100 μ M 농도의 멜라토닌을 영양외배엽 세포(pTr)와 자궁내막 내강상피세포(pLE)에 처리하고 멜라토닌 처리에 따른 세포 내 멜라토닌 수용체 MTNR1A 및 MTNR1B의 발현을 확인하였다.
- [0078] 그 결과, 도 10A 및 도 10B와 같이 멜라토닌 처리 농도 의존적으로 멜라닌 수용체인 MTNR1A 및 MTNR1B의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 도 10C와 같이 SIRT1 유전자의 mRNA 발현이 멜라토닌 처리에 의해 농도의존적으로 증가하는 것이 확인되었다.
- [0079] 한편, 현재까지 보고되지 않은 SIRT1 유전자의 발현을 발정주기 및 임신 초기 돼지 자궁내막 조직에서 확인하였다.
- [0080] 그 결과, 도 10D 및 도 10E와 같이 임신 12-14일에 SIRT1 mRNA 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 상기 발현은 자궁내막 내강상피세포(LE)와 선상피세포(GE)에서 두드러지게 발현되었을 뿐만 아니라, 자궁 내강에 떠있는 수태산물에도 발현이 확인되었다.
- [0081] 또한, SIRT1의 억제제인 EX527을 영양외배엽 세포 및 자궁내막 내강상피세포에 용량의존적으로 처리하고 각 세포의 증식양상을 분석한 결과, 도 10F 및 도 10G와 같이 SIRT1 억제제 EX527이 처리된 영양외배엽 및 자궁내막 내강상피세포의 증식 감소가 확인되었다.
- [0083] <실시예 9> 멜라토닌과 SIRT1 조절에 의한 영양외배엽, 자궁내막 세포 증식 및 이주능에 미치는 영향 확인
- [0084] 멜라토닌과 SIRT1 억제제 EX527을 사용하여 영양외배엽 세포 및 자궁내막 내강상피세포의 증식과 이주능 변화를 확인하였다.
- [0085] 그 결과, 도 11A와 같이 EX527에 의하여 감소하였던 두 가지 세포의 증식양상이 멜라토닌을 용량의존적으로 처리함에 따라 다시 증가하는 것이 확인되었다.
- [0086] 상기 결과는 각 세포 사이의 이동성에 영향을 주어 도 11B와 같이 멜라토닌에 의해 증가하였던 세포 이주능이 EX527 처리에 의해 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0087] 또한, 각 세포의 이주능을 확인하기 위해 migration assay 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 11C 및 도 11D와 같이 EX527 처리에 의해 감소되었던 각 세포의 이주능이 멜라토닌 처리에 의해 다시 회복되는 것이 확인되었다.
- [0088] 상기 결과로부터 멜라토닌은 SIRT1 조절을 통하여 세포의 증식과 이주능을 조절하는 것이 확인되었다.
- [0090] <실시예 10> 멜라토닌과 SIRT1 조절에 의한 영양외배엽, 자궁내막 세포 신호전달기전 분석
- [0091] 멜라토닌과 SIRT1 억제제 EX527을 사용하여 영양외배엽, 자궁내막 내강상피세포의 신호전달기전 변화를 확인하였다.
- [0092] 그 결과, 도 12와 같이 앞선 실험에서 확인된 멜라토닌에 의해 증가하는 PI3K, MAPK 신호전달 단백질의 인산화 수준이 EX527 처리에 의해 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 멜라토닌과 병용처리된 경우, 인산화가 회복되거나 더욱 증가하는 것으로 나타났다.
- [0093] 상기 결과로부터 SIRT1 억제제 처리시 영양외배엽, 자궁내막 내강상피세포의 증식이 감소되는 것 역시 PI3K, MAPK 신호전달기전 불활성화에 의한 것임을 확인할 수 있었다.
- [0095] <실시예 11> SIRT1 유전자 억제와 멜라토닌 조절에 의한 영양외배엽 및 자궁내막 세포 이주능 변화 확인
- [0096] 실제 세포 내 SIRT1 유전자를 억제하였을 때 동일한 양상을 나타내는 지 확인하기 위해, SIRT1 siRNA를 영양외배엽 세포 및 자궁내막 내강상피세포에 형질주입하고 세포의 이주능 및 이동성을 확인하였다.
- [0097] 그 결과, 도 13과 같이 SIRT1 유전자를 발현억제 시킨 실험군은 대조군 siRNA를 주입한 세포와 비교하여 세포 이주능이 감소하였다. 반면, 동일한 조건에서 멜라토닌을 처리한 실험군에서는 다시 이주능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0098] 또한, 두 세포 간 이동성을 확인하기 위해 동일한 조건으로 멜라토닌이 처리된 실험군에 SIRT1 siRNA를 처리한

결과, 세포-세포 상호작용이 감소하여 이동성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0100] <실시예 12> 제브라피쉬 생식 모델을 이용한 멜라토닌의 수정능 및 항염증 효과 확인

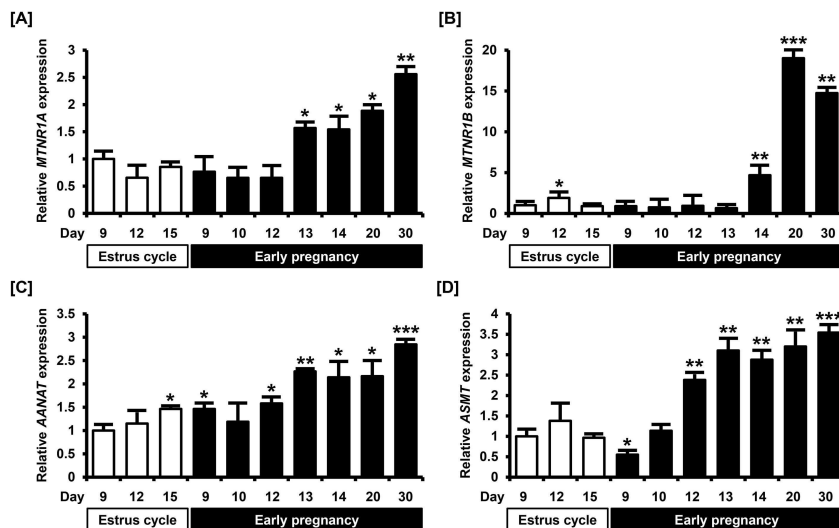
[0101] 암컷 제브라피쉬에 4주간 염증 유도물질인 LPS 처리 또는 LPS와 멜라토닌을 함께 처리하고 멜라토닌의 수정능 및 항염증 효과를 확인하였다.

[0102] 그 결과, 도 14A 내지 14D와 같이 LPS가 단독 처리된 암컷 제브라피쉬가 낳은 알들의 부화율은 50%로 감소하였으며, 발달이 현저하게 감소하는 것이 확인되었다. 반면, 도 14E 내 14J와 같이 LPS와 멜라토닌이 함께 처리된 실험군에서는 알의 부화율과 발달이 회복되는 것이 확인되었으며, LPS에 의해 증가되었던 casp3, nf- κ b, cox2, tnfa, mpo 및 cxcl18b의 mRNA가 멜라토닌에 의해 다시 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

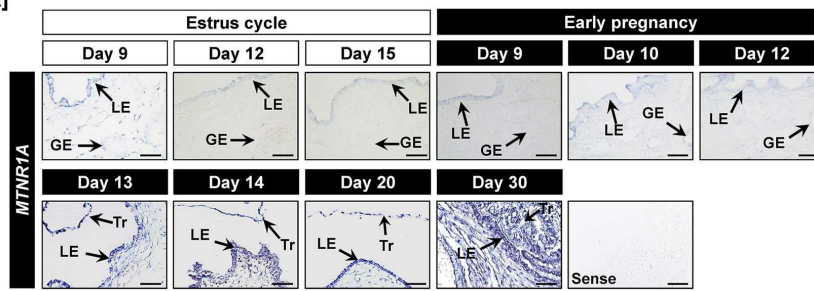
도면

도면1

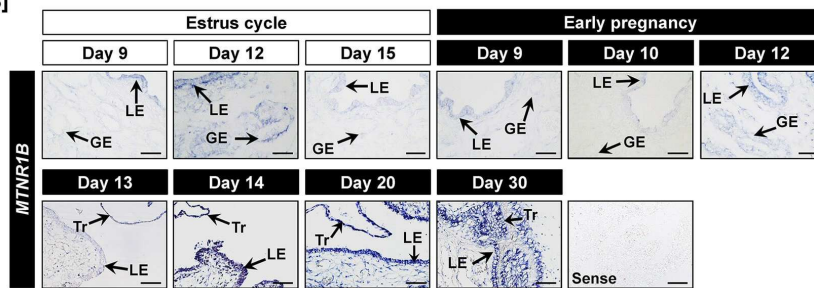


도면2

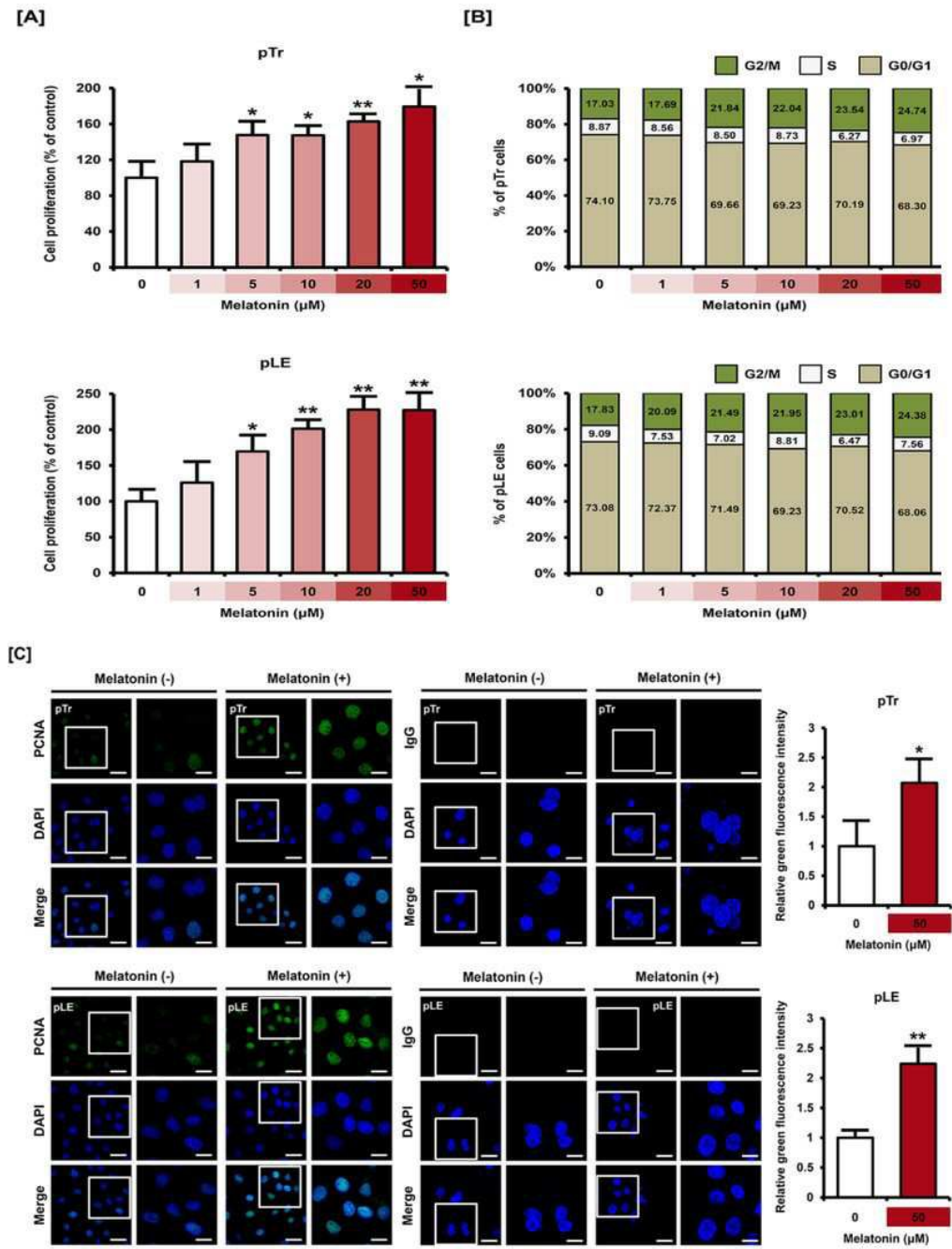
[A]



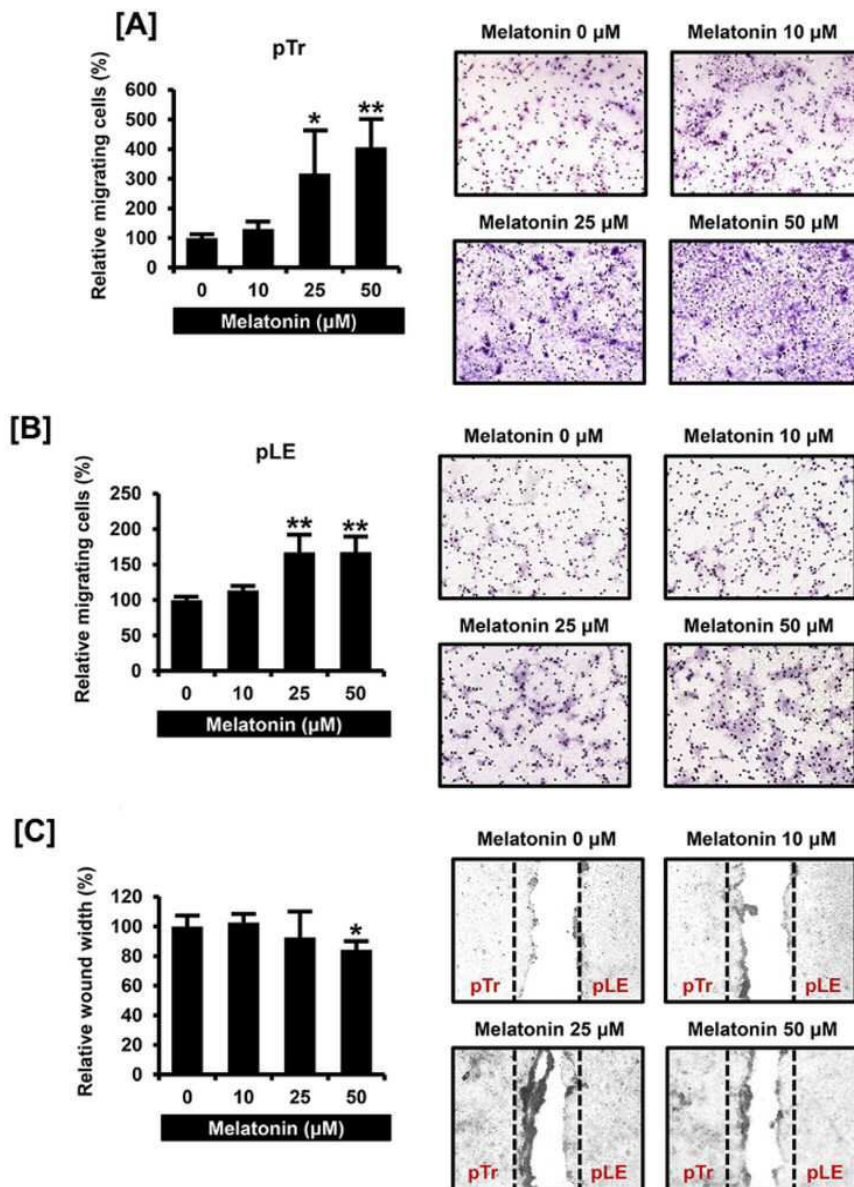
[B]



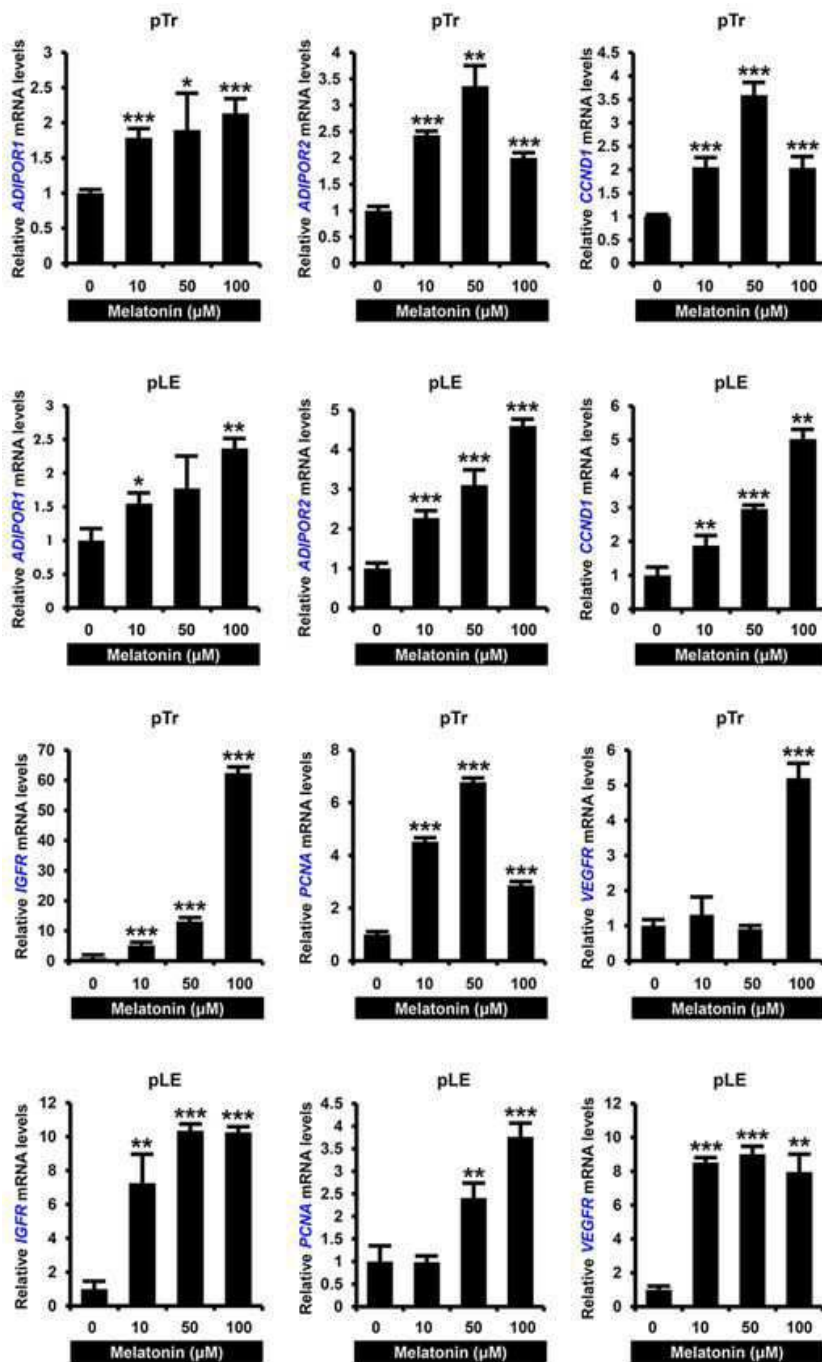
도면3



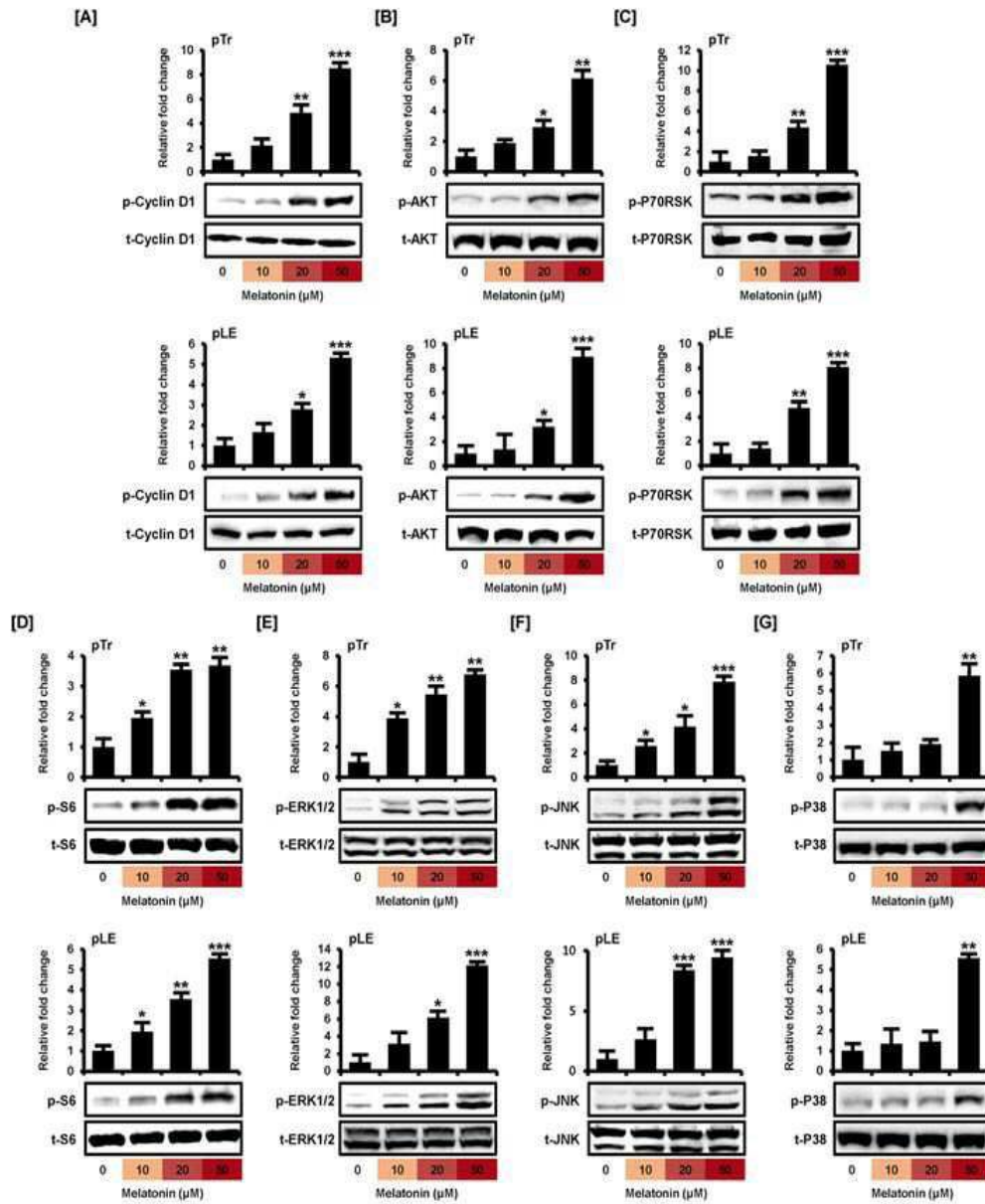
도면4



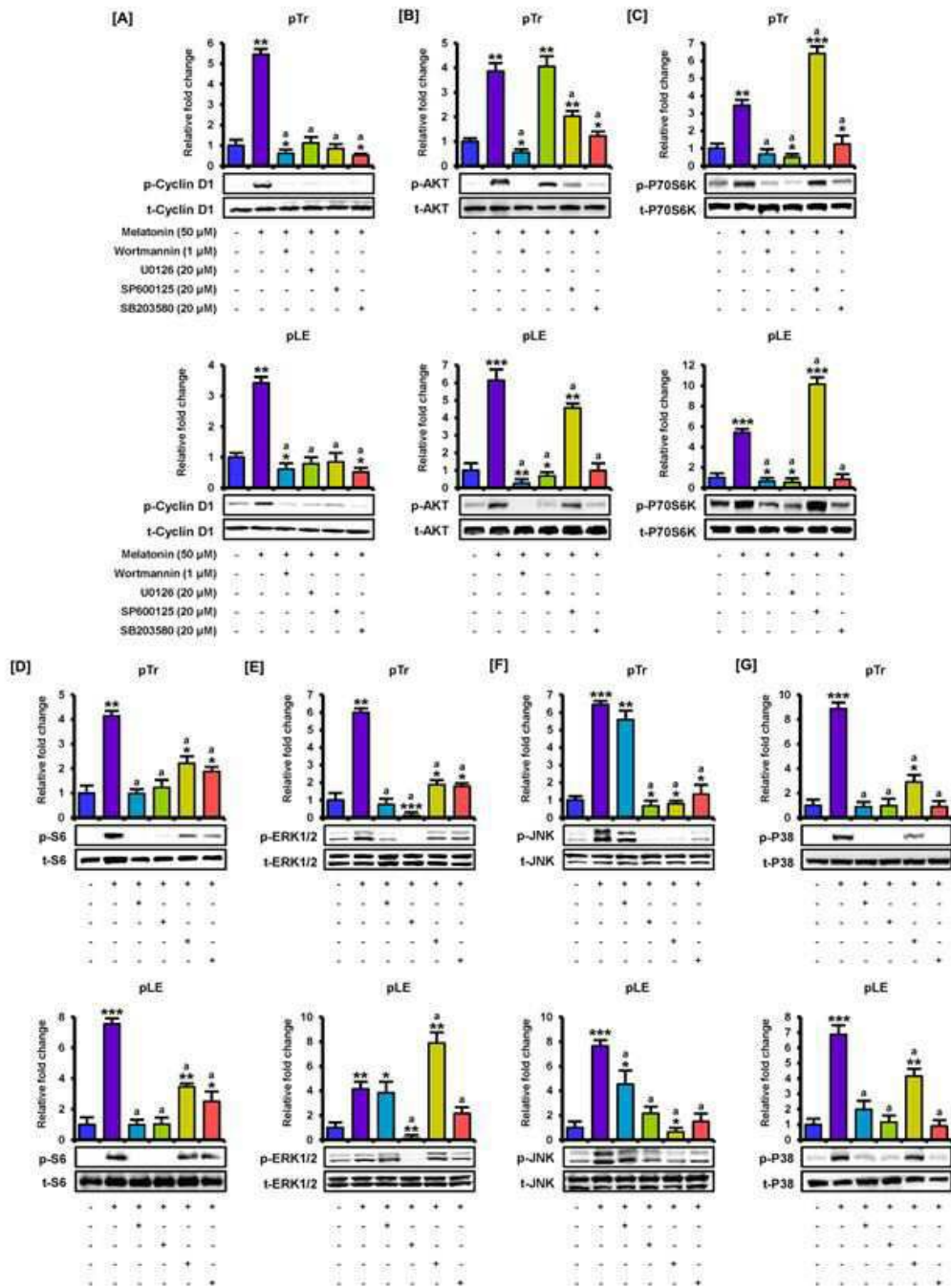
도면5



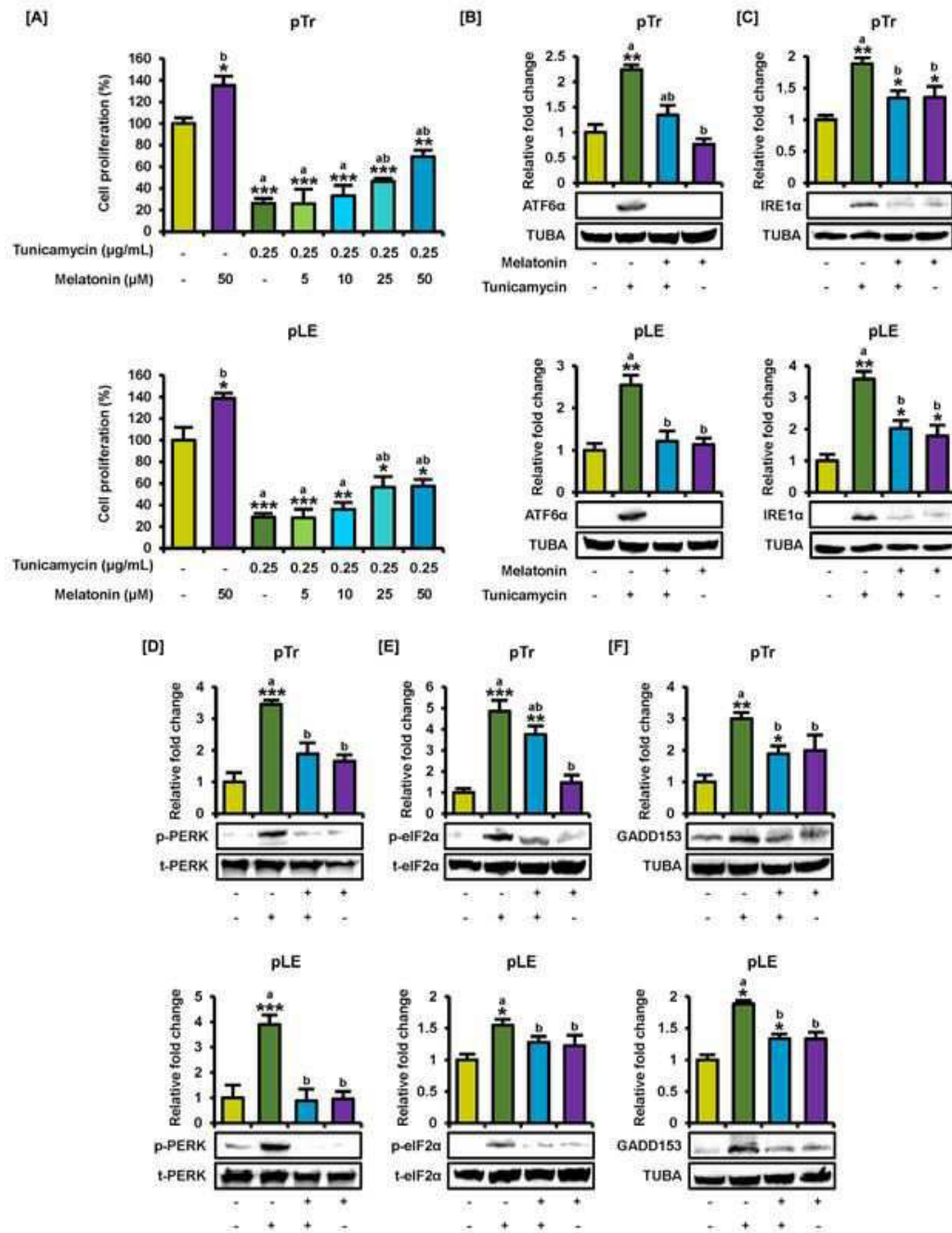
도면6



도면7

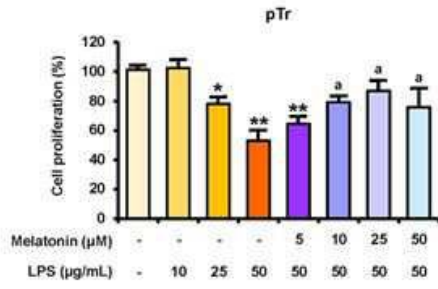


도면8

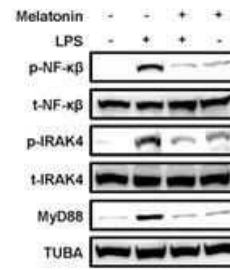


도면9

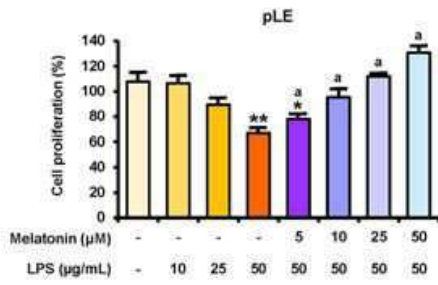
[A]



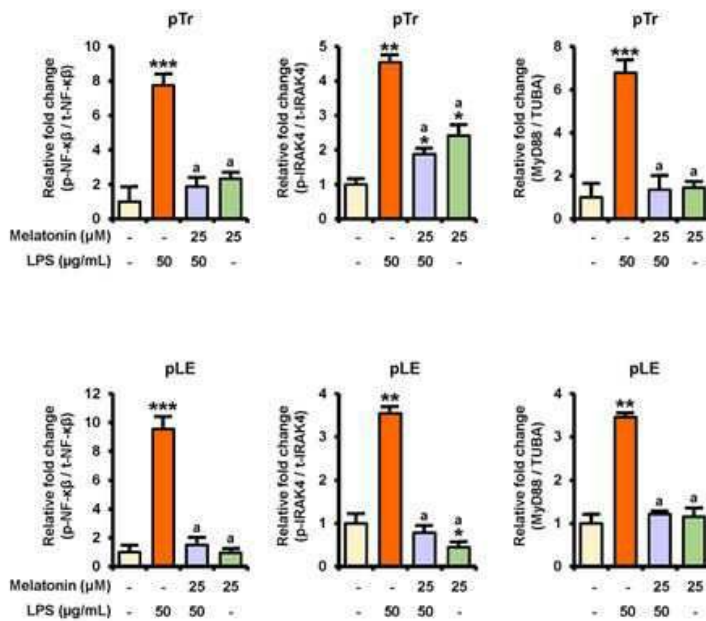
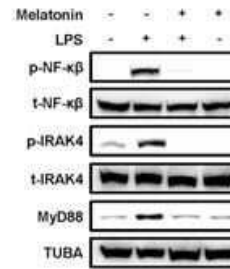
[C]



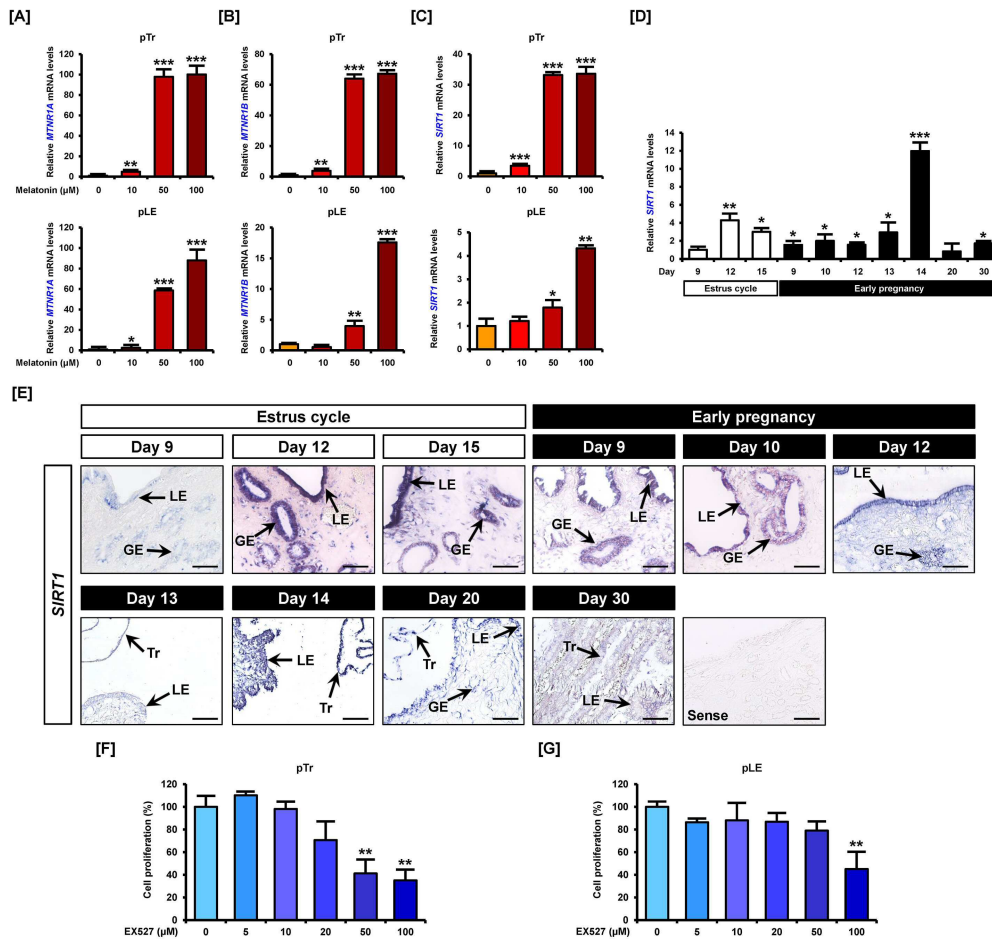
[B]



[D]

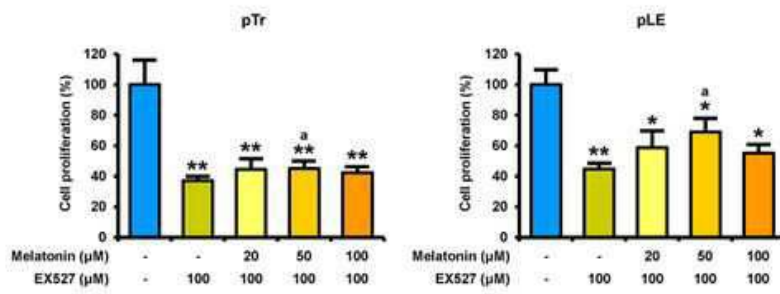


도면10

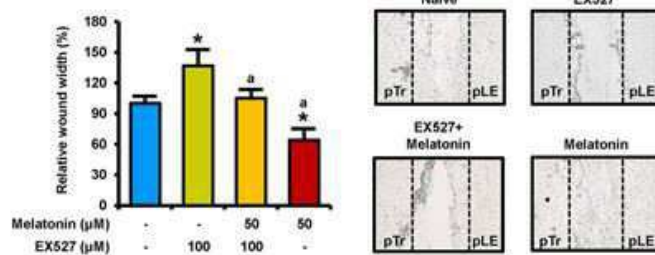


도면11

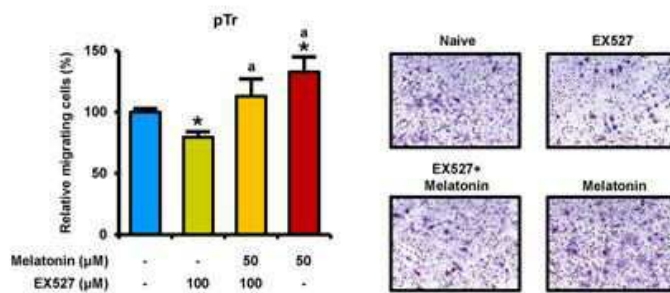
[A]



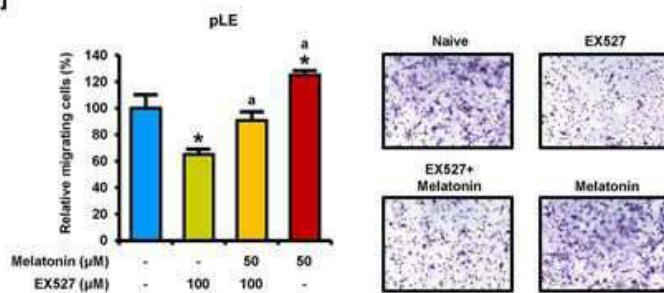
[B]



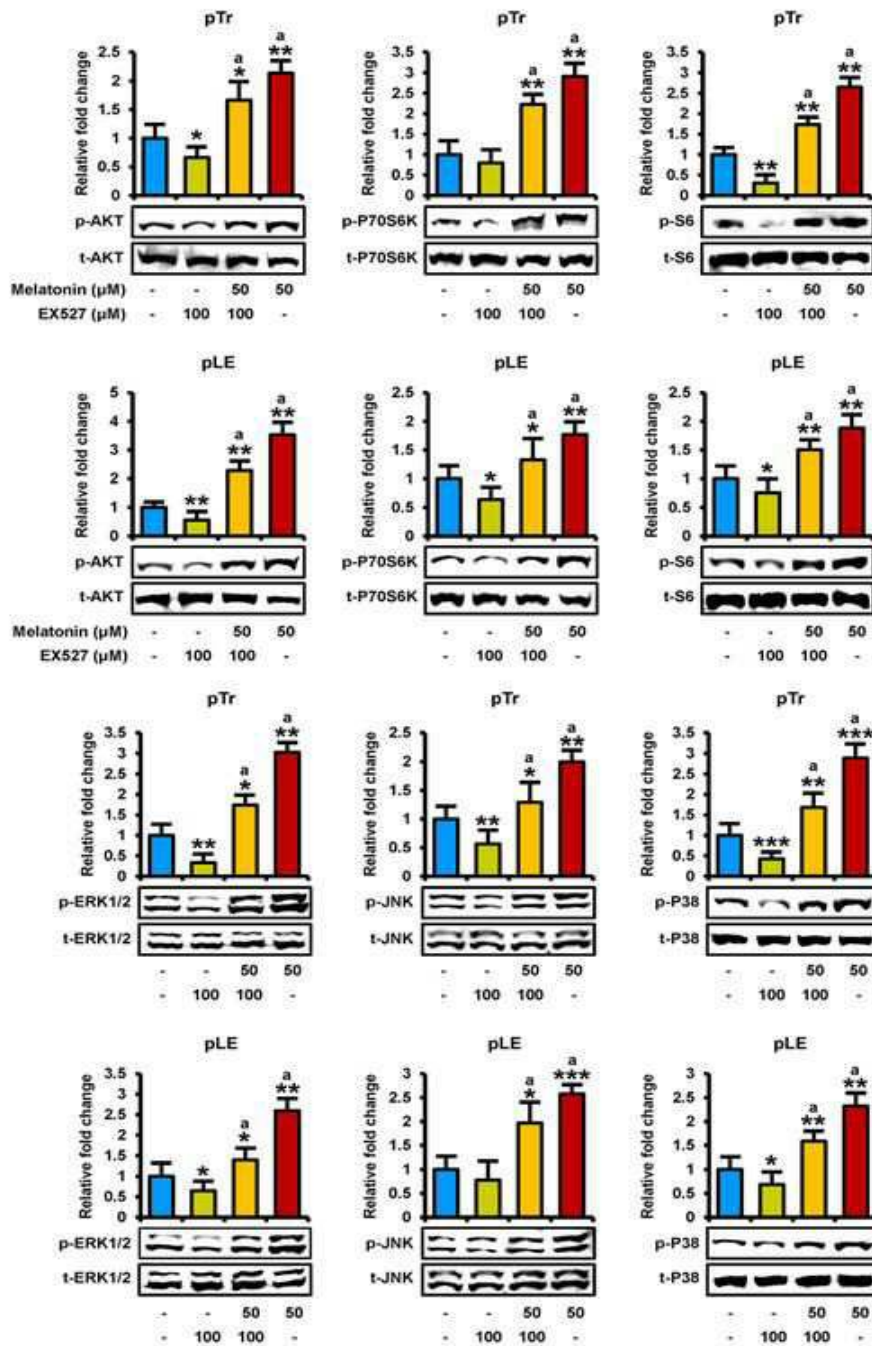
[C]



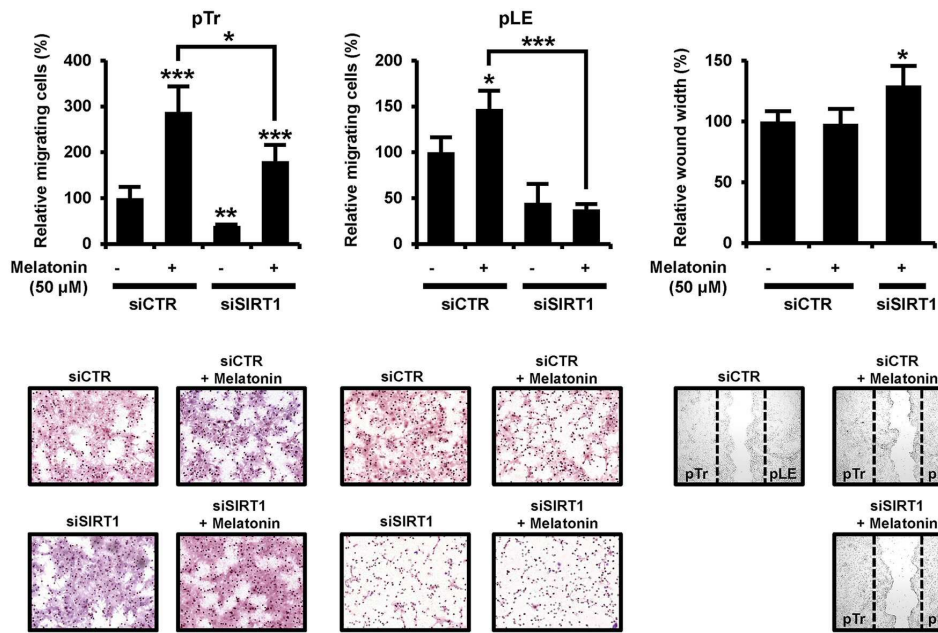
[D]



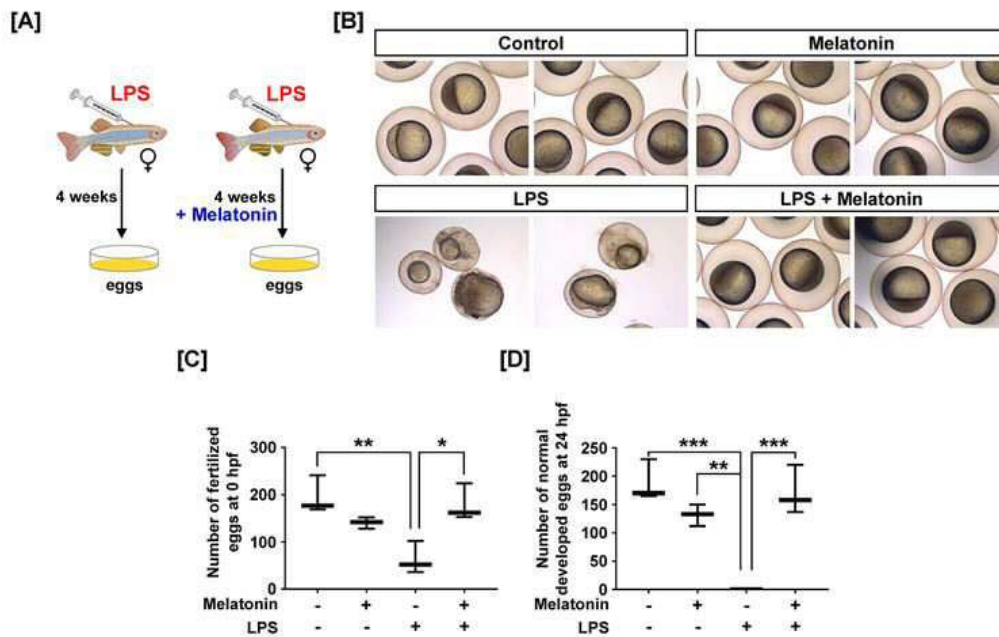
도면12



도면13



도면14



도면15

