

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0099263 (43) 공개일자 2016년08월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/05 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	
(52) CPC특허분류 A61K 31/05 (2013.01) A23L 1/30 (2013.01)	(72) 발명자 김준범 서울특별시 관악구 인현16가길 17	
(21) 출원번호 10-2015-0021497	(74) 대리인 강성혜	
(22) 출원일자 2015년02월12일 심사청구일자 2015년02월12일		

전체 청구항 수 : 총 2 항

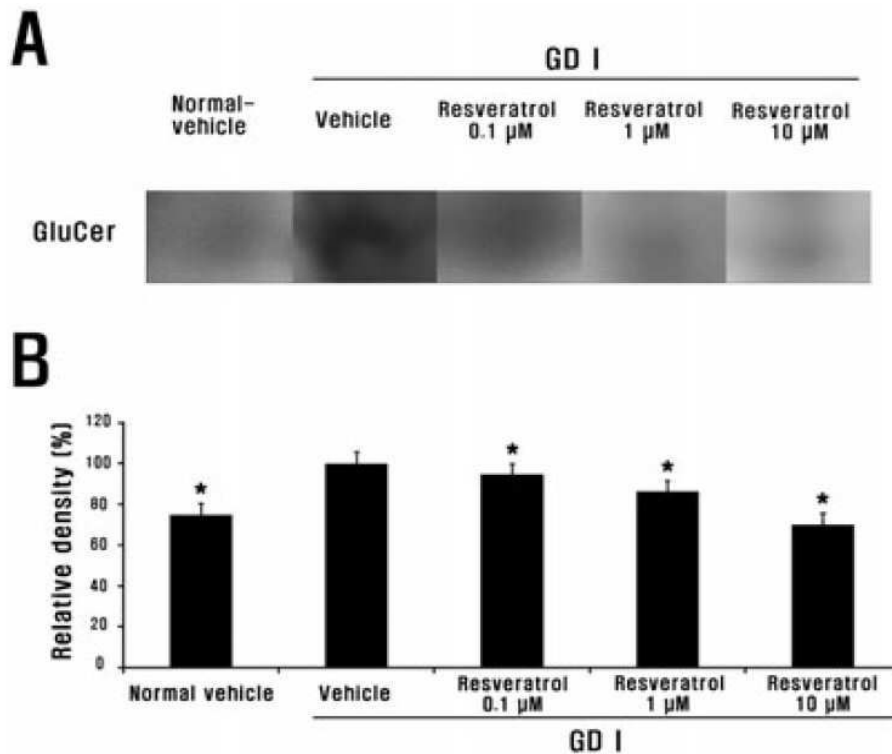
(54) 발명의 명칭 레스베라트롤을 함유하는 I형 고셔병 치료용 약학 조성물

(57) 요약

레스베라트롤은 항염증, 항산화, 신경보호효과와 같은 다양한 특성을 갖는 천연 폴리페놀이다. 본 발명자는 고셔병 환자 유래 1차 섬유아세포에 대한 레스베라트롤의 치료 효과를 평가하였다. 레스베라트롤이 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT 분석으로 평가하였고, 레스베라트롤이 고셔병 환자 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 웨스턴

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



면역블랏으로 AIF, Bax, 절단된 캐스페이즈-3, ACAT1, E3BP 및 CS의 발현 변화를 평가하였다. 또한, 레스베라트롤 처리한 세포의 세포 내 글루코실세라마이드(글루코세레브로사이드) 농도를 박막 크로마토그래피로 확인하였다. 그 결과, 레스베라트롤 처리 세포는 대조군 세포와 비교하여 생존율이 현저히 증가하였다. 레스베라트롤 처리 후 세포사멸인자인 AIF, Bax 및 절단된 캐스페이즈-3의 발현 수준은 투여량 의존적으로 감소하였고, ACAT1, E3BP 및 CS의 발현 수준은 투여량 의존적으로 증가하였다. TLC 결과는 레스베라트롤 처리한 고셔병 환자의 세포에서 글루코실세라마이드가 현저히 감소함을 보여주었다. 이러한 결과들은 레스베라트롤이 세포사멸을 감소시키고, 글루코실세라마이드 농도를 낮추어 치료제로서의 가능성이 있음을 말해준다.

명세서

청구범위

청구항 1

레스베라트롤을 함유하는 I형 고셔병 치료용 약학 조성물.

청구항 2

레스베라트롤을 함유하는 I형 고셔병 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 레스베라트롤을 함유하는 I형 고셔병 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 레스베라트롤을 처리하면 I형 고셔병 환자의 세포에서 글루코세레브로사이드가 현저히 감소하고, 세포사멸인자의 발현이 현저히 감소하였다.

배경 기술

[0002] 고셔병(Gaucher disease, GD)은 세포 내 글루코세레브로시데이즈 (glucocerebrosidase, GCase)를 암호화하는 유전자의 돌연변이로 인한 효소의 기능 결함으로 발생하는 질환으로 글루코세레브로사이드(gluco-cerebroside; 이하 "글루코실세라마이드"와 혼용함)가 비장, 간, 폐, 골수, 뇌에 축적되며 간과 비장이 커지고, 피로증상을 동반한 빈혈이 관찰되며, 혈소판 감소로 지혈이 잘 되지 않는 일반적인 병증과 더불어 과도한 지질 축적으로 인해 뇌세포 손상이 초래되는 것으로 알려져 있다 (Beutler and Grabowski, 2001). 고셔병은 크게 세 가지 형태로 분류된다. 첫 번째는 전체 고셔병의 90% 이상을 차지하는 I형으로, 이는 만성적으로 심각한 합병증이 동반되며, 혈액응고를 담당하는 세포가 감소하여 내피세포의 출혈발생빈도가 높아지며, 적혈구 수치 또한 감소하여 만성피로 및 빈혈을 초래하게 된다. 또한 신체적인 특징으로는 간과 비장의 이상비대 현상이 나타나며 경색증, 골격이상, 그리고 폐와 신장기능에 문제가 발생하게 된다. 두 번째로 II형은 급성 신경병증형(acute neuropathic form)이라 불리는데, 병증의 진행속도가 빠르며, 생후 1년 이내에 증상이 시작되어 신경계에서 이상 증상이 발생하는데, 주로 유아기 및 신생아 시기의 뇌에 글루코세레브로사이드 축적으로 인한 신경학적 합병증이 특징적으로 수반된다. 생후 6개월 이내에 비장의 비대가 발생하고, 수축 경화증상이 발생하며, 성장이 지연되고, 대부분 3년 이내에 사망하는 것으로 알려져 있다. 세 번째로 아급성 신경병증형(subacute neuropathic form)으로 불리는 III형은 인종에 따른 발병빈도의 특이점은 없으며 대략 50,000명당 1명의 빈도로 발생한다. 신경계 증상은 II형보다 비교적 느리게 진행되고, 증상의 발현 시기는 매우 다양하지만 일반적으로 아동기나 청소년기에 나타난다. 신경학적 합병증으로는 정신지체, 운동능력상실, 간대성 근경련 등이 발생하고 있으며 간질성 폐질환이 발병하기도 한다. II형과 III형 모두 뇌 기능에 장애가 발생하여 간질과 발작을 일으키는 특징을 나타낸다 (Beutler and Grabowski, 2001). 고셔병의 원인 중 하나는 소포체 내에 돌연변이체 글루코세레브로시데이즈가 축적되기 때문이다. 결함 있는 GCase가 소포체로부터 리소좀으로 이동할 수 없게 되어 소포체 내에 축적되므로 이는 소포체 스트레스 (ER stress)를 유도하여 Bcl-2 패밀리 멤버 및 캐스페이즈(caspases)와 같은 자기세포사멸 경로에 관여하는 효소를 활성화시켜 세포 사멸에 이르게 한다 (Zong et al., 2003; Wei et al., 2008). 뿐만 아니라, 고셔병에서는 인슐린 저항성 및 비정상적인 지질 대사와 같은 대사 반응의 손상도 나타난다 (Wennekes et al., 2009).

[0003] 효소 치료가 불가능하던 과거에는 고셔병에 대한 증상 치료와 골수이식을 시행하였으나, 1990년대 이후 효소치료 요법이 가능해지면서 현재는 효소치료가 주요 치료방법이다. 효소 치료는 비장비대, 빈혈, 혈소판 감소, 뼈의 침범, 뼈의 통증 등에 효과가 입증되었으나 신경학적 증상의 호전에는 효과가 떨어진다. 이밖에 축적되는 글루코세레브로사이드의 생성을 줄이기 위해 전구물질 생성 억제제도 치료제로 사용되고 있다. 고셔병 치료용 효

소치료제로는 Genzyme사의 글루코세레브로시다제(Cerezyme™)가 사용되고 있다. 그러나, 세레자임은 세포 내 반감기가 짧아 환자에게 자주 투여해야 하므로(매 2주마다 약 60단위/kg(체중)), 매년 치료제로 십만 달러 이상 소요될 뿐 아니라, 소량 생산되며, 전량 수입에 의존해야 하는 문제점이 있다. 또한, 잦은 투여간격과 정맥주입으로 인한 환자의 불편을 초래하는 등의 문제점이 있다.

[0004]

레스베라트롤(resveratrol, trans-3,5,4'-Trihydroxystilbene)은 많은 식물이 곰팡이, 박테리아 감염 등 다양한 외부 환경으로부터 자신을 보호하기 위해 스스로 생성하는 파이토알렉신(phytoalexin) 계열의 폴리페놀 물질로서 지방 과산화 억제 및 자유 라디칼 소거 기능과 같은 항산화 작용, cyclooxygenase 저해 등의 항염증 작용, 암세포 성장 억제 및 암 예방 효능, 혈소판 응집억제, 심혈관계질환 방지, 신경보호작용 및 수명 연장 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며(Liu et al., 2011), 포도 껍질, 블루베리, 땅콩 등에서 발견된다. 뿐만 아니라, 레스베라트롤은 지질과 포도당 대사를 조절하는 효과가 있음이 보고된바 있다(Bradamante et al., 2004; Vallianou et al., 2013). 그러나, 고서병에서의 자기세포사멸 및 대사 교란에 대한 레스베라트롤의 효과는 아직 알려진바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005]

(비특허문헌 0001) Beutler E, Grabowski GA. 2001. Gaucher disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8th edn), Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). McGraw-Hill: New York; 3635-3668.

(비특허문헌 0002) Bradamante S, Barengi L, Villa A. 2004. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 22: 169-188.

(비특허문헌 0003) Bravo R, Gutierrez T, Paredes F, et al. 2012. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 16-20.

(비특허문헌 0004) Buhaescu I, Izzedine H. 2007. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin Biochem* 40: 575-584.

(비특허문헌 0005) Kim DH, Heo TH, Kim JB, Kim SJ. 2010. Resveratrol upregulates p21, cell cycle regulator, in Gaucher disease cells. *J Life Sci* 20: 1281-1286.

(비특허문헌 0006) Kim SJ, Kang SY, Kim JB. 2012. Possible therapeutic effects of myxobacterial metabolites on type I Gaucher disease. *Gene* 504: 156-159.

(비특허문헌 0007) Liu C, Shi Z, Fan L, Zhang C, Wang K, Wang B. 2011. Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury. *Brain Res* 1374: 100-109.

(비특허문헌 0008) Roche TE, Baker JC, Yan X, et al. 2001. Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70: 33-75.

(비특허문헌 0009) Sullivan A, Singh M, Srere P, Glusker J. 1977. Reactivity and inhibitor potential of hydroxycitrate isomers with citrate synthase, citrate lyase, and ATP citrate lyase. *J Biol Chem* 252: 7583-7590.

(비특허문헌 0010) Szegezdi E, Logue S, Gorman A, Samali A. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7: 880-885.

(비특허문헌 0011) Vallianou NG, Evangelopoulos A, Kazazis C. 2013. Resveratrol and diabetes. *Rev Diabet Stud* 10: 236-242.

(비특허문헌 0012) Wei H, Kim SJ, Zhang Z, Tsai P, Wisniewski K. 2008. ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Hum Mol Genet* 17: 469-477.

(비특허문헌 0013) Wennekkes T, Berg R, Boot R, Marel G, Overkleeft H, Aerts J. 2009. Glycosphingo- lipids nature, function, and pharmacological modulation. Angew Chem Int Ed Engl 48: 8848-8869.

(비특허문헌 0014) Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, et al. 2003. Bax and Bak can localize to endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. J Cell Biol 162: 59-69.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명자들은 치료비용을 절감하고 부작용을 최소화하며 환자의 치료에 따른 불편함을 최소화한 I형 고서병 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007]

돌연변이 글루코세레브로시데이즈의 잘못된 폴딩으로 인해 고서병 세포의 소포체 내에서 이 효소가 축적되며, 이는 소포체 스트레스를 유발하고, 지속되는 소포체 스트레스는 세포 내 Ca^{2+} 항상성을 손상시키며, 미토콘드리아 손상과 기능부전의 원인이 된다. 이는 또 Bax 및 캐스페이즈 같은 세포사멸 효소를 활성화시켜 세포 사멸에 이르게 한다(Bravo et al., 2012; Wei et al., 2008; Szegezdi et al., 2006). 본 발명에서는 레스베라트롤 처리한 I형 GD 세포가 생존율이 증가할 뿐 아니라 AIF, Bax 및 절단된 캐스페이즈-3 발현 수준이 투여량 의존적으로 감소함을 밝혔다. 고서병에서 인슐린 저항성 및 지질 대사 손상과 같은 대사 이상이 보고된바 있었고(Wennekes et al., 2009), 레스베라트롤이 포도당과 지질 대사를 개선한다는 발표가 있었기 때문에(Vallianou et al., 2013; Bradamante et al., 2004), 본 발명자들은 I형 고서병 세포에서 이러한 대사 경로에 연관된 인자들에 대한 레스베라트롤의 영향을 평가하였다. 그 결과, 레스베라트롤 처리한 고서병 세포에서는 글루코세레브로사이드 농도가 현저하게 감소하는 것으로 나타났고, 탄수화물 대사 및 구연산회로에 관여하는 효소들인 E3BP 및 CS 발현이 증가할 뿐 아니라, 지질 대사에 관련된 효소인 ACAT1 발현도 투여량 의존적으로 증가하였다(도 3). E3BP는 피루브산을 아세틸-CoA로 비가역적으로 산화적 디카복실화하는 반응을 촉매하고 당분해 및 구연산회로를 연결하며(Roche et al., 2001), 반면 CS는 구연산회로의 첫 단계에 관여하는 조절효소로서 손상되지 않은 미토콘드리아의 마커로 알려져 있고, 아세틸-CoA와 옥살로아세테이트를 반응시켜 구연산을 합성하는 반응을 촉매한다(Sullivan et al., 1977). 글루코세레브로사이드는 정상적으로 대사되면 라이소좀에서 포도당과 세라마이드로 분해되고, 이 과정에서 생성된 포도당은 주요 에너지원으로 이용될 수 있다. 본 발명 실시예의 결과들은 레스베라트롤이 세포에서 글루코세레브로사이드 축적을 감소시킴으로써 세포내 스트레스를 감소시키고, 세포는 아세틸-CoA 요구를 증가시킴으로써 대사경로 활성을 증가시켜 회복될 수 있음을 제시한다(도 5). ACAT1은 두 분자의 아세틸-CoA로부터 아세토아세틸-CoA 형성을 촉매하며, 이것은 메발로네이트 경로를 통한 성장, 분화 및 유지를 포함하는 다양한 세포 과정에 필요한 분자 합성의 기초가 된다(Buhaescu and Izzedine, 2007). GD 세포에서 레스베라트롤 처리 이후 ACAT1 발현 증가는 글루코세레브로사이드 분해의 부산물인 아세틸-CoA가 메발로네이트 경로를 통한 세포 생존, 성장 및/또는 증식에 필요한 분자 생성에 이용될 수 있는 아세토아세틸-CoA 생산에 이용될 수 있음을 말해준다. 본 발명에서 레스베라트롤은 GCase 활성을 증가시키지는 않았다(데이터 나타내지 않음). 따라서, GD 섬유아세포에서 글루코세레브로사이드의 감소는 기질의 분해로 인한 것으로 보이며, 이는 포도당을 생성하여, 포도당과 지질 대사경로의 상향조절에 관여한다. 세포 내 스트레스 감소와 더불어 글루코세레브로사이드 분해는 다양한 하류(downstream)의 유리한 효과들, 즉 세포사멸인자를 감소시켜 세포 생존을 높일 뿐 아니라 포도당과 지질 대사를 상향조절하여 GD 세포가 좀 더 생존할 수 있고 기능을 잘 수행하도록 해준다.

[0008]

결론적으로 본 발명자들은 인비트로에서 I형 고서병 세포에 대한 레스베라트롤의 효과를 평가하였다. 그 결과를 보면, I형 고서병 세포에서 레스베라트롤은 글루코세레브로사이드 축적을 감소시키고 세포사멸인자의 발현을 감소시키며, 세포 생존율과 포도당 및 지질 대사와 관련된 효소의 발현을 증가시켰다. 따라서, 레스베라트롤은 I형 고서병 치료제로서 유용할 것으로 판단된다.

[0009]

본 발명은 레스베라트롤을 유효성분으로 함유하는 I형 고서병 치료용 약학 조성물을 제공한다. 레스베라트롤을

유효성분으로 함유하는 I형 고서병 치료용 약학 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태 등으로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0010] 나아가, 본 발명은 상기 레스베라트롤을 유효성분으로 하고 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, I형 고서병 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0011] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 $0.01\mu\text{g}\sim 100\text{mg/kg}$ 을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 레스베라트롤을 유효성분으로 하며, I형 고서병 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 의하면 I형 고서병 환자의 세포에 레스베라트롤을 처리하면 세포 내 글루코세레브로사이드 농도가 현저히 감소하므로, 세포 생존율이 높아진다.

[0014] 또한, 본 발명에 의하면 I형 고서병 환자의 세포에 레스베라트롤을 처리하는 경우 대조군에 비하여 세포사멸인자의 발현이 현저히 낮아져 세포 생존율이 높아진다.

[0015] 따라서, 레스베라트롤을 함유한 약학 조성물을 I형 고서병 환자에게 투약할 경우 레스베라트롤이 천연 폴리페놀 성분이므로 특별한 부작용 없이 세포 생존율이 높아지고 글루코세레브로사이드 축적이 저하되어 I형 고서병 증상의 현저한 개선을 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 레스베라트롤 처리 후 세포 생존율의 변화를 나타낸다. MTT 분석 결과 레스베라트롤 처리한 고서병 세포의 생존율은 증가하였다. DMSO(담체)로 처리한 I형 고서병 세포의 생존율을 상대적 세포 생존율 100%로 정의하였다.

Normal-vehicle: DMSO로 처리한 정상 세포; GD I, I형 고서병 섬유아세포. *는 담체군과 다른 군 간의 유의한 차이를 나타낸다. *, $P<0.05$ by Student's t-test.

도 2a, 도 2b는 자기세포사멸인자인 AIF, Bax 및 절단된 캐스페이즈-3의 발현 패턴이다. (2a) I형 GD 세포에서 레스베라트롤은 AIF, Bax 및 절단된 캐스페이즈-3의 발현을 감소시켰다. (2b) 밀도계 분석 결과 단백질 농도가 투여량 의존적으로 감소하였다. β -액틴은 대조군으로 이용하였다. 담체군(vehicle)은 I형 GD 세포를 DMSO로 처리한 것이고, 이를 상대적 밀도 100%로 정의하였다. Normal-vehicle, DMSO로 처리한 정상세포; GD I, I형 고서병 섬유아세포. *는 담체군과 다른 군 간의 유의한 차이를 나타낸다. *, $P<0.05$ by Student's t-test.

도 3a, 도 3b는 ACAT1, E3BP 및 CS 단백질의 발현 패턴을 나타낸다. (3a) I형 GD 세포에서 레스베라트롤은 ACAT1, E3BP 및 CS 단백질 발현을 증가시켰다. (3b) 밀도계 분석 결과 단백질 농도가 투여량 의존적으로 증가하였다. β -액틴은 대조군으로 이용하였다. 담체군(vehicle)은 I형 GD 세포를 DMSO로 처리한 것이고, 이를 상대적 밀도 100%로 정의하였다. Normal-vehicle, DMSO로 처리한 정상세포; GD I, I형 고서병 섬유아세포. *는 담체군과 다른 군 간의 유의한 차이를 나타낸다. *, $P<0.05$ by Student's t-test.

도 4는 박막크로마토그래피(TLC)(A) 및 밀도계 분석(B)으로 세포 내 글루코실세라마이드를 측정하는 것이다. GD

세포에서 레스베라트롤은 글루코실세라마이드(글루코세레브로사이드, 이하 혼용함) 농도를 감소시켰다. 담체군(vehicle)은 I형 GD 세포를 DMSO로 처리한 것이고, 이를 상대적 밀도 100%로 정의하였다. Normal-vehicle, DMSO로 처리한 정상세포; GD I, I형 고서병 섬유아세포. *는 담체군과 다른 군 간의 유의한 차이를 나타낸다. *, $P < 0.05$ by Student's t-test.

도 5는 I형 GD 세포에서 레스베라트롤의 활성을 나타내는 개요도이다. AIF, apoptosis-inducing factor; ACAT1, acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1; E3BP, E3-binding protein; CS, citrate synthase.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

세포 배양

I형 고서병 섬유아세포를 Coriell Institute for Medical Research (GM# 10915; Coriell, Camden, NJ, USA)에서 입수하였다. 정상 섬유아세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, South Korea)에서 입수하였다. 세포는 20% 우태혈청(Thermo Scientific, South Logan, UT, USA), 100 units/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신 및 0.25 μ g/mL 암포테리신(amphotericin) B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)(Mediatech Inc., Herndon, VA, USA)이 든 100-mm 접시에서 배양하였다. 배양액은 5% CO₂가 든 인큐베이터에서 37°C로 유지하였다.

MTT 분석

MTT{3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} 분석은 I형 GD 세포 생존율에 대한 레스베라트롤의 영향을 평가하기 위하여 수행하였다. GD 섬유아세포와 정상 섬유아세포는 100 μ l의 배지가 든 96-웰 플레이트(10³ 세포/웰)(Thermo Scientific)에서 37°C 온도의 CO₂ 배양기 내에서 24시간 배양하였고, 그 후 0.1 μ M, 1 μ M 또는 10 μ M 레스베라트롤(다이메틸설폭사이드(DMSO)에 용해하여 준비함; Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 함유하는 DMEM에서 24시간 동안 37°C로 배양하였다. GD 섬유아세포 및 정상 섬유아세포 모두 담체 대조군으로서 0.1% DMSO에 노출되었다. 각 웰에 MTT 스톡 용액 (5mg/mL)을 10 μ l씩 가하여 두 시간 동안 37°C로 배양하였다. 배양 후, 생성된 MTT 포마잔의 양은 마이크로플레이트 분광기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 405nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다. 세포 생존율은 대조군 세포 생존율에 대한 백분율로 나타내었다.

웨스턴 면역블랏 분석

I형 GD 섬유아세포에 대한 레스베라트롤의 분자적 효과를 규명하기 위하여 apoptosis-inducing factor), Bax(Bcl-2-associated X protein), ACAT1(acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1), E3BP(E3-binding protein) 및 CS(citrate synthase) 발현 수준 변화를 측정하였다. 약 1×10^6 GD 섬유아세포 및 정상 섬유아세포를 레스베라트롤(0.1 μ M, 1 μ M 또는 10 μ M)이 든 배양배지를 함유하는 100-mm 접시에서 37°C로 배양하였다. GD 섬유아세포 및 정상 섬유아세포 모두를 0.1% DMSO(담체 대조군)에서도 배양하였다. 24시간 배양 후 차가운 PBS로 세포를 세척하고 프로테아제 저해제 콕테일(Roche, Penzberg, Germany)이 함유된 총세포 용균 완충액(20mM HEPES pH 7.5, 0.5mM EDTA, 0.1mM EGTA, 350mM NaCl, 10mM NaF, 1mM MgCl₂, and 1% Triton X-100 [Sigma])에서 용균시켰다. 단백질 농도는 쿠마시+단백질 분석제(Pierce, Rockford, IL, USA)로 측정하였다. 각 시료에서 30 μ g의 단백질을 모아 전기영동 겔에 러닝하고, 폴리비닐리덴 다이플루오라이드 막(Millipore, Billerica, MA, USA)에 옮겼다. 막은 AIF 항체(Abcam, Cambridge, MA, USA), Bax 항체(Cell Signaling, Beverly, USA), 절단된 캐스페이즈-3 항체(Cell Signaling), E3BP 항체(Abcam), CS 항체(Abcam), ACAT1 항체(Abcam) 및 β -액틴 항체(Sigma)와 함께 배양하였다. 그런 다음 막을 항-마우스 2차 항체(Abcam) 및 항-토끼 2차 항체(Abcam)와 함께 배양하였다. 띠는 enhanced chemiluminescence system (SuperSignalWest Pico Luminol/Enhancer Solution, Pierce)으로 시각화하였다. TINA 2.0 소프트웨어(Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Straubenhardt, Germany)

로 단백질 농도를 정량하기 위해 밀도 분석을 수행하였다.

[0024] **지질 추출 및 글루코세레브로사이드 농도 측정**

[0025] 레스베라트롤 또는 DMSO(담체 대조군)로 처리한 세포의 글루코세레브로사이드 농도의 정량적 변화를 박막 크로마토그래피(TLC)로 측정하였다. 지질 추출 및 글루코세레브로사이드 분리는 종래 기술에 따라 수행하였다 (Kim et al., 2012). TINA 2.0 소프트웨어(Raytest Isotopenmesssgerate GmbH)를 이용하여 글루코세레브로사이드 농도를 측정하기 위해 밀도 분석을 수행하였다.

[0026] **통계 분석**

[0027] 각 실험은 최소 세 번에서 최대 여섯 번까지 독립적으로 수행하였다. Student's t-test는 유의한 차이가 존재함을 확인하기 위해 수행하였다. $P < 0.05$ 값은 유의한 것으로 판단된다.

[0028] **결과 1: GD 섬유아세포에서 레스베라트롤의 항세포사멸 활성**

[0029] I형 GD 섬유아세포를 0.1 μM , 1 μM 및 10 μM 의 레스베라트롤로 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT 분석법으로 분석하였다. 0.1 μM , 1 μM 및 10 μM 의 레스베라트롤 처리는 DMSO로 처리한 GD 섬유아세포와 비교하여 GD 섬유아세포의 생존율을 투여량 의존적으로 15-34% 증가시켰다($P < 0.05$, 도 1). 레스베라트롤의 보호 활성을 규명하기 위해 세포사멸과 관련된 AIF, Bax 및 절단된 캐스페이즈-3의 발현 패턴을 평가하였다. 0.1 μM , 1 μM 및 10 μM 레스베라트롤을 처리하면 AIF (44-89%; $P < 0.05$), Bax (13-51%; $P < 0.05$) 및 절단된 캐스페이즈-3 (49-71%; $P < 0.05$) 발현이 DMSO-처리 GD 섬유아세포와 비교하여 투여량 의존적으로 감소하였다(도 2).

[0030] **결과 2: GD 섬유아세포에서 레스베라트롤의 대사 활성**

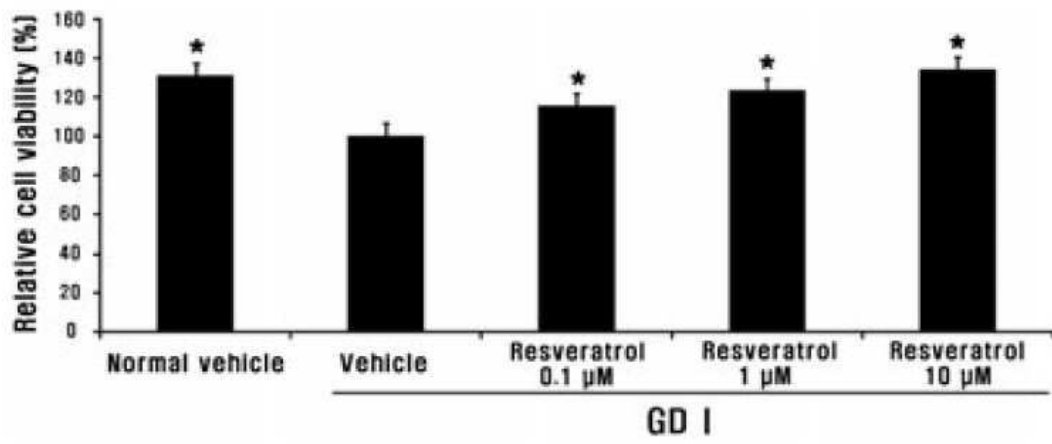
[0031] 고셔병에서 인슐린 저항성 및 지질대사 손상과 같은 대사 이상이 보고된바 있고(Wennekes et al., 2009), 포도당과 지질 대사에 대한 레스베라트롤의 조절 효과가 보고된바 있기 때문에(Vallianou et al., 2013; Bradamante et al., 2004), I형 GD 섬유아세포에서 레스베라트롤이 대사 경로에 관여하는 인자들의 농도를 조절하는지를 알아보았다. 농도별로 레스베라트롤을 처리하고 24시간 경과한 후 담체 대조군과 비교하여 ACAT1 및 E3BP 발현 농도는 투여량 의존적으로 증가하였다(각각 11-46% 및 10-38%)($P < 0.05$). 또한, 미토콘드리아 마커 효소인 CS 발현 농도는 투여량 의존적으로 9-34% 증가하였다($P < 0.05$, 도 3).

[0032] **결과 3: GD 섬유아세포에서 글루코세레브로사이드 농도의 변화**

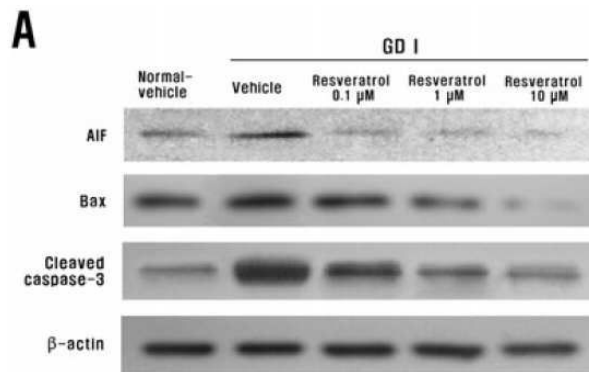
[0033] I형 GD 섬유아세포에서 글루코세레브로사이드 농도 변화는 박막 크로마토그래피로 평가하였다. 정상세포와 비교하여 DMSO로 처리한 GD 세포에서 글루코세레브로사이드 농도는 증가하였다. 레스베라트롤 농도를 증가시키면서 처리한 GD 세포에서는 글루코세레브로사이드 축적이 투여량 의존적으로 감소하였다(상대적 밀도 스캔에 의하면 6-30% 감소함, $P < 0.05$, 도 4).

도면

도면1

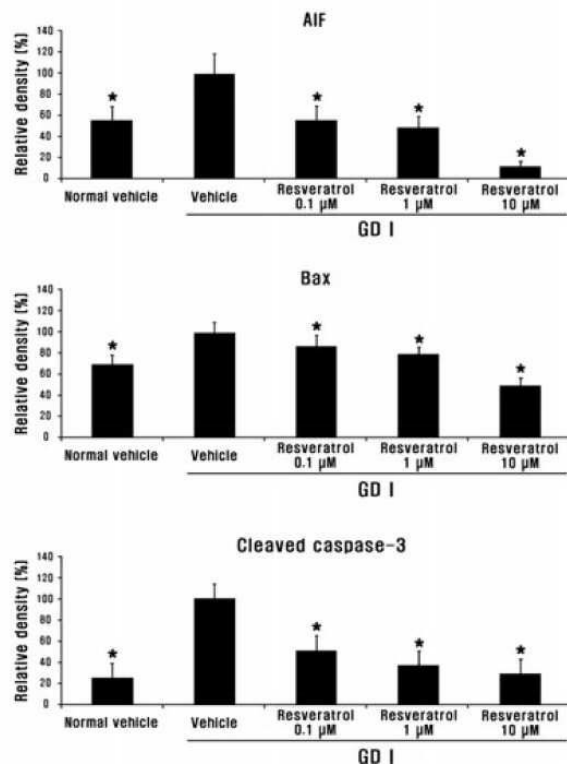


도면2a

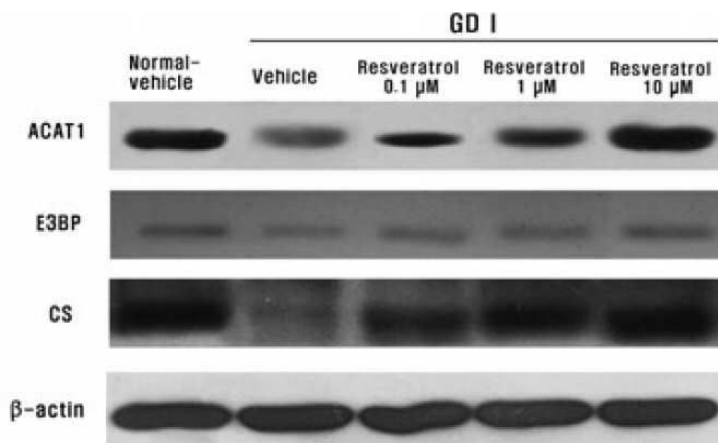


도면2b

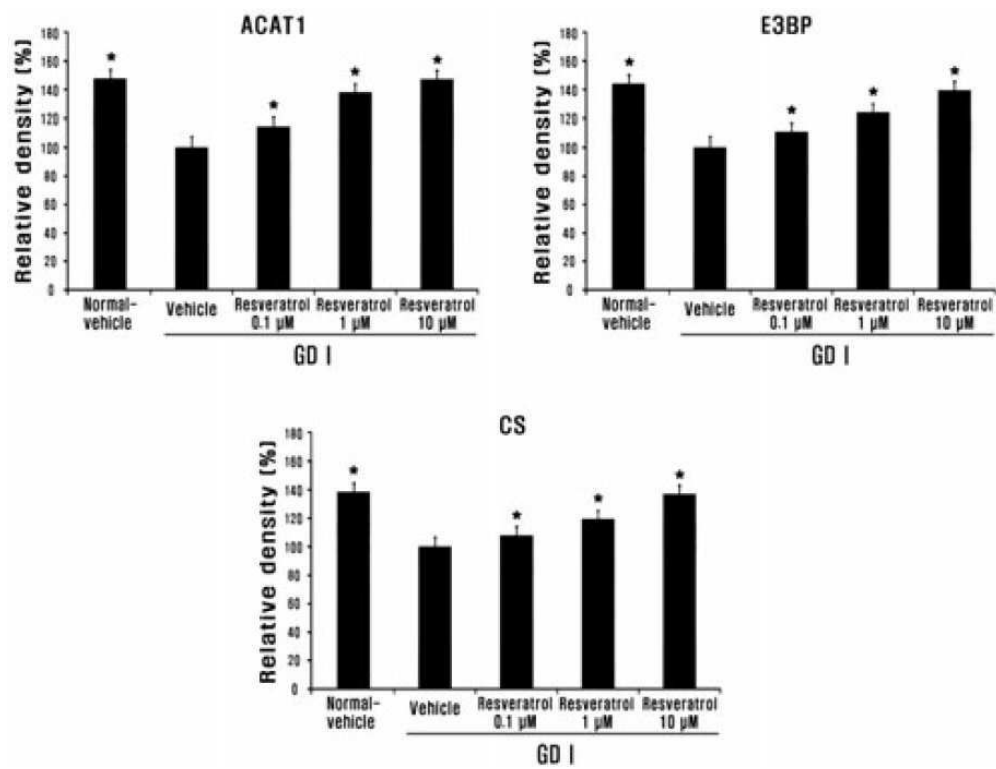
B



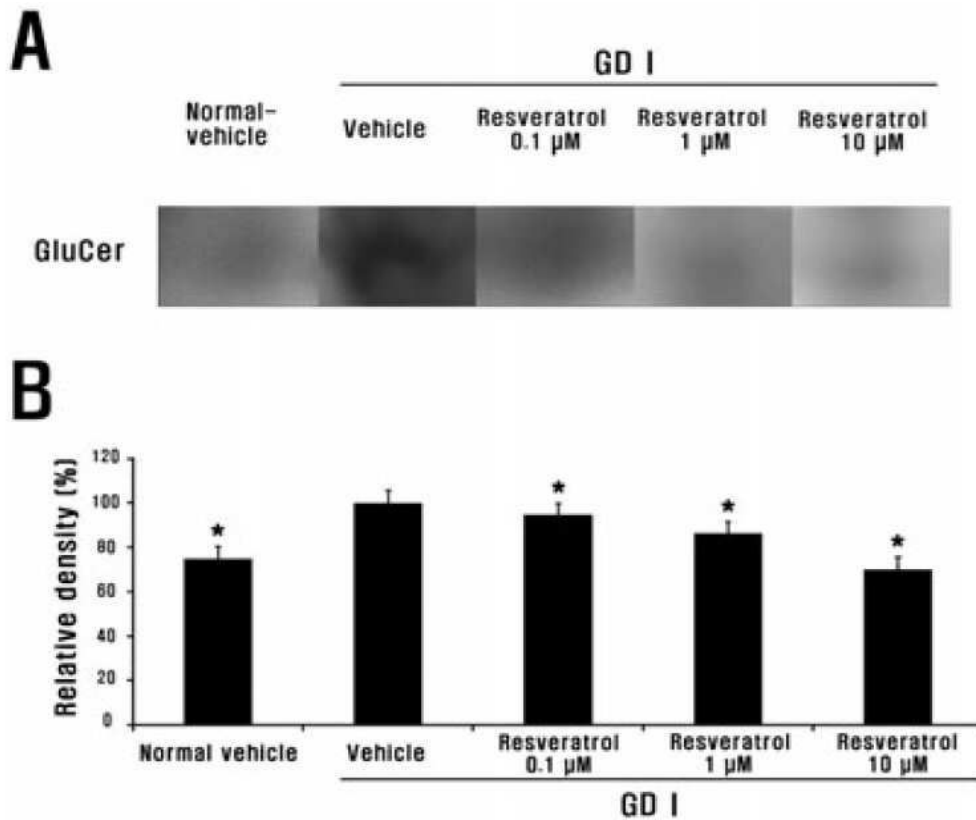
도면3a



도면3b



도면4



도면5

