



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0015671
(43) 공개일자 2015년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4045 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0091299

(22) 출원일자 2013년08월01일

심사청구일자 2013년08월01일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김미리

대전광역시 유성구 가정로 65, 대림아파트 101동 201호 (신성동)

석대은

대전광역시 유성구 가정로 65, 101동 201호 (신성동)

김미진

대전광역시 유성구 충남대학교 학생생활관 7동 824호

(74) 대리인

김원준

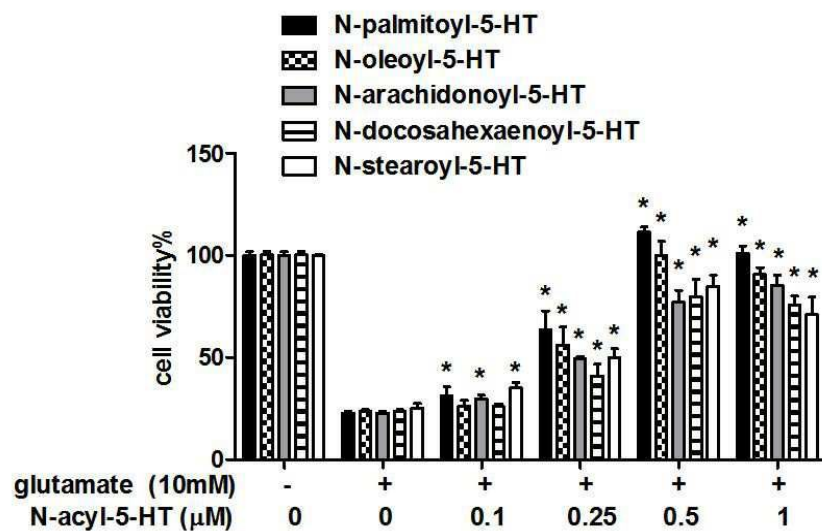
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 뇌질환 치료 및 예방용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 글루타메이트 매개 신경독성에 의해 야기되는 뇌질환 치료 및 예방용 약학 조성물 및 인지기능 저하 및 손상 개선용 건강기능식품에 관한 것으로, 보다 상세하게는 N-아실-세로토닌(N-acyl-5-HT)을 유효성분으로 하는 뇌질환 치료 및 예방용 약학 조성물에 관한 것이다. 이때, 아실기는 C16~C22의 포화 또는 불포화 지방산 유래의 아실기를 나타낸다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

N-아실-세로토닌(N-acyl-5-HT)을 유효성분으로 하는 뇌질환 치료 및 예방용 약학 조성물.

이때, 아실기는 C16~C22의 포화 또는 불포화 지방산 유래의 아실기임.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 N-아실-세로토닌은 N-팔미토일 세로토닌(N-palmitoyl-5-HT) 또는 N-올레일 세로토닌(N-oleoyl-5-HT)인 것을 특징으로 하는 뇌질환 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 조성물은 글루타메이트에 의한 신경독성을 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌질환 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 뇌질환은 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 루게릭병, 헌팅톤병, 뇌졸중 또는 근위축성 측삭 경화증인 것을 특징으로 하는 뇌질환 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 5

N-아실-세로토닌(N-acyl-5-HT)을 유효성분으로 하는 인지기능의 저하 및 손상 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 N-아실-세로토닌은 N-팔미토일 세로토닌(N-palmitoyl-5-HT) 또는 N-올레일 세로토닌(N-oleoyl-5-HT)인 것을 특징으로 하는 인지기능의 저하 및 손상 개선용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 글루타메이트 매개 신경독성에 의해 야기되는 뇌질환 치료 및 예방용 약학 조성물 및 인지기능 저하 및 손상 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

신경세포 사이의 흥분의 전달은 시냅스(synapse)를 통해 이루어진다. 한 뉴런(neuron)의 축색 돌기 말단과, 다

른 신경세포의 수상 돌기 또는 신경 세포체는 약 20nm의 극히 좁은 틈인 스냅스 틈을 두고 접촉하여 시냅스를 형성하고 있다. 뉴런을 따라 전달된 흥분이 축삭 돌기 말단까지 전도되면 축삭 말단에 있는 시냅스 소포에서 신경전달물질(neurotransmitter)이 방출된다. 그러나 신경전달물질의 과다생산과 기능의 이상은 파킨스씨병, 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 우울증(depression)을 유발한다.

[0003]

신경전달물질의 대표적인 예로 포유동물의 중추신경계에서 중요한 아미노산성 신경전달물질인 글루타메이트(glutamate)를 들 수 있다. 글루타메이트는 NMDA(N-메틸-D-아스파테이트) 수용체, AMPA(L- α -아미노-3-히드록시-5-메틸-4-이소자졸프로피오네이트) 수용체, 카이네이트(Kainate) 수용체 및 1S,3R-ACPD 수용체와 같은 다양한 흥분성 아미노산 리간드 이온 수용기(ligand-gated ion channel)에 결합하여 탈분극과 신경흥분을 일으킨다. 정상적인 신경전달의 경우 그 효과는 순간적이나 글루타메이트에 의한 수용기의 흥분이 과다하거나 길어지면, 신경세포가 손상되어 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 루게릭병, 헌팅톤병, 뇌졸중 및 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 등의 퇴행성 신경질환(neurodegenerative disorders)을 유발한다.

[0004]

글루타메이트 독성은 수용체에 의해 매개되는 흥분독성(excitotoxicity)과 비-수용체 매개의 산화독성 두가지로 나눌 수 있다. 이온성 글루타메이트 수용기가 결합된 불사화 마우스 해마 세포주인 HT-22 세포는 글루타메이트에 의해 유도되는 신경독성의 연구 모델로 널리 사용되고 있다. 글루타메이트 유도 신경독성은 세포 내 글루타치온의 감소와 산화 스트레스에 이어 세포사로 특징된다. 이러한 글루타메이트 신경독성의 산화적 특성은 신경세포에서 산화 스트레스를 방지하는 보호 효과를 갖는 화합물의 스크리닝에 이용되어져 왔다. 글루타메이트 유도 산화 손상은 HO-1(heme oxygenase-1)의 과발현이나 sodium selenite에 의해 방지될 수 있음이 보고된 다 있다. EGCG, caffeic acid ester (CAPE), 레스베라트롤(resveratrol), 커큐민(curcumin) 음식물 유래의 페놀성 항산화제의 신경보호 효과에 관한 관심이 증가하고 있으며, 상기 물질들은 모두 Nrf2/ARE 시그널링 과정을 통하여 산화적 스트레스로부터 신경세포(뉴론)을 보호한다고 알려졌다. 또한 최근의 연구에 의하면 친전자적 페놀성 화합물 전구체들이 심각한 부작용 없이 산화스트레스를 방지할 수 있는 가능성들이 강조되고 있다.

[0005]

엔도칸나비노이드(endocannabinoid)는 칸나비노이드 수용체를 활성화시키는 칸나비노이드의 일종으로 동물 체내에서 생성되는 내인성 칸나비노이드(endogenous cannabinoid)를 일컫는다. 칸나비노이드 수용체는 뇌, 심혈관 조직 및 혈관 내피세포에서 발현되는 CB1 수용체와 대부분 면역 및 혈관 조절모 세포에서 발현되는 CB2 수용체로 나뉜다. 최근에는 CB1 및 CB2와 결합하는 물질들이 비만, 우울증, 파킨슨병, 암 등 수많은 질병의 치료에 이용될 수 있다는 연구결과들이 보고되고 있다.

[0006]

N-acetyl-5-HT(N-acetyl-5-hydroxytryptamine, N-acetyl serotonin)은 엔도칸나비노이드의 일종으로 멜라토닌의 전구체이기도 하다. SHEN 등(비특허문헌 1)은 N-acetyl-5-HT 유도체들이 TrkB 활성화에 의해 신경보호 효과를 나타냄을 보고하였는데, N-[2-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl]-2-oxopiperidine-3-carboxamide(HIOC)의 효과가 특히 현저하였다. 그러나, 지방산 사슬을 갖는 N-acyl-5-HT 유도체들의 신경 보호 효과에 대해서는 아직까지 연구된 바 없다.

[0007]

또한, 엔도칸나비노이드(endocannabinoid) 중 N-acylated dopamines이나 N-arachidonoyl-5-HT과 같은 페놀성 엔도칸나비노이드는 면역억제 및 항염증 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 즉, N-acyl dopamine는 TRPV1 채널의 활성화에 의해 감염 반응과 통증을 매개하는 것이 보고되었으며, 면역억제 및 항염증활성을 갖는 것 역시 보고되었다. 이와 별도로, N-arachidonoyl-5-HT은 지방산 아마이드 가수분해효소의 저해제이며 TRPV1 채널의 길항제로 IgE에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포에서 항염증 및 항알레르기 활성을 나타낸다. 최근에는 페놀성 엔도칸나비노이드는 칸나비노이드 수용체와 무관하게 Nrf2 경로의 활성화를 통해 항염증 활성을 나타낼 것임이 제안되었다. 이러한 관점에서, 페놀기를 갖는 N-acyl-5-HT 역시 Nrf2/항산화 반응 효소의 활성화에 효율적이며 항산화 활성을 나타낼 것임이 기대된다. 따라서 N-acetyl-5-HT의 TrkB 활성화와 더불어 글루타메이트에 의해 유도되는 산화 스트레스에 대한 항산화 활성으로 인한 신경 보호 효과가 있을 것으로 기대하고, 지방산 사슬을 갖는 여러 가지 N-acyl-5-HT 유도체에 대해 신경 보호 효과를 스크리닝하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) PNAS 2012, vol. 109, no. 9, 3540??3545.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 독성이 없어 안전하게 이용할 수 있으면서도, 글루타메이트 매개 신경독성에 의한 뇌질환 예방 및 치료에 효과적인 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한 본 발명은 글루타메이트 매개 신경독성에 의한 인지 기능의 저하 및 손상을 개선할 수 있는 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 N-아실-세로토닌(N-acyl-5-HT)을 유효성분으로 하는 뇌질환 치료 및 예방용 약학 조성물에 관한 것이다. 이때, 아실기는 C16~C22의 포화 또는 불포화 지방산 유래의 아실기를 나타낸다.

[0012] N-acyl-5-HT 유도체들은 HT-22세포에서 글루타메이트에 의해 유도된 신경독성으로 인한 세포사를 크게 감소시켰다. 세포 생존률의 회복을 위한 이들의 EC₅₀은 모두 0.5 μM 이하로 종래 신경보호 효과가 있음이 확인된 N-acetyl-5-HT(EC₅₀=64 μM)에 비해 매우 현저한 효과를 나타내었으며, 멜라토닌(5-methoxy-5-HT)이나 세로토닌(5-HT)은 100 μM까지 세포생존률에 유의한 영향을 미치지 않았다. 특히 N-팔미토일 세로토닌(N-palmitoyl-5-HT)과 N-올레일 세로토닌(N-oleoyl-5-HT)의 세포 생존률의 회복을 위한 EC₅₀은 각각 0.23 μM과 0.29 μM로 그 효과가 매우 현저하였다. 또한 N-palmitoyl-5-HT과 N-oleoyl-5-HT은 5 μM 농도까지 세포독성을 전혀 나타내지 않아 안전하게 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0013] 상기 뇌질환으로는 글루타메이트 매개 신경독성과 관련있는 것으로 알려진 상기 뇌질환은 글루타메이트 수용체 과다 활성화에 의해 유발되는 것으로 알려진 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 루게릭병, 헌팅톤병, 뇌졸중 또는 근위축성 측삭 경화증일 수 있다.

[0014] 본 발명의 조성물은 그 자체 또는 약학적 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 현탁액, 시럽 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 물활성화를 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1kg 당 상기 화합물을 1~100mg의 양으로 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 뇌신경 질환 분야의 전문의의 판단에 따라 상기 용량 이외의 투여량을 투여할 수 있다.

[0016] 본 발명의 조성물은 또한 N-acyl-5-HT의 뇌세포 보호효과로 인하여 인지기능의 저하 및 손상 개선용 건강기능식품에 이용될 수 있다. 상기 건강기능식품에는 특히 신경 보호효과가 탁월한 N-팔미토일 세로토닌 또는 N-올레일 세로토닌을 함유하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 건강기능식품은 식품학적 분야에서 허용되는 첨가물과 함께 정제, 캡슐제, 환제 또는 액체의 형태로 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0017] 이상과 같이 본 발명의 약학 조성물에 의하면 세포독성이 없어 안전하게 이용할 수 있으며, 신경보호 효과가 우수하여 뇌질환의 치료 및 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

[0018] 또한 본 발명의 건강기능식품은 뇌세포 보호 효과에 의하여 인지기능의 저하 및 손상 개선에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 N-acyl-5-HT 유도체의 글루타메이트 매개 신경독성에 의한 세포생존률에 대한 영향을 보여주는 그래프.
 도 2는 N-acyl-5-HT 유도체의 글루타메이트 매개 신경독성에 의한 세포내 ROS에 대한 영향을 보여주는 그래프.
 도 3은 N-acyl-5-HT 유도체의 글루타메이트 매개 신경독성에 의한 세포내 GSH에 대한 영향을 보여주는 그래프.
 도 4는 HT-22 세포에서 N-acyl-5-HT 유도체의 항산화 효소 발현에 대한 영향을 보여주는 전기영동 사진 및 정량 그래프.
 도 5는 HT-22 세포에서 N-acyl-5-HT 유도체의 Nrf2 단백질의 핵이동에 대한 영향을 보여주는 전기영동 사진.
 도 6은 HT-22 세포에서 N-acyl-5-HT 유도체의 MAPKs 인산화에 대한 영향을 보여주는 전기영동 사진 및 정량 그래프.
 도 7은 HT-22 세포에서 N-acyl-5-HT 유도체의 PI3K 및 Akt 인산화에 대한 영향을 보여주는 전기영동 사진 및 정량 그래프.
 도 8은 HT-22 세포에서 PI3K 저해제와 p38저해제 전처리 시 N-acyl-5-HT 유도체의 Nrf2 단백질의 핵이동 및 GCLC의 발현에 대한 영향을 보여주는 전기영동 사진 및 정량 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0021] 실시예 1 : 글루타메이트에 의해 유도되는 HT-22 세포의 산화적 손상에 대한 N-acyl-5-HT의 영향 평가

[0022] 1. 세포 배양 및 N-acyl-5-HT의 처리

[0023] N-acyl-5-HT의 신경 독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 글루타메이트(glutamate)에 의해 유도되는 신경 손상을 세포생존률과 산화스트레스 마커인 ROS(활성산소종) 및 GSH(글루타치온, glutathione)의 세포내 수준에 의해 평가하였다.

[0024] 먼저 HT-22 세포(mouse hippocampus-derived cell line)를 96-웰 플레이트에 웰당 100μl의 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin (Gibico-BRL, Grand Island, NY))와 함께 5×10^3 세포의 농도로 분주하였다. 세포에 1.25~1 μM N-acyl-5-HT 유도체(Cayman Chemical Company)가 들어있는 글루타메이트의 DMSO 용액(10 mM)을 가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 12시간 배양하였다.

[0025] 2. 세포생존률에 대한 영향 평가

[0026] 1.의 세포 배양 12시간 후 세포 생존율을 EZ-Cytox cell viability assay kit(DaeiLab Service)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 측정하였다. 흡광율은 a Emax precision microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였으며, 세포생존율은 대조군에 대한 상대적인 값으로 결정하였다.

[0027] 도 1은 여러 가지 N-acyl-5-HT 유도체의 처리량에 따른 세포생존률에 대한 영향을 보여주는 그래프이다. 도 1에서 N-acyl-5-HT 유도체들은 농도 의존적으로 세포생존율에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험

경 보호 활성은 모든 N-acyl-5-HT에서 공통적이었으며, N-acyl기의 형태에 따라 차이가 있었다. 유도체 중에서도 특히 N-palmitoyl-5-HT(EC_{50} , 0.23 μ M)와 N-oleoyl-5-HT(EC_{50} , 0.29 μ M)는 글루타메이트에 의해 유도된 세포독성을 거의 완벽히 차단하였다. N-arachidonoyl-5-HT, N-docosahexaenoyl-5-HT, N-stearoyl-5-HT는 신경 보호 효과가 다소 저하되어 불포화도 또는 사슬 길이의 증가가 세포 보호 효과를 저하시키는 것으로 판단된다.

[0028] 도 1에 도시하지는 않았으나, 짧은 사슬의 N-acetyl-5-HT은 EC_{50} 이 64 μ M이었으며, 멜라토닌(5-methoxy-5-HT)이나 세로토닌(5-HT)은 100 μ M까지 신경보호 효과를 나타내지 않아 5-OH기 또는 아마이드기가 세로토닌 유도체의 세포독성 억제에 필요한 것으로 사료된다.

[0029] 별도로, 글루타메이트를 첨가하지 않고 N-acetyl-5-HT 유도체만을 처리하여 N-acetyl-5-HT의 세포독성을 평가한 결과 N-palmitoyl-5-HT와 N-oleoyl-5-HT는 5 μ M까지 전혀 세포독성을 나타내지 않았으며, N-palmitoyl-5-HT의 경우 25%의 치사율을 나타내는 IC_{25} 이 16.8 μ M로 측정되었으며, 20 μ M까지도 치사율이 30%이하를 나타내어 안전하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0030] 3. 세포내 ROS 수준 분석

[0031] 1.의 세포 배양 12시간 후 DCFDA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, Invitrogen)을 이용하여 Biochem. Biophys. Res. Commun. 18(2012) 658-664에 기재된 방법에 의해 세포 내 ROS 수준을 측정하였다. 즉, 세포를 10 μ M DCFDA(in Hanks' balanced salt 용액)로 30분간 암실에서 염색한 후 DTX 880 Multimode Detector(Beckman Coulter, Brea, CA)를 사용하여 여기 파장 485nm, 방출 파장 525nm의 조건에서 형광을 측정하고 그 결과를 도 2에 도시하였다.

[0032] 도 2에서 글루타메이트의 자극에 의해 ROS의 양은 3 배 이상 증가하며, N-acyl-5-HT(0.1-1 μ M)는 농도 의존적으로 글루타메이트에 의한 ROS의 증가를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. ROS 억제 효과는 2.의 세포생존율과 일치하여 N-palmitoyl-5-HT의 효과가 가장 현저하였다.

[0033]

[0034] 4. 세포내 GSH 수준 분석

[0035] 1.의 세포 배양 12시간 후 세포를 수집하여 PBS 완충액으로 세척하고, 1mM EDTA를 함유하는 PBS 완충액에 재현탁하였다. 현탁액을 볼텍스(vortex)로 혼합하고, 2회 동결-해동 처리한 후 4°C, 10,000xg에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 Quanticrom Glutathione Assay Kit from BioAssay Systems (Hayward, CA, USA)을 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 GSH 수준을 분석하여 도 3에 도시하였다.

[0036] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 글루타메이트의 처리에 의해 GSH 수준은 저하되었으나, N-acyl-5-HT의 처리에 의해 그 감소가 용량 (농도) 의존적으로 억제되었다. 또한, 세포생존율이나 ROS 결과에서와 마찬가지로 N-palmitoyl-5-HT의 효과가 가장 현저하였으며, N-oleoyl-5-HT, N-arachidonoyl-5-HT, N-docosahexaenoyl-5-HT의 순으로 효과를 나타내었다.

[0037] 실시예 2 : 항산화 효소 활성화에 대한 N-acyl-5-HT의 영향 평가

[0038] 실시예 1에서 확인한 N-acyl-5-HT의 산화스트레스 억제 효과가 HT-22 세포에서 Nrf-2 신호전달 과정의 활성화를 통하여 ROS 제거를 담당하는 것으로 알려진 HO-1(heme oxygenase-1), GCLC(glutamylcysteine ligase catalytic subunit) 또는 NQO-1(NAD(P)H quinone oxidoreductase-1)과 같은 항산화 효소의 발현을 유도하는 것에 의한 것인지 확인하였다.

[0039] HT-22 세포를 N-palmitoyl-5-HT 0.5 μ M과 함께 실시예 1과 동일한 배양 조건에서 20시간동안 배양하면서 시간에 따른 항산화 효소의 발현량을 웨스턴 블랏팅에 의해 측정하였다. 보다 구체적으로, 배양 시간에 따라 세포 샘플을 취하여 세포로부터 PRO-PREP Protein Extraction solution(iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 세포의 총 단백질을 추출하였다. 세포 용출액에서 단백질의 함량을 Bradford

assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 측정하여 상등액으로부터 단백질을 50 μ g을 취하여 SDS-PAGE로 용해시킨 후 polyvinylidene fluoride (PVDF)으로 전이시켰다. 막을 5% nonfat milk를 함유하는 TBS 완충액(20 mM Tris-HCl + 150 mM NaCl, pH 7.4)으로 1시간 동안 처리한 후 anti-HO-1(Cell Signaling Technology), anti-GCLC 또는 anti-NQO-1 rabbit poly/monoclonal antibodies(Abcam)을 각각 가하여 배양하였다. 이후, horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG(Cell Signaling Technology)을 가하여 1시간 추가 배양한 후 West One(TM) Western Blot Detection System(iNtRON Biotechnology)으로 검출하였다. 상대적인 단백질의 발현량은 densitometry(Matrox Inspector 2.1 software)를 사용하여 정량화하였다.

[0040] 도 4는 항산화효소에 대한 웨스턴 블랏팅의 전기영동 사진 및 정량 그래프이다. 도 4에서 HO-1에 비해 GCLC와 NQO-1의 발현이 크게 증가하여 글루타메이트에 의해 유도된 산화스트레스에 대한 신경 보호 활성화에 대해 GCLC와 NQO-1의 기여가 더 큰 것을 시사하였다.

[0041] 실시예 3 : Nrf2의 핵 이동에 대한 N-acyl-5-HT의 영향 평가

[0042] HT-22 세포를 N-palmitoyl-5-HT 0.5 μ M과 함께 실시예 1과 동일한 배양 조건에서 6시간동안 배양하면서 시간에 따라 핵과 세포질에서의 Nrf2의 발현량을 웨스턴 블랏팅에 의해 측정하였다.

[0043] 핵과 세포질의 단백질은 Nuclear Extraction Kit(Cayman Chemical)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 분획하였다. 구체적으로, 세포를 수확한 후 4 $^{\circ}$ C, 300xg에서 5분간 원심분리하였다. 세포 침전물을 phosphatase inhibitor와 protease inhibitor를 함유하는 hypotonic 완충액과 혼합하여 얼음상에서 10분간 배양한 후 10% Nonidet P40 Assay Reagent를 첨가하였다. 핵은 14,000xg로 30초간 원심분리하여 회수하였으며, 상등액은 세포질 추출액으로 -80 $^{\circ}$ C 에서 사용 시까지 보관하였다. 핵은 핵 추출용 완충액을 사용하여 얼음 상에서 30분간 추출하였으며, 불용물은 14,000xg에서 10분간 원심분리하여 제거하고 핵 추출액으로 사용하였다.

[0044] 상기 방법으로 추출한 핵추출액과 세포질추출액을 사용하여 실시예 2의 웨스턴 블랏팅 방법과 동일한 방법에 의해 anti-Nrf2(Cell Signaling Technology)를 사용하여 핵과 세포질의 Nrf2를 정량하였다.

[0045] 도 5는 웨스턴 블랏팅 결과를 보여주는 전기영동 사진으로 N-palmitoyl-5-HT에 의해 Nrf2 단백질의 핵이동이 증가하여 2시간 처리 시 가장 핵에서의 Nrf2 양이 피크가 됨을 확인할 수 있었다. 이에 반해, 세포질에서의 Nrf2 단백질은 N-palmitoyl-5-HT 처리 1시간 후에 급감하였다. 이로부터 μ M 이하 농도의 N-palmitoyl-5-HT에 의해 Nrf2의 핵 이동이 증가함을 알 수 있었다.

[0046] 실시예 4 : MAPKs 또는 PI3K 활성화에 대한 N-acyl-5-HT의 영향 평가

[0047] Nrf2 핵 이동의 상위 신호전달에 관여하는 MAPKs(mitogen-activated protein kinases) 또는 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 단백질의 인산화에 대한 N-palmitoyl-5-HT의 영향을 평가하였다. 즉, HT-22 세포를 N-palmitoyl-5-HT 0.5 μ M과 함께 실시예 1과 동일한 배양 조건에서 2시간동안 배양하면서 실시예 2와 동일한 방법에 의해 p-p38, p-JNK, p-ERK, p-PI3K 및 p-Akt에 대한 항체를 사용하여 MAPKs 또는 PI3K/Akt 단백질의 인산화 정도를 웨스턴 블랏팅에 의해 측정하였다.

[0048] 도 6은 MAPKs(p38, JNK와 ERK)의 인산화, 도 7은 PI3K와 Akt의 인산화에 대한 웨스턴 블랏팅 결과를 보여주는 전기영동 사진 및 그래프이다.

[0049] 도 6에 의하면, N-palmitoyl-5-HT는 처리 시간 의존적으로 MAPK 단백질 중 p-38과 ERK(extracellular signal-regulated kinase)의 인산화를 증가시키는 데 반하여 JNK(c-jun N-terminal kinase)의 인산화에는 큰 영향을 미치지 않았다. 또한 도 7로부터 N-palmitoyl-5-HT에 의해 Akt 및 PI3K의 인산화 역시 시간 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 N-palmitoyl-5-HT에 의해 유도된 Nrf2의 핵 이동에 관여하는 상위 신호전달은 p38 MAPK, ERK MAPK 및 PI3K/Akt의 인산화와 연관되어 있음을 알 수 있다.

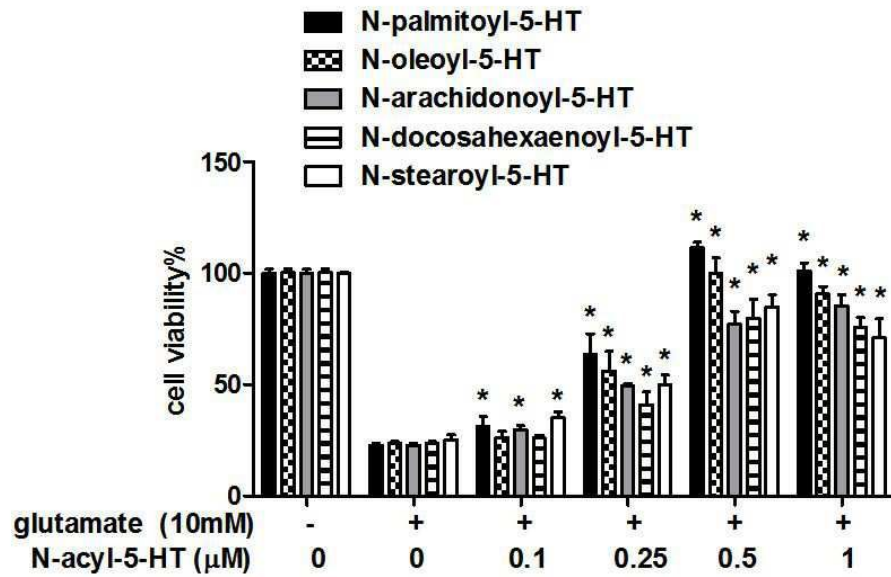
[0050] 이와 별도로, HT-22 세포를 ERK 저해제인 PD98059 20 μ M, p38 저해제인 SB203580 20 μ M 또는 PI3K의 저해제인 LY294002 10 μ M(모두 Cayman Chemical Company로부터 구입)로 전처리 한 후 실시예 2 또는 3과 동일한 방법에 의해 N-palmitoyl-5-HT 0.5 μ M를 처리하고 12시간 후의 세포 내 GCLC 및 2시간 후의 핵에서의 Nrf2 단백질 양을 웨스턴 블랏팅에 의해 측정하였다. 도 8은 상기 웨스턴 블랏팅 결과를 보여주는 전기영동 사진이다.

[0051]

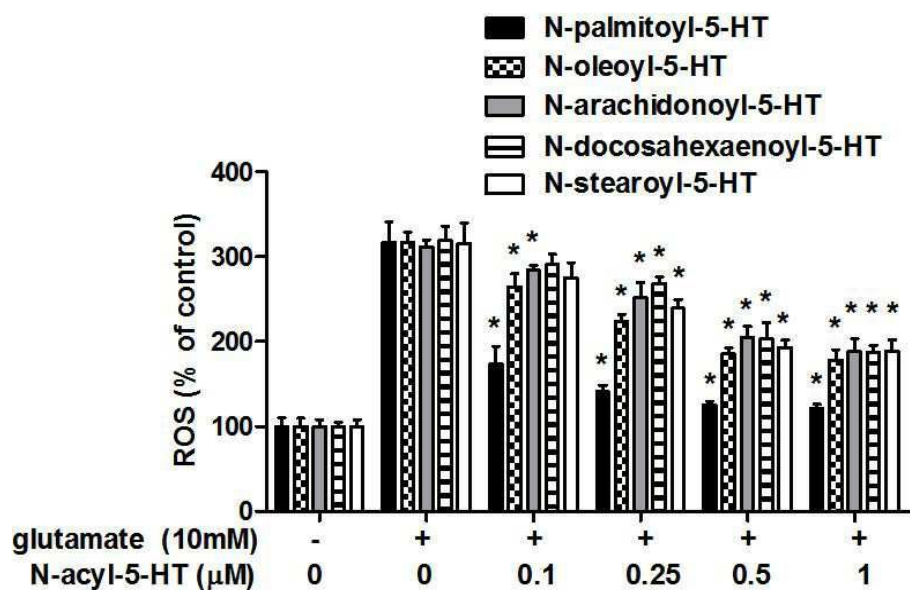
도 8에서 확인할 수 있듯이, PI3K 저해제와 p38 저해제는 N-palmitoyl-5-HT에 의한 Nrf2의 핵 이동과 GCLC의 발현을 효과적으로 저해하였으나, ERK 저해제는 Nrf2의 핵 이동이나 GCLC의 발현에 큰 영향을 미치지 않았다. 이로부터, N-palmitoyl-5-HT에 의한 Nrf2/ARE 신호전달은 p38 MAPK pathway와 PI3K/Akt pathway의 활성화에 의한 것이라 생각된다.

도면

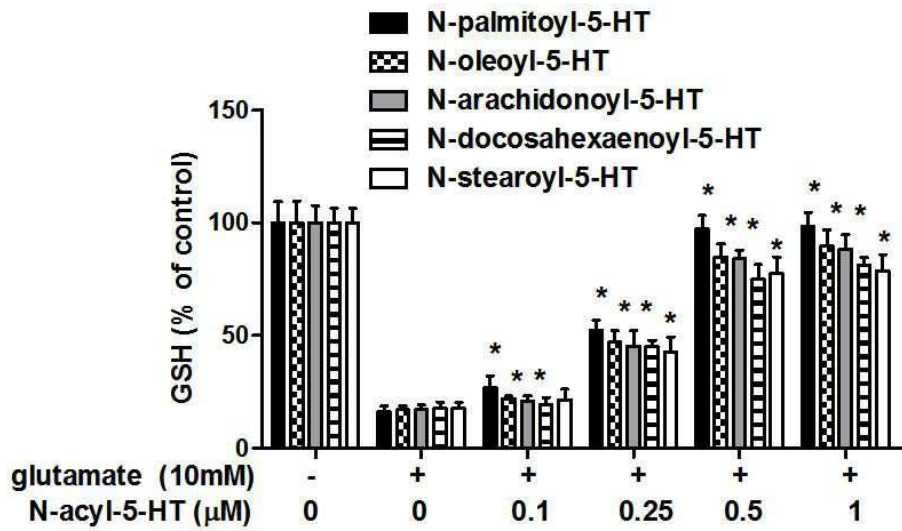
도면1



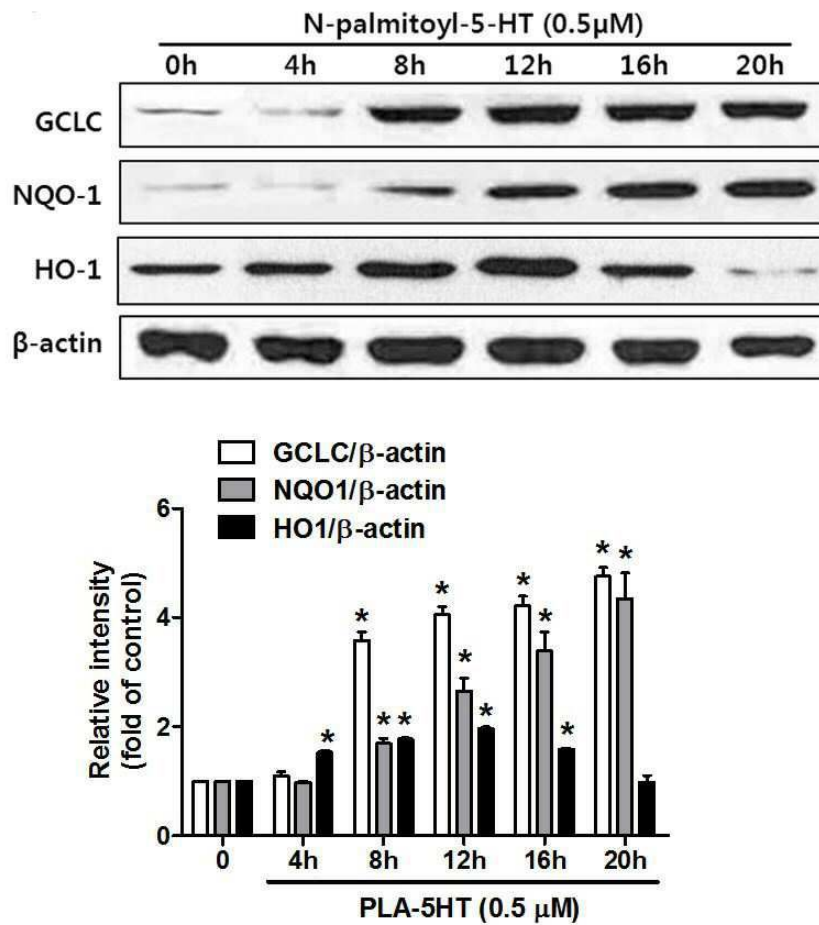
도면2



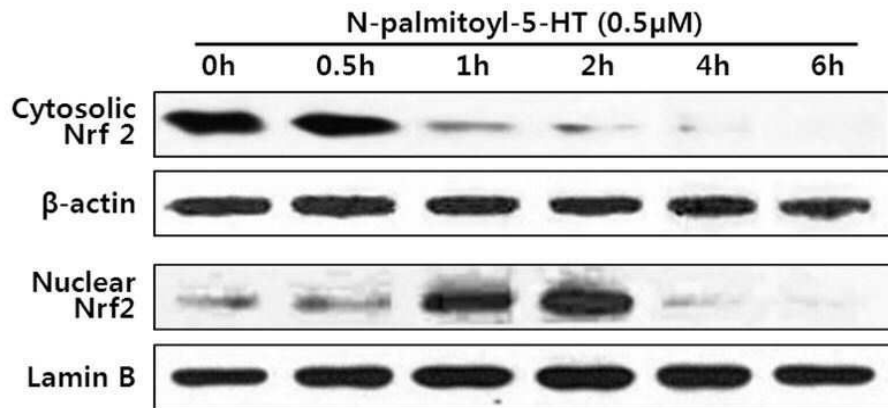
도면3



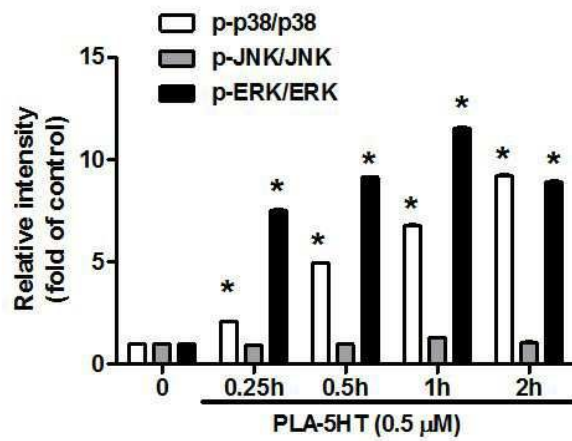
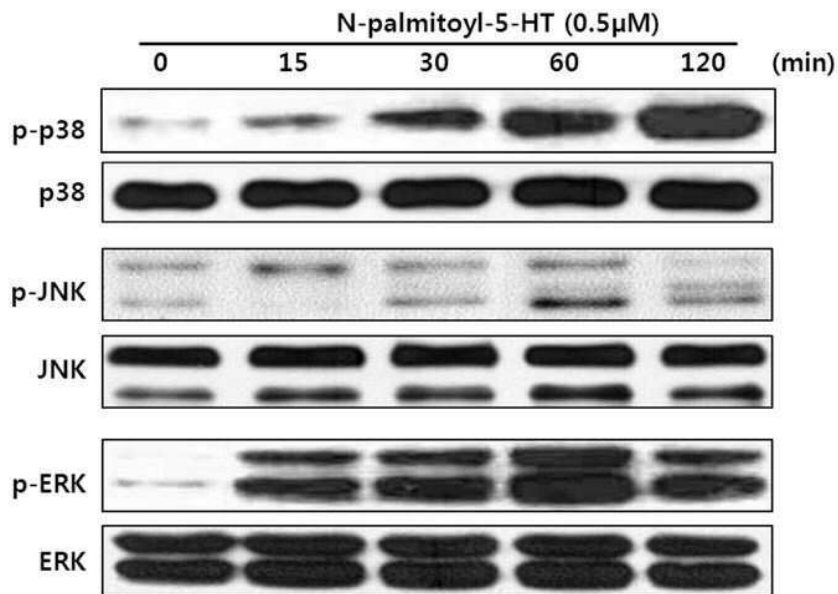
도면4



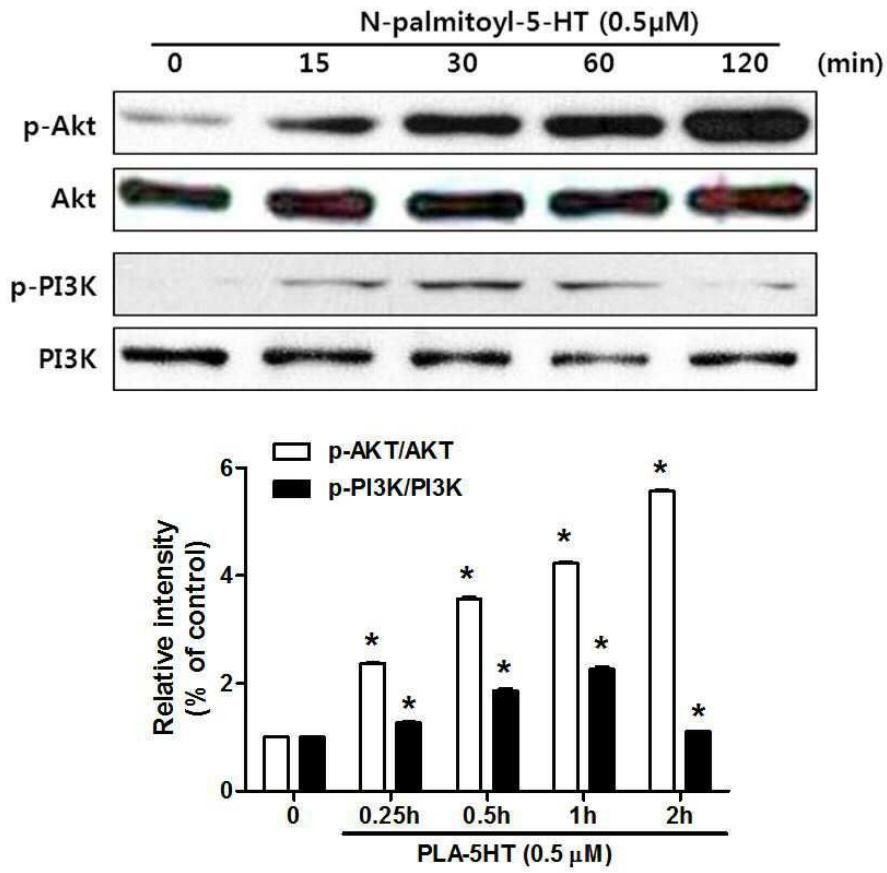
도면5



도면6



도면7



도면8

