(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0136864
(43) 공개일자 2021년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/37 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/37 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0057791
(22) 출원일자 2021년05월04일
심사청구일자 2021년05월04일
(30) 우선권주장
1020200055208 2020년05월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호
박선우
서울특별시 동대문구 약령시로 25, 105동 903호
양창원
서울특별시 성북구 한천로 713, 501동 1202호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 7 항

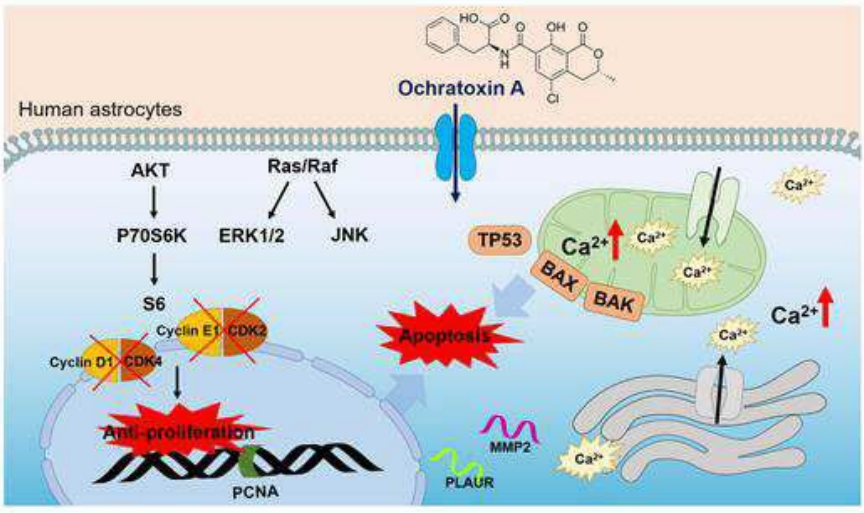
(54) 발명의 명칭 **오크라톡신 A를 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 오크라톡신 A(ochratoxin A)를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 조성물은 성상세포 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 메커니즘을 조절하는 세포주기 조절 단백질의 발현을 억제함으로써 성상세포의 증식을 억제하고, Bax와 TP53과 같은 세포사멸 인자를 증가시켜 세포사멸 효과를 향상시키는 효과를 보이는바, 성상세포의 비정상적 활성에 의해 발병하는 신경 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

오크라톡신 A(ochratoxin A)를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 오크라톡신 A가 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환은 성상세포종(Astrocytoma), 신경교식증(Astrogliosis), 뇌허혈(Ischemic stroke) 또는 뇌손상 후 섬유화(Glial scar formation)인 것을 특징으로 하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

오크라톡신 A(ochratoxin A)를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

오크라톡신 A(ochratoxin A)를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 성상세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 7

부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA)을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 성상세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오크라톡신 A(ochratoxin A)를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 중추신경계 중 성상세포는 뇌-혈관 접합부에 주로 존재하며 뇌의 이온 균형, 영양 공급, 시냅스를 통한 정보 전달, 면역 보호, 해독작용 등 전반적인 항상성 유지를 담당하고 있다 (Pan et al., Mol Brain., 2016; Horner

and Palmer, Trends Neurosci. 2003).

[0003] 뇌 손상이 일어나는 동안 성상세포는 반응성 세포로 변화하며 형태학적 변형뿐만 아니라 유전적, 종양원성, 이주/침투력 등이 증가하는 양상을 보이며, 손상이 회복되는 과정에서 GFAP, MMP2와 같은 지표 인자들이 활성화된다(Burda et al., Exp Neurol, 2016; Hope and Hope, J Environ Public Health, 2012). 기능이 변형되거나 과활성 상태가 된 성상세포는 뇌-혈관 접합부의 기능 상실을 일으키며, 뇌 허혈과 같은 뇌손상을 가속화시키는 문제를 일으킨다(Maurya et al., Pestic Biochem Phys, 2014).

[0004] 한편, 오크라톡신 A는 누룩곰팡이나 푸른곰팡이가 생산하는 곰팡이 독소의 일종으로, 커피나 곡물을 통해 섭취되어 체내로 유입되며 과다 섭취시, 종양원성을 보이거나 신경독성을 일으키는 것으로 보고된바 있고(Sueck *et al.*, Mol Nutr Food Res, 2019; Paradells *et al.*, J Appl Toxicol, 2015), 최근 연구들에서는, 오크라톡신 A의 암세포 사멸 효과가 보고되고 있으며, 백혈병 및 림프종, 자궁내막암 세포에서 그 기전 또한 보고된 바 있다(Y. Ueno *et al.*, Nat Toxins, 1995; Darif Y *et al.*, J Toxicol Sci, 2016; J. Seegers *et al.*, Toxicol Appl Pharmacol, 1994).

[0005] 이처럼, 오크라톡신 A의 다양한 기능 및 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 성상세포 과증식에 의한 신경질환 치료 효과에 대해서는 보고된바 없다.

[0006] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 성상세포 과증식에 의한 신경질환 치료 물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 오크라톡신 A가 성상게포의 증식을 억제하고, 세포의 사멸효과를 향상시키는 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 성상세포의 증식을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 성상세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 성상세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 성상세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 조성물은 성상세포 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 메커니즘을 조절하는 세포주기 조절 단백질의 발현을 억제함으로써 성상세포의 증식을 억제하고, Bax와 TP53과 같은 세포사멸 인자를 증가시켜 세포사멸 효과를 향상시키는 효과를 보이는바, 성상세포의 비정상적 활성에 의해 발병하는 신경 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 오크라톡신 A가 성상세포 증식에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 오크라톡신 A가 성상세포의 사멸 및 미토콘드리아에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 성상세포에 작용하는 오크라톡신 A의 신호전달 단백질 조절 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 오크라톡신 A의 성상세포 증식 억제 및 성상세포 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 오크라톡신 A의 성상세포 내 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 4).

[0020] 본 발명은 일 관점에서 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 다른 관점에서 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 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 성상세포는 포유동물 유래의 세포일 수있으며, 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 삵쾡이), 토끼목(토끼 및 우는 토끼), 식충목(예를 들어, 고슴도치, 두더지 및 솔레노돈) 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, 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 등

으로 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 오크라톡신 A가 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 따르면, PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명에 따르면, 상기 신경질환은 성상세포 과증식에 의해 유발되는 것이라면 반드시 이에 제한되는 것으 아니지만, 예를 들어 성상세포종(Astrocytoma), 신경교식증(Astrogliosis), 뇌허혈(Ischemic stroke) 또는 뇌손상 후 섬유화(Glial scar formation)일 수 있으며, 그 외에도 척수 손상, 파킨슨병, 뇌졸중, 근위축성 척수측색경화증, 운동신경손상, 외상에 의한 말초신경손상, 허혈성 뇌손상, 신생아 저산소성 허혈성 뇌손상, 뇌성마비, 간질, 난치성 간질, 알쯔하이머병, 선천성 대사성 신경계질환 및 외상성 뇌손상 (traumatic brain injury)으로 이루어진 군에서 선택되는 질환에도 적용될 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 발명은 또 다른 관점에서, 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 성상세포의 증식을 억제하는 방법에 관한 것이다.

[0036] 본 발명은 또 다른 관점에서, 오크라톡신 A를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 성상세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0038] [실시예]

[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.

[0041] **실험방법**

[0042] 세포배양

[0043] NHA 세포는 Lonza Life Science에서 구매하여 SV40LT로 불멸화 시킨 후 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 astrocyte medium complete kit (Cat No. #1801) 배지에 풀어, 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[0045] 실험 재료

[0046] 후보 조성물질인 오크라톡신 A ((Cat No. O1877)은 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 신호전달 메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT (Ser^{473}, catalog number: 4060), P70S6K (Thr^{421}/Ser^{424}, catalog number: 9204), S6 (Ser^{235}/Ser^{236}, catalog number: 2211), ERK1/2 (Thr^{202}/Tyr^{204}, catalog number: 9101), JNK (Thr^{183}/Tyr^{185}, catalog number: 4668) 단백질 및 total-AKT (catalog number: 9272), P70S6K (catalog number: 9202), S6 (catalog number: 2217), ERK1/2 (catalog number: 4695), JNK (catalog number: 9252) 단백질에 대한 항체를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다.

[0048] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0049] NHA-SV40LT 세포의 증식 능력에 오크라톡신 A가 미치는 영향을 확인하기 위하여 배양한 5×10^3개의 세포와 배지 100 ㎕를 96 well에 분주하고 오크라톡신 A (0, 1, 2, 5, 10 μM)를 용량의존적으로 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. NHA-SV40LT 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 후 3차례 씻어주고, 마지막으로 100 μl의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응시키고, ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0051] 면역형광법

[0052] 3×10^4개의 NHA-SV40LT 세포를 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 오크라톡신 A 1 μM를 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 1시간 동안 배양하였다. NHA-SV40LT 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 자궁내막증 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] 오크라톡신 A에 의한 NHA-SV40LT 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저, 5×10^5개의 세포를 6 well에 배양하고 오크라톡신 A (0, 0.5, 1, 2 μM)를 용량의존적으로 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 세포 현탁배양하여 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.

[0057] Propidium iodide 염색을 통한 세포주기 분석

[0058] 세포주기 분석은 Propidium iodide (BD Biosciences) 염색을 통해 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5 개의 세포를 6 well에 배양하고 오크라톡신 A (0, 0.5, 1, 2 μM)를 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고, 차가운 70% 에탄올로 18시간 이상 세포를 고정하였다. 원심분리를 이용해 세포를 모아 1 mL의 0.1% BSA-PBS를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻은 다음, 200 μL의 1× binding buffer으로 세포 현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μL 넣고 10 mg/mL RNase A (Sigma-aldrich) 5 μL, 50 mg/mL PI 5 μL를 함께 혼합하여 세포를 30분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후 1× binding buffer를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 세포주기를 분석하였다.

[0060] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0061] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용

하여 측정하였다. NHA-SV40LT 세포 5×10^5개를 6 well에 배양하고 오크라톡신 A (0, 0.5, 1, 2 μM)를 용량의존적으로 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 시켰다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0063] Fluo-4와 Rhod-2를 이용한 세포내 Ca^{2+} 농도 측정

[0064] 세포 내 Ca^{2+} 농도에 오크라톡신 A가 미치는 영향을 확인하기 위하여 먼저 NHA-SV40LT 세포 5×10^5개를 6 well에 배양하고 오크라톡신 A (0, 0.5, 1, 2 μM)를 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 Fluo-4 AM (Invitrogen)을 37℃ 인큐베이터 내에서 20분 동안 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 PBS로 한 번 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다. 미토콘드리아 특이적 Ca^{2+} 농도 측정을 위해 Rhod-2 AM (Invitrogen)을 HBSS에 희석한 후 4℃에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 HBSS로 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0066] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0067] NHA-SV40LT 세포에 시간에 따라 오크라톡신 A를 처리한 다음 NHA-SV40LT 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 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 단백질의 발현을 분석하였다.

[0069] 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응

[0070] 5×10^5개의 세포를 6 well에 배양하고 오크라톡신 A (0, 0.5, 1, 2 μM)를 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 세포의 RNA는 Trizol reagent를 통해 제조사의 매뉴얼 대로 RNA 추출을 시행하였다. cDNA는 total RNA 1 μg과 AccuPower premix로 합성하였으며, 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma-Aldrich)과 StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)로 측정하였다. 타겟 유전자의 발현은 C_T값으로 계산하였으며, GAPDH 발현을 기준으로 표준화하였다. PCR 조건은 95℃로 3분 진행한 후, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초 조건을 40회 증폭하였다.

[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] 오크라톡신 A에 의한 성상세포의 증식 억제 효과

[0077] 오크라톡신 A를 용량의존적으로 (0, 1, 2, 5, 10 μM) 사람의 성상세포 (NHA-SV40LT)에 처리한 후 세포 증식력 변화를 확인하였다. 그 결과 NHA-SV40LT 세포의 증식력은 각각 대조군에 비해 약 29% ($p < 0.001$), 50% ($p < 0.001$), 82% ($p < 0.001$), 83% ($p < 0.001$) 감소하였다 (도 1A). 다음으로, 세포 증식에 필수적인 단백질인 PCNA의 단백질 발현 변화를 확인함으로써 오크라톡신 A에 의한 성상세포의 증식력 억제 효과를 검증하였다. 그

결과, PCNA의 발현을 의미하는 녹색 형광 강도가 오크라톡신 A 처리 시 감소하는 것을 확인하였다 (도 1B). 이를 정량화하였을 때 오크라톡신 A에 의해서 NHA-SV40LT 세포에서 약 42% ($p < 0.05$) PCNA 형광 강도가 감소하였다. 또한, 세포주기와 관련하여, 오크라톡신 A는 용량의존적으로 NHA-SV40LT 세포의 Sub-G1기 그룹의 세포 수를 약 2.79배까지 증가시키고, G0/G1에 해당하는 세포의 수를 감소시키는 효과를 보였다 (도 1C). 이러한 세포주기의 억제는 오크라톡신 A에 의해 유도되는 CCND1, CCNE1, CDK4, MYC의 세포주기 조절 단백질 발현을 감소시킴으로써 유도되는 것을 확인하였다 (도면 1D). 이러한 결과를 통해 오크라톡신 A는 성상세포에서 세포증식과 DNA 복제를 저해함으로써 세포증식을 억제한다는 것을 확인하였다.

[0079] 오크라톡신 A에 의한 성상세포 사멸 유도 및 미토콘드리아 기능 억제 효과

[0080] 오크라톡신 A가 성상세포의 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해 FITC가 결합된 Annexin V 및 PI 염색을 수행한 후 유세포분석기를 이용해 분석하였다. 2 μM의 오크라톡신 A는 NHA-SV40LT 세포의 사멸을 244% ($p < 0.001$) 증가시켰다 (도 2A). 또한, 오크라톡신 A를 처리함에 따라 NHA-SV40LT 세포 내 미토콘드리아 막전위차가 처리하지 않은 세포에 비해 약 255% ($p < 0.001$)까지 감소하는 것으로 나타났다 (도 2B). 뿐만 아니라, 오크라톡신 A는 세포사멸 단백질인 BAX와 TP53의 유전자 발현을 각각 42.8배, 7.3배 증가시켰다 (도 2C). 이러한 결과를 통해, 오크라톡신 A가 사람의 성상세포인 NHA-SV40LT 세포에서 미토콘드리아 의존적 세포사멸 경로를 활성화하여 자멸사를 유도한다는 것을 확인하였다. 세포 사멸에 관한 작용 외에도 세포 내 칼슘 항상성을 잘 유지하는 것 역시 미토콘드리아의 기능 중 하나이므로, 오크라톡신 A가 세포 내 칼슘 항상성에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 먼저, 세포질 내 칼슘 이온의 변화를 Fluo4-AM 염색을 통해 FACS로 측정 및 상대적 농도를 분석하였다. 그 결과 오크라톡신 A에 의해 NHA-SV40LT 세포질 칼슘이 117% ($p < 0.05$) 증가하였으며 (도 2D), 미토콘드리아 칼슘은 점진적으로 증가하여 2 μM 오크라톡신 A에 의해서는 401%까지 ($p < 0.001$) 증가하는 것을 확인하였다 (도 2E).

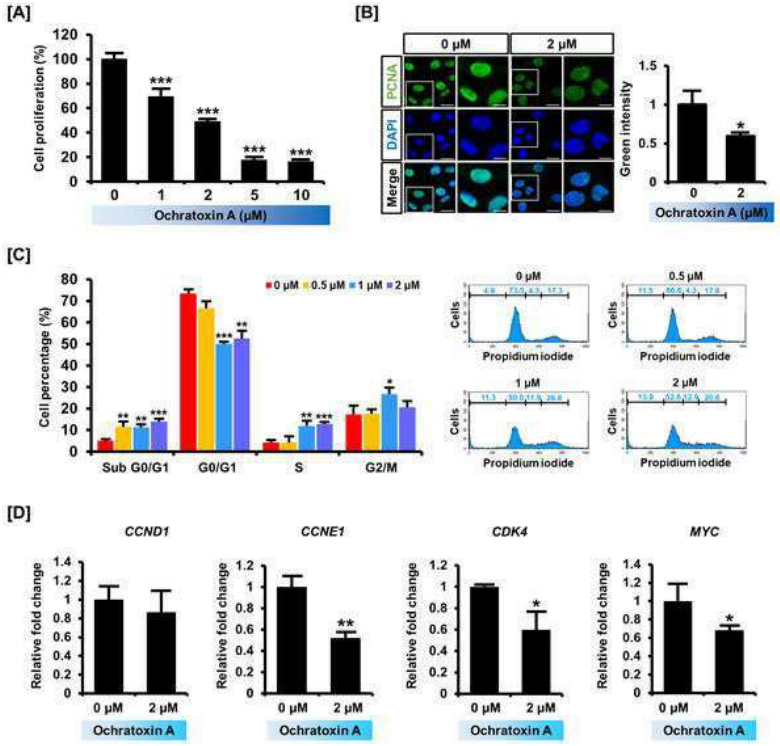
[0082] 성상세포에 작용하는 오크라톡신 A의 신호단백질 조절 효과 분석

[0083] 오크라톡신 A에 의한 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 단백질 변화를 알아보기 위해, 웨스턴 블랏을 수행하였다. NHA-SV40LT에 오크라톡신 A를 처리한 시간에 따라 모든 단백질의 인산화가 변화하였으며, AKT는 1시간-24시간 사이 (도 3A), P70S6K는 0.5시간-24시간 사이 (도 3B), S6는 1시간에서 24시간 사이에 (도 3C) 증가하였다. 유사한 형태로, 오크라톡신 A를 처리한 성상세포 내 ERK1/2의 인산화는 0.5시간-24시간 사이 (도 3D), P90RSK는 0.5시간-1시간 사이 (도 3E), JNK는 0.5시간에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

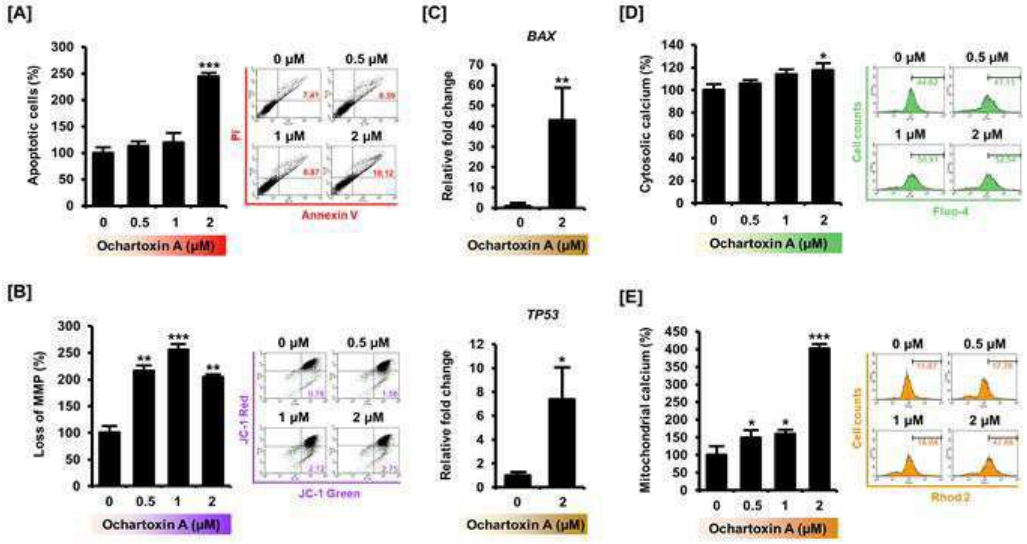
[0085] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

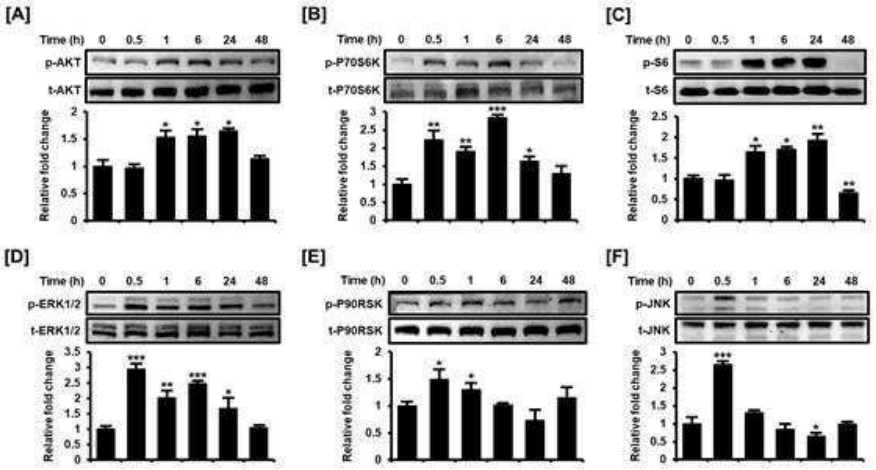
도면1


[A]
Cell proliferation (%)
Ochratoxin A (μM)
[B]
0 μM
2 μM
PCNA
DAPI
Merge
Green intensity
Ochratoxin A (μM)
[C]
Cell percentage (%)
Sub G0/G1
G0/G1
S
G2/M
Cells
Propidium iodide
[D]
CCND1
CCNE1
CDK4
MYC
Relative fold change
Ochratoxin A

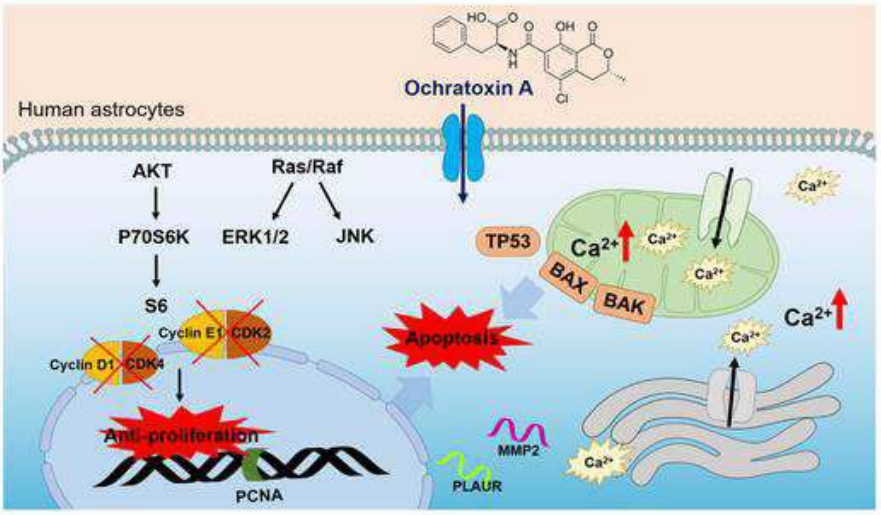
도면2


[A]
Apoptotic cells (%)
PI
Annexin V
Ochartoxin A (μM)
[B]
Loss of MMP (%)
JC-1 Red
JC-1 Green
[C]
BAX
TP53
Relative fold change
[D]
Cytosolic calcium (%)
Cell counts
Fluo-4
[E]
Mitochondrial calcium (%)
Rhod 2

도면3


[A]
Time (h) 0 0.5 1 6 24 48
p-AKT
t-AKT
Relative fold change
[B]
Time (h) 0 0.5 1 6 24 48
p-P70S6K
t-P70S6K
Relative fold change
[C]
Time (h) 0 0.5 1 6 24 48
p-S6
t-S6
Relative fold change
[D]
Time (h) 0 0.5 1 6 24 48
p-ERK1/2
t-ERK1/2
Relative fold change
[E]
Time (h) 0 0.5 1 6 24 48
p-P90RSK
t-P90RSK
Relative fold change
[F]
Time (h) 0 0.5 1 6 24 48
p-JNK
t-JNK
Relative fold change

도면4


Ochratoxin A
Human astrocytes
AKT
Ras/Raf
P70S6K
ERK1/2
JNK
S6
Cyclin E1
CDK2
Cyclin D1
CDK4
Anti-proliferation
PCNA
TP53
Ca2+
BAX
BAK
Apoptosis
MMP2
PLAUR