(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0098040
(43) 공개일자 2020년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/19 (2006.01) *A23K 20/147* (2016.01)
A23L 33/17 (2016.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/195 (2013.01)
A23K 20/147 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2019-0015636
(22) 출원일자 2019년02월11일
심사청구일자 2019년02월11일

(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 8 항

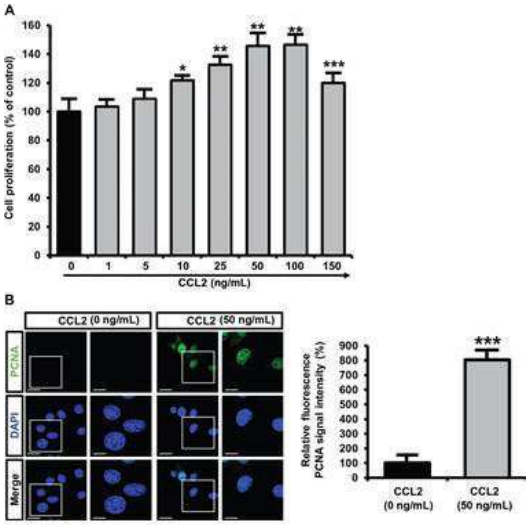
(54) 발명의 명칭 **CCL2를 유효성분으로 포함하는 산유량 증가용 조성물, 및 유방염 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CCL2를 유효성분으로 포함하는 산유량 증가용 조성물, 사료 첨가제 조성물, CCL2를 유효성분으로 포함하는 유방염 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 CCL2를 유효성분으로 포함하는 조성물은 체내에서 생성되는 단백질을 원료로 하는바 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로 내 단백질의 발현 활성화를 통해 유방상피세포의 증식을 향상시키고, 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현을 감소시키며, 염증 반응을 완화시키는 효과가 있는바, 산유량 증가용 조성물, 사료 첨가제 조성물, 유방염을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/17 (2016.08)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 산유량 증가용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CCL2는 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 산유량 증가용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CCL2는 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 산유량 증가용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 소포체 스트레스 유도 단백질은 IRE1α, ATF6α, PERK, eIF2α 및 GADD153로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 산유량 증가용 조성물.

청구항 5

CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제 조성물.

청구항 6

CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 유방염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 유방염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 유방상피세포의 증식 능력을 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CCL2를 유효성분으로 포함하는 산유량 증가용 조성물, 사료 첨가제 조성물, CCL2를 유효성분으로 포함하는 유방염 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 정상적인 우유 생산은 소의 자손 번식 및 성장 뿐 아니라 사람의 건강과도 직결되는 문제이다(Nissen A *et al.*, Jopurnal of Dairy Science, 2013). 또한, 유방상피세포는 유선을 이루는 기능적 단위로서 우유 생산에 관여하는 가장 중요한 세포이다(Arendt LM and Kuperwasser C, Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2015). 따라서, 유방상피세포 증식력 유지는 산유량 향상을 위해 필수적이며, 유방상피세포의 증식에는 다양한 성장인자, 사이토카인 등이 이에 관여하는 것으로 알려져 있다(Inman JL *et al.*, Development, 2015).

[0003] 한편, 소의 유선에 염증반응이 지속적으로 일어나 유방염이 발생하게 되면 생성되는 우유 내의 카세인 및 칼슘의 감소가 나타나 우유 품질을 떨어뜨리는 요인이 된다. 관련하여 에프린 B2와 그의 표적 수용체는 유선 상피세포에서 발현하며 유선 내 세포의 악성화를 유도하는 것으로 보고된바 있다(Vaught D *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 2009).

[0004] 그러나 현재까지 유방상피세포의 증식 또는 염증 반응과 관련하여 케모카인 CCL2의 기능에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0005] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 유방상피세포의 증식력을 향상시켜 산유량을 증가시키고, 염증 반응을 완화시켜 유방염을 치료할 수 있는 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, CCL2가 PI3K/AKT와 MAPK 신호전달 경로를 활성화시켜 유방상피세포의 증식을 향상시키고, 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현 감소 및 염증반응을 완화시키는 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 산유량 증가용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 또한, CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 또한, CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 유방염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한, CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 유방염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 또한, CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 유방상피세포의 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 산유량 증가용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 유방염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 유방염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, CCL2(C-C motif chemokine ligand 2)를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 유방상피세포의 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 CCL2를 유효성분으로 포함하는 조성물은 체내에서 생성되는 단백질을 원료로 하는바 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로 내 단백질의 발현 활성화를 통해 유방상피세포의 증식을 향상시키고, 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현을 감소시키며, 염증 반응을 완화시키는 효과가 있는바, 산유량 증가용 조성물, 사료 첨가제 조성물, 유방염을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 소의 유방상피세포 증식에 CCL2가 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 CCL2 처리에 따른 소의 유방상피세포 세포주기 변화 양상을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 CCL2 처리에 따른 소의 유방상피세포 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전 경로 변화 양상을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 AKT, ERK1/2, JNK의 표적 억제제와 CCL2의 혼합 조성물에 의한 신호전달 단백질의 인산화 양상 및 유방상피세포의 증식력 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 소의 유방상피세포 내 CCL2 처리에 따른 소포체 스트레스에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 소의 유방상피세포 내 CCL2 처리에 따른 항염증 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 소의 유방상피세포의 증식, 소포체 스트레스 완화 및 항염증 효과와 관련된 CCL2의 작용기전을 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 유방상피세포의 증식, 소포체 스트레스 완화 및 항염증 효과와 관련된 CCL2의 작용 기전을 밝혔다(도 7).

[0021] 본 발명은 CCL2를 유효성분으로 포함하는 산유량 증가용 조성물을 제공한다.

[0022] 상기 조성물은 약학적 조성물, 식품 조성물, 사료 첨가제 조성물을 모두 포함한다.

[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, 상기 유방상피세포는 포유동물 유래의 세포일 수 있으며, 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 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.

[0029] 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 생

리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 식품을 의미한다.

[0030] 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.

[0031] 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 발명에서 사료 첨가제 조성물은 가축용 사료 첨가제 조성물일 수 있으며, 상기 가축은 이에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 소, 말, 양, 돼지, 사슴, 닭, 오리, 거위, 칠면조, 메추리, 타조, 꿩, 그 밖에 농림축산식품부령으로 정하는 동물일 수 있으며, 바람직하게 반추동물일 수 있다. 상기 반추동물은 되새김동물이라고도 하며, 이에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 낙타과, 애기사슴과, 사슴과, 기린과, 소과의 동물을 말한다.

[0033] 본 발명에서 상기 반추동물은 바람직하게 소과의 동물일 수 있으며, 더욱 바람직하게 젖소일 수 있고, 더더욱 바람직하게 전환기 젖소일 수 있다.

[0034] 본 발명의 가축용 사료 첨가제 조성물을 가축에게 급여함으로써, 산유량, 유질을 개선시키고, 유선에서 발생하는 염증을 완화시키는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명에 따르면, 상기 CCL2는 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 활성화시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 본 발명에 따르면, 상기 CCL2는 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0037] 이때, 상기 소포체 스트레스 유도 단백질은 IRE1α, ATF6α, PERK, eIF2α, 및 GADD153로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 CCL2를 유효성분으로 포함하는 유방염 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[0039] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 모두 포함한다.

[0040] 상기 약학적 조성물 또는 식품 조성물은 상술한 CCL2를 유효성분으로 포함하는 약학적 제제 또는 식품 제제를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 조성물과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0042] 본 발명은 또한, 상기 CCL2를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 유방상피세포의 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0044] 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.

[0045] **실시예**

[0046] **<실험 방법>**

[0047] 실험동물 및 세포배양

[0048] 소 유방상피세포주(bovine mammary epithelial, MAC-T)를 건국대학교 이홍구 박사의 연구실 (Konkuk University, Republic of Korea)로부터 제공받았으며, 일차배양한 소 유선세포에 SV40 large T항체를 도입하여 불멸화시켰다. 소 유방상피세포는 플라스틱 기층에서 배양 시 자갈 모양을 띄며, 본 발명에 사용된 소 유방상피세포는 25-30회 계대배양하였다. 소 유방상피세포의 단층배양을 위해서 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's medium, HyClone, Logan, UT)에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)를 혼합하여 사용하였다. 실험을 위해 소 유방상피세포는 24시간 기아 상태로 배양하였으며, 이후 다양한 농도의 CCL2를 처리하였다. 모든 실

험은 세 번 반복되어 수행하였다.

[0050] 실험 재료

[0051] 재조합 CCL2 (catalog number: 279-MC/CF)는 R&D Systems로부터 구매하여 사용하였으며, tunicamycin (catalog number: T7765)과 LPS (catalog number: L3491)는 sigma에서 구입하였다. CCL2에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT (Ser^{473}, catalog number: 4060), P70S6K (Thr^{421}/Ser^{424}, catalog number: 9204), S6 (Ser^{235}/^{236}, catalog number: 2211), ERK1/2 (Thr^{202}/Tyr^{204}, catalog number: 9101), JNK (Thr^{183}/Tyr^{185}, catalog number: 4668), P38 (Thr^{180}/Tyr^{182}, catalog number: 4511), cyclin D1 (Thr^{286}, catalog number: 3300), eIF2α (Ser^{51}, catalog number: 3398) 단백질 및 total-AKT (catalog number: 9272), P70S6K (catalog number: 9202), S6 (catalog number: 2217), ERK1/2 (catalog number: 4695), JNK (catalog number: 9252), P38 (catalog number: 9212), cyclin D1 (catalog number: 2922), eIF2α(catalog number: 5324), IRE1α (catalog number: 3294) 단백질에 대한 항체를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다. phospho-PERK (Thr^{981}, catalog number: sc-32577), total-PERK (catalog number: sc-13073), ATF6α (catalog number: sc-166659), GRP78 (catalog number: sc-13968), GADD153 (catalog number: sc-7351), PCNA (catalog number: sc-56) 단백질에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology사로부터 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K/AKT 억제제인 wortmannin (catalog number: 9951)을 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126 (catalog number: EI282)과 JNK 억제제인 SP600125 (catalog number: EI305)를 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0053] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0054] 소 유방상피세포의 증식 능력에 CCL2가 미치는 영향을 확인하기 위하여 5×10^3개의 세포와 배지 100 μl를 96 well에 분주하고 FBS 기아 조건으로 세포를 배양하였다. 그 다음 CCL2를 용량의존적으로(0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 ng) 처리하고, tunicamycin(0.25 μg/ml), wortmannin(1 μM), U0126(20 μM), SP600125(20 μM)를 같이 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다 (https:// www .sigmaaldrich.com/ content/ dam/ sigma -aldrich/ docs/ Roche/Bulletin/ 1/ 11647229001bul .pdf). 48시간 인큐베이션 이후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. MAC-T 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시키고, 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. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였다.

[0056] 면역형광법

[0057] 3×10^4개의 소 유방상피세포를 10% FBS가 포함된 DMEM배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 CCL2 (50 ng/mL)를 24시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 1:100으로 희석된 PCNA, cyclin D1 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG 또는 rabbit IgG를 처리하여 4℃에서 16시간 인큐베이션하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A11017, Invitrogen, Carlsbad, CA) 또는 goat anti-rabbit IgG Alexa 488 (catalog number: A-11008, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 소 유방상피세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 소 유방상피세포 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. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였다. 상대적인 형광 강도는 MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 녹색 형광을 DAPI 형광 강도로 나누어 정량화하였다.

[0059] 세포 주기 분석

[0060] CCL2에 의한 소 유방상피세포의 세포주기 변화 양상을 확인하기 위하여 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, CCL2를 용량의존적(0, 5, 10, 25, and 50 ng/mL)으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 0.1% BSA/PBS로 워싱을 진행하고 70% Ethanol에서 16시간 동안 세포를 고정시켰다. 이후, 0.1% BSA/PBS로 워싱하고 RNase A (Sigma) 처리 하에서 PI 염색을 수행하였다. FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 세포 주기를 분석하였다.

[0062] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0063] 소 유방상피세포에 CCL2 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 MAC-T 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) 시약 및 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다. 2차 항체는 goat anti-rabbit IgG polyclonal antibody (Seracare, catalog number: 474-1506) 또는 goat anti-mouse IgG polyclonal antibody (Seracare, catalog number: 474-1806)을 1:2500 비율로 희석하여 상온에서 1시간 인큐베이션하였다. Total protein의 발현은 인산화된 단백질의 발현을 정규화하기 위해 사용되었다. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였다.

[0065] mRNA 발현 분석 (qPCR)

[0066] 소 유방상피세포에 CCL2 및 LPS를 처리한 다음 Trizol reagent (Invitrogen)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 전체 RNA를 추출하였다 (https:// www.qiagen .com/ se/ resources/ resourcedetail ?id = 14e7cf6e-521a -4cf7 -8cbc -bf9f6fa33e24 & lang = en). RNA의 농도와 순도는 spectrometry와 denaturing agarose gel electrophoresis를 이용해 확인하였다. 이후, 1 μg의 RNA를 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. *IL8*, *IL6*, *NFKB1* 유전자를 증폭하기위한 프라이머는 GenBank database를 기반으로 Primer 3 software (ver 4.0.0, Free Software Foundation Inc., Boston, MA)를 이용하여 디자인되었다. 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma)과 StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 측정하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분 동안 인큐베이션 후 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 3분 조건을 40회 증폭하였으며 *GAPDH* 발현량에 기반하여 정규화하였다. 상대적인 유전자의 발현은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용하여 정규화되었다. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였다.

[0068] 통계분석

[0069] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다. 웨스턴 블롯의 단백질 발현은 total protein 또는 α-tubulin의 발현으로 정규화되었다. Students *t* tests가 두 샘플간의 평균 비교를 위해 사용되었다.

[0071] **<결과 및 고찰>**

[0072] CCL2가 소의 유방상피세포의 증식력에 미치는 영향

[0073] CCL2에 의한 소의 유방상피세포 내 증식력 변화를 분석하기 위해 CCL2를 농도별 (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 ng/mL)로 처리하여 BrdU incorporation assay를 수행하다. 측정 결과, 50 ng/mL 까지 용량의존적으로 세포 증식력이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 대조군과 비교하여 10, 25, 50, 100, 150 ng/mL의 CCL2 처리시 각각

121.8% ($P < 0.05$), 132.6% ($P < 0.01$), 145.7% ($P < 0.01$), 146.5% ($P < 0.05$), 120.1% ($P < 0.001$) 세포 증식이 증가하였다. 본 실험에 기반하여 50 ng/mL을 이후 실험에서 사용되는 CCL2의 최적 농도로 설정하였다. 또한 세포 증식에 필수적인 단백질인 PCNA의 발현을 면역형광염색법을 통해 확인한 결과 CCL2 (50 ng/mL) 처리 시 소의 유방상피세포 내 PCNA의 발현이 현저히 증가함 (804.6%, $P < 0.001$)을 확인하였다(도 1). 이러한 결과를 통해 CCL2가 소 유방상피세포의 증식을 촉진한다는 것을 확인하였다.

[0075] CCL2가 소의 유방상피세포의 세포 주기에 미치는 영향

[0076] CCL2가 소의 유방상피세포의 세포 주기에 미치는 영향을 분석하기 위하여 Propidium iodide (PI) 염색을 수행하였으며 용량의존적(0, 5, 10, 25, 50 ng/mL)으로 G2/M기의 비율이 증가하는 것을 통해 세포 주기가 진행되는 것을 CCL2가 촉진 할 수 있음을 확인하였다. CCL2를 처리하지 않았을 때 G2/M기의 비율은 3.90% 였으며 25 ng/mL의 CCL2에 반응하여 5.78% ($P < 0.05$)까지 증가하였고 50 ng/mL의 CCL2에 노출되었을 때는 7.10% ($P < 0.01$)까지 증가하였다. 또한 세포 주기를 진행시키는 대표적인 단백질인 Cyclin D1의 발현 역시 CCL2 (50 ng/mL) 처리 시 확연히 증가함 (590.1%, $P < 0.001$)을 면역형광염색법을 통해 확인할 수 있었다 (도 2). 이러한 결과를 통해 CCL2가 소 유방상피세포의 세포 주기 진행을 촉진시킨다는 것을 확인하였다.

[0078] CCL2의 용량의존적 투여에 따른 소의 유방상피세포 내 신호전달기전 변화 분석

[0079] CCL2를 소의 유방상피세포에 용량의존적(0, 5, 10, 25, 50 ng/mL)으로 처리한 후 세포내 단백질을 추출하여 세포증식에 관여하는 PI3K/AKT, MAPK 신호전달 단백질의 인산화를 분석한 결과, AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK, P38 등 모든 단백질의 인산화가 증가하였으며 Cyclin D1 단백질의 인산화 역시 함께 증가함을 확인하였다(도 3). AKT의 경우 10, 25, 50 ng/mL의 CCL2에 반응하여 각각 3.27배 ($P < 0.01$), 13.12배 ($P < 0.001$), 29.39배 ($P < 0.001$) 인산화가 증가하였다. P70S6K의 인산화는 25, 50 ng/mL의 CCL2 처리에 의하여 각각 4.18배 ($P < 0.01$), 4.40배 ($P < 0.001$) 증가하였다. 또한 S6의 인산화는 10, 25, 50 ng/mL의 CCL2 처리에 의해 각각 5.56배 ($P < 0.001$), 8.97배 ($P < 0.001$), 14.00배 ($P < 0.001$) 증가하였다. 뿐만 아니라, 50 ng/mL의 CCL2는 ERK1/2의 인산화를 12.59배 ($P < 0.001$)배 증가시켰으며 10, 25 ng/mL의 CCL2는 각각 8.40배 ($P < 0.001$), 12.15배 ($P < 0.001$) ERK1/2의 인산화를 증가시켰다. 또한 JNK의 인산화는 10, 25, 50 ng/mL의 CCL2에 의해 각각 1.94배 ($P < 0.01$), 2.50배 ($P < 0.001$), 2.53배 ($P < 0.01$) 증가하였다. P38의 인산화는 25, 50 ng/mL의 CCL2 처리에 의해 각각 3.98배 ($P < 0.01$), 4.41배 ($P < 0.01$) 증가하였다. CyclinD1의 인산화는 5, 10, 25, 50 ng/mL의 CCL2에 의해 각각 2.81배 ($P < 0.01$), 2.75배 ($P < 0.05$), 12.40배 ($P < 0.001$), 18.29배 ($P < 0.001$) 증가하였다. 또한, CCL2(50 ng/mL)과 함께 신호전달 단백질에 대한 선택적 억제제인 Wortmannin(AKT 억제제, 1 μM), U0126(ERK1/2 억제제, 20 μM), SP600125(JNK 억제제, 20 μM)을 처리하여 세포 증식력을 확인한 결과 신호전달 단백질 억제제와 병용 처리하였을 때 세포 증식력이 감소함을 확인하였다. Wormannin, U0126, SP600125는 각각 29.7% ($P < 0.01$), 38.7% ($P < 0.01$), 29.9% ($P < 0.05$) CCL2에 의해 증가한 소 유방상피세포의 증식력을 감소시켰다. CCL2를 신호전달 단백질 억제제와 병용 처리 후 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯 분석을 통해 PI3K/AKT, MAPK 신호전달 경로의 활성화를 분석하였을 때 각 단백질들의 복잡한 교차효과를 기반으로 한 분자적 메커니즘을 통해 세포 증식을 증가시키는 것으로 나타났다 (도 4). PI3K/AKT 신호전달 경로에 해당하는 AKT, P70S6K, S6 단백질은 Wortmannin과 CCL2의 병용 처리에 의해 인산화가 감소하였다. 뿐만 아니라, U0126 또는 SP600125의 사전 처리는 CCL2 단독 처리에 비해 AKT의 인산화를 증가시켰다. 하지만 P70S6K의 인산화는 Wortmannin을 제외한 다른 억제제에 의해서는 인산화가 변하지 않았다. U0126 처리는 CCL2에 의해 증가한 S6의 인산화를 감소시켰지만 SP600125는 S6 단백질에 큰 영향을 주지 않았다. CCL2에 의해 증가한 ERK1/2의 인산화는 Wortmannin 또는 SP600125와의 병용 처리에 의해 더욱 증가하였다. 또한, CCL2에 의해 증가한 JNK의 인산화는 Wortmannin 또는 U0126 처리에 의해 더욱 증가하였다. P38의 인산화는 Wormannin과 CCL2가 병용처리되었을 때 CCL2 단독 처리에 비해 더욱 증가하였다. CyclinD1의 인산화는 U0126이나 SP600125와 CCL2가 병용처리되었을 때 CCL2 단독 처리에 비해 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과를 통해 CCL2에 의해 조절되는 신호전달 경로의 교차효과가 소의 유선상피세포 증식에 관여한다는 것을 확인하였다.

[0081] CCL2의 소의 유방상피세포 내 소포체 스트레스 완화 효과 분석

[0082] 소의 유방상피세포 내 소포체 스트레스를 유발하는 Tunicamycin(0.25 μg/mL)과 CCL2 (50 ng/mL)를 병용 처리

하여 세포 증식 변화를 확인한 결과, Tunicamycin에 의해 감소한 세포 증식력이 CCL2에 의해 회복되었으며 IRE1α, ATF6α, PERK, eIF2α, GRP78, GADD153 등 소포체 스트레스 관련 단백질의 발현 또는 활성이 CCL2 처리 시 감소하였다 (도 5). Tunicamycin가 소 유선상피세포에 단독 처리되었을 때 약 30.2% ($P < 0.01$) 정도 세포 증식이 감소하였으며 tunicamycin과 CCL2가 병용 처리되었을 경우 약 16.9% ($P < 0.05$) 정도 세포 증식이 감소하는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, CCL2는 소포체 스트레스 센서 단백질인 IRE1α (82.5%, $P < 0.01$), ATF6α (45.9%, $P < 0.05$)의 발현과 PERK의 인산화 (93.0%, $P < 0.001$)를 tunicamycin 단독 처리시보다 감소시켰다. 또한 PERK의 하위 단백질인 eIF2α의 활성화는 tunicamycin 단독 처리에 비해 CCL2와 병용 처리시 약 96.7% ($P < 0.001$) 감소하였다. 또한 GRP78, GADD153 단백질의 발현 역시 CCL2 처리시 tunicamycin 단독 처리에 비해 각각 50.3% ($P < 0.01$), 54.6% ($P < 0.01$) 감소하였다. 이러한 결과를 통해 CCL2가 소 유선 상피세포의 소포체 스트레스를 감소시킨다는 것을 확인하였다.

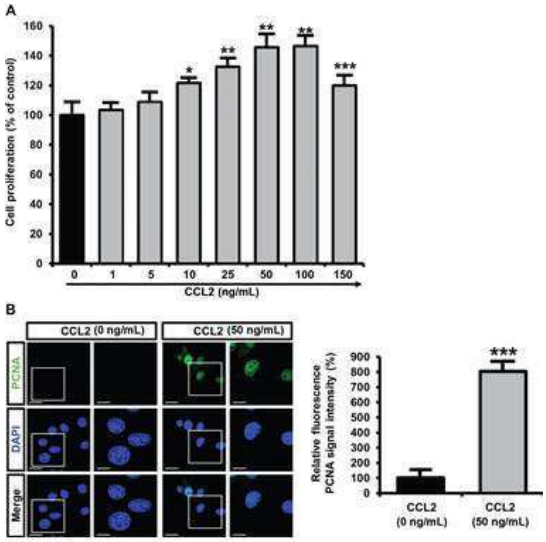
[0084] CCL2의 소의 유방상피세포 내 항염증 효과 분석

[0085] CCL2에 의한 소의 유방상피세포 내 염증반응 조절 효과에 대해 분석하기 위해 염증성 사이토카인인 IL8, IL6와 염증성 사이토카인을 전사 조절하는 인자인 NFκB의 mRNA 수준 발현을 lipopolysaccharide(LPS)와 CCL2를 병용 처리하여 분석한 결과 LPS에 의해 증가한 유전자의 발현이 CCL2에 의해 감소하였다. LPS는 IL8과 IL6 mRNA 수준을 용량 의존적으로 증가시켰으며 5 μg/mL의 LPS에 의해 각각 7.03배 ($P < 0.001$), 3.27배 ($P < 0.001$) 발현이 증가하였다. 하지만 CCL2는 LPS에 의해 증가한 *IL8*, *IL6*의 발현을 유의적으로 감소시켰다. 또한 LPS에 의해 증가한 NFκB의 발현은 CCL2에 처리에 의해 유의적으로 감소하였다. 소 유선상피세포의 증식력은 LPS 0.5, 1, 5 μg/mL의 LPS 처리에 의해 각각 15.7% ($P < 0.01$), 22.9% ($P < 0.05$), 31.1% ($P < 0.01$) 감소하였다. 또한 LPS에 의해 감소한 소의 유방상피세포 증식력이 CCL2와 병용 처리 시 다시 회복되는 것으로 나타났으며 신호전달 단백질 억제제를 추가하여 처리하였을 때는 이러한 회복 효과가 나타나지 않았다 (도 6). 25, 50 ng/mL의 CCL2 처리에 의해 LPS 단독 처리와 비교하여 각각 137.5% ($P < 0.05$), 150.8% ($P < 0.01$) 세포 증식이 증가하였다. 한편, Wortmannin (1 μM), U0126 (20 μM), SP600125 (20 μM)의 추가 처리는 CCL2와 LPS의 병용 처리군과 비교하여 각각 37.4% ($P < 0.001$), 35.9% ($P < 0.001$), 44.2% ($P < 0.001$) 감소하였다. 이러한 결과를 통해 CCL2의 항염증 효과가 LPS에 의해 유도된 항증식효과를 억제할 수 있으며 이는 PI3K/AKT, MAPK 신호전달 경로를 매개할 것임을 암시한다.

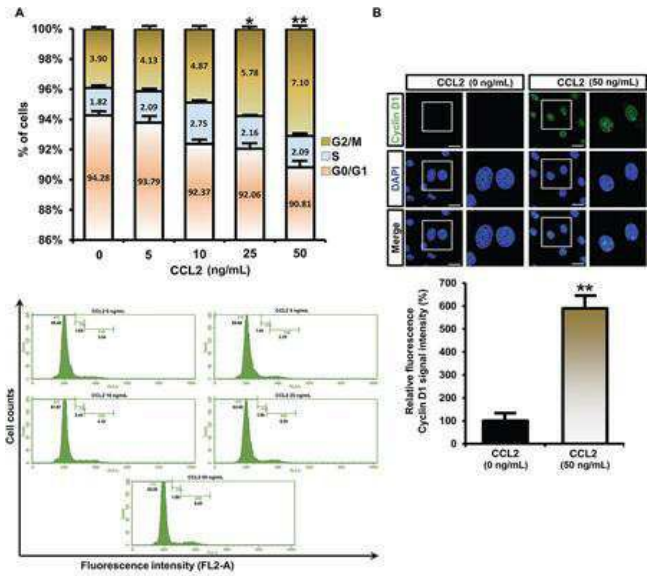
[0087] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

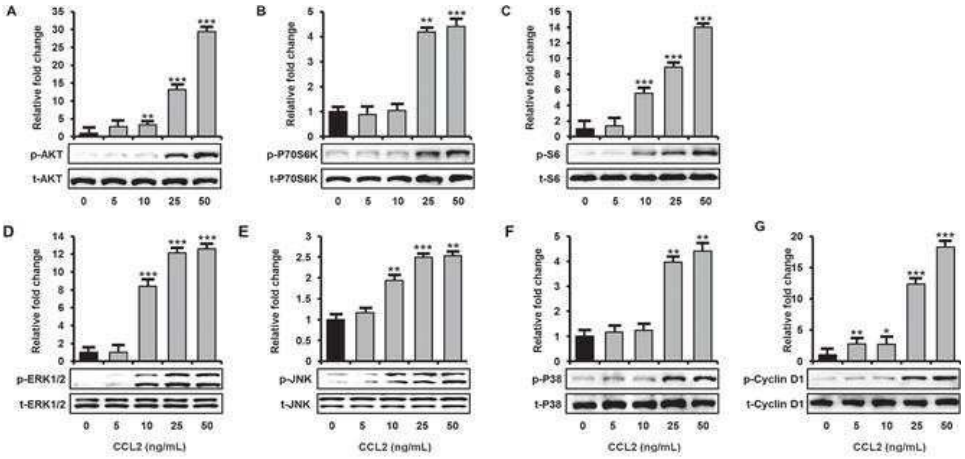
도면1


A
Cell proliferation (% of control)
CCL2 (ng/mL)
B
CCL2 (0 ng/mL)
CCL2 (50 ng/mL)
PCNA
DAPI
Merge
Relative fluorescence PCNA signal intensity (%)

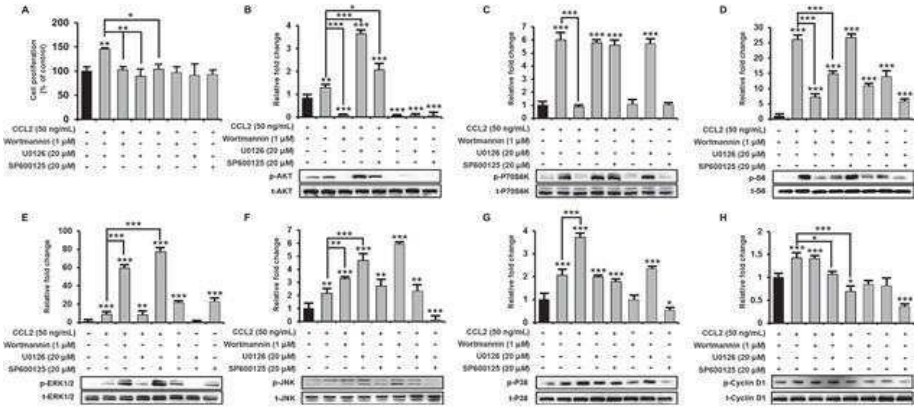
도면2


A
% of cells
G2/M
S
G0/G1
CCL2 (ng/mL)
Cell counts
Fluorescence intensity (FL2-A)
B
CCL2 (0 ng/mL)
CCL2 (50 ng/mL)
Cyclin D1
DAPI
Merge
Relative fluorescence Cyclin D1 signal intensity (%)

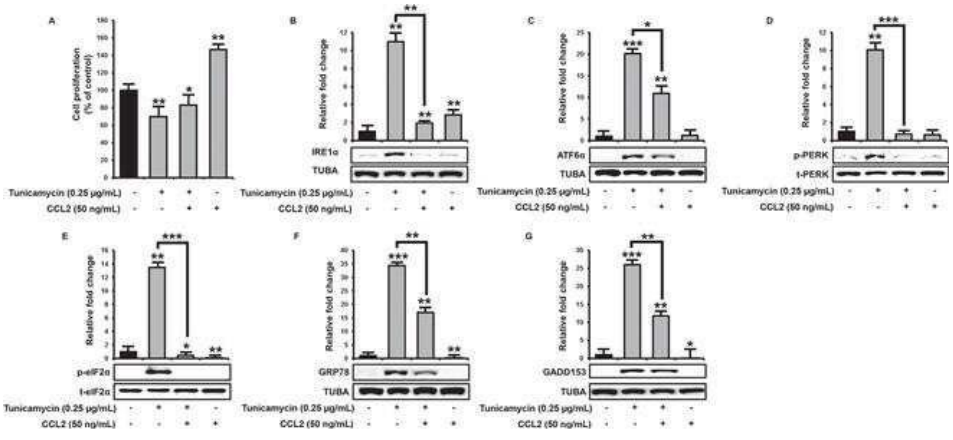
도면3


A
B
C
D
E
F
G
Relative fold change
p-AKT
t-AKT
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-JNK
t-JNK
p-P38
t-P38
p-Cyclin D1
t-Cyclin D1
0 5 10 25 50
CCL2 (ng/mL)

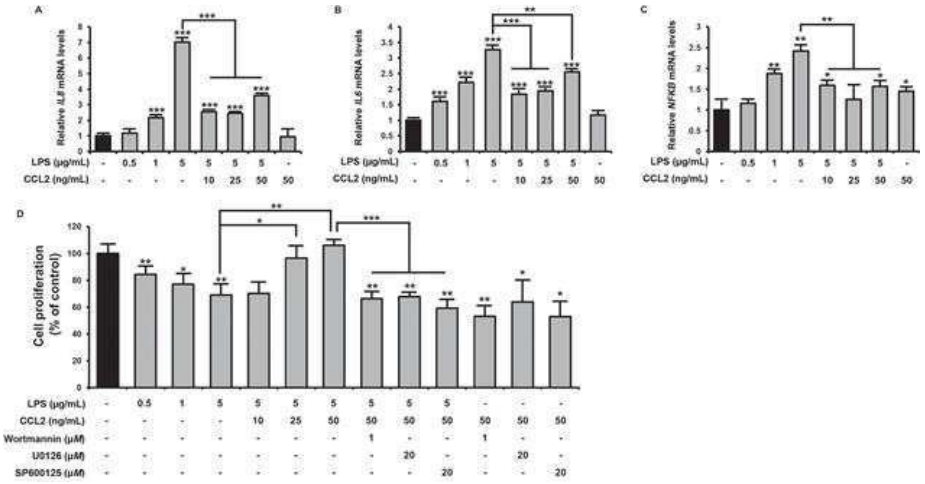
도면4


A
B
C
D
E
F
G
H
Cell proliferation (% of control)
Relative fold change
CCL2 (50 ng/mL)
Wortmannin (1 μM)
U0126 (20 μM)
SP600125 (20 μM)
p-AKT
t-AKT
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-JNK
t-JNK
p-P38
t-P38
p-Cyclin D1
t-Cyclin D1

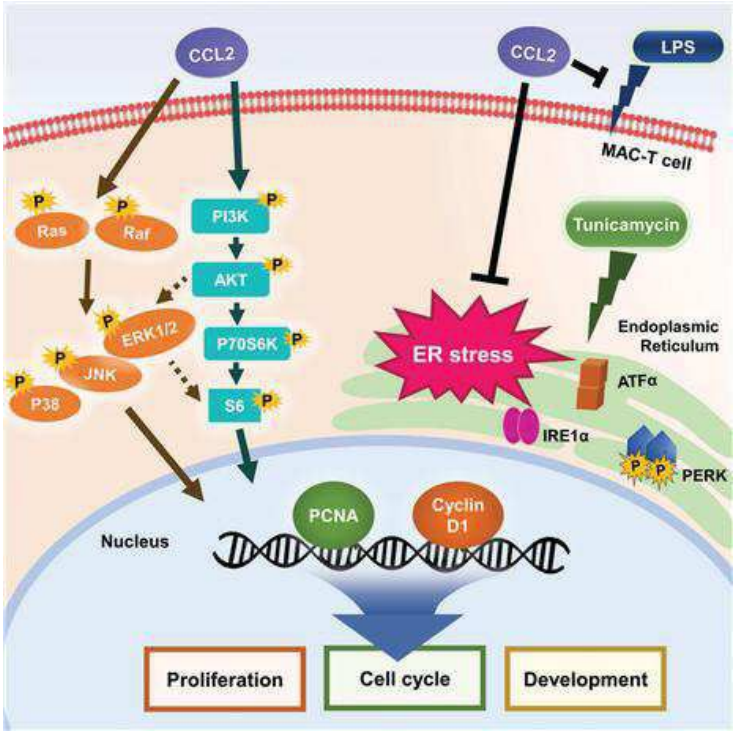
도면5


A
B
C
D
E
F
G
Cell proliferation (% of control)
Relative fold change
Tunicamycin (0.25 μg/mL)
CCL2 (50 ng/mL)
IRE1α
TUBA
ATF6α
p-PERK
t-PERK
p-eIF2α
t-eIF2α
GRP78
GADD153

도면6


A
B
C
D
Relative IL8 mRNA levels
Relative IL6 mRNA levels
Relative NFKB mRNA levels
Cell proliferation (% of control)
LPS (μg/mL)
CCL2 (ng/mL)
Wortmannin (μM)
U0126 (μM)
SP600125 (μM)

도면7


CCL2
CCL2
LPS
MAC-T cell
Ras
Raf
PI3K
AKT
ERK1/2
P70S6K
JNK
P38
S6
Tunicamycin
ER stress
Endoplasmic Reticulum
ATFα
IRE1α
PERK
PCNA
Cyclin D1
Nucleus
Proliferation
Cell cycle
Development