(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월09일
(11) 등록번호 10-2154236
(24) 등록일자 2020년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0025686
(22) 출원일자 2019년03월06일
심사청구일자 2019년03월06일
(56) 선행기술조사문헌
US20060078533 A1
KR1020050060981 A

(73) 특허권자
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
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 성선영

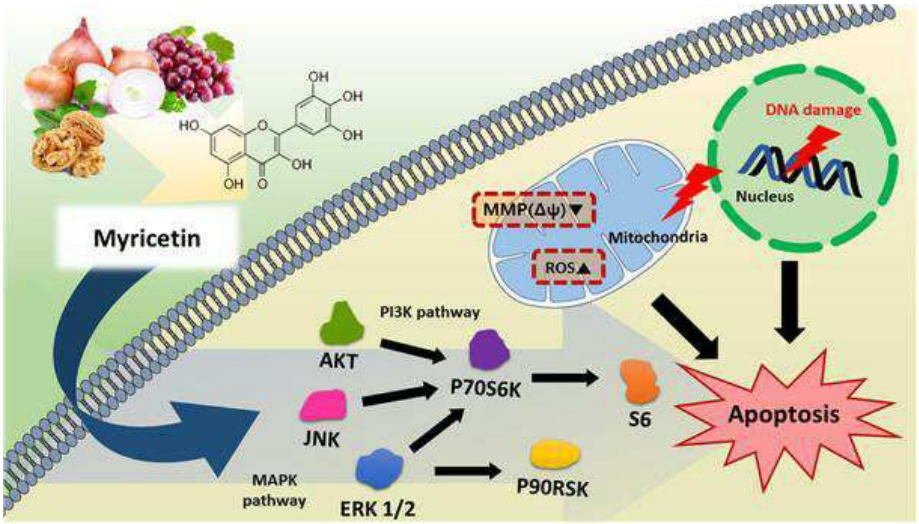
(54) 발명의 명칭 **미리세틴을 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 골육종 세포주의 증식을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 골육종을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
(72) 발명자
박선우
서울특별시 강동구 양재대로 1340, 421동 305호

박하현
서울특별시 중랑구 봉화산로 144, 1309동 703호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI17C0929
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발사업
연구과제명 액체생체검사 기반 난소암 조기 진단, 재발 예측 및 항암제 내성 관련 엑소좀 바이오마커 발굴 및 검증
기 여 율 1/1
과제수행기관명 가톨릭관동대학교
연구기간 2017.04.10 ~ 2019.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미리세틴이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 억제제, MAPK/ERK1/2 억제제 및 MAPK/JNK 억제제 중 1종 이상의 타겟 억제제를 더 포함하고,

상기 PI3K/AKT 억제제는 LY294002(2-morpholin-4-yl-8-phenylchromen-4-one)이고, 상기 MAPK/ERK1/2 억제제는 U0126(1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene)이며, 상기 MAPK/JNK 억제제는 SP600125(Anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one)인 것을 특징으로 하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 미리세틴이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

PI3K/AKT 억제제, MAPK/ERK1/2 억제제 및 MAPK/JNK 억제제 중 1종 이상의 타겟 억제제를 더 포함하고,

상기 PI3K/AKT 억제제는 LY294002(2-morpholin-4-yl-8-phenylchromen-4-one)이고, 상기 MAPK/ERK1/2 억제제는 U0126(1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene)이며, 상기 MAPK/JNK 억제제는 SP600125(Anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one)인 것을 특징으로 하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 골육종 세포주의 증식을 억제시키는 방법.

청구항 8

미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 골육종 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골육종은 뼈에 생기는 가장 흔한 원발성 악성 종양으로, 개에서는 대략 85~98%로 발생하며, 사람과 개 모두 팔다리 골격에서 외골격까지 다양한 골격에서 발생하는 것으로 알려져 있다(Morello *et al.*, Vet J, 2011:Szewczyk *et al.*, Vet Res Commun, 2015).

[0003] 골육종을 치료하기 위한 기존 방법으로는 수술, 방사선치료, 면역요법, 항암화학요법 등이 보고되었으며(Brodey and Abt, J Am Vet Med Assoc, 1976:Walter *et al.*, Vet Comp Oncol, 2005), 그 중 항암 화학요법으로서 독소루비신, 시스플라틴, 카보플라틴 또는 이들을 조합하여 사용한 치료방법은 생존율을 향상시키는 방법으로 알려져 있으나, 약제의 독성으로 인한 부작용의 문제점이 존재한다.

[0004] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 새로운 골육종 치료제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 천연물 유래 물질인 미리세틴(myricetin)이 골육종 세포주의 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도함으로써 골육종에 대한 치료 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 본 발명은 또한, 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 또한, 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 증식을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 또한, 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 증식을 억제시키는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 골육종 세포주의 증식을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 골육종을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 골육종 세포주 증식에 미리세틴이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 골육종 세포주의 세포 사멸 및 DNA 분절화에 미리세틴이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 골육종 세포 내 미리세틴 처리에 따른 활성산소종 증가 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 골육종 세포 내 미리세틴 처리에 따른 미토콘드리아 탈분극 유도 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 골육종 세포주에서 미리세틴의 용량의존적 처리에 의한 신호전달물질의 인산화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 골육종 세포주에서 미리세틴과 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 단백질 표적 억제제의 병용 처리에 따른 세포 증식 변화 양상 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 골육종 세포주에서 미리세틴과 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 단백질 표적 억제제의 병용 처리에 따른 신호전달 단백질 인산화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 골육종 세포 내 미리세틴에 의한 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 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.

[0017] 본 발명에서는 미리세틴의 골육종 세포 내 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 8).

[0018] 본 발명은 일 관점에서 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 다른 관점에서 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 골육종 세포는 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.

[0023] 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.

[0024] 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, 산화 방지제, 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.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 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.

[0029] 본 발명에 따르면, 상기 미리세틴이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따르면, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0031] 본 발명에 따르면, 상기 미리세틴은 활성산소종을 발생시키고, 미토콘드리아 막전위의 탈분극을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0033] 본 발명은 또 다른 관점에서, 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 증식을 억제하는 방법에 관한 것이다.

[0034] 본 발명은 또 다른 관점에서, 미리세틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 세포 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0036] 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.

[0037] **실험방법**

[0038] 실험동물 및 세포배양

[0039] D-17, DSN 세포주는 개 골육종 상피세포로부터 기원한 세포로 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 Minimum Essential Medium (Cat No. SH30024.01)에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다. 세포는 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양되었으며 미리세틴을 처리하기 전 24시간 동안 기아상태를 유지하였다.

[0041] 실험 재료

[0042] 후보 조성물질인 미리세틴은 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 미리세틴에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-ERK1/2, P90RSK, JNK, AKT, P70S6K, S6 단백질 및 total-ERK1/2, P90RSK, JNK, AKT, P70S6K, S6에 대한 항체를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, JNK 억제제인 SP600125 및 ERK1/2 억제제인 U0126을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0044] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0045] 골육종 세포의 증식 능력에 미리세틴이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 세포를 96 well에 분주하고 미리세틴을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 또는 20 μM의 신호전달기전 억제제와 같이 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 한 후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 골육종 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 후 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.

[0047] 면역형광법

[0048] 3×10^4개의 골육종 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 미리세틴 100 μM을 48시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, Santa Cruz Biothecnology사에서 구입하여 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 1시간동안 배양하였다. 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음에는 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 골육종 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.

[0050] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0051] 미리세틴에 의한 골육종 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 미리세틴을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 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 얻은 후 200 μL의 1× binding buffer으로 세포현탁배양하여 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.

[0053] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석

[0054] 3×10^4개의 골육종 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 미리세틴 100 μM을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 한번 헹궈내고 0.1% sodium citrate에 0.1% Triton X-100가 함유된 용액을 사용하여 아이스 위에서 2분간 인큐베이션 시켰다. 다음으로 In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche) 에 포함된 TUNEL staining mixture를 사용하여 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 PBS로 헹구고 DAPI를 염색한 후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0056] DCFH-DA 염색을 이용한 활성산소종 생성 측정

[0057] 세포내 활성산소종 생성을 측정하기 위해 과산화물의 존재하에 2 ‘,7’-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA)에서 2 ‘,7’-dichlorofluorescine (DCF)로 전환되는 시약을 Sigma-Aldrich사에서 구매하여 사용하였다. 골육종 세포는 0.05% 트립신을 사용하여 배양접시에서 떼어낸 후 원심분리하여 PBS에 워싱하고, 10 μM의 DCFH-DA를 처리하여 30분간 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 인큐베이션 하였다. 이후 PBS로 두 번 워싱을 진행하고, 미리세틴을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 처리하여 1시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 인큐베이션 후 PBS로 워싱을 진행한 후 유세포 분석기를 사용하여 DCF의 형광강도를 측정하였다.

[0059] Linoleamide alkyne (LAA)를 통한 지질과산화 형광 측정

[0060] Life technologies사에서 Click-iT lipid peroxidation imaging kit를 구입하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 간단히, 3×10^4개의 골육종 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 100 μM 미리세틴과, 50 μM의 linoleamide alkyne(LAA)을 처리하여 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 인큐베이션 하였다. 이후 3.7% 포름알데하이드로 고정시키고, 0.5% Triton X-100 용액을 사용하여 투과화 과정을 진행한 후, LAA 산화에 변형된 단백질의 친핵성 곁사슬을 Alexa Fulor 488 azide처리 gm 실온에서 30분 인큐베이션하여 표시하였다. DAPI를 염색한 후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영

하였다.

[0062] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0063] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 5×10^5개의 골육종 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 미리세틴을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 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 하고, 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0065] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0066] 골육종 세포에 미리세틴 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 골육종 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. 전체 단백질 양은 웨스턴블롯의 정규화를 위한 대조군으로 사용되었다. 모든 항체는 Cell Signaling Techonology 사에서 구입하였다.

[0068] 통계분석

[0069] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, PROC-GLM 모델에 따라 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다. 데이터는 따로 표기되지 않는 한, 평균의 표준오차로 제시되었다.

[0071] **결과 및 고찰**

[0072] 골육종 세포의 증식에 대한 미리세틴의 영향 분석

[0073] 미리세틴에 의한 개 골육종 세포(D-17, DSN)의 변화양상을 분석하기 위하여 BrdU reagents를 이용하였다. 먼저 미리세틴을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 첨가한 배지에 골육종 세포를 48시간 배양하였으며 이후 세포 증식 양상을 분석한 결과 골육종 세포의 증식력이 미리세틴에 의해 단계적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (도 1A). 대조군에 비하여 100 μM의 미리세틴을 처리하였을 때, D-17 세포의 증식력이 40.3% ($p < 0.001$), DSN 세포의 증식력이 38.2% ($p < 0.001$) 감소하였다. 이 후, 세포 증식 마커로서, 단백질인 PCNA 발현을 면역형광기법을 통해 확인하였다 (도 1B). 그 결과, 컨트롤 그룹에 비해 100 μM 미리세틴을 48시간 처리한 골육종 세포의 핵 내에서는 PCNA의 발현이 현저히 감소함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 미리세틴이 개 골육종 세포의 증식을 효과적으로 억제시킨다는 것을 확인하였다.

[0075] 미리세틴에 의한 골육종 세포의 사멸유도 효과

[0076] 미리세틴의 개 골육종 세포 (D-17, DSN)에 대한 세포사멸 유도 효과를 분석하기 위해, Annexin V 및 PI 염색을 통해 세포사멸이 일어나는 골육종 세포의 수를 유세포 분석기를 사용하여 측정하였다 (도 2A). D-17, DSN 두 세포에서 50 μM의 미리세틴 처리부터 세포 사멸이 유의적으로 유도된 것을 확인하였다. 이를 수치화 하였을 시 대조군과 비교하여 50, 100 μM를 처리하였을 때, D-17 세포의 사멸은 각각 157% ($p < 0.05$), 247% ($p < 0.01$) 증가하였으며 DSN 세포의 사멸은 각각 169% ($p < 0.05$), 273% ($p < 0.001$) 증가하였다. 또한, 개 골육종 세포에 100 μM의 미리세틴을 48시간 인큐베이션 한 후 TUNEL assay를 수행하여 세포 내 DNA 분절화 (DNA fragmentation)의 정도를 비교하였다. 대조군 세포 내에서는 DNA 분절화가 거의 발생하지 않았지만 미리세틴 처리시 두 세포에서 모두 분절화가 된 DNA에 라벨링된 빨간 형광의 발현이 증가한 것을 확인하였다 (도 2B). 이러한 결과를 통해 미리세틴이 개 골육종 세포에서 세포사멸 효과를 유도하고, 개 골육종 세포로부터 DNA 분절화 및 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

[0078] 미리세틴에 의한 개 골육종 세포 내 활성산소종 발생 및 미토콘드리아 탈분극 유도 효과

[0079] 개 골육종 세포(D-17, DSN) 내 미리세틴의 미토콘드리아 매개 세포사멸 효과가 발생하는지 알아보기 위해, 미리

세틴의 용량의존적 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 처리에 따른 활성산소종의 발생과 미토콘드리아 막전위의 탈분극 여부에 관한 실험을 수행하였다. 활성산소종의 경우, 형광 프로브인 DCFH-DA를 이용하여 FACS로 형광강도를 측정하였고, 100 μM의 미리세틴 처리 시, 각각 230% (D-17), 1164% (DSN)까지 활성산소종 발생이 증가하는 것을 확인하였다 (도 3A). LAA 시약으로 골육종 세포를 염색하여 지질 과산화가 유도 효과를 확인한 결과에서도 미리세틴 처리된 골육종 세포에서 유의적으로 발현이 증가한 것을 확인하였다 (도 3B).

[0080] 또한, 미토콘드리아의 탈분극을 JC-1 염색 이 후 FACS를 이용하여 측정하였고, 골육종 세포에 미리세틴 100 μM을 처리하였을 경우 대조군에 비하여 596% (D-17), 4554% (DSN) 가량 미토콘드리아의 막 전위 감소가 나타남을 확인하였다 (도 4A-B). 이러한 결과를 통해 미리세틴이 개 골육종 세포로부터 미토콘드리아 손상을 매개로 세포 사멸을 효과적으로 유도한다는 것을 확인하였다.

[0082] 미리세틴에 의한 개 골육종 세포 내 신호전달기전 조절 양상 분석

[0083] 개 골육종 세포내 미리세틴에 의해 유도되는 세포의 증식 억제 및 세포 사멸에 영향을 미치는 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 PI3K/AKT 신호전달 경로 및 MAPK 신호전달 경로에 대한 인산화 양상을 미리세틴 용량의존적 (0, 20, 50, 100 μM)으로 웨스턴블롯을 이용하여 분석하였다 (도 5). 그 결과, 미리세틴은 골육종 세포내에서 ERK1/2와 그 하위 물질인 P90RSK의 인산화를 용량의존적으로 증가시켰며, JNK MAPK의 인산화 또한 미리세틴에 의해서 용량의존적으로 유도되었다 (도 5A-C).

[0084] PI3K/AKT 신호전달 경로에서는 미리세틴 처리에 의해 AKT, P70S6K, S6의 인산화 양상이 두 골육종 세포에서 모두 유도되는 경향을 보였다 (도 5D-F). 이러한 결과는 미리세틴이 개 골육종 세포에서 MAPK와 PI3K/AKT 신호전달경로를 조절한다는 것을 암시한다.

[0086] 미리세틴과 MAPK, PI3K/AKT 신호전달기전 억제제 혼합물을 통한 개 골육종 세포 내 증식변화양상 분석 및 신호전달물질 인산화 패턴 분석

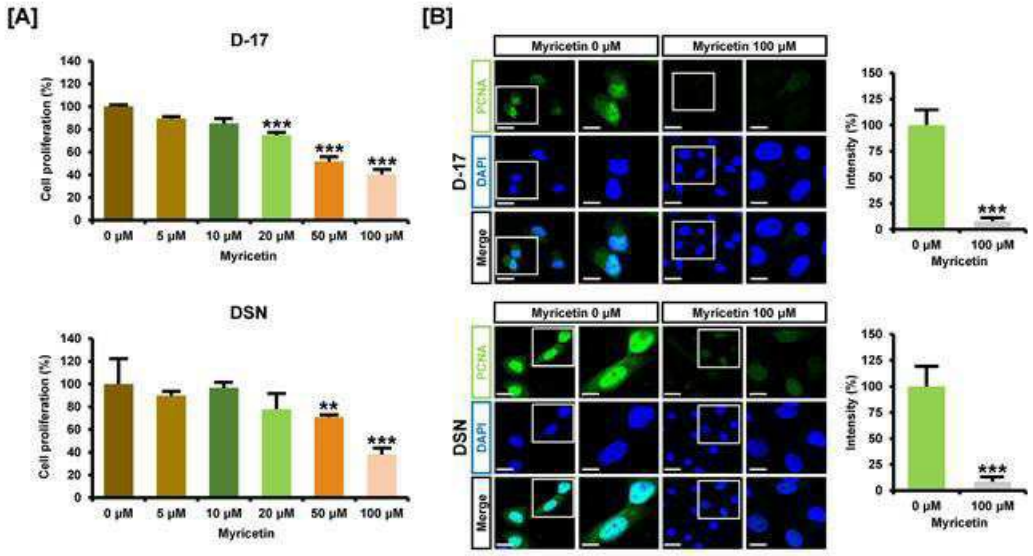
[0087] 미리세틴에 의해 조절되는 신호전달분자가 개 골육종 세포의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위해 세포 내 20 μM의 PI3K/AKT 억제제 (LY294002), ERK1/2 억제제 (U0126), JNK 억제제 (SP600125)를 미리세틴 100 μM과 병용처리 하였다 (도면 6). 각 억제제는 D-17과 DSN 세포에서 모두 대조군에 비해 세포 증식을 억제시켰으며, D-17 세포의 경우 PI3K/AKT 억제제 및 MAPK 억제제와 미리세틴을 병용처리시 더욱 세포증식을 억제하는 결과를 보였다 (도 6A-B).

[0088] 또한, 골육종 세포의 미리세틴 처리가 의 정확한 세포내 기전을 파악하기 위해 골육종 세포 내에 신호전달기전 억제제 20 μM을 2시간동안 먼저 인큐베이션 시키며 신호전달기전을 막은 후 미리세틴 100 μM을 처리하여 MAPK와 PI3K/AKT 신호전달 경로의 인산화 양상을 확인하였다 (도 7). 각 단백질은 타겟으로 하는 신호전달기전 억제제에 의해 모두 인산화 양상이 억제되었다. ERK1/2의 인산화의 경우, U0126을 제외한 다른 억제제에 의해서는 유의적인 억제 효과를 발휘하지 못하였다(도 7A). 하지만 P90RSK의 경우, D-17세포에서는 ERK1/2와 비슷한 양상을 보였지만, DNS 세포에서는 유의적인 변화를 확인할 수 없었다 (도 7B). JNK의 인산화 역시 SP600125를 제외한 다른 신호전달기전 억제제 처리시 두 세포 모두에서 오히려 증가하는 양상을 보였다 (도 7C). PI3K/AKT 신호전달 경로에서 AKT의 인산화는 LY294002에 의해 두 가지 골육종 세포에서 모두에서 약하게 억제되었다 (도 7D). P70S6K의 경우 인산화는 D-17 세포에서 LY294002에 의해 감소되었고, DSN 세포에서는 U0126과 LY294002에 의해 증가경향이 감소되었다 (도 7E). PI3K/AKT 경로의 하위 신호전달물질인 S6는 모든 신호전달 억제제에 의해 감소되는 경향을 보였다 (도 7F). 이러한 결과를 통해 골육종 세포에 미치는 미리세틴의 영향이 PI3K/AKT와 MAPK 신호전달기전 억제제와의 병용처리 시 시너지 효과를 발휘하여 개 골육종 세포의 증식을 더욱 억제할 수 있음을 확인하였다.

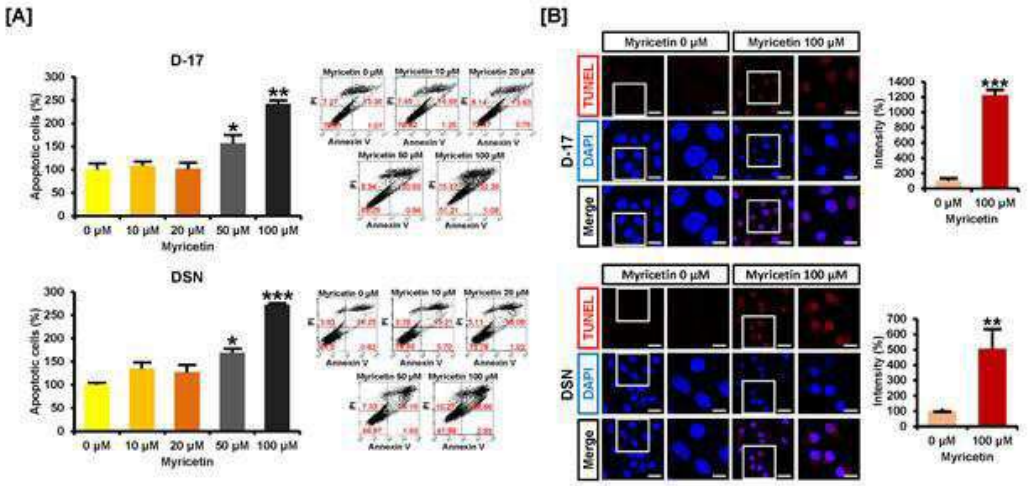
[0090] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

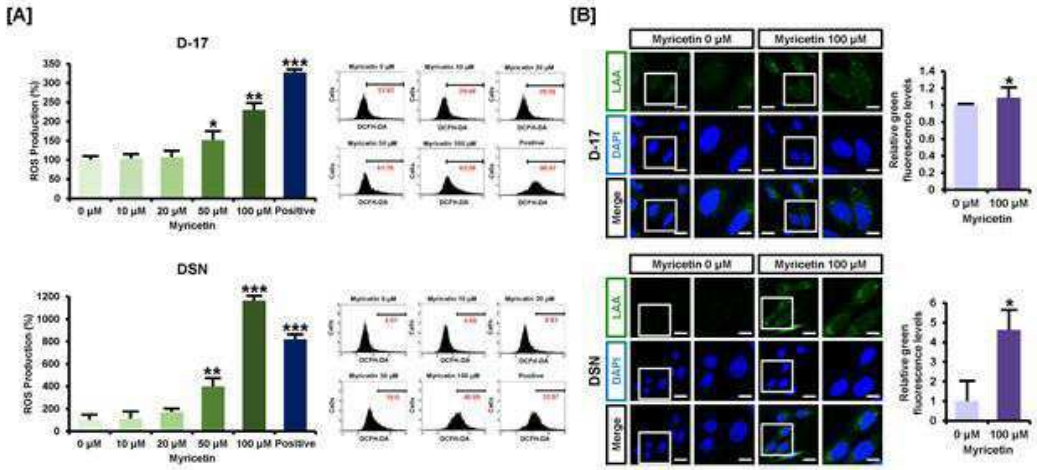
도면1


[A]
D-17
Cell proliferation (%)
0 μM 5 μM 10 μM 20 μM 50 μM 100 μM
Myricetin
DSN
[B]
Myricetin 0 μM
Myricetin 100 μM
PCNA
DAPI
Merge
D-17
DSN
Intensity (%)
0 μM 100 μM
Myricetin

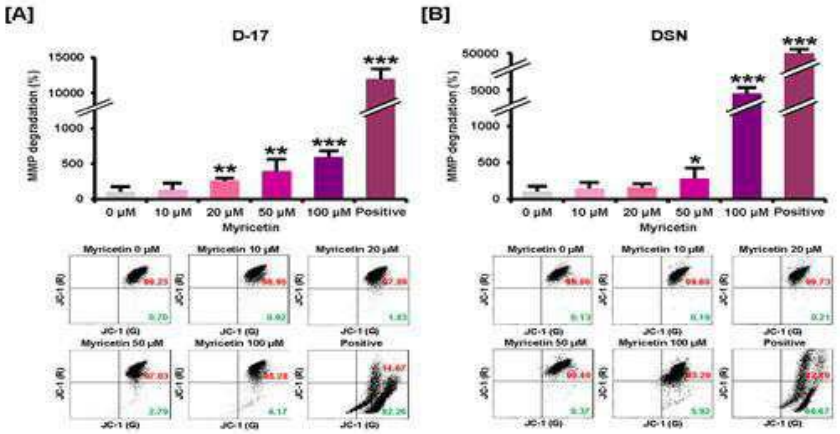
도면2


[A]
D-17
Apoptotic cells (%)
0 μM 10 μM 20 μM 50 μM 100 μM
Myricetin
Annexin V
DSN
[B]
Myricetin 0 μM
Myricetin 100 μM
TUNEL
DAPI
Merge
D-17
DSN
Intensity (%)
0 μM 100 μM
Myricetin

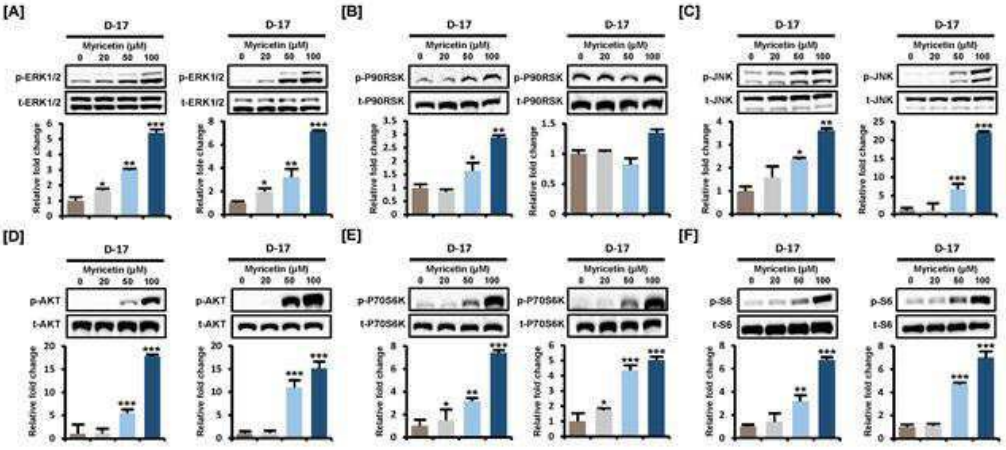
도면3


[A]
D-17
ROS Production (%)
0 μM 10 μM 20 μM 50 μM 100 μM Positive
Myricetin
DSN
[B]
Myricetin 0 μM
Myricetin 100 μM
D-17
DSN
LAA
DAPI
Merge
Relative green fluorescence levels
0 μM 100 μM
Myricetin

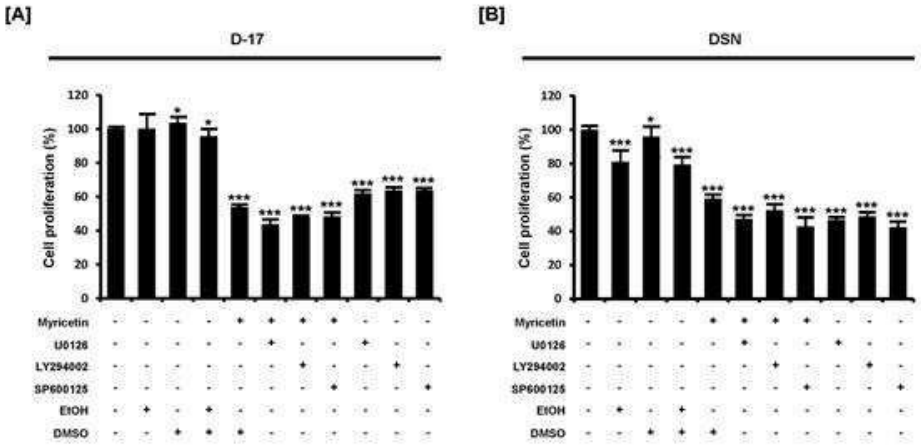
도면4


[A]
D-17
MMP degradation (%)
0 μM 10 μM 20 μM 50 μM 100 μM Positive
Myricetin
[B]
DSN
Myricetin 0 μM
Myricetin 10 μM
Myricetin 20 μM
Myricetin 50 μM
Myricetin 100 μM
Positive
JC-1 (R)
JC-1 (G)

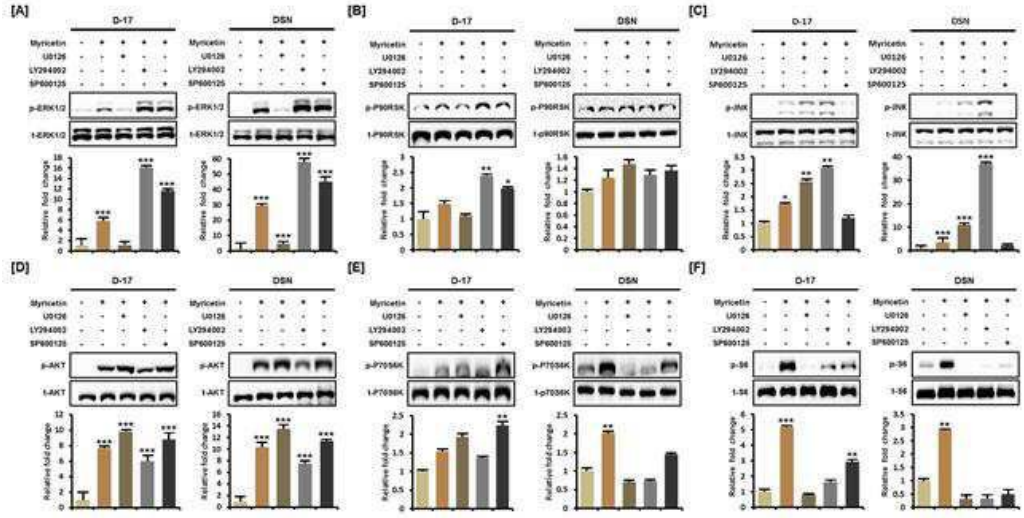
도면5


[A]
[B]
[C]
[D]
[E]
[F]
D-17
Myricetin (μM)
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-P90RSK
t-P90RSK
p-JNK
t-JNK
p-AKT
t-AKT
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
Relative fold change

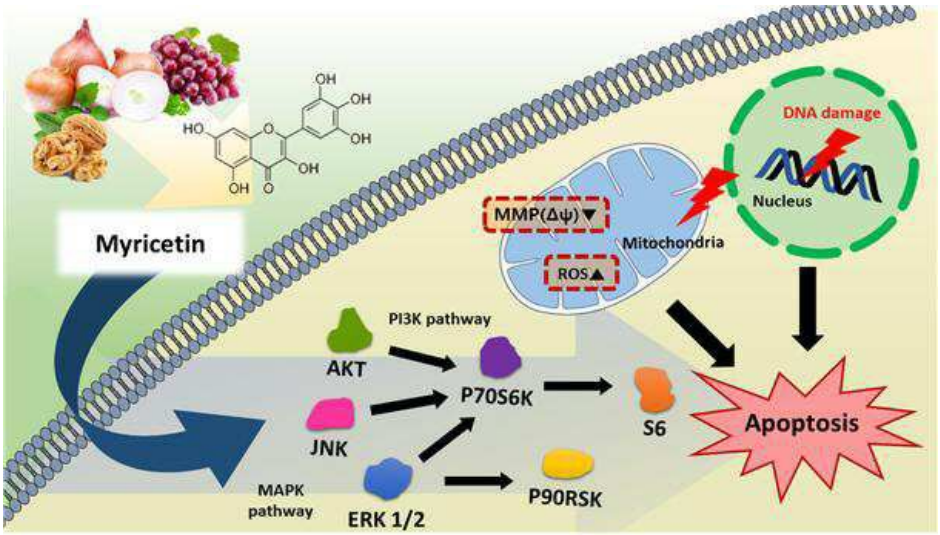
도면6


[A]
D-17
[B]
DSN
Cell proliferation (%)
Myricetin
U0126
LY294002
SP600125
EtOH
DMSO

도면7


[A]
[B]
[C]
[D]
[E]
[F]
D-17
DSN

도면8


Myricetin
DNA damage
Nucleus
MMP(Δψ)▼
Mitochondria
ROS▲
PI3K pathway
AKT
P70S6K
S6
Apoptosis
JNK
MAPK pathway
ERK 1/2
P90RSK