(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0036412
(43) 공개일자 2011년04월07일

(51) Int. Cl.
A61K 31/357 (2006.01) *A61K 36/03* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0094069
(22) 출원일자 2009년10월01일
심사청구일자 2009년10월01일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
장췐
부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단
이용
부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단
김세권
부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트 125동 1402호
(74) 대리인
이덕록

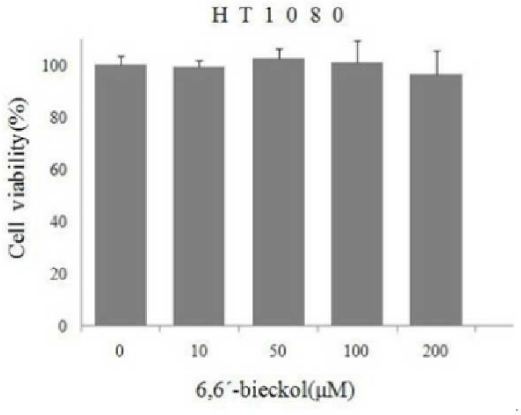
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 감태 유래 6,6 '-비엑콜을 함유하는 항암 조성물

(57) 요 약

본 발명은 해양 천연 산물인 감태로부터 유래된 플로로탄닌 화합물인 6,6 '-비엑콜을 유효성분으로 함유하여 암의 증상을 완화시킬 수 있는 항암용 약제학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 감태 유래 6,6 '-비엑콜은 NF-κB를 하향조절함으로써 MMP-2 및 MMP-9 발현의 저해제로서 작용하여 암의 증상을 완화시키는 약물로서 효과가 있다.

대 표 도 - 도1

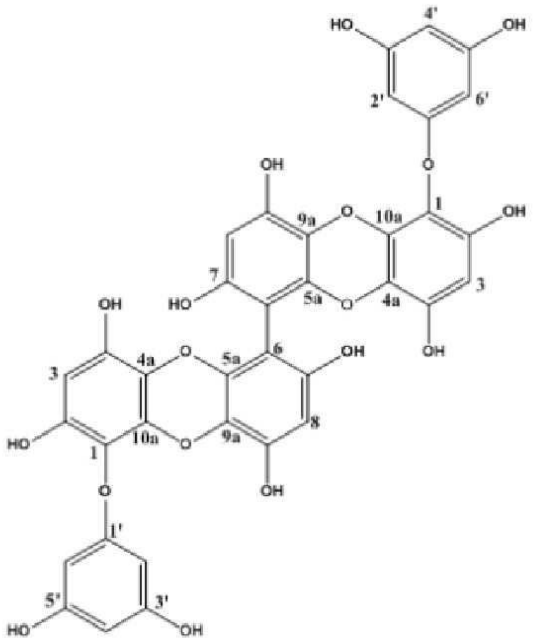


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 6,6 '-비엑콜을 유효성분으로 함유하는 항암용 약제학적 조성물.

<화학식 1>



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 6,6 '-비엑콜이 감태로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 항암용 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 6,6 '-비엑콜이 NF-κB를 하향조절함으로써 MMP-2 및 MMP-9 발현을 저해하는 것을 특징으로 하는 항암용 약제학적 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 감태 유래 6,6 '-비엑콜을 함유하는 항암 조성물에 관한 것으로 보다 구체적으로는 해양 천연 산물인 감태로부터 유래된 플로로탄닌 화합물인 6,6 '-비엑콜을 유효성분으로 함유하여 암의 증상을 완화시킬 수 있는 항암용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암에 의한 사망에 관계되는 주요 메카니즘은 이동 및 침습으로, 여기서 2차 종양이 야기된다. 암 세포가 침습하여 이동하면, 다수의 단백질분해 효소가 세포외 메트릭스(extracellular matrix; ECM) 및 기저 멤브레인과 같은 환경 장벽의 분해시킨다(Pasco et al. 2005). 메트릭스 메탈로프로테이나제(Matrix metalloproteinases; MMP)는 공통 구조 영역을 공유하는 일군의 아연-함유 엔도펩티다아제로서, 암의 침습성 성장, 전이 및 혈관신생에 필수적인 세포외 메트릭스를 분해하는 주요 효소이다(Johnson et al. 1998; Woessner et al. 1991; Baker et al. 2002; Tanimura et al. 2005; McCawley et al. 2000; Ashley 1999). 모든 MMP는 불활성 효소원으로서

생성되고 프로테이나제 분열에 의해 활성화된다(Schmalfeldt et al. 2001). 통상적인 생리학적 조건하에서, MMP의 활성은 정확하게 조절되지만, 병리적 환경, 특히 악성 종양에서 MMP의 활성이 통제되지 않으며, 이들의 발현이 종종 좋지 않은 예후와 관계된다(Sen et al. 2009; Das et al. 2008). MMP 중 MMP-2 및 MMP-9는 다양한 악성 종양에서 많이 발현되며, 종양 침습 및 전이에 결정적인 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다(Westermarck et al. 1999; John et al. 2001). 따라서 MMP, 특히 MMP-2 및 MMP-9의 발현 및 활성을 저해할 수 작용제가 임상적 이용에 있어 커다란 잠재력을 가질 수 있다,

[0003] 최근 들어, 합성된 고활성 화합물을 이용한 합리적 약물 디자인에 대한 현저한 발전이 이루어지고 있다. 그러나 천연 공급원은 아직까지 생활성 주요 화합물 및 이들의 유도체에 대한 고가의 공급원으로 알려져 있다. 지금까지 20,000 종 이상의 새로운 화합물이 해양 유기체로부터 분리되었고, 이들로부터 상당한 수의 자연 발생 유도체가 약제학적 용도를 위한 잠재적인 후보군으로 개발되었다(Yuan et al. 2006). 플로로탄닌은 2차 대사체로 다양한 식물에 분포되어 있다. 이들은 in vivo 및 in vitro에서 다양한 생물학적 기능, 예를 들어, 항산화, 항-HIV, 항종양 및 항염증 기능을 갖는 플로로글루신 유도체이다(Kim et al. 2008; Artan et al. 2008). 해양 조류 감태에서 유래된 6,6-비엑콜은 중요한 플로로글루신의 유도체로서 MMP의 발현을 저해할 수 있으나, 널리 연구되어진 바는 없다(Kang et al. 2004; Kim et al. 2006).

[0004] 본 발명에서는 6,6 '-비엑콜이 MMP의 발현을 저해한다는 사실을 밝혀내고, HT1080 세포주의 생존력 및 거동에 대한 영향을 조사하였으며, 또한 HT1080 세포주에서 MMP 발현의 하향조절 메카니즘을 조사하고 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

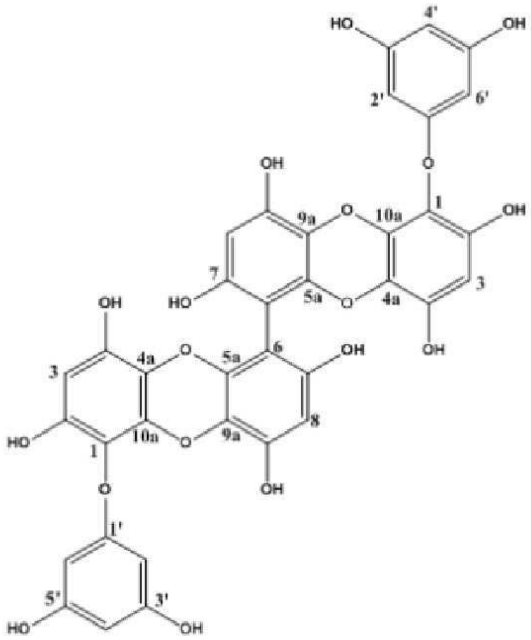
[0005] 따라서 본 발명의 목적은 감태 유래 6,6 '-비엑콜을 함유하는 항암용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0006] 상기와 같은 본 발명의 목적은 식용 해양 갈조류 감태(*Ecklonia cava;* EC)에서 6,6 '-비엑콜을 고수율로 수득하고, 각각의 분자 메카니즘 하에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현 및 인간 섬유육종세포주(HT1080)의 형태학적 변화에 대해 6,6 '-비엑콜을 분석함으로써 달성되었다.

[0007] 본 발명은 하기 화학식 1의 6,6 '-비엑콜을 유효성분으로 함유하는 항암용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0008] <화학식 1>



[0009]

[0010] 상기 본 발명에 따른 6,6‘-비엑콜은 감태로부터 유래된 것임을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명에 따른 6,6‘-비엑콜 함유 항암용 약제학적 조성물은 NF-κB를 하향조절함으로써 MMP-2 및 MMP-9 발현을 저해하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명에 있어서, "유효성분"이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능, 효과가 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0013] 본 발명의 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 약학 조성물의 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0015] 6,6-비엑콜은 다양한 in vitro 및 in vivo 생물학적 기능, 예를 들어, 항산화, 항종양 및 항염증 기능을 갖는 플로로글루시놀 유도체로서, 본 발명자들에 의해 발견되었다. 본 발명에서는 세포 생존력에 대한 6,6‘-비엑콜의 영향을 평가하기 위해, HT1080 세포주에 대하여 MTT 세포 생존력 분석을 수행하였고(도 1 참조), 그 결과 6,6’-비엑콜은 200 μM 이하의 농도에서 세포 생존력에 영향을 미치지 않았다. 또한, 스크래피 상처-치유 이동 분석(scratch wound-healing motility assay)으로 HT1080 세포주의 이동성에 대한 6,6‘-비엑콜의 영향을 측정하였고, 시험된 6,6’-비엑콜은 상처 공간 전역에서 HT1080 세포주의 이동을 용량의존적 방식으로 저해하였다(도 2 참조).

[0016] 본 발명에서는 3D I형 콜라겐 겔 세포 배양 시스템(3D type I collagen gel cell culture system)을 이용하여 HT1080 세포주의 조직화에 대한 6,6‘-비엑콜의 영향을 조사하였다. 3D 시스템은 암 세포 in vivo 상태에 근접한 환경을 제공한다. 48 시간 후, HT1080 세포주는 방사선 구조를 형성하였고, 콜라겐 메트릭스 내로 이동하였다, 그러나 6,6-비엑콜 처리가 세포주의 발아(sprouts) 수 및 길이를 현저히 감소시켰다(도 3 참조). 웨스턴 블롯 및 자이모그래피의 결과에 따르면, 6,6-비엑콜은 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 용량의존적 방식으로 저해할 수 있다(도 4 및 5 참조). 또한, AP-1 및 NF-κB 경로에서, 6,6-비엑콜은 NF-κB(p65)를 용량의존적 방식으로 저해하나, AP-1 발현에 대하여는 명확한 효과를 보이지 않았다(도 6 참조).

[0017] MMP는 일군의 아연-의존성 엔도펩티다아제로서 많은 생리학적 및 병리학적 과정에 관여한다. MMP의 저해와 활성화 사이의 불균형은 골관절염, 류마티스 관절염, 종양 전이, 심혈관 질환 및 충혈성 심장 손상과 같은 질환의

병상과 관련이 있다(Spinale et al. 1999; Yoshihara et al. 2000 Stricklin et al. 1983). 현재 이러한 질환들을 치료하기 위한 MMP 저해제의 탐색에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. MMP 저해제는 몇몇 생화적 위치에서 MMP를 조절할 수 있으나, 이들 대부분은 효소의 활성을 직접적으로 저해한다. 하지만, MMP 발현 수준을 저해할 수 있는 화합물들이 치료적 개재에서 매력적인 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다.

[0018] 본 발명에서는 MMP 연구 모델로 일반적으로 사용되고 있는 HT1080 세포주를 선택하여 MMP-2 및 MMP-9 발현에 대한 6,6‘-비엑콜의 효과를 분석하였다. 이를 위하여, 선택된 농도(0200 μM)의 6,6’-비엑콜로 배양된 HT1080 세포주를 처리하고, 극히 강력한 종양 유발인자(PMA)로 MMP-2 및 MMP-9 발현을 유도하였다. 종래의 몇몇 연구에서 PMA가 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 유도할 수는 있느나 MT1080 세포주에서 MMP-2의 발현 수준이 MMP-9에서 보다 느리다는 사실을 보여주었다(Yoon et al. 2002). MMP-2 및 MMP-9 유전자의 유발 위치에서, 유전자 발현을 조절하는 전사 인자에 대한 몇몇 추정 결합 위치가 존재한다. 이 유발인자는 출발 위치에서 -79 상부에 AP-1 결합 교감 위치를 포함하고, 추가의 상부에 또 다른 AP-1 결합 위치, AP-2 및 NF-κB 결합 위치를 포함하는 조절 요소 클러스터가 존재한다. 하지만 일반적으로 MMP-9 전사는 주로 AP-1을 통해 조절된다고 알려져 있다(Moon et al. 2004; Rajapakse et al. 2006). 또한 몇몇 염증성 또는 다른 병리적 증상 하에서, MMP-2 및 MMP-9 전사는 상이한 신호 경로를 통해 NF-κB에 의해 조절될 수 있다(Yan et al. 2001). 흥미롭게도, 6,6‘-비엑콜은 MMP-2 및 MMP-9 유전자 발현에서 관찰된 것과 유사한 용량의존적 방식으로 NF-κB 유전자 발현을 저해하였다. 하지만 MMP-2 및 MMP-9와는 다르게, 6,6’-비엑콜은 AP-1 발현에 대해서는 유의적인 영향을 끼치지 못하였다. 사실, 현재 MMP-2 및 MMP-9의 발현에 대한 NF-κB와 AP-1의 상대적인 연관성은 명확하게 확인된 바 없다. 따라서 6,6'-비엑콜에 의해 NF-κB 뿐만 아니라 AP-1 저해의 중요성에 대한 특정 결론을 도출하기는 곤란하다(Fujisaki et al. 2007; Lee et al. 2006). 이러한 현상은 독특한 화학 구조를 갖는 6,6‘-비엑콜에 의해 기인된 것일 수 있다.

[0019] 지금까지, 도입한 임상적 시험에 도입된 MMP 저해제는 합성 물질로, 이들의 바람직하지 않은 부작용으로 인해 임상적 시험이 실패하게 되었다(Overall and L´opez-Ot´ın, 2002). 한편, 대양은 놀랄만한 생물학적 및 약제학적 활성을 갖는 천연 산물의 보고로서, 지구상의 동물 및 식물 중 약 80%가 대양에서 발견되고 있으며, 다양한 해양 박테리아가 5천만 내지 1억 종에 이를 수 있다. 따라서 최근 들어 해양 천연 산물 유래 이상적인 MMP 저해제에 관심이 주목되고 있다. 최근 보고된 광폭 생활성 스펙트럼을 이용한 6,6‘-비엑콜에 대한 지속적인 연구를 통해, 6,6’-비엑콜이 MMP 및 세포 형태에 대하여 잠재적인 활성을 보유한다는 사실을 보여주었다. 상기 이유들은 시험된 6,6‘-비엑콜의 구조적 특성을 바탕으로 논의되어야 할 것이다. 시험 화합물의 독특한 골격으로 기인하여 구조-활성 관계(structure-activity relationship; SAR)를 기술할 수 있었다. 우선, 화학구조에 존재하는 하이드록실기 요소가 플로로글루시놀 단위의 중합도를 보다 높이기 때문에 중요한 역할을 할 것이고, 두 번째로 플로로글루시날 중 O-브리지 결합(에테르 결합)이 보다 많은 자유 음이온을 공여하여 원인이 되는 수용체를 공격한다.

[0020]

효 과

[0021] 본 발명에 따른 감태 유래 6,6‘-비엑콜은 NF-κB를 하향조절함으로써 MMP-2 및 MMP-9 발현의 저해제로서 작용하며, 이러한 MMP-2 및 MMP-9의 저해는 HT1080 세포주의 이동 및 3D 배양에 대한 6,6‘-비엑콜의 억제에 의한 메카니즘 중 하나일 수 있기 때문에 본 발명에 따른 6,6’-비엑콜은 암의 증상을 완화시키는 약물로서 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0022] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0023] **실시예**

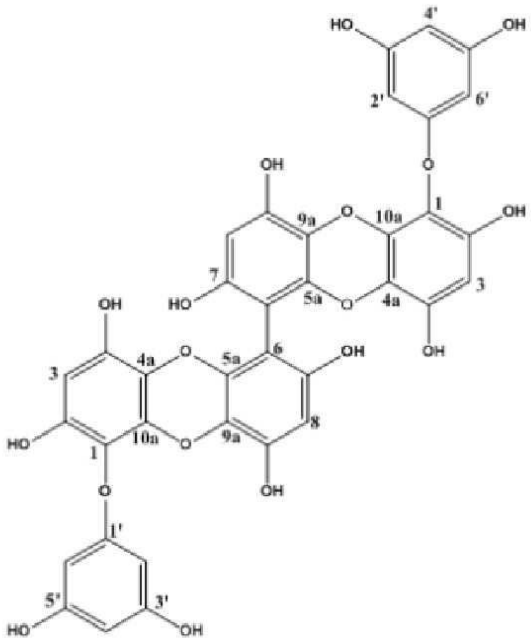
[0024] ^{1}H NMR (400 MHz) 및 ^{13}CNMR(100MHz) 스펙트럼을 내부 참조 표준 물질로서 DMSO-d_6 용매 피크(^{1}H NMR에서 2.50

ppm 및 ^{13}CNMR에서 39.5ppm)를 이용하여 JEOL JNM-ECP400 NMR 분광계(JEOL,Japan)에 기록하였다. 몇가지 신호에 대하여, 화학적 이동을 소수 셋째자리까지 어림하였다. 이는 매우 근사한 수치의 신호들을 구분하기 위한 것이나, 그럼에도 불구하고 이는 스펙트럼의 시각적 조사에 의해 명확하게 구별할 수 있다. JEOL JNM-700 분광계(JEOL,Japan)에서 MS 스펙트럼을 얻었다. EC의 추출은 추출 유닛(Extraction Unit; Dongwon Scientific Co., Korea)를 사용하여 수행하였다. 실리카겔 60(silica gel 60; 230-400 mesh, Merck, Germany), 세파덱스 LH-20(Sephadex LH-20; Sigma, St. Louis, MO)으로 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 박막 크로마토그래피(Thin-layer chromatography; TLC)는 프리코티드 머크 키에셀게 $160F_{254}$ 플레이트((precoated Merck Kieselge $160F_{254}$ plates; 0.25mm) 상에서 수행하고, TLC 플레이트 상의 스팟을 전개 용매 시스템으로 $CHCl_3$/MeOH/H_2O/아세트산(65:25:4:3,v/v/v/v)를 이용하여 UV 램프(254 및 365nm) 하에서 검출하였다. 바닐린-H_2SO_4를 페놀 화합물에 대한 검출 시약으로 사용하였다. 본 발명에서 사용한 모든 용매 및 화학물질은 화학물질 공급원에서 공급된 시약 등급의 것들을 사용하였다.

[0025] **실시예 1 : 감태로부터 6,6‘-비엑콜의 추출, 분리 및 정제**

[0026] 해양 식용 갈조류 감태를 대한민국 제주도 해안에서 2004년 10월부터 2005년 3월에 걸쳐 수집하였다. 신선한 감태를 물로 3회 세척하여 염분을 제거하였다. 동결건조한 감태를 추출하기 위해 분쇄하여 분말화하였다. 건조한 감태 분말(10kg)을 10일 동안 MeOH(3 x 5L)로 교반 추출 유닛에 의해 추출하였다. 감태 추출물(273g)을 물에 현탁시키고, n-헥산(35.92g), CH_2Cl_2(20.49g), EtOAc(24.87g), *n*-BuOH(106g)을 사용하여 순차적으로 분획하였다. 인간 세포에 대하여 가장 강력한 항-알러지 활성 EtOAc 분획(24.87g)을 헥산/EtOAc/MeOH(구배)으로 용출시키는 실리카겔 플래쉬 크로마토그래피 처리하여 10 개의 하위 분획(F1-F10)을 수득하였다. 상기 하위 분획 중 F6을 MeOH만을 이용하는 세파덱스 LH-20로 추가 정제하여 하기와 같은 화학식 1의 플로로탄닌, 6,6‘-비엑콜(127.51mg)을 수득하였다.

[0027] <화학식 1>



[0028]

[0029] 6,6′ -비엑콜 : 연갈색 분말(동결건조), ^{1}HNMR(DMSO-d_6,400 MHz) δ 9.29 (1H, s, OH-9), 9.16 (2H, s, OH-3′ , 5′), 9.15 (1H, s, OH-2), 9.09 (1H, s, OH-4), 8.65 (1H, s, OH-7), 6.09 (1H, s, H-3), 6.05 (1H, s, H-8), 5.80 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-4′), 5.75 (2H, d, J = 2.2 Hz, H-2′ , 6′), ^{13}CNMR data, δ_C in ppm 123.5 (s, C-1), 145.4 (s, C-2), 97.7 (d, C-3), 141.4 (s, C-4), 121.9 (s, C-4a), 141.3(s, C-5a), 99.7(d, C-6),151.3(s, C-7), 97.8(d, C-8), 144.5(s, C-9), 122.7(s, C-9a), 137.2(s, C-10a), 160.4(s, C-1

′), 93.7 (d, C-2′), 158.8 (s, C-3′), 96.1 (d, C-4′), 158.8 (s, C-5′), 93.7 (d, C-6′); LREIMS *m/z*743.12[M]$^{+}$.

[0030] **실험예**

[0031] ATCC(American Type Culture Collection)에서 입수한 HT1080 인간 섬유육종세포를 공기 중 37℃에서 5% 이산화탄소 중에 열-불활성 FBS(heat-inactivated fetal bovine serum; Gibco) 없이 100 U/mL 페니실린, 100 mg/mL 스트렙토마이신이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco) 배지에서 일반적으로 배양하였다. 실험을 위하여, 세포를 5 회 이상 계대배양하고, 트립신-EDTA로 분리하였다.

[0032] 모든 데이터는 평균±표준편차로 나타내었다. 스튜던츠 t-테스트를 이용하여 P<0.05에서 유의성을 측정하였다.

[0033]

[0034] **실험예 1 : 세포생존력 분석(MTT 분석)**

[0035] HT1080 세포주를 96-웰 플레이트 중 10% FBS를 함유한 200㎕ DMEM 배지에 1×10^{3}cells/well 밀도로 접종하였다. 접종한 지 24 시간 후, 배지를 제거하고 세포를 다양한 농도의 6,6′-비엑콜의 부재 또는 존재하에 1% FBS 함유 DMEM 배지로 2일 동안 배양하였다. 2일 후, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)(0.5mg/mL 최종 농도) 용액을 각 웰에 가하고, 5% 이산화탄소 중에 37℃에서 추가로 4 시간 동안 배양하였다. 이어서, 마이크로플레이트 리더기(ELX800, Biotek, USA) 상에서 시험 파장 490 nm 이상으로 흡수능을 측정하였다.

[0036] 도 1에 나타낸 바와 같이, 다양한 농도(0-200 ㎛M)의 6,6′-비엑콜을 사용하여 2일 동안 세포의 생장을 비교하였다. 모든 농도의 6,6'-비엑콜에 대한 수치는 대조구(6,6′-비엑콜 처리하지 않음)의 수치와 유사하였으며, 이는 세포 생존력은 상기 농도 범위 (0-200 ㎛M)에 영향받지 않았음을 지시하는 것이다.

[0037]

[0038] **실험예 2 : 상처 회귀 분석(*Wound migration assay*)**

[0039] 상기와 같이, 6,6'-비엑콜은 시험농도(0-200 ㎛M)에서 유의적인 세포독성을 나타내지 않았고, 200 ㎛M 농도에서 세포는 96%의 세포 생존력을 나타내었다. 따라서, 세포를 0-100 ㎛M 농도 범위의 6,6′-비엑콜로 처리하고 후속 실험을 수행하였다.

[0040] 종래의 방법((Lee et al. 2006))에 따라 세포 회귀 분석을 수행하였다. HT1080 세포주를 6-웰 플레이트 셀에 접종하였다. 배양 접시에 80% 컨플루언스로 도말된 셀 상에 손상 라인이 1 mm 폭 첨단으로 형성되기 전에 상기 셀을 미토마이신 C (25 ㎍g/ml)로 30 분 동안 전처리 한 후, PBS로 세척하였다. 상기 셀을 24 시간 동안 상이한 농도의 6,6′-비엑콜의 존재 하에 무혈청 배지로 옮겼다. 상기 결과를 현미경(IX-51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

[0041] 6,6′-비엑콜이 종양 이동을 저해하는지 여부를 조사하기 위하여, 6,6'-비엑콜 처리된 HT1080 세포주에 대한 상처 이동 분석을 수행하였다.

[0042] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 6,6′-비엑콜이, HT1080 세포주가 상처입은 공간을 전역으로 이동하는 것을 용량의존적 (0-100 ㎛M) 방식으로 저해하였음이 관찰되었다.

[0043] **실험예 3 : HT1080 세포주의 3차원(3D) 배양**

[0044] 3D 배양 모델을 종래의 방법(Frisk et al. 2005; Frisk et al. 2007; Hotary et al. 2003)으로 확립하였다. 간략하게, HT1080 세포주(1.5×10^{3})를 I형 콜라겐 및 1/5 배수 5XDMEM의 중화 용액(200㎍g/mL)에 현탁시켰다. 다양한 최종 농도의 6,6′-비엑콜을 함유한 세포 현탁액을 24-웰 플레이트에 가하고, 겔화될 때까지 37℃로 보관하였다. 이어서, 상기 플레이트를 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 상기 결과를 현미경(IX-51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

[0045] 상기와 같이 3D 시스템에서 배양된 세포의 거동 및 형태는 2D 시스템에서 관찰된 것과 매우 상이하다. HT1080

세포주에 대한 6,6‘-비엑콜의 효과를 조사하기 위하여, 다양한 최종 농도의 6,6’-비엑콜에 현탁된 동일한 밀도의 세포를 3D 콜라겐 겔에 접종하였다. 48시간 후, 대조구(6,6-비엑콜 처리하지 않음)는 겔에서 뻗어 나와 많은 분지되고 연장된 구조의 I형 콜라겐 매트릭스를 형성하였다(도 3A 참조). 반면, 5 μM 농도의 6,6‘-비엑콜로 처리된 세포의 분지 구조는 감소되었고(도 3B 참조), 6,6’-비엑콜의 농도가 100 μM까지 증가되면, 분지된 구조가 사라졌으며(도 3E 참조), 세포가 구형으로 변하였다. 이러한 결과는 6,6‘-비엑콜이 3D 배양 조건에서 세포의 모양과 형태에 영향을 미쳤음을 나타내는 것이다.

[0046] **실험예 4 : 젤라틴 자이모그래피**

[0047] 6,6‘-비엑콜이 MMP-2 및 MMP-9의 단백질 수준을 저해할 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, 젤라틴 자이모그래피 분석을 수행하였다.

[0048] 젤라틴 자이모그래피를 이용하여 6,6‘-비엑콜 처리 HT1080에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현 및 활성을 측정하였다. 이를 위하여, HT1080 세포주를 무혈청 배지를 이용한 24-웰 플레이트에 접종하고, 다양한 농도의 6,6’-비엑콜로 1 시간 동안 전처리하였다. PMA(10 ng/mL)로 처리하여 MMP의 발현을 촉진시키고, 추가로 48시간 동안 배양을 지속하였다. 배양 후, 컨디셔닝된 배지를 수집하고, 그들의 단백질 함량을 브래드포드 단백질 측정 방법으로 측정하였다. 배양 상등액을 62.5mM TrisHCl(pH6.8), 10% 글리세롤, 2% SDS, 및 0.00625%(w/v) 브로모페놀 블루를 함유한 시료 완충액에 재현탁시키고, 끓이지 않고 0.1%(w/v) 젤라틴 함유 10%(w/v) 아크릴아미드 겔 중에 적재하였다. 전기영동 후, 상기 겔을 1 시간 동안 2.5%(v/v) 트리톤 X-100에서 세척하여 SDS를 제거한 후, 37℃에서 36시간 동안 배양 완충액(50mM Tris-HCl(pH7.5), 0.15M NaCl, 10mM $CaCl_2$, 및 1μM$ZnCl_2$)에서 배양하여 젤라틴 기질을 단백질 분해시켰다. 활성에 상응하는 밴드를 쿠마씨 블릴리언트 블루 R-250(Coomassie Brilliant blue R-250; Bio-Rad,Richmond,CA)를 사용하여 음성 염색으로 시각화하고, 사전염색된 SDS-PAGE 마커와 MMP 표준물질(Chemicon)(Jackson et al. 2009)을 참고로 하여 분자량을 산정하였다.

[0049] 도 4에 나타낸 바와 같이, 6,6‘-비엑콜 처리 세포에서 MMP-2 및 MMP-9에 대한 단백질 발현이 명확하게 저해되었다. 6,6’-비엑콜 처리에 의한 MMP-2 및 MMP-9 발현의 하향조절이 용량의존적 방식으로 관찰되었다.

[0050] 도 5에 추가로 나타낸 웨스턴 블롯 분석 결과, 6,6‘-비엑콜에 의해 MMP-2 및 MMP-9 단백질 발현이, 상기 자이모그래피 분석 결과와 다소 유사한 방식으로, 저해되었다.

[0051] 또한 MMT 세포 생존력 분석에 따르면, 상기의 농도 범위가 세포융화성(cytocompatible)이었으며, 이들 MMP-2 및 MMP-9 저해가 세포독성적 영향에 기인한 것이 아님이 밝혀졌다.

[0052] **실험예 5 : 웨스턴 블롯 분석**

[0053] 상기 단백질 발현의 하향조절을 분석하고, 활성제 단백질-1(activator protein-1; AP-1)과 NF-κB(nuclear factor-kappa B)의 발현에 대한 6,6‘-비엑콜의 영향에 있어 가능한 메카니즘을 구현하기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0054] HT1080 세포주를 다양한 농도의 6,6‘-비엑콜로 처리하거나 처리하지 않은 후 PMA로 촉진시키고, 인산분해효소 저해제와 단백질분해효소 저해제 함유 1% 노니데트(Nonidet) P-40 용리 완충액으로 용리시켰다. 용리물을 원심분리하고, 상등액을 10% SDS-폴리아크릴아므드 겔 전기영동에 의해 분리하고, 단백질을 PVDF 멤브레인(Millipore, Bedford, MA)으로 전기이동시키고, PVDF 멤브레인을 PBS에서 0.2% 트윈-20중의 10% 탈지 우유로 블록킹시키고, 1차 항체로 1 시간 동안 배양하고, PBS에서 0.2% 트윈-20으로 세척한 후, HRP-연결 2차 항체로 배양하였다. DAB 시약을 사용하여 면역반응성 단백질을 시각화하였다.

[0055] 도 6에 나타낸 바와 같이, 6,6‘-비엑콜은 AP-1 발현의 명확한 억제 효과를 나타내지 않았다. NF-κB 전사 패밀리 단백질은 몇 가지 단백질 서브유니트로 이루어져 있고, 이들 중 전이활성 영역을 포함하는 p65 서브유니트는 유전자 유도에 필요하다. 따라서, 6,6’-비엑콜 처리 후 NF-κB (p65) 단백질의 발현을 조사하였다. 그 결과 NF-κB (p65) 의 수준이 용량의존적 방식으로 감소함이 명확히 밝혀졌다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 HT1080 세포주의 세포 생존력에 대한 실고기 유래 6,6‘-비엑콜의 효과를 나타낸 도이다.

[0057] 도 2는 HT1080 세포주의 이동에 대한 실고기 유래 6,6‘-비엑콜의 효과를 나타낸 도이다.

[0058] 도 3은 HT1080 세포주에 대한 3차원 배양 결과를 나타낸 도로서, (A) 대조군(6,6-비엑콜 처리하지 않음); (B) 5 μM 농도의 6,6-비엑콜; (C) 10 μM 농도의 6,6-비엑콜; (D) 50 μM 농도의 6,6-비엑콜; (E) 100 μM 농도의 6,6-비엑콜.

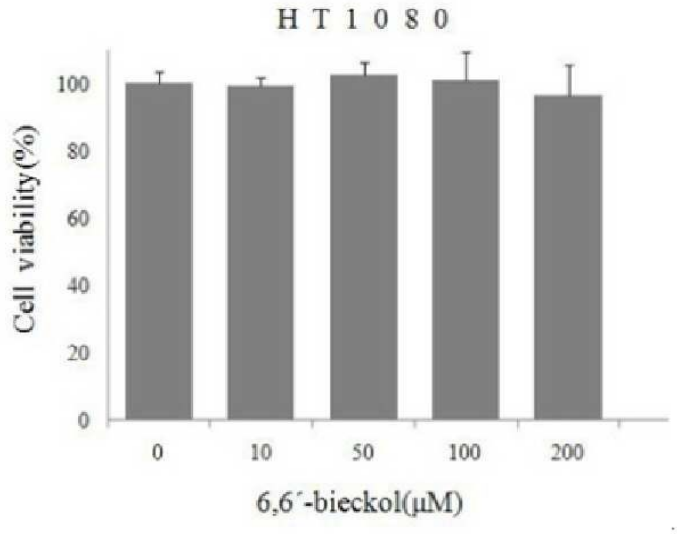
[0059] 도 4는 6,6‘-비엑콜 처리 HT1080 세포주에서 MMP-2 및 MMP-9 활성을 측정한 젤라틴 자이모그래피 결과를 나타낸 도이다.

[0060] 도 5는 웨스턴 블롯 분석을 이용한 HT1080 세포주에서 MMP-2 및 MMP-9 단백질 발현에 대한 6,6‘-비엑콜의 효과를 나타낸 도이다.

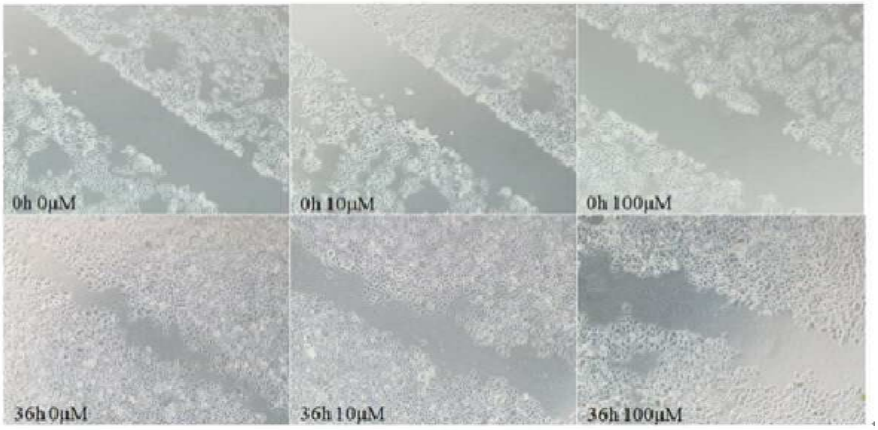
[0061] 도 6는 웨스턴 블롯 분석을 이용한 HT1080 세포주에서 AP-1 및 NF-κB(p65) 단백질에 대한 6,6‘-비엑콜의 효과를 나타낸 도이다.

도면

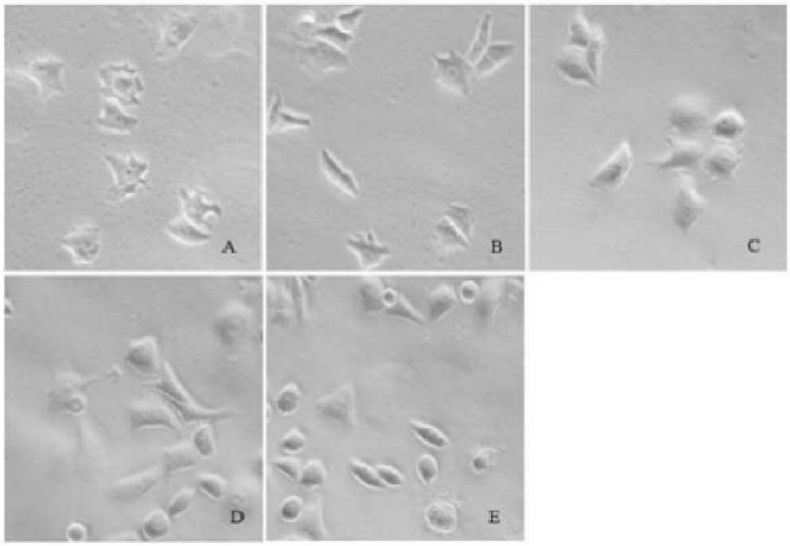
도면1



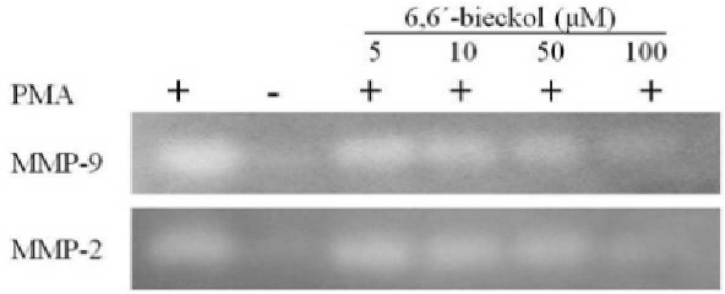
도면2



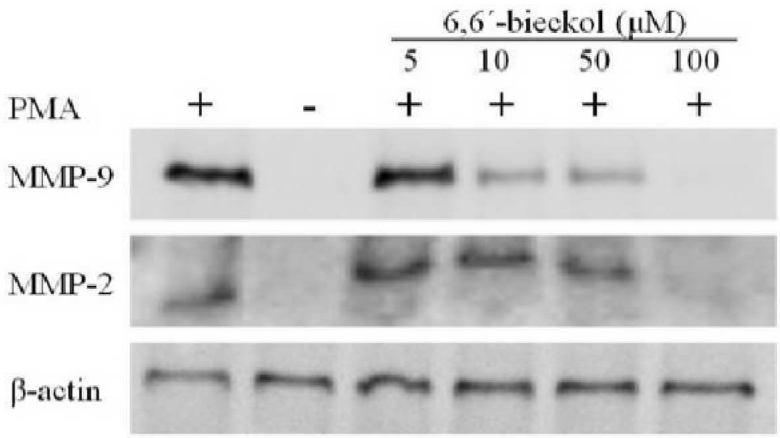
도면3


A
B
C
D
E

도면4


6,6′-bieckol (μM)
5
10
50
100
PMA
+
-
+
+
+
+
MMP-9
MMP-2

도면5


6,6′-bieckol (μM)
5
10
50
100
PMA
+
-
+
+
+
+
MMP-9
MMP-2
β-actin

도면6

