(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0087996
(43) 공개일자 2009년08월19일

(51) Int. Cl.
A61K 31/352 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0013276
(22) 출원일자 2008년02월14일
심사청구일자 2008년02월14일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
김명옥
경남 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호
정봉철
서울 성북구 하월곡동 39-1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

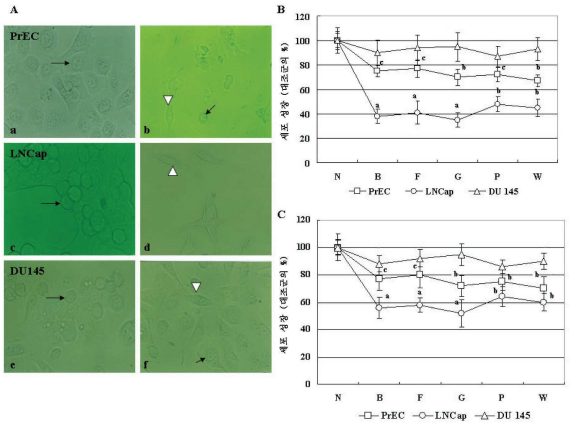
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 인간 안드로겐 민감성 ＬＮＣａｐ 전립선암 세포주에선택적 아폽토시스를 유발하는 항암제

(57) 요 약

본 발명은 초기 전립선암 세포주인 인간 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주에 선택적 아폽토시스를 유발하는 바이칼레인(baicalein), 워고닌(wogonin) 및 글리벡(gleevec)에서 선택된 항암제를 제공한다. 또한 상기 항암제는 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주 내에서 아폽토시스 유발 단백질인 bax 단백질의 발현을 유도함으로서 LNCap 전립선암 세포주를 아폽토시스, 성장 억제시킴을 특징으로 한다.

대 표 도



(72) 발명자

정병화

서울 성북구 하월곡동 39-1

박문석

경남 진주시 가좌동 900

이혜령

경남 진주시 가좌동 900

특허청구의 범위

청구항 1

초기 전립선암 세포주인 인간 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주에 선택적 아폽토시스를 유발하는 바이칼레인(baicalein), 워고닌(wogonin) 및 글리벡(gleevec)에서 선택된 항암제

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주 내에서 아폽토시스 유발 단백질인 bax 단백질의 발현을 유도함으로서 LNCap 전립선암 세포주를 아폽토시스, 성장 억제시킴을 특징으로 하는 항암제

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 항암제는 안드로겐 불감성 DU145 전립선암 세포주에는 항-아폽토시스 유발 단백질인 bcl-2 단백질의 발현을 유도함으로서 아폽토시스 및 성장 억제 효과가 저해됨을 특징으로 하는 항암제

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 초기 전립선암 세포주인 인간 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주에 선택적 아폽토시스를 유발하는 항암제에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 인간 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주에 대해 선택적 아폽토시스 및 성장 억제를 유발하는 바이칼레인(baicalein), 워고닌(wogonin) 및 글리벡(gleevec) 등의 초기 전립선암 치료에 효과적인 항암제에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 전립선암은 해마다 50만 건의 발병률을 지닌 세 번째로 가장 일반적인 남성 암이고 미국에서는 가장 빈번하게 진단되는 남성 암이다. 그러나 아시아에서는 전립선암의 발병률은 유의적으로 낮고 폐암, 위암 및 결장암 발병보다 하위에 존재하나 오늘날 아시아는 전립선암 발병률의 증가 추세를 나타내며 일부 국가에서는 서부 국가 높은 사망률을 나타낸다.

<3> 이러한 악성 종양은 대부분 전립선에서 발생하고 종양이 진행됨에 따라 전립선 주변 조직 또는 정낭 내로 전이된다. 전립선암의 초기 치료는 일반적으로 안드로겐 절제술, 방사선치료 또는 근치 전립샘절제술이고, 환자는 치료 초기에는 안드로겐 절제 치료에 반응하나 후기 단계에서 이들 대부분은 재발성 안드로겐 독립적 전립선암 및 전이로 인해 사망한다.

<4> 그러나 초기 안드로겐 의존적 암에서 안드로겐 불응 또는 독립적 암으로의 전환을 유발하는 메커니즘에 관하여 거의 알려져 있지 않다. 안드로겐은 정상 전립선의 성장을 조절하고 양성 전립선 증식을 증진시키는데 중요한 역할을 한다. 일부 연구자들은 연장된 항-안드로겐 치료가 안드로겐-불감성 전립선 암세포 콜론의 과다 성장을 유발하여 질병의 진행을 가속시킨다고 제안하였다.

<5> 상피 조직 또는 세포의 정상적인 전환은 증식, 이동, 분화 및 아폽토시스와 관련되고, 이는 또한 상피 항상성을 유지시킨다. 세포 분열을 통한 세포 증식과 아폽토시스를 통한 세포 소실간 균형의 교란은 종양 형질전환 및 진행을 생성한다. 그러나 세포 아폽토시스의 역할은 일부 알려져 있지 않고 논쟁의 여지가 있으며 이는 일반적인 검출 방법의 한계에 기인한다.

<6> 대부분의 아폽토시스 자극은 bcl-2, bcl-X_L(아폽토시스의 억제제 또는 저해제), bax, bak(아폽토시스의 증진제 또는 유도제) 등과 같은 세포 사멸의 작용제 및 길항제 모두를 포함한 상동성 단백질 그룹을 암호화하는 bcl-2 유전자 패밀리의 멤버에 의해 조절되는 경로를 통해 진화적으로 보존된 포유류 세포 사멸을 유도한다. 이들 멤버는 차별적으로 조절되나 서열-상동성 도메인을 공유한다. 아폽토시스 상에서 bcl-2 및 bax(bcl-2 단백질과 21% 상동성 공유)와 같은 프로(pro)- 및 항-아폽토시스 패밀리 멤버의 길항 효과는 아폽토시스를 진행하는 세포 감수성을 측정하는 bax에 대한 bcl-2 비율(bcl-2/bax)로 상동- 또는 이형-이량체의 형성에 의해 조절된다.

<7> 전립선 종양 상피 내 bcl-2 단백질의 과발현은 안드로겐 독립적 질병으로의 종양 진행과 연관되고 화학물질 저항성(chemoresistance)을 증가시킴을 나타내었다. 또한 bcl-2/bax 비율이 전립선암 사례에서 치료 반응에 대한 예측 마커임이 알려졌다.

<8> 전립선암에는 일반적이지 않으나 다른 암에서 널리 사용되는 일부 약물의 잠재적 관련성을 증명하기 위해 bcl-2 발현과 bax 발현과 전립선의 아폽토시스 상태뿐만 아니라 암종양으로의 세포 성장과의 상관관계는 규명되어야 한다.

<9> 본 발명에서는 하기 논의된 5가지 다른 항암제를 사용하였다. 이중 3가지는 백혈병, 위장 종양, 혈관 장애 및 간-세포 암종양용으로 유효한 약물이고 한국에서 매우 일반적인 것이고, 다른 2가지는 전세계적으로 전립선암 치료에 잘 알려져 있는 것이다.

<10> 본 발명은 인체 안드로겐 민감성(의존적 또는 반응성으로도 알려짐) LNCap 및 안드로겐 불감성 DU145 전립선 암종 세포주 내 세포 성장 및 생존 상의 이들의 효과를 조사하였다. 아폽토시스 활성은 요오드화프로피듐(PI) 및 아크리딘 오렌지(AO) 형광 염색을 이용하여 가시화되었고 아폽토시스 지수가 계산되었다.

<11> 또한 본 발명은 bcl-2 발현 및 bax 단백질 수치를 조사하였고 세포 성장, 생존 및 아폽토시스의 조절에 가감 역할을 하는 그의 상대 비율(즉 bcl-2/bax 비율)을 계산하였다. 또한 본 발명은 분석의 비교 기준을 생성하기 위해 이들 약물이 배양시 24시간 처리 후 정상 전립선 세포주(PrEC) 내에서 아폽토시스를 유도하는지 여부를 측정하였다.

<12> 이와 같은 전립선암 세포주에 대한 항암제의 아폽토시스 유도, 성장 억제 효과 등을 측정한 결과 상기 항암제들이 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주만을 선택적으로 아폽토시스 유도, 성장 억제시킴을 발견하고 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<13> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 전립선암 세포주에 대한 바이칼레인, 플루타마이드, 파클리탁셀, 워고닌 및 글리벡 항암제의 아폽토시스 유도, 성장 억제 효과 등을 측정하여 상기 항암제들의 전립선암 세포주의 선택성을 규명코자 한 것이다.

과제 해결수단

<14> 본 발명의 목적은 초기 전립선암 세포주인 인간 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주에 선택적 아폽토시스를 유발하는 바이칼레인(baicalein), 워고닌(wogonin) 및 글리벡(gleevec)에서 선택된 항암제를 제공하는 것이다.

<15> 또한 상기 항암제는 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주 내에서 아폽토시스 유발 단백질인 bax 단백질의 발현을 유도함으로서 LNCap 전립선암 세포주를 아폽토시스, 성장 억제시킴을 특징으로 한다.

<16> 한편 상기 항암제는 안드로겐 불감성 DU145 전립선암 세포주에는 항-아폽토시스 유발 단백질인 bcl-2 단백질의 발현을 유도함으로서 아폽토시스 및 성장 억제 효과가 저해됨을 특징으로 한다.

효 과

<17> 본 발명의 효과는 초기 전립선암 세포주에 대한 바이칼레인, 워고닌 및 글리벡 항암제의 아폽토시스 유도, 성장 억제 효과 등의 전립선암 항암 활성 효과를 제공하는 것이다. 또한 상기 항암제들의 초기 전립선암 세포주인 안드로겐 민감성 LNCap 전립선암 세포주에 대한 선택적 아폽토시스 유도, 성장 억제 효과를 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<18> 본 발명은 인간 안드로겐 민감성 LNCap 및 안드로겐 불감성 DU145 전립선암 세포주 내 아폽토시스 억제제 bcl-2 및 아폽토시스 프로모터 bax의 발현에 따른 세포 성장, 생존 및 아폽토시스 상의 5가지 다른 항암제의 효과를 조사하고 정상 전립선 세포주 PrEC와 비교하였다.

<19> 결과는 시험관 내 배양시 30 μM 바이칼레인(baicalein), 5 μM 플루타마이드(flutamide), 0.1 μM 파클리탁셀

(paclitaxel), 80 μM 워고닌(wogonin) 및 10 μM 글리벡(gleevec)으로 24시간 처리 후 LNCap, PrEC 및 DU145 세포주 내에서 각각 적절한 내지 강한 성장 억제, 세포 생존 감소 및 아폽토시스 증가를 나타내었다.

<20> RT-PCR에 의한 bax 및 bcl-2 mRNA의 차별적 발현 및 웨스턴 블럿에 의한 대응 단백질 수치는 파클리탁셀 처리된 LNCap 세포주 내 단백질 발현을 제외하고는 아폽토시스 지수를 확증시켰다.

<21> 약물 처리 후 DU145 세포주에서 bax에 대한 높은 bcl-2의 비율이 수득된 반면 LNCap 세포주 내의 bax에 대한 높은 bcl-2 비율은 약물 처리 후 감소되었다. 따라서 LNCap 세포주 내 약물-의존적 아폽토시스 사멸 및 bcl-2 수치의 감소는 bcl-2에 대한 bax 비율의 강한 증가를 유발하였고, 이는 LNCap 세포주의 약물-의존적 성장 억제 및 세포 생존 저하를 나타낸다.

<22> 초기 임상 전립선암 성장이 안드로겐 의존적이고 이후 안드로겐 불감성으로 전환되기 때문에 안드로겐 민감성 LNCap 세포주 및 불감성 DU145 세포주에 대한 항암제의 아폽토시스 유발 정도를 측정한 본 발명의 결과는 글리벡, 바이칼레인 및 워고닌과 같이 전립선암 치료에 적용되지 않는 약물이 초기 단계의 전립선암 세포주인 안드로겐 민감성 LNCap 세포주에 대해 유망하고 효과적인 항암제로서 적용 가능성을 제시한다.

<23> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<24> 세포 성장을 저해하고 세포 생존을 감소시키는 항암제

<25> 본 발명에서 수행된 모든 실험에서 인간 정상 전립선 세포주 PrEC, 안드로겐 의존적 전립선암 세포주 LNCap 및 안드로겐 불감성 전립선암 세포주 DU145는 30 μM 바이칼레인, 5 μM 플루타마이드, 10 μM 글리벡, 0.1 μM 파클리탁셀 및 80 μM 워고닌으로 처리되었다. 약물 처리 및 비처리시 24시간 후 배양액 내 PrEC, LNCap 및 DU145 세포주의 성장은 도 1A에 나타나 있다.

<26> 세포 성장의 유의적인 저해는 대조군으로 채택된 비처리 정상 세포주와 비교시 LNCap 세포 주 내에서 글리벡(65%), 바이칼레인 (62%), 플루타마이드(59%), 워고닌(55%) 및 파클리탁셀(52%)에 대해 관찰되었다(도 1B). 또한 PrEC 세포주는 세포 성장의 약물-의존적 저해를 나타내었고 동일한 조건 하에서 최대 성장 저해가 워고닌(33%)에서 수득되었고 글리벡(30%), 파클리탁셀(28%), 바이칼레인(25%) 및 플루타마이드(23%) 순으로 나타났다.

<27> DU145 암세포주 내 성장 저해 경향은 다른 2개의 세포주와 비교시 유의적이지 않았다(도 1B). 전체적인 분석은 세포 성장의 약물-의존적 저해가 LNCap 세포주에서 우세하고(성장 저해 범위: 52~65%) 약물 중 글리벡이 더욱 효과적임을 나타낸다(도 1B).

<28> 세포 생존 상의 약물 효과를 측정하기 위해 트립판 블루 염료 배제 에세이가 위상차 현미경을 이용하여 수행되었다. 대조군으로 채택된 각각의 비처리 정상 세포주와 비교시 약물 처리 결과로서 다른 정도의 생존 감소 경향이 암세포주 및 정상 세포주 모두에서 관찰되었다(도 1C). 또한 도 1C에 나타난 바와 같이 LNCap 세포주는 글리벡 처리 후 52%의 최저 세포 생존 및 파클리탁셀 처리 후 64%의 최대 세포 생존을 나타내었다. 동일한 조건 하에서 DU145 세포주 및 PrEC 세포주는 각각 87~95% 및 70~80% 세포 생존을 나타내었다(도 1C).

<29> bax 및 bcl-2의 차별적 발현으로 아폽토시스 지수를 증가시키는 항암제

<30> 형광 신호가 양성 세포의 세포핵 내에서 검출 가능하기 때문에 AO 형광 세포핵이 정상 형태 즉 비처리 염색질 및 분열되거나 분산되고 응축된 염색질을 포함한 아폽토시스 세포핵에 대해 선별되었다. PI 및 AO 에세이는 PrEC, LNCap 및 DU145 세포주 내 염색질 응축 및 세포핵 분절의 발생을 나타내었으나 아폽토시스의 이들 엄격한 형태학적 기준은 안드로겐 민감성 LNCap 세포주 내에서 특히 우세하였다(도 2A).

<31> 아폽토시스 지수는 비처리 정상 세포주와 비교시 글리벡 처리된 LNCap 세포주에서 750%까지 유의적으로 증가된 반면 바이칼레인, 플루타마이드, 워고닌 및 파클리탁셀 처리된 그룹의 아폽토시스 지수는 각각 710%, 650%, 550% 및 455%까지 증가되었다(도 2B). 약물 처리된 PrEC 세포주는 대조군으로 채택된 비처리 정상 PrEC 세포주와 비교시 바이칼레인, 플루타마이드 및 파클리탁셀을 제외하고 워고닌에 대해 205%, 글리벡에 대해 185%까지 아폽토시스 지수 증가를 나타내었다(도 2B). 이와 대조적으로 매우 낮은 반응은 동일한 조건 하에서 아폽토시스 지수가 25~85%까지 증가된 DU145 세포주에서 발견되었다(도 2B).

<32> bcl-2 및 bax이 세포의 사멸을 결정하는 즉 세포가 아폽토시스 사멸을 진행하거나 생존하는지 여부를 결정하는 2개의 중요한 평형 유전자이기 때문에 PrEC, LNCap 및 DU145 세포주 상의 bcl-2 및 bax의 면역형광법이 수행되었다.

<33> 도 3A 및 B는 PrEC, LNCap 및 DU145 세포주 각각에서 아폽토시스 억제제 bcl-2 및 아폽토시스 유도제 bax의 차별적 면역반응을 나타내었다. 각각의 세포주 내 비처리 정상군(대조군)과 비교시 다른 정도의 면역반응이 약물 처리된 군에서 관찰되었고(도 3A, B), 이는 도 2B의 각각의 아폽토시스 지수와 일치하였다. 더욱이 전체 세포 형태는 일반적인 타원형 또는 원형 형태와 비교시 많은 세포가 신장되어 PrEC, LNCap 및 DU145 세포주 내 워고닌, 바이칼레인 및 글리벡 처리 후 정상 세포 형태의 변형을 나타내었다(도 1A, 3A, B). 또한 상기 기술된 바와 같은 약물 처리 조건 하에서 불규칙하고 불균등한 세포 표면이 3개 세포주에서 관찰되었다(도 2A, 3A, B).

<34> 전립선암 세포주 내 bcl-2 및 bax mRNA의 발현을 간섭하는 항암제

<35> 본 발명에서 약물 처리 조건 하에서 아폽토시스 지수의 존재에 따른 프로-아폽토시스성 bax 및 항-아폽토시스성 bcl-2의 차별적 면역반응성이 관찰되었다. 따라서 약물 존재 또는 부재시 24시간 처리 후 PrEC, LNCap 및 DU145 세포주 내 2개의 아폽토시스 조절 유전자인 bcl-2 및 bax의 상대 발현 수치를 측정하기 위해 RT-PCR 분석이 수행된 후(도 4A) 각각의 mRNA 밴드의 농도계측 조사가 제공되었다(도 4B).

<36> 비처리 대조군과 비교시 bax mRNA의 유의적으로 높은 발현이 워고닌(40%), 글리벡(30%) 및 파클리탁셀(20%) 처리된 PrEC 세포주에서 관찰되었다. 바이칼레인 및 플루타마이드의 효과도 통계적으로 유의적이지는 않으나 정상보다 높은 bax mRNA 발현을 유발하였다(도 4B). PrEC 세포주 내 bcl-2 mRNA 수치의 약물-의존적 반응은 비처리 대조군과 비교시 동일한 조건 하에서 플루타마이드를 제외하고 워고닌(50%), 글리벡(38%), 파클리탁셀(24%) 및 바이칼레인(15%)의 처리 후 유의적인 감소를 나타내었다(도 4B).

<37> 항-아폽토시스성 bcl-2 mRNA 발현은 프로-아폽토시스성 bax mRNA 발현보다 비처리 정상 LNCap 세포주에서 더욱 높은 것으로 나타났다(도 4B). 또한 도 4B에 나타난 바와 같이 bcl-2 mRNA 발현은 LNCap 세포주에서 바이칼레인(76%), 플루타마이드(57%), 워고닌(53%) 및 파클리탁셀(47%) 보다 글리벡(84%) 처리 후 유의적으로 감소되었다. LNCap 암세포주 내 bax mRNA 발현의 중간 내지 강한 증가가 통계적 유의성에 도달하지 못한 파클리탁셀을 제외한 글리벡(75%), 바이칼레인(51%), 플루타마이드(37%) 및 워고닌(26%) 처리시 관찰되었다(도 4B).

<38> 이와 대조적으로 bcl-2 mRNA의 과발현이 비처리 대조군 세포주와 비교시 파클리탁셀을 제외한 글리벡(54%), 플루타마이드(40%), 워고닌(26%) 및 바이칼레인(16%) 처리 후 DU145 세포주에서 통계적으로 유의적임을 나타내었다(도 4B). 또한 비처리 대조군 DU145 세포주 내 낮은 bax mRNA 발현은 파클리탁셀(115%), 바이칼레인(84%) 및 워고닌(51%) 처리 후 유의적으로 증가되었으나 이는 각각의 높은 bcl-2 mRNA 수치를 극복하기에는 충분치 않다(도 4B). 더욱이 DU145 세포주 내 bax mRNA의 상대 수치는 비처리 대조군 세포주와 비교시 플루타마이드 처리 후 다소 증가되고 글리벡 처리 후 감소되었으나 통계적으로 유의성은 나타내지 않았다(도 4B).

<39> 전립선 세포주 내 bax 및 bcl-2 단백질 수치를 간섭하는 항암제

<40> RT-PCR 결과 및 공초점 현미경 사진은 조사된 3개 세포주 내 bax와 bcl-2 발현 간의 현저히 상이한 반응 패턴을 나타내었다. 따라서 전립선암 내 치료적 반응에 대한 예측 마커 즉 bcl-2/bax 비율을 계산할 뿐만 아니라 단백질 수치 내 반응 경향을 조사하기 위해 웨스턴 블럿 분석이 수행되었다(도 5A). 이후 각각의 단백질 밴드의 농도계측 조사가 제공되었다(도 5B).

<41> 본 발명에서 비처리 대조군 PrEC 세포주 내 bax 단백질의 증가된 발현 및 bcl-2 단백질의 감소된 발현이 관찰되었다(도 5B). 또한 밴드의 농도계측 분석은 비처리 대조군 세포주와 비교시 플루타마이드를 제외한 워고닌(99%), 글리벡(71%), 파클리탁셀(55%) 및 바이칼레인(32%) 처리 PrEC 세포주 내에서 bax 단백질의 유의적인 약물-의존적 증가를 나타내었다(도 5B). 또한 PrEC 세포주 내 bcl-2 단백질 수치의 유의적인 감소가 비처리 대조군 세포주와 비교시 워고닌(66%), 글리벡(56%), 파클리탁셀(49%) 및 바이칼레인(29%) 처리 후 관찰되었다(도 5B).

<42> LNCap 세포주 내 단백질 밴드의 농도계측 조사는 비처리 대조군 세포주와 비교시 바이칼레인(70%), 플루타마이드(39%), 워고닌(29%) 및 파클리탁셀(28%)보다 글리벡(90%) 처리 후 아폽토시스성 bcl-2의 유의적으로 낮은 발현을 나타내었고(도 5B), 이는 도 4B의 각각의 mRNA에 대응된다.

<43> 이와 동시에 프로-아폽토시스성 bax 단백질 발현은 비처리 대조군 세포주와 비교시 글리벡(157%), 바이칼레인(55%), 플루타마이드(36%) 및 워고닌(26%) 순으로 LNCap 세포주 내에서 중간 내지 강한 증가가 입증되었다(도 5B). 또한 bax 단백질 발현(도 5B)은 도 4B에 나타난 각각의 mRNA와 일치하였다. 또한 LNCap 세포주 내에서 bax 단백질 발현은 통계적으로 유의적이지는 않으나 0.1 μM 파클리탁셀 처리 후에만 bcl-2 단백질 보다 낮았다

(도 5B).

<44> 이와 대조적으로 정상 세포주와 비교시 유의적으로 높은 bcl-2 단백질 발현이 글리벡(29%), 플루타마이드(21%) 및 워고닌(14%) 처리 후 DU145 세포주 내에서 관찰된 반면 파클리탁셀 처리군은 bcl-2 단백질 발현의 유의적인 감소를 유발하였다(도 5B). 또한 bcl-2 발현은 바이칼레인 처리 후 무의미하게 증가되었다. 그러나 bax 단백질의 유의적으로 높은 발현이 글리벡 및 플루타마이드를 제외한 모든 처리된 DU145 세포주(파클리탁셀의 경우 99%, 바이칼레인의 경우 78%, 워고닌의 경우 56%)에서 관찰되었으나 전체적인 결과는 약물 존재 또는 부재시 안드로겐 불감성 DU145 전립선암 세포주 내 아폽토시스 저해제 또는 억제제 bcl-2 단백질과 비교시 전-아폽토시스성 bax 단백질의 현저하게 낮은 발현을 나타내었다(도 5A, B).

<45> 항암제와 아폽토시스 조절제인 bcl-2/bax 비율의 관련성

<46> 항-아폽토시스성 bcl-2 및 프로-아폽토시스성 bax의 수치, 상호작용, 이동 및 비율은 약물 처리 후 세포의 전체적인 프로- 또는 항-아폽토시스성 사멸을 결정한다. 본 발명의 결과가 LNCap 및 DU145 세포주 내 아폽토시스 조절제인 bax 및 bcl-2 단백질의 차별적 발현에 따른 아폽토시스성 세포 사멸의 변동을 나타내었기 때문에 본 발명자들은 이들 이벤트가 그의 감소가 아폽토시스에 편향되는 bcl-2/bax 비율과 관련되는지 여부를 평가하였다. PrEC는 조사된 3개 세포주 중 비처리 조건시 비교적 낮은 bcl-2/bax 비율을 나타내었다(도 5C). PrEC 세포주 내 bcl-2/bax 비율 수치는 동일한 조건 하에서 비처리 대조군과 비교시(0.88) 플루타마이드를 제외한 워고닌(0.17), 글리벡(0.26), 파클리탁셀(0.33) 및 바이칼레인(0.56) 처리 후 유의적으로 감소되었다(도 5C).

<47> LNCap 세포주에서 bcl-2/bax 비율 수치는 비처리 대조군과 비교시 약물 노출 후 현저하게 감소되었다(도 5C). 1.26의 대조군 수치와 비교시 대응하는 0.05의 bcl-2/bax 수치를 기반으로 글리벡이 LNCap 세포주에서 더욱 효과적인 항암제이고 바이칼레인(0.29) 및 워고닌(0.81)의 순서이었다. 전립선암의 유효 약물인 플루타마이드도 LNCap 세포주에서 유의적으로 낮은 bcl-2/bax 비율(0.63)을 나타낸 반면 다른 일반적인 전립선암 약물인 파클리탁셀은 통계적으로 유의적이지는 않으나 비교적 높은 수치(1.16)를 나타내었다(도 5C). bcl-2/bax 비율은 대조군 세포주와 비교시(3.51) 플루타마이드 및 글리벡을 제외하고는 파클리탁셀(1.7), 바이칼레인(2.13) 및 워고닌(2.62) 처리 DU145 세포주에서 유의적으로 낮았으나 전체적인 비율은 LNCap(범위: 0.05~1.26) 및 PrEC(범위: 0.17~0.88) 세포주 보다 DU145 세포주(범위: 1.7~3.82)에서 더 높았다.

<48> 모든 결과를 조합하면 전체적인 bcl-2/bax 비율은 약물 처리 후 안드로겐 불감성 DU145 암세포주보다 안드로겐 의존적 LNCap 암세포주 및 정상 PrEC 세포주에서 낮은 것으로 결론지을 수 있다.

<49> 글리벡, 바이칼레인 및 워고닌은 DU145 세포주와 비교시 LNCap 세포주에서 성장을 억제하고, 세포 생존을 감소시키고 bcl-2와 bax 단백질의 차별적 발현을 통해 아폽토시스를 유도하기 때문에 상당한 잠재성을 나타낸다.

<50> 따라서 본 발명에서 약물-의존적 아폽토시스성 사멸 및 LNCap 및 PrEC 세포주 내 bcl-2 수치의 감소가 bax/bcl-2 비율의 강한 증가를 유발하였고, 이는 DU145 세포주에서는 나타나지 않았다.

<51> 아폽토시스의 유도는 종양 세포의 개시, 진행 및 전이를 분열시킨다. 따라서 암 화학-예방 및 치료를 위한 신규하고 유망한 전략으로서 아폽토시스의 조작에 대한 연구가 집중되고 있다. 많은 목적이 종양 세포 내 아폽토시스성 사멸을 유도하는 세포내 신호를 유발시킴으로서 암의 발병률 및 부하를 감소시킬 수 있는 화합물에 대한 탐색에 집중되었다.

<52> 본 발명에서는 인간 안드로겐 민감성 LNCap 및 불감성 DU145 전립선암 세포주 상에서 비교를 근거로 바이칼레인, 워고닌, 파클리탁셀, 플루타마이드 및 글리벡의 역할을 조사하고 전립선암 치료에 우수한 약물을 발견하였다. 파클리탁셀 및 플루타마이드를 제외하고 글리벡, 바이칼레인 및 워고닌은 백혈병, 위장 종양, 혈관 장애 및 간-세포 암종에 유효한 약물이다. 최근 일부 연구에서 전립선암에 대한 바이칼레인, 워고닌(모두 식물 플라보노이드이며 중국 약초 '황금(*Scutellaria baicalensis*)'에서 수득됨) 및 글리벡의 역할을 보고하였으나 결과는 여전히 확정적이지 않다.

<53> 약제 또는 약물이 정상-상태 세포군에 영향을 미치고 염색질 응축, 세포핵 무사분열 등을 통해 DNA를 손상시키는 경우 종양 세포는 아폽토시스에 의해 제거된다. bax 단백질은 아폽토시스의 주요한 작동기이고, 이는 bcl-2와 함께 세포 내 상대 비율을 변화시키고 생존(bcl-2 증가) 또는 사멸(bax 증가)에 대한 생물학적 성향을 변환시킨다. 또한 bcl-2의 높은 발현과 함께 bax의 낮은 발현은 세포 축적 및 종양 형성과 상호관련된다.

<54> 전임상 전립선암 모델에 있어서 bcl-2 발현 저해는 전립선 암세포 내 아폽토시스를 증가시킴으로서 화학치료 효과를 가능하게 한다. 상기 논의된 증거에 따라 본 발명은 DU146 암세포주에서 나타난 바와 같이 bax 단백질의 높은 발현 수치(bax는 36~157%까지 증가됨)와 함께 bcl-2 단백질의 낮은 발현(bcl-2는 28~90%까지 감소됨)이 약물 처리된 LNCap 암세포주를 세포 생존보다는 아폽토시스성 사멸로 추진시킴을 나타낸다.

<55> 본 발명은 비처리 대조군과 비교시 약물 처리된 LNCap 세포주에서 세포 성장의 52~65% 저해 및 세포 생존의 36~48% 감소를 나타내었다. 종전 연구를 보강하여 약물 처리된 LNCap 세포주 내 bcl-2의 감소가 DU145 세포주보다 bax/bcl-2 비율의 실질적인 증가에 충분하다고 기술될 수 있고, 이는 두 세포주 모두의 각각 아폽토시스 지수로부터 입증된 바와 같이 약물 유도 아폽토시스에 대한 중요한 메커니즘이 된다(도 2). 그러나 파클리탁셀 처리된 LNCap 세포주는 bax 및 bcl-2의 mRNA와 단백질 수치간에 명백한 불일치를 나타내었고, 이는 bcl-2의 매우 긴 반감기 또는 초기 bcl-2 단백질 수치 또는 그의 항-아폽토시스성 활성의 중요한 결정소로 판단되는 bcl-2의 번역 후 변형에 의한 것일 수 있다.

<56> 본 발명은 약물 처리 조건 존재 또는 부재시 PrEC 세포주 내 bax 및 bcl-2 단백질의 차별적 발현을 나타내었다. bcl-2는 정상 전립선 상피의 기저 세포층 및 증식 조건의 관강 분비 세포 형태 내에서 발현되었다. 또한 bax 단백질의 양성적 발현이 정상 대조군 전립선의 과립성 상피 세포 및 높은 등급의 전립선 상피내종양 내에서 관찰되었다.

<57> bcl-2의 상대 발현이 종양 세포 형태와 단계에 따라 달라지나 항-아폽토시스성 bcl-2의 과발현은 다양한 세포독성 화학치료 자극시 호르몬 불감성 전립선 암세포 및 더 많은 침윤성 종양 세포가 아폽토시스를 방지하도록 촉진시키는데 압도적인 역할을 할 수 있다.

<58> 또한 bcl-2 과발현은 호르몬-원시적 1차 전립선암과 비교시 안드로겐-고갈 환경에서 화학물질 저항성 표현형을 증가시킨다. 또한 bcl-2가 세포 내 그의 상대 비율의 변화를 통해 bax 매개된 아폽토시스를 방지한다고 알려져 있다. 이러한 견지에서 약물 처리된 DU145 암세포주 내 bcl-2 단백질의 과발현이 LNCap(bcl-2/bax 비율 범위: 0.05~1.16) 및 PrEC(bcl-2/bax 비율 범위: 0.17~0.69) 세포주와 비교시 전체적인 bcl-2/bax 비율을 증가시킨다고(범위: 1.7~3.82) 기술될 수 있다. 이러한 높은 bcl-2/bax 비율은 DU145 세포주에 아폽토시스 보다는 생존을 지시하고 약물에 대한 화학물질 저항성을 증가시킨다. 따라서 DU145 세포주는 약물 처리 조건 하에서도 한계 변화와 함께 배양액 내 그의 성장 및 생존을 유지할 수 있다(도 1).

<59> 따라서 본 발명에서는 4가지의 명백한 결과를 획득하였다. 첫 번째는 약물 처리 후 안드로겐 불감성 DU145 세포주보다 안드로겐 민감성 LNCap 세포주 내에서의 중간 내지 강한 성장 저해이다. 두 번째로 성장 저해는 DU145 세포주보다 약물 처리된 LNCap 세포주 내에서의 증가된 아폽토시스 및 감소된 세포 생존에 의해 유발된다는 것이다. 세 번째로 bax 및 bcl-2 mRNA의 약물-의존적 발현은 조사된 모든 세포주의 아폽토시스성 사멸과 제휴된다는 것이다. 마지막으로 네 번째로 bcl-2 단백질의 높은 발현 및 bax 단백질의 낮은 발현은 안드로겐 민감성 LNCap 암세포주와 비교시 약물 처리 조건 하에서 안드로겐 불감성 DU145 암세포주 내 전체적인 높은 bcl-2/bax 비율을 나타낸다는 것이다. 또한 정상 PrEC 세포주도 약물 처리 후 매우 낮은 bcl-2/bax 비율을 나타내었다.

<60> 결론적으로 글리벡, 바이칼레인 및 워고닌은 높은 성장-억제 효과를 나타내고 (bcl-2)-bax 발현을 통해 매개되는 아폽토시스를 유도하고 낮은 세포 생존을 유발하기 때문에 안드로겐 민감성 LNCap 암세포주 상에 상당한 잠재성을 나타낸다. 따라서 LNCap 세포주를 기반으로 한 이들 전임상 데이터가 초기 단계 전립선암 환자에게 글리벡, 바이칼레인 및 워고닌의 임상 연구에 대한 강한 지지를 제공함은 의심의 여지가 없다. 더욱이 상기 약물은 정상 전립선 상피 세포주(PrEC) 내에서 bax 단백질 발현, 성장 저해 및 낮은 세포 생존에 따른 아폽토시스를 유발하고, 이는 전립선암 치료 개시에 대한 견해를 제공한다. bcl-2 및 bax 유전자 발현에 따른 그의 서장, 생존 관계, 화학물질 저항성 특성을 고려하여 안드로겐 불감성 DU145 암세포주에 대한 항-bcl-2를 목표로 하는 진행 단계 전립선암에 대한 신규한 치료 전략을 고안하는 추가 연구가 진행되고 있다.

<61> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<62> (실시예 1) 세포 배양 및 약물 처리

<63> 인간 전립선 암종 세포주(LNCap 및 DU145) 및 정상 전립선 세포주(PrEC)는 한국세포주은행(KCLB, 서울)에서 수득되었다. LNCap 및 DU145 세포는 RPMI-1640(HyClone, Logan, UT) 내에 유지되었고 PrEC 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, HyClone, Logan, UT) 내에 유지되었다. 배지는 10% 열-불활성화 우태아 혈청

(Gibco, Grand Island, NY), 10000 유니트/ml의 페니실린 및 10 mg/ml의 스트렙토마이신을 함유한 1% 항생-항진균 용액(HyClone, Logan, UT), HEPES, 중탄산나트륨, p-아미노벤조산 및 인슐린으로 보충되었다. 세포는 37℃에서 72시간 동안 5% CO_2를 함유한 가습 대기 내에서 성장되었다. 이후 세포는 상기 기술된 것과 동일한 조건 하에서 60 mm 플레이트(Nunc, 덴마크) 내에서 각각의 배양 배지로 계대배양되었고 약물 처리는 24시간 동안 배양액 내에서 수행되었다(표 1).

표 1

<64> 24시간 동안 배양시 사용된 약물 요약

약물	현재 알려진 치료 역할	원액 농도	작용 농도
바이칼레인	아폽토시스 유도제, 백혈병 및 간-세포 암종에 유용	DMSO 내 10 mM	배지 내 30 μM
플루타마이드	항안드로겐, 안드로겐 민감성 전립선암에 매우 효과적	에탄올 내 0.1 M	배지 내 5 μM
글리벡	키나제 저해제, 만성 골수백혈병, 위장 종양 및 뇌종양 치료에 사용	DMEM 내 10 mM	배지 내 10 μM
파클리탁셀	진행형 카포시 육종, 폐암, 난소암, 유방암 및 전립선암에 사용되는 미세관 손상 약물	에탄올 내 0.1 M	배지 내 0.1 μM
워고닌	아폽토시스 유도제, 백혈병, 간 암종 및 혈관 장애에 효과적	DMSO 내 8 mM	배지 내 80 μM

<65> 사용된 약어: M: 몰; mM: 밀리몰; μM: 마이크로몰; DMSO: 디메틸설폭사이드

<66> 하기 논의된 각각의 실험은 3반복 플레이트 내에서 수행되었고 약물이 처리되지 않은 세포주는 각 케이스의 대조군으로 취해졌다. 바이칼레인, 워고닌 및 글리벡은 Wako Pure Chemical Industrials(일본)에서 구입되었다. 플루타마이드 및 파클리탁셀은 Sigma, St. Louis, MO에서 구입되었다. 모든 다른 화학물질은 특별히 언급되지 않는 한 최고 순도 등급이고 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입되었다.

<67> (실시예 2) 세포 성장 에세이

<68> PrEC, LNCap 및 DU145 세포주는 약물 처리 24시간 후 채취되고 혈구계로 2반복으로 측정되고 각 세포주 내 비처리 대조군의 결과와 비교되었다. 세포 성장은 대조군을 100%로 간주하고 그에 대한 백분율로 표기되었다.

<69> (실시예 3) 세포 생존의 측정

<70> PrEC, LNCap 및 DU145 세포주의 생존은 트립판 블루 염료 배제 기술을 기반으로 측정되었다. 약물 처리 24시간 후 세포가 채취되었고 실온에서 5분간 PBS 내 0.4% 트립판 블루로 인큐베이트되었다. 위상차 현미경(Olympus, 일본)을 이용하여 5개의 고자장/슬라이드에서 생존 및 사멸 세포가 측정되었고 결과는 대조군의 생존을 100%로 간두하고 각 세포주 내 비처리 대조군에 대한 백분율로 표기되었다.

<71> (실시예 4) 형태 측정

<72> PrEC, LNCap 및 DU145 세포주는 37℃에서 72시간 동안 5% CO_2를 함유한 가습 대기 내 4-챔버 배양 슬라이드(Nunc, 덴마크) 상에서 신선한 배지로 계대배양된 후 배양액 내에서 24시간 동안 약물로 처리되었다. 이후 배지는 흡인되고 세포는 PBS 내 4% *p*-파라포름알데하이드(중성-완충 파라포름알데하이드, NBP)로 10분간 고정되고, PBS로 세척되고 PI(1 mg/ml 원액)으로 암조건으로 20분간 실온에서 인큐베이트되었다. 일부 표본은 AO(10 mg/ml 원액)으로 인큐베이트되었다. 모든 슬라이드는 형광 봉입제(DakoCytomation Inc., 미국)로 봉입되고 에어 포켓(air pocket)은 커버 슬립과 글래스 슬라이드 사이의 접합부에서 코팅된 매니큐어액으로 방지되었다. 세포핵 형태는 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview FV1000, Olympus, 일본)에 의해 가시화되었고, 이미지는 FV10-ASW 어드밴스 어플리케이션 소프트웨어, 버전 1.5에 의해 획득되었다. 100개 세포 당 아폽토시스성

세포핵의 수는 5개 고자장/슬라이드에서 측정되었고 아폽토시스 지수는 각각의 세포주 내 약물 비처리 대조군을 100%으로 간주하고 그에 대한 백분율로서 표기되었다.

<73> (실시예 5) bcl-2 및 bax의 면역형광법

<74> 면역형광법은 DMEM(PrEC용) 및 RPMI-1640 배지(LNCap 및 DU145용)를 이용한 4-챔버 배양 슬라이드(Nunc, 덴마크) 상에서 성장된 후 상기 기술된 약물로 처리된 PrEC, LNCap 및 DU145 세포주 배양액 상에서 수행되었다. 이후 비-특이적 결합을 차단하기 위해 배지는 흡인되고 4% NBP 고정 세포는 1시간 동안 실온에서 정상 염소 혈청(PBS 내 1:20 희석; Vector Lab Inc., Burlingame, CA)으로 예비-인큐베이트된 후 1차 항체: 토끼 항-bax 폴리클론 IgG 및 토끼 항-bcl-2 폴리클론 IgG(PBS 내 1:300 희석; Santa Cruz Biotechnology Inc., 미국)와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이트되었다. 2차 항체(TRITC-컨쥬게이트 돼지 항-토끼 폴리클론 IgG, PBS 내 1:20 희석; DAKO, 덴마크)로 처리 후 세포는 PBS로 세척되었고 커버 슬립이 형광 봉입제(DakoCytomation Inc., 미국)로 슬라이드 상에 봉입되었다. 에어 포켓은 상술된 바와 동일한 슬라이드 상에서 코팅된 매니큐어액으로 방지되었다. 이미지를 위해 본 발명은 공초점 레이저 주사현미경(Fluoview FV1000, Olympus, 일본) 및 FV10-ASW 어드밴스 어플리케이션 소프트웨어, 버전 1.5을 이용하였다.

<75> (실시예 6) RAN 분리 및 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)

<76> 약물 처리 동안 bcl-2 및 bax mRNA의 상대 발현 수치를 확인하기 위해 RT-PCR이 수행되었다. PrEC, LNCap 및 DU145 세포주는 상기 기술된 바와 같이 배양액 내 약물 처리 24시간 후 채취되었다. 이후 전체 RNA는 표준 실험 프로토콜에 따라 TRIzol 시약(Invitrogen, 뉴질랜드)을 이용하여 추출되었다. RNA 순도 및 농도는 260 nm에서 분광광도계로 측정되었다(Amersham Pharmacia Biotech, 미국). 이후 2 ㎍의 전체 RNA가 0.5 ㎍/㎕ 올리고(dT) 12-18 프라이머(Invitrogen, 뉴질랜드), 200 유니트/㎕ M-MLV 역전사효소(Promega, 미국), 40 유니트/㎕ RNasin(Promega, 미국), 2.5 mM dNTPmix(Takara Bio Inc., 일본) 및 M-MLV RT 5x 완충액(Promega, 미국)을 함유한 최종 부피 25 ㎕ 내에서 42℃에서 1시간 동안 역전사되었다. PCR 반응을 위해 4 ㎕의 cDNA가 PCR 완충액, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP mix and Taq enzyme(Promega, 미국), 전방 프라이머 25 피코몰(pM) 및 역방 프라이머 25 pM(Bioneer Corporation, 한국)을 함유한 GoTaq® Green Master Mix 2x과 반응하고 증폭되었다. PCR 생성물의 예측 크기는 bcl-2의 경우 300 bp 및 bax의 경우 200 bp이었다. bcl-2 mRNA의 검출을 위해 하기 단계가 수행되었다: 각각 94℃에서 1분간 전변성 및 변성, 68℃에서 1분간 어닐링(annealing) 및 총 25 사이클의 72℃에서 1분간 연장 및 72℃에서 10분간 최종 추가 연장. bax mRNA 검출을 위해 어닐링 온도(53℃)를 제외하고는 bcl-2 mRNA와 동일한 PCR 조건이 수행되었다. mRNA의 정량을 조절하기 위해 액틴 프라이머가 각각의 반응에 첨가되었다(어닐링 온도 63℃). 인간 프라이머 서열은 하기와 같다: bcl-2 전방 프라이머: 5'-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3'(서열번호: 1), bcl-2 역방 프라이머: 5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3'(서열번호: 2), bax 전방 프라이머: 5'-GTGCACCAAGGTGCCGGAAC-3'(서열번호: 3), bax 역방 프랑이머: 5'-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3'(서열번호: 4), 액틴 전방 프라이머: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'(서열번호: 5) 및 액틴 역방 프라이머: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'(서열번호: 6). 12 ㎕의 각각의 PCR 생성물은 25분간 에티듐 브로마이드(1 ㎕/ml 농도)를 함유한 1% 아가로스 겔 내에서 전기영동되고 밴드 촬영을 위해 UV 램프에 노출되었다. 증폭된 생성물의 분자 크기는 RT-PCR 생성물 병행하여 이동된 분자량 마커(100 bp DNA 래더, Promega, 미국)과의 비교에 의해 측정되었다. 각각의 mRNA에 대한 밴드 밀도는 Molecular Analyst™, 버전 1.4.1(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 계산되었다.

<77> (실시예 7) 웨스턴 블럿 분석

<78> 약물 처리 24시간 후 세포주가 상기 기술된 바와 같이 채취되었다. 웨스턴 블럿 분석을 위해 세포는 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1% 소듐 디옥시콜레이트, 150 mM/L 염화나트륨, 50 mM/L Tris-염산(pH 7.5), 1 mM/L 페닐메틸 설포닐 플루오라이드(PMSF) 및 0.2 유니트/ml 아프로티닌(aprotinin)을 함유한 얼음-냉각된 전체 세포 용해 완충액(pH 7.4) 내에서 용해되었다. 단백질 농도는 표준물질로서 우혈청 알부민(BSA)을 이용한 Bio-Rad 단백질 에세이에 의한 Bradford 에세이에 의해 295 nm에서 분광광도계로 측정되었다(Spectronic, 덴마크). 단백질(전체 30 ㎍ 단백질/레인)은 5분간 비등되고 환원 조건 하에서 12.5% SDS-PAGE(150 볼트)에 의해 분석되었다. 6~175 kDa 범위의 미리 염색된 단백질 마커(Biolabs Inc., New England)가 단백질 분자량 검출을 위해 병행하여 이동되었다. 이후 단백질은 일렉트로블럿팅(electroblotting)(39 mM 글리신, 48 mM Tris, 15% 메탄올 및 0.037% SDS 일렉트로트랜스퍼 완충액 내에서 90 볼트로 1시간 동안)의해 PVDF 멤브레인(Santa Cruz Biotechnology Inc., 미국) 상에 옮겨지고 전기영동 이동 셀(15 볼트, 90분) 상에서 반건조되었다. 비-특이적 결합을 감소시키기 위해 멤브레인은 TBST 완충액(20 mM Tris-염산, pH 7.4, 500 mM 염화나트륨 및 0.01% Tween

20) 내 5% 스킴 밀크를 함유한 차단 용액으로 처리되었다. 면역반응은 4℃에서 밤새 5% BSA를 함유한 TBST로 1:500으로 희석된 1차 항체를 이용하여 수행되었다. 토끼 항-bax 폴리클론 IgG(23 kDa) 및 토끼 항-bcl-2 폴리클론 IgG(28 kDa)(Santa Cruz Biotechnology Inc., 미국)가 상기 목적으로 사용되었다. Sigma사의 토끼 항-액틴(20~30개 아미노산) 폴리클론 IgG(42 kDa)이 균일한 로딩을 확인하기 위한 대조군으로 사용되었다. 당근 과산화효소-컨쥬게이트된 염소 항-토끼 폴리클론 IgG(1x TBST 내 1:1000 희석; Santa Cruz Biotechnology Inc., 미국)이 2차 항체로 사용되었다. 단백질 밴드는 프로토콜에 따라 강화 화학발광(ECL) 검출 시스템(Amersham Biosciences, 영국)을 이용하여 검출된 후 X-선 노출되고 Sigma Gel, 버전 1.0(Jandel Scientific, San Rafeal, CA)을 이용하여 농도계측되었다.

<79> (실시예 8) bcl-2/bax 비율 계산

<80> bcl-2/bax 비율은 대응 단백질 밴드의 농도계측 분석을 기반으로 각각의 약물 처리된 PrEC, LNCap 및 DU145 세포주 내에서 계산되고 대조군으로 채택된 각각의 세포주 내 비처리 정상 수치와 비교되었다.

<81> 통계 분석

<82> 수치는 3개의 독립적 실험의 평균을 나타내고 평균±SEM으로 표기되었다. 데이터의 통계 분석은 SPSS® 버전 10.0(SPSS Inc., 미국)을 이용한 투-테일(two-tail) Student 't' 테스트에 의해 수행되었다. 대조군과 처리군간의 차이는 $p<0.05$인 경우 통계적으로 유의적인 것으로 간주되었다.

도면의 간단한 설명

<83> 도 1은 배양액 내 24시간 약물 처리 후 LNCap, DU145 및 PrEC 세포주 내 세포 성장 및 생존에 대한 약물-의존적 반응을 나타낸 것이다. 비처리 정상 세포주가 대조군으로 채택되었다(a, N). 80 μM 워고닌(b, W), 0.1 μM 파클리탁셀(c, P), 30 μM 바이칼레인(d, B) 5 μM 플루타마이드(e, F) 및 10 μM 글리벡(f, G)이 사용된다. 도 1A는 원형 또는 타원형 세포(→) 및 신장된 세포(△)로 나타난 배양액 내 세포 성장의 대표 이미지를 나타낸다(x400). 도 1B는 세포 성장의 평균±SEM을 나타낸다. 도 1C는 세포 생존의 평균±SEM을 나타낸다. 각각의 세포주 내 정상군과 비교시 $^{a}p<0.001$, $^{b}p<0.01$, $^{c}p<0.05$.

<84> 도 2는 배양액 내 24시간 약물 처리 후 LNCap, DU145 및 PrEC 세포주 내 아폽토시스 상의 약물 효과를 나타낸 것이다. 10 μM 글리벡(a, e, G), 0.1 μM 파클리탁셀(b, g, P), 30 μM 바이칼레인(c, I, B), 5 μM 플루타마이드(d, h, F) 및 80 μM 워고닌(f, W)이 사용된다. 비처리 정상 세포주가 대조군으로 채택된다(N). 도 2A는 PI(오렌지색) 및 AO(녹색) 형광(대표 이미지)을 이용하여 염색질 응축 및 세포핵 무사분열(→)에 의해 입증되는 아폽토시스성 세포핵을 나타낸다. a, d, g x400, b, c x1000 및 e, f, h, i x1500. 도 2B는 아폽토시스 지수의 평균±SEM을 나타낸다. 각각의 세포주 내 정상군과 비교시 $^{a}p<0.001$, $^{b}p<0.01$, $^{c}p<0.05$.

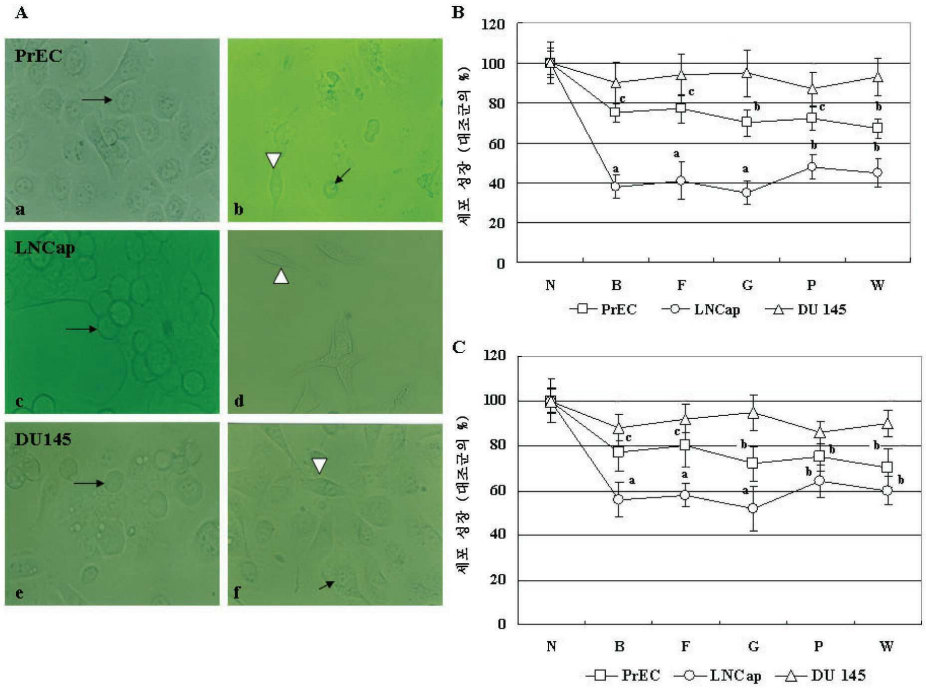
<85> 도 3은 배양액 내 24시간 약물 처리 후 LNCap, DU145 및 PrEC 세포주 내 bcl-2 및 bax 면역반응성의 약물-의존적 반응을 나타낸 것이다(대표 이미지 x1500). 도 3A에서 bcl-2 면역반응성은 →으로 표시되고, a, e, i: 비처리 정상군(대조군), b, f, j: 80 μM 워고닌, c, k: 세포 형태 (80 μM 워고닌), d, h, l: 0.1 μM 파클리탁셀 및 g: 10 μM 글리벡을 나타낸다. 도 3B에서 bax 면역반응성은 ⇒로 표시되고, a, e, i: 비처리 정상군(대조군), b, f, j: 30 μM 바이칼레인, c, g, k: 5 μM 플루타마이드 및 d, h, l: 10 μM 글리벡을 나타낸다.

<86> 도 4는 배양액 내 24시간 약물 처리 후 LNCap, DU145 및 PrEC 세포주 내 bax 및 bcl-2 mRNA 발현의 약물-의존적 반응을 나타낸 것이다. 레인 1: 정상(N, 비처리 세포주, 대조군으로 채택), 레인 2: 30 μM 바이칼레인(B), 레인 3: 5 μM 플루타마이드(F), 레인 4: 10 μM 글리벡(G), 레인 5: 0.1 μM 파클리탁셀(P) 및 레인 6: 80 μM 워고닌(W). 도 4A는 RT-PCR에 의한 bax 및 bcl-2 mRNA의 상대 수치를 나타낸다. 도 4B는 대응 mRNA 밴드 농도의 평균±SEM을 나타낸다. 각각의 세포주 내 정상군과 비교시 $^{a}p<0.001$, $^{b}p<0.01$, $^{c}p<0.05$.

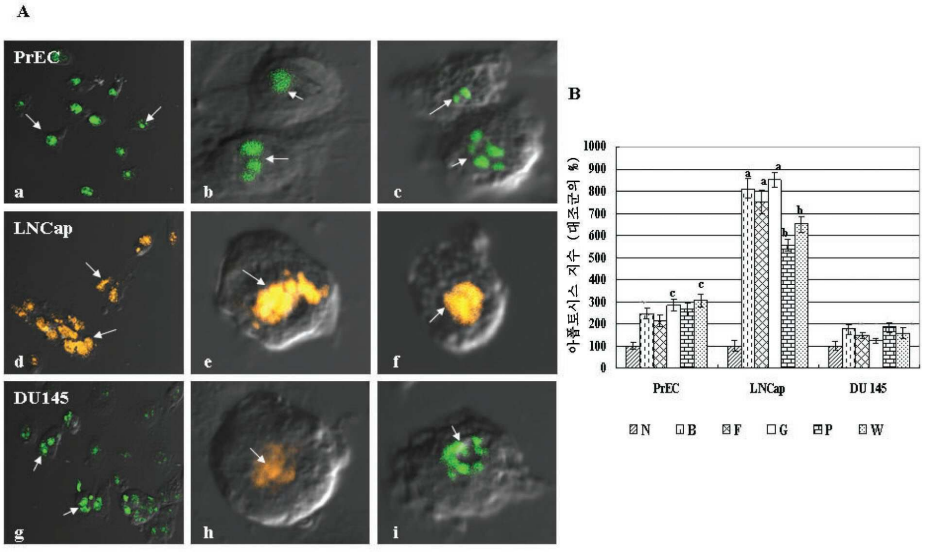
<87> 도 5는 배양액 내 24시간 약물 처리 후 LNCap, DU145 및 PrEC 세포주 내 bax 및 bcl-2 단백질 발현 상의 약물 효과를 나타낸 것이다. 레인 1: 정상(N, 비처리 세포주, 대조군으로 채택), 레인 2: 30 μM 바이칼레인(B), 레인 3: 5 μM 플루타마이드(F), 레인 4: 10 μM 글리벡(G), 레인 5: 0.1 μM 파클리탁셀(P) 및 레인 6: 80 μM 워고닌(W). 도 5A는 bax 및 bcl-2 단백질 수치의 웨스턴 블럿을 나타낸다. 도 5B는 대응 단백질 밴드 농도의 평균±SEM을 나타낸다. 도 5C는 단백질 밴드의 웨스턴 블럿에서 계산된 bcl-2/bax 비율을 나타낸다. 각각의 세포주 내 정상군과 비교시 $^{a}p<0.001$, $^{b}p<0.01$, $^{c}p<0.05$.

도면

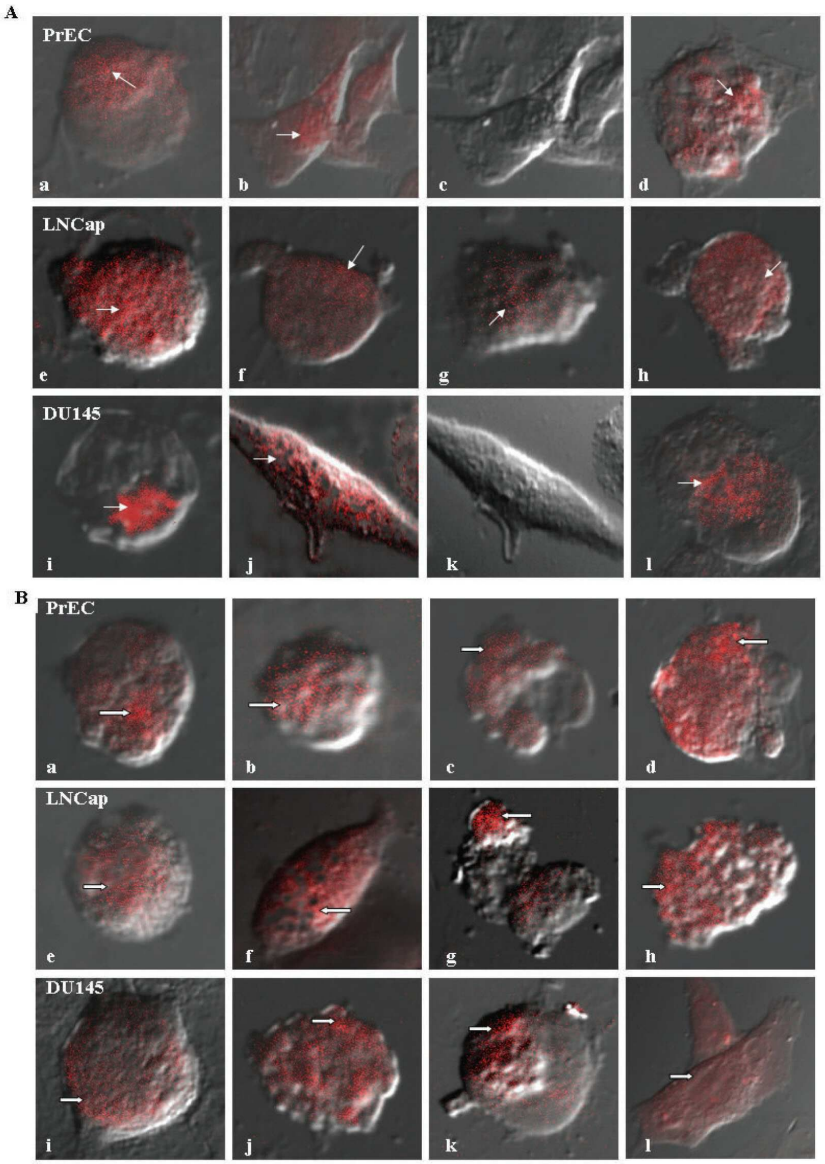
도면1


A
PrEC
a
b
LNCap
c
d
DU145
e
f
B
세포 성장 (대조군의 %)
120
100
80
60
40
20
0
N
B
F
G
P
W
PrEC
LNCap
DU 145
C
세포 성장 (대조군의 %)
120
100
80
60
40
20
0
N
B
F
G
P
W
PrEC
LNCap
DU 145

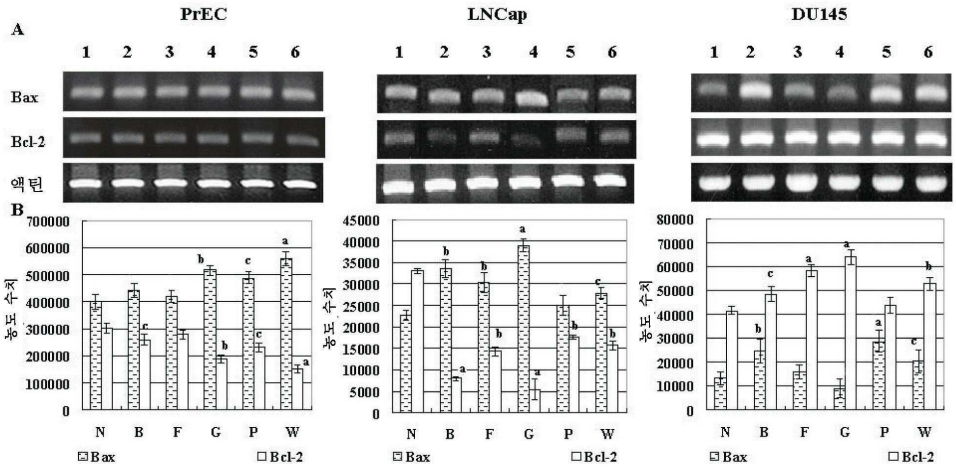
도면2


A
PrEC
a
b
c
LNCap
d
e
f
DU145
g
h
i
B
아폽토시스 지수 (대조군의 %)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
PrEC
LNCap
DU 145
N
B
F
G
P
W

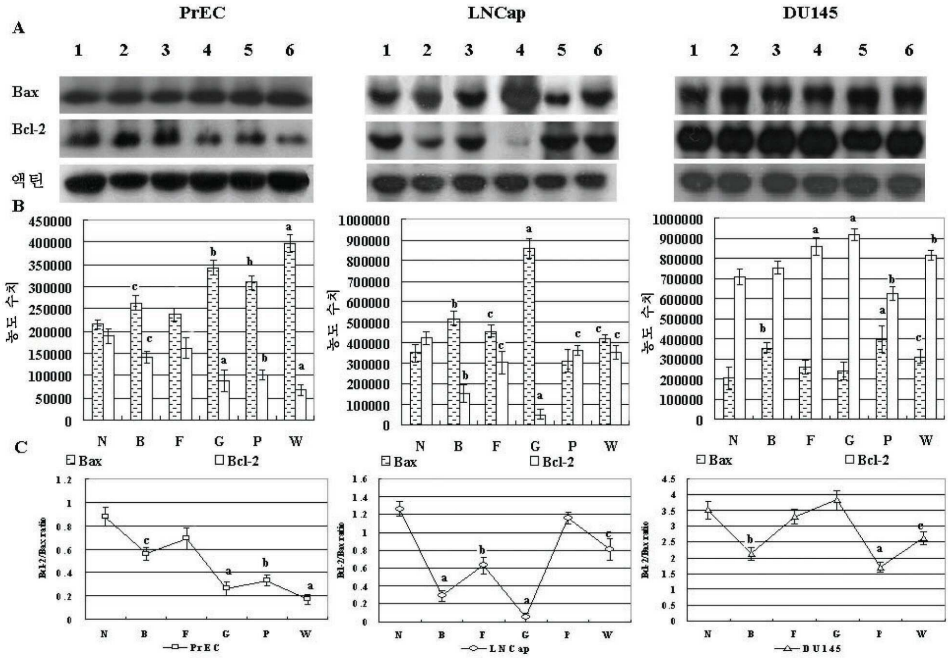
도면3


A
PrEC
a
b
c
d
LNCap
e
f
g
h
DU145
i
j
k
l
B
PrEC
a
b
c
d
LNCap
e
f
g
h
DU145
i
j
k
l

도면4


A
PrEC
LNCap
DU145
1 2 3 4 5 6
Bax
Bcl-2
액틴
B
농도 수치
N B F G P W
Bax
Bcl-2

도면5



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
<120> Anticancer agent inducing selective appoptosis to the human androgen sensitive LNCap prostate cancer cell line

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 1
cgacgacttc tcccgccgct accgc 25

<210> 2
<211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 2
ccgcatgctg gggccgtaca gttcc 25

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 3
gtgcaccaag gtgccggaac 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 4
tcagcccatc ttcttccaga 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 5
gtggggcgcc ccaggcacca 20

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 6
ctccttaatg tcacgcacga tttc 24