(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0020856
(43) 공개일자 2022년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/235 (2006.01) *A61P 15/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/235 (2013.01)
A61P 15/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0013006(분할)
(22) 출원일자 2022년01월28일
심사청구일자 2022년01월28일
(62) 원출원 특허 10-2019-0162637
원출원일자 2019년12월09일
심사청구일자 2019년12월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호
임화선
서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호
함지연
서울특별시 성북구 고려대로 38-1, 402호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 2 항

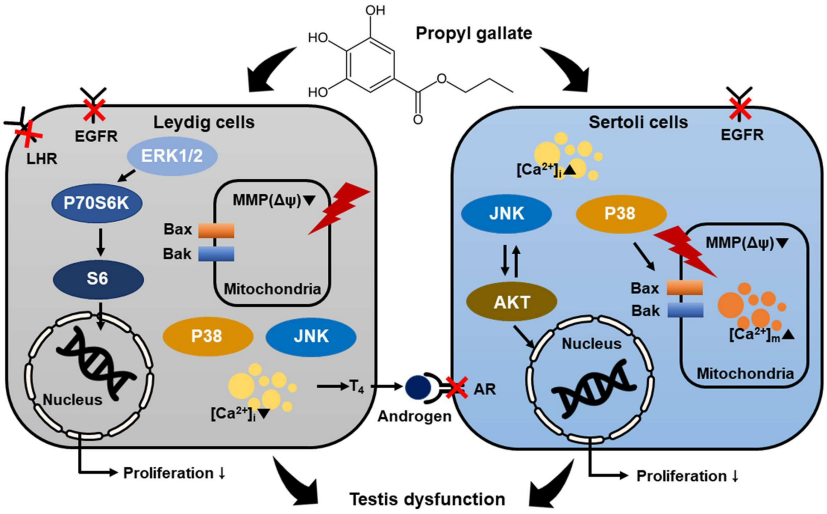
(54) 발명의 명칭 **프로필 갈레이트를 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 조성물은 고환 세포주의 증식을 억제하고, 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 고환 세포주의 비정상적 증식에 의한 남성 생식기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품, 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465028677
과제번호	HI17C0929000019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발
연구과제명	액체생체검사 기반 난소암 조기 진단, 재발 예측 및 항암제 내성 관련 엑소좀 바이오마커 발굴 및 검증
기 여 율	50/100
과제수행기관명	국민대학교 산학협력단
연구기간	2017.04.10 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711089343
과제번호	2018R1C1B6009048
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구
연구과제명	엑소좀 유래 운반 RNA 소편을 이용하여 모체 영양불량에 의한 태반 형성, 태아 프로그래밍의 후성유전학적 기전 규명 및 임신기 영양 평가를 위한 플랫폼 구축
기 여 율	50/100
과제수행기관명	국민대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는, 라이디히(Leydig) 세포 또는 세르톨리(Sertoli) 세포의 과증식에 의해 유발되는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 라이디히 세포 또는 인간을 제외한 포유동물 유래 세르톨리 세포의 증식 능력을 억제시키는 방법.

청구항 2

프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는, 라이디히(Leydig) 세포 또는 세르톨리(Sertoli) 세포의 과증식에 의해 유발되는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 라이디히 세포 또는 인간을 제외한 포유동물 유래 세르톨리 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 고환에는 테스토스테론과 같은 스테로이드 호르몬을 합성하는 것을 주요 기능으로 하는 간질 세포인 라이디히 세포(Leydig cell)와 정세관에서 정자형성과정을 통해 생식 세포를 발달시키는 세르톨리 세포 (Sertoli cell)가 존재한다. 칼슘이온에 의해 활성화되는 신호전달 경로는 라이디히 세포에서는 스테로이드신생성과 관련이 있으며, 세르톨리 세포에서는 정자 배출과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Lyon *et al.*, Biol Reprod, 2017).

[0003] 정자형성과정이 일어나는 동안, 세포질 내 칼슘이온의 농도가 증가하면 세르톨리 세포의 사멸이 일어나며 남성 불임이 유발될 수 있는 것으로 알려져 있다(Liz *et al.*, Free Radic Biol Med, 2013). 이처럼, 고환에서 칼슘 항상성의 유지는 수정 능력이나 스테로이드합성 또는 정자형성과정과 같은 역할을 수행하는데 있어 매우 중요하다(Sullivan *et al.*, Mol Cell Endocrinol, 1984; Ogunbayo *et al.*, Toxicol In Vitro, 2008).

[0004] 한편, 프로필 갈레이트는 식품 첨가제, 화장품, 교착제 등에 함유되어 있으며 산화방지 효과를 위해 널리 사용되고 있다. 또한, 프로필 갈레이트는 자연적으로 생성되는 항산화제인 갈산의 합성 에스터 형태로 지방 함유 제품의 산패를 방지하는 역할을 한다. 프로필 갈레이트의 이러한 산화 조건 조절 효과는 다양한 세포의 독성에 대한 민감도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 화학예방 효과와 세포독성 효과를 모두 지니는 것으로 보고된 바 있으며(Wu et al., Biochem, Pharmacol, 1994), 에스트로겐 수용체에 결합하여 에스트라디올의 활성을 억제하는 효과를 지니는 것으로 보고된바 있다(Amadasi et al., Chem. Res. Toxicol, 2009).

[0005] 이처럼, 프로필 갈레이트에 의한 다양한 약리적 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 남성 생식기 질환과 관련하여 프로필 갈레이트의 효능에 대해 알려진 바는 없다.

[0006] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 남성 생식기 질환 치료 물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 프로필 갈레이트가 고환 세포주의 증식을 억제하고, 세포의 사멸효과를 향상시키는 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 고환 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 고환 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 고환 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 고환 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 조성물은 고환 세포주의 증식을 억제하고, 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 고환 세포주의 비정상적 증식에 의한 남성 생식기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품, 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 프로필 갈레이트가 고환 세포주의 증식 및 세포주기에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 프로필 갈레이트가 고환 세포주의 미토콘드리아 기능 장애 및 세포사멸 유도에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 프로필 갈레이트가 고환 세포주의 칼슘항상성 저해에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4 및 도 5는 프로필 갈레이트가 고환 세포주 내 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 프로필 갈레이트와 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 고환 세포주 내 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 프로필 갈레이트 처리에 따른 고환 세포주 내 mRNA 발현 양상 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 프로필 갈레이트 처리에 따른 mRNA 발현 변화 및 위치를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 프로필 갈레이트의 고환 세포주 내 작용 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 프로필 갈레이트에 의한 고환 세포주의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 9).

[0020] 본 발명은 일 관점에서 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 다른 관점에서 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 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, 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.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 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.

[0029] 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 있어서, 상기 프로필 갈레이트가 고환 세포주의 증식과 관련된 PI3K/AKT, MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 프로필 갈레이트가 소포체 스트레스를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 프로필 갈레이트가 미토콘드리아 기능장애 및 칼슘항상성 저해를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 프로필 갈레이트가 스테로이드 생합성, 세포주기, 호르몬 수용체 및 정자형성과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 남성 생식기 질환은 고환 세포주의 비정상적 증식에 의한 것이라면 모두 가능하며, 예를 들어 라이디히(Leydig) 세포 종양, 세르톨리(Sertoli) 세포 종양, 고환염, 부고환염, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0036] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0038] 본 발명은 다른 관점에서, 프로필 갈레이트를 포함하는 조성물을 이용하여 고환 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명은 또 다른 관점에서, 프로필 갈레이트를 포함하는 조성물을 이용하여 고환 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0041] [실시예]

[0042] 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.

[0044] **<실험 방법>**

[0045] 실험 재료

[0046] 후보 조성물질인 프로필 갈레이트는 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 프로필 갈레이트에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-ERK1/2, P38 MAPK, JNK, P90RSK, c-jun, AKT, P70S6K, S6, eIF2α, Bax, Bak, Bcl-xL 단백질 및 total-ERK1/2, P38 MAPK, JNK, P90RSK, c-jun, AKT, P70S6K, S6, eIF2α, caspase-9, caspase-3에 대한 항체를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다. 또한, 신호전달 억제제로서 PI3K 억제제인 LY294002, ERK1/2 억제제인 U0126 및 JNK 억제제인 SP600125를 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0048] 세포배양

[0049] TM3(immature mouse leydig cell), TM4 (immature mouse sertoli cell) 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.

[0051] 실험동물

[0052] 40마리의 3주령 C57BL/6 수컷 마우스를 DBL에서 구입하여 사육장에 1주일간 사육하며 환경에 적응시켰다. 마우스들은 표준사료(standard chow)를 섭취하였으며, 12시간 주기로 소등되는 환경에서 길러졌다. 모든 실험 절차는 고려대학교의 IACUC 승인 (KUIACUC-20171109-1)을 받아 진행되었으며, 적응기간이 끝난 후 무작위로 두 그룹으로 나뉘어 실험을 시작하였다. 각 그룹은 마리당 20마리로 이루어져 있으며 대조군으로는 DMSO를 사용하였다. 4주간 매 3일 마다 100 μl의 프로필 갈레이트를 50 mg/kg 농도로 복강 내 주입하였으며, 4주 후 고환조직은 각각 RNA 추출과 파라핀 블락을 만들기 위해 샘플링 되었다.

[0054] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0055] 마우스 고환 세포주의 증식 능력에 프로필 갈레이트가 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 3×10^3개의 세포와 배지 100 ㎕를 96 well에 분주하고 프로필 갈레이트를 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10, 20, 50 μM 또는 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 μM) 처리하여 24시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 라이디히 세포와 세르톨리 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어주었다. 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.

[0057] 면역형광법

[0058] 3×10^4개의 라이디히 세포 및 세르톨리 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 프로필 갈레이트를 20 또는 10 μM으로 24시간 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 1시간 동안 배양하였고, 이후 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 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.

[0060] Propidium iodide (PI)를 이용한 세포주기 분석

[0061] 프로필 갈레이트의 마우스 고환 세포주의 세포주기의 정지 효과를 확인하기 위하여 BD Biosicences사의 Propidium iodide (PI) 시약을 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 1×10^5 세포를 6 well에 배양하고 60 ~ 70% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 프로필 갈레이트를 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10, 20, 50 μM 또는 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 μM) 처리하여 24시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 2번 워싱을 진행하고 70%의 에탄올로 고정시켜 4℃에 하루 동안 보관되었다. 다음으로 PBS로 2번 워싱을 진행하고 10 mg/ml의 RNase A 5 μL, 50 mg/ml PI 5 μL을 PBS에 함께 혼합하여 실온에 30분동안 빛을 차단한 채 염색한다. 이후 PBS를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 세포주기의 변화를 측정하였다.

[0063] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0064] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 1×10^5개의 마우스 고환 세포를 6 well에 배양하고 60 ~ 70% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 프로필 갈레이트를 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포를 JC-1 staining solution에 풀어준 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0066] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0067] 마우스 고환 세포에 프로필 갈레이트 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 고환 세포주로부터 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, ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0069] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석

[0070] 3×10^4개의 마우스 고환 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 프로필 갈레이트 20 또는 10 μM을 24시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4%

paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 한번 헹궈내고 0.1% sodium citrate에 0.1% Triton X-100가 함유된 용액을 사용하여 아이스 위에서 2분간 인큐베이션 시킨 다음, 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 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0072] Fluo-4 AM 염색을 통한 세포질 내 칼슘농도 변화 측정

[0073] 세포질 내 칼슘농도를 측정하기 위해 Fluo-4 AM을 사용하여 측정하였다. 1×10^5 개의 라이디히 및 세르톨리 세포를 6 well에 배양하고 60 ~ 70% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 프로필 갈레이트을 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포를 Fluo-4 staining solution에 풀어준 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 PBS로 워싱한 후 다시 원심분리로 세포 pellet을 얻었다. 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0075] Rhod-2 AM 염색을 통한 미토콘드리아 기질 내 칼슘 농도 측정

[0076] 세포질 내 칼슘농도를 측정하기 위해 Rhod2-AM을 사용하여 측정하였다. 1×10^5 개의 마우스 고환 세포주를 6 well에 배양하고 60 ~ 70% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 프로필 갈레이트을 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포를 Rhod2 staining solution에 풀어준 후 빛을 차단시켜 4℃ 냉장상태 내에서 30분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 HBSS (w/o Ca2+, Mg2+) 500 μl로 세포 pellet을 풀어준 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 10분 동안 배양하였고, 이후, 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0078] 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응

[0079] 라이디히 및 세르톨리 세포와 샘플링한 고환 조직을 Trizol reagent를 통해 제조사의 매뉴얼대로 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.

[0081] 현장 혼성화 (In situ hybridization) 분석

[0082] 혼성화 프루브를 만들기 위하여, RT-PCR분석에 사용되는 프라이머로 합성한 cDNA로부터 PCR prouduct를 얻어내었다. 이 PCR product를 겔에 내린 후 추출하여 TOPO vector (Invitrogen)를 이용해 클로닝하였다. 유전자 서열이 포함되어있는 플라스미드는 T7-과 SP6-specific primer를 사용하여 증폭하였고, DIG RNA labeling kit (Roche)를 이용하여 RNA probe에 digoxigenin을 라벨링 하였다. 조직 절편의 경우 탈파라핀화, 재수화과정을 거쳐 PBS에 1%의 Triton X-100를 녹인 용액에 20분간 처리하고, 이후 DEPC-PBS로 두 번 워싱을 진행하였다. 4% 파라포름알데하이드로 후 고정을 진행한 후에, 실온에서 최소 10분 가 rehybridization 용액에 조직 절편을 인큐베이션 시켰다. 혼성화 및 블로킹 단계를 거친 후, 조직 절편은 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase, Roche)가 결합되어 있는 양(sheep)의 anti-DIG 항체에 오버나이트 인큐베이션 하였다. 0.4 mM의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)와 0.4mM의 나이트로블루 테트라졸륨(nitroblue tetrazolium, NBT) 및 2mM의 레바미솔(levamisole, sigma)을 포함한 용액으로 조직절편내 mRNA 발현을 가시화하였다.

[0084] 통계분석

[0085] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0087] **<결과 및 고찰>**

[0088] 프로필 갈레이트의 마우스 TM3 (라이디히 세포)와 TM4 (세르톨리 세포)에 대한 증식 억제 효과

[0089] 프로필 갈레이트에 대한 라이디히 세포와 세르톨리 세포의 세포 증식 능력에 대해 알아보기 위해, 프로필 갈레이트를 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10, 20, 50 μM) 처리한 배지에 24시간 배양하여 BrdU reagents를 이용해 세포 증식을 측정하였다 (도 1). TM3 세포에서는 50 μM의 프로필 갈레이트를 처리 시 세포 증식이 50%로 감소하였고 (p <0.001) , TM4 세포에서는 10 μM의 프로필 갈레이트 처리시 43.82%까지 세포 증식이 감소하는 효과를 보였다 (도 1A, 1B). 또한, 세포 증식의 마커로 쓰이는 PCNA의 발현을 면역형광법으로 확인한 결과, 대조군에 비해 TM3, TM4 세포에서 모두 유의적으로 감소하였다 (도 1C, 1D). 또한 세포 주기와 관련하여, 프로필 갈레이트는 용량의존적으로 TM3, TM4 세포의 Sub-G1기 그룹의 세포 수를 약 5.2배, 4.2배까지 증가시키고, G0/G1에 해당하는 세포의 수를 감소시키는 효과를 보였다 (도 1E, 1F). 이러한 결과를 통해 프로필 갈레이트는 라이디히 세포와 세르톨리 세포에서 세포증식과 DNA복제를 저해함으로써 sub-G1기의 세포를 증가시킨다는 것을 확인하였다.

[0091] 프로필 갈레이트에 의해 유도된 TM3, TM4 세포의 미토콘드리아 기능 장애 및 세포사멸 유도효과 분석

[0092] 프로필 갈레이트의 미토콘드리아에 대한 기능장애 여부에 대해 알아보기 위해, JC-1 dye를 이용하여 미토콘드리아 탈분극에 대해 실험을 수행하였다. 용량의존적으로 프로필 갈레이트를 처리할 경우 미토콘드리아 막전위가 TM3와 TM4 세포에 각각 약 7.6배, 4.7배 감소하는 것으로 나타났다 (도 2A, 2B). 또한, 미토콘드리아 매개 세포자멸사가 일어났는지 확인하기 위해, 세포자멸사 관련 단백질 발현을 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다. 먼저, 프로아폽토틱 단백질인 Bak과 Bax의 경우 프로필 갈레이트의 용량의존적 (TM3의 경우 0, 10, 20, 50 μM, TM4의 경우 0, 2, 5, 10 μM) 처리에 따라 최대 1.5배에서 2.4배까지 증가하였고, 안티아폽토틱 단백질인 Bcl-xL의 경우 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (도 2C, 2D). 추가로, 잘린 형태의 Caspase-9이 TM3, TM4 모두에서 증가하였으며, Caspase-3의 경우 TM3에서만 유의적으로 프로필 갈레이트에 의해 잘린 형태가 증가하였다 (도 2E, 2F). 더불어, TUNEL assay로 프로필 갈레이트 처리시 TM3와 TM4 세포의 핵 내에서 DNA 분절화가 일어나, 세포자멸사가 일어났음을 공초점 현미경을 통해 붉은 형광이 증가한 것으로 확인하였다 (도 2G). 이러한 결과를 통해, 프로필 갈레이트가 마우스 고환 세포주인 TM3, TM4 세포에서 미토콘드리아의 기능을 와해하고 세포자멸사를 유도한다는 것을 확인하였다.

[0094] TM3, TM4세포에서 각기 다른 기작으로 작용하는 프로필 갈레이트의 칼슘 항상성 조절 장애 효과 및 소포체 스트레스 유도 효과 분석

[0095] 칼슘 항상성을 잘 유지하는 것 또한 미토콘드리아의 주된 기능 중 하나이기 때문에, 프로필 갈레이트가 칼슘 항상성 유지에 미치는 영향에 대해 실험을 진행하였다 (도 3). 먼저, 세포질 내 상대적인 칼슘 농도의 변화를 Fluo4-AM 염색을 통해 FACS로 측정 및 분석을 진행하였다. 그 결과 TM3 세포에서는 프로필 갈레이트의 처리 (0, 10, 20, 50 μM)에 따라 세포질 내 칼슘 농도가 41.7%까지 감소하는 것으로 나타났고, 반대로 TM4 세포에서는 프로필 갈레이트 처리 시 (0, 2, 5, 10 μM) 최대 453%까지 증가하는 것으로 나타났다 (도 3A, 3B). 미토콘드리아 기질 내 상대적인 칼슘 농도는 Rhod2-AM 염색을 통해 실험을 진행하였으며, TM3에서는 유의미한 변화가 없는 반면, TM4 세포에서는 대조군에 비해 프로필 갈레이트 처리 시 약 2배 가까이 증가하는 것을 확인하였다 (도 3C, 3D). 또한, 프로필 갈레이트 처리에 따른 TM3, TM4 세포 내 소포체 스트레스가 유도되었는지 확인하기 위해 웨스턴 블랏을 수행하였다. 마우스 고환 세포주 TM3, TM4 모두에서 프로필 갈레이트 처리에 따라 GRP78과 GADD153 단백질이 유의적으로 증가하였으며, TM4에서는 추가적으로 유의미한 IRE1α 단백질의 증가도 확인되었다 (도 3E, 3F). eIF2α의 인산화는 TM3에서만 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다 (도 3E, 3F). 이러한 결과를 통해, 프로필 갈레이트는 TM3와 TM4 세포에서 각기 다른 기작으로 세포질과 미토콘드리아 내 칼슘 항상성을 저해하고 소포체 스트레스를 유도한다는 것을 확인하였다.

[0097] TM3와 TM4세포에서 프로필 갈레이트에 의해 조절되는 MAPK와 PI3K/AKT 신호전달 기전 양상 분석

[0098] 프로필 갈레이트에 대한 MAPK와 PI3K/AKT 신호전달 경로에 대한 효과를 알기 위해, 웨스턴 블랏을 수행하였다. 프로필 갈레이트 처리에 따라 (TM3의 경우 0, 10, 20, 50 μM, TM4의 경우 0, 2, 5, 10 μM) TM3 세포서 ERK1/2의 인산화는 50 μM의 프로필 갈레이트를 처리한 TM3을 제외하고 점진적으로 증가하였으며, TM4에서는 약간 감소하였다 (도 4A). P38과 JNK의 인산화는 두 세포주 모두에서 프로필 갈레이트의 처리에 따라 1.5배에서 최대 5.2배까지 증가하는 경향을 보였으며 (도 4B, 4C), P90RSK는 ERK1/2의 인산화와 비슷한 경향을 보였다 (도 4D). c-jun 단백질은 두 세포주에서 모두 유의미한 변화가 일어나지 않았다 (도 4E). 대게 세포의 생존과 증식 신호와 관련된 PI3K/AKT 신호전달 경로의 경우, 예상과는 다르게 AKT의 인산화가 프로필 갈레이트의 용량의존적 처리에 따라 증가하는 경향을 보였다 (도 5A). 이와는 반대로 하위 신호로 알려진 P70S6K과 S6 단백질의 인산화는 TM3 세포에서는 각각 72%, 64%까지 감소하고 TM4 세포에서는 유의미한 변화가 없었다 (도 5B,5C). 이러한 결과를 통해 마우스 고환 세포주에서는 프로필 갈레이트 처리에 따라 P38과 JNK MAPK는 상향조절되고, PI3K/AKT 신호전달 경로에서는 각기 다르게 조절된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0100] 신호전달기전 억제제와 병용처리시 프로필 갈레이트의 TM3, TM4 세포 내 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 기전의 변화 양상 분석

[0101] 좀 더 정확한 세포전달 경로를 알기 위하여, 프로필 갈레이트에 신호전달 억제제를 같이 병용처리하여 웨스턴 블랏을 진행하였다. ERK1/2의 인산화는 해당 단백질의 억제제인 U0126에 의해 완전히 억제되었으며, AKT 억제제인 LY294002를 처리하였을 때에는 TM3에서는 인산화가 감소하지 않았으며, TM4에서는 감소한 효과를 나타내었다 (도 6A). 또한, TM4에서는 JNK 억제제인 SP600125 처리시 ERK1/2의 인산화가 감소함을 확인하였다(도 6A). 프로필 갈레이트에 의해 유도된 JNK의 인산화는 세 억제제에 의해 모두 감소하는 것으로 확인되었다 (도 6B). AKT의 경우, 두 세포주 모두에서 프로필 갈레이트에 의해 증가한 AKT는 LY294002에 의해 완전히 억제되었으며, SP600125 병용 처리시에는 본래의 수준을 회복하였다 (도 6C). 하지만 U0126을 통한 ERK1/2의 억제는, AKT의 인산화를 더욱 증가시키는 결과를 보였다 (도 6C). 일반적인 하위 신호로 알려진 P70S6K와 S6의 경우, 두 세포에서 모두 각 억제제에 의해 인산화가 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (도 6D,6E).

[0103] 프로필 갈레이트 처리에 따른 라이디히 세포와 세르톨리 세포 내 mRNA 발현 조절 효과 분석

[0104] 프로필 갈레이트 처리에 따른 mRNA 발현 변화를 세포주기에 관련된 유전자와 스테로이드 생합성에 관련된 유전자 및 수용체에 대해 알아보았다. 먼저, 세포주기 중 G1/S기에 특이적으로 작용하는 Ccnd1과 Ccne1 유전자의 경우 프로필 갈레이트의 용량의존적 처리 (TM3의 경우 0, 10, 20, 50 μM, TM4의 경우 0, 2, 5, 10 μM)에 따라 감소하는 효과를 보였다 (도 7A, 7B). 이는 세포주기 정지를 유발하는 in vitro의 결과와 상응하는 결과이다. 또한, 스테로이드 생합성에 관련한 유전자인 Srd5a2와 Srd5a3의 발현을 확인한 결과, TM3 세포에서 각각 54%, 67% 수준으로 감소하는 결과를 보였으며, TM4 세포에서는 Srd5a2의 발현이 28%까지 감소하였으나,Srd5a3는 오히려 120%까지 약간 증가하는 것으로 나타났다 (도 7C, 7D). 표피성장인자 수용체인 Egfr의 발현은 프로필 갈레이트 처리(TM3는 50 μM, TM4는 10 μM)에 따라 TM3와 TM4 세포에서 모두 절반 이하로 유의미하게 감소하였다 ($p < 0.001$) (도 7E). 정상적으로 호르몬 피드백 루프를 조절하는 inhibin 단백질을 암호화하는 유전자인 Inha와 AP-1 전사인자 소단위로 작동하는 Jund의 경우도 마찬가지로 마우스 고환 세포주 모두에 프로필 갈레이트 처리에 따라 감소하는 효과를 보였다(도 7F, 7G). 하지만 라이디히 세포에서 황체호르몬 수용체인 Lhr은 프로필 갈레이트 처리에 따른 유의적인 변화를 보이지 않았지만, 세르톨리 세포에서 안드로겐 수용체인 Ar은 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10 μM) 감소하는 효과를 보였다 (도 7H, 7I).

[0106] C57BL/6 마우스의 고환에서 조직-, 세포- 특이적으로 발현하는 호르몬 수용체들과 스테로이드 합성 관련 효소들의 발현 양상 분석

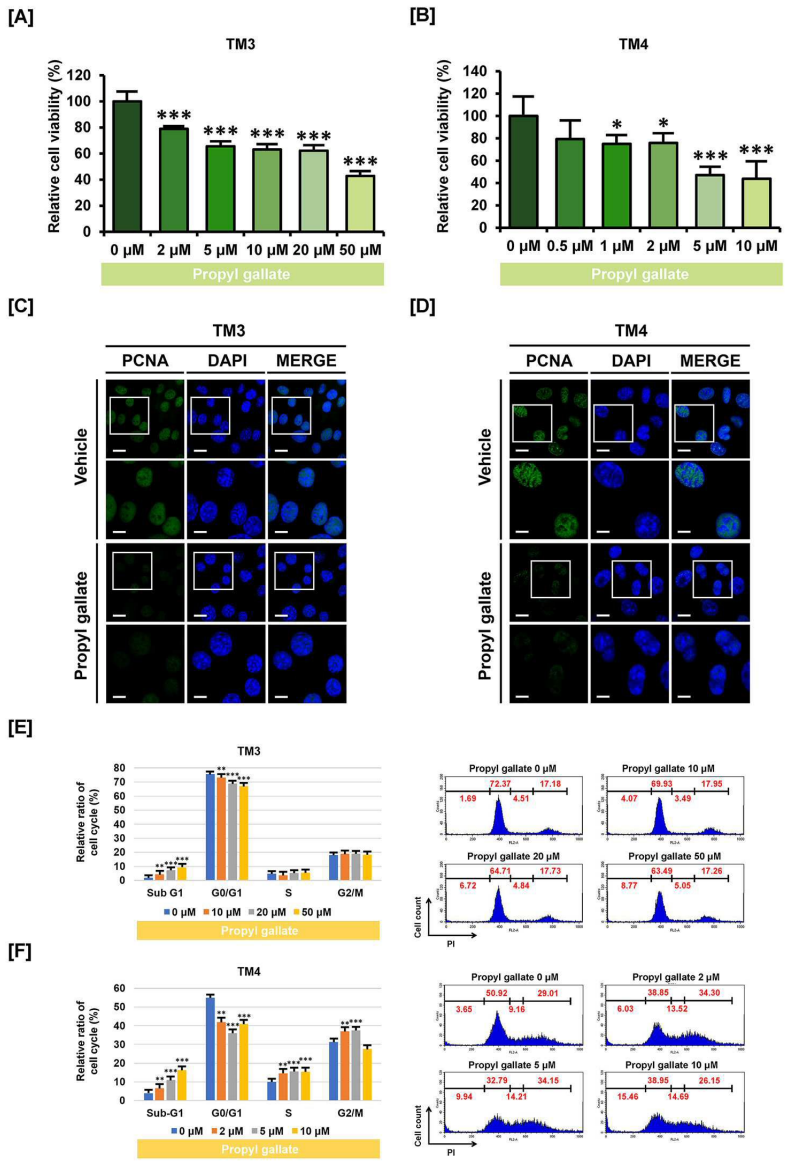
[0107] 대조군으로 DMSO를 주입하고, 실험군으로 프로필 갈레이트를 주입한 마우스들은 실험이 끝난 후, 희생된 고환조직을 샘플링하여 무게를 측정하였고 두 그룹간 유의적인 차이는 확인되지 않았다 (도 8A). 추가적으로, in vitro에서 확인한 유전자 발현 조절 효과가 in vivo에서도 동일한지 확인하기 위해 샘플링한 고환조직에서 RNA

를 추출하여 mRNA 발현을 확인해 보았다 (도 8B-K). 그 결과, Ccne1, Ccnd1, Lhr, Egfr, Inha, Jund 모두 유의적으로 프로필 갈레이트 처리시 54 ~ 79%까지 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 8B, 8C, 8F, 8H, 8J, 8K). 이와는 반대로 Srd5a2와 Ar에서는 유의미한 변화가 없었으며, Srd5a3와 Fshr은 오히려 프로필 갈레이트 처리시 각 1.2배, 1.8배 증가한 경향을 보였다 (도 8D, 8E, 8G, 8I). 이 중 몇 가지 유전자에 대해 mRNA의 위치를 확인하기 위해 현장 혼성화(in situ hybridization)를 수행하였다. 먼저, Ccnd1과 Srd5a2 mRNA 발현은 프로필 갈레이트 처리에 따라 세르톨리 세포, 정원세포, 정모세포, 정세포, 정자에서 확연히 감소하였다 (도 8L). 또한, 프로필 갈레이트 처리 시 Lhr mRNA 발현은 라이디히 세포에서 감소하였지만 Fshr 발현은 세르톨리 세포에서 증가한 것을 확인할 수 있었다 (도 8L). Egfr과 Ar의 mRNA 발현은 세르톨리 세포, 정원세포, 정모세포, 정세포 및 정자에서 대조군보다 낮게 발현됨을 확인하였다(도 8L). 정자형성과정에 중요한 역할을 수행하는 Inha과 Jund의 경우에도 프로필 갈레이트 처리에 따라 고환 조직 전반적으로 뚜렷히 감소한 것을 확인할 수 있었다 (도 8L).

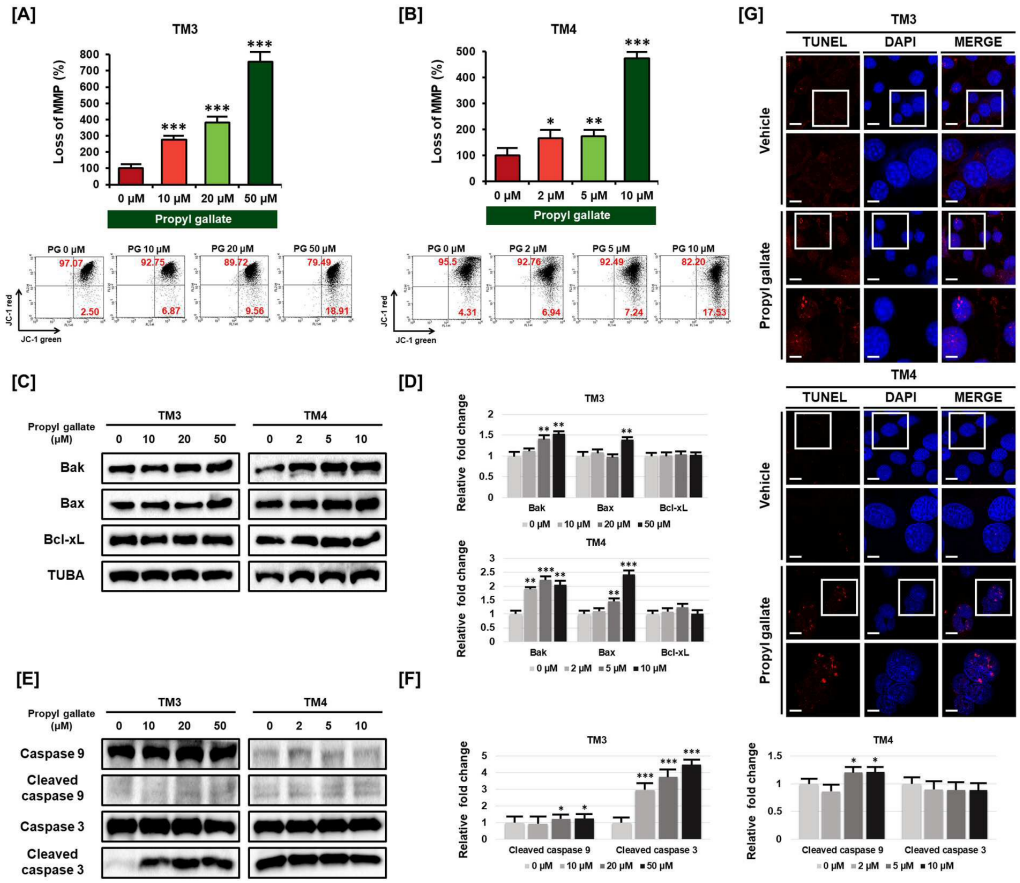
[0109] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

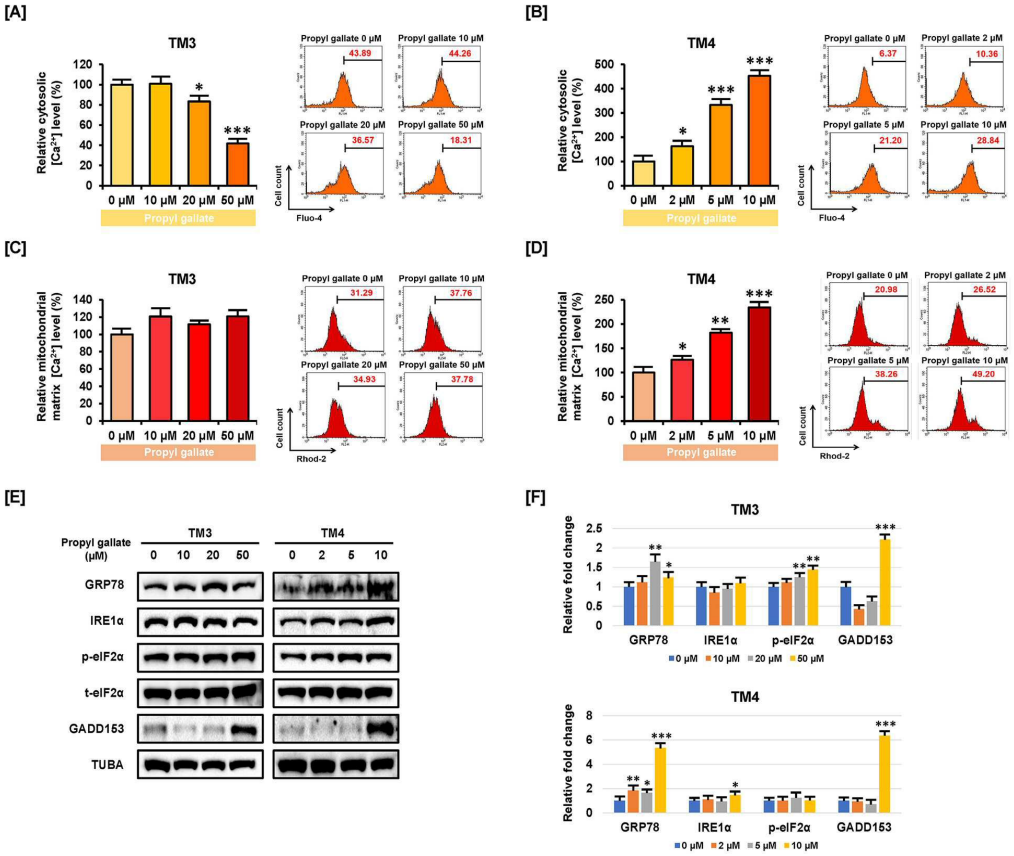
도면1


[A]
TM3
Relative cell viability (%)
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM 20 μM 50 μM
Propyl gallate
[B]
TM4
Relative cell viability (%)
0 μM 0.5 μM 1 μM 2 μM 5 μM 10 μM
Propyl gallate
[C]
TM3
PCNA
DAPI
MERGE
Vehicle
Propyl gallate
[D]
TM4
PCNA
DAPI
MERGE
Vehicle
Propyl gallate
[E]
TM3
Relative ratio of cell cycle (%)
Sub G1
G0/G1
S
G2/M
0 μM 10 μM 20 μM 50 μM
Propyl gallate
Propyl gallate 0 μM
Propyl gallate 10 μM
Propyl gallate 20 μM
Propyl gallate 50 μM
Cell count
PI
[F]
TM4
Relative ratio of cell cycle (%)
Sub-G1
G0/G1
S
G2/M
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM
Propyl gallate
Propyl gallate 0 μM
Propyl gallate 2 μM
Propyl gallate 5 μM
Propyl gallate 10 μM
Cell count
PI

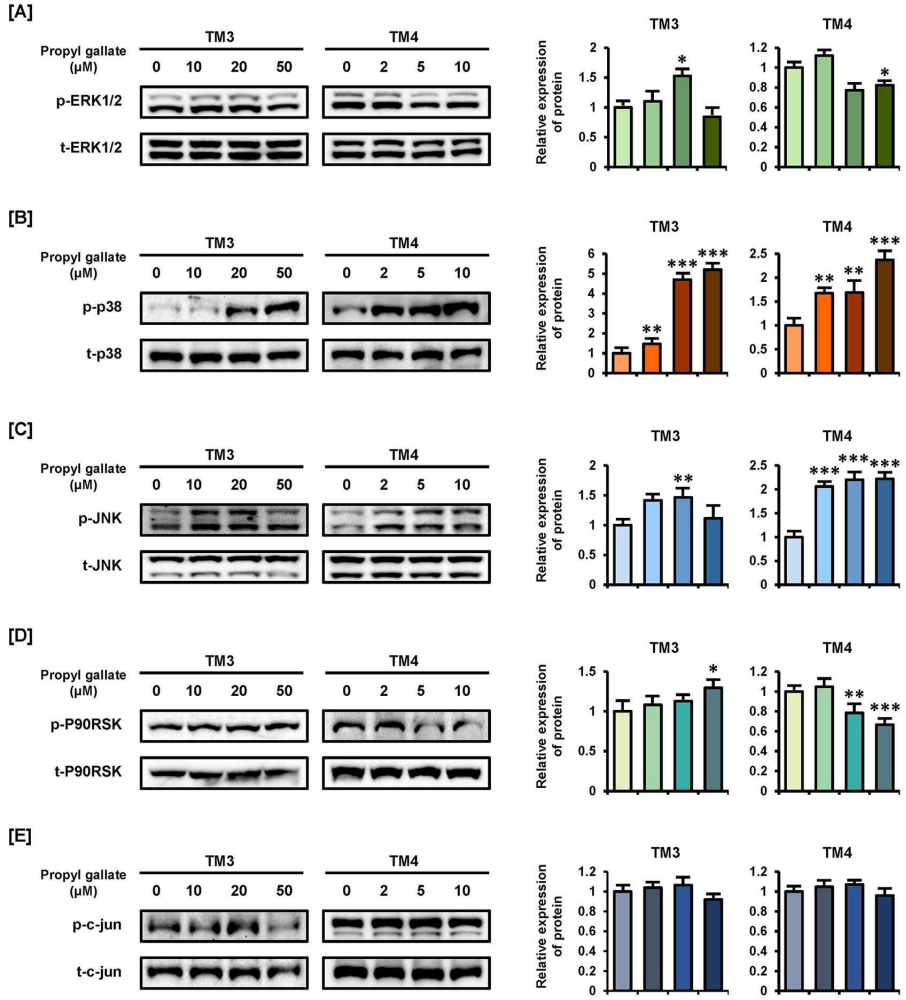
도면2


[A]
TM3
Loss of MMP (%)
0 μM 10 μM 20 μM 50 μM
Propyl gallate
PG 0 μM
PG 10 μM
PG 20 μM
PG 50 μM
JC-1 red
JC-1 green
[B]
TM4
Loss of MMP (%)
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM
Propyl gallate
PG 0 μM
PG 2 μM
PG 5 μM
PG 10 μM
[C]
Propyl gallate (μM)
TM3
TM4
Bak
Bax
Bcl-xL
TUBA
[D]
TM3
Relative fold change
Bak
Bax
Bcl-xL
0 μM 10 μM 20 μM 50 μM
TM4
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM
[E]
Caspase 9
Cleaved caspase 9
Caspase 3
Cleaved caspase 3
[F]
TM3
Cleaved caspase 9
Cleaved caspase 3
TM4
[G]
TM3
TUNEL
DAPI
MERGE
Vehicle
Propyl gallate
TM4

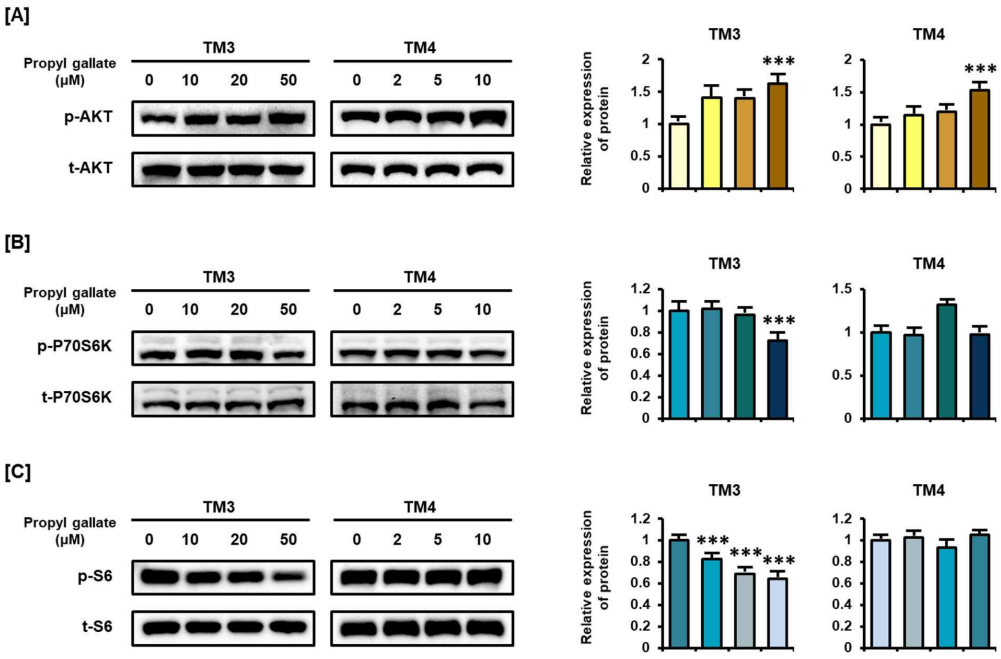
도면3


[A]
TM3
Relative cytosolic [Ca2+] level (%)
0 μM 10 μM 20 μM 50 μM
Propyl gallate
Propyl gallate 0 μM
Propyl gallate 10 μM
Propyl gallate 20 μM
Propyl gallate 50 μM
43.89
44.26
36.57
18.31
Cell count
Fluo-4
[B]
TM4
Relative cytosolic [Ca2+] level (%)
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM
Propyl gallate
Propyl gallate 0 μM
Propyl gallate 2 μM
Propyl gallate 5 μM
Propyl gallate 10 μM
6.37
10.36
21.20
28.84
Fluo-4
[C]
TM3
Relative mitochondrial matrix [Ca2+] level (%)
0 μM 10 μM 20 μM 50 μM
Propyl gallate
Propyl gallate 0 μM
Propyl gallate 10 μM
Propyl gallate 20 μM
Propyl gallate 50 μM
31.29
37.76
34.93
37.78
Cell count
Rhod-2
[D]
TM4
Relative mitochondrial matrix [Ca2+] level (%)
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM
Propyl gallate
Propyl gallate 0 μM
Propyl gallate 2 μM
Propyl gallate 5 μM
Propyl gallate 10 μM
20.98
26.52
38.26
49.20
Cell count
Rhod-2
[E]
Propyl gallate (μM)
TM3
0 10 20 50
TM4
0 2 5 10
GRP78
IRE1α
p-eIF2α
t-eIF2α
GADD153
TUBA
[F]
TM3
Relative fold change
GRP78 IRE1α p-eIF2α GADD153
0 μM 10 μM 20 μM 50 μM
TM4
Relative fold change
GRP78 IRE1α p-eIF2α GADD153
0 μM 2 μM 5 μM 10 μM

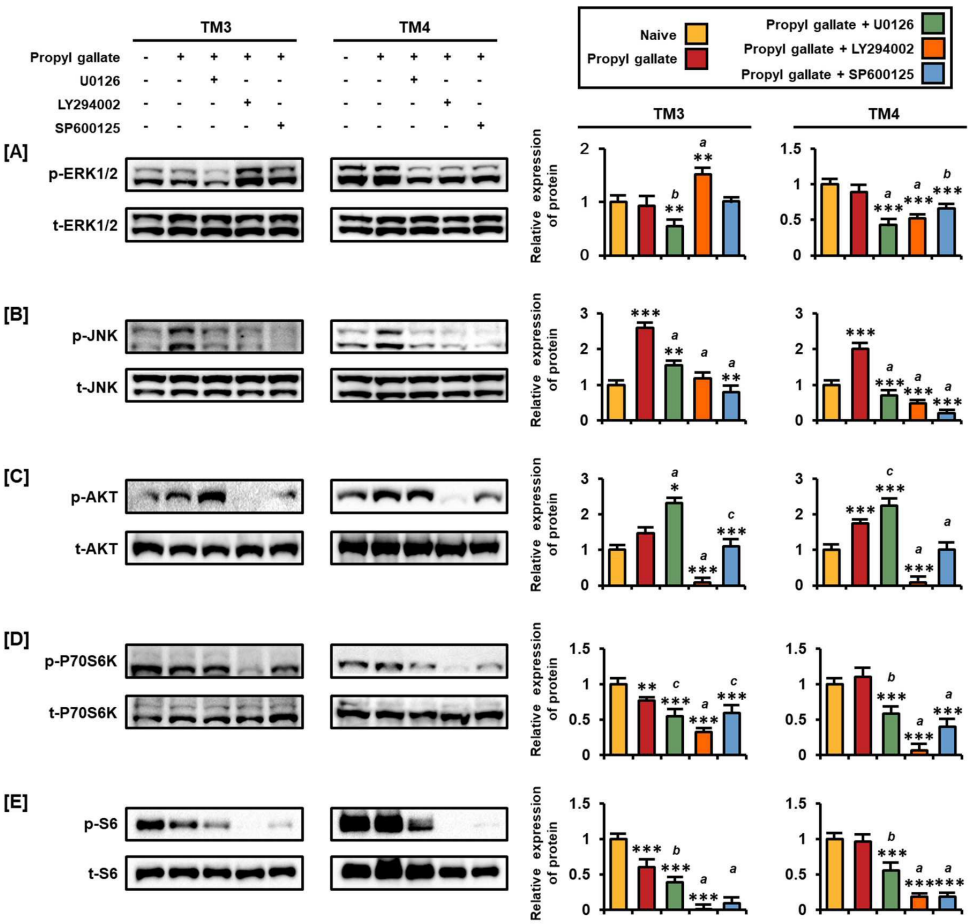
도면4


[A]
TM3
TM4
Propyl gallate (μM)
0 10 20 50
0 2 5 10
p-ERK1/2
t-ERK1/2
Relative expression of protein
[B]
p-p38
t-p38
[C]
p-JNK
t-JNK
[D]
p-P90RSK
t-P90RSK
[E]
p-c-jun
t-c-jun

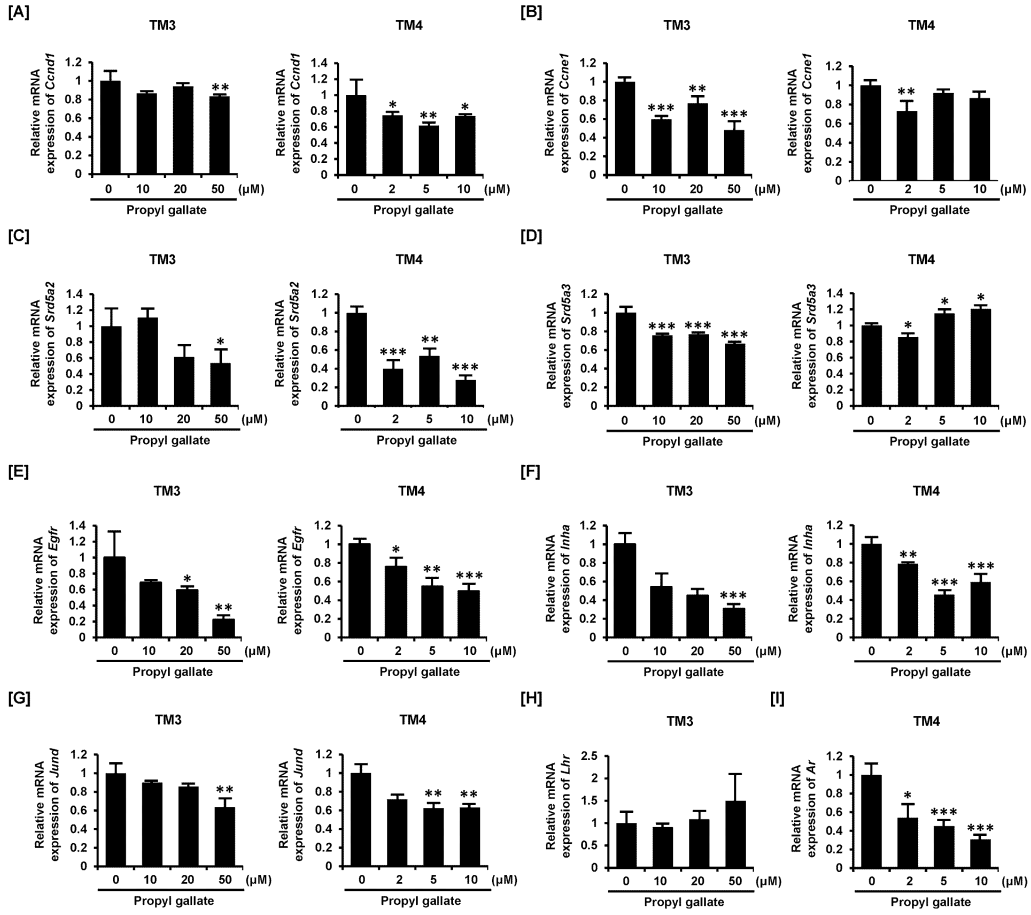
도면5


[A]
Propyl gallate (μM)
TM3
TM4
0 10 20 50
0 2 5 10
p-AKT
t-AKT
Relative expression of protein
***
[B]
p-P70S6K
t-P70S6K
[C]
p-S6
t-S6

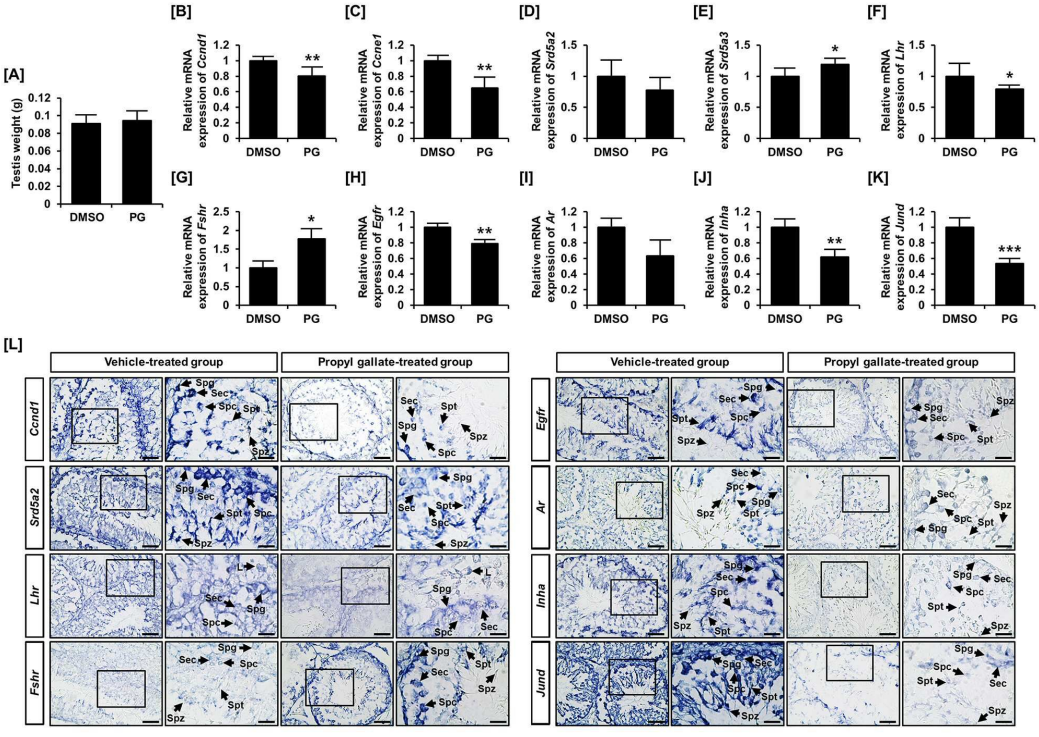
도면6


TM3
TM4
Propyl gallate
U0126
LY294002
SP600125
Naive
Propyl gallate
Propyl gallate + U0126
Propyl gallate + LY294002
Propyl gallate + SP600125
[A]
p-ERK1/2
t-ERK1/2
[B]
p-JNK
t-JNK
[C]
p-AKT
t-AKT
[D]
p-P70S6K
t-P70S6K
[E]
p-S6
t-S6
Relative expression of protein

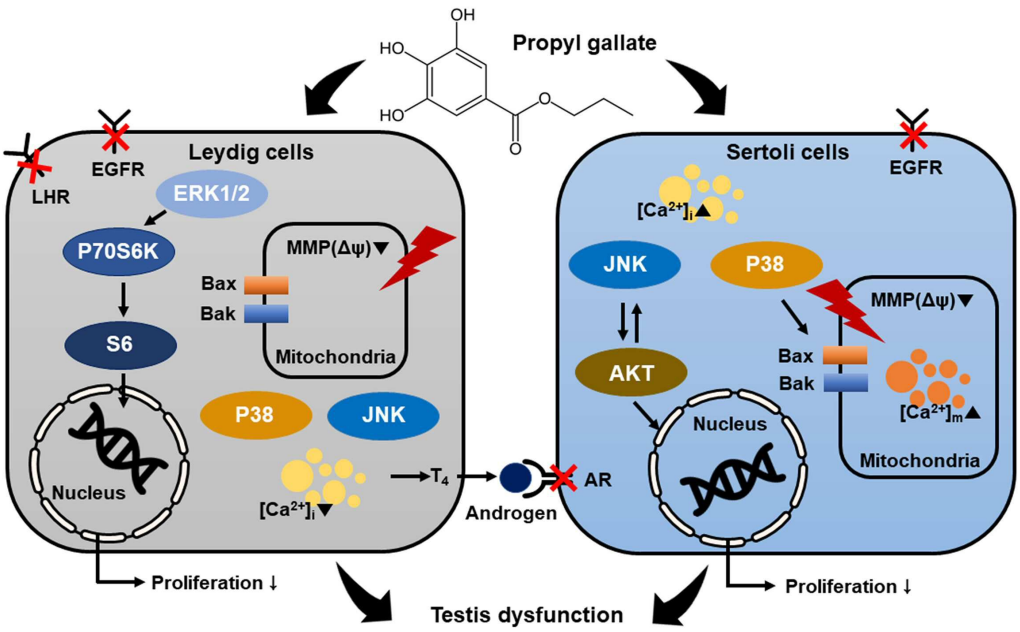
도면7


[A]
TM3
TM4
Relative mRNA expression of Ccnd1
[B]
Relative mRNA expression of Ccne1
[C]
Relative mRNA expression of Srd5a2
[D]
Relative mRNA expression of Srd5a3
[E]
Relative mRNA expression of Egfr
[F]
Relative mRNA expression of Inha
[G]
Relative mRNA expression of Jund
[H]
Relative mRNA expression of Lhr
[I]
Relative mRNA expression of Ar
0 10 20 50 (μM)
0 2 5 10 (μM)
Propyl gallate

도면8


[A]
Testis weight (g)
[B]
Relative mRNA expression of Ccnd1
[C]
Relative mRNA expression of Ccne1
[D]
Relative mRNA expression of Srd5a2
[E]
Relative mRNA expression of Srd5a3
[F]
Relative mRNA expression of Lhr
[G]
Relative mRNA expression of Fshr
[H]
Relative mRNA expression of Egfr
[I]
Relative mRNA expression of Ar
[J]
Relative mRNA expression of Inha
[K]
Relative mRNA expression of Jund
DMSO PG
[L]
Vehicle-treated group
Propyl gallate-treated group
Ccnd1
Srd5a2
Lhr
Fshr
Egfr
Ar
Inha
Jund
Spg
Sec
Spc
Spt
Spz
L

도면9


Propyl gallate
OH
HO
HO
O
O
Leydig cells
EGFR
LHR
ERK1/2
P70S6K
S6
Nucleus
MMP(Δψ)▼
Bax
Bak
Mitochondria
P38
JNK
[Ca2+]i▼
T4
Androgen
AR
Proliferation ↓
Sertoli cells
EGFR
[Ca2+]i▲
JNK
P38
AKT
Nucleus
MMP(Δψ)▼
Bax
Bak
[Ca2+]m▲
Mitochondria
Proliferation ↓
Testis dysfunction