



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0065888
(43) 공개일자 2014년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/56 (2006.01) A61K 31/573 (2006.01)

A61P 7/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0132906

(22) 출원일자 2012년11월22일

심사청구일자 2012년11월22일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

강덕희

서울 영등포구 여의동로3길 10, 301동 3203호 (여의도동, 여의도자이)

(74) 대리인

안소영

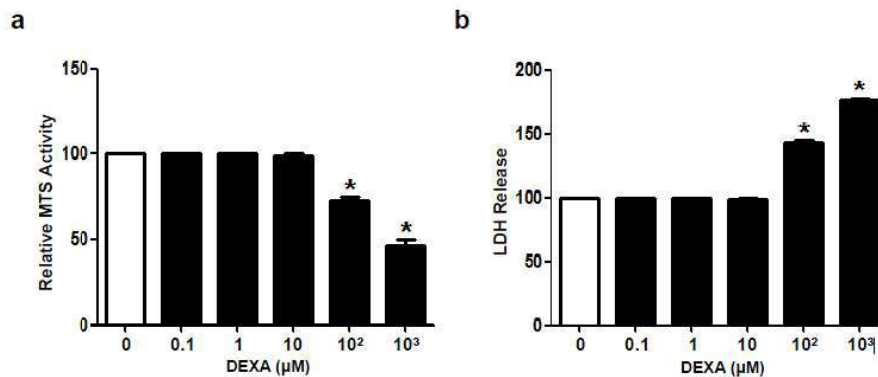
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 스테로이드를 유효성분으로 함유하는 복막기능부전 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 스테로이드를 포함하는 복막기능부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학 조성물은 TGF- β 에 의해 유도되는 EMT 차단함으로써 복막 섬유화를 억제할 수 있으며, 복막 투석액으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A100422

부처명 보건복지부

연구사업명 단독중계연구

연구과제명 스테로이드가 복막세포 표현형변이 및 복막섬유화에 미치는 영향

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

스테로이드를 포함하는 복막기능부전 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 스테로이드는 당질 코르티코이드인 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 당질 코르티코이드는 코르티솔, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 프르드로 코르티솔, 코르티손, 하이드로코르티손, 트리암시노론, 베타메타손, 텍사메타손 또는 이들의 약학적으로 가능한 염으로 이루어진 군에서 선택된 것인 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 당질 코르티코이드는 텍사메타손인 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 스테로이드의 농도는 $0.1 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ 인 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 복막기능부전 예방 또는 치료는 복막섬유화 억제에 의한 것인 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 복막섬유화 억제는 $\text{TGF-}\beta$ 에 의해 유도되는 EMT 차단에 의한 것인 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 복막 투석액으로 사용되는 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 전해질 및 완충제를 더 포함하는 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 스테로이드를 유효성분으로 함유하는 복막기능부전 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 복막투석(Peritoneal Dialysis; PD)은 혈액투석 및 신장이식과 함께 신부전의 치료법으로 사용되고 있다. 복막 투석법은 신부전 환자의 복강 내로 카테터를 삽입하고, 이를 통하여 투석액 백으로부터 복막 투석액을 복강 내로 주입하고, 일정시간 저장한 후, 상기 카테터를 통하여 체외로 배출하는 과정으로 이루어진다.

[0003] 이러한 복막투석법은 인공막에 의한 혈액투석법과는 달리, 환자 자신의 생체막인 복막을 통하여 상시 연속적으로 혈액 정화를 할 수 있으므로 혈액투석법보다도 생리적으로 우수하고, 환자의 사회 활동도 용이한 이점이 있어 널리 이용되고 있다.

[0004] 그러나, 장기 복막투석 환자 중 일부는 복막의 손상으로 더 이상 복막투석을 할 수 없게 된다. 이는 복막의 생체 부적합한(bio-incompatible) 복막 투석액에의 노출과 반복적인 복막염이 복막손상의 원인으로 알려져 있다. 장기간 복막투석을 시행하면 복막에는 복막 섬유화(Peritoneal Fibrosis)와 신생혈관형성을 포함한 혈관병증 같은 구조적인 변화가 일어난다. 드물게는 섬유화가 극단적으로 진행하여 피막화 복막경화증(encapsulating

peritoneal sclerosis)이 발생하기도 한다. 상기 복막 섬유화와 혈관병증은 서로 밀접한 관계가 있으며, 신생혈관형성이 복막 섬유화의 한 현상으로 나타나기도 하고 섬유화 자체가 신생혈관들을 안정화시키는 역할을 한다. 섬유화에 동반된 복막의 혈관병증은 한외여과부전의 원인으로 복막의 기능부전을 초래한다.

[0005] 일반적인 복막 투석액은 정상인이 노로서 배출하고 있는 혈액 중의 과잉 수분을 제거하기 위하여 복강 내로 주입하는 투석액에 삼투압제를 첨가한다. 상기 삼투압제는 투석액의 삼투압을 혈액의 삼투압보다 높게 하여 한외여과에 의하여 수분을 제거할 수 있다. 삼투압을 높이는 수단으로는 주로 포도당이 사용되어 왔다.

[0006] 그러나 상기 포도당 함유 복막 투석액은 포도당분해산물(Glucose Degradation Products, 이하 'GDP'라 함)을 형성시키는 것으로 알려져 있다. 상기 GDP로는 포도당 함유 투석액의 가열 멸균시 만들어 지는 아세트알데히드(acetaldehyde), 포름알데히드(formaldehyde), 메틸글리옥살(methylglyoxal), 글리옥살(glyoxal), 5-하이드록시메틸 퍼알데히드(5-hydroxymethyl furaldehyde), 2-퍼알데히드(2-furaldehyde) 및 3-데옥시글루코스(3-deoxyglucosone)와 같은 물질들을 말하며, 이들 포도당분해산물(GDP) 및 고농도의 포도당은 복막의 후기당화산물(Advanced Glycation End-product, 이하 'AGE'라 함)의 생성을 촉진시키고 복막 섬유화를 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 한편, 복막중피세포(Human Peritoneal Mesothelial Cell, 이하 'HPMC'라 함)는 복막 투석액과 가장 먼저 접촉하게 되는 기관의 세포로서, 생체 부적합한 투석액이 주입되는 경우 복막 섬유화가 발생하는 곳이다.

[0008] 구체적으로 복막중피세포(HPMC)가 고포도당 함유 복막 투석액에 노출되면, 포도당분해산물(GDP) 및 후기당화산물(AGE)가 생성되고, 생성된 AGE가 그 수용체인 RAGE와 결합하면, TGF- β (Transforming Growth Factor- β)의 발현이 증가한다. 이렇게 발현된 TGF- β 는 복막중피세포(HPMC)의 근육섬유모세포(myofibroblast)로의 전이를 일으키고, 이와 같은 EMT(Epithelial-to-Mesenchymal Transition)는 복막 섬유화의 중요한 기전으로 알려져 있다.

[0009] 따라서, 복막중피세포(HPMC)의 EMT를 차단으로 복막 섬유화를 예방 또는 치료할 수 있다는 기대를 갖게 하며, 또한 그러한 시도가 이루어져 왔다. 예를 들면, 이코텍스트린(icodextrin), Low-GDP 함유 복막 투석액, 아미노산 함유 복막 투석액, 라파마이신(rapamycin) 함유 복막 투석액 등이 있다.

[0010] 그러나, 이코텍스트린 함유 복막 투석액은 복막의 내인성 방어체계를 활성화시킬 수 없으며, 조직적 부작용이 있는 것으로 보고되었다. 또한, Low-GDP 함유 복막 투석액은 GDP 화합물이 일부 포함되어 있으므로 여전히 GDP에 의한 부작용 문제가 존재하며, 아미노산 함유 투석액은 혈중 질소를 현저히 상승시켜 혈중 요소 농도에 악영향을 미칠 수 있는 단점이 존재한다. 그리고, 라파마이신 함유 복막 투석액은 높은 가격으로 인하여 상업화가 어려우며, 약동학이 규명되지 않은 문제점이 있다.

[0011] 이에 본 발명자는 상기 문제점이 없고, 복막 섬유화를 방지하여 복막기능부전을 예방 또는 치료할 수 있는 포도당 대체 약학 조성물을 개발하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2001-0040586호(2001. 05. 15 공개)

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) Nephroal Dial Transplant, 2011 Jan; 26(1):282-91 (Low-GDP peritoneal dialysis fluid ('balance') has less impact in vitro and ex vivo on epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of mesothelial cells than a standard fluid)

(비특허문헌 0002) Int J Artif Organs, 2005 Feb; 28(2):164-9 (Effects of rapamycin on the epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 스테로이드를 유효성분으로 함유하는 복막기능부전 예방 또는 치료용, 특히 복막 섬유화를 억제하는 약학 조성물을 제공하는데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 스테로이드를 유효성분으로 함유하는 복막 투석액을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은 스테로이드를 포함하는 복막기능부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 스테로이드는 당질 코르티코이드인 것이 바람직하다. 상기 코르티솔, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 프르드로코르티솔, 코르티손, 하이드로코르티손, 트리암시노론, 베타메타손, 텍사메타손 또는 이들의 약학적으로 가능한 염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 텍사메타손을 사용하는 것이 가장 바람직하다.
- [0018] 또한, 상기 스테로이드의 농도는 0.1 μ M ~ 10 μ M인 것이 바람직하다.
- [0019] 본 발명의 구체예에서, 상기 복막기능부전 예방 또는 치료는 복막섬유화 억제에 의한 것이며, 상기 복막섬유화 억제는 TGF- β 에 의해 유도되는 EMT 차단에 의한 것이다.
- [0020] 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 약학 조성물은 복막 투석액으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 약학 조성물은 복막중피세포(HPMC)에서 TGF- β 1에 의해 유도되는 EMT를 차단함으로써, 복막 섬유화를 억제할 수 있다. 따라서 본 발명의 약학 조성물은 복막기능부전 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있으며, 구체적으로 복막 투석액으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 복막중피세포(HPMC)에서 세포증식(a) 및 독성(b)에 대한 텍사메타손(DEXA)의 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 TGF- β 1으로 자극된 복막중피세포(HPMC)에서 세포형태(a) 및 E-cadherin과 α -SMA의 발현에 대한 텍사메타손(DEXA)의 효과를 나타낸 도면이다(C, control; T, TGF- β 1; D, DEXA).
- 도 3은 복막중피세포(HPMC)에서 ZO-1 및 α -SMA에 대한 형광 면역세포화학 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 4는 Real-time PCR에 의한 E-cadherin, α -SMA, 및 피브로넥틴의 mRNA 발현에 대한 텍사메타손(DEXA)의 효과를 보여주는 도면이다(C, control; T, TGF- β 1; D, DEXA).
- 도 5는 EMT 및 Snail 발현에 대한 RU486의 효과를 나타낸 도면이다(C, control; T, TGF- β 1; D, DEXA; R, RU486).
- 도 6은 TGF- β 1으로 유도된 EMT의 가역성 및 복막중피세포(HPMC)에서의 MET에 대한 텍사메타손(DEXA)의 효과를 나타낸 도면이다(C, control; T, TGF- β 1; M, Media; D, DEXA; R, RU486).
- 도 7은 ERK MAPK 및 p38 MAPK의 활성화에 대한 텍사메타손(DEXA)의 효과를 나타낸 도면이다(C, control; T, TGF- β 1; D, DEXA).
- 도 8은 TGF- β 1으로 유도된 EMT에 대한 MAPK 억제제들의 효과를 나타낸 도면이다(C, control; T, TGF- β 1; P, PD98059; S, SB203580).
- 도 9는 TGF- β 1으로 유도된 EMT에 대한 Smad2/3 siRNA 트랜스펙션의 효과를 나타낸 도면이다.
- 도 10은 TGF- β 1과 관련한 Smad2/3 활성화에 대한 텍사메타손(DEXA)의 효과를 나타낸 도면이다(C, control; T, TGF- β 1; D, DEXA).
- 도 11은 GSK-3 β 인산화 및 Snail 발현에 대한 텍사메타손(DEXA)의 효과를 나타낸 도면이다(C, control; T, TGF- β 1; D, DEXA; R, RU486; P, PD98059; S, SB203580).

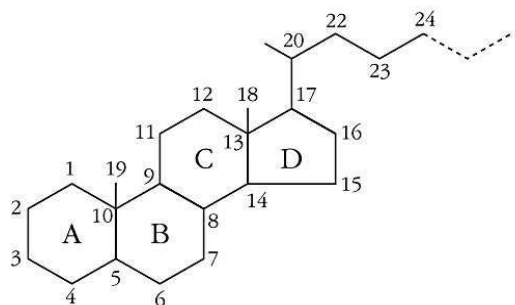
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] **복막기능부전 예방 또는 치료용 약학 조성물**

[0025] 본 발명은 스테로이드를 포함하는 복막기능부전 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 스테로이드는 하기 구조와 같이 3개의 6각 링과 1개의 5각 링을 공통적으로 가지는 물질이다.



[0027]

[0028] 이러한 스테로이드는 항염증 작용 등이 있는 것으로 널리 알려져 있으나, 본 발명의 복막기능부전 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용되는 것에 대하여 당업계에서 전혀 알려진 바 없다.

[0029] 또한, 본 발명에서 사용되는 스테로이드는 포도당을 대체하는 삼투압제로서, 당질 코르티코이드 (Glucocorticoid, GC)인 것이 바람직하다.

[0030] 상기 당질 코르티코이드는 코르티솔, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 프르드로코르티솔, 코르티손, 하이드로코르티손, 트리암시노론, 베타메타손, 텍사메타손 또는 이들의 약학적으로 가능한 염으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으며, 텍사메타손이 가장 바람직하다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 또한, 상기 스테로이드의 농도는 $0.1\mu\text{M} \sim 10\mu\text{M}$ 인 것이 바람직하다. 이는 세포 배양 실험을 근거로 한 것으로 실제 인체에서의 사용의 경우는 약동학에 관한 추가 실험이 필요할 수 있다(세포배양 실험에서는 $0.1\mu\text{M}$ 미만인 경우 원하는 약리효과를 달성할 수 없으며, $100\mu\text{M}$ 를 초과하는 경우에는 세포독성 문제가 발생함이 관찰되었다).

[0032] 복막중피세포(HPMC)는 TGF- β 에 의해 EMT가 유도되어 복막 섬유화가 진행되는 것으로 알려져 있다. 복막 섬유화가 진행된 복막은 복막투석 치료를 더 이상 할 수 없게 된다. 따라서 지속적인 복막투석을 위하여 복막기능을 보호할 필요성이 있다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 복막중피세포(HPMC)와 접촉할 경우 EMT가 발생하지 않았으며, TGF- β 에 의하여 유도된 EMT를 다시 회복하는 효과까지 있음이 확인되었다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물은 복막 섬유화에 의한 복막 기능부전을 예방하거나 치료가 가능하다.

[0034] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 복막 투석액으로 사용이 가능하다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 전해질 및/또는 완충제를 더 포함할 수 있다.

[0036] 상기 전해질은 복막 투석액에 통상적으로 사용되는 전해질을 사용할 수 있으며, 나트륨, 칼륨, 염소, 마그네슘 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 완충제는 복막 투석액에 통상적으로 사용되는 완충제를 사용할 수 있으며, 다양한 농도의 식염수, 포도당 용액, 아미노산 제제 등을 포함할 수 있다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] **실시예- 스테로이드의 EMT 개선 효과 확인**

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0040] **1. 시약**

- [0041] 본 발명에서 사용되는 모든 물질 및 조직 배양판은 다른 언급이 없는 한, Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA) 및 Nunc Labware (Waltham, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.
- [0042] **2. 통계 분석**
- [0043] 모든 데이터는 평균±표준편차로 표시된다. 그룹들 간의 다양한 파라미터 차이는 쌍-방향 ANOVA[®]에 의하여 측정되고 다중 비교를 위하여 보정되었다. *P*값이 ≤ 0.05 이면, 그 결과는 유의한 것으로 평가되었다.
- [0044] **3. 복막중피세포(HPMC)의 분리 및 유지**
- [0045] 복막중피세포(HPMC)는 종전에 공지된 방법을 사용하여 분리되었다. 요약하면, 복부수술을 하는 환자로부터 동의를 받아 획득한 인간 장막의 조각을 HBSS (Hank's balanced salt solution)로 세척하고, 0.05% 트립신-0.02% EDTA 용액에서 20분 동안 37℃에서 교반하면서 배양하였다. 배양 후에, 현탁액은 4℃에서 5분 동안 500 × g 에서 원심분리되었고, 상기 세포들은 10% FBS, 100 U/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신 및 26 mmol/L NaHCO₃를 함유하는 배지 199에서 배양되었다. 배지의 반은 접종 후 48시간 후에 교환되었고, 전체 배지는 4일에 한 번 교체되었다. HPMC는 형태학적 기준에 따라 위상차 현미경으로 식별하고 면역형광 기술로 식별하였다.
- [0046] **4. 스테로이드의 복막중피세포(HPMC)에 대한 세포증식 및 세포독성 분석**
- [0047] 복막중피세포(HPMC)의 세포증식을 측정하기 위하여, MTS uptake 분석법이 사용되었다. 96-well plate에서 성장한 세포들은 48시간 동안 텍사메타손(0.1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM)으로 처리되었다. 20 μl MTS 시약의 첨가 및 5% CO₂ 대기 하에 37 °C에서 4시간 동안 배양 후에, HPMC의 증식은 96-well plate 판독기 (Dynex Revelation, Dynex Ltd., Billingshurst, UK)를 사용하여 490 nm에서의 흡수도를 읽음으로써 측정되었다.
- [0048] HPMC에서 텍사메타손의 독성은 LDH 독성 탐지 키트(Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 48시간 처리 후 배지에 방출되는 락테이트 디하이드로게나제(LDH)의 양으로 측정하였다. 모든 데이터는 3번 측정되었다.
- [0049] **5. 세포이동 분석**
- [0050] 세포이동의 변화는 8 μm 구멍 폴리비닐피롤리돈-프리 폴리카보네이트 멤브레인(Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA)으로 보이든(Boyden) 챔버에서 트랜스웰 이동 분석법을 사용하여 평가되었다. 필터는 130 μg/ml 매트릭젤(10 μg/ml; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 하룻밤 동안 담가 두었다. 복막중피세포(HPMC)은 혈청-프리 조건 하에서 텍사메타손(10 μM)를 가하면서 트랜스웰 필터의 상단부에 하부 챔버 방향으로 접종되었다. TGF-β로 배양 48시간 후, 필터들은 4% 파라포름알데하이드로 고정되고, PBS에서 1% 크리스탈 바이올렛으로 염색되었다. 필터의 상부면은 cotton-tipped applicator로 조심스럽게 닦았다. 필터 구멍을 통과하여 필터의 하부면에 부착된 세포들은 high power field(X200)에서 계산되었다. 각 시료는 4개의 실험에서 3회씩 수행되었다.
- [0051] **6. 복막중피세포(HPMC)의 세포형태 및 면역형광 분석**
- [0052] 세포형태는 독립 위상차 현미경(Axiovert 200; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)에서 분석되었고, 이미지는 디지털 카메라(AxioCam HRC; Carl Zeiss)로 얻었다. 면역형광 염색을 위해, 세포들은 4% 포스페이트-완충 파라포름알데하이드에서 세척되고, 고정되었으며(20 °C에서 25분), PBS에서 1% 트리톤 X-100으로 투과시켰다(4 °C에서 15분). 5% BSA에서 4℃에서 하룻밤 동안 ZO-1(Invitrogen, Calsbad, CA, USA) 또는 α-SMA(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 특이 1차 항체로 배양한 후 PBS로 세척하고, 세포들은 PBS에서 5% BSA로 1시간 동안 처리되었다. 그리고 나서 염소 항-마우스 IgG-FITC-공액 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 암실에서 1시간 동안 실온에서 배양하기 전에 상기 세포들은 0.2% 트윈(Tween) 20으로 세척되었다. 핵은 DAPI로 대비염색되고, 세포는 10×10 및 20×10 NA 대물렌즈가 있는 Axiovert 200 형광 현미경으로 관찰되었다. 디지털 사진은 Axiovision 4.3(Carl Zeiss)으로 얻고, 포토샵 7.0 (Adobe Systems, Toronto, Ontario, Canada)을 사용하여 합쳐진 사진을 얻었다.
- [0053] **7. 웨스턴 블로팅**
- [0054] 세포 용해물로부터 단백질을 분리한 후에, 시료(단백질 30 μg)들을 리듀싱 버퍼에서 혼합하고, 끓이고, 10% SDS-PAGE 겔에서 용해하였다. 그리고, 일렉트로브로팅에 의해 폴리비닐리덴 다이플로라이드 멤브레인(Millipore, Bedford, MA, USA)으로 전달하였다. 멤브레인을 실온에서 30분 동안 트윈 20으로 인산-완충 식염수에서 5% wt/vol 무지방 분유로 블로킹하였다. 그 후, 블롯은 블로킹 용액에서 1차 항체와 함께 4 °C에서 하룻밤

동안 배양되었다. 마우스 단일클론성 인간 E-cadherin(BD Bioscience, Bedford, MA, USA), 마우스 단일클론성 인간 α -SMA, 마우스 다중클론성 인간 β -actin(Santa Cruz Biotechnology)등이 사용되었다. TGF- β 및/또는 텍사메타손으로 처리된 HPMC에서 ERK1/2, p38 MAPK, Smad2/3 및 GSK-3 β 인산화는 ERK1/2(Santa Cruz Biotechnology), phospho-ERK(Santa Cruz Biotechnology), p38(Santa Cruz Biotechnology), phospho-p38(Santa Cruz Biotechnology), phospho-Smad2(Cell signaling, Danvers, USA), phospho-Smad3(Cell signaling), Smad2/3(Santa Cruz Biotechnology), GSK-3 β (Cell signaling) 및 phospho-GSK-3 β (Cell signaling)에 대한 1차 항체들을 사용하여 웨스턴 블롯 분석법에 의하여 평가되었다. E-cadherin의 핵심 전사 표현형인 Snail(Cell signaling) 또한 HPMC에서 평가되었다. 트윈 20 및 인산-완충 식염수로 블롯을 세척한 후, 각각의 1차 항체 및 enhanced chemiluminescence detection (Santa Cruz Biotechnology)에 상응하는 호오스래 디쉬 퍼록시다제-퀴뉴게이트드 2차 항체들과 함께 블롯을 배양하였다. 양성 면역반응 밴드들은 농도도에 의하여 정량화되고 인간 β -actin(Santa Cruz Biotechnology)의 발현으로 비교되었다.

[0055] **8. Total RNA의 분리 및 Real-time PCR**

[0056] 각각의 실험 후, 전체 세포의 RNA는 TRIZOL로부터 분리되었고, 오염된 DNA는 RNAase-무함유 DNAase를 사용하여 제거되었다. DNA-무함유 RNA는 Superscript First Strand Synthesis System (Life Technologies BRL, Carlsbad, CA)을 사용하여 cDNA로 역전사되었다. Real-time PCR은 제조업자(Applied Biosystems, Foster City, CA)의 지시에 따라 이중가닥 DNA-특이 염료인 SYBR Green I을 사용하여 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System에서 수행되었다. PCR 반응은 반응당 20 μ l의 최종 부피를 위해 5 μ l의 cDNA, 10 μ l의 SYBR Green PCR master mix, 및 5pM의 센스 및 안티센스 프라이머에서 수행되었다. 프라이머 농도는 각각의 프라이머의 최적 농도를 분석한 예비 실험에 의하여 결정되었다. Real-time PCR에 사용된 모든 프라이머는 Primer Express 2.0 software(Applied Biosystems)를 사용하여 디자인되었고, BLAST에서 상동관계를 체크하였다.

[0057] 사용된 PCR 조건은 다음과 같다:

[0058] E-cadherin - 95 $^{\circ}$ C에서 15초 동안 변성 40회, 60 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 어닐링, 및 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 중합;

[0059] α -SMA - 95 $^{\circ}$ C에서 20초 동안 변성 40회, 60 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 어닐링, 및 72 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 중합;

[0060] 피브로넥틴 및 β -actin - 95 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 변성 40회, 60 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 어닐링, 및 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 중합.

[0061] 각 반응의 마지막에, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 및 60 $^{\circ}$ C에서 10초의 1 사이클로, 각각의 사이클은 2 $^{\circ}$ C/분의 온도 전이율로 감온된 후 다시 95 $^{\circ}$ C로 급히 승온하여 Melting curve 분석을 수행하였다. cDNA가 없는 대조군이 각 분석과 병행하여 진행되었다.

[0062] 각 샘플에서 목표 유전자들의 상대적 mRNA 발현 정도는 비교 CT 방법을 사용하여 계측되었다. 상기 CT 값은 형광 신호가 나타난 threshold보다 높은 곳에서의 사이클 횟수이다. 최소 3회의 독립적인 PCR 절차가 통계적 분석을 위하여 수행되었다. PCT 생성물의 양은 대조군과 대한 각 mRNA의 상대적 발현 비율을 결정하기 위하여 하우스키핑 유전자 β -actin으로 표준화되었다.

[0063] **9. RU486, PD98059 및 SB20358의 효과**

[0064] HPMC에서 TGF- β 1-유도 EMT에 대한 텍사메타손의 효과가 당질코르티코이드 수용체(GR)로 조정되는지 여부를 검사하기 위하여, GR 안타고니스트인 RU486(2 μ M)을 사용하였다. EMT 및 GSK-3 β 활성화에 대한 텍사메타손의 효과에서 MAPK의 역할을 검사하기 위한 실험에서, ERK 및 p38 MAPK의 블로커인 PD98059(10 μ M) 및 SB20358 (10 μ M)을 또한 사용하였다.

[0065] **10. siRNA의 트랜스펙션**

[0066] HPMC의 TGF- β -유도 EMT에 대한 텍사메타손의 효과에서 Smad2 및 Smad3의 기여도를 측정하기 위하여, Thermo Scientific(San Diego, CA, USA)에서 구입한 인간 Smad2 및 Smad3 siRNA로 HPMC를 처리하였다. 하기의 siRNA가 사용되었다: Smad2, ON-TARGET plus SMART pool human Smad2(4087); Smad3 siRNA, ON-TARGET plus SMART pool human Smad3(4088). Scrambled siRNA 대조군은 Thermo Scientific으로부터의 비표적 siRNA 풀이다. siRNA의 트랜스펙션을 위하여, HPMC는 약 80%의 일치로 24시간 동안 6개의 웰 속으로 배양하고 나서, siRNA의 트랜스펙션은 제조업자의 프로토콜에 따라 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 사용하여 수행되었다.

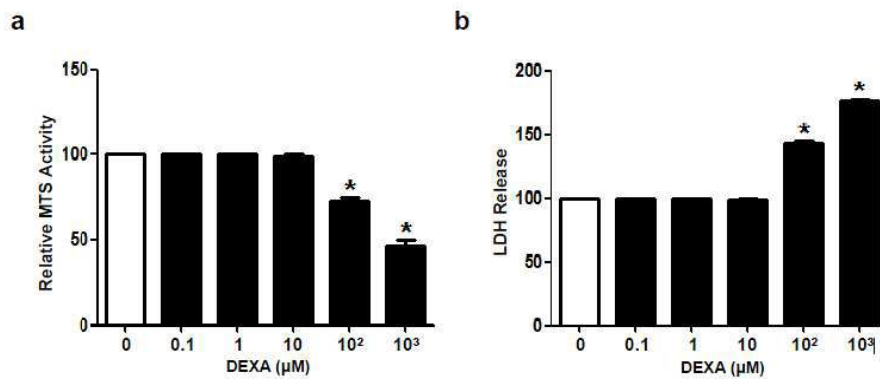
[0067] **11. 실험 결과**

- [0068] (1) 텍사메타손의 HPMC의 TGF- β -유도 EMT를 개선 효과
- [0069] 텍사메타손의 적절 농도를 결정하기 위한 in vitro 실험에서, 세포증식 및 세포독성에서 텍사메타손(0.1 μ M - 1 mM)의 효과를 분석하였다. 100 μ M 텍사메타손의 48 시간 자극부터 세포증식의 농도의존적 억제가 있었다. 또한, 텍사메타손-자극 세포에서 10 μ M의 농도까지 특별한 독성이 관찰되지 않았다(도 1a 및 1b 참조).
- [0070] TGF- β (1 ng/ml) 유도 EMT는 세포형태의 변화로 나타나며(도 2 및 3 참조), epithelial 마커인 E-cadherin 또는 ZO-1 및 mesenchymal 마커인 α -SMA의 발현 정도가 변하였다(도 2b 및 3 참조). 텍사메타손(10 μ M)은 형태 변이를 개선하였고(도 2a 및 3 참조), TGF- β -유도 HPMC에서 E-cadherin 및 ZO-1의 발현정도를 회복하였다. 텍사메타손은 또한 TGF- β 로 유도되는 α -SMA 발현 증가를 억제하였다(도 2b 및 3 참조).
- [0071] Real-time PCR 분석은 웨스턴 블로팅 및 면역형광 분석과 유사한 결과를 보여주었다. TGF- β 1은 E-cadherin 유전자 발현을 감소시킨 반면, 텍사메타손 처리로 억제되는 α -SMA 및 피브로넥틴 유전자의 de novo 발현을 증가시켰다(도 4 참조).
- [0072] (2) RU486의 텍사메타손의 효과에 대한 영향
- [0073] GR 안타고니스트인 RU486의 전처리는, EMT에 대한 텍사메타손의 GR-매개 효과를 나타내는, TGF- β 1-유도 EMT에 대한 텍사메타손의 유리한 효과를 억제하였다(도 5a 참조).
- [0074] (3) TGF- β 1으로 유도되는 세포이동에 대한 텍사메타손의 효과
- [0075] 세포형태 및 표현형에 대한 효과에 따라, 텍사메타손은 또한 TGF- β 1으로 유도되는 세포 이동 증가를 개선하였다(도 5b 참조). TGF- β 1으로 자극된 HPMC의 트랜스웰 이동으로 평가되는 세포 운동성에서의 유의한 증가(2배)는 텍사메타손 처리로 대조군 수준으로 거의 회복하였다.
- [0076] 한편, TGF- β 1으로 유도되는 HPMC의 이동에 대한 텍사메타손의 억제효과는 RU486 전처리에 의하여 차단되었다.
- [0077] (4) 텍사메타손의 TGF- β 1으로 유도되는 Snail 발현 개선
- [0078] TGF- β 1은 HPMC의 Snail 발현을 상향조절하였다. 텍사메타손은 TGF- β 1에 의한 Snail 발현의 증가를 개선하였다.
- [0079] 한편, 이는 RU486 전처리에 의하여 차단되었다(도 5c 참조).
- [0080] (5) TGF- β 1으로 자극된 HPMC에서 텍사메타손의 EMT 회복 또는 MET 유도 효과
- [0081] 48시간 동안 TGF- β 1 자극에 의하여 유도되는 HPMC의 EMT는 TGF- β 1의 제거로 부분적으로 되돌아갔다(도 6a 및 6b 참조). TGF- β 1의 제거와 함께 텍사메타손을 가한 경우 E-cadherin 및 α -SMA의 변화된 발현의 부분적인 회복과 함께 세포형태가 더욱 회복되었다(도 6a 및 6b 참조). 따라서, 텍사메타손은 TGF- β 1으로 자극된 HPMC의 MET를 유도하였다.
- [0082] 한편, RU486은 텍사메타손의 MET 효과를 억제하였다(도 6 참조).
- [0083] (6) TGF- β 1-유도 EMT에 대한 텍사메타손의 유리한 효과와 ERK1/2 및 p38 MAPK 활성화의 관계
- [0084] HPMC에서 TGF- β 1으로 유도된 EMT의 기전을 연구하기 위하여, TGF- β 1 및/또는 텍사메타손에 의한 ERK1/2 및 p38 MAPK 신호경로의 활성화를 연구하였다. TGF- β 1은 5분부터 24시간에서 2차 피크로 HPMC에서 ERK1/2 및 p38 MAPK를 활성화시켰다. ERK1/2 억제제(PD98059) 및 p38 억제제(SB20358)는 모두 TGF- β 1으로 유도된 EMT를 차단하였다(도 8 참조). 텍사메타손은 TGF- β 1 자극에 의한 ERK 및 p38 MAPK의 인산화를 억제하였다(도 7 참조). 이는 HPMC의 EMT에 대한 텍사메타손의 유리한 효과는 TGF- β 1에 의하여 유도되는 ERK 및 p38 MAPK의 억제에 의하여 조절되는 것으로 보인다.
- [0085] (7) TGF- β 1-유도 EMT에 대한 텍사메타손의 유리한 효과와 Smad2/3 활성화의 관계
- [0086] Smad2/3 신호는 TGF- β 1-유도 EMT와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. siRNA-매개 Smad2/3 삭감은 TGF- β 1에 노출된 HPMC의 세포 표현형의 회복을 초래하였다(도 9 참조). 그러나, 텍사메타손은 TGF- β 1-유도 Smad2/3 인산화를 변화시키지 않았다. 따라서, TGF- β 1-유도 EMT에 대한 텍사메타손의 효과는 Smad2/3 경로에 의하여 매개되지 않는다(도 10 참조).
- [0087] (8) 텍사메타손의 TGF- β 1으로 유도되는 GSK-3 β 의 인산화 억제 및 Snail 발현 증가 효과

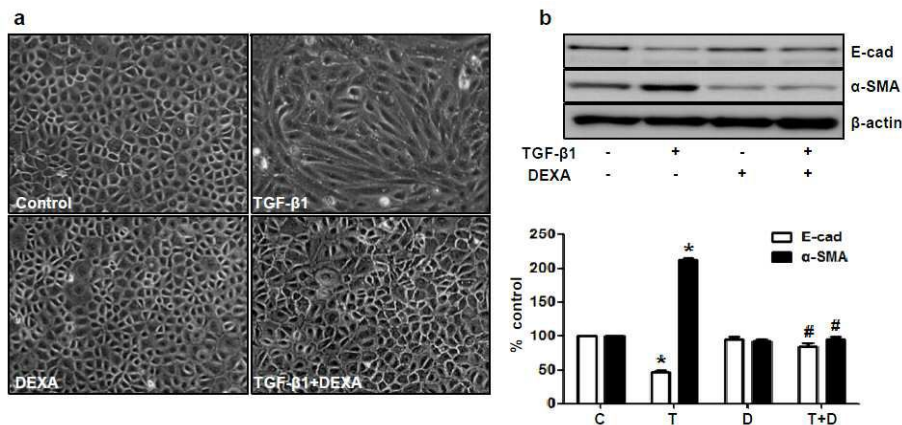
- [0088] TGF- β 1은 3시간부터 GSK-3 β 의 인산화를 유도하였고, 6시간부터 24시간까지 Snail의 발현을 증대시켰다. 텍사메타손은 TGF- β 1-유도 GSK-3 β 인산화 및 Snail 상향 조절을 개선하였다.
- [0089] 한편, RU486은 텍사메타손의 이러한 효과를 억제하였다(도 11 참조).
- [0090] (9) MAPK의 억제가 GSK-3 β 의 인산화 및 Snail 상향조절에 미치는 영향
- [0091] ERK 및 p38 MAPK의 억제제인 PD98059 및 SB203580은 TGF- β 1에 노출된 HPMC에서 GSK-3 β 의 인산화 및 Snail 발현의 변화를 차단하였고(도 11 참조). 따라서, MAPK의 활성화는 GSK-3 β 인산화로 이어짐을 알 수 있다.

도면

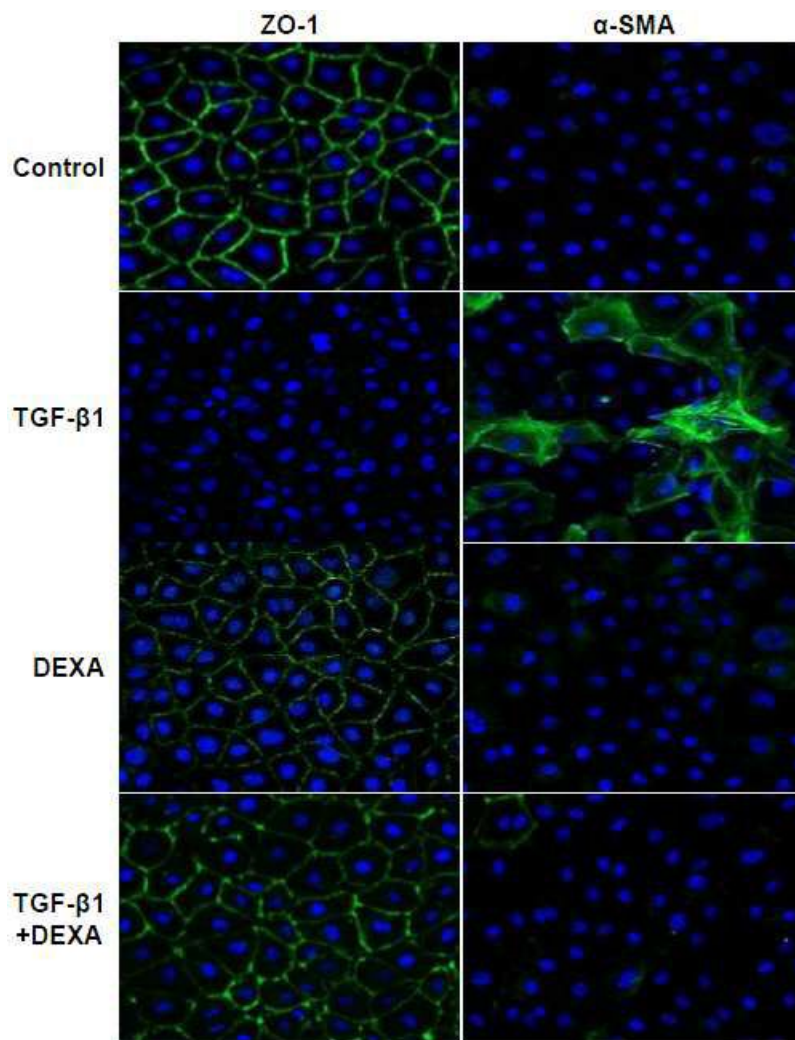
도면1



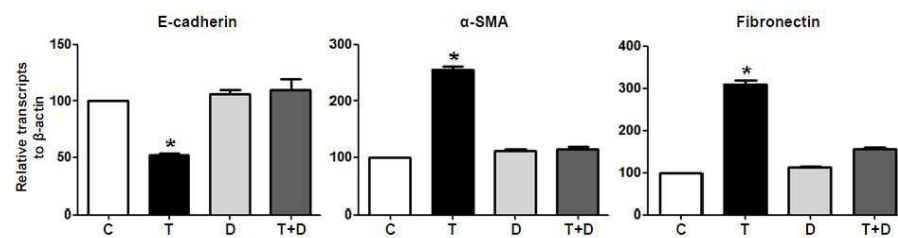
도면2



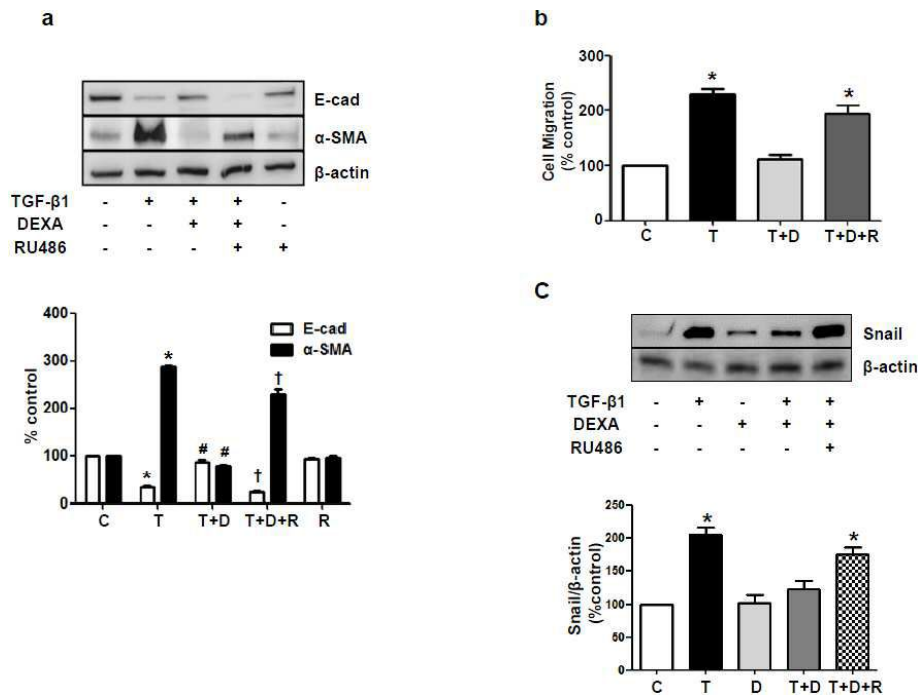
도면3



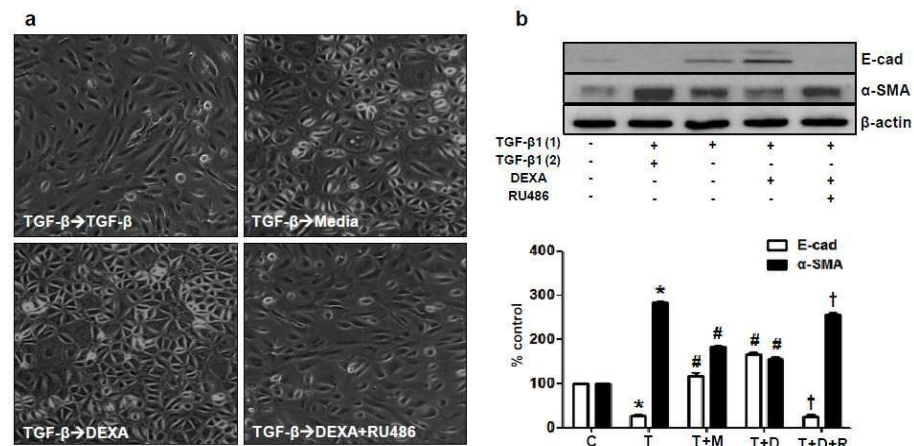
도면4



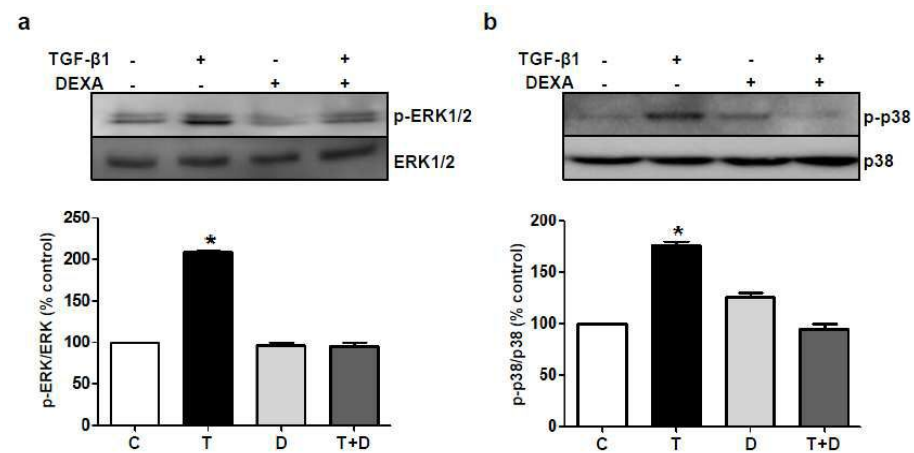
도면5



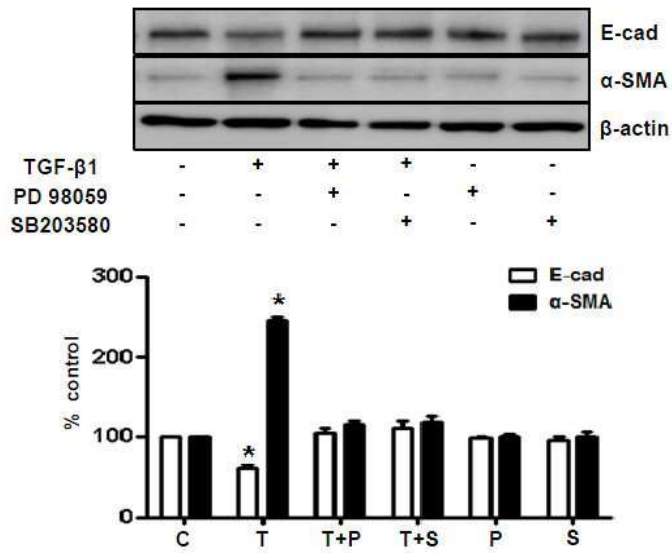
도면6



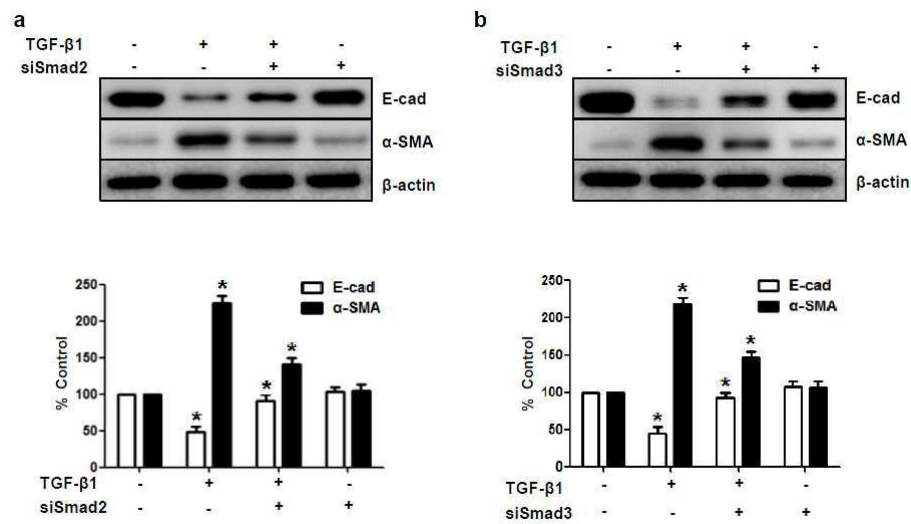
도면7



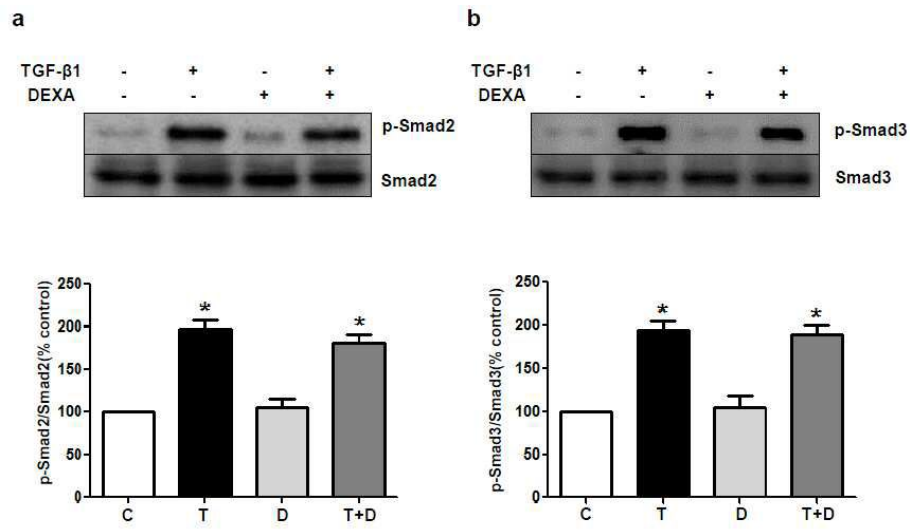
도면8



도면9



도면10



도면11

