



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0044409  
(43) 공개일자 2021년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61P 15/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0127504

(22) 출원일자 2019년10월15일

심사청구일자 2019년10월15일

(71) 출원인

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

박선우

서울특별시 강동구 양재대로 1340, 421동 305호

(74) 대리인

정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 8 항

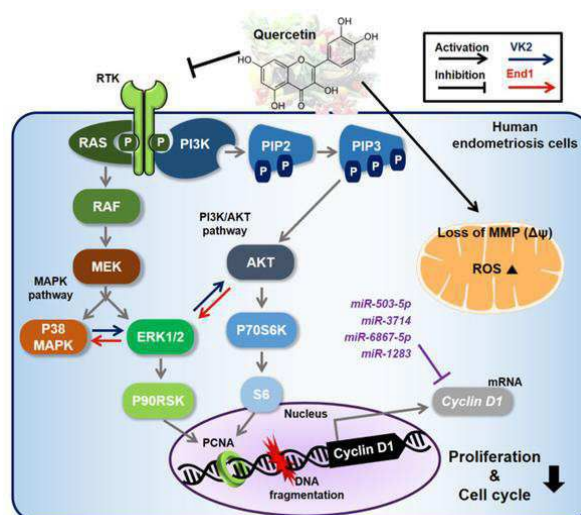
(54) 발명의 명칭 케르세틴, 루테올린, 델피니딘 또는 이들의 혼합물을 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 케르세틴, 루테올린, 델피니딘 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 케르세틴, 루테올린, 델피니딘 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 케르세틴, 루테올린, 델피니딘 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 조성물은 자궁내막증 세포 내 PI3K/AKT 신호전달 메커니즘을 조절하는 하위 신호전달물질의 인산화를 억제함으로써 자궁내막증 세포의 증식을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 자궁내막 세포의 비정상적 발달에 의해 발병하는 자궁내막증을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

**A61K 45/06** (2013.01)

**A61P 15/02** (2018.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/30** (2013.01)

**A23V 2250/30** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                                                         |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 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       | 30/100                                                                                  |
| 과제수행기관명     | 국민대학교 산학협력단                                                                             |
| 연구기간        | 2018.03.01 ~ 2021.02.28                                                                 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                          |
|-------------|----------------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 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       | 30/100                                                   |
| 과제수행기관명     | 국민대학교 산학협력단                                              |
| 연구기간        | 2017.04.10 ~ 2019.12.31                                  |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                   |
|-------------|---------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | HI15C0810010017                                   |
| 부처명         | 보건복지부                                             |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국보건산업진흥원                                         |
| 연구사업명       | 질환극복기술개발                                          |
| 연구과제명       | 염증성 조산 치료 및 신생아의 뇌손상 치료를 위한 태아 유래 중간엽 줄기세포 치료제 개발 |
| 기 여 율       | 40/100                                            |
| 과제수행기관명     | 고려대학교 산학협력단                                       |
| 연구기간        | 2015.09.07 ~ 2018.09.06                           |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

케르세틴, 루테올린 및 텔피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

케르세틴, 루테올린 및 텔피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 6

제4항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 따른 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법.

#### 청구항 8

제1항에 따른 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0002] 자궁내막증은 가임기 여성의 난소, 난관, 복벽등에 비정상적으로 증식하여 35-50% 환자에게서 불임을 야기하는 질환으로서(Vigano et al, Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004; Bulun, N Engl J Med, 2009), 이에 대한 병리학적 기전에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있으나, 아직까지 정확한 발병 원인은 밝혀지지 않고 있다.
- [0003] 자궁내막증의 기본적인 치료 방법으로는 수술적 제거와 호르몬치료 방법이 있으며, 자궁내막증은 예후 인자를 기반으로 한 진단이 아닌, 증상 위주의 진단이 이루어지기 때문에 수술적 제거를 진행하여도 5년 내 재발률이 30-40%에 육박하는 것으로 알려져 있다(Busacca *et al.*, J Obstet Gynecol, 2006; Vignali *et al.*, J Minim Invasive Gynecol, 2005).
- [0004] 성선자극 호르몬 유리호르몬 효능제 (GnRH agonist)나 아로마타제 저해제 (aromatase inhibitor)를 이용한 호르몬 치료 방법 또한, 부작용과 약제 저항성 등의 문제점이 보고된바 있다(Gao *et al.*, Gynecol Oncol, 2014).
- [0005] 최근에는 자궁내막증에 대한 치료 요법이 수술에서 식물 성분 유래 치료제 등으로 변화하고 있는 추세에 있으나 아직까지 정확한 작용 기작이나 부작용에 대한 연구가 부족한 실정이다(Johnson et al., Hum Reprod, 2013).
- [0006] 한편, 케르세틴은 여러 채소에서 하루 평균 25-50mg 정도를 섭취할 수 있는 플라보놀중 하나로서, 유방암, 난소암 등과 같은 부인 암세포에서 사멸효과를 일으키는 것으로 보고된바 있다(K. Bishayee, S. Ghosh, A. Mukherjee, R. Sadhukhan, J. Mondal, A.R. Khuda-Bukhsh. Cell Prolif, **46** (2013), pp. 153-163 / S. Ranganathan, D. Halagowder, N.D. Sivasithambaram. PLoS One, **10** (2015), Article e0141370).
- [0007] 또한, 루테올린은 브로콜리와 당근 등에 함유된 플라본 계열의 식물 추출물로 항염증, 항암, 항산화 효과 등을 지닌 것으로 알려져 있다(Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Phytotherapy research : PTR. 509 2015;**29**:323-331).
- [0008] 또한, 델피니딘은 가지, 베리류 등의 색소로부터 추출되는 안토시아닌 계열의 플라보노이드로, 항산화, 항암 효과 등을 지닌 것으로 알려져 있다(Hou DX, Fujii M, Terahara N, Yoshimoto M. J Biomed Biotechnol. 2004;**2004**:321-325).
- [0009] 이처럼, 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘의 다양한 약리적 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 이들의 자궁내막증 치료 효과는 보고된바 없다.
- [0010] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 자궁내막증 치료 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘이 자궁내막증 세포주의 증식을 억제하고, 세포의 사멸효과를 향상시키는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포의 증식 능력을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포의 증식 능력을 억제하는 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 조성물은 자궁내막증 세포 내 PI3K/AKT 신호전달 메커니즘을 조절하는 하위 신호전달물질의 인산화를 억제함으로써 자궁내막증 세포의 증식을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 자궁내막 세포의 비정상적 발달에 의해 발병하는 자궁내막증을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0020] 도 1a 내지 도 1e는 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘 처리가 자궁내막증 세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2a 내지 도 2f는 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘 처리가 자궁내막증 세포의 사멸에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3a 내지 도 3f는 케르세틴, 루테올린, 델피니딘에 의한 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아 막 투과성 변화 및 세포질 칼슘 농도와 활성산소 조절을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4a 내지 4c는 케르세틴, 루테올린, 델피니딘에 의한 자궁내막증 세포 내 신호전달기전 조절 양상을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 케르세틴, 루테올린, 델피니딘과 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 자궁내막증 세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6a 내지 도 6c는 케르세틴, 루테올린, 델피니딘과 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 세포 내 신호전달 단백질의 활성 변화에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 케르세틴과 루테올린에 의한 자궁내막증 동물모델 내 병변 성장 억제 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8a 내지 도 8i는 세포주기 조절 단백질의 mRNA 발현 억제와 케르세틴 및 루테올린 병용 처리를 통한 자궁내막증 세포 성장 억제 및 사멸 촉진 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 케르세틴 처리에 따른 자궁내막증 세포 및 동물모델 내 병변의 microRNAs 발현 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 케르세틴에 의한 자궁내막증 세포의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

도 11은 루테올린에 의한 자궁내막증 세포의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

도 12는 델피니딘에 의한 자궁내막증 세포의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 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.

[0023] 본 발명에서는 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘에 의한 자궁내막증 세포의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 10-12).

[0024] 본 발명은 일 관점에서 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0025] 본 발명은 다른 관점에서 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

- [0027] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미늄, 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.
- [0029] 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, 에멀전, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 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.
- [0031] 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.
- [0032] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있고, 과립제, 정제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 껌, 차, 젤리, 각종 음료수, 드링크제, 알코올 음료 등으로 제조될 수 있으며, 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다.
- [0033] 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.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 성분이 자궁내막증 세포의 증식과 관련된 PI3K/AKT, MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 케르세틴, 루테올린 및 델피니딘으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 성분이 자궁내막증 세포의 산화스트레스, 활성산소 및 지질과산화를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물이 자궁내막증 세포의 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 유도하며 세포사멸 단백질의 발현을 활성화시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 케르세틴, 델피니딘은 미토콘드리아 막 전위 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 케르세틴, 루테올린은 활성산소를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 루테올린, 델피니딘은 세포질 내 칼슘이온을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 케르세틴과 루테올린은 자가이식 자궁내막증 동물모델의 병변 크기를 감소시키며 병변 내 세포주기조절 단백질의 발현을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 케르세틴은 세포주기조절 단백질 Cyclin D1을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 케르세틴은 Cyclin D1 타겟 마이크로알엔에이를 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 루테올린은 세포주기조절 단백질 Cyclin E1을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0048] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.
- [0051] [실시예]
- [0052] 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.
- [0054] **실시예**
- [0055] **<실험 방법>**
- [0056] 실험동물 및 세포배양
- [0057] 자궁내막증 세포주인 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 Keratinocyte 배지에 재조합인간상피세포성장인자(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF) 0.1ng/mL 및 소태아혈청 (Fetal bovine serum, FBS) 0.05mg/mL을 함께 혼합하여 사용하였다.
- [0059] 실험 재료
- [0060] 후보 조성물질인 케르세틴, 루테올린은 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 텔피니딘은 INDOFINE Chemical Company, Inc로부터 구매하였다. 조성물질들에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6, P38 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6, P38에 대한 항체를 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 이외, PCNA 항체는 각각 Santa Cruz Biotechnology 사에서 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.
- [0062] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석
- [0063] 자궁내막증 세포의 증식 능력에 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘이 미치는 영향을 확인하기 위하여 배양한  $5 \times 10^3$  개의 세포와 배지 100  $\mu$ l를 96 well에 분주하고 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘을 용량 의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50 혹은 100  $\mu$ M) 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 이 후, 10  $\mu$ M BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37°C/5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. VK2/E6E7, End1/E6E7 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이 후 3차례 씻어주었다. 마지막으로 100  $\mu$ l의 3,3' ' substrate으로 세포를 반응하여 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

- [0065] Propidium iodide 염색을 이용한 세포 주기 분석
- [0066] 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의한 자궁내막증 세포의 세포주기 변화를 확인하기 위하여  $5 \times 10^5$  세포를 6 well에 70 ~ 80% 세포가 잘 때까지 배양하였다. 이후, 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20  $\mu$ M 혹은 0, 20, 50, 100  $\mu$ M) 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO<sub>2</sub> 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 얻었다. 다음으로 200  $\mu$ L의 1×binding buffer으로 세포현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100  $\mu$ L 넣고 RNase 5  $\mu$ L, PI 5  $\mu$ L를 함께 혼합하여 세포를 1시간 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후, 1×binding buffer를 400  $\mu$ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 각 세포 주기에 해당하는 세포의 수를 측정하였다.
- [0068] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석
- [0069] 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의한 자궁내막증 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저  $5 \times 10^5$  세포를 6 well에 배양하였다. 이후, 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20  $\mu$ M 혹은 0, 20, 50, 100  $\mu$ M) 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO<sub>2</sub> 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 얻었다. 다음으로 200  $\mu$ L의 1×binding buffer으로 세포현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100  $\mu$ L 넣고 Annexin V 5  $\mu$ L, PI 5  $\mu$ L를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후, 1×binding buffer를 400  $\mu$ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.
- [0071] 면역형광법
- [0072]  $3 \times 10^4$  개의 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포를 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 케르세틴, 루테올린 (20  $\mu$ M), 텔피니딘 (100  $\mu$ M)을 48시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2  $\mu$ g/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 4°C에서 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 배양하였다. VK2/E6E7, End1/E6E7 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 VK2/E6E7, End1/E6E7 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.
- [0074] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석
- [0075]  $3 \times 10^4$  개의 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포를 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 케르세틴, 루테올린 (20  $\mu$ M), 텔피니딘 (100  $\mu$ M)을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 한번 헹구내고 0.1% sodium citrate에 0.1% Triton X-100가 함유된 용액을 사용하여 아이스 위에서 2분간 인큐베이션 시킨다. 다음으로 In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche)에 포함된 TUNEL staining mixture를 사용하여 37°C/5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 PBS로 헹구고 DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.
- [0077] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

- [0078] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다.  $5 \times 10^5$  개의 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포를 6 well에 배양하고 배양 접시의 70 ~ 80% 에 세포가 찰 때까지 배양하였다. 이후, 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20  $\mu$ M 혹은 0, 20, 50, 100  $\mu$ M) 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 JC-1 staining solution 에 풀어준 후 37°C/5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 시켰다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.
- [0080] DCFH-DA를 이용한 세포내 ROS 측정
- [0081] 자궁내막증 세포주 내 ROS 생성에 크리소파놀이 미치는 영향을 확인하기 위하여 peroxide 존재 하에 2' 7' -dichlorofluorescein (DCF)로 변환되어 형광을 띠는 2' 7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma)를 사용하였다. VK2/E6E7, End1/E6E7 세포를 트립신을 통해 떼어내고 원심분리를 통해 세포 pellet을 얻었다. 이후 PBS로 한번 워싱하고 10  $\mu$ M의 DCFH-DA를 37°C 인큐베이터 내에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 이후, 세포를 PBS에 의해 두 번 워싱하고 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20  $\mu$ M 혹은 0, 20, 50, 100  $\mu$ M) 1시간 동안 37°C 인큐베이터 내에서 인큐베이션 하였다. 처리된 세포는 PBS로 다시 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 DCF 형광 강도를 분석하였다.
- [0083] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)
- [0084] VK2/E6E7, End1/E6E7 세포에 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95°C에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동을 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.
- [0086] 자가이식 자궁내막증 동물모델
- [0087] 마우스를 마취 후 자궁각 한쪽을 묶어 잘라낸 후 삼등분하여 같은 마우스의 장관막 혈관에 고정시켜준 후 일주일간 회복시켰다. 이후 한달 동안 DMSO, 케르세틴 (35mg/kg)과 루테올린 (40mg/kg)을 각각 100  $\mu$ l 씩 10회 주입한 후 희생 (sacrifice)하여 이식한 자궁내막증 병변의 크기를 비교하였다. 각 마우스당 세 개의 자궁내막 조직을 이용하여 RNA를 추출하거나 조직을 고정시켜 H&E 염색, In situ Hybridization, Immunohistochemistry를 통해 조직내 mRNA 및 단백질 발현 정도를 확인하였다.
- [0089] 통계분석
- [0090] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다.  $P < 0.05$  수준에서 유의성 검정을 실시하였다.
- [0092] **<결과 및 고찰>**
- [0093] 자궁내막증 세포의 증식력, 세포주기 억제 및 사멸에 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의한 영향 분석
- [0094] 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의해 자궁내막증 세포주 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포의 변화양상을 분석하기 위하여 먼저 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50 혹은 100  $\mu$ M) 첨가한 배지에 48시간 배양하였다. 이후 세포 증식 양상을 분석한 결과, 케르세틴과 루테올린은 두 가지 자궁내막증 세포주에서 20  $\mu$ M의 농도까지 용량의존적으로 세포의 증식력을 감소시키는 것으로 나타났으며(도 1a, 1b). 텔피니딘은 100  $\mu$ M의 농도에서 그 효과가 나타났다 (도 1c). 이후, 면역형광기법을 바탕으로 20  $\mu$ M 케르세틴, 루테올린과 100

$\mu\text{M}$  텔피니딘을 48시간 처리한 후 자궁내막증 세포 내 증식 마커인 PCNA를 형광 염색하였다. 그 결과 대조군의 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포주 내에서는 PCNA 각각 세포의 핵에 과다발현을 이루는 것을 확인할 수 있었지만 각 추출물의 처리에 따라 발현이 약화되는 것 또한 확인하였다(도 1d-1f). 이러한 결과를 통해 케르세틴, 루테올린 텔피니딘이 자궁내막증 세포의 증식을 억제시킬 뿐만 아니라, 농도 의존적 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘 처리는 자궁내막증 세포주의 세포 주기를 subG0/G1에 멈추게 하여 세포 성장을 억제시킨다는 점을 확인하였다 (도 1g-1i).

[0096] 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘 적용에 따른 자궁내막증 세포주의 사멸 효과 분석

[0097] 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의해 자궁내막증 세포 내 사멸된 세포의 수를 측정하기 위하여 각 물질을 용량 의존적으로 처리하여 48시간 인큐베이션 시킨 후 Annexin V 및 propidium iodide(PI)으로 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다 (도 2a-2c). 그 결과, 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘은 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포 내 작용하여 용량의존적으로 사멸 세포의 수를 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 각 식물 유래 추출물에 의해 사멸된 자궁내막증 세포주 내 DNA 분절화(DNA fragmentation)의 발생여부를 확인하기 위하여 tetramethyl-rhodamine-dUTP 표지화를 통한 TUNEL assay를 실시하였다. 그 결과, 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘은 모두 VK2/E6E7과 End1/E6E7 세포주의 핵 내 DNA 분절화에 따른 붉은 형광을 유도하였다 (도 2d-2f). 이러한 결과를 통해 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘은 자궁내막증 세포주 내 DNA 분절화를 통한 세포사멸을 효과적으로 유도함을 확인할 수 있었다.

[0099] 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의한 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아 막 투과성 변화 및 세포질 칼슘 농도와 활성산소 조절 분석

[0100] 케르세틴, 텔피니딘에 의해 미토콘드리아 막 전위 변화를 확인하기 위하여 각 해당물질을 자궁내막증 세포주에 처리하여 48시간 인큐베이션 시킨 다음, JC-1 염색하고 FACS 분석을 수행하였다. 그 결과, 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아 막 전위가 케르세틴, 텔피니딘에 의해 용량 의존적으로 감소한다는 것을 확인하였다 (도 3a, 3b). 또한 루테올린과 텔피니딘은 세포질 내 칼슘이온을 유의적으로 증가시켰다(도 3c, 3d), 또한, 케르세틴, 루테올린에 의해 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포 내 산화 스트레스가 유발되는지 확인하기 위해 DCF 형광 관찰을 통해 세포 내 활성산소(ROS) 생성 정도를 확인한 결과, 케르세틴 (도 3e), 루테올린 (도 3f)을 처리한 세포주 내 DCF 형광이 용량의존적으로 증가하며, 증가한 활성산소는 세포질 내에서 지질산화(lipid peroxidation)을 야기한다는 것을 알 수 있었다.

[0102] 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의한 자궁내막증 세포 내 신호전달기전 조절 양상 분석

[0103] 자궁내막증 세포 내 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의해 유도되는 세포의 증식 억제 및 세포 사멸에 영향을 미치는 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 증식과 연관된 PI3K, ERK1/2 신호전달물질의 인산화 양상을 용량, 시간 의존적으로 확인하였다(도 4). 그 결과, 케르세틴은 자궁내막증 세포주 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포에서 용량의존적으로 작용하여 ERK1/2-P90RSK, P38MAPK, AKT-P70S6K-S6 단백질의 인산화를 감소시키는 것으로 나타났다 (도 4a). 루테올린은 ERK1/2, JNK, AKT-P70S6K-S6 단백질의 인산화를 감소시키는 반면 P38MAPK 단백질 인산화를 증가시킴으로써 자궁내막증 세포를 사멸시키는 것으로 확인되었다 (도 4b). 텔피니딘은 ERK1/2, AKT-P70S6K-S6 신호단백질의 활성을 억제하는 동시에 P90RSK와 P38 MAPK 단백질의 인산화를 용량의존적으로 증가시키는 것으로 나타났다(도 4c). 이러한 결과를 통해 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘이 자궁내막증 세포 내에서 PI3K/AKT, MAPK 신호전달기전을 조절한다는 것을 알 수 있었다.

[0105] 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘과 신호전달기전 억제제 병용처리를 통한 세포증식 변화 양상 분석

[0106] 용량의존적 분석을 통해 선별된 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘이 조절하는 신호전달분자가 자궁내막증 세포의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 자궁내막증 세포 내 LY294002 (PI3K 억제제) 20  $\mu\text{M}$  또는 U0126 (ERK1/2 억제제) 10  $\mu\text{M}$ 을 케르세틴, 루테올린 20  $\mu\text{M}$  및 텔피니딘 100  $\mu\text{M}$ 과 병용처리 하였다 (도 5). 그 결과, 케르세틴에 의해 감소한 자궁내막증 세포의 증식은 LY294002, U0126, SB203580을 병용 처리함으로써 인해 추가적으로 세포 증식이 감소하는 것으로 나타났으며, 특히 각 세포주 모두 LY294002와 SB203580을 단독으로 각 세포에 처리하

였을 때와는 달리 세포 증식 억제 효과가 효율적으로 개선됨을 보였다 (도 5a). 루테올린에 의해 감소한 자궁내막중 세포의 증식은 LY294002, U0126, SP600125, SB203580을 병용 처리함으로 인해 추가적으로 세포 증식이 감소하는 것으로 나타났으며, 특히 각 세포주 모두 신호전달 억제제를 단독으로 각 세포에 처리하였을 때와는 달리 세포 증식 억제 효과가 효율적으로 개선됨을 보였다 (도 5b). 텔피니딘에 의해 감소한 자궁내막중 세포의 증식은 LY294002, U0126, SB203580을 병용 처리함으로 인해 추가적으로 세포 증식이 감소하는 것으로 나타났으며, 특히 각 세포주에 신호전달 억제제를 단독으로 각 세포에 처리하였을 때 보다 병용처리시 세포 증식 억제 효과가 효율적으로 개선됨을 보였다 (도 5c).

[0108] 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘과 AKT, MAPK 신호전달기전 억제제 혼합물을 통한 자궁내막중 세포 내 신호전달물질 인산화 패턴 분석

[0109] 자궁내막중 세포 내에서 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의해 조절되는 정확한 분자적 메커니즘을 규명하기 위하여 자궁내막중 세포 내 LY294002 20  $\mu$ M, U0126 10  $\mu$ M, SP600125 20  $\mu$ M, SB203580 20  $\mu$ M 을 37°C/CO<sub>2</sub> 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하고 이후 20  $\mu$ M의 케르세틴 및 루테올린, 100  $\mu$ M의 텔피니딘을 각각 30분 동안 처리하여 단백질을 추출하고, 웨스턴 블롯을 통해 타겟 분자의 인산화를 분석하였다. 그 결과, 케르세틴에 의해 감소했던 ERK1/2와 P90RSK의 인산화 역시 VK2/E6E7과 End1/E6E7 모두 U0126을 함께 처리하였을 때 더욱 억제되었고, 또한 케르세틴과 SB203580의 병용처리에 의해 P38 인산화도 추가적으로 억제되는 양상을 나타내었다. 케르세틴에 의해 감소된 AKT의 인산화는 아피제닌과 LY294002를 병용 처리함에 따라 더욱이 억제되는 양상을 나타냈고, P70S6K와 S6 역시 케르세틴을 단독으로 처리한 것 보다 LY294002와 병용 처리하였을 때 인산화가 더욱 약화되는 양상을 확인할 수 있었다 (도 6a). 또한, 루테올린에 의해 감소했던 ERK1/2와 JNK의 인산화 역시 U0126 혹은 SP600125를 함께 처리하였을 때 더욱 억제되었고, 루테올린에 의해 증가했던 P38의 인산화는 SB203580의 병용처리에 의해 억제되는 양상을 나타내었다. 루테올린 의해 감소된 AKT, P70S6K와 S6의 인산화는 루테올린과 LY294002를 병용 처리함에 따라 더욱이 억제되었다 (도 6b). 텔피니딘과 신호전달억제제의 병용처리시, ERK1/2는 LY294002 및 U0126에 의해 추가적으로 감소하였고, 텔피니딘의 처리에 의해 증가하였던 P90RSK의 인산화도 LY294002 및 U0126에 의해 감소하였다. 증가되었던 P38 MAPK의 인산화는 VK2/E6E7 세포 내에서는 모든 신호전달억제제에 의해 감소하였지만, End1/E6E7 세포 내에서는 U0126과 SB203580에 의해서 감소하였다. LY294002는 텔피니딘에 의해 감소한 AKT-P70S6K-S6의 인산화를 모두 억제하였으며, AKT의 인산화는 SB203580에 의해, P70S6K의 인산화는 U0126에 의해서도 감소하는 양상을 보였다 (도 6c). 이러한 결과를 통해 케르세틴, 루테올린, 텔피니딘에 의해 조절되는 MAPK와 AKT 신호전달경로가 서로 상호작용하며 자궁내막중 세포의 항증식 효과를 확인하였다.

[0111] 자가이식 동물모델 내에서 케르세틴과 루테올린의 자궁내막중 병변 성장 억제효과 확인

[0112] 자궁각을 3등분 하여 장간막에 이식한 자궁내막중 동물 모델에 케르세틴 (35mg/kg)과 루테올린 (40mg/kg)을 복강 내 10회 주입하였을 때, 용매만 주입한 대조군에 비해 유의적으로 병변 크기가 감소하였다 (도 7a, 7d). 케르세틴을 주입한 마우스의 병변에서는 용매만 주입한 마우스에 비하여 세포 주기 조절 단백질인 Ccnd1의 mRNA (도 7b) 및 단백질(도 7c)의 발현이 감소하였다. 또한, 루테올린을 주입한 마우스의 병변에서는 용매만 주입한 마우스의 병변에 비하여 세포 주기 조절 단백질인 Ccne1, Cdk2, Cdk4의 mRNA 발현이 감소하였다 (도 7e).

[0114] 세포주기 조절 단백질의 mRNA 발현 억제와 케르세틴 및 루테올린 병용 처리를 통한 자궁내막중 세포 성장 억제 및 사멸 촉진 효과 확인

[0115] 자궁내막중 세포인 VK2/E6E7, End1/E6E7는 CCND1 siRNA 용량의존적 (10, 20, 40nM) 처리에 의해 세포 내 CCND1 mRNA 발현이 Control siRNA 처리 세포에 비해 효과적으로 감소하였고 (도면 8a), 그중 세포 내 CCND1 및 PCNA mRNA 발현이 40 nM의 CCND1 siRNA처리와 케르세틴 20  $\mu$ M 처리시 유사함을 확인하였다 (도 8b). 세포 성장 역시 CCND1 siRNA를 용량의존적으로 처리함에 따라 감소하였고, 두 세포에서 모두 40 nM의 siRNA가 케르세틴 20  $\mu$ M 과 유사한 정도의 세포 성장 억제율을 보였다 (도 8c). 또한, control siRNA와 케르세틴을 병용 처리하였을 때 보다 CCND1 siRNA와 케르세틴을 병용 처리하였을 때 자궁내막중 세포의 사멸이 더욱 증가하였다 (도 8d). 세포 주기 억제 역시 control siRNA와 케르세틴을 병용 처리하였을 때 보다 CCND1 siRNA와 케르세틴을 병용처리 하였을 때, sub G0/G1기의 세포가 더욱 증가하는 경향을 보였다 (도 10e). 루테올린 역시 CCNE1 및 PCNA mRNA 발현

이 control siRNA와 루테올린을 병용처리 하였을 때 보다 40 nM의 CCNE1 siRNA와 루테올린 20  $\mu$ M 병용 처리시 더욱 감소하는 것을 확인하였다 (도 8f). 세포 성장 역시 control siRNA와 루테올린 병용처리 보다 CCNE1 siRNA를 용량의존적으로 루테올린과 병용처리함에 따라 추가적으로 감소하는 것을 확인하였다 (도 8g). 또한, control siRNA와 루테올린을 병용처리 하였을 때보다 CCNE1 siRNA와 루테올린을 병용처리 하였을 때 자궁내막증 세포의 사멸이 더욱 증가하였다 (도 8h). 세포주기 억제 역시 control siRNA와 루테올린을 병용 처리하였을 때 보다 CCNE1 siRNA와 루테올린을 병용처리 하였을 때, VK2/E6E7에서 sub G0/G1기의 세포가 더욱 증가하며 G0/G1기의 세포가 감소하는 경향을 보였고, End1/E6E7에서는 G2/M기의 세포가 증가하며 G0/G1가 감소하는 경향을 보였다 (도 8i).

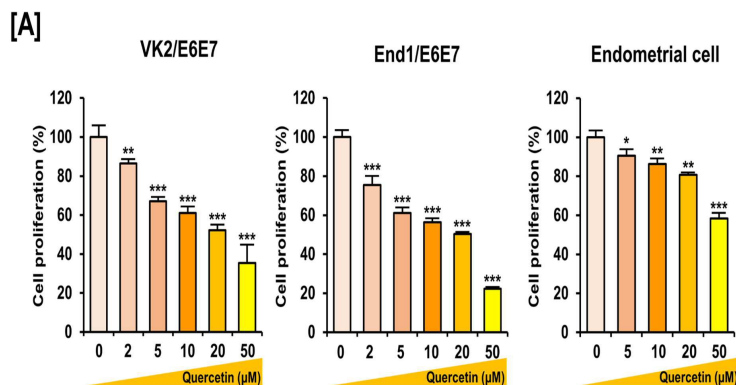
[0117] 케르세틴 처리에 따른 자궁내막증 세포 및 동물모델 내 병변의 microRNAs 발현 변화 확인

[0118] 자궁내막증 세포인 VK2/E6E7, End1/E6E7 및 마우스 내 CCNE1 유전자와 결합 확률이 높은 microRNA를 선별하였다 (도 9a 및 9b). VK2/E6E7 세포에 케르세틴 처리에 따라 miR-503-5p, miR-1283, miR-3203, miR-3714 및 miR-6867-5p가 증가하였다. 또한 End1/E6E7 역시 케르세틴 처리에 따라 miR-503-5p, miR-1283, miR-3714 및 miR-6867-5p가 증가하였다 (도 9c-9g). 마우스에서 선별된 miR-503-5p와 miR-546 역시 케르세틴 주입에 따라 병변 내에서 감소하였다 (도 9h 및 9i).

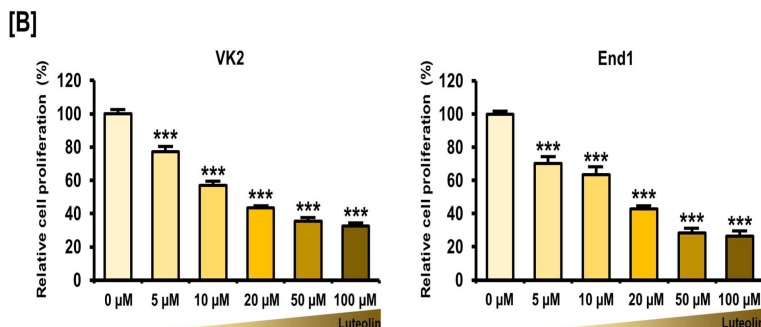
[0120] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

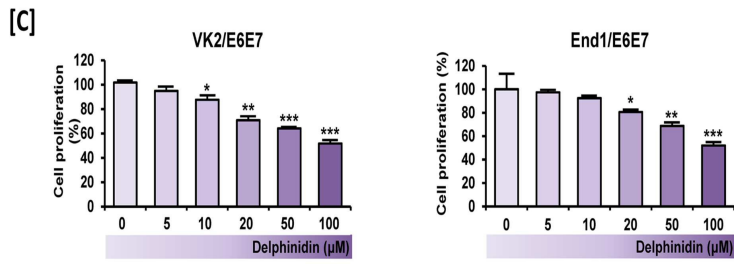
### 도면1a



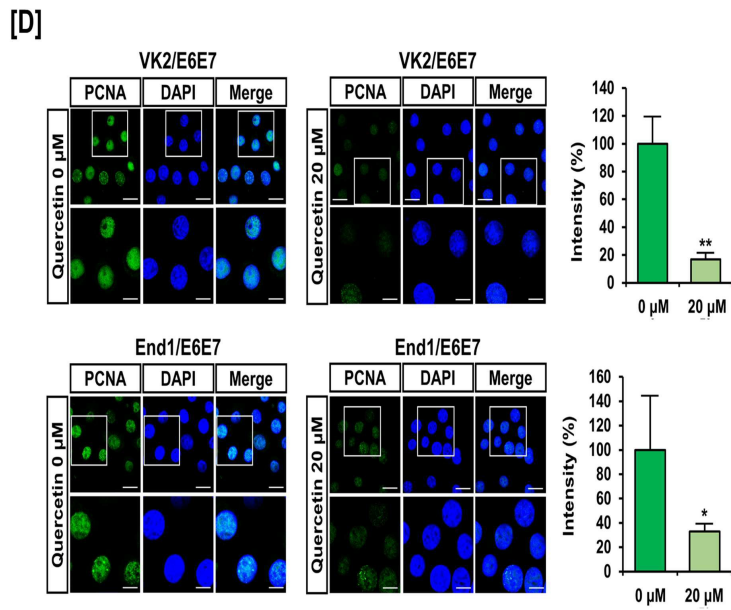
### 도면1b



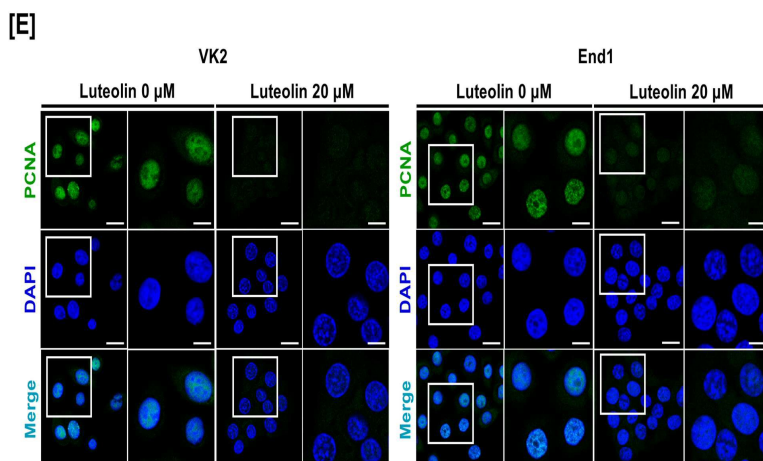
도면1c



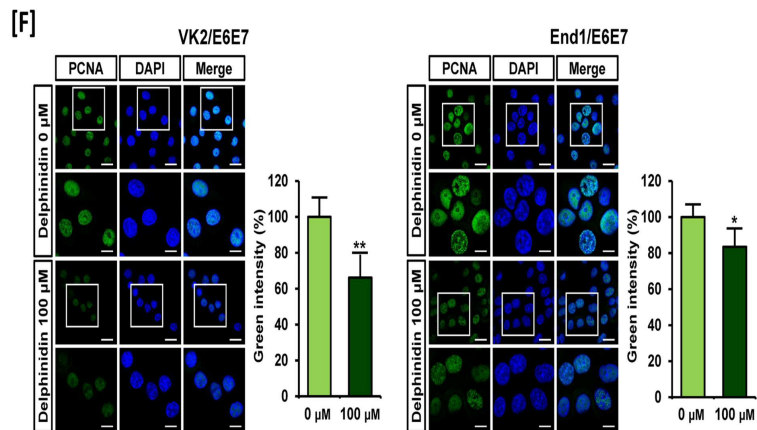
도면1d



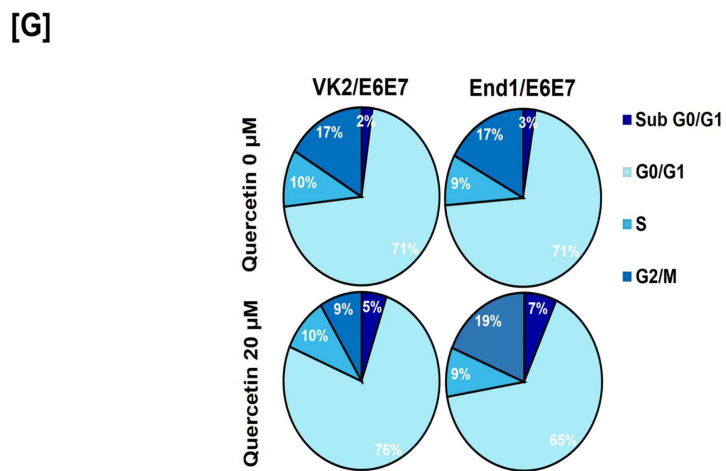
도면1e



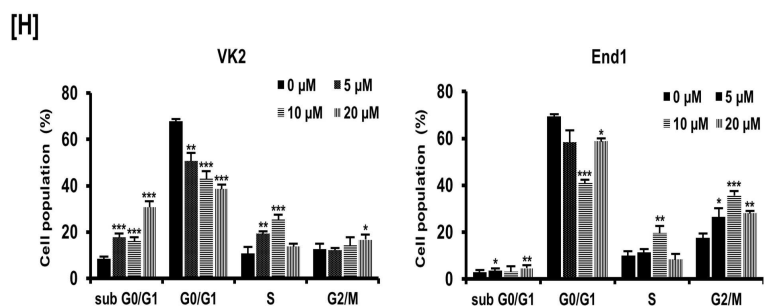
도면1f



도면1g

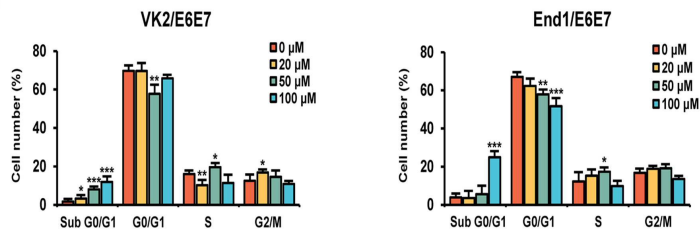


도면1h



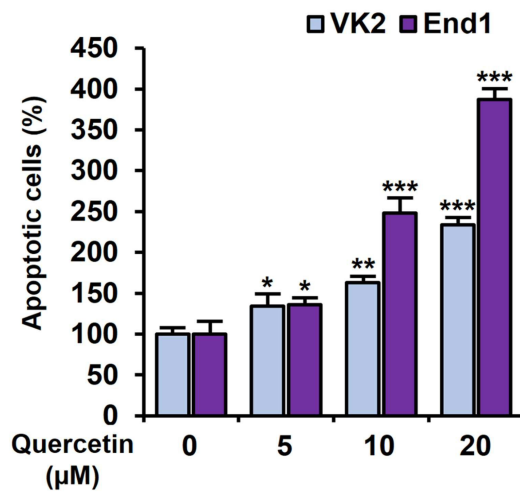
도면1i

[I]



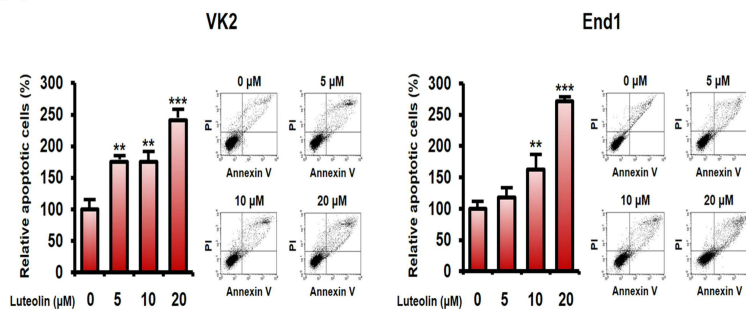
도면2a

[A]

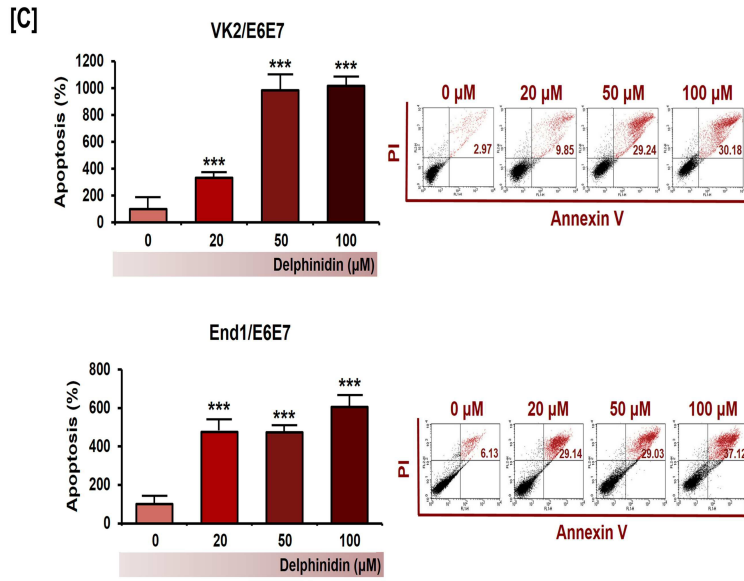


도면2b

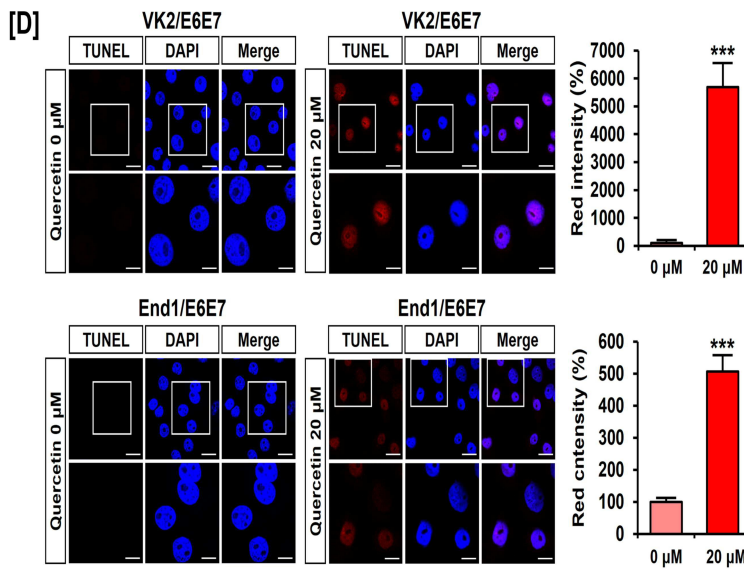
[B]



도면2c

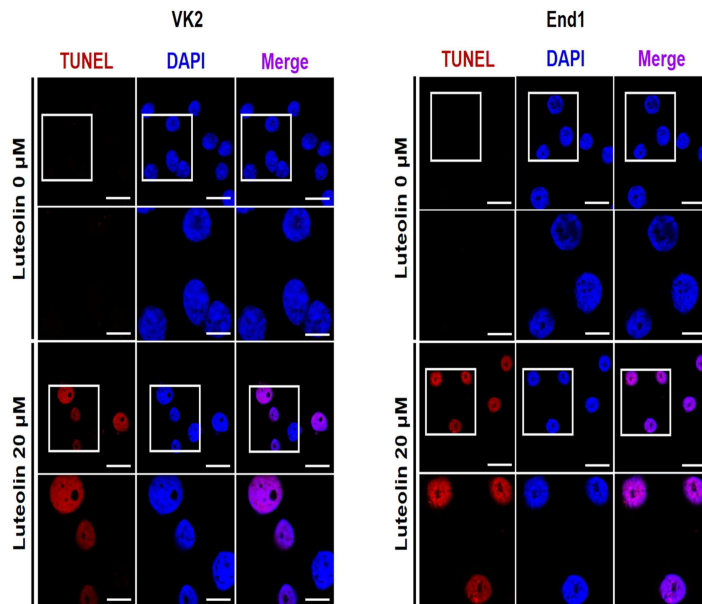


도면2d



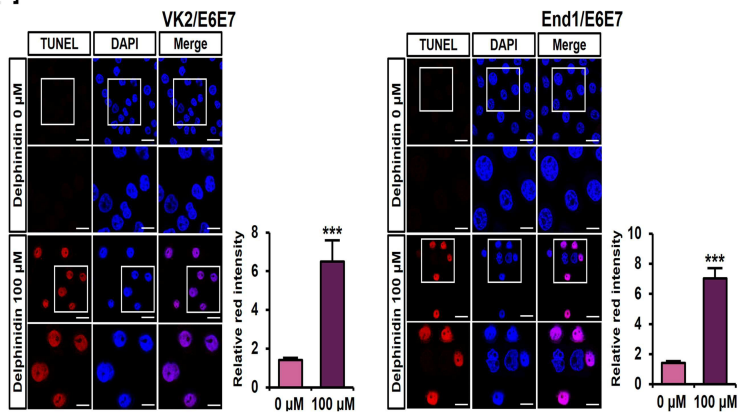
도면2e

[E]



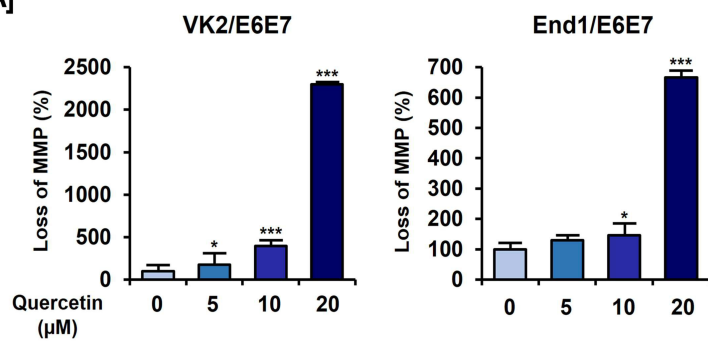
도면2f

[F]



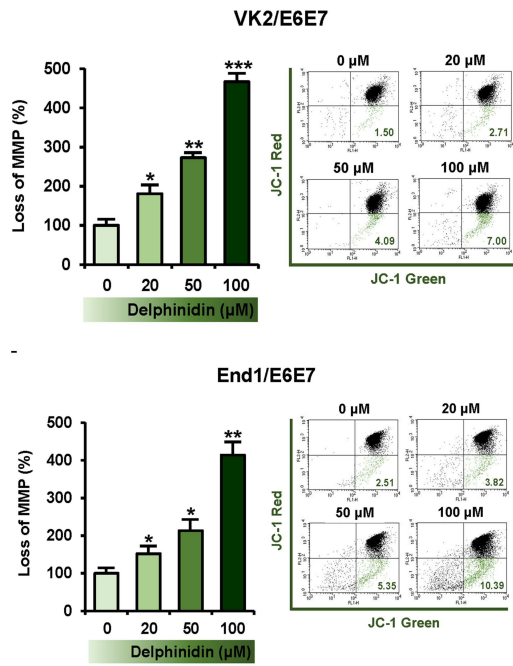
도면3a

[A]



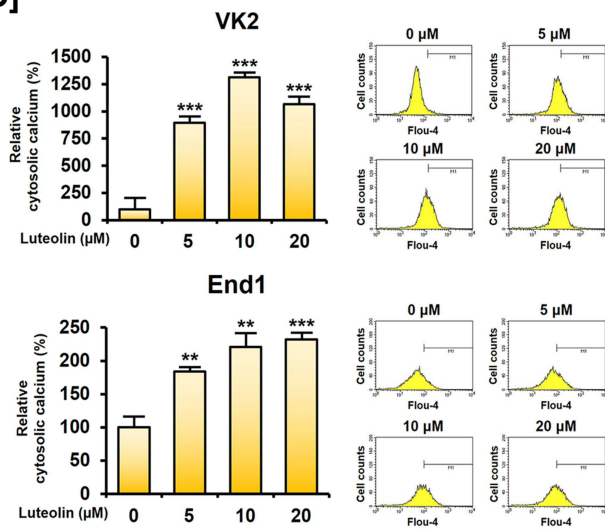
도면3b

[B]



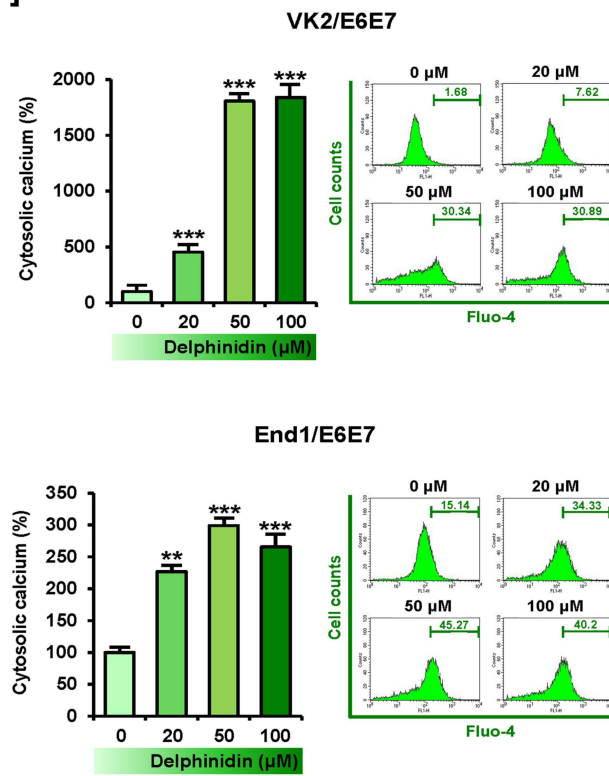
도면3c

[C]



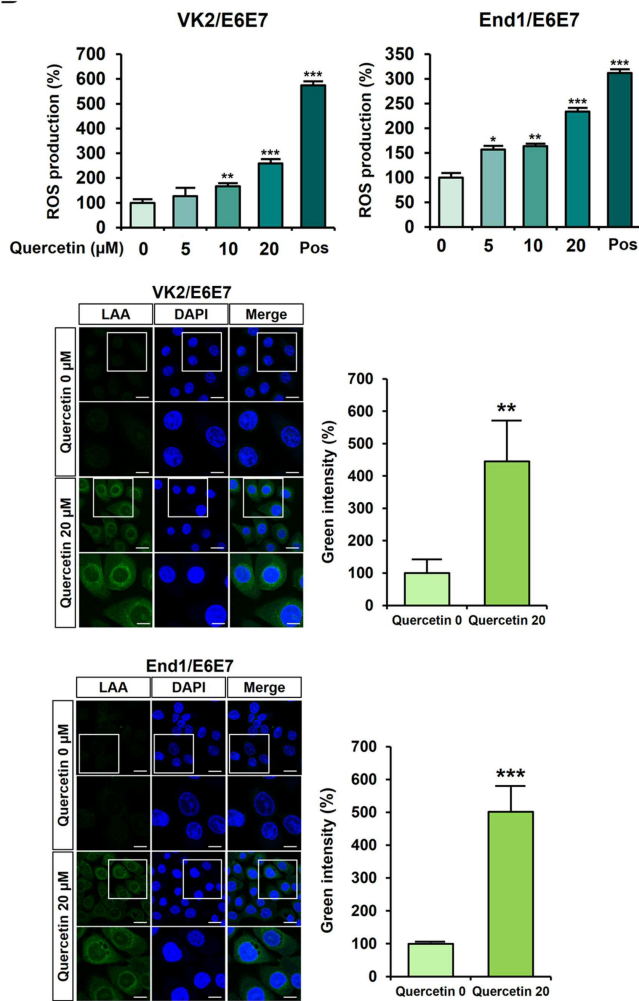
도면3d

[D]



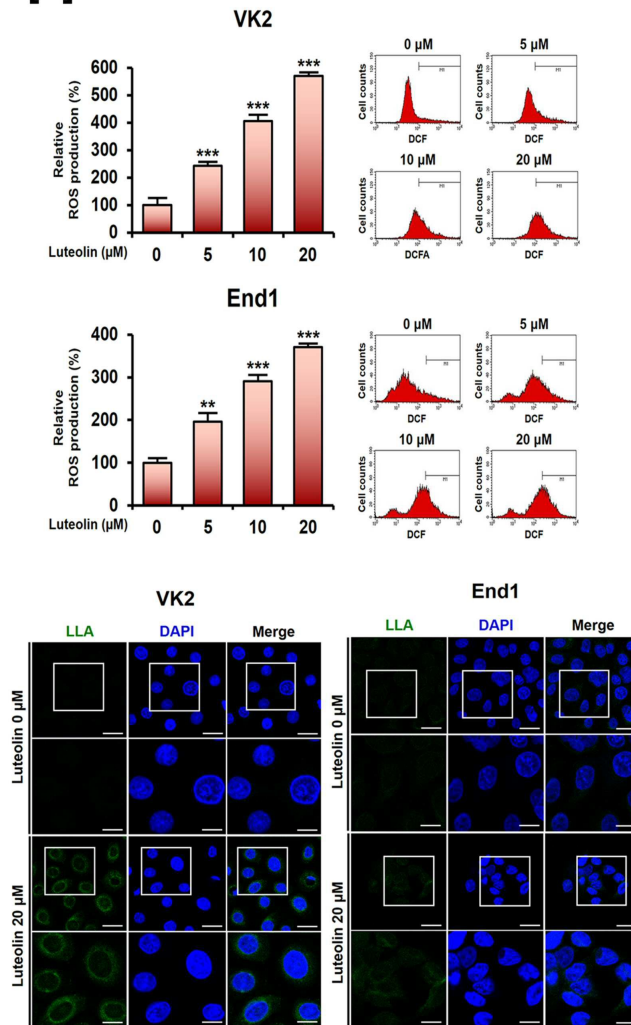
도면3e

[E]



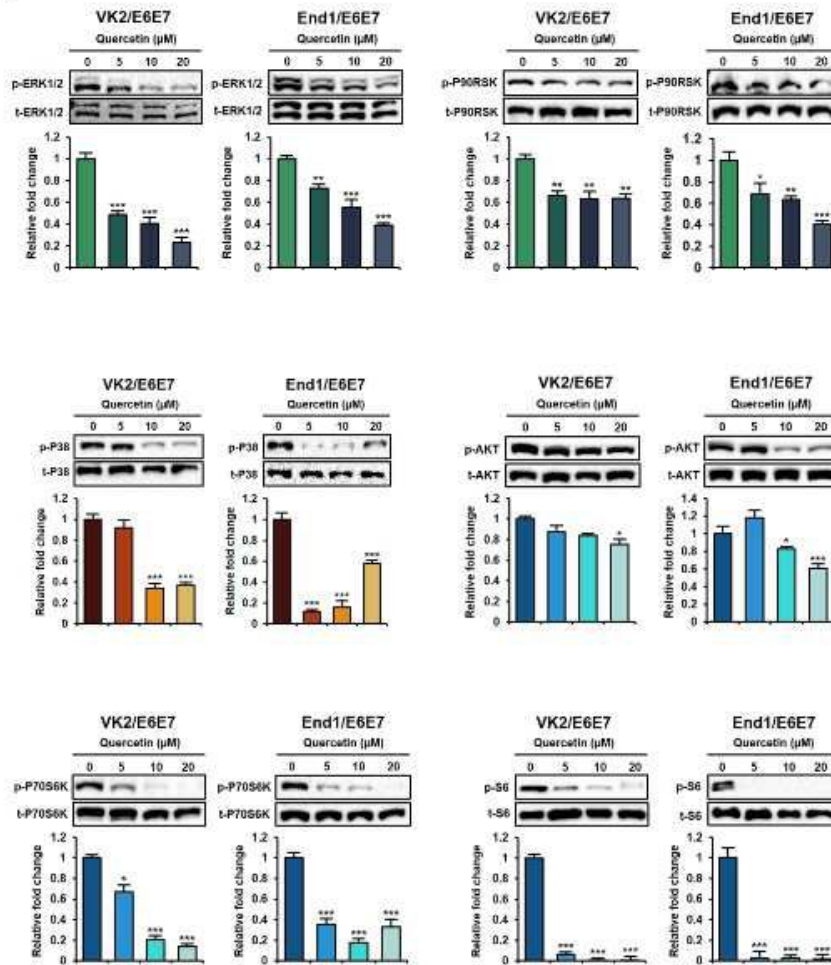
도면3f

[F]



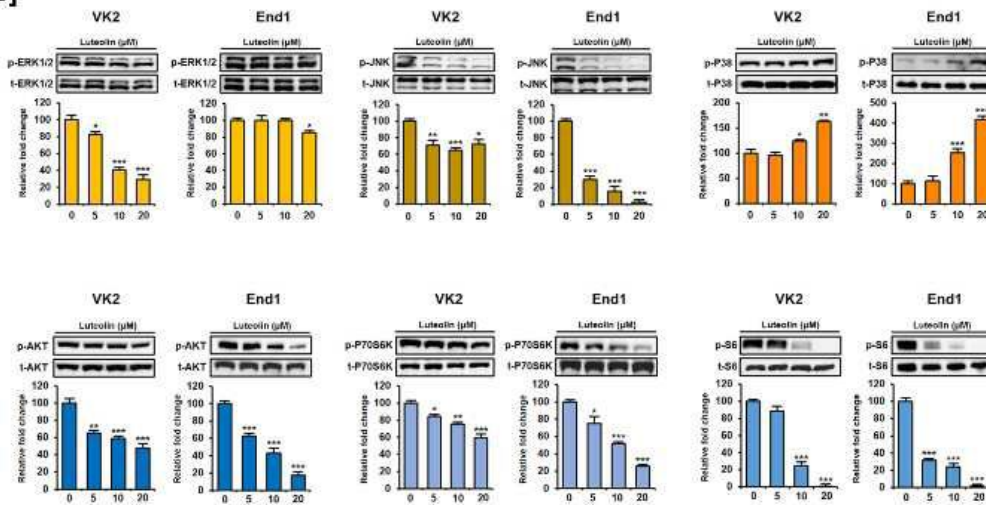
도면4a

[A]



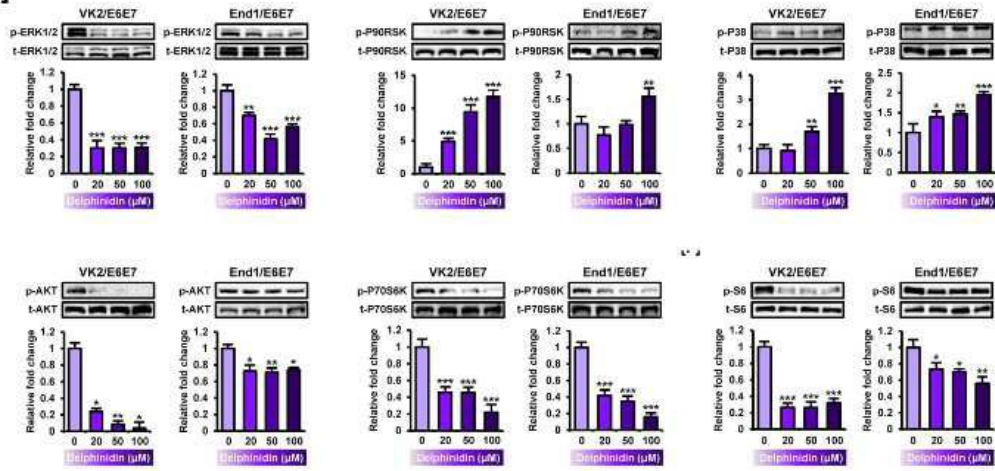
도면4b

[B]

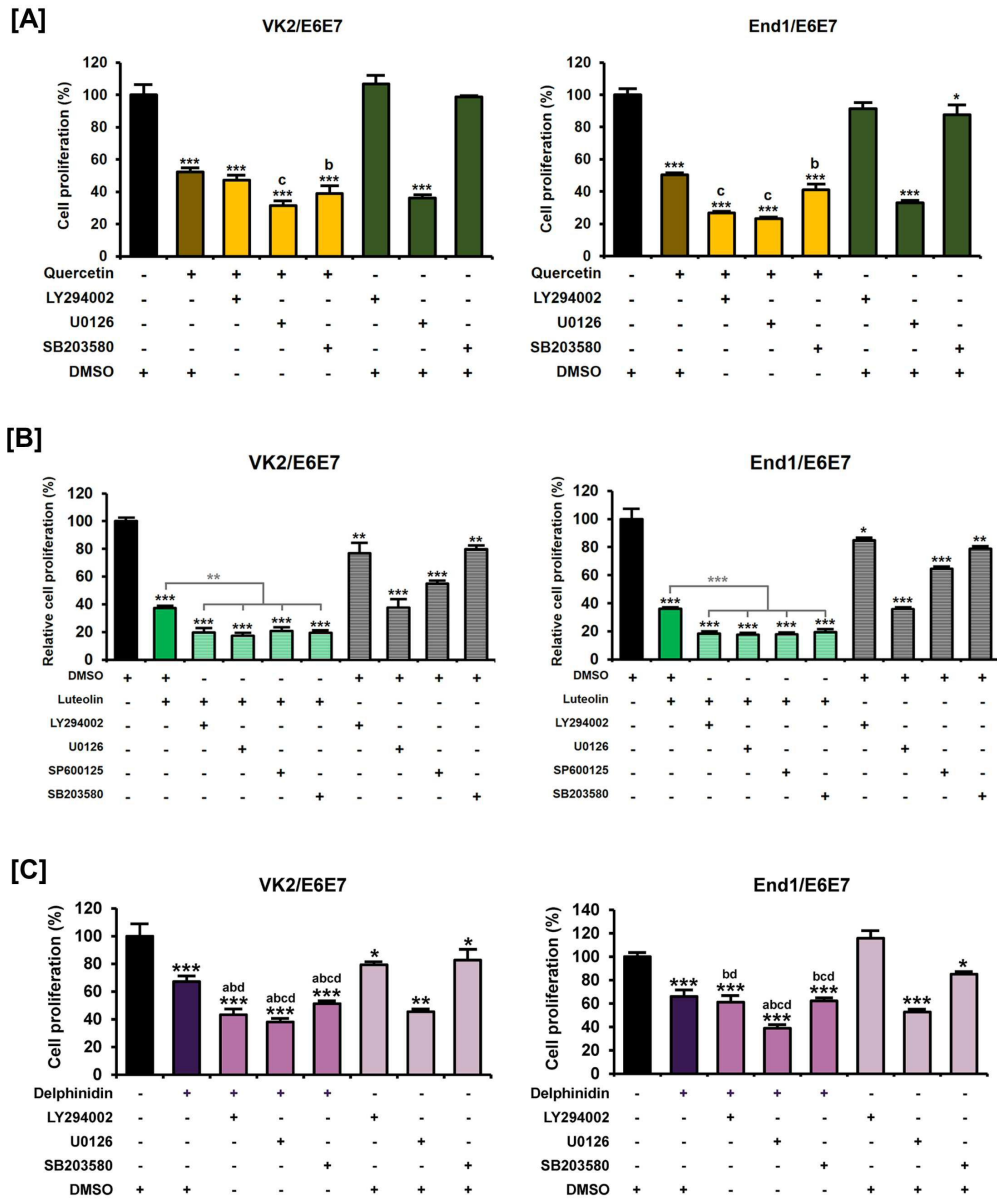


도면4c

[C]

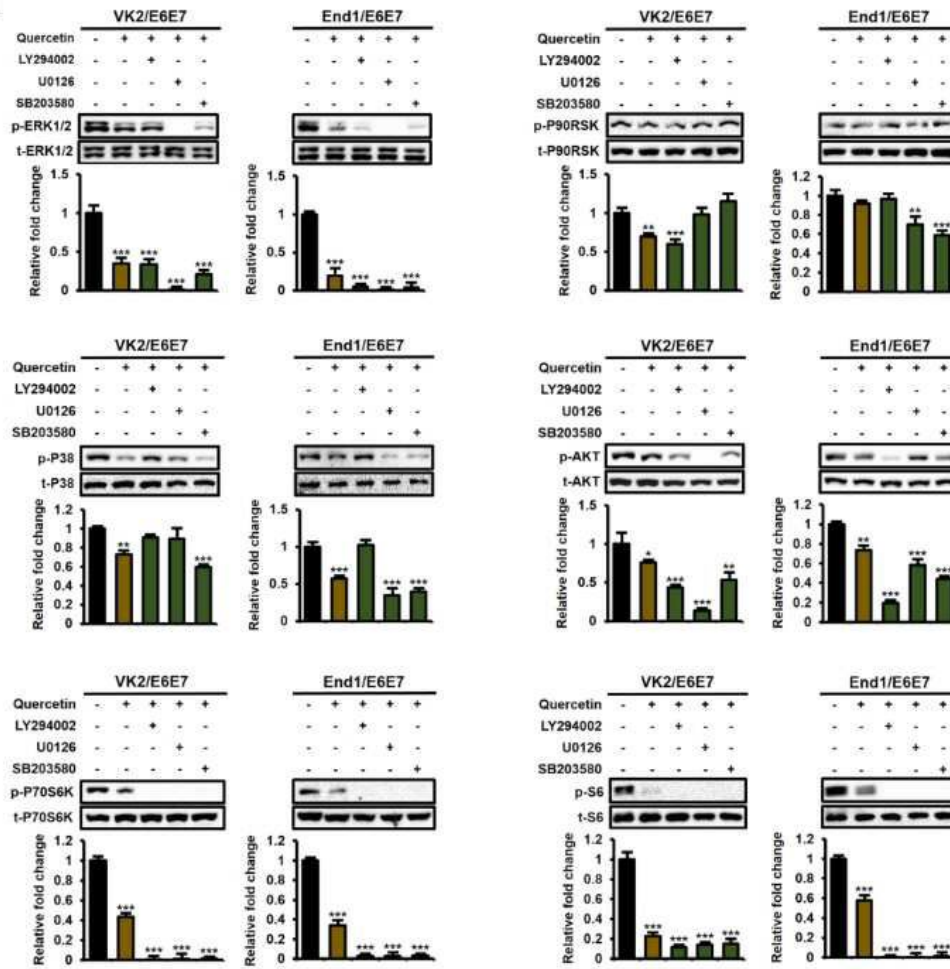


도면5



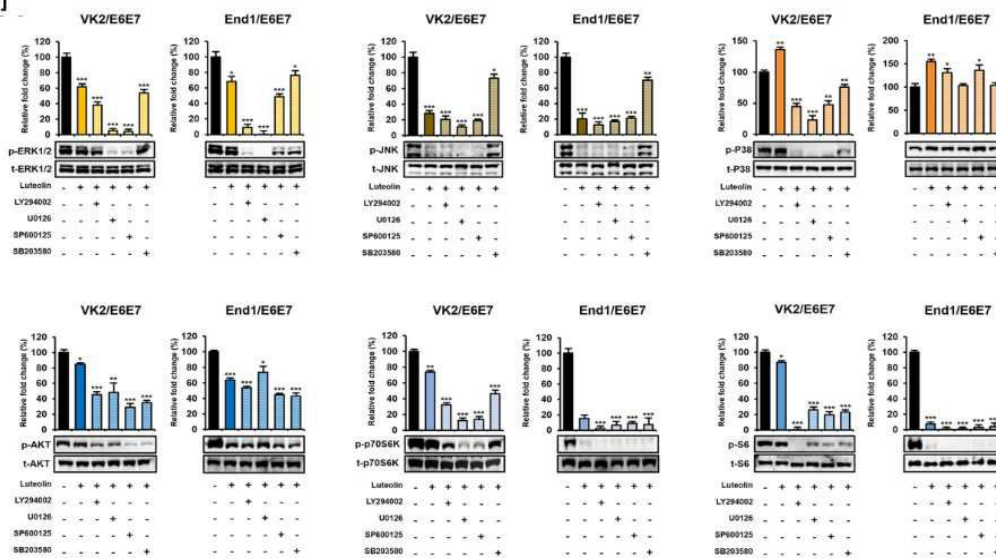
도면6a

[A]

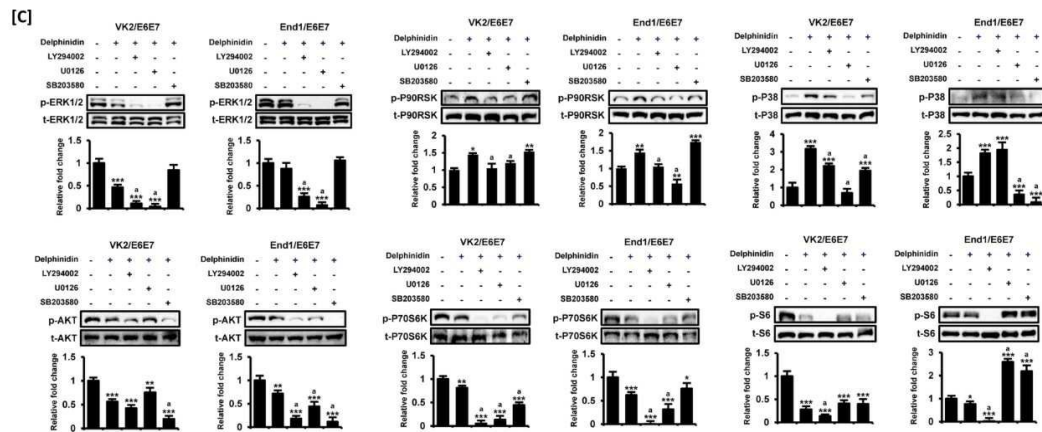


도면6b

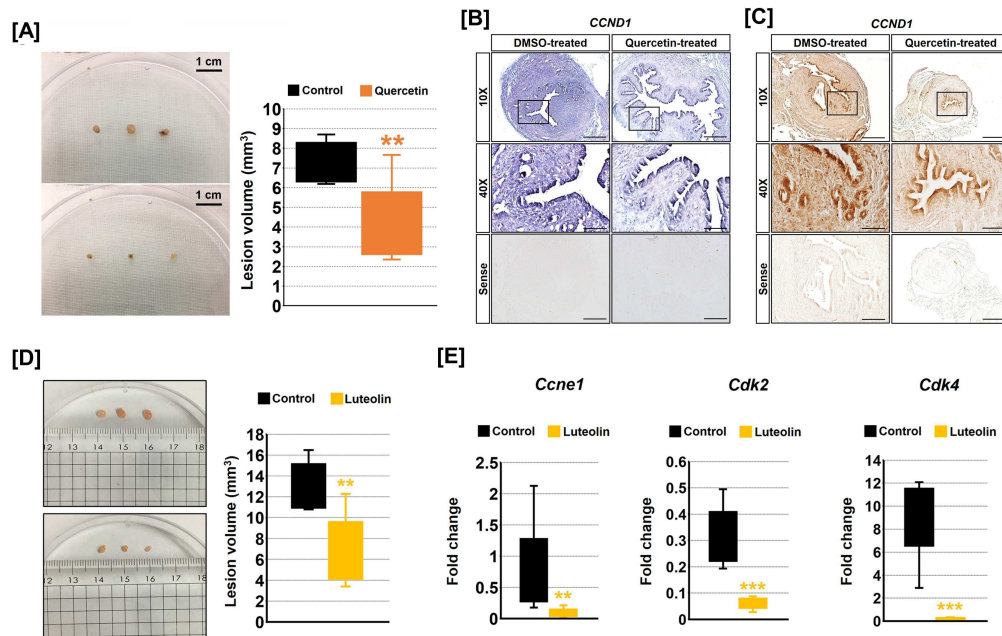
[B]



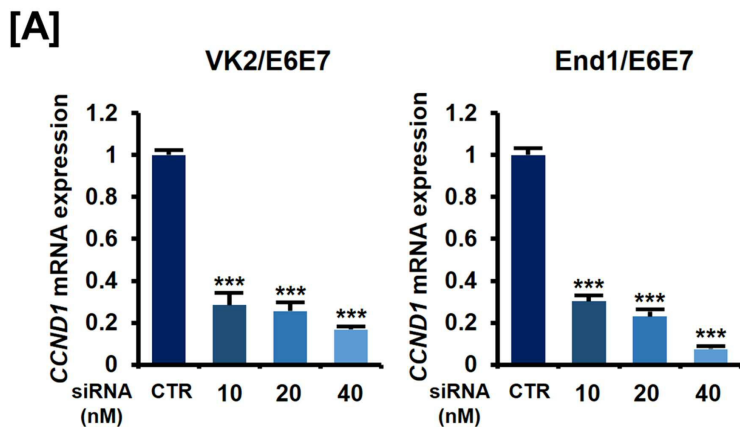
도면6c



도면7

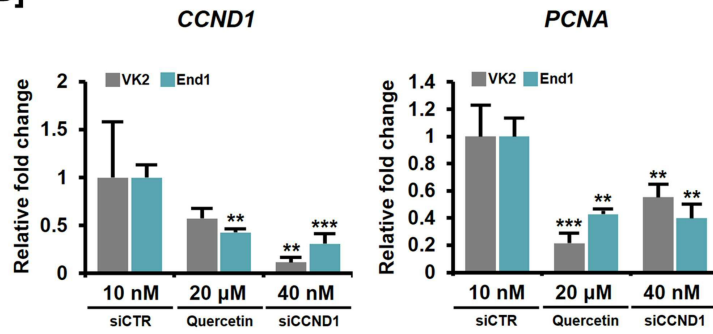


도면8a



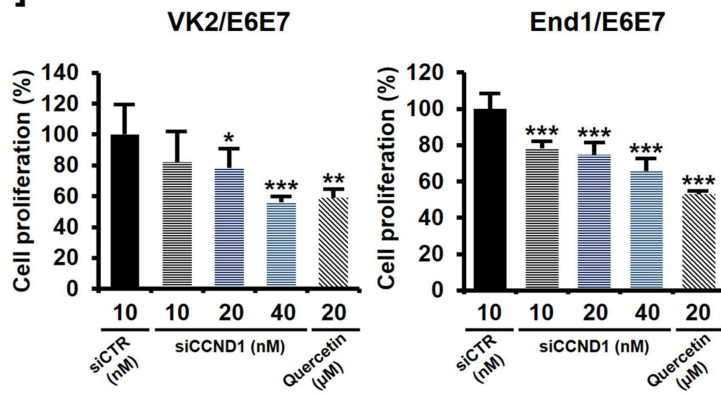
도면8b

[B]



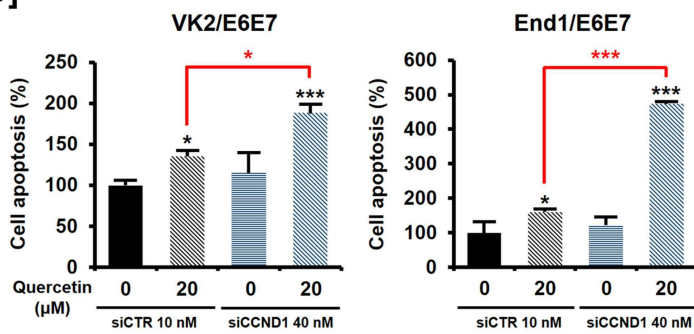
도면8c

[C]



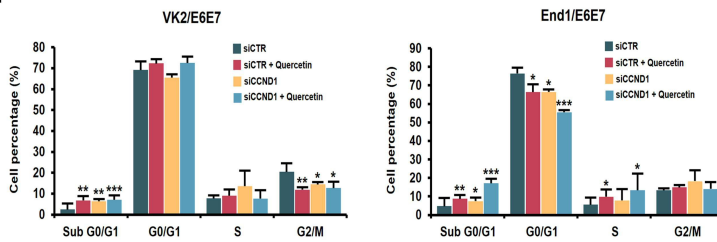
도면8d

[D]



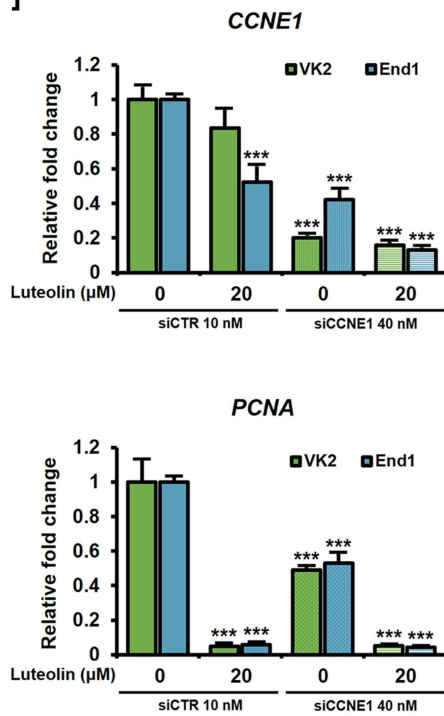
도면8e

[E]



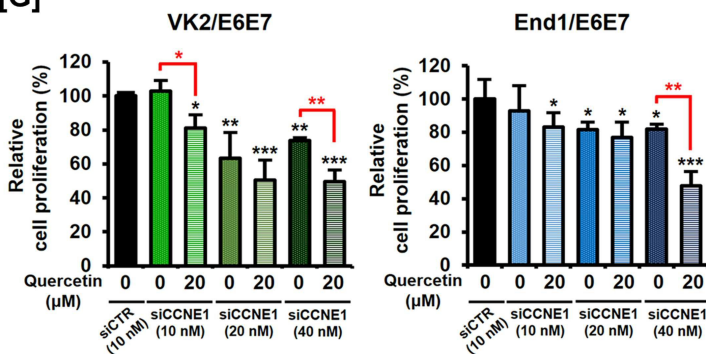
도면8f

[F]



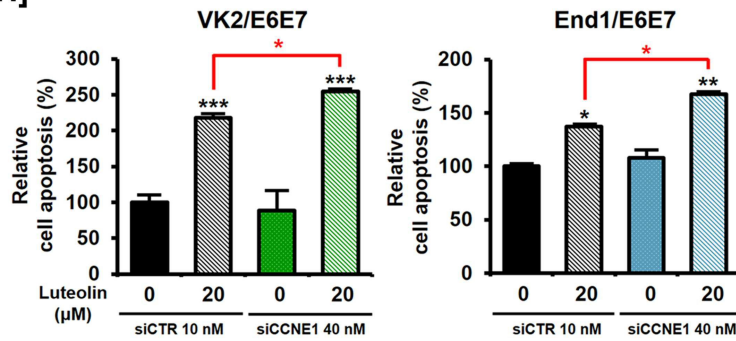
도면8g

[G]



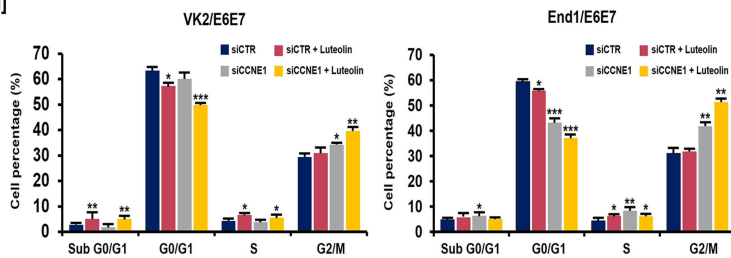
도면8h

[H]

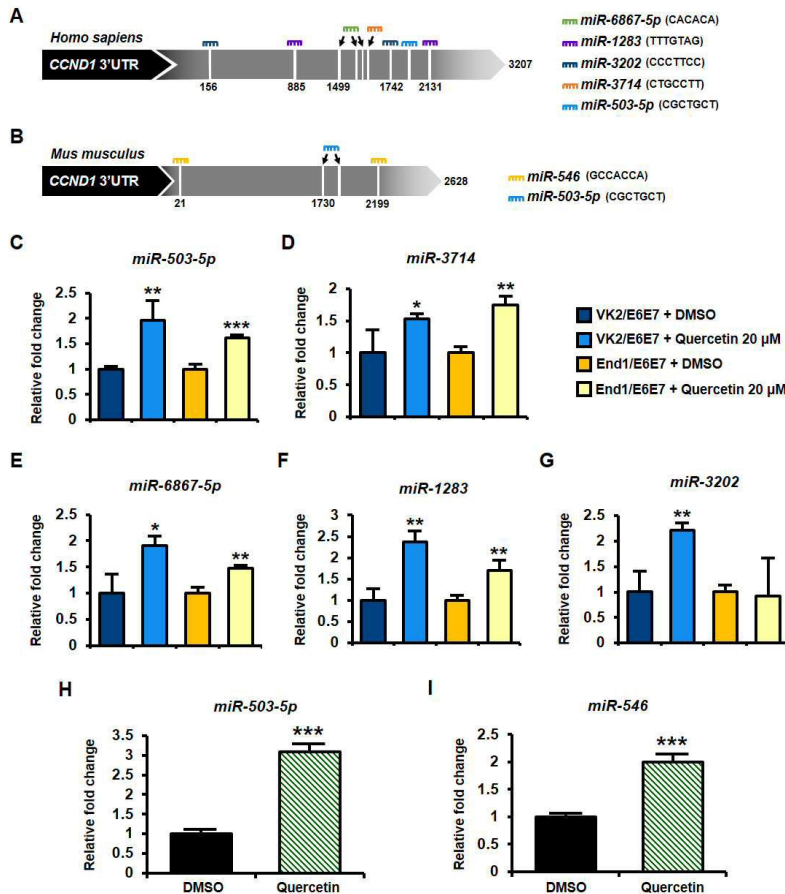


도면8i

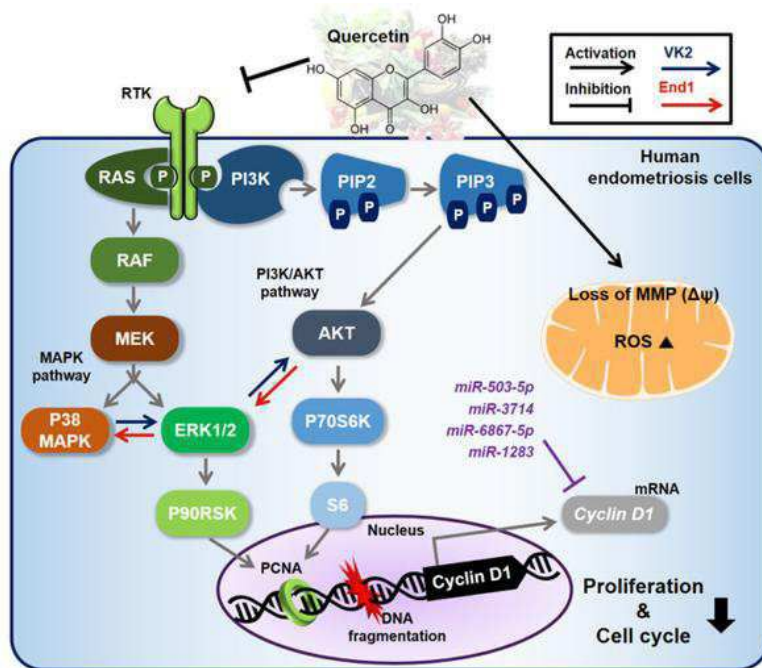
[I]



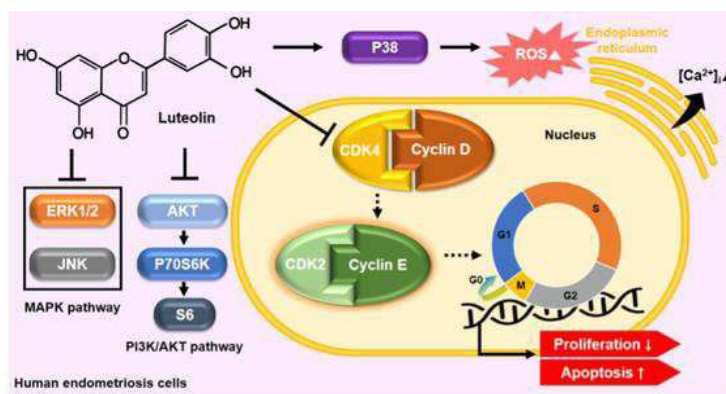
도면9



도면10



도면11



도면12

