



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0069642
(43) 공개일자 2020년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0631 (2013.01)

C12N 2501/115 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0156929

(22) 출원일자 2018년12월07일

심사청구일자 2018년12월07일

(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

배효철

서울특별시 동대문구 무학로 193, 103호

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 8 항

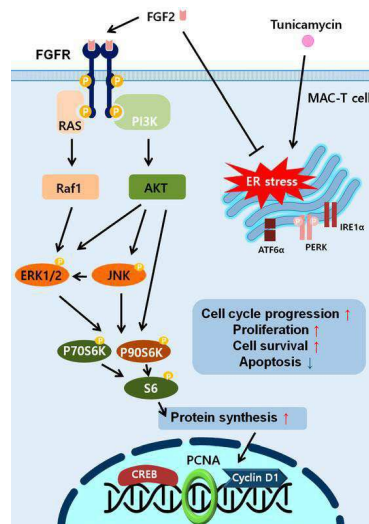
(54) 발명의 명칭 FGF2를 유효성분으로 포함하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 섬유아세포성장인자2(fibroblast growth factor 2, FGF2)를 유효성분으로 포함하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 조성물은 체내 물질을 원료로 하는바 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로 내 단백질의 발현 활성화 및 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현 감소를 통해 유선상피세포의 증식을 향상시킬 수 있는바, 유선 기능 향상을 통한 산유량 증진용 약학 조성물, 식품 조성물, 사료 첨가제 조성물과 관련된 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1B03031644

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업 (기본연구지원사업)

연구과제명 목향 외 전통약용식물의 여성 자궁내막 수용력 및 착상부전 개선 효능 검증 및 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 단국대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

FGF2(Fibroblast growth factor 2)를 유효성분으로 포함하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 FGF2는 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 FGF2는 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 소포체 스트레스 유도 단백질은 IRE1 α , ATF6 α , p-PERK, p-eIF2 α , GRP78 및 GADD153으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 포유동물의 산유량을 증진시키는 것을 특징으로 하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 6

제1항에 따른 조성물을 이용하여 유선상피세포의 증식 능력을 향상시키는 방법.

청구항 7

제1항에 따른 조성물을 이용하여 유선상피세포의 소포체 스트레스를 완화시키는 방법.

청구항 8

제1항에 따른 조성물을 이용하여 포유동물의 산유량을 증진시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 섬유아세포성장인자2(fibroblast growth factor 2, FGF2)를 유효성분으로 포함하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포유류에서 모유의 생산은 신생아에게 생존과 성장, 충분한 영양 공급을 위한 필수적인 요건으로 성공적인 자손 번식을 뒷받침 하는 요인이다. 또한, 유방은 구조적인 성장과 발달, 분화 및 퇴행을 반복하며, 유방의 발달 주기는 생식 주기와 밀접한 연관이 있으며 다양한 호르몬과 성장인자의 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Bauman and Vernon, Annu Rev Nutr, 1993).

[0003] 관련하여, 유방 발달에 중요한 역할은 하는 것으로 알려진 성장인자로서 인슐린양성장인자 I(insulin-like growth factor 1) 표피성장인자(epidermal growth factor), 간세포성장인자(hepatocyte growth factor), 형질 전환성장인자(transforming growth factor) 등이 보고된바 있다(Bauman and Vernon, Annu Rev Nutr, 1993; Akers RM *et al.*, Lactation and the Mammary Gland, 2002).

[0004] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 유방의 발달을 통해 모유의 생산을 향상시킬 수 있는 신규 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 섬유아세포성장인자 2(Fibroblast growth factor 2, FGF2)가 PI3K/AKT와 MAPK 신호전달경로를 활성화시켜 유선상피세포의 증식을 향상시키고, 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현을 감소시켜 유선의 기능을 정상화시키는 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 FGF2(Fibroblast growth factor 2)를 유효성분으로 포함하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 유선상피세포의 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 유선상피세포의 소포체 스트레스를 완화시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 포유동물의 산유량을 증진시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 FGF2(Fibroblast growth factor 2)를 유효성분으로 포함하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 유선상피세포의 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 유선상피세포의 소포체 스트레스를 완화시키는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 포유동물의 산유량을 증진시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 조성물은 체내 물질을 원료로 하는바 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로 내 단백질의 발현 활성화 및 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현 감소를 통해 유선상피세포의 증식을 향상시킬 수 있는바, 유선 기능 향상을 통한 산유량 증진용 약학 조성물, 식품 조성물, 사료 첨가제 조성물과 관련된 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 FGF2가 소의 유선상피세포의 세포 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 FGF2 처리에 의한 소의 유선상피세포의 세포주기 변화 양상을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 FGF2의 용량 의존적 투여에 따른 소의 유선상피세포내 신호 전달조절 인산화효소의 발현 양상을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 PI3K, MAPK 억제제와 FGF2의 혼합조성물에 의한 유선상피세포 증식 및 신호 전달 조절 인산화효소의 발현 양상을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 섬유아세포성장인자 수용체 억제제 처리 후 FGF 처리 시 유선상피세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 소의 유선상피세포에서 FGF2 처리가 소포체 스트레스에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 소의 유선상피세포의 발달, 증식, 소포체 스트레스 완화 효과와 관련된 FGF2의 작용기전을 나타낸 것이다.

다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 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.
- [0016] 본 발명에서는 유선상피세포의 증식 및 소포체 스트레스 완화 효과와 관련된 FGF2의 작용 기전을 밝혔다(도 7).
- [0017] 본 발명은 FGF2(Fibroblast growth factor 2)를 유효성분으로 포함하는 유선상피세포 증식 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0018] 상기 조성물은 약학적 조성물, 식품 조성물 및 사료 첨가제 조성물을 모두 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0021] 본 발명의 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라 식품 또는 가축의 사료에 혼합하여 투여될 수도 있고, 투여 용량의 정확한 조절을 위하여 약제학적으로 허용되는 부형제 EH는 보조제와 혼합되어 여러 가지 제형으로 제제화될 수도 있다. 이러한 제형에는 예를 들어, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 드렌치(drench) 등의 액체, 유제 및 현탁제 등의 경구용 제제로서 주사제 등이 포함된다.
- [0022] 본 발명의 조성물을 포함하는 주사제는 약제학적으로 허용 가능한 담체로서 증류수, 올레인산에칠, 에탄올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등; 항산화제로서 아스코르브산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, 토코페롤 등; 보존제로서 질산페닐수은, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 파라옥시안식향산메틸, 벤질알코올 등을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 조성물을 포함하는 산제 및 과립제는 통상적으로 사용되는 비타민류, 글루코스, 락토스 등의 당류, 전분, 말분, 질석 또는 각종 분말 및 액상 효소를 사용한 범위로 함유시켜 제조될 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자 또는 동물의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 FGF2의 일일 투여량은 0.01 내지 10000 mg/kg이며, 바람직하게는 1 내지 20 mg/kg이고, 하루 1회 내지 3회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0025] 본 발명에 따른 조성물이 사료첨가제 조성물로 이용될 경우, 투여 대상은 산유량 증진이 요구되는 포유동물이라면 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 소, 젖소, 양, 산양, 염소, 돼지, 말, 낙타, 개 등의 가축이며, 더욱 바람직하게는 젖소 또는 산양일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 조성물은 또한 산유량 증진을 목적으로 하는 건강기능식품에 포함될 수 있으며, 본 발명의 유효성분을 식품 첨가물로 사용할 경우, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수도 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0027] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 또는 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0028] 본 발명의 식품 보조 첨가제는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로 텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에르트리톨 등의 당알콜이다 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0029] 상기 외에 본 발명에 따른 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부

제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명에 따른 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 FGF2는 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 활성화시킴으로써 유선상피세포의 증식 능력을 향상시키는 효과를 가진다.

[0032] 이때, 상기 유선상피세포는 포유동물 유래의 세포일 수 있으며, 상기 포유동물은 설치목(예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 및 기니피그), 우제목(예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소, 사슴, 기린 및 영양), 기제목(예를 들어, 말, 당나귀, 코뿔소 및 맥), 식육목(예를 들어, 개, 고양이, 호랑이, 늑대, 여우, 사자, 치타, 표범, 너구리, 오소리, 퓨마, 재규어 및 샴쌍이), 토끼목, 식충목(예를 들어, 고슴도치, 두더지 및 슬레노돈) 및 영장목(예를 들어, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 보노보노, 일본원숭이, 붉은털원숭이)일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 FGF2는 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현을 감소시켜 유선상피세포의 증식을 촉진시키는 효과를 가진다.

[0034] 이때, 상기 소포체 스트레스 유도 단백질은 IRE1 α , ATF6 α , p-PERK, p-eIF2 α , GRP78 및 GADD153으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 조성물은 유선상피세포의 증식을 촉진시킴으로써 포유동물의 산유량을 증진시키는 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명은 또한, 상기 FGF2를 포함하는 조성물을 이용하여 유선상피세포의 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명은 또한, 상기 FGF2를 포함하는 조성물을 이용하여 유선상피세포의 소포체 스트레스를 완화시키는 방법을 제공한다.

[0039] 본 발명은 또한, 상기 FGF2를 포함하는 조성물을 이용하여 포유동물의 산유량을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0041] 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.

[0043] **실시예**

[0044] **<실험 방법>**

[0045] **실험동물 및 세포배양**

[0046] 소 유선상피세포(simian vacuolating virus 40)는 large T-antigen으로 불멸화된 세포를 사용하였으며, 소 유선세포의 단층배양을 위해서 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 항생제인 Penicillin Streptomycin 1%를 함께 혼합하여 사용하였다.

[0048] **실험 재료**

[0049] 후보 조성물질인 FGF2는 R&D systems로부터 구매하여 사용하였으며, FGF2에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, JNK, S6 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, JNK, S6 단백질을 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 wortmannin을 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126, 섬유아세포성장인자

수용체 억제제인 BGJ398을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0051] 세포증식 분석

[0052] 96-well plate에 소 유선상피세포를 3×10^3 cells/well로 분주하여 배양한 다음 serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 24시간 동안 배양하여 starvation을 진행한 다음 유용물질을 처리하고 48시간을 배양하여 10 μ M BrdU를 첨가해 2시간 배양한 뒤 cell Proliferation ELISA, BrdU kit (Cat No. 11647229001, Roche)를 사용하여 세포 증식 정도를 확인하였다.

[0054] 면역형광법

[0055] 3×10^4 개의 소 유선상피세포를 10% FBS가 포함된 serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)배지 300 μ l와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 섬유아세포성장인자 20ng을 60분 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 1:200으로 희석된 PCNA, p-Cyclin D1 항체를 처리하였으며 대조군에는 rabbit IgG를 처리하여 4℃에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-rabbit IgG Alexa 488 (catalog number: A-11008, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간동안 배양하였다. 소 유선상피세포를 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.

[0057] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0058] 소 유선상피세포에 FGF2 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 세포로부터 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) 시약을 사용하여 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0060] 세포주기 분석

[0061] 소 유선상피세포를 6-well plate에 배양하여 serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 24시간동안 starvation을 진행하고 농도의존적으로 FGF2를 처리하여 48시간 동안 배양한 뒤 세포를 원심분리 하여 모아주고 0.1% BSA-PBS로 세포를 두 차례 씻어주고 70% 에탄올로 4℃에서 24시간동안 세포 고정을 해준 다음 세포를 원심분리 하여 모아주고 0.1% BSA-PBS로 세포를 두 차례 씻어주고 RNase A (Sigma-Aldrich)가 100 μ g/mL 포함된 propidium iodide (PI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)으로 빛이 들어오지 않는 조건에서 30분 동안 염색한 뒤 Cytometer (BD Biosciences)를 이용하여 형광을 측정하였으며, 각 세포 주기의 변화를 관찰하였다.

[0063] 통계분석

[0064] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0066] <결과 및 고찰>

[0067] FGF2가 소 유선상피세포의 세포증식에 미치는 영향

[0068] 소의 유선상피세포를 대상으로 FGF2를 처리하여 세포증식을 분석한 결과, 소 유선상피세포의 증식이 FGF2의 처리량에 비례하여 20ng에서 160%까지 증가하는 것을 확인하였으며, 그 이후의 농도에서는 큰 변화가 없는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 세포 증식 인자인 PCNA를 면역형광기법으로 소 유선상피세포를 염색하여 확인한 결과 그 발현이 FGF2에 의해 유도된다는 것을 확인하였다 (도 1).

[0070] FGF2가 소 유선상피세포의 세포주기에 미치는 영향

[0071] FGF2가 소 유선상피세포의 세포주기에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 0~20ng의 FGF2를 처리하여 세포 주기 분석을 수행한 결과, 0ng에서 9.25%이었던 G2/M phase가 20ng에서 17.63%까지 처리량에 비례하여 증가하였으며, 세포 주기를 가속화하였음을 확인하였다. 또한, 뿐만 아니라 세포 주기 인자인 Cyclin D1을 면역형광기법으로 소 유선상피세포를 염색하여 확인한 결과 그 발현이 FGF2에 의해 유도되는 것을 확인하였다(도 2).

[0073] FGF2의 투여에 따른 소 유선상피세포 내 신호전달기전 변화 분석

[0074] 0~20ng 농도의 FGF2를 투여한 소 유선상피세포 단백질을 추출하여 세포증식 관련 주요 신호전달매개 단백질인 AKT, ERK1/2, P70S6K, JNK, S6, P90S6K, Cyclin D1 단백질의 인산화 양상을 확인한 결과 일곱 가지 단백질 모두 20ng의 FGF2를 인큐베이션하였을 때 대조군에 비해 증가하는 양상을 보임을 확인하였다 (도 3).

[0076] FGF2가 소 유선상피세포의 PI3K/AKT, MAPK 신호전달경로에 미치는 영향

[0077] 소 유선세포 내 FGF2에 의한 PI3K, MAPK 신호전달경로 조절양상을 확인하기 위하여 PI3K경로 억제제인 wortmannin과 ERK1/2경로 억제제인 U0126, JNK 억제제인 SP600125를 FGF2와 함께 처리한 결과, FGF2에 의해 증가하였던 소 유선상피세포의 세포 증식이 다시 감소하는 것을 확인하였으며, 뿐만 아니라, 활성화 되었던 AKT, ERK1/2, P70S6K, JNK, S6 단백질의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 FGF2가 소 유선상피세포 내 PI3K/AKT, MAPK 신호전달 경로를 통해 세포 증식을 유도한다는 것을 확인하였다(도 4).

[0079] 섬유아세포성장인자 수용체 억제를 통한 FGF2의 효과 억제 확인

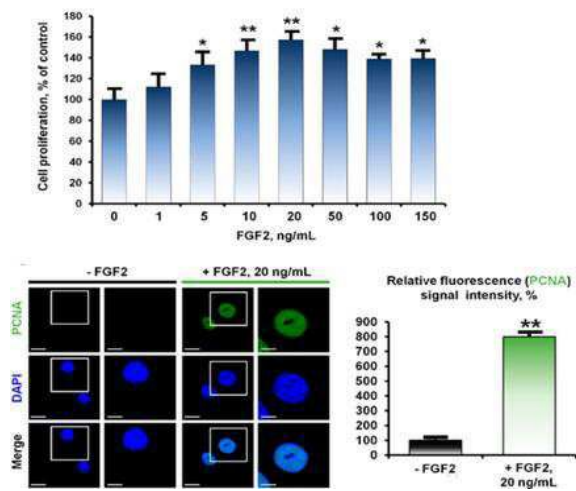
[0080] 소 유선상피세포 내 신호전달 기작이 섬유아세포성장인자 수용체에 의해 매개되는 것인지 확인하기 위하여 섬유아세포성장인자 수용체 억제제인 BGJ398을 소 유선세포에 처리한 뒤 FGF2 20ng을 처리한 결과, FGF2에 의해 증가하였던 소 유선상피세포의 세포 증식이 BGJ398에 의해 다시 감소하는 것을 확인하였으며, 또한, PI3K 및 MAPK 신호전달 과정의 주요 신호전달매개 단백질인 AKT, ERK1/2, P70S6K, JNK, S6, P90S6K, Cyclin D1 단백질의 인산화 양상도 일곱 가지 단백질 모두 20ng의 FGF2를 단독 인큐베이션 하였을 때는 대조군에 비해 증가하였지만, BGJ398과 함께 처리할 경우 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 FGF2가 섬유아세포성장인자 수용체를 통해 유선상피세포 내 신호전달 경로 및 세포 증식을 조절한다는 것을 확인하였다(도 5).

[0082] FGF2가 소 유선상피세포의 소포체 스트레스에 미치는 영향 분석

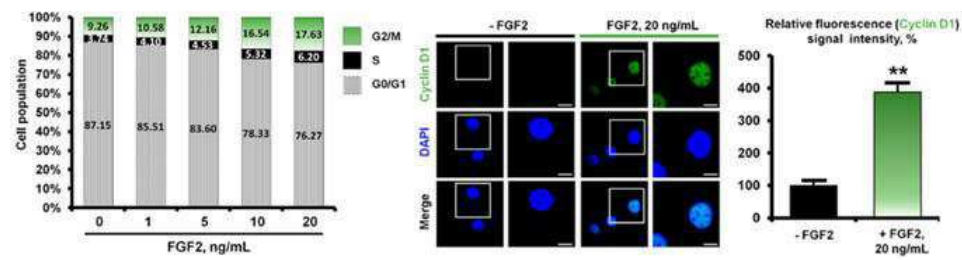
[0083] 소 유선상피세포를 대상으로 소포체 스트레스 유도물질인 Tunicamycin을 처리한 결과, 소 유선상피세포의 세포 증식이 감소하는 것을 확인하였으며, Tunicamycin과 FGF2 혼합물을 처리할 경우 감소하였던 세포증식이 다시 완화되는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 소포체 스트레스 유발 시에 발현되는 IRE1 α , ATF6 α , p-PERK, p-eIF2 α , GRP78, GADD153과 같은 인자가 Tunicamycin을 단독으로 처리할 경우 증가하는 반면, Tunicamycin과 FGF2 혼합물을 처리할 경우 완화되는 것을 확인하였다. 이를 통해 FGF2가 소 유선상피세포에서 소포체 스트레스를 감소시키고 세포사멸을 억제하여 유선의 기능을 정상화 또는 향상시킨다는 것을 확인하였다(도 6).

도면

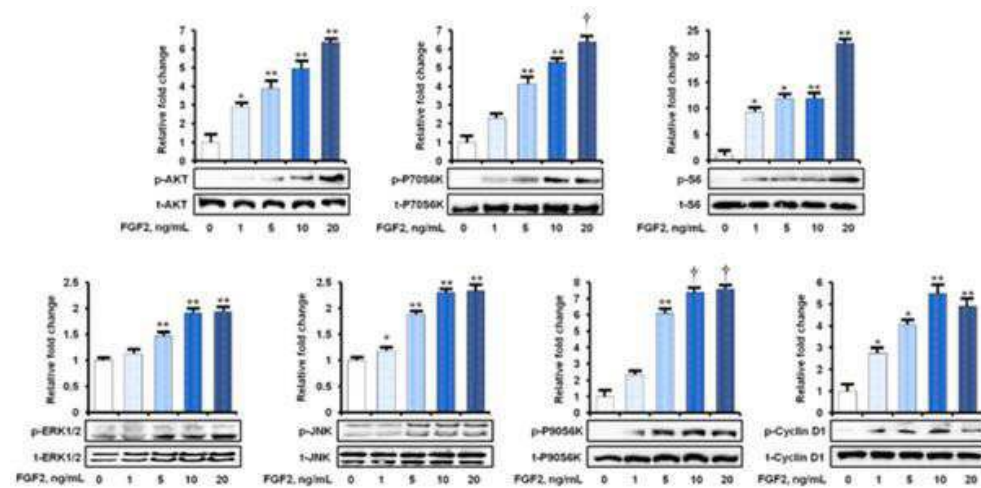
도면1



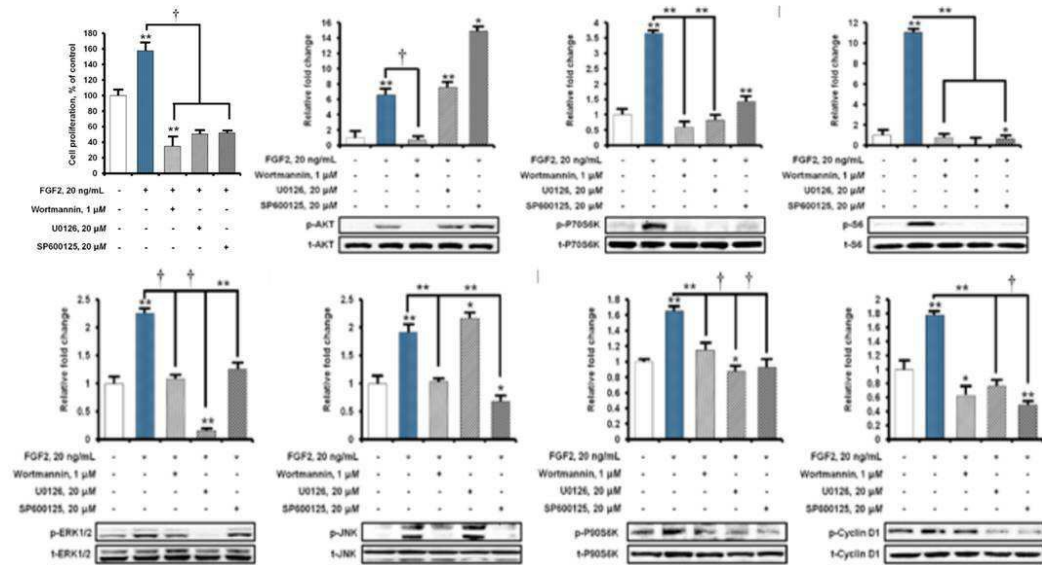
도면2



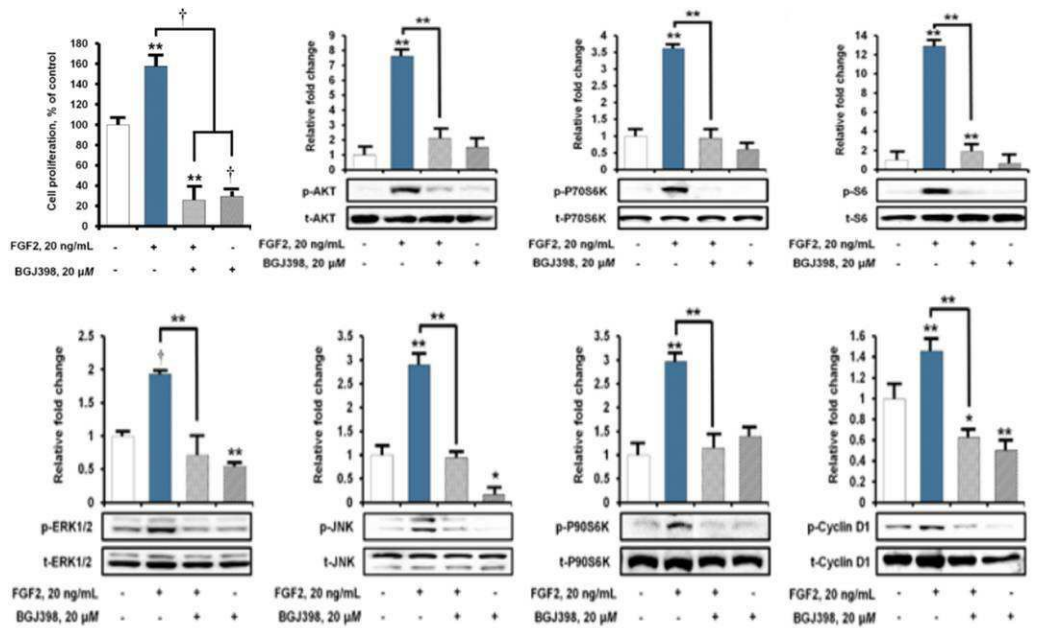
도면3



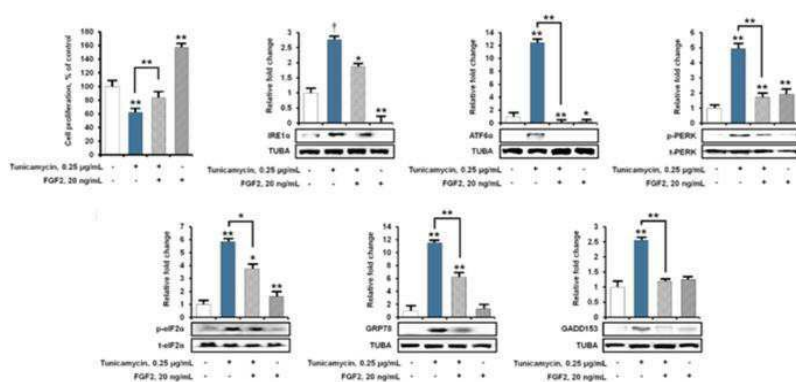
도면4



도면5



도면6



도면7

