(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0067153
(43) 공개일자 2021년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/706 (2006.01) *A61P 15/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/706 (2013.01)
A61P 15/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-0156485
(22) 출원일자 2019년11월29일
심사청구일자 2019년11월29일

(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 10 항

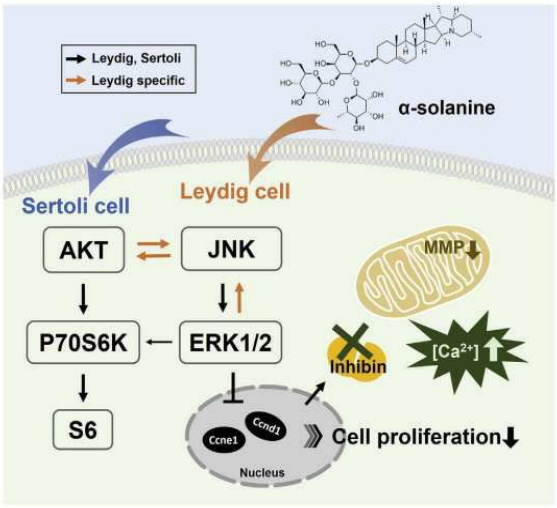
(54) 발명의 명칭 **알파-솔라닌을 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

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

본 발명에 따른 알파-솔라닌을 유효성분으로 포함하는 조성물은 고환 세포주의 증식을 억제하고, 생식샘자극호르몬 억제 단백질의 발현을 감소시키는 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 - 도6



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	50/100
과제수행기관명	국민대학교 산학협력단
연구기간	2017.04.10 ~ 2019.12.31

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	50/100
과제수행기관명	국민대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

알파-솔라닌을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알파-솔라닌이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 알파-솔라닌이 미토콘드리아 막 전위를 감소시키고, 세포질 내 칼슘 이온을 증가시키는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 남성 생식기 질환은 라이디히(Leydig) 세포 종양, 세르톨리(Sertoli) 세포 종양, 고환염, 부고환염, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

알파-솔라닌을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 알파-솔라닌이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 알파-솔라닌이 미토콘드리아 막 전위를 감소시키고, 세포질 내 칼슘 이온을 증가시키는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 남성 생식기 질환은 라이디히(Leydig) 세포 종양, 세르톨리(Sertoli) 세포 종양, 고환염, 부고환염, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 남성 생식기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

알파-솔라닌을 포함하는 조성물을 이용하여 고환 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법.

청구항 10

알파-솔라닌을 포함하는 조성물을 이용하여 생식샘자극호르몬 억제 단백질의 발현을 감소시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알파-솔라닌을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알파-솔라닌을 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] 고환염, 음낭수종, 고환암 등의 남성 생식기관 질환은 고환 세포의 비정상적 증식, 과도한 염증반응으로 인해 발병하는 질병이다. 고환은 남성 생식기관 중 라이디히 세포(Leydig cell)와 세르톨리 세포 (Sertoli cell)는 남성 호르몬을 만들어 내고 정자를 생산하는 핵심 세포로서, 손상이 발생하는 경우 생식 세포의 사멸, 세포 주기 조절 단백질 감소, 세포내 활성 산소 증가에 따른 불임이 야기된다 (Rindone, G.M., *et al.*, Reproduction, 2018. **156**(2): p. 93-101. / Kirk, D. and U. Mittwoch, Humangenetik, 1975. **26**(2): p. 105-11. / Pan, B., *et al.*, Cancer Med, 2016. **5**(11): p. 3214-3222).

[0003] 상기 남성 생식기관 질환 중 고환암은 국내 10만명당 0.45명이 발병하는 드문 암이고 병기가 낮은 경우 90%이상의 완치율을 보이지만, 20-40세 사이의 청장년층에서 발병률이 전 세계적으로 증가하고 있으며 정상 남성보다 불임을 일으킬 확률이 세배 이상 높으며 (Scott M., *et al.* , Urologic Clinics of North America, 2015. **42**(3): p.269-275), 고환암 환자는 통증이 없기 때문에 진행된 병기에서 발견하는 경우가 많고, 림프절을 따라 전이가 쉽게 일어나는 것으로 알려져있다 (Mariotto A.B., *et al.*, CA Cancer J Clin 2014; **64**: pp. 252-271).

[0004] 한편, 알파-솔라닌(α-solanine)은 감자, 토마토, 가지 등에서 합성되는 삼당 글리코알칼로이드 (trisaccharide glycoalkaloid)로써, 주로 감자 독성이라고 불리는 세포 독성 효과를 지니고 있으며, 최근 연구에 따르면, 췌장암 세포에 알파-솔라닌 처리시 cytochrome c와 Smac 단백질을 통한 caspase-3 활성을 유도하여 마이토콘드리아 의존성 세포 사멸이 일어나는 것으로 보고된바 있다(Sun, H., et al., Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 805926).

[0005] 이처럼, 알파-솔라닌에 의한 다양한 약리적 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 남성 생식기 질환과 관련하여 알파-솔라닌의 효능에 대해 알려진 바는 없다.

[0006] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 남성 생식기 질환 치료 물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 알파-솔라닌이 고환 세포주의 증식을 억제하고, 생식샘자극호르몬 억제 단백질의 발현을 감소시키는 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

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

[0008] 또한, 본 발명은 알파-솔라닌을 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 생식샘자극호르몬 억제 단백질의 발현을 감소시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 알파-솔라닌을 유효성분으로 포함하는 남성 생식기 질환의 예방 또는

치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 알파-솔라닌을 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 생식샘자극호르몬 억제 단백질의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 알파-솔라닌을 유효성분으로 포함하는 조성물은 고환 세포주의 증식을 억제하고, 생식샘자극호르몬 억제 단백질의 발현을 감소시키는 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 알파-솔라닌이 고환 세포주의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 알파-솔라닌이 고환 세포주의 미토콘드리아 막 전위에 미치는 영향 및 세포질 내 칼슘 이온의 양에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 알파-솔라닌이 고환 세포주 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 알파-솔라닌과 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 고환 세포주 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 알파-솔라닌이 세포 주기 조절 단백질 및 생식샘자극호르몬 억제 단백질의 mRNA 발현에 미치는 영향 및 해당 유전자의 발현 위치를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 알파-솔라닌의 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 알파-솔라닌에 의한 고환 세포주의 증식 억제 기전을 밝혔다(도 6).

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

[0021] 본 발명은 다른 관점에서 알파-솔라닌을 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, 계면활성

제, 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 알파-솔라닌이 고환 세포주의 증식과 관련된 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 알파-솔라닌이 미토콘드리아 막 전위를 감소시키고, 세포질 내 칼슘 이온을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 알파-솔라닌이 스테로이드 생합성, 세포주기, 호르몬 수용체 및 정자형성과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 알파-솔라닌이 생식샘자극호르몬 억제 단백질의 발현을 감소시키는 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, 알파-솔라닌을 포함하는 조성물을 이용하여 고환 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.

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

[0040] 본 발명은 또 다른 관점에서, 알파-솔라닌을 포함하는 조성물을 이용하여 생식샘자극호르몬 억제 단백질의 발현을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0042] [실시예]

[0043] 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 등가물

에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0045] **<실험 방법>**

[0046] 세포배양

[0047] 쥐의 라이디히 세포주 TM3, 세르톨리 세포주 TM4 세포는 한국세포주은행 (Korean cell line bank)에서 구매하여 사용하였다. 두 세포의 단층 배양을 위해서 DMEM 배지에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 추가한 배양용 배지에서 배양하였다.

[0049] 실험 재료

[0050] 알파-솔라닌은 Sigma로부터 구매하여 사용하였으며, 세포주 내 신호전달기작을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, S6, JNK 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, S6, JNK 단백질을 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다. 이외에, PCNA 항체는 Santa Cruz Biotechnology사에서 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2, JNK 억제제인 U0126, SP600125을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0052] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0053] 두 세포주에 대한 알파-솔라닌의 증식 억제 효과를 확인하기 위하여, FBS 기아 조건으로 배양한 TM3 및 TM4 세포주에 알파-솔라닌을 용량 의존적으로 (0, 1, 5, 10, 20 μM) 섞은 100μl 배지에서 48시간 인큐베이션 하였다. 이후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어주었다. 마지막으로 100 μl의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 반응시켜 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0055] 면역형광법을 이용한 세포 증식 마커 확인

[0056] 1×10^4개의 TM3 및 TM4 세포를 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 알파-솔라닌 15 μM을 24시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μg/ml의 PCNA 항체를 처리하여 4℃에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이후, 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. 또한, DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0058] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0059] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (Mitochondria Membrane Potential) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 1×10^5 개의 TM3 및 TM4 세포를 6 well에 배양하고, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 알파-솔라닌을 용량 의존적으로 (0, 1, 5, 15 μM) 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 세포를 JC-1 staining solution 에 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.

[0061] 세포질 내 칼슘 이온 농도 변화 확인

[0062] TM3 및 TM4 세포의 세포질 내 칼슘 이온 농도는 칼슘에 결합하는 fluo-4 dye의 형광 염색을 통해 확인하였다. 1×10^5개의 세포를 6 well에 배양하고, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 알파-솔라닌을 용량 의존적으로 (0, 1, 5, 15 μM) 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포를 fluo-4 dye가 포함된 serum 기아 배지에 풀어준 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 차가운 PBS로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0064] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0065] TM3 및 TM4 세포주에 알파-솔라닌 또는 신호 단백질 인산화 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 각 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 통해 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0067] mRNA 발현 분석 (Real time - qPCR)

[0068] 두 세포주에 알파-솔라닌 15 μM을 24h 처리하고, 마우스에 2.5 mg/kg 알파-솔라닌을 10회 주입한 후 고환을 적출하여 모두 Trizol reagent (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이후, 1 μg의 RNA를 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma)과 StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 측정하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분동 안 인큐베이션 후 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 3분 조건을 40회 증폭하였으며, GAPDH 발현량에 기반하여 분석하였다.

[0070] 조직 내 mRNA 발현 위치 분석 (*In situ hybridization*)

[0071] 합성된 상보적 DNA를 해당 유전자의 시퀀스를 이용하여 부분적으로 증폭시킨 후 클로닝 백터(Invitrogen)에 주입하여 클로닝 하였다. 해당 시퀀스를 포함하는 플라스미드는 특정 T7- 및 SP6 프라이머를 이용하여 다시 증폭시키고 DIG RNA labeling kit (Roche, Indianapolis, IN)를 이용하여 프로브(probe)를 합성하였다. 적출하여 4% 파라포름알데하이드에 (paraformaldehyde) 고정한 쥐의 고환 절편은 탈파라핀, 함수, 탈수, 침투의 과정을 거쳐 전잡종화 용액에 (prehybridization mixture) 인큐베이션 시켰다. 10분 후 조직 절편을 anti-DIG 항체에 하루밤 인큐베이션 한 후 0.4 mM의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, 0.4 mM의 nitroblue tetrazolium, 2 mM의 levamisole (Sigma)가 포함된 용액을 이용하여 도색화 하였다. 조직 절편은 Leica DM 2500 현미경으로 관측하였다.

[0073] 통계분석

[0074] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0076] **<결과 및 고찰>**

[0077] 알파-솔라닌이 라이디히세포와 세르톨리세포에 보이는 세포 증식 억제 효과 확인

[0078] 알파-솔라닌이 남성 고환 세포주 TM3 (라이디히세포), TM4 (세르톨리세포) 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 알파-솔라닌을 용량 의존적으로 (0, 1, 5, 10, 15, 20 μM) 추가한 배양액에서 48시간 배양하였다. 그 후 BrdU를 이용하여 세포 증식 정도를 확인한 결과, 두 세포주에서 모두 15 μM의 알파-솔라닌에 의해 세포 증식이

50% 이하로 감소한 것으로 확인되었다 (도 1A, 1B). 또한, 핵 내 증식 마커인 PCNA의 발현 역시 알파-솔라닌 15 μM에 의해 TM3에서 50%, TM4에서 58%로 감소하는 것을 확인하였다(도 1C, 1D). 이러한 결과를 통해, 알파-솔라닌이 고환 세포주의 증식력을 유의적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0080] 알파-솔라닌이 라이디히세포 및 세르톨리세포 내 마이토콘드리아에 미치는 영향 확인

[0081] JC-1 염색을 이용하여 용량의존적으로 (0, 5, 10, 15 μM)처리한 알파-솔라닌이 TM3, TM4 세포의 마이토콘드리아 막 전위에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과, 알파-솔라닌은 TM3, TM4 세포주의 마이토콘드리아 막 전위차 감소를 각각 235%, 121%씩 유도시키는 것을 확인하였다 (도 2A, 2B). 또한, 알파-솔라닌 처리된 두 세포주는 세포질에서 fluo-4로 측정되는 칼슘 이온이 각각 TM3에서 575%, TM4에서는 148% 증가하는 것으로 확인되었다 (도 2C, 2D).

[0083] 알파-솔라닌 및 신호 단백질 활성 저해제 적용에 따른 남성 고환 세포주 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호 단백질의 인산화 변화

[0084] 웨스턴블롯을 이용하여 TM3 및 TM4 세포주 내 알파-솔라닌의 용량 의존적 (0, 5, 10, 15 μM) 처리에 따른 세포 내 신호 전달 단백질의 인산화를 측정하였다. 그 결과, TM3와 TM4에서 알파-솔라닌의 용량이 증가함에 따라 모두 AKT (각각 2.3배, 1.22배), P70S6K (각각 1.19배, 1.35배), S6 (각각 1.9배, 2.25배), ERK1/2 (각각 2.2배, 2.65배), JNK (각각 1.6배, 3.6배) 단백질의 인산화가 점진적으로 증가하는 것을 확인하였다 (도 3). 이어, TM3 및 TM4 세포주 내 신호전달 매커니즘을 명확히 하기 위하여 알파-솔라닌과 (LY294002), ERK1/2 억제제 (U0126), JNK 억제제 (SP600125)를 각각 병용처리 하여, 각 단백질의 인산화 양상을 확인하였다. 그 결과 두 세포주에서 모두 인산화가 증가한 AKT는 LY294002와 SP600125에 의해 감소하였고, P70S6K와 S6는 모든 억제제에 의해 인산화가 감소하였다 (도 4A - 4C). 알파-솔라닌에 의해 인산화가 증가하였던 ERK1/2는 TM3에서 모든 억제제에 의해 활성이 감소한데 반하여, TM4에서는 U0126에 의해서만 활성이 감소하였다 (도 4D). JNK 단백질의 경우, 모든 억제제와 알파-솔라닌 병용 처리시에 증가되었던 인산화가 효과적으로 감소하는 것을 확인하였다 (도 4E). 뿐만 아니라, TM3에 알파-솔라닌 및 억제제를 병용 처리하였을 때, LY294002 의해 약 50%의 추가적인 세포 증식 억제가 관찰되었다 (도 4F). 더욱이, TM4에서는 모든 억제제가 알파-솔라닌에 더하여 세르톨리세포의 증식을 55% 이상의 추가적인 억제 효과를 보였다 (도 4G).

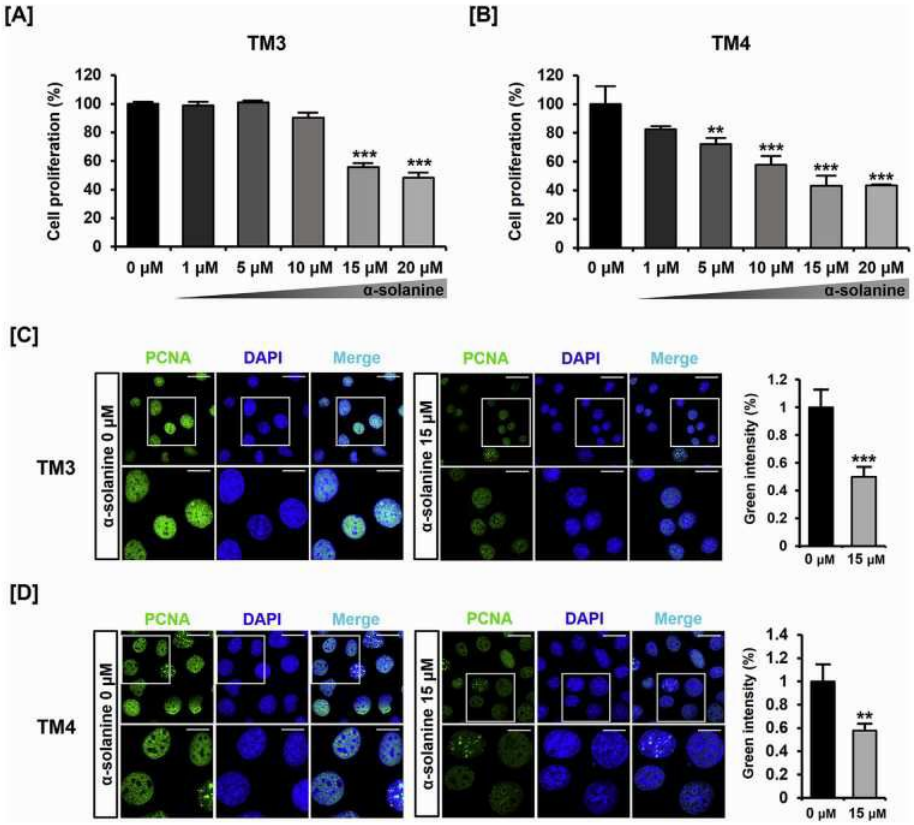
[0086] 알파-솔라닌의 처리에 따른 고환 구성 세포와 마우스 고환의 증식 및 성 호르몬 조절 단백질 발현 변화

[0087] 라이디히세포와 세르톨리세포주에 알파-솔라닌 처리시 세포 주기 조절 단백질인 *Ccnd1* (도 5A) 및 *Ccne1* (도 5C)의 mRNA 발현이 감소하고, 생식샘자극호르몬 억제 단백질인 *Inha* (도 5E)와 *Inhba* (도 5G)의 mRNA 발현이 감소하였다. 추가적으로, 본 발명자들은 동일 효과가 마우스 내에서도 발생하는지 확인하기 위하여 마우스에 알파-솔라닌을 10회 주사하여 고환을 획득한 후, mRNA의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, 마우스 고환에서도 *Ccnd1* (0.63배; 도 5B), *Ccne1* (0.6배; 도 5D), *Inha* (0.8배; 도 5F), *Inhba* (0.29배; 도 5H)의 발현이 감소하였으며, 조직 내 해당 유전자들의 발현 위치 또한 확인하였다 (도 5I).

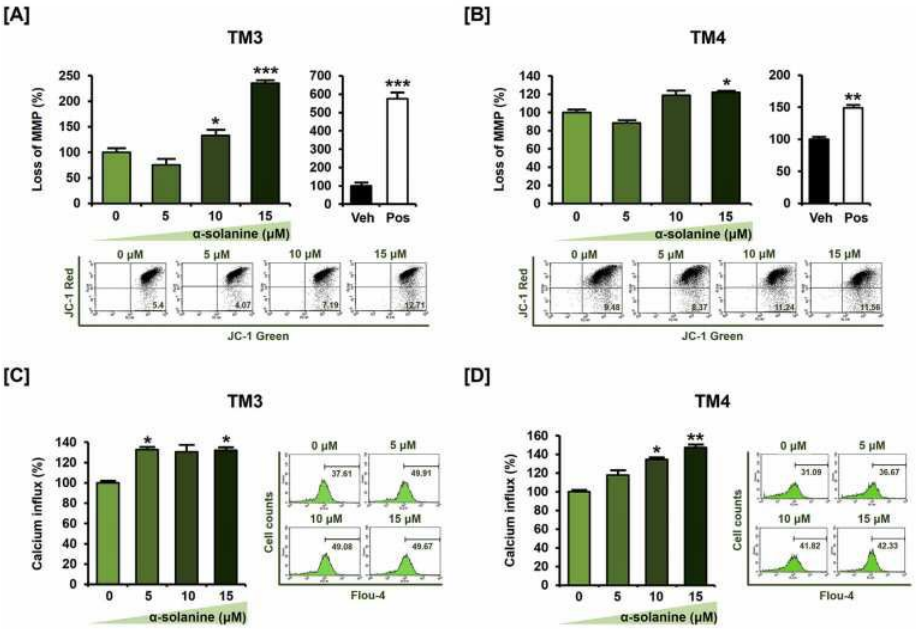
[0089] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

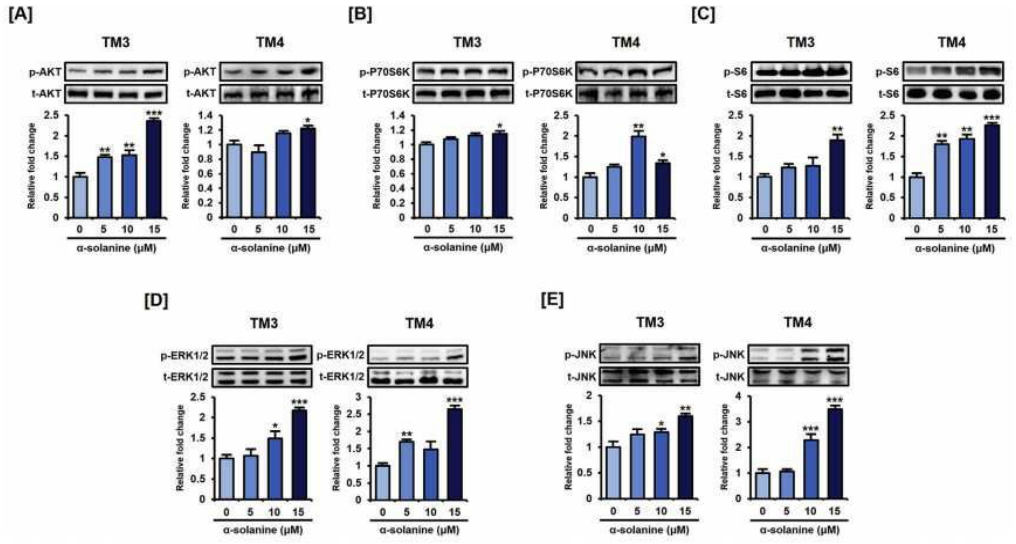
도면1


[A]
TM3
Cell proliferation (%)
0 μM 1 μM 5 μM 10 μM 15 μM 20 μM
α-solanine
[B]
TM4
Cell proliferation (%)
0 μM 1 μM 5 μM 10 μM 15 μM 20 μM
α-solanine
[C]
TM3
PCNA DAPI Merge
α-solanine 0 μM
α-solanine 15 μM
Green intensity (%)
0 μM 15 μM
[D]
TM4
PCNA DAPI Merge
α-solanine 0 μM
α-solanine 15 μM
Green intensity (%)
0 μM 15 μM

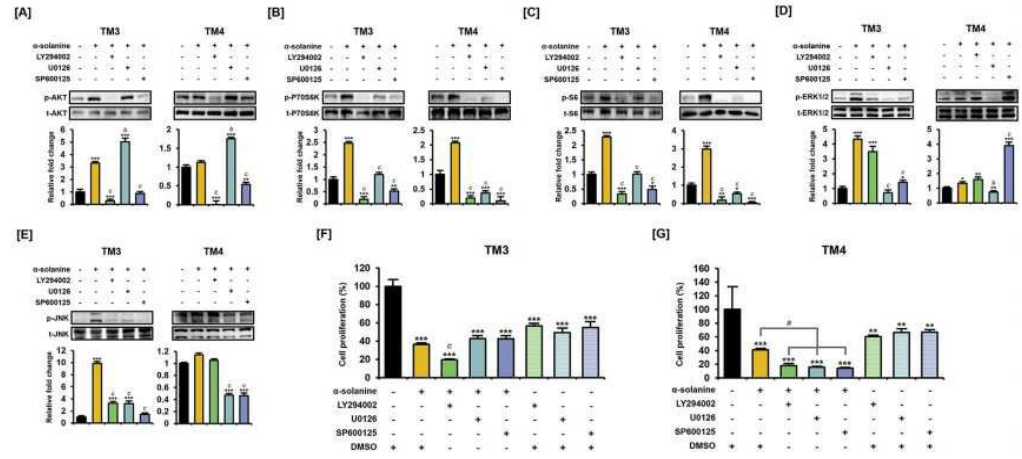
도면2


[A]
TM3
Loss of MMP (%)
α-solanine (μM)
Veh Pos
JC-1 Red
JC-1 Green
[B]
TM4
Loss of MMP (%)
α-solanine (μM)
Veh Pos
JC-1 Red
JC-1 Green
[C]
TM3
Calcium influx (%)
α-solanine (μM)
Cell counts
Flou-4
[D]
TM4
Calcium influx (%)
α-solanine (μM)
Cell counts
Flou-4

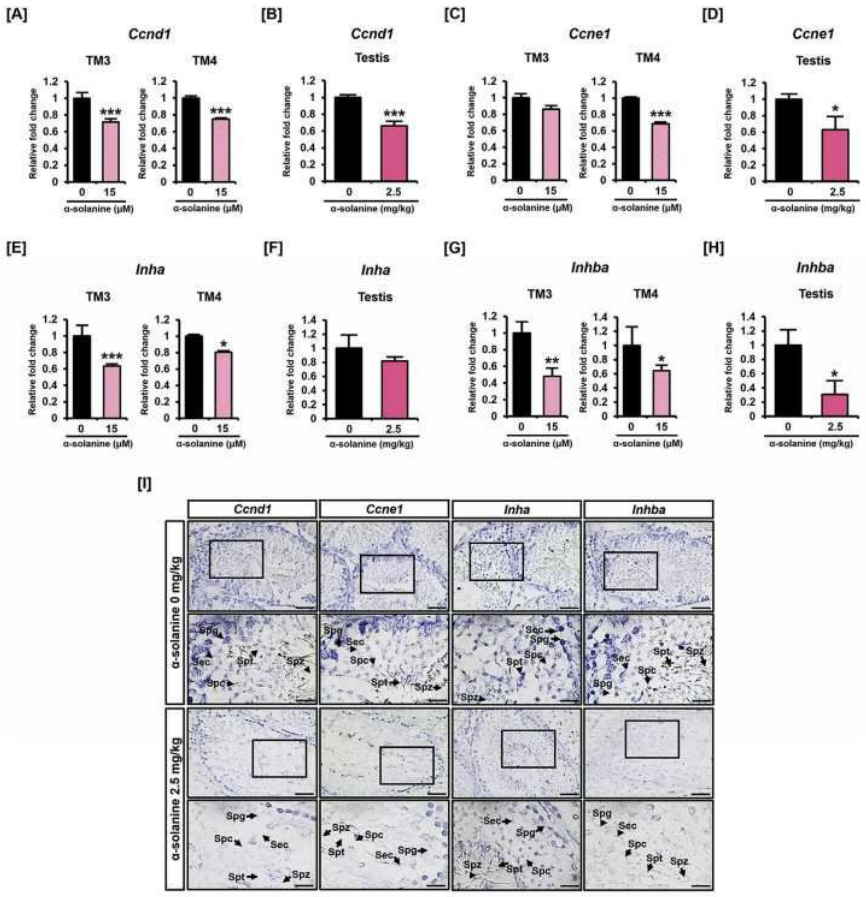
도면3


[A]
TM3
TM4
p-AKT
t-AKT
Relative fold change
α-solanine (μM)
[B]
p-P70S6K
t-P70S6K
[C]
p-S6
t-S6
[D]
p-ERK1/2
t-ERK1/2
[E]
p-JNK
t-JNK

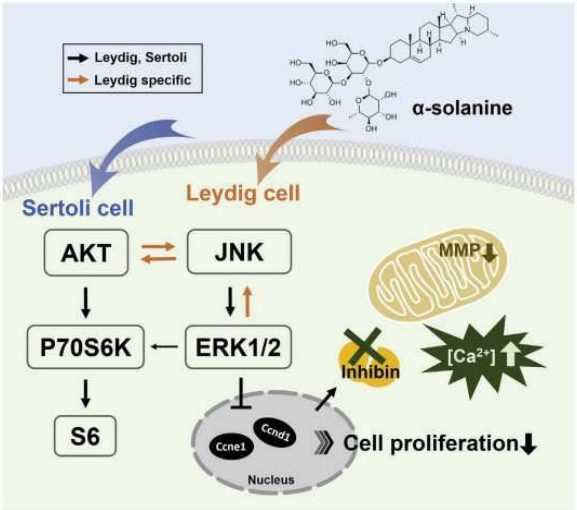
도면4


[A]
[B]
[C]
[D]
[E]
[F]
[G]
TM3
TM4
α-solanine
LY294002
U0126
SP600125
DMSO
Cell proliferation (%)

도면5


[A]
Ccnd1
TM3
TM4
[B]
Ccnd1
Testis
[C]
Ccne1
TM3
TM4
[D]
Ccne1
Testis
[E]
Inha
TM3
TM4
[F]
Inha
Testis
[G]
Inhba
TM3
TM4
[H]
Inhba
Testis
Relative fold change
α-solanine (μM)
α-solanine (mg/kg)
[I]
Ccnd1
Ccne1
Inha
Inhba
α-solanine 0 mg/kg
α-solanine 2.5 mg/kg
Spg
Sec
Spc
Spt
Spz

도면6


Leydig, Sertoli
Leydig specific
α-solanine
Sertoli cell
Leydig cell
AKT
JNK
MMP
P70S6K
ERK1/2
Inhibin
[Ca2+]
S6
Ccnd1
Ccne1
Cell proliferation
Nucleus