



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년05월13일
(11) 등록번호 10-1978077
(24) 등록일자 2019년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/03 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/03 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0184518
(22) 출원일자 2017년12월29일
심사청구일자 2017년12월29일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170104776 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이승호
인천광역시 남구 노적산로 43 (학익동, 인천학익
두산위브)
(74) 대리인
차준용

전체 청구항 수 : 총 8 항

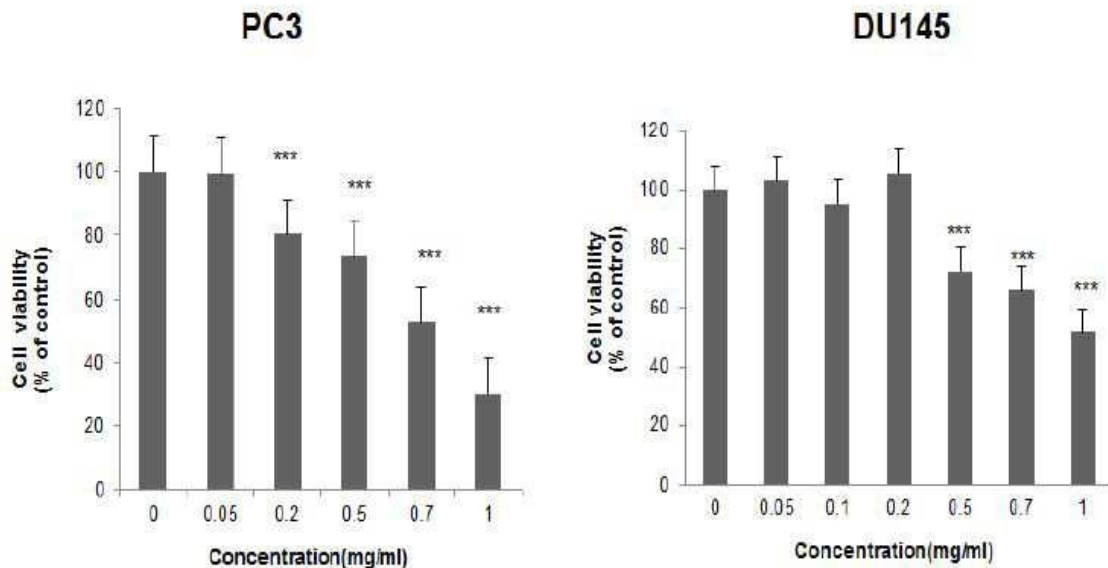
심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 패 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 패(Ishige okamurae) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로 본 발명에 따른 패 추출물은 PC3, DU145 세포에 패 추출물을 처리하였을 때 Erk, p38 인산화율 농도의존적으로 증가시켜, 패 추출물이 MAPK pathway의 활성화를 통하여 PC3, DU145의 세포사멸(apoptosis)을 유도한다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 패 추출물의 ROS 생성을 통하여 세포사멸(apoptosis)이 유도된다는 것을 알 수 있었고, 이는 전립선암에 대한 항암 치료제로서의 가능성을 제시한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/202 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

패(Ishige okamurae) 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 C1 내지 C2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출한 후, 건조하여 1,3-butylene glycol에 녹인 것을 특징으로 하는 전립선암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 저급 알코올은 메탄올인 것을 특징으로 하는 전립선암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 패 추출물은 MAPK pathway를 활성화 시켜 전립선암세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것을 특징으로 하는 전립선암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 패 추출물은 ERK 또는 p38 단백질을 활성화시켜 전립선암세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것을 특징으로 하는 전립선암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

패(Ishige okamurae) 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선암 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 추출물은 C1 내지 C2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출한 후, 동결건조하여 1,3-butylene glycol에 녹인 것을 특징으로 하는 전립선암 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 9

삭제

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 패 추출물은 MAPK pathway를 활성화 시켜 전립선암세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것을 특징으로 하는 전립선암 예방 및 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 패(Ishige okamurae) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물 또는 암 예방 및 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 패(Ishige okamurae)는 갈조류로서 패과에 속한다. 중국, 일본, 태국 연안에 분포하며, 우리나라에서는 서해안, 남해안, 제주도 해안가의 바위에 붙어 자생한다. 패는 xanthophyll, fucoxanthin 등을 함유하여 다양한 범위의 생산물에 있어서 alginate 및 항염증, 항산화제의 훌륭한 급원이 되며, 패의 폴리페놀 성분으로 알려져 있는 phlorotannin은 생리활성 물질로 항플라즈민 억제 효과 및 항산화 활성이 있다고 보고되었다. 패는 이처럼 다양한 생리활성 물질을 함유하지만 항암 억제에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

[0004] 식생활의 변화 등 우리나라의 생활 문화가 전반적으로 서구화되고 있으며, 노령화로 인하여 전립선암의 발생은 점차 증가하고 있다. 전립선암은 남성에게만 발병하며, 선진국에서 가장 많이 발생하는 암으로, 2015년 기준으로 미국에서 전체 암환자 중 가장 많은 발병률과 암 관련 사망률 2위를 나타내고 있다. 우리나라에서는 2013년 기준으로 암 발병률 5위, 사망률은 7위를 차지하고 있다.

[0005] 전립선암의 치료는 안드로겐 호르몬 제거, 방사선 요법 및 외과적 요법을 병행하기도 하지만 부작용을 감수해야 하며, 안드로겐 비의존성 전립선암 환자의 경우 치료가 어렵기 때문에 천연물과 같은 생물 의약을 이용한 세포사멸(apoptosis) 유도법 개발의 필요성이 대두되고 있다.

[0006] 세포사멸(apoptosis)은 세포 내에서 일어나는 프로그램 된 사멸 기전으로, 호르몬 또는 화학 물질과 같은 많은 세포사멸(apoptosis) 관련 인자들에 의해 조절되는데, 세포 괴사인 necrosis와는 구별되는 것으로, 암의 치료와도 밀접한 관계가 있기 때문에 다양한 암세포를 대상으로 한 세포사멸(apoptosis) 유도와 관련된 연구가 진행되고 있으며, 특징적으로 핵과 크로마틴의 응축으로 인한 세포의 수축, DNA의 단편화, 단백질의 절단 형성, apoptotic body 등과 같은 현상이 나타난다. 이러한 세포사멸(apoptosis)은 세포 내의 Bcl2 family, caspase의 활성화, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 조절에 의해 발생하게 된다. 최근에는 세포사멸(apoptosis)이 reactive oxygen species (ROS)와 많은 관련이 있다고 보고되고 있다. ROS는 세포 대사 과정에서 생성되고 즉시 불활성화되지만 산화 환원의 균형이 무너지게 되면, 세포손상을 가져오게 된다. 이러한 ROS는 스트레스가 없는 상황에서 세포 내 신호전달에서 주요한 역할을 하지만, ROS는 산화적 스트레스를 일으켜 DNA 손상, 노화와 세포사멸(apoptosis) 등을 일으키게 된다.

[0007] 본 연구에서 항암의 효능을 가지고 있는 패를 재료로, 인간 전립선암 세포주인 PC3, DU145 세포에 미치는 항암 효과의 분자 생물학적 기전에 대하여 조사하였고, 그 중에 ROS가 세포사멸(apoptosis) 유발에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0981184호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 패(Ishige okamurae) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물 또는 암 예방 및 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 패(Ishige okamurae) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 암 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 패 추출물은 인간 전립선암 세포주인 PC3, DU145 세포에서 ERK, p38 인산화를 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하여, 패 추출물이 MAPK pathway를 활성화시켜 PC3, DU145의 세포사멸(apoptosis)을 유도한다는 것을 알 수 있었다. 이는 인간 전립선암 세포에 대한 항암치료제로서의 가능성을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 세포사멸(apoptosis) 신호 경로를 나타내는 도면으로, 단백질 키나아제 신호 전달 경로와 apoptotic cascade를 도시한다.

도 2는 패 추출물의 PC3, DU145 세포 생존율(cells viability)에 대한 그래프이다. 통계 분석은 일원 분산 분석(One-way ANOVA)을 사용하고 적어도 세 번의 실험에 기초하여 수행되었다(** : $p < 0.01$, *** : $P < 0.001$).

도 3은 PC3, DU145 세포를 40시간 동안 농도 의존성 방식으로 패 추출물을 처리하고, 400X 배율에서 inverted microscopy으로 관찰 하였다.

도 4는 48시간 동안 다양한 농도의 패 추출물로 배양된 PC3, DU145 세포로부터의 DNA의 아가로스젤 전기영동 사진이다(M : 1000bp 마커).

도 5는 패 추출물이 PC3, DU145에서 annexin V-PI 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프로, 유동 세포 계측법 분석에 의해 측정되었다.

도 6은 패 추출물이 PC3, DU145 세포에서 caspase 발현에 미치는 영향을 나타내는 웨스턴 블롯 사진으로, caspase-3,9 and PARP의 절단을 추정할 수 있으며, β -actin은 대조군으로 사용하였다.

도 7은 패 추출물이 DU145에서 ROS 생성을 촉진하는 것을 나타내는 도면으로 (a) PC3의 ROS 생산; (b) PC3에서의 NAC 효과; (c) DU145의 ROS 생산; (d) DU145에서의 NAC 효과를 나타낸다(데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차(각 군에서 $n = 3$)로 나타내었다, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ VS. 통제 그룹).

도 8은 패 추출물에 의한 ROS 생성에 따른 Cell viability 변화를 나타내는 도면이다. 통계 분석은 일원 분산 분석(One-way ANOVA)을 사용하고 적어도 세 번의 실험에 기초하여 수행되었다(** : $p < 0.01$, *** : $P < 0.001$).

도 9는 패 추출물 및 NAC를 처리하여 PARP 단백질 발현을 나타내는 웨스턴 블롯 사진이다. β -액틴 단백질은 대조군으로 사용되었다.

도 10은 PC3, DU145 세포에서 패 추출물 처리에 의한 Erk(extracellular-regulated protein kinase), p38의 변화를 관찰한 웨스턴 블롯 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명은 패(Ishige okamurae) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 추출물은 상기 추출물은 C1 내지 C2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 용매로 추출한 후, 건조하여

1,3-butylene glycol에 녹인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다

- [0020] 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0021] 상기 폐 추출물의 추출 방법으로는 여과법, 열수추출, 침지추출, 환류 냉각추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있으며, 열수추출 방법으로 1회 내지 5회 추출하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로 3회 반복 추출하는 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [0022] 상기 추출용매는 폐에 0.1 내지 10배 첨가할 수 있으며, 0.3 내지 5배 첨가하는 것이 바람직하다.
- [0023] 추출온도는 20 내지 40℃인 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 12 내지 48시간인 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [0024] 상기 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이며, 바람직하게는 동결건조하는 것이나 이에 한정하지 않는다.
- [0025] 상기 폐 추출물은 MAPK pathway를 활성화 시켜 암세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0026] 상기 폐 추출물은 ERK 또는 p38 단백질을 활성화시켜 암세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0029] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0030] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로글, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용 또는 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 피부외용으로 사용한다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 폐 추출물의 양을 기준으로 0.01 내지 1000 mg/kg이고, 바람직하게는 30 내지 500 mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50 내지 300 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

- [0036] 본 발명은 패(Ishige okamurae) 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0037] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0038] 본 발명의 패 추출물 또는 이의 분획물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기 간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효 성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스 파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0040] 상기 외에 본 발명의 패 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 패 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 패 추출물은 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0042] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.
- [0044] **시약 및 기기**
- [0045] Dulbecco's modified Eagle's minimal medium (DMEM), and Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, corning, USA) and penicillin/streptomycin은 Hyclone에서 구입하였고, FBS는 Corning, HS, PBS, 0.25% Trypsin-EDTA는 Gibco에서 구매하였다. WST-1은 cayman chemical에서 구매하였다. N-Acetyl-L-cysteine, glutamic acid, 2',7'-Dichlorofluorescein은 Sigma-Aldrich, amyloid β peptide(25-35)는 abcam에서 구매하였으며, TRIzol[®] Reagent은 ambion을 구매하였다. SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix, reverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover는 TOYOBO에서 구매하였다. Acrylamide solution은 Tech & Innovation에서 구입하였으며, ECL solution은 BIO-RAD에서 구매하였다.
- [0046] 실험에 사용한 모든 Antibody들과 inhibitor들은 아래의 [표 1]에 정리하였다. 본 발명에서 사용된 기기는 ELISA microplate reader (iMark Microplate Reader, Bio-Rad laboratories, Inc.), Real-Time PCR Detection Systems(iMark Microplate Reader, Bio-Rad laboratories, Inc.), Flow cytometry (Beckman Coulter), Nikon Eclipse Ti-S microscope (Nikon), Automatic X-RAY filmprocessor (JPI) 등을 사용하였다.

표 1

Name	Company	clonal	Isotype
p44/42 MARK(ERK1/2)	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
phospho-p44/42	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
MARK(Erk1/2)	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
phospho-Akt	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
Akt	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG

phospho-p38	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
p38	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
Cleaved Caspase-3	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
Caspase-3	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
Cleaved Caspase-9	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
Caspase-9	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
Cleaved PARP	Cell Signaing	Polyclonal	Rabbit IgG
PARP	Cell Signaing	Polyclonal	Mouse IgG
Anti-mouse IgG	Santa Cruz	Polyclonal	Rabbit IgG
Anti-rabbit IgG	Santa Cruz	Polyclonal	Rabbit IgG

[0050] 실험방법

[0051] <Cell culture>

[0052] 인간 전립선암 세포주인 PC3 세포는 한국 세포주은행에서 분양받았으며, RPMI 배지에 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 10% fetal bovine serum을 첨가하여 사용하였으며, 5% CO₂가 포함된 37℃의 배양기 내에서 배양하였다. 인간 전립선암 세포주인 DU145 세포는 한국 세포주은행에서 분양받았으며, DMEM 배지에 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 10% fetal bovine serum을 첨가하여 사용하였으며, 5% CO₂가 포함된 37℃의 배양기 내에서 배양하였다.

[0054] <Cell viability>

[0055] PC3, DU145 세포를 5×10^3 cell/well 씩 96 well plate에 분주하고, 24시간 배양 후에 serum이 들어있지 않은 배지에 패 추출물을 농도별로 처리하여 다시 24시간 배양하였다. WST-1(Tetrazolium Salts) 10 µl를 각각 첨가하고 2시간 배양하였다.

[0057] <Apoptosis assay>

[0058] PC3, DU145 세포는 5×10^6 cell을 10cm cell culture dish에 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, serum free 배지로 0/N한 다음, 패 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 1×10^6 cells을 모으고 PBS로 두 번 washing 해준 후, annexin V/PI 시약과 1× binding buffer를 사용하여 암실에서 20분간 염색시킨 후, 염색된 세포는 유동세포계수법(flow cytometry)을 이용하여 분석하였다.

[0060] <DNA fragmentation assay>

[0061] PC3, DU145 cells을 10cm cell culture dish에 70~80% 키운 후 PC3 cell을 10cm dish에 cell이 70~80% 정도 키운 후 24시간 serum starvation 한 후 여러 농도로 약제 처리를 한 후 48시간 후 cell를 긁어 모은 후 그 media를 15ml tube에 수거하고 2000 rpm 정도 5분간 원심분리한다. 원심분리 후 media 제거 후 모여진 세포에 lysis buffer 700 µl를 넣고 4℃에 2시간 처리한다. 4℃ 14000 rpm 20분 원심분리하고 상층액에 Phenol : chloroform : isoamyl alcohol 혼합용액(25 : 24 : 1)를 700 µl를 첨가하고 잘 섞은 후 30분간 rotate시킨 후 4℃ 14000 rpm 20분 원심분리한다. 상층액에 상층액이랑 동량의 isopropanol과 5M NaCl를 10~15 µl를 첨가한 후 1~2시간 동안 냉동보관한다. 4℃ 14000 rpm 20분 원심분리시킨 후 액체를 제거한다. 70% 에탄올 500 µl를 넣고 한 번 흔들어 준 후 4℃ 14000 rpm 5분 원심분리다. 그 후 air dry를 5분 정도 한 후 RNase A (10mg/ml) 7 µl와 TE buffer 70 µl를 넣고 녹여준다. 2% agarose gel를 만든 후 6X loading dye에 DNA를 섞어 50V로 영동한다.

[0063] <Measurement of ROS>

[0064] PC3, DU145 세포는 5×10^5 cells/well을 6 well에 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, serum free 배지로 0/N한 다음, 패 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포를 분리하여 PBS로 세척한 뒤, 10 µM의 DCFH-DA(dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 처리하여 37℃에서 30분간 염색 후 flow cytometry를 사용하여 측정하였다.

[0066] <Quantitative real-time PCR>

- [0067] PC3, DU145 세포는 5×10^5 cell을 6 well에 분주하고 24시간 동안 안정화 시킨 후, serum free 배지로 O/N한 다음, 패 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Trizol을 이용하여 RNA를 추출하여, cDNA를 만들어 SYBR Kit로 RT-PCR을 하였다. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 internal standard로 사용하였다.
- [0069] <Western blotting>
- [0070] PC3, DU145 세포는 2×10^5 cells/well을 6 well에 분주하고 24시간 동안 안정화 시킨 후, serum free 배지로 O/N한 다음, 패 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포를 분리하여 PBS로 세척한 뒤, 이후 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1%(W/V) IGEPAL[®] CA-630, 5 mM sodium pyrophosphate, 10mM β -glycerophosphate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride와 protease inhibitor mixture로 구성된 lysis buffer를 처리하여 세포를 분해하였다. 동등한 양의 단백질을 10%의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분리하여, polyvinylidene difluoride membrane으로 transfer하였다. Transfer된 membrane (PVDF)은 5% skim milk를 포함한 20 mM Tris-HCl buffer, pH7.4, 136 mM NaCl, 0.1% Tween 20의 TBS-T buffer로 1시간 blocking 해주었다. 그 후 primary antibody를 4°C에서 overnight 한 뒤 TBS-T buffer로 3회 세척 후, secondary antibody를 실온에서 40분 처리하여 주었다. 다시 TBS-T buuffer로 3회 세척한 후, ECL 시약을 처리하여 Automatic X-RAY film processor를 이용하여 확인하였다. 확인된 protein band는 Image J를 통하여 측정하였다.
- [0072] 실시예: 패 추출물의 제조
- [0073] 본 실험에서 사용한 패는 제주도 해안에서 채취하여, 세척하고 세절하고 80% 메탄올로 3회 추출하여 여과지 감압 농축을 한 후 동결건조 과정을 거친 후 분말화 하여 -80°C deep freezer에 보관하였다. 분말로 만든 약제는 85% 1,3-Butylene glycol에 녹인 후, 용액을 원심분리하여, 상층액만 옮겨 사용하였다.
- [0075] 실험예 1. 패 추출물 처리에 따른 세포 생존률(Cell Viability) 및 세포형태 변화
- [0076] PC3, DU145 세포의 Cell viability rate를 확인하기 위하여 패 추출물의 농도를 달리하여 WST-1을 수행하였다. 대조군과 비교했을 때 PC3 세포에서는 0.5 mg/mL 이상의 농도에서 세포 독성이 나타나며, DU145 세포에서는 0.5 mg/mL 이상에서 세포독성이 나타남을 확인하였다(도 2).
- [0077] PC3, DU145 세포에 미치는 형태변화를 관찰하기 위해서 다양한 농도로 패 추출물을 처리하여 48시간 배양한 후 광학 현미경으로 관찰한 결과, 농도 의존적으로 형태적인 변형뿐만 아니라 세포 밀도의 감소와 부착력이 떨어져 부유하는 세포들을 확인할 수 있었다(도 3).
- [0079] 실험예 2. 패 추출물 처리에 따른 DNA fragment
- [0080] PC3, DU145 세포에 패 추출물(0, 1mg/ml)을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후, 전기영동을 통해 DNA ladder를 관찰하였다. 세포사멸(apoptosis)이 일어나게 되면 genomic DNA가 분절되게 된다. 패 추출물 농도가 높아짐에 따라 DNA ladder가 점차 강해지는 것을 확인할 수 있었다(도 4).
- [0082] 실험예 3. 패 추출물의 세포사멸(apoptosis) 유도에 따른 Annexin V와 PI의 staining
- [0083] PC3, DU145 세포에 패 추출물로 인한 세포사멸(apoptosis)을 규명하기 위해, Annexin V와 PI의 염색을 이용하여 조사하였다. PC3, DU145 세포에 패 추출물(0, 0.5, 1mg/mL)을 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후, 10 μ L의 annexin V-FITC, 5 μ L의 PI로 15분간 암반응 시켰다. 이후 flow cytometer로 분석하였다.
- [0084] 실험결과 패 추출물(0, 0.5, 1mg/ml) 농도에 의존적으로 annexin V의 염색량이 증가하였고, PI와의 염색량은 변화하지 않았다. PC3 세포에서 대조군은 4.37%였고, 1mg/mL는 46.38%로 세포사멸(apoptosis)이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, DU145 세포에서 대조군은 5.62%였고, 1mg/mL는 18.62%로 세포사멸(apoptosis)이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 실험결과 패 추출물로 인해 early 세포사멸(apoptosis)되는 전립선암세포가 유의성 있게 증가함을 보여준다(도 5).
- [0086] 실험예 4. 패 추출물에 의한 세포사멸(apoptosis) 관련 단백질인 caspase-3,9 및 ADP-ribose polymerase (PARP) 발현 변화 분석
- [0087] PC3, DU145 세포에서 패 추출물에 의한 세포사멸(apoptosis)을 일으키는 단백질과 효소를 알아보기 위해

Western blot analysis를 시행 하였다.

[0088] PC3, DU145 세포에 패 추출물(0, 0.5, 1mg/ml)을 24시간 처리 후, caspase-3, 9의 변화를 관찰하였다. PC3, DU145 세포에 패 추출물(0, 0.5, 1mg/ml)을 처리 시 caspase-3,9는 Cleaved 되어 활성화되었다. 패 추출물의 농도와 비례하여 caspase-3,9의 활성도는 높아져 PC3, DU145 세포를 세포사멸(apoptosis)에 이르게 함을 알 수 있었다. PC3, DU145 세포에 패 추출물(0, 0.5, 1mg/ml)을 처리 시 PARP는 cleaved 되어 억제되었다. 패 추출물의 농도와 비례하여 PARP(poly-ADP ribose polymerase)는 억제되어 세포사멸(apoptosis)의 효율성을 높임을 알 수 있었다. β -actin은 대조군으로 사용되었다(도 6).

[0090] **실험예 5. 패 추출물의 reactive oxygen species (ROS) 생성 유도**

[0091] reactive oxygen species (ROS)는 세포에서 증식과 분화와 관련이 있으며 과도한 ROS는 세포사멸을 유도한다.

[0092] 따라서 패 추출물 처리에 따른 DU145 세포의 세포사멸이 ROS 생성과 관련이 있는지 확인하기 위해서 DCFH-DA를 이용하여 96 well black plate로 plate reader 분석하였다. DCFH-DA는 세포 안으로 들어가서, ROS와 반응하여 DCF로 전환되어 형광을 나타냄으로써 ROS 생성량을 측정할 수 있다.

[0093] 패 추출물을 처리하였을 때 ROS 생성량이 농도 의존적으로 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. ROS 생성량은 대조군에 비해 패 추출물(1mg/mL)은 약 2배 많은 ROS가 생성되었다. 이러한 패 추출물에 의한 ROS 생성이 ROS scavenger 인 N-acetylcysteine (NAC)에 의해서 억제되는지 확인하였다. 먼저, NAC를 5 mM 1시간 전 처리한 후 24시간 동안 패 추출물(1mg/mL)을 처리하였을 때 ROS의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이전 연구에서도, 암세포에서 ROS의 증가는 세포사멸(apoptosis)을 유도한다고 보고되어 패 추출물은 ROS를 농도 의존적으로 발생시키고 이후 세포사멸(apoptosis)과 관련이 있을 것으로 생각된다(도 7).

[0095] **실험예 6. 패 추출물에 의한 reactive oxygen species (ROS) 생성에 따른 Cell viability 변화**

[0096] 패 추출물에 의한 ROS 생성이 세포사멸(apoptosis)과 연관이 되어 있는지 확인하기 위하여 ROS scavenger 인 NAC를 이용하여 WST-1으로 cell viability를 확인하였다.

[0097] 먼저, PC3, DU145 세포에서 NAC를 1시간 전처리한 후 24시간 동안 패 추출물 (1mg/mL)을 처리하였을 때, 패 추출물 단독으로 처리할 때보다 cell viability의 비율은 PC3 세포에서 약 2배 증가되어 나타났으며, DU145 세포는 약 1.5배 증가되어 나타났으며, NAC의 처리가 ROS를 억제해 세포사멸(apoptosis)을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[0099] **실험예 7. 패 추출물에 의한 reactive oxygen species (ROS) 생성이 세포사멸(apoptosis)에 미치는 영향**

[0100] NAC를 전 처리하여 세포사멸(apoptosis) 관련 단백질 변화를 관찰한 결과, PARP와 같은 세포사멸(apoptosis) 관련 단백질들의 발현량이 회복됨을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 실험 결과를 통해 패 추출물이 처리된 암세포에서 ROS를 생산됨으로써 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것을 알 수 있었다(도 9).

[0102] **실험예 8. 패 추출물에 의한 MAPKs pathway가 세포사멸(apoptosis)에 미치는 영향**

[0103] PC3, DU145 세포에서 패 추출물에 의한 세포사멸(apoptosis)을 일으키는 단백질과 효소를 알아보기 위해 Western blot analysis를 시행하였다. PC3, DU145 세포에 패 추출물(0, 0.5, 1mg/ml)을 24시간 처리 후, Erk(extracellular-regulated protein kinase), p38의 변화를 관찰하였다. PC3, DU145 세포에 패 추출물(0, 0.5, 1mg/ml)을 처리시 농도 의존적으로 활성화되었다. 패 추출물의 농도와 비례하여 ERK, P38의 활성도는 높아져 PC3, DU145 세포를 세포사멸(apoptosis)에 이르게 함을 알 수 있었다(도 10).

[0105] **<결론 및 고찰>**

[0106] 해조류인 패라는 천연물을 가지고 PC3, DU145 세포의 세포사멸(apoptosis)을 확인하였다.

[0107] PC3, DU145 세포에 패 추출물을 처리하였을 때 WST-1을 사용하여 농도에 의존적으로 cell viability가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

[0108] AnnexinV와 PI staining을 통해 농도의존적으로 세포사멸(apoptosis)이 일어나는 것을 확인하였으며, Western blotting을 통해서 PARP, Caspase-3,9가 감소하는 것을 통해서 세포사멸(apoptosis)이 일어남을 재확인하였다. DCFH-DA 염색을 통해 농도의존적으로 ROS가 증가하는 것을 확인하였고, ROS scavenger인 NAC을 처리를 통해 ROS와 세포사멸(apoptosis)이 회복됨을 확인하였다.

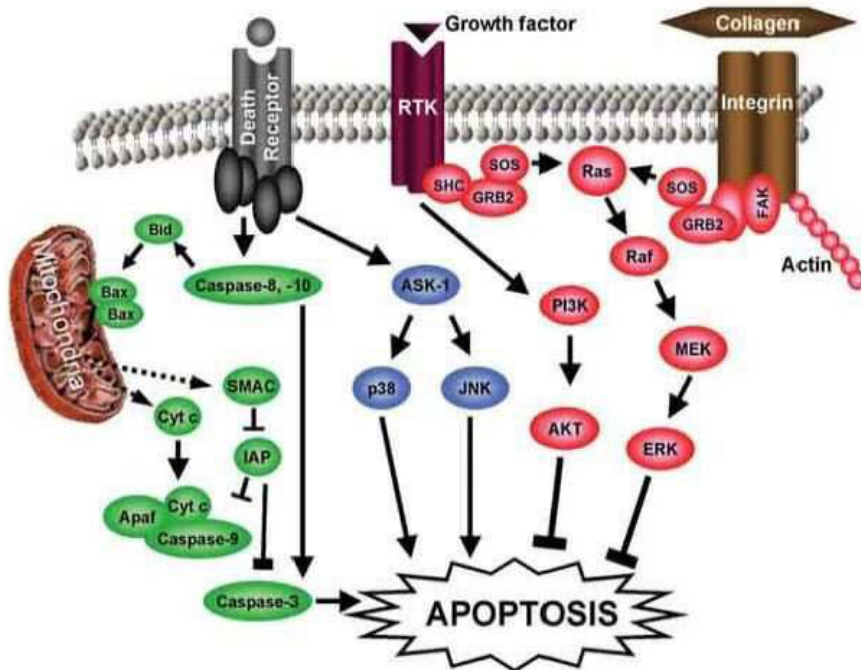
[0109] MAPK pathway는 세포의 세포사멸(apoptosis), growth, proliferation 및 metastasis 등의 주요기능들을 시행하

는 다양한 signaling cascade에 관여하는 것으로 알려졌다. MAPKs에는 ERK, p38 등이 포함되어 있다. MAPK pathway는 oxidative stress, cytotoxic chemical agent을 포함한, cell stress-inducing을 활성화한다고 한다. 따라서 PC3, DU145 cell에서 Erk, p38 인산화를 살펴 본 결과, 농도의존적으로 증가하는 것으로 확인하여, 폐 추출물이 MAPK pathway를 활성화시켜 PC3, DU145의 세포사멸(apoptosis)을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

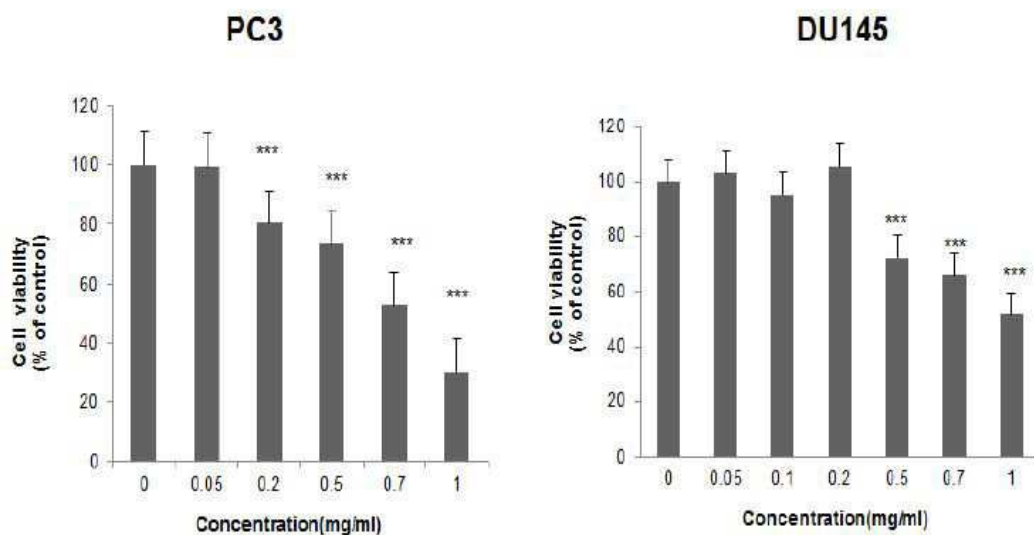
[0110] 따라서, 폐 추출물의 ROS 생성을 통하여 세포사멸(apoptosis)이 유도된다는 것을 알 수 있었고, 이는 전립선암에 대한 항암제치료제로서의 가능성을 제시한다.

도면

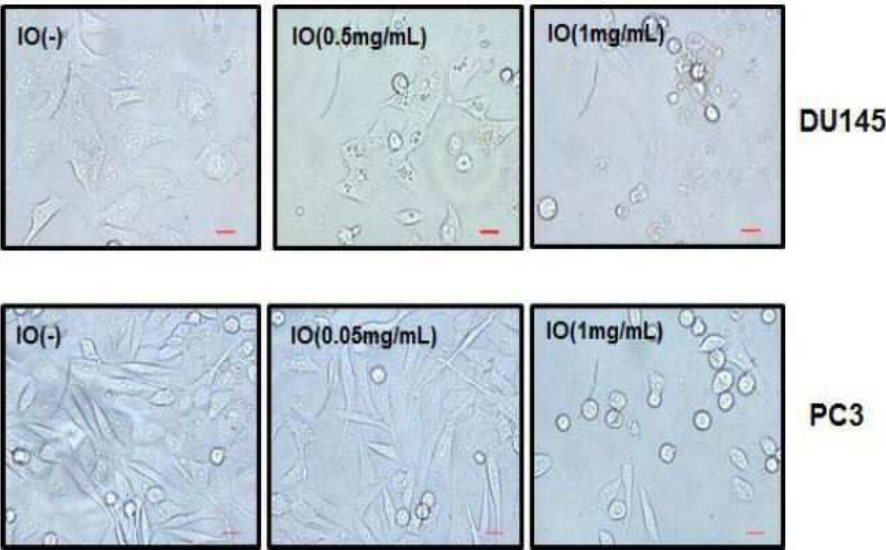
도면1



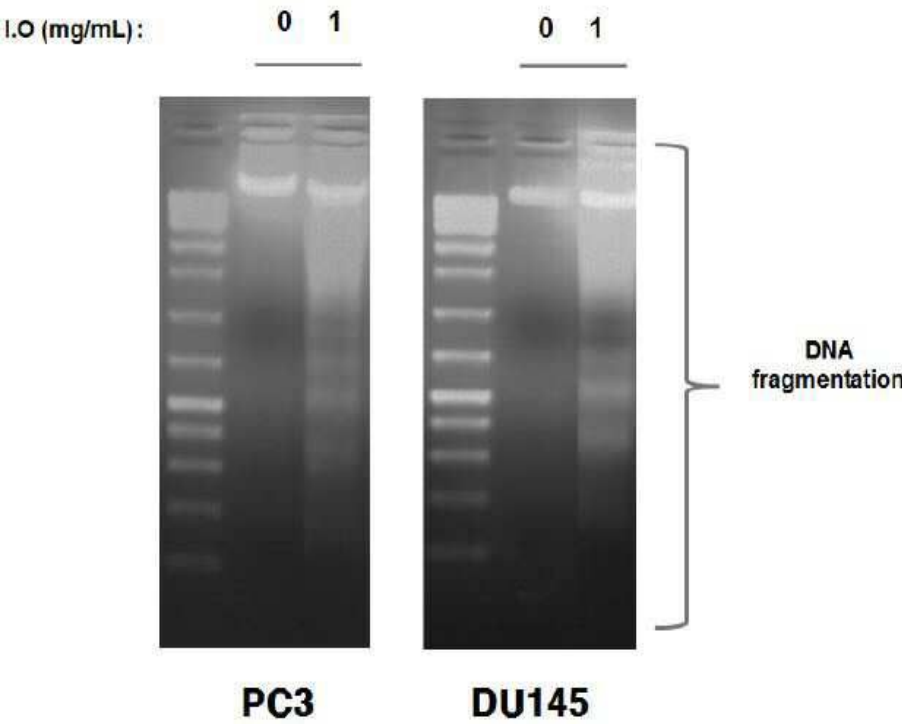
도면2



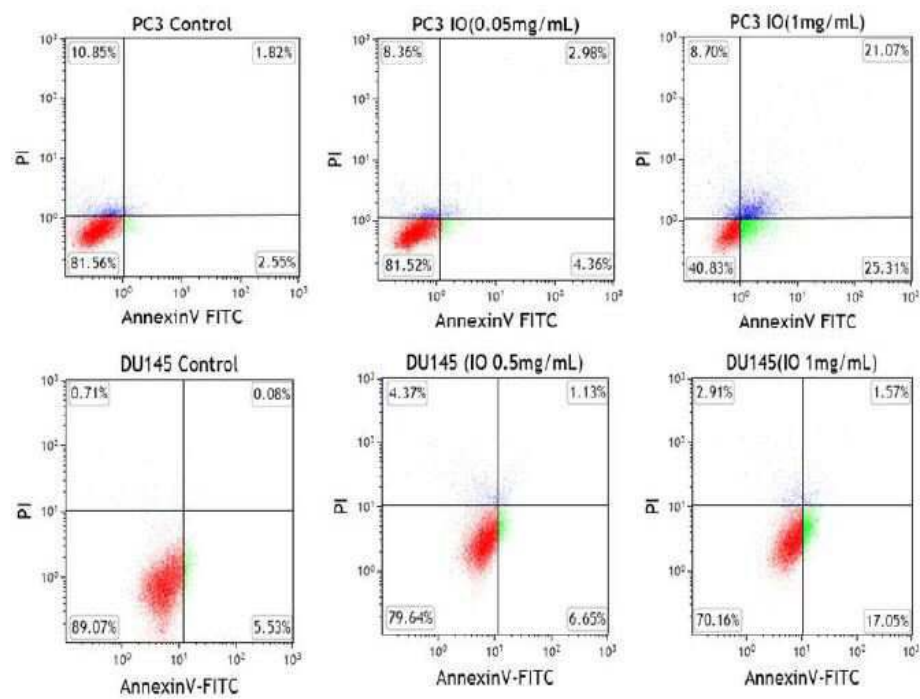
도면3



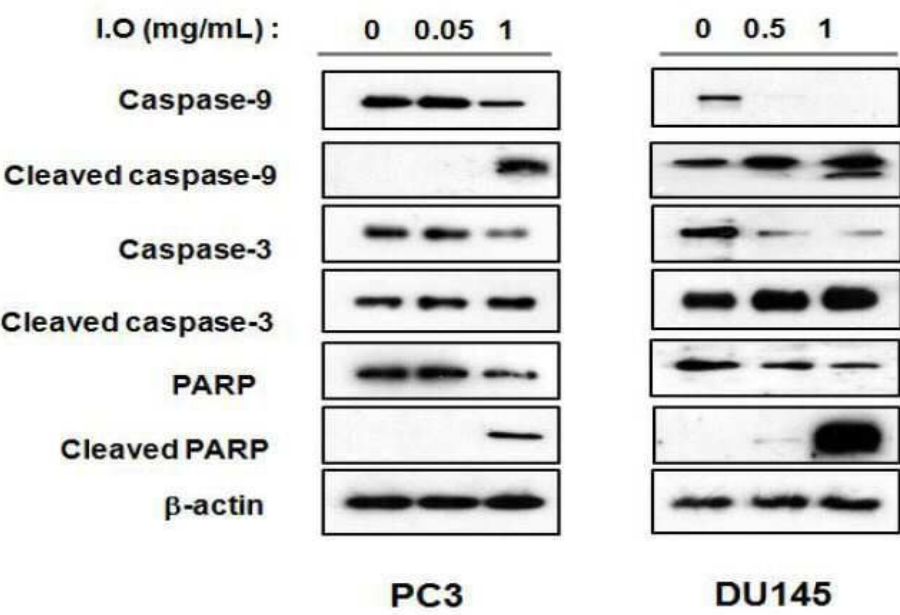
도면4



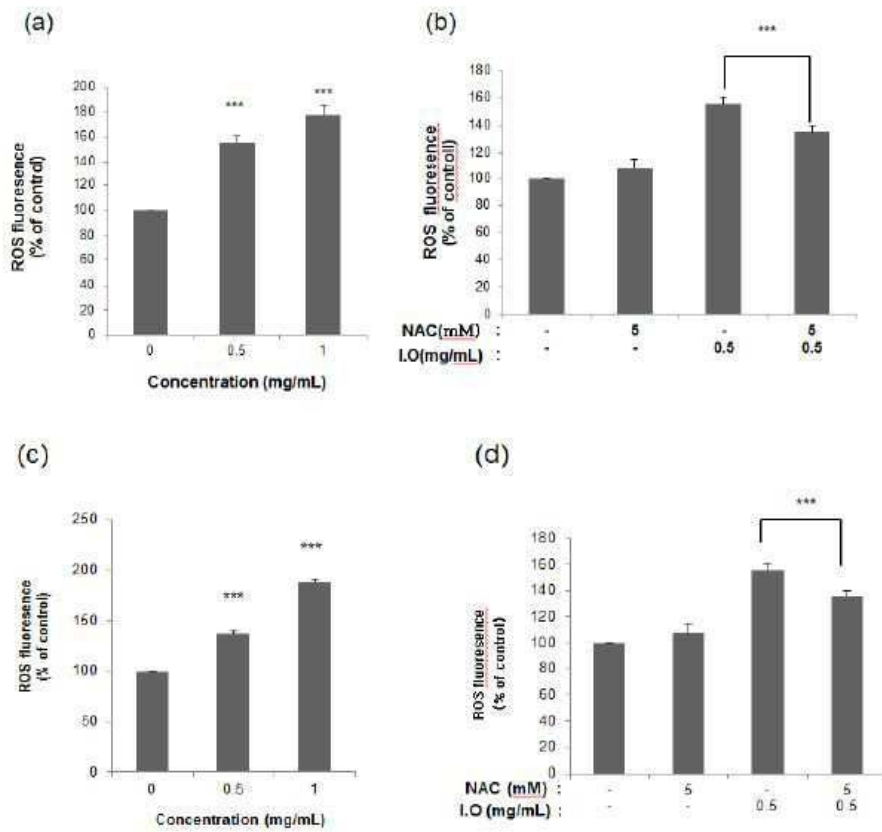
도면5



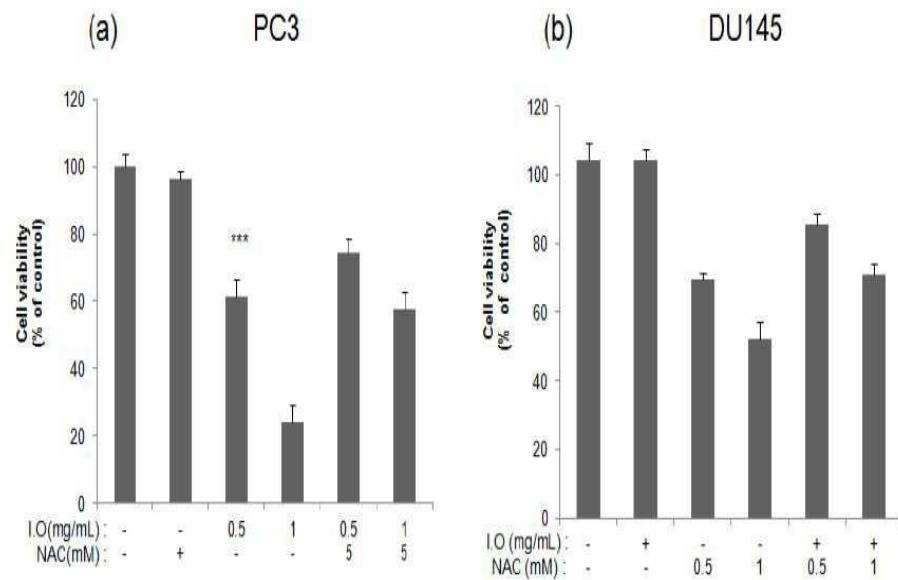
도면6



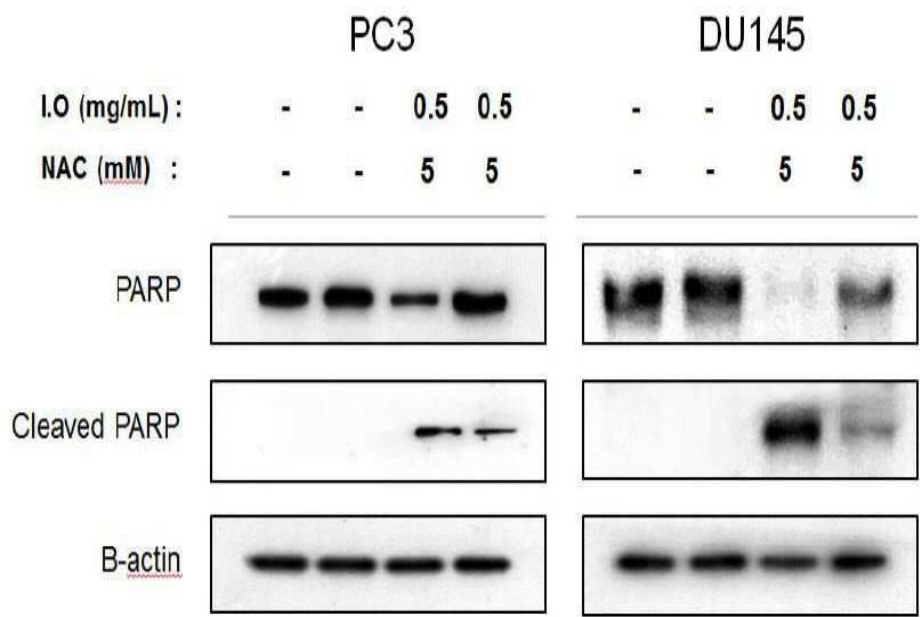
도면7



도면8



도면9



도면10

