(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0037775
(43) 공개일자 2024년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7034 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7034 (2013.01)
A23L 33/125 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2022-0116706
(22) 출원일자 2022년09월15일
심사청구일자 2022년09월15일

(71) 출원인
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임화선
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 124동 901호
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
공병욱

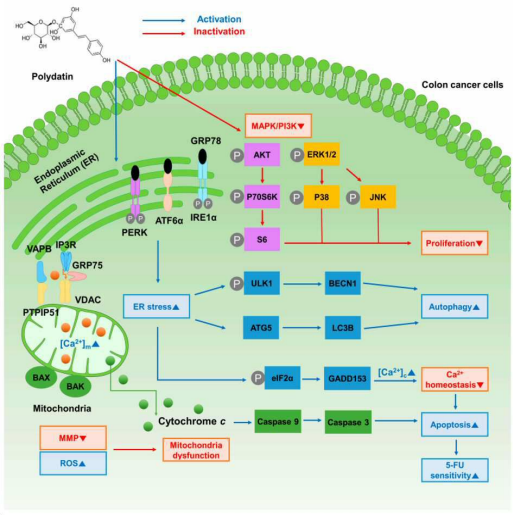
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **폴리다틴을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 폴리다틴을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 폴리다틴을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 대장암 세포의 증식 및 이동을 억제하고, 대장암 세포의 아폽토시스를 유도하며, 기존 화학 항암제에 대한 내성을 완화하여 대장암의 화학항암요법의 문제점을 해결할 수 있는 새로운 치료제 또는 병용제로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자
배효철
서울특별시 동대문구 무학로 193, 103호

송지수
경기도 이천시 이여로101번길 101-4, 101동 601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711129209
과제번호 2021R1C1C1009807
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업 우수신진연구
연구과제명 멜라토닌에 의한 엑소좀 유래 운반 RNA 소편 기반 자궁내막증 개선 메커니즘 규명
기 여 율 1/2
과제수행기관명 성균관대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2024.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711157986
과제번호 2021R1A2C2005841
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업 중견연구
연구과제명 멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기 지표 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리다틴(polydatin) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 화학 항암제와 병용하여 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 화학 항암제는 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 이리노테칸(irinotecan), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 류코보린(Leucovorin), 카페시타빈(capecitabine), 듀오카르마이신(duocarmycin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 화학 항암제인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 대장암은 화학 항암제에 대하여 내성을 갖는 대장암인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화학 항암제는 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 이리노테칸(irinotecan), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 류코보린(Leucovorin), 카페시타빈(capecitabine), 듀오카르마이신(duocarmycin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 화학 항암제인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 대장암 세포의 산화적 스트레스 초래하여 아폽토시스(apoptosis)를 유도하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 대장암 세포의 칼슘 항상성의 불균형을 초래하여 아폽토시스를 유도하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 대장암 세포의 소포체 스트레스를 활성화하여 아폽토시스를 유도하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 대장암 세포의 소포체-미토콘드리아 접촉을 활성화하여 자가포식(autophagy)을 유도하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 대장암 세포의 PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT 및 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로 불활성화를 통하여 대장암 세포의 증식을 억제하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 11

폴리다틴을 포함하는 대장암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 12

제11항의 식품 조성물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폴리다틴을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 대장암(Colon cancer)은 전세계 인구에서 3 번째로 흔하게 발생하는 암인만큼 유병률이 높은 질환이다. 대장암 치료를 위한 표적치료제와 면역항암제가 발전하고 있지만, 대장암 치료에는 여전히 일반적으로 항암제인 5-플루오로우라실(5-fluorouracil, 5-FU)을 사용한 항암 화학요법이 사용된다. 그러나, 5-플루오로우라실은 반감기가 짧아 치료에 불리하며, 소화 기관, 순환계, 신경계 및 피부 등 전신에 세포독성 손상을 유발할 수 있으며, 항암제 내성과 같은 부작용을 나타낸다. 5-플루오로우라실 이외에 대장암 치료에 사용되는 이리노테칸(irinotecan), 류코보린(Leucovorin), 옥살리플라틴(oxaliplatin)과 같은 기존 화학 항암제 역시 항암제 내성을 유발할 수 있고, 암세포 뿐만 아니라 정상세포까지 손상시키는 등 그 부작용의 위험이 매우 크다. 따라서, 이러한 치료에 대한 부작용 또는 저항성 등을 해결하기 위한 혁신적인 치료법이 수립되어야 하는 실정이다. 최근에는 부작용이 적고 효능이 높은 천연물을 이용한 항암제의 개발이 진행되고 있다.

[0004] 폴리다틴(3,4,5-trihydroxystibene-3-β-mono-D-glucoside)은 일년생 식물 호장근(*Polygonum cuspidatum*)에서 추출한 천연 활성 화합물로, 염증 억제를 통한 간 보호 효과, 아밀로이드-베타 펩타이드(amyloid-β peptide) 축적 차단을 통한 신경 퇴행성 질환 억제 효과, 난소암, 유방암, 인간 골육종(human osteosarcoma) 억제 효과 등 그 다양한 약리효과가 알려져 있다. 다만, 폴리다틴의 대장암 억제 효과는 명확히 규명된 바 없으며, 폴리다틴을 이용하여 대장암의 표준 항암제인 5-FU에 대한 내성을 극복할 수 있는지 여부 및 그 근본적인 작용 기전은 밝혀지지 않은 실정이었다.

[0005] 따라서, 천연물에서 추출한 화합물인 폴리다틴을 활용하여 대장암의 화학항암요법의 문제점을 해결할 수 있는 방법에 대한 연구가 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1951194호 (2019.02.18. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 호장근(*Polygonum cuspidatum*)에서 추출한 폴리다틴(polydatin)을 활용하여 대장암의 화학 항암 요법의 문제점을 해결할 수 있는 대장암 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 폴리다틴을 유효 성분으로 포함하는 조성물이 대장암 세포의 증식 및 이동을 억제하고 아폽토시스를 유도하며, 기존 화학 항암제에 대한 내성을 완화함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 폴리다틴(polydatin)을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 폴리다틴을 포함하는 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 폴리다틴(polydatin) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 호장근(*Polygonum cuspidatum*)에서 추출한 폴리다틴(polydatin)을 활용하여 대장암의 화학 항암 요법의 문제점을 해결할 수 있는 대장암 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 폴리다틴을 유효성분으로 포함하는 조성물이 대장암 세포의 증식 및 이동을 억제하고, 대장암 세포의 아폽토시스를 유도하며, 기존 화학 항암제에 대한 내성을 완화함을 규명하였다.

[0015] 본 명세서에서 용어 "폴리다틴"(polydatin) (3,4,5-trihydroxystibene-3-β-mono-D-glucoside)은 일년생 식물 호장근(*Polygonum cuspidatum*)에서 추출한 천연 활성 화합물로, 염증 억제를 통한 간 보호 효과, 아밀로이드-베타 펩타이드(amyloid-β peptide) 축적 차단을 통한 신경 퇴행성 질환 억제 효과, 난소암, 유방암, 인간 골육종(human osteosarcoma) 억제 효과 등 그 다양한 약리효과가 알려져 있다. 다만, 현재까지 폴리다틴의 대장암 억제 효과는 명확히 규명된 바 없다. 본 발명의 약제학적 조성물의 유효성분인 폴리다틴의 화학 구조식을 도 1에 나타내었다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 상술한 유효성분 이외에 다른 약제학적 활성 약제 및 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 상기 "조합"은 동시 또는 병용투여로 표현될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 화학치료, 방사선 치료, 종양-표적 치료, 보조 치료, 면역치료 또는 수술에 의해 대장암을 치료하는 다른 방법과 조합하여 추가로 사용될 수 있다.

[0017] 상술한 본 발명의 약제학적 조성물과 조합하여 사용될 수 있는 치료제로는 당업계에 공지된 1 이상의 화학 항암제, 1 이상의 표적치료제, 1 이상의 면역치료제가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 화학 항암제와 병용하여 투여되는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 화학 항암제는 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 이리노테칸(irinotecan), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 류코보린(Leucovorin), 카페시타빈(capecitabine), 듀오카르마이신(duocarmycin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 화학 항암제인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물에 유효성분으로 포함된 폴리다틴은 기존의 대장암 치료용 화학 항암제인 5-FU(5-플루오로우라실, 5-fluorouracil) 또는 이리노테칸(irinotecan)과 각각 병용하여 대장암 세포주(HCT116 및 HT-29 세포주)에 처리하였을 때 대장암 세포의 증식을 현저하게 억제하는 효과를 나타낸다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 대장암은 화학 항암제에 대하여 내성을 갖는 대장암일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 화학 항암제는 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 이리노테칸

(irinotecan), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 류코보린(Leucovorin), 카페시타빈(capecitabine), 듀오카르마이신(duocarmycin) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 화학 항암제인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물에 유효성분으로 포함된 폴리다틴은 기존의 대장암 치료용 화학 항암제인 5-FU에 대하여 내성을 갖는 대장암 세포에서 현저한 세포증식 억제 및 아폽토시스 유도 효과를 보여, 화학 항암제에 대한 대장암 세포의 내성을 완화하는 효과를 나타낸다.

[0024] 특히, 폴리다틴을 기존의 대장암 치료용 화학 항암제인 5-FU와 병용하여 처리하는 경우, 폴리다틴을 단독처리하는 경우보다도 양적으로 현저한 세포증식 억제 및 아폽토시스 유도 효과를 나타낸다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제, 담체, 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0026] "약제학적으로 허용가능한(pharmaceutically acceptable)"은 제제가 멸균이고 발열원(pyrogen)이 없는 것이다. 적절한 약제학적 담체는 약제학 분야에서 잘 알려져 있다. 상기 담체(들)은 본 발명의 유효성분의 효능에 악영향을 미치지 않고 그의 수용자(recipient)에게 해롭지 않다는 의미에서 "허용가능(acceptable)"해야 한다. 전형적으로, 상기 담체는 멸균되고 발열원이 없는 물 또는 식염수일 것이다; 그러나, 다른 허용가능한 담체가 사용될 수 있다. 따라서, "약제학적으로 허용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)" 및 "약제학적으로 허용가능한 부형제(pharmaceutically acceptable excipient)"는 단순히 담체로서 작용하도록 의도된, 즉, 그 자체의 생물학적 활성을 갖는 것으로 의도되지 않는, 제제의 일부를 형성하는데 사용된 화합물(들)을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 일반적으로 안전하고, 무독성이다. 본 명세서에 사용된 것과 같은 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제는 1 이상의 담체 및/또는 부형제를 모두 포함한다.

[0027] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비 톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 부형제는 하나 이상의 탄수화물, 폴리머, 지질 및 미네랄일 수 있다. 탄수화물의 예는 락토스, 수크로스, 만니톨, 및 시클로덱스트린을 포함하고, 이것은 예를 들여, 동결건조를 가능하게 하기 위해 조성물에 첨가된다. 폴리머의 예는 전분, 셀룰로스 에테르, 셀룰로스 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 에틸히드록시에틸 셀룰로스, 알기네이트, 카라기난, 히알루론산 및 그의 유도체, 폴리아크릴산, 폴리술포네이트, 폴리에틸렌글리콜/폴리에틸렌 옥시드, 폴리에틸렌옥시드/폴리프로필렌 옥시드 코폴리머, 상이한 가수분해도(degree of hydrolysis)의 폴리비닐알콜/폴리비닐아세테이트, 및 모든 상이한 분자량의 폴리비닐피롤리돈이고, 이들은 예를 들어, 점도 조절을 위해, 접착을 이루기 위해, 또는 화학적 및 단백질 분해성 분해로부터 지질을 보호하기 위해 상기 조성물에 첨가된다. 지질의 예는 지방산, 인지질, 인산, 모노-, 다이-, 및 트리글리세리드, 세라마이드, 모든 상이한 아실 사슬 길이 및 포화의 스핑고지질 및 당지질, 달걀 레시틴, 콩 레시틴, 수소화된 달걀 및 콩 레시틴이고, 이들은 폴리머에 대한 이유와 유사한 이유로 조성물에 첨가된다. 미네랄의 예는 탈크, 산화마그네슘, 산화아연 및 산화티타늄이고, 이들은 액체 축적의 감소 또는 유리한 색소 특성과 같은 이점을 수득하기 위해 상기 조성물에 첨가된다.

[0029] 희석제(diluent)는 약제학적 제조에서 펩타이드를 희석할 목적을 갖는 수성 또는 비-수성 용액을 의미하는 것으로 의도된다. 희석제는 하나 이상의 식염수(saline), 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올 또는 (홍화유, 옥수수유, 땅콩 기름, 면실유 또는 참기름과 같은) 오일일 수 있다.

[0030] 희석제는 또한 완충액으로서 기능할 수 있다. 용어 "완충액(buffer)"은 pH를 안정화하는 목적을 갖는 산-염기 혼합물을 함유하는 수성 용액을 의미하는 것으로 의도된다. 완충액의 예는 Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, 포스페이트, 카르보네이트, 아세테이트, 시트레이트, 글리콜레이트, 락테이트, 보레이트, ACES, ADA, 타르타레이트, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, 카코딜레이트, CHES, DIPSO, EPPS, 에탄올아민, 글리신, HEPPSO, 이미다졸, 이미다졸락트산, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO 및 TES이다.

[0031] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical

Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0032] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 예컨대 정맥내 투여, 피하 투여, 근육 투여, 복강 내 투여, 척수강 내 투여, 뇌내 투여, 흉골내 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 질환을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질환 상태의 방지 또는 보호적인 치료를 의미한다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 질환 상태의 감소, 억제, 진정 또는 근절을 의미한다.

[0035] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 대장암 세포의 산화적 스트레스 초래하여 아폽토시스(apoptosis)를 유도한다.

[0037] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물에 유효성분으로 포함된 폴리다틴은 대장암 세포에서 용량의존적으로 ROS(Reactive Oxygen Species, 활성산소종)를 증가시키며, 이러한 산화적 스트레스를 통해 대장암 세포에서 아폽토시스를 유도한다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 대장암 세포의 칼슘 항상성의 불균형을 초래하여 아폽토시스를 유도한다.

[0039] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물에 유효성분으로 포함된 폴리다틴은 용량의존적으로 대장암 세포질(cytosol) 내부 및 미토콘드리아 내부 Ca^{2+} 수준을 증가시키며, 이러한 칼슘 조절 과정의 변경을 통하여 칼슘 항상성의 불균형을 초래하여 대장암 세포에서 아폽토시스를 유도한다.

[0040] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 대장암 세포의 소포체 스트레스를 활성화하여 아폽토시스를 유도한다.

[0041] 본 명세서에서 용어 "소포체 스트레스(endoplasmic reticulum stress, ER stress)"는 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되어 소포체 기능에 장애가 발생하는 것을 말하며, 주로 소포체 단백질 폴딩 부하가 초과된 상태를 의미한다.

[0042] 소포체 스트레스가 발생하면 세포는 생존하기 위한 방어기전을 가지는데, 이를 소포체 스트레스 반응(ER stress response)라고 한다. 소포체 스트레스 반응은 소포체 막에 존재하는 세 가지의 신호전달체계인 PERK (pancreatic ER kinase), IRE-1α/XBP-1 (inositol-requiring 1α/X-box binding protein 1) 및 ATF6 (activating transcription factor)에 의해 매개되며 그 하부 기질인 eIF2-α 경로 또한 관여한다.

[0043] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물에 유효성분으로 포함된 폴리다틴은 소포체 스트레스 관련 반응 인자인 IRE1α, PERK, eIF2α의 인산화를 촉진하고 ATF6α, GADD153, GRP78 단백질을 활성화하여 대장암 세포의 소포체 스트레스를 활성화하고, 이를 통하여 아폽토시스를 유도한다.

[0044] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 대장암 세포의 소포체-미토콘드리아 접촉을 활성화하여 자가포식(autophagy)을 유도한다.

[0045] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물에 유효성분으로 포함된 폴리다틴은 대장암 세포의 소포체-미토콘드리아 접촉을 활성화하여 자가포식(autophagy)을 유도한다.

[0046] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 대장암 세포의 PI3K(phosphatidylinositol 3-

kinase)/AKT 및 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로를 구성하는 단백질 모두의 인산화를 감소시켜 불활성화하고, 이를 통하여 대장암 세포의 증식을 억제한다.

[0047] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물에 유효성분으로 포함된 폴리다틴은 과도한 Ca^{2+} 분비를 야기시키고, 이는 곧 오토파고좀(autophagosome) 형성을 유도하며, 이로써 결과적으로 항암 효과를 나타낸다.

[0049] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 폴리다틴을 포함하는 대장암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 건강기능 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가될 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 용어 "개선"은 본 발명의 대상 질환인 대장암의 증상을 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0051] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 식품 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 상기 건강기능 식품은 음료류, 육류, 초콜릿, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 또는 건강보조 식품류일 수 있다.

[0052] 상술한 식품 조성물에 함유된 폴리다틴의 함량은 식품의 형태, 소망하는 용도 등에 따라 적절하게 조절될 수 있고 특별한 제한이 없다. 예컨대, 혼합추출물의 함량은 전체 식품 중량의 0.001 중량% 내지 30 중량% 또는 0.01 중량% 내지 20 중량%일 수 있고, 건강 음료 조성물의 경우 100 ml을 기준으로 0.001 g 내지 15 g, 0.02 g 내지 10 g, 또는 0.3 g 내지 1 g일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명의 폴리다틴을 포함하는 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효 성분으로서 상기 추출물 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있다. 상기 첨가 성분은 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 상기 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0054] 본 발명의 대장암 예방 또는 개선용 식품 조성물은 상술한 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물과 동일하게 유효성분으로서 폴리다틴을 포함하기 때문에, 양 발명 간에 공통된 사항은 본 명세서의 과도한 중복성을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0056] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 폴리다틴을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 치료가 필요한 대상체(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 대장암의 치료방법을 제공한다.

[0057] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 대상체는 포유동물 또는 인간이다.

[0058] 본 발명의 암의 치료방법은 상술한 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 방법이므로, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0060] 본 발명의 폴리다틴을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 대장암 세포의 증식 및 이동을 억제하고, 대장암 세포의 아폽토시스를 유도하며, 기존 화학 항암제에 대한 내성을 완화하여 대장암의 화학항암요법의 문제점을 해결할 수 있는 새로운 치료제 또는 병용제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 폴리다틴(polydatin)의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 2a는 BrdU를 이용한 HCT116 및 HT-29 세포의 세포증식 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 2b는 HCT116 및 HT-29 세포의 3D 스페로이드 형성을 관찰한 결과를 나타낸 것이다. Bright field 이미지는 300 μM의 폴리다틴 처리 전후의 스페로이드 형태를 비교한 것이다(Scale bar: 100 μm).

도 2c는 PI 염색으로 확인한 HCT116 및 HT-29 세포의 세포주기 별 세포 분포를 나타낸 것이다.

도 2d는 JC-1 분석을 통하여 HCT116 및 HT-29 세포의 미토콘드리아 막 전위 변화를 관찰한 결과를 나타낸 것이다. (빨강: JC-1 모노머, 초록: JC-1 응집체)

도 2e는 HCT116 및 HT-29 세포의 아폽토시스-관련 단백질에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3a는 폴리다틴에 의한 대장암 세포의 아폽토시스 유도 효과를 확인하기 위하여 Annexin V 및 propidium iodide 염색을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 3b는 대장암 세포내 ROS를 DCFH-DA를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3c는 폴리다틴 단독처리, 또는 폴리다틴 및 NAC의 병용처리 시 Annexin V 및 propidium iodide 염색 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3d는 폴리다틴 단독처리, 또는 폴리다틴 및 NAC의 병용처리 시 발생한 ROS 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 4a는 세포질 내부 Ca^{2+} 농도를 Fluo-4 분석으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4b는 미토콘드리아 내부 Ca^{2+} 농도를 Rhod-2 분석으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4c는 BAPTA/AM 및 2-APB 처리 후 세포질 내부 Ca^{2+} 농도를 Fluo-4 분석으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4d는 BAPTA/AM 및 2-APB 처리 후 미토콘드리아 내부 Ca^{2+} 농도를 Rhod-2 분석으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4e는 폴리다틴을 단독처리, 또는 폴리다틴을 2-APB 또는 BAPTA/AM과 와 병용처리한 경우의 Annexin V 및 propidium iodide 염색 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 경로를 구성하는 단백질 인산화효소의 인산화 양상을 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6a는 소포체 스트레스 관련 반응 인자인 IRE1α, ATF6α, PERK, GADD153, eIF2α, GRP78 단백질의 인산화 또는 활성을 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6b는 소포체-미토콘드리아 축을 조절하는 단백질들의 발현을 확인하여 소포체-미토콘드리아 간의 커뮤니케이션을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 6c는 폴리다틴에 의한 대장암 세포 내 자가포식(autophagy) 양상을 확인하기 위하여 자가포식 조절 관련 단백질 수준을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7a는 대장암 세포에 5-Fu과 이리노테칸을 각각 단독처리, 또는 5-FU과 이리노테칸을 각각 폴리다틴과 병용처리한 후 BrdU를 이용하여 암세포 증식 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7b는 대장암 세포에 5-Fu과 이리노테칸을 각각 단독처리, 또는 5-FU과 이리노테칸을 각각 폴리다틴과 병용처리한 후 3D 스페로이드 배양한 결과를 나타낸 것이다.

도 8a는 5-FU-R(5-FU-resistant)에 폴리다틴 단독처리, 5-FU 단독처리, 또는 폴리다틴과 5-FU를 병용처리하고 세포증식 억제 효과를 확인한 것이다.

도 8b는 5-FU-R(5-FU-resistant)에 폴리다틴 단독처리, 5-FU 단독처리, 또는 폴리다틴과 5-FU를 병용처리하고 3D 스페로이드 배양한 결과를 나타낸 것이다.

도 8c는 5-FU-R(5-FU-resistant)에 폴리다틴 단독처리, 5-FU 단독처리, 또는 폴리다틴과 5-FU를 병용처리하고 Annexin V 및 propidum iodide 염색을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 8d는 5-FU 표적 단백질인 TYMS(thymidylate synthase) 및 아폽토시스-관련 인자(BAX, P53, BAK, 절단된

(cleaved) caspase 3, 절단된(cleaved) caspase 9 및 사이토크롬 C)에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 대장암 세포에서 폴리다틴의 작용에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0065] **실시예**

[0067] **<실험재료 및 실험방법>**

[0068] **1. 실험재료**

[0069] 폴리다틴(polydatin)(Cat No: 15721), 5-FU(5-Fluorouracil)(20 μM) 및 이리노테칸(irinotecan)(10 μM)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 3 개의 시약을 DMSO(dimethyl sulfoxide, 다이메틸설폭사이드)에 용해시켜 사용하였다. 조성물에 의한 신호 전달 메커니즘을 확인하기 위하여 사용된 항체들은 Cell Signaling Techonology, Santa Cruz Biotechnology사로부터 구매하였다.

[0071] **2. 세포 배양(Cell Culture)**

[0072] 대장암 세포주인 HCT116 및 HT-29는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 RPMI-1640(HEPES) 배지에 10% 소 태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다. 5% CO_2와 함께, 37℃ 세포배양기에서 배양하였으며, 약물처리 전에는 세포를 무혈청 배지에서 24 시간 동안 배양하였다.

[0073] 5-FU에 내성인 HCT116 세포(5-FU-R HCT116 세포)를 얻기 위하여 5-FU를 0.5 μM 부터 점진적으로 증가하는 농도로 가하여 최소 6 개월 동안 배양하였다. 5-FU에 대한 세포 생존능의 반수 최대 억제 농도(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})는 5-FU-R HCT116 세포에서 16.1 μM인 반면, 모 HCT116 세포에서는 1.9 μM이었다. 5-FU-R 세포에 대한 실험은 3 회 수행하였다.

[0075] **3. BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석**

[0076] 대장암 세포의 증식 능력에 폴리다틴이 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험으로 세포 증식 능력을 분석하였다. 배양한 세포와 배지 100 ㎕를 96 웰에 분주하고 각각 다양한 농도의 폴리다틴(0, 100 μM, 200 μM 및 300 μM), 또는 5-플루오로우라실과 이리노테칸을 병용으로 처리하고 48 시간 동안 인큐베이션한 다음, BrdU(5-bromo-2-deoxyuridine) 키트(Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48 시간 인큐베이션 이후, 10 μM BrdU를 각 웰에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2 시간 동안 배양하였다. HCT116, HT-29 세포에 BrdU를 라벨링하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD(peroxidase) 용액을 상온에서 90 분 인큐베이션 시킨 이후, 3 차례 씻어주었다. 100 μl의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응시키고 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0078] **4. Propidium iodide 염색을 이용한 세포 주기 분석**

[0079] 폴리다틴에 의한 대장암 세포의 세포주기 변화를 확인하기 위하여 대장암 세포를 6 웰에 70% 내지 80%로 세포가 찰 때까지 배양한 뒤, 다양한 농도의 폴리다틴(0, 100 μM, 200 μM 및 300 μM)을 처리하여 48 시간 동안 37℃

/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이 후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1X binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 펠렛을 얻었다. 다음으로 200 μL의 1X binding buffer으로 세포 현탁 배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μL을 넣고 RNase 5 μL, PI(Propidium iodide) 5 μL를 함께 혼합하여 세포를 1 시간 동안 실온에 두어 염색하였다. 이 후 1X binding buffer를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하고 각 세포 주기에 해당하는 세포의 수를 측정하였다.

[0081] **5. Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 아폽토시스 분석**

[0082] 폴리다틴에 의한 대장암 세포의 아폽토시스 유도 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 아폽토시스 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 세포를 6 웰에 배양한 다음 다양한 농도의 폴리다틴(0 μM, 100 μM, 200 μM 및 300 μM)을 처리하여 48 시간 동안 37℃ 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 이후 트립신을 사용해 세포를 떼어내고 PBS로 워싱을 진행하였다. 그 다음 1 ml의 1x binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 그리고 200 μl의 1x binding buffer로 세포 현탁 배양하여 1.5ml 브라운 튜브에 100 μl를 넣고 Annexin V와 PI 5 μl를 함께 혼합하여 세포를 15 분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이 후, 1x binding buffer를 400μl 추가하여 5ml FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0083]

[0084] **6. JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial Membrane Potential, MMP) 측정**

[0085] 미토콘드리아 막 전위(Mitochondrial Membrane Potential, MMP) 변화는 JC-1 미토콘드리아 염색 키트(Cat no: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 대장암 세포주 HCT116, HT-29를 6 웰에 배양한 뒤 다양한 농도의 폴리다틴(0 μM, 100 μM, 200 μM 및 300 μM)을 처리하여 48 시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 떼어내고 원심분리를 하여 세포 펠렛을 얻었다. 세포는 JC-1 염색 용액에 풀어준 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 20 분간 인큐베이션을 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 염색 buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 이용해 미토콘드리아 막전위 변화를 분석하였다.

[0087] **7. DCFH-DA를 이용한 세포내 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 측정**

[0088] 대장암 세포주 내 ROS 생성에 폴리다틴이 미치는 영향을 확인하기 위하여 퍼옥사이드 존재 하에 2', 7'-dichlorofluorescin (DCF)로 변환되어 형광을 띠는 2', 7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA, Cat No: D6883, Sigma-Aldrich)로 세포를 염색하였다. 대장암 세포를 6 웰에서 트립신을 사용하여 떼어내고 원심분리를 통해 세포 pellet을 얻었다. 이 후, PBS로 한번 워싱하고 10 μM의 DCFH-DA를 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 30 분 동안 인큐베이션 하였다. 그 다음 세포를 PBS로 두 번 더 워싱하고 폴리다틴(0 μM, 300 μM)및/또는 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine, NAC)와 병용처리하여 1 시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 인큐베이션한 뒤 처리된 세포를 PBS로 다시 워싱하여 유세포 분석기를 이용해 DCF 형광 강도를 분석하였다.

[0090] **8. Fluo-4와 Rhod-2 염색을 통한 세포질(cytosol) 및 미토콘드리아 내부 칼슘 이온(Ca^{2+})농도 분석**

[0091] 폴리다틴에 의한 대장암 세포의 세포질(cytosol) 또는 미토콘드리아 내 칼슘 이온(Ca^{2+})의 농도를 확인하기 위하여 3 μM의 fluo-4 acetocymethyl ester (AM) (invitrogen)와 3 μM rhod-2를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 세포를 6 웰에 배양한 뒤 다양한 농도의 폴리다틴(0 μM, 100 μM, 200 μM 및 300 μM) 단독처리, 또는 300 μM의 폴리다틴과 각 칼슘 킬레이터(calcium chelators)을 병용처리하고, 48 시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 사용된 칼슘 킬레이터는 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB; Cat No: D9754, Sigma-Aldrich)와 1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N,N,N,N-tetra-acetic acid tetrakis (BAPTA/AM; Cat No: sc-202488, Santa Cruz Biotechnology)이었다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 3 μM의 fluo-4 또는 3 μM rhod-2를 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 20 분간 염색하여 PBS로 워싱을 진

행하고 FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포분석기를 사용해 형광 강도를 분석하여 세포 내 또는 미토콘드리아 내 칼슘 농도를 측정하였다.

[0093] **9. 3D 스페로이드 배양**

[0094] 대장암 세포주 HCT116, HT-29에 대한 스페로이드를 형성하기 위하여 행잉 드롭법(hanging drop method)를 이용하여 폴리다틴을 단독 또는 기존 항암제와 병용처리한 세포를 배양 접시의 뚜껑에 배양하였다. 두 세포주 모두 300 μM의 폴리다틴 또는 300 μM의 폴리다틴과 각 기존 항암제를 병용처리하고, 3 일 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양한 뒤, Leica DM3000 현미경에서 형태학적 변화를 관찰하였다. 사용된 기존 항암제는 5-FU와 이리노테칸이었다. 각 이미지의 총 면적은 image J 소프트웨어로 분석되었으며, Revisp 소프트웨어를 통해 구형 3D 이미지로 변환되었다.

[0096] **10. 단백질 발현 분석 (웨스턴 블롯)**

[0097] 대장암 세포에 다양한 농도의 폴리다틴(0 μM, 100 μM, 200 μM 및 300 μM) 단독처리, 또는 폴리다틴과 5-FU를 병용처리한 다음 처리된 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-red, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이 후, 추출한 단백질을 95℃에서 5 분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동을 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션시킨 다음 chemiluminescence detection (Supersignal west pico, pierce, Rockford, IL, USA) 시약, chemiDoc EQ system 및 Quantity one software (Bio-red) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0099] **11. 통계분석**

[0100] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0103] **<실험결과>**

[0104] **실시예 1: 대장암 세포에서 폴리다틴에 의한 세포증식 억제와 세포 사멸 유도 및 미토콘드리아 막전위 변화 분석**

[0105] 폴리다틴에 의해 대장암 세포주 HCT116, HT-29 세포의 변화양상을 분석하기 위하여 BrdU를 이용하여 세포증식에 대해 분석한 결과 폴리다틴의 농도가 증가할수록 세포증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 폴리다틴은 300 μM의 농도에서 각 세포주의 암 진행을 69% 및 66%로 감소시켰다(도 2a). 이러한 결과를 토대로 300 μM을 폴리다틴의 최적 용량으로 설정하였고, 이 농도까지의 폴리다틴을 사용하여 모든 실험을 수행하였다.

[0106] 폴리다틴의 농도가 증가할수록 세포증식이 억제되는 것을 3D 스페로이드 배양 및 세포주기를 통해서도 확인할 수 있었다(도 2b 및 도 2c). 300 μM의 폴리다틴을 처리한 경우, HCT116 및 HT-29 세포에서 형성된 총 스페로이드 영역은 각각 약 59%($p < 0.01$) 및 54%($p < 0.05$)로 감소하였으며, 스페로이드의 상대 밀도도 각각 35% 및 30%($p < 0.01$)로 감소하였다(도 2b). 폴리다틴 처리 후 G0/G1 단계의 비율은 HCT116 세포의 경우 65.5%에서 49.8%로, HT-29 세포의 경우 55.6%에서 38.8%로 감소하였다(도 2c). 또한, S 단계의 비율은 두 세포주에서 약간 증가하였으며, G2/M 단계의 비율은 HCT116에서 30.2%에서 38.4%로, HT-29에서 39.4%에서 47.9%로 약간 증가하였다. 흥미롭게도, 두 세포주에서 모두 S 단계의 비율이 폴리다틴에 의해 유의하게 증가하였고, 이는 아폽토시스(apoptosis)의 시작을 시사한다.

[0107] 또한, 폴리다틴이 대장암 세포 내에서 아폽토시스를 유도하는지 확인하기 위하여, 우선 아폽토시스 유도와 관련이 있는 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial Membrane Potential, MMP)에 대해 분석하였다. JC-1 응집체에 대한 JC-모노머의 비율은 폴리다틴 처리시 HCT116 세포주는 1.3%에서 16.0%로, HT-29 세포주는 0.5%에서 4.5%로 급증하였다. 이와 같이, 폴리다틴은 용량의존적으로 미토콘드리아 막전위 손실을 증가시키는 것을 확인할 수 있

었다(도 2d).

[0108] 웨스턴 블롯을 통하여 폴리다틴 처리 시 아폽토시스-관련 단백질의 발현을 확인한 결과를 도 2e에 나타내었다. 폴리다틴 처리 시, caspase-3, caspase-9의 절단(cleavage)이 유도되고 아폽토시스를 유도하는 단백질인 BAK, BAX, 사이토크롬 C(Cytochrome C)의 발현이 증가함을 확인할 수 있었다(도면 2e).

[0109] 결과적으로, 폴리다틴이 대장암 세포에서 세포증식을 억제하고 아폽토시스를 유도하는 양상을 나타낸다는 것을 확인하였다.

[0111] **실시예 2: 대장암 세포에서 폴리다틴으로 인한 아폽토시스 유도 확인 및 활성산소종(ROS), 칼슘이온 농도 변화 양상 분석**

[0112] **실시예 2-1. 대장암 세포에서 폴리다틴으로 인한 아폽토시스 유도 확인**

[0113] 폴리다틴에 의한 대장암 세포의 아폽토시스 유도 효과를 확인하기 위하여 Annexin V 및 propidium iodide 염색을 수행한 결과, 폴리다틴은 HCT116, HT-29 세포주 모두에서 용량의존적으로 아폽토시스를 유도하는 것을 확인할 수 있었고, 특히 300 μM의 폴리다틴 처리 시, 상대적인 세포 사멸은 대조군(0 μM)에 비해 HCT116 세포주에서 약 2000%($p < 0.01$), HT-29 세포주에서 437%($p < 0.01$)까지 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다(도 3a).

[0115] **실시예 2-2. 대장암 세포에서 폴리다틴의 아폽토시스 유도 메커니즘 확인을 위한 활성산소종(ROS) 변화 양상 분석**

[0116] DCFH-DA를 이용한 세포내 ROS(Reactive Oxygen Species, 활성산소종) 측정을 통하여, 폴리다틴은 HCT116, HT-29 세포주 모두에서 용량의존적으로 ROS를 증가시킴을 확인할 수 있었다(도 3b).

[0117] 폴리다틴 처리로 인한 ROS 생성과 아폽토시스 간의 관계를 밝히기 위하여, 300 μM의 폴리다틴을 단독처리, 또는 300 μM의 폴리다틴을 ROS 제거제인 NAC(N-acetyl-L-cysteine)와 병용처리한 경우의 Annexin V 및 propidium iodide 염색 분석을 수행하였다(도 3c). 그 결과, 폴리다틴과 NAC을 병용처리한 경우, 폴리다틴을 단독처리한 경우에 비하여 아폽토시스 세포(apoptotic cells)가 HCT116 세포주에서는 1050%에서 475%로, HT-29 세포주에서는 688%에서 288%로 감소하였음을 확인할 수 있었다(도 3c). 또한, 폴리다틴과 NAC을 병용처리한 경우, ROS 생성이 HCT116 세포주에서는 500%에서 264%로, HT-29 세포주에서는 482%에서 176%로 감소하였음을 확인할 수 있었다(도 3d).

[0118] 결과적으로, 폴리다틴은 대장암 세포에서 산화적 스트레스를 통해 아폽토시스를 유도함을 알 수 있었다.

[0120] **실시예 2-3. 대장암 세포에서 폴리다틴의 아폽토시스 유도 메커니즘 확인을 위한 칼슘이온(Ca^{2+}) 변화 양상 분석**

[0121] 대장암 세포에서 Ca^{2+} 수준 조절에 대한 폴리다틴의 영향을 확인하기 위하여 수행한 Fluo-4 분석 및 Rhod-2 분석 결과를 각각 도 4a 및 도 4b에 나타내었다. 도 4a 및 도 4b에 나타난 바와 같이, 폴리다틴은 용량의존적으로 대장암 세포질(cytosol) 내부 및 미토콘드리아 내부 Ca^{2+} 수준을 증가시킴을 확인할 수 있었으며, 특히 300 μM의 폴리다틴 처리시 HCT116 및 HT-29 세포주에서 세포질 내부 Ca^{2+} 수준이 각각 480% 및 405%(p <0.01) 증가하였으며(도 4a), 미토콘드리아 내부 Ca^{2+} 수준은 각각 292% 및 586%(p <0.01) 증가하였다(도 4b).

[0122] 폴리다틴 처리로 인한 Ca^{2+} 수준 증가와 아폽토시스 간의 관계를 밝히기 위하여, 칼슘 킬레이터인 BAPTA/AM 및 2-APB를 각각 처리하여 유리 Ca^{2+} 수준을 변경하였다. 폴리다틴을 처리하는 경우 HCT116 및 HT-29 세포주에서 세포질 내부 유리 Ca^{2+} 수준은 각각 최대 282% 및 449%까지 증가하였으며, 300 μM의 폴리다틴을 처리하는 경우 유리 Ca^{2+} 수준이 효과적으로 증가하였음을 알 수 있었다(도 4c). 이와 유사하게, 폴리다틴을 처리하는 경우 HCT116 및 HT-29 미토콘드리아 내부 유리 Ca^{2+} 수준은 각각 최대 313% 및 502%까지 증가하였다(도 4d). 300 μM의 폴리다틴을 단독처리, 또는 300 μM의 폴리다틴을 2-APB 또는 BAPTA/AM과 와 병용처리한 경우의 Annexin V 및 propidium iodide 염색 분석을 수행하였다(도 4e). 그 결과, 폴리다틴에 의한 아폽토시스는 폴리다틴을 2-

APB 또는 BAPTA/AM과 병용처리 시 크게 감소되었음을 확인할 수 있었다.

[0123] 결과적으로, 폴리다틴은 칼슘 조절 과정을 변경하여 칼슘 항상성의 불균형을 초래하여 대장암 세포의 아폽토시스를 유도함을 알 수 있었다.

[0125] **실시예 3. 폴리다틴에 의한 대장암 세포내 세포증식 관련 세포 신호전달 경로 변화 분석**

[0126] 폴리다틴이 대장암 세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포의 증식과 연관된 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 경로를 구성하는 단백질 인산화효소의 인산화 양상을 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. 그, 결과 폴리다틴 용량의존적으로 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 경로 모두에서 단백질의 인산화가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 5). 이로써 폴리다틴이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 경로 불활성화를 통하여 대장암 세포의 증식을 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[0128] **실시예 4. 폴리다틴에 의한 대장암 세포 내 소포체-미토콘드리아 축 및 자가포식(autophagy) 조절 분석**

[0129] 다양한 농도의 폴리다틴(0, 100 μM, 200 μM 및 300 μM)을 처리한 후 HCT116 및 HT-29 세포주 내 소포체 스트레스 변화 양상을 확인하기 위하여, 소포체 스트레스 관련 반응 인자로서, i) ER 스트레스를 유도하는 단백질(ER stress inducers)인 PERK(PKR-like ER-resident kinase), IRE1α(inositol-requiring enzyme 1α), ATF6α(activating transcription factor 6α), ii) ER 스트레스 센서 단백질(ER stress sensors)인 eIF2α(eukaryotic translation-initiation factor 2α), GADD153(DNA damage-inducible gene 153), iii) ER 스트레스 센서의 상향조절 단백질(upregulation protein of ER stress sensor)인 GRP78(glucose-regulated protein 78) 단백질의 인산화 또는 활성을 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다(도 6a). 그 결과, 폴리다틴이 용량의존적으로 ER 스트레스 관련 반응 인자들을 인산화 또는 활성화하여 대장암 세포주 내에 소포체 스트레스를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0130] 이후, 폴리다틴에 의하여 소포체-미토콘드리아 축을 조절하는 단백질들의 발현을 확인하여 소포체-미토콘드리아 간의 커뮤니케이션을 조사하였다(도 6b). 그 결과, 폴리다틴 처리 시 HCT116 및 HT-29 세포주 모두에서 IP3R(inositol 1,4,5-triphosphate receptor)-VDAC(voltage-dependent anion channel) 칼슘 조절 및 VAPB(vesicle-associated membrane and protein-associated protein B/C)의 발현이 증가하였고, 이에 따라 소포체-미토콘드리아 접촉 현상이 증가하여 소포체로부터 Ca^{2+} 분비가 일어나며, 이는 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도 증가를 야기함을 알 수 있었다.

[0131] 소포체-미토콘드리아 접촉 부위(ER-mitochondria contact site)에서의 세포내 반응은 자가포식(autophagy)과 밀접한 관련이 있다. 따라서, 상기 결과를 바탕으로 폴리다틴에 의한 대장암 세포 내 자가포식(autophagy) 양상을 확인하기 위하여 다양한 농도의 폴리다틴(0 μM, 100 μM, 200 μM 및 300 μM)을 처리한 후 자가포식 조절 관련 단백질 수준을 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다(도 6c). 그 결과, 폴리다틴은 용량의존적으로 HCT116 및 HT-29 세포주에서 소포체-미토콘드리아 접촉을 통하여 과도한 Ca^{2+} 분비를 야기시키고, 이는 곧 세포 내 자가포식(autophagy)을 위한 오토파고좀(autophagosome) 형성을 유도하며, 이로써 결과적으로 항암 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0132] **실시예 5. 폴리다틴과 기존 화학 항암제의 병용처리에 따른 대장암 세포 증식 억제 효과 분석**

[0133] HCT116 및 HT29 세포주에 대장암 치료제로 널리 쓰이는 기존 화학 항암제인 5-FU와 이리노테칸을 각각 단독처리, 또는 5-FU와 이리노테칸을 각각 폴리다틴과 병용처리한 후 BrdU를 이용하여 암세포 증식 정도를 분석하였다(도 7a). 도 7a에 나타난 바와 같이, 5-FU과 이리노테칸을 각각 폴리다틴과 병용처리한 경우 대장암 세포의 증식을 현저하게 억제시킴을 알 수 있었다.

[0134] 3D 스페로이드 배양을 통해서도 위와 같은 결과를 확인할 수 있었다(도 7b). 도 7b에 나타난 바와 같이, 5-FU와 폴리다틴을 병용처리한 경우, HCT116 세포주에서는 스페로이드 상대 밀도가 40%에서 12%($p < 0.01$)로 감소되었고, HT-29 세포주에서는 65%에서 10%($p < 0.05$)로 감소되었다. 이리노테칸과 폴리다틴을 병용처리한 경우, HCT116 세포주에서는 스페로이드 상대 밀도가 50%에서 9%($p < 0.001$)로 감소되었고, HT-29 세포주에서는 44%에서 9%($p < 0.01$)로 감소되었다.

[0135] 이와 같이, 폴리다틴과 기존 화학 항암제를 병용처리하는 경우, 양적으로 현저한 암세포 증식 억제효과가 나타남을 확인할 수 있었다.

[0137] **실시예 6. 폴리다틴의 기존 화학 항암제 내성 완화 효과 분석**

[0138] 5-FU를 HCT116에 추가하고 장기간 동안 점진적으로 농도를 증가시켜 확립한 5-FU 내성 세포 5-FU-R(5-FU-resistant)에 폴리다틴 단독처리, 5-FU 단독처리, 또는 폴리다틴과 5-FU를 병용처리하여 세포증식 억제 및 아폽토시스 유도 효과를 확인하였다.

[0139] 그 결과, 5-FU-R에 폴리다틴을 단독처리하는 경우 5-FU를 단독처리하는 경우 보다 양적으로 현저한 세포증식 억제 효과를 보였으며, 특히 폴리다틴과 5-FU를 병용처리하였을 때(상대적 세포 증식률: 7%) 5-FU를 단독처리하는 경우(상대적 세포 증식률: 75%)보다 양적으로 현저한 세포증식이 억제효과가 나타남을 확인할 수 있었다(도 8a).

[0140] 3D 스페로이드 배양에서도, 5-FU-R에 폴리다틴과 5-FU를 병용처리하였을 때(스페로이드의 상대 밀도: 15%) 5-FU를 단독처리하는 경우(스페로이드의 상대 밀도: 69%)보다 양적으로 현저한 세포증식이 억제효과가 나타남을 확인할 수 있었다(도 8b).

[0141] Annexin V 및 propidium iodide 염색을 수행하여 아폽토시스 유도를 확인한 경우에도, 5-FU-R에 폴리다틴을 단독처리하였을 때 아폽토시스가 2000%까지 증가하였고, 5-FU-R에 폴리다틴과 5-FU를 병용처리한 경우에는 아폽토시스가 약 3000%까지 증가하여, 5-FU를 단독처리하는 경우보다 양적으로 현저한 아폽토시스 유도 효과를 보였음을 알 수 있었다(도 8c).

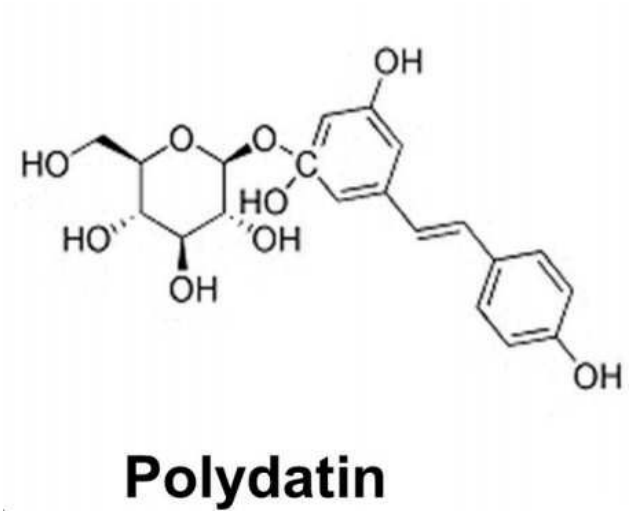
[0142] 5-FU-R에 대한 효과가 5-FU 표적 단백질인 TYMS(thymidylate synthase) 및 아폽토시스-관련 인자(BAX, P53, BAK, 절단된(cleaved) caspase 3, 절단된(cleaved) caspase 9 및 사이토크롬 C)와 연관이 있는지를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다(도 8d). 5-FU-R에 5-FU 단독처리한 경우, 상기 단백질의 발현에 유의한 변경은 관찰되지 않았으나, 폴리다틴과 5-FU를 병용처리한 경우, p-P53을 제외한 상술한 모든 단백질 수준이 상향조절됨을 확인할 수 있었다.

[0143] 결과적으로, 폴리다틴은 대장암 세포에 유도된 5-FU 내성을 완화할 수 있으며, 특히 폴리다틴과 5-FU를 병용처리하는 경우 내성 완화 효과가 더욱 현저함을 확인할 수 있었다.

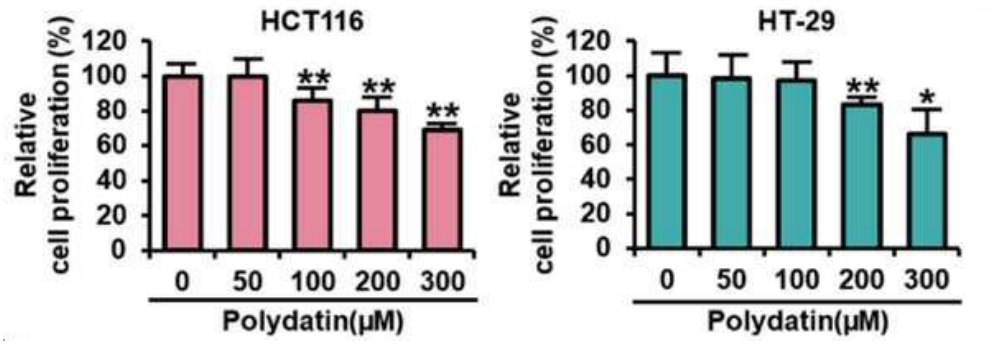
[0145] 상술한 실시예 1 내지 6을 통하여, 폴리다틴은 대장암 세포에서 i) PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 경로를 불활성화하여 세포증식을 억제하고, ii) 산화적 스트레스 또는 칼슘 항상성의 불균형을 통하여 아폽토시스를 유도하며, iii) 소포체-미토콘드리아 접촉을 통하여 과도한 Ca^{2+} 분비를 야기시켜 세포 내 자가포식을 유도하고, iv) 기존 화학 항암제와 병용처리 시 세포증식을 억제하며, v) 기존 화학 항암제에 대한 내성을 완화함을 확인할 수 있었다. 위와 같은 폴리다틴의 대장암 세포에 대한 작용에 대한 모식도를 도 9에 나타내었다.

도면

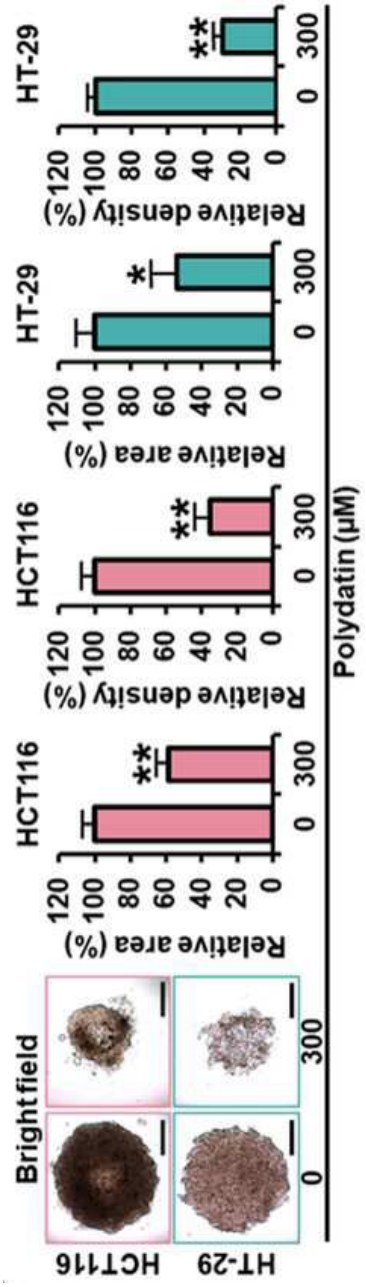
도면1


OH
HO
O
O
C
HO
HO
OH
OH
OH
Polydatin

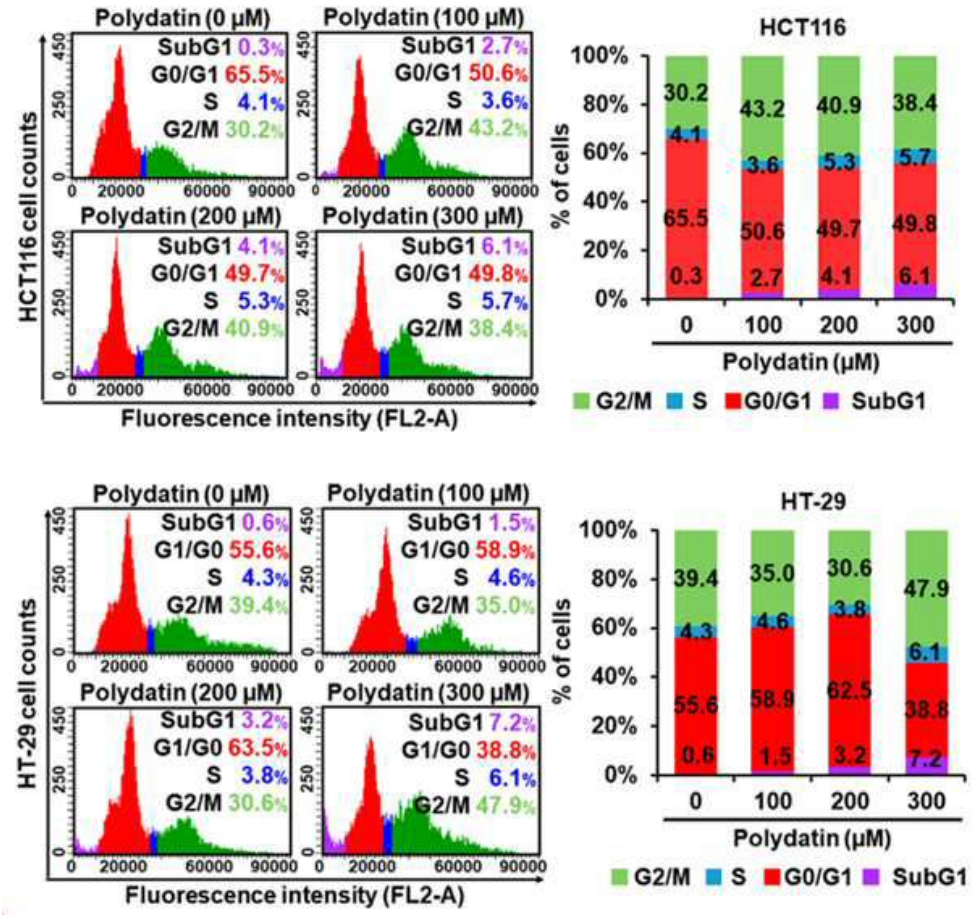
도면2a


HCT116
Relative cell proliferation (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
0
50
100
200
300
Polydatin(μM)
HT-29
Relative cell proliferation (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
*
0
50
100
200
300
Polydatin(μM)

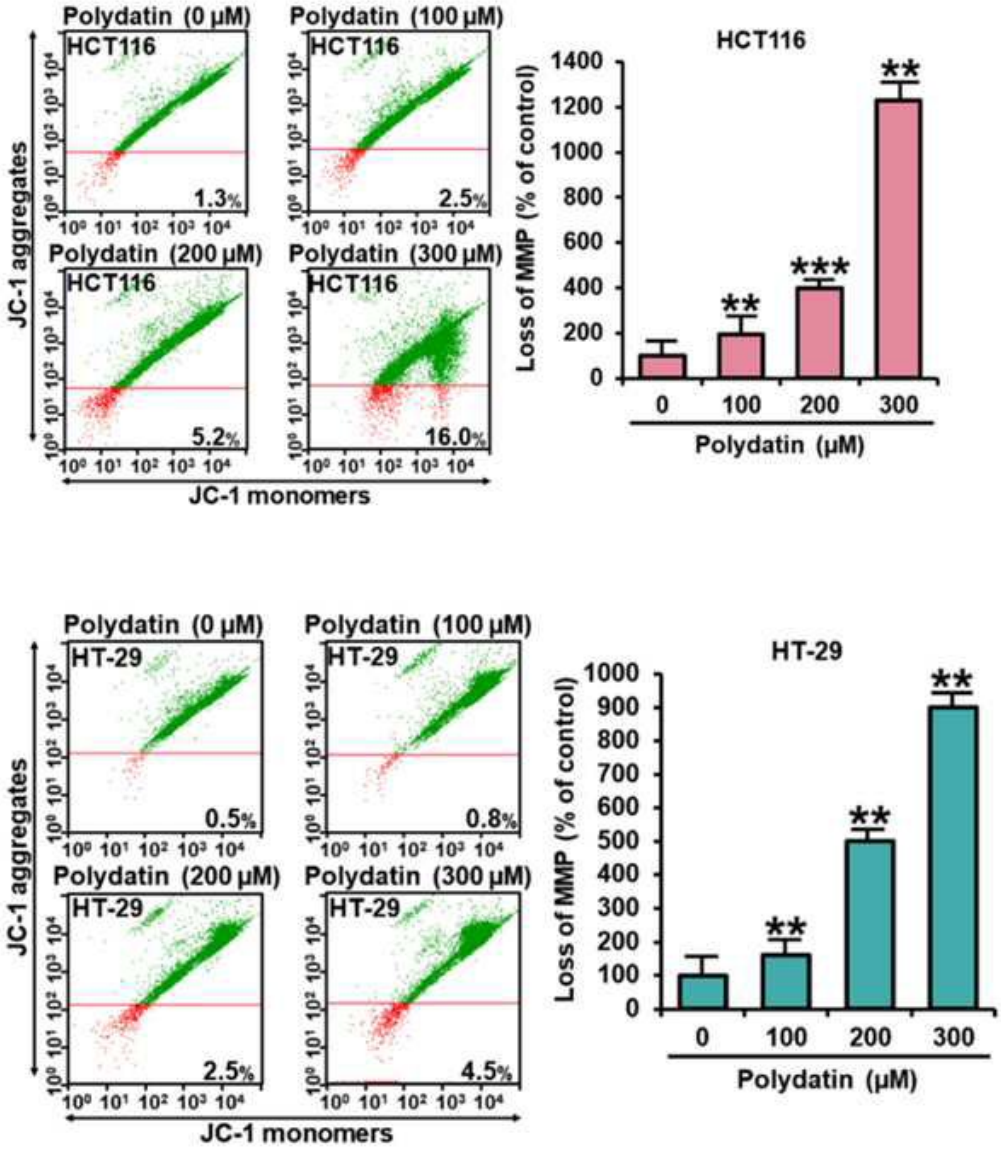
도면2b


HCT116
HT-29
Brightfield
0
300
Relative area (%)
HCT116
Relative density (%)
HCT116
Relative area (%)
HT-29
Relative density (%)
HT-29
Polydatin (μM)

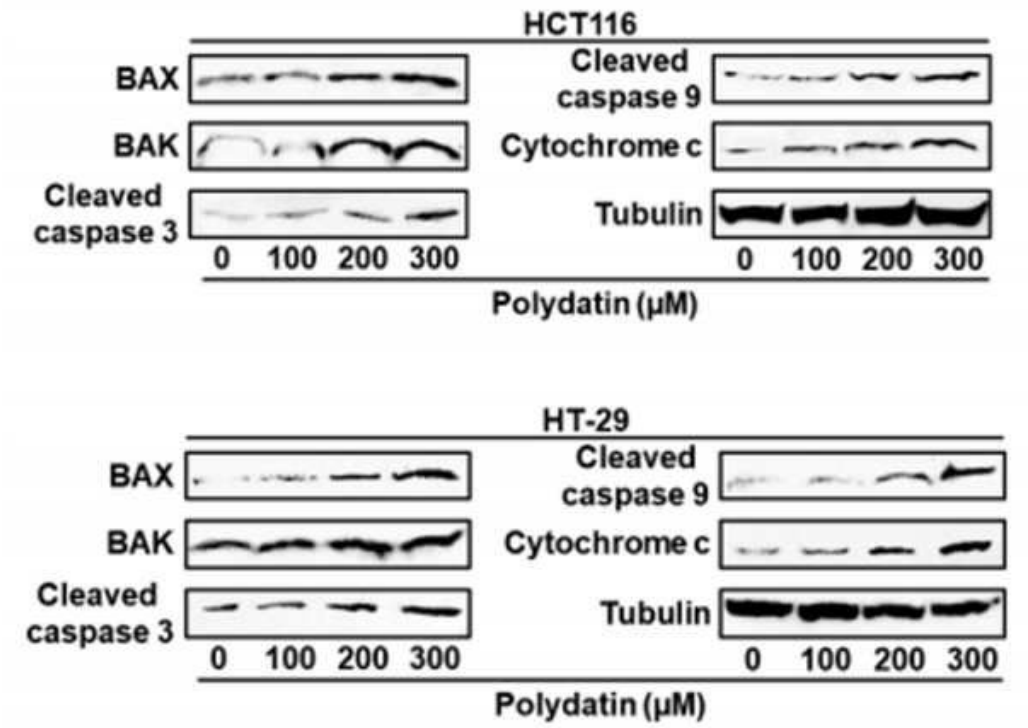
도면2c


Polydatin (0 μM)
SubG1 0.3%
G0/G1 65.5%
S 4.1%
G2/M 30.2%
Polydatin (100 μM)
SubG1 2.7%
G0/G1 50.6%
S 3.6%
G2/M 43.2%
Polydatin (200 μM)
SubG1 4.1%
G0/G1 49.7%
S 5.3%
G2/M 40.9%
Polydatin (300 μM)
SubG1 6.1%
G0/G1 49.8%
S 5.7%
G2/M 38.4%
HCT116 cell counts
Fluorescence intensity (FL2-A)
HCT116
% of cells
30.2
4.1
65.5
0.3
43.2
3.6
50.6
2.7
40.9
5.3
49.7
4.1
38.4
5.7
49.8
6.1
Polydatin (μM)
G2/M S G0/G1 SubG1
Polydatin (0 μM)
SubG1 0.6%
G1/G0 55.6%
S 4.3%
G2/M 39.4%
Polydatin (100 μM)
SubG1 1.5%
G1/G0 58.9%
S 4.6%
G2/M 35.0%
Polydatin (200 μM)
SubG1 3.2%
G1/G0 63.5%
S 3.8%
G2/M 30.6%
Polydatin (300 μM)
SubG1 7.2%
G1/G0 38.8%
S 6.1%
G2/M 47.9%
HT-29 cell counts
Fluorescence intensity (FL2-A)
HT-29
% of cells
39.4
4.3
55.6
0.6
35.0
4.6
58.9
1.5
30.6
3.8
62.5
3.2
47.9
6.1
38.8
7.2
Polydatin (μM)
G2/M S G0/G1 SubG1

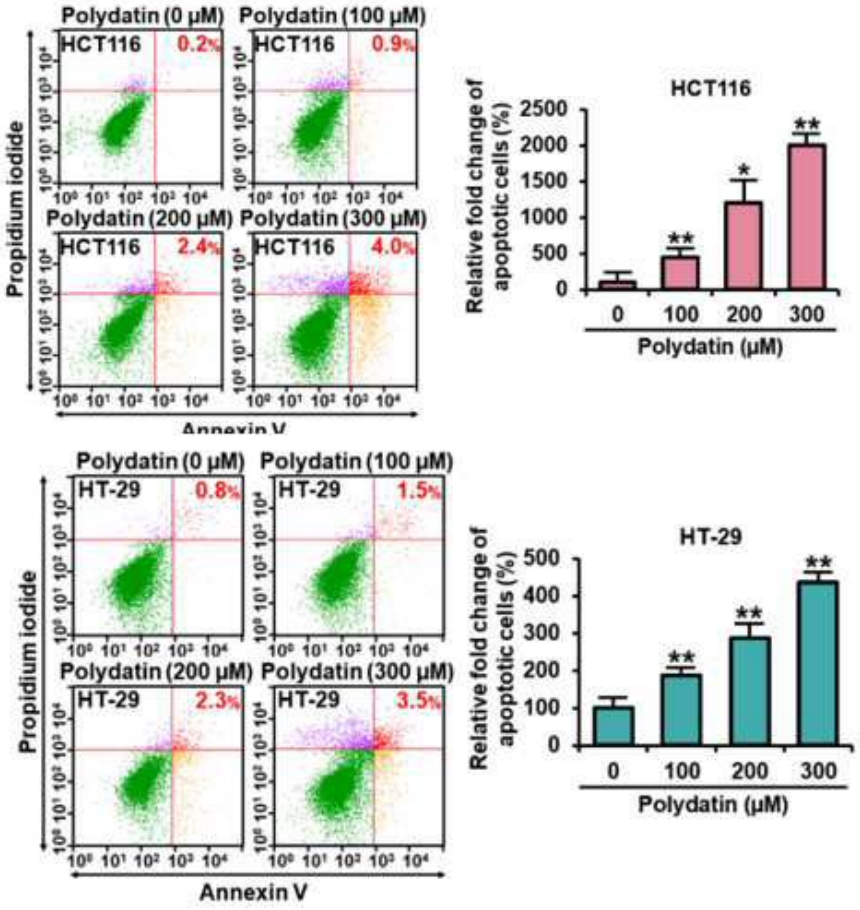
도면2d


Polydatin (0 μM)
HCT116
1.3%
Polydatin (100 μM)
HCT116
2.5%
Polydatin (200 μM)
HCT116
5.2%
Polydatin (300 μM)
HCT116
16.0%
JC-1 aggregates
JC-1 monomers
HCT116
Loss of MMP (% of control)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
**
***
**
0
100
200
300
Polydatin (μM)
Polydatin (0 μM)
HT-29
0.5%
Polydatin (100 μM)
HT-29
0.8%
Polydatin (200 μM)
HT-29
2.5%
Polydatin (300 μM)
HT-29
4.5%
JC-1 aggregates
JC-1 monomers
HT-29
Loss of MMP (% of control)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
**
**
**
0
100
200
300
Polydatin (μM)

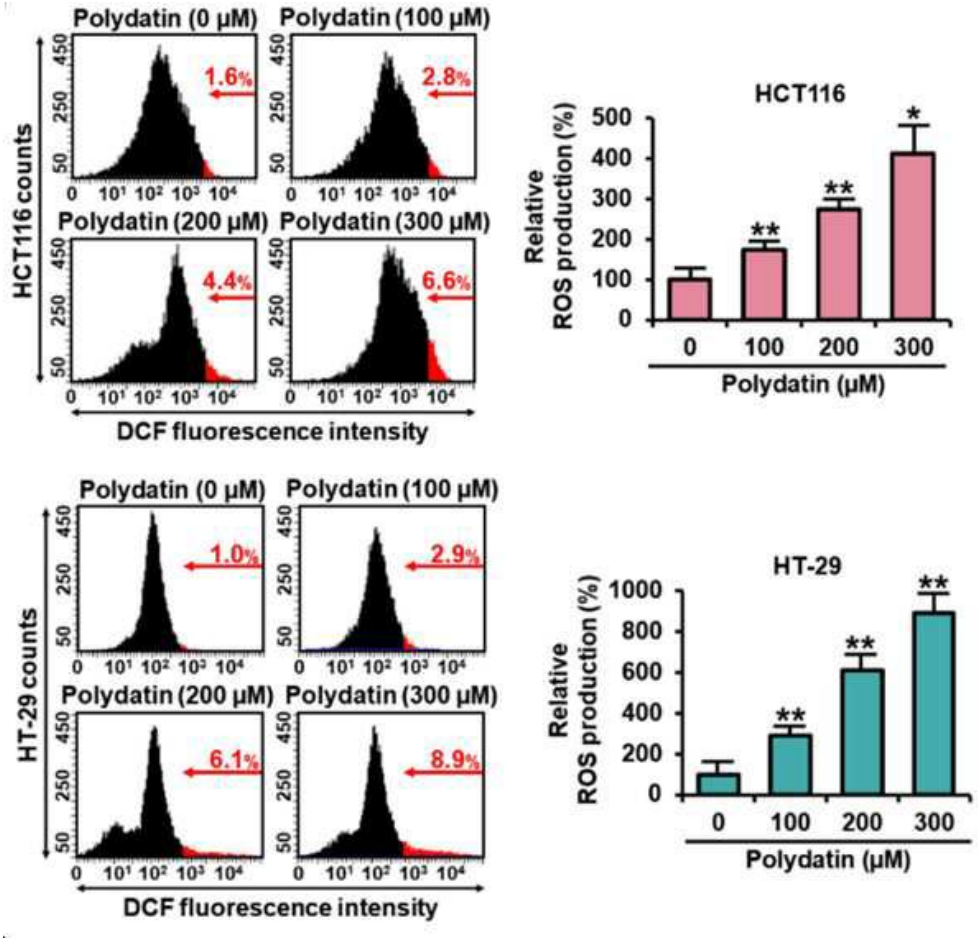
도면2e


HCT116
BAX
BAK
Cleaved caspase 3
Cleaved caspase 9
Cytochrome c
Tubulin
0 100 200 300
0 100 200 300
Polydatin (μM)
HT-29
BAX
BAK
Cleaved caspase 3
Cleaved caspase 9
Cytochrome c
Tubulin
0 100 200 300
0 100 200 300
Polydatin (μM)

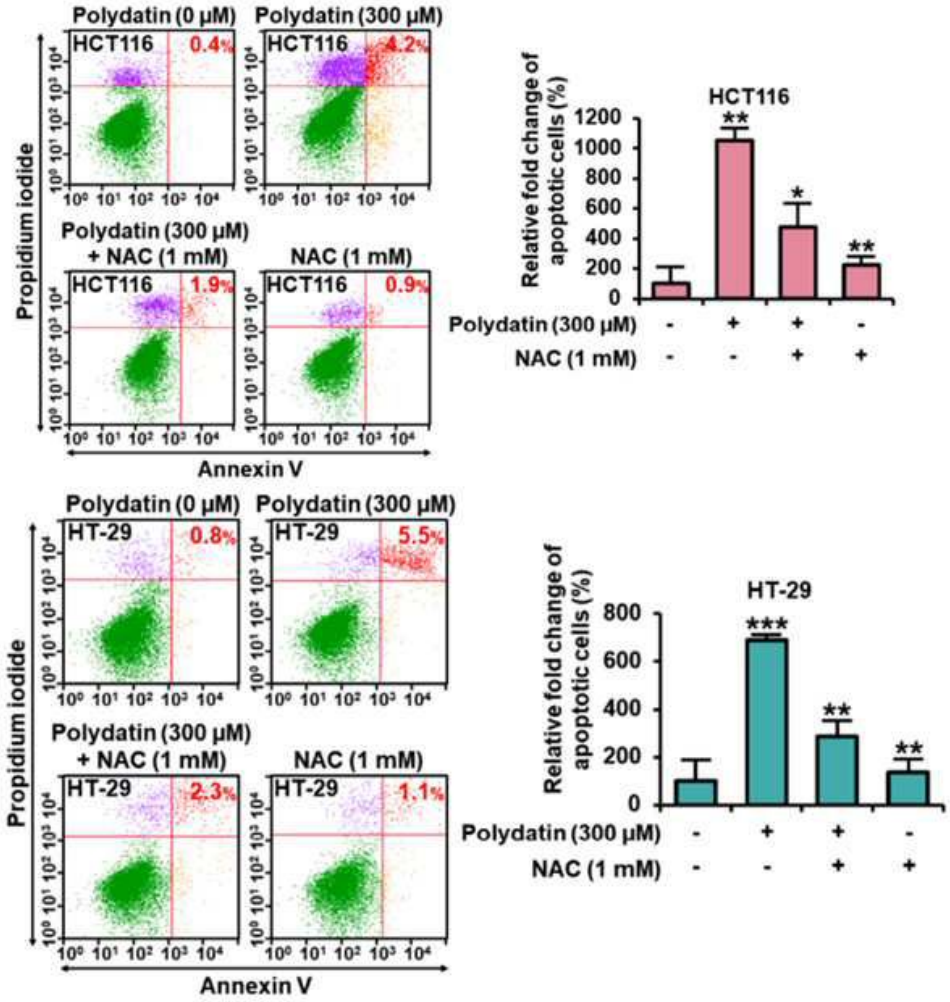
도면3a


Polydatin (0 μM)
Polydatin (100 μM)
Polydatin (200 μM)
Polydatin (300 μM)
HCT116
0.2%
0.9%
2.4%
4.0%
Propidium iodide
Annexin V
HCT116
Relative fold change of apoptotic cells (%)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 100 200 300
Polydatin (μM)
Polydatin (0 μM)
Polydatin (100 μM)
Polydatin (200 μM)
Polydatin (300 μM)
HT-29
0.8%
1.5%
2.3%
3.5%
Propidium iodide
Annexin V
HT-29
Relative fold change of apoptotic cells (%)
500
400
300
200
100
0
0 100 200 300
Polydatin (μM)

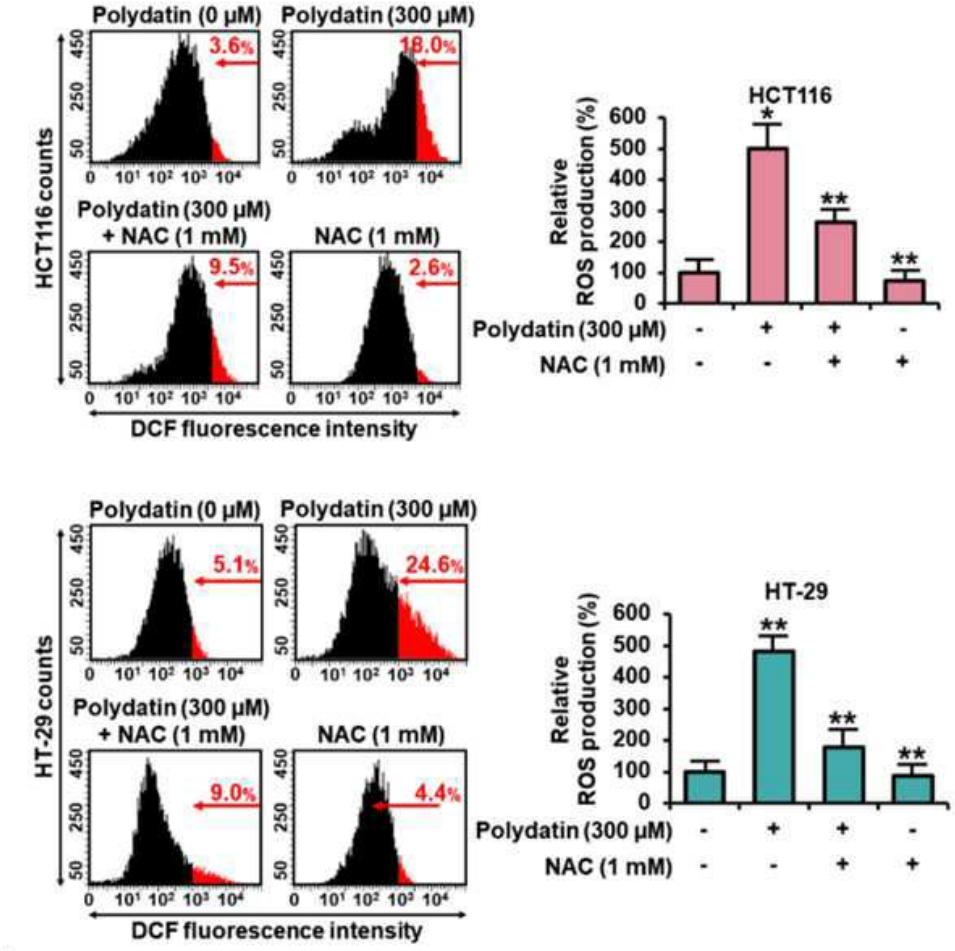
도면3b


Polydatin (0 μM)
Polydatin (100 μM)
Polydatin (200 μM)
Polydatin (300 μM)
1.6%
2.8%
4.4%
6.6%
HCT116 counts
DCF fluorescence intensity
HCT116
Relative ROS production (%)
Polydatin (μM)
1.0%
2.9%
6.1%
8.9%
HT-29 counts
HT-29

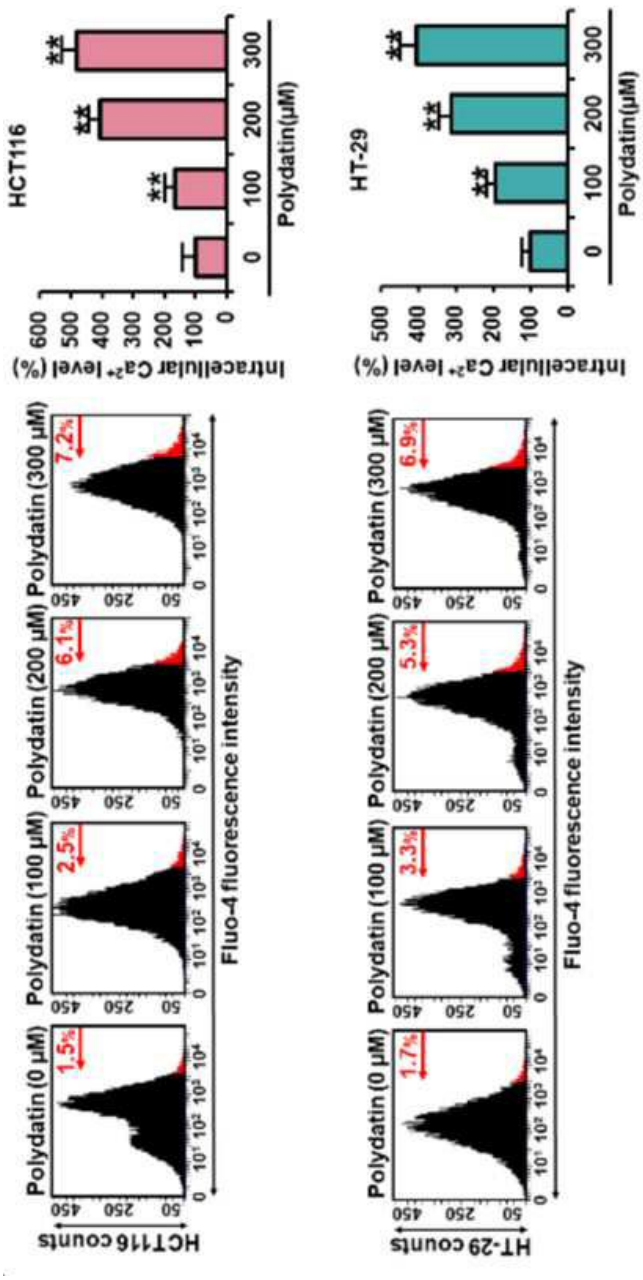
도면3c


Polydatin (0 μM)
Polydatin (300 μM)
HCT116
0.4%
HCT116
4.2%
Polydatin (300 μM)
+ NAC (1 mM)
NAC (1 mM)
HCT116
1.9%
HCT116
0.9%
Propidium iodide
Annexin V
HCT116
Relative fold change of apoptotic cells (%)
1200
1000
800
600
400
200
0
**
*
**
Polydatin (300 μM) - + + -
NAC (1 mM) - - + +
Polydatin (0 μM)
Polydatin (300 μM)
HT-29
0.8%
HT-29
5.5%
Polydatin (300 μM)
+ NAC (1 mM)
NAC (1 mM)
HT-29
2.3%
HT-29
1.1%
Propidium iodide
Annexin V
HT-29
Relative fold change of apoptotic cells (%)
800
600
400
200
0
***
**
**
Polydatin (300 μM) - + + -
NAC (1 mM) - - + +

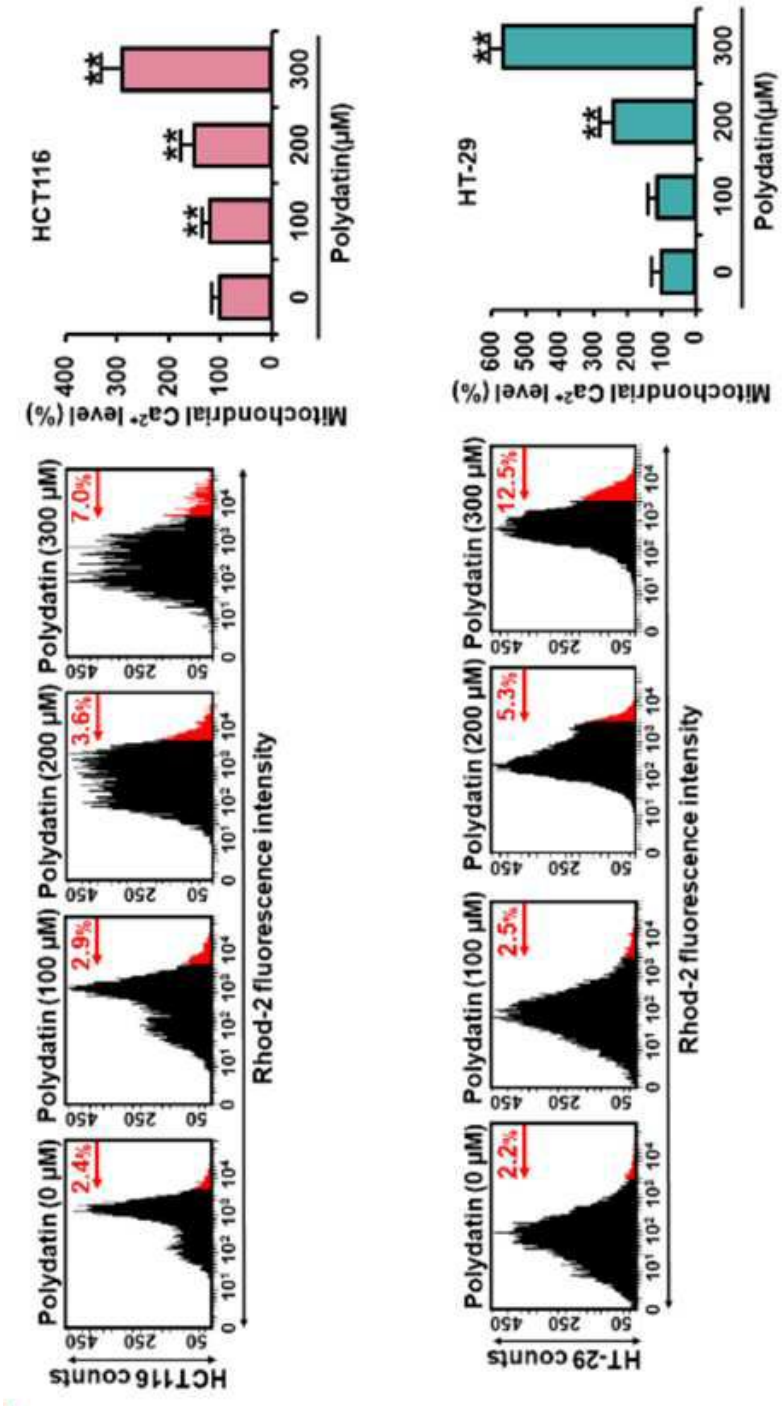
도면3d


Polydatin (0 μM)
Polydatin (300 μM)
3.6%
18.0%
Polydatin (300 μM)
+ NAC (1 mM)
NAC (1 mM)
9.5%
2.6%
HCT116 counts
DCF fluorescence intensity
HCT116
Relative ROS production (%)
Polydatin (300 μM)
NAC (1 mM)
Polydatin (0 μM)
Polydatin (300 μM)
5.1%
24.6%
Polydatin (300 μM)
+ NAC (1 mM)
NAC (1 mM)
9.0%
4.4%
HT-29 counts
DCF fluorescence intensity
HT-29
Relative ROS production (%)
Polydatin (300 μM)
NAC (1 mM)

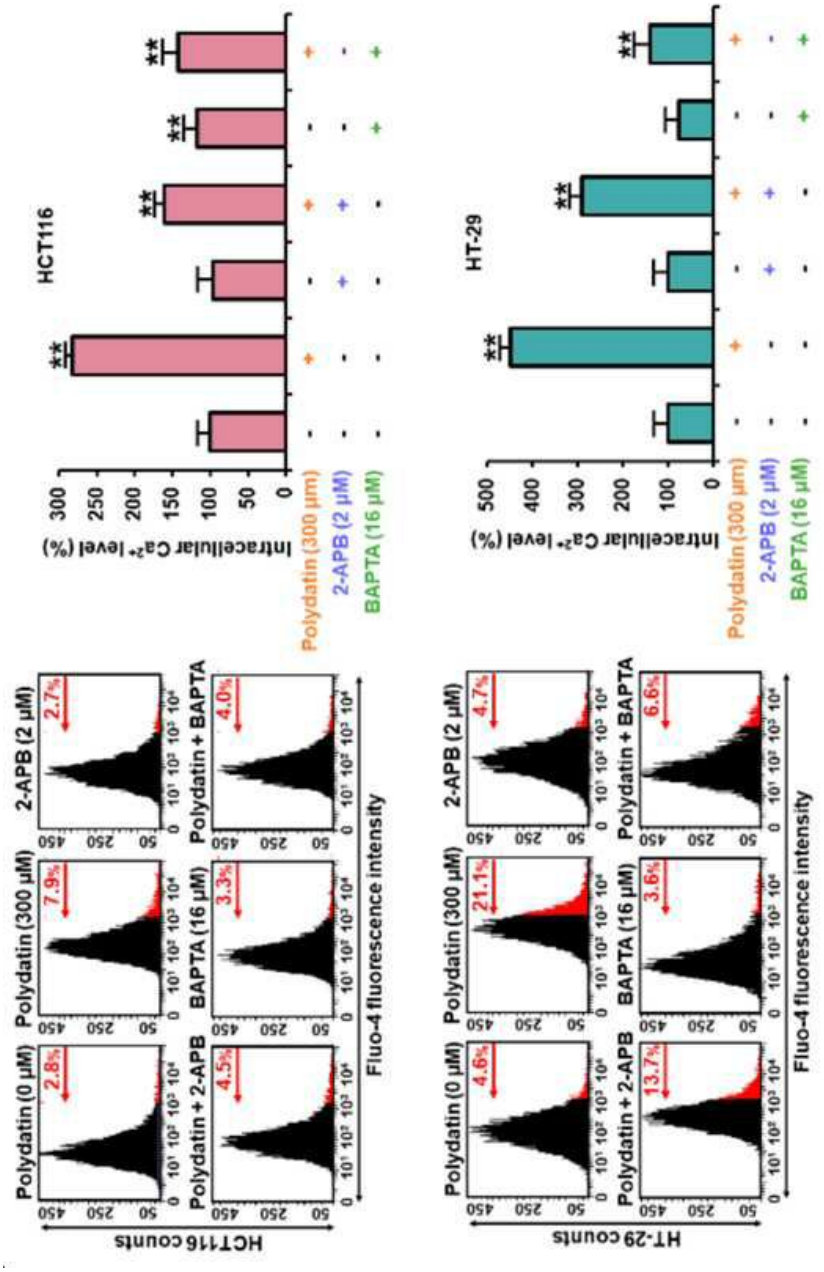
도면4a


HCT116
HT-29
Intracellular Ca2+ level (%)
Polydatin(μM)
Polydatin (0 μM)
Polydatin (100 μM)
Polydatin (200 μM)
Polydatin (300 μM)
1.5%
2.5%
6.1%
7.2%
1.7%
3.3%
5.3%
6.9%
HCT116 counts
HT-29 counts
Fluo-4 fluorescence intensity

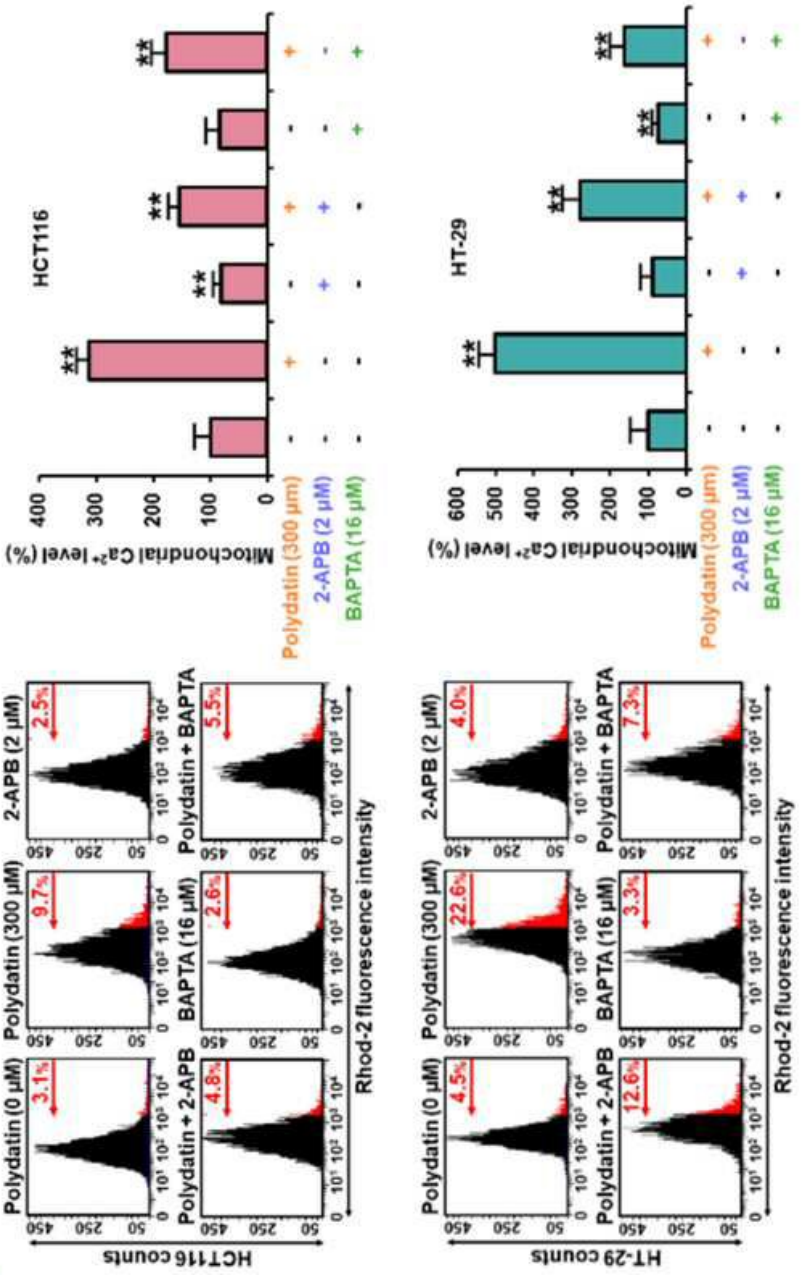
도면4b


HCT116
HT-29
Mitochondrial Ca2+ level (%)
Polydatin(μM)
0
100
200
300
400
500
600
**
Polydatin (0 μM)
Polydatin (100 μM)
Polydatin (200 μM)
Polydatin (300 μM)
2.4%
2.9%
3.6%
7.0%
2.2%
2.5%
5.3%
12.5%
HCT116 counts
HT-29 counts
Rhod-2 fluorescence intensity

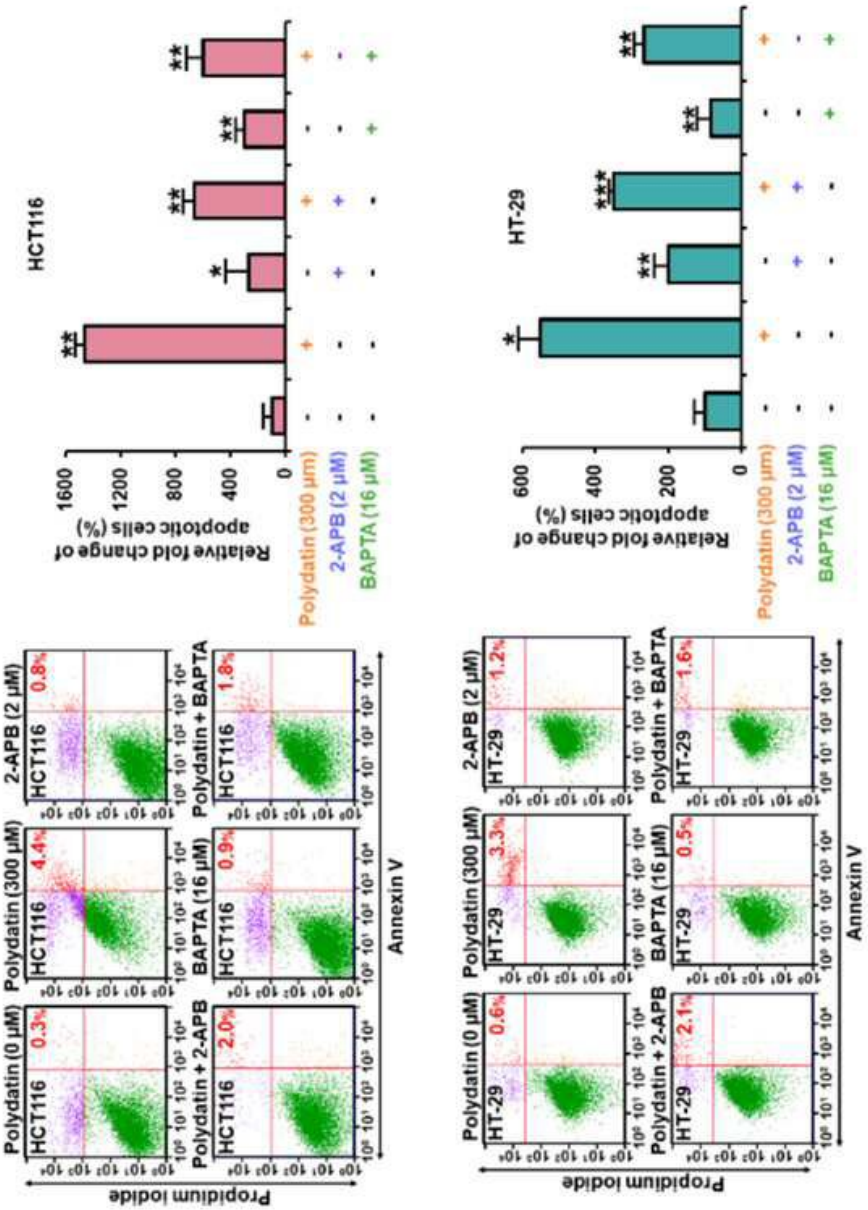
도면4c


HCT116
HT-29
Intracellular Ca2+ level (%)
Polydatin (300 μm)
2-APB (2 μM)
BAPTA (16 μM)
Polydatin (0 μM)
Polydatin + 2-APB
Polydatin + BAPTA
HCT116 counts
HT-29 counts
Fluo-4 fluorescence intensity

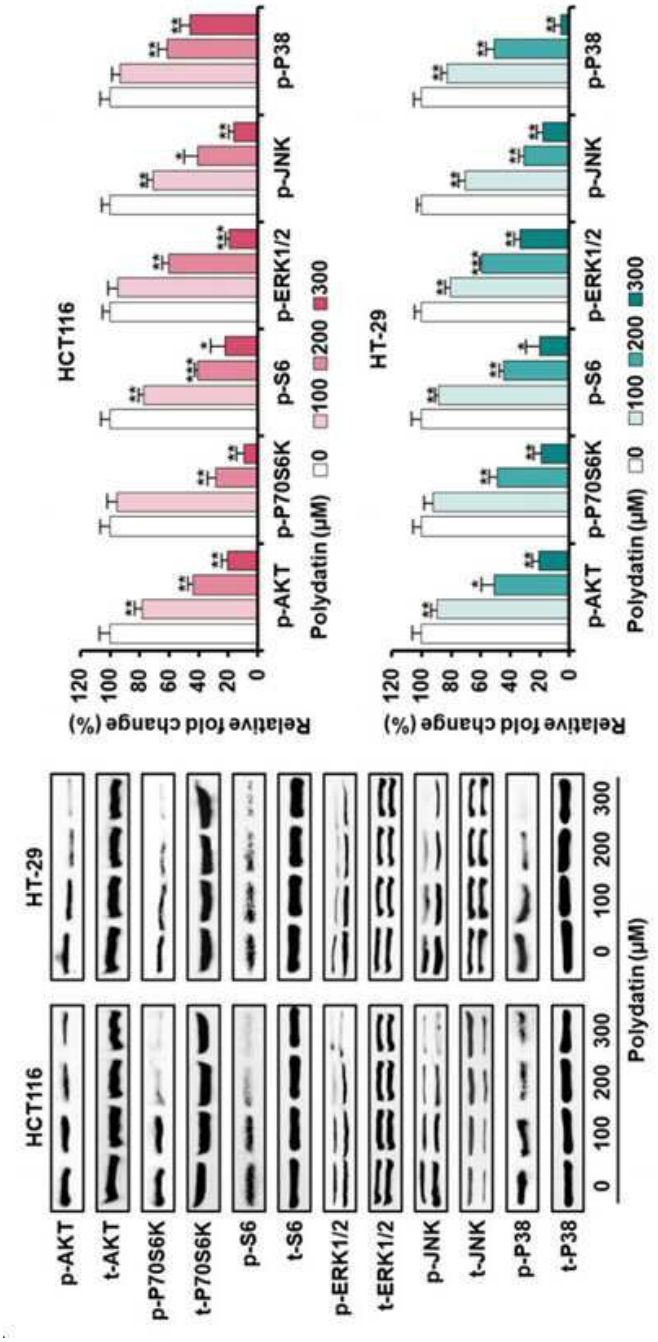
도면4d


HCT116
HT-29
Mitochondrial Ca2+ level (%)
Polydatin (300 μm)
2-APB (2 μM)
BAPTA (16 μM)
Polydatin (0 μM)
Polydatin + 2-APB
Polydatin + BAPTA
HCT116 counts
HT-29 counts
Rhod-2 fluorescence intensity

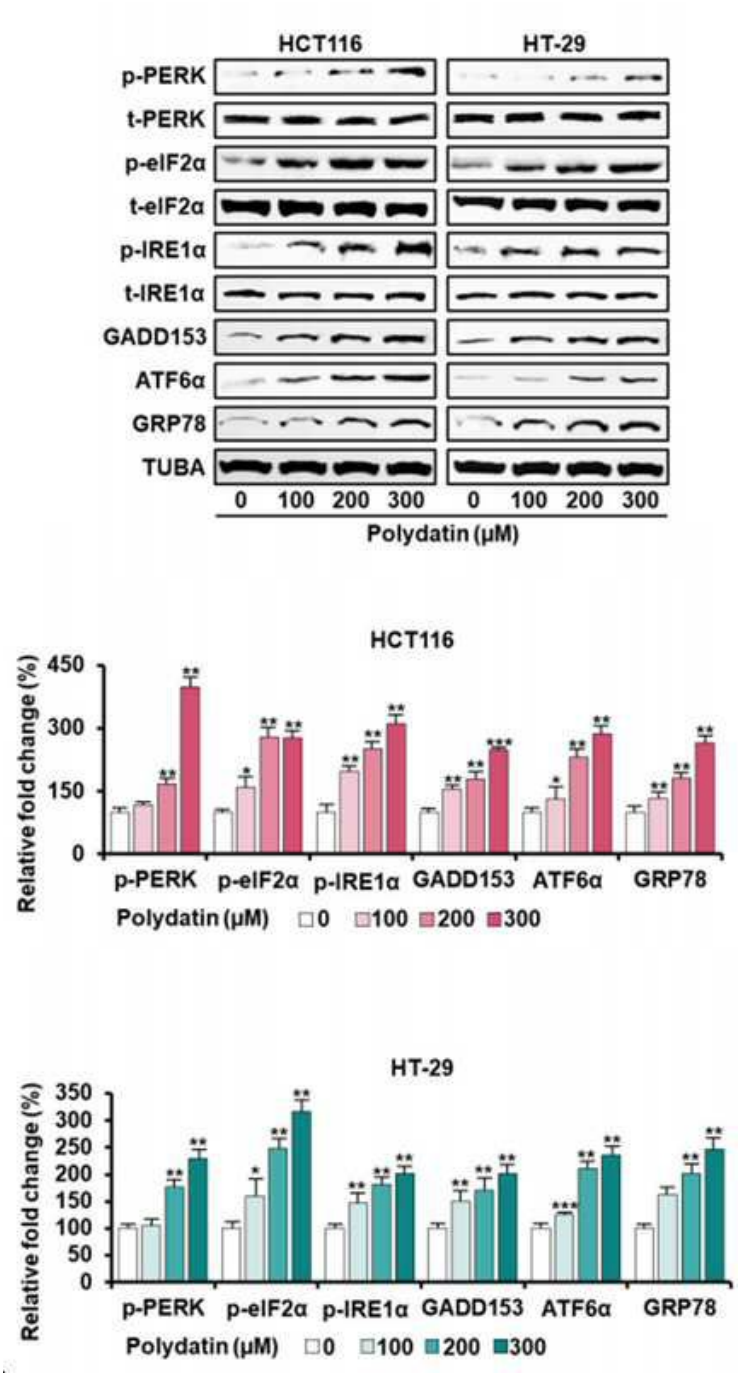
도면4e


HCT116
HT-29
Relative fold change of apoptotic cells (%)
Polydatin (300 μm)
2-APB (2 μM)
BAPTA (16 μM)
Polydatin (0 μM)
Polydatin + 2-APB
Polydatin + BAPTA
Propidium Iodide
Annexin V

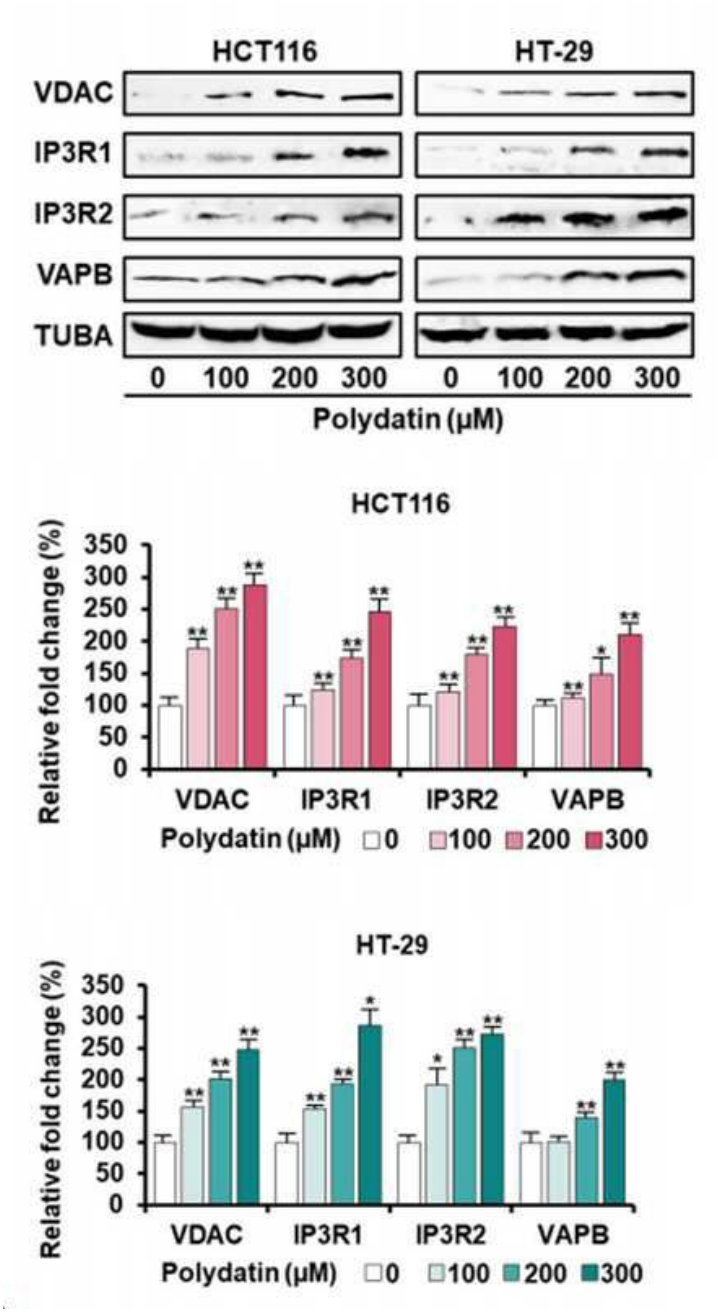
도면5


HCT116
HT-29
p-AKT
t-AKT
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-JNK
t-JNK
p-P38
t-P38
0 100 200 300
0 100 200 300
Polydatin (μM)
Relative fold change (%)
0 20 40 60 80 100 120
p-AKT p-P70S6K p-S6 p-ERK1/2 p-JNK p-P38
Polydatin (μM) 0 100 200 300

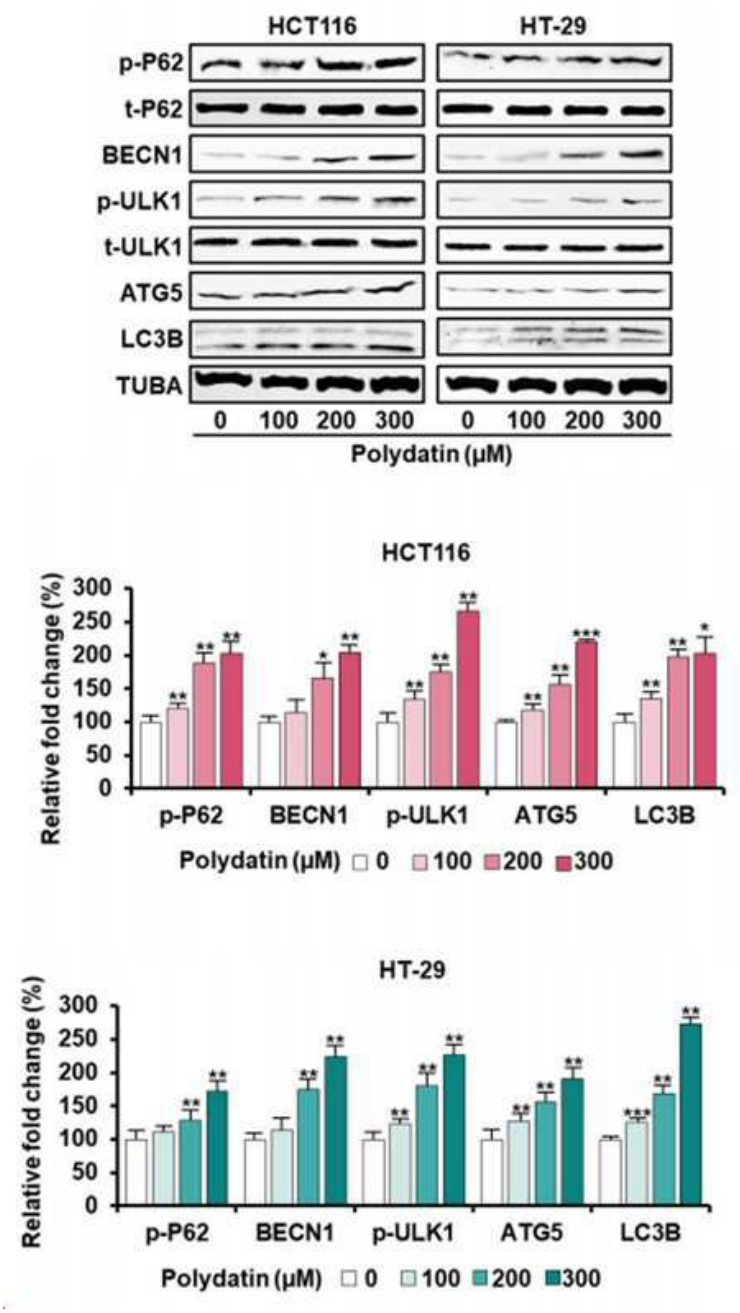
도면6a


HCT116
HT-29
p-PERK
t-PERK
p-eIF2α
t-eIF2α
p-IRE1α
t-IRE1α
GADD153
ATF6α
GRP78
TUBA
0 100 200 300 0 100 200 300
Polydatin (μM)
HCT116
Relative fold change (%)
450
300
150
0
p-PERK p-eIF2α p-IRE1α GADD153 ATF6α GRP78
Polydatin (μM) 0 100 200 300
HT-29
Relative fold change (%)
350
300
250
200
150
100
50
0
p-PERK p-eIF2α p-IRE1α GADD153 ATF6α GRP78
Polydatin (μM) 0 100 200 300

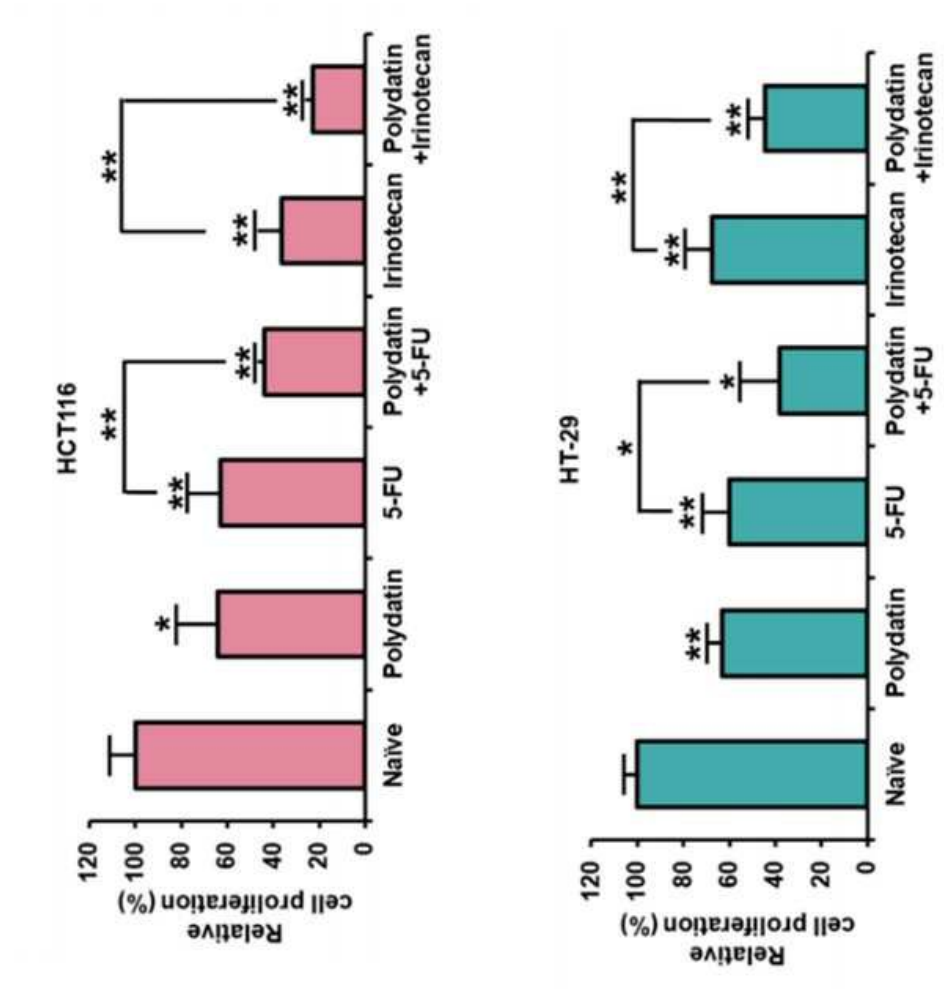
도면6b


HCT116
HT-29
VDAC
IP3R1
IP3R2
VAPB
TUBA
0 100 200 300 0 100 200 300
Polydatin (μM)
HCT116
Relative fold change (%)
350
300
250
200
150
100
50
0
VDAC IP3R1 IP3R2 VAPB
Polydatin (μM) 0 100 200 300
HT-29
Relative fold change (%)
350
300
250
200
150
100
50
0
VDAC IP3R1 IP3R2 VAPB
Polydatin (μM) 0 100 200 300

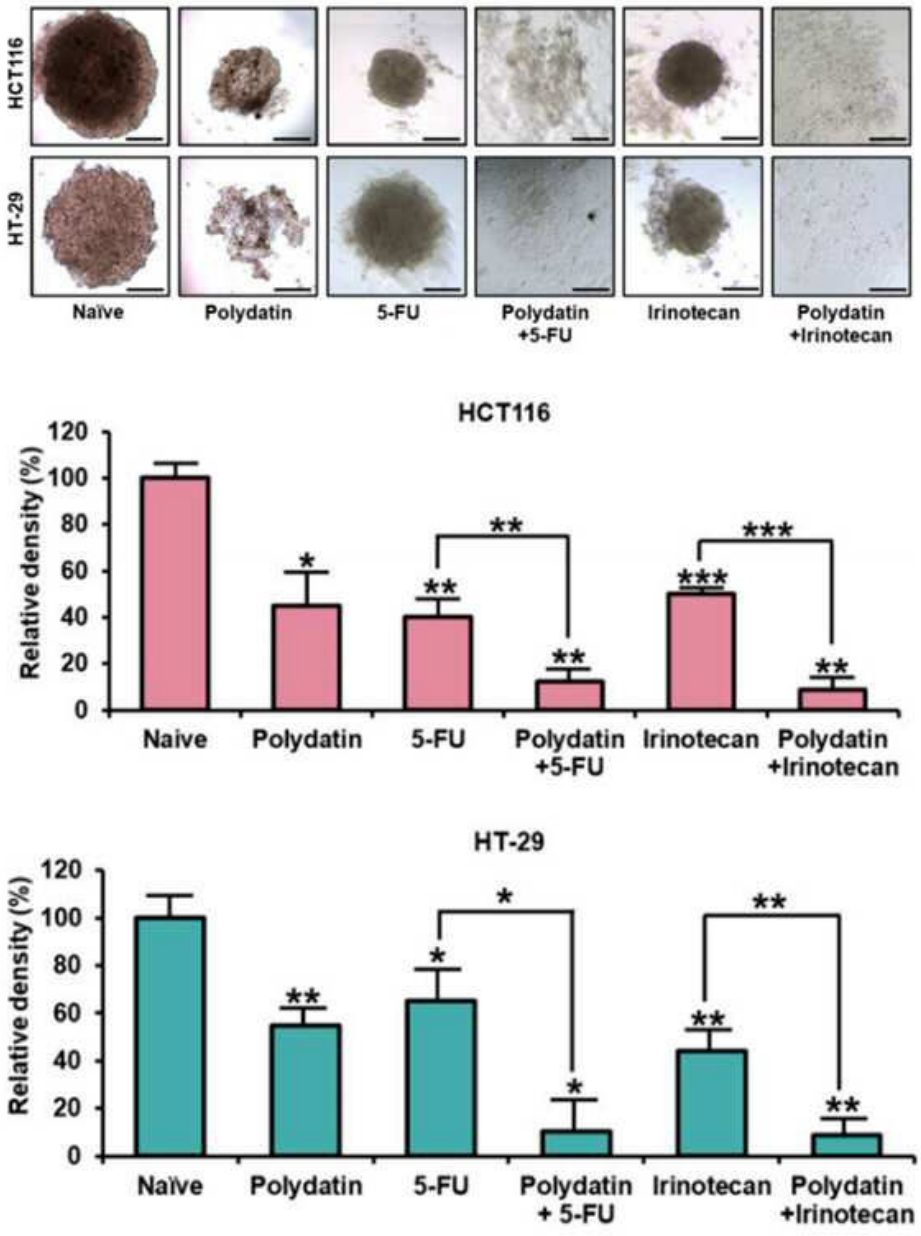
도면6c


HCT116
HT-29
p-P62
t-P62
BECN1
p-ULK1
t-ULK1
ATG5
LC3B
TUBA
0 100 200 300 0 100 200 300
Polydatin (μM)
HCT116
Relative fold change (%)
300
250
200
150
100
50
0
p-P62
BECN1
p-ULK1
ATG5
LC3B
Polydatin (μM) 0 100 200 300
HT-29
Relative fold change (%)
300
250
200
150
100
50
0
p-P62
BECN1
p-ULK1
ATG5
LC3B
Polydatin (μM) 0 100 200 300

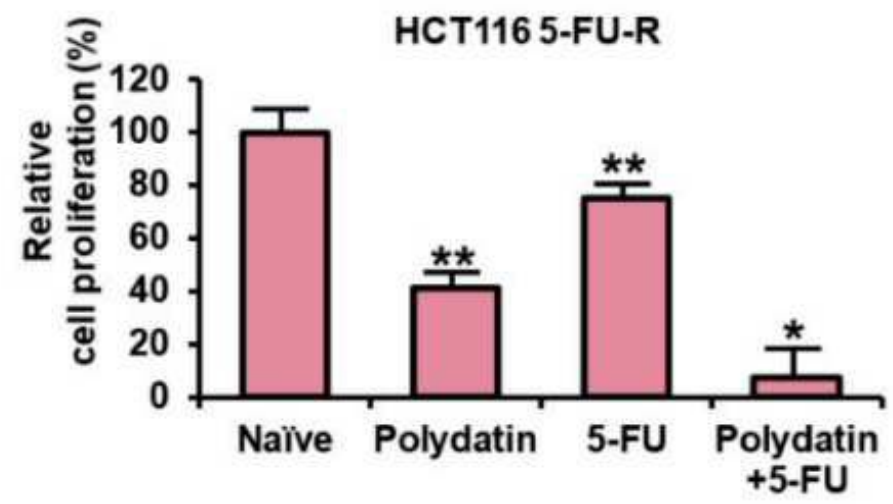
도면7a


HCT116
HT-29
Relative cell proliferation (%)
0
20
40
60
80
100
120
Naïve
Polydatin
5-FU
Polydatin +5-FU
Irinotecan
Polydatin +Irinotecan
*
**

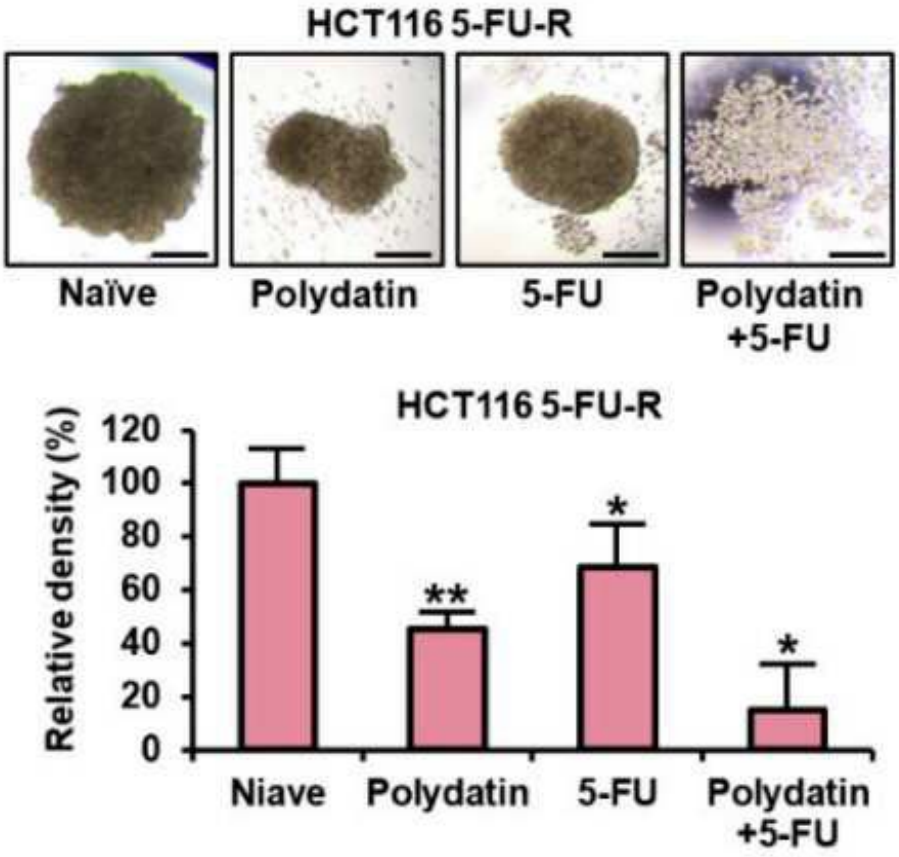
도면7b


HCT116
HT-29
Naïve
Polydatin
5-FU
Polydatin +5-FU
Irinotecan
Polydatin +Irinotecan
HCT116
Relative density (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
**
**
**
***
***
**
Naïve
Polydatin
5-FU
Polydatin +5-FU
Irinotecan
Polydatin +Irinotecan
HT-29
Relative density (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
*
*
*
**
**
**
Naïve
Polydatin
5-FU
Polydatin + 5-FU
Irinotecan
Polydatin +Irinotecan

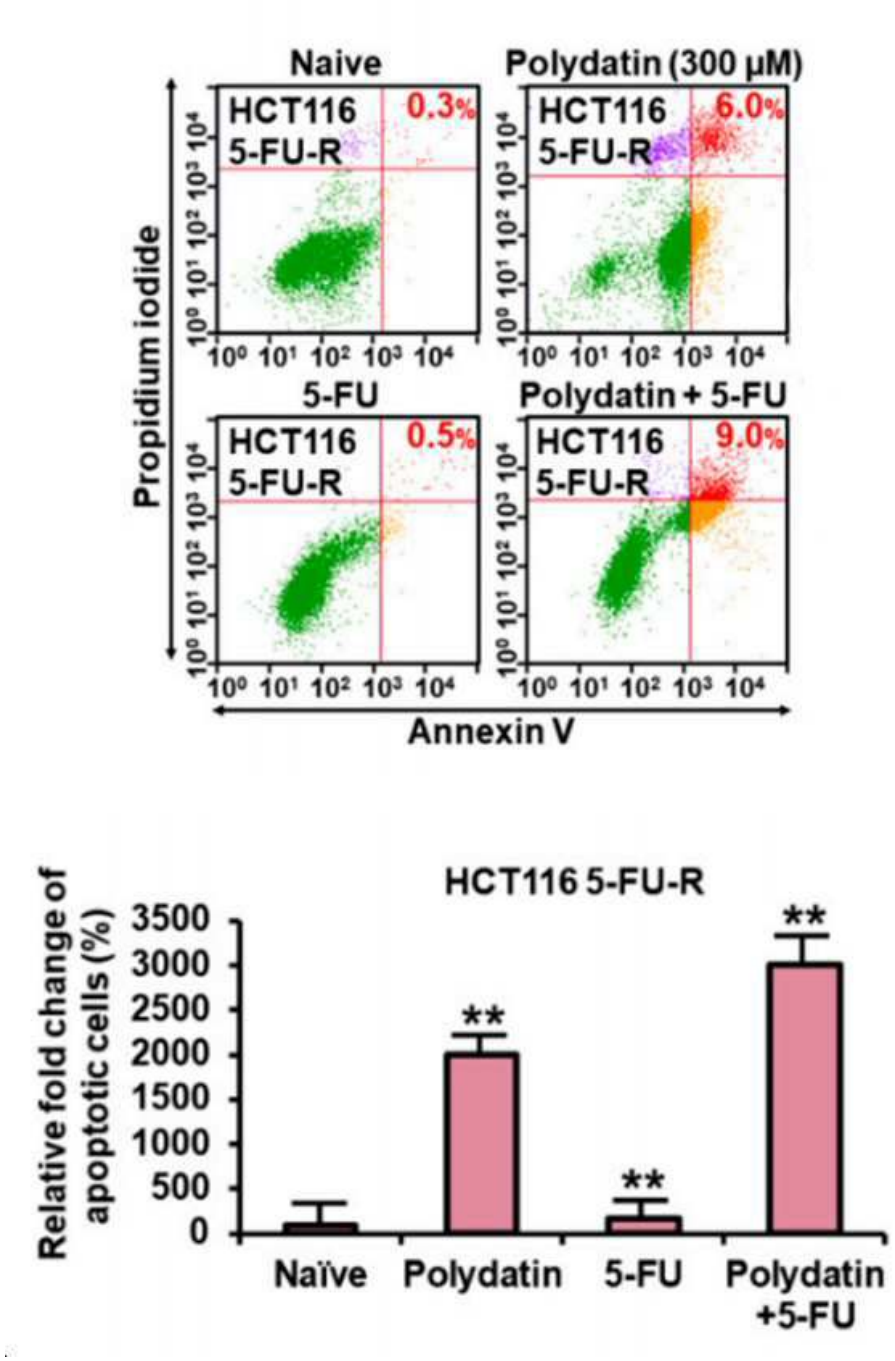
도면8a


HCT116 5-FU-R
Relative cell proliferation (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
*
Naïve
Polydatin
5-FU
Polydatin +5-FU

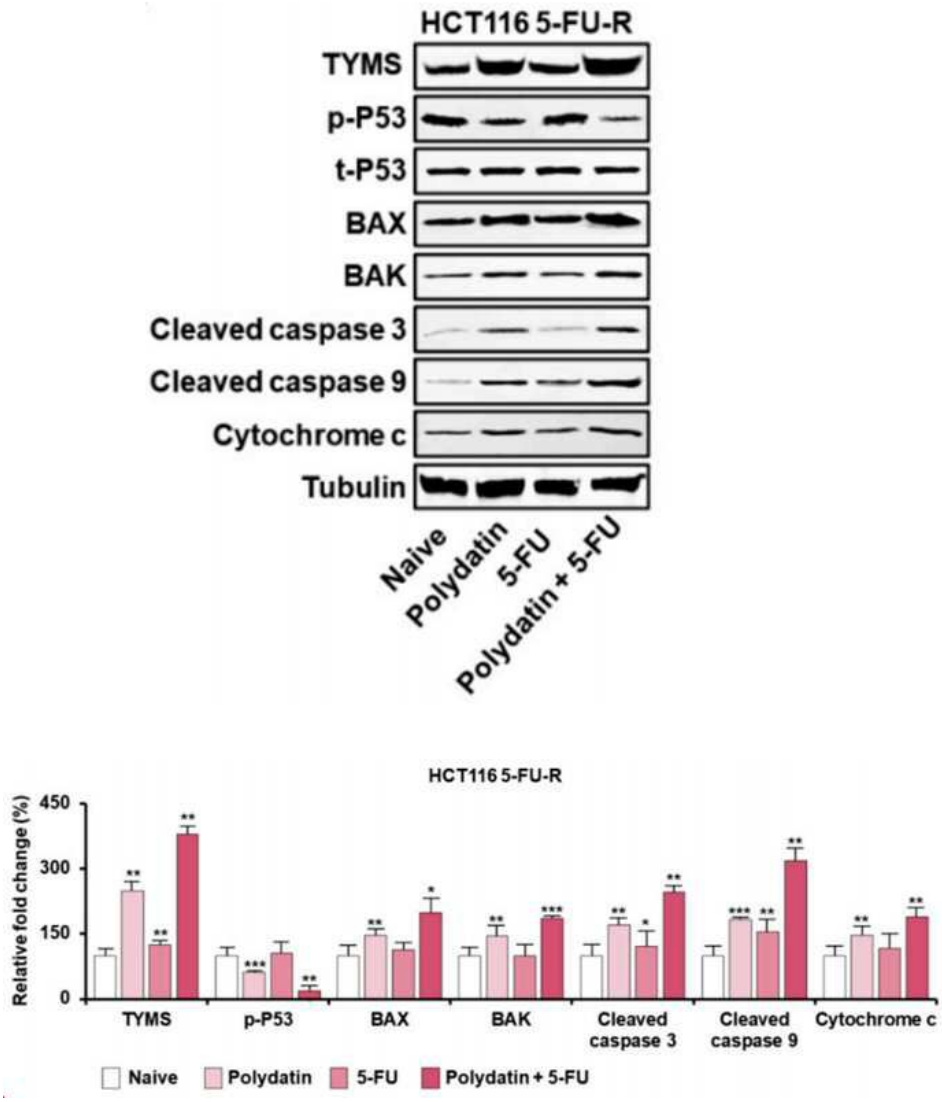
도면8b


HCT116 5-FU-R
Naïve
Polydatin
5-FU
Polydatin +5-FU
HCT116 5-FU-R
Relative density (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
*
*
Niave
Polydatin
5-FU
Polydatin +5-FU

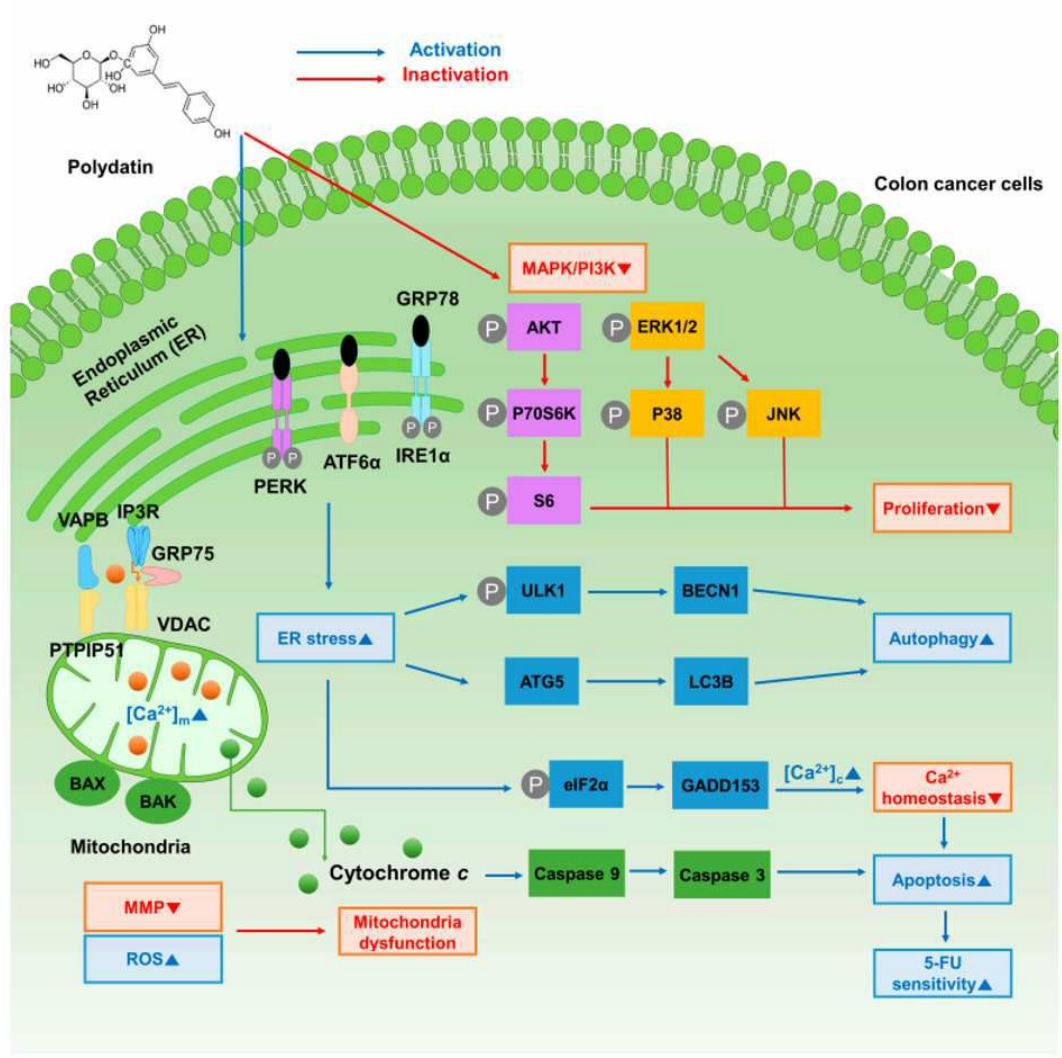
도면8c


Naive
Polydatin (300 μM)
5-FU
Polydatin + 5-FU
HCT116
5-FU-R
0.3%
6.0%
0.5%
9.0%
Propidium iodide
Annexin V
HCT116 5-FU-R
Relative fold change of apoptotic cells (%)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
**
Naïve
Polydatin
5-FU
Polydatin +5-FU

도면8d


HCT116 5-FU-R
TYMS
p-P53
t-P53
BAX
BAK
Cleaved caspase 3
Cleaved caspase 9
Cytochrome c
Tubulin
Naive
Polydatin
5-FU
Polydatin + 5-FU
HCT116 5-FU-R
Relative fold change (%)
450
300
150
0
TYMS
p-P53
BAX
BAK
Cleaved caspase 3
Cleaved caspase 9
Cytochrome c
Naive
Polydatin
5-FU
Polydatin + 5-FU

도면9


Activation
Inactivation
Polydatin
Colon cancer cells
MAPK/PI3K▼
GRP78
AKT
ERK1/2
Endoplasmic Reticulum (ER)
P70S6K
P38
JNK
ATF6α
IRE1α
PERK
S6
Proliferation▼
VAPB
IP3R
GRP75
VDAC
ULK1
BECN1
ER stress▲
Autophagy▲
PTPIP51
ATG5
LC3B
[Ca2+]m▲
BAX
BAK
eIF2α
GADD153
[Ca2+]c▲
Ca2+ homeostasis▼
Mitochondria
Cytochrome c
Caspase 9
Caspase 3
Apoptosis▲
MMP▼
ROS▲
Mitochondria dysfunction
5-FU sensitivity▲