(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0045079
(43) 공개일자 2021년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0128379
(22) 출원일자 2019년10월16일
심사청구일자 2019년10월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 동남구 문암1길 68, 105동 1402호
임화선
서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호
박선우
서울특별시 강동구 양재대로 1340, 421동 305호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 8 항

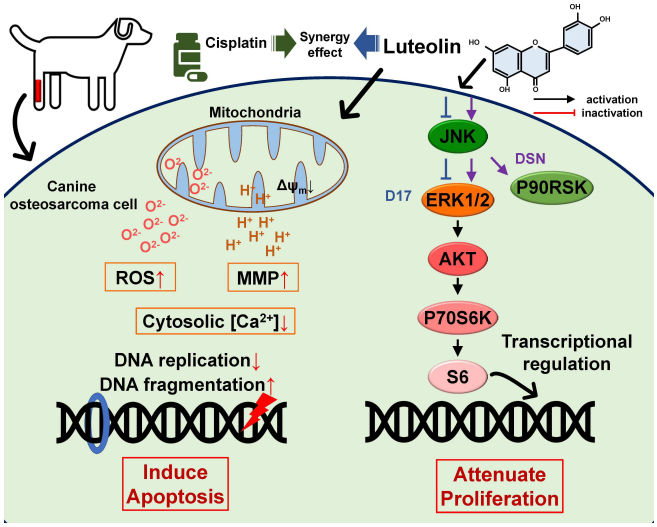
(54) 발명의 명칭 **루테올린을 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 골육종 세포주의 증식을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시킬 수 있는바, 골육종을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C0810010017
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 염증성 조산 치료 및 신생아의 뇌손상 치료를 위한 태아 유래 중간엽 줄기세포 치료제 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.09.07 ~ 2018.09.06
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

명 세 서

청구범위

청구항 1

루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 루테올린이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

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

청구항 4

루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 루테올린이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

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

청구항 7

루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 증식을 억제시키는 방법.

청구항 8

루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골육종은 뼈에 생기는 가장 흔한 원발성 악성 종양으로, 개에서는 대략 85~98%로 발생하며, 사람과 개 모두 팔다리 골격에서 외골격까지 다양한 골격에서 발생하는 것으로 알려져 있다(Morello *et al.*, Vet J,

2011:Szewczyk *et al.*, Vet Res Commun, 2015).

[0003] 골육종을 치료하기 위한 기존 방법으로는 수술, 방사선치료, 면역요법, 항암화학요법 등이 보고되었으며(Brodey and Abt, J Am Vet Med Assoc, 1976:Walter *et al.*, Vet Comp Oncol, 2005), 그 중 항암 화학요법으로서 독소루비신, 시스플라틴, 카보플라틴 또는 이들을 조합하여 사용한 치료방법은 생존율을 향상시키는 방법으로 알려져 있으나, 약제의 독성으로 인한 부작용의 문제점이 존재한다.

[0004] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 새로운 골육종 치료제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 천연물 유래 물질인 루테올린(luteolin)이 골육종 세포주의 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도함으로써 골육종에 대한 치료 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 본 발명은 또한, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 또한, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 증식을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 또한, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 증식을 억제시키는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 골육종 세포주의 증식을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시킬 수 있는바, 골육종을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 골육종 세포주 증식 및 세포 주기에 루테올린이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 골육종 세포주의 세포 사멸에 루테올린이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 골육종 세포 내 루테올린 처리에 따른 미토콘드리아 막 전위, 활성산소, 세포질의 칼슘 이온 양 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 골육종 세포 내 루테올린 처리에 따른 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 단백질의 인산화 양상 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 골육종 세포주에서 루테올린과 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 단백질 표적 억제제의 병용 처리에 따른 신호전달 단백질 인산화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 루테올린과 시스플라틴의 병용 처리거 골육종 세포주의 세포 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타

낸 것이다.

도 7은 루테올린에 의한 골육종 세포주의 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

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.

[0017] 본 발명에서는 루테올린의 골육종 세포 내 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 7).

[0018] 본 발명은 일 관점에서 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 다른 관점에서 루테올린을 유효성분으로 포함하는 골육종 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 골육종 세포는 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 삵쾡이), 토끼목(토끼 및 우는 토끼), 식충목(예를 들어, 고슴도치, 두더지 및 솔레노돈) 및 영장목(예를 들어, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 보노보노, 일본원숭이, 붉은털원숭이)일 수 있다.

[0023] 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.

[0024] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 할 수 있고, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화 방지제, 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.

[0025] 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.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 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, 방

부제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분들을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따르면, 상기 루테올린이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따르면, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0031] 본 발명에 따르면, 상기 루테올린은 활성산소종을 발생시키고, 미토콘드리아 막전위의 탈분극을 유도하여, 세포질의 칼슘 이온을 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0033] 본 발명은 또 다른 관점에서, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 증식을 억제하는 방법에 관한 것이다.

[0034] 본 발명은 또 다른 관점에서, 루테올린을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 골육종 세포주의 세포 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0036] 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.

[0037] **실험방법**

[0038] 세포배양

[0039] D-17, DSN 세포주는 개 골육종 상피세포로부터 기원한 세포로 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 Minimum Essential Medium (Cat No. SH30024.01)에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다. 세포는 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양되었으며 루테올린을 처리하기 전 24시간 동안 기아상태를 유지하였다.

[0041] 실험 재료

[0042] 후보 조성물질인 루테올린과 골육종 치료제인 시스플라틴은 Sigma로부터 구매하여 사용하였으며, 루테올린에 의한 신호전달기작을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, S6, JNK, P38 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, S6, JNK, P38 단백질을 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다. 이 외, 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.

[0044] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0045] 개의 골육종 세포에 대한 루테올린 또는 시스플라틴의 증식 억제 효과를 확인하기 위하여, FBS 기아 조건으로 배양한 BD17, DSN 세포주에 루테올린을 용량 의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 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 후 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.

[0047] 면역형광법을 이용한 세포 증식 마커 확인

[0048] 3×10^4개의 D17 및 DSN 세포를 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 루테올린 50 μM을 24시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μg/ml의 PCNA 항체를 처리하여 4℃에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A-11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간동안 배양하였다. 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 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.

[0050] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0051] 루테올린 처리에 의한 개의 골육종 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 3×10^5 세포를 6 well에 배양하고, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 루테올린을 용량 의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50 μM) 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1× binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음으로 200 μL의 1× binding buffer으로 세포현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μL 넣고 Annexin V 5 μL, PI 5 μL를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후 1× binding buffer를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0053] TUNEL assay를 통한 DNA 분절화 측정

[0054] 3×10^4개의 골육종 세포주를 confocal dish (catalog number: 100350, SPL) 에 배양한 후, 24시간 serum 기아상태로 추가로 배양하여 루테올린 50 μM을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 한번 헹궈내고 0.1% sodium citrate에 0.1% Triton X-100가 함유된 용액을 사용하여 아이스 위에서 2분간 인큐베이션 시켰다. 다음으로 In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche) 에 포함된 TUNEL staining mixture를 사용하여 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 PBS로 헹구고 DAPI를 염색한 후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0056] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0057] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (Mitochondria Membrane Potential) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 3×10^5개의 D17 및 DSN 세포를 6 well에 배양하고, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 루테올린을 용량 의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50 μM) 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 JC-1 staining solution 에 풀어준 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0059] DCFH-DA를 이용한 세포내 ROS 측정

[0060] 개의 골육종 세포주내 ROS 생성에 루테올린이 미치는 영향을 확인하기 위하여 peroxide 존재 하에 2',7'-dichlorofluorescin (DCF)로 변환되어 형광을 띠는 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA, Sigma)를 이용하였다. 세포를 트립신을 통해 떼어내고 원심분리를 통해 세포 pellet을 얻은 후 PBS로 한번 워싱하고 10 μM의 DCFH-DA를 37℃ 인큐베이터 내에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 이후, 세포를 PBS에 의해 두 번 워싱하

고 루테올린을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50 μM) 1시간 동안 37℃ 인큐베이터 내에서 인큐베이션하였다 .처리된 세포를 PBS로 다시 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 DCF 형광 강도를 분석하였다.

[0062] 세포질 내 칼슘 이온 농도 변화 확인

[0063] D17 및 DSN 세포의 세포질 내 칼슘 이온 농도는 칼슘에 결합하는 fluo-4 dye의 형광 염색을 통해 확인하였다. 3×10^5개의 세포를 세포주별로 6 well에 배양하고, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 루테올린을 용량 의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50 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.

[0065] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0066] D17 및 DSN 세포주에 루테올린 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) 시약, ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0068] 통계분석

[0069] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0071] **결과 및 고찰**

[0072] 루테올린이 개의 골육종 세포에 보이는 세포 증식억제 효과 확인

[0073] 루테올린이 개의 골육종 세포주 D17, DSN 세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 루테올린을 용량 의존적으로(0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 추가한 배양액으로 48시간 배양하였으며, 이후 BrdU를 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 그 결과, 대조군에 비하여 50 μM 루테올린을 처리한 D17과 DSN의 증식력이 20% ($P < 0.001$)로 감소하였다 (도 1A, 1B). 이러한 효과는 50 μM 루테올린을 24 시간 처리한 세포 내 핵 내 증식 마커인 PCNA가 감소하는 것을 통해 다시한번 증명되었다 (도 1C, 1D). 뿐만 아니라, 루테올린의 용량 의존적 처리는 (0, 5, 10, 20, 50 μM) D17과 DSN의 세포주기를 sub G0/G1기에 멈추게 함으로써 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다 (도 1E, 1F).

[0075] 루테올린이 개의 골육종 세포의 사멸에 미치는 영향 확인

[0076] 루테올린이 D17과 DSN 세포 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여 루테올린을 용량 의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50 μM) 처리한 배양액에서 두 세포주를 48시간 배양한 후, Annexin V & PI 염색을 통해 사멸한 세포의 수를 확인하였다. 이를 수치화 하였을 시 대조군과 비교하여 50 μM 루테올린을 처리한 D17과 DSN의 세포 사멸은 각각 150% ($p < 0.05$)와 266% ($p < 0.01$) 증가하였다 (도 2A, 2B). 또한, 48시간의 50 μM 루테올린 처리는, 대조군에서와 달리 두 골육종 세포주의 DNA 분절화 (DNA fragmentation)을 유발하여 세포를 사멸시키는 것으로 확인되었다 (도 2C, 2D).

[0078] 루테올린의 적용에 따른 골육종 세포주 내 세포소기관 및 이온 변화

[0079] 개의 골육종 세포주 내 루테올린 처리에 따른 마이토콘드리아 막 전위 변화를 측정하기 위해 루테올린을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50 μM) 48시간 처리한 후, JC-1 염색을하였다. 유세포 측정기를 통해 관찰된 마이토콘드리아 막 탈분극은 루테올린의 용량의존적 처리에 따라 D17에서는 2053%, DSN에서는 4897% 증가하는 것을 확인하였다 (도 3A, 3B). 또한, 유세포 측정기를 통해 측정한 두 세포주의 세포질 내 DCF 형광 역시 D17에서는 191%, DSN에서는 300% 증가하여, 루테올린 처리가 활성 산소를 증가시킨다는 것을 확인하였다 (도 3C, 3D). 뿐만 아니라, 루테올린은 D17, DSN 세포주 내 세포질 칼슘 이온을 각각 65%, 95% 이상 감소시켰다 (도 3E, 3F).

[0081] 루테올린의 적용에 따라 개의 골육종 세포주 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 단백질의 인산화 변화 확인

[0082] D17 및 DSN 세포주 내 루테올린의 용량의존적 처리에 따른 세포 내 신호전달 단백질의 인산화 변화를 확인하기 위하여 웨스턴블롯을 통해 PI3K/AKT 및 MAPK 경로 단백질을 확인하였다. 그 결과, 두 세포주에서 모두 AKT, P70S6K, S6의 인산화를 감소시켰으며 (도 4A-4C), ERK1/2의 인산화는 증가시켰다 (도 4D). P38 MAPK는 두 세포주에서 모두 루테올린 처리에 따른 변화가 없었으며 (도 4E), JNK (도 4F)와 P90RSK (도 4G)는 D17에서 감소하고 DSN에서는 증가하였다. 이를 통해 루테올린이 개의 골육종 세포주에서 신호 전달 단백질의 활성을 조절하여 세포의 증식 및 사멸을 조절한다는 것을 확인하였다.

[0084] 루테올린과 AKT, ERK1/2, P38, JNK 인산화 억제제의 병용 처리를 통한 신호전달 단백질 인산화 양상 분석

[0085] D17 및 DSN 세포주 내 루테올린 처리에 의해 변하는 세포 내 신호전달 기전을 분석하기 위하여 루테올린과 AKT 억제제 (LY294002), ERK1/2 억제제 (U0126), JNK 억제제 (SP600125)를 각각 병용처리 하여, 각 단백질의 인산화 양상을 웨스턴블롯으로 확인하였다. 그 결과, 루테올린에 의해서 두 세포주에서 감소한 AKT와 P70S6K, S6는 모두 LY294002와 U0126에 의해 추가적으로 인산화가 감소하였다 (도 5A-5C). 반면, 루테올린에 의해 인산화가 증가하였던 ERK1/2는 D17에서는 LY294002와 U0126에 의해서만, DSN에서는 모든 억제제에 의해 인산화의 감소가 나타났다 (도 5D). D17에서 루테올린에 의해 감소하고, DSN에서 루테올린에 의해 증가했던 JNK의 인산화는 두 세포주에서 모두 SP600125에 의해서만 감소하였다 (도 5F). JNK와 유사하게 D17에서 인산화가 감소하고, DSN에서 인산화가 증가하였던 P90RSK 단백질은 D17에서는 어떠한 억제제도 추가적인 감소를 유도하지 못했으며, DSN에서는 SP600125에 의해 감소함을 보였다 (도 5G). 이와 같은 결과들을 통해 루테올린이 개의 골육종 세포주 내 세포 증식 및 사멸에 관여하는 PI3K/AKT 및 MAPK 경로 단백질들을 조절하여 골육종 세포주의 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

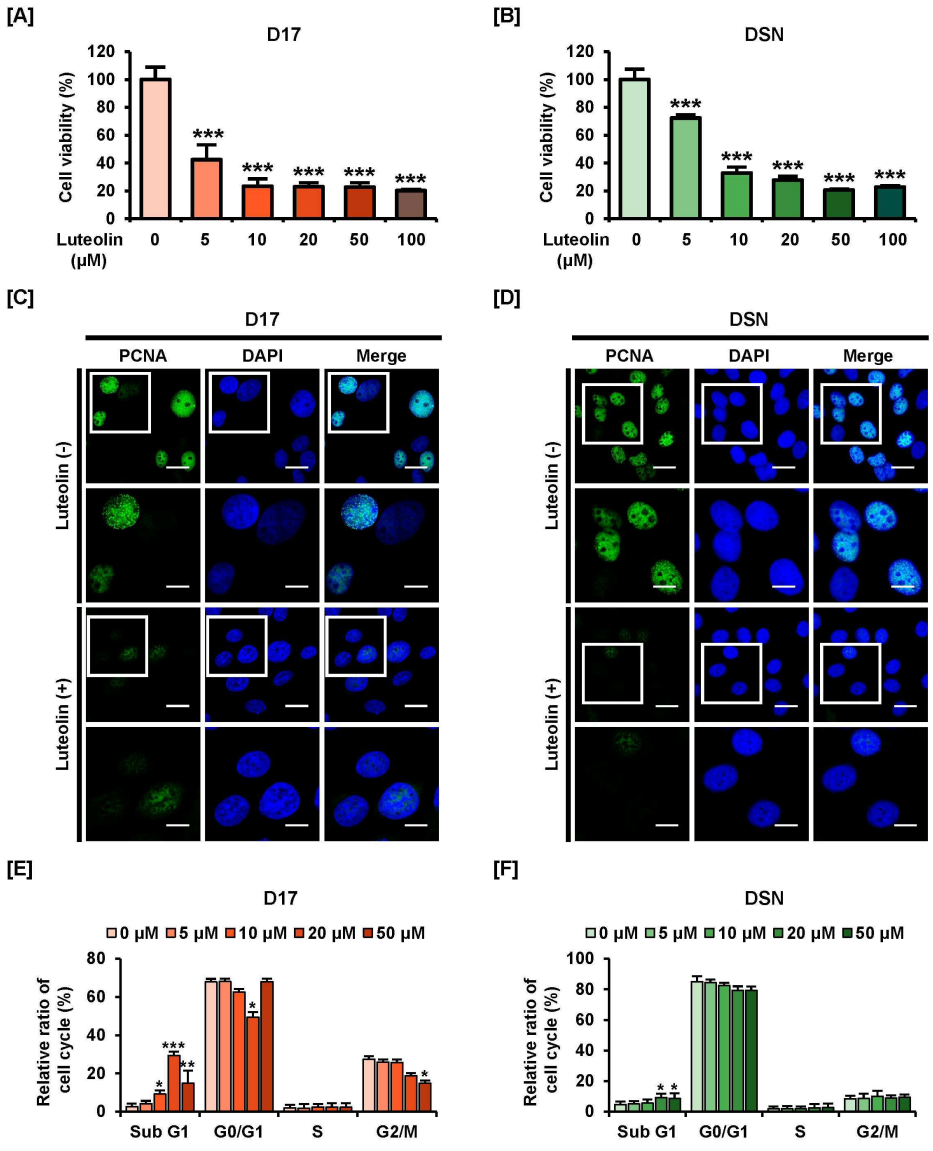
[0087] 루테올린과 시스플라틴 병용 처리를 통한 골육종 세포주의 증식 억제 효과

[0088] 추가적으로, 개의 골육종에 현재 사용되고 있는 시스플라틴을 D17 및 DSN에 처리하여 루테올린의 세포 증식 억제 효과와 비교 및 병용처리를 통한 추가적인 세포 억제 효과를 확인하였다 (도 6). 먼저, 시스플라틴의 용량의존적 처리는 D17과 DSN 세포주의 세포 증식을 점진적으로 감소시키는 것으로 나타났다 (도 6A, 6B). 또한, 루테올린은 10 μM 시스플라틴 단독 처리보다 골육종 세포의 증식을 효과적으로 억제하였고, 루테올린과 시스플라틴의 병용처리는 두 세포주 모두 루테올린 단독 처리에 비해 뚜렷한 증식 억제 효과를 나타내지 못했다 (도 6C, 6D).

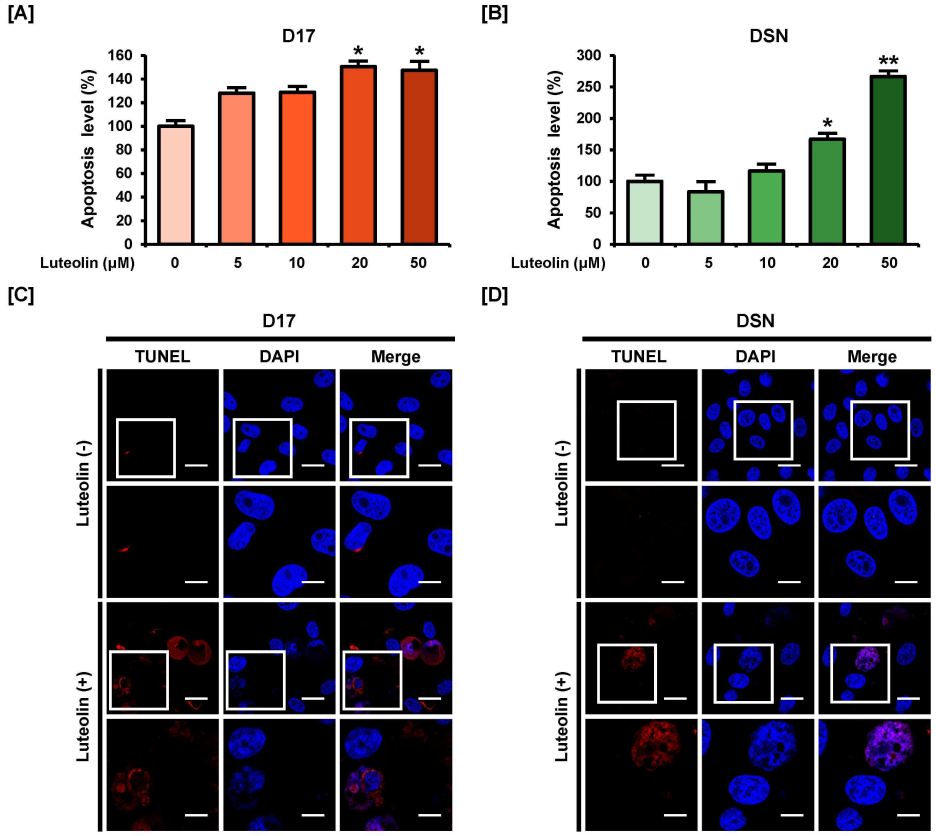
[0090] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

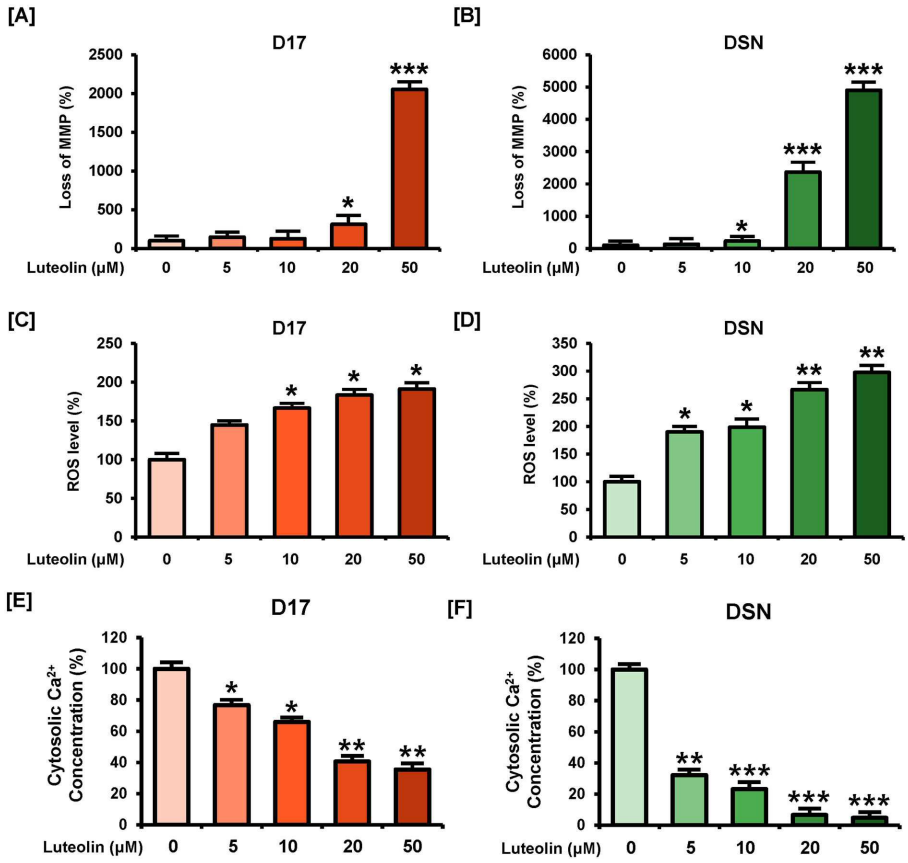
도면1


[A]
D17
Cell viability (%)
Luteolin (μM)
[B]
DSN
[C]
D17
PCNA
DAPI
Merge
Luteolin (-)
Luteolin (+)
[D]
DSN
[E]
D17
0 μM 5 μM 10 μM 20 μM 50 μM
Relative ratio of cell cycle (%)
Sub G1
G0/G1
S
G2/M
[F]
DSN

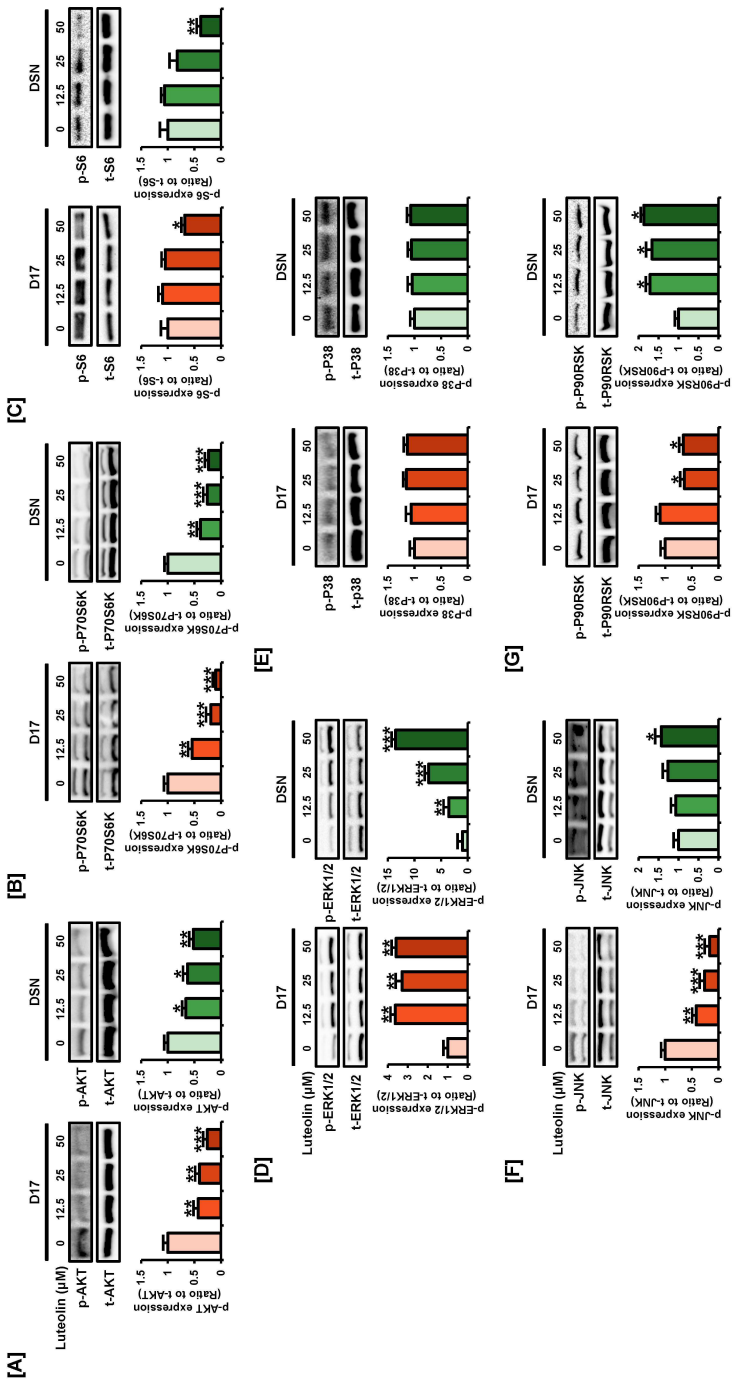
도면2


[A]
D17
Apoptosis level (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
*
Luteolin (μM) 0 5 10 20 50
[B]
DSN
Apoptosis level (%)
300
250
200
150
100
50
0
*
**
Luteolin (μM) 0 5 10 20 50
[C]
D17
TUNEL
DAPI
Merge
Luteolin (-)
Luteolin (+)
[D]
DSN
TUNEL
DAPI
Merge
Luteolin (-)
Luteolin (+)

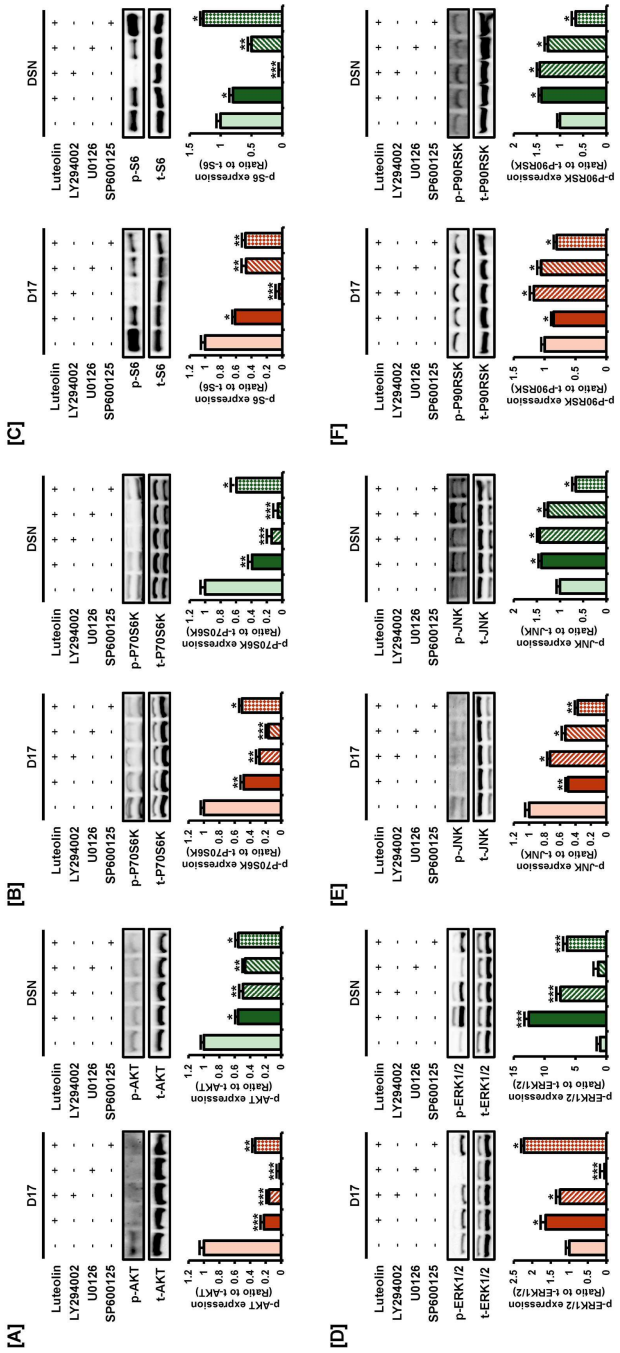
도면3


[A]
D17
Loss of MMP (%)
2500
2000
1500
1000
500
0
***
*
Luteolin (μM) 0 5 10 20 50
[B]
DSN
Loss of MMP (%)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
***
*
Luteolin (μM) 0 5 10 20 50
[C]
D17
ROS level (%)
250
200
150
100
50
0
*
*
*
Luteolin (μM) 0 5 10 20 50
[D]
DSN
ROS level (%)
350
300
250
200
150
100
50
0
**
**
*
*
Luteolin (μM) 0 5 10 20 50
[E]
D17
Cytosolic Ca2+ Concentration (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
*
**
**
Luteolin (μM) 0 5 10 20 50
[F]
DSN
Cytosolic Ca2+ Concentration (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
***
***
***
Luteolin (μM) 0 5 10 20 50

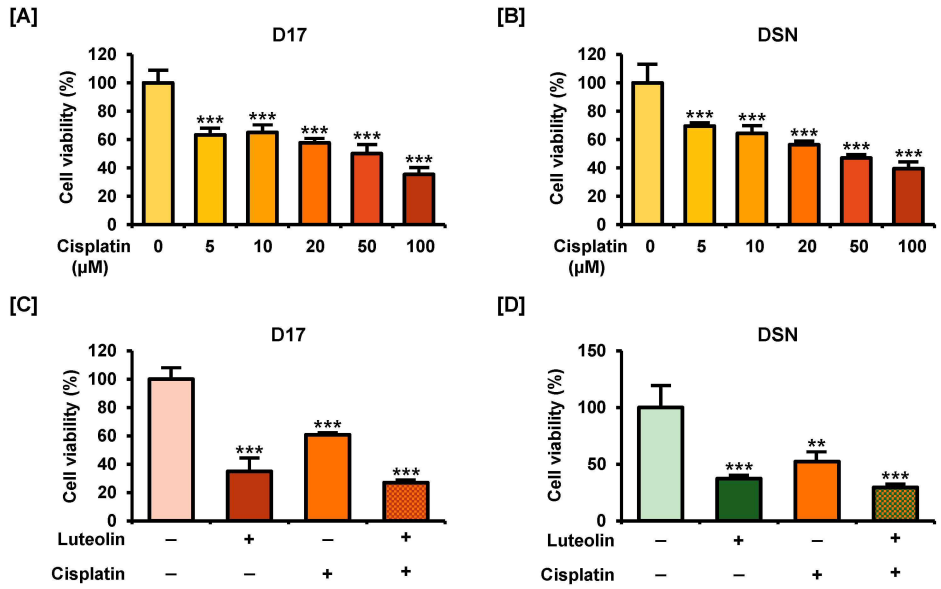
도면4


[A]
Luteolin (μM)
D17
DSN
0
12.5
25
50
p-AKT
t-AKT
p-AKT expression (Ratio to t-AKT)
[B]
p-P70S6K
t-P70S6K
p-P70S6K expression (Ratio to t-P70S6K)
[C]
p-S6
t-S6
p-S6 expression (Ratio to t-S6)
[D]
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-ERK1/2 expression (Ratio to t-ERK1/2)
[E]
p-P38
t-p38
p-P38 expression (Ratio to t-P38)
[F]
p-JNK
t-JNK
p-JNK expression (Ratio to t-JNK)
[G]
p-P90RSK
t-P90RSK
p-P90RSK expression (Ratio to t-P90RSK)

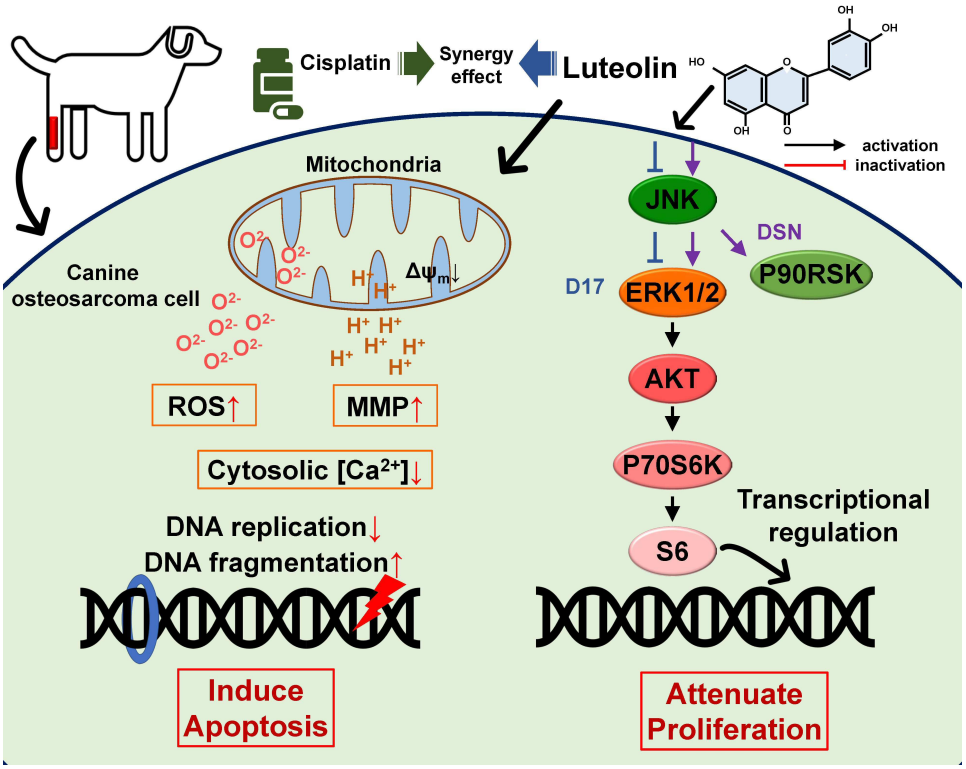
도면5


[A]
[B]
[C]
[D]
[E]
[F]
D17
DSN
Luteolin
LY294002
U0126
SP600125
p-AKT
t-AKT
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-JNK
t-JNK
p-P90RSK
t-P90RSK
p-AKT expression (Ratio to t-AKT)
p-P70S6K expression (Ratio to t-P70S6K)
p-S6 expression (Ratio to t-S6)
p-ERK1/2 expression (Ratio to t-ERK1/2)
p-JNK expression (Ratio to t-JNK)
p-P90RSK expression (Ratio to t-P90RSK)

도면6


[A]
D17
Cell viability (%)
Cisplatin (μM)
[B]
DSN
[C]
Luteolin
Cisplatin
[D]

도면7


Cisplatin
Synergy effect
Luteolin
activation
inactivation
Mitochondria
Canine osteosarcoma cell
ROS↑
MMP↑
Cytosolic [Ca2+]↓
DNA replication↓
DNA fragmentation↑
Induce Apoptosis
JNK
DSN
P90RSK
D17
ERK1/2
AKT
P70S6K
S6
Transcriptional regulation
Attenuate Proliferation