(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0049667
(43) 공개일자 2009년05월19일

(51) Int. Cl.
A61K 31/00 (2006.01) *A61K 33/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0115852
(22) 출원일자 2007년11월14일
심사청구일자 2007년11월14일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
김명옥
경남 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호
박종윤
경남 진주시 칠암동 경상대학교 의과대학 의학과
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

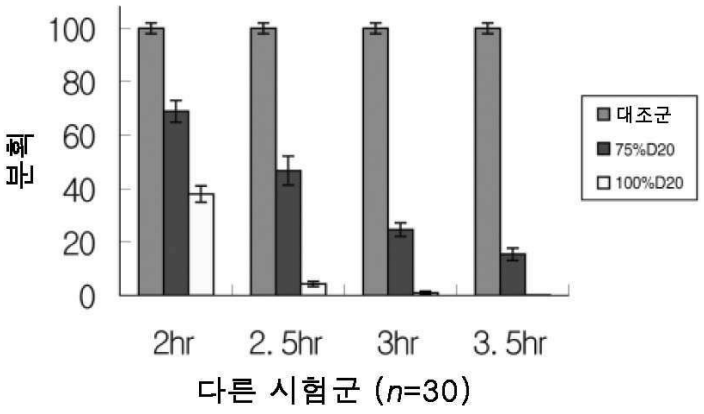
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 아폽토시스 조절 인자에 영향을 주는 산화중수소 방광암항암제

(57) 요 약

본 발명은 아폽토시스 조절 인자인 bcl-2 및 bax의 발현 조절을 통해 방광 암세포에 유효한 활성을 지니는 산화중수소를 포함하는 방광암 항암제를 제공한다. 또한 본 발명의 산화중수소의 농도는 75~100%이고 방광 암세포에 대한 시험관 내 노출시간은 2~3.5시간임을 특징으로 한다.

대 표 도



(72) 발명자

박태주

미국 위스콘신주 53706 엘름 드라이브 매디슨 625 스노우 콜 425

이혜령

경남 진주시 가좌동 900번지 경상대학교 대학원응용생명과학부

특허청구의 범위

청구항 1

아폽토시스 조절 인자인 bcl-2 및 bax의 발현 조절을 통해 방광 암세포에 유효한 활성을 지니는 산화중수소를 포함하는 방광암 항암제

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 산화중수소의 농도는 75~100%이고 방광 암세포에 대한 시험관 내 노출시간은 2~3.5시간임을 특징으로 하는 산화중수소를 포함하는 방광암 항암제

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 산화중수소는 방광 암세포 내에서 bcl-2의 발현을 감소시키고 bax의 발현을 증가시켜 방광 암세포의 사멸을 유도함을 특징으로 하는 산화중수소를 포함하는 방광암 항암제

청구항 4

75~100%의 산화중수소를 유효성분으로 함유하고 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 방광암 항암제 조성물

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 아폽토시스 조절 인자에 영향을 주는 산화중수소 방광암 항암제에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 아폽토시스 조절 인자인 bcl-2 및 bax의 발현 조절을 통해 방광 암세포에 유효한 활성을 지니는 산화중수소를 포함하는 방광암 항암제에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 방광암은 많은 나라의 2가지 가장 일반적인 비뇨기과 암 중의 하나이고 방광 점막은 요로상피 주로 이행상피로 덮여있다. 방광암의 생물학적 특성은 높은 재발율 및 표재율이다. 높은 재발율의 원인은 간단하지 않으나 높은 표재율은 생명 위협 효과를 지닌다. 각 기관 내 요로상피는 유사한 암 원인 또는 위험 인자를 지닌다.

<3> H_2O에서 수소(^1H)의 듀테늄(^2H)으로의 교체는 산화중수소(D_2O, 중수)를 유발한다. D_2O가 원자로 내 1차 냉각수 및 감속재로 사용되고 있으나 인간의 일부 생리적 상태의 측정에도 사용되었다. D_2O는 양성 및 악성 세포 및 조직 모두에서 일부 독성적인 생물학적 효과를 지닌다. 실험 동물 내에서 D_2O의 독성은 동물 투여 함량이 총 유체 흡수 함량의 25% 이하인 경우 유의적이지 않았다. D_2O 독성 메커니즘은 DNA 및 RNA 합성의 교란 및 유사분열 및 멤브레인 기능의 손상으로 인해 저지된 세포주기를 유도한다. 암세포와 관련한 세포독성 및 세포증식 억제 효과에 관한 연구는 오랜 역사를 지니고 있으나 인간 내 독성은 명확히 확인되지 않았다. 경구 투여 또는 정맥내 주입시 적은 함량의 D_2O 흡수는 인간에게 어떠한 부작용도 지니지 않는다.

<4> 방광암의 진행은 세포 증식 및 사멸의 조절에 관련된 다양한 유전자의 활성 변화에 의해 결정된다. 아폽토시스 비율의 감소 또는 증가는 암의 확대 또는 축소를 촉진시킨다. bcl-2 및 bcl X1과 같은 일부 단백질은 세포 사멸의 차단제인 반면 bax 및 bcl-Xs은 증진제이다. Bax 및 Bcl-2는 아폽토시스 경로와 관련한 중요한 효능 유전자를 지닌다. Bax는 매우 보존된 도메인 Ⅰ 및 Ⅱ에서 bcl-2와 상동성을 지닌 21-KDa 단백질이다. Bcl-2 과발현은 아폽토시스성 세포 사멸의 유도를 억제한다. bcl-2 단백질의 과발현은 방사선 및 거의 모든 화학요법 약물을 포함한 다양한 아폽토시스성 공격을 보호한다. 이러한 암세포 내 bcl-2의 과발현은 아폽토시스 경로의 저해를 통한 시스플라틴의 치료 효과를 방해하는 것으로 보고되었다. bax 단백질은 내인성 약제감수성의 결정인자로서 작용하고, bax-음성 종양 세포의 점진적인 증가는 화학요법-유도된 아폽토시스에 더욱 저항적

이 되도록 하는 선택적 생존력을 부여한다.

<5> 실험 동물 내 D_2O의 낮은 전신성 독성 및 인간 암세포에 대한 낮은 세포독성은 비뇨기암의 치료를 위한 D_2O의 적용 가능성을 제안한다. 본 발명은 요도경유절제술 후 초기 표재성 방광암의 재발 방지 또는 치료를 위한 D_2O의 가능성을 확인하기 위해 세포 증식, bcl-2 및 bax와 관련한 D_2O의 효과를 조사함으로서 방광 암세포에 대한 산화중수소의 항암 효과를 확인함으로서 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 요도경유절제술 후 초기 표재성 방광암의 재발 방지 또는 치료를 위한 D_2O의 가능성을 측정하여 방광 암세포에 대한 항암 활성제를 개발코자 한 것이며, 세포 증식, bcl-2 및 bax와 관련한 D_2O의 항암 활성 효과를 측정함으로서 방광 암세포에 대한 항암 활성제를 개발코자 한 것이다.

과제 해결수단

<7> 본 발명의 목적은 아폽토시스 조절 인자인 bcl-2 및 bax의 발현 조절을 통해 방광 암세포에 유효한 활성을 지니는 산화중수소를 포함하는 방광암 항암제를 제공하는 것이다.

<8> 또한 산화중수소의 농도는 75~100%이고 방광 암세포에 대한 시험관 내 노출시간은 2~3.5시간임을 특징으로 한다.

<9> 한편 산화중수소는 방광 암세포 내에서 bcl-2의 발현을 감소시키고 bax의 발현을 증가시켜 방광 암세포의 사멸을 유도함을 특징으로 한다.

<10> 또한 본 발명의 또다른 목적은 75~100%의 산화중수소를 유효성분으로 함유하고 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 방광암 항암제 조성물를 제공하는 것이다.

효 과

<11> 본 발명의 효과는 요도경유절제술 후 초기 표재성 방광암의 재발 방지 또는 치료를 위한 D_2O의 가능성을 측정하여 방광 암세포에 대한 항암 활성제를 제공하는 것이며, 세포 증식, bcl-2 및 bax와 관련한 D_2O의 항암 활성 효과를 측정함으로서 방광 암세포에 대한 항암 활성제를 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<12> 본 발명은 방광 종양의 요도경유 절제술후 방광내 점적주입용 약물로서의 가능성을 조사하기 위해 bcl-2 및 bax 관련 산화중수소(D_2O)의 항암 효과를 조사하였다. 방광암 세포 T-24가 사용되었고 배양 배지는 H_2O 및 다른 농도인 (D_2O v/v), 0(대조군), 75 및 100%의 D_2O로 제조되었다. 세포는 2, 2.5, 3 및 3.5시간 동안 각각의 D_2O에 노출되었다. 항증식 효과는 정량적 비색 분석(MTT 분석) 및 혈구계에 의해 측정되었다.

<13> 침입 조사는 D_2O 노출 후 변형된 재구성 기저막으로 실행되었다. D_2O와 아폽토시스 사이의 연관성을 평가하기 위해 bcl-2 및 bax에 대한 면역조직화학 염색 및 웨스턴 블럿 분석이 수행되었다. 75% 및 100% D_2O로의 노출시 현저한 세포감소가 관찰되었다. 75% D_2O 내 세포 증식은 2, 2.5, 3 및 3.5 시간의 노출 시간에서의 대조군과 비교시 각각 68.95, 46.77, 24.65 및 14.41%이었다. 100%에서의 비교 비율은 각각의 노출군에서 37.93, 4.30, 1.00 및 0.18%이었다. D_2O 노출 세포의 재구성 기저막으로의 침입은 발생하지 않았다.

<14> 형태학적 세포 조사는 아폽토시스를 나타내었다. bcl-2 및 bax 단백질은 D_2O 노출에 관계없이 대부분의 세포로부터 주목된다. bcl-2의 발현은 75 및 100% D_2O에서의 증가된 노출 시간에 따라 감소되었다. bax의 발현은 두 농도 모두에 대한 증가된 노출 시간에 따라 증가되었다. D_2O는 2.5시간 이상의 장시간 노출시 75 및 100% D_2O에서 항증식 및 항-침입 효과를 지닌다.

<15> 본 발명은 D_2O의 항증식 효과 메커니즘이 아폽토시스에 의해 매개되는 것으로 측정되었다. 또한 D_2O 관련 세포독성 결과는 표재성 방광암의 방광 종양 요도경유절제술 후 방광내 점적주입용 약제로서의 적용 가능한 것이다.

<16> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<17> 세포의 형태

<18> D_2O 처리된 방광 암세포는 대조군과 비교시 형태 상 현저한 변화를 나타내었다. 많은 세포는 배양 플라스크 바닥에 부착되지 않았고 부착된 세포는 알 모양에서 원형 팽창부로 그의 다각형 형태를 소실하였고 세포 내 공포 형성 및 세포핵 응집이 증가되었다. 또한 일부 팽창된 세포의 윤곽이 희미하고 일부는 불규칙하여 아폽토시스 과정을 나타내었으나 일부는 수축되었다. 일부는 세포질의 한면 또는 세포벽에 인접하여 응집된 세포핵을 지녔다. 대조군은 대부분 융합성의 일반적인 다각형 형태를 나타내었고 윤곽 가장자리는 일부 처리과정과 함께 뚜렷하였다.

<19> 세포의 증식

<20> D_2O 노출 후 세포 증식 비율은 정량적 비색 분석(MTT 분석)으로 측정되었고 대조군과 비교되었다. 75% D_2O 내에서의 세포 증식의 평균 비교 비율은 2, 2.5, 3 및 3.5시간의 노출시간에서 대조군과 비교시 각각 68.95, 46.77, 24.65 및 14.41%이었다. 100%에서의 비교 비율은 각각의 노출군에서 37.93, 4.30, 1.00 및 0.18% 이었다(도 1). 100%는 대조군과 비교시 2.5시간 이상부터 상당한 세포감소 및 5% 이상의 암세포 생존율을 나타내었다. 75%에서는 세포감소가 노출시간 증가시 100%와 유사하지는 않았으나 세포 생존율의 상당한 감소가 존재하였다.

<21> 침입 조사

<22> 상단 챔버 내 대부분의 D_2O 노출 세포는 15시간의 후-분주시 부착되지 않고 원형 형태로 부동하였고 일부만이 필터의 상단 표면에 부착되었다. D_2O에 노출된 실험군 내의 세포는 재구성 기저막 내로이 침입을 나타내지 않았다. 대조군은 고배율 시야에서 95.4개 세포를 나타내었다.

<23> 면역조직화학적 염색

<24> bcl-2 및 bax의 면역-양성 세포는 갈색으로 염색되었다. 염색된 bcl-2(도 2C 및 D)의 세포 농도는 bax(도 2A 및 B)보다 낮았다. bcl-2 및 bax 모두의 염색 농도는 서로 달랐다.

<25> 웨스턴 블럿 분석

<26> bcl-2 및 bax 상의 웨스턴 블럿 분석은 D_2O 농도를 기반으로 개별적으로 수행되었다. 75% D_2O에서(도 3) bcl-2 발현은 대조군에서 최대이고 노출시간의 증가에 따라 bcl-2 발현이 감소되었다. 그러나 bax에서는 발현은 대조군에서 최소이고 노출시간 증가에 따라 증가되었다. 100% D_2O에서(도 4) bcl-2는 2시간에서 최대이고 노출시간 증가에 따라 발현이 감소되었다. bax는 2시간의 노출시간에서 최소이고 발현은 노출시간 증가에 따라 증가되었다.

<27> 일반적으로 두 가지의 D_2O 농도 모두에서 bcl-2의 발현은 노출시간의 증가에 따라 감소되었으나 bax의 발현은 노출시간의 증가에 따라 증가되었다.

<28> D_2O는 그의 효율 및 선택성에 관계없이 낮은 독성을 지닌 항암 효과를 지닌 유체이다. D_2O의 항암 효과는 수십년간 연구되었고 다양한 암세포 또는 이종이식도니 암 조직에 대한 그의 반응은 인상적이다. 간암, 췌장암, 위암 및 결장암 또는 조직은 D_2O 처리에 대해 연구되었고 배양되거나 이종이식된 암세포에 대한 그의 세포증식억제 또는 세포독성 효과가 확인되었다. 완전한 D_2O 메커니즘은 아직 확인되지 않았으나 이는 약물 대사 전환 효과를 지니고 일부 항암 약물의 유전적독성을 감소시킨다. 세포독성은 세포주기 저지에 의한 유사분열의 손상, 세포 분열의 간섭, 멤브레인 기능의 손상 및 세포 내 DNA-전구체의 흡수의 억압에 의해 유발된다. 설치류로의 시험관 내 연구는 D_2O 함량이 물 흡수의 총 부피의 25~30% 이하인 경우 실험 동물 내 전신성 독성 효과가 관찰되지 않았음을 나타낸다. 일부 인간 지원자에서 D_2O가 소량으로 경구투여 또는 정맥 내로 주입되었으나 어떠한 독성 효과도 나타내지 않았다. 이러한 연구팀에서 일부 지원자가 75 및 100% 용액을 포함한 D_2O 50 mL까지 포

함한 혼합물을 1주 이상 간격 및 수회 음용하였으나 어떠한 질환도 경험하지 않았다. D_2O의 내성 정도는 종 또는 조직에 따라 다르다.

<29> 본 발명에서는 노출 지속 시간 및 D_2O 농도에 따라 8개의 실험군만을 배치하였다. 이에 따라 본 발명은 재구성 기저막을 통한 세포의 침입 상의 D_2O 효과를 조사하였다. 그 결과 관련된 특정 유전자에 대해 조사하지는 않았으나 D_2O가 대조군과 비교시 전이에 필수적인 세포의 부착 및 침입을 방지하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 암 환자에게 유익할 것이다.

<30> 방광 및 D_2O와 관련된 연구는 매우 희박하다. 본 발명자들은 종전 3가지 주요 비뇨기관 내에서 D_2O에 노출된 암세포의 형태 변화 및 생장 패턴을 조사한 바 있다: 전립샘, 방광 및 신장. 이들 중 방관 암세포가 D_2O에 가장 민감하였고 전립샘 암세포가 가장 둔감하였다. D_2O는 그의 기원에 관계없이 용량 및 노출시간 의존적인 세포독성을 나타내었다. 형태 변화는 정상에서 DNA 무사분열을 나타내는 외형으로 진행되었다.

<31> 크기, 조직학적 형태 및 분화 등급과 같은 병리학적 파라미터 이외에 암 생물학의 예측을 위한 생물학적 마커는 매우 한정적이다. 또한 암의 진행 또는 전이에 대한 위험 인자에 대해서도 마찬가지이다. 방광암의 위험 인자의 예측을 위해 bcl-2 패밀리로의 후향 연구가 임상적 소지에 대해 분석되었다. bcl-2 및 bax 단백질은 정상 세포 및 D_2O 처리 세포에서 검출되었다. 일부는 정상 표본 내 bcl-2 mRNA가 전혀 관찰되지 않은 반면 일부는 66%의 낮은 단계 종양 및 100%의 높은 단계 종양에서 양성적이었다. bax는 62%의 정상, 16%의 낮은 단계 종양 및 14%의 높은 단계에서 양성적이었다. bcl-2/bax 비율은 비-유두 요로상피세포암 내에서 높았고 이는 Bcl-2가 이들 종양에서 과도하다는 결론을 암시한다. 또한 양성 bcl-2가 Ta-T1 요로상피세포암 내에서 높은 재발 확률과 관련되고 bcl-2/bax 비율이 1 이하인 경우 무-재발 시간은 유의적으로 더 긴 것으로 보인다고 보고되었다. Bax는 bax-bcl-2 복합체를 유도하거나 다른 bcl-2 타겟과 경쟁함으로서 bcl-2의 기능을 저해한다. bax 발현이 bcl-2 발현보다 높은 경우 질환의 초기 단계에서 초기 재발에 대해 방어적인 것으로 나타났다. 이러한 연구에 따라 노출시간이 길고 농도가 높을수록 bax의 더 높은 발현 및 bcl-2의 더 낮은 발현이 방광암의 재발에 대한 더 큰 방어를 유도하는 적당한 비율의 bcl-2/bax를 유도한다.

<32> 본 발명은 종전 다른 연구자들에 의해 수행된 바와 같이 각각의 개체 내 시점에서의 정적인 데이터를 해석하는 대신 bcl-2 및 bax의 연속적 변화로서 데이터를 해석하였다. 본 발명에서 점진적으로 증가된 bax 및 감소된 bcl-2 발현은 메커니즘이 아직 규명되지는 않았으나 D_2O가 이들 변화에 중요함을 나타낸다.

<33> 본 발명은 2가지 다른 농도에서의 bcl-2 및 bax의 발현을 조사하였다. bcl-2의 발현은 75% D_2O 보다 100% D_2O에서 더 낮았고 동일한 농도에서 노출시간 증가시 발현이 감소되었다. bax의 발현은 100% D_2O보다 75% D_2O에서 더 낮았고 동일한 농도에서 노출시간 증가시 발현은 증가되었다. 본 발명의 단백질의 일반적인 패턴은 D_2O의 농도 증가 또는 노출시간 증가가 전-아폽토시스성 유전자 발현을 증가시키고 항-아폽토시스성 유전자 발현을 감소시킴을 나타낸다. 이는 예측에 적당하고 D_2O가 표재성 방광암의 치료에 사용될 수 있는 가능성을 나타낸다.

<34> 대부분의 표재성 방광암은 요도경유절제술(TUR)에 의해 치료된다. TUR의 기본 원리는 가시성 종양의 완전한 절제이다. 방광 종양의 TUR후 절제 사이트의 완전한 회복이 이루어진 경우 순환계 내로의 세척제의 흡수는 최소가 되거나 전혀 이루어지지 않게 된다. 수술후(TUR 후) 항암제 또는 면역자극제의 방광내 점적주입은 표재성 방광암의 재발 지연 또는 방지를 위한 일반적인 절차이다. 마이토마이신 C, 티오테파, 아드리아마이신, 에피루비신, 에토글루시드, 바실러스 Calmette-Guerin(BCG), 인터페론(IFN), 인터루킨-2(IL-2), 브로피리민, 키홀-림펫 헤모시아닌(KLH) 등이 이러한 목적으로 사용된다. 이들 약제는 다양한 효과를 지니나 절제 사이트를 통한 이들 약제의 흡수에 기인한 불필요한 부작용을 지니게 된다. 지난 연구결과 및 본 발명의 경험을 고려하여 적은 정도의 흡수가 발생하더라도 인체에 있어서 D_2O의 낮거나 부재한 독성이 TUR 후 방광내 점적주입을 위한 안전한 약제로서의 가능성을 제안한다.

<35> 본 발명은 D_2O가 항-증식성, 항-부착성 및 항-침입성 효과를 지님을 나타내고, 농도 증가 및 노출시간 증가가 적당한 예측 가능성을 나타내는 유전적 변화를 유도함을 나타낸다. 상기 데이터와 함께 본 발명은 D_2O가 낮은 전신성 독성을 지닌 표재성 방광암의 수술후 방광내 점적주입용 화학요법제로서의 가능성을 지닌다.

<36> 본 발명은 외과 치료 후 초기 작은 표재성 방광암의 재발 방지 또는 치료를 위해 2.5시간 이상의 노출된 수술후

방광에 대해 농축된 D_2O(75% 또는 100% 용액)로의 높은 치료 결과를 기대할 수 있다.

<37> 한편 본 발명의 방광암 치료를 위한 항암 조성물은 조성물 총 중량에 대해 산화중수소를 10~90 중량%을 포함할 수 있으며 이 때 항암 조성물은 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제 등을 포함할 수 있다.

<38> 본 발명에 따른 방광암 치료를 위한 항암 조성물은 통상의 방법에 따라 액제 또는 현탁제 등의 경구형 제형 또는 주사제 등의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.

<39> 본 발명의 방광암 치료를 위한 항암 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 상이하지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으며 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.001~10 mg/kg·체중으로 투여할 수 있다.

<40> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<41> (실험)

<42> 본 발명은 방광암의 관리 약제로서 산화중수소(D_2O)의 가능성을 조사하였다. 본 발명은 ATCC로부터 입수된 이행 암세포, T-24를 사용하였다. 본 발명은 분말화된 배양 배지인 RPMI-1640(Sigma, 미국)을 준비하였다. 배양 배지는 프로토콜에 따라 정제된 3등급 증류수(DW) 및 여과된 D_2O(Aldrich, 미국)로 제조되었다. 대조군으로 사용된 배지는 물로만 제조되었고 실험에 사용된 배지는 물과 75 및 100% D_2O(vol/vol 내 D_2O) 용액 내 D_2O로 구성되었다. 각각의 배지는 10% 우태아 혈청, L-글루타민, HEPES 및 항생제(Sigma, 미국)로 보충되었다. 해동 후 T-24 세포는 물로 구성된 배지로 배양되었고 추가 연구에 충분한 정도로 증폭되었다. 실험시 물로만 구성된 배지는 24시간의 후-계대배양에서 프로토콜에 따라 다른 농도 및 노출 시간으로 변경되었다. D_2O 노출 후 세포는 PBS로 2회 세척되고 물만으로 이루어진 신선한 배지가 공급되었다. 추가 배양은 6일 이상 동안 유지되었고 세포가 채취되었다. 세포의 탈착을 위해 플라스크는 먼저 PBS로 2회 세척된 후 0.025% 트립신-1 mM EDTA 용액이 첨가되었다.

<43> (분류)

<44> 세포는 상기 기술된 배지에 따라 2가지로 분류되었다: 물만으로 이루어진 배지에서 배양된 세포인 대조군 및 물과 75 및 100%의 D_2O(vol/vol 내 D_2O)로 이루어진 배지로 배양된 세포. 24웰 배양 플레이트 내 세포가 MTT 시험에 사용되었다. 각각의 75% 및 100% 그룹이 2, 2.5, 3 및 3.5시간의 노출시간에서 하위 그룹으로 분류되었다.

<45> (실시예 1) 세포 형태 변화 및 세포 증식

<46> 형태 변화는 24시간의 D_2O 처리시 매일 검사되었다. 세포 생장은 MTT 시험 및 혈구계로 측정되었다. 간단하게는 MTT 시험시 24 웰 플레이트에서 세포는 1일간 정상 배지 내에서 배양되고 계획된 농도의 D_2O 농도 및 시간에 노출된 후 배지가 천천히 제거되고 정상 배지로 3일간 배양되었다. 3일째에 세포는 3.5시간 동안 MTT(0.1 mg/mL)로 처리되었고 배지가 제거되고 DMSO가 세포의 용해를 위해 적용되었다. 570 nm 파장에서의 흡광도(OD_{570}) 변화는 마이크로플레이트 판독기(Bio-Rad 모델 55)를 이용하여 측정되었다. 측정된 흡광도 데이터가 계산되고 100%의 대조군과 비교되었다. 혈구계로 측정시 세포수는 광학 현미경 하에서 측정되었다.

<47> (실시예 2) 암세포의 재구성 기저막으로의 침입

<48> 방광 암세포의 재구성 기저막으로의 침투 상의 D2O의 효과는 변형된 Boyden 챔버(Transwell, 8 ㎛ 세공, Costar 미국)로 조사되었다. 상단 챔버에서의 필터 상단 표면은 Matrigel(100 ㎕, 500 ㎍/mL)로 도포되었고 하단 표면은 제4형 콜라겐(50 ㎕, 50㎍/mL)으로 도포되었다. 상단 챔버 내로 충진된 배지는 대조군 및 D_2O(2시간 동안 75%)에 노출된 암세포(1.5×10^6/mL)와의 혼합물인 완전한 RPMI-1640(100 mL)이었다. 하단 챔버 내 배지는 세포가 없이 우혈청 알부민(0.1%)으로 보충된 완전한 RPMI-1640(600 mL)으로 충진되었다. Boyden 챔버는 12시간 동안 인큐베이트되었다. 인큐베이션 후 상단 챔버가 제거되었고 상단 챔버 내 모든 세포는 흡출되고 필터의 상단 표면은 완전히 제거되었다. 팰터는 미세하게 절단되었고 헤마톡실린 및 에오신으로 염색되었다. 필

터의 하단 표면은 현미경으로 조사되었다(×400).

<49> (실시예 3) bcl-2 및 bax 상의 T-24 세포의 면역조직화학적 염색

<50> 본 발명은 면역조직화학에 의해 세포 내 bax 및 bcl-2 단백질의 위치를 측정하였다. 세포 펠렛을 OCT 화합물(A.O.)로 함몰시킨 후 10 ㎛로 절단시켰다. 절편은 건조되고 15분간 0.02 M 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척되었다. 정상 염소 혈청은 비-특이적 결합의 감소를 위해 실온에서 90분간 처리되었다(1:20). 이후 1차 항체가 4℃에서 24시간 동안 처리되었다(토끼-유래 항 bax 및 bcl-2, 1:500). 0.5% 과옥소산으로의 처리 후 실온에서 90분간 2차 항체(1:200, 비오틴화 염소 항-토끼 IgG)와 인큐베이트되었다. 이후 슬라이드는 PBS로 세척되고 표본은 아비딘-비오틴화 과산화효소 복합체(Vector, 1:50)으로 실온에서 90분간 표지되었다. 이후 PBS so 3,3'-디아미노벤지딘-H_2O_2로 5분간 염색되고 세척되었다. 최종적으로 슬라이드는 명시야 현미경으로 광찰되고 촬영되었다.

<51> (실시예 4) 웨스턴 블럿 분석

<52> 웨스턴 블럿 분석이 이용되었다. 탈착된 세포는 균질화되고 단백질 함량은 표준물질로서 우혈청 알부민과 함께 Bio-Rad 단백질 에세이로 측정되었다. 표본(총 50 ㎍/단백질 레인)은 환원 조건 하에서 12.5% 소듐 도데실 설페이트-폴리-아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분석되었다. 단백질은 전이-완충액 시스템 및 반건조 전기영동 전이 세포(15 V, 45분)를 이용하여 PVDF 멤브레인으로 옮겨졌다. 옮겨진 멤브레인은 비-특이적 결합을 감소시키기 위해 차단 용액(Tris 완충 식염수(TBS) 0.1%, Tween 20, 6% 비-지방 건조 우유, TTBS)으로 차단되었다. 이들은 1차 항체(토끼-유래 항-bax 및 bcl-2, 1:500)로 4℃에서 24시간 동안 인큐베이트되었다. TBS, TTBS로 세척된 후 2차 항체(홍당무 과산화효소-컨쥬게이트 염소 항-토끼 IgG, Bio-Rad 1:1000)로 2시간 동안 인큐베이트되었다. 단백질은 ECL 웨스턴 블럿팅 검출 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)로 검출되었다. 웨스턴 블럿은 컴퓨터-기반 Sigma Gel(SPSS Inc. Chicago, 미국) 시스템을 이용한 농도계측기로 분석되었다. 농도 수치는 평균±SEM으로 표기되었다. 관련 처리군 사이의 유의성 차이를 측정하기 위해 일원 ANOVA 분석 후 Tukey-Kramer 다중-비교 시험이 수행되었다. 모든 경우에서 통계적인 유의성 수용 수준은 $P < 0.05$이었다.

도면의 간단한 설명

<53> 도 1은 D_2O로의 노출 후 정량적 비색 분석(MTT 분석)에 의해 측정된 방광 암세포 T-24의 증식을 나타낸 것이다. 3개의 시험군 모두는 5×10^4 세포로 분주되었고 2시간 이상 동안 노출되었고 6일 이상 동안 배양되었다. 2.5시간 이상 노출된 세포는 대조군의 1/2보다 더 낮은 감소된 세포수를 나타내었다(75% 시험군에서 46.66 및 100% 시험군에서 4.3).

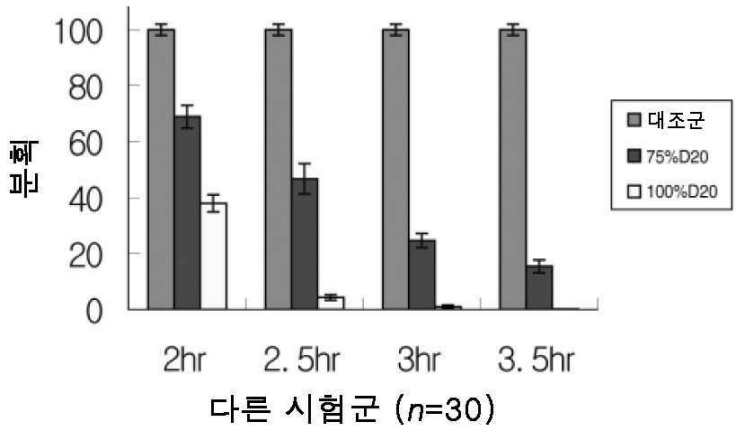
<54> 도 2는 bcl-2 및 bax에 대한 면역조직화학적 염색을 나타낸 것이다. 모든 양성적 염색은 갈색을 나타낸다. bax의 양성 세포 농도(A 및 B)는 blc-2(C 및 D)보다 더 높은 것으로 나타났다. 축척 막대 = 200 ㎛(A 및 C) 및 50 ㎛(B 및 D).

<55> 도 3은 75% D_2O에 노출된 세포에서 추출된 단백질 내 bcl-2(A 및 B) 및 bax(C 및 D)를 나타낸 것이다. blc-2 발현은 대조군(1)에서 최대이고 노출시간 증가에 따라 감소되었다. bax 발현은 대조군(1)에서 최소이고 노출시간에 따라 증가되었다. 노출시간 증가에 따른 bcl-2 및 bax 발현 경향은 각각 정상군과 비교시 직접적으로 반대이었다(1: 대조군, 2: 노출 2시간, 3: 노출 2.5시간, 4: 노출 3시간, 5: 노출 3.5시간)($P<0.01$).

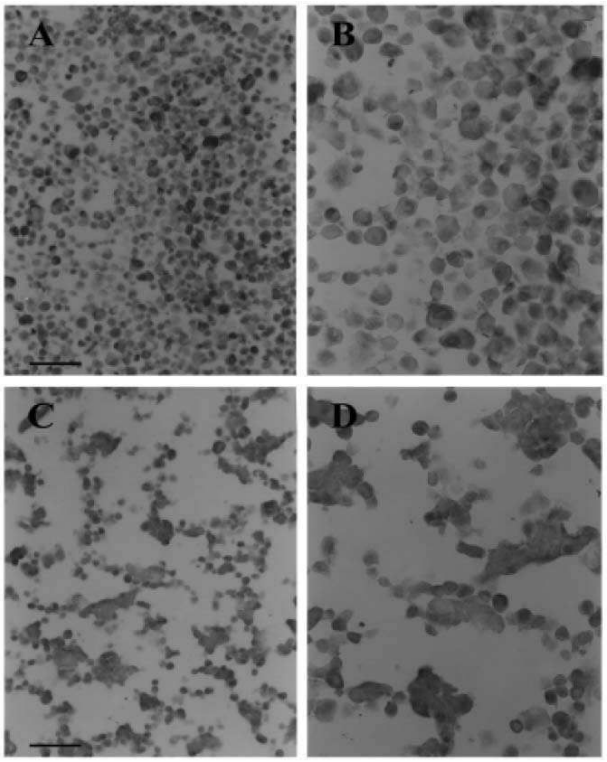
<56> 도 4는 100% D_2O에 노출된 세포에서 추출된 단백질 내 bcl-2(A, B) 및 bax(C, D)의 웨스턴 블럿 분석이다. bcl-2 발현은 2시간 노출시(1) 최대이고 노출시간 증가시 발현은 감소되었다. bax 발현은 2시간 노출시(1) 최소이고 노출시간 증가시 발현은 증가되었다. bcl-2 및 bax의 발현 경향은 75% D_2O 노출과 유사하였고 발현은 각각의 정상군(n=5)과 비교시 시간이 경과함에 따라 직접적으로 반대이었다(1: 노출 2시간, 2: 노출 2.5시간, 3: 노출 3시간, 4: 노출 3.5시간)($P<0.01$).

도면

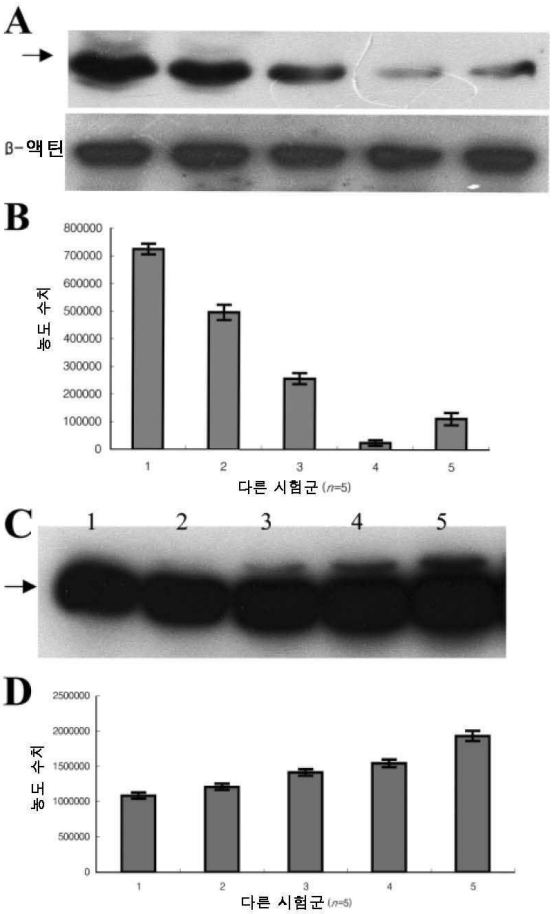
도면1


100
80
60
40
20
0
2hr
2. 5hr
3hr
3. 5hr
다른 시험군 (n=30)
대조군
75%D20
100%D20

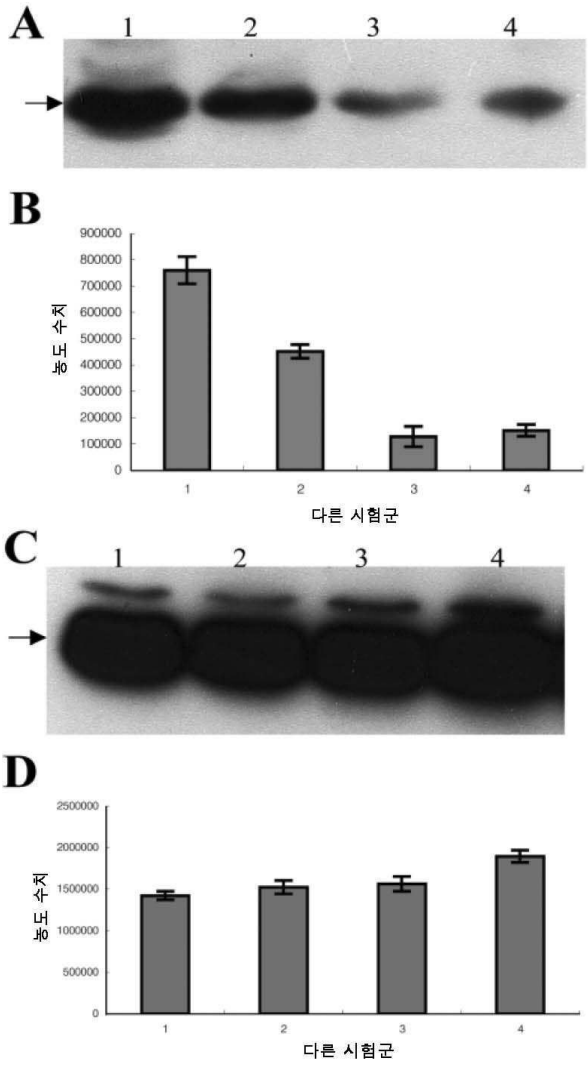
도면2


A
B
C
D

도면3


A
β-액틴
B
농도 수치
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
1
2
3
4
5
다른 시험군 (n=5)
C
1
2
3
4
5
D
농도 수치
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
1
2
3
4
5
다른 시험군 (n=5)

도면4


A
1
2
3
4
B
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
농도 수치
1
2
3
4
다른 시험군
C
1
2
3
4
D
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
농도 수치
1
2
3
4
다른 시험군