(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0041863
(43) 공개일자 2021년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/357 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0124606
(22) 출원일자 2019년10월08일
심사청구일자 2019년10월08일

(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
함지연
서울특별시 성북구 고려대로 38-1, 402호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 8 항

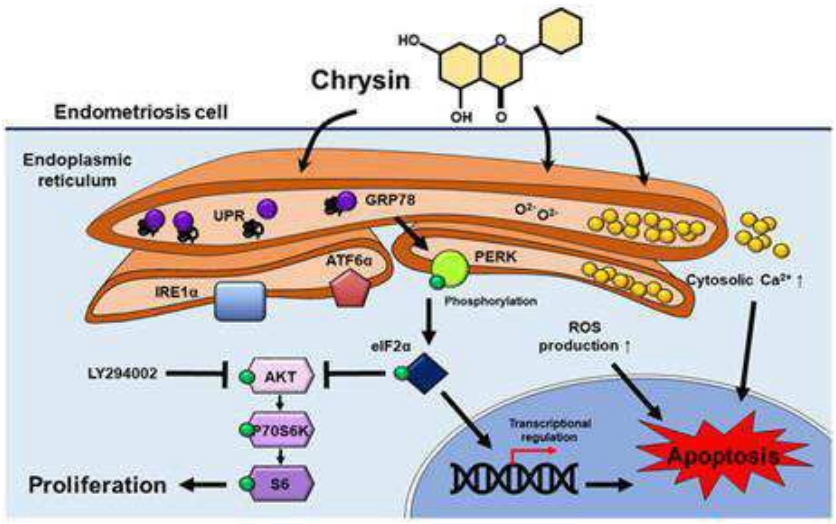
(54) 발명의 명칭 **크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 자궁내막증 세포 내 PI3K/AKT 신호전달 메커니즘을 조절하는 하위 신호전달물질의 인산화를 억제함으로써 자궁내막증 세포의 증식을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 자궁내막 세포의 비정상적 발달에 의해 발병하는 자궁내막증을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61K 31/357 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 15/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI17C0929000019
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 액체생체검사 기반 난소암 조기 진단, 재발 예측 및 항암제 내성 관련 엑소좀 바이오마커 발굴 및 검증
기 여 율 50/100
과제수행기관명 국민대학교 산학협력단
연구기간 2017.04.10 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 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

명 세 서

청구범위

청구항 1

크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물이 PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

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

청구항 4

크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물이 PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 따른 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법.

청구항 8

제1항에 따른 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자궁내막증은 가임기 여성의 난소, 난관, 복벽등에 비정상적으로 증식하여 35-50% 환자에게서 불임을 야기하는 질환으로서(Vigano et al, Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004; Bulun, N Engl J Med, 2009), 이에

대한 병리학적 기전에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있으나, 아직까지 정확한 발병 원인은 밝혀지지 않고 있다.

[0003] 자궁내막증의 기본적인 치료 방법으로는 수술적 제거와 호르몬치료 방법이 있으며, 자궁내막증은 예후 인자를 기반으로 한 진단이 아닌, 증상 위주의 진단이 이루어지기 때문에 수술적 제거를 진행하여도 5년 내 재발률이 30-40%에 육박하는 것으로 알려져 있다(Busacca *et al.*, J Obstet Gynecol, 2006: Vignali *et al.*, J Minim Invasive Gynecol, 2005).

[0004] 성선자극 호르몬 유리호르몬 효능제 (GnRH agonist)나 아로마타제 저해제 (aromatase inhibitor)를 이용한 호르몬 치료 방법 또한, 부작용과 약제 저항성 등의 문제점이 보고된바 있다(Gao *et al.*, Gynecol Oncol, 2014).

[0005] 최근에는 자궁내막증에 대한 치료 요법이 수술에서 식물 성분 유래 치료제 등으로 변화하고 있는 추세에 있으나 아직까지 정확한 작용 기작이나 부작용에 대한 연구가 부족한 실정이다(Johnson et al., Hum Reprod, 2013)

[0006] 한편, 크리신(chrysin)은 캐모마일, 시계초, 느타리버섯 등에 주로 함유된 플라본 계열의 식물추출물로 항암, 항염증, 항신혈관생성 효과 등을 지닌 것으로 알려져있다 (Khoo et al., International Journal of Molecular Sciences, 2010; Ha et al., Neuroscience Letters, 2010; Yang *et al.*, Scanning, 2015).

[0007] 또한, 실리비닌(silibinin)은 큰 엉겅퀴의 씨앗에서 추출할 수 있는 물질로, 간을 보호하는 특성을 가지고 있으며, 전립선, 대장, 폐와 같은 암종에 항암효과를 가지고 있다고 알려져 있다 (Kavitha *et al.*, Mol Carcinog 2014: Sadava *et al.*, Cancer Lett, 2013).

[0008] 이처럼, 크리신과 실리비닌의 다양한 약리적 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 이들의 자궁내막증 치료 효과는 보고된바 없다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 자궁내막증 치료 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 크리신과 실리비닌 및 이들의 병용처리가 자궁내막증 세포주의 증식을 억제하고, 세포의 사멸효과를 향상시키는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포의 증식 능력을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포의 증식 능력을 억제하는 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 자궁내막증 세포 내 PI3K/AKT 신호전달 메커니즘을 조절하는 하위 신호전달물질의 인산화를 억제함으로써 자궁내막증 세포의 증식을

억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 자궁내막 세포의 비정상적 발달에 의해 발병하는 자궁내막증을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 크리신, 실리비닌 처리가 자궁내막증 세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 크리신, 실리비닌 처리가 자궁내막증 세포의 사멸 및 세포주기 조절에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 크리신, 실리비닌 처리가 자궁내막증 세포 내 산화 스트레스 유도에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 크리신, 실리비닌 처리가 자궁내막증 세포 내 소포체 스트레스 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 크리신, 실리비닌이 자궁내막증 세포 내 신호전달기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 크리신, 실리비닌과 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 자궁내막증 세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 실리비닌에 의한 자궁내막증 동물모델 내 병변 크기의 감소와 염증성 사이토카인의 발현 억제효과 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 크리신과 실리비닌의 병용처리가 자궁내막증 세포의 사멸에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 크리신에 의한 자궁내막증 세포의 증식 억게 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

도 10은 실리비닌에 의한 자궁내막증 세포의 증식 억게 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 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.

[0022] 본 발명에서는 크리신 및 실리비닌에 의한 자궁내막증 세포의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 9, 10).

[0023] 본 발명은 일 관점에서 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0024] 본 발명은 다른 관점에서 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0027] 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.

[0028] 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, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보

조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 용액, 현탁액, 에멀젼, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 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.

[0030] 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.

[0031] 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.

[0032] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 인체를 비롯한 동물 신체에 투여하기 적합한 임의의 생약 형태, 더욱 구체적으로는 경구 투여에 통상적인 임의의 형태, 예를 들어 식품 또는 사료, 식품 또는 사료의 첨가제 및 보조제, 강화된 식품 또는 사료, 정제, 환제, 과립, 캡슐 및 발포 배합물 등과 같은 고체 형태 또는 용액, 현탁액, 유화액, 음료, 페이스트 등과 같은 액체형태 일 수 있고, 영양제, 비타민, 전해질, 감미제, 착색제, 유기산, 방부제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분들을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물이 자궁내막증 세포의 증식과 관련된 PI3K/AKT, MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물이 자궁내막증 세포의 산화스트레스, 활성산소 및 지질과산화를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 크리신, 실리비닌 또는 이들의 혼합물이 자궁내막증 세포의 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 유도하며 세포사멸 단백질의 발현을 활성화시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0040] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 증식능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.

[0041] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0043] [실시예]

[0044] 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.

[0046] **실시예**

[0047] **<실험 방법>**

[0048] 실험동물 및 세포배양

[0049] VK2/E6E7 (catalog number: CRL-2616)과 End1/E6E7 (catalog number: CRL-2615) 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 serum-free medium (Gibco, catalog number: 17005-042)에 EGF 0.1 ng/ml 및 bovine pituitary extract (0.05 mg/ml)을 첨가하여 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 정상 자궁내막 세포는 자궁내막증 환자의 정상부위 조직에서 동정하였다.

[0050] 실험동물 구축을 위해 8주령의 C57BL/6 암컷 마우스를 DBL(충청도, 한국)에서 구매하여 사육장에서 1주일간 적응 기간을 거친 후 수술을 진행하였다. 마우스들은 일반사료를 섭취하였으며 박테리아 감염을 막기 위해 0.0185% HCl-H_20를 섭취하였다. 사육장은 12시간 주기로 소등이 이루어진다. 모든 실험적인 절차는 고려대학교의 IACUC (KUIACUC-2017-67)의 승인을 받아 진행하였다. C57BL/6 마우스는 150 μl의 Ketamine과 100 mg/kg의 Rompun을 PBS에 10 mg/kg으로 희석하여 주사로 마취를 진행하였다.

[0051] 자궁관 접합 및 자궁경부 연결부를 잘라 얻어낸 자궁각을 3 mm의 금속 펀치를 사용하여 세 개의 동일한 크기로 잘라낸 후 자궁내막층이 노출되도록 펼쳐 잘라내었다. 이 자궁내막층이 장간막의 동맥 근처에 맞닿도록 6-0 black silk suture로 심었다. 대조군으로는 지방조직을 일부 떼내어 장간막의 동맥 근처에 심었다. 6-0 vicryl suture로 복벽을 꼬매고, 6-0 black silk suture로 가죽부분을 꼬맸다. 일주일의 회복기간이 지난 후, 마우스를 무작위로 두 그룹으로 나눈 뒤, 실리비닌과 DMSO를 대조군으로 3일마다 4주간 복강내 주사를 진행하였다. 총 10번의 주사가 이루어졌으며, 매번 100 μl의 실리비닌을 100 mg/kg의 농도로 주입하였다. 4주 후 CO_2 질식사로 희생시킨 후, 심어둔 자궁내막조직에 생긴 병변을 제거하여 RNA 추출에 사용하였다. 제거 전 각 병변의 크기는 칼리퍼를 통해 크기를 측정하였으며, 각 병변의 부피는 아래 식을 통해 계산하였다.

[0052] $Volume=[width]^2 \times length\ of\ lesion \times 0.52)$

[0054] 실험 재료

[0055] 후보 조성물질인 크리신 (catalog number: C80105, 97% purity)과 실리비닌 (Cat No: S0417)은 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 크리신 또는 실리비닌에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT (Ser^{473}, catalog number: 4060), P70S6K (Thr^{421}/Ser^{424}, catalog number: 9204), S6 (Ser^{235}/Ser^{236}, catalog number: 2211), ERK1/2 (Thr^{202}/Tyr^{204}, catalog number: 9101), JNK (Thr^{183}/Tyr^{185}, catalog number: 4668), P38 (Thr^{180}/Tyr^{182}, catalog number: 4511), eIF2α (Ser^{51}, catalog number: 3398) 단백질 및 total-AKT (catalog number: 9272), P70S6K (catalog number: 9202), S6 (catalog number: 2217), ERK1/2 (catalog number: 4695), JNK (catalog number: 9252), P38 (catalog number: 9212), eIF2α (catalog number: 5324), IRE1α (catalog number: 3294) 단백질에 대한 항체와 PI3K/AKT 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다. phospho-PERK (Thr^{981}, catalog number: sc-32577), total PERK (catalog number: sc-13073), GRP78 (catalog number: sc-13968), GADD (catalog number: sc-7351) 단백질에 대한 항체는 Santacruz Biotechnology사로부터 구매하였다. ERK1/2 억제제인 U0126, JNK 억제제인 SP600125 및 P38 억제제인 SB203580을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0057] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0058] 자궁내막증 세포의 증식 능력에 크리신 또는 실리비닌이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5×10^3개의 세포와 배지 100 ㎕를 96 well에 분주하고 크리신 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 또는 실리비닌 (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 μM)을 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 이후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 자궁내막증 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 후 3차례 씻어주었다. 마지막으로 100 μl의 3,3' ' substrate으로 세포를 반응시키고 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0060] 면역형광법

[0061] 3×10^4개의 자궁내막증 세포를 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 크리신 20 μM 또는 실리비닌 25 μM를 48시간 동안 처리하고 메탄올로 10분간 세포를 고정한 후, 2 μg/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4 ℃에서 16시간 인큐베이션하였다. 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 1시간 동안 배양하였다. 자궁내막증 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 자궁내막증 세포 내 타겟 단백질뿐만 아니라 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0063] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0064] 크리신 또는 실리비닌에 의한 자궁내막증 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5 개의 세포를 6 well에 배양하고 크리신 (0, 5, 10, 20 μM) 또는 실리비닌 (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 μM)을 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 또한, 병용처리 조건으로는 20 μM의 크리신과 50 μM의 실리비닌을 각각 또는 병용처리하여 48시간 동안 위와 같은 조건으로 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.

[0066] Propidium iodide 염색을 통한 세포주기 분석

[0067] 세포주기 분석은 Propidium iodide (BD Biosciences) 염색을 통해 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5개의 세포를 6 well에 배양하고 크리신 (0, 5, 10, 20 μM) 또는 실리비닌 (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 μM)을 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고, 차가운 70% 에탄올로 18시간 이상 세포를 고정하였다. 원심분리를 이용해 세포를 모아 1 mL의 0.1% BSA-PBS를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음으로 200 μL의 1×binding buffer으로 세포현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μL 넣고 10 mg/mL RNase A (Sigma-aldrich) 5 μL, 50 mg/mL PI 5 μL를 함께 혼합하여 세포를 30분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후 1×binding buffer를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 세포주기를 분석하였다.

[0069] DCFH-DA을 이용한 활성산소 형성 분석

[0070] 활성산소 형성 분석은 2’ 7’ diacetate(DCFH-DA, Sigma-Aldrich)을 통해 진행하였다. 100π 배양 접시에 70 ~ 80% 세포가 찼을 때, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포에 10 μM DCFH-DA을 처리해 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 30분 동안 배양하였다. 이후, PBS로 워싱을 진행한 뒤 크리신 (0, 5, 10, 20 μM) 또는 실리비닌 (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 μM)을 용량의존적으로 처리하여 1시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 세포를 다시 원심분리 하여 PBS로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0072] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0073] 자궁내막증 세포에 크리신, 실리비닌 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 자궁내막증 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95℃에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음 chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약을 사용하여 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0075] 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응

[0076] 수술적인 방법으로 유도한 병변을 Trizol reagent를 통해 제조사의 매뉴얼 대로 RNA 추출을 시행하였다. cDNA는 total RNA 1 μg과 AccuPower premix로 합성하였으며, 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma-Aldrich)과 StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)로 측정하였다. 타겟 유전자의 발현은 C_T값으로 계산하였으며, GAPDH 발현을 기준으로 표준화하였다. PCR 조건은 95℃로 3분 진행한 후, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초 조건을 40회 증폭하였다.

[0078] 통계분석

[0079] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0081] **<결과 및 고찰>**

[0082] 크리신 또는 실리비닌에 의한 자궁내막증 세포의 증식 억제 효과

[0083] 크리신 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 또는 실리비닌 (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 μM)을 용량의존적으로 사람의 자궁내막증 세포 (End1/E6E7, VK2/E6E7)와 정상 자궁내막 세포에 처리한 후 세포 증식력 변화를 확인하였다. 그 결과, End1/E6E7 세포의 증식력은 5, 10, 20, 50, 100 μM의 크리신에 반응하여 각각 대조군에 비해 약 19% ($p < 0.05$), 34% ($p < 0.01$), 45% ($p < 0.001$), 44% ($p < 0.001$), 71% ($p < 0.001$) 감소하였다 (도 1a). VK2/E6E7 세포에서도 5, 10, 20, 50, 100 μM의 크리신에 반응하여 각각 대조군에 비해 약 20% ($p < 0.01$), 26% ($p < 0.01$), 47% ($p < 0.001$), 64% ($p < 0.001$), 70% ($p < 0.001$) 증식력이 감소하였다. 정상 자궁내막 세포에 크리신을 처리하였을 때는 50, 100 μM의 고농도에서만 약 12% ($p < 0.05$), 27% ($p < 0.001$) 세포 증식력이 감소하는 것으로 보아 크리신의 세포 증식 억제 능력은 자궁내막증 세포에 특이적인 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라, 실리비닌은 25 μM 농도에서 자궁내막증 세포의 증식력을 절반 정도로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (도 1b). 또한 실리비닌은 정상 자궁내막 세포의 증식력을 25, 50 μM의 고농도에서만 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 다음으로 세포 증식에 필수적인 단백질인 PCNA의 단백질 발현 변화를 확인함으로써 크리신 또는 실리비닌에 의한 자궁내막증 세포의 증식력 억제 효과를 검증하였다. 그 결과, PCNA의 발현을 의미하는 녹색 형광 강도가 크리신 또는 실리비닌 처리 시 감소하는 것을 확인하였다 (도 1c, 1d). 이를 정량화하였을 때 크리신 처리에 의해서 End1/E6E7 세포에서는 약 85% ($p < 0.01$), VK2/E6E7 세포에서는 약 66% ($p < 0.01$) PCNA 형광 강도가 감소하였고, 실리비닌 처리에 의해서 End1/E6E7 세포에서는 약 71% ($p < 0.01$), VK2/E6E7 세포에서는 약 37% ($p < 0.05$). 이러한 결과들은 크리신 또는 실리비닌이 자궁내막증 세포의 증식력을 유의적으로 감소시킴을 나타낸다.

[0085] 크리신 또는 실리비닌에 의한 자궁내막증 세포 사멸 유도 효과

[0086] 크리신 또는 실리비닌이 자궁내막증 세포의 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해 FITC가 결합된 Annexin V 및 PI 염색을 수행한 후 유세포분석기를 이용해 분석하였다. 10, 20 μM의 크리신은 End1/E6E7 세포의 사멸을 각각 173% ($p < 0.05$), 284% ($p < 0.01$) 증가시켰다 (도 2a). 또한 VK2/E6E7 세포는 20 μM 크리신에 의해 세포사멸이 약 172% ($p < 0.05$) 증가하였다. 실리비닌 처리에 의해서는 자궁내막증 세포에 용량의존적으로 (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 μM) 유의미한 후기 세포자살세포 수의 증가를 확인하였다. 다음으로, 크리신 또는 실리비닌이 자궁내막증 세포의 세포주기에 미치는 영향을 확인하기 위해 크리신 (0, 5, 10, 20 μM)과 실리비닌 (0, 2.5, 5,

10, 25, 50 μM)을 용량의존적으로 처리한 후 PI 염색 및 유세포분석을 수행하였다. 그 결과, End1/E6E7과 VK2/E6E7 세포 모두에서 크리신 또는 실리비닌에 의해 Sub-G1기가 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 2b). 이러한 결과를 통해, 크리신 또는 실리비닌이 자궁내막증 세포에서 사멸을 유도하고 세포주기를 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0088] 크리신 또는 실리비닌에 의한 자궁내막증 세포 내 활성산소 및 소포체 스트레스 변화 분석

[0089] 크리신 또는 실리비닌에 의한 자궁내막증 세포의 사멸 기전에 활성산소의 과도한 증가에 의한 산화 스트레스가 관여하는지 알아보기 위해 세포에 DCFH-DA를 처리한 후 녹색 형광 강도를 유세포 분석기로 측정하였다. 그 결과, End1/E6E7 세포 내에서 ROS의 생성은 5, 10, 20 μM의 크리신 처리에 의해 대조군에 비해 각각 208% ($p < 0.05$), 266% ($p < 0.01$), 277% ($p < 0.01$) 증가하였다 (도 3a). 또한 VK2/E6E7 세포에서는 5, 10, 20 μM의 크리신 처리에 의해 대조군에 비해 각각 405% ($p < 0.01$), 525% ($p < 0.01$), 744% ($p < 0.01$) ROS 생성이 증가하였다. 또한 실리비닌 (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 μM) 처리에 따라 용량의존적으로 ROS 생성이 증가하였으며 최고 농도에서 End1/E6E7 세포에서 240% ($p < 0.001$), VK2/E6E7 세포에서 320% ($p < 0.001$)까지 증가함을 확인하였다.

[0090] 세포 내 산화 스트레스에 의해 증가하는 소포체 스트레스의 변화를 분석하기 위해 소포체 스트레스 반응과 관련된 단백질들(GRP78, IRE1α, 인산화된 PERK, eIF2α 및 GADD153)의 발현 변화를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 그 결과, 자궁내막증 세포 내에서 GRP78 단백질의 발현이 크리신 처리에 따라 유의적으로 증가하였다 (도 4a). 하지만, IRE1α 단백질의 발현은 크리신에 반응하여 큰 변화를 보이지 않았다 (도 4b). 또한 자궁내막증 세포에 크리신 처리는 PERK 및 eIF2α 단백질의 인산화를 유도하였다 (도 4c, 4d). 이러한 결과는 크리신이 자궁내막 세포 내에서 산화 스트레스 및 소포체 스트레스를 매개하는 세포사멸을 유도할 수 있음을 암시한다. 또한 실리비닌을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 25 μM) 자궁내막증 세포에 처리하여, IRE1α와 PERK의 인산화 양상의 증가를 확인하였다 (도 4e, 4f). 또한, 하위 신호인 eIF2α의 인산화 및 GADD153의 양도 실리비닌에 의해 유의적으로 증가하였음을 확인하였다 (도 4g, 4h). 이러한 결과를 통해, 실리비닌은 자궁내막증 세포에서 세포사를 일으킬 수 있는 소포체 스트레스를 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0092] 크리신에 의한 자궁내막증 세포 내 신호전달기전 조절 양상 분석

[0093] 세포 증식에 필수적인 신호전달경로로 알려진 PI3K 경로에 크리신이 미치는 영향을 알아보기 위해 End1/E6E7 세포와 VK2/E6E7세포에 크리신을 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행하였다. 크리신은 두 세포주에서 용량의존적으로 AKT, P70S6K, S6 단백질의 인산화를 감소시켰다 (도 5a-c). 다음으로, PI3K에 대한 약학적 억제제인 LY294002를 20 μM의 농도로 크리신과 병용 처리한 후 PI3K 신호전달 단백질의 인산화 변화를 확인하였다. 그 결과, LY294002와 크리신의 병용 처리는 각각을 단독 처리하였을 때보다 AKT, P70S6K, S6 단백질의 인산화를 더욱 감소시키는 것으로 나타났다 (도 5d-f). 뿐만 아니라, 두 자궁내막증 세포주 (VK2/E6E7, End1/E6E7)에서 시간에 따른 (0, 5, 10, 30, 60, 120분) MAPK 신호전달 분자의 인산화 변화 양상에 대해 분석하였다. ERK1/2, P38 MAPK 및 P70S6K의 인산화는 25 μM의 실리비닌 처리시, 5분에서 급격히 인산화되었다가 이후 서서히 감소하였다 (도 5g, 5i, 5j). JNK의 인산화 역시 5분에서 15분 사이에 인산화가 많이 되었다가 이후 다시 원래 수준으로 돌아오는 경향을 보였다 (도 5h). 이러한 결과를 통해, 실리비닌이 자궁내막증 세포에서 MAPK 신호전달 기작을 조절한다는 것을 알 수 있었다.

[0094] 또한, 크리신과 LY294002를 병용 처리한 후 End1/E6E7 세포와 VK2/E6E7 세포의 생존력 변화를 분석하였다. 그 결과, 크리신과 LY294002를 병용 처리하였을 때 단독 처리군에 비해 세포 생존력이 더욱 감소하는 것으로 나타났다 (도 6a, 6b). 이러한 결과는 크리신이 PI3K 신호전달경로를 조절할 뿐만 아니라 이는 자궁내막증 세포 증식력의 감소로 이어질 수 있음을 나타낸다. 뿐만 아니라, VK2/E6E7과 End1/E6E7 세포에서 모두 실리비닌과 SP600125 또는 SB203580을 병용처리시 항증식 효과에 시너지가 발생하는 것으로 나타났다 (도 6c, 6d). 이러한 결과들을 통해, 실리비닌에 의해 억제된 MAPK 신호전달 경로는 자궁내막증 세포의 세포증식의 억제를 보다 향상시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0096] 실리비닌에 의한 자궁내막증 동물모델 내 병변 크기의 감소와 염증성 사이토카인의 발현 억제효과 분석

[0097] 실리비닌의 자궁내막증에 의한 효과를 검증하기 위해, 수술로 자궁내막증 동물모델을 구축하여 100mg/kg 의 실리비닌을 4주간 복강내 주사로 투여하였다. 대조군 그룹과 비교하였을 때 실리비닌을 처리한 그룹에서 수술적으로 유도한 병변의 크기가 약 41.7% 가량 감소하는 것으로 나타났다 (도 7a, 7b). 또한, 병변을 샘플링하여 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6)과 세포주기(c-Myc, CCNE1)에 관련한 유전자들의 mRNA 발현을 확인한 결과, 실리비닌을 처리한 그룹의 TNF-a, IL-1b, IL-6의 mRNA 수준이 대조군에 비해 각각 80.4%, 73.8%, 96.5%로 감소하는 것으로 나타났다 (도 7c-7e). 하지만 세포주기에 관여하는 c-Myc이나 CCNE1의 mRNA 발현에는 유의미한 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 7f, 7g). 이러한 결과를 통해, 실리비닌이 염증과 관련된 유전자들의 발현을 조절하여 병변의 크기를 줄일 수 있음을 확인하였다.

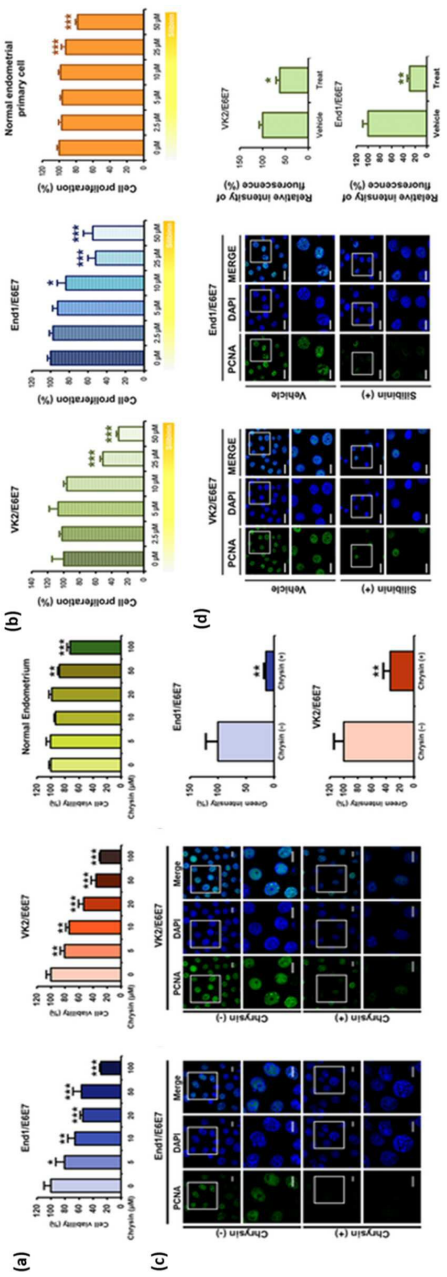
[0099] 크리신과 실리비닌의 병용처리를 통한 자궁내막증 세포주 내 세포사멸효과 분석

[0100] 앞서 확인한 크리신과 실리비닌 각각의 자궁내막증에 대한 효과를 확인한 후, 병용처리 시의 세포 사멸 효과를 확인해보았다. 그 결과, 크리신(20 μM)과 실리비닌 (50 μM)을 단독처리하였을 때, VK2/E6E7 세포주에서는 각각 약 200 %, 150%, End1/E6E7 세포주에서는 160, 200%의 세포 사멸효과가 나타났다 (도 8A-B). 또한, 이들 각각의 최적 농도를 병용처리할 경우에는 VK2/E6E6 세포는 205%, End1/E6E7 세포는 약 660%로 세포사멸 효과가 현저하게 향상되는 것으로 나타났다 (도 8A-B).

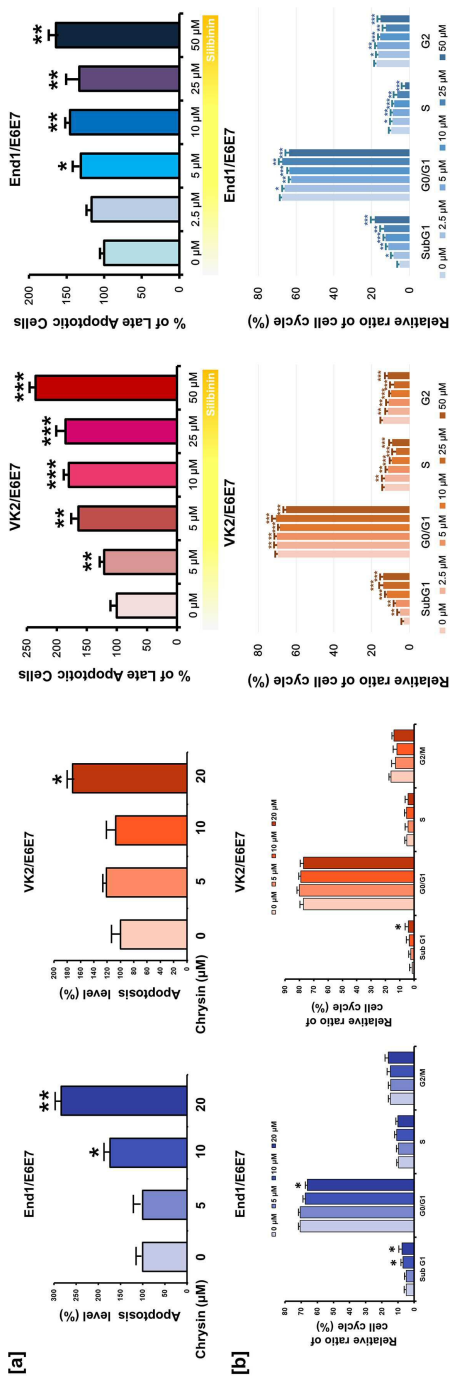
[0102] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

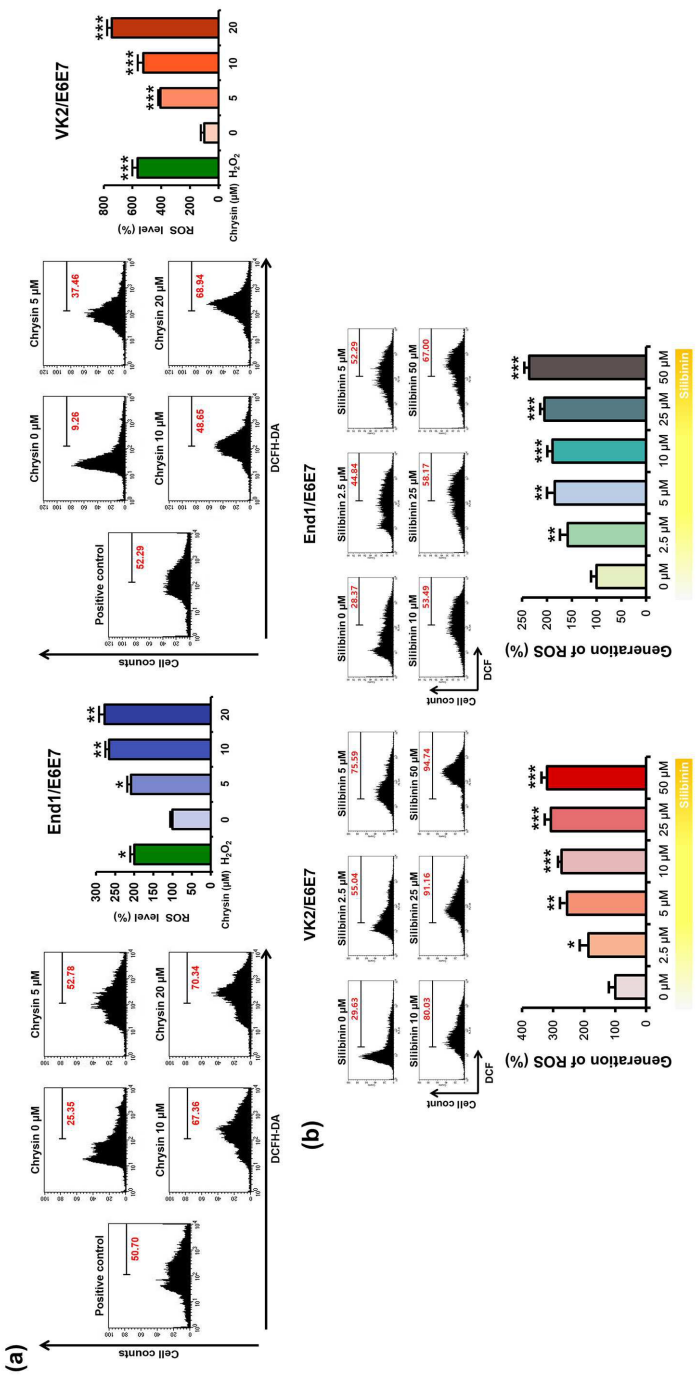
도면1


(a)
End1/E6E7
Cell viability (%)
Oxysin (μM)
(b)
VK2/E6E7
Cell proliferation (%)
End1/E6E7
Normal endometrial primary cell
Normal Endometrium
(c)
PCNA
DAPI
Merge
Oxysin (-)
Oxysin (+)
(d)
MERGE
Vehicle
Silibinin (+)
Relative intensity of fluorescence (%)
Vehicle
Treat

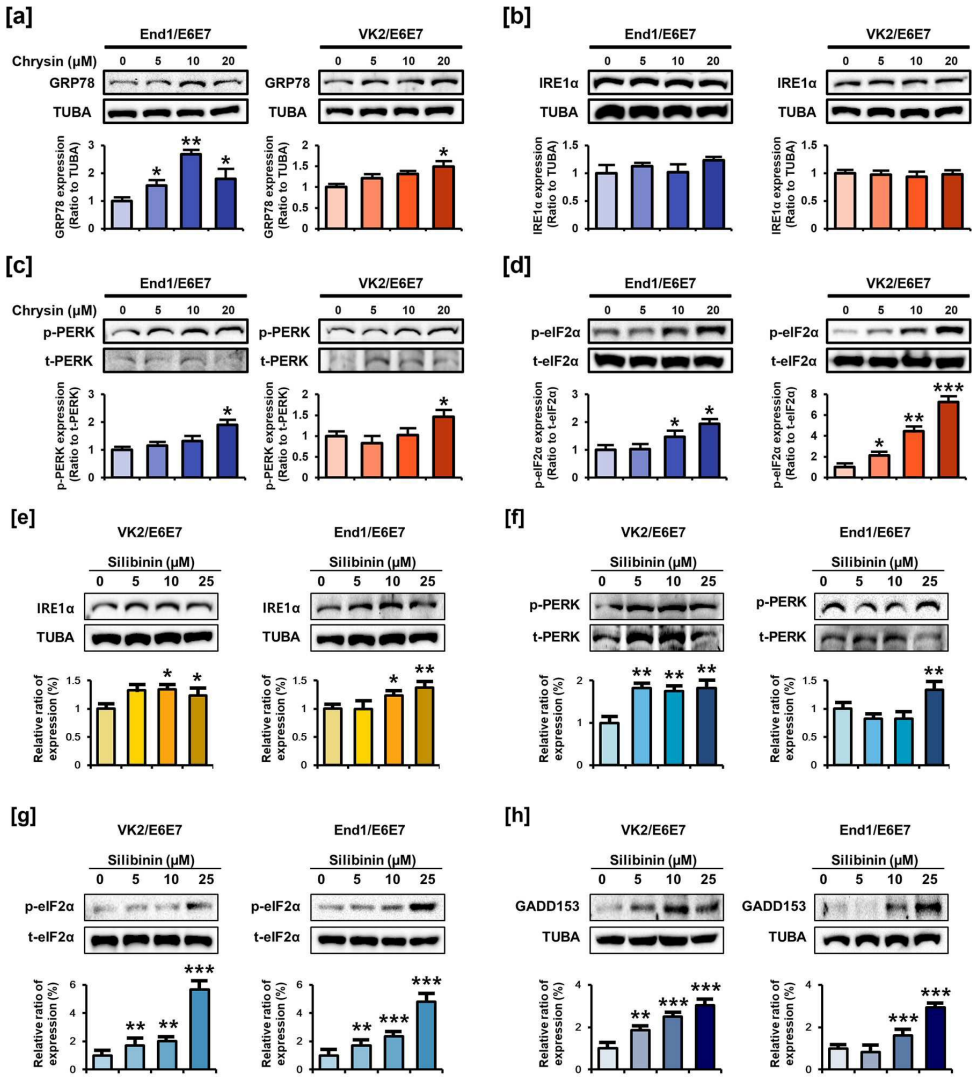
도면2


[a]
End1/E6E7
Apoptosis level (%)
Chrysin (μM)
0
5
10
20
VK2/E6E7
[b]
Relative ratio of cell cycle (%)
SubG1
G0/G1
S
G2/M
% of Late Apoptotic Cells
Silibinin
0 μM
2.5 μM
5 μM
10 μM
25 μM
50 μM

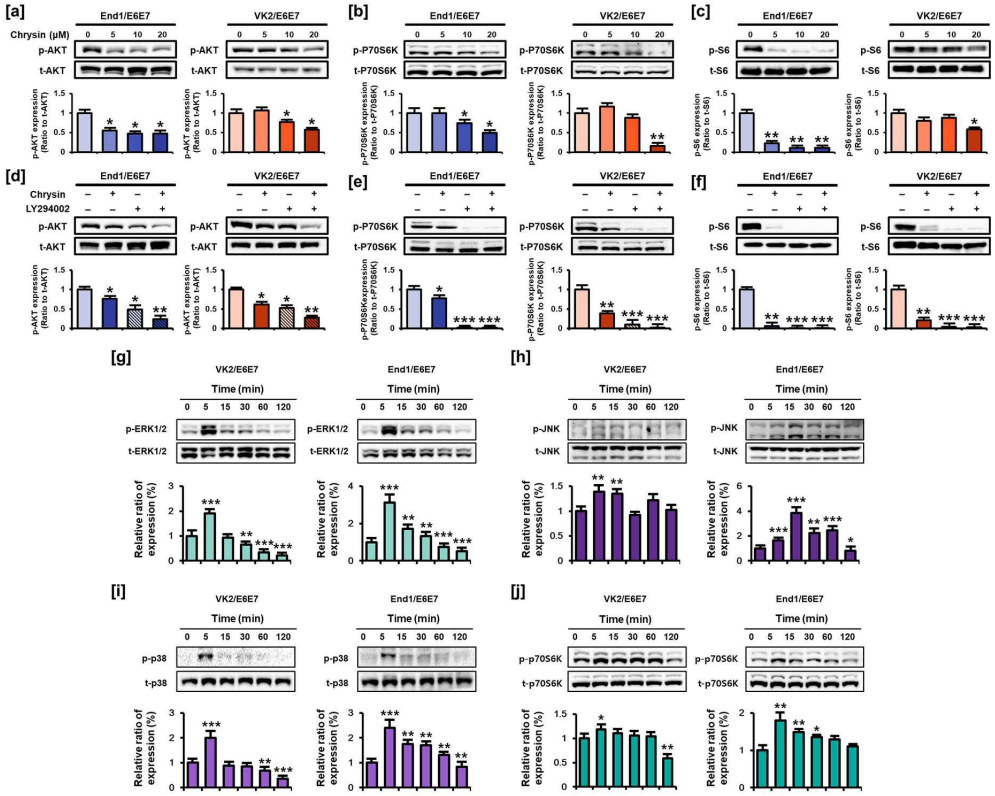
도면3


(a)
Cell counts
Positive control
50.70
Chrysin 0 μM
25.35
Chrysin 5 μM
52.78
Chrysin 10 μM
67.36
Chrysin 20 μM
70.34
DCFH-DA
End1/E6E7
ROS level (%)
Chrysin (μM) H2O2
VK2/E6E7
(b)
Silibinin 0 μM
25.63
Silibinin 5 μM
75.59
Silibinin 2.5 μM
55.04
Silibinin 25 μM
91.16
Silibinin 10 μM
80.03
Silibinin 50 μM
94.74
DCF
Cell count
Generation of ROS (%)
0 μM 2.5 μM 5 μM 10 μM 25 μM 50 μM
Silibinin
Positive control
52.29
Chrysin 0 μM
9.26
Chrysin 5 μM
37.46
Chrysin 10 μM
48.65
Chrysin 20 μM
68.94
Silibinin 0 μM
28.37
Silibinin 5 μM
52.29
Silibinin 2.5 μM
44.84
Silibinin 25 μM
56.17
Silibinin 10 μM
53.49
Silibinin 50 μM
67.00

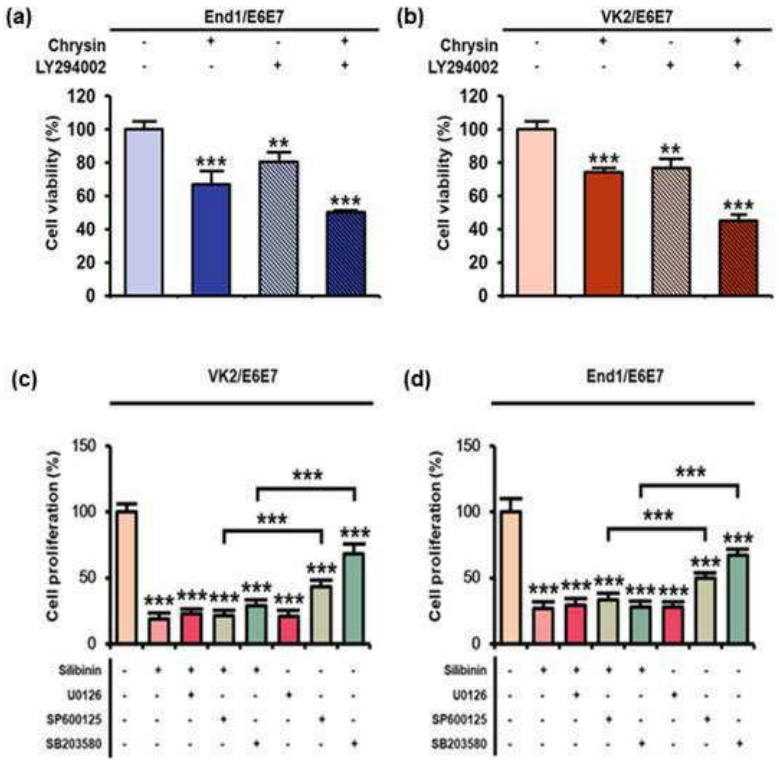
도면4


[a]
End1/E6E7
VK2/E6E7
Chrysin (μM)
0 5 10 20
GRP78
TUBA
GRP78 expression (Ratio to TUBA)
[b]
IRE1α
IRE1α expression (Ratio to TUBA)
[c]
p-PERK
t-PERK
p-PERK expression (Ratio to t-PERK)
[d]
p-eIF2α
t-eIF2α
p-eIF2α expression (Ratio to t-eIF2α)
[e]
Silibinin (μM)
0 5 10 25
Relative ratio of expression (%)
[f]
[g]
[h]
GADD153

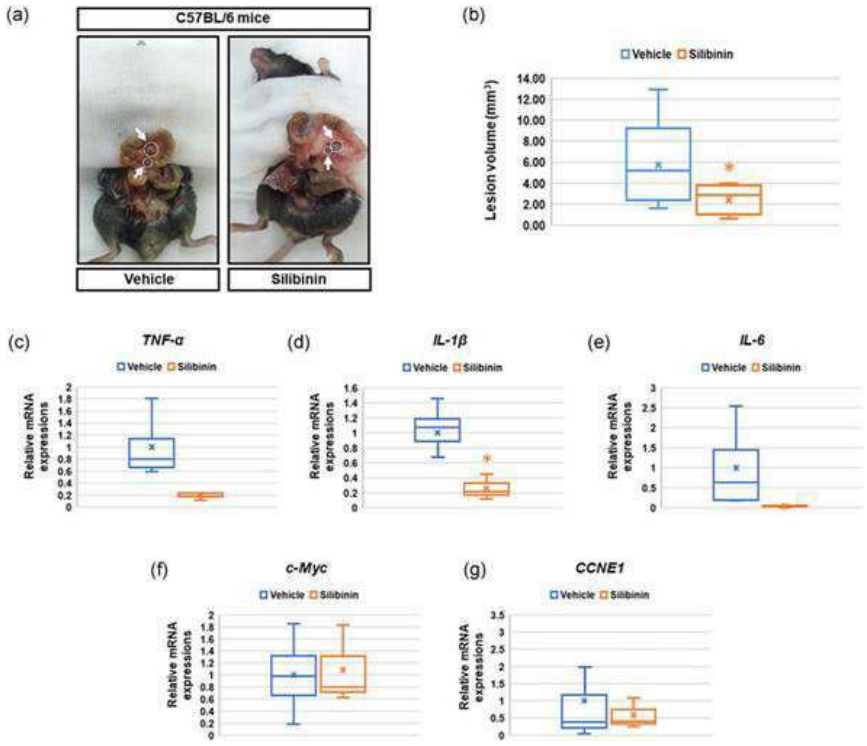
도면5


[a]
End1/E6E7
VK2/E6E7
Chrysin (μM)
0 5 10 20
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]
Chrysin
LY294002
[e]
[f]
[g]
Time (min)
0 5 15 30 60 120
p-ERK1/2
t-ERK1/2
Relative ratio of expression (%)
[h]
p-JNK
t-JNK
[i]
p-p38
t-p38
[j]
p-p70S6K
t-p70S6K

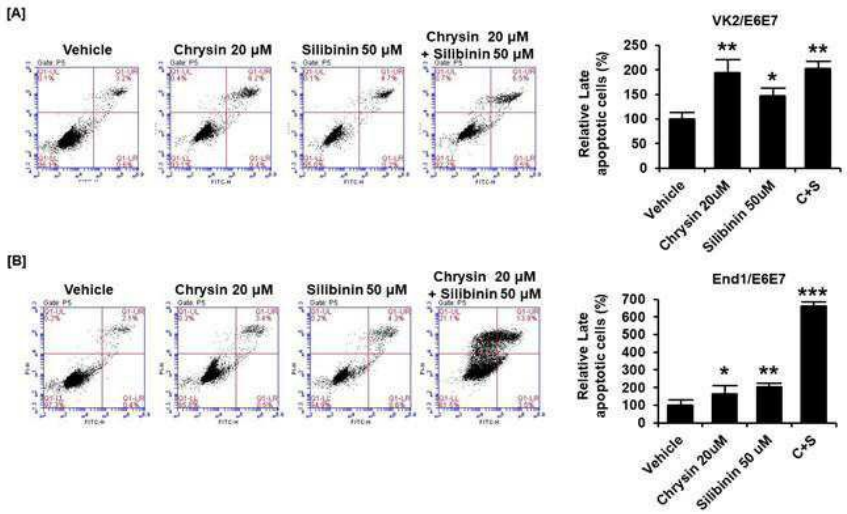
도면6


(a)
End1/E6E7
Chrysin
LY294002
Cell viability (%)
(b)
VK2/E6E7
(c)
Cell proliferation (%)
Silibinin
U0126
SP600125
SB203580
(d)

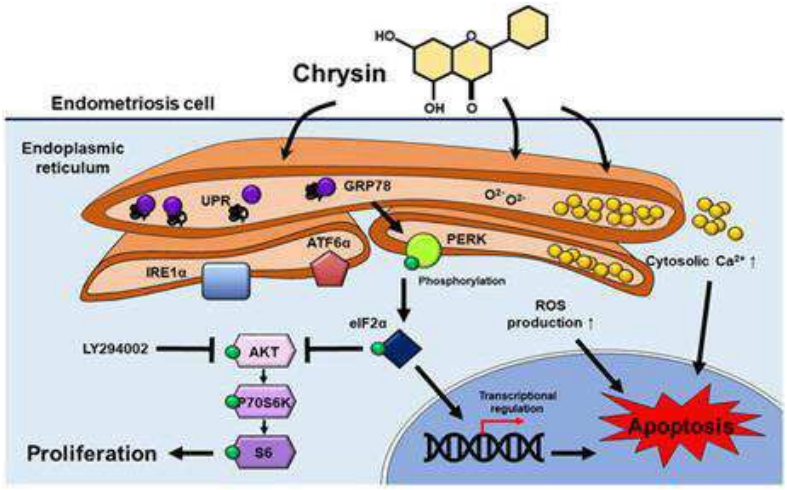
도면7


(a)
C57BL/6 mice
Vehicle
Silibinin
(b)
Vehicle Silibinin
Lesion volume (mm³)
(c)
TNF-α
(d)
IL-1β
(e)
IL-6
Relative mRNA expressions
(f)
c-Myc
(g)
CCNE1

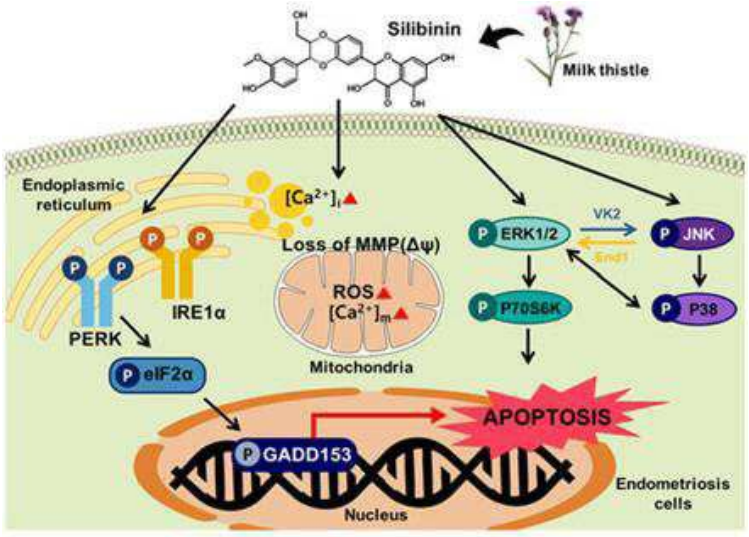
도면8


[A]
Vehicle
Chrysin 20 μM
Silibinin 50 μM
Chrysin 20 μM + Silibinin 50 μM
VK2/E6E7
Relative Late apoptotic cells (%)
Vehicle
Chrysin 20uM
Silibinin 50uM
C+S
[B]
End1/E6E7

도면9


Chrysin
HO
OH
O
Endometriosis cell
Endoplasmic reticulum
UPR
GRP78
O^{2-} O^{2-}
ATF6α
PERK
IRE1α
Phosphorylation
Cytosolic Ca^{2+} ↑
eIF2α
ROS production ↑
LY294002
AKT
P70S6K
S6
Proliferation
Transcriptional regulation
Apoptosis

도면10


Silibinin
Milk thistle
Endoplasmic reticulum
$[Ca^{2+}]_i$
Loss of MMP(Δψ)
ROS
$[Ca^{2+}]_m$
Mitochondria
IRE1α
PERK
eIF2α
ERK1/2
VK2
JNK
P70S6K
P38
APOPTOSIS
GADD153
Nucleus
Endometriosis cells