



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0137743
(43) 공개일자 2018년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/357 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 36/03 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/357 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0077349
(22) 출원일자 2017년06월19일
심사청구일자 2017년06월19일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김성훈
서울특별시 강남구 언주로30길 57, E동 2405호 (도곡동, 타워팰리스)
(74) 대리인
위병갑

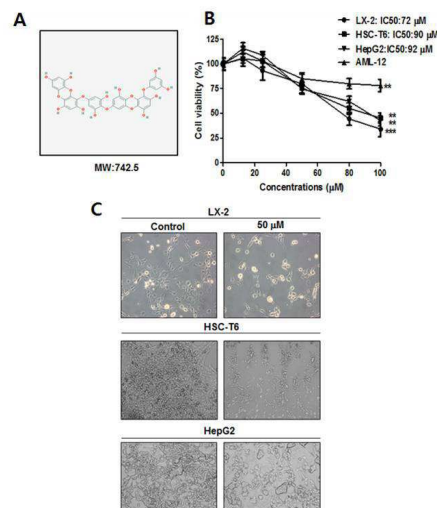
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 디에콜을 포함하는 간섬유화 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 디에콜을 유효성분으로 포함하는 간섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 디에콜을 유효성분으로 포함하는 간섬유화 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명은 간성상 세포의 증식 억제 및 간성상 세포의 사멸 촉진을 통해 간섬유화의 예방 또는 치료에 현저한 효과 가져, 간섬유화의 예방, 치료 또는 개선에 효과적이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/03 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A10052872

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업

연구과제명 간 섬유화 및 암화 유발 유전자를 표적하는 한약소재의 분자작용기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

디에콜을 유효성분으로 포함하는 간섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 디에콜은 감태(*Ecklonia cava*)에서 추출된 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 간섬유화는 알콜 중독, 대사성 질환, 바이러스성 간염, 콜레스테롤성 간 질환 또는 자가 면역성 질환에 의해 유발된 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 간성상 세포의 증식을 억제하는 것인 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 세포의 증식 억제는 세포주기 조절로 인한 것인 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 간성상 세포의 사멸을 촉진하는 것인 약학적 조성물.

청구항 7

디에콜을 유효성분으로 포함하는 간섬유화 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디에콜을 포함하는 간섬유화 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간섬유화(hepatic fibrosis)는 간 조직이 손상과 재생을 반복하여 간염이 발생하고, 간염에서 간섬유증으로 다시 간섬유증에서 간경화증으로 진행되면서 발생하는 질환에 속한다. 간섬유화는 간세포의 지속적인 파괴와 반복적인 간손상에 따라 나타나는 섬유화 현상(fibrogenesis)으로, 세포외 기질(extracellular matrix; ECM)의 생성은 증가되지만 이에 대한 분해는 상대적으로 줄어드는 현상이 발생하고 심해지면 간경화증, 간부전이나 간암으로 진행된다. 간섬유증은 일단 섬유화가 진행되면 정상간으로 복원되기 어려우며, 간경화증이나 간암으로 진행되어 이에 대한 사망률이 계속적으로 증가되는 추세이다.

[0003] 간섬유화에서의 ECM 과다 생성은 간내 대식세포인 쿠퍼 세포(Kupffer cell)가 활성화됨으로써 분비되는 활성 산소종(reactive oxygen species), 성장인자(growth factors), 전섬유화 사이토카인(profibrogenic cytokines) 등에 의해 간성상 세포(hepatic stellate cell; HSC)의 활성화가 촉진되어 상기 활성화된 간성상 세포에서 결합 조직의 생성이 증가됨으로써 발생하는 것으로 알려져 있다(문헌[J. Clin. Invest., 2005, 115 (2), 209-218], 문헌[Gastroenterology, 2008, 134(6), 1655-1669 ; Arch. Pathol. Lab. Med., 2007, 131(11), 1728-1734] 및 문헌[Hepatology, 2009, 50 (4), 1294-1306 ; J. Gastroenterol., 2000, 35, (9), 665-672] 등 참조).

[0004] 이러한 배경 하에, 간섬유화의 치료를 위한 새로운 치료 물질들에 대한 연구개발이 진행될 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 디에콜을 유효성분으로 포함하는 간섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0006] 또한, 본 발명은 디에콜을 유효성분으로 포함하는 간섬유화 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

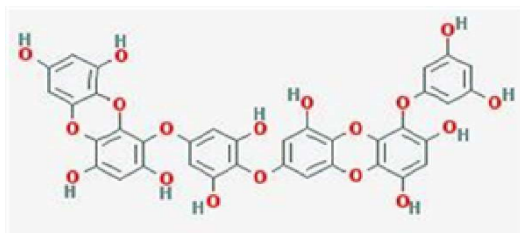
[0007] 본 발명자는 간섬유화 치료에 적합한 치료제를 개발하기 위하여 연구를 진행하던 중 감태(*Ecklonia cava*)에서 추출된 성분인 디에콜(Dieckol)이 간섬유화의 예방 및 치료에 현저한 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 디에콜을 유효성분으로 포함하는 간섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 약학적 조성물은 간성상 세포의 증식 억제 및 간성상 세포의 사멸 촉진을 통해 간섬유화의 예방 또는 치료에 현저한 효과를 나타낸다.

[0010] 본 발명에서, 디에콜이란 하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물이다.

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 디에콜은 갈조류인 감태(*Ecklonia cava*), 곰태(*Ecklonia stolonifera*) 및 대황(*Eisenia bicyclis*) 등으로부터 유래된 플로로타닌(phlorotannin) 화합물로서, 감태, 곰태 또는 대황에서 분리 가능하며, 당업계에 알려진 방법에 따라 상기 갈조류에서 분리 및 추출하여 사용하거나, 신규로 합성하여 사용하거나 시판되는 제품을 구매하여 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명에서 “추출”이란 천연물로부터 활성성분을 분리하는 것을 의미하며, 물, 유기 용매 또는 이의 혼합용매를 이용하는 추출 과정으로 추출물을 획득할 수 있으며, 상기 추출물은 추출액, 이의 건조 분말 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명에서 상기 추출은 알코올 수용액으로 추출되는 것일 수 있다. 본 발명의 알코올 수용액은 탄소수 1 내지 4의 알코올 수용액일 수 있고, 바람직하게는 메탄올 수용액일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 알코올 수용액은 20% 내지 90%의 알코올 수용액일 수 있고, 80% 알코올 수용액인 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명에서, 간섬유화(hepatic fibrosis)란 간 장애의 결과 간에 섬유가 증가한 상태를 의미하며, 만성 간염에 의해 유도되는 세포의 기질의 과도한 축적에 따른 간 질환이다. 상기 만성 간염은 알콜 중독, 대사성 질환, 바이러스성 간염, 콜레스테롤성 간 질환 및 자가면역성 질환 등에 의한 것일 수 있으며, 종국적으로 간경변증으로 진행될 수 있다. 상기 바이러스성 간염은 B형 간염 또는 C형 간염을 포함한다.

[0017] 본 발명의 약학적 조성물은 간성상 세포의 증식 억제 및 간성상 세포의 사멸 촉진을 통해 간섬유화의 예방 또는 치료 효과를 나타내며, 특히 간성상 세포의 세포주기 조절 및 JNK 활성화 등을 통해 간섬유화의 예방 및 치료에 현저한 효과를 보인다.

[0018] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 90 중량 % 함유할 수 있다.

[0019] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스,

오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 약학적 조성물 100 중량%에 대해 0.1 내지 90 중량% 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 약학적 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제 화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0023] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 0.001 내지 300mg/체중kg일 수 있고, 바람직하게는 0.01 내지 30mg/체중kg일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 투여의 경우 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다.

[0024] 아울러, 본 발명은 디에콜을 유효성분으로 포함하는 간섭유화 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0025] 본 발명에서 “건강기능식품”이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미한다. 본 발명에서 “기능성”이란 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적인 작용으로 보건 용도에 유용한 효과를 의미할 수 있다.

[0026] 본 발명의 간섭유화 예방 또는 개선용 건강기능식품은 디에콜을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 디에콜을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 또는 건강기능식품은 간성상 세포의 증식 억제 및 간성상 세포의 사멸 촉진을 통해 간섭유화의 예방 또는 치료에 현저한 효과 가져, 간섭유화의 예방, 치료 또는 개선에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 간성상 세포에서 디에콜의 세포독성을 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 간성상 세포에서 간섭유 생성(fibrogenesis)의 바이오마커인 α -SMA 및 TGF- β 1에 대한 디에콜의 발현 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 간성상 세포에서 디에콜의 서브-G1 기 유도 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 간성상 세포에서 디에콜에 의한 아포토시스 소체 형성 결과를 나타낸다.

도 5는 간성상 세포에서 디에콜의 pro-PARP 및 pro-caspase 3 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 간성상 세포에서 디에콜의 JNK 활성화 및 NF- κ B 및 I κ B 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 간성상 세포에서 디에콜의 간염유화 억제에 대한 JNK의 역할을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0031] <제조예 1> 디에콜의 추출 및 분리
- [0032] 감태(*Ecklonia cava*)를 제주도에서 수확 및 분리하였다. 건조된 감태 2.8 kg을 10 L의 n-헥산(hexane)에 담가 여과하여, 0.3% 아스코르브산을 포함하는 80% MeOH (10 L $\times$ 3)에서 12 시간 동안 진탕 추출하였다. 추출 용액을 여과 및 증발시켜 MeOH 추출물 289 g을 얻었다. 그 다음, MeOH 추출물을 H₂O(4L)에 붓고 n-헥산(4 L $\times$ 2), EtOAc(4 L $\times$ 2), 및 n-BuOH(3.5 L $\times$ 2)로 연속하여 추출하였다. 각 층을 증발시켜 n-헥산 분획(12 g), n-BuOH 분획(34 g), EtOAc 분획(63 g) 및 수성 분획(180 g)을 얻었다. EtOAc 분획의 일부(ECE, 55 g)에 대해 셀라이트(Celite) 컬럼 크로마토그래피(c.c.)를 실시하고 CHCl₃-MeOH (3:1)로 용출시켜 11 분획(ECE1 내지 ECE11)을 얻었다. 용출 용매로서 80% MeOH를 사용하여 세파덱스(Sephadex) LH-20에 ECE-3 분획(6 g)을 적용해 20 분획(ECE3-1 내지 ECE3-20)과 함께 플로로타닌(phlorotannin)인 디에콜 ECE3-19, 124 mg)을 얻었다.
- [0033] 디에콜, 즉 [[[디옥신-2-일]옥시]3-5-디히드록시페녹시]-디벤조[b,e][1,4]디옥신-1,3,6,8-테트롤([[[dioxin-2-yl]oxy]-3,5-dihydroxyphenoxy]-dibenzo[b,e][1,4]dioxin-1,3,6,8-tetrol)을 참고 문헌에 보고된 데이터와 비교하여 NMR, MS 및 IR 등의 분광 분석으로 동정하였다.
- [0034] <제조예 2> 세포의 배양
- [0035] 간성상 세포(hepatic stellate cell)로서 사람의 불멸화(immortalization) 간성상세포(human LX-2) 및 래트의 간성상세포(HSC-T6)를 분양받아 사용하였고, 인간의 간암세포주인 HepG2 암종 세포(ATCC HB-8065) 및 정상 간세포인 AML-12 세포(ATCC CRL-2254)를 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 얻었다.
- [0036] 간성상 세포를 5% 우태혈청(FBS) 및 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 mg/mL)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 37°C, 5% CO₂ 하에서 인큐베이션하였다. 인간 간암세포주인 HepG2 세포주와 인간의 정상 간세포 AML-12 세포주를 10% 우태혈청(FBS) 및 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 mg/mL)을 포함하는 DMEM으로 37°C, 5% CO₂ 하에서 인큐베이션하였다.
- [0037] <실시예 1> 간성상 세포에서 디에콜의 세포독성 확인
- [0038] 디에콜의 세포독성 효과를 MTT assay를 사용하여 측정했다. 먼저, LX-2, HSC-T6, HepG2 및 AML-12 세포(1 $\times$ 10⁵ 세포/웰)를 96-웰 배양 플레이트에 분배한 뒤, 다양한 농도(0, 12.5, 25, 50, 80 및 100 μ M)의 디에콜로 24 시간 동안 처리했다. 그 다음, MTT 용액(PBS 내에 1 mg/mL) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)을 첨가하고 2 시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 PBS로 세척하고, 100 μ l의 DMSO를 첨가한 후 상온에 20 분 동안 방치하였다. 그 다음, 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서의 광학밀도(OD)를 측정했다. 디에콜이 처리된 군과 비처리된 군에서 세포 생존율(viability)을 생존한 세포의 퍼센트로 계산했다.
- [0039] 그 결과를 도 1에 나타냈다. 도 1의 B는 다양한 농도의 디에콜을 처리한 후의 세포 생존율을 나타낸 것으로, 디에콜은 간성상 세포(LX-2, HSC-T6 세포) 및 간암 세포(HepG2) 세포에서는 생존율을 상당히 억제하였으나, 정상 간세포(AML-12 세포)에서는 비교적 세포 독성이 미미함을 보여준다.
- [0040] 한편, LX-2, HSC-T6 및 HepG2 세포에 50 μ M의 디에콜을 24 시간 동안 처리한 후 세포의 형태를 현미경(배율 $\times$ 200)으로 관찰한 결과를 도 1C에 나타냈다. 도 1의 C는 디에콜이 처리되거나 처리되지 않은 LX-2, HSC-T6 및 HepG2 세포의 현미경 사진으로, 디에콜이 처리되지 않은 대조군의 경우 LX-2, HSC-T6 및 HepG2 세포 모두 섬유화의 특징적인 형태(large, spread out, flattened polygonal shape)가 관찰되었으나, 디에콜이 처리된 군에서

는 세포의 형태에 변화가 일어나, 길고(elongated) 둥근(round) 단일 세포들이 관찰되었다.

[0041] 따라서, 디에콜은 간성상 세포의 사멸을 촉진하여 간섬유화의 진행을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0042] <실시예 2> 간성상 세포에서 디에콜의 간섬유생성 단백질 억제 효과 확인

[0043] LX-2 및 HSC-T6 세포에서 디에콜의 간섬유화 저해(heaptic antifibrosis) 효과를 측정하기 위해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0044] 먼저, 세포에 24 시간 동안 디에콜을 처리한 후, PBS로 세척한 다음 lysis 용액 (20mM 자당, 1mM EDTA, 20 μ M Tris-CL, pH7.2, 1mM DTT, 10mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 5 μ g/mL 펩스타틴 A, 10 μ g/ml 류펩틴 및 2 μ g/mL 아프로티닌)을 첨가하여 용리시켰다. 원심분리 후 상등액을 수집하여 단백질 농도를 측정한 후, 30 μ g을 함유한 분취액을 bio-rad 단백질 분석 키트를 이용하여 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리한 다음, 니트로셀룰로스 멤브레인에 트랜스퍼하였다. 3% BSA를 포함한 PBST-Tween20에 희석(1:5001:2000)된 지시된 1차 항체로 4 ° C에서 밤새 인큐베이션하고, PBS-Tween20으로 3회 세척한 다음, HRP-컨쥬게이트된 2차 항체로 인큐베이션하였다. 단백질 발현을 ECL 웨스턴 블롯팅 검출 시약 (GE Healthcare, Buckingham, England)을 사용하여 측정하였다.

[0045] LX-2 및 HSC-T6 세포에서, 간섬유 생성(hepatic fibrogenesis)의 바이오마커인 α -SMA 및 TGF- β 1의 발현을 α -SMA (#53015, 1:1000), TGF- β 1 (#146, 1:1000) (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) 및 β -액틴 항체 (#A5316, 1:5000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 1차 항체로 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 측정했다.

[0046] 그 결과를 도 2에 나타냈다. 도 2의 그래프는 β -액틴 발현양에 대한 α -SMA 및 TGF- β 1 발현양의 상대적 비율을 나타내며, 디에콜은 LX-2 및 HSC-T6 세포 모두에서 α -SMA 및 TGF- β 1의 발현을 저해함을 확인하였다.

[0047] 따라서, 디에콜은 간섬유 생성에 관여하는 단백질 활성을 억제하여 간섬유화를 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0048] <실시예 3> 간성상 세포에서 디에콜의 서브-G1 기 유도 효과 확인

[0049] LX-2 및 HSC-T6 세포에서 세포 사멸을 의미하는 서브-G1 population에 대한 디에콜의 효과를 알아보기 위해, 세포 주기 분포를 디에콜이 처리된 세포에서 유세포 분석기(flow cytometry)로 분석했다.

[0050] 먼저, 디에콜에 24 시간 동안 노출된 LX-2 및 HSC-T6 세포를 수확하여 70% 에탄올에서 고정했다. 그 후, 세포를 0.1% 리보뉴클레아제(RNase) A가 포함된 PBS에서 37 ° C로 30 분 동안 인큐베이션하고, 30 μ g/mL 프로피디움 아이오다이드(PI)를 포함하는 PBS에서 상온으로 30 분 동안 현탁했다. 그 다음, Cell Quest program (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)과 FACSCalibur (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 염색된 세포로부터 서브-G1 축적량(accumulation)을 측정했다.

[0051] 그 결과를 도 3에 나타냈다. 도 3은 아포토시스가 진행중인 서브-G1 DNA 함량의 퍼센트를 나타내며, LX-2 및 HSC-T6 세포 모두에서 디에콜의 처리는 서브-G1 기에 속한 population을 상당히 증가시켰다.

[0052] 따라서, 디에콜은 간성상세포의 세포 사멸을 촉진하여 간섬유화 진행의 억제에 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0053] <실시예 4> 간성상 세포에서 디에콜에 의한 아포토시스 소체 유도 효과 확인

[0054] LX-2, HSC-T6 및 HepG2 세포를 4×10^5 세포/mL의 농도로 시딩하고, 24 시간 동안 디에콜(50 μ M)을 처리하거나 처리하지 않았다. 세포를 모아서 3.7% 파라포름알데히드로 상온에서 10 분 동안 고정하였다. 그 후, 상등액을 제거하고 200 μ l의 PBS로 현탁하여 cytopsin으로 세포를 슬라이드 글라스에 부착시킨 후, PBS와 DW로 번갈아 세척하여 건조시켰다. 그 후, 2.5 μ g/ml로 희석시킨 DAPI 용액으로 30 분 동안 염색시켰다. 현광 현미경 (Carl Zeiss Inc., Weimar, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 세포핵의 형태를 관찰했다.

[0055] 그 결과를 도 4에 나타냈다. 도 4는 DAPI 염색된 LX-2, HSC-T6 및 HepG2 세포를 400 배의 배율로 관찰한 것으로, 비처리군과 비교하여 디에콜이 처리된 LX-2, HSC-T6 및 HepG2 세포 모두에서 아포토시스 소체(apoptotic body)가 나타남을 확인하였다.

[0056] 따라서, 디에콜은 간성상세포의 세포 사멸을 촉진하여 간섬유화 진행의 억제에 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0057] <실시예 5> 간성상 세포에서 디에콜의 pro-PARP 및 pro-caspase 3 억제 효과 확인

[0058] 디에콜이 pro-PARP 및 pro-caspase 3의 발현양에 미치는 영향력을 알아보기 위해, LX-2, HSC-T6 및 HepG2 세포

를 24 시간 동안 디에콜(0, 25, 50 μ M)로 처리했다. 그 다음, 세포 용해물을 준비하여 poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP#9542, 1:1000), Pro-caspase-3 (#9662, 1:1000) (Cell signaling, Beverly, MA, USA), 및 β -액틴 (#A5316, 1:5000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 항체로 pro-PARP, pro-caspase-3 및 β -액틴에 대한 웨스턴 블롯팅을 실시예 2에 기재된 방법대로 실시했다.

[0059] 그 결과를 도 5에 나타냈다. 도 5의 그래프는 β -액틴에 대한 pro-PARP 및 pro-caspase-3의 상대적 발현량을 나타내며, LX-2, HSC-T6 및 HepG2 세포 모두에서 pro-caspase-3 및 pro-PARP의 발현을 모두 상당히 약화시켰다.

[0060] 따라서, 디에콜은 간성상세포의 세포 사멸을 촉진하여 간섬유화 진행의 억제에 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0061] <실시예 6> 간성상 세포에서 디에콜의 JNK 활성화 및 NF- κ B 및 I κ B 억제 효과 확인

[0062] LX-2 세포사멸에 MAPK kinases가 관련하고 있는지 확인을 한결과 p-JNK의 활성을 통하여 세포사멸이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 간성상세포 활성화는 손상 받은 주위 간세포, Kupffer 세포 혹은 SECs 등에서 분비되는 TGF β 1, PDGF, ET-1 등의 사이토카인 및 lipid peroxides에 의한 oxidative stress등에 의해 성상세포에서 nuclear factor κ B (NF- κ B)의 전사인자 발현이 증가되어 활성화가 일어나며, 간섬유화를 유발시키는 기전으로 알려져 있다.

[0063] MAPK kinase, NF- κ B 및 I κ B 단백질 활성화에 미치는 디에콜의 효과를 알아보기 위해, LX-2 세포에 24 시간 동안 디에콜(0, 25, 50 μ M)을 처리했다. 세포 용해물을 준비하여 p-ERK (#9101, 1:1000), p-p38 (#9211, 1:1000), p38 (#9212, 1:1000), p-JNK (#9251, 1:1000), JNK (#9252, 1:1000), AKT (#4691, 1:1000), p-AKT (#4060, 1:1000),

[0064] NF- κ B (#8242, 1:1000), p-NF- κ B (#3033, 1:1000), p-I κ B (#9246, 1:1000) (Cell signaling, Beverly, MA, USA) 및 β -액틴 (#A5316, 1:5000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 항체로 phospho-p38, p38, phospho-JNK, JNK, phospho-ERK 및 ERK 및 phospho-NF- κ B, NF- κ B, p-I κ B에 대한 웨스턴 블롯팅을 실시예 2에 기재된 방법대로 수행했다.

[0065] 그 결과를 도 6에 나타냈다. 디에콜은 세포사멸을 유도하는 phospho-JNK를 활성화시킨 반면, p38, NF- κ B 및 I κ B의 인산화를 상당히 억제하여, 간섬유화 유발을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여준다.

[0066] <실시예 7> 간성상 세포에서 디에콜의 간섬유화 억제에 대한 JNK의 역할 확인

[0067] 디에콜에 의해 유발된 간섬유화 억제 및 세포사멸 효과에서 JNK의 역할을 확인하기 위해, LX-2 세포에 10 μ M의 JNK 억제제(SP600125)를 1 시간 동안 전처리한 다음, 50 μ M의 디에콜을 24 시간 동안 처리했다. 전체 세포 용해물을 준비하고, 제조사의 프로토콜에 따라, NE-PER 세포핵 및 세포질 추출 시약(Thermo, Rockford, IL, USA)을 사용하여 세포질 분획물 및 세포핵 분획물을 준비했다. 그 다음, 전체 세포 용해물에 대해 JNK (#9252, 1:1000), p-JNK (#9251, 1:1000) (Cell signaling, Beverly, MA, USA), α -SMA (#53015, 1:1000), TGF- β 1 (#146, 1:1000) (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA), pro-caspase-3 (#9662, 1:1000), poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP#9542, 1:1000), β -액틴 (#A5316, 1:5000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 항체로, 세포질 분획(CE)에 대해 p-I κ B (#9246, 1:1000) (Cell signaling, Beverly, MA, USA) 및 β -액틴 (#A5316, 1:5000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 항체로, 세포핵 분획(NE)에 대해 NF- κ B (#8242, 1:1000), poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP#9542, 1:1000) (Cell signaling, Beverly, MA, USA) 항체로 실시예 2에 기재된 방법대로 웨스턴 블롯팅을 수행했다.

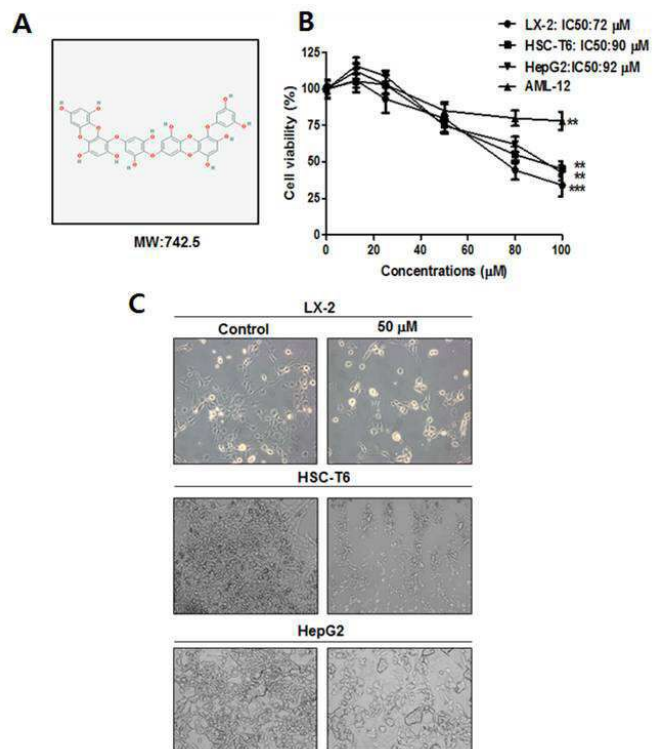
[0068] 그 결과를 도 7에 나타냈다. JNK 억제제 SP600125는 LX-2 세포에서 디에콜에 의해 억제된 TGF- β 1를 활성화시키고(도 7의 B), 억제된 caspase-3를 활성화시킬 뿐만 아니라 PARP의 절단으로 감소된 Pro-PARP의 발현을 회복시켰으며(도 7의 C), 디에콜에 의해 억제된 세포질 내 I κ B 및 세포핵 내 NF- κ B를 원래 수준으로 회복(도 7의 D)시켰다.

[0069] 즉, JNK 억제제와 디에콜을 모두 처리하였을 경우 세포사멸이 유도되지 않음을 확인할 수 있으며, 디에콜이 JNK를 활성화시킴으로써 NF- κ B를 조절하여 세포사멸을 유도함을 확인할 수 있다.

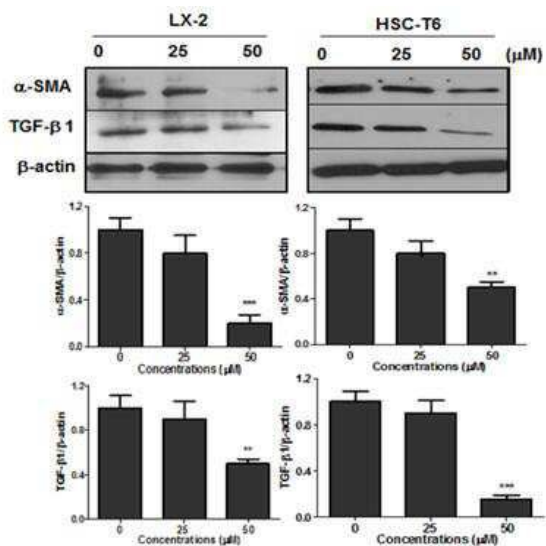
[0070] 따라서, 디에콜은 JNK 인산화 및 NF- κ B 억제를 통해 간성상세포의 간섬유화 진행을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있다.

도면

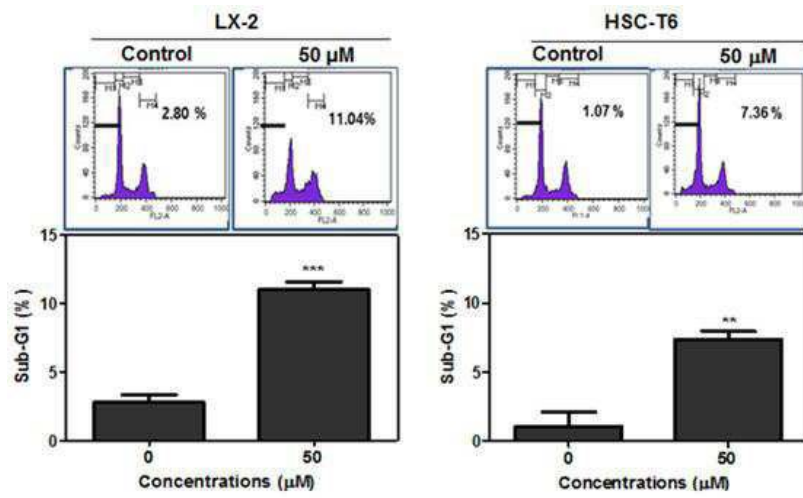
도면1



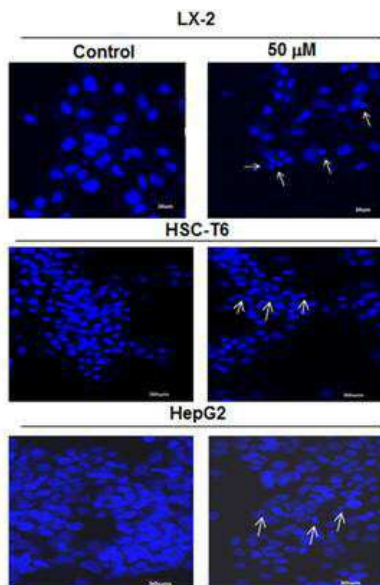
도면2



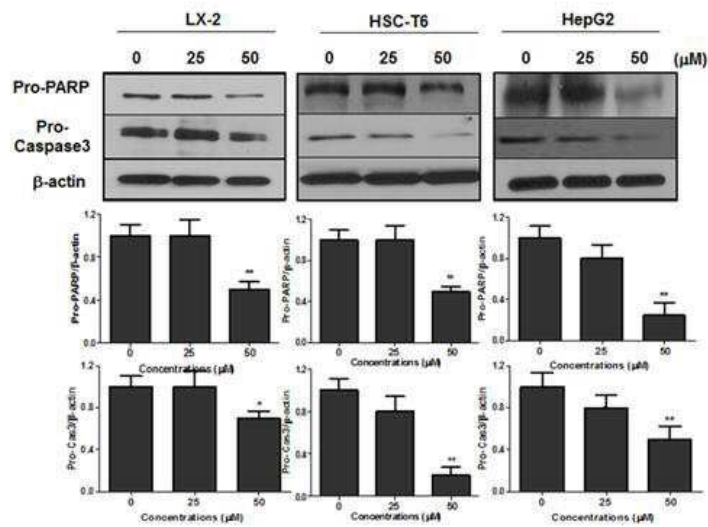
도면3



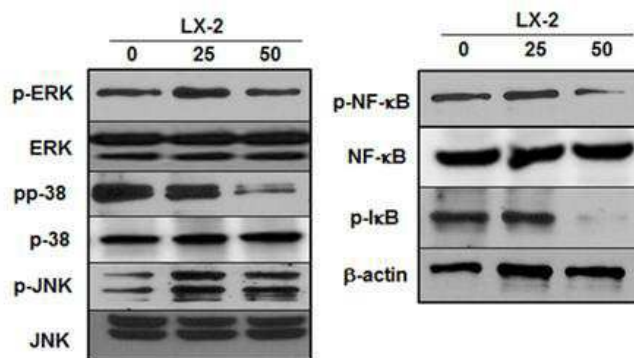
도면4



도면5



도면6



도면7

