



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0052547
(43) 공개일자 2020년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/353 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)

A61P 15/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/353 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0135584

(22) 출원일자 2018년11월07일

심사청구일자 2018년11월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

가톨릭관동대학교산학협력단

강원도 강릉시 범일로579번길 24(내곡동, 가톨릭관동대학교)

(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

전체 청구항 수 : 총 7 항

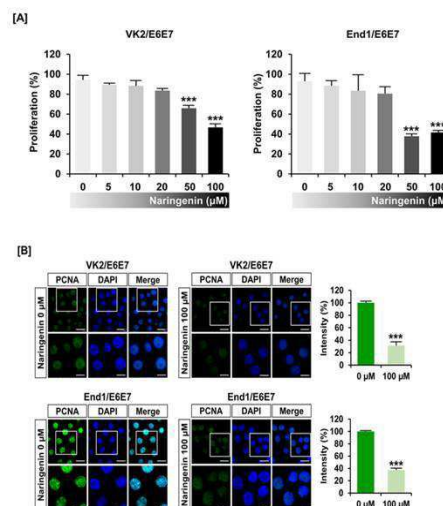
(54) 발명의 명칭 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

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

본 발명에 따른 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 조성물은 천연물을 원료로 하는바 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 자궁내막증 세포주의 증식 억제 및 사멸 효과를 향상시킬 수 있는바, 자궁내막증 예방, 치료 또는 개선용 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 15/02 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C0929

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 액체생체검사 기반 난소암 조기 진단, 재발 예측 및 항암제 내성 관련 엑소좀 바이오마커

발굴 및 검증

기 여 율 1/1

주관기관 가톨릭관동대학교

연구기간 2017.04.10 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

나린제닌을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나린제닌이 자궁내막증 세포의 증식과 관련된 PI3K/AKT, MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 나린제닌이 자궁내막증 세포의 산화스트레스, 활성산소 및 지질과산화를 유도하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 나린제닌이 자궁내막증 세포의 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 유도하며 세포사멸 단백질의 발현을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

나린제닌을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 따른 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법.

청구항 7

제1항에 따른 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

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

배경 기술

[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), 자궁내막증은 그 발병 원인이 뚜렷하게 밝혀지지 않았고, 따라서 수술 외에는 근본적인 치료방법이 전무한 상태이며 25%의 환자는 통증의 재발을 경험하는 것으로 보고된바 있다(Practice Committee of the American Society for Reproductive, Fertil Steril 2012; Vercellini P *et al.*, Hum Reprod Update, 2009).

[0003] 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).

[0004] 한편, 나린제닌(naringenin)은 폴리페놀계 화합물로서 항돌연변이, 항염증, 항산화, 항암 등의 효과를 가지는 식물추출물로 연구되고 있으나(Patel K et al., Chin J Integr Med, 2014), 현재까지 나린제닌의 자궁내막증 치료 효과는 보고된바 없다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 자궁내막증 치료 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 나린제닌이 자궁내막증 세포주의 증식을 억제하고 세포의 사멸효과를 향상시키는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 또한, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 조성물은 천연물을 원료로 하는바 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 자궁내막증 세포주의 증식 억제 및 사멸 효과를 향상시킬 수 있는바, 자궁내막증 예방, 치료 또는 개선용 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 나린제닌 처리가 자궁내막증 세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 나린제닌 처리가 자궁내막증 세포의 사멸에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 나린제닌에 의한 자궁내막증 세포의 사멸이 미토콘드리아 의존적인 경로로 발생하는지 여부를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 나린제닌 처리가 자궁내막증 세포 내 활성산소, 소포체 스트레스 발생에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 나린제닌 처리가 정상 자궁내막 세포의 증식 및 사멸에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 나린제닌이 자궁내막증 세포 내 신호전달기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 나린제닌과 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 자궁내막증 세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 나린제닌과 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 자궁내막증 세포 내 신호전달 단백질의 인산화에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 자궁내막증 세포 내 나린제닌에 의한 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 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.
- [0018] 본 발명에서는 나린제닌에 의한 자궁내막증 세포의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 9).
- [0019] 본 발명은 일 관점에서 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명은 다른 관점에서 나린제닌을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [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, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 용액, 현탁액, 에멀전, 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 얻는 목적으로 섭취하는 식품을 의미한다.
- [0027] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있고, 과립제, 정제, 환제, 현탁액, 에멀전, 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, 방부제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분들을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 나린제닌이 자궁내막증 세포의 증식과 관련된 PI3K/AKT, MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 나린제닌이 자궁내막증 세포의 산화스트레스, 활성산소 및 지질과산화를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 나린제닌이 자궁내막증 세포의 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 유도하며 세포사멸 단백질의 발현을 활성화시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 자궁내막증 세포주의 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] **실시예**
- [0038] **<실험 방법>**
- [0039] 세포배양
- [0040] 자궁내막증 세포주인 VK2와 End1 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 Keratinocyte 배지에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 human EGF (epithelial growth factor)을 함께 혼합하여 사용하였다.
- [0042] 실험 재료
- [0043] 후보 조성물질인 나린제닌은 Sigma로부터 구매하여 사용하였으며, 나린제닌에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6, P38, JNK, eIF2 α 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6, P38, JNK, Bak, Bax, IRE1 α 단백질을 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 이 외, PCNA 항체와 α -tubulin, GRP78, GADD153은 각각 Santa Cruz Biotechnology사에서 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126, P38 억제제인 SB203580, JNK 억제제인 SP600125을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.
- [0045] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석
- [0046] 자궁내막증 세포의 증식 능력에 나린제닌이 미치는 영향을 확인하기 위하여 3×10^3 개의 VK2와 End1 세포에 나린제닌을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 이후, 10 μ M BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37 $^{\circ}$ C/5% CO $_2$ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. VK2와 End1 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어 주었다. 마지막으로 100 μ l의 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine substrate으로 세포를 반응시켜 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.
- [0048] TUNEL assay를 통한 DNA 분절화 확인
- [0049] 3×10^4 개의 VK2와 End1 세포를 각각 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 나린제닌 100 μ M을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시키고, 상기 고정된 세포를 PBS로 한번 행

귀내고 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% CO₂ 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였으며, 마지막으로 PBS로 행구고 DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0051] 면역형광법

[0052] 3×10^4 개의 VK2와 End1 세포를 각각 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 나린제닌 100 μ M을 24시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μ g/ml의 PCNA 항체를 처리하였으며 37℃에서 24시간 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 1시간 동안 배양하였다. VK2와 End1 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 두 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.

[0054] 마이트콘드리아 막전위 측정

[0055] 5×10^5 개의 VK2와 End1 세포에 나린제닌을 용량의존적으로 처리하여 48시간동안 배양한 뒤 세포를 JC-1 염색을 시켜 37℃에서 20분간 처리하였다. 이후, 각 세포를 버퍼로 워싱한 다음 유세포분석기 (FACS calibur)를 이용하여 세포의 마이트콘드리아 막전위차를 측정하였다.

[0057] DCFH-DA 염색을 이용한 활성산소종 생성 측정

[0058] 세포내 활성산소종 생성을 측정하기 위해 과산화물의 존재하에 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)에서 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 전환되는 시약을 Sigma-Aldrich사에서 구매하여 사용하였다. 자궁내막증 세포를 0.05% 트립신을 사용하여 배양접시에서 떼어낸 후 원심분리하여 PBS에 워싱하고, 10 μ M의 DCFH-DA를 처리하여 30분간 37℃/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 인큐베이션 하였다. 이후 PBS로 두 번 워싱을 진행 하고, 나린제닌을 용량의존적으로 처리하여 1시간 동안 37℃/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 인큐베이션 하였다. 다시 PBS로 워싱을 진행한 후 유세포 분석기를 사용하여 DCF의 형광강도를 측정하였다.

[0060] Linoleamide alkyne (LAA)를 통한 지질과산화 형광 측정

[0061] Life technologies사에서 Click-iT lipid peroxidation imaging kit를 구입하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 간단히, 3×10^4 개의 자궁내막증 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μ l와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 100 μ M 나린제닌과, 50 μ M의 linoleamide alkyne(LAA)을 처리하여 37℃/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2시간 인큐베이션 하였다. 이후 3.7% 포름알데하이드로 고정시키고, 0.5% Triton X-100 용액을 사용하여 투과화 과정을 진행한 후, LAA 산화에 변형된 단백질의 친핵성 결사슬을 Alexa Fulor 488 azide처리 gm 실온에서 30분 인큐베이션하여 표시하였다. DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0063] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0064] VK2와 End1 세포에 나린제닌 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 VK2와 End1 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.

[0066] 통계분석

[0067] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0069] **<결과 및 고찰>**

[0070] 나린제닌이 자궁내막증 세포 증식에 미치는 영향 확인

[0071] 나린제닌이 자궁내막증 세포 VK2와 End1에 미치는 영향을 확인하기 위하여 나린제닌을 용량별 (0, 5, 10, 25, 50, μ 100 M)로 처리하여 48시간 이후의 세포성장을 BrdU를 이용하여 비교측정하였다. 그 결과 자궁내막증 세포의 증식능력은 나린제닌의 농도에 따라 점진적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 1A). 두 세포에서 모두 100 μ M 농도의 나린제닌 처리 시 세포 증식력이 최대 50% 이상 감소 ($P < 0.001$) 하였으나, 이후 실험에서는 100 μ M을 나린제닌 처리의 최적 농도로 설정하였다. 다음으로 100 μ M 나린제닌을 24시간 처리한 자궁내막증 세포에 세포증식마커인 PCNA를 면역형광염색 하였다. 그 결과 대조군의 VK2 및 End1 세포에서는 PCNA가 과다발현 하고 있었지만, 나린제닌을 처리한 세포에서는 PCNA 발현이 모두 감소한 것을 확인하였다(도 1B). 이러한 결과를 통해 나린제닌이 자궁내막증 세포인 VK2, End1 세포의 증식을 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[0073] 나린제닌의 처리에 따른 VK2와 End1 세포 사멸 확인

[0074] 세포증식 실험의 결과에 따라, 나린제닌을 VK2와 End1 세포에 48시간 처리하였을 때 사멸하는 세포의 수를 Annexin V 및 propidium iodide로 염색하여 측정하였다. 그 결과, 자궁내막증 세포는 나린제닌 용량 의존적 (0, 20, 50, 100 μ M)으로 사멸 세포의 수가 증가하였다 (도 2A). 100 μ M의 나린제닌 처리 시 VK2 세포의 사멸은 약 7배 ($P < 0.001$) 증가하였고 End1 세포의 사멸은 약 2배 ($P < 0.001$) 증가하였다. 또한, 100 μ M 나린제닌의 24시간 처리를 통해 VK2와 End1의 DNA 분절화 (DNA fragmentation)가 발생하는 것을 관찰하였다(도 2B). 나린제닌 처리에 따라 세포사멸이 발생하는 자궁내막증 세포 내에서 붉은색으로 관찰되는 DNA 분절화를 확인할 수 있었으며 이를 통하여 나린제닌이 자궁내막증 세포의 DNA 분절화를 통해 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

[0076] 나린제닌 처리에 따른 자궁내막 세포의 미토콘드리아 의존성 세포사멸 확인

[0077] 나린제닌을 용량 의존적으로 자궁내막증 세포에 처리하였을 때, 세포사멸이 미토콘드리아 의존적인 경로로 발생하는지 여부를 미토콘드리아 염색 키트를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 나린제닌을 처리한 자궁내막증 세포 내에서 미토콘드리아 막 투과성이 감소하는 것을 확인하였다(도 3A). 미토콘드리아 막 투과성은 100 μ M 나린제닌 처리에 따라 VK2 세포에서 2배 ($P < 0.001$) 가량 감소하였으며 End1 세포에서 10배 ($P < 0.001$) 가량 감소하였다. 뿐만 아니라, 양성 대조군으로 발리노마이신이 미토콘드리아의 막 전위를 떨어뜨리는데 사용되었다. 또한, 미토콘드리아의 세포 사멸유도 단백질인 Bax와 Bak가 나린제닌 처리에 따라 점진적으로 증가하는 것을 웨스턴블롯을 통해 확인하였다(도 3B). 이러한 결과들을 통해 나린제닌 처리에 따른 세포사멸 효과는 미토콘드리아 의존적인 경로를 통해 DNA 분절화가 일어나며 발생한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0079] 나린제닌의 용량의존적 처리에 따른 자궁내막증 세포내 활성산소 및 소포체 스트레스 발생 확인

[0080] 자궁내막증 세포주 내 나린제닌 처리에 따른 활성산소 발생 여부를 DCFH-DA 염색을 통해 관찰하였다. 그 결과, 자궁내막증 세포주인 VK2와 End1에서 모두 용량의존적인 활성산소 증가가 관찰되었다(도 4A). 100 μ M 나린제닌 처리에 따라 VK2 세포에서는 활성산소가 3배 ($P < 0.001$) 가량 증가하였으며 End1 세포에서는 약 2배 ($P < 0.001$) 가량 증가하였다. 양성 대조군으로 0.03%의 과산화수소가 사용되었다. 활성산소의 증가는 세포질내 지질의 과산화반응 (peroxidation)을 유도하며, 100 μ M 나린제닌을 2시간 처리한 VK2와 End1 세포주 내에서 형광이 증가하

였다(도 4B). 이러한 결과를 통해 나린제닌이 자궁내막증 세포내 활성산소 생산을 촉진시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 또한, 상기 발생된 활성산소가 자궁내막증 세포 내 소포체 스트레스를 유도하는지 여부를 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 통해 소포체 스트레스 단백질을 관찰하였다. 그 결과, 나린제닌은 VK2와 End1 세포주 내 소포체 스트레스 단백질(eIF2 α , IRE1 α , GADD153 및 GRP78)의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다(도 4C). 이러한 결과를 통해, 나린제닌이 자궁내막증 세포 내에서 활성산소의 생성과 소포체 스트레스의 조절을 통해 세포 사멸을 유도함을 유추할 수 있었다.

[0083] 정상 자궁내막 세포에 나린제닌이 미치는 영향 확인을 통한 부작용 감소 가능성 제시

[0084] 나린제닌의 세포독성을 검증하기 위하여 나린제닌 처리에 따른 정상 자궁내막세포의 증식, 사멸, 활성산소의 변화를 관찰하였다. 측정 결과, 나린제닌은 정상 자궁내막 세포인 VK2와 End1의 증식 및 사멸을 변화시키지 않음을 확인하였다(도 5A, 5B). 또한, 나린제닌 처리는 오히려 세포내 활성산소를 감소시켰으며 그에 따라 소포체 스트레스도 변화가 없거나 오히려 감소하는 것으로 나타났다(도 5C, 5D). IRE1 α , GADD153 및 GRP78 단백질의 발현은 나린제닌에 의해 유의적으로 감소하였다. 양성 대조군인 과산화수소에 의해서 자궁내막증 세포 내 활성산소가 증가하였으나 나린제닌 처리에 따라서는 활성산소 생성이 감소하였다. 이러한 결과를 통해 나린제닌은 자궁내막증 세포에 선택적으로 작용하여 세포증식 억제와 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

[0086] 나린제닌 처리에 따른 자궁내막증 세포 신호전달 단백질 변화 확인

[0087] 나린제닌의 용량의존적 처리에 따른 세포신호전달 단백질의 인산화 변화를 웨스턴블롯을 통해 측정하였다(도 6). 측정 결과, 나린제닌은 VK2 세포에서는 ERK1/2의 인산화에 대해 용량의존적인 변화를 유도하지 않았지만 End1 세포에서는 100 μ M의 나린제닌 처리에 따라 ERK1/2의 인산화가 감소하였다. 하지만 P90RSK의 인산화는 두 세포주 모두에서 나린제닌에 의해 감소하는 경향을 보였다. P38 단백질의 인산화는 두 세포주에서 모두 나린제닌에 의해 용량의존적으로 증가하였다. JNK 단백질 인산화의 경우 50, 100 μ M의 나린제닌 처리에 따라 VK2 세포에서는 증가하였으나 End1 세포에서는 동일 농도의 나린제닌 처리시 JNK의 인산화가 감소하였다. 또한 P70S6K 단백질의 인산화는 나린제닌에 의한 용량의존적 반응은 확인할 수 없었으나 S6 단백질은 나린제닌에 의해 용량의존적으로 인산화가 감소하였다. 이러한 결과를 통해 나린제닌이 세포신호전달 단백질의 인산화를 조절하여 세포 증식 및 사멸, 세포소기관의 변화를 일으킨다는 것을 확인하였다.

[0089] 나린제닌과 세포증식 신호 단백질 억제제의 병용 처리에 따른 세포증식 억제 효과

[0090] 선행 결과를 바탕으로 신호전달기전 억제제와 나린제닌의 연관성 및 이에 따른 자궁내막증 세포 VK2와 End1의 증식 양상을 확인하기 위하여 나린제닌과 각각의 신호전달기전 억제제를 단독 또는 병행 처리하여 BrdU를 통해 분석하였다(도 7). 사용한 신호전달 단백질 억제제는 LY294002 (PI3K 억제제, 20 μ M), U0126 (ERK1/2 억제제, 20 μ M), SB203580 (P38 억제제, 20 μ M), SP600125 (JNK 억제제, 20 μ M) 이다. 측정 결과, 나린제닌에 의한 VK2 자궁내막증 세포의 증식억제 효과는 U0126과 SP600125의 병용처리 시 더욱 증가하였으며, LY294002, SB203580, SP600125를 단독 처리하였을 때 보다는 나린제닌과 병용처리 하였을 때 증식 억제효과가 더 개선되는 것으로 나타났다(도 7A). End1 자궁내막증 세포주에서는 나린제닌 단독처리에 비해 나린제닌과 신호전달 단백질 억제제의 병용처리는 추가적인 증식억제 효과를 보이지 못했지만, 신호전달기전 억제제 단독처리에 비해 나린제닌의 병용 처리 시 세포 증식 억제 효과가 효율적으로 개선된다는 것을 확인하였다(도 7B).

[0092] 나린제닌이 자궁내막증 세포의 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달경로에 미치는 영향 확인

[0093] 용량의존적 분석을 통해 선별된 나린제닌 조절 신호전달분자의 정확한 기전을 분석하기 위하여 자궁내막증 세포인 VK2와 End1 세포 내 LY294002 (PI3K 억제제), U0126 (ERK1/2 억제제), SP600125 (JNK 억제제), SB203580 (P38 억제제)를 먼저 2시간동안 37 $^{\circ}$ C/CO $_2$ 인큐베이터 내에서 배양하고 이후 100 μ M의 나린제닌을 처리하여 단백질 추출 이후 웨스턴 블롯을 통해 타겟 분자의 인산화를 분석하였다. 그 결과, 나린제닌에 의해 감소된 ERK1/2는 U0126을 병용 처리함에 따라 인산화가 더욱 억제되는 양상을 나타내었고(도 8A), AKT, P70S6K 및 S6의

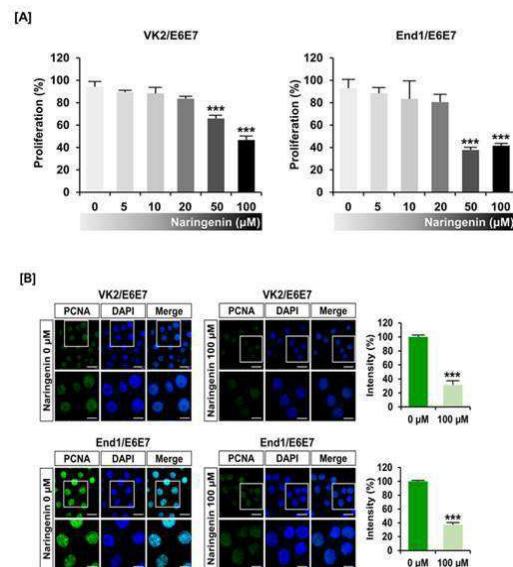
인산화는 나린제닌과 LY294002을 병용 처리함에 따라 더욱 억제되는 양상을 나타내었다(도 8E-G).

[0094]

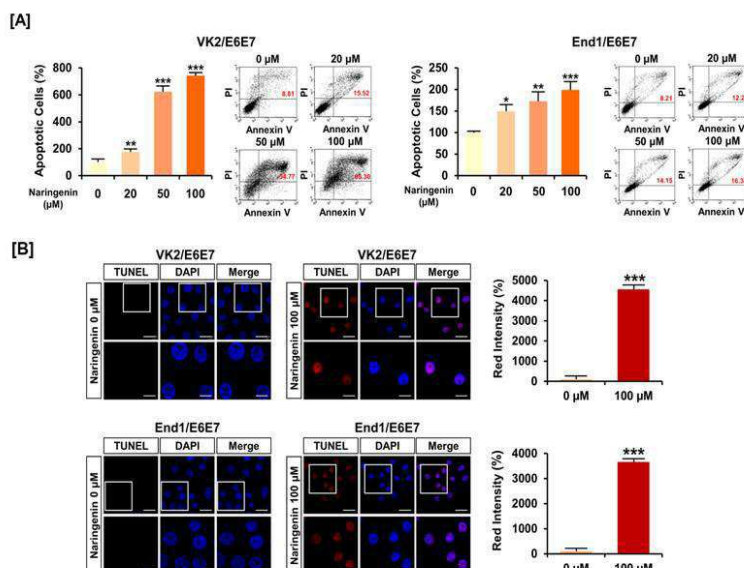
하지만 나린제닌에 의해 감소하였던 P90RSK의 활성은 모든 신호전달 단백질 억제제에 의해서도 감소하지 않았다(도 8B). 나린제닌 처리에 의해 증가하였던 P38은 SB203580의 병용처리 시 효과적으로 감소되었으며(도 8C), VK2에서 증가하고 End1에서 감소하였던 JNK는 SP600125에 의해 두 세포주에서 모두 감소하였다(도 8D). 나린제닌에 의한 AKT의 인산화는 두 세포주 내에서 LY294002, SP600125, SB203580 처리에 의해 감소하였다. 또한 P70S6K의 인산화는 나린제닌과 LY294002 또는 U0126의 병용처리에 따라 감소하였다. S6의 인산화는 VK2와 End1 세포 모두에서 모든 신호전달 단백질과 나린제닌의 병용처리에 따라 감소하는 양상을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 나린제닌과 신호전달 단백질 억제제는 인산화를 억제하는 데에 시너지 효과를 발휘할 뿐만 아니라 몇몇의 경우 항증식 효과와 관련하여 신호전달 단백질을 활성화할 수 있음을 암시한다.

도면

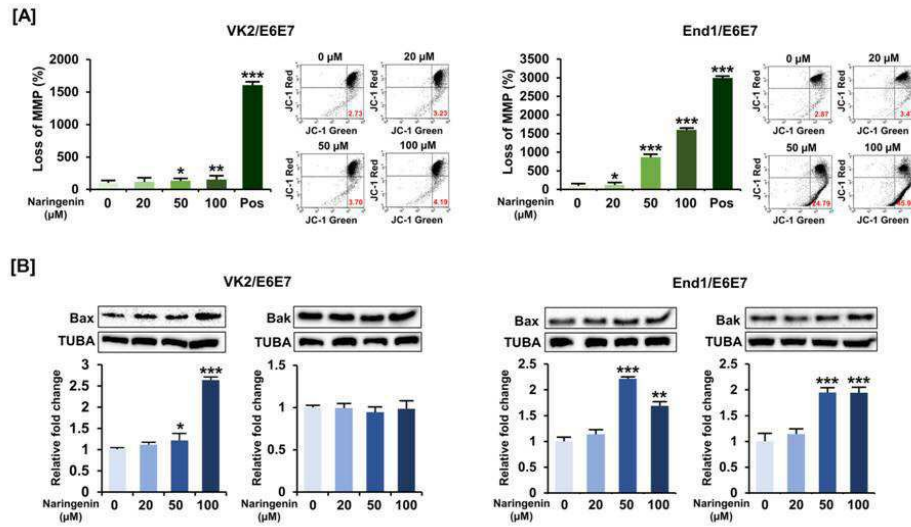
도면1



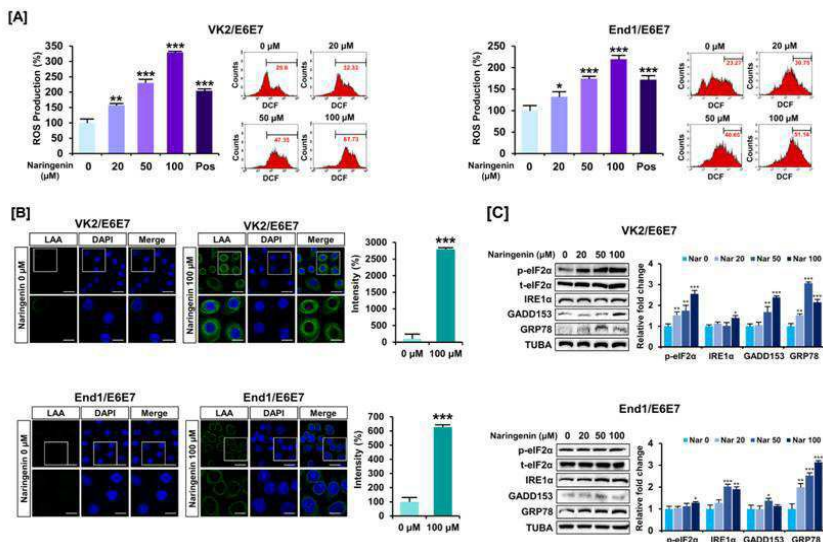
도면2



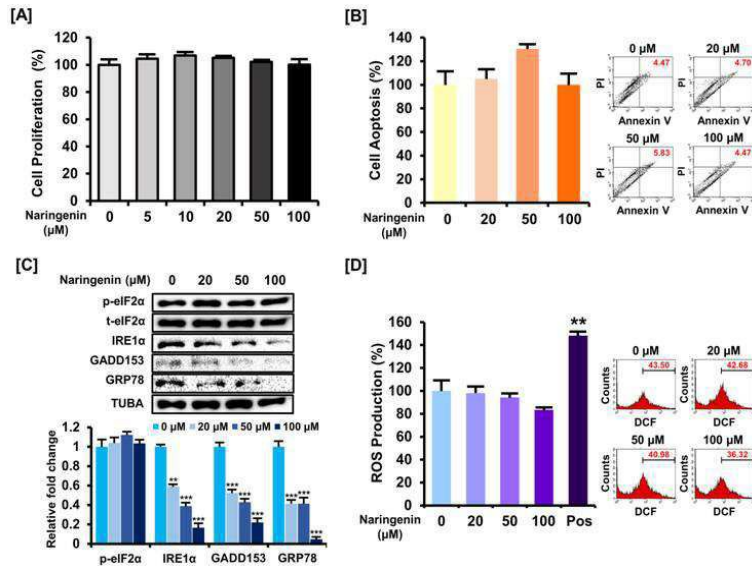
도면3



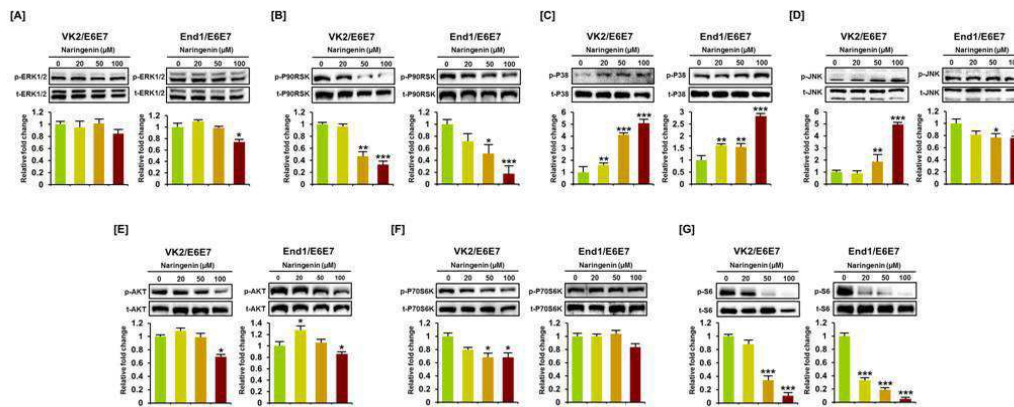
도면4



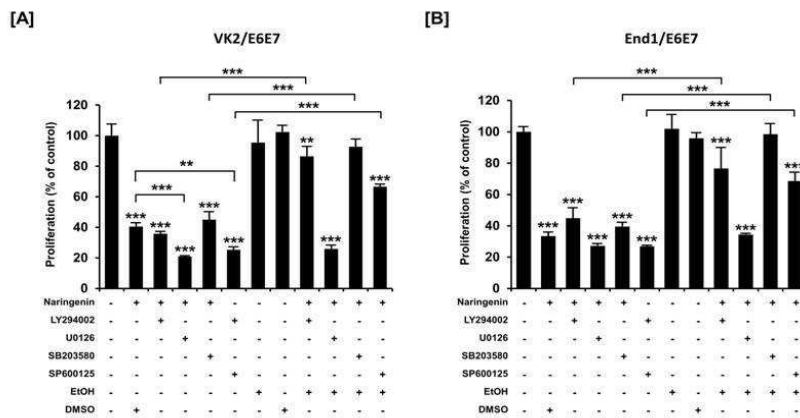
도면5



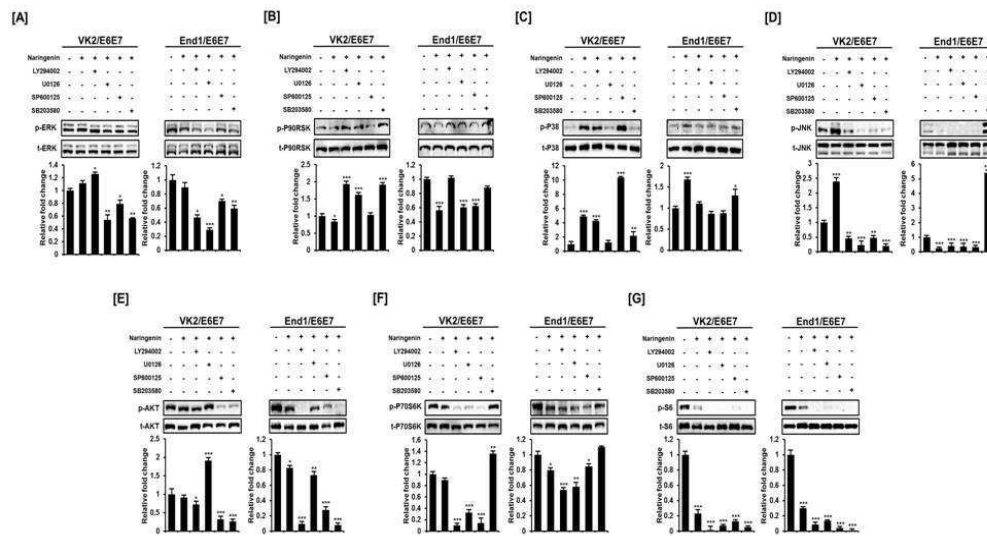
도면6



도면7



도면8



도면9

