(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0092179
(43) 공개일자 2011년08월17일

(51) Int. Cl.
A61K 36/899 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0011694
(22) 출원일자 2010년02월08일
심사청구일자 2010년02월08일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
강영희
강원도 춘천시 옥천동 1번지 한림대학교 생명과학관 8513호
리징
강원도 춘천시 옥천동 1번지 한림대학교 생명과학관 8512호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김지형

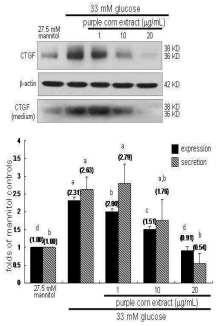
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 검정옥수수 추출물을 함유하는 당뇨합병성 신장섬유증 억제용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 당뇨합병증으로 인해 초래되는 신장섬유증에 직접적으로 관련된 인간 신장 혈관간세포(Human Renal Mesangial Cell, HRMC)를 고혈당에 노출시키고 여기에 검정옥수수 추출물과 3일간 배양함으로써, 결합조직 성장인자(Connetive Tissue Growth Factor, CTGF)의 활성을 억제하고, 제 4(Ⅳ)형 콜라겐(Collagen) 생성을 감소시키며, 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase, MT-1 MMP)의 발현을 증가시켜 만성 고혈당으로 인한 신장 섬유증을 개선시키는 검정옥수수 추출물을 함유하는 당뇨병성 신장섬유증 억제용 조성물 대한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

성혜영

경상북도 경산시 진량읍 상림리 91-1

임순성

강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102동 401호

이재용

강원도 춘천시 퇴계동 그린타운아파트 103동 1303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109163-03-1-SB030

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구관리전문기관

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 당뇨합병증으로 인한 혈관손상과 사구체경화 예방 및 개선을 위한 검정옥수수 소재개발

기여율

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2009년 4월 10일 ~ 2010년 4월 9일

특허청구의 범위

청구항 1

만성 고혈당에 노출된 신장 혈관간세포(HRMC)의 결합조직 성장인자(CTGF) 활성 억제, 제 4(IV)형 콜라겐 생성 감소시키는 것을 특징으로 하는 검정옥수수 추출물을 함유한 당뇨병성 신장섬유증 억제용 조성물.

청구항 2

만성 고혈당에 노출된 신장 혈관간세포(HRMC)의 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase, MT-1 MMP)의 발현을 증가시켜 세포내 기질 축적을 억제하는 것을 특징으로 하는 검정옥수수 추출물을 함유한 당뇨병성 신장섬유증 억제용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 검정옥수수 추출물은 검정옥수수 파우더에 100% 에탄올(Ethanol)을 중량대비 1 : 7~10의 비율로 혼합하여 20~40분 동안 초음파 분해하여 추출한 후, 상기 추출물을 원심분리기를 사용하여 2500~3500rpm으로 10~20분 동안 분리하여 상층액만 감압 농축하여 제조된 것을 특징으로 하는 검정옥수수 추출물을 함유한 당뇨병성 신장섬유증 억제용 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 검정옥수수 추출물은 검정옥수수 파우더에 100% 에탄올(Ethanol)을 중량대비 1 : 7~10의 비율로 혼합하여 20~40분 동안 초음파 분해하여 추출한 후, 상기 추출물을 원심분리기를 사용하여 2500~3500rpm으로 10~20분 동안 분리하여 상층액만 감압 농축하여 제조된 것을 특징으로 하는 검정옥수수 추출물을 함유한 당뇨병성 신장섬유증 억제용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 검정옥수수 추출물을 함유하는 당뇨합병성 신장섬유증 억제용 조성물 대한 것으로, 더 상세하게는 당뇨합병증으로 초래되는 신장섬유증에 직접적으로 관련된 인간 신장 혈관간세포(Human Renal Mesangial Cell;HRMC)를 고혈당에 노출시키고 여기에 검정옥수수 추출물과 배양함으로써, 결합 조직 성장인자(Connetive Tissue Growth Factor:CTGF)의 활성 억제, 제 4(IV)형 콜라겐(Collagen) 생성 감소, 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase; MT-1 MMP)의 발현을 증가시켜 만성 고혈당으로 인한 신장 섬유증을 개선시킬 수 있는 검정 옥수수 추출물을 함유한 조성물에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 고혈당으로 인하여 여러 증상 및 징후를 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 된다.

[0003] 또한, 당뇨병 환자가 장기간 고혈당에 노출되었을 경우에는 말초신경증, 자율신경증, 대혈관 합병증, 미세혈관

합병증을 비롯하여 기타 만성합병증을 초래할 수 있다. 미세혈관 합병증의 하나인 당뇨병성 신증의 초기변화는 신장의 용적이 증가하고 단백뇨 배설이 증가하며, 사구체 및 세뇨관 기저막의 비후, 이후 사구체 혈관간질 증가, 세포 외 지질의 축척, 사구체 경화증 및 세뇨관 간질의 섬유화로 진행하게 된다. 특히 고혈당이 이러한 변화를 유발하는 가장 중요한 인자이며, 이로 인해 신장혈관간세포의 비정상적인 증식으로 혈관간조직이 비대해져서 결국 사구체 기저막이 비후하게 되고 사구체 혈관내경이 좁아지게 된다.

[0004] 콜라겐(Collagens), 프로테오글리칸(Proteoglycans) 그리고 당단백질과 같은 구조단백질로 구성된 세포외기질(Extracellular Matrix, ECM)의 시기적절한 분해는 정상적인 생물학적인 현상인 배아형성, 생식, 기관 형성, 뼈 성장, 상처 치유 및 혈관신생과 세포사멸에 필수적이고, 암, 관절염, 심혈관질환, 신경성 질환과 위궤양, 간경화와 같은 병리학적인 과정에도 관여한다(McCawley and Matrisian, 2000; Nagase and Woessner, 1999). 특히 기질단백질 분해효소(Matrix Metalloproteinases, MMP)는 조직의 흡수와 다양한 질환 과정에서 수반되는 세포외기질(ECM) 제거에 있어서 매우 중요한 역할을 담당한다(Raza and Cornelius LA, 2000). 대부분 기질단백질 분해효소(MMP)의 발현은 세포성장인자, 호르몬, 사이토카인(Cytokines) 및 세포의 형질전환과 같은 요인에 의하여 조절된다(Memtsas et., 2009). MMP는 20종 이상 알려져 있으며 콜라겐 분해효소(Collagenease), 젤라틴 분해효소(Gelatinase), 스트로멜라이신(Stromelysins), 그리고 막형 기질단백질 분해효소(membrane type MMP)로 구분된다. 모든 종류의 분해효소(MMP)는 대부분의 경우 프리프로(Prepro)-효소로 합성되어 불활성 형태의 프로(Pro)-MMP로 분비된다(Nagase and Woessner, 1999).

[0005] 옥수수는 볏과의 한해살이풀로 높이는 2~3m이며 잎은 수수잎같이 크고 길며 꽃은 단성화로 수꽃이삭은 줄기 끝에 달리고 암꽃이삭은 줄기 중앙의 잎겨드랑이에 달려있으며, 열매는 녹말이 풍부하고 식용하거나 가축 사료로도 쓰인다. 그리고, 옥수수는 세계적으로 그 종류가 다양하며 색의 차이로는 흰색, 노란색, 적색, 자색, 갈색, 녹색, 남색 등으로 구분한다. 여기서, 옥수수는 주로 페루에서 수천년 전부터 재배된 이래 주 작물로서 남북 아메리카 대륙에 걸쳐 널리 재배되었다. 콜럼버스 신대륙 발견이후 옥수수 종자를 스페인으로 가지고 돌아간 후부터 30년 동안에 전 유럽에 전파되었으며, 그 후 인도나 중국에도 16세기 초에는 널리 퍼졌다.한국에는 조선시대 임진왜란 이후에 도입된 것으로 추정된다.

[0006] 검정옥수수는 안토시아닌이 풍부하게 함유되어 있으며 식량이나 천연색소로 광범위하게 이용되어 왔다. 검정옥수수는 다양한 지 매이(Zea mays)의 하나이며 매이즈 모라도(Maiz Morado)라고 불리는 낮은 분지에서 수확되는 안데스 작물이다. 검정옥수수는 대부분 페루의 해안이나 고산지역에서 경작된다. 안데스 산맥에 거주하는 사람들은 치차 모라다(Chicha Morada)라는 검정옥수수의 청량음료를 만들어서 마신다.

[0007] 검정옥수수의 특성에 관한 대부분 보고에 의하면, 천연 착색료로서의 기능(Cevallos-Casals et al., 2004), 항산화(Toshimoto et al., 2001; Celvallos-Casals et al., 2003a), 항세균성(Cevallos-Casals et al., 2003b), 항돌연변이(Heinonen et al., 2003; Katsube et al., 2003), 항암활성(Hagiwara et al., 2001) 등의 특성이 있는 것으로 보고되어 있다. 이러한 활성은 검정옥수수에 함유된 페놀(Phenolics)과 안토시아닌(Anthocyanins)의 기능으로 간주되고 있다. 페놀과 안토시아닌은 항산화 활성을 비롯한 많은 생리활성 효능을 가지고 있다고 알려져 있다. 또한, 안토시아닌은 남색, 자색이나 붉은색을 나타내는 플라보노이드의 일종이다. 안토시아닌은 결체조직의 재생성, 미세순환의 개선 및 산화적 손상으로부터 혈관 보호작용을 지닌다고 한다.

[0008] 현재까지 당뇨병의 합병증에 대한 예방 및 치료를 위한 혈관 및 신장합병증에 대한 연구가 이루어지고 있으며, 장기간 고혈당 노출에 의한 신장섬유증과 사구체경화증에 대한 억제효과를 위한 여러 연구가 진행 중에 있다. 그러나 천연물을 이용하여 신장섬유증과 사구체경화증을 예방하고 치료하는 연구는 활발히 이루어지지 못하고 있다. 따라서 결합조직 성장인자(CTGF)의 활성을 억제시키고 제 4(IV)형 콜라겐 생성을 감소시키며 막형 기질단백질 분해효소(MT-1 MMP)의 발현을 증가시켜 만성 고혈당으로 인한 신장 섬유증과 사구체경화증을 개선시킬 수 있는 천연물에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하고자 발명한 것으로,

[0010] 그 목적은 당뇨병 합병증으로 인하여 초래되는 신장섬유증의 주요원인인 인간 신장 혈관간세포(HRMC)의 결합조직 성장인자(CTGF)의 활성 억제, 제 4(IV)형 콜라겐(Collagen) 생성 감소, 막형 기질단백질 분해효소(MT-1 MM

P)의 발현을 증가시킴으로써 만성 고혈당으로 인한 신장섬유증을 개선시킬 수 있는 검정옥수수 추출물을 함유한 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 신장섬유증에 직접적으로 관련된 인간 신장 혈관간세포(HRMC)를 고혈당에 노출시키고 여기에 검정옥수수 추출물과 함께 배양함으로써, 결합조직 성장인자(CTGF)의 활성 억제, 제 4(IV)형 콜라겐(Collagen) 생성 감소, 막형 기질단백질 분해효소(MT-1 MMP)의 발현을 증가시켜 만성 고혈당으로 인한 신장 섬유증을 개선시킬 수 있다.

[0012] 검정옥수수 낱알(Purple Corn Kernel) 전체를 마쇄한 파우더(Powder)는 Brilliant Project Int'l Co., LTD., (Seoul, Korea)에서 공급되었다. 검정옥수수 추출물 제조를 위하여 먼저 검정 옥수수 파우더를 Diaion HP-20로 압축된 glass open column (1.0×300 mm I.D.)에 넣어 당과 불순물을 물로 추출 제거하였다. 그런 후에 100% 에탄올(Ethanol)을 중량대비 1 : 7~10의 비율로 혼합하여 20~40분 동안 초음파로 분해하여 추출하였다. 상기 추출물을 원심분리기를 사용하여 2500~3500rpm으로 10~20분 동안 분리하여 상층액만 감압 농축하여 안토시아닌(anthocyanin)이 풍부한 분액물(Fraction)을 수확하였다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 검정옥수수 추출물을 함유한 조성물을 이용함으로써, 결합조직 성장인자(CTGF)의 활성 억제, 제 4(IV)형 콜라겐(Collagen) 생성 감소, 막형 기질단백질 분해효소(MT-1 MMP)의 발현을 증가시켜 당뇨합병증으로 초래되는 신장 섬유증을 개선시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 검정옥수수(Purple Corn) 추출물이 만성 고혈당에서의 인간 신장 혈관간세포(HRMC)의 결합조직 성장인자(CTGF)의 발현 및 분비 억제활성을 나타낸 웨스턴 블롯 분석결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화한 것이다.

도 2는 검정옥수수 추출물이 만성 고혈당에서의 인간 신장 혈관간세포(HRMC)의 제 4(IV)형 콜라겐 생성에 대한 억제활성을 나타낸 웨스턴 블롯 분석결과이며, 이것을 덴시토미터로 측정하여 정량화한 것이다.

도 3은 검정옥수수 추출물이 만성 고혈당에서의 인간 신장 혈관간세포(HRMC)의 막형 기질단백질 분해효소(MT-1 MMP)의 발현을 촉진시키는 활성을 나타낸 웨스턴 블롯 분석결과이며, 이것을 덴시토미터로 측정하여 정량화한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 당뇨합병증으로 인해 초래되는 신장섬유증과 사구체경화증에 억제 활성을 갖는 자색 옥수수 추출물을 함유한 조성물에 대한 것이다.

[0016] 더 상세하게는 신장섬유증과 사구체경화증에 직접적으로 관련된 인간 신장 혈관간세포(Human Renal Mesangial Cell, HRMC)를 고혈당에 노출시키고 여기에 검정옥수수 추출물과 배양함으로써, 결합조직 성장인자(Connetive Tissue Growth Factor, CTGF)의 활성 억제, 제 4(IV)형 콜라겐(Collagen) 생성 감소, 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase, MT-1 MMP)의 발현 증가를 촉진시켜 만성 고혈당으로 인한 신장섬유증과 사구체경화증을 개선시킬 수 있는 검정옥수수 추출물을 함유한 조성물에 대한 것이다.

[0017] 본 발명에 따른 검정옥수수 추출물을 제조하기 위하여 먼저 검정 옥수수 파우더를 Diaion HP-20로 압축된 glass open column (1.0×300 mm I.D.)에 넣어 당과 불순물을 물로 추출 제거하였다. 그런 후에 100% 에탄올(Ethanol)을 중량대비 1 : 7~10의 비율로 혼합하여 20~40분 동안 초음파로 분해하여 추출하였다. 상기 검정옥수

수 추출물을 원심분리기를 사용하여 2500~3500rpm으로 10~20분 동안 분리하여 상층액만 감압 농축하여 안토시아닌(anthocyanin)이 풍부한 분액물(Fraction)을 수확하였다.

[0018] 그리고, 검정옥수수 에탄올 추출물은 안전성을 높일 뿐 아니라, 인체에 무해하기 때문에 검정옥수수 추출물을 식품의 첨가물로 사용할 때에 적합할 수 있으며, 안전성 확보를 위한 엄격한 공정관리 등과 같은 비용의 증가가 발생하지 않으므로 경제적이다. 검정옥수수 에탄올 추출은 20~40분 동안 초음파로 분해하여 추출하였는데 이것은 일반적인 추출방법인 추출용매를 넣은 후 추출온도를 가함으로써 추출하는 것에 비해, 온도를 가하지 않음으로써 유효한 성분이 파괴되지 않고 원활하게 분해하여 추출하기 위함이다.

[0019] 본 발명에 의한 당뇨합병증으로 인해 초래되는 신장섬유증과 사구체경화증에 억제 활성을 갖는 자색 옥수수 추출물을 함유한 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 음료, 분말, 농축, 캡슐, 의약으로 하는 것이다.

[0020] 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 제한하는 것이 아님은 당업자에게 있어서 명백한 사실이다. 즉, 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 당업자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

[0021] 실시예 1 : 검정옥수수 추출물 제조

[0022] 검정옥수수 추출물을 제조하기 위하여 먼저 검정 옥수수 파우더를 Diaion HP-20로 압축된 glass open column (1.0×300 mm I.D.)에 넣어 당과 불순물을 물로 추출 제거하였다. 그런 후에 100% 에탄올(Ethanol)을 중량대비 1 : 10의 비율로 혼합하여 30분 동안 초음파로 분해하여 추출하였다. 상기 검정옥수수 추출물을 원심분리기를 사용하여 3000rpm으로 15분 동안 분리하여 상층액만 감압 농축하여 안토시아닌(anthocyanin)이 풍부한 분액물(Fraction)을 수확하였다.

[0023] 실시예 2 : 세포배양 실험

[0024] 신장 혈관간세포(HRMC)는 Sciencell Research Lab.에서 구입하여 배양하였다. HRMC는 15% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)과 2mM 글루타민(Glutamine), 100 U/ml 페니실린(Penicillin), 100 mg/ml 스트렙토마이신(Streptomycin)이 첨가되어 있는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 Nutrient Mixture F-12가 7:1로 함유된 배지를 이용하여 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 조건에서 배양하였다.

[0025] 상기 배양된 배지를 만성 고혈당으로 인한 신장섬유증 및 사구체 경화증과 같은 상황을 유도하기 위하여 33mM 글루코오스(Glucose), 2% FBS, 8μg/ml 인슐린(Insulin)을 첨가한 배지에서 3일 동안 처리하였다.

[0026] 그리고, 상기 배양된 배지를 33mM 글루코오스(Glucose), 2% FBS, 8μg/ml 인슐린(Insulin)을 첨가한 배지에서 검정옥수수 추출물 1μg/ml, 10μg/ml, 20μg/ml을 3일 동안 각각 처리하였다.

[0027] 또한, 삼투압 대조군으로 5.5mM 글루코오스와 27.5mM 마니톨(Mannitol)이 함유된 배지에서 혈관간세포를 상기 조건에서 3일간 배양하였다.

[0028] 실시예 3 : 결합조직 성장인자(Connetive Tissue Growth Factor, CTGF) 발현 및 분비 억제

[0029] <웨스톤 블롯>

[0030] 인간의 신장 혈관간세포(HRMC)의 CTGF의 발현 정도를 측정하기 위해 상기 배양처리된 신장혈관간세포(HRMC)를 1% β-Mercaproethanol, 1M β-Glycerophosphate, 0.1M Na_3VO_4, 0.5M 불화소다(NaF)와 Protease Inhibitor Cocktail을 포함한 완충액(Buffer)으로 분해(Lysis)시켜 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하였다. 이렇게 얻은 상층액을 10% SDS-PAGE 겔(Gel)상에서 80V로 전기영동 하였다. 겔(Gel)상에 있는 단백질은

니트로셀룰로우스 막(Nitrocellulose Membrane)으로 전이시킨 다음, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 3% 소혈청 알부민 (Bovine Serum Albumin, BSA)에 3시간 동안 blocking하였다. CTGF의 일차항체(Polyclonal Rabbit Anti-human Antibody, Merk, UK)로 니트로셀룰로우스 막(Nitrocellulose membrane)과 교반하면서 3시간 배양한 후, 4℃에서 하룻밤 배양하고 다시 실온에서 3시간 배양한 후 이차항체인 Goat Anti-rabbit Horseradish Peroxidase (Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, PA, USA)로 1시간 동안 배양하였다. 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)에 전이된 단백질은 Supersignal West pico Chemiluminescence (Pierce Biotech., Rockford, IL, USA)로 검출하여 삼투압 대조군인 인간 신장 혈관간세포(27.5mM Mannitol 대조군)와 검정옥수수 추출물을 처리하지 않은 세포와 검정옥수수 추출물을 1㎍/ml, 10㎍/ml, 20㎍/ml로 각각 처리한 세포를 X-ray 필름으로 촬영하였다.

[0031] 위 결과는 도 1에 나타내었다.

[0032] 도 1에 도시된 바와 같이 삼투압 대조군인 인간 신장 혈관간세포(27.5mM Mannitol 대조군)는 CTGF의 발현 및 분비가 적었으나, 검정옥수수 추출물을 처리하지 않고 3일간 고혈당에 노출된 혈관간세포(HRMC)는 CTGF의 발현 및 분비가 현저하게 증가하였다.

[0033] 여기서, 3일간 고혈당에 노출된 HRMC에 검정옥수수 추출물을 1㎍/ml 처리하였을 때 CTGF의 발현 및 분비에는 거의 변화가 없었으며, 검정옥수수 추출물을 10㎍/ml 이상 처리하였을 때는 CTGF의 발현 및 분비가 억제되는 것으로 나타났다.

[0034] 따라서, 만성 고혈당에 노출된 HRMC에 검정옥수수 추출물을 10㎍/ml 이상으로 처리하였을 경우에 신장 혈관간세포에서의 결합조직 성장인자의 생성을 억제시키는 효과가 뛰어나는 것을 알 수 있다.

[0035] 실시예 4 : 제 4(IV)형 콜라겐 생성 감소

[0036] <웨스톤 블롯>

[0037] 인간의 신장 혈관간세포(HRMC)의 제4(IV)형 콜라겐의 생성 정도를 측정하기 위해 상기 배양 처리된 신장 혈관간세포(HRMC)에 분해 완충액(Lysis Buffer)을 처리하여 세포 추출물을 준비하였다. 세포 추출물의 단백질 분리는 8% SDS-PAGE로 수행되었다. 전기 영동된 단백질 밴드들은 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 탈지분유를 처리한 다음 제4(IV)형 콜라겐 단백질의 일차항체(Polyclonal Rabbit Anti-human Antibody, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA)를 1000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, Goat Anti-rabbit Horseradish Peroxidase (1:10000, Jackson ImmunoReasearch Lab.)의 이차항체로 1시간 반응시켰다. 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)에 있는 제 4(IV)형 콜라겐 단백질은 Supersignal West pico Chemiluminescence (Pierce Biotech.)로 검출하여 삼투압 대조군인 인간 신장 혈관간세포(27.5mM Mannitol 대조군)와 검정옥수수 추출물을 처리하지 않은 세포와 검정옥수수 추출물을 1㎍/ml, 10㎍/ml, 20㎍/ml로 각각 처리한 세포를 X-ray 필름으로 촬영하였다.

[0038] 위 결과는 도 2에 나타내었다.

[0039] 도 2에 도시된 바와 같이 삼투압 대조군인 인간 신장 혈관간세포(27.5mM Mannitol 대조군)는 제 4(IV)형 콜라겐 분비 생성이 적었으나, 검정옥수수 추출물을 처리하지 않고 3일간 고혈당에 노출된 혈관간세포(HRMC)는 제 4(IV)형 콜라겐 생성이 현저하게 증가하였다.

[0040] 여기서, 3일간 고혈당에 노출된 HRMC에 검정옥수수 추출물을 1㎍/ml 처리하였을 때 제 4(IV)형 콜라겐 생성에는 거의 변화가 없었으며, 검정옥수수 추출물을 10㎍/ml, 20㎍/ml 처리하였을 때는 제 4(IV)형 콜라겐 생성이 억제되는 것으로 나타났다.

[0041] 따라서, 고혈당에 노출된 HRMC에 검정옥수수 추출물을 10㎍/ml 이상으로 처리하였을 경우에 결합조직을 형성하는 콜라겐의 축적을 억제하는 데에 뛰어난 효과를 발휘하는 것을 알 수 있다.

[0042] 실시예 5 : 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase, MT-1 MMP)의 발현 증가

[0043] <웨스톤 블롯>

[0044] 인간의 신장 혈관간세포(HRMC)의 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase, MT-1 MMP)의 발현 증가를 측정하기 위해 상기 배양 처리된 신장 혈관간세포(HRMC)에 분해 완충액(Lysis Buffer)을 처리하여 세포 추출물을 준비하였다. 세포 추출물의 단백질 분리는 15% SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동된 단백질 밴드들은 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% BSA를 처리한 다음 MT-1 MMP 단백질의 일차항체(Polyclonal Rabbit Anti-human Antibody, Santa Cruz Biotech.)를 1000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, Goat Anti-rabbit Horseradish Peroxidase (1:2000, Jackson ImmunoReasearch Lab.)의 이차항체로 1시간 반응시켰다. 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)에 있는 제4형 콜라겐 단백질은 Supersignal West pico Chemiluminescence (Pierce Biotech.)로 검출하여 삼투압 대조군인 인간 신장혈관간세포(27.5mM Mannitol 대조군)과 검정옥수수 추출물을 처리하지 않은 세포와 검정옥수수 추출물을 1㎍/ml, 10㎍/ml, 20㎍/ml로 각각 처리한 세포를 X-ray 필름으로 촬영하였다.

[0045] 위 결과는 도 3에 나타내었다.

[0046] 도 3에 도시된 바와 같이 삼투압 대조군인 인간 신장 혈관간세포(27.5mM Mannitol 대조군)는 MT-1 MMP의 발현이 뚜렷하게 이루어지지만, 검정옥수수 추출물을 처리하지 않고 3일간 고혈당에 노출된 혈관간세포(HRMC)는 MT-1 MMP의 발현이 현저하게 감소되었다.

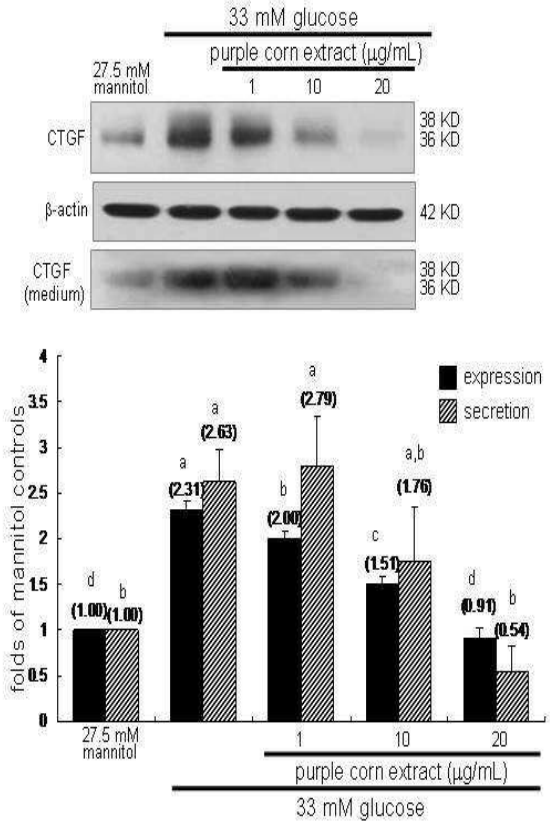
[0047] 여기서, 3일간 고혈당에 노출된 HRMC에 검정옥수수 추출물을 1㎍/ml 처리하였을 때 MT-1 MMP의 발현이 거의 변화가 없었으며, 검정옥수수 추출물을 10㎍/ml, 20㎍/ml 처리하였을 때는 MT-1 MMP의 발현이 두드러지게 증가되는 것을 볼 수 있었다.

[0048] 따라서, 고혈당에 노출된 HRMC에 검정옥수수 추출물을 10㎍/ml 이상으로 처리하였을 경우에 막형 기질단백질 분해효소(MT-1 MMP)의 발현을 증가시키는 효과를 발휘하는 것을 알 수 있다.

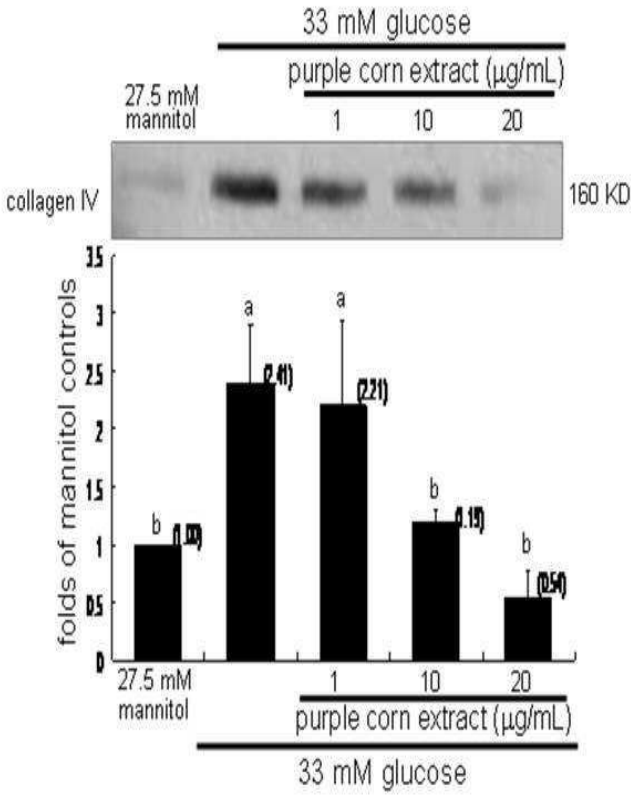
[0049] 결론적으로, 검정옥수수 추출물은 막형 기질단백질 분해효소의 활성을 촉진하여 결합조직을 구성하는 콜라겐과 같은 세포 외 기질(extracellular matrix;ECM)의 분해를 도모하였고 이로써 혈관간 결합조직의 기질 축적을 억제하여 만성 고혈당으로 인한 신장섬유증과 사구체경화증을 억제하는 효과를 발휘한다고 볼 수 있다.

도면

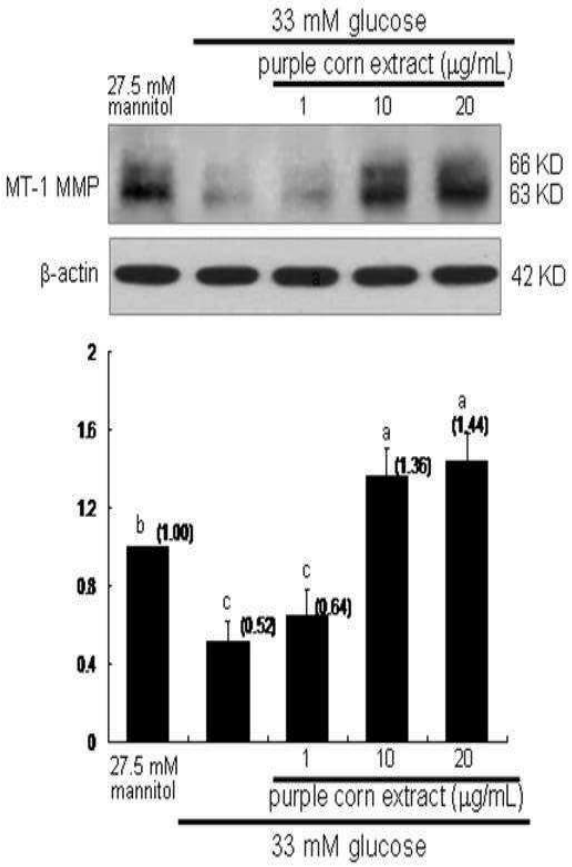
도면1


33 mM glucose
purple corn extract (μg/mL)
27.5 mM mannitol
1
10
20
CTGF
38 KD
36 KD
β-actin
42 KD
CTGF (medium)
38 KD
36 KD
expression
secretion
folds of mannitol controls
(1.00)
(1.00)
(2.31)
(2.63)
(2.00)
(2.79)
(1.51)
(1.76)
(0.91)
(0.54)
27.5 mM mannitol
purple corn extract (μg/mL)
33 mM glucose

도면2


33 mM glucose
purple corn extract (μg/mL)
27.5 mM mannitol
1
10
20
collagen IV
160 KD
folds of mannitol controls
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
a
a
b
b
b
(2.41)
(2.21)
(0.19)
(0.54)
27.5 mM mannitol
1
10
20
purple corn extract (μg/mL)
33 mM glucose

도면3


33 mM glucose
purple corn extract (μg/mL)
27.5 mM mannitol
1
10
20
MT-1 MMP
66 KD
63 KD
β-actin
42 KD
2
1.6
1.2
0.8
0.4
0
b (1.00)
c (0.52)
c (0.64)
a (1.36)
a (1.44)
27.5 mM mannitol
1
10
20
purple corn extract (μg/mL)
33 mM glucose