



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0019212
(43) 공개일자 2025년02월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61N 5/06 (2006.01) A61F 7/00 (2025.01)
A61F 7/08 (2025.01)
(52) CPC특허분류
A61N 5/0613 (2013.01)
A61F 7/08 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2023-0099895
(22) 출원일자 2023년07월31일
심사청구일자 2023년07월31일

(71) 출원인
재단법인 한국탄소산업진흥원
전라북도 전주시 덕진구 반룡로 110-11(팔복동2가)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
황지영
전라북도 전주시 덕진구 비석남로 111, 403호
박영수
전라북도 완주군 봉동읍 봉비로 176 제일오투그란데 110동1102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 다해

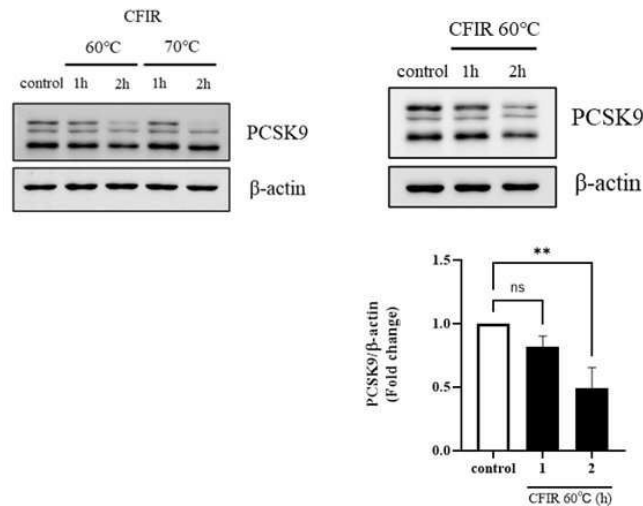
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 탄소섬유시트 기반의 면상발열체를 포함하는 PCSK9의 발현을 감소시켜 LDL 콜레스테롤 흡수를 촉진하는 장치

(57) 요약

본 발명은 탄소섬유시트 기반의 면상발열체를 포함하는 PCSK9의 발현을 감소시켜 LDL 콜레스테롤 흡수를 촉진하는 장치에 관한 것으로, 세포의 LDL 콜레스테롤 흡수를 촉진시키는 효과가 우수하며, PCSK9의 발현을 억제할 수 있으므로, 고지혈증, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 심혈관 질환 또는 고콜레스테롤혈증 등의 질환의 예방 또는 개선에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61N 5/0625 (2018.08)

A61F 2007/0088 (2013.01)

A61N 2005/066 (2013.01)

(72) 발명자

공다영

전라북도 전주시 완산구 봉곡2길 25, 205호

조인호

서울특별시 송파구 올림픽로 135 리센츠 203동
2401호

정성철

서울특별시 서초구 명달로4길 68 서초네스피아 A동
502호

송대진

서울특별시 강서구 마곡동로2길 25, 이화여자대학교
의과대학1107호 (마곡동)

오세영

서울특별시 양천구 안양천로 1071 이화여대목동병
원 MCC A관817호

박진희

서울특별시 강서구 양천로49길 34, 408호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345352062
 과제번호 2021R1I1A1A01046931
 부처명 교육부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 이공학학술연구기반구축
 연구과제명 원적외선의 골다공증 치료제로서의 효능 및 기전 분석
 기 여 율 1/5
 과제수행기관명 이화여자대학교
 연구기간 2021.06.01 ~ 2024.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345360535
 과제번호 5199990614253
 부처명 교육부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 4단계두뇌한국21사업(R&D)
 연구과제명 4IR (4th Industrial Revolution)-기반 헬스케어 전문인력양성사업단
 기 여 율 1/5
 과제수행기관명 이화여자대학교
 연구기간 2020.09.01 ~ 2027.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711188099
 과제번호 2021R1F1A1048113
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 만성콩팥병 및 뇌경색에서 발생하는 심장기능이상에서마이크로바이옴 유래 나노소포

기반 조절기전 탐색

기 여 율 1/5
 과제수행기관명 이화여자대학교
 연구기간 2021.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711183088
 과제번호 2022M3A9G1017179
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 바이오의료기술개발
 연구과제명 ER 바이오 코어 구축사업
 기 여 율 1/5
 과제수행기관명 이화의대부속목동병원
 연구기간 2020.09.01 ~ 2027.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415168744
 과제번호 20010853
 부처명 산업통상자원부
 과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
 연구사업명 전략핵심소재자립화기술개발사업
 연구과제명 천연가스로부터 고결정성전도성 흑연구조를 갖는 탄소소재개발
 기 여 율 1/5
 과제수행기관명 (주)제이오
 연구기간 2020.04.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

탄소섬유시트로 제작된 면상발열체를 포함하는
고지혈증, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 심혈관 질환 또는 고콜레스테롤혈증 혈증의 예방 또는 개선용 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 면상발열체의 원적외선 조사 대상은 간세포인 것인 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 면상발열체의 원적외선 조사 온도는 30 내지 90 ℃인 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 면상발열체의 원적외선 조사 시간은 10 분 내지 10 시간인 장치.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 장치는 간세포에서 PCSK9의 수준을 감소시키는 것인 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탄소섬유시트 기반의 면상발열체를 포함하는 PCSK9의 발현을 감소시켜 LDL 흡수를 촉진하는 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콜레스테롤은 담즙산과 호르몬의 생합성, 배아 발달, 세포 증식 등 다양한 세포 활동에 필수적인 요소로서, 중성지방, HDL 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤로 분류된다. 이 중 LDL 콜레스테롤(Low density lipoprotein cholesterol; LDL-C)은 혈관벽에 과도한 콜레스테롤 침착을 유발하여 관상동맥 질환의 주요 위험 요인이며, 이상지질혈증을 유발하여 심혈관 질환, 당뇨병, 고혈압, 뇌졸중의 위험을 증가시킬 수 있다.

[0003] 최근 현대인의 식습관으로 인한 심혈관질환의 증가와 콜레스테롤에 대한 인식의 확산으로 혈중 LDL-C 수치를 낮추기 위한 치료법이 주목받고 있다. 종래에 LDL-C를 낮추는 것으로 알려진 치료제는 스타틴(statins), 에제티미브(ezetimibe), 피브레이트(fibrates) 등이 있으나, 간독성, 당뇨병과 같은 합병증을 유발할 수 있다는 한계가 있다. 따라서, 부작용이 적고 보다 효과적인 치료법에 대한 필요성이 증가하고 있는 실정이다.

[0004] 프로단백질 전환효소 서브틸리신/케신 9형(PCSK9)은 지단백질 대사에 중요한 역할을 하는 효소로서, 특히 간 조

직에서 LDL 수용체(Low density lipoprotein receptor; LDLR)와 결합하여 LDLR의 분해를 증가시키고 혈중 LDL-C 수치를 증가시킨다. 이렇듯 PCSK9는 LDL-C로 인한 질환에 적합한 표적이나, 알리로쿠맙(Alirocumab) 및 에볼로쿠맙(Evolocumab) 등 PCSK9을 표적으로 하는 단일클론항체는 2주 또는 1개월마다 피하주사를 해야하는 문제점이 있다.

[0005] 본 발명자들은 기존에 알려진 억제제보다 부작용 위험이 낮고 효과적인 PCSK9 억제제로 원적외선(FIR)을 이용하는 방법을 개발하였다. 원적외선은 국제조명위원회에 따라 설정된 파장 범위가 3~1000 μm 인 눈에 보이지 않는 전자기 복사로서, 에너지를 순수한 열로 변환한 다음 피부 세포의 열수용체에 의해 복사열로 인식되는 것으로 알려져 있다. 원적외선 조사는 또한 물 분자의 거동을 조절하여 다양한 생물학적 구조와 세포 활동을 변경한다. 본 발명자들의 최근 연구에서는 원적외선이 편도 유래 중간엽 줄기세포(TMSC)의 지방 생성 및 골 형성 분화에 영향을 미친다는 것을 밝혔으며, 특히 원적외선이 TRP(transient receptor potential) 2 채널을 활성화함으로써 세포 내 칼슘을 증가시킴으로써 TMSC의 지방 생성을 조절한다는 것을 보여주었다. 그러나 원적외선이 지질 및 콜레스테롤 대사를 조절하는 PCSK9에 TRP 칼슘 채널을 통해 미치는 영향은 밝혀지지 않았다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선이 TRP 채널을 활성화할 수 있음에 착안하여, 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 설계하고 이를 간세포의 PCSK9 발현량 억제에 이용하는 경우 종래 세라믹 램프 발열체를 이용하는 경우에 비하여, 발열면적 전체에 걸쳐 균일한 열과 원적외선을 제공함으로써 적정 온도를 장시간 유지할 수 있어 세포 및 조직의 손상을 초래하지 않고 전력 소비를 최소화할 뿐만 아니라, 세포의 LDL 콜레스테롤 흡수를 효과적으로 증가시키고 TRPV4 채널을 활성화함으로써 PCSK9의 발현을 억제할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체를 포함하는 고지혈증, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 심혈관 질환 또는 고콜레스테롤혈증 혈증의 예방 또는 개선용 장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양상은 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체를 포함하는 고지혈증, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 심혈관 질환 또는 고콜레스테롤혈증 혈증의 예방 또는 개선용 장치를 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 면상발열체의 원적외선 조사 대상은 간세포(hepatocyte)일 수 있다. 구체적으로 상기 간세포는 HepG2 세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0010] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 면상발열체의 원적외선 조사 온도는 30 내지 90 $^{\circ}\text{C}$ 일 수 있고, 바람직하게는 50 내지 70 $^{\circ}\text{C}$ 일 수 있다. 상기한 온도 범위 내에서는 간세포의 세포 생존능이 우수하고, PCSK9의 수준 감소 효과가 향상될 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 면상발열체의 원적외선 조사 시간은 10 분 내지 10 시간일 수 있고, 바람직하게는 30 분 내지 2 시간, 더욱 바람직하게는 30 분 내지 1 시간일 수 있다. 특히, 전술한 면상발열체의 조사 온도 범위 및 상기 면상발열체의 조사 시간 범위를 모두 만족하는 경우 간세포의 세포 생존능, LDL 콜레스테롤 흡수 촉진 및 PCSK9의 수준 감소 효과가 현저히 향상될 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 장치는 간세포에서 프로단백질 전환효소 서브틸리신/케신 9형(PCSK9)의 수준을 감소시키는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0013] 탄소섬유시트 기반의 면상발열체를 포함하는 LDL 콜레스테롤 흡수 촉진용 장치는 세포의 LDL 콜레스테롤 흡수를 촉진시키는 효과가 우수하며, PCSK9의 발현을 억제할 수 있으므로, 고지혈증, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 심혈관 질환 또는 고콜레스테롤혈증 등의 질환의 예방 또는 개선에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 실제로 촬영한 이미지이다.

도 3은 도 1에 도시된 발열유닛을 분해한 도면이다.

도 4는 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치에 의해 60 ℃로 가열된 발열유닛을 열화상카메라로 촬영한 영상 및 가열시간에 따른 온도변화를 나타낸 그래프(A. Heating to 60℃ by the CF sheet)와, 60℃에서 가열된 하부 플레이트를 열화 상 카메라로 촬영한 영상과 가열시간에 따른 온도변화를 나타낸 그래프(B. CuttingMat at 60℃)를 나타낸다.

도 5는 도 1에 도시된 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치에 배양용기가 놓인 상태를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 제2구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치의 발열유닛의 측면도이다.

도 7은 HepG2 세포에 세라믹 적외선 조사기로 원적외선 조사 시 PCSK9 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 8은 HepG2 세포에 세라믹 적외선 조사기로 원적외선을 30 분 동안 조사한 후 습윤한 37→ 배양기에서 배양 시간(30 분, 1 시간)에 따라 PCSK9 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 9는 세라믹 적외선 조사기에 의해 방출되는 원적외선 조사 시의 열화상 카메라 촬영 이미지이다.

도 10은 HepG2 세포에 원적외선을 조사하지 않고 25 ℃ (실온, RT) 및 37 ℃에서 배양하여 원적외선을 조사한 HepG2 세포와 비교분석한 결과이다.

도 11은 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치로 원적외선 조사 시 PCSK9 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 12는 세라믹 적외선 조사기(A) 또는 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치(B)에 의해 방출된 원적외선이 HepG2 세포의 LDLR 및 LDL 흡수에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 13은 원적외선 조사 시 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 14는 이오노마이신을 처리하여 세포 내 칼슘이 PCSK9 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 15는 Ruthenium Red를 처리한 HepG2 세포에 세라믹 적외선 조사기(A) 또는 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치(B)로 원적외선을 조사하여 TRP 채널이 PCSK9 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 16은 원적외선을 조사한 HepG2 세포에서 발현되는 TRPV 채널의 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석 결과이다.

도 17은 HepG2 세포에 TRPV1, TRPV2 및 TRPV4 채널 활성제를 처리하여 PCSK9 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 18은 HepG2 세포에 TRPV1, TRPV2 및 TRPV4 채널 억제제를 처리하고 원적외선을 조사하여 PCSK9 발현에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면들을 참조하여 더욱 상세하게 설명한다. 본 발명의 실시예는 여러 가지 형태로 변형할 수 있으며, 본 발명의 범위가 아래의 실시예들로 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 도면에서의 요소의 형상은 보다 명확한 설명을 강조하기 위해 과장되었다.

[0017] 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치(이하, 면상발열체 장치라 함)

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는, 상기 간세포가 배치되는 하부 플레이트; 상기 하부 플레이트의 상부 영역에 상기 하부 플레이트에 대해 이격되어 배치되는 상부 플레이트; 상기 상부 플레이트와 상기 하부 플레이트에 연결되는 가이드 샤프트; 상기 가이드 샤프트에 이동 가능하게 연결되며, 상기 배양용기에 대해 접근 및 이격되는 방향으로 이 동되는 승강 스테이지유닛; 상기 상부 플레이트에 결합되고, 상기 승강 스테이지유닛에 연결되며, 상기 승강 스테이지유닛을 이동시키는 이동유닛; 및 상기 승강 스테이지유닛에 결합되며, 상기 간세포에 에너지를 인가하는 탄소섬유시트 면상발열체가 장착된 발열유닛을 포

합하는 것일 수 있다.

[0020] 이하, 본 발명의 제1 실시예에 따른, 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치를 자세히 설명한다.

[0021] 도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명의 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는, 하부 플레이트(110), 상부 플레이트(120), 가이드 샤프트(130), 승강 스테이지유닛(140), 이동유닛(150), 발열유닛(160), 및 온도조절기(170)로 구성된다.

[0022] 이하 본 발명을 하나 이상의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0024] [하부 플레이트(110), 상부 플레이트(120), 가이드 샤프트(130)]

[0025] 하부 플레이트(110)에는 간세포 및/또는 배양 배지(또는 배양액)가 담긴 배양용기(S)가 놓인다. 배양용기(S)는 하나 이상이 하부 플레이트(110)에 놓을 수 있고, 배양용기(S)의 크기와 높이는 다양하게 형성될 수 있다. 일 예로, 하부 플레이트(110)는 96-웰 플레이트(96-well plate)를 4개 정도 올려놓을 수 있는 크기로 제작되며, 예를 들어, 하부 플레이트(110)의 크기는 50x50 mm 내지 500x1000 mm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적인 예로, A4 사이즈 내에서 200x200mm 원적외선 조사가 가능하다.

[0026] 하부 플레이트(110)의 상면에는 배양용기의 크기를 시각적으로 확인할 수 있는 눈금표시기가 형성된다. 눈금표시기는 격자무늬 눈금으로 형성될 수 있다. 본 실시예에서는 하부 플레이트(110)에 눈금표시기로 커팅 매트(cutting mat) 또는 눈금이 있는 플라스틱류(예를 들어, 눈금자)를 부착하여 배양용기(S)를 항상 동일한 위치 및 배열을 유지할 수 있다(도 5). 상기 눈금표시기로써 부착되는 구성의 종류는 전술한 바에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 상부 플레이트(120)는 하부 플레이트(110)의 상부 영역에 하부 플레이트(110)에 대해 이격되어 배치된다.

[0028] 본 실시예에서 상부 플레이트(120)와 하부 플레이트(110)는 동일한 크기의 사각판 형상으로 형성된다.

[0029] 가이드 샤프트(130)는 상부 플레이트(120)와 하부 플레이트(110)에 연결된다. 상부 플레이트(120)와 하부 플레이트(110)는 가이드 샤프트(130)에 의해 서로 이격된다.

[0031] [승강 스테이지유닛(140)]

[0032] 승강 스테이지유닛(140)은 가이드 샤프트(130)에 이동 가능하게 연결되며, 하부 플레이트(110)에 놓인 배양용기(S)에 대해 접근 및 이격되는 방향으로 이동된다.

[0033] 승강 스테이지유닛(140)은 승강 플레이트(141), 가이드 부시(142)로 구성된다.

[0034] 승강 플레이트(141)는 이동유닛(150)에 연결된다. 본 실시예에서 승강 플레이트(141)는 알루미늄 재질로 제작된다. 그러나 이에 한정되지 않으며 아크릴 등 다양한 재질로 제작될 수 있다. 승강 플레이트(141)에는 이동유닛(150)의 후술할 스크류 샤프트(152)가 회전 가능하게 결합되는 지지홈(141a)이 형성된다.

[0035] 가이드 부시(142)는 승강 플레이트(141)에 결합되며, 가이드 샤프트(130)의 외주면에 슬라이딩 이동 가능하게 연결된다. 가이드 부시(142)에는 가이드 샤프트(130)가 관통하는 관통홀(미도시)이 형성된다.

[0037] [이동유닛(150)]

[0038] 이동유닛(150)은 상부 플레이트(120)에 결합되고, 승강 스테이지유닛(140)에 연결되며, 승강 스테이지유닛(140)을 이동시킨다. 이동유닛(150)은 발열 유닛(160)을 하부 플레이트(110)로부터 20mm~140mm 범위에서 높이 조절이 가능하다. 승강 스테이지유닛(140)의 높이를 확인하기 위한 자가 상부 플레이트(120)와 하부 플레이트(110) 사이에 부착될 수 있다(도 5).

[0039] 이동유닛(150)은 고정 허브(151), 스크류 샤프트(152), 회전부재(153)로 구성된다.

[0040] 고정 허브(151)는 상부 플레이트(120)의 중앙영역에 결합된다. 고정 허브(151)에는 스크류 샤프트(152)의 외주

면에 형성된 나선형의 스크류(미도시)가 연결되는 나사홈(미도시) 형성된다.

[0041] 스크류 샤프트(152)는 고정 허브(151)에 나사결합되며, 승강 플레이트(141)에 회전 가능하게 결합된다. 스크류 샤프트(152)의 하단부 영역은, 승강 플레이트(141)에 형성된 지지홈(141a)에 회전 가능하게 결합된다.

[0042] 회전부재(153)는 스크류 샤프트(152)의 상단부에 결합되며 스크류 샤프트(152)를 회전시킨다. 본 실시예에서 회전부재(153)로 회전용 손잡이가 사용된다. 회전부재(153)가 회전용 손잡이인 경우 스크류 샤프트(152)를 수동으로 회전시킨다. 이와 달리 회전부재(153)로 회전용 모터를 사용하여 스크류 샤프트(152)를 자동으로 회전시킬 수도 있다.

[0044] [발열유닛(160)]

[0045] 발열유닛(160)은 승강 스테이지유닛(140)에 결합된다.

[0046] 도 3에 도시된 바와 같이, 발열유닛(160)은 탄소섬유시트 면상발열체(161), 단열블록(162), 제1소수성필름(163), 제2소수성필름(164), 금속전극(166)으로 구성된다.

[0047] 탄소섬유시트 면상발열체(161)는 간세포 및/또는 배양 배지(또는 배양액)를 가열하며, 간세포 및/또는 배양 배지로 원적외선을 방출한다.

[0048] 원적외선은 물리학적으로 $3\mu\text{m}\sim 1,000\mu\text{m}$ 파장대의 빛으로, 일반적으로 온열작용, 건조, 생체효과, 물의 활성화, 숙성 및 생육촉진, 침투작용, 복사작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. 최근 이런 다양한 작용으로 인해, 원적외선이 항염증, 골다공증, 관절염, 뼈재생 등 인체에 유용한 효과가 있다고 알려지면서, 원적외선이 인체에 미치는 영향에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0049] 탄소섬유시트 면상발열체(161)는 고전도성 탄소섬유시트로 만들어진다. 이로 인해, 간세포 및/또는 배양 배지의 온도를 유지할 수 있을 뿐만 아니라 탄소섬유시트가 방출하는 원적외선을 이용하여 원적외원이 세포에 미치는 영향에 대해서도 동시에 테스트해 볼 수 있다.

[0050] 본 실시예에서 탄소섬유시트 면상발열체(161)는 $200\times 200\text{mm}$ 로 제작된다. 이렇게 제작된 탄소섬유시트 면상발열체(161)는 예를 들어, $25\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위에서 발열이 가능하나, 상기한 온도 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 본 실시예에서 제작된 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 특성은 하기 표 1 및 2와 같다. 하기 표 1에는 탄소섬유시트 면상발열체의 전기적 특성을 나타내었고, 표 2에는 탄소섬유시트 면상발열체의 원적외선 방출 특성을 나타내었다.

표 1

Type	Thickness (mm) (n=6)	Tensile Strength (MPa) (n=6)	Young's Modulus (GPa) (n=6)	Surface Resistance (Ω/sq) (n=4)	Electrical Conductivity (S/cm) (n=4)	Thermal Conductivity (W/m·K) / Hot Disk (n=3)
CF Sheets	0.205 ± 0.008	15.3 ± 5.8	2.09 ± 0.47	2.02 ± 0.09	14.1 ± 0.96	1.246 ± 0.010

[0052]

표 2

Laminated CF Sheets	Type (n=2)	
	Emissivity ($5\sim 20\mu\text{m}$)	Radiation energy ($\text{W}/\text{m}^2\cdot\mu\text{m}$)
70°C	0.912	5.49×10^2

[0053]

- [0054] 단열블록(162)은 승강 스테이지유닛(140)의 승강 플레이트(141)의 하면에 결합된다. 단열블록(162)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)에서 발생한 열을 단열한다. 본 실시예에서 단열블록(162)은 코르크 재질로 제작된다. 그러나 이에 한정되지 않으며, 유리면, 펠트, 난연플라스틱, 우레탄보드 등의 재질로 제작될 수 있다.
- [0055] 단열블록(162)에는 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도를 측정하는 온도 측정기가 장착될 수 있다. 이 경우, 단열블록(162)의 하면에는 온도 측정기가 장착되는 온도 측정기용 장착홈이 형성된다. 온도 측정기로는 써모커플(Thermocouple)이 장착될 수 있다.
- [0057] <제1소수성필름(163)과 제2소수성필름(164)>
- [0058] 제1소수성필름(163)과 제2소수성필름(164)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)에 부착된다.
- [0059] 제1소수성필름(163)은 상면이 단열블록(162)의 하면에 결합된다. 제1소수성필름(163)의 하면은 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 상부에 배치되며, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 상면을 커버한다. 제1소수성필름(163)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)보다 작게 형성되어, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 양단부에 배치된 금속전극(166)은 커버하지 않는다.
- [0060] 제2소수성필름(164)은 상면이 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 하부에 배치되며, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 하면의 일부분 즉, 중앙영역을 커버한다.
- [0061] 본 실시예에서 제1소수성필름(163)과 제2소수성필름(164)은 열가소성 폴리우레탄(thermoplastic polyurethane, TPU) 재질로 제작된다. 그러나 이에 한정되지 않으며, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 에틸렌초산비닐(Ethylene Vinyl Acetate, EVA) 등의 필름으로 제작될 수 있다.
- [0062] 제1소수성필름(163)과 제2소수성필름(164)은 배양 배지 또는 배양액에서 증발된 수분이 탄소섬유시트 면상발열체(161)나 단열블록(162)에 맺히거나 내부로 스며드는 것을 방지한다.
- [0064] <금속전극(166)>
- [0065] 탄소섬유시트 면상발열체(161)에 전원을 연결하기 위해, 금속전극(166)이 탄소섬유시트 면상발열체(161)에 부착된다. 금속전극(166)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 양단부에 부착된다. 본 실시예에서 금속전극(166)은 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 상면에 부착되었으나, 이와 달리 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 하면에 부착되거나 상면과 하면 모두에 부착될 수 있다.
- [0066] 금속전극(166)은 구리, 알루미늄, 은, 니켈, 주석 등을 포함하는 금속 또는 이들의 합금으로 이루어질 수 있다. 금속전극(166)은 리본 또는 선 형태일 수 있다. 본 실시예에서 금속전극(166)으로 구리가 사용된다. 탄소섬유시트면 상발열체(161)의 양단부에 구리테이프를 붙이고 전원을 연결한다.
- [0067] 탄소섬유시트 면상발열체(161), 단열블록(162), 제1소수성필름(163), 제2소수성필름(164), 금속전극(166)으로 만들어진 발열유닛(160)의 네 측면은 절연필름으로 감싸진다. 절연필름으로는 폴리이미드(polyimide, PI), 폴리프로필렌(polypropylene, PP), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 에틸렌초산비닐(Ethylene Vinyl Acetate, EVA) 등이 사용될 수 있다.
- [0069] <온도조절기(170)>
- [0070] 온도조절기(170)는 탄소섬유시트 면상발열체(161)에 연결되는 전원을 조절하여 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 발열온도를 조절한다. 구체적으로, 상기 온도조절기(170)는 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도를 측정하는 온도 측정기와 연결되어, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도 및 시간을 제어할 수 있다.
- [0072] 이하, 본 발명의 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 발열체 장치의 작동을 자세히 설명한다.
- [0073] 상기 간세포가 담지되는 배양 배지(또는 배양액)의 온도는 약 35 내지 40℃이며 이 온도를 유지해야 한다. 따라

서 상기 배양 배지(또는 배양액)가 담긴 배양용기(S)를 상기 면상발열체 장치에 배치하기 전에, 하부 플레이트(110)를 예열하는 과정이 필요하다.

[0074] 본 실시예에서는 발열유닛(160)의 금속전극(166)에 전원을 연결하여 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도를 약 60℃로 가열한다. 가열온도는 간세포 및/또는 배양 배지를 37℃로 유지할 수 있도록, 발열유닛(160)의 높이와 배양용기(S)의 크기에 따라 60℃~80℃로 조절될 수 있다. 이동유닛(150)의 회전부재(153)를 작동시켜 승강 스테이지유닛(140)의 승강 플레이트(141)를 하부 플레이트(110)로 하강시킨다.

[0075] 본 실시예에서는 발열유닛(160)과 하부 플레이트(110) 사이의 간격 이 약 40 mm인 상태에서, 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 온도를 약 60 ℃로 유지하 고 약 1분이 지나면, 하부 플레이트(110)의 온도가 약 35 ℃~40 ℃(평균 37 ℃)가 된다(도 4).

[0076] 하부 플레이트(110)은 30 분 정도의 예열과정이 필요하며, 예열과정이 끝나면 승강 플레이트(141)를 상승시켜 발열유닛(160)과 하부 플레이트(110) 사이의 간격을 벌린 후, 간세포 및/또는 배양 배지(또는 배양액)가 담긴 배양용기(S)를 하부 플레이트(110)의 중앙 영역에 배치시킨다.

[0077] 도 5에 도시된 바와 같이, 발열유닛(160)과 하부 플레이트(110) 사이의 간격이 약 1 내지 50 cm 또는 25 내지 35 cm가 될 때까지 승강 플레이트(141)를 하강시킨다. 간세포 및/또는 배양 배지를 적정 시간(약 30분 내지 24 시간) 동안 배양시킨다.

[0078] 이하, 본 발명의 제2구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열 체 장치를 자세히 설명한다. 도 1 및 도 6을 기본적으로 참조한다.

[0079] 본 발명의 제2구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치는, 발열유닛(260)에서 제1구현예와 차이가 있다. 제2구현예에 따른 발열유닛(260)은 얇은 탄소섬유시트 면상발열체 복수 개를 구비한다. 얇은 탄소섬유시트 면상발열체를 복수 개 사용하면, 두꺼운 탄소섬유시트 면상발열체를 한 장 사용할 때보다, 탄소섬유시트 면상발열체에서 방출되는 열과 원적외선의 방출량을 보다 정밀 하고 쉽게 조절할 수 있다. 따라서 온도 범위를 더 다양하게 구성할 수 있고, 원적 외선의 방출량에 따른 세포에 미치는 영향을 다양한 조건 하에서 테스트해 볼 수 있다.

[0080] 제2구현예에서는 발열유닛(260)이 두 개의 탄소섬유시트 면상발열체를 포함하고, 각 탄소섬유시트 면상발열체의 상면과 하면에 소수성필름이 부착된다. 그러나 이에 한정되지 않고, 탄소섬유시트 면상발열체의 개수는 이보다 더 많게 형성될 수 있고, 이에 상응하여 소수성필름도 증가될 수 있다.

[0081] 나머지 구성은 제1구현예와 동일하므로, 동일한 구성에 대한 자세한 설명은 생략한다. 동일한 구성에 대해서는 동일한 부호를 사용한다.

[발열유닛(260)]

[0084] 발열유닛(260)은 승강 스테이지유닛(140)에 결합된다.

[0085] 도 6에 도시된 바와 같이, 발열유닛(260)은 제1탄소섬유시트 면상발 열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b), 단열블록(262), 제1소수성필름 (263), 제2소수성필름(264), 제3소수성필름(265), 금속전극(266)으로 구성된다. 제 1구현예에 따른 발열유닛(160)과 동일한 내용은 자세한 설명을 생략하고, 구별되는 특징을 중심으로 설명하기로 한다.

<단열블록(262)>

[0088] 단열블록(262)은 제1구현예의 발열유닛(160)의 단열블록(162)과 동일하다

<제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264), 제3소수성필름(265)>

[0091] 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 상면과 하면에 각각 부착되고, 제2소수성필름(264)과 제3소수성필름(265)은 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 상면과 하면에 각각 부착된다.

- [0092] 제1소수성필름(263)은 상면이 단열블록(262)의 하면에 결합된다. 제1소수성필름(263)의 하면은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 상부에 배치되어, 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 상면을 커버한다.
- [0093] 제2소수성필름(264)은 상면이 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 하부에 배치되어, 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)의 하면을 커버한다. 제2소수성필름(264)의 하면은 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 상부에 배치되어, 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 상면을 커버한다.
- [0094] 제3소수성필름(265)은 상면이 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 하부에 배치되어, 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 하면을 커버한다.
- [0095] 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)보다는 길이가 작게 형성되어 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 양단부에 부착된 금속전극(266)은 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)과 제3소수성필름(265)에 의해 커버되지 않는다.
- [0096] 본 실시예에서 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)과 제3소수성필름(265)은 열가소성 폴리우레탄(thermoplastic polyurethane, TPU) 재질로 제작된다. 그러나 이에 한정되지 않으며, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 에틸렌조산비닐(Ethylene Vinyl Acetate, EVA) 등의 필름으로 제작될 수 있다.
- [0097] 제1소수성필름(263)과 제2소수성필름(264)과 제3소수성필름(265)은 간세포 및/또는 배양 배지에서 증발된 수분이 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b) 또는 단열블록(262)에 맺히거나 내부로 스며드는 것을 방지한다.
- [0099] <금속전극(266)>
- [0100] 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)에 전원을 연결하기 위해, 금속전극(266)이 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)에 각각 부착된다. 금속전극(266)은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 양단부에 부착된다. 본 실시예에서 금속전극(266)은 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 상면에 각각 부착되었으나, 이와 달리 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 하면에 각각 부착되거나 상면과 하면 모두에 부착될 수도 있다.
- [0101] 본 실시예에서 금속전극(266)으로 구리가 사용된다. 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)의 양단부에 구리테이프를 붙이고, 각 금속전극(266)에 전원을 연결한다.
- [0103] 이하, 본 발명의 제2구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치의 작동을 자세히 설명한다. 도 1 및 도 6을 기본적으로 참조한다.
- [0105] 기본적으로는 제1구현예에 따른 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치의 작동과 동일하므로, 제1구현예와 구별되는 작동을 중심으로 설명하기로 한다.
- [0106] 발열유닛(260)의 금속전극(266)에 전원을 연결할 때, 제1구현예와 같은 온도 범위와 원적외선의 방출량으로 시험하고자 할 때에는 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)에만 전원을 공급한다.
- [0107] 이와 달리, 제1구현예의 온도 범위와 원적외선의 방출량보다 더 큰 범위의 열을 방출하고자 할 때에는 제1탄소섬유시트 면상발열체(261a)와 제2탄소섬유시트 면상발열체(261b)에 전원을 공급한다.
- [0109] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 일 구현예를 이용하여 설명한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 발명에서 설명된 실시예는 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이런 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호범위

는 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0111] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0113] 제조예 1. 세포 배양

[0114] HepG2 세포를 한국 오가노이드 은행(Korean Organoid Bank, Seoul, Republic of Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 10% FBS(fetal bovine serum), 1% 페니실린/스트렙토마이신(100U/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 25mM HEPES (Gibco, Grand Island, New York)를 첨가한 EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC, VA, USA)에서 37 °C, 5 % CO₂ 조건으로 배양하였다. 이하에서는 계대수가 68 내지 76인 HepG2 세포를 사용하였다.

[0116] 실시예 1. 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치에 의한 원적외선 조사

[0117] 원적외선(FIR) 복사를 방출하는 탄소섬유시트(CFS; Carbon fiber sheets)의 온도를 제어하는, 본 발명에 따른 면상발열체 장치를 사용하여 원적외선을 조사하였다.

[0118] 구체적으로, 탄소섬유시트를 1 시간 동안 예열하고 HepG2 세포가 담지된 배양용기(S)가 배치된 하부 플레이트(110)와 탄소섬유시트 면상발열체(161)의 이격 거리가 3 cm가 되도록 하여 1 또는 2 시간 동안 60 °C 또는 70 °C에서 탄소섬유시트로부터 방출되는 원적외선(FIR-CFS)을 조사하였다. FIR-CFS 조사 후, HepG2 세포를 인큐베이터에서 37 °C, 5 % CO₂ 조건으로 1 시간 동안 추가로 배양하였다.

[0120] 비교예 1. 세라믹 적외선 조사기에 의한 원적외선 조사

[0121] 종래 연구에서 사용했던 세라믹 적외선 조사기를 사용하여 원적외선을 조사하였다. 구체적으로, 방출 파장이 3 내지 10 μm인 스크류 베이스(Model No. IOT/90-250W, Elstein-Werk M. Steinmetz GmbH & Co. KG, Northeim, Germany)의 세라믹 적외선 조사기(Model No. S-O.T.M 9H, Saeik Medical Co., Ltd., Bucheon, Republic of Korea)를 사용하였다. 세라믹 적외선 조사기를 1 시간 동안 예열하고 HepG2 세포가 담지된 6 well plate와 세라믹 적외선 조사기의 이격 거리가 30 cm가 되도록 하여 30 분 동안 원적외선을 조사하였다. 원적외선 조사 후, HepG2 세포를 인큐베이터에서 37 °C, 5 % CO₂ 조건으로 1 시간 동안 추가로 배양하였다.

[0123] 실시예 2. 웨스턴블롯 분석

[0124] 웨스턴블롯 분석을 위해 각 실험 시도에 대해 HepG2 세포를 DPBS (Welgene Inc., 경산, 대한민국)로 2 회 부드럽게 세척한 후, 1 X Protease Inhibitor Cocktail™, 1 mM β-glycerophosphate, 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 mM NaF 및 1mM Na₃VO₄가 첨가된 용해 완충액(pH 7.5, 1 mM Tris-HCl 20 mM, Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)을 사용하여 용해하였다. 모든 시료는 50 ug/ul의 농도로 준비되었고, 동일한 양의 단백질(20 μg)을 BCA 분석 키트(Sigma-Aldrich, Massachusetts, USA)를 사용하여 로드(load)하고 SDS 겔을 사용하여 분리한 후 기공 크기가 20 μm인 nitrocellulose blotting membranes (Amersham™Protran™0.2 μm NC; GE Healthcare Life science, Chicago, Illinois)에 옮겼다. 웨스턴블롯 전이 키트(Biorad, California, USA)를 사용하여 단백질을 멤브레인으로 옮긴 후, 1 X TBST에 5 % 탈지유(BD Life Sciences, New Jersey, USA)를 넣고 1:1000의 희석액으로 1차 항체(표 3의 PCSK9, LDLR, SREBP1 및 SREBP2) 또는 5 % 탈지유에 1:3000의 희석액으로 β-actin을 사용하여 밤새 처리하였다. 다음으로, 블롯을 1 X TBST로 10 분 동안 3 회 세척하고 1:3000으로 희석한 2차 항체를 함유한 5 % 탈지유에서 1 시간 동안 실온에서 배양하였다. 블롯을 1 X TBST로 10 분 동안 3 회 세척하고, 표적 단백질의 블롯을 ECL 용액(Biorad, California, USA)을 사용하여 화학발광법에 따라 Amersham™ImageQuant™800 (Cytiva, Marlborough, Massachusetts, USA)을 사용하여 시각화하였다. 단백질 수준은 Image Lab 소프트웨어(Biorad, California, USA)를 사용하여 정량화 및 분석하였다.

표 3

Antibody	Species	Dilution	Company (Catalog#)
PCSK9	Mouse	1:1000	Santa cruz (sc-515082)
LDLR	Rabbit	1:1000	Abcam (EP1553Y)
β -actin	Rabbit	1:3000	Abfrontier(LF-PA0207)

실시예 3. RT-PCR 분석

역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석을 위해 PureLink RNA 미니 키트(Invitrogen™, Massachusetts, USA)를 사용하여 Total RNA를 원적외선을 조사한 HepG2 세포에서 정제하였다. cDNA는 M-MLV 역전사효소, dNTPs, 반응 버퍼 및 oligo dT15가 함유된 5X Reverse Transcription Premix (Elpis Biotech, Daejeon, Republic of Korea)를 사용하여 합성하였다. 표 4의 특이적 프라이머(distinct primers)를 사용하여 특정 표적 PCR products를 증폭하였으며, PCR 조건은 94 °C에서 2 분간, 이후 [94 °C에서 30 초간, 56 °C에서 30 초간, 72 °C에서 1 분간] 수행하는 세 구간은 40 cycle을 반복시키고 마지막으로 72 °C에서 5 분간으로 수행되었다. PCR products는 2% 아가로스 겔(TAE buffer 0.5 %)에서 전기영동기기를 사용하여 분리되었으며, 분리된 PCR products는 Davinchi-Gel™ (Model No.CG550, YOUNG IN Labplus Co.,Ltd., Gangnam, Republic of Korea)로 시각화되었다. 기준 유전자로는 GAPDH가 사용되었다.

표 4

Primers	Sequences (5' → 3')	Amplicon size (bp)
TRPV1	F- CAG GCT CTA TGA TCG CAG GAG R- TTT GAA CTC GTT GTC TGT GAG G	121
TRPV2	F- TCA GGT TGG AGA CAT TAG ATG GAR- TCG GTA GTT GAG GTT GAC TCT T	155
TRPV3	F- AGG CTT CTA CTT CGG TGA GACR-AGG GCG TGA AGG ATG TTG TTG	138
TRPV4	F- GAT GGG CGA CCA AAT CTG CR- GAG GAC TCA TAT AGG GTG GAC TC	98
TRPV5	F- GGT TTT CTA CCT AAG GCA GAA GGR- CTC GAA GCA GTG GAG ACT CT	148
TRPV6	F- GTG AGC CTC AAG TGG AAG CR- GTG CGG TTA TTG GTC CTG GG	131
GAPDH	F- GTC AGT GGT GGA CCT GAC CTR- AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG	420

실시예 4. 통계 분석

데이터 값은 평균 $\pm$ 표준편차(S.D.)로 표시되었다. 통계적 유의성은 두 그룹 간의 비교를 위해 t-검정을 통해 결정되었다. 다중 비교는 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 수행되었다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어 버전 7(GraphPad Software, San Diego, CA)에서 제공되는 통계 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 모든 분석에서 P < 0.05는 통계적으로 유의미한 것으로 간주되었다.

실험예 1. 탄소섬유시트로 방출되는 원적외선의 PCSK9 발현 억제 효과 확인

1-1. 세라믹 적외선 조사기로 원적외선 조사 시 PCSK9 발현 억제 효과 확인 및 최적화

1-1-1. 원적외선 조사 시간에 따른 PCSK9 발현 억제 효과 확인

[0137] 세라믹 적외선 조사기로 원적외선 조사 시 HepG2 세포의 PCSK9 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 비교예 1의 방법으로 HepG2 세포에 원적외선을 조사한 후 실시예 2의 방법으로 웨스턴블롯을 수행하였다. 분석 결과, 세라믹 적외선 조사기로 원적외선 조사 시 HepG2 세포에서 PCSK9 단백질 발현이 유의하게 감소한 것으로 확인되었다($p < 0.01$, 도 7).

[0138] 또한, 세라믹 적외선 조사기로 원적외선을 30 분 조사 후, 30 분과 1 시간 동안 배양시킨 결과 1 시간 동안 배양시킨 그룹에서 PCSK9 단백질 수준이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(도 8). 이러한 결과를 토대로 이후의 세라믹 적외선 조사기로 원적외선을 30 분 동안 조사하고 1 시간 동안 추가로 배양하는 것을 실험 조건으로 진행되었다.

[0140] 1-1-2. 원적외선 조사의 PCSK9 발현 억제 효과 확인

[0141] 비교예 1의 조건으로 원적외선을 조사하는 동안 시간경과에 따른 온도 변화를 열화상 카메라를 이용하여 촬영한 다음 FLIR Thermal Studio 프로그램을 이용하여 분석한 결과, 세라믹 적외선 조사기는 400~500 °C의 높은 방사열로 원적외선 조사 시 배지의 온도가 약 37 °C까지 상승됨을 확인하였다(도 9). 세라믹 원적외선의 조사가 PCSK9에 미치는 잠재적인 열 효과를 확인하기 위해, 세라믹 원적외선 조사에 노출된 HepG2 세포의 PCSK9 단백질 발현을 원적외선에 노출되지 않고 25 °C (실온, RT) 및 37 °C의 습윤한 CO₂ 배양기 내에서 유지된 세포와 비교하였다.

[0142] 분석 결과, 원적외선을 조사하지 않은 HepG2 세포의 PCSK9 단백질 발현은 37 °C 및 RT 간에 유의한 차이가 없었으나, 원적외선에 노출된 HepG2 세포에서만 PCSK9가 유의하게 감소하였다(도 10).

[0143] 이와 같은 결과를 통해, 원적외선에 의한 PCSK9의 억제가 열 효과와는 독립적인 것으로 확인되었다.

[0145] 1-2. 탄소섬유시트 원적외선(CFIR) 조사 시 PCSK9 발현 억제 효과 확인 및 최적화

[0146] 탄소섬유시트 원적외선(CFIR) 조사가 HepG2 세포의 PCSK9 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실시예 1의 방법으로 HepG2 세포에 원적외선을 조사한 후 실시예 2의 방법으로 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0147] 분석 결과, 배지의 온도는 34~36 °C의 온도를 유지하여, 세라믹보다 더 낮은 온도증가를 보여주었다. HepG2 세포의 PCSK9 단백질 발현의 경우, 70 °C보다 60 °C의 온도에서 더 감소하였음을 확인하였고, 60 °C에서 2 시간 동안 조사 시 PCSK9의 발현이 더 감소되는 것으로 나타났다($p < 0.01$, 도 11). 이러한 결과를 토대로 이후의 탄소섬유시트 원적외선 조사는 60 °C에서 2 시간 동안 조사함을 실험 조건으로 진행되었다.

[0149] 실험예 2. 탄소섬유시트로 방출되는 원적외선이 간세포의 LDLR 및 LDL 흡수에 미치는 영향 분석

[0150] 저밀도 지질단백질(low-density lipoprotein, LDL)은 혈액을 통해 간이나 장의 콜레스테롤을 조직으로 운반하는 분자 중 하나로 알려져 있다. 원적외선 조사로 인한 PCSK9 발현 억제 효과가 HepG2 세포에서의 LDLR(Low-Density Lipoprotein Receptor) 및 LDL 흡수에 미치는 영향을 확인하기 위해 LDL 흡수 검사 키트를 사용하여 원적외선이 LDLR 및 LDL 흡수에 미치는 영향을 분석하였다.

[0151] 구체적으로, 세포 내 저밀도 지질단백질 흡수(intracellular low-density lipoprotein uptake)는 LDL Uptake Assay kit (ab133127, Abcam, Cambridge, UK)를 사용하여 제조사 프로토콜에 따라 평가되었다. HepG2 세포를 헤마톡실린(hematoxylin)으로 역염색(counter-stained)한 후 3 일 동안 6 well plate에서 3.0×10^5 cells/well의 밀도로 배양하였다. 배양 배지는 원적외선 조사 24 시간 전에 교체되었으며, LDL 염색 프로토콜 이전에 인큐베이터에 배치되었다. 세포는 원적외선에 노출시킨 후 LDL-Dylight™ 550 (10 µg/ml)과 함께 습윤한 37 °C 배양기에서 4 시간 동안 배양하였으며, 배양 후 DBPS(Disinfection by-products)로 3회 세척하였다. 4 % PFA로 10 분 동안 고정하고, 1 x TBST로 5 분씩 3 번 세척하였다. 그리고 3% BSA blocking buffer를 이용하여 30 분 동안 실온에서 배양하였다. Rabbit anti-LDL 수용체 1차 항체(Abcam, 1:500)와 함께 1 시간 동안 배양한 후 FITC 결합 2차 항체(1:500)를 1시간 동안 배양하여 LDL 수용체 발현을 시각화하였다. 세포를 DPBS로 3회 세척하고 DAPI로 1 분 동안 역염색하였다. 염색된 세포가 부착된 glass coverslip을 마운트로 슬라이드에 부착하고 매킨큐어를 사용하여 밀봉하였다. LDLR, LDL 및 핵은 공초점 현미경(LSM5 Pascal1, Cal ZEISS, Oberkochen,

Germany)을 통해 각각 FITC (LDLR, 녹색), Texas red (LDL, 적색), DAPI (핵, 청색)로 시각화되었다.

[0152] 분석 결과, 도 12A에 보이는 바와 같이, 세라믹 적외선 조사기에 의한 원적외선 조사는 LDLR(녹색) 발현을 증가시켜 LDL (빨간색)의 세포 내 흡수를 증가시킨 것으로 확인되었다. 또한 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치에 의한 원적외선 조사 또한 LDLR (녹색) 발현을 증가시켜 LDL (빨간색)의 세포 내 흡수를 증가시킨 것으로 확인되었다(도 12B).

[0153] 이와 같은 결과를 통해, 세라믹 적외선 조사기 및 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치에서 방출되는 원적외선이 HepG2 세포의 LDL 흡수를 증가시키는 효과가 우수한 것으로 확인되었다.

[0155] 실험예 3. 탄소섬유시트로 방출되는 원적외선 조사 시 간세포의 칼슘 채널이 PCSK9 발현에 미치는 영향 분석

[0156] 3-1. 세포 내 칼슘 농도에 미치는 영향 분석

[0157] 본 발명자들은 이전 연구들을 통하여 원적외선의 조사는 편도유래줄기세포와 bovine aorta endothelial cells (BAECs)에서 세포 내 칼슘을 증가시켜 각각 지방형성 억제와 혈관 이완을 유발시킨다는 것을 밝혀 내었다(Kim 등, 2021; Park 등, 2013). 이러한 변화가 원적외선 조사 후에도 HepG2 세포에서 발생하는지 여부를 확인하기 위해, 세포 내 칼슘 농도를 고수준 칼슘의 형광 지시체인 Fluo-4 AM(Thermo Fisher Science, Waltham, MA, USA)을 사용하여 측정하였다.

[0158] 구체적으로, HepG2 세포의 세포 내 칼슘을 Fluo4-AM($0.5 \mu\text{M}$)으로 염색하고, 배양된 HepG2 세포를 원적외선에 30 분간 노출시킨 후 DPBS로 즉시 세척을 반복하였다. 이어서 HepG2 세포를 실온에서 4 % 파라포름알데히드(4% PFA, Tech&Innovation, Gangwon, Republic of Korea)로 15 분간 고정하였다. DPBS로 2 회 세척 후 고정된 HepG2 세포의 핵을 DAPI (5 mg/ml)로 1 분간 염색하였다. 형광 강도 이미지(Fluorescence intensity images)는 공초점 현미경(LSM5 Pascal1, Cal ZEISS, Oberkochen, 독일)으로 촬영되었으며, 형광 강도는 이미지 J 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.

[0159] 분석 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 세라믹 적외선 조사기 원적외선 조사에 의해 HepG2 세포의 세포 내 칼슘 농도가 유의하게 증가하였다. 이러한 결과를 통해 원적외선에 의한 PCSK9 발현 억제가 세포 내 칼슘 농도 변화와 관련이 있을 수 있음이 확인되었다.

[0161] 3-2. 세포 내 칼슘이 PCSK9 발현에 미치는 영향 분석

[0162] 세포 내 칼슘이 PCSK9 발현에 관여하는지 여부를 확인하기 위해 세포 내 칼슘을 증가시킨다고 알려진 이오노포어(ionophore)인 이오노마이신(ionomycin; AG Scientific, CA, USA)을 HepG2 세포에 처리하였다. 이오노마이신은 용량($2.5, 5, 10 \mu\text{M}$) 별로사용하였다.

[0163] 분석 결과, 실험예 4-1의 결과와 동일하게, 이오노마이신은 HepG2 세포에서의 PCSK9 단백질 발현을 감소시키는 것으로 확인되었다(도 14).

[0165] 3-3. TRP 채널이 PCSK9 발현에 미치는 영향 분석

[0166] 세포 내 칼슘이 조절되는 대표적인 형태는 칼슘채널인 TRP 채널의 활성화에 의한 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 이전 연구들을 통하여 TRP 채널 TRPV2가 세라믹 원적외선 조사로 인한 편도유래줄기세포에서의 지방분화 억제에 매개체 역할을 하는 것을 확인하였다(Kim 등, 2021, 2019). 이에 따라, 원적외선 조사 후 HepG2 세포에서 세포 내 칼슘 및 PCSK9 발현 수준을 결정하는 데 TRP 채널이 관여하는지 여부를 확인하기 위해 TRP 채널의 억제제로 알려진 Ruthenium Red (Sigma, Massachusetts, USA)를 농도별로 사용하여 PCSK9에 미치는 영향을 측정하였다.

[0167] 구체적으로, HepG2 세포에 Ruthenium Red를 $2.5, 5, 10 \mu\text{M}$ 농도로 처리하고, 실험예 1과 비교예 1에서 최적화된 조건에 따라 원적외선을 조사하였다.

[0168] 분석 결과, Ruthenium Red는 농도 의존적으로 세라믹 적외선 조사기(도 15A) 및 탄소섬유시트로 제작된 면상발열체 장치(도 15B)에서 방출된 원적외선 조사로 인해 감소한 PCSK9의 발현을 회복시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 원적외선조사에 의한 PCSK9 단백질 발현의 억제가 TRP 칼슘 채널의 활성화를 통해 일부적으로

매개되며, 이는 HepG2 세포의 세포 내 칼슘 농도를 증가시키는 것으로 확인되었다.

[0170] 3-4. TRPV4 채널이 PCSK9 발현에 미치는 영향 분석

[0171] 실시예 3의 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석을 통해 표 4에 제시된 유전자 발현을 조사하였다. 분석 결과, 원적외선을 조사한 HepG2 세포에서 TRPV1, TRPV2, TRPV4 및 TRPV6 유전자의 발현이 확인되었고(도 16), 이중 TRPV1, TRPV2 및 TRPV4는 지질 대사 및 지방형성에 관여한다고 보고되어(Dhaka1과 Lee, 2019), 원적외선 조사에 의해 PCSK9 단백질 발현을 조절하는 위한 잠재적인 후보로 선택하였다.

[0172] 상기 후보군 중 PCSK9을 조절하는 TRPV 채널을 확인하기 위해, HepG2 세포에 해당 채널 활성제와 억제제를 처리한 후 원적외선을 조사하였다. 구체적으로, TRPV1의 활성제로 capsaicin (10, 25 μ M), TRPV2의 활성제로 probenecid (1, 2, 4 mM), TRPV4의 활성제로 4 α -PDD (5, 10, 20 μ M)를 처리한 경우, 모든 경우에서 원적외선 조사의 효과를 모사하여 PCSK9의 단백질 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다(도 17).

[0173] 또한, TRPV4의 억제제로 RN1734를 20, 40, 60 μ M 처리한 결과, 원적외선 조사에 의한 PCSK9 단백질 발현 감소를 유의하게 회복시키는 것으로 나타났다(도 18). 반면, capsazepine (10, 20 μ M) 및 tranilast (50, 100, 200 μ M)에 의한 TRPV1 및 TRPV2의 억제는 원적외선 조사로 인한 PCSK9 단백질 발현 감소를 회복시키지 못하였으며, 오히려 PCSK9 단백질 발현을 더욱 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 TRPV4는 원적외선 조사에 의해 활성화된 중요한 칼슘 채널로서 PCSK9의 단백질 발현을 억제하는 것으로 확인되었다.

[0175] 이제까지 본 발명에 대하여 그 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

[0177]

110: 하부 플레이트

120: 상부 플레이트

130: 가이드 샤프트

140: 승강 스테이지유닛

141: 승강 플레이트

141a: 지지홈

142: 가이드 부시

150: 이동유닛

151: 고정 허브

152: 스크류 샤프트

153: 회전부재

160, 260: 발열유닛

161: 탄소섬유시트 면상발열체

162, 262: 단열블록

163, 263: 제1소수성필름

164, 264: 제2소수성필름

165: 제3소수성필름

166, 266: 금속전극

170: 온도조절기

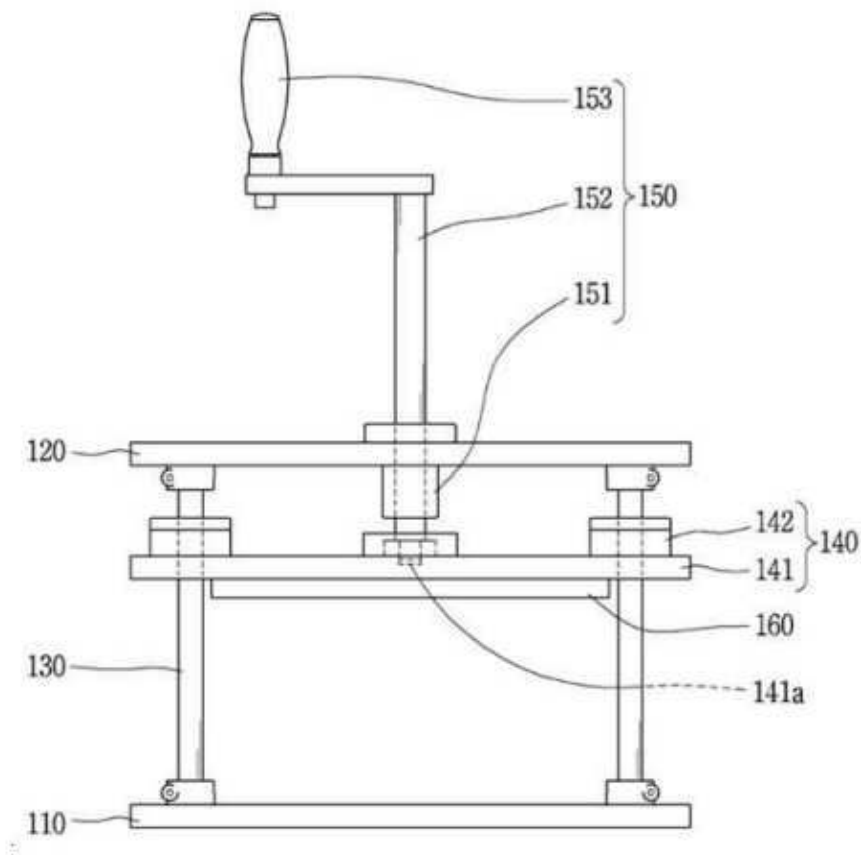
261a: 제1탄소섬유시트 면상발열체

261b: 제2탄소섬유시트 면상발열체

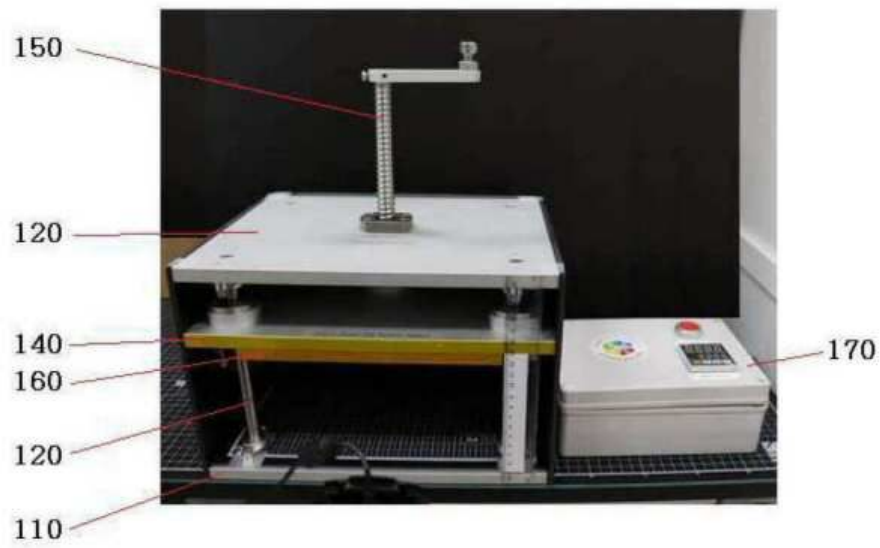
S: 배양용기

도면

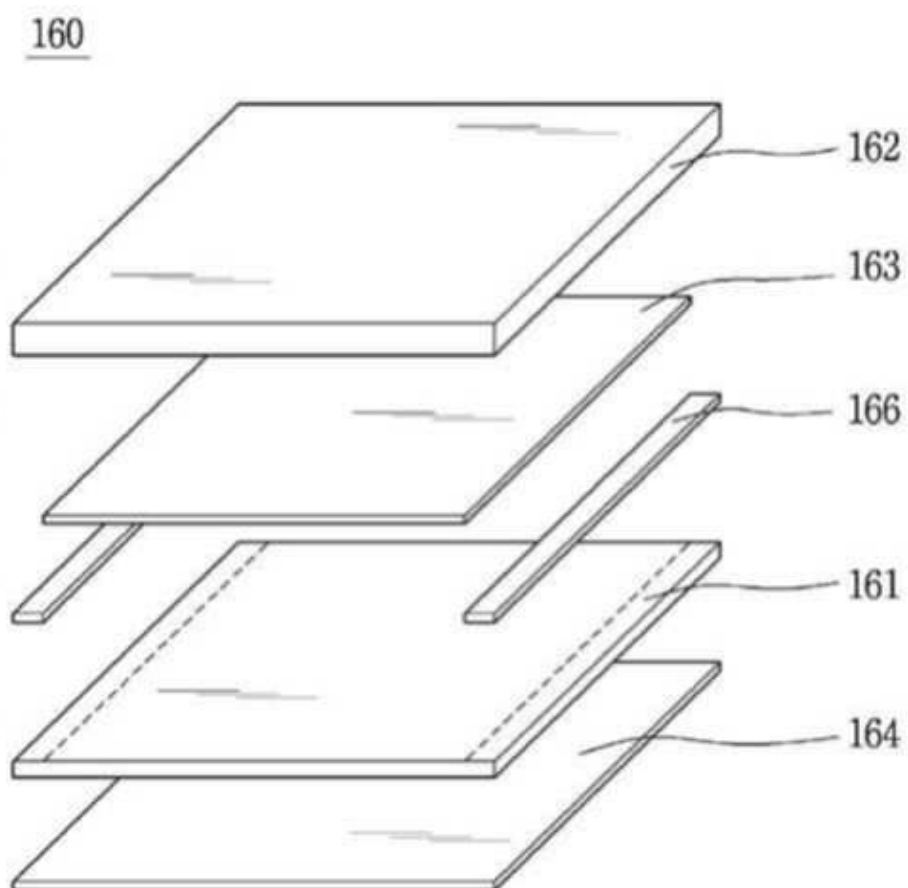
도면1



도면2

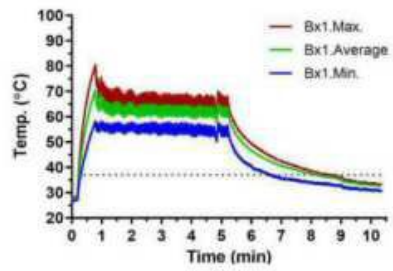
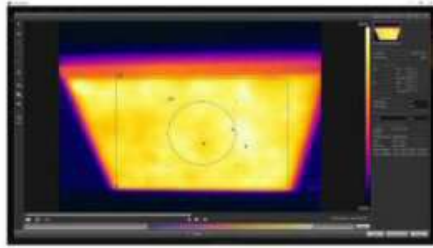


도면3

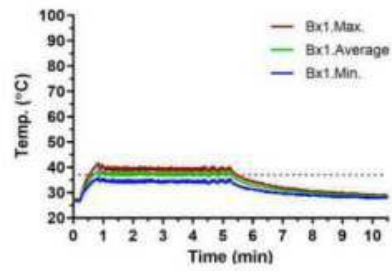


도면4

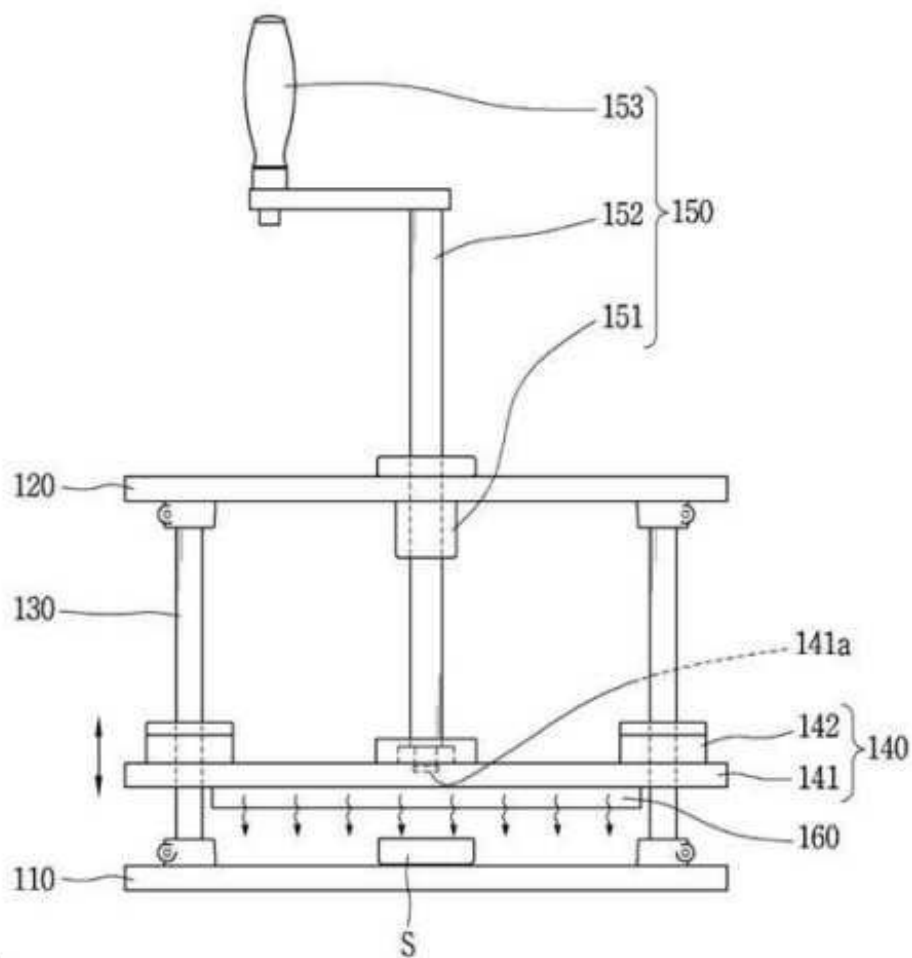
A. Heating to 60°C by the CF sheet



B. Cutting Mat at 60°C

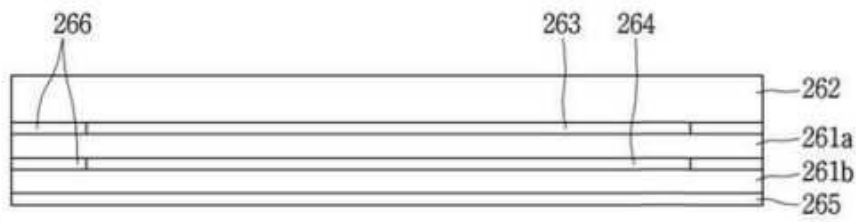


도면5

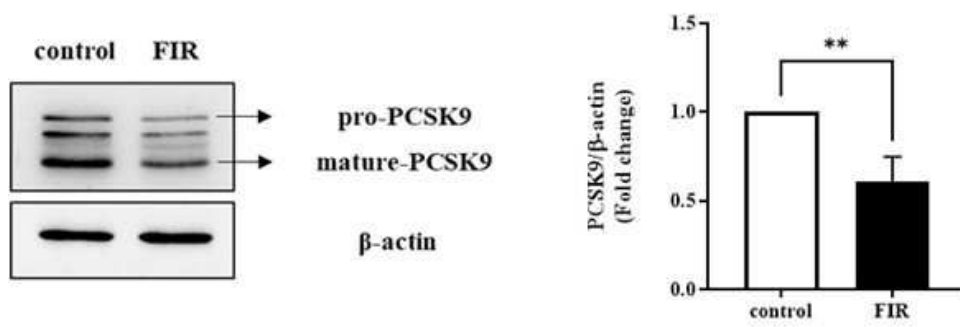


도면6

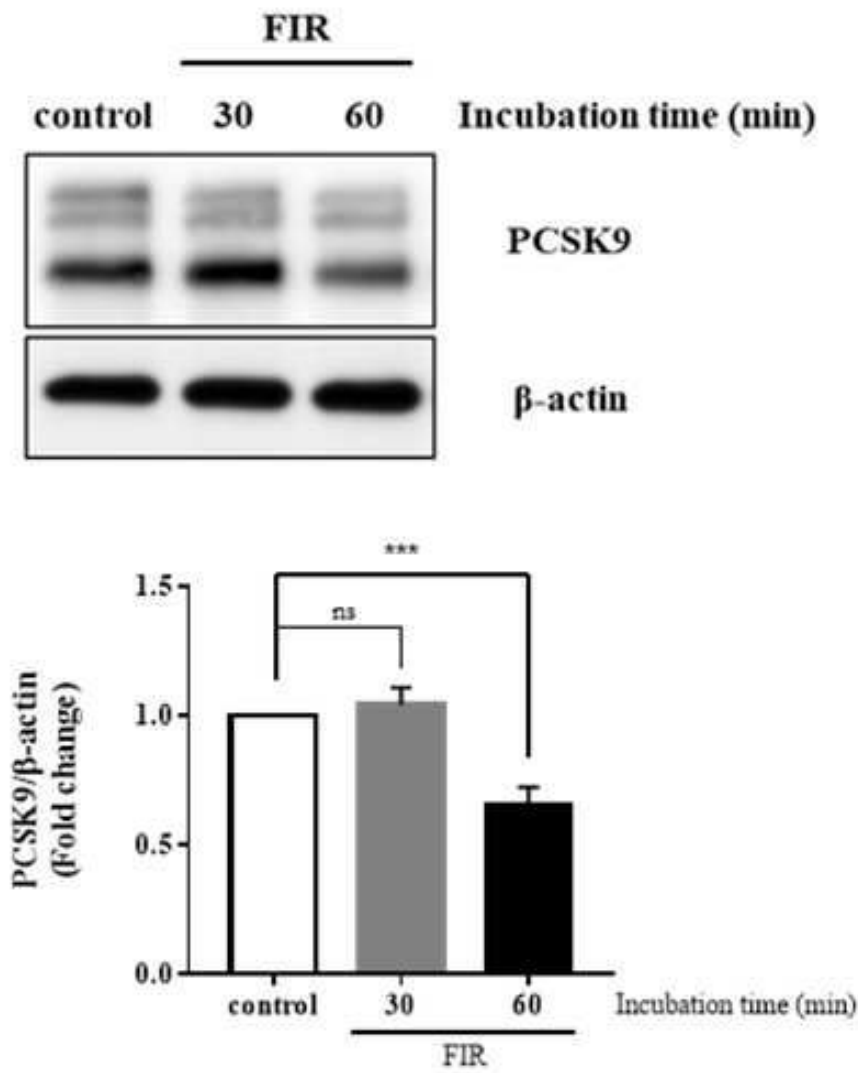
260



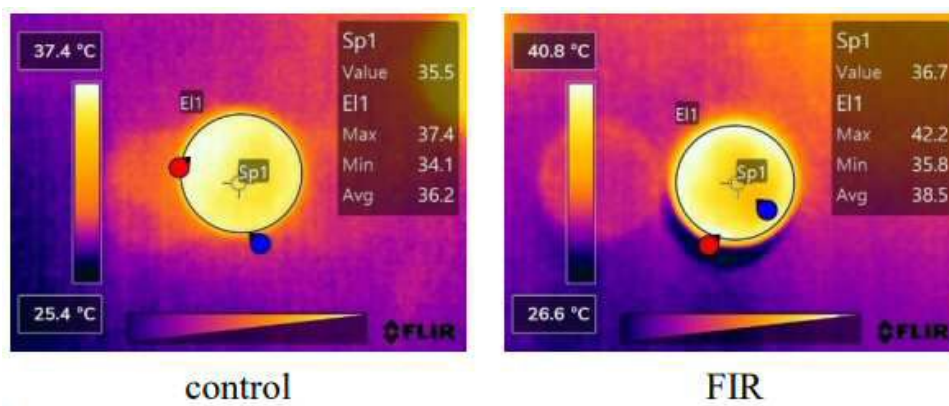
도면7



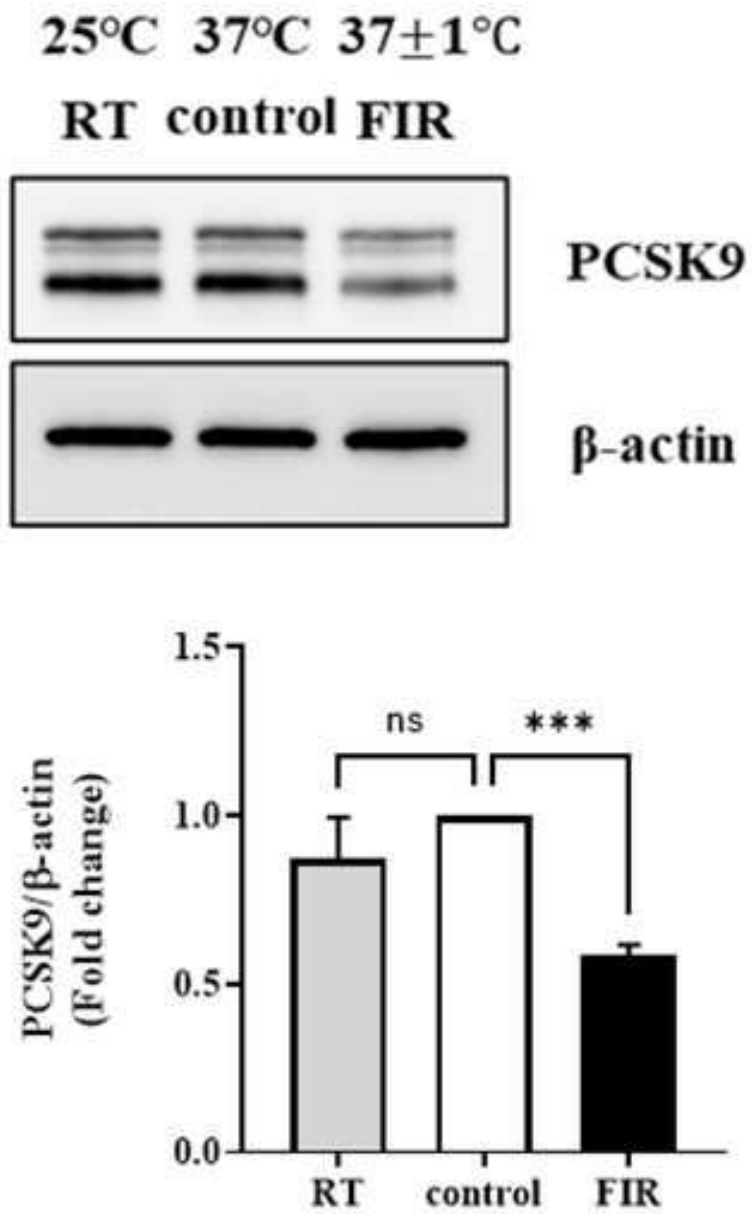
도면8



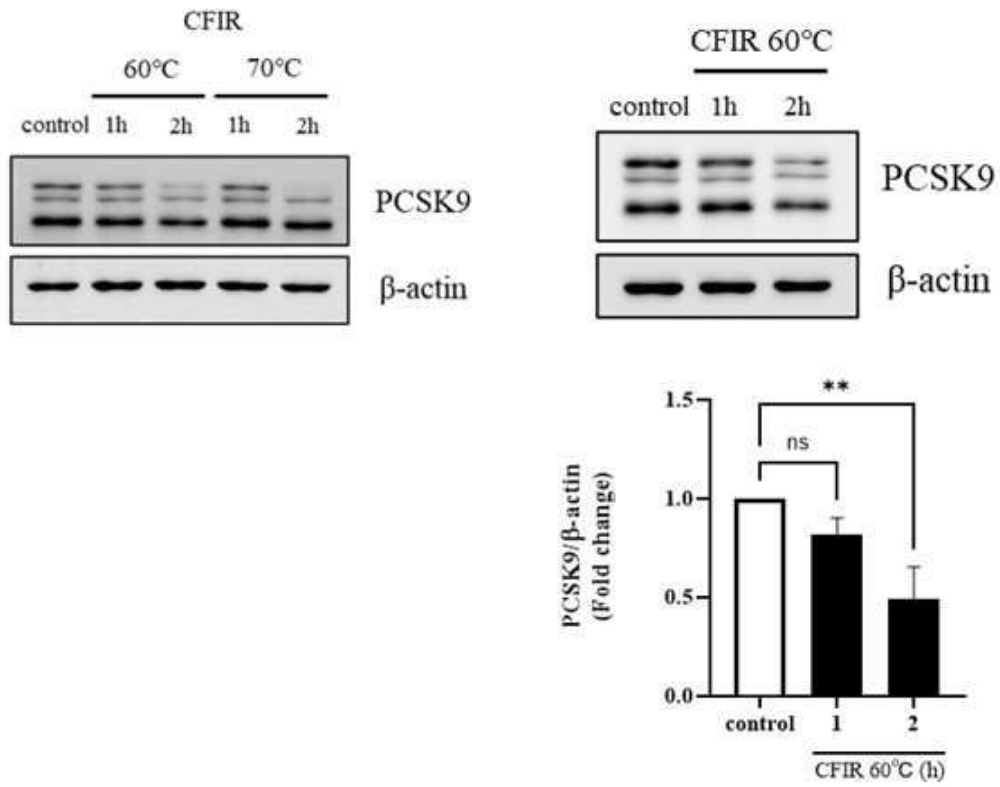
도면9



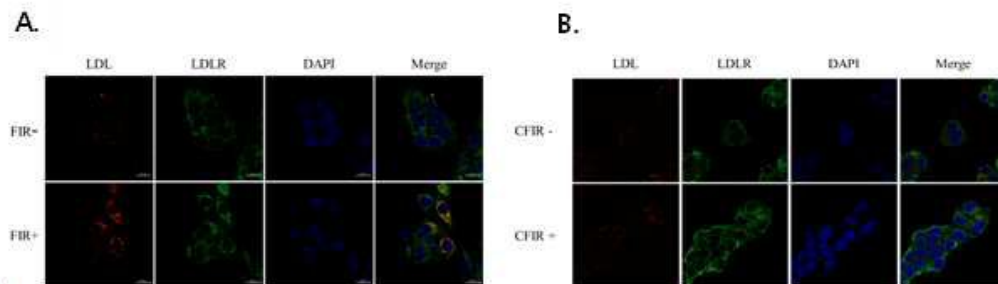
도면10



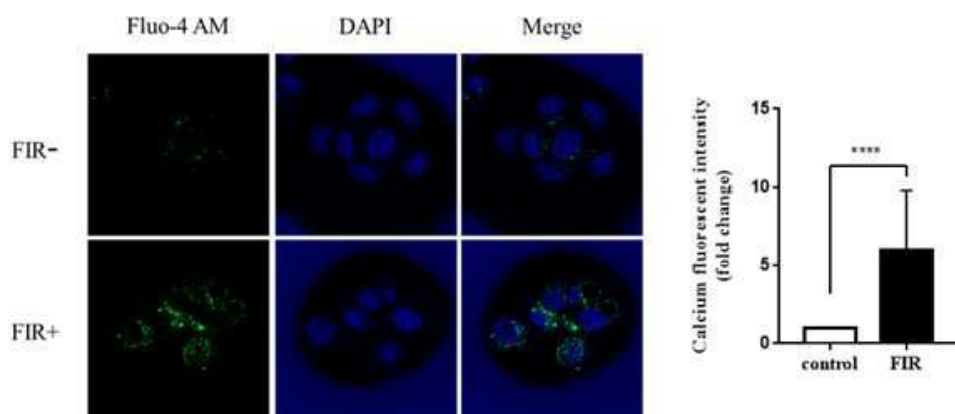
도면11



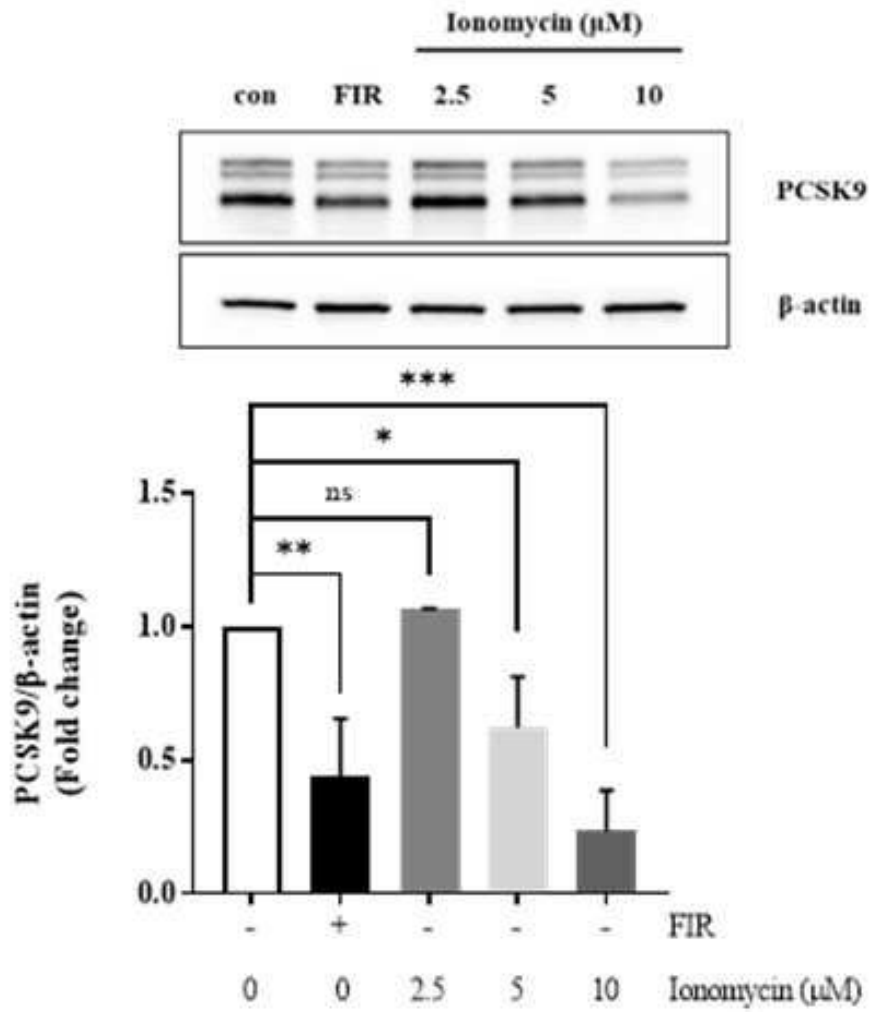
도면12



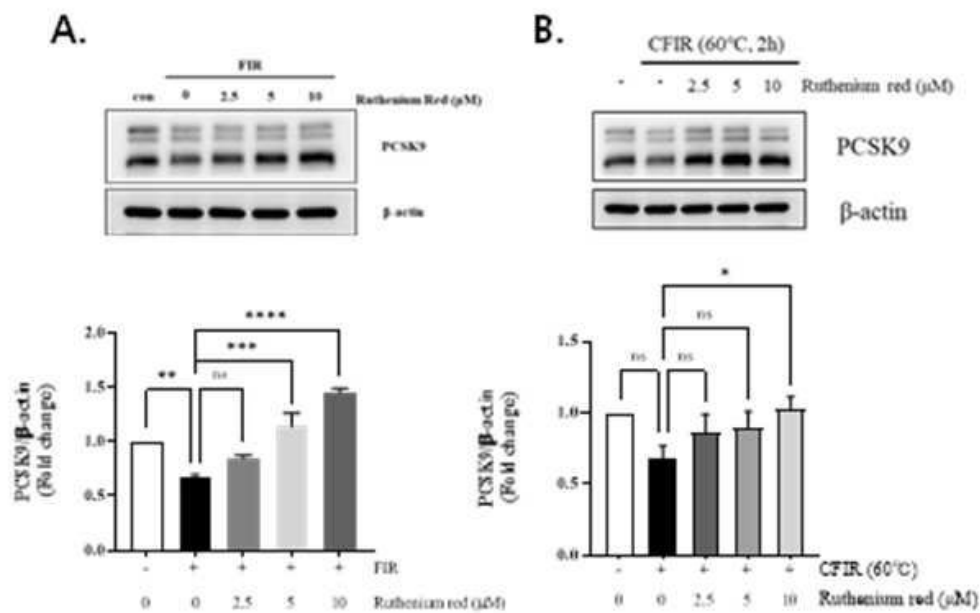
도면13



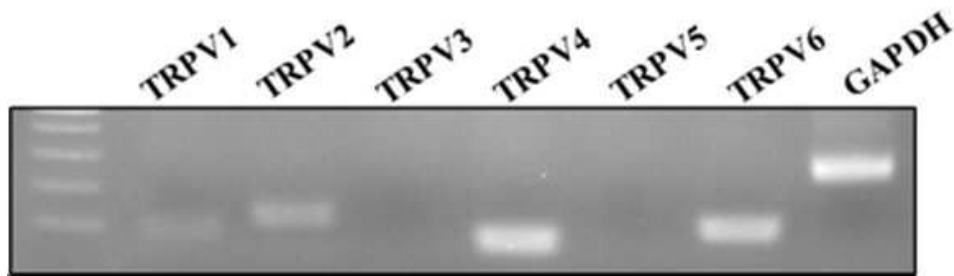
도면14



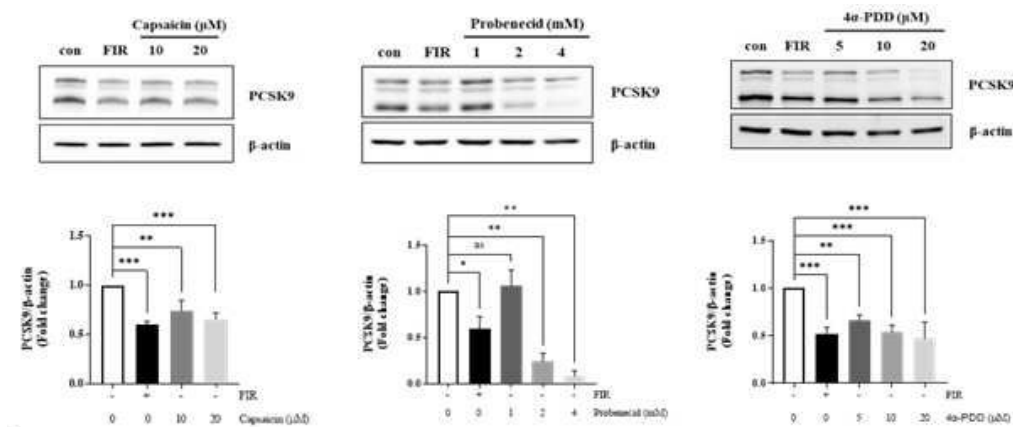
도면15



도면16



도면17



도면18

