



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월07일
(11) 등록번호 10-1765676
(24) 등록일자 2017년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/25 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/25 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0044076
(22) 출원일자 2016년04월11일
심사청구일자 2016년04월11일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150118689 A
비특허문헌: J. BIOSCI. BIOENG.
KR100663284 B1
인터넷뉴스 (2013.12.23.)
http://news.newsway.co.kr/common/newsprint.php?tp=1&ud=2013122316590184657*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조선대학교 산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
송희상
광주광역시 남구 봉선로175번길 6 202동 104호
임리진
광주광역시 남구 봉선로175번길 6 202동 104호
(74) 대리인
정성중, 신명용

전체 청구항 수 : 총 2 항

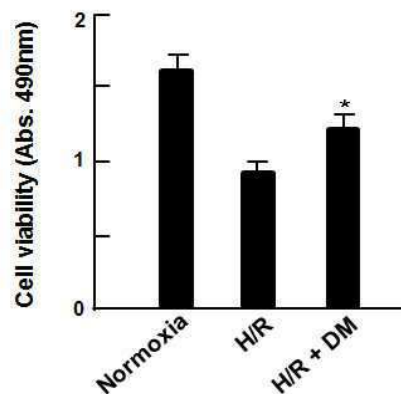
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 심근증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 심근증 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 유효성분인 황칠 추출물은 저산소 및 재산소 처리(hypoxia and reoxygenation, H/R)에 의해 손상된 심근세포의 사멸을 억제하고, 손상된 심근세포 내 활성산소종(ROS)의 생성을 억제하며, 칼슘 농도 유지에 관여하는 단백질인 SERCA2a 및 RYR2의 발현을 조절함으로써 손상된 심근세포 내에서 증가한 칼슘이온(Ca^{2+})의 농도를 억제하는 효과를 나타내므로, 심근증을 예방 또는 치료하기 위한 조성물로서 유용하게 사용할 수 있다. 또한, 상기 황칠 추출물은 인체에 대한 부작용이 없으므로 약품 또는 식품에 안전하게 적용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1405002190

부처명 산림청

연구관리전문기관 산림청

연구사업명 임업기술연구개발사업(보조포함)

연구과제명 황칠나무 추출물의 심혈관질환 예방 및 제어 유효성 분석

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2014.04.15 ~ 2015.04.14

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

황칠나무의 잎 또는 가지 중 어느 하나 이상을 열수 추출한 추출물을 유효성분으로 포함하는 심근증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

황칠나무의 잎 또는 가지 중 어느 하나 이상을 열수 추출한 추출물을 유효성분으로 포함하는 심근증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 심근증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 심근증 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리 몸에 혈액을 내보내는 역할을 하는 심장은 심근(심장근육)으로 구성되어 있는데, 심근의 기능에 이상이 발생하면 제대로 펌프 역할을 할 수 없게 되고, 이로 인해 혈액 순환이 제대로 이루어지지 않으므로 생명이 위협 받게 된다. 이러한 심근 기능의 이상에 의해 발생하는 병을 총칭하여 심근증(cardiomyopathy; 심근병증)이라 한다.

[0003] 상기 심근증은 크게 i) 특별한 이유 없이 심장의 근육자체의 기능이 상실되는 일차성(또는 특발성) 심근증과 ii) 바이러스의 감염과 스트레스에 의한 염증; 약물 과민반응; 관상동맥 협착 또는 폐색, 혈장증, 혈관연축, 고혈압 등의 질병 등에 의해 심장으로 공급되는 혈류가 차단됨으로써 비가역적인 심근의 손상, 즉 심근세포 및 조직의 사멸이 일어나 심근의 기능이 상실되는 이차성(또는 속발성) 심근증으로 나뉜다.

[0004] 우리나라에서는 매년 약 10,000여명의 새로운 심근증 환자가 발생된다고 알려져 있으며, 심근증에 의한 사망자는 대부분 급사자로 총 사망자의 약 1%를 차지한다고 추정될 뿐, 아직 국내 역학이나 통계가 정확히 발표된 바가 없다. 그러나, 미국 질병관리센터(center for disease control)에서 35세 이상의 사망자를 대상으로 조사한 자료를 보면 심장 돌연사의 발생률은 연 0.1~0.2%로 1년에 20~40만명이 심장 돌연사로 사망하고 있으며, 이러한 심장 돌연사의 원인은 약 80%가 관동맥질환이다(Zipes DP *et al.*, 1998, Circulation, 98:2334-2351.).

[0005] 즉, 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥의 심한 협착 또는 폐색 등이 발생하면 심근세포의 생존에 필요한 산소 및 영양소 공급이 차단되고, 그 결과 심근세포가 사멸하거나 심각한 심근 기능장애(심근증)가 나타나게 되며, 이로 인해 심장 돌연사가 발생하게 됨을 알 수 있다. 특히, 심근세포는 재생, 증식하는 능력이 미약한 세포로서, 산소 및 영양소 공급의 차단으로 인한 심근세포의 사멸은 심장기능의 악화에 큰 영향을 미친다.

[0006] 이에 당분야에서는 심장 돌연사의 주된 원인인 관동맥질환의 환자를 대상으로 심근증의 예방에 치중하고 있는 실정이다. 구체적으로, 현재 심근증을 치료하는 방법으로는 혈전용해제인 안지오텐신전환효소 억제제(ACE

inhibitor; 예, 캅토프릴, 리시노프릴 등), 베타 차단제(beta-blockers; 예, 메토프롤올, 카르베딜롤 등), 스피로락톤, 에플레레논 등을 이용한 내과적 치료; 협착 또는 폐쇄된 관상동맥을 재관류 시켜주는 경피적 관상동맥 확장성형술 또는 우회로술과 같은 혈관성형술; 또는 심장이식 등의 수술적 치료가 이루어지고 있다.

[0007] 그러나, 상기 혈전용해제와 혈관성형술에 의해 심장 혈류가 재개되는 경우 심근세포에서 활성 산화 물질(rective oxygen species, ROS)의 급격한 증가와 강한 염증 반응이 일어나 이차적인 심근세포의 사멸이 유발되며, 이는 심장 수축의 저하 및 기능 감소를 발생시키기 때문에 심근증을 예방하는 측면에서는 크게 도움이 되지 않는다. 이러한 과정에서 심근세포 내의 칼슘 농도가 변화되고, 칼페인(calpain)과 카스파제(caspase)와 같은 단백질 분해효소들이 활성화되어 직접적으로 심근세포를 손상시키거나 칼슘 조절 단백질(Ca^{2+} regulating protein)를 변성시켜 심근세포의 기능 이상을 촉진시킨다. 특히, 혈전용해제의 경우는 대부분 화학 합성물로 장기간 복용시 부작용이 발생하는 문제를 동반한다. 또한, 상기 수술적 치료는 심근세포의 재생이 어렵기 때문에 근본적으로 완전한 치유가 어렵고, 비용이 비싸며, 수술 후 부정맥, 심인성 쇼크와 같은 합병증이 발생할 수 있는 문제가 있다.

[0008] 따라서, 관동맥질환 등의 질환이 있으면서 심근의 기능이상을 가지는 심근증 환자의 돌연사를 예방하기 위해서는 산소 및 영양소 공급의 차단으로 인해 심근세포의 사멸을 야기시키는 인자의 발현을 억제하여 심근세포가 사멸하지 않도록 함으로써 심근의 기능적 상태를 정상으로 유지해주는 것이 무엇보다 중요하다고 생각된다. 즉, 손상된 심근세포에서 증가된 활성산소종의 생성을 억제하고, 칼슘 조절 단백질의 발현을 조절함에 따라 증가된 칼슘이온(Ca^{2+}) 농도를 감소시킴으로써 심근증을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0009] 이에 본 발명자들은 인체에 안전한 천연물질로부터 심근증을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 탐색하던 중, 황칠 추출물이 저산소 및 재산소 처리에 의해 손상된 심근세포의 사멸을 억제하고, 손상된 심근세포에서 증가되는 활성산소종과 칼슘이온의 농도를 억제하며, 심근세포에서 칼슘 농도 유지에 관여하는 단백질의 발현수준을 조절하여 손상된 심근세포 내 칼슘 농도 증가를 억제하는 효과를 나타내므로, 황칠 추출물을 심근증 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 심근증 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 심근증 예방 또는 치료용 약학적 또는 식품 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 하나의 양태로서, 본 발명은 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 심근증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 황칠 추출물은 황칠나무의 수피, 잎, 열매, 뿌리, 가지, 및 전초로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상, 바람직하게는 잎, 및 가지를 건조 및 분말화한 다음, 당업계에 공지된 추출방법, 예를 들어 추출용매를 이용한 직접 추출법, 수증기 증류법, 초임계 유체 추출법 또는 냉가압법 등에 따라 추출할 수 있다.

[0014] 상기 추출용매를 이용하여 추출하는 경우, 추출용매는 예를 들어, 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함유 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 또는 에틸렌글리콜), 아세트산, DMF(dimethyl-formamide) 또는 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함하는 극성 용매; 또는 아세톤, 아세토나이트릴, 에틸 아세테이트, 메틸 아세테이트, 플루오로알칸, 펜탄, 헥산, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로헥탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, *o*-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 클로로포름, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소 및 THF를 포함하는 비극성 용매가 이용될 수 있다.

[0015] 또한, 상기 황칠 추출물은 상기 추출방법 이외에 통상적인 정제과정을 거쳐서도 수득할 수 있다. 예컨대, 일정

한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제방법을 통해 얻어진 분획을 통하여서도 황칠 추출물을 수득할 수 있다.

- [0016] 본 발명의 황칠 추출물은 추출, 분획 또는 정제(분리, 분획)의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획, 및 정제물, 그들의 회석액, 농축액 또는 건조물일 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기한 방법에 의하여 얻어진 황칠 추출물은 저산소 및 재산소 처리(hypoxia and reoxygenation, H/R)에 의해 손상된 심근세포의 사멸을 억제하고, 손상된 심근세포 내 활성산소종(ROS)의 생성을 억제하며, 칼슘 농도 유지에 관여하는 단백질인 SERCA2a의 발현은 촉진하는 반면 RYR2의 발현은 억제함으로써 손상된 심근세포 내에서 증가한 칼슘이온(Ca^{2+})의 농도를 억제하는 효과를 나타낸다.
- [0018] 따라서, 본 발명의 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 심근증을 예방 또는 치료하기 위한 용도로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 황칠 추출물은 천연식물재료인 황칠나무로부터 추출한 것으로서 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 황칠 추출물이 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예로서, 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 황칠 추출물은 전체 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01 내지 0.4 중량%의 함량으로 포함될 수 있다. 상기 황칠 추출물의 함량이 0.01 중량% 미만일 경우 손상된 심근세포 내 활성산소종의 발생 억제 및 칼슘 항상성을 유지하는 단백질의 발현 조절 효과가 미약하고, 0.4 중량%를 초과하는 경우 함량 증가에 따른 효과 증가가 비례적이지 않아 비효율적일 수 있으며, 제형상의 안정성이 확보되지 않는 문제가 있다.
- [0021] 본 발명의 하나의 구체적 용도로서, 본 발명의 조성물은 심근증을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 사용되는 경우, 유효성분으로서 황칠 추출물 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물(예: 락토스, 아밀로스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염 용액, 알코올, 아라비아 고무, 식물성 기름(예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0023] 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태 등의 요인에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다. 다만, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- [0025] 상기 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방법은 모든 방식으로 이루어질 수 있는데, 예를 들어, 경구; 직장; 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막, 또는 심근내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 하나의 구체적 용도로서, 본 발명의 상기 조성물은 심근증을 예방 또는 개선하기 위한 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 사용되는 경우, 유효성분으로서 황칠 추출물 이외에 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 상기 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리

톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0029] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명의 황칠 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0030] 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 황칠 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0031] 또한, 상기 식품 조성물은 상술한 성분 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0032] 한편, 본 발명의 황칠 추출물은 천연식물재료인 황칠나무로부터 추출한 것으로 인체에 무해하며, 독성 및 부작용이 없으므로 장기간 사용시에도 안심하고 사용할 수 있으며, 특히 상기한 바와 같은 약학적 조성물 또는 식품 조성물에 안전하게 적용할 수 있다.

발명의 효과

[0033] 상기한 바와 같이, 본 발명의 황칠 추출물은 저산소 및 재산소 처리(hypoxia and reoxygenation, H/R)에 의해 손상된 심근세포의 사멸을 억제하고, 손상된 심근세포 내 활성산소종(ROS)의 생성을 억제하며, 칼슘 농도 유지에 관여하는 단백질인 SERCA2a 및 RYR2의 발현을 조절함으로써 손상된 심근세포 내에서 증가한 칼슘이온(Ca^{2+})의 농도를 억제하는 효과를 나타내므로, 심근증을 예방 또는 치료하기 위한 조성물로서 유용하게 사용할 수 있다. 또한, 상기 황칠 추출물은 인체에 대한 부작용이 없으므로 약품 또는 식품에 안전하게 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 황칠 추출물의 저산소 및 재산소 처리(H/R)에 의해 손상된 심근세포에 대한 사멸억제 효과를 정량화한 그래프이다.

도 2는 황칠 추출물의 저산소 및 재산소 처리(H/R)에 의해 손상된 심근세포 내 활성산소종(ROS) 생성 억제 효과를 관찰한 그림이다.

도 3은 황칠 추출물의 저산소 및 재산소 처리(H/R)에 의해 손상된 심근세포 내 활성산소종(ROS) 생성 억제 효과를 정량화한 그래프이다.

도 4는 황칠 추출물의 저산소 및 재산소 처리(H/R)에 의해 손상된 심근세포 내 칼슘 농도 증가를 억제하는 효과를 관찰한 그림이다.

도 5는 황칠 추출물의 저산소 및 재산소 처리(H/R)에 의해 손상된 심근세포 내 칼슘 농도 증가를 억제하는 효과를 정량화한 그래프이다.

도 6은 황칠 추출물 처리시 저산소 및 재산소 처리(H/R)에 의해 손상된 심근세포 내 SERCA2a와 RYR2의 발현 수준을 웨스턴 블롯(western blot)으로 확인한 그림이다.

도 7은 황칠 추출물 처리시 저산소 및 재산소 처리(H/R)에 의해 손상된 심근세포 내 SERCA2a와 RYR2의 발현 수준을 정량화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 실시예 등을 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예 등은 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예 등에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0036] **제조예 1: 황칠 추출물 제조**

[0037] 황칠나무로부터 잎과 가지를 채취하여(원물 1kg 기준, 잎:가지=100g:900g) 이물질 및 불순물이 완전히 제거되도

록 깨끗이 세척한 후, 분리, 절단, 분쇄과정을 거쳐 30℃가 유지되는 배양실에서 건조하였다. 그 다음, 상기 건조된 잎과 가지에서 얻은 분말 200g을 물 2L에 넣고 60℃에서 24시간 동안 저온추출하였다. 그 다음, 상기 저온 추출물을 원심분리 및 여과한 후 증발기로 24시간 동안 농축시켜 황칠 추출물을 제조하였다. 그 다음, 여기서 얻은 황칠 추출물을 50mg/ml로 stock하여 4℃ 냉장보관하였으며, 실험을 위해 세포생존률 분석을 하여 25 µg/ml의 처리농도를 결정하였다.

[0038] **제조예 2: 심근세포 준비**

[0039] 건강상태가 양호한 생후 3일된 SD(Sprague Dawley) 계통의 백서(흰쥐)의 흉곽을 절개한 후 심장조직을 분리하였다. 그 다음, 상기 심장조직을 PBS (phosphated buffer saline, PH7.2)에 담그고 micro dissecting scissor를 사용해 심근 세포가 1 mm³ 정도 될 때까지 절단하였다. 그 후, 상기 심근세포에 5 ml의 콜라게나아제(collagenase type II; 0.8 mg/ml, 262 units/mg)를 첨가한 다음, 37℃, 5% CO₂에서 7분 동안 배양하였다. 그 다음, 상기 배양한 세포로부터 콜라게나아제 부유액을 제거한 후 다시 콜라게나아제(collagenase II) 5ml를 첨가하여 5분 동안 배양하였다. 그 다음, 상기 배양한 세포의 상등액을 새 튜브에 옮기고 세포배양배지(10 % FBS α-MEM)를 첨가한 후, 4분 동안 1,200rpm에서 원심분리하였다. 그 다음, 상기 원심분리한 세포 침전물을 5 ml의 세포배양배지(10 % FBS α-MEM)에 부유시킨 후 콜라게나아제를 첨가하여 배양하는 과정을 심근세포가 거의 남지 않을 때까지 반복한 후, 세포 상등액을 하나의 튜브에 모았다. 그 다음, 상기 세포 상등액을 100 mm tissue culture plate에 접종하고 2시간 동안 배양하여 섬유아세포(fibroblast)만 plate에 부착하게 한 후, plate에 붙지 않은 심근세포들만을 모아 실험에 사용하는 조건에 따라 농도를 달리하여 새로운 plate에 접종하여 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 이 때, 심근세포의 배양은 세포배양배지에 0.1mM의 Bromodeoxyuridine(Brd U)를 첨가하여 섬유아세포(fibroblast)의 성장을 억제시키면서 수행하였다.

[0040] 2-2. 저산소 및 재산소 처리(hypoxia and reoxygenation, H/R)에 의해 손상된 심근세포 준비

[0041] 상기 2-1에서 배양 중인 심근세포로부터 10% FBS가 함유된 α-MEM(37℃, 5% CO₂/20% O₂) 배지를 제거한 후 10% FBS가 함유되지 않은 Serum free α-MEM 배지로 교환(N₂ gas degassing하여 용존 산소를 제거)하고, 37℃, 5% CO₂/1% O₂, 94% N₂의 저산소 배양기에서 30분 동안 저산소 처리하였다. 그 다음, 상기 저산소 처리된 심근세포로부터 Serum free α-MEM 배지를 제거한 후 다시 10% FBS가 함유된 α-MEM 배지로 교환하고, 5% CO₂/20% O₂의 배양기에서 1시간 동안 재산소 처리하여 손상된 심근세포를 준비하였다.

[0042] **시험예 1: 황칠 추출물에 따른 손상된 심근세포의 세포생존도 측정**

[0043] 상기 제조예 2-1에서 준비한 심근세포를 웰당 1X10⁴ 밀도가 되도록 96-웰 플레이트(96-well plate, Gibco)에 접종한 다음, 상기 각 웰의 세포에 상기 제조예 1에서 제조된 황칠 추출물을 25 µg/ml씩 처리하고 37℃, 5% CO₂/20% O₂ 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 배양된 세포를 제조예 2-2와 같은 조건으로 저산소 30분/재산소 1시간 동안 처리하여 심근세포에 손상을 가한 다음, 10% FBS가 함유된 α-MEM 배지로 교환하였다. 그 후, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] 용액 (Promega, Celltiter 96[®] Aqueous One Solution, USA) 10µl를 각 웰에 가하여 37℃, 5% CO₂/95% O₂ 배양기에서 2시간 동안 정치시킨 다음, ELISA 플레이트 리더기(ELISA plate reader; Tecan Infinite M200, USA)로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(H/R)으로는 황칠 추출물을 처리하지 않은 상기 제조예 2-2에서 저산소 및 재산소 처리하여 손상된 심근세포를 사용하였으며, 양성 대조군(Normoxia)으로는 상기 제조예 2-1에서 배양한 심근세포를 사용하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0044] 실험결과, 저산소 및 재산소 처리에 의해 손상된 심근세포(H/R)의 생존율은 정상 심근세포(양성 대조군, Normoxia)에 비해 약 44.1% 감소된 반면, 황칠 추출물을 처리한 손상된 심근세포(H/R+DM)의 생존율은 정상 심근세포(양성 대조군, Normoxia)에 비해 약 23.5% 감소된 것을 확인하였다.

[0045] 상기 결과를 통해 황칠 추출물은 손상된 심근세포의 사멸을 억제하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0046] **시험예 2: 황칠 추출물 처리에 따른 손상된 심근세포에서 생성되는 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS) 함량 측정**

[0047] 세포 내 reactive oxygen species(ROS) 함량은 DCF-DA assay로 측정하였다. fluorescence probe 2',7'-

dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)는 세포 내 활성산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 것으로 DCF-DA를 세포에 처리하여 발생하는 형광을 측정 함으로써 세포내의 활성 산소 농도를 측정할 수 있다.

[0048] 구체적으로, 상기 제조예 2-1에서 준비한 심근세포를 웰당 5×10^4 밀도가 되도록 24웰 플레이트(24-well plate, Gibco)에 접종한 다음, 상기 각 웰의 세포에 상기 제조예 1에서 제조된 $25 \mu\text{g/ml}$ 의 황칠 추출물을 처리하고 37°C , 5% CO₂/0% O₂ 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 배양된 세포를 제조예 2-2와 같은 조건으로 저산소 30분/재산소 1시간 동안 처리하여 심근세포에 손상을 가한 다음, 칼슘과 마그네슘이 함유된 PBS로 1회 세척하였다. 그 후 PBS에 희석한 $10 \mu\text{M}$ 세포-투과성 H₂DCF-DA와 세포핵을 염색시키는 $50 \mu\text{g/ml}$ 의 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)용액을 처리하여 30분 동안 37°C 배양기에서 빛을 차단한 상태에서 배양한 후 PBS로 3회 세척하였다. 그 다음, 형광 현미경(Fluoview FV1000 confocal system, Olympus)을 이용하여 λ excitation 485 nm, λ emission 530 nm에서 DCF fluorescence intensity를 측정하여 세포 내 활성산소종의 발생량을 관찰하였다. 측정된 형광이미지는 Image J software program을 통해 분석하였다. 대조군(H/R)으로는 황칠 추출물을 처리하지 않은 상기 제조예 2-2에서 저산소 및 재산소 처리하여 손상된 심근세포를 사용하였으며, 양성 대조군(Normoxia)으로는 상기 제조예 2-1에서 배양한 심근세포를 사용하였다. 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0049] 실험결과, 황칠 추출물을 처리한 손상된 심근세포(H/R+DM)에서 생성되는 활성산소종의 양은 저산소 및 재산소 처리에 의해 손상된 심근세포(H/R)에서 생성하는 활성산소종의 양에 비해 약 50% 이상 감소된 것을 확인하였다.

[0050] 시험예 3: 황칠 추출물 처리에 따른 손상된 심근세포에서의 칼슘이온 농도 측정

[0051] 심근세포내 칼슘농도의 변화 측정은 칼슘이온(Ca^{2+})과 결합할 수 있는 막 투과성 형광 표지자인 Fluo-4am을 사용하여 이루어졌다.

[0052] 구체적으로, 상기 제조예 2-2에서 준비한 손상된 심근세포를 웰당 5×10^4 밀도가 되도록 24-웰 플레이트(24-well plate, Gibco)에 접종한 다음, 상기 각 웰의 세포에 상기 제조예 1에서 제조된 $25 \mu\text{g/ml}$ 의 황칠 추출물을 처리하고 37°C , 5% CO₂/20% O₂ 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 배양된 세포를 제조예 2-2와 같은 조건으로 저산소 30분/재산소 1시간 동안 처리하여 심근세포 손상을 가한 다음, 세포의 배지를 제거하고 serum free media로 1회 세척하였다. 그 후 상기 세척된 세포에 serum free media에 희석된 탐침자인 fluo-4AM을 $2 \mu\text{M}$ 과 DAPI 용액 $50 \mu\text{g/ml}$ 를 처리하였다. 그 다음, 37°C 에서 20분 동안 빛을 차단한 상태에서 배양한 후 PBS로 3회 세척하였다. 칼슘 측정은 confocal microscope(Fluoview FV1000 confocal system, Olympus)를 이용하여 λ excitation 485 nm, λ emission 530 nm에서 fluo-4 AM 형광파장을 측정하여 칼슘이온 변화를 관찰하였다. 대조군(H/R)으로는 황칠 추출물을 처리하지 않은 상기 제조예 2-2에서 저산소 및 재산소 처리하여 손상된 심근세포를 사용하였으며, 양성 대조군(Normoxia)으로는 상기 제조예 2-1에서 배양한 심근세포를 사용하였다. 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0053] 실험결과, 저산소 및 재산소 처리에 의해 손상된 심근세포(H/R) 내 칼슘이온의 농도는 정상 심근세포(양성 대조군, Normoxia)에 비해 약 171% 증가된 반면, 황칠 추출물을 처리한 손상된 심근세포(H/R+DM) 내 칼슘이온의 농도는 정상 심근세포(양성 대조군, Normoxia)에 비해 약 78% 감소된 것을 확인하였다.

[0054] 즉, 황칠 추출물을 처리에 의해 손상된 심근세포(H/R+DM) 내 칼슘이온의 농도는 저산소 및 재산소 처리에 의해 손상된 심근세포(H/R) 내에서 증가된 칼슘이온 농도를 약 93% 감소시킴을 알 수 있었다.

[0055] 시험예 4: 황칠 추출물 처리에 따른 손상된 심근세포에서의 SERCA2a 및 RYR2 단백질 발현 변화 측정

[0056] 심근세포에서 칼슘 항상성을 유지하는 가장 중요한 채널 단백질인 SERCA2a 및 RYR2의 발현 변화를 웨스턴 블롯(Western blot)을 통해 확인하였다.

[0057] 구체적으로, 상기 제조예 2-1에서 준비한 심근세포를 웰당 2×10^5 밀도가 되도록 12-웰 플레이트(12-well plate, Gibco)에 접종한 다음, 상기 각 웰의 세포에 상기 제조예 1에서 제조된 황칠 추출물을 $25 \mu\text{g/ml}$ 씩 처리하고 37°C , 5% CO₂/20% O₂ 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 배양된 세포를 제조예 2-2와 같은 조건으로 저산소 30분/재산소 1시간 동안 처리하여 심근세포에 손상을 가한 다음, 10% FBS가 함유된 α -MEM 배지로 교환하였다. 그 후, 상기 심근세포를 4°C 의 PBS로 세척한 다음, 1x 세포용해용액(lysis buffer; 1mM PMSF)으로 suspension시켜 4°C 에서 10분 동안 용해하고 30초 동안 2번 vortex하였다. 그 후, 상기 세포를 4°C 에서

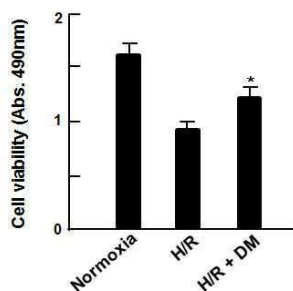
12,000rpm로 15분 동안 원심분리하여 상등액을 분리한 다음, Bradford protein assay로 정량하였다. 그 후, 상기 추출한 동량의 단백질을 크기에 맞게 6~15% SDS-폴리아크릴아미드 겔(Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel)에 전기영동하여 분리한 다음, 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)과 transfer buffer (20mM Trizma® base, 190mM Glycine, 20% Methanol)를 사용하여 전기적으로 단백질을 이동(transfer)시켰다. 그 후, 단백질이 이동된 막을 5% 탈지유와 TBS-t(1x TBS, 0.1% TWEEN-20)를 혼합한 blocking buffer에서 1시간 동안 블로킹(blocking)한 다음, 1:1,000 비율로 희석된 항-SERCA2a 또는 항-RYR2 항체가 포함된 5% 탈지유와 TBS-t(1x TBS, 0.1% TWEEN-20) 완충액을 처리하여 4℃에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 항-SERCA2a 또는 항-RYR2 항체를 처리한 막을 TBS-t로 5분간 5회 세척한 후 1:7,500 비율로 희석된 HRP-conjugated anti-rabbit IgG(Santacruz, CA, USA)를 처리하여 실온에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 TBS-t로 5분간 5회 세척하고 화학발광 시스템(Enhanced chemiluminescence plus western blotting system, ECL)을 이용하여 발광시킨 다음, 암실에서 현상하였다. 그 후, 상기 현상한 산물을 이미지 분석 시스템(Image J software programe)을 이용하여 정량하였다. 대조군(H/R)으로는 황칠 추출물을 처리하지 않은 상기 제조예 2-2에서 저산소 및 재산소 처리하여 손상된 심근세포를 사용하였으며, 양성 대조군(Normoxia)으로는 상기 제조예 2-1에서 배양한 심근세포를 사용하였다. 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0058] 실험결과, 저산소 및 재산소 처리에 의해 손상된 심근세포(H/R)에서 SERCA2a의 발현은 감소하였고, RYR2 발현은 증가하였음을 확인하였다. 반면, 황칠 추출물을 처리한 손상된 심근세포(H/R+DM)에서 SERCA2a의 발현은 급격히 증가하였으며, RYR2 발현은 현저히 감소한 것을 확인하였다.

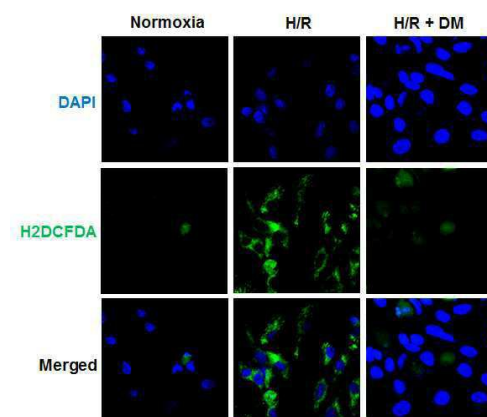
[0059] 상기 결과를 통해 황칠 추출물은 저산소 및 재산소 처리에 의해 손상된 심근세포에서 칼슘 항상성 관련 유전자의 발현을 조절하여 칼슘 항상성을 유지시킴을 알 수 있었다.

도면

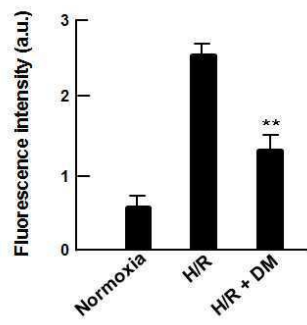
도면1



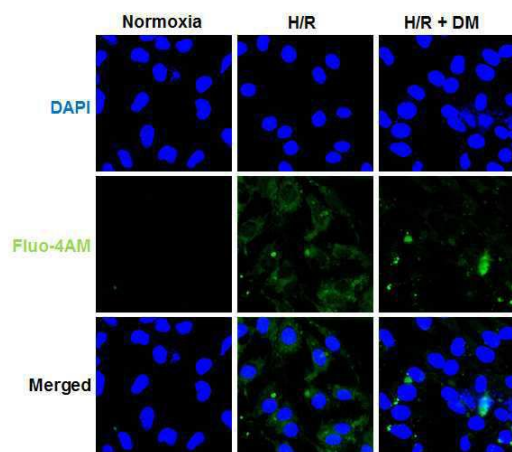
도면2



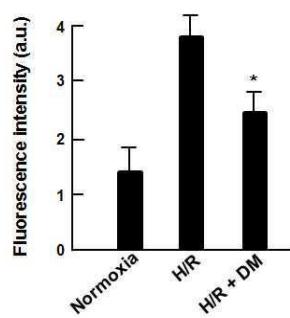
도면3



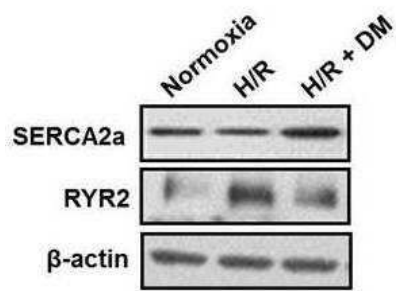
도면4



도면5



도면6



도면7

