



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0027769
(43) 공개일자 2020년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/12 (2016.01) A61K 31/192 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/12 (2016.08)
A61K 31/192 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0105993
(22) 출원일자 2018년09월05일
심사청구일자 2018년09월05일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
강영희
강원도 춘천시 옥천동 한림대학길 1 한림대학교
생명과학관 8513호
오형주
강원도 춘천시 옥천동 한림대학길 1 한림대학교
생명과학관 8512호
박신혜
경기도 용인시 처인구 금학로235번길 26, 온누리
마을A 102-1401
(74) 대리인
특허법인태동

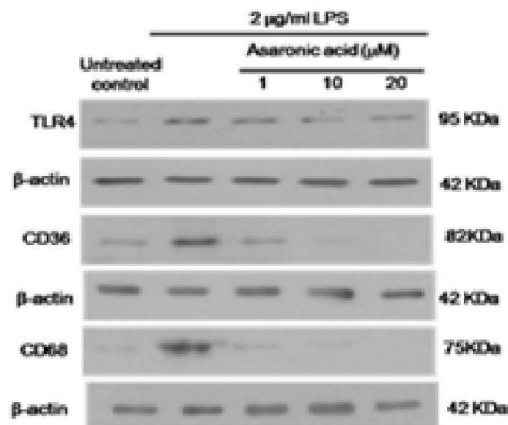
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 아사론산을 함유하는 염증성 질환의 개선 및 치료, 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 대식세포의 분극화를 억제 및 촉진하는 효과가 있는 아사론산(asaronic acid)을 함유하는 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 염증성 질환 개선용 식품 조성물 또는 염증성 질환 치료 및 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 3/04 (2018.01)

A61P 3/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 염증 개선용 식품 조성물.

청구항 2

아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 개선용 식품 조성물.

청구항 3

아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 선택되는 어느 하나의 항에 있어서,
상기 아사론산은 1 ~ 20 μ M 함유된 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 5

아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 염증 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 6

아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 7

아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 선택되는 어느 하나의 항에 있어서,
상기 아사론산은 1 ~ 20 μ M 함유된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아사론산을 함유하는 조성물에 관한 것으로, 아사론산이 대식세포의 분극화에 영향을 미쳐 염증성 질환을 개선할 수 있는 식품 또는 치료 및 예방할 수 있는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 염증(inflammation)이란 우리 몸 속에 유해한 자극원에 대한 생체반응 중 하나로 면역세포, 혈관, 분자생물학적인 중간체들이 관여되어 있는 보호반응이다. 염증 반응이 제대로 일어나지 않는다면, 세균과 같은 유해한 자극원들에 의해 점차적인 조직손상이 올 수 있으며 생명체의 생존을 위협할 수도 있다. 만성염증의 경우 치주염, 동맥경화증, 류마티스 관절염, 암과 같은 질병들을 유발할 수 있다.
- [0004] 대식세포는 주요한 염증세포로 알려져 있으며 분극화에 의해 두 가지 대식세포로 존재한다. M1 대식세포는 전염증(pro-inflammatory)의 특징을 가지고 염증성 대식세포의 형태를 띤다. LPS(Lipopolysaccharide)는 대식세포 매개 염증반응을 유발하는 대표적인 병원성 물질로 알려져 있으며, 대식세포 표면에 발현하는 TLR4와 결합하여 염증성 사이토카인(cytokines)의 분비를 통해 염증 반응을 유발한다.
- [0005] 이와 반대로, 항염증(anti-inflammatory)의 특징을 가지고 있는 M2 대식세포는 IL-4 및 IL-13과 같은 사이토카인에 의해 유도되며, IL-10과 같은 항염증성 사이토카인을 분비한다. 그에 따라 상처 회복 및 조직의 리모델링과 같은 항상성을 유지하는데 작용함으로써 염증을 해소하는데 주요한 역할을 한다.
- [0006] 염증은 M1 및 M2 대식세포의 균형이 붕괴되는 상황에서 발생한다. M2 대식세포보다 M1 대식세포의 수가 많아지면 만성염증으로 이어진다. 따라서 M1 대식세포로의 분극을 억제하고 M2 대식세포로의 성장을 촉진하여 염증성 질환을 치료 및 예방하는 효과가 있는 물질에 대한 연구 개발의 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1672708호(2016.10.31.)에는 차즈기 추출물 또는 알파-아사론을 함유하는 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물 및 치료용 약학 조성물이 기재되어 있다.
- (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1733048(2017.04.27.)에는 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 염증성 대식세포로의 분극을 억제하고 항염증성 대식세포로의 분극을 촉진하여 대식세포 발현 불균형을 억제하는 효과가 있는 아사론산(asaronic acid)을 함유하는 염증성 질환 개선용 식품 조성물 또는 염증성 질환 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 하는 염증 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 하는 당뇨 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 하는 비만 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명 식품 조성물에 있어서, 상기 아사론산은, 바람직하게 1~20 μ M 함유되는 것이 좋다.
- [0015] 한편, 본 발명은 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 하는 염증 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 하는 당뇨 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 하는 비만 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명 약학 조성물에 있어서, 상기 아사론산은, 바람직하게 1~20 μ M 함유되는 것이 좋다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 아사론산을 함유하는 염증성 질환의 개선, 치료 및 예방용 조성물로서, 대식세포의 분극화를 억제 또는 촉진하여 대식세포의 발현 불균형을 억제하는 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 아사론산을 함유하는 조성물은 염증성 질환의 개선용 식품조성물 또는 치료 및 예방용 약학 조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 LPS를 J774A.1에 48시간 처리하였을 때 세포 생존을 나타내는 그래프이다.
 도 2는 IL-4를 J774A.1에 48시간 처리하였을 때 세포 생존을 나타내는 그래프이다.
 도 3은 아사론산(asaronic acid)의 농도를 달리하여 J774A.1에 48시간 처리하였을 때 세포 생존을 나타내는 그래프이다.
 도 4는 아사론산(asaronic acid)의 M1 대식세포로의 분극 억제 효과를 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.
 도 5는 도 4에 따른 웨스턴 블롯 결과를 그래프로 도식화 한 것이다.
 도 6은 아사론산(asaronic acid)이 대식세포 M2로의 분극을 촉진하는지 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.
 도 7은 도 6에 따른 웨스턴 블롯 결과를 그래프로 도식화 한 것이다.
 도 8은 M2에서 발현되는 IL-10 발현량이 아사론산(asaronic acid)에 의해 증가하는 것을 확인한 ELISA 그래프이다.
 도 9는 M2 대식세포에서 TGF- β 발현량을 염색한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 아사론산(asaronic acid)을 함유하는 염증 개선용 식품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 아사론산을 함유하는 염증 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 아사론산(asaronic acid)은 아사릴산(asarylic acid) 또는 2,4,5-트리메톡시벤조익산(2,4,5-trimethoxybenzoic acid)라고도 하며, 시중에서 구입하거나, 2,4,5-트리메톡시톨루엔을 산화하여 얻을 수 있다.

[0025] 본 발명의 아사론산을 유효성분으로 포함하는 염증 개선용 식품 조성물 또는 염증 치료 및 예방용 약학 조성물에 있어서, 상기 아사론산은 M1 대식세포 분극화를 억제하고 M2 대식세포 분극화를 촉진하여 M1 및 M2 대식세포 발현 불균형을 조절하는 것을 특징으로 한다. M2 대식세포보다 M1 대식세포의 수가 많아지면 만성염증으로 이어지므로, M1 대식세포로의 분극화를 억제하고 M2 대식세포로의 성장을 촉진하여 M1 및 M2 대식세포 발현 불균형을 조절하면, 염증을 개선 또는 치료 또는 예방할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 개선용 식품 조성물을 제공하고, 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 식품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공하고, 아사론산(asaronic acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 치료 및 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0027] 당뇨와 비만은 염증성 질환으로서 대식세포가 분극화되면 당뇨와 비만이 촉진될 수 있는 것으로 알려져 있는데, 하기 본 발명에 의할 경우, 아사론산에 의해 대식세포 분극이 억제되는 것으로 나타나, 당뇨와 비만이 억제될 수 있는 것으로 판단된다.

[0028] 한편, "대식세포 분극의 억제로 말미암아 당뇨와 비만이 억제될 수 있는 것"에 대한 참고문헌으로는, Julia Braune et al., IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity, The Journal of Immunology, February 13, 2017와 Linnan Zhu et al., Cellular Metabolism and Macrophage Functional Polarization, International Reviews of immunology, 34:82-100, 2015 등이 있다.

- [0029] 따라서, 아사론산이 대식세포 분극을 억제하는 것으로 확인한 본 발명은, '당뇨 또는 비만 개선용 식품 조성물' 또는 '당뇨 또는 비만의 치료 및 예방용 약학 조성물'로 사용될 수 있는 것이다.
- [0030] 한편, 본 발명의 아사론산을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 아사론산은 바람직하게 1 ~ 20 μM 함유되는 것이 좋다.
- [0031] 한편, 염증으로 발생하는 질환은, 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 채장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, 혈관염 증후군과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease), 출혈성 관절증(hemarthrosis), 헤노흐-헨라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열, 베하트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia), 염증성 피부질환 등이 있는데, 항염 효과를 나타내는 본 발명은 이들 질환에 적용될 수 있다.
- [0032] 한편, 본 발명의 식품 조성물은 일 예로 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜렛, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 한편, 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물류가 있으며, 이중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다. 또한, 치료 및 예방제가 약제인 경우 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유효제 또는 방부제 등이 추가적으로 포함될 수 있다.
- [0034] 한편, 본 발명의 약학 조성물의 제형은 사용 방법에 따라 바람직한 형태로 제조될 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니멘트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 안연고제(OPHTHALMIC OINTMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 전제(DECOCTIONS), 침제-INFUSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLASMA), 캡셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 틴크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0035] 한편, 본 발명의 약학조성물에 있어서, 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 유효성분인 아사론산을 기준(건조중량)으로 하였을 때 1일 0.1 내지 100mg/kg (체중)으로 1회 이상 투여 가능하다. 다만, 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태와 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.
- [0036] 한편, 본 발명에서 ‘유효성분으로 함유하는 것’의 의미는 본 발명에서 요구하는 M1 대식세포로의 분극화 억제 및 M2 대식세포로의 분극화 촉진의 효과가 본 발명의 성분인 아사론산으로부터 발생함을 의미하고, 그 외에 다른 성분을 보조성분으로 포함할 수 있음을 의미한다.
- [0038] 이하, 본 발명의 내용에 대해 하기 실시예 및 실험예에서 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0040] [실시예 1 : 아사론산의 세포 생존률 시험]

[0041] 본 실시예에서 사용한 아사론산(asaronic acid)은 SIGMA(#138894)에서 구매한 2,4,5-트리메톡시벤조익산(2,4,5-Trimethoxybenzoic acid)이다.

[0043] (1) 마우스 대식세포(J774A.1) 배양

[0044] 대식세포는 'mouse macrophage cell line' 으로 J774A.1 세포주를 이용해 Dulbecco's Modified Eagles' s Medium(DMEM) + 10% FBS 배지에 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 사용하였다. M1 대식세포로 분극화 시키기 위해 LPS (2μg/ml)을 배지에 첨가한 뒤, 아사론산(asaronic acid)을 48시간 처리하였다. 또한, IL-4(40ng/ml)을 첨가한 배지에 아사론산(asaronic acid)을 48시간 처리하여 M2상태를 유도하였다.

[0046] (2) 세포 생존률 시험(Cell viability test)

[0047] 마우스 대식세포(J774A.1)를 LPS, IL-4, 아사론산(asaronic acid)과의 세포배양 실험을 거친 후 세포 생존율을 측정하기 위해서 자동 microplate reader spectrophotometer를 이용한 MTT 분석이 이루어졌다. 이 분석법은 tetrazlium MTT salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di- phenyltetrazolium bromide)가 미토콘드리아 효소인 숙신산탈수소효소(succinate dehydrogenase)에 의해 불용성의 포르마잔(formazan)으로 변하는 과정을 이용하여 측정하였다.

[0048] J774A.1 대식세포를 LPS(20ng/ml) 및 IL-4(40ng/ml)에 48시간 배양하고 세척한 후 MTT(5mg/ml stock solution)가 첨가된 phenol red가 들어있지 않은 배지에서 3시간 배양시켜서 확인하였다. 그 후에 isopropyl alcohol을 가하여 조심스럽게 흔들어 주면서 형성된 포르마잔(formazan)을 용해시키고 λ=570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0049] 도 1은 LPS를 J774A.1에 48시간 처리하였을 때 세포 생존을 나타내는 그래프이고, 도 2는 IL-4를 J774A.1에 48시간 처리하였을 때 세포 생존을 나타내는 그래프이고, 도 3은 아사론산(asaronic acid)의 농도를 달리하여 J774A.1에 48시간 처리하였을 때 세포 생존을 나타내는 그래프이다.

[0051] [실험예 1 : 대식세포 M1 분극화 억제 실험]

[0052] 본 실험예에서는 M1에 특이적인 반응을 하는 대표적인 marker로 사용되는 TLR4, CD36, CD68의 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[0053] M1 대식세포로 분극화 시키기 위해 2μg/ml의 LPS와 아사론산(asaronic acid, SIGMA(#138894)의 2,4,5-Trimethoxybenzoic acid) 1, 10, 20μM을 각각 처리하고, 바이오마커의 단백질 수준을 확인하기 위해 웨스턴블롯(western blot) 분석법을 이용해 확인하였다. 세포 배양 후 라이시스버퍼(lysis buffer)를 이용해 셀 라이시스(cell lysis)를 실시하여 로우리(lower) 단백질 정량법을 사용하여 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE에 전기영동하였다. 전기영동 후 SDS-PAGE에 분리된 단백질을 니트로셀룰로소막(nitrocellulose membrane)에 옮기고, 특이적 항원-항체 반응을 위해 블로킹(blocking), 일차항체(primary antibody), 이차항체(secondary antibody)를 반응시키고, 'ECL solution' 으로 발광시켜 엑스레이 필름(x-ray film)으로 검출하였다.

[0054] 실험 결과, 아사론산(asaronic acid) 1, 10, 20μM을 첨가한 군에서 TLR4, CD36, CD68의 발현이 모두 감소(대조군으로 β-actin을 사용)하는 것으로 나타났다. 이로부터 아사론산(asaronic acid)가 M1 대식세포로의 분극화를 억제시키는 것을 확인 할 수 있었다. 도 4는 아사론산(asaronic acid)의 M1 대식세포로의 분극 억제 효과를 확인한 웨스턴 블롯(western blot) 결과이고, 도 5는 도 4에 따른 그래프이다.

[0056] [실험예 2 : 대식세포 M2 분극화 촉진 실험]

[0057] 본 실험예에서는 본 발명의 아사론산(asaronic acid, SIGMA(#138894)의 2,4,5-Trimethoxybenzoic acid)이 대식세포 M2로의 분극을 촉진하는 효과가 있는지 확인하고자 하였다.

[0058] IL-4에 의해 분극화되는 M2 대식세포에 아사론산(asaronic acid) 1, 10, 20 μ M을 각각 처리하여 M2 분극에 아사론산(asaronic acid)가 영향을 미치는지 확인하기 위하여 M2를 대표하는 마커인 Arginase-1, CD163, PPAR γ 를 관찰하였다. 바이오마커의 단백질 수준을 확인하기 위해 웨스턴블롯(western blot) 분석법을 이용하여 확인하였다. 세포 배양 후 라이시스 버퍼(lysis buffer)를 이용해 셀 라이시스(cell lysis)를 실시하여 로우리(lowery) 단백질 정량법을 사용해 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE에 전기영동하였다. 전기영동 후 SDS-PAGE에 분리된 단백질을 니트로셀룰로소막(nitrocellulose membrane)에 옮기고, 특이적 항원-항체 반응을 위해 블로킹(blocking), 일차항체(primary antibody), 이차항체(secondary antibody)를 반응시키고, 'ECL solution'으로 발광시켜 엑스레이 필름(x-ray film)으로 검출하였다.

[0059] 실험결과, 아사론산(asaronic acid) 1, 10, 20 μ M을 첨가한 군에서 M2 대식세포의 분극을 촉진하는 것을 확인하였다. 도 6은 아사론산(asaronic acid)이 대식세포 M2로의 분극을 촉진하는지 확인한 웨스턴블롯(western blot) 결과이고, 도 7은 도 6에 따른 그래프이다.

[0060] 또한, 세포에서 분비되는 사이토카인(cytokine)을 엘라이저(ELISA)로 확인하였다. 세포 배양 후 라이시스 하기 전 미디어(media)를 모아 원심분리기(centrifuge)로 3000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10min을 돌린 후, 상층액 800 μ l만을 가지고 ELISA 실험을 하였다. M2에서 가장 많이 분비되는 IL-10의 분비량을 확인한 결과 IL-4로 유도되는 M2 대식세포가 아사론산(asaronic acid)를 같이 처리하면 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 도 8은 M2에서 발현되는 IL-10 발현량이 아사론산(asaronic acid)에 의해 증가하는 것을 확인한 ELISA 그래프이다.

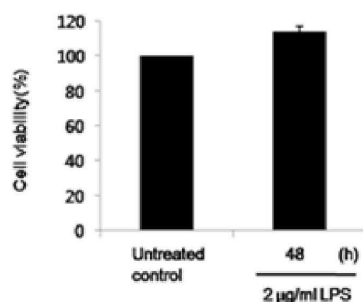
[0062] [실험예 3 : TGF-beta 발현 실험]

[0063] 본 실험예에서는 cell 염색을 통해 M2 대식세포가 분극화 되면서 분비되는 TGF-beta 발현을 확인하였다.

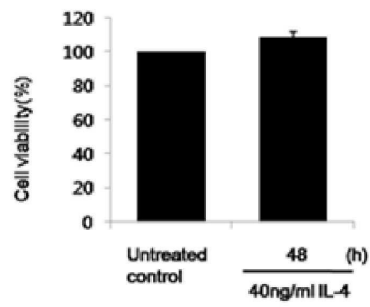
[0064] 대식세포 J774A.1를 IL-4로 M2 분극화를 유도하면서 동시에 아사론산(asaronic acid, SIGMA(#138894)의 2,4,5-Trimethoxybenzoic acid) 1, 10, 20 μ M을 각각 처리한 후, 세포를 4% 포름알데히드(formaldehyde)로 고정하고, PBS로 충분히 씻어 준 후 5% BSA에 상온에서 1시간 블락킹(blocking)한 후 일차항체(primary antibody), 이차항체(secondary antibody)인 CY3(red) 반응시켰다. DAPI(blue)로 핵을 염색하고 세척하였다. 세척 후, 슬라이드 글라스 위에 봉입(mounting)하여 광학 현미경으로 관찰하였다. IL-4만으로 유도한 M2보다 아사론산(asaronic acid)을 같이 넣은 cell에서 TGF-beta 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 도 9는 M2 대식세포에서 TGF-beta 발현양을 염색한 사진이다.

도면

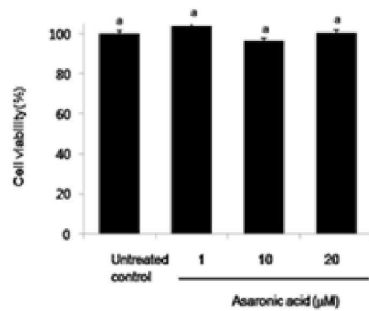
도면1



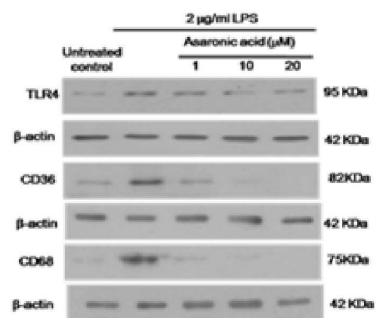
도면2



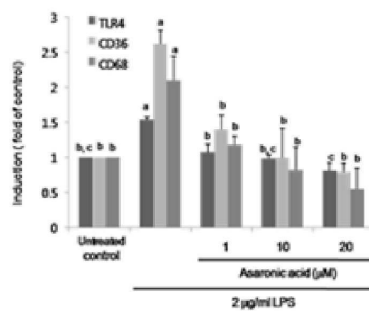
도면3



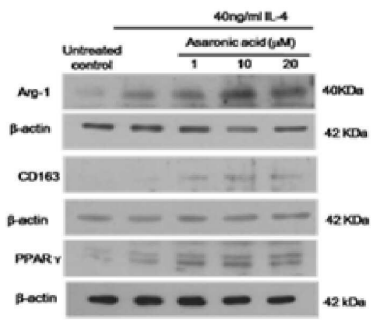
도면4



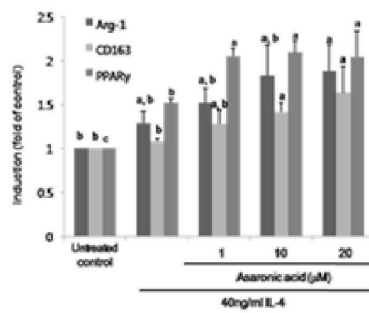
도면5



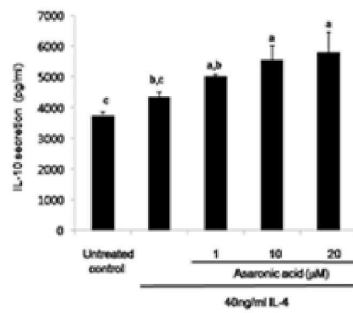
도면6



도면7



도면8



도면9

