(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월18일
(11) 등록번호 10-1949471
(24) 등록일자 2019년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/15 (2016.01) *A23L 33/11* (2016.01)
A61K 31/352 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/15 (2016.08)
A23L 33/11 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0119912
(22) 출원일자 2018년10월08일
심사청구일자 2018년10월08일
(56) 선행기술조사문헌
EP01847265 A1
'Tangeretin ameliorates oxidative stress in the renal tissues of rats with experimental breast cancer induced by 7,12-dimethylbenz[a] anthracene', Toxicology Letters 229, 333-348쪽, 2014년.*
Felix Vargas 외 7명, 'Flavonoids in Kidney Health and Disease', Frontiers in Physiology, 9권, 1-12쪽, 2018년 4월.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
강영희
강원도 춘천시 충열로 32, 103-1102(우두동, 동부아파트)
강민경
제주특별자치도 광양 7길 30, 3층
김동연
서울특별시 노원구 섬밭로 265 경남아파트3-709
(74) 대리인
특허법인태동

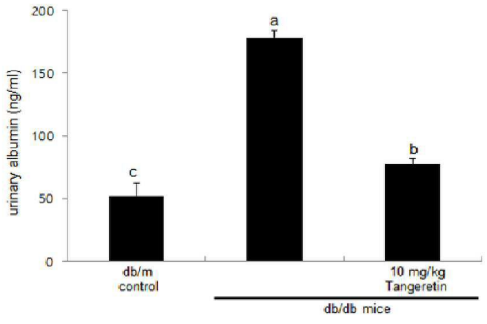
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 **탄저레틴을 함유하는 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 개선, 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 탄저레틴을 유효성분으로 함유하는 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 발생의 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 신장 사구체 상피세포에서 네프린(Nephrin)과 포도신(Podocin)의 발현 증가 및 사구체 Human renal mesengial cells (HRMC)에서 제1(I)형 콜라겐(collagen)과 Pro-collagen 생성 감소를 통해 소변에서 알부민의 발현을 감소시켜 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 발생의 개선, 예방 또는 치료에 효능을 발휘한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A61P 13/12 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A6A3A04011473
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 학문후속세대재원사업(대통령 POST_DOC 펠로우쉽)
연구과제명 Nobiletin 및 Tangeretin의 당뇨병을 포함한 당뇨병성 미세혈관합병증억제에 대한 분자 영양학적 기전 연구
기 여 율 1/1
주관기관 한림대학교
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

탄저레틴(Tangeretin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 고혈당에 의해 유도된 신장 섬유증, 신장 사구체 경화증 및 알부민뇨 발생의 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알부민뇨 발생은,

신장 사구체 상피세포(Podocyte)의 손실로 인한 것임을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 탄저레틴은,

고혈당으로 인해 감소된 신장 사구체 상피세포(Podocyte)의 네프린(Nephrin)과 포도신(Podocin)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 탄저레틴은,

신장 사구체 Human renal mesengial cells (HRMC)의 제1(I)형 콜라겐과 Pro-collagen 생성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 5

탄저레틴(Tangeretin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 고혈당에 의해 유도된 신장 섬유증, 신장 사구체 경화증 및 알부민뇨 발생의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 알부민뇨 발생은,

신장 사구체 상피세포(Podocyte)의 손실로 인한 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 탄저레틴은,

고혈당으로 인해 감소된 신장 사구체 상피세포(Podocyte)의 네프린(Nephrin)과 포도신(Podocin)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 탄저레틴은,

신장 사구체 Human renal mesengial cells (HRMC)의 제1(I)형 콜라겐과 Pro-collagen 생성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 탄저레틴을 함유하는 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 신장 사구체 Human renal mesengial cells (HRMC)에서 제1(I)형 콜라겐(collagen)과 pro-collagen 생성 감소 및 신장 사구체 podocyte에서 네프린(Nephrin)과 포도신(Podocin)의 발현 증가를 통해 소변에서 알부민의 생성(분비)을 감소시켜 신장 섬유증의 개선, 예방 또는 치료에 효능이 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당 농도가 높은 고혈당을 특징으로 하고, 이로 인한 여러 증상 및 징후를 일으키며 소변에서 포도당을 배출하게 된다.

[0004] 또한, 당뇨병 환자가 장기간 고혈당에 노출되면 말초 신경증, 자율 신경증, 대 혈관 합병증, 미세혈관 합병증 등 기타 만성 합병증을 초래할 수 있다. 미세혈관 합병증의 하나인 당뇨병성 신증은 초기에 신장 용적의 증가, 단백뇨 배설의 증가, 사구체 및 세뇨관 기저막의 비후 등으로 나타나며 이후, 사구체 혈관 간질 증가, 세포외 지질 축적, 사구체 경화증 및 세뇨관 간질의 섬유화로 진행하게 된다.

[0005] 신장에는 세뇨관 및 간질이 전체 신장 용적의 80%를 차지하며, 특히 간질은 10~17%로 큰 부분을 차지하고 있다. 간질은 세뇨관, 혈관, 사구체, 토리사이질(mesangium)과 밀접하게 연결되어 있어 이들 주변의 병적인 문제에 쉽게 영향을 받게 되는데, 세뇨관 간질의 병변이 신장 기능의 예후와 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다. 일반적으로 신장 섬유 조직의 성장(renal figrogenesis)의 과정은 유도(induction), 기질 생성(matrix synthesis), 및 분해(resolution)로 나뉘게 되는데, 섬유화는 섬유아세포(fibroblast)의 이동과 증식으로 유도되며 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 여러 프로테오글리칸(proteoglycan)과 같은 간질성 기질 단백질(interstitial matrix protein)의 생성과 축적으로 일어나게 된다. 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 축적은 정상적인 상처 치유 과정의 일부인데, 신장이 염증 또는 손상을 받게 되면 여러 인자들이 세포외기질의 생산을 자극하게 되어 이로 인한 세포외기질의 과다 생성은 세포 경화 유발, 신장의 구조 및 기능상의 손상을 가져오게 된다.

[0006] 지속적으로 고혈당에 노출되면 신장 사구체 상피세포간의 연접(tight junction)이 상실되어 족세포 족돌기 사이의 세극막(slit diaphragm)이 벌어져 상피세포의 탈락과 소실 등의 구조적 변화 및 세극막 단백질의 성분상 변화를 보이게 된다. 또한, 족세포 세극막의 대표 단백질인 네프린(Nephrin)과 포도신(Podocin) 단백질 발현이 감소하게 되고. 세포와 세포외기질을 이루고 있는 기질 단백질인 제1(I)형 콜라겐(collagen)이 크게 증가하게 된다. 이러한 단백질 발현 변화와 기질단백질 분비는, 사구체 상피세포들 간의 연접 소실에 의한 사구체 섬유화에 중요한 역할을 하여 최종적으로 미세알부민뇨 같은 단백뇨를 보인다고 알려져 있다.

[0007] 종래에 혈관 및 신장합병증과 관련된 당뇨 합병증의 예방 및 치료를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 장기간 고혈당 노출에 의해 일어나는 신장 사구체 섬유화로 인한 신장 경화증 완화를 위해 다양한 연구가 진행되고 있다. 하지만, 식이 성분을 포함한 천연 성분을 이용하여 신장 사구체 섬유화로 인한 사구체 경화증을 예방

하고 치료하는 연구는 미흡한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1510257호 (등록일자:2015.04.02)에는, 크리신을 유효성분으로 하는 당뇨합병성 신세뇨관 섬유화로 인한 신장 섬유증 억제용 조성물에 관해 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 만성 고혈당으로 인한 신장 사구체 경화증과 사구체 족세포 손실로 인한 알부민뇨 생성(분비)을 개선시킬 수 있는 천연 성분을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 탄저레틴(Tangeretin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 발생의 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 식품 조성물에 있어서, 상기 알부민뇨 발생은 일 예로, 신장 사구체 상피세포(Podocyte)의 손실로 인한 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 식품 조성물에 있어서, 상기 탄저레틴은, 바람직하게 신장 사구체 상피세포(Podocyte)의 네프린(Nephrin)과 포도신(Podocin)의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 식품 조성물에 있어서, 상기 탄저레틴은, 바람직하게 신장 사구체 Human renal mesengial cells (HRMC)의 제1(I)형 콜라겐과 Pro-collagen 생성을 감소시키는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명은 탄저레틴(Tangeretin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 발생의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 약품 조성물에 있어서, 상기 알부민뇨 발생은 일 예로, 신장 사구체 상피세포(Podocyte)의 손실로 인한 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 탄저레틴은, 바람직하게 신장 사구체 상피세포(Podocyte)의 네프린(Nephrin)과 포도신(Podocin)의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 탄저레틴은, 바람직하게 신장 사구체 Human renal mesengial cells (HRMC)의 제1(I)형 콜라겐과 Pro-collagen 생성을 감소시키는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 신장 사구체 Human renal mesengial cells (HRMC)의 제1(I)형 콜라겐(collagen)과 Pro-collagen 생성 감소 및 사구체 상피세포 접착단백질 네프린과 포도신의 증가에 따른 마우스 소변의 알부민 발현을 감소시켜 당뇨병성 신장 사구체 섬유화로 인한 신장 경화증을 개선, 예방 또는 치료할 수 있는 탄저레틴을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 탄저레틴을 Human renal mesengial cell (HRMC)에 처리하여 배양하였을 때, 만성 고혈당에서 제1(I)형 콜라겐과 Pro-collagen 생성에 대한 억제활성을 나타낸 웨스턴 블롯 분석결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화한 것이다.

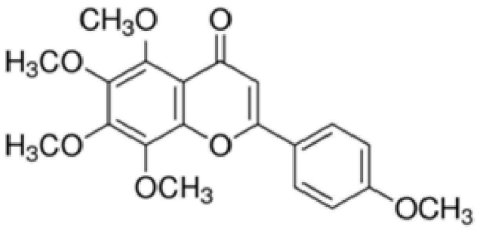
도 2는 탄저레틴을 마우스 사구체상피세포(Podocyte)에 처리하여 배양하였을 때, 만성 고혈당에서 사구체 상피세포 간의 연접을 확인하기 위한 네프린(Nephrin)과 포도신(Podocin)의 발현을 나타낸 웨스턴 블롯 분석결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화한 것이다.

도 3은 탄저레틴을 10 mg/kg으로 8주간 경구투여한 당뇨병성 동물모델인 db/db인 마우스의 24시간 뇨에서 단백뇨인 미세알부민뇨 억제활성의 ELISA 분석결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 탄저레틴(Tangeretin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 발생의 개선용 식품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 탄저레틴(Tangeretin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 발생의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] [화학식 1]



[0026]

[0027] 탄저레틴(5,6,7,8-tetramethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one, Tangeretin)은 시트러스류의 껍질에 분포되어 있는 플라보노이드(flavonoid)의 일종으로 항산화, 항염증, 항암, 항알레르기 작용, 파킨슨병의 예방효과 등 다양한 생리 활성이 보고되어 있는 생리 활성 물질이다. 탄저레틴은 통상적인 방법에 따라 사용하거나 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 탄저레틴은 하기 실험에 의할 경우, 신장 사구체 상피세포의 세극막 관련 단백질 마커인 네프린과 포도신의 발현을 증가시키고, 신장 사구체 Human renal mesengial cells에서 제1(I)형 콜라겐과 Pro-collagen 생성(분비)을 감소시키며, 알부민뇨의 생성(분비)을 억제시키는 것으로 확인되었는데, 제1(I)형 콜라겐의 생성(분비)은 신장 사구체 경화증의 인자이다. 따라서, 네프린과 포도신의 발현을 증가시키고, 신장 사구체 Human renal mesengial cells에서 제1(I)형 콜라겐과 Pro-collagen 생성(분비)을 감소시키며, 알부민뇨 생성(분비)을 억제시키는 본 발명의 탄저레틴은 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증의 개선, 예방 또는 치료에 효능을 보이는 것이라 할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 상기 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증은, 바람직하게 당뇨합병성 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증일 수 있다. 또한, 상기 알부민뇨 발생은 일 예로, 신장 사구체 상피세포(Podocyte)의 손실로 인한 것일 수 있다. 당뇨 합병성 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 발생은 개선 또는 치료가 용이하지 않을 수 있는데, 본 발명의 탄저레틴은 이에 효과를 보이는 것이다.

[0030] 한편, 본 발명의 식품 조성물은 일 예로 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜렛, 빵류, 스넥류, 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.

[0031] 한편, 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다. 또한, 치료 및 예방제가 약제인 경우 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등이 추가적으로 포함될 수 있다.

[0032] 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(OPHTALMIC OINTMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실

제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPESIONS), 전제(DECOCTIONS), 침제(INFUSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITIORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLSMA), 캅셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 틴크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0033] 한편, 본 발명의 약학조성물에 있어서, 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 유효성분인 탄저레틴을 기준으로 하였을 때 1일 0.000001 내지 100 mg/kg (체중)으로 1회 이상 경구 투여 가능하다. 다만, 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태와 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.

[0034] 한편, 본 발명에서 '유효성분으로 함유하는 것'의 의미는 본 발명에서 요구하는 신장 섬유증 또는 신장 사구체 경화증 또는 알부민뇨 발생의 개선, 예방 또는 치료 효능이 본 발명의 성분인 탄저레틴으로부터 발생함을 의미하고, 그 외에 다른 성분으로 보조성분으로 포함할 수 있음을 의미한다.

[0036] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0038] **[실시예 1: Human renal mesengial cells (HRMC)에서 신장 섬유증 관련 단백질 변화 양상 확인 실험]**

[0039] 본 실시예에서는 Human renal mesengial cells (HRMC)를 고혈당에 노출시키고, 여기에 탄저레틴(tangeretin)을 농도별로 처리하여 배양한 후, 상기 Human renal mesengial cells의 신장 섬유증 관련 단백질 변화 양상을 확인하였다.

[0041] **(1) Human renal mesengial cells (HRMC) 배양**

[0042] Human renal mesengial cells (HRMC)은 Sciencell Reasearch Laboratories(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 배양하였다. 먼저, 정상 Human renal mesengial cells에는 15% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)과 2mM 글루타민, 100 U/ml 페니실린(Penicillin), 100 mg/ml 스트렙토마이신(Streptomycin)이 첨가되어 있는 DMEM/F12(7:1) 배양액(DMEM, F12 media, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 조건에서 배양하였다.

[0043] 다음으로 만성 고혈당으로 인한 신장 섬유증 및 신장 사구체 경화증과 같은 상황을 유도하기 위해 Human renal mesengial cells (HRMC)를 33mM 글루코오스(Glucose)를 첨가한 배지에서 배양하고, 탄저레틴(Tangeretin)을 농도별(1μM~20μM)로 처리하여 함께 배양하였다. 또한, 삼투 대조군으로 5.5mM 글루코오스(Glucose)와 27.5mM 만니톨(Mannitol)이 함유된 배지에서 4일간 배양하였다.

[0045] **(2) Human renal mesengial cells (HRMC)의 제1(Ⅰ)형 콜라겐과 pro-collagen 생성양상 확인 실험**

[0046] Human renal mesengial cells (HRMC)에서 제1(Ⅰ)형 콜라겐과 pro-collagen이 과다하게 생성(분비)되는 것은 신장 사구체 경화증을 일으키게 된다. Human renal mesengial cells(HRMC)의 제1(Ⅰ)형 콜라겐과 pro-collagen의 생성 정도를 측정하기 위해 상기 세포 추출물과 배양액을 사용하였고, 단백질 분리는 6% SDS-PAGE로 수행되었다. 전기 영동된 단백질 밴드들은 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 탈지분유를 처리한 다음 제1(Ⅰ)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 막에 있는 제1(Ⅰ)형 콜라겐과 pro-collagen단백질은 Immobilon western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)로 검출하여 정상 사구체 mesengial cells와 탄저레틴(Tangeretin)을 1μM, 10μM, 20μM로 각각 처리한 세포 샘플을 X-ray 필름으로 촬영하였다. 그 결과, 도 1과 같이 삼투 대조군인 사구체 상피세포(5.5mM glucose, 27.5mM mannitol)는 제1(Ⅰ)형 콜라겐과 pro-collagen 생성(분비)이 적었으나, 4일간 고혈당에 노출된 사구체 mesengial cells는 이 단백질들의 생성(분비)이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 4일간 고혈당에 노출된 사구체 mesengial cells에 탄저레틴을 1μM 처리하였을 때 제1(Ⅰ)형 콜라겐과 pro-collagen 생성(분비)에는 거의 변화가 없었으며, 탄저레틴을 10μM 이상 처리하였을 때 제1(Ⅰ)형 콜라겐과 pro-collagen 생성(분비)이 점차 억제되는 것으로 나타났다.

[0047] 따라서, 만성 고혈당에 노출된 사구체 mesengial cells에 탄저레틴을 10μM 이상으로 처리하였을 경우에 신장

사구체에서 결합조직을 형성하는 콜라겐의 생성(분비)을 억제하는 데에 뛰어난 효과를 발휘하는 것을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과를 통해 탄저레틴은 신장 사구체 경화증의 원인이 되는 콜라겐의 생성(분비)을 억제함으로써 신장 사구체 경화증의 개선, 예방 또는 치료에 효능을 나타내는 물질로 이용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0049] **[실시예 2: 마우스 신장 podocyte에서 세포 부착 관련 단백질 변화 양상 확인 실험]**

[0050] 본 실시예에서는 마우스 신장 사구체 상피세포(Podocyte)를 고혈당에 노출시키고, 여기에 탄저레틴(Tangeretin)을 농도별로 처리하여 배양한 후, 세포 부착 관련 단백질 네프린과 포도신의 변화 양상을 확인하였다.

[0052] **(1) 마우스 신장 사구체 세포 배양**

[0053] 마우스 사구체 상피세포 (Podocyte)는 Cell Line Service (Eppelhein, Germany)에서 구입하여 배양하였다. 먼저, 정상 마우스 사구체 상피세포는 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)과 100 U/ml 페니실린(Penicillin), 100 mg/ml 스트렙토마이신(Streptomycin)이 첨가되어 있는 RPMI 1640 (RPMI-1640 media, Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 배양액을 사용하였으며 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 조건에서 배양하였다.

[0055] **(2) 마우스 사구체 상피세포의 세포 추출물 준비**

[0056] 상기에서 배양한 정상, 대조군(5.5mM glucose, 27.5mM mannitol) 및 탄저레틴이 농도별(1μM~20μM)로 처리된 마우스 사구체 상피세포에 분해 완충액(Lysis Buffer)을 처리하여 세포 추출물을 준비하였다.

[0058] **(3) 신장 사구체 상피세포 연접에 관여하는 세극막 관련 단백질 네프린과 포도신 발현 양상 확인 실험**

[0059] 마우스 사구체 상피세포의 세포 밀착연접에 관여하는 족세포 세극막의 대표적인 단백질 네프린과 포도신에 이상이 있을 때 심한 알부민뇨가 일어나게 된다. 네프린과 포도신의 발현 정도를 측정하기 위해 상기 세포 추출물을 사용하였고, 단백질 분리는 8% SDS-PAGE로 수행되었다. 전기 영동된 단백질 밴드들은 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 탈지분유를 처리한 다음 네프린 단백질의 일차항체(Goat Polyclonal Antibody, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 1000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, Rabbit Anti-goat Horseradish Peroxidase (1:10000, Jackson ImmunoReasearch Lab.)의 이차항체로 1시간 반응시켰다. 포도신 단백질의 일차항체(Rabbit Polyclonal Antibody, Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, MO, USA)를 1000배로 희석하여 교반하여 반응시키고, Goat Anti-rabbit Horseradish Peroxidase (1:10000, Jackson ImmunoReasearch Lab.)의 이차항체로 1시간 반응시켰다.

[0060] 니트로셀룰로스 막에 있는 네프린과 포도신 단백질은 Immobilon western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)로 검출하여 정상 사구체 상피세포(Podocyte)와 탄저레틴(Tangeretin)을 1μM, 10μM, 20μM로 각각 처리한 세포 샘플을 X-ray 필름으로 촬영하였다. 그 결과, 도 2와 같이 삼투 대조군인 사구체 상피세포(5.5mM glucose, 27.5mM mannitol)는 세극막 단백질 마커인 네프린과 포도신의 발현량이 많았으나, 4일간 고혈당에 노출된 사구체 상피세포에서는 네프린과 포도신의 발현량이 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. 또한, 4일간 고혈당에 노출된 사구체 상피세포에 탄저레틴을 1μM 처리하였을 때 네프린과 포도신의 발현량에는 거의 변화가 없었으며, 10μM 이상 처리하였을 때 네프린과 포도신의 발현량이 농도 의존적으로 점차 증가되는 것으로 나타났다.

[0061] 따라서, 만성 고혈당에 노출된 사구체 상피세포에 탄저레틴을 10μM 이상으로 처리하였을 경우에 신장 사구체 상피세포에서 사구체 상피세포 세극막 관련 단백질인 네프린과 포도신의 발현을 증가시키는 데에 뛰어난 효과를 발휘하는 것을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과를 통해 탄저레틴은 네프린과 포도신의 이상으로 인한 알부민뇨가 생기는 것을 억제함으로써 알부민뇨의 개선, 예방 또는 치료에 효능을 나타내는 물질로 이용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0063] **[실시예 3: 당뇨병이 유도된 마우스에 대한 탄저레틴의 알부민 생성(분비) 억제 효과 확인]**

[0064] 본 실시예에서는 당뇨병이 유도된 마우스에 대해 탄저레틴이 알부민 생성(분비)에 대해 억제 효과를 나타내는지를 확인하기 위해 하기의 실험을 진행하였다.

[0065] 먼저 당뇨병이 유도된 마우스에 8주 동안 매일매일 10 mg/kg의 탄저레틴을 경구투여하였다. 이때, 대조군으로 비당뇨 동물모델(C57BLKS/J; Jackson Laboratory)을 사용하고, 당뇨모델(C57BLKS/+Lepdblar; Jackson Laboratory, CA)을 사용하여 비교하였다.

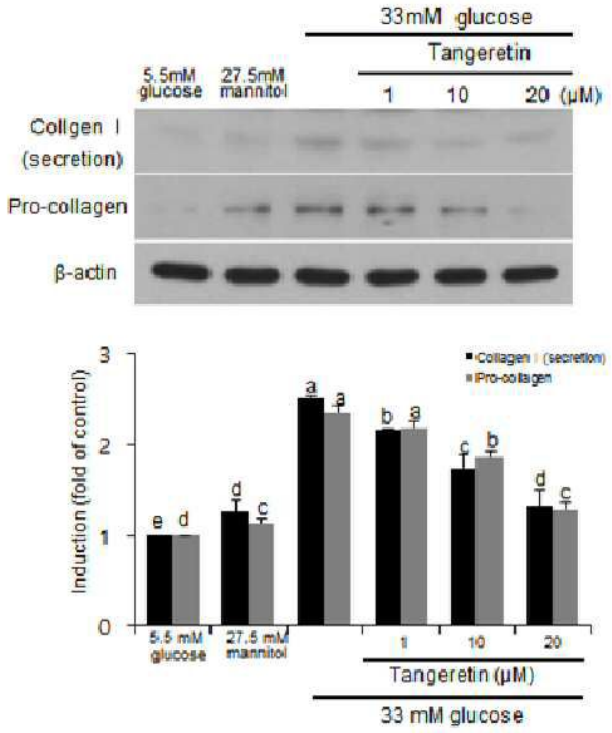
[0066] 마우스의 24시간 뇨를 얻기 위해서 대사 케이지(metabolic cage)에 24시간 동안 넣어두어 모아진 소변을 사용하

였고, 소변 미량알부빈의 측정은 효소면역정량법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)을 진행하였다. ELISA plates(Abcam Biochemicals, Cambridge, UK)에 마우스 소변을 희석하여 각 well에 100 μl를 분주하여 약 1시간 동안 반응시켰다. 각 반응을 진행한 후 ELISA autoleader로 파장 450 nm에서 광학 밀도(optical density, OD)를 측정하였고, 단위는 ng/ml을 사용하였다. 당뇨병성 동물모델에 8주간 10 mg/kg의 탄저레틴을 매일 경구투여한 결과, 도 3과 같이 투여하지 않은 당뇨모델그룹에 비해 뇨의 알부민 수치가 대조군 수준으로 감소한 것으로 나타났다.

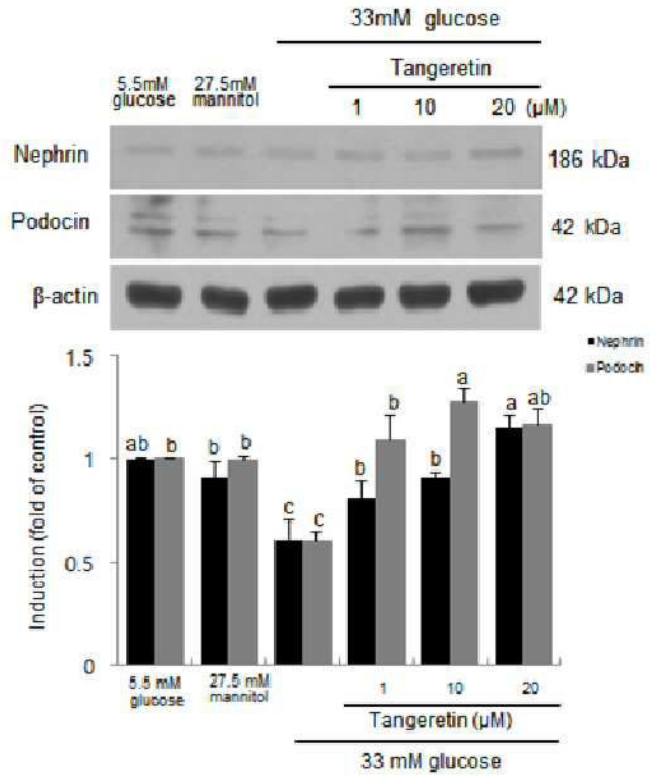
[0067] 따라서, 10 mg/kg의 탄저레틴을 8주간 경구투여한 당뇨병성 동물모델에서 미세알부민뇨의 생성(분비)을 억제하는 데 뛰어난 효과를 발휘하는 것을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과를 통해 탄저레틴은 당뇨병이 유도된 마우스에서 알부민뇨가 생기는 것을 억제함으로써 알부민뇨의 개선, 예방 또는 치료에 효능을 나타내는 물질로 이용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

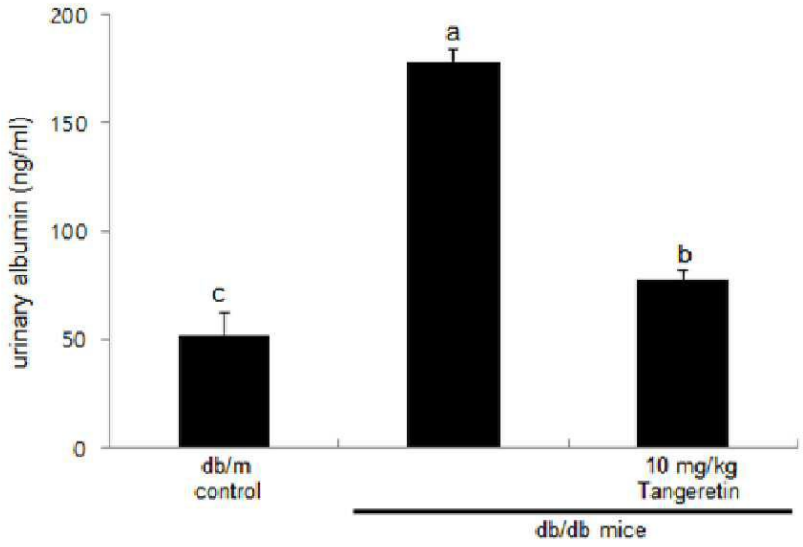
도면1



도면2


33mM glucose
Tangeretin
5.5mM glucose
27.5mM mannitol
1
10
20 (μM)
Nephrin
186 kDa
Podocin
42 kDa
β-actin
42 kDa
Nephrin
Podocin
Induction (fold of control)
1.5
1
0.5
0
ab b b b c c b b b a a ab
5.5 mM glucose
27.5 mM mannitol
1
10
20
Tangeretin (μM)
33 mM glucose

도면3


urinary albumin (ng/ml)
200
150
100
50
0
c
a
b
db/m control
10 mg/kg Tangeretin
db/db mice