(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0055988
(43) 공개일자 2024년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 33/04 (2006.01) *A23L 33/16* (2016.01)
A61P 19/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 33/04 (2013.01)
A23L 33/16 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0136072
(22) 출원일자 2022년10월21일
심사청구일자 2022년10월21일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이상수
서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32, 105동 901호(목동, 이편한세상)
서은민
강원도 춘천시 삭주로 77 한림대학교 춘천 성심병원 정형외과
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인본

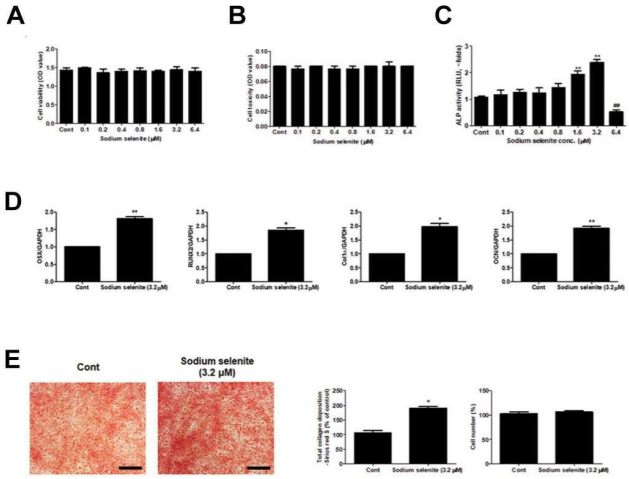
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따르면, 소듐 셀레나이트는 조골세포의 분화를 촉진하여, 골다공증의 예방 또는 치료 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 19/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2250/1626 (2013.01)
(72) 발명자
아쉬시 란잔 샤르마
강원도 춘천시 성심로 67
이연희
강원도 춘천시 삭주로80번길 14, 306호

명 세 서

청구범위

청구항 1

소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 소듐 셀레나이트는 조골세포의 분화를 촉진하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 조골세포 분화의 촉진은 ALP의 활성 증가에 의한 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 조골세포 분화의 촉진은 OSX, Runx2, Col1α 및 OCN의 mRNA 발현 증가에 의한 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 소듐 셀레나이트는 Wnt/β -카테닌 신호전달경로의 활성을 촉진하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 소듐 셀레나이트는 조성물 총량에 대해 0.01μM 이상 6.4μM 미만의 농도로 포함되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 소듐 셀레나이트는 조골세포의 분화를 촉진하는 것인, 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조골세포 분화의 촉진은 ALP의 활성 증가에 의한 것인, 식품 조성물.

청구항 10

소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 11

소듐 셀레나이트를 포함하는 골형성 촉진용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 소듐 셀레나이트는 조골세포의 분화를 촉진하는 것인, 골형성 촉진용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 조골세포 분화의 촉진은 ALP의 활성 증가에 의한 것인, 골형성 촉진용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골다공증은 골밀도를 감소시켜 골다공증성 골절의 위험을 증가시키는 가장 대표적인 골격 질환이다. 골다공증이 진행되는 동안 다른 합병증도 증가할 수 있다. 골다공증은 뼈 조직의 흡수와 재생 사이의 불균형의 결과이다. 골다공증은 진행 속도가 느리기 때문에 '침묵의 질환'로 여겨져 세계적으로 중요한 건강 문제로 대두되고 있다. 이 상태는 뼈 무게 감소와 뼈 퇴화로 구별되고, 골절로 이어지는 경향이 있다.

[0003] 골다공증 관련 골절은 또한 여성의 약 33%, 남성의 20%에서 고위험 인자를 갖는 연령 관련 골 질환으로 간주된다. 분자 수준에서 많은 요인이 골다공증의 시작에 영향을 미친다. 그 중 하나는 폐경 동안 노화 세포에서 염증성 사이토카인의 분비를 유도하는 것이다. 골다공증 동안 뼈 손실의 진행은 종종 염증성 물질의 방출과 관련이 있다. 골다공증 동안 뼈 손실의 진행은 인터페론-감마(IFN-γ), 종양 괴사 인자-알파(TNF-α), 인터루킨(IL)-1, IL-6, IL-8, 및 IL-1β와 같은 염증성 사이토카인의 방출과 관련이 있다. 또한 노화 또는 폐경기 동안 증가된 산화 스트레스가 염증 또는 미토콘드리아 기능 장애로 인한 자유 라디칼 축적으로부터 골다공증으로 이어지는 뼈 조직의 흡수에 기여한다는 것을 시사하는 증거가 늘고 있다.

[0004] 골다공증 치료를 위한 접근 방식은 에스트로겐과 같은 동화 작용제를 사용하여 조골 세포의 증식 및 분화를 향상시켜 골아세포 생성을 유도하는 방식이 있다. 또 다른 골다공증 치료를 위한 접근 방식은 비스포스포네이트와 같은 항흡수 약물을 사용하여 조혈 단핵구 전구체 세포로부터 골 특이적 다핵 파골세포의 분화를 억제함으로써 파골세포 생성을 감소시키는 것이다. 동화제와 항흡수제는 골다공증에 효과적이지만 골질 저하 및 발암을 비롯한 심각한 부작용과 관련이 있다. 골 자극 효과가 있는 식물성 에스트로겐에 대한 최근 연구는 유망한 것으로 보인다. 그러나 생체이용률 문제가 있어 효율적인 전달 시스템이 필요하다. 따라서 골다공증을 예방할 수 있는 새로운 약제의 발굴이 필요하다.

[0005] osterix(OSX) 및 runt 관련 전사 인자 2(Runx2)와 같은 전사 인자는 전사 수준에서 조골세포 증식 및 분화 과정을 조절한다. 동시에 콜라겐 I형(Col1α), 오스테오칼신(OCN), 알칼리성 인산분해효소(ALP) 및 오스테오폰틴(OPN)과 같은 뼈 매트릭스 단백질은 뼈의 광물화 과정을 자극한다. 따라서 이러한 분자는 뼈의 발달과 확립 과정을 조절하는 것으로 여겨진다. 또한, 조골세포와 파골세포 모두의 증식과 분화는 WNT/β-카테닌 표준 신호 전달 경로에 의해 여러 수준에서 조절되어 조골세포 생성을 증가시키고 파골세포 생성을 감소시킬 수 있다. WNT는 β-카테닌 의존성 표준 경로를 통해 조골세포 전구체를 성숙한 조골세포로 분화시키는 것을 촉진할 수 있다.

[0006] 활성산소종(ROS)은 종종 산화 스트레스로 간주되며 단백질, 지질 및 DNA를 분해하여 세포 병리를 유도하는 것으로 나타났다. 산화 스트레스가 있는 거의 대부분의 소스는 세포막을 투과할 수 있는 과산화수소(H_2O_2)를 생성한다. H_2O_2 처리는 조골세포에서 세포사멸을 일으키고 조골세포의 분화를 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 H_2O_2는 산화 스트레스에 대한 시험관 내 세포 모델을 설정하고 뼈와 같은 세포에서 골괴사, 증식 및 골아세포 분화를 평가하는 데 사용된다.

[0007] 셀레늄은 다양한 생물학적 활성 효소의 보조인자로 존재하는 미량 영양소이므로 세포 환경에서 필수 항산화제 역할을 한다. 셀레늄은 산화 스트레스를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 셀레늄 섭취와 골다공증 사이에 역 상관관계가 있다. 부적절한 셀레늄 섭취는 골 교체율 증가 및 골밀도(BMD) 감소와 관련이 있는 것으로 밝혀졌기 때문에

뼈 질환의 높은 위험과 관련이 있다. 소듐 셀레나이트는 미토콘드리아 신호전달 경로의 변경을 통해 성숙한 파골세포에서 세포자멸사를 유도하는 것으로 관찰되었다. 그러나 뼈 형성에서 소듐 셀레나이트의 역할과 관련된 신호 전달 메커니즘은 덜 연구되었다.

[0008] 여기에서 본 발명자들은 MC3T3-E1 세포 증식 및 분화 과정에 대한 소듐 셀레나이트의 역할을 조사하였다. MC3T3-E1은 조골세포의 증식, 분화 과정 및 광물화를 연구하는 데 사용된 전 조골 세포주(pre-osteoblast cell line)이다. 또한, 본 발명자들은 MC3T3-E1 세포 분화를 유도하는 소듐 셀레나이트의 기본 분자 메커니즘을 확인하는 것을 목표로 했다. 또한, 소듐 셀레늄의 항산화 특성과 이것이 H_2O_2 처리된 조골세포에서 골형성에 미치는 영향을 평가하였다.

선행기술문헌

[0009] Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. Nat Med. 2013; 19(2): 179-192.

[0010] Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. Cell Mol Life Sci. 2017; 74(9): 1649-1657.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 또한 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명은 또한 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 본 발명은 또한 소듐 셀레나이트를 포함하는 골형성 촉진용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0015] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 소듐 셀레나이트는 조골세포의 분화를 촉진하는 것일 수 있다.

[0018] 상기 조골세포 분화의 촉진은 ALP의 활성 증가에 의한 것일 수 있다.

[0019] 상기 조골세포 분화의 촉진은 OSX, Runx2, Col1α 및 OCN의 mRNA 발현 증가에 의한 것일 수 있다.

[0020] 상기 소듐 셀레나이트는 Wnt/β-카테닌 신호전달경로의 활성을 촉진하는 것일 수 있다.

[0021] 상기 소듐 셀레나이트는 조성물 총량에 대해 0.01μM 이상 6.4μM 미만의 농도로 포함되는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명은 또한 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공할 수 있다.

[0024] 본 발명은 또한 소듐 셀레나이트를 포함하는 골형성 촉진용 조성물을 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0026] 본 발명은 또한 소듐 셀레나이트를 포함하는 골형성 촉진용 조성물을 제공할 수 있다.

[0027] 본 발명은 또한 소듐 셀레나이트를 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은, 소듐 셀레나이트를 다양한 농도로 조골세포에 처리하였을 때의 효과를 나타낸 이미지로서, A는 세포 활성, B는 MTT 및 LDH 분석을 통한 세포 독성, C는 ALP 활성을 통해 확인된 골형성 활성, D는 골형성 마커의 발현, E는 콜라겐 점착(deposition)을 나타낸 것이다.

도 2는, H_2O_2 처리된 조골세포에서 소듐 셀레나이트의 효과를 나타낸 이미지로서, A는 다양한 농도의 소듐 셀레나이트를 처리하였을 때 ALP 활성을 나타낸 그래프, B는 소듐 셀레나이트를 처리하였을 때 나타나는 골형성 마커를 나타낸 도이다.

도 3은, 소듐 셀레나이트가 H_2O_2 처리된 조골세포에서 Wnt/β-카테닌 신호전달경로 활성화하는 것을 나타낸 이미지로서, A는 소듐 셀레나이트를 처리하였을 때 Axin-2 리포터의 활성을 나타낸 그래프이며, B는 소듐 셀레나이트를 처리하였을 때 β-카테닌의 활성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"는 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법으로서, 본 발명의 목적을 위해 유익하거나 바람직한 임상적 결과를 감지 가능하거나 가능하지 않거나를 불문하고, 또한 부분적이든 전체적이든 상관없이 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 더 나빠지지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 속도감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감을 포함한다. 본 발명에서 사용된 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물을 이용하여 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명은 치료법적 치료 및 예방적인 차원의 것들 모두를 가리킨다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 통상의 기술자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성 분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성 물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0031] 본 발명에서 용어, "식품 조성물"은 그를 섭취하는 대상체에 제공되는 영양소에 관계없이, 그 생물의 하나 이상의 기능에 유리하게 작용하여 보다 나은 건강 상태를 제공하는 식품을 의미한다. 결과적으로, 상기 식품 조성물은 질병 또는 질병-유발 인자의 예방, 개선 또는 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 식품 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 식품학적으로 허용 가능하거나 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 식품 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0033] 본 발명에서, "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 포함하며, 영양 공급 외에도 본 발명의 목적상 골다공증 질환의 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.

[0034] 소듐 셀레나이트 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 변경될 수 있음은 물론이며, 상기 소듐 셀레나이트는 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1~80중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 복용 효율성이 떨어질 수 있으며, 95중량%를 초과할 경우에는 제형화의 어려움이 있을 수 있다.

[0035] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 목이버섯 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0036] 본 발명의 소듐 셀레나이트 조성물이 건강기능식품으로서 사용되는 경우, 소듐 셀레나이트의 골형성 촉진 또는 골다공증 개선 또는 예방 효과에 유해한 영향을 미치지 않는 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0038] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0040] **시험예**

[0041] 1. 물질

[0042] 세포독성 검출 키트는 일본 Takara Bio Inc.에서 구입했다. CSPD 기판은 독일 Roche에서 구입했다. Trizol 시약, Renilla luciferase thymidine kinase 구조체 및 SuperScript II Reverse Transcriptase는 미국 Invitrogen에서 수득했다. Phosphate-buffered saline(PBS)은 한국 T&I에서 수득했다. SYBR green qPCR MasterMix는 한국 Bioneer에서 수득했다. Sodium selenite(Na_2SeO_3), 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), Sirius red 염료, Bouin's fluid는 미국 Sigma-Aldrich에서 수득하였다. 페니실린-스트렙토마이신 용액(P/S), 태아 소 혈청(FBS) 및 α-최소 필수 배지(MEM)는 미국 Gibco에서 구입했다.

[0044] 2. 세포 배양

[0045] 마우스 전 조골 세포(mice pre-osteoblast) MC3T3-E1 세포(ATCC, CRL 2593)를 α-MEM 배지에서 성장시켰다. 세포는 95% 공기와 5% CO2의 가습된 분위기에서 37℃에서 배양되었다. 배양 배지에 FBS(10%), P/S(1%), L-글루타민(2mM), 피루브산나트륨(1mM) 및 비필수 아미노산(0.1mM)을 보충하였다.

[0047] 3. 세포독성 시험(MTT 및 LDH 분석)

[0048] MTT 분석은 세포의 세포 생존력을 평가하기 위해 수행되었다. 이를 위해 MC3T3-E1 세포(1 x 10^4 cells/well)를 96-well plate에서 배양하고 다양한 용량(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4㎛M)의 소듐 셀레나이트를 24시간 동안 처리하였다. 불용성 보라색 MTT 포르마잔 결정은 대사 활성 세포의 미토콘드리아에서 숙시네이트 탈수소효소를 생성한다. MTT 용액(10 ㎕: 5 mg/ml in PBS)을 세포와 함께 웰에 피펫팅하고 37℃에서 2시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 이후 MTT를 녹이기 위해 상층액을 제거하고 DMSO(200㎕)를 각 well에 첨가하고 부드럽게 흔들어주었다. UV-Vis 분광 광도계(Molecular Devices LLC, USA)를 사용하여 570 nm의 파장에서 광학 밀도를 기록했다. 세포에 대한 소듐 셀레나이트의 세포독성 효과는 세포독성 검출 키트 프로토콜에 따라 결정되었다.

[0049] 젖산 탈수소효소(LDH) 분석을 위해, 세포를 상기 기재된 바와 유사하게 배양하였다. 세포 배양 배지(10 ㎕)를 새로운 96-웰 플레이트의 배양된 웰로부터 수집하였다. 다음으로, PBS(40㎛l) 및 LDH 시약(50㎛l)을 플레이트의 모든 웰에 피펫팅하고 25℃의 암실에서 인큐베이션(45분)했다. 효소 반응을 종료하기 위해 정지 용액(50㎕)을 각 웰에 첨가하였다. UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 490 nm에서 광학 밀도를 기록했다. 양성 대조군의 경우 총 세포 용해물의 광학 밀도를 기록했다.

[0051] 4. 알칼리성 인산분해효소 활성

[0052] 48-웰 플레이트에서 MC3T3-E1 세포를 5 x 10^4 cells/well의 밀도로 배양하였다. 그런 다음, 과산화수소(H_2O_2)가 있거나 없는 소듐 셀레나이트를 MC3T3-E1 세포에 다양한 용량(0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 및 6.4㎛M)으로 처리했다. 48시간 동안 배양한 후, 차가운 PBS를 사용하여 세포를 두 번 세척하였다. 그런 다음 차가운 RIPA 완충액(100㎛l)을 각 웰에 첨가하고 부드럽게 흔들었다. 전세포 용해물을 4℃, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상청액(20 ㎕)을 수집하고 CSPD 기질(100 ㎕)에 첨가하였다. 이어서, 반응 용액을 실온에서 30분 동안 유지하였다. 발광 강도는 발광계(Glomax, Promega, USA)를 사용하여 기록하였다. 전체 세포 용해물의 발광성을 정규

화에 사용하였다.

[0054] 5. 시리우스 레드 염색

[0055] 48웰 플레이트에서 MC3T3-E1 세포를 3.2μM의 소듐 셀레나이트로 7일 동안 처리했다. 배지는 소듐 셀레나이트와 함께 2일마다 교체되었다. 치료 후 Bouin's fluid를 이용하여 1시간 동안 세포를 고정하였다. 그런 다음 Sirius Red 염료(포화 수성 피크르산 중 1 mg/ml)를 사용하여 1시간 동안 세포를 염색했다. 염색된 세포에서 Sirius Red 염료를 정량하기 위해 0.1N 수산화나트륨을 웰에 30분 동안 첨가했다. 염료를 용해시킨 후, 3중 배양에서 분광광도계를 사용하여 광학 밀도를 550 nm에서 측정하였다(수산화나트륨(0.1 N)은 블랭크로 사용됨).

[0057] 6. 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응

[0058] MC3T3-E1 세포를 6-웰 플레이트에서 3 x 10^5 cells/well의 밀도로 배양하고 3.2 μM의 소듐 셀레나이트로 처리하였다. 세포 RNA는 처리 48시간 후에 Trizol 시약을 사용하여 수집되었다. 흡광도 비율(260/280)을 측정하여 수집된 RNA의 품질을 확인했다. 또한 RNA를 아가로즈 젤에서 분리하여 무결성을 관찰했다. 실시간 중합효소 연쇄 반응(PCR)은 실험실 프로토콜에 따라 수행되었다. 2 μg의 RNA를 사용하여 SuperScript II Reverse Transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성했다. 합성된 cDNA 1μl로 SYBR green qPCR MasterMix 및 Rotor-Gene 3000 real-time PCR(독일 Corbett 소재)을 사용하여 실시간 PCR을 수행했다. qPCR 절차는 95℃에서 10분간 denaturation하는 초기 단계와 95℃에서 20초, 60℃에서 20초간 증폭, 72℃에서 25초간 확장의 40주기로 진행되었다. GAPDH는 mRNA의 상대적인 발현을 표준화하는 데 사용되었으며 이중 델타 CT(ΔΔCT) 방법으로 정량화되었다. 표 1은 사용된 프라이머 서열의 목록을 보여준다.

표 1

Gene	Primer sequence (5′-3′)
OSX	F: GGAAAGGAGGCACAAAGAAGCCAT
	R: AGTCCATTGGTGCTTGAGAAGGGA
Col1a	F: TTCTCCTGGCAAAGACGGAC
	R: AGGAAGCTGAAGTCATAACCGCCA
OCN	F: TGCTTGTGACGAGCTATCAG
	R: GAGGACAGGGAGGATCAAGT
Runx2	F: AAGTGCGGTGCAAACTTTCT
	R: TCTCGGTGGCTGGTAGTGA
GAPDH	F: TCGTGGATCTGACGTGCCGCCTG
	R: CACCACCCTGTTGCTGTAGCCGTAT

[0059]

[0060] 7. 웨스턴 블로팅

[0061] 6-웰 플레이트에서, MC3T3-E1 세포를 3 x 10^5 cells/well 밀도로 성장시켰다. 소듐셀레나이트(3.2μM)을 12, 24, 48시간 동안 세포에 처리했다. 단백질을 분리하고 소듐 도데실 설페이트(SDS)-폴리아크릴아미드 겔에 로딩했다. 젤에서 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 멤브레인으로 옮겨졌다. 5% 탈지유를 이용하여 1시간 동안 막을 차단한 후 OSX, β-catenin, Runx2, β-actin에 대한 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 그 후, 1X TBST(Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20)를 사용하여 막을 세척하고 홀스래디쉬 퍼옥시다아제가

결합된 2차 항체와 함께 실온에서 45분간 배양하였다. 화학발광 시약을 사용하여 표적 단백질 밴드를 시각화했다. 로딩 대조군으로 β-액틴을 사용하였다. Image J 소프트웨어(NIH, USA)를 사용하여 밴드 강도를 정량화했다.

[0063] 8. 통계 분석

[0064] 양적 통계 분석은 양측 스튜던트 t 테스트를 사용하는 Graphpad Prism 5.0(San Diego, CA) 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. $P<0.05$의 데이터 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0066] **결과**

[0067] 1. 소듐 셀레나이트는 조골세포에서 골형성 활성을 유도한다.

[0068] MC3T3-E1의 세포 생존율 및 세포 독성에 대한 소듐 셀레나이트의 영향을 평가하기 위해 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 및 3.2μM)의 소듐 셀레나이트를 세포에 24시간 동안 처리했다. MTT 및 LDH 분석을 사용하여 각각 MC3T3-E1의 세포 생존력 및 세포 독성을 평가했다. 다양한 농도의 소듐 셀레나이트는 조골세포의 세포 생존력과 세포독성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(도 1의 A 및 B).

[0069] 조골세포에 대한 소듐 셀레나이트의 골형성 효과를 평가하기 위해 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2μM)의 소듐 셀레나이트를 MC3T3-E1 세포에 48시간 동안 처리하고 ALP 활성을 분석했다. ALP는 조골세포에서 발견되는 효소로서 조골세포 분화의 표지자로 여겨진다. 소듐 셀레나이트 처리된 조골세포는 대조군과 비교하여 1.6 및 3.2 μM 농도에서 유의하게 증가된 ALP 활성을 나타냈다. 그러나 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성의 현저한 감소는 6.4 μM의 용량에서 관찰되었다(도 1의 C).

[0070] 또한, 소듐 셀레나이트의 골형성 효과는 골형성 마커의 mRNA 발현 수준에 의해 확인되었다. 소듐 셀레나이트(3.2μM)를 MC3T3-E1 세포에 24시간 동안 처리하였다. 골형성을 위한 마스터 조절인자(OSX), 조골세포 분화 전사 인자(Runx2), 말단 분화 마커인 Col1α 및 OCN의 mRNA 수준을 실시간 qRT-PCR을 통해 검출하였다. 소듐 셀레나이트는 대조군과 비교하여 OSX(~2배), Runx2(~2배), Col1α(~2배) 및 OCN(~2배)의 mRNA 발현을 유도했다(도 1의 D). 시리우스 레드 염색에 의해 입증된 바와 같이, 콜라겐 침착은 대조군과 비교하여 3.2 μM의 소듐 셀레나이트 처리 조골세포에서 ~1.8배 증가했다(도 1의 E). 결론적으로, 소듐 셀레나이트는 조골세포에서 골형성 분화를 유도할 수 있다.

[0072] 2. 소듐 셀레나이트는 H_2O_2로 자극된 조골세포에서 조골세포 분화를 회복했다.

[0073] 이전 연구에서는 H_2O_2가 산화 스트레스를 유발하고 조골세포의 분화 과정을 억제하는 데 기여한다고 알려졌다. H_2O_2로 자극된 조골세포에서 소듐 셀레나이트의 골형성 효과를 확인하기 위해 H_2O_2(100μM)를 단독으로 또는 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2μM)의 소듐 셀레나이트와 함께 조골세포에 48시간 동안 처리하였다. H_2O_2 단독 처리는 조골세포의 ALP 활성을 현저하게 감소시켰다. 그러나, 감소된 ALP 활성은 1.6 및 3.2 μM의 소듐 셀레나이트을 동시 처리한 경우 대조군과 유사한 수준으로 유의하게 회복되었다(도 2의 A). 또한, H_2O_2(100μM)를 단독으로 또는 소듐 셀레나이트(3.2μM)과 함께 조골세포에 48시간 동안 처리하였다. 수집된 단백질 용해물을 웨스턴 블롯팅을 통해 조골세포에 대한 골형성 전사 인자의 발현을 분석하였다. H_2O_2 처리는 단백질 수준에서 골형성 전사 인자(Runx2 및 OSX)의 발현을 감소시켰다. 그러나 Runx2 및 OSX의 감소된 발현 수준은 3.2μM의 소듐 셀레나이트의 공동 처리한 경우 회복되었다(도 2의 B). 이 결과는 MC3T3-E1 세포에 소듐 셀레나이트 처리가 골형성 과정에 대한 H_2O_2의 억제 효과를 가릴 수 있음을 보여주었다. 따라서 뼈 형성 신호에 영향을 미치는 소듐 셀레나이트의 가능성이 예측될 수 있다.

[0075] 3. 소듐 셀레나이트는 H_2O_2로 자극된 조골세포에서 억제된 WNT/β 카테닌 신호전달 경로를 회복한다.

[0076] WNT/β-카테닌 신호전달 경로는 조골세포의 분화와 뼈 형성에 중요하다. 다음으로 본 발명자들은 H_2O_2로 자극된

조골세포에서 소듐 셀레나이트에 의한 조골세포의 골형성 유도에 WNT/β-카테닌 신호전달 경로의 관련성을 평가했다. 이를 위해 Axin 2 luciferase report construct를 Genefectine 시약(Genetrone Biotech, Korea)을 이용하여 24시간 동안 조골세포에 형질감염시킨 후 H_2O_2(100μM) 단독 또는 3.2μM의 sodium selenite와 함께 12시간 및 24시간 동안 처리하였다.

[0077] 대조군과 비교하여 Axin-2 luciferase 활성은 12시간 및 24시간 처리 모두에서 H_2O_2에 의해 감소된 것으로 나타났다. 24시간 동안 소듐 셀레나이트를 H_2O_2로 동시 처리하는 동안 H_2O_2에 의해 억제된 감소된 Axin-2 리포터 활성이 유의하게 회복되었다(도 3의 A).

[0078] WNT 신호 전달 경로가 활성화되면 β-카테닌이 핵에 국한되어 안정화된다. 그런 다음 β-카테닌은 DNA 결합 단백질의 TCF/LEF 계열에 결합하고 WNT 매개 유전자를 표적으로 하여 골형성을 조절한다. 따라서 조골세포를 H_2O_2(100μM) 단독 또는 소듐 셀레나이트(3.2μM)와 함께 12시간 및 24시간 동안 처리하고 웨스턴 블롯을 수행하여 β-카테닌 분자의 안정성을 분석하였다. H_2O_2는 처리 12시간 및 24시간 후에 β-카테닌 분자의 안정화를 감소시켰지만, 소듐 셀레나이트는 24시간 처리 후에 H_2O_2에 의해 감소된 β-카테닌 안정화 수준을 유의하게 회복할 수 있었다(도 3의 B). 종합하면 WNT/β-카테닌 신호전달을 통해 소듐 셀레나이트는 조골세포에서 H_2O_2에 의해 감소된 골형성 활성을 회복시킨다.

[0080] **결론**

[0081] 셀레늄은 필수 미량 원소이며 셀레노시스테인(SeCys) 잔기의 필수 구성성분이다. 다양한 셀레노시스테인 함유 세포내 셀레노단백질의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 셀레늄은 정상적인 산소 대사 동안 방출되는 자유라디칼을 제거하는 데 중요한 역할을 하는 여러 항산화 효소의 필수 구성성분이다. 최근에 노인 인구에 대한 사례 대조 연구에 따르면 셀레늄 섭취량이 많은 사람들의 골다공증성 고관절 골절 위험이 감소했다. 그러나 이는 또한 흡연 상태에 크게 의존했다. 더욱이, 설치류에서 피질 및 섬유주 광물화가 잘 발달되지 않은 것을 나타내는 뼈 표현형은 적은 셀레늄 섭취 때문이다. 또한, 소듐 셀레나이트로서 셀레늄은 뼈의 광물화된 기질 형성에 필요한 조골세포의 OCN 발현을 조절하는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명자들은 조골 세포의 골 분화 과정에 대한 셀레늄의 영향을 관찰하려고 했다. 본 발명자들의 발명은 MC3T3-E1 세포에서 소듐 셀레나이트가 ALP 활성을 자극한다는 것을 보여주었다. 또한, 골형성 전사 인자(OSX 및 Runx-2), 골형성 마커(Col1α 및 OCN)의 mRNA의 발현 수준 유도 및 콜라겐 합성 증가는 MC3T3-E1 세포의 골형성 활성에 대한 소듐 셀레나이트의 효과를 추가로 확인했다

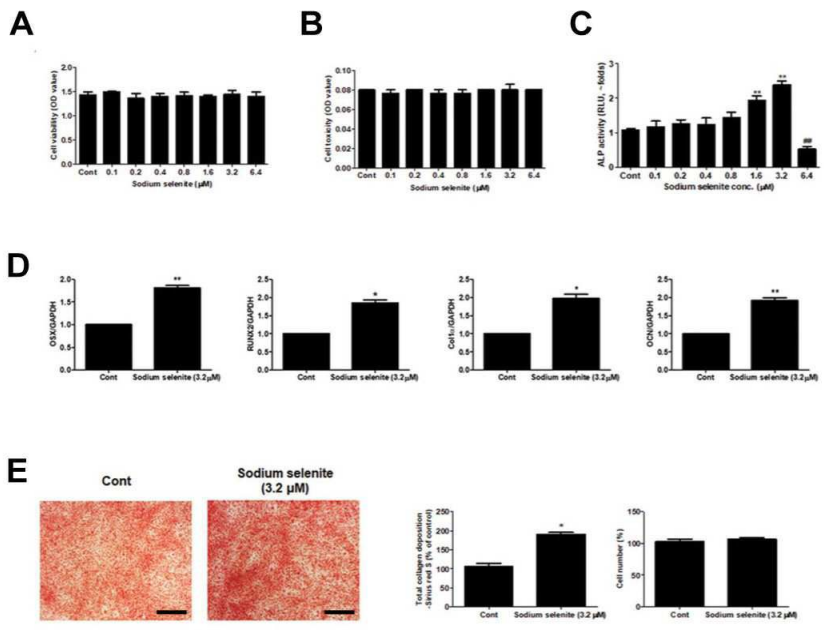
[0082] 다양한 환경 조건이나 작용제 또는 정상적인 세포 대사가 ROS를 생성할 수 있으며, 이는 골다공증을 비롯한 다양한 병리의 발병기전을 담당하는 것으로 알려져 있다. ROS 계열의 구성원인 H_2O_2는 생물학적 막을 통해 확산되고 다양한 종류의 생물학적 활동을 일으키는 능력이 있다. H_2O_2의 외인성 처리는 MC3T3-E1 및 골수 기질 세포(MSC) 세포에서 조골 세포 분화를 억제하는 것으로 알려졌다. 이전에는 소듐 셀레나이트가 H_2O_2로 인한 조골세포 분화 억제로부터 뼈 MSC를 보호하는 것으로 알려졌다. 이 연구는 소듐 셀레나이트의 효과가 산화 스트레스 억제 및 미토겐 활성화 단백질 키나아제(MAPK) 신호 전달 경로와 관련이 있음을 관찰했다. 따라서 MC3T3-E1 세포에서 본 발명자들은 H_2O_2의 영향을 확인하고 동시에 소듐 셀레나이트가 골형성 활성(ALP 활성)에 대한 구제 효과를 관찰했다. 소듐 셀레나이트(3.2μM) 처리는 조골세포 전 세포에서 골형성 분화 마커(ALP 활성)에 대한 H_2O_2의 역효과를 유의하게 구제하는 것으로 관찰되었다. MC3T3-E1 세포에서 H_2O_2 억제된 ALP 활성에 대한 소듐 셀레나이트의 이 구제 효과는 골형성 전사 인자(OSX 및 Runx-2)의 억제된 발현을 구제하기 때문이다. 최근에는 골다공증이 있는 폐경 후 여성에서 산화 스트레스가 전체 대퇴골의 골밀도와 음의 상관관계가 있는 것으로 관찰되었다. 더욱이, 난소 절제된 쥐에서 H_2O_2와 지질 과산화 수준이 증가했지만 대퇴 조직 균질물에서 글루타티온 S 트랜스퍼라제(GST), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD), 글루타티온 과산화효소(GPx)와 같은 효소적 항산화제는 감소했다. 조골세포와 골 MSC에서는 thioredoxin reductases, GPx, selenoprotein P, type 2 iodothyronine deiodinase를 비롯한 다양한 종류의 셀레노단백질 또는 셀레노효소가 발현되는 것으로 알려져 있다. 뼈 MSC에서 항산화 효소 GPx의 발현은 H_2O_2에 의해 유도된 산화 손상으로부터 보호하기 위해 필요하다. 또한 뼈 MSC에 소듐 셀레나이트를 전처리하면 총 항산화 능력(TAOC) 및 감소된 루타티온(GSH) 수준을 증가시키고 세포 내 ROS 수준과 지질 과산화

를 억제함으로써 H_2O_2 유도 산화 스트레스를 효과적으로 억제한다는 것이 알려졌다. 따라서 소듐 셀레나이트의 전처리는 GPx와 같은 항산화 효소의 발현을 증가시켜 조골 분화 과정에 대한 H_2O_2의 억제 역할을 구제할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

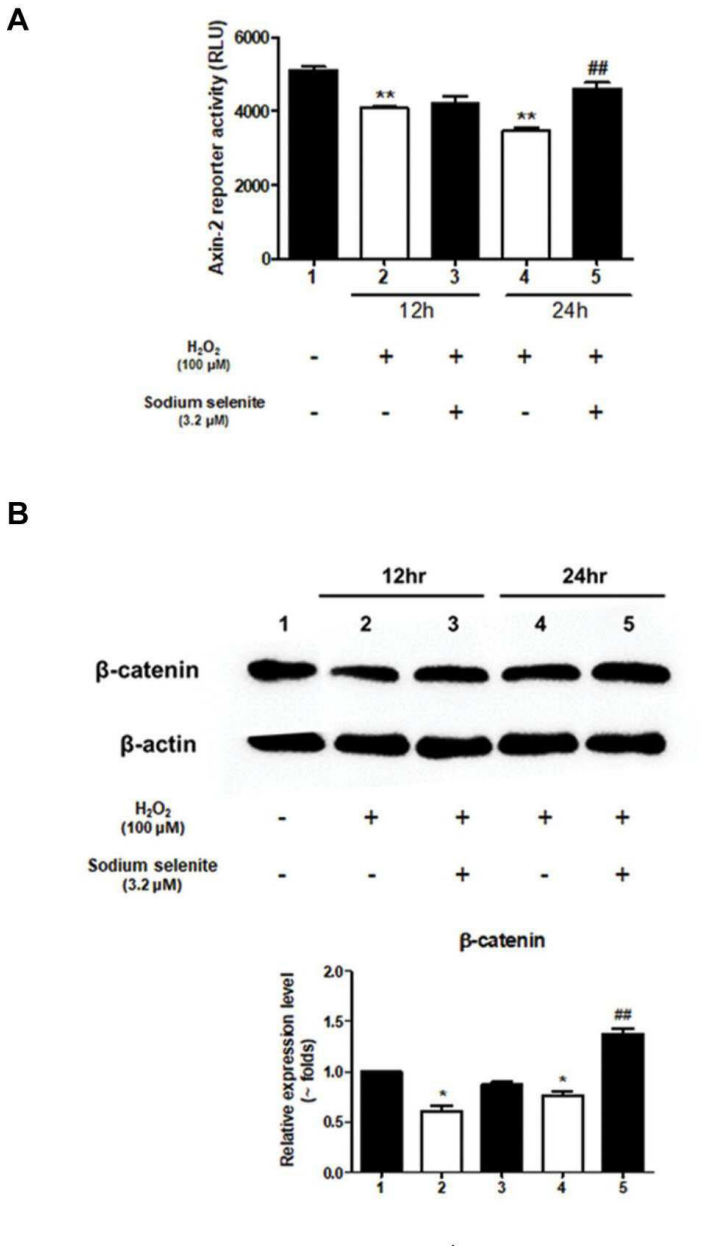
[0083] WNT/β-카테닌 신호전달 경로는 증식, 분화 및 광물화와 같은 골아세포 형성의 다양한 과정을 조절함으로써 뼈 형성에 필수적이다. 소듐 셀레나이트가 H_2O_2로 처리된 MC3T3-E1 세포에서 골형성 마커 및 ALP 활성의 감소를 약화시킬 수 있었기 때문에 본 발명자들은 다음으로 소듐 셀레나이트에 의해 매개되는 구제 효과에서 WNT/β 카테닌 신호전달 경로의 역할을 조사하려고 시도했다. H_2O_2 처리는 12시간 및 24시간 후 Axin-2 리포터 활성을 감소시켰다. β-카테닌 안정성의 유사한 감소가 H_2O_2 처리된 MC3T3-E1 세포에서 관찰되었다. MC3T3-E1 세포에 H_2O_2와 함께 소듐 셀레나이트를 처리하면 처리 24시간 후에 억제된 Axin-2 리포터 활성이 크게 회복되었다. 이것은 MC3T3-E1 세포에 H_2O_2와 함께 소듐 셀레나이트를 처리한 후 β-카테닌의 증가된 안정성에 의해 추가로 확립되었다. 소듐 셀레나이트 처리 후 β-카테닌 안정성과 Axin-2 리포터 활성의 증가는 조골세포에서 WNT 신호 전달 경로의 관여를 의미한다. WNT 신호 전달 경로에 대한 소듐 셀레나이트의 자극 효과는 H_2O_2로 자극된 MC3T3-E1 세포의 골형성 활성에 대한 소듐 셀레나이트의 구제 효과를 설명할 수 있다. MAPK는 뼈 형성에 필수적인 역할을 한다. 연구에 따르면 ERK1/2 신호 전달 경로는 조골 세포 분화에 대한 H_2O_2의 억제 효과를 담당하는 것으로 알려져 있다. JNK 및 p38과 같은 다른 MAPK도 산화 스트레스에 의해 매개되는 생리학적 과정에 연루되어 있지만, H_2O_2에 의해 유도된 조골 세포 분화 억제에서의 역할은 명확하게 이해되지 않았다. 최근에, 골 MSC의 골아세포 분화에 대한 H_2O_2 매개 부작용이 셀레늄에 의해 억제되는 것으로 관찰되었다. 그 효과는 산화 스트레스의 감소와 ERK 신호 전달 경로의 부분적인 자극 때문이다. 이전 연구에서는 조골 세포 분화 과정에서 MAPK와 WNT 신호 전달 경로 사이의 크로스토크를 강조했으며, 이는 주로 자극의 종류에 의해 결정된다. 따라서, 조골 세포에서 골 형성 활성의 유도에서 셀레늄의 영향 하에 WNT 신호 전달 경로와 MAPK의 물리적 크로스토크를 이해하기 위해서는 향후 연구가 필수적이다.

도면

도면1

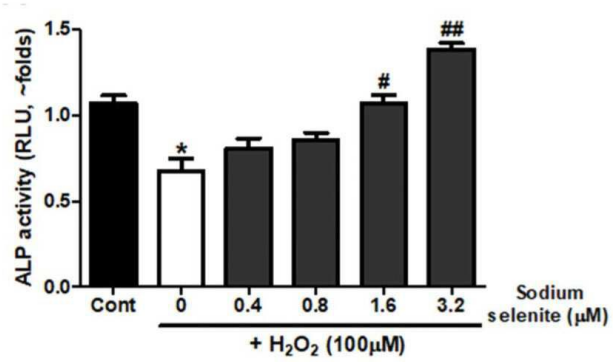


도면2

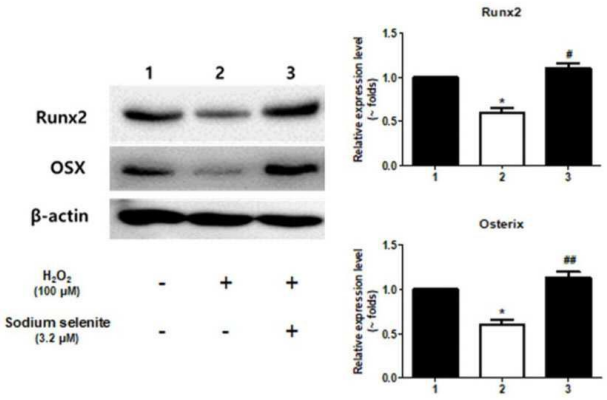

A
Axin-2 reporter activity (RLU)
6000
4000
2000
0
**
**
##
1
2
3
4
5
12h
24h
H2O2 (100 μM)
- + + + +
Sodium selenite (3.2 μM)
- - + - +
B
12hr
24hr
1
2
3
4
5
β-catenin
β-actin
H2O2 (100 μM)
- + + + +
Sodium selenite (3.2 μM)
- - + - +
β-catenin
Relative expression level (~ folds)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
##
1
2
3
4
5

도면3

A


ALP activity (RLU, ~folds)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
##
Cont
0
0.4
0.8
1.6
3.2
Sodium selenite (μM)
+ H2O2 (100μM)

B


1
2
3
Runx2
OSX
β-actin
H2O2 (100 μM)
- + +
Sodium selenite (3.2 μM)
- - +
Runx2
Relative expression level (~ folds)
Osterix
Relative expression level (~ folds)