(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0009726
(43) 공개일자 2012년02월02일

(51) Int. Cl.
A61K 31/353 (2006.01) *A61K 31/35* (2006.01)
A61P 21/02 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0070186
(22) 출원일자 2010년07월20일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
황은숙
서울특별시 양천구 목동서로 340, 목동아파트 909동 303호 (신정동, 목동신시가지아파트9단지)
(74) 대리인
안소영

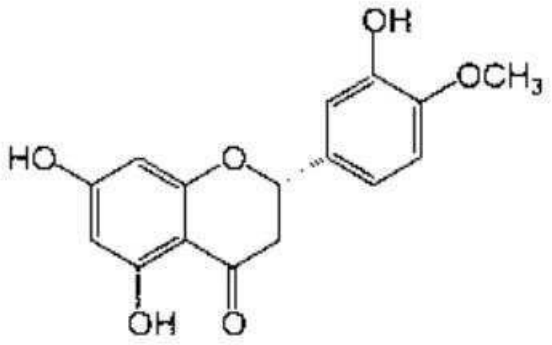
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 근육세포 분화 또는 재생 촉진제

(57) 요 약

본 발명은 근육세포 분화 또는 재생 촉진제, 근육장애 치료 또는 예방용 약학 조성물, 근육장애 개선 또는 억제용 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 촉진제는 근육 세포 분화와 재생에 효과적이며, 본 발명의 조성물은 근육장애 치료(개선) 또는 예방에 효과적이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0073324
부처명 한국학술진흥재단
연구관리전문기관
연구사업명 이공계일반연구자지원사업
연구과제명 근육세포 분화 조절에 있어서 TAZ 단백질의 기능 네트워크 연구
기여율
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2010년 05월 ~ 2011년 04월

특허청구의 범위

청구항 1

헤스페레틴을 유효성분으로 포함하는 근육세포 분화 또는 재생 촉진제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 근육세포분화촉진은 MyoD 단백질 유발 미오게닌 전사 활성화에 의한 것인 촉진제.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 근육세포재생은 손상된 근육세포의 재생인 촉진제.

청구항 4

헤스페레틴을 유효성분으로 포함하는 근육장애 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 근육장애는 근육위축증, 근질환, 근육 손상, 근이영양증, 근육감소증, 근신경 전도성 질병 또는 신경 손상 중에서 선택된 하나 이상인 약학조성물.

청구항 6

헤스페레틴을 유효성분으로 포함하는 근육장애 개선 또는 억제용 식품조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 근육장애는 근육위축증, 근질환, 근육 손상, 근이영양증, 근육감소증, 근신경 전도성 질병 또는 신경 손상 중에서 선택된 하나 이상인 식품조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 근육세포 분화 또는 재생 촉진제, 및 근육장애 치료(개선) 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 헤스페리딘(hesperidin)과 그 어글리콘인 헤스페레틴(hesperetin)은 감귤류 바이오플라보노이드로 분류되며 아포지단백 B 분비 감소와 마이크로좀 트리글리세라이드 전달 단백질과 acyl CoA(cholesterol acyltransferase)의 발현 억제에 의해 항-아테롬 활성(anti-atherogenic activity)을 나타내는 것으로 알려져 있다. 경구투여된 헤스페리딘은 장내 세균총에 의해 체내에서 디글리코실화 대사체인 헤스페레틴으로 전환된다. 헤스페레틴은 비만세포에서 히스타민 분비를 억제하고, 항-알러지 특성을 나타낸다. 또한, 헤스페레틴은 신경세포와 골아세포(osteoblast)를 산화적 스트레스에서 보호하고 세포주기를 G1에서 억제함으로써 유방암 세포의 증식을 억제한다. 최근엔 헤스페레틴이 알카린 포스파타아제 활성을 증가시키고 BMP 신호 경로(signaling pathway)에서 RUNX2활성을 유도하여 골아세포 분화를 촉진하는 것이 보고되었다. 이는 골(骨)대사에서 헤스페레틴이 동화(anabolic effect)작용을 하는 것을 나타내는 것이다.

[0003] 성인 골수 중간엽줄기세포는 다능성 줄기 세포로 골아세포, 지방세포, 연골세포, 근육세포로 분화될 수 있다. 그 중 근육세포 분화는 MyoD, Myf5, 미오게닌(myogenin), MRF4와 같은 다양한 근육 조절 인자(muscle regulatory factors; MRFs)에 의해 조절된다. MyoD는 근육-특이 유전자의 발현을 개시하게 하고 중간엽줄기세포가 근육세포 계열로 분화하는 것을 유도한다. 미오게닌 발현의 유도는 MyoD 활성에 의해 조절되고, 최종 분화와 MHC(myosin heavy chain), MCK(muscle creatine kinase)와 같은 근육 특이 유전자의 유도에 중요한 요소이다. 전사인자인 MEF2(myocyte enhancer factor 2)류 또한 MyoD와 미오게닌 처럼 근육 bHLH 단백질과 협동작용에 의

해 근육 분화를 조절할 수 있다.

[0004] 근육세포 분화 또는 재생 촉진제는 근위축증(muscular dystrophy), 근질환(myopathy), 손상된 근육세포의 재생 등 근육장애 치료(개선) 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

[0005] 본 발명자들은 근육세포 분화 또는 재생 촉진제의 개발과 근육장애 치료(개선) 또는 예방을 위한 연구한 결과 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 근육세포 분화 또는 촉진제를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명이 해결하고자 하는 또 하나의 과제는 근육장애 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 또 하나의 과제는 근육장애 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 헤스페레틴(hesperetin)을 유효성분으로 포함하는 근육세포 분화 또는 재생 촉진제를 제공한다.

[0010] 상기 헤스페레틴은 도 1의 화학식으로 표시되며, IUPAC 명은 (S)-2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one이다.

[0011] 상기 '근육세포 분화'는 근육세포로 분화 가능한 중간엽줄기세포 등의 근육세포로의 분화일 수 있다.

[0012] 상기 근육세포분화촉진은 MyoD 단백질 유발 미오게닌 전사 활성화에 의한 것일 수 있다.

[0013] 상기 근육세포재생은 손상된 근육세포의 재생일 수 있다. 상기 손상은 수술, 암, 염증, 감염 등 유전적 인자와 환경적 인자에 의한 것일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 헤스페레틴을 유효성분으로 포함하는 근육장애 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0015] 상기 '근육장애(muscle disorder)'는 타박상(contusion), 열상(laceration), 압좌(crush)와 같은 외적 요인, 갑작스럽거나 심한 낙상 또는 스포츠 활동 중의 근육 긴장(muscle strain)과 같은 내적 요인, 치료 중 발생할 수 있는 혈액 공급이 중단될 때 발생하는 근육 손상, 근육 소모, 및/또는 그로 인한 근육 기능의 손실 등을 포함하는 의미이며, 그 원인은 유전적 인자 및/또는 환경적 인자에 의할 수 있다. 상기 근육장애의 예로는 근육위축증(muscle atrophy), 근질환(myopathy), 근육 손상(muscle injury), 근이영양증(muscle dystrophy), 근육감소증(sarcopenia), 근신경 전도성 질병(myoneural conductive diseases) 및/또는 신경 손상(nerve injury)과 같은 골격근 질병 및 장애들을 포함한다. 상기 근육위축증은 소아마비 후 근위축(PPMA; post-polio muscle atrophy) 및/또는 X-연관 척수구근 근위축 등을 포함한다. 상기 근육 손상은 외상성 근육 손상 등을 포함한다. 상기 근이영양증은 뒤시엔느 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy), 근긴장성 이영양증(myotonic dystrophy) 및/또는 선천성 근이영양증 등을 포함한다. 상기 근신경 전도성 질병 및/또는 신경 손상은 근육 손상에 의해 유도되는 것일 수 있다.

[0016] 상기 예방은 경미한 근육손상 등에 의해 질병으로 전이되기 전단계에서 질환화하는 것을 차단하는 효과를 포함하는 의미이다.

[0017] 또한, 본 발명은 헤스페레틴을 유효성분으로 포함하는 근육장애 개선 또는 예방용 식품조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 식품조성물에 있어서, 본 발명의 약학조성물에서 언급된 사항과 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

[0019] 상기 식품조성물은 건강기능식품일 수 있으며, 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.

[0020] 본 발명에 있어서, '근육 손상'은 수술, 암, 염증, 및/또는 감염 등 유전적 인자와 환경적 인자에 의해 근육이 손상된 것을 의미한다.

[0021] 헤스페레틴은 근육세포 분화 또는 재생 촉진 및 근육장애를 치료(개선) 또는 예방하는 효과를 나타낸다.

[0022] 따라서, 본 발명은 헤스페레틴의 근육세포 분화 또는 재생 촉진 용도 및 근육장애 치료 또는 예방용 의약 용도와 개선 또는 예방용 식품 용도를 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 헤스페레틴을 필요로 하는 포유류(인간을 포함함)에게 투여하는 단계를 포함하는 근육세포 분화 또는 재생 촉진방법 및 근육장애 치료(개선) 또는 예방방법을 제공한다.

[0024] 별도의 언급이 없는 한, 본 발명의 조성물에 관한 내용은 본 발명의 용도, 방법에도 동일하게 적용된다.

[0025] 상기 헤스페레틴은 인간을 포함한 포유류에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 유효성분을 약학적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 제제화하여 투여할 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 및 젤라틴 등을 첨가하여 제조한다. 또한, 마그네슘, 탈크 등 윤활제도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 주사가능한 액제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 비강세척제 및 좌제가 포함된다. 주사가능한 액제, 현탁제, 유제는 물, 비수성용제나 현탁용제와 유효성분을 혼합하여 제조할 수 있으며, 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등일 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등의 사용될 수 있다. 본 발명의 약학조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사로 투여가능하다.

[0026] 본 발명의 조성물, 용도 및 방법에서는, 헤스페레틴 기준으로 성인 기준 1일 0.001~10g/kg, 바람직하게는 0.1~1g/kg의 용량으로 사용가능하다.

[0027] 본 발명의 조성물 중 유효성분은 총 중량 중 0.01~99.99 중량% 함유할 수 있다.

[0028] 상기 헤스페레틴은 약학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등을 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 촉진제는 근육 세포 분화와 재생에 효과적이며, 본 발명의 조성물은 근육장애에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 헤스페레틴의 화학식을 나타낸 도이다.

도 2는 헤스페레틴 처리에 따른 C2C12 세포형태를 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 C2C12세포를 형광 현미경으로 관찰시, field 당 형광-양성 세포를 계수한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 헤스페레틴을 처리한 C2C12세포와 헤스페레틴을 처리하지 않은 C2C12세포를 각각 4일간 배양시킨 후, 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 그림이다.

도 5는 헤스페레틴 처리에 따른 C2C12세포의 형태를 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 C2C12세포를 형광 현미경으로 관찰시, field 당 형광-양성 세포를 계수한 결과이다.

도 7은 분화된 C2C12 세포 추출물을 immunoblot한 결과이다.

도 8 내지 10은 각각 분화된 C2C12 세포 추출물 내의 미오게닌, myoD, 및 MCK의 상대적인 mRNA 발현량을 나타낸 도이다.

도 11은 헤스페레틴의 처리 농도에 따른, pMyogenin-luc의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 12는 헤스페레틴의 처리 농도에 따른, pMCK-luc의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 13은 헤스페레틴의 처리 농도 및 MyoD 처리 유무에 따른, pMyogenin-luc의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 14는 헤스페레틴의 처리 농도 및 MyoD 처리 유무에 따른, pMCK-luc의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 15는 헤스페레틴의 농도별 처리에 따른, pMyogenin-luc의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 16은 MyoD, MEF2C, 또는 MyoD+MEF2C 발현벡터를 pMyogenin-luc 벡터와 함께 형질전환시킨 세포에서 리포터 유전자를 분석한 결과이다.

도 17은 Myc-MyoD 또는 MEF2C 발현백터와 함께 공동-형질전환시킨 세포에 대하여, immunoprimmunopre(IP)와 면역학적 분석(IB)을 수행한 결과이다.

도 18은 헤스페레틴을 투여한 세포의 핵추출물을 immunoblot 한 결과이다.

도 19는 헤스페레틴을 처리한 세포로부터 수득한 추출물에 대하여, 면역학적 분석을 수행한 결과이다.

도 20은 MyoD가 과발현된 세포로부터 수득한 추출물에 대한 DNA pull-down 분석결과를 나타낸 도이다.

도 21은 헤스페레틴을 첨가한 세포에서, MyoD, 미오게닌 및 베타-엑틴의 발현 수준을 면역학적 분석방법으로 분석한 결과이다.

도 22 내지 도 24는 각각 헤스페레틴을 처리한 세포에서, MyoD, 미오게닌 및 MCK의 상대적 발현 수준을 나타낸 그림이다.

도 25은 TA 근육을 분리한 후, 현미경으로 관찰한 결과이다.

도 26는 TA 근육으로부터 수득한 세포추출물을 SDS-PAGE 방법으로 분리 전기영동한 후, 미오게닌 항체로 immunoblotting한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 설명하나, 본발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] **<시약의 준비>**

[0033] 본 발명의 실시예에서 사용한 모든 시약은 아래와 같이 입수하였다

[0034] 헤스페레틴(순도 95%)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)로부터 입수하였으며, 세포배양을 위한 모든 시료는 GIBCO-BRL(Invitrogen, Carlsbad, CA)로부터 구입하였고, FBS(Fetal bovine serum)와 HS(Hores serum)는 HyClone(Cogan, UT)으로부터 입수하였다.

[0035] **<데이타 처리>**

[0036] 실시예 중 데이터는 평균±SEM으로 나타냈다. 통계적 유의성은 unpaired Student's t-test 또는 one way ANOVA로 결정되었다. 0.05 이하의 P-값은 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하며, 도에서*:P<0.05이고, **:P<0.005이다.

[0037] **실시예 1. 헤스페레틴의 근육세포로의 분화 촉진 효과 확인**

[0038] **1-1. 헤스페레틴의 근세포(myocytes) 분화 유도효과**

[0039] 전근모세포(myoblast)인 C2C12 세포주(ATCC,CRL-1772, myoblast)를 저농도 mitogen 배지 내에서, 헤스페레틴을 포함하는 경우와 불포함하는 경우로 나누어 근세포(myocytes)로 분화를 유도함으로써, 헤스페레틴이 근세포 분화 유도에 미치는 영향을 파악하고자 하였다.

[0040] 구체적으로, 10%의 FBS를 첨가한 완전배지 내에서, C2C12세포를 48시간 동안 confluence 세포성장시켰다. 그 후, 세포 배지를 2%의 HS를 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 성장배지로 교체하였다. 상기 세포를 두 그룹으로 나누어 (i) 첫번째 그룹에는 헤스페레틴을 처리하지 않았고(-Hsp), (ii) 두번째 그룹에는 헤스페레틴 100(mM)을 처리하였다(+Hsp). 상기 DMEM 배지는 격일로 갈아주며 세포 분화를 유도하였다. 상기 두 그룹을 1일, 2일, 4일째에 0.1% Triton X-100을 함유하는 2% 파라포름알데히드로 세포침투시켜 고정하고, 1차항체인 항-MHC 항체(Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA)와 함께 배양한 후, Alexa Fluor 488-융합 2차 항체(Invitrogen)와 함께 배양하였다.

[0041] 형광-양성 세포를 형광현미경(Zeiss Axiovert 200 형광 현미경, Carl Zeiss, 독일)으로 관찰하고, 형광-양성 세포수를 계수하였다. 그 결과를 도 2 내지 도 4에 나타내었다.

[0042] 도 2는 1일, 2일, 4일째의 헤스페레틴 처리 C2C12세포(-Hsp) 그룹과 헤스페레틴을 처리하지 않은 C2C12세포

(+Hsp) 그룹을, 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 그림이다. 상기 도에서 눈금은 50㎜를 나타낸다.

[0043] 도 2에 의하면, 미오게닌의 분화시 원통형 근세포(myocytes)로의 형태학적(Morphological) 변화는 시간 의존적으로 증가함을 알 수 있다.

[0044] 도 3은 2일, 4일째의 헤스페레틴 처리 C2C12세포(+Hsp) 그룹과 헤스페레틴을 처리하지 않은 C2C12세포(-Hsp) 그룹에 대하여, 형광 현미경 내의 field 당 형광-양성 세포를 계수한 결과를 나타낸 도이다. 10 field로부터의 평균 및 표준 오차를 계산하였다.

[0045] 상기 도 2 및 도 3의 결과로부터, 헤스페레틴에 의해 원통형 근세포(myocytes)의 수가 급증하였으며, MHC(myosin heavy chain) 발현이 강화되었음을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 전근모세포(myoblast)가 근세포(myocytes)로 분화하는 것을 헤스페레틴이 유도하였음을 나타내는 것이다.

[0046] 한편, 도 4는 헤스페레틴을 처리한 C2C12세포와 헤스페레틴을 처리하지 않은 C2C12세포를 4일간 배양한 후, 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 그림이다. 헤스페레틴을 처리한 C2C12세포(+Hsp)에서 다핵성 근관(myotubes)이 관찰되었다.

[0047] 전근모세포(myoblast)는 융합되어 다핵성 근관(myotubes)을 형성하고 이어 성숙한 근섬유로 재생되는 것으로 알려져 있으므로, 이와 같은 결과로 부터 근섬유 재생 가능성을 예견할 수 있다.

[0048] **1-2. 헤스페레틴의 미오게닌 발현 촉진 효과**

[0049] 1차 항체를 항-MHC 항체 대신 항-미오게닌 항체(Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA)를 사용한 것을 제외하고, 상기 1-1.과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0050] 그 결과를 도 5와 도 6에 나타내었다.

[0051] 도 5는 1일, 2일, 4일째의 헤스페레틴 처리 C2C12세포(+Hsp) 그룹과 헤스페레틴을 처리하지 않은 C2C12세포(-Hsp) 그룹을 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 그림이다.

[0052] 도 5에서 보는 바와 같이 미오게닌의 발현 역시, 헤스페레틴을 처리한 그룹에서 급격히 증가함을 알 수 있다.

[0053] 도 6은 1일, 2일, 4일째의 헤스페레틴 처리 C2C12세포(+Hsp) 그룹과 헤스페레틴을 처리하지 않은 C2C12세포(-Hsp) 그룹에 대하여 형광 현미경 내의 field 당 형광-양성 세포를 계수한 결과이다. 10 field로부터의 평균 및 표준 오차를 계산하였다.

[0054] 이를 통해 헤스페레틴이 근육조절인자의 발현을 촉진함으로써, 근육세포 유전자의 발현과 최종 분화를 촉진함을 확인하였다.

[0055] 따라서, 헤스페레틴은 근육세포 분화를 촉진하는 작용을 나타냄을 알 수 있다.

[0056] **실시예 2. 헤스페레틴에 의한 미오게닌과 MCK 유전자 발현 촉진에 의한 근육세포 분화 효과 확인**

[0057] **2-1. 분화된 C2C12 세포 추출물의 immunoblot 분석**

[0058] 상기 실시예 1에서, 헤스페레틴에 의해 미오게닌 발현이 촉진됨을 확인한 것에 이어, 미오게닌 유전자 발현에 있어서 헤스페레틴의 조절 메커니즘에 대해 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

[0059] 헤스페레틴을 농도별(0, 20, 50, 100uM)로 처리한 배지에서, C2C12 세포를 2일 동안 실시예 1-1.에서와 동일한 방법으로 분화시켰다. 전체 세포 추출물(Whole cell extract)은 세포를 용해용액 (0.5 % Triton X-100, 20 mM Tris, pH 7.5, 2 mM MgCl2, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 50 mM beta-glycerophosphate, 25 mM NaF, 1 mM Na3VO4, 100 mg/ml PMSF, 2 mg/ml protease inhibitors)에서 용해시킨 다음, 원심분리하여 상층액을 취하여 얻었다. 7.5% 아크릴아마이드 젤을 사용하여 단백질을 전기영동 분리하였다. 단백질이 분리된 아크릴아마이드 젤로부터 전류를 통하여 단백질을 immobilon-P 막(Millipore Inc., Invitrogen)에 transfer시킨 후, 미오게닌, MyoD, MEF2C, 및 베타-액틴에 대한 항체(Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA)와 함께 결합시키고, 곧이어 2차 항체(HRP-conjugated anti-Rabbit IgG 또는 anti-mouse IgG, Zymed, South San Francisco, USA)와 함께 반응시켰다. 그 후, luminal 시약(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 development한 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7은 immunoblot 분석 결과로, 헤스페레틴은 2일째에 용량-의존적으로 미오게닌의 발현을 증가시킨 반면, Myo D와 MEF2C의 발현수준은 헤스페레틴의 농도에 따라 변하지 않음을 알 수 있다.

[0060] **2-2. 분화된 C2C12 세포 추출물의 real-time PCR분석**

[0061] 상기 2-1.에서와 동일한 방법으로 분화한 세포로부터 TRIzol시약(Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 수확하여, 역전사시킨 후, real-time PCR분석을 다음과 같이 수행하였다.

[0062] 먼저 cDNA 합성을 위해 상기 RNA를 reverse transcriptase (Invitrogen) 효소로 역전사시켰다. 그 후 ABI-Prism 7000 서열 디텍터(Applied Biosystems, San Mateo, CA)를 사용하여 Real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR은 다음의 특정 프라이머로 수행하였다:

[0063] 베타-액틴

[0064] Forward primer: 5'-agagggaaatcgtgcgtgac-3' (서열번호 1)

[0065] Reverse primer: 5'-caatagtgatgacctggccgt-3' (서열번호 2)

[0066] MCK

[0067] Forward primer: 5'-cacctccacagcacagacag-3' (서열번호 3)

[0068] Reverse primer: 5'-accttggccatgtgattgtt-3' (서열번호 4)

[0069] 미오게닌

[0070] Forward primer: 5'-caaccaggaggagcgagacctccg-3' (서열번호 5)

[0071] Reverse primer: 5'-aggcgctgtgggatatgcattcact-3' (서열번호 6)

[0072] MyoD

[0073] Forward primer: 5'-tgggatatggagcttctatcgc-3' (서열번호 7)

[0074] Reverse primer: 5'-ggtgagtcgaaacacggatcat-3' (서열번호 8)

[0075] 각각의 상대적인 mRNA 발현량 값은 베타-액틴 값으로 표준화(normalization)한 후, Ct(threshold cycle)값으로 결정하였다. 그 결과를 도 8 내지 10에 나타내었다. 데이터는 3회의 독립적인 실험을 수행한 후, 결과를 평균±SEM로 나타내었다.(Ns:not significant, *: $p<0.05$, ***: $P<0.0005$)

[0076] 상기 도 8 내지 10에 의하면, 유전자 전사의 수준에서, 헤스페레틴이 미오게닌의 발현을 유도하나, MyoD 유전자 전사에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있다. 또한, 헤스페레틴은 근육-특이적 마커인 MCK의 발현을 증가시킴을 알 수 있다.

[0077] 이러한 결과는 헤스페레틴이 선택적으로 미오게닌과 MCK의 유전자 전사를 조절할 수 있음을 의미한다.

[0078] **실시예 3. 헤스페레틴의 미오게닌과 MCK의 유전자 전사를 유도하는 MyoD의 활성 강화작용 확인**

[0079] 상기 실시예 2를 통해, 헤스페레틴이 미오게닌과 MCK의 mRNA 수준을 증가시킴을 확인하였으며, 유전자 전사에서 헤스페레틴의 조절기능에 대한 실험을 수행하였다.

[0080] **3-1. 헤스페레틴의 미오게닌 프로모터와 MCK 프로모터 활성유도 효과**

[0081] 헤스페레틴이 직접 미오게닌과 MCK의 유전자 전사를 조절하는지 조사하기 위해, C2C12 세포를 완전 배지(DMEM)에서, 배양 접시의 바닥의 50-60%를 세포가 채울 때까지(50-60% confluence) 세포성장시켰다. 그 후, 두 그룹으로 나누어 (i) 첫번째 그룹에는 C2C12세포에 미오게닌 프로모터에 연결된 luciferase reporter 유전자(pMyogenin-luc; Dr. Andrew B. Lassar(Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA)로 부터 입수)를 칼슘포스페이트형질주입방법(Jung H, Lee 등, Augmentation of PPARgamma-TAZ interaction contributes to the anti-adipogenic activity of KR62980. Biochem Pharmacol 2009 참조)으로 일시적으로 형질주입(transfection)시키고, (ii) 두번째 그룹에는 MCK 프로모터에 연결된 luciferase reporter 유전자(pMCK-luc; Dr. Andrew B. Lassar(Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA)로 부터 입수)를 상기 (i)과 동일한 방법으로 일시적으로 형질주입하였다. 각각의 군에는 pCMVβ(Invitrogen)을 함께 형질주입하였다. 24시간 후, 상기 두 그룹에 저농도 mitogen 배지를 주입하고, 각각 헤스페레틴(0, 20, 100uM)을 주입하여 24시간 동안 배양하였다.

[0082] 각각의 그룹에 대해 luciferase 활성을 Luciferase Assay Kit(Promega, Madison, WI)를 이용하여, 제조사의 매뉴얼에 따라 측정하였다.

[0083] RLU(Relative luciferase unit)은 형질주입 효율을 위해 내부 컨트롤로 공-형질주입된 pCMVβ의 베타-갈락토시다아제 활성으로 표준화하여 결정하였다. fold induction은 콘트롤 활성을 1로 하여 계산하였으며, 데이타는 3회의 독립적인 실험의 평균 ±SEM로 나타내었다.(*: p<0.05, **: P<0.005, ***: P<0.0005)

[0084] 그 결과를 도 11과 도12에 나타내었다.

[0085] 도 11은 헤스페레틴의 처리 농도에 따른, 미오게닌 프로모터에 연결된 luciferase reporter 유전자(pMyogenin-luc)의 활성을 나타낸 그래프이며, 도 12는 헤스페레틴의 처리 농도에 따른, MCK 프로모터에 연결된 luciferase reporter 유전자(pMCK-luc)의 활성을 나타낸 그래프이다.

[0086] 도 11 및 도 12에 의하면, 헤스페레틴은 미오게닌과 MCK 프로모터 모두의 활성을 유도하였다. 따라서, 헤스페레틴은 프로모터 활성화를 통해 미오게닌과 MCK의 유전자 전사를 증가시킬 수 있을 것으로 보인다.

[0087] **3-2. 헤스페레틴의 MyoD 활성화 확인**

[0088] 미오게닌의 프로모터와 MCK의 프로모터는 모두 미오게닌의 bHLH 단백질 결합 부위를 가지므로, 미오게닌의 bHLH(basic helix loop helix) 단백질인, MyoD가 헤스페레틴에 의해 활성화 되는지 여부를 실험하였다.

[0089] 실험에 사용한 세포주는 10% FBS 함유 DMEM 배지에 유지한 HEK 293T(ATCC, CRL-1573)이었다.

[0090] **(1) pMyogenin-luc reporter 유전자를 이용한 실험**

[0091] HEK 293T 세포주에 컨트롤 벡터(mock) 또는 MyoD 발현벡터(Dr. Andrew B. Lassar)를 pMyogenin-luc reporter 유전자와 함께 칼슘포스페이트형질주입방법으로 세포내로 도입하고 단백질을 발현시켰다. 유전자 도입 후 24시간에 상기 세포에 헤스페레틴(0, 20, 100uM)을 첨가하여 24시간 더 배양하였다.

[0092] luciferase 활성측정과 RLU 결정은 상기 3-1.과 동일한 방법으로 실시하여 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0093] 도 13은 헤스페레틴의 처리 농도에 따른, 미오게닌 프로모터에 연결된 luciferase reporter 유전자(p Myogenin-luc)의 활성을 나타낸 그래프이다.

[0094] **(2) pMCK-luc reporter 유전자를 이용한 실험**

[0095] 293T 세포주에 컨트롤 벡터(mock) 또는 MyoD 발현벡터를 pMCK-luc reporter 유전자와 함께 칼슘포스페이트형질주입방법으로 세포내로 도입하고 단백질을 발현시켰다. 유전자 도입 후 24시간에 상기 세포에 헤스페레틴(0, 20, 100uM)을 첨가하여 24시간 더 배양하였다.

[0096] luciferase 활성측정과 RLU 결정은 상기 3-1.과 동일한 방법으로 실시하여 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0097] 도 14는 헤스페레틴의 처리 농도에 따른, MCK 프로모터에 연결된 luciferase reporter 유전자(pMCK-luc)의 활성을 나타낸 그래프이다.

[0098] 상기 도 13 및 도 14에서, fold induction은 콘트롤 활성을 1로 하여 계산하였으며, 데이타는 3회의 독립적인 실험의 평균 ±SEM로 나타내었다.(*: p<0.05, **: P<0.005, ***: P<0.0005)

[0099] 그 결과, 293T 세포에서 MyoD의 외적(Ectopic) 발현은 미오게닌 프로모터의 활성과 MCK 프로모터의 활성을 각각 7배, 4배 증가시켰다.

[0100] 상기와 같이, 헤스페레틴은 MyoD 유도 유전자 프로모터 활성을 추가로 증가시켰으나, MyoD 발현 백터를 형질전환 시키지 않은 그룹에서는 상기와 같은 효과를 나타내지 않았다.

[0101] 이러한 결과로부터, 헤스페레틴은 MyoD의 전사적 활성을 강화하여, 그 목표 유전자의 전사를 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0102] **실시예 4. 헤스페레틴의 MyoD에 대한 선택적 활성 조절 효과 확인**

[0103] 미오게닌과 MCK의 프로모터 활성에 있어서, 헤스페레틴이 미오게닌과 다른 MRFs의 활성에 미치는 효과에 대한 실험을 수행하였다.

[0104] 세포주는 3-2.의 세포주와 동일한 세포주를 사용하였다.

[0105] **4-1. 헤스페레틴이 pMyogenin-luc의 활성에 미치는 영향**

[0106] 293T 세포주에 컨트롤 벡터(mock) 또는 미오게닌 발현벡터(Dr. Andrew B. Lassar)를 pMyogenin-luc reporter

유전자와 함께 칼슘포스페이트형질주입방법으로 세포내로 도입하고 단백질을 발현시켰다. 유전자 도입 후 24시간에 상기 세포에 헤스페레틴(0, 20, 100uM)을 첨가하여 24시간 더 배양하였다.

[0107] luciferase 활성측정과 RLU 결정은 상기 3-1.과 동일한 방법으로 실시하여 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[0108] 도 15는 미오게닌에 의한 pMyogenin-luc의 활성화에 대한 헤스페레틴의 농도별 처리에 따른 효과를 나타낸 그래프이다.

[0109] 상기 도 15에서, fold induction은 컨트롤 활성(mock)을 1로 하여 계산하였으며, 데이타는 3회의 독립적인 실험의 평균±SEM로 나타내었다.(ns: not sigmificant, **: P<0.005)

[0110] 도 15에서 보는 바와 같이, 강화된 미오게닌 발현은 미오게닌 그 자신의 프로모터 활성을 활성화시켰으나, 헤스페레틴은 미오게닌의 전사적 활성을 추가로 증가시키지는 않았다.

[0111] **4-2. 헤스페레틴이 미오게닌과 다른 MRFs의 활성에 미치는 효과**

[0112] 293T 세포주에 컨트롤 벡터(mock), MyoD, MEF2C, 또는 MyoD+MEF2C 발현벡터를 pMyogenin-luc reporter 유전자와 함께 칼슘포스페이트형질주입방법으로 세포내로 도입하고 단백질을 발현시켰다. 유전자 도입 후 24시간에 상기 세포에 헤스페레틴(0, 20, 100uM)을 첨가하여 24시간 더 배양하였다.

[0113] luciferase 활성측정과 RLU 결정은 상기 3-1.과 동일한 방법으로 실시하여 그 결과를 도 16에 나타내었다.

[0114] 상기 도 16에서, fold induction은 콘트롤 활성(mock)을 1로 하여 계산하였으며, 데이타는 3회의 독립적인 실험의 평균±SEM로 나타내었다.(*: p<0.05, **: P<0.005)

[0115] 도 16에서 보는 바와 같이, MyoD에 의한 미오게닌 프로모터 활성은 헤스페레틴 처리에 의하여 증가하였다. 또한, MyoD 활성을 증가시키는 MEF2C 공동 발현에 의해 MyoD에 의한 미오게닌 프로모터 활성은 증가하였다. 그러나, 헤스페레틴은 이러한 MEF2C의 MyoD 활성 촉진에는 의미있는 영향을 미치지 않았다.

[0116] **4-3. 헤스페레틴의 효과에 MEF2C와 MyoD의 상호작용이 영향을 미치는지 여부**

[0117] 293T 세포주에 Myc-표지 MyoD 발현벡터(Dr. Andrew B. Lassar) 및 MEF2C 발현벡터를 4-2.과 동일한 방법으로 도입하여 도17에 기재된 바와 같은 조건으로, 단백질을 발현시키고, 헤스페레틴(100uM)을 처리(+ 표시군)하고 24시간 동안 배양한 후 수확하였다. 추출한 총 세포 추출물(WCE; whole cell extract)과 항-Myc 항체를 반응시켜 면역결합 복합체를 침전시켰다 (immunoprecipitatio, IP). 분리한 면역결합복합체 및 총 세포 추출물을 SDS-PAGE 방법으로 분리한 다음, 항-Myc 항체, 항-MEF2C 항체를 사용하여 면역학적 분석(IB; immunoblot assay)을 수행하였다. 그 결과를 도 17에 나타내었다.

[0118] 도 17에 의하면, MEF2C와 MyoD의 직접 상호작용은 헤스페레틴에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 헤스페레틴에 의한 특정 전사 조절은 MEF2C가 아닌, MyoD의 활성화를 통해서 나타냄을 알 수 있다.

[0119] **실시예 5. 헤스페레틴의 MyoD의 핵내 발현 촉진 및 DNA 결합 활성 촉진작용 확인**

[0120] **5-1. 헤스페레틴이 C2C12 MyoD의 nuclear localization에 미치는 효과**

[0121] 헤스페레틴의 MyoD 활성화에 기반을 둔 조절 메커니즘을 더 상세히 밝히기 위해, 헤스페레틴의 존재 하에서 MyoD의 세포내 위치분포(subcellular localization)를 평가하였다.

[0122] C2C12 세포를 confluence 세포성장 시킨 후, 저농도 mitogen 배지에서 헤스페레틴을 농도별(0, 20, 50, 100uM)로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 상기 세포로부터 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents(Pierce)로 핵 추출물(NE)을 수득하여, 실시예 2-1.의 방법으로 MyoD에 대한 immunoblot 분석을 수행하였다. 다만, OCT 1 항체(Santa Cruz Biotech Inc.)를 핵 단백질 loading control 로 사용하였다.

[0123] 도 18에 그 결과를 나타내었다.

[0124] 도 18은 헤스페레틴을 투여한 세포의 핵추출물을 immunoblot 한 결과이다. 도 18에 의하면, 헤스페레틴은 C2C12 세포 내 MyoD의 nuclear localization을 용량-의존적으로 강화시켰으나, 핵 컨트롤 단백질인 OCT1의 핵내 수준(level)에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

[0125] **5-2. MyoD 수준과 DNA와의 관계 확인**

[0126] C2C12 세포를 헤스페레틴이 추가(+), 또는 추가되지 않은(-) 근육분화 배지에서 48시간 배양하였다. 본 실험을

위하여 동위원소를 사용하지 않는 EMSA (electrophoretic gel mobility shift assay)로 상기 5-1.에서 사용한 방법으로, 세포 핵 단백질을 추출하여 biotin으로 표지된 DNA와 반응용액 (10 mM HEPES, pH 7.9, 60 mM NaCl, 10 % glycerol, 0.2 % NP-40, 2 mg/ml BSA, 2 mM Na3VO4, 2 mM DTT)에서 결합시켰다. 실온에서 20분간 반응시킨 다음, native 6 % 아크릴아마이드 젤에서 전기영동하였다. 분리된 단백질을 나일론 membrane으로 transfer하고 MyoD 단백질의 DNA 결합 복합체 확인을 위하여 Horse-radish peroxidase가 표지된 Streptavidin과 반응하고 신호를 필름으로 감지하였다. 헤스페레틴이 처리되지 않은 세포 핵단백질을 사용하여 경쟁적 DNA (competitor) 존재 유무에 따른 DNA-단백질 결합복합체 생성을 확인하였다. 또한 헤스페레틴이 처리된 세포 핵단백질에서의 DNA 결합 활성 증가 여부를 확인하였다.

[0127] 그 결과를 도 19에 나타내었다. MyoD 단백질의 특이적 DNA 결합 복합체 형성이 헤스페레틴 처리에 의하여 증가함을 의미한다.

[0128] **5-3. DNA pull-down 분석**

[0129] 5-2.에서와 같은 조건에서 헤스페레틴 처리에 의한 MyoD 단백질의 DNA 결합활성 증가는 핵으로 이동된 MyoD 단백질의 양적 증가에 의한 결과일 수 있다. 따라서 MyoD 단백질의 직접적인 DNA 결합력 증가에 대한 헤스페레틴의 효과 검증을 위하여 전체 단백질 추출물을 사용하여 DNA pull-down 분석을 수행하였다.

[0130] 세포를 HKMG 용액(10 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 5 mM MgCl2, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 1 mM DTT and protease inhibitor cocktail)로 파괴하여 얻은 총 세포 추출물을 biotinylated 미오게닌 프로모터 DNA를 처리하여 배양한 후, streptavidin 아가로오스 beads를 처리하여 배양하였다.

[0131] 침전물을 HKMG 버퍼로 3회 세척한 후, 실시예 2-1.과 동일한 방법으로 SDS-PAGE 및 MyoD 항체를 사용하여 immunoblot assay하였다. 그 결과를 도 20에 나타내었다. 도 20은 DNA pull-down 분석결과이다.

[0132] 도 20을 참고하면, 헤스페레틴은 MyoD의 특정 프로모터 DNA 결합 친화도를 증가시켰으나, MyoD의 발현수준을 직접 변화시키지는 않았음을 알 수 있다.

[0133] 따라서 헤스페레틴은 MyoD의 핵 localization 과 DNA 결합 활성 모두에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있다.

[0134] **실시예 6. MyoD발현을 통한 헤스페레틴의 pro-myogenic활성**

[0135] 실험에 사용한 세포주는 10% FBS 함유 DMEM 배지에 유지한 C3H10T1/2 중간엽줄기세포(ATCC CCL-226)이었다. 세포 배양 조건에 따라 골세포와 지방세포 등으로 분화할 수 있음이 이미 잘 알려져 있다(Harada S, RodanGA:Controlofosteoblastfunctionandregulationofbonemass.*Nature*2003,423:349-355.; Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ: Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *SciSTKE*2005,2005:pe37. 참조).

[0136] **6-1. MyoD, 미오게닌 및 베타-엑틴의 발현 수준의 면역학적 분석**

[0137] 헤스페레틴의 pro-myogenic 활성이 premyoblast C2C12 세포에 국한되지 않음을 입증하기 위해 하기와 같은 방법으로 실험하였다.

[0138] C3H10T1/2 중간엽줄기세포 세포주에 MyoD 발현 벡터 및 컨트롤 벡터를 도입하였다. 유전자 도입 및 안정적인 발현 세포주 확립을 위하여 retroviral transduction 방법(Jung H et al., 2010, FASEB J 참조)을 사용하였다. 세포주를 확립하고 단백질 발현 여부를 확인하고, 근육세포 분화 배지로 교환하고 동시에 헤스페레틴(20, 50, 100 mM)을 첨가하고 48시간 배양하였다. 실시예 2-1.과 동일한 방법으로 세포 추출물을 분리하여 SDS-PAGE, Immunoblot 분석 방법을 실시하였다.

[0139] 그 결과를 도 21에 나타내었다.

[0140] 그 결과, MyoD가 비-근육세포 형태의 미오게닌 전환에 중요하기 때문에, MyoD의 부재시 헤스페레틴에 의한 미오게닌 발현의 유도는 없었다.

[0141] **6-2. MyoD, 미오게닌 및 MCK의 상대적 발현수준의 real-time PCR 분석**

[0142] 실시예 6-1과 같은 분화 조건에서, 세포를 헤스페레틴과 함께 2일간 배양하고, TRIzol 시약(Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 세포로부터 수득하여, 역전사 반응을 수행하였고 곧이어 real-time PCR 분석을 실시하였다. real-time PCR은 실시예 2-2.과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0143] MyoD, 미오게닌 및 MCK의 상대적 발현 수준을 베타-액틴 수준을 기준으로 표준화하여 비교한 결과를 도 22 내지 도 24에 각각 도시하였다. 각각의 상대적인 mRNA 발현량 값은 베타-액틴 값으로 표준화(normalization)한 후, Ct(threshold cycle)값으로 결정하였다. 그 결과를 도 22 내지 24에 나타내었다. 데이터는 3회의 독립적인 실험을 수행한 후, 결과를 평균±SEM로 나타내었다.(Ns:not significant, *: p<0.05, **: P<0.005)

[0144] 바이러스 transduction에 의한 MyoD의 발현은 미오게닌 발현을 증가시켰다. 또한, MyoD를 발현시킨 경우, 헤스페레틴은 미오게닌과 MCK의 유전자 발현을 용량-의존적으로 증가시켰다.

[0145] 이러한 결과로부터, 헤스페레틴은 중간엽 줄기세포의 근육세포로의 분화에서 MyoD 활성의 조절을 통해 강력한 pro-myogenic 활성을 가짐을 알 수 있다.

[0146] **실시예 7. in vivo에서 헤스페레틴의 근육 재생 효과 확인**

[0147] 헤스페레틴이 in vivo에서 근육세포 분화와 재생에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해 하기와 같이 실험하였다.

[0148] C57BL/6 마우스를 Jackson Laboratories(Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하여 사용하였다. 마우스(n=6)를 약하게 마취시킨 후, TA(tibialis anterior) 근육에 $BaCl_2$(1.2% BaCl2 50ul/마우스)를 근육주사하여 손상시켰다. 두 그룹으로 나누어, 첫번째 그룹의 쥐에게 매일 헤스페레틴을 복강(intraperitoneal) 내로 PBS에 용해시켜 주입하였다(50 mg/kg, i.p.). 두번째 그룹의 쥐에게는 PBS(PHOSPHATE BUFFERED SALINE)를 투여하였다. 5일 동안 상기와 같이 처리한 후, 5일째 두 그룹의 쥐를 CO_2가스로 안락사시켰다. 대조를 위해 TA를 손상시키지 않은 정상 쥐를 준비하였다.

[0149] **7-1. 헤스페레틴의 근육 재생 효과 현미경 관찰**

[0150] TA 근육을 분리한 후, 10um 두께로 동결절단(cryosection)하고, 각 섹션을 hematoxylin과 eosin으로 염색하였다. 현미경으로 섹션을 관찰하였다. 그 결과를 도 25에 나타내었다.

[0151] 도 25는 상기 근육을 현미경으로 관찰한 결과이며, 도면상에 표시된 눈금은 100um를 나타낸다.

[0152] 손상 후 5일째에 myofibers의 재생은 조금 일어나며, 손상된 근육은 명백한 괴사(necrosis)를 나타내었고, 광범위한 면역 세포 침투를 나타내었다. 그러나, 헤스페레틴의 복용에 의해, 중앙 핵 재생 근섬유(centrally nucleated regenerating myofibers)의 유도가 가속화됨을 알 수 있다.

[0153] **7-2. 헤스페레틴의 근육 재생 효과 면역학적 관찰**

[0154] TA 근육으로부터 얻은 총 세포 추출물을, SDS-PAGE 방법으로 분리전기영동 한 후, 미오게닌 항체로 immunoblot 분석법을 실시하였다(실시예 2-1.과 동일한 방법임). 그 결과를 도 26에 나타내었다. 도 26은 이뮤노블롯팅 결과를 나타내며, 헤스페레틴은 근육 손상에 의해 유도되는 근육 분화와 재생 동안 미오게닌의 유도 또한 강화하였음을 알 수 있다.

[0155] 이러한 결과로부터 헤스페레틴의 처리에 의해 생체 내에서 근육 재생 과정에서 미오게닌 발현을 강화하고, 손상-유도된 근육 분화와 재생을 개선시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0156] 따라서, 헤스페레틴은 근육세포 분화 또는 재생 촉진 작용을 나타내며, 근육장애(근육위축증, 근질환, 근육 손상, 근이영양증, 근육감소증, 근신경 전도성 질병, 신경 손상 등)에 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[0157] <제조예 1> 약학조성물

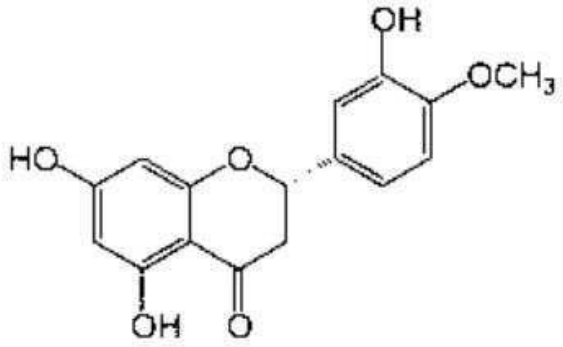
[0158] 헤스페레틴 50mg, 결정성 셀룰로오스 3mg, 락토오스 14.8mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2mg을 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0159] <제조예 2> 식품 조성물

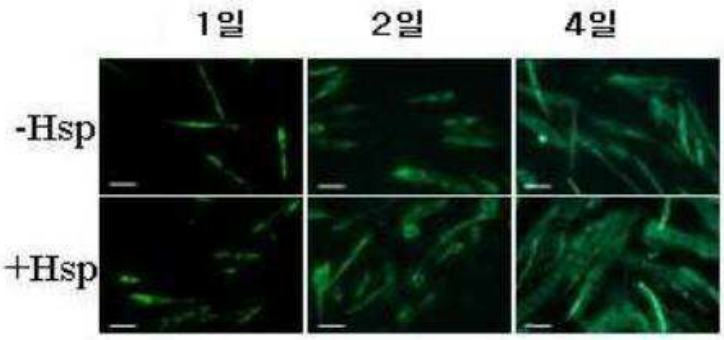
[0160] 헤스페레틴(1중량 %), 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량%), 및 식염(0.5중량%)에 물을 추가하여 잔량을 맞춘 후 균질하게 배합하여 순간 살균을 하여 건강음료를 제조하였다.

도면

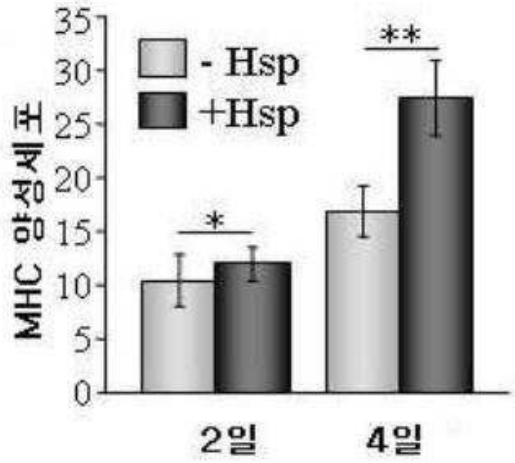
도면1



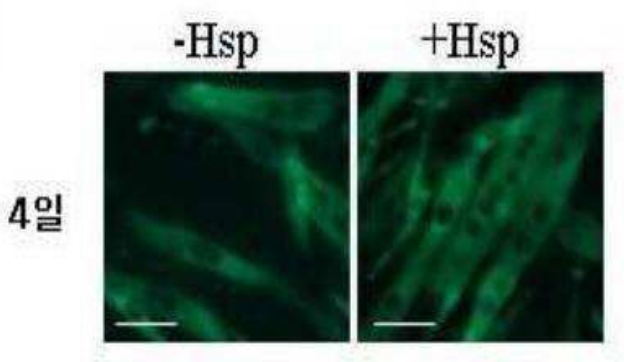
도면2



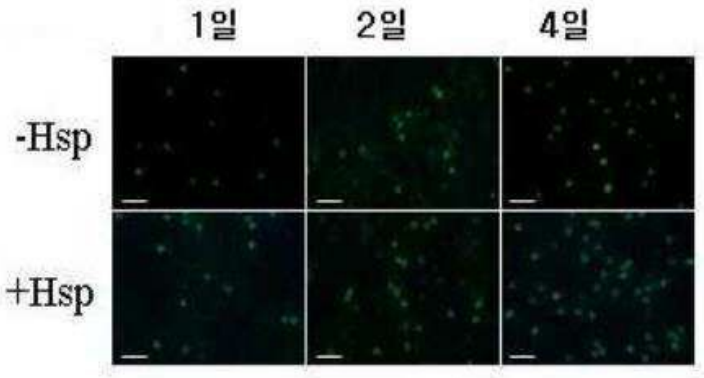
도면3



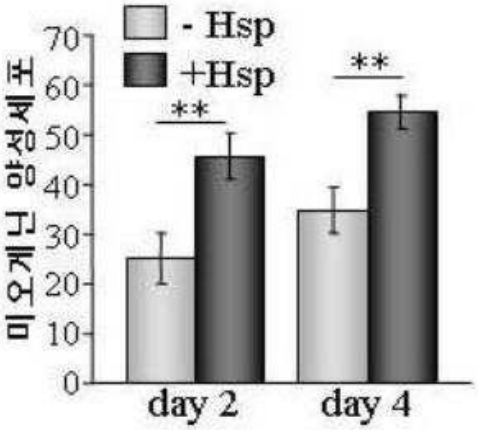
도면4


-Hsp
+Hsp
4일

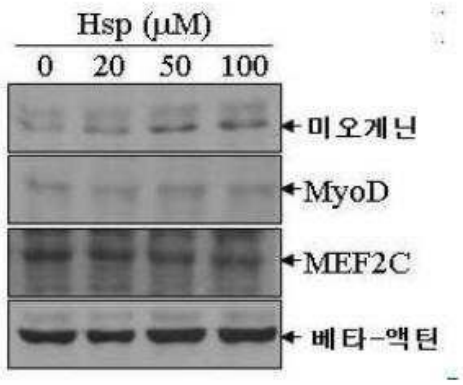
도면5


1일
2일
4일
-Hsp
+Hsp

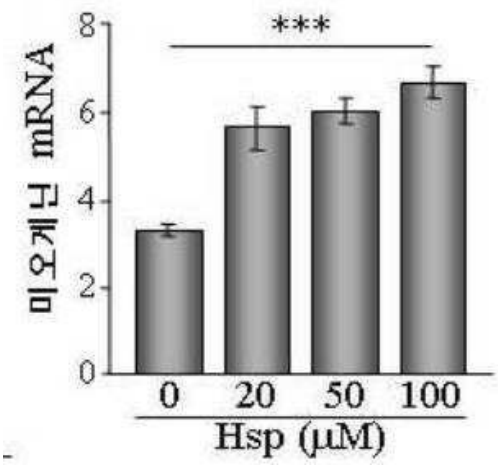
도면6


- Hsp
+Hsp
미오게닌 양성세포
70
60
50
40
30
20
10
0
**
**
day 2
day 4

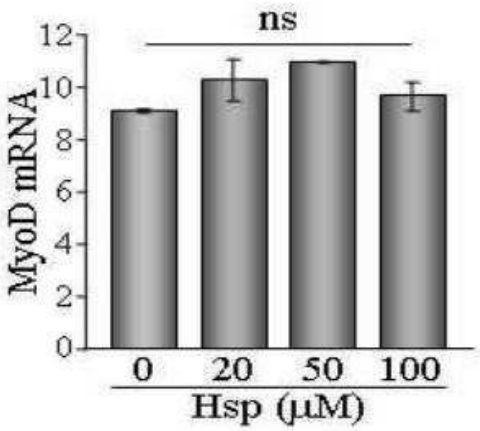
도면7


Hsp (μM)
0
20
50
100
미오게닌
MyoD
MEF2C
베타-액틴

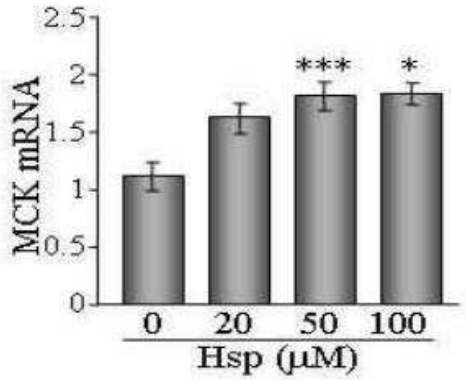
도면8


***
미오게닌 mRNA
0
2
4
6
8
0
20
50
100
Hsp (μM)

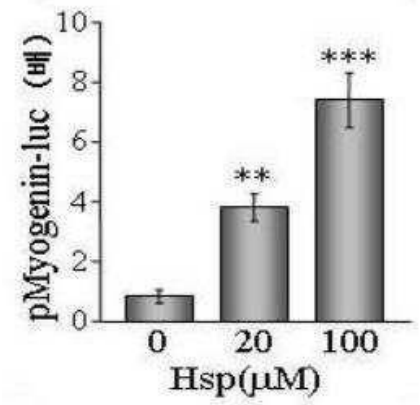
도면9


ns
MyoD mRNA
0
2
4
6
8
10
12
0
20
50
100
Hsp (μM)

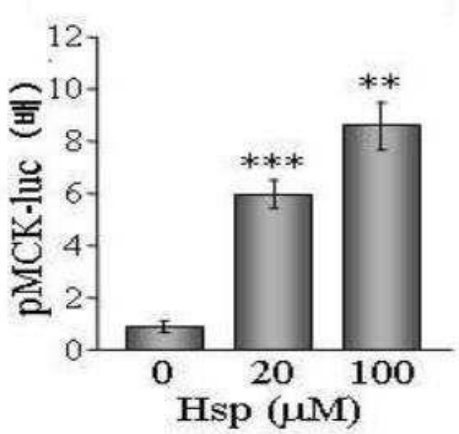
도면10



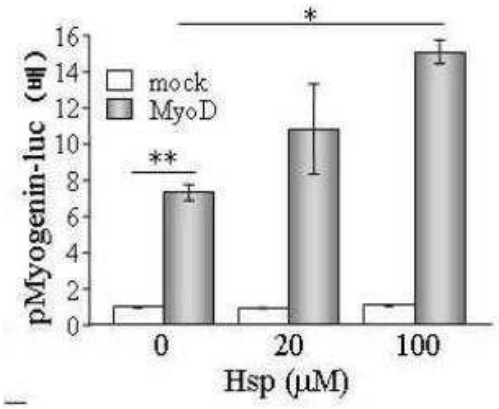
도면11



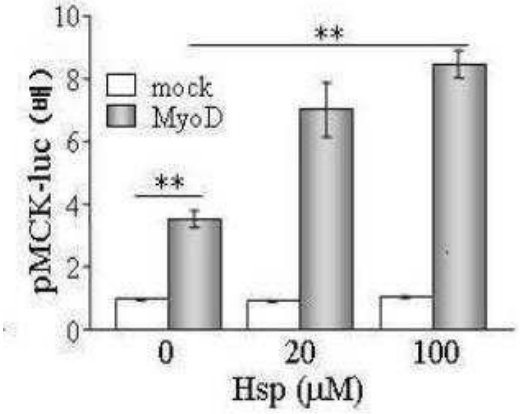
도면12



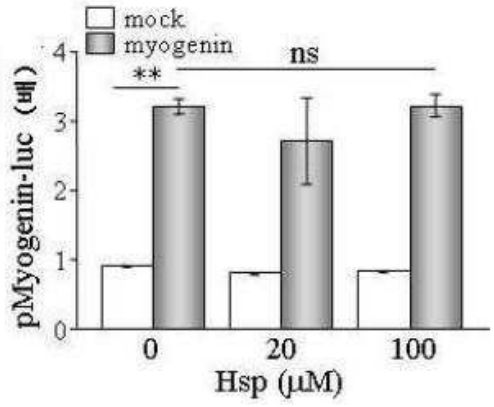
도면13



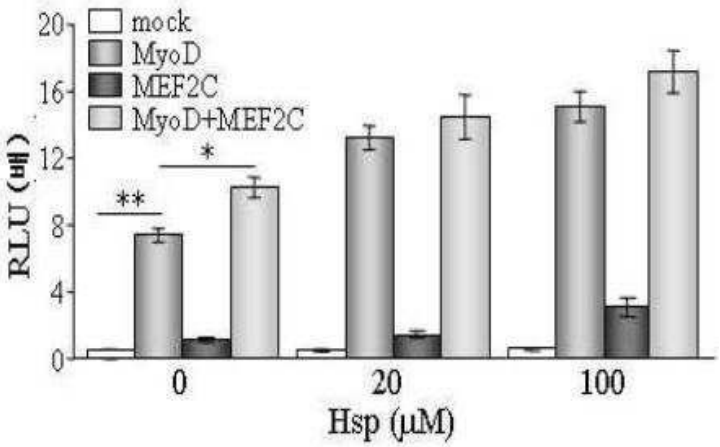
도면14



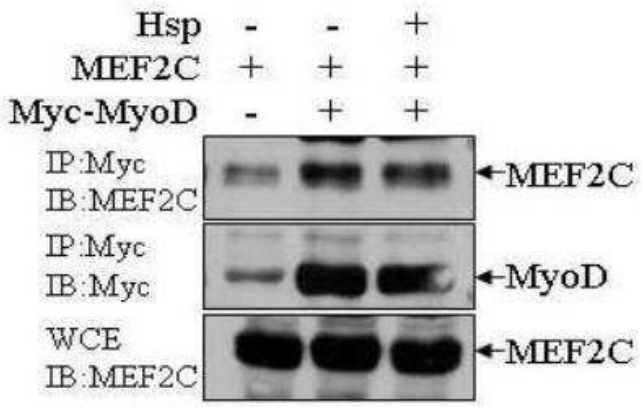
도면15



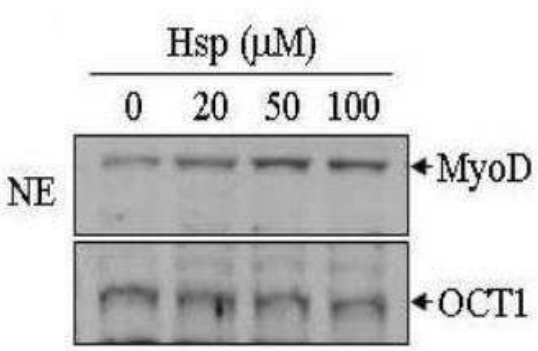
도면16



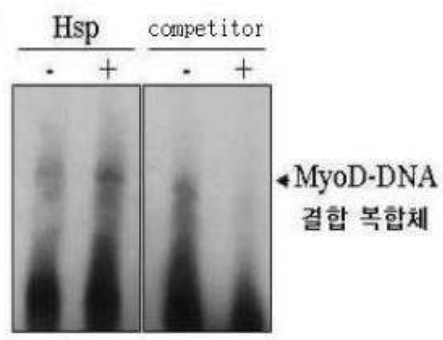
도면17



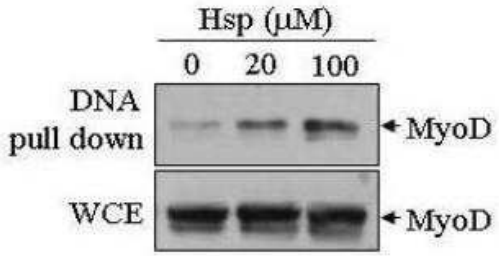
도면18



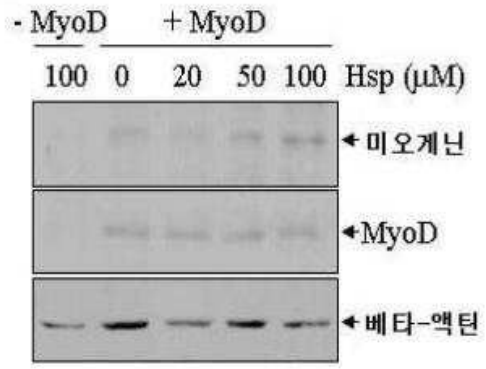
도면19



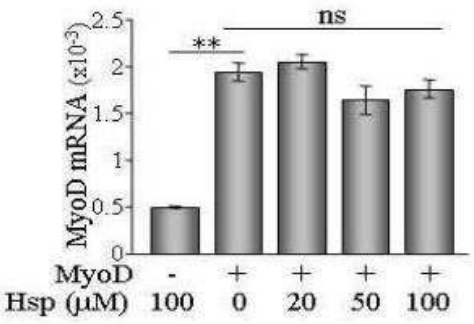
도면20



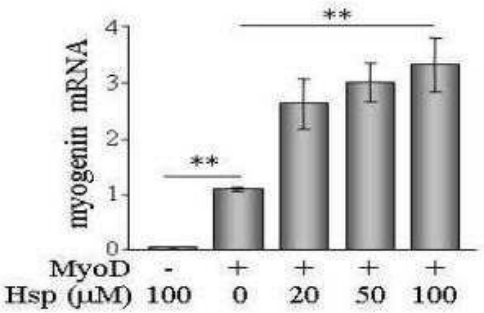
도면21



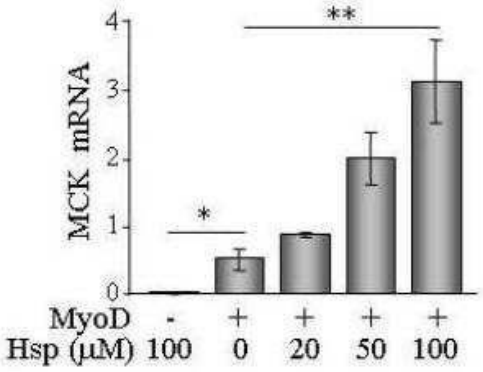
도면22



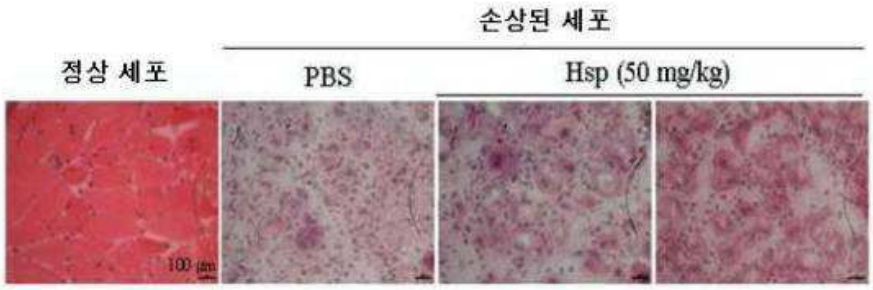
도면23



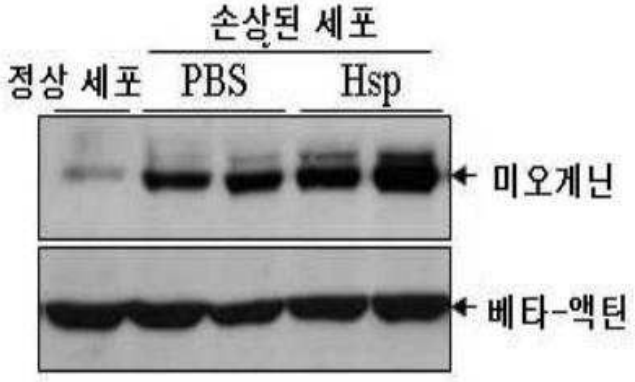
도면24



도면25



도면26



서 열 목 록

<110> Ewha University-Industry Collaboration Foundation

<120> Promoting agent for differentiation or regeneration of muscle cells

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> primer for beta-actin-FWD

<400> 1

agagggaaat cgtgcgtgac 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> primer for beta-actin-REV

<400> 2

caatagtgat gacctggccg t 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> primer for MCK-FWD

<400> 3

cacctccaca gcacagacag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> primer for MCK-REV

<400> 4

accttggcca tgtgattgtt 20

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> primer for myogenin-FWD

<400> 5

caaccaggag gagcgagacc tccg 24

<210> 6

<211

> 25

<212> DNA

<213> primer for myogenin-REV

<400> 6

aggcgctgtg ggatatgcat tcact 25

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> primer for MyoD-FWD

<400> 7

tgggatatgg agcttctatc gc 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> primer for MyoD-REV

<400> 8

ggtgagtcga aacacggatc at 22