(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0025220
(43) 공개일자 2023년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/122 (2006.01) *A23K 20/105* (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) *A61P 11/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/122 (2013.01)
A23K 20/105 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2021-0107483
(22) 출원일자 2021년08월13일
심사청구일자 2021년08월13일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
농업회사법인주식회사힘찬
충청북도 음성군 생극면 음성로 1863-45
(72) 발명자
김군도
부산광역시 남구 분포로 113, 225동 704호(용호동, 엘지메트로시티)
최우석
부산광역시 수영구 광안해변로 386, 104동 2603호(민락동, 롯데캐슬자이언트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

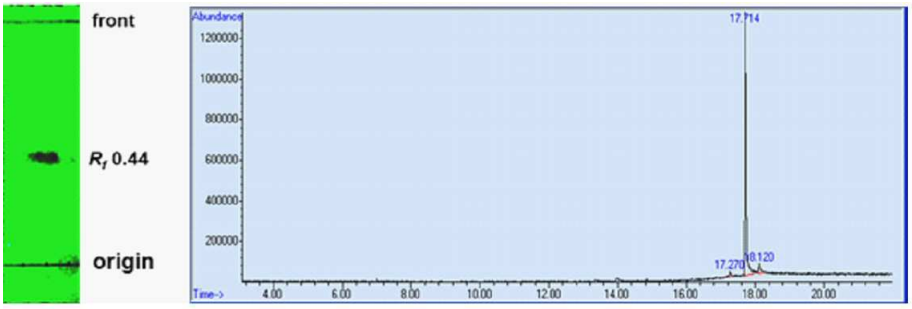
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 점액 과잉 생산에 따른 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 코엔자임Q9의 호흡기 점액 과잉 생산에 대한 억제효과를 입증한 것으로, 더욱 구체적으로는 코엔자임Q9은 세포 항산화능 증진 효과 및 뮤신 단백질 과잉 생성 억제효과를 가지므로, 우수한 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2022.01)
A61P 11/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/314 (2013.01)
(72) 발명자
강민재
부산시 남구 석포로 26번가길 4, 한울시너스 103동 503호

신평균
경상북도 김천시 용전로 47, 109동 1403호(율곡동, 사랑으로부영1단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545022351
과제번호	119077022HD020
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농축산물안전유통소비기술개발사업
연구과제명	흰개미버섯(흑계종)의 기능성 효능 평가
기 여 율	1/1
과제수행기관명	㈜ 힘찬
연구기간	2019.06.20 ~ 2021.06.19

명 세 서

청구범위

청구항 1

코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 호흡기 질환은 호흡기 점액 과잉으로 인해 발생하는 것인, 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 호흡기 점액 과잉은 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의한 것인, 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 호흡기 질환은 낭포성 섬유증, 기관지염, 기관지확장증 및 만성 폐쇄성 폐질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 MUC5AC 또는 MUC5B의 생성을 억제하는 것인, 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 FOXA2를 발현을 증가시키는 것인, 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 EGFR 경로의 비활성화를 통하여 점액 과분비에 따른 기도 폐쇄를 억제하는 것인, 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 STAT6 경로의 비활성화를 통하여 점액 과분비에 따른 기도 폐쇄를 억제하는 것인, 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 NRF-2, γ-GCS 또는 NQO-1의 발현량을 감소시키는 것인, 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 개선용 사료조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 점액 과잉 생산에 따른 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 점액 과다 생성은 낭포성 섬유증, 기관지염, 기관지확장증 그리고 만성 폐쇄성 폐질환 등의 만성 호흡기 질환에서 나타나는 대표적인 증상으로서 호흡기 폐색의 주된 원인으로 알려져 있다. 만성 폐 질환의 호흡기 내 점액 축적은 다양한 병원성 미생물의 증식 환경을 조성하여 만성 염증을 유발, 점액 생성을 촉진하는 지속적 악순환의 원인이 된다. 녹농균은 이러한 호흡기 폐쇄성 질환에서 분리되는 주요 병원성 세균으로 다제성 항생제 내성과 다양한 독성물질 생산을 동반하여 치료 효율을 저하시키는 것으로 보고되었다. 피오사이아닌(*Pyocyanin*)은 녹농균에서 유래한 산화-환원 반응을 촉진하는 독소로서 숙주 세포 내에서 활성산소의 대량 생산을 유발하여 다양한 병리 기전을 야기한다. 특히 호흡기 상피조직에서 배상세포의 과다형성과 화생을 촉진하여 점액 축적을 유발하는 원인 물질로 보고되었다. 기존의 다양한 연구들은 N-아세틸시스테인과 글루타치온과 같은 항산화제들이 녹농균과 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의해 유발된 점액 과다 생성을 억제하는 점액 작용제가 될 수 있음을 보고하였다. 이에 따라 항산화능을 가지는 생리활성 물질들이 잠재적인 점액 작용제로서 제시되었다.

[0003] 항산화제의 점액 생성 억제 효과에도 불구하고, 과도한 점액 축적과 미생물 감염을 동반하는 호흡기에서는 이러한 점액 작용제의 점액 용해 및 객담 제거 효과가 제한적이다. 특히, 녹농균의 감염이 동반된 만성 호흡기 질환의 경우, 피오사이아닌(*Pyocyanin*)이 지속적인 산화 스트레스를 유발하여 항산화제의 효과를 약화시킨다. 더불어, 세포내 해독 효소인 NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1효소)의 활성이 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의해 억제되어, 세포 내에서 독성을 나타낼 수 있는 퀴논을 하이드로 퀴논으로 환원하는 기전이 저하되어 세포독성을 높인다. 이는 폴리페놀과 플라보노이드 계열의 항산화 제재가 활성산소를 환원시키는 과정에서 생성하는 퀴논을 환원하지 못하게 되어 녹농균 감염을 동반한 호흡기 질환에서 오히려 세포독성을 높이므로 잠재적인 약재의 개발 및 선별이 상당히 제한적이다. 따라서, 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의한 이차적인 세포독성을 나타내지 않는 항산화제에 대한 연구가 요구된다.

[0004] 한편, 코엔자임Q9은 지용성 생리활성 물질로서, 세포의 미토콘드리아에 주로 위치하여 전자전달계를 구성하고 세포 호흡을 통해 ATP 합성을 유도한다. 특히 코엔자임Q10의 경우, 인간의 세포 내에 가장 일반적인 형태의 코엔자임으로서 에너지 합성과 더불어 항산화능을 통해 세포 내 산화-환원 반응의 항상성을 유지하고, 과도한 산화스트레스의 생성을 제어하는 것으로 보고되었다. 이러한 항산화능을 바탕으로 코엔자임Q10은 다양한 질병을 예방할 수 있음이 보고되었다. 본 발명에 이용된 코엔자임Q9은 코엔자임Q10과 달리 생리활성 기전이 잘 알려져 있지 않으며, 대체 약물로서 역할 또한 활발히 연구되지 않았다.

[0005] 흑피계종(*Oudemansiella raphanipes*)에서 추출된 코엔자임Q9은 기존의 점액 활성제의 보조 제재로서 만성 호흡기 질환에서 산화 스트레스를 조절을 도와 점액 생합성 항상성을 복구하며, 녹농균 감염이 동반된 호흡기 질환에서는 추가적인 세포독성 없이 점액 과다 생성을 억제할 수 있다.

[0006] 본 발명에서는 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 점액 과잉 생산에 따른 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 코엔자임Q9의 뛰어난 세포 항산화능 증진 효과 및 뮤신 단백질 과잉 생성 억제효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

[0007] KR 20150050798 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 점액 과잉 생산에 따른 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것으로, 본 발명의 코엔자임Q9은 세포 항산화능 증진 효과 및 뮤신 단백질 과잉 생성 억제효과를 나타내므로, 이는 호흡기 점액 과잉 생산에 따른 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "호흡기 질환"은 호흡기 점액 과잉으로 인해 발생하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "호흡기 점액 과잉"은 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의한 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "호흡기 질환"은 낭포성 섬유증, 기관지염, 기관지확장증 및 만성 폐쇄성 폐질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "약학적 조성물"은 MUC5AC 또는 MUC5B의 생성을 억제하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "약학적 조성물"은 FOXA2를 발현을 증가시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "약학적 조성물"은 EGFR 경로의 비활성화를 통하여 점액 과분비에 따른 기도 폐쇄를 억제하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "약학적 조성물"은 STAT6 경로의 비활성화를 통하여 점액 과분비에 따른 기도 폐쇄를 억제하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, "약학적 조성물"은 NRF-2, γ-GCS 또는 NQO-1의 발현량을 감소시키는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 또한, 본 발명은 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 점액 과잉 생산에 따른 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물로, 본 발명의 조성물은 세포 항산화능 증진 효과 및 뮤신 단백질 과잉 생성 억제효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 분리된 물질의 순수도를 확인하기 위하여 NP-TL와 GC/M로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2a는 코엔자임Q9의 NHBE 세포에서의 세포 독성효과를 나타낸 도이다.

도 2b는 코엔자임Q9의 피오사이아닌(*pyocyanin*, PCN) 처리에 의한 세포 독성효과에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 3은 ALI 방식으로 배양된 NHBE 세포에서 코엔자임Q9 및 피오사이아닌(*pyocyanin*, PCN)이 MUC5AC, MUC5B, FOXA2 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 4는 액내 배양법으로 배양된 NHBE 세포에서 코엔자임Q9 및 피오사이아닌(*pyocyanin*, PCN)이 MUC5AC, MUC5B, FOXA2 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 5는 코엔자임Q9이 피오사이아닌(*pyocyanin*, PCN)에 의해 활성화된 EGFR과 STAT6 신호전달 경로에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 6은 코엔자임Q9이 피오사이아닌(*pyocyanin*, PCN)에 의해 자극된 NHBE 세포에서의 항산화 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

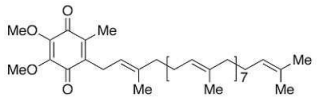
[0024] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0025] 일 측면에서, 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질

[0028] 환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0029] 본 발명의 코엔자임Q9은 Ubiquinone-9과 동의어로 $C_{54}H_{82}O_4$를 화학식으로 하며  의 화학구조를 갖는다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0033] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁

제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0035] 상기 약학적 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0036] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0037] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0038] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 호흡기 질환은 호흡기 점액 과잉으로 인해 발생하는 것일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 호흡기 점액 과잉은 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의한 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 “피오사이아닌(*Pyocyanin*)”은 녹농균이 생산하는 청록색의 항균성 색소로 인간의 폐나 기도 표피세포에서 뮤신의 과생산을 유발하는 독성 물질로 알려져있다.

[0042] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 호흡기 질환은 낭포성 섬유증, 기관지염, 기관지확장증 및 만성 폐쇄성 폐질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 “만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)”은 유해한 입자나 가스 노출에 의해 유발된 기도와 폐포의 이상으로 인해 지속적인 기류제한과 호흡기계 증상이 발생한 질병을 뜻하며, 흡연과 유해물질 노출에 의해 폐손상과 폐 및 전신의 염증이 발생하고, 폐가 충분히 성장하지 못했거나 폐기능이 급격히 나빠짐으로써 만성적인 기류제한이 발생한 경우에 발병하는 질환이다. 만성폐쇄성폐질환과 관련된 인자로서, MUC5AC 및 MUC5B가 알려져 있으며, MUC5AC 및 MUC5B는 호흡기에서 점액 과분비와 관련된 유전자로서, 만성폐쇄성폐질환의 주요 유발 인자로 알려져 있다.

[0044] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 MUC5AC 또는 MUC5B의 생성을 억제하는 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 “MUC5AC 또는 MUC5B”는 호흡기에서 점액 과분비와 관련된 유전자로서 만성폐쇄성폐질환과 관련된 인자로 알려져있다.

[0046] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 FOXA2를 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0047] 본 발명의 “FOXA2”는 MUC5AC와 MUC5B의 유전자 발현을 억제하는 주요 전사 억제 인자로서, 뮤신의 발현과는 다르게 피오사이아닌(*pyocyanin*, PCN) 존재하에서 FOXA2의 발현이 줄어드는 것으로 알려져있다.

[0048] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 EGFR 경로의 비활성화를 통하여 점액 과분비에 따른 기도 폐쇄를 억제하는 것일 수 있다.

[0049] 본 발명의 “EGFR 경로”는 점액을 생성하는 배상세포의 발달과 FOXA2의 활성 변화를 통한 뮤신의 생합성에 관여하는 주요한 신호전달 경로로 알려져있다. EGFR의 하위 인자인 AKT와 ERK1/2의 경우 피오사이아닌(*pyocyanin*, PCN)에 의해 인산화되어 활성화되는 것으로 알려져있다.

[0050] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 STAT6 경로의 비활성화를 통하여 점액 과분비에 따른 기도 폐쇄를 억제하는 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 “STAT6 경로”는 점액을 생성하는 배상세포의 발달과 FOXA2의 활성 변화를 통한 뮤신의 생합성에 관여하는 주요한 신호전달 경로로 알려져있다.

[0052] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 NRF-2, γ-GCS 또는 NQO-1 의 발현량 감소를 통하여 항산화 효과를 갖는 것일 수 있다.

[0053] 본 발명의 “NRF-2”는 해독 효소인 γ-GCS와 NQO-1의 발현을 조절하는 주요 전사인자로 알려져있다.

[0054] 일 측면에서, 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0055] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 유효성분인 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0056] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0057] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 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. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0058] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능성식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능성식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능성식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캅셀 형태의 건강기능성식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능성식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능성식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0059] 일 측면에서, 코엔자임Q9을 유효성분으로 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 개선용 사료조성물에 관한 것이다.

[0060] 본 발명의 “사료조성물”은 종래 사료조성물에 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있다. 이러한 사료조성물에 첨가되는 성분의 일예로서 곡류분말, 고기분말, 및 두류 등을 포함할 수 있다.

[0061] 상기에서 곡류분말은 쌀가루, 밀가루, 보릿가루, 및 옥수수가루 중에서 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있

다. 다만, 식이 알러지를 유발하지 않는 범위 내에서 최소량으로 첨가된다.

[0062] 상기에서 고기분말은 닭고기, 소고기, 돼지고기, 및 타조고기 중에서 선택된 어느 하나 이상을 분말화한 고기분말을 사용할 수 있다. 다만, 식이 알러지를 유발하지 않는 범위 내에서 최소량으로 첨가된다.

[0063] 상기에서 두류는 대두, 강낭콩, 완두콩, 및 검정콩 중에서 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다. 다만, 식이 알러지를 유발하지 않는 범위 내에서 최소량으로 첨가된다.

[0064] 본 발명의 사료조성물은 상기에서 언급한 종래 사료조성물에 첨가되는 성분인 곡류분말, 고기분말, 및 두류 이외에도 사료의 영양성을 증대시키기 위해 영양제, 및 무기물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가할 수 있으며, 사료 품질의 저하를 막기 위해 항곰팡이제, 항산화제, 항응고제, 유화제, 및 결착제 중에서 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명의 사료조성물은, 기능성 물질을 추가로 더 포함할 수 있다.

[0066] 상기 기능성 물질은 DHA, EPA, 알로에, 스쿠알렌, 옥수수수염, 가르시니아캄보지아, 히비스커스, 대나무잎, 클로렐라, 스피루리나, 부추, 녹차, 둥글레, 감잎, 뽕잎, 작설, 현미, 보리, 루이보스, 보이, 및 결명자 중에서 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 기능성 물질은 사료조성물 전체 중량 대비 0.1~10 중량부가 되도록 첨가할 수 있다.

[0067] 상기에서 언급한 종래 사료조성물의 성분은 당업자가 적의 선택하여 실시할 수 있고, 본 발명에서 필수 구성성분과는 다소 차이가 있으므로 이하 본 발명에서 자세한 내용은 생략하기로 한다.

[0069] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0071] **<준비예>**

[0072] **준비예 1. 코엔자임Q9의 분리**

[0073] 흑피계종 건조분말 80 g을 유기용매와 물로 버섯 건조중량의 10배의 양을 넣어 추출하였다. 유기용매는 hexane, chloroform, methanol을 사용하여 순차적으로 극성을 높여가며 추출을 하였다. 각 추출물들은 진공농축기로 농축하였다. 1차 분리는 NP-silica gel column chromatography법을 실시하여 78개의 fraction을 얻었다. 용출용매는 hexane과 ethylacetate 혼합용매로 극성을 높여가면서 분획을 하였다. 분획물은 thin layer chromatography(TLC)를 실시하여 Rf 값이 유사한 것들로 9개 그룹으로 나누었다. 분리된 분획물은 다시 TLC(thick 1mm, 0.25mm)를 2차례 실시하여 순수분리를 하였다. 순수 분리 된 물질의 분리정도를 확인하기 위해 GC 분석을 실시하였다. 구조동정을 위해 UV/Vis spectrophotometer 측정과 1D-NMR(1H-NMR,13C-NMR) 및 2D-NMR(gCOSY, gHSQC, gHMBC) 분석을 실시하였으며, 물질 분자량 측정을 위해 FAB-MS 분석을 실시하였다.

[0074] 순수 분리된 물질의 순수도를 확인하기 위하여 NP-TL와 GC/M로 확인한 결과 불순물이 없는 것을 확인하였다(도 1).

[0075] 이후 구조 분석을 위하여 UV/Vis spectrophotometer 측정, 1D, 2D-NMR 분석과 FAB-MS 측정을 실시하였으며, 이들 결과를 토대로 구조를 결정하였다. UV/Vis spectrophotometer 측정한 결과 275 nm에서 최대 흡수를 나타냈고, 250 nm에서도 peak가 확인되어 구조에 이중결합이 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] 1H-NMR assign 결과, isoprenoid methyl groups 1.59, terminal methyl 1.67, isoprenoid methylenes(-CH2) 2.09 to 2.04, methyl on C-22.01, methoxyl protons(-OCH3) 3.99, isoprenoid vinyl(-CH) 5.12 ppm에서 확인할 수 있었고, Ravada et al.(2009)이 보고한 CoQ10 NMR spectrum 패턴과 shift 값이 동일하였다. 13C-NMR chemical shift값을 보면 benzene ring의 carbonyl carbon [δ184.73 and 183.88], methoxyl carbons [δ17.66 and 16.33], C2의 methyl carbon은 [δ11.95] signal을 확인할 수 있었다. Isoprene 특유의 carbon -C, -CH signal은 각각 137.61 ppm과 124.38 ppm에서 강하게 나타났고, isoprene의 -CH2 signal은 39.72 ppm과

27.18 ppm에서 강하게 나타났다. Vinyl의 methyl group은 δ16.00 에서 확인할 수 있었다. 이것은 isoprenoid 구조의 일반적인 분석값으로 Vitamin A와 carotenoid 등의 구조에서 쉽게 확인할 수 있다. 13C-NMR assignment 값과 pattern 이 Ng et. al.(2006)이 보고한 논문과 동일하게 나타났으며, 이는 코엔자임Q10의 NMR shift 값과 유사한 것을 확인하였다.

[0077] FAB-MS 분석을 실시한 결과, m/z 796.8(M+1)에서 molecular peak를 확인할 수 있어, 최종적으로 NMR과 MS data를 바탕으로 순수 분리한 물질을 코엔자임Q9($C_{54}H_{82}O_4$)으로 동정하였다.

[0079] **준비예 2. 세포배양**

[0080] 정상 인간 기관지 표피 세포(NHBE cell)는 액내 배양법과 공기-액체 접촉(ALI) 방법을 이용하여 5% 이산화탄소를 함유한 37도의 배양기에서 배양되었다. 액내 배양을 위하여 Lonza사의 SingleQuots 보충제가 들어있는 기관지 표피세포 성장 배지(BEGM)를 사용하였고, 3번의 계대 배양 이후에 세포를 트립신을 이용하여 분리한 뒤, coverslip이 있는 12-well plate와 96-well plate에 각각 면역형광염색 분석과 활성 산소 생성 확인 실험을 위하여 세포를 분주하였다.

[0081] ALI 배양법에서는 0.4 μM 사이즈의 Costar transwell insert에 5 × 10^4의 세포를 분주한 후, 5일 동안 액내 배양법과 같은 방식으로 well의 기저 부분과 insert 내부 모두 BEGM 배지를 넣어서 배양하였다. 이후 6일째에 기저부와 insert 내부 배지를 모두 제거하고 PnemoCult-ALI 보충제와 헤파린, hydrocortisone이 함유된 Pneumo-cult ALI 배지를 기저측에만 공급하여 세포를 공기 중에 노출하며 20일간 배양하며 분화를 유도하였다. 이후 21일 째에 피오사이아닌(*Pyocyanin*)과 코엔자임Q9을 24시간 처리하였다.

[0083] **준비예 3. 단백질 추출**

[0084] 단백질 추출에는 액내 배양법에서 자란 NHBE 세포를 사용하였다. 전체 단백질 추출은 RIPA buffer를 이용하여 1시간 동안 얼음에서 세포를 용해하였고, 이때 10분 간격으로 vortexing 해주었다. 이후 용해된 세포를 14,200 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액의 단백질을 회수하였다. 세포질과 핵내 단백질은 Nuclear & Cytoplasmic Extraction kit를 이용하여 추출하였다. 배양된 세포를 얼음에서 세포질 용해 용액에서 10분간 용해한 뒤, 14,200 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액에서 세포질 내 단백질을 회수하였다. 펠렛은 핵 용해 용액을 이용하여 얼음에서 1시간 동안 용해하였으며, 이 때 15분 간격으로 초음파 분쇄를 진행하였다. 이후 용해된 액을 14,200 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액의 핵 내 단백질을 회수하였다. 단백질의 정량은 BCA Protein Assay Kit를 이용하여 정량하였다.

[0086] **준비예 4. Western blot 분석**

[0087] 동량의 단백질은 2X sample loading buffer와 100도에서 5분간 반응하였다. 완성된 단백질 샘플은 10% SDS-PAGE를 통하여 분리하고, nitrocellulose membrane에 3시간 동안 transfer하였다. 이후 5% skim milk가 함유된 TBST에 30분간 blocking하였고, 5% BSA-TBST에 1:1000으로 희석된 1차 항체를 4도에서 overnight으로 반응시켰다. 다음 날, membrane은 HRP가 결합된 anti-rabbit이나 anti-mouse IgG 이차 항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 Clarity ECL 용액을 이용하여 시각화하였다.

[0089] **준비예 5. 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응**

[0090] 액내 배양이나 ALI 방법으로 배양된 NHBE 세포는 1시간 코엔자임Q9을 처리하고 피오사이아닌(*Pyocyanin*)을 24시간 처리하였다. 이후 세포를 Trizol을 이용하여 용행하였고, 용해된 액을 100% 에탄올과 1:1로 반응시킨 다음, 12,000 × *g*에서 15분간 원심분리하였다. 상등액에 포함된 RNA는 회수하여 Direct-zol RNA miniprep을 이용하여 정제하였다. 정제된 RNA는 Superscript Ⅲ First Synthesis System을 이용하여 cDNA로 합성하였고, 합성된 cDNA는 Power green PCR Master Mix를 이용하여 real time PCR을 진행하였다.

[0092] **준비예 6. 면역형광 분석**

[0093] 액내 배양법이나 ALI 방법으로 배양된 세포는 4% 포름알데히드를 이용하여 15분간 고정하였다. 고정된 세포는 TBS에 0.5% Triton-X가 함유된 투과화 용액으로 15분 반응시켜 투과성을 만들어 주었다. 이후 5% BSA가 함유된 TBS 용액에 1시간 동안 blocking하여 주고, 5% BSA가 함유된 TBS에 1:500으로 희석된 1차 항체를 overnight으로 반응시켜 주었다. 다음날, 세포는 Alexa flour 488이 결합된 anti-rabbit IgG와 Alexa flour 568이 결합된 anti-mouse IgG 2차 항체를 1시간 동안 반응시켰다. 이후 핵은 DAPI로 15분간 염색하였다. 시각화는 Nikon A1R 공초점 현미경을 이용하여 진행하였다.

[0095] **준비예 7. DPPH 라디칼 소거능 측정**

[0096] DPPH 용액은 95% 에탄올에 120 μM로 준비하였다. 10 μL의 코엔자임Q9 용액과 190 μL의 DPPH 용액을 96-well plate에서 30분간 상온에서 암반응시켰다. 반응 후에 517 nm에서의 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였다.

[0098] **준비예 8. 활성산소종 확인 실험**

[0099] 활성산소종의 발현량은 OxiselectTMinvitroROS/RNSassaykit를 이용하여 진행하였다.

[0101] **<실험예>**

[0102] **실험예1. 코엔자임Q9의 NHBE 세포에서 피오사이아닌에 의한 독성에 대한 보호**

[0103] 코엔자임Q9의 NHBE 세포에 대한 독성을 확인하였을 때, 100 μM의 농도까지 24시간이나 48시간 배양에도 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다(도 2a). 이후 코엔자임Q9이 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의한 세포독성에서 어떠한 효과를 나타내는지 확인하였다. 피오사이아닌(*Pyocyanin*)은 5 μg/mL의 농도로 세포에 처리하였을 때 별다른 독성을 보이지 않았다. 반면 10 μg/mL의 농도로 24시간 동안 피오사이아닌(*Pyocyanin*)을 처리하였을 때, 코엔자임Q9이 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의한 세포 사멸에서 농도 의존적으로 세포 사멸을 방지하는 것을 확인할 수 있었다(도 2b).

[0104] **실험예2. 코엔자임Q9의 피오사이아닌에 의해 자극된 NHBE 세포에서 뮤신 MUC5AC, MUC5B와 FOXA2의 발현에 대한 효과**

[0105] 피오사이아닌(*Pyocyanin*)은 인간의 폐나 기도 표피 세포에서 뮤신의 과생산을 유발하는 독성 물질로 알려져있다. 5 μg/mL 농도의 피오사이아닌(*Pyocyanin*)이 세포에 대하여 독성이 없기 때문에 실험에 사용하였다. 먼저 코엔자임Q9이 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의한 뮤신 과생산을 조절하는지 확인하였다. 면역형광 염색 결과에서 피오사이아닌(*Pyocyanin*)만 처리된 ALI 방식으로 배양된 NHBE 세포에서는 주요한 두 뮤신인 MUC5AC와 MUC5B의 발현이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반대로 코엔자임Q9을 전처리하였을 때는 MUC5AC와 MUC5B의 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 3a 및 3b). FOXA2는 MUC5AC와 MUC5B의 유전자 발현을 억제하는 주요 전사 억제 인자로서, 뮤신의 발현과는 다르게 피오사이아닌(*Pyocyanin*) 존재하에서 FOXA2의 발현이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 코엔자임Q9 전처리 시에 FOXA2의 발현이 정상적으로 회복되어 뮤신의 발현을 억제함을 확인할 수 있었다(도 3a 및 3b). 단백질 발현과 마찬가지로 전사 수준에서도 피오사이아닌(*Pyocyanin*) 처리시 MUC5AC와 MUC5B의 RNA 발현량이 증가하지만, 코엔자임Q9 전처리에 의하여 두 뮤신 유전자의 발현이 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 3c). 반면에 FOXA2 유전자는 피오사이아닌 처리에 의하여 RNA 발현이 감소하였지만, 코엔자임Q9 전처리 시에는 발현이 회복되는 것을 확인할 수 있었다(도 3c).

[0106] ALI 방법으로 배양된 것과 마찬가지로 액내 배양법으로 배양된 NHBE 세포에서도 피오사이아닌(*Pyocyanin*)으로 자극될 시 MUC5AC와 MUC5B의 발현량은 RNA와 단백질 수준에서 모두 증가하지만, 코엔자임Q9 전처리시 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 4a, 4b 및 4c). 마찬가지로 FOXA2 발현 역시 피오사이아닌(*Pyocyanin*) 자극에 의해서는 RNA와 단백질 수준에서 감소하지만, 코엔자임Q9 전처리에 의해서는 증가함을 확인하였다(도 4a, 4b 및 4c).

[0107] 따라서 코엔자임Q9은 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 자극에 의해 발생하는 FOXA2 억제에 의한 뮤신 과생산을 억제

하며, 이는 FOXA2의 발현을 다시 회복시킴에 의해 일어나는 것을 확인하였다.

[0109] **실험예3. 피오사이아닌에 의해 자극된 NHBE 세포에서 EGFR과 STAT6 유래 신호전달 경로에 대한 코엔자임Q9의 효과**

[0110] EGFR과 STAT6에 의해 매개되는 신호전달 경로는 점액을 생성하는 배상세포의 발달과 FOXA2의 활성 변화를 통한 뮤신의 생합성에 관여하는 주요한 신호전달 경로로 알려져있다. 특히 기도 표피 세포에서 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의한 EGFR과 STAT6 경로에 의한 FOXA2의 발현 변화는 뮤신 과생산을 유도하는 것으로 확인되었다. 따라서 코엔자임Q9이 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의해 활성화된 EGFR과 STAT6 신호전달 경로에 어떠한 역할을 하는지 western blot 분석을 이용하여 확인하였다. EGFR와 그 하위 인자인 AKT와 ERK1/2의 경우 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의하여 자극되면 인산화되어 활성화 되었으며, 코엔자임Q9을 전처리하였을 경우에는 인산화가 감소하여 활성화가 줄어드는 것을 확인하였다(도 5a 및 5b). 유사하게 코엔자임Q9 전처리는 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의해 일어나는 STAT6의 인산화를 억제하는 것을 확인하였다(도 5c 및 5d).

[0111] 따라서 코엔자임Q9은 피오사이아닌(*Pyocyanin*) 자극에 의해 일어나는 EGFR, AKT, ERK1/2 및 STAT6의 인산화에 의한 활성을 억제함으로서 뮤신 과생산을 방지하는 것을 확인하였다.

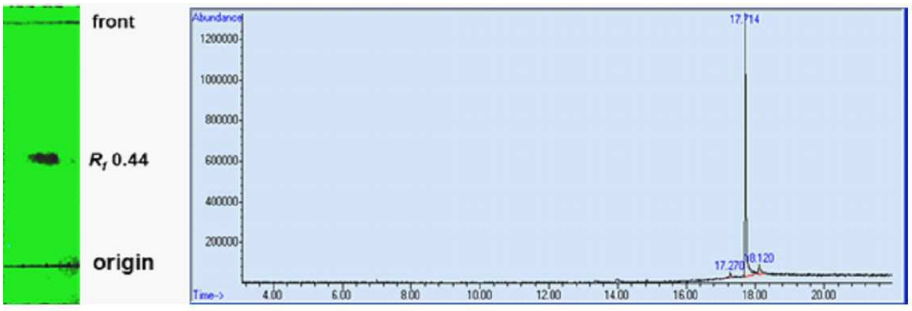
[0113] **실험예4. 코엔자임Q9의 피오사이아닌에 의해 자극된 NHBE 세포에서의 항산화 효과 기작 확인**

[0114] 피오사이아닌(*Pyocyanin*)이 세포 내 항산화 효소들의 발현과 기능을 조절함으로서 산화적 스트레스를 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 코엔자임Q9이 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의해 유도된 세포내 산화적 스트레스에 대한 효과를 가지고 있는지 확인하기 위하여 먼저 활성산소종 발현을 확인하였으며, 코엔자임Q9 전처리가 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의해 유도된 활성산소종 발생을 억제하는 것을 확인하였다(도 6a). 또한 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였을 시, 동량의 ascorbic acid와 비교하여 20% 정도의 효과가 있는 것을 확인하였다(도 6b). 따라서 코엔자임Q9이 자유 라디칼과 활성산소종에 대한 보호 효과가 있는 것을 확인하였다. 이후 항산화 기작 확인을 위하여 해독 효소인 γ-GCS와 NQO-1의 발현을 조절하는 주요 전사인자인 NRF-2의 단백질 수준에서의 발현량을 확인하였다. 이들은 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의해 발현이 증가하였지만, 코엔자임Q9 전처리에 의해서 발현량이 감소하는 것을 확인하였다(도 6c). 핵 내 NRF-2의 발현량도 코엔자임Q9에 의해 조절되었으므로, NRF-2에 의해 발현이 조절되는 γ-GCS와 NQO-1의 mRNA 수준에서의 발현량을 확인하였다. γ-GCS와 NQO-1의 mRNA 발현량 역시 피오사이아닌(*Pyocyanin*)에 의하여 증가하지만, 코엔자임Q9을 같이 처리하였을 때에는 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 6d).

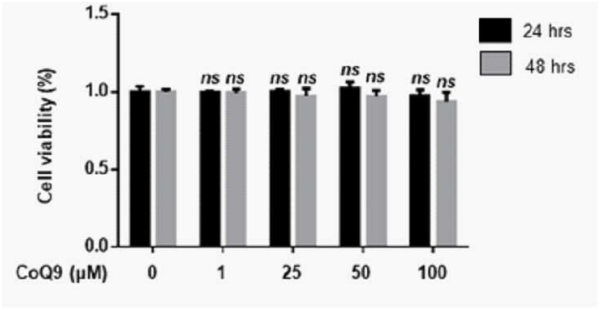
[0115] 따라서 코엔자임Q9의 자체적인 항산화능과 더불어 세포 내 항산화 기전을 유도하여 과도한 산화 스트레스에 의한 뮤신 단백질 생성과 세포 사멸을 억제하는 것을 확인하였다.

도면

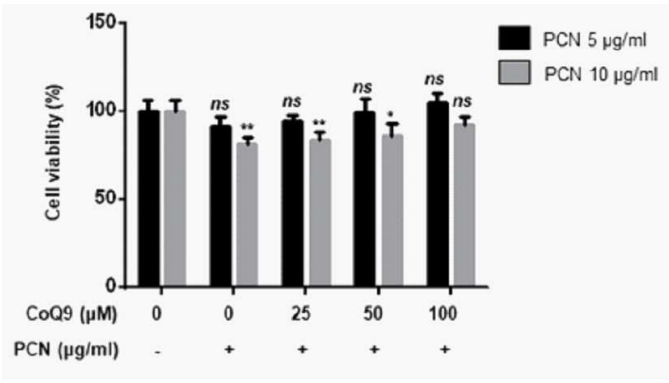
도면1



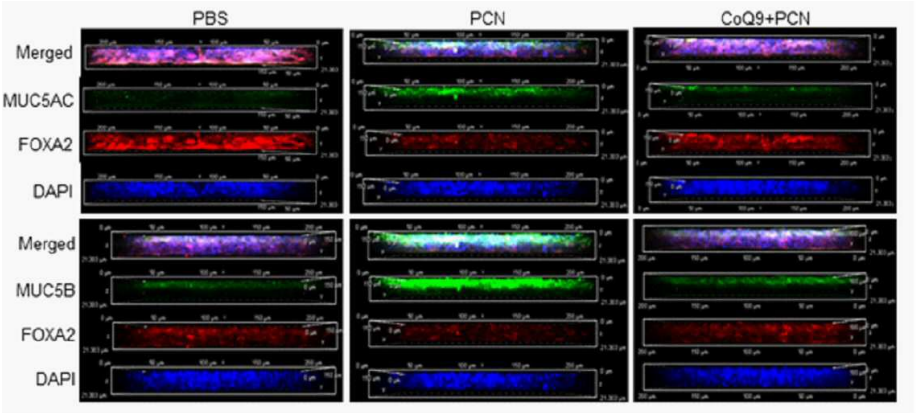
도면2a



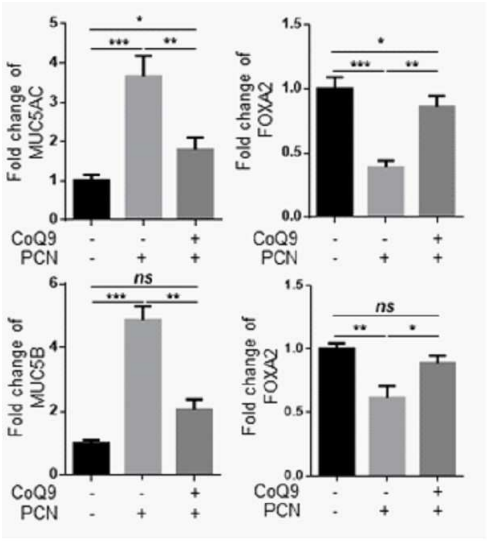
도면2b



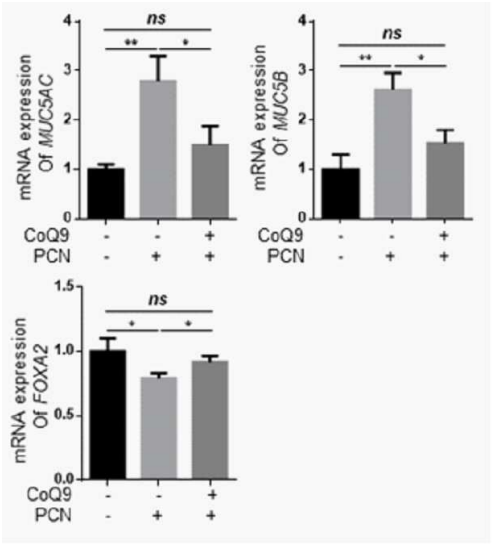
도면3a



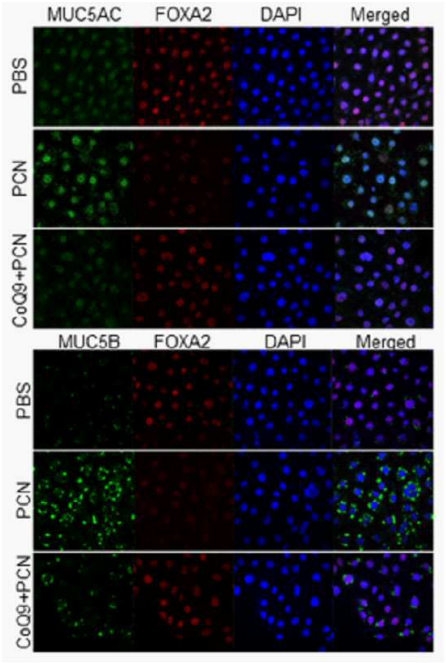
도면3b


Fold change of MUC5AC
Fold change of FOXA2
Fold change of MUC5B
Fold change of FOXA2
CoQ9
PCN
ns

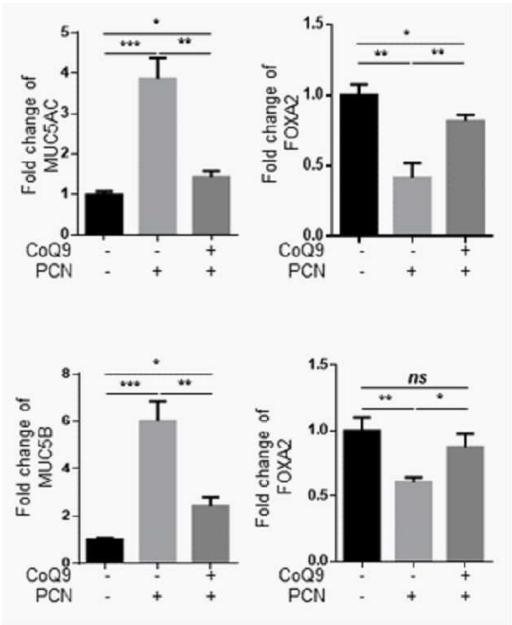
도면3c


mRNA expression Of MUC5AC
mRNA expression Of MUC5B
mRNA expression Of FOXA2
CoQ9
PCN
ns

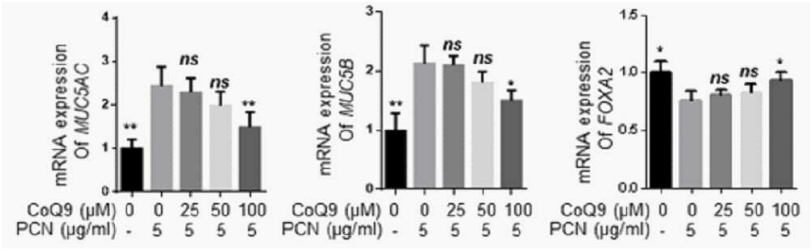
도면4a


MUC5AC
FOXA2
DAPI
Merged
PBS
PCN
CoQ9+PCN
MUC5B
FOXA2
DAPI
Merged
PBS
PCN
CoQ9+PCN

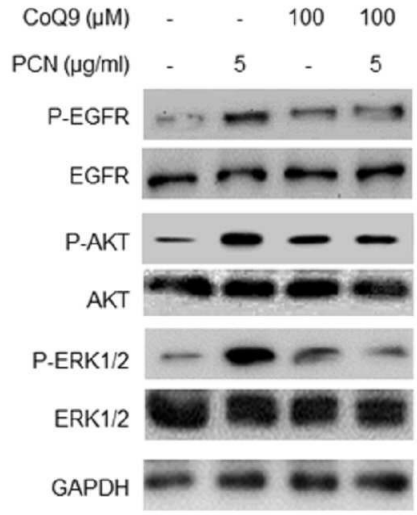
도면4b


Fold change of MUC5AC
Fold change of FOXA2
Fold change of MUC5B
Fold change of FOXA2
CoQ9
PCN
ns

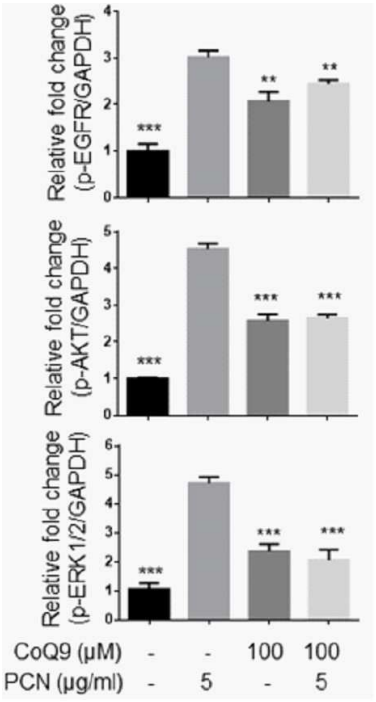
도면4c


mRNA expression Of MUC5AC
mRNA expression Of MUC5B
mRNA expression Of FOXA2
CoQ9 (μM) 0 0 25 50 100
PCN (μg/ml) - 5 5 5 5
ns
*
**

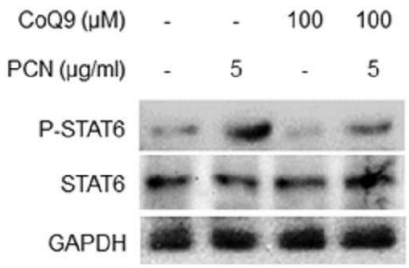
도면5a


CoQ9 (μM) - - 100 100
PCN (μg/ml) - 5 - 5
P-EGFR
EGFR
P-AKT
AKT
P-ERK1/2
ERK1/2
GAPDH

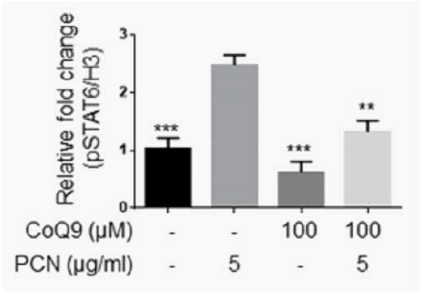
도면5b



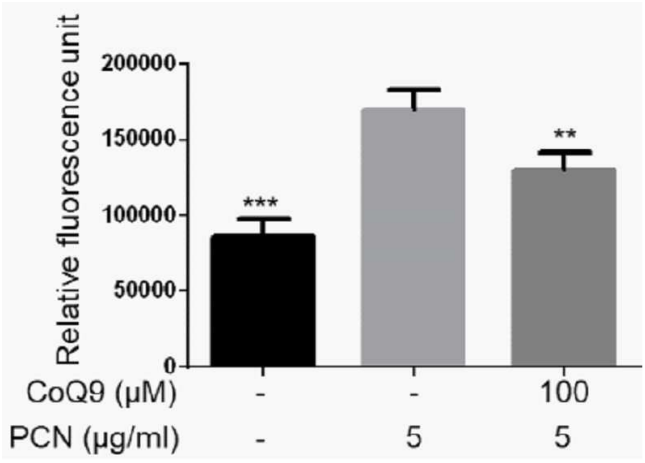
도면5c



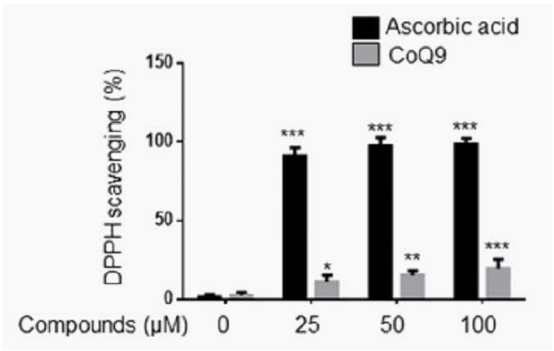
도면5d



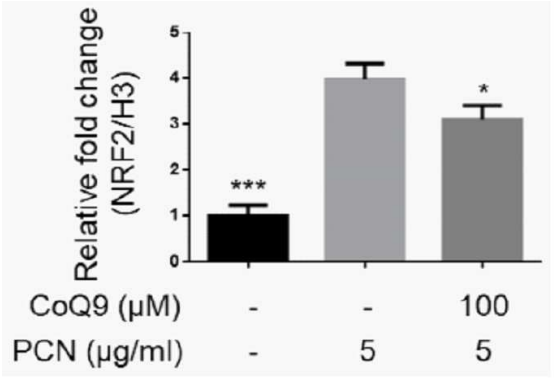
도면6a



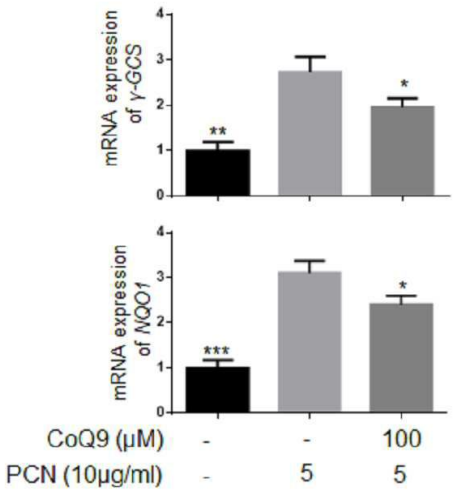
도면6b



도면6c



도면6d


mRNA expression of γ-GCS
mRNA expression of NQO1
**
*
***
*
CoQ9 (μM) - - 100
PCN (10μg/ml) - 5 5