(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0118689
(43) 공개일자 2015년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/25 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0044536
(22) 출원일자 2014년04월15일
심사청구일자 2014년04월15일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
송희상
광주광역시 남구 봉선로175번길 6, 202동 104호 (봉선동, 삼익2차아파트)
(74) 대리인
정성종

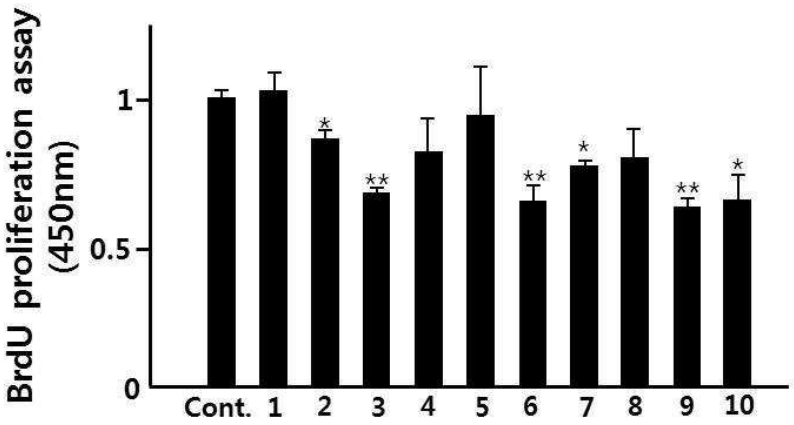
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **황칠 추출물을 포함하는 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 황칠 추출물을 포함하는 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 황칠 추출물은 기질금속단백질분해효소 2(MMP 2) 또는 기질금속단백질분해효소 9(MMP 9)의 발현과 활성을 억제하고, 동맥 평활근세포의 증식과 이동을 촉진시키는 신호전달물질인 인산화된 AKT(phospho-AKT, p-AKT) 또는 인산화된 ERK 1/2(phospho-ERK 1/2, p-ERK 1/2)의 발현을 저해하여 혈관 평활근세포의 증식 및 이동을 억제하는 효능을 나타낸다. 따라서 상기 황칠 추출물은 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환을 예방, 치료 또는 개선하기 위한 약제학적 또는 식품 조성물에 적용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 S121213L040110
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 산림청
연구사업명 산림과학기술개발사업
연구과제명 자생 황칠나무로부터 심혈관질환 제어 식·의약소재 및 생물학적 지표 개발
기 여 율 1/1
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2012.06.21 ~ 2015.04.14

명 세 서

청구범위

청구항 1

황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 황칠 추출물은 황칠나무 잎 또는 가지로부터 추출한 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 혈관 평활근세포 이상 증식성 질환은 혈관재협착증, 혈관협착증, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 고혈압성 심장질환증, 선천성 심장질환증, 뇌졸중 또는 말초혈관협착증 중의 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 황칠 추출물은 황칠나무 잎 또는 가지로부터 추출한 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 혈관 평활근세포 이상 증식성 질환은 혈관재협착증, 혈관협착증, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 고혈압성 심장질환증, 선천성 심장질환증, 뇌졸중 또는 말초혈관협착증 중의 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 황칠 추출물을 포함하는 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 황칠나무로부터 추출한 황칠 추출물이 혈관 평활근세포의 증식 및 이동을 억제함으로써 혈관 평활근세포의 증식 및 이동에 기인하는 질환을 효과적으로 예방 또는 치료하는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 죽상동맥경화증(atherosclerosis, 이하, 동맥경화증이라 함)은 심혈관계 질환의 주요원인으로서 최근 20~30년간 급격한 사회적, 경제적 발전과 서구화된 생활 방식 등에 의해 발병률이 급격히 증가하고 있으므로 이에 따른 병

인, 기전 및 치료에 관한 연구의 중요성이 점차 증대되고 있는 실정이다.

[0003] 동맥경화증은 혈관 내피세포의 산화적 손상으로부터 시작된 염증반응에 의해 내피세포와 단핵구에서 사이토카인이 분비되고 그에 따른 평활근 세포의 혈관 내막 내의 이동(migration)과 증식을 촉발하며, 그 결과 혈관 내막의 플라그 형성으로 인해 혈행이 저해되는 질병이다.

[0004] 현재까지 개발된 동맥질환에 대한 치료법으로는 약물요법, 유전자 치료법, 관상동맥 풍선 확장술, 스텐트 삽입술(percutaneous transluminal coronary angioplasty and stenting, PTCA) 또는 외과적으로 수술하는 관동맥 우회술(coronary artery bypass graft, CABG)의 혈관 재생술(revascularization therapy) 등이 있으며, 상기 방법 중 혈관 재생술이 많이 이용되고 있다. 그러나 상기 관상동맥 풍선 확장술이나 스텐트 삽입술과 같은 관상동맥 재생술은 시행 3 내지 6개월이 경과한 후에 약 40%의 환자들에게 혈관 재협착(restenosis)이 일어난다는 문제점이 있다.

[0005] 이러한 혈관 재협착은 풍선이 장착된 카테터(catheter)에 의해 손상된 혈관내피 세포, 활성화된 혈소판 또는 대식세포에서 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 성장인자(growth factor) 등이 생성, 분비되면서 혈관 평활근 세포(vascular smooth muscle cells, VSMCs)의 이동(migration) 및 증식이 촉진되고, 이에 따라 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 생성 및 분비가 촉진되어 혈관내막의 비후(hyperplasia)가 일어나 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 최근 연구에 따르면 혈관 평활근세포(vascular smooth muscle cells, VSMCs)의 이동과 증식이 동맥경화의 형성과 진행에 중요한 과정으로 밝혀져 있다. 구체적으로 동맥경화의 진행 및 형성에 관련된 주요인자 중 기질금속단백질분해효소(matrix metallo-proteinases, MMPs)는 동맥경화에 관련된 사이토카인에 의해 자극된 대식세포, 혈관내피세포, 평활근세포 등에서 발현되며, 증가된 MMPs의 단백질 분해 활성에 의해 평활근세포 주변의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)이 분해되어 세포가 혈관 내막으로 이동하게 된다. 특히, 응집된 혈소판에서 방출되는 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growht factor, PDGF)가 혈관 평활근세포의 세포막에 존재하는 PDGF 수용체와 결합하여 세포를 중막에서 내막으로 이동시키고, 동시에 세포의 증식을 유도하여 혈관 내벽에는 신생 혈관 내막이 형성된다. 이러한 과정은 혈관 내경의 축소와 혈류 장애 등을 유발하여 동맥경화의 초기 반응을 매개한다.

[0007] 또한, PDGF와 PDGF 수용체의 결합은 수용체의 티로신(tyrosine) 잔기에서 인산화가 일어나게 되어 세포 내 PI3K(phosphatidyllinositol-3-kinase)와 MAPKs(mitogen-activated protein kinase)의 신호전달이 활성화되며, 이는 세포의 증식과 이동을 조절한다.

[0008] 구체적으로, 상기 PI3K의 활성화는 다양한 하위 신호 전달을 활성화시키며, 대표적으로는 PKB(protein kinase B; AKT)를 활성화 시킨다. 상기 PKB는 세포의 주기조절과 단백질 합성에 관여하며, 세포의 사멸(apoptosis)과 증식(proliferation)을 조절하는 중요한 분자로 알려져 있다. 상기 MAPKs는 세포의 이주와 증식을 조절하는 대표적인 신호전달 체계이다. 특히 혈관 평활근세포의 이주와 증식을 조절하는 주요 신호전달체계로 잘 알려져 있으며, p38 MAPK, ERK 1/2(extracellular-regulatory protein kinase) 및 JNK(*c-jun* N-terminal kinase) 세 가지 형태가 있다.

[0009] 따라서 MMPs 의존적 경로와 세포 증식 신호전달경로의 억제는 평활근세포의 이동 및 증식을 저해하여 동맥경화 또는 혈관 재협착을 예방 또는 개선할 수 있다.

[0010] 현재까지 알려진 동맥경화 또는 혈관 재협착을 억제하기 위해 항 혈소판제, 항 응고제, 콜레스테롤 생합성 제해제, 항 알레르기제 등이 사용되어지고 있으나, 상기 억제제는 혈전 형성을 억제하는 것 이외에 상처재생억제, 혈관손상, 간독성, 신장손상 등의 다양한 부작용을 나타낸다. 이에 인간에 대하여 안전성이 입증된 다양한 천연물로부터 유래된 동맥경화 또는 혈관 재협착을 억제할 수 있는 물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 임상에서는 아직 충분한 결과를 얻지 못한 실정이다.

[0011] 이에 본 발명자들은 기질금속단백질분해효소(MMPs) 및 세포 증식의 신호전달물질의 발현을 억제하여 혈관 평활근세포의 증식 및 이동에 기인하는 질환을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있는 물질을 인체에 안전한 천연물질로부터 탐색하여 개발하고자 노력한 결과, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 목적은 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 하나의 양태로서, 본 발명은 황칠 추출물 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0015] 상기 황칠은 황칠나무(*Dendropanax morbifera*)의 수피에서 채취되는 수액으로, 세스퀴테르펜 등의 정유성분 뿐만 아니라, 아라키딕산, 팔미틱산, 아르기닌 등 다양한 성분을 함유하고 있어, 혈액 내 콜레스테롤 및 중성지방 감소, 간기능 개선, 항산화, 뼈 재생 촉진, 면역 증강, 항균, 항암 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 상기 황칠은 그대로 음용하거나 식품 또는 약제학적 조성물에 첨가하여 사용되기에는 쓴맛이 강하여 소비자들에게 관능학적으로 비선호되고 있으며, 아직까지 황칠의 혈관 평활근세포의 이동 및 증식을 억제하는 효능에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0016] 한편, 황칠나무 잎, 열매, 뿌리 또는 가지에는 황칠이 가지고 있는 정유성분, 단백질, 비타민 C, 수용성 타닌 및 아직 밝혀지지 않은 많은 휘발성 성분을 다량 함유하고 있다.

[0017] 이에, 본 발명의 황칠 추출물은 황칠나무의 잎, 열매, 뿌리, 가지 및 전초로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상, 바람직하게는 잎 또는 가지를 당업계에서 통상적으로 사용되는 추출방법에 의하여 추출하여 사용할 수 있다. 상기 추출방법은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 초임계 유체 추출법, 수증기 증류법, 열수 추출법 또는 유기용매를 이용한 직접 추출법 등이 있다.

[0018] 하나의 구체적 예로서, 상기 황칠나무의 잎 또는 가지는 세척, 절단, 건조 및 분쇄한 분말, 상기 분말을 고온의 온도가 유지되는 덖음기(예로, 볶음솥) 등을 이용하여 잘 저어주면서 일정시간 덖음한 분말 또는 상기 분말을 발효시킨 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 하나의 구체적 실시에서, 초임계 유체 추출법을 이용하여 황칠 추출물을 얻는 경우, 황칠나무의 잎 또는 가지를 채취하여 20 내지 35℃의 온도가 유지되는 음지에서 건조하고, 110 내지 125℃의 고온에서 20 내지 40분 동안 멸균시킨 후 냉각시킨다. 그 다음 상기 멸균한 잎 또는 가지를 분쇄기로 분쇄한 다음, 이를 초임계 추출장치에 넣고, 150 내지 350 bar의 압력을 가하여 황칠나무 잎 또는 가지로부터 황칠 추출물을 수득할 수 있다.

[0020] 다른 하나의 구체적 실시에서, 수증기 증류법을 이용하여 황칠 추출물을 얻는 경우, 황칠나무의 잎 또는 가지를 채취하여 20 내지 35℃의 온도가 유지되는 음지에서 건조하고, 110 내지 125℃의 고온에서 20 내지 40분 동안 멸균시킨 후 냉각시킨다. 그 다음 상기 멸균한 잎 또는 가지를 분쇄기로 분쇄한 다음, 증류수에 침지하고 가열하여 수증기와 함께 비등되어 나오는 황칠 성분을 냉각 분리하여 황칠 추출물을 수득할 수 있다.

[0021] 또 다른 하나의 구체적 실시에서, 열수 추출법을 이용하여 황칠 추출물을 얻는 경우, 황칠나무의 잎 또는 가지를 채취하여 50℃의 온도가 유지되는 음지에서 3일 동안 건조하여, 수분 함량 5% 이하, 혹은 원물 대비 건조 중량 15% 이하가 되는 재료에 대하여 100배의 증류수를 넣고 80℃에서 24시간 동안 추출한 다음 125℃의 고온에서 20 내지 40분 동안 멸균시킨 후 냉각시켜 황칠 추출물을 수득할 수 있다. 물의 첨가량은 추출액의 농도 변화를 위해 10배에서 200배까지 다양하게 사용할 수 있다.

[0022] 또 다른 하나의 구체적 실시에서, 유기 용매를 이용하여 황칠 추출물을 얻는 경우, 황칠나무의 잎 또는 가지를 채취하여 20 내지 35℃의 온도가 유지되는 음지에서 건조하고, 110 내지 125℃의 고온에서 20 내지 40분 동안 멸균시킨 후 냉각시킨다. 그 다음 상기 멸균한 잎 또는 가지를 분쇄기로 분쇄한 다음, 황칠나무 잎 또는 가지의 중량비에 대하여 5 내지 10 배의 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N, N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합용매이며, 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 부탄올, 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출물의 유효 성분이 파괴되지 않거나

최소화된 조건에서 실온 또는 가온하여 추출할 수 있다. 추출하는 유기용매에 따라 추출물의 유효성분의 추출 정도와 손실정도가 차이가 날 수 있으므로, 알맞은 유기용매를 선택하여 사용하도록 한다.

[0023] 본 발명에 따른 황칠 추출물은 기질금속단백질분해효소의 발현과 활성을 억제하고, 혈소판 유래 성장인자(PDGF) 수용체의 인산화를 억제함으로써 혈관 평활근세포의 증식 및 이동을 억제하는 효능을 나타낸다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 기질금속단백질분해효소(matrix metallo-proteinase, MMPs)는 결합조직의 세포외 기질과 기저막의 단백질 성분을 분해하고, 염증 및 암 등의 조직에서 발현이 증가되는 효소를 말하며, 바람직하게는 기질금속단백질분해효소 2(matrix metallo-proteinase 2; MMP 2) 또는 기질금속단백질분해효소 9(matrix metallo-proteinase 9; MMP 9) 이다.

[0025] 상기 신호전달물질은 혈소판 유래 성장인자와 혈소판 유래 성장인자 수용체의 결합에 의하여 활성화되어 혈관 평활근세포의 주기, 단백질 합성, 이동 또는 증식을 조절하는 물질을 말한다. 하나의 예로, 혈관 평활근세포의 증식과 이동을 조절하는 주요 신호전달체계로 알려진 p38 MAPK, ERK 1/2(extracellular-regulatory protein kinase) 또는 JNK(*c-jun* N-terminal kinase), 또는 세포의 주기조절과 단백질 합성에 관여하며, 세포의 사멸(apoptosis)과 증식(proliferation)을 조절하는 중요한 분자인 PKB(protein kinase B; AKT) 등이다.

[0026] 하나의 구체적 실시에서, 본 발명의 황칠 추출물을 처리한 동맥 평활근세포의 증식은 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포에 비하여 약 10~40% 감소하였고, 황칠 추출물을 처리한 동맥 평활근세포의 이동(migration)은 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포에 비하여 약 40%~60% 감소하였다. 또한, 황칠 추출물을 처리한 동맥 평활근세포에서 MMP 2 및 MMP 9의 mRNA 발현은 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포에 비하여 약 25~50% 감소하였으며, 황칠 추출물을 처리한 동맥 평활근세포에서 p-AKT 또는 p-ERK 1/2의 발현은 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포에 비하여 약 30~80% 감소하는 것을 확인하였다.

[0027] 따라서, 본 발명의 황칠 추출물은 혈관 평활근세포의 증식 및 이동을 억제하여 예방 또는 치료될 수 있는 다양한 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환, 질병 또는 이상 상태에 적용될 수 있다. 상기 혈관 평활근세포의 이상 증식 및 이동으로 인하여 유발되는 질환은, 예를 들어, 혈관 재협착증, 혈관협착증, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 혈관협착증 또는 동맥경화증에 의해 이차적으로 유발되는 심혈관계 질환인 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 고혈압성 심장질환증, 선천성 심장질환증, 뇌졸중 또는 말초혈관협착증 등이다.

[0028] 본 명세서에서, 용어 "평활근"은 관 모양의 기관(organ), 방광, 복강, 자궁, 생식도관, 위장관, 호흡기관, 맥관구조, 피부 및 모양체근(ciliary muscle), 눈의 홍채 등의 기관(organ)의 벽(wall) 내에서 발견되는 비-줄무늬근 (non-striated muscle)으로서 상기 평활근은 방추형 (spindle shaped)이며 수축과 이완이 가능하다.

[0029] 상기 평활근을 구성하는 세포인 "평활근세포"는 단핵세포로서, 시트 (sheet)나 다발(bundle)의 형태로 배열되어 갭정션(gap junction)에 의해 연결되어 있는 세포를 의미한다.

[0030] 본 명세서에서, 용어 "혈관 평활근세포(vascular smooth muscle cells, VSMCs)"는 혈관 벽의 평활근을 구성하는 세포를 의미한다.

[0031] 본 명세서에서, 용어 "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 개체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다. 본 명세서에서, 용어 "치료" 또는 "개선"은 개체에서 (a) 질환 또는 질병의 발전의 억제, (b) 질환 또는 질병의 경감, 또는 (c) 질환 또는 질환의 제거를 의미한다. 본 명세서에서, 용어"개체"는 본 발명의 상기 조성물을 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 돼지, 양, 개, 고양이, 래트, 마우스, 침팬지 등의 포유동물을 의미한다.

[0032] 본 발명에 있어서, 약제학적 조성물은 상기 황칠 추출물 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물(예: 락토스, 아밀로스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스, 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염 용액, 알코올, 아라비아 고무, 식물성 기름(예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히

기재되어 있다.

[0033] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-100 ㎎/㎏(체중)이다. 다만, 상기 투여량은 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0036] 상기 황칠 추출물의 유효성분은 전체 조성물을 기준으로 하여 0.00001 내지 15중량%, 바람직하게는 0.0001 내지 10중량%, 보다 바람직하게는 0.0001 내지 5중량%이다. 상기 황칠 추출물의 중량이 0.00001중량% 미만일 경우 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효능이 미약하고, 15중량%를 초과하는 경우에는 함량의 증가에 따른 효과의 증가가 매우 미약하다는 문제점이 있다.

[0037] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 황칠 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 평활근세포 이상 증식성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0038] 본 발명에 있어서, 본 발명의 식품 조성물은 상기 황칠 추출물 이외에 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물은 포도당 및 과당 당의 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 올리고당 등의 디사카라이드, 덱스트린 및 사이클로덱스트린 등의 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0039] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 황칠 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0040] 본 발명의 식품이 음료일 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0041] 상기 식품은 상술한 성분 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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. 그 밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일쥬스, 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0042] 상기 황칠 추출물의 유효성분은 전체 조성물을 기준으로 하여 0.00001 내지 15중량%, 바람직하게는 0.0001 내지 10중량%, 보다 바람직하게는 0.0001 내지 5중량%이다. 상기 황칠 추출물의 중량이 0.00001중량% 미만일 경우 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효능이 미약하고, 15중량%를 초과하는 경우에는 함량의 증가에 따른 효과의 증가가 매우 미약하다는 문제점이 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 황칠 추출물은 기질금속단백질분해효소 2(MMP 2) 또는 기질금속단백질분해효소 9(MMP 9)의 발현과 활

성을 억제하고, 동맥 평활근세포의 증식과 이동을 촉진시키는 신호전달물질인 인산화된 AKT(phospho-AKT, p-AKT) 또는 인산화된 ERK 1/2(phospho-ERK 1/2, p-ERK 1/2)의 발현을 저해하여 혈관 평활근세포의 증식 및 이동을 억제하는 효능을 나타낸다. 따라서 상기 황칠 추출물은 혈관 평활근세포 이상 증식 및 이동성 질환, 예를 들어 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 혈관 재협착증, 혈관협착증 및 이로 인해 이차적으로 발생되는 다양한 심혈관계 질환의 예방, 치료 또는 개선하기 위한 약제학적 또는 식품 조성물에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 발명의 황칠 추출물을 쥐의 동맥 평활근세포에 처리한 후, BrdU 분석법을 이용하여 동맥 평활근세포의 DNA 합성 억제 효과를 나타낸 것으로서 동맥 평활근세포 증식 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 황칠 추출물을 쥐의 동맥 평활근세포에 처리한 후, 2-D 운드 힐링 분석법(wound healing assay)을 이용하여 동맥 평활근세포의 이동 억제 효과를 현미경으로 관찰한 동맥 평활근세포 및 동맥 평활근세포의 이동율을 정량화한 그래프이다.

도 3은 본 발명의 황칠 추출물을 쥐의 동맥 평활근세포에 처리한 후, 3-D 보이든 챔버 분석법(boyden chamber assay)을 이용하여 동맥 평활근세포의 이동 억제 효과를 현미경으로 관찰한 동맥 평활근세포 및 동맥 평활근세포의 이동율을 정량화한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 황칠 추출물을 처리한 동맥 평활근세포의 MMP2, MMP7 및 MMP9의 mRNA 발현 저해능을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 황칠 추출물을 처리한 동맥 평활근세포의 인산화된 AKT(p-AKT)와 인산화된 ERK(p-ERK)의 발현 저해능을 확인한 웨스턴 블롯(western blot) 사진 및 이를 정량화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0046] **제조예 1 : 황칠나무 준비**

[0047] 1-1. 황칠나무 준비

[0048] 황칠나무로부터 잎 및 가지를 채취하여 이물질 및 불순물이 완전히 제거되도록 깨끗이 세척한 후 20 내지 35℃의 온도가 유지되는 음지에서 건조하고, 121℃의 온도에서 30분 동안 멸균시킨 후 냉각시켰다. 그 다음 상기 멸균한 잎 및 가지의 입자 크기가 0.5㎜ 이하가 되도록 분쇄하였다.

[0049] 1-2. 발효 황칠나무 준비

[0050] 황칠나무로부터 잎 및 가지를 채취하여 이물질 및 불순물이 완전히 제거되도록 깨끗이 세척한 후 20 내지 35℃의 온도가 유지되는 음지에서 건조하고, 121℃의 온도에서 30분 동안 멸균시킨 후 냉각시켰다. 그 다음 상기 멸균한 잎 및 가지의 입자 크기가 0.5㎜ 이하가 되도록 분쇄하였다. 그 후 상기 잎 또는 가지 분말 100g에 누룩(*Aspergillus oryzae*) 2㎖을 접종하고 45℃ 온도, 70% 습도에서 발효시켰다.

[0051] 1-3. 열수추출용 황칠나무 준비

[0052] 황칠나무로부터 잎 및 가지를 채취하여 이물질 및 불순물이 완전히 제거되도록 깨끗이 세척한 후 50℃의 온도가 유지되는 음지에서 건조하여 준비하였다.

[0053] **제조예 2 : 혈관벽이 손상된 동맥 평활근세포 준비**

[0054] 6~8 주령의 랫트 SD(rat sprague dawley)로부터 동맥 평활근세포(rat aortic amooth muscel cells, RAoSMCs)를 분리하여 분쇄하였다. 그 다음 상기 분쇄한 동맥 평활근 세포를 5%(v/v)의 100mm dish에 분주하고 콜라게나아제 타입 Ⅰ(collagenase type Ⅰ, sigma-aldrich, USA) 1 mg/ml 및 엘라스테이스(elastase, USB Co. USA) 0.5 mg/ml이 포함된 DMEM 배지에 접종하고 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 그 후 상기 배양한 세포의 외피를 핀셋을 이용하여 분리하여 콜라게나아제 타입 Ⅰ(collagenase type Ⅰ, sigma-aldrich, USA) 1 mg/ml 및 엘라스테이스(elastase, USB Co. USA) 0.5 mg/ml이 포함된 DMEM 배지에 접종하고 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 그 다음 상기 배양한 세포를 회수하여 1,500rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 펠렛은 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지에 접종한 후 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 계대 배양하여 콜라게나아제 및 엘라스테이스에 의해 혈관벽이 손상된 동맥 평활근 세포를 준비하였다.

[0055] **제조예 3 : 추출방법에 따른 황칠 추출물 제조**

[0056] 3-1. 메탄올 용매를 이용한 황칠 추출물 제조

[0057] 상기 제조예 1-1에서 준비한 황칠나무의 잎 분말 60g을 메탄올에 침지한 후 가열하여 황칠 추출물을 제조하였다.

[0058] 3-2. 초임계 유체 추출법(supercritical fluid extract, SFE)을 이용한 황칠 추출물 제조

[0059] 상기 제조예 1-1에서 준비한 황칠나무의 잎 또는 가지 분말 60g을 99.9% 이산화탄소(CO_2)를 용매로 하여 초임계 추출기(automated supercritical fluid extractor, ILSHINAUTOCLAVE CO., LTD)에서 150 내지 350 bar 압력으로 황칠 추출물을 제조하였다.

[0060] 또한, 상기 제조예 1-1에서 준비한 황칠나무 잎 분말을 90 내지 100℃의 온도에서 덖음 한 후 99.9% 이산화탄소(CO_2)를 용매로 하여 초임계추출기(automated supercritical fluid extractor, ILSHINAUTOCLAVE CO., LTD)에서 150 내지 350 bar 압력으로 황칠 추출물을 제조하였다.

[0061] 3-3. 수증기 증류 추출법(steam distillation extraction, SDE)을 이용한 황칠 추출물 제조

[0062] 상기 제조예 1-1에서 준비한 황칠나무 잎 또는 가지 분말 60g을 증류수에 침지하고 가열한 후 증발되는 수증기를 모아 황칠 추출물을 제조하였다.

[0063] 또한, 상기 제조예 1-2에서 준비한 발효된 황칠나무 잎 또는 가지 분말 60g을 증류수에 침지하고 가열한 후 증발되는 수증기를 모아 황칠 추출물을 제조하였다.

[0064] 3-4. 열수 추출법을 이용한 황칠 추출물 제조

[0065] 상기 제조예 1-3에서 준비한 건조된 황칠나무 잎 또는 가지 60g을 증류수 6L에 침지하고 80℃에서 24시간 동안 가열하여 황칠 추출물을 추출한 후 125℃의 온도에서 20~30분 동안 멸균시킨 다음 냉각시켜 황칠 추출물을 제조하였다.

표 1

[0066]

추출방법	황칠나무 부위	구분
초임계 유체 추출법	잎	1
	덖음시킨 잎	2
	가지	3
메탄올 추출법	잎	4
수증기 증류 추출법	가지	5
	잎	6
발효 후 수증기 증류 추출법	가지	7

	잎	8
열수추출법	잎	9
	가지	10

[0067] **실시예 1 : 황칠나무 부위 및 추출방법에 따라 추출된 황칠 추출액의 동맥 평활근세포의 증식 억제 효과**

[0068] 제조예 2에서 준비한 동맥 평활근세포를 96-웰 플레이트에 접종하고, 5%(v/v)의 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 배양하였다. 그 다음 상기 제조예 3의 황칠 추출물을 각각 최종농도가 1~3번은 10ug/ml, 4번 25ug/ml, 5번 50ug/ml, 6번 10ug/ml, 7번 100ug/ml, 8번 표본은 50ug/ml, 9~10번 표본은 열수추출물을 20ul/ml이 되도록 동맥 평활근세포에 처리하고, 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 각 배양세포에 BrdU(bromodeoxyuridine, BD biosciences, USA)를 처리하여 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 6시간 동안 배양하였다. 그 다음 배지를 제거하고 상기 세포를 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 처리한 후 실온에서 30분 동안 고정시켰다. 그 후 상기 DMSO를 제거한 후 POD가 붙어 있는 BrdU와 특이적으로 반응하는 항체를 처리하였다. 그 다음 상기 항체를 제거한 후 1× PBS를 이용하여 세포를 세척하였다. 그 후 상기 항체와 결합하여 발색을 도와주는 기질용액(substrate solution)을 처리하여 반응시킨 후 반응을 종료시키는 용액(stop solution)을 처리하고 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포를 이용하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0069] 실험결과, 황칠나무 가지를 초임계 유체 추출법으로 추출한 황칠 추출물(3), 황칠나무 잎을 수증기 증류법으로 추출한 황칠 추출물(6) 및 황칠나무 잎 또는 가지를 열수 추출법으로 추출한 황칠 추출물(9, 10)을 처리한 동맥 평활근세포의 증식 활성은 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포에 비하여 약 30% 감소한 것으로 확인되었다. 또한, 발효시킨 황칠나무 가지를 수증기 증류법으로 추출한 황칠 추출물(7)과 황칠나무 잎을 덖음 한 후 초임계 유체 추출법으로 추출한 황칠 추출물(2)을 처리한 동맥 평활근세포의 증식 활성은 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포에 비하여 각각 약 20%, 약 10% 감소한 것으로 확인되었다.

[0070] 따라서 이하에서는 동맥 평활근세포의 증식 활성을 억제하는 효과가 있는 황칠 추출물과 추출방법에 따른 황칠 추출물의 혈관내피세포의 이동 및 혈관형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 황칠나무 잎을 덖음 한 후 초임계 유체 추출법으로 추출한 황칠 추출물(2), 황칠나무 가지를 초임계 유체 추출법으로 추출한 황칠 추출물(3), 황칠나무 잎을 메탄올 용매 추출법으로 추출한 황칠 추출물(4), 황칠나무 잎을 수증기 증류법으로 추출한 황칠 추출물(6), 발효시킨 황칠나무 가지를 수증기 증류법으로 추출한 황칠 추출물(7) 및 황칠나무 잎 또는 가지를 열수 추출법으로 추출한 황칠 추출물(9, 10)을 사용하였다.

[0071] **실시예 2 : 황칠나무 부위 및 추출방법에 따라 추출된 황칠 추출액의 동맥 평활근세포 이동(migration) 억제 효과**

[0072] 2-1. 2-D migration 분석

[0073] 제조예 2에서 준비한 동맥 평활근세포를 6-웰 플레이트에 접종하고, 5%(v/v) 우태아 혈청(FBS)이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 배양하였다. 그 다음 셀 스크렙퍼(cell scraper, BD bioscience, USA)를 이용하여 단일 세포층을 긁어낸 후 상기 제조예 3에서 제조한 황칠 추출물 2, 3, 4, 6, 7, 9 및 10을 각각 10ug/ml, 10ug/ml, 25ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 20ul/ml 및 20ul/ml이 되도록 처리한 다음 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 16 시간 동안 배양하였다. 세포 이동성은 배양하기 전과 배양이 종료된 후의 세포를 현미경(×10배율)으로 사진 촬영하여 현미경에 내장된 프로그램에 의해 측정된 양 단간의 거리를 측정하여 통계처리 하였다. 대조군으로는 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포를 이용하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0074] 실험결과, 황칠 추출물을 처리한 동맥 평활근세포의 이동거리가 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포(대조군)에 비하여 감소하였다. 특히, 황칠나무 잎을 메탄올 용매 추출법으로 추출한 황칠 추출물(4), 발효시킨 황칠나무 가지를 수증기 증류법으로 추출한 황칠 추출물(7) 및 황칠나무 잎을 열수 추출법으로 추출한 황칠 추출물(9)을 처리한 동맥 평활근세포는 대조군에 비하여 40% 이상 이동이 감소하였다. 또한, 황칠나무 가지를 초임계 유체 추출법으로 추출한 황칠 추출물(3)과 황칠나무 가지를 열수 추출법으로 추출한 황칠 추출물(10)을 처리한 동맥 평활근세포 역시 대조군에 비하여 현저한 이동 감소를 보였다.

[0075] 2-2. 3-D migration 분석

[0076] 제조예 2에서 준비한 동맥 평활근세포 5×10^4 cells/100㎕를 24-웰 트랜스웰 배양 챔버(24-well transwell culture chamber, Costar; 8-㎛ pore size)의 위쪽 챔버에 접종하고 배양하였다. 그 다음 상기 배양된 평활근세포에 상기 제조예 3에서 제조한 황칠 추출물 2, 3, 4, 6, 7, 9 및 10을 각각 10ug/ml, 10ug/ml, 25ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 20ul/ml 및 20ul/ml이 되도록 처리한 후 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 16시간 동안 배양하였다. 필터 아래쪽 면으로 이동한 세포들은 0.6% 헤마톡실린(hematoxylin)과 0.5% 에오신(eosin)으로 염색하고 광학현미경(×200배율)을 통해 임의적으로 5개의 시야(field)의 세포의 수를 세어 수치화하였다. 상기 24-웰 트랜스웰 배양 챔버의 막은 젤라틴 Ⅰ으로 코팅되었고, 플레이트 아래쪽 챔버는 5% 우태아 혈청을 포함하는 DMEM 배지로 채워졌다. 대조군으로는 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포를 이용하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0077] 실험결과, 황칠나무 잎을 메탄올 용매 추출법으로 추출한 황칠 추출물(4), 발효시킨 황칠나무 가지를 수증기 증류법으로 추출한 황칠 추출물(7) 및 황칠나무 잎을 열수 추출법으로 추출한 황칠 추출물(9)을 처리한 동맥 평활근 세포는 대조군에 비하여 각각 약 50%, 약 60%, 약 50% 이동이 감소하였다. 이는 도면에는 나타내지 않았으나 혈관평활근세포(VSMCs)에서 항이동성을 가지는 천연산으로 알려진 코디세핀(cordycepin) 보다 더 효과적이었다.

[0078] **실시예 3 : 황칠나무 부위 및 추출방법에 따라 추출된 황칠 추출액에 의한 기질금속단백질분해효소(matrix metallo-proteinases, MMPs)의 발현 저해 효과**

[0079] 상기 실시예 2에서 황칠 추출액을 처리한 후 배양한 세포에 트리졸 용액(trizol agent, MRC, Cincinnati, OH)을 첨가하고, 세포를 파쇄하였다. 그 다음 상기 파쇄한 세포에 콜로로폼(chloroform, sigma-aldrich, USA)을 첨가하여 15분 동안 4℃에서 정치시킨 후 4℃에서 14,000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 그 후 상층액만을 수거하여 동량의 아이소프로판올(isopropanol, sigma-aldrich, USA)을 첨가하고 4℃에서 10분 동안 정치시키고, 14,000rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 그 다음 상층액을 제거하고, 0.1% DEPC를 처리한 증류수로 희석한 75% 에탄올을 첨가하여 세척한 후 에탄올을 완전히 제거하고 0.1% DEPC를 처리한 증류수에 펠렛을 녹여 RNA을 수득하였다. 그 후 상기 RNA을 정량하여 1㎍의 RNA를 RT-PCR 키트(applied biosystems, branchburg, NJ)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 MMP2, MMP7 및 MMP9를 증폭하는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 상기 PCR 프라이머의 서열과 반응조건은 다음과 같다. MMP2, forward: 5′-ACGATGGCAAGGTGTGGTGT-3′, reverse: 5′-CCTTGGTCAGGACAGAAGCC-3′; MMP9, forward: 5′-CGAGCTATCCACTCATCAAACAT-3′, reverse: 5′-GTGTCCTCCGATGTAAGAGAGAA-3′; MMP7, forward: 5′-TATGAGGCTCACCCTGTTCC-3', reverse: 5′-AACTTCTGGATGCCTGCAAT-3′ 를 사용하여 95℃에서 5분 동안 1회 변성(denaturation)시킨 후, 95℃에서 20초 동안 변성(denaturation), 60℃에서 40초 동안 풀림(annealing) 및 연장(extension)을 1회 반응으로 하여 30회 반복 수행하였다. 상기 RT-PCR은 형광 염색시약을 첨가한 반응으로서 실시간으로 증폭 정도를 측정하였다. 대조군으로는 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근 세포를 이용하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0080] 실험결과, 황칠 추출물을 처리한 동맥 평활근세포의 MMP2와 MMP9의 mRNA 발현수준은 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포(대조군)에 비하여 발현수준이 유의적으로 감소하였다. 반면 MMP7의 mRMA 발현은 차이가 없었다.

[0081] **실시예 4 : 황칠나무 부위 및 추출방법에 따라 추출된 황칠 추출액에 의한 인산화된 AKT 및 ERK 1/2의 발현 저해 효과**

[0082] 상기 실시예 2에서 황칠 추출액을 처리한 후 배양한 세포로부터 단백질을 추출하였다. 그 다음 상기 추출한 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)에 전기영동 시킨 후 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 겔의 단백질을 블롯킹(blocking)시켰다. 그 후 상기 막을 3% BSA로 1시간 동안 블로킹(blocking)한 후 인산화된-AKT(phospho-AKT) 항체, 인산화된-ERK 1/2(phospho-ERK 1/2) 항체, AKT 항체 또는 ERK 1/2 항체들의 1:1,000 희석액을 처리하여 4℃에서 16시간 동안 배양하였다. 그 다음 상기 인산화된-AKT(phospho-AKT) 항체, 인산화된-ERK 1/2(phospho-ERK 1/2) 항체, AKT 항체 또는 ERK 1/2 항체를 특이적으로 결합하면서 발색물질이 결합되어 있는 2차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 동안 배양한 후 화학발광법(chemiluminescence)으로 현상하였다. 또한, 상기 현상한 산물을 이미지 분석 시스템을 이용하여 정량하였다.

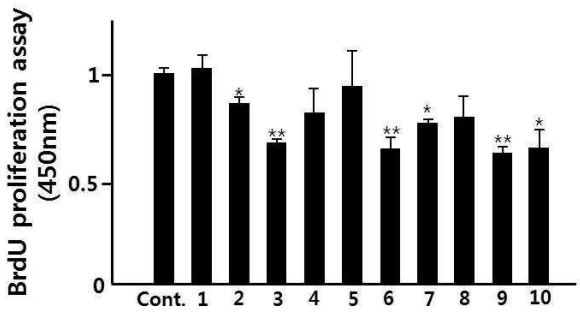
대조군으로는 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포를 이용하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0083] 실험결과, 황칠 추출물을 처리한 동맥 평활근세포의 인산화된-AKT 발현은 황칠 추출물을 처리하지 않은 동맥 평활근세포(대조군)에 비하여 감소하였다.

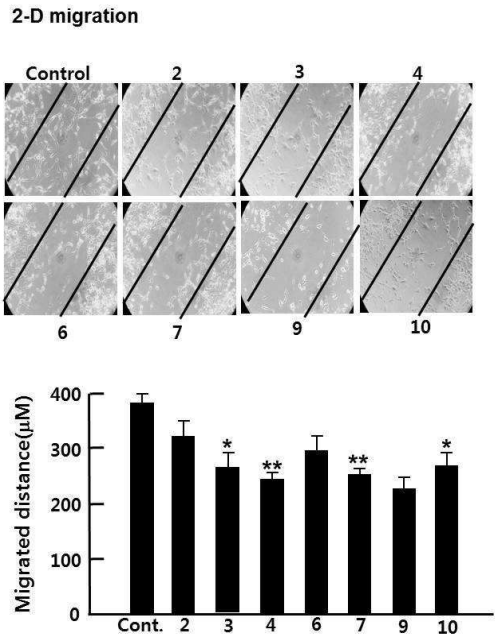
[0084] 반면, 인산화된-ERK 발현은 황칠나무 잎을 덖음 한 후 초임계 유체 추출법으로 추출한 황칠 추출물(2), 황칠나무 가지를 초임계 유체 추출법으로 추출한 황칠 추출물(3), 발효시킨 황칠나무 가지를 수증기 증류법으로 추출한 황칠 추출물(7), 황칠나무 잎을 열수 추출법으로 추출한 황칠 추출물(9) 및 황칠나무 가지를 열수 추출법으로 추출한 황칠 추출물(10)을 처리한 동맥 평활근세포에서만 감소하는 것을 확인하였다.

도면

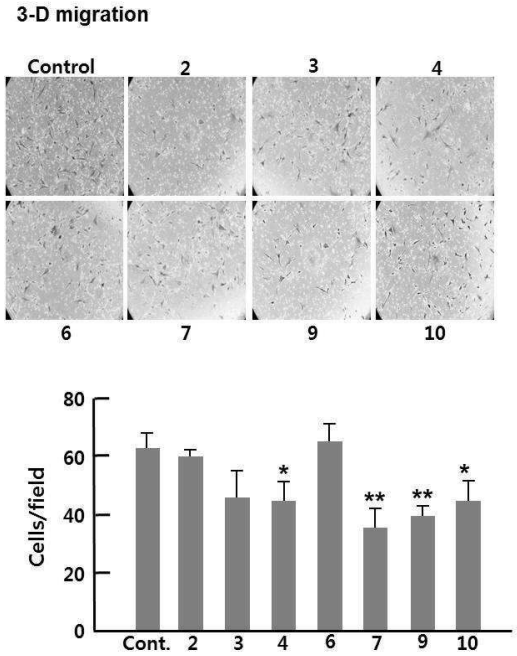
도면1



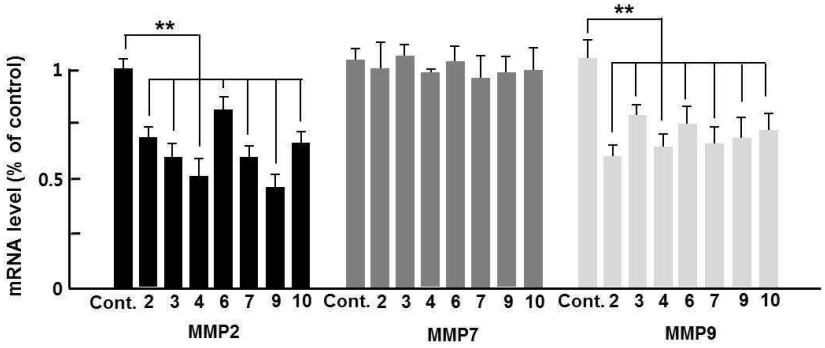
도면2



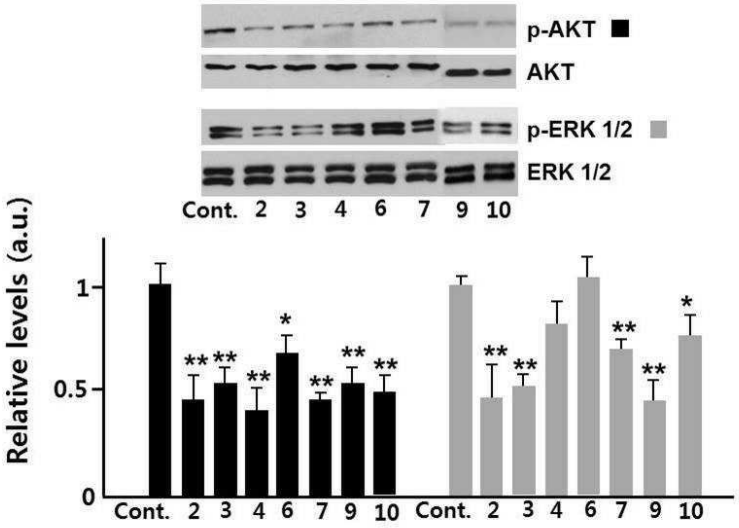
도면3


3-D migration
Control
2
3
4
6
7
9
10
Cells/field
80
60
40
20
0
Cont.
2
3
4
6
7
9
10
*
**
**
*

도면4


mRNA level (% of control)
1
0.5
0
**
**
Cont. 2 3 4 6 7 9 10
MMP2
Cont. 2 3 4 6 7 9 10
MMP7
Cont. 2 3 4 6 7 9 10
MMP9

도면5


p-AKT
AKT
p-ERK 1/2
ERK 1/2
Cont. 2 3 4 6 7 9 10
Relative levels (a.u.)
1
0.5
0
Cont. 2 3 4 6 7 9 10 Cont. 2 3 4 6 7 9 10