(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0100427
(43) 공개일자 2023년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/81 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/81 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0190286
(22) 출원일자 2021년12월28일
심사청구일자 2021년12월28일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(주)메디레독스
대전광역시 유성구 대학로 99, 901호 비-4 (궁동, 충남대학교 산학연교육연구관)
(72) 발명자
전병화
대전광역시 서구 둔산남로 127, 204동 803호(둔산동, 목련아파트)
주희경
대전광역시 서구 만년로 25, 102동 701호(만년동, 강변아파트)
이유란
대전광역시 유성구 상대복용로29번길 52, 102동 1301호(상대동, 대전아이파크시티 1단지)
(74) 대리인
김원준

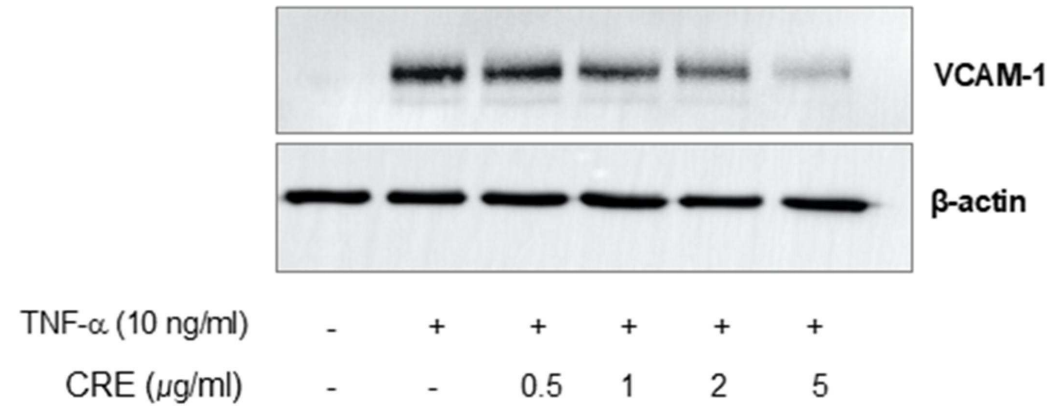
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **파프리카 추출물을 함유하는 혈관염증질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 식품 소재로서 독성에 대한 우려없이 안전하게 복용할 수 있으면서, VCAM-1의 발현을 억제하는 효과가 있어 혈관염증질환의 예방 또는 치료/증상개선에 유용하게 사용할 수 있는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 파프리카 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료/증상개선용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/12 (2013.01)
A61P 9/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345345414
과제번호 2014R1A6A1029617
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발
기 여 율 40/100
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545024439
과제번호 213006055SBX20
부처명 다부처
과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원
연구사업명 GoldenSeed프로젝트(R&D)(농림부,산림청,해수부)
연구과제명 채소작물 유래성분의 전임상 기능성 평가
기 여 율 60/100
과제수행기관명 충남대학교 산학협력단
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

파프리카 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 파프리카 추출물은 캡산틴 함유 분획인 것을 특징으로 하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 파프리카 추출물은 비극성 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 비극성 용매는 C5~C8의 알칸, C1~C3의 할로알칸, C2~C6의 에테르 또는 C2~C6의 에스테르인 것을 특징으로 하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 혈관내피세포에서 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 단백질의 발현을 저해하는 것을 특징으로 하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 혈관염증질환은 죽상경화증, 폐쇄성 말초 동맥 질환, 대동맥류, 신혈관 폐쇄, 하지동맥 폐쇄증, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

캡산틴을 유효성분으로 포함하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

파프리카 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관염증질환의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

캡산틴을 유효성분으로 포함하는 혈관염증질환의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식품 소재로서 독성에 대한 우려없이 안전하게 복용할 수 있으면서, VCAM-1의 발현을 억제하는 효과가 있어 혈관염증질환의 예방 또는 치료/증상개선에 유용하게 사용할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈관내피세포(vascular endothelial cell)는 혈관의 안쪽을 구성하는 단층 세포로 혈관의 확장과 수축, 혈소판 활성, 백혈구 유착, 평활근 세포의 증식과 이동 등 혈관의 항상성을 유지하는 주요한 조절 역할을 한다. 정상 혈관내피세포들은 염증세포와 상호작용이 일어나지 않기 때문에 염증세포는 혈류를 따라 흘러갈 뿐이므로 혈관벽과의 접촉이 거의 일어나지 않는다. 반면, 혈관내피세포에 염증이 일어나면 염증세포와 혈관내피세포의 상호작용에 의해 염증세포가 혈관벽에 달라붙게 되어 혈관에서 염증반응이 일어나게 된다. 초기 동맥 염증 과정에서, 병원체(pathogen), 산화 지질 또는 종양괴사인자(TNF)-α, 인터루킨(IL)-1/3 및 IL-6와 같은 사이토카인을 비롯한 다양한 자극에 의해 내피세포가 활성화되며, 이후 연속적으로 순환하는 단핵구가 플라그-형성 병소(foci)로 되는 것을 증가시키는 특정 부착 수용체인 VCAM-1(Vascular cell adhesion protein-1) 단백질의 발현을 유도한다. 염증이 생긴 혈관내피세포에서 롤링(rolling) 및 부착된 단핵구는 연속적으로 전이되어, 결과적으로 혈관벽을 통해 삼출(diapedesis)된다. 이러한 혈관염증반응에서의 주요 매개체로 알려진 VCAM-1의 발현을 억제하는 물질은 염증으로 인한 혈관질환의 치료물질로 활용되고 있다(Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis; Int J Clin Pract. 2007 Apr;61(4):697-701). 죽상경화증과 같은 혈관질환의 초기병변은 주로 혈관내피세포의 염증반응이 원인이 되고 있다(Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26). 이외에도 혈관염증에 의해 야기되는 혈관염증질환으로는 폐쇄성 말초 동맥 질환, 대동맥류, 신혈관 폐쇄, 하지동맥 폐쇄증, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중을 예로 들 수 있다.

[0003] 파프리카는 피망을 달고 과육이 많도록 개량한 것으로, 서양에서는 sweet pepper라 하여 동일한 품목으로 인식하나 우리나라에서는 색깔과 과육의 두께에 차이가 있어 서로 다른 것으로 취급하고 있다. 파프리카에는 비타민 C와 같은 항산화 물질이 풍부하여 노화방지, 면역력 강화, 암 예방, 알레르기 또는 천식의 치료와 피로 회복에 효과가 있으며, 피라진 성분이 혈액의 응고를 막아주어 혈액의 응고에 기인하는 혈관 질환에도 유용하다. 또한 비타민 A와 베타카로틴을 다량 함유하여 노안을 예방하고, 눈의 피로를 예방하는 효과도 있다. 그러나 아직 혈관염증반응의 주요한 매개체인 VCAM-1의 발현을 억제하는 효능은 보고된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis; Int J Clin Pract. 2007 Apr;61(4):697-701.

(비특허문헌 0002) Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 인체에 대한 부작용없이 안전하게 사용할 수 있으면서도, VCAM-1의 발현을 억제하여 혈관염증질환의 예방 및 치료/증상개선에 효과적인 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 파프리카 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0007] 파프리카 추출물은 카로티노이드계 화합물을 다량 함유하고 있으며, 특히 캡산틴의 함량이 풍부하였다. 파프리카 추출물과 상기 추출물의 지표물질인 캡산틴은 TNF-α에 의해 자극된 혈관내피세포에서 혈관염증의 초기 반응에 작용하는 VCAM-1의 발현을 억제하여 혈관염증질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다. 혈관내피세포의 염증반응에 의한 VCAM-1의 발현 증가가 발병의 주요 요인이 되는 것으로 알려진 죽상경화증 동물 모델에서 파프리카 추출물과 캡산틴은 혈관내 플라크의 형성과 VCAM-1의 발현 및 염증마커인 NLR을 현저하게 억제하였다. 특히 고지혈증 치료제로 알려진 아트로바스타틴은 파프리카 추출물이나 캡산틴에 비해 혈중 콜레스테롤의 농도와 저밀도리포단백질(LDL)의 농도를 낮추는데에는 효과적이었지만(데이터 미도시), 혈관 내 플라크 형성 억제 효능은 파프리카 추출물이나 캡산틴에 비해 낮았다. 이는 단순히 혈중 지질농도가 아닌 VCAM-1의 발현 억제가 죽상경화증의 유발에 중요하다는 것으로부터 이해될 수 있다.

[0008] 본 발명에서 '파프리카 추출물'이란 파프리카의 가공에 의해 생 파프리카 자체에 비해 일부 성분의 비율이 높아지도록 한 것을 의미하는 것으로, 용매를 사용한 추출물은 물론이고, 건조물, 반건조물, 착즙물 역시 본 발명의 추출물의 범주에 포함된다. 본 발명에서 '파프리카 추출물'은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 의해 제조될 수 있다. 용매를 사용하여 추출하는 경우에는 냉침, 열추출, 초음파추출, 초임계추출 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0009] 본 발명의 실시예에서는 각종 용매를 사용하여 추출한 후, 카로티노이드를 분석한 결과 캡산틴(capsanthin)이 가장 다량으로 함유되어 전체 카로티노이드 함량의 2/3 정도를 차지하였다. 이에 카로티노이드 함량이 가장 높은 비극성 용매 추출물을 대상으로 VCAM-1 발현 억제 효능을 평가하였다. 캡산틴 자체 역시 혈관내피세포에서 VCAM-1의 발현을 억제하는 효능을 나타내었으나, 파프리카 추출물은 캡산틴 또는 전체 카로티노이드 함량으로부터 예상되는 것에 비해서도 현저한 활성을 나타내었다. 이는 캡산틴 추출에 유리한 조건에서 캡산틴과 함께 추출되는 캡산틴 및 카로티노이드 이외의 성분이 파프리카 추출물의 우수한 VCAM-1 발현 억제 활성에 기여하거나, 혹은 파프리카 고유의 카로티노이드의 조성이 상승효과를 나타내는 것에 의해 우수한 VCAM-1 발현 억제 활성을 나타내는 것을 시사하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 추출물을 용매를 사용하여 추출하는 경우에는 비극성 용매 추출물을 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 또한 효율적인 추출을 위하여 잘게 자르거나 분쇄 또는 마쇄 후 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 비극성 용매로는 C5~C8의 알칸, C1~C3의 할로알칸, C2~C6의 에테르 또는 C2~C6의 에스테르를 예로 들 수 있으며, 더욱 구체적으로는 펜탄, 헥산, 헥탄, 옥탄, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 디에틸에테르, 에틸아세테이트를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 비극성 용매의 추출물은 생 파프리카를 마쇄하여 비극성 용매를 가한 후 추출할 수도 있으며, 파프리카의 건조물 또는 C1~C4인 알코올 추출물을 수득 후 이를 추출할 수도 있다. 또한 혈관염증질환에 대한 효능을 가진 유효성분을 더욱 농축하기 위하여 상기 추출물을 추가로 분획을 실시할 수도 있다.

[0011] 착즙이나 용매를 사용한 추출에 의해 얻어진 추출물은 그 자체로 사용하거나, 농축하거나, 건조하여 사용할 수 있다. 건조방법 역시 분무건조, 열건조, 동결건조 등 통상의 방법을 사용할 수 있음은 당연하다.

[0012] 본 발명에서 "혈관염증질환"이란 혈관의 염증에 의해 야기되는 혈관질환을 의미하며, 예를 들면 죽상경화증, 폐쇄성 말초 동맥 질환, 대동맥류, 신혈관 폐쇄, 하지동맥 폐쇄증, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 또한 전술한 바와 같이 지표물질로 설정한 캡산틴 역시 VCAM-1의 발현 억제 효능을 나타내는 것을 확인하였으므로, 본 발명은 또한 캡산틴을 유효성분으로 포함하는 혈관염증질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 조성물은 예방 또는 치료용 약제로 이용하기 위하여, 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조

될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로 제형화하여 사용할 수 있으며, 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 제제의 형태, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 병용 투여되는 경우에는 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적인 투여량은 0.001mg/kg·일~10g/kg·일이다. 본 발명의 조성물은 식품 소재 유래로 독성 및 부작용이 없이 안전하게 사용할 수 있으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0015] 또한 본 발명은 파프리카 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관염증질환의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 약학 조성물과 마찬가지로 본 발명은 파프리카 추출물 뿐 아니라 캡산틴을 유효성분으로 포함하는 혈관염증질환의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 본 발명의 건강기능식품에 바람직하게는 0.01~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강식품 조성물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 과자, 주류, 초콜릿, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다. 또는 본 발명의 건강기능식품은 그 자체로 혹은 다른 성분과 혼합하여 음식의 조리 시 사용할 수 있는 조미료의 형태로 사용될 수도 있다. 예를 들어, 분말 또는 과립 형태의 조성물은 샐러드나 반찬의 제조 시 첨가하는 것에 의해, 혈관염증질환의 예방 및 개선 활성을 나타내는 것은 물론 맛과 색감을 풍부하게 하는 효과가 있다.

발명의 효과

[0017] 이상과 같이 본 발명의 조성물은 오랫동안 식품으로 사용하던 파프리카 추출물을 유효성분으로 포함하므로 장기간 복용 시에도 독성이나 부작용에 대한 우려 없이 안전하게 사용할 수 있어, 혈관염증질환의 예방 또는 치료/증상개선에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 파프리카 추출물이 혈관내피세포에서 TNF-α에 의해 유도되는 VCAM-1의 발현을 억제하는 것을 보여주는 전기영동 이미지.

도 2는 캡산틴이 혈관내피세포에서 TNF-α에 의해 유도되는 VCAM-1의 발현을 억제하는 것을 보여주는 전기영동 이미지.

도 3은 죽상경화증 동물 모델에서 파프리카 추출물 및 캡산틴의 플라크 형성 억제 효능을 보여주는 이미지.

도 4는 죽상경화증 동물 모델에서 파프리카 추출물에 의한 VCAM-1 발현 억제를 보여주는 현미경 이미지.

도 5는 죽상경화증 동물 모델에서 죽상경화와 관련된 염증 마커의 발현을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0020] **[실시예]**

[0021] **실시예 1 : 파프리카 추출물의 제조**

[0022] 제조예 1 : 파프리카 분말

[0023] 라온레드 파프리카의 꼭지를 제거하고 깨끗이 세척한 후 물기를 제거하였다. 100 kg의 시료를 블렌더를 사용하여 마쇄하고, 이를 동결건조하여 10.5 kg의 파프리카 분말을 얻었다.

[0024] 제조예 2 : 파프리카 추출물 (CRE)

[0025] 상기 제조예 1의 파프리카 분말 8.5 kg에 10배(v/w)의 n-헥산을 넣고 25℃에서 12시간 교반하여 추출하였다. 교반 후 불용물을 여과하여 제거하고 농축하여 168 g의 헥산 추출물을 수득하였다.

[0026] **실시예 2 : 지표성분 설정**

[0027] 실시예 1에서 제조된 파프리카 추출물의 지표가 되는 성분을 설정하기 위하여 카로티노이드계 화합물의 유효성분 분석을 실시하였다. 이를 위하여 12종의 카로티노이드를 기준물질로 하여 HPLC에 의해 추출물 중 카로티노이드계 화합물의 함유량을 분석하고, 그 결과를 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

[0028]

Content (mg/100g)	제조예 1	제조예 2
Neoxanthin	1.01±0.03	32.8±0.19
Capsorubin	2.52±1.56	189.99±2.59
Violaxanthin	0±0	0±0
Capsanthin	34.33±2.29	2067.02±44.24
Antheraxanthin	0±0	0±0
Zeaxanthin	9.64±0.6	488.55±11.68
Lutein	0±0	0±0
α-cryptoxanthin	0.18±0	4.61±0.02
β-cryptoxanthin	0.8±0.04	36.48±0.61
Lycopene	0±0	0±0
α-carotene	0.88±0.05	52.68±3.79
β-carotene	5.11±0.32	304.54±13.36
Total	54.46±3.28	3176.67±75.67

[0029] 상기 표 1에서 확인할 수 있듯이, 카로티노이드계 화합물이 제조예 1의 파프리카 분말에는 0.05%, 실시예의 추출물에는 3.18% 중량비로 함유되어 있으며, 그 중 캡산틴(capsanthin)의 함량이 총 카로티노이드계 화합물 함유량의 2/3 정도를 차지하여 압도적으로 우세하였다. 이에 캡산틴을 지표성분으로 하여 다양한 용매를 사용한 추출 효능을 분석하였다.

[0030] 이를 위하여, 파프리카 분말 789g에 20배의 주정을 첨가하고 80℃에서 3시간 교반하여 추출하였다. 불용물을 여과하여 제거하고 농축시킨 뒤 진공건조하여 EtOH 추출물을 제조하였다. EtOH 추출물에 10배의 정제수를 첨가하여 용해시키고, 정제수와 동일한 양의 n-헥산(n-hexane), 에틸아세테이트(EtOAc) 및 n-부틸알코올(n-BuOH)을 사용하여 순차적으로 추출하였다. 각 분획의 추출은 3회씩 반복 추출하였다. 각각의 추출물들은 농축, 건조하여 각 유기용매 분획을 수득하였다. 얻어진 분획에 대해 파프리카 분말 기준 수율과 지표물질로 설정한 캡산틴의 함량을 정량하여 하기 표 2에 기재하였다.

표 2

시료	추출 수율	캡산틴 함량 (mg/100g)
제조예 1	-	30.69
EtOH 추출물	57.50%	4.22
n-Hexane 분획	0.14%	881.69
EtOAc 분획	2.90%	9.33
n-BuOH 분획	4.38%	0.22
H_2O 분획	44.13%	0

[0031]

[0032] 캡산틴은 극성 용매인 물이나 에탄올에 의해서는 추출이 효율적이지 않았으며, 비극성 용매인 n-헥산에 의해 가장 효과적으로 추출되는 것을 보여준다.

[0033] **실시예 3 : 파프리카 추출물의 VCAM-1 발현 억제효능 평가**

[0034] HUVECs(혈관내피세포, Clonetics, USA)에서 TNF-α에 의하여 유도 발현되는 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) 발현에 파프리카 추출물 및 캡산틴이 미치는 영향을 규명하였다. 파프리카 추출물은 제조예 2의 파프리카 추출물(CRE)을 사용하였다.

[0035] HUVEC 배양 세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 6-well 플레이트에 분주하고, 0.5, 1, 2 및 5 ㎍/㎖의 농도로 파프리카 추출물 또는 캡산틴을 1시간 동안 전처리하였다. 이후 TNF-α(10 ng/ml)를 처리하여 18시간동안 37℃ 수분 공급형 배양기에서 배양하였다.

[0036] 상기 혼합물을 인산완충액 식염수로 3회 세척한 후 세포분쇄기를 이용하여 분쇄하고 이를 12,000 g에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상기 상등액을 이용하여 브래드포드 어세이(BIO-Rad)를 통해 단백질 정량을 하고, 정량된 결과를 참고하여 30㎍ 씩의 단백질을 10% SDS-PAGE(10% sodium dodecyl sulphatepolyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후, PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 이후, VCAM-1 발현량을 β-actin에 대한 양을 기준으로 면역 블랏팅에 의해 확인하고, 그 결과를 도 1 및 도 2에 도시하였다.

[0037] 도 1에서 보여주듯이, TNF-α의 처리는 HUVECs에서 VCAM-1의 발현을 유도하였으나, 파프리카 추출물을 전처리한 경우 VCAM-1의 발현이 현저하게 저하되었다. 이러한 VCAM-1의 발현 억제는 파프리카 추출물의 농도에 의존적이었다. 도 2는 파프리카 추출물의 지표물질인 캡산틴이 VCAM-1의 발현에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이다. 캡산틴 역시 VCAM-1의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 보여준다. 표 1에서 파프리카 추출물 중 캡산틴의 함량은 2 wt%로, 5 ㎍/㎖ 중에는 0.1 ㎍/㎖의 캡산틴이 함유되어 있다. 도 1의 파프리카 추출물과 도 2의 캡산틴의 VCAM-1의 발현 억제 효과를 비교해 보면, 캡산틴의 VCAM-1 발현 억제 효능은 파프리카 추출물의 효능의 일부에만 기여함을 알 수 있다. 즉, 파프리카 추출물 내의 다른 성분의 VCAM-1 발현 억제 효능 또는 다른 성분과 캡산틴의 혼합에 의한 시너지 효과에 의해 전체 추출물의 VCAM-1의 발현 억제 효능이 현저하게 우수하였다.

[0038] **실시예 4 : 죽상경화증에 대한 파프리카 추출물의 효능 평가**

[0039] 죽상경화증은 혈관벽에 단순히 지질이 침착되어 발생하는 병으로 인식되었던 과거와 달리, 최근에는 혈관내피세포, 면역세포, 혈관평활근세포들의 복잡한 염증작용으로 설명되고 있다. 즉, 혈관내피세포에서의 VCAM-1과 같은 부착분자의 발현 증가는 죽상경화증의 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 인식된다.

[0040] 이에 고지방 식이에 의한 죽상경화증에 파프리카 추출물이 미치는 영향을 평가하였다.

[0041] 생후 8-12주령 된 체중 25 g 내외의 웅성 ApoE Knock out mice를 동물사육실에서 일정한 조건(온도: 22±2℃, 습도:50±5%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 사육하였다. 실험군은 각 군당 6마리로 하였으며, 각 군에 지정된 식이와 지정된 약물을 12주간 투여하였다. 식이는 물과 함께 자율적으로 제한없이 공급하였으며, 각 군당 지정된 약물은 1일 1회 경구투여 하였다. 실험군의 분류는 다음과 같다.

[0042] ① 음성대조군(ND) - 정상식이

[0043] ② 양성대조군(WD) - 고지방식이(Western diet, 0.2% 콜레스테롤, 21% fat, Harlan)

[0044] ③ 제1실험군(CRE) - 고지방식이 + 제조예 2 추출물 (25 mg/kg · 일)

[0045] ④ 제2실험군(CAP) - 고지방식이 + Capsanthin (0.5 mg/kg · 일, Cayman Inc.)

[0046] 혈관 내 플라크 형성 정도를 관측하기 위하여 식이 종료시점에 마우스를 희생시키고 대동맥을 채취하여 10% 중성 완충 포르말린에 24시간동안 고정시켰다. 고정시킨 대동맥의 옆을 가위로 잘라 펼친 후 혈관 내부가 잘 보이도록 노출시켰다. 혈관 내부를 노출시킨 조직을 60% 이소프로판올로 10분간 씻어내고, Oil Red O 용액에 30분간 반응시켰다. 이후 다시 60% 이소프로판올로 10분간 씻어낸 뒤 증류수에 보관하며, 현미경으로 관측하였다. 도 3은 그 결과를 보여주는 사진으로, 정상식이군에 비해 고지방식이군은 플라크가 크게 증가하였다. 반면 파프리카 추출물 또는 캡산틴을 처리한 제1실험군과 제2실험군은 플라크의 형성이 크게 감소하였으며, 특히 파프리카 추출물을 처리한 제1실험군은 음성대조군과 거의 유사한 정도로 플라크 형성이 감소하였다.

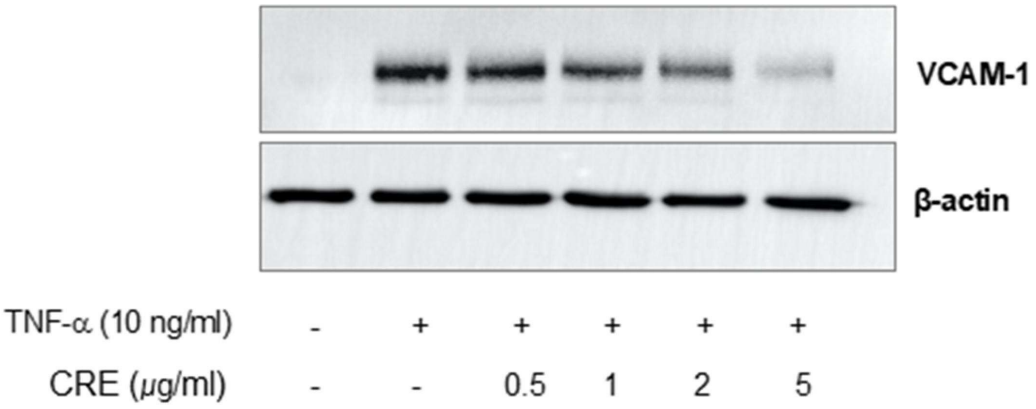
[0047] 도 4는 각 실험군에서 혈관 내 VCAM-1의 발현을 면역염색방법으로 관측한 이미지이다. 조직면역염색은 고정된 대동맥을 파라핀에 포매시켜, 3 ㎛의 두께로 조직 절편 슬라이드를 제작하였다. 제작된 슬라이드를 탈파라핀화시킨 후 면역염색을 위한 전처리를 진행하였고, VCAM-1 항체를 1:100의 조건으로 4℃에서 하루동안 반응시켰다. 그 후 슬라이드 조직에 2차 항체를 반응시킨 뒤, DAB 용액에 3분간 반응시켰다. 대조 염색을 위하여 헤마토실린 염색을 진행하였고, 그 뒤 현미경을 이용하여 사진을 촬영하였다. 이미지 중 갈색이 VCAM-1의 발현을 나타내는 것으로, 고지방 식이에 의해 증가한 VCAM-1의 발현이 파프리카 추출물의 투여에 의해 현저히 감소하였음을 확인할 수 있다.

[0048] 호중구/림프구 비율(NLR, neutrophil lymphocyte ratio)은 죽상경화증과 관련된 염증마커이다. 이에 각 실험군에서 NLR 값을 비교하고, 그 결과를 도 5에 도시하였다. 채취된 혈액은 EDTA 코팅 채혈 튜브에 보관하였으며, 채취 후 24h 내에 ProCyte DX 혈구 분석기를 이용하여 호중구와 림프구를 측정하였다. 측정된 호중구 수와 림프구 수를 계산하여 NLR 수치를 도출하여 그래프로 나타내었다. 도 5에서 역시 파프리카 추출물과 캡산틴에 의해 NLR 값이 크게 감소하였음을 나타내었다.

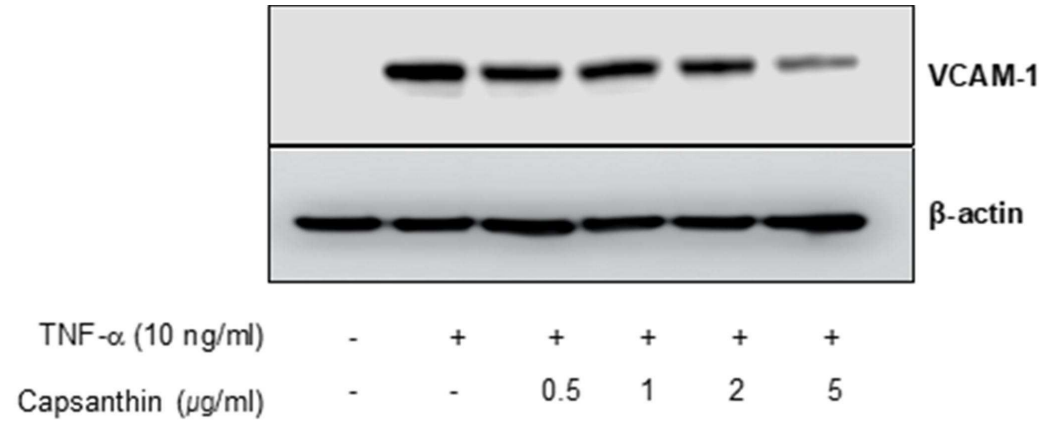
[0049] 지금까지 본 발명을 바람직한 실시예를 참조하여 상세히 설명하였지만, 본 발명이 상기한 실시예에 한정되는 것은 아니며, 특허청구범위에서 청구하는 본 발명의 기술적 요지를 벗어남이 없이 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변형 또는 수정이 가능한 범위까지 본 발명의 기술적 사상이 미치는 것으로 이해하여야 한다.

도면

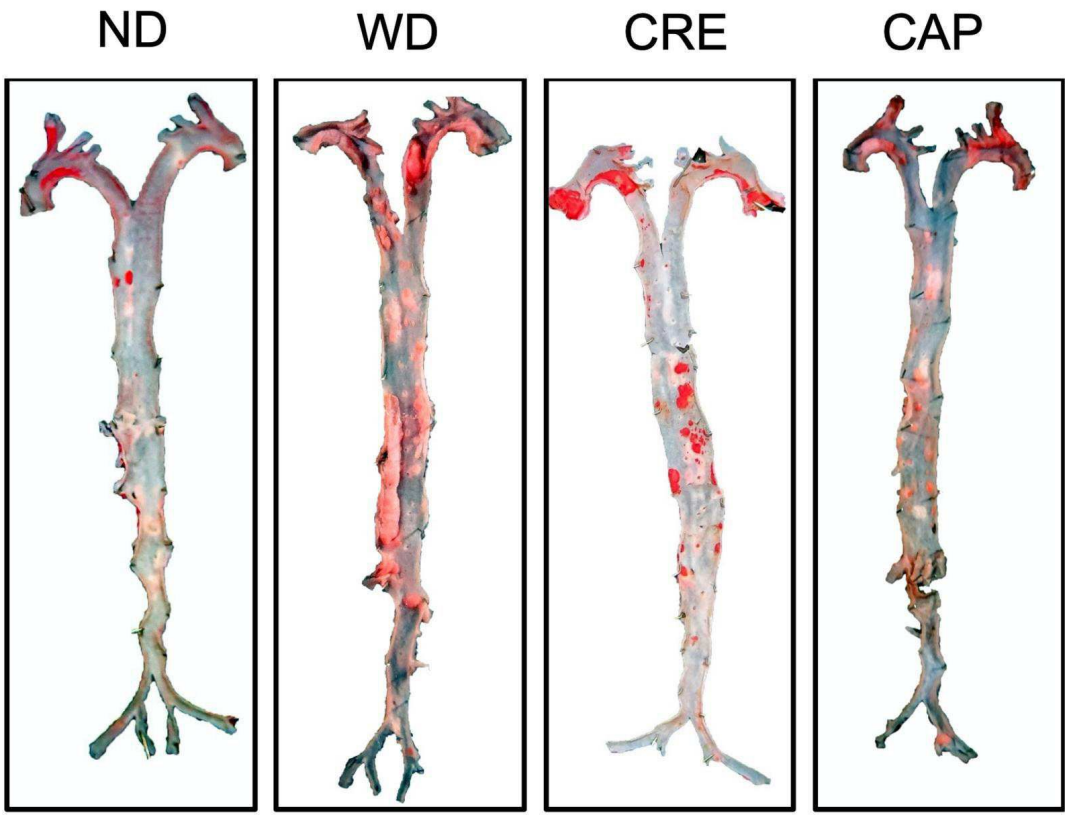
도면1



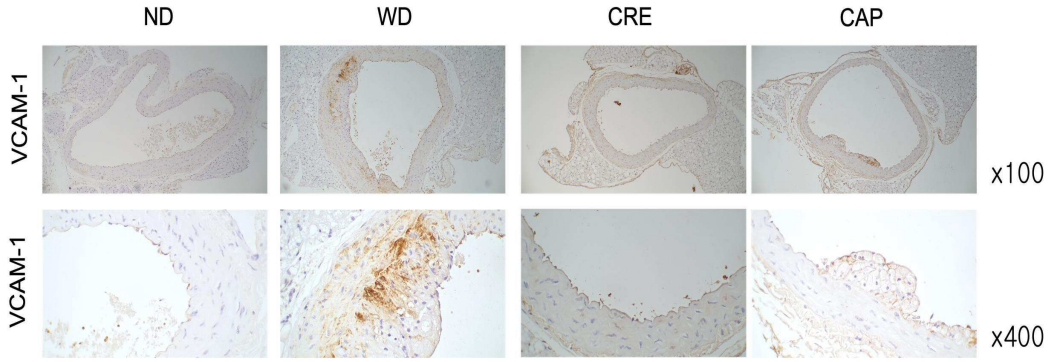
도면2


VCAM-1
β-actin
TNF-α (10 ng/ml) - + + + + +
Capsanthin (μg/ml) - - 0.5 1 2 5

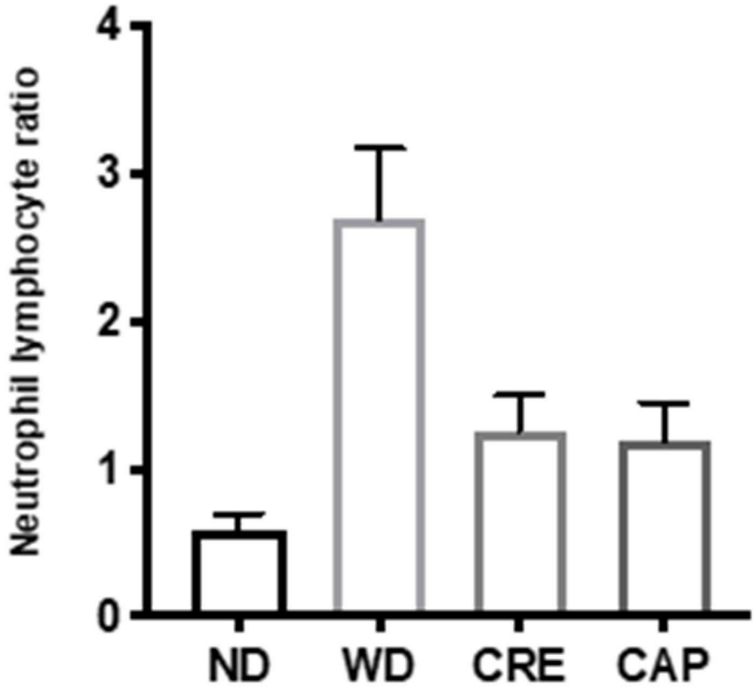
도면3


ND
WD
CRE
CAP

도면4



도면5



n=6 animals per group
#p < 0.05 versus ND, *p < 0.05 versus WD