



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0100723
(43) 공개일자 2008년11월19일

(51) Int. Cl.

A61K 36/68 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0046755

(22) 출원일자 2007년05월14일

심사청구일자 2007년05월14일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

이성준

서울시 강남구 청담동 삼성청담공원아파트
104-402

정미자

서울 광진구 자양3동 우방리버파크아파트
103-2002

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 8 항

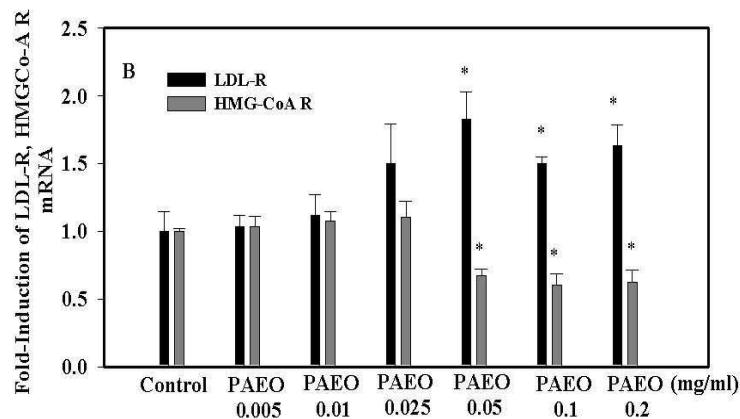
(54) 차전초 정유를 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물

(57) 요약

본 발명은 차전초 정유의 새로운 약학적 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 차전초 정유를 이용하여 아직 고지혈증이나 아테로마성 동맥경화 질병을 가지고 있지 않은 일반 사람들에게 이들 질병에 걸릴 위험성을 줄여 줄 수 있는 콜레스테롤 저하제 개발을 위한 기능성 식·의약 소재 개발에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 수증기 증류법을 이용하여 얻은 허브 이차대산물인 차전초 정유는 항산화 및 콜레스테롤 저하 작용이 있고 이들 작용에 기인하여 동맥경화를 예방하거나 치료하는 데에 도움을 줄 수 있는 천연 의약 소재 및 건강 기능성 소재 개발을 위해 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

김경현

서울시 서초구 서초4동 삼풍아파트 18-703

박권우

서울 중랑구 묵1동 두산아파트 520-1005

특허청구의 범위

청구항 1

차전초 정유 (*Plantago asiatica* oils)를 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물.

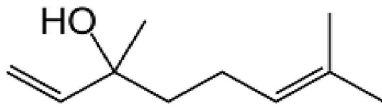
청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 차전초 정유는 수증기 증류 (steam distillation)법을 이용하여 추출하는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 저하용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 차전초 정유는 주요 휘발성 정유 물질로서 하기 화학식 1의 리나로올 (linalool)을 함유하는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 저하용 조성물.

[화학식 1]



청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 차전초 정유는 리나로올 (linalool)외에 펜칠알콜 (fenchylalcohol), 비시클로저마크렌 (bicyclogermacrene), 멘텐-2,3-디올 (menthen-2,3-diol) 및 유제놀 (eugenol)을 더 함유하는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 저하용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 차전초 정유는 인간의 간세포에서 LDL 수용체의 발현을 증가시키고 HMG-CoA 환원효소의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 저하용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 차전초 정유는 인간의 혈액과 간장에서 콜레스테롤 및 중성지방을 낮출 수 있는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 저하용 조성물.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항의 콜레스테롤 저하용 조성물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 또는 동맥경화증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 6항의 콜레스테롤 저하용 조성물을 유효성분으로 함유하는 기능성 건강 식품.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<6> 본 발명은 차전초 정유의 새로운 약학적 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 차전초 정유를 이용하여 아직 고지혈증이나 아테로마성 동맥경화 질병을 가지고 있지 않은 일반 사람들에게 이들 질병에 걸릴 위험성을 줄여 줄 수 있는 콜레스테롤 저하제 개발을 위한 기능성 식·의약 소재 개발에 관한 것이다.

<7> 관상동맥 심장질환은 과학이 발전을 하였지만 여전히 주요한 사망 원인 질병이다. 혈중 LDL 콜레스테롤

과 중성지방 수준의 증가는 관상동맥 심장질환의 위험인자이다. 지질을 낮추는 약이나 항산화제 첨가제는 고지혈증이나 아테로마성 동맥경화 질병을 가진 환자에게 동맥경화성 지단백질 형성을 영향력 있게 줄여 줄 수 있다. 그러나 식이적 방지는 아직 고지혈증이나 동맥경화 질병을 가지고 있지 않은 일반 사람들에게 아주 중요하다. 보통 우리가 섭취하는 과일이나 채소, 과거부터 사용되어 오고 있는 한약재료에 함유되어 있는 phytochemicals은 지질과 지단백질에 관여하는 유전자 발현을 조절함으로써 콜레스테롤을 영향력 있게 줄여 줄 수 있다. 따라서, 이들 phytochemicals은 아마 정상적인 사람이 고지혈증에 걸리는 것을 방지하기 위해서 사용되어질 수 있다. 식품에 함유되어 있는 phytochemicals은 종종 강력한 항산화력을 가지고 있다. 따라서 그것들에 의해 고유한 혈장 지질 수준을 유지할 수 있을 것이다.

<8> 차전초 (*Plantago asiatica*)는 질경이라 불리기도 하면 이 풀은 질경이과 (*Plantaginaceae*)에 속하며, 영명은 Asian plantain이다. 이들 풀은 동아시아에서 항암과 감염성 질병들 등 다양한 질병의 치료를 위해 사용되어진 전형적인 한약재료이다.

<9> 차전초 수용성 추출물은 다양한 스트레스 환경들을 영향력 있게 중화할 수 있는 heme oxygenase-1의 발현을 증가시키고 인간 mononuclear 세포내에서 interferon- γ 분비를 역시 촉진시킨다. 식물의 수용성 추출물과 비교하여, 허브 정유는 일반적으로 다양한 휘발성 화합물을 함유하고 있고 그것들은 향기가 있고 약효를 가지고 있다. 허브 오일은 일반적으로 토크페놀과 페놀 화합물이 풍부하고 이들은 강한 항산화력을 가지고 있다. 허브 정유에서 발견된 terpenoids는 간에서 콜레스테롤 생합성 저해를 통하여 콜레스테롤 저해효과를 나타내는 것이 보고되었다.

<10> 따라서 유사한 다른 정유인 차전초 정유도 다양한 휘발성 생리활성물질이 함유하고 있을 것이고 그리고 항산화 효과와 지질을 낮추는 영향을 나타낼 것이다. 그러나 이들 차전초 정유의 휘발성 생리활성 물질의 조성 과 지질을 감소시키는 영향력에 대해서는 연구되어지지 않았다. 따라서 본 발명자들은 차전초 정유의 휘발성 구성 물질이 무엇인지를 분석하였고, 차전초 정유가 혈중 및 간장에서 지질을 감소시킬 수 있는지 먼저 알아보았고, 그 다음 어떤 기작에 의해 이들 지질이 감소되는지 콜레스테롤 대사와 관련된 유전자 및 단백질 발현을 통해 알아보았다.

<11> 차전초는 이뇨제로 소변불리, 신장염, 방광염, 요도염, 부종, 각기병, 눈의 충혈, 기침, 가래 등에 민간에서 사용하였다. 그 외에도 진해제로 만성기관지염에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 만성간염, 동맥경화증 등과 같은 성인병 치료제로 그 중요성이 대두되고 있어 차전초의 생리활성에 대한 연구들이 진행되고 있다.

<12> 보고된 생리활성 기능을 위해 사용부위는 잎과 씨이며, 씨의 추출물은 이뇨 (diuretic effect), 상처치료 (wound healing), 세포억제효과가 있는 것으로 알려졌고, 차전초 추출물은 고혈압, 항종양, 혈당강하, 담즙울체개선 효과가 이미 연구되었다. 상기의 차전초의 약리효과를 이용하는 방법으로는 차전초 생즙을 마시거나 달려 마시는 방법이 민간에서 주로 사용되고 있고 차전초에 포함된 생리활성 물질을 분리하여 의약품으로 이용하는 방법도 시도되고 있다. 그러나 차전초 생즙을 마시거나 달려 마시는 방법은 바쁜 현대를 살아가는 현대인에게 복용상의 어려움이 있고 생리활성 물질을 분리하는 방법은 시간과 비용이 많이 들어 시장성이 없다는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 수증기 추출법을 이용하여 간단하게 차전초 이차대사산물인 정유를 얻어 기능성 식·의약 소재를 개발하였다.

<13> 차전초 정유의 휘발성 성분은 아직 보고되어 있지 않고, 차전초 정유가 혈중 콜레스테롤이나 간장 콜레스테롤을 낮출 수 있는지 대한 연구 및 그 기작에 대한 연구는 전무한 상태이다. 많은 생리활성 물질 연구에서 기작 연구와 같은 생의학적 연구접근이 미비하여 식·의약 소재 개발을 위한 한계를 가지고 있었다.

<14> 따라서 본 발명은 차전초 정유 투여가 혈중 및 간장에서 콜레스테롤 및 중성지방 함량에 미치는 영향을 마우스 모델을 사용하여 실험하였고, 어떤 기작에 의해 콜레스테롤 저하효과를 나타내는지 그 기작을 인간 간세포와 마우스 간을 이용하여 연구를 진행하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<15> 따라서, 본 발명의 목적은 허브이차대사물인 차전초 정유를 이용하여 아직 고지혈증이나 아테로마성 동맥경화 질병을 가지고 있지 않은 일반 사람들에게 이들 질병에 걸릴 위험성을 줄여 줄 수 있는 콜레스테롤 저하제 개발을 위한 기능성 식·의약 소재 개발에 관한 것이다.

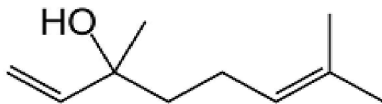
발명의 구성 및 작용

<16> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 차전초 정유 (*Plantago asiatica* oils)를 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물을 제공한다.

<17> 본 발명에 있어서, 상기 차전초 정유는 차전초로부터 정유를 추출할 수 있는 어떠한 당업계에 알려진 추출방법, 예컨대, 용매추출 (solvent extraction), 증류 (hydrodistillation) 및 수증기 증류 (steam distillation) 등의 다양한 방법을 사용할 수 있으나, 가장 바람직한 방법인 수증기 증류 (steam distillation)을 이용하여 추출하는 것을 특징으로 한다.

<18> 본 발명에 있어서, 상기 차전초 정유는 바람직하게는 주요 휘발성 정유 물질로서 하기 화학식 1의 리나로올 (linalool)을 함유하는 것을 특징으로 한다. 상기 리나로올은 상기 차전초 정유의 82.5%를 차지함으로써 본 발명의 콜레스테롤 저하 효과에 주된 유효성분으로 작용할 것으로 여겨진다.

<19> [화학식 1]



<20>

<21> 상기 리나로올 (linalool) ($C_{10}H_{18}O$, CAS No.: 78-70-6)은 많은 방향성 식물이나 꽃에서 발견되는 천연 terpene alcohol로서, 종래에는 향수나, 비누, 세제, 샴푸 등의 향료성분으로 사용되었으나, 본 발명에서는 상기 리나로올의 콜레스테롤 저하 효과를 처음으로 밝혀냈다.

<22> 본 발명에 있어서, 상기 차전초 정유는 바람직하게는 리나로올 (linalool)외에 펜칠알콜 (fenchylalcohol), 비시클로저마크렌 (bicyclogermacrene), 멘텐-2,3-디올 (menthen-2,3-diol) 및 유제놀 (eugenol)을 더 함유하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서는 상기 차전초 정유의 주요 휘발성 정유 성분을 GC-MS로 분석하였다.

<23> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 차전초 정유는 인간의 간세포에서 LDL 수용체의 발현을 증가시키고 HMG-CoA 환원효소의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 한다. 또한, 바람직하게는 상기 차전초 정유는 인간의 혈액과 간장에서 콜레스테롤 및 중성지방을 낮출 수 있는 것을 특징으로 한다.

<24> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 콜레스테롤 저하용 조성물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 또는 동맥경화증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<25> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 콜레스테롤 저하용 조성물을 유효성분으로 함유하는 기능성 건강 식품을 제공한다.

<26> 본 발명에서는 상기 차전초 정유가 실험관내, 세포 및 마우스에서 콜레스테롤을 저하시키는 효과가 있다는 것을 증명하였다. 이러한 콜레스테롤 저하 효과가 나타나는 것은 간에서 콜레스테롤 생합성에 관여하는 HMG-CoA 환원효소 발현 억제에 기인된 기작이라는 것을 발견하였다. 뿐만 아니라 간 세포내에서 LDL-수용체가 증가하는 것도 더해진 콜레스테롤 저하 기작이라는 것을 발명하였다. 또한, 감소된 혈장 중성지방 수준과 감소된 콜레스테롤 수준 효과 역시 적당히 차전초 정유를 섭취했을 때 심장 질환 예방에 더해진 유익성을 제공할 수 있음을 알 수 있다.

<27> 본 발명의 콜레스테롤 저하 효과가 있는 차전초 정유는 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있으며 이들은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 뿐만 아니라 일반인에게 동맥경화 예방을 위한 기능성 식품 개발 시 첨가제로 사용할 수 있다.

<28> 본 발명에 따른 차전초 콜레스테롤 저하용 정유는 0.03-0.15 mg 차전초 정유/18-25 g 몸무게/일 섭취량을 기준으로 섭취 할 수 있도록 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물 그리고 동맥경화증 예방에 효과가 있는 기능성 식품 조성물을 제조하여 섭취할 수 있다. 상기 투여량은 연령, 증상 등에 따라 적당히 증감하는 것이 가능하다.

<29> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<30> 실험재료

<31> 본 발명에 사용된 차전초 잎은 2005년 6월 고려대학교 수목원에서 재배한 것을 사용하였다. LDL은 고려대학교병원에서 인체에서 채취한 혈액을 초원심분리 (111,000 rpm, 1시간 51분)하여 LDL을 얻었다. HepG2 세포는 한국 세포주은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다.

<32>

<33> 실시예 1. 차전초 정유 (essential oil) 제조방법 및 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)에 의한 차전초 정유의 분석

<34> 차전초 잎 부분을 세절하여 차전초 정유 추출을 위한 시료로 사용하였다. 차전초 정유 (essential oil)는 수증기 연속추출방법 (SDE, simultaneous steam distillation/extraction)으로 추출하였다. 즉 차전초 잎 생체시료 100 g에 증류수 4 L를 더한 후 전기 맨틀 위에서 3시간 동안 연속 추출하였다. 추출용매로는 디에틸에테르 (diethyl ether)를 사용하였다. 추출한 후 Na₂SO₄를 이용하여 용매 내 수분을 완전히 제거하였고, rotary evaporator로 감압 농축하여 최종적으로 정유 성분을 분리하였으며, 이들 정유는 GC-MS로 분석하였고 사용된 MS와 GC는 각각 Quattro GC/MS/MS (Macromass, Manchester, UK)와 Agilent 6890 N (Agilent Technologies, CA, USA)이었고, GC 분석 조건은 capillary column (50 m length x 0.25 mm I.d. x 0.2 µm film thickness, AT-1701, Alltech, PA, USA)을 사용하여 1 µL 차전초 정유를 각 칼럼내로 주입하였다. 오븐 온도는 40℃ 초기온도에서 분당 3℃씩 120℃까지, 그 다음은 분당 5℃씩 200℃까지 올라가게 설정하였다. 헬륨을 이동상 기체로 사용하였고, 흘러가는 속도는 분당 1 mL로 설정하였다. Injector와 detector 온도는 각각 280℃와 240℃였다. 차전초 정유의 Total ion chromatograms는 MassLynx 4.0 (MassLynx 4.0 SCN 474, Micromass, Manchester, UK)로 분석하였고, 이 결과들은 Wiley mass spectral database와 비교하여 동정하였다.

<35> 그 결과, 차전초 잎의 정유 성분은 40개가 검출되었고, 주요한 휘발성 정유 물질은 linalool (82.5%), fenchylalcohol (9.1%), bicyclogermacrene (3.7%), menthen-2,3-diol (2.7%) 그리고 eugenol (2.0%) 이라는 것을 발명하였다 (표 1).

<36> [표 1] gas chromatography-mass spectrometry를 이용하여 차전초 정유의 성분 분석

<37>

Peak number	Compound	Peak area (%)
Monoterpene hydrocarbons		
1	Sabinene	t ^a
2	β-Pinene	t
3	Limonene	t
4	Phellandrene	t
Oxygenated monoterpenes		
5	2,3-Dehydro-1,8-cineole	t
6	Carvacrol	t
7	Epoxylinool	t
8	α-Terpineol	t
9	Linalool	82.52
10	Borneol	t
11	Citronellal	t
12	Myrtenol	t
13	Terpinene-4-ol	t
14	(Z)-Carveol	t
15	Menthen-2,3-diol	2.66
16	Neral	t
17	Anethole	t
18	Geranial	t
19	Citronellyl acetate	t
20	Geranylacetate	t
21	Damascenone	t

22	Eugenol	1.97
23	Dihydrocarveol	t
24	Neroloxide	t
Sesquiterpene hydrocarbons		
25	Bicyclogermacrene	3.73
26	Caryophyllene	t
27	Germacrene-D	t
28	Farnesene	t
29	γ -Elemene	t
30	Cadinene	t
Carbonyl compounds		
31	Nonanal	t
32	(Z)-Jasmone	t
33	β -Ionone	t
Alcohols		
34	Benzylalcohol	t
35	Fenchylalcohol	9.12
36	Chavicol	t
Other		
37	Dodecane	t
38	Iso-geranol	t
39	Bourbonene	t
40	1-Dodecen-3-yne	t
Total area of identified peaks (%)		98.02

^a t: Trace amount, less than 0.05% of the total peak area.

실시예 2. 세포주 배양 및 시료처리

간암 세포주인 HepG2는 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양 받아 사용하였다. 이 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Join Bio-Innovation, Korea) 배지에 10% 비활성화 우태아 혈청 (Join Bio-Innovation, Korea), 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액 (100 x)를 첨가하여 37℃ 및 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. 우선 충분한 세포를 얻기 위하여 T75 플라스크에서 세포를 배양하였고, 2 ~ 3일에 한번씩 배지를 80% 교체하였다. 충분히 자랐을 때 trypsin-EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) 용액 (1 x)를 사용하여 부착된 세포를 떼어 낸 후 성장 배지에 세포수를 1×10^5 cells/mL로 조정하여 6-well Falcon 배양판에 2 mL씩 분주하였다. 분주한 세포가 80% 정도 성장하였을 때 우태아 혈청과 항생제를 첨가하지 않은 DMEM에 차전초 정유 0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 그리고 0.2 mg/mL를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이와 같이 배양된 세포는 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)를 위한 시료로 사용하였고, Western blot 분석을 위해서는 같은 조건에서 차전초 정유 0, 0.025, 0.05, 0.1 그리고 0.2 mg/mL를 각각 처리 하였다.

실시예 3. 세포내의 RNA 추출

HepG2 세포는 배지를 제거한 후 TRIzol Reagent (Invitrogen)를 1 mL 씩 각 배양 well에 넣고 피펫으로 여러 번 혼합시켜 배양세포로부터 RNA 추출 시료를 얻었다. 마우스 간은 5분간 실온에 방치한 후 1 mL 의 TRIzol 용액 당 0.2 mL의 클로로포름을 넣고 15초간 잘 흔들어 준 후 실온에서 2 ~ 3분간 더 반응시켰다. 4℃에서 15분간 원심분리 ($12,000 \times g$)하면 가장 위층인 RNA, 중간층인 DNA, 그리고 가장 아래층인 단백질 층으로 분리되었다. DNA가 오염되지 않게 조심스럽게 위층을 잘 분리하여 다른 튜브로 옮긴 후 아이소프로필알콜을 0.5 mL넣고 10분간 반응시켜 RNA를 침전시켰다. 그 후 4℃에서 10분간 원심분리 ($12,000 \times g$)후 상층액을 버리고 침전물을 75% DEPC-ethanol을 1 mL 을 넣고 몇 번 흔들어 준 후 다시 4℃에서 5분간 원심분리 ($12,000 \times g$)하였다. 역시 상층액을 버리고 실온에서 침전물을 5 ~ 10분간 말린 후 0.1% DEPC 증류수로 침전물을 녹였다. 0.1% DEPC 증류수 995.0 mL에 RNA 5 mL를 넣어 200배 희석 후 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. RNA의 농도는 260

nm에서의 흡광도값 $\times 40 \mu\text{g/mL} \times (\text{희석배수})$ 로 계산하였고, 260 nm 와 280 nm의 비가 1.6이상일 때 순수한 RNA라고 보고 다음 단계를 진행하였다.

실시예 4. 올리고뉴클레오타이드 프라이머 (Oligonucleotide primers)

본 발명에 사용된 인간 LDL 수용체, HMG-CoA 환원효소, 및 18s rRNA, 그리고 마우스 LDL 수용체, HMG-CoA 환원효소, 및 β -actin의 뉴클레오타이드 서열은 표 2에 나타난 바와 같다.

[표 2] 본 발명에 사용된 PCR 프라이머의 서열

Gene	Primer	Sequence ^a
Human		
LDL receptor	Forward	CAATGTCTCACCAAGCTCTG
	Reverse	TCTGTCTCGAGGGTAGCTG
HMG-CoA reductase	Forward	TACCATGTC AGGGGTACGTC
	Reverse	CAAGCCTAGAGACATAATCATC
18s rRNA	Forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA
	Reverse	GCTGGAATTACCGCGGCTGC
Mouse		
LDL receptor	Forward	ACTCAGGCAGCAGGAACGAG
	Reverse	GTCATTTTCACAGTCTACCT
HMG-CoA reductase	Forward	GTTCTTTCGGTGCTGTGTCTGGA
	Reverse	CTGATATCTTTAGTGCAGAGTGTGGCAC
β -actin	Forward	TGCTGTCCCTGTATGCCTCT
	Reverse	AGGTCTTTACGGATGTCAACG

^a Primers are shown 5'→ 3'.

실시예 5. cDNA 합성

본 발명의 First-strand cDNA를 생산하기 위하여 PowerScript Reverse Transcriptase (Clontech)를 이용하였다. 즉, 먼저 oligo(dT)₁₅ primer (Promega, USA)와 Random hexamers (Promega, USA)를 동일량 섞어 1 μL PCR 튜브에 넣고 추출한 RNA (2 μg)와 RNase-free 증류수로 최종 부피가 11 μL 가 되도록 맞추었다. 70 °C에서 10분 동안 끓인 후 즉시 얼음에서 냉각시켰다. 5 X first-strand 완충액 4 μL , dNTP mix (10 mM each) 2 μL , DTT (100 mM) 2 μL 및 Powerscript Reverse Transcriptase 1 μL 를 첨가한 후 피펫으로 골고루 섞었다. 그 후 42 °C에서 90분 70 °C에서 15분간 반응시켰다.

실시예 6. PCR

각 유전자 발현을 알아보기 위하여 PCR를 실시하였다. 각 유전자 발현을 알아보기 위하여 PCR를 실시하였다. 1U Taq DNA polymerase (iNtRON Biotechnology, Inc. Korea), 10 mM dNTP 2 μL , 10xPCR Buffer (iNtRON Biotechnology, Inc. Korea) 2 μL , Forward Primer (15 μM)와 Reverse Primer (15 μM)를 각각 0.25 μL , 증류수 14.25 μL 그리고 앞에서 합성한 first-strand cDNA (DNA templet) 1 μL 을 PCR tube에 넣은 후 잘 섞었다. Human LDL 수용체와 HMG-CoA 환원효소는 혼합물을 95°C에서 5분간 pre-denature시킨 후, 95°C에서 30초간, 62°C에서 30초간, 72°C에서 30초간 각각 29와 26 cycles 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension 반응을 하였다. Human 18s rRNA는 혼합물을 95°C에서 10분간 pre-denature시킨 후, 95°C에서 30초간, 60°C에서 30초간, 72°C에서 30초간 10 cycles 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension 반응을 하였다. Mouse LDL receptor는 혼합물을 94°C에서 4분간 pre-denature시킨 후, 94°C에서 30초간, 42°C에서 30초간, 72°C에서 30초간 30 cycles 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension 반응을 하였다. Mouse HMG-CoA reductase는 혼합물을 94°C에서 4분간 pre-denature시킨 후, 94°C에서 30초간, 57°C에서 30초간, 72°C에서 30초간 29 cycles 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension 반응을 하였다. Mouse β -actin은 혼합물을 94°C에서 4분간 pre-denature시킨 후, 94°C에서 30초간, 50°C에서 30초간, 72°C에서 30초간 23 cycles 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension 반응을 하였다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가된 1.2% agarose gel에 80 V에서 30분간 전기영동 한 후 자외선광으로 유전자 발현 정도를 알아

보았다. 그 밴드의 강도를 SigmaGel (Jandel Scientific) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였고, 내부 표준물질로써 HepG2는 18s rRNA를 그리고 생쥐 (Mouse)는 β -actin을 사용하였다.

<52> 그 결과, 인간의 간세포 HepG2에 0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 이나 0.2 mg/mL 차전초 정유를 12시간동안 처리하였을 때 LDL 수용체 및 HMG-CoA 환원효소의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 알아보았다 (도 1A). 차전초 정유 처리는 낮은 농도에서는 유전자 발현 변화에 영향을 미치지 않았다. 그러나, LDL 수용체의 mRNA 발현 수준은 0.05, 0.1, 그리고 0.2 mg/mL 차전초 정유 처리에 의해 증가하였다 (도 1A). 반대로, HMG-CoA 환원효소의 mRNA 발현은 현저하게 감소하였다. 0.2 mg/mL 차전초 정유 처리가 LDL 수용체 mRNA 발현에 미치는 영향을 무처군과 비교한 결과 63% 증가시켰고, HMG-CoA 환원효소는 37% 감소시켰다 (도 1A).

<53> 실시예 7. Western blot 분석

<54> 대조군과 24시간동안 차전초 정유를 처리한 HepG2를 lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor Cocktail)를 이용하여 4°C에서 용해시킨 후 원심분리 (14,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 단백질을 얻었다. 단백질의 농도는 이미 알고 있는 albumin을 표준용액으로 하여 Bradford 방법 (1976)으로 측정하였고, 동일량의 단백질(30 μ g)과 β -mercaptoethanol를 포함한 sample buffer (50 μ L β -mercaptoethanol per 950 μ L sample buffer)를 1:2로 혼합한 후 3분 동안 끓였다. 그 단백질은 Bio-Rad mini-gel system를 이용하여 SDS-PAGE 후, 그들 중 하나는 Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, 1993)로 염색을 하였고 다른 하나는 nitrocellulose membrane (0.45 μ m, Schleicher&Schuell BioScience PROTAN nitrocellulose transfer membrane)으로 단백질을 전이하였다. 비특이적인 단백질 (nonspecific protein) 결합 부분은 0.1% Tween 20와 5% 탈지분유를 함유한 PBS에 1시간동안 반응 시킴으로써 blocking을 하였고, nitrocellulose 막에 전이된 단백질은 특정 항체와 반응하여 western blot을 실시하였다. 발색은 enhanced chemiluminiscent (ECL) method를 이용하여 x-ray 필름에 감광시켰다.

<55> Western blot분석 결과는 RT-PCR에 의한 결과와 유사하였다. 즉, 0.025, 0.05, 그리고 0.1 mg/mL 차전초 정유 처리에 의해 LDL 수용체 단백질이 현저하게 증가하였고, 반면 HMG-CoA 환원효소 수준은 현저하게 감소하였다 (도 1B).

<56> 실시예 8. 사용 동물의 사육 및 식이

<57> 실험동물은 평균체중이 15~19 g인 6주령의 C57BL/6J 생쥐를 오리엔트바이오로부터 구입하였다. 일반식으로 일주 일간 환경에 적응시킨 후 난괴법 (randomized complete block design)에 의해서 한 군을 6 마리씩 나누었고 사육상자에 3~4 마리씩 넣어 실험 사육하였다. 사육기간 동안 물은 자유로이 섭취시키며, 매일 일정량의 차전초 허브 정유를 경구 투여하였다. 사육실의 온도 ($20 \pm 2^\circ$ C) 및 습도 ($50 \pm 10\%$)는 최적조건으로 유지시켰고, 명암은 12시간 주기로 조절하였다. 차전초 (*Plantago asiatica*) 허브 이차 대사 산물인 허브 정유를 고지혈증에 미치는 영향을 알아보기 위해서 일반식이군 (1군, n=6), 저농도 차전초 정유 경구 투여군 1 (PAEO 1: 0.03 mg 차전초 정유/마우스/일, n=6) 및 고농도 차전초 정유 경구 투여군 2 (PAEO 2: 0.15 mg 차전초 정유/마우스/일, n=6)으로 나누어 3주간 실험 사육하였다.

<58> 실시예 9. 실험동물의 처리

<59> 사육기간 중 실험동물은 1주마다 체중을 측정한 후 16~19시간 절식시킨다. 그런 다음 에테르 마취하에 안와정맥 총 채혈법으로 채혈한 다음 3,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다.

<60> 마지막 3주째는 안와정맥총 채혈후 심장채혈법으로 최대한 많은 혈액을 채혈하였고 원심분리하여 얻은 혈청 (serum)을 실험을 위해 즉시 사용하거나 -20° C에 보관하였다. 마지막 3주째 채혈 후 간장 (liver)을 적출하여 PBS로 씻은 후 즉시 액체질소에 냉동 후 -80° C에 다음 실험을 위해 보관하였다.

<61> 실시예 10. 혈청 및 간장 분석

<62> 간장 조직 (0.1 g)을 10 mL를 chloroform:methanol (2:1, v/v) 용액으로 지질을 추출하고 N_2 하에서 건조 시킨 후 100 μ L 3차 증류수로 녹여 측정용 시료로 한다. 간 (liver)과 혈청 (serum) 중 총콜레스테롤 및 중성지질 농도는 시판 kit을 이용하여 효소 비색법으로 측정한다.

<63> 낮은 농도의 차전초 정유 (PAEO 1: 0.03 mg/마우스/일)를 1주나 2주 동안 구강 투여 후 중성지방은 변화지 않았다 (도 2B). 그러나 혈장 콜레스테롤 수준은 2주 후 현저하게 감소하였다 (-17% ; 도 2A). 3주 후, 그 혈장 콜레스테롤과 중성지방 수준은 대조군의 그것과 비교하여 각각 29%, 46%까지 현저하게 감소하였다 (도 2A, 2B). 고

농도의 차전초 정유 (PAEO 2: 0.15 mg/마우스/일)에서는 혈장 중성지방 농도가 구강 투여 일주일부터 대조군과 비교하여 현저하게 감소하였으나 2주와 3주 지속되는 구강투여가 더 중성지방을 낮추지는 못하였다 (도 2B). 혈장 콜레스테롤 농도가 구강투여 2주후 대조군과 비교하여 현저히 낮았으며, 3주에도 유사한 경향을 보여 주었다 (도 2A). 총콜레스테롤 및 중성지방 농도가 고농도의 차전초 정유를 3주동안 투여했을 때 각각 21% 및 29% 감소하였다 (도 2A, 2B). 간장 중 총콜레스테롤 및 중성지방 농도는 도 3A, 3B와 같다. 총 콜레스테롤 농도와 중성지방 농도는 저농도 차전초 투여군 PAEO 1 처리군에서는 일반식이군과 비교하여 유의적 차이를 나타내지 않았지만 고농도 차전초 정유 투여군 PAEO 2 처리군은 일반식이군과 비교하여 현저히 낮았다 (도 3A, 3B).

<64> **실시 예 12. 마우스 간장 내 LDL receptor, HMG-CoA reductase, β -actin 유전자 발현 분석 및 LDL receptor, HMG-CoA reductase 단백질 발현 분석**

<65> -80° C에 보관된 간을 꺼내어 액체질소를 부으면서 해동되지 않은 상태에서 일정량 취하여 즉시 TRIzol을 넣어 균질화 (homogenization) 하였다 [0.01 g의 시료당 1 mL TRIzol Reagent (Invitrogen)]. 그 다음 *In vitro*와 동일한 방법으로 RT후 PCR로 유전자 발현을 분석하였다.

<66> 남은 조직은 lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor Cocktail)를 첨가한 후 단백질 발현 분석을 위해 균질화 (homogenization)하였다. 원심분리 (14,000 rpm, 10 min, 4° C)한 후 단백질을 얻었고 *In vitro*와 동일한 방법으로 western blot을 실시하고, 발색은 enhanced chemiluminiscent (ECL) method를 이용하여 x-ray 필름에 감광시킨다.

<67> 혈장 콜레스테롤 농도가 저, 고농도의 차전초 정유 구강투여에 의해 현저하게 감소되었기 때문에 본 발명에서는 차전초 정유를 3주 동안 구강 투여한 마우스의 간을 추출하여 콜레스테롤과 관련된 유전자 발현을 분석하였다. 차전초 정유를 구강 투여한 마우스의 LDL 수용체 mRNA 유전자 발현 수준이 대조군 마우스에 비해 현저히 높았고 (도 4), 저농도 투여군 (PAEO 1)이 고농도 투여군 (PAEO 2)에 비해 더 높았다 (도 4). 그러나 LDL 수용체 단백질 수준은 저농도 투여군에서 약간 증가하였으나 통계학적 유의적 차이는 보여주지 않았다 (도 5). 간에서 HMG-CoA 환원효소 mRNA와 단백질 수준은 차전초 정유 투여 후 대조군에 비해 현저히 감소하였다 (도 4, 5). HMG-CoA 환원효소 전사가 저농도 투여시 41%, 고농도 투여시 46% 감소하였다 (도 4). 단백질 수준은 역시 고농도 구강투여시 11%까지 현저히 감소하였다 (도 5).

<68> **통계처리**

<69> 통계분석은 두 그룹 간에는 Students *t*-test를 이용하였고, 다양한 그룹 간에는 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 한 후 $P < 0.05$ 일 때 Tukey test에 의하여 각 실험군의 유의성을 검정하였다. 실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차 (Mean $\pm$ SD)로 나타내었다.

발명의 효과

<70> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 수증기 증류법을 이용하여 얻은 허브 이차대산물인 차전초 정유는 항산화 및 콜레스테롤 저하 작용이 있고 이들 작용에 기인하여 동맥경화를 예방하거나 치료하는 데에 도움을 줄 수 있는 천연 의약 소재 및 건강 기능성 소재 개발을 위해 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 인간의 간세포 HepG2에 차전초 정유 처리가 콜레스테롤 생합성에 관여하는 효소인 HMG-CoA 환원효소 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase) 및 LDL를 혈중에서 간으로 이동시키는 LDL 수용체 (LDL-receptor)의 mRNA 발현량에 미치는 영향 (1A)과 LDL 수용체 및 HMG-CoA 환원효소의 단백질 발현에 미치는 영향 (1B)을 나타낸 그래프이다.

<2> 도 2는 C57BL/6J 마우스에 차전초 정유 경구 투여가 혈청 총콜레스테롤 (total cholesterol)(2A) 및 중성지방 (triglyceride)(2B) 농도에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

<3> 도 3은 C57BL/6J 마우스에 차전초 정유 경구 투여가 간장 총콜레스테롤 (3A) 그리고 중성지방(3B) 농도에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

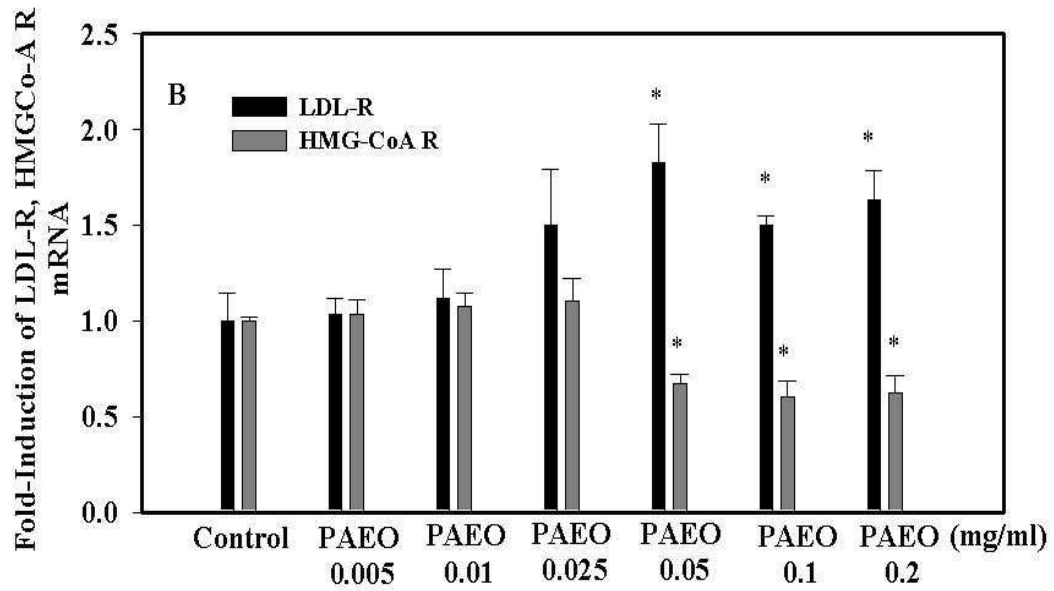
<4> 도 4는 C57BL/6J 마우스에 차전초 정유 경구 투여가 LDL-수용체 및 HMG-CoA 환원효소 유전자 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

<5> 도 5는 C57BL/6J 마우스에 차전초 정유 경구 투여가 LDL-수용체와 HMG-CoA 환원효소 단백질 발현에 미치는 영향

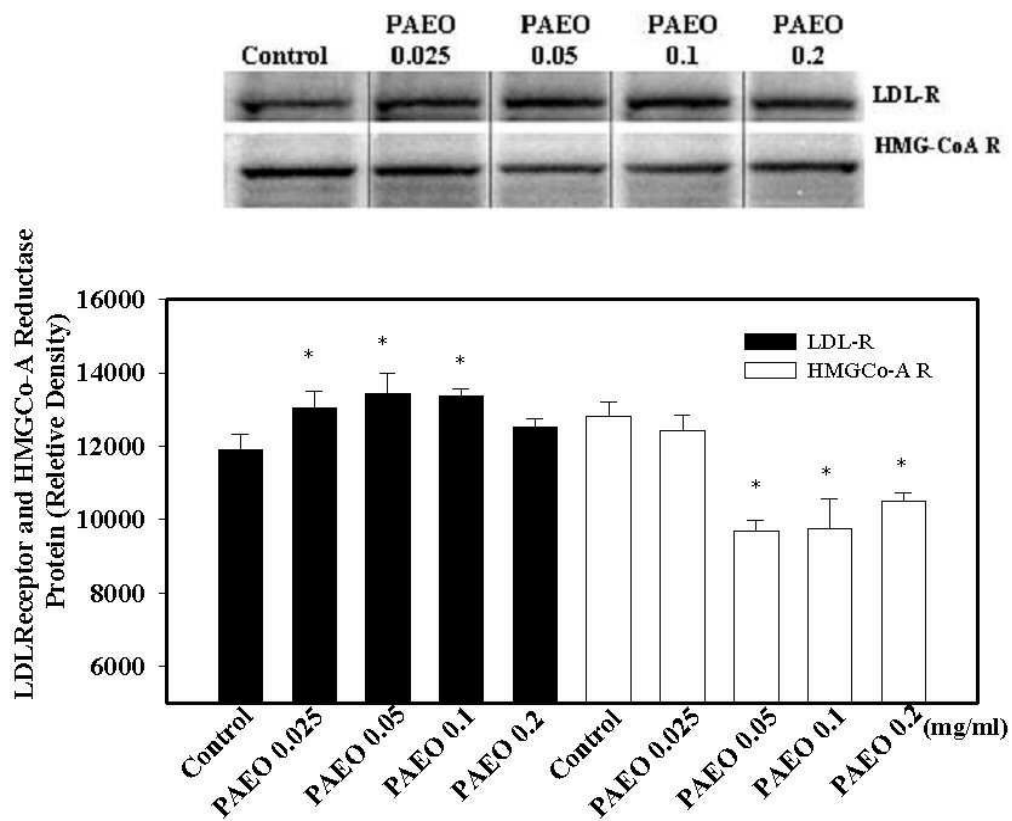
을 나타낸 그래프이다.

도면

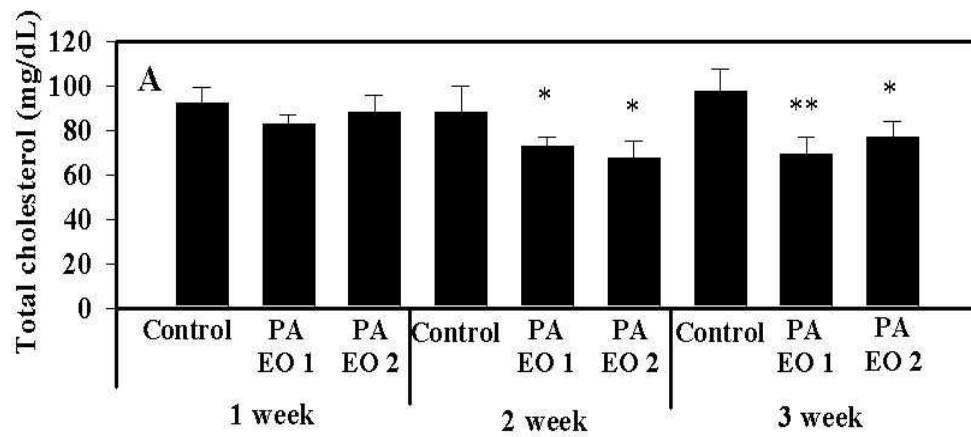
도면1a



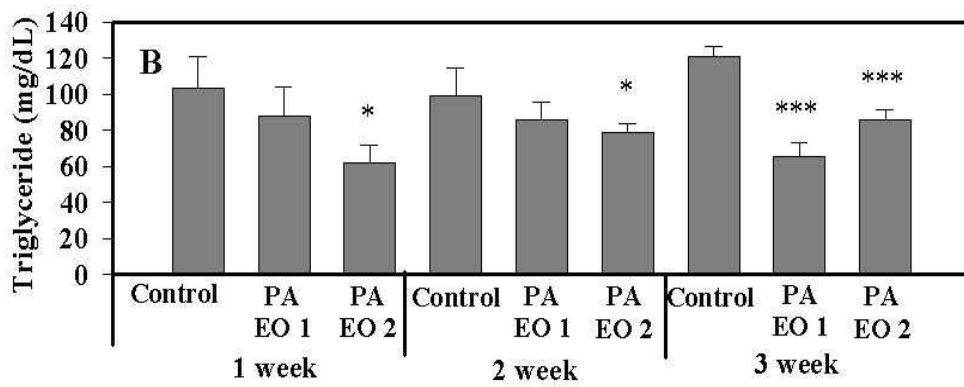
도면1b



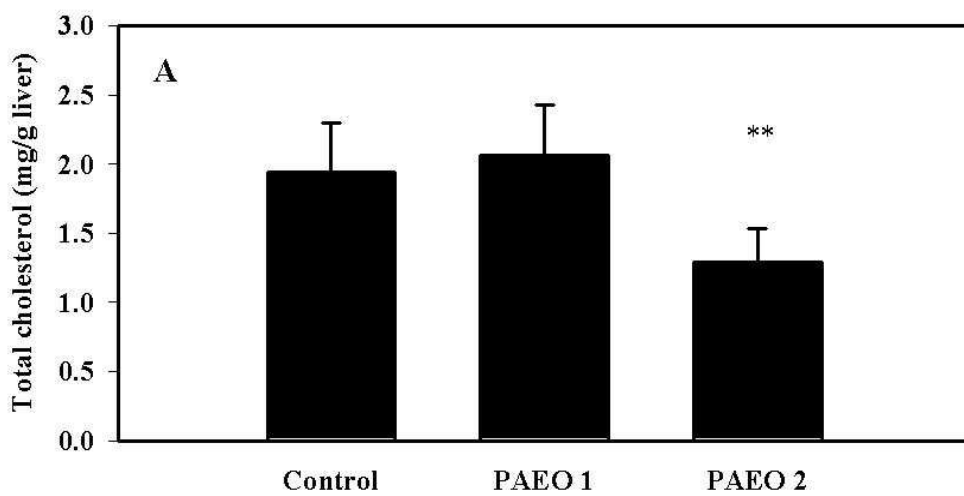
도면2a



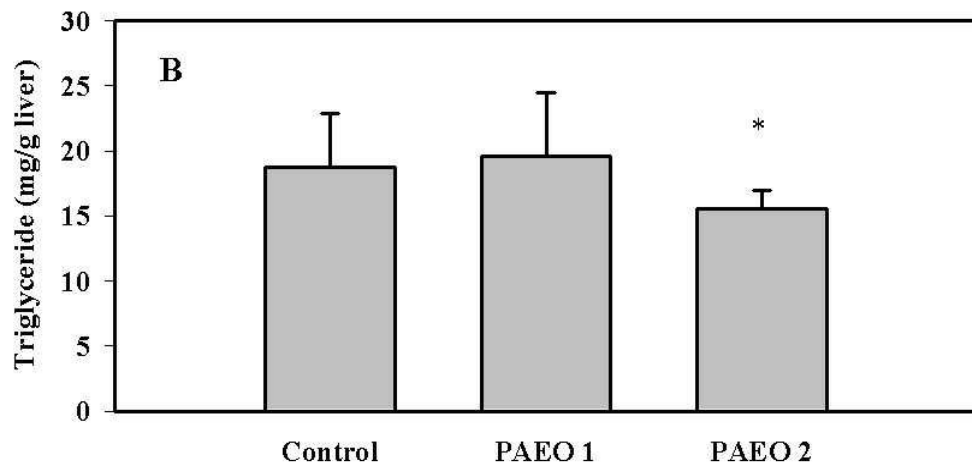
도면2b



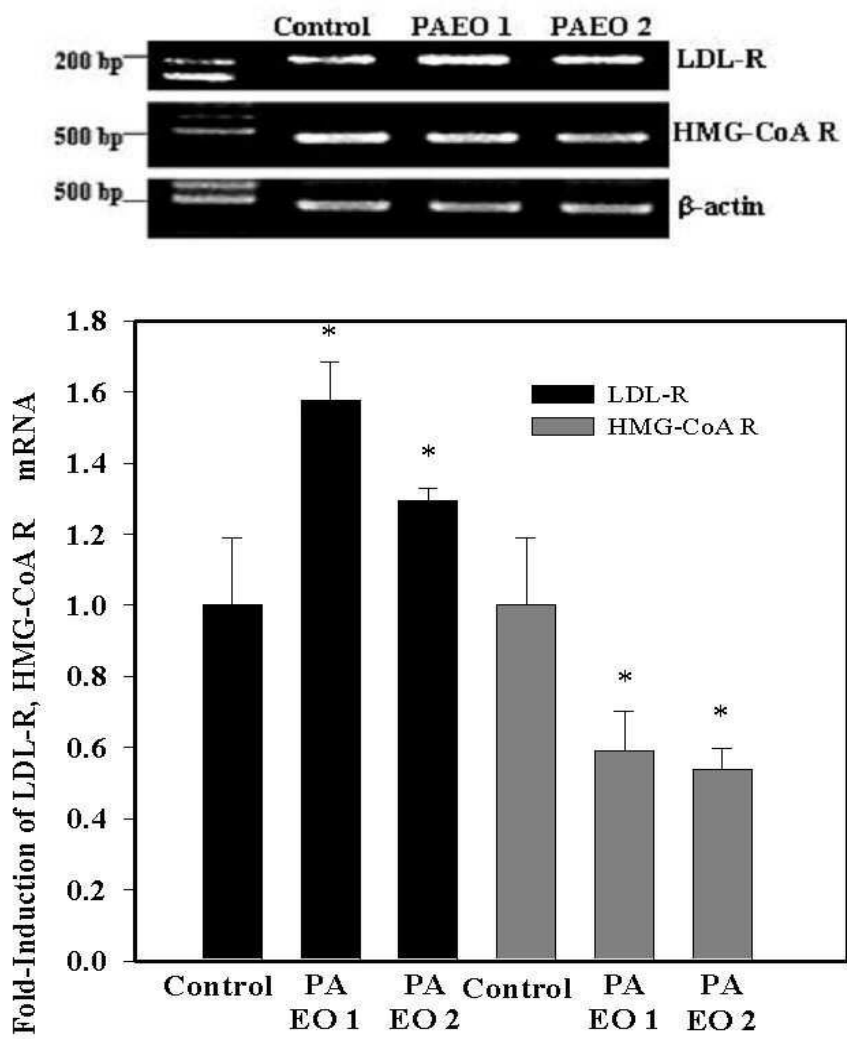
도면3a



도면3b



도면4



도면5

