



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0065117
(43) 공개일자 2017년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/00 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A23P 10/00 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0171156

(22) 출원일자 2015년12월03일

심사청구일자 2015년12월03일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

정혜광

대전광역시 유성구 반석서로 98, 609동 1102호 (반석동, 반석마을6단지아파트)

진순우

대전광역시 유성구 문화원로 123, 1동 707호 (봉명동, 봉명시티빌)

(74) 대리인

최규환

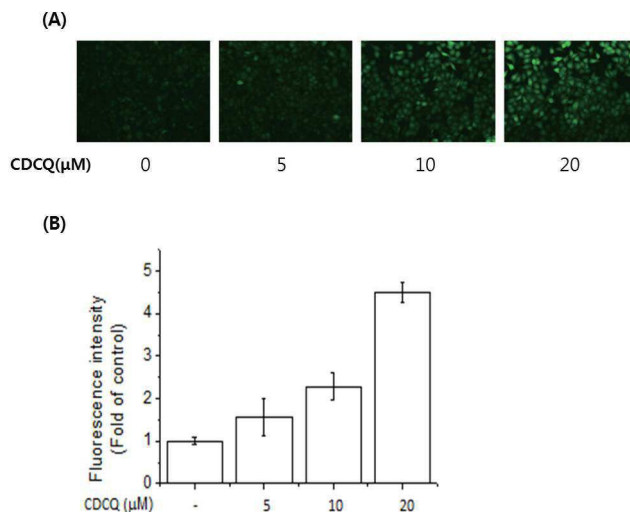
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 함초(*Salicornia herbacea*)로부터 분리한 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 혈관내피세포에 처리하였을 때, phospho-eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 발현량을 증가시켜 NO(nitric acid)의 생성량이 증가되고, 생성된 NO가 혈관으로 유리되어 평활근(smooth muscle)의 이완을 유도하여 혈관을 이완시키므로 고혈압, 동맥경화, 관상동맥질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환 또는 대동맥질환 등의 혈관질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/19 (2013.01)

A61K 9/20 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

C12Y 114/13039 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

A23V 2250/02 (2013.01)

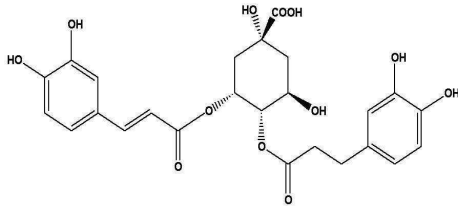
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid) 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산은 함초(*Salicornia herbacea*)로부터 분리된 것을 특징으로 하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혈관질환은 동맥경화, 고혈압, 뇌혈관질환, 말초혈관질환 또는 대동맥질환인 것을 특징으로 하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 혈관내피세포에서 phospho-eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 발현량을 증가시켜 NO(nitric acid)의 생성량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

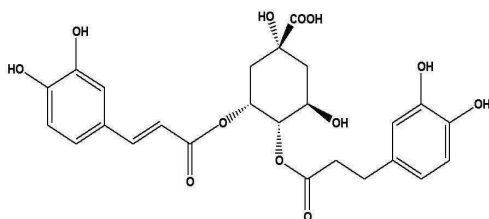
청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid) 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 중에서 선택된

어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 건강기능식품 또는 약학 조성물로 이용될 수 있는 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈관의 내피(endothelium)는 혈관반응성(vasoreactivity), 혈소판 활성화, 백혈구 부착, 평활근 세포의 증식 및 이동 등에 대한 혈관의 항상성을 유지시키는 데 중요한 역할을 한다. 혈관내피에서 생성되는 NO(nitric oxide)는 혈관을 보호하는 가장 강력한 물질로, 혈관 평활근 세포를 이완시켜 혈관을 확장하는 역할을 하며, 손상된 NO 신호전달체계는 동맥경화(atherosclerosis) 및 고혈압(hypertension) 등의 혈관 질환을 초래한다. NOS(nitric oxide synthase)는 O_2 및 보조인자 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드(flavin adenine dinucleotide, FAD), 플라빈 모노뉴클레오티드(flavin mononucleotide, FMN), 헴(heme), 테트라하이드로바이오프테린(tetrahydrobiopterin, BH4)의 존재 하에 L-아르기닌의 말단 질소 원자로부터 NO를 합성시키는 한 그룹의 효소이며, 지금까지 알려진 NOS 중에는, n-NOS(neuronal nitric oxide synthase), e-NOS(endothelial NOS), i-NOS(inducible NOS)의 3종류가 있는데, 이 중 e-NOS가 혈관 내에서 NO를 생성하고 혈관 기능 조절에 관여한다.

[0003] 한편, 함초(*Salicornia herbacea*)는 우리나라 서해안 개펄에 자라는 한해살이 풀로 흔히 염초 또는 통통마디라고도 불리우며, 전체 모양이 산호를 닮았다 하여 산호초라고도 한다. 중국 최고의 의학책인 신농본초경에는 "함초"로, 일본의 대화본초에는 "신초", "복초" 또는 "염초"로 기록되어 있으며, 화농성 염증을 치료하고 갖가지 균을 죽이는 작용이 있어 민간요법 치료제로 널리 사용되어 왔다. 함초는 몸 안에 쌓인 독소 및 숙변을 없애고, 암, 자궁근종, 축농증, 고혈압, 저혈압, 요통, 당뇨병, 기관지천식, 갑상선 기능저하, 갑상선 기능항진, 피부병, 관절염, 신장염 또는 갖가지 난치병에 탁월한 치료 효과를 지니고 있는 놀라운 약초라 알려져 있다.

[0004] 한편, 한국공개특허 제2011-0081007호에는 함초 발효물을 포함하는 고혈압 예방 또는 개선용 조성물에 대해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1323157호에는 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산을 유효성분으로 함유하는 암 전이 억제용 약학 조성물에 대해 개시하고 있다. 하지만 본 발명의 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해서는 아직 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 함초(*Salicornia herbacea*)로부터 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 분리하였고, 상기 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산을 혈관내피세포에 처리하였을 때 phospho-eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 발현량을 증가시켜 NO(nitric acid)의 생성량을 증가시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid) 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid) 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 함초(*Salicornia herbacea*)로부터 분리한 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-

4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 혈관내피세포에 처리하였을 때, phospho-eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 발현량을 증가시켜 NO(nitric acid)의 생성량이 증가되고, 생성된 NO가 혈관으로 유리되어 평활근(smooth muscle)의 이완을 유도하여 혈관을 이완시키므로 고혈압, 동맥경화, 관상동맥질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환 또는 대동맥질환 등의 혈관질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 농도별로 혈관내피세포에 처리하였을 때, 세포 생존율(cell viability)을 나타낸 그래프이다. CDCQ는 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 농도별로 혈관내피세포에 처리하였을 때, phospho-eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 발현량을 나타낸 것이다. β -actin은 로딩 컨트롤이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 농도별로 혈관내피세포에 처리하였을 때, NO(nitric oxide)의 생성 정도를 전반사형광현미경 사진(A) 및 형광강도 그래프(B)로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 혈관내피세포에 시간별로 처리하였을 때, phospho-eNOS 및 NO 생성 관련 신호 전달 단백질인 PKA(protein kinase A)(A) 및 CaMKIIa(calcium/calmodulin-dependent protein kinase)(B)의 발현량을 나타낸 것이다. β -actin은 로딩 컨트롤이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 PKA 및 CaMKIIa의 억제제인 H-89 및 KN-93을 혈관내피세포에 각각 전처리한 후 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 처리하였을 때, phospho-eNOS의 발현량을 나타낸 것이다. β -actin은 로딩 컨트롤이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 PKA 및 CaMKIIa의 억제제인 H-89 및 KN-93를 혈관내피세포에 각각 전처리한 후, 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 처리하였을 때, NO(nitric oxide)의 생성 정도를 전반사형광현미경 사진(A) 및 형광강도 그래프(B)로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid) 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산은 함초(*Salicornia herbacea*)로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0012] 상기 혈관질환은 동맥경화, 고혈압, 뇌혈관질환, 말초혈관질환 또는 대동맥질환일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 상기 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 혈관내피세포에서 phospho-eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 발현량을 증가시켜 NO(nitric acid)의 생성량을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0014] 본 발명의 혈관질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능식품 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.

[0015] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건

강식품을 모두 포함한다.

- [0016] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등), 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.
- [0017] 상기 건강기능식품 조성물 이외에 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 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0018] 또한, 본 발명은 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid) 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 염으로는 약학적으로 허용되는 것이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 불화수소산, 브롬화수소산, 포름산 아세트산, 타르타르산, 젖산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 톨루엔술폰산, 나프탈렌술폰산 등을 사용할 수 있다. 산 부가염 이외에도, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 트리에틸아민, 3차-부틸아민과 같은 염기 부가염도 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제에는 상기 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0024] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0025] 실시예 1. 함초로부터 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산의 분리

[0026] 서해안 갯벌에서 채취한 1.5kg의 함초 건조물을 쇠절하고 100%(v/v) 메탄올로 3일 동안 추출하여 감압여과한 후, 그 여액을 60℃의 수조에서 감압농축한 메탄올 농축액을 1ℓ의 증류수에 현탁하였다. 증류수에 현탁시킨 메탄올 추출물은 2ℓ의 에틸아세테이트로 진탕 추출하여 물층을 얻은 다음, 상기 물층을 60℃의 수조에서 감압농축하여 물층에 존재하는 에틸아세테이트를 제거하였다. 에틸아세테이트가 제거된 상기 물층을 증류수에 평형화된 디이아이온 에이치피-20 칼럼 크로마토그래피(Diaion HP-20 column chromatography)에 흡착시켜 물로 세척한 후에 30%(v/v) 메탄올 용액으로 활성물질을 추출하여 활성 분획물을 얻었다. 이 후, 상기 활성 분획물을 감압농축하여 소량의 메탄올에 녹여 메탄올에 평형화된 세파덱스 엘레이치-20 칼럼(Sephadex LH-20 gel column chromatography)에서 전개시켜 활성 분획물을 얻었고, 그 분획물을 YMC 겔 ODS 칼럼 크로마토그래피(YMC gel ODS column chromatography)에서 산성조건에서 20%(v/v) 아세트나이트릴 수용액을 용매로 사용하여 고속액체크로마토그래피를 이용하여 분리하였으며, 기기분석 결과, 화학식 1과 같은 구조의 화합물인 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ, molecular formula : $C_{25}H_{26}O_{12}$)을 얻었다.

[0027] 실시예 2. 혈관내피세포에서 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산의 세포독성 확인

[0028] 본 발명의 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(CDCQ, 3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)이 세포독성이 없는 화합물인지 확인하기 위해, 혈관내피세포에 1, 5, 10, 20 및 50 μ M의 CDCQ를 처리하여 24시간 배양한 후, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석 키트(USB corporation, cleveland, OH USA)를 이용하여 세포 생존율(cell viability)를 측정하였다. 이를 위해, EA.hy926 세포를 48-웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음, 500 μ ℓ의 세포배양액을 교체하면서 상기 CDCQ를 농도별로 희석하여 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 각 시료가 처리된 배지를 수거하여 96-웰 플레이트에 0.2mg/ml의 MTT 용액을 각 웰에 처리한 뒤 30분 동안 반응시켰다. 반응 종료 후에는 상등액을 제거하고 100 μ ℓ의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 생성된 포마잔(formazan) 결정을 용해시켜 마이크로플레이트 분석기로 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 도 1에 개시된 바와 같이 혈관내피세포에 본 발명의 CDCQ를 처리하였을 때, 50 μ M 이하의 농도에서는 세포독성이 없음을 확인하였다(도 1).

[0029] 실시예 3. 혈관내피세포에서 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산 처리에 따른 phospho-eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 발현 양상 확인

[0030] EA.hy926 세포에 본 발명의 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산(CDCQ, 3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 1시간 동안 처리하여, 총 세포 용해액(total cell lysates)을 얻었고, 웨스턴 블롯 분석을 통해 상기 세포 용해액 내의 phospho-eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 혈관내피세포에서 CDCQ의 처리에 따라 phospho-eNOS의 발현량이 농도의존적으로 증가하였음을 확인할 수 있었다.

[0031] 실시예 4. 혈관내피세포에서 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산 처리에 따른 NO(nitric acid)의 생성 확인

[0032] 혈관내피세포에서 NO의 생성 정도는 DAF-FM 디아세테이트(4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate, Molecular Probe, OR)를 이용하여 측정하였다. 혈관내피세포는 96-웰 플레이트에 5×10^4 cfu/ml의 밀도로 부착시켰다. 세포는 생장배지에서 12시간 동안 배양하였으며, 37℃에서 FBS(fetal bovine serum)가 없는 배지에서 3시간 배양한 후 L-NAME(L-N^G-Nitroarginine methyl ester, NOS inhibitors, 100M)를 처리한 군과 무처리한 군으로 구분하여 30분 동안 전처리하였다. 그 후, 본 발명의 CDCQ를 60분 동안 처리하였고, 혈관내피세포를 PBS로 2번 씻어준 후 10 μ M의 DAF-FM 디아세테이트를 20분간 처리하였다. 배지를 제거하고 고정액인 4%의 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 사용하여 5분간 세포를 고정시킨 후 다시 FBS가 없는 배지로 교체하여 형광정도를 측정하였다. 여기(excitation) 파장은 488nm이고 DAF에 NO가 결합되면 515nm에서 형광을 낸다. 도 3은 전반사형광현미경(Total internal fluorescence microscope, Nikon, Japan) 사진 및 마이크로플레이트 분석기(microplate reader)로 측정한 결과를 나타낸 것으로, 이를 통해 혈관내피세포에서 CDCQ의 처리에 의하여 NO의 생성이 농도의존적으로 증가하였음을 확인할 수 있었다.

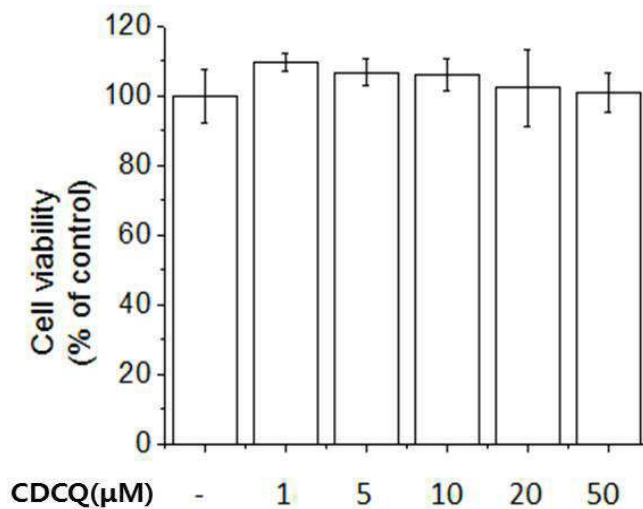
[0033] 실시예 5. 혈관내피세포에서 3-카페오일-4-디히드로카페오일 퀴닉산 처리에 따른 phospho-eNOS 및 NO 생성 관련 신호전달 단백질의 발현 양상 확인

[0034] EA.hy926 세포에 20 μ M의 CDCQ를 10, 30 및 60분간 처리하여, 총 세포 용해액(total cell lysates)을 얻었고, 웨스턴 블롯 분석을 통해 상기 세포 용해액 내의 phospho-eNOS 발현 관련 신호전달 단백질을 조사하였으며, 그 결과 도 4에 개시된 바와 같이 본 발명의 CDCQ가 신호전달 단백질인 PKA(protein kinase A) 및 CaMKIIa(calcium/calmodulin-dependent protein kinase)의 발현량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 상기 신호전달 단백질 PKA 및 CaMKIIa의 발현 여부와 phospho-eNOS의 관련성을 확인하기 위해, PKA 및 CaMKIIa의 각각 억제제인 H-89 및 KN-93을 사용하였다. 혈관내피세포에 각각의 억제제를 1시간 전처리한 후 20 μ M의 CDCQ를 1시간 처리하여, 총 세포 용해액을 얻었고, 웨스턴 블롯 분석을 통해 상기 세포 용해액 내의 phospho-eNOS의 발현량을 조사하였으며, 그 결과 도 5에 개시된 바와 같이 혈관내피세포에서 신호전달 단백질인 PKA 및 CaMKIIa의 발현이 CDCQ에 의한 phospho-eNOS의 발현에 관여함을 확인할 수 있었다.

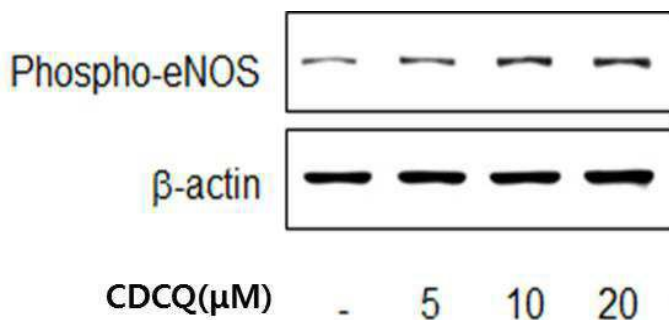
[0035] 또한, 상기 신호전달 단백질 PKA 및 CaMKIIa의 발현 여부와 NO 생성의 관련성을 확인하기 위해, 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 PKA 및 CaMKIIa의 억제제인 H-89 및 KN-93을 혈관내피세포에 1시간 전처리한 후 20 μ M의 CDCQ를 1시간 처리하여, DAF-FM 디아세테이트(Molecular Probe, OR)를 이용하여 형광정도를 측정하였다. 도 6은 전반사형광현미경(Total internal fluorescence microscope, Nikon, Japan) 사진 및 마이크로플레이트 분석기로 측정된 결과를 나타낸 것으로, 이를 통해 혈관내피세포에서 CDCQ에 의한 NO 생성에 신호전달 단백질인 PKA 및 CaMKIIa가 관여함을 확인할 수 있었다.

도면

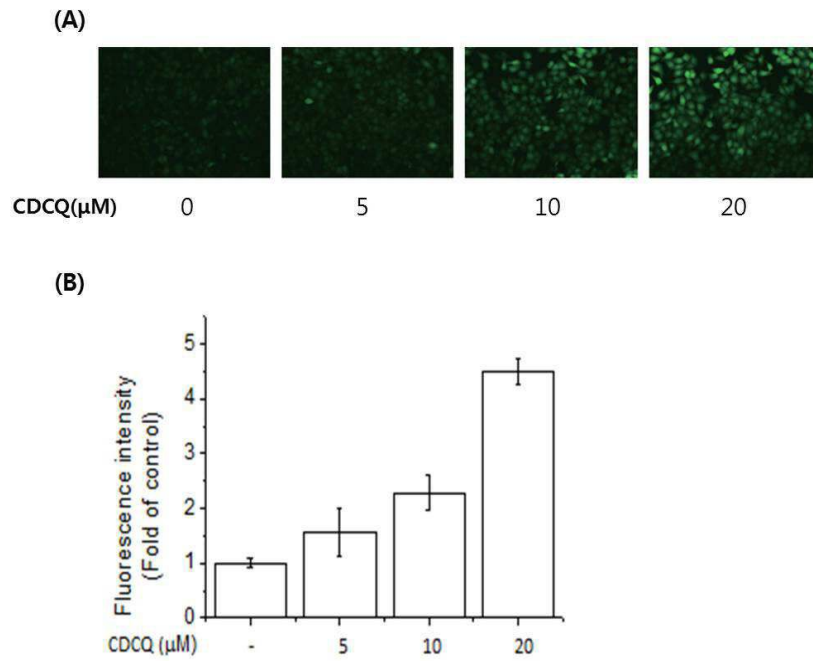
도면1



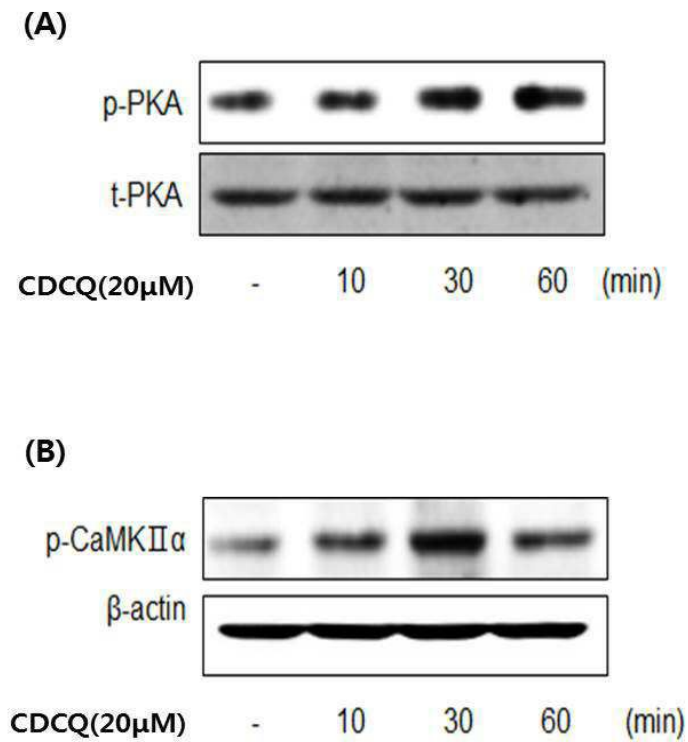
도면2



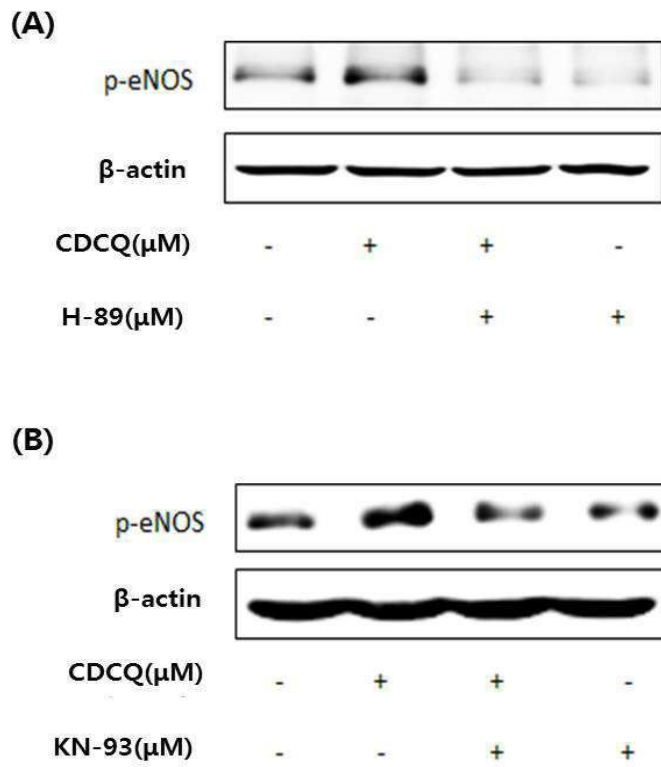
도면3



도면4



도면5



도면6

