



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0027102
(43) 공개일자 2008년03월26일

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0129621

(22) 출원일자 2006년12월18일

심사청구일자 2006년12월18일

(30) 우선권주장

60/826,381 2006년09월21일 미국(US)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

이성준

서울시 강남구 청담동 삼성청담공원아파트
104-402

전희진

서울 성북구 안암동2가 160-11번지 306호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭, 양부현, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 4 항

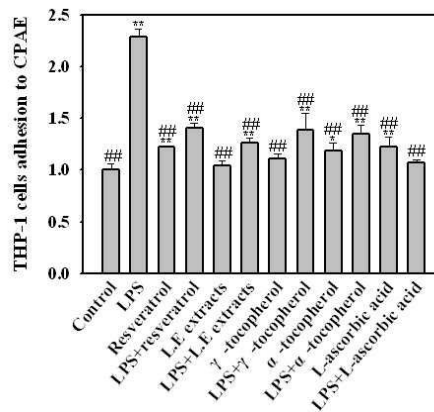
(54) 비색분석법을 이용한 항-동맥경화 물질 탐색방법

(57) 요약

본 발명은 항-동맥경화 물질 탐색 방법에 있어서, 혈관내피세포 (vascular endothelium)를 배양하는 1단계; 상기 배양물에 항-동맥경화 후보물질을 처리하는 2단계; 상기 처리 배양물에 단핵구 (monocyte)를 추가하여 배양하는 3단계; 상기 혈관내피세포에 결합되지 않은 단핵구를 세척에 의해 제거하는 4단계; 및 상기 혈관내피세포와 단핵구의 결합을 MTT 분석법을 이용하여 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항-동맥경화 물질 탐색 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 항-동맥경화 물질 탐색 방법은 육안으로 직접 개수판별하거나 동위원소를 사용하지 않고 혈관내피세포에 부착된 단핵구의 세포수를 정량화 하는 방법을 이용하여 저렴하고 간편하게 항-동맥경화 물질을 스크리닝 할 수 있다.

대표도 - 도3a



(72) 발명자

이호정

서울시 강동구 명일 2동 고덕 현대아파트 13-306

김경현

서울시 서초구 서초4동 삼풍아파트 18-703

특허청구의 범위

청구항 1

항-동맥경화 물질 탐색 방법에 있어서, 혈관내피세포 (vascular endothelium)를 배양하는 1단계; 상기 배양물에 항-동맥경화 후보물질을 처리하는 2단계; 상기 처리 배양물에 단핵구 (monocyte)를 추가하여 배양하는 3단계; 상기 혈관내피세포에 결합되지 않은 단핵구를 세척에 의해 제거하는 4단계; 및 상기 혈관내피세포와 단핵구의 결합을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 분석법 (MTT assay)을 이용하여 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항-동맥경화 물질 탐색 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 1단계에서 지질다당류 (LPS) 또는 종양괴사인자- α (TNF- α)를 처리하여 염증반응을 유도하는 것을 특징으로 하는 항-동맥경화 물질 탐색 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 지질다당류는 1 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$, 종양괴사인자- α 는 0.1 ~ 10 pg/ml 로 처리하는 것을 특징으로 하는 항-동맥경화 활성물질 탐색 방법.

청구항 4

자초 (Lithospermum erythrorhizon)추출물을 유효성분으로 함유하는 항-동맥경화용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <5> 본 발명은 비색분석법을 이용한 항-동맥경화 물질 탐색방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 항-동맥경화 물질 탐색 방법에 있어서, 혈관내피세포를 배양하는 1단계; 상기 배양물에 항-동맥경화 후보물질을 처리하는 2단계; 상기 처리 배양물에 단핵구 (monocyte)를 추가하여 배양하는 3단계; 상기 혈관내피세포에 결합되지 않은 단핵구를 세척에 의해 제거하는 4단계; 및 상기 혈관내피세포와 단핵구의 결합을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 분석법 (MTT assay)을 이용하여 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항-동맥경화 물질 탐색 방법에 관한 것이다.
- <6> 단핵구 (monocyte)의 혈관내피세포 (vascular endothelium)에의 부착은 동맥경화에 있어서 첫 번째 단계이다. 동맥경화 (atherosclerosis)는 동맥에서 콜레스테롤-풍부한 지단백질 (cholesterol-rich lipoproteins)의 축적에 의해 진행된다. 순환형 단핵구 (circulating monocyte)의 내피세포에 부착과 그 후에 일어나는 단핵구의 대식세포로의 분화는, 대식세포에 의한 산화된 저-밀도 지단백질 (low-density lipoproteins, LDL)의 흡수 (uptake)을 가지며, 동맥경화 병변 (atherosclerotic lesions)의 형성에서 가장 초기 단계이다 (Ross 1993, Libby 2002). ICAM-1과 같은 세포부착 분자들은 단핵구가 내피세포에 결합하거나 상호작용 하는 것을 지지하고, 아마도 이러한 복합체 형성과정에서 결정적인 역할을 할 것이다 (Gr?fe et al. 1997). 따라서, 단핵구의 내피세포 부착을 감소시키는 것은 동맥경화의 진행을 지연시킬 수 있었다. 그 결과로, 동맥경화 병변의 형성에서 내피세포/단핵구 결합의 분석은 항-동맥경화 화합물을 스크리닝하는 데에 유용하게 사용될 수 있을 것이다 (Usha et al. 2002, Woollard et al. 2002).
- <7> 종래에는 내피세포에 파라포름알데하이드-고정된 단핵구 (paraformaldehyde-fixed monocytes)를 카운팅하는 것 (Ferrero et al. 1998), 목적 내피세포들에 부착하는 크롬-표지된 백혈구들 (chromium-labelled leukocytes)을 정량하는 것 (Warren et al. 1996), 및 세포-표면 항원들의 ELISA-기초한 탐색하는 것 (Takahashi et al. 1996)을 포함하는 기술들이 내피세포/단핵구 결합을 측정하기 위하여 사용되어 왔다. 그러나, 이러한 방법들은 낮은 감도, 높은 비용, 및 방사성 물질의 취급을 포함하는 실험상 불편함의 단점들이 있다. 따라서, 항-동맥경화 활성을 스크리닝하는 개선된 방법이 요구된다.

<8> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 항-동맥경화 물질 탐색 방법에 있어서 MTT 분석을 이용하는 경우, 저렴하고 간편하게 혈관내피세포와 단핵구의 결합을 측정하여 항-동맥경화 물질을 스크리닝 할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<9> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 저렴하고 간편하게 동맥경화 예방 기능의 생물소재를 탐색할 수 있는 비색분석법을 이용한 항-동맥경화 물질 탐색방법을 제공하는 데 있다.

<10> 본 발명의 다른 목적은 상기 항-동맥경화 물질 탐색방법을 이용하여 스크리닝한 자초추출물을 유효성분으로 함유하는 항-동맥경화용 조성물을 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

<11> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 항-동맥경화 물질 탐색 방법에 있어서, 혈관내피세포 (vascular endothelium)를 배양하는 1단계; 상기 배양물에 항-동맥경화 후보물질을 처리하는 2단계; 상기 처리 배양물에 단핵구 (monocyte)를 추가하여 배양하는 3단계; 상기 혈관내피세포에 결합되지 않은 단핵구를 세척에 의해 제거하는 4단계; 및 상기 혈관내피세포와 단핵구의 결합을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 분석법 (MTT assay)을 이용하여 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항-동맥경화 물질 탐색 방법을 제공한다.

<12> 본 발명에 있어서, 상기 MTT 분석법은 비색분석법 (colorimetric assay)의 하나로써 미토콘드리아의 숙신산탈수소효소 (succinate dehydrogenase)에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)가 환원되는 정도를 측정하는 것이다. MTT는 세포 안에 침투하여 미토콘드리아 속에서 불용성의 보라색을 나타내는 formazan product로 환원되는데, 이를 유기용매로 용해시킨 후 분광학적인 방법으로 그 값을 측정한다. 이러한 환원성은 대사가 활발한 살아 있는 세포의 경우에만 일어나므로 세포의 생존력 (viability)을 측정하는 데에 사용될 수 있다. 그러므로 본 발명의 세포결합분석 (cell binding assay)은 MTT 분석법을 이용하여 생존세포를 정량할 수 있다는 점에 착안하였다. 즉, 내피세포에 단핵구가 부착하였을 경우와 그렇지 않았을 경우를 비교하였다. 내피세포와 단핵구의 세포결합을 유도하고 세척에 의해 결합되지 않은 세포들을 제거한 후 살아 있는 세포수를 측정하였다. 이를 이용하여 항-동맥경화 물질 처리 후 내피세포에 대한 단핵구의 부착이 감소할 경우 그 세포수를 측정하며 이에 따라 내피세포에 부착한 단핵구의 양을 정량할 수 있다.

<13> 본 발명의 항-동맥경화 물질 탐색 방법에서, 상기 1단계에서 LPS 또는 TNF- α 를 처리하지 않더라도 단핵구는 내피세포에 결합할 수 있으나, 바람직하게는 지질다당류 (LPS) 또는 종양괴사인자- α (TNF- α)를 처리하여 염증반응을 유도하는 것을 특징으로 한다.

<14> 본 발명에서, 동맥경화의 초기 단계 중 하나가 혈관내막의 염증으로 인한 단핵구의 부착이기 때문에, 내피세포에 염증을 유발하기 위하여 LPS 또는 TNF- α 를 사용하였으며, 이로 인하여 더 많은 단핵구의 부착을 유도할 수 있다.

<15> 본 발명에 있어서, 상기 지질다당류는 1 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$, 종양괴사인자- α 는 0.1 ~ 10 pg/ml 로 처리하는 것이 바람직하다. 상기 수치범위 미만일 경우 단핵구가 내피세포에 결합되는 정도가 적으며, 상기 수치범위 초과일 경우 단핵구가 내피세포에 너무 강하게 결합하여 항-동맥경화 물질에 의한 부착 감소를 측정하기 어려울 수 있다.

<16> 본 발명에서는 여러 가지 생리활성물질을 처리하였을 때, 내피세포에 대한 단핵구의 부착이 감소한 원인 중 하나로써 ICAM-1의 발현 정도를 확인하였으며, ICAM-1은 동맥경화 초기에 내피세포에 대한 단핵구의 부착을 유도하는 유전자이다. CPAE에서 ICAM-1의 발현은 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS에 4시간 동안 노출된 후 증가되었으며, 반면 자초추출물 및 γ -토코페롤은 ICAM-1의 발현을 현저하게 억제하였으며, TNF- α 는 ICAM-1의 발현에 영향을 주지 않았다. 자초추출물이 TNF- α 에 노출된 후 ICAM-1의 발현을 저해하였지만, 그 효과는 현저하지 않았다. TNF- α 의 효과는 ICAM-1 발현에서보다 내피세포/단핵구 상호작용에서 더 탁월하였다. 이러한 데이터는 LPS가 더 효과적인 단기 내피세포 자극인자 (short-term endothelial stimulant)라는 것을 나타낸다 (도 4 참조).

<17> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 자초 (Lithospermum erythrorhizon)추출물을 유효성분으로 함유하는 항-동맥경화용 조성물을 제공한다.

<18> 본 발명의 동맥경화증 (atherosclerosis)은 동맥에서 콜레스테롤-풍부한 지단백질 (cholesterol-rich lipoproteins)의 축적에 의해 진행된다. 이러한 콜레스테롤-풍부한 지단백질의 축적은 순환형 단핵구

(circulating monocyte)가 내피세포에 부착하고 그 후에 단핵구가 대식세포로 분화되어 산화된 저-밀도 지단백질 (low-density lipoproteins, LDL)을 흡수 (uptake)로 인하여 일어나게 된다. 따라서, 동맥경화의 초기 단계인 내피세포-단핵구의 결합을 저해함으로써 항-동맥경화 효과를 나타낼 수 있다.

- <19> 본 발명에서, 자초추출물을 함유하는 약학적 조성물은 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한, 이들은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다.
- <20> 본 발명에 따른 항-동맥경화용 조성물을 유효성분으로 투여하는 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.001 ~ 10 mg이 투여될 수 있다.
- <21> 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- <22> 단핵구 (monocyte)의 혈관내피세포 (vascular endothelium)에의 부착은 동맥경화 (atherogenesis)에 있어서 첫 번째 단계이다. 이것을 정량하기 위하여, 본 발명자는 배양된 내피세포와 함께 단핵구를 인큐베이션 하였으며, 비색분석법 (colorimetric assay)를 사용하여 부착된 살아있는 단핵구 (live monocytes)를 측정하였다. 지질다당류 (LPS) 또는 TNF- α 로 활성화된 내피세포는 투여량-의존 방식 (dose-dependent manner)으로 단핵구들을 유인하였고 L-ascorbic acid, α -토코페롤, γ -토코페롤, 레스베라트롤 (resveratrol), 및 자초뿌리추출물 (Lithospermum erythrorhizon root extract)로 후-처리함으로써 단핵구의 혈관내피세포에의 부착을 감소시켰다. 이러한 비-방사성의 비색분석법은 동맥경화 초기에 항-동맥경화 화합물을 스크리닝하는 데에 유용할 것이다.
- <23> 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.
- <24> 실시예 1. 내피세포 배양
- <25> 한국 세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)으로부터 송아지 폐동맥 내피세포 (Calf pulmonaryarterial endothelium, CPAE)를 구입하였으며, 20% 열처리-비활성화된 우태혈청 (fetal bovine serum, FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 및 0.5% 겐타마이신 (gentamicin)으로 보충한 RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640배지에 배양하였다.
- <26> 실시예 2. 단핵구 배양
- <27> 단핵 백혈구 세포주 THP-1을 KCLB로부터 구입하였으며, 10% 열처리-비활성화된 FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 및 0.5% 겐타마이신을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 새로운 배지를 추가하거나 교체함으로써 5×10^4 내지 8×10^5 viable cells/ml 사이의 밀도에서 세포들을 배양하였다.
- <28> 실시예 3. 항-동맥경화 활성화에 대한 내피세포-단핵구 결합 분석
- <29> CPAE를 6-well 배양플레이트에 분주하여 콘플루언트 단층 (confluent monolayers)으로 키운 다음, LPS 또는 TNF- α 로 4시간 동안 염증반응을 유도하였고, 레스베라트롤 (resveratrol), 자초 (Lithospermum erythrorhizon) 추출물, α -토코페롤, γ -토코페롤, 또는 L-ascorbic acid (비타민 C)로 2시간 동안 처리하였다. 그 후, 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 및 0.5% 겐타마이신을 포함하는 RPMI 1640 배지에 있는 THP-1을 1,775,000 cells/ml의 농도로 각각의 well에 분주하였으며, 내피세포에 결합할 수 있도록 5 % CO₂ 조건하 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 결합되지 않은 세포들을 RPMI 1640으로 가볍게 세척하여 제거하였다. 다음으로, MTT 용액을 배양배지에서 최종농도 1 mg/ml가 되도록 각각의 well에 추가한 후, 5% CO₂ 조건하에서 37℃에서 2시간 동안 방치하였다. Lysis buffer 1 ml를 각 well에 넣고 내피세포-단핵구 (endothelium-monocyte)를 녹여낸 뒤 (37℃에서, 1시간), 분광광도계 (spectrophotometer)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 내피세포/단핵구 결합 (endothelium/monocyte)을 THP-1이 CPAE에 부착하였을 경우의 흡광도에서 순수한 CPAE의 흡광도를 빼어 계산하였다.
- <30> 실시예 4. 내피세포/단핵구 결합 분석을 위한 lysis buffer
- <31> Sodium dodecyl sulfate (SDS)를 40% 농도가 되도록 적당한 열과 교반으로 물에 용해하였다. 그 다음, 동일한 양의 N,N-디메틸 포름알데하이드 (N,N-dimethyl formaldehyde)를 40% SDS 용액에 첨가하였고 실온에서 교반으로 30분 동안 혼합하였다. 30분 후, 상기 용액을 여과지로 여과하고 동일한 양의 80% 아세트산 (acetic acid)과

1 N 염산 (hydrochloric acid) (v/v)을 추가하여 pH를 4.7로 조정하였다 (Hansen et al., 1989).

<32> 실시예 5. RT-PCR 분석

<33> Trizol reagent를 사용하여 CPAE로부터 total RNA를 추출하였고 분광분석법으로 260 nm에서 정량하였다. 상기 RNA를 분석할 때까지 -80 °C에서 보관하였다. cDNA cycle kit와 oligo dT 를 사용하여 2 µg mRNA로부터 single-strand cDNA를 합성 (42 °C, 90분, 70 °C, 15분)하였다. cDNA, 10x PCR buffer, 2.5 mM dNTPs, 10 mM forward 및 reverse primers, DNA polymerase, 및 sterile water를 혼합하여 총 20 µl로 만들었다. bovine IACM-1 과 β_2 -microglobulin에 대한 프라이머의 서열은 아래에 기재하였다. Bovine IACM-1 (GenBank accession #U09134) 5'-AACTCTTCCAGAACCTCG-3' (forward), 5'-AGCACCAGGTAGACCTTAGC-3' (reverse), bovine β_2 -microglobulin (GenBank accession #X69084); 5'-TGGCCTTGGTCCTTCTC-3' (forward), 5'-AGCACCAGGTAGACCTTAGC-3'(reverse). Bovine IACM-1과 β_2 -microglobulin을 증폭하기 위하여 94 °C에서 1 분, 54 °C에서 1 분, 그리고 72 °C에서 1 분의 조건으로 30 PCR cycles를 진행시켰다 (Kampen & Mallard 2001). PCR 산물은 ethidium bromide을 함유하는 agarose gel에 전기영동 (110 V) 하여 밴드를 확인하고 UN-SCAN-IT software (Silk Scientific, Orem, UT, USA)을 사용하여 정량하였다.

<34> 여러 가지 생리활성물질을 처리하였을 때, 내피세포에 대한 단핵구의 부착이 감소한 원인 중 하나로써 ICAM-1의 발현 정도를 살펴 본 것이며, ICAM-1은 동맥경화 초기에 내피세포에 대한 단핵구의 부착을 유도하는 유전자이다. β_2 -microglobulin은 실험 샘플들이 다르다고 할지라도, 각각의 샘플에서 항상 똑같은 양만큼 발현 되는 유전자이므로 RT-PCR 실험이 잘 되었는지, 그리고 신뢰할 수 있는지를 알 수 있도록 해준다.

<35> 통계분석

<36> 측정된 결과치는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, Student's *t*-test를 이용하여 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 을 통계학 적으로 유의한 것으로 판정하였다.

<37> 실험결과

<38> RT-PCR을 사용하여, 본 발명자는 엔지오텐신-변환효소 (angiotensin-converting enzyme, ACE)가 모든 CPAE 내 피세포에서 발현됨을 확인하였으며, CPAE 내피세포들의 기본적인 특징을 확인하였다 (데이터 미도시, Kobayashi et al. 2001). 더욱이, 이러한 분석을 위해 본 발명자는 다른 내피세포주와 비교할 때 CPAE의 성장과 취급이 빠 르고 용이하기 때문에 CPAE를 선택하였다.

<39> LPS 또는 TNF- α 가 있거나 없는 상태에서 4시간 동안 배양된 CPAE를 THP-1 세포들과 37 °C에서 30분 동안 배양 하였다. 도 1에서 보여지는 바와 같이, LPS 및 TNF- α 자극은 THP-1 세포가 CPAE에 결합하는 것을 증가시켰으며, 증가한 THP-1 세포들은 내피세포/단핵구 결합을 한층 더 유도하였다. 게다가, 1 내지 5 µg/ml LPS는 1 pg/ml TNF- α 가 유도한 것보다 내피세포/단핵구 결합을 약하게 유도하였다.

<40> CPAE를 4시간 동안 5 µg/ml LPS로 자극하였고, 100 nM 레스버라트롤로 2시간 동안 처리한 후, 다양한 세포수로 THP-1 세포를 배양하였다. 700,000 THP-1 세포에서의 내피세포/단핵구 결합을 제외하면, 레스버라트롤은 단핵구 들이 비-활성화된 내피세포에 대한 기본적인 결합에 아무런 효과가 없었다. Usha et al. (2002)는 레스버라트롤 이 내피세포의 활성화를 약화시킴으로써 단핵구가 내피세포 결합하는 것을 억제하였으며, 단핵구의 비-활성화된 내피세포와의 결합은 변화하지 않았다고 제안하였다. 그러나, 본 발명의 결과는 5 µg/ml LPS로 처리한 것과 비 교할 때 결합이 감소하는 경향을 나타낸다 (도 2).

<41> 그 다음 연구는 레스버라트롤, 자초 추출물, γ -토코페롤, α -토코페롤, 및 L-ascorbic acid를 이용한 항-동맥 경화 활성화에 대한 스크리닝을 위해 수행되었다. CPAE를 5 µg/ml LPS 또는 1 pg/ml TNF- α 로 4시간 동안 자극한 후 100 nM 레스버라트롤, 0.1 µg/ml 자초 추출물, 25 µM γ -토코페롤, 100 µM α -토코페롤, 또는 100 µM vitamin C로 2시간 동안 처리하였으며, 2,800,000 THP-1 세포와 배양하였다.

<42> 도 3은 대조군 (비처리)의 흡광도와 비교하여 상대적인 값을 나타낸다. LPS는 대조군과 비교할 때 THP-1 세포의 CPAE에의 결합을 현저하게 증가시킨 반면, 레스버라트롤, 자초 추출물, γ -토코페롤, α -토코페롤, 및 L-ascorbic acid는 LPS 자극에 대한 단핵구의 내피세포와의 결합을 뚜렷하게 저해하였다. 즉, 레스버라트롤은 39%, 자초 추출물은 45%, γ -토코페롤은 39%, α -토코페롤은 40%, 및 ascorbic acid는 53%의 저해효과를 나타 내었다 (도 3a). TNF- α 는 LPS에 비해 THP-1의 CPAE에의 결합을 약간 유도한 반면, 레스버라트롤, 자초추출물, 및 γ -토코페롤 처리는 단핵구의 활성화된 내피세포와의 결합을 억제하였다 (도 3b).

- <43> 본 발명에 적용된 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 테스트는 세포독성, 세포 생존력, 및 살아있는 세포들의 증식을 분석하기 위하여 널리 사용되는 것이다 (Vellonen et al. 2004). THP-1 세포의 흡광도는 CPAE 단독의 흡광도와 THP-1 세포와 결합된 CPAE의 흡광도 사이의 차이로부터 결정되었다.
- <44> 내피세포/단핵구 결합 상호작용을 조절하는 세포부착분자의 발현은 자극하는 인자들과 처리시간에 의해 영향을 받는다 (Kampen & Mallard 2001). 항-동맥경화 물질은 부착 분자의 종류 (class)와 자극 인자들에 의존하는 여러 경로를 통해 다른 효과를 가진다 (Zapolska-Downar et al. 2001, Cominacini et al. 1997).
- <45> 도 4는 대조군 (비처리)과 비교할 때 ICAM-1 mRNA의 상대적인 발현을 나타낸다. CPAE에서 ICAM-1의 발현은 5 μ g/ml LPS에 4시간 동안 노출된 후 증가되었으며, 반면 자초추출물 및 γ -토코페롤은 ICAM-1의 발현을 현저하게 억제하였으며, TNF- α 는 ICAM-1의 발현에 영향을 주지 않았다. 자초추출물이 TNF- α 에 노출된 후 ICAM-1의 발현을 저해하였지만, 그 효과는 현저하지 않았다. TNF- α 의 효과는 ICAM-1 발현에서보다 내피세포/단핵구 상호작용에서 더 탁월하였다. 이러한 데이터는 LPS가 더 효과적인 단기 내피세포 자극인자 (short-term endothelial stimulant)라는 것을 나타낸다. Kampen & Mallard (2001)는 bovine ICAM-1 mRNA 발현이 시간에 따라 현저하게 변화하고 자극에 따른 발현 동력학 (expression kinetics)이 다르다는 것을 제안하였다. 그러한 것은 LPS-자극된 bovine aortic endothelial cells (BAECs)에서 bovine ICAM-1의 표면발현이 3시간에서 피크를 나타내었으며, 반면 TNF- α -자극된 BAECs의 표면발현은 12-18시간에서 피크를 나타내었음을 나타내었다. 따라서, LPS, TNF- α , 및 항-동맥경화 물질들로 연장된 처리는 더욱 명확한 결과가 나타나게 한다. 그러나, LPS 자극 4시간 후 항-동맥경화 물질로 2시간 동안 처리하는 것은 항-동맥경화 활성에 대한 스크리닝하는 데에 충분한 것으로 여겨진다. 그러므로, 본 발명은 세포 부착 분자들에 의해 조절되는 내피세포/단핵구 결합에 의한 빠르고 편리한 항-동맥경화 활성의 스크리닝에 유용할 것이다.

발명의 효과

- <46> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 동맥경화 예방기능의 생물소재 탐색방법에 있어서, 기존의 방법들은 낮은 감도, 높은 비용 및 방사성 물질의 취급을 포함하는 실험상 불편함이 있었다. 본 발명은 이러한 기존의 방법에 비해 비용이 저렴하며 조작이 간편한 비색분석법을 이용하여 항-동맥경화 물질의 탐색방법을 개발하였으며, 이러한 방법은 항-동맥경화 기능의 바이오소재 물질의 스크리닝에 유용할 것이다.

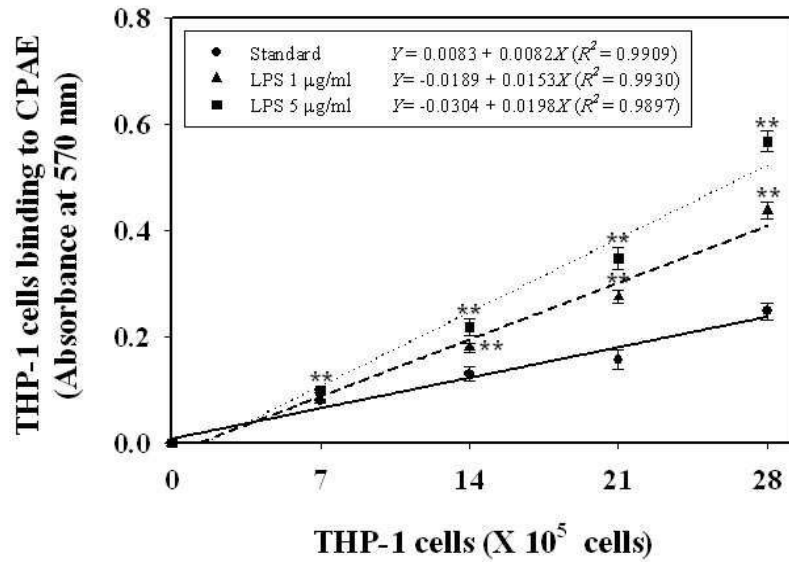
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 LPS 또는 TNF- α 가 있거나 없는 경우에 THP-1 세포의 CPAE에의 결합을 나타낸다. CPAE를 4시간 동안 LPS (A) 또는 TNF- α (B)로 처리한 후 30분간 다양한 세포수의 THP-1세포로 배양하였다. *, **표준 (비처리)과 유의하게 서로 다른 THP-1 세포수, *P < 0.05 및 **P < 0.01. 데이터는 3번의 독립된 실험에 따라 평균 $\pm$ 표준편차로 나타낸다.
- <2> 도 2는 LPS 또는 레스버라트롤 (resveratrol)이 있거나 없는 경우에서 THP-1 세포의 CPAE에의 결합을 나타낸다. CPAE를 LPS로 4시간 동안 또는 레스버라트롤로 2시간 동안 처리한 후 30분간 다양한 세포수의 THP-1세포로 배양하였다. *, **표준 (비처리)과 유의하게 서로 다른 THP-1 세포수, *P < 0.05 및 **P < 0.01. 데이터는 3번의 독립된 실험에 따라 평균 $\pm$ 표준편차로 나타낸다.
- <3> 도 3은 LPS 또는 TNF- α 자극이 있거나 없는 경우에서 항-동맥경화 물질들로 처리된 THP-1 세포의 CPAE에의 결합을 나타낸다. CPAE를 5 μ g/ml LPS 또는 1 pg/ml TNF- α 로 4시간 동안 처리한 후 항-동맥경화 물질들로 2시간 동안 처리하였으며, 그 다음에 2,800,000 THP-1 세포로 30분간 배양하였다. (A) 대조군, 비처리; LPS, 5 μ g/ml; 레스버라트롤 100 nM, 자초 (LE, Lithospermum erythrorhizon)추출물 0.1 μ g/ml, γ -토코페롤 25 μ M, α -토코페롤 100 μ M, 및 L-ascorbic acid (비타민 C) 100 μ M. (B) (A)에서 LPS 대신에 1 pg/ml TNF- α 로 CPAE를 자극하였다. *, ** 대조군 (비처리)과 유의하게 서로 다른, *P < 0.05 및 **P < 0.01. #, ## LPS 또는 TNF- α 와 유의하게 서로 다른, #P < 0.05 및 ##P < 0.01. 데이터는 3번의 독립된 실험에 따라 평균 $\pm$ 표준편차로 나타낸다.
- <4> 도 4는 LPS 또는 TNF- α 자극이 있는 경우에서 항-동맥경화 물질들로 처리된 CPAE에서 ICAM-1 mRNA 발현을 나타낸다. CPAE를 5 μ g/ml LPS 또는 1 pg/ml TNF- α 로 4시간 동안 자극한 후 항-동맥경화 물질들로 2시간 동안 처리하였다. a, 대조군 (비처리); LPS (5 μ g/ml); LE, 자초추출물 (0.1 μ g/ml); γ -토코페롤 (25 μ M); 레스버라트롤 (100 μ M); TNF- α (1 pg/ml) LE, 자초추출물. *, ** 대조군 (비처리)과 명백히 서로 다른, *P < 0.05

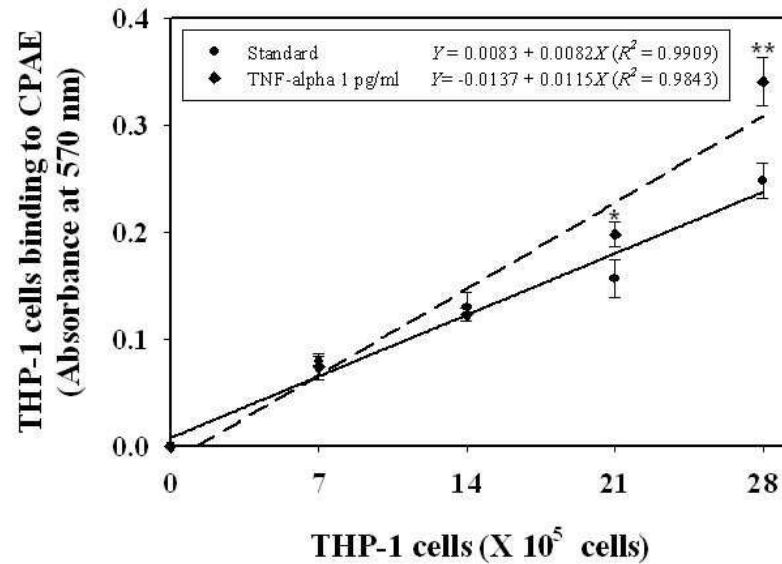
및 $**P < 0.01$. #, ## LPS 또는 TNF- α 와 명백히 서로 다른, $\#P < 0.05$ 및 $\#P < 0.01$. 데이터는 3번의 독립된 실험에 따라 평균 $\pm$ 표준편차로 나타낸다. 각 샘플에서 ICAM-1 mRNA 수준을 참고문헌에서처럼 β_2 -microglobulin을 사용하여 표준화하였다.

도면

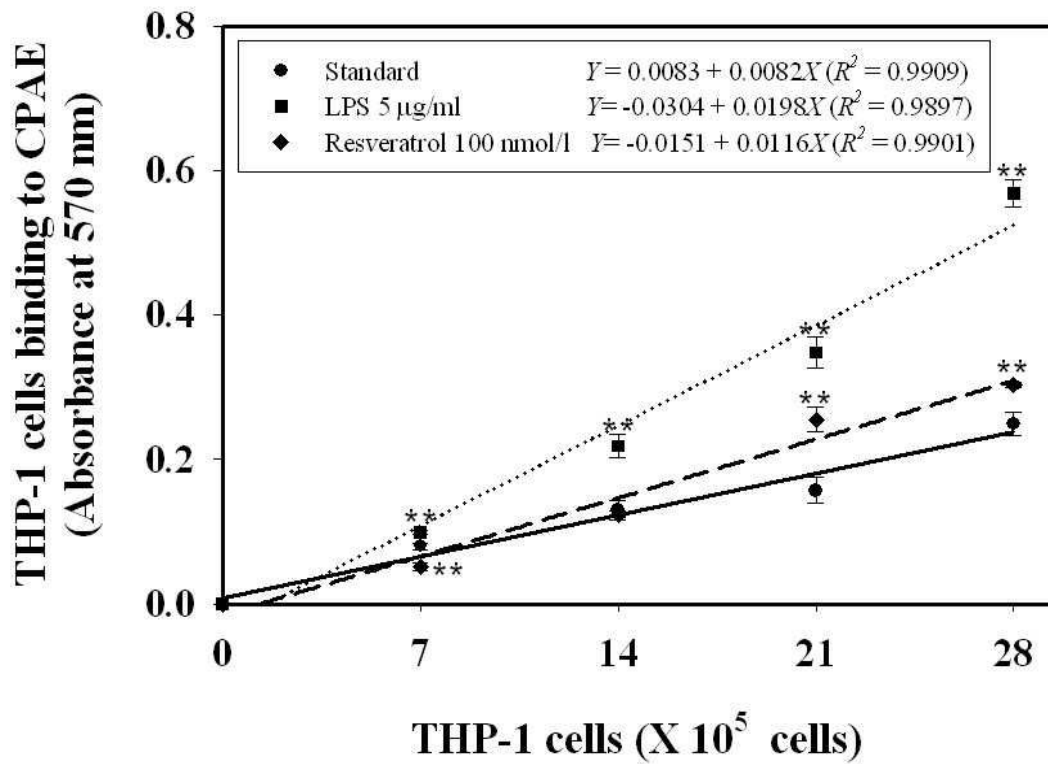
도면1a



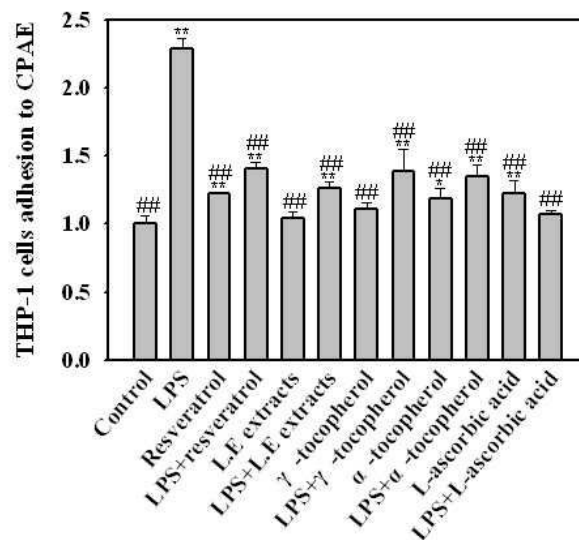
도면1b



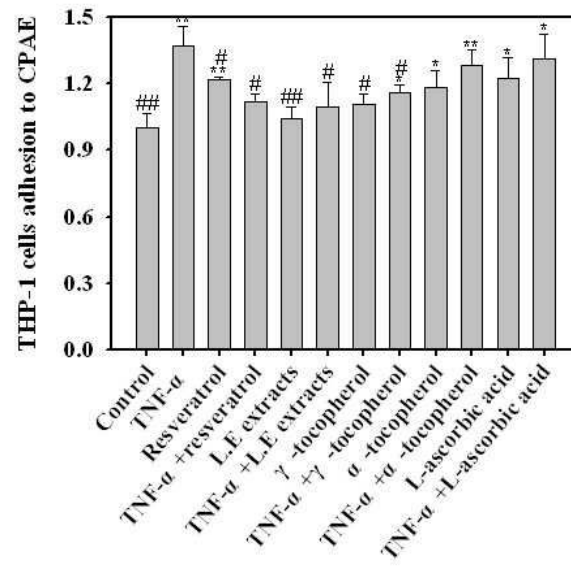
도면2



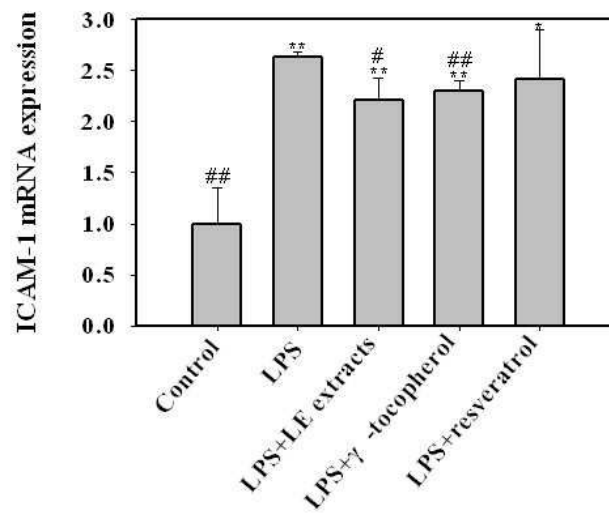
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

