

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0010941 (43) 공개일자 2013년01월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/53 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	
(21) 출원번호 10-2011-0071743	(72) 발명자 강영희 강원도 춘천시 봉의산길22번길 29, 한림대학교 생 명과학관 8513호 (옥천동)	
(22) 출원일자 2011년07월20일 심사청구일자 2011년07월20일	박신혜 강원도 춘천시 봉의산길22번길 29, 한림대학교 생 명과학관 8512호 (옥천동)	
	임순성 강원도 춘천시 춘주로 174, 102동 401호 (퇴계동, 그린타운아파트)	
	(74) 대리인 김지형	

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물

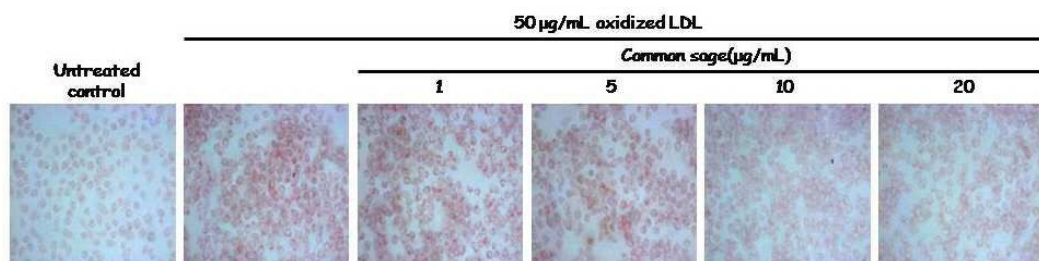
(57) 요약

본 발명은 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물에 관한 것으로서, 배암차즈기에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 3~5시간 동안 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 제조하는 것을 특징으로 한다.

상기의 방법으로 제조된 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 조성물은 부작용이 없으면서 죽상동맥경화증의 발달단계 중 거품세포의 형성을 감소시키고, 이미 축적된 거품세포에서는 축적된 콜레스테롤을 외부로 유출하는 것을 촉진함으로써 죽상동맥경화증의 개선 및 예방할 수 있는 성분으로 제공될 수 있다.

대표도 - 도1

To prove intracellular lipids by Oil red o staining (magnified x400)



특허청구의 범위

청구항 1

배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 배암차즈기 추출물은 배암차즈기에 물, 알코올, 아세톤, 헥산, 에틸아세테이트 중 하나 또는 둘 이상을 혼합한 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 3~5시간 동안 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 제조된 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

초기 죽상동맥경화증의 진행 단계인 거품세포의 형성하는 과정에서 산화 저밀도지단백질의 유입에 관여하는 청소수용체(scavenger receptor class B-1)의 발현을 감소시키며, 거품세포가 형성된 이후 세포 내 축적된 콜레스테롤을 세포 외부로 유출하는 기능을 가진 ATP binding cassette A-1(ABCA1) 수송체와 ATP binding cassette G-1(ABCG1) 수송체의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 혈관 내 콜레스테롤과 같은 지질 침전물의 축적으로 인한 고지혈증을 포함한 죽상동맥경화증에서, 축적된 콜레스테롤을 혈관 외부로 유출시키면서 죽상동맥경화증을 개선 및 예방할 수 있는 배암차즈기 추출물에 대한 것이다.
- [0002] 더욱 구체적으로, 대식세포가 산화 저밀도지단백질(low density lipoprotein)의 유입으로 인해 거품세포(foam cell)를 형성하는 과정에서 배암차즈기 추출물은 산화 저밀도지단백질의 유입에 관여하는 청소수용체(scavenger receptor class B-1)의 발현을 감소시키며, 거품세포 형성을 확인할 수 있는 Oil red O 염색법에서 대식세포 세포내 붉은색 염색정도를 감소시킨다. 그리고, 배암차즈기 추출물은 죽상동맥경화증을 유도하는 과정인 거품세포가 형성된 이후 세포 내 축적된 콜레스테롤을 세포 외부로 유출하는 기능을 가진 ATP binding cassette A-1 (ABCA1) 수송체(transporter)와 ATP binding cassette G-1 (ABCG1) 수송체의 발현을 증가시킨다.
- [0003] 따라서, 배암차즈기 추출물은 부작용이 없으며 거품세포의 형성을 감소하고, 이미 세포 내 축적된 불필요한 콜레스테롤을 외부로 유출하는 것을 촉진함으로써 죽상동맥경화증의 개선 및 예방할 수 있게 된다.

배경기술

- [0004] 국회 보건복지위원회가 건강보험심사평가원으로부터 제출받은 '영양관련 질병 현황'을 분석한 결과, 고혈압, 고지혈증, 당뇨, 빈혈, 동맥경화, 골다공증, 비만 등 영양섭취 및 식습관이 원인인 7개 질병으로 병원을 찾은 환자수가 2005년 699만명에서 2009년 931만명으로 5년동안 33%가 증가한 것으로 나타났다. 특히, 2005년도 이후로 가장 빠르게 증가한 질병은 동맥경화다. 2005년 진료건수가 6만 500건 정도였으나, 2009년에는 2.6배 증가한 16만 8천건(157%), 총 진료비 역시 2005년 약 127억원에서 103% 증가한 258억원이다. 이러한 이유에는 생활수준의 향상으로 먹고 살기가 풍족해졌지만 잘못된 식습관 및 영양섭취불균형 등으로 인한 질병은 오히려 늘고 있는 추세다.

- [0005] 동맥경화증은 동맥의 종류에 따라서 각기 다르다. 동맥경화는 크게 죽상 경화증, 중막 석회화, 세동맥 경화증 등 세가지로 나눌 수 있다. 이중 최근 들어 가장 주목되고 있는 것이 죽상 경화증이다. 죽상 경화증은 동맥의 안쪽에 콜레스테롤이 침착되는 형태다. 죽상 경화증의 가장 중요한 원인은 혈액 중에 지방질이 많은 상태, 즉 고지혈증이다. 고지혈증이 있거나 혈압이 높으면 지방질이 혈관 벽에 스며들어 침착하므로 동맥경화를 일으키기 쉽다. 이렇게 혈관 안쪽에 지방질이 붙게 되면 혈관이 두터워지고 탄력성을 잃어버리게 되며 주위의 조직이 붕괴되고 콜레스테롤 등 지방질이 석출되거나 궤양이 발생한다. 또 이 부위는 혈액이 응고된 혈전을 형성하기 좋은 환경적 여건을 만들며, 혈전이 혈관을 갑자기 막아버리기도 한다. 이러한 동맥경화를 치료하는데 있어서 중요한 부분으로 영양적 측면 또는 식사요법과 관련되어 사료된다.
- [0006] 동맥경화는 염증반응으로 인한 혈액내의 단핵구가 혈관벽 안으로 이동하면 대식세포로 형질이 변환되고 혈관내의 산화된 콜레스테롤을 청소수용체(Scavenger receptor)B-1 등의 수용체를 통해 세포 내로 섭취되어 결국 거품세포로 전환되고 혈관 내 축적되었던 콜레스테롤은 ATP-binding cassette class A-1 수송체 또는 앞에서와는 역으로 청소수용체(Scavenger receptor)B-1에 의해 다시 유출될 수 있다.
- [0007] 대식세포의 콜레스테롤 항상성 조절 능력 상실은 동맥에서 죽상반(atheroma)의 발생에 핵심적인 요소로 알려져 있다. 또한 효율적인 수송 기작을 통하여 포말 대식세포에서 과도한 콜레스테롤을 제거하는 것이 죽상경화증 병변을 억제시키는데 핵심이 되는 것으로 여겨지고 있다. ABCA1, ABCG1, ABCG4과 같은 ABC(ATP-binding cassette) 지방 수송체들과 apoA1, apoE 등의 apo(apolipoprotein) 수용체가 협력하여 이들 죽상경화증 병변을 억제한다고 알려져 있다. 또한 SREBPs(sterol-regulatory-element-binding proteins)와 같은 스테롤 반응성 전사인자를 조절하는 콜레스테롤 항상성 유지 기작도 보고되고 있다. 이처럼 콜레스테롤 항상성 유지에 여러 단백질들이 관련된 것으로 알려져 있지만 아직까지 확실한 기작이 규명되지는 못한 형편이다.
- [0008] 간과 장에서 분비된 apoA1은 아직 콜레스테롤을 함유하고 있지 않은 원시적인 HDL이다(lipid poor apoA1). Lipid poor apoA1이 말초세포(대식세포 포함)에 접근하여 ABCA1이라는 특수한 도킹시스템을 통하여 콜레스테롤을 받는다. 그 결과 원반형인 납작한 HDL이 생성된다(discoidal HDL 또는 pre-β HDL). 세포에서 주는 콜레스테롤은 free cholesterol로 수용성이다. 수용성 콜레스테롤은 HDL의 표면에만 존재할 수 있으므로 콜레스테롤을 많이 수송할 수 없다. 콜레스테롤을 많이 수송하기 위해서는 구형의 HDL이 되는 것이 가장 유리하다. LCAT효소는 free cholesterol을 지용성인 cholesteryl ester로 변환시킨다. Cholesteryl ester는 지용성이므로 HDL표면에 존재하지 못하고 내부로 함입되어 결과적으로 HDL을 구형으로 변화시킨다. 구형의 HDL은 SR-B1과 ABCG1 등의 수용체에 도킹하여 추가로 콜레스테롤을 흡수한 후 간으로 향한다(HDL2b, 2a).
- [0009] 배암차즈기는 꿀풀과의 식물로 학명으로는 *Salvia plebeia* R. Br.로 표기하며, 영문으로는 common sage로 표기한다. 저지대의 약간 습한 물가나 도랑 등지에 분포한다. 이년초로서 원줄기는 높이 30~70cm로 네모가 지며, 밑을 향한 잔털이 있다. 경생엽은 란상장타원형 또는 광피침형이고 끝이 둔하며 밑부분이 설저이고 길이 3~6cm, 폭 1~2cm로서 양면에 털이 드문드문 있으며 둔한 거치가 있다. 꽃은 5~7월에 피고 연한 자주색이며, 수상화서는 윗부분의 엽액과 끝에 달리고 길이 8~10cm정도인데 짧은 털이 다소 밀생한다. 꽃받침은 길이 2.5~3mm에서 4mm 정도로 자라며 양신형이고 선점과 잔털이 있다. 화관은 길이 4~5mm로서 양신형이다.
- [0010] 상기 배암차즈기는 혈액을 맑게 하며, 고혈압, 염증질환, 기관지질환, 독소 배출, 부인병, 불임증, 당뇨병, 냉증 등에 효능이 있다. 그러나, 배암차즈기 추출물을 함유하는 동맥경화 특히, 죽상동맥경화증의 개선 및 예방에 대한 종래기술은 없는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) 고혈압, 동맥경화 등 성인병 최근 4년새 33% 증가..식습관 바꿔야 [On-line], 2010.10.02.(검색일 : 2011.02.16.)
- (비특허문헌 0002) 신준식, 건강코너 - 동맥경화증. 한국 : 대한산업안전협회, 안전기술 no.89, 2005년, pp.30-31.
- (비특허문헌 0003) 서홍석(고려의대), 죽상경화증의 병태 생리(Pathophysiology of Atherosclerosis), 한국 : Clinical Vascular Medicine.

(비특허문헌 0004) 해외기술[영국], 콜레스테롤 축적을 차단하는 START 단백질, 2010-07-01, <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/06/100623085843.htm>

(비특허문헌 0005) 연세대학교화학연구소 조흥근 교수, 콜레스테롤 역수송의 기능적3단계, <http://cafe.daum.net/nursingkorea/LShb/6?docid=1Am9G|LShb|6|20091220082011&q=%C4%DD%B7%B9%BD%BA%C5%D7%B7%D1%20abcg1>

(비특허문헌 0006) 제주자연식품. Natural Cheju Food Co. [On-line], 2000. (검색일 : 2011.02.16)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하고자 발명한 것으로, 그 목적은 배암차즈기에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 3~5시간 동안 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 제조된 배암차즈기 추출물이 죽상동맥경화증의 단계에서 거품세포의 형성을 감소시키고 이미 축적된 불필요한 콜레스테롤을 외부 HDL로 유출하는 것을 촉진시킴으로써 죽상동맥경화증의 예방 및 개선을 위한 성분을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따른 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물은 배암차즈기에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 3~5시간 동안 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 제조된 것을 특징으로 한다.
- [0014] 또, 상기 배암차즈기 추출물은 물, 알코올, 아세톤, 헥산, 에틸아세테이트 중 하나 또는 둘 이상을 혼합한 것을 사용한 용매추출에 의해 제조하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 배암차즈기 추출물은 죽상동맥경화증의 진행단계인 거품세포의 형성을 감소시키고, 이미 축적된 거품세포에서의 콜레스테롤을 유출시키는 효능으로 죽상동맥경화증을 예방하고 개선할 수 있다.
- [0016] 이로써 배암차즈기 추출물은 부작용이 없으면서 죽상동맥경화증의 진행과정 중 거품세포의 형성을 감소시키고, 이미 축적된 거품세포에서는 축적된 콜레스테롤을 외부 HDL로 유출하는 것을 촉진함으로써 죽상동맥경화증의 개선 및 예방할 수 있는 성분으로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 죽상동맥경화증의 초기 단계에서 나타나는 산화 저밀도지단백질 (oxidized LDL)을 대식세포가 탐식할 때 관여하는 청소수용체의 단백질 발현을 배암차즈기 추출물이 감소시키는 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 죽상동맥경화증의 초기 단계에서 형성되는 거품세포의 형성을 지질을 염색하는 Oil red O염색법을 통해 확인한 결과로 배암차즈기 추출물이 거품세포의 형성을 감소시키는 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 이미 형성된 거품세포에서 축적된 콜레스테롤을 세포 외부 HDL로 유출해 거품세포에서 콜레스테롤을 유출시키는 데 관여하는 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현을 배암차즈기 추출물이 촉진시키는 것을 나타낸 결과다.
- 도 4는 콜레스테롤 유출 확인법을 통해 이미 축적된 콜레스테롤이 실제로 어느 정도가 세포 외부로 유출되었는가를 퍼센트로 정량화한 결과다. 배암차즈기 추출물이 콜레스테롤의 유출 확인법에서 유출을 촉진시키는 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물에 관한 것으로서, 배암차즈기에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 3~5시간 동안 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 배암차즈기 추출물을 제조하는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 상기 배암차즈기는 쌍떡잎식물 통화식물목 꿀풀과의 두해살이풀로서, 뱀배추라고도 하며, 약간 습기가 있는 도랑 근처에서 자라며, 높이 30~70cm이고, 네모지며 밑을 향한 잔털이 난다. 꽃은 5~7월에 연한 자주색으로 피는데, 길이 4~5mm이고 줄기 윗부분의 잎겨드랑이에 총상꽃차례로 달린다. 또한, 상기 배암차즈기는 혈액을 맑게 하며, 고혈압, 염증질환, 기관지질환, 독소 배출, 부인병, 불임증, 당뇨병, 냉증 등에 효능이 있다.
- [0020] 또한, 상기 배암차즈기에 용매를 혼합하여 추출할 때, 상기 용매는 물, 알코올, 아세톤, 헥산, 에틸아세테이트 중 하나 또는 둘 이상을 혼합한 것을 사용하는 것이 바람직하며, 물과 메탄올을 혼합하여 사용하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0021] 여기서, 상기 용매를 혼합하여 사용할 때 물 100중량부에 알코올 100~150중량부, 아세톤 100~150중량부, 헥산 100~150중량부, 에틸아세테이트 100~150중량부 중 하나 또는 둘 이상을 혼합하여 사용하는 것이다.
- [0022] 그리고, 상기 배암차즈기에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하는 것은 상기 배암차즈기가 용이하게 추출될 수 있도록 하기 위한 혼합비율이며, 상기 배암차즈기에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합한 후 60~70℃에서 3~5시간 동안 가열하는 것 또한 반복된 실험을 통하여 배암차즈기 추출물을 원활하게 추출하기 위함이다.
- [0023] 만약, 상기 배암차즈기에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합한 후 60℃ 미만에서 가열할 경우에는 가열 시간도 오래 걸릴 뿐 아니라 상기 배암차즈기의 유효한 성분이 충분히 용출되지 못할 수 있으며, 70℃를 초과하여 가열할 경우에는 높은 온도로 인하여 상기 배암차즈기의 유효한 성분이 변질 될 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 배암차즈기에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 3~5시간 동안 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조함으로써 추출이 더욱 원활하게 이루어지게 된다.
- [0025] 상기의 방법으로 제조된 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물은 초기 죽상동맥경화증의 진행 단계인 거품세포의 형성을 감소시키고, 이미 형성된 거품세포에서 축적된 불필요한 콜레스테롤을 세포 외부 HDL로 유출해 제거함으로써 배암차즈기 추출물을 죽상동맥경화증의 개선 및 예방을 위한 물질로서 제공한다.
- [0026] 더욱 상세하게는, 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물은 죽상동맥경화증의 발달에 거품세포가 형성되고, 이것을 유도하기 위해 대식세포 (마우스 대식세포인 J774A1)에 산화 저밀도 지단백질을 탐식시키고, 이때 산화 저밀도지단백질이 대식세포로 유입될 때 나타나는 청소수용체의 단백질 발현을 감소시키고, 지질이 축적된 거품세포의 형성을 확인할 수 있는 지질을 염색하는 Oil red O염색법을 통해 확인한바 거품세포의 형성을 감소시켰다. 그리고, 이미 불필요한 콜레스테롤이 축적된 거품세포에서 콜레스테롤을 거품세포 외부로 유출해 제거하는 데 관여하는 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현을 증가시키고, 실제로 콜레스테롤 유출 확인법을 통해 어느 정도의 양이 유출되는가를 확인한 결과, 유출이 촉진되는 것을 확인하였다. 이로써 배암차즈기 추출물은 부작용이 없으면서 죽상동맥경화증의 발달단계 중 거품세포의 형성을 감소시키고, 이미 축적된 거품세포에서는 축적된 콜레스테롤을 외부로 유출하는 것을 촉진함으로써 죽상동맥경화증의 개선 및 예방할 수 있는 성분으로 제공될 수 있다.
- [0027] 그리고, 본 발명에 의해 제조된 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 하는 죽상동맥경화증 개선 및 예방 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않지만, 음료, 분말, 농축, 캡슐 제형 또는 의약 제형으로 제조하는 것이 바람직하다.
- [0028] 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 제한하는 것이 아님은 당업자에게 있어서 명백한 사실이다. 즉,

본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 당업자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

- [0029] 실시예 : 배암차즈기 추출물 제조
- [0030] 중국산 배암차즈기 300g에 5L의 물과 메탄올을 용매로 첨가하여 추출했다. 이 추출과정 중 추출조의 온도는 60 내지 70 °C에서 진행되었고 4시간 동안 추출했다. 상기 방법으로 추출된 배암차즈기는 여과와 농축과정을 거쳐 동결건조 후 이 발명의 증명에 사용되기 위해 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 녹여 사용하였다.
- [0031] 실험 1 : 세포배양 실험
- [0032] <마우스 대식세포 (J774A1) 배양>
- [0033] 마우스 대식세포 (J774A1)는 10% fetal bovine serum (FBS)와 100 unit/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin이 첨가되어 있는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 거품세포로 유도하기 위해 50 µg/mL 산화 저밀도지단백질 (oxidized LDL)을 첨가한 배지에서 배암차즈기 추출물을 최대 18시간까지 각각 처리하였다.
- [0034] 실험 2 : 배암차즈기 추출물에 의한 청소수용체와 ABCA1의 단백질 발현
- [0035] <웨스턴블롯>
- [0036] 대식세포에 산화 저밀도지단백질의 탐식 시 이것의 유입에 관여하는 청소수용체와 이미 형성된 거품세포에서 콜레스테롤을 거품세포 외부로 유출하는 데 관여하는 ABCA1의 단백질 발현정도를 확인하기 위해 50 x 10⁴ 밀도의 J774A1 대식세포에 배암차즈기 추출물을 처리하였다. 청소수용체와 ABCA1의 단백질 발현을 확인하기 위해 세포 배양으로 수확한 세포를 용해시켜 세포 추출물을 얻었다. 세포 추출물 단백질의 웨스턴블롯은 6-10% SDS-PAGE로 수행하였다. 전기영동으로 얻은 단백질 띠 (bands)들은 nitrocellulose membrane으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% skim milk에 3시간 동안 blocking하였다. 청소수용체 단백질의 일차항체 (polyclonal rabbit anti-mouse antibody, Santa Cruz Biotech., CA, USA)와 ABCA1과 ABCG1 단백질의 일차항체 (polyclonal rabbit anti-mouse antibody, Novus biological., Littleton, CO, USA)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, goat anti-rabbit horseradish peroxidase (1:5000, Jackson ImmunoResearch Lab.)의 이차항체로 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane에 있는 청소수용체와 ABCA1과 ABCG1의 단백질은 Immobilon Western Chemiluminescent Horseradish Peroxidase Substrate (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)로 검출하여 X-ray 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.
- [0037] 그 결과는 도 1과 3에 나타내었다.
- [0038] J774A1 대식세포를 산화 저밀도지단백질에 탐식시키고 배암차즈기 추출물을 처리하면, 산화 저밀도지단백질을 탐식하는 과정에서 청소수용체의 단백질 발현이 감소하며, 이미 형성된 거품세포에서 축적된 불필요한 콜레스테롤이 세포 외부로 유출되는 것과 관련된 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현이 촉진되는 것을 나타내었다.
- [0039] 실험 3 : 거품세포의 형성 감소
- [0040] <Oil red O 염색법>
- [0041] 대식세포가 산화 저밀도지단백질을 탐식하면서 거품세포를 형성하는 정도를 확인하기 위해 10 x 10⁴ 밀도의 J774A1에 배암차즈기 추출물을 처리하였다. 18 시간 동안 세포 배양을 한 후 PBS로 1회 세척 후 4% formaldehyde로 1시간 동안 고정시켰다. 60 % isopropanol용액에 0.5 %로 Oil red O (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 녹여 1시간 동안 염색하고, 증류수로 충분히 세척하여 거품세포의 형성 정도를 광학현미경으로 관찰하였다.

[0042] 실험 4 : 콜레스테롤 유출 증가

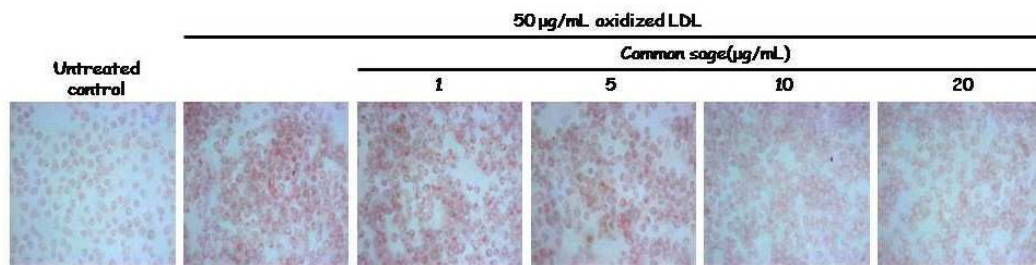
[0043] <콜레스테롤 유출 확인법>

[0044] 대식세포가 산화 저밀도지단백질을 탐식하면 거품세포를 형성하고, 거품세포 내부에는 콜레스테롤을 포함한 지질대사산물들이 축적되게 된다. 이때 불필요한 콜레스테롤은 ABCA1을 통해 세포 외부로 유출되어 제거된다. 실제로 콜레스테롤이 어느 정도 유출되어지는지 확인하는 방법으로 콜레스테롤 유출 확인법을 실시하여 퍼센트로 정량화시켰다. 대식세포에 배양차즈기 추출물을 12 시간 처리한 후, 이후 6시간 동안 형광성분이 붙은 NBD 콜레스테롤을 1 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한다. 그 후, PBS로 3번 세척한 후 새로운 배지로 바꿔준다. 그리고나서 6시간 동안 배양하면서 배지로 유출된 형광이 입혀진 콜레스테롤을 형광 강도 측정기에서 485nm와 538nm 파장 사이에서 측정하였다. 그리고 아무것도 처리하지 않은 군에 대비해 퍼센트로 정량화하여 도 4에 나타내었다.

도면

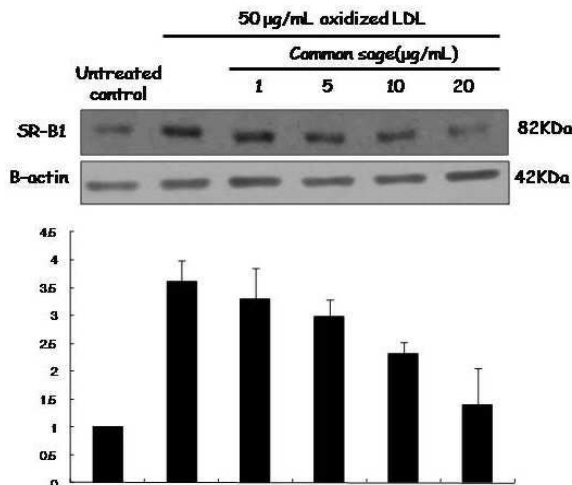
도면1

To prove intracellular lipids by Oil red o staining (magnified x400)



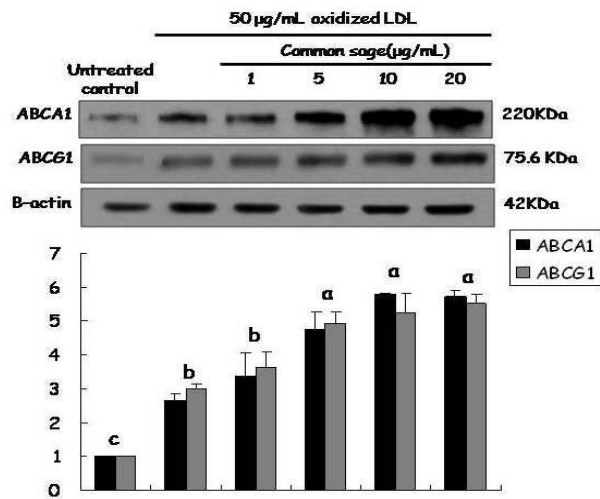
도면2

Expression of SR-B1 related to influx of cholesterol



도면3

Expression of ABCA1 related to efflux of cholesterol



도면4

Cholesterol efflux assay

