

	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호 10-2009-0115280
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자 2009년11월05일
(51) Int. Cl.	(71) 출원인	한림대학교 산학협력단
A61K 31/70 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)	강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교	주식회사 비피도
(21) 출원번호 10-2008-0041037	강원 홍천군 홍천읍 상오안리 688-1	(72) 발명자
(22) 출원일자 2008년05월01일	강영희	강원도 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관 8513호
심사청구일자 2008년05월01일	지근억	서울특별시 서초구 방배동 임광아파트 5-201
	(뒷면에 계속)	

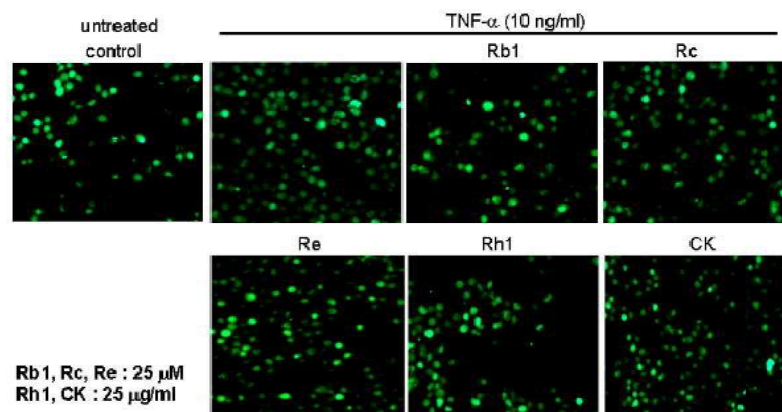
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 인삼으로부터 분리된 사포닌 유도체 진세노사이드를함유하는 단핵구 유착 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 사포닌 유도체 진세노사이드의 단핵구 유착 억제용 조성물에 관한 것이다. 좀 더 상세하게는 사포닌 유도체 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K(CK)가 혈관내피세포에 단핵구의 세포 유착을 억제, 혈관내피세포의 세포유착물질(cell adhesion molecules)의 발현을 억제하는 활성이 우수하고 염증반응에 근거한 동맥경화의 발생을 초기에 억제시킬 수 있는 효과가 있어 이러한 사포닌 유도체 진세노사이드를 유효성분으로 함유하는 단핵구 유착 억제 조성물을 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

신승용

강원도 춘천시 후평동 575-4 동산아파트 102-801

최정숙

강원도 춘천시 칠전동 칠전대우2차아파트 206-1506

김동수

강원도 강릉시 포남동 1068-2 백조아파트 2-303

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명

중소기업청

연구사업명

기업혁신개발사업

연구과제명

미세혈관 혈행개선을 위한 인삼진세로이드의 기능성 소재효능 규명

주관기관

(주)비피도

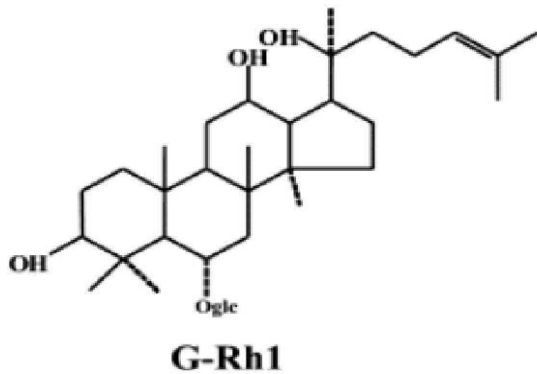
연구기간

2007년 07월 01일 ~ 2009년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

하기 식 I의 진세노사이드 Rh1을 함유하는 단핵구 유착 억제용 조성물.



화학식 I

청구항 2

하기 식 II의 CK를 함유하는 단핵구 유착 억제용 조성물.

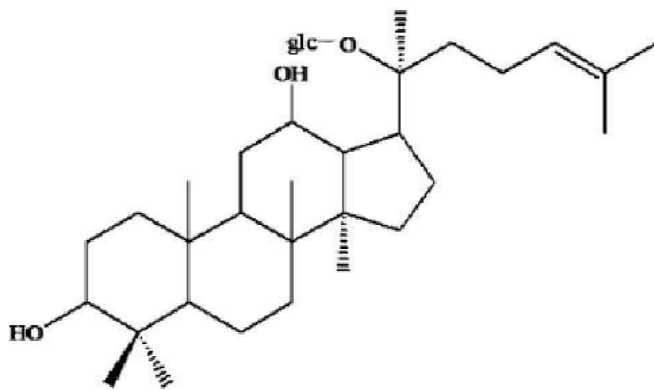


Figure 1. Chemical structure of compound K.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 진세노사이드 Rh1이 단핵구의 혈관내피세포 부착을 억제하는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 진세노사이드 Rh1이 세포부착물질-1(ICAM-1)의 발현을 억제하는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 진세노사이드 Rh1이 혈관세포부착물질-1(VCAM-1)의 발현을 억제하는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 2 항에 있어서, 상기 CK가 단핵구의 혈관내피세포 부착을 억제하는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 2 항에 있어서, 상기 CK가 세포부착물질-1(ICAM-1)의 발현을 억제하는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 2 항에 있어서, 상기 CK가 혈관세포부착물질-1(VCAM-1)의 발현을 억제하는 것임을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 단핵구 유착 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 혈관내피세포에 단핵구의 세포유착을 방지하여 동맥경화로의 발생을 초기에 차단시킬 수 있는 사포닌 유도체 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K에 관한 것이다.

배경기술

<2> 혈중 고콜레스테롤은 죽상경화증을 발현시키는 핵심요인으로 간주되어 왔다(Ross R. 1993. Nature 362: 801-809; Krauss RM. 1987. Am Heart J 113: 578-582 ; Steinberg G, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. 1989. N Eng J Med 320: 915-924). 죽상경화과정의 초기단계는 임파구, 다형다핵성 백혈구 및 단핵구가 손상된 혈관 내피조직에 결집되면서 나타나는데, 이는 세포유착분자들(cell adhesion molecules: 이하 CAMs라 함) 예를 들면 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1(intracellular adhesion molecule-1) 및 E-셀렉틴(selectin) 등에 의하여 수반된다고 알려져 있다(Scalia R, Appel JZ III, Lefer AM. 1998. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18: 1093-1100 ; Schonbeck U, Mach F, Libby P. 2001. Circ Res 89: 1092-1103 ; Osborn L, Hessian C, Tizard R, Vassalio C, Luhowskyj S, Chi-Rosso S, Lobb R. 1989. cell 59: 1203-1211; Cybulsky ML, Gimbrone MA Jr. 1991. Science 251:788-791).

<3> 상기 CAMs는 인터루킨-I 과 종양괴사인자-a(tumor necrosis factor-a : TNF-a) 등의 염증성 사이토카인에 의하여 발현이 증가된다(Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. 1986. J Immunol 137: 245-254). 또한 CAMs의 발현은 다양하게 이루어지며, 성장인자, 혈소판 활성화 및 주화성인자(chemotactic factor)에 의한 복잡한 조절기전이 관여하는 것으로 추정된다. CAMs는 토끼와 생쥐에서 뿐만 아니라 사람의 관상동맥과 복부대동맥의 죽상경화성 병변부위에서 발견되며, 신생혈관 및 염증성 침범부위의 죽상경화성 플라그 형성에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, Dichiaro M, Medoff BD, Cybulsky MI. 1999. Circ res 85: 199-207 ; Lessner SM, Prado HL, Waller EK, Galis ZS. 2002. Am J Pathol 160:2145-2155 ; Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. 1992. Am J Pathol 141: 161-168 ; O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Furgerson M, Hundkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE. 1993. J Clin Invest 92: 945-951).

<4> 인삼(the root of Panax ginseng C.A. Meyer. Araliaceae)은 중국, 한국, 일본 등의 아시아 국가에서 전통적으로 각종 질병의 치료에 사용되어 온 약재 중 하나이다. 이러한 인삼의 주요 활성 성분인 인삼 사포닌(saponin)(진세노사이드)은 항노화, 항염증, 중추 신경계와 심혈관계 및 면역계에서의 항산화 활성(Wu JY, et al., J. Immunol., 148:1519-25, 1992; Lee FC., Facts about ginseng, the elixir of life. Hollyn International. New Jersey, 1992; Huang KC., The pharmacology of Chinese herbs. CRC Press. Florida, 1999), 항당뇨 활성(Chang HM., Pharmacology and application of Chinese material medica. Vol1. World Scientific. Singapore, 1986) 및 항종양 활성(Sato K, et al., Biol. Pharm. Bull. 17:635-9, 1994; Mochizuki M, et al., Biol. Pharm. Bull. 18:1197-1202, 1995) 등과 같은 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다.

<5> 현재까지 30여 종이 넘는 진세노사이드가 인삼 사포닌으로부터 분리·동정되었으며, 담마란(dammarane) 골격을 가진 아글리콘(aglycone)을 포함하는 글리코사이드(glycoside)인 진세노사이드에는 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)계 사포닌에 속하는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd와 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol)계 사포닌에 속하는 진세노사이드 Re와 Rg1이 대부분을 차지하고 있다.

<6> 한편, 진세노사이드는 섭취 후 사람의 장내 미생물에 의해 대사되어 그 대사산물이 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(Karikura M, et al., Chem. Pharm. Bull., 39:2357-61, 1991; Kanaoda M, et al.,

J. Tradit. Med. 11:241-5, 1994; Akao T, et al., Biol. Pharm. Bull. 21:245-9, 1998). 예를 들어, 프로토파낙사디올계 사포닌인 Rb1, Rb2, Rc는

<7> 사람의 장내 세균에 의해 20-O-β-D-글루코피라노실(glucopyranosyl)-20(S)-프로토파낙사디올[IH-901, 화합물 K(compound K)]로 대사되고(Hasegawa H, et al., Planta Medica 63:463-40, 1997; Tawab MA, et al., Drug Metab. Dispos. 31:1065-71, 2003), 프로토파낙사트리올계 사포닌인 Re와 Rg1은 장내세균에 의해 진세노사이드 Rh1이나 진세노사이드 F1으로 대사되며(Hasegawa H, et al., Planta Medica 62:453-7, 1996; Tawab MA, et al., Drug Metab. Dispos. 31:1065-71, 2003), 이렇게 전환된 화합물 K, Rh1 및 F1은 다양한 생리활성을 나타낸다. 구체적으로, 화합물 K는 종양의 침입을 막거나 염색체 변형과 종양형성을 예방함으로써 항전이 또는 항암 효과를 유도한다고 알려져 있으며(Wakabayashi C, et al., Oncol. Res. 9:411-7, 1998; Lee SJ, et al., Cancer Lett. 144:39-43, 1999), Rh1은 각종 암세포의 성장에 대한 세포독성 효과(Odashima S, et al., Cancer Res. 45:2781-4, 1985; Ota T, et al., Cancer Res. 47:3863-7, 1987; Lee HY, et al., Differentiation mechanism of ginsenosides in cultured murine F9 teratocarcinoma stem cells. Proc. 6th Int. Ginseng symp. Seoul 127-31, 1993) 및 항알레르기, 항염증 활성(Park EK, et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 133:113-120, 2004)을 가진다.

<8> 그러나 상기 종래 기술에서는 본 발명의 사포닌 유도체 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K를 함유한 조성물의 초기 단계에서의 동맥경화 예방 및 치료제로서의 용도에 대해서는 전혀 개시되어 있지 않다.

발명의 내용

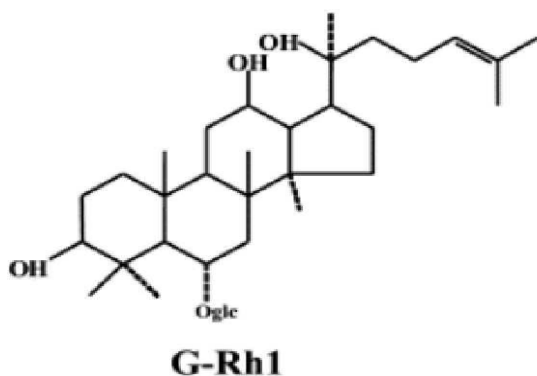
해결 하고자하는 과제

<9> 본 발명은 동맥경화 발생 초기에 혈관내피세포의 손상을 효과적으로 예방하고, 단핵구 유착을 억제할 뿐만 아니라 인체에도 무해한 인삼의 유효성분으로 함유하는 조성물 및 인삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 동맥경화성 심혈관 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<10> 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명은 동맥경화로의 진행을 억제 할 수 있는 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K의 단핵구 유착 억제용 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 혈관내피세포의 염증 활성화를 저해 할 수 있는 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

<11> 본 발명의 목적은 하기 식 I의 사포닌 유도체 진세노사이드 Rh1 및 하기 식 II의 화합물 K를 유효성분으로 함유하는 단핵구 유착 억제용 조성물을 제공하는 것이다.



<12>

<13> 화학식 I

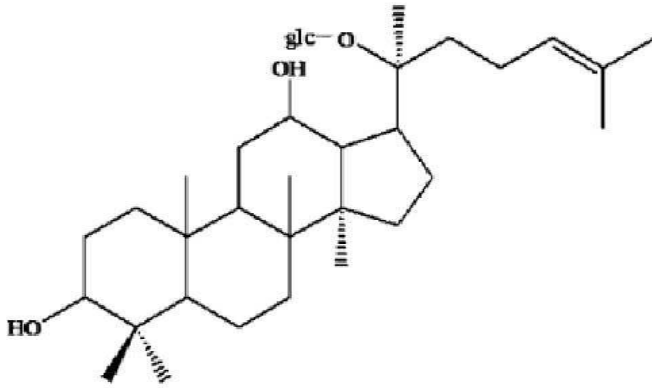


Figure 1. Chemical structure of compound K.

<14>

<15> 화학식 II

<16> 또한 상기 사포닌 유도체 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K는 단핵구의 혈관내피세포로의 세포 부착에 관여하는 단백질들(CAMs)의 발현을 억제하고 유착을 억제함으로써 초기단계 동맥경화 발생을 저해함을 특징으로 한다.

효과

<17> 상술한 바와 같이, 본 발명의 사포닌 유도체 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K는 염증에 의한 혈관내피세포의 손상을 효과적으로 예방하고, 인체에 부작용을 발생시키지 않으므로 이를 함유하는 조성물은 동맥경화성 혈관질환의 예방 및 개선을 위한 식품 조성물 또는 의료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<18> 본 발명은 초기단계에서의 동맥경화 예방 또는 개선을 위한 사포닌 유도체 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K를 유효성분으로 함유하는 단핵구 유착 억제용 조성물을 제공한다.

<19> 본 발명은 사포닌 유도체 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K는 염증성 사이토카인을 처리한 혈관내피세포와 THP-1 단핵구 세포 실험에서 단핵구의 세포 유착 억제효과와 혈관부착분자 발현을 현저하게 억제하였다.

<20> 본 발명의 방법에 있어서, 인삼 추출물은 인삼을 물 또는 메탄올, 에탄올, 프로판올 등의 저급 알코올을 이용하여 추출함으로써 제조될 수 있다. 또한, 비피도박테리움 속의 미생물로는 비피도박테리움 sp. Int57 및 비피도박테리움 sp. SJ32를 단독, 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 또한, 진세노사이드 Rh1의 제조에 사용되는 인삼 진세노사이드는 진세노사이드 Re 또는 Rg1인 것이 바람직하지만, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다.

<21> 또한, 진세노사이드 Rh1의 제조에 사용되는 원료인 상기 인삼 추출물은 물이나 완충용액과 같은 수성용매 및/또는 유기용매를 추가로 포함할 수 있다. 상기 수성용매로는 pH 3 내지 8, 바람직하게는 pH 4 내지 6 범위의 포스페이트 완충용액, 구연산 완충용액을 사용할 수 있고, 상기 유기용매로는 메탄올, 에탄올, 프로판올 등의 저급 알코올과 톨루엔, 에틸아세테이트, 클로로포름 등의 화합물을 사용할 수 있으나, 반드시 여기에 한정되는 것은 아니다. 상기 유기용매는 수성용매에 0 내지 50 중량% 정도 혼합되는 것이 좋으나, 유기용매의 혼합 비율은 반응에 사용되는 고농도의 인삼 진세노사이드 원료 물질을 용해시킬 수 있고, 효소의 활성을 저하시키지 않는 범위에서 사용한다. 최적의 용매조건을 얻기 위해서는 수성 완충용액만 사용하는 것보다 유기용매를 적절히 혼합하여 사용하는 것이 바람직하다.

<22> 본 발명의 단핵구 유착 억제를 위한 조성물은, 상기 인삼 사포닌 유도체를 조성물 총 중량에 대하여 0.02 ~ 90 중량%로 포함한다.

<23> 본 발명의 인삼 사포닌 분획으로부터 분리된 사포닌 유도체들을 포함하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<24> 본 발명의 인삼 사포닌 분획으로부터 분리된 사포닌 유도체 진세노사이드들을 함유하는 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, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마

그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

- <25> 본 발명에 따른 인삼 사포닌 분획으로부터 분리된 사포닌 유도체들을 포함하는 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.
- <26> 본 발명의 인삼 사포닌 분획으로부터 분리된 사포닌 유도체들의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 인삼 사포닌 분획으로부터 분리된 사포닌 유도체의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <27> 본 발명의 인삼 사포닌 분획으로부터 분리된 사포닌 유도체를 포함하는 조성물은 상기와 같은 제형으로 동맥경화성 혈관질환의 예방 및 치료를 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 유도체를 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- <28> 본 발명은 다음의 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되지는 않는다.
- <29> (실시예 1) 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K의 제조
- <30> 상술한 방법에 의해 분리된 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K는 본 발명에 공동 출원인으로 참여하는 (주) 비피도(대한민국, 원주)에서 제공받았다. 실험에 사용한 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K는 세포 배양실험을 위하여 미리 디메틸설폭시드(DMSO)에 녹여서 사용하였고(Anderson JJ, Garner SC. 1998. Baillieres Clin Endocrinol Metab 12: 543-557), 세포배양에 사용된 DMSO의 최종 농도는 0.5%로 하였으며, 배양실험을 위해 25 µg/ml 농도로 사용하였다.
- <31> (실시예 2) 혈관내피세포 준비
- <32> 혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cells)는 콜라게나제효소(collagenase typeIII, Worthington Biochemicals Co., Lakewood, NJ, USA)를 이용하여 분리하였고, 37℃, 95% O₂+5% CO₂ 배양 조건에서 일차배양하였다(Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Clin Invest 52:2745-2756). 혈관내피세포의 진위 판별은 DiI(1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)의 형광물질(Molecular Probes Co., Eugene, OR, USA)로 표지된 아세틸화된 저밀도지단백의 추적 실험을 통하여 이루어졌다(Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. 1984. J Cell Biol 99: 2034-2040).
- <33> (실시예 3) 세포독성 실험(Cell Cytotoxicity)
- <34> 세포독성이 있는지 여부를 혈관내피세포에서의 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K에 의한 세포독성 효과로서 측정하였다.
- <35> 측정시료에 대한 세포독성은 분광 MTT assay(Scudiero D. A. et al., Cancer Res., 48:4827-4833, 1988)로 측정하였다. 즉, 24 well microtiter tissue culture plate (Falcon)에 혈관내피세포를 7 X 10⁴ cells/ml로 plating 한 후, 각각의 well에 측정시료를 처리한 다음, 일정시간 배양시킨 후, MTT 시료를 처리하여 formazan 형성시 이를 solubilization용액으로 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 하기 도 1에 나타내었다.
- <36> 도 1에서 알 수 있듯이, 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K 모두 적정 농도(25 µg/ml)에서 혈관내피세포 독성이 전혀 나타나지 않았다.
- <37> (실시예 4) 단핵구 세포유착 억제 효과 검증
- <38> 4-1. 실험방법
- <39>
- <40> 1) 세포배양실험
- <41> 일차배양으로 준비된 혈관내피세포는 10% FBS(fetal bovine serum), 2 mM 글루타민, 100 U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신, 0.9 mg/mL bovine brain extract, 0.75 mg/mL 사람 외피성장인자 및 0.075 mg/mL 하이드로코르티손이 첨가되어 있는 25mM HEPES-M199 배지(Sigma Co. St. Louis, MO, USA)에서 배

양하였다. 사람 단핵구성 백혈병 세포인 THP-1 단핵구 세포주는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다.

<42>

<43>

2) In vitro 유착 실험

<44>

M199 배지에서 배양한 혈관내피세포에 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K를 각각 25 μ g/ml 농도로 20분간 전처리한 후 10 ng/mL TNF- α 를 처리하여 6시간 활성화 시켰다. RPMI-1640 배지에서 배양한 THP-1 단핵구는 5 μ M 칼세인-AM(Molecular Probes Co.)으로 30분간 염색을 시키고, 혈관내피세포와 동시 배양시켜 세척한 다음 SPOT II 디지털 카메라가 부착된 형광 현미경상에서 485 nm 여기, 538 nm 방출 파장으로 THP-1 단핵구의 혈관내피세포에 유착정도를 측정하였다(Axiolmer, Zeiss).

<45>

3) 통계처리

<46>

실험결과는 평균 $\pm$ SEM으로 표시하였으며, SAS PC 프로그램(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 그룹간의 차이($p < 0.05$)를 비교하였다. One Way ANOVA로 검증하였고 유의적인 차이를 보이는 그룹에 대해서는 투키 검정(Tukey correction)으로 검증하였다.

<47>

4-2. 결과

<48>

TNF- α 로 활성화된 혈관내피세포와 단핵구의 유착에 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K가 어떤 영향을 주는 지 조사하였다.

<49>

그 결과, 혈관내피세포에 TNF- α 를 단독으로 6시간 처리한 경우 이것을 처리하지 않은 대조군에 비하여 THP-1 단핵구의 유착이 유의적으로 증가되었다. 그러나 TNF- α 를 처리한 혈관내피세포에 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K 처리시 단핵구 유착이 억제되는 것으로 확인되었으며, 대조군에서는 단핵구의 유착이 억제되지 않은 것으로 확인되었다.

<50>

<51>

(실시에 5) 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K에 의한 TNF- α 로 활성화된 CAMs 단백질 발현 억제 효과검증

<52>

4-1. 실험방법

<53>

1) 단백질 분리와 웨스턴 블롯 분석

<54>

혈관내피세포의 VCAM-1과 ICAM-1 단백질 발현을 측정하기 위하여 웨스턴 블롯을 실시하였다. 혈관내피세포에 100% 글리세롤, 10% SDS, 1% B-글리세로포스페이트, 0.1 M Na_3VO_4 , 0.5 M NaF 및 프로테아제 저해 각테일이 함유된 1.0 M Tris-HCl(pH6.8) 세포용혈 완충액을 처리하여 세포 추출물을 준비하였다. 세포 추출물의 단백질은 8 % SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동 된 단백질 밴드들은 나이트로셀룰로소막으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5 % 탈지분유를 처리한 다음 각각의 CAMs 단백질의 일차 항체(monoclonal rabbit anti-human antibody, Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, 염소 항-토끼 호스래디시 페록시다제(1:0000, Jackson Immuno Research Lab., West Grove, PA, USA)의 일차 항체로 1시간 반응시켰다. 나이트로셀룰로소막에 있는 CAMs 단백질은 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광기(Supersignal West pico chemiluminescence, Pierce Biotech. Inc., Rockford, IL, USA)로 검출하여 코니카 X-레이 필름으로 촬영하였다. VCAM-1과 ICAM-1 단백질 발현량은 광학 농도계(densitometer)로 정량화 하였다.

<55>

4-2. 결과

<56>

CAMs은 주로 혈관내피조직에 단핵구가 결집하는 것을 담당하고, 죽상경화성 혈관손상을 초래하며 죽상경화성 플라그 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Dustin ML, Springer TA. 1988. J Cell Biol 107: 321-331). TNF- α 에 의한 혈관내피세포의 단핵구 유착에 있어 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K의 억제효과가 혈관내피세포의 CAMs 발현 억제에 기인한 것인지 조사하였다. 이를 위하여 CAMs 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 시도하였다.

<57>

도 3a 및 3b는 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K에 의한 TNF- α 에 의해 유도된 CAMs의 ICAM-1과 VCAM-1 단백질 발현 변화를 확인한 것이다. 그 결과, 혈관내피세포에 TNF- α 를 처리하지 않은 대조군에서는 ICAM-1과 VCAM-1 단백질의 발현이 나타나지 않았으나, TNF- α 를 처리하였을 때 ICAM-1과 VCAM-1 단백질의 발현이 현저하게 증가하였다. 10 ng/mL TNF- α 를 처리한 혈관내피세포에 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K를 25 μ g/ml 농도로 처리한 경우 ICAM-1과 VCAM-1 단백질 발현이 현저히 억제되었다. 반면에 25 μ M로 처리한 진세노사이드 Rh1, Rc 및

Re의 경우 ICMA-1과 VCAM-1 발현을 전혀 억제시키지 못하였다.

<58> 따라서 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K가 혈관내피세포의 CAMs 단백질의 발현을 억제함으로써 혈관내피조직에 단백질의 유착을 억제시킴을 확인할 수 있었다. 이에 따라 진세노사이드 Rh1 및 화합물 K가 동맥경화의 초기과정을 차단시키면서 죽상경화증과 관상동맥질환 등의 동맥경화성 심혈관질환을 예방하고 치료 용도로 제공이 가능하다.

도면의 간단한 설명

<59> 도 1은 진세노사이드 Rh1과 CK에 의한 혈관내피세포의 세포독성 효과를 확인한 것이다.

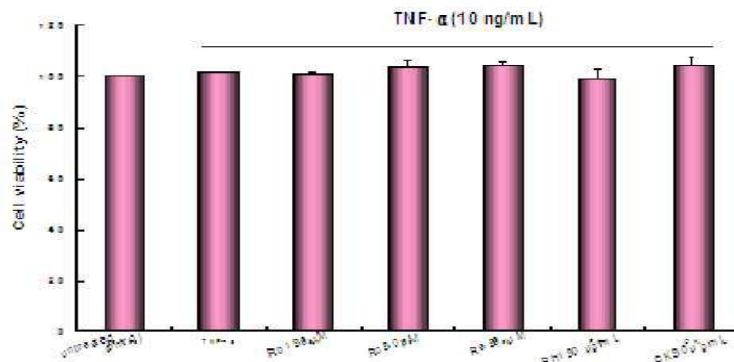
<60> 도 2는 TNF- α 활성화된 혈관내피세포에서의 진세노사이드 Rh1 및 CK의 단백질 유착 억제효과를 확인한 것이다.

<61> 도 3은 진세노사이드 Rh1 및 CK가 TNF- α 에 의해 유도된 ICAM-1 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 것이다.

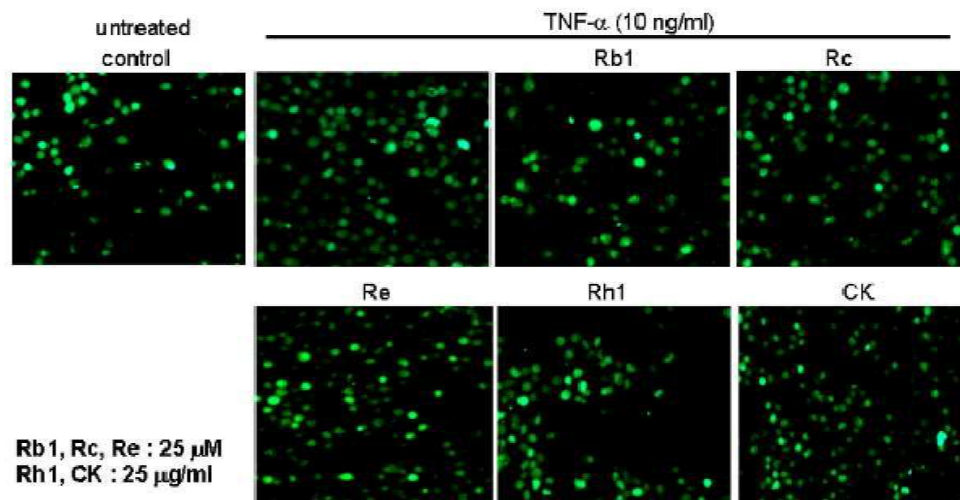
<62> 도 4는 진세노사이드 Rh1 및 CK가 TNF- α 에 의해 유도된 VCAM-1 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도면

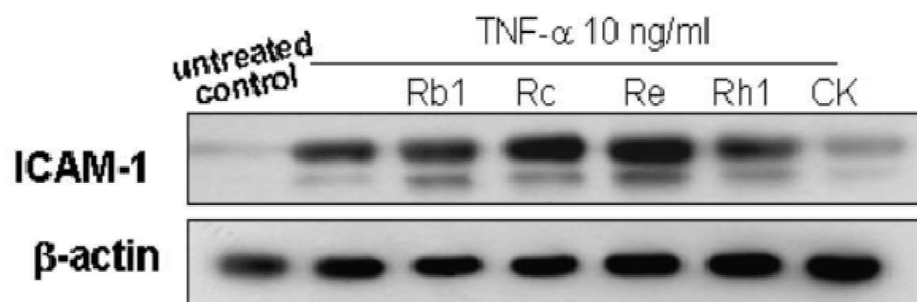
도면1



도면2



도면3a



도면3b

