(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월04일
(11) 등록번호 10-1874534
(24) 등록일자 2018년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/31 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/31 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0068342
(22) 출원일자 2017년06월01일
심사청구일자 2017년06월01일
(56) 선행기술조사문헌
Food Funct., vol.5, pp.1082-1090 (2014.02.21.).
The FASEB Journal, vol.23, no.1_supplement, abstract (2009.04.01.).

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
전병화
대전광역시 서구 둔산남로 127, 204동 803호(둔산동, 목련아파트)
최성아
대전광역시 서구 문정로170번길 167-13(둔산동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

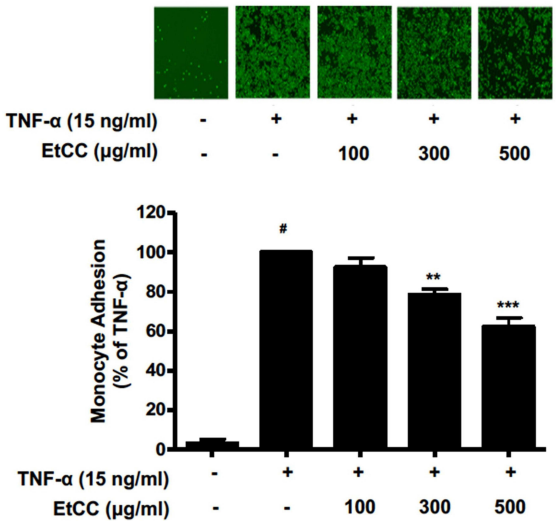
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 **배추 추출물을 함유하는 혈관염증질환 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 혈관내피세포에서 TNF-α에 의해 유도되는 VCAM-1의 발현과 단핵구의 부착을 억제하는 효과가 있어 혈관염증질환에 대한 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있는 혈관염증질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 배추 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
(72) 발명자
주희경
대전광역시 서구 만년로 25, 102동 701호(만년동, 강변아파트)
임용표
대전광역시 유성구 상대남로 26, 903동 1602호(상대동, 도안신도시9블록 트리풀시티아파트)
권오하
충청북도 청주시 서원구 신화로 6, 에버스테이 107호(성화동)
박종태
대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 603동 1102호(하기동, 송림마을6단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014R1A6A1029617
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원사업
연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발
기 여 율 40/100
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2014.09.01 ~ 2017.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 213002044SBX20
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 Golden Seed 프로젝트
연구과제명 신규육종 채소작물 유래성분의 전임상 기능성 평가
기 여 율 60/100
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2016.03.01 ~ 2016.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

배추(*Brassica Rapa Ssp. pekinensis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 배추 추출물은 C1~C4의 저급 알콜, 물 또는 이의 혼합물을 사용하여 추출한 것을 특징으로 하는 혈관 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 조성물은 손상된 혈관내피세포에 단핵구의 유착을 억제하고, VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 단백질의 발현을 저해하는 것을 특징으로 하는 혈관 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 혈관염증질환은 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

배추(*Brassica Rapa Ssp. pekinensis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈관내피세포에서 TNF-α에 의해 유도되는 VCAM-1의 발현과 단핵구의 부착을 억제하는 효과가 있어 혈관염증질환에 대한 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있는 혈관염증질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 동맥경화와 같은 혈관질환의 초기병변은 주로 혈관내피세포의 염증반응이 원인이 되고 있다(Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26). 정상 혈관내피세포들은 염증세포와 상호작용이 일어나지 않고 혈류를 따라 흘러갈 뿐이므로 혈관벽과의 접촉이 거의 일어나지 않는 반면, 혈관내피세포에 염증이 일어나면, 염증세포와 상호작용이 일어나 염증세포가 혈관벽에 달라붙어 염증반응이 일어나게 된다. 초기 동맥 염증 과정에서, 병원체(pathogen), 산화 지질 또는 종양괴사인자(TNF)-α,

인터루킨(IL)-1/3 및 IL-6와 같은 사이토카인을 비롯한 다양한 자극에 의해 내피세포가 활성화되며, 이후 연속적으로 순환하는 단핵구가 플라그-형성 병소(foci)로 되는 것을 증가시키는 특정 부착 수용체인 VCAM-1(Vascular cell adhesion protein-1) 단백질의 발현을 유도한다. 염증이 생긴 혈관내피세포에서 롤링(rolling) 및 부착된 단핵구는 연속적으로 전이되어, 결과적으로 혈관벽을 통해 삼출(diapedesis)된다. 이러한 혈관염증반응에서의 주요 매개체로 알려진 VCAM-1의 발현을 억제하는 물질은 염증으로 인한 혈관질환의 치료물질로 활용되고 있다(Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis; Int J Clin Pract. 2007 Apr;61(4):697-701). 혈관염증에 의해 야기되는 혈관염증질환으로는 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중을 예로 들 수 있다.

[0003] 배추는 십자화과 배추속에 속하는 광범위하게 재배되는 식용식물로 노란색 또는 초록색의 커다란 잎을 갖는다. 십자화과 식물은 중국, 일본 및 한국을 포함한 동부아시아에서 중요한 식품원으로 전통적으로 건강을 유지하는데 사용되고 있으며, 서방 국가에서도 점차 그 소비가 증가하고 있다. 종래의 연구에서 십자화과 작물에는 순무와 청경채 유래의 플라보노이드(이소람네틴, 캠패롤, 퀘르세틴)와 페닐프로파노이드(phenylpropanoide) 유도체, 배추와 무의 절단 또는 저작 과정의 가수분해 효소에 의해 생성되는 이소티오시아네이트(페닐에틸 이소티오시아네이트, 벤질 이소티오시아네이트), 브로콜리 유래의 상대적으로 풍부한 설포라판(sulforaphane)과 브로콜리 및 콜리플라워 유래의 인돌 알칼로이드 및 스테롤 글루코시드와 같은 활성물질이 포함되어 있음이 보고되어 있다. 또한 이들 화합물들은 암이나 당뇨병과 같은 만성 질환에 대한 생물학적 활성을 나타낸다고 보고되어 있다. 산화적 손상을 야기하는 활성산소종의 조절에 관한 연구 역시 식물성 화학물질과 만성 질환의 위험성에 역상관관계가 있음을 보여준다.

[0004] 배추의 성분은 대부분이 수분이지만, 철분, 칼슘, 엽록소, 비타민 등이 많이 함유되어 있고 침의 분비를 촉진하여 소화를 도우며 위장과 가슴의 소모성 열을 제거하여 갈증과 주독을 풀어주는 효과가 있다고 알려져 있다. 배추는 항산화 특성을 지니고 있으며 한국 전통 발효 음식인 김치의 형태로 대량 소비되어 진다. 배추에 대해서도 많은 활성물질들이 연구되어 왔지만, 이들의 혈관염증질환에 대한 효과는 보고되어진 바 없다.

[0005] 등록특허 10-1248548호 및 공개특허 10-2016-0146007호는 곰보 배추의 추출물이 염증에 효능이 있다는 것으로부터, 곰보배추 추출물을 함유하는 화장료 조성물과 호흡기염증 질환의 예방 및 치료용 조성물을 게시하였다. 그러나 배암차즈기라고도 불리우는 곰보배추(Salvia plebeia)는 배추라는 명칭이 붙기는 하였으나, 통화식물목 꿀풀과에 속하는 식물로서 양귀비목 십자화과에 속하는 배추와는 계통학적으로 전혀 다른 식물체이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 등록특허 10-1248548호

(특허문헌 0002) 공개특허 10-2016-0146007호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26.

(비특허문헌 0002) Int J Clin Pract. 2007 Apr;61(4):697-701.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 인체에 대한 부작용이 없어 상시적으로 안전하게 사용할 수 있으며, VCAM-1의 발현 및 손상된 혈관내피세포에의 단핵구의 부착을 억제하여 혈관염증질환의 예방 및 치료, 개선에 효과적인 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 배추 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010] 본 발명에서 상기 배추의 추출물은 당업계의 통상적인 추출방법을 적용하여 제조된 추출물로, 구체적으로는 수확된 그대로의 상태, 건조된 상태 또는 동결된 상태의 배추를 추출이 용이하도록 적절한 크기로 절단하거나 마쇄하여 추출한 것이다. 추출을 위한 용매로는 C1~C4의 저급 알콜, 물 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 잔류 용매의 안전성을 고려한다면 더욱 바람직하게는 에탄올 수용액을 사용하는 것이 좋다. 추출방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출을 이용할 수 있다.

[0011] 배추 추출물은 갈산, 커피산, 쿠마르산, 프랜스-페룰산, 시나핀산을 포함한 페놀산과 플라보놀의 함량이 풍부하였으며, TNF-α에 의해 자극된 혈관내피세포에서 단핵구의 부착을 효과적으로 억제하였을 뿐 아니라 혈관염증의 초기 반응에 작용하는 VCAM-1의 발현을 하향조절(downregulation)하는 것에 의해 VCAM-1의 발현을 억제하므로 혈관염증질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0012] 본 발명에서 "혈관염증질환"이란 염증에 의해 야기되는 혈관질환을 의미하며, 예를 들면 동맥경화증, 고혈압, 협심증, 심근경색, 허혈성 심장질환, 심부전, 경혈관 동맥 성형술 후 발생하는 합병증, 뇌경색, 뇌출혈 및 뇌졸중을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 조성물은 치료용 약제로 이용하기 위해서 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로 제형화하여 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 제제의 형태, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0014] 본 발명의 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로, 예방 목적으로 장기간 복용하는 경우에도 안전하게 사용될 수 있다.

[0015] 또한 본 발명은 배추의 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상기 배추의 추출물은 본 발명의 건강기능식품에 바람직하게는 0.01~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

발명의 효과

[0016] 이상과 같이 본 발명의 배추 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 손상된 혈관내피세포에서의 VCAM-1의 전사 조절에 의해 발현을 억제하고, 단핵구의 부착을 억제하는 효과가 더욱 현저하여 혈관염증질환의 예방 및 치료, 증상 개선에 효율적으로 이용될 수 있다.

[0017] 또한 본 발명의 조성물은 세포독성을 나타내지 않아 장기간 사용 시에도 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 세포 생존율에 대한 배추 추출물의 영향을 보여주는 그래프.

도 2는 혈관내피세포에의 단핵구의 부착에 대한 배추 추출물의 영향을 보여주는 그래프.

도 3은 혈관내피세포에서 VCAM-1의 발현에 대한 배추 추출물의 영향을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것

은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0020] **[실시예]**

[0021] **실시예 1 : 배추 추출물의 제조**

[0022] 2015년 가을에 수확된 배추(Kwonnong Carotene™, 권농 종묘)를 권농 종묘사에서 구매하여 -20℃에서 저장하며 사용하였다. 시료를 해동한 후 블랜더를 사용하여 으깨준 후 4℃에서 20분간 원심분리(15,000 g)하여 상등액을 제거하였다. 고형분에 2배의 50%(v/v) 에탄올을 넣고 상온에서 15분간 250 rpm(OS20-Pro, Scilogex, USA)으로 교반하였다. 이후 4℃에서 20분간 원심분리(15,000 g)하여 고형분을 제거하고 에탄올 추출물(EtCC)을 수득하였다. 시료로 사용한 배추에 대한 추출물의 수율은 2.1%(w/w)였다. 추출물은 진공 하에서 동결건조하였으며, -20℃에서 저장하며 사용하였다.

[0023] **실시예 2 : 배추 추출물 중 페놀화합물의 분석**

[0024] 배추 추출물(EtCC) 중 갈산, 커피산, 쿠마르산, 트랜스-페룰산, 시나핀산을 포함한 페놀산(phenolic acids)과 플라보놀의 함량을 Jiang N 등(Hortic Environ Biotechnol 2013: 54 :82~88)이 기술한 방법에 따라 정량하고 그 결과를 표 1에 기재하였다. 위의 다섯가지 페놀산은 각각 표준물질에 의해 정량하였으며, 표준물질이 없는 페놀산은 시나핀산을 표준물질로 하여 정량하였다. 플라보놀의 정량은 퀘르세틴과 캠페롤을 표준물질로 사용하였다.

표 1

[0025]

페놀화합물		함량(mg/EtCC g)
총페놀산		7.07±0.09
플라보놀	퀘르세틴	0.014±0.30
	캠패롤	0.060±0.01

[0026] 표 1에서 확인할 수 있듯이, 배추추출물 중 페놀산의 함량은 플라보놀에 비해 100배 정도 많았다. 캠패롤은 주된 플라보놀로 확인되었다.

[0027] **실시예 3 : 배추 추출물의 세포독성 확인**

[0028] HUVECs(혈관내피세포, Clonetics, USA)에 대한 배추 추출물의 세포독성을 확인하였다. HUVECs의 단층배양체는 Lee 등(Integr Med Res 2016 ; 5 ; 131-139)의 방법에 따라 유지하였다. 80~90%의 컨플루언스(confluence)의 HUVECs에 1~1000 ㎍/㎖)의 EtCC를 1시간 동안 전처리한 후 TNF-α(15 ng/㎖, Sigma, USA)를 처리하여 72시간 동안 37℃의 수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 세포생존율은 제조사의 매뉴얼에 따라 불투명한 assay plate에서 RealTime-Glo™ MT luminescent kit(Promega, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0029] 도 1은 3회의 측정결과를 도시한 그래프로, EtCC의 처리 농도가 1000 ㎍/㎖까지 대조군과 유사한 세포 생존율을 나타내어 세포 독성이 없이 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였다. 이에 하기 실험에서는 500 ㎍/㎖ 이하의 농도로 EtCC를 처리하여 시험하였다.

[0030] **실시예 4 : 배추 추출물의 혈관내피세포에의 단핵구 부착 억제효과 확인**

[0031] EtCC 추출물에 의한 혈관염증 억제효과를 혈관내피세포에 대한 단핵구의 유착정도로 파악하였다.

[0032] U937 단핵구(Clonetics, USA)는 10% Fetal Bovine Serum과 penicillin 100 U/㎖, streptomycin 100 ㎍/㎖을 보충한 RPMI 1640배지에서 배양했다. 세포주는 5%의 이산화탄소와 95%의 공기가 혼합된 37℃수분 공급형 배양기에서 유지·배양하였다.

[0033] HUVECs는 Endothelial cell growth medium에 배양·유지된 세포를 이용하였다.

[0034] HUVEC 배양 세포를 3×10^4 cells/well의 농도로 96-well 플레이트에 분주하고, 50, 100, 300 및 500 ㎍/㎖의 농

도로 EtCC 추출물을 1시간 동안 전처리하였다. 이후 TNF-α(15 ng/ml)를 처리하여 18시간동안 37℃수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 18시간 후 단핵구 유착 정보를 정량하기 위하여, 1 μM BCECF-AM으로 형광염색시킨 U937세포를 TNF-α가 처리된 HUVECs에 가하여 추가로 2시간 반응시켰다. 부착하지 않은 U937세포를 Hanke's 완충식염수로 3회 세척하고 혈관내피세포에 부착한 U937세포의 수를 GloMax fluorometer(ex: 485 nm; em: 538nm)를 사용하여 측정하였다. HUVECs만을 포함하는 well을 대조군으로 하였다. 부착된 U937 세포는 형광 현미경(Axiophot; Carl Zeiss, Germany)으로 관측하였다.

[0035] 도 2에서 확인할 수 있듯이 HUVECs에 대한 단핵구의 유착은 TNF-α에 의하여 유도되었으며, EtCC의 전처리는 이러한 단핵구의 유착을 농도 의존적으로 억제하였다. 예를 들어, EtCC를 300 ㎍/㎖의 농도로 전처리 한 경우, 대조군에 비해 단핵구의 유착이 21.7% 감소하였다. EtCC 만을 처리하는 경우에는 단핵구의 유착에 영향을 미치지 않아(데이터 미도시), EtCC는 손상된 내피세포의 표면에 단핵구가 부착하는 것을 저해하는 것에 의해 TNF-α에 의한 혈관염증반응을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0036] **실시예 5 : 배추 추출물의 VCAM-1 발현 억제효과 확인**

[0037] HUVECs에서 TNF-α에 의하여 유도 발현되는 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) 발현에 배추 추출물이 미치는 영향을 규명하였다.

[0038] HUVEC 배양 세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 6-well 플레이트에 분주하고, 50, 100, 300 및 500 ㎍/㎖의 농도로 EtCC 추출물을 1시간 동안 전처리하였다. 이후 TNF-α(15 ng/ml)를 처리하여 18시간동안 37℃수분 공급형 배양기에서 배양하였다.

[0039] 상기 혼합물을 인산완충액 식염수로 3회 세척한 후 세포분쇄기를 이용하여 분쇄하고 이를 12,000 g에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상기 상등액을 이용하여 브래드포드 어세이(BIO-Rad)를 통해 단백질 정량을 하고, 정량된 결과를 참고하여 30㎍ 씩의 단백질을 10% SDS-PAGE(10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후, PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 이후, VCAM-1 발현량을 β-actin에 대한 양을 기준으로 면역 블랏팅에 의해 확인하고, 그 결과를 도 3의 A에 도시하였다.

[0040] 도 3의 A에서 보여주듯이, TNF-α의 처리는 HUVECs에서 VCAM-1의 발현을 유도하였으나, EtCC를 전처리한 경우 VCAM-1의 발현이 현저하게 저하되었다. 이러한 VCAM-1의 발현 억제는 EtCC의 농도에 의존적이었으며, EtCC의 전처리 농도가 300 ㎍/㎖인 경우 50%의 발현 억제 효과를 나타내었다.

[0041] VCAM-1의 발현 억제가 VCAM-1의 전사 조절에 기인한 것인지를 Lee 등(Integr Med Res 2016 ; 5 ; 131-139)이 보고한 방법에 따라 초파리의 luciferase reporter 유전자가 융합된 VCAM-1 프로모터를 갖는 HEK 293T 세포(#CCL-2, American Type Culture Collection, USA)(HEK 293T/VCAM-1-luc)에서 배추 추출물이 VCAM-1의 전사에 미치는 영향을 검정하고, rt-PCR에 의해 확인하였다.

[0042] 보다 상세하게는 HEK 293T/VCAM-1-luc 세포를 불투명한 96-well 플레이트에 4×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 50, 100, 300 및 500 ㎍/㎖의 농도로 EtCC 추출물을 1시간 동안 전처리하였다. 이후 TNF-α(15 ng/ml)를 처리하여 6시간 동안 37℃수분 공급형 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포를 루시페린(luciferin) 150 ㎍/㎖으로 30분간 추가로 처리한 후, IVIS® Lumina XRMS Imaging System(PerkinElmer, Inc., USA)으로 이미지를 측정하고, Living Image Software 4.4(PerkinElmer)로 그 결과를 분석하여 도 3의 B에 도시하였다.

[0043] rt-PCR을 위해 EtCC로 1시간 동한 전처리한 후 TNF-α로 6시간 동안 처리한 HUVECs로부터 Qiaqen RNeasy kit(Valencia, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 양성 대조군으로는 EtCC 대신 캠패롤 (30 μM)을 처리하였다. olig(dT) 프라이머(Intron Biotechnology, Korea)를 함유하는 Maxime RT PreMit kit를 사용하여 cDNA를 합성하고, AriaMx Real-time PCR system (Agilent Technologies)을 사용하여 rt-PCR에 의해 cDNA 수준을 정량하였으며, 각 사이클마다 형광을 측정하였다. PCR은 Taq polymerase를 활성화하기 위하여 95℃에서 12분간 처리한 후, 95℃에서 10초, 60℃에서 20초, 72℃에서 30초의 사이클을 40회 반복하였다. 서로 다른 양의 cDNA를 사용하여 표준곡선을 작성하였으며, ΔCt 값을 계산하였다. VCAM-1에 대한 프라이머는 다음과 같다. 분석결과는 도 3의 B에 도시하였다.

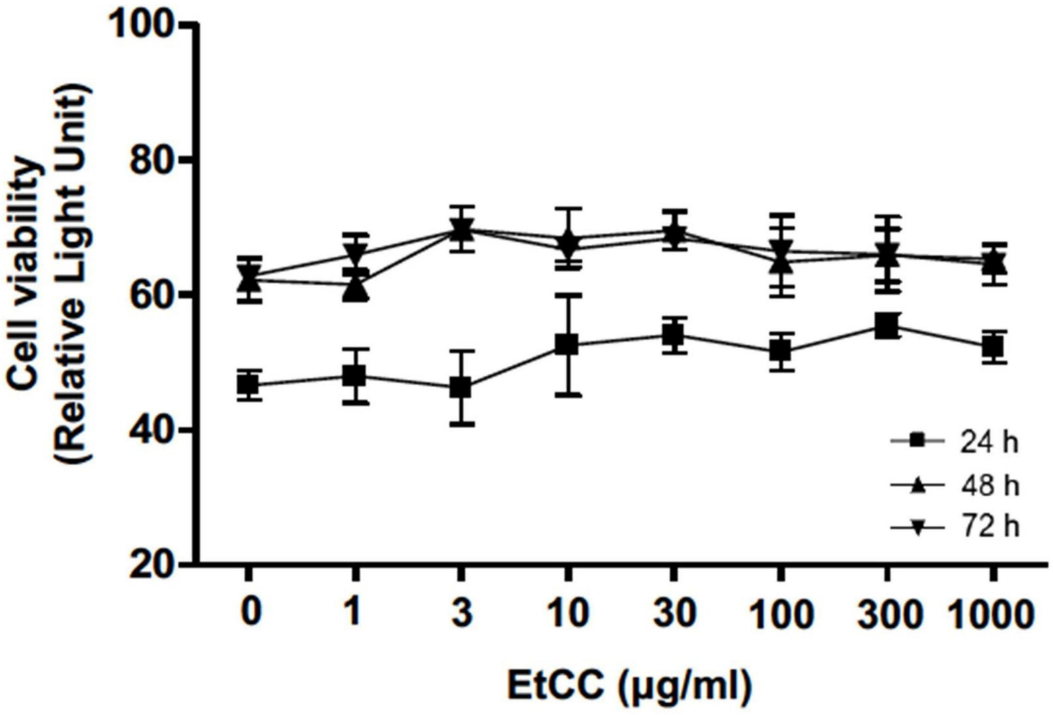
[0044] 서열번호 1 : forward 5'-GTTGAAGGATGCGGGAGTAT-3'

[0045] 서열번호 2 : reverse 5'-TTCATGTTGGCTTTTCTTGC-3'

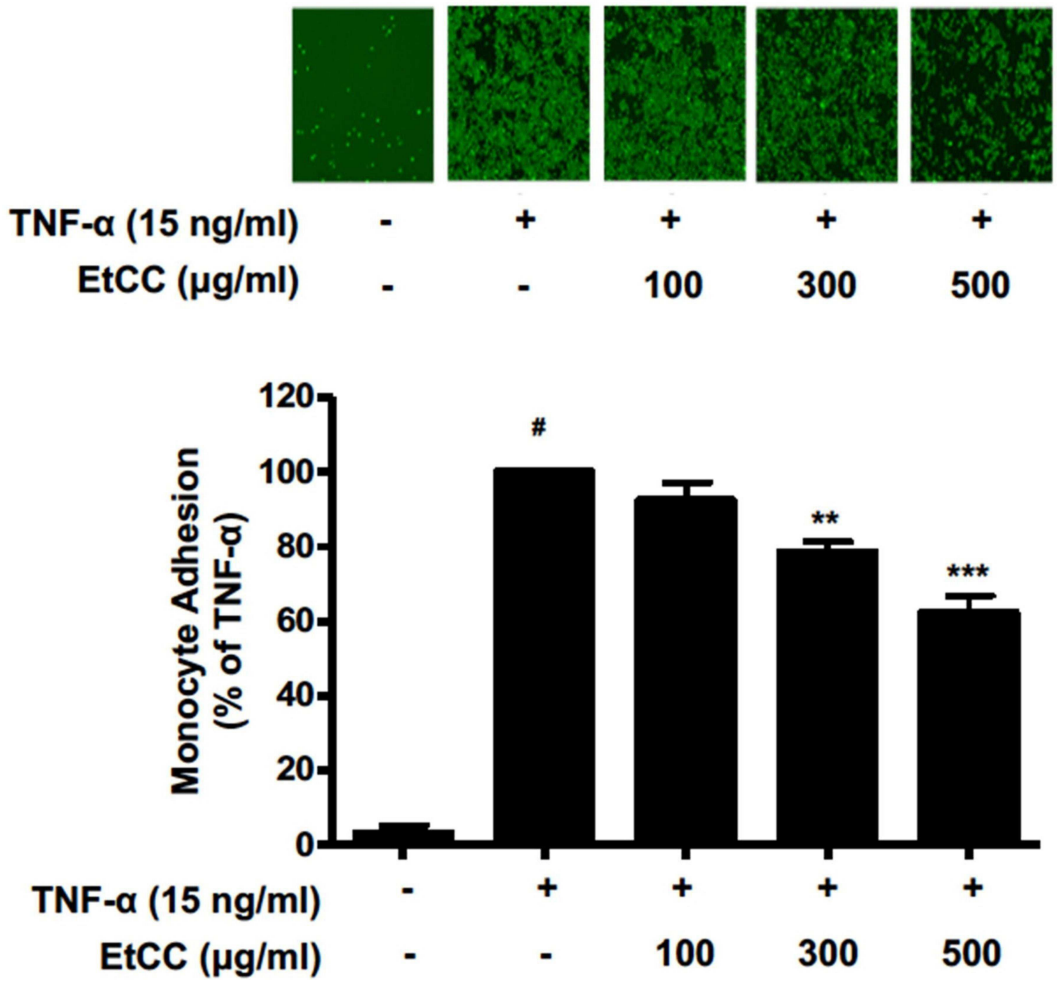
[0046] 도 3의 B에서 TNF-α는 HEK 293T/VCAM-1-luc 세포에서 VCAM-1의 전사 활성 및 HUVECs에서 VCAM-1 전사 수준을 증가시키는 것을 알 수 있다. TNF-α에 의해 자극된 세포에서 EtCC의 전처리는 면역블랏의 결과와 마찬가지로 VCAM-1의 전사 활성과 mRNA의 발현수준을 현저하게 감소시켰으며, 감소 정도는 농도 의존적이었다. 이는 EtCC에 의한 VCAM-1의 발현 억제가 VCAM-1의 전사 조절에 의해 이루어지는 것을 의미한다.

도면

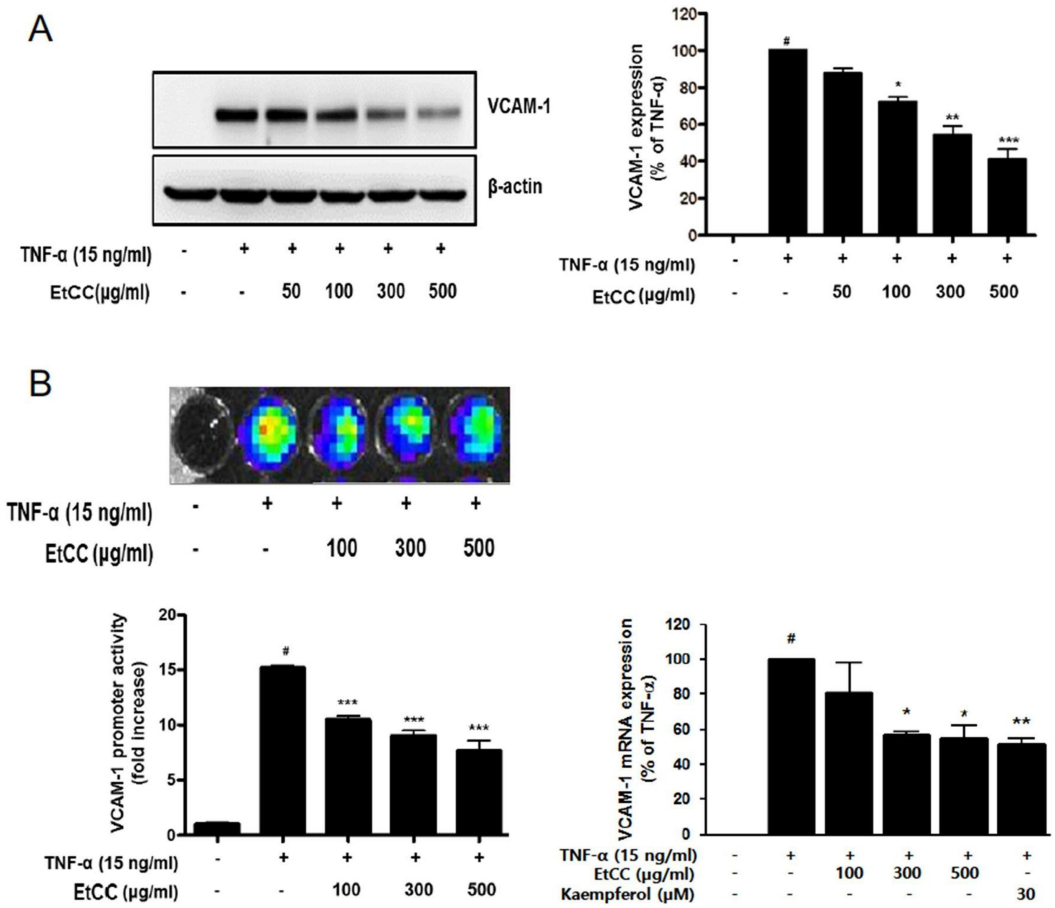
도면1



도면2


TNF-α (15 ng/ml) - + + + +
EtCC (μg/ml) - - 100 300 500
Monocyte Adhesion (% of TNF-α)
120
100
80
60
40
20
0
#
**
***
TNF-α (15 ng/ml) - + + + +
EtCC (μg/ml) - - 100 300 500

도면3



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Composition for Prophylaxis and Treatment of Vascular Inflammatory Diseases Comprising Brassca Rapa Ssp. pekinensis Extract

<130> P0617-411

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gttgaaggat gcgggagtat 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ttcatgttgg cttttcttgc 20