(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0137674
(43) 공개일자 2010년12월31일

(51) Int. Cl.
A61K 31/351 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0055838
(22) 출원일자 2009년06월23일
심사청구일자 2009년06월23일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이성준
서울 강남구 청담동 삼성청담공원 아파트 104-402
조성윤
서울특별시 성북구 돈암1동 633번지 동부센트레빌 아파트 103동 1002호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 7 항

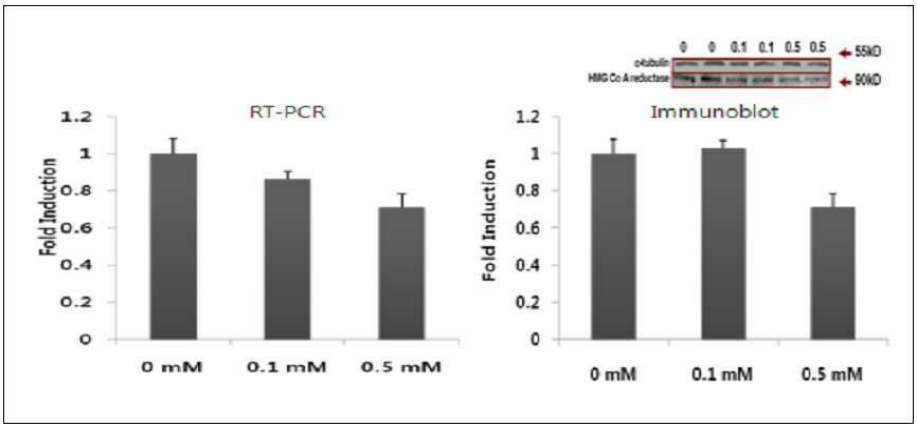
(54) 리나룰을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 리나룰을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 콜레스테롤 생합성에 관여하는 HMG-CoA 환원효소의 발현을 감소시킴으로써 콜레스테롤 생합성 단계를 유의적으로 조절할 수 있는, 리나룰을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명은 리나룰이 혈중 및 간조직에서 콜레스테롤을 감소시킬 수 있는지 확인하였으며, 콜레스테롤 대사에 관여하는 주요 유전자 발현을 조사한 뒤 이러한 유전자 발현을 조절하는 인자의 발현을 추가적으로 조사하였다. 그 결과, 본 발명의 리나룰은 SREBP-2의 발현을 감소시키고 이에 따라 HMG-CoA 환원효소의 발현을 감소시킴으로써 콜레스테롤 생합성 단계를 유의적으로 조절함을 알아내었다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

박효민

서울특별시 강남구 청담1동 117-3 대우빌라 로얄카운티 601호

김진영

경기도 의왕시 포일동 인덕원삼호아파트 4동 1101호

김경헌

서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 18동 703호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 200804010340490080100

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 BIO 그린 21사업

연구과제명 [세부]허브 유효성분과 영양유전체/대사체 기법을 이용한 대사질환 개선용 효능 및 안정성 평가

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2008년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

리나룰(Linalool)을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 HMG-CoA 환원효소와 LDL-수용체의 유전자 발현을 감소시킴으로써 콜레스테롤 저하 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 SREBP, SCAP, 및 S1P 유전자의 발현을 감소시키고, Insig-1 유전자 발현을 증가시킴으로써 콜레스테롤 저하 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 유효성분으로 함유하는 동맥경화 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 유효성분으로 함유하는 동맥경화 예방 및 개선용 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 리나룰을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 콜레스테롤 생합성에 관여하는 HMG-CoA 환원효소의 발현을 감소시킴으로써 콜레스테롤 생합성 단계를 유의적으로 조절할 수 있는, 리나룰을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현대인의 건강은 식습관과 생활패턴의 변화로 인해 각종 성인병으로부터 위협을 받고 있다. 대표적인 성인병 중 하나가 동맥경화증이며 그 발병빈도는 증가 추세에 있다. 따라서 동맥경화증의 치료와 예방에 중요한 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 농도 등을 효과적으로 조절할 수 있는 식품과 의약품에 관한 연구가 많이 수행되고 있다. 천연 식의약 소재 개발은 경제 산업적으로 큰 의의를 가지고 있으며, 특히 인체에 부작용이 없으면서 동맥경화증을 예방 및 치료할 수 있는 천연 식의약 소재 개발이 절실히 요구 되고 있다.

[0003] 리나룰(Linalool)은 자연계에 존재하는 터펜 알코올(terpene alcohol)로서 200종 이상의 꽃(특히 민트향기가 나는 Lamiaceae 속 허브종), 향료 식물에 포함되어 있는 부드러운 향기를 가진 방향성의 화합물이다. 상업적으로 향장제품, 아로마 용도로 많이 이용되고 있지만 항산화능이 있는 천연 물질임에도 동맥경화 등 성인병 예방효과에 대해서는 연구가 이뤄진 바가 없다. 리나룰과 비슷한 이소프레노이드(isoprenoid) 구조를 가지고 있는 토코트리에놀(tocotrienol)이 콜레스테롤 합성 저해효과를 나타내는 것이 보고되었고 리나룰의 항산화 효능이 보고된 바, 본 발명자들은 리나룰이 콜레스테롤 대사에 미치는 영향을 연구하였다.

[0004] 한편, 지금까지 개발된 콜레스테롤 저하약물은 장기복용 시 여러 가지 부작용이 나타날 수 있다. 예를 들어, 가장 많이 상용되고 있는 스타틴(statin)의 경우, 근염(myositis), 근질환(myopathy) 등 근육계 부작용, 신부전증, 코엔자임Q(CoenzymeQ) 결핍 등 부작용이 생길 수 있다. 따라서 천연물을 이용하여 건강기능식품 및 천연물 신약의 형태로 새로운 제품개발에 대한 수요가 크며 각종 생리활성이 있는 플라보노이드(flavonoids), 터펜(terpenes), 폴리페놀(polyphenols) 등이 다량 함유된 허브에서 유래한 물질을 대상으로 만성질환 효능물질을 연구할 필요가 있으나 방향성 저분자 물질은 향장, 아로마 성분으로 생각되어 왔을 뿐 인체 생리활성효능에 대한 연구가 많이 진행되지 않았다. 특히, 현재까지 리나룰 단일물질의 콜레스테롤 조절효능은 연구가 된 바가 없다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 리나룰이 혈중 콜레스테롤을 낮출 수 있고 특히, 콜레스테롤 생합성에 관여하는 HMG-CoA 환원효소의 발현을 감소시킴으로써 콜레스테롤 생합성 단계를 유의적으로 조절할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 HMG-CoA 환원효소 및 LDL-수용체의 발현을 감소시킴으로써 콜레스테롤 생합성 단계를 유의적으로 조절할 수 있는, 리나룰을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 함유하는 고지혈증 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 함유하는 동맥경화 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 함유하는 고지혈증 치료 및 개선용 건강기능식품을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 함유하는 동맥경화 치료 및 개선용 건강기능식품을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0011] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 리나룰(Linalool)을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명에서, 상기 리나룰(Linalool)은 자연계에 존재하는 터펜 알코올(terpene alcohol)로서 다양한 허브 식물, 예컨대 라미아세아(Lamiaceae) 속 허브 종에서 발견되는 방향성의 화합물이다. 이러한 리나룰은 상기 식물에서 당업계에 공지된 방법, 예컨대 용매추출, 증류 및 수증기 증류 등의 방법을 사용하여 추출, 정제한 것을 사용할 수도 있으며, 본 발명의 실시예에서는 상기 리나룰을 단일물질로서 상업적으로 정제된 제품을 구입하여 사용하였다.

[0013] 구체적으로, 상기 리나룰을 식물로부터 추출 및 정제하는 방법은, 예컨대, Maria do Socorro S. Rosa, et

al., Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from Croton cajucara, Antimicrob Agents Chemother. 2003 June; 47(6): 1895-1901에 개시되어 있다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 HMG-CoA 환원효소와 LDL-수용체의 유전자 발현을 감소시킴으로써 콜레스테롤 저하 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 상기 HMG-CoA 환원효소는 콜레스테롤 생합성 관련 효소로서 발현이 감소하면 콜레스테롤 생합성이 억제된다. 또한 LDL-수용체(Low-Density Lipoprotein receptor)는 혈중 콜레스테롤을 간조직 내로 흡수하는데 관여하는 단백질로 LDL-수용체의 감소는 간조직내 콜레스테롤 축적을 억제함을 의미한다. 본 발명의 실시예에서는, 리나룰 처리가 HMG-CoA 환원효소를 유전자와 단백질 발현에서 각각 30%씩 감소시켰고 LDL-수용체는를 유전자 발현에서 39%, 단백질 발현에서 16% 감소시켰음을 확인하였다 (도 2, 3 참조). 따라서 본 발명의 리나룰 처리가 콜레스테롤 생성 및 축적을 감소시키는 효과를 있는 것으로 판단할 수 있다.

[0015] 또한, 상기 조성물은 SREBP, SCAP, 및 S1P 유전자의 발현을 감소시키고, Insig-1 유전자 발현을 증가시킴으로서 콜레스테롤 저하 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 상기 SREBP-2는 콜레스테롤 농도에 따라 활성이 조절되는 유전자 전사인자로서 SREBP-2발현이 감소하면 콜레스테롤 생합성이 감소하고 발현이 증가하면 콜레스테롤 생합성이 증가하는 방향으로 유전자 발현이 조절된다. SREBP-2는 체내 콜레스테롤 생합성의 중요한 효소인 HMG-CoA 환원효소의 발현을 직접적으로 조정하는 것으로도 알려져 있다. 따라서 리나룰이 HMG-CoA 환원효소의 발현을 감소시키는 것은 상위 메카니즘인 SREBP-2 발현을 감소시킴으로 인해 조절되는 것으로 판단할 수 있다. 본 발명의 실시예에서, 리나룰을 간세포에 처리했을 때, 유의적으로 SREBP-2가 감소하였다. 또한 지방산 대사를 조절하는 유전자 전사인자인 SREBP-1a는 모든 농도에서 유의적으로 감소하였다 (도 4 참조).

[0016] 또한, 상기 SREBP는 세포내 소포체 막에 130 kDa 정도의 비활성 상태로 존재하고 있다. 세포내 콜레스테롤 농도가 높으면 SCAP이 SREBP와 결합을 끊고 Insig-1, Insig-2 (Insulin-induced proteins)와 결합하게 되어 SREBP가 골지체로 이동하지 못하게 되고 반대로 생체 내의 콜레스테롤 농도가 낮아지면 SCAP (SREBP cleavage activating protein)이 비활성 형태인 SREBP와 결합하여 골지체로 이동한다. 비활성 형태인 130 kDa인 SREBP가 SCAP과 결합하여 골지체로 가게 되면 S1P(Site 1 protease), S2P(Site 2 protease) 단백질 분해효소의 작용을 받아 활성형 형태인 70 kDa로 변하게 되는데 활성형 SREBP가 세포핵으로 이동하여 타겟유전자 프로모터 부위의 SRE(Sterol regulatory element)에 결합하여 콜레스테롤 또는 지방산 대사와 관계된 여러 유전자들의 발현을 조절하게 되는 것이다. 본 발명의 실시예에서, 리나룰은 비활성 형태인 SREBP를 절단하는데 필요한 효소인 S1P, S2P 발현을 억제(각각 31%, 29%)는 것을 볼 수 있다. 또한 리나룰은 비활성형태의 SREBP가 골지체로 들어가는 것을 저해하는 Insig-1의 유전자 발현도 유의적으로 촉진(77%)한다 (도 5 참조). 따라서 본 발명의 리나룰은 비활성형태의 SREBP(130 kDa)가 활성형 SREBP(70 kDa)가 되는 단계를 억제하여 HMG CoA 환원효소 및 LDL-수용체 유전자 발현을 억제한다고 판단할 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 고지혈증은 중성 지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 지방량이 많아지는 증상으로, 본 발명의 리나룰은 혈액 중 콜레스테롤의 저하 및 중성지방의 감소에 효과가 있으므로 고지혈증 예방 및 치료 용도로 사용될 수 있다 (도 7 참조).

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 동맥경화는 혈관에 지방, 주로 콜레스테롤, 중성지방 등이 침착하여 혈관 내강이 좁아지고 탄력성을 잃는 증상으로, 본 발명의 리나룰은 이러한 콜레스테롤의 저하 및 중성지방의 감소에 효과가 있으므로 동맥경화증 예방 및 치료 용도로 사용될 수 있다 (도 7 참조).

[0019] 또한, 상기 고지혈증 또는 동맥경화의 치료 및 예방 효과는, 본 발명의 실시예 8에서 확인할 수 있는데, 동물모델에서 리나룰 섭취시 HDL 콜레스테롤이 다소 증가하고 중성지방이 감소함으로써 고지혈증 및 동맥경화에 효과가 있으며, 리나룰 섭취가 마우스 간조직에서 콜레스테롤 생성을 저하시킴으로써 지방간의 생성도 감소시키는 것을 확인하였다.

[0020] 본 발명의 콜레스테롤 저하용 조성물이 상기와 같은 고지혈증 또는 동맥경화 예방 및 치료용 조성물로 이용되기 위해서는 약제학적 분야에서 공지된 방법, 예컨대 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 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.

[0021] 상기 고지혈증 또는 동맥경화 예방 및 치료 효과를 위하여, 본 발명에 따른 콜레스테롤 저하용 조성물을 유효성분으로 투여하는 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 ~ 1000 mg이 투여될 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0023] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 동맥경화 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0024] 본 발명에 따른 콜레스테롤 저하용 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 상기 조성물은 원료에 대하여 0.01 ~ 50 중량부, 바람직하게는 0.1 ~ 10 중량부의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 하거나 또는 콜레스테롤 저하를 목적으로 하여 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 뿐만 아니라 일반인에게 콜레스테롤 저하를 위한 기능성 식품 개발 시 첨가제로 사용할 수 있다.

[0025] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명에 따른 콜레스테롤 저하용 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0026] 또한 본 발명의 콜레스테롤 저하용 조성물을 함유하는 식품이 음료일 경우, 통상의 음료와 같이 여러 거자 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 상기 콜레스테롤 저하용 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0027] 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.

[0028] **실시예 1. 리나룰의 DPPH 라디칼 소거작용 분석**

[0029] 본 발명에서 사용된 리나룰(linalool)은 시그마사(Sigma Aldrich)에서 구입하여 사용하였다. DPPH(1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼(radical) 소거작용 분석을 위해, DPPH(1.5×10^{-4} M) 120㎕과 증류수(대조구), 리나룰 2.49 M, 2.18 M, 1.87 M, 1.56 M, 1.24 M, 0.934 M, 0.622 M, 및 0.3111 M을 넣은 후 37° C에서 30분간 인공 배양하였다. 혼합 후 증류수 반응물을 대조구로 하여 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0030] DPPH radical 소거작용(%) = (시료 처리구 흡광도/대조구 흡광도) × 100

[0031] 도 1에서, 다양한 농도 범위에서 리나룰을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능력을 통한 항산화 능력을 평가한 결과, 농도 의존적으로 활성산소 제거능력을 확인하였다. 따라서 항산화 능력이 있는 물질로서 리나룰은 산화 LDL 형성을 억제하여 동맥경화를 예방할 수 있다.

[0032] **실시예 2. 세포주 배양 및 시료처리**

[0033] 간조직 세포주인 HepG2는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양받아 사용하였다. 이 세포는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium; Join Bio-Innovation, Korea) 배지에 10% 비활성화 우태아혈청(Join Bio-Innovation, Korea), 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액을 첨가하여 37℃ 및 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. T75 플라스크에서 세포를 배양하였고, 2-3일에 한 번씩 배지를 교체하였다. 충분히 세포가 자랐을 때 트립신-EDTA 용액(1x)을 이용하여 계대배양을 실시하였다. 세포수를 1×10^5 cells/ml로 조정하여 6-웰 Falcon 배양판에 2 ml씩 분주하였고 분주한 세포가 80% 정도 성장하였을 때 우태아혈청과 항생제를 첨가하지 않은 DMEM에 리나룰(linalool)을 처리하였다.

[0034] 리나룰은 세포독성 테스트(MTT assay)를 통해서 독성이 없는 농도를 우선 결정하고 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 및 1 mM의 농도를 사용하였다. 리나룰 처리 24시간 후, RT-PCR, 면역블로팅(Immunoblotting) 및 면역조직화학법(Immunohistochemistry)을 수행하였다.

[0035] **실시예 3. 세포내의 RNA 추출**

[0036] 상기 실시예 2에서 배지를 제거한 후 TRIzol Reagent (Invitrogen)를 1 ml씩 각 배양 웰에 넣고 피펫으로 여러 번 혼합시켜 배양세포로부터 RNA 추출 시료를 얻었다. RNA 추출 시료를 5분간 실온에 방치한 후 1 ml의 TRIzol 용액 당 0.2 ml의 클로로포름을 넣고 15초간 잘 흔들어 준 후 실온에서 2-3분간 더 반응시켰다. 4℃에서 15분간 12,000×g로 원심분리 후 가장 위층인 RNA, 중간층인 DNA, 및 가장 아래층인 단백질 층으로 분리되었다. DNA가 오염되지 않게 조심스럽게 위층을 잘 분리하여 다른 튜브로 옮긴 후 이소프로필알코올을 0.5 ml 넣고 10분간 반응시켜 RNA를 침전시켰다. 그 후 4℃에서 10분간 12,000×g로 원심분리 후 상층액을 버리고 침전물을 75% DEPC(diethylpyrocarbonate)-에탄올을 1 ml을 넣고 몇 번 흔들어 준 후 다시 4℃에서 5분간 12,000×g로 원심분리 하였다. 역시 상층액을 버리고 실온에서 침전물을 5-10분간 말린 후 0.1% DEPC 증류수로 침전물을 녹였다. 0.1% DEPC 증류수 995.0 ml에 RNA 5 ml를 넣어 200배 희석 후 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. RNA의 농도는 260 nm에서의 흡광도 값 × 40 μg/ml ×(희석배수)로 계산하였고, 260 nm와 280 nm의 비가 1.6이상일 때 순수한 RNA라고 보고 다음 단계를 진행하였다.

[0037] **실시예 4. cDNA 합성**

[0038] 본 발명에서 First-stand cDNA를 생산하기 위하여 역전사효소(PowerScript Reverse Transcriptase, Clontech)를 이용하였다. 즉, 먼저 올리고$(dT)_{15}$ 프라이머(Promega, USA)와 랜덤 헥사머(Random hexamers, Promega, USA)를 동일량으로 섞어 1 μl PCR 튜브에 넣고 추출한 RNA(2 μg)와 RNase-free 증류수로 최종 부피가 11 μl가 되도록 맞추었다. 70℃에서 10분 동안 끓인 후 즉시 얼음에서 냉각시켰다. 5× first-strand 완충액 4 μl, dNTP mix (10 mM each) 2 μl, DTT (100 mM) 2 μl 및 역전사효소(Powerscript Reverse Transcriptase) 1 μl을 첨가한 후 피펫으로 골고루 섞었다. 그 후 42℃에서 90분 70℃에서 15분간 반응시켰다.

[0039] **실시예 5. PCR**

[0040] 본 발명에 사용된 LDL 수용체, HMG-CoA 환원효소, SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2 등의 뉴클레오타이드 서열은 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

[0041] [표 1-1]. 올리머뉴클레오티드 프라이머 서열

Gene	Primer	Sequence[a]
Human		
PPAR-α	Forward	GCCTAAGGAAACCGTTCTGTG
	Reverse	TCCGACTCCGTCTTCTTGATG
PPAR-r	Forward	GCAGGAGCAGAGCAAAGAGGTG
	Reverse	AAATATTGCCAAGTCGCTGTCATC
SREB2	Forward	CCCTTCAGTGCAACGGTCATTCAC
	Reverse	TGCCATTGGCCGTTTGTGTC
SREBP-1a	Forward	CTGCTGACCGACATCGAAGAC
	Reverse	GATGCTCAGTGGCACTGACTCTTC
SREBP-1c	Forward	CGGAGCCATGGATTGCACTTTC
	Reverse	GATGCTCAGTGGCACTGACTCTTC
HMG-CoA reductase	Forward	TACCATGTCAGGGGTACGTC
	Reverse	CAAGCCTAGAGACATAATCATC
LDL receptor	Forward	CAATGTCTCACCAAGCTCTG
	Reverse	TCTGTCTCGAGGGGTAGCTG
SCAP	Forward	CTATCCCATCCCCATCATCC
	Reverse	TGAACGAAATACATCTACTGCC
S1P	Forward	AGATGGAGAAGAAGCGGAG
	Reverse	CAAAGTCAGGTGGGAACAG
S2P	Forward	CCTCTTCCTCCTCTTCTTCC
	Reverse	GTCCTCAGCAACTTCAGTG
Insig-1	Forward	GCACTGCATTAAACGTGTGG
	Reverse	GCAGCACTGAAATGAATGGA
Insig-2	Forward	TCCAGTGTAATGCGGTGTGT
	Reverse	TACTCCAAGGCCAAAACCAC
CYP7A1	Forward	GCATCATAGCTCTTTACCCAC
	Reverse	GGTGTTCTGCAGCAGTCCTGTAAT
GAPDH	Forward	ATGGATGATGATATCGCCGCC
	Reverse	CTCCATGTCGTCCCAGTTGGT
SRE promoter region	Forward	TGCTGGGACTCGAACGGCTAT
	Reverse	TTACGCACGCTCGGAGCTGGAC

[0042] [a] Primers are shown 5'→3'

[0043] [표 1-2].

Gene	Primer	Sequence[a]
Mouse		
LDL receptor	Forward	ACTCAGGCAGCAGGAACGAG
	Reverse	GTCATTTTCACAGTCTACCT
HMG-CoA reductase	Forward	GTTCTTTCCGTGCTGTGTTCTGGA
	Reverse	CTGATATCTTTAGTGCAGAGTGTGGCAC
CYP7A1	Forward	CCTTGGACGTTTTCTCGCT
	Reverse	GCGCTCTTTGATTTAGGAAG
β-actin	Forward	TGCTGTCCCTGTATGCCTCT
	Reverse	AGGTCTTTACGGATGTCAACG
PPAR-α	Forward	CCTCAGGGTACCACTACGGAG
	Reverse	GCCGAATAGTTCGCCGA
PPAR-γ	Forward	CCATTCTGGCCCACCAA
	Reverse	AATGCGAGTGGTCTTCCAT
SREBP-1c	Forward	GGAGCCATGGATTGCACAT
	Reverse	GGCCCGGGAAGTCACTG
SREBP2	Forward	CACAATATCATTGAAAAGCGCTACCGGTCC
	Reverse	TTTTTCTGATTGGCCAGCTTCAGCACCATG
SCAP	Forward	GAGAACCTGGTCCACGTGCACTTCAA
	Reverse	TCTCTAACCCAATAACCACCAC
S1P	Forward	AGATGGAGAAGAAGCGGAGAAAGAAATG AAAGCCTCT
	Reverse	GAGAATTCCACCTTCAAAGTCAGGTGGGAA
S2P	Forward	ACCAGTCCAGCAGCTAAGGA
	Reverse	GGTGAGTCCTCTGCGACTTC
Insig-1	Forward	CATTTGGCGTGGTCCTGGC
	Reverse	CCAGGACCAGTGTCTCCACAT
Insig-2	Forward	TGCATTGACAGGCATCTAGG
	Reverse	AAGCAATTCCAACACCAAGG

[a] Primers are shown 5'→3'

[0044]

[0045] 각 유전자 발현을 알아보기 위하여 PCR를 실시하였다. 1U Taq DNA 중합효소(DNA polymerase, iNtRON Biotechnology, Inc. Korea), 10 mM dNTP 2 μl, 10×PCR 버퍼(PCR buffer, iNtRON Biotechnology, Inc. Korea) 2 μl, 전방향 프라이머(15 μM)와 역방향 프라이머 15 μM)를 각각 0.25 μl, 증류수 14.25 μl, 및 상기 합성된 first-strand cDNA (DNA templet) 1 μl을 PCR 튜브에 넣은 후 잘 섞었다. 모든 인간 및 마우스 프라이머 신장(primer extension) 반응은 혼합물을 95℃에서 5분간 전처리(pre-denature)시킨 후, 95℃에서 30초간, 57℃에서 30초간, 72℃에서 30초간 20 ~ 40 사이클(cycles; 각 유전자마다 최적의 사이클은 조금씩 상이함)을 실시하였고, 최종적으로 72℃에서 7분간 신장(extension) 반응을 하였다. PCR 산물은 0.002% EtBr(ethidium bromide)이 첨가된 1.2% 아카로즈 겔에 80 V에서 30시간 전기영동 한 후 자외선광으로 유전자 발현정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 Gelpro 소프트웨어에 의해 분석 정량하였고, 내부 표준물로써 HepG2는 GAPDH를, 그리고 생쥐(Mouse)는 β-액틴을 사용하였다.

[0046] 실험결과, 도 2와 3에서, 간조직 세포인 HepG2에 리나룰을 처리하면 HMG-CoA 환원효소와 LDL-수용체의 유전자 발현 및 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다. HMG-CoA 환원효소는 콜레스테롤 생합성 관련 효소로서 발현이 감소하면 콜레스테롤 생합성이 억제된다. 또한 LDL-수용체는 혈중 콜레스테롤을 간조직 내로 흡수하는데 관여하는 단백질로 LDL-수용체의 감소는 간조직내 콜레스테롤 축적을 억제함을 의미한다. 즉, 리나룰 처리에 의해 HMG-CoA 환원효소는 유전자와 단백질에서 각각 30%씩 감소하고 LDL-수용체는 유전자에서 39%, 단백질에서 16% 감소하였으므로, 리나룰 처리가 간조직 세포에서 콜레스테롤 생성 및 축적을 감소시킬 수 있는 것으로 판단하였다.

[0047] 도 4에서는 리나룰을 간세포에 처리했을 때, 특히 0.1 mM에서 유의적으로 SREBP-2가 감소하였다 (53%, $p<0.01$). 또한 지방산 대사를 조절하는 유전자 전사인자인 SREBP-1a는 모든 농도에서 유의적으로 감소하였다 (0.5mM에서 36%, $p<0.001$). SREBP-2는 콜레스테롤 농도에 따라 활성이 조절되는 유전자 전사인자로서 SREBP-2발현이 감소하면 콜레스테롤 생합성이 감소하고 발현이 증가하면 콜레스테롤 생합성이 증가하는 방향으로 유전자 발현이 조절된다. SREBP-2는 체내 콜레스테롤 생합성의 중요한 효소인 HMG-CoA 환원효소의 발현을 직접적으로 조정하는 것으로도 알려져 있다. 따라서 리나룰이 HMG-CoA 환원효소의 발현을 감소시키는 것은 상위 메카니즘인 SREBP-2 발현을 감소시킴으로 인해 조절되는 것으로 판단할 수 있다.

[0048] 또한, SREBP는 세포 내 소포체막에 130 kDa 정도의 비활성 상태로 존재하고 있는데, 세포 내 콜레스테롤 농도가 높으면 SCAP이 SREBP와 결합을 끊고 Insig-1, Insig-2 (Insulin-induced proteins)와 결합하게 되어 SREBP가 골지체로 이동하지 못하게 되고 반대로 생체 내의 콜레스테롤 농도가 낮아지면 SCAP (SREBP cleavage activating protein)이 비활성 형태인 SREBP와 결합하여 골지체로 이동한다. 비활성 형태인 130 kDa인 SREBP가 SCAP과 결합하여 골지체로 가게 되면 S1P(Site 1 protease), S2P(Site 2 protease) 단백질 분해효소의 작용을 받아 활성형 형태인 70 kDa로 변하게 되는데, 활성형 SREBP가 세포핵으로 이동하여 타겟유전자 프로모터 부위의 SRE(Sterol regulatory element)에 결합하여 콜레스테롤 또는 지방산 대사와 관계된 여러 유전자들의 발현을 조절하게 되는 것이다.

[0049] 도 5에서, 리나룰은 모든 농도(0, 0.1 및 0.5 mM)에서 비활성 형태인 SREBP를 절단하는데 필요한 효소인 S1P, S2P 발현을 각각 31%, 29% 억제하는 것을 확인하였다. 또한 리나룰은 비활성형태의 SREBP가 골지체로 들어가는 것을 저해하는 Insig-1의 유전자 발현도 유의적으로 촉진한다 (77%). 이를 종합해 보면 리나룰은 비활성형태의 SREBP(130 kDa)가 활성형 SREBP(70 kDa)로 되는 단계를 억제하여 HMG CoA 환원효소, LDL-수용체 등 유전자 발현을 억제한다고 판단할 수 있다.

[0050] **실시예 6. 웨스턴 블롯 분석**

[0051] 실시예 2에서와 동일하게 처리한 HepG2를 용해버퍼(lysis buffer; 10 mM Tris-HCl pH7.4, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor Cocktail)를 이용하여 4℃에서 용해시킨 후 원심분리(14,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 단백질을 얻었다. 단백질의 농도는 이미 알고 있는 알부민(albumin)을 표준용액으로 하여 Bradford 방법(1976)으로 측정하였고, 동일량의 단백질(30 μg)과 β-머캡토에탄올(β-mercaptoethanol)을 포함한 샘플버퍼(sample buffer; 샘플버퍼 950 μl 당 β-머캡토에탄올 50 μl)를 1:2로 혼합한 후 3분 동안 끓였다. 그 단백질은 바이오-래드 미니-겔 시스템(Bio-Rad mini-gel system)을 이용하여 SDS-PAGE 후, 그들 중 하나는 쿠마시(Coomassie Brilliant Blue G-250; Bio-Rad Laboratories, 1993)로 염색을 하였고 다른 하나는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane; 0.45 μm, Schleicher&Schuell BioScience PROTAN nitrocellulose transfer membrane)으로 단백질을 전이하였다. 비특이적인 단백질(nonspecific protein) 결합 부분은 0.1% Tween 20과 5% 탈지분유를 함유한 PBS에 1시간동안 반응시킴으로써 블로킹을 하였고, 니트로셀룰로오스 막에 전이된 단백질은 특정 항체와 반응하여 웨스턴 블롯(western blot)을 실시하였다. 발색은 ECL(enhanced chemiluminiscent method)을 이용하여 x-ray 필름에 감광시켰다.

[0052] 분석결과, 도 6에서, 리나룰을 24시간 처리한 HepG2 세포주에서 핵단백질과 수용성단백질을 분리하여 단백질 발현을 측정해 보면 0.1 mM에서 활성형 SREBP가 비활성형 SREBP보다 줄어듬을 볼 수 있다 (대조군에 비해 30% 감소). 따라서 리나룰은 SREBP를 전사단계에서 직접 발현감소 시킬 뿐 아니라 SCAP, S1P, S2P, Insig-1 등의 유전자 발현을 변화를 통해 활성형 SREBP의 총량을 감소시키는 것으로 판단된다.

[0053] **실시예 7. 면역조직화학법**

[0054] HepG2 세포주를 적정농도(0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1 mM)로 24시간 동안 처리한 후, 3.7% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 이용하여 10분간 고정하였다. 그 이후 PBS(5% BSA 첨가)를 이용하여 잘 씻은 후 발현 정도를 알고 싶은 항체를 1:1000으로 PBS에 희석하여 24시간 동안 HepG2 세포의 표적단백질과 결합하도록 배양하였다. 그 후 PBS를 이용하여 잘 씻어준 후 형광물질이 표지된 1차 항체(SREBP-2, Santacruz, CA, USA)를 인식하여 붙을 수 있는 2차 항체(anti-rabbit Alexa Fluor 488, Invitrogen)를 1시간 배양하였다. 그 이후 공초점

현미경(Confocal Laser Scanning Microscope(LSM 5 Exciter), Carl zeiss)을 이용하여 이미지를 촬영하였다.

[0055] 실험결과, 도 8에서 녹색형광은 SREBP-2 단백질의 양과 분포를 나타낸다. 0 mM 사진과 0.05, 0.2, 1 mM의 리나룰을 처리한 실험군을 비교할 때 대조군에 비해서 처리군의 SREBP-2 단백질 발현이 현저하게 감소하는 것이 관찰되었다(대조군에 비해 최대 48%). 따라서 리나룰은 SREBP-2의 단백질 발현을 현저히 감소시킨다고 판단된다.

[0056] **실시예 8. 생체 내 실험**

[0057] 실험동물은 평균체중이 15 ~ 19 g인 6주령의 C57BL/6J 생쥐를 오리엔트바이오로부터 구입하였다. 일반식이로 일주일간 환경에 적응시킨 후 난괴법 (randomized complete block design)에 의해서 한 군을 6-12 마리씩 나누었고 사육상자에 3-5 마리씩 넣어 실험 사육하였다. 고지혈증 모델 생쥐를 만들기 위해 일주일간 적응기간 후에 40% 고지방 식이를 5주간 투여하였다. 사육기간 동안 물은 자유로이 섭취시키며, 6주 동안 매일 일정량의 단일 물질을 경구 투여하였다. 이 6주간의 실험기간 동안에도 생쥐들은 계속 40% 고지방 식이를 섭취시켰다. 사육실의 온도(20±2° C) 및 습도(50±10%)는 최적조건으로 유지시켰고, 명암은 12시간 주기로 조절하였다.

[0058] 리나룰이 고지혈증에 미치는 영향을 알아보기 위해서 고지방식이군(1군, n=12), 고농도 리나놀 투여군(120 mg 리나룰 / kg체중; 2군 n=6), 저농도 리나룰 투여군(0.57 mg 리나룰 / kg체중; 2군 n=6)으로 나누어 6주간 실험 사육하였다.

[0059] **실험동물의 처리**

[0060] 사육기간 중 실험동물은 3주마다 체중을 측정한 후 16-19시간 절식시킨다. 그런 다음 복강주사를 통해 에버틴(avertin)을 주입하여 마취한 후 안와정맥총 채혈법으로 채혈한 다음 13,000 rpm, 4° C에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 0, 3, 및 6주째는 안와정맥총 채혈 후 심장채혈법으로 최대한 많은 혈액을 채혈하였고 원심분리하여 얻은 혈청(serum)을 실험을 위해 즉시 사용하거나 -20° C에 보관하였다. 마지막 6주째 채혈 후 간장(liver)을 적출하여 PBS로 씻은 후 즉시 액체질소에 냉동 후 -80° C에 다음 실험을 위해 보관하였다.

[0061] **LDL receptor, HMG-CoA reductase, CYP7A1, β-actin 유전자 발현 분석 및 LDL receptor, HMG-CoA reductase 단백질 발현 분석**

[0062] -80° C에 보관된 간을 꺼내어 액체질소를 부으면서 해동되지 않은 상태에서 일정량 취하여 즉시 TRIzol를 넣어 균질화(homogenization) 하였다 [0.01 g의 시료당 1mL TRIzol Reagent (Invitrogen)]. 그 다음 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 RT(reverse transcription)후 PCR로 유전자 발현을 분석하였다. 남은 조직은 용해버퍼(lysis buffer; 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor Cocktail)를 첨가한 후 단백질 발현분석을 위해 균질화하였다. 원심분리 (14,000 rpm, 10 min, 4° C)한 후 단백질을 얻었고 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 실시하고, 발색은 ECL 방법를 이용하여 x-ray 필름에 감광시킨다.

[0063] 생체내 실험결과, 도 7에서, 6주 동안 리나룰을 생쥐에 경구 투여했을 시 총 콜레스테롤은 고농도(120 mg linalool/mouse/day)에서 유의적으로 감소하고 (24%, $p<0.05$), HDL 콜레스테롤은 6주차에서 저농도에서는 24%, 고농도에서는 15%로 다소 증가하였다. 또한 중성지방의 경우는 고농도와 저농도(0.57 mg linalool/mouse/day)에서 3주, 6주 모두 통계적으로 유의적인 차이에서 급격히 줄어들었다 (3주차에서 대조군에 비해 각각 33%, 31%, 6주차에서 각각 41%, 41% 감소, $p<0.01$).

[0064] 또한, 도 9 내지 도 11에서, 리나룰 섭취가 마우스 간조직 HMG-CoA 환원효소의 유전자 및 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 리나룰의 HMG-CoA 환원효소 유전자 발현 조절효과는 세포계 실험보다 동물실험에서 명확하게 나타났다. 비만이 유도된 C57BL/6 생쥐의 간조직에서는 저농도와 고농도 리나룰 섭취의 경우 모두 유전자 발현이 통계적으로 유의성 있게 현저하게 감소하였다 (각각 35%, 60%). 실시간으로 유전자의 증폭된 양을 측정하는 Realtime PCR에서도 RT-PCR과 똑같은 경향으로 HMG-CoA 환원효소의 유전자 발현이 감소되었다 (79%,

p<0.01). 단백질 발현 또한 통계적으로 유의하게 발현이 감소하였다 (55%, p<0.05). 따라서 리나룰이 생체 내 콜레스테롤 생합성에 필수적인 HMG-CoA 환원효소의 유전자 및 단백질 발현을 직접적으로 감소시킨다고 판단할 수 있다.

[0065] 도 12 내지 도 13에서는, 리나룰 섭취가 마우스 간조직 SREBP-2 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. SREBP-2는 HMG-CoA 환원효소의 발현을 직접적으로 조절하는 유전자 전사조절인자이다. 고농도의 리나룰 섭취시 마우스 간조직에서 SREBP-2의 유전자 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였다 (43%, p<0.01). 이는 실시간으로 유전자 발현 확인이 가능한 Realtime PCR에서도 확인되었다 (91%, p<0.01). 따라서 생체 내(in vivo) 실험에서도 HMG-CoA 환원효소의 발현의 감소는 이를 조절하는 전사인자인 SREBP-2의 발현이 감소됨으로서 조절되는 것으로 판단된다.

[0066] 도 14 내지 도 16에서는, 리나룰 섭취가 마우스 간조직 SCAP, S1P, S2P, Insig-1 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. SCAP은 체내 콜레스테롤 양을 인지하고 비활성형태인 SREBP(130 kDa)와 결합하여 골지체로 운반된다. 리나룰을 섭취한 생쥐의 간조직에서의 SCAP의 유전자 발현은 통계적으로 유의한 수준에서 현저하게 줄어들었다 (89%, p<0.01). 또한 비활성형인 SREBP(130 kDa)이 활성형 SREBP(70 kDa)으로 전환되는 과정에 작용하는 단백분해효소인 S1P의 발현이 리나룰을 섭취한 생쥐의 간조직에서 통계적으로 유의한 수준에서 감소하였고 (79%, p<0.05), Insig-1은 통계적으로 유의한 수준에서 증가하였다 (57%, p<0.05). 종합하면 세포계 실험결과와 마찬가지로, 리나룰을 섭취한 마우스의 간조직에서 비활성형 SREBP-2가 활성형 SREBP-2로 전환되는 과정을 억제하여 콜레스테롤 합성에 관련한 단백분해효소를 억제하여 HMG CoA 환원효소, LDL-수용체 등 유전자 발현을 억제한다고 판단할 수 있다.

[0067] 도 17에서는, 리나룰 섭취가 마우스 간조직 SREBP-2 활성형, 비활성단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 리나룰 투여 후 SREBP 발현에 영향을 미치는 SCAP, S1P, S2P, Insig-1의 유전자 발현이 조절되었기에 SREBP-2의 비활성형(130 kDa), 활성형(70 kDa) 단백질 총량에 영향을 주는지 조사하였다. 리나룰 저농도, 고농도 섭취시 마우스 간조직의 활성형 및 비활성형 SREBP-2 단백질 발현이 모두 감소하는 것을 확인하였다 (53%). 따라서 리나룰은 SREBP-2 전사인자의 발현단계를 주로 조절하며 활성형과 비활성형의 비율에는 큰 영향이 없음을 확인하였다.

[0068] 도 18에서는, 간조직을 이용한 조직병리학적 분석을 수행하였다. 마우스에 고지방 사료를 급여하면서 리나룰을 6주 동안 경구 투여한 후 간조직을 적출한 뒤, 염색하여 조직병리학적 분석(histopathological analysis)을 실시한 결과 대조군의 조직에서는 흰색의 지방간이 다수 발견된 반면 저농도와 고농도의 리나룰 투여군에서는 지방간 병변이 현저히 개선되었다. 즉, 리나룰 섭취가 마우스 간조직에서 콜레스테롤 생성을 저하시킴으로써 지방간의 생성도 감소시킨 것으로 판단된다.

[0069] **통계처리**

[0070] 통계분석은 두 그룹간에는 Students t-test를 이용하였고, 다양한 그룹간에는 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 한 후 $P < 0.05$일 때 Tukey test에 의하여 각 실험군의 유의성을 검정하였다. 실험결과는 평균 ± SD로 나타내었다.

산업이용 가능성

[0071] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 리나룰이 혈중 및 간조직에서 콜레스테롤을 감소시킬 수 있는지 확인하였으며, 콜레스테롤 대사에 관여하는 주요 유전자 발현을 조사한 뒤 이러한 유전자 발현을 조절하는 인자의 발현을 추가적으로 확인하였다. 따라서, 본 발명의 리나룰은 SREBP-2의 발현을 감소시키고 이에 따라 HMG-CoA 환원효소의 발현을 감소시킴으로써 콜레스테롤 생합성 단계를 유의적으로 조절함을 할 수 있으므로, 리나룰을 이용하여 혈중 콜레스테롤 및 중성지방에 의해 발생되는 고지혈증, 동맥경화증의 예방 및 치료를 위

한 약품 및 식품의 제조에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1은 본 발명에 따른 리나룰이 DPPH 라디칼 소거 효과를 나타내는 그래프이다.

[0073] 도 2는 본 발명에 따른 리나룰이 HMG-CoA 환원효소 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[0074] 도 3은 본 발명에 따른 리나룰이 LDL-수용체 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[0075] 도 4는 본 발명에 따른 리나룰이 SREBP 유전자 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[0076] 도 5는 본 발명에 따른 리나룰이 SCAP, S1P, S2P, Insig-1,2 유전자 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[0077] 도 6은 본 발명에 따른 리나룰이 활성형 혹은 비활성형 SREBP 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[0078] 도 7은 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스에서 혈청 콜레스테롤, 중성지방 및 HDL 콜레스테롤에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[0079] 도 8은 본 발명의 리나룰 처리 후 면역조직화학 분석을 이용하여 SREBP 단백질의 분포를 조사한 공초점 현미경 사진이다.

[0080] 도 9는 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스 간조직에서 HMG-CoA 환원효소의 RT-PCR 결과를 나타낸다.

[0081] 도 10은 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스 간조직에서 HMG-CoA 환원효소의 Real-time PCR 결과를 나타낸다.

[0082] 도 11은 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스 간조직에서 HMG-CoA 환원효소의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸다.

[0083] 도 12는 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스 간조직에서 SREBP-1의 RT-PCR 결과를 나타낸다.

[0084] 도 13은 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스 간조직에서 SREBP-1의 Real-time PCR 결과를 나타낸다.

[0085] 도 14는 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스 간조직에서 SCAP의 RT-PCR 및 웨스턴 블롯 결과를 나타낸다.

[0086] 도 15는 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스 간조직에서 S1P와 S2p의 RT-PCR 및 웨스턴 블롯 결과를 나타낸다.

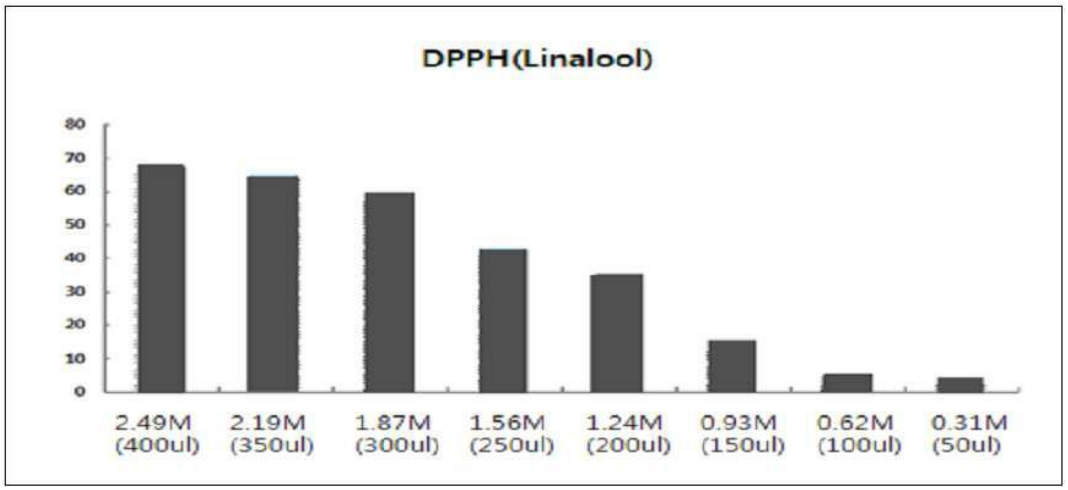
[0087] 도 16은 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스 간조직에서 Insig의 RT-PCR 및 웨스턴 블롯 결과를 나타낸다.

[0088] 도 17은 본 발명에 따른 리나룰 섭취 시 마우스 간조직에서 활성형 혹은 비활성형 SREBP 단백질 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

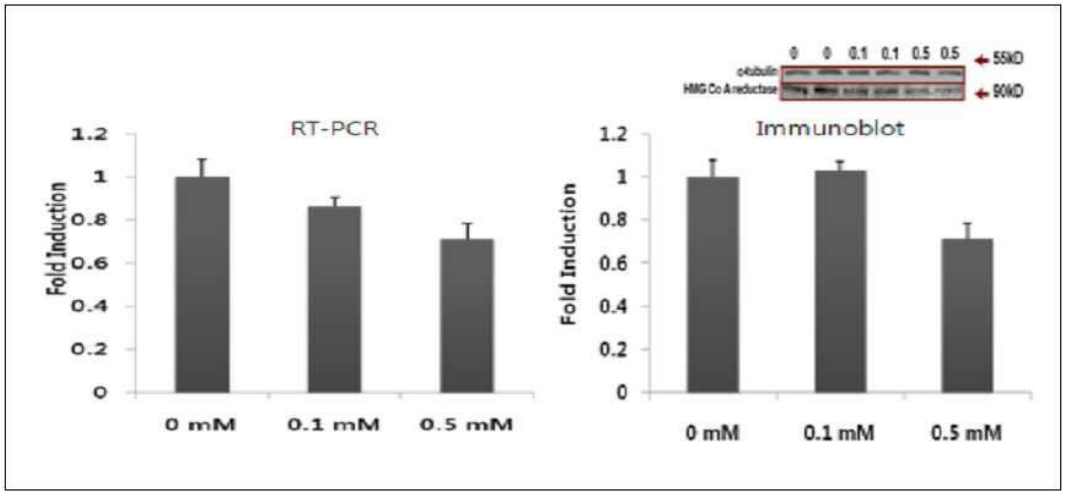
[0089] 도 18은 본 발명에 따른 라나룰 섭취한 마우스에서 간조직을 이용한 조직병리학적 분석을 수행한 결과를 보여주는 사진이다.

도면

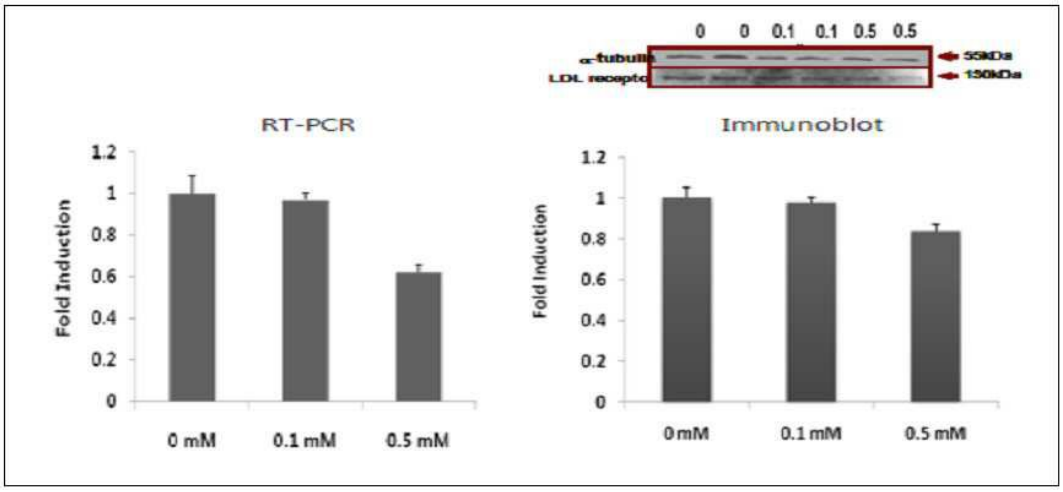
도면1


DPPH(Linalool)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
2.49M (400ul)
2.19M (350ul)
1.87M (300ul)
1.56M (250ul)
1.24M (200ul)
0.93M (150ul)
0.62M (100ul)
0.31M (50ul)

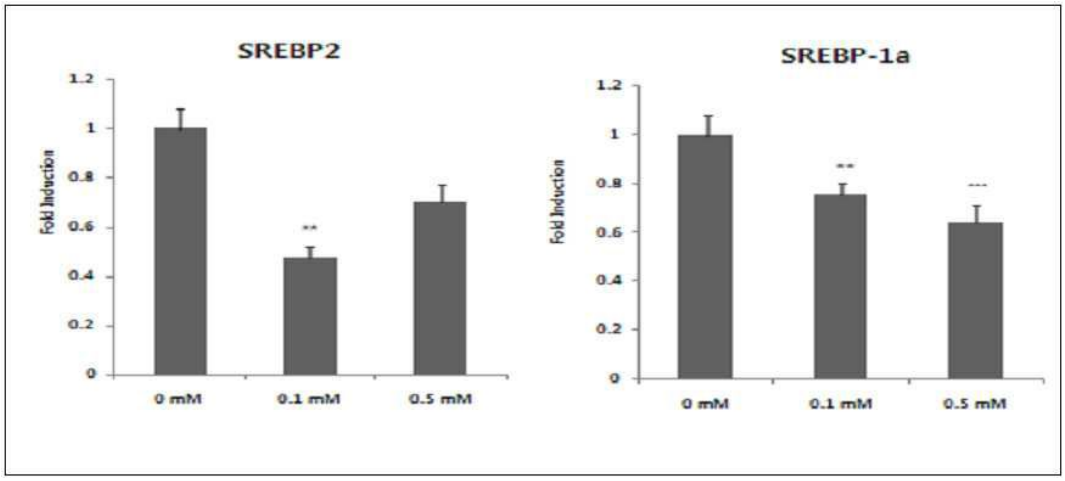
도면2


RT-PCR
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
0 0 0.1 0.1 0.5 0.5
55KD
90KD
Immunoblot
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 mM
0.1 mM
0.5 mM

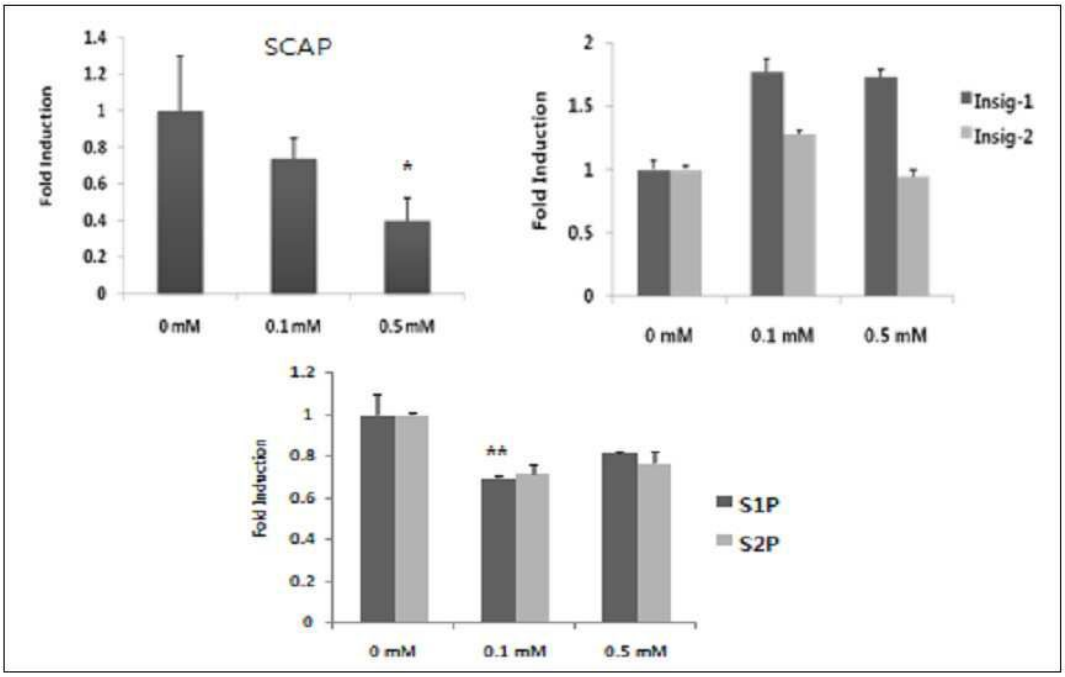
도면3


0 0 0.1 0.1 0.5 0.5
α-tubulin
LDL receptor
55kDa
150kDa
RT-PCR
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
Immunoblot
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0mM
0.1 mM
0.5 mM

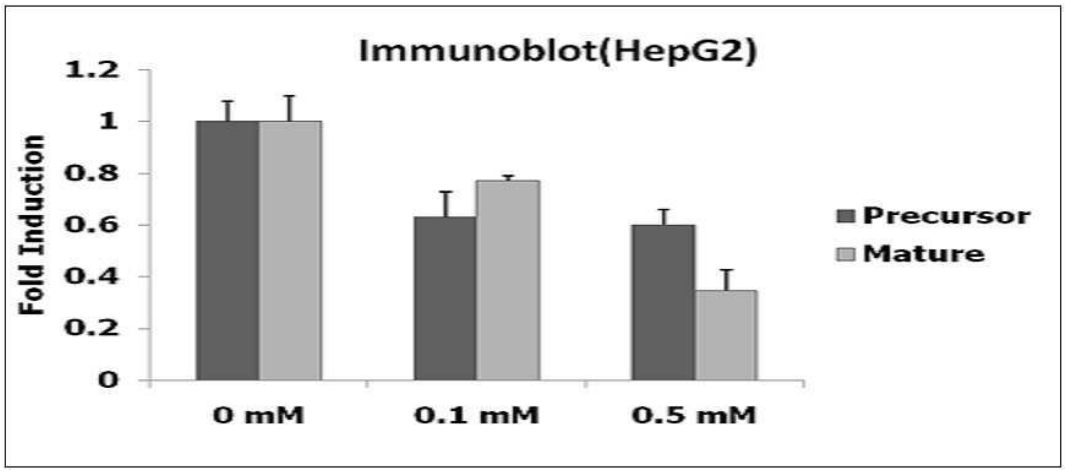
도면4


SREBP2
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
**
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
SREBP-1a
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
**
---
0 mM
0.1 mM
0.5 mM

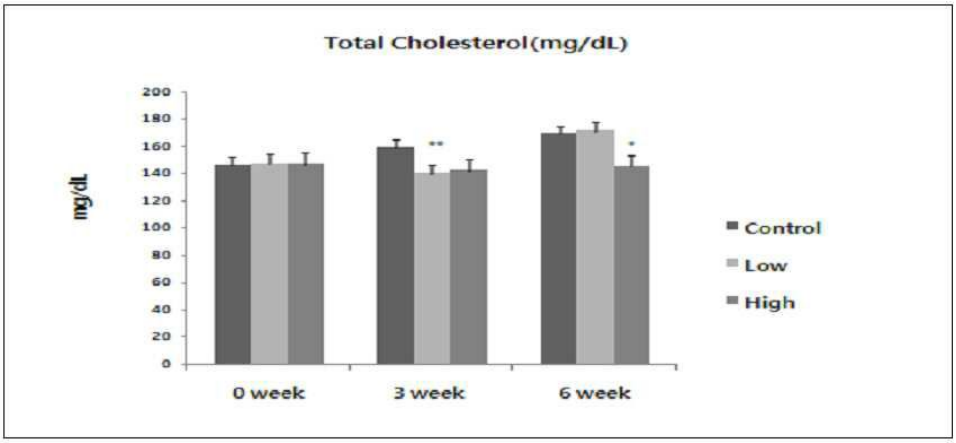
도면5

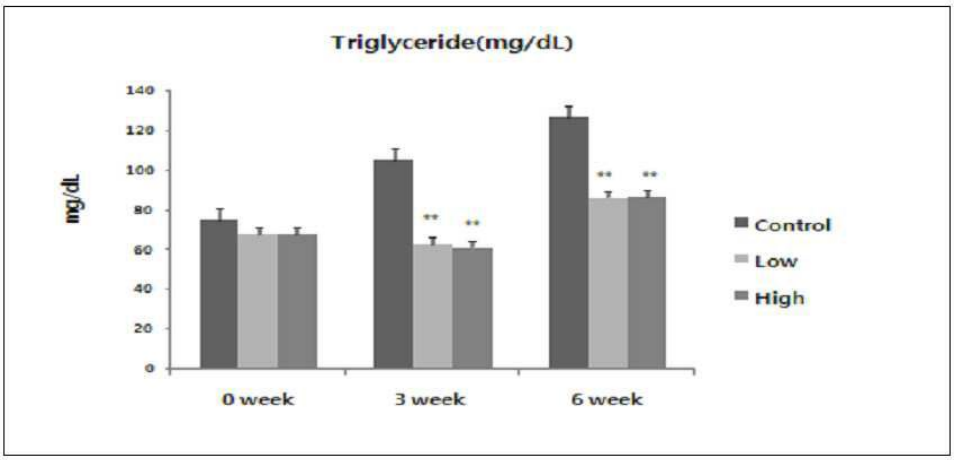

SCAP
Fold Induction
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
*
Fold Induction
2
1.5
1
0.5
0
Insig-1
Insig-2
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
**
S1P
S2P
0 mM
0.1 mM
0.5 mM

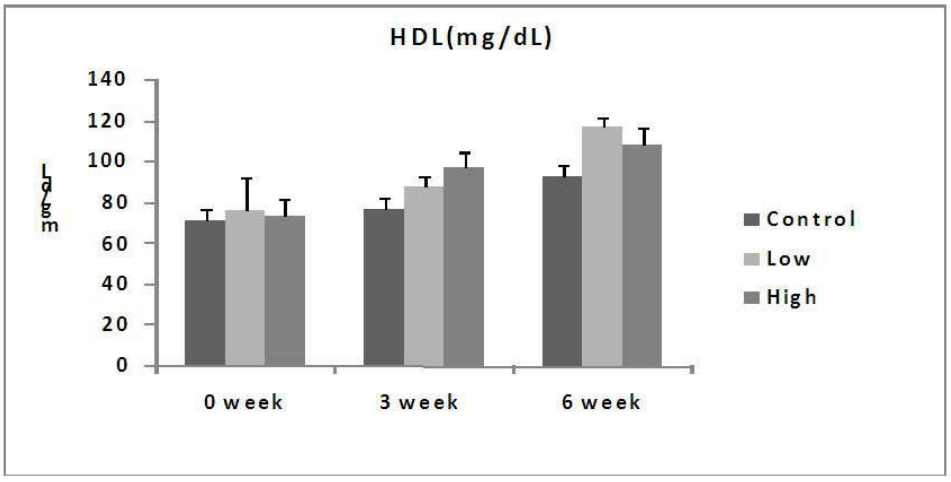
도면6


Immunoblot(HepG2)
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
Precursor
Mature

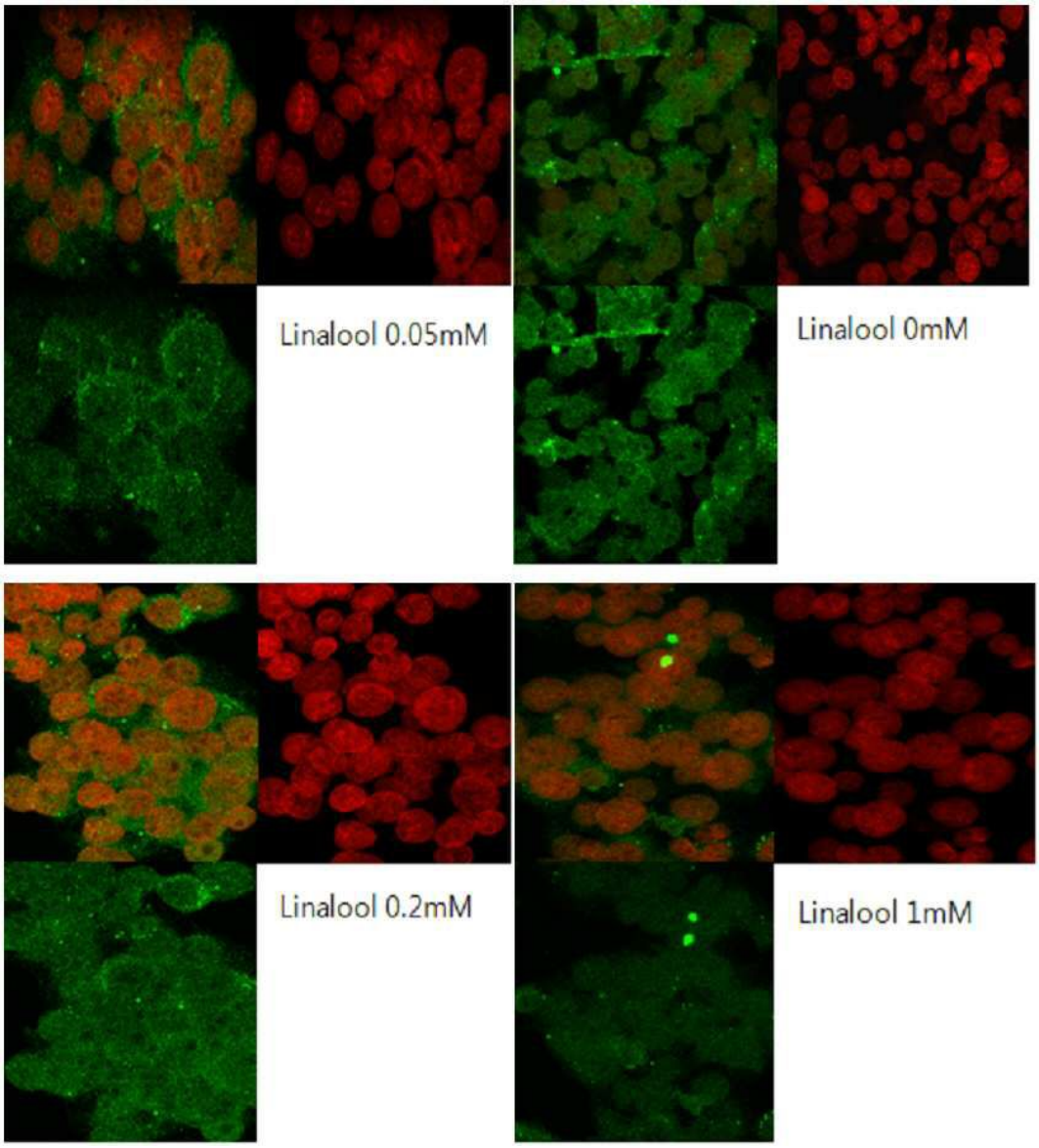
도면7


Total Cholesterol(mg/dL)
mg/dL
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0 week
3 week
6 week
Control
Low
High


Triglyceride(mg/dL)
mg/dL
140
120
100
80
60
40
20
0
0 week
3 week
6 week
Control
Low
High

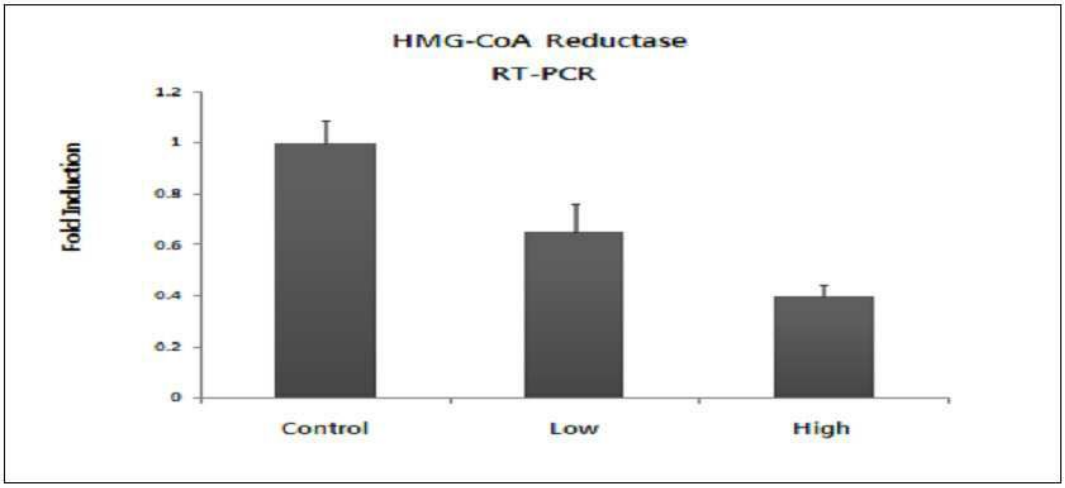

HDL(mg/dL)
mg/dL
140
120
100
80
60
40
20
0
0 week
3 week
6 week
Control
Low
High

도면8

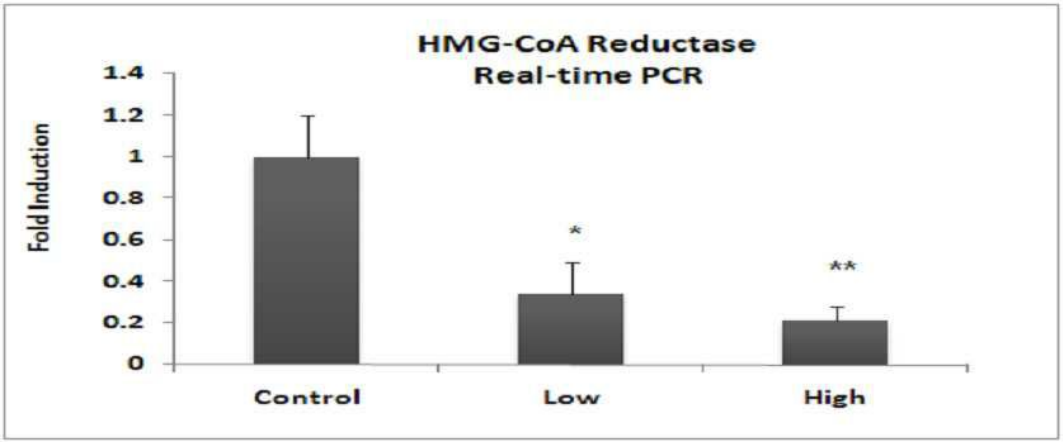


도면9

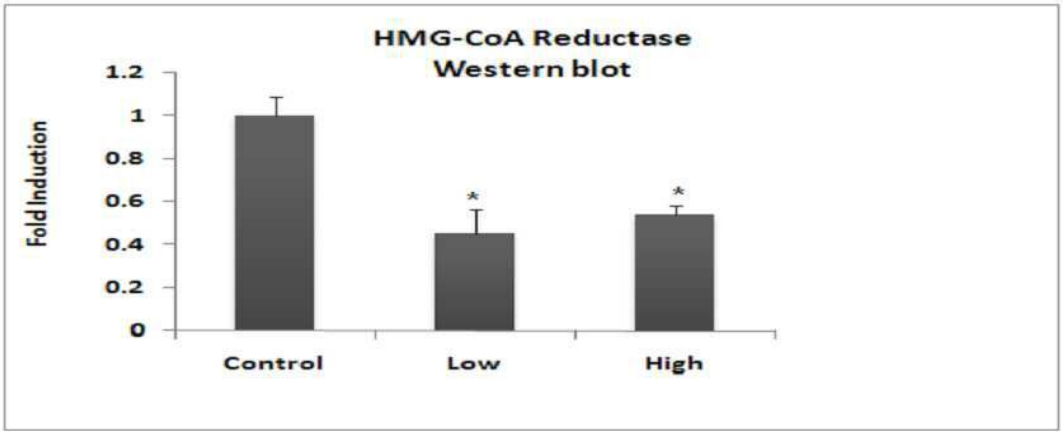

control
Low
High
β-actin
HMG-CoA


HMG-CoA Reductase
RT-PCR
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
Low
High

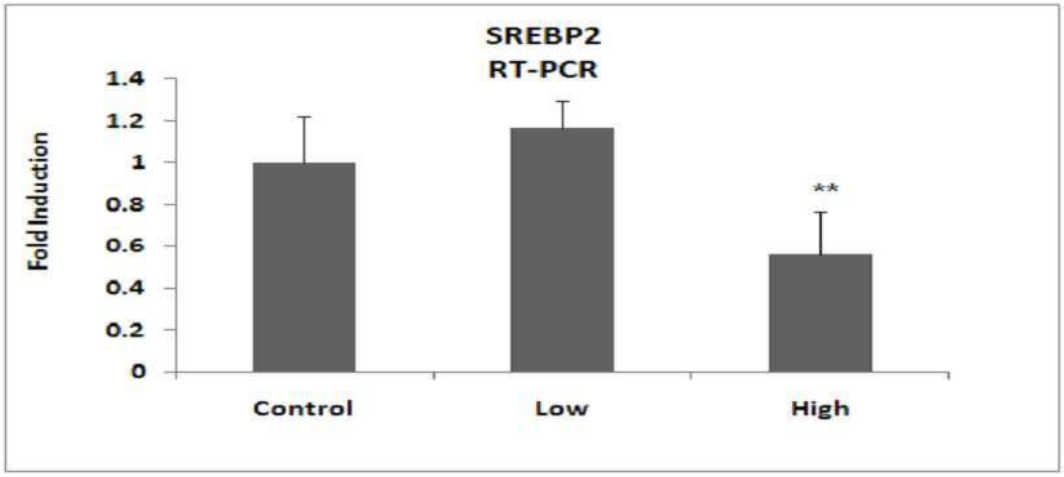
도면10


HMG-CoA Reductase
Real-time PCR
Fold Induction
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
**
Control
Low
High

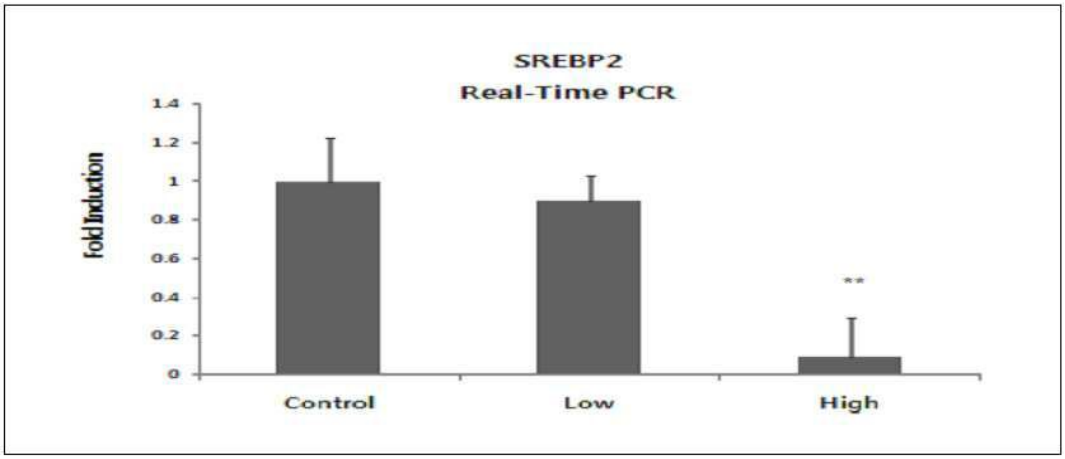
도면11



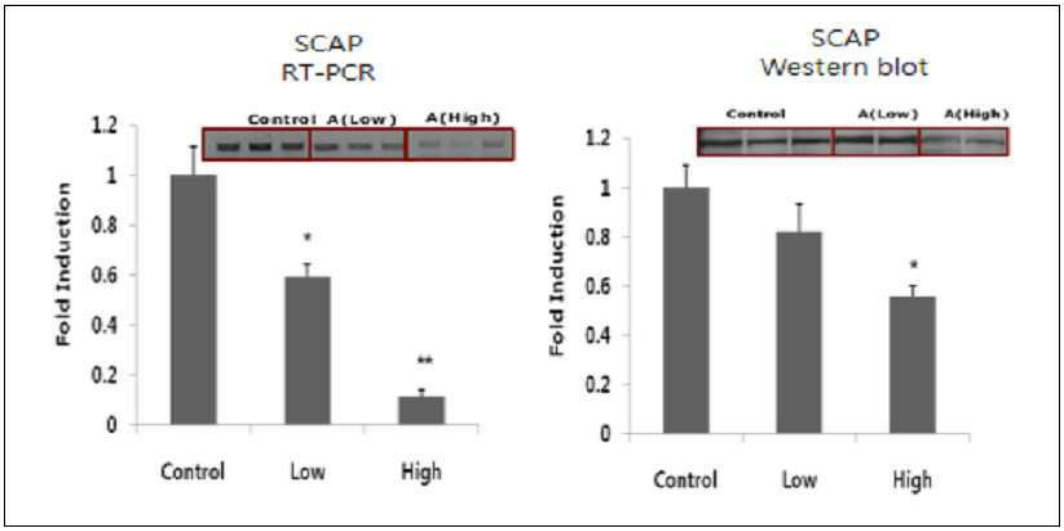
도면12



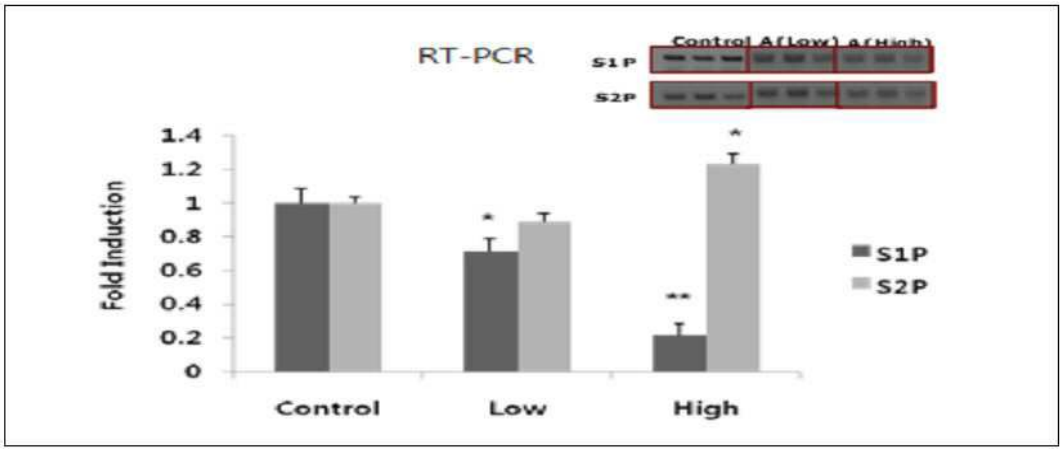
도면13



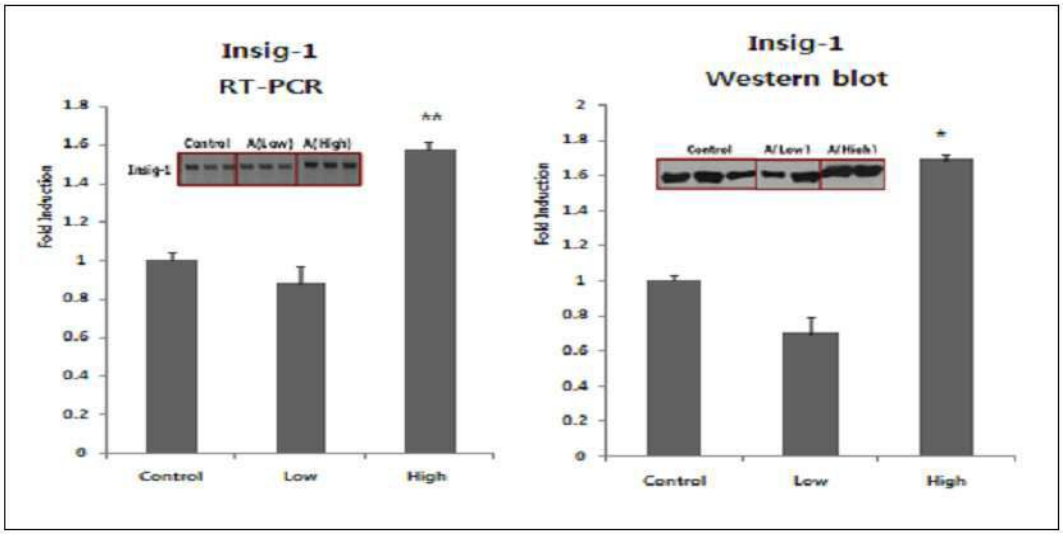
도면14



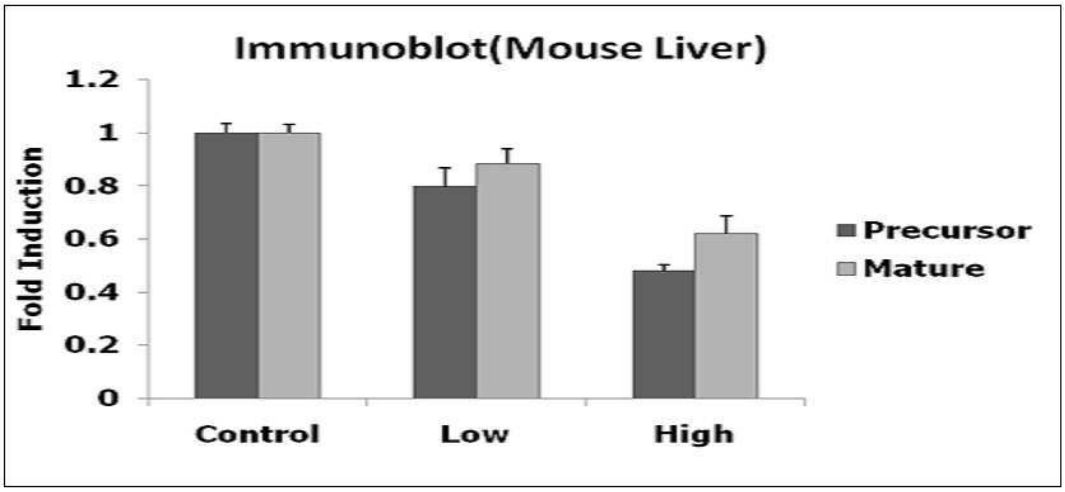
도면15



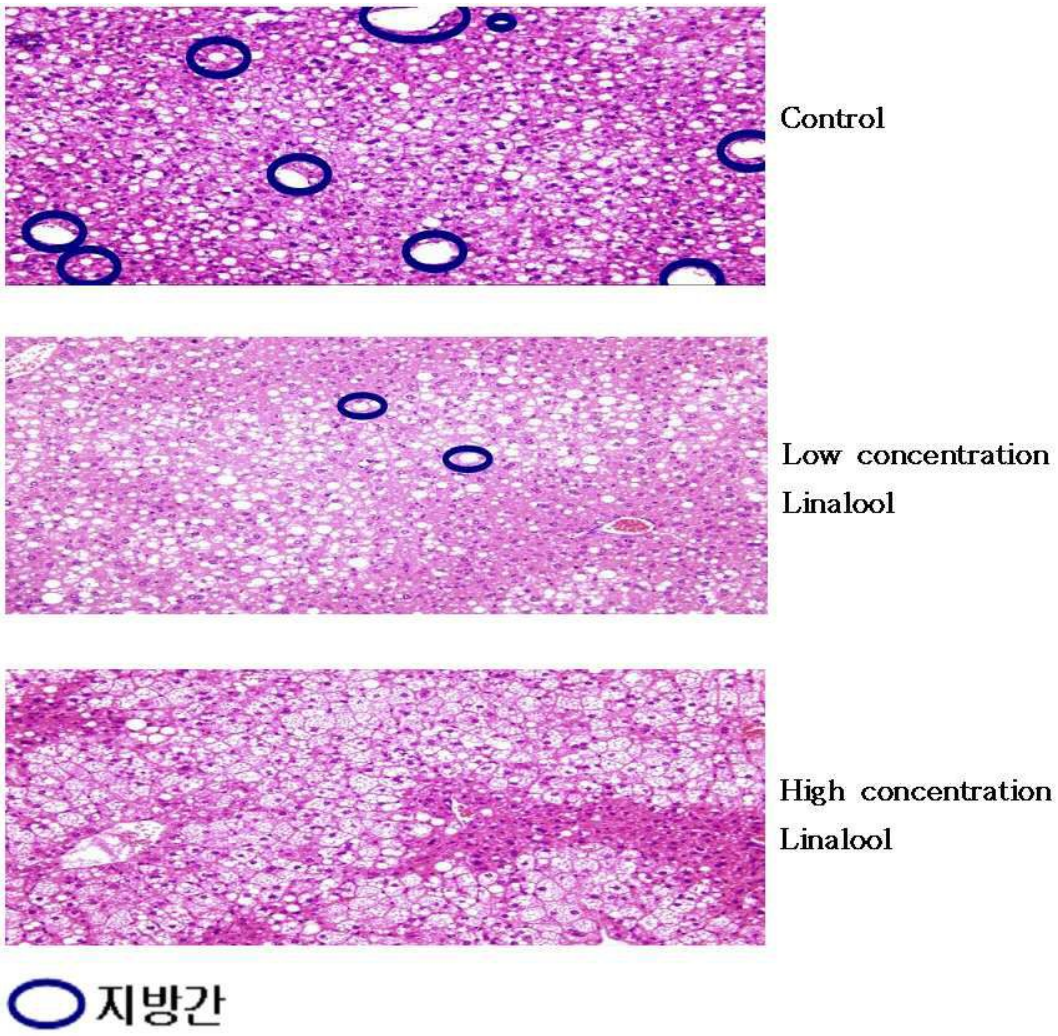
도면16



도면17


Immunoblot(Mouse Liver)
Fold Induction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
Low
High
Precursor
Mature

도면18


Control
Low concentration
Linalool
High concentration
Linalool
지방간