



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월01일

(11) 등록번호 10-1548982

(24) 등록일자 2015년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/11 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0165105

(22) 출원일자 2013년12월27일

심사청구일자 2013년12월27일

(65) 공개번호 10-2015-0076644

(43) 공개일자 2015년07월07일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090020279 A

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이은직

서울 마포구 창전로 26, 103동 603호 (신정동, 서강GS아파트)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 7 항

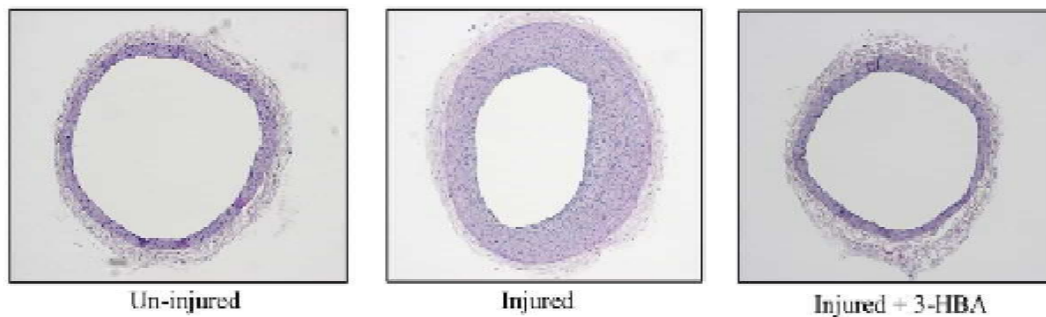
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 3-히드록시벤즈알데히드를 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 3-히드록시벤즈알데히드(3-Hydroxybenzaldehyde)를 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분인 3-히드록시벤즈알데히드는 혈관평활근세포의 증식 및 이동 억제, 혈관내피세포 보호 및 신생혈관내막 증식 억제효과를 가져 혈관내피세포 손상을 원인으로 하는 다양한 혈관 질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 작용한다. 한편, 본 발명의 유효성분인 3-히드록시벤즈알데히드는 천연물질로서 인체에 무해한 물질로 독성 및 부작용이 거의 없으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있으며, 약제학적 및 식품 조성물에 안전하게 적용할 수 있다.

대표도 - 도4a



특허청구의 범위

청구항 1

3-히드록시벤즈알데히드(3-Hydroxybenzaldehyde, 3-HBA)를 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 유효성분은 조성물의 총 중량을 기준으로 0.00001 내지 15.0 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 혈관 질환은 동맥경화, 고혈압, 관상동맥질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환, 대동맥질환, 뇌경색, 심근경색, 말초혈액순환장애 및 허혈성 뇌질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈관평활근세포 내 p-AKT의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 신생혈관내막(neointima)의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

3-히드록시벤즈알데히드(3-Hydroxybenzaldehyde, 3-HBA)를 유효성분으로 포함하는 혈관 질환의 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 혈관 질환은 동맥경화, 고혈압, 관상동맥질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환, 대동맥질환, 뇌경색, 심근경색, 말초혈액순환장애 및 허혈성 뇌질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 3-히드록시벤즈알데히드를 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 혈관의 기능을 조절하고 항상성을 유지하는데 가장 중요한 역할을 하는 세포는 혈관의 내막을 구성하여 혈액과

직접 접하고 있는 혈관내피세포층이며, 이러한 세포층은 다양한 생리활성 물질을 분비하여 혈관의 확장, 혈전의 저해, 혈관벽의 선택적인 대사산물들의 투과 및 이동을 조절하고, 세포표면에 다양한 세포막 단백질을 발현하여 혈액의 흐름 및 백혈구와 혈소판의 부착을 조절하는 역할을 한다.

[0003] 혈관내피세포는 발생단계에서 중배엽에서 생성된 내피전구세포인 혈관모세포 (angioblast)가 분화하여 인체의 다양한 기관에 생리적, 생화학적, 형태적으로 특이한 내피조직을 구성하며, 이러한 기관 특이적인 내피조직은 기관에 존재하는 주변세포 혹은 환경적 요인에 의한 내피세포의 특이적인 분화가 유도되어 형성될 것으로 여겨지고 있다(Jain RK., Nat. Med., 9, pp685-93, 2003).

[0004] 정상적인 성인에 있어서 내피조직은 이를 구성하는 세포들의 신진대사가 활발히 진행되지만 기존의 조직이 그대로 유지되어 이를 구성하는 혈관내피세포의 재편성은 매우 느리게 진행된다. 혈관벽에 가해지는 박동성 스트레스, 혈관에 미치는 장력에 의한 물리적 요인, 혈액 내 과다한 지질 및 글루코스와 같은 다양한 체액성 요인, 혈관폐쇄에 의한 산소 및 영양분의 고갈, 활성산소 등은 혈관내피세포의 사멸, 치밀이음부의 이상, 조기노화를 유발하고, 이로 인한 혈관기능의 이상은 혈관염증반응, 심근경색, 허혈성 뇌손상 등 다양한 인체 질환의 중요한 원인이 된다.

[0005] 혈관 이상 질환 중 동맥경화는 동맥에 죽종이 형성되어 혈관이 점차 좁아지는 진행성 질병으로서, 죽종의 형성 과정은 혈청 내 산화된 지질과 내막으로 유주(流注)한 평활근세포 또는 혈관 내막에서 증식한 평활근세포에 의하여 이루어지며, 이는 동맥경화 발병에 있어 주요한 원인으로 밝혀져 있다.

[0006] 따라서, 혈관평활근세포의 증식을 억제하며, 내피세포의 사멸 및 치밀이음부의 소실 등과 같은 내피세포의 손상을 방어하고 혈관기능의 향상성을 높이는 물질은 상기한 다양한 혈관성 질환의 예방 및 치료에 매우 중요하게 활용될 수 있다

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 혈관내피세포의 손상을 억제하여 혈관 손상시 혈관을 복원할 수 있는 혈관 복원 치료제를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 3-히드록시벤즈알데히드가 혈관평활근세포의 증식 및 이동 억제, 혈관내피세포 보호 및 신생혈관내막 증식 억제효과를 통한 혈관질환의 예방 또는 치료 용도를 사용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명의 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 혈관 질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 3-히드록시벤즈알데히드(3-Hydroxybenzaldehyde, 3-HBA)를 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 혈관내피세포의 손상을 억제하여 혈관 손상시 혈관을 복원할 수 있는 혈관 복원 치료제를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 3-히드록시벤즈알데히드(3-Hydroxybenzaldehyde)가 혈관평활근세포의 증식 및 이동 억제, 혈관내피세포 보호 및 신생혈관내막 증식 억제효과를 통한 혈관질환의 예방 또는 치료 용도를 사용될

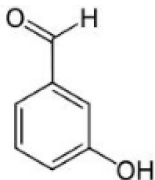
수 있음을 확인하였다.

[0013] 본 발명에 따르면, 본 발명의 유효성분인 3-히드록시벤즈알데히드는 혈관평활근세포의 증식 및 이동을 유의적으로 억제하며, 혈관내피세포를 보호하고, 신생혈관내막 증식을 효율적으로 억제한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 혈관내피세포의 손상으로 야기되는 다양한 병적상태(pathological condition)에 대한 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0014] 본 명세서에서 용어 “혈관 질환”은 혈관내피세포에 물리적, 산화적 및 염증 손상을 비롯한 다양한 손상이 가해져 혈관 조직이 손상·소실됨으로써 혈류의 흐름 및 혈류량에 이상이 생기는 모든 질환을 의미한다. 구체적으로는, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 혈관 질환은 동맥경화, 고혈압, 관상동맥질환, 뇌혈관질환, 말초혈관질환, 대동맥질환, 뇌경색, 심근경색, 말초혈액순환장애 및 허혈성 뇌질환을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 이용되는 3-히드록시벤즈알데히드(3-Hydroxybenzaldehyde, 3-HBA)는 화학합성 등의 방법으로 제조될 수도 있고, 식물, 특히 식용 식물의 추출물로부터 얻거나, 상업적으로 구입하여 이용할 수 있다. 3-HBA의 IUPAC 명은 3-히드록시벤즈알데히드(3-Hydroxybenzaldehyde)이고, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이다.

[0016] **화학식 1**



[0017]

[0018] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 이용되는 3-히드록시벤즈알데히드를 추출하여 이용하는 경우에는 당업계에 공지된 다양한 추출 방법을 이용하여 수득할 수 있으며, 바람직하게는, (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), (c) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸 아세테이트, (f) 클로로포름 또는 (g) 1,3-부틸렌글리콜을 추출 용매로 하여 수득할 수 있다.

[0019] 필요한 경우, 본 발명의 3-히드록시벤즈알데히드를 얻기 위하여, 상기의 추출용매 처리 이후에 추가적인 정제 과정을 거쳐 얻을 수 있다. 예컨대, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 3-히드록시벤즈알데히드를 얻을 수 있다.

[0020] 본 발명의 상기 화학식 1의 3-히드록시벤즈알데히드는 당업계에서 통상적으로 실시되는 치환기의 부가 또는 치환 반응에 의하여 얻어지는 유도체 중 혈관평활근세포 증식 및 이동 억제, 혈관내피세포 보호 및 신생혈관내막 증식 억제효과를 통한 혈관질환의 예방 또는 치료 효과를 나타내는 유도체를 포함한다는 것은 당업계의 기술 수준을 고려하여 당업자에게 명확하다.

[0021] 본 발명에 따르면, 상기 3-히드록시벤즈알데히드 유효성분은 전체 조성물을 기준으로 하여 0.00001 내지 15.0 중량%이며, 보다 바람직하게는 0.0001 내지 10 중량%, 가장 바람직하게는 0.0001 내지 5 중량%이다. 3-히드록시벤즈알데히드의 유효성분의 중량이 0.00001 중량% 미만일 때는 그 효과가 나타나기 어렵고, 15.0 중량%를 초과하는 경우에는 함량의 증가에 따른 효과의 증가가 매우 미약하고, 제형상의 안정성이 확보되지 않는 문제점이 있다.

[0022] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는

Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [0023] 본 발명의 약제학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 경구 또는 비경구 등의 다양한 경로로 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.001-100 mg/kg이다.
- [0025] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 연고, 크림등의 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등을 비롯하여 약제학적 제제에 적합한 어떠한 형태로든 사용할 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 3-히드록시벤즈알데히드뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다.
- [0027] 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0028] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 3-히드록시벤즈알데히드 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0029] 한편, 본 발명의 유효성분인 3-히드록시벤즈알데히드는 천연물질로서 인체에 무해한 물질로 독성 및 부작용이 거의 없으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있으며, 특히 상기한 바와 같은 약제학적 및 식품 조성물에 안전하게 적용할 수 있다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0031] (a) 본 발명은 3-히드록시벤즈알데히드(3-Hydroxybenzaldehyde, 3-HBA)를 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.
- [0032] (b) 본 발명의 유효성분인 3-히드록시벤즈알데히드는 혈관평활근세포의 증식 및 이동 억제, 혈관내피세포 보호 및 신생혈관내막 증식 억제효과를 가져, 혈관내피세포 손상을 원인으로 하는 혈관 질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 작용한다.
- [0033] (c) 한편, 본 발명의 유효성분인 3-히드록시벤즈알데히드는 천연물질로서 인체에 무해한 물질로 독성 및 부작용이 거의 없으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있으며, 특히 상기한 바와 같은 약제학적 및 식품 조성물에 안전하게 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 3-히드록시벤즈알데히드(3-HBA)가 혈관평활근세포의 증식을 억제함을 보여준다.
 도 2a는 3-히드록시벤즈알데히드(3-HBA)가 혈관평활근세포에서 세포 증식에 관련된 AKT의 활성을 억제함을 보여 주며(1: control; 2: PDGF only; 3: PDGF + 3HBA), 도 2b는 3-히드록시벤즈알데히드(3-HBA)가 혈관평활근세포에서 세포의 이동을 억제함을 보여준다.

도 3a 및 3b는 3-히드록시벤즈알데히드(3-HBA)에 의해서 혈관내피세포가 보호되어 래트 총경동맥 풍선 손상(Rat Common Carotid Artery Balloon injury) 이후에도 손상이 억제됨을 보여준다.

도 4a 및 4b는 3-히드록시벤즈알데히드(3-HBA)가 신생혈관내막 과다증식 (neointimal hyperplasia)을 억제함을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0036] **실시예**

[0037] **실험 재료 및 방법**

[0038] **실험재료**

[0039] 3-히드록시벤즈알데히드(3-Hydroxybenzaldehyde: 3-HBA)는 시그마(Sigma, H19808)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

[0040] **실험방법**

[0041] **1) 혈관내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cell) 배양**

[0042] 혈관내피세포는 GIBCO(C-003-5C)에서 구입하여 사용하였다. EBM(CC-3129) 배지용액에 EGM-2 kit(FBS, CC-4176)을 첨가한 후 CO₂배양기(5% CO₂, 37℃)내에서 배양하였다. 2-3일 간격으로 배양배지를 교체하면서 융합된 세포들을 트립신-EDTA용액으로 박리하여 계대 배양하고, 이 세포들은 혈관내피세포들의 특징인 편평하고 중심 핵(flat and central nucleus)을 보였다.

[0043]

[0044] **2) 래트의 혈관평활근세포 분리 및 배양**

[0045] 래트의 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cells, VSMC)는 200 g - 250 g 수컷 SD 래트를 사용하였다. 에틸 에테르 마취하에 래트의 흉복부를 절개하고, 흉부 대동맥을 분리하여 효소법(콜라게나제와 엘라스타제 이용)으로 대동맥 중막세포를 분리하였다. 수득한 세포는 10% FBS (fetal bovine serum)를 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지용액에 넣은 후 CO₂ 배양기(5% CO₂, 37℃)내에서 배양하였다. 2-3일 간격으로 배양배지를 교체하면서 융합된 세포들을 트립신-EDTA용액으로 박리하여 계대 배양하였다. 이 세포들은 혈관평활근세포들의 특징인 'hill-and-valley'의 형태를 나타내며, 실험에는 5회 계대배양한 세포들을 이용하였다.

[0046] **3) 실험 약물 처리**

[0047] 실험 약물을 처리하기 2 시간 전에 혈청인자들의 영향을 배제하기 위하여 EGM-2 키트(FBS)를 제거한 EBM 배지에서 세포를 배양한 후, 약물을 처리하여 CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 혈관내피세포에서 3-히드록시벤즈알데히드(3-HBA)의 효과를 알아보기 위하여 100 μM로 24시간 동안 처리하였고, 이때 3-HBA는 10 mg/ml를 DDW에 희석하여 0.22 μm 필터로 거른 후에 희석하여 사용하였다. 실험의 목적에 따라 PDGF-BB (platelet-derived growth factor-BB, 20 ng/ml, 24시간) 혹은 TNF-α를 처리하여 혈관내피세포를 자극하였으며, 실험목적에 맞게 시료를 얻었다.

[0048]

[0049] **4) 평활근세포의 증식능의 측정**

[0050] 세포 증식능은 MTS/PMS (methyl tetrazolium salt/phenazine methosulfate) 분석기(CellTiter 96 Aqueous

nonreactive cell proliferative assay, Promega)를 이용하여 측정하였다. MTS/PMS 분석은 각 웰에 혈관평활근 세포를 배양하고, 3-히드록시벤즈알데히드(3-HBA)를 농도별(10 μ M - 100 μ M)로 24시간동안 처리함으로써 수행하였다. 여기에 PDGF-BB (20 ng/ml)을 24시간동안 처리한 후 MTS/PMS용액 20 μ l를 투여하고 4시간 경과 후 ELISA 플레이트 리더에서 490 nm 파장의 UV로 광밀도(OD)를 측정하여 세포성장 억제를 비교하였다. 대사가 왕성한 세포에서 발견되는 디하이드로게네이즈(dehydrogenase) 효소에 의해서 MTS가 포르마잔으로 바뀌며, 490 nm 자외선으로 측정되는 흡광도의 정도가 배양 시 살아있는 세포의 수와 직접 비례한다. 실험은 3번 반복하여 그 평균치를 비교하였다

[0051]

5) 이유노블롯팅(Immunoblotting)

[0052]

항원 에피토프(antigen epitope)와 반응하는 항체를 이용하여 단백질 혼합물 중에서 원하는 단백질(antigen)만을 찾는 방법으로 혈관 평활근세포에서 세포의 증식반응을 유도하도록 하기 위하여 PDGF-BB (20ng/mL)을 24시간 동안 처리하였다. 또한 세포 용해물(lysate)을 얻은 후 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer)에 단백질 분해효소 억제제(protease inhibitor)와 인산 분해효소 억제제(phosphatase inhibitor)를 첨가한 후 20분 동안 얼음에서 보관하였다. 14,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 얻은 후, 단백질 정량을 하여서 각 실험군마다 동일한 단백질 양을 만들었다. 10% SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 PVDF 멤브레인(Millipore, MA, USA)에 옮겨 주었다. 5% 스킵 밀크(skim milk)를 이용하여 멤브레인에 있는 비-특이적 결합 부위를 모두 블로킹(blocking)하였다. 일차항체인 p-AKT (Cell signaling 1:1000)와 4°C에서 반응시키고, 이후 이차항체를 2시간 동안 처리 하였다. 발색 기질(chromogenic substrate)을 이용하여 발색시켰다.

[0053]

[0054]

6) 혈관 평활근세포의 이동분석

[0055]

혈관 평활근세포의 이동억제에 대한 히드록시벤즈알데히드(3-HBA)의 효과를 알아보려고 100 μ M로 24시간 동안 처리하였고, 그 후 혈관평활근세포를 피펫 팁 끝으로 일정하게 긁은 후 PDGF-BB(20ng/ml, 24시간)을 처리하여 증식 및 이동을 유도하여 고정을 한 후 이동한 세포의 개수를 측정하였다.

[0056]

[0057]

7) 래트 대동맥 고리 분석(Aortic Ring Assay)

[0058]

래트(100g)을 주문하고 당일 날 가슴대동맥(thoracic aorta)을 박리한다. 박리된 가슴대동맥을 얇게 잘라내어 고리(ring)을 만든다. 고리를 매트릭셀(matrigel)(Basement Membrane Extract, BME, 3431-001-01,Cultrex) 상에 올려놓은 후 EBM (CC-3129) 배지용액에 EGM-2 키트(FBS, CC-4176)를 첨가한 것과 3-HBA를 첨가한 것을 각각 CO₂배양기(5% CO₂, 37° C)내에서 배양한다. 5-7일 사이에 고리를 관찰하여 혈관신생(angiogenesis)에 의해서 고리에서 뻗어 나오는 스프라우트(sprout)가 내피세포 보호(endothelial protection) 작용에 의해 억제되는지 확인할 수 있다.

[0059]

8) 래트 총경동맥 풍선 손상 모델(Rat Common Carotid Artery Balloon injury model)

[0060]

실험 전 래트(250 g)는 2주 동안 3-HBA 100 mg/ml을 복강내(intra-peritoneal) 투여로 전처리하였다. 마취 가스는 이소플루란(isoflurane)을 사용하고 N₂O와 O₂를 7:3의 비율로 혼합한 가스에 섞어 사용하였다. 5% 이소플루란을 주입한 마취통(anesthesia chamber)안에 마우스를 넣고 호흡이 현저히 느려지는 것이 확인될 때 까지 마취 가스를 흡입하게 하여 마취를 유도 하였다. 총경동맥의 주변 근육과 신경조직을 박리하였고, 위 갑상동맥을 끊고 이 부분에서 혈액이 흘러 나오지 않는지 확인하고 풍선 손상 카테터(catheter)가 들어갈 외경동맥에 구멍을 만들기 위해 마이크로시저(microscissor)로 외경동맥의 정 가운데 부분에 구멍을 만들어주었다. 이때, 혈관의 중막(media)은 총 3겹으로 이루어져 있기 때문에 깨끗하게 카테터가 들어가기 위해서 한 번에 외경동맥의 정 가운데 부분에 구멍을 내었다. 카테터를 총동경맥쪽으로 집어넣고 7번 위 아래로 카테터를 움직여서 혈관 벽에 손상을 주었다.

[0061]

실험 결과

[0062]

1) 혈관평활근세포 증식억제

[0063]

3-HBA가 혈관평활근세포의 증식에 영향을 미치는 농도를 확인하고자, 혈관평활근 세포에 3-HBA를 10 μ M - 100 μ M 농도로 각각 24시간 처리한 후, PDGF-BB로 세포증식을 유도하여 MTS 분석을 한 결과, 3-HBA는 50 μ M 이상의 농도에서 혈관평활근세포의 증식을 유의미하게 감소시키는 것으로 확인되었다(도 1).

[0064]

2) 혈관평활근세포의 증식 및 이동 억제

[0065]

3-HBA가 PDGF-BB에 의한 혈관평활근세포의 증식 및 이동의 반응에 미치는 영향을 분석하고자, 혈관평활근세포에 3-HBA를 100 μ M 농도로 24 시간 전 처리한 후, PDGF-BB (10 ng/ml)를 24시간 처리하여 AKT의 활성을 측정하였고, 혈관평활근세포를 일정범위로 굽은 후 세포의 이동을 분석하였다. 그 결과, 도 2a와 2b에서 확인할 수 있듯이, 3-HBA가 AKT의 활성을 억제하고, 세포의 이동 작용을 억제함을 확인하였다.

[0066]

3) 3-HBA의 혈관내피세포 보호 효과

[0067]

3-HBA가 혈관내피세포 보호에 미치는 영향을 분석하고자, 100 g 래트의 가슴대동맥(thoracic aorta)을 분리 적출한 후, 가늘게 잘라서 고리 모양으로 만들고 그것을 매트릭스에 올려놓고 Day 0 - Day 6 까지 스프라우트(sprout)를 확인해 본 결과, 혈관내피세포가 보호되어 동맥경화를 일으키는 혈관 신생(angiogenesis)을 억제함을 확인하였다(도 3a 및 도 3b).

[0068]

4) 3-HBA의 신생혈관내막 증식 억제 효과

[0069]

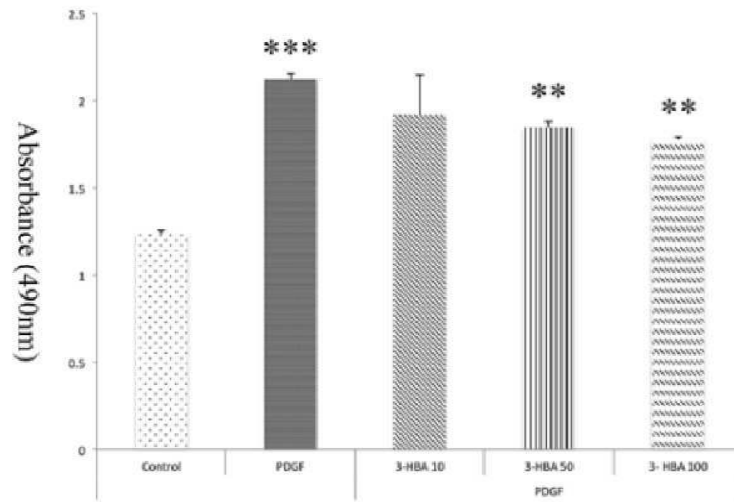
3-HBA가 혈관내피세포 보호를 통한 혈관 보호 작용을 통하여, 동맥경화를 유발하는 손상에 대해서 보호 작용이 있는지 분석하였다. 동맥경화에 미치는 영향을 분석하고자, 250 g 랫트를 2주 동안 복강내(intraperitoneal)로 3-HBA 100 mg/kg을 투여하여 전처리하고 나서 CCA(rat carotid artery) 풍선 손상(balloon injury)을 시행하였다. 총경동맥에 손상을 주고 나서 4주 동안 3-HBA를 주사한 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정(fixation)한 후에 대동맥(aorta) 조직을 박리 하였다. 그 조직을 파라핀 고정(paraffinization)한 후에 헤마톡실린-에오신 염색(hematoxyline-eosine staining)을 시행한 결과, 도 4a 및 4b에서 볼 수 있듯이, 3-HBA가 신생혈관내막 과다증식(neointimal hyperplasia)을 억제함을 확인 하였다.

[0070]

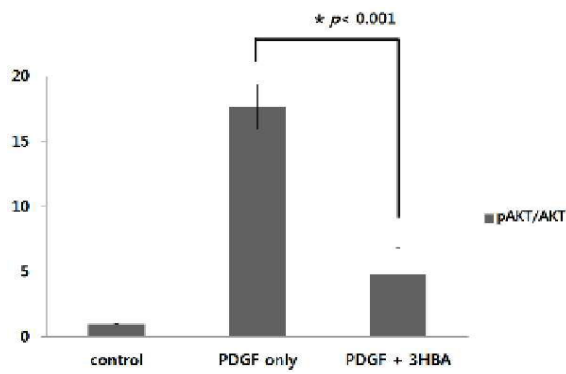
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

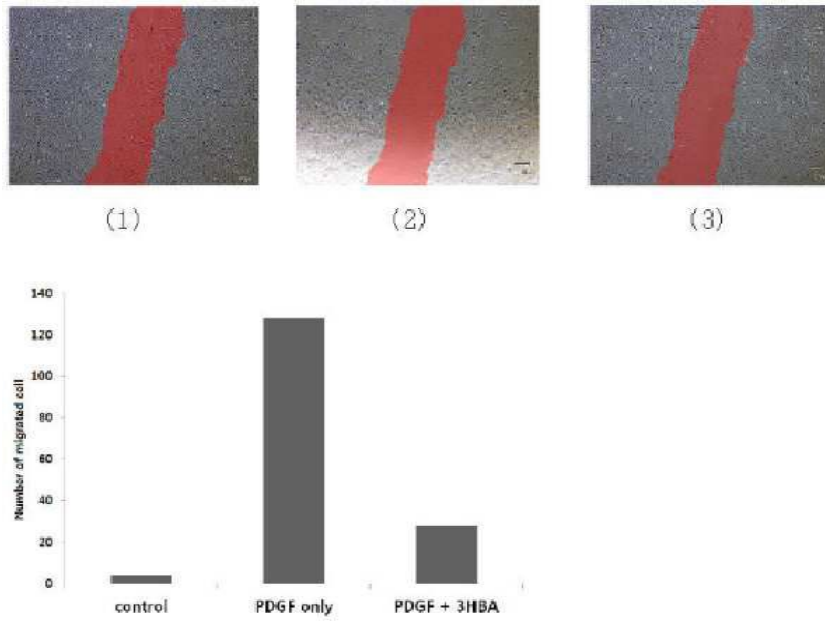
도면1



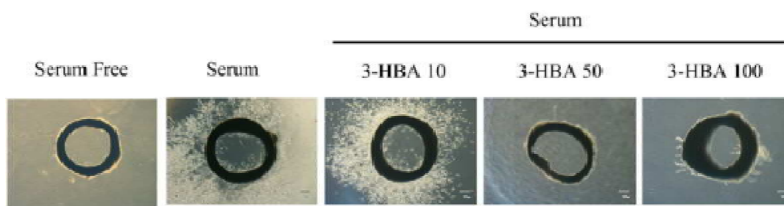
도면2a



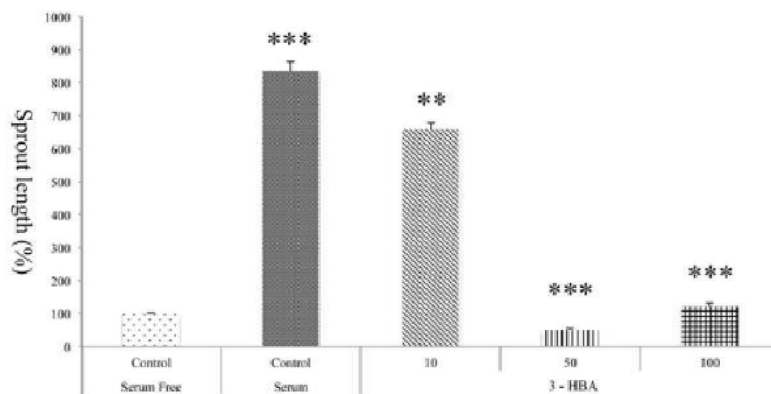
도면2b



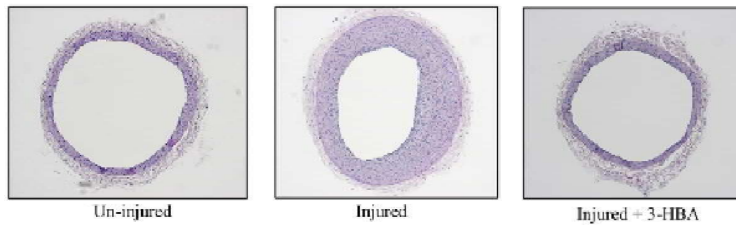
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

