(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0118736
(43) 공개일자 2012년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/8905 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0036298
(22) 출원일자 2011년04월19일
심사청구일자 2011년04월19일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
주식회사 고암바이오알앤디수
경기도 남양주시 와부읍 도곡리 1117 건영덕소리버파크 105-304
(72) 발명자
김승환
경기도 용인시 수지구 손곡로 53, 신명아파트 503동 1302호 (동천동)
곽종환
경기도 수원시 장안구 하률로1번길 6-13, 303호 (천천동, 은하수빌)
오균식
경상남도 거창군 거창읍 상동7길 46, A동 301호 (영창빌라)
(74) 대리인
특허법인태백

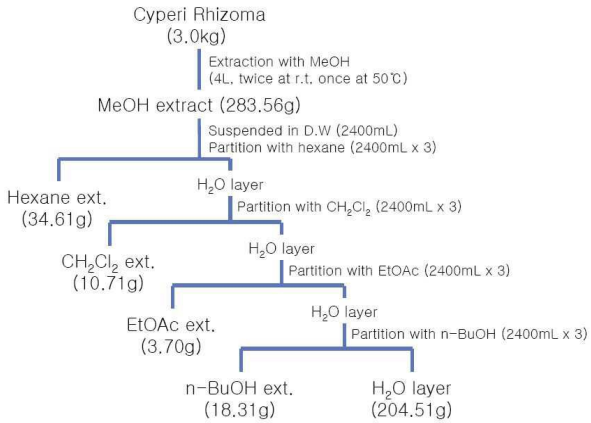
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **향부자 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물**

(57) 요 약

본 발명은 향부자 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방간 치료제에 관한 것으로, 특정 용매로 추출한 향부자 추출물이 LXR과 TRAP80 간의 상호결합을 저해하며, 지질 합성의 핵심 유전자인 SREBP-1c의 발현을 선택적으로 억제함으로써 지방간, 특히 비알콜성 지방간을 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0975
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	LXR binding protein 조절을 통한 지질대사 개선
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

향부자 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 지방간은 알콜성 지방간 또는 비알콜성 지방간인 것을 특징으로 하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 향부자 추출물은 LXR과 TRAP80 간의 상호결합을 억제함으로서 지질 합성을 억제하는 것을 특징으로 하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 향부자 추출물은 SREBP-1c의 전사를 선택적으로 억제하는 것을 특징으로 하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 향부자 추출물은 C1 내지 C4의 알코올, 헥산, 사이크로헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 에테르(에틸에테르), 에틸 아세테이트, 물 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 향부자 추출물은 향부자를 메탄올 또는 에탄올로 추출한 후, 상기 메탄올 또는 에탄올 추출물을 증류수에 현탁하고, 상기 증류수와 동량의 헥산을 가해 분획한 헥산 추출물인 것을 특징으로 하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 7

향부자 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방간 개선용 건강식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 향부자 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 핵 수용체 슈퍼패밀리에 속하는 전사인자인 LXR(Liver X receptor)은 LXRα(NR1H3)와 LXRβ(NR1H2) 두 가지 이소폼이 있으며 이 둘 사이에 DNA-결합 도메인(DBD)과 리간드-결합 도메인(LBD)의 아미노산 서열이 약 78%가 유사하다. LXR의 조직에 따른 발현 정도는 LXRα의 경우 비장, 간, 지방조직, 장, 신장, 폐에서 많이 발현되고 있으며 LXRβ의 경우 모든 조직에서 발현되고 있다.

[0003] LXR은 생체 내 지방 대사조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. LXR의 합성 효능제로 잘 알려진 GW3965나 T0901317을 투여한 동물실험에서 대식세포의 ATP-결합 카세트 수송체 A1 (ABCA1), ATP-결합 카세트 수송체 G1 (ABCG1) 증가에 의한 역 콜레스테롤 수송 (RCT) 증가, NF-kB 시그날링 억제를 통한 염증반응 억제, 혈관평활근 증식 억제, 대식세포의 매트릭스 메탈로프로테이네이즈-9 (MMP9) 억제 등을 통한 항동맥경화 효과가 보고되어 있고 간 내 포도당 신생합성 (gluconeogenesis)의 억제, 췌장 베타 세포에서의 인슐린 분비 증가, 말초 조직의 인슐린에 의한 포도당 흡수 증가 등에 의한 항당뇨 효과 또한 보고되어 있다. LXR 효능제의 투여는 동맥경화와 당뇨의 치료에 효과가 있지만 고중성지방혈증 (hypertriglyceridemia)과 지방간 (hepatic steatosis)을 발생시

킨다는 보고 또한 되어 있다. 이는 LXR에 의해 생체 내 지질합성에 중요한 전사조절인자인 스테롤 조절인자 결합 단백질(SREBP)-1c가 활성화 되기 때문이다.

[0004] SREBP는 소포체에 존재하고 있다가 활성화가 되면 프로세싱 과정을 거쳐 핵으로 이동하는 basic helix loop helix leucine zipper superfamily에 속하는 전사인자로서, SREBP는 SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2의 3가지 이소폼이 존재하며 이 중 SREBP-1c는 지방산 및 중성지방의 합성과 관련된 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있으며 간에서는 주로 SREBP-1c 이소폼의 발현이 우세하다.

[0005] SREBP-1c가 조절하는 대표적인 유전자들은 아세틸-CoA 카르복실레이즈 (ACC), 지방산 합성효소 (FAS), 스테아로일-CoA 디사투레이즈 1 (SCD1), 글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼레이즈 (GPAT) 등이 있고 이들은 모두 아세틸-CoA가 지방산을 거쳐 중성지방으로 합성되는 과정에서 중요한 효소이다. 간에서의 SREBP-1c의 전사는 인슐린에 의해 조절 받고 있고 인슐린의 작용에 있어서 LXR이 중요한 매개체로 작용하고 있다.

[0006] 비알코올성 지방간은 알코올의 섭취가 없는 사람의 간에서 알코올성 지방간과 유사한 소견이 보이는 질환으로, 간세포에 중성지방이 많이 축적된 것이 특징이며 비만, 제2형 당뇨병 등 대사성 질환이 비알코올성 지방간과 연관되어 있다. 간단한 단순지방증 (hepatic steatosis)부터 염증반응이 동반되는 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 간경변증 (cirrhosis) 등이 이 질병의 범주에 속한다. 비알코올성 지방간의 병태생리는 명확하게 밝혀지지 않았지만 인슐린 저항성이 이 질병과 밀접한 연관이 되어 있다고 알려져 있고, 비알코올성 지방간의 발생에서 SREBP-1c는 인슐린 저항성이나 비만에서 나타나는 고인슐린혈증 (hyperinsulinemia)에 의해 혈중 인슐린 농도가 증가하게 되고, 증가된 인슐린에 의해 SREBP-1c가 간에서 활성화 되어 최종적으로 중성지방을 간에 축적하게 한다.

[0007] 최근 본 발명자는 LXRα LBD 부분을 bait로 하여 LXR 결합 단백질 5 (TRAP80)라는 신규 단백질을 찾아내었고, 이 단백질이 LXRα와 직접적으로 리간드 의존적 상호작용을 하고 있으며 LXRα의 전사활성조인자로서 SREBP-1c의 발현을 선택적으로 증가시킨다는 사실을 밝혀 내었다. LXRα의 활성화 시 전사활성조인자와의 상호작용을 통해 표적 유전자의 발현이 증가하므로 LXR과 TRAP80의 상호작용을 저해할 경우 LXR의 표적 유전자인 SREBP-1c의 발현이 감소하고 이로 인해 다운스트림 표적인 FAS, SCD1, ACC 등이 감소하면 생체 내 지질합성의 억제가 가능할 것으로 예상하고, 이러한 연구를 통해 잠재적으로 지방간, 특히 비알코올성 지방간에 효과적인 약제 후보를 개발하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자는 천연물 중 향부자 추출물이 LXR과 TRAP80의 상호작용을 저해하며, 지질 합성의 핵심 유전자인 SREBP-1c의 발현을 선택적으로 억제하는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 향부자 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 향부자 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방간 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0011] 상기 향부자(Cyperi Rhizoma)는 방동사니과에 속하는 여러해살이 풀의 덩이뿌리로서, 성질이 따뜻하고 매운 맛이 있어서 사방으로 기를 퍼지게 하는 효능을 지니며, 각종 부인과 질환과 스트레스성 위장질환이나 만성 장염 또는 담낭염 등의 증상에 활용되고 있다.

[0012] 상기 향부자 추출물은 알콜성 지방간 또는 비알콜성 지방간을 모두 치료하거나 예방할 수 있지만, 바람직하게는 비알콜성 지방간을 치료하거나 예방할 수 있다.

[0013] 상기 향부자 추출물은 LXR과 TRAP80 간의 상호결합을 억제함으로서 지질 합성을 억제하며, 특히 SREBP-1c의 전사를 선택적으로 억제함으로써 비알콜성 지방간을 치료하거나 예방할 수 있다.

[0014] 상기 향부자 추출물은 C1 내지 C4의 알코올, 헥산, 사이크로헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 에테르(에틸에테르), 에틸 아세테이트, 물 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출하여 얻을 수 있으며, 보다 바람직하게는 향부자 추출물은 향부자를 메탄올 또는 에탄올로 추출한 후, 상기 메탄올 또는 에탄올 추출

물을 증류수에 현탁하고, 상기 증류수와 동량의 헥산을 가해 분획한 헥산 추출물이다.

[0015] 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 향부자 추출물을 0.1 내지 50.0 중량부로 함유하는 것이 바람직하다. 만약, 향부자 추출물을 상기 함량 범위를 벗어나 포함하면 de novo 지방산 합성의 중요한 조절제인 SREBP-1c의 전사를 선택적으로 억제할 수 없어 본 발명에서 원하는 효과를 얻을 수 없다.

[0016] 또한, 본 발명의 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 약학조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 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, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0018] 본 발명에 따른 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0019] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.

[0020] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0021] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 사용하는 향부자 추출물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있지만, 지방간 치료 또는 예방을 위한 유효량은 통상 0.01 내지 500 mg/kg, 바람직하게는 0.1 내지 300 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0023] 특히, 상기 향부자 추출물은 이미 임상에 적용되고 있는 천연물로서 그 안전성이 확보된 물질이다.

[0024] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 비강, 복강, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 향부자 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방간 개선용 건강식품을 제공한다.

[0026] 상기 건강식품은 건강기능식품 또는 건강음료의 형태로 제공될 수 있으며, 기능성 음료, 환제, 정제 또는 상기 성분을 건조 분말화하여 충진한 연질 또는 경질 캡슐제의 형태로 이용하는 것이 바람직하다.

[0027] 본 발명에 따른 향부자 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어 각종 식품류, 캔디, 초코릿, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 각종 건강보조 식품류 등이 있고 분말, 과립, 정제, 환제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0028] 상기 건강식품은 식품학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시예로서, 본 발명의 건강식품이 음료인 경우에는 지시된 비율로 필수 성분으로서 향부자 추출물을 함유하는 것 이외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 이때, 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당, 디사카라이드, 예를 들어 말토즈, 수크로즈, 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올을 들 수 있다. 또, 상기 향미제로는 천연향미제 예를 들어 타우마틴, 스테비아 추출물, 헤바우디오시드 A, 글리시르히진과 합성 향미제 예를들어 사카린, 아스파르탐 등을 사용할 수 있다.

[0029] 상기 음료 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0030] 상기 건강식품에 함유된 향부자 추출물의 유효 용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 향부자 추출물은 LXR과 TRAP80의 상호작용을 저해하며, 지질 합성의 핵심 유전자인 SREBP-1c의 발현을 선택적으로 억제함으로써 지방간, 특히 비알콜성 지방간을 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명에 따른 향부자 추출물을 제조하는 공정도이고,

도 2a는 포유류 이중 하이브리드 시스템용 컨스트럭트를 나타낸 것이고,

도 2b는 Gal4-TRAP80 및 VP16-LXRα LBD 간의 리간드 의존적 상호작용을 나타낸 것이고,

도 2c는 Gal4-TRAP80 및 VP16-LXRα LBD 간의 상호작용을 최적 조건을 규명한 것이고,

도 3은 포유류 이중 하이브리드 시스템을 이용한 LXR와 TRAP80 간의 상호작용에 대한 향부자 추출물의 억제 효과를 나타낸 것이고,

도 4a는 SREBP-1c 및 ABCA1의 유전자 발현에 대한 향부자 추출물의 효과를 나타낸 것이고,

도 4b는 SREBP-1c, ABCA1 및 FAS의 유전자 발현에 대한 다양한 농도의 향부자 추출물의 효과를 나타낸 것이고,

도 5a 내지 도 5c는 3XLXRE, SREBP-1c 및 ABCA1 프로모터에 대한 향부자 추출물의 선별적 억제 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0034] **<실시예 1> 향부자 추출물 제조**

[0035] 음건, 세절한 향부자 3.0kg을 MeOH 4L로 실온에서 2회 반복 추출하고 다시 4L의 MeOH로 온침한 후 감압 농축하여 MeOH 추출물 283.56g을 얻었다. 상기 MeOH 추출물을 증류수 2.4L에 현탁하고 동량의 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸 아세테이트, n-부탄올로 각각 3회 상법에 따라 차례로 분획하여 헥산 분획(34.61g), 메틸렌 클로라이드 분획(10.71g), 에틸 아세테이트 분획(3.70g), n-부탄올 분획(18.31g) 그리고 물 분획(204.51g)을 얻었다.

[0036] **<실시예 2> LXRα와 TRAP80 간의 상호결합 억제 활성 검토**

[0037] 실시예 1에서 준비된 향부자 추출물이 LXRα와 TRAP80 간의 상호작용을 억제하는지 여부를 포유류 이중 하이드리드 시스템(mammalian two hybrid system)을 이용하여 검토하였다. 즉, 포유류 이중 하이드리드 시스템은 DNA에 결합할 수 있는 Gal4 도메인에 원하는 bait를 붙이고 전사활성을 증가시킬 수 있는 VP16 도메인에 bait와 상호작용하는 단백질을 붙여 두 단백질이 상호작용할 경우 리포터 유전자의 발현 증가로 확인할 수 있는 시스템이다.

[0038] 1. 포유류 이중 하이드리드 시스템 구축을 위한 컨스트럭트 제작

[0039] 포유류 이중 하이드리드 시스템 구축을 위한 컨스트럭트를 제작하기 위해 pCMXGAL4N과 pCMXVP16 벡터에 hLXRα LBD와 hTRAP80 전장(full length)을 각각 클로닝 하였다. pcDNA3.1-hLXRα와 pNT7-SB-hTRAP80을 각각 hLXRα LBD, hTRAP80의 주형(template)으로 하여 *Bam*HI과 *Xho*I site를 첨가하여 PCR을 수행하였다. 벡터와 PCR 산물은 *Bam*HI과 *Xho*I으로 20시간 이상 37℃에서 반응시키고 T4 라이게이즈(ligase)를 이용하여 라이게이션 하였다. 열충격(Heat shock) 방법을 이용하여 형질전환한 후 100 μg/ml 암피실린을 함유한 LB 한천 배지에서 콜로니를

선별하여, 인서트를 함유한 클론을 제한효소를 이용하여 확인하고, 이 후 선택된 플라스미드 DNA를 시퀀싱 하였다.

[0040] 시퀀싱 결과, pCMXGAL4-hLXRα LBD, pCMXGAL4-hTRAP80, pCMXVP16-hLXRα LBD, pCMXVP16-hTRAP80 컨스트럭트에 변이가 없는 것을 확인하고 이후 실험에 사용하였다. 이때, 컨스트럭트 제작에 사용한 프라이머는 Bionics (Seoul, Korea)에서 합성하였고 염기서열은 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

[0041]

명명	염기서열
Gal4/VP16-hTRAP80 forward	GGG GTA CCA TGT CCG GGG TG (서열번호 1)
Gal4/VP16-hTRAP80 reverse	CTA GCT AGC TCA TAG TAG ACA AG (서열번호 2)
Gal4/VP16-hLXRα LBD forward	GGG GTA CCG CTG GCA TGC GGG (서열번호 3)
Gal4/VP16-hLXRα LBD reverse	CTA GCT AGC TTC GTG CAC AT (서열번호 4)

[0042] 2. 포유류 이중 하이드리드 시스템 구축

[0043] 상기 준비된 포유류 이중 하이드리드 시스템은 HeLa 세포를 이용하여 확인하였다. HeLa 세포를 96well plate에 1 X 10^5 cell/well로 DMEM 배지를 이용하여 분주하였다. DNA의 조합은 Gal4-TK-Luc와 액틴 β-Gal을 well 당 25ng, 12.5ng을 공통으로 넣고 Gal4-hLXRα LBD와 VP16-hTRAP80 또는 Gal4-hTRAP80과 VP16-hLXRα LBD 조합으로 각각 10ng씩 넣어 주었다(도 2a 참조). RXRα를 형질감염 시키는 경우 pcDNA3.1-hRXRα를 10ng 추가하였다. 형질감염 시약으로는 리포펙틴을 well 당 0.25μl 사용하였다. 25μl opti-MEM에 DNA와 리포펙틴을 각각 혼합하여 상온에서 5분 반응 후 2가지를 섞어 20분 동안 상온에서 반응시켰다. 배지를 제거하고 opti-MEM 50μl로 배지를 바꾸어 준 후, 반응혼합물 50μl를 첨가하여 CO_2 배양기에서 6시간 동안 배양한 후 charcoal stripped FBS가 포함된 DMEM 배지 200μl로 교체해 주고 다음날 DMSO와 1μM T0901317 단독 또는 1μM T0901317/1μM 9-시스 레티노익산을 복합 처리하여 16시간 동안 CO_2 배양기에서 배양하였다. 16시간 후 배지를 제거하고 라이시스 완충액 50μl에 용해시켜 그 중 10μl를 루시퍼레이즈 리포터 분석(luciferase reporter assay)에 사용하고, 30μl를 β-갈락토시데이즈 분석에 사용하였다.

[0044] 루시퍼레이즈 리포터 분석은 루시페린 용액 50μl를 첨가하면서 2초 동안 값을 발광측정기(Luminometer)를 이용하여 측정하였고, β갈락토시데이즈 분석은 2X β-갈락토시데이즈 완충액과 혼합 하여 37℃에서 반응하여 420nm에서 ELISA reader로 값을 측정하였다. Normalization은 루시퍼레이즈 활성을 β-갈락토시데이즈 값으로 나누어 주었다.

[0045] 도 2b와 같이, Gal4-hTRAP80/VP16-hLXRα LBD 방향의 경우 두 가지를 동시에 형질감염시킨 경우에만 T0901317에 의한 반응이 있는 것을 확인할 수 있는 반면, Gal4-hLXRα LBD/VP16-hTRAP80방향의 경우에는 두 컨스트럭트가 같이 형질감염 되었을 경우 뿐만 아니라 Gal4-hLXRα LBD만을 형질감염시킨 군에서도 T0901317에 의해서 활성이 증가하는 것을 확인하였다. Gal4-hLXRα LBD/VP16-hTRAP80의 방향을 이용할 경우 두 단백질의 상호작용을 통한 반응이 아닌 hLXRα LBD 부분만으로도 리간드에 의한 루시퍼레이즈의 발현 증가를 유도했기 때문에, 리간드에 의해 증가하는 폭은 낮지만 두 단백질 사이의 리간드 의존적 상호작용을 확인할 수 있는 Gal4-hTRAP80/VP16-hLXRα LBD 방향으로 이후 실험을 진행하였다.

[0046] Gal4-hTRAP80/VP16-hLXRαLBD 방향을 이용한 경우 T0901317에 의한 루시퍼레이즈의 발현 증가가 높지 않았기 때문에 이를 극복하고자 실제 생체 내에서 LXR과 결합하여 작용하는 RXRα를 함께 형질감염시키고 RXRα의 리간드인 9-시스 레티노익산(9-cis RA)을 동시에 처리하여 루시퍼레이즈의 발현을 더 증가시키고자 하였으며, 도 2c와 같이 RXRα가 함께 형질감염되고 9-cis RA를 같이 처리한 경우 T0901317만 처리한 경우 보다 증가 폭이 더 커지는 것을 확인할 수 있었다.

[0047] Gal4-hTRAP80/VP16-hLXRα LBD/hRXRα를 이용한 포유류 2중 하이브리드 시스템이 LXR 리간드에 특이한 반응인지 확인하기 위하여 다른 핵수용체의 리간드들을 처리하여 루시퍼레이즈의 발현을 비교한 결과, 도 2d와 같이 덱사메타손, 로시글리타존, 9-cis RA를 각각 단독 처리한 경우 모두 루시퍼레이즈 발현에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[0048] 따라서, Gal4-hTRAP80/VP16-hLXRαLBD/hRXRα를 이용한 포유류 2중 하이브리드 시스템을 통해서 LXR과 TRAP80

단백질 사이의 상호작용이 LXR 리간드 특이적으로 일어남을 확인할 수 있었다.

[0049] 3. LXRα와 TRAP80 간의 상호결합 억제 활성 검토

[0050] 상기 구축된 포유류 2중 하이브리드 시스템을 이용하여 실시예 1에서 준비된 향부자 추출물이 LXR과 TRAP80 단백질 사이의 상호작용을 저해할 수 있는지 여부를 검토하였다.

[0051] 즉, HeLa 세포에 DNA를 형질감염 시키고 6시간 후 10% charcoal stripped FBS를 포함한 DMEM 배지로 바꿔준 후 하루 동안 배양하였다. 1μM T0901317, 1μM 9-cis RA, 100μg/ml 향부자 추출물을 16시간 동안 처리한 후 배지를 제거하고 라이시스 완충액을 이용하여 용해시켰다. 용해물 중 일부는 루시퍼레이즈 리포터 분석을 하고 일부는 β-갈락토시데이즈 분석을 진행하였다. 1μM T0901317/9 cis-RA를 기준(1.00)으로 향부자 추출물을 처리한 경우 루시퍼레이즈 활성의 변화를 비교하였다.

[0052] 그 결과, 도 3과 같이 향부자 메탄올 추출물, 향부자 메틸렌 클로라이드 추출물 및 향부자 헥산 추출물이 LXR과 TRAP80 단백질 사이의 상호작용을 저해하는 것으로 확인되었으며, 특히 향부자 헥산 추출물은 리간드(T/RA)에 의해 증가한 루시퍼레이즈 활성을 0.2 배 이하로 낮추어 LXR과 TRAP80 단백질 사이의 상호작용을 저해하는 가장 뛰어난 물질로 확인되었다.

[0053] **<실시예 3> LXR 표적 유전자 발현에 미치는 영향 검토**

[0054] 포유류 2중 하이브리드 시스템을 통해서 LXR과 TRAP80 사이의 상호작용을 저해하는 것으로 확인된 향부자 헥산 추출물이 실제 리간드에 의해 증가한 LXR 표적 유전자 발현을 억제하는지를 마우스 초대배양 간세포(mouse primary hepatocyte)에서 RT-PCR을 이용하여 확인하였다.

[0055] 1. 마우스 초대배양 간세포 분리

[0056] mRNA의 발현을 확인하기 위해서 마우스 초대배양 간세포를 분리하였다. 10주령 C57/BL6을 졸레틸과 롬푼 1 : 3의 비율로 혼합하여 복강 내 주사하여 마취하였다. 마취가 된 마우스는 수술대에 사지를 고정한 후 개복하였다. 콜라게네이즈(0.864 unit/ml)와 트립신 억제제(4.8 mg/ml) 가 들어있는 HBSS(Ca^{2+}, Mg^{2+}free)를 50ml 시린지 튜브에 넣어 37℃에서 미리 따뜻하게 준비시켜 놓았다. 나비침과 튜브를 연결하고 나비침을 하대정맥에 넣어 관류시켜 주었다. 관류 시 문맥을 커팅하여 간 내의 혈액이 빠져 나오게 하였고 50ml을 관류시켜 주었다. 관류가 끝난 후 간을 적출하여 M199 (항생제만 첨가) 배지에서 흔들어 세포를 단일세포 상태로 분리하였다. 30μm mesh를 이용하여 세포를 한번 걸러준 후 4℃, 300rpm, 3분 동안 원심분리 (Union 32R plus, Hanil) 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 15ml M199에 재현탁한 후 퍼콜 5ml과 잘 섞어준 후 4℃, 300rpm, 10분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 M199 (항생제만 첨가) 배지로 재현탁하여 4℃, 300rpm, 3분 원심분리 하였다. 1회 세정 반복 후 세포를 카운팅하여 원하는 컨플루언시가 되도록 분주하였다.

[0057] 2. 총 RNA 준비

[0058] 총 RNA는 마우스 초대배양 간세포에서 분리하였다. 콜라겐(354231, BD)을 코팅한 12well plate에 분리한 마우스 초대배양 간세포를 2.5 X 10^5cell/well로 M199 (항생제만 첨가) 배지에 분주하였다. 간세포가 플레이트에 붙은 후 1μM T0901317/1μM 9-시스 레티노익산과 실시예 1에서 준비한 향부자 헥산 추출물을 동시에 처리하고 18시간 동안 배양하였다. 18시간 처리 후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세정 후 트리졸 시약을 이용하여 RNA를 분리하였다. 트리졸 시약은 제조사의 프로토콜(15596-018, Invitrogen)을 스케일 다운하여 사용하였으며 분리한 RNA는 DEPC-물에 녹여서 사용하였고, -20℃에서 보관하였다.

[0059] 3. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

[0060] 총 RNA를 정량하고 1500ng을 역전사(RT) 하였다. 역전사 시 랜덤 헥사머를 프라이머로 사용하였으며 역전사 효소로는 M-MLV 역전사 효소를 사용하여 합성하였다. 역전사가 완료된 시료를 주형으로 하여 18S rRNA, SREBP-1c, ABCA1, FAS 특이적 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고, 아가로즈 겔에 로딩하여 EtBr로 시각화 하였다. 밴드 강도는 FujiFilm Multi Gauge ver 2.3을 이용하여 측정하였다. 이때, 사용한 프라이머는 Bionics에서 합성하였고 프라이머의 염기서열은 표 2에 표시하였다.

표 2

[0061]

명명	염기서열
18S rRNA forward	CGT CCC CCA ACT TCT TAG AG (서열번호 5)
18S rRNA reverse	CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC (서열번호 6)
SREBP-1c forward	GGC GCA TGG ATT GCA CAT TT (서열번호 7)
SREBP-1c reverse	GCA GGC TGT AGG ATG GTG A (서열번호 8)
ABCA1 forward	ACA AAG AGC TGG AGC GAC AT (서열번호 9)
ABCA1 reverse	CAG CCA ACT CCT GAA AGG TC (서열번호 10)
FAS forward	TTC CAG GAA GCA CTG TGG CA (서열번호 11)
FAS reverse	AAG ATG ACC CGG CCG TCA AT (서열번호 12)

[0062] 도 4a와 같이, 리간드(T/RA)를 처리할 경우, LXR의 표적 유전자인 SREBP-1c와 ABCA1 모두 mRNA 발현이 증가하였으나, 향부자 헥산 추출물을 같이 처리한 경우, SREBP-1c 발현을 잘 억제하였다. 특히, 향부자 추출물 중 SREBP-1c의 발현은 억제하면서 ABCA1의 발현은 크게 억제하지 않는 것은 헥산 추출물이 유일한 것으로 확인되었다.

[0063] 또한, 여러 농도의 향부자 헥산 추출물을 처리하여 SREBP-1c 발현 억제능을 비교한 결과, 도 4b와 같이 100 μg/ml에서 SREBP-1c 선택적 발현 저해효과가 보였으며, SREBP-1c의 다운스트림 표적의 하나이며 생체 내 지질 합성에 중요한 FAS의 발현도 동일 농도인 100 μg/ml에서 저해되는 것을 확인하였다.

[0064] **<실시예 4> SREBP-1c와 ABCA1 프로모터에 미치는 영향 검토**

[0065] LXR 효능제와 향부자 헥산 추출물을 처리한 마우스 초대배양 간세포의 mRNA 발현을 조사함으로써 향부자 헥산 추출물이 LXR 효능제에 의해 증가한 LXR 표적 유전자 중 SREBP-1c는 억제하지만 또 다른 표적 유전자인 ABCA1은 억제하지 않는 효과를 확인하였다. 이러한 현상의 원인이 향부자 헥산 추출물이 SREBP-1c와 ABCA1 프로모터에서 각각 다르게 작용하고 있기 때문인지, 프로모터 상에 리쿠르트된 LXR 과 TRAP80이 아닌 프로모터 밖의 제 3의 인자에 미친 영향 때문인지를 구별하기 위해서 다음과 같이 루시퍼레이즈 리포터 분석을 수행하였다.

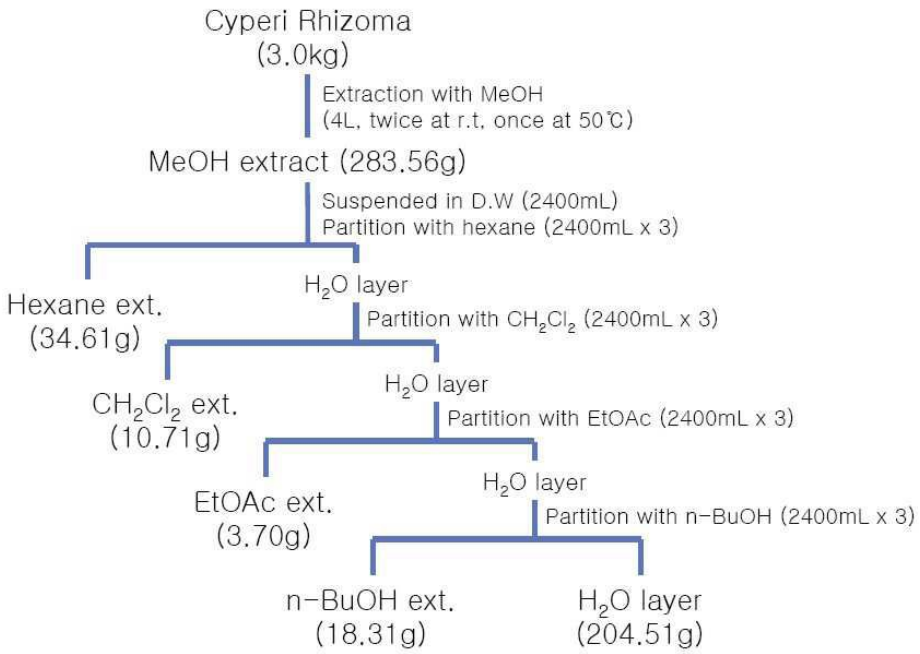
[0066] 리포터로는 pGL3-3XLXRE (synthetic LXRE), pGL3-mSREBP1c (-550/+42), pGL3-hABCA1 (-928/+101)의 3가지를 사용하였다. 24well에 HepG2 세포를 well 당 60% 컨플루언시 하도록 DMEM (10% FBS, 항생제 제외) 배지를 이용하여 분주하였다. 형질감염은 리포펙타민 2000 (11668-027, Invitrogen)을 사용하였으며 제조사의 프로토콜에 준하여 실시하였다. 형질감염 6시간 후 charcoal stripped FBS가 포함된 DMEM 500μL로 배지를 교체하고 다음날 실시예 1에서 준비된 향부자 헥산 추출물을 5, 10, 50 μg/ml로 처리하였다. 16시간 후 배지를 제거하고 라이시스 완충액 100μl에 용해시켜 그 중 10μl를 루시퍼레이즈 리포터 분석에 사용하고, 50μl를 β-갈락토시데이즈 분석에 사용하였다. 루시퍼레이즈 리포터 분석은 루시페린 용액 100μl를 첨가하면서 2초 동안 값을 발광측정기(Luminometer)를 이용하여 측정하였고, β갈락토시데이즈 분석은 2X β-갈락토시데이즈 완충액과 혼합하여 37℃에서 반응하여 420nm에서 ELISA reader로 값을 측정하였다. Normalization은 루시퍼레이즈 활성을 β-갈락토시데이즈 값으로 나누어 주었다.

[0067] 도 5a와 같이, 3XLXRE-luc과 SREBP1c-Luc에서는 5, 10, 50 μg/ml의 향부자 헥산 추출물에 의해 T0901317에 의한 루시퍼레이즈 활성이 저해되는 것을 확인할 수 있었지만, ABCA1-Luc의 경우에는 5 μg/ml의 향부자 헥산 추출물은 루시퍼레이즈 활성을 저해하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

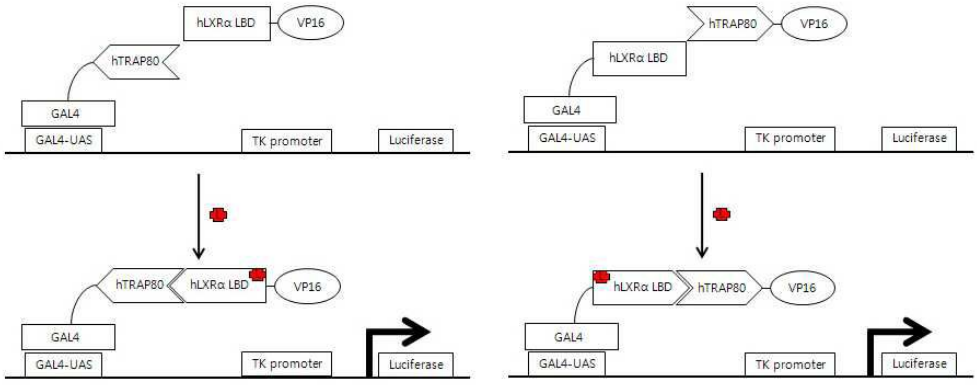
[0068] 이러한 결과는 LXR에 의한 SREBP-1c와 ABCA1 프로모터 활성의 증가에 있어, 향부자 헥산 추출물이 직접적으로 SREBP-1c 프로모터 자체에 선택적으로 억제작용을 하고 있음을 제시하며, 따라서 LXR이 각 유전자의 프로모터에 작용하여 발현을 증가시키게 될 때 향부자 헥산 추출물이 SREBP-1와 ABCA1 프로모터에 서로 다르게 작용한다는 것을 알 수 있다.

도면

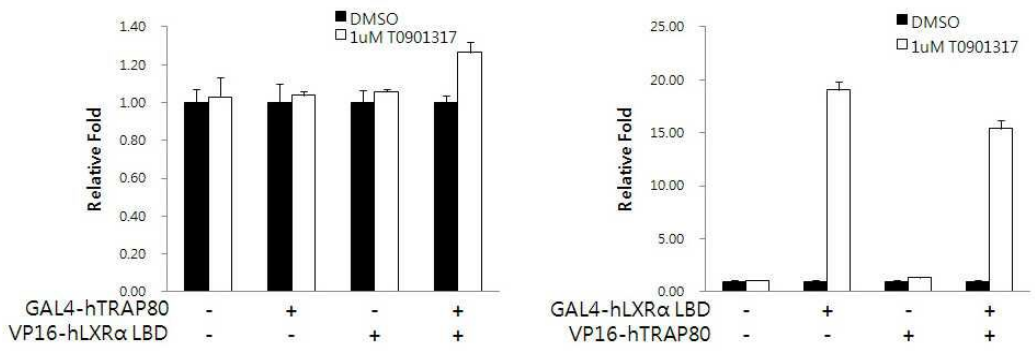
도면1



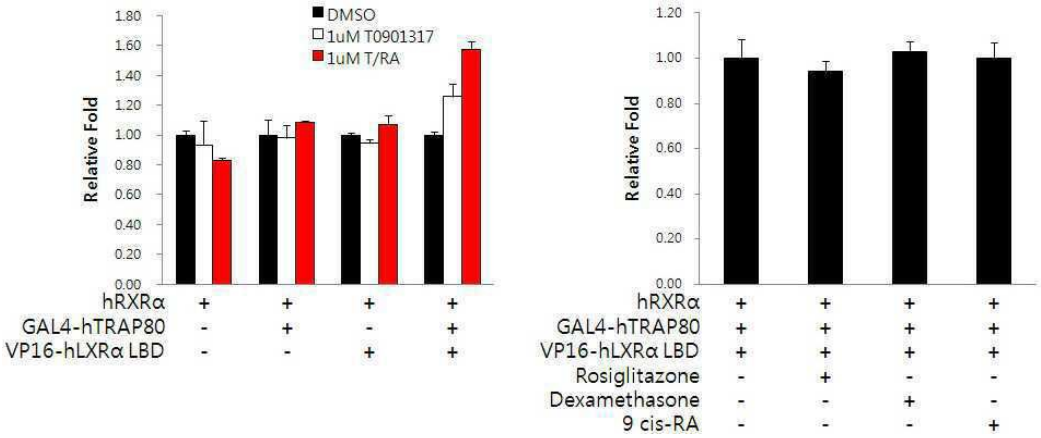
도면2a



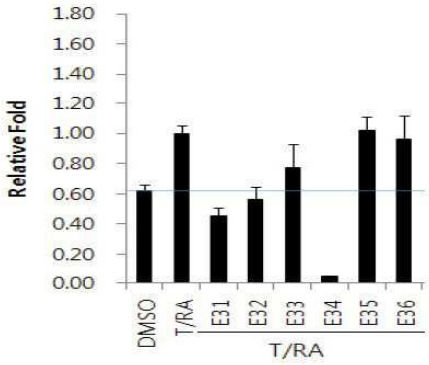
도면2b



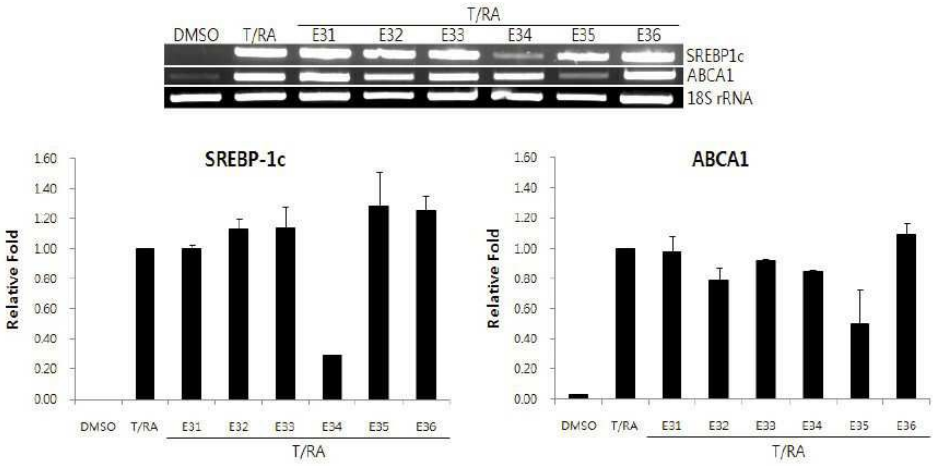
도면2c



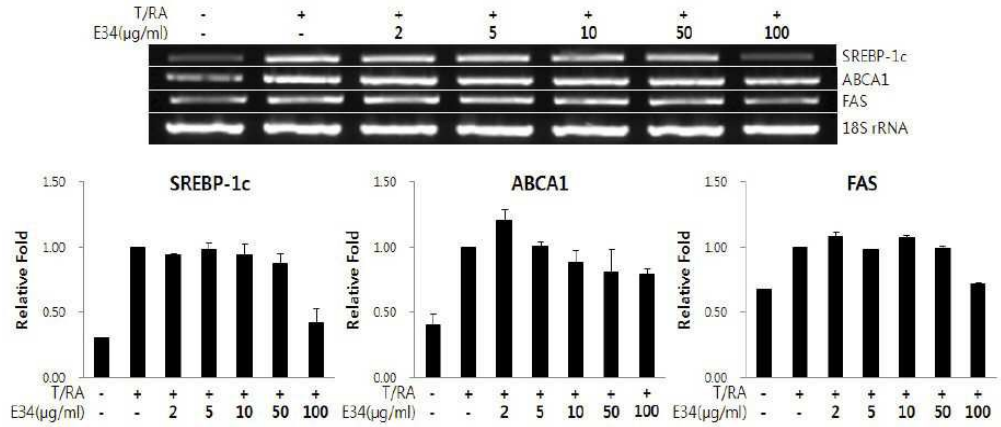
도면3



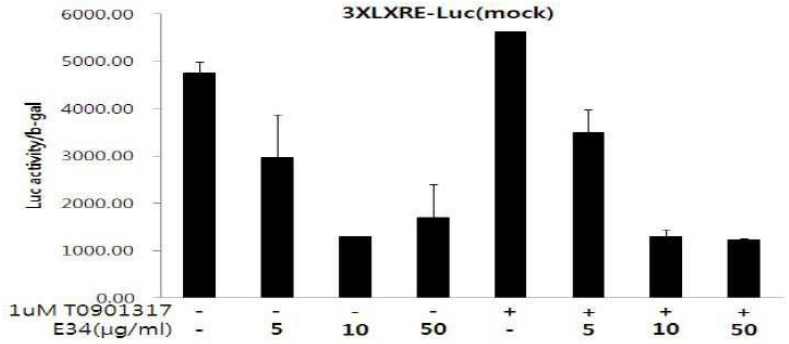
도면4a



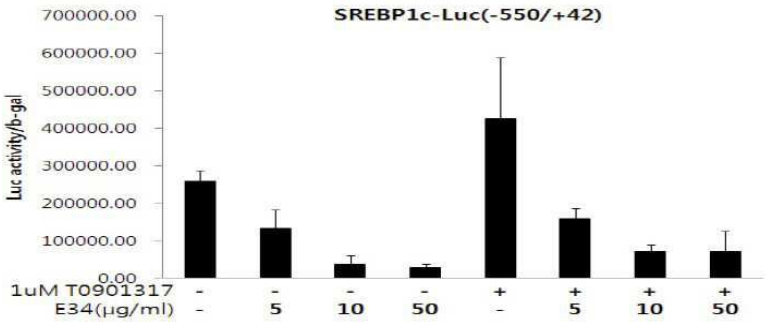
도면4b



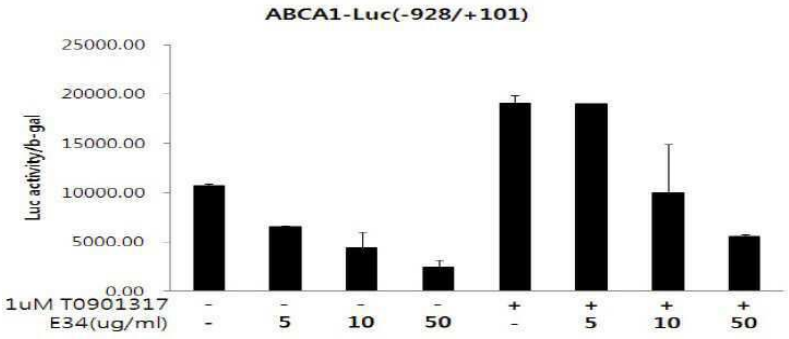
도면5a



도면5b



도면5c



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION

<120> Pharmaceutical composition for treating or preventing non-alcoholic fatty liver disease comprising extract of Cyperi Rhizoma

<130> DP-2010-0745

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Gal4/VP16-hTRAP80

<400> 1

ggggtaccat gtccggggtg 20

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Gal4/VP16-hTRAP80

<400> 2

ctagctagct catagtagac aag 23

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Gal4/VP16-hLXR alpha LBD

<400> 3

ggggtaccgc tggcatgcgg g 21

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Reverse primer for Gal4/VP16-hLXR alpha LBD

<400> 4

ctagctagct cattcgtgca cat 23

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for 18S rRNA

<400> 5

cgtcccccaa cttcttagag 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for 18S rRNA

<400> 6

cacctacgga aaccttgtta c 21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for SREBP-1c

<400> 7

ggcgcatgga ttgcacattt 20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for SREBP-1c

<400> 8

gcaggctgta ggatggtga 19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for ABCA1

<400> 9

acaaagagct ggagcgacat 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for ABCA1

<400> 10

cagccaactc ctgaaaggtc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for FAS

<400> 11

ttccaggaag cactgtggca 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for FAS

<400> 12

aagatgaccc ggccgtcaat 20