(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0128119
(43) 공개일자 2013년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/899 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0051925
(22) 출원일자 2012년05월16일
심사청구일자 2012년05월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
조홍연
서울특별시 성북구 돈암1동 동부센트레빌아파트 103-1002
임원철
경기도 평택시 평택동 185-310 9/1 2층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 10 항

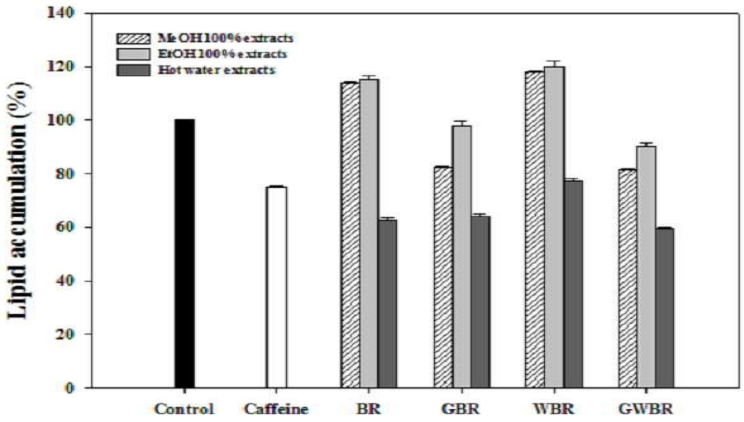
(54) 발명의 명칭 **발아검정찰현미 추출물을 포함하는 항비만 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 비만의 예방, 개선 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 발아검정찰현미 추출물은 우수한 3T3-L1 지방전구세포주의 세포분화 억제 활성 및 지방세포분화에 관여하는 상위 전사인자인 PPAR-γ, CEBP-α, aP2 유전자 발현의 높은 저해를 나타내는바, 비만의 예방, 개선 및 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이진규

경상북도 포항시 북구 장성동 산호그린5차아파트 1413호

박재현

서울특별시 금천구 독산동 중앙하이츠 101-1101

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110026976

부처명 한국연구재단

연구사업명 (이공)일반연구자-기본(유형II)

연구과제명 [2차년도] 흑미의 nutrigenomic 및 proteomic analysis를 통한 항당뇨/항비만용 식품신소재의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

발아검정찰현미 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 및 치료용 의약 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 발아검정찰현미 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는 용매로 추출한 것인 비만의 예방 및 치료용 의약 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 비만은 지방축적형 비만인 비만의 예방 및 치료용 의약 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 발아검정찰현미 추출물은 3T3-L1 지방전구세포주의 세포분화 억제 활성 및 PPAR-γ, CEBP-α, aP2 유전자 발현을 특징으로 하는 비만의 예방 및 치료용 의약 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 발아검정찰현미 추출물은 전체 의약 조성물 대비 0.0001내지 10 중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만의 예방 및 치료용 의약 조성물.

청구항 6

발아검정찰현미 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 발아검정찰현미 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는 용매로 추출한 것인 비만 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 비만은 지방축적형 비만인 비만 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 발아검정찰현미 추출물은 3T3-L1 지방전구세포주의 세포분화 억제 활성 및 PPAR-γ, CEBP-α, aP2 유전자 발현을 특징으로 하는 비만 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제 6항에 있어서,

상기 발아검정찰현미 추출물은 전체 의약 조성물 대비 0.0001내지 10 중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 개선용 식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 3T3-L1 지방전구세포주의 세포분화 억제 활성 및 지방세포분화에 관여하는 상위 전사인자인 PPAR-γ, CEBP-α, aP2 유전자 발현을 특징으로 하는 발아검정찰현미 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 및 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 지방축적형 비만의 예방, 개선 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비만은 에너지의 축적과 소비의 불균형으로 인하여 신체에 지방이 과도하게 축적되어 발생하는 만성 대사성 질환으로서 당뇨병, 고혈압, 심근경색, 암, 관절염 및 뇌졸중 등 다양한 합병증을 유발할 가능성이 높다고 알려져 있다. 국민건강영양조사에 따르면 비만율이 2001년도에는 32.7%에서 2005년도에는 34.9%로, 지방에너지 섭취 비중이 2001년도에는 19.5%에서 2005년도에는 20.3%로, 이는 현대인들의 서구화된 식생활에 따른 육류 등의 고칼로리 음식의 섭취량이 증가함에 따라, 비만인구가 점점 증가하고 있는 추세이다.

[0003] 따라서 비만을 해소하기 위한 방법으로 식이요법, 운동요법, 행동수정요법, 그리고 약물 및 수술요법 등 다양한 방법들이 개발·시도되고 있다. 그 중 대표적인 약물요법으로 미국 FDA에서 승인을 받고 국내외에서 판매되고 있는 비만치료제 '제니칼'(한국로슈)과 '리덕틸'(일성신약)이 있으며, 그 외에도 프랑스에서 개발된 비처방의 약품으로 녹차 카테콜 성분을 주원료로 하는 '엑소리제'(구주제약) 등이 있다. 그러나, 제니칼의 경우 지방변, 가스생성, 지용성비타민 흡수저하 등의 위장계 부작용을 일으키며, 리덕틸의 경우에는 교감신경계의 세로토닌과 노르아드레날린 농도를 증가 시킴으로써 두통, 식욕부진, 불면증 또는 변비 등의 부작용을 일으킴이 보고되어, 부작용 없는 비만 치료제로서는 한계가 존재하여 왔다. 그 외, 지방분해 효과가 알려진 아미노필린은 신경계, 순환기계, 소화기계에 걸친 폭넓은 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있으며, 펜프루라민, 덱스펜플루라민, 토피라메이, 에페드린 및 이소프로테레놀 등도 비만치료 부적합 약물로 판정되어 식품의약품안전청에 의해 현재 판매가 금지된 상태이다.

[0004] 이와 같이 약물요법에 따른 부작용으로 인하여 식품소재를 이용한 항비만 천연물질에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이다. 예를 들어, 지방 및 당류의 흡수율을 낮추는 뽕잎, 췌장 리파제 활성을 억제하는 발효 붉은 고추 그리고 지방 대사 및 지방 연소율을 증강시키는 식품등이 다이어트 건강식품으로 출시되고 있다. 그 외에도 현미와 같은 곡류, 허브 및 다류 등의 식품들이 비만 억제 효능을 갖는 것으로 보고된 바 있다.

[0005] 현미(Oryza sativa)는 도정에 의한 영양분의 손실이 거의 없어 백미에 비해 비타민, 무기질 및 식이섬유가 풍부함에도 불구하고 백미에 비해 소화성이 낮고 식감이 좋지 않아 선호도가 낮다. 최근에는 이를 개선하기 위하여

발아현미, 발아검정현미, 검정찰현미, 발아검정찰현미 제품이 출시되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 발아검정찰현미의 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방, 개선 및 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적 달성을 위하여, 본 발명자들은 천연물로부터 비만의 약리·생리 활성을 띠는 물질을 발굴하고자 연구를 거듭했다. 그 결과, 발아검정찰현미 추출물이 3T3-L1 지방전구세포주의 세포분화 억제 활성을 나타내며, 지방세포분화에 관여하는 상위 전사인자인 PPAR-γ, CEBP-α, aP2 유전자 발현 억제를 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에 본 발명은 발아검정찰현미 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0010] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 사용하는 발아검정찰현미는 적당한 온도와 수분, 산소 등을 공급해 검정찰현미의 싹을 1~5 ㎜까지 발아시킨 것으로 검정찰현미의 영양과 기능을 극대화시키면서 식미는 검정찰현미보다 훨씬 부드러운 유색미이다. 발아검정찰현미는 검정찰현미의 발아 과정에서 세포벽 분해효소의 작용에 의해 검정찰현미 외피가 분해되어 수분흡수가 용이하게 됨에 따라 취반성이 개선되는 것으로 알려져 있다. 발아검정찰현미에는 GABA, 비타민 E, 스쿠알렌(squalene), 시토스테롤(sitosterol), 캄페스테롤(campesterol) 및 스티그마스테롤(stigmasterol) 등이 주요한 구성 성분으로 밝혀져 있고, 탄수화물의 인체 내 소화율 증가, 반영양적 요소의 감소나 제거 등 다양한 기능성 식품 소재로의 활용 연구가 활발히 이루어지고 있다. 한편 생리·약리활성으로는 고혈압 예방, 신경안정 등이 보고되고 있다. 그 이외 발아 중 저장 단백질의 질적 변화, 미량 영양소의 증가, 구성 탄수화물의 인체 내 소화율 증가 및 반영양적 요소의 감소나 제거 등 다양한 기능성 식품소재로의 활용 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0011] 본 발명의 의약 조성물 또는 식품 조성물의 유효성분으로 사용되는 발아검정찰현미 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있다.

[0012] 발아검정찰현미 추출물의 제조를 위해 사용되는 추출용매는 이에 제한되는 것은 아니나, 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는 용매일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산, 디클로로메탄 등의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 예를 들어, 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등으로부터 선택될 수 있다.

[0013] 본 발명에 있어서, 발아검정찰현미 추출물은 상기 추출용매를 이용하여 추출된 1차 추출물을 극성이 다른 추출용매를 이용하여 다시 분획한 분획물을 포함한다. 예를 들어, 발아검정찰현미 추출물은 탄소수 1 내지 5의 알코올로 추출한 후, 에테르, 벤젠, 헥산 등의 극성이 다른 용매로 다시 분획한 분획물 일 수 있다.

[0014] 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0015] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0016] 본 발명의 한 구체예로서, 본 발명에 따른 비만의 예방, 개선 및 치료용 의약 조성물 및 식품 조성물은 지방축적형 비만인 비만의 예방, 개선 및 치료에 사용할 수 있다.

[0017] 비만이란, 일반적으로 살이 찐 상태를 말하며, 체내 지방이 과다하게 축적된 상태를 의미한다. 이와 같은 비만의 종류는 원인, 지방세포의 수와 크기 및 부위에 따라 분류될 수 있다. 특히 지방세포의 수와 크기에 따라, 지방증식형 비만과 지방축적형 비만으로 나뉘는데, 지방증식형 비만은 선천성 요인에 의해 지방 세포 수가 증가하는 비만으로 주로 소아비만에 많으며, 지방축적형 비만은 후천적 요인에 의해 지방세포 속에 지방이 꽉 차서 지방세포의 크기가 커지는 형태로 주로 성인비만에 많다. 지방세포의 수는 일단 늘어나면 일생 동안 변하지 않고 그 수는 줄지 않기 때문에, 지방 축적형 비만은 치료가 매우 어려운 중증 비만으로 분류된다.

[0018] 한편, 지방세포는 중성지방(triglyceride, TG)의 형태로 에너지의 합성, 저장 및 분해하는데 중심적인 역할을 한다. 즉, 과잉 열량 시 중성지방의 형태로 저장해 두었던 열량을 열량소모가 많을 때 이를 분해하여 에너지로 사용하도록 하는 것이다. 이렇게 지방세포가 에너지 밸런스를 유지하는 데는 지방 합성(lipogenesis) 및 지방분해(lipolysis)에 관여하는 많은 다양한 효소 및 조절인자들이 필요하고, 비만의 주요 원인은 상기와 같은 효소들에 의한 체내 밸런스 유지의 실패에 의해 일어나게 되며, 이는 지방조직의 과도한 체내 축적을 야기하게 된다.

[0019] 지방조직은 해부학적 위치, 형태학적 구조, 기능 및 조절에 따라 크게 백색지방(white adipose tissue, WAT)과 갈색지방(brown adipose tissue, BAT)으로 분류할 수 있다. 이들 두 지방조직은 주로 중성지방(triglycerides) 상태로 에너지를 저장하는 공통점이 있으나 백색지방의 경우에는, 필요에 따라 이 에너지를 배출하고, 갈색지방의 경우에는 이 에너지원을 열로 전환 시킨다. 갈색지방은 백색지방에 비해 많은 혈관이 분포되어 있고 사이토크롬 색소로 인하여 갈색을 띄게 되며, 특히 동면동물이 동면할 때나 새로 태어난 포유동물의 체온 조절에 중요한 역할을 담당한다. 이에 반해 백색지방은 체내 에너지 항상성 유지에 중추적 역할을 담당하는데, 구체적으로는 에너지 흡수량이 소비량에 비해 많은 경우 이를 중성지방의 형태로 저장하고, 에너지가 부족한 경우 에너지원을 이용할 수 있도록 조절하는 역할을 담당한다. 이와 같이 상기 두 지방세포의 분포 및 기능이 상이하며 특히, 통상적으로 지방세포라고 부르는 백색지방세포는 주로 피하와 장기 주위에 고루 퍼져 있으며 연료의 저장고와 같은 역할을 하므로 비만과 더 밀접한 연관성이 있다.

[0020] 본 발명의 발아검정찰현미 추출물이 상기 두 지방조직 중 특히, 과도한 에너지 흡수 결과 중성지방의 형태로 저장하는 역할을 하는 백색지방 조직 내 지방 축적형 비만의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0021] 또한 본 발명의 한 구체예로서, 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 발아검정찰현미 추출물은 3T3-L1 지방전구세포주의 세포분화 억제 활성을 나타내며, 지방세포분화에 관여하는 상위 전사인자인 PPAR-γ, CEBP-α, aP2 유전자 발현 억제를 나타내고, 또한 천연 소재이기 때문에 부작용이 없고, 안전성이 매우 높으므로 안전하면서도 효과적으로 비만을 예방, 개선 및 치료할 수 있다.

[0022] 본 발명에서의 용어, "성숙 지방세포"란, 지방세포의 분화 과정에서 생성된 완전한 지방세포의 형태를 의미하며, 구체적으로는 줄기세포가 지방전구세포(pre-adipocytes)로 된 다음, 상기 지방전구세포가 완전한 지방세포(adipocytes)로 성숙하게 되는 과정을 거쳐 생성된다.

[0023] 본 발명에서의 용어, "지방전구세포"란, 지방세포의 분화단계 중 줄기세포로부터 가장 먼저 생성되는 지방세포로의 분화능을 갖는 세포를 의미하며, 지방전구 세포는 성장이 진행되어 100% confluency가 되면 성장이 정지되고 지방세포로의 분화가 서서히 진행된다. 지방전구 세포가 지방세포로 분화되는 과정은 배양액에 첨가한 혈청 중의 분화유도인자들에 의해 일어나는 현상이다. 그러므로 배양액 중에 분화촉진인자들 (인슐린, 덱사메타손(dexamethasone), 3-isobutyl-1-methylxanthine)을 첨가함으로써 세포분화를 더욱 촉진시킬 수 있으며, 반대로 분화억제인자들 (actinomycin D, tumor necrosis factor a, bromo deoxyuridine 등)을 첨가함으로써 분화를 억제할 수도 있다. 최종적으로 분화된 지방전구 세포는 세포 내 지방이 축적되는 등의 성숙 지방세포로서의 형태를 나타내게 되며, 지방세포 특유의 유전자 발현 및 지방축적을 유도하는 효소의 활성화가 일어나게 된다. 지금까지 알려진 대표적인 지방세포 분화촉진인자들로는 인슐린과 인슐린-유사 성장인자-I(insulin-like growth factor-I, IGF-I)등이 있다.

[0024] 본 발명에서의 용어, "PPAR-γ(peroxisome proliferator activated receptor-γ)"란, PPARs(peroxisome

proliferator activated receptors)인 핵수용체(nuclear hormone receptor) 수퍼 패밀리(superfamily)에 속하는 것으로, PPARα, PPARɣ 및 PPARδ 등이 상기 수퍼패밀리에 포함되며 지방세포 분화 조절 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

[0025] 본 발명에서의 용어 "aP2(adipocyte protein 2)"란, 지방세포 특이적인 지방산 결합 단백질(fatty acid binding protein 4)로서 지방세포에서 PPARɣ에 의해 발현이 유도되고, PPARɣ와 마찬가지로 지방세포 분화 유도 과정에서 기능하는 유전자로 알려져 있다.

[0026] 본 발명에서의 용어 "CEBP(CCAAT enhancer binding protein)"란, basic-leucine zipper motif를 가진 전사인자 가운데 하나로, 이들은 지방세포에 한정되어 발현되지는 않으며, 과립구(granulocyte)나 간세포에서도 발현하여 상기 세포들의 최종분화에 중요한 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다.

[0027] 이와 같이 상기 전사인자들은 지방전구세포(preadipocyte)가 증식 및 분화되는 과정을 거쳐 성숙한 지방세포(adipocyte)로 되는 과정인 지방세포분화(adipogenesis)에 관여하는 일련의 유전자 발현을 조절하는 역할을 하는데, 특히, CEBP 패밀리와 PPARɣ는 호르몬에 의해 지방세포분화가 유도되는 과정에서 중요하게 작용하는 전사인자로, 지방세포분화를 총괄적으로 조절하는 역할을 하며, 지방세포로 분화된 상태를 유지하는데 필수적인 인자이다. 또한, CEBPβ는 PPARɣ발현을 촉진시켜 지방전구세포의 초기 분화과정에서 중요한 역할을 하는 한편, PPARɣ와의 강한 상승작용을 통해 지방전구세포의 말기 분화과정을 촉진하는 역할을 한다.

[0028] 본 발명의 발명자들은 발아검정찰현미 추출물의 지방축적 억제효과를 확인하기 위하여 지방전구세포주인 3T3-L1 세포를 성숙 지방세포로 분화시키고, 발아검정찰현미 추출물을 농도별로 성숙한 지방세포에 처리한 결과, 발아검정찰현미 추출물이 대조군으로 사용된 발아검정찰현미 추출물을 넣지 않은 것과 양성 대조군으로 사용된 카페인 및 검정현미, 발아검정현미, 검정찰현미 등에 비하여 높은 지방축적 억제능을 가짐을 확인하였다.(실시예 1, 2,3 및 도1, 2, 3) 또한, 발아검정찰현미 추출물의 지방전구세포의 분화 억제 활성 효과를 확인하기 위하여, 지방전구세포의 분화 인자인 PPAR-ɣ(peroxisome proliferator activated receptors-ɣ), CEBP-β(CCAAT enhancer binding protein-β), SREBP1c(sterol regulatory element binding protein 1c) 및 aP2(adiopcyte protein 2)의 발현을 확인한 결과, 상기 유전자 모두의 발현이 감소됨을 확인하였으며, 이로부터 발아검정찰현미 추출물이 지방전구세포의 분화 억제 활성을 가짐을 확인하였다(실시예 4, 5, 6 및 도 4, 5, 6). 바람직하게 본 발명은 PPAR-ɣ, CEBP-β 및 aP2로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 발현 억제를 측정하되, 상기 세 종류의 인자 중 어느 둘 이상 또는 전부의 발현 양상을 확인함으로써 지방전구세포의 분화 억제 효과를 확인할 수 있다. 또한, 이러한 발현 양상은 순차적으로 또는 동시에 수행할 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 한 구체예에서, 본 발명은 발아검정찰현미 추출물을 전체 조성물 대비 0.0001 내지 10 중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만의 예방 및 치료용 의약 조성물 또는 비만 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0030] 한편, 본 발명에 따른 의약 조성물 및 식품 조성물의 함량은 조성물의 종류, 제형 및 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 유효 성분 및 종류 및 함량 등 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 일률적으로 규정할 수 없지만, 상기 의약 조성물은 발아검정찰현미 추출물을 전체 조성물 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%, 보다 구체적으로 0.001 중량% 내지 1 중량%로 포함할 수 있다. 식품 조성물의 경우에는 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 과립, 정제 또는 캡슐형태의 식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량% 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 발아검정찰현미 추출물은 우수한 3T3-L1 지방전구세포주의 세포분화 억제활성과 지방세포 분화와 관련하여 상위 전사인자인 PPAR-ɣ, CEBP-α, aP2 유전자 발현의 높은 저해를 보이며, 지방 축적 억제에 우수한 효과를 보여줌으로써, 비만의 예방, 개선 또는 치료를 위한 유효성분으로서 활용가치가 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 발아검정찰현미 용매별 추출물의 지방세포 내 지방축적 저해활성을 보인 도표

도 2는 발아검정찰현미 열수추출물의 농도별 지방세포내 지방축적 저해활성을 보인 도표

도 3은 발아검정찰현미 열수추출물의 농도별 지방축적저해활성을 보인 현미경 사진

도 4는 발아검정찰현미 열수추출물의 PPAR-γ mRNA 발현 억제 활성을 보인 도표

도 5는 발아검정찰현미 열수추출물의 CEBP α mRNA 발현 억제 활성을 보인 도표

도 6은 발아검정찰현미 열수추출물의 aP2 mRNA 발현 억제 활성을 보인 도표

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0034] **실시예 1: 발아검정찰현미로부터 용매별 추출한 추출물의 지방축적 저해능**

[0035] 검정현미, 발아검정현미, 검정찰현미, 발아검정찰현미를 대상으로 에탄올 100%, 메탄올 100%, 물을 사용하여 가열환류방법으로 추출한 추출물 12종에 대한 성숙지방세포 내에서의 지방축적 저해활성을 검토하였다. 이를 위해 지방전구세포주인 3T3-L1 (mouse embryo fibroblast cell line)을 $2x10^5$ cells/well의 농도로 6 well-plate에 배양, 100% confluency 도달 후 2일 간 추가로 배양한 다음, 성숙지방세포로 분화시키기 위해 원배지를 제거하고, 0.5 mM 3-isobutyl- 1-methylxanthine (IBMX), 0.1 uM dexamethasone (DEX), and 1 ug/ml insulin (INS), 10% fetal bovine serum (FBS)가 첨가된 DMEM에 상기 검정현미 12종 추출물을 0.1 mg/ml의 농도로 첨가하여 37℃, CO_2 incubator에서 48시간 배양시켰다. 48시간째 다시 원배지를 제거한 후 1 ug/ml INS, 10% FBS가 첨가된 DMEM에 추출물을 0.1 mg/ml의 농도로 첨가하여 37℃, CO_2 incubator에서 48시간 배양시켰다. 다시 배지를 제거한 후 10% FBS가 첨가된 DMEM을 37℃, CO_2 incubator에서 48시간 배양시킨 후 다시 원배지를 제거하고 10% FBS가 첨가된 DMEM을 37℃, CO_2 incubator에서 48시간 배양시켰다. 대조구는 추출물을 첨가하지 않았으며, 양성 대조군으로 추출물 대신에 caffeine 0.1 mg/ml을 처리하였다. 추출물 처리 후 8일째 배양 된 세포를 Oil red O staining 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 배양액을 완전히 제거한 후, PBS로 2회 세척하고 10% formalin 용액을 400 ul/well로 첨가하여 세포를 고정시키기 위해 1시간 동안 방치시켰다. 이 후 PBS로 세척하고 Oil red O working solution을 400 ul/well당 첨가하여 2시간 동안 분화된 지방세포내의 지방을 염색시켰다. 이 후 Oil red O working solution을 제거하고 2차 증류수를 사용하여 well의 기벽에 묻어있는 Oil red O working solution을 완전히 세척한 후, 건조기에 넣고 5분간 건조시키고, well에 isopropyl alcohol 500 ul을 첨가한 다음 micro plate reader (Model 680 microplate reader, Bio-Rad, USA)을 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지방축적능은 다음의 식에 의해 구하였다.

[0036] Lipid accumulation (%) = [(Sample O.D - Blank O.D)/ (Control O.D - Blank O.D)]× 100

[0037] 도 1에 나타난 바와 같이, 추출물을 처리하지 않은 대조구(control)의 지방축적능을 100%로 하여 비교하였을 때, positive control인 caffeine(0.1 mg/ml 처리)의 지방축적능은 75%이었고, 검정현미(BR)의 MeOH 100%, EtOH 100%, 열수 추출물의 지방축적능은 각각 114%, 115%, 62%, 발아검정현미(GBR)의 MeOH 100%, EtOH 100%, 열수 추출물의 지방축적능은 각각 82%, 98%, 64%, 검정찰현미(WBR)의 MeOH 100%, EtOH 100%, 열수 추출물의 지방축적능은 각각 118%, 120%, 77%, 발아검정찰현미(GWBR)의 MeOH 100%, EtOH 100%, 열수추출물의 지방축적능은 각각 82%, 90%, 59%이었다. 이 결과들로부터 발아검정찰현미 열수추출물이 대조구 대비 약 40%, positive control인 caffeine 대비 약 15%의 높은 지방축적 저해효과를 보였음을 확인하였다.

[0038] **실시예 2: 발아검정찰현미 열수추출물의 농도별 지방축적 저해능**

[0039] 발아검정찰현미 열수추출물에 대한 성숙지방세포 내에서의 지방축적 저해활성을 농도별로 검토하기 위해 추출물

을 1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml로 처리하고 실시예 1의 방법과 같이 동일하게 지방세포를 분화시켰다. 그 결과 도 2에서와 같이 positive control의 지방축적능은 73%, 발아검정찰현미 열수추출물의 지방축적능은 각각 53%, 60%, 68%, 93%를 보임으로써 농도의존적으로 지방축적을 저해함을 확인하였고, positive control인 caffeine보다 5% 내외의 높은 지방축적 저해능을 확인하였다.

[0040] **실시예 3: 발아검정찰현미 열수추출물의 농도별 지방축적 저해능을 나타낸 현미경 관찰**

[0041] 발아검정찰현미 열수추출물의 농도별 지방축적 저해능을 현미경으로 관찰하기 위해 실시예 2의 방법과 같이 지방세포를 분화시켰다. 8일간 배양 된 세포를 Oil red O staining 방법을 사용하여 염색한 후 지방세포를 관찰한 결과 붉은색으로 염색된 지방의 면적이 발아검정찰현미 열수추출물의 처리 농도에 따라 농도의존적으로 감소됨을 관찰할 수 있었다.

[0042] A: Control

[0043] B: Caffeine 0.1 mg/ml

[0044] C: GWBR 열수 추출물 1.0 mg/ml

[0045] D: GWBR 열수 추출물 0.5 mg/ml

[0046] E: GWBR 열수 추출물 0.1 mg/ml

[0047] F: GWBR 열수 추출물 0.01 mg/ml

[0048] **실시예 4 : 발아검정찰현미 열수추출물의 지방세포 분화 관련 전사인자의 발현 억제**

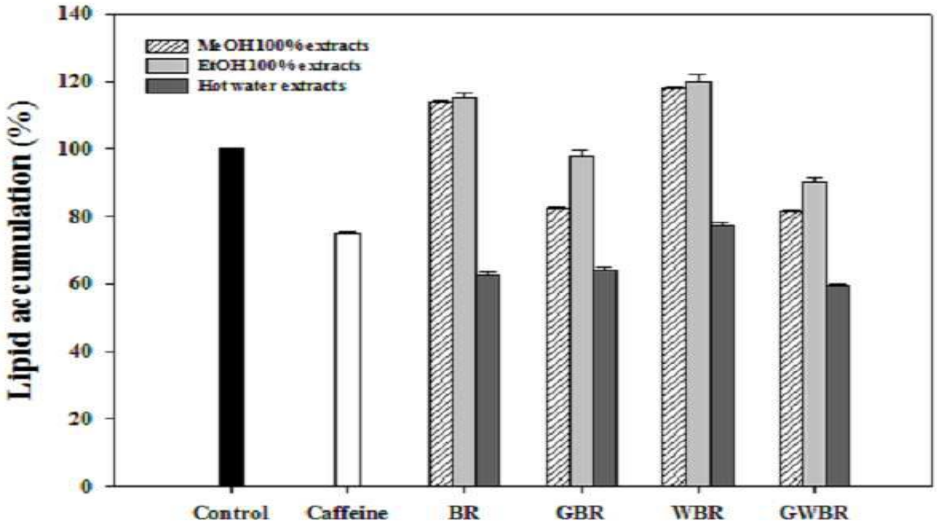
[0049] 실시예 2에서와 같이 발아검정찰현미 열수추출물을 농도별로 처리, 배양하여 얻은 세포로부터 RNA을 추출한 후 지방세포분화에 관여하는 상위 전사인자인 PPAR-γ, CEBP-α, aP2를 대상으로 reverse transcraptase-PCR(RT-PCR)을 아래와 같이 실시하고 아가로즈(agarose) 전기영동에 의해 발현 정도를 비교하였다.

[0050] 즉, 분화된 세포의 RNA를 추출하기 위해 배양세포를 PBS로 두 번 세척한 후, TRIzol과 클로로포름을 가하여 혼합하고 원심분리하였다. 가장 위층인 RNA를 분리한 후 이소프로필알코올로 RNA를 침전시키고 원심분리하여 얻은 침전물을 75% DEPC-ethanol로 용해시키고 원심분리한 다음 침전 RNA를 0.1% DEPC 증류수로 용해시켜 RNA를 추출하였다. cDNA 합성하기 위해 동일량의 $Oligo(dT)_{15}$ primer와 random hexamers, 추출한 RNA, RNase-free 증류수를 혼합한 후 가열 냉각한 다음 5X first-strand 완충액, dNTP mix, DTT 및 reverse transcriptase를 첨가하고 42℃에서 90분, 70도에서 15분간 반응시켜 합성하였다. 합성한 first-strand cDNA (DNA templet), Taq DNA polymerase, dNTP, 10XPCR buffer, forward primer, reverse primer을 PCR tube에 넣고 혼합하였다. 95℃에서 5분간 pre-denature시킨 후, 95℃에서 30초간 denaturing과 50~65℃에서 30초간 annealing을 40 cycles 실시한 다음 최종적으로 72℃에서 30분간 extension시켰다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가된 2.5% agarose gel에서 100 V로 일정시간 전기영동한 후 자외선광으로 발현 정도를 확인하고, 밴드의 강도를 Gelpro 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다. 이 때 내부 표준물질로써 β-actin을 사용하였다.

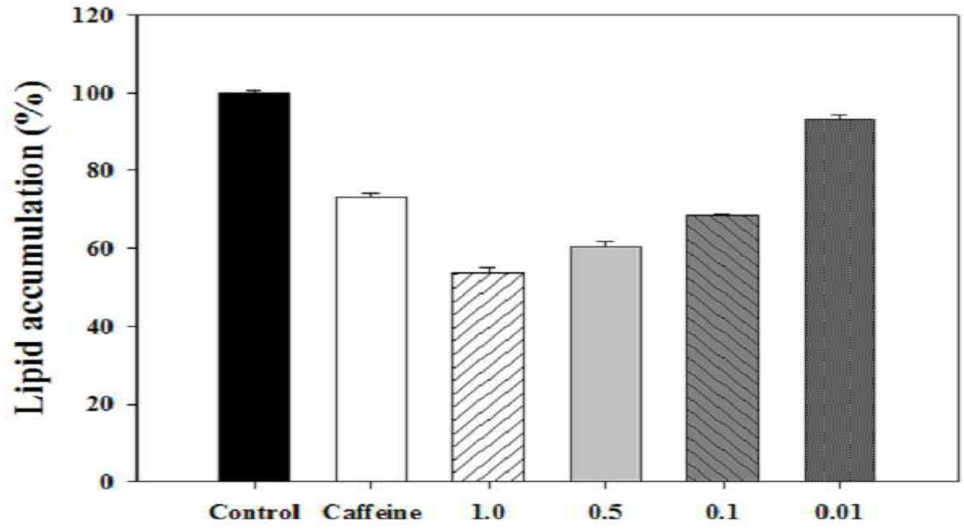
[0051] 도 4~6에서와 같이 추출물을 처리하지 않은 대조구를 100%로 기준하여 비교하였을 때, PPAR-γ(도 4)의 경우 caffeine은 74%, 발아검정찰현미 열수추출물은 1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml의 농도 처리 시 각각 12%, 19%, 70%, 96%의 발현률을 나타내었다. 도 5의 CEBP-α의 경우 caffeine은 86%, 발아검정찰현미 열수추출물은 1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml의 농도 처리 시 각각 20%, 53%, 71%, 100%의 발현률을 나타내었고, 도 6의 aP2의 경우 caffeine은 74%, 발아검정찰현미 열수추출물은 1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml의 농도 처리시 각각 38%, 47%, 77%, 87%의 발현률을 나타내었다. 이 결과들로부터 발아검정찰현미 열수추출물은 지방세포 분화에 관련된 전사인자들을 농도의존적으로 down regulation 시킴과 동시에 positive control인 caffeine과 유사한 발현 억제능을 보임으로써 발아검정찰현미 열수추출물의 지방세포분화 및 지방축적 저해활성의 기전을 유전자 발현 수준에서 규명할 수 있었다.

도면

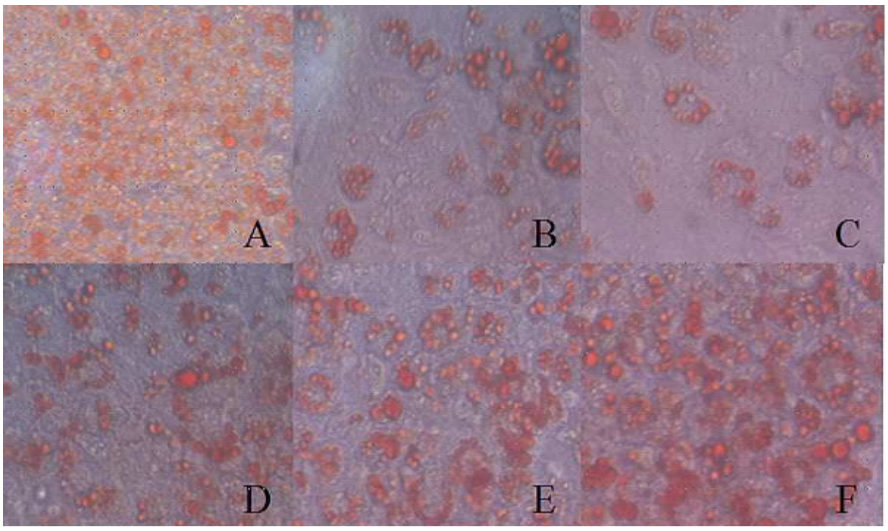
도면1


MeOH100% extracts
EtOH100% extracts
Hot water extracts
Lipid accumulation (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
Caffeine
BR
GBR
WBR
GWBR

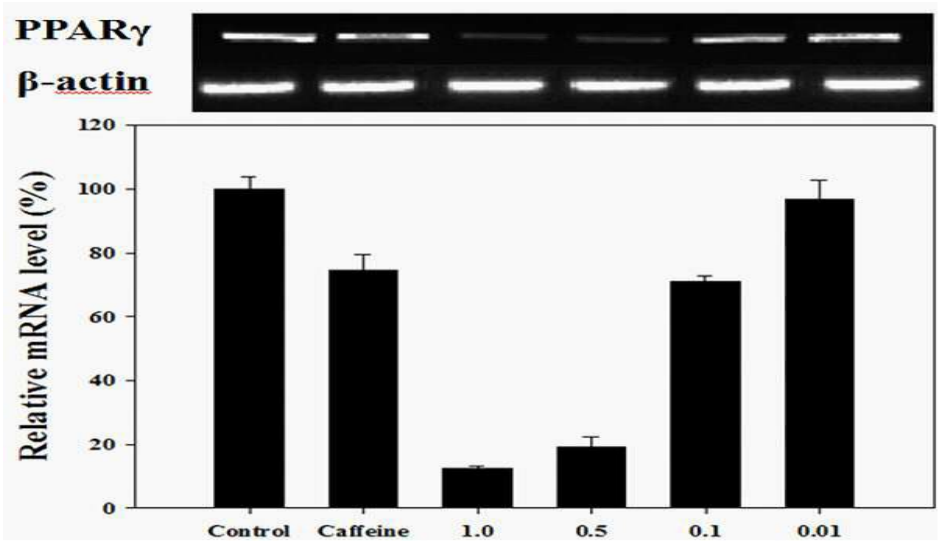
도면2


Lipid accumulation (%)
120
100
80
60
40
20
0
Control
Caffeine
1.0
0.5
0.1
0.01

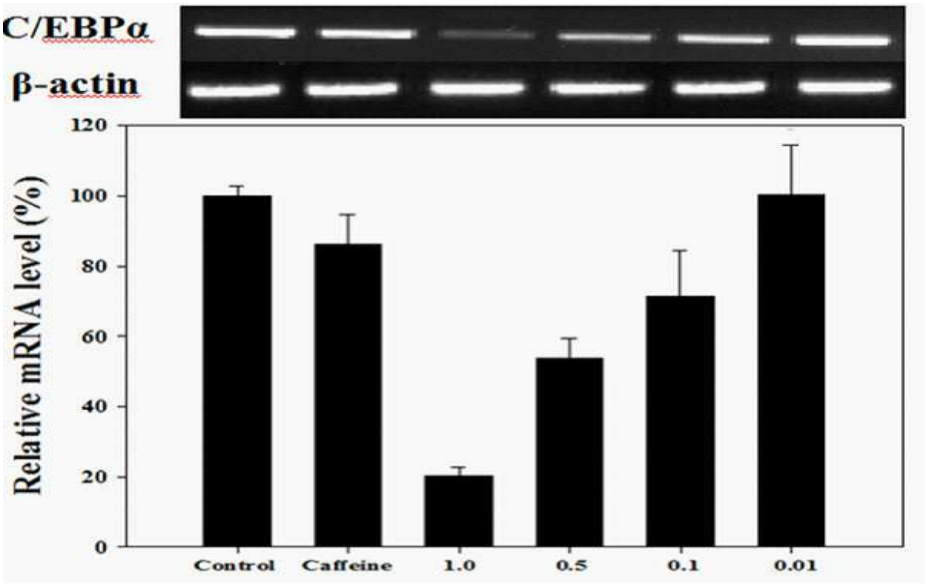
도면3


A
B
C
D
E
F

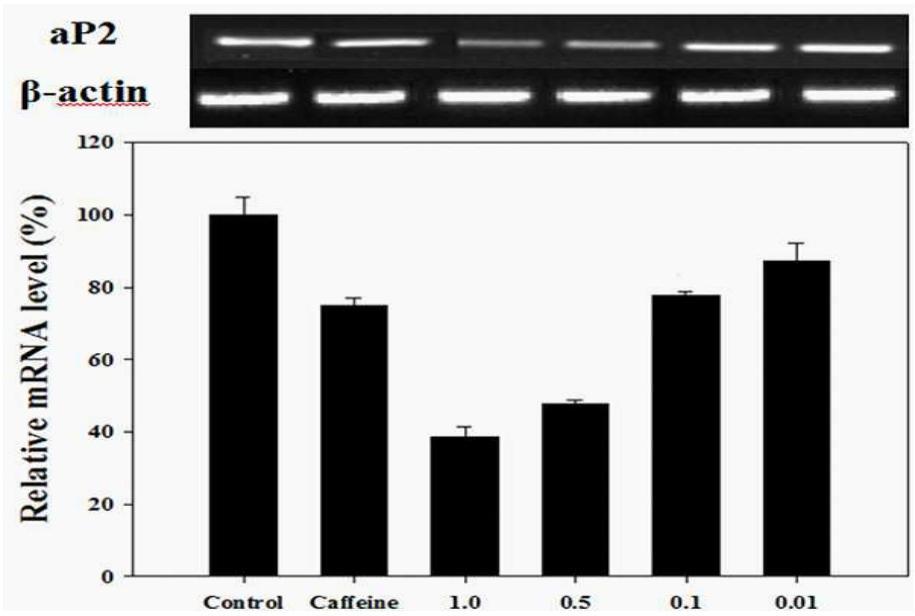
도면4


PPARγ
β-actin
Relative mRNA level (%)
120
100
80
60
40
20
0
Control
Caffeine
1.0
0.5
0.1
0.01

도면5


C/EBPα
β-actin
Relative mRNA level (%)
120
100
80
60
40
20
0
Control
Caffeine
1.0
0.5
0.1
0.01

도면6


aP2
β-actin
Relative mRNA level (%)
120
100
80
60
40
20
0
Control
Caffeine
1.0
0.5
0.1
0.01