(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년08월26일
(11) 등록번호 10-0914213
(24) 등록일자 2009년08월20일

(51) Int. Cl.
A61K 31/231 (2006.01) *A61K 31/235* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0045406
(22) 출원일자 2008년05월16일
심사청구일자 2008년05월16일
(56) 선행기술조사문헌
KR100665315 B1
JP2000247965 A
전북대학교 박사학위 논문(이나영, 2007. 2.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
조철훈
대전 유성구 어은동 한빛아파트 127-803
송현파
광주 서구 금호동 시영아파트 305-1516
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 조명선

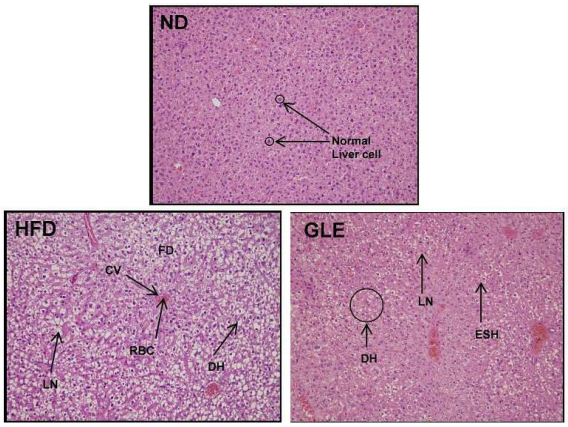
(54) 고지혈증 및 비만 억제효과를 갖는 조성물

(57) 요 약

본 발명은 하기 octadeca-9,12-dienyl-3,4,5-trihydroxybenzoate(GLE)를 유효성분으로 함유하는 고지혈증 또는 비만 예방 및 치료용 조성물 및 이를 함유하는 건강식품에 관한 것이다.

본 발명의 조성물 및 이를 함유하는 건강식품은 간과 지방조직에 지방 축적을 감소시켜 체중 증가 및 간의 비대화를 억제하고, 혈중 총 콜레스테롤, 중성 지방 및 저밀도 콜레스테롤의 증가를 효율적으로 억제하여 고지혈증과 같은 심혈관계 질환 및 비만의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

장애라

경기 부천시 오정구 원종2동 서원빌라 401호

김경수

광주 남구 진월동 삼익아파트 201-1505

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R01-2007-000-10753-0

부처명 한국과학재단

연구사업명 특정기초연구사업

연구과제명 Octadeca-9,12-diphenyl-3,4,5-hydroxybenzoate의생리기능성 평가 및 이를 이용한 고급 가금육 및 계란 생산응용

주관기관 충남대학교

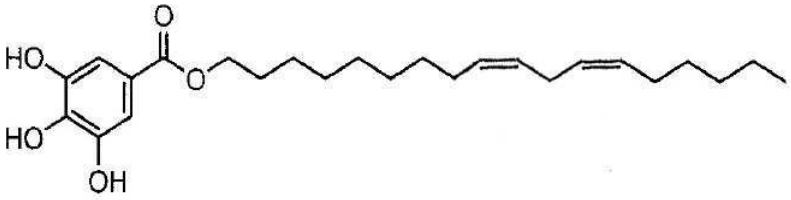
연구기간 2007. 3. 1~2010. 2. 28

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표기되는 옥타데카-9,12-디에닐-3,4,5-트리히드록시벤조에이트(octadeca-9,12-dienyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, GLE)를 유효성분으로 함유하는 고지혈증 또는 비만 예방 및 치료용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제 1 항의 제조한 고지혈증 또는 비만 예방 및 치료용 조성물이 첨가된 것을 특징으로 하는 기능성 건강식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 중성지방, 총콜레스테롤 및 저밀도 콜레스테롤의 증가를 효율적으로 억제하여 고지혈증과 같은 심혈관계 질환 또는 비만을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 조성물과 이를 함유하는 건강 식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 식생활의 다양화 및 서구화로 인해 고칼로리 음식 및 동물성 식품의 섭취가 증가됨에 따라 1970년 총 열량의 7.3%에 불과했던 지방섭취량이 1995년에는 18.8%로 급증하면서 비만, 당뇨병과 같은 성인병이 늘어나고 있다. 비만은 에너지 섭취가 소비보다 많아 과잉된 칼로리가 지방조직에 축적되어 대사성 불균형이 장기간 지속되는 것으로 고지혈증, 고혈압, 당뇨병, 심근경색증, 지방간 등과 같은 성인병 발생의 위험 인자로 작용한다. 2001년 대한민국 통계청 자료에 의하면, 사망자 사망원인의 순위는 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨 및 간질환 순으로 나타났다. 특히 심혈관계 질환, 뇌혈관 질환, 동맥경화증, 혈전증과 같은 순환기계 질환이 주요 사망원인으로 손꼽히고 있으며, 순환기계 질환으로 인한 사망자중 42%가 비만인 것으로 보고되어 있어 비만은 성인병 발생에 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다. 즉, 현대인들의 고칼로리, 고지방 섭취는 혈중의 콜레스테롤 함량을 증가시킴으로써 동맥의 플라그 형성을 촉진하여 심혈관계 질환의 발생을 증가시킨다고 볼 수 있다. 따라서 혈액에서 이들 지질 수준을 저하시키기 위한 의약품이나 자연식품에 대한 연구가 많이 수행되고 있으며, 항비만 효과를 나타내는 식품 소재를 발굴하려는 연구가 국내외에서 활발하게 진행되고 있다.

<3> 한편, 고지혈증(hyperlipidemia)은 소장에서의 중성지방(triglyceride)의 흡수와 유미지립(chylomicron)의 분비증가, 간장에서의 중성지방의 합성증가, 초저밀도 지방단백질(very low density lipoprotein, VLDL)과 저밀도 지방단백질(low density lipoprotein, LDL)의 합성 및 분비증가, 고밀도 지방단백질(high density lipoprotein, HDL)의 합성 감소 및 리파아제(lipase)의 활성감소로 인한 말초조직에서의 중성지방의 제거 감소에 기인하는 것으로서, 혈장 내에 콜레스테롤(cholesterol)이나 중성지방이 비정상적으로 증가된 상태를 의미한다. 특히 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia)은 심장에서 체내 각 부위로 산소와 영양분을 운반하는 동맥의 혈관벽이 두꺼워지는 죽상 동맥경화증(atherosclerosis)을 유발하여 혈류량을 감소시키고, 허혈성 심장질환과 협심증 및 심근경색의 주요 원인이 되어 임상적으로 중요한 문제가 되고 있다.

<4> 고지혈증을 치료하기 위하여 콜레스티라민(chloestyramine) 등과 같이 장내에서 담즙산의 재흡수를 억제하는 담즙산 결합수지제(bile acid sequestrants), 콜레스테롤의 합성을 직접적으로 억제하는 로바스타틴(lovastatin)과 같은 HMG-CoA reductase 저해제 및 혈액내 중성지방의 농도를 낮추는 gemfibrozil 등과 같은 피부린산 과유도체 등의 약물들이 개발되어져 널리 이용되고 있다. 그러나 이러한 약물들은 장기 복용 시 지용성 비타민 결

핍증, 간기능 저하 및 신장 기능 저하 등의 부작용을 동반하여 약물요법의 적용에 제약이 있다. 이로 인하여, 일반적으로 고지혈증의 치료는 식이요법 또는 생활요법에 일차적으로 의존하는 경우가 많다. 식이요법은 콜레스테롤 함량이 높은 음식이나 포화지방(동물성 지방)의 섭취를 억제하고, 특히 비만환자의 경우에는 총 열량 섭취를 줄이며, 체내 콜레스테롤을 줄일 수 있는 음식을 섭취하는 방법이 대표적으로 이용된다. 식물섬유, 어류, 화분류, 영지, 인삼 및 saponin류 등은 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 것으로 보고된 대표적인 음식물이다.

<5> 갈산(Gallic acid)은 차, 적포도주, 과일 및 약용식물에 다량 존재하는 탄닌산(tannic acid)의 구조적 단위로서 항산화작용, 항암작용 및 항고혈압 작용이 있는 것으로 보고되어 있다. 그러나 갈산은 또한 세포독성이나 피부 트러블을 야기하는 것이 알려져 있어 갈산 자체의 사용에는 제약이 따른다. 이에 반해 갈산의 에스터는 인체에 무해하여 프로필 에스터의 경우에는 항산화제 및 보존제로서 식품, 의약품 및 화장품 등에 첨가제로서 FDA의 승인을 받아 1948년 이래 사용되고 있다. 최근 Wacher 등(미국 특허 6180666)은 프로필 갈레이트, 라우릴 갈레이트, 옥틸 갈레이트와 같은 갈산의 에스터는 약학적 유효성분과 함께 복용했을 때 약물의 단독 복용시에 비해 생물학적 이용가능성(bioavailability)을 증가시킨다고 보고하였다.

<6> 한편, 리놀레산(linoleic acid, LA)은 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-1β(IL-1β) 및 암괴사인자(TNF)-α의 분비를 감소시키는 것에 의해 염증을 억제하는 효과가 있다. 또한 리놀레산의 이성체인 공액 리놀레산(conjugated linoleic acid(CLA))은 동물의 피부암 및 유방암 발생 실험을 통해 강한 항암물질임이 증명되어 천연 항암물질로 분류되고, 항암기작에 대해 많은 연구가 진행되고 있다.

<7> 리놀레산 사슬로 에스터화한 갈산은 전술한 바와 같은 갈산 및 리놀레산의 항산화작용과 같은 약학적 효과를 유지하면서도 갈산 에스터의 생물학적 이용가능성 증가 효과를 동시에 가질 수 있을 것으로 기대된다. 이에 본 발명자들은 신규화합물인 리놀레산 사슬로 에스터화된 갈산(GLE, octadeca-9, 12-dienyl-3,4,5-trihydroxybenzoate)을 합성하고 그 항산화성을 검증하여 Food Sci. Biotechnol. 15(2) 317-320 (2006)에 발표한 바 있다. 이에 더 나아가 동물 실험을 통하여 상기 화합물 GLE가 항산화 효과 뿐 아니라 고지혈증 및 지방축적 억제효과가 있음을 입증하여 고지혈증 또는 비만억제제로서의 효능을 밝히는 것에 의해 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

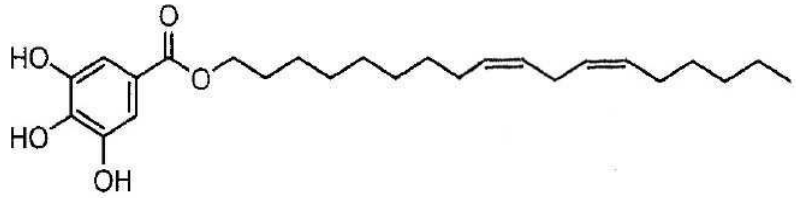
<8> 본 발명은 식생활의 서구화로 지질 섭취량의 증가로 인한 고지혈증을 비롯한 순환계 질환 및 비만이 증가하고 있는 가운데, 이들 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물을 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.

<9> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 또는 비만 예방을 위한 건강식품을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<10> 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 하기 화학식 1로 표기되는 octadeca-9,12-dienyl-3,4,5-trihydroxybenzoate(GLE)를 유효성분으로 함유하는 고지혈증 또는 비만 예방 및 치료용 조성물인 것을 특징으로 한다.

화학식 1



<11>

<12> GLE를 고지방식이에 1% 비율로 사료에 첨가하여 흰쥐에 7주간 자유 급식시킨 후(GLE군) 고지방식이로부터 유도되는 고지혈증과 비만 등에 대한 효과를 확인하기 위해 체중, 간 무게, 혈액 지질 조성 및 간과 지방조직 검사를 하였다. 비교를 위하여 일반식이를 급식시킨 쥐(ND군)와 고지방식이를 급식시킨 쥐(HFD군)을 함께 검사하였다.

<13> 그 결과 HFD군은 ND군에 비하여 체중이 32.82% 증가하였으나, 고지방 식이에 GLE를 첨가하여 급이한 GLE군의 경우에는 ND군과 비슷한 수치를 나타내어 고지방식이로부터 유도되는 체중 증가가 유의적으로 억제되었음을 확인할 수 있었다. 또한, GLE 투여로 인한 특이적인 식이량의 변화나 생체반응의 변화 역시 관측되지 않아 GLE의 투여가 생체내 거부반응을 유발하지 않았음을 알 수 있었다.

<14> 고지방식이를 7주간 섭취시킨 HFD군의 혈중 지질 농도는 ND군에 비해 총콜레스테롤, 고밀도(HDL)-콜레스테롤 및 저밀도(LDL)-콜레스테롤 함량의 유의적인 증가를 보여 고지혈증이 유발었음을 확인할 수 있었다. GLE군의 경우 총콜레스테롤, 중성지방 및 LDL-콜레스테롤 함량이 HFD군에 비해 유의적으로 낮아지는 효과를 보였다. 특히 동맥경화의 원인이 되는 LDL-콜레스테롤의 생성을 증가시키는 것으로 알려진 중성지방의 함량은 GLE군이 ND군에 비해서도 유의적으로 낮았다. 고밀도 콜레스테롤은 혈관벽의 콜레스테롤을 제거하는 효능이 있다고 알려져 있으며, 많은 연구 결과에 의하면 비록 LDL-콜레스테롤 함량이 정상적이라고 하더라도 HDL-콜레스테롤 함량이 낮은 경우 동맥경화의 위험성이 있다고 한다. 따라서 총 콜레스테롤의 양 뿐 아니라 HDL-콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤의 함량비가 중요한 의미를 갖는다. HFD군은 ND군에 비해 상기 함량비가 감소한 반면 GLE 군은 가장 높은 수치를 나타내었다. 이는 혈액내의 콜레스테롤 구성에 있어 관상동맥 질환을 억제하는 것으로 알려진 HDL-콜레스테롤의 상대적인 농도 증가를 의미하는 것으로 고지혈증으로 인한 순환기계 질환의 위험성을 개선하는 효과를 제공할 것으로 기대된다.

<15> 간을 적출하여 무게를 측정한 결과, HFD 군의 간무게는 1.51 g으로 ND군의 1.18 g에 비해 27.8%가 증가하였으나, GLE군의 간 무게는 1.06 g으로 유의적이지는 않으나 오히려 ND군보다도 약간 낮은 경향을 보였다. 이는 HFD군의 간 무게에 비교하여 29.80% 낮은 수준으로 고지방식이로부터 기인하는 간의 비대화를 유의적으로 억제하였음을 나타낸다. 이러한 결과는 고지방식이의 급여가 간장의 내부에 지방 축적을 유도하여 HFD군에서는 간의 무게가 증가되었으나 GLE군에서는 고지방식이에도 불구하고 GLE의 작용에 의해 간의 지방 축적이 감소되었기 때문으로 사료된다.

<16> 간 조직을 현미경으로 관찰하여 이를 확인한 결과, HFD군은 지방 입자가 지방구를 형성하고 심한 지방 축적을 보여 지방간을 나타낸 반면, GLE군은 지방구 크기의 증가가 현저히 억제되었음을 확인하였다. 이러한 현상은 지방조직의 지방세포 관찰에서도 동일하게 관찰할 수 있었다.

<17> 이상의 결과로부터 GLE를 유효성분으로 하는 조성물은 고지혈증 또는 비만의 예방 및 치료에 이용될 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명에 의한 GLE는 건강 식품에 유효성분으로 함유하여 고지혈증 또는 비만의 예방 및 치료효과를 갖는 기능성 건강식품으로 이용할 수도 있다.

<18> 본 발명의 GLE를 유효성분으로 함유하는 조성물이 예방 및 치료용 약제 또는 식품으로 이용되기 위해서는 약제학적 및 식품학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적 또는 식품학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한, 이들을 경구 또는 비경구로 투여용 제제와 같은 단위투여형 또는 수회투여형 제제로 제형화하여 고지혈증과 같은 심혈관계 질환 및 비만 억제 효과를 갖는 예방 및 치료제로 사용할 수 있다.

효 과

<19> 이상과 같이 본 발명에 의하면 화학식 1의 GLE 화합물은 간과 지방조직에 지방 축적을 감소시켜 체중 증가 및 간의 비대화를 억제하고, 혈중 총 콜레스테롤, 중성 지방 및 저밀도 콜레스테롤의 함량을 감소시키는 효능을 나타내므로 고지혈증과 같은 심혈관계 질환 및 비만의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<20> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

<21> **실시예**

<22> **실험예 1 : Octadeca-9,12-dienyl-3,4,5-trihydroxybenzoate(GLE)의 합성**

<23> GLE 합성을 위한 갈산, 리놀레산, 메틸렌클로라이드(CH_2Cl_2), DIBAL-H(diisobutylaluminium hydride), 질소가스, 메타놀(MeOH), 실리카겔(SiO_2), THF(tetrahydrofuran), DCC(N,N'-dicyclohexylcarbodiimide), 에틸

아세테이트(EA, ethyl acetate), 시트르산(citric acid) 및 마그네슘 설페이트($MgSO_4$)는 미국 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

<24> GLE 합성은 Food Sci. Biotechnol. 15(2) 317-320 (2006)에 기술된 방법에 의해 합성하였다. 보다 구체적인 합성 방법은 하기와 같다.

<25> 1) Octadeca-9,12-diene-ol의 합성

<26> 3 mM linoleic acid methyl ester를 10 ml CH_2Cl_2에 녹인 뒤 -78℃에서 냉각시켰다. 질소 분위기 하에서 상기 용액에 6 mM DIBAL-H를 서서히 가한 후 1시간 동안 교반하고 5% $NaHCO_3$를 천천히 가한 뒤 methanol을 이용하여 희석하였다. 용해되지 않은 물질을 Whatman paper(No.1)을 이용하여 거른 뒤 감압증류 하였다. 농축 잔사를 SiO_2 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 90%의 수율로 octadeca-9,12-diene-ol을 얻었다.

<27> 2) Octadeca-9,12-dienyl 3,4,5-trihydroxybenzoate(GLE)의 합성

<28> 1)에서 합성한 octadeca-9,12-diene-ol 5.5mM과 갈산 5.5mM을 15mL의 THF에 녹이고 0℃로 냉각한 후 THF 7mL에 16.5mM DCC를 녹인 용액을 가하였다. 상기 반응액을 상온에서 20시간 교반한 후 감압하에서 농축하였다. 농축 잔사를 EA로 추출하고 용해되지 않는 물질은 여과하여 제거하였다. 여과액을 5% 시트르산 용액, 포화 $NaHCO_3$ 수용액, 물로 차례로 세척한 후 $MgSO_4$를 사용하여 건조하고 농축하였다. 농축 잔사를 SiO_2 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 85%의 수율로 엷은 노란색 가루상의 GLE를 얻었다.

<29> ^1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 0.91(t, J=6.8Hz, 3H, H18), 1.31(m, 16H, H3-7, H15-17), 1.72(m, 2H, H2), 2.06(m, 4H, H8, H14), 2.79(dd, J=5.9, 5.9Hz, 2H, H11), 4.26(t, J=6.4Hz, 2H, $-OCH_2$), 5.37(m, 4H), 7.28(s, 1H, aromatic), 7.30(s, 1H, aromatic)

<30> **실시예 2 : 실험동물의 사육 및 식이**

<31> 5주령된 암컷 흰쥐(C57BL/6)를 (주)중앙(안성)에서 분양받아 환경에 적응시키기 위해 일반배합사료((주)삼양사)로 1주일간 예비사육 후 각 식이별로 12마리씩 세 개의 식이군(ND군, HFD군, GLE군)으로 나누어 실험에 사용하였다. ND(Normal diet)군은 일반식이를, HFD(High-fat diet)군은 고지방식이를, GLE(high-fat diet with Octadeca-9, 12-dienyl-3,4,5-trihydroxybenzoate)군은 고지방식이에 1% GLE를 첨가하여 급여하였으며, 일반식이와 고지방식이는 미국의 영양권장협회(American institute of nutrition recommendations)에 따라 하기 표 1과 같이 제조하였다. 사육장의 온도는 23℃로 유지하였으며, 식이와 식수는 7주간 자유롭게 먹도록 하며 하기 실시예의 각 식이군별 비교실험을 하였다.

표 1

Ingredients (g/kg)	Group		
	ND	HFD	GLE
Casein	200.0	238.8	238.8
L-Cysteine	3.0	3.6	3.6
Corn starch	397.5	198.1	188.1
Sucrose	100.0	87.8	87.8
Dextrose	132.0	116.5	116.5
Cellulose	50.0	59.7	59.7
Soybean oil	70.0	0.0	0.0
Lard	0.0	238.8	238.8
t-Butyl-hydroquinone	0.01	0.0	0.0
Mineral mixture	35.0	41.8	41.8
Vitamin mixture	10.0	11.9	11.9
Choline bitartate	2.5	3.0	3.0
GLE	-	-	10.0

<32>

<33> 상기 표 1에서 미네랄 혼합물(mineral mixtrue)는 357g calcium carbonate, 196g potassium phosphate

(monobasic), 70.78g potassium citrate, 74g sodium chloride, 46.6g potassium sulfate, 24g magnesium oxide, 6.06g ferric citrate, 1.65g zinc carbonate, 0.63g manganous carbonate, 0.30g cupric carbonate, 0.01g potassium Iodate, 0.01025g sodium selenate, 0.00795g ammonium paramolybdate, 1.45g sodium metasilicate, 0.275g chromium potassium sulfate, 0.0174g lithium chloride, 0.0815g boric acid, 0.0635g sodium fluoride, 0.0318g nickel carbonate, 0.0066g ammonium vanadate 및 221.026g sucrose의 혼합물을, 비타민 혼합물(Vitamin mixture)은 3g niacin, 1.6g calcium pentothenate, 0.7g pyridoxine HCl, 0.6g thiamin HCl, 0.6g riboflavin, 0.2g folic acid, 0.02g biotin, 15g vitamin E acetate(500 IU/g), 2.5g vitamin B12(0.1%), 0.8 g vitamin A palmitate(500,000 IU/g), 0.25g vitamin D3(400,000 IU/g), 7.5g vitamin K1/dextrose mix(10 mg/g) 및 967.23g sucrose로 구성된 혼합물을 의미한다.

<34> **실시예 3 : 각 식이군별 고지혈증 및 지방 축적 비교 실험**

<35> 하기 각 실험의 결과는 SAS 통계프로그램을 이용하여 분산분석하고 유의적인 차이가 나타난 경우 Duncan's Multiple Range Test를 이용하여 평균값 간의 차이를 분석하였다.

<36> **1) 체중 측정**

<37> 전 실험기간동안 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 체중을 측정하고 각 군의 평균을 구하여 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

	Week	Groups			표준오차
		ND	HFD	GLE	
체중 (g)	1	17.00	19.54	17.41	0.452
	2	18.23	21.00	18.22	0.398
	3	19.81	22.54	19.43	0.508
	4	19.20	23.24	20.83	0.466
	5	21.55^{b}	25.54^{a}	21.62^{b}	0.552
	6	21.72^{b}	26.34^{a}	21.49^{b}	0.478
	7	22.64^{b}	30.07^{a}	23.61^{b}	0.504

<38> a-b : 같은 칼럼에서 서로 다른 문자는 유의적으로 차이가 있다($P<0.05$).

<39> 표 2에서 확인할 수 있듯이 HFD군은 실험기간 동안 가장 높은 체중 증가를 보였으며, 7주 후의 체중은 30.07 g으로 ND군의 22.64 g 보다 32.82% 높았다. 반면, GLE군은 체중이 23.61 g으로 ND군과 비슷한 수치를 나타내어 HFD군에 비해 28.10% 낮아 고지방식이로부터 유도되는 체중 증가를 유의적으로 억제하였음을 확인할 수 있었다. 또한, GLE 투여로 인한 특이적인 식이량의 변화나 생체반응의 변화 역시 관측되지 않아 GLE의 투여가 생체내 거부반응을 유발하지 않고 본 실험에 적합함을 알 수 있었다.

<40> **2) 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 농도의 분석**

<41> 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 농도 분석은 실시예 2에서 7주간 자유 급식시킨 각 식이군별 흰쥐를 12시간 절식시킨 후 복부대동맥으로부터 채혈하여 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 분석하였다. 채혈한 혈액은 37℃에서 2시간 응고시킨 후 혈청을 15,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 취하여 ADVIA 1650 lipid analyzer(Bayer, Wuppertal, Germany)를 이용하여 중성지방, 총 콜레스테롤, 고밀도(HDL)-콜레스테롤 및 저밀도(LDL)-콜레스테롤 농도를 측정하고 각 군별로 평균값을 구하여 그 값을 표 3에 나타냈다.

표 3

Groups	총콜레스테롤 (mg/dL)	중성지방 (mg/dL)	HDL - cholesterol (mg/dL)	LDL - cholesterol (mg/dL)	HDL/LDL ratio
ND	110.14^{c}	107.25^{a}	48.42^{b}	12.85^{c}	3.77
HFD	157.01^{a}	106.25^{a}	64.54^{a}	18.27^{a}	3.53
GLE	148.82^{b}	82.50^{b}	60.00^{a}	15.26^{b}	3.93
표준오차	2.691	2.659	1.711	0.97	0.226

<42> a-c : 같은 칼럼에서 서로 다른 문자는 유의적으로 차이가 있다(P<0.05).

<43> 표 3에 기재된 바와 같이 고지방식이를 7주간 섭취시킨 HFD군의 혈중 지질 농도는 ND군에 비해 총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 함량의 유의적인 증가를 보여 고지혈증이 유발되었음을 확인할 수 있었다. GLE군의 경우 총콜레스테롤, 중성지방 및 LDL-콜레스테롤 함량이 고지방식이 실험군에 비해 유의적으로 낮아 고지방식이로부터 기인하는 고지혈증에 대한 억제 효과를 보였다. 특히 동맥경화의 원인이 되는 LDL-콜레스테롤의 생성을 증가시키는 것으로 알려진 중성지방의 함량은 GLE군이 ND군에 비해서도 유의적으로 낮았다.

<44> **3) 간의 무게 측정 및 간조직과 지방조직의 광학현미경적 관찰**

<45> 각 실험군에 7주간 식이별로 급이 후 12시간 동안 절식시킨 후 간을 적출하고 복부 지방조직을 샘플링하였다.

<46> 간은 적출 후 차가운 생리 식염수로 헹군 후 표면의 수분을 제거하고 무게를 측정하여 그 값을 각각 표 4에 나타내었다.

표 4

Groups	ND	HFD	GLE	표준오차
간 무게(g)	1.18^{b}	1.51^{a}	1.06^{b}	0.044

<47> a-b : 같은 칼럼에서 서로 다른 문자는 유의적으로 차이가 있다(P<0.05).

<48> 표 4의 간 무게 측정 결과에서 알 수 있듯이, HFD 군의 간무게는 1.51 g으로 ND군의 1.18 g에 비해 27.8%가 증가하였으나, GLE군의 간 무게는 1.06 g으로 유의적이지는 않으나 오히려 ND군보다도 약간 낮은 경향을 보였다. 이는 HFD군의 간 무게에 비교하여 29.80% 낮은 수준으로 고지방식이로부터 기인하는 간의 비대화를 유의적으로 억제하였음을 나타낸다.

<49> 간과 지방조직의 광학현미경적 관찰을 위하여 무게를 재고 난 직후의 간과 지방조직을 10% neutral formalin 용액에 고정한 다음 수세, 탈수과정을 거친 후 xylol/hard paraffin(2:1), xylol/hard paraffin(1:2) 및 hard paraffin 용액을 3시간씩 순차적으로 처리하였다. Paraffin block은 4~5 μm 두께로 박절하여 hematoxylineosin으로 염색하고 200 배율로 광학현미경(Pro® Plus version 4.5 Media Cybernetics, MD, USA)을 이용하여 관찰하고 그 결과를 도 1 및 도 2에 각각 도시하였다.

<50> 도 1은 간조직의 현미경 관찰결과를 보여주는 사진으로, CV(Central vein)는 중심정맥, FD(Fat droplets)는 지방구, LN(Loss of nucleus)는 핵의 손실, ESH(Extensive swelling of hepatocytes)는 심하게 팽창된 간세포, DH(Disintegrated hepatocytes)는 붕괴된 간세포를 나타낸다. 도 1에서 확인할 수 있듯이 HFD군에서는 지방입자가 지방구를 형성하여 심한 지방 침착을 보여 지방간을 나타냈다. GLE 첨가군에서도 지방간은 보였으나 고지방식이군에 비해 지방구 크기의 증가가 현저하게 억제됨이 확인되었다.

<51> 이러한 현상은 도 2의 지방조직의 지방세포 관찰에서도 확인할 수 있었다. 도 2에서 SRC(signet ring cell)는 인환세포암, ESRC(enlarged signet ring cell)는 증대된 인환세포암, V(Venules)는 소정맥, TCRs(Thin cytoplasmic rims)는 세포질변(邊). BV(blood vessel)는 혈관을 나타낸다. 통상, 일단 형성된 지방 세포의 수는 식이에 의해 감소가 되지 않으나 지방세포의 크기는 조절이 가능하다고 알려져 있다. 도 2에서 GLE 첨가군

의 지방세포 크기가 HFD군에 비해 적은 것은 GLE에 의해 체지방 축적이 감소하였음을 나타낸다.

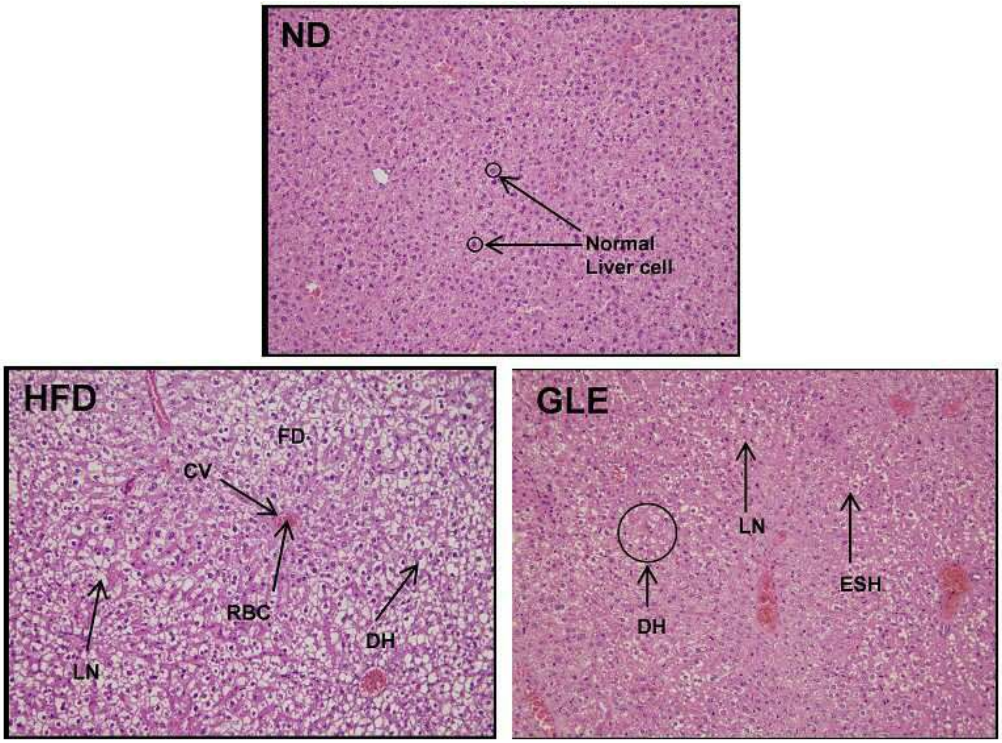
도면의 간단한 설명

<52> 도 1은 본 발명의 일실시예의 동물실험에서 각 식이군의 간조직을 현미경으로 관찰한 결과 사진.

<53> 도 2는 본 발명의 일실시예의 동물실험에서 각 식이군의 지방세포의 지방 조직을 현미경으로 관찰한 결과 사진.

도면

도면1



도면2

