(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0056146
(43) 공개일자 2015년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/015 (2006.01) *A61K 31/01* (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0138766
(22) 출원일자 2013년11월15일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이성준
서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 104동 402호 (청담동, 청담공원아파트)
우춘연
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 자연계 캠퍼스 생명과학대학 동관 411호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 4 항

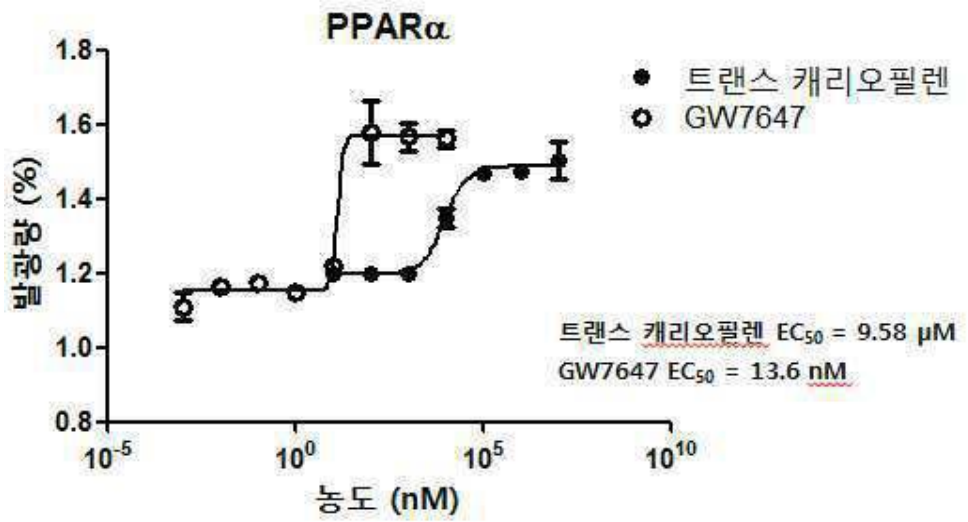
(54) 발명의 명칭 **지질대사 개선 및 중성지질 강하 효능을 가진 트랜스 캐리오필렌 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 생활습관병 및 대사증후군과 특히 밀접한 관련이 있는 PPAR α (peroxisome proliferator-activated protein α)를 활성화시킴으로서 결론적으로 혈중 중성지질 농도를 효과적으로 저하시키고 체내 지질대사를 개선하는 트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 의약조성물 및 건강기능성 식품에 관한 것이다.

본 발명에서는 식물 유래 성분인 트랜스 캐리오필렌을 이용하여 혈중 중성지질을 개선시키며 기존에 주로 사용되고 있던 스타틴류의 약물에 비하여 부작용이 적은 안전한 약물을 제조함으로써 소비자들의 기대에 부응할 수 있고, 트랜스 캐리오필렌을 함유한 건강기능성 식품을 제조하여 복용함으로써 생체기능 활성화를 통한 심혈관계 질병 발생 위험의 감소 및 건강 증진에 도움이 된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

가요요

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 자연계 캠퍼스 생명과학대학 동관 411호

이지혜

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 자연계 캠퍼스 생명과학대학 동관 411호

김연지

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 자연계 캠퍼스 생명과학대학 동관 411호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ906950032013
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	공동연구_농축산물부가가치향상기술개발_농축산물부가가치향상
연구과제명	특수미의 항비만, 항암, 항염증 및 성장촉진 생리활성 비교분석
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교
연구기간	2011.03.01 ~ 2013.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 의약조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 지질대사 개선은 혈중 중성지질 수치 감소, 간내 중성지질 수치 감소 또는 지방간 증세 개선인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 건강기능 식품.

청구항 4

제3항에 있어서, 지질대사 개선은 혈중 중성지질 수치 감소, 간내 중성지질 수치 감소 또는 지방간 증세 개선인 것을 특징으로 하는 건강기능 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 생활습관병 및 대사증후군과 특히 밀접한 관련이 있는 PPAR α (peroxisome proliferator-activated protein α)를 활성화시킴으로서 결론적으로 혈중 중성지질 농도를 효과적으로 저하시키고 체내 지질대사를 개선하는 트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 의약조성물 및 건강기능성 식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대사 증후군은 비만, 인슐린 저항성으로 인한 당뇨병, 혈중 콜레스테롤 및 중성지질의 증가로 인한 심혈관계 질환, 고혈압 등과 같은 임상적인 증상을 보인다. 대사 증후군은 만성질환으로서 생활 습관에서 비롯되는 병이며, 이 습관을 바꿈으로 어느 정도 치료 가능한 것으로 알려져 있다. 그 가운에서도 식습관 조절을 통한 치료가 가장 효과적인 방법으로서 제안되고 있다. 특히 죽상동맥경화성 질병은 현대인들의 사망률과 이환율을 높이는 주요한 질환으로서 고콜레스테롤혈증, 고혈압, 비만, 당뇨 등에 영향을 미치게 된다. 내막표면의 손상으로 혈소판 침착을 유발하고 혈전을 형성시킴으로서 뇌졸중, 심근경색 등 치명적인 결과를 야기시킬 수 있으므로 조기에 교정 가능한 위험인자들을 교정해주는 것임 중요하다. 이를 예방하기 위해 식이요법, 운동을 비롯한 생활양식의 변화 (TLC: therapeutic lifestyle changes)를 유지하는 것이 도움은 되지만 대부분의 만성질환자들은 생활습관만으로는 교정이 어려운 경우가 많아 지질저하 약물 치료를 비롯한 관리가 필요한 실정이다. 지질저하 약물의 경우 평생 투여해야 하며, 간기능 수치 상승 등의 합병증 발병 위험이 있으므로 식품 성분 중 만성질환을 치료해 줄 수 있는 유용한 유효 성분에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

[0003] 최근 PPARs(peroxisome proliferator-activated proteins)를 중심으로 주요 생활습관/대사성 질환의 예방 및 치료에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌고 졌다. PPARs는 핵수용체로서 리간드가 결합하게 되면 활성화 되어 핵으로 이동한 후, 일련의 타겟 유전자 프로모터에 결합하여 전사조절인자로 작용하여 유사한 대사과정에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하게 된다. PPARs에는 PPAR-α, γ, β/δ 의 세 가지가 있는데 각기 다른 유전

자 군을 조절하여 대사작용을 조절한다. PPAR-α는 주로 간 조직에서 발현되며 지방산 및 중성지질 합성과 분해에 관여하는 유전자 발현을 조절한다. PPAR-γ의 경우 주로 지방과 근육조직에서 조직의 혈당 흡수 촉진 등을 통해 인슐린 민감도 (insulin sensitivity)를 증가시키며 한편 지방세포생성 (adipogenesis)를 촉진시킨다. PPAR-β/δ는 주로 지방조직에서 지방산화와 열발생 (thermogenesis)을 촉진시키는 것으로 알려져 PPARs를 타겟으로 하는 많은 약물 연구가 이루어지고 있다.

[0004] 한편, 트랜스 캐리오필렌은 산약초 및 허브류로부터 추출된 에센셜 오일에 함유되어 있는 성분으로, 구조적으로는 세스퀴테르펜 (sesquiterpene) 계열에 속한다(도 1). 지금까지 연구된 바에 의하면 트랜스 캐리오필렌의 항염증작용, 세포독성효능 정도가 연구되어있으며, 지질대사와 관련된 내용은 미비한 실정이다. 트랜스 캐리오필렌은 약용식물인 쑥 (Artemisia princeps) 의 에센셜오일 성분 중에서 16% 정도 함유되어있다. 또한 쑥의 에센셜오일을 배양세포에 처리하자 LDL-콜레스테롤 산화 억제, 자유라디컬 소거능 증가, LDL-receptor 유전자의 발현 증가로 인한 항동맥경화 효능을 보인 연구가 보고되어있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 혈중 중성지질 농도를 효과적으로 저하시키고 체내 지질대사를 개선하는 식물유래 성분을 개발하고자 예의 노력한 결과, 쑥 추출물의 단일 성분인 트랜스 캐리오필렌이 PPAR α 활성을 통한 지질대사 개선 효능을 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 혈중 중성지질 농도를 효과적으로 저하시키고 체내 지질대사를 개선하는 식물유래 성분을 함유하는 의약조성물을 제공하는데 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 혈중 중성지질 농도를 효과적으로 저하시키고 체내 지질대사를 개선하는 식물유래 성분을 함유하는 기능성 식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 의약조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, 트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 건강기능 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에서는 식물 유래 성분인 트랜스 캐리오필렌을 이용하여 혈중 중성지질을 개선시키며 기존에 주로 사용되고 있던 스타틴류의 약물에 비하여 부작용이 적은 안전한 약물을 제조함으로써 소비자들의 기대에 부응할 수 있고, 트랜스 캐리오필렌을 함유한 건강기능성 식품을 제조하여 복용함으로써 생체기능 활성화를 통한 심혈관계 질병 발생 위험의 감소 및 건강 증진에 도움이 된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 트랜스 캐리오필렌의 구조, 구조식, 분자량을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 트랜스 캐리오필렌에 대한 PPAR α 활성 효능을 알아보기 위해 reporter gene assay를 실시한 결과를 나타낸 것으로, EC_{50} 값은 최대 효율의 50%에 해당하는 효능제(agonist)의 농도를 의미한다.

도 3은 본 발명에 따른 트랜스 캐리오필렌에 대한 PPAR α 리간드 활성 효능을 탐색하기 위해 SPR 실험을 분석한 그래프이다. 그래프는 신호강도(RU)-시간으로 나타내었다. 결합정수(K_D) 값은 테스트 물질과 PPAR α 사이의 친화력을 의미하며 양성대조군으로는 PPAR α agonist로 알려진 GW7647을 사용하여 비교 분석하였다.

도 4는 본 발명에 따른 트랜스 캐리오필렌에 대한 PPAR α 리간드 활성 효능을 탐색하기 위해 TR-FRET PPAR α coactivator assay를 분석한 그래프이다. EC_{50} 값은 최대 효율의 50%에 해당하는 효능제(agonist)의 농도를 의미한다.

도 5는 HepG2 세포에 GW7647 (1μM), 트랜스 캐리오필렌 (1, 10, 100 μM)을 각각 24시간 처리한 후 세포내의 중성지질 함량을 측정한 그래프이다. 그래프에서 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005을 의미한다.

도 6은 트랜스 캐리오필렌에 의한 지방산 흡수 변화를 분석한 그래프이다. 왼쪽의 그래프는 FACS 분석에 의한 나타난 형광(BODIPY)으로 표지된 지방산 흡수 정도를 나타내며, 오른쪽의 막대 그래프는 FACS 분석 값의 평균치를 계산한 결과이다. 그래프에서 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005을 의미한다.

도 7은 HepG2 세포에 GW7647 (1 μM)과 트랜스 캐리오필렌 (1, 10, 100 μM)을 각각 24시간 처리한 후, [1-^{14}C]로 표지된 팔미트산(0.44mM,57mCi/mmol)이 대사되어 생성되는 $^{14}CO_2$의 양을 대조군과 비교 측정한 그래프이다. 그래프에서 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005을 의미한다.

도 8은 PPAR α와 그 타겟 유전자의 real-time PCR의 결과를 나타낸 그래프이다. 그래프에서 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005을 의미한다.

도 9는 본 발명에 따른 트랜스 캐리오필렌을 처리한 세포를 Immunoblot 실험법을 사용하여 PPAR α의 발현정도와 그 타겟 유전자의 단백질 발현 정도를 분석한 그래프이다. 그래프에서 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명에서는 트랜스 캐리오필렌 조성물의 중성 지질 강하 효능을 확인하였다. 현재 지질 저하제로 스타틴(statin) 및 피브레이트(fibrte) 계열의 약물이 이용되고 있다. 스타틴의 경우 간 질환 및 신경병증에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있는데 비해 대체 성분으로 식품 성분의 일종인 트랜스 캐리오필렌 조성물은 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있다.

[0013] 본 발명에서는 트랜스 캐리오필렌 조성물의 지질 저하 효능을 분석하여 약물 및 식품 첨가제로의 이용가능성을 확인하였다.

[0014] 일 관점에서, 본 발명은 트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 의약조성물에 관한 것이다.

[0015] 본 발명에서는 트랜스 캐리오필렌 조성물의 지질 개선 효능을 평가하기 위해, 트랜스 캐리오필렌 조성물을 HepG2세포의 중성지질 함량을 분석하고 지방산 흡수 및 산화 변화 효능을 분석하여 상기 조성물에 대한 지질 대사 개선 효능을 평가하였다. 또한 트랜스 캐리오필렌을 처리한 그룹에서의 PPAR α agonist로서의 특징을 확인함으로써 트랜스 캐리오필렌의 지질 저하 효능의 기전으로 PPAR α 활성을 통한 통해 지방산화 촉진과 중성지질 분해를 유도하는 기전의 가능성을 규명하였다.

[0016] 본 발명에 있어서, 지질대사 개선은 혈중 중성지질 수치 감소, 간내 중성지질 수치 감소 또는 지방간 증세 개선인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0017] 현재 지질 저하제로 스타틴(statin) 및 피브레이트(fibrte) 계열의 약물이 이용되고 있다. 스타틴의 경우 간 질환 및 신경병증에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있는데 비해 대체 성분으로 식품 성분의 일종인 트랜스 캐리오필렌 조성물은 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있다.

[0018] 본 발명에서는 트랜스 캐리오필렌 조성물의 지질 개선 효능을 평가하기 위해, 트랜스 캐리오필렌 조성물을 HepG2세포의 중성지질 함량을 분석하고 지방산 흡수 및 산화 변화 효능을 분석하여 상기 조성물에 대한 지질 대사 개선 효능을 평가하였다. 또한 트랜스 캐리오필렌을 처리한 그룹에서의 PPAR α agonist로서의 특징을 확인함으로써 트랜스 캐리오필렌의 지질 저하 효능의 기전으로 PPAR α 활성을 통한 통해 지방산화 촉진과 중성지질 분해를 유도하는 기전의 가능성을 규명하였다.

[0019] PPAR α 은 핵수용체의 일종으로, 리간드에 의해 활성화되며, 타깃 유전자의 프로모터자리에 결합하여 관련 유전자들의 발현을 조절하는 역할을 수행한다. 간에서 PPAR α 는 지방산의 흡수, 산화 및 분해에 관여하는 유전자의 발현을 조절함으로서 혈액 내 중성지질 농도를 감소시키는 것으로 알려져 있다. 또한, PPAR α는 LXR-

SREBP1c 경로를 통해 지방산 합성에도 관여하며 지질대사, 지단백 대사, 콜레스테롤 대사에 집중적으로 연관되어 있음이 밝혀져 이를 타겟으로 하는 많은 약물 연구가 이루어지고 있다.

[0020] 본 발명의 일 양태에서는, 천연물질인 트랜스 캐리오필렌이 PPAR α 활성 효능을 확인하기 reporter gene assay를 실시한 결과, 트랜스 캐리오필렌은 일정 농도이상 (9.58μM)에서는 뛰어난 PPAR α 활성효능을 보였다. 따라서 PPAR α 에 대해 활성을 보인 트랜스 캐리오필렌이 PPAR α에 대한 직접적 결합능을 평가하기 위해 TR-FRET과 SPR실험을 수행하였다. SPR (surface plasmon resonance) 실험 결과, 트랜스 캐리오필렌과 PPAR α 사이의 친화력을 의미하는 결합정수(K_D) 값은 약 1.93μM로 나타났다. 또한 TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) 분석 결과, 활성효능을 갖는 최고농도의 50%에 해당하는 EC_{50}값이 3.2 μM로 측정되었다. 따라서 트랜스 캐리오필렌은 PPAR α의 리간드로 작용하며, 그 활성 및 전사에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에서는, 사람 간세포 모델인 HepG2 배양세포를 이용한 연구에서 트랜스 캐리오필렌을 고농도 (100 μM) 처리한 결과, 세포내 중성지질을 17% 저하시키는 효능을 보였다(P<0.05). 또한 간에서의 트랜스 캐리오필렌에 의한 지방산 흡수 및 산화 변화 효능을 평가하였다. 그 결과, 고농도(100 μM)의 트랜스 캐리오필렌 처리 그룹에서 세포내 지방산 흡수가 대조군 대비 각각 30% 증가하는 결과를 보였으며(P<0.05) 지방산 산화 속도는 8% 까지 통계적으로 유의성 있게 증가함을 확인하였다(P<0.05). 또한, 트랜스 캐리오 필렌이 지질대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 PPAR α 와 그 타겟 유전자의 발현 및 단백질 발현 정도를 측정하였다. qPCR 결과, 트랜스 캐리오필렌은 PPAR α의 mRNA 발현을 80-190% 유의하게 증가(P<0.01)하였으며 간의 세포막에서 지방산을 흡수하는데 관여하는 FATP4와 ACS는 트랜스 캐리오필렌 처리에 의해 각각 115%, 530% 까지 유의적으로 증가하였다(P<0.05). 또한 트랜스 캐리오필렌은 지방산 산화에 관여하는 ACOX와 CPT1의 유전자 발현을 각각 70%(P<0.05), 400%(P<0.01)까지 증가시켰고, 이에 반해 지방산 합성에 관여하는 SREBP1C의 유전자발현은 30% 이상 감소하였다(P<0.05). mRNA 발현 변화와 더불어, Immunoblot을 통해 알아본 단백질 발현 또한 비슷한 경향으로 나타났다. 고농도의 트랜스 캐리오필렌 처리군(100 μM)에서 PPAR α는 35% 정도 증가하였고(P<0.05), FATP4, ACS는 대조군 대비 각각 19%(P<0.05), 35%(P<0.05) 증가하였다. 또한, ACOX, CPT1의 경우, 대조군 대비 각각 37%(P<0.05), 22%(P<0.05) 증가하였으며, SREBP1c는 19%(P<0.05) 감소하는 것으로 나타났다.

[0022] 이와 같은 트랜스 캐리오필렌의 중성지질 강하 및 지방산 대사 개선 효과는 PPAR α의 활성에 의한 결과로 해석할 수 있다. 천연물질인 트랜스 캐리오필렌는 PPAR α의 활성을 증가시키는 agonist로서 작용하여 이는 PPAR α 활성에 의한 지방산화 촉진과 중성지질 분해를 유도한다. 따라서 트랜스 캐리오필렌은 간에서 중성 지질의 산화 및 흡수를 촉진하여 혈중 중성지질을 감소시켜 대사증후군, 동맥경화의 예방 및 완화 효능을 가진다.

[0023] 다른 관점에서, 본 발명은 트랜스 캐리오필렌을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 건강기능 식품에 관한 것이다.

[0024] 본 발명의 기능성 식품은 산화 예방을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은, 예를 들어, 각종 식품류, 캔디, 초콜릿, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0025] 본 발명의 상기 추출물은 지질대사 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 20 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0026] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0027] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증

점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0028] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시 예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0029] **실시예1. 트랜스 캐리오필렌의 PPAR α 활성 효능 평가**

[0030] 본 실시예에서는 트랜스 캐리오필렌에 의한 PPAR α 활성 스크리닝을 확인하기 위하여 reporter gene assay를 실시하였다. 리포터 유전자로는 luciferase(특정 기질을 산화하여 빛을 방출하는 작용을 촉매 하는 효소)가 사용되었으며, 이 유전자는 프로모터 구간의 LXRE에 LXR/RXR 이량체가 결합되면 발현되도록 고안되었다.

[0031] 본 실험에서는 HEK293 (human embryonic kidney 293, ATCC CRL 1573) 세포주를 사용하였으며 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 DMEM배지(Hyclone, 미국)를 사용하여 배양되었다. 96-well plate에 HEK293세포를 24시간 배양한 후, pCMV-3xPPRE-Luc 벡터, pSG5-PPAR-α 벡터(Addgene, 미국)를 동시에 형질전환(transfection)시켰다.

[0032] 형질전환된 세포에 PPAR α agonist로 개발된 GW7647(Cayman chemical company, 미국) 및 트랜스 캐리오필렌(Sigma-Aldrich, 미국)을 24시간 동안 처리하고, Firefly luciferase assay lysis kit(Biotium, Hayward, CA, USA)를 사용하여 PPAR α 활성을 발광법 (Luminescence)로 측정하였으며, DMSO만을 처리한 군을 음성대조군으로 사용하였다.

[0033] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 트랜스 캐리오필렌은 기존에 PPAR α 활성물질로 개발된 GW7647 보다는 높은 농도에서 PPAR α를 활성화시키는 것으로 나타났으나, 일정 농도이상 (9.58μM)에서는 뛰어난 PPAR α 활성 효능을 보였다.

[0034] **실시예 2: 트랜스 캐리오필렌의 PPAR α 리간드 효능 평가 (SPR분석)**

[0035] cell free assay로 트랜스 캐리오필렌의 PPAR α 리간드 활성을 측정하기 위하여, SPR (surface plasmon resonance) 분석을 실시하였다. SPR 실험을 위한 human-PPAR α 리간드 결합 도메인(ligand binding domain, LBD) 단백질의 정제를 위해, pET-32a-c(+)가 발현된 벡터(Novagen, Germany)에 human PPARα LBD을 복제하고 E. coli Rosetta (DE3) strain에 형질전환(transfection)시켰다. 형질전환된 세포에서 PPARα LBD 단백질을 얻은 후 HiTrap™ Chelating HP Column (GE Healthcare, 영국)에 주입하여 Bio-Rad BioLogic LP system (Hercules, 미국)을 이용해 PPARα LBD protein을 정제하였다. SPR 실험은 Biacore 2000 기기 (GE healthcare 제품)를 이용하여 분석하였다. human-PPAR α LBD 단백질을 CM5 센서칩(GE healthcare, 스웨덴) 에 고정시키고 트랜스 캐리오필렌 및 GW7647을 고농도부터 저농도 순으로 주입시켜주었다.

[0036] 분석환경은 25℃로 유지되었으며, HBS running 버퍼 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.005% [v/v] surfactant P20, 1% DMSO, pH 7.4)는 25 μL/min의 속도로 일정하게 흘려보내주었다. 테스트 물질 주입 후, 물질이 human-PPAR α LBD과 결합하면 SPR 신호 (RU) 가 증가하게 되며, 신호강도(RU)-시간과의 그래프로 나타내게 된다. 일정시간 후, 테스트 물질이 제외된 버퍼만을 다시 흘려보내주면, human-PPAR α LBD와 물질사이의 결합이 해제되며, RU 값이 감소하게 된다. 즉, 해당반응에서의 결합능(Ka 값) 과 해제능(Kd 값)을 이용하여 결합정수 (K_D) 값을 계산하였다. 양성대조군으로는 PPAR α agonist로 알려진 GW7647을 사용하여 비교 분석하였다.

[0037] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 양성대조군인 GW7647과 트랜스 캐리오필렌은 각각 50~10μM, 250~100μM 범위에서 PPAR α-ligand binding domain과 결합하는 것으로 나타났다. 해리상수인 K_D (kinetic dissociation constant) 값은 GW7647이 약 32.4nM, 트랜스 캐리오필렌이 약 1.93μM로 나타났다. 이는 두 시험물질 모두 PPAR α-LBD와 결합가능하나, GW7647의 결합효율이 트랜스 캐리오필렌보다 뛰어남을 의미한다. 식물유래 천연성분인 트랜스 캐리오필렌의 경우, PPAR α의 리간드로 작용할 수 있으나, 약물로 개발된 GW7647 보다는 효능이 약하지만 약물로 인한 부작용을 최소화 시키며, 대사증후군을 개선시킬 수 있을 것으로 기대된다.

[0038] **실시예 3: 트랜스 캐리오필렌의 PPAR α 리간드 효능 평가 (TR-FRET 분석)**

[0039] 본 실시예에서는 cell free assay로, TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) 실험을 수행하여, 트랜스 캐리오필렌의 PPAR α 리간드 효능을 분석하였다. TR-FRET 실험은 coactivator를 사용하여 agonist 혹은 antagonist로서의 활성효능을 평가하는 시험방법으로서 PPAR α 에 리간드가 결합하면, PPAR α 의 입체구조가 변화하여 coactivator의 결합이 용이하게 된다. 본 원리를 바탕으로, GST 항체를 사용하여 테르븀(terbium)이 표지된 PPAR α 에 리간드가 결합하면 형광으로 표지된 coactivator의 펩타이드 결합이 이루어지게 되어 테르븀은 340nm파장에서 들뜬 상태가 되고, 이 에너지는 보조인자 펩타이드의 형광신호로 전이되는데, 이 신호를 520nm에서 측정한다. PPAR α 에 리간드 결합이 증가할수록 TR-FRET 시그널은 증가하게 된다.

[0040] 본 실시예에서는 PGC1 α 를 PPAR α에 대한 coactivator로 사용하였으며, 실온에서 두 시간 반응시킨 후, Spectra Max 기기를 사용하여 형광파장을 측정하였다 (여기파장 340 nm, 방출파장 520 nm). 그래프와 EC_{50}값은 GraphPad™ Prism® 5.0 프로그램을 사용하여 나타내었다. 양성대조군으로는 PPAR α의 agonist로 개발된 GW7647(Cayman chemical company, 미국) 을 사용하여 트랜스 캐리오필렌과 효능을 비교분석하였다.

[0041] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 양성대조군인 GW7647과 시험물질인 트랜스 캐리오필렌 모두 PPAR α의 agonist로 작용하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 활성효능을 갖는 최고농도의 50%에 해당하는 EC_{50}값이 GW7647은 7.1 nM, 트랜스 캐리오필렌은 3.2 μM로 계산되어, SPR실험결과와 마찬가지로, PPAR α agonist로 개발된 합성 GW7647에 비하여 천연물인 트랜스 캐리오필렌의 효과가 낮은 것으로 나타났다. 따라서 대사증후군 예방효능을 가지고 있는 기능성식품으로서의 개발이 적합할 것으로 사료된다.

[0042] **실시예 4: 트랜스 캘오필렌에 의한 세포내 중성지질 강하효능 평가**

[0043] 간에서 PPAR α는 FATP, ACS, CPT1등과 같은 유전자들의 발현을 조절하여, 지방산의 흡수를 증가시키고, 지방산 산화를 촉진시켜, 체내 지방산의 농도를 감소시키는 효능을 갖는다. 또한 PPAR α는 LPL의 발현을 증가시키는데, 이 단백질은 중성지질을 분해하는 효소로, 체내 중성지질농도를 감소시키는데 관여하며, LPL 저해제로 작용하는 ApoCIII의 발현을 저해한다. 결국 PPAR α의 활성증가는 대사증후군의 증세를 완화시키는 것으로 알려져 있으며, 본 실험에서는 트랜스 캐리오필렌에 의한 중성지질 감소효능을 HepG2 (human hepatocyte) 세포주(ATCC No. HB-8065))를 사용하여 분석하였다. 실험에 사용된 세포는 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양되었으며 본 실험을 위해, HepG2 세포에 지질을 축적시키고 트랜스 캐리오필렌을 처리하여 세포내 남아있는 중성지질 함량을 지질자동화 분석기기인 COBAS C111기기를 사용하여 분석하였다. 세포내 지질성분은 단백질 함량을 사용하여 표준화시켰다. 트랜스 캐리오필렌 처리군은 총 3농도 (1, 10, 100 μM) 로 시험하였으며, 양성대조군으로는 PPAR α agonist로 알려진 GW7647을 1 μM로 처리하여 비교분석 하였다.

[0044] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 양성대조군인 GW7647과 트랜스 캐리오필렌 고농도 (100 μM)처리그룹에서 중성지질의 함량의 유의성 있게 감소함을 확인하였다. 100 μM의 트랜스 캐리오필렌 처리시, 세포내 중성지질 농도는 대조군 대비 17% 정도 감소하였다.

[0045] **실시예 5: 트랜스 캐리오필렌에 의한 지방산 흡수 변화**

[0046] 트랜스 캐리오필렌에 의한 지방산 흡수 변화를 측정하기 위하여 BODIPY로 표지된 지방산과 FACS를 이용하였다. HepG2 (human hepatocyte)세포를, 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하고, 배양된 세포는 6-well plate에 1 x 10^5cell/well로 분주하였다. 48시간 이후, 양성 대조군인 GW7647 (1μM), 트랜스 캐리오필렌 (1, 10, 100μM)을 형광 탐침자가 붙은 지방산(C1-BODIPY 500/510 C12; 4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoic acid; 2 μM in Hank's buffered salt solution containing 0.1% bovine serum albumin)과 함께 처리하였다. 1분간 처리 후, Hank's buffered salt solution을 이용해 반응을 멈춘 후 FACS 완충용액을 사용해 유세포 분석기(FACS Calibur; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 통해 형광을 측정하였다.

[0047] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 양성대조군인 GW7647과 트랜스 캐리오필렌 고농도 (100 μM)처리그룹에서 지방산의 흡수가 유의성 있게 증가함을 확인하였다. 100 μM의 트랜스 캐리오필렌 처리시, 세포내 지방산 흡수

는 대조군 대비 30% 정도 증가하였다.

[0048] **실시예 8: 트랜스 캐리오필렌에 의한 지방산 산화속도 변화 분석**

[0049] 트랜스 캐리오필렌이 지방산 산화 속도를 증가시키는지 알아보기 위하여 세포에 방사능으로 표지된 지방산을 처리한 후, 대사 후에 생성되는 CO_2의 생성 속도를 측정하였다. HepG2 세포에 지질을 축적시킨 후, 양성대조군인 GW7647 (1 μM)과 트랜스 캐리오필렌 (1, 10, 100 μM)을 처리하였다. 24시간 후, [1-^{14}C]로 표지된 팔미트산(0.44mM,57mCi/mmol)을 1시간 처리하여 생성되는 $^{14}CO_2$의 양을 액체섬광계수기를 통해 측정하였다. 세포내 CO_2 성분은 단백질함량을 사용하여 표준화 시켰다.

[0050] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 트랜스 캐리오필렌은 지방산의 산화를 유의하게 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 양성대조군인 GW7647과 트랜스 캐리오필렌 고농도 (100 μM)처리그룹에서 지방산 산화 속도가 대조군 대비 각각 10%, 8% 까지 유의적으로 증가하였다. 이는 트랜스 캐리오필렌이 간에서의 지방산흡수를 증가시킴과 동시에 산화시켜 에너지로의 전환을 증진시켜 결론적으로 혈중 중성지질의 농도를 낮출 수 있다는 점에서 긍정적 효과인 것으로 사료된다.

[0051] **실시예 9: 트랜스 캐리오필렌의 PPAR α와 지방산 대사 조절 효능 평가 (유전자 수준)**

[0052] 트랜스 캐리오필렌이 지질대사에서 미치는 영향을 유전자 수준에서 분석하기위해 qPCR(quantitative real-time PCR) 방법을 사용하였다. PPAR α와 지질대사에 관여하는 주요 유전자를 선별한 후 HepG2 세포로 부터 total RNA를 추출하였고, 이로부터 cDNA를 합성하여 qPCR에 사용하였다. 트랜스 캐리오필렌 처리군은 총 3농도 (1, 10, 100 μM) 로 시험하였으며, 양성대조군으로는 PPAR α agonist로 알려진 GW7647을 1 μM로 처리하여 비교분석 하였다.

[0053] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 트랜스 캐리오필렌에 의해 PPAR α와 그 타겟 유전자의 발현이 유의적으로 변화함을 확인하였다. 트랜스 캐리오필렌은 PPAR α의 mRNA 발현을 80-190% 유의하게 증가시켰고, 상기 결과에 의해 PPAR α 타깃 유전자들 역시 발현의 변화가 있을 것으로 예측하여 관련유전자들의 농도변화를 수행하였다. 간의 세포막에서 지방산을 흡수하는데 관여하는 FATP4와 ACS는 트랜스 캐리오필렌 처리에 의해 각각 115%, 530% 까지 유의적으로 증가하였다. 또한 트랜스 캐리오필렌은 지방산 산화에 관여하는 ACOX와 CPT1의 유전자 발현을 각각 70%, 400% 까지 유의적으로 증가시켰고, 이에 반해 지방산 합성에 관여하는 SREBP1C의 발현은 30% 이상 감소하였다.

[0054] **실시예 10: 트랜스 캐리오필렌의 PPAR α와 지방산 대사 조절 효능 평가 (단백질 수준)**

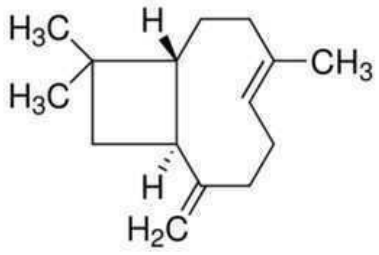
[0055] 간내 지질대사에서 트랜스 캐리오필렌이 미치는 영향을 알아보기 위해 immunoblot 실험법을 사용하여 PPAR α와 그 타겟 유전자의 단백질 발현정도를 측정하였다. HepG2 세포를 배양한 이후, 양성대조군인 GW7647 (1 μM), 트랜스 캐리오필렌 (10 μM, 100 μM)을 24시간동안 처리하였다. 이후 lysis buffer, protease inhibitor, phosphorylase 를 첨가하여 단백질을 추출하고, 정량하여 immunoblot에 사용하였다. Immunoblot에 사용된 단백질량은 40 μg이며, 각 세포에서 발현된 단백질의 양을 각각 정량하여 β-actin당 발현된 각각의 단백질 값을 계산하였다.

[0056] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 트랜스 캐리오필렌에 의한 mRNA 발현 변화와 더불어, 단백질 발현 또한 비슷한 경향으로 나타났다. 고농도의 트랜스 캐리오필렌 처리군에서 PPAR α의 발현은 35% 정도 유의하게 증가하였고, 이는 또한 지방산 흡수 경로에서 FATP4, ACS의 발현을 대조군 대비 각각 19%, 35% 증가시켰다. 또한, 지방산 산화를 위한 ACOX, CPT1의 발현은 대조군 대비 각각 37%, 22% 증가하였으며, 지방산 합성을 위한 SREBP1c의 발현은 100 μM의 고농도에서 19% 정도 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 앞서 관찰된 HepG2 세포내의 중성지질 함량의 감소는 PPAR α의 활성화로 인한 그 타겟 유전자들의 발현 변화에 대한 결과로 사료된다.

[0057] 상기 실시예들의 통계분석은 두 그룹간 유의성 검사는 Students t-test를 이용하였고, 대조군과 비교하여 $*P<0.05$, $**P<0.01$를 의미한다. 각 그래프의 오차막대는 평균 ±SEM으로 나타내었다.

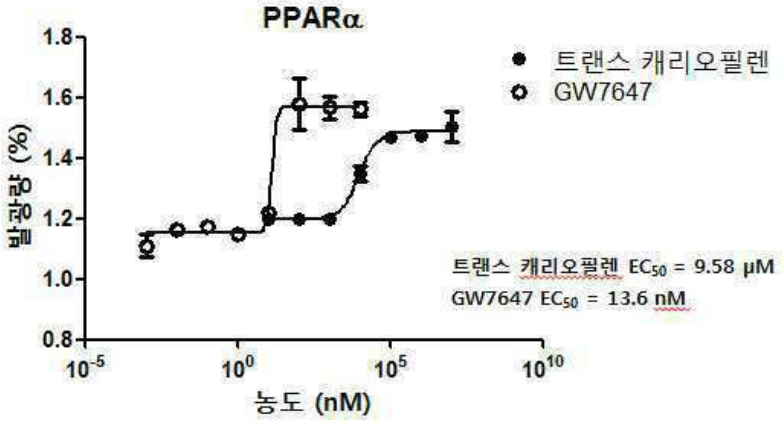
도면

도면1

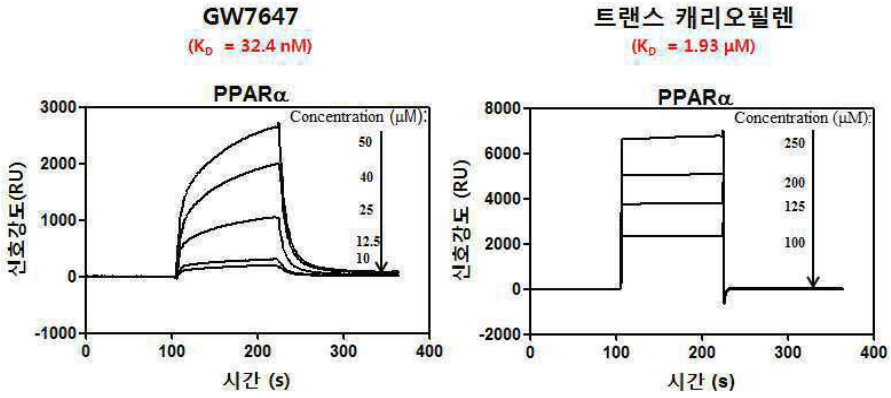


분자식 : $C_{15}H_{24}$
분자량 : 204.35 g/mol

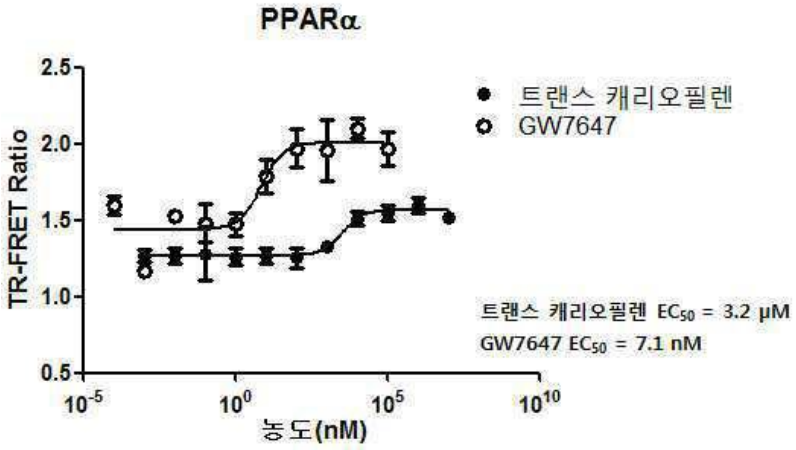
도면2



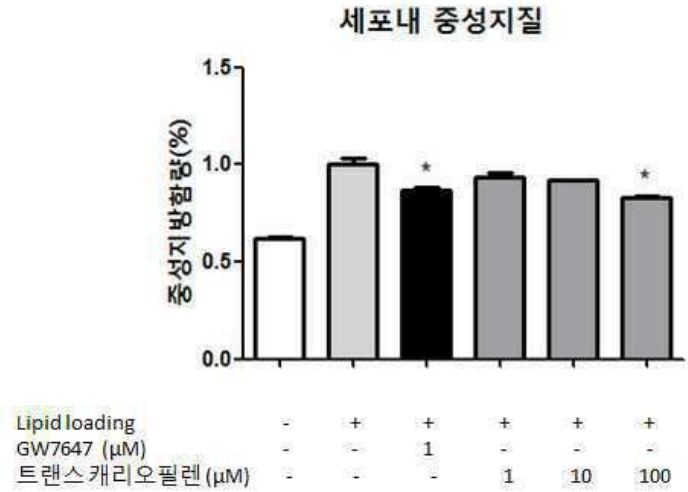
도면3



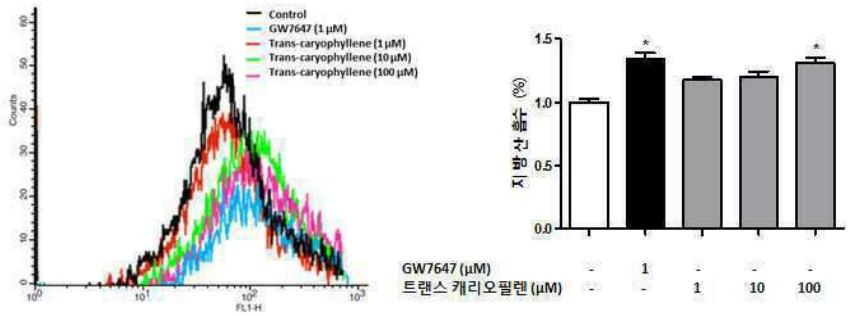
도면4


PPARα
TR-FRET Ratio
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
10^{-5}
10^{0}
10^{5}
10^{10}
농도(nM)
트랜스 캐리오필렌
GW7647
트랜스 캐리오필렌 EC_{50} = 3.2 μM
GW7647 EC_{50} = 7.1 nM

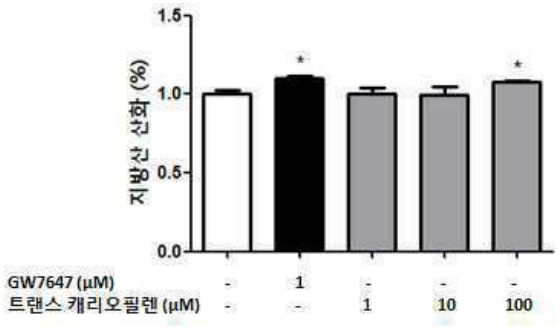
도면5


세포내 중성지질
중성지방함량(%)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
Lipid loading - + + + + +
GW7647 (μM) - - 1 - - -
트랜스캐리오필렌(μM) - - - 1 10 100

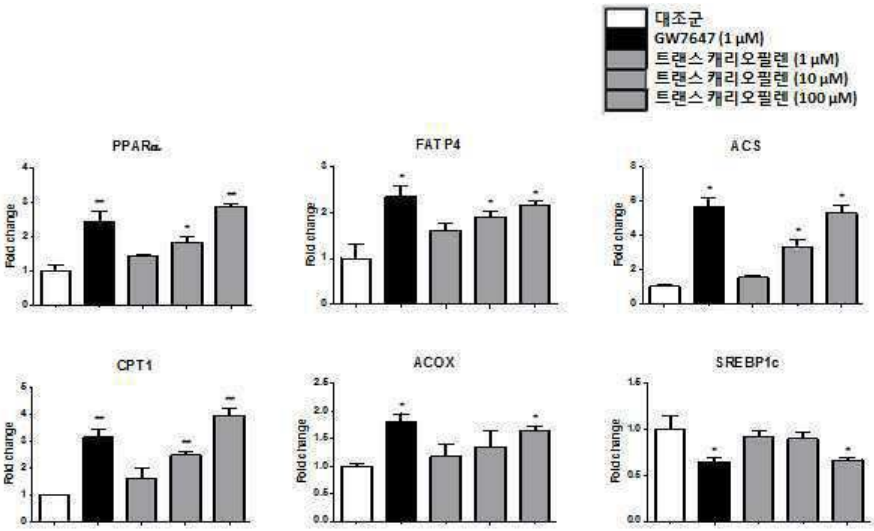
도면6


Control
GW7647 (1 μM)
Trans-caryophyllene (1 μM)
Trans-caryophyllene (10 μM)
Trans-caryophyllene (100 μM)
Counts
FL1-H
지방산 흡수 (%)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
GW7647 (μM) - 1 - - -
트랜스 캐리오필렌 (μM) - - 1 10 100

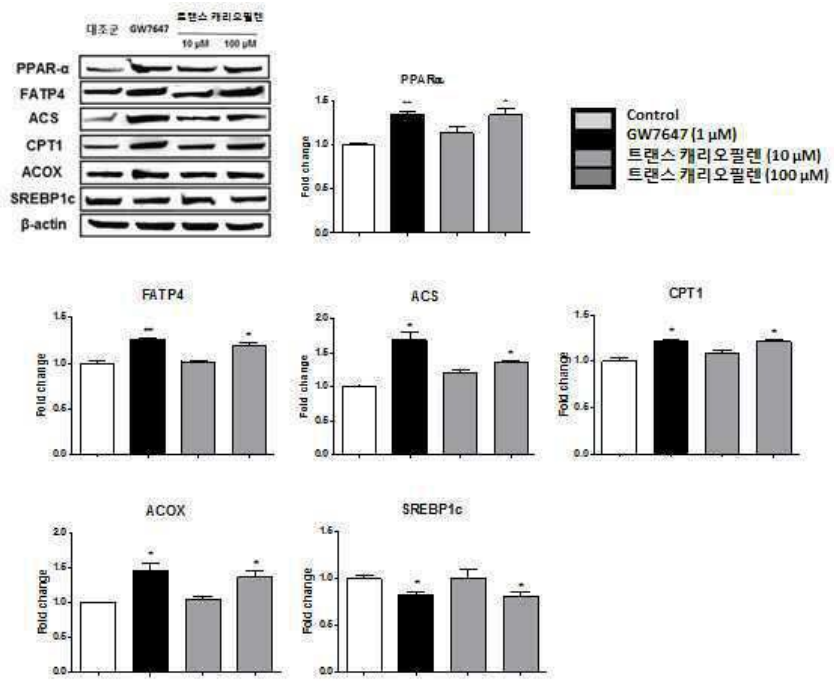
도면7


지방산 산화 (%)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
GW7647 (μM) - 1 - - -
트랜스 캐리오필렌 (μM) - - 1 10 100

도면8


대조군
GW7647 (1 μM)
트랜스 캐리오필렌 (1 μM)
트랜스 캐리오필렌 (10 μM)
트랜스 캐리오필렌 (100 μM)
PPARα
FATP4
ACS
CPT1
ACOX
SREBP1c
Fold change

도면9


대조군
GW7647
트랜스 캐리오필렌
10 μM
100 μM
PPAR-α
FATP4
ACS
CPT1
ACOX
SREBP1c
β-actin
PPARα
Fold change
Control
GW7647 (1 μM)
트랜스 캐리오필렌 (10 μM)
트랜스 캐리오필렌 (100 μM)
FATP4
ACS
CPT1
ACOX
SREBP1c