



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0058203

(43) 공개일자

2016년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/00 (2016.01) A61K 36/185 (2006.01)

A61K 36/66 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0147116

(22) 출원일자

2014년10월28일

심사청구일자

2014년10월28일

(71) 출원인

(주)제주사랑농수산

제주특별자치도 제주시 구좌읍 행원로13길 66

(72) 발명자

양경월

제주특별자치도 제주시 구좌읍 행원로13길 66

김상철

제주특별자치도 제주시 남광로 181, 306동 408호

(일도이동, 대유대림아파트)

김정희

제주특별자치도 제주시 남광로 181,306동 408호(

일도이동, 대유대림아파트)

(74) 대리인

특허법인 태웅

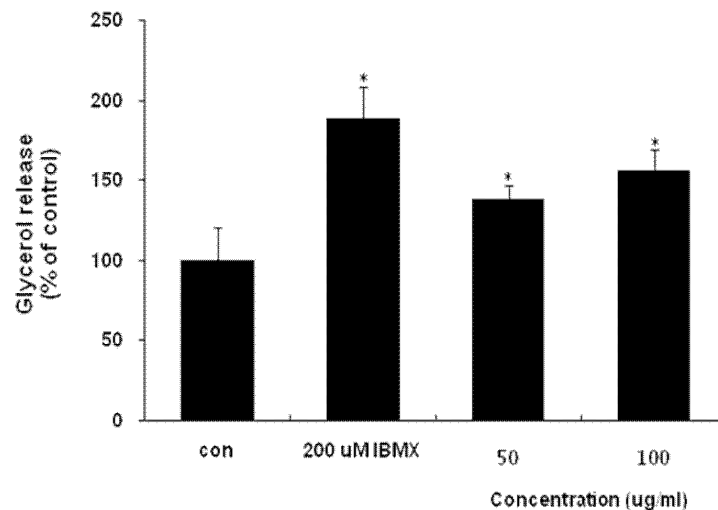
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 유채꽃 추출물을 이용한 항비만용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유채꽃 추출물을 이용한 항비만용 조성물을 개시한다. 구체적으로 본 발명은 인슐린 등에 의하여 3T3-L1 전구지방세포가 지방세포로 분화될 때 중성지방인 트리글리세라이드(triglycerides)의 생성을 억제함과 함께 그 분해를 촉진하고 지방분해효소인 insulin responsive lipase의 발현을 억제하는 활성을 가지는 유채꽃 추출물을 이용한 항비만용 조성물을 개시한다.

대표도 - 도2



명세서

청구범위

청구항 1

유채꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 항비만용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유채꽃 추출물은 유채꽃을 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 얻어진 것을 특징으로 하는 항비만용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 항비만용 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 항비만용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유채(*Brassica napus* L.) 꽃 추출물을 이용한 항비만용 조성물에 관한 것이다.

[0002]

배경 기술

[0003] 최근 우리나라는 경제성장과 더불어 국민소득이 향상되고 식생활이 서구화되면서 각종 동물성 식품의 섭취량이 늘고 있다. 2008년 국민 1인당 하루 평균 식품섭취량 중 식물성 식품이 전체의 80.5%이고 동물성 식품이 19.5%로 집계되어 동물성 식품의 섭취 비율이 국민건강 영양조사를 처음 시작한 1969년에 조사된 3%에 비하여 6배 이상 증가한 것으로 조사되었다.

[0004] 이에 따라 비만 인구가 급속히 늘고 있는데, 우리나라의 비만(BMI>25) 인구 비율은 1995년 11.7%이던 것이 2008년 30.7%, 고도 비만(BMI>30) 인구 비율은 1998년 2.3%에서 2008년 4.1%로 조사되고 있다(보건복지부, 2009).

[0005] 비만은 에너지의 섭취와 소모의 불균형으로 인하여 체내에 에너지가 과잉으로 축적되어 지방조직이 비정상적으로 증가된 상태를 말한다(Clinical Endocrinology 28:675-689, 1998; Clinical Obesity (eds. Kopelman PG, Stock MJ) 248-89 (Blackwell Science, Oxford 1998).

[0006] 세계보건기구(WHO)는 동양인 기준 BMI(Body Mass Index: 체질량지수)가 23~25를 과체중, 25~30을 비만, 30 이상을 고도비만으로 보고 있다.

[0007] 비만의 원인으로는 유전적 요인과 더불어 고지방·고열량의 식생활, 바쁜 사회적 환경에 따른 운동 부족, 내분

비 이상 등 환경적 요인을 들 수 있는데, 이 중 비만의 50 내지 70% 정도가 환경적 요인에 의한 것으로 알려져 있고, 나머지가 유전적 요인에 의한 것으로 알려져 있다.

[0008] 지방세포에 저장된 지방은 체내의 중요한 에너지원으로 사용되지만 비만이 진행됨에 따라서 지방세포의 수적증가와 함께 지방세포의 분화가 이루어진다. 지방세포의 분화에 따라 중성지방(트리글리세라이드) 합성이 증가한다. 지방세포에 축적 저장되는 중성지방은 지방세포의 크기를 증가시키는데 지방의 저장에 따라 그 직경이 약 20배까지 늘어날 수 있으며 그 결과 세포 용적은 수천 배까지 증가되는 것으로 알려져 있다 (Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Int J Obes Relat Metab Disord. 2003;27:875-888). 이러한, 지방세포의 크기는 식사 조절을 통해 조절이 가능하지만 새로운 전구지방세포가 지방세포로 분화되는 과정은 식사 조절로는 효과가 없기 때문에 비만의 근본적 치료 또는 억제를 제어하기 위해서는 지방세포의 분화과정을 조절하는 것이 중요하다.

[0009] 현재 주로 미용 목적으로 사용되고 있는 지방 분해 촉진제로는 카테콜아민의 유도체인 이소프로테레놀(isoproterenol)과 카페인(cafeine)이나 테오필린(theophylline)과 같은 젠틴류(xanthine), 갑상선 호르몬(thyroid hormone), 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 성장호르몬(growth hormone) 등이 있다.

[0010] 이와 같이 물질들은 호르몬이거나 혹은 호르몬 유도체들로서 그에 따른 부작용으로 인해 사용량이 제한되어 있고, 효과에 있어서도 의견이 분분한 상황이다 (Greenway RL, Bray GA. Clin Therapy., 1987; 9(6): 663). 따라서 천연물로부터 유래하는 부작용이 적어 안전하면서도 체중 감소 효과가 우수한 비만 치료제의 개발이 필요하다.

[0011] 유채(*Brassica napus* L.)는 십자화과(Brassicaceae)에 속하며, 캐나다, 아르헨티나, 인도 등에서 다량으로 재배되고 있는 유종실 작물이며, 국내에서는 제주도 전역과 남부지역에서 재배되고 있는 중요한 식물자원이다. 특히 유채는 거의 모든 부분(유채대, 유채씨, 유채유성분, 유채박)을 산업에 직간접적으로 활용 할 수 있는 에너지 작물이며 주로 종실로부터 기름을 짜서 이용하는 유지 작물 중 하나이다. 한방에서는 유채꽃의 지상부(운대)는 산혈, 소종의 효능이 있으며, 산후혈풍, 어혈, 토혈, 노상, 혈리, 단독, 열독창을 치료하며, 종자(운대자)는 행혈, 파기, 소종, 산결의 효능이 있으며, 산후복통, 하혈, 혈리, 중독, 치루, 몽정의 치료 등의 용도로 사용하여 왔다(.한국약초도감, 박종희, 2004)

[0012] 또한, 종실에서 착유한 기름은 식용으로서 샐러드, 마가린, 버터, 과자제조 등에 쓰이며 의학 및 공업용으로는 강철당금유, 인조고무, 비누, 인쇄잉크, 화장품제조 등에 쓰이고 있다. 그리고 어린 잎과 줄기는 채소로 많이 이용되고 있으며 줄기는 사료로도 쓰이고 있다. 하지만 아직까지 유채꽃에 대한 비만예방 및 치료제로서의 연구 및 보고는 없는 실정이다,

[0013] 본 발명은 유채꽃 추출물의 항비만 활성을 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 유채꽃 추출물을 이용한 항비만용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명자들은 아래의 실시예 및 실험예에서 확인되는 바와 같이, 유채꽃 추출물이 인슐린 등에 의하여 3T3-L1 전구지방세포가 지방세포로 분화될 때 중성지방인 트리글리세라이드(triglycerides)의 생성을 억제함과 함께 그 분해를 촉진하고 지방분해효소인 insulin responsive lipase의 발현을 억제함을 확인할 수 있었다.

[0017] 본 발명은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것으로서, 본 발명의 항비만용 조성물은 유채꽃 추출물을 유효성분으로 포함함을 특징으로 한다.

[0018] 본 명세서에서, "추출물"이란 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N, N-디메틸포름아미드(DMF), 디메

틸선평사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 얻어진 조추출물과 그 추출물을 상기 열거한 용매 중 하나 이상으로 분획하여 얻어진 분획물을 말한다. 추출 방법은 유효성분의 추출 정도, 보존 정도를 고려하여 냉침, 환류, 가온, 초음파 방사 등 임의의 방식을 적용될 수 있다. 분획된 추출물의 경우 상기 조추출물을 특정 용매에 현탁시킨 후 극성이 다른 용매와 혼합·정제시켜 얻은 분획물, 상기 조추출물을 실리카 겔 등이 충전된 칼럼에 흡착시킨 후 소수성 용매, 친수성 용매 또는 이들의 혼합 용매를 이동상으로 하여 얻은 분획물을 포함하는 의미이다. 또한 상기 추출물의 의미에는 동결건조, 진공건조, 열풍건조, 분무건조 등의 방식으로 추출 용매가 일부 제거된 농축된 액상의 추출물 또는 전부 제거된 고형상의 추출물이 포함된다. 바람직하게는 아래의 실시예에서와 같이 추출용매로서 물, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 얻어진 추출물, 특히 물과 에탄올의 혼합 용매를 사용하여 얻어진 추출물을 의미한다.

- [0019] 또한 본 명세서에서, "비만"이란, 그것이 유전적 요인에 의한 비만이든 또는 환경적 요인에 의한 비만이든 지방 조직이 비정상적으로 증가된 상태를 의미하며, 체질량지수의 구분에 따른 비만(BMI이 30.0 이상인 경우)과 과체중(BMI이 25~30인 경우)을 포함하는 의미이다.
- [0020] 또한 본 명세서에서, "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [0021] 또한 본 명세서에서, "항비만"이란 비만의 예방, 비만의 치료를 포함하여, 체지방의 감소 및/또는 체중의 감소를 포함하는 의미이다.
- [0022] 본 발명의 항비만제 조성물은 그 유효성분을 비만 개선 활성을 나타낼 수 있는 한 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 99.990 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 비만 개선 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 조성물이 적용(치방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다.
- [0024] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 유채꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 다이어트용 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 본 명세서에서 "다이어트"란 체중 상태가 비만이나 과체중은 아니지만 미용이나 건강 목적으로 체중/체지방의 감소가 바람직하거나 필요한 상태로서 정의된다. 통상 본 발명의 다이어트용 조성물은 정상인의 미용이나 건강 목적으로 사용하기 위하여 제조·사용될 것이다.
- [0026] 본 발명의 다이어트용 조성물에 있어서, 유채꽃 추출물의 의미, 그것의 유효량 등과 관련하여서는 상기 본 발명의 항비만제 조성물과 관련하여 전술한 바가 그대로 유효하다.
- [0027] 본 발명의 항비만용 조성물과 다이어트용 조성물(이하 "본 발명의 조성물")은 그 유효성분인 유채꽃 추출물을 포함하는 이외에, 그 항비만 활성 등을 상승·보강할 수 있도록 항비만 활성을 갖는 공지의 천연물 또는 화합물을 포함할 수 있다.
- [0028] 그러한 천연물 또는 화합물로서는 구기자 분말 또는 추출물, 어성초 분말 또는 추출물, 삼백초 분말 또는 추출물, 마황 분말 또는 추출물, 석고 분말 또는 추출물, 창출 분말 또는 추출물, 죽엽 분말 또는 추출물, 황금 분말 또는 추출물, 두충엽 분말 또는 추출물, 솔잎 분말 또는 추출물, 구기자 분말 또는 추출물, 인삼 분말 또는 추출물, 오갈피 분말 또는 추출물 등을 들 수 있다.
- [0029] 상기에서 추출물의 의미는 유채꽃 추출물과 관련하여 앞서 설명한 바와 같다. 이러한 추출물은 추출 대상을 혼합하여 얻어질 수도 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로 파악할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 감미제, 풍미제, 생리활성 성분, 미네랄 등이 포함될 수 있다.
- [0032] 감미제는 식품이 적당한 단맛을 나게 하는 양으로 사용될 수 있으며, 천연의 것이거나 합성된 것일 수 있다. 바람직하게는 천연 감미제를 사용하는 경우인데, 천연 감미제로서는 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 당 감미제를 들 수 있다.
- [0033] 풍미제는 맛이나 향을 좋게 하기 위하여 사용될 수 있는데, 천연의 것과 합성된 것 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 천연의 것을 사용하는 경우이다. 천연의 것을 사용할 경우에 풍미 이외에 영양 강화의 목적도 병행할 수 있다. 천연 풍미제로서는 사과, 레몬, 감귤, 포도, 딸기, 복숭아 등에서 얻어진 것이거나 녹차잎, 둥굴레,

대잎, 계피, 국화 잎, 자스민 등에서 얻어진 것일 수 있다. 또 인삼(홍삼), 죽순, 알로에 베라, 은행 등에서 얻어진 것을 사용할 수 있다. 천연 풍미제는 액상의 농축액이나 고형상의 추출물일 수 있다. 경우에 따라서 합성 풍미제가 사용될 수 있는데, 합성 풍미제는 에스테르, 알콜, 알데하이드, 테르펜 등이 이용될 수 있다.

- [0034] 생리 활성 물질로서는 카테킨, 에피카테킨, 갈로가테킨, 에피갈로카테킨 등의 카테킨류나, 레티놀, 아스코르브산, 토코페롤, 칼시페롤, 티아민, 리보플라빈 등의 비타민류 등이 사용될 수 있다.
- [0035] 미네랄로서는 칼슘, 마그네슘, 크롬, 코발트, 구리, 불소화물, 게르마늄, 요오드, 철, 리튬, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 인, 칼륨, 셀레늄, 규소, 나트륨, 황, 바나듐, 아연 등이 사용될 수 있다.
- [0036] 또한 본 발명의 식품 조성물은 상기 감미제 등 이외에도 필요에 따라 보존제, 유향제, 산미료, 점증제 등을 포함할 수 있다.
- [0037] 이러한 보존제, 유향제 등은 그것이 첨가되는 용도를 달성할 수 있는 한 극미량으로 첨가되어 사용되는 것이 바람직하다. 극미량이란 수치적으로 표현할 때 식품 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.0005중량% 내지 약 0.5중량% 범위를 의미한다.
- [0038] 사용될 수 있는 보존제로서는 소듐 소르브산칼슘, 소르브산나트륨, 소르브산칼륨, 벤조산칼슘, 벤조산나트륨, 벤조산칼륨, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 등을 들 수 있다.
- [0039] 사용될 수 있는 유향제로서는 아카시아검, 카르복시메틸셀룰로스, 잔탄검, 펙틴 등을 들 수 있다.
- [0040] 사용될 수 있는 산미료로서는 연산, 말산, 푸마르산, 아디프산, 인산, 글루콘산, 타르타르산, 아스코르브산, 아세트산, 인산 등을 들 수 있다. 이러한 산미료는 맛을 증진시키는 목적 이외에 미생물의 증식을 억제할 목적으로 식품 조성물이 적정 산도로 되도록 첨가될 수 있다.
- [0041] 사용될 수 있는 점증제로서는 현탁화 구현제, 침강제, 겔형성제, 팽화제 등을 들 수 있다.
- [0042] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약제학적 조성물은 그 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등을 포함하여, 경구용 제형(정제, 현탁액, 과립, 에멀전, 캡슐, 시럽 등), 비경구용 제형(멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액), 국소형 제형(용액, 크림, 연고, 젤, 로션, 패치) 등으로 제조될 수 있다.
- [0044] 상기에서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응가능한 독성 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.
- [0045] 약제학적으로 허용되는 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 전분(예컨대 옥수수 전분, 감자 전분 등), 셀룰로오스, 그것의 유도체(예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸셀룰로오스 등), 맥아, 젤라틴, 탈크, 고체 윤활제(예컨대 스테아르산, 스테아르산 마그네슘 등), 황산 칼슘, 식물성 기름(예컨대 땅콩 기름, 면실유, 참기름, 올리브유 등), 폴리올(예컨대 프로필렌 글리콜, 글리세린 등), 알긴산, 유향제(예컨대 TWEENS), 습윤제(예컨대 라우릴 황산 나트륨), 착색제, 풍미제, 정제화제, 안정화제, 항산화제, 보존제, 물, 식염수, 인산염 완충 용액 등을 들 수 있다. 이러한 담체는 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적당한 것을 하나 이상 선택하여 사용할 수 있다.
- [0046] 부형제도 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적합한 것을 선택하여 사용할 수 있는데, 예컨대 본 발명의 약제학적 조성물이 수성 현탁제로 제조될 경우에 적합한 부형제로서는 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 히드로프로필메틸셀룰로오스, 알긴산 나트륨, 폴리비닐피롤리돈 등의 현탁제나 분산제 등을 들 수 있다. 주사액으로 제조되는 경우 적합한 부형제로서는 링거액, 등장 염화나트륨 등을 들 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있고, 경우에 따라서는 국소적으로 투여될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약제학적 조성물은 그 1일 투여량이 통상 0.001 ~ 150 mg/kg 체중 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니 된다.

발명의 효과

- [0049] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 유채꽃 추출물을 이용한 항비만용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 항비만용 조성물은 식품 또는 약품으로 제형화될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1은 유채꽃 추출물의 3T3-L1 지방전구세포에 대한 독성 실험 결과이다.
- 도 2는 유채꽃 추출물의 분화된 3T3-L1 세포에서의 지방분해 촉진 활성을 유리된 글리세롤의 함량으로 평가한 결과이다.
- 도 3은 유채꽃 추출물의 분화된 3T3-L1 세포에서의 중성지방인 트리글리세라이드의 생성 억제 효과를 보여주는 결과이다.
- 도 4는 유채꽃 추출물의 분화된 3T3-L1 세포에서의 지방분해효소인 insulin responsive lipase의 발현 억제 활성을 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] <실시예> 유채꽃 추출물의 제조

- [0054] 실험에 사용된 유채꽃을 제주 구좌읍 행원리 부근에서 채취하여 음건하였고, 음건된 식물체는 세절하여 분쇄한 후 실험재료로 사용하였다.
- [0055] 유채꽃의 추출은 유채꽃 1.0 kg을 70% 에탄올로 실온에서 24시간 동안 3회 추출 후 여과(Whatman No.2)한 여액을 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)로 농축 후 동결건조 하여 실험 때까지 -20℃에 보관하여 사용하였다.

[0056] <실험예> 유채꽃 추출물의 항비만 활성 실험

[0057] <1> 실험 방법

[0058] <1-1> 지방세포의 분화 유도

- [0059] 실험에 사용한 3T3-L1 (CL-173) 지방전구세포를 ATCC (American Tissue Culture Collection)으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 배지는 100 units/ml 의 penicillin-streptomycin (GIBCO Inc, NY, USA) 과 10% 의 bovine calf serum (BCS; GIBCO Inc, NY, USA) 이 함유된 DMEM (GIBCO Inc, NY, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3-4일에 한 번씩 시행하였다.

- [0060] 3T3-L1 지방전구세포를 24 well plate에 5×10^4 /well의 세포수로 분주한 후 100% confluency 시점이 되면 2일 동안 더 유지시켰다. 지방전구세포는 MDI (0.5 mM IBMX, 1μM dexamethasone, 1 μg/ml insulin)를 포함하는 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO Inc, NY, USA)이 함유된 DMEM 배지로 지방세포 분화를 2일 동안 유도하였고, 배양 48시간 후, 1μg/ml insulin이 함유된 10% FBS DMEM 으로 이틀 동안 배양하였다. 그 후 2일마다 4일 동안 10% FBS DMEM 배양액으로 교체하여 완전하게 분화된 지방세포를 얻었다.

[0061] <1-2> 세포독성 실험

- [0062] 실시예의 유채꽃 추출물 처리에 의한 세포독성 실험은 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하였다 (Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD and Mitchell JB. *Cancer Research*. 1987; 47(4): 936-942.). 3T3-L1 전구지방세포 (5×10^4 /well)을 96 well plate의 각 well에

넣고 24시간 배양한다. 유채꽃 추출물을 농도별로 첨가하여 3 일간 배양한 다음, MTT (Sigma, MO, USA) 100 μ g (2 mg/ml)을 첨가하고 4 시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm 에서 5분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma, MO, USA) 150 μ l 을 가하여 MTT 의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식 억제 정도를 조사하였다.

[0063] <1-3> 지방분해 촉진 효과 실험 - Glycerol release assay

[0064] 완전히 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 버리고, PBS(-)로 세정한 후, 10 % FBS를 함유하는 DMEM 교환한다. 교환 후 실시예의 유채꽃 추출물을 처리하여 24시간 더 배양하였다. 이후 세포배양 상층액(10 μ l)만 취하여 유리 글리세롤 시약(0.8ml; Free Glycerol Reagent; sigma-Aldrich)에 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후 microplate에 옮겨 넣고 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 지방분해 촉진율을 구하였다.

[0065] <1-4> 중성지방 억제 효과 실험 - Triglycerides accumulation

[0066] 세포를 파쇄 후 1ml Triton X-100에 넣고 80~100℃까지 2~5min 동안 가열해 준다. 실온에서 식힌 후 한 번 더 가열을 반복한다. 샘플을 96well plate에 넣고 triglyceride assay kit (Sigma-Aldrich, USA) 를 이용하여 정량한다. 샘플을 분주한 각각의 well에 lipase를 넣어준 후 triglyceride가 글리세롤과 지방산으로 변할 때까지 실온에서 배양 후 Triglyceride probe, enzyme mix, assay buffer를 넣고 반응시켜 흡광도 570 nm에서 측정한다.

[0067] <1-5> 지방분해효소 발현 억제 효과 실험 - Western blot analysis

[0068] 적정량의 단백질을 위해서 1×10^6 개의 세포를 수확한 다음, 차가운 PBS로 2-3회 세척한다. 500 μ l의 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 μ g/ml aprotinin, 25 μ g/ml leupeptin)를 첨가하여 1시간 동안 lysis 시켰으며, 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량하였다(Bradford MM. Analytical Biochemistry. 1976; 72, 248-254). 40 μ g의 lysate를 10% 및 12% mini gel SDS-PAGE(Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane(BIO-RAD, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 Membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. 1차 항체를 TTBS 용액에서 희석(1:1000)하여 1시간 반응 후 TTBS로 3회 세척하였다. 2차 항체로는 HRP (HorseRadish Peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)또는 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 1: 5000으로 희석하여 이용하였으며, 반응은 상온에서 30분 동안 진행하였다. 그 후 membrane을 TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Pharmacia Biotech, UK, USA)과 1-3분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

[0069] <2> 실험 결과

[0070] <2-1> 세포독성 실험 결과

[0071] 실시예의 유채꽃 추출물의 세포 독성 평가에 대한 효과는 tetrazolium salt의 하나인 MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다. 3T3-L1 세포를 96 well plate에 5×10^4 /well 세포수로 분주하여 배양한 후 유채꽃 추출물을 각각 농도별 (0, 50, 100 μ g/ml)로 24시간 동안 처리하여 실험을 진행하였다.

[0072] 결과를 [도 1]에 나타내었는데, [도 1]을 참조하여 보면, 모든 처리 농도에서 특별한 세포독성을 나타내지 않았다.

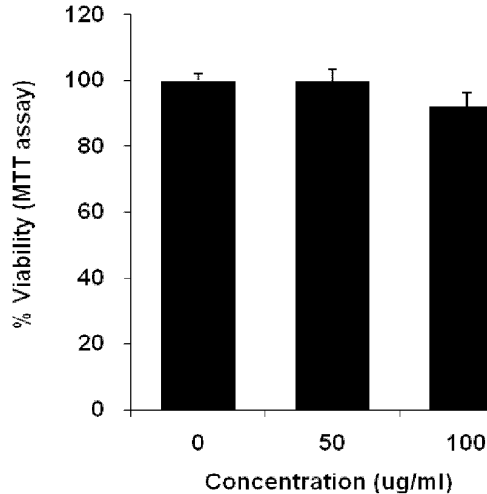
[0073] <2> 지방분해 촉진 효과 실험 결과

[0074] 지방세포 내 축적된 지방구에 존재하는 triglyceride가 분해되면 glycerol 과 지방산으로 나누어지는데 인체의 경우 glycerol은 세포 외 혈액으로 유리되어 간으로 이송되게 된다. 마찬가지로 3T3-L1 지방세포에서는 유리된 glycerol의 함량이 지방구 내 triglyceride의 분해 정도를 간접적으로 나타내는 척도가 된다.

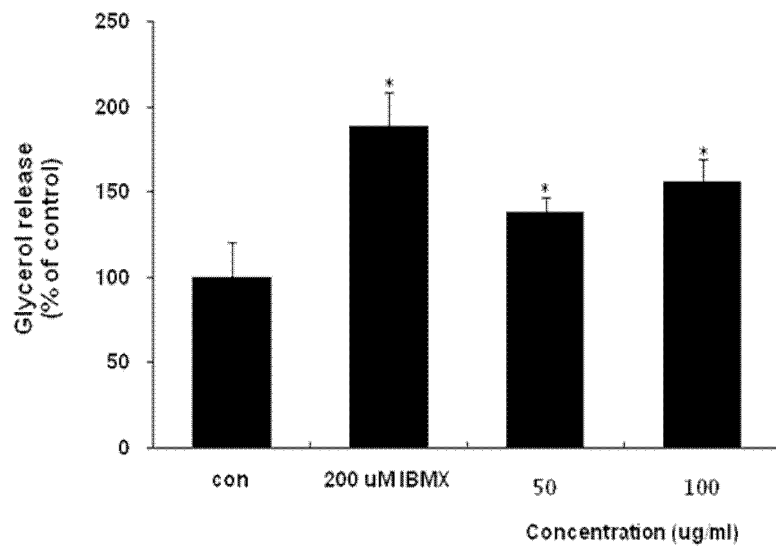
- [0075] [도 2]에서 확인되는 바와 같이, 실시예의 유채꽃 추출물을 처리한 결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유리된 glycerol의 정도가 38.0%, 55.9%로 증가한 것을 확인하였는데, 이는 유채꽃 추출물에 의해 triglyceride의 분해가 촉진된 결과로 볼 수 있다.
- [0076] <3> 중성지방 억제 효과 실험 결과
- [0077] 미성숙 지방세포 3T3-L1에 MDI를 처리하여 지방세포를 분화를 유도한 후 생성된 트리글리세라이드를 트리글리세라이드 측정 키트를 이용하여 측정하였다.
- [0078] 결과를 [도 3]에 나타내었는데, 실시예의 유채꽃 추출물을 처리함에 의해 농도(50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$) 의존적으로 중성지방의 양이 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0079] <4> 지방분해효소 발현 억제 효과 실험 결과
- [0080] 지방세포에서 triglyceride의 분해는 insulin responsive lipase 인 HSL에 의해 주로 매개되는 것으로 알려져 있는데, 세포 내 지방의 함량을 조절하는 중요한 단계로 여겨지고 있다. 본 실험에서는 유리된 glycerol이 HSL 등의 지방분해효소에 의한 것인지 판단하기 위해 단백질 발현 측정하였다.
- [0081] 결과를 [도 4]에 나타내었는데, 3T3-L1 지방세포로부터 HSL 단백질 발현을 확인한 결과, 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 HSL 단백질 발현이 유의적으로 증가를 나타내었다.
- [0082] 이러한 결과는 분화된 3T3-L1 지방세포에서 유채꽃 추출물의 지방축적 억제효과는 HSL 지방분해효소의 발현 증가에 의한 것으로 판단된다.

도면

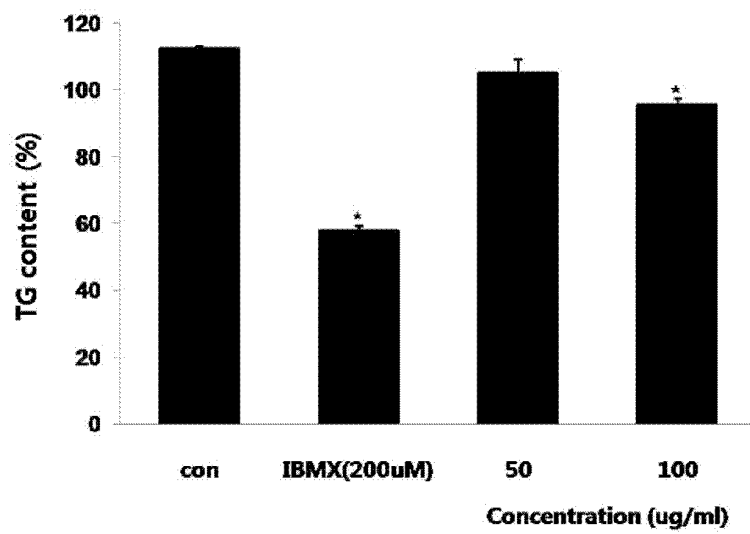
도면1



도면2



도면3



도면4

