

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0138144 (43) 공개일자 2012년12월24일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/56 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01) A61P 25/32 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)	
(21) 출원번호 10-2011-0057481	(72) 발명자 정성현 서울특별시 서초구 신반포로 270, 111동 1701호 (반포동, 반포자이)	
(22) 출원일자 2011년06월14일 심사청구일자 2011년06월14일	권해연 서울특별시 동대문구 천장산로7길 52-12, 103호 (이문동)	
	(74) 대리인 안소영	

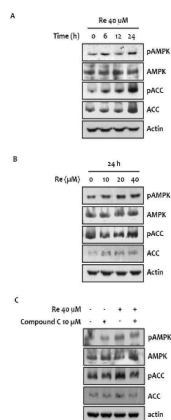
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 진세노사이드 Re 를 유효성분으로 함유하는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 진세노사이드 Re 를 유효성분으로 함유하는 약학적 또는 식품 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 약학적 또는 식품 조성물은 지방간의 예방, 개선 또는 치료 효과를 나타낸다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20101797
부처명	농림수산식품기술기획평가원(농림기술관리센터)
연구사업명	생명산업기술개발
연구과제명	전임상실험
주관기관	세명대학교
연구기간	2010.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

진세노사이드 Re 를 유효성분으로 함유하는, 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 지방간은 비알코올성 지방간인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 진세노사이드 Re 를 조성물 전체 중량에 대하여 1 내지 50 중량%로 함유하는 약학적 조성물.

청구항 4

진세노사이드 Re 를 유효성분으로 함유하는, 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 지방간은 비알코올성 지방간인 식품 조성물.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 진세노사이드 Re 를 조성물 전체 중량에 대하여 1 내지 50 중량%로 함유하는 식품 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 지방간의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 생활수준의 향상으로 인하여 위생환경이 개선되고 식생활의 향상으로 섭취열량 또한 급속한 증가가 이루어지고 있는 반면, 운동은 부족하고 소비되는 열량은 적어 체내에 과도한 영양분의 축적 등으로인한 각종 성인병의 발생이 증가하고 있다. 이와 같은 성인병 중 특히 지방의 과다 섭취는 혈중 콜레스테롤, 체내 지방축적으로 인한 지방간 유발 즉 간의 지방함성 증가, 중성지방 배출 및 연소 감소 등으로 인하여 간에 지방이 축적되어 발생하며 또한 동맥경화 등 심혈관계 질환을 유발할 수 있다.

[0003] 지방간에서 축적된 지방의 대부분은 중성지방(triglyceride)이며, 지방간은 크게 과음으로 인한 알코올성 지방간과 비만, 당뇨병, 고지혈증 또는 약물 등으로 인한 비알코올성 지방간으로 나눌 수 있다. 비알코올성 지방간은 비만, 인슐린 과민증, 당뇨병으로 앓고 있는 사람에게서 많이 발생하며 인슐린 저항성이나 과도한 지방 분해에 의해 혈액내 유리 지방산의 농도가 높아지는 것에 기인하여 나타난다.

[0004] 현재 지방간을 약물학적으로 치료하는데 유용한 약제는 거의 없는 상태이며 운동과 식이요법만이 권장되고 있기 때문에 지방간 치료제 개발이 요구된다.

[0005] 최근에는 AMPK (AMP-Activated Protein Kinase: 5'아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 키나아제)의 다양한 기능이 보고되면서 특히 항비만의 타겟 분자로 알려지고 있다. AMPK는 세포내 AMP를 감지하여 활성화되는 단백질로서 ATP를 소모하는 신호전달경로를 억제하고 ATP를 합성하는 신호전달경로를 활성화하여 에너지 대사의 촉진에 있어서 중요한 역할을 하는 대표적인 단백질이다. 또한 AMPK를 활성화시킴으로써, 지방산 산화 촉진, 간의 TG축적 억제, 2형 당뇨, 대사증후군, 비만, 암, 퇴행성질환(치매) 등의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다는 것이 알려져 있다.

[0006] SREBP1은 지방축적을 조절하는 전사인자로서 지방산, 중성지방, 콜레스테롤, 인지질 등의 합성과 흡수를 조절한

다. SREBP (Sterol regulatory element-binding protein: 스테롤 조절 인자 결합 단백질)는 소포체막에 결합한 불활성 전구체로 합성되고 N 말단이 잘려나간 후 활성화되어 핵으로 이동하게 되고 조절 유전자 프로모터의 SRE(sterol regulatory elements: 스테롤 조절인자)에 결합하게 된다. 그 중 SREBP1은 중성지질의 합성을 주로 조절하는 것으로 알려져 있다. 지방축적으로 인한 지방간 유발 즉 간의 지방합성을 조절하는 유전자는 SREBP1을 비롯해 FAS (fatty acid synthase: 지방산 합성효소), SCD1 (stearol CoA desaturase: 스테롤 코에이 탈포화효소), 및 GPAT(glycerol-3-phosphate acyltransferase: 글리세롤-3-인산 아실트랜스퍼라제) 등이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 지방간 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0008] 본 발명은 또한 지방간 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 안전성이 우수한 천연물을 대상으로 지방간의 치료를 위한 다양한 활성 물질을 검색한 결과, 놀랍게도 인삼의 활성 성분중 하나인 진세노사이드 Re가 간조직 내 지방구 생성을 감소시키고, 또한 간세포에서 지방 축적에 관여하는 유전자인 SREBP1, FAS, SCD1 의 발현을 억제하는 동시에 간세포 내 AMPK 를 활성화시켜 지방 축적을 억제하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

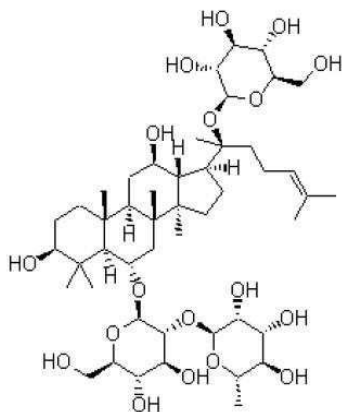
[0010] 본 발명은 진세노사이드 Re 를 유효성분으로 포함하는 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 바람직하게는, 본 발명은 진세노사이드 Re 를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 진세노사이드 Re 를 유효성분으로 포함하는 지방간의 예방 또는 치료용 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 바람직하게는, 본 발명은 진세노사이드 Re 를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료용 식품 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 조성물 내 유효성분인 진세노사이드 Re (Ginsenoside Re)는 프로토파낙사트리올(Protopanaxatriol)계 진세노사이드의 일종으로, 그 화학 구조는 다음과 같다.



<진세노사이드 Re>

[0015]

[0016] 진세노사이드 Re 는 항당뇨 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 (Jing-Tian Xie 등, Biochimica et Biophysica Acta, 1740, p.319-325, 2005), 혈장 콜레스테롤 수준 감소 효과 (Xuan Xia 등, Journal of Diabetes, 2, p.243-249, 2010), 피부개선 효과 (대한민국 공개특허공보 10-2011-0034742호) 등이 공개되었으나, 간세포에서 지방 축적 관련 유전자인 SREBP1, FAS, SCD1의 발현을 억제하고, 간세포 내 AMPK 를 활성화하며, 간지방 조직에서 지방구를 감소시키는 작용효과에 대해서는 밝혀진 바 없었다.

- [0017] 본 발명에서, 진세노사이드 Re는 당 분야에 공지된 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 인삼 또는 홍삼으로부터 분리될 수 있으며, 예컨대, 인삼 또는 홍삼으로부터 박층크로마토그래피법, 고성능액체크로마토그래피법 등에 의하여 분리될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 상기 인삼은 통상적으로 사용되는 인삼일 수 있으며, 바람직하게는 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer), 화기삼(*Panax quinquefolium*), 전칠삼(*Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonicum*), 삼엽삼(*Panax trifolium*) 또는 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*)일 수 있다. 더 바람직하게는 인삼일 수 있으며, 그 가공형태에 따라서 수삼 또는 백삼일 수 있다. 또한, 홍삼은 통상적으로 사용되는 홍삼일 수 있으며, 예를 들어 천삼(天蔘:heaven grade ginseng) 지삼(地蔘:earth grade ginseng) 및/또는 양삼(良蔘:good grade ginseng) 등을 사용할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 약학적 조성물 내 진세노사이드 Re의 함량은 질환의 증상, 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 1 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 5 중량% 이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 약학적 조성물 내 유효성분으로 함유되는 진세노사이드 Re는 약제학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등과 함께 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 구현형태로써, 본 발명에 따른 진세노사이드 Re를 함유하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0022] 여기에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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 광물유 등을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0024] 경구투여를 위한 고형제제로 제제화되는 경우, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 가능하며, 이러한 고형 제제는 진세노사이드 Re 이외에 적어도 한 가지 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 혼합하여 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [0025] 경구투여를 위한 액상제제로 제제화되는 경우, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 가능하며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0026] 비경구 투여를 위한 제제로 제제화되는 경우, 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위하여, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분인 진세노사이드 Re 함량을 기준으로 성인 기준 1일 10 mg/kg 내지 50 mg/kg으로, 바람직하게는 5 mg/kg 내지 20 mg/kg 이다.
- [0028] 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 범주는 상기 투여량 및 투여횟수에 의해 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구로, 또는 복강내, 직장내, 정맥내, 근육내, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(Intracerebroventricular)로 주사 등에 의해 투여될 수 있다.

- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 지방간의 질환의 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 지방간은 비알코올성 지방간이다.
- [0031] 따라서, 본 발명은 지방간, 바람직하게는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료를 위한 진세노사이드 Re의 용도, 지방간, 바람직하게는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 진세노사이드 Re의 용도, 인간을 포함한 포유류에 약제학적으로 유효한 양의 진세노사이드 Re를 투여하는 것을 포함하는 지방간, 바람직하게는 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료를 위한 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명은 또한 진세노사이드 Re 를 유효성분으로 함유하는, 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0033] 바람직하게는, 본 발명은 진세노사이드 Re 를 유효성분으로 함유하는, 비알코올성 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0035] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정 이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0036] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0037] 본 발명의 건강 기능성 식품 조성물은 지방간, 바람직하게는 비알코올성 지방간의 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 지방간, 바람직하게는 비알코올성 지방간의 예방 또는 개선을 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여 진세노사이드 Re를 약 1 내지 50 중량% 로 포함할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 지방간, 바람직하게는 비알코올성 지방간의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0040] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 진세노사이드 Re, 부형제, 결합제, 봉해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0041] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질캡슐제는 통상의 경질캡슐에 진세노사이드 Re, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡슐제는 진세노사이드 Re, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0042] 환 형태의 건강기능식품은 진세노사이드 Re, 부형제, 결합제, 봉해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [0043] 과립형태의 건강기능식품은 진세노사이드 Re, 부형제, 결합제, 봉해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μ m), 14호 (1410 μ m) 및 45호 (350 μ m) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것이 전체량의 5.0 %이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하일 수 있다.
- [0044] 상기 부형제, 결합제, 봉해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5

개정판, p33-48, 1989).

발명의 효과

- [0045] 본 발명의 진세노사이드 Re는 간조직 내 지방구의 생성을 감소시키고, 간세포에서 지방 축적에 관여하는 유전자인 SREBP1, FAS, SCD1, GPAT 의 발현을 억제하는 동시에 간세포 내 AMPK 를 활성화시켜 지방 축적을 억제하는 작용효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 진세노사이드 Re를 함유하는 약학적 또는 식품 조성물은 지방간의 예방, 개선 또는 치료 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 진세노사이드 Re에 의한 간세포에서 AMPK 및 ACC 인산화 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 진세노사이드 Re에 의한 간세포에서 지방생성 관련 유전자인 SREBP1, FAS, SCD1의 발현 억제를 확인한 도이다.
- 도 3은 진세노사이드 Re에 의한 간조직 내 지방구의 감소를 확인한 도이다.
- 도 4는 진세노사이드 Re에 의한 고지방식이 마우스의 간조직 세포에서 AMPK 및 ACC 인산화 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 간조직 내 진세노사이드 Re에 의한 고지방식이 마우스의 간조직 내 지방생성 관련 유전자인 SREBP1, FAS, SCD1, GPAT의 발현 억제를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[제조예]

- [0049] 진세노사이드 Re는 세명대학교 고성권교수님 연구실에서 제공하였고 0.1 % DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹여 사용하였다.

[실시예]

[0051] 실시예 1. 진세노사이드 Re의 간세포에서 지방 생성 억제 효과 확인

[0052] (1) 간세포의 배양 및 진세노사이드 Re 처리

- [0053] 인간 간암세포주 HepG2 (ATCC No. HB-8065)는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다. 10% 소태아 혈청 (FBS: fetal bovine serum), 페니실린 (100U/ml), 스트렙토마이신 (100U/ml)을 포함한 고글루코스 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco)를 사용하여 CO₂ 배양기에 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

- [0054] HepG2 세포를 6 웰 플레이트에 씨딩하고 이튿날 진세노사이드 Re 를 농도별(0, 10, 20, 40 μM; 24시간 처리) 및 시간별 0, 6, 12, 24 시간 (진세노사이드 Re 40 μM 처리)으로 각각 처리하여 시료를 준비하였다. 또한, 진세노사이드 Re에 의한 AMPK 활성화와 지방 생성/분해 기전과의 연관성을 확인하기 위하여, 화합물 C (AMPK 억제제) (칼바이옴, Darmstadt, Germany) 10 μM로 전처리한 시료를 준비하였다.

[0055] (2) 진세노사이드 Re 의 HepG2 세포에서 AMPK 활성화 효과 확인-AMPK 및 ACC 인산화 효과 확인

- [0056] 상기 HepG2 세포를 라이시스 버퍼 (50 mM 트리스-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.25% 수크로스, 0.4 mg/ml digonin 및 1.5 mM PMSF)와 함께 균질화한 후 단백질을 4 °C에서 20분간 13000 rpm 으로 원심 분리하였다.

- [0057] 단백질 정량은 바이오-레드 검정 시약 (Bio-Rad assay reagent: Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였고 분석한 단백질 30 μg을 SDS-PAGE로 분리한 후 젤 멤브레인에 트랜스퍼하고 5% 스킵 밀크로 상온에서 1시간 블로킹한 후 1:1000 비율로 희석시킨 1차 항체(pAMPK: Cell signaling, 2531; AMPK: Cell signaling, 2532; pACC: Cell signaling, 3661; ACC: Cell signaling, 3662; Actin: Santa cruz, 1616)와 4 °C에서 밤새 반응시켰다. 다음 TBST(Tris-buffered saline tween-20)로 3번 세척한 후 1:2000 비율로 희석시킨 2차 항체(Santa Cruz, sc-2313; sc-2005; sc-2033)와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 TBST로 3번 세척하고 ECL 용액 (Amersham,

Sweden)을 이용하여 X-ray 필름에 현상하였다. 웨스턴 블롯팅 결과를 도 1에 나타내었다.

[0058] 도 1A와 1B 에서 확인되는 바와 같이 진세노사이드 Re는 용량, 시간에 각각 의존적으로 AMPK와 ACC(acetyl-CoA carboxylase)를 현저하게 인산화시켰다. 이는 진세노사이드 Re 가 간세포에서 AMPK 를 활성화하여 간세포에서 지방 축적을 억제하는 것을 나타낸다. 한편, 도 1C에서 확인되는 바와 같이, AMPK 억제제인 화합물 C를 전처리 하였을때 AMPK와 ACC 인산화가 억제됨을 확인하였다. 이는 진세노사이드 Re가 AMPK 경로를 통하여 작용함을 나타내는 것이다.

[0059] (3) 진세노사이드 Re에 의한 지방축적 관련 인자 발현 억제 효과 확인-RNA 추출 및 RT-PCR

[0060] 상기 HepG2 세포로부터 구아니딘 티오시아네이트-물 포화 페놀/클로로포름 (guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform) 분리법을 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 물 층에 있는 전체 RNA를 이소프로필 알코올을 이용하여 침전시키고, 분리한 RNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 총 RNA 1 μ g을 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 유래 역전사효소 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)와 올리고(dT)15 프라이머를 이용하여 역전사 하였다. 사용된 프라이머 종류 및 서열은 하기 표 1에 기재하였다. 프라이머는 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 5 μ l cDNA 및 2.5 유닛의 Taq DNA 중합효소가 포함되어 있는 25 μ l의 반응 용액에 각각의 최종 농도가 0.5 μ M이 되도록 첨가하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 변성, 30초 동안 어닐링 (상응하는 어닐링 온도는 하기 표 1에 기재), 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 연장으로 하여 총 30 사이클 수행하였다. 이후, 반응 생성물을 0.5 μ g/ml 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색된 1% 아가로스 겔을 이용하여 100V에서 전기영동 하였다. GAPDH 는 증폭된 유전자들의 대조군으로 사용하였다. RT-PCR 결과를 도 2에 나타내었다.

[0061] [표 1] 프라이머 서열 및 어닐링 온도

유전자	정방향 프라이머 (5' to 3')	역방향 프라이머 (5' to 3')	어닐링 온도($^{\circ}$ C)
SREBP1	GTGGCGGCTGCATTGAGAGTGAG	AGGTACCCGAGGGCATCCGAGAAT	62
FAS	GGTAGTGGATACTCTGTCGTCCA	CATCAGCAACATCATTCGGT	66
SCD-1	CCCTGAACATCGAGTGTCTGA	CTTGCCAGAGATTTGAGGTCCT	57
GAPDH	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	AGGTACCCGAGGGCATCCGAGAAT	54

[0062]

[0063] 도 2A 및 도 2B에서 확인되는 바와 같이, 간세포 내 지방축적 관련 유전자인 SREBP1, FAS, SCD1 유전자의 발현이 시간별, 농도별, 특히 농도 의존적으로 진세노사이드 Re에 의하여 감소되는 것을 알 수 있었다. 또한, 도 2C에서 확인되는 바와 같이, HepG2 세포에 AMPK 억제제인 화합물 C를 전처리하였을때 지질 축적 관련 유전자인 SREBP-1, SCD1, FAS의 발현이 증가한 것을 알 수 있었다. 이는 진세노사이드 Re의 지질 축적 관련 유전자에 대한 효과가 AMPK와 관련이 있음을 나타낸다.

[0064] 실시예 2. 마우스 모델에서 진세노사이드 Re의 지방간 치료 효과 확인

[0065] (1) 실험 동물 모델의 구축

[0066] 5주령의 웅성 C58BL/6J 마우스 (대한민국, 성남, (주)오리엔트에서 구입)를 플라스틱 마우스 케이지에 보관하여 동물실험실에서 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 $\pm$ 10%, 광/암 주기 (12/12 hr)의 조건하에서 사육하며, 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하여 실험시작 전 일주일 동안 환경에 적응시켰다. 실험동물은 정상식이 투여군 (Regular Diet: RD), 고지방식이 투여군 (High-fat diet: HFD), 고지방식사와 진세노사이드 Re 5 mg/kg 투여군 (HFD+RE 5), 고지방식사와 진세노사이드 Re 10 mg/kg 투여군 (HFD+RE 10), 고지방식사와 진세노사이드 Re 20 mg/kg 투여군 (HFD+RE 20)의 5개 그룹으로 나누어, 3주 동안 매일 경구투여 하였다. 각 실험군은 6마리씩 나누었다.

[0067] (2) 진세노사이드 Re 에 의한 혈중 지질 강하 효과 확인 (혈액 지표 분석)

[0068] 상기 3주 실험 종료 시점에, 12시간 절식 후 혈액을 채취하여 혈액 지표분석을 실시하였다. 채혈한 혈액을 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 수집한 혈청을 분석에 사용하였다. 혈중 중성지방, 유리지방산 (Nonesterified fatty acid: NEFA)농도를 시판 kit(Stanbio, USA)를 구입하여 생화학 분석기기 (SMARTLAB, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정 결과를 아래 표 2에 나타내었다.

[0069] [표 2]

파라미터	그룹	RD	HFD	HFD+Re (mg/kg)		
				5	10	20
트리글리세리드 (mg/dl)		56.2±3.7	77.9±8.2 [*]	74.1±7.8	69.1±6.1	54.9±3.8 [#]
NEFA (mEq/L)		641.4±24.8	870.2±33.6 ^{***}	787.0±21.7	742.5±28.4 ^{##}	707.5±28.3 ^{###}

상기 값은 평균 ± SE (n=6), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Con, #p<0.05,

[0070] ##p<0.01, ###p<0.001 vs. HFD를 나타낸다.

[0071] 위 표 2에서 확인되는 바와 같이, 그룹 간 비교한 결과, 진세노사이드 Re 20 mg/kg 투여그룹은 고지방식이 (HFD) 그룹에 비하여 혈중 트리글리세리드(TG) 수준이 30% 감소하였고, 유리지방산(NEFA) 수준은 진세노사이드 Re 투여그룹은 HFD 그룹에 비하여 각각 10%, 15%, 20% 감소된 것을 알 수 있었다. 이는 혈중에서의 트리글리세리드 및 유리지방산의 합성이 감소하였음을 시사한다.

[0072] (3) 진세노사이드 Re 에 의한 간조직 내 지방구 감소 효과 확인 (간조직의 형태학적 관찰)

[0073] 실험동물로부터 적출한 간조직을 10% 중성 완충 포르말린 (neutral buffered formalin)을 사용하여 고정하고, 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하여 두께 5 μm의 관상 절편으로 제작하였다. 이후 자일렌을 사용하여 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화시킨 다음 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색하고, 다시 탈수과정을 거쳐 캐나다 발삼 (Canada balsam)으로 봉입하고 광학현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

[0074] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0075] 도 3에서 확인되는 바와 같이, HFD군에서 많은 지방들이 관찰되었지만, 진세노사이드 Re 투여군에서는 지방구가 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 이는 진세노사이드 Re가 TG, NEFA를 조절할 뿐만 아니라 비알코올성 지방간 (non-alcoholic fatty liver disease)에도 탁월한 효과가 있음을 나타낸다.

[0076] (4) 지방분화 관련 단백질 발현 수준 확인: 단백질추출 및 웨스턴 블롯팅

[0077] HepG2 세포 대신 위 실험 종료후 실험동물로부터 적출한 간조직을 이용한 것을 제외하고, 상기 실시예 1-(2)에 기재된 것과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 웨스턴 블롯팅 결과를 도 4에 나타내었다.

[0078] 도 4에서 확인되는 바와 같이, HFD군에 비해 진세노사이드 Re 투여군에서는 AMPK가 용량 의존적으로 현저하게 인산화되었으며, ACC 역시 현저하게 인산화되었음을 확인하였다. 이는 진세노사이드 Re 가 간세포에서 AMPK 를 활성화하여 간세포에서 지방 축적을 억제하는 것을 나타낸다.

[0079] (5) 지방 축적 관련 유전자 발현 수준 확인: RNA 추출 및 RT-PCR

[0080] HepG2 세포 대신 실험동물로부터 적출한 간조직, 및 하기 표3의 프라이머 서열 및 어닐링 조건을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 1-(3) 과 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과를 도 5에 나타내었다.

[0081] [표 3]

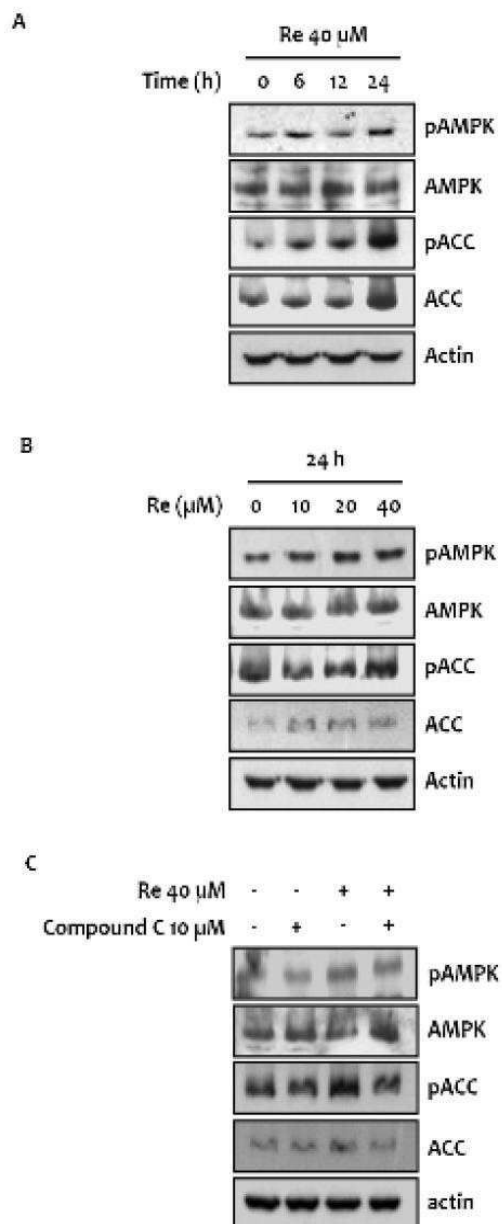
유전자	정방향 프라이머 (5' to 3')	역방향 프라이머 (5' to 3')	어닐링 온도(°C)
SREBP1	GTGGCGGCTGCATTGAGAGTGAG	AGGTACCCGAGGGCATCCGAGAAT	62
FAS	GGTAGTGGATACTCTGTCGTCCA	CATCAGCAACATCATTCGGT	66
SCD-1	CCCTGAACATCGAGTGTCGA	CTTGCCAGAGATTGAGGTCCT	57
GPAT	GGTAGTGGATACTCTGTCGTCCA	CAGCAACATCATTCGGT	58
β-actin	GTCGTACCACTGGCATTGTG	GCCATCTCCTGCTCAAAGTC	57

[0082]

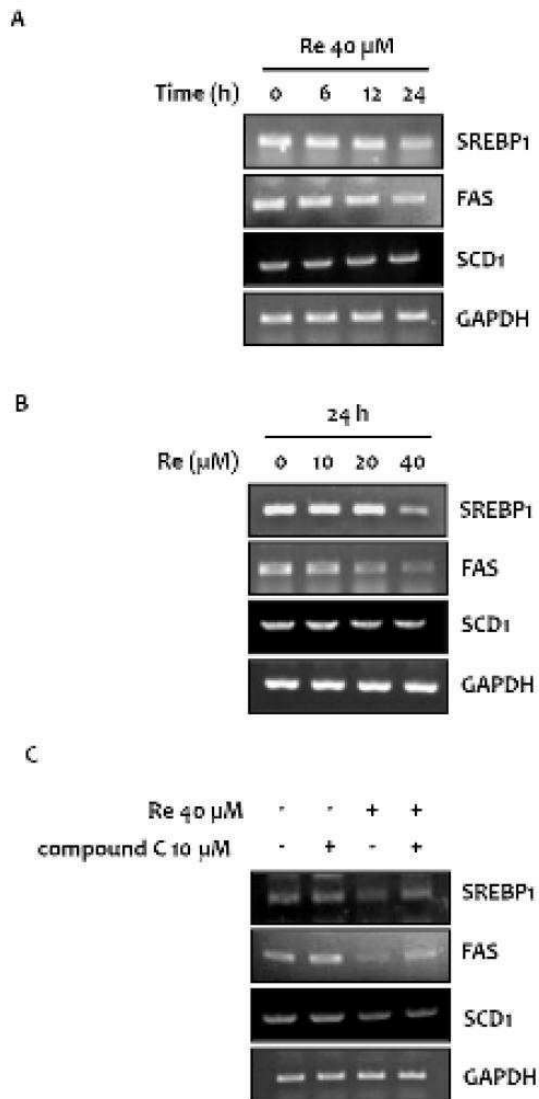
[0083] 도 5에서 확인되는 바와 같이, 간조직에서 중성지방 축적에 관여하는 유전자들의 발현수준을 그룹한 비교한 결과, 진세노사이드 Re 투여군에서 지방축적 관련 유전자인 SREBP1, FAS, SCD1, GPAT 의 발현을 HFD그룹과 비교하여 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

도면

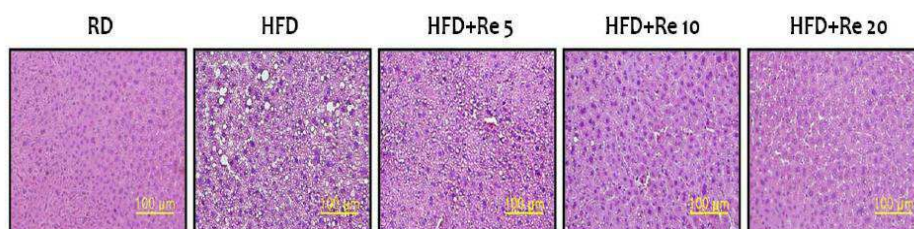
도면1



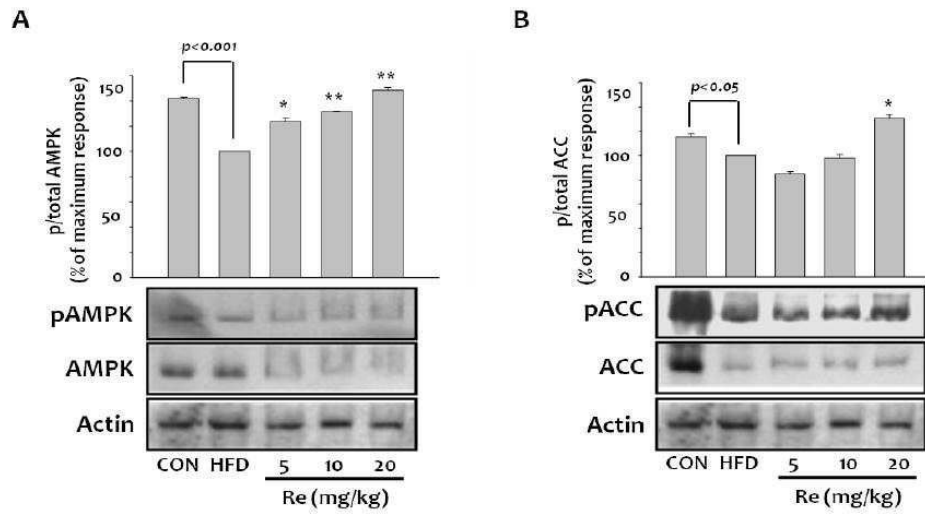
도면2



도면3



도면4



도면5

