(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0051105
(43) 공개일자 2011년05월17일

(51) Int. Cl.
A23L 1/29 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 36/258 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0107776
(22) 출원일자 2009년11월09일
심사청구일자 2009년11월09일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
정성현
서울특별시 서초구 반포동 반포자이 111-1701
원해단
서울시 종로구 동숭동 129-161
(74) 대리인
김순웅

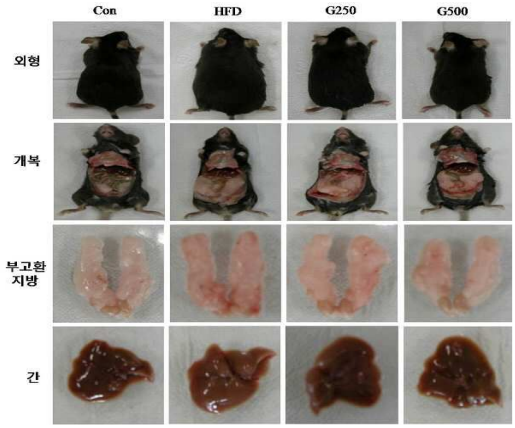
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 비만 억제 및 고지혈증 개선 용 인삼잎 추출물

(57) 요 약

본 발명은 비만 억제 및 고지혈증 개선 효과가 있는 천연물 추출물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 비만 억제 및 고지혈증 개선 효과가 있는 인삼잎 추출물에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 인삼의 부산물인 인삼잎 추출물을 비만 억제 및 고지혈증 개선에 효과적으로 이용할 수 있으며, 이로써 천연 추출물을 이용한 비만 억제 및 고지혈증 개선용 건강기능 식품 및 의약품을 제공할 수 있고, 자원을 활용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

인삼잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 억제 및 고지혈증 개선용 건강기능식품.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 인삼잎 추출물은 인삼잎을 서늘한 곳에서 한 주간 말린 후 70% 알코올로 5시간 추출한 다음, 상기 추출물을 여과 및 농축 후 동결건조 하여 분말을 얻어 제조된 것을 특징으로 하는 비만 억제 및 고지혈증 개선용 건강기능식품.

청구항 3

제 1항에 있어서,

음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류, 캅셀, 분말, 현탁액 및 환제로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 형태인 비만 억제 및 고지혈증 개선용 건강기능식품.

청구항 4

인삼잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 억제 및 고지혈증 개선용 약제학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 인삼잎 추출물은 인삼잎을 서늘한 곳에서 한 주간 말린 후 70% 알코올로 5시간 추출한 다음, 상기 추출물을 여과 및 농축 후 동결건조 하여 분말을 얻어 제조된 것을 특징으로 하는 비만 억제 및 고지혈증 개선용 약제학적 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서,

산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 멸균 주사용액, 좌제 및 경피 투여용 제제로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 제형화 되어 사용되는 비만 억제 및 고지혈증 개선용 약제학적 조성물.

청구항 7

비만 억제 및 고지혈증 개선효과가 있는 임삼잎 추출물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비만 억제 및 고지혈증 개선 효과가 있는 천연물 추출물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 경제성장과 생활방식의 변화에 따라 식습관에도 많은 변화가 있다. 특히, 바쁜 현대인들은 패스트푸드 등의 고열량식이와 적은 운동량으로 인하여 체중과다 및 비만이 증가하고 있다. 이로 인하여 성인들은 물론 어린이나 청소년들에서도 동맥경화, 고혈압, 당뇨병, 지혈증 또는 심장질환 등의 각종 성인병의 발병률이 증가하고 있으며, 근래에는 비만 자체를 질병으로 여겨야 한다는 주장이 제기되고 있다.

[0003] 이와 같이 비만 인구가 늘어남에 따라 다이어트 산업이 크게 대두되어, 약물뿐만 아니라 의복, 화장품, 기구,

수술요법, 운동요법 등에 이르기까지 다이어트에 대한 다양한 접근이 이루어지고 있다. 그러나, 이에 따른 부작용이나 실패사례 등이 발생하고 있어 보다 안심하고 간편하게 시행할 수 있는 보조식품류의 개발이 요구되고 있다.

[0004] 대한민국특허등록 제304430호는 인삼과 감귤류 과피를 함유하는 동맥경화, 고지혈증, 간질환 등의 성인병 예방에 효과가 있는 식품조성물에 관한 것으로 혈중 콜레스테롤 및 중성지질의 함량을 감소시키는 효과가 있다고 기재하고 있으나, 체중감량의 효과는 기대하기 어렵다.

[0005] 또한, 대한민국특허공보 제2001-88728호에는 의이인, 황기, 창출, 오미자, 맥문동, 석창포 등의 생약성분을 원료로 하는 비만방지 차 조성물에 관하여 기재하고 있다. 그러나 상기 발명은 체중감소 효과보다는 체중증가율을 감소시키는 데에 효과가 있다는 결과를 도시하고 있다. 또한 단순한 체중증감만을 측정하였으므로 실제로 체성분상의 유효한 변화가 있었는지 알 수 없다.

[0006] 체중감소시 가장 주의해야 할 것이 단백질과 수분의 유실이다. 체중감소에 따른 체성분의 변화에 있어서 지방의 산화에 의하여 체중이 감소되는 것이 가장 바람직하며, 단백질의 감소는 주로 급격한 체중 변화시에만 발생한다. 신체가 체중감소시에도 에너지 항상성을 유지하는 동시에 감량의 효과를 낼 수 있어야만 신체에 무리가 가지 않고 안전하게 감량이 진행되는 것이다. 따라서 단순한 무게변화에만 주목하지 않고 체성분의 변화와 에너지 항상성을 고려하는 다이어트 제제의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명은 비만 억제 및 고지혈증 개선에 효과가 있는 새로운 천연물 추출물을 제시하고, 상기 천연물 추출물을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물 및 건강기능식품을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

[0008] 본 발명은 비만 억제 및 고지혈증 개선 효과가 있는 천연물 추출물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 비만 억제 및 고지혈증 개선 효과가 있는 인삼잎 추출물에 관한 것이다.

[0009] 인삼은 두릅나뭇과의 여러해살이풀로서, 높이는 60㎝ 정도이며, 잎은 줄기 끝에 서너 개씩 돌려나고 손모양 겹잎이다. 봄에 녹황색의 꽃이 피고 열매는 타원형으로 붉게 익는다. 뿌리는 희고 비대한 다육질인데 강장제로 귀중히 여겨진다. 깊은 산에 야생하거나 밭에서 기르는데 한국의 강원○경기○평남○평북○함남, 중국 등지에 분포한다. 인삼의 부위 중 뿌리 부분은 예로부터 불로장생의 명약으로서 널리 약용되어오고 있다. 하지만, 본 발명에서는 인삼의 부위 중 인삼잎의 추출물을 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 상기 인삼잎 추출물은 그 제조방법에 있어 통상적으로 사용되는 천연물 추출방법이라면 특별히 제한 없이 사용할 수 있으며, 하기 실시예에서는 인삼잎을 서늘한 곳에서 한 주간 말린 후 70% 알코올로 5시간 추출한 다음, 상기 추출물을 여과 및 농축 후 동결건조 하여 분말을 얻어 인삼잎 추출물을 제조하였다.

[0011] 본 발명의 다른 양태로는, 상기 인삼잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 억제 및 고지혈증 개선용 건강기능식품이 될 수 있다.

[0012] 건강 기능 식품이란, 상기 유효성분을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캅셀화, 분말화, 현탁액, 환제 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미한다. 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강 기능 식품은 타액 분비 증강용 보조제로 섭취가 가능하다.

[0013] 상기 건강 기능 식품은 인삼잎 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함하여 제조될 수 있다.

[0014] 본 발명의 건강 기능 식품 중 건강 기능성 음료 조성물은 상기 인삼잎 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로써 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0015] 상기 외에 본 발명의 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 인삼잎 추출물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 인삼잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 억제 및 고지혈증 개선용 약제학적 조성물이 될 수 있다. 본 발명의 비만 억제 및 고지혈증 개선용 약제학적 조성물은 인삼잎 추출물에 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가하여 약제학적 단위 투여형으로 제형화되어 사용될 수 있다.

[0017] 본 발명의 상기 약제학적 단위 투여형의 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등 경구 투여용 제형, 멸균 주사용액, 좌제 및 경피 투여용 제제로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 필요에 따라 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제형화한다.

[0018] 한 양태로서, 본 발명의 인삼잎 추출물을 함유하는 약제학적 조성물은 경구 투여용 고상 제제로 제형화 할 수 있다. 경구 투여를 위한 고상 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되는데, 이러한 고상 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0019] 다른 양태로서, 본 발명의 인삼잎 추출물을 함유하는 약제학적 조성물은 경구 투여용 액상 제제로 제형화하여 사용될 수도 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 이러한 액상 제제에는 통상적으로 사용되는 불활성 희석제 (예를 들면, 정제수, 에탄올, 리퀴드 파라핀) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0020] 또 다른 양태로서, 본 발명의 인삼잎 추출물을 함유하는 약제학적 조성물은 비경구, 바람직하게는 복강 내 투여를 위한 제제로 제형화될 수도 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 멸균된 수용액으로는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충용액을 이용할 수 있으며, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 이용될 수 있다. 필요에 따라 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제를 이용할 수도 있다. 한편, 좌제의 경우에는 이의 통상적인 기제인 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0021] 상기와 같은 방법으로 제형화된 조성물은 유효량으로 비경구 또는 경구 (경피, 피하, 정맥, 근육, 복강 등)를

포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서"유효량"이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 인삼잎 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 0.001~10000㎍/체중kg/day로 투여될 수 있다. 보다 바람직하게는, 0.001 내지 1000mg/kg 의 양으로 투여된다.

효 과

[0022] 본 발명에 의하면, 인삼의 부산물인 인삼잎 추출물을 비만 억제 및 고지혈증 개선에 효과적으로 이용할 수 있으며, 이로써 천연 추출물을 이용한 비만 억제 및 고지혈증 개선용 건강기능 식품 및 의약품을 제공할 수 있고, 자원을 활용할 수 있는 효과가 있다.

[0023]

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 상세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 일 예에 지나지 않으며, 이에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0025] <실시예>

[0026] **1. 인삼잎 추출물의 제조**

[0027] 인삼잎을 서늘한 곳에서 한 주간 말린 후 70% 알코올로 5시간 추출하였다. 그런 다음, 상기 추출물을 통상적인 방법으로 여과 및 농축 후 동결건조 하여 분말을 얻어 인삼잎 추출물을 제조하였다.

[0028] **2. 실험동물 및 약물투여**

[0029] 6 주령의 C57BL/6J mouse를 (주) 오리엔트사로부터 구입하여 1 주일 동안 고형사료와 물을 섭취하면서 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 실험군은 대조군(Con), high fat diet control군(HFD), 인삼 잎 추출물 250 mg/kg 투여군(G250), 인삼 잎 추출물 500 mg/kg 투여군(G500)으로 나누었으며 Con그룹 마우스는 regular diet를 섭취시켰고 나머지 그룹은 고지방 식이를 섭취시켰다. 인삼 잎 추출물 투여는 고지방 식이 섭취 6주 후부터 시작하였다. 인삼잎 추출물은 물에 용해하여 8주간 경구 투여하였으며 몸무게, 식이 섭취량 및 물 섭취량은 한 주에 두 번씩 측정하였다. 고지방 식이의 조성은 하기 [표 1]에 나타난 바와 같다.

[0030] [표 1] 고지방 식이 조성

	HFD 45%cal	
	g%	kcal%
Protein	24	20
Carbohydrate	41	35
Fat	24	45
kal/kg	4,776	
Ingredient	g	kcal
casein(from milk)	200	800
corn Starch	155.036	620
sucrose	50	200
dextrose	132	528
cellulose	50	0
soybean Oil	25	225
corn oil	175	1575
mineral Mixture	35	0
vitamin Mixture	10	40
TBHQ	0.014	0
DL-methionine	-	-
L-Cystine	3	12
Choline Bitartrate	2.5	0
Total	837.6	4,000

[0031]

[0032] **3. 혈액 지표 분석**

[0033] 혈액 지표 분석을 위한 혈액 채취는 12시간 절식 시킨 후 실시하였다. 채혈한 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 혈청을 분석에 사용하였다. 혈중 유리지방산은 효소반응을 이용한 colormetric method로 일본의 Eiken Chemical Co.의 시판 키트를 사용하여 측정하였으며, 혈중 총 콜레스테롤(Total cholesterol) 및 혈중 중성지방 (triglyceride, TG)은 시판 kit (Stanbio, USA)를 구입하여 생화학 분석기기 (SMARTLAB, USA)을 사용하여 측정하였고, 혈중 렙틴(leptin)은 마우스 leptin ELISA kit (LINCO research, USA) 를 구입하여 측정하였다.

[0034] 하기 [표 4]는 8 주 동안 시료를 경구 투여한 후, 12시간 절식시켜 공복 상태의 실험동물에서 전 혈을 채취한 후 측정한 중성지방(TG), 총 콜레스테롤(Total cholesterol, TC), 지방세포에서 분비되는 adipokine인 렙틴(leptin) 및 유리지방산(NEFA)의 농도를 나타낸 것이다. 혈중 중성지방은 HFD 군에서 Con 군에 비해 유의적으로 낮았으며 (p<0.001) G250, G500 투여군에서는 HFD 대조군에 비해 각각 22.7%(p<0.01), 30.5%(p<0.001) 낮아져서, 투여-의존적(dose-dependent)으로 낮아지는 경향을 보였다. 총 콜레스테롤은 HFD군에 비해 G250, G500 투여군에서 각각 14.3% (p<0.001), 17.8 (p<0.001)로 유의적으로 낮아지는 경향을 보였다. 렙틴 농도(Leptin level)는 G250 투여군에서는 HFD군과 비슷하게 나타났고, G500 투여군에서는 16.9% 낮아지는 경향을 보였다. 유리지방산 농도(NEFA level)는 HFD군에 비해 G250, G500 투여군에서 각각 38.3% (p<0.001), 36.8% (p<0.001)로 유의적으로 낮아지는 경향을 보였다.

[0035] [표 4] 인삼잎 추출물이 여러 가지 혈액지표들에 미치는 영향

그룹	중성지방 (mg/dl)	콜레스테롤 (mg/dl)	렙틴 (ng/ml)	유리 지방산 (μEq/L)
Con	50.1±3.3	120.3±4.7	2.09±0.29	1151.2±63.0
HFD	87.1±3.7###	188.2±2.4###	13.74±1.55###	1700.2±62.9###
G250	67.3±3.5**	161.3±4.1***	13.80±0.85	1048.8±46.4***
G500	60.5±2.5***	154.7±2.5***	11.42±1.11	1074.0±61.2***

[0036]

[0037] **4. 각 실험군 마우스의 외형상 변화 확인 및 체중, 부위별 무게 (내장지방, 부고환 지방)의 측정**

[0038] 도 1은 본 실시예에 각 실험군의 마우스의 외형상의 변화를 나타내고 있다. 도 1에서 확인할 수 있듯이, HFD 군 마우스는 Con군 마우스에 비하여 뚱뚱하였고 개복했을 때 가장 많은 내장 지방을 드러내었다. 하지만, 인삼잎 투여군 마우스(G250, G500)는 HFD 군에 비하여 덜 뚱뚱하였고, 내장 지방도 적었다. 부고환 지방 역시 HFD군 마우스에서 제일 컸지만 인삼잎 투여군(G250, G500)에서는 농도 의존적으로 작아졌음을 관찰할 수 있었다. 하지만, 간의 크기와 관련해서는 각 군에서 차이가 없었다.

[0039] 또한, 각 실험군의 마우스의 체중을 측정하여 체중 증가량을 검사하였으며, 각 실험군 마우스에서 부고환 지방, 갈색지방조직(brown adipose tissue)인 견갑(scapular) 부위를 각각 적출하여 부위별 무게를 비교 하였으며, 이는 하기 [표 1]에 나타난 바와 같다.

[0040] 하기 [표 1]에 의하면, HFD 군은 Con 군에 비하여 체중이 23.1% (p<0.001) 유의적으로 증가하였고, G250, G500 투여군은 HFD군에 비하여 농도 의존적으로 체중이 3.4%, 6.8% (p<0.05)로 감소하였다. 체중 증가량 역시 Con 군에 비하여 HFD군에서 139.6% (p<0.001) 유의적으로 증가하였고, G250, G500 투여군은 HFD 군에 비하여 7.0%, 19.1%, 감소하였다. 부고환 지방 무게는 HFD군에서 Con군에 비하여 174.3% (p<0.01) 유의적으로 증가하였고, G250투여군에서는 HFD군에 비하여 변화가 없었으나, G500 투여군에서는 9.4% 감소하였다. Brown 갈색지방 무게 역시 HFD군에서 Con 군에 비하여 64.7% (p<0.01)로 유의적으로 증가하였으나 인삼잎 추출물 투여군에서는 감소하는 경향을 보였다.

[0041] 이로써, 인삼잎 추출물이 High fat diet에 의한 체중증가에 대해 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0042] [표 1] 인삼잎 추출물이 마우스의 체중 및 지방에 미치는 영향

그룹	몸무게(g)		체중 증가량(g)	부고환지방(g)	갈색지방(g)
	처음	마지막			
Con	22.5±0.6	27.3±0.3	4.8±0.3	0.74±0.05	0.17±0.02
HFD	22.2±0.3	33.6±0.8###	11.5±0.6###	2.03±0.11##	0.28±0.02##
G250	21.8±0.5	32.5±0.5	10.7±0.7	2.03±0.09	0.24±0.03
G500	22.0±0.2	31.3±0.5*	9.3±0.5	1.84±0.08	0.25±0.02

[0043]

[0044] **5. 조직의 형태학적 관찰**

[0045] 각 실험군의 쥐에서 적출한 간, 췌장, 부고환지방을 10% 중성완충포르말린(neutral buffered formalin)을 사용하여 고정한 후, 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블럭을 제작하고, 두께 5 ㎛의 관상 절편으로 제작한 후 자일렌(xylene)으로 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화시킨 후 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색하여 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였으며, 그 결과는 도 2

에 나타난 바와 같다.

[0046]

[0047] 도 2에서 보는 바와 같이, 간 조직의 경우, HFD 군에서 많은 지방들이 관찰 되었지만, 인삼잎 추출물 투여군(G250, G500)에서는 지방구가 현저하게 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 췌장 조직에서는 인삼잎 추출물 투여군(G250, G500)에서 췌장 islet의 모양이나 구조가 HFD 투여군에 비해 규칙적이고 뚜렷하게 나타났으며, 부고환지방의 경우 인삼잎 추출물 투여군(G250, G500)의 지방size는 HFD 그룹의 지방 size 에 비해 현저하게 작았다.

[0048] 상기 결과는 인삼잎 추출물이 혈당 조절 활성뿐 아니라, 비만으로 야기되는 비알코올성 지방간에도 탁월한 효과가 있고, 췌장 구조 보호 작용도 있으며, 또한 부고환 지방 크기 감소에도 효과가 있음을 보여준다.

[0049] **6. Western blot**

[0050] 각 실험군 마우스의 간 조직에서, Western blot 방법으로 phospho-AMPK, AMPK, phospho-ACC, ACC를 측정하였다. 단백질 분석을 위해 먼저, 간 조직을 lysis buffer를 이용하여 균질화 시켰다. 단백질 정량은 Bio-Rad assay reagent (Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였고 정량한 단백질 20 μg을 8% SDS-PAGE 로 분리한 후 gel을 멤브레인(Milipore, Cat. No: IPVH00010)에 옮기고, 5% 탈지유(skim milk)로 상온에서 1시간 blocking 한 후 1:3000 비율로 희석시킨 primary antibody (P-AMPK, AMPK, P-ACC, ACC)와 4℃에서 오버나이트(overnight) 하였다. 다음 Tris-buffered saline tween-20 (TBST)로 4번 세척(washing) 한 후 1 : 5000의 비율로 희석시킨 secondary antibody와 상온에서 1시간 반응한 후, TBST로 4번 세척(washing)하고 ECL solution (Amersham, Sweden)을 이용하여 X-ray 필름에 developing 하였다.

[0051] 상기 Western blot 결과는 도 3에 나타난 바와 같았다. 도 3에서 보는 바와 같이, HFD군에 비해 인삼잎 투여군(G250, G500)에서는 AMPK가 용량 의존적으로 현저하게 인산화(phosphorylation) 되었으며, ACC 역시 현저하게 인산화(phosphorylation) 되었다.

[0052] **7. 간조직에서 지방합성, 지방분해 및 당신생에 관여하는 유전자발현 측정**

[0053] 간 조직에서 total RNA분리는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform 분리 방법을 이용하였다. 물 층에 있는 total RNA는 이소프로판올을 이용하여 침전시켜 분리한 RNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, 총 RNA 10 μg을 Moloney murine leukemia virus transcriptase와 Oligo (dT) 15 primer를 이용하여 역전사 하였다. Primer의 종류 및 서열은 다음과 같다.

[0054] SREBP1-α (Sterol regulatory element-binding proteins)의 주형사 서열은 GCG CTA CCG GTC TTC TAT CA, 비주형사 서열은 TGC TGC CAA AAG ACA AGG G; FAS (Fatty acid synthesis)의 주형사 서열은 GAT CCT GGA ACG AGA ACA C, 비주형사 서열은AGA CTG TGG AAC ACG GTG GT; SCD1 (Stearoyl CoA desaturase)의 주형사 서열은 CGA GGG TTG GTT GTT GAT CTG T, 비주형사 서열은 ATA GCA CTG TTG GCC CTG GA; GPAT(Glycerol-3-phosphate acyltransferase)의 주형사 서열은 GGT AGT GGA TAC TCT GTC GTC CA, 비주형사 서열은 CAT CAG CAA CAT CAT TCG GT; PPAR-α (Peroxisome proliferator activated receptor-α)의 주형사 서열은 CCC TGA ACA TCG AGT GTC GA, 비주형사 서열은 CTT GCC CAG AGA TTT GAG GTC CT; CD36의 주형사 서열은 TCC TCT GAC ATT TGC AGG TCT ATC, 비주형사 서열은 GTG AAT CCA GTT ATG GGT TCC AC; PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 주형사 서열은 ATG CCT CCT CAG CTG CAT A, 비주형사 서열은 TTA CAT CTG GCT GAT TCT CTG TT; CPN의 주형사 서열은 ATG GTC AAC CCC ACC GTG, 비주형사 서열은 TTA GAG TTG TCC ACA GTC GGA GA이다. PCR 반응 조건은 SREBP-a, FAS, SCD1, GPAT, PPAR-α α, PEPCK, CPN 의 경우 95℃에서 30초 동안 변성, 57℃에서 30초 동안 붙임, 72℃에서 30초 동안 연장을 하여 총 30 cycle 하고, CD36의 경우 95℃에서 30초 동안 변성, 51℃에서 30초 동안 붙임, 72℃에서 30초 동안 연장을 하여 총 30 cycle 하였다. 이후 반응 생성물을 0.5 μg/ml ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel을 이용하여 100 V에서 전기영동 하였다. CPN은 증폭된 유전자들의 대조군으로 사용하였다.

[0055] 도 4에 나타난 RT-PCR 결과에서, 인삼잎 추출물 투여군에서 지방합성(lipogenesis) 관련 유전자 들인 SREBP1-α, FAS, SCD1, GPAT등 gene들의 발현에는 영향을 미치지 못했지만 지방분해(lipolysis) 관련 유전자들인 CD36, PPAR-α의 발현은 현저하게 증가시켰고, 당신생과정에서 rate-limiting enzyme인 PEPCK gene의 발현은 현저하게 감소시켰다.

[0056] 이상에 설명한 바와 같이, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기의 상세한 설명보다는 후술할 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 각 실험군 마우스의 외형적 변화를 나타내는 사진이다.

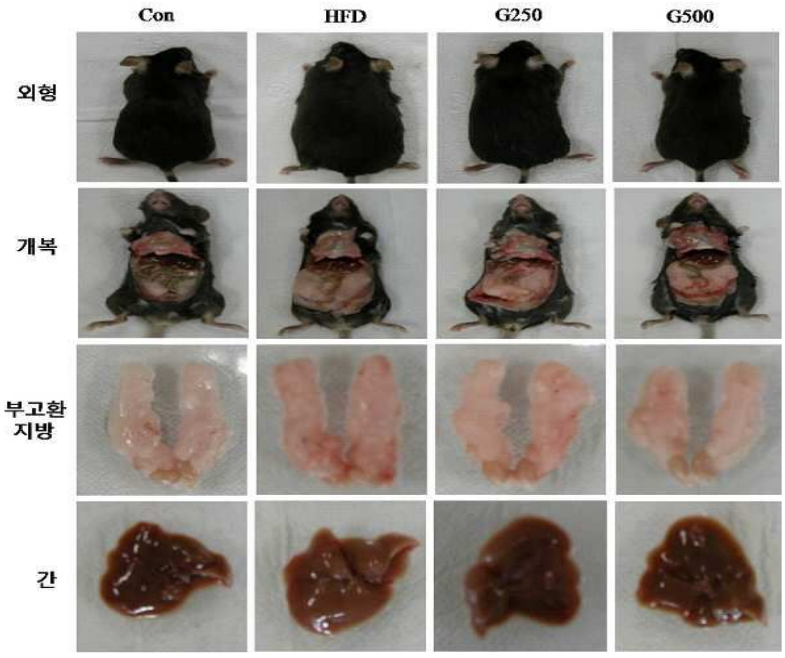
[0058] 도 2는 각 실험군 마우스의 간, 췌장, 부고환 지방 조직의 광학현미경 사진을 나타낸 것이다.

[0059] 도 3은 각 실험군 마우스의 간 조직에서, Western blot 방법으로 phospho-AMPK, AMPK, phospho-ACC, ACC 단백질 발현을 측정한 것은 나타내는 것이다.

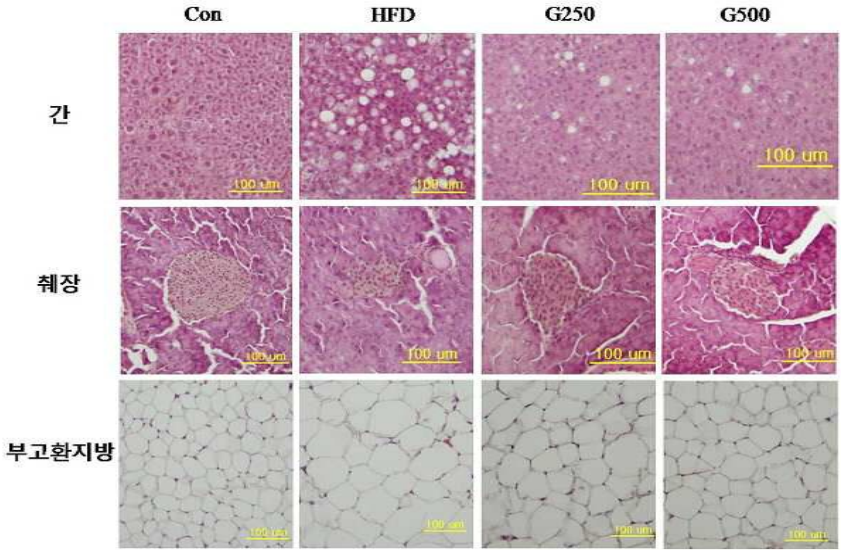
[0060] 도 4는 각 실험군 마우스의 간 조직에서, 지방합성 관련 유전자, 지방분해 관련 유전자 및 당신생 관련 유전자들의 발현을 측정한 것이다.

도면

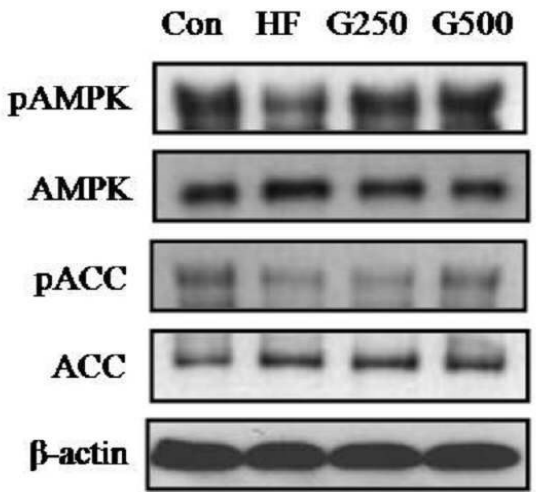
도면1



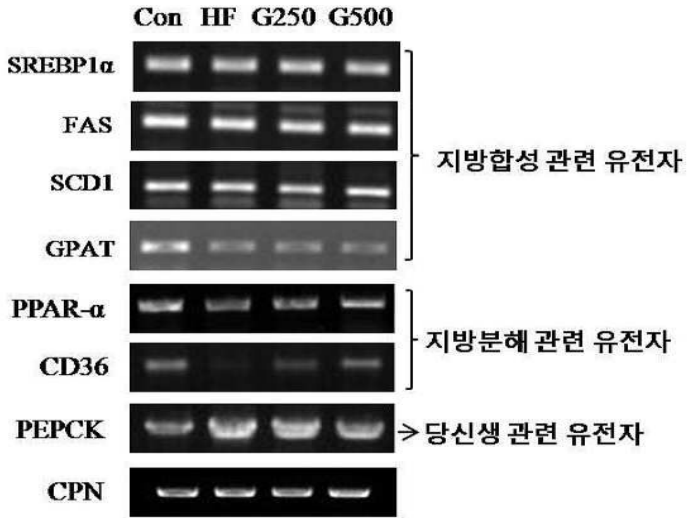
도면2


Con
HFD
G250
G500
간
췌장
부고환지방
100 um

도면3


Con
HF
G250
G500
pAMPK
AMPK
pACC
ACC
β-actin

도면4


Con
HF
G250
G500
SREBP1α
FAS
SCD1
GPAT
지방합성 관련 유전자
PPAR-α
CD36
지방분해 관련 유전자
PEPCK
당신생 관련 유전자
CPN