



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0122335
(43) 공개일자 2016년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/899 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/899 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0051973

(22) 출원일자 2015년04월13일

심사청구일자 2015년04월13일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

한국생산기술연구원

충청남도 천안시 서북구 입장면 양대기로길 89

재단법인 대구테크노파크

대구광역시 동구 동대구로 475 (신천동)

(72) 발명자

장병철

대구광역시 달서구 진천로 77 계룡리쉬빌아파트
108동 1303호

박유경

대구광역시 수성구 수성로39안길 16 (중동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

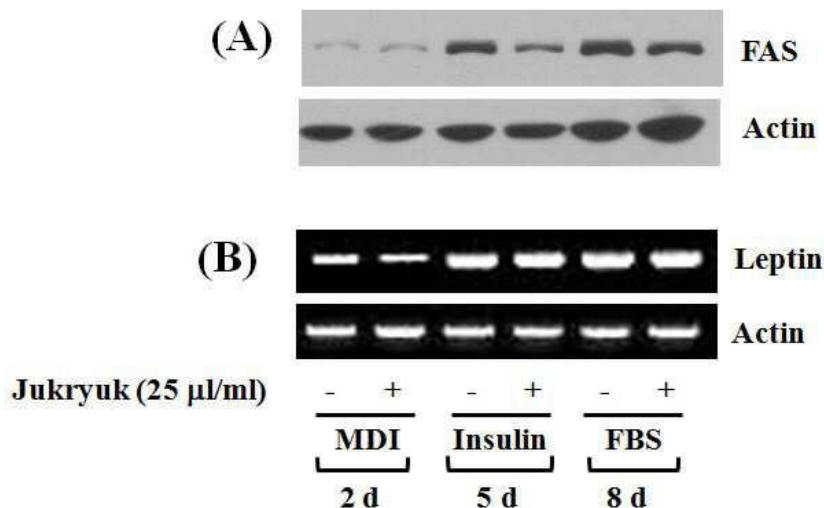
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 죽력을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 죽력을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 유효 성분인 죽력은 지방전구세포에서 지방세포로 분화 과정 중에서 지방의 생성 및 축적을 억제함으로써 항비만 활성을 나타낸다. 본 발명의 죽력의 항비만 효과는 매우 우수하여 항비만용 약제 및 기능성 식품의 활성성분으로 개발될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

이동목

대구광역시 달서구 월서로 14 101동 804호 (상인동, 상인역e편한세상1단지아파트)

이우종

경기도 성남시 분당구 내정로166번길 42 120동 101호 (수내동, 파크타운삼익아파트)

정희경

대구광역시 남구 두류공원로16길 90-16 (대명동)

명세서

청구범위

청구항 1

죽력(Bambusae Caulis in Liquamen)을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 지방 축적을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 C/EBP(CCAAT-enhancer binding protein)- β 의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 FAS(fatty acid synthase)의 mRNA 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 렙틴(leptin)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

죽력(Bambusae Caulis in Liquamen)을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 죽력을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비만은 인슐린 저항성, 타입 2 당뇨병, 고지혈증, 고혈압, 심혈관질환 및 암을 포함한 다양한 인간의 질환의 위험 요인이다(1). 비만이 다양한 유전적 이상 및 내분비 이상, 의약, 저대사율, 영양 및 환경 인자뿐만 아니라 에너지 항상성의 불균형에 의해 발생된다고 알려져 있다(2, 3). 최근 연구 결과에 따르면, 지방세포들은 아디포카인(adipokine)을 분비함으로써 에너지 대사에서 중요한 역할을 한다는 것이 증명되고 있다(3, 4). 그러나, 대체로 지방세포의 과도한 분화와 연관된 지방조직의 비정상적 팽창/축적, 지방세포 수의 증가(세포수의 과형성) 및 지방세포에서 지질 함량의 증가(비대)가 비만의 발달과 밀접하게 연관되어 있다는 것을 시사하는 강한 증거가 있다(5, 6). 따라서, 지방세포의 과도한 분화 및/또는 지방세포 수의 증가/비대를 억제하는 어떠한 천연물 또는 화합물이 비만 및 비만-관련 질병의 예방 및/또는 치료 가능성을 가질 수 있다.

[0004] 지방전구세포로부터 지방세포로의 분화가 전사인자, 세포 주기 관련 단백질, 지방세포 특이 유전자, 지방생성

효소 및 신호전달 단백질과 같은 다양한 세포 단백질의 복잡한 네트워크에 의해 조절된다는 것을 보여주는 연구 결과들이 보고되어 있다. 예를 들어, C/EBP(CCAAT-enhancer binding protein) - α , - β 및 - γ , 단백질 패밀리와 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors)- γ , - α 및 - β 패밀리의 단백질들이 지방세포분화에 매우 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다(7, 8). 또한, 최근 JAK-2(janus-activated protein kinase-2)/STAT-3(signal transducer and activator of transcription-3) 신호전달 복합체가 지방세포의 분화에 관련되어 있다는 보고가 있다(9, 10). 또한, PKA, cAMP, PKCs, 및 ERK-1/2와 같은 다수의 신호전달 단백질 및 인자들이 지방세포의 분화 조절에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다(11-13).

[0005] 대나무는 가장 빨리 자라는 식물 중 하나이다. 대나무 잎 및 죽순을 포함하는 대나무 유래 추출물은 한국을 포함한 아시아에서 지방간, 당뇨병, 암 및 비만을 조절하기 위한 전통한약 및/또는 전통음식 및 음료로 널리 이용되어 왔다[14-16]. 죽력이라고도 불리는 Bambusae Caulis in Liquamen은 대나무 줄기에 열을 가하여 추출한 액체이다. 죽력은 마우스에서 중대뇌 동맥이 막힌 다음 나타나는 대뇌혈관 국소성 빈혈에 대하여 보호 효과를 나타낸다[17]. 또한, 죽력은 항-염증, 항-아토피 피부염, 항-알러지, 항산화 및 안지오텐신 I 컨버팅 효소 억제 활성을 갖는 것으로 알려져 있다[18-21]. 그러나 지금까지 죽력의 항비만 효과에 대해서는 알려진 바 없다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 비만을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있으며 인체에 안전한 물질, 특히 식물-유래 물질을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 대나무 줄기에 열을 가하여 추출한 죽력(Bambusae Caulis in Liquamen)이 지방전구세포의 지방세포로의 분화 유도 과정 중에서 지방의 생성 및 축적을 억제함으로써 우수한 항비만 활성을 나타낸다는 것을 실험적으로 증명하였으며, 이로써 죽력이 비만을 예방 또는 치료하는데 매우 유효하다는 것을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 죽력을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 죽력을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 죽력을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 죽력을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 비만을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있으며 인체에 안전한 물질, 특히 식물-유래 물질을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 대나무 줄기에 열을 가하여 추출한 죽력(Bambusae Caulis in Liquamen)이 지방전구세포의 지방세포로의 분화 유도 과정 중에서 지방의 생성 및 축적을 억제함으로써 우수한 항비만 활성을 나타낸다는 것을 실험적으로 증명하였으며, 이로써 죽력이 비만을 예방 또는 치료하는데 매우 유효하다는 것을 규명하였다.

- [0018] 본 발명의 조성물은 비만의 예방, 개선 또는 치료에 매우 효과적으로 작용한다.
- [0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 “비만”은 체내에 체지방이 과도하게 축적되는 것을 의미한다.
- [0020] 본 발명의 조성물은 분화 유도된 지방전구세포에서 지방의 생성 및 축적을 억제한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 분화 유도된 지방전구세포에서 C/EBP- β 의 발현을 억제한다.
- [0022] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 분화 유도된 지방전구세포에서 FAS(fatty acid synthase) 또는 렙틴(leptin)의 발현을 억제한다.
- [0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 조성물은 약제학적 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 제공될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물 형태로 제공되는 경우 (a) 상기 죽력의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 형태로 제공된다.
- [0025] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0027] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.
- [0028] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 따라 다양한 방법으로 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-1000 mg/kg(체중)이다.
- [0029] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물이 식품 조성물 형태로 제공되는 경우, 상기 죽력을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 식품 조성물의 형태로 제공된다.
- [0032] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives), 음료 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 예컨대, 건강식품으로는 죽력을 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있으며 파우더, 캡셀, 연질캡셀, 정제, 껌 및 점착 타입 액체 조성물의 형태로 제조하여 섭취할 수도 있다. 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품 및 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 인삼 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 식품 조성물에는 상기 주요성분 이외에도 보조성분(비타민 B, C, E, 베타카로틴 등), 미네랄 함유 화합물(Ca, Mg, Zn 등), 인지질(레시틴 등), 말톨, 올리고당 및 아미노산 등을 사용할 수 있으며, 이 중에서도 2

내지 3 성분을 혼합하여 사용하면 생체 활성효과를 보강할 수 있기 때문에 더욱 바람직하다.

[0034] 또한, 상기 성분 이외에도 공지의 첨가제로서 미각을 돋우기 위하여 매실, 레몬향, 파인애플향 또는 허브향과 같은 천연향료나 천연과즙, 클로르필린(Chlorophyllin), 플라보노이드(Flavonoid) 등의 천연색소, 감미 성분인 과당, 벌꿀, 당알코올, 설탕 및 산미제인 구연산, 구연산나트륨을 혼합하여 사용할 수 있다.

[0035] 상기 외의 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 및 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하지 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0038] (i) 본 발명은 죽력을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0039] (ii) 본 발명의 유효성분인 죽력은 지방전구세포에서 지방세포로 분화 과정 중에서 지방의 생성 및 축적을 억제함으로써 항비만 활성을 나타낸다.

[0040] (iii) 본 발명의 죽력의 항비만 효과는 매우 우수하여 항비만용 약제 및 기능성 식품의 활성성분으로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 죽력이 지방전구세포 분화 동안에 지질 축적에 미치는 영향을 측정한 결과이다. (A) 3T3-L1 지방전구세포 분화에 대한 계획도(scheme)이다. (B) 3T3-L1 지방전구세포(분화되지 않은 세포) 또는 분화된 지방세포에서 8일째에 Oil Red O 염색에 의해 세포내 지방구(lipid droplet)를 측정한 결과를 보여준다. 세포 위상차 이미지를 시료 처리 후에 촬영하였다. 패널 (B)에서 아래쪽 패널임. 패널 (B)에서 각 사진은 3회 독립실험의 대표 사진이다.

도 2는 지방세포의 분화동안에 죽력이 트리글리세라이드(TG)의 합성 및 세포 성장에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 패널 (A)는 8일째에 AdipoRed 분석을 통해 죽력을 처리한 3T3-L1 지방세포에서 세포내 TG 함량을 정량한 결과이다. 측정값들은 3회 반복 실험한 3개의 독립실험으로부터의 데이터의 평균±SE이다. *P < 0.05 vs. 대조군(죽력 처리하지 않음). 패널 (B)는 3T3-L1 지방전구세포를 상기 언급한 도 1의 패널 (A)에서의 3T3-L1 지방전구세포 분화 조건하에서 배양하였다. 8일째에, 트립판 블루 염색제(trypan blue dye)로 죽력을 처리한 3T3-L1 세포를 현미경하에서 계수하였다. 세포 계수 분석은 3회 반복하여 행하였다. 데이터는 3회 독립 실험의 평균±SE이다. *P < 0.05 vs. 대조군(죽력 처리하지 않음).

도 3은 3T3-L1 지방세포 분화동안에 C/EBP- α , C/EBP- β , PPAR- γ , STAT-3 및 STAT-5의 발현 및/또는 활성에 미치는 죽력의 영향을 측정한 결과이다. 3T3-L1 지방전구세포들을 MDI, 인슐린, 및 FBS를 포함하는 유도배지로, 죽력의 존재 또는 부존재하에서 분화를 유도하고, 각각 2일, 5일 및 8일 시점에서 세포들을 회수하였다. 지정된 시점에서 세포 단백질을 추출하고, 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다. 각 사진은 3회 독립실험의 대표도이다.

도 4는 3T3-L1 지방세포 분화 동안에 FAS(Fatty Acid Synthase) 및 렙틴(leptin)의 단백질 및/또는 mRNA 발현에 미치는 죽력의 영향을 측정한 결과이다. 패널 A 및 패널 B: 3T3-L1 지방전구세포들을 죽력의 존재 또는 부존재하에서 MDI, 인슐린, 및 FBS를 포함하는 분화유도배지를 사용하여 분화 유도시키고 각각 2일, 5일 및 8일째에 회수하였다. 지정 시점에서 세포 단백질을 추출하고 웨스턴 블로팅(패널 A) 및 RT-PCR(패널 B)으로 각각 분석하였다. 패널 A 및 패널 B에서 각 그림은 3회 독립 실험의 대표도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체

적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0045] **실시예**
- [0046] 재료 및 방법
- [0047] 실험 재료
- [0048] C/EBP- α 다클론항체, C/EBP- β 다클론항체, PPAR- γ 단클론항체, STAT-3 단클론항체, p-STAT-3(phospho-STAT-3) 단클론 항체, STAT-5 다클론항체 및 p-STAT-5 다클론항체를 Santa Cruz Biotechnology (Delaware, CA)로부터 구입하였다. FAS 단클론항체는 BD Bioscience (San Jose, CA)에서, β -액틴 단클론항체는 Sigma (St. Louis, MO)로부터 구입하였다.
- [0049]
- [0050] **죽력**
- [0051] 신선한 대나무 줄기를 쪼개어 항아리에 넣어 황토로 밀봉 후 고온 가열하여 얻어진 액체(죽력)를 여과 후 pH를 7.0으로 보정하여 사용하였다.
- [0053] **세포 배양 및 분화**
- [0054] 3T3-L1 지방전구세포(ATCC, Manassas, VA)를 접촉 억제 단계까지 생장시키고, 10% 송아지혈청(BCS, Gibco) 및 페니실린-스트렙토마이신(Welgene, Daegu)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 2일간 포스트-컨플루언트(post-confluent) 단계에서 유지하였다. 이어서, 배지를 10% 우태아혈청(FBS, Welgene, Daegu)과 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸잔틴(M)(Sigma), 0.5 μ 텍사메타손(D) (Sigma) 및 5 μ 인슐린(I)(Sigma)을 포함하는 호르몬 콕테일(MDI)이 첨가된 DMEM으로 교체하고, 지정 농도의 죽력의 존재 또는 부존재하에서 분화를 유도하였다. 48 시간(2 일간) MDI-유도를 행한 후에, 분화 유도 배지를 10% FBS 및 5 μ 의 인슐린이 첨가된 DMEM으로 교체하여 지정된 농도의 죽력 존재 또는 부존재하에서 배양하였다. 이어서, 세포에 지정된 농도의 죽력 포함되거나 포함되지 않은 10% FBS가 첨가된 DMEM을 배양 8일째가 될 때까지 격일로 교체하여 주었다. 8일째에 지방전구세포는 둥글고 지방구로 채워진 성숙한 지방세포가 되었다.
- [0055]
- [0056] *Oil red O* 염색
- [0057] 분화유도 8일째에 죽력을 처리한 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세정하고, 10% 포르말데히드로 상온에서 2시간 동안 고정시키고, 60% 이소프로판올로 세정한 후 완전히 건조시켰다. 이어서 고정된 세포는, 99% 이소프로판올내의 0.5% 스톡용액을 증류수로 6:4 비율로 1시간 동안 상온에서 희석하여 제조한 Oil red O 작용시약으로 염색한 후에, 증류수로 2회 세정하였다. 지방구는 광학현미경(Nikon)을 사용하여 관찰하였다.
- [0058]
- [0059] **세포 계수 분석**
- [0060] 24-웰 플레이트에 접종한 3T3-L1 지방전구세포는 상기 언급한 분화 조건하에서 유사하게 성장하였다. 분화 8일째에, 트립판 블루 염료로 염색되지 않는 죽력을 처리한 3T3-L1 세포들을 현미경하에서 계수하였다. 세포 계수 분석은 3회 반복 수행하였다. 데이터는 3회 독립실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SE)이다.
- [0061]
- [0062] *AdipoRed* 분석법에 의한 세포내 트리글리세라이드(TG) 함량의 정량분석
- [0063] 처리 후 8일이 지난 시점에, 상업적으로 구입가능한 AdipoRed Assay Reagent kit(Lonza)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 지방 함량을 측정하였다. 10분간의 인큐베이션 후에, 플레이트를 Victor3(Perkin Elmer)에 두고, 형광을 485 nm의 여기 파장 및 572 nm의 방출 파장으로 측정하였다.

[0065] 전세포 용해물의 제조

[0066] 지정한 시점에서, 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세정하고, 변경한 RIPA 완충액 [50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% 소듐 도데실 설페이트, 0.25% 소듐 디옥시콜레이트, 1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 프로테아제 억제제 콕테일(1x)]에 노출시켰다. 세포용해물을 1.5 mL 튜브에 수집하고 12,000 rpm에서 4℃에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 취하고 단백질의 농도를 Bradford reagent(Bio-Rad)로 측정하였다.

[0067]

[0068] 웨스턴 블롯 분석

[0069] 단백질(50 µg)을 SDS-PAGE(10%)으로 분리한 후 니트로셀룰로오스 멤브레인(Millipore)상으로 트랜스퍼시켰다. 멤브레인을 0.05%(vol/vol) Tween 20(TBST)이 첨가된 TBS(10 mM Tris, 150 mM NaCl)으로 세정하고 5%(wt/vol)탈지유를 포함하는 TBST으로 블로킹하였다. 멤브레인을 4℃에서 C/EBP-α (1:1,000), C/EBP-β (1:1,000), PPAR-γ (1:1,000), STAT-3 (1:1,000), p-STAT-3 (1:1,000), STAT-5 (1:1,000), p-STAT-5 (1:1,000), FAS (1:1,000) 또는 β-액틴 (1:10,000)에 특이적인 항체와 함께 하룻밤 인큐베이션하였다. 이어서, 멤브레인을 호오스래디쉬 퍼옥시다제에 커플링된 2차 항체에 상온에서 2시간 동안 노출시켰다. 멤브레인을 상온에서 TBST로 3회 세정하였다. 면역반응성은 ECL 시약으로 검출하였다. 동일량의 단백질 로딩량의 확인은 액틴(actin) 단백질의 발현 수준을 측정하여 행하였다.

[0070]

[0071] RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

[0072] 지정한 시점에서 총 세포 RNA를 대조군 세포 또는 죽력이 처리된 3T3-L1 세포로부터 RNAzol-B(Tel-Test, Friendswood, TX)를 사용하여 분리하였다. 3 µg의 총 RNA를 랜덤 헥사데옥시뉴클레오타이드 프라이머 및 역전사 효소를 사용하여 역전사하였다. 단일쇄 cDNA를 다음의 프라이머들을 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다. 증폭에 사용된 프라이머 서열은 다음의 표 1에 정리하였다.

표 1

[0073] RT-PCR에 이용된 프라이머

유전자	프라이머 서열
렙틴(Leptin)	센스: 5' -CCAAAACCCTCATCAAGACC-3' (서열번호 1)
	안티센스: 5' -CTCAAAGCCACCACCTCTGT-3' (서열번호 2)
FAS(Fatty Acid Synthase)	센스: 5' -TTGCTGGCACTACAGAATGC-3' (서열번호 3)
	안티센스: 5' -AACAGCCTCAGAGCGACAAT-3' (서열번호 4)
액틴(Actin)	센스: 5' -GGTGAAGTTCGGTGTGAACG-3' (서열번호 5)
	안티센스: 5' -GGTAGGAACACGGAAGGCCA-3' (서열번호 6)

[0076] 적용한 PCR 조건은 다음과 같다: 렙틴(Leptin): 95℃에서 변성 1분, 57℃에서 어닐링 1분, 및 72℃에서 연장 1분의 30 사이클. FAS: 95℃에서 변성 15초, 55℃에서 어닐링 40초, 및 68℃에서 연장 45초의 30 사이클. 액틴(Actin): 95℃에서 변성 30초, 57℃에서 어닐링 30초, 및 72℃에서 연장 1분의 25 사이클. 액틴 mRNA의 발현수준을 렙틴 및 FAS mRNA의 상대적 발현을 평가하는데 내부 대조군으로 사용하였다.

[0077]

[0078] 통계분석

[0079] 세포 계수 분석은 3회 중복으로 행하였고, 3회 반복하였다. 데이터는 평균±표준편차(SE)으로 표시하였다. 유의한 차이는 일원 ANOVA에 의해 결정하였다. 모든 유의성 테스트는 p값 <0.05에 기초하였다.

[0080]

[0081] 실험결과

[0082] 죽력은 강력한 항-지방생성 효과를 나타내었다.

[0083] 먼저, Oil Red O 염색을 통해 3T3-L1 지방전구세포의 분화 동안 죽력이 지방 축적에 미치는 영향을 조사하였다. 3T3-L1 지방전구세포 분화에 대한 타임스케일은 도 1A와 같다. 도 1B(왼쪽 패널)에 나타난 바와 같이, 지방구(lipid droplet)들은 3T3-L1 지방전구세포에서 유도배지로 세포 분화를 유도한 8일째에만 다수 형성되었으며, 분화되지 않은 세포에서는 지방구가 나타나지 않았다. 그러나, 지방전구세포에 죽력을 처리한 경우, 대조군과 비교하여 지방구의 양이 용량 의존적 방식으로 현저하게 감소하였다. 확실하게, 50 μ l/ml 농도의 죽력을 처리한 경우 지방구가 최대로 감소하였다. 죽력-매개 지방감소효과는 광학현미경 측정에 의해서도 관찰할 수 있었다(도 1B의 아래쪽 패널들).

[0084] 다음으로 AdipoRed 분석법을 사용하여 죽력이 3T3-L1 지방전구세포 분화 과정 동안에 트리글리세라이드(TG) 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 도 2A에서 보는 바와 같이, 죽력은 mock-처리된 세포와 비교하여 지방세포 분화 동안 용량 의존적 방식으로 TG 함량을 크게 감소시켰다. 확실하게, 50 μ l/ml 농도의 죽력을 처리한 경우 TG 합성이 최대로 억제되었다. 농도별 죽력(10, 25, 및 50 μ l/ml)의 지방세포 성장에 대한 효과는 세포 계수 분석을 통해 확인하였다. 흥미롭게도 25 μ l/ml 죽력을 처리한 경우, 지방세포의 수에 변화가 없었던 반면, 50 μ l/ml 죽력을 처리한 경우, 세포 수가 크게 감소하였다(도 2B). 이러한 결과로부터 강력한 항-지방생성 효과를 나타내면서 세포 독성이 없는 25 μ l/ml 죽력을 선택하여 추가 실험을 진행하였다.

[0086] 죽력은 지방세포 분화 동안에 C/EBP- β 의 발현을 억제한다.

[0087] 죽력-매개된 항-지방생성 효과의 분자 및 세포 메커니즘을 이해하기 위해, 죽력이 지방생성에 관여하는 C/EBPs, PPARs, 및 STATs 패밀리의 발현 및/또는 활성화(인산화)에 미치는 영향을 조사하였다. 웨스턴 블롯 분석 결과 MDI, 인슐린 및 FBS를 포함하는 유도배지의 처리에 의해 3T3-L1 지방전구세포에서 생산되는 C/EBP- α , C/EBP- β 및 PPAR- γ 단백질 수준이 2일, 5일, 및 8일 시점에서 시간 의존적 방식으로 증가하였다는 것을 확인하였다. 중요하게, 죽력은 C/EBP- β 의 지방생성 의존성 단백질 발현을 억제하였으나, C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현에는 영향을 미치지 않았다.

[0088] 한편, MDI, 인슐린 및 FBS를 포함하는 유도 배지로 3T3-L1 지방전구세포를 분화유도 시켰을 때에 2일, 5일 및 8일에 생성된 STAT-3 및 STAT-5의 인산화 수준이 각각 더욱 높았다. 그러나, 죽력은 지방세포 분화 동안 5일 및 8일에 STAT-3의 인산화 수준 및 8일에 STAT-5의 인산화 수준에 영향을 주지 않았다. 또한, 죽력은 지정된 시점에서 지방세포 분화 동안에 STAT-3 및 STAT-5의 총 단백질 수준에는 영향을 미치지 않았다.

[0090] 죽력은 지방세포 분화 동안에 FAS 및 렙틴(leptin)의 발현을 억제한다.

[0091] 다음으로, 죽력이 지방세포 분화 동안에 지방세포 특이적 유전자 및/또는 아디포카인의 발현을 조절하는지에 대해 조사하였다. 도 4A에서 보는 바와 같이, 지방세포 분화 동안 FAS의 단백질 발현이 시간 의존적 방식으로 증가되었다. 그러나, 죽력은 지방세포 분화 동안 5일 및 8일 시점에서 FAS의 단백질 레벨을 현저히 감소시켰다. 도 4B의 RT-PCR 분석 결과, 지방세포 분화 동안 2일, 5일 및 8일 시점에 렙틴의 mRNA 발현이 시간 의존적 방식으로 증가하였다. 주목할만하게도, 죽력은 2일 시점에 MDI-유도된 렙틴 mRNA 발현을 억제시켰으나, 5일 및 8일 시점에 인슐린-유도된 및 FBS-유도된 렙틴 mRNA 발현 유도에는 영향을 미치지 않았다. 대조군 액틴의 단백질 또는 mRNA 발현은 이러한 실험 조건하에서 일정하게 유지되었다.

[0093] 고찰

[0094] 과도한 지방세포 분화는 지방조직의 비정상적인 팽창/축적을 가져오고 이는 염증, 인슐린 내성 및 대사 질환과 관련되어 있는 병인성 아디포카인(adipokines)의 분비를 증가시킨다. 따라서, 지방세포 분화의 강력한 억제자는 항비만 약물로서 치료적 가능성을 갖는다. 본 발명자들은 대나무 줄기의 열 추출물인 죽력이 C/EBP- β 및 FAS의 발현 조절을 통해 항비만 활성을 나타내는지에 대해 실험을 실시하였다. 성숙되거나 분화된 지방세포는 둥근 모양이고 많은 지방구(lipid droplet)로 채워져 있으며 섬유아세포 유사 지방전구세포와 구별된다(22).

[0095] 본 발명의 연구 결과에 의하면, 죽력(25 μ l/ml)이 8일간 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 동안에

지방의 축적을 크게 억제한다는 결과를 확인하였는데(도 1B, 도 2A), 이러한 결과는 강력한 항-지방생성 효과를 암시하는 것이다. 세포계수 분석 데이터는 8일 동안의 죽력(25 μ l/ml) 처리에 의해서 생존 3T3-L1 지방세포의 수에는 영향을 미치지 않는다는 것으로 보여주었다(도 2B). 반면에, 죽력(50 μ l/ml)을 8일간 처리한 경우도 지방 축적을 억제하였으나(도 1B, 도 2A), 이러한 죽력의 효과는 많은 수의 지방세포 소실에 의해 입증되는 바와 같이 세포독성 효과에 기인한 것으로 추정된다(도 2B).

[0096] 지방세포 분화가 C/EBP- α , C/EBP- β 및 PPAR- γ 와 같은 지방생성 전사인자의 발현 및/또는 활성화에 의해 크게 영향을 받는다는 사실을 증명하는 증거들이 증가하고 있다. 지방세포의 분화 동안에 상기 C/EBP- α , C/EBP- β 및 PPAR- γ 의 발현 및/또는 활성을 각각의 약리학적 억제자 또는 siRNA 트랜스펙션에 의해 차단하면 지방 축적이 억제된다는 사실이 보고되었고, 마우스에서 C/EBP- α , C/EBP- β 또는 PPAR- γ 를 녹아웃 시키면 백색 지방조직이 감소하거나 손상된다는 것이 보고되었다[7, 8, 23-28]. STAT-1, STAT-3 및 STAT-5를 포함하는 STATs 패밀리가 3T3-L1 지방전구세포 및 지방세포 모두에서 발현되고[9], STAT-3 및 STAT-5를 포함하는 STAT 패밀리의 몇몇의 멤버들이 3T3-L1 지방세포 분화에 중요하다[10, 29-33]. 따라서, 죽력이 지방세포 분화 동안에 C/EBP- β 의 단백질 발현을 억제하고, C/EBP- α 및 PPAR- γ 의 발현 및 STAT-3 및 STAT-5의 인산화에 영향을 미치지 않는다는 점을 고려하면(도 3), 죽력에 의해 매개되는 항-지방생성효과는 C/EBP- β 의 감소된 발현과 매우 밀접하게 관련되어 있다고 할 수 있다.

[0097] C/EBPs 및 PPARs의 발현 및/또는 활성의 증가가 FAS, 렙틴(leptin) 및 아디포넥틴(adiponectin)과 같은 지방세포 특이적 유전자 및 아디포카인들의 발현에 필수적이라는 사실을 입증하는 증거들이 있다[34-36]. 이들 중에서, FAS는 지방산 합성에 관련된 지방생성 효소이고, 이의 발현은 높은 지방산 합성율을 갖는 세포 또는 조직에서 크게 증가되어 있다[37]. 3T3-L1 지방전구세포가 텍사메타손 및 이소부틸잔틴 처리에 의해 분화유도되면, 인슐린에 대한 반응성 및 FAS 유도를 포함하여 진정한 지방세포로서의 특성을 습득한다고 제안되어 왔다[38]. 본 발명의 연구에서는 MDI 처리에 의해 지방세포 분화가 일어나도록 1차적으로 유도된 3T3-L1 세포를 인슐린과 FBS로 처리하는 경우 FAS의 mRNA의 발현이 유도된다는 사실도 증명하였다(도 4A). 그러나, 죽력은 3T3-L1 지방세포에서 인슐린-유도 및 FBS-유도된 FAS의 발현을 억제하였다. 이는 죽력이 FAS 발현을 억제함으로써 항-지방생성 효과를 갖는다는 점을 암시하는 것으로서, 이러한 사실은 죽력-매개된 항-지방생성에 더욱 기여할 것이다. 성숙된(분화된) 지방세포는 에너지 항상성의 내분비 조절에 관련된 일정의 아디포카인들을 합성하고 분비하는 능력에 의해 특징 지워진다(39). 또한, 증가하는 증거들에 의해 렙틴(leptin)의 비정상적 발현/분비가 비만 및 비만-관련 질병에 연관되어 있다는 점이 입증되고 있다(3, 40). 본 연구 결과에 따르면, 죽력은 지방세포 분화 동안 MDI-유도된 렙틴의 mRNA 발현을 억제하는 능력을 갖는다. 이러한 결과는 죽력이 렙틴의 과발현이 중요한 병인적 역할을 하는 비만과 이와 관련된 대사성 질환의 예방 및/또는 치료에 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

[0099] 참고문헌

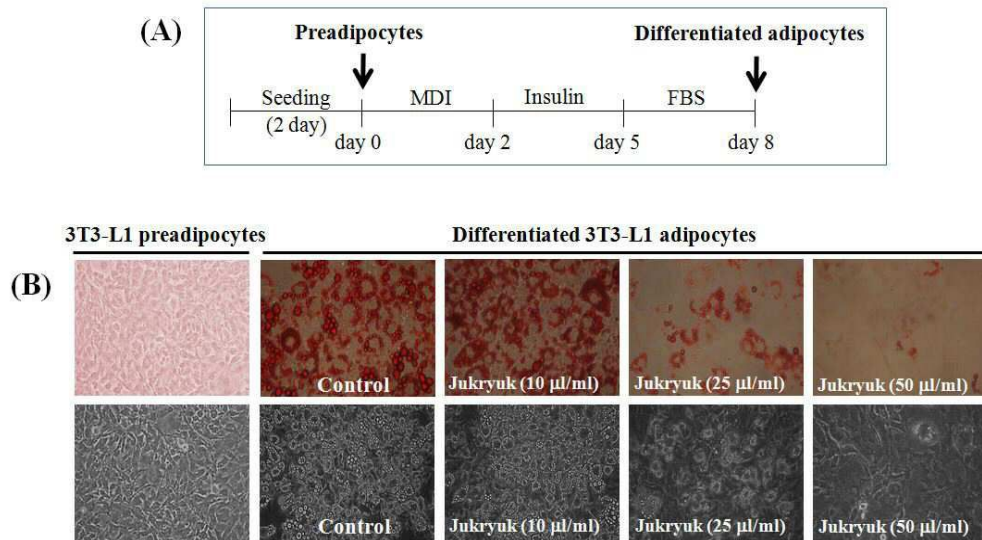
- [0100] [1] P.G. Kopelman, *Nature* 404 (2000) 635-643.
- [0101] [2] R.S. Ahima, J.S. Flier, *Trends. Endocrinol. Metab.* 11 (2000) 327-332.
- [0102] [3] P.J. Havel, *Curr. Opin. Lipidol.* 13 (2002) 51-59.
- [0103] [4] B.M. Spiegelman, J.S. Flier, *Cell* 104 (2001) 531-543.
- [0104] [5] H.E. Bays, *Am. J. Med.* 122 (2009) S26-S37.
- [0105] [6] I. Melnikova, D. Wages, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5 (2006) 369-370.
- [0106] [7] Z. Cao, R.M. Umek, S.L. McKnight, *Genes. Dev.* 5 (1991) 1538-1552.
- [0107] [8] S.R. Farmer, *Cell. Metab.* 4 (2006) 263-273.
- [0108] [9] J.M. Stephens, R.F. Morrison, P.F. Pilch, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 10441-10444.
- [0109] [10] K. Zhang, W. Guo, Y. Yang, J. Wu, *J. Cell. Biochem.* 112 (2011) 488-497.
- [0110] [11] C.N. Martini, M.V. Plaza, C. Maria del Vila, *Mol. Cell. Endo.* 298 (2009) 42-47.
- [0111] [12] Y. Zhou, D. Wang, F. Li, J. Shi, J. Song, *J. Biochem. Cell. Biol.* 38 (2006) 2151-2163.

- [0112] [13] D. Prusty, B.H. Park, K.E. Davis, S.R. Farmer, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46226-46232.
- [0113] [14] Panee J, An Evidence-based Approach, chapter 9 (2008) 159191.
- [0114] [15] S.I. Kang, H.S. Shin, H.M. Kim, Y.S. Hong, S.A. Yoon, S.W. Kang, J.H. Kim, H.C. Ko, S. J. Kim, *Biosci Biotechnol Biochem.* 76 (2012) 755-761.
- [0115] [16] J.H. Kim, S. I. Kang, H.S. Shin, S.A. Yoon, S.W. Kang, H.C. Ko, S.J. Kim, *Biosci Biotechnol Biochem.* 77 (2013) 1595-1598.
- [0116] [17] 류주열, 김영균, 권정남, *J Korean Oriental Med.* 23 (2002) 134-144.
- [0117] [18] L.Van Hoyweghen, K. De Bosscher, G. Haegeman, D. Deforce, A. Heyerick, *Phytother Res.* 28 (2014) 224-230.
- [0118] [19] X.F. Qi, D.H. Kim, Y.S. Yoon, J.H. Li, D. Jin, Y.K. Deung, K.J. Lee, *J Ethnopharmacol.* 123 (2009) 195-200.
- [0119] [20] J.Y. Je, P.J. Park, E.K. Kim, C.B. Ahn, *Food Chemistry.* 113 (2009) 932935.
- [0120] [21] H. Jeon, N.J. Kang, G.S. Kim, *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 17 (2003) 241246.
- [0121] [22] E.D. Rosen, B.M. Spiegelman, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16 (2000) 145-171.
- [0122] [23] E.D. Rosen, O.A. MacDougald, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7 (2006) 885-896.
- [0123] [24] H.G. Linhart, K. Ishimura-Oka, F. DeMayo, T. Kibe, D. Repka, B. Poindexter, R.J. Bick, G.J. Darlington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (2001) 12532-12537.
- [0124] [25] E.D. Rosen, P. Sarraf, A.E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D.S. Milstone, B.M. Spiegelman, R.M. Mortensen, *Mol. Cell.* 4 (1999) 611-617.
- [0125] [26] Y.Y. Zhang, X. Li, S.W. Qian, L. Guo, H.Y. Huang, Q. He, Y. Liu, C.G. Ma, Q.Q. Tang, *Mol Biol Cell.* 22 (2011) 2165-2174.
- [0126] [27] L. Guo, X. Li, Q.Q. Tang, *J Biol Chem.* 290 (2015) 755-761.
- [0127] [28] W.C. Yeh, Z. Cao, M. Classon, S.L. McKnight, *Genes Dev.* 15 (1995) 168-181.
- [0128] [29] W.C. Stewart, R.F. Morrison, S.L. Young S, J.M. Stephens, *Biochim. Biophys. Acta.* 1452 (1999) 188-196.
- [0129] [30] C.A. Shang, M.J. Waters, *Mol. Endocrinol.* 17 (2003) 2494-2508.
- [0130] [31] D. Wang, Y. Zhou, W. Lei, K. Zhang, J. Shi, Y. Hu, G. Shu, J. Song, *Biol. Cell.* 102 (2009) 1-12.
- [0131] [32] Y.K. Park, J. Lee, V.S. Hong, J.S. Choi, T.Y. Lee, B.C. Jang, *PLoS One.* 6 (2014) e109344.
- [0132] [33] Y.K. Park, T.Y. Lee, J.S. Choi, V.S. Hong, J. Lee, J.W. Park, B.C. Jang, *Genes. Dev.* 3 (1989) 1323-1335.
- [0133] [35] B. Gustafson, M.M. Jack, S.W. Cushman, U. Smith, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (2003) 933-939.
- [0134] [36] C.S. Hwang, T.M. Loftus, S. Mandrup, M.D. Lane, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13 (1997) 231-259.
- [0135] [37] M.R. Lakshmanan, C.M. Nepokroeff, J.W. Porter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69 (1972) 3516-3519.
- [0136] [38] C.S. Rubin, A. Hirsch, C. Fung, O.M. Rosen, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 7570-7578.
- [0137] [39] F.M. Gregoire, C.M. Smas, H.S. Sul, *Physiol. Rev.* 78 (1998) 783-809.
- [0138] [40] A. Yadav, M.A. Kataria, V. Saini, A. Yadav, *Clin. Chim. Acta.* 417 (2013) 80-84.
- [0140] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한

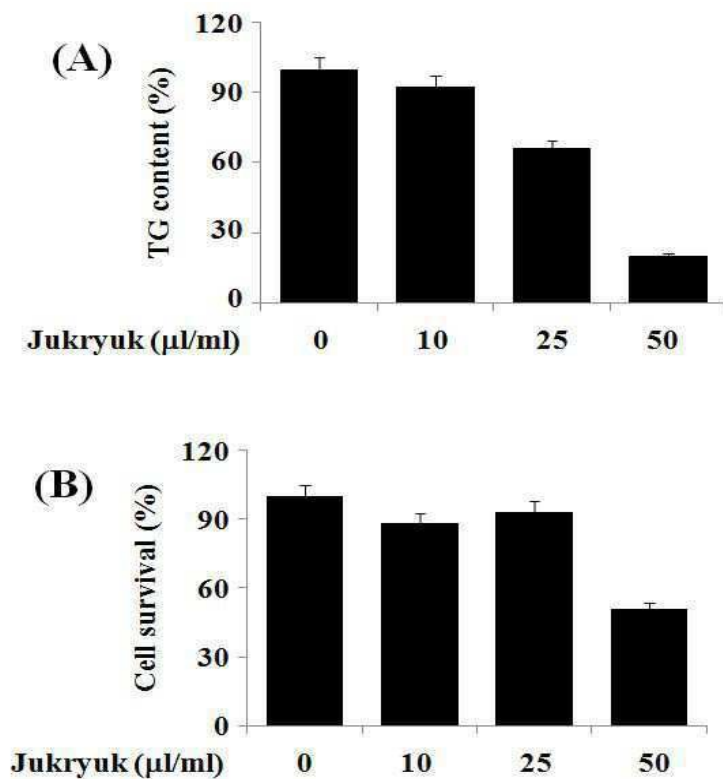
구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

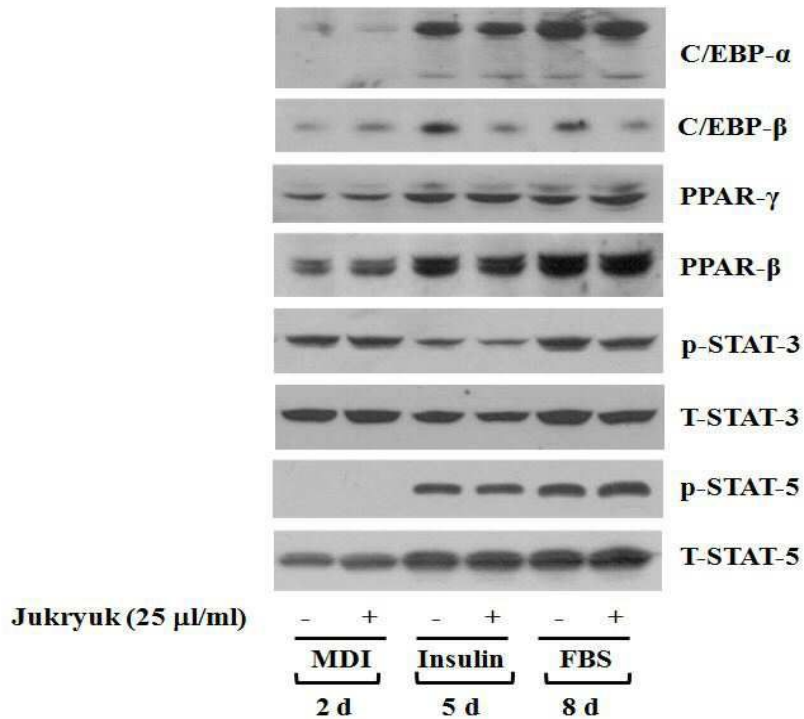
도면1



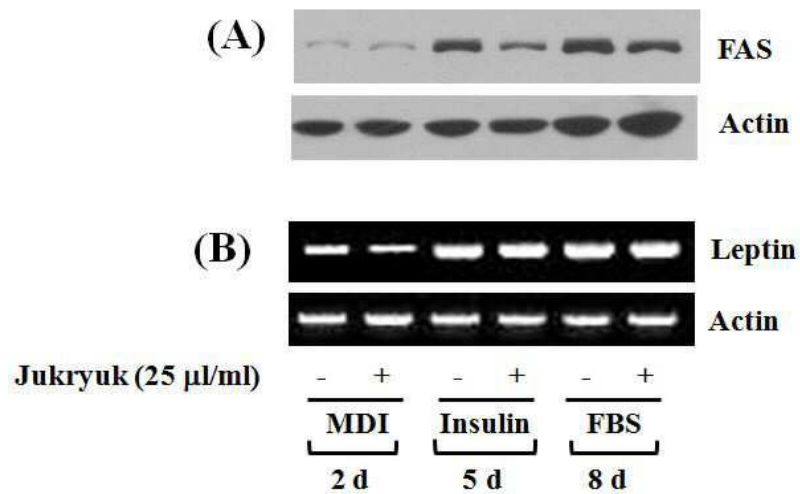
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> Compositions for Preventing, Improving or Treating Obesity
Comprising Bambusae Caulis in Liquamen as An Active Ingredient
- <130> PN150086
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Leptin sense
 <400> 1
 ccaaaaccct catcaagacc 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Leptin anti-sense
 <400> 2
 ctcaaagcca ccacctctgt 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FAS sense
 <400> 3
 ttgctggcac tacagaatgc 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FAS anti-sense
 <400> 4
 aacagcctca gagcgacaat 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Actin sense

<400>	5	
ggtgaaggtc ggtgtgaacg		20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Actin anti-sense	
<400>	6	
ggtaggaaca cggaaggcca		20