(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년11월09일
(11) 등록번호 10-0992995
(24) 등록일자 2010년11월02일

(51) Int. Cl.
A61K 31/357 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0041249
(22) 출원일자 2010년05월03일
심사청구일자 2010년05월03일
(56) 선행기술조사문헌
EP0997137 A
WO2008117062 A1

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교
(72) 발명자
박태선
서울특별시 서대문구 연희동 740 연희성원아파트 104동 1903호
(74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 정다원

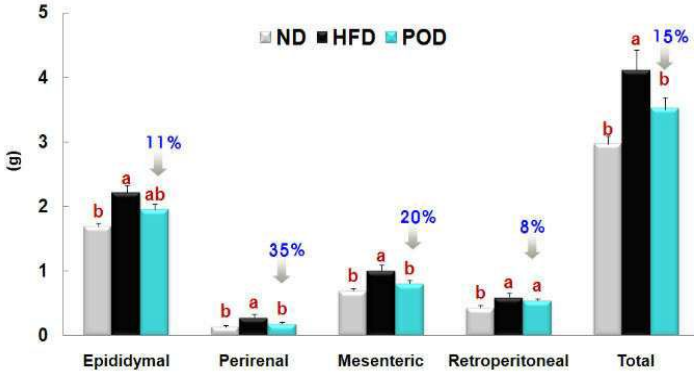
(54) 피페로날의 신규한 용도

(57) 요 약

본 발명은 피페로날을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물은 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료 활성을 나타낼 뿐만 아니라 공복시 혈당 및 혈중 인슐린 농도의 유의한 감소를 유도하여 제2형 당뇨 또는 인슐린 저항성을 개선하는 효과 및 이와 밀접하게 관련된 대사질환을 개선하는 의약 또는 기능성 식품 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A080020
부처명 한국보건산업진흥원
연구관리전문기관
연구사업명 건강기능식품 중개연구사업
연구과제명 건강기능식품소재의 대사질환 개선효능 평가 및 작용기작 규명을 통한 산업화 중개연구
기여율
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

피페로날(piperonal)을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disease)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 이상지방혈증은 고지혈증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 인슐린 저항성 증후군은 인슐린 저항성에 의한 비만, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증, 고인슐린혈증, 비알콜성 지방간 및 제2형 당뇨병으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 질환을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈중 지방, 간 지방 또는 내장 지방을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 지방은 중성지방, 콜레스테롤 또는 유리지방산을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 내장 지방은 부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방 및 후복강지방으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 지방을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈액내 ALT(alanine aminotransferase) 또는 AST(aspartate aminotransferase)의 양을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 PPARγ(Peroxisome proliferator activated receptor gamma), C/EBPs(CCAAT enhancer-binding proterins) 또는 aP2(fatty acid binding protein)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 TNF-α(tumor necrosis factor-alpha) 및 IL-6(interleukin-6)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 UCP1(uncoupling protein 1) 또는 UCP3(uncoupling protein 3)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈액의 포도당 수치를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

피페로날을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피페로날의 신규한 용도, 보다 구체적으로는 피페로날을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

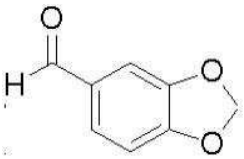
[0002] 생활환경의 변화에 의해 현대인들의 내장지방형 비만이 증가하면서 당뇨병, 고혈압, 지질대사이상, 인슐린저항성 등을 수반하는 대사증후군(metabolic syndrome)의 발병이 급증하고 있다. 이들 질환은 상호간의 발생위험을 증가시키며, 노화, 스트레스 및 면역기능저하 등의 다원적인 생체대사변화와 관련이 있는 공통 질환이다. 비만은 외관상의 문제뿐 아니라, 지방간, 고혈압, 당뇨병, 심혈관계 질환 등의 만성질환을 유발한다. 보건복지가족부가 최근 발표한 2007년 국민건강·영양조사결과에 의하면 한국성인의 31.7%가 비만으로 나타났으며, 이는 우리나라 성인 10명 가운데 3명이 각종 비만합병증에 노출되어 있다는 것을 의미한다. 이와 같은 과체중 및 비만인구의 증가는 만성질환 유병률 증가로 이어지는데, 2007년도 한국인의 당뇨환자수는 3,000,000명이고, 2030년에는 5,450,000명으로 증가하여, 한국인의 10%가 당뇨환자가 될 것으로 예측된다. 2005년, 당뇨병으로 인한 사망률은 한국인의 경우 인구 100,000명당 35.5명으로, 일본 (5.9명), 영국(7.5명), 또는 독일 (16.6명)에 비해 3-7배 이상 높은 것으로 조사되었다. 보건사회연구원의 통계에 따르면, 2006년 비만 및 비만합병증으로 인한 사회경제적 손실은 진료비와 치료에 따른 소득손실 등 간접비용까지 합해 총 2조 1천억원으로 추정된다. 이에 따라 정부는 성인비만율을 20% 이하, 그리고 청소년 비만율을 15% 이하로 낮추는 것을 2010년 국민건강증진의 주요목표로 설정한 바 있다. 보건사회연구원의 통계에 따르면, 2006년 비만 및 비만합병증으로 인한 사회경제적 손실은 진료비와 치료에 따른 소득손실 등 간접비용까지 합해 총 2조 1천억원으로 추정된다. 이에

따라 정부는 성인비만율을 20% 이하, 그리고 청소년 비만율을 15% 이하로 낮추는 것을 2010년 국민건강증진의 주요 목표로 설정하고, 목표달성을 위한 시행전략으로 비만과 대사질환에 대한 정확한 정의와 측정방법을 모색키로 한 바 있다.

[0003] 세계인구 중 약 25%에 해당하는 17억명이 현재 과체중(BMI>25)이고, 주요 시장인 미국, 유럽, 일본의 1억2천명을 포함한 서구지역의 3억명 이상이 비만환자(BMI> 30)로 분류되고 있다. OECD 국가 중에서 비만율이 가장 높은 나라는 미국으로, 전 국민의 31%가 비만환자이고, 그 다음이 멕시코(24%), 영국(23%), 그리스(22%), 호주(22%), 뉴질랜드(21%), 헝가리(19%), 캐나다(14%), 스페인(13%), 아일랜드(13%), 독일(13%), 포르투칼(13%), 핀랜드(13%0, 터키(12%), 벨기에(12%)의 순으로 전체 인구 중 비만환자 비율이 높게 나타나고 있다. 중국은 7천만명이 비만인구이고, 급속도로 체중조절 관련 시장이 확대되고 있으며, 총 시장규모는 100억위안 정도로 예측하고 있다. 아울러 현재 세계적으로 어린이 5명 중 1명이 소아비만에 해당되며, 그 숫자도 급속도로 증가하고 있어 소아비만이 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 소아비만은 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 수치가 높아 생활습관병으로 불리는 당뇨, 고혈압, 뇌졸중 등의 주요 원인이 되고, 소아비만아의 80% 이상이 성인비만으로 연결되어 나이가 들수록 비만으로 인한 건강상의 문제는 더욱 심각해질 수 있다. 또한 지방이 많을수록 성호르몬 분비가 자극되어 나이에 비해 사춘기가 빨리 찾아와 성장장애를 가져올 수 있으며, 혈액순환 및 영양공급에도 영향을 미쳐 성장저해요소의 원인이 되었다.

[0004] 국내외에서 판매되는 비만치료제로는 미 FDA에서 승인을 받은 orlistat을 주원료로 하는 '제니칼'(한국로슈), sibutramine을 원료로 하는 '리덕틸'(일성신약), 그리고 녹차 카테콜 성분을 원료로 하는 '엑소리제'(구주제약) 등이 있다. 리파아제작용을 억제하는 제니칼의 경우 지방변, 가스생성, 지용성비타민 흡수저하 등의 위장계 부작용을, 그리고 리덕틸의 경우에는 교감신경계의 세로토닌과 노르아드레날린 농도를 증가시킴으로서 두통, 구갈, 식욕부진, 불면, 변비 등의 부작용을 나타낸다. 이외에도 그동안 항비만 약제로 개발된 제품 중에는 심각한 부작용으로 인해 판매가 금지된 것들도 상당수에 이른다. 예를 들어, 아미노필린은 탁월한 체지방 분해효과에도 불구하고 정신 신경계, 순환기계, 소화기계에 걸쳐 폭넓은 부작용이 보고된 바 있고, 펜프루라민, 덱스펜플루라민, 토피라메이, 에페드린 등도 비만치료 부적합 약물로 판정되어 판매가 금지되었다. 이와 같이 합성의약품의 부작용과 만성질환의 극복에 서양의학이 한계를 보임에 따라 천연물 식의약품에 대한 가치가 새롭게 부각되고 있다.

[0005] 피페로날(piperonal)은 헬리오트로핀(heliotropine, heliotropin), 디옥시메틸렌프로토카테큐익 알데히드(dioxymethyleneprotocatechuic aldehyde), 피페로닐 알데히드(piperonyl aldehyde), 3,4-벤조디옥솔-5-카복살데히드(3,4-benzodioxole-5-carboxaldehyde), 1,3-벤조디옥솔-5-카복살데히드(1,3-benzodioxole-5-carboxaldehyde), 3,4-메틸렌 디하이드록시벤즈알데히드(3,4-methylene dihydroxybenzaldehyde) 등으로도 불리운다. 피페로날은 케이퍼(*Capparis spinosa Linne* ,Caper), 녹나무(*Cinnamomum camphora*, Camphor), 멜론(*Cucumis melo Linn*), 송엽초(*Galium verum var. asiaticum*), 후추(*Piper nigrum*, Black Pepper), 만향옥(*Polianthes tuberosa*, Tuberose), 하이부시블루베리(*Vaccinium corymbosum*, American blueberry), 바닐라(*Vanilla planifolia*, Bourbon vanilla), 향기제비꽃(*Viola odorata*, Apple leaf) 등의 식물에 함유되어 있는 알칼로이드계 화합물이다. 피페로날의 구조식은 $C_8H_6O_3$이고, 분자량은 150.13 g/mol이며 화학구조는 다음과 같다.

[0006] 

[0007] 피페로날은 FDA(Food and Drug Administration) 및 KFDA(Korea Food and Drug Administration) 식품첨가물 데이터베이스에 착향료로 사용가능한 물질로 등재되어 있으며, 버찌, 바닐라계 향료의 조합에 쓰이고, 아이스크림 및 베이커리 제품에 주로 이용되어 왔다. 피페로날은 종양 동물모델에서 종양억제 효과를 나타냄이 보고되었고(Anto RJ, George J, Babu KV, Rajasekharan KN, Kuttan R., Antimutagenic and anticarcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids. *Mutat Res* 370:127-31, 1996), 암진단을 위한 MRI(magnetic resonance imaging, 자기공명영상) 촬영 동안 비강 배관(nasal cannula)을 통해 피페로날을 환자들의 후각에 자극을 준 결과, 환자들의 불안을 완화시켜주는 효과가 있음이 보고되었다(Redd WH, Manne SL, Peters B,

Jacobsen PB, Schmidt H., Fragrance administration to reduce anxiety during MR imaging. *J Magn Reson Imaging*. 4: 623-6, 1994).

[0008] 피페로날은 식용 가능하며 안전한 물질로 알려져 있다. 즉, 사람에게 10 g의 피페로날을 복용시킨 결과 독성이 나타나지 않았고(Von Oettingen WF, *Nat Inst Health Bull*. 190: 342, 1949), 흰쥐를 대상으로 피페로날의 LD_{50}를 측정한 결과 2,700 mg/kg로 보고되었다(Jenner PM et al, *Food Cosmet Toxicol* 2: 327, 1964). 또한 피페로날을 1% 첨가한 사료를 흰쥐에게 28주간 섭취시킨 실험에서도 혈액, 주요 장기의 중량 및 조직학적 이상이 발견되지 않았다(Hagan E et al, *Fd Cosmet Toxicol* 5: 141, 1967). 사료에 피페로날을 0.1% 및 0.5% 첨가하여 흰쥐에게 2년간 섭취시킨 연구에서도 독성의 발현은 관찰되지 않았다(FAO *Nutr Meet Rep Ser* No. 44A, WHO Fd. Add. 68, 33, 73, 1968).

[0009] 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

[0010] 본 발명자들은 비만, 이상지방혈증(dyslipidemia) 및/또는 지방간 등을 포함하는 대사질환에 예방 또는 치료 활성을 갖는 천연물질을 개발하고자 노력하였다. 그 결과 다양한 식물에 포함된 피페로날이 상기 지질 대사질환에 대한 개선효과를 갖는다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 또는 개선용 조성물을 제공하는데 있다.

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

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 피페로날을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disease)의 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 비만, 이상지방혈증 및/또는 지방간 등을 포함하는 대사질환에 예방 또는 치료 활성을 갖는 천연물질을 개발하고자 노력하였다. 그 결과 다양한 식물에 포함된 피페로날이 상기 지질 대사질환에 대한 개선효과를 갖는다는 사실을 발견하였다.

[0015] 본 발명에 따르면, 피페로날은 체중 및 내장 지방의 감소, 혈장 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL+VLDL 콜레스테롤 농도의 감소, 유리지방산의 농도의 감소, 간조직 중성지방의 감소를 유발하여 고지방 식이로 유도된 비만 현상을 현저히 완화하는 효능을 발휘한다. 나아가, 고지방식이 섭취에 의해 간조직에서 증가하였던 핵전사인자 및 이의 타겟유전자 발현이 모두 감소하고, TNFα(tumor necrosis factor alpha) 및 IL-6(interleukin-6) 유전자 발현이 감소하여 비알콜성 지방간이 진행되고 있는 간 조직에서의 염증활성화를 현저히 개선한다.

[0016] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이상지방혈증"은 고지혈증을 포함하는 개념으로, 혈액내의 지방수치 증가로 나타나는 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 낮은 HDL-콜레스테롤혈증 외에도 지단백의 대사이상 등의 문제로 나타나는 비정상적 지질상태를 의미한다.

[0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 "지방간"은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.

[0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 “당뇨병”은 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 용어 당뇨병은 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β-세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 저항성에 의해 초래된다.

[0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 “인슐린 저항성”은 혈당을 낮추는 인슐린의 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 것을 말한다. 인슐린 저항성이 높을 경우, 인체는 너무 많은 인슐린을 만들어 내고 이로 인해 고혈압이나 이상지방혈증은 물론 심장병, 당뇨병 등까지 초래할 수 있다. 특히 제2형 당뇨병에서는 근육과 지방조직에서 인슐린의 증가를 알아채지 못하여, 인슐린의 작용이 일어나지 않는다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 용어 “인슐린 저항성 증후군”은 상기 인슐린 저항성에 의하여 유발된 질환을 총칭하는 개념으로 인슐린 작용에 대한 세포의 저항성, 고인슐린혈증, 초저밀도지단백(very low density lipoprotein, VLDL)과 중성지방의 증가, 고밀도지단백(high density lipoprotein, HDL)의 감소 및 고혈압 등을 특징으로 하는 질환을 의미하며, 심혈관질환과 제2형 당뇨병의 위험인자로 인식되고 있는 개념이다(Reaven GM, Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes*, 37: 1595-607, 1988). 또한 인슐린 저항성은 고혈압, 당뇨, 흡연 등의 위험인자들과 함께 세포 내 산화스트레스를 증가시키고 신호전달체계를 변화시켜 염증반응을 유발하여 죽상경화증을 진행시킨다고 알려져 있다(Freeman BA et al, Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-26, 1982), Kawamura M et al, Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 94: 771-8, 1994).

[0021] 본 명세서에서 사용되는 용어 “대사질환”은 각종 심혈관 질환과 제 2형 당뇨병의 위험 요인들이 서로 군집을 이루는 현상을 한 가지 질환군으로 개념화시킨 것으로 인슐린 저항성 및 이와 관련된 복잡하고 다양한 여러 대사 이상과 임상 양상을 모두 포괄하여 의미하는 개념이다. 1988년 Reaven은 이러한 증상들의 공통적인 원인이 체내의 인슐린 작용이 잘 되지 않는 인슐린 저항성임을 주장하고 인슐린 저항성 증후군이라고 명명했으나 1998년 세계보건기구(WHO)는 인슐린 저항성이 이 증상들의 모든 요소를 다 설명할 수 없기에 대사증후군 또는 대사질환이라는 용어를 도입하였다.

[0022] 본 발명의 피페로날을 유효성분으로 포함하는 조성물은 대사 질환의 다양한 질환, 예를 들어, 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군을 개선하는 활성을 갖는다. 본 발명의 조성물은 다양한 활성에 의하여 대사질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 이상지방혈증은 고지혈증이다.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 “고지혈증”은 중성 지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 지방량이 많아 유발되는 질환을 말한다. 보다 구체적으로 고지혈증이란 혈액내의 중성지방, LDL 콜레스테롤, 인지질 및 유리 지방산 등의 지질 성분이 증가된 상태로 발생빈도가 높은 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증을 포함한다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 인슐린 저항성 증후군은 인슐린 저항성에 의한 비만, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증, 고인슐린혈증, 비알콜성 지방간 및 제2형 당뇨병으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 질환을 포함한다.

[0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈중 지방, 간 지방 또는 내장 지방을 감소시킨다.

[0027] 본 발명에서 용어 “간” 및 “내장”은 각각 세포 또는 조직을 포함한다.

[0028] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물 섭취군은 고지방식이(HFD) 대조군에 비하여 혈중 및 간조직의 지질농도가 유의하게 감소하였으며, 총 내장지방 무게가 15% 유의하게 감소하였다.

[0029] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 지방은 중성지방, 콜레스테롤 또는 유리지방산을 포함한

다.

[0030] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 내장 지방은 부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방 및 후복강지방으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 지방을 포함한다.

[0031] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물 섭취군은 고지방식이(HFD) 대조군에 비하여 각각 부고환지방의 무게가 11%, 신장주변지방무게가 35%, 장간막지방무게가 20%, 후복강지방무게가 8% 유의하게 감소하였다.

[0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈액내 ALT(alanine aminotransferase) 또는 AST(aspartate aminotransferase)의 양을 감소시킨다.

[0033] 본 발명에서 용어 "ALT" 및 "AST"는 간이 손상이 되는 경우 혈중에서 수치가 각각 증가되는 효소로서, 이러한 특성을 이용하여 간기능 지표로 활용되는 있는 효소이다.

[0034] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 고지방식이 대조군보다 혈액내 ALT 및 AST의 양을 각각 27% 및 15% 유의하게 감소시킴으로써, 지방간, 보다 바람직하게는 비알코올성 지방간 현상을 현저히 완화시켜 지방간을 개선하는 효과를 가짐이 확인되었다.

[0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 PPARγ(peroxisome proliferator activated receptor gamma), C/EBPs(CCAAT enhancer-binding proterins) 또는 aP2(adipocyte protein 2)의 발현을 감소시킨다.

[0036] 본 발명의 조성물은 PPARγ 및 C/EBPs의 발현을 감소시키고, 궁극적으로 이의 타겟 유전자인 aP2의 발현을 감소시킴으로써, 내장지방량을 감소시키는 효과를 나타내었다. aP2 유전자는 지방전구세포가 증식 및 분화하여 지방세포로 변환되는 과정에서 발현되는 유전자이며, PPARγ 및 C/EBPs는 aP2 유전자를 발현을 조절하는 인자이다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 TNF-α(tumor necrosis factor-alpha) 및 IL-6(interleukin-6)의 발현을 감소시킨다.

[0038] 고지방식이에 의해 비만이 유도되면 체액에 유리지방산 (특히, 포화지방산)이 증가하게 되고, TLR4(toll-like receptor 4)에 유리지방산이 리간드로 결합하면 IKK(inhibitor of κB kinase)를 활성화시켜 NF-κB(nuclear factor κB)를 활성화시키고, 염증전구 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 TNF-α, IL-6 등의 분비를 촉진하여 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0039] 그 외에도 TNF-α 및 IL-6은 , SOCS3(suppressor of cytokine signaling 3)과 JNK(c-Jun N-terminal kinase)를 활성화시킴으로써 IRS(insulin receptor substrate)의 세린(serine) 잔기를 인산화하여 당(glucose) 수송을 저해하고, 간 또는 근육 등의 말초조직에서 인슐린저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 UCP1(uncoupling protein 1) 또는 UCP3(uncoupling protein 3)의 발현을 증가시킨다.

[0041] 본 명세서에서 용어 "UCP1"과 "UCP3"은 미토콘드리아 내의 단백질로, UCP1는 갈색지방조직에서 많이 발현되고, UCP3는 골격근에서 발견된다. 이들 단백질은 미토콘드리아 내에서 작용하여 열발생을 일으킴으로써 에너지 소모를 증가시키므로 비만치료제의 표적이 될 수 있다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 발열단백질인 UCP1과 UCP3의 발현을 증가시켜 발열을 촉진함으로써 항비만 등의 효능을 발휘한다.

[0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈액의 포도당 수치를 감소시킨다.

[0043] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 공복시 혈당 수치를 27% 유의하게 감소시켜 인슐린저항성을 개선하여 대사질환의 예방 또는 치료 활성을 나타내었다.

[0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 피페로날은 식물로부터 유래된다.

[0045] 본 발명에서 이용하는 피페로날은 식물로부터 추출될 수 있으며, 바람직하게는 상기 피페로날은 케이퍼(*Capparis spinosa Linne* ,Caper), 녹나무(*Cinnamomum camphora*, Camphor), 멜론(*Cucumis melo Linn*), 송엽초(*Galium verum var. asiaticum*), 후추(*Piper nigrum*, Black Pepper), 만향옥(*Polianthes tuberosa*, Tuberose), 하이부시블루베리(*Vaccinium corymbosum*, American blueberry), 바닐라(*Vanilla planifolia*, Bourbon vanilla), 향기제비꽃(*Viola odorata*, Apple leaf) 등의 식물로부터 추출 또는 분획할 수 있다.

[0046] 피페로날을 포함하는 식물 추출물은 상기 식물에 통상적인 추출용매를 이용하여 얻을 수 있으며, 바람직하게는 (a) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (b) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (c) 아세톤, (d) 에틸아세테이트, (e) 클로로포름, (f) 1,3-부틸렌글리콜, (g) 헥산, (h) 디에틸에테르, (i) 부틸아세테이트 또는 (j) 물을 추출용매로 하여 얻을 수 있다.

[0047] 피페로날을 포함하는 식물 분획물은 상기 식물 추출물을 추가적으로 분리/정제하여 얻은 보다 단리/정제된 형태(form)를 의미한다. 예컨대, 상기 식물 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친 화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 피페로날을 포함하는 식물 분획물에 포함되는 것이다.

[0048] 또한 본 발명의 피페로날은 화학적 방법에 의하여 대량으로 합성할 수도 있다.

[0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이다.

[0050] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학 적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 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(19 th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0051] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.

[0052] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 ㎎/kg 범위 내이다.

[0053] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스 제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물이다.

[0055] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 피페로날 뿐 만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라 이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트 린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추

출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스 파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0056] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분인 피페로날 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

발명의 효과

[0057] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0058] (a) 본 발명은 피페로날을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 인슐린 저항성 증후군의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0059] (b) 본 발명의 조성물은 다양한 식물을 이용하여 분리할 수 있으며, 화학적 방법을 통하여도 합성 가능하다.

[0060] (c) 본 발명의 조성물은 비만, 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료 활성을 나타낼 뿐만 아니라 공복시 혈당 및 혈중 인슐린 농도의 유의한 감소를 유도하여 제2형 당뇨 또는 인슐린 저항성을 개선하는 효과 및 이와 밀접하게 관련된 대사질환을 개선하는 의약 또는 기능성 식품 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1a-1d는 실험식이를 섭취한 마우스의 체중증가량(도 1a 및 1b), 식이섭취량(도 1c) 및 식이효율(도 1d)을 나타낸 그림이다. 8마리 마우스의 평균±표준오차 값으로 나타내었으며, 바(bar) 상단의 다른 문자는 일원 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 Duncan 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 $P<0.05$에서의 다른 식이 그룹들(dietary groups)과 유의적인 차이를 나타낸 것이다.

도 2는 실험식이를 섭취한 마우스의 부위 별 내장지방 무게를 나타낸 그림이다. 8마리 마우스의 평균±표준오차 값으로 나타내었으며, 바(bar) 상단의 다른 문자는 일원 분산분석을 실시한 후 Duncan 다중범위검정을 이용하여 $P<0.05$에서의 다른 식이 그룹들과 유의적인 차이를 나타낸 것이다.

도 3은 실험식이를 섭취한 마우스의 내장지방조직 사진이다.

도 4는 피페로날을 섭취시킨 마우스의 혈장 지질 및 포도당 농도를 나타낸 그림이다. 8마리 마우스의 평균±표준오차 값으로 나타내었으며, 바(bar) 상단의 다른 문자는 일원 분산분석을 실시한 후 Duncan 다중범위검정을 이용하여 $P<0.05$에서의 다른 식이 그룹들과 유의적인 차이를 나타낸 것이다.

도 5는 피페로날을 섭취시킨 마우스의 간무게를 나타낸 그림이다. 8마리 마우스의 평균±표준오차 값으로 나타내었으며, 바(bar) 상단의 다른 문자는 일원 분산분석을 실시한 후 Duncan 다중범위검정을 이용하여 $P<0.05$에서의 다른 식이 그룹들과 유의적인 차이를 나타낸 것이다.

도 6은 피페로날을 섭취시킨 마우스의 간조직 지질농도 및 간기능 수치를 나타낸 그림이다. 8마리 마우스의 평균±표준오차 값으로 나타내었으며, 바(bar) 상단의 다른 문자는 일원 분산분석을 실시한 후 Duncan 다중범위검정을 이용하여 $P<0.05$에서의 다른 식이 그룹들과 유의적인 차이를 나타낸 것이다.

도 7은 마우스 내장지방조직의 UCPs 유전자 발현변화를 나타낸 그림이다. 좌측 패널은 UCP1 및 UCP3의 RT-PCR 분석의 젤 사진을 나타낸 그림이고, 우측패널은 이들 유전자의 상대적 발현정도를 보여주는 그림이다. 데이터는 GAPDH mRNA 수준에 맞추어 표준화하였으며, ND 마우스 값과의 상대적인 값으로 표시하였다. 결과는 8마리 마우스의 RNA 샘플을 이용한 세 개의 독립적인 실험값에 대한 평균±표준오차로 나타냈다. 바(bar) 상단의 다른 문자는 일원 분산분석을 실시한 후 Duncan 다중범위검정을 이용하여 $P<0.05$에서의 다른 식이 그룹들과 유의적인 차이를 나타낸 것이다.

도 8은 마우스 간조직의 지방생성(lipogenesis) 관련 유전자 발현변화를 나타낸 그림이다. 좌측 패널은 C/EBP α, PPARγ2 및 aP2의 RT-PCR 분석의 젤 사진을 나타낸 그림이고, 우측패널은 이들 유전자의 상대적 발현정도를 보여주는 그림이다. 데이터는 GAPDH mRNA 수준에 맞추어 표준화하였으며, ND 마우스 값과의 상대적인 값으로 표시하였다. 결과는 8마리 마우스의 RNA 샘플을 이용한 세 개의 독립적인 실험값에 대한 평균±표준오차로 나

타냈다. 바(bar) 상단의 다른 문자는 일원 분산분석을 실시한 후 Duncan 다중범위검정을 이용하여 P<0.05에서의 다른 식이 그룹들과 유의적인 차이를 나타낸 것이다.

도 9는 마우스 간조직의 염증 관련 유전자 발현변화를 나타낸 그림이다. 좌측 패널은 TNFα 및 IL-6의 RT-PCR 분석의 젤 사진을 나타낸 그림이고, 우측패널은 이들 유전자의 상대적 발현정도를 보여주는 그림이다. 데이터는 GAPDH mRNA 수준에 맞추어 표준화하였으며, ND 마우스 값과의 상대적인 값으로 표시하였다. 결과는 8마리 마우스의 RNA 샘플을 이용한 세 개의 독립적인 실험값에 대한 평균±표준오차로 나타냈다. 바(bar) 상단의 다른 문자는 일원 분산분석을 실시한 후 Duncan 다중범위검정을 이용하여 P<0.05에서의 다른 식이 그룹들과 유의적인 차이를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0063] 다른 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)부 또는 %, 고체/액체는 (중량/부피) 부 또는 %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) 부 또는 %이다.

[0064] **실시예**

[0065] **실시예 1: 마우스를 이용한 피페로날의 체중 및 내장지방 감소효능**

[0066] **1) 실험식이 제조 및 실험동물의 사육**

[0067] 본 실험에서 사용한 비만유도식이는 고지방대조식이(high fat diet, HFD: 40% 지방 칼로리(fat calorie), 17 g 라드(lard) + 3% 옥수수오일/100 g 식이)이며, 피페로날이 보충된 식이(piperonal-supplemented high fat diet, POD)는 HFD와 조성이 동일하되 피페로날이 0.05% 수준으로 포함되었다. 정상식이(ND)는 AIN-76 설치류 식이조성(American Institute of Nutrition, Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. J. Nutr. 107: 1340-1348, 1977)에 준하여 조제하였다(표 1). 피페로날은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

표 1

[0068] 실험식이 조성표

성분	정상식이(ND) (g/kg diet)	고지방 대조식이 (HFD)(g/kg diet)	피페로날 보충식이 (POD)(g/kg diet)
카제인	200	200	200
DL-메티오닌	3	3	3
옥수수 전분	150	111	110.5
수크로오스	500	370	370
셀룰로오스	50	50	50
옥수수유	50	30	30
라아드	-	170	170
비타민 복합물	10	12	12
미네랄 복합물	35	42	42
콜린 비타르트레이트	2	2	2
콜레스테롤	-	10	10
tert-부티하이드로퀴논	0.01	0.04	0.04
피페로날	**-**	-	**0.5**
총합(g)	**1,000**	**1,000**	**1,000**
지방(% 칼로리)	11.5	39.0	39.0
총 열량, kJ/kg diet	16,439	19,315	19,315

[0069] 5주령의 수컷 C57BL/6J 마우스(오리엔트, 한국)를 고형사료로 1주일 간 실험실 환경에 적응시킨 후, 난괴법에 따라 고지방식이대조군과 실험군으로 임의 배치하여, 총 10주간 사육하였다. 식이는 매일 오전 10-11시 사이에 물과 함께 공급하였으며, 식이 섭취량은 매일, 체중은 매주 측정하였다. 사료섭취에 따른 갑작스런 체중변화를 막기 위해 사료통을 제거하고 2시간 후에 체중을 측정하였다. 실험동물을 12시간 이상 금식시킨 후, 디에틸 에테르로 마취한 상태에서 혈액, 간 및 내장지방조직(부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방 및 후복강지방)을 채취하여 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4)으로 세척한 후, 무게를 측정하였다. 복부대동맥으로부터 채혈한 혈액은 1000 x g에서 15분 간 원심분리하여 혈장을 분리하였다.

[0070] **2) 체중 및 내장지방 무게 변화**

[0071] 실험식이를 10주간 섭취시킨 후 최종체중 및 10주간의 체중증가량을 살펴보면, 고지방식이대조군 (HFD)에 비해 피페로날을 보충 섭취시킨 군(POD)에서 누적 체중증가량이 19% 유의하게 감소하였다. 피페로날 섭취는 일일 식이섭취량에 유의한 변화를 초래하지 않았고, 실험기간 동안의 총체중증가량(g)을 총식이섭취량(g)으로 나누어 계산된 식이효율값(food efficiency ratio)을 HFD군에 비해 15% 유의하게 감소시켰다(도 1). 따라서 피페로날의 체중감소 효능은 식욕억제에 기인한 것은 아님을 알 수 있다.

[0072] 실험식이를 10주 간 섭취시킨 후 내장지방을 구성하는 부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방 및 후복강지방을 각기 적출하여 무게를 측정한 결과, 대조군(HFD)에 비해 피페로날 섭취군(POD)에서 부고환지방무게가 11%, 신장주변지방무게가 35%, 장간막지방무게가 20%, 후복강지방무게가 8%, 그리고 이들 네가지 부위를 합한 총 내장지방 무게가 15% 유의하게 감소하였다($P < 0.001$)(도 2 및 도 3). 따라서 피페로날은 매우 탁월한 체중 및 내장지방량 감소효과가 있음이 확인되었다.

[0073] **실시예 2: 피페로날의 고지혈증 및 2형 당뇨의 예방 및 치료 효능**

[0074] **1) 혈액의 생화학분석 방법**

[0075] 상기에서 10주간 사육된 실험동물을 대상으로 혈장 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방, 포도당농도, 그리고 간조직의 지질성분을 다음과 같이 측정하였다. 혈장 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방, 유리지방산 및 포도당농도는 상업용 측정키트(Bio Clinical system)를 이용하여 각각 2회 반복 측정하였고, 혈중 LDL+VLDL 콜레스테롤 농도는 총콜레스테롤 농도로부터 HDL-콜레스테롤 농도를 제하여 산출하였다.

[0076] **2) 혈장 지질 및 포도당농도의 변화**

[0077] 표 1에 제시된 실험식이를 10주간 섭취시킨 마우스의 혈장 지질농도를 살펴보면, 피페로날 섭취군(POD)에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 중성지방농도가 21%, 총콜레스테롤농도가 14%, LDL+VLDL 콜레스테롤농도가 18%, 그리고 유리지방산농도가 17% 각기 유의하게 감소하였고, 동맥경화지수가 17% 유의하게 감소하였다(도 4). 아울러 고지방식이를 섭취하는 마우스에게 피페로날을 보충섭취시킨 결과 HFD군에 비해 공복시 혈당을 27% 유의하게 감소시켰다. 따라서 피페로날은 고지방식이로 유도된 비만에서 나타나는 고지혈증을 현저히 완화시키고, 공복시 혈당을 개선하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0078] **실시예 3: 피페로날의 비알콜성 지방간 예방 및 치료 효능**

[0079] **1) 간조직의 지질농도 분석방법**

[0080] 간조직의 지질성분을 Folch 등의 방법(Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957;226:497-509)에 준하여 다음과 같이 추출하였다. 0.25 g의 간조직에 1 mL의 증류수를 가한 후 폴리트론(polytron) 균질기 (IKA-WERKE GmbH & Co., Ultra-Turrax, Staufen, Germany)를 사용하여 균질화시켰다. 균질액에 클로로포름:메탄올 용액(2:1, v/v) 5 mL을 가하여 잘 혼합한 후, 1000 x g에서 10분간 원심분리하여 하층액을 분리하였고, 상층액에 다시 클로로포름:메탄올 용액(2:1, v/v) 2 mL을 첨가한 후, 동일 과정을 반복하여 간의 지질성분을 완전히 분리하였다. 이렇게 얻은 하층액에 클로로포름:메탄올:0.05% $CaCl_2$ (3:48:47, v/v/v) 용액 3 mL을 가하여 1분

간 혼합한 후 1000 x g에서 10분간 원심분리하였고, 최종 하층액을 취하여 질소가스로 완전히 건조시킨 후, 건조된 지질을 1 mL의 메탄올에 용해하여 지질성분 분석에 사용하였다. 간조직 지질추출액의 중성지방, 콜레스테롤 및 유리지방산 농도는 혈장의 분석을 위해 사용된 것과 동일한 상업용 지질분석 키트(Bio Clinical System)를 사용하여 측정하였다.

[0081] 간기능지표로 사용되는 혈중 ALT 및 AST 활성은 상업용 분석키트(Bio Clinical System, 한국)를 사용하여 측정하였다.

[0082] **2) 간무게, 간조직의 지질농도 및 간기능수치의 변화**

[0083] 실험식이를 10주간 섭취시킨 마우스의 간무게를 살펴보면, 피페로날 섭취군(POD)에서 고지방식이대조군에 비해 절대 간무게(g)가 23%, 그리고 체중대 간무게(g/ 100 g 체중)가 15% 각기 유의하게 감소하였다(도 5).

[0084] 간조직의 지질농도를 살펴보면, 피페로날 섭취군에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 중성지방농도가 13%, 콜테스테롤농도가 39%, 그리고 유리지방산농도가 27% 유의하게 감소하였다. 아울러 고지방식이를 섭취시킨 군의 경우 정상식이군에 비해 간기능지표로 활용되는 혈중 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 활성이 유의하게 증가하였고, 피페로날 섭취는 혈중 ALT 및 AST 활성을 고지방식이대조군에 비해 각기 27% 및 15% 유의하게 감소시켰다(도 6). 따라서 피페로날은 고지방식이로 유도된 비만에서 나타나는 지방간 현상을 현저히 완화시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0085] **실시예 4: 피페로날에 의한 마우스 내장지방조직의 *UCP*(*uncoupling protein*) 유전자발현 억제 효능**

[0086] **1) Trizol 방법을 이용한 RNA 분리 및 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)**

[0087] 내장지방조직 0.1g당 Trizol 용액 1 ml을 첨가하여 조직을 분쇄한 후, 4℃, 12,000× g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 클로로포름 200 ㎕을 첨가하고, 볼텍싱하였다. 이 과정을 두 번 반복한 다음, 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 이소프로판올과 상층액을 1:1 비율로 첨가하였다. 10회 세게 흔든 다음 실온에서 10분 동안 방치한 후, 12,000×g, 4℃에서 10분간 원심분리시킨 후 상층액을 제거하고, 남은 침전물에 70% 에탄올 1 ml을 가한 후 7,500× g, 4℃에서 5분 동안 원심분리하였다. 에탄올을 제거한 후 RNA 침전물이 담긴 튜브를 실온에서 5분 동안 건조시키고, 무 핵산분해효소수(nuclease free water)를 사용하여 RNA 침전물을 용해시켰다. UV/VIS 분광 광도계(Beckman coulter, DU730)를 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고, 아가로스 젤 전기영동을 실시하여 RNA 시료의 완전성을 확인하였다.

[0088] 내장지방조직에서 추출된 RNA시료를 대상으로 올리고 dT 프라이버와 SuperScript 역전사효소(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. 역전사를 통해 얻은 cDNA를 주형으로 하고 증폭하고자 하는 유전자 cDNA의 5' 과 3' 좌우 서열(flanking sequence)을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였으며, 이때 사용된 프라이머 서열은 표 2에 제시된 바와 같다. 증폭된 PCR 산물 1 ㎕를 1% 아가로스 젤에 전기영동하여 DNA 밴드를 확인하였다.

표 2

[0089] RT-PCR을 위한 프라이머 서열

유전자	프라이머	서열 (5' →3')	어닐링온도(℃)	PCR산물(bp)
Uncouplin protein 1 (UCP1)	정방향	GGGACCTACAATGCTTACAG	55	103
	역방향	GGTCATATGTCACCAGCTCT		
Uncouplin protein 3 (UCP3)	정방향	ACGGATGTGGTGAAGGTCCG	55	464
	역방향	TACAAACATCATCACGTTCC		
Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH)	정방향	AGAACATCATCCCTGCATCC	55	321
	역방향	TCCACCACCCTGTTGCTGTA		

[0090] **2) 내장지방조직의 RT-PCR 분석결과**

[0091] 미토콘드리아의 기능장애는 노화, 심장병, 위장장애, 내분비장애, 신경장애와 관련이 있으며, 미토콘드리아 산화과정 장애는 간조직의 글루코스 생산을 증가시키고 고혈당(hyperglycemia)을 유발시켜 지방간을 초래하는 것으로 알려져 있다. 미토콘드리아는 전자전달계를 이용하여 미토콘드리아 내막과 외막 사이의 양성자 농도구배를 형성하게 되며, 이를 구동력으로 FOF1-ATPase를 통해 ATP를 형성하게 된다. 그러나 FOF1-ATPase가 정상적으로 작동하지 않을 경우 UCPs(uncoupling proteins)를 통해 양성자 농도구배를 해소하며 이 과정에서 열이 발생하게 된다. 최근 이러한 에너지 분산 메카니즘(energy-dissipatory mechanism)을 통하여 지방조직에서 UCP들이 산화환원 균형(redox balance)을 유지하며 열발생을 촉진함이 보고되면서, AMPK(AMP-activated protein kinase)와 함께 UCP가 비만치료의 새로운 타겟으로 관심을 받고 있다.

[0092] 실험식이를 섭취시킨 흰쥐의 내장지방조직에서 mRNA를 추출한 후 생체내 열발생을 조절하는 UCP1과 UCP3의 발현량을 RT-PCR분석에 의해 측정한 결과, HFD군의 경우 ND군에 비해 UCP1과 UCP3 유전자발현이 모두 유의하게 감소하였다. 한편 피페로날을 보충 섭취시킨 결과, 고지방식이 섭취에 의해 감소하였던 내장지방조직의 UCP1과 UCP3 유전자발현이 ND군과 유사한 수준으로 다시 증가하였다(도 7). 따라서 피페로날 섭취는 내장지방조직에서 비만으로 인해 유도된 열발생 저해현상을 현저히 개선하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0093] **실시예 5: 피페로날에 의한 마우스 간조직의 유전자발현 변화**

[0094] **1) Trizol method를 이용한 RNA 분리 및 RT-PCR 방법**

[0095] 간조직 0.1g 당 Trizol 용액 1 ml를 첨가하여 조직을 분쇄한 후, 4℃, 12,000 x g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 클로로포름 200 ㎕를 첨가하고, 볼텍싱하였다. 이 과정을 두 번 반복한 다음, 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 이소프로판올과 상층액을 1:1 비율로 첨가하였다. 10회 세게 흔든 다음 실온에서 10분 동안 방치한 후, 12,000×g, 4℃에서 10분간 원심분리시킨 후 상층액을 제거하고, 남은 침전물에 70% 에탄올 1 ml을 가하여후 7,500× g, 4℃에서 5분 동안 원심분리하였다. 에탄올을 제거한 후 RNA 침전물이 담긴 튜브를 실온에서 5분 동안 건조시키고, 무 핵산분해효소수를 사용하여 RNA 침전물을 용해시켰다. UV/VIS 분광광도계(Beckman coulter, DU730)를 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고, 아가로스젤 전기영동을 실시하여 RNA 시료의 완전성을 확인하였다.

[0096] 간조직에서 추출된 RNA시료를 대상으로 올리고 dT 프라이머와 SuperScript 역전사효소(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. 역전사를 통해 얻은 cDNA를 주형으로 하고 증폭하고자 하는 유전자 cDNA의 5' 과 3' 좌우서열을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였으며, 이때 사용된 프라이머 서열은 표 3에 제시된 바와 같다. 증폭된 PCR 산물 1 ㎕를 1% 아가로스 젤에 전기영동하여 DNA 밴드를 확인하였다.

표 3

[0097] RT-PCR에 이용된 프라이머 서열

유전자	프라이머	서열(5' →3')	어닐링 온도(℃)	PCR산물 크기(bp)
PPARγ2(Peroxisome proliferator activated receptor gamma)	F	TTCGGAATCAGCTCTGTGGA	55	148
	R	CCATTGGGTCAGCTCTTGTG		
aP2(Adipocyte protein 2)	F	AGCATCATAACCCTAGATGG	55	128
	R	GAAGTCACGCCTTTCATAAC		
C/EBPα(CCAAT/enhancer binding protein alpha)	F	TCGGTGCGTCTAAGATGAGG	55	187
	R	TCAAGGCACATTTTTGCTCC		
TNFα(tumor necrosis factor alpha)	F	TGTCTCAGCCTCTTCTCATT	55	156
	R	AGATGATCTGAGTGTGAGGG		
(IL-6)Intereukin 6	F	ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAGACT	55	638
	R	CACTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC		

[0098] **2) 마우스 간조직의 RT-PCR 분석결과**

[0099] 비알콜성 지방간이 생성되는 과정에서 지질이 축적되고 aP2, LPL(lipoprotein lipase) 및 아딥신(adipsin)과 같은 지방조직에 특이적인 유전자들이 발현되는데, 이러한 유전자들의 발현조절에는 PPARγ, C/EBPs 및 SREBP-1c(sterol regulatory binding protein-1c)라고 불리는 세 가지 전사인자(transcription factor)들이 중추적인 역할을 담당하고 있다.

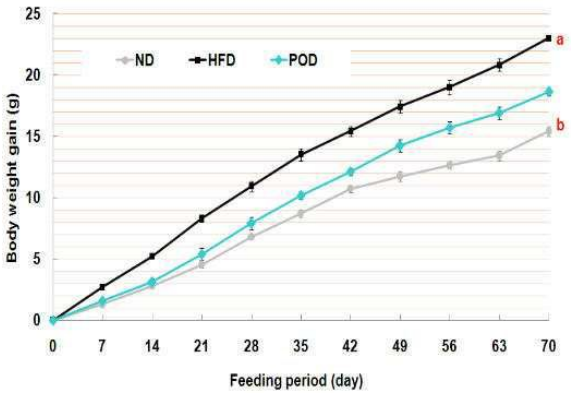
[0100] RT-PCR을 이용하여 간조직의 mRNA 발현정도를 평가한 결과, HFD군의 경우 ND군에 비해 지질합성에 중요한 역할을 담당하는 핵 전사인자(nuclear transcription factor)인 C/EBPα와 PPARγ2, 그리고 이들 전사인자의 타겟 유전자인 aP2 발현이 모두 유의하게 증가하였다. 한편 피페로날을 보충섭취시킨 군(POD)의 경우 고지방식이 섭취에 의해 간조직에서 증가하였던 핵전사인자 (C/EBPα와 PPARγ2) 및 이의 타겟유전자 (aP2) 발현이 모두 ND군과 유사한 수준으로 다시 감소하였다(도 8). 따라서 피페로날 보충섭취는 간조직에서 지질 합성에 중추적 역할을 하는 핵전사인자 및 이의 타겟 유전자발현을 감소시키므로서 지방간 생성을 예방하였음을 알 수 있다.

[0101] RT-PCR을 이용하여 간조직에서 염증을 활성화시키는 사이토카인의 mRNA 발현정도를 평가한 결과, HFD군의 경우 ND군에 비해 TNFα 및 IL-6 유전자발현이 모두 유의하게 증가하였다. 한편 피페로날을 보충 섭취시킨 결과, 고지방식이 섭취에 의해 증가하였던 간조직의 TNFα 및 IL-6 유전자발현이 모두 ND군과 유사한 수준으로 다시 감소하였다(도 9). 따라서 피페로날 섭취는 비알콜성지방간이 진행되고 있는 간조직에서 나타나는 염증활성화를 현저히 개선하는 효과가 있음을 알 수 있다.

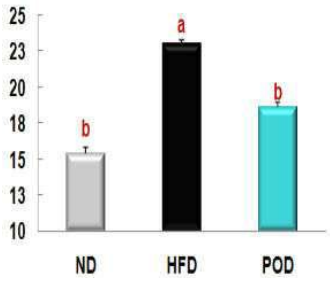
[0102] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

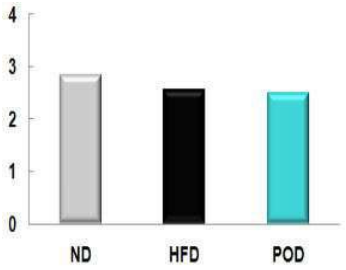
도면1a



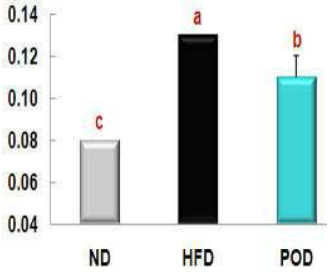
도면1b



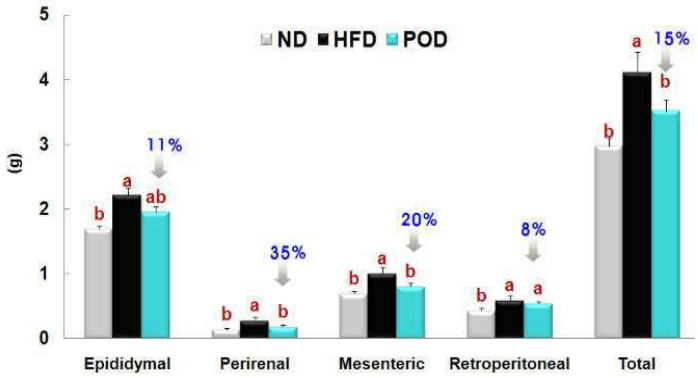
도면1c



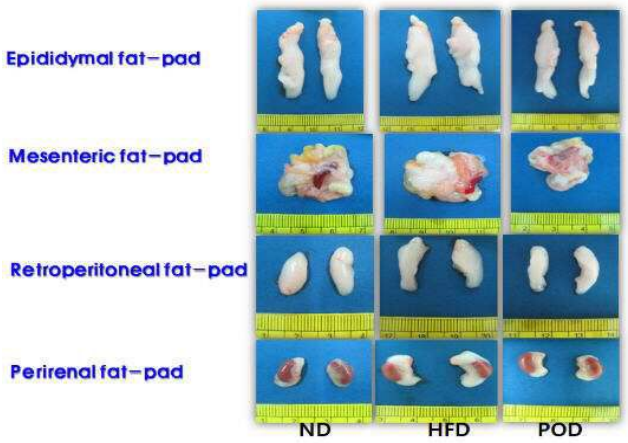
도면1d



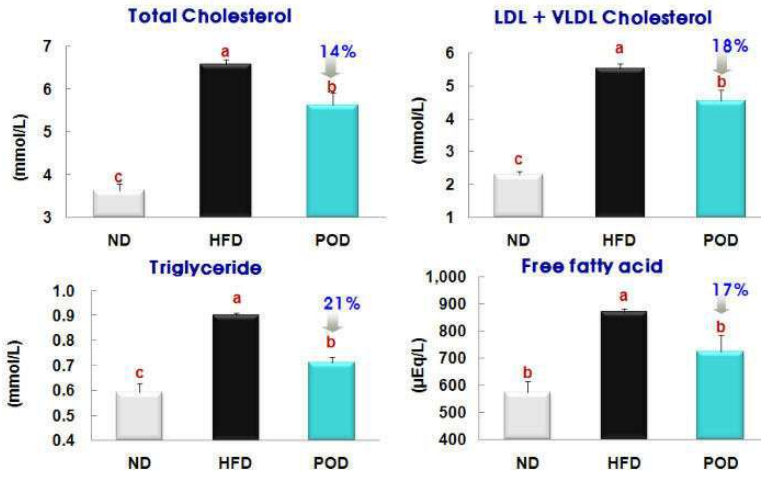
도면2



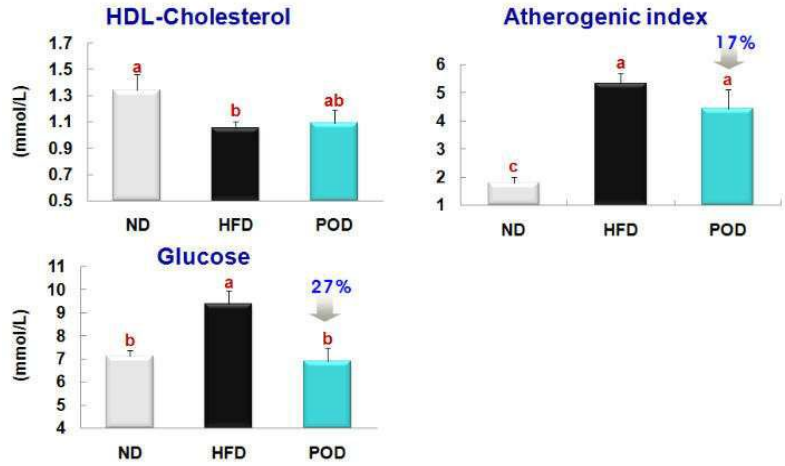
도면3



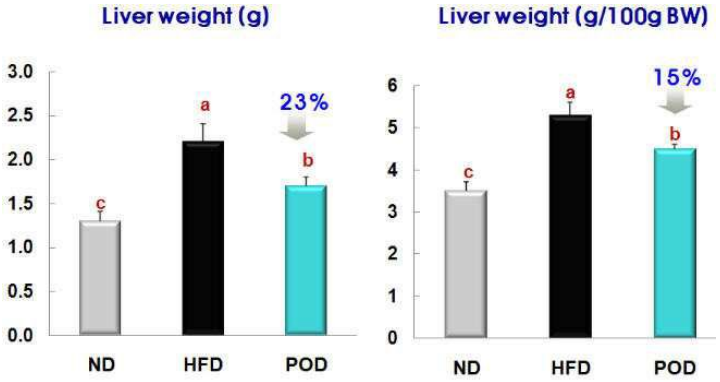
도면4a



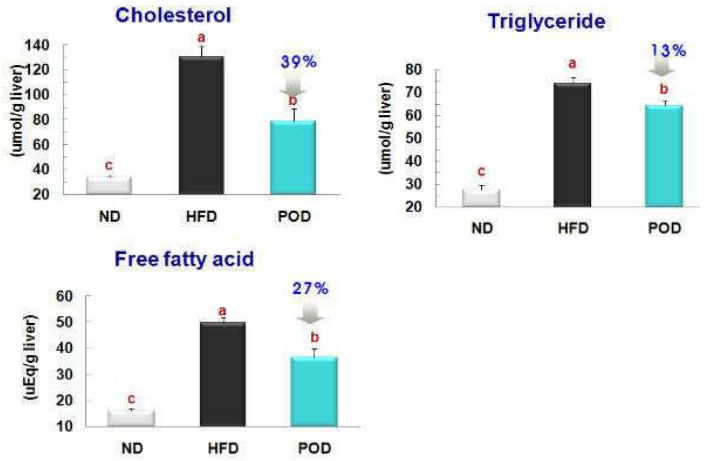
도면4b



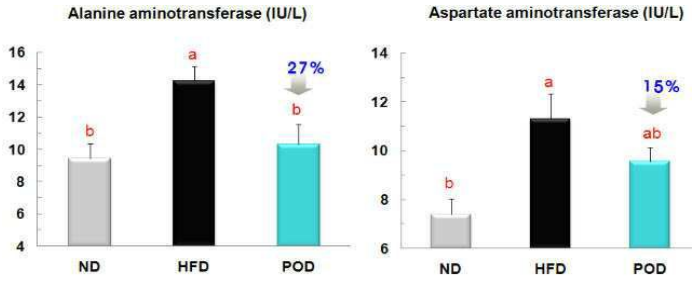
도면5



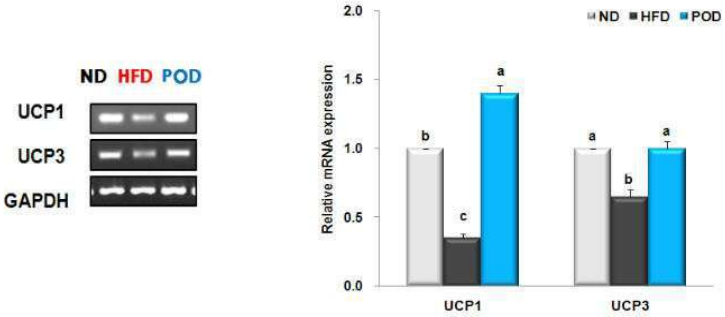
도면6a



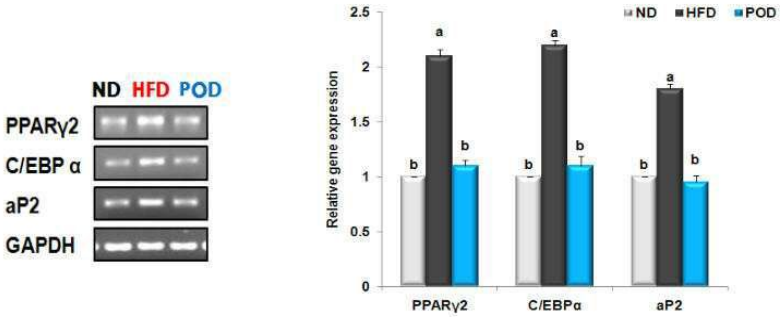
도면6b



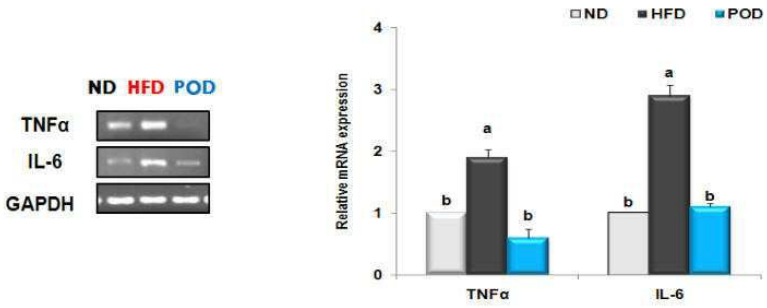
도면7



도면8



도면9


ND HFD POD
TNFα
IL-6
GAPDH
ND
HFD
POD
Relative mRNA expression
0
1
2
3
4
a
b
b
b
a
b
TNFα
IL-6