



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0029728
(43) 공개일자 2014년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/70 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0095186
(22) 출원일자 2012년08월29일
심사청구일자 2012년08월29일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
재단법인대구경북과학기술원
대구 달성군 현풍면 테크노중앙대로 333,
(72) 발명자
유미희
대구 달성군 다사읍 죽곡1길 42, 103동 1810호 (대실역e편한세상아파트)
박성진
대구 수성구 무학로 189, 110동 805호 (지산동, 녹원아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

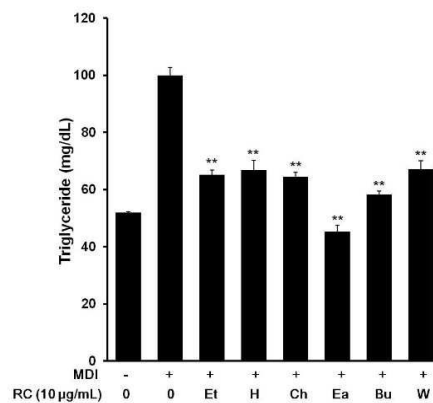
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 소리쟁이 추출물을 함유하는 항비만 조성물

(57) 요약

본 발명은 소리쟁이 추출물의 신규한 항비만 용도에 관한 것이다. 본 발명의 소리쟁이 추출물은 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제함으로써 항비만 효과를 달성한다. 소리쟁이 추출물은 비만의 예방, 치료 또는 개선용으로 개발될 수 있다. 또한, 본 발명의 소리쟁이 추출물은 전통 약초로 사용되어 온 소리쟁이로부터 추출된 추출물이므로, 인체에 적용시 부작용이 매우 적다는 이점을 갖는다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

최준혁

대구 남구 대명로47길 43-17, 501호 (대명동, 나원하이츠)

임남경

대구 서구 국채보상로38길 32, 12동 103호 (중리동, 중리시영2차아파트)

정길생

대구 달서구 호산로 125, 209동 2002호 (파호동, 삼성명가타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0805

부처명 교육과학기술부

연구사업명 융합과학 국제협력네트워크 사업

연구과제명 3T3-L1 지방전구세포에서의 소리쟁이의 항 비만효과와 작용기전

기 여 율 1/1

주관기관 대구경북과학기술원

연구기간 2012.02.01 ~ 2012.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

소리쟁이 (*Rumex crispus* L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 치료 또는 개선용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 소리쟁이 추출물은 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 클로로포름, 헥산(Hexane) 및 1,3-부틸렌 글리콜로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 용매 추출물 또는 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 소리쟁이 추출물은 조성물 총 중량에 대해 0.0001 - 30 중량%의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 소리쟁이 추출물은 지방세포로의 분화유도 조건하의 지방전구세포에서 지방구(lipid droplet) 생성 또는 중성지방의 축적을 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 소리쟁이 추출물은 지방세포로의 분화유도 조건하의 지방전구세포에서 PPAR γ (peroxisome proliferators activated receptor γ), C/EBP(CCAAT enhancer binding protein), 또는 SREBP1c(sterol regulatory element binding protein 1c) 유전자의 발현을 억제하는 활성을 갖는 것으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 항비만 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 현대사회는 생활환경의 편의, 교통의 발달, 과학과 의학의 발달로 인하여 과거에 비하여 매우 풍족한 생활을 누리고 있다. 하지만 신체활동의 감소와 함께 과도한 칼로리 섭취로 인한 과체중이나 비만이 미국, 영국 등의 선진국뿐만 아니라 일부 개발도상국에서도 증가하고 있고, 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 2000년부터 비만을 주요 보건의료문제로 지정하였다.
- [0003] 비만이란 음식물의 섭취(food intake)와 에너지의 사용(energy expenditure)의 불균형으로 발생하는 과도한 에너지가 체지방으로 축적되어 나타나는 상태로 최근 들어 전반적인 신체활동 감소, 동물성 포화지방 섭취의 증가와 같은 서구화된 생활습관들은 이러한 비만 발병을 증가 시키고 있다. 비만은 체내지방이 과잉 축적되어 다른 만성병들이 동반될 위험이 높은 의학적 상태를 말하며, 유전이나 환경과의 복잡한 상호작용에 의해 발병된다. 주로 유전적 요인, 내분비계 이상, 활동 부족, 식생활 양식, 심리적 요인 등이 복합적으로 작용하며, 주된 원인은 운동 부족과 잘못된 식생활 등의 생활습관의 불균형으로 체내에 과잉 에너지가 피하에 축적되는 것이다.
- [0004] 지방세포의 체내기능은 몸에 필요한 에너지를 축적하는 세포로, 필요시 중성지방(triacylglyceride)을 분해시켜 이용한다. 하지만 최근 연구에 의하여 지방조직은 에너지 축적의 기능뿐만 아니라, 내분비 기관으로 지방대사, 당대사를 포함한 체내 에너지 대사를 조절하는 기능을 수행하는 역할을 하는 것으로 알려졌다. 지방세포는 중간엽 전구세포(mesenchymal precursor)에서 지방전구세포(predipocyte)를 거쳐 지방세포로 분화되며, 분화과정 동안 형태적, 생화학적 변화를 통하여 체내 지방을 축적하며, 지방조직은 크기의 증가, 새로운 지방전구세포(preadipocyte)로부터 분화된다. 지방세포의 분화는 지방 조직세포에 특징적으로 발현되는 유전자들의 조절부위에 작용하는 전사인자(transcription factor)들이 지방세포로 분화되는 과정에서 발현된다. 인슐린은 지방세포 분화를 유도하는 호르몬으로 지방세포 대사 조절에 주요 외부인자이다.
- [0005] 지방 세포는 분화동안 C/EBP family, PPAR-gamma, ADD1/SREBP1 등의 전사인자들의 전사 발현이 증가하고 이들 전사인자들은 상호 전사를 유도하여 지방세포를 분화하여 지방축적, 지방합성, 지방수송의 인자들을 작용시켜 에너지 생산 및 비만에 이르게 된다. 현재 국내외에서 비만 치료를 위해 사용하고 있는 치료제에는 올리스타트(orlistat)을 주원료로 하는 제니칼(Xenical)과 시부트라민(sibutramine)을 주원료하는 리덕틸(Reductil)이 있다. 제니칼의 경우는 소장에서 리파아제작용을 억제하여 지방변, 가스생성, 지용성비타민 흡수저하 등의 위장계 부작용을 일으키며, 리덕틸의 경우는 세로토닌과 노르아드레날린 농도를 증가시킴으로서 두통, 구갈, 식욕부진, 불면, 변비 등의 부작용을 수반한다. 따라서, 부작용이 없는 천연물을 이용한 비만 치료제 개발이 필요하다.
- [0006] 소리쟁이(Rumex crispus L.)는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년초 식물로서 우리나라 전국 각지에서 자생하고 있으며, 들이나 개울가 등의 습한 곳에서 잘 자란다. 소리쟁이는 부위별로 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있으며, 본초강목에서는 끓은 부위나 부스럼에 붙이면 효능이 좋으며, 맛이 달고 성질은 미끄러우며 차고 독이 없다고 기록되어 있다. 민간에서는 변비, 소화불량, 장출혈 등에 효과가 있다고 보고되었다. 소리쟁이의 유용성분으로는 에모딘(emodin), 네포딘(nepodin) 등과 플라보노이드, 폴리페놀 등 다양한 항산화 물질이 함유되어 있다.
- [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

- [0008] 본 발명자들은 비만 치료 및 예방물질을 천연물로부터 발굴하기 위해 연구노력하였다. 그 결과, 소리쟁이 추출물이 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제함으로써 비만의 예방 및 치료제로 개발될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 소리쟁이(Rumex crispus L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0010] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명자들은 천연물로부터 비만의 예방 및 치료제를 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, 소리쟁이 추출물이 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제한다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0013] 본 발명의 조성물은 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0014] 본 발명에서의 소리쟁이 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 추출물을 얻기 위해 사용되는 소리쟁이의 추출 부위는 제한되지 않으나, 바람직하게는 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 및 열매로 구성되는 군에서 선택된 하나 이상의 부위이다.
- [0016] 본 발명에서 소리쟁이 추출물을 얻기 위해 사용할 수 있는 용매는 극성 용매 또는 비극성 용매를 사용할 수 있으며, 극성 용매로서는 물; 알코올, 바람직하게는, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 또는 에틸렌글리콜; 아세트산; DMF(dimethyl-formamide); 및 DMSO(dimethylsulfoxide)를 포함한다. 비극성 용매로서는 아세톤, 아세토나이트릴, 에틸아세테이트, 메틸아세테이트, 플루오로알칸, 펜탄, 헥산, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, o-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 클로로포름, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소 및 THF를 포함한다.
- [0017] 보다 바람직하게는, 본 발명에서 소리쟁이 추출물을 얻기 위해 사용되는 용매는 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올), 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 클로로포름, 헥산(Hexane) 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매를 사용할 수 있다. 보다 더 바람직하게는, 에탄올, 부탄올, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 및 물로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 용매를 사용한다.
- [0018] 본 발명의 소리쟁이 추출물은 상기 설명된 용매로부터 선택된 하나의 용매를 사용하여 얻은 추출물일 수 있으며, 또한 상기 용매로부터 선택된 2종 이상의 용매를 순차적으로 사용하여 얻은 분획물일 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 “유효성분으로 포함하는”이란 소리쟁이 추출물이 항비만 효과를 달성하는 데 충분한 양으로 포함한다는 의미이다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 조성물에서 상기 소리쟁이 추출물은 조성물 총 중량에 대해 0.0001 - 30 중량%의 농도, 보다 바람직하게는 0.001 - 20 중량%의 농도, 보다 더 바람직하게는 0.01 - 10 중량%의 농도로 포함된다.
- [0021] 본 발명의 소리쟁이 추출물은 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제하는 활성을 갖는다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 소리쟁이 추출물은 지방세포로의 분화 유도 조건하의 지방전구세포에서 지방구(lipid droplet) 생성 또는 중성지방의 축적을 억제한다.
- [0023] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 소리쟁이 추출물은 지방세포로의 분화 유도 조건하의 지방전구세포에서 PPAR γ (peroxisome proliferators activated receptor γ), C/EBP (CCAAT enhancer binding protein), 또는 SREBP1c (sterol regulatory element binding protein 1c) 유전자 발현을 억제한다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 소리쟁이 추출물은 지방세포로의 분화 유도 조건하의 지방전구세포에서 ASC1(acyl CoA synthetase 1), FAS(fatty acid synthase), FATP1(fatty acid transport 1), FATP4(fatty acid binding protein 4) 및 perilipin로 구성되는 유전자로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현을 억제한다.
- [0025] 본 발명의 소리쟁이 추출물은 비만의 예방, 치료 또는 개선 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

- [0026] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물의 형태로 제조될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 비만의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물로 제조될 수 있으며, 이 경우 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0028] 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. 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.
- [0029] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.
- [0030] 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 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg이다.
- [0031] 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 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 비만의 예방 또는 개선용 식품 조성물로 제조될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 소리쟁이 추출물 또는 분획물 뿐만 아니라, 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0034] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다.
- [0035] (i) 본 발명은 소리쟁이 추출물의 신규한 항비만 용도에 관한 것이다.
- [0036] (ii) 본 발명의 소리쟁이 추출물은 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제함으로써 항비만 효과를 달성한다.
- [0037] (iii) 소리쟁이 추출물은 비만의 예방, 치료 또는 개선용으로 개발될 수 있다.
- [0038] (iv) 본 발명의 소리쟁이 추출물은 전통 약초로 사용되어 온 소리쟁이로부터 추출된 추출물이므로, 인체에 적용 시 부작용이 매우 적다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명은 소리쟁이 추출물의 항비만 용도에 관한 것이다. 본 발명의 소리쟁이 추출물은 비만전구세포에서 지방세포로의 분화에 관여하는 전사인자의 발현을 억제하고, 지방구(lipid droplet)의 생성과 중성지방의 축적을 억제함으로써 결과적으로 지방세포로의 분화를 억제한다. 따라서, 본 발명의 소리쟁이 추출물은 항비만제의 활성성분으로 유용하게 활용될 수 있다.

[0040]

도면의 간단한 설명

[0041]

도 1은 3T3-L1 지방전구세포의 생존율에 미치는 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물의 영향을 측정한 결과이다. 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포-유도 배지에 9일 동안 유지시키면서 소리쟁이 추출물과 분획물(20 μ g/mL)로 매 2일간 처리하였다. 세포 생존율은 대조군에서의 MTT 대사량의 백분율로 계산하였다. 결과는 3회 독립실험의 평균 $\pm$ S.D.으로 나타내었다.

도 2는 3T3-L1 지방세포에서 지방축적에 미치는 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물의 영향을 측정한 결과이다. 지방세포-유도 배지내에서 분화하는 3T3-L1 세포를 소리쟁이 추출물 및 분획물(10 μ g/mL)로 매 2일 마다 9일 동안 처리하였다. 세포내 지질을 Oil-Red-O으로 염색하였다(패널 A). 지방함유량 축적을 측정하기 위해, Oil-Red-O 염색제를 이소프로판올내에 용해시키고, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다(패널 B). 측정 결과는 3회 독립적 실험의 평균 $\pm$ S.D.으로 표시하였다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 대조군. 패널 A에서, 1: 분화된 대조군, 2: 소리쟁이(*Rumex crispus* L.)의 70% 에탄올 추출물 처리군, 3: 소리쟁이 hexan 분획물 처리군, 4: 소리쟁이 클로로포름 분획물 처리군, 5: 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물 처리군, 6: 소리쟁이 n-부탄올 분획물 처리군, 7: 소리쟁이 물 분획물 처리군.

도 3은 3T3-L1 지방세포내에서 트리글리세라이드 함유량에 미치는 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물의 영향을 측정한 결과를 보여준다. 지방세포-유도 배지내에서 분화하는 3T3-L1 세포를 소리쟁이 추출물 및 분획물(10 μ g/mL)을 매 2일 마다 9일 동안 처리하였다. 트리글리세라이드의 함유량은 실험방법에 설명된 방법으로 측정하였다. 측정결과는 3회 독립반복실험의 평균 $\pm$ S.D.으로 표시하였다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 대조군.

도 4는 지방세포생성 관여 전사인자(adipogenic transcription factor)들에 미치는 소리쟁이 추출물의 효과를 측정한 결과이다. 지방세포-유도 배지내에서 분화하는 3T3-L1 세포를 소리쟁이 추출물 및 분획물(10 μ g/mL)을 매 2일 마다 9일 동안 처리하였다. 9일째에 지방세포 단백질을 분리하고 PPAR γ 및 C/EBP α 의 단백질 발현수준을 웨스턴 블로팅으로 분석하였다.

도 5는 지방세포생성 관여 전사인자의 mRNA에 대한 소리쟁이 추출물의 효과를 측정한 결과이다. 지방세포-유도 배지내에서 분화하는 3T3-L1 세포를 소리쟁이의 에틸아세테이트 분획물로 매 2일 마다 9일 동안 처리하였다. 9일째에 지방세포 RNA를 분리하고 PPAR γ , SREBP-1c and C/EBP α 의 mRNA 발현을 실시간 PCR법으로 분석하였다. 실험결과는 3회 독립실험의 평균 $\pm$ S.D.으로 표시하였다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 대조군.

도 6은 지방세포생성 관여 전사인자의 mRNA에 대한 소리쟁이 추출물의 효과를 측정한 결과이다. 지방세포-유도 배지내에서 분화하는 3T3-L1 세포를 소리쟁이의 에틸아세테이트 분획물로 매 2일 마다 9일 동안 처리하였다. 9일째에 지방세포 RNA를 분리하고 ACS, FAS, FATP1, FATP4, 및 Perilipin의 mRNA 발현을 실시간 PCR법으로 분석하였다. 실험결과는 3회 독립 실험의 평균 $\pm$ S.D.으로 표시하였다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 대조군.

도 7은 소리쟁이 추출물의 효과를 활성의 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042]

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.

[0043]

실시예

[0044]

실험방법

[0045]

1. 재료 및 시약

[0046]

시료의 추출 및 분획에 사용된 용매는 에탄올(ethanol), n-헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), n-부탄올(n-butanol)은 J. T.Baker사(Mallinckrodt Baker Inc., Philipsburg, USA)의 특급시약을 사용하였다. DMEM(Dulbecco's modified Eagle media), FBS(fetal bovine serum), BCS(bovine calf serum), 트립신-EDTA 및 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)은 WelGene사에서 구입하여 사용하였고, 지방세포로의 분화유도 시약인 인슐린(insulin), IBMX(isobutylmethoxyxanthine), 텍사메타손

(dexamethasone)은 Sigma (Sigma Chem. Co., St. Louis. Mo., USA)의 제품을 사용하였다. 또한 실시간(real-time) PCR을 위해 사용한 SYBR green은 Takara사(shinga, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2. 추출물의 제조 및 계통적 분석

실험에 사용된 소리쟁이는 대구시 약령시장에서 건조 상태의 것을 구입하여 사용하였다. 먼저 시료 무게의 10 배량(w/v)의 70% 에탄올로 24 시간 동안 정치 배양 하여 총 3회 추출하였다. 추출액은 여과지(whatman No. 3, England)를 사용하여 2회 여과하고 상등액은 로터리 진공 증발기(rotary vacuum evaporator, UNI TRAP UT-1000, Etela, Tokyo, Japan)로 55℃로 농축한 후 동결하여 사용하였다. 동결된 에탄올 추출물을 20배(w/v)의 증류수에 녹인 후 n-헥산(n-hexane, H), 클로로포름(chloroform, Ch), 에틸아세테이트(ethyl acetate, Ea) 및 부탄올(butanol, Bu)을 순차적으로 3회 반복 추출하여 각 용매별로 계통 분석하였고, 남은 수용성 층은 농축하여 수(water) 분석으로 감압 농축하고, speed vacuum으로 남은 유기용매를 휘발시켜 동결건조 후 사용하였다.

3. 3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화 유도 및 샘플처리

실험에 사용된 3T3-L1 세포는 한국세포주 은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 배양 및 분화 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM)에, 10% 송아지 혈청(calf serum)과 항생제(antibiotics)를 첨가하여 5% CO₂, 37℃ 인큐베이터에서 배양하여 세포가 밀집(confluent) 상태가 되면, 트립신/EDTA를 처리하여 세포를 원심분리하였다. 이어서, 세포를 모아서 3 x 10⁶/웰의 밀도로 6 웰에 분주한 후 100% 밀집(confluency) 상태에서 48 시간 방치 후 DMEM에 10% BCS와 23 mg/mL IBMX, 5 mg/mL 인슐린, 1 mM 텍사메타손이 첨가된 배지(MDI)를 처리하여 48시간 동안 분화를 유도하고, 그 후 2일 마다 10% FBS DMEM 배지에 5 mg/mL의 인슐린이 첨가된 배지를 교체해주었다. 소리쟁이 추출물 시료는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다.

4. MTT 분석

시료의 세포증식활성과 독성 여부를 확인하기위해 Green 등의 방법에 따라 MTT[3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 분석을 실시하였다. MTT 분석은 미토콘드리아의 탈수소효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 포르마잔(formazan)으로 환원되는 원리를 이용한 방법으로, 생성된 포르마잔(formazan)의 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 세포를 5 x 10⁴/웰으로 96 웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양 후 배지를 새로운 배지를 시료와 함께 처리하여 24시간 후 MTT 시약을 5 mg/mL 농도로 10 μL를 각 웰에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 웰에 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 용해시켜 ELISA reader(Spectra MAX M2, Molecular Device, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

5. Oil-red-O 염색

3T3-L1 지방전구세포를 9일 동안 분화시킨 후 배지를 제거하고 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고 10% 포르말데히드 용액으로 세포를 고정시켰다. 다시 PBS로 세척 후, oil-red-o 용액을 첨가하여 30분간 실온에서 염색하고, oil-red-o용액을 제거 후 증류수로 세척하여 건조시킨 다음 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. 또한, 100% 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)로 염색된 지방구를 용해하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 중성지방측정

세포를 용해시켜 4℃에서 14,000 rpm으로 10 분간 원심 분리하여 얻은 상등액에, 0.02 mL 중성지방 표준용액에

조제한 반응시약[(주)아산제약 중성지방 키트(AM 157S-K)]를 3 mL씩 첨가하여 혼합하고, 37℃에서 5분간 반응시켜 550 nm 에서 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도 값을 식에 대입하여 중성지방 농도를 계산하였다.

[0059] 7. 웨스턴 블로팅

[0060] 소리쟁이 추출물이 지방세포 분화과정에서 발현하는 인자 PPAR-gamma, C/EBP-alpha 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 웨스턴 블로팅(western blot)을 실시하였다. 분화와 시료 처리가 완료된 세포를 2-3회 PBS로 세척한 후 1 mL의 용해 완충액(lysis buffer)를 첨가, 30분 - 1시간 동안 용해시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)을 표준화 한 Bio-Rad 단백질 분석 키트(protein assay kit)를 사용하여 정량하였다. 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 상등액은 단백질을 정량한 후 10% 러닝젤(running gel)과 4.5% 스택킹젤(stack gel)을 이용하여 125 V에서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다.

[0061] 전기영동으로 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane과 이동완충액(transfer buffer; 20% 메탄올, 25 mM Tris-HCl, 192 mM 글리신)을 사용하여 350 mA에서 120분간 이동(transfer)시켰다. 단백질이 이동된 멤브레인(membrane)은 패스트 그린 용액(fast green solution)으로 이동의 유무를 확인한 후, 5% 무지방 탈지유 용액(non-fat skim milk solution)으로 블로킹(blocking)하였다. 4℃에서 일차 항체의 발현 정도를 검토하기 위하여 TST 용액에 1:1000으로 희석하여 24시간 반응시킨 후 TST로 3회 세척하였다. 계속하여 이차항체를 2시간 반응시키고 다시 TST로 3회 세척하였다. 증류수로 세척하고 멤브레인에 ECL 검출 키트의 발색시약 I 과 II를 1:1로 섞은 후에 혼합액을 도포하고, X-레이 필름에 노출하여 현상한 후 필름상의 밴드 농도를 관찰하였다.

[0062] 8. 실시간(Real-time) PCR 법

[0063] 지방세포로 분화가 완료된 세포를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 세척하여 배양된 세포에서 배지를 제거하고 PBS 10 mL로 두 번 세척한 후 TRI 시약을 처리하였다. 이것을 1.5 mL 튜브에 1 mL 씩 담고 1-bromo-3-chloropropane을 200 μ L 첨가하여 30 초간 볼텍스(vortex) 하여 원심분리(3,000 rpm, 15분, 4℃)하고, 상등액을 취해 새로운 튜브에 옮겼다. 여기에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 이상 방치하고 나서 원심분리(13,000 rpm, 15분, 4℃)한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 75% 에탄올을 첨가하여 제거한 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 증류수를 첨가하여 65℃ 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다. 추출된 RNA를 이용하여 cDNA를 합성한 후 SYBER Green과 분화 발현 인자인 PPAR-gamma, C/EBP-alpha, SREBP-1를 확인하고, 지방 축적, 합성, 저장에 관련된 FAS, FATP1, Perilipin을 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 실시하였다. 프라이머의 염기서열은 아래 표 1과 같다.

[0064] 실시간 PCR은 초기변성 95℃ 30초, 변성은 95℃ 5초, 어닐링(annealing)은 60℃ 15초, 신장반응은 72℃ 10초로 하여 40 사이클을 진행했다. 용해 곡선은 55℃로 시작하여 95℃를 종말점으로 0.5℃씩 상승시키며 80번을 반응하여 원하는 형광 값을 검출하였다.

표 1

타겟 유전자	프라이머 염기 서열	서열번호	Accession No.
GAPDH	GTATGATCCACTCACGGCA	서열번호 1	NM_002046.3
	GGTCTCGCTCCTGGAAGAGG	서열번호 2	
PPAR	GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG	서열번호 3	NM_011146.3
	TGCAGCAGGTTGTCTTGATG	서열번호 4	
C/EBP	TTGAAGCACAATCGATCCATCC	서열번호 5	NM_007678.3
	GCACACTGCCATTGCACAAG	서열번호 6	
SREBP	AGCCTGGCCATCTGTGAGAA	서열번호 7	NM_011480.3
	CAGACTGGTACGGGCCACAA	서열번호 8	
ACS	GTCTTTGCCACATCCGACCTATC	서열번호 9	NM_007981.3
	TTAGTGCAAACCCAGTTGTGCTTC	서열번호 10	
FAS	AGCACTGCCTTCGGTTCAGTC	서열번호 11	NM_007988.3
	AAGAGCTGTGGAGGCCACTTG	서열번호 12	
FATP1	CAGACGGACGTGGCTGTGTA	서열번호 13	NM_011977.3
	GCCGAGCATAGGATGCAAGAA	서열번호 14	
FABP4	TGGGAACCTGGAAGCTTGTCTC	서열번호 15	NM_024406.2
	GAATTCCACGCCCAAGTTTGA	서열번호 16	
Perilipin	GATGAGAGCCATGACGACCAGA	서열번호 17	NM_175640.2
	TGTGTACCACACCAACCCAGGA	서열번호 18	

[0065]

[0066]

9. 통계처리

[0067]

실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 군간의 유의성 검정은 SPSS 프로그램을 이용하여 5% 수준에서 Duncan's multiple range test 및 대조군과 추출물 처리군의 Student's t-test로 비교하였다. 통계처리 후 p값이 0.05 미만일 경우와 p값이 0.01 미만일 경우 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

[0068]

실험결과

[0069]

1. 소리쟁이 추출물이 3T3-L1 지방전구세포의 생존율에 미치는 영향

[0070]

소리쟁이 분획물이 지방전구세포(preadipocyte)에 미치는 독성평가는 Green 등의 방법에 준하여 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 분석을 실시하여 행하였다. 소리쟁이 분획물을 일정시간 세포에 20 µg/mL을 처리하였고 일정시간 배양하였을 때 측정된 세포 생존율을 도 1에 나타내었다. 시료처리 결과 모든 추출물 및 분획물의 가장 높은 실험 농도인 20 µg/mL에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다.

[0071]

2. 소리쟁이 추출물이 3T3-L1 지방전구세포의 지방구(lipid droplet) 생성에 미치는 영향

[0072]

지방구(Lipid droplet)은 인지질 단일막에 의해 둘러싸인 중성지방으로 구성된 비활성 소낭으로서 섬유아세포 전구세포(precursor fibroblast)에서부터 지방세포로의 분화과정에서 나타나며, 지방세포로의 분화는 PPAR γ 와 같은 중요한 지방생성 관여 전사인자(adipogenic transcription factor)들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 성숙한 지방세포에서 지방소립이 유지되는 것은 LPL (lipoprotein lipase)에 의한 트리글리세라이드(triglyceride) 유입과 ATGL(adipose triglyceride lipase) 및 HSL(hormone sensitive lipase)에 의한 트리글리세라이드 유출에 의해 조절된다.

[0073]

따라서, 소리쟁이 추출물이 3T3-L1 지방전구세포의 지방구 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 지방전구세포를 6웰에 3×10^6 /웰로 분주하여 밀집(confluent) 상태에서 48시간 경과 후 분화유도배지(MDI)와 소

리쟁이 추출물 및 분획물 각각을 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하면서 지방세포로의 분화를 유도하였다. 이후 48시간 주기로 10% FBS DMEM 배지에 5 mg/mL의 인슐린이 첨가된 배지로 3회 교체하면서 시료 10 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리하여 Oil-red-O로 지방구를 염색하여 200 배율의 현미경으로 지방구를 관찰하였다(도 2 참조). 그 결과, 소리쟁이 추출물 및 분획물을 처리하지 않고 분화를 유도하였을 경우, 세포질 내 지방구의 형성이 활발하게 유발되는 것으로 관찰되었으나, 소리쟁이 추출물 및 분획물 처리에 의해 지방구 형성이 억제되는 것이 관찰되었다. 특히, 지방구 형성 억제효과는 에틸아세테이트(ethyl acetate, Ea)와 헥산(hexane, H)의 분획물에서 가장 우수한 결과가 나타났다.

[0074]

3. 소리쟁이 추출물이 지방세포 내 트리글리세라이드 생성에 미치는 영향

[0075]

[0076]

중성지방으로 알려진 트리글리세라이드(triglyceride)는 1분자의 글리세롤에 3분자의 지방산이 에스테르(ester) 결합한 것으로 음식물로 섭취하는 지방의 95% 이상이 트리글리세라이드이며, 동물의 저장지방의 경우에도 트리글리세라이드 형태로 저장된다. 지방조직에서의 트리글리세라이드의 저장은 킬로미크론(chylomicron) 및 VLDL(very low density lipoprotein) 등과 같은 트리글리세라이드 풍부 지단백(lipoprotein)에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 트리글리세라이드는 포도당과 함께 세포의 중요한 에너지원으로 사용되지만 여분의 트리글리세라이드는 지방세포에 흡수되고 저장되어 비만의 원인으로 작용하며, 다양한 질환의 원인이 되기도 한다.

[0077]

3T3-L1 지방전구세포에 소리쟁이 추출물 및 분획물을 처리한 결과, 트리글리세라이드 함량은 도 3에서 나타나는 바와 같이 분화된 지방세포와 비교했을 때, 모든 분획물에서 트리글리세라이드 형성 억제 효과가 나타났다. 특히, 에틸아세테이트 분획물 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 트리글리세라이드 생성 억제 효과가 큰 것으로 나타났다.

[0078]

4. 웨스턴 블로팅에 의한 단백질 발현 조사

[0079]

지방세포생성(adipogenesis)은 지방전구세포(pre-adipocyte)가 증식 및 분화되는 과정을 거쳐 성숙한 지방세포(adipocyte)로 되는 과정을 의미한다. 이 과정에서 지질 축적, 호르몬에 대한 민감성 변화가 초래되며, 지질생성(lipogenesis) 및 지질분해(lipolysis)에 관여하는 일련의 유전자발현이 변화된다. 이들 유전자들의 발현은 궁극적으로 SREBP1c(sterol regulatory element binding protein 1c), PPAR γ (peroxisome proliferators activated receptor γ)와 C/EBPs(CCAAT enhancer binding proteins) 패밀리의(family) 등의 전사인자에 의해 조절된다. C/EBP 패밀리와 PPAR γ 는 호르몬에 의해 지방세포생성(adipogenesis)이 유도되는 과정에서 중요하게 작용하는 전사인자이다. 핵 수용체 슈퍼패밀리(Nuclear receptor superfamily)에 속하는 PPAR γ 는 지방세포생성을 총괄적으로 조절하는 역할을 하며, 지방세포로 분화된 상태를 유지하는데 필수적인 인자이다. 또한 C/EBP β 는 PPAR γ 발현을 촉진시켜 지방전구세포의 초기 분화과정에서 중요한 역할을 하는 한편, c/EBP α 는 PPAR γ 와의 강한 상승작용을 통해 지방전구세포의 말기 분화 과정을 촉진한다.

[0080]

따라서, 소리쟁이 추출물 및 분획물이 지방세포생성 관련 전사인자(adipogenic transcription factor)의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 단백질 수준에서 확인하였다. 지방전구세포에서 분화를 유도시킴과 동시에 소리쟁이 분획물을 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하고 FBS와 인슐린 배지로 갈아 줄때마다 시료를 같이 처리하여 분화 종료 후 단백질 발현을 조사하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다. 시료를 처리하지 않은 분화 유도군에서는 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 나타났으나, 소리쟁이의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물 처리시에 PPAR γ 및 C/EBP α 의 단백질 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다.

[0081]

5. 실시간 PCR법을 이용한 mRNA 발현조사

[0082]

실시간 PCR 방법을 이용하여 3T3-L1 지방전구세포의 분화억제 효과가 가장 우수한 것으로 확인된 소리쟁이의 에틸아세테이트 분획물이 지방세포생성 관련 전사인자(adipogenic transcription factor) 및 관련 유전자들의 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 측정한 결과는 도 5 및 도 6에 나타내었다. 분화를 유도한 대조군에서는 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP1c의 mRNA 발현이 증가되었으나, 소리쟁이 분획물(RC-Ea)을 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 실험군에서는 그 발현이 유의적으로 감소되었다. 또한, 이들 전사인자들의 하위 인자인 ASC1(acyl-CoA synthetase-1), FAS(fatty acid synthesis), FATP1(fatty acid transport-1), FATP4(fatty acid binding protein-4) 및 perilipin의 결과에서도 분화유도에 따라 각 유전자의 mRNA의 발현이 현저하게 증

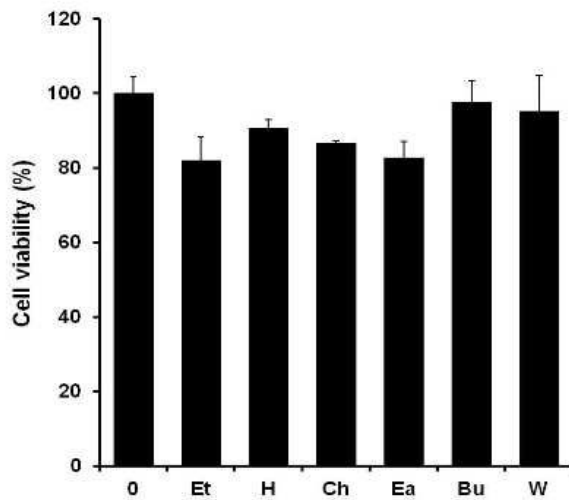
가하였으나, 소리쟁이 분획물(RC-Ea) 처리에 의해 유의적으로 감소됨이 관찰되었다.

[0083] 이상의 실험결과에 의하면, 소리쟁이의 추출물 또는 분획물은 3T3-L1 지방전구세포에서 지방세포생성 관련 전사 인자(adipogenic transcription factor)인 PPAR γ , C/EBP α 그리고 SREBP1c 및 지질 합성(lipid synthesis), 지질 이동(lipid transport), 지질 저장(lipid storage)에 관여하는 유전자들의 발현을 억제함으로써 지방구(lipid droplet) 및 트리글리세라이드 생성을 감소시켜 지방세포로의 분화를 억제시킬 수 있는 것으로 생각된다(도 7).

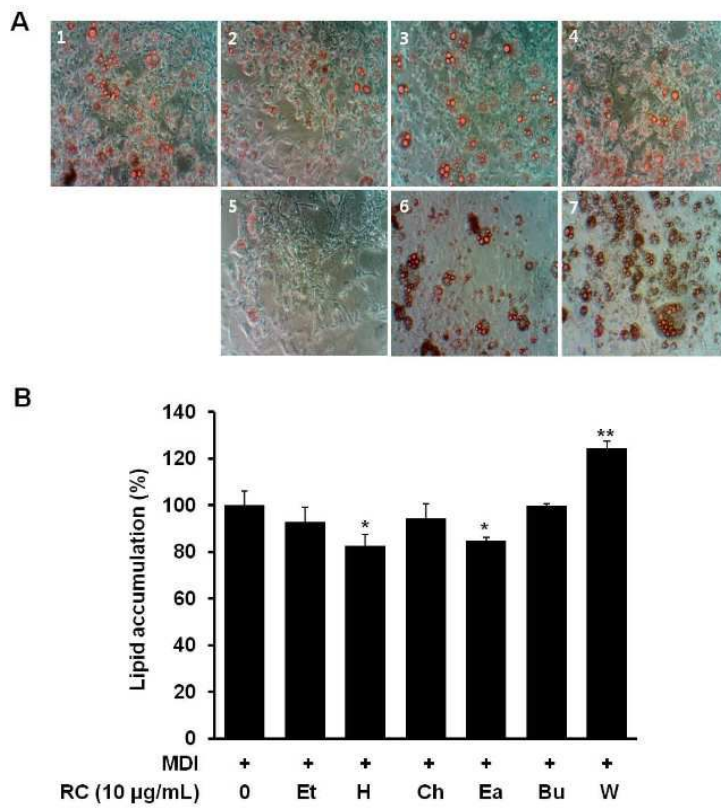
[0084] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

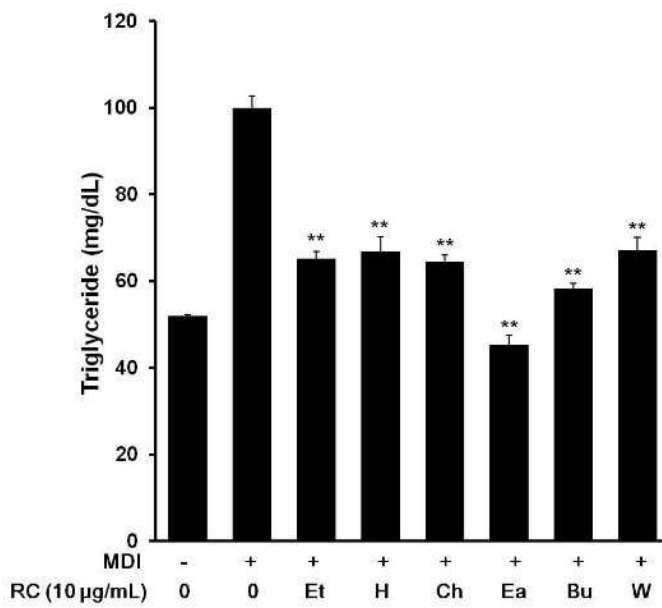
도면1



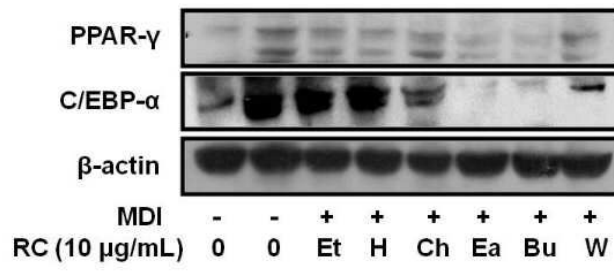
도면2



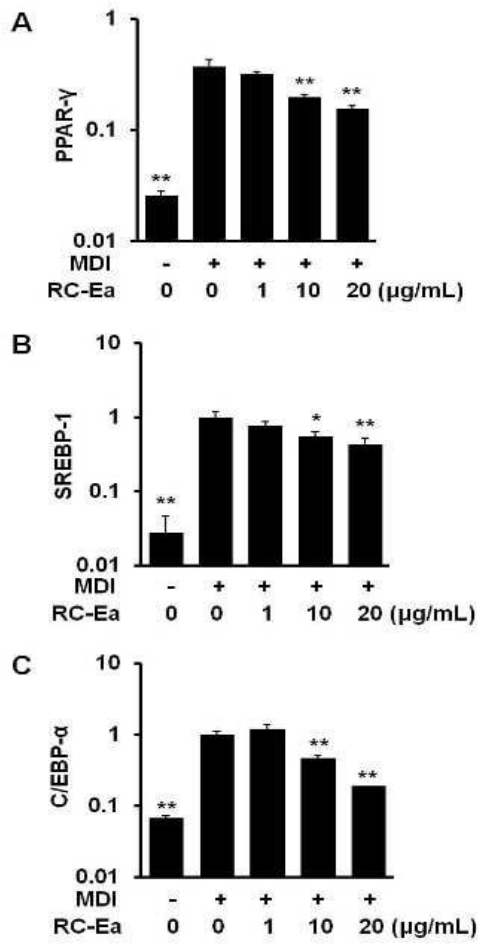
도면3



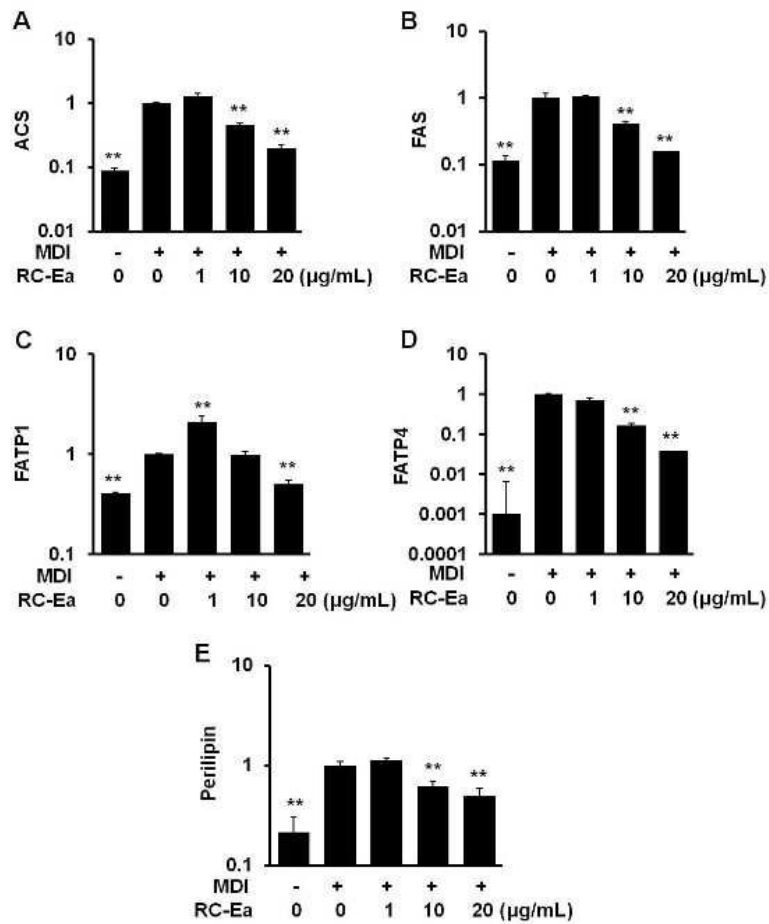
도면4



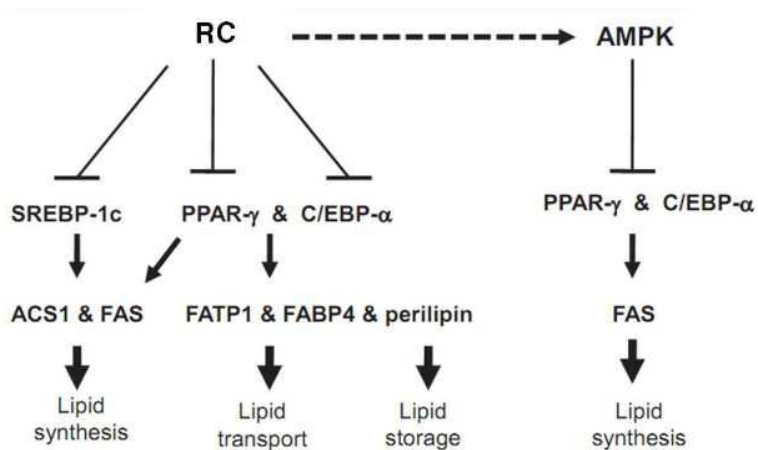
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Keimyung University Industry Academic Cooperation Foundation
Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology
- <120> Composition for Anti-Obesity Containing Extract from Rumex

crispus L.

<160> 18

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 1

glatgatcca ctcacggca 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 2

ggtctcgctc ctggaagagg 20

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 3

ggagcctaag tttgagtttg ctgtg 25

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 4

tgcagcaggt tgtcttggat g 21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 5
 ttgaagcaca atcgatccat cc 22
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 6
 gcacactgcc attgcacaag 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 7
 agcctggcca tctgtgagaa 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 8
 cagactggta cgggccacaa 20
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 9
 gtccttgcca catccgacct atc 23
 <210> 10

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 10
 ttagtgcaaa cccagttgtg cttc 24

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 11
 agcactgcct tcggttcagt c 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 12
 aagagctgtg gaggccactt g 21

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 13
 cagacggacg tggctgtgta 20

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 14

gccgagcata ggatgcaaga a	21
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 15	
tgggaacctg gaagcttgtc tc	22
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 16	
gaattccacg cccagtttga	20
<210> 17	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 17	
gatgagagcc atgacgacca ga	22
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 18	
tgtgtaccac accacccagg a	21