

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0028082 (43) 공개일자 2009년03월18일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/343</i> (2006.01) <i>A61P 3/04</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2007-0093379 (22) 출원일자 2007년09월14일 심사청구일자 2007년09월14일	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원 춘천시 한림대학길 39 (72) 발명자 강영희 강원 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관 8513호 신승용 강원 춘천시 후평동 575-4 동산아파트 102동 801호 임순성 강원 춘천시 퇴계동 현진아파트 102동 805호 (74) 대리인 김형준	

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드를 유효성분으로포함하는 비만 억제용 조성물

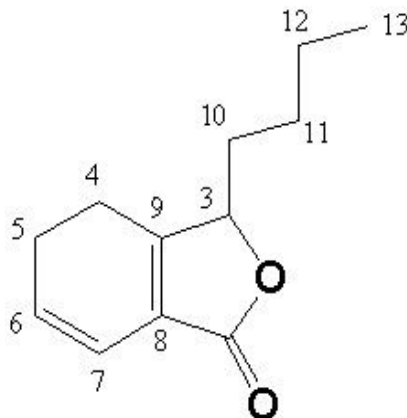
(57) 요약

본 발명은 천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 비만 억제용 조성물은, 천궁을 준비하는 제1공정, 준비한 천궁을 에탄올에 침지시킨 후, 이를 환류추출하여 천궁추출물을 제조하는 제2공정, 상기 천궁추출물을 농축시켜 천궁추출농축물을 제조하는 제3공정, 제조한 천궁추출농축물에 물을 넣고 현탁시킨 후, 헥산으로 용매분획한 후 이를 농축하여 천궁분획물을 제조하는 제4공정, 제4공정에서 제조된 천궁분획물을 실리카겔 컬럼으로 용출시켜 리구스틸라이드(Ligustilide) 성분이 함유된 활성화합물을 수득하는 제5공정으로 제조하는 조성물로 구성된다.

본 발명에 의해, 리구스틸라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

비만 억제용 조성물에 있어서,

천궁(*Cnidium Rhizoma*)을 준비하는 제1공정,

준비한 천궁을 에탄올에 침지시킨 후, 이를 환류추출하여 천궁추출물을 제조하는 제2공정,

상기 천궁추출물을 농축시켜 천궁추출농축물을 제조하는 제3공정,

제조한 천궁추출농축물에 물을 넣고 현탁시킨 후, 헥산으로 용매분획한 후 이를 농축하여 천궁분획물을 제조하는 제4공정,

제4공정에서 제조된 천궁분획물을 실리카겔 컬럼으로 용출시켜 리구스틸라이드 성분이 함유된 활성화합물을 수득하는 제5공정으로 제조된 조성물로서,

천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

제2공정의 천궁추출물을 제조할 시, 90 ~ 95 % 에탄올에 천궁을 넣고 70 ~ 80 ℃에서 1 ~ 4 시간동안 환류추출하여 제조하는 것이 특징인,

천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

제5공정의 리구스틸라이드(Ligustilide) 성분이 함유된 활성화합물 수득 시, 실리카겔 컬럼에서 용출용매로 n-헥산과 에틸아세테이트를 사용하는 것을 특징으로 하는,

천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 최근 우리나라에서도 경제발전으로 생활양식이 편리해지고 식생활이 서구화되어 동물성 식품의 섭취가 늘어나고, 지방의 섭취량이 증가함에 따라 체중과다나 비만이 점차 늘어나는 추세이다.
- <3> 체중과다와 비만이 되는 이유는 섭취한 열량 중 소모되고 남는 것이 지방으로 전환되어 체내의 여러 부분 특히 피하조직과 복강 내에 축적되기 때문이다.
- <4> 특히, 현대인은 과로, 과음, 스트레스 등으로 인하여 체력이 저하되며, 약 30 ~ 40 %가 비만증을 가지고 있고, 그 중 약 10 % 정도는 심각하거나 병적인 비만증을 나타낸다고 보고된 바 있다.
- <5> 이러한 비만은 전세계적으로 공통적이고 매우 심각한 공중 보건 문제로서, 고혈압, 아테롬성 동맥경화증, 울혈성 심부전, 뇌졸중, 췌장 질환, 골관절염, 수면 무호흡, 생식 장애, 다낭성 난소 증후군, 유방, 전립선 및 결장의 암, 및 일반적인 마취의 합병증 발생 증가에 대해 인지된 위험 인자이다.
- <6> 비만은 수명을 감소시킬 뿐만 아니라 감염, 정맥류, 흑색 가시세포증, 습진, 운동 못견딤증, 인슐린 저항성, 고

혈압 고콜레스테롤혈증, 담석증, 정형외과적 손상, 및 혈전색전성 질환의 심각한 위험을 지닌다.

- <7> 따라서 이러한 비만을 해결하기 위해, 일부 비만 환자들은 식이요법과 운동요법을 통해 체중을 줄이려고 노력하고 있다.
- <8> 그러나, 식이요법은 총 에너지 섭취량을 제어하는 치료방법이긴 하나, 안정시의 대사율이 저하되기 때문에 기대와 같은 체중감소는 얻어질 수 없고, 감량성공의 경우라도 제(除)지방 체중의 감소가 중심이 되는 경우가 많고, 또는 영양 불량장애, 공복감 또는 스트레스라고 하는 육체적 및 정신적 고통을 환자에게 초래하는 문제가 있다.
- <9> 또한, 운동요법의 경우 소비 에너지의 증가뿐만 아니라, 안정시 대사율의 개선, 인슐린 저항성의 시정 및 체지방의 감소 등의 효과가 있다고 되어 있으나, 1 회에 20 분간의 호기적 운동을 주3회 이상 행하는 것이 필요하므로 계속적으로 시행하는 것은 매우 곤란하다.
- <10> 따라서, 극도의 비만에 대한 긴급치료의 필요가 있는 경우에는 식이요법 또는 운동요법만으로는 충분한 효과를 얻는 것은 일반적으로 곤란하므로, 약물요법 또는 외과요법 등이 행해지고 있으나, 외과요법은 환자에게 주는 부담이 매우 크다.
- <11> 약물요법을 위해 사용되는 비만증 치료약으로서는 식욕억제제, 소화흡수 저해제, 비만축적방해제 또는 대사촉진제 등이 있으나, 이들 비만 치료제는 약물의존성 등의 부작용을 일으킬 위험성이 있다.
- <12> 또한, 투여한 환자에게 단기간에 내성이 생겨버리는 경우도 있기 때문에, 장기간 연속하여 사용할 수 없다는 문제점도 있다.
- <13> 따라서, 환자에게 부담을 주지 않으면서 장기간 연속하여 사용할 수 있는, 부작용이 적고 효과적으로 체중감소를 촉진하는 의약품 개발로 아래와 같이 천연약재를 이용한 연구가 시행되고 있다.
- <14> 한국공개특허공보 특2002-0095513호(비만억제용 길경 조성물)에는, 길경(도라지)추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 영양과잉에 의한 비만억제용 조성물에 관한 것이 공개되어 있다.
- <15> 한국등록특허공보 제10-0595459호(비만 억제용 조성물)에는, 옷나무 껍질 추출물을 유효성분으로 하는 비만 억제용 조성물에 관한 것이 공개되어 있다.
- <16> 상기와 같이, 비만 억제용 조성물 대상으로 여러 약재를 이용하여 연구된 바 있으나, 비만 억제용 조성물로 천궁에 대해 아직까지 연구된 바는 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <17> 상기의 문제점을 해결하기 위해, 본 발명에서는 천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물을 제공하려는 것이다.

과제 해결수단

- <18> 본 발명의 비만 억제용 조성물은, 천궁을 준비하는 제1공정, 준비한 천궁을 에탄올에 침지시킨 후, 이를 환류추출하여 천궁추출물을 제조하는 제2공정, 상기 천궁추출물을 농축시켜 천궁추출농축물을 제조하는 제3공정, 제조한 천궁추출농축물에 물을 넣고 현탁시킨 후, 헥산으로 용매분획한 후 이를 농축하여 천궁분획물을 제조하는 제4공정, 제4공정에서 제조된 천궁분획물을 실리카겔 컬럼으로 용출시켜 리구스틸라이드(Ligustilide) 성분을 함유하는 활성화합물을 수득하는 제5공정으로 제조하는 조성물로 구성된다.

효 과

- <19> 본 발명에 의해, 천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물이 제공된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <20> 본 발명의 주재료인 천궁(*Cnidium Rhizoma*)은 뿌리나 지하부를 이용하는 약용자원식물로서 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 여러해살이 숙근초이다.
- <21> 천궁의 뿌리는 진경작용, 진정작용, 혈압강하작용, 혈관확장작용, 항균작용, 향진작용, 그리고 비타민 E 결핍증

치료 등의 약리작용이 있으며 간질과 치통, 구취 증상을 가볍게 하고 피를 맑게 하며 혈압을 낮추고 혈류량을 증가시키는 작용을 하여 두통, 어지럼증, 고혈압, 협심증, 근육마비, 신경통 및, 수족냉증 등에 좋은 약으로 주로 이용되고 있다.

- <22> 한방에서는 예로부터 교애궁귀탕, 사물탕, 궁귀조혈음 등에 주요 약제로 배합되어 보혈, 진정, 강장약으로 쓰이고 있으며, 빈혈증, 냉증, 축농증, 월경불순 및 부인병 질환에도 널리 쓰이고 있다.
- <23> 천궁의 화학성분으로는 프탈라이드계(phthalide) 성분인 크니딜라이드(cnidilide), 네오크니딜라이드(neocnidilide), 리구스틸라이드(ligustilide), 부틸프탈라이드(butylphthalide), 센큐놀라이드(senkyunolide) 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Fuzita M. 및 Kobayashi M.; Chem. Pharm. Bull., 35(4), pp1427-1433, 1987).
- <24> 현재 상기와 같은 효능을 가지는 천궁에 관한 연구로는 천궁 엑기스 및 분획의 소염 및 진통 작용에 관한 생약적 연구, 식물세포배양에 의한 천궁의 정유 성분 생산 연구, 향기성 성분분석, 천궁을 이용한 침출주 및 약용주의 제조, 천궁의 항산화 연구 등 다양한 연구가 국내에서 보고된 바 있으나, 비만 효과에 대해서는 아직 보고된 바가 없다.
- <25> 따라서, 전세계적으로 매우 심각한 공중 보건 문제인 비만에 대한 관심이 증가되면서, 본원발명의 발명자들은 여러 천연물질을 이용하여 비만 억제용 조성물을 개발하는데 수차례 연구한 결과, 천궁추출물에서 분획한 분획물이 비만 억제제로 우수한 효능을 나타냄을 알게 되었다.
- <26> 또한, 여러가지 시행착오를 거쳐, 어떤 용매를 사용하여 추출할 때 더 뛰어난 비만 억제효과를 나타내는 물질을 함유하고 있는지를 확인하였고, 구체적인 실험을 통해, 어떠한 성분으로 인하여 비만 억제효과를 나타내는지를 알 수 있었다.
- <27> 즉, 본 발명의 천궁분획물에서 비만 억제효과를 나타내는 성분으로는 리구스틸라이드(ligustilide)성분임을 알 수 있었다.
- <28> 이러한, 리구스틸라이드(ligustilide) 성분은 도 1에 제시되어 있듯이, 분자식이 $C_{12}H_{16}O_2$, 분자량 192로서, 천궁으로부터 분리된 성분 중 하나이다.
- <29> 이렇게 본 발명의 천궁분획물로부터 분리된 리구스틸라이드(Ligustilide)가 함유된 활성화합물은 지방세포의 형성을 억제함과 동시에 지방세포 형성을 촉진하는 피피에알 감마(PPAR γ) 및 씨이비피 알파(C/EBP α) 단백질 발현 억제효과가 확인됨으로써, 본 발명에서 제조된 조성물이 비만 억제용 조성물로 이용가능함을 알 수 있었다.
- <30> 따라서, 본 발명의 천궁분획물로부터 분리된 리구스틸라이드(Ligustilide)가 함유된 활성화합물이 포함된 조성물은 비만 억제에 유용한 의약품으로 사용할 수 있다.
- <31> 본 발명의 조성물은 상기 천궁분획물로부터 분리된 리구스틸라이드(Ligustilide)가 함유된 활성화합물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- <32> 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다.
- <33> 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- <34> 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- <35> 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- <36> 일일 투여량은 본 발명의 천궁분획물로부터 분리된 리구스틸라이드가 함유된 활성화합물이 포함된 조성물이 50 ~ 150mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- <37> 이하, 본 발명의 천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드(Ligustilide)를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 대해 상세히 설명하면 다음과 같다.

- <38> <천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드(Ligustilide)를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물의 제조공정>
- <39> 1. 제1공정 : 재료준비
- <40> 천궁을 준비한다.
- <41> 이때, 뿌리 또는 지상부(줄기, 잎)을 각각 세절하여 준비한다.
- <42> 2. 제2공정 : 천궁추출물 제조
- <43> 준비한 천궁을 에탄올에 침지시킨 후, 이를 환류추출하여 천궁추출물을 제조한다.
- <44> 이때, 90 ~ 95 % 에탄올에 천궁을 넣고 70 ~ 80 °C에서 1 ~ 4 시간동안 환류추출하여 제조하는 것이 바람직하다.
- <45> 3. 제3공정 : 천궁추출농축물 제조
- <46> 상기 천궁추출물을 농축시켜 천궁추출농축물을 제조한다.
- <47> 이때, 45 °C 이하에서 감압농축하여 천궁추출농축물을 제조하는 것이 바람직하다.
- <48> 4. 제4공정 : 천궁분획물 제조
- <49> 제조한 천궁추출농축물에 물을 넣고 현탁시킨 후, 헥산으로 용매분획한 후, 이를 농축하여 천궁분획물을 제조한다.
- <50> 이때, 45 °C 이하에서 감압농축하여 천궁분획물을 제조하는 것이 바람직하다.
- <51> 5. 제5공정 : 리구스틸라이드가 함유된 활성화합물 수득
- <52> 제4공정에서 제조된 천궁분획물을 실리카겔 컬럼으로 용출시켜 리구스틸라이드(Ligustilide)가 함유된 활성화합물을 수득하여 비만 억제용 조성물을 제조한다.
- <53> 이때, 실리카겔 컬럼에서 용출용매로 n-헥산과 에틸아세테이트를 사용하여 리구스틸라이드가 함유된 활성화합물을 수득하는 것이 바람직하다.
- <54> 이하, 본 발명의 천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드(Ligustilide)를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 대하여 실시예 및 실험예를 통하여 상세히 설명하면 다음과 같다.
- <55> 그러나, 이들이 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- <56> <실시예 1> 본 발명의 비만 억제용 조성물 제조1
- <57> 천궁 200 g에 95 % 에탄올 500 ml를 넣고 75 °C에서 2 시간 동안 환류추출하여 추출하였다.
- <58> 상기 과정을 3 회 반복하여 나온 추출액을 45 °C에서 감압농축하여 38 g(19 %)의 농축물을 확보하였다.
- <59> 이 농축물에 증류수 300 ml를 넣어 현탁한 후, n-Hexane 300 ml를 넣고 강하게 흔들어 용매분획하였다.
- <60> 이 과정을 3 회 반복하여 얻어진 n-hexane 분획물을 45 °C 이하에서 감압 농축하여 15g (7.5%)의 n-hexane 분획물을 확보하였다.
- <61> 이 분획물 4 g을 실리카겔에 코팅하여 실리카겔 컬럼 (30x 500 mm, 500g)을 사용하고, 용출 용매는 n-헥산 : 에틸아세테이트(100:0 → 0:100, 10시간)의 gradient 법을 통해 활성화합물을 수득하여 비만 억제용 조성물을 제조하였다.
- <62> <실시예 2> 본 발명인 비만 억제용 조성물 제조2
- <63> 천궁 200 g에 90 % 에탄올 500 ml를 넣고 75 °C에서 1 시간 동안 환류추출하여 추출하였다.
- <64> 상기 과정을 2 회 반복하여 나온 추출액을 45 °C에서 감압농축하여 38 g(19 %)의 농축물을 확보하였다.
- <65> 이 농축물에 증류수 300 ml를 넣어 현탁한 후, n-Hexane 300 ml를 넣고 강하게 흔들어 용매분획하였다.
- <66> 이 과정을 2 회 반복하여 얻어진 n-hexane 분획물을 45 °C 이하에서 감압 농축하여 15g (7.5%)의 n-hexane 분획물을 확보하였다.

- <67> 이 분획물 4 g을 실리카겔에 코팅하여 실리카겔 컬럼 (30x 500 mm, 500g)을 사용하고, 용출 용매는 n-헥산 : 에틸아세테이트(100:0 → 0:100, 10시간)의 gradient 법을 통해 활성화합물을 수득하여 비만 억제용 조성물을 제조하였다.
- <68> <실시예 3> 본 발명인 비만 억제용 조성물을 이용한 산제 제조
- <69> 실시예 1의 비만 억제용 조성물 2g
- <70> 유당 1g
- <71> 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- <72> <실시예 4> 본 발명인 비만 억제용 조성물을 이용한 정제 제조
- <73> 실시예 1의 비만 억제용 조성물 100mg
- <74> 옥수수전분 100mg
- <75> 유 당 100mg
- <76> 스테아린산 마그네슘 2mg
- <77> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- <78> <실시예 5> 본 발명인 비만 억제용 조성물을 이용한 캡슐제 제조
- <79> 실시예 1의 비만 억제용 조성물 100mg
- <80> 옥수수전분 100mg
- <81> 유 당 100mg
- <82> 스테아린산 마그네슘 2mg
- <83> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- <84> <실험예 1> 성분 분석
- <85> 실시예 1에서 제조된 비만 억제용 조성물을 IR, UV, EI-mass, NMR 등을 통하여 성분 분석하였다.
- <86> 그 결과, 도 1과 같이, 리구스틸라이드에 3번과 1 '번의 탄소에 수소가 들어있는 3, 1 '-dihydroligustilide (4,5-dihydro-3-n- butylphthalide)을 확인하였다.
- <87> 즉, 분자식 $C_{12}H_{16}O_2$, 분자량 192,
- <88> UV(λ_{max} , nm) (MeOH): 324(9500), 296(7600), 283(8100)
- <89> IR v (cm⁻¹, liq. film): 2950(CH), 2860, 1750(C=O), 1450, 1330, 1210, 1180, 1030, 930, 775
- <90> ¹H-NMR(CDC13, 300 MHz) δ : 0.96(t, H-13), 1.29 (m, H-11, 12), 1.57 (m, H-10), 2.15 (t, H-4, 5), 4.90 (t, H-3), 5.80 (d, H-6), 5.92(d, H-7)
- <91> EI-MS: M⁺ = 192
- <92> m/z = "135, 107(100), 85, 79, 57"이 확인되었다.
- <93> <실험예 2> 지방형성 억제작용 효과측정
- <94> 1. 실험동물 세포주 및 처리
- <95> 마우스의 전구지방 세포주 3T3-L1은 한국세포주은행에서 구입하였다.
- <96> DMEM 배양액, 트립신, FBS(Fetal bovine serum)은 캄브렉스사(Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ)에서 구입하였다.
- <97> 실시예 1에서 제조된 조성물을 농도별(1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M)로 준비하였다.
- <98> 2. 실험방법

- <99> 3T3-L1 섬유아세포를 10 % 혈청과 항생제가 포함된 DMEM 배지가 들어있는 12 well plate에 7×10^3 /ml 농도로 넣고 이산화탄소 배양기에서 24 시간 전배양하였다.
- <100> 그 후 인슐린 1 micromol, 이소부틸메틸잔틴(isobutylmethylxanthine) 250 mmol 및 덱사메타손(dexamethasone) 1 micromol을 처리하여 8 일동안 처리하여 지방세포로 분화시켰다.
- <101> 이때 4일마다 배지를 바꾸어 주었고 분화를 위한 시약과 실시예 2에서 제조된 조성물을 농도별로 처리하고 배양하여 지방세포로 분화되는 정도를 확인하였다.
- <102> 8일 동안 지방세포(adipocytes)로 분화(differentiation)시킨 다음 배지를 버리고 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 2 회 세척한 후 4 % 포르말데하이드(formaldehyde) 용액에서 20 분 동안 고정된 뒤 0.2 % Tween 20을 포함하고 있는 인산완충용액으로 3 회 세척한 다음, 지방염색용 시약(oil red O)으로 1 시간 동안 염색하였다.
- <103> 염색된 세포를 세척한 후 현미경으로 관찰하였다.
- <104> 3. 실험결과
- <105> 상기 실험결과, 도 2와 같이 리구스틸라이드가 함유된 활성화합물을 농도별로 처리한 결과, 8 일째 농도가 증가할수록 지방형성 정도가 억제됨을 확인할 수 있었다.
- <106> <실험예 3> 지방형성 관련 단백질 발현 억제작용 측정
- <107> 1. 실험동물 세포주 및 처리
- <108> 마우스의 전구지방 세포주 3T3-L1은 한국세포주은행에서 구입하였다.
- <109> DMEM 배양액, 트립신, FBS(Fetal bovine serum)은 캄브렉스사(Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ)에서 구입하였다.
- <110> 실시예 2에서 제조된 조성물을 농도별(1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M)로 준비하였다.
- <111> 2. 실험방법
- <112> 3T3-L1 섬유아세포를 10 % 혈청과 항생제가 포함된 DMEM 배지가 들어있는 60 mm 배양접시에 6×10^4 /ml 농도로 넣고 이산화탄소 배양기에서 24시간 전배양하였다.
- <113> 그 후 인슐린 1 micromol, 이소부틸메틸잔틴(isobutylmethylxanthine) 250 mmol 및 덱사메타손(dexamethasone) 1 micromol을 5 일 동안 처리하여 지방세포로 분화시켰다.
- <114> 이때 분화를 위한 시약과 실시예 2에서 제조된 조성물을 농도별(1, 5, 10 및 20 micromol)로 동시에 처리하여 배양세포를 준비하였다.
- <115> 세포 용해물 (lysates)은 배양된 3T3-L1 섬유아세포로부터 10% SDS, 1% β -글리세로포스페이트, 0.1 M Na₃VO₄, 0.5 M NaF 및 프로티아제 억제 각테일을 포함하는 1 mol Tris-HCl 세포용해 완충액에서 얻었다.
- <116> 상기 세포에서 PPAR γ 와 C/EBP α 단백질의 발현을 측정하기 위하여 동일한 양의 총 단백질을 포함하는 세포 용해물을 이용하여 10%의 SDS-PAGE를 수행하였다.
- <117> 전기영동 된 단백질 밴드들을 나이트로셀룰로스 막으로 전이시켰고, 비특이적인 결합의 방지를 위하여 3시간 동안 3% BSA (bovine serum albumin)를 포함하는 TBS-T 완충액 [0.5M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5M NaCl, 0.1% Tween 20]을 이용하였다.
- <118> 상기 막은 PPAR γ 와 C/EBP α 단백질의 일차항체 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA)를 1,000배 희석하여 교반하면서 3시간 동안 배양시키고, 그 후 TBS-T 완충액로 세 번 세척하고 나서 염소 항-토끼 IgG 호 오스레디쉬 페록시다제 (1:10,000, Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA)의 이차항체로 1시간 동안 반응시켰다.
- <119> PPAR γ 와 C/EBP α 단백질의 양은 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광기(Supersignal West pico chemiluminescence, Pierce Biotech. Inc., Rockford, IL)로 검출하여 코니카 X-레이 필름으로 촬영하여 도 3에 나타내었다.

<120> 이때, 단일클로날 마우스 β -액틴 항체(1:10,000)를 처리한 것을 대조군으로 하여 측정하였다.

<121> 3. 실험결과

<122> 상기 실험결과, 도 3과 같이 리구스틸라이드가 함유된 활성화합물을 농도별로 처리한 결과, 5 일째 본 발명의 조성물의 농도가 증가할수록 지방 형성에 관여하는 단백질 발현작용이 억제됨을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<123> 도 1은 본 발명인 천궁분획물에서 분리한 리구스틸라이드 성분의 구성도.

<124> 도 2는 본 발명의 실시예 1의 조성물을 농도별로 처리한 후 8 일째 세포의 지방 형성 정도를 나타낸 그림.

<125> control : 분화유도물질을 처리하지 않은 것

<126> DM : 분화유도물질

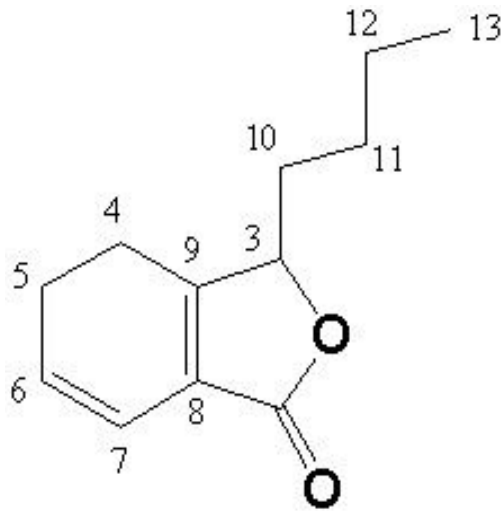
<127> 도 3은 본 발명의 실시예 2의 조성물을 농도별로 처리한 후 5일째 지방 형성에 관여하는 단백질 발현을 나타낸 그림.

<128> control : 분화유도물질을 처리하지 않은 것

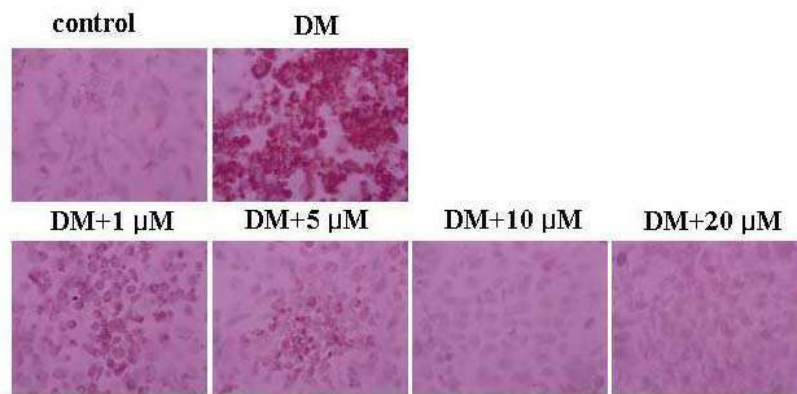
<129> DM : 분화유도물질

도면

도면1



도면2



도면3

