



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0044081
(43) 공개일자 2016년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/488 (2006.01) A61K 36/804 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0138089

(22) 출원일자 2014년10월14일

심사청구일자 2014년10월14일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

권오란

서울 용산구 서빙고로 35, 102동 2303호 (한강로 3가, 용산시티파크1단지아파트)

이효진

서울 마포구 신촌로 150, 806호 (노고산동, 신촌포스빌)

임예니

서울 서초구 서초대로74길 27, 405호 (서초동, 강남역한화오벨리스크)

(74) 대리인

이원희

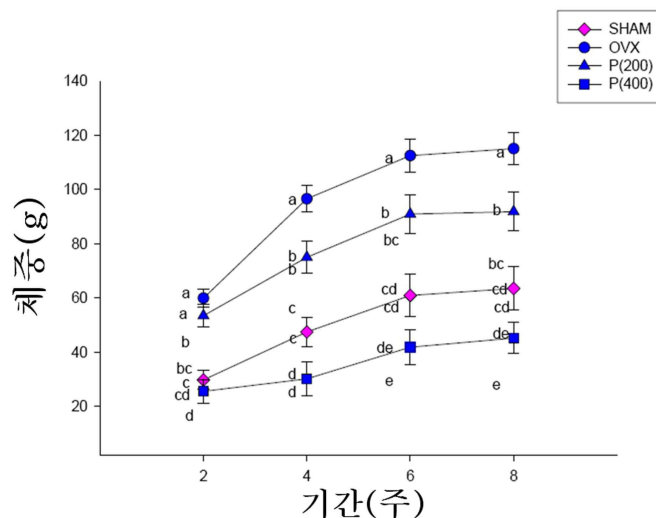
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **갈근 및 지황 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명의 갈근(Pueraria lobata) 및 지황(Rhemannia glutinosa) 복합추출물은 난소를 적출한 갱년기 유발 동물 모델에서 증가된 체중과 체지방조직(생식기주변 지방, 장간막 지방, 복막 후 지방 및 신장주변 지방)의 무게가 감소하는 것을 확인하였고, 증가된 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방의 수치를 감소시키며, 증가된 인슐린 저항성을 개선하는 것을 확인함으로써 상기 갈근 및 지황 복합추출물은 대사성 질환(Metabolic disease) 예방 및 치료를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M3A9C4078153

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 전통천연물기반유전자-동의보감사업

연구과제명 인체시험기반 MC/MT 효능검증 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2022.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

갈근(Pueraria lobata) 및 지황(Rhemannia glutinosa) 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환(Metabolic disease) 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 복합추출물은 갈근 및 지황을 1:1 내지 5:1의 중량비로 혼합한 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 복합추출물은 물, C₁ 내지 C₂ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하는 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 복합추출물은 총콜레스테롤(Total-Cholesterol, TC), LDL 콜레스테롤(Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 및 중성지방(Triglyceride, TG)의 수치를 감소시키는 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 대사성 질환은 갱년기성 고지혈증 또는 갱년기성 당뇨병인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

갈근 및 지황 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 복합추출물은 갈근 및 지황을 1:1 내지 5:1의 중량비로 혼합한 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 복합추출물은 물, C₁ 내지 C₂ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하는 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 복합추출물은 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방의 농도를 감소시키는 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 대사성 질환은 갱년기성 고지혈증 또는 갱년기성 당뇨병인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 갈근(*Pueraria lobata*) 및 지황(*Rhemannia glutinosa*) 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환(Metabolic disease) 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 갈근(*Pueraria lobata*)은 콩과 식물의 다년생 초본인 칩(*Pueraria lobata* Ohwi)의 주피를 제거하여 뿌리를 건조시킨 것으로 한국, 중국, 일본 각 지역의 산에 자생하는 생약이다. 한의학에서는 칩의 여러 부위를 각각 분류하여 칩뿌리를 건조한 것을 갈근, 꽃은 갈화, 열매는 갈곡 또는 갈실, 잎은 갈엽, 덩굴은 갈만이라 부르며 질병의 증상 및 치료방법에 따라 각각 다르게 사용하여 왔다. 한방에서 갈근은 기육을 풀어 주는 작용을 하므로 감기 몸살이나 발진성 질환, 항강통 등에 해표시킬 목적으로 사용되며, 비장과 위장의 기를 상승하게 도와주어 진액을 만들어 갈증을 해소하게 하고 지사시키는 작용을 한다(본초학, 148, 1995). 또한, 사상의학에서는 태음인의 약물로 분류하여 갈근해기탕, 열다한소탕, 갈근승기탕, 조각대황탕, 갈근부평탕 등의 기본처방에 사용한다(사상의학원론, 343-50, 1985).

[0003] 갈근은 이소플라보노이드(isoflavonoide)를 다량 함유하고 있으며(중약현대연구여임상응용, 626, 1994), 주로 이소플라보노이드와 관련한 성분의 연구가 많이 보고되어 있다. 갈근과 관련한 약리 작용으로는 항알콜중독(antidipsotropic) 작용(Proceeding of National Academy of Sciences of USA, 95(5):2198-203, 1998; Alcoholism: Clinical & Experimental Research 40(4):659-63, 1996), 간보호 작용(Planta Medica, 64(5):413-6, 1998), 숙취 억제 작용(Proceeding of National Academy of Sciences of USA, 94(5):1675-9, 1997), 항산화 작용(Chem. Pharm. Bull. 40(3):721-4, 1992) 등이 알려져 있다. 또한, 평활근의 이완 작용, 심혈관계에서 관상동맥 확장 및 혈압 강하, 심박동 조절작용, 혈소판 응집 억제 작용, 강혈당 작용, 해열 작용 등이 알려져 있으며(중약현대연구여임상응용, 626-632, 1994), 노년 질환의 두통, 항강, 사지 감각 장애, 이통, 당뇨 등에도 응용된다(항노쇠중약학, 186-187, 1989). 그러나, 현재까지 갈근의 갱년기 여성에서의 지질 대사 또는 인슐린 저항성 개선에 직접적으로 이용한 보고는 없다.

[0004] 지황(*Rhemannia glutinosa*)은 현삼과의 지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel)의 뿌리로, 제법에 따라 생지황, 건지황 및 숙지황으로 분류된다. 전통적으로 생지황은 량혈, 발진, 토혈 및 인후중통에, 건지황은 청열량혈, 양음, 음허내열, 골증노열, 내열소갈, 토혈 및 발진에, 숙지황은 자음보혈, 보정전수로 간신음허, 요슬산연, 골증조열, 도한유정, 내열소갈, 혈허위황, 심계정충, 현훈, 이명 및 수발조백 등의 질환에 사용되어 왔다. 또한, 지황은 허리와 무릎이 시리고 아픈 증상이나 월경이상, 어지럼증 등을 치료하고 머리를 검게 하는 효능이 있는 것으로 알려져있고, 각종 만성병 중 몸이 허약하여 나타나는 내열(內熱), 인후건조(咽喉乾燥), 갈증 등의 증상에 쓰여져 왔고, 민간요법에서는 돼지고기를 삶은 국물과 함께 복용하면 습관성 변비에 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나, 이러한 지황을 갱년기 여성에서의 지질 대사 또는 인슐린 저항성 개선에 사용하였다는 보고는 아직까지 없다.

- [0005] 최근 의학의 발달과 경제수준의 향상으로 인간의 평균 수명이 길어져, 전 세계적으로 노인 인구가 증가하는 추세이다. 특히 2001년 한국인의 평균 수명은 남성 72.8세, 여성 80세였으나, 2006년 남성 75.7세, 여성 82.4세로 빠른 속도로 평균 수명이 증가하고 있으며, 65세 이상 인구가 전체 한국 인구의 9.5 %로 이미 고령화 사회에 접어들었다. 그러므로 전례없이 길어지고 있는 노령기에 대비하여 노인의 건강과 삶의 질 향상을 위한 연구가 요구된다. 특히, 전체 여성의 20% 정도가 그 증상을 겪는 것으로 알려진 갱년기는, 노화 현상의 하나로, 난소의 기능이 점차 감소하는 40세 이후부터 서서히 시작되는데, 여성의 평균 수명이 점차 연장됨에 따라 호르몬 결핍기간은 일생의 1/3 이상을 차지한다는 점이 문제점으로 대두되고 있다.
- [0006] 갱년기는 난소기능의 전반적이고 점진적인 감소가 일어나 생리적 기능 및 성기능이 감소 내지 소실되는 과도기를 말하며, 갱년기의 한 과정으로 난소기능이 정지된 후에 일어나는 생리의 영구적인 정지인 폐경(menopause)이 오게 된다. 폐경이 오게 되면 에스트로겐 생성의 감소, 난포자극호르몬(follicular stimulating hormone, FSH) 및 황체호르몬(luteinizing hormone, LH)의 상승 등 호르몬의 변화에 따른 여러 질환이 발생하게 된다. 상기 호르몬 변화에 따른 질환을 갱년기 질환(menopausal disorder), 폐경기 질환(postmenopausal syndrome) 또는 폐경기 증후군이라고도 불리며, 40대 내지 50대 여성에서 주로 나타난다. 즉, 갱년기 질환은 난소의 노화로 인한 에스트로겐(여성호르몬)의 분비 감소에 기인하며 폐경을 전후로 약 2년 내지 10년에 걸쳐 나타난다.
- [0007] 갱년기는 내분비 증후군의 일종으로 분리되며 난소기능의 전반적이고 점진적인 감소가 일어나 생리적 기능 및 성기능이 감소 내지 소실되는 과도기를 말하며, 갱년기 질환의 경우 주로 다섯가지 증상이 나타난다: i) 혈관성 변화에 의한 증상, ii) 근골격계 변화에 의한 증상, iii) 비뇨생식기 변화에 의한 증상, iv) 뇌신경계 변화에 의한 증상 및 v) 일반적 변화에 의한 증상으로 나누어진다. 상기 혈관성 변화에 의한 증상은 주로 안면 홍조, 빈맥, 발한 또는 두통 등이 있으며, 상기 근골격계 변화에 의한 증상은 근육통, 관절통 또는 요통 등이 있고, 상기 비뇨생식기 변화에 의한 증상은 빈뇨 또는 요실금 등이 있으며, 상기 뇌신경계 변화에 의한 증상은 기억력 감퇴, 우울증, 집중력 감퇴 및 현기증 등이 있으며, 상기 일반적 변화에 의한 증상은 시력감퇴 또는 피부 및 모발의 변화 등이 있다. 상기 증상들은 정도의 차이가 있으나 폐경 전후 여성의 약 80%가 경험하고 있다고 보고되고 있다. 무엇보다도 주목할 만한 사실은 상기 갱년기 질환은 여성의 생명 및 건강에 영향을 미치는 중요한 변화가 장기간 걸쳐 진행됨으로써 여성의 건강에 치명적인 질환 즉, 골다공증이나 심혈관계질환 등의 발생 위험성이 증가된다는 것이다. 따라서, 중년 여성들의 신체적, 정신적 건강 증진 및 삶의 질의 개선을 위하여 상기 갱년기 질환의 치료제의 개발이 요구되고 있다.
- [0008] 현대 사회에 이르러 삶의 질이 향상되고 수명이 연장되고 있는 반면에, 대사성 질환의 발병도 증가하고 있는 추세이다. 대사성 질환 중에서도 비만, 당뇨병 및 암은 산업화 사회에서 급속도로 증가하고 있으며, 특히 발병 연령이 낮아져 큰 문제가 되고 있다. 특히 식생활의 향상으로 섭취 열량이 크게 증가하여 심각한 비만이 발생하며 이에 따라 야기되는 당뇨병이 증가하고 있다. 당뇨병이 오래 지속되면 혈당의 증가 이외에도 혈중 지질 농도가 증가하여 동맥 경화, 관상 심장 질환 등의 심혈관 질환, 당뇨병성 신장 및 망막질환 등의 합병증을 유발한다.
- [0009] 지질 관련 대사성 질환은 생체 내 물질대사 장애에 의해 발생하는 질환 중 혈중 지질과 관련된 것을 의미하며, 구체적으로 지방간, 제2형 당뇨병, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 및 지질 관련 대사증후군 등을 포함한다. 상기 대사증후군은 당뇨 등 여러가지 대사성 질환이 한 사람에게 동시에 나타나는 질환을 의미한다. 상기 지질 관련 대사성 질환의 효과적인 치료제의 개발이 필요하다.
- [0010] 당뇨병은 대사성 만성 질환으로서 세계적으로 발병 빈도가 지속적으로 증가하는 추세이고, 통계에 따르면 당뇨병 환자 수는 2010년에 약 2억 2천만 명에 이를것으로 예상된다. 당뇨병은 인슐린의 분비와 작용 여부에 따라 크게 인슐린 의존성 당뇨병(제1형 당뇨병) 및 인슐린 비의존성 당뇨병(제2형 당뇨병)으로 분류되는데, 인슐린의 작용 및 반응성의 이상으로 인한 제2형 당뇨병이 전체 환자의 90% 이상을 차지하여 이에 대한 효과적인 치료 및 예방책이 요구된다.
- [0011] 제2형 당뇨병의 발병 기전은 명확히 밝혀진 바 없으나, 간에서의 당 생성 과다, 인슐린 저항성, 근육과 지방 세

포 등에서 당 처리 능력 감소 등의 특징을 나타내는 복합적인 질병이다. 특히 정상 체중보다 과체중인 경우 약 13% 정도 발병률이 높고, 미국에서는 제2형 당뇨병 환자의 85%가 비만으로 나타나 비만이 당뇨병의 주요 원인인 것으로 알려져 있다. 제2형 당뇨병은 말초 인슐린 내성의 증가 및 비정상적인 인슐린 분비 둘 모두를 특징으로 한다. 또한, 제2형 당뇨병은 진행성 질병이며, 망막증(retinopathy), 백내장(cataract), 신장병(nephropathy), 신경장해(neuropathy) 및 동맥경화증(atherosclerosis) 등의 합병증을 야기한다. 이와 같은 합병증의 발생을 줄이기 위하여 제2형 당뇨병 환자에게는 혈당 수준을 정상 수치에 가깝게 유지하는 치료가 필요하며, 제2형 당뇨병 환자에게는 혈당 조절을 최적화하고 잠재적으로 정상화시키는 데 치료의 초점이 맞추어져 있다. 그러나 현재 알려진 치료제들은 소화장애, 간독성 등의 부작용이 보고된 바 있어 안전성 측면에서 문제점을 야기할 수 있는 단점이 있다.

[0012] 고지혈증(hyperlipemia)이란 필요 이상으로 많은 지방성분 물질이 혈액 내에 존재하면서 혈관벽에 쌓여 염증을 일으키고 그 결과 심혈관질환을 일으키는 상태를 말한다. 고지혈증은 콜레스테롤(cholesterol), 중성지방(triglyceride), 인지질 및 유리지방산 등의 혈청 지질 가운데 하나 이상의 혈청 내 농도가 공복 시 혈청 지질의 정상범위인 중성지방 50~150 mg/dl, 인지질 150~250 mg/dl, 콜레스테롤 130~230 mg/dl 및 유리지방산 5~10 mg/dl 보다 높은 상태이다. 이러한 고지혈증을 방지할 경우 고혈압, 관상동맥 경화증(협심증, 심근경색), 뇌동맥 경화증(뇌경색) 등의 위독한 합병증을 초래할 가능성이 높아지게 된다.

[0013] 현재 고지혈증 치료제로서 담즙산과 결합하는 레진(resin)들(예, cholestyramine, colesipol 등), 콜레스테롤 생합성 과정의 주요 효소인 HMG-CoA 환원효소 저해제(예, 로바스타틴(lovastatin), 플루바스타틴(fluvastatin), 심바스타틴(simvastatin), 프라바스타틴(pravastatin)) 등이 임상에서 사용되고 있으나, 장기 복용시 부작용 발생의 우려가 있다. 특히 HMG-CoA 환원효소 저해제인 스타틴계열 약물은 간 손상 및 근육병(myopathy)등을 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 현재 시판되고 있는 혈중 콜레스테롤 강하제들은 크게 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA(HMG-CoA) 환원효소(reductase) 저해제, bile-salt sequestrants, 파이브레이트(fibrate)류 및 니코틴산(nicotinic acid) 유도체들이 있다. 이 중 로바스타틴, 심바스타틴 및 프라바스타틴 등은 콜레스테롤 생합성의 초기단계의 HMG-CoA 환원효소를 저해하는 가장 잘 알려진 콜레스테롤 강하제이지만 스테로이드 호르몬 및 돌리콜(dolichol)의 합성을 또한 저해함으로써 심각한 부작용을 초래하고 있다(Havel, R.L. et al., Ann. Internal Med., 107: 609-615, 1987; Illingworth, D.R. and Bacon, S. Am. J. Cardiology 60: 33-42, 1987). 따라서, 보다 안전하면서도 지질대사 억제 및 고지혈증 치료 효과가 우수한 새로운 치료제 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

[0014] 이에, 본 발명자들은 대사성 질환 예방 및 치료제를 개발하기 위하여 연구하던 중, 갈근과 지황이 혼합된 복합 추출물을 난소를 적출한 갱년기 유발 동물 모델에 투여하였을 때, 증가된 체중과 체지방조직의 무게가 감소하는 것을 확인하였고, 증가된 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방의 수치를 감소시키며, 증가된 인슐린 저항성을 개선하는 것을 확인함으로써 상기 갈근 및 지황 복합추출물을 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물의 유효 성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 갈근(*Pueraria lobata*) 및 지황(*Rhemannia glutinosa*) 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환(Metabolic disease) 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 갈근(*Pueraria lobata*) 및 지황(*Rhemannia glutinosa*) 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환(Metabolic disease) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 갈근 및 지황 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품

을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 갈근(*Pueraria lobata*) 및 지황(*Rhemannia glutinosa*) 복합추출물은 난소를 적출한 갱년기 유발 동물 모델에서 증가된 체중과 체지방조직(생식기주변 지방, 장간막 지방, 복막 후 지방 및 신장주변 지방)의 무게가 감소하는 것을 확인하였고, 증가된 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방의 수치를 감소시키며, 증가된 인슐린 저항성을 개선하는 것을 확인함으로써 상기 갈근 및 지황 복합추출물은 대사성 질환(Metabolic disease) 예방 및 치료를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 갱년기 유발 동물 모델에서 갈근(*Pueraria lobata*) 및 지황(*Rhemannia glutinosa*) 복합추출물 투여에 따른 몸무게 변화를 나타낸 도이다:

SHAM : 정상군,

OVX : 대조군,

P(200) : 갈근 및 지황 복합추출물 200 mg/kg/일 투여군, 및

P(400) : 갈근 및 지황 복합추출물 400 mg/kg/일 투여군.

도 2는 갱년기 유발 동물 모델에서 갈근 및 지황 복합추출물 투여에 따른 혈액에서의 총콜레스테롤 수치를 나타낸 도이다:

TC : 총콜레스테롤,

SHAM : 정상군,

OVX : 대조군,

P200 : 갈근 및 지황 복합추출물 200 mg/kg/일 투여군, 및

P400 : 갈근 및 지황 복합추출물 400 mg/kg/일 투여군.

도 3은 갱년기 유발 동물 모델에서 갈근 및 지황 복합추출물 투여에 따른 혈액에서의 LDL 콜레스테롤 수치를 나타낸 도이다:

LDL-C : LDL 콜레스테롤,

SHAM : 정상군,

OVX : 대조군,

P200 : 갈근 및 지황 복합추출물 200 mg/kg/일 투여군, 및

P400 : 갈근 및 지황 복합추출물 400 mg/kg/일 투여군.

도 4은 갱년기 유발 동물 모델에서 갈근 및 지황 복합추출물 투여에 따른 중성지방 수치를 나타낸 도이다:

TG : 중성지방,

SHAM : 정상군,

OVX : 대조군,

P200 : 갈근 및 지황 복합추출물 200 mg/kg/일 투여군, 및

P400 : 갈근 및 지황 복합추출물 400 mg/kg/일 투여군.

도 5은 갱년기 유발 동물 모델에서 갈근 및 지황 복합추출물 투여에 따른 근육에서의 FOXO 단백질의 위치를 통해 인슐린 저항성을 확인한 도이다:

SHAM : 정상군,

OVX : 대조군,

OVX+PR200 : 갈근 및 지황 복합추출물 200 mg/kg/일 투여군, 및

OVX+PR400 : 갈근 및 지황 복합추출물 400 mg/kg/일 투여군.

도 6은 갱년기 유발 동물 모델에서 갈근 및 지황 복합추출물 투여에 따른 근육에서의 GLUT4 단백질의 핵 및 세포질에서의 위치를 통해 인슐린 저항성을 확인한 도이다:

SHAM : 정상군,

OVX : 대조군,

OVX+PR200 : 갈근 및 지황 복합추출물 200 mg/kg/일 투여군, 및

OVX+PR400 : 갈근 및 지황 복합추출물 400 mg/kg/일 투여군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은 갈근(*Pueraria lobata*) 및 지황(*Rhemannia glutinosa*) 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환(Metabolic disease) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 갈근 및 지황 복합추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

1) 갈근 및 지황에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및

3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출용매는 물, C₁ 내지 C₂ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출용매는 건조된 갈근 및 지황에 0.1 내지 10배로 하는 것이 바람직하고, 0.3 내지 7배 첨가하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 추출온도는 20 내지 70인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출시간은 1 내지 24시간인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

상기 복합추출물은 갈근 및 지황을 혼합한 후 추출할 수 있고, 갈근 및 지황을 각각 추출한 추출물을 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 복합추출물은 갈근 및 지황을 1:1 내지 5:1의 중량비로 혼합하는 것이 바람직하고, 2:1 내지 4:1의 중량비로 혼합하는 것이 보다 바람직하며, 3:1의 중량비로 혼합하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 복합추출물은 총콜레스테롤(Total-Cholesterol, TC), LDL 콜레스테롤(Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 및 중성지방(Triglyceride, TG)의 수치를 감소시키는 것을 특징으로 한다.

상기 대사성 질환은 비만, 제2형 당뇨, 이상지질혈증, 인슐린저항성, 간지방증(hepatic steatosis) 및 비알콜성 지방간(fatty liver)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 바람직하게는 갱년기성 고지혈증 또는 갱년기성 당뇨병일 수 있다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 갱년기 유발 동물 모델에서의 갈근 및 지황 복합추출물의 효과를 확인하기 위해, 난소를 적출한 갱년기 유발 동물 모델을 제조하고, 갈근 및 지황 복합추출물의 체중 감소 효

과를 확인한 결과, 시험 2주차부터 갈근 및 지황 복합추출물을 고용량 투여한 P400군이 대조군에 비해 유의적으로 체중이 감소되는 것을 확인하였고(도 1 참조), 체지방조직 무게 감소 효과를 확인한 결과, 갱년기 유발 동물 모델에서 증가한 생식기주변 지방, 장간막 지방, 복막 후 지방 및 신장주변 지방의 무게가 갈근 및 지황 복합추출물을 투여한 군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(표 2 참조).

[0033] 또한, 본 발명자들은 갈근 및 지황 복합추출물의 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방 개선 효과를 확인한 결과, 갱년기 유발 동물 모델에서 증가한 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방 수치가 갈근 및 지황 복합추출물을 투여한 군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고(도 2 내지 도 4 참조), 인슐린 저항성 개선 효과를 확인한 결과, FOXO 단백질은 인슐린 저항성을 나타낼 경우 핵 안으로 이동하고, GLUT4는 정상적일 경우 세포막에 위치하는데, 갱년기 유발 동물 모델에서 FOXO(빨간색)가 파란색으로 염색된 핵과 동일하게 위치하여 겹쳐 있으나, 갈근 및 지황 복합추출물을 투여한 군에서는 핵에 FOXO 단백질이 위치해 있지않고, 핵 부분이 비어 있음을 확인하였으며(도 5 참조), 갈근 및 지황 복합추출물을 투여한 군에서는 GLUT4가 세포막에서 강하게 발현하는 것을 확인하였다(도 6 참조).

[0034] 따라서, 본 발명의 갈근 및 지황 복합추출물은 난소를 적출한 갱년기 유발 동물 모델에서 증가된 체중과 체지방 조직(생식기주변 지방, 장간막 지방, 복막 후 지방 및 신장주변 지방)의 무게가 감소하는 것을 확인하였고, 증가된 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방의 수치를 감소시키며, 증가된 인슐린 저항성을 개선하는 것을 확인함으로써 상기 갈근 및 지황 복합추출물은 대사성 질환 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0035] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0036] 상기 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0037] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0038] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0040] 또한, 본 발명은 갈근 및 지황 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

- [0041] 상기 갈근 및 지황 복합추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0042] 1) 갈근 및 지황에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0043] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및
- [0044] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.
- [0045] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출용매는 물, C₁ 내지 C₂ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출용매는 건조된 갈근 및 지황에 0.1 내지 10배로 하는 것이 바람직하고, 0.3 내지 7배 첨가하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 추출온도는 20 내지 70인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출시간은 1 내지 24시간인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [0047] 상기 복합추출물은 갈근 및 지황을 혼합한 후 추출할 수 있고, 갈근 및 지황을 각각 추출한 추출물을 혼합하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 상기 복합추출물은 갈근 및 지황을 1:1 내지 5:1의 중량비로 혼합하는 것이 바람직하고, 2:1 내지 4:1의 중량비로 혼합하는 것이 보다 바람직하며, 3:1의 중량비로 혼합하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 상기 복합추출물은 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방의 수치를 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- [0050] 상기 대사성 질환은 비만, 제2형 당뇨병, 이상지질혈증, 인슐린저항성, 간지방증(hepatic steatosis) 및 비알콜성 지방간(fatty liver)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 바람직하게는 갱년기성 고지혈증 또는 갱년기성 당뇨병일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 갈근 및 지황 복합추출물은 난소를 적출한 갱년기 유발 동물 모델에서 증가된 체중과 체지방조직(생식기주변 지방, 장간막 지방, 복막 후 지방 및 신장주변 지방)의 무게가 감소하는 것을 확인하였고, 증가된 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방의 수치를 감소시키며, 증가된 인슐린 저항성을 개선하는 것을 확인함으로써 상기 갈근 및 지황 복합추출물은 대사성 질환 예방 및 개선을 위한 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0052] 본 발명의 복합추출물이 상기와 같은 대사성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로 이용되기 위해서는, 식품학 또는 약제학적 분야에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있으며 그 자체 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 경구로 섭취할 수 있는 어떤 식품 형태로도 제조될 수 있다. 바람직하게는 음료, 환, 과립, 정제 또는 캡슐 형태이다.
- [0053] 본 발명의 건강기능식품은, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되고 식품학적으로 허용되는 성분을 더 포함할 수 있다. 예컨대, 음료수로 제조되는 경우에는 본 발명의 복합추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등에서 하나 이상의 성분을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 건강기능식품의 유효성분으로 포함될 수 있는 양은 대사성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 원하는 사람의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 g 내지 10.0 g 정도로 포함되는 것이 좋으며, 이러한 함량을 갖는 건강기능식품을 섭취함으로써 대사성 질환 예방 및 개선 효과를 얻을 수 있다.
- [0055] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0056] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0057] <실시예 1> 추출물의 제조

[0058] <1-1> 갈근(*Pueraria lobata*) 추출물의 제조

[0059] 본 발명에 사용된 갈근 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0060] 구체적으로, 갈근(약수당, 중국) 10kg을 세척 및 건조하여 추출탱크에 투입하고, 80% 에탄올을 갈근 중량의 5배로 첨가하고 60℃에서 3시간 환류냉각 추출하였다. 상기 추출과정에서 추출액은 종이 여과지로 여과하였으며, 상기 여과액에 다시 80% 에탄올을 첨가하고, 60℃에서 3시간 동안 추출하고, 추출액은 종이 여과지를 이용하여 여과하였다. 상기 여과액은 50℃ 이하에서 감압농축하였다.

[0061] <1-2> 지황(*Rhemannia glutinosa*) 추출물의 제조

[0062] 본 발명에 사용된 지황 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0063] 구체적으로, 지황(약수당, 중국)을 세척하여 건조시켜 10kg을 추출탱크에 투입하고, 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 지황 추출물을 제조하였다.

[0064] <1-3> 갈근 및 지황 복합추출물의 제조

[0065] 상기 실시예 <1-1> 및 <1-2>의 방법으로 제조된 갈근 및 지황의 단일 추출물을 하기 표 1과 같은 구성 및 중량비가 되도록 혼합하여 복합추출물을 제조하였다.

표 1

	갈근 추출물	지황 추출물
중량(g)	7.5	2.5
중량비	3	1

[0067] <실시예 2> 갱년기 유발 동물 모델의 제조

[0068] 갱년기 여성에서의 효과를 확인하기 위해 실험에 앞서 갱년기 유발 동물 모델을 제조하였다.

[0069] 구체적으로, 실험 동물은 8주령 Sprague-Dawley(SD)종 암컷 랫트(180-200 g)를 중앙실험동물(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 1주일간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후 랫트에게 마취제(졸레틸(Zoletil) : (립폰)Rumpun 혼합(3:1) 0.2 mg/kg)를 투입하여 마취 후 랫트의 등에 1 cm정도 절개 후 난소적출을 시행하였다. 수술 후 수술부위에 포비돈 요오드액을 도포, 일주일의 회복기를 가졌다. 이를 통해 에스트로겐 결핍에 의한 갱년기 유발 동물 모델을 만들었다.

[0070] <실시예 3> 갈근 및 지황 복합추출물의 체중 감소 효과 확인

[0071] 본 발명의 갈근 및 지황 복합추출물의 체중 감소 효과를 확인하였다.

[0072] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 제조한 갱년기 유발 동물 모델 랫트를 가지고 난소적출을 하지 않고 수술만 시행한 랫트를 정상군(SHAM)으로 설정하였으며 시험기간 동안 1차 증류수를 경구투여하였다. 난소 절제술 후 1차 증류수를 경구투여한 랫트를 대조군(OVX)으로 설정하였고, 갱년기 유발 동물 모델 랫트에 갈근 및 지황 복합추출물을 용량을 달리하여 200 mg/kg/일로 경구투여한 P200군, 400 mg/kg/일로 경구투여한 P400군으로 나누어 총 4군으로 진행하였다. 시험기간 동안 식이와 물은 자유로이 섭취하게 하고, 실내온도 22±2℃, 습도 55±5%, 12시간 간격으로 light-dark 사이클(cycle)을 자동 유지하였다. 총 8주간 매주 체중을 측정하였다.

[0073] 그 결과 도 1에 나타낸 바와 같이, 시험 2주차부터 갈근 및 지황 복합추출물 고용량 투여군인 P400군이 대조군에 비해 유의적으로 체중이 감소되는 것을 확인하였다(P<0.0001)(도 1).

[0074] <실시예 4> 갈근 및 지황 복합추출물의 체지방조직 무게 감소 효과 확인

[0075] 본 발명의 갈근 및 지황 복합추출물의 체지방조직 무게 감소 효과를 확인하였다.

[0076] 구체적으로, 상기 <실시예 3>과 동일한 방법으로 진행하였고, 생식기주변 지방, 장간막 지방, 복막 후 지방 및 신장주변 지방의 무게를 각 그룹당 10마리씩 측정하였다.

[0077] 그 결과 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 생식기주변 지방, 장간막 지방, 복막 후 지방 모두에서 정상군에 비하여 대조군에서 무게가 유의적으로 증가하였고, 대조군에 비하여 갈근 및 지황 복합추출물을 투여한 P200, P400 군 모두 무게가 유의적으로 감소하였다($P<0.0001$)(표 2). 신장주변 지방의 무게는 P400군에서 유의적으로 감소하였다($P<0.0001$)(표 2).

표 2

체지방조직 분류	그룹			
	정상군 (SHAM)	대조군 (OVX)	P200	P400
생식기주변 지방	9.87 ± 1.05^{ab}	11.86 ± 0.61^a	8.38 ± 0.76^{bc}	4.77 ± 0.60^{de}
장간막 지방	4.34 ± 0.76^{bc}	7.24 ± 0.74^a	4.70 ± 0.62^b	2.67 ± 0.36^{cd}
복막 후 지방	5.30 ± 0.80^b	7.43 ± 0.54^a	5.42 ± 0.53^b	2.77 ± 0.26^{cd}
신장주변 지방	1.64 ± 0.17^a	1.87 ± 0.29^a	1.77 ± 0.22^a	0.99 ± 0.14^b

[0079] 1) 상이한 첨자와 동일 행의 값은 일원분산분석(one-way ANOVA) 및 던칸의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)에 의해 $p<0.05$ 에서 유의한 차이가 있다.

[0080] 2) 값은 평균±표준오차로 나타내었다.

[0081] <실시예 5> 갈근 및 지황 복합추출물의 총콜레스테롤(Total-Cholesterol, TC), LDL 콜레스테롤(Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 및 중성지방(Triglyceride, TG) 개선 효과 확인

[0082] 본 발명의 갈근 및 지황 복합추출물의 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방 개선 효과를 확인하였다.

[0083] 구체적으로, 혈장 총콜레스테롤은 상업용 키트(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였고, 혈장 LDL 콜레스테롤은 상업용 키트(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 이용하여 HDL 콜레스테롤(High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)을 측정하고 프리데발트(Friedewald) 계산법을 이용하여 중성지방, 총콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤 결과를 바탕으로 계산하였다. 혈장 중 유리형 및 에스테르(ester)형으로 존재하는 콜레스테롤이 있는데, 에스테르형에 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소(Cholesterol ester hydrolase)를 반응시켜 유리형과 지방산으로 분해하고, 유리형에 콜레스테롤 산화 효소를 반응시키면 H₂O₂와 4-콜레스테롤이 생성된다. 생성된 H₂O₂에 과산화 효소와 4-아미노산티피린 및 페놀(phenol)을 동시에 반응시키면 산화적 축합 반응으로 키논이 생성된다. 이때, 500 nm에서 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Eon Microplate Spectrophotometer, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하여 확인하였다. 또한, 간 조직의 중성지방은 간 조직을 유기용매(chloroform)를 이용하여 지질을 녹여낸 후, 유기물을 증발시키고 남은 지질을 에탄올(ethanol)에 triton X-100이 5%가 되도록 첨가하여 중성지방 농도를 측정하였고, 상기과 동일한 방법으로 흡광도를 측정하여 확인하였다.

[0084] 그 결과 도 2 내지 도 4에 나타난 바와 같이, 총콜레스테롤 수치는 정상군에 비하여 대조군에서 증가하는 경향을 보였고, 갈근 및 지황 복합추출물 고용량 투여군인 P400군에서 유의적으로 감소하였고(도 2), LDL 콜레스테롤은 정상군에 비하여 대조군에서 유의적으로 증가하였고, 갈근 및 지황 복합추출물 P200, P400군에서 유의적으로 감소하였으며($P<0.0001$)(도 3), 중성지방은 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로 증가하였으나 P200, P400군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다($P=0.0314$)(도 4).

[0085] <실시예 6> 갈근 및 지황 복합추출물의 인슐린 저항성 개선 효과 확인

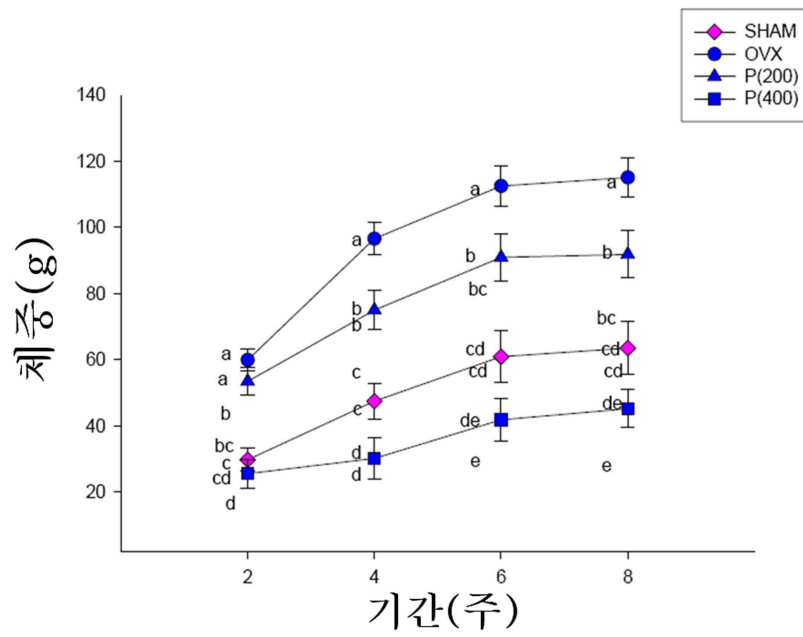
[0086] 본 발명의 갈근 및 지황 복합추출물의 인슐린 저항성 개선 효과를 확인하였다. FOXO 단백질은 인슐린 저항성을 나타낼 경우 핵 안으로 이동하고, 반대로 인슐린 민감성이 증가되는 경우 세포질에 위치하는 특성을 가진다. 또한, GLUT4는 골격근에서 특이적으로 발현되는 글루코스(glucose) 수송체 단백질 중 하나이며, 외부로부터 유입되는 글루코스를 세포 내로 전달하며, 골격근에서 GLUT4의 정상적인 활성화는 인슐린 민감성을 촉진시켜 주는 것으로 알려져 있다.

[0087] 구체적으로, 가자미근(soleus)을 4% 포르말린(formalin) 용액에 넣어 상온에서 최소 12시간 방치하여 고정하였다. 흐르는 물을 이용해 포르말린 용액을 세척한 뒤 70%, 80%, 90% 그리고 100% EtOH 순서대로 1시간씩 2회 조직을 담구어 탈수시킨다. 이후 자일렌(xylene) 1시간씩 2회, 60℃에서 파라핀(paraffin) 용액을 1시간 동안 반응시켜 조직 내부에 관찰하고자 하는 모양이 유지되도록 침투시킨다. 조직 카세트에 파라핀으로 감싼 조직을 고정시켜 마이크로톰(Microtome) 기계로 조직을 슬라이스 한 뒤 슬라이드글라스에 올리고 37℃에서 건조시켜 슬라이드와 밀착되도록 하였다. 조직을 염색하기 위해 자일렌 용액을 5분씩 3회 반응시켜 파라핀을 제거해준 후, 100, 90, 80, 70% EtOH에 5분씩 차례로 반응시켜 자일렌 용액을 세척해주고, 마지막 10분간 물로 알코올을 세척하였다. 60℃에서 30분간 완전히 수분을 제거해 준 뒤, 조직에 항체가 침투할 수 있도록 세포막을 뚫어주는 permeabilization 작업을 0.01% triton x-100을 함유한 PBST로 15분간 진행한 후 PBS로 5분간 세척하고, 3% BSA를 함유한 PBS로 상온에서 30분간 블락킹(blocking)을 실시하였다. PBS로 2회 세척한 후 FOXO(Cell signaling), GLUT4(AbCam) 항체를 각각 1:500의 비율로 3% BSA에 희석하여 4℃에서 12시간 반응시켰다. 이후 0.05% Tween-20을 함유한 PBS로 10분씩 2회 씻어내고, 그 다음 Alexa568-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody(Invitrogen)를 3% BSA를 함유한 PBS에 1:200의 비율로 희석하여 상온에서 15 분간 반응시킨 후 0.05% Tween-20을 함유한 PBS로 10분씩 2회 세척하였다. 마지막으로, 핵(nuclei)의 위치를 관찰할 수 있는 4',6-diamidino-2phenylindole(DAPI)를 PBS에 1:1000의 비율로 희석하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 3회 세척하였다. 반응이 끝난 조직을 슬라이드글라스에 정렬한 뒤, 조직이 마르지 않도록 mounting media(Vectorshield, vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)를 처리하여 커버글라스로 고정하였다. 완성된 슬라이드는 디지털 이미지 시스템이 갖추어진 confocal microscope LSM-700 Meta (Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 촬영하여 확인하였다.

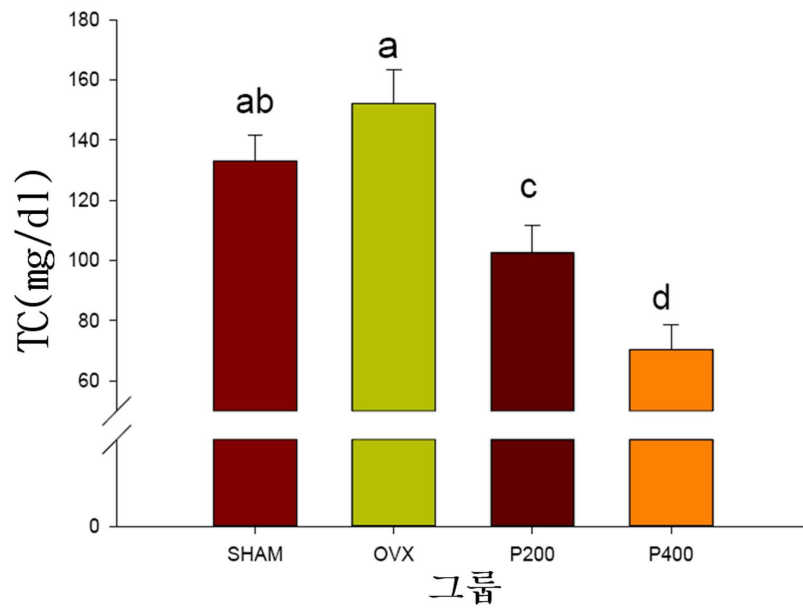
[0088] 그 결과 도 5 내지 도 6에 나타난 바와 같이, 난소적출로 인해 인슐린 저항성을 나타내는 경우인 대조군에서는 FOXO(빨간색)가 파란색으로 염색된 핵과 동일하게 위치하여 겹쳐 있으나, 갈근 및 지황 복합추출물을 투여한 P200, P400군 모두 핵에 FOXO 단백질이 위치해 있지않고, 핵 부분이 비어 있음을 확인하였으며(도 5), GLUT4의 경우 대조군에서는 GLUT4(녹색)가 세포막에 정상적으로 위치하지 못하고 있지만, P400군에서는 세포막에 GLUT4가 강하게 발현되고 있음을 확인하였다(도 6).

도면

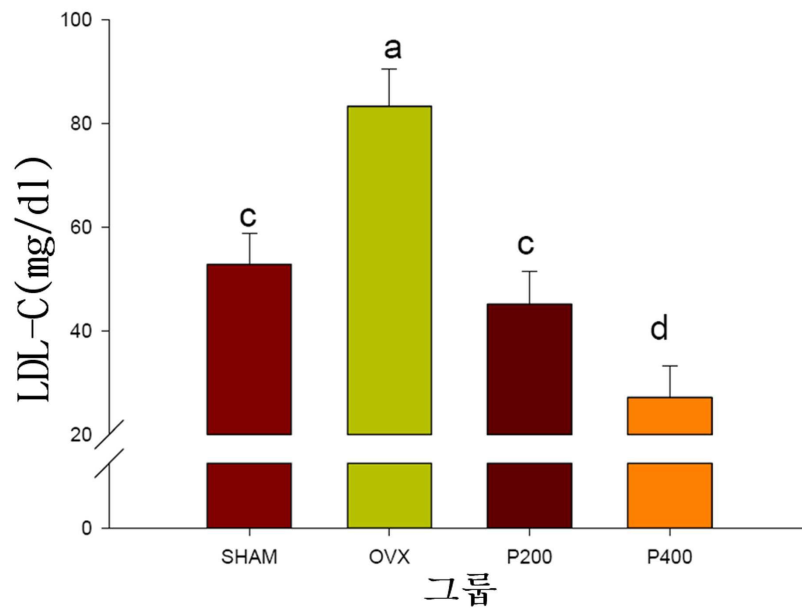
도면1



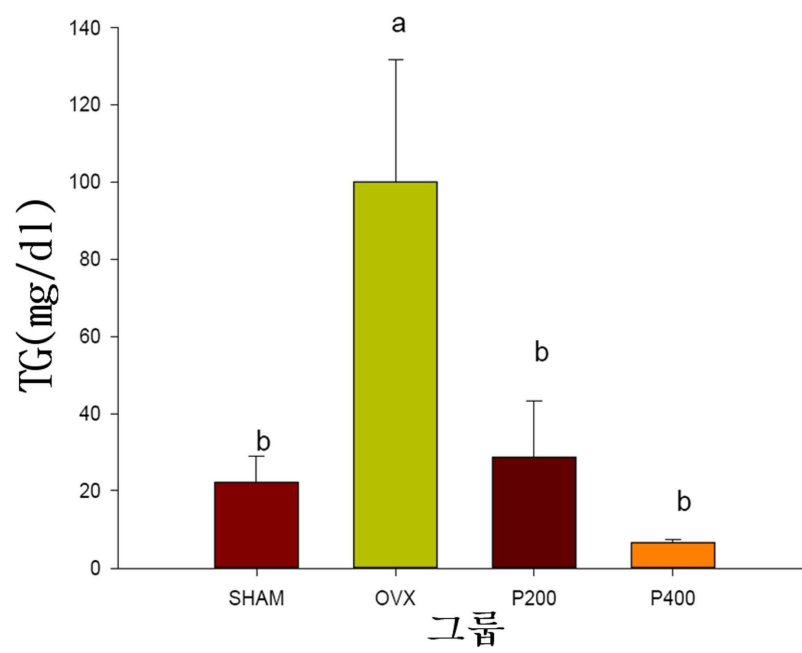
도면2



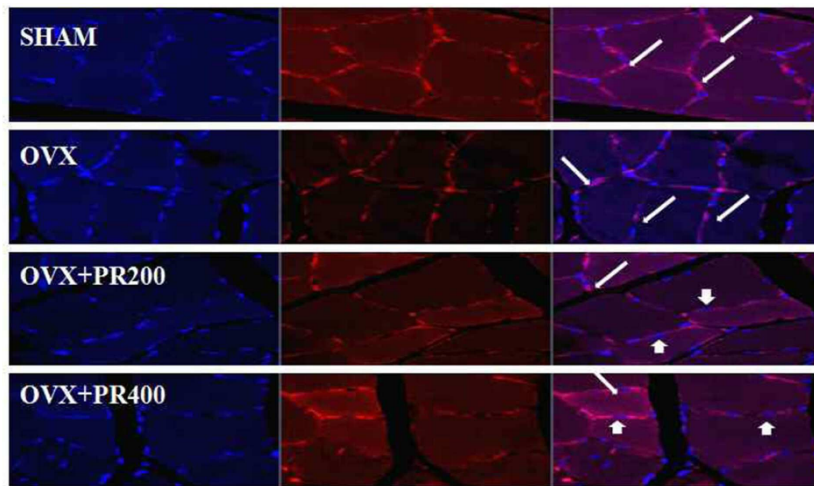
도면3



도면4



도면5



도면6

