(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0136083
(43) 공개일자 2016년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/739 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/739 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0069798
(22) 출원일자 2015년05월19일
심사청구일자 2015년05월19일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
강일준
강원도 춘천시 삭주로 89-7, 107-503 (후평동 에리트아파트)
정다운
경기도 남양주시 수동면 남가로 1720-42
(74) 대리인
특허법인태동

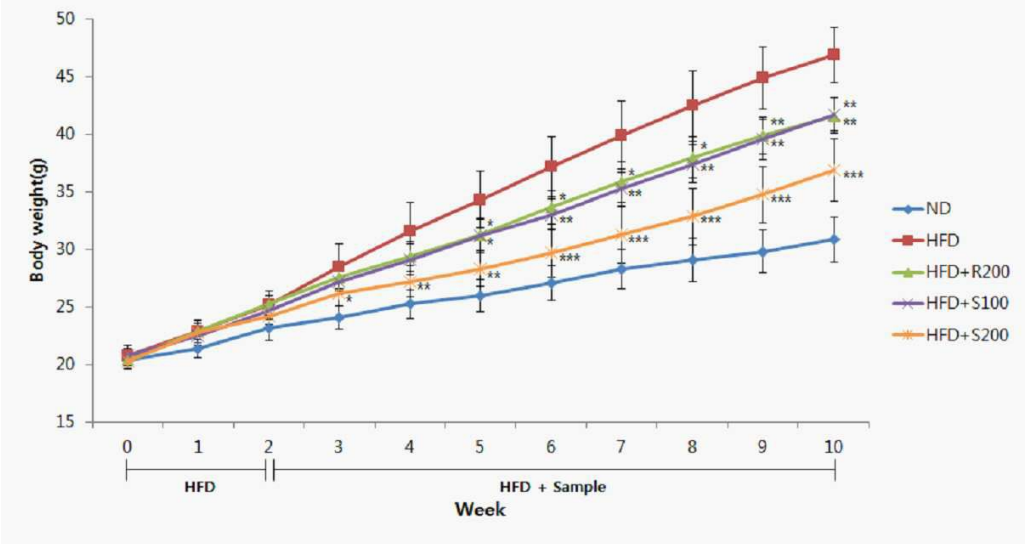
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 및/또는 개선용 조성물**

(57) 요 약

오이풀(*Sanguisorba officinalis L.*)추출물 또는 상기 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 및/또는 개선용 조성물이 제공된다. 보다 구체적으로, 본 발명에서는 오이풀 추출물의 지방 생성 억제, 체중 및 체지방 감소와 지질대사 개선 효과가 우수하여 비만이나 비만으로 유도된 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 대사증후군 예방 및 치료용 조성물 또는 기능성 식품, 약학적 조성물 및 건강식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A23V 2200/328 (2013.01)
A61K 2236/30 (2013.01)
A61K 2236/331 (2013.01)
A61K 2236/35 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

오이풀을 물 및 C_1 내지 C_4의 직쇄 또는 분지형 알코올 또는 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 추출하여 얻어진 추출물 및 상기 추출물을 물, 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 부탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 분획하여 얻어진 분획물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만 및 비만으로 유도된 대사증후군의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서 오이풀 추출물은 오이풀을 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매로 추출한 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서 대사증후군은 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 또는 동맥경화를 말하며, 이 중에서 선택된 하나 이상의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 4

오이풀 추출물 또는 이를 유효성분으로 함유하는 비만 및 비만으로 유도된 대사증후군의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 건강기능식품은 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 중 어느 하나의 형태를 갖는 건강기능식품.

청구항 6

체중 및 체지방 감소 및 지질대사의 개선 및 대사증후군의 예방 및 치료의 효과를 나타내는 오이풀 추출물 또는 이를 유효성분으로 함유하는 건강보조식품.

청구항 7

제 6항에 있어서 상기 식품은 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 또는 건강 기능성 식품류인 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오이풀(*Sanguisorba officinalis* L.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 및/또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인해 체내 지방이 과잉 축적되어 있는 상태를 말하며, 원인으로는 서구화된 식생활, 내분비 장애, 유전적 요인 등이 있다. 비만 자체로만으로도 건강에 문제가 되지만, 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 대사증후군을 일으키는 요인으로도 문제가 되고 있다.

[0003] 최근 현대인들의 생활수준이 향상되면서 전 세계적으로 비만 및 대사질환 환자가 급격히 증가하여 사회적 문제가 되고 있다. 2012년 국민영양건강조사에 따르면, 우리나라의 비만 유병률은 32.8%로 이는 2001년 29.2%에 비해 3.6%나 증가하였다.

[0004] 비만에 대한 예방 및 치료법으로는 식습관 개선과 주기적인 운동이 요구되고 있지만, 현대인의 특성상 비만억제를 위한 주요 노력은 비만치료제 약물과 건강보조 식품에 초점이 맞춰져 있다.

[0005] 비만을 개선하기 위한 약물로서는 식욕을 억제하는 시부트라민(sibutramine)과 체내의 리파아제(lipase)를 억제하여 지방의 흡수를 감소시키는 올리스타트(orlistat)가 있다. 그러나 시부트라민의 경우, 두통, 구강건조, 불면증, 고혈압 등의 부작용이 있고, 올리스타트의 경우 복통, 설사, 지방변, 분실금 등의 부작용이 있다.

[0006] 이에 따라 최근 비만의 예방과 치료를 위해서는 안전하면서도 항비만 효과가 우수한 약물에 대한 연구의 필요성이 제기되고 있으며, 특히 부작용이 적은 천연물을 이용하여 치료제를 찾고자하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 따라서 독성 측면에서 안전한 천연물로부터 비만 및 비만으로 유도된 대사증후군을 효과적으로 예방하거나 개선하는 소재를 개발하고, 그 효능을 과학적으로 검증하고자 하였다.

[0007] 오이풀(*Sanguisorba officinalis* L.)은 중국, 일본, 우리나라 전지역에 널리 분포하고 있으며, 장미과에 속하는 다년생 식물로 그 동속 식물의 뿌리를 생약에서 지유(地楡)라 하고 산과 들, 특히 산비탈의 습기가 적당한 곳에서 많이 자라는 것으로 알려져 있다.

[0008] 오이풀은 식용가능하나 뿌리인 지유에 비해 생리활성에 관한 연구 자료가 매우 미흡한 실정이며, 현재까지 오이풀을 이용한 비만 예방 및 치료에 대한 연구는 보고되지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 오이풀 추출물의 지방 생성 억제, 체중 및 체지방 감소와 혈중 지질 수치 개선 효과를 통해 비만 및 비만으로 유도된 대사증후군의 치료에 우수한 효과가 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 일례는 오이풀의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 비만이나 비만으로 유도된 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 대사증후군 예방 및/또는 개선용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0012] 오이풀 추출물 및/또는 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만이나 비만으로 유도된 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 대사증후군 예방 및/또는 개선용 조성물이 제공된다.

[0013] 오이풀(*Sanguisorba officinalis* L.)은 쌍떡잎식물 이판화군 장미목 장미과의 여러해살이풀로 잎을 자르면 상큼한 오이냄새가 나기 때문에 오이풀이라고 하며, 지유초(地楡草)라고도 부른다. 오이풀은 굵은 뿌리줄기에서 갈라진 뿌리는 양끝이 뾰족한 원기둥 모양으로 굵어지고 원대는 곧게 1 m 정도 자라며 위에서 가지가 갈라진다. 잎은 마디마다 서로 어긋나게 자리하고 있으며 깃털 모양의 겹잎으로 홀수의 잎 조각을 가진다. 일반적으로 잎은 길쭉한 타원형으로 생겼고 끝이 무디며 가장자리에 거친 톱니를 가진다. 꽃은 7~9월에 피고 검붉은색이며 수상꽃차례에 달린다. 꽃이삭은 타원형 또는 거꾸로 선 달걀모양의 타원형이며 위에서부터 꽃이 피기 시작한다. 열매는 수과로 10월에 익고 사각형이며 꽃받침으로 싸여 있다. 오이풀은 식용으로 어린잎을 먹고, 약용으로 뿌리를 지혈제로 쓴다.

[0014] 현재 체지방 억제에 유용한 약용식물 추출물을 포함하는 항비만조성물에 대한 특허를 주식회사 백옥생에서 등록한 바 있다(특허 10-2010-0887916). 이는 삼백초, 옥발, 적하수오 및 지유의 혼합 추출물을 통해 지방 축적을 억제하여 비만 예방 및 개선 효과를 얻었다.

[0015] 따라서 본 발명에서는 현재 진행되어 있지 않은 오이풀 잎과 줄기의 추출물로 비만 및 비만으로 유도된 대사증후군 예방 및/또는 개선 효과를 증명하고자 한다.

[0016] 본 발명에서는 오이풀 추출물 조성물의 비만 및 비만으로 유도된 대사증후군 예방 및/또는 개선 효과를 제공한

다.

[0017] 본 발명의 비만 예방 및 개선 효과는 *in vitro* 시험으로 3T3-L1 지방전구세포에서 지방 생성 및 축적 억제를 통해 항비만 가능성을 확인한 후, *in vivo* 시험으로 C57BL/6J 마우스에서 체중 및 체지방 감소와 혈중 지질 수치 감소를 통해 오이풀 추출물의 항비만 효과가 있음을 입증하였다.

[0018] 본 발명에 따른 오이풀 추출물은 3T3-L1세포에서 우수한 지방 축적 억제 효과를 갖는 것으로 나타났다(**표 1**, **도 6** 및 **도 7**). 전구지방세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포 내에 지방을 축적한다. 오이풀 추출물들을 3T3-L1에 처리하였을 때 50% EtOH 추출물에서 지방세포로의 분화가 억제되었으므로 비만이나 비만과 관련된 대사증후군 예방과 치료 목적으로 이용될 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 오이풀 추출물은 C57BL/6J 마우스에서 체중과 체지방의 감소 효과를 갖는 것으로 나타났다(**표 3** 및 **도8**). 시험군은 ND(Normal Diet)군, HFD(High Fat Diet)군, HFD+R200군, HFD+S100군, HFD+S200군으로 나누었다. 시험 기간 동안 체중을 측정하였고, 시험 종료 후 장기를 해부하였다. HFD군과 비교하였을 때 HFD+S200군의 체중이 가장 많이 감소되었고, HFD+R200군과 HFD+S100군이 다음으로 감소되었다. 부고환 지방의 무게도 HFD+S200군이 가장 많이 감소되고, 다음으로 HFD+R200군과 HFD+S100군이 감소되어, 체중과 비슷한 경향을 보였다. 따라서 오이풀 50% EtOH 추출물은 체중과 체지방 감소 효과가 우수하여 비만이나 비만으로 유도된 대사증후군 예방과 치료 목적으로 이용될 수 있음을 확인하였다. 또한 동일한 200 mg/kg 농도에서 오이풀 추출물이 지유 추출물보다 체중 및 체지방 감소 효과가 더 우수한 것도 확인하였다.

[0020] 본 발명에 따른 오이풀 추출물은 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청 내 triglycerides(TG), total cholesterol(TC), high density lipoprotein-cholesterol(HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol(LDL-C) 농도를 측정하였을 때, TG, TC, LDL-C 수치 모두 ND군을 제외하고 HFD+S200군이 가장 낮았고, 다음으로 HFD+R200군과 HFD+S100군이 낮았다(**표 4**). 이를 통해 오이풀 50% EtOH 추출물이 혈청 지질 수치를 개선함으로써 비만이나 비만과 관련된 대사증후군 예방과 치료 목적으로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0021] 본 발명의 조성물은 유효성분인 오이풀 추출물 외에, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다. 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 오이풀 추출물 또는 분획물 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위 또는 리코리시딘 100 중량부 당 100 내지 10,000,000 중량부 범위에서 추가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 상기 조성물 내의 상기 오이풀 추출물의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50중량%인 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0023] 상기 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0024] 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도 한 가지 이상의 부형제 및/또는 윤활제 등을 포함할 수 있다.경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.

[0025] 상기 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 보다 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분을 기준으로 1일 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg으로 하는 것이 좋으나 이에 제한되는 것은 아니다.투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 유효성분의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0026] 또 다른 예에서, 상기한 바와 같은 오이풀 추출물을 포함하는 비만 및 비만과 관련된 대사증후군의 예방 및/또는 개선용 조성물이 제공된다. 본 발명에서 식품은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의미로 사용된다. 상기 식품의 예로서 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 또는 음료첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0027] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0028] 또한, 상기 식품에 있어서, 상기 오이풀 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 식품이 음료인 경우에는 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 오이풀 추출물을 포함하는 조성물은 비만 및 비만으로 유도된 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 대사증후군의 치료 효과가 우수하면서도 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 조성물이므로, 비만 및 비만으로 유도된 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 대사증후군의 치료에 보다 안전하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 오이풀 물 추출물의 세포생존능력 시험에 관한 것이다.

도 2는 오이풀 30% EtOH 추출물의 세포생존능력 시험에 관한 것이다.

도 3은 오이풀 50% EtOH 추출물의 세포생존능력 시험에 관한 것이다.

도 4는 오이풀 70% EtOH 추출물의 세포생존능력 시험에 관한 것이다.

도 5는 오이풀 100% EtOH 추출물의 세포생존능력 시험에 관한 것이다.

도 6은 3T3-L1 세포에서 오이풀 추출물 처리에 따른 TG 축적량을 나타낸 것이다.

도 7은 3T3-L1 세포에서 오이풀 추출물 처리했을 때 축적된 TG를 Oil red O 염색하여 광학현미경으로 관찰한 것이다.

도 8은 C57BL/6J 마우스에서 오이풀 추출물을 투여했을 때 시험 기간 동안의 체중변화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하도록 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 대표적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0032] **재료준비**

[0033] 오이풀(*Sanguisorba officinalis* L.)은 강원도 인제에서 채취하여 시료로 사용하였다. DMSO(dimethyl sulfoxide), MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide), Oil Red O는 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였고, TG(triglyceride), TC(total cholesterol), HDL-C(high density lipoprotein cholesterol), LDL-C(low density lipoprotein cholesterol)은 Thermo(USA)로부터 구입하여 사용하였고, 그 외 분석에 사용된 모든 시약은 특급을 사용하였다.

[0034] **시료 제조예**

[0035] 본 발명의 오이풀 추출물은 건조된 오이풀 무게 1000 g의 10배의 여러 가지 용매(물, 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 100% EtOH)를 가하고 수용액상에서 50~90℃에서 3시간 추출한 다음 이를 여과하여 추출액을 얻는다. 추출하는 과정을 3회 반복한다. 얻어진 추출액을 50℃이하에서 감압 농축한 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물을 얻는다. 3T3-L1세포에는 오이풀 추출물을 DMSO에 용해하여 처리하였고, C57BL/6J 마우스에는 생리식염수에 용해하여 현탁액 상태로 경구 투여하였다.

[0036] **실시예 1. 3T3-L1 지방전구세포 배양 및 분화**

[0037] 3T3-L1 지방전구세포(ATCC, Manassas, VA, USA)는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Lonza, Allendale, NJ, USA)에 10% calf serum(CS, Gibco, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin(P/S, Gibco, Grand Island, NY, USA)을 혼합하여 5% CO_2 37℃ 조건에서 배양하였다.

[0038] 지방세포 분화는 24 well plate에 1×10^5 cell/mL로 분주한 후 100% confluent 상태로 되면 2일 간 더 유지하였다. 2일 후 0.5 mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 μM Dex(dexamethasone, Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 ㎍/mL Insulin(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 포함하는 10% fetall bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) DMEM 배지로 2일 동안 분화를 유도하였다. 2일 후 10 ㎍/mL Insulin을 포함하는 10% FBS DMEM 배지로 2일 간 더 유지하고, 그 후 2일 마다 4일 동안 10% FBS DMEM 배지로 교환하였다. 오이풀 추출물은 분화유도물질 처리할 때부터 첨가하였다.

[0039] **실시예 2. MTT를 이용한 세포생존능력 측정**

[0040] 본 실시예2에서는 오이풀 추출물이 지방세포의 생존에 독성을 나타내는지 확인하였다. 탈수소 효소 작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 비수용성 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용한 시험법이다. 24 well plate에 3T3-L1 지방전구세포를 5×10^4 cell/mL로 분주하여 5% CO_2, 37℃ 조건에서 배양하였다. 24시간 후 오이풀 각 추출물을 0, 50, 100, 200 ㎍/mL로 첨가하고 24시간을 더 배양하였다. 2 mg/mL MTT 용액을 처리하고 4시간동안 반응시킨 뒤 배지를 제거하고 DMSO로 용해한 다음 ELISA reader기를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다

[0041] 상기 얻어진 결과를 **도 1, 도 2, 도 3, 도 4 및 도 5**에 나타내었다. 3T3-L1 지방전구세포에 오이풀의 추출물을 각각 0, 50, 100, 200 ㎍/mL 농도로 처리한 후 세포생존능력을 측정한 결과, 물, 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 100% EtOH 추출물 모두 대조군과 비교하였을 때 세포생존률이 통계학적으로 유의적인 차이를 나타나지 않았으므로 200 ㎍/mL까지는 독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0042] **실시예 3. Oil red O 염색을 통한 TG 함량 측정**

[0043] 본 실시예3에서는 3T3-L1세포의 분화에서 형성되는 중성지방을 특이적으로 염색시키는 Oil Red O용액을 통해 오이풀 추출물의 지방세포 분화 및 지방생성 억제를 확인하였다. 분화 종료 후 배지를 제거하고 PBS(Posphate Buffered Saline)로 2회 세척한 후 4% formaldehyde로 30분 동안 상온에서 고정하였다. 고정 후 60% isopropanol로 세척하고 0.2% oil red O(dissolved in 60% isopropanol)으로 1시간 동안 상온에서 염색하였다.

염색 후 증류수로 세척한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 염색한 세포는 isopropanol로 용해한 다음 ELISA reader기를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다

[0044] 상기 얻어진 결과를 **표 1**, **도 6** 및 **도 7**에 나타내었다. 오이풀 50% EtOH 추출물은 100 ㎍/mL농도에서 MDI와 비교하였을 때 중성지방축적률이 84.3%이며, 통계학적으로도 유의적인 차이를 보였다. 이를 통해 오이풀 추출물 중에 50% EtOH 추출물이 지방세포로의 분화와 중성지방의 생성을 억제하는 효과가 가장 우수한 것으로 확인되었다.

표 1

[0045]

Sanguisorba officinalis L. (100 ㎍/mL)	TG accumulation (%)
Control	57.181.47[a]
MDI	1003.07[c]
Water ex.	119.703.14[d]
30% EtOH ex.	135.242.31[e]
50% EtOH ex.	84.263.06[b]
70% EtOH ex.	103.663.82[c]
100% EtOH ex.	151.812.36[f]

[0046] **실시예 4. 동물실험설계**

[0047] 5주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)의 수컷 C57BL/6J 마우스를 중앙실험동물(주)(Jung-Ang Lab. Animal, Inc, Seoul, Korea)을 통하여 공급받아 사용하였다. 식이는 일반식이(10% kcal fat)과 고지방식이(60% kcal fat)를 공급하였으며, 조성은 **표 2**에 나타내었다. 마우스는 각 군당 8마리씩, 총 5군으로 나누었다. 즉, ND군(10% kcal fat 식이를 공급받는 Normal Diet군), HFD군(60% kcal fat 식이를 공급받는 High Fat Diet군), HFD+R200군(60% kcal fat식이와 지유 50% EtOH 추출물 200 mg/kg 공급받는 시험군), HFD+S100군(60% kcal fat식이와 오이풀 50% EtOH 추출물 100 mg/kg 공급받는 시험군), HFD+S200군(60% kcal fat식이와 오이풀 50% EtOH 추출물 200 mg/kg 공급받는 시험군) 으로 나누었다. 2주간 고지방식이를 공급하여 비만을 유도한 후 8주간 각 추출물을 경구 투여하였으며, 각 투여물질은 생리식염수에 녹여 매일 1회 동일한 시간에 투여하였고, 대조군에는 생리식염수만 투여하였다.

[0048] 실험동물은 온도 20.9~22.6℃, 상대습도 45~55%, 환기회수 및 방식 10~15회/시간, 전배기방식, 조명시간 12시간(08:00~20:00) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(278×420×200 mm, 쓰리샤인, 금산)에 4마리씩 수용하였다.

표 2

[0049]

Ingredient	10% Kcal Fat	60% Kcal Fat
Casein, 80 Mesh	800	800
L-Cystine	12	12
Corn Starch	1260	0
Maltodextrin10	140	500
Sucrose	1400	275.2
Cellulose, Bw200	0	0
Soybean Oil	225	225
Lard	180	2205
Mineral Mix	0	0
DiCalcium Phosphate	0	0
Calcium Carbonate	0	0
Potassium Citrate, 1 H2O	0	0

Vitamin Mix	40	40
Choline Bitartrate	0	0
Total Kcal	4057	4057

[0050] **실시예 5. 체중 변화, 식이섭취량, 장기무게 측정**

[0051] 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스를 이용하여 오이풀 50% EtOH 추출물의 체중 및 체지방 감소 효과를 확인하였다. 체중과 식이섭취량을 주 1회 측정하였고, 시험기간 종료 후 해부하여 부고환 무게를 측정하였다.

[0052] 상기 얻어진 결과를 **표 3** 및 **도 8**에 나타내었다. 체중증가량은 HFD군이 가장 크고, HFD+R200군과 HFD+S100군이 다음으로 크며, 두 군은 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 HFD+S200군이 ND군 다음으로 체중증가량이 작았다. 칼로리 섭취량은 ND군을 제외한 나머지 군은 통계학적 유의성이 없었으며, 이를 통해 오이풀 추출물이 식욕을 억제하는 것 보다 지방 합성을 억제하거나 지방 분해를 촉진하는 것으로 예측되었다. 또한 동일한 200 mg/kg 농도에서 오이풀 추출물이 지유 추출물보다 체중 및 체지방 감소 효과가 좋았으며, 오이풀 추출물의 항비만 효과는 농도의존적인 것으로 확인되었다.

표 3

[0053]

Parameters	Group				
	ND	HFD	HFD+R200	HFD+S100	HFD+S200
Initial body weight (g)	20.410.82^{a}	20.810.90^{a}	20.530.84^{a}	20.790.58^{a}	20.290.41^{a}
Final body weight (g)	30.841.94^{d}	46.852.39^{a}	41.631.55^{b}	41.741.45^{b}	36.862.71^{c}
Body weight gain (g)	10.432.04^{d}	26.051.74^{a}	21.091.04^{b}	20.950.98^{b}	16.572.56^{c}
Calorie intake (kcal/day)	10.070.47^{b}	12.480.29^{a}	12.200.63^{a}	12.230.54^{a}	12.100.49^{a}
Liver (g/100g body weight)	3.370.18^{a}	2.740.12^{b}	2.600.03^{b}	2.260.14^{b}	2.670.15^{b}
Kidney (g/100g body weight)	1.040.12^{a}	0.790.10^{b}	0.800.05^{b}	0.790.04^{b}	0.800.06^{b}
Epididymis fat (g/100g body weight)	3.390.64^{c}	6.580.26^{a}	6.410.42^{ab}	6.310.47^{ab}	5.690.40^{b}

[0054] **실시예 6. 혈액생화학적 검사**

[0055] 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스의 혈액을 이용하여 오이풀 50% EtOH 추출물의 지질 대사 개선 효과를 확인하였다. 실험종료 후 마우스로부터 채취한 혈액을 분리하고, 혈청으로 혈액 생화학 분석기기(KoneLab 20, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Finland)를 이용하여 triglycerides(TG), total cholesterol(TC), high density lipoprotein-cholesterol(HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol(LDL-C)을 측정하였다.

[0056] 상기 얻어진 결과를 **표 4**에 나타내었다. 혈액 내 TG, TC 농도는 HFD+S200군이 ND군 다음으로 낮았고, HFD+R200군과 HFD+S100군은 HFD군과 통계학적으로 유의적 차이가 보이지만, 두군 사이는 유의성이 나타나지 않았다. 혈액 내 HDL-C 농도는 ND군을 제외하고 나머지 군들은 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, LDL-C 농도는 ND군 다음으로 HFD+S200군이 가장 낮고, HFD+R200군과 HFD+S100군이 그 다음 낮았으며, 두 군은 서로 통계학적으로 유의적인 차이가 없었다. 혈관에 쌓인 불필요한 콜레스테롤을 간으로 운반하는 HDL-C는 고지방 식이를 먹인 모든 군에서 차이가 없었지만, 혈관에 쌓여 동맥경화를 유발하는 LDL-C는 오이풀 추출물을 제공한 군에서 농도 의존적으로 감소하였으며, 지유 추출물 200 mg/kg 농도와 비교하였을 때도 오이풀 200 mg/kg 투여군은 통계학적으로 유의적인 감소를 나타낸 것을 확인하였다. 따라서 오이풀 추출물은 TG, TC, 및 LDL-C를 감소시킴으로써 혈중 지질수치를 개선하고, 이를 통해 심혈관 질환의 발병 위험률을 낮출 수 있음을 확인하였다.

표 4

[0057]

Serum	Group				
	ND	HFD	HFD+R200	HFD+S100	HFD+S200
TG (mg/dL)	66.633.77^{c}	94.714.80^{a}	80.823.41^{b}	80.983.22^{b}	74.938.90^{bc}
TC (mg/dL)	112.733.78^{c}	163.696.32^{a}	152.3111.78^{ab}	152.2312.13^{ab}	139.606.15^{b}
HDL-C (mg/dL)	73.494.27^{b}	109.135.15^{a}	107.884.39^{a}	109.045.80^{a}	112.823.10^{a}
LDL-C (mg/dL)	9.471.72^{d}	29.542.11^{a}	24.142.76^{b}	24.871.86^{b}	20.391.96^{c}

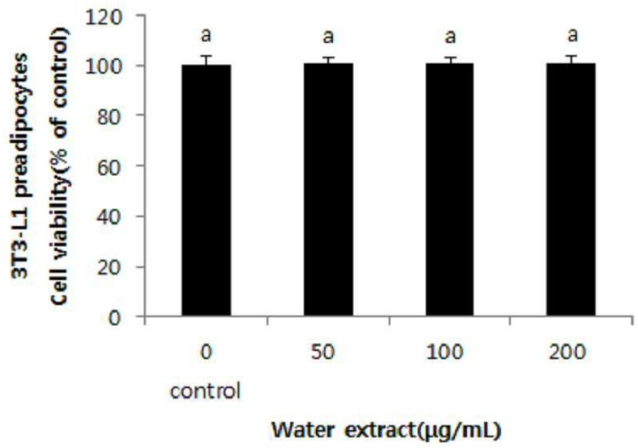
[0058] 연구결과를 종합해보면, 오이풀 추출물은 3T3-L1 세포에서 지방 생성 및 축적 억제 효과가 있고, C57BL/6J 마우스에서 체중 및 체지방 감소와 혈청 지질 수치 개선 효과가 있어 항비만 효과가 우수한 것으로 사료된다.

[0059] **통계처리**

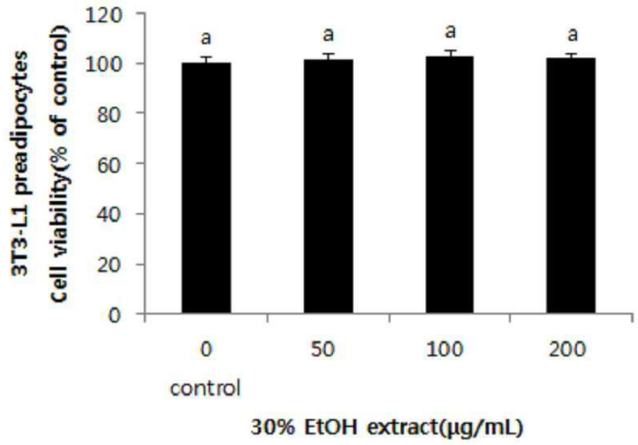
[0060] 모든 자료의 통계분석은 SAS 통계 프로그램(SAS institute, 1987)을 이용하여 분석하였으며, 분석결과는 실험군당 평균과 표준오차로 나타냈다. 처리군 간의 유의성은 Duncans multiple range test로 $p<0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

도면

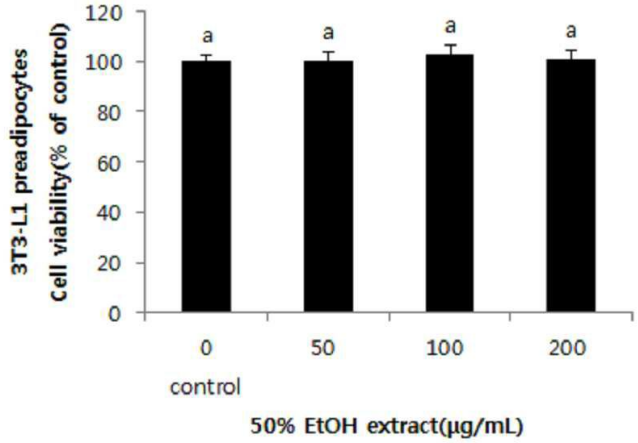
도면1



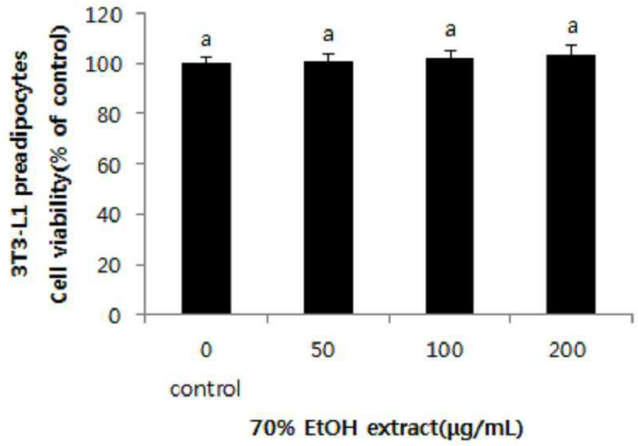
도면2


3T3-L1 preadipocytes
Cell viability(% of control)
120
100
80
60
40
20
0
a
a
a
a
0
50
100
200
control
30% EtOH extract(μg/mL)

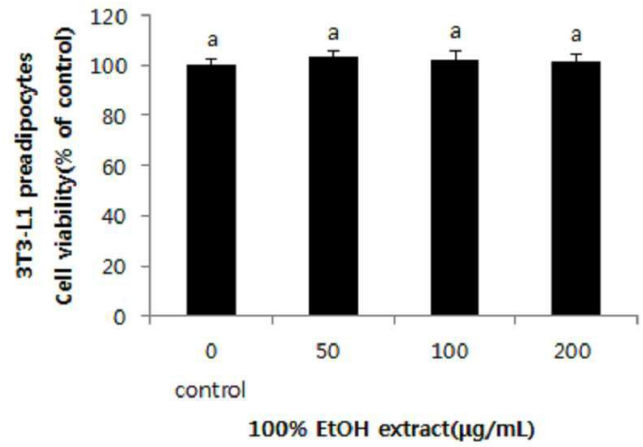
도면3


3T3-L1 preadipocytes
Cell viability(% of control)
120
100
80
60
40
20
0
a
a
a
a
0
50
100
200
control
50% EtOH extract(μg/mL)

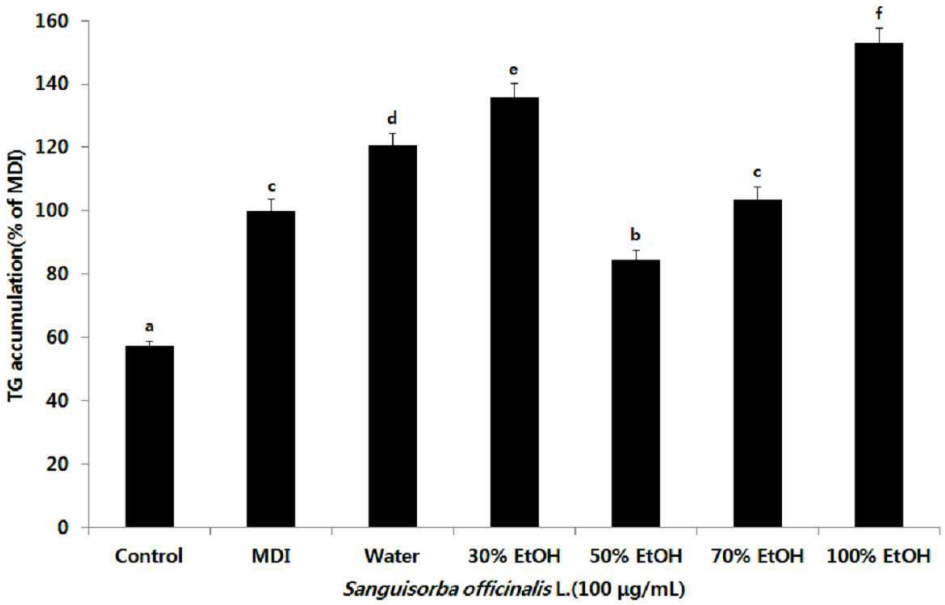
도면4


3T3-L1 preadipocytes
Cell viability(% of control)
120
100
80
60
40
20
0
a
a
a
a
0
50
100
200
control
70% EtOH extract(μg/mL)

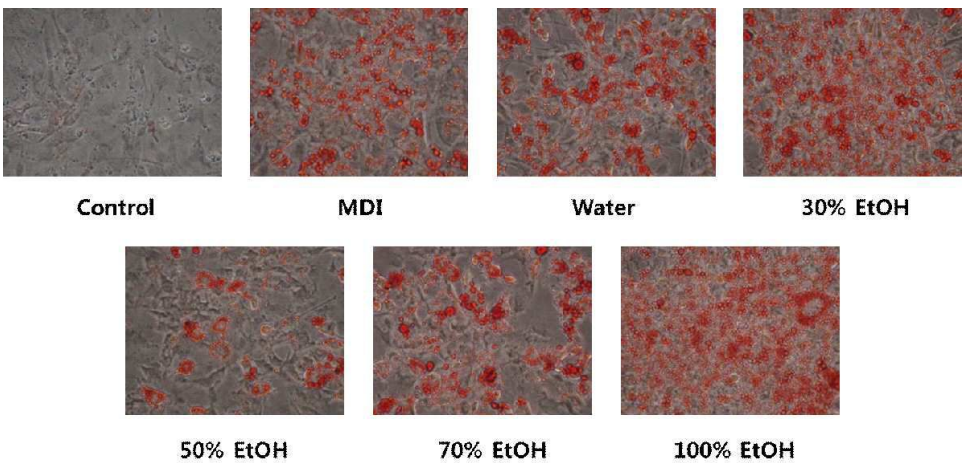
도면5


3T3-L1 preadipocytes
Cell viability(% of control)
120
100
80
60
40
20
0
a
a
a
a
0
50
100
200
control
100% EtOH extract(μg/mL)

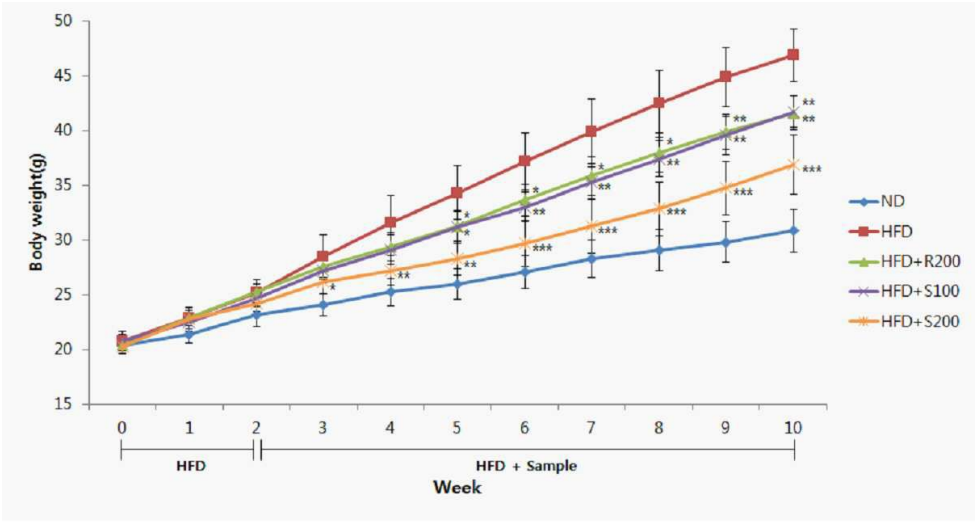
도면6


TG accumulation(% of MDI)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
a
c
d
e
b
c
f
Control
MDI
Water
30% EtOH
50% EtOH
70% EtOH
100% EtOH
Sanguisorba officinalis L.(100 μg/mL)

도면7


Control
MDI
Water
30% EtOH
50% EtOH
70% EtOH
100% EtOH

도면8


Body weight(g)
50
45
40
35
30
25
20
15
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
HFD
HFD + Sample
Week
ND
HFD
HFD+R200
HFD+S100
HFD+S200