



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0105343
(43) 공개일자 2022년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) A23K 20/10 (2016.01)
A23L 13/00 (2016.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0653 (2013.01)
A23K 20/10 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2021-0007918
(22) 출원일자 2021년01월20일
심사청구일자 2021년01월20일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이승호
인천광역시 연수구 해돋이로84번길 30 송도금호어
울림아파트 103동 404호
(74) 대리인
차준용

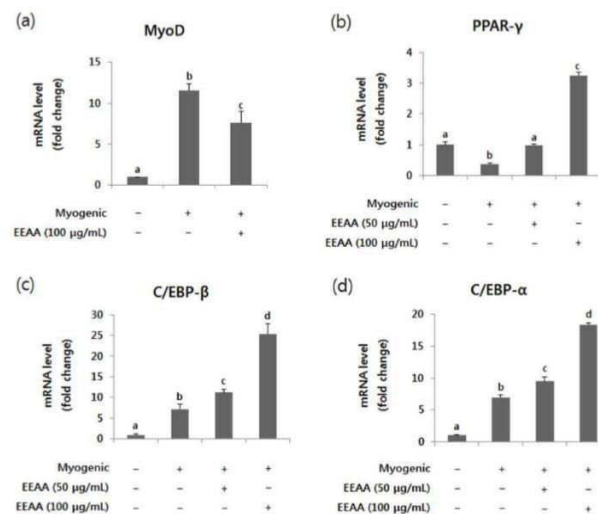
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 미후도 에탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화를 유도하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 미후도 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Actinidia arguta, EEAA)을 유효성분으로 포함하는 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도할 수 있는 조성물에 관한 것으로서, EEAA의 처리는 근육세포가 근관세포로 분화하는 것을 억제하였고, Oil Red O 염색을 통하여 지방세포로 분화는 근아세포의 수와 비율이 증가한 것을 확인하였다. 위와 같은 실험 결과를 통하여 EEAA가 근육세포에서 지방세포 혹은 지방 유사세포로 전환분화를 조절할 수 효능이 있음을 확인하였다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23L 13/00 (2016.08)

C12N 2500/76 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2506/1323 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345313226
과제번호	2016R1D1A1B01009729
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	광노화에 현상에 대한 한의학적 치료기술 개발 및 기전연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2016.06.01 ~ 2022.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

미후도 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Actinidia arguta, EEAA)을 유효성분으로 포함하는 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미후도 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Actinidia arguta, EEAA)은 근육세포가 근관세포로 분화하는 것을 억제하는 것을 특징으로 하는 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미후도 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Actinidia arguta, EEAA)은 myogenic marker인 MyoD의 mRNA 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 미후도 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Actinidia arguta, EEAA)은 adipogenesis marker인 C/EBP- β , C/EBP- α , PPAR- γ 의 mRNA 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 근육세포는 C2C12 근아세포인 것을 특징으로 하는 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물.

청구항 6

상기 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물을 이용하여 배양함으로써, 자연 지방조직이 생성된 인공육.

청구항 7

상기 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물을 포함하는 고급육 생산을 위한 사료 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미후도 에탄올 추출물(ETHANOL EXTRACTS OF ACTINIDIA ARGUTA, EEAA)을 유효성분으로 포함하여 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화를 유도할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 근육생성과 지방생성에 관한 연구는 건강과 밀접한 관련이 있어 꾸준히 연구 중에 있다. 근육세포와 지방세포는 같은 배아 줄기세포로부터 유래되기 되기 때문에 서로 간의 전환분화가 가능하다.

[0003] 따라서 전환분화를 조절하여 근육생성과 지방생성을 조절할 수 있다면 병리학적, 약리학적으로 의미가 있을 것으로 예상된다. 이러한 전환분화를 조절할 수 있는 물질로 천연물이 손꼽히고 있다.

[0004] 한편, 많은 근육과 관련한 질병들이 이소성 지방 생성에 의해 발병하기도 하며, 근육생성과 지방생성에 대한 연구는 건강과 항상 밀접하여 꾸준한 연구 중에 있다. 또한 마블링 증가 등 고급육 생산과 관련된 축산물 산업에도 매우 중요하다. 따라서 근육세포와 지방세포 간의 전환분화에 대한 연구는 꾸준히 진행중에 있으며, 이를 조절할 수 있는 물질에 대한 관심 또한 꾸준히 증가하고 있다. 전환분화를 조절할 수 있는 가능성이 있는 물질들 가운데 천연물이 손꼽히고 있다. 천연물은 항산화나 항 노화, 항암효과 등의 이미 여러 분야에서 이미 신약 및 건강 증진 물질 등에 이용 중에 있다. 또한 천연물은 자연에서 직접 얻은 물질이기 때문에 일반적으로 합성된 물질들에 비하여 부작용이 덜하다는 장점도 있다.

[0005] 미후도(Actinidia arguta)는 다래나무과 식물인 다래나무의 익은 열매를 말린 것이다. 신경, 위경에 작용하며 해열효과와 이뇨효과가 있으며, 치질이나 황달 등의 치료에도 전통적으로 이용되어 왔다. 최근 연구들을 살펴보면 Actinidia arguta을 이용하여 다양한 생리활성 효과를 입증하였다.

[0006] 미후도(Actinidia arguta)는 전통적으로 사용되어 왔던 천연물 약재로써 항암 효과, 항산화 효과 등의 약리학적 효과가 입증되었다.

[0007] 하지만 근육세포와 지방세포 간의 전환분화의 조절에 대한 연구는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1663971호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 미후도 에탄올 추출물(ETHANOL EXTRACTS OF ACTINIDIA ARGUTA, EEAA)을 유효성분으로 포함하여 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화를 유도할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 실시예로 미후도 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Actinidia arguta, EEAA)을 유효성분으로 포함하는 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 미후도 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Actinidia arguta, EEAA)은 근육세포가 근관세포로 분화하는 것을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 상기 미후도 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Actinidia arguta, EEAA)은 myogenic marker인 MyoD의 mRNA 발현을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 미후도 에탄올 추출물(Ethanol extracts of Actinidia arguta, EEAA)은 adipogenesis marker인 C/EBP- β , C/EBP- α , PPAR- γ 의 mRNA 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

- [0014] 상기 근육세포는 C2C12 근아세포인 것을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명의 다른 실시형태에 따르면, 상기 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물을 이용하여 배양함으로써, 자연 지방조직이 생성된 인공육을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 실시형태에 따르면, 상기 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물을 포함하는 고급육 생산을 위한 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명을 통하여 EEAA의 근아세포의 지방세포 혹은 지방유사세포로의 전환분화 효능을 확인하였다. 먼저 다른 부작용이 없도록 독성이 없는 적정수준의 EEAA를 사용하였다. 근아세포에서는 myogenic 분화진행 시 근관세포로의 분화가 일어나지만 EEAA 처리 시 근관세포로 분화하는 비율이 감소하였으며, 지방세포 혹은 지방유사세포로 전환분화가 일어나는 비율이 증가함을 현미경을 통한 근관세포 형성 감소와 Oil Red O 염색을 통하여 붉은색으로 염색되는 지질의 증가를 통해 확인하였다. 이는 myogenesis marker인 MyoD의 발현감소와 adipogenesis marker인 PPAR- γ , C/EBP- β , C/EBP- α 발현 증가 등에 의한 것임을 확인하였다.
- [0019] 미후도는 이미 항산화, 항암 등의 여러 병리효과를 입증하였으며 꾸준히 천연물 소재로 이용 중에 있다. 이러한 미후도를 통하여 아직 밝혀지지 않은 근육세포의 지방세포로의 전환분화 실험을 진행하여 전환분화 효과가 있음을 밝혔다.
- [0020] 즉, 기존의 세포 배양으로부터 개발되고 있는 인공육의 경우 근내지방의 부족으로 향미 및 부드러움을 재현할 수 없어 근육이 만들어진 후 인위적으로 지방을 섞어 사용할 수 밖에 없는 한계점을 보유하고 있는 반면, 본 발명에 따른 EEAA는 세포 배양으로부터 생산할 수 있는 인공육 개발 과정에서 자연 지방조직을 생성할 수 있는 소재로 사용할 수 있어 고부가가치 인공육생산에 필수 소재로 사용될 수 있다.
- [0021] 또한, 국내 한우를 비롯하여 고급육 생산을 위해 근내지방 함량의 비율을 높이는 사양법 및 사료 개발시, 본 발명에 따른 EEAA는 마블링이 우수한 고급육 생산을 위해 사료 첨가제로 급여하여 근내지방 축적을 향상 시킬 수 있는 주요 소재로 사용될 수 있어, 한우 및 여러 소의 고급육 생산을 위한 주요 소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 EEAA 농도에 따른 C2C12 근아세포의 생존율을 나타내는 도면이다(***는 대조군과 유의미한 차이가 있음을 나타냄).
- 도 2는 Myogenic 분화시 EEAA 처리에 따른 근관세포 형성 감소를 나타내는 도면이다(상기한 문자는 그룹간에 유의미한 차이를 나타냄, $P<0.05$).
- 도 3은 Oil Red O 염색을 통한 C2C12 근아세포의 지방세포로의 전환분화를 확인한 도면이다(상기한 문자는 그룹간에 유의미한 차이를 나타냄, $P<0.05$).
- 도 4는 Myogenic 분화시 EEAA 처리에 따른 Myogenesis와 Adipogenesis marker의 발현 변화를 나타내는 도면이다(상기한 문자는 그룹간에 유의미한 차이를 나타냄, $P<0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0025] 실시예

- [0026] 1.1. 연구 재료 및 방법

- [0027] 1.1.1. 약제

- [0028] 본 실험에서 사용한 EEAA는 한국식물추출물은행에서 구매하여 사용하였다. 미후도 생약을 분말화 한 후 95% 에틸알코올에 넣고 밀봉한 후 실온에서 24시간 동안 두었다. 상기 추출을 3회 반복하였으며 그로부터 얻은 상층액

을 여과 및 농축하였다. 추출물은 동결건조기(Biotron, Clean-vac 12)로 24시간 건조하여 제조하였다. 제조된 약제는 10% DMSO에 녹여서 실험에 사용하였다.

[0029] 1.1.2. 시약 및 기기

[0030] 본 연구에서 사용된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)과 Antibiotic/Antimycotic 은 Hyclone (Logan, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) 배지와 태아 소 혈청 (Fetal Bovine Serum), 소 혈청 (Bovine Serum), 말 혈청 (Horse Serum), 0.25% 트립신-EDTA는 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구매하였다. 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), Dexamethasone, ITS Liquid Media Supplement, 단백질 가수분해효소 억제 혼합물, Oil Red O 용액은 Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA)에서 구매하였다. Water soluble tetrazolium salts-1 (WST-1)은 EZ-Cytox (Daeilbio, South Korea)에서 구매하였고, TRIZOL® Reagent은 ambion (AllenWay, USA)에서 구매하였다. ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover, SYBR® Green Realtime PCR Master Mix은 TOYOBO (Osaka, Japan)에서 구매하였다. 아크릴 아마이드 용액은 Tech & Innovation (Gangwon, South Korea)에서 구입하였으며, Polyvinylidene fluoride 멤브레인과 ECL 용액은 Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)에서 구매하였고, MEDICAL X-RAY 필름은 AGFA (Mortsel, Belgium)에서 구매하였다. Realtime PCR 실험에 사용한 모든 Primer 들은 아래의 표 1에 정리하였다.

[0031] 본 연구에서 사용한 기기는 Microplate Absorbance Reader (iMark™ Microplate Reader, Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, USA), Micro Centrifuges 1730R (LABOGENE, Seoul, South Korea), 100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA), CFX Connect™ Real-time system Optics module, PowerPac Basic™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), Power supply (i-MyRun, Cosmobio, USA), LEICA DM IL LED microscope (Leica-MICROSYSTEMS, Wetzlar, Germany), Nikon Eclipse Ti-S microscope (Nikon, Minato, Japan), Automatic X-RAY film processor (JPI Healthcare, Seoul, Korea) 등을 사용하였다.

표 1

Gene	Direction	Sequence	Product length (bp)
¹ PPAR-γ	Forward	5'-CGCTGATGCACTGCCTATGA-3'	101
	Reverse	5'-AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC-3'	
² C/EBP-β	Forward	5'-ACTTCAGCCCTACCTGGAG-3'	86
	Reverse	5'-GAGGTCTGGAGAGGAAGTCGT-3'	
³ C/EBP-α	Forward	5'-AGGTGCTGGAGTTGACCACT-3'	224
	Reverse	5'-CAGCCTAGAGATCCAGCGAC-3'	
⁴ MyoD	Forward	5'-CCGTGTTTCGACTCACCAGA-3'	110
	Reverse	5'-ACCGCAGTAGAGAAGTGTGC-3'	
⁵ GAPDH	Forward	5'-AAGCTGTGGCGTGATGGC-3'	82
	Reverse	5'-TGACCTTGCCCACAGCCT-3'	

[0034] ¹ PPAR- γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

[0035] ² C/EBP-β : CCAAT/enhancer-binding protein beta

[0036] ³ C/EBP- α : CCAAT/enhancer-binding protein alpha

[0037] ⁴ MyoD : Myoblast determination protein 1

- [0038] ⁵GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- [0040] 1.1.3. 세포 배양
- [0041] 마우스 근아세포인 C2C12 세포는 한국세포주은행 (Seoul, South Korea)에서 분양 받았으며, DMEM 배지에 10% (v/v) 태아 소 혈청, 1% (v/v) Antibiotic/Antimycotic을 첨가하여 배양에 사용하였다. 배양조건은 온도 37℃, 5% CO₂ 가 포함된 배양기 내에서 배양하였다.
- [0042] 1.1.4. 세포 생존율 평가
- [0043] C2C12 근아세포는 5×10^3 cells/well의 수로 96-well plate에 분주하고, 48시간 배양 시켜 80% confluence한 상태를 만들었다. 이후 각 세포들에 대하여 약제들을 농도별로 (0-1000 μ g/mL) 처리한 후 24시간 동안 배양 하였다. WST-1을 10 μ L씩 각 well에 처리한 후 40분 동안 배양하였다. Microplate reader (iMark™ Microplate Reader, Bio-red laboratories, Inc., USA)를 이용하여 450 nm 흡광도에서 비교하였다.
- [0044] 1.1.5. 세포 분화
- [0045] C2C12 근아세포를 0.6×10^5 cells/well을 6-well plate에 분주하고 48시간 배양 후 80% confluence한 상태로 만든 뒤 myogenic 분화배지(DMEM, 2% (v/v) 말 혈청, 1% (v/v) Antibiotic/Antimycotic)와 adipogenic 분화배 지로 (DMEM&F12, 10% (v/v) 태아 소 혈청, 1% (v/v) Antibiotic/Antimycotic, Dexamethasone 1 μ M, IBMX 0.5 mM, Insulin 10 μ g/mL) 변경해주었다. Myogenic으로의 분화는 myogenic 분화배지를 2일마다 새로운 myogenic 분화배지로 변경해주었으며 총 7일간 분화를 진행한 후 실험에 사용하였다. Adipogenic으로의 분화는 adipogenic 분화배지로 2일간 배양한 후 adipogenic 유지배지로 (DMEM&F12, 10% (v/v) 태아 소 혈청, 1% (v/v) Antibiotic/Antimycotic, Insulin 10 μ g/mL) 5일 동안 더 배양하여 총 7일간 분화를 진행 한 후 실험에 사용 하였다.
- [0046] 1.1.6. Oil Red O 염색
- [0047] 상술한 바와 같이 상기 C2C12 근아세포는 7일간 분화 및 전환분화를 진행한 후 실험에 사용하였다. 대조군 그룹 은 분화배지 및 유지배지 외에 아무 처리도 하지 않았으며 실험군 같은 경우는 분화배지와 유지배지를 넣어줄 때 추가로 EEAA를 100 μ g/mL의 농도로 넣어주었다. 각 조건으로 분화시킨 세포를 4% 포르말데히드 용액 2 mL을 넣어준 후 5분간 실온에 두었다. 이후 새로운 4% 포르말데히드 용액 2 mL을 넣어준 후 40분간 세포를 고정시켰 다. 고정 시킨 후 60% Isopropyl alcohol을 이용하여 1회 세척하였다. 세척 후 세포를 완전히 말린 후 Oil Red O working solution을 통하여 60분간 세포를 염색하였다. 염색 후 염색액을 제거하고 D.W를 이용하여 3회 세척 후 완전히 말린 다음 현미경을 통하여 각 세포의 분화 정도를 관찰하였다.
- [0048] 1.1.7. 실시간 중합효소 연쇄 반응 (qRT-PCR)
- [0049] 상기 C2C12 근아세포는 상술한대로 7일간 분화 및 전환분화를 진행한 후 실험에 사용하였다. 대조군 그룹은 분 화배지 및 유지배지 외에 아무 처리도 하지 않았으며 실험군 같은 경우는 분화배지와 유지배지를 넣어줄 때 추 가로 EEAA를 100 μ g/mL의 농도로 넣어주었다. 각 조건으로 분화시킨 세포를 차가운 PBS로 1회 세척한 후 Trizol을 처리하여 RNA를 추출하였다. cDNA 합성을 위하여 총 2000 ng의 RNA를 사용하였고, 역전사 과정은 ReverTra Ace® qRCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan)을 사용하여 진행하였다. cDNA 합성 이후 qRT-PCR은 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)를 이용하여 진행하였으며, 94℃에서 3분 반응시킨 후 94℃에서 15초, 55℃에서 20초, 72℃에서 40초씩 40회, 95℃에서 10초, 65℃에서 5초, 95℃에서 5초 반응시키는 조건으로 증폭하였다.
- [0051] **결과**
- [0052] 2.1. C2C12 근아세포의 전환분화
- [0053] 2.1.1. EEAA 처리에 따른 세포 생존율 평가
- [0054] C2C12 근아세포에서 세포 생존율을 확인하기 위하여 EEAA의 농도를 달리하여 WST-1 assay을 실시하였다. EEAA (0-1000 μ g/mL)을 세포에 처리하였을 때, 특정 농도 (200 μ g/mL) 이상에서 세포 독성을 나타내는 것을 확인하

였으며, 200 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다 (도 1) (***)는 대조군과 유의미한 차이가 있음을 나타냄). 따라서 세포 실험은 세포에 독성을 미치지 않는 수준인 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 진행하였다.

[0055] 2.1.2. EEAA 처리에 따른 근관세포 형성 감소 및 지방세포로의 전환분화

[0056] EEAA을 분화배지와 유지배지에 추가로 처리해준 실험군과 아무 처리도 하지 않은 대조군을 7일간 myogenic 분화와 adipogenic 분화를 진행하였다. 7일간의 분화를 마친 뒤 세포를 고정 후 Oil Red O 염색을 진행한 후 현미경으로 관찰하였다. Myogenic 분화배지만을 넣어준 그룹에서는 근관세포 형성이 잘 일어난 것을 확인할 수 있었으며, myogenic 분화배지에 추가적으로 EEAA (50 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$)를 처리해준 그룹에서는 대조군에 비하여 근관세포 형성이 EEAA 처리 농도에 따라 농도 의존적으로 감소된 것을 확인할 수 있었다 (도 2a 및 2b) (상이한 문자는 그룹간에 유의미한 차이를 나타냄, $P<0.05$). 또한 myogenic 분화

[0057] 배지만을 넣어준 그룹에서는 Oil Red O 용액에 의해 염색된 부분이 거의 없었으나, myogenic 분화배지에 EEAA (50 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$)를 추가로 처리해준 그룹에서는 Oil Red O 염색법에 의해 붉은색으로 염색되는 부분이 어느 정도 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (도 3a 및 3b) (상이한 문자는 그룹간에 유의미한 차이를 나타냄, $P<0.05$).

[0058] 2.1.3. EEAA 처리에 따른 myogenesis marker 발현 감소 및 adipogenesis marker 발현 증가

[0059] EEAA에 의해 근아세포가 지방세포로 전환분화가 일어나는지 알아보기 위하여 C2C12 근아세포의 분화 과정에서 분화배지에 추가적으로 EEAA (50 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$)를 처리 해주었다. 분화배지와 유지배지만 처리해준 대조군과 분화배지와 유지배지에 추가적으로 EEAA를 처리해준 실험군 간의 myogenesis 및 adipogenesis marker의 mRNA 발현양을 비교하였다. 7일간 myogenic 분화와 adipogenic 분화를 진행시키고 나서 얻은 샘플로 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 qRT-PCR을 진행하였다. Myogenic 분화를 진행한 실험에서는 EEAA을 처리해준 실험군에서 myogenesis marker인 MyoD의 발현이 유의하게 감소하였으며 (도 4a), adipogenesis marker인 PPAR- γ , C/EBP- β , C/EBP- α 3가지 marker의 발현은 EEAA 처리농도에 따라 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다 (도 4b-4d) (상이한 문자는 그룹간에 유의미한 차이를 나타냄, $P<0.05$).

[0061] 고찰 및 결론

[0062] 예로부터, 건강은 항상 사람들의 관심사였다. 그렇기 때문에 근육생성과 지방생성에 관련된 질병들을 치료하기 위하여 꾸준히 연구 중에 있다. 근육세포와 지방세포는 공통된 배아 전구세포를 갖기 때문에 서로 간의 전환분화가 가능하다. 따라서 이를 조절할 수 있는 물질을 찾고, 어떠한 기작에 의하여 전환분화가 가속화되거나, 혹은 약화하는지를 알 수 있다면 병리학적으로 의미가 있을 것으로 판단하였다. 또한 전환분화는 소의 근육에서 지방세포로 전환분화를 일어나게 하여 마블링을 증가시키는 등의 고급육 생산이 가능하게 함으로 축산업에서도 관심을 끌고 있다.

[0063] 이러한 전환분화를 일으킬 수 있는 물질로 천연물을 이용하였다. 천연물은 자연계에서 발견되는 살아있는 유기체에 의해 생성되는 물질을 말하며, 인공적으로 합성된 화합물보다는 부작용이 덜하다는 장점이 있다. 본 발명에서 앞서 지방세포 분화효능이 있다고 알려져 있는 천연물 약제들을 가지고 지방세포 분화 실험을 진행하였으며, 그 중 천연물 약제인 Actinidia arguta의 에탄올 추출물(EEAA)이 지방세포 분화 효능이 가장 좋았다. 따라서 EEAA를 이용하여 C2C12 근아세포의 분화 및 전환분화에 대하여 실험을 진행하였다.

[0064] 본 발명을 통하여 EEAA에 의한 근아세포의 지방세포 혹은 지방유사세포로의 전환분화 효능을 확인하였다. 먼저 다른 부작용이 없도록 독성이 없는 적정수준의 EEAA를 사용하였다. 근아세포에서는 myogenic 분화진행 시 근관세포로의 분화가 일어나지만 EEAA 처리 시 근관세포로 분화하는 비율이 감소하였으며, 지방세포 혹은 지방유사세포로 전환분화가 일어나는 비율이 증가함을 현미경을 통한 근관세포 형성 감소와 Oil Red O 염색을 통하여 붉은색으로 염색되는 지질의 증가를 통해 확인하였다. 이는 myogenesis marker인 MyoD의 발현감소와 adipogenesis marker인 PPAR- γ , C/EBP- β , C/EBP- α 발현증가 등에 의한 것임을 확인하였다.

[0065] 미후도는 이미 항산화, 항암 등의 여러 병리효과를 입증하였으며 꾸준히 천연물 소재로 이용 중에 있다. 이러한 미후도를 통하여 아직 밝혀지지 않은 근육세포의 지방세포로의 전환분화 실험을 진행하여 전환분화 효과가 있음을 밝혔다.

[0066] 또한 미후도를 이용하여 소 근육에서도 지방세포로의 전환분화 효과가 있음을 확인할 수 있다면 마블링 증가로

인한 고급육 생산 등, 축산업에서도 굉장히 의의를 가질 수 있을 것이다.

[0067] 본 발명의 다른 실시형태에 따르면, 상기 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물을 이용하여 배양함으로써, 자연 지방조직이 생성된 인공육을 제공한다.

[0068] 즉, 기존의 세포 배양으로부터 개발되고 있는 인공육의 경우 근내지방의 부족으로 향미 및 부드러움을 재현할 수 없어 근육이 만들어진 후 인위적으로 지방을 섞어 사용할 수 밖에 없는 한계점을 보유하고 있는 반면, 본 발명에 따른 EEAA는 세포 배양으로부터 생산할 수 있는 인공육 개발 과정에서 자연 지방조직을 생성할 수 있는 소재로 사용할 수 있어 고부가가치 인공육생산에 필수 소재로 사용될 수 있다.

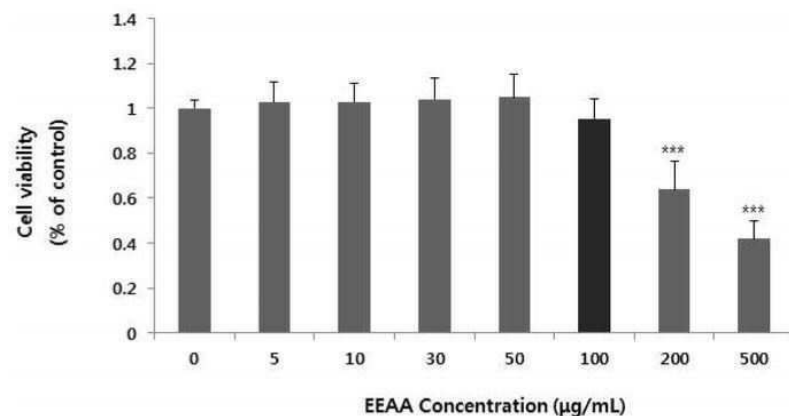
[0069] 한편, 본 발명의 또 다른 실시형태에 따르면, 상기 근육세포에서 지방세포로 직접교차분화(Direct Transdifferentiation)를 유도하는 조성물을 포함하는 고급육 생산을 위한 사료 첨가제를 제공한다.

[0070] 즉, 국내 한우를 비롯하여 고급육 생산을 위해 근내지방 함량의 비율을 높이는 사양법 및 사료 개발시, 본 발명에 따른 EEAA는 마블링이 우수한 고급육 생산을 위해 사료 첨가제로 급여하여 근내지방 축적을 향상시킬 수 있는 주요 소재로 사용될 수 있어, 한우 및 여러 소의 고급육생산을 위한 주요 소재로 사용될 수 있다.

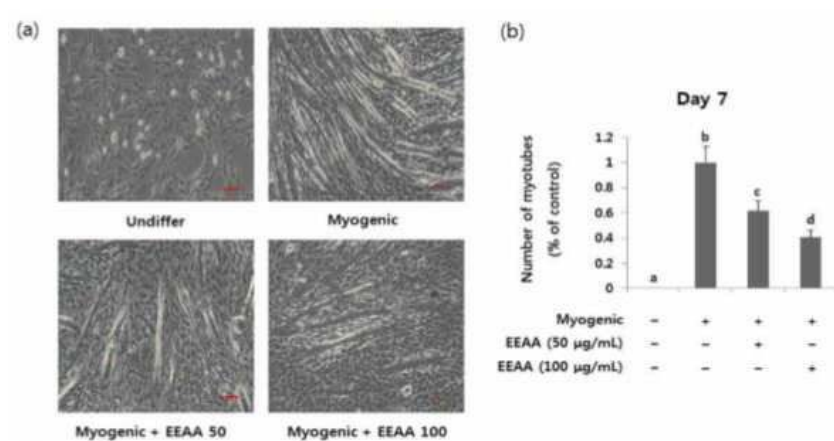
[0072] 이상에서 설명한 본 발명은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위내에서 여러 가지 치환, 변경이 가능하므로 전술한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

도면

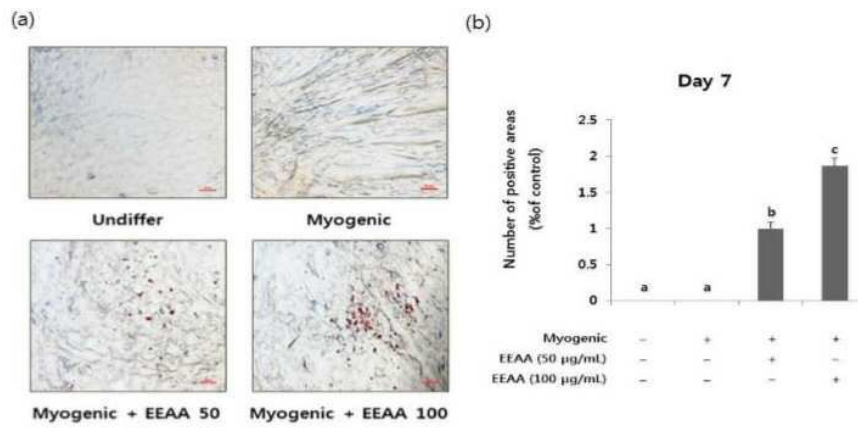
도면1



도면2



도면3



도면4

