



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0118551
(43) 공개일자 2016년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/70 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/70 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0046839
(22) 출원일자 2015년04월02일
심사청구일자 2015년04월02일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김영철
대구광역시 달서구 호산로 125, 209동 1305호(파
호동, 삼성명가타운)
김상남
경상북도 성주군 벽진면 수촌2길 12-8
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

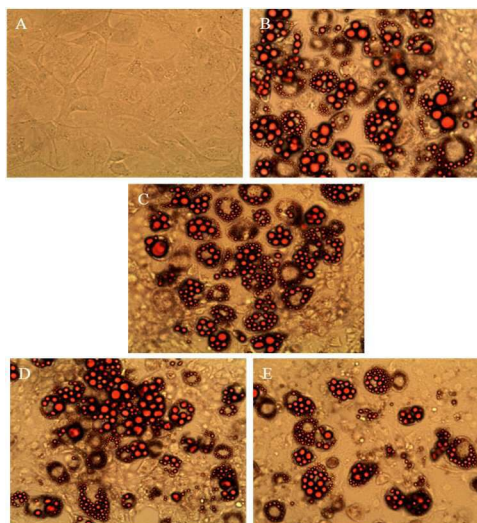
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 머느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 머느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 본 발명의 머느리배꼽 추출물은 낮은 세포독성을 나타내었으며, 지방전구세포의 분화를 유도하는 전사인자 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP-1c의 유전자 및 단백질의 발현을 감소시켰으며, 지방합성 인자인 ACC의 발현을 억제시켜 지방합성 및 지질축적을 감소시키는 것으로 확인됨에 따라, 본 발명에 따른 머느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 항비만용 약학조성물 및 건강식품으로 사용할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61K 2236/33 (2013.01)

(72) 발명자

이채명

대구광역시 서구 새방로25길 16-1, B동 301호(상리
동, 경원하이츠2차)

황지연

경상북도 상주시 경상대로 2930-10, 110동 114호(
낙양동, 명지아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

며느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 며느리배꼽 추출물은 물, C1 내지 C4 알콜 및 이의 혼합용매에 의해 추출된 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 며느리배꼽 추출물은 지방전구세포의 분화를 유도하는 전사인자 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP-1c와 지방합성 인자 FAS, ACC 및 aP2의 발현을 억제하여 지방세포로의 분화 및 지방합성을 저해시키는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여, 며느리배꼽 추출물을 0.01 내지 90 중량부로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

며느리배꼽 추출물은 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 며느리배꼽 추출물은 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만이란 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환이며 과잉된 열량으로 인해 지방조직이 비정상적으로 증가된 상태를 말한다. 남자는 체지방이 체중의 25%, 여자는 체중의 30% 이상일 때 비만으로 보며, 임상적으로는 BMI(Body Mass Index: 체질량지수)가 24.0 내지 30.0은 과체중으로 정의하고 3.0 이상인 경우를 비만으로 정의한다.

[0003] 비만이 발생하여 그 상태가 지속되면 여러 질환의 원인으로 작용하는데, 그러한 질환으로서 고혈압, 혈중 콜레스테롤 상승, 당뇨병, 신장 질환, 뇌졸중, 동맥경화증, 지방간, 관절염, 암, 수면 무호흡증, 당뇨병 등을 들 수 있다.

[0004] 비만의 원인으로는 고지방고열량의 식생활, 바쁜 사회적 환경에 따른 운동 부족, 내분비 이상 등 환경적 요인과 유전적 요인을 들 수 있는데, 이 중 비만의 50 내지 70% 정도가 환경적 요인에 의한 것으로 알려져 있고, 나머지 30 내지 50% 정도가 유전적 요인에 의한 것으로 알려져 있다.

[0005] 비만 치료제는 일반적으로 3가지 범주 즉 식욕 억제제, 체내 에너지 대사 촉진제 및 소화 흡수 억제제로 구분된다. 식욕을 억제하는 약리 기전을 이용하는 대표적인 비만 치료제로는 리덕틸(Reductil™, 애보트사, 미국)을 들 수 있고, 체내 에너지를 촉진하는 약리 기전을 이용하는 대표적인 비만 치료제로서는 엑소리제(Exorise™, 아코파마사, 프랑스)를 들 수 있으며, 지방의 소화 흡수를 억제하는 약리기전을 이용하는 대표적인 비만 치료제로서는 제니칼(Xenical™, 로슈제약회사, 스위스)을 들 수 있다.

[0006] 며느리배꼽(Persicaria perfoliata)은 한해살이 덩굴식물로, 한방에서는 꽃과 열매를 포함한 모든 부분을 사용

하여 해독, 해열, 기침, 백일해(pertussis) 및 호흡기 질환의 치료를 위한 약제로 사용되어 왔으며, 머느리배꼽의 항균작용 효과에 대해서는 연구보고된 바가 있지만, 현재까지 머느리배꼽(Persicaria perfoliata)의 항비만 효과에 대해서는 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0023949호(2012.03.14)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 머느리배꼽 추출물은 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공하여, 지방전구세포의 분화 및 지방합성을 억제하여 비만을 예방하거나 치료할 수 있는 항비만용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 머느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 머느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 머느리배꼽 추출물은 낮은 세포독성을 나타내었으며, GPDH 활성을 감소시키고, 지방전구세포의 분화를 유도하는 전사인자 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP-1c의 유전자 및 단백질의 발현을 저해시켰으며, 지방합성 인자인 ACC의 발현을 억제시켜 지방합성 및 지질축적을 감소시켰다.

[0012] 따라서, 본 발명에 따른 머느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 항비만용 약학조성물 및 건강식품으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 DPPH 분석을 통하여 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물의 전자공여 능력을 확인한 결과이다.

도 2는 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 확인한 결과이다.

도 3은 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물의 과산화물 제거효소(Superoxide dismutase; SOD) 활성을 확인한 결과이다.

도 4는 62.5, 125, 250, 500, 1000 및 2000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포의 세포생존도를 확인한 결과이다.

도 5는 62.5, 125, 250, 500 및 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포의 형태를 확인한 결과로, 도 5A는 비처리 대조군이며, 도 5B는 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포의 형태이며, 도 5C는 125 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포의 형태이며, 도 5D는 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포의 형태이며, 도 5E는 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포의 형태이며, 도 5F는 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포의 형태이다($\times 100$).

도 6은 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물을 8일간 처리한 후, 오일 레드 O 염색을 수행하여 지방방울 생성 정도를 확인한 결과로, 도 6A는 미분화 정상세포군이며, 도 6B는 분화가 유도된 대조군 세포이며, 도 6C는 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포군이며, 도 6D는 125 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방

전구세포군이며, 도 6E는 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포군의 염색 결과이다($\times 200$).

도 7은 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에 분화를 유도하고, 오일 레드 O 염색을 수행하여 분화에 의한 생성된 지방의 함량을 정량한 결과로, N은 미분화된 정상세포이며, C는 분화된 대조군 세포이다(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

도 8은 지방세포로 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물을 8일간 처리하고 GPDH 활성을 확인한 결과로, N은 미분화된 정상세포이며, C는 분화된 대조군 세포이다(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

도 9는 지방세포로 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 4일 및 8일간 처리하고 분화를 유도하는 유전자의 발현을 확인한 RT-PCR 결과로, Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 10은 지방세포로 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 8일간 처리하고 PPAR γ 단백질 발현 정도를 확인한 결과로, Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 11은 지방세포로 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 8일간 처리하고 C/EBP α 단백질 발현 정도를 확인한 결과로, Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 12는 지방세포로 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 4일 및 8일간 처리하고 지방합성과 관련되는 유전자의 발현을 확인한 RT-PCR 결과로, Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 13은 지방세포로 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 8일간 처리하고 ACC 단백질 발현 정도를 확인한 결과로, Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 14는 지방세포로 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 4일 및 8일간 처리하고 에너지 소비 유전자의 발현을 확인한 RT-PCR 결과로, Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 15는 지방세포로 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 4일 및 8일간 처리하고 지방 분해 유전자의 발현을 확인한 RT-PCR 결과로, Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 16은 지방세포로 분화를 유도시킨 3T3-L1 지방전구세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 8일간 처리하고 ATGL 및 HSL 단백질 발현 정도를 확인한 결과로, Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 17은 분화된 3T3-L1 지방세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물을 8일간 처리한 후, 오일 레드 O 염색을 수행하여 지방방울 생성 정도를 확인한 결과로, 도 6A는 미분화 정상세포군이며, 도 6B는 분화된 대조군 세포이며, 도 6C는 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방세포군이며, 도 6D는 125 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방세포군이며, 도 6E는 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방세포군의 염색결과이다($\times 200$).

도 18은 분화된 3T3-L1 지방세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물을 24시간 처리하고, 오일 레드 O 염색을 수행하여 지방의 함량을 정량한 결과로, N은 미분화된 정상세포이며, C는 분화된 대조군 세포이다(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

도 19는 분화된 3T3-L1 지방세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물을 24시간 처리하고, 방출된 글리세롤을 정량한 결과이다(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

도 20은 분화된 3T3-L1 지방세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물을 24시간 처리하고, 지방세포분화, 지방합성 및 지방분해 유전자의 발현을 확인한 RT-PCR 결과로, Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 21은 분화된 3T3-L1 지방세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물을 24시간 처리하고, PPAR γ 단백질 발현을 확인한 결과로 Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 22는 분화된 3T3-L1 지방세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물을 24시간 처리하고, ACC 및 FAS 단백질 발현을 확인한 결과로 Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

도 23은 분화된 3T3-L1 지방세포에 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물을 24시간 처리하고, ATGL 및 HSL 단백질 발현을 확인한 결과로 Normal은 미분화된 정상세포이며, Control은 분화된 대조군 세포이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 머느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0015] 상기 머느리배꼽 추출물은 물, C1 내지 C4 알콜 및 이의 혼합용매에 의해 추출된 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 보다 상세하게는 상기 머느리배꼽 추출물은 지방전구세포의 분화를 유도하는 전사인자 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α) 및 SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein-1c)와 지방합성 인자 FAS (fatty acid synthase), ACC (Acetyl-CoA carboxylase) 및 aP2의 발현을 억제하여 지방세포로의 분화 및 지방합성을 저해할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 따르면, 62.5-250 $\mu\text{g/mL}$ 머느리배꼽 추출물과 분화유도 배지를 8일간 처리한 3T3-L1 지방전구세포에서 분화를 유도하는 전사인자 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP-1c mRNA의 발현 수준 및 단백질 발현 수준을 확인한 결과, 도 9 내지 도 11과 같이 머느리배꼽 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서 각 유전자의 mRNA 및 단백질 발현 수준이 머느리배꼽 추출물이 처리되지 않은 대조군보다 감소한 것이 확인되었으며, 상기 전사인자에 영향을 받는 지방합성 인자인 ACC, aP2 및 FAS mRNA 및 단백질 발현 수준 역시, 도 12 및 도 13과 같이 머느리배꼽 추출물이 처리되지 않은 대조군보다 머느리배꼽 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서 감소된 것을 확인하였다.
- [0018] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 3T3-L1 지방전구세포의 분화에 따른 지질생성에 대한 머느리배꼽 에탄올 추출물의 영향을 확인하기 위해, 지질생성 정도를 확인할 수 있는 특수염색법인 오일 레드 O 염색을 수행한 결과, 도 6B와 같이 머느리배꼽 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서는 많은 양의 지방방울이 확인된 반면, 도 6C와 같이 머느리배꼽 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서는 분화에 의한 지방방울 생성이 농도의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0019] 또한, 지방세포에만 특이적으로 활성이 증가되어, 세포내 중성지방 합성 정도를 나타내는 GPDH 활성을 확인한 결과, 도 8과 같이 아무것도 처리되지 않은 대조군과 비교하여 머느리배꼽 추출물이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서는 농도의존적으로 GPDH 활성이 감소하였다.
- [0020] 상기 결과들로부터 머느리배꼽 추출물은 지방합성과 관련된 유전자들의 발현을 감소시켜 초기 지방합성 및 지질 축적을 억제함으로써, 우수한 항비만에 효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0021] 본 발명의 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여, 머느리배꼽 추출물을 0.01 내지 90 중량부로 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 머느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 구체예에서, 머느리배꼽 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0024] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨,

말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0026] 상기 머느리베콕 추출물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 또한, 본 발명은 머느리베콕 추출물은 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0029] 상기 건강식품은 상기 머느리베콕 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0030] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0031] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.

[0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0033] <참고예> 시약 및 기구

[0034] 디메틸 설펍사이드[Dimethyl sulfoxide; DMSO] 1,1-디페닐-2-피크릴 하이드라질[1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH], 2,2'-아지노-(3-에틸벤조티아졸린-6-설포닉산[2,2'-azino-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; ABTS], 탄닌산[tannic acid], 아스코르브산[ascorbic acid], Folin-Ciocalteu's 페놀시약, 3-(4,5-디메틸-티아졸-2-일)-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로마이드[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; MTT], 3-이소부틸-1-메틸잔틴[3-isobutyl-1-methylxanthine; IBMX], 인슐린, 덱사메타손[dexamethasone; DEX] 및 오일 레드 O를 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0035] DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), 태아소혈청(fetal bovine serum ;FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; P/S)을 Lonza Company (Cascade, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

- [0036] PPAR γ (catalogue #2435), C/EBP α (catalogue #2295), ACC (catalogue #3662), FAS (catalogue #3180), ATGL (catalogue #2138) 및 HSL (catalogue #4107) 특이적 항체를 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA) 에서 구입하여 사용하였으며, β -액틴(catalogue sc-47778) 특이적 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.
- [0037] CO₂ 배양기(MCO-17AC, SANYO Electric, Japan)를 이용하여 세포를 배양하고 도립현미경(CKX41, Olympus, Japan)으로 세포 성장을 관찰하였다.
- [0038] <실시예 1> 머느리배꼽 에탄올 추출물(Persicaria perfoliata ethanol extract; PPEE)
- [0039] 머느리배꼽을 대한민국 경상북도 성주에서 수확하였다.
- [0040] 분쇄된 시료 100g을 80% 에탄올 1000 mL가 담긴 플라스크에 넣어 25℃에서 24시간 추출하였으며, 상기 과정을 3 번 반복하여 추출물을 얻었다.
- [0041] 필터 페이퍼에 상기 추출물을 여과하고 동결건조에 의한 회전식 감압농축기를 이용하여 머느리배꼽 에탄올 추출 물을 농축하여 12.1% 수율로 얻었다.
- [0042] <실시예 2> 머느리배꼽 에탄올 추출물(Persicaria perfoliata ethanol extract; PPEE)의 항산화 활성 확인
- [0043] 1. 전자공여능력(Electron donating ability) 확인
- [0044] 이전에 보고된 방법(Blois, 1958)으로 전자공여능력을 확인하였다.
- [0045] 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 250, 500 및 1000 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 증류수로 희석한 후, 1 mL씩 테스트 튜브 에 담고 각 튜브에 0.4 mM DPPH 4 mL을 첨가하였다. 상기 혼합물을 강하게 흔들어 혼합하고 60 °C에서 10초간 인큐베이션한 후, 525 nm에서 각 혼합용액의 흡광도를 측정하였으며, 카테킨(Catechin)을 양성대조군으로 사용 하였다. 각 용액의 DPPH 라디칼 소거 능력을 하기식에 따라 억제 백분율로 계산되었다.
- [0046] % 공여 능력 = $[1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$
- [0047] A_{sample} 및 A_{control} 은 각 시료 및 대조군의 흡광도이다.
- [0048] 그 결과, 도 1과 같이 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)의 전자공여능력이 89.0%로 대조군인 카테 킨의 전자공여능력과 동일한 것을 확인할 수 있었다.
- [0049] 2. ABTS 라디칼 소거 능력 확인
- [0050] 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)과 카테킨의 항산화 활성을 비교하기 위해, ABTS 양이온 탈색 분석(Re et al. 1999)을 수행하였다.
- [0051] ABTS 라디칼 양이온(ABTS^+)을 생산하기 위해, 7 mM 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설포닉산) 용액과 2.4 mM 과산화이중황산칼륨(potassium peroxodisulfate)을 실온 및 암조건에서 12시간 동안 반응시켰다. 그 후, 734 nm 에서 0.7 ± 0.02 의 흡광도까지 에탄올로 희석하였다.
- [0052] 카테킨 및 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 각각 31.25-1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하고 96-웰 플레이트에 3 번 반복되도록 분주한 후, 동일한 부피의 ABTS 라디칼 양이온(ABTS^+) 용액을 첨가하였다. 그 후, 실온 및 암조 건에서 7분 동안 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 하기식을 이용하여 % 소거능을 계산하였다.
- [0053] % 소거능 = $[1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$
- [0054] 그 결과, 도 2와 같이 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)의 ABTS 라디칼 양이온 소거능력이 87.6%로 나타났으며, 동일한 농도의 카테킨과 유사한 수준으로 확인되었다.
- [0055] 3. 과산화물 제거효소(Superoxide dismutase; SOD) 활성 확인
- [0056] 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE) 및 아스코르브산의 과산화물 제거효소(SOD) 유사 활성을 이전에 보고된 방법 (Marklund and Marklund 1974)으로 확인하였다.
- [0057] 각각 31.25-1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE) 및 아스코르브산 용액에 Tris-HCl 버퍼(50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL 및 7.2 mM 피로갈롤(pyrogallol) 0.2 mL을 혼합하고 25℃에서 10분간 인

큐베이트하였다.

[0058] 그 후, 1 M HCl 0.1 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하고 산화된 피로갈롤(pyrogallol)의 양을 하기식으로 계산하여 확인하였다.

[0059] % SOD 유사 활성 = $[1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$

[0060] 그 결과, 도 3과 같이 500 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)의 과산화물 제거효소 유사 활성이 각각 24.5% 및 25.0%로 나타났으며, 대조군인 카테킨보다 높은 과산화물 제거효소 유사 활성 효과를 나타내었다.

[0061] 상기 결과들로부터 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)은 대조군인 카테킨보다도 높은 항산화 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0062] <실시예 3> 머느리배꼽 에탄올 추출물(Persicaria perfoliata ethanol extract; PPEE)의 세포독성 확인

[0063] 1. 세포 배양

[0064] 3T3-L1 지방전구세포를 장병철 교수님(Keimyung University, Daegu, Korea)께 얻어 배양하고 분화시켰다.

[0065] 세포를 10% 우아혈청(bovine calf serum; BCS) 및 5% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 2 일간 배양한 후, 지방전구세포를 10% 태아소혈청, 5% P/S, 0.5 mM IBMX, 1 μM 텍사메타손 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 인슐린(MDI)이 포함된 DMEM 배지로 2일간 배양하였다.

[0066] 그 후, 세포에 10 $\mu\text{g/mL}$ 인슐린이 포함된 DMEM 배지로 교체하여 추가로 3일간 배양하였으며, 10% 태아소혈청이 포함된 DMEM 배지로 2일마다 교체하여 세포를 유지하였다.

[0067] 2. 세포 생존도 분석

[0068] 3T3-L1 지방전구세포에 대한 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)의 최대허용수준(maximum permissible level; MPL)을 결정하기 위해, MTT 분석을 수행하여 세포 생존도를 확인하였다.

[0069] 3T3-L1 지방전구세포를 96-웰 플레이트의 한 웰 당 1.5×10^4 세포로 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 가습 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE) 200 μL 를 DMEM 배지를 이용하여 0 내지 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하고 각 웰에 첨가한 후, 48 시간 동안 배양하였다. 그 후, MTT 0.5 mg/mL를 각 웰에 첨가하고 3시간 동안 인큐베이션한 후, 1,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 각 웰에 DMSO 200 μL 를 첨가하고 플레이트 진탕기에서 15분 동안 세포를 용해시킨 후, ELISA(Model 680, Bio Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0070] 세포 생존도의 백분율은 하기식에 따라 계산되었다.

[0071] % 세포 생존도 = $(A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$

[0072] 그 결과, 도 4와 같이 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 250 및 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 세포군에서 세포생존도가 각각 19.7 및 23.9% 감소된 것이 확인되었다.

[0073] 또한, 62.5 내지 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 3T3-L1 지방전구세포에 처리하고 48시간 동안 배양한 후 도립현미경으로 세포 형태를 관찰하였다.

[0074] 그 결과, 도 5와 같이 62.5 내지 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 세포군에서는 아무것도 처리되지 않은 대조군과 유사하게 편평하고 고른 방추형 모양의 세포가 유지된 반면, 500 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 세포군에서는 불규칙적이거나 둥근 모양의 세포가 확인되었으며, 세포 밀도가 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0075] 상기 결과로부터 3T3-L1 지방전구세포에 대한 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)의 최대허용농도는 250 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다.

[0076] <실시예 4> 지방전구세포의 분화기간 동안 머느리배꼽 에탄올 추출물(Persicaria perfoliata ethanol extract; PPEE)의 지방합성 억제 효과 확인

[0077] 1. 세포 분화 유도 및 시료 처리

[0078] 머느리배꼽 에탄올 추출물이 지방전구세포가 지방세포로의 분화되는 과정에서 나타나는 영향을 확인하기 위해, 분화유도배지 MDI(0.5mM IBMX, 1 μ M 텍사메타손, 10/mL 인슐린)와 62.5-250 μ g/mL 머느리배꼽 에탄올 추출물을 함께 첨가하여 세포를 배양하고, 진단 마커 및 지방 방울의 발현을 측정하였다. 세포 분화는 8일 후 완성되었다.

[0079] 또한, 분화된 지방세포에서, 지방대사에 미치는 머느리배꼽 에탄올 추출물의 영향을 확인하기 위해, 세포에 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE) 62.5, 125 및 250 μ g/mL를 24시간 처리하고, 지질생성 및 지질분해 마커의 발현과 지질 축적을 확인하였다.

[0080] 2. 오일 레드 O(Oil red O) 염색

[0081] 3T3-L1 지방전구세포의 분화에 따른 지질생성에 대한 머느리배꼽 에탄올 추출물의 영향을 확인하기 위해, 지질생성 정도를 확인할 수 있는 특수염색법인 오일 레드 O 염색을 수행하였다.

[0082] 상기 방법으로 분화가 유도된 3T3-L1 세포를 PBS로 두 번 반복하여 세척하고, 10%(v/v) 신선한 포르말린으로 3시간 동안 고정시키고, 오일 레드 O 작업용액(working solution)으로 1시간 동안 세포를 염색하였다. 그 후, 염색 용액을 제거하고, 3T3-L1 세포의 염색된 지방 방울을 증류수로 4번 세척하였다. 염색된 오일 레드 O를 정량하기 위해, 웰 당 이소프로판올 1 mL를 첨가하여 세포와 10 분간 인큐베이트하였다.

[0083] 인큐베이트 후, 용해 반응물을 96-웰 플레이트에 옮겨 담고 multi-well plate reader(Model 680, Bio Rad, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0084] 그 결과, 도 6A와 같이 분화되지 않은 정상 세포에서는 지질 축적이 나타나지 않았으나, 도 6B의 분화가 유도된 대조군 세포에서는 아주 많은 양의 지방 방울이 확인되었다. 반면, 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 세포군에서는 대조군과 비교하여 농도의존적으로 지방 방울이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0085] 또한, 상기 오일 레드 O를 용해하여 정량 분석한 결과, 도 7과 같이 62.5, 125 및 250 μ g/mL 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 세포군의 지질 함량이 대조군과 비교하여 농도의존적으로 각각 1.3%, 12.5%(p<0.01) 및 27.8%(p<0.001) 감소하였다.

[0086] 상기 결과로부터 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)은 지질축적을 억제하는데 효과적임을 확인할 수 있었다.

[0087] 4. 글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나아제(GPDH) 활성 분석

[0088] 지방세포에만 특이적으로 활성이 증가되는 GPDH의 활성을 확인하여 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE) 처리에 따른 지방세포 분화 여부 및 중성지방의 축적 정도를 확인하였다.

[0089] GPDH 활성분석 키트(Takara Bio Inc., Japan)를 사용하여, GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 분석을 수행하였다. 상기 방법으로 8일 동안 분화 배지와 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 함께 처리한 지방세포의 배양 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척한 후, 효소 추출 버퍼로 용해시켰다. 추출 후 즉시, 2-멜캅토에탄올(mercaptoethanol)이 첨가된 희석 버퍼를 동일한 부피로 첨가하여 세포를 두 배로 희석하였다.

[0090] 96-웰 플레이트의 각 웰에 희석한 세포와 기질 용액을 분주하고 30 °C에서 사전 인큐베이션한 후, 희석된 시료를 25 μ L씩 첨가하고 플레이트를 교반한 후 30 °C, 340 nm에서 흡광도 감소를 확인하였다.

[0091] 그 결과, 도 8과 같이 아무것도 처리되지 않은 대조군과 비교하여 62.5, 125 및 250 μ g/mL 농도의 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 세포군의 GPDH 활성이 각각 2.5%, 9.7%(p<0.05) 및 24.9%(p<0.001)로 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)의 용량의존적으로 감소하였다.

[0092] 5. 지방전구세포에서 지질생성 및 형성에 관여하는 유전자 발현 확인

[0093] 5-1. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

[0094] 지방생성에 관여하는 유전자 발현에 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 미치는 영향을 확인하기 위해, 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 수행하였다.

[0095] 제조사의 설명서에 따라 TRIzol(Invitrogen, CA) 0.8 mL로 상기 방법으로 분화 및 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 3T3-L1 지방세포의 전체 RNA를 추출하고, 추출된 RNA 5 μ g을 5 $\times$ M-MLV 역 전사효소(Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) 버퍼 8 μ L, dNTPs(10 mM) 3 μ L, RNase 억제제(40 U/ μ L) 0.45 μ L,

M-MLV 역 전사효소(200 U/ μ L; Promega, USA) 0.3 μ L, 및 oligo dT (20 pM/ μ L; Bioneer, Daejeon, Korea) 3.75 μ L가 포함된 반응 혼합물 40 μ L로 역전사 시켰다.

[0096] 5×Green Go-Taq Flexi 반응 버퍼 4 μ L, dNTPs(10 mM) 0.4 μ L, Taq polymerase(5 U/ μ L) 0.1 μ L, MgCl₂ (25 mM; Promega, USA) 1.2 μ L 및 각각의 특이적 프라이머(20 pM/ μ L)를 0.4 μ L씩 이용한 PCR을 수행하여 단일 가닥 cDNA를 증폭하였다.

[0097] 표 1과 같은 각각의 프라이머의 염기서열을 사용하여, 표 2의 조건으로 PCR을 수행하였다.

표 1

[0098]

유전자	염기서열	예상 크기 (염기쌍)
SREBP-1c	정방향(5'→3')GCG CTA CCG GTC TTC TAT CA (서열번호 1)	234
	역방향(5'→3')TGC TGC CAA AAG ACA AGG G (서열번호 2)	
C/EBP β	정방향(5'→3')GAC TAC GCA ACA CAC GTG TAA CT (서열번호 3)	488
	역방향(5'→3')CAA AAC CAA AAA CAT CAA CAA CCC (서열번호 4)	
PPAR γ	정방향(5'→3')GGT GAA ACT CTG GGA GAT TC (서열번호 5)	268
	역방향(5'→3')CAA CCA TTG GGT CAG CTC TC (서열번호 6)	
C/EBP α	정방향(5'→3')TTA CAA CAG GCC AGG TTT CC (서열번호 7)	232
	역방향(5'→3')CTC TGG GAT GGA TCG ATT GT (서열번호 8)	
ACC	정방향(5'→3')TGA CCG TGG GCA CAA AGT T (서열번호 9)	351
	역방향(5'→3')AGG AGG AAC CGC ATT TAT CGA (서열번호 10)	
aP2	정방향(5'→3')AAC ACC GAG ATT CCT TCA A (서열번호 11)	206
	역방향(5'→3')TCA CGC CTT TCA TAA CAC AT (서열번호 12)	
FAS	정방향(5'→3')GGT TCG GAA TGC TAT CCA GG (서열번호 13)	301
	역방향(5'→3')CTG CGG AAA CTT CAG GAA AT (서열번호 14)	
Leptin	정방향(5'→3')CCA AAA CCC TCA TCA AGA CC (서열번호 15)	352
	역방향(5'→3')CTC AAA GCC ACC ACC TCT GT (서열번호 16)	
Adiponectin	정방향(5'→3')GGA GAT GCA GGT CTT CTT GGT (서열번호 17)	368
	역방향(5'→3')TCC TGA TAC TGG TCG TAG GTG AA (서열번호 18)	
ATGL	정방향(5'→3')TTC ACC ATC CGC TTG TTG (서열번호 19)	155
	역방향(5'→3')AGT TCC ACC TGC TCA GAC (서열번호 20)	
HSL	정방향(5'→3')GTC GCC TTT CTC CTG ATG AC (서열번호 21)	410
	역방향(5'→3')CTT GCT GCT TCT CTT GGC TC (서열번호 22)	
GAPDH	정방향(5'→3')GTA TGA CTC CAC TCA CGG CAA A (서열번호 23)	248
	역방향(5'→3')GGT CTC GCT CCT GGA AGA TG (서열번호 24)	

표 2

[0099]

유전자	단계	온도	시간	사이클
SREBP-1c	초기변성(Predenaturation)	95℃	10 분	1
	변성(Denaturation)	95℃	1 분	30
	풀림(Annealing)	54℃	1 분	
	연장(Extension)	72℃	1 분	
	연장 후(Extension)	72℃	10 분	1
C/EBP β	초기변성(Predenaturation)	95℃	10 분	1
	변성(Denaturation)	94℃	30 초	30
	풀림(Annealing)	53℃	30 초	
	연장(Extension)	72℃	30 초	
	연장 후(Extension)	72℃	7 분	1

PPAR γ	초기변성(Predenaturation)	95℃	10 분	1
	변성(Denaturation)	94℃	30 초	30
	풀림(Annealing)	53℃	30 초	
	연장(Extension)	72℃	30 초	
	연장 후(Extension)	72℃	7 분	1
C/EBP α	초기변성(Predenaturation)	94℃	10 분	1
	변성(Denaturation)	94℃	30 초	30
	풀림(Annealing)	62℃	30 초	
	연장(Extension)	72℃	30 초	
	연장 후(Extension)	72℃	7 분	1
ACC FAS	초기변성(Predenaturation)	94℃	5 분	1
	변성(Denaturation)	94℃	30 초	30
	풀림(Annealing)	56℃	1 분	
	연장(Extension)	72℃	1 분	
	연장 후(Extension)	72℃	5 분	1
aP2	초기변성(Predenaturation)	94℃	10 분	1
	변성(Denaturation)	94℃	30 초	30
	풀림(Annealing)	59℃	30 초	
	연장(Extension)	72℃	30 초	
	연장 후(Extension)	72℃	7 분	1
Leptin	초기변성(Predenaturation)	94℃	1 분	1
	변성(Denaturation)	94℃	1 분	33
	풀림(Annealing)	57℃	1 분	
	연장(Extension)	72℃	2 분	
	연장 후(Extension)	72℃	7 분	1
Adiponectin	초기변성(Predenaturation)	95℃	10 분	1
	변성(Denaturation)	95℃	1 분	35
	풀림(Annealing)	53.5℃	1 분	
	연장(Extension)	72℃	10 분	
	연장 후(Extension)	72℃	7 분	1
ATGL HSL	초기변성(Predenaturation)	94℃	5 분	1
	변성(Denaturation)	94℃	45 초	29
	풀림(Annealing)	53℃	45 초	
	연장(Extension)	72℃	90 초	
	연장 후(Extension)	72℃	5 분	1

[0100] 5-2. 단백질 시료 준비 및 웨스턴 블롯 분석

[0101] 60 mm 플레이트서 배양된 3T3-L1 지방전구세포에 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE) 존재 또는 비 존재 조건하에 서 분화유도제로 8 일간 분화를 유도하였다.

[0102] 세포를 PBS로 세척하고 세포 균개를 이용하여 세포를 수집한 후, 용해버퍼[1×RIPA(Sigma, CA, USA), 2 mM 페닐 메틸설포닐 플루오라이드(PMSF), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM 글리세롤 2-포스페이트 디소듐 염 수화물 (glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate; G) 및 1×단백질분해효소 억제제(PI)]로 세포를 용해시키고 10 분간 얼음에서 추가로 인큐베이트하였다.

[0103] 세포 용해물을 4℃, 14,000 rpm에서 20 분간 원심분리하고 상층액의 단백질을 BSA Protein Assay Reagent Kit(Bio Rad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0104] 동일한 양의 단백질(30 mg)을 10% 폴리아크릴아마이드 겔의 각 레인에 적재하고 전기영동으로 분리시켰다.

[0105] 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고 PPAR γ (1:1,000), C/EBP α (1:1,000), ACC(1:1,000), FAS(1:1,000), ATGL(1:1,000) 및 HSL(1:1,000)에 대한 특이적 항체와 반응시킨 후, 2차 항체인 항-래빗 IgG(1:1,000)와 반응시켰다.

[0106] ECL Western blotting detection reagents (Bio Rad, CA, USA)를 이용하여 면역 반응성 밴드를 화학발광시켜

확인하였다.

- [0107] 밴드 강도는 Image J program (NIH, Bethesda, USA)을 이용하여 밴드 강도를 측정하였으며, β -액틴을 번역블로팅을 위한 내부 대조군으로 사용하였다.
- [0108] 5-3. 지방전구세포의 분화를 유도하는 유전자(adipogenic gene)의 발현 확인
- [0109] 상기 방법과 같이 RT-PCR 및 웨스턴 블롯을 수행하여 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 지방세포로의 분화를 유도하는 유전자에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0110] 그 결과, 도 9와 같이 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 세포에서는 대조군보다 전사 활성인자인 SREBP-1c와 지방세포로의 분화 및 지방 합성을 유도하는 전사 인자 PPAR γ 및 C/EBP α 의 mRNA 발현이 감소되었다.
- [0111] 또한, PPAR γ 단백질의 발현 정도를 확인한 웨스턴 블롯 결과, 도 10과 같이 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 세포는 대조군과 비교하여 PPAR γ 단백질의 발현이 감소되었으며, 도 11과 같이 머느리배꼽 에탄올 추출물이 처리된 세포에서는 C/EBP α 단백질의 발현이 대조군보다 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0112] 상기 결과로부터, 머느리배꼽 에탄올 추출물은 3T3-L1 지방전구세포의 SREBP-1c, PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현을 억제함으로써 지방세포로의 분화를 저해시켜 지방 합성을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0113] 5-4. 지방합성 유전자(lipogenic gene) 발현 확인
- [0114] 상기 방법과 같이 8 일간 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 3T3-L1 지방전구세포에 처리하고, RT-PCR 및 웨스턴 블롯을 수행하여 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 지방합성에 관여하는 유전자에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0115] 그 결과, 도 12와 같이 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서 PPEE의 용량의존적으로 ACC, aP2 및 FAS mRNA 발현이 감소되는 것이 확인되었다.
- [0116] 또한, 도 13과 같이 ACC 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과, 대조군과 비교하여 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서는 ACC 단백질의 발현이 감소하였다.
- [0117] 상기 결과로부터 머느리배꼽 에탄올 추출물은 3T3-L1 지방전구세포의 지방합성과 관련된 ACC, aP2 및 FAS의 발현을 억제함으로써 지방합성을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0118] 5-5. 에너지 소비 및 지질분해 유전자 발현 확인
- [0119] 3T3-L1 지방전구세포의 분화 동안 에너지 소비 유전자인 렙틴 및 아디포넥틴의 발현 정도를 확인하였다.
- [0120] 도 14와 같이 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에서는 렙틴 유전자의 발현이 증가한 반면, 정상 세포 및 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서는 렙틴 유전자의 발현이 매우 약하거나, 발현이 나타나지 않았다.
- [0121] 분화가 유도되지 않은 정상세포군과 비교하여 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에서 아디포넥틴 유전자의 발현이 증가되는 것이 확인된 반면, 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 250 μ g/mL 농도로 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서는 아디포넥틴의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0122] 또한, 상기 방법과 같이 8 일간 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 3T3-L1 지방전구세포에 처리하고, RT-PCR 및 웨스턴 블롯을 수행하여 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 지질분해 유전자에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0123] ATGL(adipose triglyceride lipase) 및 HSL(hormone-sensitive lipase)은 지방세포의 지질분해를 조절하는 주요 인자로, 도 16과 같이 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서는 ATGL 및 HSL의 mRNA 발현 수준이 감소하였다.
- [0124] ATGL 및 HSL 단백질의 웨스턴 블롯 결과, 도 17과 같이 대조군과 비교하여 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 3T3-L1 지방전구세포에서는 HSL 단백질의 발현 정도가 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0125] 상기 결과들은 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 초기 지방합성에 관여하는 유전자들의 발현을 억제함으로써, 초기 지방합성 및 지질축적이 감소함에 따라, 에너지 소비 인자 및 지질분해 인자의 발현이 억제되었기 때문인 것으로 제안될 수 있다.
- [0126] **<실시예 5> 분화된 지방세포에서 머느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)의 효과 확인**

- [0127] 1. 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)의 지질 축적 억제 효과 확인
- [0128] 지질 축적에 있어서, 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)의 잠재적 영향을 확인하기 위해, 8 일간 3T3-L1 지방전구 세포의 분화를 유도하고, 분화된 3T3-L1 지방세포에 0-250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 각각 24시간 동안 처리한 후, 오일 레드 O로 염색을 수행하고 이미지를 촬영하여, 지질 축적 정도를 확인하였다.
- [0129] 그 결과, 도 17과 같이 미분화된 정상 세포에서는 지방 축적이 거의 나타나지 않은 반면, 지방세포로 분화된 대조군에서는 많은 양의 지방 방울이 확인되었다. 그러나, 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 지방세포는 대조군보다 지방 방울이 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0130] 상기 생성된 지방 방울을 정량한 결과, 도 18과 같이, 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 지방세포에서는 농도의존적으로 각각 10.9%, 11.9% ($p<0.05$) 및 16.1% ($p<0.05$) 지방 방울의 감소가 확인되었다.
- [0131] 2. 글리세롤 분석
- [0132] 3T3-L1 세포가 배양되고 분화되면서 배지로 방출한 글리세롤을 확인하였다.
- [0133] 효소 시약 및 프리 글리세롤 시약(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 GPO-TRINDER 회사의 설명서에 따라, 배지로 방출된 글리세롤 수준을 확인하였다.
- [0134] 그 결과, 도 19와 같이 대조군과 비교하여 62.5, 125 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 세포에서 각각 10.1%, 33.5% ($p<0.05$) 및 64.6% ($p<0.001$) 증가된 글리세롤 방출이 확인되었다.
- [0135] 상기 결과로부터 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 성숙한 지방세포의 트리글리세리드(TG) 가수분해를 유도하여 지질분해 효과를 나타낼 수 있음이 확인되었다.
- [0136] 3. 분화된 3T3-L1 지방세포에서 지질생성, 지질형성 및 지질분해 유전자 발현 효과 확인
- [0137] 분화된 3T3-L1 지방세포에 0-250 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)을 각각 24시간 동안 처리한 후, RT-PCR을 수행하여 지질생성, 지질형성 및 지질분해 유전자의 mRNA 발현 수준을 확인하고, 웨스턴 블롯을 수행하여 각 유전자의 단백질 발현 정도를 확인하였다.
- [0138] 그 결과, 도 20과 같이 지질생성 유전자에 있어서, 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 3T3-L1 지방세포는 대조군과 비교하여 전사 활성인자인 PPAR γ 의 발현이 감소 되었으며, 지질형성 유전자인 ACC 및 렙틴(Leptin) 유전자는 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리에 의해 감소되었다.
- [0139] 또한, 도 21 및 도 22와 같이 대조군과 비교하여 며느리배꼽 에탄올 추출물(PPEE)이 처리된 3T3-L1 지방세포에서 PPAR γ 와 ACC 및 FAS 단백질의 발현 감소가 나타났다.
- [0140] 지질분해 유전자인 ATGL 및 HSL의 경우, 도 20과 같이 mRNA의 발현에는 변화가 확인되지 않았으나, 도 22와 같이 HSL 단백질 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0141] 한편, 본 발명에 따른 며느리배꼽 추출물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기에서는 본 발명에 따른 며느리배꼽 추출물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0142] <제제예 1> 약학조성물의 처방예
- [0143] <제제예 1-1> 주사제의 제조
- [0144] 며느리배꼽 에탄올 추출물 10 mg, 소듐 메타비셀파이트 3.0 mg, 메틸파라벤 0.8 mg, 프로필파라벤 0.1 mg 및 주사용 멸균증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 mL이 되도록 제조한 후, 2 mL 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.
- [0145] <제제예 2-1> 정제의 제조
- [0146] 며느리배꼽 에탄올 추출물 10 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0147] <제제예 3-1> 캡슐제의 제조

[0148] 머느리배꼽 에탄올 추출물 10 mg, 유당 50 mg, 전분 50 mg, 탈크 2 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

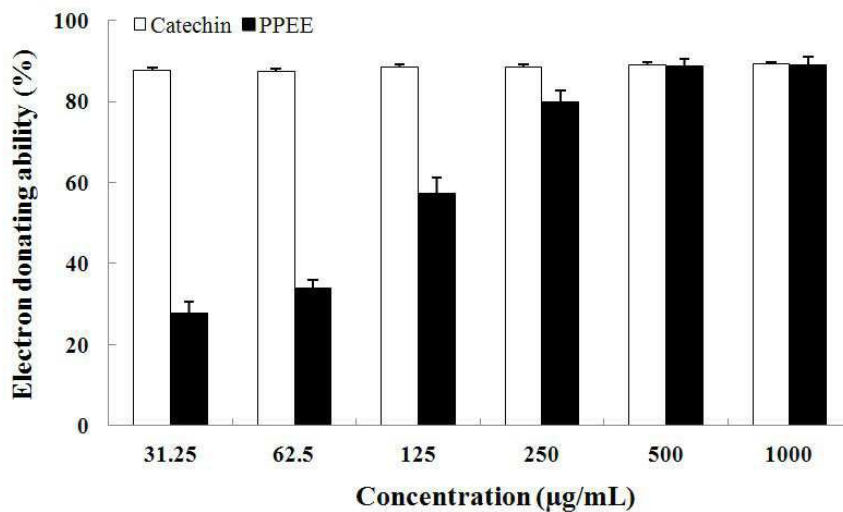
[0149] <제제예 2> 건강식품의 제조

[0150] 머느리배꼽 에탄올 추출물 0.5 mg, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B 1 0.13 mg, 비타민 B 2 0.15 mg, 비타민 B 6 0.5 mg, 비타민 B 12 0.2 μ g, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5 mg) 및 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.

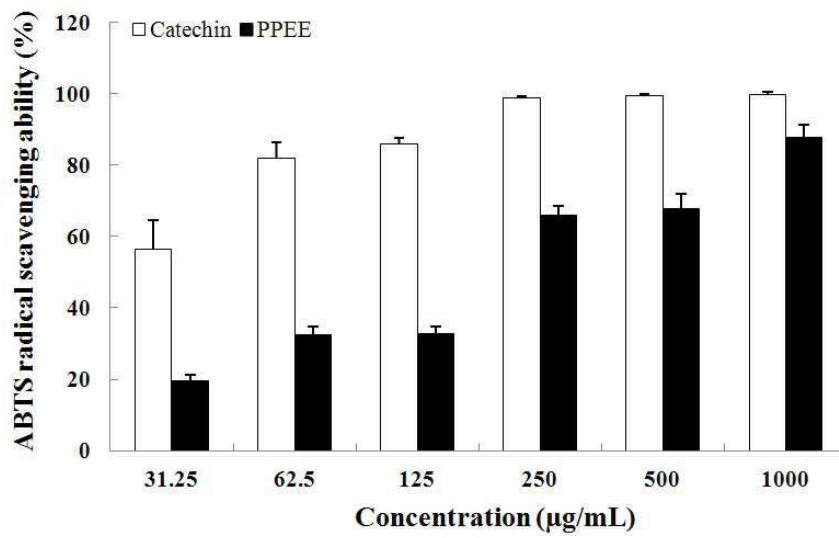
[0151] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

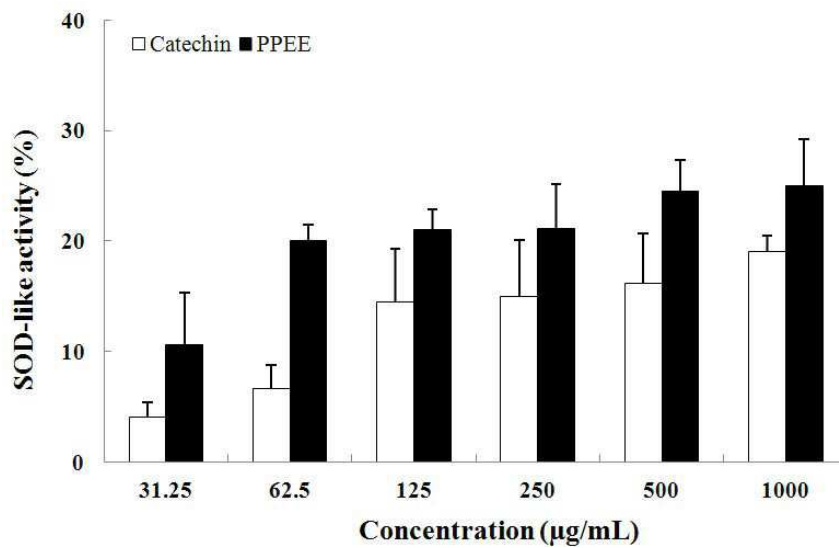
도면1



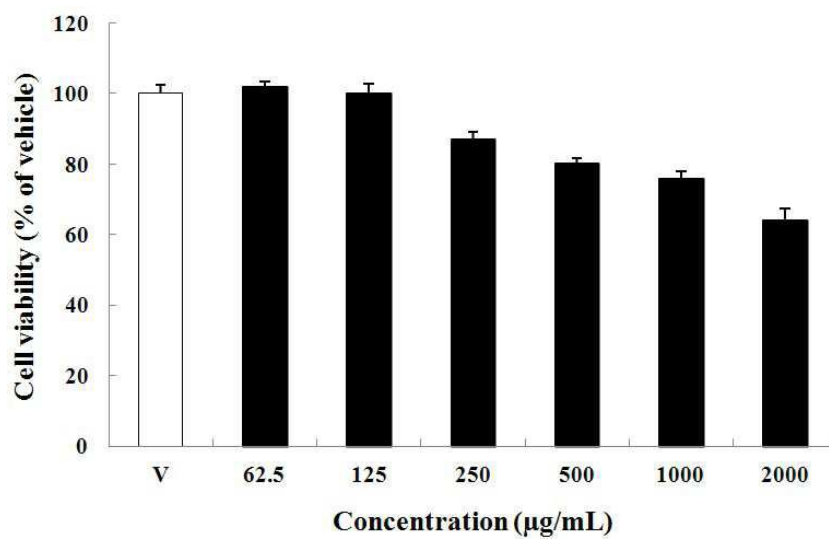
도면2



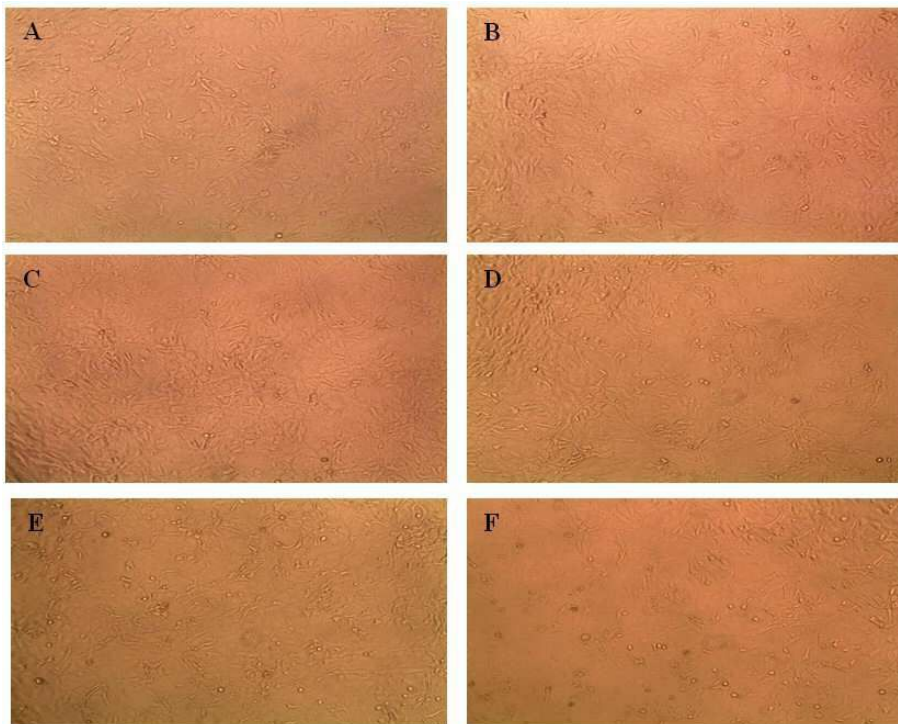
도면3



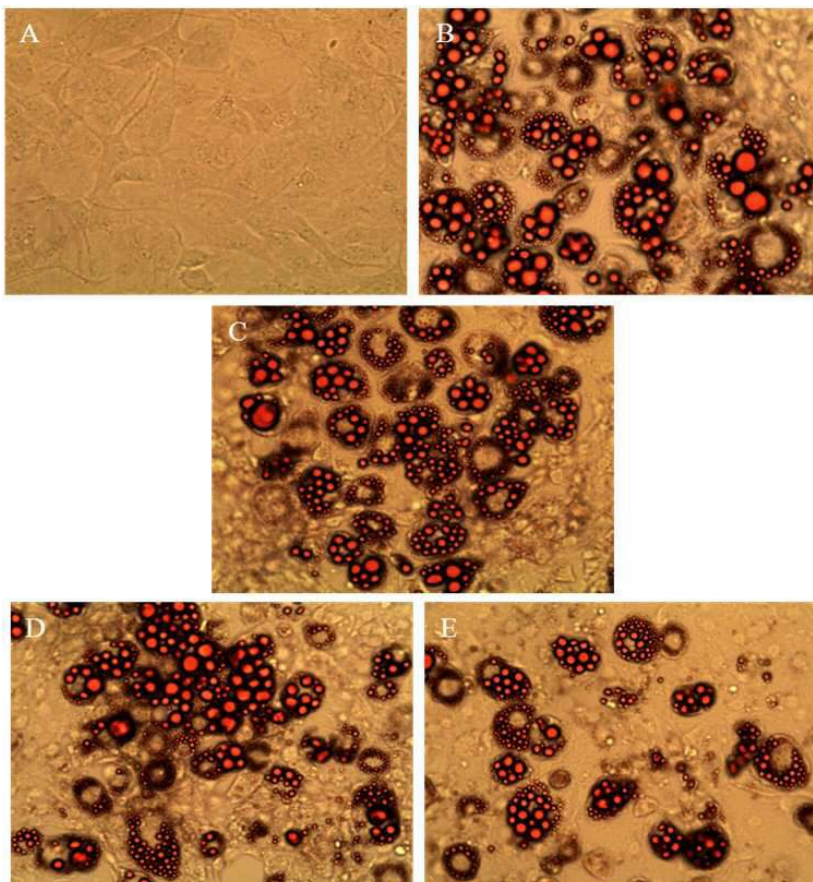
도면4



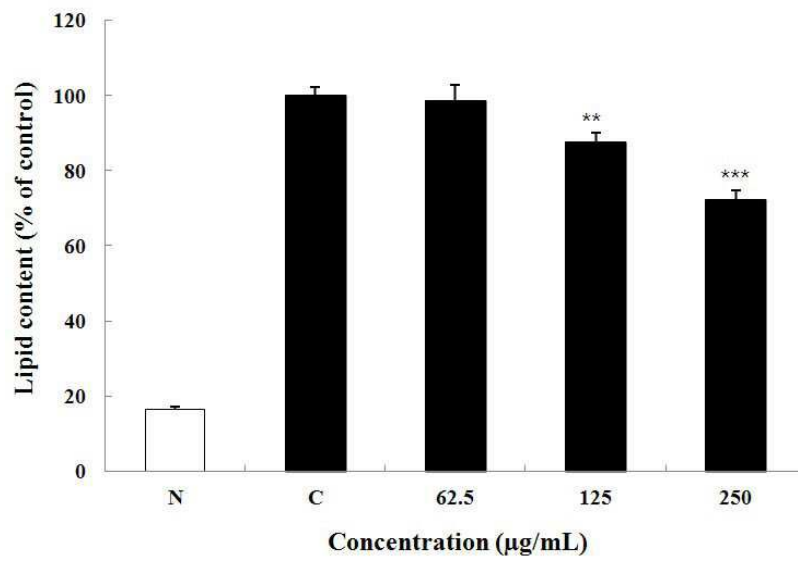
도면5



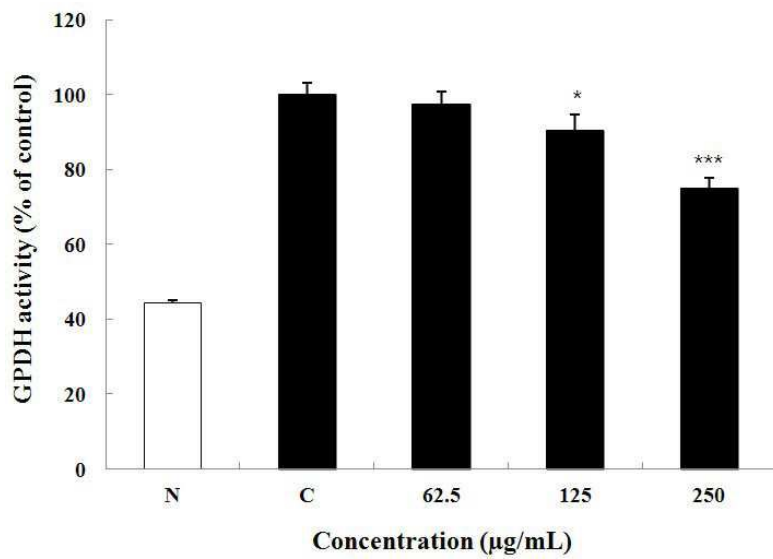
도면6



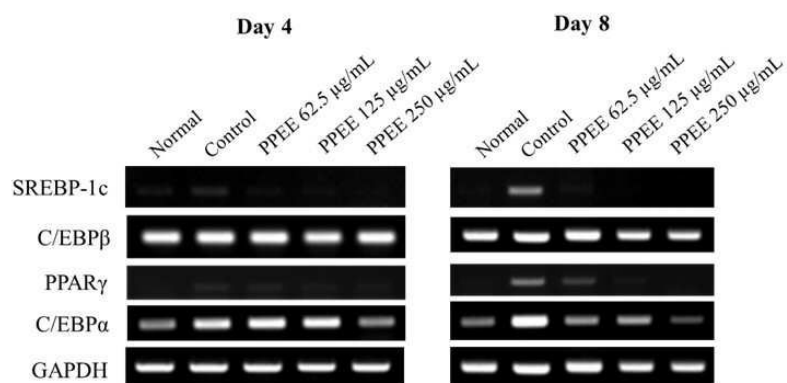
도면7



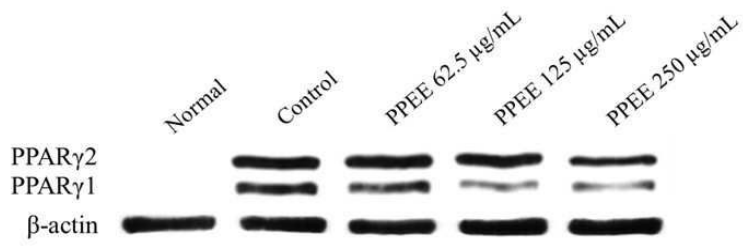
도면8



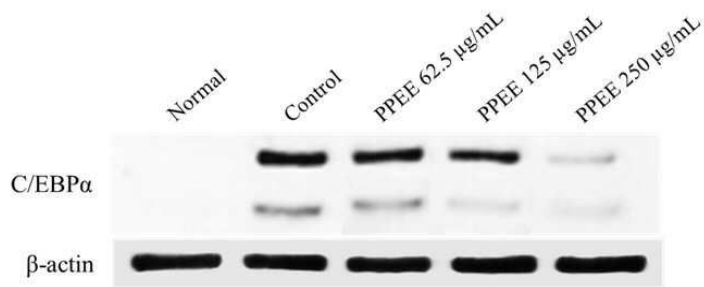
도면9



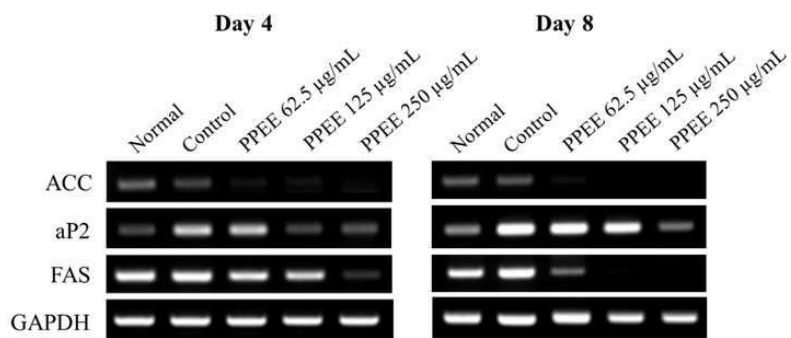
도면10



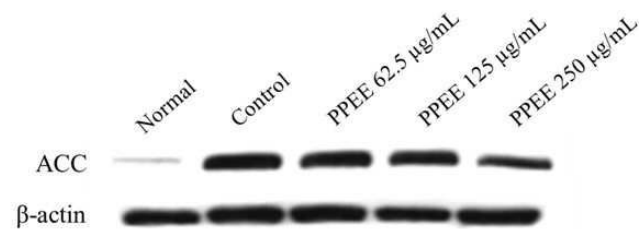
도면11



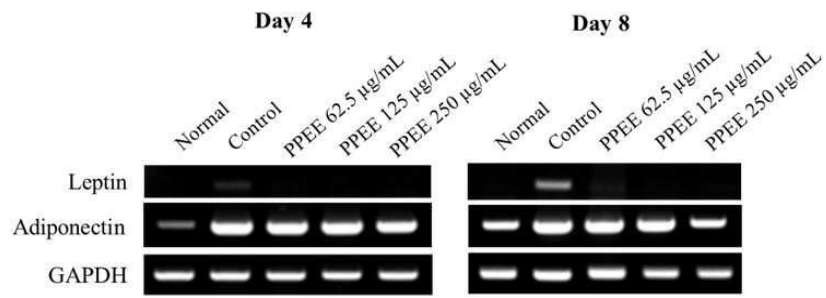
도면12



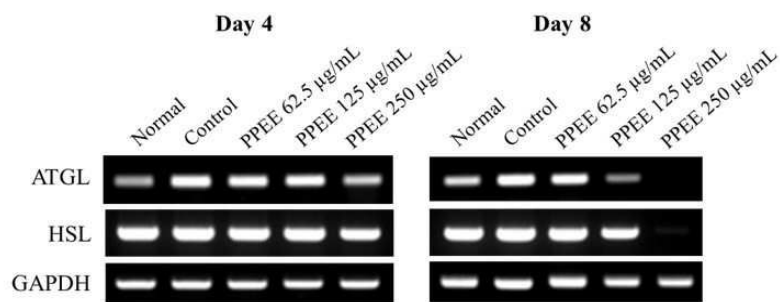
도면13



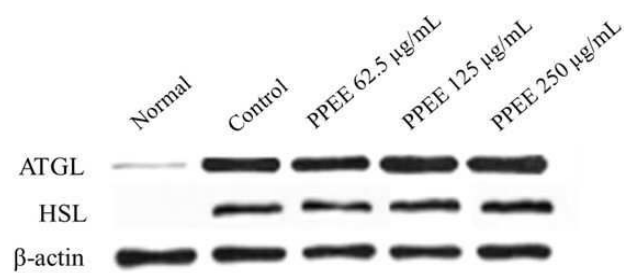
도면14



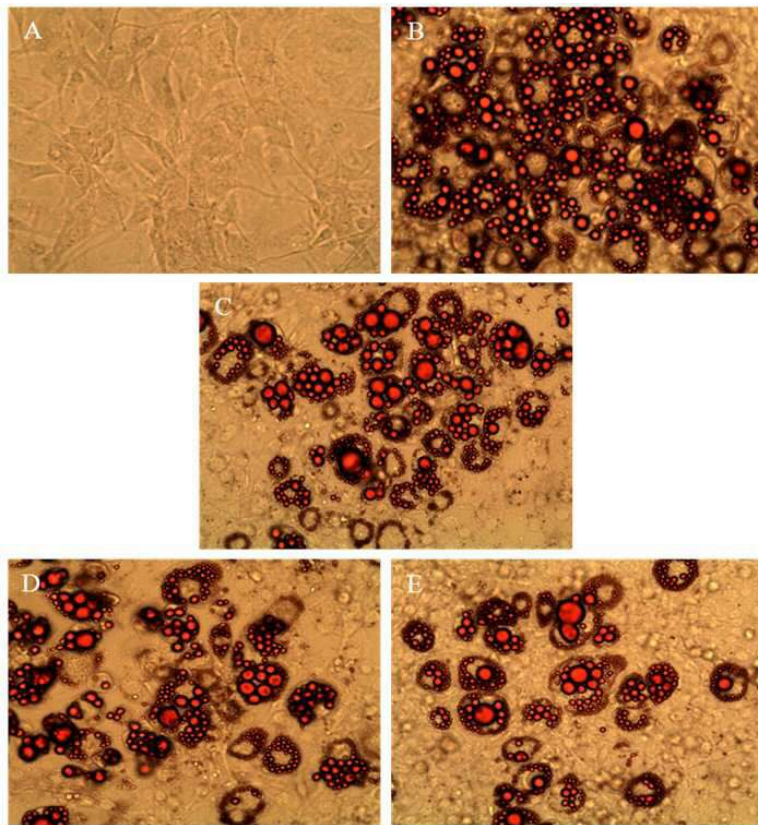
도면15



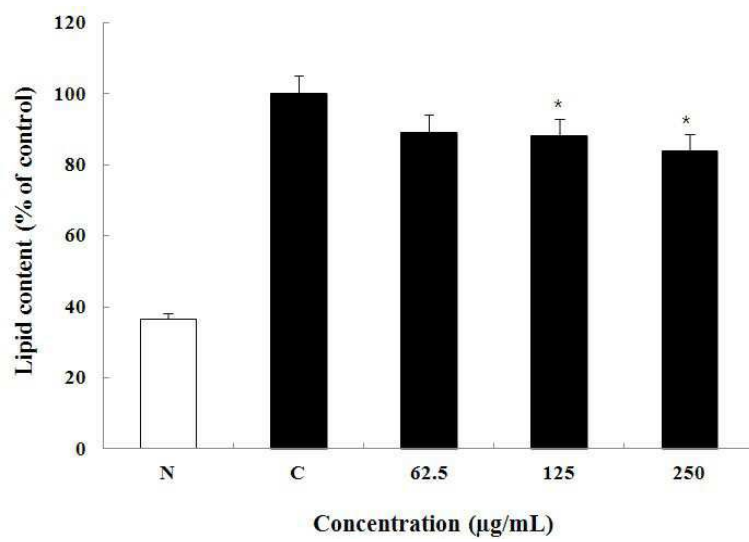
도면16



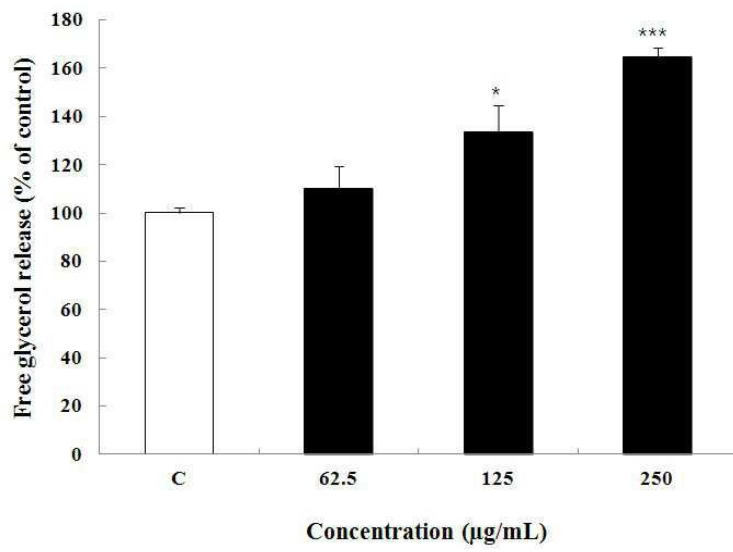
도면17



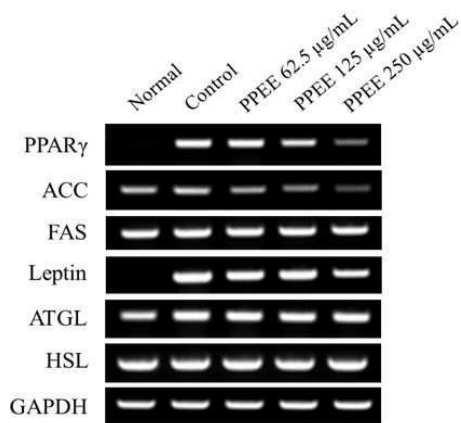
도면18



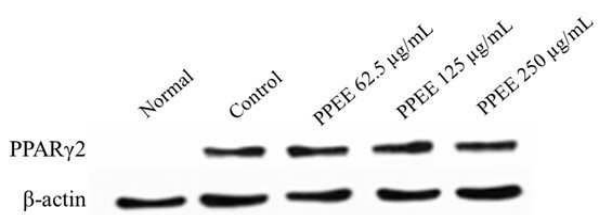
도면19



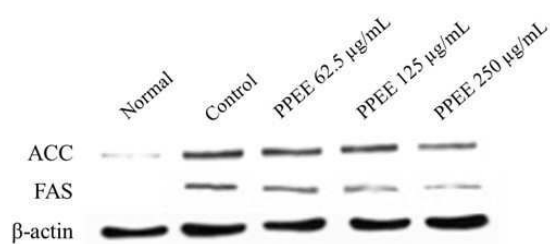
도면20



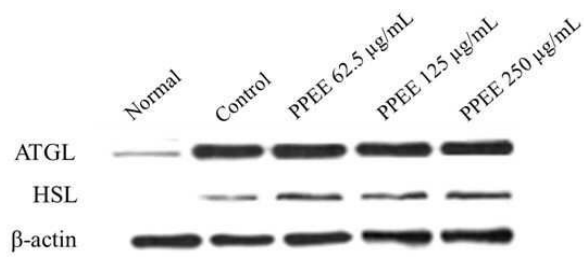
도면21



도면22



도면23



서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating obesity comprising extract of persicaria perfoliata
- <130> ADP-2015-0087
- <160> 24
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> SREBP-1c forward
- <400> 1
- gcgctaccgg tcttctatca 20
- <210> 2
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> SREBP-1c reverse
- <400> 2
- tgctgcaaaa agacaaggg 19
- <210> 3
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> C/EBP forward
- <400> 3

gactacgcaa cacacgtgta act	23
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C/EBP reverse	
<400> 4	
caaaaccaaa aacatcaaca accc	24
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PPAR forward	
<400> 5	
ggtgaaactc tgggagattc	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PPAR reverse	
<400> 6	
caaccattgg gtcagctctc	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C/EBP forward	
<400> 7	
ttacaacagg ccaggtttcc	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> C/EBP reverse
 <400> 8
 ctctgggatg gatcgattgt 20
 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ACC forward
 <400> 9
 tgaccgtggg cacaagtt 19
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ACC reverse
 <400> 10
 aggaggaacc gcatttatcg a 21

 <210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aP2 forward
 <400> 11
 aacaccgaga ttccttcaa 19
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aP2 reverse
 <400> 12
 tcacgccttt cataacacat 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FAS forward	
<400>	13	
ggttcggaat gctatccagg		20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FAS reverse	
<400>	14	
ctgcggaac ttcaggaaat		20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Leptin forward	
<400>	15	
ccaaaaccct catcaagacc		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Leptin reverse	
<400>	16	
ctcaaagcca ccacctctgt		20
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Adiponectin forward	
<400>	17	
ggagatgcag gtcttcttgg t		21
<210>	18	

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Adiponectin reverse
 <400> 18
 tcctgatact ggtcgtaggt gaa 23
 <210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATGL forward
 <400>
 > 19
 ttcacatcc gcttgttg 18
 <210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATGL reverse
 <400> 20
 agttccacct gctcagac 18
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HSL forward
 <400> 21
 gtcgcctttc tcctgatgac 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HSL reverse
 <400> 22

cttgctgctt ctcttgctc	20
<210> 23	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH forward	
<400> 23	
glatgactcc actcacggca aa	22
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GAPDH reverse	
<400> 24	
ggtctcgctc ctggaagatg	20