

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0130919

(43) 공개일자 2023년09월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 491/18 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61K 31/4748 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 491/18 (2022.08)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2022-0028120

(22) 출원일자 2022년03월04일

심사청구일자 2022년03월04일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

이승욱

대구광역시 달성군 다사읍 대실역북로 26, 207동
102호(대실역청아람 2단지)

전창환

대구광역시 달성군 유가읍 테크노대로 195, 111동
1403호(대구테크노폴리스 반도유보라 아이비파크)

박지현

대구광역시 동구 팔공로 274, 201동 1504호(봉무
동, 이시아폴리스 더샵 2차)

(74) 대리인

특허법인태백

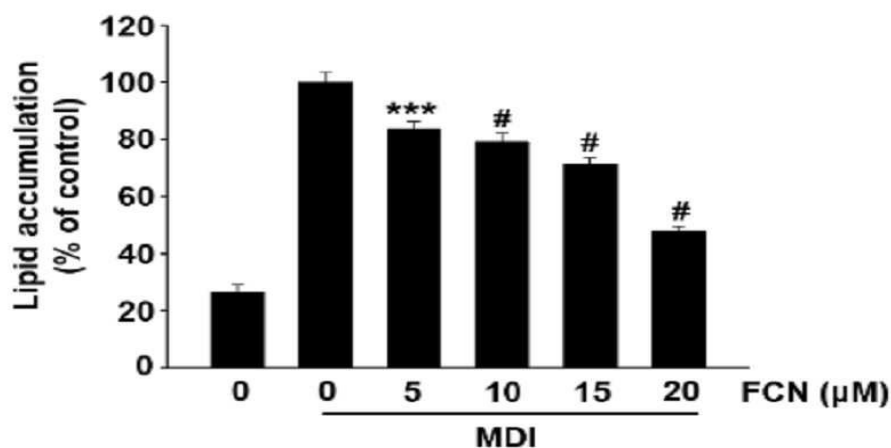
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 팜키놀린을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 팜키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 팜키놀린이 지방세포 분화 관련 단백질 및 세포주기 조절인자의 발현 조절을 통해 지방세포 분화 효과를 나타내는 것을 확인함에 따라, 비만 또는 심혈관계 질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 31/4748 (2013.01)

A61P 3/10 (2018.01)

A61P 9/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/3262 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711142919

과제번호 2020R1A2C1005339

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 지방세포 분화과정에서의 Nur77과 AMPK α 의 상호작용 규명 및 신규 항비만용 식의약
소재 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 계명대학교

연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

팡키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

팡키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 팡키놀린은 지방세포 분화 억제제를 통한 체지방 개선 또는 혈중지질 농도 개선 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 팡키놀린은 지방세포 분화 관련 단백질인 PPAR γ , C/EBP α , FAS, adiponectin, C/EBP β 및 C/EBP δ 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 팡키놀린은 세포주기 조절인자인 cyclin A 또는 p27의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

청구항 2에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 고혈압, 저혈압, 동맥경화, 고지혈증, 심근경색, 뇌졸중, 뇌출혈, 부정맥, 협심증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

팡키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

팡키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 혈중 중성지방 또는 콜레스테롤 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 팡키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만은 최근 생활수준의 향상으로 위생환경이 개선되고 식생활이 서구화하여 평균 수명이 연장되면서, 질병의 양상 또한 선진국형으로 급격히 변화되고 있는 양상 중에 가장 대표적인 질환이다. 따라서, 성인병이 오늘날 가장 큰 의학적 과제로 등장하게 되었으며 이러한 성인병의 주요한 원인이 되고 있는 비만도 급격하게 증가되고 있는 상황이다.

[0003] 비만은 소모하는 열량에 비해 과다한 열량을 섭취함으로써 여분의 열량이 체내에 지방의 형태로 축적되는 현상을 말한다. 남자는 체지방이 체중의 25%, 여자는 체중의 30% 이상일 때 비만으로 보며, 임상적으로는

BMI(Body Mass Index: 체질량지수)가 25.0 내지 30.0를 과체중으로 정의하고, 30.0 이상인 경우를 비만으로 정의한다. 비만은 유전적 영향, 서구화되는 식생활에 의한 환경적인 영향, 스트레스에 의한 심리적인 영향 등 다양한 원인에 의해 유발되는 것으로 여겨지고 있으나, 아직 그 정확한 원인이나 기작에 관해서는 명확히 정립된 바가 없는 상황이다.

[0004] 비만 치료제는 일반적으로 식욕 억제제, 체내 에너지 대사 촉진제 및 소화 흡수 억제제로 구분된다. 식욕 억제를 통한 대표적인 비만 치료제는 리덕틸(Reductil™, 애보트사, 미국)을 들 수 있고, 체내 에너지를 촉진을 통한 대표적인 비만 치료제로서는 엑소리제(Exorise™, 아코 파마사, 프랑스)를 들 수 있으며, 지방의 소화 흡수를 통한 대표적인 비만 치료제로서는 제니칼(Xenical™, 로슈제약회사, 스위스)을 들 수 있다.

[0005] 비만이 발생하여 그 상태가 지속되면 고혈압, 혈중 콜레스테롤 상승, 신장 질환, 뇌졸중, 동맥경화증, 지방간, 관절염, 암, 수면 무호흡증, 당뇨병 등 여러 질환의 원인으로도 작용할 수 있기 때문에, 전 세계적으로 비만 치료에 많은 관심이 모아지고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-2293927호(2016.02.23. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 팅키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 팅키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 팅키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 팅키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 팅키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 혈중 중성지방 또는 콜레스테롤 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 팅키놀린(Fangchinoline)이 지방세포 분화 관련 단백질 및 세포주기 조절인자의 발현 조절을 통해 지방세포 분화 효과를 나타내는 것을 확인함에 따라, 비만 또는 심혈관계 질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 팅키놀린(Fangchinoline) 처리에 따른 3T3-L1 전구지방세포의 분화 억제 효과를 분석한 결과이다. 도 1a는 분석한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 1b는 상기 세포를 오일-레드-0(oil-red-0) 염색 후 현미경으로 관찰한 이미지이다.

도 2는 3T3-L1 전구지방세포의 단계별 분화 과정에 미치는 팅키놀린(Fangchinoline)의 영향을 분석한 결과이다. 도 2a는 팅키놀린(Fangchinoline) 처리기간 및 실험결과를 나타낸 그래프이고, 도 2b는 상기 세포를 오일-레드-0(oil-red-0) 염색 후 현미경으로 관찰한 이미지이다.

도 3은 웨스턴 블롯(Western blot) 분석을 통해 팅키놀린(Fangchinoline) 처리에 따른 지방세포의 분화 관련 단

백질(PPAR γ , C/EBP α , FAS, adiponectin, C/EBP β 및 C/EBP δ)과 세포주기 조절인자(cyclin A 및 p27)의 발현 변화를 분석한 결과이다. 도 3a는 PPAR γ , C/EBP α , FAS 및 adiponectin의 발현 분석 결과이고, 도 3b는 C/EBP β , C/EBP δ , cyclin A 및 p27의 발현 분석 결과이다.

도 4는 팡키놀린(Fangchinoline)에 따른 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델에서의 항비만 효과를 확인하기 위한 동물 실험 진행도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016]

본 발명은 팡키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017]

상기 팡키놀린은 지방세포 분화 억제제를 통한 체지방 개선 또는 혈중지질 농도 개선 효과를 나타낼 수 있고, 바람직하게는 지방세포 분화 초기를 효과적으로 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0018]

또한, 상기 팡키놀린은 지방세포 분화 관련 단백질인 PPAR γ , C/EBP α , FAS, adiponectin, C/EBP β 및 C/EBP δ 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019]

또한, 상기 팡키놀린은 세포주기 조절인자인 cyclin A 또는 p27의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020]

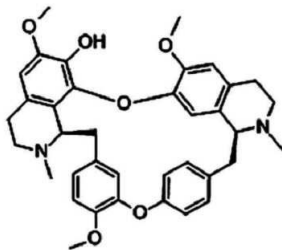
상기 심혈관계 질환은 고혈압, 저혈압, 동맥경화, 고지혈증, 심근경색, 뇌졸중, 뇌출혈, 부정맥, 협심증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021]

상기 팡키놀린은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물로서, 분자식 $C_{37}H_{40}N_2O_6$, 분자량 608을 가진다.

[0022]

[화학식 1]



[0023]

[0024]

본 발명에서 상기 팡키놀린의 수득 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 공지된 방법으로 분방기 (*Stephania tetrandra*)와 같은 천연물로부터 추출하거나, 화학적으로 합성하거나, 시판되는 물질을 사용할 수 있다.

[0025]

본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0026]

상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0027]

본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0028]

상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취,

분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 외용제 형태로 제형화될 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 봉해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에 게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

[0032] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 팅키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 팅키놀린(Fangchinoline)을 유효성분으로 포함하는 혈중 중성지방 또는 콜레스테롤 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능 식품"이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0038] 상기 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0039] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0040] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다. 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능 식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

- [0041] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0042] 본 발명에서 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 “개선”이란 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 질환의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0044] 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.
- [0046] **[실험예 1] 세포 배양 및 시료 처리**
- [0047] 팡키놀린(Fangchinoline; 이하 FNC라고 함)은 Toronto Research Chemicals (Ohtario, Canada)로부터 구입하여 사용하였다.
- [0048] 지방 전구세포인 3T3-L1 세포를 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다. DMEM 배지(Dulbeccos modified Eagles medium high glucose; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 10% 우아 혈청(bovine calf serum; BCS) 및 항생제를 첨가하여 배양 및 분화 배지로 사용하고, 5% CO₂ 및 37℃ 인큐베이터에서 세포를 배양하고 세포가 confluent 상태가 되면 트립신/EDTA를 처리하였다.
- [0049] 트립신 처리된 세포를 원심분리(L-70, Bekman Coulter, Fullerton, CA, USA)하여 세포를 수집하고 3⁵ cells/well의 밀도로 6-well에 분주한 후 100% confluency 상태에서 48시간 방치한 후, 10% BCS, 23mg/mL 아이소부틸메틸젠티딘(isobutylmethylxanthine; 이하 IBMX라함, Sigma-Aldrich, Chem. Co., St. Louis, MO, USA), 5mg/mL 인슐린(Sigma-Aldrich, Chem. Co.) 및 1mM 덱사메타손(dexamethasone, Sigma-Aldrich, Chem. Co.)이 첨가된 DMEM 배지(MDI)에 처리하여 48시간 동안 분화를 유도하였다.
- [0050] 분화유도 후 2일 마다 10% FBS, 5mg/mL 인슐린 및 농도별(1, 5 및 10 μM) FNC가 첨가된 DMEM 배지로 교체해주었다.
- [0052] **[실시예 1] 오일-레드-O 염색을 통한 지방 전구세포 분화 억제 효과 측정**
- [0053] 3T3-L1 전구지방세포를 9일 동안 분화시킨 후 배지를 제거한 후 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고, 10% 포름알데하이드 용액으로 세포를 고정시켰다. 다시 PBS로 세척 후, 오일-레드-O(oil-red-O) 용액을 첨가하여 30분간 실온에서 염색하고, 오일-레드-O 용액을 제거한 후 증류수로 세척하여 건조시킨 다음 위상차 현미경으로 관찰하였으며, 100% 이소프로필 알콜(isopropyl alcohol)로 염색된 지방구를 용해시켜 510nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0054] 그 결과, FNC가 각 처리농도에서 지방세포의 분화를 억제하는 활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 1).
- [0056] **[실시예 2] 지방세포 단계별 분화 과정에서 FNC의 효과 분석**
- [0057] FNC 처리가 지방세포 단계별 분화에 미치는 영향을 분석하기 위해, 성장을 멈춘(G1 arrest) 3T3-L1 세포에 MDI(분화유도물질)를 처리하여 세포주기 조절 단백질의 발현을 증가시켜 수회에 걸쳐 mitotic clonal expansion(MCE)을 진행시킴으로써, 초기 분화를 유도하였다. 이후, MCE가 끝난 지방세포들은 adipogenesis를 조절하는 핵심 전사인자인 PPAR γ 및 C/EBP α 를 중심으로 중기 및 후기 분화가 진행되었고, 지방세포 분화 마커들의 발현을 통해 성숙한 지방세포의 분화가 완료되었다. 그 후, FNC의 처리 기간을 달리하여 단계별 분화 과정을 분석하였다.

[0058] 그 결과, FNC는 분화 초기 단계에서 특히 높은 지방세포 분화 억제 활성을 나타내는 것을 확인했다(도 2).

[실시예 3] Western blot 분석을 통한 지방 전구세포 분화 마커 발현 측정

[0061] 농도별 FNC 처리에 의한 지방세포의 분화 관련 단백질(PPAR γ , C/EBP α , FAS, adiponectin, C/EBP β 및 C/EBP δ)과 세포주기 조절인자(cyclin A 및 p27)의 발현을 측정하기 위해, 웨스턴 블롯(western blot)을 실시하였다. 샘플 처리가 완료된 세포(분화 7일째)의 상등액 및 세포를 각각 취하여 단백질을 정량한 후, 10% 러닝겔(running gel)과 4.5% 스택킹 겔(stack gel)을 이용하여 125V에서 SDS-폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel) 전기영동(SE260, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 실시하였다. 전기영동으로 분리한 단백질은 트랜스퍼 버퍼(transfer buffer; 20% 메탄올, 25mM Tris-HCl 및 192mM 글라이신)를 이용하여 350mA에서 120분간 이모빌론-피-트랜스퍼 멤브레인(immobilon-P transfer membrane; PVDF transfer membrane, Port Washington, NY, USA)으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 멤브레인은 5% 탈지유(non-fat dry milk; skim milk solution)로 블로킹(blocking)하였다. 4℃에서 일차 항체의 발현 정도를 검토하기 위하여, TBST(tris-buffered saline and tween 20) 용액에 1:1000으로 희석하여 24시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세척하였다. 그 후, 이차 항체를 2시간 TBST 용액에 1:2000으로 희석하여 반응시키고 다시 TBST로 3회 세척하였다. 증류수로 한 번 더 세척한 후, 멤브레인에 ECL 감지 키트(WSE-7120s, ATTO Co., Tokyo, Japan)의 발색시약 I 과 II를 1:1로 섞은 후 혼합액을 도포하고, X-선 필름(X-ray film; CP-G plus, Agfa Healthcare Ltd, New Orleans, LA, USA)에 노출하여 현상한 다음 필름 상에서 단백질의 발현 정도를 관찰하였다.

[0062] 그 결과, FNC 처리에 따라 PPAR γ , C/EBP α , FAS 및 adiponectin의 발현이 억제되었을 뿐만 아니라(도 3a), 지방세포 초기 분화 과정에서의 주요 전사인자인 C/EBP β 및 C/EBP δ 와 세포주기 조절 인자인 cyclin A 및 p27의 발현 역시 FNC 처리에 따라 농도 의존적으로 억제되었음을 확인했다(도 3b).

[실시예 4] 고지방 식이 유도 비만 마우스 모델에서 FNC의 항비만 효과 측정

[0065] C57BL/6N 마우스(6주령, 수컷)는 ㈜중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 동물은 12시간 명암 주기의 기 후 제어 환경(21℃ $\pm$ 5% 습도)에서 사육하였고, 7일 동안의 적응 기간을 가졌다. 이후 마우스를 체중에 따라 무작위로 다음 4개 그룹으로 분리하였다: 정상 대조군(ND), 고지방식 대조군(HFD), 고지방식+10 mg/kg/d FNC(HFD+FL) 및 고지방식+40mg/kg/d FNC(HFD+FH). 마우스는 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였으며, 정상 대조군과 고지방 식이군은 각각 일반식(10Kcal% 지방, Cat. No. D10001; Research Diets, INC., New Brunswick, NJ, USA)과 고지방식(60Kcal% 지방; Cat. No. D12492; Research Diets) 사료로 사육하였다. FNC는 옥수수수유에 녹여 총 6주간 경구투여하였으며, 매주 식이 섭취량과 체중을 측정하였다. 실험동물들은 희생 전 12 시간 동안 절식시켰으며, 마취 후 각 마우스로부터 심장 채혈하고 주요 장기들을 적출하였다. 모든 동물은 영남 대학교 동물병원 동물관리위원회 지침(YUMC-AEC2021-021)에 따라 관리 및 사용하였다. 이상에서 설명한 동물 실험 진행도는 도 4와 같다.

[0066] 6주간의 투여를 끝낸 후 모든 동물은 12시간 절식시켰으며, 마취 후 심장 채혈하여 혈청을 분리하였다. 혈청 지질 농도는 ㈜두열바이오텍에 의뢰하여 측정하였으며, 지방조직은 부고환 지방, 신장 주변 지방 및 내장 지방을 각각 분리한 후 무게를 측정하여 그룹별로 비교하였다.

[0067] 6주간의 체중 변화, 각 부위별 체지방 함량 및 혈중 지질농도에 미치는 FNC의 효과를 분석한 결과, FNC 저농도(FNC+FL) 및 고농도(FNC+FH) 투여군 모두 체중 증가가 유의적으로 감소하는 것을 확인했다. 혈중 지질농도의 경우, FNC 저농도(FNC+FL) 투여군에서는 중성지질 함량이, 고농도(FNC+FH) 투여군에서는 중성지질 및 총콜레스테롤의 함량이 유의적으로 감소하였다. 한편, 지방조직 각 부위별(부고환 지방, 신장 주변 지방 및 내장 지방) 무게는 고농(FNC+FH)도 투여군에서만 모든 항목에서 유의적인 감소를 보였다(표 1).

표 1

		ND ¹⁾	HFD	HFD+FL	HFD+FH
체중 증가(g)		5.07 $\pm$ 0.61 ^c	13.67 $\pm$ 3.43 ^a	9.26 $\pm$ 3.40 ^b	3.40 $\pm$ 3.49 ^c

지방 무게 /체중(mg/g) ²⁾	E fat	13.97± 5.72 ^c	58.14± 10.88 ^a	58.89± 11.39 ^a	28.81± 16.22 ^b
	P fat	6.09± 4.85 ^c	28.43± 3.83 ^a	27.06± 4.72 ^a	17.17± 15.90 ^b
	I fat	4.84± 2.52 ^b	22.48± 9.10 ^a	19.35± 7.87 ^a	5.60± 6.18 ^b
혈중 지질 농도 ³⁾	TC (mg/dL)	100.40± 14.50 ^c	184.20± 17.46 ^a	179.39± 14.95 ^a	123.83± 25.65 ^b
	TG (mg/dL)	74.17± 20.59 ^b	104.67± 20.01 ^a	82.00± 17.78 ^b	51.83± 13.50 ^c

¹⁾ ND : 정상식이 대조군
HFD : 고지방식 대조군
HFD+FL : 고지방식 + FNC 10mg/kg/day 투여군
HFD+FH : 고지방식 + FNC 40mg/kg/day 투여군

²⁾ E fat : 부고환 지방(epididymal fat)
P fat : 신장주변 지방(perirenal fat)
I fat : 내장 지방(inguinal fat)

³⁾ TC : total cholesterol
TG : triglyceride

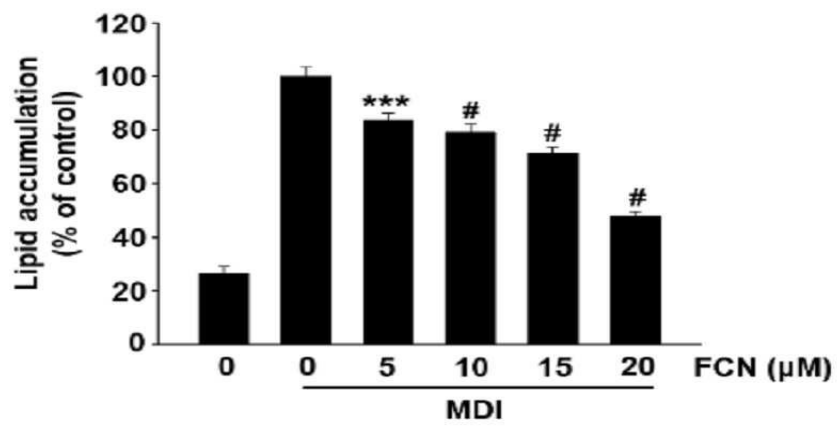
All results are expressed as means ± SD and different superscripts in the same row are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

[0070] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

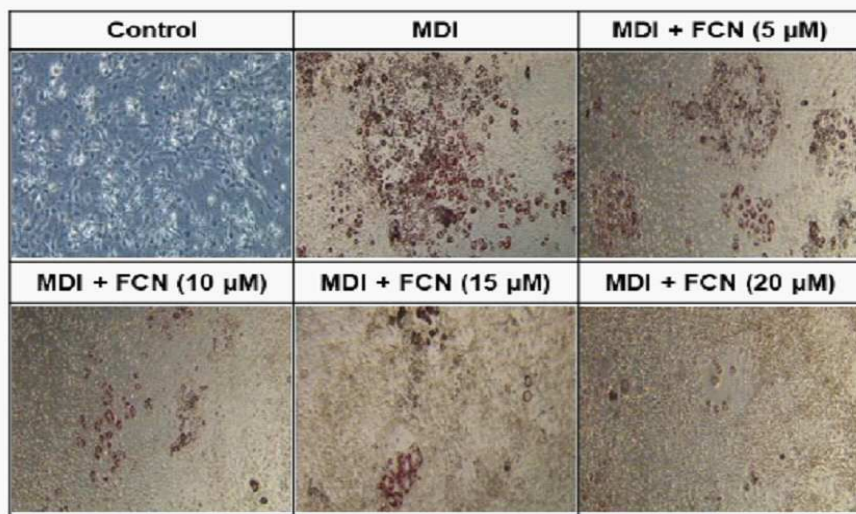
[0071] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

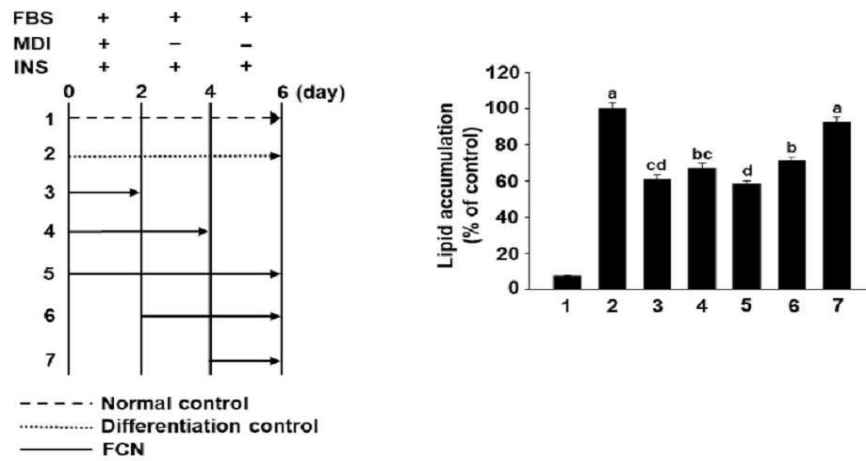
도면1a



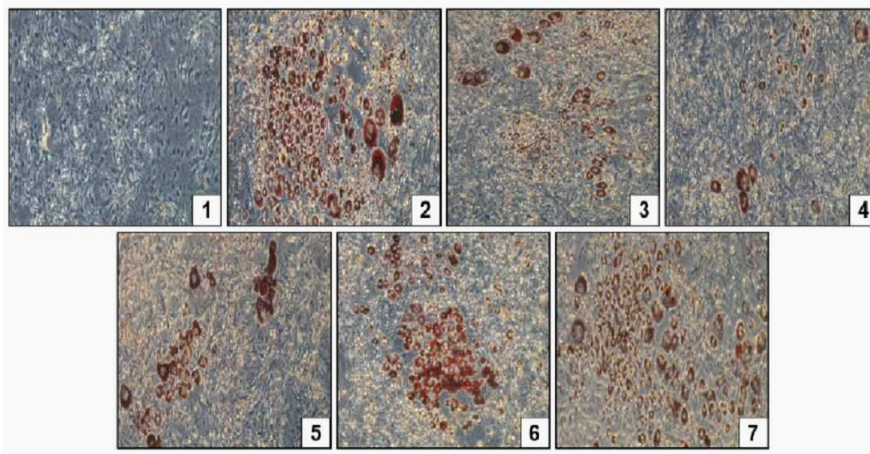
도면1b



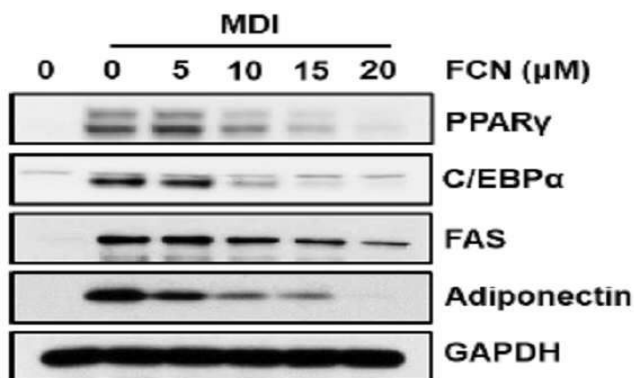
도면2a



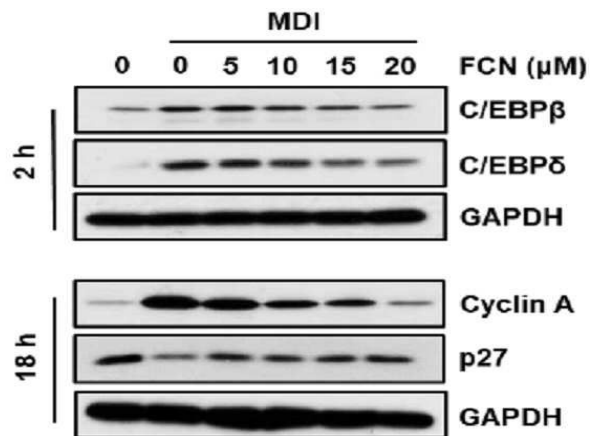
도면2b



도면3a



도면3b



도면4

