

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0080848
(43) 공개일자 2023년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/10 (2022.01) *A23K 20/111* (2016.01)
A23L 33/00 (2016.01)
 (52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2022.01)
A23K 20/111 (2016.05)
 (21) 출원번호 10-2021-0168359
 (22) 출원일자 2021년11월30일
 심사청구일자 2021년11월30일
 기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
 동아대학교 산학협력단
 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
 (72) 발명자
 김은경
 부산광역시 강서구 명지오션시티11로 22 두산위브 포세이돈 116동 103호
 범미기
 부산광역시 사하구 낙동대로 519번길 38-2 (하단동 500-7) 승학파크 202호
 최영진
 부산광역시 강서구 명지국제3로 97, 105동 2103호
 (74) 대리인
 위병갑

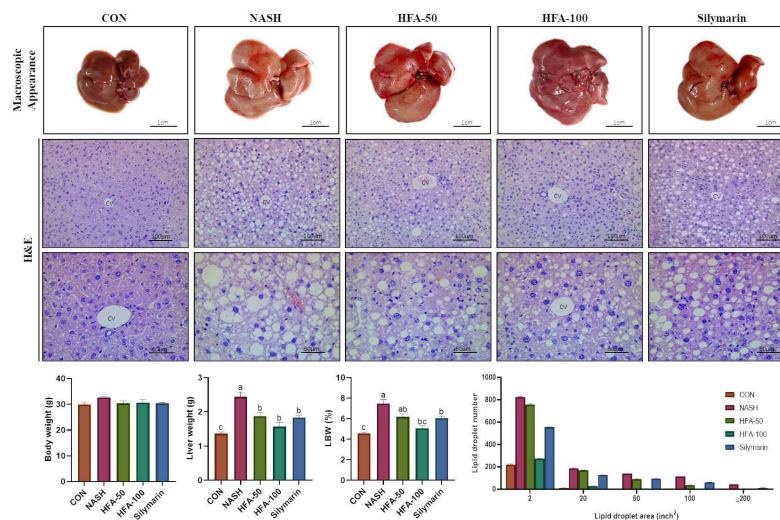
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 여주 유래 하이드로페룰산을 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 여주 유래 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 여주 유래의 하이드로페룰산을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방, 개선 또는 치료의 효과가 있는 조성물에 대해 제공하는 것으로 건강기능성식품 또는 의약품 산업 전반에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 33/30 (2016.08)

A61K 31/192 (2023.05)

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 3/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 하이드로페룰산(hydroferulic acid)은 여주 유래인 것을 특징으로 하는, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 지방간은 비알코올성 지방간인 것을 특징으로 하는, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 지질 축적을 억제시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 혈청 내 LDL/VLDL 비율, 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs) 및 혈청 콜레스테롤(TC)을 감소시키고, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 증가시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 간 섬유화를 억제시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 α -SMA, COL1A1 및 COL1A2의 발현을 감소시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개

선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 간 내 염증을 억제하는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 F4/80, CD68, Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β 의 발현량을 감소시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 조성물은 IL-1 β , TNF- α , MCP-1의 발현량을 감소시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 12

하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 여주 유래 하이드로페룰산을 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만은 대한 늘어나는 경각심과 비만의 원인을 이해하고 이에 대응하고자 하는 전 지구적 노력에도 불구하고, 비만은 가속적으로 증가하는 추세에 있다(Mitchell et al., Implications for female fertility and obesity. *Reproduction*. 2005;130:583-97). 지난 10년간 국내 고도비만 환자는 급격한 증가 추세다. 대한비만학회에 따르면 국내 고도비만율은 2009년 3.5%에서 2018년 6.01%로 10년간 약 72%나 증가하였다. 이 정도 상승세라면 2030년에는 국민 10명 중 1명이 고도비만으로 전망된다. 비만을 단순히 '살이 많이 찐 상태'라고 여기는 사람이 많다. 그러나 비만은 각종 질환을 유발하여 다양한 합병증을 유발할 수 있어 이에 대한 관리가 필요할 것이다.

[0003] 또한, 비만과 더불어 지방간은 지방이 간에 침착된 정도가 간 무게의 5% 이상인 경우를 의미하는 것으로 지방 중에서 중성 지방(트리글리세라이드, TG)이 간세포에 축적된다. 지방간은 음식물 등을 통하여 섭취한 지방질을 원활하게 처리하지 못하면서 발생하는 것으로 분당 서울대 병원 임수 교수 연구진은 '지방간에서 생긴 염증이

악화되면 지방간염을 넘어 간경화, 간암 등 간 고유의 합병증뿐만 아니라 심혈관 질환 및 당뇨병과 같은 만성질환으로 이어져 사망에 이를 수 있기 때문에 이러한 연결 고리를 끊는 것이 중요하다' 라는 연구 결과를 발표한 바 있다.

[0004] 한편, 여주(*Momordica charantia*)는 열대 아시아 원산이며 관상용으로 심어 기른다. 줄기는 덩굴손으로 물체를 감으며 잎은 5~7개로 크게 갈라진다. 덩굴손과 잎이 마주난다. 7~8월에 피는 꽃은 잎겨드랑이에서 하나씩 달리는데 노란색이다. 열매가 특이한데, 길이 7~9 센티미터 정도 되는 길둥근 모양으로 조그만 혹 모양 돌기가 열매 가득 돌아 있으며 익으면 갈라져 붉은색 육질에 싸여 있는 씨가 드러난다. 여주에는 인슐린이 많이 포함되어 있어서 2형 당뇨병에 탁월한 효과가 있다. 그 밖에 항암효과, 피로해소, 기관지강화, 해역작용, 다이어트 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 다만, 여주 물 추출물에서 분리된 하이드로페룰산(hydroferulic acid)의 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 치료효과에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1561600호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0010] 이어서, 본 발명은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0011] 나아가, 본 발명은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 여주 유래 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방, 개선 또는 치료의 효과가 있는 조성물에 대해 제공하는 것으로 건강기능성식품 또는 의약품 산업 전반에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 동물실험 디자인을 간단히 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 간 조직에서 지방 감소 효과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 혈액 및 지방 조직 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 지방침착 및 간 섬유화 억제 효과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 간 조직에서 간 섬유화 관련인자 발현량 측정 결과를 나타낸 도

이다.

도 6은 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 간 조직에서 염증 관련인자(F4/80, CD68, IL-1 β , TNA- α , MCP-1) 발현량 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 간 조직에서 염증 관련인자(Gas6, MerTK, ERK, p-ERK, TGF- β) 발현량 측정 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0015] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0016] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w)%, 고체/액체는 (w/v)%, 그리고 액체/액체는 (v/v)%이다.
- [0017] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예 또는 실험예들을 참조하면 명확해질 것이다.
- [0019] 본 발명은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 상기 하이드로페룰산(hydroferulic acid)은 여주 유래, 바람직하게는 여주 물 추출물에서 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어 “여주(*Momordica charantia*)”는 박과(Cucurbitaceae)에 속하는 채소 또는 약용식물로 주로 열대나 아열대 지역에서 자라며, 주로 열매를 식용으로 이용하는데, 쓴 맛이 강하여 일반적으로 영문으로는 bitter gourd 또는 bitter melon이라고 불린다. 어린 열매는 녹색을 나타내고, 더 성숙되면 오렌지색으로 변하며, 시간이 더 지나면 과육이 터져 빨간색 가종피가 노출되고, 종자는 일반적으로 브라운색을 나타낸다. 일본, 중국, 동남아시아에서는 주로 미숙과를 식용으로 재배하고 있으나 어린잎을 식용으로 이용하기도 한다.
- [0022] 또한, 상기 비만은 비만 이외에 당뇨병, 지방간, 고지혈증, 동맥경화증 및 이들의 합병증과 같은 비만 관련 질환을 포함하는 것일 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 지방간은 알코올성 지방간 또는 비알코올성 지방간일 수 있으며, 바람직하게는 비알코올성 지방간일 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어 “비알콜성 지방간”은 운동 부족, 고열량 식사 등의 나쁜 생활 습관에 의하여 과잉된 에너지가 간에 중성지방 형태로 쌓여 발생하는 질환을 말한다. 방치할 경우 간염, 간경화에서 간암까지 진행할 수 있으나, 현재까지는 마땅한 치료약이 없어 운동 및 식생활 개선을 통한 치료가 주로 이루어지고 있다. 본 발명에서 상기 비알콜성 지방간은 단순히 지방만 끼어 있고 간세포 손상은 거의 없는 단순 비알콜성 지방간, 간세포 손상이 심하고 지속되는 만성 비알콜성 지방간염, 간경변증에 이르는 다양한 형태의 간질환을 포함한다.
- [0025] 또한, 상기 조성물은 지질 축적을 억제시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 또한, 상기 조성물은 혈청 내 LDL/VLDL 비율, 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs) 및 혈청 콜레스테롤(TC)을 감소시키고, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 또한, 상기 조성물은 간 섬유화를 억제시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0028] 또한, 상기 조성물은 α -SMA, COL1A1 및 COL1A2의 발현을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 또한, 상기 조성물은 간 내 염증을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 또한, 상기 조성물은 F4/80, CD68, Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β 의 발현량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 또한, 상기 조성물은 IL-1 β , TNA- α , MCP-1의 발현량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 하이드로페룰산(hydroferulic acid)를 유효성분으로 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0033] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0034] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0036] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0038] 이어서, 본 발명은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 사료 조성물은 기존의 항생제를 대체하고 유해한 식품 병원성균의 생장을 억제하는 바, 동물체의 건

강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 사료 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 등의 형태로 제조될 수 있다. 상기 발효사료는 본 발명의 펩타이드 이외의 여러 가지 미생물균 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 펩타이드를 혼합하여 제조할 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일리지는 청예사료를 본 발명에 따른 미생물로 발효시킴으로써 제조할 수 있다. 습식발효사료는 음식물 쓰레기 등과 같은 유기물을 수집 및 운반하여 살균과정과 수분조절을 위한 부형제를 일정비율로 혼합한 후, 발효에 적당한 온도에서 24 시간 이상 발효하여, 수분함량이 약 70%로 포함되도록 조절하여 제조할 수 있다. 발효건조사료는 습식 발효사료를 건조과정을 추가로 거쳐 수분함량이 30% 내지 40% 정도 함유되도록 조절하여 제조할 수 있다.

[0040] 본 발명의 사료 조성물은 종래 사료에 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있다. 이러한 사료에 첨가되는 성분의 일례로서 곡류분말, 고기분말, 및 두류 등을 포함할 수 있다. 상기에서 곡류분말은 쌀가루, 밀가루, 보리가루, 및 옥수수가루 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다. 상기에서 고기분말은 닭고기, 소고기, 돼지고기, 및 타조고기 중에서 선택된 어느 하나 이상을 분말화한 고기분말을 사용할 수 있다. 상기에서 두류는 대두, 강낭콩, 완두콩, 및 검정콩 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 사료 조성물은 상기에서 언급한 종래 사료에 첨가되는 성분인 곡류분말, 고기분말, 및 두류 이외에도 사료의 영양성을 증대시키기 위해 영양제, 및 무기물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가할 수 있으며, 사료 품질의 저하를 막기 위해 항곰팡이제, 항산화제, 항응고제, 유화제, 및 결합제 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0043] 나아가, 본 발명은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명에 따른 드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 투여로 비만, 지방간 또는 지방간염 관련 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 대상에게 소정의 물질, 즉 본 발명에 따른 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 이에 따라, 본 발명의 약학적 조성물은 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 폐내투여, 직장 내 투여 등의 방식으로 투여될 수 있으나, 정맥내, 피하 또는 경구를 통하여 투여되는 것이 바람직하다. 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물이 비만의 예방 또는 치료 용도로 사용되는 경우에는 정맥내 투여가 바람직하고, 지방간 또는 지방간염의 예방 또는 치료 용도로 사용되는 경우에는 피하 투여가 바람직하다.

[0046] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(Adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0049] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이

해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(Witepsol), 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01~5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0051] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다. 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0052] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다. 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0054] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0056] <준비예 1> 여주 추출물의 제조

[0057] 신선한 여주 잎(Shandong, China)을 실온(RT)에서 2주 동안 그늘에서 공기 건조시킨 후 샘플을 분쇄하여 분말로 만들었다. 분말 샘플은 추출 전에 실온에서 보관하였다. 이후 상기 분말을 증류수를 이용하여 추출물을 제조하였다. 추출 효율을 위해 잎의 분말 100 g을 1L 용매가 들어 있는 2L 표준 플라스크에 별도로 담갔다. 담근 식물 분말을 포함하는 플라스크를 면 마개와 알루미늄 호일로 밀봉하고 실온에서 1시간 동안 진탕기에 두었다. 최대 추출을 위해 이 과정을 3회 반복하였다. 3회 반복 추출후 추출물을 회전 증발기를 이용하여 60℃에서 농축한 후 여과하고 5일 동안 동결건조하였다.

[0059] <준비예 2> 실험동물 조건

[0060] 실험동물의 준비는 도 1을 참조하여 수행하였다. 9주령 C57BL/6 수컷 마우스를 나라바이오 동물센터(나라바이오택, 서울, 한국)에서 구입하여 실험시설에서 1주일 동안 적응시킨 후, 아스펜 칩이 부착된 투명 플라스틱 케이지 내부에 4마리씩 그룹으로 수용하고, 마우스를 무작위로 두 그룹으로 나누어 깨끗한 병원균이 없는 조건에서 표준 마우스 일반식(Chow diet)과 별도의 처리가 되지 않은 수돗물을 공급하였다. 해당 두 그룹은 정상 식이(CON, 총 에너지 중 10% 지방, 70% 탄수화물, 20% 단백질, 총 3.85 kcal/g; D12450B, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA, n=10) 및 1.25% 콜레스테롤을 포함하는 Western diet (총 에너지 중 42% 지방, 42.7% 탄수화물, 15.2% 단백질, 총 4.51 kcal/g, D120528, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA, n=30)를 급여하였다.

[0061] WD군은 당분의 섭취를 높이기 위해 23.1g/L d fructose (Sigma-Aldrich, F0127) 및 18.9g/L d-glucose(Sigma Aldrich, G8270)을 물에 녹여 자유롭게 음용할 수 있게 하였다. 간 섬유증을 유발시키기 위해 CC14(Sigma-Aldrich, 289116-100ML)를 0.2 μl (0.32 $\mu\text{g}/\text{g}$) 1주일에 1회 복강주사하였다. 6주간 사료와 CC14를 투여한 뒤 실험군인 WD+ 샘플 투여군은 hydroferulic acid을 물에 녹여 그룹별 농도에 맞게 50, 100 mg/kg를 1일 1회

경구투여하였다. 양성 대조군인 WD + Silymarin 투여군은 Silymarin 10 mg/kg를 존대를 이용하여 1일 1회 경구 투여하였다. 섭취한 사료의 양은 매일 기록하며, 마우스별 하루 섭취량은 제한하지 않고 매일 생쥐의 몸무게를 측정하여 하이드로페룰산(hydroferulic acid)의 항비만, 항염증 효과를 검색하였다. 실험 종료 후 RNase가 제거된 수술기구로 부고환지방, 피하지방, 갈색지방, 내장지방과 간 조직을 분리하여 무게를 측정한 뒤 부고환지방과 간조직의 일부는 단백질 및 유전자 발현 분석을 위해 -80° C에 보관하고 남은 일부는 H&E 염색을 실시하기 위해 10% 포름알데히드에 보관하였다.

[0062] 동물 환경은 20 내지 21℃에서 12시간의 암기를 두며, 40 내지 45%의 상대 습도로 적절하게 제어되었다. 모든 실험은 건국대학교 동물병원 동물관리위원회의 승인을 받았으며, 본 발명에 관련한 실험(KU17089)은 사용된 동물의 수와 고통을 최소화하도록 설계하였다.

[0063]

[0064] <실시예 1> 하이드로페룰산(HFA)의 분리

[0065] Vion UPLC™ 시스템(Vion, Waters, Milford, MA, USA)이 사용되었고 LC 조건은 Acquity UPLC BEH C18 컬럼(2.1 ×100 mm, 1.7 μm; Waters, Milford, MA, USA)에서 9분 이내에 최적화되었다. 온도는 55℃로 설정하였다. 유속은 0.35 mL/분으로 설정되었다. 이동상은 0.1% 포름산이 포함된 물(FA)에 0.1% 아세토니트릴(ACN)을 첨가하여 사용하였다. 분광계는 음의 모드에서 전자분무 이온화(ESI)와 함께 사용되었다. MS 작동 조건은 모세관 전압 2.5 kV, Sample cone 20 V, 이온 소스 온도(Ion source temperature) 200℃, 탈용매 온도 400℃, Cone gas 30 L/h, 탈 용매 가스 900 L/h, 스캔 시간 0.2초, 스캔 범위 50 내지 1500 m/z, 충돌 에너지 램프 10 내지 30 eV(50 내지 1000m/z)으로 사용하였다. MarkerLynx 소프트웨어(Waters, Milford, MA, USA)는 UPLC-Q-TOF MS(Waters, Milford, MA, USA)로 분석된 MS 데이터 세트를 수집하였고, 정규화 및 정렬에 사용하였다. 스펙트럼은 모두 내부 표준(Terfenadine[M + H] 및 Zidovudine[M - H])으로 표준화시켰다.

[0067] <실시예 2> 하이드로페룰산 처리에 따른 체중 및 간 무게 변화 측정

[0068] 하이드로페룰산의 지방 감소 효과를 확인하기 위해, 각 실험군 마우스의 체중을 측정하고, 간 조직을 적출하여 간 조직 무게 조직학적 변화를 분석하였다.

[0069] 구체적으로, 6주의 실험기간동안 실험동물의 체중을 주 1회 씩 측정하였다. 6주간 투여 후 mouse를 에테르 마취 하에 채혈 및 방혈치사시킨 다음 간을 적출하여 간의 중량을 측정하였다.

[0070] 마우스에서 분리한 간조직을 10% formalin에서 하루 이상 고정하고 12시간 이상 흐르는 물에서 formalin을 세척한 후 60% etahnol, 70% ethanol, 80%ethanol 90% ethanol, 95% ethanol, 100% ethanol에서 각각 1시간씩 탈수하였다. Xylene에 1시간씩 3번의 투명과정후 paraffin에 1시간씩 2번 침투과정을 실시하였다. 포매과정을 거쳐 약 4 μm의 두께로 박절하여 slide 위에 조직을 얹고 건조시킨 후 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다. Slide의 물기를 없애고 mounting medium을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 마무리하였다. 현미경으로 간 조직의 조직학적 변화를 확인하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0071] 도 2에 나타낸 바와 같이, 각 실험군 마우스의 유의미한 체중 변화는 나타나지 않았으나, NASH 군의 간은 지방 침착이 상당히 진행되어 밝은 핑크색에 가까운 것으로 나타났으며, -H&E 조직 염색사진: 간 조직에 침착된 지방구 확인되었다. 또한, 비알콜성지방간염(NASH) 유도군에 비해 하이드로페룰산(HFA) 섭취군에서 농도 의존적으로 간 조직 무게, 몸무게 대비 간 무게 및 간 조직내 지방구 크기와 수가 감소하는 것으로 나타났다.

[0073] <실시예 3> 하이드로페룰산 처리에 따른 혈액 분석

[0074] 하이드로페룰산의 지방 감소 효과를 확인하기 위해, 각 실험군의 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs), 혈청 콜레스테롤(TC), 혈청 LDL/VLDL를 측정하고, 지방조직 내 중성지방(TG), 유리지방산(FFAs), LDL/VLDL, HDL을 측정하였다.

[0075] 구체적으로, 간 조직은 간을 채취하여 무게를 측정하고 액체 질소에 동결시켜 수득하였으며, 혈청 샘플은 심장 천자를 사용하여 혈액 샘플을 수집하고, 혈청을 원심분리(20분 동안 3000 rpm)로 분리하여 수득하였다. 간 조직 및 혈청 샘플은 추가 분석이 있을 때까지 -80℃에서 보관하였다. 급속혈중지질분석기(OSANG Healthcare Lipid Pro, 안양, 대한민국)를 사용하여 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs), 혈청 총콜레스테롤(TC), 저밀도

지단백 콜레스테롤(LDL), 초저밀도 지질단백질(VLDL), 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 측정하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0076] 도 3에 나타난 바와 같이, 비알콜성지방간 유도군에 비해 하이드로페룰산 섭취군에서 농도의존적으로 혈청 중성 지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs), 혈청 콜레스테롤(TC), 혈청 LDL/VLDL이 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 지방조직 내 중성지방(TG), 유리지방산(FFAs), LDL/VLDL은 감소하였고, HDL은 증가하는 것으로 나타났다.

[0078] <실시예 4> 하이드로페룰산 처리에 따른 지질 축적 측정

[0079] 하이드로페룰산의 지방 감소 효과를 확인하기 위해, 각 실험군의 동물 모델에서 간 조직을 적출하고, 지방 침착 (Oil Red O) 및 간섬유화(Masson, Sirius Red) 정도를 분석하였다.

[0080] 구체적으로, Oil Red O 염색을 위해 동결시킨 간 조직을 4 μ m 두께로 절단한 후 슬라이드에 표본을 고정시키고 Oil Red O (Sigma, St. Louis, MO) 시약으로 염색하여 광학현미경을 사용하여 간 내 지방 침착을 관찰하였다.

[0081] 간섬유화 정도를 분석하기 위해 마우스에서 분리한 간조직을 약 4 μ m로 자른 절편을 부착시킨 슬라이드를 담은 트레이를 100% 에탄올 3분, 95% 에탄올 3분, 70% 에탄올에 3분 동안 차례대로 담근 뒤 Weigert's hematoxylin working solution에 10분간 담가둔 후 흐르는 물에 10분간 용액을 씻어내고 증류수에 5회간 담갔다 꺼내는 것을 반복하고, Ponceau S acid fuchsin solution에 15분간 담가둔 후 증류수에 5회간 담갔다 꺼내는 것을 반복하였다. 그리고 1% phosphotungstic solution에 15분간 담가둔 후, aniline blue solution에 10 분간 담고 증류수에 3회 담갔다 꺼내는 것을 반복한 후 1% acetic acid solution에 5분간 담가두었다. 95% ethanol과 100% ethanol에 3회씩 차례대로 담갔다 꺼내는 것을 반복한 후 paraffin 제거를 위해 xylene에 3분간 2회 담가두었다. 상온에 조직을 말린 후 canada balsam (3) : xylene (1)의 비율로 제작한 mounting medium을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 마무리하였다.

[0082] Sirius Red 염색은 마우스에서 분리한 간조직을 약 4 μ m로 자른 절편을 부착시킨 슬라이드를 담은 트레이를 100% 에탄올 3분, 95% 에탄올 3분, 70% 에탄올에 3분 동안 차례대로 담근 뒤 Sirius Red working solution에 30분간 담가둔 후 증류수에 5회간 담갔다 꺼내는 것을 반복하였다. 95% ethanol과 100% ethanol에 3회씩 차례대로 담갔다 꺼내는 것을 반복한 후 paraffin 제거를 위해 xylene에 3분간 2회 담가두었다. 상온에 조직을 말린 후 canada balsam (3) : xylene (1)의 비율로 제작한 mounting medium을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 마무리 하였다.

[0083] 현미경을 이용해 염색한 간 조직을 촬영한 뒤 imageJ(NIH, USA)를 이용하여 간의 섬유화된 정도를 비교하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0084] 도 4에 나타난 바와 같이, 간 조직 염색결과 비알콜성지방간 유도군의 경우 지방 침착 및 간 섬유화가 증가하였으나, 하이드로페룰산 섭취군의 경우 농도의존적으로 지방 침착 및 간 섬유화가 억제되는 것으로 나타났다.

[0086] 이어서, 추가적으로 간조직 내 섬유화와 관련된 α -SMA, COL1A1 및 COL1A2 발현량 측정하였다.

[0087] 구체적으로, α -SMA 면역조직화학염색은 습윤챔버를 사용하여 수기로 시행하였다. 그 과정은 4 μ m 두께의 파라핀 절편을 제작하여 슬라이드에 붙이고 60°C의 슬라이드 건조기에서 충분히 건조시킨 후 자일렌에 탈파라핀, 알코올을 이용해 함수한 후 면역조직화학염색을 습윤챔버를 사용하여 시행하였다. 조직 절편을 수세 후 3% Hydrogen peroxidase 에 10분간 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 차단하였고, Tris buffer saline으로 세척한 후 비특이적 반응을 차단하기 위해 Block solution에 옮겨 60분간 작용시켰다. 이어 일차 항체로 α -SMA monoclonal antibody와 각각 overnight 반응시킨 다음 Tris buffer saline로 적당히 세척하고 HRP-polymer를 사용하여 2시간 반응시켰다. 그 후 DAB로 5분간 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조염색하고 탈수, 투명을 거쳐 mount로 봉입하였다.

[0088] 간 내 α -SMA, COL1A1의 단백질 발현량을 확인하고자, 간을 LIPA buffer를 이용해 lysis하여, 단백질을 추출하고 정량하였다. 정량한 단백질 샘플을 SDS-acrylamide gel에 loading하고, 전기영동한 뒤 membrane으로 transfer 하였다. membrane을 blocking buffer로 상온에서 2시간 blocking한 뒤 α -SMA, COL1A1 monoclonal antibody를 이용하여 4°C overnight shaking 하였다. TBST로 10분 동안 washing 한 다음 Secondary antibody를 상온에서 1시간 정도 shaking하였다. TBST(또는 PBST)로 10분 동안 washing한 뒤 ECL solution를 membrane에

뿌리고, chemi-doc을 사용하여 단백질 발현량을 측정하였다.

[0089] 간 내 COL1A1, COL1A2의 mRNA 발현량을 확인하고자 마우스의 간 조직에서 TRIzol을 이용해 RNA를 추출한 후 RNase가 처리된 0.1% DEPC water로 용해시켜 UV spectro-photometer로 260nm/280nm에서 흡광도를 측정하였다. AccuPower CycleScript RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Republic of Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Nuna[®] Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, MA, USA)를 이용하여 Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems, NSW, Australia)를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 표적 유전자의 Ct(threshold cycle, 임계치 주기: 증폭이 지수적으로 일어나는 영역에서 일정 증폭 산물량이 되는 주기수)와 기준 유전자의 Ct를 이용하여 COL1A1, COL1A2의 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0090] 도 5에 나타낸 바와 같이, 간 조직내 섬유화와 관련된 α -SMA 염색 결과 비알콜성지방간 유도군에 비해 하이드로페룰산 섭취군에서 농도의존적으로 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 또한, 간 조직 RNA 내 섬유화 관련 인자인 COL1A1, COL1A2의 발현량 측정 결과 농도의존적으로 COL1A1, COL1A2의 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 이를 통해 하이드로페룰산의 처리가 간 조직의 섬유화를 억제하는 것을 확인하였다.

[0092] <실시예 5> 하이드로페룰산 처리에 따른 염증인자 발현량 측정

[0093] 지방간에 의해 발생한 염증 억제 효과를 확인하기 위해, 간 조직 내 염증관련 인자의 발현량을 측정하였다.

[0094] 구체적으로, CD68, F4/80, MerTK 면역조직화학염색은 습윤챔버를 사용하여 수기로 시행하였다. 그 과정은 4 μ m 두께의 파라핀 절편을 제작하여 슬라이드에 붙이고 60°C의 슬라이드 건조기에서 충분히 건조시킨 후 자일렌에 탈파라핀, 알코올을 이용해 함수한 후, 면역조직화학염색을 습윤챔버를 사용하여 시행하였다. 조직 절편을 수세 후 3% Hydrogen peroxidase 에 10분간 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 차단하였고, Tris buffer saline 으로 세척한. 다음 비특이적 반응을 차단하기 위해 Block solution에 옮겨 60분간 작용시켰다. 이어 일차 항체로 CD68 monoclonal antibody, F4/80 monoclonal antibody, MerTK monoclonal antibody를 각각 overnight 반응시킨 다음 Tris buffer saline로 세척하고 HRP-polymer를 사용하여 2 시간 반응시켰다. 그 후 DAB로 5분간 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조염색하고 탈수, 투명을 거쳐 mount로 봉입하였다.

[0095] 마우스에서 RNA를 추출하기위해 간 조직에서 RNA를 추출한 후 RNase가 처리된 0.1% DEPC water로 용해시켜 UV spectro-photometer로 260nm/280nm에서 흡광도를 측정함. 역전사 반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)법을 이용하여 mRNA에 대한 PCR 산물을 정량화 한 뒤 PCR은 Accupower PCR Premix (Bioneer Co., Korea) tube에 역전사된 cDNA 1 μ g을 이용하여 qPCR을 수행하였으며 IL-1 β , TNA- α , MCP-1, TGF- β mRNA의 발현을 하였다.

[0096] 간 조직 내 염증과 관련된 Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β 의 단백질 발현량을 확인하고자, 간을 LIPA buffer를 이용해 lysis하여, 단백질을 추출하고 정량하였다. 정량한 단백질을 샘플을 SDS-acrylamide gel에 loading하고, 전기영동한 뒤 membrane으로 transfer 하였다. membrane을 blocking buffer로 상온에서 2시간 blocking한 뒤 Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β monoclonal antibody를 이용하여 4°C overnight shaking 하였다. TBST로 10분 동안 washing 한 다음 Secondary antibody를 상온에서 1시간 정도 shaking하였다. TBST(또는 PBST)로 10분 동안 washing한 뒤 ECL solution를 membrane에 뿌리고, chemi-doc을 사용하여 단백질 발현량을 측정하였다.

[0097] 그 결과는 도 6 및 도 7에 나타내었다.

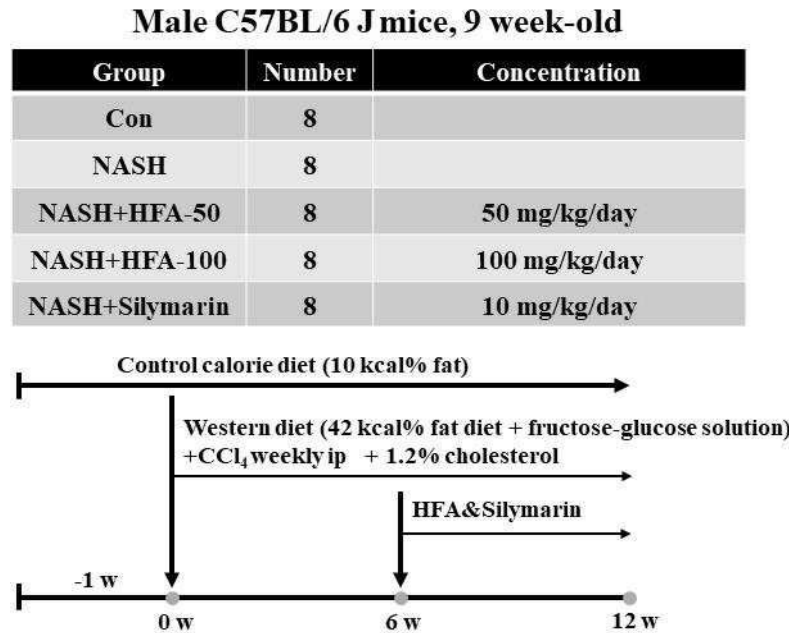
[0098] 도 6에 나타낸 바와 같이, 간 조직 내 염증과 관련된 F4/80, CD68, Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β 의 발현량 측정 결과 비알콜성지방간 유도군에 비해 하이드로페룰산 섭취군에서 농도의존적으로 상기 염증 관련 인자들의 발현이 억제되는 것으로 나타났다(도 6A 및 도 7). 또한, 간 조직 RNA 내 염증관련 인자의 발현량 확인 결과 IL-1 β , TNA- α , MCP-1 등의 발현이 감소되는 것을 확인하였다.

[0100] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 상

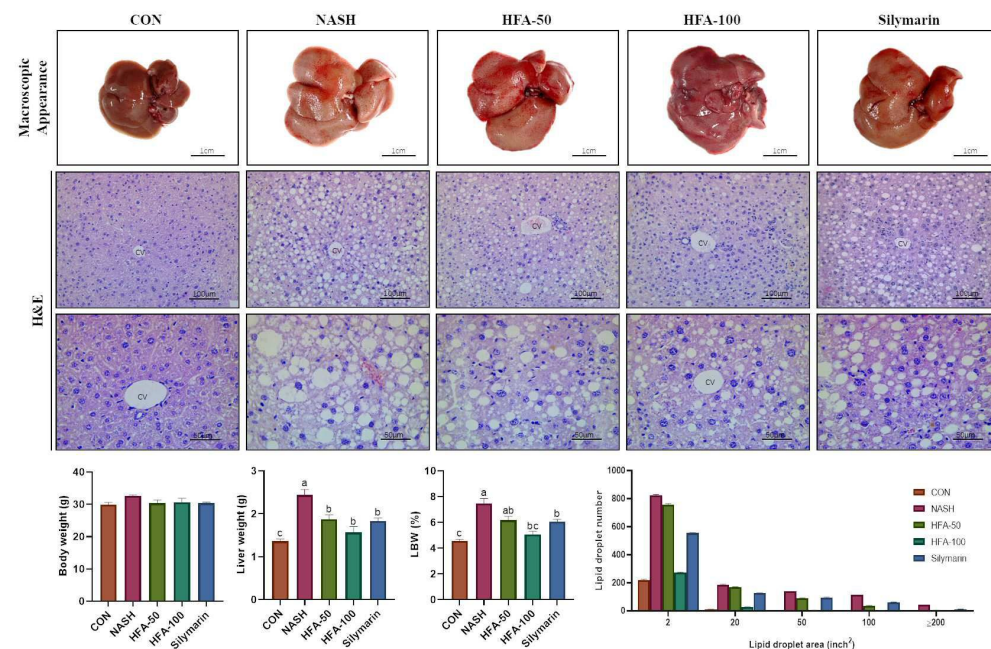
세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

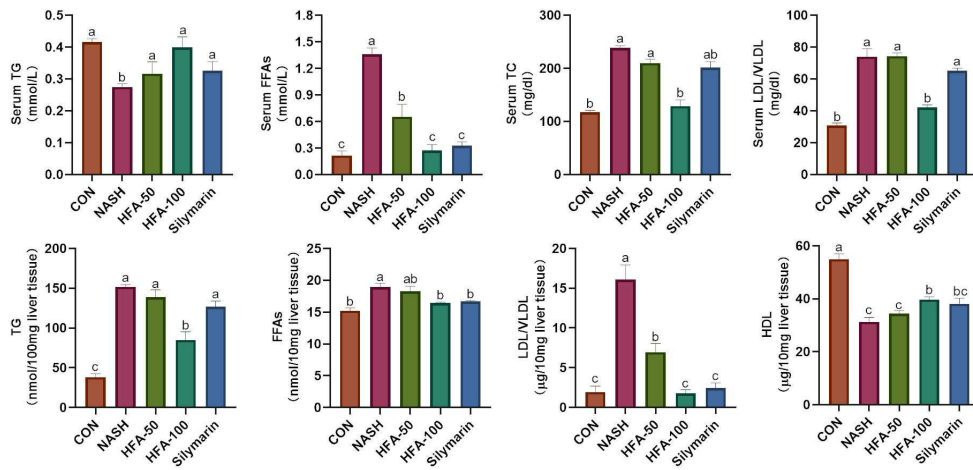
도면1



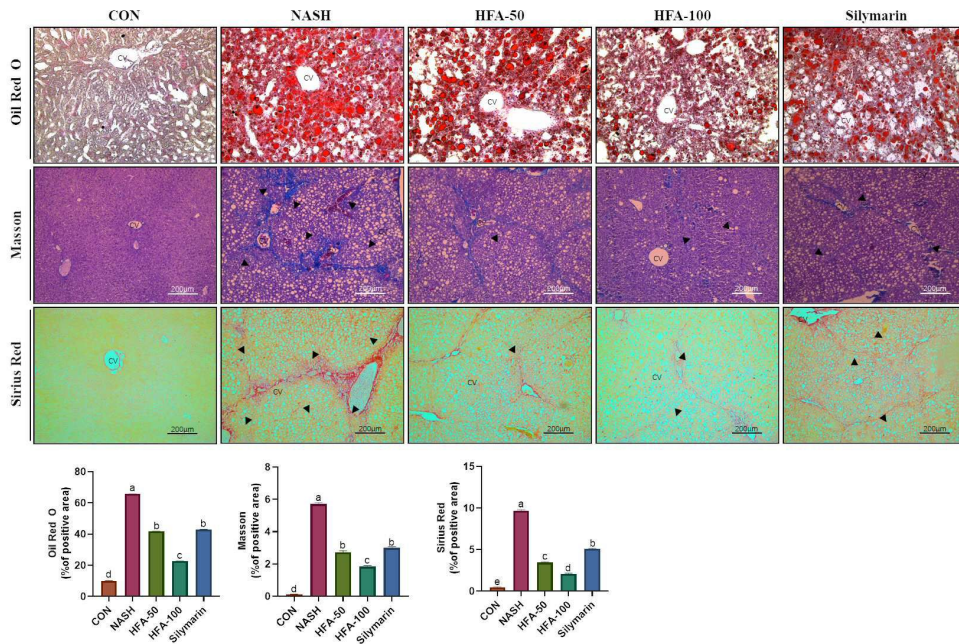
도면2



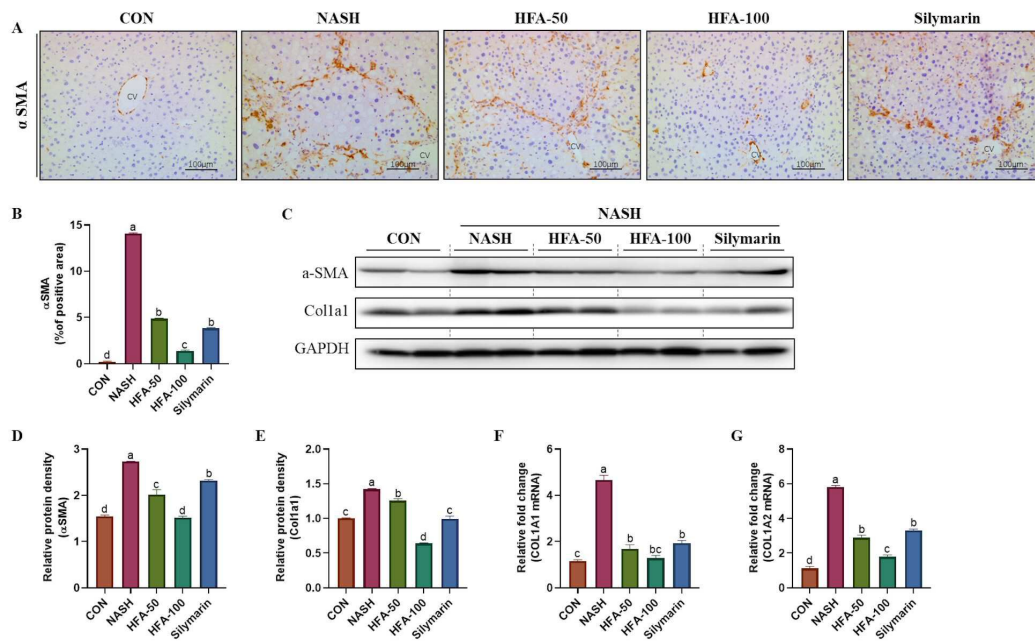
도면3



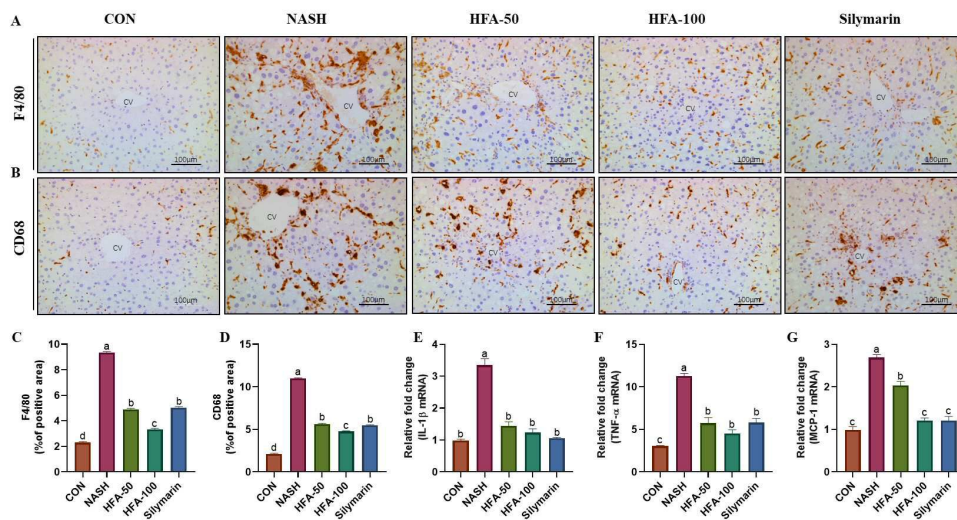
도면4



도면5



도면6



도면7

