



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0021270
(43) 공개일자 2017년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/488 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/488 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0020474(분할)
(22) 출원일자 2017년02월15일
심사청구일자 2017년02월15일
(62) 원출원 특허 10-2015-0046840
원출원일자 2015년04월02일
심사청구일자 2015년04월02일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김영철
대구광역시 달서구 호산로 125, 209동 1305호 (파
호동, 삼성명가타운)
이채명
대구광역시 서구 새방로25길 16-1, B동 301호 (상
리동, 경원하이츠2차)
김상남
경상북도 성주군 벽진면 수촌2길 12-8
(74) 대리인
특허법인태백

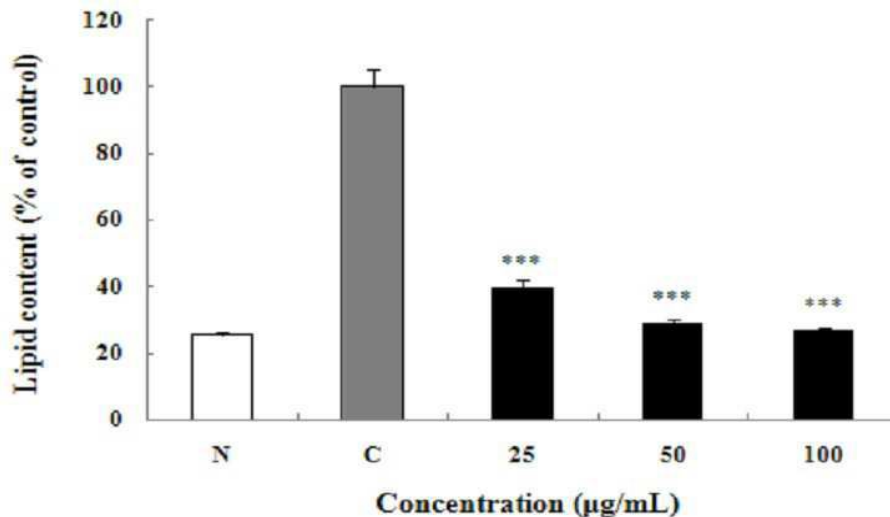
전체 청구항 수 : 총 5 항

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

(57) 요약

본 발명은 최임 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 최임 추출물은 천연추출물로 지방전구체세포의 분화과정에서 지방합성에 주요한 역할을 하는 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 유전자의 발현을 저해시키고 지방분화 및 지방합성에 관여하는 GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)의 활성을 감소시켜, 지질축적을 저해하는 것이 확인됨에 따라, 본 발명의 최임 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 비만을 예방하거나 치료할 수 있는 약학조성물 또는 건강식품으로 제공될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 2236/33 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

췌장 추출물을 유효성분으로 함유하며, 상기 췌장 추출물은 생체 외(in vitro)에서 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 시약조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 췌장 추출물은 물, C1~C4의 알콜 또는 이의 혼합 용매에 의해 추출된 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 시약조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 췌장 추출물은 지방전구세포의 GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 활성 및 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 발현을 억제하여 지방세포로의 분화 및 지질합성을 억제하는 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 시약조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 시약조성물은 시약조성물 총 100 중량부에 대하여, 췌장 추출물은 0.01 내지 90 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 시약조성물.

청구항 5

인간을 제외한 개체로부터 분리된 지방전구세포에 췌장 추출물을 처리하는 단계를 포함하는, 생체 외(in vitro) 지방세포 분화 억제방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 췌장 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물에 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 고지방·고열량의 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, 나머지가 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] 췌장은 다년생 식물로 오래전부터 구황작물로 식용되었고 자양강장제 등 건강식품으로 이용되기도 하였다. 한방에

서는 뿌리를 갈근이라하여 항염증, 항산화, 혈압강하, 항괴양, 간보호를 위한 약제로 사용하고 있으며, 현재까지는 에스트로겐 활성이 가장 높은 칩뿌리를 대상으로 한 지질 축적 저해 연구가 보고된 바 있으나, 칩잎의 비만 예방 또는 치료 효능에 대한 연구는 전무한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0645385호(2006.11.23)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 천연물인 칩잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공하여 지방전구세포의 분화를 저해함으로써, 지질합성 및 지질축적 억제시켜 비만을 예방하거나 치료할 수 있는 항비만용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

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

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

[0011] 본 발명은 칩잎 추출물을 유효성분으로 함유하며, 상기 칩잎 추출물은 생체 외(in vitro)에서 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 시약조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 개체로부터 분리된 지방전구세포에 칩잎 추출물을 처리하는 단계를 포함하는, 생체 외(in vitro) 지방세포 분화 억제방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 천연물인 칩잎 추출물은 지방전구세포의 분화과정에서 지방합성에 주요한 역할을 하는 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 유전자의 발현을 저해시키고 지방분화 및 지방합성에 관여하는 GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)의 활성을 감소시켜, 지질축적을 저해하는 것을 확인하였다.

[0014] 따라서, 본 발명의 칩잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 비만을 예방하거나 치료할 수 있는 약학조성물 또는 건강식품으로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 칩잎 에탄올 추출물의 세포 독성을 확인한 결과로, 3T3-L1 지방전구세포에 0 내지 800 $\mu\text{g/mL}$ 칩잎 에탄올 추출물을 48시간 처리하고 세포생존도를 확인한 MTT 분석 결과이다.

도 2는 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 25 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ 칩잎 에탄올 추출물을 8일간 처리하고 분화되는 동안 축적된 지질을 확인한 오일 레드 O 염색 결과로, a는 분화되지 않은 정상 3T3-L1 지방전구세포의 염색 결과이며, b는 지방세포로 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포군에서 축적된 지질의 염색 결과이며, c는 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 25 $\mu\text{g/mL}$ 칩잎 에탄올 추출물이 처리된 세포군의 염색 결과이며, d는 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 50 $\mu\text{g/mL}$ 칩잎 에탄올 추출물이 처리된 세포군의 염색 결과이며, e는 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 100 $\mu\text{g/mL}$ 칩잎 에탄올 추출물이 처리된 세포군의 염색 결과이다.

도 3은 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 25, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 칩잎 에탄올 추출물을 8일간 처리하고 분화되는 동안 축적된 지질의 함량을 확인한 결과로, 분화된 대조군과 비교하여 $***p<0.001$ 이며, N은 분화되지 않은 정상대조군이며, C는 분화된 대조군 세포이다.

도 4는 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 25, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 칩잎 에탄올 추출물을 8일간 처리하고 분화되는 동안 GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 활성을 확인한 결과로, 칩잎 에탄올 추출물이 처리되지 않은 세포분화 대조군과 비교하여 $**p<0.01$ 이며, N은 분화되지 않은 정상대조군이며, C는 세포분화 대조군이다.

도 5는 3T3-L1 지방전구세포에 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 침입 에탄올 추출물을 8일간 처리하고 분화가 유도된 3T3-L1세포에서 ACC(acetyl-CoA carboxylase) mRNA 발현 수준을 확인한 RT-PCR 결과로, A는 겔에서 ACC mRNA 밴드를 확인한 결과이며, B는 ACC mRNA 발현을 정량한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 침입 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0017] 보다 상세하게는 상기 침입 추출물은 물, C 1 내지 4 알콜 및 이의 혼합 용매에 의해 추출된 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 침입 추출물은 지방전구세포의 GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 활성 및 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 발현을 억제하여 지방세포로의 분화 및 지질합성을 억제할 수 있다.
- [0019] 보다 상세하게는 GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)는 글리세롤과 지방산의 에스테르 결합을 촉매하는 효소로 GPDH의 활성은 세포내에서 중성지방 합성정도를 증가시키기 때문에 지방세포 분화에 대한 표지로 알려져 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 따르면, 도 4와 같이 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 침입 에탄올 추출물이 처리된 경우, 침입 에탄올 추출물이 처리되지 않은 분화세포보다 지방분화 및 지방합성에 관여하는 GPDH의 활성이 각각 16.8% 및 17.9% 감소된 것을 확인하였다.
- [0021] 또한, ACC(acetyl-CoA carboxylase)는 FAS의 기질인 malonyl-CoA를 형성하고 지방산 합성 속도를 조절하며 지방산 합성의 제 1반응 단계를 촉매하는 장쇄지방산 합성을 촉진하는 유전자로, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 도 5와 같이 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 침입 에탄올 추출물이 처리된 경우, 침입 에탄올 추출물이 처리되지 않은 분화세포보다 ACC 유전 발현이 각각 34.6 및 33.3% 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따르면, 지질성분에 특이적으로 민감하게 반응하여 붉은색을 나타냄으로써 지질 축적 정도를 확인할 수 있는 오일 레드 O 염색 결과, 도 2와 같이 분화가 유도된 3T3-L1 지방세포의 지방 방울이 침입 에탄올 추출물의 농도의존적으로 감소되는 것을 확인하였다.
- [0023] 상기 결과로부터 침입 에탄올 추출물은 지방전구세포의 분화과정에서 지방합성에 주요한 역할을 하는 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 유전자의 발현을 저해시키고 지방분화 및 지방합성에 관여하는 GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)의 활성을 감소시켜, 지질축적을 저해하는 것이 확인되었다.
- [0024] 상기 결과들로부터 본 발명은 침입 추출물을 유효성분으로 함유하며, 상기 침입 추출물은 생체 외(in vitro)에서 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 시약조성물로 제공될 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 개체로부터 분리된 지방전구세포에 침입 추출물을 처리하는 단계를 포함하는, 생체 외(in vitro) 지방세포 분화 억제방법을 제공할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여, 침입 추출물은 0.01 내지 90 중량부로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 침입 추출물을 유효성분으로 함유하는 자외선에 의한 세포손상 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.
- [0028] 본 발명의 다른 구체예에서, 침입 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.
- [0029] 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 스티레이트, 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0030] 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.

[0031] 상기 침입 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.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 또한, 본 발명은 침입 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0034] 상기 건강식품은 상기 침입 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 적절하게 결정될 수 있다.

[0035] 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.

[0036] 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.

[0038] 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.

[0039] <참고예> 시약 및 기구

[0040] 탄닌산(Tannic acid), folin-ciocalteu's 페놀 시약, 디(에틸렌글리콜) [di(ethylene glycol)] 시약, DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), 인슐린, 3-이소부틸-1-메틸잔틴[3-isobutyl-1-methylxanthine], 덱사메타손[dexamethasone], 오일 레드 O[Oil red O]는 Sigma 사(USA)의 제품을 사용하였고, DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), 태아소혈청(fetal bovine serum; FBS), 페니실린/스트렙토마이신(P/S)은 Lonza 사(USA)의 제품을 구입하여 사용하였으며, 그 외 일반시약,들은 특급품을 사용하였다. 시료추출은 회전진공농축기(R-205, B-490, Buchi, Japan)를 사용하였다. 세포주 관찰은 도립현미경(CKX41, Olympus, Japan)을 사용하였고, 세포주 배양은 CO₂ 배양기(MCO-15AC, Sanyo Electric, Japan)를 사용하였다.

[0041] <실시예 1> 침입 에탄올 추출물

[0042] 경상북도 칠곡에서 채취하여 음건시킨 침입 300g에 80% 에탄올 3L를 첨가하여 24시간 침적, 3회 반복 추출하여 여과지로 여과한 후 농축하고 동결건조시켜 분말상태의 시료를 제조하였다. 수율(yield)은 1.2%였다.

[0043] <실시예 2> 침입 에탄올 추출물의 세포독성 확인

[0044] 1. 세포주 및 배양

- [0045] 3T3-L1 지방전구세포를 계명대학교 의과대학 분자의학실에서 분양받아 계대 배양하여 사용하였다. 세포 배양 플레이트에 부착시키고 10% 우아혈청(bovine calf serum; BCS)와 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.
- [0046] 2. MTT 분석
- [0047] 3T3-L1 지방전구세포를 10% BCS와 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)이 포함된 DMEM 배지에 풀어 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 안정화시킨 후, MTT 분석에 사용하였다. 안정화된 3T3-L1 지방전구세포를 96-웰 플레이트에 적정세포수(1×10^4 cells/well)로 200 μ l씩 분주하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 다음, PBS로 1회 씻은 다음 동결건조시킨 쥘잎 에탄올추출물을 DMEM 배지에 25-800 μ g/ml 농도별로 희석하여 200 μ l씩 넣은 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다.
- [0048] 그 후, PBS로 1회 씻고 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]가 0.5 mg/mL 함유된 DMEM 배지를 200 μ l씩 넣은 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 배양하였다. 배지를 버리고 DMSO를 200 μ l씩 넣고 플레이트 교반기에서 15분간 세포를 녹여낸 다음 ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.
- [0049] 그 결과, 도 1과 같이 100 μ g/ml 농도의 쥘잎 에탄올 추출물이 처리된 경우, 3T3-L1 지방전구세포가 89.3%의 세포생장률을 보인 반면, 200 μ g/ml 농도의 쥘잎 에탄올 추출물에서 68.8%로 나타나 세포독성을 보임으로써 최대허용농도는 100 μ g/ml로 확인되었다.
- [0050] 상기 결과로부터 하기 모든 실험에서는 100 μ g/ml 이하의 농도를 사용하였다.
- [0051] **<실시에 3> 쥘잎 에탄올 추출물의 지질 합성 억제 효과 확인**
- [0052] 1. 세포 분화 및 시료 처리
- [0053] 3T3-L1 지방전구세포를 분화유도하기 위하여 세포를 60 mm 플레이트에 1×10^6 세포로 분주하고 2일 후 배지를 교환하여 4일째에 세포가 100% 밀집되게 배양하였다. 10% 태아소혈청(FBS)과 MDI 용액(0.5mM IBMX, 1 μ M 텍사메타손, 10/mL 인슐린)을 포함한 DMEM 배지를 2일 처리하였다. 이때 쥘잎 에탄올 추출물이 지방세포분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 쥘잎 에탄올 추출물을 25, 50 및 100/mL 농도로 함께 처리하였다. 분화 유도 2일 후 배지를 각 농도별 쥘잎 에탄올 추출물, 10% FBS 및 10/mL 인슐린을 포함한 DMEM으로 3일간 처리하였고, 이후부터는 쥘잎 에탄올 추출물과 함께 2일에 한 번씩 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)이 포함된 DMEM으로 교환하여 총 8일간 세포를 분화시켰다.
- [0054] 2. 오일 레드 O(Oil red O) 염색 및 지질 함량 확인
- [0055] 지질성분에 특이적으로 민감하게 반응하여 붉은색을 나타냄으로써 지질 축적 정도를 확인할 수 있는 특수염색법인 오일 레드 O 염색을 이용하여 쥘잎 에탄올 추출물의 지질 합성 억제 효과를 확인하였다.
- [0056] 상기 방법으로 분화시킨 3T3-L1 지방전구세포의 분화 8일째에 배지를 제거하고 PBS로 세포를 세척한 뒤 실온에서 10% 포름알데하이드(formaldehyde)로 60분 동안 고정하였다. 고정액을 제거하고 60% 이소프로판올(isopropanol)을 이용하여 세척한 후, 세포내 생성된 지질방울(lipid droplet)과 특이적으로 반응하는 오일 레드 O(Oil red O) 용액을 이용하여 실온에서 염색하였다.
- [0057] 그 결과, 도 2와 같이 분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 8일간 쥘잎 에탄올 추출물을 처리하고 도립현미경을 사용하여 200 배율에서 관찰한 결과, 도 2a와 같이 미분화된 3T3-L1 지방전구세포에서는 붉은색이 거의 확인되지 않은 반면, 도 2b의 8일간 분화시킨 대조군 지방세포에서는 많은 양의 붉은색이 확인됨에 따라, 많은 양의 지질이 축적된 것을 확인하였다. 또한, 대조군 지방세포와 비교하여 쥘잎 에탄올 추출물 25 μ g/ml(도 2c), 50 μ g/ml(도 2d) 및 100 μ g/ml(도 2e)가 처리된 세포군에서는 농도 의존적으로 붉은색이 적게 관찰됨에 따라, 지질 축적이 억제된 것을 확인하였다.
- [0058] 또한, 염색된 세포는 현미경 관찰한 후 100% 이소프로판올을 이용하여 오일 레드 O 염색을 용해하여 추출한 뒤 490 nm에서 흡광도를 측정하여 지방세포 내에 있는 지질함량을 수치로 나타내어 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.
- [0059] 그 결과, 도 3과 같이 8일간 분화시킨 3T3-L1 지방세포인 대조군(C)에 비해 쥘잎 에탄올 추출물 25, 50 및 100

$\mu\text{g/ml}$ 가 처리된 세포군에서는 농도의존적으로 각각 60.0%, 71.1% 및 73.3% 유의하게($p<0.001$) 지질 함량이 낮게 나타났다.

[0060] 상기 결과로부터, 쥘 잎 에탄올 추출물은 지질축적 저해 효능이 있음이 확인되었다.

[0061] 3. 글리세롤-3-포스페이트 디하이드로게나아제(GPDH) 활성 확인

[0062] 지방세포에만 특이적으로 활성이 증가되는 GPDH 활성을 확인하여 쥘 잎 에탄올 추출물 처리에 따른 지방세포 분화 여부 및 중성지방의 축적 정도를 확인하였다.

[0063] GPDH 활성 측정은 GPDH activity kit(Takara Bio Inc., Japan)을 사용하였다. 8일 동안 분화 배지와 쥘 잎 에탄올 추출물을 함께 처리한 지방세포의 배양액을 제거하고, 효소 추출 버퍼(enzyme extraction buffer)를 넣어 세포를 수집하고 2-멜캅토에탄올(mercaptoethanol)이 포함된 희석버퍼로 세포를 희석하였다.

[0064] 기질을 넣은 플레이트에 희석한 세포를 넣어 혼합한 후, 분광광도계(spectrophotometer)에서 340 nm, 10분간 매 1분마다 흡광도의 변화를 측정하였다. GPDH 활성도는 1분 동안 기질 1 μM 을 사용하기 위한 효소의 양을 계산하고, 계산된 값을 mg 단백질/ml로 환산하였다. 상층액의 단백질 함량 측정은 Bio-red protein assay kit(BioRad, CA, USA)로 정량하였다.

[0065] 그 결과, 도 4와 같이 대조군(C)과 비교하여 쥘 잎 에탄올 추출물 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 이 처리된 세포군은 GPDH 활성을 각각 16.8 및 17.9% 유의하게($p<0.01$) 저해시키는 것이 확인되었다.

[0066] 상기 결과로부터, 쥘 잎 에탄올 추출물은 효과적으로 지방세포 분화 및 지방합성을 저해하는 효능을 갖고 있음이 확인되었다.

[0067] 4. ACC(아세틸-CoA 카르복실라아제) 유전자 발현 확인

[0068] FAS의 기질인 malonyl-CoA를 형성하고 지방산 합성 속도를 조절하며 지방산 합성의 제 1반응 단계를 촉매하는 장쇄지방산 합성을 촉진하는 아세틸-CoA 카르복실라아제(ACC) 유전자 발현에 쥘 잎 에탄올 추출물이 미치는 영향을 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)으로 확인하였다.

[0069] 상기 방법으로 분화 및 쥘 잎 에탄올 추출물이 처리된 3T3-L1 지방세포에 0.8 ml Trizol-Reagent(Life Technologies, CA, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에 160 μl 클로로포름(chloroform)을 넣고 혼합한 후 원심분리하는 과정을 2번 반복하여 상층액을 분리하였다. 400 μl 이소프로필 알콜(isopropyl alcohol)을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% 에탄올로 세척하고 자연 건조시킨 후 DEPC-water에서 RNA를 녹여 -80°C 에 저장하였다.

[0070] 상기 방법으로 대조군 및 실험군에서 각각 분리된 전체 RNA 5 μg 을 M-MLV RT 5 $\times$ 버퍼 8 μl , 10 mM dNTPs의 3 μl , 10,000U RNase 억제제 0.45 μl , 50,000U M-MLV 역전사효소(Promega, USA) 0.3 μl 및 20 pmol/ oligo dT(Bioneer, Korea) 3.75 μl 가 포함된 용액 40 μl 을 이용해 역전사하여 cDNA를 제조하였다.

[0071] 상기 방법으로 제조된 단일 가닥 cDNA를 5 $\times$ green Go Taq flexi buffer 4 μl , 10 mM dNTPs 0.4 μl , 500U Taq polymerase 0.1 μl , 25 mM MgCl_2 (Promega, Madison, USA) 1.2 μl 및 ACC, FAS, GAPDH의 특이적인 정방향 및 역방향 프라이머를 각각 20 pmol/L 0.4 μl 를 사용하여 PCR로 증폭하였다. PCR에 사용한 프라이머 염기서열과 예상 크기는 표 1과 같다.

[0072] 내부표준물질로 GAPDH(50, 28 cycle), 실험물질로 ACC(94 30초, 56 1분, 72 1분, 30 cycle)를 사용하였으며, PCR 산물을 1.2% 아가로스 겔에 전기영동 시킨 후 분석하였다.

표 1

[0073]

유전자	프라이머	예상크기(염기쌍)
ACC	정방향(5'→3')TGA CCG TGG GCA CAA AGT T(서열번호 1)	351
	역방향(5'→3')AGG AGG AAC CGC ATT TAT CGA(서열번호 2)	
GAPDH	정방향(5'→3')GTA TGA CTC CAC TCA CGG CAA A(서열번호 3)	248
	역방향(5'→3')GGT CTC GCT CCT GGA AGA TG(서열번호 4)	

[0074] 그 결과, 도 5와 같이 쥘 잎 에탄올 추출물이 처리되지 않은 대조군 3T3-L1 지방세포와 비교하여 25 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 쥘 잎 에탄올 추출물이 처리된 세포군에서 ACC 유전자 발현이 각각 34.6 및 33.3% 감소된 것을 확인할 수 있

었다.

[0075] 상기 결과로부터, 췌장 에탄올 추출물은 지방합성 초기단계에서 발현이 유도되는 ACC 유전자 발현을 감소시켜 3T3-L1 지방전구세포에서 지방합성을 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] 한편, 본 발명에 따른 췌장 추출물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기에서는 본 발명에 따른 췌장 추출물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0079] <제제예 1> 약학조성물의 처방예

[0080] <제제예 1-1> 주사제의 제조

[0081] 췌장 에탄올 추출물 10 mg, 소듐 메타비설파이트 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.

[0082] <제제예 2-1> 정제의 제조

[0083] 췌장 에탄올 추출물 10 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0084] <제제예 3-1> 캡슐제의 제조

[0085] 췌장 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.

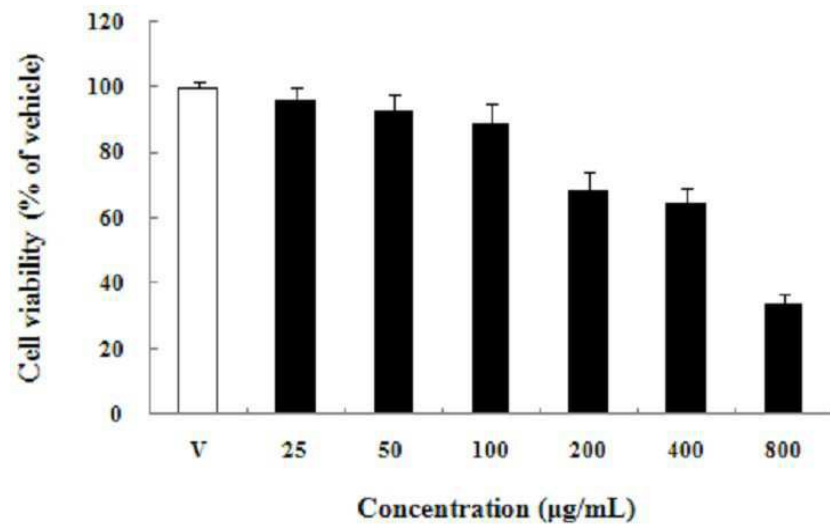
[0086] <제제예 2> 건강식품의 제조

[0087] 췌장 에탄올 추출물 0.5 mg, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 µg, 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 µg, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 µg, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 µg, 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.

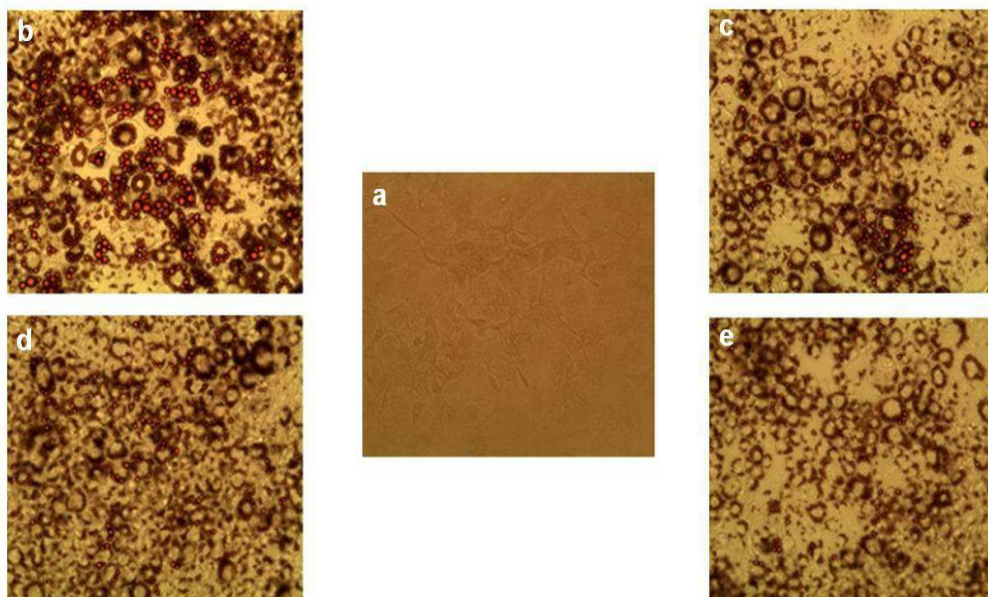
[0089] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

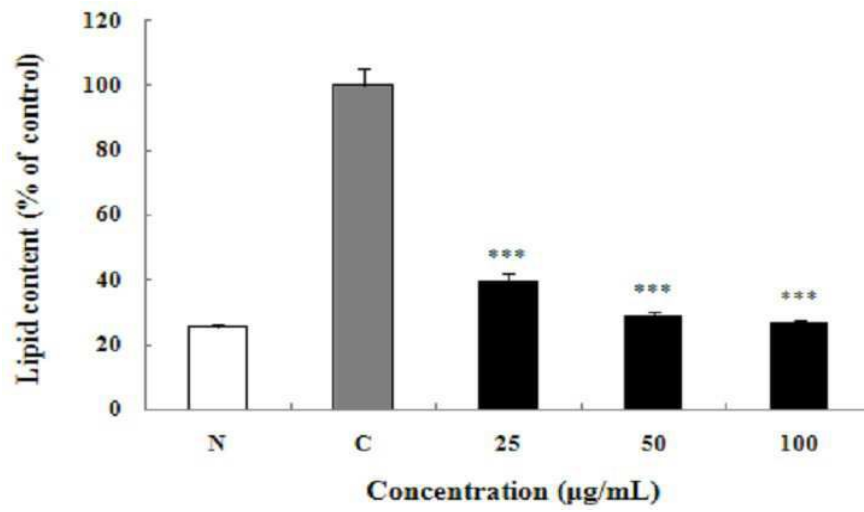
도면1



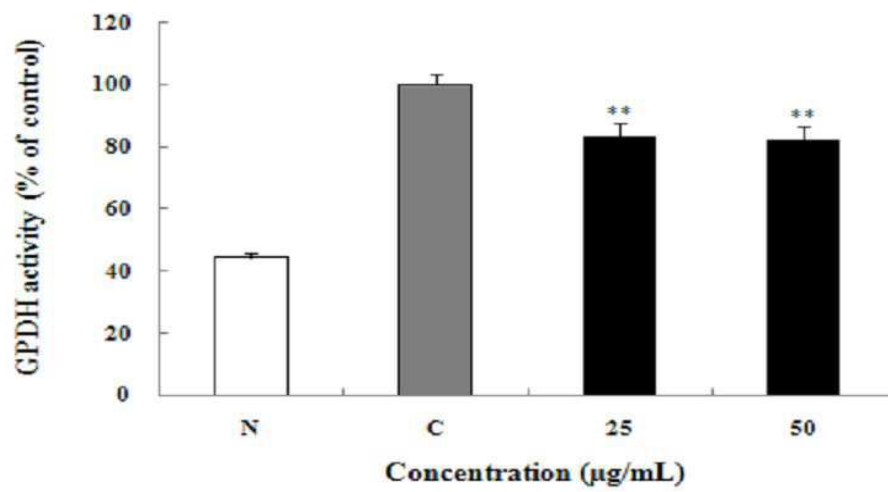
도면2



도면3

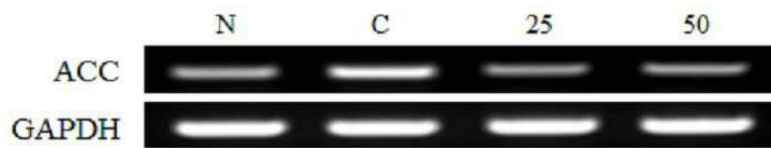


도면4

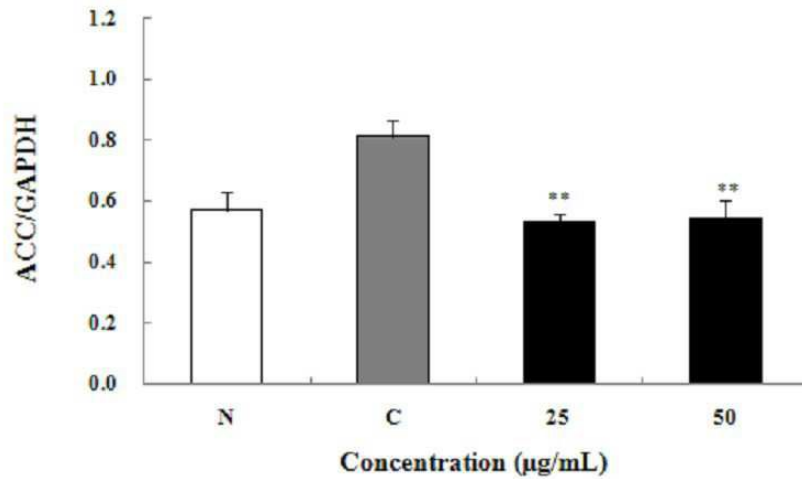


도면5

(A)



(B)



서열 목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating obesity comprising extract of pueraria lobata leaf
- <130> ADP-2015-0088
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ACC forward
- <400> 1
- tgaccgtggg cacaaagt
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223>	ACC reverse	
<400>	2	
aggaggaacc gcatttatcg a		21
<210>	3	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH forward	
<400>	3	
glatgactcc actcacggca aa		22
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH reverse	
<400>	4	
ggtctcgctc ctggaagatg		20