(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0016166
(43) 공개일자 2020년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0087551
(22) 출원일자 2019년07월19일
심사청구일자 2019년07월19일
(30) 우선권주장
1020180091221 2018년08월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
류혜진
서울특별시 영등포구 여의도동 한양아파트 D동 1006호
황환진
경기도 안산시 단원구 고잔동 네오빌 중앙주공아파트 614동 1204호
(74) 대리인
공병욱

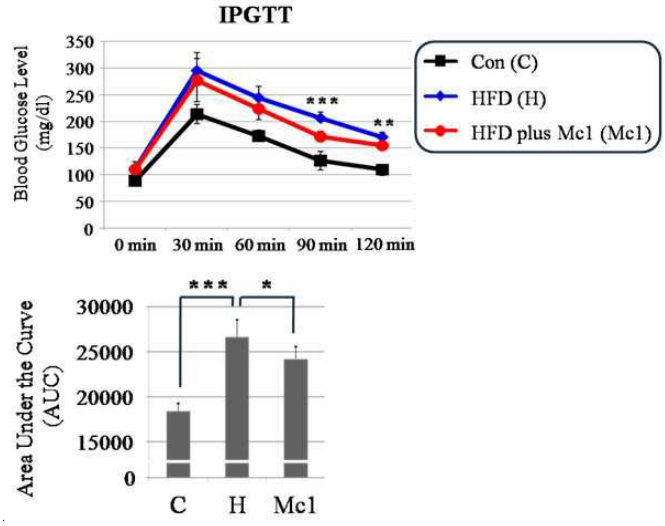
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **진세노사이드 MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 진세노사이드 MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환의 개선용 식품 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 대사성 질환의 예방, 치료 또는 개선 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61P 3/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/3262 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)

명 세 서

청구범위

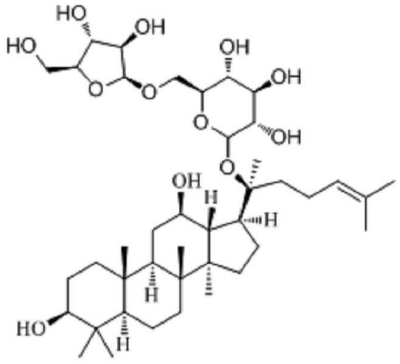
청구항 1

진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 진세노사이드 MC1을 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 진세노사이드 MC는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

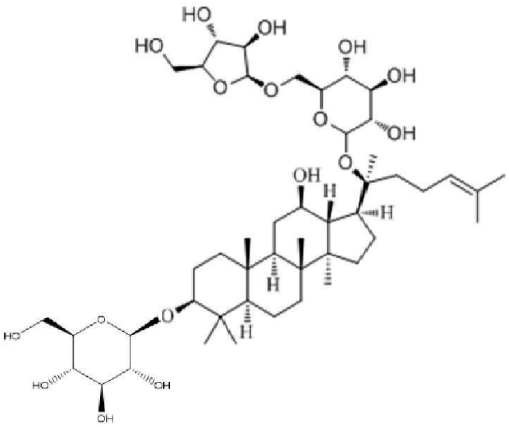
[화학식 1]



청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 진세노사이드 MC1은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 2]



청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증, 간질환, 심근병증, 심근경색, 뇌경색, 근감소증, 과인슐린혈증, 과혈당증, 당뇨병 및 인슐린 저항성 질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 대사성 질환은 당뇨병, 동맥경화, 간질환 및 심근경색으로 이루어진 군에서 선택된 하

나 이상인 것인, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

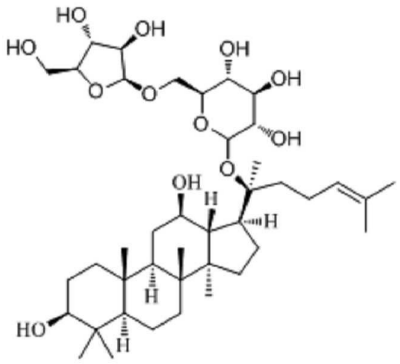
청구항 6

진세노사이드(Ginsenoside) MC1 또는 진세노사이드 MC를 포함하는 대사성 질환 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 진세노사이드 MC는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것인, 대사성 질환 개선용 식품 조성물.

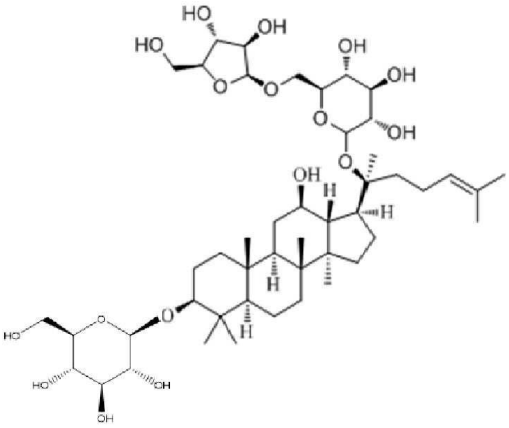
[화학식 1]



청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 진세노사이드 MC1은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것인, 대사성 질환 개선용 식품 조성물.

[화학식 2]



청구항 9

제 6 항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증, 간질환, 심근병증, 심근경색, 뇌경색, 근감소증, 과인슐린혈증, 과혈당증, 당뇨병 및 인슐린 저항성 질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 대사성 질환 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제 6 항에 있어서, 상기 대사성 질환은 당뇨병, 동맥경화, 간질환 및 심근경색으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 대사성 질환 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대사성 질환 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는, 진세노사이드 MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 경제 발전에 따른 생활 수준의 향상으로 인해 식생활을 풍족하게 즐길 수 있게 되었지만 육식위주의 식생활 변화 등은 과다한 열량의 섭취를 유발하였다. 이러한 현대인의 식생활의 변화는 턱없이 부족한 운동부족 등으로 인하여 소모열량이 적기 때문에 빠른 비만 인구의 증가경향을 보이고 있다.

[0003] 또한, 이러한 생활 양식의 변화에 따른 식습관의 서구화 및 운동 부족과 더불어, 노인 인구의 증가는 대사성 질환의 발병률을 증가시키고 있다.

[0004] 한편, 대사성 질환(Metabolic disease)은 생체 내 물질대사 장애에 의해서 발생하는 질환의 총칭으로, 그 질환의 원인이 다양하고 복합적으로 작용하기 때문에 명확한 치료법을 개발하기 어려운 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국내등록특허 제10-1500974호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 대사성 질환(Metabolic disease)의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1이 심근세포 내 활성 산소종 억제 및 세포 생존률 향상, 및 혈관내피세포 내 세포 생존률 향상 효과가 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 약학적 조성물의 대사성 질환의 치료 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 대사성 질환의 예방, 개선, 또는 치료용 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1이 심근세포 내 활성 산소종 억제 및 세포 생존률 향상, 및 혈관내피세포 내 세포 생존률 향상 효과가 있음을 규명하였다.

[0012] 본 발명은 진세노사이드 MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 진세노사이드 MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환의 개선용 식품 조성물, 진세노사이드 MC 또는 MC1을 포함하는 약학적 조성물을 이용한 대사성 질환의 예방 또는 치료 방법, 및 이의 대사성 질환의 치료 용도에 관한 것이다.

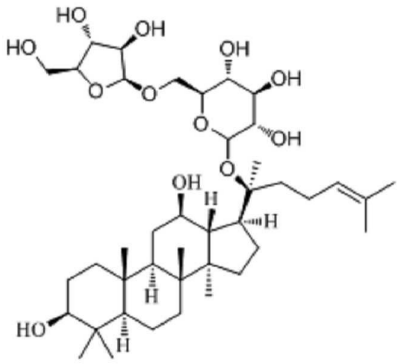
[0013] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0015] 본 발명의 일 양태는 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0016] 본 명세서에서 "진세노사이드(Ginsenoside) MC"는 하기 화학식 1의 구조를 갖는 [20-O-[α-L-아라비노퓨라노실

(1→6)-β-D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사디올]을 의미한다.

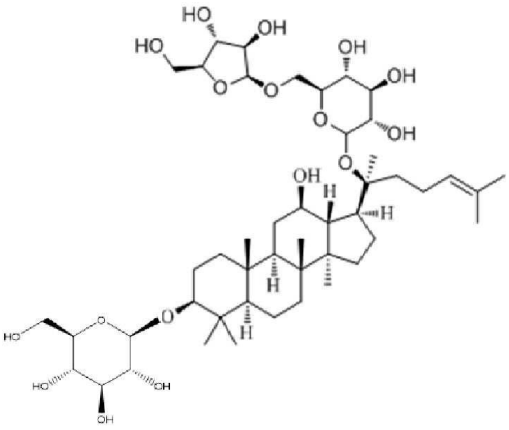
[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 본 명세서에서 "진세노사이드(Ginsenoside) MC1"은 하기 화학식 2의 구조를 갖는 [20-O-[α-L-아라비노퓨라노실(1→6)-β-D-글루코피라노실]-3-O-[β-D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사디올]을 의미한다.

[0020] [화학식 2]



[0021]

[0022] 상기 진세노사이드 MC 및 MC1은 프로토파낙사디올(Protopanaxadiol) 타입의 진세노사이드 대사물질로서, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 등의 진세노사이드가 탈당화를 거치면 진세노사이드 MC 및 MC1과 같은 저분자 진세노사이드로 전환될 수 있다.

[0023] 상기 진세노사이드 MC 및 MC1은 식물에서 추출될 수 있고, 당업계에 공지된 방법에 따라 합성하여 사용할 수도 있으며, 상업적으로 시판되는 것을 사용할 수도 있다. 또한 진세노사이드 MC 및 MC1은 인삼 추출물에서 수득할 수 있다.

[0024] 이 때 사용되는 인삼의 종류는 특히 제한되지 않고, 수삼, 홍삼, 백삼, 태극삼, 미삼 등을 사용할 수 있다.

[0025] 또한, 상기 인삼 추출물은 인삼으로부터 침출, 전출하여 얻은 침출액 뿐 아니라 침출액을 다시 일부 또는 전부 농축하여 얻은 농축물 또는 상기의 농축물을 다시 건조시켜 제조한 침체, 전제, 정기, 유동엑기스 및 인삼 중에 함유되어 주 효과를 발휘하는 화학 물질은 물론 식물 그 자체를 모두 포함하며, 줄기, 뿌리, 잎, 꽃, 열매 등 인삼의 모든 부분으로부터의 추출물이 사용 가능하고 어느 특정 부분의 추출물로 한정되지 않는다.

[0026] 또한, 인삼 추출물로부터 진세노사이드 MC 및 MC1을 추출하는 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다.

[0027] 구체적으로 상기 진세노사이드 MC 및 MC1은 인삼에서 당업계에 잘 알려진 방법으로 물 또는 유기용매로 인삼 추출물을 제조한 후, 이로부터 분리할 수 있다. 본 발명에 사용하는 유기용매는 에탄올, 메탄올, 부탄올, 에테르, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 이들 유기용매와 물의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 "대사성 질환"은 당질, 지질, 단백질, 비타민, 미네날 및 수분 등의 불균형에 의한 질환을 총칭하며, 이중 지질관련 대사성 질환은 생체 내 과도한 지질 축적에 의해서 발생하는 질환을 의미하고, 구체적으로 비만, 당뇨 등이 있다.

[0029] 상기 대사성 질환은 비만, 고혈압, 동맥경화증, 고지혈증, 간질환, 심근병증, 심근경색, 뇌경색, 근감소증, 과

인슐린혈증, 과혈당증, 당뇨병 또는 인슐린 저항성 질환일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에서 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 대사성 질환을 억제시키거나 이의 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0031] 본 발명에서 "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 대사성 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0032] 본 발명에서 약제학적으로 허용 가능한 염은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있는 것으로, 예를 들면, 염산, 브롬화수소, 황산, 황산수소나트륨, 인산, 탄산 등의 무기산과의 염, 또는 개미산, 초산, 옥살산, 벤조산, 시트르산, 타르타르산, 글루콘산, 게스티스산, 푸마르산, 락토비온산, 살리실릭산 또는 아세틸살리실릭산(아스피린)과 같은 유기산과 함께 산의 염을 형성하거나, 또는 나트륨, 칼륨 등의 알칼리금속이온과 반응하여 이들의 금속염을 형성하거나, 또는 암모늄 이온과 반응하여 또 다른 형태의 약제학적으로 허용 가능한 염을 형성하는 것을 의미한다.

[0033] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상기 진세노사이드 MC 또는 MC1을 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0034] 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충식염수, 사이클로덱스트린, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포좀 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다.

[0035] 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0036] 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0039] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지 150mg, 바람직하게는 0.01 내지 100mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 또 다른 일 양태는 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0042] 상기 진세노사이드 MC 및 MC1은 상술한 본 발명의 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 동일하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0043] 본 발명의 식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등의 형태로 제조될 수 있다. 예컨대 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류 등이 있다.

[0044] 본 발명의 식품 조성물은 알리티아민, 푸르설티아민, 벤포티아민 또는 이들의 염뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다.

[0045] 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 알리티아민, 푸르설티아민, 벤포티아민 또는 이들의 염 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0047] 본 발명의 다른 일 양태는 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0048] 상기 개체는 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0049] 본 발명의 또 다른 일 양태는 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 약학적 조성물의 대사성 질환의 치료 용도에 관한 것이다.

[0050] 상기 조성물의 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략한다.

발명의 효과

[0051] 본 발명은 진세노사이드(Ginsenoside) MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 진세노사이드 MC 또는 MC1을 포함하는 대사성 질환의 개선용 식품 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 대사성 질환의 예방, 치료 또는 개선 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC1의 카탈라아제(catalase) 및 SOD2의 발현 유도 효과를 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC1의 하이드로퍼옥사이드 매개 활성 산소종의 증가에 대한 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 3a 및 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC1의 하이드로퍼옥사이드 매개 세포사멸의 증가에 대한 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC1의 하이드로퍼옥사이드 매개 유도된 Bax/Bcl2 비율 감소 효과를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC1의 비만 매개 혈당조절 능력 감퇴에 대한 개선 효과를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC1의 하이드로퍼옥사이드 매개 인슐린 신호 억제에 대한 개선 효과를 확인한 결과이다.

도 7a 및 도 7b는 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC1의 MyoD 및 MyoG의 발현, 및 분화효율 회복 효과를 확인한 결과이다.

도 8a 내지 도 8c는 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC1의 *In vivo* 효과(심장 조직)를 확인한 결과이다.

도 9a 내지 도 9c는 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC1의 *In vivo* 효과(간 조직)를 확인한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC의 AMPK 인산화 증가, LC3-Ⅱ 및 Beclin-2 발현 증가 및

p62 발현을 감소 효과를 확인한 결과이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC의 하이드로퍼옥사이드 매개 세포사멸의 증가에 대한 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 12a 및 도 12b는 본 발명의 일 실시예에 따른 진세노사이드 MC의 LPS 처리에 의한 인슐린 신호 억제에 대한 개선 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0055] **준비예 1. 진세노사이드 MC 및 MC1**

[0056] 진세노사이드 MC(Ginsenoside MC) 및 진세노사이드 MC1(Ginsenoside MC1)은 앰보연구소(Ambo Institute, 한국)에서 구입하였다.

[0058] **준비예 2. 세포 배양**

[0059] 래트(Rat) 심근세포(H9c2 cells, 한국세포주은행), 인간 간세포(HepG2 cells, 한국세포주은행) 및 인간 근육세포(C2C12 cells, 한국세포주은행)를 각각 100 mm & 24-웰 배양접시에서 둘베코수정이글배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM, Invitrogen, CA, USA)에 10 % 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Invitrogen) 및 1 % 항생제(Invitrogen)를 섞은 배양배지를 이용하여, 5 % 이산화탄소 및 95 % 공기가 공급되는 37 ℃ 세포 배양기에서 배양하였다. 이때, C2C12 세포주는 2 % 말혈청(horse serum, Invitrogen)이 포함된 DMEM을 이용하여 추가적으로 4 일간 분화시켰다.

[0060] 인간 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cells; HUVECs, C-003-5C, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 구입하여 계대수 4~6 회 세포를 이용하였다. 60 mm & 24-웰 배양접시에서 M200PRF 배지(M-200PRF, Invitrogen) 및 LSGS 배지(S-003-10, Invitrogen)를 섞은 배양배지를 이용하여, 5 % 이산화탄소 및 95 % 공기가 공급되는 37 ℃ 세포 배양기에서 배양하였다.

[0062] **실험예 1. 진세노사이드 MC1의 카탈라아제(catalase) 및 SOD2(Superoxide dismutase 2)의 발현 유도 효과 확인**

[0063] H9c2 세포주에 진세노사이드 MC1을 0, 25, 및 50 ug/mL의 농도로 24 시간 동안 처리하였다.

[0064] 약 20 ug의 단백질을 분리하여 β-머캅토에탄올(β-mercaptoethanol)이 첨가된 2X 샘플 버퍼(BIO-RAD, USA)를 넣고 95 É에서 10 분 동안 가열하였다. 5 % 축적 겔(stacking gel) 및 10~15 % 분리 겔(separating gel)에서 각각 70 V로 30 분, 120 V로 1~2 시간 동안 전기영동 후, 전송완충액(25 mM 트리스, 192 mM 글라이신, 0.01% SDS, 20 % 메탄올; pH 8.3)에서 100 V로 60 분 동안 추가로 전기영동하여 단백질을 나이트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 이동시켰다.

[0065] 5 % skim milk 또는 BSA 용액을 이용하여 블로킹(blocking) 후, 일차 항체를 4 É에서 16 시간 동안 처리하고 다시 이차 항체를 실온에서 1 시간 반응시킨 후 image J program을 이용하여 타겟 밴드(target band)를 정량화하였다.

[0066] 실험에서 사용한 항체는 다음과 같다: Catalase(H-9) 항체(Santa cruz Biotechnology, 미국, Cat. Sc-271803), SOD2(A-2) 항체(Santa cruz Biotechnology, Cat. Sc-133134), β-Actin(C4) 항체(Santa cruz Biotechnology, Cat. Sc-47778), HRP Goat 항-Rabbit IgG 항체(Vector Laboratories, 미국, Cat. PI-1000), HRP Horse 항-Mouse IgG 항체(Vector Laboratories, Cat. PI-2000).

[0067] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 항산화 효소인 카탈라아제 및 SOD2의 발현을 유도하였

다.

[0069] **실험예 2. 진세노사이드 MC1의 활성 산소종 생성 억제 효과 확인**

[0070] H9c2 세포주는 25 ug/mL 진세노사이드 MC1, 50 ug/mL 진세노사이드 MC1 또는 비히클(vehicle)로 24 시간 동안 전처리하였다.

[0071] 전처리 된 세포주는 하이드로퍼옥사이드(hydroperoxide) 600 uM 단독 처리군, 하이드로퍼옥사이드 및 25 ug/mL 진세노사이드 MC1 처리군, 및 하이드로퍼옥사이드 및 50 ug/mL 진세노사이드 MC1 처리군으로 나누어 3 시간 동안 반응 시킨 후, 10 uM의 DHE(invitrogen) 시약을 이용하여 30 분 동안 염색하였다.

[0072] H_2O_2에 의해 생성된 슈퍼옥사이드(superoxide)는 형광 현미경을 이용하여 관찰하였으며, image J 프로그램을 이용하여 정량화하였다.

[0073] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 하이드로퍼옥사이드 처리에 의한 활성 산소종의 증가를 효과적으로 억제하였다.

[0075] **실험예 3. 진세노사이드 MC1의 세포사멸 억제 효과 확인**

[0076] H9c2 세포주 및 HUVECs 세포주는 25 ug/mL 진세노사이드 MC1, 50 ug/mL 진세노사이드 MC1 또는 비히클로 24 시간 동안 전처리하였다.

[0077] 전처리 된 H9c2 세포주는 하이드로퍼옥사이드 600 uM 단독 처리군, 하이드로퍼옥사이드 및 25 ug/mL 진세노사이드 MC1 처리군, 및 하이드로퍼옥사이드 및 50 ug/mL 진세노사이드 MC1 처리군으로 나누어 3 시간 동안 반응 시킨 후, EZ-CYTOX(DoGenBio, Korea) 시약을 이용하여 세포 생존률을 측정하였다.

[0078] 전처리 된 HUVECs 세포주는 하이드로퍼옥사이드 400 uM 단독 처리군, 하이드로퍼옥사이드 및 25 ug/mL 진세노사이드 MC1 처리군, 및 하이드로퍼옥사이드 및 50 ug/mL 진세노사이드 MC1 처리군으로 나누어 3 시간 동안 반응 시킨 후, EZ-CYTOX 시약을 이용하여 세포 생존률을 측정하였다.

[0079] 도 3a 및 3b에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 H9c2 세포주(도 3a) 및 HUVECs 세포주(도 3b) 모두에서 하이드로퍼옥사이드 처리에 의한 세포사멸의 증가를 효과적으로 억제하였다.

[0081] **실험예 4. 진세노사이드 MC1의 Bax/Bcl2의 비율 감소 효과 확인**

[0082] H9c2 세포주는 25 ug/mL 진세노사이드 MC1, 50 ug/mL 진세노사이드 MC1 또는 비히클로 24 시간 동안 전처리하였다.

[0083] 전처리 된 세포주는 하이드로퍼옥사이드 600 uM 단독 처리군, 하이드로퍼옥사이드 및 25 ug/mL 진세노사이드 MC1 처리군, 및 하이드로퍼옥사이드 및 50 ug/mL 진세노사이드 MC1 처리군으로 나누어 3 시간 동안 반응시켰다.

[0084] 상기 실험예 1과 동일한 방법(Western blotting)을 이용하여 Bax 및 Bcl-2의 비율을 확인하였다.

[0085] 실험에서 사용한 항체는 다음과 같다: Bax 항체(Cellular Signaling, 미국, Cat. 2772), Bcl-2(C-2) 항체(Santa cruz Biotechnology, Cat. Sc-7382).

[0086] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 하이드로퍼옥사이드 처리에 의해 유도된 Bax/Bcl2의 비율을 효과적으로 감소시켰다.

[0088] **실험예 5. 진세노사이드 MC1의 혈당 감소 효과 확인**

[0089] C57BL/6 마우스를 5 마리씩 3 그룹으로 나누고, Con 그룹(C)은 일반식이(normal diet; ND), HFD 그룹(H)은 고지방식이(high fat diet; HFD)로 사육하며 2 일 간격으로 비히클(vehicle)을 복강 내로 주입하였다. HFD plus MC1 그룹(MC1)은 고지방식이(HFD)로 사육하며 2 일 간격으로 10 mg/kg의 진세노사이드 MC1을 복강으로 투여하였다.

[0090] 4 달 후, 16 시간 동안 단식시킨 각 마우스에 글루코스(glucose)를 kg 당 1g씩 복강 내 주입 후 꼬리 혈관으로부터 혈액을 획득하여 혈당을 측정하였다.

[0091] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 고지방식이에 의해 억제된 혈당 처리 능력을 효과적으로 개선시켰다.

[0093] **실험예 6. 진세노사이드 MC1의 인슐린 신호 전달 보호 효과 확인**

[0094] HepG2 세포주는 200 uM 하이드로퍼옥사이드, 하이드로퍼옥사이드 및 50 ug/mL 진세노사이드 MC1, 또는 비히클로 24 시간 동안 전처리하였다.

[0095] 전처리 된 세포주는 1 ug/mL 인슐린 처리군, 인슐린 및 200 uM 하이드로퍼옥사이드 처리군, 인슐린, 하이드로퍼옥사이드 및 50 ug/mL 진세노사이드 MC1 처리군으로 나누어 10 분 동안 반응 시켰다.

[0096] 상기 실험예 1과 동일한 방법(Western blotting)을 이용하여 인산화된 IRS 및 AKT를 정량하였다.

[0097] 실험에서 사용한 항체는 다음과 같다: Phospho-IRS-1(Tyr895) 항체(Cellular Signaling, Cat. 3070), Phospho-Akt(Ser473) 항체(Cellular Signaling, Cat. 9271).

[0098] 도 6에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 하이드로퍼옥사이드에 의해 억제된 인슐린 매개 신호 전달을 효과적으로 개선시켰다.

[0100] **실험예 7. 진세노사이드 MC1의 MyoD 및 MyoG의 발현, 및 분화효율 회복 효과 확인**

[0101] 분화된 C2C12 세포주는 1 ug/mL 리포폴리사카라이드(LPS), LPS 및 25 또는 50 ug/mL 진세노사이드 MC1, 또는 비히클을 처리하여 배양시켰다.

[0103] 먼저, 48 시간 동안 배양된 세포로부터 단백질을 회수하여 분화 마커인 MyoD 및 MyoG의 발현 정도를 측정하였다(Western Blotting). 실험에서 사용한 물품은 다음과 같다: MyoD 항체 (Santa cruz Biotechnology, 미국, Cat. sc-377460), MyoG 항체(Santa cruz Biotechnology, 미국, Cat. sc-12732).

[0104] 도 7a에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 LPS에 의해 감소된 MyoD 및 MyoG의 발현을 효과적으로 회복시켰다.

[0106] 다음으로, 96 시간 동안 배양된 세포를 10% 포르말린(formalin)에 30분 동안 고정한 후, 메탄올(methanol)과 -20 ℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 5 % skim milk 를 이용하여 블로킹(blocking) 후, 일차 항체를 4 ℃에서 16 시간 동안 처리하고 다시 형광이 붙은 이차 항체를 실온에서 1 시간 반응시킨 후 형광현미경(fluorescence microscope)을 이용하여 분화된 세포를 계수하였다. 실험에서 사용한 물품은 다음과 같다: Skeletal Muscle Myosin 항체 (Santa cruz Biotechnology, 미국, Cat. sc-32732).

[0107] 도 7b에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 LPS에 의해 감소된 분화효율을 효과적으로 회복시켰다.

[0109] **실험예 8. 진세노사이드 MC1의 *In vivo* 효과 확인(심장 조직)**

[0110] C57BL/6 마우스를 5 마리씩 3 그룹으로 나누고, Con 그룹(C)은 일반식이(normal diet; ND), HFD 그룹(H)은 고지방식이(high fat diet; HFD)로 사육하며 2 일 간격으로 비히클(vehicle)을 복강 내로 주입하였다. HFD plus MC1 그룹(MC1)은 고지방식이(HFD)로 사육하며 2 일 간격으로 10 mg/kg의 진세노사이드 MC1을 복강으로 투여하였다.

[0111] 4 달 후, 16 시간 동안 단식시킨 각 마우스에서 심장 조직을 획득하였다.

[0113] **8-1. 항산화 단백질(antioxidant protein) 발현(Western Blotting)**

[0114] 실험에서 사용한 항체는 다음과 같다: Catalase(H-9) 항체(Santa cruz Biotechnology, 미국, Cat. Sc-271803), SOD2(A-2) 항체(Santa cruz Biotechnology, Cat. Sc-133134).

[0115] 도 8a에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 심장 조직에서 항산화 효소인 카탈라아제 및 SOD2의 발현을 유도하였다.

[0117] **8-2. 세포사멸(Western Blotting 및 Caspase 3 활성)**

[0118] 실험에서 사용한 물품은 다음과 같다: Bax 항체(Cellular Signaling, 미국, Cat. 2772), Bcl-xL 항체(Cellular Signaling, 미국, Cat. 2762s), Caspase-3 활성 측정 키트(Abcam, 미국, Cat. ab39401; 제조사의 사용자지침서에 따라 진행).

[0119] 도 8b에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 고지방식이에 의해 유도된 심장 조직의 세포사멸을 효과적으로 억제하였다.

[0121] **8-3. 섬유화(Western Blotting 및 Collagen 축적)**

[0122] 실험에서 사용한 물품은 다음과 같다: Collagen 1 항체(Santa cruz Biotechnology, 미국, Cat. sc-293182), Total collagen 측정 키트(BioAssay Systems, 미국, Cat. ECOL-100; 제조사의 사용자지침서에 따라 진행).

[0123] 도 8c에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 고지방식이에 의해 유도된 심장 조직의 콜라겐의 발현 증가 및 섬유화 반응을 효과적으로 억제하였다.

[0125] **실험예 9. 진세노사이드 MC1의 *In vivo* 효과 확인(간 조직)**

[0126] C57BL/6 마우스를 5 마리씩 3 그룹으로 나누고, Con 그룹(C)은 일반식이(normal diet; ND), HFD 그룹(H)은 고지방식이(high fat diet; HFD)로 사육하며 2 일 간격으로 비히클(vehicle)을 복강 내로 주입하였다. HFD plus MC1 그룹(MC1) 은 고지방식이(HFD)로 사육하며 2 일 간격으로 10 mg/kg의 진세노사이드 MC1을 복강으로 투여하였다.

[0127] 4 달 후, 16 시간 동안 단식시킨 각 마우스에서 간 조직을 획득하였다.

[0129] **9-1. 세포사멸(Western Blotting 및 Caspase 3 활성)**

[0130] 실험에서 사용한 물품은 다음과 같다: GRP78 항체 (Santa cruz Biotechnology, 미국, Cat. sc-13539), CHOP/GADD153 항체(Santa cruz Biotechnology, 미국, Cat. sc-7351), Caspase-3 활성 측정 키트(Abcam, 미국, Cat. ab39401; 제조사의 사용자지침서에 따라 진행).

[0131] 도 9a에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 고지방식이에 의해 유도된 간 조직의 소포체 스트레스 및 세포사멸을 효과적으로 억제하였다.

[0133] **9-2. 지방축적(Western Blotting 및 triglyceride 축적)**

[0134] 실험에서 사용한 물품은 다음과 같다: ACC 항체 (Cellular Signaling, 미국, Cat. 3662s), Fas 항체(Cellular Signaling, 미국, Cat. 3180s), Triglyceride 측정 키트(Biovision, 미국, Cat. K622-100; 제조사의 사용자지침서에 따라 진행).

[0135] 도 9b에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 고지방식이에 의해 유도된 간 조직 내 지방축적을 효과적으로 억제하였다.

[0137] **9-3. 인슐린 민감성(insulin sensitivity)(Western Blotting)**

[0138] 실험에서 사용한 물품은 다음과 같다: Serine phosphorylated IRS-1 항체 (Cellular Signaling, 미국, Cat. 2381s), IRS-1 항체(Cellular Signaling, 미국, Cat. 2382s).

[0139] 도 9c에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC1의 처리는 고지방식이에 의해 감소된 인슐린 민감성을 효과적으로 회복시켰다.

[0141] **실험예 10. 진세노사이드 MC의 오토파지 활성 효과 확인**

[0142] H9c2 세포주에 120 ug/mL 진세노사이드 MC를 1 시간 또는 24 시간 동안 처리하였다.

[0143] 상기 실험예 1과 동일한 방법(Western blotting)을 이용하여 1 시간 처리 된 세포로부터 인산화된 AMPK를, 24 시간 처리된 세포로부터 LC3-II, Beclin2 및 p62를 정량하였다.

[0144] 실험에서 사용한 항체는 다음과 같다: Phospho-AMPKα(Thr172)(40H9) 항체(Cellular Signaling, Cat. 2535), LC3A 항체(Novus-Biologicals, 미국, Cat. NB-100-2331), Beclin2(H-300) 항체 Santa cruz Biotechnology, Cat. Sc-11427), SQSTM1/p62 항체(Cellular Signaling, Cat. 5114).

[0145] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC의 처리는 세포 내 오토파지의 함량 증가를 효과적으로 유도하였다. 또한, AMPK의 인산화를 증가시켰으며, LC3-Ⅱ 및 Beclin-2의 발현을 증가시켰고, p62의 발현을 감소시켰다.

[0147] **실험예 11. 진세노사이드 MC의 세포사멸 억제 효과 확인**

[0148] H9c2 세포주는 40 ug/mL 진세노사이드 MC, 120 ug/mL 진세노사이드 MC 또는 비히클로 24 시간 동안 전처리하였다.

[0149] 전처리 된 세포주는 하이드로퍼옥사이드 400 uM 단독 처리군, 하이드로퍼옥사이드 및 40 ug/mL 진세노사이드 MC 처리군, 및 하이드로퍼옥사이드 및 120 ug/mL 진세노사이드 MC 처리군으로 나누어 3 시간 동안 반응 시킨 후, EZ-CYTOX 시약(두젠, 한국)을 이용하여 세포 생존률을 측정하였다.

[0150] 도 11에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC의 처리는 하이드로퍼옥사이드 처리에 의한 세포사멸의 증가를 효과적으로 억제하였다.

[0152] **실험예 12. 진세노사이드 MC의 인슐린 신호 전달 보호효과 확인**

[0153] 분화된 C2C12 세포주 및 HepG2 세포주는 1 ug/mL 리포폴리사카라이드(LPS), LPS 및 25 ug/mL 진세노사이드 MC, 또는 비히클로 24 시간 동안 전처리하였다.

[0154] 전처리 된 세포주는 1 ug/mL 인슐린 처리군, 인슐린 및 1 ug/mL LPS 처리군, 인슐린, LPS 및 25 ug/mL 진세노사이드 MC 처리군으로 나누어 10 분 동안 반응시켰다.

[0155] 상기 실험예 6과 동일한 방법(Western blotting)을 이용하여 인산화된 IRS 및 AKT를 정량하였다.

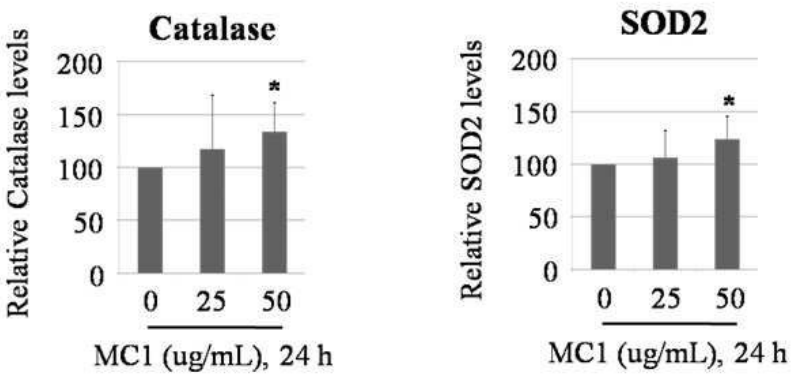
[0156] 도 12a 및 도 12b에서 확인할 수 있듯이, 진세노사이드 MC의 처리는 C2C12 세포주(도 12a) 및 HepG2 세포주(도 12b) 모두에서 LPS에 의해 억제된 인슐린 매개 신호 전달을 효과적으로 개선시켰다.

[0158] **통계**

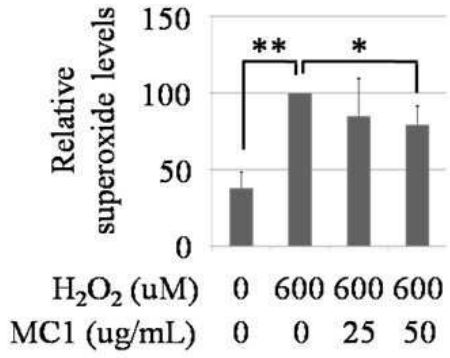
[0159] 모든 결과는 One-Way ANOVA를 통해 분석하였으며, p-value(P)가 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다(*, $P<0.05$; **, $P<0.005$; ***, $P<0.0005$).

도면

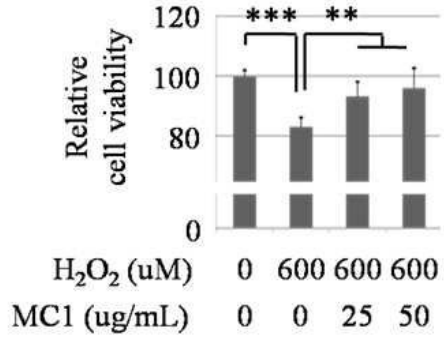
도면1



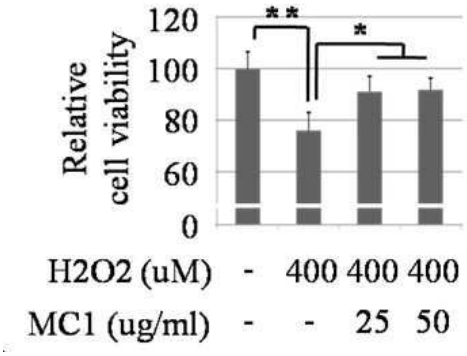
도면2



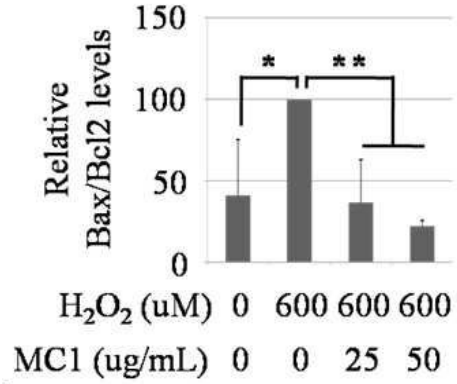
도면3a



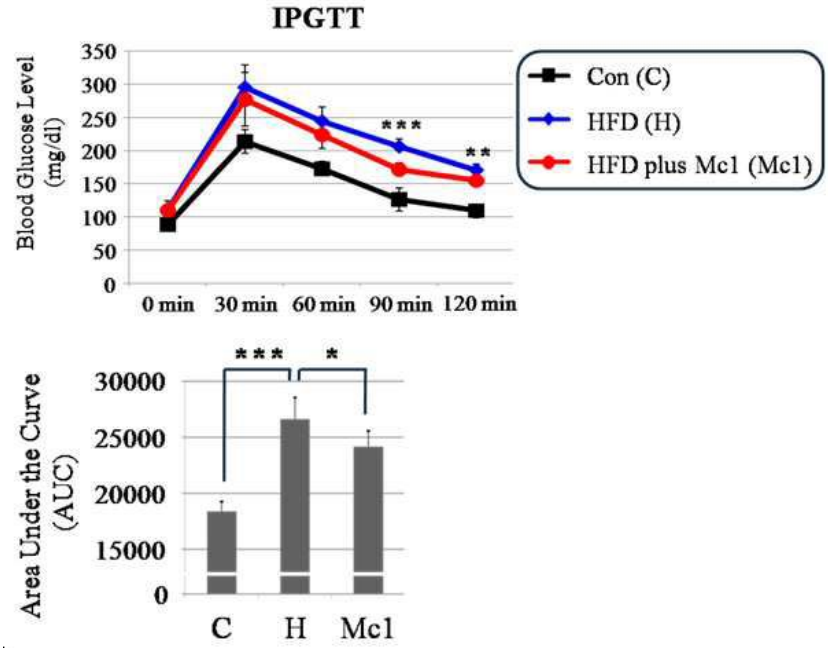
도면3b


Relative cell viability
120
100
80
60
0
**
*
H2O2 (uM) - 400 400 400
MC1 (ug/ml) - - 25 50

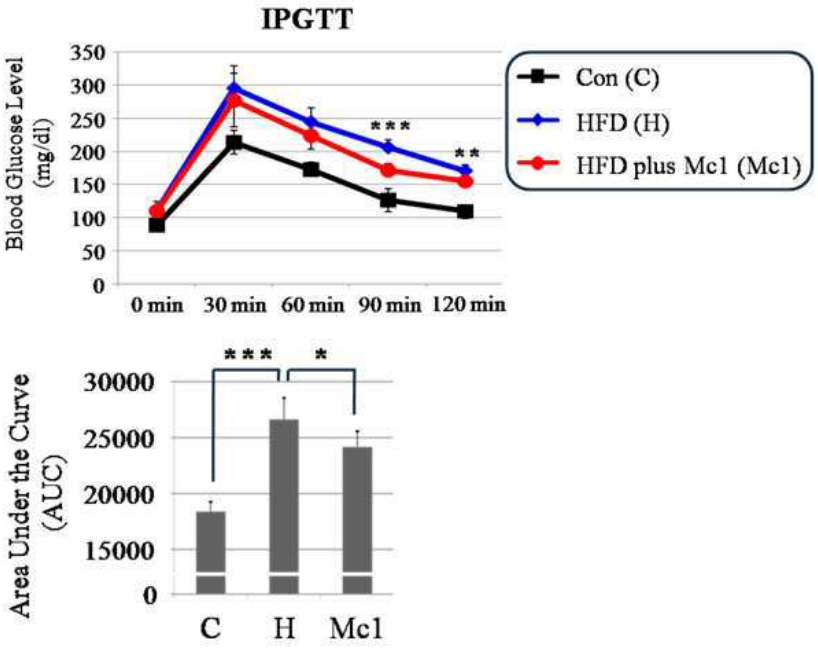
도면4


Relative Bax/Bcl2 levels
150
100
50
0
*
**
H2O2 (uM) 0 600 600 600
MC1 (ug/mL) 0 0 25 50

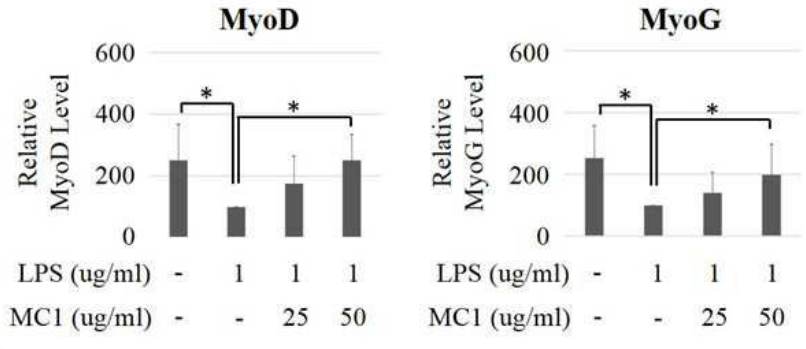
도면5


IPGTT
Blood Glucose Level (mg/dl)
350
300
250
200
150
100
50
0
0 min
30 min
60 min
90 min
120 min
***
**
Con (C)
HFD (H)
HFD plus Mc1 (Mc1)
Area Under the Curve (AUC)
30000
25000
20000
15000
0
***
*
C
H
Mc1

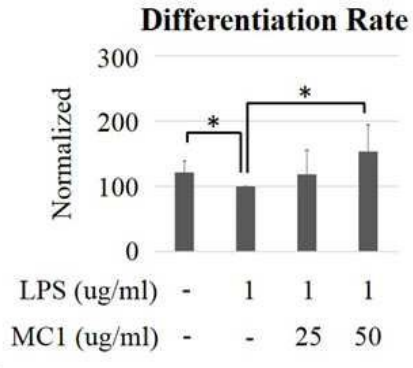
도면6



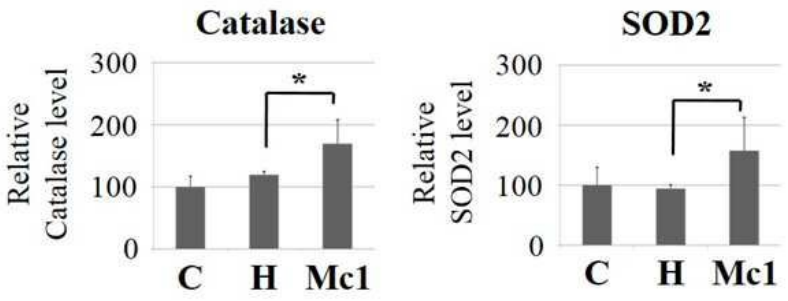
도면7a



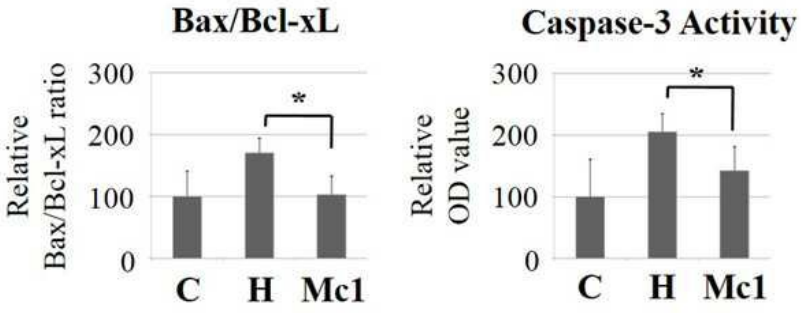
도면7b



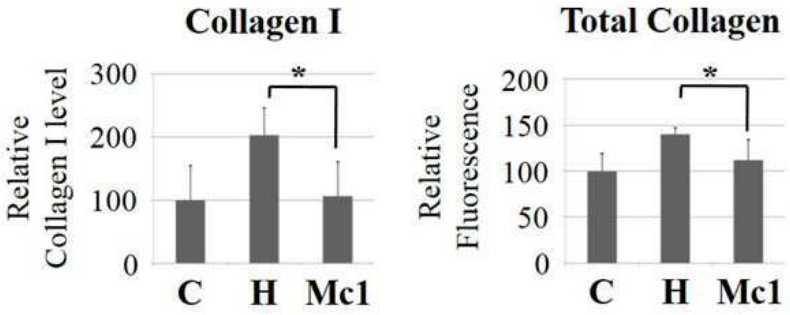
도면8a



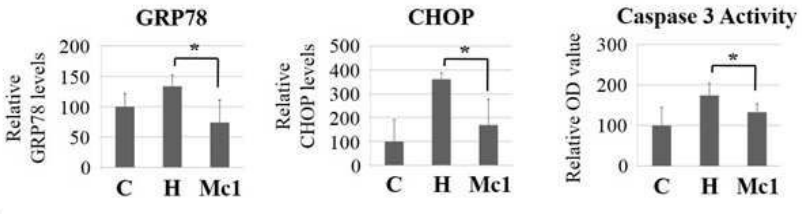
도면8b



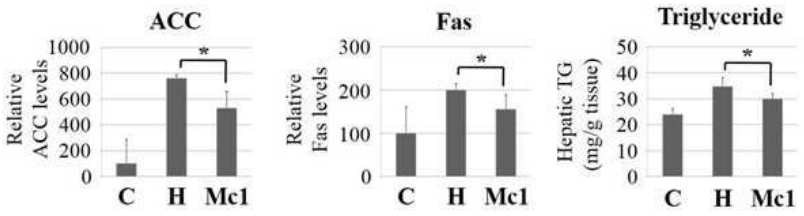
도면8c



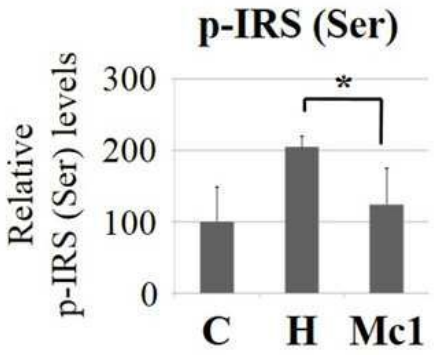
도면9a



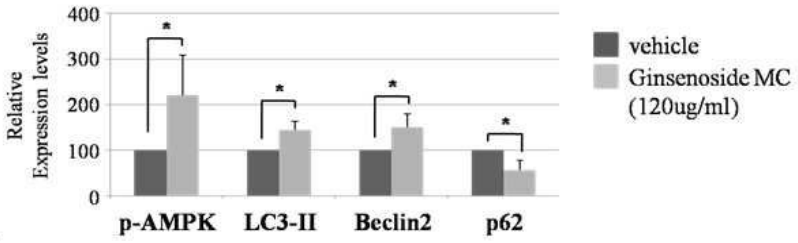
도면9b



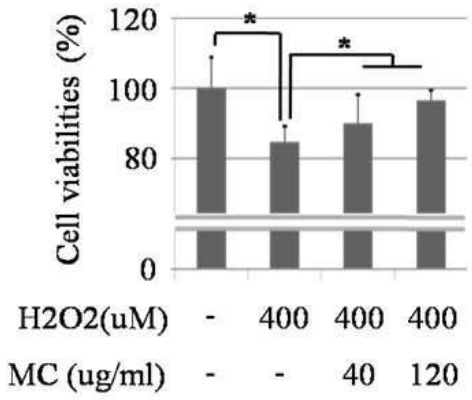
도면9c



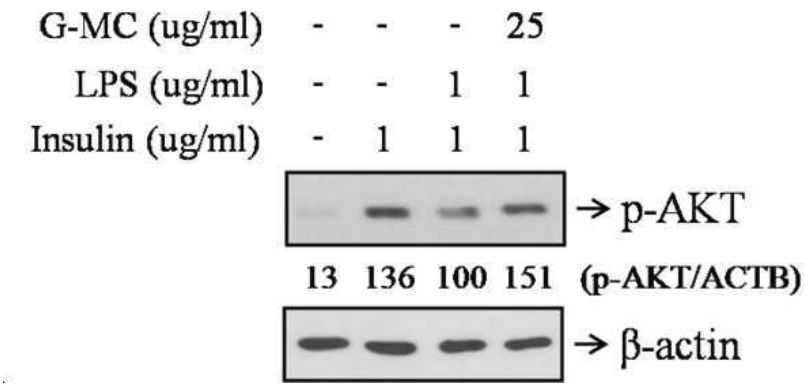
도면10



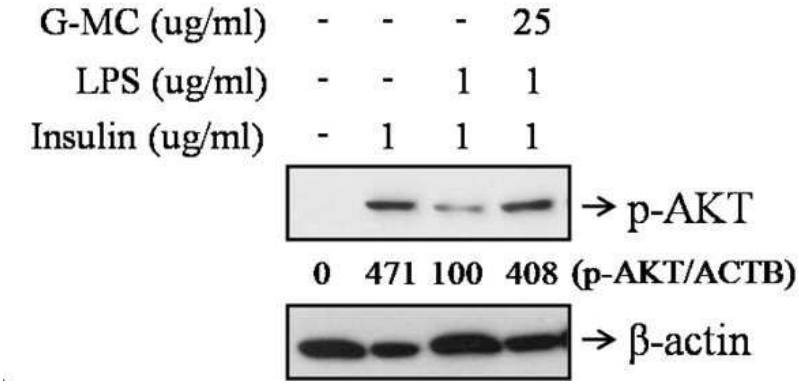
도면11



도면12a


G-MC (ug/ml) - - - 25
LPS (ug/ml) - - 1 1
Insulin (ug/ml) - 1 1 1
→ p-AKT
13 136 100 151 (p-AKT/ACTB)
→ β-actin

도면12b


G-MC (ug/ml) - - - 25
LPS (ug/ml) - - 1 1
Insulin (ug/ml) - 1 1 1
→ p-AKT
0 471 100 408 (p-AKT/ACTB)
→ β-actin