

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0066742 (43) 공개일자 2016년06월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/185 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	
(21) 출원번호 10-2014-0171876	(72) 발명자 서준교 강원도 춘천시 충열로 29, 107-303 (우두동, 롯데 인벤스아파트)	
(22) 출원일자 2014년12월03일 심사청구일자 2014년12월03일	남하진 강원도 춘천시 보안길 40, 318-201(주공3 차아파트) 김진규 강원도 춘천시 승지골길16번길 47, 1005-1103(퇴 계동, 퇴계뜨란채아파트)	
	(74) 대리인 강성혜	

전체 청구항 수 : 총 5 항

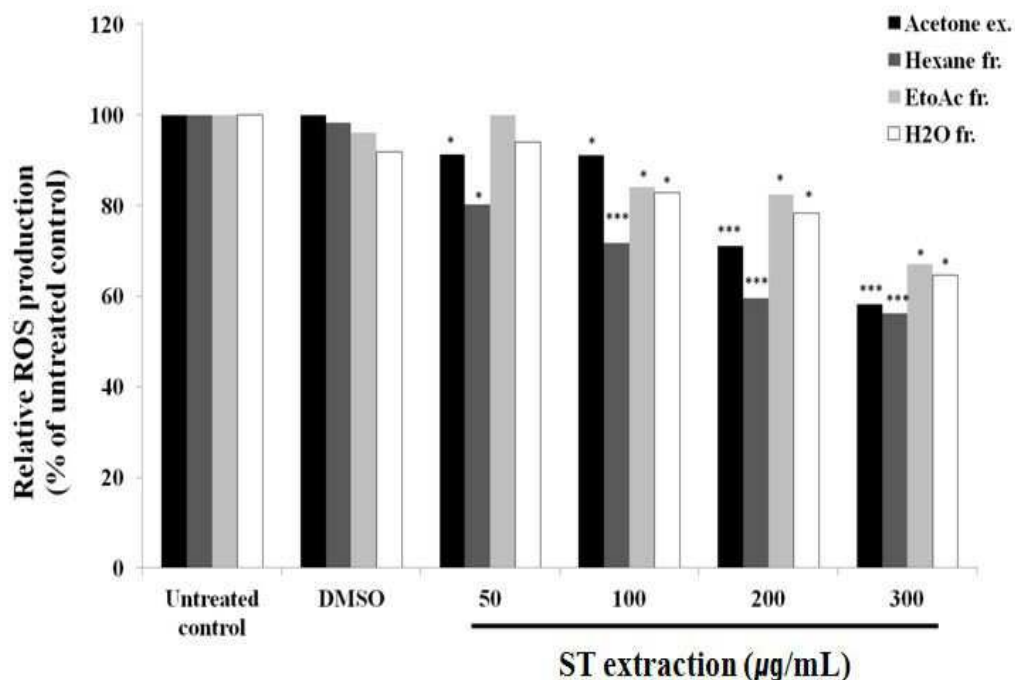
(54) 발명의 명칭 **때죽나무 열매 추출물을 함유하는 비만 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

때죽나무 열매 추출물과 그 분획의 지방축적 억제효과를 시험하였다. 때죽나무 열매 추출물과 그 분획 (0~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 세포를 72시간 동안 노출시킨 것은 미처리 대조군과 비교하여 세포 생존율에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 때죽나무 열매 추출물과 그 분획은 50~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 투여량 의존적으로 3T3-L1 지방세포의 지방 축

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5



적을 저해하였다. 지방세포생성의 주요 마커들인 PPAR γ 및 C/EBP α 발현은 미처리 대조군과 비교할 때 8일간 세포에 때죽나무 열매 추출물 또는 그 분획을 처리한 경우 현저히 감소하였다 ($p<0.05$, $p<0.005$). 3T3-L1 세포를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획과 함께 0~2, 2~4, 4~6, 6~8, 및 0~8일 동안 배양하고, 8일째에 정량하였을 때 때죽나무 열매 추출물 및 분획은 지방세포 분화를 억제하였다. 또한 지방세포 형성 단계 중 때죽나무 열매 추출물과 그 분획의 억제 효과는 분화 (0~2일)의 초기 단계에서 가장 강력하였다. 세포 내 활성산소종의 생성은 대조군과 비교하여 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획을 처리한 세포에서 현저히 감소하였고, 헥산 분획이 가장 높은 항산화 활성(~ 44%)을 나타내었다. 결론적으로, 때죽나무 열매 추출물과 분획이 활성산소종 수준을 하향시키고 지방세포생성 전사 인자를 감소하여 지방세포 생성을 억제할 수 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 때죽나무 열매 추출물과 그 분획이 천연 항비만 물질로서 치료제로 또는 예방 및 개선 용도로 이용될 수 있음을 제시해 주는 것이다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2009-0094071

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 교육부

연구사업명 기초연구기반구축사업

연구과제명 중추신경계질환치료를 위한 천연물 유래 신소재 개발 및 기전연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교

연구기간 2007.12.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

때죽나무 (*Styrax japonica* Siebold et Zucc.) 열매 추출물을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 때죽나무 열매 추출물은 열수, 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

때죽나무 (*Styrax japonica* Siebold et Zucc.) 열매 추출물을 포함하는 비만 예방 또는 개선용 식품.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 식품은 음료 형태인 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 개선용 식품.

청구항 5

청구항 3에 있어서,

상기 때죽나무 열매 추출물은 열수, 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 개선용 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 때죽나무 열매 추출물을 함유하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 때죽나무 열매 추출물은 투여량 의존적으로 지방세포의 지방 축적을 저해하였고, 8일간 세포에 때죽나무 열매 추출물을 처리한 경우 지방세포생성의 주요 마커들인 PPAR γ 및 C/EBP α 발현이 미처리 대조군과 비교할 때 현저히 감소하였다.

배경 기술

[0002]

세계보건기구(WHO)에 따르면, 과체중과 비만은 비정상적이거나 과도한 지방 축적으로 건강을 손상시킨다고 정의한다(1). 현재 세계 인구의 35% 이상이 과체중이거나 비만이다(2). 비만은 유전 및 환경적 요인으로 인한 만성 다인성 질환이다(3). 특히 식단의 서구화는 비만의 환경적 요인 중 하나임에 분명하다. 서양 식단과 전통 식단을 비교했을 때, 서양 식단은 고지방, 고당류의 과도한 칼로리 섭취로 비만 및 과체중을 유도한다(4). 비만 및 과체중은 고지혈증, 당뇨병, 심혈관 질환, 일부 암, 자가면역질환과 같은 건강과 연관된 세계적인 문제이다(5,6). 현재, 항비만 약물은 대부분 심각한 부작용을 일으킨다(7). 일부 화학합성 항비만 약물 중 orlistat와 lorcaserin을 제외하고는 안전성 문제로 인해 사용이 중지되었다(7). 따라서, 비만 및 과체중을 치료하는 더 안

전하고 더 저렴한 비만약을 개발하기 위해 천연물 기반의 약제가 연구되어 왔다(8).

[0003] 비만은 지방세포의 분화에 의한 지방세포의 크기 및 숫자가 증가하는 것에 기인한 지방조직의 확장을 특징으로 한다(9). 실제로 지방세포의 수는 지방세포 크기보다 비만과 더 높은 상관 관계가 있다(10).

[0004] 그러나 일부 동물연구는 지방세포 크기의 증가가 지방세포 수의 증가보다 우선함을 제시한다(11). 지방세포의 크기 증가 또한 제2형 당뇨병을 일으키는 독립적인 위험 요인이 될 수 있다(12). 지방세포 형성은 엄격하게 조절되는 세포 분화 과정인데, 여기에서 지방전구세포(pre-adipocyte)에서 분화된(성숙된) 지방세포로 전환된다(13). 지방조직의 부피는 지방 생성을 저해함으로써 감소 될 수 있고, 이는 PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ) 및 C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein- α)와 같은 주요 전사인자를 통해 조절될 수 있다(13).

[0005] 활성산소종(ROS)은 지방세포 생성 중 지방세포에 의해 생산된다(14). 과도한 지방에 의해 유도되는 지방세포에서의 산화스트레스는 비만으로 인한 대사 증후군의 근원이 될 수 있다(15). 최근 연구들은 활성산소종 생성이 비만, 당뇨병, 고혈압, 동맥 경화, 노화 및 암과 같은 대사증후군의 유병률 증가와 연관되어 있음을 보여 주었다(14, 16, 17, 18). 따라서, 지방조직에서 활성산소종 수준의 억제는 비만과 대사증후군 방지에 중요할 것이다.

[0006] 때죽나무(*Styrax japonica* Siebold et Zucc.)는 매나무과로 중앙 아메리카, 멕시코, 지중해 지역, 필리핀, 중국, 일본 및 한국의 남부지역에서 분포한다(19, 20). 때죽나무는 한방에서 인후통, 기침, 치통, 염증 및 마비 등의 증상에 사용되었다(20, 21). 줄기 껍질은 UV에 의해 유도되는 피부손상의 치료에 생물학적으로 활성을 갖는 것으로 보고 되었다(22). 꽃잎은 항균효과 등 여러 생물학적 활성을 나타내는 것으로 보고 되었다(23). 열매는 세포사멸 활성(20), 항산화(24), 항암 효과(25)와 같은 생물학적 활성을 나타내는 것으로 보고되었다. 그러나 때죽나무 열매의 항 비만 효과에 관한 연구는 보고된 바 없었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Gillman MW, Poston L. Maternal obesity. Cambridge university press, New York, pp 1-7 (2012)
- (비특허문헌 0002) World Health Organization. Overweight/obesity: overweight by country. Global Health Observatory Data Repository 2008 2013 (2013)
- (비특허문헌 0003) Aguilera CM, Olza J, Gil A. Genetic susceptibility to obesity and metabolic syndrome in childhood. Nutr. Hosp. 28: 44-55 (2013)
- (비특허문헌 0004) Cannon CP1, Kumar A. Treatment of overweight and obesity: lifestyle, pharmacologic, and surgical options. Clin Cornerstone. 9: 55-71 (2009)
- (비특허문헌 0005) Kurukulasuriya LR, Stas S, Lastra G, Manrique C, Sowers JR. Hypertension in obesity. Med. Clin. North Am. 95: 903-917 (2011)
- (비특허문헌 0006) Franssen R, Monajemi H, Stroes ES, Kastelein JJ. Obesity and dyslipidemia. Med. Clin. North Am. 95: 893-902 (2011)
- (비특허문헌 0007) Brashier DB, Sharma AK, Dahiya N, Singh SK, Khadka A. Lorcaserin: A novel antiobesity drug. J. Pharmacol. Pharmacother. 5: 175-178 (2014)
- (비특허문헌 0008) Vasudeva N, Yadav N, sharma SK. Natural products: a safest approach for obesity. Chin. J. Integr. Med. 18: 473-480 (2012)
- (비특허문헌 0009) Hsu CL, Yen GC. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. Mol. Nutr. Food Res. 52: 53-61 (2008)
- (비특허문헌 0010) Hirsch J, Batchelor B. Adipose tissue cellularity in human obesity. Clin. Endocrinol. Metab. 5: 299-311(1976)
- (비특허문헌 0011) Weyer C1, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous

abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 43: 1498-1506 (2000)

(비특허문헌 0012) Lonn M, Mehlig K, Bengtsson C, Lissner L. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. *FASEB J.* 24: 326-331 (2010)

(비특허문헌 0013) Kong CS, Kim JA, Eom TK, Kim SK. Phosphorylated glucosamine inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 21: 438-443 (2010)

(비특허문헌 0014) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114: 1752-1761 (2004)

(비특허문헌 0015) Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444: 847-853 (2006)

(비특허문헌 0016) Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? 88: 10045-10048 (1991)

(비특허문헌 0017) Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 91: 2546-2551 (1993)

(비특허문헌 0018) Valko M, Moncol DJ, Cronin TD, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84 (2007)

(비특허문헌 0019) Kim MR, Lee HH, Hahm KS, Moon YH, Woo ER. Pentacyclic triterpenoids and their cytotoxicity from the stem bark of *Styrax japonica* S. et Z. *Arch. Pharm. Res.* 27: 283-286 (2004)

(비특허문헌 0020) Lee J, Lim KT. Apoptotic activity of ethanol extract from *Styrax Japonica* Siebold et al Zuccarini in HepG2 cells. *J. Ethnopharmacol.* 131: 210-215 (2010)

(비특허문헌 0021) Lee J, Lim KT. Normalizing effect of SJSZ glycoprotein (38 kDa) on proliferating cell nuclear antigen and interferon- γ in diethylnitrosamine-induced mice splenocytes. *J. Cell Biochem.* 114: 808-815 (2013)

(비특허문헌 0022) Moon HI, Lee J, chung JH. The effect of erythrodiol-3-acetate on the expressions of matrix metalloproteinase-1 and type-1 procollagen caused by ultraviolet irradiated cultured primary old aged human skin fibroblasts. *Phytomedicine* 13: 707-711 (2006)

(비특허문헌 0023) Harikrishnan R, Kim JS, Kim MC, Balasundaram C, Heo MS. *Styrax japonica* supplementation diet enhances the innate immune response in *Epinephelus bruneus* against bacterial and protozoan infections. *Exp. Parasitol.* 129: 260-265 (2011)

(비특허문헌 0024) Lee J, Lim KT. SJSZ glycoprotein (38 kDa) modulates expression of IL-2, IL-12, and IFN- γ in cyclophosphamide-induced Balb/c. *Inflamm. Res.* 6: 1319-1328 (2012)

(비특허문헌 0025) Kwon OW, Kim WJ, Lee HJ. Anti-cancer Activity of *Styrax japonica* Bark extracts. *J. Korean Wood Sci. Tech.* 42: 68-77 (2014)

(비특허문헌 0026) Kim, MJ, Park MH, Jeong MK, Yeo MK, Yeo JD, Cho WI, Chang PS, Chung JH, Lee JH. Radical scavenging activity and anti-obesity effects in 3T3-L1 preadipocyte differentiation of *Ssuk* (*Artemisia princeps* Pamp.) extract. *Food Sci. Biotechnol.* 19: 535-540 (2010)

(비특허문헌 0027) Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)

(비특허문헌 0028) Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 44-49 (2003)

(비특허문헌 0029) Kang SI, Kim MH, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Park JG, Ko HC, Lee NH, Chung WS, Kim

SJ. A water-soluble extract of *Petalonia binghamiae* inhibits the expression of adipogenic regulators in 3T3-L1 preadipocytes and reduces adiposity and weight gain in rats fed a high-fat diet. J. Nutr. Biochem. 21: 1251-1257 (2010)

(비특허문헌 0030) Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. J. Nutr. Biochem. 19: 717-726 (2008)

(비특허문헌 0031) Lee YJ, Kim DB, Lee JS, Cho JH, Kim BK, Choi HS, Lee BY, Lee OH. Antioxidant activity and anti-adipogenic effects of wild herbs mainly cultivated in Korea. Molecules 18: 12937-12950 (2013)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 부작용 없이 지방세포 생성을 억제하는 항비만 조성물의 제공을 목적으로 한다. 상기 항비만 조성물은 약학 조성물 또는 식품을 나타낸다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 수십 종의 천연물에 대하여 항-지방세포생성 활성을 스크린하여 그 중 활성이 높은 천연물들을 선택하고, 그 중에서도 세포독성이 없고 항비만 효과가 높은 때죽나무 열매 추출물을 선택하여 항비만 약학 조성물 및 식품으로의 응용 가능성을 시험한 것이다.

[0010] 본 발명자들은 때죽나무 열매 추출물과 그 분획의 지방축적 억제효과를 시험하였다. 때죽나무 열매 추출물과 그 분획 (0~500 $\mu\text{g/ml}$)에 세포를 72시간 동안 노출시킨 것은 미처리 대조군과 비교하여 세포 생존율에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 때죽나무 열매 추출물과 그 분획은 50~300 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 투여량 의존적으로 3T3-L1 지방세포의 지방 축적을 저해하였다. 지방세포생성의 주요 마커들인 PPAR γ 및 C/EBP α 발현은 미처리 대조군과 비교할 때 8일간 세포에 때죽나무 열매 추출물 또는 그 분획을 처리한 경우 현저히 감소하였다 ($p<0.05$, $p<0.005$). 3T3-L1 세포를 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획과 함께 0~2, 2~4, 4~6, 6~8, 및 0~8일 동안 배양하고, 8일째에 정량하였을 때 때죽나무 열매 추출물 및 분획은 지방세포 분화를 억제하였다. 또한 지방세포 형성 단계 중 때죽나무 열매 추출물과 그 분획의 억제 효과는 분화 (0~2일)의 초기 단계에서 가장 강력하였다. 세포 내 활성산소종의 생성은 대조군과 비교하여 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획을 처리한 세포에서 현저히 감소하였고, 핵산 분획이 가장 높은 항산화 활성(~ 44%)을 나타내었다. 결론적으로, 때죽나무 열매 추출물과 분획이 활성산소종 수준을 하향시키고 지방세포생성 전사 인자를 감소하여 지방세포 생성을 억제할 수 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 때죽나무 열매 추출물과 그 분획이 천연 항비만 물질로서 치료제로 또는 예방 및 개선 용도로 이용될 수 있음을 제시해 주는 것이다.

[0011] 본 발명은 때죽나무 열매 추출물을 포함하는 항비만 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 상기 때죽나무 열매 추출물이 열수, 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출되는 것을 특징으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 때죽나무 열매 추출물을 포함하는 비만 예방 및 개선용 식품에 관한 것이다. 상기 식품은 음료 형태, 건강기능성 식품, 빵, 과자 등 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 때죽나무 열매 추출물이 열수, 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 식품에 관한 것이다.

[0014] 때죽나무 열매 추출물을 얻는 방법의 일 실시예는 다음과 같다.

[0015] 때죽나무 열매를 껍질을 제거한 후 과육만을 선택하여 때죽나무 열매 부피의 2배 내지 200배, 바람직하게는 10

배 내지 30배의 유기용매를 가하고, 10 내지 30℃에서 1일 내지 20일간, 바람직하게는 5일 내지 10일간 추출하고 여과한 후 감압 농축하여 때죽나무 열매 추출물을 제조할 수 있다. 이때, 추출용매로는 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매를 사용할 수 있다. 또는 70~100℃ 열수 추출도 가능하다.

[0016] 상기 때죽나무 열매 추출물 제조시 유기용매로 추출하여 얻은 때죽나무 열매 추출물에 헥산, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 중에서 선택된 어느 하나 이상의 용매로 재추출하는 단계를 1회 이상 추가로 더 포함하여 때죽나무 열매 추출물을 제조할 수 있다.

[0017] 본 발명의 때죽나무 열매 추출물을 포함하는 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 상기한 기능을 갖는 약학 조성물을 제조할 수 있다. 상기에서 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0018] 상기 때죽나무 열매 추출물을 포함하는 약학 조성물은 충진제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 상기에서 제형은 정제, 알약, 분말, 새세이(sachet), 엘릭서(elixir), 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다.

[0020] 본 발명의 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 유효성분을 기준으로 할 때 때죽나무 열매 추출물은 10mg/kg 체중 내지 100mg/kg 체중, 바람직하게는 10mg/kg 체중 내지 30mg/kg 체중의 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 활성성분의 실제 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0021] 본 발명은 때죽나무 열매 추출물을 포함하는 비만 예방 및 개선용 식품을 포함한다.

[0022] 본 발명은 때죽나무 열매 추출물을 포함하여 비만 및 비만 합병증을 예방하거나 개선할 수 있는 건강 증진용 식품 또는 음료 조성물을 제공할 수 있다.

[0023] 본 발명의 때죽나무 열매 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들면 각종 식품류, 음료수, 과자류, 껌, 아이스크림, 차, 인스턴트 차, 과일, 향료, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 때죽나무 열매 추출물을 식품 제조시 원료 물질에 첨가하거나 조리된 식품에 적절히 혼합하여 상기한 건강 증진용 식품 또는 음료를 제조할 수 있으며, 이 경우 최종적으로 제조된 식품 또는 음료 중에 때죽나무 열매 추출물의 함량은 0.01중량% 내지 30중량% 범위일 수 있다.

[0025] 본 발명의 약학 조성물, 또는 건강 증진용 식품 또는 음료는 목적하는 효과를 상승시키거나 보완하기 위해 약학적으로 허용되는 다른 생약제 또는 이의 추출물을 추가로 포함할 수 있으며, 그러한 생약제의 대표적인 예로는 우슬, 당귀, 황백 및 울금 등을 들 수 있다. 상기 생약제는 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01중량% 내지 50중량%의 양으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 때죽나무 열매 추출물을 포함하는 조성물은 지방세포 분화억제, 지방축적 억제 및 지방세포 생성억제 효과가 우수하므로, 비만의 예방 및 치료 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 패죽나무 열매 추출물과 그 분획이 지방세포 생존율에 미치는 영향. 패죽나무 열매 추출물 및 그 분획 (헥산, 에탄올 및 물)의 효과를 조사하기 위해 분화된 3T3-L1 세포를 다양한 농도(0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$)의 패죽나무 열매 추출물로 72시간 동안 처리하였다. 시험 세포 생존율에 대한 CCK-8 분석은 처리 후 72시간 후에 수행하였다. 값은 별도의 세 가지 실험의 평균 표준편차로 나타내었다.

도 2는 패죽나무 열매 추출물 및 그 분획이 지방세포 분화의 지질 축적에 미치는 영향. 3T3-L1의 지방전구세포에 전체 분화 과정에 대한 샘플(0~8일)로 처리하였다. 지방세포의 대표적인 형태학 현미경 이미지는 0, 50, 100, 200, 및 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고, 8일 후 오일 레드 O로 염색하였다. 현미경 사진은 200배의 배율로 촬영하였다. 흡광도 값은 오일 레드 O 염색된 세포의 이소프로판올을 용출하여 측정하였다. 패죽나무 열매 추출물 및 그 분획은 3T3-L1 세포에서의 지방형성 동안 지질 축적을 억제; 아세톤 추출물 (A), 헥산 분획 (B), 에틸아세테이트 분획 (C), 물 분획 (D). 값은 별도의 세 가지 실험의 평균 표준편차로 나타내었다. 처리되지 않은 대조군과 비교 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$.

도 3은 패죽나무 열매 추출물과 그 분획이 지방세포 관련 단백질의 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블랏 분석으로 분석하였다. 결과는 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현 수준은 패죽나무 열매 추출물 및 분획으로 처리한 8일째에 3T3-L1 세포에서 감소하는 것으로 나타났다; 아세톤 추출물 (A), 헥산 분획 (B), 에틸아세테이트 분획 (C), 물 분획 (D). 신호는 β -액틴을 정규화하였다. 값은 별도의 세 가지 실험의 평균 표준편차로 나타내었다. 미처리 대조군과 비교 * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$.

도 4는 패죽나무 열매 추출물 및 그 분획이 지방세포 분화에 미치는 영향. 패죽나무 열매 추출물 및 그 분획을 0~2, 2~4, 4~6, 6~8, 및 0~8일 동안 함께 배양하였다. 8일째 되는 날 세포는 오일 레드 O로 염색하였다. 값은 별도의 세 가지 실험의 평균 표준편차로 나타내었다. 미처리 대조군과 비교 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

도 5는 패죽나무 열매 추출물 및 그 분획이 지방 형성시 3T3-L1 세포에서 활성산소종(ROS)의 생산에 미치는 영향. 활성산소종 생산은 진한 청색 포르마잔의 형성에 기초하여 570 nm의 파장에서 NBT 분석으로 평가하였다. 값은 별도의 세 가지 실험의 평균 표준편차로 나타내었다. 미처리 대조군과 비교 * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0029] 시약 및 시료

[0030] 3T3-L1 지방전구세포는 ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas, VA, USA)에서 입수하였다. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), β -액틴 항체, 인슐린, IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 텍사메타손, 오일 레드 O 용액 및 NBT(nitroblue tetrazolium)은 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 우태혈청, NCS (newborn calf serum), 25% 트립신-EDTA 및 항생제, 항미생물제는 Gibco (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포계수 키트-8 (CCK-8)은 Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Kumamoto, Japan)에서 구입하였다. Quant-iT 단백질 분석키트는 Invitrogen (Auckland, New Zealand)에서 구입하였고, PPAR γ 및 C/EBP α 에 대한 항체들은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 입수하였다. 호스 래디쉬 퍼옥시데이즈-결합된 염소 항-토끼 IgG는 Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)에서 구입하였다.

[0031] 패죽나무 열매 추출물 제조

[0032] 패죽나무 (*Styrax japonica*) 열매는 강원도 산림개발연구원에서 제공받았다. 보증용 건본 (G-11-11)은 강원도 산림개발연구원 식물표본실에 기탁하였다. 패죽나무 열매는 동결건조시키고, 건조된 샘플(100 g)은 분말화하고 상온에서 24시간 동안 70% 아세톤 5ℓ로 추출하였다. 총 수율은 16.8 g이었다. 조추출물 15g에서 헥산 분획 (0.05 g), EtOAc 분획 (1.2 g), 물 분획 (12.9 g)을 얻었다.

[0033] **세포 배양**

[0034] 3T3-L1 지방전구세포는 10% NCS, 100 IU/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 5% CO_2 를 함유한 습한 조건에서 37 $^\circ\text{C}$ 로 세포가 충분히 자랄 때까지 유지, 배양하였다. 지방세포형성을 유도하기 위해 세포는 충분히 자란 다음 이를 후까지 배양하였고, 그런 다음 10% FBS 함유 DMEM에 5 $\mu\text{g/ml}$ 인슐린, 0.5 M 텍사메타손 및 0.5 M IBMX를 포함하는 분화 촉진 혼합물을 가하여 유도하였다. 그런 다음 5 $\mu\text{g/ml}$ 인슐린 함유 10% FBS/DMEM으로 이틀에 한 번 배지를 바꾸었다. 시료는 분화 개시 시점에서 때죽나무 열매 추출물을 각각 0~500 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였고, 각 배지는 2일마다 바꾸었고, 총 8일간 처리하였다 (0~8일).

[0035] **오일 레드 O 염색**

[0036] 오일 레드 O 염색은 김 등의 문헌에 기재된 절차를 이용하여 수행하였다(26). 분화된 지방세포를 PBS로 세척한 다음, 10% 포르말린이 함유된 PBS로 실온에서 60분간 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 세 번 세척한 다음 실온에서 30분간 여과된 오일 레드 O 용액으로 염색한 후 세포를 증류수로 두 번 세척하였다. 세포 형태는 도립현미경 (inverted microscope)(ZEISS, Oberkochen, Germany)으로 확인하였고, 이미지는 디지털 카메라 (Nikon, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 염색된 오일 방울은 아이소프로판올로 용해시킨 다음 형광 마이크로플레이트 판독기 (Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 정량하였다. 값은 미처리 대조군과 비교하여 백분율로 계산하였고, 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

[0037] **세포 생존율 분석**

[0038] 세포 생존율은 CCK-8을 이용하여 결정하였다. 간단히 설명하면, 각각 0, 50, 100, 200, 300, 400 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 때죽나무 열매 추출물이 없는 상태 또는 있는 상태에서 지방세포형성 촉진 각테일로 3T3-L1 세포를 자극하였고, 이 실험은 96웰 플레이트 (각 웰당 5,000개의 세포)에서 72시간 동안 수행하였다. 각기 지시된 시간 이후 시험 물질을 넣은 DMEM은 20 μl 의 CCK-8 용액을 포함한 DMEM으로 교체하여 어두운 곳에서 두 시간 동안 배양하였다. 생존 세포 내의 탈수소효소 활성의 양은 형광 마이크로플레이트 판독기 (Spectramax/M2^e, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm의 흡광도를 측정하여 탐지하였다. 각 분석은 세 번씩 수행하였다.

[0039] **웨스턴 블랏 분석**

[0040] 세포를 100 mm 디쉬 플레이트에 시딩하였다. 지방세포 분화 및 때죽나무 열매 추출물 처리는 위에서 기재된 바와 같이 수행하였다. 세포 추출물은 단백질 추출용액 (PRO-PREP, Intron Biotechnology, Sungnam, Korea)을 가하여 제조하였다. 세포 용균액 내의 단백질 함량은 브래드포드 방법으로 결정하였다(27). 단백질 (20 μg)을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 0.1% Tween 20을 포함하는 TBS에 용해한 5% 탈지분유로 블로킹하였다. 블랏은 PPAR γ (1:200) 및 C/EBP α (1:5000)를 포함하는 일차 항체 및 블로킹 용액 내의 염소 항-마우스 IgG-HRP 이차항체로 4 $^\circ\text{C}$ 에서 밤새 배양하였다. 목표 단백질은 ECL 웨스턴 블랏팅 탐지 시약 (GE Healthcare, Seoul, South Korea)으로 탐지하였다.

[0041] **활성산소종 측정**

[0042] 유도 후 8일째에, 활성산소종의 생산은 비색 NBT 분석으로 측정하였다. 일련의 처리 후, NBT 분석을 위한 세포를 0.2 % NBT 함유 PBS에 90분 동안 배양하였다. 세포 상의 포르마잔을 50 % 아세트산에 용해시켰다. 용해된 NBT 용액을 96-웰 플레이트에 옮기고, 형광 마이크로플레이트 판독기 (Spectramax/M2^e, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm의 흡광도를 측정하여 탐지하였다.

[0043] **통계 분석**

[0044] 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성을 결정하기 위해 데이터는 student's *t* test를 이용하여

분석하였다. $p < 0.05$ 값은 통계적으로 유의미한 것으로 판단되었다.

[0045] **결과 1: 세포 생존율에 미치는 때죽나무 열매 추출물의 효과**

[0046] 지방세포 분화의 초기 단계에서 3T3-L1 세포의 생존 능력에 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획(핵산, 에탄올 및 물)의 효과를 조사하기 위해 분화된 3T3-L1 세포를 다양한 농도(0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 때죽나무 열매 추출물로 72시간 동안 처리하였다. 도 1과 같이, 미처리 대조군 세포에 비해 때죽나무 열매 추출물 및 각 분획으로 세포를 처리한 것은 세포 독성 효과를 나타내지 않았다. 세포 형태에 어떠한 변화도 현미경 분석으로 관찰되지 않았다(데이터는 도시되지 않음).

[0047] **결과 2: 지방세포 형성에 미치는 때죽나무 열매 추출물의 효과**

[0048] 지방세포 분화과정에 미치는 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획(핵산, 에탄올 및 물)의 억제 효과를 조사하기 위하여 미분화된 3T3-L1 세포에 다양한 농도(0, 50, 100, 200, 및 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 때죽나무 열매 추출물을 처리하여 8일간 배양하였다. 도 2와 같이, 미처리 대조군 세포에 비해 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획은 유의적인 저해 활성을 보였다. 형태학적 관찰에 나타난 바와 같이, 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획이 처리된 세포는 미처리 대조군 세포에 비해 지질의 축적 정도가 낮았다(도 2a~d). 모든 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획 처리군은 지방세포 형성이 두어량 의존적으로 억제되었다(도 2a~d). 핵산 분획이 가장 높은 지방세포 생성 억제 효과를 보였고(도 2b), 그 다음으로 아세톤 분획(도 2a), 물 분획(도 2d) 및 에틸아세테이트 분획(도 2c) 순이다. 때죽나무 열매 추출물 및 분획의 지방세포 형성 억제 효과는 오일 레드 O 염색 후에 관찰하였다. 그러나, 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획은 성숙된 지방세포에 대해서는 지질 분해 활성을 나타내지 않았다(데이터 미기재). 이러한 결과는 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획이 지방세포 생성 억제효과는 있으나, 지방분해 효과는 없음을 말해 준다.

[0049] **결과 3: 지방세포 형성과 관련된 단백질 발현에 미치는 때죽나무 열매 추출물의 효과**

[0050] 분화를 위해서는 지방전구세포가 성장 정지 단계로 들어가고 적절한 유사분열 촉진 및 지방세포 형성 신호에 의해 이후의 분화 과정이 계속된다. 지방세포 형성 공정의 첫 번째 특징은 세포 외 매트릭스 성분과 세포 골격 성분의 종류 및 발현 수준의 변화와 병행하는 세포 형태의 변화이다 (28). 이러한 과정은 나아가 C/EBP α 및 PPAR γ 를 포함하는 지방세포형성 전사 인자의 발현을 촉진한다(28). PPAR γ 및 C/EBP α 는 지방세포 형성의 주요 전사인자이며, 많은 지방세포 기능성 단백질 합성에 필요하다. 따라서, 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획의 3T3-L1 세포에 대한 지방세포생성 억제효과의 분자적 기작을 알아보기 위해, 본 발명자들은 지방세포 형성에 직접적으로 관여하는 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현을 분석하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 때죽나무 열매 추출물에 8일 동안 노출한 후, 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현 수준을 측정하였다. 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획이 처리된 세포는 대조군 세포에 비해 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현이 유의적으로 억제되었다 (도 3a~d). 이러한 결과는 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획이 지방세포 생성의 초기 단계에서 필수적인 지방세포 생성 전사 인자 PPAR γ 와 C/EBP α 의 하향 조절을 통해 지방세포 형성을 억제함을 말해 준다.

[0051] **결과 4: 지방세포의 분화 단계 따른 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획의 억제 효과**

[0052] 지방세포의 생성은 세포 형태, 성장 정지, 클론 확장과 같은 형태적 변화와 유전자 발현의 변화, 그리고 몇 단계를 거쳐 발생하는 지질의 축적과 같은 복잡한 일련의 과정을 포함한다(29). 3T3-L1 세포에서 지방세포 생성 동안 때죽나무 열매 추출물의 작용 시점에 대한 자세한 정보를 얻기 위해, 본 발명자들은 표준분화 프로토콜에 따라 3T3-L1 지방전구세포를 시험하고 때죽나무 열매 추출물 및 분획으로 처리 시간을 제한하여 지방 생성을 억제하였다. 3T3-L1 세포를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획과 함께 0~2, 2~4, 4~6, 6~8, 및 0~8일 동안 배양하였다. 8일째에, 세포를 오일 레드 O로 염색하고, 염색된 오일 방울을 450 nm에서 정량하였다. 도 4와 같이 6~8일 동안 처리한 것은 유의한 억제 효과가 관찰되지 않았으나, 0~2, 2~4, 4~6 및 0~8일 동안 처리하였을 때, 때죽나무 열매 추출물 및 분획은 지방세포 분화를 억제하였다. 지방세포 형성 단계 중 때죽나무 열매 추출물과 그 분획의 억제 효과는 분화 (0~2일)의 초기 단계에서 가장 강력하고, 중간 단계 (2~4, 4~6일)에서는 감소하였다 (도 4). 이러한 결과는 때죽나무 열매 추출물 및 분획이 특히 지방 생성의 초기 및 중간 단계를 억

제할 수 있음을 시사한다. 또한, 헥산 분획이 지방세포 형성에 가장 높은 억제효과를 나타내고, 그 다음으로는 아세톤 분획, 물 분획, 에틸 아세테이트 분획의 순으로 효과를 나타낸다(도 4). 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획은 지방세포 분화의 초기 및 중기에 작용함을 알 수 있었다.

[0053] **결과 5: 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획의 활성산소종 생성 억제 효과**

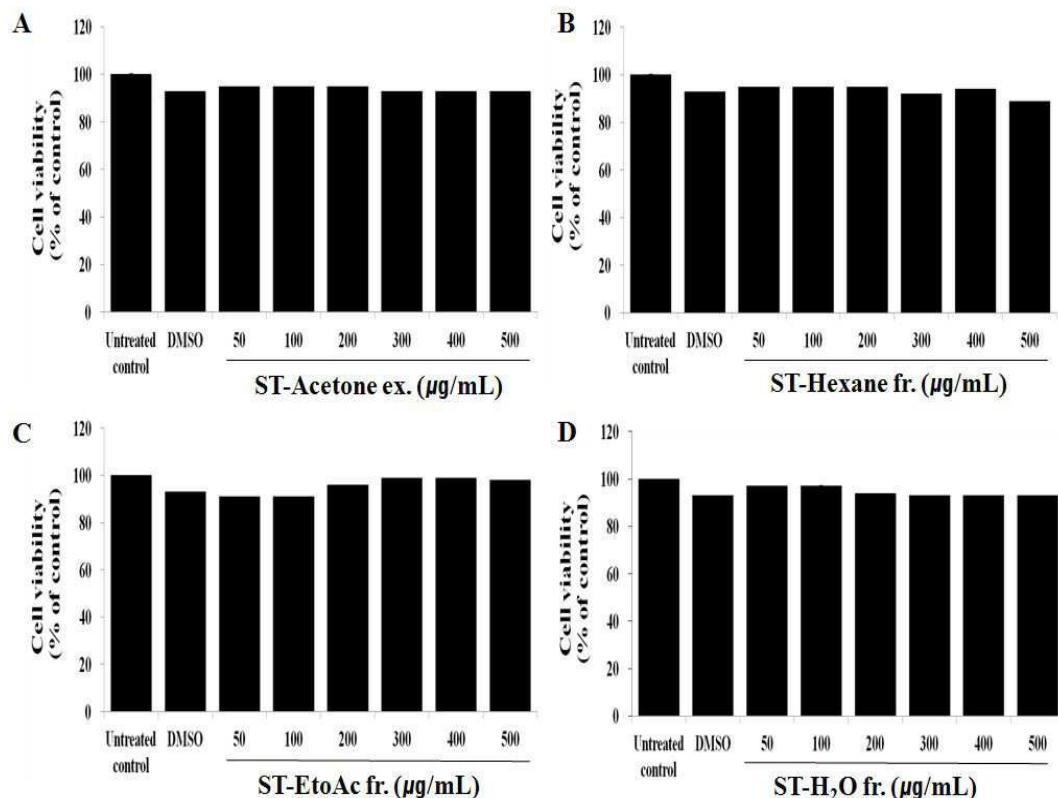
[0054] 비만은 주로 지질 대사 및 산화적 스트레스에 복합적으로 연관되어 있다(30). 이러한 이유로, 3T3-L1 세포가 분화하는 동안 때죽나무 열매 추출물과 그 분획의 효과를 NBT 분석으로 측정하였다. NBT 분석은 세포의 산화적 대사를 정량화하는데 사용되는 기술이다(31). 세포 내 활성산소종의 생성을 나타내는 진한 청색 포르마잔은 대조군 세포와 비교하여 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획을 처리한 세포에서 현저히 감소하였다 (데이터 미기재). 헥산 분획이 때죽나무 열매 추출물 및 분획 중 가장 높은 항산화 활성(~ 44%)을 나타내었다 (도 5). 뿐만 아니라, 3T3-L1 세포에서 지질 축적과 활성산소종 생성 간에 유사한 패턴이 관찰되었다 (도 2 및 도 5). 많은 연구에서는 비만이 인간과 마우스에서 산화 스트레스를 유도할 수 있다고 보고된바 있다(13). 지방세포 생성 중 지방 축적이 활성산소종 생성과 관련되기 때문에 3T3-L1 세포에서 지질 축적이 감소하는 것은 매우 중요하다.

[0055] 결론적으로, 때죽나무 열매 추출물과 분획이 활성산소종 수준을 하향시키고 지방세포생성 전사 인자를 감소하여 지방세포 생성을 억제할 수 있음을 알 수 있다. 따라서, 때죽나무 열매 추출물 및 그 분획은 비만 치료를 위한 천연 소재의 새로운 후보가 될 수 있을 것으로 사료된다.

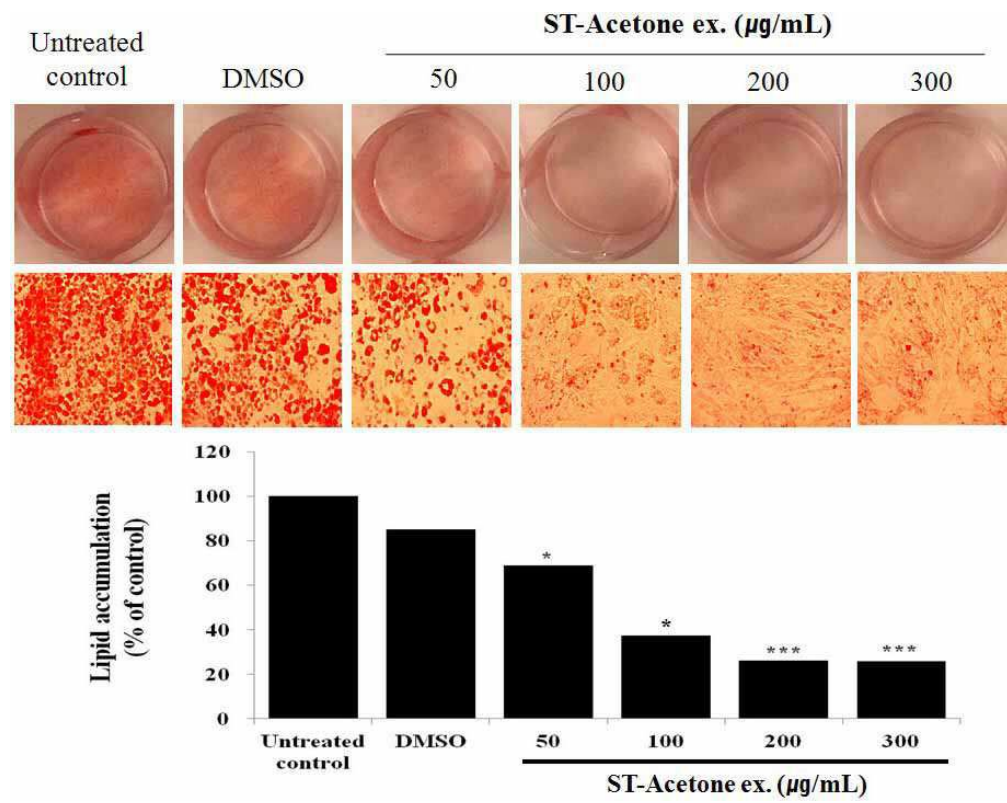
[0056]

도면

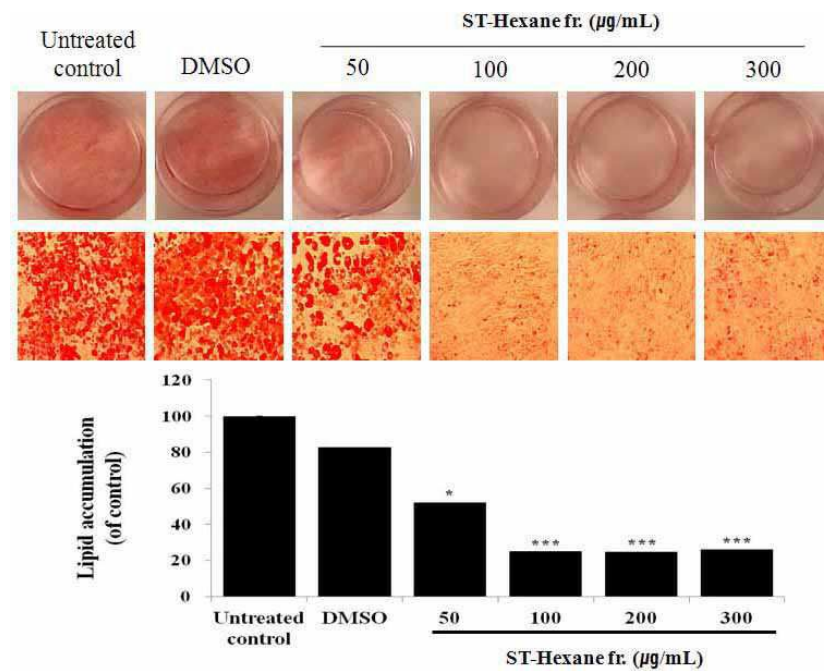
도면1



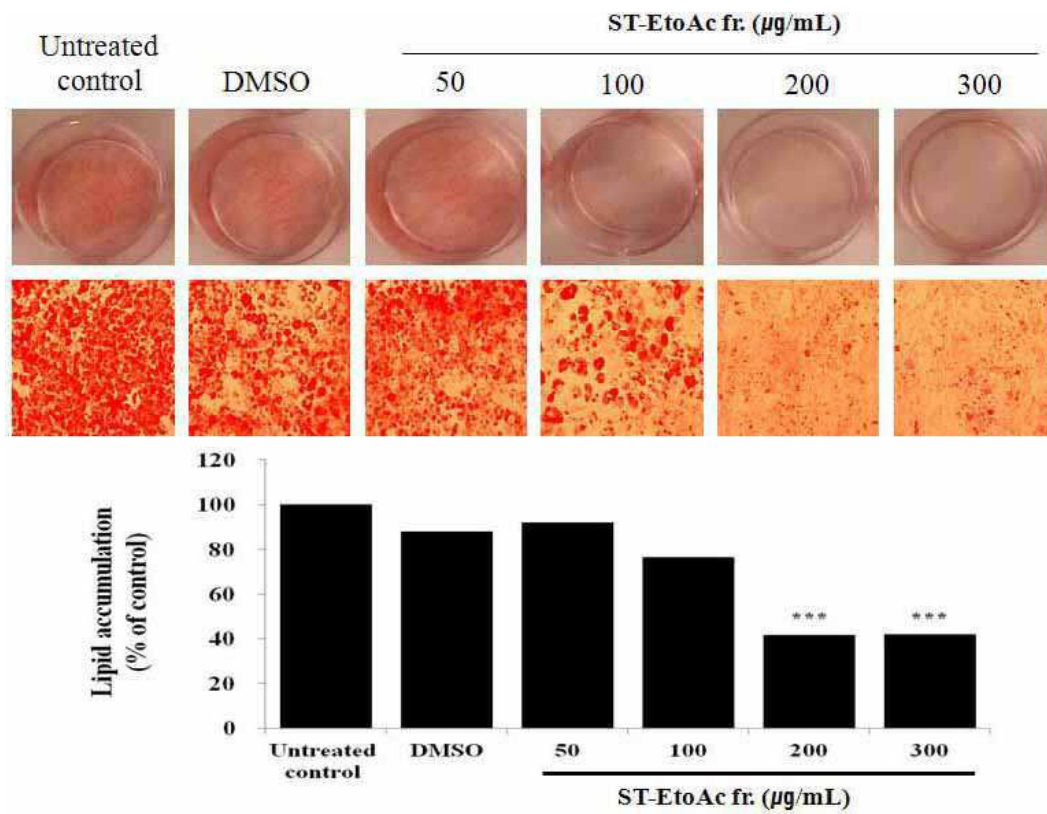
도면2a



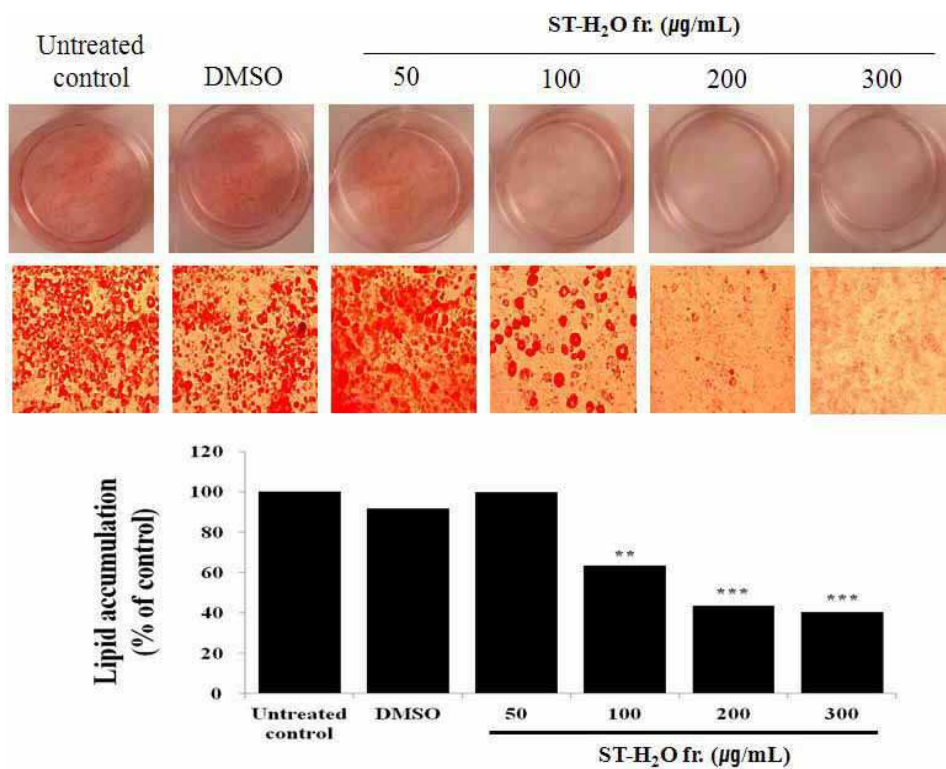
도면2b



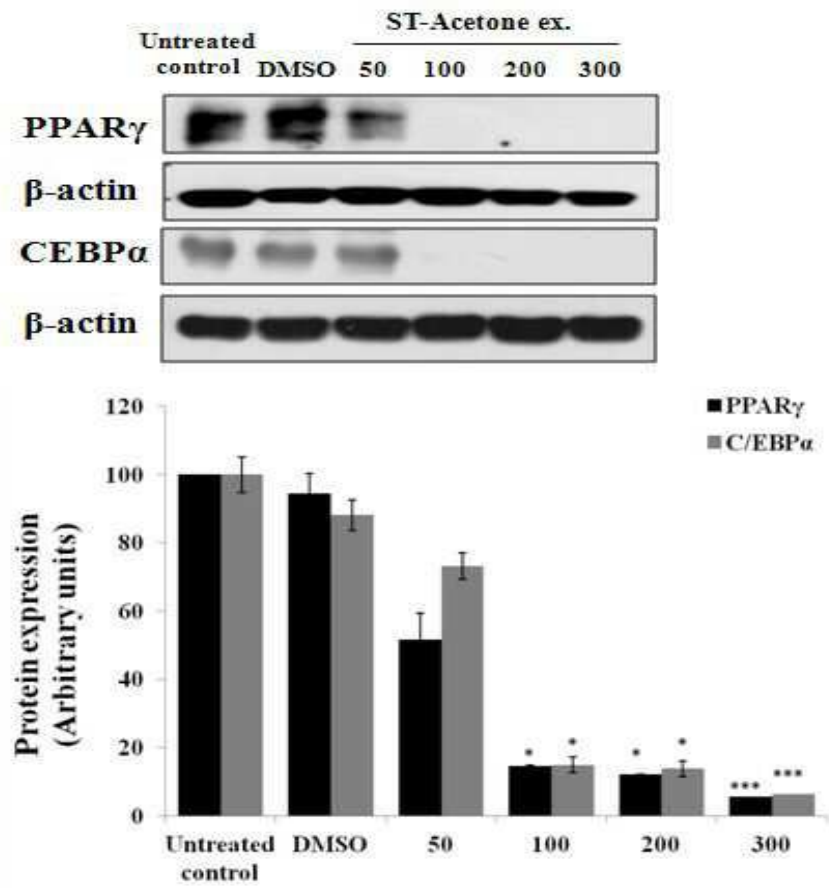
도면2c



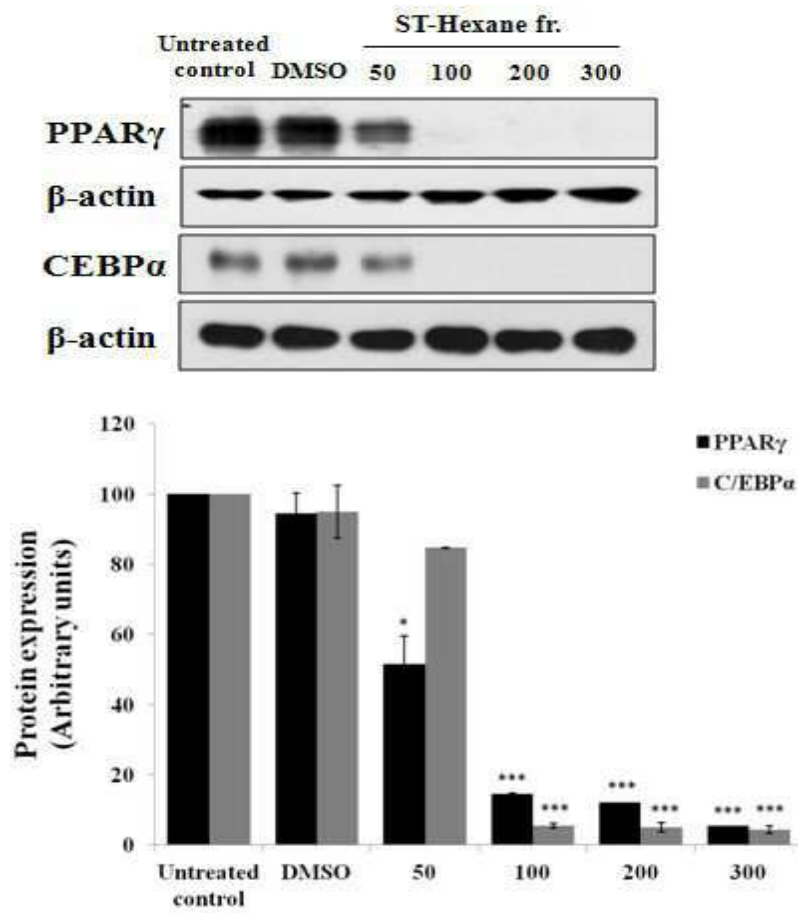
도면2d



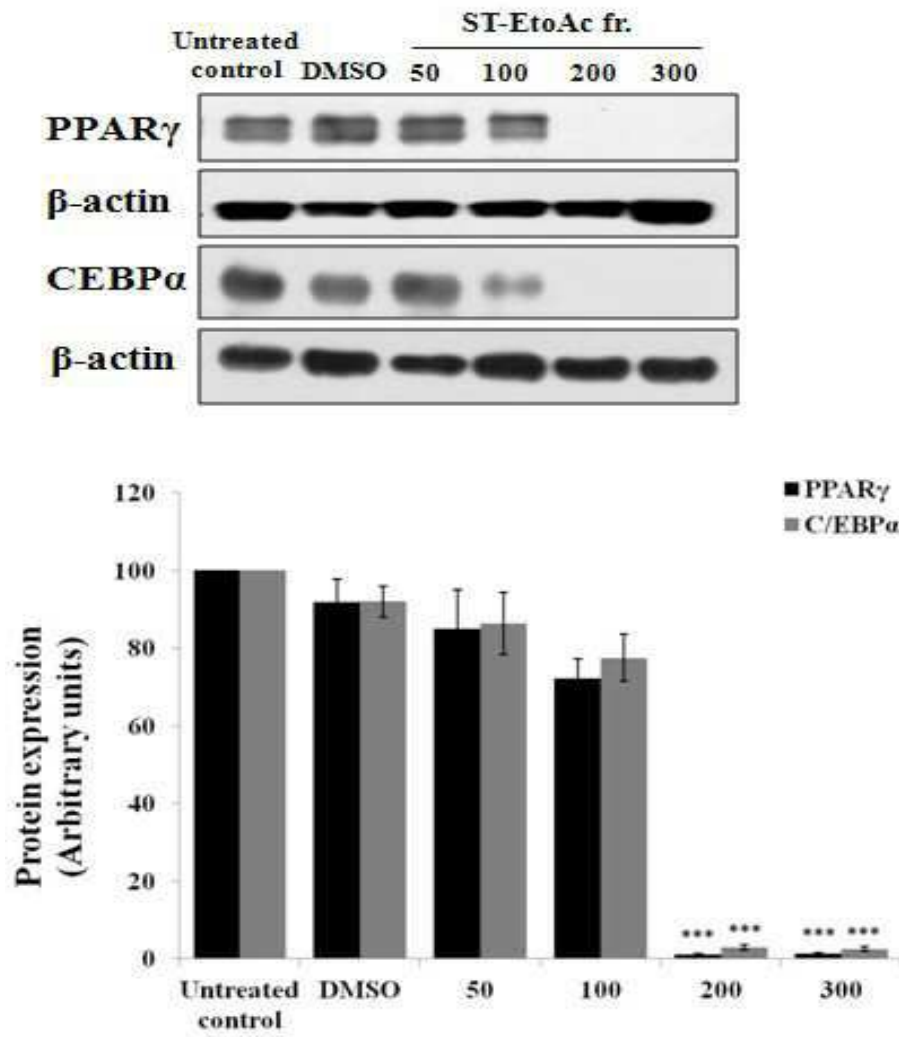
도면3a



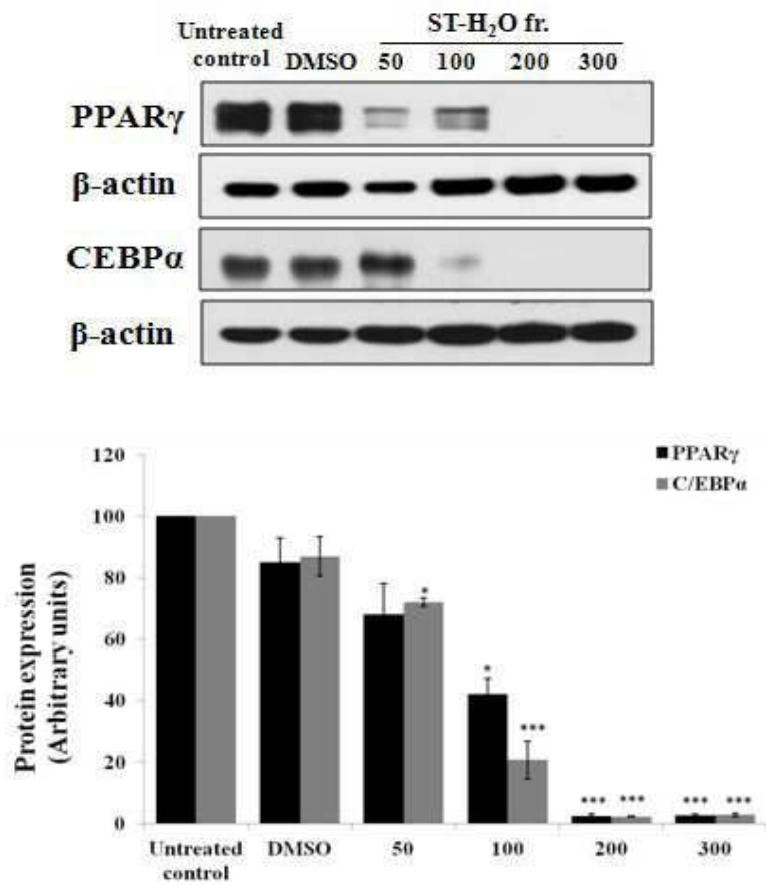
도면3b



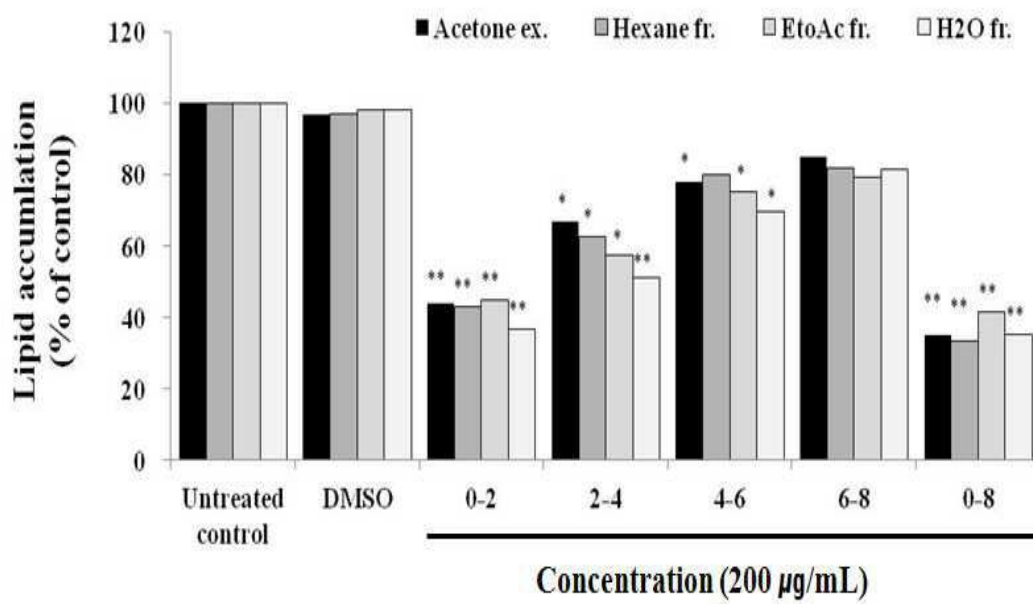
도면3c



도면3d



도면4



도면5

