



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0078834
(43) 공개일자 2012년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/047 (2006.01) **A61K 31/045**

(2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0000106

(22) 출원일자 2011년01월03일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)

(72) 발명자

황재관

경기도 고양시 덕양구 화정동 870번지 은빛마을 553-1104

김대영

경기도 안양시 동안구 시민대로159번길 59, 은하수청구아파트 105동 105호 (비산동)

(뒷면에 계속)

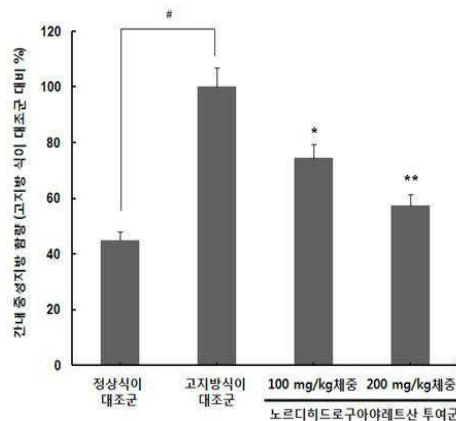
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **노르디히드로구아야레트산을 포함하는 지방간 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 노르디히드로구아야레트산(Nordihydroguaiaretic acid)을 유효성분으로 포함하는 지방간의 개선용 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 AMPK를 인산화/활성화시켜 지방 합성 기전의 전사인자 SREBP-1c 및 그 타겟 단백질 효소인 FAS와 ACC의 발현을 억제하고, 지방 산화 기전의 PPAR를 활성화하여 간 내 지방의 축적을 예방하고 개선하는 효과가 우수한 노르디히드로구아야레트산을 포함하는 비알콜성 지방간 예방, 개선용 조성물 및 상기 성분을 포함하는 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

조근애

서울특별시 관악구 호암로 527, 606호 (신림동,
동마아파트)

김재경

서울특별시 강남구 개포로22길 42, 502호 (
개포동, 대신홈타운)

최유리

경기도 성남시 중원구 순환로461번길 18 (은행동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0001928

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업 - 선도연구센터육성사업(이공학분야) - 단백질기능제어이행 연구센터

연구과제명 대사성?면역계통 질환 질환 치료를 위한 천연 핵수용체 리간드 개발

주관기관 연세대학교 산학협력단

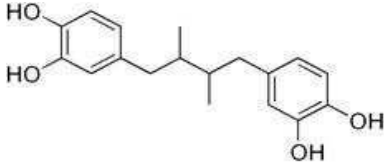
연구기간 2010.03.01 ~ 2011.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1으로 표시되는 노르디히드로구아야레트산을 유효성분으로 포함하는 지방간 개선용 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

노르디히드로구아야레트산을 주성분으로 AMPK를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 지방간 질환의 예방, 치료용 조성물

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 노르디히드로구아야레트산을 주성분으로 간 내 지방합성을 저해하고, 지방산화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 지방간 질환의 예방, 치료용 조성물

청구항 4

제 2항과 3항의 노르디히드로구아야레트산을 유효성분으로 포함하는 지방간 질환의 예방, 치료용 조성물

청구항 5

제 2항과 3항의 노르디히드로구아야레트산을 유효성분으로 포함하는 지방간 질환 개선용 건강기능식품 조성물

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 지방간은 비알콜성 지방간인 건강기능식품 조성물

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 노르디히드로구아야레트산(Nordihydroguaiaretic acid)을 유효성분으로 포함하는 지방간의 개선용 조성물, 상기 성분을 포함하는 비알콜성 지방간 개선용 조성물 및 상기 성분을 포함하는 비알콜성 지방간 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 경제발전으로 인한 생활수준의 향상과 생활습관의 서구화로 인하여 위생환경이 개선되고 서구적인 식습관에 의해 섭취되는 열량 또한 급속도로 증가하는 반면, 운동이나 일상생활에서 소비되는 열량은 적기 때문에 체내에 과도한 영양분의 축적 등으로 인한 각종 성인병의 발생이 증가하고 있다. 이와 같은 성인병 중 특히 식이에 의한 비만, 당뇨, 지방간 등과 같은 대사성 질환이 주로 발생하게 되었다. 특히, 지방간은 과도한 지방이나 알코올 섭취, 간의 지질 대사의 교란에 의한 지방 합성 증가 및 연소 감소 등으로 인하여 간에 과도한

양의 지방이 축적되어서 발생하며, 일반적으로 간에서 5% 이상의 비중이 지방일 때 지방간으로 정의된다(*Hepatology*, 41, 1313-1321, 2005).

[0003] 지방간은 원인에 따라 크게 알콜성 지방간과 비알콜성 지방간으로 나누어 진다. 서구화시대의 식습관의 변화로 인해 발생하는 비알콜성 지방간은 고지방 식이 및 비만 등에 의해 발병하며 다양한 합병증을 유발한다고 보고되어 있다. 비알콜성 지방간 환자의 69~100%는 비만환자이고, 비만환자의 20~40%는 비알콜성 지방간을 동반하며, 특히, 남성 비만환자의 간질환 유병률이 여성 비만자에 비해 더 높게 나타난다(*N Engl J Med*, 346, 1221-1231, 2002; *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 17, 63-70, 2007). 서구사회에서는 비만환자뿐만 아니라 정상 체중 성인의 3%~30%가 비알콜성 지방간병변을 나타내는 것으로 보고되고 있다(*Hepatology*, 40, 1387-1395, 2004; *Hepatology*, 42, 44-52, 2005). 또한, 비알콜성 지방간은 성인 뿐 아니라 비만아동에서도 문제가 되고 있다. 국내의 한 보고에 따르면 최근 10대 청소년에서 비알코올성 비만이 급증하면서 지방간도 점차 증가 추세에 있다. 비만아동(유럽, 미국 및 아시아 거주)의 10~77%가 비알콜성 지방간병변을 보였는데, 이는 비알콜성 간질환의 가장 중요한 위험인자가 비만이기 때문이라 보고 되고 있다. 이러한 비알콜성 지방간은 조기에 치료가 이루어지지 않으면 간경화로 발전한 이후 간암까지 발전할 가능성이 높으므로 초기 가역적인 상태에서의 치료가 매우 중요하게 인식되고 있다.

[0004] 최근의 연구결과들에 따르면 비알콜성 지방간은 대사증후군의 특징을 갖고 있다. 인슐린저항성과 고인슐린혈증은 대사증후군과 비알콜성 지방간 모두에서 중요한 요인들인데, 비알콜성 지방간 환자의 90%가 적어도 한가지 대사증후군 특징을 가지며 33%에서는 대사증후군의 모든 특징을 가지고 있다. 대사증후군 환자에서 연령, 성별, 체질량지수와 관계없이 간조직 지질함량이 증가하며 비알콜성 지방간 환자의 30~100%에서 비만이 보여 지는데 비만의 경우 지방간 비율이 정상에 비해 4.6배 높다 (*J Clin Endocrinol Metab*, 92, 3490-3497, 2007).

[0005] 비만으로 인한 고인슐린혈증은 비알콜성 지방간 질환의 병태생리학적 요인으로 생각되고 있고, 비알콜성 지방간 질환을 간에서 일어나는 대사증후군의 한 형태로 보는 견해가 우세하다(*Korean J Intern Med*, 68, 347-349, 2005; *Diabetes*, 50, 1844-1850, 2001). 비알콜성 지방간 질환은 중성지방 합성의 증가로 인한 세포 내 중성지방 함량의 증가로 발생하는 것이 특징이다. 인슐린은 간의 지방 생합성에 중요한 역할을 하는 호르몬 중의 하나로, 고인슐린혈증으로 인한 간의 지방산 합성은 지방산 생합성 경로에 중요한 효소인, acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 fatty acid synthase (FAS) 유전자의 발현이 증가함으로 인해 발생한다(*Physiol Rev*, 75, 47-76, 1995). 이 과정에 sterol regulatory element binding protein (SREBPs)가 인슐린의 역할을 매개하는 중요한 전사인자로 알려져 있으며, 지방산과 콜레스테롤의 생합성 경로에 관련되는 효소를 활성화하여 간에서의 지방산과 콜레스테롤 합성을 조절하는 중요한 전사활성인자이다(*Proc Natl Acad Sci*, 95, 5987-5992, 1998).

[0006] 현재까지 비알콜성 지방간환자에게 사용되고 있는 치료제는 크게 두 가지로 분류되고 있다. 첫 번째는 비만치료제 (orlistat), 인슐린저항성치료제 (metformin, pioglitazone, rosiglitazone), 고지혈증치료제 (clofibrate, gemfibrozil, bezafibrate, atorvastatin, simvastatin) 등과 같이 위험인자의 교정을 통해 지방간을 치료 및 개선하는 약제이고, 두 번째는 비알콜성 지방간의 위험인자 교정과는 독립적으로 손상된 간세포 회복시키는 기능을 담당하는 약물로서 간세포보호제 (ursodeoxycholic acid 및 taurine), 항산화제 (vitamin E) 및 nutritional supporter (lecithin, betaine, N-acetylcysteine) 등이 여기에 해당된다(*Lancet*, 358, 893-894, 2001; *Semin Liver Dis*, 21, 81-88, 2001). 그러나 현재까지는 비알콜성 지방간 질환에 대한 효과적인 약물치료가 없고 다만 식사요법, 운동요법 등을 통한 체중감량 등의 기본적인 치료법만이 권고되고 있다. 그러므로 앞으로 비알콜성 지방간에 대한 여러 기전 연구와 지방간의 발생을 억제하는데 필요한 세포 신호전달 체계를 규명함으로써 독창적 작용점에 근거한 비알콜성 지방간 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

[0007] AMP-activated protein kinase(이하, 'AMPK')는 탄수화물과 지질대사에 관여하며 포도당 이송을 조절하는 역할을 하는 것으로 최근 밝혀졌으며 제 2형 당뇨병 치료의 새로운 타겟으로 주목받고 있다(*Therapie*, 62, 293-310, 2007). AMPK는 세포의 영양상태나 운동, 스트레스 등에 의해 변화하는 세포의 에너지 상태 (AMP/ATP비율)에 반응하여 그 활성이 조절되는 인산화 효소이다(*Trends Mol Med*, 14, 539-549, 2008; *Cell Metab*, 1, 15-25, 2005). AMPK는 세포의 에너지 대사에 관여하는 여러 가지 효소들의 인산화를 조절함으로써, 포도당 수송, 지방산 및 콜레스테롤 합성 등의 여러 가지 생리활성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(*Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292, 1308-1317, 2007). 특히 최근 여러 연구에서 AMPK가 간조직에서의 지방대사에 중요한 역할을 수행함이 보고되었다(*Gastroenterology*, 127, 1798-1808, 2004). 세포 내 AMP가 증가하여

인산화된 AMPK는 지방합성기전에 관여하는 ACC와 같은 효소들을 비활성화시키고, 간 내 지방합성이 감소하게 된다. 또한 인산화된 AMPK는 SREBP-1c의 발현을 억제하여 SREBP-1c의 타겟 단백질로 알려진 FAS, L-type pyruvate kinase (LPK) 등의 발현을 감소시킨다(*J Clin Invest*, 108, 1167-117, 2001).

[0008] 따라서, AMPK를 활성화시키는 약물을 발굴하는 것은 간에서의 지방합성을 억제하고 지방산화를 촉진하여 비알콜성 지방간 질환을 예방 및 개선할 수 있는 치료제의 개발로 이어질 수 있다. 그러나 아직까지 안전성과 효능을 동시에 갖고 있는 약물을 개발하는 것이 쉽지 않은 것이 현실이다. 따라서 안전성이 입증된 천연물로부터 비알콜성 지방간 질환의 치료 전략에 부합하는 성분을 찾아 약물로써 이용하려는 시도는 합성제체로부터 치료제를 개발하는 것에 비해 더욱 효율적인 접근방법이라 할 수 있을 것이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 우수한 비알콜성 지방간 개선 활성을 가지며 안전하게 적용될 수 있는 천연물질을 탐색하는 연구를 수행하여, 노르디히드로구아야레트산(Nordihydroguaiaretic acid)이 탁월한 지방간 개선 및 고지방식이에 의한 체중증가량 억제 효능을 갖는다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

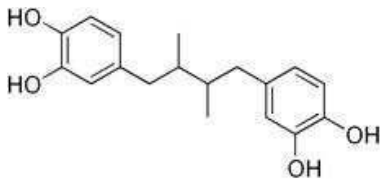
해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 노르디히드로구아야레트산을 유효성분으로 포함하는 지방간 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 노르디히드로구아야레트산을 유효성분으로 포함하는 지방간 개선용 조성물을 제공한다:

[0012] [화학식 1]



[0013] 상기 화학식 1은 노르디히드로구아야레트산을 나타낸다.

[0015] 본 발명자들은 노르디히드로구아야레트산이 가지는 다른 생리 활성으로서 지방간 억제 활성을 확인하기 위하여, 하기 실시예 및 실험예에서 확인되는 바와 같은 실험을 수행하였다. 그 결과, 노르디히드로구아야레트산은 효과적인 지방간을 억제 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0016] 본 발명의 지방간 개선제 조성물은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것이다.

[0017] 본 명세서에서, 지방간이란, 두 가지의 유형 즉 중성지방 지방간 및 콜레스테롤 지방간을 모두 포함하는 의미이며, 지방간의 원인에 따른 유형인 알콜성 지방간과 비알콜성 지방간 중 비알콜성 지방간을 의미하는 것이다. 그것은, 하기 실시예 및 실험예가 노르디히드로구아야레트산이 실험동물간의 지방함량을 낮추는 활성을 지니고 있음을 보여주고 있고, 고지방식이를 이용하여 지방간을 유도하였기 때문이다.

[0018] 또한, 본 명세서에서, 상기 개선이란, 증산의 예방, 경감 및 제거를 포함하는 의미이다.

[0019] 한편, 지방간은 방치될 경우 간염 및 간경변증 등으로 진행될 수 있기 때문에 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 노르디히드로구아야레트산을 유효성분으로 포함하는 지방간을 원인으로 하는 질병의 예방용 조성물로도 파악될 수 있다.

[0020] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기의 노르디히드로구아야레트산을 유효성분으로 포함하는 비만 개선용 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 명세서에서, 비만이란 그것이 유전적, 환경적 요인에 의한 비만으로 지방조직 및 체중이 비정상적으로 증가한 상태를 의미하는 것이다.

[0022] 하기 실시예 및 실험예에서 확인되듯이, 고지방식이를 이용한 쥐에서 노르디히드로구아야레트산 처리에 따른

체중증가량의 유의적인 감소가 비만 개선용 조성물에 대한 진술을 유효하게 한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 의해 제공되는 노르디히드로구아야레트산을 유효성분으로 포함하는 지방간 개선용 조성물은 효과적으로 간의 지방축적을 억제 및 체중 감량에 의한 우수한 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1. 고지방 식이로 유도된 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산 처리에 의한 체중 변화를 측정한 결과이다.

도 2. 고지방 식이로 유도된 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산 처리에 의한 간의 외형 변화를 도시한다.

도 3. 고지방 식이로 유도된 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산 처리에 의한 간의 지방 함량의 변화를 염색을 통해 측정한 결과이다.

도 4. 고지방 식이로 유도된 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산 처리에 의한 간의 중성지방 함량의 변화를 정량적으로 측정한 결과이다.

도 5. 고지방 식이로 유도된 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산을 처리하였을 때 간에서의 지방 생성 기전에 관여하는 주요 단백질인 SREBP-1c, FAS, ACC와 지방 분해 기전에 관여하는 주요 단백질인 PGC-1, PPAR, CPT-1L의 발현 변화 양상을 웨스턴 블랏 어세이를 통해 측정한 결과이다.

도 6. 고지방 식이로 유도된 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산을 처리하였을 때 간에서의 AMPK 및 ACC 단백질의 인산화 변화 양상을 웨스턴 블랏 어세이를 통해 측정한 결과이다.

도 7. 인간 유래 간암화 세포인 HepG2 세포주에 노르디히드로구아야레트산을 처리하였을 때 SREBP-1c, FAS, ACC 및 PGC-1, PPAR, CPT-1L의 발현 변화 양상을 웨스턴 블랏 어세이를 통해 측정한 결과이다.

도 8. 인간 유래 간암화 세포인 HepG2 세포주에 노르디히드로구아야레트산을 처리하였을 때 AMPK 및 ACC 단백질의 인산화 변화 양상을 웨스턴 블랏 어세이를 통해 측정한 결과이다.

도 9. 인간 유래 간암화 세포인 HepG2 세포주에 노르디히드로구아야레트산과 AMPK의 억제제인 compound C를 처리하였을 때 SREBP-1c, FAS, ACC 및 PGC-1, PPAR, CPT-1L의 발현 양상을 웨스턴 블랏 어세이를 통해 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 실시예 1. 노르디히드로구아야레트산 준비

[0027] 건조시킨 라레아 디바리카타(*Larrea divaricata*)에서 분리된 순도 90%의 노르디히드로구아야레트산(N5023)을 시그마에서 구입하였다. 리사이클링 고성능 액체 크로마토그래피(recycling HPLC, column: W252, 20.0 mm ID500 mm L)를 수행하여 순도 99%이상의 노르디히드로구아야레트산을 얻을 수 있었다.

[0028] 실시예 2. 고지방식으로 유도한 비만쥐와 노르디히드로구아야레트산의 투여

[0029] 상기 실시예 1에서 제조된 노르디히드로구아야레트산을 이용하여 비알콜성 지방간 개선을 조사하기 위해 고지방 식이로 유도된 비만마우스를 모델을 선정하여 실험하였다. 32마리의 4주령된 C57BL/6 마우스를 1주일간 적응시키고 8마리는 정상식이(AIN93G, DooYeol Biotech, Korea)를 유지하면서 나머지 24마리는 비만을 유도하기 위해 고지방 식이(Rodent diet D1245, Research Diet, New Brunswick, NJ)를 7주간 공급하여 비만을 유도시킨 다음, 각각 8마리씩 총 4군으로 임의적으로 나누어 실험에 이용하였다. 실험군으로는 노르디히드로구아야레

[0030] 트산을 물에 100 mg/kg체중과 200 mg/kg체중의 투여농도로 1일 1회씩 8주간 동안 일정한 시간에 투여하였다. 이 때, 대조군으로는 실험군이 섭취하는 동일한 양의 물을 투여한 군을 사용하였다. 시료를 투여한 마우스의 식이량과 개체의 무게를 1주일에 2회씩 측정하였다.

- [0031] **실험예 1. 고지방식으로 유도한 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산의 투여에 따른 체중변화 및 식이량의 측정**
- [0032] 상기 실시예 2에서 이용한 동물모델에서, 시료 투여후 8주일 동안 실험군과 대조군의 체중 변화량을 측정한 결과 도 1에서 보는 바와 같이 고지방 식이 대조군에 비해 노르디히드로구아야레트산 200 mg/kg체중 투여군의 체중이 유의적으로 낮게 나타났다 ($p<0.05$). 따라서 노르디히드로구아야레트산이 체중감량에 효과적으로 작용하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0033] **실험예 2. 고지방식으로 유도한 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산의 투여에 따른 간의 중성지방량 감소 측정**
- [0034] 상기 실시예 2에서 이용한 동물모델에서, 시료 투여후 8주일 동안 실험군과 대조군의 간내 중성지방의 차이를 측정하기 위해 고지방 식이를 섭취시키면서 노르디히드로구아야레트산을 경구로 8주간 투여한 C57BL/6 쥐로부터 간조직을 채취하였다. 도 2에서 보는 바와 같이 정상 식이군에 비해 고지방 식이 대조군에서 더 많은 지방이 축적된 것을 관찰 할 수 있었고, 노르디히드로구아야레트산의 처리에 따라 지방 축적량이 감소한 것을 육안으로 확인할 수 있었다.
- [0035] 지방 축적량을 더 자세하게 보기위해 간을 헤마토시린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색을 하였다. 염색을 위해 8주간 시료를 투여한 쥐를 12시간 이상 절식시키고 나서 복부를 절개한 다음, 신속하게 간을 적출하여 4% 포오름알데히드(formaldehyde) 용액에 담가 고정하였다. 고정한 다음 수세와 탈수과정을 거친 후 파라핀(paraffin) 용액으로 처리하여 파라핀 블록(paraffin block)을 만들고 4mm두께로 박절하여 헤마토시린과 에오신으로 염색한 뒤 광학현미경으로 관찰하였다.
- [0036] 그 결과, 도 3에서 보여지듯이 정상 식이 대조군에 비해 고지방 식이군의 간에 더 많은 지방 방울이 축적된 것을 확인할 수 있었고, 노르디히드로구아야레트산의 처리에 따라 그 지방 방울양이 감소한 것을 확인 할 수 있었다.
- [0037] 정량적으로 간 내의 중성지방의 양을 측정하기위해 고지방 식이를 섭취한 쥐와 노르디히드로구아야레트산과 고지방 식이를 함께 섭취한 C57BL/6 쥐로부터 간조직을 채취한 후 절취하여 0.9% NaCl 용액으로 분쇄시킨 후, 물 : 클로로포름 : 메탄올 = 8 : 4 : 3으로 섞은 용액을 넣고 섞어준 다음 30분 이상 정치하였다가 다시 섞어준 후, 클로로포름을 첨가하여 추가로 3분 동안 정치하였다. 이어서 증류수를 첨가하여 섞어주고 3,000 rpm에서 25분간 원심분리한 뒤, 아래층을 채취 한 뒤, 탈수제를 넣었다. 미리 클로로포름으로 침지시킨 여과지를 꺼내어 깔대기에 대고 추출한 용액을 여과시킨 후 건조시켜서 지질을 추출하였고 중성지방 분석용 kit (Asan Pharm Co., Korea)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준시험물질의 흡광도를 기준으로 얻어진 중성지방의 농도를 기준으로 하여 노르디히드로구아야레트산 투여군의 간에서 중성지방 함량을 산출하였다.
- [0038] 도 4에서 보여지듯이, 노르디히드로구아야레트산을 투여한 쥐의 간조직 지방함량은 고지방 식이 대조군에 비해 농도 의존적이고 유의적으로 낮게 나타났다 ($p<0.05$). 이와 같은 결과로부터 노르디히드로구아야레트산의 투여로 고지방 식이로 유도된 C57BL/6 쥐의 지방간 형성이 효과적으로 억제 및 감소되었음을 확인하였다.
- [0039] **실험예 3. 고지방식으로 유도한 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산의 투여에 따른 지방 합성 기전의 억제 및 지방산 산화 기전의 활성화에 측정**
- [0040] 상기 실시예 2에서 이용한 동물모델에서, 시료 투여후 8주일 동안 실험군과 대조군의 간내 중성지방의 차이를 측정하기 위해 고지방 식이를 섭취시키면서 노르디히드로구아야레트산을 경구로 8주간 투여한 C57BL/6 쥐로부터 간조직을 채취하였다. 간조직을 조직파쇄기(Bullet blender, Next advance, USA)를 이용하여 분쇄한 후, 단백질의 발현 양상을 확인하였다. 간에서 중성지방 및 콜레스테롤 합성 기전의 가장 중요한 인자인 SREBP-1c 및 그 타겟 단백질인 FAS 및 ACC의 항체를 준비하여 웨스턴 블랏 어세이를 통해 발현양상을 확인한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 세 가지 단백질 모두 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 간의 미토콘드리아 내 지방산 산화에 관여하는 인자인 PGC-1, PPAR, CPT-1L의 항체를 준비하여 웨스턴 블랏 어세이를 통해 발현양상을 확인한 결과, 도 5에 나타난 것처럼, 대조군에 비해 세 가지 단백질 모두 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0041] **실험예 4. 고지방식으로 유도한 비만쥐에서 노르디히드로구아야레트산의 투여에 따른 AMPK 및 ACC 인산화 증가 측정**
- [0042] 상기 실시예 2에서 이용한 동물모델에서, 시료 투여후 8주일 동안 실험군과 대조군의 간내 중성지방의 차이를

측정하기 위해 고지방 식이를 섭취시키면서 노르디히드로구아아레트산을 경구로 8주간 투여한 C57BL/6 쥐로부터 간조직을 채취하였다. 간조직을 조직파쇄기(Bullet blender, Next advance, USA)를 이용하여 분쇄한 후, 단백질의 발현 양상을 확인하였다. 활성화된 형태인 인산화된 AMPK 항체 및 AMPK의 downstream이자 지방산 합성에 관여하는 중요효소인 ACC의 불활성화된 형태인 인산화된 ACC(이하, 'pACC')를 준비하였다. 또한 인산화되지 않은 AMPK 및 ACC를 준비하였다. 노르디히드로구아아레트산의 투여에 따른 AMPK 및 ACC의 인산화 증감을 확인하기 위하여 웨스턴 블랏 어세이를 통해 나타내었다. 실험 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 노르디히드로구아아레트산의 투여군에서 pAMPK 및 pACC의 발현량이 증가하는 결과를 얻을 수 있었다.

[0043] **실험예 5. 인간 간암화 세포주인 HepG2 세포에서 노르디히드로구아아레트산의 처리에 따른 지방 합성 기전의 억제 및 지방산 산화 기전의 활성화, AMPK 인산화 증감 변화 측정**

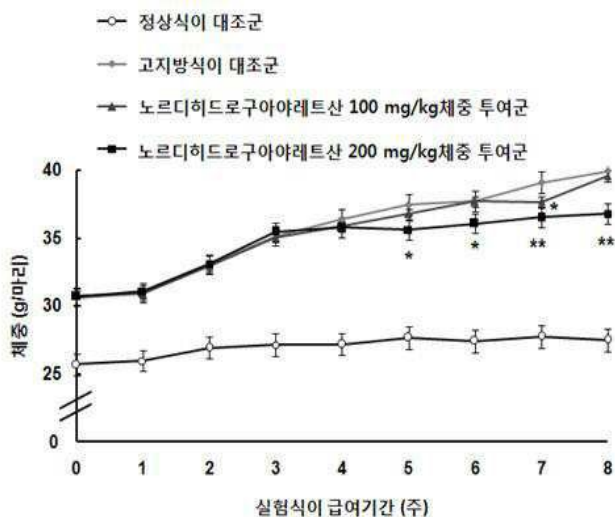
[0044] 0.1 M의 인슐린을 12시간 처리하여 인슐린 저항성을 유도한 HepG2 세포주에 각각 5, 10, 25, 50 M의 NDGA를 12시간 처리하였고, SREBP-1c, FAS, ACC 및 PGC-1, PPAR, CPT-1L의 발현을 웨스턴 블랏 어세이를 통해 확인하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 농도의존적으로 발현이 모두 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 동일하게 인슐린 저항성이 유도된 HepG2 세포주에 각각 5, 10, 25, 50 M의 NDGA를 1시간 처리한 후, AMPK 및 ACC의 인산화 증감을 웨스턴 블랏 어세이를 통해 확인한 결과, 도 8에서와 같이, 모두 농도의존적으로 인산화가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0045] **실험예 6. 노르디히드로구아아레트산의 AMPK 활성화를 통한 지방간 개선 효과 검증**

[0046] 인슐린 저항성이 유도된 HepG2 세포주에 AMPK 억제제인 compound C를 1시간 처리한 후, 10 M의 NDGA를 처리하였다. 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, NDGA에 의해 증가하였던 PPAR는 그 발현이 감소되는 것을 확인하였으나, PGC-1의 발현은 감소되지 않았다. 또한 SREBP-1c 및 FAS, ACC은 NDGA에 의해 그 발현이 감소되었다가, compound C에 의해 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 NDGA가 PPAR 및 SREBP-1c, SREBP-1c의 타겟 단백질의 발현을 조절하여, 간에서의 지방 생성 및 산화에 영향을 미친다는 사실을 보여준다.

도면

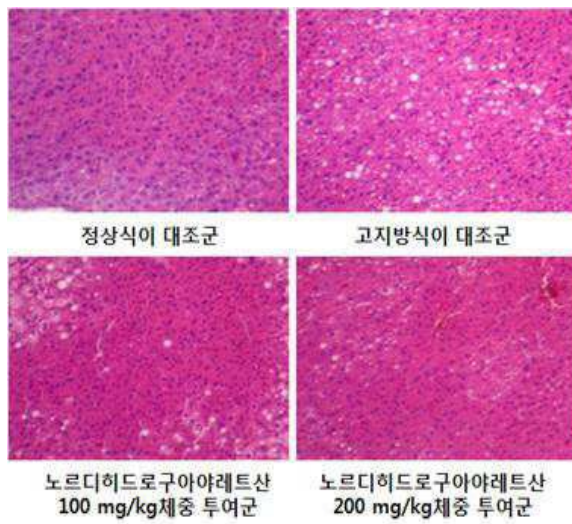
도면1



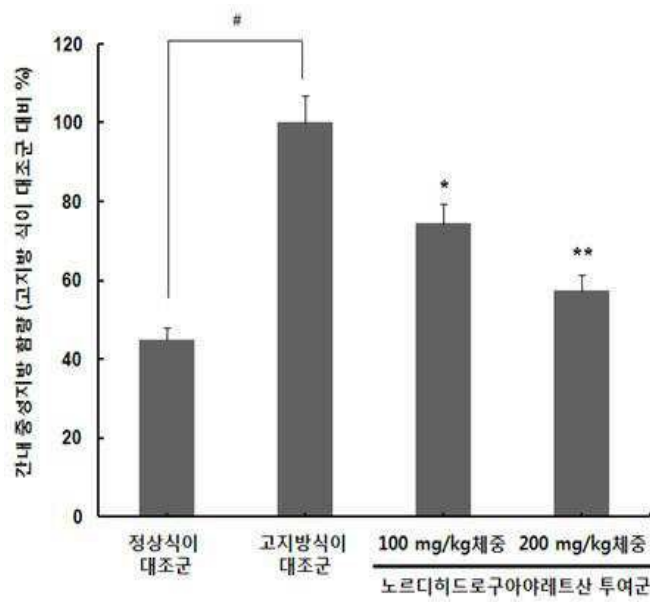
도면2



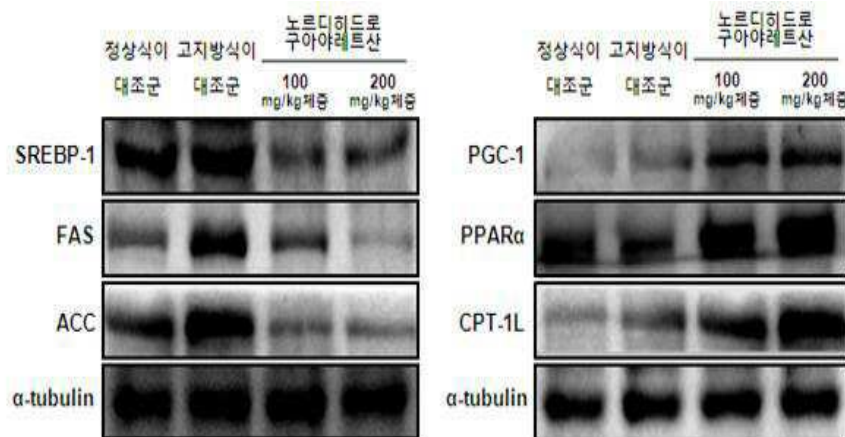
도면3



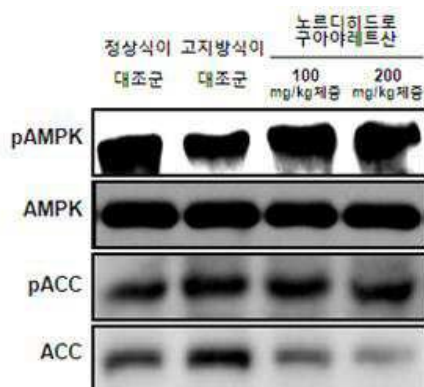
도면4



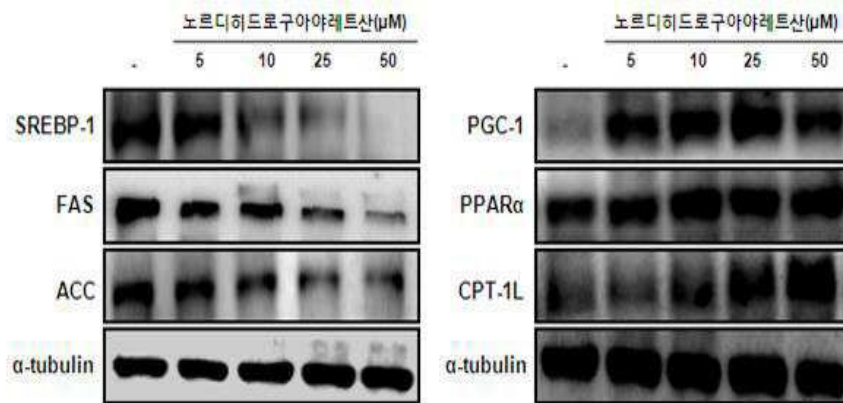
도면5



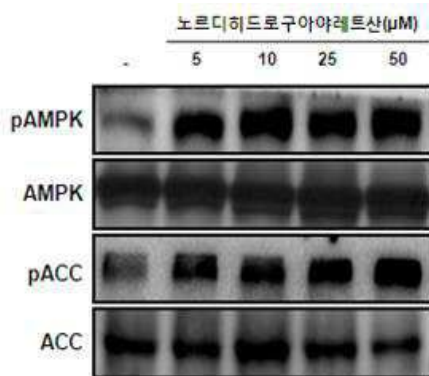
도면6



도면7



도면8



도면9

