



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0106274
(43) 공개일자 2009년10월08일

(51) Int. Cl.

A61K 36/14 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0031868

(22) 출원일자 2008년04월04일

심사청구일자 2008년04월04일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

박태선

서울 서대문구 연희동 740 연희성원아파트 104동

김하원

서울 강동구 천호동 우성아파트 5동 201호

(74) 대리인

양부현, 김승진

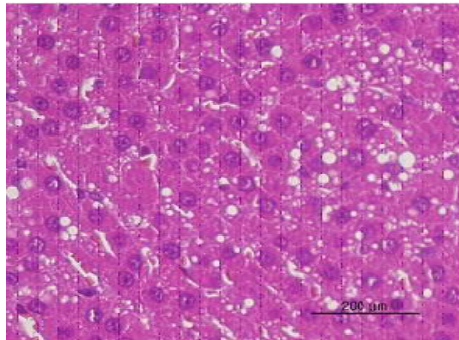
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 노송나무 추출물을 포함하는 고지혈증 또는 지방간의 예방또는 치료용 조성물

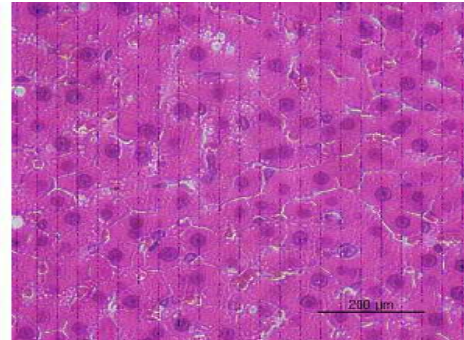
(57) 요약

본 발명은 노송나무(*Juniperus chinensis*)의 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 간의 형태적, 구조적, 생리학적 기능을 유지하도록 고지혈증 및 지방간 질환의 진행을 억제하고 치료할 수 있으며, 더불어 그 발생을 예방하는 효과도 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 혈장 및 간 조직 내에 존재하는 지질함량을 감소시킴으로써 고지혈증 예방 또는 치료하거나 개선하는 활성을 가지고 있으며 또한 간 기능 지표 효소의 활성을 정상화하여 간 조직 내의 지방축적을 개선하여 지방간 발생의 예방, 진행 억제 또는 질병 상태를 호전시킬 수 있는 효과도 있다.

대표도 - 도1



A



B

특허청구의 범위

청구항 1

노송나무(*Juniperus chinensis*)의 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 노송나무추출물, 특히 *Juniperus chinensis*로부터 추출한 노송나무추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 향나무의 일종인 노송나무(*Juniperus chinensis*)는 한국, 일본, 중국 및 몽골에 분포하는 종으로 겉씨식물 구과 식물아강 구과목 측백나무과의 상록교목으로 높이는 20 m에 달한다. 중국에서는 노송나무의 잎을 “회엽”이라 하여 약용으로 사용해 왔으며(김창민 등, 중약대사전, 도서출판 정담(2004)), 한국에서는 약용식물로 알려져 예전부터 염증치료, 정신이상, 폐양 등의 민간치료에 사용해 왔다. 그러나 이러한 여러 가지 효능에 대한 정확한 근거 자료는 밝혀진 바가 없다.
- <3> 최근, 생활수준의 향상으로 인한 식생활 형태의 변화에 기인하여, 고지혈증 및 지방간 환자의 수가 급증하고 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 지방의 과다 섭취는 혈중 LDL(Low Density Lipoprotein) 콜레스테롤을 상승시키고, 체내 지방의 축적을 초래하며, 동맥경화 등의 심혈관계 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 고지혈증, 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료를 위하여, 다양한 기능성 식품들을 개발하고자 하는 시도가 있어 왔다. 특히 국내외에서 콜레스테롤을 저하시키는 다양한 기능성 식품들이 생산, 판매되고 있으나, 2007년 2월까지 보고된 바에 의하면, 식품의약품안전청에서 혈중 지질저하 효능이 인정된 원료라 할지라도 그 효능에 대한 과학적 근거가 미약하거나, 인체 실험을 통해 추가 확인이 필요한 기능성 식품들만이 존재할 뿐이다.
- <4> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <5> 본 발명자들은 고지혈증 또는 지방간에 대한 우수한 예방 또는 치료 효능을 발휘하는 천연물질을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 노송나무(*Juniperus chinensis*) 추출물이 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료에 유효하다는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- <6> 따라서, 본 발명의 목적은 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- <7> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

- <8> 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 노송나무(*Juniperus chinensis*)의 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈

증 또는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

- <9> 본 발명자들은 고지혈증 또는 지방간에 대한 우수한 예방 또는 치료 효능을 발휘하는 천연물질을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 노송나무(*Juniperus chinensis*) 추출물이 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료에 유효하다는 것을 발견하였다.
- <10> 본 발명의 조성물은 노송나무(*Juniperus chinensis*)로부터 추출한 노송나무추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다. 노송나무는 한국, 일본, 중국 및 몽골에 분포하는 종으로 겉씨식물 구과식물아강 구과목 측백나무과의 상록교목으로 높이는 20 m에 달한다. 중국에서는 노송나무의 잎을 “회엽”이라 하여 약용으로 사용해 왔으며(김창민 등, 중약대사전, 도서출판 정담(2004)), 한국에서는 약용식물로 알려져 예전부터 염증치료, 정신이상, 폐양 등의 민간치료에 사용해 왔다.
- <11> 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 노송나무추출물은 노송나무의 다양한 기관(예컨대, 잎, 잎, 꽃, 줄기, 과실 및 종자 등)으로부터 추출하여 얻은 것을 의미하고, 바람직하게는 노송나무의 목부로부터 얻은 추출물을 의미한다.
- <12> 본 발명에서의 노송나무추출물은 다양한 추출 용매, 예를 들어, (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), (c) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸 아세테이트, (f) 클로로포름 또는 (g) 1,3-부틸렌글리콜을 추출 용매로 하여 노송나무로부터 얻을 수 있다. 한편, 본 발명의 추출물은 상기한 추출 용매뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 노송나무추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다.
- <13> 바람직하게는, 본 발명의 노송나무추출물은 (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올을 이용하여 얻은 추출물이고, 보다 바람직하게는 물, 메탄올 또는 에탄올을 이용하여 얻은 추출물이며, 보다 더 바람직하게는 물 또는 에탄올을 이용하여 얻은 추출물이고, 가장 바람직하게는 물(예컨대, 열수)을 이용하여 얻은 추출물이다.
- <14> 또한, 본 발명의 추출물은 상술한 추출 용매에 의한 추출물뿐만 아니라, 통상적인 정제 과정을 거친 추출물도 포함한다. 예컨대, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 노송나무추출물에 포함되는 것이다.
- <15> 본 발명의 노송나무추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.
- <16> 본 발명의 조성물은 고지혈증 또는 지방간의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 작용한다.
- <17> 본 명세서에서 사용되는 용어 “고지혈증”은 중성 지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 지방량이 많아 유발되는 질환을 말한다. 보다 구체적으로 고지혈증이란 혈액내의 중성지방, LDL 콜레스테롤, 인지질 및 유리 지방산 등의 지질 성분이 증가된 상태로 발생빈도가 높은 고콜레스테롤지혈증을 말한다.
- <18> 본 명세서에서 사용되는 용어 “지방간”은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.
- <19> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물, 또는 식품 조성물로 제공될 수 있다.
- <20> 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- <21> 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.
- <22> 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일일 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg이다.
- <23> 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- <24> 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 노송나무추출물뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 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.
- <25> 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 노송나무추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- <26> 본 발명의 조성물은 간의 형태적, 구조적, 생리학적 기능을 유지하도록 고지혈증 및 지방간 질환의 진행을 억제하고 치료할 수 있으며, 더불어 그 발생을 예방하는 효과도 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 혈장 및 간 조직 내에 존재하는 지질함량을 감소시킴으로써 고지혈증 예방 또는 치료하거나 개선하는 활성을 가지고 있으며 또한 간 기능 지표 효소의 활성을 정상화하여 간 조직 내의 지방축적을 개선하여 지방간 발생의 예방, 진행 억제 또는 질병 상태를 호전시킬 수 있는 효과도 있다.

효 과

- <27> 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- <28> (i) 본 발명의 고지혈 또는 지방간 치료용 조성물은 노송나무추출물을 유효성분으로 포함한다.
- <29> (ii) 본 발명의 조성물은 간의 형태적, 구조적, 생리학적 기능을 유지하도록 고지혈증 및 지방간 질환의 진행을 억제하고 치료할 수 있으며, 더불어 그 발생을 예방하는 효과도 있다.
- <30> (iii) 특히, 본 발명의 조성물은 혈장 및 간 조직 내에 존재하는 지질함량을 감소시킴으로써 고지혈증 예방 또는 치료하거나 개선하는 활성을 가지고 있으며 또한 간 기능 지표 효소의 활성을 정상화하여 간 조직 내의 지방축적을 개선하여 지방간 발생의 예방, 진행 억제 또는 질병 상태를 호전시킬 수 있는 효과도 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <31> 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.

실시예

<32> 실시예 1: 노송나무 열수 추출물의 제조

- <34> 노송나무(*Juniperus chinensis*)는 품질이 양호하고 변질되지 않은 것을 사용하였다. 노송나무 목부 5 kg의 표면을 세척하고, 추출이 용이하게 되도록 하기 위하여 일정한 길이로 절단하였다. 정선된 노송나무를 추출기에 넣고, 노송나무의 증량에 대해 6배의 열수에 넣어 90℃에서 5시간 동안 계속 가열하면서 노송나무 내의 성분들이 추출되도록 하였다. 상기 추출물을 상온으로 냉각한 뒤 10 μm의 여과기기를 이용하여 여과하여 노송나무 본체를 제거하고 여과된 노송나무추출물은 감압 농축하여 노송나무농축액 500 g을 수득하고, 이를 동결 건조하여 고형분 함량이 90-100%인 40-50 g의 노송나무추출물을 제조하였다.

<35> 실험예 1: 실험 동물모델의 제조

<36> 실험 동물의 설계 및 실험식이 조성

<37> 웅성 래트(5 주령, 체중 110-120 g, Sprague-Dawley 계통, 주 오리엔트)들을 고형사료로 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 난괴법에 따라 고지방식이군(n=8)과 노송나무열수추출물 첨가군(n=8)으로 임의배치하여 11주간 사육하였다.

<38> 실험식이는 매일 오전 8-9시 사이에 물과 함께 매일 공급하였으며 본 실험식이는 고지혈증을 유도할 수 있는 실험식으로 본 발명자에 의해 개발된 고지방식이(40% 지방 칼로리(fat calorie), 17 g 라드(lard) + 3% 옥수수 오일/100 g 식이)이다. 상기 고지혈증 식이는 일반적으로 섭취 칼로리의 40%를 지방으로 제조하여 동물에게 섭취시켰을 경우, 체중과 체지방률을 현격히 증가시키고, 이는 지방세포의 크기와 수를 증가시켜 비만을 유발한다. 상기 실험식이 조성물의 성분 및 함량은 표 1에 정리되어 있다.

표 1

성분(g/kg 식이)	고지방대조식이(HFD)	노송나무추출물보충식이(JCD)
카제인	200	200
DL-메티오닌	3	3
옥수수 녹말(Corn starch)	111	101
수크로오스(Sucrose)	370	370
셀룰로오스(Cellulose)	50	50
옥수수 오일(Corn oil)	30	30
라드(Lard)	170	170
미네랄 혼합물(AIN-76A) ¹⁾	42	42
비타민 혼합물(AIN-76A) ²⁾	12	12
주석산수소콜린(Choline bitartrate)	2	2
콜레스테롤(Cholesterol)	10	10
tert-Butylhydroquinone	0.04	0.04
노송나무열수추출물	-	10

<40> ¹⁾ 미네랄 혼합물(g/kg of mix): CaHPO₄ 500; NaCl 74; K₂H₆O₇H₂O 220; K₂SO₄ 52; MgO 24; MnCO₃ 3.5; Fe(C₆H₅O₇) · 6H₂O 6; ZnCO₃ 1.6; CuCO₃ 0.3; KIO₃ 0.01; Na₂SeO₃ · 5H₂O 0.01; CrK(SO₄)₂ 0.55; 설탕분말 118.03.

<41> ²⁾ 비타민 혼합물(g/kg of mix): 티아민 · HCl 0.6; 리보플라빈 0.6; 피리독신 · HCl 0.7; 니코틴산 3; D-칼슘 판토테네이트 1.6; 엽산 0.2; D-비오틴 0.02; 시아노코발라민(Vitamin B12)(0.1%) 1.0; 비타민 A 팔미틴산염(500,000 IU/g); 콜레칼시페롤(Vitamin D3)(400,000 IU/gm) 0.25; 비타민 E 아세테이트(500 IU/g) 10; 메나디온 나트륨 중아황산염 0.08; 설탕 분말 981.15.

<42> 실험동물의 체중 증가량, 식이효율 및 조직 무게 조사

<43> (1) 실험방법

<44> 실험기간 동안 상기 실험예의 각 실험동물에 대하여 3일에 한번씩 체중증가량을 측정하고 사료섭취에 따른 갑작스런 체중변화를 막기 위해 사료통을 제거하고 2시간 후에 체중을 측정하였으며, 식이효율(FER, food efficiency ratio)은 실험식이 공급일로부터 희생일까지를 총 실험기간으로 하여 실험기간 동안의 누적체중증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 산출하였다. 또한, 실험식이 공급 11주 후 실험동물을 12시간 절식시킨 후, 디에틸 에테르로 마취시킨 상태에서 동물을 부검하여 조직 중량을 측정하여 체중단위당 조직무게를 산출하였다.

<45> (2) 실험결과

<46> 표 2에서 확인할 수 있듯이, 래트를 실험식으로 11주간 사육한 결과 노송나무추출물섭취군(JCD)의 누적체중증가량은 고지방대조식이군(HFD)에 비해 유의적으로 더 낮았고(p<0.05), 식이효율(FER)도 JCD군이 HFD군에 비해 유의적으로 더 낮았다(p<0.05). 체중 당 조직의 무게는 JCD군이 HFD군보다 유의적으로 더 가벼웠다(p<0.05). 즉, 본 발명의 노송나무추출물은 고지방식이에 의한 간과 비장의 무게 증가의 억제 효과 및 체중 증가의 억제

효과가 우수하였다.

표 2

<47>

구분	체중 증가량 (g/11 주)	식이효율 ¹⁾	조직무게(g/100g 체중)	
			간	비장
고지방대조식이군 (HFD)	436.8± 15.36	0.25± 0.01	4.22± 0.18	0.17± 0.01
노송나무추출물 보충식이군 (JCD)	359.1± 15.85 [*]	0.20± 0.01 [*]	3.57± 0.13 [*]	0.16± 0.01

<48>

¹⁾ 식이효율=[실험기간 동안 증가한 체중(g/day)]/[실험기간 동안 섭취한 식품의 양(g/day)]

<49>

^{*}t-test를 통해 고지방대조식이군(HFD)과 비교할 때 유의적 차이가 있음을 의미함(p<0.05).

<50>

실험예 2: 노송나무열수추출물의 고지혈증 개선 효과의 측정

<51>

노송나무열수추출물이 고지혈증을 개선하는 효과가 있는지 확인하기 위하여 실험예 1에서 제조된 동물모델의 혈장의 지질농도를 측정하였다. 모든 실험결과는 SAS(Statistical Analysis System, SAS version 8.01, SAS Institute Inc., Cary, NC) PC 패키지를 사용하여 통계분석하였고, 분석 수치는 평균 ± SEM으로 나타내었다. 실험군간의 유의적인 차이는 Student's-test를 실시하여 검증하였고, p<0.05 수준에서 유의성을 관찰하였다.

<52>

혈장의 지질농도 분석

<53>

(1) 실험방법

<54>

실험식이 공급 11주 후 상기 실험예 1에서 제조한 각각의 래트를 12시간 절식시킨 후, 디에틸 에테르로 마취시킨 상태에서 개복하고 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채혈은 헤파린을 처리한 주사기를 사용하였으며, 채취된 혈액은 4℃, 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리시킨 뒤 분석시까지 에펜돌프 튜브(eppendorf tube)에 나누어 -70℃에 냉동 보관한 후 이들 혈장의 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 및 중성지방농도를 상업용 키트(영동제약)를 이용하여 2회 반복 측정하였다. 유리지방산(free fatty acid) 농도는 SICDIA NEFAZYME 키트(Eiken Chemical, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하며, 혈중 LDL + VLDL 콜레스테롤농도는 총콜레스테롤농도에서 HDL 콜레스테롤농도를 제하여 산출하였다.

<55>

(2) 실험결과

<56>

표 3에서 확인할 수 있듯이, 혈장 중성지방의 농도 및 유리지방산농도는 노송나무추출물보충식이군(JCD)이 고지방대조식이군(HFD)에 비해 각각 58%, 33%가 더 낮았다(p<0.05). 혈장 총콜레스테롤 및 LDL + VLDL 콜레스테롤은 JCD군이 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었고, 또한 HDL 콜레스테롤은 JCD군이 HFD군에 비해 유의적으로 증가되어 지질 대사를 개선하는 효과가 있고, 이에 고지혈 예방 또는 치료 효능이 있음을 알 수 있다.

표 3

<57>

구분	고지방대조식이군(HFD)	노송나무추출물보충식이군(JCD)
중성지방 (mmol/L)	1.18± 0.07	0.5± 0.03 [*]
총 콜레스테롤 (mmol/L)	4.03± 0.10	2.6± 0.13 [*]
HDL-콜레스테롤 (mmol/L)	0.56± 0.03	0.83± 0.09 [*]
LDL+VLDL-콜레스테롤 (mmol/L)	3.48± 0.12	1.80± 0.17 [*]
유리지방산 (uEq/dL)	84.77± 4.52	57.4± 1.73 [*]

<58>

^{*}t-test를 통해 고지방대조식이군(HFD)과 비교할 때 유의적 차이가 있음을 의미함(p<0.05).

실험예 3: 노송나무열수추출물의 지방간 개선 효과의 측정

노송나무열수추출물이 지방간을 개선하는 효과가 있는지 확인하기 위하여 실험예 1에서 제조된 동물 모델의 간 조직의 지질농도와 간 손상 지표 효소의 활성도를 측정하고 간 조직의 병리학적 검사를 수행하였다.

간 조직의 지질농도 분석

(1) 실험방법

실험식이 공급 11주 후 상기 실험예 1에서 제조한 각각의 래트를 12시간 절식시킨 후, 디에틸 에테르로 마취시킨 상태에서 혈액채취 후 간을 적출하였다. 적출된 간은 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하여 여과지에 놓아 여분의 물을 제거하였다. Folch 등에 의해 공지된 방법(Folch et al. *J. Biol. Chem.*, 226:497-509(1957))에 의해 간 조직의 지질성분을 추출하였다. 0.5 g의 간 조직에 2 ml의 증류수를 가한 후 폴리트론 균질기(polytron homogenizer: IKA-WERKE GmbH & Co., Germany)를 사용하여 일정하게 균질화시켰다. 균질액에 클로로포름:메탄올 용액(2:1,v/v) 5 ml를 가하고 1분간 혼합한 후 1000 × g에서 10분간 원심분리하고 하층액만을 분리하여 간의 지질성분을 완전히 분리하였다. 분리된 하층액들은 클로로포름:메탄올:0.05% CaCl₂(3:48:47, v/v/v)용액 3 ml를 가하여 1분간 혼합한 후 1000 × g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 하층액만을 취하여 질소가스로 완전히 건조시킨 후, 총 지질량을 측정하고 1 ml의 에탄올(95%)에 녹여 지질 분석에 사용하였다.

간 조직 지질추출액의 중성지방 및 콜레스테롤 농도는 상업용 지질분석 키트(영동제약)를 사용하고 유리지방산 농도는 SICDIA NEFAZYME 키트(Eiken Chemical, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

(2) 실험결과

표 4에서 확인할 수 있듯이, 간조직의 중성지방과 콜레스테롤 농도는 노송나무추출물보충식이군(JCD)이 고지방대조식이군(HFD)에 비해 유의적으로 감소하였다.

표 4

구분	중성지방(μmol/g liver)	콜레스테롤(μmol/g liver)
고지방대조식이군(HFD)	20.449 ± 0.15	13.55 ± 0.19
노송나무추출물보충식이군(JCD)	15.47 ± 0.29*	10.55 ± 0.64*

* t-test를 통해 고지방대조식이군(HFD)과 비교할 때 유의적 차이가 있음을 의미함(p<0.05).

간 조직의 지질농도 분석

간 기능 지표가 되는 GOT(glutamate oxaloacetate transferase)와 GPT(glutamate pyruvate transferase)의 활성이 증가되면 고지방식이나 알코올의 과다섭취로 인한 지방대사의 저해로 간실질세포의 장애가 발생하여 혈중으로 방출이 항진되는 것을 의미한다(김희숙 등, *한국식품영양학회지*, 11(3):312-318(1998)). 이에 본 발명에서는 노송나무추출물이 GOT와 GPT활성에 미치는 영향을 조사하였다.

(1) 실험방법

실험예 2의 래트에서 분리된 혈장의 GOT 및 GPT의 활성을 자동분석용 시약(Bayer, Co., USA)를 이용하여 생화학 자동분석기(Express Plus, Chiron Diagnostics Co., USA)로 측정하였다.

(2) 실험결과

표 5에서 확인할 수 있듯이, 노송나무추출물보충식이군(JCD)이 고지방대조식이군(HFD)에 비해 GOT의 수치가 25% 감소하였으며(p<0.05), GPT의 수치는 21% 감소한 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명은 고지방식을 섭취한 래트에서의 노송나무열수추출물 투여가 GOT, GPT의 활성을 감소시켜 간 조직의 손상을 개선시키는 효과가 우수하다는 것을 알 수 있다.

표 5

항목	GOT ¹⁾ (Unit/L)	GPT ²⁾ (Unit/L)
고지방대조식이군(HFD)	86.62 ± 2.12	27.53 ± 1.2
노송나무추출물보충식이군(JCD)	65.12 ± 4.17*	21.91 ± 1.04

¹⁾GOT: 글루타메이트 옥살로아세트테이트 트랜스퍼라제(Glutamate oxaloacetate transferase)

²⁾GPT: 글루타메이트 피루베이트 트랜스퍼라제(Glutamate pyruvate transferase)

* t-test를 통해 고지방대조식이군(HFD)과 비교할 때 유의적 차이가 있음을 의미함(p<0.05).

간 조직의 병리학적 검사

(1) 실험방법

실험예 2에서 혈액채취가 끝난 즉시 각 래트에서 장기를 적출하여, 적출된 장기를 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하여 여과지에 놓아 여분의 물을 제거하였다. 간은 4등분하여 액체질소에서 급속 냉동시킨 후 -70℃에 보관하고 그 간조직의 일부를 0.5 mm³의 크기로 잘게 조각낸 후 파라핀으로 포매한 후, 5 μm의 두께로 박편하여 절편 슬라이드를 만들었다. 그리고 헤마톡실린과 에오신으로 염색하여 핵과 세포질을 염색한 후, 광학현미경(Axioplan 2, Zeiss, Gottingen, Germany)과 현미경에 장착된 디지털 카메라를 이용하여 현상하였다.

(2) 실험결과

도 1에서 확인할 수 있듯이, 노송나무추출물보충식이군(JCD)에서 고지방대조식이군(HFD)에 비해 간세포내 지방 축적량이 현저히 감소한 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명은 고지방식을 섭취한 래트에서 노송나무열수추출물이 간 조직 내의 지방축적을 개선하는 효과가 우수하다는 것을 알 수 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 노송나무추출물보충식이군(JCD) 및 고지방대조식이군(HFD)의 간 조직에 대한 사진이다.

도면

도면1

