

발간등록번호

11-1543000-000240-01

**지리산 한방자생식물을 활용한 비알콜성 지방간 질환
억제 천연소재개발 (생명산업기술개발사업)**

(Research for investigation of natural materials and study
of regulation mechanism using medicinal plants for
NAFLD)

한국국제대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “지리산 한방자생식물을 활용한 비알콜성 지방간 질환 억제 천연소재개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 08 월 19 일

주관연구기관명 : 한국국제대학교산학협력단

주관연구책임자 : 황용필

세부연구책임자 : 황용필

연 구 원 : 이보람

연 구 원 : 이준수

연 구 원 : 유윤상

요 약 문

I. 제 목

지리산 한방자생식물을 활용한 비알콜성 지방간 질환 억제 천연소재개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- ▶ 비알코올성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease, 이하 NAFLD)은 현재 수많은 사람들이 고통 받고 있는 질환으로 다양한 유전적 요인, 환경적 차이, 개체 간에 따른 발생요인을 갖고 있다. 지난 수십 년 동안 많은 연구자들은 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)을 비롯한 대사성증후군의 원인과 치료방법을 밝히기 위한 생화학, 분자생물학, 의학, 의과학, 실험동물학, 약학 등의 다양한 접근방법을 시도하였다. 그러나 다양한 증상을 수반하는 NAFLD의 복잡성으로 하여 확실한 진단 및 치료방법을 개발하지 못하고 있는 실정이다.
- ▶ NAFLD를 비롯한 대사성 증후군으로 인한 합병증은 식품과 의약계뿐만 아니라 바이오 산업계에서도 지속적인 핫이슈가 되고 있으며, 따라서 국가적으로 이러한 질병발생 패턴의 변화에 맞추어 만성질환에 대한 원인을 규명하고 이를 예방하거나 치료하는 새로운 기술의 개발이 절실히 필요한 시점이다.
- ▶ 본 연구에서는 지리산 한방자생식물을 활용하여 지방산 합성 효소 발현을 조절하는 소재를 개발하고자 하였다. 천연물 유래 지방산 합성 효소 발현 조절 소재를 개발을 위해 *in vitro* 및 *in vivo* 동물 실험모델을 활용하여 1) AMPK를 타겟으로 한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크 규명, 2) 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 및 분자기전을 연구하고자 하였다.
- ▶ 본 연구를 통하여 지방축적에 의한 NASH(비알코올성 지방간염) 질환 유발에 관여하는 대사체 조절 마커 및 신호전달체계에 대한 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 규명을 통해 NAFLD (비알콜성 지방간질환) 제어 천연소재를 개발하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

■ 본 연구에서는 지리산 한방자생식물을 활용하여 지방산 합성 효소 발현을 조절하는 소재를 개발하고자 하였다. 천연물 유래 지방산 합성 효소 발현 조절 소재를 개발을 위해 *in vitro* 및 *in vivo* 동물 실험모델을 활용하여 1) AMPK를 타겟으로 한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크 규명, 2) 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 및 분자기전을 연구하고자 하였다.

1. AMPK를 타겟으로 한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크 규명

- 1) Fat-overloading 유도 모델 및 NASH 세포모델 확립
- 2) 지방합성 효소발현 전사조절인자인 SREBP-1 promoter를 활용한 비알콜성 지방간염 억제 *in vitro* 스크리닝법 확립을 통한 천연소재 탐색-지리산 약초 단순 추출물을 활용함.
- 3) SREBP1 활성 억제 천연 소재의 에너지 대사 관련 신호전달자인 AMPK를 타겟으로 한 분자기전 연구
- 4) SREBP1의 타겟 단백질인 FAS의 발현 영향연구
- 5) LKB1, Ca²⁺ 인자의 영향 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 조절 연구
- 6) 간세포에서 Cholesterol 및 TG 측정.
- 7) 시료의 세포독성을 MTT 및 LDH assay를 통해 측정함.

2. 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 및 분자기전 연구

- 1) 비알콜성 지방간염 동물 모델에서 원인 대사체 조절 마커 및 유전자 탐색
- 2) 동물 모델에서 비알콜성 지방간 대사 조절 및 기전 연구
 - SREBP1, AMPK 활성 및 FAS의 발현조사
- 3) 비만, 인슐린저항성 개선 등의 위험인자 교정을 통한 지방간 개선 평가
 - 실험쥐의 몸무게 변화 및 간조직의 무게 변화 측정
 - Cholesterol, TG 측정 및 혈당측정
- 4) 장기간 시료 투여 후 간독성 측정 (ALT, AST 등)

IV. 연구개발결과

가. High glucose로 유도된 간세포주에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간 억제 효과 및 작용기전 규명

■ AMPK를 타겟으로 한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크 규명

- 본 연구에서는 Fat-overloading 유도 모델 및 NASH 세포모델 확립을 위해 High glucose로 유도된 간세포주를 확립하여 활용하였다.
- 지방합성 효소발현 전사조절인자인 SREBP-1 promoter를 활용하여 비알콜성 지방간염 억제 *in vitro* 스크리닝법을 확립하였으며, 위의 system을 활용하여 비알콜성 지방간염 억제 효과를 나타내는 개똥쑥 및 복령 등 천연물 소재 2건을 확보하였다.
- 개똥쑥 추출물과 복령 추출물의 FAS 및 SREBP-1c 활성억제 관여하는 상위 신호전달체계를 조사한 결과, 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해서 지방합성효소의 활성을 억제하는 AMPK 및 ACC의 인산화가 증가하였다.
- 개똥쑥 추출물과 복령 추출물이 AMPK 의존적으로 FAS 및 SREBP-1의 활성을 억제하는지를 규명하기 위하여 AMPK 저해제인, Compound C를 시료와 같이 처리하였다. 혈청이 제거된 배양배지에 Compound C를 1시간 전처리후 개똥쑥 추출물과 복령 추출물을 100 μ g/ml 농도로 처리한 후 24 시간 후에 FAS 와 SREBP-1 단백질 발현을 측정하였다. 또한, 세포내 지질의 축적을 Nile Red 형광 시약으로 염색 후 형광과장을 측정하였다. 실험결과, 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해 감소한 FAS 와 SREBP-1 단백질 발현이 AMPK 저해제에 의해서 감소하지 않음을 확인하였다. 마찬가지로, 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해 감소한 지질축적이 AMPK 저해제에 의해서 감소하지 않음을 확인하였다.
- 개똥쑥 추출물과 복령 추출물의 지방합성 효소 (Fatty acid synthase; FAS) 및 전사조절인자인 SREBP-1의 활성억제 효과를 측정한 결과, 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해서 high glucose 처리에 의해서 증가한 FAS 및 SREBP-1c 단백질 발현이 감소함을 확인하였다. 또한 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해서 high glucose (30 mM) 처리에 의해서 증가한 SREBP-1 promoter 활성이 감소함을 확인하였다.
- 위의 결과에서 개똥쑥 추출물의 FAS 및 SREBP-1c의 발현 억제는 AMPK 인산화 pathway를 통해 이루어짐을 알 수 있었다.
- 본 연구에서는 AMPK의 상위 신호 체계를 규명하기위하여 개똥쑥 및 복령 추출물에 의한 LKB1 과 CaMKK β 의 하위 신호 전달자인 CaMKIIa의 인산화를 측정하였다. 실험 결과에

의하면 개똥쑥 및 복령 추출물에 의해서 LKB1 (Ser428)의 인산화와 CaMKIIa (Thr286)의 인산화가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.

- 천연물 시료의 비알콜성지방간 및 비만 개선 활성 평가를 위하여 *in vitro* 간세포에서 비알콜성지방간 세포주를 확립하였다. 인체 간세포인 HepG2 세포에 고농도의 glucose 30 mM을 24간 이상 처리하여 비알콜성지방간 세포주를 확립하였다. 세포주의 확립을 확인하기 위하여 확립된 세포주에서 지질의 생성량을 Nile red assay 법을 이용하여 확인하였다. 100% DMSO로 탈색시켜 형광을 측정하였다.
- 확립된 *in vitro* 비알콜성 지방간 세포주에서 배양 조건에서 개똥쑥 추출물 (*Artemisia annua* extract; AAE) 과 복령 추출물 (*Poria cocos* extract PCE)의 지질축적 억제 효능을 평가한 결과 고농도 (200 µg/ml)에서 30 mM 고농도의 glucose 처리에 의해서 증가한 지질의 축적이 개똥쑥 추출물과 복령 추출물 처리에 의해서 억제되었음을 확인하였다.
- 또한, 고농도의 glucose 처리에 의해서 증가한 triglycerides 및 total cholesterol 함량도 개똥쑥 추출물과 복령 추출물 처리에 의해서 감소하였다.
- 인체 간세포 HepG2 세포에서 개똥쑥 및 복령 열수추출물의 세포독성을 MTT 및 LDH assay 통해 측정한 결과 500 µg/ml의 농도에서도 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 세포독성이 나타나지 않는 농도 (500 µg/ml 이하)에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 효능을 측정하였다. 본 실험에서는 천연물시료의 최고 농도를 100 µg/ml로 사용하였다.

나. 고지방식이 동물모델에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간억제효과 및 작용기전 규명

■ 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 및 분자기전 연구

- *In vivo*에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간 개선 효능을 평가하기 위하여 고지방식이 (High Fat Diet: HFD) 동물 모델을 확립하였다. 4 주령의 ICR mice에 고지방식이를 4 주간 투여한 후, 몸무게를 측정하여 몸무게가 증가한 마우스를 선별하였다. 선별된 마우스를 3 group (양성 대조군: high fat diet (HFD), HFD+AAE 200 mg/kg, HFD+PCE 200 mg/kg)으로 나눈 후 개똥쑥 및 복령 추출물을 4주 동안 매일 일정한 시간에 구강 투여하였다. 각 group당 5마리를 사용하였다. 확립된 동물 모델을 이용하여 개똥쑥 및 복령 추출물의 지질개선 효능을 평가하였다.
- 본 연구에서는 고지방 식이 마우스 동물모델에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 지방합성 효소 (Fatty acid synthase; FAS) 및 sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) 활성억제 효과와 관련 신호전달체계를 조사하기 위하여 간조직에서 FAS 및 SREBP-1 단백질 발현과 AMP-activated protein kinase (AMPK) and acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인

산화 변화를 western blot 방법을 이용하여 확인하였다. 실험결과 개똥쭉 및 복령 추출물에 의해서 지방합성효소인 FAS 및 상위 전사조절인자인 SREBP-1c의 단백질 발현이 감소하였다.

- 또한, 고지방 식이에 의해서 감소한 AMPK의 인산화가 개똥쭉 및 복령 추출물을 투여한 그룹에서는 다시 증가함을 확인하였다.
- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 개똥쭉 및 복령 추출물의 체중 (body weight), 간 무게 (liver weight) 및 내장지방 무게 (Fat pad weight)를 측정된 결과, 고지방 식이에 의해 증가된 마우스의 체중 및 간조직의 무게가 개똥쭉 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소하였으며, 내장지방 (복부지방)의 무게도 감소함을 확인하였다..
- 또한 *in vivo*에서 고지방식이에 의한 개똥쭉 및 복령 추출물의 혈당 변화량을 측정된 결과 고지방식이에 의해서 증가한 혈청 내 glucose (혈당)이 개똥쭉 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소함을 확인하였다.
- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 개똥쭉 및 복령 추출물의 간장내 지질 억제 효과를 측정하기 위해 Hepatic triglyceride(TG) 및 total cholesterol 함량을 측정하였다. 실험결과, 고지방 식이에 의해 증가된 triglyceride 및 total cholesterol의 함량이 개똥쭉 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소하였다.
- 또한 분자생물학적 조직염색법 (hematoxylin and eosin 염색법) 실험을 통해 조직내의 지방의 축적 정도 및 steatosis 정도를 측정된 결과 지방의 축적이 개똥쭉 및 복령 추출물에 의해서 감소함을 확인하였다.
- *in vivo*에서 고지방식이에 의한 개똥쭉 및 복령 추출물의 간 손상 보호효과를 조사하기 위하여 간 손상의 지표인 ALT 및 AST 효소의 활성을 측정하였다. 실험결과 고지방식이에 의해서 증가한 AST, ALT 효소의 활성이 개똥쭉 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소함을 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- ▶ 지방산 합성효소 발현 분자기전에 기초한 표적분자 발굴 및 비알콜성 지방 간질환 동물 모델개발, 이를 활용한 천연소재 발굴 탐색 및 발굴 체계를 구축함으로써 비알콜성 지방 간질환 제어 건강기능식품개발 연구의 활성화에 기여하고자한다.
- ▶ 비알콜성 지방 간질환 활성 평가 model 확립 및 작용기전 규명을 통한 비알콜성 지방 간질환 개선 건강기능식품, 약용식품 (Pharmafood) 및 nutraceutical food 개발을 위한 산업기반 기술 구축에 활용하고자한다.
- ▶ 비알콜성 지방 간질환 발병 과정의 분자기전 규명 및 제어 타겟을 발굴하고, 이를 활용한 비알콜성 지방 간질환의 조기진단 기술을 산업체에 기술이전 함으로써 바이오산업 활성화에 기여하고자한다.
- ▶ 지리산 한방자생식물의 재배농가 대폭 확대를 통한 농가소득 수입의 안정적 보장에 기여.
- ▶ 분자기전에 기초한 표적분자 발굴 시험을 통한 비알콜성 지방 간질환을 예방하거나 억제할 수 있는 기능성 소재개발에 관련 기술을 응용하여 기능성 식품 소재 및 치료제 개발에 근거 자료 활용하고자 한다.
- ▶ 본 연구를 통해 얻어진 비알콜성 지방 간질환 개선제 탐색 및 기전연구로 우수한 약효를 갖는 천연물질을 발굴하여 농가소득 증대 및 산업화에 기여하고자 한다.
- ▶ 본 연구 결과 중 일부는 국내외 학술 잡지에 게재되어 관련 학문과 기술의 개발에 이바지 될 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. The subjective of the project

Research for investigation of natural materials and study of regulation mechanism using medicinal plants for NAFLD

II. The objective and importance of the project

- ▶ Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is emerging as the most common liver disease in industrialized countries. Recently, natural compounds that may be beneficial for improving NAFLD have received increasing attention. Excessive fat accumulation in the bodies cause chronic diseases such as NAFLD, diabetes mellitus, hyperlipidemia, cardiovascular diseases, digestive diseases, and various cancers in both humans and laboratory animals.
- ▶ In addition to diet therapy and exercise for the control of body weight, many different approaches such as drugs for weight loss or loss of appetite and food supplements have been suggested. However, most lipid lowering drugs have been withdrawn from the market based on U.S. FDA warnings of serious adverse reactions.
- ▶ Due to the side effects associated with current lipid lowering agents, there is a growing interest in herbal remedies, and the plant kingdom provides a vast field in which to search for naturally effective lipid lowering with less significant side effects.
- ▶ The purpose of this study is to determine the protective effect of medicinal her plants on high-fat-diet (HFD)-induced hepatic lipid accumulation, and elucidate the molecular mechanisms behind its effects *in vivo* and *in vitro*.

III. The scope and contents of the project

1. The protective effect of medicinal herb plants on high glucose-induced hepatic lipid accumulation, and elucidate the molecular mechanisms behind its effects *in vitro* hepatocytes

1) The establishment of a model of NASH induced by high concentrations of glucose in

HepG2 cells.

- 2) The investigation of medicinal herb plants for NAFLD through the establishment of *in vitro* screening method.
- 3) Effects of medicinal herb plants on hepatic AMPK activation *in vitro* HepG2 cells.
- 4) Effect of medicinal herb plants on the expression of SREBP1c and FAS in high glucose-induced HepG2 cells.
- 5) Effect of medicinal herb plants on the phosphorylation of LKB1 and Ca²⁺ related factor, CaMKII α , in HepG2 cells.
- 6) Effect of medicinal herb plants on total cholesterol and triglycerides (TG) in HepG2 cells.
- 7) The determined of cell cytotoxicity of medicinal herb plants using MTT and LDH release assays.

2. Beneficial effects of medicinal herb plants on lipid metabolism in obese mice fed a high-fat diet

- 1) The research of lipid metabolism related regulation marker and genes using medicinal plants for NAFLD
- 2) The study of regulation mechanism using medicinal plants for NAFLD
 - Effect of medicinal herb plants on the expression of SREBP1c and FAS in HFD mice
- 3) The valuation for improvement NAFLD by medicinal herb plants in HFD mice.
 - Effects of medicinal herb plants on HFD-induced body weight, liver weight, and serum glucose
 - Effects of medicinal herb plants on accumulation of hepatic triglyceride and total cholesterol in HFD livers
- 4) Effects of medicinal herb plants on HFD-induced hepatotoxicity Hepatotoxicity was determined by quantifying the serum activity of ALT and AST.

IV. The research results and the recommendation

1. **The protective effect of AAE and PCE on high glucose-induced hepatic lipid accumulation, and elucidate the molecular mechanisms behind its effects *in vitro* hepatocytes**
 - To characterize the effect of medicinal herb plants to AMPK signaling, lipid metabolism

and high glucose-induced lipid accumulation in the HepG2 hepatocyte model was studied. HepG2 cells were incubated in serum-free DMEM containing normal (5.5 mM D-glucose) or high concentrations of glucose (30 mM D-glucose), and subsequently treated with medicinal herb extracts.

- We first determined the concentration dependence of the cytotoxic effects of AAE or PCE (0, 50, 100, 250, and 500 mg/ml) in the absence or presence of high glucose (30 mM) for 48 h in HepG2 cells using MTT and LDH assays. AAE or PCE at high concentrations displayed no cytotoxic effects on the cells.
- To observe the effects of AAE or PCE on lipid accumulation, HepG2 cells were treated with various concentrations of AAE or PCE (0, 10, 100, and 200 mg/ml) for 24 h and stained with Nile Red. As the results, AAE or PCE dose-dependently reduced intracellular lipid accumulation without cytotoxicity.
- AAE or PCE significantly decreased the triglyceride and total cholesterol accumulation in a dose-dependent manner.
- Western blot analysis revealed that the lipogenic protein levels of FAS and SREBP-1 were reduced in AAE or PCE-treated HepG2 cells.
- To determine whether the hypolipidemic effects of AAE or PCE are mediated by AMPK, we examined AMPK phosphorylation, which indicates AMPK activation. AAE or PCE supplementation dose-dependently increased AMPK activity and ACC phosphorylation.
- To confirm the role of AMPK in the regulation of metabolic gene expression, HepG2 hepatocytes were preincubated for 1 h with the selective AMPK inhibitor compound C. Compound C pretreatment attenuated the inhibitory effects of AAE or PCE on SREBP-1 and FAS expression. Moreover, although AAE or PCE significantly decreased the lipid content in cells exposed to high glucose concentrations, compound C abolished this inhibitory effect of AAE or PCE.

2. The potential health benefits of AAE and PCE on NAFLD and related disorders in high-fat diet (HFD)-induced obese mice

- To investigate the activity of AAE or PCE in the liver, we used obese mice after 4 weeks of HFD feeding. Mice were divided into three groups. The ICR mice were divided into four groups (each group, $n = 5$) and fed with ND or HFD supplemented with AAE or HFD supplemented with PCE (200 mg/kg/day). After 4 weeks of dietary manipulation

to induce obesity, 15 animals in the HFD group were divided into three experimental groups (each group, $n = 5$): Group 1 received a HFD; Group 2 received the HFD with AAE (200 mg/kg/day); Group 3 received the HFD with PCE (200 mg/kg/day).

- AAE or PCE reduced the body weight, liver weight, serum AST, serum ALT, and serum glucose in obese mice.
- The gross appearance and H&E analysis of the liver revealed fatty infiltration in the HFD control group compared to mice fed the ND; however, fatty infiltration was not observed in the livers of AAE or PCE-treated mice. As shown in results, AAE or PCE treatment decreased HFD-induced hepatic triglyceride and total cholesterol levels.
- To determine the molecular mechanism by which AAE or PCE exerts its hypolipidemic effects, Western blot analysis was performed to examine the expression of proteins involved in lipid metabolism. As shown in results, AAE or PCE decreased the level of mature SREBP-1 in the liver. Furthermore, the expression of the SREBP-1 target gene FAS was reduced by AAE or PCE.
- These results suggest that AAE or PCE regulates hepatic lipid metabolism through regulating the expression of proteins related to lipid metabolism, eventually leading to the suppression of lipogenesis.
- In conclusion, this study demonstrated that AAE and PCE supplementation results in markedly lower lipid accumulation, AMPK phosphorylation up-regulation and lipogenic gene such as FAS and SREBP-1c down-regulation in the livers of mice and HepG2 cells. This suggests that AAE and PCE can have protective effects against HFD-induced hepatic steatosis via enhanced hepatic lipid metabolism via AMPK activation, thus providing a therapeutic approach to prevent non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

CONTENTS

(영 문 목 차)

Charpter 1. Outline of the project	1
Charpter 2. The dosmetic and international states of the technology	6
Charpter 3. The research contents and results	12
1. Effect of AAE and PCE on NAFLD	12
1. Introduction	12
2. Material and Methods	16
3. The research contents and results	19
1) The protective effect of AAE and PCE on high glucose-induced hepatic lipid accumulation, and elucidate the molecular mechanisms behind its effects <i>in vitro</i> hepatocytes	19
2) The potential health benefits of AAE an PCE on NAFLD and related disorders in high-fat diet (HFD)-induced obese mice	33
4. Summary	44
Charpter 4. The attainment and contribution	48
Charpter 5. The utilization and extension	49
Charpter 6. The gathering of technical know-how in a foreign country	51
Charpter 7. The states of research institution and equipment	53
Charpter 8. Reference	53

목 차

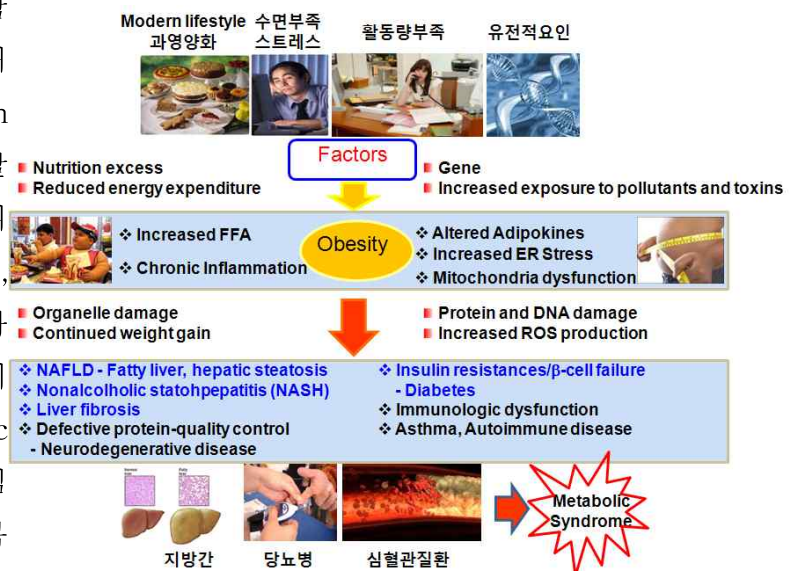
제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	6
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	12
제 1 절	개똥썩, 복령 추출물의 비알콜성 지방간 억제효과 연구	12
1. 서론	12
2. 재료 및 방법	16
3. 결과 및 고찰	19
가. High glucose로 유도된 간세포주에서 개똥썩 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간억제효과 및 작용기전 규명	19	
나. 고지방식이 동물모델에서 개똥썩 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간억제효과 및 작용기전 규명	33	
4. 요약	44
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	48
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	49
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	51
제 7 장	연구시설·장비 현황	53
제 8 장	참고문헌	53

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발대상 기술의 경제적 · 산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

1. 경제적 · 산업적 중요성

- 전 세계가 안고 있는 전염병인 비만은 세계 인구의 4분의 1인 17억 명, 국내 비만인구는 성인 10명중 3명꼴로 나타나고 있다. 급변하는 현대사회에서 식습관의 변화와 함께 비만 및 이와 관련된 합병증은 지속적으로 증가하고 있으며 이에 따른 사회 문제가 발생되고 있으며 식품과 의약계뿐만 아니라 바이오 산업계에서도 지속적인 핫이슈가 되고 있다.
- 비만자에게는 간질환, 당뇨병, 담석, 만성신염, 뇌혈관 장애, 심질환 및 사고 등에 의한 사망이 높은 비율로 나타나고 있기에 큰 문제가 되고 있다. 이중 비만이 원인이 되는 간질환에는 비알코올성 지방간질환 (non-alcoholic fatty liver disease, 이하 NAFLD)이 있는데 이는 음주와 관계없이 간세포 내에 중성지방이 축적되는 질환이며 이는 단순 지방간 (steatosis) 와 비알코올성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)으로 나뉜다. 또한 NAFLD은 간기능 장애의 주요원인으로 일반적 증상이 없이 간경변, 간기능 상실, 간암 등의 복잡하고 점진적 간 손상을 진행시킨다.
- NAFLD는 단순지방증(fatty liver, hepatic steatosis), 섬유화와 간경변으로 발전할 수 있는 NASH와 당뇨, 고혈압, 고지질 등의 대사증후군과도 밀접히 관련되어 있다.
- 최근 음주와는 무관하게 간세포 내 중성지방이 축적되는 비알콜성지방간 질환이 비만과 함께 발병률이 증가 추세에 있으며, 미국에서는 환자수가 2000만 명을 육박하고 있다.
- 과체중과 비만은 비알콜성 지방간, 인슐린 저항성, 제2형 당뇨, 동맥경화성 심혈관계질환과 그리고 여러 형태의 암을 포함한 다양한 만성질환의 주요 위험인자이다. WHO(world health organization)에서는 2005년 발표 시 세계적으로 16억 이상의 15세 이상 성인이 과체중이며, 4억 이상 성인인구가 비만이라고 보고한 바 있다 (그림 1). 이러한 대사성 증후군 (metabolic Syndrome)은 비만, 당뇨병, 심혈관계질환 등 여러 질환의 복합



합적인 증상으로 정의할 수 있으며 우리나라도 노령화와 식이 및 생활패턴의 <그림

1. 생활습관 변화에 따른 비만과 비알콜성 지방 간질환 유발>

서구화에 따라 대사성 질환 발현이 기하급수적으로 증가하고 있다 (The global obesity problem, WHO, 2005; Hummasti and Hotamisligil, 2010).

- 비알콜성 지방간 환자의 69~100%는 비만환자이고, 비만환자의 20~40%는 비알콜성 지방간을 동반하며, 특히, 남성 비만환자의 간질환 유병율이 여성 비만자에 비해 더 높게 나타나고 있다. 서구사회에서는 비만환자뿐만 아니라 정상체중 성인의 3%~30%가 비알콜성 지방간병변을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 우리와 식생활이 유사한 일본의 비알콜성 지방간 유병율은 약 20%로 추정되며, 이중 1%가 비알코올성 지방간염으로 추정되고 있다.
- 비알콜성 지방간은 성인 뿐 아니라 비만아동에서도 문제가 되고 있는데, 국내의 한 보고에 따르면 최근 10대 청소년에서 비알코올성 비만이 급증하면서 지방간도 점차 증가 추세에 있다. 예로 10대 청소년 비만율은 1988년 12.5% 에서 1998년 35.6%로 증가되고, 이들 중 30% 이상이 지방간을 보였다고 보고되고 있어 그 심각성이 점점 심해지고 있다. 비만아동 (유럽, 미국 및 아시아 거주)의 10~77%가 비알콜성 지방간병변을 보였는데, 이는 비알콜성 간질환의 가장 중요한 위험인자가 비만이기 때문이라 보고되고 있다. 이러한 비알콜성 지방간은 조기에 치료가 이루어지지 않으면 간경화로 발전한 이후 간암까지 발전할 가능성이 높으므로 초기 가역적인 상태에서의 치료가 매우 중요하게 인식되고 있다.
- WTO 및 FTA체결 이후 농수축산물 및 이들 가공품의 시장이 개방된다에 따라 각 나라들은 자국의 농업 생산기반을 지키기 위하여 다양한 천연 소재 개발, 가공기술 개발 및 고부가가치 제품생산을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 따라서 국민의 식생활의 의식의 급격한 변화와 WTO 출범 및 FTA 체결로 국제 환경의 변화에 대처하고 국민 보건 증진이라는 궁극적 목표를 달성하기 위하여 세계적으로 급속하게 진행되고 있는 생리 활성 기능성 소재 개발이 필요한 시점이다.
- 서구화된 식생활, 비만인구의 증가 및 운동량의 감소에 기인한 생활양식(lifestyle)의 변화로 대사증후군의 증가는 사망률을 증가시키고 의료비의 증가로 인한 사회·경제적 질병 부담을 증가시킬 뿐 만 아니라 이로 인한 환자 개개인의 삶의 질 저하로 이어지는 심각한 국가적 문제로 확산되고 있다.
- 현재 전 세계 의약품시장은 약 300조원에 달하고 있으며 대사성질환용 의약품은 약 40조원에 달하고 있고 연간 10% 이상 성장하고 있다. 특히 중성지방과 콜레스테롤 등 혈중 지질을 낮추려는 의약품 분야는 연간 20% 이상의 고성장을 기록하고 있다. 따라서 경제적으로 보았을 때 대사성질환 관련 질환 예방, 치료제 분야는 커다란 산업을 형성하고 있으며 세계에서 가장 많이 판매되는 의약품 20개중 6개가 대사성질환용 계열 치료제이며 이 분야에 연구개발 활동이 집중되어 있다.
- 최근의 의약품 개발 경향의 변화에 의하면 화학적인 합성물질의 개발에는 한계가 있으며,

고비용의 합성물질의 개발 후에도 그 물질의 부작용 등을 배제 할 수 없다는 단점 때문에 현재는 천연물로부터의 새로운 물질을 순수 분리하고, 그 물질들의 생리활성을 정밀하게 분석하여 치료제 또는 보조제로서의 가능성을 확인하는 형태의 학문 방향으로 전환하는 일로에 이르러 있다.

- 최근 천연자원으로부터 지방간질환, 혈관 재협착억제제, 동맥경화 예방물질, 혈관 확장 유도 물질에 대한 관심이 집중되고 있다. 따라서, 본 연구에서 제시한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크규명 및 동물모델을 이용한 간지방합성효소 및 분자기전 연구가 필요하다.
- 본 연구를 통하여 지방축적에 의한 NASH(비알코올성 지방간염) 질환 유발에 관여하는 대사체 조절 마커 및 신호전달체계에 대한 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 규명을 통해 NAFLD (비알코올성 지방간질환) 제어 천연소재를 개발하고자 하였다.

2. 연구개발의 필요성

- 복합적 증상으로 나타나는 대사성 증후군의 원인에 대하여 많은 논란이 있어 왔지만 현재 연구자들에게 가장 중요한 요소로 받아들여지고 있는 것은 조직 내 지방축적 및 인슐린 저항성이다.
- NAFLD (비알코올성 지방간질환)은 현재 수많은 사람들이 고통 받고 있는 질환으로 다양한 유전적 요인, 환경적 차이, 개체 간에 따른 발생요인을 갖고 있다. 지난 수십 년 동안 많은 연구자들은 NASH를 비롯한 대사성증후군의 원인과 치료방법을 밝히기 위한 생화학, 분자생물학, 의학, 의과학, 실험동물학, 약학 등의 다양한 접근방법을 시도하였다. 그러나 다양한 증상을 수반하는 NAFLD의 복잡성으로 인하여 확실한 진단 및 치료방법을 개발하지 못하고 있는 실정이다.
- NAFLD를 비롯한 대사성 증후군으로 인한 합병증은 식품과 의약계뿐만 아니라 바이오 산업계에서도 지속적인 핫이슈가 되고 있으며, 따라서 국가적으로 이러한 질병발생 패턴의 변화에 맞추어 만성질환에 대한 원인을 규명하고 이를 예방하거나 치료하는 새로운 기술의 개발이 절실히 필요한 시점이다.
- 현재 전 세계 의약품시장은 약 300조원에 달하고 있으며 대사성질환용 의약품은 약 40조원에 달하고 있고 연간 10% 이상 성장하고 있다. 특히 중성지방과 콜레스테롤 등 혈중 지질을 낮추려는 의약품 분야는 연간 20% 이상의 고성장을 기록하고 있다. 따라서 경제적으로 보았을 때 대사성질환 관련 질환 예방, 치료제 분야는 커다란 산업을 형성하고 있으며 세계에서 가장 많이 판매되는 의약품 20개중 6개가 대사성질환용 계열 치료제이며 이 분야에 연구개발 활동이 집중되어 있다.
- 서구화된 식생활 및 운동량의 감소에 기인한 lifestyle의 변화로 대사증후군의 증가는 사망률을 증가시키고 의료비의 증가로 인한 사회·경제적 질병 부담을 증가시킬 뿐 만 아니라 이

로 인한 환자 개개인의 삶의 질 저하로 이어지는 심각한 국가적 문제로 확산되고 있다.

- 공중보건에 대한 관심이 높아지고 삶의 질을 향상시키고자 하는 욕구가 증가함에 따라 더욱더 많은 사람들이 비만의 위해성에 대해 깊이 인식하고 있으며 과도한 지방 섭취는 당뇨와 같은 다른 합병증을 유발할 확률이 현저하게 증가된다는 사실이 알려진 이후로 과도한 지방축적이 단순한 미용의 관점에서 질병의 관점으로 인식의 전환이 이루어지고 있다.
- 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.
- 그러나 현재까지는 비알콜성 지방간 질환에 대한 효과적인 약물치료는 없으나 다만 식이요법, 운동요법 등을 통한 체중감량 등의 기본적인 치료법만이 권고되고 있다. 그러므로 앞으로 비알콜성 지방간에 대한 여러 기전 연구와 지방간의 발생을 억제하는데 필요한 세포신호전달 체계를 규명함으로써 독창적 작용점에 근거한 비알콜성 지방간 치료제의 개발이 필요한 시점이다.
- 최근 예방의학 차원에서 건강에 도움이 되는 천연식품성분들을 공급하여 질병을 예방 및 최적의 건강을 유지하려는 노력이 증대되고 있으며, 이는 현대사회의 생활습관에서 발생하는 질병을 개선하기 위한 차원에서 천연식품이 의약품을 대체 할 목적으로 사용되고 있기 때문이다.
- 대사성 증후군의 선도물질을 개발하는 데 있어서 사용되는 천연물의 장점으로서는 우선 화합물의 다양성을 들 수 있다. 현재까지 천연물로부터 약 14만종의 화합물이 발견되었으며 합성 의약품에 비하여 새로운 골격을 발견할 가능성이 매우 높은 것으로 평가되고 있다. 또한 얻어진 화합물 중 약 40%는 합성으로 얻기 불가능하거나 어려운 매우 독특한 골격을 가지고 있다. 천연물은 대개의 경우 2차 대사산물로서 저분자, 지용성 화합물로 약물이 갖추어야 할 흡수, 대사, 배설의 측면에서 약물과 같은 성질을 많이 지니고 있어 의약품으로 이용될 가능성이 높다.
- 현재 지구상 약 60%의 인구가 병의 치료를 식물추출물에 전적으로 의존하고 있다는 것은 천연물의 의약품 자원으로서의 중요성을 반증하는 것이며, 또다른 통계에서도 근래 20년간 개발된 877종의 의약품 중 약 61%가 천연물, 또는 천연물을 기반으로 하는 의약품이다.
- 대사성 증후군의 치료 후보물질을 개발하는 과정에 있어서 중요한 것은 안전성이다. 대사성 증후군은 질환의 발생과 더불어 병의 진행기간 동안 지속적인 약물의 처리가 필요한 관리형 질환이다. 그러나 현재 개발, 판매되고 있는 대부분의 약물의 경우 정도의 차이는 있으나 대

부분 부작용을 갖고 있다.

- 천연물로부터 건강기능성 식품 소재 및 의약품 소재 개발을 위해서는 소재의 기능성에 대한 과학적 근거를 명확히 규정하여야 할 것이며, 과학적 근거에 의해 올바른 생리조절 기능을 표현하게 하여 구체적인 유용성을 표시하도록 하는 필요성이 대두되고 있다.
- 데일리 식생활 천연소재는 오랜 기간 동안 섭취해왔으며, 효능과 안전성을 확보하고 있어 제품개발의 용이 및 소비자에게 친숙한 소재이므로 마케팅에서 유리한 장점을 가진다.
- 생명과학의 세포신호전달계 기초연구와 약학의 응용연구를 융합한 학제 간 교육과 연구를 통하여 NASH 질환제어 target의 발굴 및 작용기전 규명과 동물 모델을 이용한 target 물질의 검증을 통하여 NASH 질환 제어 데일리 식생활 천연 소재 발굴의 원천 기술 체계를 구축 할 수 있으며, 이러한 결과물들은 교육적, 인적 및 기술적 신약 개발 인프라를 구축하여 과학기술의 국제적 경쟁력 증대에 기여할 것이다.
- 본 연구에서는 지방축적에 의한 NASH(비알코올성 지방간염) 질환 유발에 관여하는 대사체 조절 마커 및 신호전달체계에 대한 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 규명을 통해 NAFLD (비알코올성 지방간질환) 제어 천연소재를 개발하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내 연구 현황

- 최근에는 지질대사이상에 의한 지방축적과 대사과정의 조절을 통한 대사성질환 연구로, 비지방조직 (간, 근육, 췌장, 심장)에서의 지방축적에 기인한 지질 독성 (lipotoxicity)이 대사성질환의 주된 병태 생리를 설명하는 기전으로 알려진 인슐린저항성(insulin resistance)과의 관련성이 알려지면서 지질의 섭취, 대사, 축적, 연소 등의 기능조절 연구가 대사성질환의 새로운 핵심 연구 분야로 부각되고 있다.
- 혈중 지방산은 세포 내에서 산화 과정을 거쳐 에너지로 소모되고 남은 잉여분은 중성 지방의 형태로 조직 내에 축적되게 된다. 지방산의 산화과정은 세포내 acetyl CoA, malonyl-CoA, citrate 등과 같은 지방산 대사의 중간물질이나 glucose 대사산물간의 상호 연결고리를 통해 carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1), AMPK, acetyl CoA carboxylase (ACC), malonyl-CoA decarboxylase(MCD)등의 효소작용과 연관되어 조절되고, 지방산합성은 fatty acid synthase (FAS), 중성지방 합성은 diacylglycerol acyltransferase 등의 효소와 관련되어 있다.
- 이들 대사들은 다양한 기전에 의해 상호 조절되어 항상성을 유지하는 데, 어떤 요인, 즉, 유전적, 환경적, 비만, 고지혈, 음식, 약물 등에 의해 대사장애가 일어나면 세포수준에서 인슐린저항성이 초래 된다. 어떤 원인으로든 지방산 산화에 장애가 발생하면 fatty acyl CoA나 중성지방 등이 세포 내에 축적되며, 이는 외부의 신호전달체계에 이상을 초래하여 인슐린 표적장기에서의 인슐린 저항성을 일으키며 결국 지질독성 (lipotoxicity)를 유발하게 되어, 각 조직의 기능 이상, 심근, 동맥내피세포, 췌장 베타세포의 기능 이상이 발생하게 된다.
- 심혈관계질환 등 대사성질환 환자가 급증하는 가운데 콜레스테롤과 중성지방을 낮출 수 있는 기능성 제품으로 파마넥스사의 콜레스틴이 출시된 후, 홍국을 주원료로 한 하이포콜(서울제약)과 로스테롤 (렉스진바이오텍)을 출시하였으며 유진사이언스에서는 식물스테롤을 물에 녹일 수 있는 기술을 개발하여 식물스테롤의 주성분으로 ‘유콜’이 함유된 ‘콜제로’를 음료 형태로 출시한 바 있다.
- 한국-핀란드 합자회사인 라이지오케미칼 코리아에서는 소나무 목정에서 추출한 식물스테롤을 사용한 ‘베네콜’을 준비하고 있으며, 기능성식품 전문업체인 N&K는 혈진증 예방 기능성 식품인 ‘나토키나제’를 출시 하였다. 이외에도 선인장이나 한약제 등에서 추출한 천연성분을 활용한 기능성 식품이 속속 개발될 예정으로 기능성 식품에 이어 기능성 음료 등도 출시되는 등 점차 시장 규모가 확대되고 있다
- 국내 의약품 특허의 동향을 살펴보면 고지혈증 치료제 분야의 경우, 물질특허 제도가 도

입된 1987년부터 출원 건수가 증가하다가 90년대에는 연간 10여건 정도의 출원 건수를 나타내고 1997년에는 20건 이상 2000년에는 44건으로 특허출원 건수가 급격히 증가하는 추세에 있다. 출원인의 국내/국외별 분포를 보면 국내 출원인이 33%를 차지하고 외국 출원인이 67%로 미국과 일본이 각각 25%, 21%를 차지하고 있다.

- 정부가 2016년까지 10년간 총 19조 1,557억 원(연 14.8% 증가)을 생명공학 사업 확대와 신규 사업에 투자해 2조 4,000억 원의 시장을 60조 규모의 시장으로 확대시켜 생명공학 분야 세계 7위의 기술 강국의 '바이오 경제'를 구현할 방침이라고 밝혔다.
- 특히 농·축산 식품 분야의 경우 향후 생명과학을 바탕으로 고유의 핵심기술 개발을 통한 원천 기반기술 강화와 분자 육성과 지식 기반을 통한 고부가가치 동식물 생산, 질병 예방 및 조기 치료가 가능한 세계적 기능성 식품 개발을 중점적으로 추진해 나갈 예정이다.
- 추진 전략으로는 △농업생명공학 연구의 유용 원천기술 개발 및 농업생물자원의 다양성 확보와 활용을 위한 공동 연구 확대 △영양 유전체학을 활용한 개인 맞춤형 기능성 식품 개발 및 전통 발효 식품의 고기능화 표준화 기술 개발 △실용화를 위한 GM 작물에 대한 안전성 평가 기반 확립 및 기능성 활성 물질의 체계적 임상시험 기반 구축을 꼽았다.
- 국내 연구팀이 전통 한약재 속에 들어있는 비만, 당뇨 억제물질을 찾아냈다. 서울대 생명과학부 김재범 교수와 생명공학연구원 오원근, 이철호 박사팀은 호주 가변 연구소의 데이비드 제임스 박사팀과 공동으로 국내 일부 자생 약용식물에 함유된 '베르베린(berberine)'이 항비만 및 항당뇨병 효과를 가지고 있다고 밝혔다. 베르베린 성분은 한국과 중국 등 동양의 학에서 지난 수백년동안 항균 작용과 설사, 감염 등의 치료제로 사용되어 왔다.
- 농촌진흥청과 부경대학교의 공동 연구로서 누에에 함유된 DNJ(Doxynojirimycin) 성분이 기존의 당뇨치료제 아카보스와 거의 동일한 혈당 강하효과가 있다가 입증된 항당뇨 음료가 상품화되어 본격적으로 시중에 출시하였다.
- 아미코젠(주)는 천연물(두부순물, 캐롭)에서 혈당 강하 효과 및 당뇨합병증 예방효과가 있는 피니톨 생산기술 개발하였다.

제 2 절. 국외 연구 현황

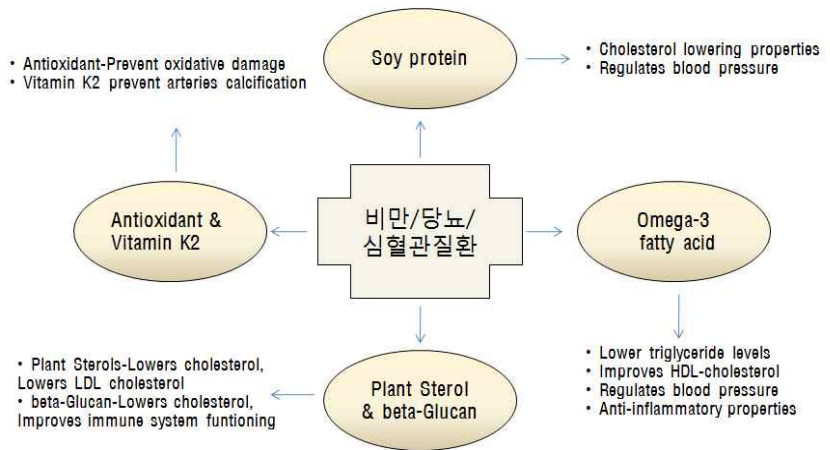
- 현재 전 세계 의약품시장은 약 300조원에 달하고 있으며 대사성질환용 의약품은 약 40조원에 달하고 있고 연간 10% 이상 성장하고 있다. 특히 중성지방과 콜레스테롤 등 혈중 지질을 낮추려는 의약품 분야는 연간 20% 이상의 고성장을 기록하고 있다. 따라서 경제적으로 보았을 때 대사성질환 관련 질환 예방, 치료제 분야는 커다란 산업을 형성하고 있으며 세계에서 가장 많이 판매되는 의약품 20개중 6개가 대사성질환용 계열 치료제이며 이 분야에 연구개발 활동이 집중되어 있다.
- 전체 대사성질환 질환 중 현재는 고혈압 치료제가 주종을 이루고 있으나, 가장 성장이 빠른

분야는 고지혈증, 제2형 당뇨, 항 비만제로 볼 수 있다. 이상과 같이 대사성질환용 의약품 개발 연구는 현재 혈중 중성지방, 콜레스테롤 저하제등 고지혈증 치료제 연구가 가장 활발하며 여러 종류의 신제품들이 앞으로 큰 시장을 점유할 것이며 이 분야의 제품개발에 주력하면 세계시장 진출이 가능하고 국가경쟁력이 크게 올라갈 수 있을 것으로 사료된다.

- 최근 세계적으로 의료비가 늘어나고 있는 주요 원인의 하나로 세계보건기구(WHO)가 비만을 지목한 것으로도 알 수 있듯이 비만은 이제 건강의 가장 무서운 적이 되고 있다. 식품 시장에서도 체중 감량 효과가 있는 소재들이 주목받고 있는 상황이다.
- 그 중 가장 주목받고 있는 체중 감량 소재의 하나가 공액리놀레산(Conjugated Linoleic acid-CLA)이 있다. Frost & Sullivan사에 따르면 2006년이 세계 CLA 시장 규모는 6,540만 달러였으며 2013년엔 1억 99만 달러에 달할 것으로 예상되고 있다. 세계 CLA 시장은 지역적으로는 미국과 유럽이 85%를 차지하고 있다. 아시아 시장은 일본 말고는 아직 규모가 모두 작다. 아시아 시장의 75%는 일본임. 그러나 최근 중국 한국 태국이 성장 잠재성이 있는 시장으로 유망 시 되고 있다.
- 대사성증후군(metabolic syndrome, syndrome X), 인슐린 저항성 증후군이란 비만 고혈압 당뇨병(당대사이상포함, 이상지혈증 (중성지방상승 고밀도 콜레스테롤감소), 고혈압 등의 여러 질환이 복합적으로 나타나는 질환으로 정의할 수 있으며 이들 대사성증후군은 최종적으로는 인간의 주요사망 원인인 동맥경화성 심혈관계질환 (atherosclerotic cardiovascular disease, CVD)를 초래하는 원인질환이다.
- 대부분의 심혈관 질환은 생활패턴의 변화와 식습관 등과 관련된 변화와 관련된 것이다.

따라서 예방적 치료제의 목적은 심장질환의 발생 가능성을 낮추는 것이라고 할 수 있다. 미국의 심장의협회에 따르면 심혈관질환으로 인한 사망률이 전체 사망자의 36%를 차지하고 있으며, 약 8백만명의 심혈관 질환환자가 존재한다고 함. 이러한 심장질환 환자에 대한 의사의 처방 중 약 72%가 건강기능보조식품을 권장하는 것이었다 (그림 2 참조).

관련 기능성 식품 소재>



<그림 2. 비만/당뇨/심혈관 질환

- 이러한 보조제 중 대표적인 것들은 multivitamins, omega-3, vitamin C, fiber, phytosterols, B vitamins, coenzyme Q10 (CoQ10)등이 있다. 이들 비만 및 당뇨를 포함한 심혈관 관련 보조제의 미국내 시장 규모는 2008년에 약 5억 6천만 달러, 연평균 예상 성장률은 약 20%로

추정되고 있다. 콩 단백질의 경우는 phytoestrogen이 매우 풍부하며 콜레스테롤 수치를 낮춰주며 lipoprotein산화를 방지하는 역할을 할 뿐만 아니라 콩 섬유질과 함께 작용할 경우 심장질환의 핵심위험요인인 homocysteine을 저감시켜주는 효과는 가지는 것으로 알려져 있다. 오메가 3 Fatty Acid는 건강을 유지하는데 필수적인 지방산이긴 하지만 인간의 몸에서 생성되지 않는 물질임. 오메가 3는 대양어류나 대양 미세조류, 그리고 특정한 도토리나 식물성 기름에서 얻어짐. 오메가 3 중 EPA나 DHA는 어류에서 나오지만 ALA는 식물에서 추출하는 것이 일반적이다.

- 오메가 3는 triglycerides는 줄여주는 반면에 high-density lipoprotein(HDL) cholesterol의 수치는 높여주는 것으로 분석되었으며 고혈압 예방 및 동맥경화를 불러일으킬 수 있는 arrhythmias의 위험 역시 저감시켜 주는 것으로 분석되었다. 그러나 대개의 오메가 3가 열, 빛, 산소에 대단히 민감하게 반응하기 때문에 마이크로인캡슐레이션 기술에 대한 의존성이 매우 높으며 마이크로인캡슐레이션 기술 덕분으로 인해 오메가 3의 활용 가능성과 그 범위가 획기적으로 확대되었다.
- 식물 스테롤/파이토스테롤은 식물, 채소, 견과류 등에서 추출되는 것으로서 콜레스테롤과 비슷한 분자구조/기능을 가지고 있다. 파이토스테롤은 콜레스테롤 합성을 방해함으로써 전체 콜레스테롤 수준을 낮춰주는 역할을 한다. 비타민 K는 수용성 비타민 그룹에 속해 있으며 칼슘의 침전을 막고 정상적인 피의 응고를 돕는 기능을 가짐. 비타민 K는 인체내에서 합성되지 않으며 치즈나 일본의 콩발효 식품인 낫토 혹은 한국의 청국장을 통해서 섭취된다.
- 안티옥시단트는 항산화제로서 많은 음식물들 속에 함유되어 있으며 비만 및 당뇨를 예방하고 혈류의 흐름을 촉진시켜주는 기능을 제공한다.
- 비만 및 당뇨로 인한 심혈관계의 건강에 관한 소비자들의 관심이 지속적으로 증가하고 있으며, 비만 및 당뇨 질환 환자의 지속적 증가로 인해 이 영역에서 건강기능식 시장의 성장성은 매우 높다. 그동안 비만 및 당뇨 관련 건강기능식에는 파이토스테롤, 베타글루칸, 콩단백질, 그리고 오메가 3 등이 널리 사용되어 왔으며, 최근에는 Inulin, Oligofructose, 그리고 Pomegranate의 효능에 주목하여 제품화하려는 시도가 진행되고 있다 (표. 1참조).

< 전 세계 시장에 판매되고 있는 기능성 식품과 의약품들의 예 >

Food	Target	Drugs
Enriched with Phytosterol–stanolesters	Low density lipoprotein cholesterol	Statins, ezetimibe
Containing bioactive peptides	Blood pressure	Antihypertensive drugs (such as thiazide diuretics)
Containing melatonin	Quality of sleep	Benzodiazepines
Containing omega 3 fatty acids	Depression	Antidepressants
	Triglycerides	Fibrates
Containing β glucan	Blood sugar values	Insulin, oral hypoglycaemic drugs
	Low density lipoprotein cholesterol	Statins, ezetimibe
Containing prebiotics	Bowel frequency	Laxatives
Containing probiotics	Immune functioning	
	Diarrhoea (wet stools)	Loperamide
	Crohn's disease (under investigation)	Mesalazine, corticosteroids
Containing extra calcium or vitamin D or both	Bone health	Alendronate, calcitonin, oestrogens
Containing protein r bioactive peptides	Obesity and type 2 diabetes	Orlistat, rimonabant
	Appetite	

(출처 : 기능성 식품에 대한 근접평가, 식품연구원)

표 1. 세계시장에서 판매되고 있는 기능성 식품과 의약품들의 예 (자료출처: 식품연구원; 기능성 식품에 대한 근접평가)

- 비만 억제 : 1983년 개인 발명가에 의해 '식물성 단백 인조미' 특허출원, 1987년 스웨덴의 아코뤼케메델 에이비 비른 올란더의 '비만치료용 장용성 제제' 특허출원 등 비만 관련 식품 류나 의약품에 대한 연구가 활발하며 특히 비만 관련 식품 기술에서도 식품의 영양 개선, 다이어트 식품에 관련된 기술 연구가 활발히 진행되고 있다.
- Dietary fiber 식품 : 다이어트 식품에 사용되는 주요 소재를 작용기전에 따라 구분하면, 섭취량 조절(식욕 억제)용 소재는 hydroxycitric acid(HCA), 페닐알라닌, 식이섬유소, 녹차추출물, 트립토판, 렙틴 등이 있다. 지방흡수 억제용 소재는 키토산, 글루칸이, 지방합성 억제용 소재는 HCA, L-카르니틴, L-카르니틴과 HCA 병용, pyruvate, conjugated linoleic acid, synephrine, raspberry ketone 등이 있다. 대사활용화 소재는 HCA, CLA, DHEA, guarana, 녹차추출물, 중쇄 트리글리세리드, capsacin, synephrine, 렙틴 등이 있다. 기타용 소재는 HCA, L-카르니틴, chromium, 식이섬유소, fructan, β-glucan, CLA 등이 있다.
- 최근 예방의학 차원에서 건강에 도움이 되는 천연 식품성분들을 공급하여 질병을 예방하고 최적의 건강을 유지하려는 노력이 증대되고 있다. 이는 현대사회의 생활습관에서 발생하는 질병을 개선하기위한 차원에서 천연 식품이 의약품을 대체 할 목적으로 사용되고 있기 때문이다.
- 먹는 혈당강화제는 크게 인슐린 분비 촉진제와 인슐린 감수성 개선제로 나뉘는데, 인슐린 분비 촉진제는 설폰요소제(sulfonylurea)와 메글리티나이드(meglitinide)계가 있고, 설폰요소제는 흔히 처방되는 약으로, 저혈당 상태를 유발할 수 있다는 것을 제외하고는 큰 부작용이 없는 편이며, 아마릴(성분: 글리메프라이드 glimepiride), 디아미크롱(성분명: 글리클라자이드

gliclazide), 다오닐(성분명: 글리벤클라마이드 glibenclamide) 등이 이에 속한다.

- 인슐린 분비 촉진제의 일종인 메글리티나이드계는 약효가 매우 빠른 제제로 식전에 복용하며, 노보넴(성분명: 레파글리나이드 repaglinide), 파스틱(성분명: 나테글리나이드 nateglinide), 글루펙스트(성분명: 미티글리나이드 mitiglinide) 등이 있다.
- 인슐린 감수성 개선제는 단독으로 복용 시 저혈당이 거의 없는 것이 특징이며, 바이구아나이드(biguanide) 계열 약물인 메트포르민(metformin)과, 치아졸리딘다이온 (thiazolidinedione) 계열의 아반디아(성분명: 로지글리타존 rosiglitazone), 액토스(성분명: 피오글리타존 pioglitazone) 등이 있으며, 그 외에 소장에서 탄수화물 흡수를 지연시키는 글.루코바이(성분명: 아카보즈 acarbose), 베이슨(성분명: 보글리보스voglibose) 등이 있다.
- 최근 신약으로는 혈당을 낮추는 역할을 하는 호르몬인 GLP-1(glucagon-likepeptide-1; 글루카곤 유사 펩티드-1)의 작용을 이용하여 개발된 GLP-1 작용제 (agonist)가 있으며, 익스에나티드(exenatide)와 리라글루티드(liraglutide)가 여기에 해당된다.
- 또한 GLP-1을 신속하게 불활성화시키는 효소인 DPP-4(dipeptidyl peptidase-4; 디펩티딜 펩티데이즈-4)의 작용을 억제하는 DPP-4 억제제(inhibitor)도 최근 개발된 신약이며, 자누비아(성분명: 시타글립틴 sitagliptin), 가브스(성분명: 빌다글립틴 vildagliptin), 삭사글립틴(saxagliptin) 등이 있다.
- 인슐린은 현재 주사약으로 나와 있으며 피하주사로 투여하는 것을 원칙으로 하고 있고, 작용 시간에 따라 투여 방법이 다르며, 먹는 약에 비해서 혈당강하 효과가 더빠르게 나타나고, 먹는 약을 쓸 수 없는 환경에서도 안전하게 쓸 수 있으며 용량의제한도 없지만, 주사침에 대한 거부감, 투여 방법의 어려움 등이 단점으로 꼽힌다.
- 본 연구를 통하여 지방축적에 의한 NASH 질환 유발에 관여하는 대사체 조절 마커 및 신호전달체계에 대한 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 규명을 통해 NAFLD 제어 천연소재를 개발하고자 하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

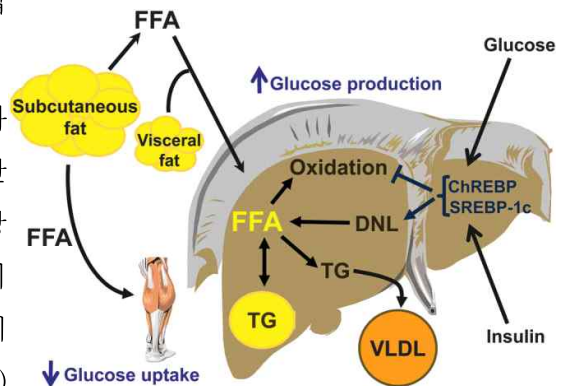
제 1 절: 개똥쑥, 복령 추출물의 비알콜성 지방간 억제효과 연구

1. 서 론

가. AMPK를 타겟으로 한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크 규명

- 과체중과 비만은 인슐린 저항성, 제2형 당뇨, 동맥경화성 심혈관계질환과 비알콜성 지방간, 그리고 여러 형태의 암 을 포함한 다양한 만성질환의 주요 위험인자이다.
- 최근 식생활의 서구화에 따라 영양과다 등의 원인으로 비만이 증가하고 있다. 비만은 동맥 경화증의 위험인자의 하나이고, 또한 당뇨병이나 고혈압 등과도 관련이 있어, 심각한 문제가 되고 있다. 비만은 신체에 지방이 과잉되게 축적된 상태이며, 지방이 체내에 축적되는 원인은 당질(탄수화물)의 과잉섭취 또는 지방을 과잉섭 취 하는데 있다.

- 당질을 과잉하게 섭취함으로써 비만에 달하는 메카 니즘은, 음식물 중에 함유되는 당질이 소화되어 단 당이 되고 소장을 통해 체내로 흡수되며, 혈당이 상 승하여 그 자극으로 분비되는 인슐린이 지방세포에 작용해서 혈액 중의 단당을 지방세포에 받아들여게 해서 지방으로 바꾸는 것이다 (그림. 3)



<그림 3. 지방산에 의한 NAFLD 생성>

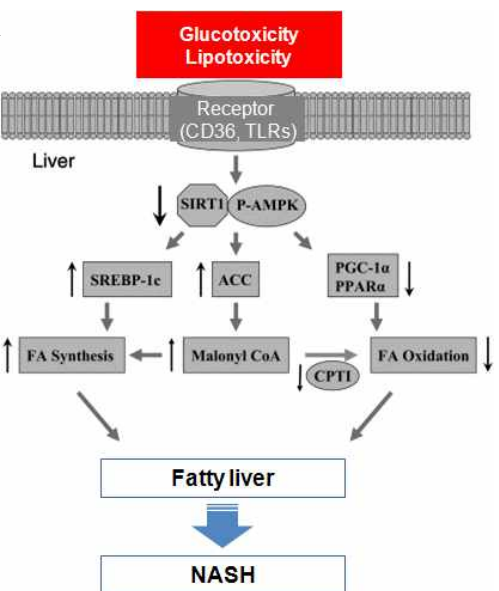
- 또한, 식품성분 중에서 가장 고칼로리인 지방(트리글리세리드)은 췌(膵)리파아제에 의해 분 해되어 소장을 통해 흡수되는 것이며, 섭취 칼로리의 과잉은 저장 칼로리를 증가하도록 작 용하여, 저장 칼로리가 증가되는 결과가 된다. 즉, 과잉 지방섭취에 의해 비만에 달하는 것 이다.
- 그래서, 비만에 달하는 이들의 어떤 경로의 일부분을 저해함으로써, 항비만 작용을 발생시 키려는 생각을 바탕으로 현재 각종 항비만제에 관한 연구가 진행되고 있다. 즉, 당질 과잉섭 취로 비만에 달하는 경로를 저해하는, 당질분해 소화요소 저해작용, 혈당상승 억제작용, 또 는 단당흡수 억제작용에 의해, 혹은 지방 과잉 섭취에 의해 비만에 달하는 경로를 저해하는, 콜산 흡착 배설작용, 콜레스테롤 지하작용, 혈중 트리글리세리드 저하작용, 또는 리파아제 저해작용에 의해 비만을 예방, 개선할 수 있다고 생각되어, 이들 작용을 가지는 의약성분의 연구가 수없이 행해지고 있다.
- 또한, 탄수화물(당질)의 과잉섭취로 인한 급격한 식후 혈당상승과 과도한 인슐린 분비는, 비

만외에도 당뇨병 혹은 고지혈증을 조장한다고 생각되고 있고, 당질분해 소화효소를 저해함으로써, 당뇨병 혹은 고지혈증도 예방, 개선할 수 있다고 생각되고 있다. 더욱이, 고지혈증을 예방하는 것은 동맥경화증 예방의 효과적인 방법의 하나이다.

- 따라서, 당질분해 소화효소 저해제, 단당흡수 억제제 또는 혈당상승 억제제는 항당뇨병제, 항고지혈증제 또는 항동맥경화증제로서 유용하다고 생각되고 있다.
- 비만은 인슐린 저항성 증가 및 제 2형 당뇨의 위험성을 증가시키는 것으로 알려져 왔다. 비만인의 지방조직은 비에스테르성 지방산(non-esterified fatty acid, NEFA), 글리세롤, 호르몬, 염증관련 cytokines 등을 분비하고 이는 인슐린 저항성을 유도하게 된다.
- 당뇨병은 고혈당 상태를 나타내는 여러 질환을 말하는 것으로 당뇨병의 병태생리는 매우 다양함. 일반적으로 인슐린 분비의 절대적 또는 상대적 부족이나, 인슐린 표적세포에서 인슐린의 생물학적 효과 감소로 인하여 발생하는 고혈당 및 이에 수반되는 대사장애가 장기간 지속되는 질환이다. 당뇨가 유발되면 당질대사 및 지질대사 등의 생체내 대사조절기능 이상으로 고혈당증, 고지혈증 및 심혈관계질환 등의 합병증이 생기게 된다.
- 고지혈증에 노출되면 혈액 중 지질성분이 증가하는 상태로 고콜레스테롤혈증과 고중성지방혈증을 유발하며 그 원인으로는 식사조절, 운동부족, 노화 및 환경인자 등의 요인에 의하여 유발된다.
- AMP-activated protein kinase(AMPK)는 protein kinase 의 일종으로 에너지 항상성 조절에 주된 역할을 담당함. AMPK는 heat shock, 저산소증이나 허혈과 같이 ATP가 고갈되어 AMP/ATP 비율이 상승될 때 활성화되는데, 활성화된 AMPK는 여러 하부경로의 기질을 인산화하여 ATP level을 유지하는 목적으로 반응함.

○ AMPK는 지방산 합성에서의 acetyl-CoA carboxylase(ACC)나 콜레스테롤 합성에서의 3-hydroxyl-3-methyl CoA reductase와 같은 생합성 경로에서의 핵심 효소를 억제함으로써 ATP의 추가적 사용을 억제한다.

○ AMPK는 또한 지방산 산화 정도의 증가와 같은 방법들을 지방 대사를 촉진시킴. ACC를 결핍시킨 생쥐에서 지방합성이 감소되고, 지방대사가 촉진되어 먹이 섭취량의 증가에도 불구하고 체중이 감소된다고 보고되었다. 따라서 ACC는 흡수된 영양소를 지방으로 저장할 것인가, 대사로 소모시킬 것인가를 결정하는 중한 인자로 생각되고 있다 (그림 4).



<그림 4. AMPK의 기능>

○ 또한 AMPK 활성을 자극하는 물질인 Metformin 및 5-aminoimidazole-4-carboxamide-riboside (AICAR)는 지방대사를 촉진시킴으로써 간조직

내 지방부하를 감소시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다.

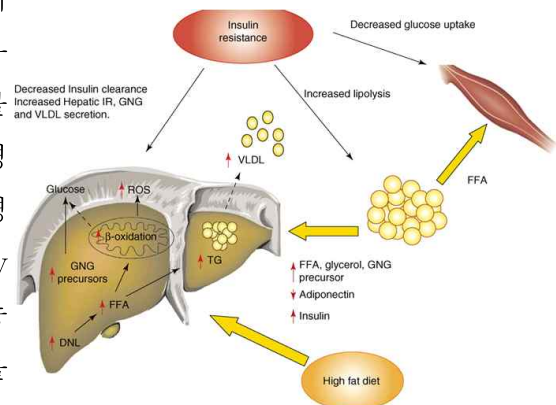
- 고지방 식이가 체중 증가를 일으키는 주요 기전은 lipogenesis (지질합성)을 조절하는 Sterol regulatory element binding protein (SREBP-1)의 발현을 증가시키고, 2 차적으로 이의 산물인 Fatty acid synthase (FASN)와 같은 지질 합성 효소의 발현을 증가시키는 것이다. 또한 AMPK는 SREBP-1를 조절하는 역할을 담당하고 있어 AMPK의 활성화조절은 항비만 치료제 개발의 주요한 이론적 토대가 되고 있다.
- 현재까지 약 300여개의 비만 관련 유전자들이 알려져 있으며, 이들 유전자들은 식욕조절, 에너지산화 조절, 지질대사, 지방세포 분화조절, 인슐린대사 및 염증반응 관련 유전자로 분류된다. 이들 유전자들의 기능은 이미 in vitro 및 in vivo에서 규명된 바 있으나, 비만을 유발하거나 제어하는 식이인자에 의해 in vitro에서 이들 유전자의 발현이 어떻게 조절되는 지에 대한 결과는 아직까지 구체적으로 밝혀지지 않았다.
- 본 연구에서는 간세포에서 1) Fat-overloading 유도 모델 및 NASH 세포모델 확립, 2) 지방합성 효소발현 전사조절인자인 SREBP1/CYP7A1-LXR promoter를 활용한 비알콜성 지방간염 억제 in vitro 스크리닝법 확립을 통한 천연소재 탐색,3) SREBP1 활성 억제 천연 소재의 에너지 대사 관련 신호전달자인 AMPK를 타겟으로 한 분자기전 연구, 4) SREBP1의 타겟 단백질인 FAS, ACC, HMGCR의 발현 영향연구, 5) LKB1, Ca²⁺ 인자의 영향 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 조절 연구 등을 수행하고자 하였다.

나. 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 및 분자기전 연구

- 간은 우리 몸에서 지질 대사에 있어서 중요한 역할을 차지 하나 간 조직에서 지질의 함량은 5%이하로 낮은 편임. 그러나 비만 환자의 증가와 더불어 지방간의 발병률이 지속적으로 증가하고 있다. 지방간은 알코올의 남용이나 유전적 요인에 의하여 발생률이 증가하였으나 최근에는 비만환자의 증가에 의한 비 알코올성 지방간 (non-alcoholic fatty liver, NAFLD)의 발생이 늘어가는 추세이다.
- 동물을 사용한 일련의 실험에서 식이성 지방 함량 증대는 간에서 지방 침착을 증가시킨 것으로 보고되고 있다. 또한, 사람에게서도 비슷한 결과들이 관찰되고 있는데, 2주 동안 지방으로 56% 에너지를 섭취시킨 고지방식을 하였을 경우 간에서 지방 침착이 보고되었고 동일한 개체에게 저지방 식이를 실시하였을 경우 간에서 지방 침착이 제거되었다.
- 비만 및 대사증후군 병태기전 연구 및 치료제 개발을 위해 그동안 30여종이 넘는 동물모델이 개발되어 사용되었으며, 이들은 spontaneous mutant, transgenic mutant, knockout (또는 knock in) 등의 유전자변이 동물모델이 주류를 이루고 있다 (박태선, 2008).
- 그 동안 비만연구에서 주로 사용되어 온 ob/ob 또는 db/db 마우스는 C57 마우스를 대상으로 leptin 또는 leptin receptor 변이를 유발시킨 종으로서 leptin resistance 및 제2형 당뇨병

구를 위해서는 적합한 모델이나, 이러한 단일유전자 변이에 의한 비만이 인체에서 매우 드물게 나타난다는 점에서 인체비만에 적용시키는 데에는 한계가 있다.

- 인체에서 가장 많이 나타나는 단일유전자변이에 의한 비만으로는 식욕억제에 관여하는 MC4-R 유전자변이를 들 수 있고, 전체 비만의 약 4%에 불과함. 인체에서 나타나는 비만의 95% 이상은 환경과 다유전자 간의 상호작용에 의한 복합적인 질병이고, 따라서 식이성비만 및 대사질환의 etiology 및 특성을 파악하거나 또는 비만치료제 또는 기능성식품소재의 체중조절 및 대사질환 개선효능을 평가하는 연구에서는 식이성비만 동물모델이 가장 적합하게 이용될 수 있다 (그림 6 참조).

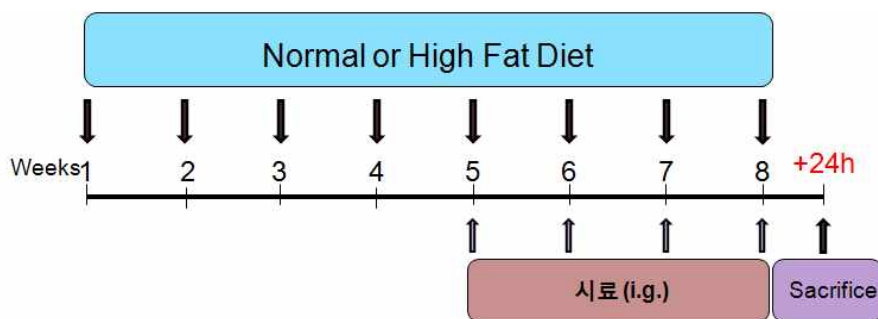


< 그림 6. 식이성비만 유발기전 >

- 식이성비만은 고열량식이 섭취를 통해 유도될 수 있으며, 고열량식으로는 high sucrose diet, high fat diet 또는 cafeteria diet 등이 사용되고 있다. 그 중 실험식이 총중량의 20~40% (w/w)을 지방으로 제공하는 고지방식이 현재까지 인체비만의 표현형을 가장 잘 나타내는 것으로 알려져 있으며, 지방함량이 같더라도 식물성지방에 비해 동물성지방을 지방급원으로 사용하는 경우 내장지방 축적 및 대사질환을 더 효율적으로 유도시킨다.
- 본 연구에서는 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 발현 및 분자기전 연구를 위해 1) 비알콜성 지방간염 동물 모델에서 원인 대사체 조절 마커 및 유전자 탐색, 2) 동물 모델에서 비알콜성 지방간 대사 조절 및 기전 연구 (SREBP1, AMPK 활성화 및 FAS의 발현조사, 3) 비만, 인슐린저항성 개선 등의 위험인자 교정을 통한 지방간 개선을 평가하고자 하였다 (실험쥐의 몸무게 변화 및 간조직의 무게 변화 측정, Cholesterol, TG 측정 및 혈당측정 등).

2. 재료 및 방법

- **열수 추출물 제조** : 건조된 개똥썩 및 복령을 각각 100 g씩 증류수 1000ml에 넣고 30분간 끓인 뒤 4000 rpm에서 5분간 원심 분리한 상등액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하고 15 ml 무균시험관에 소분하여 영하 20 $^{\circ}\text{C}$ 냉동보관 하면서 실험에 사용 하였다. 상기 약초는 경남 생약협동조합에서 구입하였다.
- **MTT assay**: 세포를 48-웰(well) 미량역가판(microtiter plate)에 세포농도 5×10^4 cells/ml로 조절하여 500 μl 씩에 넣은 다음 약초 추출물(복령, 개똥썩) high glucose (30 mM)를 처리한 다음 48 시간 배양하였다. 배양액을 교환한 후 MTT 표지시약(labeling reagent)에 EC(electron coupling reagent)를 첨가하여 준비한 MTT 표지 혼합액(labeling mixture)을 각 웰당 10 μl 씩(최종농도 0.5mg/ml) 1시간 처리한 후 550 nm 파장에서 흡광도를 이용하여 세포 독성을 측정하였다.
- **배양액 내 Lactate dehydrogenase (LDH) 측정**: 실험에 이용한 천연물 시료의 간세포 손상에 대한 영향을 조사하기 위하여 배지내의 LDH 활성을 측정하였다. LDH 활성은 기질 pyruvate가 lactate로 감소되는 정도를 조사하여 측정하였다. 이 감소는 reduced NADH가 산화되고, 340 nm에서 최대 흡광도를 나타낸다. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 2.7 ml을 cuvette에 넣고 0.1ml culture media를 첨가하고, 0.02 M sodium pyruvate 0.1 ml을 넣은 후, NADH (0.2 mg) 0.1 ml을 첨가하여 잘 섞어준 후 340 nm 흡광도에서 2분 동안 흡광도를 측정하였다.
- **실험동물 및 고지방식이 (High Fat diet; HFD) 동물 모델 확립**: 생후 6-8 주된 SPF(Specific Pathogenic Free) 약 20 g의 mouse (ICR)를 샘타코에서 구입하여 실험동물로 사용하였다. 4 주령의 ICR mice에 고지방식이를 4 주간 투여한 후, 몸무게를 측정하여 몸무게가 증가한 마우스를 선별함. 선별된 마우스에 시료 (개똥썩 및 복령 추출물; 50 mg/kg/day)를 4주동안 구강 투여하였다. 고지방식이 사료는 45%/kcal HFD (Research Diet, New Brunswick, NJ, USA)를 구입하여 사용하였다.



< in vivo 고지방 식이 동물모델 확립 >

- **Cholesterol 측정:** Cholesterol Kit (Enzymatic method)를 이용하여 시료를 농도별로 경구 투여한 군에서 mouse 혈청내의 cholesterol을 측정. 혈청 (4 μ l)에 효소시약(300 μ l)을 가하여 37 $^{\circ}$ C water bath에 15분간 반응시킨 다음 증류수를 Blank로 잡고 Wavelength 550 nm에서 흡광도 (OD)를 측정하였다. 계산식: 혈청콜레스테롤 (mg/100ml) = 300 \times (검체의 흡광도/표준의 흡광도).
- **중성지질 (Triglycerides) 측정:** Triglycerides Kit (Trinder법)를 이용하여 시료를 농도별로 경구 투여한 군에서 mouse 혈청내의 TG를 측정하였다. 혈청 (4 μ l)에 효소시약(300 μ l)을 가하여 37 $^{\circ}$ C water bath에 10분간 반응시킨 다음 1시간 내에 증류수를 Blank로 잡고 Wavelength 500nm에서 흡광도 (OD)를 측정하였다. 계산식: Triglycerides (mg/100ml) = (검체의 흡광도/표준의 흡광도) \times 표준의 농도.
- **체중 및 혈당 측정:** 체중 변화는 식이 개시일을 시작으로 정상군 (Normal Diet; ND), 고지방식이대조군 (High Fat Diet; HFD), 개똥쭉(AAE) 및 복령 (PCE) 추출물을 경구 투여한 고지방식이 (HFD+AAE OR HFD+PCE) 실험군으로 나누어 충분한 양의 사료와 물을 급여하면서 1주일에 2번씩 4주간 측정. 혈당은 실험 종료 시점에 실험동물을 12시간 절식시킨 후 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당계로 측정하였다.
- **FAS, SREBP1, AMPK, p-LKB1-p-CaMKIIa의 활성화 및 상위신호전달 체계 조사 (western blotting) :** 타겟 단백질 발현을 조사하기 위하여 시료를 처리한 세포의 단백질을 분리 후 SDS-PAGE 전기 영동 방법에 의하여 분리된 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane filter로 이동시킨 후 filter를 단백질에 대한 polyclonal 항체를 filter에 가하여 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG를 항체 용액으로 기질로 발색 반응을 통하여 확인 하였다.
- **간 손상시 유리되는 ALT 및 AST 효소활성 측정:** *In vivo* 실험동물의 혈청으로 유리되어 나오는 ALT 및 AST의 양을 측정함으로써 간세포 손상 여부를 확인 할 수 있다. ALT 및 AST의 양은 Reitman-Frankel 방법에 준하여 아산제약에서 kit를 구입하여 측정하였다.
- **Fat-overloading 유도 모델 및 non-alcoholic steatohepatitis (NASH) 세포모델 확립 :** HepG2 간 세포에 고농도의 glucose (30 mM) 및 지방산 0.5 mM (palmitate: oleate=1:1)를 24 시간 처리하여 인슐린 저항성 세포주 및 고지방산 모델을 확립하였다.
- **Nile Red assay: 세포를 4% formaldehyde로 고정을 시킨 후 Nile Red solution (1 μ g/mL)을 90 분간 37 $^{\circ}$ C에서 염색 시켰다. Lipid-bound Nile Red fluorescence was measured using a microplate fluorescence reader (Varioskan, Thermo Electron Co., Vantaa, Finland) by measuring the emission at 530 nm following excitation at 485 nm.**
- **Luciferase 활성 측정:** 지방산 합성효소 (Fatty acid synthase; FASN) 및 SREBP1 유전자의 발현에 중요한 역할을 하는 SREBP1-Luc 벡터 활성화도에 대한 영향을 조사하기 위하여 이들 플라스미드를 세포내로 도입시켜 이들 전사인자 활성화도에 대한 영향을 Transfection

방법을 이용하여 측정하였다.

- **통계 방법** : 실험결과는 평균 \pm 표준편차포 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 student' t-test를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

○ 본 연구에서는 지리산 한방자생식물을 활용하여 지방산 합성 효소 발현을 조절하는 소재를 개발하고자 하였다. 천연물 유래 지방산 합성 효소 발현 조절 소재를 개발을 위해 *in vitro* 및 *in vivo* 동물 실험모델을 활용하여 1) AMPK를 타겟으로 한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크 규명, 2) 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 및 분자기전을 연구하였다.

가. High glucose로 유도된 간세포주에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 비알콜성 지방 간억제효과 및 작용기전 규명

(1) 천연물 시료의 세포독성 측정

○ 인체 간세포 HepG2 세포에서 개똥쑥 및 복령 열수추출물의 세포독성을 실험한 결과 500 μ g/ml의 농도에서도 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1 and 2). 따라서 세포 독성이 나타나지 않는 농도 (500 μ g/ml 이하)에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 효능을 측정하였다. 본 실험에서는 천연물시료의 최고 농도를 100 μ g/ml로 사용하였다.

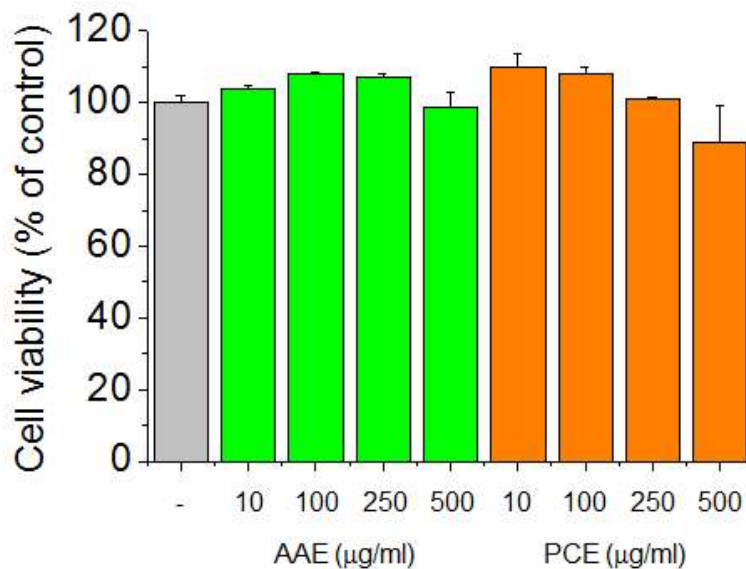


Fig. 1 Effect of AAE and PCE on cell viability. HepG2 cells were grown in serum-free medium overnight and treated with 10–500 mg/ml AAE and PCE for 48 h, and cell viability was determined by MTT assays. Abbreviation: *Artemisia annua* extract; AAE; 개똥쑥 추출물, *Poria cocos* extract PCE; 복령 추출물.

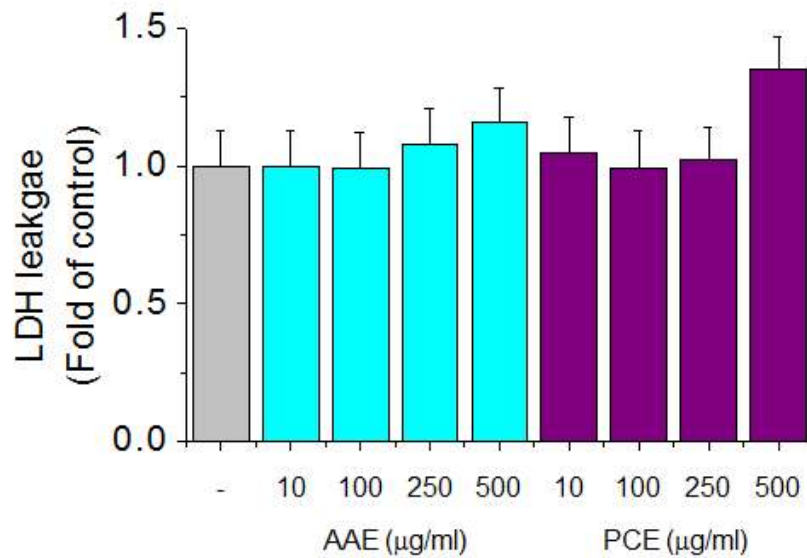


Fig. 2 Effect of AAE and PCE on cell viability. HepG2 cells were grown in serum-free medium overnight and treated with 10-500 mg/ml AAE and PCE for 48 h, and cell viability was determined by LDH release assays. Abbreviation: *Artemisia annua* extract; AAE; 개똥쑥 추출물, *Poria cocos* extract PCE; 복령 추출물.

(2) 간세포에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 지질축적 억제 효과 및 작용기전 연구

- 과체중과 비만은 비알콜성 지방간을 비롯한 인슐린 저항성, 제2형 당뇨, 동맥경화성 심혈관계질환, 그리고 여러 형태의 암을 포함한 다양한 만성질환의 주요 위험인자로 알려져 있다.
- 최근 식생활의 서구화에 따라 영양과다 등의 원인으로 비만이 증가하고 있다. 비만은 동맥경화증의 위험인자의 하나이고, 또한 당뇨병이나 고혈압 등과도 관련이 있어, 심각한 문제가 되고 있다. 비만은 신체에 지방이 과잉되게 축적된 상태이며, 지방이 체내에 축적되는 원인은 당질(glucose, Carbohydrate, 탄수화물)의 과잉섭취 또는 지방 (Fatty acid)을 과잉섭취하는데 있다.
- 당질을 과잉하게 섭취함으로써 비만에 달하는 메카니즘은, 음식물 중에 함유되는 당질이 소화되어 단당이 되고 소장을 통해 체내로 흡수되며, 혈당이 상승하여 그 자극으로 분비되는 인슐린이 지방세포에 작용해서 혈액 중의 단당을 지방세포에 받아들이게 해서 지방으로 바꾸는 것이다 (그림. 3 참조, *Varela-Rey et al. / Int J Biochem Cell Biol.* 2009 May;41(5):969-76).

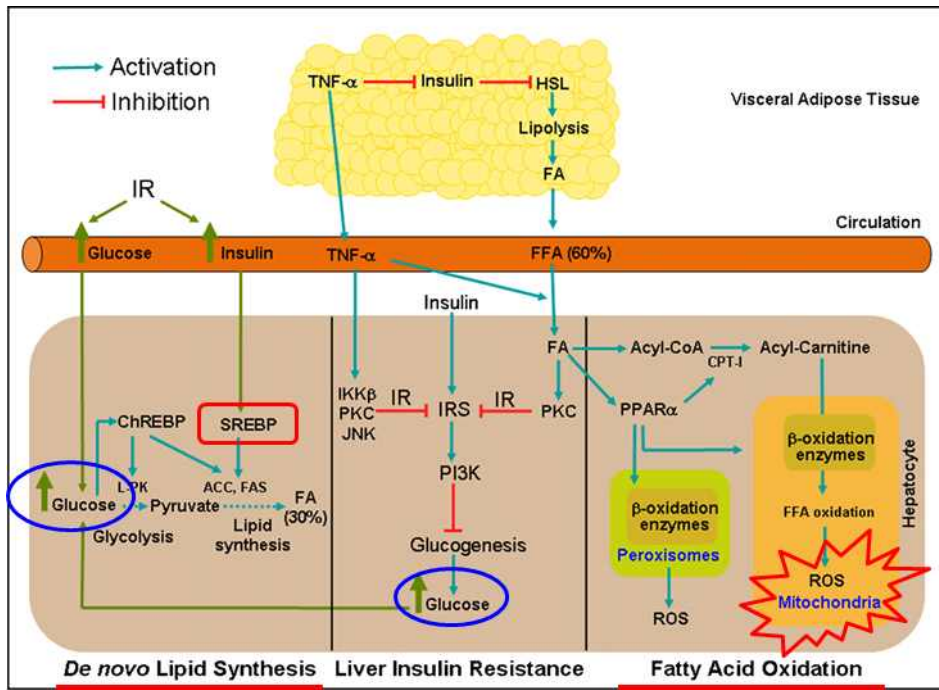


Fig. 3 Development of hepatic steatosis. Obesity is associated with an increase in TNF- α synthesis by VAT. TNF- α induces IR in VAT by increasing lipolysis and FA release into circulation. FFA and TNF- α are delivered into the liver, inducing liver IR. In the liver, TNF- α -induced increase of IKK β , PKC or JNK activity mediates IRS serine phosphorylation, FFA also contributes to liver IR by the activation of PKC- δ , which increase serine phosphorylation of IRS 1 and 2. In NAFLD patients, it has been estimated that 60% of FFA delivered into the liver arise from adipose tissue, 10% from diet and a 30% from de novo lipid synthesis.

- 또한, 식품성분 중에서 가장 고칼로리인 지방(트리글리세리드)은 췌(膵)리파아제에 의해 분해되어 소장을 통해 흡수되는 것이며, 섭취 칼로리의 과잉은 저장 칼로리를 증가하도록 작용하여, 저장 칼로리가 증가되는 결과가 됨. 즉, 과잉 지방섭취에 의해 비만에 달하는 것이다.
- 그래서, 비만에 달하는 이들의 어떤 경로의 일부분을 저해함으로써, 항비만 작용을 발생시키려는 생각을 바탕으로 현재 각종 항비만제에 관한 연구가 진행되고 있다. 즉, 당질 과잉섭취로 비만에 달하는 경로를 저해하는, 당질분해 소화요소 저해작용, 혈당상승 억제작용, 또는 단당흡수 억제작용에 의해, 혹은 지방 과잉 섭취에 의해 비만에 달하는 경로를 저해하는, 콜산 흡착 배설작용, 콜레스테롤 지하작용, 혈중 트리글리세리드 저하작용, 또는 리파아제 저해작용에 의해 비만을 예방, 개선할 수 있다고 생각되어, 이들 작용을 가지는 의약성분의 연구가 수없이 행해지고 있다.
- 또한, 탄수화물(당질)의 과잉섭취로 인한 급격한 식후 혈당상승과 과도한 인슐린 분비는, 비

만외에도 당뇨병 혹은 고지혈증을 조장한다고 생각되고 있고, 당질 분해 소화효소를 저해함으로써, 당뇨병 혹은 고지혈증도 예방, 개선할 수 있다고 생각되고 있다. 더욱이, 고지혈증을 예방하는 것은 동맥경화증 예방의 효과적인 방법의 하나이다.

- 따라서, 당질분해 소화효소 저해제, 단당흡수 억제제 또는 혈당상승 억제제는 비알콜성 지방간 억제제, 항당뇨병제, 항고지혈증제 또는 항동맥경화증제로서 유용하다고 생각되고 있다.
- 비만은 인슐린 저항성 증가 및 제 2형 당뇨의 위험성을 증가시키는 것으로 알려져 왔다. 비만인의 지방조직은 비에스테르성 지방산(non-esterified fatty acid, NEFA), 글리세롤, 호르몬, 염증관련 cytokines 등을 분비하고 이는 인슐린 저항성을 유도하게 된다.
- 고지혈증에 노출되면 혈액 중 지질성분이 증가하는 상태로 고콜레스테롤혈증과 고중성지방혈증을 유발하며 그 원인으로는 식사조절, 운동부족, 노화 및 환경인자 등의 요인에 의하여 유발된다고 보고되어 있다.
- 천연물 시료의 비알콜성지방간 및 비만 개선 활성 평가를 위하여 *in vitro* 간세포에서 비알콜성지방간 세포주를 확립하였다. 인체 간세포인 HepG2 세포에 고농도의 glucose 30 mM을 24간 이상 처리하여 비알콜성지방간 세포주를 확립하였다. 세포주의 확립을 확인하기 위하여 확립된 세포주에서 지질의 생성량을 Nile red assay 법을 이용하여 확인하였다 (Fig. 4). 100% DMSO로 탈색시켜 형광을 측정하였다 (emission at 530 nm following excitation at 485 nm).
- 확립된 *in vitro* 비알콜성 지방간 세포주에서 배양 조건에서 개똥쑥 추출물 (*Artemisia annua* extract; AAE) 과 복령 추출물 (*Poria cocos* extract PCE)의 지질축적 억제 효능을 평가한 결과 고농도 (100 µg/ml)에서 30 mM 고농도의 glucose 처리에 의해서 증가한 지질의 축적이 개똥쑥 추출물과 복령 추출물 처리에 의해서 억제되었음을 확인하였다 (Fig. 4A and B).
- 또한, 고농도의 glucose 처리에 의해서 증가한 triglycerides 및 total cholesterol 함량도 개똥쑥 추출물과 복령 추출물 처리에 의해서 감소하였다 (Fig. 5 and 6).

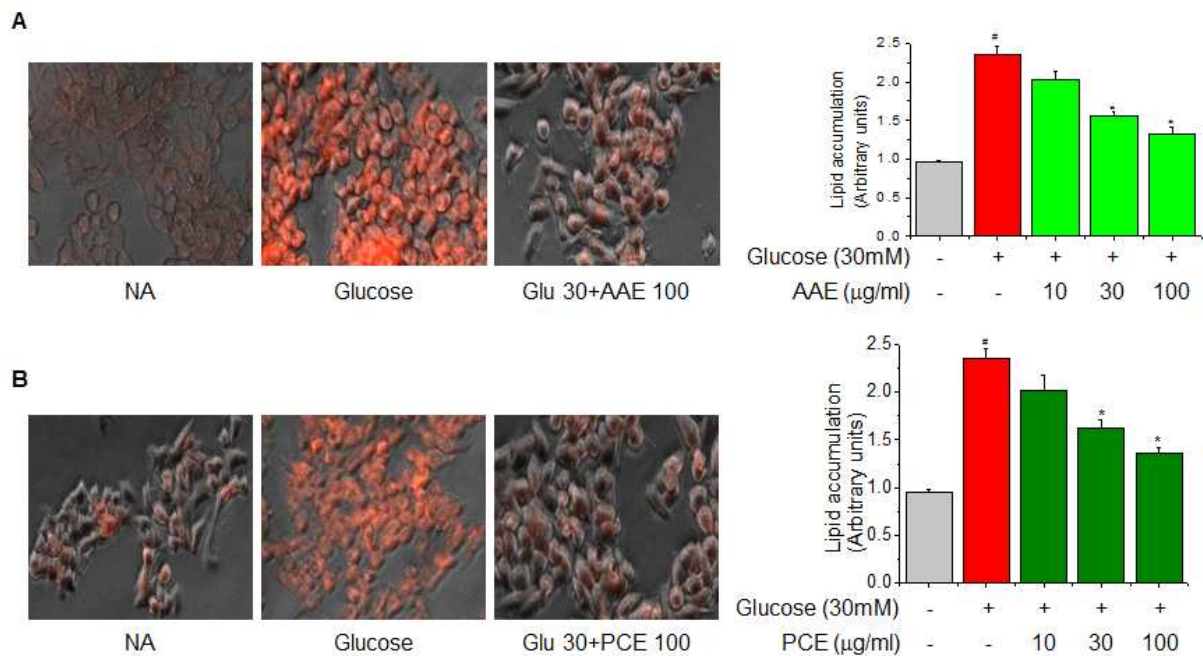


Fig. 4 Inhibition of high glucose-induced lipid accumulation by AAE (A) and PCE (B). HepG2 cells were grown in serum-free medium overnight and incubated in DMEM containing normal (5.5 mM) or high (30 mM) glucose concentrations in the absence or presence of AAE or PCE (10–100 µg/ml) for an additional 24 h. Intracellular lipids were stained with Nile red and assessed by fluorescence, as described in the Materials and methods. # $p < 0.01$, compared with the control. * $p < 0.01$, compared with high-glucose-treated cells.

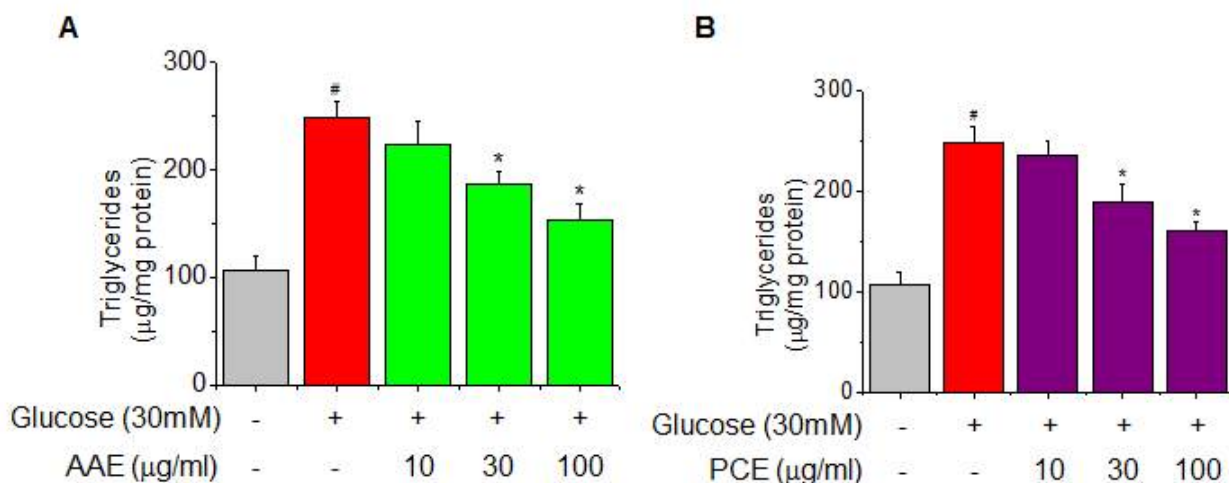


Fig. 5 Effect of AAE (A) and PCE (B) hepatic triglyceride contents in HepG2 cells. HepG2 cells were grown in serum-free medium overnight and incubated in DMEM containing normal (5.5 mM) or high (30 mM) glucose concentrations in the absence or

presence of AAE or PCE (10-100 $\mu\text{g/ml}$) for an additional 24 h. Hepatic triglyceride contents were measured as described in the Materials and methods. # $p < 0.01$, compared with the control. * $p < 0.01$, compared with high-glucose-treated cells.

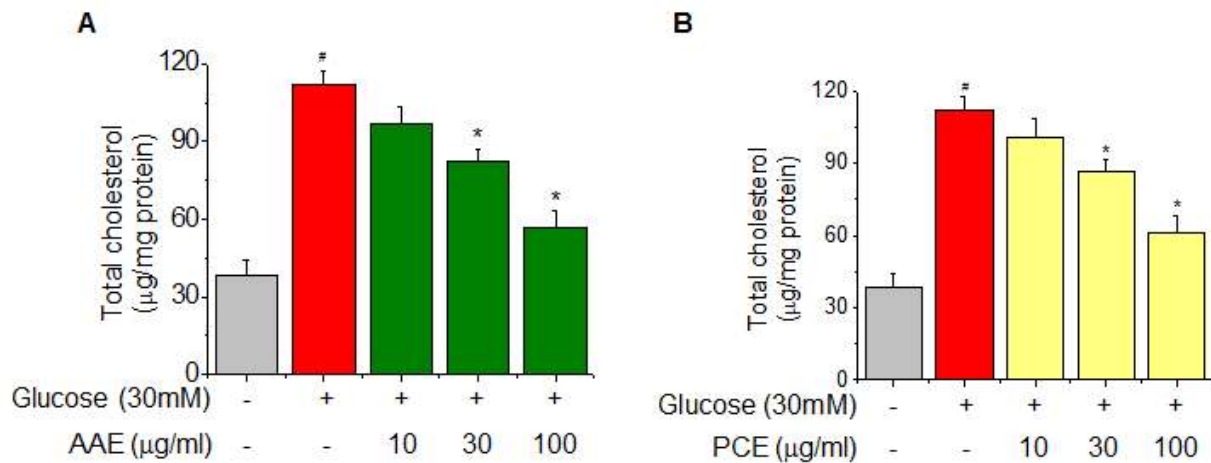


Fig. 6 Effect of AAE (A) and PCE (B) hepatic total cholesterol contents in HepG2 cells. HepG2 cells were grown in serum-free medium overnight and incubated in DMEM containing normal (5.5 mM) or high (30 mM) glucose concentrations in the absence or presence of AAE or PCE (10-100 $\mu\text{g/ml}$) for an additional 24 h. Hepatic total cholesterol contents were measured as described in the Materials and methods. # $p < 0.01$, compared with the control. * $p < 0.01$, compared with high-glucose-treated cells.

- AMP-activated protein kinase(AMPK)는 protein kinase 의 일종으로 에너지 항상성 조절에 주된 역할을 담당한다. AMPK는 heat shock, 저산소증이나 허혈과 같이 ATP가 고갈되어 AMP/ATP 비율이 상승될 때 활성화되는데, 활성화된 AMPK는 여러 하부경로의 기질을 인산화하여 ATP level을 유지하는 목적으로 반응한다.
- AMPK는 지방산 합성에서의 acetyl-CoA carboxylase(ACC)나 콜레스테롤 합성에서의 3-hydroxyl-3-methyl CoA reductase와 같은 생합성 경로에서의 핵심 효소를 억제함으로써 ATP의 추가적 사용을 억제한다.
- AMPK는 또한 지방산 산화 정도의 증가와 같은 방법들을 지방 대사를 촉진시킨다고 알려져 있다. ACC를 결핍시킨 생쥐에서 지방합성이 감소되고, 지방대사가 촉진되어 먹이 섭취량의 증가에도 불구하고 체중이 감소됨이 보고되었다. 따라서 ACC는 흡수된 영양소를 지방으로 저장 할 것인가, 대사로 소모시킬 것인가를 결정하는 중한 인자로 생각되고 있다 (Fig. 7; Luo et al., 2005/ Trends Pharmacol Sci. 2005 Feb;26(2):69-76).

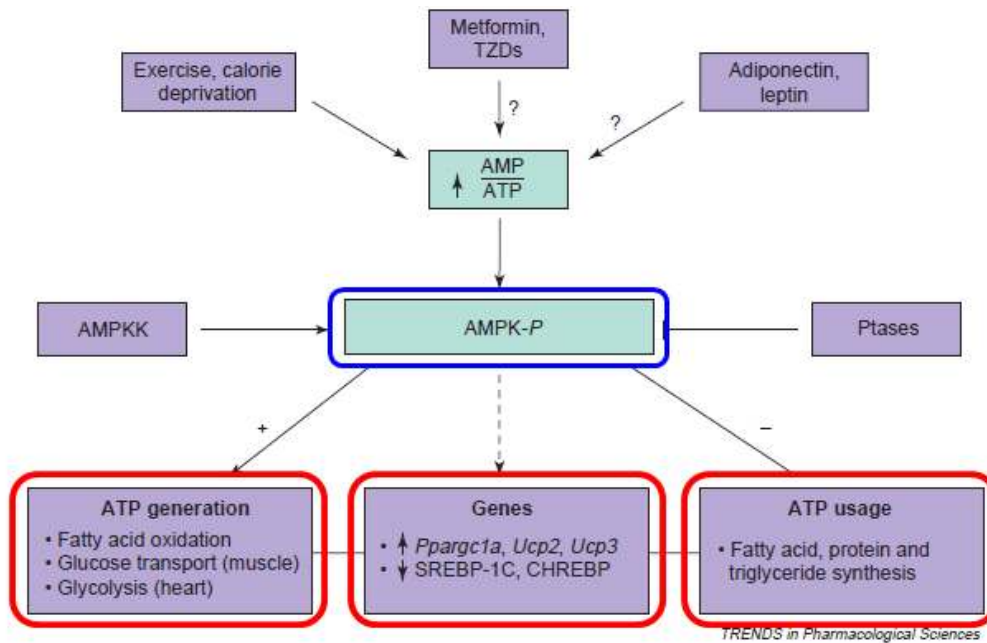


Fig. 7 AMPK activation and cellular energy state. Nutrient deprivation, exercise, hypoxia, AICAR and leptin lead to the activation of AMPK. In addition, depletion of glycogen content leads to a greater activation of AMPK. At least one AMPK Kinase (AMPKK) exists (LKB1), which is insensitive to AMP. AMPK activation stimulates ATP generating processes and inhibits ATP consuming processes.

- 또한 AMPK 활성을 자극하는 물질인 Metformin 및 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribose (AICAR)는 지방대사를 촉진시킴으로써 간조직 내 지방부하를 감소시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다.
- 고지방 식이가 체중 증가를 일으키는 주요 기전은 lipogenesis (지질합성)을 조절하는 Sterol regulatory element binding protein (SREBP-1)의 발현을 증가시키고, 2 차적으로 이의 산물인 Fatty acid synthase (FASN)와 같은 지질 합성 효소의 발현을 증가시키는 것이 일반적인 작용기전으로 보고되고 있다. 또한 AMPK는 SREBP-1를 조절하는 역할을 담당하고 있어 AMPK의 활성조절은 항비만 치료제 개발의 주요한 이론적 토대가 되고 있다.
- 현재까지 약 300여개의 비만 관련 유전자들이 알려져 있으며, 이들 유전자들은 식욕조절, 에너지산화 조절, 지질대사, 지방세포 분화조절, 인슐린대사 및 염증반응 관련 유전자로 분류된다. 이들 유전자들의 기능은 이미 in vitro 및 in vivo에서 규명된 바 있으나, 비만을 유발하거나 제어하는 식이인자에 의해 in vitro에서 이들 유전자의 발현이 어떻게 조절되는 지에 대한 결과는 아직까지 구체적으로 밝혀지지 않았다.
- 본 연구에서는 개똥썩 추출물과 복령 추출물의 지방합성 효소 (Fatty acid synthase; FAS) 및 전사조절인자인 SREBP-1의 활성억제 효과를 측정하였다. 실험 결과, 개똥썩 추출물과 복령 추출물에 의해서 high glucose 처리에 의해서 증가한 FAS 및 SREBP-1c 단백질 발현이 감소함을 확인하였다. (Fig. 8).

- 또한 개똥쭉 추출물과 복령 추출물에 의해서 high glucose (30 mM) 처리에 의해서 증가한 SREBP-1 promoter 활성이 감소함을 확인하였다 (Fig. 9)
- 본 연구에서는 개똥쭉 추출물과 복령 추출물의 FAS 및 SREBP-1c 활성억제 관여하는상위 신호전달체계를 조사한 결과, 개똥쭉 추출물과 복령 추출물에 의해서 지방합성효소의 활성을 억제하는 AMPK 및 ACC의 인산화가 증가하였다 (Fig. 10).
- 개똥쭉 추출물과 복령 추출물이 AMPK 의존적으로 FAS 및 SREBP-1의 활성을 억제하는지를 규명하기 위하여 AMPK 저해제인, Compound C를 시료와 같이 처리하였다. 혈청이 제거된 배양배지에 Compound C를 1시간 전처리후 개똥쭉 추출물과 복령 추출물을 100 μ g/ml 농도로 처리한 후 24 시간 후에 FAS 와 SREBP-1 단백질 발현을 측정하였다. 또한, 세포내 지질의 축적을 Nile Red 형광 시약으로 염색 후 형광과장을 측정하였다. 실험결과, 개똥쭉 추출물과 복령 추출물에 의해 감소한 FAS 와 SREBP-1 단백질 발현이 AMPK 저해제에 의해서 감소하지 않음을 확인하였다 (Fig. 11). 마찬가지로, 개똥쭉 추출물과 복령 추출물에 의해 감소한 지질축적이 AMPK 저해제에 의해서 감소하지 않음을 확인하였다(Fig. 12).
- 위의 결과에서 개똥쭉 추출물의 FAS 및 SREBP-1c의 발현 억제는 AMPK 인산화 pathway를 통해 이루어짐을 알 수 있었다 (Fig. 8-12).

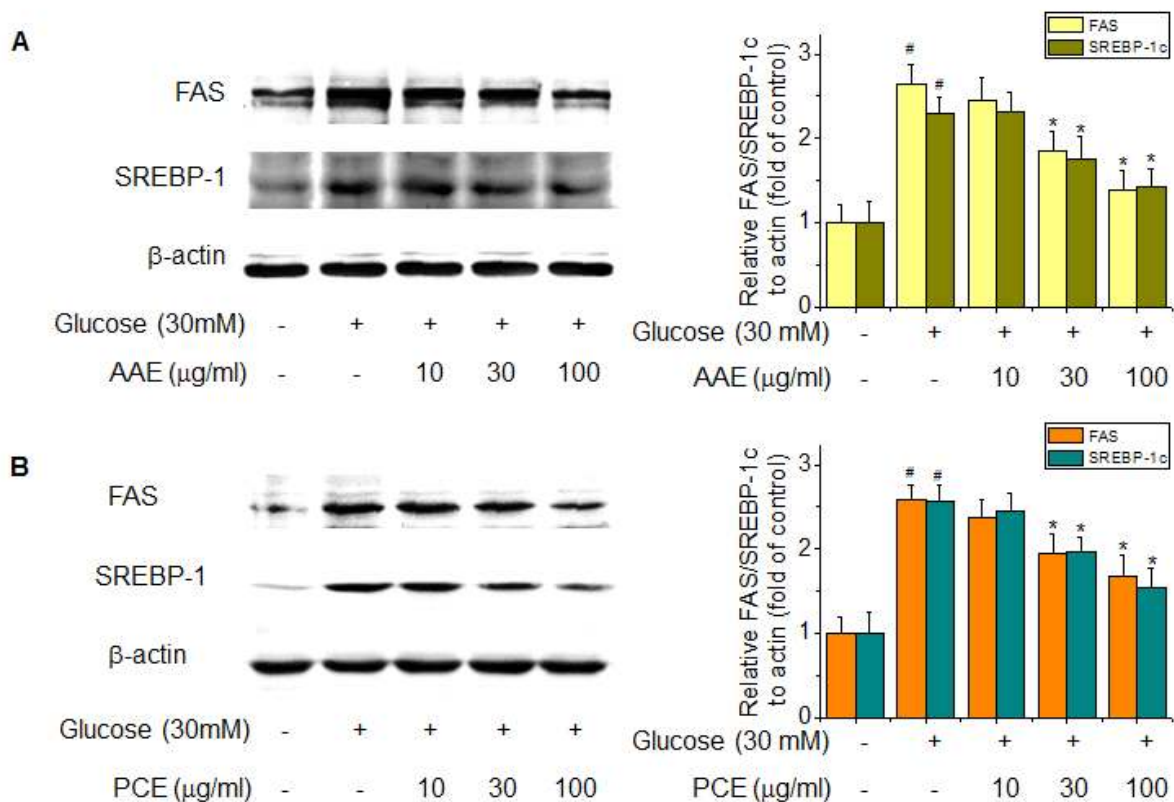


Fig. 8 Inhibition of high glucose-induced SREBP-1c and FAS expression by AAE (A) and PCE (B). HepG2 cells were grown in serum-free medium overnight and

incubated in DMEM containing normal (5.5 mM) or high (30 mM) glucose concentrations in the absence or presence of AAE or PCE (10–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for an additional 24 h. The amounts of SREBP-1c and FAS protein in the cell lysates were measured by Western blotting. # $p < 0.01$, compared with the control. * $p < 0.01$, compared with high-glucose-treated cells.

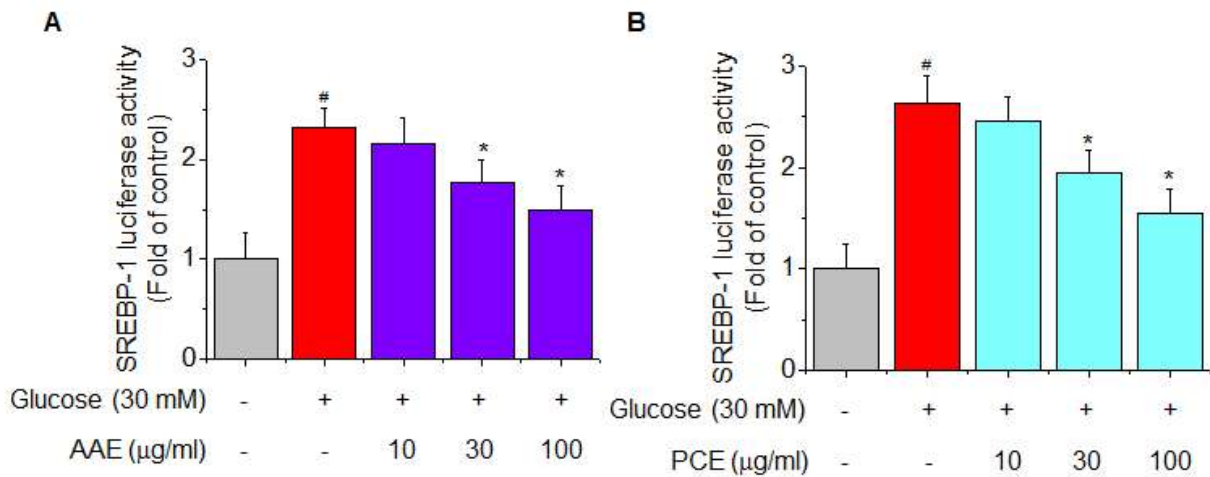


Fig. 9 Effect of AAE (A) and PCE (B) on *SREBP-1* promoter activity in high glucose-treated HepG2 cells. Cells were transfected with a pSREBP-1c-luciferase construct (500 ng/well) and then treated with 30 mM glucose and/or AAE and PCE (10–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After 24 h of treatment, luciferase activity was measured. # $p < 0.01$, compared with the control. * $p < 0.01$, compared with high-glucose-treated cells.

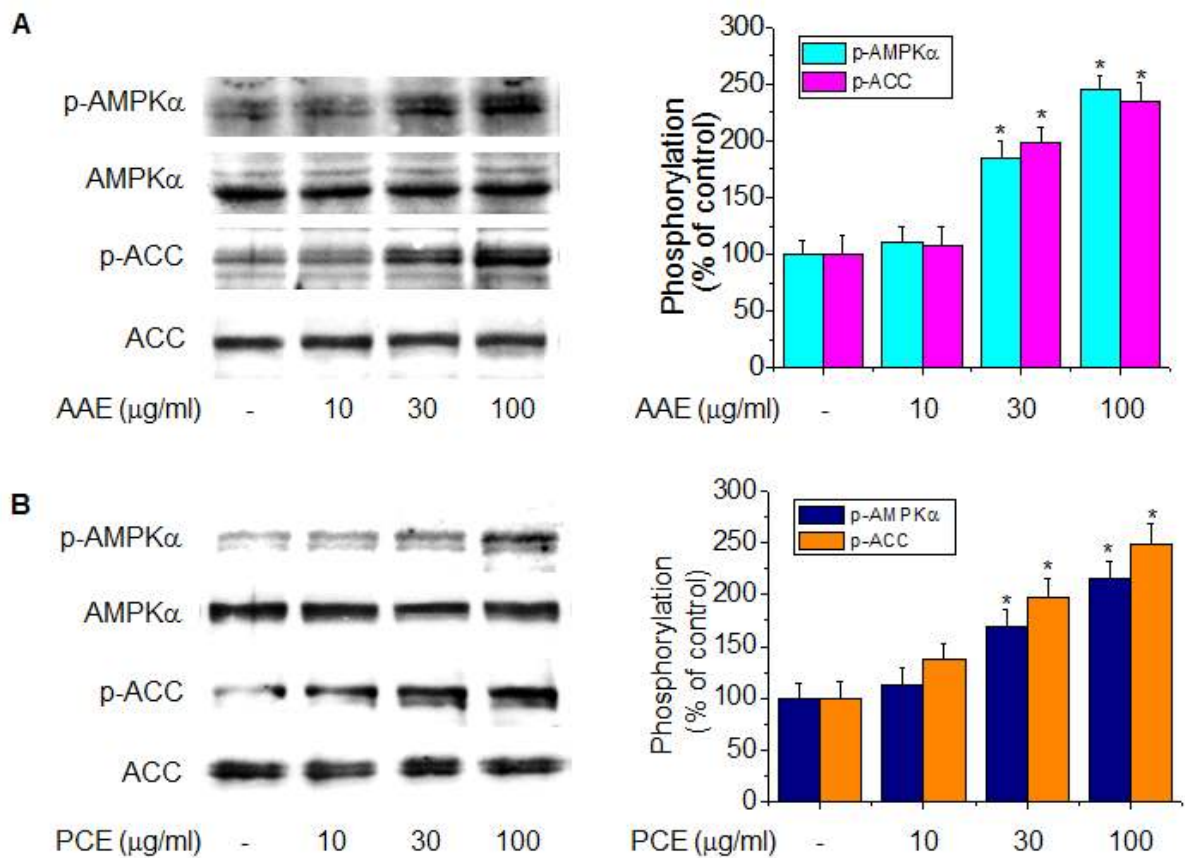


Fig. 10 AAE (A) and PCE (B) activates the phosphorylation of AMPK α and ACC. Western blots were performed on lysates of HepG2 cells that had been treated with various concentrations of AAE or PCE (10-100 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h. AMPK α and ACC were used as protein loading controls. Results are expressed as means \pm SEM of three independent experiments. Band intensities were quantified by densitometry analysis. * $p < 0.01$, compared with the control.

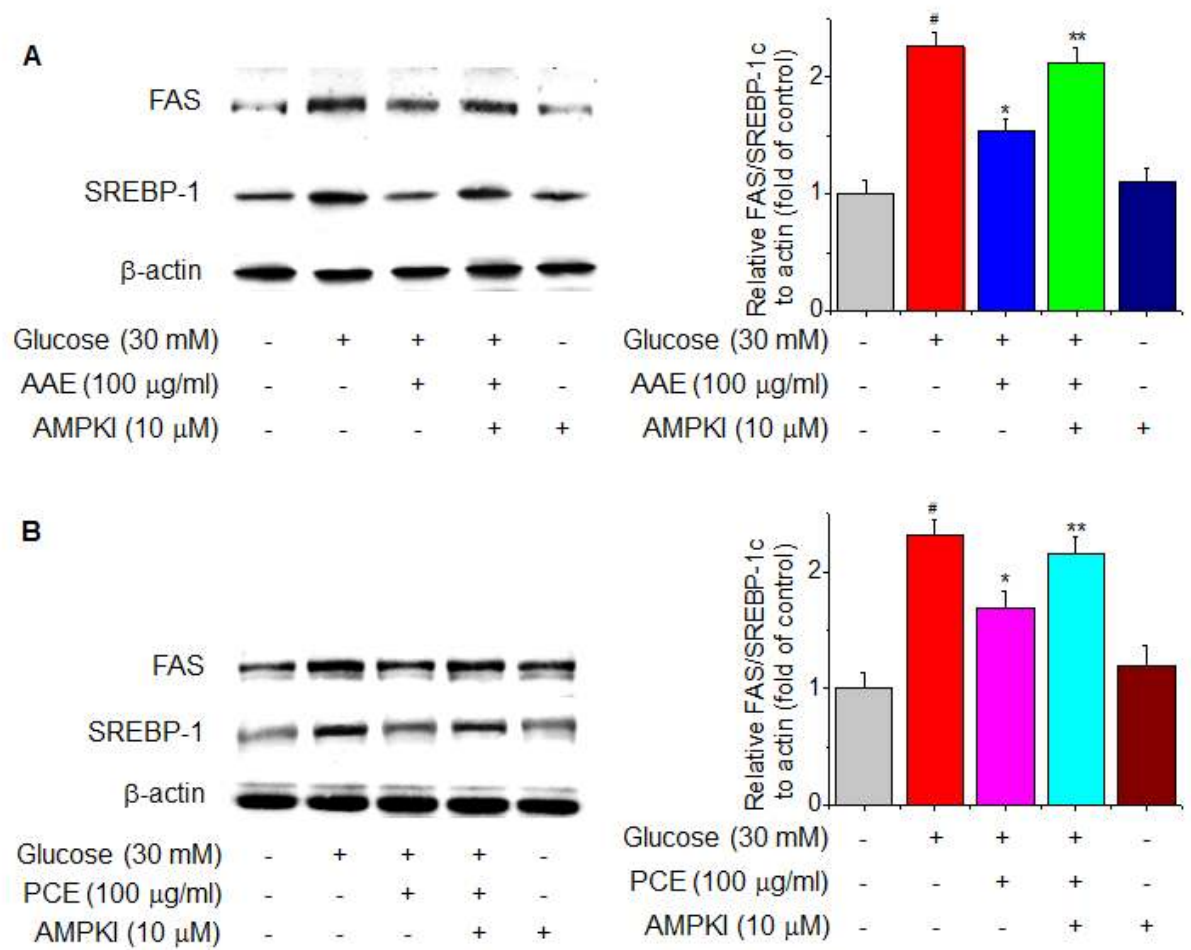


Fig. 11 AAE (A) and PCE (B) prevents protein expression of SREBP-1c and FAS induced by high glucose in an AMPK-dependent manner. HepG2 cells were treated with the AMPK inhibitor, compound C (10 mM), in serum-free medium for 1 h, followed by incubation with or without 100 μ g/ml AAE or PCE for an additional 24 h. Western blot analysis of SREBP-1c and FAS. β -Actin were used as protein loading controls. Results are expressed as means \pm SEM of three independent experiments. Band intensities were quantified by densitometry analysis. # p < 0.01, compared with the control. * p < 0.01, compared with high-glucose-treated cells. ** p < 0.01, compared with high-glucose-plus-AAE or PCE-treated cells.

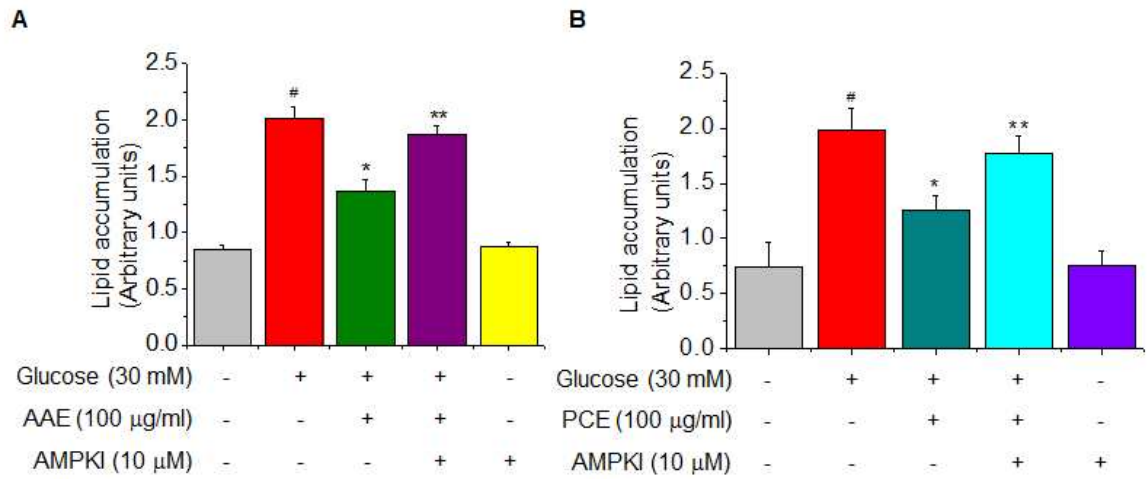


Fig. 12 AAE (A) and PCE (B) prevents high glucose-lipid accumulation in an AMPK-dependent manner. HepG2 cells were treated with the AMPK inhibitor, compound C (10 mM), in serum-free medium for 1 h, followed by incubation with or without 100 µg/ml AAE or PCE for an additional 24 h. Lipid-bound Nile red fluorescence was measured using a microplate fluorescence reader. Results are expressed as means ± SEM of three independent experiments. #*p* < 0.01, compared with the control. **p* < 0.01, compared with high-glucose-treated cells. ***p* < 0.01, compared with high-glucose-plus-AAE or PCE-treated cells.

○ 최근 보고에 의하면 포유류에서 AMPK의 upstream kinases의 신호 전달자로 liver kinase B1 (LKB1) 과 calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CaMKKβ)이 잘 알려져 있다 (Fig. 12). AMPK Thr172 의 인산화에는 LKB1이 관여하는데, 이를 위해서는 AMP의 증가가 필요하나, 반면에 CaMKKβ의 활성화에는 AMP의 농도와 무관하게 이루어짐이 보고되었다 (Fig. 12. Hardie / FEBS Letters 582 (2008) 81 - 89).

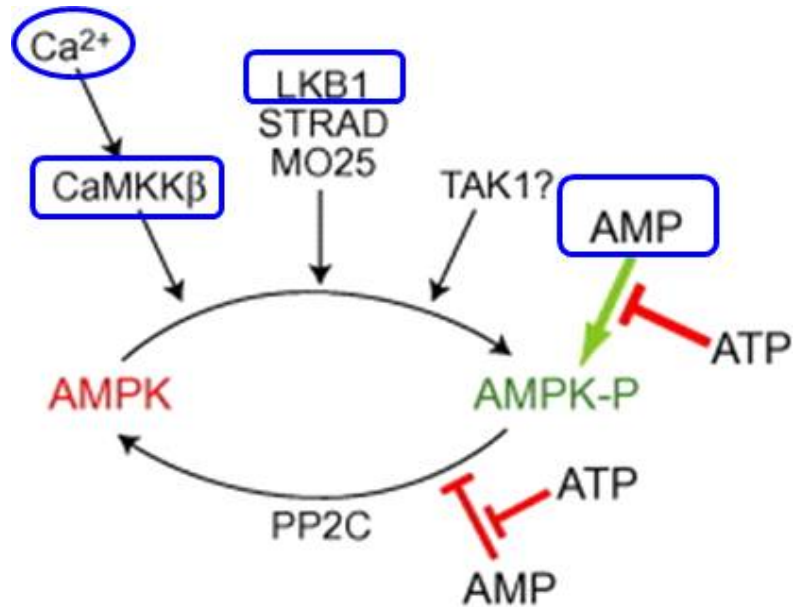


Fig. 13 Regulation of AMPK by AMP, ATP and upstream kinases. While CaMKK β is switched on by a rise in cytosolic Ca²⁺, the LKB1:STRAD:MO25 complex appears to be constitutively active and phosphorylates AMPK constantly. However, under basal conditions the phosphate is immediately removed by PP2C. A rise in the cellular AMP:ATP ratio inhibits dephosphorylation, switching AMPK to the phosphorylated form, which is also allosterically activated by the increase in AMP:ATP ratio.

○ 본 연구에서는 AMPK의 상위 신호 체계를 규명하기 위하여 개똥쑥 및 복령 추출물에 의한 LKB1 과 CaMKK β 의 하위 신호 전달자인 CaMKII α 의 인산화를 측정하였다. 실험 결과에 의하면 개똥쑥 및 복령 추출물에 의해서 LKB1 (Ser428)의 인산화와 CaMKII α (Thr286)의 인산화가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다 (Fig. 13 and 14).

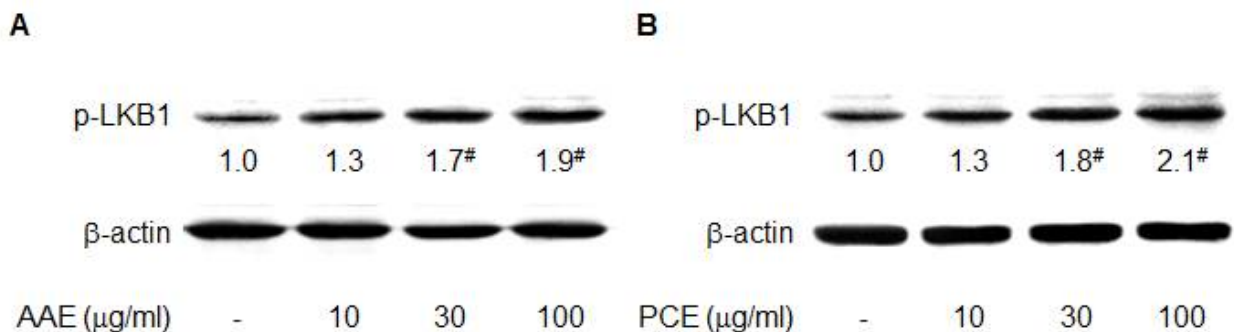


Fig. 14. AAE (A) and PCE (B) activates the upstream kinase of AMPK, LKB1, in HepG2 Cells. Immunoblots were performed on lysates of HepG2 cells that had been treated with various concentrations of AAE or PCE (10-100 μ g/ml) for 1 h. Levels of

LKB1 (Ser428) phosphorylation in the cell lysates were measured by Western blotting. Results are expressed as means \pm SEM of three independent experiments. Band intensities were quantified by densitometry analysis. # $p < 0.01$, compared with the control.

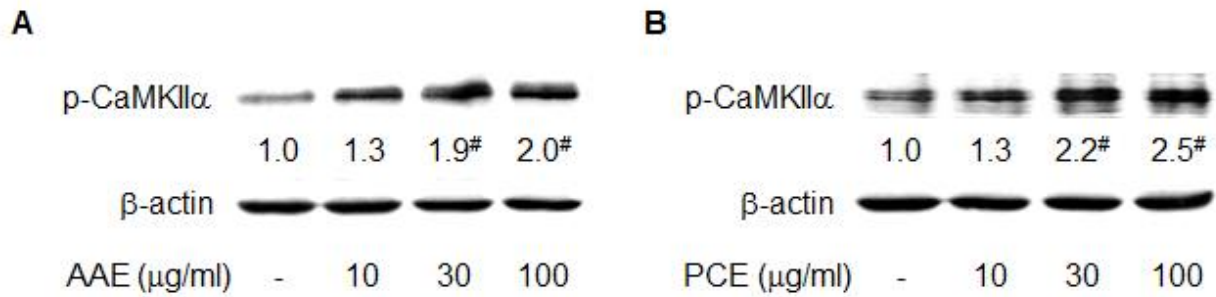


Fig. 15. AAE (A) and PCE (B) activates the upstream kinase of AMPK, CaMKII α , in HepG2 Cells. Immunoblots were performed on lysates of HepG2 cells that had been treated with various concentrations of AAE or PCE (10–100 μ g/ml) for 1 h. Amounts of CaMKII α (Thr286) phosphorylation in the cell lysates were measured by Western blotting. Results are expressed as means \pm SEM of three independent experiments. Band intensities were quantified by densitometry analysis. # $p < 0.01$, compared with the control.

나. 고지방식이 동물모델에서 개똥썩 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간억제효과 및 작용기전 규명

- 간은 우리 몸에서 지질 대사에 있어서 중요한 역할을 차지 하나 간 조직에서 지질의 함량은 5%이하로 낮은 편이다. 그러나 비만 환자의 증가와 더불어 지방간의 발병률이 지속적으로 증가하고 있다. 지방간은 알코올의 남용이나 유전적 요인에 의하여 발생률이 증가하였으나 최근에는 비만환자의 증가에 의한 비알콜성 지방간 (non-alcoholic fatty liver, NAFLD)의 발생이 늘어가는 추세이다.
- 동물을 사용한 일련의 실험에서 식이성 지방 함량 증대는 간에서 지방 침착을 증가시킨 것으로 보고되고 있다. 또한, 사람에게에서도 비슷한 결과들이 관찰되고 있는데, 2주 동안 지방으로 56% 에너지를 섭취시킨 고지방식이를 하였을 경우 간에서 지방 침착이 보고되었고 동일한 개체에 저지방 식이를 실시하였을 경우 간에서 지방 침착이 제거되었다.
- 비만 및 대사증후군 병태기전 연구 및 치료제 개발을 위해 그동안 30여종이 넘는 동물모델이 개발되어 사용되었으며, 이들은 spontaneous mutant, transgenic mutant, knockout (또는 knock in) 등의 유전자변이 동물모델이 주류를 이루고 있다 (박태선, 2008).
- 그 동안 비만연구에서 주로 사용되어 온 ob/ob 또는 db/db 마우스는 C57 마우스를 대상으로 leptin 또는 leptin receptor 변이를 유발시킨 종으로서 leptin resistance 및 제2형 당뇨병 연구를 위해서는 적합한 모델이나, 이러한 단일유전자 변이에 의한 비만이 인체에서 매우 드물게 나타난다는 점에서 인체비만에 적용시키는 데에는 한계가 있다.

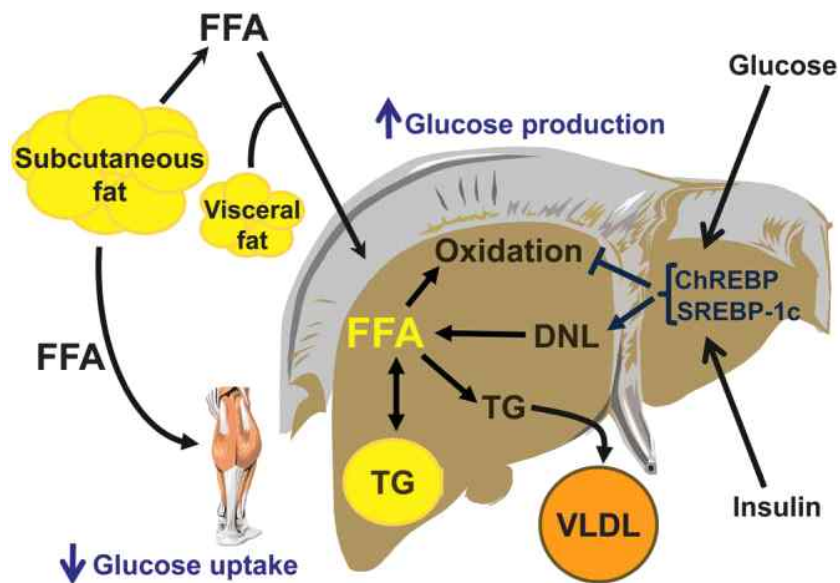


Fig. 16. The Mechanism of High fat diet-induced obesity model.

- 인체에서 가장 많이 나타나는 단일유전자변이에 의한 비만으로는 식욕억제에 관여하는 MC4-R 유전자변이를 들 수 있고, 전체 비만의 약 4%에 불과함. 인체에서 나타나는 비만

의 95% 이상은 환경과 다유전자 간의 상호작용에 의한 복합적인 질병이고, 따라서 식이성 비만 및 대사질환의 etiology 및 특성을 파악하거나 또는 비만치료제 또는 기능성식품소재의 체중조절 및 대사질환 개선효능을 평가하는 연구에서는 식이성비만 동물모델이 가장 적합하게 이용될 수 있다 (Fig. 16).

- 식이성비만은 고열량식이 섭취를 통해 유도될 수 있으며, 고열량식으로는 high sucrose diet, high fat diet 또는 cafeteria diet 등이 사용되고 있다. 그 중 실험식이 총중량의 20~40% (w/w)을 지방으로 제공하는 고지방식이 현재까지 인체비만의 표현형을 가장 잘 나타내는 것으로 알려져 있으며, 지방함량이 같더라도 식물성지방에 비해 동물성지방을 지방급원으로 사용하는 경우 내장지방 축적 및 대사질환을 더 효율적으로 유도시킨다.
- 본 연구에서는 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 발현 및 분자기전 연구를 위해 1) 비알콜성 지방간염 동물 모델에서 원인 대사체 조절 마커 및 유전자 탐색, 2) 동물 모델에서 비알콜성 지방간 대사 조절 및 기전 연구 (SREBP1, AMPK 활성화 및 FAS의 발현조사, 3) 비만, 인슐린저항성 개선 등의 위험인자 교정을 통한 지방간 개선을 평가하였다 (실험쥐의 몸무게 변화 및 간조직의 무게 변화 측정, Cholesterol, TG 측정 및 혈당측정 등).

(1) *In vivo* 마우스 고지방식이 실험동물 모델 확립 (비알콜성 지방간염 동물모델) 및 시료투여

- *In vivo*에서 개똥쭉 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간 개선 효능을 평가하기 위하여 고지방식이 (High Fat Diet: HFD) 동물 모델을 확립하였다. 4 주령의 ICR mice에 고지방식이를 4 주간 투여한 후, 몸무게를 측정하여 몸무게가 증가한 마우스를 선별하였다. 선별된 마우스를 3 group (양성 대조군: high fat diet (HFD), HFD+AAE 50 mg/kg, HFD+PCE 50 mg/kg)으로 나눈 후 개똥쭉 및 복령 추출물을 4주 동안 매일 일정한 시간에 구강 투여하였다. 각 group당 5마리를 사용하였다. 확립된 동물 모델을 이용하여 개똥쭉 및 복령 추출물의 지질개선 효능을 평가하였다 (Fig. 17).
- Forty-five percent kilojoules/fat pellet diets (D12451; Research Diet) were used as HFD, and normal-rodent pellet diet (Superfeed Co) were used as normal diets (Table 1 참조, Hwang et al., Nutr Res. 2011 Dec;31(12):896-906).

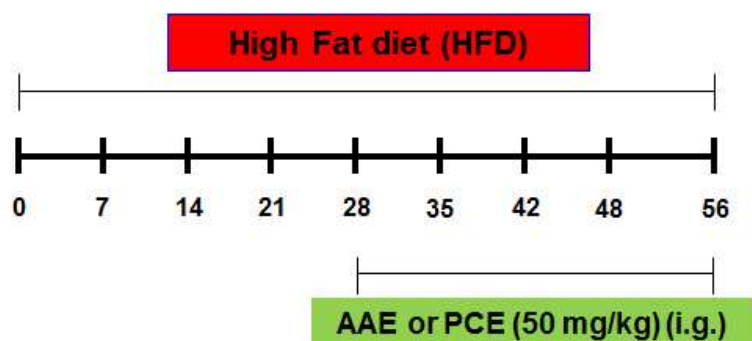


Fig. 17 Schematic diagram of the experimental procedure. Mice were divided into three groups. The ICR mice were divided into four groups (each group, $n = 5$) and fed with ND or HFD supplemented with AAE or HFD supplemented with PCE (50 mg/kg/day). After 4 weeks of dietary manipulation to induce obesity, 15 animals in the HFD group were divided into three experimental groups (each group, $n = 5$): Group 1 received a HFD; Group 2 received the HFD with AAE (50 mg/kg/day); Group 3 received the HFD with PCE (50 mg/kg/day).

Table 1 Normal Diet (ND) and High fat diet (HFDs) used in this study

	Normal pellet diets (g/kg diet)	HFDs (g/kg diet)
Ingredient		
Casein	200	200
L-Cystein	3	3
Corn starch	150	72.8
Sucrose	500	172.8
Cellulose	50	50
Soybean oil	50	25
Lard	0	177.5
Mineral mixture	35	35
Vitamin mixture	10	10
Choline bitartrate	2	2
Energy (kJ/g)	0.88	19.87
Protein (% kJ/kg)	13.3	20
Carbohydrate (% kJ/kg)	47.4	35
Fat (% kJ/kg)	8.0	45
Fiber (% kJ/kg)	8.0	8.0

(2) 개똥썩 및 복령 추출물의 *in vivo* 비알콜성 지방간장 질환 개선 효능 평가

- 체중, 간 무게, 내장지방 무게 측정

○ 고지방 식이 마우스 동물모델에서 개똥썩 및 복령 추출물의 체중 (body weight), 간 무게 (liver weight) 및 내장지방 무게 (Fat pad weight)를 측정한 결과, 고지방 식이에 의해 증가된 마우스의 체중 및 간조직의 무게가 개똥썩 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소하였으며, 내장지방 (복부지방)의 무게도 감소함을 확인하였다. (Fig. 18-21).

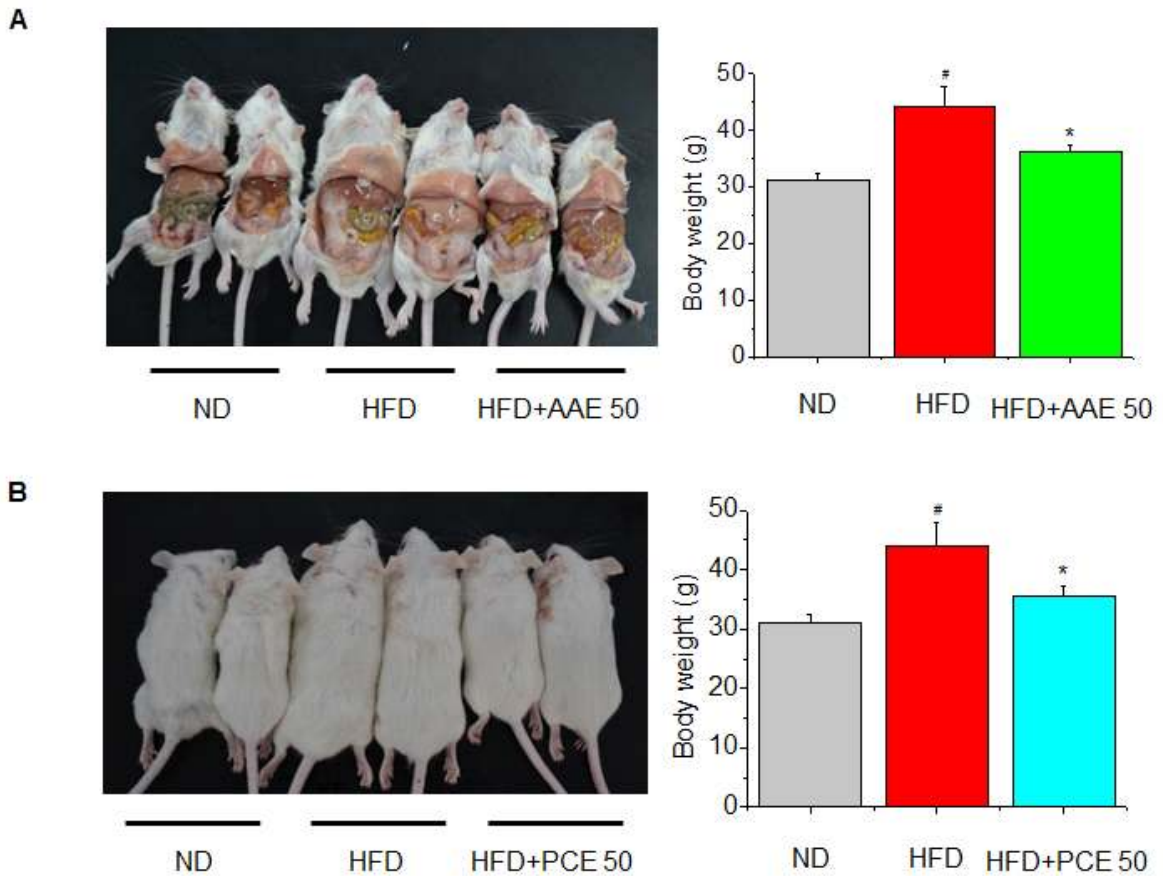


Fig. 18 Effects of AAE (A) and PCE (B) on HFD-induced body weight. Body weight in mice fed a ND, HFD, HFD with AAE 50 mg/kg/day (AAE 50) or HFD with PCE 50 mg/kg/day (PCE 50) . Data are expressed as mean \pm SD, ($n = 5$). # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). * Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$).

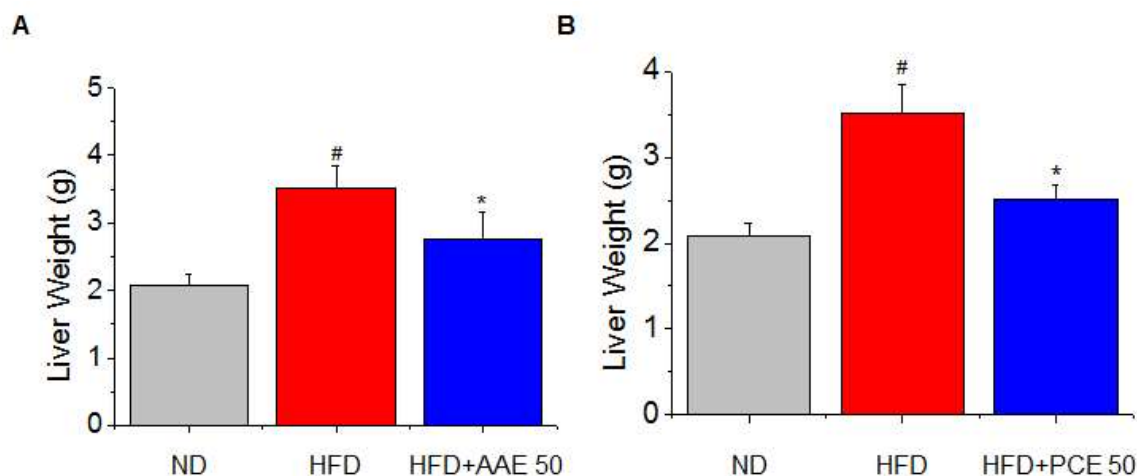


Fig.19 Effects of AAE (A) and PCE (B) on HFD-induced liver weight. Liver weight in mice fed a ND, HFD, HFD with AAE 50 mg/kg/day (AAE 50) or HFD with PCE 50 mg/kg/day (PCE 50). Data are expressed as mean \pm SD, ($n = 5$). # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). * Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$).

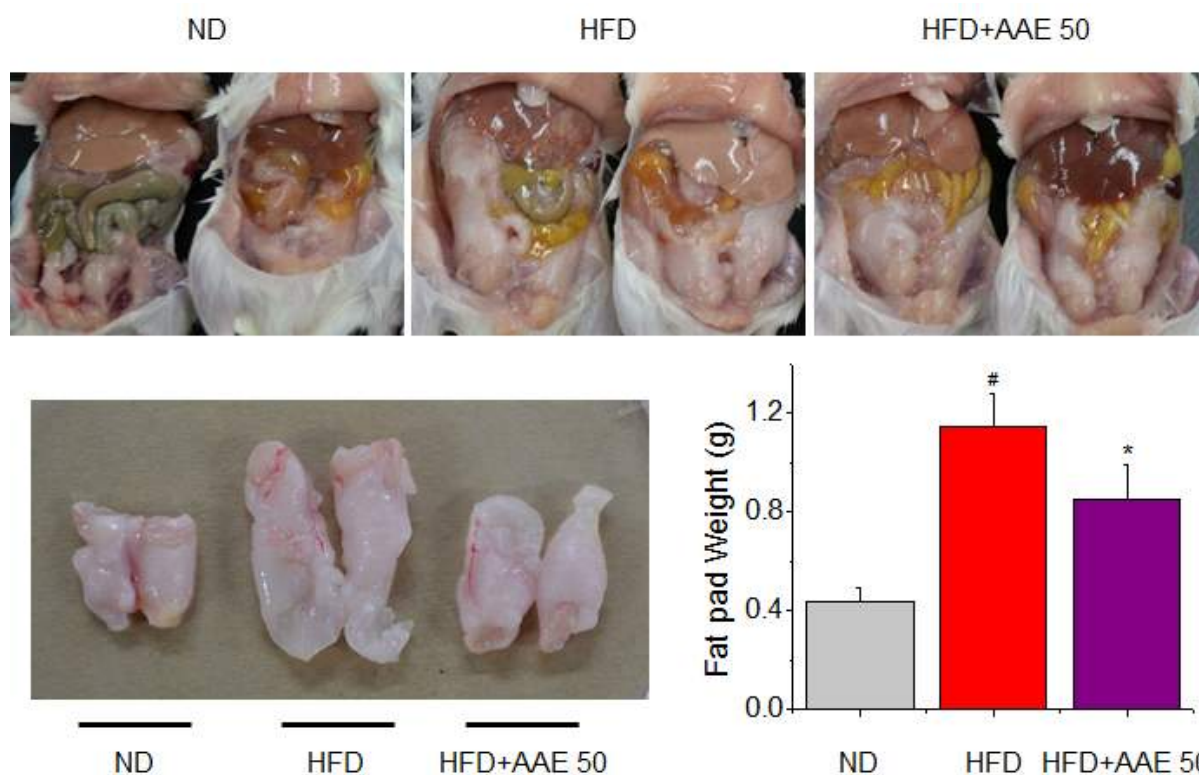


Fig. 20 Effects of AAE on HFD-induced fat pad weight. Fat pad weight in mice fed a ND, HFD, or HFD with AAE 50 mg/kg/day (AAE 50). Data are expressed as mean \pm SD, ($n = 5$). # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). * Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$).

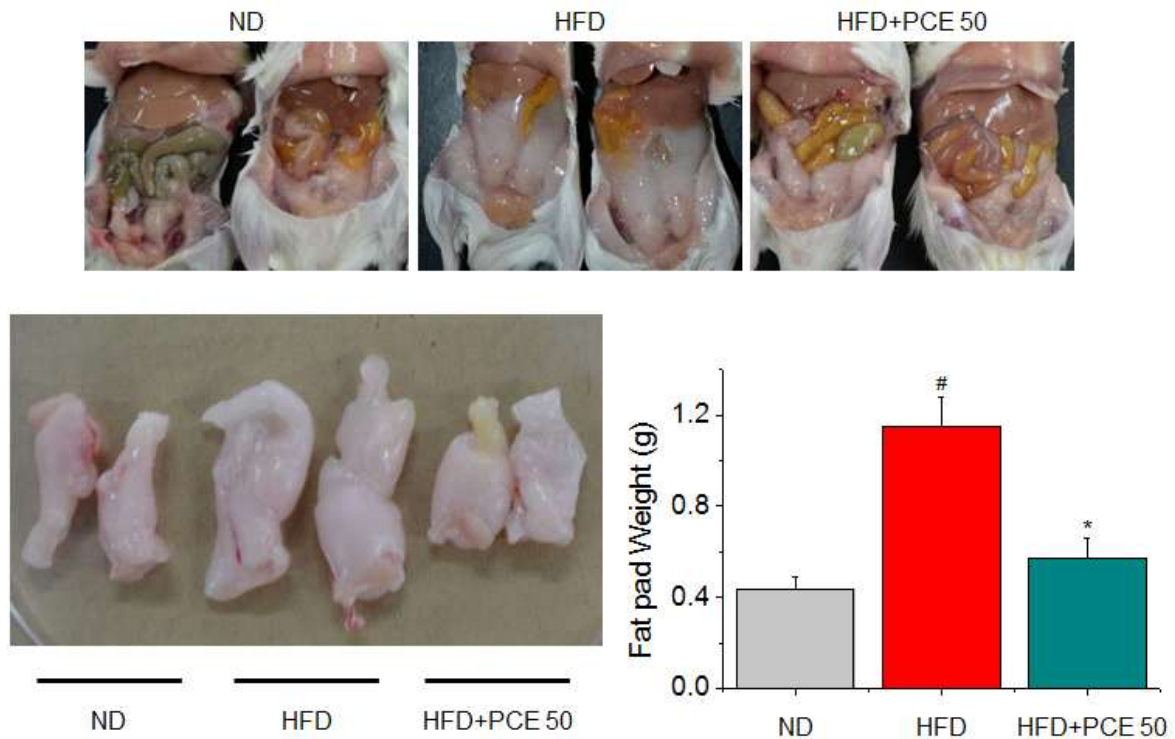


Fig. 21 Effects of PCE on HFD-induced fat pad weight. Fat pad weight in mice fed a ND, HFD, or HFD with PCE 50 mg/kg/day (PCE 50). Data are expressed as mean \pm SD, ($n = 5$). # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). * Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$).

(3) 개똥썩 및 복령 추출물의 *in vivo* 비알콜성 지방간장 질환 개선 효능 평가

-ALT, AST 활성 및 혈당 측정

- *in vivo*에서 고지방식이에 의한 개똥썩 및 복령 추출물의 간 손상 보호효과를 조사하기 위하여 간 손상의 지표인 ALT 및 AST 효소의 활성을 측정하였다. 실험결과 고지방식이에 의해서 증가한 AST, ALT 효소의 활성이 개똥썩 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소함을 확인하였다 (Fig. 22).
- 또한 *in vivo*에서 고지방식이에 의한 개똥썩 및 복령 추출물의 혈당 변화량을 측정한 결과 고지방식이에 의해서 증가한 혈청 내 glucose (혈당)이 개똥썩 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소함을 확인하였다 (Fig. 23).

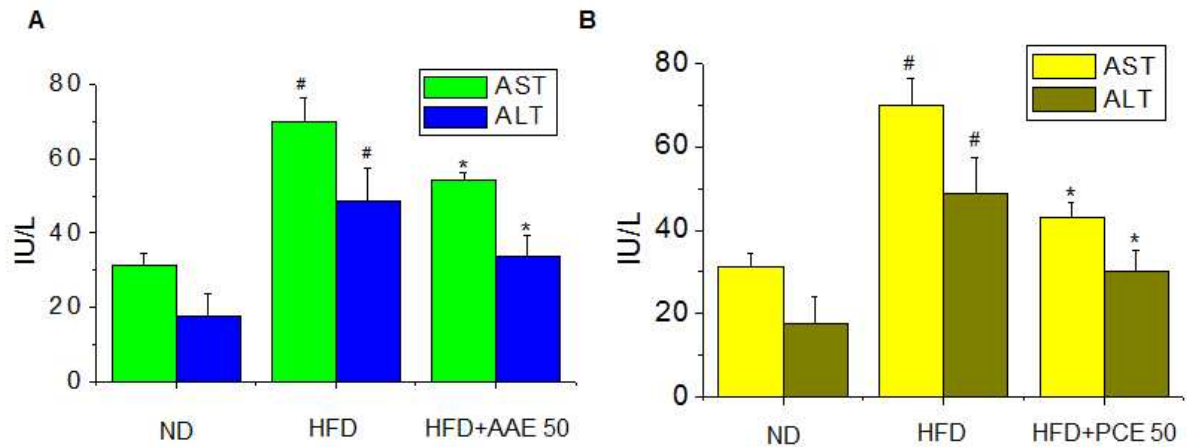


Fig. 22 Effects of AAE (A) and PCE (B) on HFD-induced hepatotoxicity. Hepatotoxicity was determined by quantifying the serum activity of ALT and AST. Data are expressed as mean \pm SD, ($n = 5$). # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). * Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$).

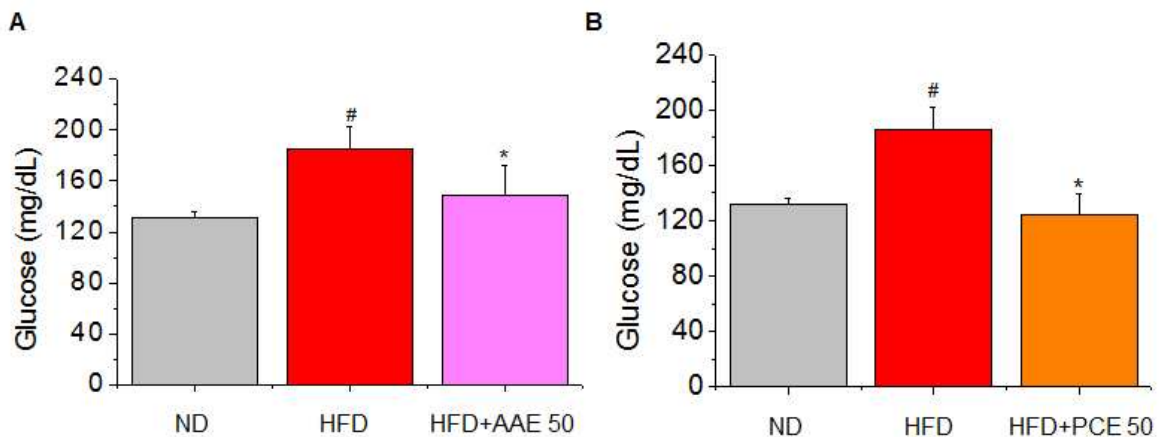


Fig. 23 Effects of AAE (A) and PCE (B) on HFD-induced hepatotoxicity. Serum glucose levels were evaluated in obese mice. Data are expressed as mean \pm SD, ($n = 5$). # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). * Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$).

(4) 개똥썩 및 복령 추출물의 *in vivo* 비알콜성 지방간장 질환 개선 효능 평가

- 혈청 triglyceride(TG) 및 total cholesterol 함량 측정

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 간장내 지질 억제 효과를 측정하기 위해 Hepatic triglyceride(TG) 및 total cholesterol 함량을 측정하였다. 실험결과, 고지방 식이에 의해 증가된 triglyceride 및 total cholesterol의 함량이 개똥쑥 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소하였다 (Fig. 24 and 25).
- 또한 분자생물학적 조직염색법 (hematoxylin and eosin 염색법) 실험을 통해 조직내의 지방의 축적 정도 및 steatosis 정도를 측정한 결과 지방의 축적이 개똥쑥 및 복령 추출물에 의해서 감소함을 확인하였다 (Fig. 26)

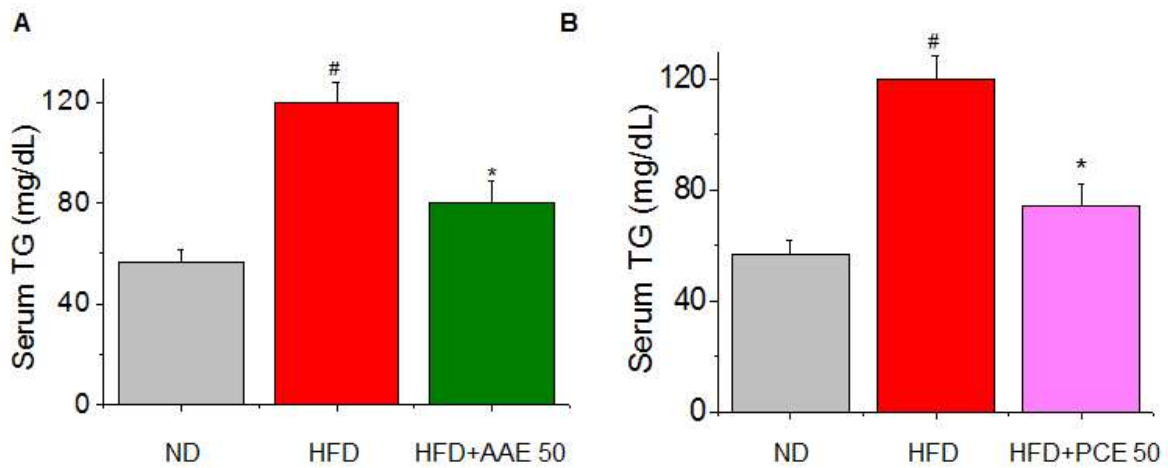


Fig. 24. AAE (A) and PCE (B) prevents high-fat diet-induced liver steatosis in obese mice. HFD-induced serum triglyceride (TG) levels in obese mice. Data are expressed as mean \pm SD, ($n = 5$). # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). *Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$)

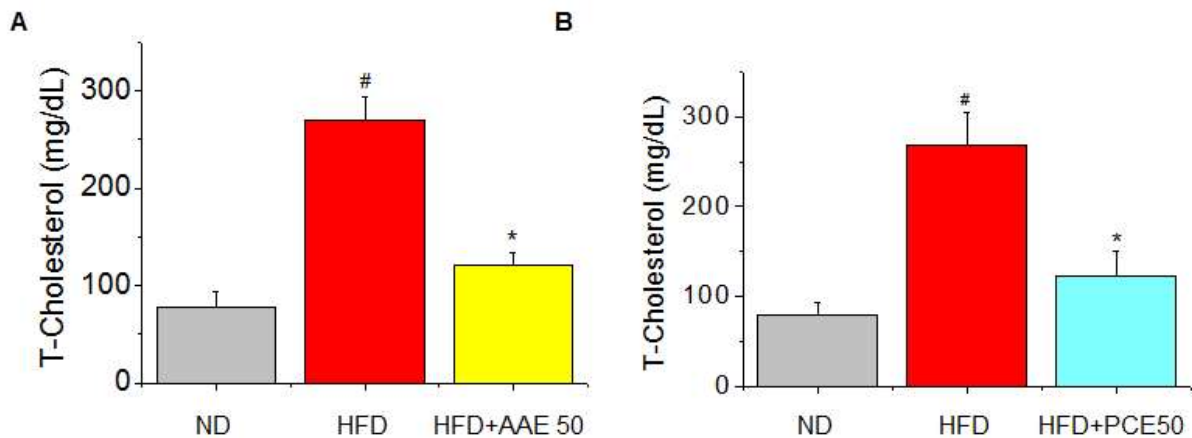


Fig. 25. AAE (A) and PCE (B) prevents high-fat diet-induced liver steatosis in

obese mice. (A and B) HFD-induced total cholesterol levels in obese mice. Data are expressed as mean \pm SD, ($n = 5$). # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). *Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$)

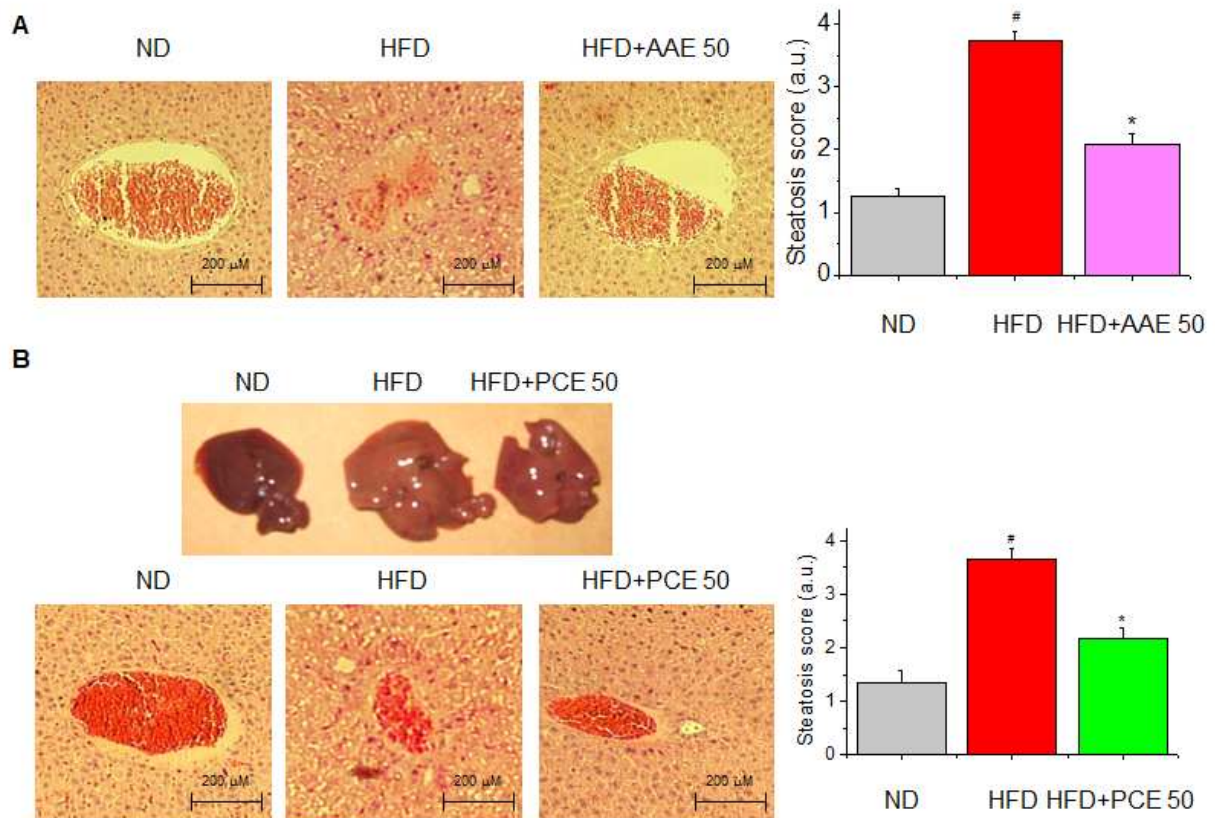


Fig. 26. AAE (A) and PCE (B) prevents high-fat diet-induced liver steatosis in obese mice. Histological analysis of the livers of mice fed a ND, HFD, HFD with AAE 50, or HFD with PCE 50 (magnification, $\times 200$). The grade of steatosis was scored as 0 = no steatosis; 1 = minimal steatosis; 2 = slight steatosis; 3 = moderate steatosis; 4 = marked steatosis; 5 = severe steatosis. Data are expressed as mean \pm SD, ($n = 5$). # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). *Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$).

(5) 개똥썩 및 복령 추출물의 *in vivo* 비알콜성 지방간장 질환 개선 효능 평가

- 비알콜성 지방간 질환 관련 대사 조절 및 기전 연구

○ 본 연구에서는 고지방 식이 마우스 동물모델에서 개똥썩 및 복령 추출물의 지방합성 효소 (Fatty acid synthase; FAS) 및 sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) 활

성억제 효과와 관련 신호전달체계를 조사하기 위하여 간조직에서 FAS 및 SREBP-1 단백질 발현과 AMP-activated protein kinase (AMPK) and acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화 변화를 western blot 방법을 이용하여 확인하였다. 실험 결과 개똥쭉 및 복령 추출물에 의해서 지방합성효소인 FAS 및 상위 전사조절인자인 SREBP-1c의 단백질 발현이 감소하였다.

- 또한, 고지방 식이에 의해서 감소한 AMPK의 인산화가 개똥쭉 및 복령 추출물을 투여한 그룹에서는 다시 증가함을 확인하였다 (Fig. 27 and 28).

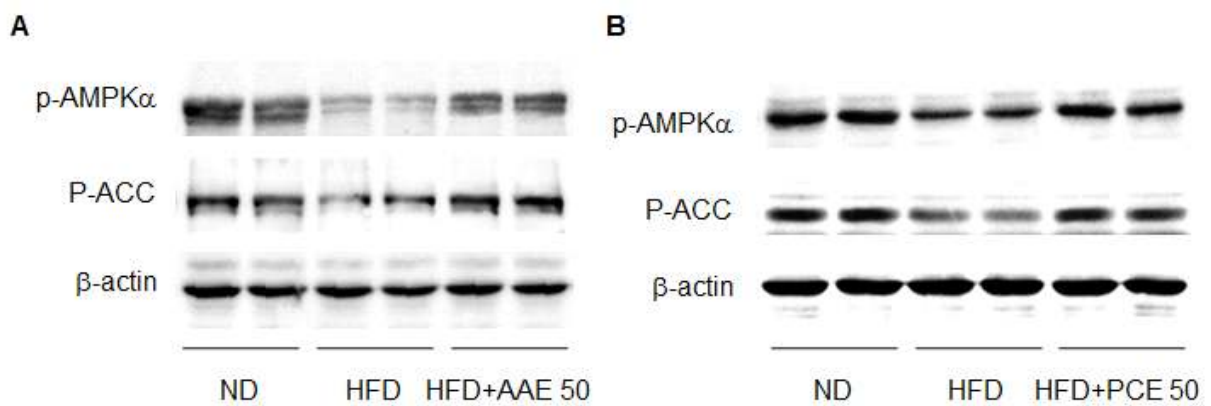


Fig. 27. AAE (A) and PCE (B) prevents high-fat diet-induced liver steatosis in obese mice. Western blot analysis of p-AMPKα and p-ACC in the liver. β-actin used as a loading control. Western blots are representative of five mice in each group. # Significantly different from the control group ($p < 0.05$). *Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$).

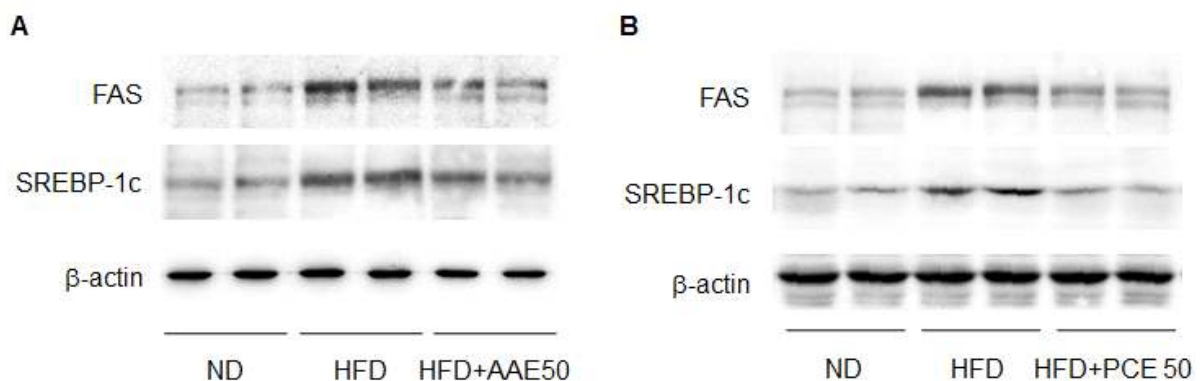


Fig. 28. AAE (A) and PCE (B) prevents high-fat diet-induced liver steatosis in obese mice. Western blot analysis of SREBP-1 and FAS expression in the liver. β-actin used as a loading control. Western blots are representative of five mice in each group. #

Significantly different from the control group ($p < 0.05$). *Significantly different from the HFD-treated group ($p < 0.05$).

▶ 최종 요약 설명 그림

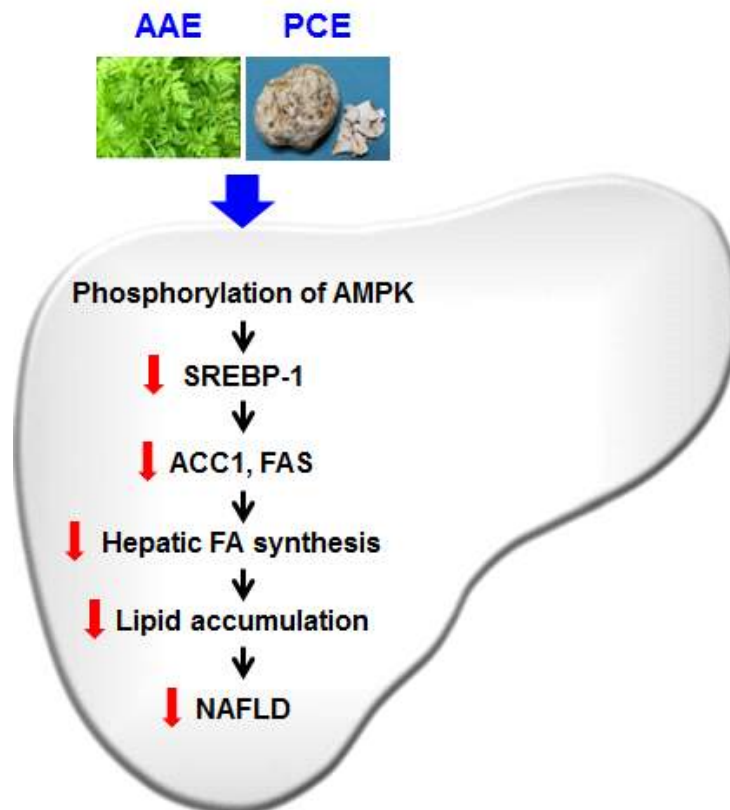


Fig. 29 The schematic figure shows the protective effect of AAE and PCE on prevent non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by HFD feeding in ICR mice and high glucose-induced HepG2 cells. In conclusion, this study demonstrated that AAE and PCE supplementation results in markedly lower lipid accumulation, AMPK phosphorylation up-regulation and lipogenic gene down-regulation in the livers of mice and HepG2 cells. This suggests that AAE and PCE can have protective effects against HFD-induced hepatic steatosis via enhanced hepatic lipid metabolism via AMPK activation, thus providing a therapeutic approach to prevent non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). MIN YOUNG UM ET AL. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2013, 113, 152-157.

4. 요약

- ▶ 본 연구의 최종 목표는 지리산 한방자생식물을 활용하여 지방산 합성 효소 발현을 조절하는 소재를 개발하는 것이다. 본 연구의 세부 연구내용은 천연물 유래 지방산 합성 효소 발현 조절 소재를 개발을 위해 *in vitro* 및 *in vivo* 동물 실험모델을 활용하여 1) AMPK를 타겟으로 한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크 규명, 2) 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 및 분자기전을 연구하고자 하였다.
- ▶ 본 연구를 통하여 지방축적에 의한 NASH(비알코올성 지방간염) 질환 유발에 관여하는 대사체 조절 마커 및 신호전달체계에 대한 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 규명을 통해 NAFLD (비알콜성 지방간질환) 제어 천연소재 개발하는 것이다.

가. High glucose로 유도된 간세포주에서 개똥쑥 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간 억제 효과 및 작용기전 규명

■ AMPK를 타겟으로 한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크 규명

1) Fat-overloading 유도 모델 및 NASH 세포모델 확립

- 본 연구에서는 Fat-overloading 유도 모델 및 NASH 세포모델 확립을 위해 High glucose로 유도된 간세포주를 확립하여 활용하였다.

2) 지방합성 효소발현 전사조절인자인 SREBP-1 promoter를 활용한 비알콜성 지방간염 억제 *in vitro* 스크리닝법 확립을 통한 천연소재 탐색.

- 지방합성 효소발현 전사조절인자인 SREBP-1 promoter를 활용하여 비알콜성 지방간염 억제 *in vitro* 스크리닝법을 확립하였으며, 위의 system을 활용하여 비알콜성 지방간염 억제 효과를 나타내는 개똥쑥 및 복령 등 천연물 소재 2건을 확보하였다.

3) SREBP1 활성 억제 천연 소재의 에너지 대사 관련 신호전달자인 AMPK를 타겟으로 한 분자기전 연구

- 개똥쑥 추출물과 복령 추출물의 FAS 및 SREBP-1c 활성억제 관여하는상위 신호전달체계를 조사한 결과, 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해서 지방합성효소의 활성을 억제하는 AMPK 및 ACC의 인산화가 증가하였다
- 개똥쑥 추출물과 복령 추출물이 AMPK 의존적으로 FAS 및 SREBP-1의 활성을 억제하는지를 규명하기 위하여 AMPK 저해제인, Compound C를 시료와 같이 처리하였다. 혈청이

제거된 배양배지에 Compound C를 1시간 전처리후 개똥쑥 추출물과 복령 추출물을 100 μ g/ml 농도로 처리한 후 24 시간 후에 FAS 와 SREBP-1 단백질 발현을 측정하였다. 또한, 세포내 지질의 축적을 Nile Red 형광 시약으로 염색 후 형광과장을 측정하였다. 실험결과, 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해 감소한 FAS 와 SREBP-1 단백질 발현이 AMPK 저해제에 의해서 감소하지 않음을 확인하였다. 마찬가지로, 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해 감소한 지질축적이 AMPK 저해제에 의해서 감소하지 않음을 확인하였다.

4) SREBP-1의 타겟 단백질인 FAS의 발현 영향연구

- 개똥쑥 추출물과 복령 추출물의 지방합성 효소 (Fatty acid synthase; FAS) 및 전사조절인자인 SREBP-1의 활성억제 효과를 측정한 결과, 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해서 high glucose 처리에 의해서 증가한 FAS 및 SREBP-1c 단백질 발현이 감소함을 확인하였다. 또한 개똥쑥 추출물과 복령 추출물에 의해서 high glucose (30 mM) 처리에 의해서 증가한 SREBP-1 promoter 활성이 감소함을 확인하였다.
- 위의 결과에서 개똥쑥 추출물의 FAS 및 SREBP-1c의 발현 억제는 AMPK 인산화 pathway를 통해 이루어짐을 알 수 있었다.

5) LKB1, Ca²⁺ 인자의 영향 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 조절 연구

- 본 연구에서는 AMPK의 상위 신호 체계를 규명하기위하여 개똥쑥 및 복령 추출물에 의한 LKB1 과 CaMKK β 의 하위 신호 전달자인 CaMKIIa의 인산화를 측정하였다. 실험 결과에 의하면 개똥쑥 및 복령 추출물에 의해서 LKB1 (Ser428)의 인산화와 CaMKIIa (Thr286)의 인산화가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.

6) 간세포에서 Cholesterol 및 TG 측정

- 천연물 시료의 비알콜성지방간 및 비만 개선 활성 평가를 위하여 *in vitro* 간세포에서 비알콜성지방간 세포주를 확립하였다. 인체 간세포인 HepG2 세포에 고농도의 glucose 30 mM을 24간 이상 처리하여 비알콜성지방간 세포주를 확립하였다. 세포주의 확립을 확인하기 위하여 확립된 세포주에서 지질의 생성량을 Nile red assay 법을 이용하여 확인하였다. 100% DMSO로 탈색시켜 형광을 측정하였다.
- 확립된 *in vitro* 비알콜성 지방간 세포주에서 배양 조건에서 개똥쑥 추출물 (*Artemisia annua* extract; AAE) 과 복령 추출물 (*Poria cocos* extract PCE)의 지질축적 억제 효능을 평가한 결과 고농도 (100 μ g/ml)에서 30 mM 고농도의 glucose 처리에 의해서 증가한 지질의 축적이 개똥쑥 추출물과 복령 추출물 처리에 의해서 억제되었음을 확인하였다.
- 또한, 고농도의 glucose 처리에 의해서 증가한 triglycerides 및 total cholesterol 함량도 개

뽕쭉 추출물과 복령 추출물 처리에 의해서 감소하였다.

7) 시료의 세포독성을 MTT 및 LDH assay를 통해 측정

- 인체 간세포 HepG2 세포에서 개뽕쭉 및 복령 열수추출물의 세포독성을 MTT 및 LDH assay 통해 측정한 결과 500 µg/ml의 농도에서도 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 세포 독성이 나타나지 않는 농도 (500 µg/ml 이하)에서 개뽕쭉 및 복령 추출물의 효능을 측정하였다. 본 실험에서는 천연물시료의 최고 농도를 100 µg/ml로 사용하였다.

나. 고지방식이 동물모델에서 개뽕쭉 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간억제효과 및 작용기전 규명

■ 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 및 분자기전 연구

1) 비알콜성 지방간염 동물 모델에서 원인 대사체 조절 마커 및 유전자 탐색

- In vivo에서 개뽕쭉 및 복령 추출물의 비알콜성 지방간 개선 효능을 평가하기 위하여 고지방식이 (High Fat Diet: HFD) 동물 모델을 확립하였다. 4 주령의 ICR mice에 고지방식이를 4 주간 투여한 후, 몸무게를 측정하여 몸무게가 증가한 마우스를 선별하였다. 선별된 마우스를 3 group (양성 대조군: high fat diet (HFD), HFD+AAE 50 mg/kg, HFD+PCE 50 mg/kg)으로 나눈 후 개뽕쭉 및 복령 추출물을 4주 동안 매일 일정한 시간에 구강 투여하였다. 각 group당 5마리를 사용하였다. 확립된 동물 모델을 이용하여 개뽕쭉 및 복령 추출물의 지질개선 효능을 평가하였다.

2) 동물 모델에서 비알콜성 지방간 대사 조절 및 기전 연구 - SREBP1, AMPK 활성화 및 FAS 의 발현조사

- 본 연구에서는 고지방 식이 마우스 동물모델에서 개뽕쭉 및 복령 추출물의 지방합성 효소 (Fatty acid synthase; FAS) 및 sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) 활성화억제 효과와 관련 신호전달체계를 조사하기 위하여 간조직에서 FAS 및 SREBP-1 단백질 발현과 AMP-activated protein kinase (AMPK) and acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화 변화를 western blot 방법을 이용하여 확인하였다. 실험결과 개뽕쭉 및 복령 추출물에 의해서 지방합성효소인 FAS 및 상위 전사조절인자인 SREBP-1c의 단백질 발현이 감소하였다.
- 또한, 고지방 식이에 의해서 감소한 AMPK의 인산화가 개뽕쭉 및 복령 추출물을 투여한 그룹에서는 다시 증가함을 확인하였다.

3) 비만, 인슐린저항성 개선 등의 위험인자 교정을 통한 지방간 개선 평가

-실험쥐의 몸무게 변화 및 간조직의 무게 변화 측정

- Cholesterol, TG 측정 및 혈당측정

- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 개똥썩 및 복령 추출물의 체중 (body weight), 간 무게 (liver weight) 및 내장지방 무게 (Fat pad weight)를 측정한 결과, 고지방 식이에 의해 증가된 마우스의 체중 및 간조직의 무게가 개똥썩 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소하였으며, 내장지방 (복부지방)의 무게도 감소함을 확인하였다..
- 또한 *in vivo*에서 고지방식이에 의한 개똥썩 및 복령 추출물의 혈당 변화량을 측정한 결과 고지방식이에 의해서 증가한 혈청 내 glucose (혈당)이 개똥썩 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소함을 확인하였다.
- 고지방 식이 마우스 동물모델에서 개똥썩 및 복령 추출물의 간장내 지질 억제 효과를 측정하기 위해 Hepatic triglyceride(TG) 및 total cholesterol 함량을 측정하였다. 실험결과, 고지방 식이에 의해 증가된 triglyceride 및 total cholesterol의 함량이 개똥썩 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소하였다.
- 또한 분자생물학적 조직염색법 (hematoxylin and eosin 염색법) 실험을 통해 조직내의 지방의 축적 정도 및 steatosis 정도를 측정한 결과 지방의 축적이 개똥썩 및 복령 추출물에 의해서 감소함을 확인하였다.

4) 장기간 시료 투여 후 간독성 측정 (ALT, AST 등)

- *in vivo*에서 고지방식이에 의한 개똥썩 및 복령 추출물의 간 손상 보호효과를 조사하기 위하여 간 손상의 지표인 ALT 및 AST 효소의 활성을 측정하였다. 실험결과 고지방식이에 의해서 증가한 AST, ALT 효소의 활성이 개똥썩 및 복령 추출물 투여에 의해서 감소함을 확인하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	목표 달성도	기여도
1차년도 (2012)	<p>■ AMPK를 타겟으로 한 지방합성 효소 전사 조절 네트워크 규명</p>	<p>1) Fat-overloading 유도 모델 및 NASH 세포모델 확립유무</p> <p>2) 지방합성 효소발현 전사조절인자인 SREBP-1 promoter를 활용한 비알콜성 지방간염 억제 in vitro 스크리닝법 확립을 통한 천연소재 탐색 2건 이상.</p> <p>3) SREBP1 활성화 억제 천연 소재의 에너지 대사 관련 신호전달자인 AMPK를 타겟으로 한 분자기전 연구 유무-AMPK 활성화 40% 이상</p> <p>4) SREBP1의 타겟 단백질인 FAS의 발현 영향연구-억제 효과 40%</p> <p>5) LKB1, Ca²⁺ 인자의 영향 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 조절 연구- 활성화 조절 40% 이상</p> <p>6) 간세포에서 Cholesterol 및 TG 측정-40%이상 억제 효과.</p> <p>7) 시료의 세포독성을 MTT 및 LDH assay를 통해 측정- 100% 독성이 없는 농도 사용</p>	100%	
	<p>■ 비알콜성 지방간염 동물모델을 이용한 간 지방합성 효소 및 분자기전 연구</p>	<p>1) 비알콜성 지방간염 동물 모델에서 원인 대사체 조절 마커 및 유전자 탐색- 유전자발현 40% 이상 억제</p> <p>2) 동물 모델에서 비알콜성 지방간 대사 조절 및 기전 연구 - SREBP1, AMPK 활성화 및 FAS 의 발현조사- 단백질 발현 및 활성화 40% 이상 효과</p> <p>3) 비만, 인슐린저항성 개선 등의 위험인자 교정을 통한 지방간 개선 평가 - 실험쥐의 몸무게 변화 및 간조직의 무게 변화 측정 - 40% 이상 효과 - Cholesterol, TG 측정 및 혈당측정-40%이상 억제 효과.</p> <p>4) 장기간 시료 투여 후 간독성 측정 (ALT, AST 등) - 100% 독성이 없는 농도 사용</p>	100%	

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 본 과제에서 비알콜성 지방간억제 천연물 소재를 2 종을 확보하였으며, 본 과제에서 도출된 결과를 바탕으로 특허 출원 1건이 완료 되었으며, 국외저명학술지 (SCI)에 2건의 논문을 투고 할 예정이다. 본 연구 결과 중 일부는 국내외 학술 잡지에 게재되어 관련 학문과 기술개발의 기초자료를 제공할 것으로 예상된다.
- 향후 본 연구에서 구명되지 않은 생체 내에서의 비알콜성 지방간 질환 억제 활성화에 대한 구체적인 연구가 필요하다.
- 지방산 합성효소 발현 분자기전에 기초한 표적분자 발굴, 관련된 비알콜성 지방 간질환 동물 모델개발, 이를 활용한 천연소재 발굴 탐색 및 발굴 체계를 구축하였으며, 이를 활용함으로써 비알콜성 지방 간질환 제어 신약개발 연구의 활성화 기여에 활용할 수 있을 것이다.
- 비알콜성 지방 간질환에 대한 이해를 증진시킴으로써 분자세포생물학, 면역학, 의생명과학 및 기타 관련된 학문분야에 파급효과가 클 것으로 기대되며, 보다 효과적인 비알콜성 지방 간질환 예방 및 개선 전략 수립에 활용 할 수 있다.
- 비알콜성 지방 간질환의 예방과 제어물질 발굴을 위한 비알콜성 지방 간질환 제어 표적분자, 염증 유발 동물 모델 등, 선도물질 탐색과 약효검증을 통해 유전자 조절분야, 세포신호 전달체계에 대한 연구 및 신물질 분리. 합성 등 제약 분야에도 크게 기여할것으로 기대된다.
- 비알콜성 지방 간질환 발병 과정의 기전연구 및 와 제어연구에 필요한 비알콜성 지방 간질환 제어 *in vitro* 및 *in vivo* 실험 모델을 개발함으로써 중성지방 축적으로 인한 질환의 제어연구에 활용 가능하다.
- 기초연구에서 임상연구로 연결되는 중개연구의 기반 마련에 활용가능하다.
- 비알콜성 지방 간질환 활성 평가 model 확립 및 작용기전 규명을 통한 비알콜성 지방 간질환 개선 건강기능식품, 약용식품 (Pharmafood) 및 nutraceutical food 개발을 위한 산업기반 기술 구축에 활용 가능하다.
- 본 연구를 통해 얻어진 천연 소재를 활용한 비알콜성 지방 간질환 조절기전 연구 기술은 다른 학문분야에서도 응용이 가능하여 인접학문의 발전에 활용 가능할 것이다.
- 현대인에게 증가 추세인 비알콜성 지방 간질환으로 인한 성인병 질환에 대한 우수한 천연 소재 발굴로 비알콜성 지방 간질환 및 대사성 질환의 의약품 개발에 소재를 제공 할수있다.
- 비알콜성 지방 간질환 개선 기능성 천연 신소재 발굴로 성인병의 효율적인 예방, 관리 및 국민보건증진에 기여에 활용 가능하다.
- 본 연구의 새로운 예방의학적 전략은 비알콜성 지방 간질환의 의료수요를 충족시키고 예방 및 개선 기술의 진보에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 국제저명학술지에 연구결과

를 게재하여 기초학문의 진흥을 꾀함으로써 관련 학문과 기술개발의 기초자료를 제공할 것으로 예상된다.

- 비알콜성 지방 간질환 및 대사성 질환을 대상으로 한 신약개발을 전문으로 하는 연구의 기초 과학자 양성으로 신약 산업을 주도할 고급인력 양성이 기대된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 식이성대사질환 작용기전에 관한 최신 연구동향을 살펴보면, 크게 다음과 같은 다섯 가지 분야에 초점이 맞추어져 있다: 1) 지방세포의 분화에 관련된 신호전달체계에 관한 연구, 2) GLUT4 translocation 조절과 인슐린저항성 연구, 3) 대사성 염증반응 (metaflammation) 조절 연구, 4) 지방산 산화 및 열발생 조절 연구 5) 근육세포의 transdifferentiation에 의한 지방축적 연구 등이다.
- 대사성질환에 대한 치료법 개발연구는 국민 복지를 증진시킬 뿐 만 아니라 막대한 상업적인 가치를 창출하게 될 것으로 예측되고 있다. 이러한 중요성에도 불구하고 우리나라의 경우 비만 및 당뇨병으로 상징되는 만성대사성질환의 기초학적 기전 연구를 수행하고 있는 연구기관은 예상보다 많지 않을 뿐 아니라 특히 에너지 상태에 의해서 조절되는 AMPK (AMP-activated protein kinase) 단백질의 조절을 타겟으로 한 연구는 아직까지 미비한 실정이다.
- 대사성 증후군의 원인인 축적된 과량의 에너지 이용을 증가시키는 미토콘드리아에 의한 에너지 대사 활성화에 관한 방법이 대사성 증후군의 치료전략의 하나로서 부각되고 있다. 미토콘드리아의 기능을 활성화 할 수 있는 방법은 본 연구 책임자를 비롯한 국내외의 몇몇 선도적인 연구자들에게도 시도되고 있는 방법으로서 에너지 대사에 관련된 다양한 기전, 참여하는 효소 전달계 및 에너지 대사과정에서 발생하는 라디칼의 소거 과정에 관련된 분자 네트워크등에 대한 연구 등이 이루어지고 있다.
- 이중, AMPK는 세포의 영양상태나 운동, stress등에 의해 변화하는 세포의 에너지 상태 (ATP/AMP ratio)에 반응하여 그 활성이 조절되는 인산화 효소로 세포의 에너지 대사에 관여하는 여러 가지 효소들의 인산화를 조절함으로써 glucose 수송 (glucose transport), 지방산 합성 (fatty acid synthesis), 콜레스테롤 합성 (cholesterol synthesis) 등의 다양한 생리작용에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다. 또한, 생물체가 근육운동을 하였을 때와 유사한 효과를 나타내는 효소 작용이 AMPK의 활성화임이 알려져 있다.
- 최근에는, AMPK 활성화 물질을 찾으려는 연구가 대사성 증후군의 치료후보물질 발굴이라는 목표로 활발히 진행되고 있다. 세계적 제약회사들은 PPAR γ 효능제의 부작용을 줄이기 위하여, 이미 metformin을 병용한 약물의 허가를 받아 시판중이며, 국내의 연구자들은 AMPK 활성화 물질인 알파리포익산의 기전연구를 수행하였다.
- 그러나, 비알콜성 지방간 질환을 야기하는 자유지방산 (free fatty acids)에 의한 AMPK 조절 기작 및 관련 신호 전달체계의 규명 연구는 아직까지 미비한 실정이다.
- 식물, 동물, 해양생물 유래의 천연 소재는 신약개발의 보고로서 신의약품 개발의 중요한 자원이 되고 있으며, 현재 사용하고 있는 약물의 50%는 천연물에서 유래한 것이다. 미국, 일

본, 유럽 등 선진국에서는 자원식물에 대한 경제적 효용가치를 높이 평가하여 다양한 천연물 소재 확보에 주력하고 있으며, 새로운 선도화합물을 분리 생산하는 체계적인 노력을 수행하고 있다. 한국은 전통의약분야에서 상대적 우위를 확보하고 있으므로, 초기 연구개발 비용감소 및 경쟁력 확보가 가능 할 것으로 생각된다.

- 천연소재는 비알콜성 지방간질환의 예방 및 치료제의 탐색소재로서 낮은 독성과 높은 치료 효과로 인하여 세계적으로 활발히 연구되고 있으며 신약개발의 성공 가능성이 높다. 따라서, 본 연구에서 제시한 지방축적에 의한 NASH 질환 유발에 관여하는 대사체 조절 마커 및 신호전달체계에 대한 연구를 통한 지방합성 효소 네트워크 규명은 비알콜성 지방간질환의 예방 및 치료제 개발을 위해 필요하다.
- 최근 연구 논문에 의하면 복령 (*Poria cocos*) 추출물이 streptozocin으로 유도된 당뇨를 억제한다는 보고가 알려져 있으나, 그 작용기전은 아직까지 보고가 안 되어 있는 실정이며, 또한 본 연구에서 제시한 고지방 식이 동물모델 조건에서 AMPK를 타겟으로 한 비알콜성 간장질환 억제에 대한 결과 및 작용기전 연구는 아직까지 보고된 바 없다 (Li et al., 2011).
- 개똥쑥 (*Artemisia annua* L)의 경우, 개똥쑥에서 분리한 단일 성분인 artemisinic acid이 human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs)의 분화를 억제하는데, 그 작용기전으로 JNK활성 억제를 통한 C/EBP δ 의 발현을 억제하여 비만을 비롯한 대사성 질환의 치료 물질로 이용가능하다는 연구논문이 보고되었다 (Lee et al., 2012). 그러나, 본 연구에서 제시한 고지방 식이 동물모델 조건 및 high glucose 로 유도된 세포주를 활용하여 AMPK를 타겟으로 한 비알콜성 간장질환 억제에 대한 결과 및 작용기전 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

-해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

- Arai M, Uchiba M, Komura H, Mizuochi Y, Harada N, Okajima K. Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010, 334(1):206-213.
- Cantó C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol.* 2009, 20(2):98-105.
- Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology.* 2010, 51(2):679-689.
- Gökhan S. Hotamisligil. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease *Cell.* 2010, 140(6): 900 - 917.
- Hardie DG. Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):81-9.
- Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res.* 2010, 107(5):579-591.
- Hwang YP, Choi JH, Han EH, Kim HG, Wee JH, Jung KO, Jung KH, Kwon KI, Jeong TC, Chung YC, Jeong HG. Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation through activating adenosine monophosphate-activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice. *Nutr Res.* 2011 Dec;31(12):896-906.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 2005, 1(1):15-25.
- Lee J, Kim MH, Lee JH, Jung E, Yoo ES, Park D. Artemisinic acid is a regulator of adipocyte differentiation and C/EBP δ expression. *J Cell Biochem.* 2012 Jul;113(7):2488-99.
- Li TH, Hou CC, Chang CL, Yang WC. Anti-Hyperglycemic Properties of Crude Extract and Triterpenes from *Poria cocos*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011. pii:

128402.

- Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Feb;26(2):69-76.
- Plutzky J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 2001, 88(8A):10K-15K.
- Sozio MS, Liangpunsakul S, Crabb D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. *Semin Liver Dis.* 2010, 30(4):378-390.
- The global obesity problem, WHO, 2005, Accessed March, 2010.
- Varela-Rey M, Embade N, Ariz U, Lu SC, Mato JM, Martínez-Chantar ML. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 May;41(5):969-76.
- 박태선, 식이성비만 및 대사질환 연구동향 분자세포 생물학 뉴스, 2008, Vol. 20, No. 3, page 40-47.
- 오원근, 대사성 증후군의 최근 연구 동향분자세포 생물학 뉴스, 2008, Vol. 20, No. 3, page 48-59.

[별첨] 실적 증빙 자료

1. 특허출원 (국내) - 1건

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2013.08.16
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2013-0097178 (접수번호 1-1-2013-0742664-30)
출원인명칭 한국국제대학교 산학협력단(2-2004-042750-8)
대리인성명 백경업(9-2008-000472-1)
발명자성명 황용필 김현수 정해광 최철웅
발명의명칭 개동속 추출물을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

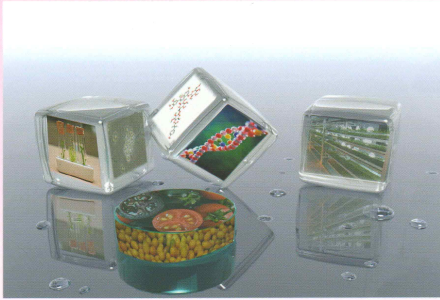
1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자격고환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

2. 학회발표 실적 - 총 6건

가. 학회명: 한국식물생명공학회-2건

**2013 한국식물생명공학회
40주년 심포지엄 및 춘계학술발표회**

“ 식물 생명공학의 발자취와 미래 ”



일시 : 2013년 6월 20일(목) ~ 6월 21일(금)
장소 : 충남대학교 정심화국제문화회관
주관 : (사)한국식물생명공학회
초치 : (사)한국식물생명공학회, 충남대학교식물유전체연구소, 차세대유전체연구사업단, GM작물실용화사업단
후원 : 농림수산식품기술기획평가원, 대전마케팅공사, 시스텔합성농생명공학사업단, (재)차세대바이오메스연구단, 식물분자유종사업단, 채소종자사업단, 농생명식의학박이오소재개발사업단, 양배추유전체육종지원사업단, 농업회사법인(주)농우바이오, 농업회사법인(주)코레온, (주)한국로슈진단

2013. 6. 20 ~ 21. 충남대학교 정심화국제문화회관

P3-23 Multigene approaches to increase the growth rate and lipid productivity in *Scenedesmus quadricauda*
 Ahmed E. Gomaa¹, Sameh Elawdy¹, Mohamad M. Gendy¹, Seung Hwan Yang², Sang Mi Sun¹, Hyun Soo Lim¹, Gyuhaa Chung^{1*}
¹Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam 550-749, Korea; ²Center for Neurochemical and Pharmaceutical Materials, Myongji University, Yongsin-Gyeonggi, Korea

P3-24 Beneficial effects of *Artemisia annua* L. extract on lipid metabolism in obese mice fed a high-fat diet.
 Chul-Yung Choi², Jun-Su Lee¹, Bo-Ram Lee¹, Yun-Sang Yu¹, Hye-Yeon Yang¹, Hyun-Su Kim¹, Yong-Pil Hwang^{1*}
¹Department of Pharmaceutical Engineering, International University of Korea, Jinju, Korea; ²Jeollanamdo Institute of Natural Resources Research, Jeollanamdo, Korea.

P3-25 Effects of *Roria coccus* on lipid metabolism in mice fed with high fat diet
 Hyun-Su Kim, Bo-Ram Lee, Jun-Su Lee, Yun-Sang Yu, Hye-Yeon Yang, Yong-Pil Hwang
 Department of Pharmaceutical Engineering, International University of Korea, Jinju, Korea

P3-26 Screening of crude extracts of medicinal plants used in Korean medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity
 Yong-Pil Hwang, Bo-Ram Lee, Jun-Su Lee, Yun-Sang Yu, Hye-Yeon Yang, Sun-Mi Jeon, Hyun-Su Kim
 Department of Pharmaceutical Engineering, International University of Korea, Jinju, Korea

P3-27 Accumulation of ginsenoside Rg3 in ginseng hairy roots elicited by methyl jasmonate
 Ok-Tae Kim¹, Gum-Sook Kim, Young-Chang Kim, Kyong-Hwan Bang, Seong-Ho Lee, Dong-Yun Hyun, Sung-Woo Lee
 Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, 924, Eumseong 369-871, South Korea

P3-28 Lycopodium-like tetrahydroamine treatment delays the persimmon softening after storage
 Ji-Hye Jung¹, Han-sol Lee¹, Stephen Ryu¹, Gwang-Hwan Ahn²
¹Lipid Signaling Research Group, Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea; ²Sweet Persimmon Research Institute, Gimhae 621-800, Korea

P3-29 Korea National Plant Research Resources Center
 Jung-a Kim, Dong-Hyang Lee, Yong-Pyo Lim
 Molecular Genetics and Genomics Laboratory, Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon, Korea.

P3-30 Rapid discrimination of CMS cybrid lines between *Brassica oleracea* var. *capitata* and *Raphanus sativus* L. using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy of genomic DNA
 Eun-Hee Joo¹, Myung-Suk Ahn¹, Seung-Yeub Song¹, Hye-Rim Chang¹, Suk-Woon Kim¹, Jang-Ryul Liu²
¹Green Bio Research Center; ²Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIIB), 125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 305-800, Korea

2013 한국식물생명공학회 40주년 심포지엄 및 춘계학술발표회

P3-24
Beneficial effects of *Artemisia annua* L. extract on lipid metabolism in obese mice fed a high-fat diet.

Chul-Yung Choi², Jun-Su Lee¹, Bo-Ram Lee¹, Yun-Sang Yu¹, Hye-Yeon Yang¹, Hyun-Su Kim¹, **Yong-Pil Hwang^{1*}**
¹Department of Pharmaceutical Engineering, International University of Korea, Jinju, Korea;
²Jeollanamdo Institute of Natural Resources Research, Jeollanamdo, Republic of Korea.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered to be the most common hepatic manifestation of metabolic syndromes such as diabetes and obesity. The dysregulation of triacylglycerol metabolism may contribute to the derangement of hepatic lipid homeostasis and chronic liver damage. *Artemisia annua* is the source of antimalarial phytochemical, artemisinin. This study was designed to examine the potential health benefits of *Artemisia annua* L. extract (AAE) on obesity and related disorders in high-fat diet (HFD)-induced obese mice. AAE administration (200 mg/kg/day) for 4 weeks decreased body weight gain and adipose tissue weight in mice fed a HFD. AAE administration significantly improved lipid parameters of the serum and inhibited fat accumulation in the liver. The protein expression of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) and fatty acid synthase (FAS) in the mice fed AAE-containing diets was significantly reduced compared with the mice fed high-fat diets. Our results suggested that AAE suppress the expression of SREBP-1c and FAS, and may lead to a decrease in liver triglyceride and total cholesterol levels.

*Corresponding author: Tel. 055-751-7946, e-mail: protoplast@hanmail.net

2013. 6. 20 ~ 21. 충남대학교 정심화국제문화회관

P3-25
Effects of *Roria coccus* on lipid metabolism in mice fed with high fat diet

Hyun-Su Kim, Bo-Ram Lee, Jun-Su Lee, Yun-Sang Yu, Hye-Yeon Yang, Yong-Pil Hwang
 Department of Pharmaceutical Engineering, International University of Korea, Jinju, Korea

Hyperlipidemia is considered to be one of the greatest risk factors contributing to the prevalence and severity of cardiovascular diseases. The purpose of this study was to determine whether a water extract of *Roria coccus* Wolf (WPC), a well-known medicinal plant, regulates hepatic lipid homeostasis in high-fat well-known medicinal plant, regulates hepatic lipid homeostasis in high-fat diet (HFD)-induced obese mice. WPC administration (100 mg/kg/day) for 4 weeks decreased body weight gain and adipose tissue weight in mice fed a HFD. Administration of WPC effectively decreased retroperitoneal fat and the serum levels of total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) in mice fed a HFD. The protein expression of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) and fatty acid synthase (FAS) in the mice fed WPC-containing diets was significantly reduced compared with the mice fed high-fat diets. Our results suggested that WPC suppress the expression of SREBP-1c and FAS, and may lead to a decrease in liver triglyceride and total cholesterol levels.

*Corresponding author: Tel. 055-751-7946, e-mail: protoplast@hanmail.net

나. 학회명: (사)한국독성학회/한국환경성물연변이·발암원학회-2건



C O N T E N T S

P-039 THE ROLE OF SAPONINS FROM *PLATYCODON GRANDIFLORUM* IN HIGH GLUCOSE-INDUCED LIPID ACCUMULATION IN HUMAN HepG2 CELLS 217
Yong-Pil Hwang^{1,2}, Jae Ho Choi¹, Hyung Kyun Kim¹, Khanal Tilak¹, Bo Ram Lee², Young Chul Chung³ and Hye Gwang Jeong^{1,*}
¹Department of Toxicology, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea, ²Department of Pharmaceutical Engineering, International University of Korea, Jinju, Korea, ³Division of Food Science, Korea International University, Jinju, Korea

P-040 S-ALLYL CYSTEINE REGULATES LIPID METABOLISM THROUGH ACTIVATION OF SIRTUIN AND AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASES IN HepG2 CELLS 218
Yong-Pil Hwang^{1,2}, Hyung Gyun Kim¹, Jae Ho Choi¹, Yun Sang Yu², Young Chul Chung³ and Hye Gwang Jeong^{1,*}
¹Department of Toxicology, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea, ²Department of Pharmaceutical Engineering, Korea International University, Jinju, Korea, ³Division of Food Science, Korea International University, Jinju, Korea

P-041 3-CAFFEYOYL, 4-DIHYDROCAFFEYOYLQUINIC ACID FROM *SALICORNIA HERBACEA* INHIBITS HIGH GLUCOSE-INDUCED HEPATIC SREBP-1 ACTIVATION AND PREVENTS LIPID ACCUMULATION THROUGH AMPK ACTIVATION 219
Yong-Pil Hwang^{1,2}, Jae Ho Choi¹, Hyung Kyun Kim¹, Minh Truong Do¹, Thu Phuong Tran¹, Jun Su Lee² and Hye Gwang Jeong^{1,*}
¹Department of Toxicology, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea, ²Department of Pharmaceutical Engineering, College of Pharmacy, International University of Korea, Jinju, Korea

P-042 ATLAS OF THE ADULT RAT BRAIN BASED ON THE 10-LEVEL CORONAL SECTION 220
Jae-Woo Cho, Byoung-Seok Lee, Soyub Rime, Heejin Park, Jiseok Han, Eue-Chun Jung, Yoon-Hee Kim, Sang-Jun Lee and Yong-Bum Kim*
Korea Institute of Toxicology, KRICIT, P.O.123, 141 Gajong-ro, Yuseong-Gu, Daejeon, Korea

P-043 TOXICITY ASSESSMENT OF FREEZE-DRIED *PROTAETIA BREVITARIS*: 4-WEEK ORAL DOSE STUDY IN SPRAGUE-DAWLEY RATS 221
So-Ri Han¹, Soyub Rime², JungHo Noh¹, Eun-Young Yun¹, Jae Sam Hwang¹, Shin-Woo Cha¹, Eun Ju Jeong¹ and Kyoung-Sik Moon^{1,*}
¹Department of Non-clinical Studies, Korea Institute of Toxicology, Daejeon, Korea, ²Toxicology Pathology Center, Korea Institute of Toxicology, Daejeon, Korea, ³Department of Agricultural Biology Applied

- xx -

P-040

S-ALLYL CYSTEINE REGULATES LIPID METABOLISM THROUGH ACTIVATION OF SIRTUIN AND AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASES IN HepG2 CELLS

Yong-Pil Hwang^{1,2}, Hyung Gyun Kim¹, Jae Ho Choi¹, Yun Sang Yu², Young Chul Chung³ and Hye Gwang Jeong^{1,*}

¹Department of Toxicology, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea
²Department of Pharmaceutical Engineering, Korea International University, Jinju, Korea
³Division of Food Science, Korea International University, Jinju, Korea

Hepatic metabolic derangements are key components in the development of fatty liver disease. AMP-activated protein kinase (AMPK) plays a central role in controlling hepatic lipid metabolism through modulating the downstream sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and fatty acid synthase (FAS) pathway. S-allylcysteine (SAC) is the most abundant organosulfur compound in aged garlic extract (AGE), which has been used to standardize commercial aged extracts. SAC has been reported to have antioxidant, anti-cancer, anti-hepatotoxic and neurotrophic properties. In this study, SAC was used to examine its effects on AMPK activation and fatty acid metabolism in human HepG2 hepatocytes. SAC significantly reduced free fatty acid (FFA)-induced total cellular lipid and triglyceride accumulation in steatotic HepG2 cells. SAC significantly increased the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) in HepG2 cells. Additionally, SAC down-regulated the levels of sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and its target genes, including ACC and fatty acid synthase (FAS). Use of a specific inhibitor showed that SAC activated AMPK via calcium/calmodulin-dependent kinase kinase (CaMKK) and SIRT1. This study demonstrates that SAC regulates hepatic lipid homeostasis via an AMPK-dependent signaling pathway. Targeting AMPK activation by SAC may represent a promising approach for the prevention and treatment of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease.

Keywords: S-Allyl cysteine, Steatosis, AMPK, Non-alcoholic fatty liver disease

* Correspondence to : hgieong@cnu.ac.kr

218

P-041

3-CAFFEYOYL, 4-DIHYDROCAFFEYOYLQUINIC ACID FROM *SALICORNIA HERBACEA* INHIBITS HIGH GLUCOSE-INDUCED HEPATIC SREBP-1 ACTIVATION AND PREVENTS LIPID ACCUMULATION THROUGH AMPK ACTIVATION

Yong-Pil Hwang^{1,2}, Jae Ho Choi¹, Hyung Kyun Kim¹, Minh Truong Do¹, Thu Phuong Tran¹, Jun Su Lee² and Hye Gwang Jeong^{1,*}

¹Department of Toxicology, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea
²Department of Pharmaceutical Engineering, College of Pharmacy, International University of Korea, Jinju, Korea

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered to be the most common hepatic manifestation of metabolic syndromes such as diabetes and obesity. The dysregulation of triacylglycerol metabolism may contribute to the derangement of hepatic lipid homeostasis and chronic liver damage. 3-Caffeoyl, 4-dihydrocaffeoylquinic acid (CDCQ) from *Salicornia herbacea* has a variety of pharmacological properties, including antioxidant and anti-inflammatory and hepatoprotective properties. In this study, we provide new data on the molecular mechanisms underlying the role of CDCQ in prevention of high glucose-induced lipid accumulation in human HepG2 cells. We found that CDCQ decreased high glucose-induced accumulation of triglyceride and total cholesterol in HepG2 cells. CDCQ inhibited the high glucose-induced mRNA levels of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), fatty acid synthase (FAS). CDCQ also inhibited the high glucose-induced protein expression of SREBP-1 and FAS. Moreover, the use of a specific inhibitor or liver kinase B1 (LKB1)-siRNA transfected HepG2 cells showed that CDCQ activated AMP-activated protein kinase (AMPK) via silent information regulator 1 (SIRT1) or LKB1 in HepG2 cells. Our findings reveal a novel mechanism by which CDCQ regulates lipogenesis and thereby inhibits hepatic steatosis, suggesting its potential therapeutic application in diabetes and related steatotic liver diseases.

Keywords: AMPK, 3-Caffeoyl, 4-Dihydrocaffeoylquinic acid, High glucose, Lipogenesis, Liver diseases

* Correspondence to : hgieong@cnu.ac.kr

The 28th Annual Meeting of KSOT/KEMS 219

다. 학회명: 한국약용작물학회-2건



P03-002
Artemisia annua L. extract regulates fatty acid metabolism via an AMP-activated protein kinase dependent signaling pathway

Jun Su Lee ^{*}, Bo Ram Lee [†], Hye Yeon Yang ^{*}, Yun Sang Yu ^{*}, Si On Park ^{*}, Chul Yung Choi [†], Hyun-Su Kim ^{*}, Yong-Pil Hwang ^{**}

^{*} Department of Pharmaceutical Engineering, International University of Korea, Jinju, Korea

[†] Jeollanamdo Institute of Natural Resources Research, Jeollanamdo, Republic of Korea.

Artemisia annua is the source of antimalarial phytochemical, artemisinin. This study was conducted to suggest the role of AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway in the anti-obesity effect of *Artemisia annua* L. extract (AAE). We found that AAE suppressed high glucose-induced lipid accumulation in HepG2 cells. AAE significantly increased the phosphorylation of AMPK and acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) in the liver and HepG2 hepatocytes. In addition, AAE down-regulated the levels of sterol regulatory element-binding protein 1 and its target genes including sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and fatty acid synthase (FAS). The specific AMPK inhibitor compound C attenuated the effects of AAE on the expression of lipid metabolism-related proteins such as SREBP-1 and FAS in HepG2 hepatocytes. These results indicate that AAE prevents high glucose-induced lipogenesis in HepG2 cells by blocking the expression of SREBP-1c, FAS through AMPK activation, suggesting that AAE is a novel AMPK activator with a potential role in the prevention and treatment obesity.

Keywords: *Artemisia annua*; high glucose; high-fat diet; AMPK; lipogenesis

*Corresponding author: Tel. 055-751-7946, e-mail: protoplast@hanmail.net

P03-003

Prevention of high glucose-induced hepatic lipogenesis by *Poria cocos* through AMPK pathways

Bo Ram Lee ^{*,†}, Hye Yeon Yang ^{*,†}, Jun Su Lee ^{*}, Yun Sang Yu ^{*}, Si On Park ^{*}, Chul Yung Choi [†], Hyun-Su Kim ^{*}, Yong-Pil Hwang ^{**}

^{*} Department of Pharmaceutical Engineering, International University of Korea, Jinju, Korea

[†] Jeollanamdo Institute of Natural Resources Research, Jeollanamdo, Republic of Korea.

Poria cocos has a variety of pharmacological properties, including anti-cancer, anti-inflammatory and hepatoprotective properties. The aims of our study were to provide new data on the molecular mechanisms underlying the role of *Poria cocos* extract (PCE) in prevention of high glucose-induced lipid accumulation in human HepG2 cells. We found that PCE suppressed high glucose-induced lipid accumulation in HepG2 cells. PCE significantly increased the phosphorylation of AMPK and acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) in the liver and HepG2 hepatocytes. In addition, PCE down-regulated the levels of sterol regulatory element-binding protein 1 and its target genes including sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and fatty acid synthase (FAS). The specific AMPK inhibitor compound C attenuated the effects of PCE on the expression of lipid metabolism-related proteins such as SREBP-1 and FAS in HepG2 hepatocytes. The results indicate that PCE inhibit lipogenesis in cultured human hepatocytes, and further suggest that SAC impair triglyceride synthesis in part due to decreased *de novo* fatty acid synthesis resulting from inhibition on AMPK-dependent FAS and SREBP-1c.

Keywords: *Poria cocos*; high glucose; high-fat diet; AMPK; lipogenesis

* These authors contributed equally

*Corresponding author: Tel. 055-751-7946, e-mail: protoplast@hanmail.net

3. 기타홍보실적 (수상실적) - 1건

가. 수상명칭 및 일시: 한국환경성독물연변이학회 우수포스터상, 2012년11월02일



발암원 12 -P-040

우수 포스터상

소속 : 한국국제대학교

성명 : 황 용 필

귀하는 2012년도 한국환경성독물연변이
발암원학회 주최 제28차 정기 학술대회
에서 우수 포스터상에 선정되었기에
이를 수여하는 바입니다.

2012년 11월 2일

한국환경성독물연변이발암원학회
회장 김 상 건



주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

지리산

한방자생식물들

활용유한

비약독성지방간질환억제

천연소재개발

농림수산식품부