

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



PCT



(10) 국제공개번호
WO 2012/021035 A2

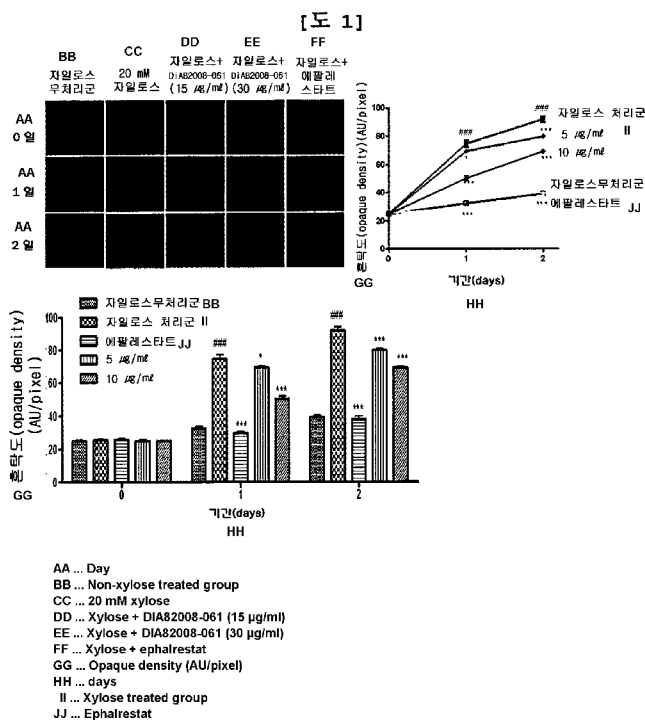
(43) 국제공개일
2012년 2월 16일 (16.02.2012)

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/54 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/005963
- (22) 국제출원일: 2011년 8월 12일 (12.08.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0078391 2010년 8월 13일 (13.08.2010) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국한의학연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) [KR/KR]; 대전시 유성구 전민동 461-24, 305-811 Daejeon (KR). **손은진 (SHON, Eun Jin)** [KR/KR]; 대전시 유성구 하기동 송림마을 5단지 510동 1205호, 305-759 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): **김진숙 (KIM, Jin Sook)** [KR/KR]; 서울시 관악구 봉천동 1615-17 반석블레스빌 804호, 151-050 Seoul (KR). **김정현 (KIM, Jung Hyun)** [KR/KR]; 서울시 영등포구 양평동 1가 238-18, 150-101 Seoul (KR). **김영숙 (KIM, Young Sook)** [KR/KR]; 대전시 유성구 장대동 479 장대푸르지오아파트 109동 203호, 305-308 Daejeon (KR). **김찬식 (KIM, Chan-Sik)** [KR/KR]; 대전시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원 기숙사 308호, 305-811 Daejeon (KR). **김기모 (KIM, Ki Mo)** [KR/KR]; 대전시 동구 가양동 569-27, 300-090 Daejeon (KR). **김은순 (KIM, Ohn Soon)** [KR/KR]; 대전시 유성구 관평동 922, 305-509 Daejeon (KR). **이윤미 (LEE, Yun Mi)** [KR/KR]; 대전시 유성구 전민동 360-5 201호, 305-390 Daejeon (KR). **이영섭 (LEE, Young Seop)** [KR/KR]; 서울시 은평구 수색동 수색청구아파트 103동 1104호, 122-759 Seoul (KR).
- (74) 대리인: **이원희 (LEE, Won Hee)**; 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2차 8층, 135-080 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING DIABETES COMPLICATIONS CONTAINING LITSEA JAPONICA EXTRACT OR FRACTION THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병병증 예방 및 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing and treating diabetes complications containing Litsea japonica extract or fractions thereof as an active ingredient, and more particularly, to Litsea japonica extract or fractions thereof for suppressing the generation of an advanced glycation end product, which is an indicator of diabetes complications, and the activity of aldose reductase, preventing diabetic eye diseases (diabetic cataract and retinopathy) that are early symptoms of diabetes complications and the loss of podocytes, wherein decreasing expression of nephrin, which is a slit diagram protein that plays an important role in podocyte functions, is suppressed in particular, thereby rendering the present invention useful as the active ingredient in the composition for preventing and treating diabetes complications including diabetic nephropathy.

(57) 요약서: 본 발명은 까마쪽나무(Litsea japonica) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병병증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 당뇨병병증의 지표인 최종당화산물의 생성 및 알도스 환원효소의 활성을 억제하며, 당뇨병병증 초기 증세인 당뇨병 안구질환(백내장 및 망막증) 및 발세포(podocyte) 소실을 예방하며, 특히 발세포 기능에 중요한 역할을 하는 슬릿 다이어그램(slit diagram) 단백질인 네프린(Nephrin)의 발현 감소를 억제하므로, 당뇨병성 신증 등 당뇨병병증 예방 및 치료용 조성물의 유효성

분으로서 유용하게 이용될 수 있다.



SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

【명세서】**【발명의 명칭】**

까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병증 예방 및 치료용 조성물

5

【기술분야】

본 발명은 당뇨병증의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 까마쪽나무(*Litsea japonica*) 추출물을 이용한 당뇨병증 예방 및 치료제, 노화방지 및 지연용 조성물, 및 건강식품용 조성물에 관한 것이다.

10

【배경기술】

당뇨병(diabetes mellitus)은 전 세계적으로 중요한 성인병 중의 하나로서, 최근 우리나라에서도 급속한 경제 성장과 더불어 당뇨병 유병률이 10%에 달하며, 현재 전 세계적으로도 당뇨병환자는 2억4천만 명이 넘었으며, 2025년에는 전
15 세계적으로 3억8천만 명으로 증가할 것이며, 이중 60%가 아시아 지역에서 발병할 것이라고 2009년 미국의사협회(JAMA)에서 발표하였다. 특히 당뇨병발병시기가 중장년으로 당겨졌으며, 수명이 연장됨으로 인해서 합병증으로 진행되는 것은 피할 수 없는 상황이 되었다. 즉, 일반적으로 당뇨병에 걸린 후 10 ~ 20년이 지나면 체내 거의 모든 기관이 손상을 받아 당뇨병 망막병증(diabetic retinopathy),
20 당뇨병 백내장(diabetic cataract), 당뇨병 신증(diabetic nephropathy), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy), 심장병, 암 또는 골다공증 등이 나타난다. 만성 당뇨병 신증은 혈액 투석 치료 및 말기 신부전의 가장 중요한 원인이 되고 있으며, 당뇨병 백내장과 망막증은 실명을 초래하고 결국엔 죽음에 이르게 한다. 미국의 경우 25 ~ 74세 연령대의 실명의 원인이 당뇨병이며, 당뇨 발병 후 15 ~ 20년이
25 지나면 60%가 실명으로 이어진다. 그러므로 당뇨병환자에게서 합병증이 발병하는 기간이 5 ~ 10년 정도 지연만 되더라도 환자 및 그 가족의 삶의 질이 달라질 것이며, 국가재정에도 커다란 영향을 끼칠 것이다.

이러한 당뇨병증을 유발하는 기전으로는 크게 단백질의 비효소적

당화반응(nonenzymatic glycation of protein), 폴리올 경로(polyol pathway) 및 산화적 스트레스(oxidative stress) 등으로 설명되고 있다. 단백질의 비효소적 당화반응(nonenzymatic glycation of protein)이란, 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당이 효소 작용 없는 축합반응, 즉 밀리아드 반응에 의한 것으로, 이 반응의 결과로 최종당화산물(advanced glycation endproducts, AGEs)이 생성된다. 단백질의 비효소적 당화반응은 (1) 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산기와 환원당의 알데히드 또는 케톤이 효소 작용 없이 친핵성 첨가 반응을 하여 초기 단계 산물인 슈프염기(schiff base)를 형성하고, 상기 슈프염기와 인접한 케토아민 어닥트(ketoamine adduct)가 서로 축합하여 가역적인 아마도리(Amadori)형의 초기당화산물이 생성되는 단계 및 (2) 고혈당 상태가 지속되어 가역적인 아마도리형의 초기당화산물이 분해되지 않고 재배열(rearrangement)되어 비가역산물인 최종당화산물이 생성되고, 이렇게 생성된 최종당화산물들이 단백질 또는 지질 등과 결합 또는 교차결합(cross-linking)하여 비가역적인 당화단백질 또는 당화지질 등의 산물이 생성되는 단계로 나눌 수 있다.

가역적인 아마도리형의 초기당화산물과 달리 최종당화산물은 비가역적인 반응 산물이므로, 일단 생성되면 혈당이 정상으로 회복되어도 분해되지 않고, 최종당화산물이 결합한 단백질 또는 지질의 생존기간 동안 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시켜 조직 곳곳에서 합병증을 유발시킨다(Vinson, J. A. et al., 1996, *J. Nutritinal Biochemistry* 7: 559-663; Smith, P. R. et al., 1992, *Eur. J. Biochem.*, 210: 729-739). 예를 들면, 포도당과 여러 종류의 단백질이 반응하여 생성된 최종당화산물 중 하나인 당화 알부민은 만성 당뇨병 신증을 일으키는 중요한 요인으로 작용한다. 당화 알부민은 당화가 진행되지 않은 정상 알부민에 비해 더 용이하게 신사구체 세포 내로 유입되고, 고농도의 포도당은 메산지움 세포를 자극하여 세포외 기질(extracellular matrix)합성을 증가시킨다.

과도하게 유입된 당화 알부민과 증가된 세포외 기질로 인하여 신사구체의 섬유화가 야기된다. 이와 같은 기전으로 신사구체가 계속 손상 받게 되어 혈액투석 또는 장기이식 등의 극단적인 치료방법을 쓸 수밖에 없는 단계에 이르게 되는 것이다. 또한, 만성 당뇨병으로 인하여 동맥벽에서는 콜라겐이, 신사구체에서는 기저막성 단백질이 최종당화산물과 결합되어 조직에 축적됨이 보고된바 있다(Brownlee, M.,

et al., 1986, *Sciences*, 232, 1629-1632). 이처럼 비효소적 단백질 당화반응에 의하여 기저막, 혈장 알부민, 수정체 단백질, 피브린, 콜라겐 등의 단백질에서 당화가 일어나며, 생성된 최종당화산물이 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시켜 당뇨병 망막병증(diabetic retinopathy), 당뇨병 백내장(diabetic cataract), 당뇨병 신증(diabetic nephropathy), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy) 등의 만성 당뇨합병증을 유발시킨다. 또한, 고혈당 상태에서 최종당화산물이 생성되는 과정에서 지질대사 이상이 일어나고 동시에 생성되는 유해한 산소 자유라디칼에 대한 방어시스템 기능이 저하되어 산화적 스트레스가 유발된다고 보고된바 있다(Yokozawa, T., et al, 2001, *J. of Trad. Med.*, 18: 107-112). 이처럼 비효소적 당화반응과 산화적 스트레스(oxidative stress) 작용 기전이 서로 연관되어 있다.

폴리올 경로란 (1) 알도스 또는 케토스로부터 알도스 환원효소(aldose reductase, AR) 작용에 의해 환원되어 솔비톨을 형성하는 단계 및 (2) 솔비톨이 솔비톨 탈수소효소에 의해 산화되어 과당을 생성하는 단계로 이루어지는 과정이다. 정상상태에서는 알도스 환원효소가 포도당에 대하여 친화력이 매우 낮지만, 고혈당 상태에 의하여 폴리올 경로의 첫 번째 효소인 알도스 환원효소가 과도하게 활성화되어, 이로 인해 과도한 고혈당이 솔비톨과 과당으로 전환되어 조직에 축적되어 삼투압의 균형이 깨져 합병증이 유발된다. 즉, 증가한 삼투압으로 인하여 수분이 인입되어 당뇨병 망막병증(diabetic retinopathy), 당뇨병 백내장(diabetic cataract), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy) 등으로 진행된다(김응진 외, 당뇨병학, 대한 당뇨병학회, 고려의학, 483쪽; Soulis-Liparota, T., et al., 1995, *Diabetologia*, 38: 357-394). 최종당화산물이 사람의 미세혈관 내피세포에서 폴리올 경로의 주효소인 알도스 환원효소를 활성화시키는 것이 보고된바 있다(Nakamura, N., et al., 2000, *Free Radic Biol. Med.*, 29: 17-25). 이때 과당은 포도당에 비하여 단백질의 비효소적 당화반응의 속도가 약 10배 정도 빠르다. 따라서 고농도의 과당이 단백질과 결합하여 결국은 최종당화산물의 형성을 가속화시킨다. 이와 같이, 비효소적 당화반응, 폴리올 경로 및 산화적 스트레스(oxidative stress) 작용 기전들이 서로 연관되어 당뇨합병증을 유발시킨다. 고혈당 상태에서 최종당화산물이 생성되는 과정에서

지질대사 이상이 일어나고 동시에 생성되는 유해한 산소 자유라디칼에 대한 방어시스템 기능이 저하되어 산화적 스트레스가 유발된다고 보고된바 있다(Yokozawa, T., et al., 2001, J. of Trad. Med., 18: 107-112). 따라서 비효소적 당화반응과 산화적 스트레스(oxidative stress) 작용 기전이 서로
 5 연관되어 있다. 따라서, 당뇨병병증의 발병을 지연하거나 예방 또는 치료하기 위해서는 최종당화산물 형성의 억제가 매우 중요한 것으로 밝혀졌다(Brownlee, M., et al., 1988, *N. Engl. Med.*, 318, 1315-1321).

현재, 단백질 당화 억제제로 합성제제인 아미노구아니딘(aminoguanidine)은
 10 친핵성 히드라진(hydrazine)으로, 아마도리 산물과 결합하여 단백질과의 교차결합을 방지함으로써 최종당화산물의 생성을 억제하여 합병증으로 진전되는 것을 지연 또는 방지한다(Brownlee, M., et al., 1986, *Sciences*, 232, 1629-1632; Edelstein, D. et al., 1992, *Diabetes*, 41, 26-29). 아미노구아니딘은 당뇨병병증의 예방 및 치료에 가장 유망한 합성 의약품으로 제 3상 임상실험까지
 15 진행되었으나, 장기간 투여 시 독성이 유발되는 문제점이 나타나 중단되었다. 그러므로 안전하고 효능이 우수한 천연약제의 개발이 요망되고 있는 실정이다.

까마쪽나무(*Litsea japonica*)는 쌍떡잎식물 미나리아재비목 녹나무과의 상록 소교목으로, 한국의 남부(제주도, 경남, 전남), 일본 등지에 분포한다. 이는
 20 주로 수직적으로 표고 700m 이내의 바닷가, 산기슭에서 자라는 특징이 있으며, 그 생김새를 살펴보면, 다음과 같다. 나무껍질은 갈색이며, 잔가지는 굵고 털이 나있고, 잎은 마주나고 긴 타원형으로 양끝이 좁고 두꺼운 혁질(革質) 또는 뒤로 조금 말렸으며, 잎 뒷면에 갈색 털이 뽁뽁이 나있다. 꽃은 7 ~ 10월에 잎겨드랑이에서 겹산형꽃차례로 피고, 그 빛깔은 노란빛이 도는 흰색이다. 총포는
 25 겹에 갈색 털이 나며 화피는 6개로 깊게 갈라진다. 열매는 핵과로 타원형이며 다음해 10월에는 열은 자주빛으로 익는다. 또한, 까마쪽나무의 화학적 구성성분으로는 정유(essential oils), 지방산(fatty acids), 락톤(lactones), 알칼로이드(alkaloids) 및 테르펜(terpenoids)이 알려져 있고(Tanaka et al., Butanolides from *Litsea japonica*, *Phytochemistry*, 29, 857859 1990),

있으로부터 분리된 플라보노이드(flavonoids) 성분인 티리로시드(tiliroside)는 보체계(complement system)에 대한 억제효과가 있음이 알려져있다(Lee *et al.*, Flavonoids from the Leaves of *Litsea japonica* and their anticomplement activity, *Phytotherapy reasearch*, 19, 273276, 2005).

5

이에 본 발명자들은 당뇨합병증을 위한, 독성 및 부작용이 거의 없는 안전하고 효과적인 천연 약재를 개발하던 중, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물이 시험관내(in vitro) 실험을 통해 최종당화산물 및 알도즈 환원효소 생성을 억제효과를 확인하였고, 생체외(ex vivo) 실험을 통해 백내장 유발을
10 억제하는 효과를 확인하였으며, 생체내(in vivo) 실험을 통해 제 2형 당뇨동물 모델의 신장기능 손실 억제 효과를 확인함으로써 강력한 당뇨합병증 억제 활성 및 노화방지효능이 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

15 【기술적 과제】

본 발명의 목적은 까마쪽나무(*Litsea japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을
20 유효성분으로 함유하는 노화방지 및 지연용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 까마쪽나무(*Litsea japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨합병증 예방 및 치료용
25 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨합병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 노화방지 및 지연용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 노화방지 및 지연용 건강식품용 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 당뇨병증에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병증
5 치료방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병증 예방방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 노화방지 또는 지연방법을 제공한다.

10 또한, 본 발명은 당뇨병증 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 제공한다.

또한, 본 발명은 당뇨병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 제공한다.

15 또한, 본 발명은 노화방지 및 지연용 약학적 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 제공한다.

아울러 본 발명은 노화방지 및 지연용 건강식품용 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

20 본 발명은 까마쪽나무(*Litsea japonica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 당뇨병증은 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증, 당뇨병 심장병, 당뇨병 골다공증, 및 당뇨병 아테롬성 동맥경화로
25 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 당뇨병증은 당뇨병이 장기간 지속될 경우 유발되는 증상이지만, 당뇨병의 발병 기준 및 판단 기준과 상이하며, 당뇨병증 치료제는 당뇨병 치료제와는 별개로서 사용될 수 있다.

상기 까마쪽나무 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해

제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다:

- 1) 까마쪽나무에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.

5 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 까마쪽나무는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 까마쪽나무는 나무 전체를 이용할 수 있고, 잎 또는 줄기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C_1 내지 C_2 저급 알코올을 이용하는 것이
10 바람직하고, 상기 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하며, 80% 에탄올 수용액을 이용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 추출 방법으로는 여과법, 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있으며, 열수추출 방법으로 1회 내지 5회 추출하는 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나
15 이에 한정하지 않는다. 상기 추출용매는 건조된 까마쪽나무 줄기에 0.1 내지 10배 첨가할 수 있으며, 0.3 내지 5배 첨가하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20 내지 70℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 12 내지 48시간인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는
20 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

 본 발명의 구체적인 실시태양에 있어서, 까마쪽나무 줄기 및 잎을 물로 세척한 후, 그늘에서 건조시켰다. 건조된 까마쪽나무 줄기 및 잎을 1:9의 비율로
25 분쇄하여 추출용기에 넣고, 추출용매로 상온에서 반복 추출하였다. 까마쪽나무 추출물을 수득한 후, 거름종이 등을 이용하여 고형분을 제거하고 여과하였다. 상기 추출액을 감압 농축하여 까마쪽나무 추출물을 제조하였다.

 또한, 본 발명은 까마쪽나무 추출물을 추가적으로 유기용매를 가하여

제조한 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 까마쪽나무 추출물의 분획물 다음과 같이 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

5 1) 까마쪽나무 추출물을 물에 현탁한 후, n-헥산을 가하여 n-헥산층을 분리하는 단계;

2) 단계 1)의 남은 물층에 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 층을 분리하는 단계;

3) 단계 2)의 남은 물층에 부탄올을 가하여 부탄올층을 분리하는 단계; 및

10 4) 단계 3)의 남은 물층에 물 분획물을 분리하는 단계.

상기 방법에 있어서, 상기 유기용매는 노르말-헥산, 에틸아세테이트 또는 노르말-부탄올인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 상기 까마쪽나무 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여

수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

15 상기 유기용매는 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 보다 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 당뇨병증은 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증, 당뇨병 심장병, 당뇨병 골다공증, 및 당뇨병 아테롬성 동맥경화로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

20 당뇨병증은 당뇨병이 장기간 지속될 경우 유발되는 증상이지만, 당뇨병의 발병 기준 및 판단 기준과 상이하며, 당뇨병증 치료제는 당뇨병 치료제와는 별개로서 사용될 수 있다.

상기 분획물은 상기 까마쪽나무 추출물에서 용매를 증발시키고 수득한 잔사에 물과 노르말-헥산을 넣어 노르말-헥산층을 분리하여 노르말-헥산 분획물을
25 수득하였다. 헥산층을 제외한 물층에 에틸아세테이트를 혼합한 후 에틸아세테이트층을 분리하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 또한, 에틸아세테이트층을 제거한 후 노르말-부탄올을 혼합한 후 노르말-부탄올층을 분리하여 노르말-부탄올 분획물을 수득하였다. 마지막으로 노르말-부탄올층을 제거한 후 물층의 물 분획물을 수득하였다.

본 발명자들은 당뇨병증의 지표 및 치료 효능 평가의 지표가 되는 최종당화산물의 생성억제 효능을 분석하기 위하여, 단백질로 우혈청알부민(bovine serum albumin; BSA)을 이용하여 과당 및 글루코스와 결합 정도를 지표로 이용하였다. 또한, 양성대조군으로는 최종당화산물에 대한 억제 효능이 매우 우수하다고 알려진 아미노구아니딘(aminoguanidine)을 이용하였다. 그 결과, 5 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 처리한 실험군이 양성 대조물질인 아미노구아니딘에 비해 약 3배 이상 효과적으로 최종당화산물 억제 효능을 나타냄을 확인하였다(표 1 참조).

본 발명자들은 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물의 당뇨병증의 또 10 다른 지표가 되는 알도즈 환원효소의 활성 억제를 측정하였다. 비교 대조군으로는 3,3-테트라메틸렌글루타르산(Tetramethyleneglutaric acid)을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 기존에 알려진 알도즈 환원효소 억제제에 비하여 더 효과적으로 알도즈 환원효소 활성을 억제하는 것으로 나타났다(표 2 참조).

표 2에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 까마쪽나무 잎 추출물의 알도즈 환원효소 활성억제효능은 양성대조물질보다 우수하며, 또한 에칠아세테이트 분획 15 층의 효능은 더욱 우수하게 나타났다.

그 결과, 까마쪽나무 추출물 및 분획물을 처리한 경우, 수정체의 혼탁을 가져오는 백내장을 억제 또는 지연시키는 효과를 나타냈다(도 1 참조). 또한, 20 신장기능의 지표가 되는 뇨 중의 전체 단백뇨(total proteinuria), protein/cr이 상승하였고(도 2 참조), 신장 내 AGEs의 축적이 까마쪽나무 추출물의 농도 의존적으로 감소하였으며(도 3 참조), 당뇨상태에서 소실되는 발세포(podocyte) 및 신장 사구체의 네프린(nephrin) 손실이 현저히 감소하였으므로(도 4 내지 도 5 참조), 당뇨병성 신증을 효과적으로 억제함을 확인하였다(도 6 참조).

따라서 본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 장기적인 당뇨상태에서 발생하는 당화생성물의 축적을 억제하고, 당뇨 합병증 초기 증세인 당뇨성 안구질환(백내장 및 망막증) 및 발세포의 소실을 예방하며, 특히 발세포 기능에 중요한 역할을 하는 슬릿 다이그람 단백질(slitt diagram protein) 인 네프린의 발현 감소를 억제하는 효과를 가지므로 당뇨성 신증 등 당뇨병증 예방 25

및 치료용 조성물에 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 노화방지 및 지연용 약학적 조성물을 제공한다.

5 최종당화산물이 생성되는 과정에서 지질대사 이상이 일어나고 동시에 생성되는 유해한 산소 자유라디칼에 대한 방어시스템 기능이 저하되어 산화적 스트레스가 유발된다고 보고된 바(Yokozawa, T., et al, 2001, *J. of Trad. Med.*, 18: 107-112), 본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 최종당화산물의 생성을 효과적으로 억제하므로, 노화방지 및 지연용 약학적 조성물에 유효성분으로
10 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 0.1 내지 99.9 중량%를 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

15 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어
20 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수
25 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지,

라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용 또는 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 피부외용으로 사용한다.

5 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 까마쪽나무 추출물의 양을 기준으로 0.01 내지 1000 mg/kg인 것이 바람직하고, 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다.

10 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

또한, 본 발명은 까마쪽나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.

15 또한, 본 발명은 까마쪽나무 추출물에 추가적으로 유기용매를 가하여 제조한 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.

상기 당뇨병증은 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증, 당뇨병 심장병, 당뇨병 골다공증, 및 당뇨병 아테롬성 동맥경화로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

20 본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 최종당화산물의 생성 및 알도즈 환원효소의 활성을 억제하고, 제 2형 당뇨병동물모델에서 당뇨병 백내장 및 당뇨병 신증에 대한 억제 효과를 나타냄으로써 당뇨병증을 효과적으로 억제함을 확인하였으므로, 당뇨병 신증 등의 당뇨병증의 예방 및 개선용 건강식품용 조성물에 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

25 또한, 본 발명은 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 노화방지 및 지연용 건강식품용 조성물을 제공한다.

최종당화산물이 생성되는 과정에서 지질대사 이상이 일어나고 동시에 생성되는 유해한 산소 자유라디칼에 대한 방어시스템 기능이 저하되어 산화적

스트레스가 유발된다고 보고된 바(Yokozawa, T., et al, 2001, *J. of Trad. Med.*, 18: 107-112), 본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 최종당화산물의 생성을 효과적으로 억제하므로, 노화방지 및 지연용 건강식품용 조성물에 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

5

본 발명의 기능성 식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의
10 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강식품 100 중량부당 0.01~0.04 중량부, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 중량부 범위에서 선택하는 것이 바람직하다.

상기 외에 본 발명의 기능성 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드
15 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 기능성 식품은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게
20 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 당뇨병증에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병증
25 치료방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병증 예방방법을 제공한다.

상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의

종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 장기적인 당뇨상태에서 발생하는 당화생성물의 축적을 억제하고, 당뇨 합병증 초기 증세인 당뇨성 안구질환(백내장 및 망막증) 및 발세포의 소실을 예방하며, 특히 발세포 기능에 중요한 역할을 하는 슬릿 다이그램 단백질(slit diagram protein) 인 네프린의 발현 감소를 억제하는 효과를 가지므로 당뇨성 신증 등의 당뇨합병증 예방 및 치료방법에 유용하게 사용될 수 있다.

10

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 노화방지 또는 지연방법을 제공한다.

최종당화산물이 생성되는 과정에서 지질대사 이상이 일어나고 동시에 생성되는 유해한 산소 자유라디칼에 대한 방어시스템 기능이 저하되어 산화적 스트레스가 유발된다고 보고된 바(Yokozawa, T., et al, 2001, *J. of Trad. Med.*, 18: 107-112), 본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 최종당화산물의 생성을 효과적으로 억제하므로, 노화방지 및 지연방법에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 당뇨합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 제공한다.

또한, 본 발명은 당뇨합병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 제공한다.

본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 장기적인 당뇨상태에서 발생하는 당화생성물의 축적을 억제하고, 당뇨 합병증 초기 증세인 당뇨성 안구질환(백내장 및 망막증) 및 발세포의 소실을 예방하며, 특히 발세포 기능에 중요한 역할을 하는 슬릿 다이그램 단백질(slit diagram protein) 인 네프린의 발현 감소를 억제하는 효과를 가지므로 당뇨성 신증 등의 당뇨합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 건강식품용 조성물에 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 노화방지 및 지연용 약학적 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 제공한다.

또한, 본 발명은 노화방지 및 지연용 건강식품용 조성물로 사용하기 위한,
5 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 제공한다.

최종당화산물이 생성되는 과정에서 지질대사 이상이 일어나고 동시에 생성되는 유해한 산소 자유라디칼에 대한 방어시스템 기능이 저하되어 산화적 스트레스가 유발된다고 보고된 바(Yokozawa, T., et al, 2001, *J. of Trad. Med.*, 18: 107-112), 본 발명의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 최종당화산물의
10 생성을 효과적으로 억제하므로, 노화방지 및 지연용 약학적 조성물 및 건강식품용 조성물에 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

【유리한 효과】

본 발명의 까마쪽나무(*Litsea japonica*) 추출물 또는 이의 분획물은
15 당뇨병증의 지표인 최종당화산물의 생성 및 알도즈 환원효소의 활성을 억제하며, 항백내장, 항망막증 및 항신증 효과를 통한 강력한 당뇨병증 억제 활성, 및 항산화 활성을 나타내므로, 당뇨병증 예방 및 치료용 조성물, 및 노화방지 및 지연용 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

20 【도면의 간단한 설명】

도 1은 생체 외(ex vivo) 실험을 통한 수정체 혼탁 지연효과 실험 사진촬영결과 및 분석결과를 나타낸 그림이다:

DiAB2008-061(15 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 까마쪽나무 추출물 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 및

DiAB2008-061(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 까마쪽나무 추출물 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

25 도 2는 뇨 중의 전체 단백질 양과 protein/Cr 비율변화를 나타낸 그래프이다:

Nor: 정상군;

db/db: 당뇨군;

MET: 양성대조군;

DiAB061-50: 까마쪽나무 추출물 50 mg/kg 처리군;

DiAB061-100: 까마쪽나무 추출물 100 mg/kg 처리군; 및

DiAB061-250: 까마쪽나무 추출물 250 mg/kg 처리군.

도 3은 신장 내 사구체에서 AGEs의 함량을 나타낸 그림이다:

5 Nor: 정상군;

db/db: 당뇨군;

MET: 양성대조군;

DiAB061-50: 까마쪽나무 추출물 50 mg/kg 처리군;

DiAB061-100: 까마쪽나무 추출물 100 mg/kg 처리군; 및

10 DiAB061-250: 까마쪽나무 추출물 250 mg/kg 처리군.

도 4는 사구체 발세포(podocyte)의 시냅토포딘(Synaptopodin) 및
데스민(Desmin) 염색변화를 나타낸 그림이다:

Nor: 정상군;

db/db: 당뇨군;

15 MET: 양성대조군;

DiAB061-50: 까마쪽나무 추출물 50 mg/kg 처리군;

DiAB061-100: 까마쪽나무 추출물 100 mg/kg 처리군; 및

DiAB061-250: 까마쪽나무 추출물 250 mg/kg 처리군.

도 5는 신장에서의 네프린 단계(Nephrin level) 변화를 나타낸 그림이다:

20 Nor: 정상군;

db/db: 당뇨군;

MET: 양성대조군;

DiAB061-50: 까마쪽나무 추출물 50 mg/kg 처리군;

DiAB061-100: 까마쪽나무 추출물 100 mg/kg 처리군; 및

25 DiAB061-250: 까마쪽나무 추출물 250 mg/kg 처리군.

도 6은 신장 사구체에서의 네프린 변화를 나타낸 그림이다:

Nor: 정상군;

db/db: 당뇨군;

MET: 양성대조군;

DiAB061-50: 까마쪽나무 추출물 50 mg/kg 처리군;

DiAB061-100: 까마쪽나무 추출물 100 mg/kg 처리군; 및

DiAB061-250: 까마쪽나무 추출물 250 mg/kg 처리군.

5 【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

10 <실시예 1> 까마쪽나무(*Litsea japonica*) 80% 에탄올 수용액 추출물의 제조

경동시장(대한민국)에서 구입하여 음건 및 세절한 까마쪽나무의 줄기 및 잎을 각각 1:9의 비율로 3 kg을 분쇄한 후 1 L의 80% 에탄올수용액을 넣고, 추출용기에서 상온 상태로 반복 추출하였다. 그런 다음, 상기 추출액을 여과한 후, 구성성분의 분해 및 가수분해를 방지할 수 있도록 농축 시 온도를 40 ~ 45℃ 이하로 유지하며 감압 농축시켜 에탄올 추출물을 390 g을 수득하였다. 또한, 증거표본(no. Diab-2008-61)은 한국한의학연구원 한의융합연구본부 당뇨합병증연구센터 표본실에 보관하였다.

<실시예 2> 까마쪽나무 분획물의 제조

까마쪽나무 분획물을 제조하기 위하여 상기 <실시예 1>의 까마쪽나무 추출물에서 용매를 증발시키고 수득한 잔사에 물과 노르말-헥산을 넣어 노르말-헥산층을 분리하여 노르말-헥산 분획물을 수득하였고, 헥산층을 제외한 물층에 에틸아세테이트를 혼합한 후 에틸아세테이트층을 분리하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 또한, 에틸아세테이트층을 제거한 후 노르말-부탄올을 혼합한 후 노르말-부탄올층을 분리하여 노르말-부탄올 분획물을 수득하였다. 마지막으로 노르말-부탄올층을 제거한 후 물층의 물 분획물을 수득하였다. 각각의 헥산층, 에틸아세테이트층, 부탄올층 및 물 층은 25.1%, 11.2%, 11.2% 및 20.6%를 차지하고 이때, 오일성분이 많아 손실(lose)의 발생으로 총 100%가 되지 않는 것을 확인하였다.

<실험예 1> 최종당화산물 생성억제 효능 분석

상기 <실시예 1>에서 수득한 까마쪽나무 추출물과 상기 <실시예 2>에서 수득한 까마쪽나무 노르말-헥산 분획물, 까마쪽나무 에틸아세테이트 분획물, 5 까마쪽나무 노르말-부탄올 분획물 또는 까마쪽나무 물 분획물의 시험관 내 최종당화산물 생성 억제 효능을 분석하였다.

구체적으로, 단백질원으로 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA, 미국 시그마)을 택한 후, BSA를 10 mg/ml의 농도가 되도록 50 mM 인산완충용액(phosphate buffer; pH 7.4)에 첨가하여 제조하였다. 당원으로는 0.2 10 M 과당 및 0.2 M 글루코스가 혼합된 용액을 사용하였다. 상기의 제조된 BSA 용액에 과당 및 글루코스 혼합액을 첨가하였다. 까마쪽나무 에탄올 추출물, 노르말-헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 노르말-부탄올 분획물은 각각 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 또는 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 제조하였고, 물 분획물은 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 또는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 제조하였다. 상기 모든 화합물을 15 디메틸설폭사이드(Dimethylsulfoxide; DMSO)에 녹인 후 15% 트윈(tween) 80을 첨가하였고, 총 DMSO의 함량은 0.2%이었다. 상기 제조된 추출물 또는 이의 분획물을 상기 BSA 및 당의 혼합액에 첨가하여 37°C에서 14일간 배양하였다. 이때, 0.02% 소듐아자이드(sodium azide) 및 안티마이코틱스(antimycotics)를 항박테리아제 및 항진균제로서 첨가하였다. BSA 및 당 혼합액을 배양한 것을 20 대조군으로서 사용하였고, 추출물 또는 이의 분획물을 제조하여, 배양하지 않을 것을 시험군과 대조군의 공시험군(blank)으로서 사용하였다. 한편, 효능의 우수함을 비교할 수 있는 지표인 양성대조군으로서 아미노구아니딘을 사용하였다. 구체적으로는, 아미노구아니딘을 증류수에 용해하여 상기에 기재한 방법으로 37°C에서 55.5 $\mu\text{g/ml}$, 74 $\mu\text{g/ml}$ 또는 92.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 14일 동안 각각 25 배양하였다. 모든 배양액은 4개씩 준비하여 최대한 오차를 피하였다. 배양 14일 후 배양액에서 생성된 최종당화산물의 함량을 분석하여 그 결과를 나타내었다. 최종당화산물은 형광, 갈색을 띠고 있으며 교차결합을 할 수 있는 물리화화학적 특성을 지니고 있을 뿐 아니라 세포막 수용체가 인지할 수 있는 배위자를 지니고 있었다. 이러한 특성을 지닌 최종당화산물의 양을 마이크로플레이트

검출기(Microplate reader; Excitation: 350 nm, Emission: 450 nm)로 측정하여 최종당화산물의 생성 억제 정도를 분석하였다(Vinson, J.A. et al., *J. Nutr. Biochem.*, 7: 659-663, 1996). 최종당화산물의 생성억제율은 하기의 [수학식 1]에 따라 계산하였다.

5

【수학식 1】

$$AGE\text{-}BSA(\%) = \frac{100 - (\text{시료군의형광강도} - \text{시료공시험군의형광강도})}{(\text{대조군의형광강도} - \text{대조군공시험군의형광강도})} \times 100$$

그 결과, 하기 [표 1]에 나타낸 바와 같이, 까마쪽나무 에탄올 추출물,
 10 까마쪽나무 에탄올 추출물의 노르말-헥산 분획물, 까마쪽나무 에틸아세테이트
 분획물, 까마쪽나무 노르말-부탄올 분획물 및 까마쪽나무 물 분획물의
 최종당화산물 생성억제 효능의 IC₅₀값은 각각 21.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 17.58
 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 7.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 및 7.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나타났다. 이는 양성대조군인
 15 아미노구아니딘(IC₅₀값: 63.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)보다 각각 3배, 3.6배, 8.4배 및 8.4배로
 효능이 현저하게 우수한 것으로 증명되었다(표 1). 이에, 까마쪽나무 추출물 또는
 이의 분획물은 단백질과 당의 결합을 억제하여 최종당화산물의 생성을 저해하는
 것으로 확인되었다(표 1).

【표 1】

	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	억제 (%)	IC ₅₀ (%)
	14 일째	14 일째	14 일째
까마쪽나무 에탄올 추출물	5	1.39 ± 0.69	21.21 ± 0.43
	10	12.88 ± 4.33	
	25	62.33 ± 0.78	

까마쪽나무 추출물의 노르말-헥산 분획물	5	-15.52 ± 2.39	> 50
	10	-6.70 ± 1.92	
	25	15.22 ± 1.95	
까마쪽나무 추출물의 에틸아세테이트 분획물	5	2.22 ± 1.82	17.58 ± 0.35
	10	22.82 ± 1.41	
	25	77.39 ± 1.21	
까마쪽나무 추출물의 노르말-부탄올 분획물	5	7.48 ± 4.36	7.52 ± 0.20
	10	27.81 ± 1.81	
	25	71.36 ± 1.09	
까마쪽나무 추출물의 물 분획물	2.5	-7.72 ± 3.83	21.52 ± 0.82
	5	5.81 ± 1.42	
	10	63.24 ± 3.36	
아미노구아니딘	55.5	42.84 ± 2.16	63.40 ± 2.61
	74	60.82 ± 2.21	
	92.5	66.96 ± 1.34	

<실험예 2> 알도즈 환원효소(aldose reductase, AR) 활성 억제 효능 분석

까마쪽나무 추출물, 또는 이의 노르말-헥산, 에틸아세테이트, 노르말-부탄올 및 물 분획물의 시험관 내에서 알도즈 환원효소 활성 억제 효능을 분석하였다.

구체적으로 듀프란(Dufrane; 1984) 방법에 따라 SD 랫트(Sprague-Dawley rat, 250 ~ 280 g)의 안구로부터 천연상태의 알도즈 환원효소를 얻기 위하여, 135 mM Na, K-인산완충용액(K-phosphate buffer; pH 7.0) 및 10 mM 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol)을 적출한 렌즈와 함께 균질기(Homogenizer)와 초음파분쇄기(Sonicater)를 이용해 분쇄하였다. 14,000 rpm에서 30분간 원심분리한 다음 상층액을 0.2 μ m의 필터에 여과한 후 사용하였다. 상기 과정은 모두 4°C에서 수행하였다. 효소(Enzyme)의 단백질원으로 BSA를 이용하여 라우리(lowry) 방법으로 정량하였다. 135 mM Na, K-인산완충용액(pH 7.0), 100 mM 리튬 설페이트(Lithium sulfate), 0.03 mM NADPH, 0.04 mM DL-

글리세알데하이드(DL-glycealdehyde) 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 효소 혼합물(mixture)을 0.1% DMSO에 녹인 후 각 농도로 희석한 시료 50 μl 에 첨가하여 총 부피 1 ml가 되도록 한 뒤 37°C에서 10분간 반응시켰다. 이때, 공시험군은 0.04 mM DL-글리세알데하이드(DL-glycealdehyde)를 첨가하지 않은 혼합물을, STD는 135 mM Na, K-인산완충용액(pH 7.0), 100 mM 리튬 설페이트(Lithium sulfate)에 50 μl NADP(0.2 ~ 5 μM)를 첨가한 시료를 사용하였다. 시료 0.3 ml의 0.5 N HCl을 첨가하여 반응을 종료시킨 뒤, 10 mM 이미다졸(imidazole)이 첨가된 6 M NaOH 1 ml를 가하여 60°C에서 10분간 반응시켜 NADP가 형광 산물(fluorescent product)로 전환되는 정도를 측정하였다. 시료는 3회(triplicate) 수행하였다. 효능 정도는 Spectrofluorophotometric detector(Bio-TEK, Synergy HT, 미국)를 이용하여 Ex. 360 nm, Em. 460 nm에서 측정하여, IC₅₀값으로 나타내었다. 까마쪽나무 추출물은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 제조하였고, 노르말-헥산 분획물은 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 에틸아세테이트 분획물은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 노르말-부탄올 분획물은 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 물 분획물은 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 각각 제조하였다. 비교대조군으로는 우수한 알도즈 환원효소 활성억제제 중의 하나인 3,3-테트라메틸렌 글루타르산(3,3-tetramethyleneglutaric acid)을 3.72 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 5.59 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 제조한 후 알도즈 환원효소 활성 억제효능을 측정하였다.

그 결과, 하기 [표 2]에서 나타낸 바와 같이, 까마쪽나무 추출물, 이의 노르말-헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 노르말-부탄올 분획물 또는 물 분획물의 알도즈 환원효소 활성억제 효능은 IC₅₀값이 각각 4.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 4.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이었으며, 양성대조군인 3,3-테트라메틸렌글루타르산(IC₅₀값: 5.41 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 비교하여 우수한 활성억제 효능을 나타내는 것을 확인하였다(표 2). 따라서, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물은 알도즈 환원효소의 활성을 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다(표 2).

【표 2】

	농도 ($\mu\text{g/ml}$)	억제 (%)	IC ₅₀ (%)
까마쪽나무 에탄올추출물	1	19.82 $\pm$ 8.50	4.08 $\pm$ 0.38
	2.5	31.72 $\pm$ 4.04	
	5	61.23 $\pm$ 4.64	
까마쪽나무 추출물의 노르말-헥산 분획물	2.5	>10	>10
	5		
	10		
까마쪽나무 추출물의 에틸아세테이트 분획물	1	10.95 $\pm$ 4.15	4.20 $\pm$ 0.58
	2.5	28.10 $\pm$ 4.94	
	10	60.95 $\pm$ 7.92	
까마쪽나무 추출물의 노르말-부탄올 분획물	2.5	18.60 $\pm$ 3.77	8.39 $\pm$ 0.70
	5	35.55 $\pm$ 1.15	
	10	57.48 $\pm$ 4.92	
까마쪽나무 추출물의 물 분획물	2.5	9.00 $\pm$ 4.36	>10
	5	10.00 $\pm$ 4.00	
	10	16.00 $\pm$ 6.24	
3,3- 테트라메틸렌글루타르산 (3,3- Tetramethyleneglutaric acid)	3.72	33.03 $\pm$ 4.36	5.41 $\pm$ 0.13
	4.66	40.27 $\pm$ 1.36	
	5.99	51.58 $\pm$ 0.78	

<실험예 3> 생체 외(ex vivo)에서의 항 백내장 효능 분석

<3-1> 까마쪽나무 추출물의 준비

상기 <실시예 1>에서 수득한 까마쪽나무 에탄올 추출물(LD)의 저장액(Stock solution)이 1000배가 되도록 DMSO(Sigma, 미국)에 녹인 후, 0.22 μm 필터(syringe filter)(Millipore, 미국)로 여과하였다. 양성대조군으로는 에팔레스타트(Epalrestat)를 사용하였다.

<3-2> 수정체 기관 배양(organ culture)

생후 4주 된 체중 200 g 내외의 흰쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였으며, 경추 파열로 동물을 희생시킨 뒤 안구를 적출하여 PBS(Welgen, 미국) 1 ml가
 5 들어있는 1.5 ml 튜브에 보관하였다. 안구에서 수정체를 분리하기 위해 후방(posterior approach)에서 조심스레 꺼내 홍채와 모양소대를 제거하였고 외과적 손상 (surgical damage)이 없는 온전한 수정체만을 사용하였다(Spector et al., *Exp. Eye Research*, 1993, 57, 656~667). 배양은 24 웰 플레이트(Nagel Nunc, Denmark)에 수정체를 5 mg/L 젠타마이신(Gentamycine)(Gibco, 미국)과 0.5 mg/L
 10 Fungizone(Gibco, 미국)이 첨가된 1 ml medium 199(Gibco, USA)에 옮겨 담은 후 5% CO₂, 95% 공기(air atmosphere) 및 37℃를 유지하면서 15 µg/ml 또는 30 µg/ml 농도의 까마쪽나무 추출물을 처리하고 4일 동안 배양하였다(Bradford, M., *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248~254).

Sugar 백내장(cataract)는 20 mM 자일로스(xylose)(Aldrich, 미국)를
 15 첨가하여 유도하였고, 양성대조군은 1 µg/ml 또는 3 µM 에팔레스탯(epalrestat)로 처리하여 배양하였다(Obazawa H., et al., *Invest. Ophthalmol*, 1974, 13, 204).

<3-3> 수정체 혼탁도 측정

상기 실험에 <3-2>에서 배양된 수정체는 4일 동안 CCD 카메라가 연결된
 20 광학 현미경으로 관찰하였다(Chand et al., *Exp. Eye Research*, 1982, 35, 491~497). 수정체 혼탁도는 Scion image analyzer(Scion Corporation, 미국)로 측정하였고 측정수치는 화소(pixel) 당 임의 단위(arbitrary units; AU)로 표현하였다.

그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 생체 외(*ex vivo*) 쥐의 수정체에서
 25 자일로스 및 까마쪽나무 추출물 15 µg/ml 및 30 µg/ml 처리군은 자일로스 단독 처리군에 비해 유의적으로 백내장 유발을 억제 및 지연시키는 것을 확인하였다(***p<0.001 vs. 자일로스로 백내장 유발 군).

<실험예 4> 제 2형 당뇨병동물모델에서의 효능 확인

<4-1> 제 2형 당뇨병동물모델 사육 및 까마쪽나무 추출물의 투여

제 2형 당뇨병 모델동물인 db/db 쥐에 까마쪽나무 추출물의 당뇨병병증 예방 및 치료 효능을 검증하기 위하여 12주간 경구투여하여 효능을 분석하였다. 동물은 제 2형 당뇨병 모델 동물인 db/db 쥐를 사용하였다. 생후 6주령 db/db 쥐(SLC, 5 일본)를 1주일 동안 적응시킨 후 절식 상태에서 혈당이 300 mg/dl 이상인 것을 선택하여 군당 평균이 균등하게 분배한 후 실험하였다. 사료와 음용수는 자유 급식하였다. 7주 후, 총 6군으로 나누어, 까마쪽나무 추출물(HR)과 대조약물 메트포르민(MET)을 날마다 1회 경구투여하였다. 시험군은, 정상군(NOR db/-), 당뇨병군(db/db), 당뇨병군에 까마쪽나무 추출물 50 mg/kg 투여군(DiAB061-50), 10 당뇨병군에 까마쪽나무 추출물 100 mg/kg 투여군(DiAB061-100), 당뇨병군에 까마쪽나무 추출물 250 mg/kg 투여군(DiAB061-250) 및 메트포르민 투여군 이었다. 각각의 군별로 12주 동안 하루 1회 경구투여 하였다. 부검 하루 전에 장기 및 뇨를 채취하였으며 -80℃에 보관하였다.

15 <4-2> 신장기능 손상 예방효능

까마쪽나무 추출물이 신장 기능에 미치는 효과를 알아보기 위하여, 당뇨병군에 까마쪽나무 추출물과 대조군 MET을 12주 동안 투여 후 부검 마지막 주에 24 시간 동안 받은 뇨를 통해 신장 기능 지표 인자를 비교 관찰하였다. 뇨는 3000 rpm, 10 분 동안 원심 분리하여 불순물을 제거한 뒤, 적당량을 사용하여 자동 20 분석기(automated analyzer)(wako, 일본)로 측정하였다. 자동 분석기는 표준 물질로 정량화한 뒤 측정을 시작하였다.

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 신장 기능의 지표가 되는 뇨 중의 전체 단백뇨(total proteinuria) 및 protein/Cr은 당뇨병군에서 정상군에 비하여 모두 유의적으로 상승한 것을 확인하였다.

25 또한, 단백뇨의 경우, 대조 약물인 MET 투여군은 당뇨병군보다 낮은 수치를 보였으나, 유의성이 없었다. 그러나 까마쪽나무 추출물 고농도 투여군은 당뇨병군과 비교할 때 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$ vs, db/db군).

아울러, 사구체 여과율 지표(protein/Cr)의 경우, 대조약물인 MET 투여군은 당뇨병군에 비하여 감소하는 경향만 보이었지만, 까마쪽나무 추출물 고농도 투여군은

당뇨군과 비교시 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$ vs, db/db군).

<4-3> 최종당화산물 AGEs 측정

신장 내 사구체에서 AGEs의 축적 정도를 조직학적 면역염색을 통하여
 5 확인하였다. 조직학적 면역염색은 탈파라핀 과정과 함수과정을 거친 슬라이드를
 내인성 페록시다제(oxidase) 활성을 제거하기 위하여 3% H_2O_2 용액에 10분 동안
 반응시킨 후, 0.05% 트윈 20이 포함된 PBS로 3회 세척하였다. 비특이적 반응을
 제거하기 위하여 5% AFB(animal free bock)을 이용하여 블로킹한 후, 1차 항체
 AGEs(Transgenic, 일본), 시냅토포딘(synaptopodin) 및 desmin(Santa cruz 미국)을
 10 각각 1:100으로 희석하여 1시간 또는 밤새 처리하였다. 1시간 동안 PBS로 세척한
 후 LSAB(labeled streptavidin biotin) 키트(Dako, 미국)를 처리한 후,
 DAB(Dako, USA) 및 AEC(Sigma 미국) 발색하여 광학현미경하에서 각각 관찰하였다.
 시냅토포딘은 1차 반응한 뒤, anti-rabbit conjugated FITC를 적용하여
 형광염색하였다.

15 또한, 신장 조직에서 피질 부분만을 선별하여 단백질을 분리한 뒤 최종당화
 생성물(AGEs)의 단백질양상을 관찰하기 위해, 적출된 신장을 액체 질소에서
 급속하게 얼린 뒤 $-70^{\circ}C$ 에 보관된 것을 이용하여 균질화(Homogenization) 버퍼(pH
 7.6)로 균질화한 시료를 라우리 원리를 이용하여 단백 정량한 뒤 30 μg 씩 SDS-
 PAGE하에서 전기영동 하였다. 겔에 이동된 단백질은 니트로셀룰로오스
 20 멤브레인(nitrocellulose membrane)에 고착시켜 10V, 250 mA상에서 16시간
 멤브레인으로 이동시켰다. 부착된 단백질들은 정량하고자 하는 항체를 면역부착을
 실행하였다. ECL(Ehanced-chemilluminecence) 용액을 이용하여 발색시킨 뒤
 단백질의 발현 정도를 scion image 분석 프로그램을 이용하여 밀도를 측정하였다.

그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 조직학적 면역염색으로 관찰한 결과,
 25 당뇨군은 정상군에 비하여 최종당화생성물의 축적이 유의적으로 상승하였고,
 대조약물 MET 투여군은 당뇨군에 비하여 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$
 vs.db/db군), 까마쪽나무 추출물 투여군은 당뇨군에 비하여 농도 의존적으로
 최종당화생성물의 축적을 감소시켰으며, 특히 고농도 투여군은 최종당화생성물
 축적을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다($p < 0.05$ vs.db/db군).

또한, 신장 사구체의 블랏팅(blotting) 결과에서도 최종당화생성물의 축적이 당뇨군은 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며($p < 0.05$ vs. db/db군), 까마쪽나무 추출물 투여군(고농도)과 대조약물 MET 투여군은 최종당화생성물의 축적유의성 있게 감소시켰다($p < 0.05$ vs. db/db군).

5

<4-4> 발세포 손실(Podocyte loss)에 대한 예방 효과

초기 당뇨 상태에서는 사구체 내 발세포가 소실되기 시작한다. 발세포 마커로 알려진 시냅토포딘(synaptopodin)을 이용하여 발세포 소실에 대한 보호 효과를 검증하기 위해 신장조직 사구체를 염색분석 하였다.

10 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 당뇨군은 정상군에 비하여 발세포의 양이 현저하게 감소하였고($p < 0.05$ vs. Nor), 까마쪽나무 추출물 투여한 군은 당뇨군에 비하여 농도 의존적으로 발세포 소실을 억제하는 효과를 나타내었으며, 특히 고농도군(까마쪽나무 추출물 250 mg/kg 투여군)은 유의성 있게 발세포 소실을 억제하였다($p < 0.05$ vs. db/db군). 또한 약물 대조군 MET 투여군에서는 당뇨군과
15 비교하여 발세포 감소를 유의성 있게 억제하였다. 따라서 까마쪽나무 추출물투여가 발세포 소실을 예방한 것을 확인하였다(도 4).

또한, 발세포의 데미지 마커(damage marker)인 데스민(Desmin) 염색법을 통하여 초기 발세포 데미지의 여부를 분석하였다.

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 당뇨군은 정상군에 비하여 데스민
20 양성(positive) 면적이 유의성 있게 증가하였으며($p < 0.05$ vs. Nor), 대조약물 MET 투여군은 발세포의 손상이 우수하게 예방되었다($p < 0.05$ vs. db/db군). 또한, 까마쪽나무 추출물 고농도 투여군은 당뇨군에 비하여 발세포의 손상을 유의적으로 예방하는 것을 확인하였다($p < 0.05$ vs. db/db)(도 4).

25

<4-5> 네프린(Nephrin) 감소에 대한 효과

발세포 기능에서 중요한 역할을 하는 슬릿 다이어그램 단백질(slot diagram protein)인 네프린은 유전자(mRNA)단계에서 조절되는 것으로 알려졌다. 따라서 유전자 단계에서의 발현 여부를 알아보고자 신장조직에서 RNA를 분리한 뒤 RT-PCR로 분석하였다. RT-PCR은 -70°C 에서 보관된 조직을 막자사발로 액체 질소를

부어가면서 가루를 낸 다음 Trizol reagent(invitrogen, 캐나다)를 넣어서 균질화 하였다. 클로로포름(Chloroform) 및 아이소프로판올(isopropanol)을 이용하여 전체 RNA 펠릿(pellet)을 얻어 다음 차가운 에탄올을 첨가하여 원심분리 하여 얻은 정제된 RNA를 분광광도계(spectrophotometer)(Nano drop, 독일)로 정량화하였다.

5 3 μ g의 RNA와 Oligo dT를 첨가하여 RT primix mixture(Intron, 한국)를 이용하여 cDNA를 만들어준다. 증폭 시키고자 하는 프라이머를 준비하여 cDNA와 함께 PCR을 써멀 사이클러(thermal cyclor)로 적정 조건설정 후 실행하였다. 하우스 키핑 진(House keeping gene)은 액틴(actin)으로 하여 상대적인 발현 변화를 scion image 프로그램을 사용하여 정량 계산하였다.

10 그 결과 도 5에 나타낸 바와 같이, 당뇨군은 정상군에 비하여 네프린의 발현이 유의성 있게 감소하였고($p < 0.05$ vs. Nor), 대조약물 MET 투여군은 당뇨군에 비하여 네프린 발현이 증가되었다($p < 0.05$ vs. db/db). 또한, 까마쪽나무 추출물 투여군은 당뇨군에 비하여 네프린의 발현이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다($p < 0.05$ vs. db/db)(도 5).

15

<4-6> In situ를 통한 네프린의 발현 변화

포매된 조직 블록을 준비하여 탈 파라핀 및 함수과정을 거친 다음, 비특이적인 반응을 줄이고 항원의 노출을 높이기 위해서 시트르산(citric acid) 버퍼 (pH 6.0)에 담구어 10분 동안 끓인 후 DNase I 처리를 한다. 미리 준비된
20 네프린 프로브(nephrin probe)(Anti-DIG-DNA labeling)를 이용하여 균질화 버퍼로 희석 시킨 뒤에 100℃에서 10 분 동안 끓이면서 이중가닥(doble strand) 프로브를 단일가닥(single strand)로 변성 시켜준다. 95℃ 뜨거운 접시 위에 슬라이드를 올려놓은 후 프로브를 50 ul 떨어뜨리고 10분 동안 배양한다. 그 후 42℃에서 하루 동안 항원에 프로브가 잘 붙도록 배양한다. 발색은 anti-DIG conjugated
25 FITC로 반응시켜 mRNA의 발현 여부를 형광 현미경으로 관찰하였다.

그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 당뇨군은 네프린 mRNA 발현이 정상군에 비하여 현저히 감소되었고($p < 0.05$ vs. Nor), 대조약물 MET 투여군에서는 당뇨군과 비교하여 유의적인 증가를 보였다($p < 0.05$ vs. db/db). 또한 까마쪽나무 추출물 투여군은 네프린 발현이 당뇨군에 비하여 농도 의존적으로 증가되었다($p < 0.05$ vs.

db/db). 따라서, 까마쪽나무 추출물을 통해 당뇨로 인한 신장 사구체의 네프린의 손상이 예방됨을 확인하였다(도 6).

<제조예 1> 약학적 제제의 제조

5 <1-1> 산제의 제조

본 발명의 <실시예 1>의 에탄올 추출물 2 g

유당 1 g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

10 <1-2> 정제의 제조

본 발명의 <실시예 1>의 에탄올 추출물 100 mg

옥수수전분 100 mg

유당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

15 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<1-3> 캡슐제의 제조

본 발명의 <실시예 2>의 노르말-부탄올 분획물 100 mg

20 옥수수전분 100 mg

유 당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

25

<1-4> 환의 제조

본 발명의 <실시예 2>의 에틸아세테이트 분획물 1 g

유당 1.5 g

글리세린 1 g

자일리톨 0.5 g

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

5 <1-5> 과립의 제조

본 발명의 <실시예 2>의 에틸아세테이트 분획물 150 mg

대두 추출물 50 mg

포도당 200 mg

전분 600 mg

10 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

<제조예 2> 식품의 제조

본 발명의 까마쪽나무 추출물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

15 <2-1> 밀가루 식품의 제조

본 발명의 <실시예 1>의 에탄올 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

20 본 발명의 <실시예 1>의 에탄올 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

25 본 발명의 <실시예 1>의 에탄올 추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

<2-4> 유제품(dairy products)의 제조

본 발명의 <실시예 1>의 에탄올 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

<2-5> 선식의 제조

현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

5 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

본 발명의 실시예 <1-1>의 에탄올 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

10 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 실시예 <1-1>의 에탄올 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

본 발명의 실시예 <1-1>의 에탄올 추출물(3 중량부),

15 영지(0.5 중량부),

지황(0.5 중량부)

<제조예 3> 음료의 제조**<3-1> 건강음료의 제조**

20 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 <실시예 2>의 에틸아세테이트 분획물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

<3-2> 야채 주스의 제조

25 본 발명의 <실시예 2>의 에틸아세테이트 분획물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

<3-3> 과일 주스의 제조

본 발명의 <실시예 2>의 에틸아세테이트 분획물 1 g을 사과 또는 포도 주스

1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

까마쪽나무(*Litsea japonica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

5

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 까마쪽나무 추출물은 까마쪽나무의 잎 또는 줄기를 이용하는 것을 특징으로 하는 당뇨병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

10 **【청구항 3】**

제 1항에 있어서, 상기 까마쪽나무 추출물은 물, C₁ ~ C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 당뇨병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

15 **【청구항 4】**

제 3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 당뇨병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 5】

20 까마쪽나무 추출물에 추가적으로 유기용매를 가하여 제조한 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 6】

25 제 5항에 있어서, 상기 분획물은 까마쪽나무 추출물을 물에 현탁시킨 후 노르말-헥산, 에틸아세테이트, 노르말-부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 에틸아세테이트 분획물 또는 노르말-부탄올 분획물인 것을 특징으로 하는 당뇨병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 7】

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당뇨합병증은 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증, 당뇨병 심장병, 당뇨병 골다공증 및 당뇨병 아테롬성 동맥경화로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 당뇨합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

5

【청구항 8】

까마쪽나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨합병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

10 **【청구항 9】**

까마쪽나무 추출물에 추가적으로 유기용매를 가하여 제조한 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨합병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

【청구항 10】

15 제 9항에 있어서, 상기 분획물은 까마쪽나무 추출물을 물에 현탁시킨 후 노르말-헥산, 에틸아세테이트, 노르말-부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 에틸아세테이트 분획물 또는 노르말-부탄올 분획물인 것을 특징으로 하는 당뇨합병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

20 **【청구항 11】**

제 8항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당뇨합병증은 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증, 당뇨병 심장병, 당뇨병 골다공증 및 당뇨병 아테롬성 동맥경화로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 당뇨합병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

25

【청구항 12】

까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 노화방지 및 지연용 약학적 조성물.

【청구항 13】

까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 노화방지 및 지연용 건강식품용 조성물.

5 **【청구항 14】**

약학적으로 유효한 양의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 당뇨병증에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병증 치료방법.

【청구항 15】10

약학적으로 유효한 양의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병증 예방방법.

【청구항 16】15

약학적으로 유효한 양의 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 노화방지 또는 지연방법.

【청구항 17】20

당뇨합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물.

【청구항 18】

당뇨합병증 예방 및 개선용 건강식품용 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물.

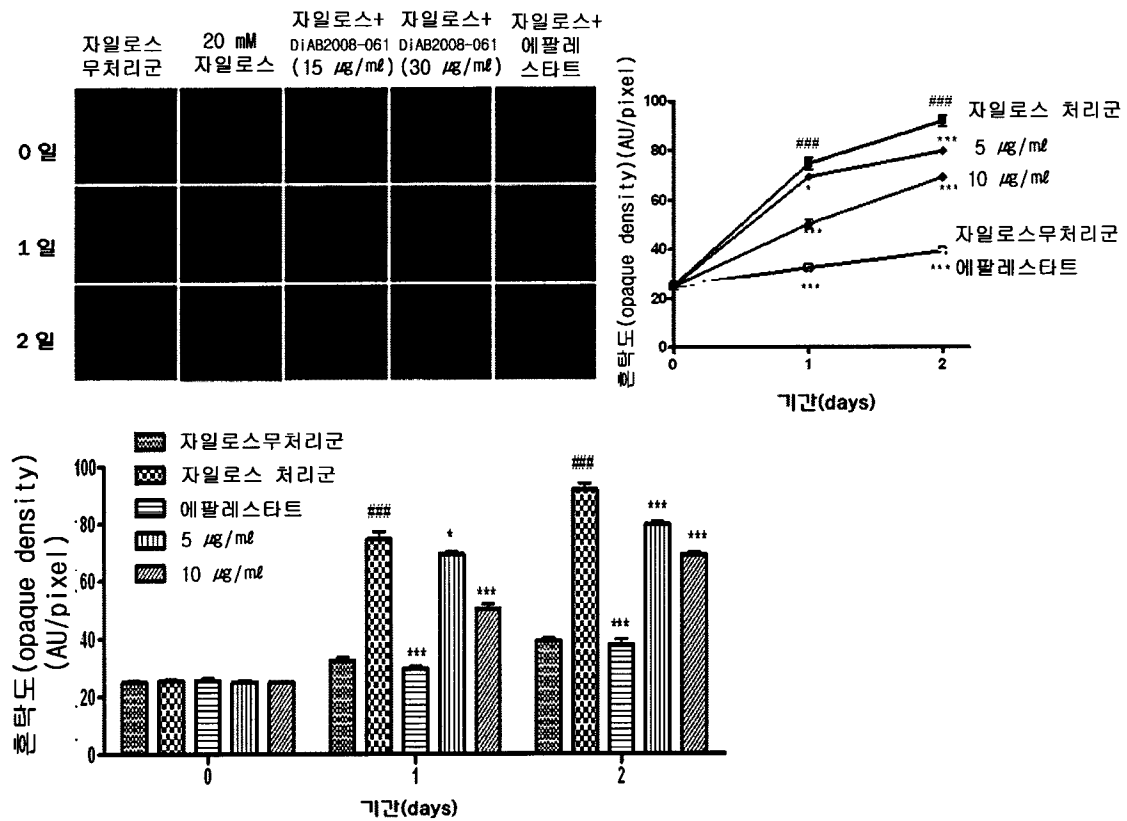
25 **【청구항 19】**

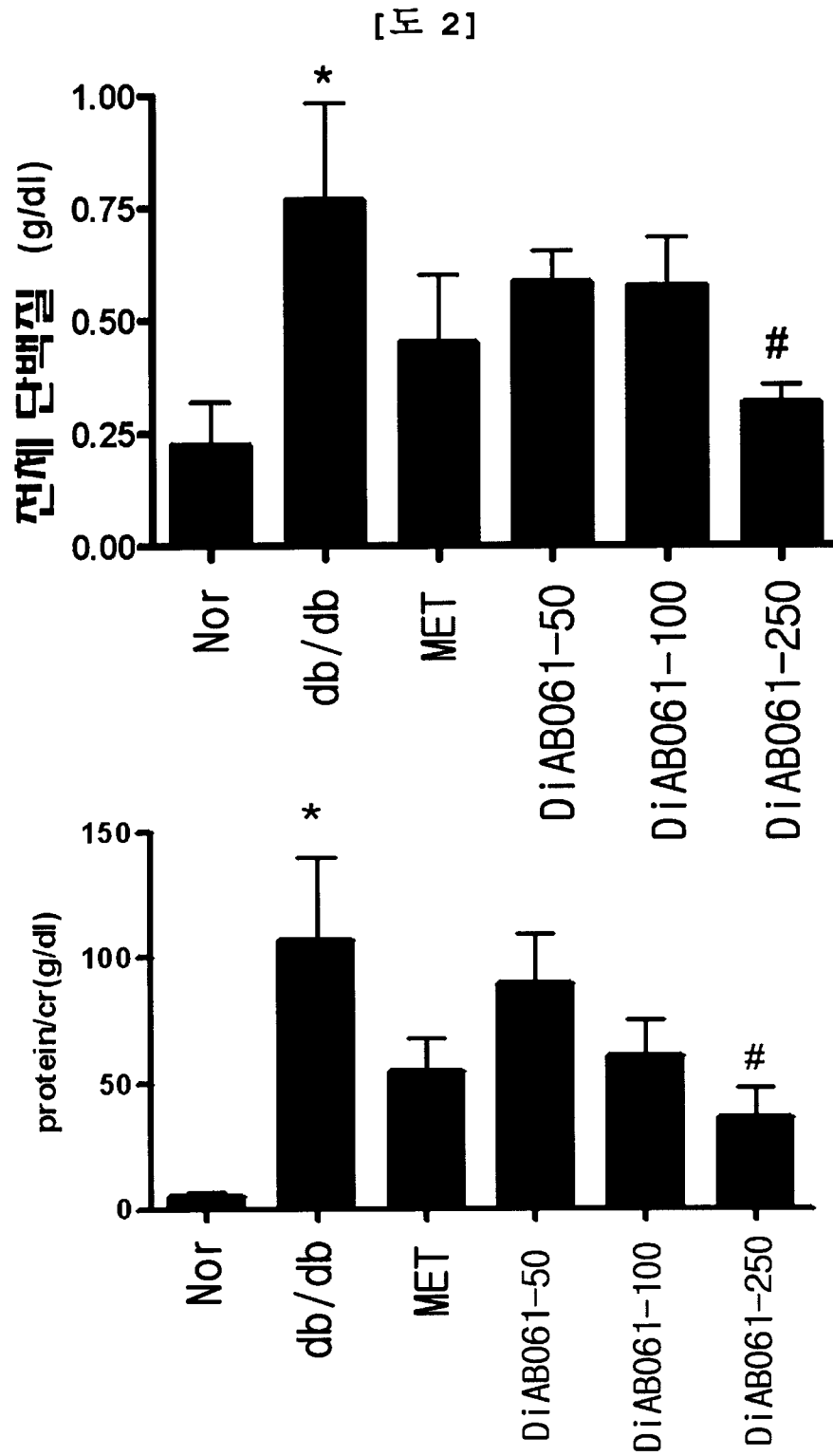
노화방지 및 지연용 약학적 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무 추출물 또는 이의 분획물.

【청구항 20】

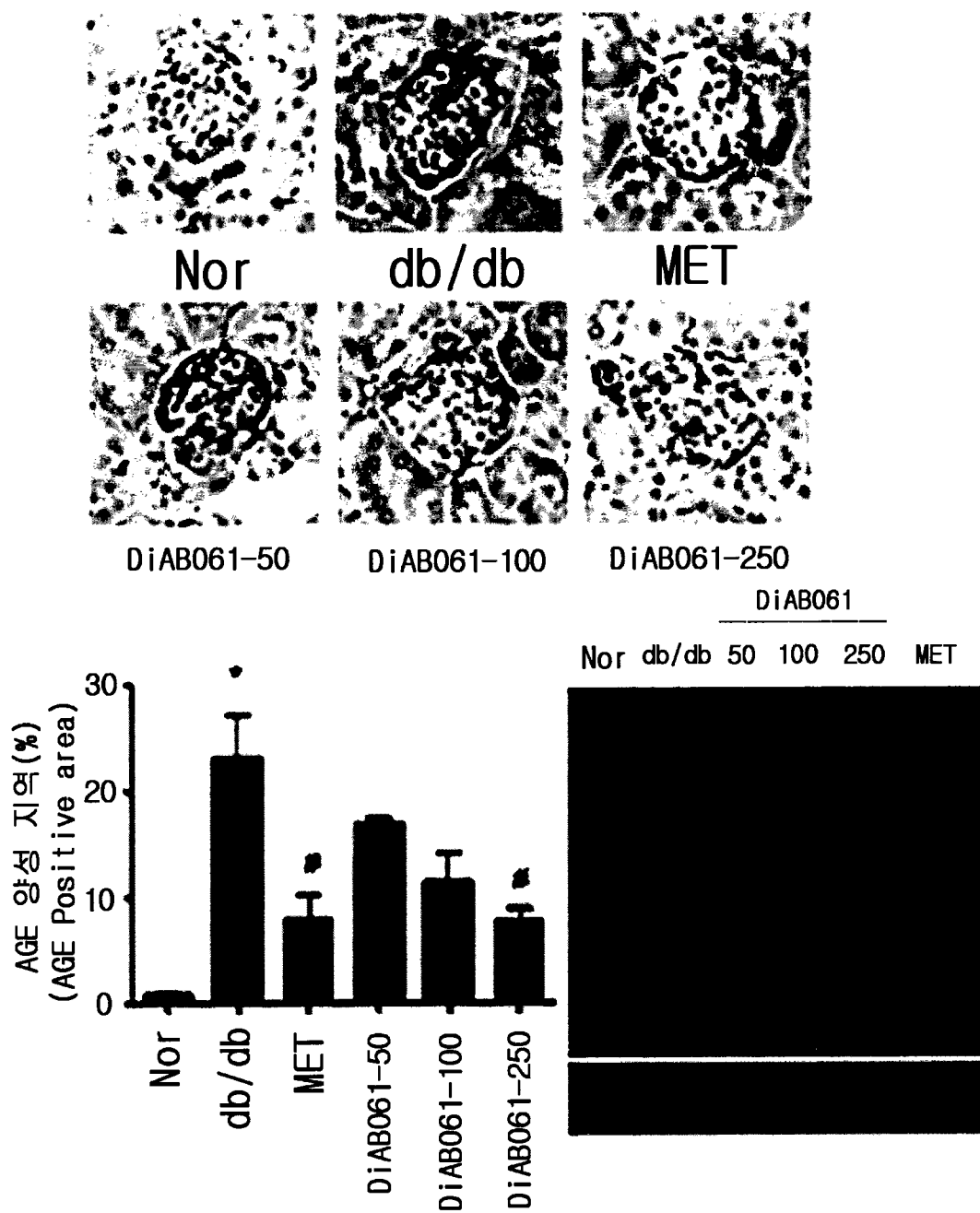
노화방지 및 지연용 건강식품용 조성물로 사용하기 위한, 까마쪽나무
추출물 또는 이의 분획물.

[도 1]

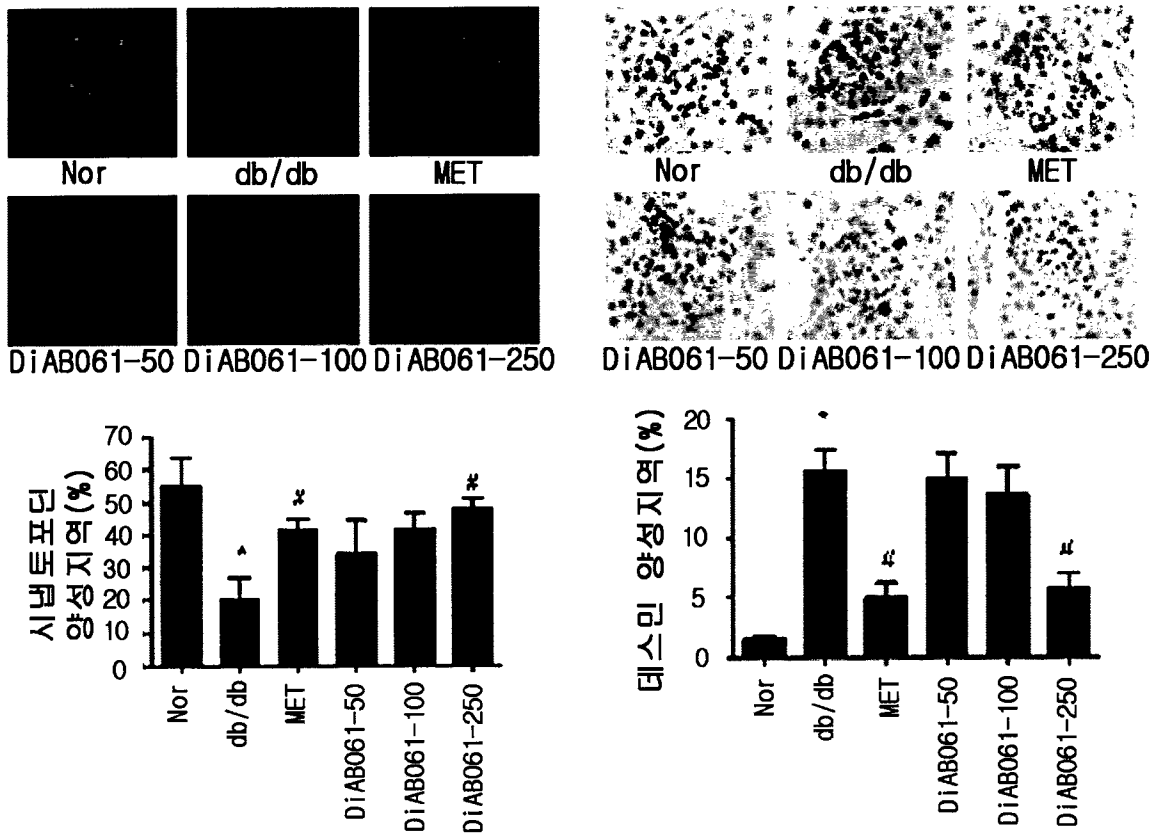




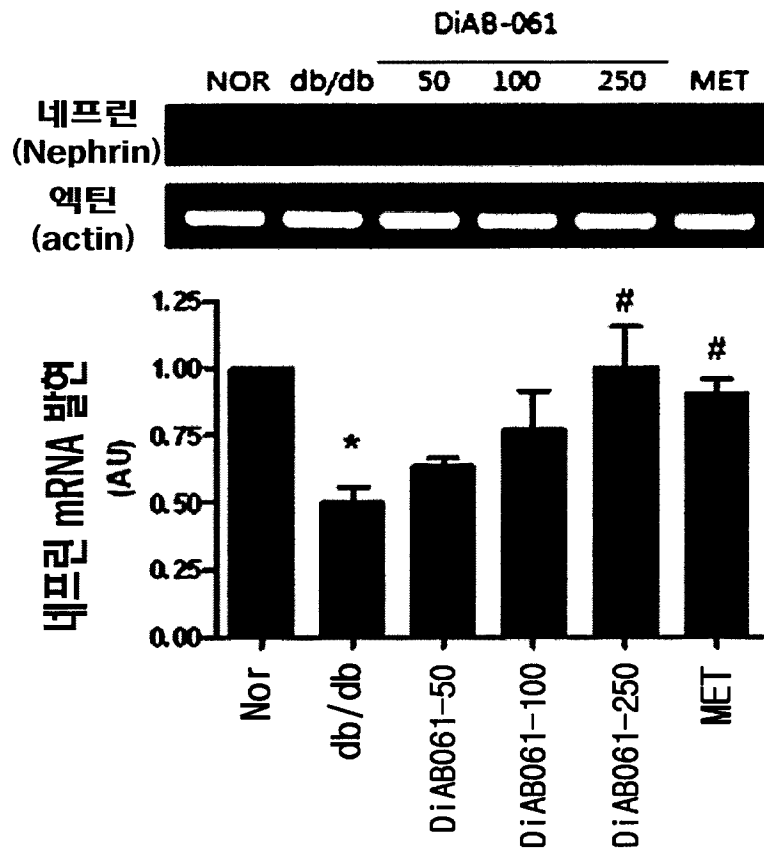
[도 3]



[도 4]



[도 5]



[도 6]

