



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0127017
(43) 공개일자 2010년12월03일

(51) Int. Cl.

A61K 31/7048 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

A61K 36/484 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0045503

(22) 출원일자 2009년05월25일

심사청구일자 2009년05월25일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김혜정

경상남도 진주시 주악동 금호아파트 101동 1302호

신성철

경상남도 진주시 평거동 한보아파트 101-609

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박창희, 김종관, 권오식

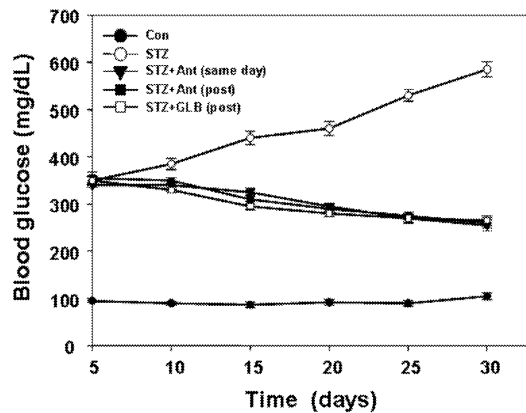
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 검정콩 껍질로부터 추출한 안토시아닌을 함유하는 당뇨 예방 및 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 검정콩부터 추출된 안토시아닌을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방용 약학조성물로 보다 상세하게는 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌을 유효성분으로 함유하는 체내 글루코스(glucose)의 감소 또는 췌장세포의 자멸사 억제에 의한 당뇨 예방용 약학조성물 및 당뇨 예방용 건강 또는 건강보조 식품으로, 본 발명에 따른 조성물은 당뇨유발 및 당뇨합병증의 예방 및 치료효과가 매우 우수할 뿐만 아니라 독성이 없으므로 식품의 형태로 섭취할 수 있어 장기적으로 일상생활의 식이 및 생활습관을 통하여 당뇨 및 당뇨 합병증을 예방 할 수 있으며 당뇨 치료제로서 유용하게 상용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정종일

경상남도 진주시 하대동 101 현대아파트 106-203

장기철

경상남도 사천시 정동면 감곡리대곡리 255번지

특허청구의 범위

청구항 1

검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌(anthocyanin)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 안토시아닌은 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside) 65 내지 80 중량%, 델피니딘-3-글루코시드(delphinidin-3-glucoside) 15 내지 25 중량% 및 피투니딘-3-글리코시드(petunidin-3-glucoside) 5 내지 10중량%로 구성되는 것을 특징으로 하는 당뇨 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 약학조성물은 체세포막의 인슐린 수용체 베타(IR β)의 인산화 및 제4형 당수송체(GLUT4)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 당뇨 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 안토시아닌의 함량은 전체 약학조성물 중 0.001 내지 15 중량%인 당뇨 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 약학조성물의 제형은 캡슐제, 정제, 주임정, 분말제, 건조시럽, 과립제, 주임정, 연질캡슐제, 환제, 드링크제 및 설하정으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 당뇨 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌(anthocyanin)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 또는 치료용 건강보조 식품.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 건강보조 식품은 드링크제, 카라멜, 초콜릿, 다이어트바 또는 과자류로 선택되어지는 것을 특징으로 하는 당뇨 예방 또는 치료용 건강보조 식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 검정콩에서 추출된 안토시아닌을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방용 약학조성물로 보다 상세하게는 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌을 유효성분으로 함유하는 체내 글루코스(glucose)의 감소 또는 체장세포의 자멸사 억제에 의한 당뇨 예방용 약학조성물 및 당뇨 예방용 건강 또는 건강보조 식품을 제공하기 위한 것이다.

배경 기술

[0002]

당뇨병은 혈액 내에 존재하는 포도당이 소변을 통해 배출되는 질환으로서, 근본적인 치유가 되지 않는 만성퇴행

성 질환 중의 하나이다. 현대에 들어와서 식생활의 변화와 운동 부족 등으로 인하여, 인체 고유의 에너지 대사 과정에 커다란 변화가 발생하였으며, 이에 따라 당뇨병 등의 만성퇴행성 질환은 증가하는 현상을 보이고 있다. 국내에서는 당뇨 유병율이 5 내지 10%에 달하는 것으로 알려져 있으며 지속적인 증가를 보이고 있다. 미국의 경우, 지난 40년간, 당뇨병은 6배가 증가 하였으며 이와 같은 수준의 증가율은 2050년에 이르러서는 환자수가 2600만명에 이르게 될 것으로 전망되고 있다.

[0003] 공개특허 10-2007-0041853- 5 -당뇨병은 인슐린작용, 인슐린 분비 또는 이러한 두 가지 모두 결함으로 발생하는 고혈당을 특징으로 하는 대사장애 증후군으로 당뇨병을 일으키는 원인으로는 자가면역기전에 의한 인슐린 부족 으로부터 인슐린 저항성 등 다양하며 대부분의 환자들의 경우 인슐린 분비 장애 및 인슐린 저항성 등이 동시에 존재하는 경우가 많다. 이러한 당뇨병은 고혈당이 만성으로 지속되면서 당질 대사 뿐 아니라 지질 및 단백질의 대사에도 장애를 일으켜, 망막, 신장, 신경, 심혈관계 등의 합병증을 유발시킴으로써 환자에게 고통과 함께 수명단축의 치명적인 문제를 초래할 수 있다.

[0004] 당뇨병은 가장 대표적인 내분비계의 대사적 장애에 의한 질병으로 최근 들어 산화적 스트레스가 인슐린 저항성, 제 1형 그리고 제 2형 당뇨의 원인으로 간주 되고 있다(Ceriello et al. Metabolism 2000;49:27). 고혈당은 체 내에서 산화적 스트레스를 발생시키며 이로 인해 수퍼옥사이드 이온, 단백질의 당질화, 그리고 포도당의 자동산화 가 일어나게 된다(Brownlee. Nature 2001;414:813, Baynes. Clin Chem Lab Med 2003;41:813, Wollff et al. Biochem J 1987;245:243, Wolff Free Radic Biol Med 1991;10:339).

[0005] 한편, 제 2형 당뇨 및 그 합병증은 장기적으로 일상생활의 식이 및 생활습관을 통하여 자연스럽게 치료해 나가야 하므로, 독성을 갖는 의약품은 한계가 있어 식품의 형태로 장기적으로 섭취할 수 있는 부작용이 없는 안전한 당뇨 예방 및 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

[0006] 안토시아닌(Anthocyanin)은 흔히 식물체의 꽃, 과실, 줄기, 잎, 뿌리 등에 존재하는 수용성 색소 배당체 (glucoside) 물질이다. 흔히 식물체 액포에 존재하며, 세포액의 산성농도, 색소화합물의 화학적 구조, 여러 금속이온들과의 결합 상태에 의해 자색, 적색, 청색 등의 색상을 나타내는 천연 색소이고, 안토시아닌은 어글리콘 (aglycone) 및 글리코시드(glycoside)로 구성된다.

[0007] 식물성 천연색소인 안토시아닌은 최근 여러 가지 생리활성이 있는 것으로 알려지고 있다. 예를 들면 노화억제작용, 항균작용, 돌연변이성 억제작용, 콜레스테롤 저하작용, 시력개선 효과, 혈관보호기능, 항궤양기능, 항산화기능 등이 알려져 있다. 그러나 이러한 생리활성은 모든 종류의 안토시아닌이 기본적으로 가지는 활성이지만, 최근 각 안토시아닌의 종류에 따라 그 활성의 차이가 있는 것으로 알려지고 있다.

[0008] 현재 안토시아닌 성분은 포도, 딸기, 올리브, 적양배추, 가지, 장미 등의 식물체로부터 추출되어 여러 가지 원료로 이용되고 있으나, 거의 조색소 상태로 추출되어 이용되고 있는 실정으로, 안토시아닌 외에 다른 성분의 화합물이 공존하는 상태로 이용되는 경우가 많으며, 또한 안토시아닌은 수용성 색소 배당체로서, 하이드록실기의 개수와 특정 하이드록실기의 메틸화에 의해 크게 6종의 안토시아닌으로 구분되고, 안토시아닌과 결합된 당의 종류와 아실기의 종류 및 결합 위치에 따라 수백종으로 구분되어지며 최근 각 안토시아닌의 종류에 따라 그 생리활성의 차이가 있는 것으로 알려지고 있다.

[0009] 이에 본 발명자들은 당뇨에 관한 연구를 진행하던 중, 놀랍게도 검정콩의 껍질에서 분리한 안토시아닌이 당뇨의 치료 및 예방에 효과적임을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 검정콩으로부터 추출된 안토시아닌을 함유하는 당뇨 예방 및 치료용 약학조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 당뇨 및 그 합병증의 치료를 위해 독성을 갖는 의약품의 한계점을 극복하고 식품의 형태로 장기적으로 섭취할 수 있는 검정콩 껍질로부터 분리한 안토시아닌을 유효성분으로 하는 당뇨 치료 및 예방용 건강 보조식품을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

[0012] 본 발명은 검정콩의 껍질로부터 추출한 안토시아닌이 인슐린의 분비 활성 증가 및 인슐린의 저항성 또는 저감수

성을 억제함으로써 당뇨의 예방 또는 치료에 유용한 약학조성물을 제공한다.

- [0013] 본 발명은 검정콩(*Glycine max* (L) Merr.)의 껍질로부터 추출한 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside), 델피니딘-3-글루코시드(delphinidin-3-glucoside) 및 피투니딘-3-글루코시드(petunidin-3-glucoside)를 함유한 안토시아닌(anthocyanin)을 유효성분으로 함유하는 약학조성물 및 건강 보조식품을 제공한다.
- [0014] 상기 안토시아닌은 검은콩(*Glycine max* (L) Merr.) 껍질 200g을 이용하여 4℃에서 24시간동안 메탄올로 3회 반복하여 추출하여 수득된 추출액을 감압 농축한 다음, Amberlite XAD-7 컬럼과 Sephadex LH-20을 이용하여 안토시아닌을 정제하여 수득한다.
- [0015] 상기 본 발명에 따른 검정콩 껍질로부터 추출한 안토시아닌은 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside) 65 내지 80 중량%, 델피니딘-3-글루코시드(delphinidin-3-glucoside) 15 내지 25 중량% 및 피투니딘-3-글루코시드(petunidin-3-glucoside) 5 내지 10중량%로 구성되며, 바람직하게는 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside) 72%, 델피니딘-3-글루코시드(delphinidin-3-glucoside) 20% 및 피투니딘-3-글루코시드(petunidin-3-glucoside) 6%를 함유하여 구성된다.
- [0016] 상기 본 발명에 따른 검정콩 껍질로부터 추출한 안토시아닌의 생리활성의 차이에 있어서, 다른 식물체(머루)에서 분리한 안토시아닌에서 보다 상승된 항당뇨 효과를 확인한 것을 특징으로 한다.
- [0017] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0018] 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌(anthocyanin)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0019] 구체적인 예로, 실험은 무처리구, 스트렙토조토신 처리구, 안토시아닌 1시간 처리 후 스트렙토조토신 처리구, 스트렙토조토신 처리 5일 후 안토시아닌 처리구, 스트렙토조토신 처리 5일 후 글리베클라미드 처리구로 5 그룹으로 나누어 본 발명의 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌의 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서의 혈당 및 체중변화에 미치는 영향을 측정하였다. 상기 스트렙토조토신을 처리한 처리구에서는 당뇨로 인하여 체중의 52% 정도가 현저하게 감소하였으나 안토시아닌을 처리한 처리구에서는 당뇨로 인한 체중의 감소가 회복되어 체중이 당뇨 유발 쥐와 비교하여 30 내지 31% 증가하였다.
- [0020] 또한, 혈액의 포도당 수치의 경우 스트렙토조토신을 처리한 처리구에서는 당뇨로 인하여 혈당이 무처리구에 비하여 5 내지 6배 정도 현저하게 증가되었으나, 안토시아닌을 처리한 처리구에서는 당뇨로 인한 혈당의 수치가 감소하여 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌이 당뇨로 인한 혈당 증가 및 체중 저하에 효과적인 것을 확인하였다. 도 1을 참조한다.
- [0021] 본 발명의 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌의 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서의 혈액학 매개변수의 개선효과를 확인한 결과, 당뇨 유발로 인한 좌심실 최고 수축혈압이 감소하였으며, 안토시아닌과 글리베클라미드를 처리한 처리구 모두에서 혈액학 매개변수의 개선효과를 보여주었으며, 합성 당뇨약인 글리베클라미드보다 혈액학 매개변수의 개선효과가 아주 향상된 것을 확인하였다.
- [0022] 본 발명의 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌의 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서의 혈청 내 인슐린 및 트리글리세라이드의 농도변화에 미치는 영향을 조사한 결과 스트렙토조토신 처리구에서는 당뇨 유발로 인하여 혈청내 인슐린이 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, 안토시아닌 및 글리베클라미드 처리구 모두에서 당뇨로 인해 감소된 혈청내 인슐린의 농도가 증가하였고, 안토시아닌이 합성 당뇨약인 글리베클라미드보다 인슐린의 생성 및 트리글리세라이드의 농도증가에 상당한 효과가 있는 것을 확인하였다. 그 결과는 도 3을 참조한다.
- [0023] 본 발명의 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌의 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서의 제4형 당수송체(GLUT4) 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과 당뇨가 유발된 쥐에서는 인슐린의 작용조직인 골격근에서 인슐린 수용체의 결합능이 감소되어 당 섭취에 필요한 제 4형 당수송체의 발현이 억제된 것을 확인 할 수 있었으며 반면, 안토시아닌 및 글리베클라미드 처리구에서는 제 4형 당수송체의 발현이 다시 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 안토시아닌이 합성 당뇨약인 글리베클라미드보다 제 4형 당수송체의 발현을 증가시킴으로써 항당뇨에 탁월한 효과가 있는 것을 확인하였다. 도 4를 참조한다.
- [0024] 본 발명의 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌의 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서의 인슐린 수용체

베타($IR\beta$)의 인산화에 미치는 영향을 조사하였다.

- [0025] 인슐린은 간과 근육 및 지방 조직에서 당대사에 영향을 미친다. 특히 말초 근육은 포도당의 80% 이상을 이용하는 조직으로 인슐린이 수용체에 결합할 때 일어나는 인산화 반응에 의해 GLUT-4(포도당 수송체)가 세포막으로 이동한 후 당이 세포내로 흡수된다. 따라서 인슐린이 수용체에 결합한 후의 신호전달체계가 손상되면 포도당의 흡수와 이용이 감소하여 인슐린 저항성이 나타날 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 안토시아닌은 당뇨가 유발된 쥐에서 저하된 인슐린 수용체의 인산화를 활성화시키는데 탁월한 효과가 있음을 확인하였다. 도 5를 참조한다.
- [0027] 본 발명의 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌의 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서의 당뇨에 의한 췌장세포의 세포사멸에 미치는 효과를 확인하기 위하여 안토시아닌이 아포토시스 세포사멸과 관련된 단백질들의 발현 변화에 미치는 영향을 알아보았다.
- [0028] 당뇨에 의하여 Bcl-2 단백질 발현이 감소되고 Bax와 cleaved caspase 3 단백질 발현이 증가되는데, 안토시아닌은 감소된 Bcl-2 단백질을 발현 증가시키고 증가된 Bax와 cleaved caspase 3 단백질의 발현을 감소시켜 췌장세포를 보호하는 것을 확인하였으며, 안토시아닌이 합성 당뇨약인 글리벤클라미드 보다 췌장세포를 보호하여 항당뇨에 탁월한 효과가 있는 것을 확인하였다. 도 6 및 7을 참조한다.
- [0029] 본 발명에 따른 검정콩 껍질로부터 추출한 안토시아닌의 생리활성의 차이에 있어서, 다른 식물체(머루)에서 분리한 안토시아닌에서 보다 상승된 항당뇨 효과를 확인한 것을 특징으로 한다.
- [0030] 본 발명의 검정콩 껍질로부터 추출한 안토시아닌은 머루 안토시아닌보다 스트렙토조토신에 의해 감소된 체중을 유의성 있게 증가시킬 뿐만 아니라 혈액의 포도당 수치의 경우 역시, 검정콩 안토시아닌과 머루 안토시아닌에 의하여 유의성 있게 감소되었고 스트렙토조토신에 증가된 혈당을 낮추는 효과는 머루 안토시아닌보다 검정콩 안토시아닌이 더 우수한 것을 확인하였다.
- [0031] 본 발명의 화장료 또는 약학 조성물은 안토시아닌을 유효성분으로 안토시아닌을 전체 약학조성물 중 0.001 내지 15 중량%를 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 약학조성물로 바람직하게는 상기 유효성분이 0.01 내지 10 중량% 포함된다.
- [0032] 상기 당뇨 예방 또는 치료용 약학조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0033] 또한 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제로 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 사용할 수 있으며, 멸균 고정 오일로는 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있고, 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있으며, 올레산과 같은 지방산은 주사용 제제에 사용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 안토시아닌의 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 질환의 중증도에 따라 달라지나, 본 발명의 안토시아닌은 환자의 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 1 g을, 1일 1-4회 투여하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에 따른 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌(anthocyanin)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 또는 치료용 건강보조 식품 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 건강식품 조성물은 안토시아닌(anthocyanin)을 유효성분으로 전체 건강식품 조성물에 중 0.0001 내지 10 중량%로 함유되는 것으로 식품 제형으로는 포도당, 구연산, 액상 올리고당, 옥수수 시럽(corn syrup), 대두 레시틴, 버터, 식물성 경화류, 탈지우유, 설탕, 마가린, 식염, 전분, 밀가루, 물엿, 맥아당, 중조 및 당 에스테르 등의 통상적으로 사용되는 성분들을 이용하여 드링크제, 카라멜, 초콜릿, 다이어트바 제형 또는 과자류인 건강식품으로 제형화 될 수 있다.

효 과

[0037] 본 발명에 따른 검정콩 껍질로부터 추출된 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside) 65 내지 80 중량%, 델피니딘-3-글루코시드(delphinidin-3-glucoside) 15 내지 25 중량% 및 피투니딘-3-글루코시드(petunidin-3-glucoside) 5 내지 10 중량%로 구성되는 안토시아닌은 당뇨유발 및 당뇨합병증의 예방 및 치료효과가 매우 우수할 뿐만 아니라 독성이 없으므로 식품의 형태로 섭취할 수 있어 장기적으로 일상생활의 식이 및 생활습관을 통하여 당뇨 및 당뇨 합병증을 예방 할 수 있으며 당뇨 치료제로서 유용하게 상용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] 안토시아닌 추출 및 정제

[0040] 진주 경상대학교 농경지에서 재배된 검은콩(Glycine max (L) Merr.) 껍질 200g을 이용하여 4℃에서 24시간동안 메탄올로 3회 반복하여 추출하였다. 이 추출액을 감압 농축하여 최종 부피가 200ml이 되게 회석하였다. 상기 안토시아닌이 포함된 용액을 100ml로 농축한 다음, Amberlite XAD-7 컬럼과 Sephadex LH-20을 이용하여 안토시아닌을 정제하였다. 정제된 안토시아닌은 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside) 72%, 델피니딘-3-글루코시드(delphinidin-3-glucoside) 20% 및 피투니딘-3-글루코시드(petunidin-3-glucoside) 6%를 함유하여 구성되었다.

[시험예]

(1) 시험계

[0043] 본 발명에 사용된 쥐는 무게 220 내지 250g의 Sprague-Dawley 성인 수컷 쥐를 이용하였고 물 및 사료는 자유섭취 시켰으며 전 시험기간 동안 사육상자속에 5마리씩 수용하였다.

(2) 시험군의 구성 및 투여

[0045] 실험은 무처리구, 스트렙토조토신 처리구(A), 안토시아닌 1시간 처리 후 스트렙토조토신 처리(B), 스트렙토조토신 처리 5일 후 안토시아닌 처리구(C), 스트렙토조토신 처리 5일 후 글리베클라미드 처리구(D)로 5 그룹으로 이루어지며, 상기 스트렙토조토신 처리구는 0.1M 시트르산 버퍼(pH4.5)에 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ)50 mg/kg 농도로 녹여 투여하며 무처리구에서는 0.1M 시트르산 버퍼(pH4.5)만을 투여하였다. 또한 글리베클라미드(Glibenclamide)는 통상적으로 사용하는 합성 당뇨약이다.

[0046] 상기 0.1M 시트르산 버퍼(pH4.5)에 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ)50mg/kg 농도로 녹여 투여 5일 후 혈액 내 포도당의 농도 범위가 300mg/dl의 저혈당증인 당뇨유발 쥐를 선발하였다.

[시험예 1] 안토시아닌이 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서 혈당 및 체중 변화에 미치는 영향.

[0048] 본 발명에 따른 안토시아닌의 처리에 의한 혈당 및 체중 변화율을 알고자 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0049] 상기 무처리구, 스트렙토조토신 처리구(A), 안토시아닌 1시간 처리 후 스트렙토조토신 처리(B), 스트렙토조토신 처리 5일 후 안토시아닌 처리구(C), 스트렙토조토신 처리 5일 후 글리베클라미드 처리구(D) 5 그룹의 체중과 혈액의 포도당 수치를 5, 10, 15, 20, 25 및 30일 간격으로 측정하였다. 혈당 측정(Accu-CHEK Sensor kit, Roche, GmbH, Germany)을 위하여 꼬리 정맥에서 혈액 샘플을 수집하였다.

[표 1]

	체중(g)					
	5일	10일	15일	20일	25일	30일
무처리구	255±15	275±15	295±20	305±16	325±18	335±20
A	254±13	220±12**	198±12**	185±12**	180±10**	175±12**
B	255±10	254±12 [†]	256±17 ^{††}	255±10 ^{††}	268±10 ^{††}	275±14 ^{††}
C	255±10	255±14 [†]	258±15 ^{††}	265±12 ^{††}	272±10 ^{††}	280±12 ^{††}
D	257±14	256±12 [†]	260±14 ^{††}	268±14 ^{††}	275±15 ^{††}	282±12 ^{††}
	혈액내 포도당의 함량(mg/dl)					
	5일	10일	15일	20일	25일	30일
무처리구	95±2	90±4	87±6	92±6	90±6	105±7
A	350±10**	385±12**	440±14**	460±15**	530±12**	585±16**
B	340±5	340 ± 8 [†]	325±8 ^{††}	295±6 ^{††}	270±10 ^{††}	255±12 ^{††}
C	355±12	350±6 [†]	310±10 ^{††}	290±8 ^{††}	275±8 ^{††}	260±11 ^{††}
D	350±8	330±6 [†]	295±10 ^{††}	280±6 ^{††}	270±8 ^{††}	265±10 ^{††}

[0050]

[0051]

상기 표 1에서 알 수 있듯이 A의 스트렙토조토신을 처리한 처리구에서는 무처리구에서 보다 10일부터 체중이 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며 30일 이후엔 체중의 52% 정도가 현저하게 감소하였다. 그러나 안토시아닌을 처리한 B와 C의 처리구에서는 175g에서 275 내지 280g 정도로 체중이 증가하는 것으로 스트렙토조토신만 처리한 A 처리구에 비교하여 30 내지 31% 체중이 증가하였다.

[0052]

또한, 혈액의 포도당 수치의 경우 A의 스트렙토조토신 처리구 모두에서는 무처리구에서 보다 5일부터 혈액의 포도당 수치가 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 30일 이후엔 5 내지 6배 정도가 포도당이 현저하게 증가되었으나, 안토시아닌을 처리한 B와 C의 처리구에서는 10일 이후 혈당의 수치가 감소하였으며 30일 이후에는 585 mg/dl에서 255 mg/dl 내지 260 mg/dl로 혈당의 수치가 감소한 것을 도 1의 결과에서도 확인할 수 있었다.

[0053]

[시험예 2] 안토시아닌이 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서 혈액학 매개변수에 미치는 개선효과

[0054]

본 발명에 따른 안토시아닌의 당뇨에 의한 혈액학 매개변수의 개선효과를 알고자 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0055]

상기 무처리구, 스트렙토조토신 처리구(A), 안토시아닌 1시간 처리 후 스트렙토조토신 처리(B), 스트렙토조토신 처리 5일 후 안토시아닌 처리구(C), 스트렙토조토신 처리 5일 후 글리베클라미드 처리구(D) 5 그룹의 심장 기능(좌심실 확장기말 압력, 심박수, 좌심실 이완기말 및 수축기말 용적)을 측정하기 위하여 Millar catheter(Millar Instruments Inc. Houston, TX)를 이용하여 혈액학적으로 분석하였다.

[0056]

경동맥은 상행 대동맥에서 2F Millar catheter를 이용하여 평균 동맥압, 심박수와 최고 수축혈압을 측정하였다. 압력변환기는 좌심실 최고 수축혈압(LV systolic pressure, LVSP), 좌심실 확장기말 압력(LV end-diastolic pressure, LVEDP), 좌심실 내압(LV developed pressure, LVDP)을 측정하였고 좌심실 압에 대한 1차 도함수로 나타내었다.

[0057]

그 결과 하기 표 2와 같이 당뇨가 유발 된 후 좌심실 최고 수축혈압이 감소하였으며, 안토시아닌과 글리베클라미드를 처리한 처리구 모두에서 혈액학 매개변수의 개선효과를 보여주었다. 또한 안토시아닌 1시간 처리 후 스트렙토조토신 처리(B) 및 스트렙토조토신 처리 5일 후 안토시아닌 처리구(C) 모두에서는 스트렙토조토신 처리

5일 후 글리벤클라미드 처리구(D)에서 보다 혈역학 매개변수의 개선효과가 아주 향상된 것을 확인 할 수 있었다.

[표 2]

	무처리구 (n=4)	A (n=5)	B (same-day, n=5)	C (post, n=5)	D (post, n=5)
LVSP (mm/Hg)	132.4±13.7	97.5±6.4*	122.3±13.0 [†]	128.08±12.4 [†]	123.7±7.4 [†]
LVEDP (mmHg/sec)	16.2±1.3	12.6±1.0**	14.6±0.6 [†]	14.9±0.8 [†]	16.5±1.1 ^{††}
HR (bpm)	269.9±17.6	257.2±38.4	261.2±15.8	257.4±7.2	278.6±25.3
+dP/dt (mmHg/sec)	4670.7±360.6	3202.2±218.7**	4533.1±227.1 ^{††}	4491.4±98.4 ^{††}	4627.4±456.5 ^{††}
-dP/dt (mmHg/sec)	-4317.3±584.3	-2396.1±216.5**	-3780.8±386.6 ^{††}	-3991.9 ± 258.4 ^{††}	-4035.95±452.2 ^{††}
SBP (mmHg)	127.8±15.8	94.9±7.0*	118.0±14.1	125.1±13.2 [†]	123.9±15.4 [†]
DBP (mmHg)	97.1±9.4	69.3±9.7*	90.5±9.1	93.1±10.3 [†]	89.4±8.4
MAP (mmHg/sec)	107.3±11.4	77.8±8.7*	99.7±10.8	103.7±10.9 [†]	100.8±3.5 [†]

[시험예 3] 안토시아닌이 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서 혈청내 인슐린 및 트리글리세라이드의 농도에 미치는 영향

본 발명에 따른 안토시아닌의 당뇨에 대한 혈청내 인슐린 및 트리글리세라이드(중성지방)의 농도 조절에 대한 효과를 알고자 하기와 같은 실험을 수행하였다.

상기 무처리구, 스트렙토조토신 처리구(A), 안토시아닌 1시간 처리 후 스트렙토조토신 처리(B), 스트렙토조토신 처리 5일 후 안토시아닌 처리구(C), 스트렙토조토신 처리 5일 후 글리벤클라미드 처리구(D) 5 그룹의 혈청내 인슐린 농도 변화를 ELISA kit(Rat insulin ELISA kit, Bachem, San Carlos, CA)를 이용하여 측정하였다.

도 3의 각 처리구에서의 혈청내 인슐린의 농도변화를 확인한 결과에서 알 수 있듯이, 스트렙토조토신 처리구(A)에서 혈청내 인슐린 농도가 감소하였고, 감소된 혈청내 인슐린이 안토시아닌 및 글리벤클라미드 처리구 모두에서 증가함을 확인 할 수 있었다.

또한 상기 무처리구를 포함한 4개의 처리구에서 트리글리세라이드의 농도 변화를 kit(Triglyceride Quantification kit, BioVision, Mountain View, CA)를 이용하여 측정하였다. 그 결과 혈청내 트리글리세라이드의 농도가 스트렙토조토신 처리구(A)에서 유의성있게 증가하였고, 스트렙토조토신에 의해 증가된 혈청내 트리글리세라이드 농도가 안토시아닌 및 글리벤클라미드 처리에 의해 유의성있게 감소하였는데, 안토시아닌이 글리벤클라미드보다 효과적으로 감소시켰다. 이는 안토시아닌이 글리벤클라미드 보다 인슐린의 생성과 트리글리세라이드의 농도 변화에 상당한 효과가 있는 것을 확인 할 수 있으며 그 결과는 도 3을 통하여 확인할 수 있었다.

[시험예 4] 안토시아닌이 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서 제4형 당수송체(GLUT4) 단백질의 발현에 미치는 영향

본 발명에 따른 안토시아닌의 당뇨에 대한 GLUT-4 단백질의 발현변화에 미치는 영향을 알고자 하기와 같은 실험을 수행하였다.

상기 무처리구, 스트렙토조토신 처리구(A), 안토시아닌 1시간 처리 후 스트렙토조토신 처리(B), 스트렙토조토신 처리 5일 후 안토시아닌 처리구(C), 스트렙토조토신 처리 5일 후 글리벤클라미드 처리구(D)의 상기 5 그룹의 처리구에서 4주 후 쥐들의 심장근육 및 골격근 각 조직들로부터 Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction kit(PIERCE, Rockford, IL)를 이용하여 단백질을 분리 정제하였다. 상기 정제된 각 처리구의 단백질을 브래드 포드 방법을 이용하여 정량을 하여 10%의 SDS-폴리아크릴아마이드겔에 전기영동하였다. 전기영동으로 분리된 단백질들을 PVDF 막으로 전이, 부착시켰다. 상기 막을 1차 항체인 anti-GLUT4 항체를 1:500 농도로 5% 탈지유에 희석한 용액에 담근 후, 4℃에서 16 내지 18시간 반응시켰다. 이 막을 TBS-T 용액으로 세척하고 다

시 horseradish peroxidase(HRP)가 부착된 2차 항체 IgG로 상온에서 1시간 반응시킨 후 웨스턴 블로팅 루미놀 시약 시스템(Western Blotting Luminol Reagent system)과 자동 방사선 사진술(autoradiography)로 발색시키고 분석하였다.

[0067] 그 결과 도 4에서 보는 바와 같이, 당뇨가 유발된 쥐(스트렙토조토신이 처리된 A 처리구)에서는 인슐린의 작용 조직인 골격근에서 인슐린 수용체의 결합능이 감소되어 당 섭취에 필요한 제 4형 당수송체(GLUT-4)의 발현이 억제된 것을 확인 할 수 있었으며 반면, 안토시아닌 및 글리벤클라미드 처리구에서는 제 4형 당수송체(GLUT-4)의 발현이 다시 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 안토시아닌이 합성 당뇨약인 글리벤클라미드 보다 제 4형 당수송체(GLUT-4)를 더 효과적으로 발현증가시키는 것을 확인함으로써 항당뇨에 탁월한 효과가 있는 것을 유추할 수 있었다.

[0068] **[시험예 5] 안토시아닌이 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서 인슐린 수용체 베타(IR β)의 인산화에 미치는 영향**

[0069] 상기 시험예 4에서와 동일한 방법으로 무처리구를 포함한 5개의 처리구에서 단백질을 분리정제한 후, 당뇨 유발 쥐에서의 안토시아닌 처리에 의한 인슐린 수용체 베타의 인산화를 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 방법을 이용하여 확인하였다.

[0070] 인슐린은 간과 근육 및 지방 조직에서 당대사에 영향을 미친다. 특히 말초 근육은 포도당의 80% 이상을 이용하는 조직으로 인슐린이 수용체에 결합할 때 일어나는 인산화 반응에 의해 GLUT-4(포도당 수송체)가 세포막으로 이동한 후 당이 세포내로 흡수된다. 따라서 인슐린이 수용체에 결합한 후의 신호전달체계가 손상되면 포도당의 흡수와 이용이 감소하여 인슐린 저항성이 나타날 수 있다.

[0071] 도 5에서 확인 할 수 있듯이 당뇨가 유발된 쥐인 스트렙토조토신이 처리된 A 처리구에서는 인슐린 수용체의 인산화 반응이 현저하게 저하되었으나, 안토시아닌 및 글리벤클라미드 처리구 모두에서는 인슐린 수용체의 인산화에 탁월한 효과가 있는 것을 확인하였다.

[0072] **[시험예 6] 안토시아닌이 스트렙토조토신에 의해 유발된 당뇨 쥐에서 췌장세포의 세포사멸에 미치는 보호 효과**

[0073] 상기 시험예 4에서와 동일한 방법으로 무처리구를 포함한 5개의 처리구에서 단백질을 분리정제한 후, 당뇨에 의한 췌장세포의 세포사멸에 대한 안토시아닌의 효과를 확인하기 위하여 아포토시스 세포사멸 관련 단백질들의 발현변화를 알아보았다.

[0074] 그 결과 도 6 및 도 7에서 확인 할 수 있듯이, 당뇨에 의해 아포토시스 세포사멸 관련 단백질중 Bcl-2 단백질이 발현감소하고, Bax와 cleaved caspase 3 단백질의 발현이 증가되었는데, 안토시아닌에 의하여 상기 감소된 Bcl-2 단백질이 발현 증가하고 상기증가된 Bax와 cleaved caspase 3 단백질의 발현이 감소되어, 안토시아닌이 췌장세포를 보호하는 것을 확인하였으며, 안토시아닌의 상기효과는 글리벤클라미드의 효과보다 탁월하였다. 이는 안토시아닌이 합성 당뇨약인 글리벤클라미드 보다 항당뇨에 탁월한 효과가 있는 것을 유추 할 수 있었다.

[0075] **[시험예 7] 검정콩에서 분리한 안토시아닌과 다른 식물체(머루)에서 분리한 안토시아닌의 항당뇨효과 비교**

[0076] 상기 시험예 1에서와 동일한 방법으로 무처리구, 스트렙토조토신 처리구(A), 스트렙토조토신 처리 5일 후 검정콩 안토시아닌 처리구(B), 스트렙토조토신 처리 5일 후 머루 안토시아닌 처리구(C)로 4 그룹으로 나누어 체중과 혈액의 포도당 수치를 측정하였다.

[표3]

	체중 (g)					
	5일	10일	15일	20일	25일	30일
무처리구	240 ± 10	260 ± 5	275 ± 15	289 ± 8	307 ± 9	315 ± 10
A	220 ± 4**	179 ± 13**	177 ± 7**	173 ± 7**	170 ± 8**	169 ± 8**
B	216 ± 6	185 ± 7	181 ± 5	185 ± 4 [†]	188 ± 5 [†]	186 ± 3 [†]
C	216 ± 6	172 ± 6	181 ± 5	182 ± 3	180 ± 1 [#]	178 ± 1 [#]
	혈액내 포도당의 함량 (mg/dl)					
	5일	10일	15일	20일	25일	30일
무처리구	97 ± 6	94 ± 3	93 ± 9	98 ± 3	96 ± 6	112 ± 7
A	512 ± 16**	527 ± 24**	529 ± 20**	530 ± 18**	529 ± 17**	535 ± 18**
B	496 ± 14	498 ± 25	482 ± 22 [†]	480 ± 24 [†]	445 ± 25 ^{††}	421 ± 19 ^{††}
C	499 ± 10	505 ± 8	507 ± 4	492 ± 4	480 ± 7 ^{†#}	483 ± 4 ^{†##}

상기 표 3에서 알 수 있듯이 A의 스트렙토조토신을 처리한 처리구에서는 투여 5일부터 무처리구에 비하여 체중이 유의성있게 감소하였고, 스트렙토조토신에 의하여 감소된 체중은 검정콩 안토시아닌과 머루 안토시아닌에 의하여 증가되었고, 특히 검정콩 안토시아닌은 투여 25일, 30일에 머루 안토시아닌보다 스트렙토조토신에 의해 감소된 체중을 유의성 있게 증가시켰다.

또한 혈액의 포도당 수치의 경우, 스트렙토조토신에 의하여 유의성 있게 현저히 증가되었고, 검정콩 안토시아닌과 머루 안토시아닌에 의하여 유의성 있게 감소되었고 스트렙토조토신에 증가된 혈당을 낮추는 효과는 머루 안토시아닌보다 검정콩 안토시아닌이 더 우수하였다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 안토시아닌의 혈액내 포도당의 농도 조절 효과를 보여주는 도면이고,

(●: 무처리구, ○: 대조구, ▼: 사전 안토시아닌 처리구, ■: 사후 안토시아닌 처리구, □: 글리벤클라미드 처리구)

도 2는 본 발명에 따른 안토시아닌의 혈액학 매개변수의 개선효과를 보여주는 도면이고,

(A: 좌심실의 확장기말 압력, B: 증가된 압력 증가율, C: 감소된 압력 증가율)

도 3은 본 발명에 따른 안토시아닌의 혈청내 인슐린(A) 및 트리글리세라이드(B)의 농도 조절 효과를 보여주는 도면이고,

도 4는 당뇨병으로 인한 심장 및 골격 조직에서 안토시아닌의 제4형 당수송체(GLUT4)의 발현에 미치는 효과를 보여주는 도면이고,

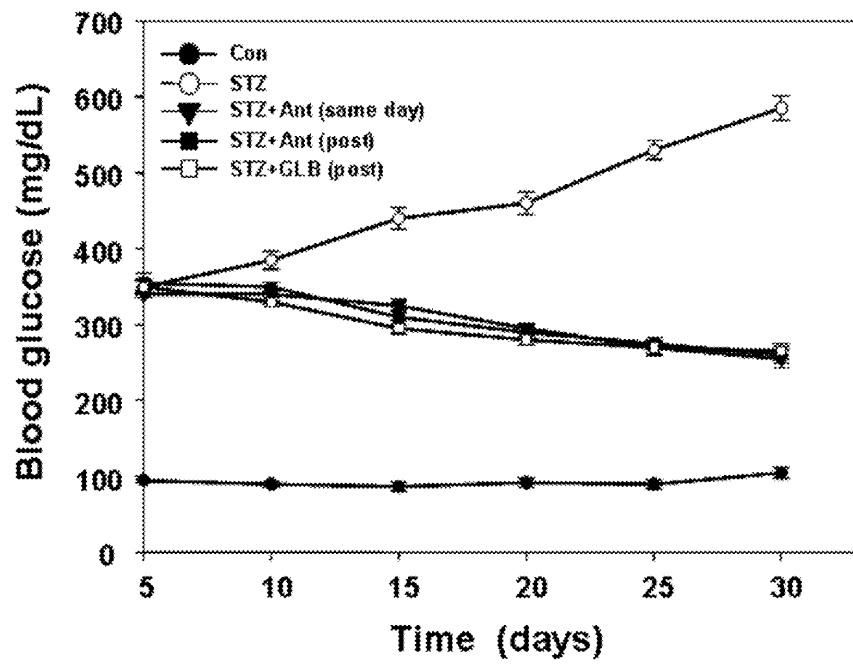
도 5는 당뇨병으로 인한 심장 및 골격 조직에서 안토시아닌의 인슐린수용체 베타(IRβ)의 인산화에 미치는 효과를 보여주는 도면이고,

도 6은 본 발명에 따른 안토시아닌의 체장 보호에 있어서 아포토시스 세포사멸 관련 단백질들의 발현 조절에 미치는 효과를 보여주는 도면이고,

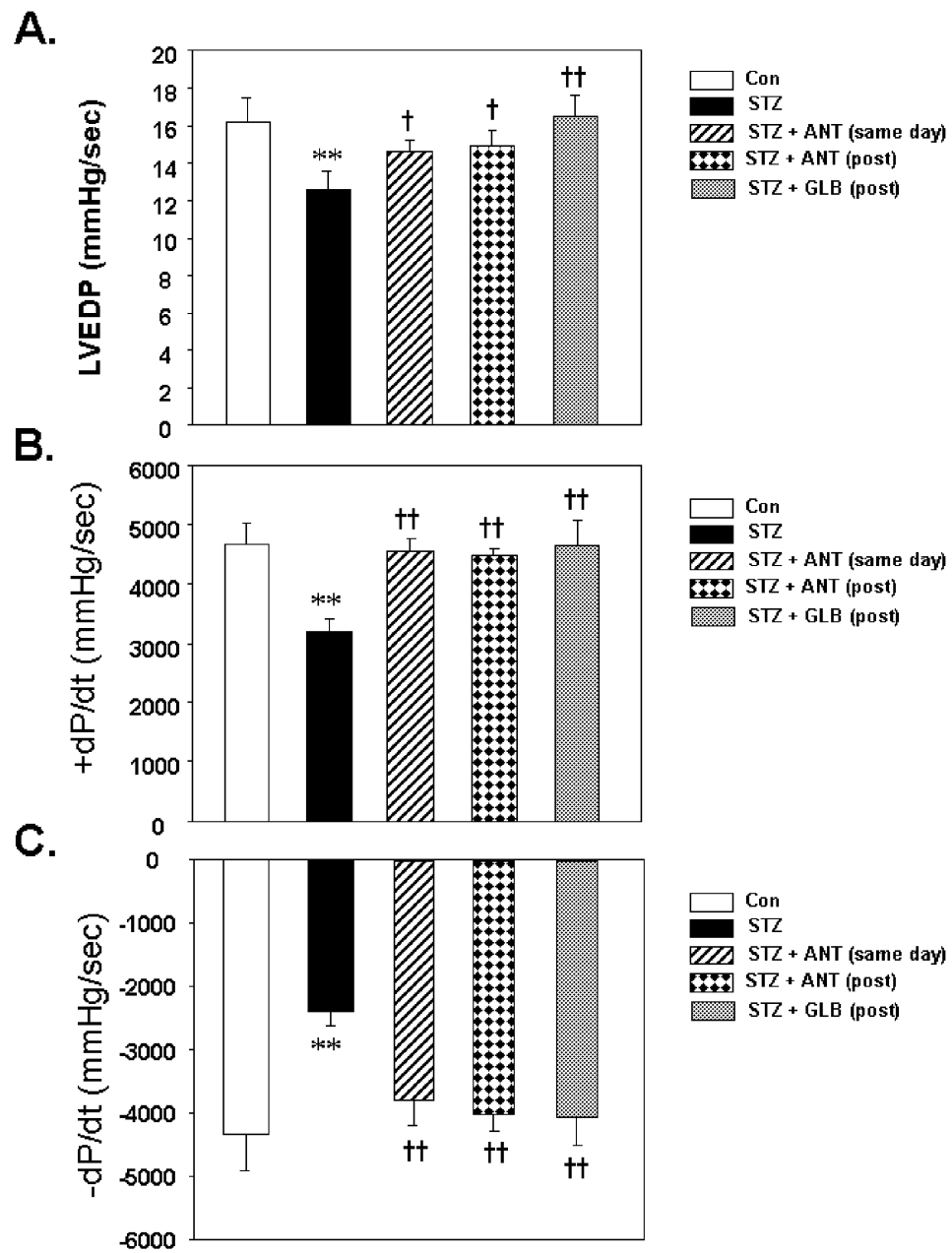
도 7은 당뇨병으로 인한 체장세포의 세포사멸에서 터넬 염색(TUNEL assay)을 통한 안토시아닌의 체장세포의 보호 효과를 보여주는 도면이다.

도면

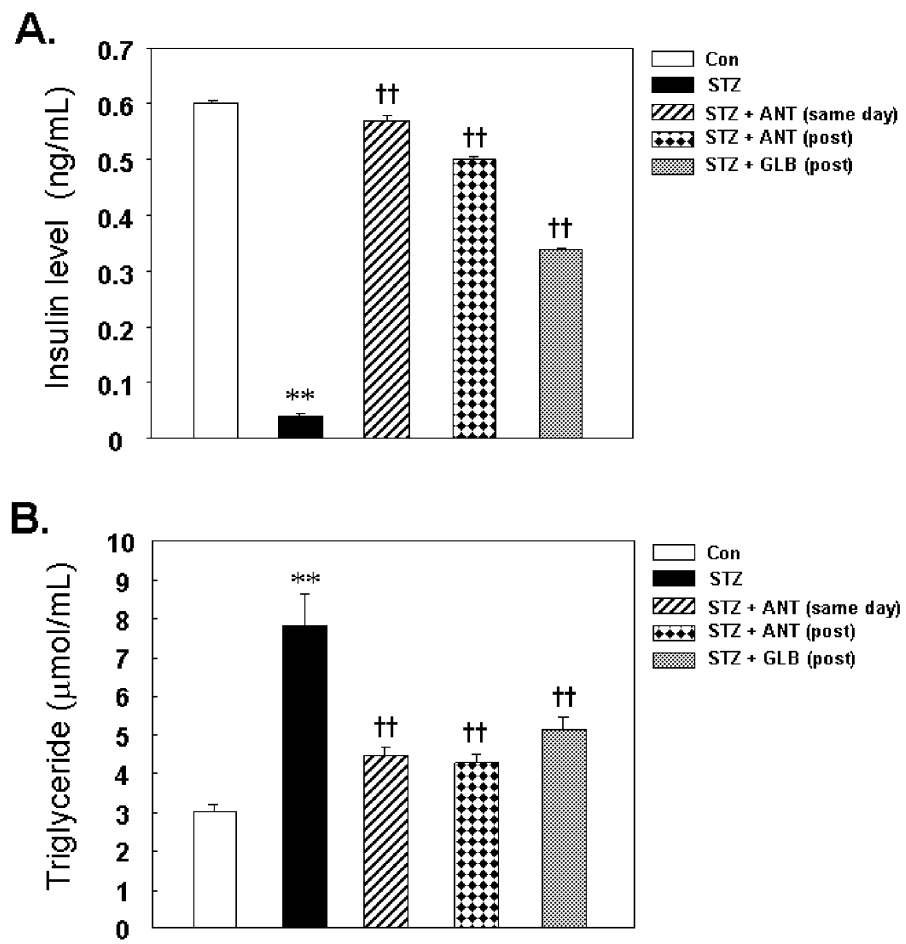
도면1



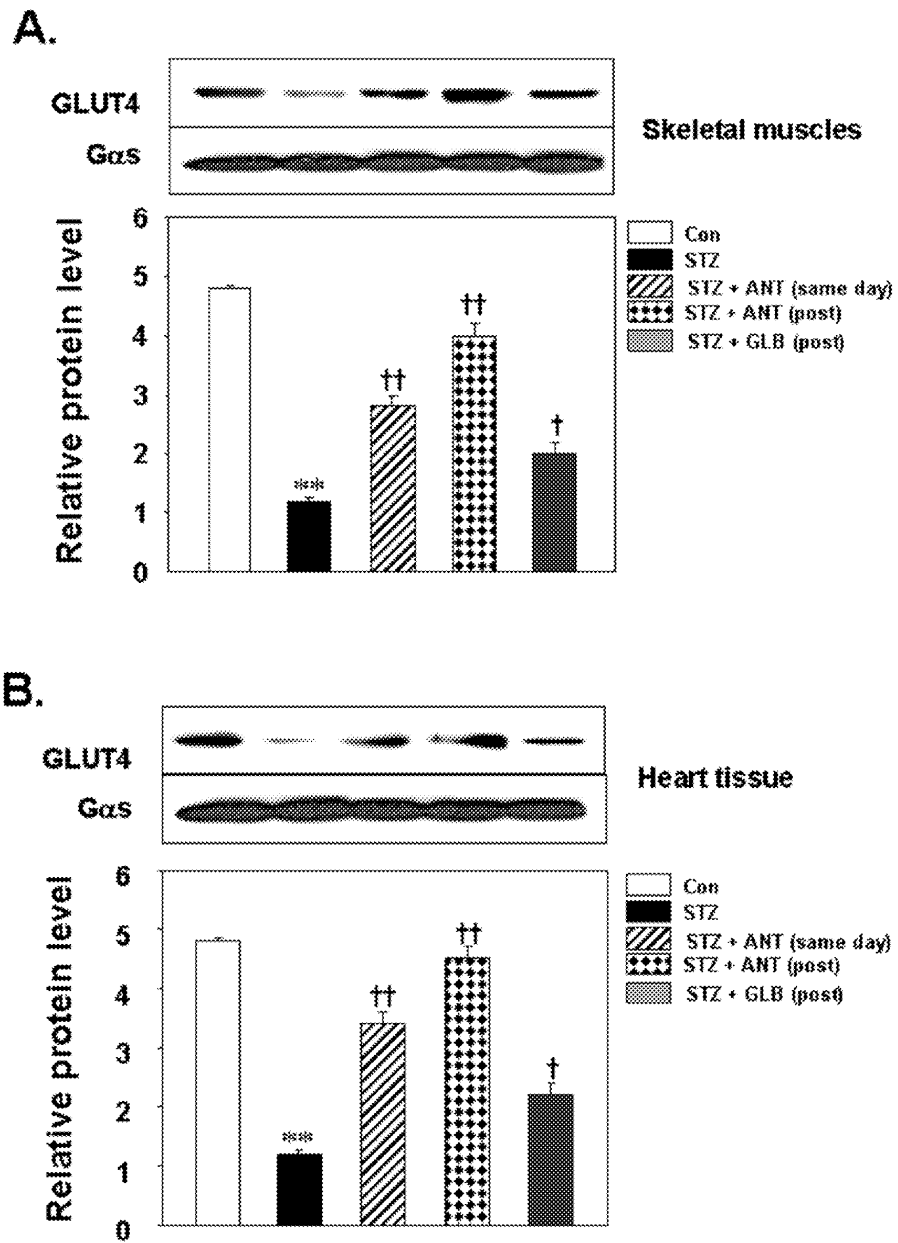
도면2



도면3

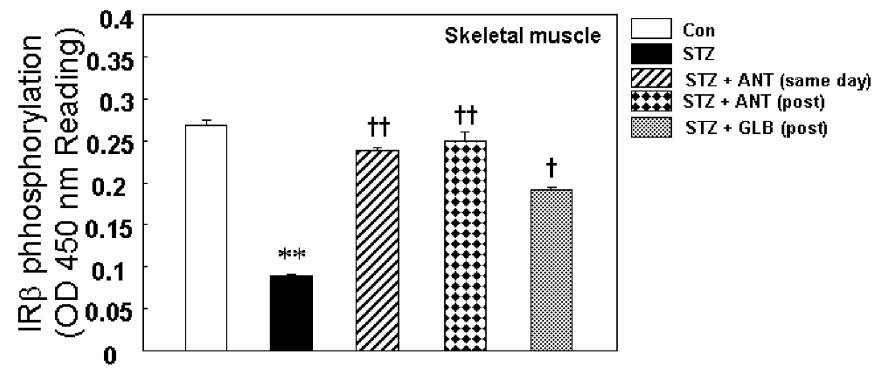


도면4

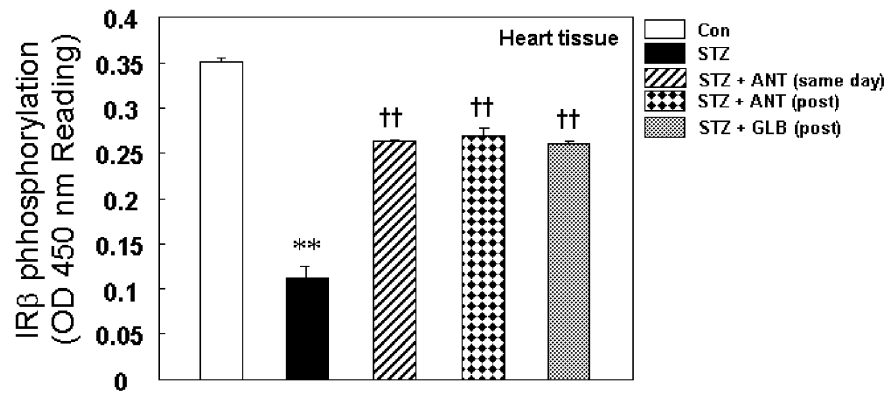


도면5

A.

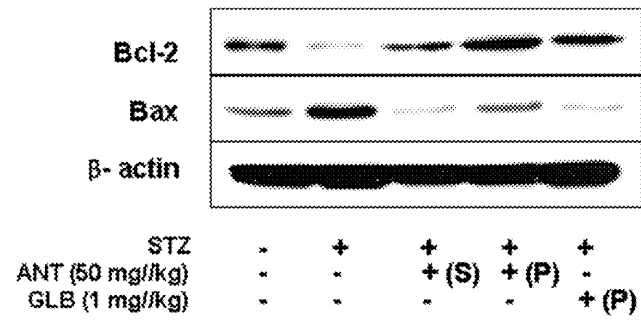


B.

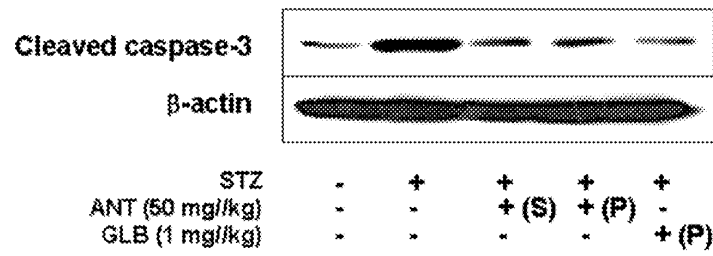


도면6

A.



B.



도면7

