(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0103517
(43) 공개일자 2011년09월21일

(51) Int. Cl.
A61K 36/03 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0022601
(22) 출원일자 2010년03월15일
심사청구일자 2010년03월15일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
김의경
경상남도 진주시 평거동 들말대경아파트 101동 206호
강창근
경상남도 진주시 내동면 신율리 253-9번지 304호
(74) 대리인
김동완

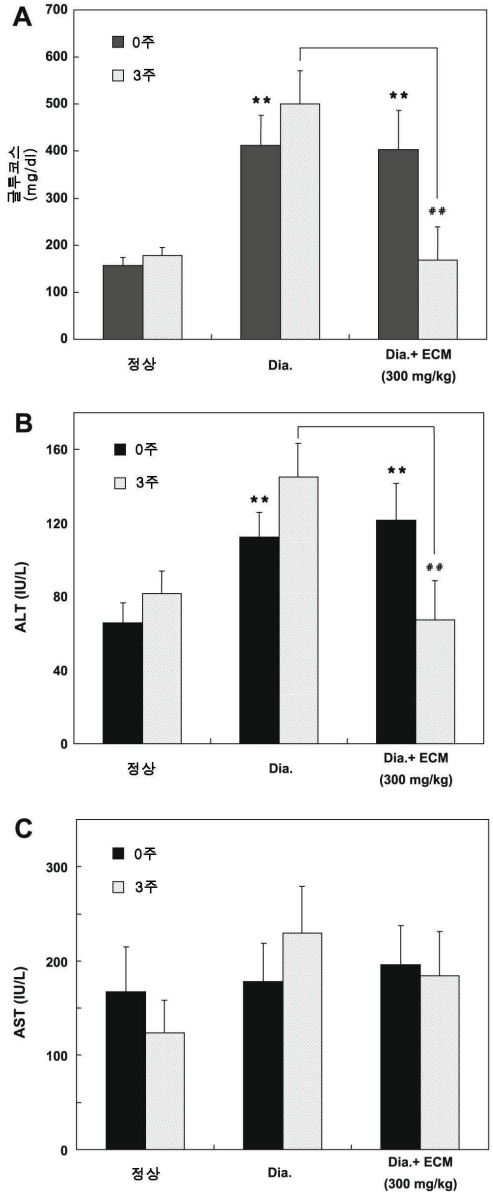
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 감태 추출물을 유효성분으로 포함하는 제1형 당뇨병 치료제 조성물

(57) 요 약

본 발명은 감태 추출물을 유효성분으로 포함하는 제1형 당뇨병 치료제 조성물 또는 제1형 당뇨병의 증상을 경감시키는 건강 기능성 식품에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 감태 메탄올 추출물을 유효 성분으로 함유하는 생체 내에서 AMP-활성화 단백질 키나제/ACC(아세틸-CoA 카복실라제) 및 PI(포스파티딜이노시톨)-3-키나제/Akt(단백질 키나제 B) 신호 경로 모두의 활성화를 통한 혈당 조절을 통해 제1형 당뇨병의 증상을 경감시키는 당뇨병 치료제 조성물 또는 건강 기능성 식품에 관한 것이다.

대 표 도


A
0주
3주
글루코스 (mg/dl)
700
600
500
400
300
200
100
0
**
**
##
정상
Dia.
Dia.+ ECM (300 mg/kg)
B
0주
3주
ALT (IU/L)
160
120
80
40
0
**
**
##
정상
Dia.
Dia.+ ECM (300 mg/kg)
C
0주
3주
AST (IU/L)
300
200
100
0
정상
Dia.
Dia.+ ECM (300 mg/kg)

특허청구의 범위

청구항 1

감태 메탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 제1형 당뇨병 치료제 조성물

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 감태 메탄올 추출물 1 ㎎의 고형분말은 100～180 ㎍의 폴리페놀을 함유하고 DPPH 라디칼 제거 효과를 지님을 특징으로 하는 제1형 당뇨병 치료제 조성물

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 감태 메탄올 추출물은 생체 내에서 당뇨병에 의해 증가된 혈장 ALT 수치를 정상 수준으로 감소시킴을 특징으로 하는 제1형 당뇨병 치료제 조성물

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 감태 메탄올 추출물은 C_2C_{12}(마우스 근육모세포 세포주)에서 AMP-활성화 단백질 키나제/ACC(아세틸-CoA 카복실라제) 및 PI(포스파티딜이노시톨)-3-키나제/Akt(단백질 키나제 B) 신호 경로 모두의 활성화를 통해 혈당 함량을 조절함을 특징으로 하는 제1형 당뇨병 치료제 조성물

청구항 5

감태 메탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 제1형 당뇨병의 증상을 경감시키는 건강 기능성 식품

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 감태 추출물을 유효성분으로 포함하는 제1형 당뇨병 치료제 조성물 또는 제1형 당뇨병의 증상을 경감시키는 건강 기능성 식품에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 감태 메탄올 추출물을 유효 성분으로 함유하는 생체 내에서 AMP-활성화 단백질 키나제/ACC(아세틸-CoA 카복실라제) 및 PI(포스파티딜이노시톨)-3-키나제/Akt(단백질 키나제 B) 신호 경로 모두의 활성화를 통한 혈당 조절을 통해 제1형 당뇨병의 증상을 경감시키는 당뇨병 치료제 조성물 또는 건강 기능성 식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인슐린은 세포가 에너지원으로 사용하는 글루코스를 저장하는데 필요한 효소이다. 당뇨병 환자의 경우 이러한 글루코스 대사는 선천적으로 낮은 수치의 인슐린을 분비하는 제1형 당뇨병과 인슐린의 분비에도 불구하고 비정상적인 내성을 지닌 제2형 당뇨병으로 구분될 수 있다. 그 결과로 당뇨병 환자는 증가된 혈당 수치를 지니고, 이는 결국 소변으로 배설되어 과도한 소변 생성 및 탈수를 유발한다. 연속적으로 이는 증가된 갈증 및 수액 섭취를 유발한다. 더욱이 당뇨병은 케톤산증과 같은 급성 합병증뿐만 아니라 심혈관 질환, 만성 신부전, 망막 손상, 신경 손상과 같은 중증 장기적 문제를 포함한 많은 합병증을 유발할 수 있다.

[0003] 최근 연구에서 산화 스트레스 및 만성 염증이 당뇨병을 포함한 대사 장애의 원인으로 보고된바 있다. 이들은 환자 및 동물 모델 상의 당뇨병 및 당뇨 합병증의 발병기전 연구를 통해 자유 라디칼 메커니즘 및 산화 스트레스

의 당뇨병 발병 요인으로 가능한 역할을 조사하였다. 또한 산화-스트레스 관련 세포 신호전달이 글루코스 대사 상의 그의 유해 효과와 밀접하게 연계됨을 나타내었다.

[0004] 많은 천연 생성물은 대체 의학에서 당뇨병의 치료제로서 오랫동안 사용되고 있다. 예를 들어 강황(*Curcuma longa*)은 인도에서 아유르베다 의사에 의해 당뇨병 치료를 위해 사용되어 왔고, 이러한 천연 생성물에 포함된 폴리페놀은 그의 약리 효과의 일부를 설명하는 것으로 추측된다.

[0005] 강황 근경의 활성 성분인 커큐민(curcumin)의 연구는 테트라하이드로커큐민(THC)이 스트렙토조톡신(streptozotocin, STZ)-유도 당뇨병 래트에서 최종 당화 산물의 형성을 저해함을 나타내었다. 녹차 유래 EGCG, 포도 껍질 유래 레스베라트롤 등과 같은 또 다른 폴리페놀의 치료 가능성을 당뇨병 Sprague-Dawley(SD) 래트로의 급성 또는 만성 투여 연구로부터 입증된 바 있다. 이들로부터 많은 과학자들은 산화 손상에 대해 세포 성분을 보호하고 산화 스트레스를 겪는 당뇨병과 같은 다양한 대사 장애 질환의 위험도를 제한하는 폴리페놀의 항산화 특성에 주목하였다.

[0006] 일반적으로 해초는 풍부한 항산화제 공급원으로 간주된다. 이들 해초 유래의 가능한 항산화 화합물은 푸코산틴, 아스타산틴, 카로티노이드와 같은 일부 색소 및 페놀산, 플라보노이드, 탄닌과 같은 폴리페놀으로 확인되었다. 이들 성분 중에 갈조류 특히 감태(*Ecklonia cava*)에서 발견된 중합된 플로로글루시놀(phloroglucinol) 유니트를 지닌 화합물 종류인 플로로탄닌(phlorotannin)은 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0007] 대한민국 공개특허공보 10-2010-1122호 '감태 추출물을 포함하는 항균 조성물'에서는 감태(Ecklonia cava) 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균조성물 또는 상기 항균 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품 보존제 및 항균 조성물을 유효성분으로 포함하는 식중독 치료 또는 예방용 조성물 및 기능성 식품 조성물을 개시하고 있다.

[0008] 전통적으로 갈조류는 분만 후 산모 건강을 증진시키는 식품 요법으로 오랫동안 사용되어 왔다. 최근 여러 증거는 감태 천연 메탄올 추출물 및/또는 감태 추출물의 주성분인 플로로탄닌이 라디칼 제거, 항증식, 매트릭스 메탈로프로티나제 저해, 항-알러지, 박테리아 및 프로테아제 저해 효과를 포함한 다양한 생물학적 활성을 지님을 개시하고 있다.

[0009] 그러나 감태 추출물의 당뇨 치료 효과는 아직 개시되지 않았고 따라서 본 발명은 본 발명자들이 생체 내 및 시험관 내 모델을 이용하여 감태 메탄올 추출물의 당뇨병 치료 또는 경감 효과를 측정함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 해결하려는 과제는 감태 메탄올 추출물의 생체 내 및 시험관 모델을 이용하여 당뇨 치료 효과를 측정코자 한 것이다. 또한 이러한 감태 메탄올 추출물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨병 치료제 조성물 또는 당뇨병을 경감시키는 건강기능성 식품을 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 목적은 감태 메탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 제1형 당뇨병 치료제 조성물 또는 제1형 당뇨병의 증상을 경감시키는 건강 기능성 식품을 제공하는 것이다.

[0012] 한편 상기 감태 메탄올 추출물 1 mg의 고형분말은 100~180 ㎍의 폴리페놀을 함유하고 DPPH 라디칼 제거 효과를 지님을 특징으로 한다.

[0013] 상기 감태 메탄올 추출물은 생체 내에서 당뇨병에 의해 증가된 혈장 ALT 수치를 정상 수준으로 감소시킴을 특징으로 한다.

[0014] 또한 상기 감태 메탄올 추출물은 C_2C_{12}(마우스 근육모세포 세포주)에서 AMP-활성화 단백질 키나제/ACC(아세틸-CoA 카복실라제) 및 PI(포스파티딜이노시톨)-3-키나제/Akt(단백질 키나제 B) 신호 경로 모두의 활성화를 통해 혈당 함량을 조절함을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 효과는 감태 메탄올 추출물의 생체 내 및 시험관 모델을 이용하여 당뇨 치료 효과를 측정한 것이다. 또한 이러한 감태 메탄올 추출물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨병 치료제 조성물 또는 당뇨병을 경감시키는 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 다양한 갈조류(A) 및 감태 조직(B)의 총 폴리페놀 함량의 비교를 나타낸 것이다. 신선하게 채취된 감태는 줄기 부분과 잎 부분에 대해 개별적으로 처리되었다. 일정량(5 mg)의 메탄올 추출물은 1 ml의 증류수 내에 용해되고 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 페놀 시약을 이용하여 측정되었다.

도 2는 정상 및 당뇨병 래트 내 혈당 수치(A), ALT(B) 및 AST(C) 상의 감태 메탄올 추출물(ECM) 처리 효과를 나타낸 것이다. 감태 메탄올 추출물은 매일 신선하게 제조되었고 복막내 주사에 의해 1일 1회 투여되었다(Dia. + ECM). 실험 대조군의 경우 일반 식염수가 각각 정상군(Normal) 및 당뇨병군(Dia.)에 투여되었다. 혈액 표본 분석은 실시예에 나타난 바와 같이 VetTest Chemistry Analyzer(IDEXX laboratories, Inc.)을 이용하여 3주 기간 동안 감태 메탄올 추출물 처리 전후에 수행되었다. 결과는 평균 ± S.D.(n = 5)로 표기되었다. $^{**}P < 0.01$ vs. 정상군, $^{\#\#}P < 0.01$ vs. 당뇨병군.

도 3은 체중(A), 사료 섭취(B) 및 물 소비(C) 상의 감태 메탄올 추출물(ECM)의 효과를 나타낸 것이다. 감태 메탄올 추출물은 실시예 및 도 2에 나타난 바와 같이 투여되었다. 생리적 파라미터는 감태 메탄올 처리 개시 1주 전부터(1주) 중지 1주 후(4주)까지 주 1회 및 매일 기록되었다. 실험 대조군의 경우 일반적인 식염수가 각각 정상군(정상) 및 당뇨병군(Dia.)에 투여되었다. 결과는 평균 ± S.D.(n = 5)로 표기되었다. $^{**}P < 0.01$ vs. 당뇨병군.

도 4는 혈장 인슐린(A) 및 췌장섬 조직학(B) 상의 감태 메탄올 추출물 효과를 나타낸 것이다. 도4(A)에서 혈장 인슐린은 실시예에 기재된 바와 같이 실험 종료시 래트 인슐린 ELISA 키트를 이용하여 측정되었다. 도 4(B)는 랑게르한스섬 내의 정상 세포를 지닌 정상군(Normal), 퇴화성, 괴사성 및 액포성 변화를 나타내는 수축된 랑게르한스섬을 지닌 당뇨병군(Dia.), 당뇨병군과 비교시 덜 퇴화된 변화를 나타내는 증가된 크기의 랑게르한스섬을 지닌 당뇨병 + 감태 메탄올 추출물(ECM)-처리군(Dia. + ECM)을 나타낸다. 대표적인 절편이 나타나 있고 유사한 결과가 모든 조사된 래트로부터 수득되었다(H&E; 축척 막대 = 50 ㎛). $^{**}P < 0.01$ vs. 정상군.

도 5는 AMPK-ACC 및 Akt 신호전달 경로를 활성화시키는 감태 메탄올 추출물(ECM)을 나타낸 것이다. 세포 용해질은 p-AMPKα, AMPKα, p-ACC, ACC, p-Akt 및 Akt에 대한 웨스턴 블럿팅을 통해 분석되었다. 항-GAPDH 항체로의 블럿팅은 동일한 단백질 적가 대조군으로 수행되었다. AMPK 및 ACC 인산화의 용량-의존적 유도가 표시된 농도(50~300 ㎍/ml)의 감태 메탄올 추출물로 1시간 동안 자극된 C_2C_{12} 세포에서 관찰되었다(A). Akt 인산화의 시간-

의존적 유도는 감태 메탄올 추출물(300 ㎍/ml)로 표시된 시간(5~60분) 동안 처리된 C_2C_{12} 세포에 측정되었다(B). 전체 형태에 대한 인산 비율이 분석되고 각각 AMPK, ACC(C) 및 Akt(D)에 대해 표시되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 갈조류인 감태의 당뇨병 치료 효과가 스트렙토조톡신-유도 제1형 당뇨병 래트 및 C_2C_{12} 근육모세포를 이용하여 측정되었다. 강한 라디칼 제거 활성을 지닌 감태의 메탄올 추출물(ECM)은 제1형 당뇨병 래트에서 혈당 수치를 감소시켰고 인슐린 농도를 증가시켰다.

[0018] 더욱이 감태의 메탄올 추출물 처리에 의해 당뇨병 래트의 혈장 알라닌 아미노전이효소(ALT)의 증가가 정상 범위 가까이로 극적으로 복구된 반면 아스파라진산 아미노전이효소(AST) 수치는 실험 전체에 어떠한 그룹에서도 유의적으로 변화되지 않았다.

[0019] 또한 다식증 및 다음증과 같은 당뇨병의 특징적인 징후는 감태의 메탄올 추출물 처리에 의해 크게 개선되었다. 감태의 메탄올 추출물의 작용 메커니즘은 적어도 부분적으로는 AMP-활성화 단백질 키나제/ACC 및 PI-3 키나제/Akt 신호 경로 모두의 활성화에 의해 매개되는 것으로 판단된다. 따라서 본 발명의 결과는 감태가 생체 내 및 시험관 내 모두의 당뇨병 개선 효과를 지님을 나타낸다.

[0020] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0021] 갈조류의 폴리페놀 함량 및 라디칼 제거 활성

[0022] 다양한 갈조류(감태(*Ecklonia cava*), 검둥감태(*Ecklonia kurome*), 패(*Ishige okamurae*) 및 모자반(*Sargassum silliquastrum*)의 메탄올 추출물이 그의 폴리페놀 함량에 대해 조사되었다(도 1A). 실험으로부터 검둥감태가 감태(116.8 ㎍/mg), 패 (73.8 ㎍/mg) 및 모자반(29.9 ㎍/mg)보다 유의적으로 높은 폴리페놀 함량을 지녔다(215.3 ㎍/mg). 이들 갈조류 중 감태가 본 발명의 추가 연구를 위해 선택되었다. 동결건조된 감태(50% 메탄올 추출물)의 총 폴리페놀 함량은 갈산의 표준 곡선을 기반으로 측정되고 줄기 부분과 잎 부분 사이에서 비교되었다(도 1B). 결과에 다라 감태 잎은 줄기 부분보다 높은 폴리페놀 함량 수치를 포함한다. 감태 잎(50% 메탄올 추출물)의 수율 및 총 폴리페놀 함량은 각각 30.2% 및 174.8 ㎍/mg이었다. 감태의 메탄올 추출물(ECM)의 라디칼 제거 활성은 DPPH 분석을 이용하여 조사되었고 양성 대조군(아스코르브산 및 BHT)과 비교되었다(표 1). 감태 메탄올 추출물은 농도-의존적 방식으로 DPPH 라디칼을 현격히 감소시켰고 감태 메탄올 추출물의 계산된 EC_{50}은 약 1.09 mg/ml이었고, 이는 감태 메탄올 추출물이 유효한 라디칼 제거제임을 나타낸다.

표 1

DPPH 라디칼 제거 활성 비교

농도(mg/ml)	제거 활성 %[a]		
	감태 메탄올 추출물	아스코르브산	BHT
0.1	10.88 ± 0.42	22.82 ± 0.44	1.44 ± 1.16
0.5	29.82 ± 1.38	92.54 ± 0.26	5.37 ± 1.18
1	46.24 ± 0.97	92.52 ± 0.21	6.79 ± 0.78
5	86.68 ± 0.10	93.30 ± 0.14	24.95 ± 0.45

[a] 3개 측정치의 평균 수치 ± S.D로 표기됨.

[0023]

[0024] 스트렙토조톡신(STZ)-유도 제1형 당뇨병 SD 래트 상의 감태 메탄올 추출물의 효과

[0025] 당뇨병 상의 감태 메탄올 추출물의 치료 가능성을 조사하기 위해 본 발명자들은 SD 래트의 스트렙토조톡신(STZ)-유도 제1형 당뇨병 모델을 이용하였다. 도 2A에 나타난 바와 같이 대조군(정상)의 혈장당 수치는 실험 기간 동안 무시 가능한 변화를 나타내었다(150 내지 200 mg/dl). 그러나 당뇨병 그룹(Dia.)의 경우 지속적으로 증가되어 약 500 mg/dl 정도까지 도달하였다. 이와 대조적으로 3주간의 감태 메탄올 추출물 처리(Dia. + ECM)는 생리 식염수만으로 처리된 당뇨병 그룹(Dia.)과 비교시 66.4%까지 혈장당 수치를 유의적으로 저하시켰다. 이들 결과는 감태 메탄올 추출물이 제1형 당뇨병의 고혈당 상태를 개선시키는 것이 가능한 구성성분을 포함함을 나타낸다. 혈장 알라닌 아미노전이효소(ALT) 및 아스파라진산 아미노전이효소(AST)의 수치도 감태 메탄올 추출물 처리 전후에 채취된 혈액으로부터 모니터되었다. 대조군 래트(정상)의 경우 ALT에 있어서 유의적인 변화가 존재하지 않은 반면 당뇨병 래트(Dia.)의 경우 현저한 증가를 나타내었다(도 2B). 또한 당뇨병 래트의 증가된 혈장 ALT 수치는 감태 메탄올 추출물 처리 후(Dia. + ECM) 대조군에 근접하게 거의 완전하게 복구되었다. 한편 혈장 AST 수치는 실험 동안 근소하게 변화되었다(도 2C). 따라서 감태 메탄올 추출물의 복막내 주사시 혈장 ALT의 현저한 감소는 STZ-유도 제1형 당뇨병의 간 기능의 치료 역할을 나타낸다.

[0026] 체중, 사료 섭취 및 물 소비의 조절

[0027] 실험 동안 모든 래트는 다음증, 다뇨증, 다식증, 고혈당증 및 체중 감소를 유발하는 근육 쇠약 및 인슐린 결핍을 포함한 제1형 당뇨병 증상에 대해 매일 및/또는 매주 모니터되었다. 도 3은 전체 실험 기간 동안 처리된 래트의 체중, 사료 섭취 및 물 소비의 관찰을 나타낸다. 체중은 대조군(정상)에서 지속적으로 증가된 반면 당뇨병 그룹(Dia.)에서는 다소 증가되었고 감태 메탄올 추출물-처리 당뇨병 그룹(Dia. + ECM)에서 다소 감소되었다(도 3A). 한편 사료 및 물 소비 수치는 대조군 래트보다 당뇨병 래트에서 유의적으로 더 컸다(도 3B 및 C). 당뇨병 그룹에서 감태 메탄올 추출물 처리시(Dia. + ECM) 사료 및 물 소비는 각각 27.2% 및 65.9%까지 현격히 감소되었고, 식염수로만 처리된 당뇨병 그룹(Dia.)보다 지속적으로 낮게 유지되었다.

[0028] 췌장 기능 상의 감태 메탄올 추출물의 효과

[0029] 처리된 래트의 췌장 기능은 실험 종료시 채취된 혈액 유래의 혈장 인슐린 수치를 측정함으로서 평가되었다. 대조군(정상)과 비교시 인슐린 분비는 당뇨병 그룹(Dia.)에서 유의적으로 감소되었다. 당뇨병 그룹(Dia.)과 비교시 감태 메탄올 추출물 처리(Dia. + ECM)는 혈장 인슐린 수치의 현저한 복구를 유도하였고, 처리 3주 후 당뇨병 그룹(Dia.)의 217%까지 도달하였다(도 4A). 또한 췌장섬(pancreatic islet) 세포의 조직학이 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 후 실험 동물 표본으로부터 조사되었다. 도 4B에 나타난 바와 같이 췌장섬의 조직학은 대조군에서 정상이었다. 그러나 감태 메탄올 추출물이 처리되지 않은 당뇨병 그룹의 경우 당뇨병 그룹의 β 세포수의 감소로 인한 β 세포에 의해 점유된 면적의 명백한 감소가 췌장 절편에서 관찰되었고, 이는 감태 메탄올 추출물 처리시 적당하게 다시 복구되었다(도 4B). 본 발명의 결과는 혈당 수치 상의 감태 메탄올 추출물의 효과와 일치하고, 이는 제1형 당뇨병 상의 감태 메탄올 추출물의 치료 가능성을 나타낸다.

[0030] C_2C_{12} 세포에서 AMPK-ACC 및 Akt 경로를 활성화시키는 감태 메탄올 추출물

[0031] 감태 메탄올 추출물의 작용 메커니즘을 이해하기 위해 AMPK, ACC 및 Akt를 포함한 글루코스 흡수 신호전달 경로가 조사되었다. 중요하게는 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT) 분석에 의해 측정시 감태 메탄올 추출물(50~300 ㎍/ml)은 C_2C_{12} 세포의 생존능에 영향을 미치지 않았다. 감태 메탄올 추출물 처리(1시간만)는 C_2C_{12} 세포에서 AMPK 인산화의 용량-의존적 증가를 유도하였다(도 5A 및 C). AMPK 활성 증가와 일치하게 AMPK의 다운스트림 신호전달 분자인 ACC 인산화도 감태 메탄올 추출물 처리 후 증가되었다. 더욱이 감

태 메탄올 추출물(300 ㎍/ml)은 시간-의존적 방식으로 Akt를 활성화시키는 것으로 나타났고, 이는 인슐린과 유사하였다(도 5B 및 D). Akt 인산화는 감태 메탄올 추출물 처리 후 5분에 최대 수치에 도달한 후 60분에 기저 수준으로 감소되었다. 이들 데이터는 감태 메탄올 추출물이 AMPK 및 Akt 경로를 통해 골격근 세포에서 대사적 역할을 지님을 나타낸다.

[0032] 산화 스트레스는 당뇨병과 같은 특정 대사 장애에 대한 중요한 원인으로 추측되었다. 최근 연구는 비만-유도 G6PD(글루코스-6-인산탈수소효소)가 NF-κB, 사이토킨, 대식세포 특이적 유전자 발현 및 염증 신호와 밀접하게 관련된 산화촉진 효소의 발현을 증가시킴으로서 산화 스트레스를 자극시킴을 나타내었다. 이들은 결국 당뇨병, 심혈관 질환을 포함한 대사 장애를 유발한다. 또한 당뇨병에서 만성 고지혈증은 과도한 자유 라디칼 생성 및 산화 스트레스를 유발하여 당뇨병성 신경병증 발생을 야기함이 주장된다. 따라서 당뇨병 및 그의 합병증은 그 질환의 병인 및 진행에 높은 산화 스트레스 수치와 실질적으로 관련되는 것으로 나타났다.

[0033] 천연 폴리페놀은 식물 기원 특히 해초의 풍부한 성분이다. 현재까지 수천의 폴리페놀이 천연 생성물에서 발견되었다. 2가지 주요 폴리페놀 타입은 플라보노이드와 페놀산이다. 이들은 그의 항산화 활성으로 인해 가능한 건강 이익을 지니기 때문에 대다수 사람은 식품 및 음료에 포함된 폴리페놀에 주목하고 있다. 이들 폴리페놀은 활성 산소종 상에 직접적으로 작용하거나 내인성 항산화 방어 시스템을 자극함으로서 산화 스트레스에 대해 세포 성분을 보호하고 조직 손상을 감소시키는 것으로 판단된다. 따라서 이들은 산화 스트레스 손상과 밀접하게 관련된 다양한 대사 이상의 위험률을 감소시킨다. 실제로 다른 연구자들은 여러 타입의 폴리페놀이 당뇨병, 심혈관 질환, 암의 진행을 제한시킬 수 있음을 제안한 바 있다. 당뇨병에 있어서 폴리페놀은 다양한 메커니즘을 통해 고혈당증을 조절함이 제안되어 왔다. 첫 번째로 이들은 말초 조직 내에서 α-글루코시다제 및/또는 나트륨-글루코스 심포터(symporter)를 저해함으로서 창자 점막 및 근위 요세관으로부터 글루코스 흡수를 감소시킨다. 두 번째로 폴리페놀은 간 글루코스신합성을 감소시키고 근육 근육 글루코스 흡수의 아드레날린성 자극 및 췌장 β 세포 인슐린 방출을 유도한다.

[0034] 최근 여러 해양 갈조류는 특정 결합을 지닌 페놀 및 폴리페놀을 포함한 천연 생물활성 구성성분의 중요한 공급원으로서 새로이 입증되었다. 본 발명에서 본 발명자들은 폴리페놀이 풍부한 갈조류인 감태에 중점을 두었다. 감태 추출물의 분석은 이것이 3개의 일반적인 스테롤(푸코스테롤, 콜레스테롤 및 에르고스테롤)과 함께 7개의 플로로탄닌 유도체(플로로글루시놀(phloroglucinol), 엑콜(eckol), 푸코디플로로에톨(fucodiphloroethol) G, 플로로푸코푸로엑콜(phlorofucofuroeckol) A, 디엑콜(dieckol), 7-프로로 엑콜(phloro eckol) 및 6,6'-비엑콜(bieckol))를 포함함을 나타내었다. 다양한 시험관 내 분석을 이용하여 감태의 7개 플로로탄닌 중 디엑콜이 가장 강한 항산화제인 것으로 나타났다. 종전 논의된 바와 같이 감태 추출물은 항-알러지 효과뿐만 아니라 강한 라디칼 제거, 항증식 및 매트릭스 메탈로프로티나제 저해, 박테리아 및 프로테아제 저해 활성을 지닌다. 그러나 그의 항당뇨 효과는 충분히 이해되지 않고 있다. 본 발명은 감태가 STZ-유도 제1형 당뇨병에서 혈장당 수치를 저하시키고 혈장 인슐린 농도를 증가시킬 수 있음을 최초로 입증하였다(도 2A 및 3A). 더욱이 감태 메탄올 추출물 처리는 대조군 당뇨병 래트와 비교시 췌장섬 크기의 유의적인 증가를 유도하였다. 실제로 스트렙토조톡신은 특히 췌장 조직에서 활성 산소종을 생성시키고 항산화 효소 활성을 감소시키기 때문에 급성 스트렙토조톡신 주사는 세포 또는 조직 산화 손상을 조사하는데 사용되고 있다. 본 발명의 데이터의 경우 감태 메탄올 추출물의 항산화 효과는 스트렙토조톡신-유도 베타 세포 내 활성 산소종의 감소에 의해 규명되어야 한다. 실제로 폴리페놀이 생체 내 동물 모델 및 시험관 내 연구로부터 인슐린-유사 효과를 지닌다는 또다른 조사 보고서가 존재한다. 이들 연구와 일치하게 본 발명의 결과도 폴리페놀이 풍부한 감태 메탄올 추출물 단독이 인슐린과 마찬가지로 Akt 신호전달 경로를 자극시킬 수 있음을 나타내었다(도 5B).

[0035] 증가된 알라닌 아미노전이효소(ALT)는 간세포 손상의 결과인 것으로 판단된다. 이는 인슐린 내성, 증가된 염증-촉진 사이토카인 생성, 산화 스트레스의 결과로 간주된다. 더욱이 증가된 ALT의 유병률은 일반적인 집단보다 제1형 또는 제2형 당뇨병의 환자에서 3~4배 더 높다. 본 발명의 데이터는 감태 메탄올 추출물이 간 손상 상에 치료 효과를 지님을 나타내었다(도 2B). 당뇨병의 주요 특징은 다음증, 다뇨증, 다식증 및 체중 감소를 유발하는 근육 쇠약이다. 이와 유사하게 본 발명의 STZ-유도 제1형 당뇨병 래트는 대조군 래트보다 물과 사료를 더욱 더

많이 섭취하는 것과 같이 잘-알려진 당뇨병 특징을 나타내었다. 그러나 이들이 감태 메탄올 추출물로 3주간 처리된 경우 그들의 음식 섭취 및 물 소비는 유의적으로 감소되었다(도 3). 또한 체중은 감태 메탄올 추추물로 3주간 처리된 당뇨병 래트에서 다소 감소되었다. 감태 메탄올 추출물의 신체 항상성을 보호하는 능력은 고혈당을 감소시킬 수 있는 능력과 관련되는 것으로 판단된다. 따라서 감태 메탄올 추출물은 제1형 당뇨병 상에 강한 치료 효과를 지닌다.

[0036] 인슐린 작용 메커니즘은 일반적으로 2개의 주요 신호전달 경로와 관련된다. 하나는 미토겐-활성화 단백질 키나제(MAPK) 경로이고, 다른 하나는 포스파티딜이노시톨(PI)3-키나제 경로이다.

[0037] 2개의 메커니즘 중 PI3-키나제 경로가 인슐린의 고혈당 효과를 매개하는데 중요하다. 한편 폴리페놀은 AMPK(AMP-활성화 단백질 키나제)와 같은 다른 메커니즘을 통해 인슐린-유사 효과를 지니는 것으로 판단된다. AMPK는 대부분의 세포에서 지방산 산화 및 지질 합성을 조절하는 계통발생학적으로 보존된 세포내 연료 센서이다. 인슐린 부재시 글루코스 운송 상의 폴리페놀 효과는 주로 PI-3 키나제 경로와 관련되지 않은 AMPK 활성화 상에 주로 의존적이다. 그러나 이들이 동시-존재하는 경우 인슐린과 폴리페놀의 신호전달 연쇄반응은 상호연결되고 증폭되어 증가된 인슐린 감수성을 유발하는 것으로 판단된다.

[0038] 또한 다른 폴리페놀과 달리 감태 메탄올 추출물 처리는 인슐린 부재시에도 C_2C_{12} 근육세포 내에서 AMPK-ACC 및 PI-3 키나제 경로 모두의 활성화를 유발하였다(도 5). 이는 본 발명에서 관찰된 STZ-유도 제1형 당뇨병의 증상을 개선시키는 감태의 작용 기전을 적어도 부분적으로 설명한다. 따라서 AMPK/ACC 및/또는 인슐린 신호전달 경로(Akt)에 대한 활성제의 확인은 현재 이용 가능한 것보다 더욱 효과적이고 적은 유해 효과를 지닌 신규한 당뇨병 치료제 개발 기회를 제공한다.

[0039] 결론적으로 감태의 폴리페놀-풍부 추출물인 감태 메탄올 추출물은 유효한 라디칼 제거 활성을 지니고 그의 투여는 본 발명의 실험 동물에서 모든 당뇨병 징후로부터 유의적인 개선을 나타내었다. 그의 작용 양식에 따라 감태 메탄올 추출물은 C_2C_{12} 골격근 세포 내 AMPK(AMP-활성화 단백질 키나제)/ACC(아세틸-CoA 카복실라제) 및 PI3K(포스파티딜이노시톨-3-키나제)/Akt(단백질 키나제 B) 신호전달 모두를 활성화시키고 이는 생체 내 결과와 일치한다. 본 발명에서 감태의 치료 가능성이 제1형 당뇨병 모델에 대해 입증되었으나 그 작용의 상세한 분자 메커니즘은 추가적인 조사가 요구된다.

[0040] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0041] 화학물질 및 시약

[0042] DPPH(2,2-디페닐-1-피크릴-하이드라질), 스트렙토조톡신(STZ), 갈산, 구연산나트륨, 구연산, Folin-Ciocalteu 페놀 시약, DMSO(디메틸 설폭사이드), 무수탄산나트륨, 부틸하이드록시톨루엔(BHT), L-아스코르브산 및 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT)는 Sigma Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM), 우태아혈청(FBS), 페니실린, 스트렙토마이신, 트립신은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 포스포-아세틸-CoA 카르복실라제(Ser79), 포스포-AMPKa(Thr172), 포스포-Akt(Ser473), AMPK 및 Akt에 대한 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA)에서 구입하였다. 사용된 다른 모든 시약은 최고 순도 등급이었다.

[0043] (실시예 1) 식물 재료 및 추출

[0044] 여러 해초(감태, 검둥감태, 패 및 모자반)의 80% 메탄올 추출물이 (재)제주하이테크산업진흥원(한국 제주)으로부터 수득되었다. 제주도 연안에서 3월에 신선하게 채취된 해양 갈조류 감태는 염, 모래 및 착생식물 오염을 제거하기 위해 즉시 수돗물로 즉시 세척되었다. 해초 표본은 신선한 증류수로 간단하게 세척되고 줄기 부분과 잎 부분으로 별도로 절단되었다. 이들은 저온 공기 조절시키며 그늘에서 건조된 후 사용 전까지 20℃에서 보관되었다. 동결 표본은 동결건조되고 추출 전 분쇄기로 균질화되었다. 메탄올 추출물은 하기 기재된 바와 같이 최소 변형으로 Zhang, Q. et al., Journal of Applied Phycology 18, 445-450, 2006의 방법을 이용하여 수득되었다. 일정량(10 g)의 동결건조된 감태 분말이 pH 2로 적정되면서 50% 메탄올 200 ml에 첨가되고 실온에서 1시간 동안 진탕되었다(150 rpm). 추출 후 상청액은 4℃에서 20분간 원심분리(7000 rpm)에 의해 회수되었고, 메탄올은 회전 진공 증발기(Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 증발되었다. 최종 수성 부분은 동결건조되고 사용 전까지 -20℃에서 보관되었다.

[0045] (실시예 2) 총 폴리페놀 함량의 측정

[0046] 총 폴리페놀 함량은 최소 변형으로 Zhang et al.(2006)의 방법을 이용하여 측정되었다. 폴리페놀 표준물질로서 갈산 원액(1 mg/ml)(증류수 내)이 제조되었고 원액은 희석되어 각각 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 200 ㎍/ml 농도의 작용 표준물질을 제공하였다. 표본의 경우 일정량(5 mg)의 여러 해초 메탄올 추출물은 1 ml의 증류수 내에 용해되었다. 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 각각의 표본 및 표준물질 용액 일정량(10 ㎕)은 96-웰 마이크로플레이트 포맷 내에서 50 ㎕의 Folin-Ciocalteu 시약과 혼합되고 5분간 인큐베이트되었다. 반응물은 7.5% 탄산나트륨 용액 40 ㎕과 혼합되고 암실에서 2시간 동안 인큐베이트되었다. 흡광도는 분광광도법 마이크로플레이트 판독기(BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)로 750 nm에서 측정되었다.

[0047] (실시예 3) DPPH 라디칼 제거 분석

[0048] 감태 메탄올 추출물의 항산화 활성은 최소 변형으로 2,2-디페닐-1-피크릴-하이라질(DPPH) 방법(Borse, B. et al., Journal of Agricultural Food Chemistry 55, 1750-1754, 2007)을 이용하여 측정되었다. 이를 위해 감태 추출물(ECM)은 상기 기재된 바와 같이 제조되었다. DPPH 작용 용액(6×10^{-5} M)도 실험 당일에 DMSO 내에 용해시키고 볼텍스-혼합시킴으로서 신선하게 제조되었다. 간단하게는 900 ㎕의 DPPH 용액은 100 ㎕의 증류수(대조군) 또는 100 ㎕의 감태 메탄올 추출물(표본)과 혼합되었다. 표본 배경 보정을 위해 100 ㎕의 감태 추출물은 DPPH 용액 대신 900 ㎕의 DMSO 단독(표본 배경)과 혼합되었다. 부틸하이드록시톨루엔(BHT) 및 L-아스코르브산은 양성 대조군으로 사용되었다. 일정량의 대조군, 표본 용액 또는 표본 배경은 96-웰 마이크로플레이트로 이동되고 암실에서 1시간 동안 인큐베이트되었다. 517 nm에서의 흡광도가 분광광도법 마이크로플레이트 판독기(BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)를 이용하여 측정되었고, 표본의 DPPH 라디칼 제거 활성은 하기 방정식을 이용하여 분석되었다.

[0049] $\text{DPPH 라디칼 제거 활성}(\%) = [1(A_1 - (A_2 - A_3))/A_1] \times 100$

[0050] A_1은 대조군의 흡광도; A_2는 표본의 흡광도; A_3은 표본 배경의 흡광도임.

[0051] (실시예 4) 동물 및 식이

[0052] 수컷 Sprague-Dawley 래트(180~220 g BW, 6주령)는 Central Laboratory Animal Inc.(한국)에서 구입하였다. 래트는 정상 12시간 명암 주기로 22±2℃ 및 60~65% 상대 습도의 공간에서 임의로 통상의 고형사료 식이

(Superfeed Co., 한국) 및 수돗물로 신선하게 사육되었다. 이들은 실험 전 1주 이상 환경 적응되었다. 모든 실험 동물은 경상대학교 실험동물 이용 관리 지침에 따라 처리되었다.

[0053] (실시예 5) 당뇨병 유도 및 감태 처리

[0054] 래트는 처리를 위해 하기와 같이 각각 5마리의 3개 그룹으로 분류되었다: 대조군(생리 식염수로 처리되는 정상 래트), 당뇨병(생리 식염수로 처리되는 당뇨병 래트), 당뇨병-감태(300 mg/kg의 감태로 처리되는 당뇨병 래트). 제1형 당뇨병의 유도를 위해 래트는 구연산 완충액(0.1 M, pH 4.5) 내에서 신선하게 제조된 스트렙토조톡신(45 mg/kg)이 투여되었다(i.p.). 당뇨병 래트는 다식증, 다음증 및 다뇨증의 징후로 확인될 수 있다. 당뇨병 상태는 스트렙토조톡신 주입 72시간 후 및 7일 후에 측정된 혈장당 수치 분석에 의해 조사되었다. 200 mg/dl 이상의 혈장당을 지닌 래트는 본 발명에서 당뇨병으로 이용되었다. 감태 메탄올 추출물 및 대조군 운반체(생리 식염수) 처리의 경우 당뇨병 래트는 2개 그룹으로 분류되어 3주간 1일 1회 시험 시약이 복막내 투여되었고 추가 1주까지 지속적으로 모니터되었다. 실험 전체 동안 이들의 사료 섭취 및 물 소비가 매일 기록되고 체중이 매주 모니터되었다.

[0055] (실시예 6) 혈액 생화학적 분석

[0056] 주 1회 래트는 12시간 동안 금식되었고, 이후 에틸에테르로 간단하게 마취 후 혈액이 채취되었다. 혈액의 생화학적 분석을 위해 당, 알라닌 아미노전이효소(ALT) 및 아스파라진산 아미노전이효소(AST)의 혈장 수치가 IDEXX VetTest Chemistry Analyzer(IDEXX laboratories, Inc., Maine, USA)로 통상의 진단 키트를 이용하여 비색법으로 측정되었다. 혈장 인슐린은 분광광도법 마이크로플레이트 판독기(BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)로 래트 인슐린 ELISA 키트(SHIBAYAGI, Co., Ltd., Gunma, Japan)를 이용하여 실험 종료시 분석되었다.

[0057] (실시예 7) 췌장의 조직병리학적 처리

[0058] 췌장 조직은 3주간 감태 메탄올 추출물 또는 운반체(생리 식염수) 처리 후 SD 래트로부터 수득되었다. 조직 단편은 10% 중화된 포르말린 용액 내에서 고정되었다. 고정 후 조직은 탈수되고 파라핀 내에 포매되었다. 파라핀 블록은 5 ㎛로 절단된 후 조직학적 변화를 관찰하기 위해 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색되었다.

[0059] (실시예 8) 세포 배양

[0060] C_2C_{12}(마우스 근육모세포 세포주)는 5% CO_2로 가습된 대기 내 37℃에서 10% 열 불활성화된 FBS 및 항생제로 보충된 DMEM 내에서 유지되었다. 근관으로의 분화를 위해 세포는 2 X 10^4 세포수/ml의 밀도로 6-웰 플레이트 내에 재분주되었다. 48시간 후(80% 융합 이상) 배지는 1%(v/v) FBS를 지닌 DMEM으로 전환되었고 배양 2, 4 및 6일 후 교체되었다. 감태 메탄올 추출물 또는 인슐린으로 세포의 처리는 근관 분화가 완료되면 기재된 바와 같이 개시되었다.

[0061] (실시예 9) 웨스턴 블럿팅

[0062] 처리 후 C_2C_{12} 세포는 얼음-냉각된 PBS로 2회 세척된 후 100 ㎕의 세포용해 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% 데옥시콜산나트륨, 150 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM 오르소바나듐산나트륨, 1 mM NaF, 1mMNa_3VO_4, 1

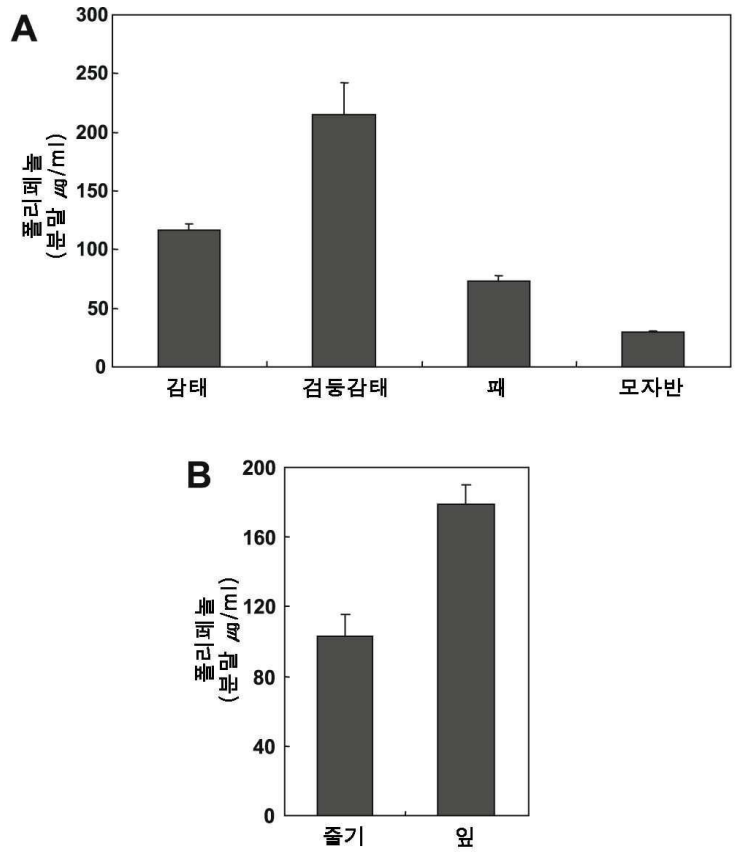
㎍/mL 아프로티닌(aprotinin), 1 ㎍/mL 류펩틴(leupeptin), 1 ㎍/mL 펩스타틴(pepstatin))에 첨가되었다. 플레이트는 얼음 위에서 3분간 진탕되었고 세포는 고무 채집기를 이용하여 에펜도르프 미세원심분리 튜브 내에 긁어서 채취되었다. 채취된 세포는 주기적 교반으로 얼음 위에서 추가 30분간 용해되었다. 세포 파편은 원심분리(22,000g, 4℃, 30분)에 의해 제거되었고 수득된 상청액은 채취되고 Bio-Rad 단백질 분석 시약(Bio-Rad, CA, USA)을 사용하여 그 단백질 분석이 측정되었다. 표본은 끓는 물에서 SDS 표본 완충액으로 5분간 처리된 후 단백질(30~40 ㎍)이 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리되고 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(Bio-Rad, CA, USA)으로 이동된 후 특정 1차 항체를 이용하여 면역블럿 분석되었다. 1차 항체와 4℃에서 밤새 인큐베이션 후 멤브레인은 당근-컨쥬게이트된 2차 항체(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이트되었다. 블럿은 청색광-감수성 필름(Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan) 상에서 조영증강 화학발광 방법(ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 시각화되었다. 필요한 경우 블럿된 멤브레인은 박탈되어 다른 항체를 이용하여 재프로브되었다. 농도계측 분석은 Hewlett-Packard 스캐너 및 NIH 이미지 소프트웨어(Image J)로 수행되었다.

[0063] 통계 분석

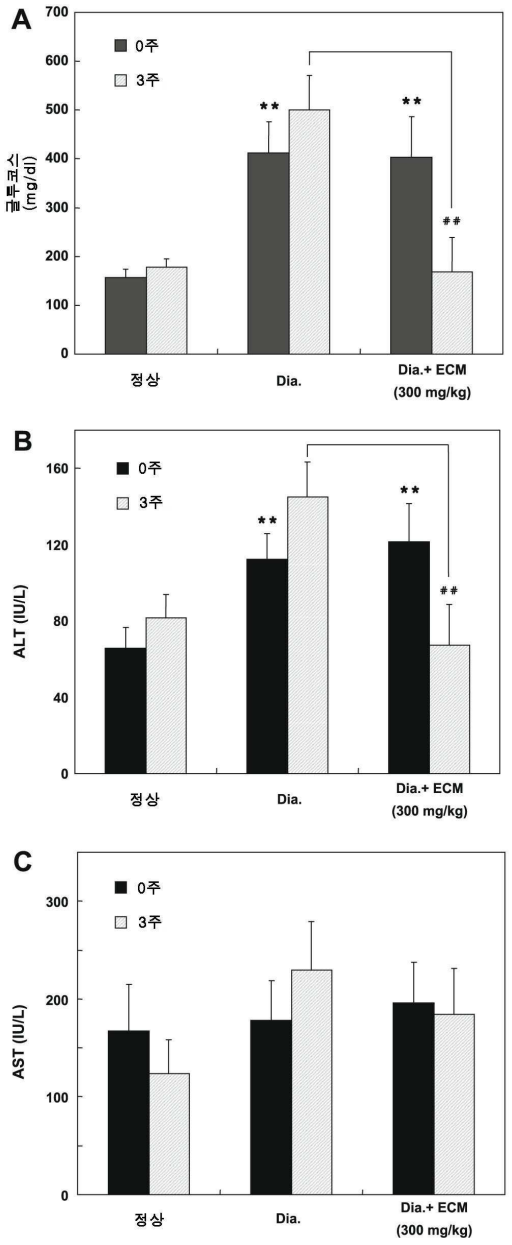
[0064] 결과는 평균 ± 표준편차(S.D)로 표기되었다. 대응 Student t-테스트가 2개 평균 수치 사이의 차이 유의성을 평가하는데 이용되었다. $P < 0.05$는 통계적으로 유의적인 것으로 간주되었다.

도면

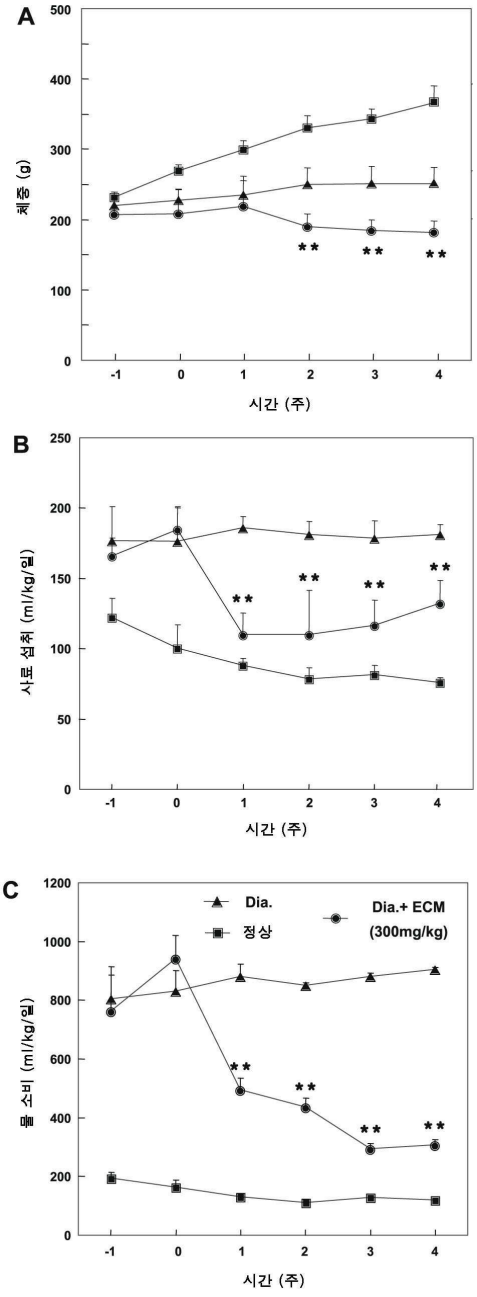
도면1



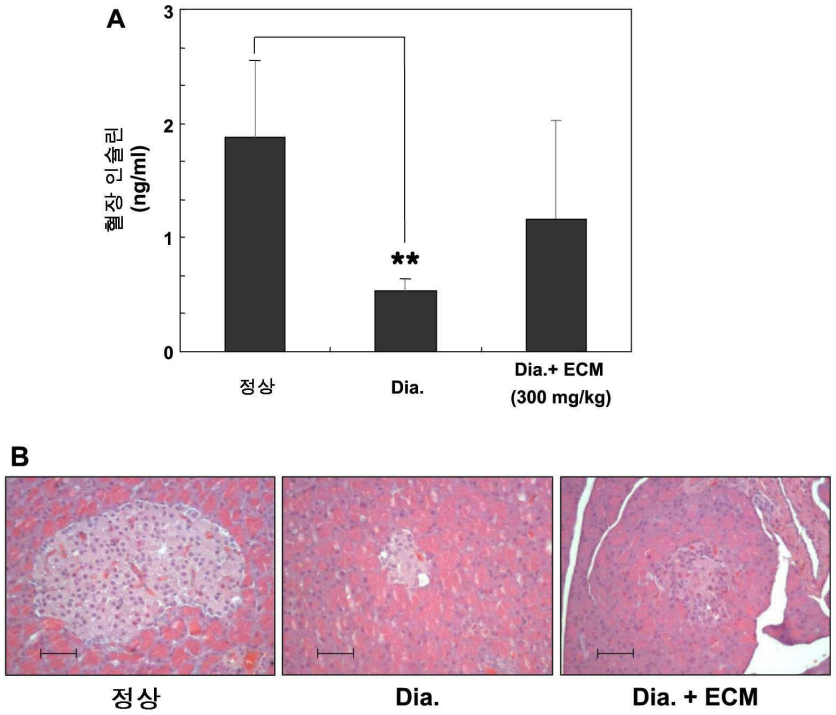
도면2


A
0주
3주
글루코스 (mg/dl)
700
600
500
400
300
200
100
0
**
**
##
정상
Dia.
Dia.+ ECM (300 mg/kg)
B
0주
3주
ALT (IU/L)
160
120
80
40
0
**
**
##
정상
Dia.
Dia.+ ECM (300 mg/kg)
C
0주
3주
AST (IU/L)
300
200
100
0
정상
Dia.
Dia.+ ECM (300 mg/kg)

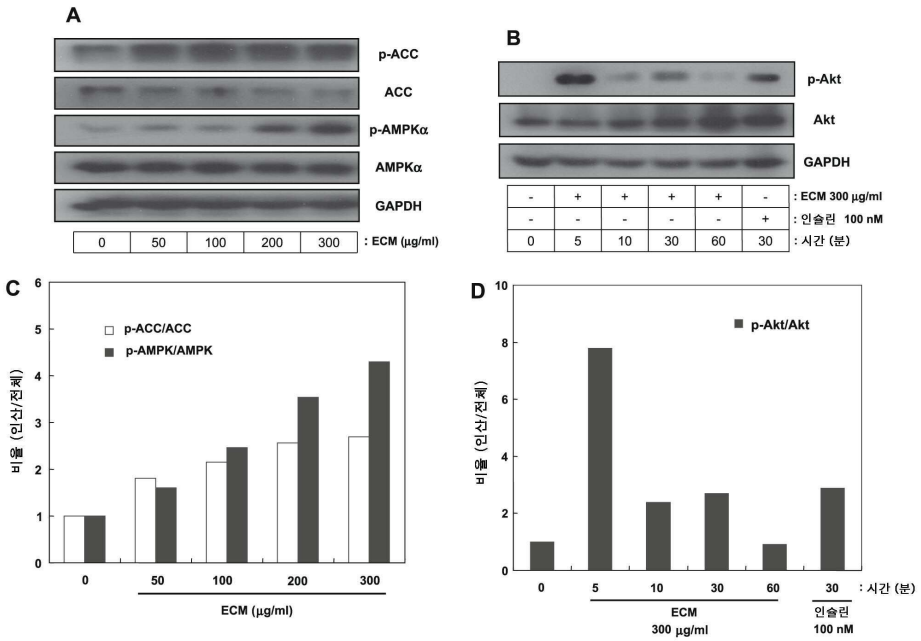
도면3


A
체중 (g)
시간 (주)
B
사료 섭취 (ml/kg/일)
시간 (주)
C
Dia.
정상
Dia.+ ECM
(300mg/kg)
물 소비 (ml/kg/일)
시간 (주)

도면4


A
혈장 인슐린 (ng/ml)
3
2
1
0
**
정상
Dia.
Dia.+ ECM (300 mg/kg)
B
정상
Dia.
Dia. + ECM

도면5


A
p-ACC
ACC
p-AMPKα
AMPKα
GAPDH
0 50 100 200 300 : ECM (μg/ml)
B
p-Akt
Akt
GAPDH
- + + + + - : ECM 300 μg/ml
- - - - - + : 인슐린 100 nM
0 5 10 30 60 30 : 시간 (분)
C
p-ACC/ACC
p-AMPK/AMPK
비율 (인산/전체)
0 50 100 200 300
ECM (μg/ml)
D
p-Akt/Akt
비율 (인산/전체)
0 5 10 30 60 30 : 시간 (분)
ECM 300 μg/ml
인슐린 100 nM