

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0102638 (43) 공개일자 2016년08월31일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/739 (2006.01) A23L 1/00 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) (52) CPC특허분류 A61K 36/739 (2013.01) A23L 1/0014 (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0024937 (22) 출원일자 2015년02월23일 심사청구일자 2015년02월23일 기술이전 희망 : , 실시권하여, 기술지도		(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동) (72) 발명자 강일준 강원도 춘천시 삭주로 89-7, 107-503 (후평동 에리트아파트) (74) 대리인 특허법인태동

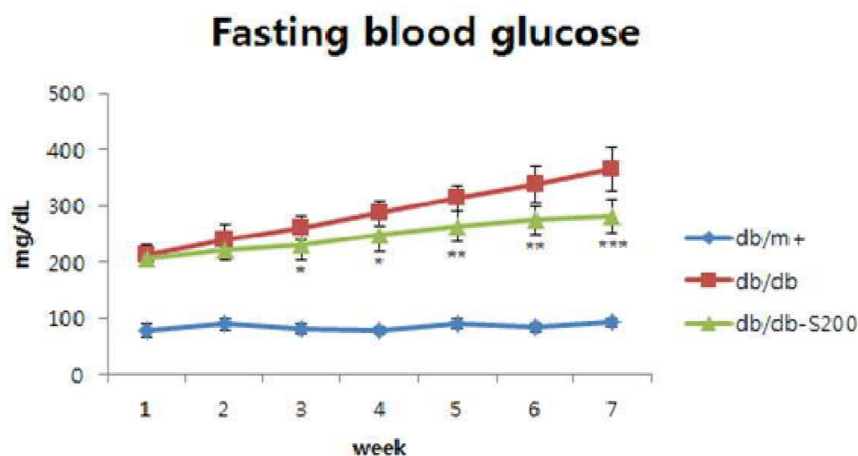
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 및 당뇨합병증 예방 또는 개선용 조성물**

(57) 요약

오이풀(*Sanguisorba officinalis* L.)추출물 또는 상기 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨 및 당뇨합병증의 예방 및/또는 개선용 조성물이 제공된다. 보다 구체적으로, 본 발명에서는 오이풀 추출물의 혈당 강하 효과와 인슐린 저항성 개선 및 고혈당에 의한 당뇨합병증 예방 활성이 우수하여 당뇨병의 주요 증상과 당뇨합병증 예방 및 치료용 조성물 또는 기능성 식품, 혈당 강하 조절용 약학적 조성물 및 혈당 강하 조절용 건강식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A23L 1/3002 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

오이풀을 물 및 C₁ 내지 C₄의 직쇄 또는 분지형 알코올 또는 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 추출하여 얻어진 추출물 및 상기 추출물을 물, 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 부탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 분획하여 얻어진 분획물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 당뇨 및 당뇨합병증의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물

청구항 2

제1항에 있어서 오이풀은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인 약학적 조성물

청구항 3

제1항에 있어서 당뇨합병증은 동맥경화증, 백내장, 뇌경색, 뇌혈전, 심근경색증, 고혈압, 고지혈증, 또는 비만 증인 약학적 조성물

청구항 4

오이풀 추출물 또는 이를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 또는 당뇨병합병증의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 중 어느 하나의 형태를 갖는 건강기능식품

청구항 6

혈당 개선, 지질대사의 개선 및 당뇨합병증의 예방 및 치료의 효과를 나타내는 오이풀 추출물 또는 이를 유효성분으로 함유하는 건강보조식품

청구항 7

제 6항에 있어서 상기 식품은 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 또는 건강 기능성 식품류인 식품

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오이풀(*Sanguisorba officinalis* L.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨 및 당뇨합병증의 예방 및/또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 현대인들의 생활수준의 향상과 인간수명의 증가로 인하여 건강에 대한 인식도가 증가함에 따라 급속도로 증가하고 있는 당뇨병은 전 세계적으로 주목 받고 있는 만성질환이다.

[0003] 당뇨병은 췌장의 베타세포에서 생성되는 인슐린 호르몬 부족 또는 인슐린 저항성의 이상과 나아가 이러한 두 가지 모두의 결함으로 발생하는 고혈당을 특징으로 하는 대사장애증후군이다. 이러한 당뇨병은 인슐린 의존형 당뇨병 (IDDM; Type I)과 인슐린 저항 및 인슐린 분비 손상에 의해 발생하는 인슐린 비의존형 당뇨병(NIDDM; Type II)으로 나눌 수 있다. 제I형과 제II형 당뇨병 모두에서 심장 질환, 장 질환, 안과 질환, 신경 질환, 뇌졸중 등과 같은 다양한 합병증이 발생하게 되는데 이는 장시간 동안 혈당과 인슐린 수준이 상승하여 만성신경질환과 심혈관질환이 발생하게 되고 단시간의 저혈당과 고혈당반응으로 급성 합병증을 야기시키게 되는 것이다.

[0004] 당뇨병은 고혈당이 만성으로 지속되면서 당질대사뿐만 아니라 지질 및 단백질 대사장애도 함께 일으킨다. 그 병태는 다양하며 직접 고혈당에 기인하는 것으로 망막, 신장, 신경, 심혈관계 등에서 당뇨병성 말초신경장해, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 신증, 당뇨병성 백내장, 각막증, 당뇨병성 동맥경화증 등이 있다. 당뇨병 환자수는 과식, 운동부족, 서구화된 식생활, 스트레스, 음주, 흡연 등 생활습관의 변화로 인해 꾸준히 증가하는 추세이다.

[0005] 대한당뇨병학회는 `한국인의 당뇨병 발생현황'보고서를 통해 우리나라 성인의 당뇨병 유병률은 10%선으로 최소 300만명에서 최대 500만명 정도가 당뇨병환자로 추산되며, 지속적으로 증가추세에 있다고 보고하였다. 당뇨병 환자의 평균수명이 연장됨에 따라 당뇨 합병증의 발생에 의한 후유증과 그로 인한 사망이 중요한 사회적 문제점으로 대두되고 있다. 당뇨 합병증은 당뇨병 노출정도에 따라 신체 각 조직에서 다양하게 나타나는 기능적 또는 형태학적 변화에 의해 초래되는 심각한 질병 상태를 말하며, 주로 눈, 신장, 심장, 신경조직에 나타나 실명, 만성 심부전, 심근경색증, 하지 절단 등 치명적인 질병의 원인이 되므로 발생을 예방하는 것이 가장 중요하다.

[0006] 당뇨의 치료법은 약물요법, 운동요법 및 식이요법이 있으며 환자의 증상에 따라 인슐린 약제와 각종 혈당제가 사용되고 있다. 그러나 당뇨병은 간에서의 당 생성 과다, 인슐린 저항성, 근육과 지방 세포 등에서 당 처리 능력 감소 등의 특징을 나타내는 복합적인 질병이므로 특정 치료법만으로는 여러 가지 부작용의 유발을 막을 수 없다. 이 중 약물요법은 인슐린 및 화학물질을 사용하고 있어 약물 복용에 따른 부작용과 환자의 내성에 끊임없는 문제가 되고 있기 때문에, 최근에는 당뇨병 치료에 있어 식이가 가능하며 부작용이 적은 천연물을 이용하여 당뇨병을 치료하고, 더 나아가 당뇨병합병증의 예방 및 치료하기 위한 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구를 통해 독성 측면에서 유리한 천연물 소재로부터 당뇨병 및 그 합병증을 효과적으로 예방하는 소재를 개발하고, 효능을 과학적으로 검증하는 것이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 오이풀의 당뇨 및 당뇨합병증 치료에 우수한 효과가 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 일례는 오이풀의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 당뇨 및 당뇨합병증 예방 및/또는 개선용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0010] 오이풀 추출물 및/또는 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 및 당뇨합병증 예방 및/또는 개선용 조성물이 제공된다.

[0011] 오이풀(*Sanguisorba officinalis* L.)은 쌍떡잎식물 이판화군 장미목 장미과의 여러해살이풀로 잎을 자르면 상큼한 오이냄새가 나기 때문에 오이풀이라고 한다. 굵은 뿌리줄기에서 갈라진 뿌리는 양끝이 뾰족한 원기둥 모양으로 굽어지고 원대는 곧게 1m 정도 자라며 위에서 가지가 갈라진다. 잎은 마디마다 서로 어긋나게 자리하고 있으며 깃털 모양의 겹잎으로 홀수의 잎 조각을 가진다. 일반적으로 잎은 길쭉한 타원형으로 생겼고 끝이 무디며 가장자리에 거친 톱니를 가진다. 꽃은 7~9월에 피고 검붉은색이며 수상꽃차례에 달린다. 꽃이삭은 타원형 또는 거꾸로 선 달걀모양의 타원형이며 위에서부터 꽃이 피기 시작한다. 열매는 수과로 10월에 익고 사각형이며 꽃받침으로 싸여 있다. 오이풀은 식용으로 어린잎을 먹고, 약용으로 뿌리를 지혈제로 쓴다. 오이풀의 성분 연구로는 전초에 플라보노이드와 키논화합물, 탄닌질 등이 있으며, 잎의 아스코르빈산 함량은 200mg%이다. 현재 오이풀 추출물을 함유하는 피부 보습용 화장료 조성물 및 그 제조방법에 대한 특허를 (주)더페이스샵코리아에서 등록한 바 있다(특허 제10-1326556000호 2011.03.09.(한국)). 이는 오이풀 추출물을 통해 표피 수분량을 증가, 표피 수분 증발을 억제, 항염, 콜라겐 생합성 등의 작용으로 피부보습효과와, 상처 치유효과, 피부 주름 개선 효과를 얻었다. 따라서 본 발명에서는 현재 진행되어 있지 않은 오이풀의 당뇨 및 당뇨합병증 효과를 증명하고자 한다.

[0012] 본 발명에서는 오이풀 추출물 조성물의 당뇨 및 당뇨합병증 치료 효과를 제공한다.

[0013] 당뇨합병증은 당뇨병으로 인한 고혈당과 단백질의 반응이 비가역적으로 진행되어 최종당화산물(Advanced

glycation endproducts, AGEs)이 생성되어 혈중이나 조직의 다른 단백질과 교차결합하여 유발시키는 여러 가지 합병증을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서 오이풀 추출물이 치료 효과를 갖는 당뇨병증은 당뇨병성 혈관장애, 당뇨병성 신경장애 또는 당뇨병성 감염증 등일 수 있으며, 바람직하게는 당뇨병 망막증(diabetic retinopathy), 당뇨병 백내장(diabetic cataract), 당뇨병 신증(diabetic nephropathy), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy), 당뇨병 혈관합병증 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 당뇨병 망막증, 당뇨병 백내장 또는 당뇨병 신증일 수 있다.

[0014] 알파-글루코시다제(alpha-glucosidase)는 가장 중요한 탄수화물 분해효소로 탄수화물 소화과정의 마지막 단계에서 글루코스(glucose) 연결고리의 분해를 촉진한다. 알파-글루코시다제 저해제(AGI)는 십이지장 등에서 탄수화물의 소화 흡수율을 저하시키는 효과가 있어 당뇨병, 비만증, 과당증 등 성인병의 예방과 치료 목적으로 이용될 수 있다.

[0015] 알도스 환원효소(aldose reductase)는 당뇨병증의 유발기전 중 하나인 polyol pathway의 증가는 세포손상을 일으키는 기전이다. Aldose reductase는 polyol pathway에서 glucose를 sorbitol에서 fructose로의 전환에 관여하는 효소이다. 고혈당 상태가 되면 세포내 포도당 대사의 변화가 일어나는데, 과잉의 포도당이 세포내로 들어오면 aldose reductase에 의해 sorbitol로 전환되며, sorbitol dehydrogenase에 의해 fructose로 전환된다. 정상혈당 상태에서는 포도당에 대한 aldose reductase의 K_m 값(70 mM)이 높아 세포 내 sorbitol 농도는 매우 낮다. 그러나 고혈당에 의해 세포 내 포도당 농도가 올라가면 세포 내 sorbitol 농도가 증가될 뿐만 아니라 sorbitol dehydrogenase의 반응속도가 느려 sorbitol이 세포내에 축적하게 된다. 결국 세포내에 축적된 sorbitol의 높은 삼투압으로 세포가 팽창하게 되고 세포가 손상을 입게 되며 결국 백내장, 당뇨병 신경증, 망막증 등의 합병증을 야기하게 된다. 따라서 본 연구를 통하여 당뇨병증 예방 및 치료 목적으로 이용될 수 있다.

[0016] 본 발명의 당뇨 및 당뇨병증 예방 및 치료 활성은 최종당화산물(Advanced Glycation Endproducts, AGEs)의 형성 억제능과 알파-글루코시다제(alpha-glucosidase) 억제 활성 및 알도스 환원효소(Aldose Reductase)억제 활성을 통하여 시험하였다. 또한 *in vitro* 시험을 통하여 오이풀의 당뇨 및 당뇨병증 예방 가능성을 확인한 후, 제2형 당뇨병모델인 C57BL/KsJ-lepr^{db}/lepr^{db} (db/db) 마우스를 통하여 오이풀의 당뇨 및 당뇨병증 치료에 우수한 효과가 있음을 입증하였다.

[0017] 본 발명에 따른 오이풀 추출물은 우수한 혈당 상승 억제 효과를 갖는 것으로 나타났다(표 1 및 도 1 참조). 알파-글루코시다제는 소장의 용모에 존재하는 소화 효소로서 이당류나 소당류를 탄수화물의 소화흡수 상태인 단당류로 가수분해하는 역할을 한다. 따라서 알파-글루코시다제 억제물질은 십이지장을 비롯한 공장 상부에서 탄수화물의 가수분해를 저해(소화 흡수율을 저하)시켜 혈당치의 상승을 억제할 수 있으므로 당뇨병, 비만증, 과당증 등 성인병의 예방과 치료 목적으로 이용될 수 있다.

[0018] 본 발명에 따른 오이풀 추출물의 최종당화산물에 대한 억제 활성을 시험한 결과, 최종당화산물 생성 억제 효과를 갖는 것으로 나타났다(표 2 및 도 2 참조). 최종당화산물은 비효소적 당화반응에 의해 당이 단백질과 결합하여 schiff base와 아마도리 산물(amadori product)을 거쳐서 생성된다. 그러나 만성적인 고혈당 상태에서는 아마도리 산물이 가역적으로 최종당화산물을 생성하는 비가역적인 반응으로 가속화되어 조직과 혈청 중에 대량 생성되어 축적된다. 따라서, 최종당화산물의 생성은 심각한 당뇨병증을 일으키는 주요원인 중 하나로 된다. 제2형 당뇨병 환자의 혈액 내 최종당화산물의 농도와 심혈관계질환의 유무 및 중증도와 연관이 뚜렷하고 여러 동물 모델 연구에서도 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 만성적인 고혈당과 생체 단백질과의 비효소적 당화 반응에 의해 생성되는 최종당화산물은 당뇨병증의 주요 원인중 하나이다. 당뇨병증은 혈당이 정상적으로 회복되었음에도 불구하고 발병하는 경우가 많다. 최종당화산물은 고혈당의 농도에 비례하여 조직에 축적되는 단백질 당화산물로 특이한 흡광도 및 형광을 나타내고, 특히 단백질의 아미노기가 서로 cross-link 반응을 일으키는 성질을 가지고 있다. 최종당화산물은 한번 생성되면 혈당이 정상적으로 조절되어도 분해되지 않고 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시키며, atheroma성 동맥경화증, DNA의 돌연변이, 노화, 알츠하이머병, 당뇨병증 등에 관여한다고 알려져 있다. 기존에 최종 당화산물의 억제제로서 알려진 아미노구아니딘(aminoguanidine)의 독성이 증가하는 것으로 나타남에 따라, 이를 대체할 수 있는 독성이 없는 안전한 천연물의 개발이 필요한 실정이다.

- [0019] 당뇨병으로 인해 혈중에 고혈당이 지속되면 oxidative stress가 증가되고 ROS를 생성시킨다. 생성된 ROS는 toxic aldehydes의 생성을 촉진시키고, 생성된 toxic aldehydes는 aldose reductase를 활성화시켜 정상상태의 약 2~4배의 glucose가 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose가 생성된다. 본 발명에 따른 오이풀 추출물의 알도오스 환원효소에 대한 억제 활성을 시험한 결과, 알도오스 환원효소 억제 효과를 갖는 것으로 나타났다(표 3 및 도 3 참조).
- [0020] 본 발명에 따른 오이풀 추출물은 제2형 당뇨의 대표적인 동물모델인 C57BL/KsJ-lepr^{db}/lepr^{db} (db/db) 당뇨마우스와 비당뇨 db/m+ 마우스를 통해 매주 공복 혈당 측정 및 복강내 당부하검사, 인슐린 내성검사를 측정한 결과, 3주차부터 당뇨군에 비해 공복 혈당이 개선되는 경향(도 7 참조)을 보였으며, 부검 전 복강 내 당부하검사로 0~120분 동안 혈당 측정한 결과, 오이풀 추출물의 투여로 120분째에는 초기 혈당으로 돌아오는 것을 확인하였다(도 5참조). 인슐린 내성검사도 60분째부터는 정상군과 같이 혈당이 오르지 않아 인슐린 저항성에도 효과가 있는 것으로 판단된다. 당화혈색소 및 혈청 insulin 농도 또한 오이풀 추출물의 투여에 의해 유의적으로 감소하여 오이풀 추출물은 당뇨병 증상 완화 및 개선에 효과적인 것으로 나타났다(표 5참조).
- [0021] 본 발명의 조성물은 유효성분인 오이풀 추출물 외에, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다. 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 오이풀 추출물 또는 분획물 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위 또는 리코리시딘 100 중량부 당 100 내지 10,000,000 중량부 범위에서 추가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 상기 조성물 내의 상기 오이풀 추출물의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50중량%인 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [0023] 상기 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0024] 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도 한 가지 이상의 부형제 및/또는 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0025] 상기 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 보다 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분을 기준으로 1일 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg으로 하는 것이 좋으나 이에 제한되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 유효성분의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0026] 또 다른 예에서, 상기한 바와 같은 오이풀 추출물을 포함하는 당뇨 및 당뇨합병증의 예방 및/또는 개선용 조성물이 제공된다. 본 발명에서 식품은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의미로 사용된다. 상기

식품의 예로서 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 음료, 식품첨가제 또는 음료첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0027] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0028] 또한, 상기 식품에 있어서, 상기 오이폴 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 식품이 음료인 경우에는 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 오이폴 추출물을 포함하는 조성물은 당뇨 및 당뇨병증 치료 효과가 우수하면서도 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 조성물이므로, 당뇨 및 당뇨병증의 치료에 보다 안전하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 오이폴 추출물들의 알파-글루코시다제 억제 효과 시험에 관한 것이다.

도 2는 오이폴 추출물들의 최종당화산물(AGEs)의 억제 효과 시험에 관한 것이다.

도 3은 오이폴 추출물들의 Aldose reductase 억제 효과 시험에 관한 것이다.

도 4는 C57BL/KsJ-db/db Mouse에서 오이폴 추출물을 투여하여 사육하는 동안 매주 1회 체중을 측정한 도이다.

도 5는 C57BL/KsJ-db/db Mouse에서 오이폴 추출물 투여에 따른 포도당 내성 검사(복강내 당부하검사) 효과를 나타낸 것이다.

도 6은 C57BL/KsJ-db/db Mouse 오이폴 추출물 투여에 따른 인슐린 내성검사 효과를 나타낸 것이다.

도 7은 C57BL/KsJ-db/db Mouse 오이폴 추출물 투여에 따른 매주 1회 공복혈당을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하도록 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 대표적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0032] 재료준비

[0033] 오이폴(*Sanguisorba officinalis* L.)은 강원도 인제에서 채취하여 시료로 사용하였다. DMSO(dimethyl sulfoxide), BSA(Albumin from bovin serum), 메틸글리옥살(Methylglyoxal), 아미노구아니딘(Aminoguanidine)은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였고, -glucosidase은 Wako(Japan)로부터 구입하여 사용하였고, 그 외 분석에 사용된 모든 시약은 특급을 사용하였다.

[0034] 시료 제조예

[0035] 본 발명의 오이폴 추출물은 건조된 오이폴 무게 1000g의 10배의 여러 가지 용매(물, 30%, 50%, 70%, 100% 에탄올)를 가하고 수용액상에서 50~90에서 3시간 추출한 다음 이를 여과하여 추출액을 얻는다. 추출하는 과정을 3회 반복한다. 얻어진 추출액을 50 이하에서 감압 농축한 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물을 얻는다.

[0036] 실시예 1. 알파-글루코시다제 억제능 시험

[0037] -glucosidase의 활성 원리는 *p*-Nitrophenyl-Alpha-D-glucoside가 alpha-glucosidase에 의해 alpha-D-glucose와 *p*-nitrophenol로 전환되는 활성을 보는 것으로 최종 생성물이 노란색을 띤다. 노란색은 405 nm 파장에서 분광광도계를 이용하여 최종 흡광도를 측정하여 수치를 얻을 수 있다

[0038] 본 연구에서 사용한 시료는 0.05 mg/mL농도로 녹여 사용하였다. -Glucosidase를 Phosphate buffer(pH 7.0)를 용해시켜 효소용액을 만들고 효소용액 60 L에 오이풀 추출물 10 L를 첨가한 후 37에서 15분간 pre-incubation하고 *p*-nitrophenyl--D-glucopyranoside를 phosphate buffer(pH 7.0)에 농도로 용해하여 만든 기질용액 30 L를 첨가하고 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 Acarbose를 사용하였고, 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도 (IC₅₀)를 표시하였으며, 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하였다.

[0039] 상기 얻어진 결과를 표 1, 도 1에 나타내었다. 오이풀 추출물의 경우 2.5 g/mL 농도에서 50% 주정 추출물의 저해능이 92.43%로 가장 높게 나타내었다. 시료 농도에 따른 -glucosidase 저해 활성 변화 곡선으로부터 50% 억제시키는 농도인 IC₅₀은 Water, 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 100% EtOH 추출물 순으로 각각 0.048, 0.051, 0.016, 0.038, 0.226 mg/mL이며, 50% EtOH에서 가장 높은 저해능을 나타내었다. 이는 -glucosidase 억제제로 알려진 Acabose와 비교했을 때 절대적으로 높은 저해능을 보여 식후 혈당이 급격히 상승하는 증상을 효과적으로 저해할 수 있는 것으로 사료된다.

표 1

[0040]

Sample	Concentration (g/mL)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
Acarbose	100	29.960.76	4.8200.142 ^c
	250	48.400.92	
	500	66.700.87	
Water ex.	2.5	65.170.81 ^c	0.0480.001 ^a
30% EtOH ex.	2.5	61.780.97 ^d	0.0510.006 ^a
50% EtOH ex.	2.5	92.430.98 ^a	0.0160.001 ^a
70% EtOH ex.	2.5	66.150.83 ^b	0.0380.001 ^a
100% EtOH ex.	2.5	11.331.04 ^e	0.2260.001 ^b

[0041] 실시예 2. 최종당화산물(AGEs)의 억제 효과 시험

[0042] 본 실시예2에서는 당뇨병증의 치료 효과를 시험하기 위하여, 메틸글리옥살을 이용한 24시간 단기 검색법으로 오이풀 추출물의 최종당화산물(AGEs) 억제 효과를 Blank와 Control을 기준으로 형광의 증가 정도를 측정하였다.

[0043] BSA(5mg/mL)와 메틸글리옥살(2mg/mL)에 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 녹인 시료 (상기 시료 제조예에서 얻어진 오이풀 추출물 10 mg/mL)를 넣고 50 mM 포스페이트 버퍼(pH 7.4)를 사용하여 총 부피를 5 mL로 맞추었다. 37에서 24시간동안 반응시킨 후, spectrofluorometer (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 반응 전후의 시료의 흡광도(Excitation: 355 nm, Emission: 460 nm)를 측정하였다. 흡광도의 억제율은 대조군의 흡광도 증가값을 기준으로 시료의 흡광도 증가값을 비교하여 계산하였다.

[0044] 계산식={1-(S₁-S₀)/(C₁-C₀)}*100

[0045] (S₀: sample 0hr 흡광도반응값, S₁: sample 24hr 흡광도반응값, C₀: control 0hr 흡광도반응값, C₁: control 24hr 흡광도반응값)을 사용하였다. 또한, 최종당화산물에 억제효과가 있다고 알려진 표준물질로 아미노구아니딘 (Aminoguanidine, Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA))을 사용하여 위와 같은 방법으로 형광억제율을 비교하였다.

[0046] 상기 얻어진 결과를 표 2, 도 2에 나타내었다. Blank와 Control을 기준으로 형광의 증가 정도를 측정한 결과, 순수한 물질인 Aminoguanidine(양성대조군)에 비해 오이풀 추출물들은 낮은 억제능을 보였으나, 용매농도별로 비교해보면 Water, 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 100% EtOH 추출물 순으로 각각 34.16, 40.43, 40.41, 47.32, 62.12% 억제능을 보였고, 그중 100% EtOH 추출물이 가장 높은 억제능을 나타내었다. 오이풀 100% EtOH

추출물은 단순한 추출물임을 감안할 때 당뇨합병증을 예방하는 효과가 있음을 확인하였다.

표 2

Sample	Concentration (g/mL)	Inhibition (%)
Aminoguanidine	200	81.500.81 ^a
Water ex.	200	34.161.13 ^e
30% EtOH ex.	200	40.430.38 ^d
50% EtOH ex.	200	40.410.94 ^d
70% EtOH ex.	200	47.320.61 ^c
100% EtOH ex.	200	62.120.43 ^b

실시예 3. Aldose reductase 억제능 시험

본 실시예3에서는 당뇨합병증의 치료 효과를 시험하기 위하여, rat lens의 수정체를 효소로 하고 NADPH, DL-glyceraldehyde를 기질로 사용하여 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하는 Aldose reductase 억제 효과를 확인하였다.

- 효소원 제조: 무게가 200 g이 넘는 rat의 lens를 적출하여 그 안의 수정체의 습중량에 따라 0.05M의 sodium buffer (pH 6.8)을 수정체 1개당 250 L을 넣어 얼음 안에서 균질화 시켜주었다. 이를 4, 7500rpm에서 30분간 원심분리(centrifuge UNION 55 R Hanil, Korea) 후, 그 상등액을 취하여 효소원으로 사용하였다.

- Aldose reductase 활성 억제능 측정: Aldose reductase 억제 활성은 Haymanh와 Kinoshita가 사용한 방법을 변형하여 실험을 수행하였다. 530 L의 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 효소원 160 L와 1.6mM NADPH 100 L, 오이풀 추출물 (1 mg/mL) 10 L를 넣어주고, 마지막으로 0.1M DL-glyceraldehyde 100 L를 넣어주었다. Cell 내부에서 4.4분 동안 반응시켜 340nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 또한Aldose reductase 억제효과가 있다고 알려진 표준물질로 Quercetin을 사용하여 상기와 같은 방법으로 처리하여 흡광도의 감소율을 측정하였다.

상기 얻어진 결과를 표 3, 도 3에 나타내었다. 오이풀 추출물의 경우 Water, 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 100% EtOH 추출물 순으로 각각 73.71, 77.43, 89.03, 89.23, 79.30% 저해능을 보였고, 그중 50%와 70% 주정 추출물은 aldose reductase 억제 물질로 알려진 Quercetin과 비교했을 때 통계학적으로 유의적인 차이가 없었다. 따라서 50%와 70% 주정 추출물은 aldose reductase를 효과적으로 저해할 수 있어 당뇨성합병증을 예방하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

표 3

Sample	Concentration (g/mL)	Inhibition (%)
Quercetin	10	89.281.04 ^a
Water ex.	10	73.711.64 ^c
30% EtOH ex.	10	77.431.64 ^b
50% EtOH ex.	10	89.031.29 ^a
70% EtOH ex.	10	89.231.64 ^a
100% EtOH ex.	10	79.301.64 ^b

실시예 4. 당뇨실험동물 및 실험설계

제2형 당뇨의 대표적인 동물모델인 5주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)의 수컷 C57BL/KsJ-lepr^{db}/lepr^{db} (db/db) 당뇨마우스와 비당뇨 db/m+ 마우스들을 중앙실험동물(주)(Jung-Ang Lab. Animal, Inc, Seoul, Korea)을 통하여 공급받아 사용하였다. 본 사육실에서 약 14일 이상 검역순화 및 적응기간 후 체중과 혈당을 측정하여 실험실시에 적합하고 병리적 소견이 없다고 판단되는 마우스들(군당 12마리)을 선별하여 사용하였다. 실험동물은 온도 20.9~22.6, 상대습도 45~55%, 환기회수 및 방식 10~15회/시간, 전배기방식, 조명시간 12시간(08:00~20:00) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(278420200 mm, 쓰리샤인, 금산)에 4마리씩 수용하였다. 본 연구에 사용한 정상대조군 db/m+ 마우스는 초기체중 24.720.65 g, db/db 마우스는 35.811.12 g였다.

실험동물은 각각 혈당 및 체중이 균등 하도록 선별하였고 정상군(db/m+), 당뇨군(db/db), 200 mg/kg 오이폴 추출물 투여군(db/db-S200)으로 나누어 7주 동안 사육하였다. 각 투여물질은 생리식염수에 녹여 매일 1회 동일한 시간에 경구투여 하였으며, 음성대조군에는 정제수를 경구투여 하였다. 실험동물의 식이는 시판용 실험동물 AIN-76 조제식이를 중앙실험동물(주)를 통해 구입하여 공급하였고 물은 자유 섭취시켰다.

실시예 5. 체중, 식이섭취량 및 수분섭취량 측정

동물을 사육하는 동안 매주 1회 체중을 측정(도 4), 식이 및 수분 섭취량(표 4)을 측정하였다.

표 4

Sample	Diet intake (g/day/mouse)	Water intake (g/day/mouse)
db/m+	2.830.30 ^b	3.030.23 ^c
db/db	4.430.58 ^a	11.191.76 ^a
db/db-S200	3.880.72 ^a	9.491.58 ^b

Values are expressed as meanSD, (n=12)

C57BL/KsJ-db/db 마우스는 leptin 수용체 유전자의 돌연변이로 인해 다식, 비만, 인슐린 저항성, 고혈당, 고인슐린혈증 등 제2형 당뇨병과 유사한 임상적 증상이 나타나는 것으로 알려져 있다. 체중증가량은 당뇨군인 db/db 군에 비하여 오이폴 추출물을 투여한 군에서 감소하는 경향을 보였고, 식이섭취량은 유의적인 차이는 없었으며, 수분섭취량은 모든 군에서 유의한 차이를 나타내 오이폴 추출물을 투여한 군은 당뇨병의 임상적 증상인 다음의 증상을 개선하는 것으로 사료된다.

실시예 6. 포도당 내성 검사(복강내 당부하검사Intraperitoneal glucose tolerance test; IPGTT), 인슐린 내성검사(Insulin tolerance test; ITT)

- 포도당 내성 검사(복강내 당부하검사): 시험 종료 1주일 전에 마우스를 12시간 절식시킨 후 혈당을 측정하고 곧바로 5% 포도당 (2 g/kg body weight)을 복강투여 한 후 15, 30, 60 및 120분에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다.

- 인슐린 내성검사: 시험 종료 1일전에 마우스를 12시간 절식시킨 후 혈당을 측정하고, 5 unit/kg body weight insulin을 피하투여하고, 30분후에 5% 포도당 (2g/kg body weight)을 복강투여 한 후 15, 30, 60 및 120분에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다.

오이폴 추출물의 포도당 내성검사를 확인하기 위하여 시험 종료 1주일 전에 마우스를 12시간 절식시켰다. 혈당을 측정한 후 5% 포도당을 복강 투여하여 0, 15, 30, 60, 120분까지 혈액을 채취하여 혈당을 측정한 결과는 도

5와 같다. 정상군에서는 30분 혈당이 최고치였으며 120분 후에는 다시 정상혈당으로 돌아오는 것을 확인하였다. 이에 비해 당뇨군에서는 30분에 최고혈당치를 나타냈으나 120분이 지나도 초기 혈당으로 돌아오지 않았다. 오이풀 추출물을 투여한 군에서는 120분후에 초기 혈당과 가깝게 떨어지는 것을 확인하였다. 이는 오이풀 추출물의 투여가 포도당 내성을 개선시키는 것으로 기대된다.

[0066] 오이풀 추출물을 투여한 마우스의 인슐린 내성을 측정한 결과는 도 6과 같다. 모든군에 인슐린 및 포도당을 투여한 후 혈당을 측정한 결과, 당뇨군과 비교해 볼 때 오이풀 추출물을 투여한 군이 인슐린 내성이 개선되어 60분부터는 혈당이 당뇨군처럼 오르지 않고, 정상군과 같이 혈당이 유지되는 경향을 나타내었으며, 유의적인 차이도 나타내었다. 따라서 오이풀 추출물의 투여로 인슐린 저항성을 개선시키는 것으로 사료된다.

[0067] 실시예 7. 혈당, 혈청 인슐린 및 당화혈색소(HbA1c) 농도 측정

[0068] 혈당 측정은 매주 1회씩 실험동물을 12시간 동안 절식시킨 후 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당측정기(Roche)를 사용하여 공복 혈당을 측정하였다. 실험동물 희생 후 채취한 혈액으로부터 분리한 혈청에서 인슐린 검사를 위해 인슐린 ELISA kit(Milipore)를 사용하여 혈중 인슐린 농도를 확인하였다. 당화혈색소는 실험동물 희생 전 12시간 절식시킨 후, 안와채혈하여 전혈을 사용하여 당화혈색소 측정기(HLC-723Hb G7, Tosoh)로 측정하였다.

[0069] C57BL/KsJ-db/db 마우스에 오이풀 추출물을 투여하여 매주 혈당변화를 측정한 결과를 도 7에 나타내었다. C57BL/KsJ-db/db mouse는 제2형 당뇨병인 인슐린 비의존성 당뇨병의 질환모델로 생후 5주령에서는 그의 이형접합체인 C57BL/KsJ-db/+mouse와 혈당의 차이가 없으나 생후 8주부터 체내 인슐린 저항성이 증가하면서 혈당이 증가하는 것으로 알려져 있다. 정상군인 db/m+군은 7주 동안 정상 수준 공복혈당을 확인하였으며, 당뇨군인 db/db군에서는 실험시작 2주후부터 혈당이 급격히 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 오이풀 추출물을 투여한 그룹은 당뇨군에 비해 유의적으로 혈당이 증가하지 않음을 확인하였다.

[0070] 혈청 인슐린 농도를 확인하기 위해 ELISA kit를 이용한 결과(표 5), 정상군인 db/m+와 당뇨군인 db/db를 비교해 볼 때, db/m+군은 모두 인슐린 분비가 정상으로 고인슐린혈증이 나타나지 않았으며, db/db군은 모두 고인슐린혈증을 나타내는 것으로 나타났다. 또한 db/db군에 오이풀 추출물을 투여한 그룹에서는 고인슐린혈증이 개선되는 것으로 나타났다. 따라서 오이풀 추출물은 인슐린 저항성을 개선시키는 것으로 사료된다. 혈당조절을 표현하는 가장 기본적인 지표로 널리 이용되며, 당화혈색소의 값으로 지난 수주일 동안의 혈당농도를 추정할 수 있어 당뇨 연구에 많이 쓰이는 HbA1c값을 확인해 본 결과, 오이풀 추출물을 투여한 군에서 당뇨군인 db/db군보다 농도가 감소되는 것을 확인하였다(표 5). 이는 오이풀 추출물의 투여로 인해 혈당을 감소시키는 효과가 있는 것을 나타낸다.

[0071] 인슐린은 혈액속의 포도당을 근육, 간, 지방조직 등에서 효과적으로 이용하도록 하는데 가장 중요한 역할을 하며 같은 혈당이라도 혈중 인슐린이 높다는 것은 동일한 상태를 유지하는데 많은 인슐린이 필요하다는 것이다. 그것은 그만큼 인슐린의 작용이 떨어지는 것을 의미하고, 이러한 상태를 인슐린 저항성이라 한다. 따라서 제 2형 당뇨병환자에 있어 인슐린 분비는 증가하고 고인슐린혈증이 유발될 수 있고, 유병기간이 길어질수록 인슐린 분비저하와 함께 혈당 조절이 악화된다. 본 연구는 제2형 당뇨병쥐를 통하여 오이풀 추출물을 경구 투여함으로써 혈당이 낮아지고 인슐린 분비 및 당화혈색소 농도가 감소되었다는 것은 인슐린 저항성 개선에 오이풀 추출물이 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

표 5

[0072]

Sample	Serum insulin (mg/dL)	HbA1c (%)
db/m+	0.690.07 ^c	3.770.34 ^c
db/db	2.630.95 ^a	8.471.46 ^a
db/db-S200	1.830.51 ^b	6.571.25 ^b

[0073] Values are expressed as meanSD, (n=12).

[0074] **실시예 8. 혈청 생화학적 검사**

[0075] 부검 당일 채취된 혈액에서 분리한 혈청을 혈액 생화학 분석기기(KoneLab 20, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Finland)를 이용하여 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), glucose(GLU) cholesterol(CHOL), triglycerides(TG)를 측정하였다.

표 6

[0076]

Sample	ALT (U/L)	AST (U/L)	GLU (mg/dL)	CHOL (mg/dL)	TG (mg/dL)
db/m+	33.089.16 ^c	99.0310.84 ^c	222.2034.29 ^c	136.088.11 ^c	53.236.64 ^b
db/db	511.9541.06 ^a	416.1355.03 ^a	594.8851.92 ^a	256.7741.95 ^a	69.6411.86 ^a
db/db-AS200	378.7952.48 ^b	327.2545.41 ^b	508.8346.51 ^b	210.3145.56 ^b	65.5513.22 ^{ab}

[0077] Values are expressed as meanSD, (n=12).

[0078] 본 실시예 8에서는 혈액 생화학 측정기기를 이용하여 각 실험군의 혈청을 분석한 결과(표 6), ALT, AST, GLU, CHOL, TG 모두 오이폴 추출물을 투여한 군에서 유의성 있게 감소하였다. 간기능 검사에 이용되고 있는 ALT의 경우 주로 간에 존재하는 효소이며 간염, 간괴사 및 간경변증 등에 의해 활성이 증가하는 특징이 있다. 본 연구에서 당뇨군에 비해 오이폴 추출물을 투여한 군에서 ALT 수치가 크게 감소한 것을 알 수 있다. 또한 AST의 경우 간, 심장, 근육, 신장에 존재하는 효소로서 이 조직들이 손상되면 혈중으로 효소가 유리되어 효소활성이 높으며, 세포손상 정도와 비교적 상관성이 높아 간염, 간경변증 등의 지표로 널리 사용되고 있다. AST도 당뇨군에 비해 수치가 감소하는 경향을 나타내기 때문에 오이폴 추출물은 간 보호에 효과적일 것으로 생각된다.

[0079] Glucose의 혈중 농도 증가는 당뇨병 환자의 인슐린 절대적 또는 상대적 부족으로 나타나는 특징적인 증상이다. glucose 수치는 오이폴 추출물을 투여한 군이 당뇨군보다 유의성 있게 감소한 것으로 보아 혈당을 낮추는 것을 확인하였다.

[0080] Cholesterol과 Triglyceride의 경우, 식사 후 고혈당 상태가 지속되면 함께 증가되어 혈관 장애를 일으킨다. 본 연구에서는 오이폴 추출물의 투여로 혈중 cholesterol과 triglyceride가 낮아지는 경향을 나타내었으며, 이는 심혈관 질환의 발병 위험률을 감소시킬 수 있음을 추측할 수 있다.

[0081]

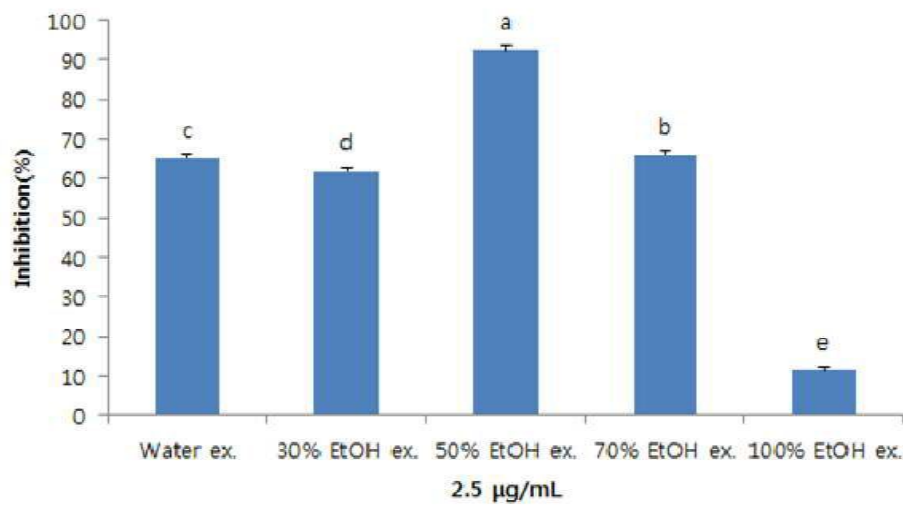
[0082] 따라서 오이폴 추출물은 db/db 마우스에서 혈당을 효과적으로 낮추었으며, 이러한 효과는 혈청 지질수치 개선과 더불어 당뇨합병증을 억제시킬 수 있을 것으로 사료된다.

[0083] **통계처리**

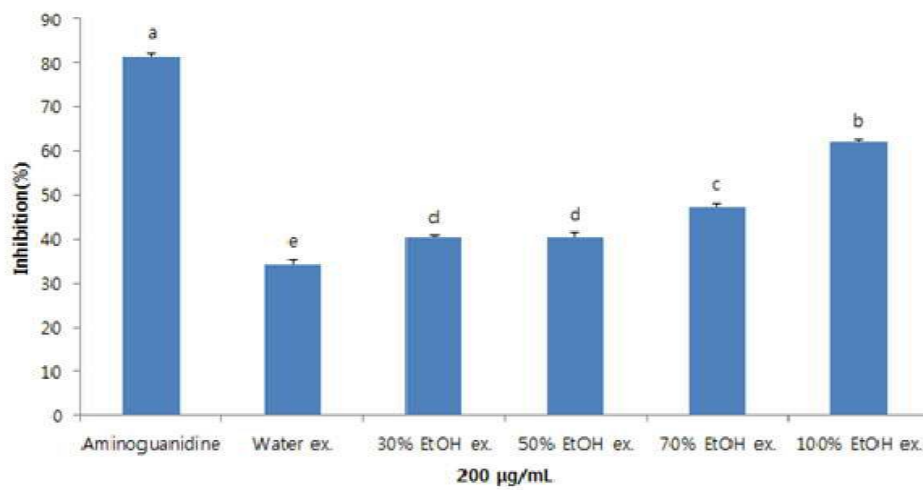
[0084] 모든 자료의 통계분석은 SAS 통계 프로그램(SAS institute, 1987)을 이용하여 분석하였으며, 분석결과는 실험군당 평균과 표준오차로 나타냈다. 처리군 간의 유의성은 Duncans multiple range test로 p<0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

도면

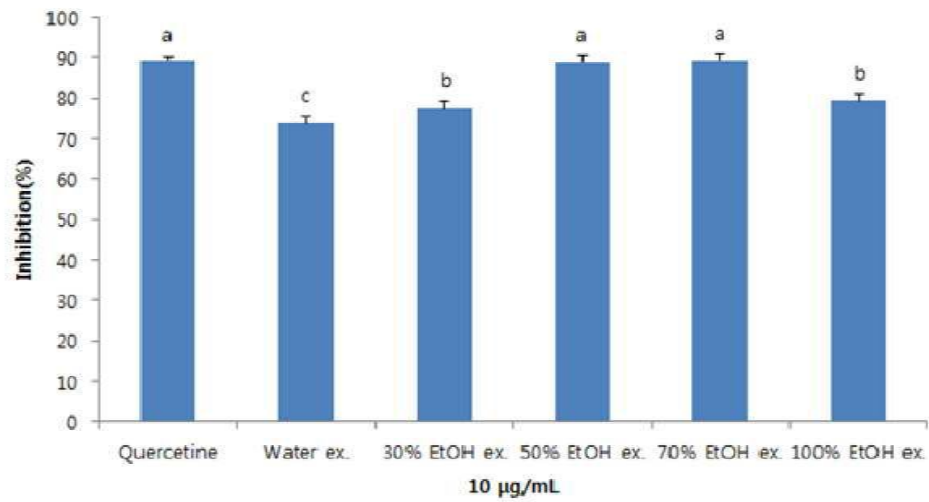
도면1



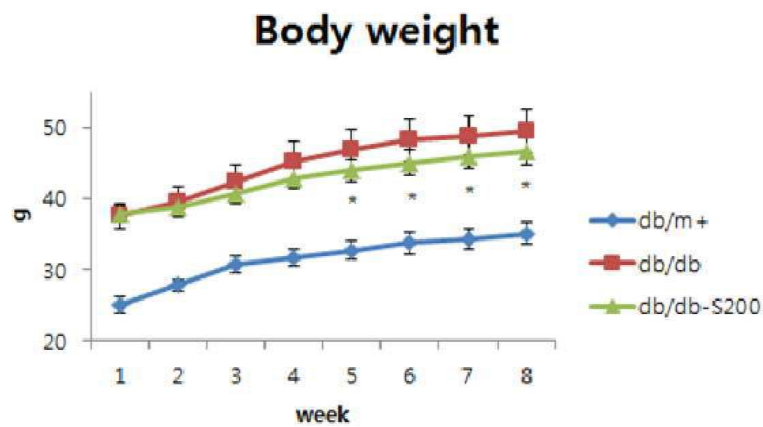
도면2



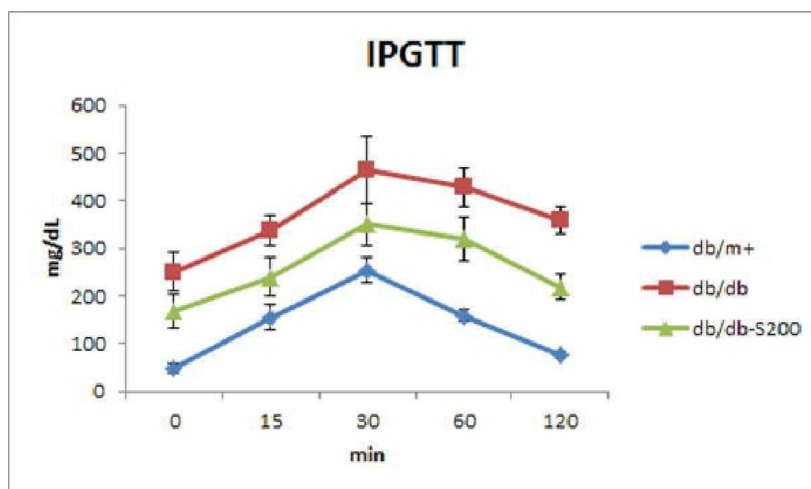
도면3



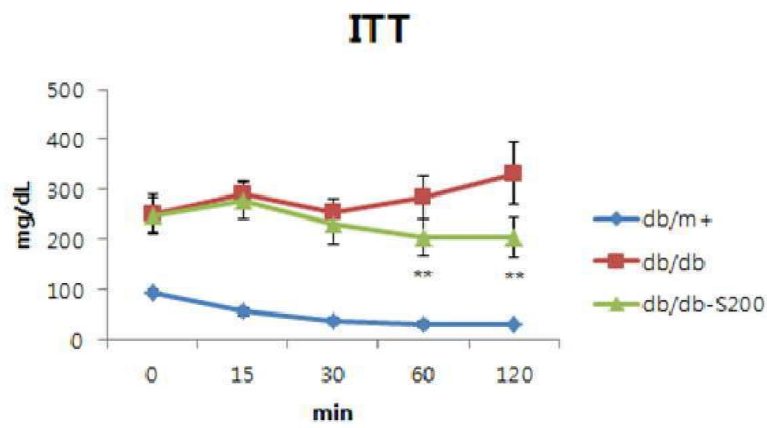
도면4



도면5



도면6



도면7

