



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0130674
(43) 공개일자 2010년12월14일

(51) Int. Cl.

A61K 36/53 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0049309

(22) 출원일자 2009년06월04일

심사청구일자 2009년06월04일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이성준

서울특별시 강남구 청담동 삼성청담공원@ 104-402

정미자

서울특별시 광진구 자양3동 793 우방리버파크
103-2002

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

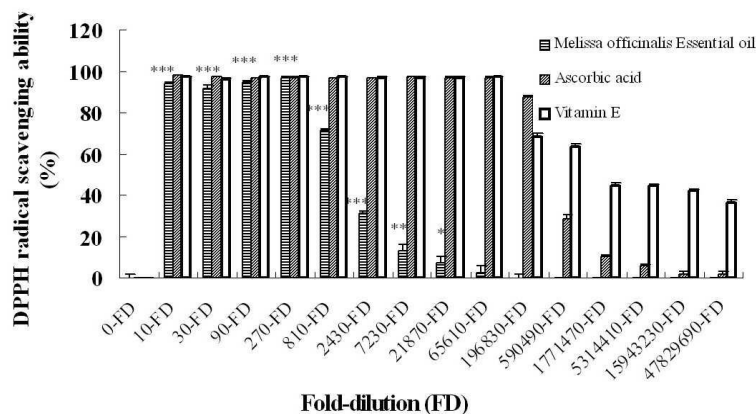
(54) 레몬밤 정유를 유효성분으로 함유하는 혈당강하용 조성물

(57) 요약

본 발명은 레몬밤 정유를 유효성분으로 함유하는 혈당강하용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 레몬밤 정유(*Melissa officinalis* essential oil)를 유효성분으로 함유하는 혈당강하용 조성물, 당뇨병 치료용 조성물 및 당뇨병 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 레몬밤 정유는 GCK(hepatic glucokinase) 활성을 개선시키고 G6Pase(glucose-6-phosphatase) 및 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase) 활성을 저해시키고, SREBP-1c, GLUT4, PPAR γ 및 PPAR α 단백질 발현을 증가시킴으로서 혈당강하 활성을 나타낸다. 따라서 본 발명의 레몬밤 정유를 함유하는 조성물은 혈당강하제 뿐만 아니라, 당뇨병 예방 및 치료 효과를 갖는 약학적 조성물 또는 건강기능식품의 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김경현

서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 18동 703호

조성윤

서울특별시 성북구 돈암1동 633번지 동부센트레빌
아파트 103동 1002호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0503473

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 BIO그린21사업

연구과제명 (총괄)허브 이차대사산물의 웰빙 기능 식'의약 소재 개발

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2007년 01월 01일 ~ 2007년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

레몬밤 정유(*Melissa officinalis* essential oil)를 유효성분으로 함유하는 혈당강하용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 레몬밤 정유는 수증기 증류법을 이용하여 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 GCK(hepatic glucokinase) 활성을 개선시키고 G6Pase(glucose-6-phosphatase) 및 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase) 활성을 저해시킴으로서 혈당강하 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 SREBP-1c, GLUT4 및 PPAR γ 및 PPAR α 단백질 발현을 증가시킴으로서 혈당강하 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 개선용 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 레몬밤 정유를 유효성분으로 함유하는 혈당강하용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 레몬밤 정유(*Melissa officinalis* essential oil)를 유효성분으로 함유하는 혈당강하용 조성물, 당뇨병 치료용 조성물 및 당뇨병 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

당뇨병(diabetes mellitus)은 제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병으로 나누어지는데, 제1형 당뇨병은 췌장의 랑겔한스 섬 세포의 파괴로 인슐린의 분비가 격감하여 혈당조절이 불가능한 경우로서 인슐린 의존형 당뇨병이라고 하며, 제2형 당뇨병은 췌장의 인슐린 분비능력은 비교적 유지되고 있지만 비만 등 여러 가지 이유로 분비된 인슐린이 제 역할을 하지 못하게 되어 생기는 당뇨병으로서 전체 당뇨병 환자의 90%이상을 차지한다. 제2형 당뇨병의 치

료는 식사요법과 운동요법을 병행하며, 대부분 경구 혈당강하제를 복용하는 것만으로도 효과를 볼 수 있다.

[0003] 그러나 당뇨병은 혈중 포도당 농도의 상승, 췌장의 손상에서 유래되는 인슐린 분비능 저하, 또는 내성에 의한 인슐린 작용의 감소, 포도당, 지방과 단백질 대사의 이상과 이로 인한 급성과 만성 합병증의 발생으로 특징되는 다양한 원인과 병인을 지닌 일련의 질환 군으로 아직까지 근원적으로 치료할 수 있는 약물을 개발하지 못하고 있는 실정이다.

[0004] 당뇨는 발생 원인이 다양하지만 어떤 형태의 당뇨이든지 증상의 개선이나 치유를 위한 기본원리는 식사 후 체내로 흡수된 당을 각 조직의 세포가 이용하는 속도를 증가시켜 혈중에 당이 과도하게 머무는 시간을 감소시키는 것이다. 즉 당뇨개선 기능을 갖는 좋은 기능성 소재라면 고혈당 상황에서 당의 이용속도를 증가시킬 수 있어야 한다. 이를 위해서는 1차적으로 당-조절 효소(glucose-regulating enzyme)인 GCK(hepatic glucokinase)가 활성화되어 글루코오스를 글루코오스-6-인산(glucose-6-phosphate)으로 전환시켜 주어야 한다. 또한 이에 앞서 혈중의 당을 간으로 이동시킬 수 있는 글루코오스 트랜스포터(glucose transporter)(예컨대, GLUT2 및 GLUT4)가 활성화되어야 할 것이다.

[0005] 제2형 당뇨병 모델 마우스(db/db)마우스는 일반 마우스와 비교하여 GCK의 활성은 현저히 낮았으며 G6Pase(glucose-6-phosphatase) 및 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 활성은 현저히 높게 나타났다. 식물에서 유래된 다양한 당뇨 개선 효과를 나타내는 물질들을 db/db 마우스에 투여하게 되면 GCK 활성은 개선되고 G6Pase와 PEPCK활성을 현저히 감소하는 것으로 알려져 있다 (Kateina Valentova et al., J. Agric. Food Chem., 2007, 55(19), 7726-7731). 또한 GCK 유전자 발현은 인슐린과 SREBP(sterol response element-binding protein)-1c의 활성화에 의해 조절되는 것으로 알려져 있고 (Shimomura, I. et al., Genes Dev. 12, 3182-3194 (1998)), SREBP-1c 활성은 GLUT4를 상향조절(up-regulation) 한다 (G Rosal et al., International Journal of Obesity (2007) 31, 1429-1436). 인슐린은 글루코키나아제(glucokinase) 활성을 증가시켜 해당작용을 촉진하여 포도당을 세포내로 흡수함으로써 열량을 소모시키고, 글리코겐 합성효소(glycogen synthase)를 자극하여 근육에서 포도당을 저장하게 한다.

[0006] 한편, 제2형 당뇨병의 치료제로서 글루코오스와 지질대사에 중요한 역할을 담당하고 있는 PPARs(peroxisome proliferator-activated receptors) 작용제(agonists)가 개발되고 있다. 이러한 PPARs는 근육과 지방조직의 대사를 촉진시키는데, 특히 근육에서 포도당 흡수를 촉진시키는 유전자의 발현을 증가시킨다. 또한, PPARs는 인슐린 감수성을 증가시키고 중성지방과 LDL-콜레스테롤을 감소시킬 뿐 아니라, HDL-콜레스테롤을 증가시킨다. 뿐만 아니라 활성산소종을 소거시켜 산화적 스트레스로부터 유발되어지는 질병 전진을 차단하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 레몬밤(*Melissa officinalis*)은 음식이나 음료에 향을 더하여 주는데 많이 사용되고 있고, 의약적으로는 진정제(sedative), 진경제(spasmolytic) 및 항균제(antibacterial)로 사용되어 왔다. 레몬밤 잎에는 파이토케미컬(phytochemicals)이 많이 함유되어 있고, 레몬밤 정유(essential oil)에는 생리활성 물질인 폴리페놀 화합물(polyphenol compounds)이 많이 함유되어 있다. 레몬밤 추출물 또는 정유는 강한 항산화력을 가지고 있는데 이는 이들이 함유하고 있는 파이토케미컬에 의한 결과인 것으로 생각된다.

[0008] 이러한 레몬밤 정유에 대한 연구들은 일부 진행되고 있으나 레몬밤 정유가 제2형 당뇨병의 예방 및 치료에 효과가 있는지에 대한 연구는 전무하다. 따라서 본 발명자들은 먼저 레몬밤 정유의 구성물질을 분석하고, 레몬밤 정유가 혈당을 감소시킬 수 있는지를 검토한 후, 체내에서 어떠한 메커니즘에 의해 혈당이 감소되는지를 체내 당 대사에 관련된 효소의 활성, 및 유전자 또는 단백질 발현을 통해 확인하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 혈당강하 활성을 갖는 레몬밤 정유를 함유하는 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 치료용 조성물, 및 당뇨병 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0011] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 레몬밤 정유(*Melissa officinalis* essential oil)를 유효성분으로 함

유하는 혈당강하용 조성물을 제공한다.

- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 레몬밤 정유는 레몬밤으로부터 다양한 추출방법, 예컨대, 용매 추출(solvent extraction), 증류(hydrodistillation) 및 수증기 증류(steam distillation) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 수증기 증류를 이용하여 추출하는 것을 특징으로 한다. 상기 수증기 증류법을 이용하여 레몬밤 정유를 추출할 경우 다른 방법과 비교하여 추출된 정유의 성분에는 큰 차이가 없으나 정유 추출량이 더 많게 된다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 GCK(hepatic glucokinase) 활성을 개선시키고 G6Pase(glucose-6-phosphatase) 및 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase) 활성을 저해시킴으로서 혈당강하 활성을 가질 뿐만 아니라, SREBP-1c, GLUT4 및 PPAR γ 및 PPAR α 단백질 발현을 증가시킴으로서 혈당강하 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 이들 효소 및 유전자의 기능을 정리하면 다음과 같다.
- [0014] GCK는 간조직에서 혈당을 글리코젠으로 전환하는 율속단계 효소로 발현증가는 혈당감소를 의미한다.
- [0015] G6Pase는 글루코오스신생합성(gluconeogenesis)의 마지막 단계 효소로 발현감소는 간조직에서 혈당생성 감소를 의미한다.
- [0016] PEPCK는 글루코오스신생합성 율속단계 효소로서 발현감소는 간조직 포도당합성 감소를 통한 혈당감소를 의미한다.
- [0017] GLUT2는 간조직 혈당(포도당) 수송체로 발현증가는 혈당강하와 관련이 있다.
- [0018] PPAR α 의 발현증가는 지방산 산화를 통한 대사질환 개선과 관련이 있다.
- [0019] SREBP-1c는 PPAR α 에 의해 발현증가되며 지방산 산화 관련 유전자 발현 증가를 통해 지방산 산화 촉진한다.
- [0020] PPAR γ 의 발현증가는 인슐린 민감도를 개선하여 혈당대사 개선한다.
- [0021] 구체적으로 본 발명의 조성물에 함유되는 상기 레몬밤 정유는, 본 발명의 실시예 8 내지 9에서 확인한 바와 같이, 체내 당 흡수와 관련된 효소인 GCK(hepatic glucokinase)의 유전자 발현을 촉진시키고, 당뇨 모델 마우스에서 높게 발현되는 G6Pase(glucose-6-phosphatase) 및 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 유전자 발현을 억제시킨다. 또한 지방세포와 간에서 혈중 포도당 흡수를 도와주는 PPARs(peroxisome proliferator-activated receptors)의 발현을 촉진시키고, 혈액에 존재하는 포도당을 세포 내로 이동시키는 GLUT4(glucose transporter 4)의 발현도 촉진시킨다. 따라서 본 발명의 레몬밤 정유는 체내 당 흡수와 대사 운반에 관여하는 유전자 발현에 영향을 미쳐 혈당 조절을 통한 당뇨병 예방 효과가 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 혈당강하용 조성물이 상기와 같은 당뇨병 예방 및 치료용 조성물로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법, 예컨대 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 의해 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한, 이들은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다.
- [0024] 상기 당뇨병 예방 및 치료 효과를 위하여, 본 발명에 따른 혈당강하용 조성물을 유효성분으로 투여하는 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.001 ~ 10 mg이 투여될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 따른 혈당강하용 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은

일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 상기 조성물은 원료에 대하여 0.001 ~ 10 중량부, 바람직하게는 0.01 ~ 1 중량부의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 하거나 또는 혈당조절을 목적으로 하여 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 뿐만 아니라 일반인에게 당뇨 예방을 위한 기능성 식품 개발 시 첨가제로 사용할 수 있다.

[0027] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명에 따른 혈당강하용 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 농식품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0028] 또한 본 발명의 혈당강하용 조성물을 함유하는 식품이 음료일 경우, 통상의 음료와 같이 여러 거자 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 상기 혈당강하용 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0030] 실시예 1. 레몬밤 정유 제조 및 분석

[0031] 본 발명에 사용된 레몬밤(*Melissa officinalis*) 잎은 2005년 6월 고려대학교 수목원에서 재배한 것을 사용하였으며, 레몬밤 잎을 세절하여 레몬밤 정유 추출을 위한 시료로 사용하였다. 레몬밤 정유(*Melissa officinalis* essential oil, MOEO)는 수증기 연속추출방법 (SDE, simultaneous steam distillation/extraction)으로 추출하였다.

[0032] 구체적으로, 레몬밤 잎 20 g을 믹서기로 잘 분쇄한 후 증류수 500 ml과 에틸에스테르(ethyl ether) 30 ml를 동시에 넣고 대기압에서 2시간 동안 증류 추출하였다. 추출한 후 Na_2SO_4 를 이용하여 용매 내 수분을 완전히 제거하였고, 회전 농축기(rotary evaporator)로 감압 농축하여, 최종적으로 정유 성분을 분리하였다. 분리된 정유 성분은 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS))를 사용하여 분석되었으며, GC는 Agilent 6890 N (Agilent Technologies, CA, USA), MS는 Quattro GC/MS/MS (Macromass, Manchester, UK)를 사용하였다.

[0033] 상기 GC 분석은 다음과 같다. capillary column (50 m length x 0.25 mm I.d. x 0.2 μm film thickness, AT-1701, Alltech, PA, USA)을 사용하여 1 μL 레몬밤 정유를 각 칼럼내로 주입하였다. 오븐 온도는 40℃ 초기온도에서 분당 3℃씩 120℃까지, 그 다음은 분당 5℃씩 200℃까지 올라가게 설정하였다. 헬륨을 이동상 기체로 사용하였고, 흘려가는 속도는 분당 1 mL로 설정하였다. 인젝터(injector)와 디텍터(detector) 온도는 각각 280℃와 240℃였다. 레몬밤 정유의 총 이온 크로마토그램(total ion chromatograms)은 MassLynx 4.0(MassLynx 4.0 SCN 474, Micromass, Manchester, UK)으로 분석하였고, 이 결과들은 와일리 질량분석 데이터베이스(Wiley mass spectral database)(2002, John Wiley & Sons, USA)와 비교하여 동정하였다.

[0034] 상기 GC-MS 분석결과는 하기 표 1에 나타내었으며, 레몬밤 잎의 정유성분은 40개가 검출되었고, 주요한 휘발성 정유 물질은 네랄(Neral, 24.7%), 제라니얼(Geranial, 65.4%) 및 제라닐아세테이트(Geranylacetate, 7.4%)임을 밝혀내었다.

[0035] [표 1]. GC-MS를 이용한 레몬밤 정유의 성분 분석 결과

No.	Compounds	Peak Area(%)
Monoterpene hydrocarbons		
1	Sabinene	t ^a
2	β -Pinene	0.32
3	Limonene	t
4	Phellandrene	t
Oxygenated monoterpenes		
5	2,3-dehydro-1,8-cineole	0.05
6	Carvacrol	t
7	Epoxylinolool	t
8	α -Terpineol	t
9	Linalool	0.75
10	Borneol	t
11	Neroloxide	t
12	Citronellal	t
13	Myrtanol	0.08
14	Terpinene-4-ol	t
15	(Z)-Carveol	0.08
16	Menthen-2,3-diol	t
17	Neral	24.65
18	Anethole	t
19	Geranial	65.42
20	Citronellyl acetate	t
21	Geranylacetate	7.38
22	Damascenone	t
23	Eugenol	t
24	Dihydrocarveol	t
Sesquiterpene hydrocarbons		
25	Bicyclogermacrene	t
26	Caryophyllene	0.77
27	Germacrene-D	t
28	Farnesene	0.05
29	γ -Elemene	t
30	Cadinene	t
Carbonyl compounds		
31	Nonanal	t
32	(Z)-Jasmone	t
33	β -Ionone	t
Alcohols		
34	Benzylalcohol	t
35	Fenchylalcohol	t
36	Chavicol	t
Others		
37	Dodecane	t
38	Iso-geranol	t
39	Bourbonene	t
40	1-dodecen-3-yne	0.09

[0036] ^a: 미량(Trace amount), 총 피크 영역의 0.05% 미만.

[0037] 실시예 2. DPPH에 대한 전자공여 작용

[0038] 레몬밤 정유를 10배에서부터 3배씩 증가시켜 47829690배까지 에탄올로 희석시킨 후 (예컨대, 10 → 30 → 90 → 270 배로 희석), 전자공여능(electron donating ability: EDA)은 Blois 등의 방법을 변형하여 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 환원성을 이용하여 측정하였다. DPPH 16 mg을 에탄올 100 mL로 정용한 후 여과지(whatman No. 6)로 여과하여, 농도별 시료 추출물(10 ~ 47829690배까지 희석한 레몬밤 정유)에 가하여 혼합한 다음 실온에서 20분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 활성비교를 위하여 양성대조군으로서 아스코르브산(ascorbic acid) 및 비타민 E(vitamin E)를 사용하였으며, 시료의 전자 공여능은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Electron donating ability(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

[0039]

[0040]

상기 DPPH 전자공여 실험결과, 레몬밤 정유는 10배 희석한 시료부터 270배 희석한 시료까지 100%에 가까운 라디칼(radical) 소거작용을 나타내었고, 이는 잘 알려진 비타민 C나 비타민 E와 비슷한 수준이었다 (도 1). 그러나 810배 희석 시료부터 희석 배수가 증가할수록 전자 공여 작용은 감소하여 65610배 희석 시료는 거의 라디칼 소거작용을 나타내지 않았다. 이와 대조적으로, 비타민 C는 590490배까지, 그리고 비타민 E는 47829690배까지 여전히 높은 라디칼 소거작용을 보였다.

[0041]

항산화 작용은 체내에 활성산소를 제거해 주어 인슐린 감수성을 높여주는 효과가 있다고 보고되어 있다 (Zheng L, Front Biosci. 2009 Jan 1;14:3974-87. Review). 따라서 본 발명의 레몬밤 정유는 항산화 작용으로 인해 인슐린 감수성을 높일 수 있으므로 당뇨병에 효과가 있는 것으로 판단하였다.

[0042]

DPPH는 짙은 자색을 띠는 프리 라디칼(free radical)로서 시스테인(cysteine), 글루타티온(glutathione)과 같은 유황 함유 아미노산과, 아스코르브산(ascorbic acid), BHA(butylated hydroxyanisole), α-토코페롤(α-tocopherol), 방향족 아민류 등의 항산화 물질들에 의해 환원되어 노란색으로 탈색되는 성질을 가지고 있다. 이러한 DPPH의 환원력을 이용한 항산화 활성측정 방법은 비교적 간단하고 실제 항산화 활성과 연관성이 높아 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다.

[0043]

실시예 3. 사용 동물의 사육 및 식이

[0044]

실험동물은 15주령의 C57BL/KsJ-db/db 마우스를 오리엔트바이오사로부터 구입하였다. 일반식으로 일주일간 환경에 적응시킨 후 난괴법(randomized complete block design)에 의해서 한 군을 7마리씩으로 나누었고, 사육 상자에 2-3 마리씩 넣어 사육하였다. 사육기간 동안 물은 자유로이 섭취시키며, 매일 일정량(0.0125 mg)의 레몬밤 정유를 경구 투여하였다. 사육실의 온도(20±2° C) 및 습도 (50±10%)는 최적조건으로 유지시켰고, 명암은 12시간 주기로 조절하였다. 레몬밤 (Melissa officinalis) 허브 이차 대사 산물인 허브 정유(MOEO)가 당뇨에 미치는 영향을 알아보기 위해서 일반식이군(n=7) 및 레몬밤 정유 투여군(n=7) 나누어 6주간 실험 사육하였다.

[0045]

실시예 4. 구강 당내성 실험

[0046]

구강 당내성 실험(oral glucose tolerance test, OGTT)을 통해 레몬밤 정유의 투여가 내당능 회복에 미치는 영향을 알아보기 위해, 실험식이를 급여한 지 6주 후 16시간 절식시켜 공복 시 혈당을 측정된 뒤, 글루코오스(glucose 0.25 g/kg body weight)를 구강투여 한 다음, 0, 15, 30, 60, 90 및 120 분 경과 후에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당측정기(녹십자, MyCare GAM-2200)로 측정하였다.

[0047]

상기 구강당내성 실험결과, 도 2a에서 레몬밤 정유 투여군(MOEO)은 대조군(control)과 비교하여 0, 15 및 120분에 현저한 혈당 감소를 나타내어 당뇨 개선 효능이 있는 것으로 판단하였다.

[0048]

실시예 5. 혈청 중 인슐린 함량 측정

[0049]

마우스 인슐린 키트(Mouse Insulin ELISA Kit, Shibayagi, Co., Ltd.)를 이용하여 효소 면역학적 검사법의 샌드위치 방법(sandwich technique; protocol of Shibayagi, Co., Ltd)에 의해 인슐린 양을 측정하였다.

[0050]

혈장 중 인슐린 함량 측정결과, 도 2b에서 당뇨대조군에 비하여 레몬밤 정유 투여군이 현저히 높은 인슐린 함량을 나타내었다.

[0051]

실시예 6. 실험동물의 처리

[0052]

사육기간 중 실험동물은 3주마다 체중을 측정한 후 16-19시간 절식시킨다. 그런 다음 아베르틴(Avertin) 마취하에 안와정맥총 채혈법으로 EDTA 실험관에 채혈한 다음 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장(plasma)을 얻

었다. 3주째에는 안와정맥총 채혈후 심장채혈법으로 최대한 많은 혈액을 채혈하였고 원심분리하여 얻은 혈장을 실험을 위해 즉시 사용하거나 -20°C 에 보관하였다. 또한 6주째에는 심장채혈 후 간(liver)과 지방조직(adipose tissue)을 적출하여 PBS로 씻은 후 즉시 액체질소에 냉동 후 -80°C 에 다음 실험을 위해 보관하였다.

[0053] 도 3a에서, 각각 0, 3, 6주에 안와정맥총 채혈법으로 채혈 후 혈장 글루코오스(plasma glucose)를 측정된 결과, 3주째 대조군에 비해 레몬밤 정유 오일 투여군(0.0125 mg/마우스/일)에서 현저하게 감소하였고 레몬밤 정유투여 6주째는 대조군에 비해 65%까지 감소하였다.

[0054] 또한 도 3b에서, 혈장 중성지방(Triglyceride)은 3주 및 6주째 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며 총콜레스테롤(total cholesterol)과 HDL-콜레스테롤(HDL-cholesterol)은 3, 6주째 대조군과 비교하여 변화를 나타내지 않았다.

[0055] 중성지방은 지방분해 효소에 의해 체내에서 지방산으로 저장된다. 지방산의 양이 증가하게 되면 포도당이 체내로 흡수되는 것을 저해시키게 된다. 따라서 레몬밤 정유의 투여로 인해 중성지방이 줄어들게 되면 포도당의 체내 흡수 속도가 증가하게 되어 혈중 포도당 농도가 낮아지게 된다.

[0056] 실시예 7. db/db 마우스 간 및 지방 조직 내의 RNA 추출 및 First strand cDNA 생성

[0057] -80°C 에 보관된 간을 꺼내어 액체질소를 부으면서 해동되지 않은 상태에서 일정량 취하여 즉시 TRIzol를 넣어 균질화(homogenization) 하였다 [0.01 g 의 시료당 1 mL TRIzol Reagent (Invitrogen)]. 5분간 실온에 방치한 후 1 mL 의 TRIzol 용액 당 0.2 mL 의 클로로포름을 넣고 15초간 잘 흔들어 준 후 실온에서 2-3분간 더 반응시켰다. 4°C 에서 15분간 원심분리($12,000\times g$)하여 가장 위층인 RNA, 중간층인 DNA, 그리고 가장 아래층인 단백질을 층으로 분리하였다. DNA가 오염되지 않게 조심스럽게 위층을 잘 분리하여 다른 튜브로 옮긴 후 이소프로필알코올을 0.5 mL 넣고 10분간 반응시켜 RNA를 침전시켰다. 그 후 4°C 에서 10분간 원심분리($12,000\times g$)후 상층액을 버리고 침전물을 75% DEPC(diethylpyrocarbonate)-에탄올을 1 mL 을 넣고 몇 번 흔들어 준 후 다시 4°C 에서 5분간 원심분리($12,000\times g$)하였다. 역시 상층액을 버리고 실온에서 침전물을 5-10분간 말린 후 0.1% DEPC 증류수로 침전물을 녹였다. 0.1% DEPC 증류수 995.0 mL 에 RNA 5 mL 를 넣어 200배 희석 후 260 nm 와 280 nm 에서 흡광도를 측정하였다. RNA의 농도는 260 nm 에서의 흡광도값 $\times 40\text{ }\mu\text{g/mL} \times (\text{희석배수})$ 로 계산하였고, 260 nm 와 280 nm 의 비가 1.6이상일 때 순수한 RNA라고 보고 다음 단계를 진행하였다.

[0058] 본 발명에서는 First-stand cDNA를 생산하기 위하여 PowerScript Reverse Transcriptase (Clontech)를 이용하였다. 즉, 먼저 oligo(dT)¹⁵ primer (Promega, USA)와 Random hexamers (Promega, USA)를 동일량 섞어 $1\text{ }\mu\text{l}$ PCR 튜브에 넣고 추출한 RNA ($2\text{ }\mu\text{g}$)와 RNase-free 증류수로 최종 부피가 $11\text{ }\mu\text{l}$ 이 되도록 맞추었다. 70°C 에서 10분 동안 끓인 후 즉시 얼음에서 냉각시켰다. 5X first-strand 완충액 $4\text{ }\mu\text{l}$, dNTP mix (10 mM each) $2\text{ }\mu\text{l}$, DTT (100 mM) $2\text{ }\mu\text{l}$ 및 Powerscript Reverse Transcriptase $1\text{ }\mu\text{l}$ 을 첨가한 후 피펫으로 골고루 섞었다. 그 후 42°C 에서 90분 70°C 에서 15분간 반응시켰다.

[0059] 실시예 8. PCR

[0060] 본 발명에 사용된 마우스 GCK, G6Pase, PEPCCK, PPAR α , PPAR γ , GLUT2, GLUT4, SREBP-1c, 및 β -액틴(actin)의 뉴클레오티드 서열은 하기 표 2과 같다.

[0061] [표 2]. 올리고뉴클레오타이드 프라이머

유전자	프라이머	서열 ^a
GCK	Forward	TTCACCTTC TCCTTCCCTGTAAGG
	Reverse	TTCACCTTC TCCTTCCCTGTAAGG
G6Pase	Forward	AAGACTCCCAGGACTGGTTCATC
	Reverse	TAGCAGGTAGAATCCAAGCGC
PEPCK	Forward	TGCTGATCCTGGGCATAACTAAC
	Reverse	TGGGTAATCCTTCTGGAGATTCC
PPAR α	Forward	CCTCAGGGTACCACTACGGAG
	Reverse	GCCGAATAGTTCGCCGA
PPAR γ	Forward	CCATTCTGGCCACCAA
	Reverse	AATGCGAGTGGTCTTCCAT
GLUT2	Forward	GGCTAATTTCAAGGACTGGTT
	Reverse	TTTCTTTGCCCTGACTTCC
GLUT4	Forward	CCTGCCCGAAAGAGTCTAAAG
	Reverse	ACTAAGAGCACCGAGACCAAC
SREBP-1c	Forward	GGAGCCATGGATTGCACAT
	Reverse	GGCCCGGGAAGTCACTG
β -actin	Forward	TGCTGTCCCTGTATGCCTCT
	Reverse	AGGTCTTTACGGATGTCAACG

[0062] ^a프라이머는 5' → 3'을 나타낸다.

[0063] 각 유전자 발현을 알아보기 위하여 PCR를 실시하였다. GoTaq(R) Green Master Mix, 2X(Promega, USA) 10 μ L, 정방향 프라이머(15 μ M)와 역방향 프라이머(15 μ M)를 각각 0.5 μ L, 증류수 8 μ L, 그리고 실시예 7에서 합성한 first-strand cDNA(DNA templet) 1 μ L을 PCR 튜브에 넣은 후 잘 섞었다.

[0064] GCK(Glucokinase)는 혼합물은 94℃에서 4분간 전-변성(pre-denature)시킨 후, 94℃에서 30초간, 57℃에서 30초간, 72℃에서 30초간 1 사이클(cycle)로 하여 각각 22 사이클 실시하였고, 최종적으로 72℃에서 5분간 신장(extension) 반응을 하였다.

[0065] G6Pase(glucose-6-phosphatase), PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxylkinase), PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptors- α), PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptors- γ), GLUT2(Glucose transporter, type 2), GLUT4(Glucose transporter, type 4) 및 SREBP-1c(Sterol regulatory element binding protein-1c)는 어닐링(annealing) 온도와 사이클 수만 달랐다. 즉, G6Pase, PEPCK, PPAR α , PPAR γ , GLUT2, GLUT4, SREBP-1c 및 β -액틴의 어닐링 온도는 각각 57℃, 57℃, 54℃, 52℃, 47℃, 54℃, 54℃ 및 50℃ 이었고, 사이클 수는 각각 20, 19, 25, 26, 28, 26, 25 및 22 사이클이었다. PCR 산물은 0.002% EtBr(ethidium bromide)이 첨가된 1.2% 아가로스 겔에 80 V에서 30분간 전기영동 한 후 자외선광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 SigmaGel (Jandel Scientific) 소프트웨어에 의해 분석, 정량하였고 내부 표준물질로 β -액틴을 사용하였다.

[0066] 도 4a에서, 레몬밤 정유를 6주 동안 투여 시 간에서 GCK mRNA 발현량은 대조군에 비해 2.6배 증가하였으나, 반대로 G6Pase와 PEPCK는 레몬밤 정유 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였다.

[0067] 또한 도 5a에서, 레몬밤 정유 투여 시 간(liver)에서 GLUT4 mRNA 발현량은 대조군에 비해 1.5배 유의적으로 증가하였고, SREBP-1c mRNA 발현량 역시 대조군과 비교하여 현저히 증가하였다. GLUT2와 PPAR γ 는 대조군과 비교하여 증가하였으나 통계학적 유의성은 나타나지 않았다. 한편, 지방조직(adipose tissue)에서는 GLUT4, PPAR γ , PPAR α 및 SREBP-1c의 mRNA 발현량 모두가 현저하게 증가하였다.

[0068] 전반적으로 간조직에서의 상기 유전자 발현은 혈당감소 및 지방산 산화(분해)촉진작용을 보여주며 지방조직에서의 상기 유전자 발현은 인슐린 민감도 향상 및 지방산 산화 촉진작용을 보여주어, 혈당조절 및 당뇨개선에 도움을 주는 작용을 하는 것으로 결론지을 수 있다.

[0069] 이러한 결과는, 레몬밤 정유 투여 시 db/db 생쥐의 경우 대조군에 비해 혈액 내 당의 사용을 촉진시키는 GCK의 유전자 및 단백질의 발현이 현저히 증가됨을 나타내고, 이와 함께 혈액 내 포도당 흡수를 촉진하는 PPAR 유전자

발현 및 혈중 당을 세포 내로 이동시키는 운반자인 GLUT4의 유전자 발현도 지방세포와 간에서 모두 현저히 증가됨을 나타낸다. 또한 혈액 내 당이 오래 머물러 있을 때 증가하는 지표인 G6Pase와 PEPCK의 유전자 발현이 대조군에 비해 현저히 감소됨을 나타낸다. 따라서 본 발명의 레몬밤 정유가 혈당조절에 효과가 있다는 것을 의미한다.

[0070] 실시예 9. 웨스턴 블롯 분석

[0071] -80° C에 보관된 조직은 용해버퍼(lysis buffer; 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor Cocktail)를 첨가한 후 단백질을 발현분석을 위해 균질화 하였다. 원심분리(14,000 rpm, 10 min, 4° C)한 후 단백질을 얻었다. 단백질의 농도는 이미 알고 있는 알부민(albumin)을 표준 용액으로 하여 Bradford 방법(1976)으로 측정하였고, 동일량의 단백질(30 µg)과 β-머캅토에탄올(β-mercaptoethanol)을 포함한 샘플버퍼(sample buffer; 샘플버퍼 950 µL 당 β-머캅토에탄올 50 µL)를 1:2로 혼합한 후 3분 동안 끓였다. 그 단백질은 바이오-레드 미니-겔 시스템(Bio-Rad mini-gel system)을 이용하여 SDS-PAGE 후, 그들 중 하나는 쿠마시(Coomassie Brilliant Blue G-250; Bio-Rad Laboratories, 1993)로 염색을 하였고 다른 하나는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane; 0.45 µm, Schleicher&Schuell BioScience PROTAN nitrocellulose transfer membrane)으로 단백질을 전이하였다. 비특이적인 단백질(nonspecific protein) 결합 부분은 0.1% Tween 20와 5% 탈지분유를 함유한 PBS에 1시간동안 반응시킴으로써 블로킹을 하였고, 니트로셀룰로오스 막에 전이된 단백질은 특정 항체와 반응하여 웨스턴 블롯(western blot)을 실시하였다. 발색은 ECL 방법(enhanced chemiluminiscent method)을 이용하여 x-ray 필름에 감광시켰다.

[0072] 웨스턴 블롯 분석결과, 도 4b 및 도 5b에서와 같이, GCK, PPAR γ 및 GLUT4의 단백질 발현량을 간(liver)과 지방조직(adipose tissue)에서 확인하였다. 간에서 GCK와 GLUT4 단백질 발현량은 레몬밤 정유 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였고, PPAR γ 역시 대조군과 비교하여 증가하였으나 통계학적 유의성은 나타나지 않았다(도 4b). 지방조직에서는 PPAR γ 와 GLUT4 단백질 발현량이 모두 레몬밤 정유 투여군에서 대조군과 비교하여 현저하게 증가하였다. 이러한 결과는 mRNA 발현과도 비슷한 양상을 보이고 있다. PPAR- γ 와 GLUT4는 발현 증가 시 포도당의 이용 및 수송 속도를 향상시켜주는 역할을 하고 있다. 즉, 레몬밤 정유 투여시 포도당 조절 이전에 도움을 주는 요소들의 발현을 증가시켜 혈당을 저하시킬 수 있다(도 5b).

산업이용 가능성

[0073] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 레몬밤 정유를 투여한 db/db 생쥐에서 혈액 내 당의 사용을 촉진시키는 GCK 유전자 및 단백질의 발현이 현저히 증가하였으며, 혈액 내 포도당 흡수를 촉진하는 PPAR 유전자의 발현과 더불어 혈중 당을 세포 내로 이동시키는 운반자인 GLUT4의 유전자 발현도 지방세포, 간에서 모두 현저히 증가하였다. 또한 혈액 내 당이 오래 머물러 있을 때 증가하는 지표인 G6Pase와 PEPCK의 유전자 발현이 현저히 감소하였다. 이와 같은 결과는 레몬밤 정유가 혈당조절 효과가 있음을 나타내는 것이므로, 향후 레몬밤 정유가 혈당을 조절할 수 있는 건강기능성 식의약 소재로 개발이 가능함을 시사한다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1은 레몬밤 정유의 DPPH에 대한 전자 공여작용을 농도별로 회색하여 시험한 결과이다.

[0075] 도 2a는 본 발명의 레몬밤 정유를 db/db 생쥐에 경구투여한 후, 구강 당내성(OGTT)을 측정한 결과이다.

[0076] 도 2b는 본 발명의 레몬밤 정유를 db/db 생쥐에 경구투여한 후, 혈청 중 인슐린 함량을 측정한 결과이다.

[0077] 도 3a는 본 발명의 레몬밤 정유를 db/db 생쥐에 경구투여한 후, 혈장 포도당(Glucose)을 측정한 결과이다.

[0078] 도 3b는 본 발명의 레몬밤 정유를 db/db 생쥐에 경구투여한 후, 중성지방(Triglyceride), HDL-콜레스테롤 및 총 콜레스테롤을 측정한 결과이다.

[0079] 도 4a는 본 발명의 레몬밤 정유를 db/db 생쥐에 경구투여한 후, GCK, G6Pase 및 PEPCK의 mRNA 양을 측정한 결과이다.

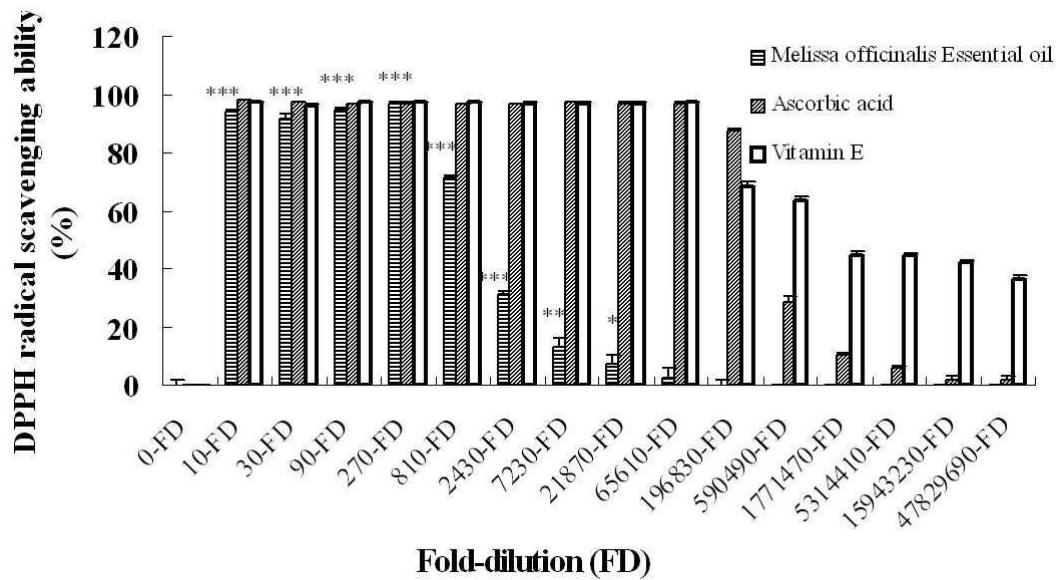
[0080] 도 4b는 본 발명의 레몬밤 정유를 db/db 생쥐에 경구투여한 후, GCK 단백질 발현량을 측정한 결과이다.

[0081] 도 5a는 본 발명의 레몬밤 정유를 db/db 생쥐에 경구투여한 후, 간과 지방조직에서 GLUTs, PPARs, SREBP1-c의 mRNA 양을 측정한 결과이다.

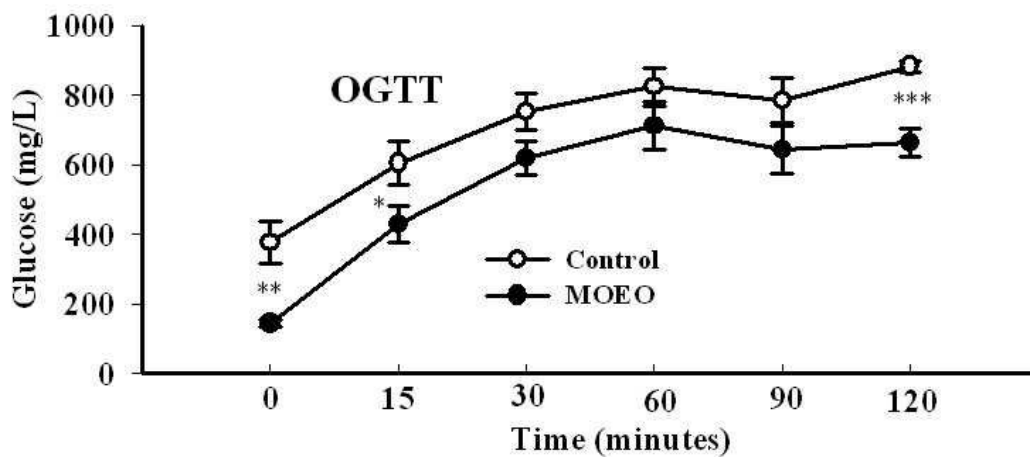
[0082] 도 5b는 본 발명의 레몬밤 정유를 db/db 생쥐에 경구투여한 후, 간과 지방조직에서 GLUT4 및 PPAR γ 단백질 발현양을 측정한 결과이다.

도면

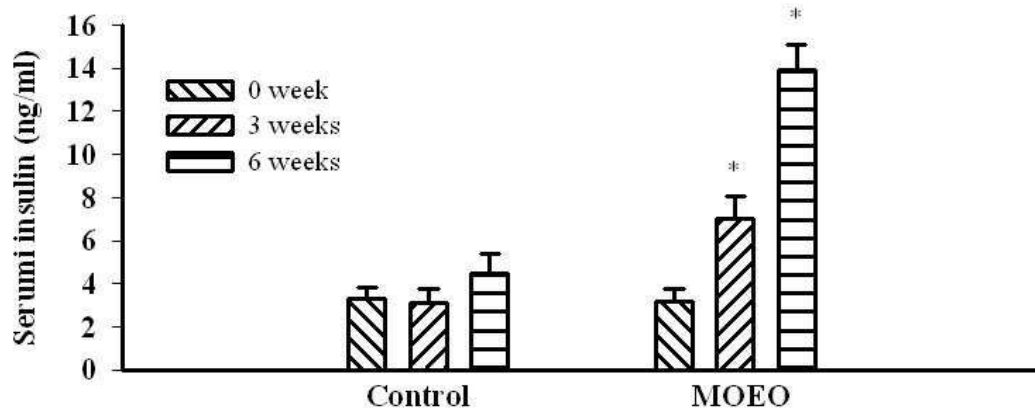
도면1



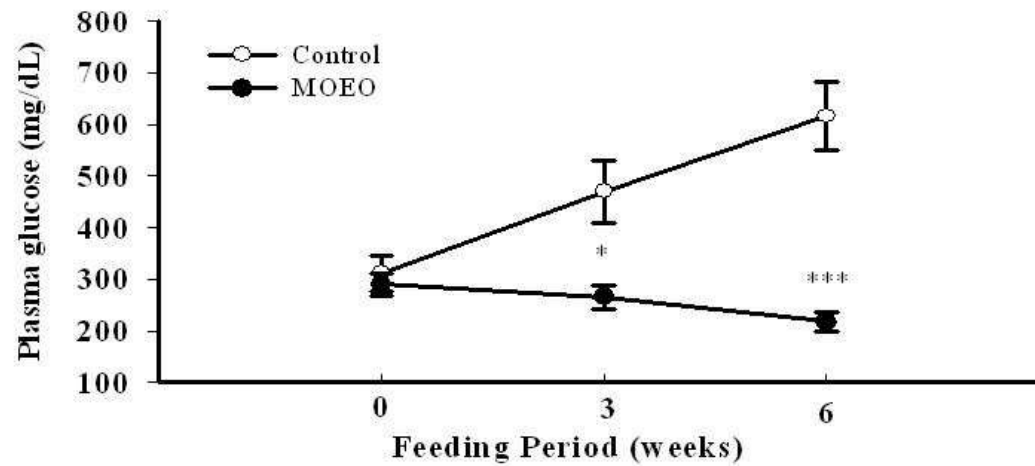
도면2a



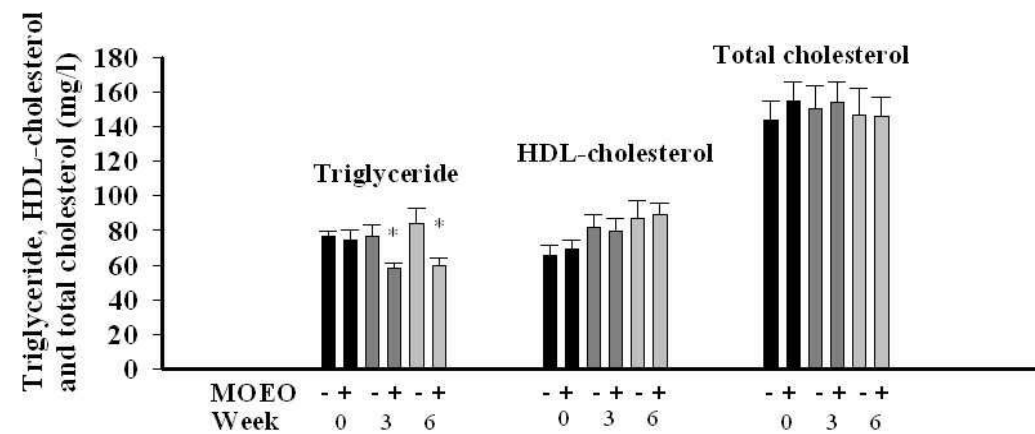
도면2b



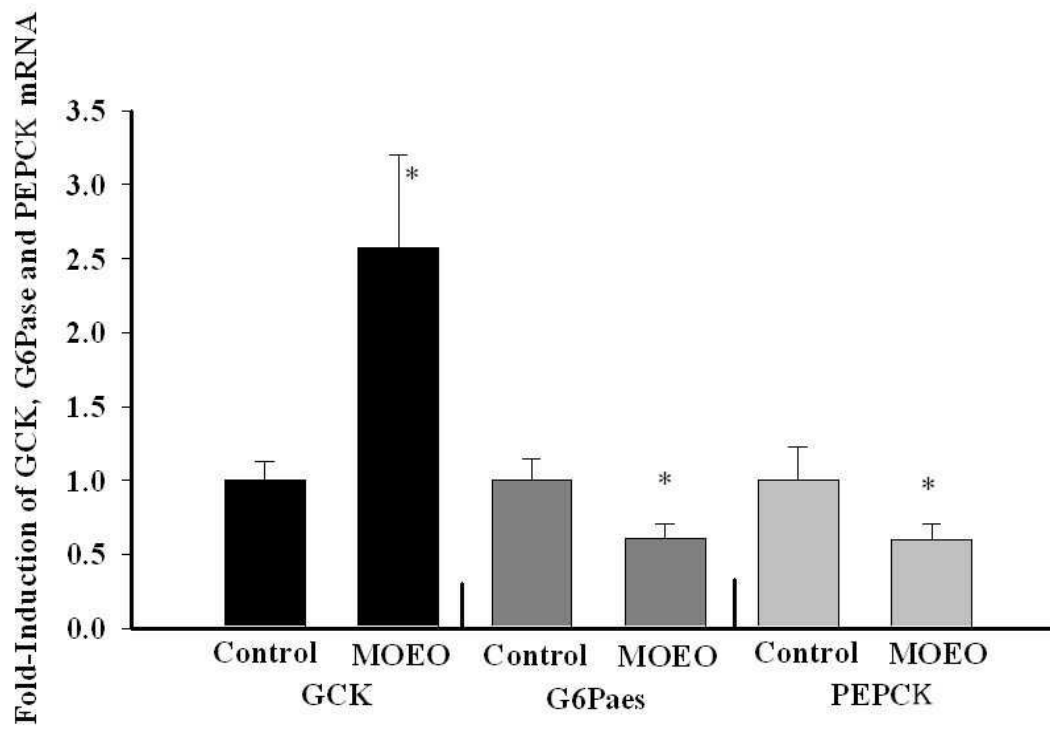
도면3a



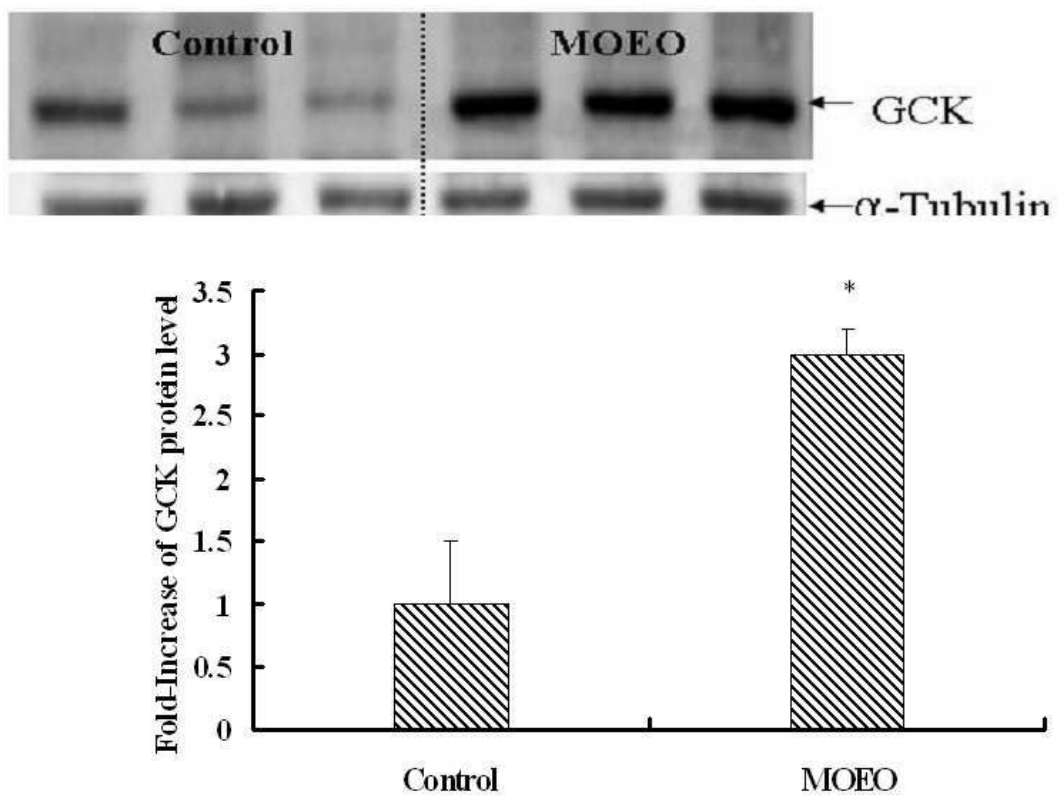
도면3b



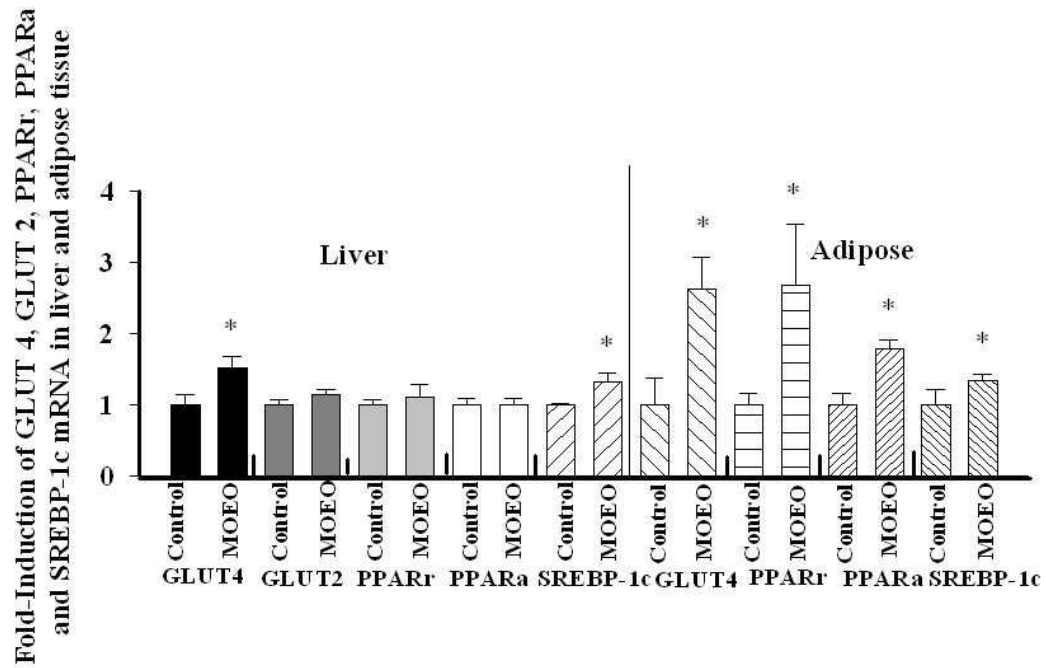
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

