



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월30일
 (11) 등록번호 10-1651908
 (24) 등록일자 2016년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/64 (2015.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0134185
 (22) 출원일자 2014년10월06일
 심사청구일자 2014년10월06일
 (65) 공개번호 10-2016-0041115
 (43) 공개일자 2016년04월18일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020140060426 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 대한민국
 (72) 발명자
 윤은영
 경기도 화성시 봉담읍 동화길 122 608동 1003호
 (동화리, 휴먼시아6단지아파트)
 황재삼
 경기도 화성시 향남읍 행정리 향남택지지구 향남
 지웰APT 1205동 1703호(행정중앙1로 61)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 나동규

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김용원

(54) 발명의 명칭 **갈색거저리 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 조성물**

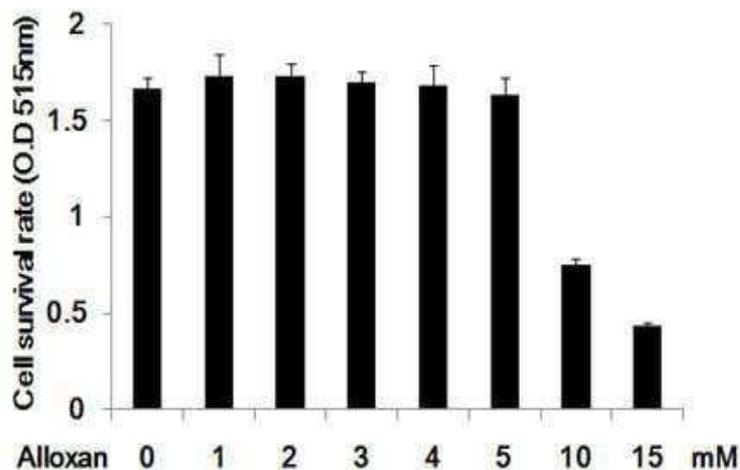
(57) 요약

본 발명은 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 당뇨 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 당뇨 예방 및 개선용 식품 조성물은 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 것이 특징이다.

본 발명에 의해 산화적 스트레스를 억제하여 췌장베타세포의 생존율을 증가시키며 더불어 인슐린의 분비를 증가시켜 혈당수치 감소효과를 나타내는 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

구태원

경기도 화성시 봉담읍 동화길 122 608동 1003호
(동화리, 휴먼시아6단지아파트)

김미애

경기도 수원시 권선구 당진로15번길 19-10 103동
1401호 (당수동, 한라비발디아파트)

유미라

부산광역시 사하구 하단1동 660-6 (낙동대로451번
안길 5)

윤영일

경기도 수원시 팔달구 덕영대로735번길 18 101동
603호 (화서동, 화서한진현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ010022

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 갈색거저리 조리법 및 다양한 체형의 제품 개발

연구과제명 조리법 및 식품 개발을 위한 갈색거저리 원료 제조 및 특성 분석

기 여 율 1/1

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2014.02.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는,
당뇨 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 당뇨는 제2형 당뇨임을 특징으로 하는,
당뇨 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,
상기 추출물은 70부피% 에탄올로 추출된 것을 특징으로 하는,
당뇨 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,
상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물은 췌장베타세포에서 산화적 스트레스를 억제하는 것
을 특징으로 하는,
당뇨 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,
상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물은 인슐린 분비능을 활성화시켜 혈당수치를 감소시키
는 것을 특징으로 하는,
당뇨 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,
상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물은 인슐린 작용 경로와 관련된 유전자인 인슐린 수용
체(IR), 인슐린 수용체 물질-1(IRS-1), 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소(PI3K) 및 포도당 수송체 타입4(GLUT4)
중 어느 하나 이상의 발현을 활성화시키는 것을 특징으로 하는,
당뇨 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물은 상기 조성물 1ml를 기준으로 100 μ g~5000 μ g으로 포함되는 것이 특징인,

당뇨 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는,

당뇨 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 추출물은 70부피% 에탄올로 추출된 것을 특징으로 하는,

당뇨 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물은 췌장베타세포에서 산화적 스트레스를 억제하는 것을 특징으로 하는,

당뇨 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물은 인슐린 분비능을 활성화시켜 혈당수치를 감소하는 것을 특징으로 하는,

당뇨 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 12

제 8항에 있어서,

상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 또는 이의 추출물은 인슐린 분비능과 관련된 유전자인 인슐린 수용체 (IR), 인슐린 수용체 물질-1(IRS-1), 포스포티딜이노시톨 3-인산화효소(PI3K) 및 포도당 수송체 타입4(GLUT4) 중 어느 하나 이상의 발현을 활성화시키는 것을 특징으로 하는,

당뇨 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 13

제 8항에 있어서,

상기 갈색거저리(Tenebrio molitor) 유충 또는 이의 추출물은 상기 조성물 1ml를 기준으로 100 μ g-5000 μ g으로 포함되는 것이 특징인,

당뇨 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 14

동결건조된 갈색거저리 유충을 분쇄시키는 제1단계;

상기 제1단계에서 제조된 갈색거저리 유충분말과 에탄올을 혼합하여 갈색거저리 혼합액을 제조하는 제2단계;

상기 제2단계에서 제조된 갈색거저리 혼합액을 초음파 분쇄기로 미세화시키는 제3단계 및,

상기 제3단계에서 미세화된 갈색거저리 혼합액을 원심분리 시킨 후, 상층액을 회수하고 이를 여과한 후 건조시켜, 항당뇨효과를 갖는 갈색거저리 유충 추출물을 제조하는 제4단계를 포함하는 방법으로 제조된 갈색거저리 유충 추출물을 유효성분으로 포함하여, 항당뇨효과를 갖는 것이 특징인,

항당뇨제.

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 갈색거저리 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 산화적 스트레스로부터 췌장세포를 보호하고 손상을 억제하며, 인슐린 분비능을 증가시키는 효과를 갖는 갈색거저리 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라에는 약 420만명이 당뇨병 환자로 전 인구의 약 10%에 이르며, 세계적으로도 10% 정도가 당뇨병에 걸린 것으로 알려져 있다. 당뇨병은 원인에 관한 수많은 연구가 있었음에도 불구하고 원인이 다양하기 때문에 당뇨병의 근본적인 원인을 찾지 못하여 적당한 치료를 하지 못하고 있다.

[0003] 당뇨병의 요인은 유전적 요인과 환경적 요인이 있으며 제1형 당뇨병(인슐린 의존형)은 주로 면역학적 기전에 의해 췌장베타세포가 파괴되어 인슐린 분비가 일어나지 않는 병이고, 제2형 당뇨병(인슐린비의존형)은 체내에서 인슐린이 생산되지만 인슐린 저항성이 증가하는 병으로 당뇨 환자의 90%~95%를 차지한다.

[0004] 제2형 당뇨병의 대표적인 원인으로는 췌장베타세포 기능 저하에 따른 인슐린 분비능 저하가 예상되고 있다. 현재까지 췌장베타세포의 기능 저하의 요인으로 여러 가지가 알려져 있으나, 고혈당에 의한 당독성, 지방산에 의한 지방독성 및 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)의 증강에 의한 산화스트레스 등이 알려져 있다.

[0005] 특히, 산화스트레스가 중요한 손상 요인으로 제기되고 있으며, 그 이유로는 췌장베타세포가 다른 세포들에 비해 항산화효소가 매우 적어 산화스트레스에 매우 취약하기 때문이다. 또한, 산화적 스트레스가 당뇨합병증에 관여하므로 당뇨합병증의 예방 방안으로 산화적 스트레스의 억제, 제거 및 지질대사 개선을 주장하는 연구들이 보고되고 있다.

[0006] 당뇨에 걸렸을 때 위험한 것은 높은 혈당수치이며, 혈당수치를 감소시키기 위해서는 인슐린 작용 경로가 활성화되어야 한다. 인슐린 작용 경로는 인슐린의 시그널을 GLUT4에게 전하는 경로이다. 혈당을 세포내로 유입시키는 GLUT4를 발견한 E. 제임스 박사에 의하면 인슐린은 혈액을 타고 세포의 표면에 있는 인슐린 수용체와 결합하고 세포막하의 인슐린 수용체 하부가 활성화해서 ATP를 끌어 당겨 인산화가 되고 시그널 전달 인자인 IRS-1가 활성화 되고 PI3K를 활성화 한다.

- [0007] 이처럼 인슐린 시그널이 릴레이되어 GLUT4에 전달되어 활성화하여 세포표면으로 이동해 세포막과 일체가 되고 혈당을 세포내로 유입한다. 하지만 통상적인 당뇨약의 경우에는 복용했을 때 췌장에서 인슐린이 강제로 분비되도록 하기 때문에 장기간 복용할 경우 췌장의 기능이 약화되고 손상되어 인슐린 분비가 원활하게 이뤄지지 않아 결국에는 인슐린 주사를 맞게 된다.
- [0008] 또한, 인슐린 주사를 맞기 시작하면 평생 주사를 통해 당뇨를 관리해야하며 인슐린 주사를 오랜 기간 맞은 경우 일부 지방조직이 파괴되거나 인슐린 과민성 반응, 저혈당 쇼크 등의 부작용이 생길수도 있다.
- [0009] 따라서, 상기와 같은 부작용 없이 당뇨병의 예방과 치료를 위한 천연물질을 찾으려는 연구들이 진행되고 있으며, 관련 선행기술로는 한국공개특허 10-2011-0012758(당뇨병 예방 및 치료용 생약조성물)과 한국등록특허 10-1246689(식물혼합추출물을 함유하는 항당뇨용 조성물)에 관한 것이 공개되어 있다.
- [0010] 한편, 갈색거저리(Tenebrio molitor)는 절지동물문 곤충강 딱정벌레목 곡물거저리속에 속하고 갈색거저리 유충은 한의학에서 양충이라 하여 토혈, 질타손상[跌打損傷], 심기위통[心氣胃痛] 등의 치료에 응용 및 항균효과가 보고되어 있다. 육류와 갈색거저리의 비교시 단백질 함량이 비슷하나, 지방의 함량은 상당히 높은 편이어서 적은 양으로도 충분한 에너지원으로 이용할 수 있으며, 지방 중 70~80% 이상이 불포화지방산이어서 인체에 유익할 것으로 판단된다.
- [0011] 현재까지 갈색거저리는 한의학 등에서 인용되어 과거부터 많은 질병에 이용되어 왔으나 이에 대한 과학적인 분석은 미진한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 갈색거저리 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하여 산화적 스트레스를 억제함으로써 췌장베타세포를 보호하고 인슐린의 분비능을 증가시켜 혈당수치를 감소시키는 당뇨 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 당뇨 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 당뇨 예방 및 개선용 식품 조성물은 갈색거저리(Tenebrio molitor) 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 것이 특징이다.
- [0015] 상기 추출물은 70부피% 에탄올로 추출된 것이 특징이다.
- [0016] 상기 갈색거저리(Tenebrio molitor) 유충은 췌장베타세포에서 산화적 스트레스를 억제하며, 인슐린 분비능을 활성화시켜 혈당수치를 감소하며, 인슐린 분비와 관련된 유전자인 인슐린 수용체(IR), 인슐린 수용체 물질-1(IRS-1), 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소(PI3K) 및 포도당 수송체 타입4(GLUT4) 중 어느 하나이상의 발현을 활성화시키는 것이 특징이다.
- [0017] 상기 갈색거저리(Tenebrio molitor) 유충 또는 이의 추출물은 상기 조성물 1ml를 기준으로 100 μ g~5000 μ g으로 포함되는 것이 특징이다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 의해, 산화적 스트레스를 억제하여 췌장베타세포의 생존율을 증가시키며 더불어 인슐린의 분비를 증가시켜 혈당수치 감소효과를 나타내는 갈색거저리 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0019]

도 1은 알록산(Alloxan)처리 후 세포 반수치사농도를 MTS assay로 측정한 그래프이다.

도 2A는 누에 추출물(BME)을 대상으로 췌장베타세포(HIT-T15)에서 세포 생존율(Cell viability)을 측정한 그래프이다.

도 2B는 뽕잎 추출물(MAE)을 대상으로 췌장베타세포(HIT-T15)에서 세포 생존율(Cell viability)을 측정한 그래프이다.

도 2C는 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물(TME)을 대상으로 췌장베타세포(HIT-T15)에서 세포 생존율(Cell viability)을 측정한 그래프이다.

도 3A는 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)에서 일산화질소(NO)의 활성을 측정한 그래프이다.

TME : 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

도 3B는 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)에서 글루타티온 S-전달효소(GST)의 활성을 측정한 그래프이다.

TME : 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

도 4A는 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)의 세포 생존율(Cell survival rate)을 나타낸 그래프이다.

TME: 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

MAE : 뽕잎 추출물 처리군

도 4B는 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)에서 글루코스(Glucose)의 분비량을 나타낸 그래프이다.

TME: 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

MAE : 뽕잎 추출물 처리군

도 4C는 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)에서 인슐린(Insulin)의 분비량을 나타낸 그래프이다.

TME: 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

MAE : 뽕잎 추출물 처리군

도 5A는 당뇨가 유발된 동물모델에서 신장의 무게(Kidney weight)를 측정한 그래프이다.

TM: 본 발명인 실시예 2의 갈색거저리 유충시료 처리군

BM : 누에 시료 처리군

도 5B는 당뇨가 유발된 동물모델에서 췌장의 면역조직화학적염색을 실시한 도면이다.

TM: 본 발명인 실시예2의 갈색거저리 유충시료 처리군

BM: 누에 시료 처리군

도 5C는 당뇨가 유발된 동물모델에서 췌장의 인슐린 양성세포(Insulin-producing cells)를 카운트하여 나타낸 그래프이다.

TM : 본 발명인 실시예2의 갈색거저리 유충시료 처리군

BM : 누에 시료 처리군

도 6A는 당뇨가 유발된 동물모델에서 혈당수치를 나타낸 그래프이다.

TM : 본 발명인 실시예2의 갈색거저리 유충시료 처리군

BM : 누에 시료 처리군

도 6B는 당뇨가 유발된 동물모델에서 인슐린수치를 나타낸 그래프이다.

TM : 본 발명인 실시예2의 갈색거저리 유충시료 처리군

BM : 누에 시료 처리군

도 6C는 당뇨가 유발된 동물모델에서 인슐린 저항성과 관련된 FFA(Free fatty acid)의 수치를 나타낸 그래프이다.

TM : 본 발명인 실시예2의 갈색거저리 유충시료 처리군

BM : 누에 시료 처리군

도 6D는 당뇨가 유발된 동물모델에서 ALT(알라닌 아미노전이효소)의 수치를 나타낸 그래프이다.

TM : 본 발명인 실시예2의 갈색거저리 유충시료 처리군

BM : 누에 시료 처리군

도 6E는 당뇨가 유발된 동물모델에서 AST(아스파라긴산 아미노전이효소)의 수치를 나타낸 그래프이다.

TM : 본 발명인 실시예2의 갈색거저리 유충시료 처리군

BM : 누에 시료 처리군

도 7A는 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)에서 인슐린 수용체(IR, Insulin receptor)의 발현양을 나타낸 그래프이다.

TME : 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

도 7B는 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)에서 IRS-1(insulin receptor substrate-1)의 발현양을 나타낸 그래프이다.

TME : 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

도 7C는 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)에서 포스포티딜이노시톨 3-인산화효소(PI3K)의 발현양을 나타낸 그래프이다.

TME : 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

도 7D는 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)에서 포도당 수용체 타입4(GLUT4)의 발현양을 나타낸 그래프이다.

TME : 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

도 8은 당뇨가 유발된 췌장베타세포(HIT-T15)에서 포도당 수용체 타입4(GLUT4)의 발현양을 웨스턴 블롯을 통해 나타낸 도면이다.

TME : 본 발명인 실시예1의 갈색거저리 유충 추출물 처리군

BME : 누에 추출물 처리군

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하며, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [0021] 당뇨병은 췌장베타세포가 파괴되어 인슐린 분비가 일어나지 않아 체내의 혈당수치가 증가되어 발생하거나, 산화적스트레스로 인한 췌장베타세포의 손상으로 발생하는 질병으로 알려져 있다.
- [0022] 따라서, 현재는 체내의 혈당수치를 감소시키고 인슐린 분비를 증가시키는 것뿐만 아니라 산화적 스트레스를 억제하여 췌장베타세포를 보호하는 것이 당뇨병 연구의 주요 요소로 부각되고 있다.
- [0023] 이에 본 발명의 발명자들은 산화적 스트레스를 억제하고 더불어 체내의 혈당수치 감소와 인슐린 분비 증가 효과를 나타내는 천연물에 대해 여러차례 연구한 바, 여러 천연물 중 갈색거저리 유충 또는 이의 추출물이 산화적 스트레스를 억제하여 췌장베타세포의 세포생존율을 증가시키며, 또한 혈당수치를 감소시키고 인슐린 분비를 증가시키는 효과를 확인하였다.
- [0024] 구체적으로 설명하면, 본 발명의 갈색거저리 유충(이하, 'TM'이라 명명함) 또는 이의 추출물(이하, 'TME'라 명명함)은 췌장베타세포인 HIT-T15 세포와 당뇨유발 동물모델을 이용하여 갈색거저리추출물(TME)의 alloxan에 의한 산화스트레스로부터의 세포보호, 인슐린 분비능 및 항산화 효소 활성을 평가하였다.
- [0025] 그 결과, TME은 HIT-T15 cell에서 최고 농도인 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 96시간 처리시에도 독성이 전혀 없었으므로 TME의 췌장세포에 대한 독성은 없음을 확인할 수 있었고, alloxan 10 mM의 농도에서 약 50%의 세포독성을 확인 후 산화적 스트레스와 관련있는 항산화 실험을 한 결과 NO의 경우 alloxan만 처리한 세포에 비해 TME 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 시 약 20%정도 감소함을 확인하였다
- [0026] 또한, alloxan만 처리한 세포의 GST 활성은 포도당이 들어있지 않는 세포에 비해 다소 감소하는 경향을 보였으나, TME의 처리농도가 증가할수록 유의적으로 GST 활성이 증가함을 확인하였다.
- [0027] 또한, Alloxan을 처리 후 TME를 농도별로 처리하여 24, 48, 72시간 경과시 세포생존률 확인한 결과 alloxan만 처리한 경우에 비해 TME 처리 농도에 의존적으로 세포생존률이 증가되었고 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시 거의 정상과 유사한 수준으로 회복되었으며, glucose 양도 alloxan 처리 시 보다 TME 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 후 72시간 경과시 24% 감소하여 거의 정상 수준이었으며, insulin도 TME 처리 후 동시간대 대비 약 10% 정도 유의성 있게 증가되어 alloxan에 의해 유발된 산화스트레스로부터 세포를 보호하여 세포생존율을 증가시킴을 확인하였다.
- [0028] 또한, Insulin pathway에 관여하는 인자인 IR과 IRS-1, PI3K, GLUT4의 발현 정도를 실시간(real-time) PCR을 통해 확인해 본 결과 IR과 IRS-1, PI3K, GLUT4의 발현량이 당뇨유발세포에 비해 크게 증가하였고 GLUT4의 단백질양도 크게 증가하는 것을 확인할수 있었다.
- [0029] 또한, 당뇨유발 동물모델에서 TM의 혈당과 인슐린을 분석한 결과, TM을 5주간 처리한 동물군이 당뇨동물군에 비해 약 40% 정도 감소되었다. 혈액 내 인슐린 농도의 경우 정상군에 비하여 당뇨군이 크게 감소하였고, TM과 누에시료(이하, 'BM'이라 명명함)는 당뇨군에 비하여 큰 차이가 없었다.
- [0030] 또한, 유리지방산(Free fatty acid, 이하 'FFA'라 명명함)의 경우 당뇨가 유발이 되면 FFA가 증가하나 TM을 경구투여한 경우 FFA가 TM은 32%정도 감소하였다.
- [0031] 간은 당분을 저장하는 곳으로서 우리 몸에 에너지가 필요할 때에 당분을 방출하는 곳이다. 당뇨병으로 당대사에 이상이 생기면 간이 영향을 받아 지방이 축적되면 비대해지면서 지방간이 된다. 이를 확인하기 위해 본 간수치의 경우 ALT, AST 둘 다 정상군에 비해 당뇨군에서 약 50% 크게 증가하였으나 ALT, AST가 TM 처리군에서 감소하는 것을 확인할수 있었다. 조직학적 분석에서는 신장은 TM 처리를 하여도 커진 신장의 무게는 감소하지 않았으나 췌장섬의 insulin 분비 세포가 TM에서 개선된 것을 확인할수 있었다.
- [0032] 이상과 같은 본 발명의 항당뇨 효능을 가지는 본 발명의 갈색거저리 유충 추출물은 혈당강하효능이 우수하여 당뇨예방에 탁월한 효과가 있을 뿐만 아니라 alloxan의 세포손상에 대하여 세포 손상 회복 효능까지 있는 등 지금까지 갈색거저리에서 알려지지 않았던 당뇨병에 대한 예방, 치료 효과를 알 수 있었다. 아울러 이러한 효능을 일반인들에서 보다 쉽고도 용이하게 접할 수 있도록 각종 식품, 음료, 차, 주류 등에도 항당뇨 기능성 제품 제조에 응용하는 것이 가장 바람직할 것으로 본다.
- [0033] 이에, 본 발명인 항당뇨 효과를 갖는 갈색거저리 유충 추출물 제조방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

- [0034] 1. 제 1단계; 갈색거저리 유충 분쇄
- [0035] 우선, 본 단계에서는 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)를 준비한다.
- [0036] 상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 절지동물문 곤충강 딱정벌레목 곡물거저리속에 속하는 것으로서, 이러한 상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 항당뇨활성을 나타내는 유효성분이 최대로 함유되어 있는 갈색거저리 유충을 사용하는 것이 좋다.
- [0037] 이렇게 준비된 상기 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충은 건조한 다음 분쇄하여 분말형태로 제조한다.
- [0038] 그 다음, 다량의 수분이 함유되어 있기 때문에 수분이 완전히 없는 상태로 만들기 위해서는 건조과정을 거쳐야 한다. 이때, 상기 갈색거저리가 함유하고 있는 유효성분들의 변화를 최소화시키기 위해 동결건조를 통해 건조를 하는 것이 좋다.
- [0039] 그 다음 하기 추출의 용이성을 위해 상기 건조된 갈색거저리 유충은 분쇄기를 이용하여 분말형태로 제조된다.
- [0040] 2. 제 2단계; 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 혼합액 제조
- [0041] 본 단계에서는 상기 제조한 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 분말을 에탄올과 혼합하여 갈색거저리 혼합액을 제조한다.
- [0042] 이때, 에탄올과 분쇄된 갈색거저리 분말의 혼합비율은 특별히 제한되지 않으나, 상기 에탄올 1ℓ 당 상기 분쇄된 갈색거저리 분말 1~3g로 혼합하는 것이 바람직하다. 상기 범위를 벗어날 경우, 번거로운 농축이나 희석 과정을 거쳐 적정 농도로 조절하는 추가 과정을 수행해야하는 문제점이 있을 수 있다.
- [0043] 또한 상기 사용된 에탄올로는 어떠한 에탄올을 사용하여도 무관하나, 갈색거저리 내에 함유된 유효성분을 가장 적절히 추출할 수 있도록 70~80%의 에탄올을 사용하는 것이 좋다.
- [0044] 3. 제 3단계; 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 혼합액을 미세화시키는 단계
- [0045] 본 단계에서는 상기 갈색거저리 혼합액으로부터 항당뇨 효과를 가지는 유효성분을 추출하기 위한 단계로써, 통상적으로 알려진 초음파 분쇄기를 이용하여 특별한 제한없이 미세화시킬 수 있으나, 초음파 분쇄기를 장수펄딩이 혼합액에 200~300jule의 에너지로 10~30초간 작동시키는 것이 바람직하다.
- [0046] 상기 초음파 분쇄기 적용 조건이 상기 범위를 벗어날 경우, 목적하는 유효성분의 추출이 이루어지지 않거나, 유효성분이 파괴되거나 변성되는 문제가 발생될 수 있다.
- [0047] 4. 제 4단계; 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충 추출물 제조단계
- [0048] 본 단계에서는 상기 미세화된 갈색거저리 혼합액을 원심분리 시킨 후, 상층액을 회수하고 이를 여과 한 다음 건조시켜 제조하는 단계로써, 최종적으로 파골세포 분화억제를 통해 항당뇨효과를 갖는 갈색거저리 유충 추출물이 제조되는 것이다.
- [0049] 이때, 상기 원심분리는 4000~5000rpm에서 5~20분동안 이루어지는 것을 특징으로, 상기 원심분리 적용 조건이 상기 범위를 벗어날 경우, 목적하는 유효성분이 파괴되거나 변성되는 문제가 발생될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 관점에서는 갈색거저리 유충 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는, 당뇨 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공하게 된다.
- [0051] 특히, 상기 조성물 중 상기 갈색거저리 유충 또는 이의 추출물은 상기 조성물 1ml를 기준으로 100 μ g 내지 5000 μ g로 포함되는 것이 특징이다. 이는 하기 실험예에 뒷받침 되는 것으로서, 상기 갈색거저리 유충 또는 이의 추출물의 함량이 100 μ g미만으로 함유될 경우에는 인슐린 분비능이 떨어져 본 발명이 목적하는 항당뇨제로 사용하기 적합하지 않으며, 5000 μ g초과로 함유될 경우에는 함유대비 보다 상승된 효과를 나타내지 않아 경제적으로 적합하지 않다.

- [0052] 이러한 상기 본 발명의 약학 조성물은 당뇨 예방 및 치료를 목적으로 항당뇨효과를 갖는 천연물의약품에 함유될 수 있다. 이때 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0053] 이때 제형은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 중 어느 하나의 형태로 구성되며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수도 있다. 즉, 이는 사용 목적에 따라서 당업자가 어려움 없이 선정하여 이루어질 수 있으며, 그 첨가량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위내에서 선택될 수 있음을 의미한다.
- [0054] 상기 약학적으로 허용되는 담체로는 제제 할 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하며, 또한, 약학적으로 허용되는 부형제로는 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 또한, 상기 본 발명의 식품 조성물에서는 그 유효성분으로 상기 갈색겨저리 유충 또는 이의 추출물을 사용할 경우, 상기 그대로 사용하거나 다른 통상의 식품 조성물의 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0056] 이러한 상기 식품 조성물은 당뇨 예방 및 개선을 위한 목적으로 건강식품에 함유될 수 있으며 그 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0057] 상기 외에 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육으로 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0059] <실시예 1> 갈색겨저리 유충 추출물 제조
- [0060] 동결 건조된 갈색겨저리 유충 분말을 월드웨이에서 구매한 후 이를 갈색겨저리 유충 추출물 제조에 사용하였다.
- [0061] 갈색겨저리 유충 분말은 3g은 70부피% 에탄올 1ℓ 에 넣고 혼합액을 제조한 후, 상기 혼합액을 초음파 파쇄기로 230 jule의 세기로 10초동안 2번 나누어서 파쇄하여 미세화시켰다.
- [0062] 상기 미세화시킨 갈색겨저리 유충 혼합액은 4500rpm에서 10분 동안 원심분리한 후, 상층액을 회수하고 상기 상층액은 0.25 μ m 주사기 필터로 여과하여 본 발명의 갈색겨저리 유충 추출물(TME)을 제조하였다.
- [0063] <실시예 2> 경구투여용 갈색겨저리 유충 시료 제조
- [0064] 실시예 1에서 사용된 동결 건조된 갈색겨저리 유충 분말을 증류수와 섞어 본 발명의 경구투여용 갈색겨저리 유충시료(TM)를 제조하였다.
- [0065] <실험예 1> 본 발명의 갈색겨저리 유충 추출물을 대상으로 항당뇨활성 확인
- [0066] 1. 실험방법

- [0067] 1) 세포 및 실험동물
- [0068] HIT-T15 cell(ATCC, MD, USA)은 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin_ 100 unit/ml과 10% FBS이 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 계대 배양을 실시하였다.
- [0069] 실험동물의 경우 중앙실험동물로부터 공급받은 체중 30 g 이상의 ICR계 수컷 쥐를 24±2℃ 조건 하에서 고형사료(research diet, New Brunswick, USA)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였다.
- [0070] 당뇨 유발은 실험동물을 16시간 절식시킨 후 alloxan(50 mg/kg, 0.05 M sodium citrate buffer)을 복강에 주사하여 당뇨를 유발시켰다.
- [0071] alloxan을 주사한지 3일 후에 실험동물의 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당측정기를 이용하여 혈당을 측정하였다. 포도당 농도가 300 mg/dL 이상인 것을 당뇨가 유발된 것으로 판정하고 실험에 사용하였다.
- [0072] 2) 항산화 활성 측정
- [0073] HIT-T15 세포를 24 well plate에 1×10⁵/well가 되도록 분주하여 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 각 well 당 10 mM alloxan(Sigma-Aldrich, MO, USA)과 시료를 농도 별로 처리한 후 1시간 동안 배양하였다.
- [0074] 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 배지에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다.
- [0075] 세포를 수거하여 Nitric Oxide detection kit(iNtRON, Korea) Glutathione S-Transferase Assay kit(cayman chemical, MI, USA)를 (NO 추가) 사용하여 항산화를 측정하였다
- [0076] 3) 세포 생존율 측정
- [0077] 세포 생존율 측정하기 위해 HIT-T15 세포를 96 well plate에 1×10⁵/well가 되도록 분주하여 각 군별로 시료를 농도 별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 μg/ml)로 첨가하여 72시간 동안 배양한 후, CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation assay(Promega, Wisconsin, USA)를 수행하였다.
- [0078] MTS reagent (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)를 최종 0.5 mg/ml 농도로 처리하여 37℃에서 4시간 추가 배양한 후 생성된 formazan의 양을 microplate reader (Beckman coulter, California, USA)를 이용하여 515 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 대조군의 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.
- [0079] 4) 인슐린 분비능 측정
- [0080] HIT-T15 세포를 96 well plate에 1×10⁵/well가 되도록 분주하여 각 well 당 10 mM alloxan과 시료를 농도 별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 μg/ml)로 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 RPMI-1640 배지에 시료를 농도 별로 처리하여 23시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 cell culture supernatant를 수거하여 Rat/Mouse Insulin kit(millipore, MA, USA)를 사용하여 측정하였다.
- [0081] 5) 동물 채혈 및 조직 분석 시료의 채취
- [0082] 실험물질 투여군은 각 군 5마리씩으로 5그룹으로 나누었으며, 정상군, 음성 대조군, 양성 대조군, 실시예 2의 갈색거저리 유충 시료(TM) 저농도군, 실시예 2의 갈색거저리 유충 시료(TM) 고농도군으로 나누어 당뇨 대조군에는 생리식염수 10 mL/kg, 누에 대조군은 3000 mg/kg의 용량으로 갈색거저리 실험군에는 300, 3000 mg/kg 용량으로 5주 동안 24시간마다 경구투여 하였다.

- [0083] 매 주 한번 혈당을 측정하였고 최종경구투여 후 24시간 경과시 에테르(ether)로 마취시키고 복부 정중선을 절개하여 췌장을 적출한 후 레퍼런스 바이오랩에 조직염색을 의뢰하여 insulin staining을 통해 조직을 관찰하였고, 심장에서 채혈하여 혈액을 모아 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 취하여 분석용 시료로 사용하였다. 원심 분리한 혈장은 분석할 때까지 -70℃에서 급속 냉동시켜 보관하였다.
- [0084] FFA, 간수치를 확인하기 위해 혈장을 녹십자에 분석 의뢰하였고 혈장에서 인슐린수치를 측정하였다.
- [0085] 6) Real-time PCR 분석
- [0086] 항당뇨 효능을 분석하기 위해 인슐린 경로(insulin pathway)와 관련 유전자인 insulin receptor(IR), insulin receptor substrate-1(IRS-1), phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K), Glucose transporter type 4(GLUT4)의 발현양을 Real-time PCR을 통해 확인 하였다.
- [0087] Alloxan을 처리한 세포에 갈색거저리 유충 추출물을 처리하여 24시간 배양한 후 세포의 배지를 제거하고 Trizol reagent를 처리한 후 cell scraper를 이용해 세포를 수집하였다.
- [0088] 수집된 세포에 클로로포름(chloroform)을 넣고 12,000 g에서 15분 동안 원심 분리하여 회수한 상층액에 이소프로판올(isopropanol)을 넣어서 RNA를 추출하고 추출된 total RNA량을 측정한 후 2 µg/ml로 농도를 정량하여 cDNA를 합성 하였다.
- [0089] 합성한 cDNA와 Power SYBR Green Mixture와 제작한 primer를 혼합한 후 real-time PCR기기(AB, Milton Keynes, UK)를 통해 insulin signaling pathway 발현수준을 조사 하였다. 사용된 primer의 염기서열은 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

Name	Sequence	
GAPDH	Forward	5'-GCCTCACCCATTGATGTT-3
	Reverse	5'-GGGAAGCCCATCACCATCT-3'
Insulin receptor	Forward	5'-GAGAGGATGTGAGACGACGG-3'
	Reverse	5'-GTATAGCCAGACGGGCACTC-3'
IRS-1	Forward	5'-AATGTGTGGCTGAGACCTGG-3'
	Reverse	5'-CTGTTGTGAGAGGGGCAGT-3'
PI3K	Forward	5'-CAGTTTGCCCTCCTGATGT-3'
	Reverse	5'-GGGCTCTGTAGTCTTGGGC-3'
Gult4	Forward	5'-CTTGGCTCCCTCAGTTGG-3'
	Reverse	5'-CTACCCAGCCACGTTGCATT-3'

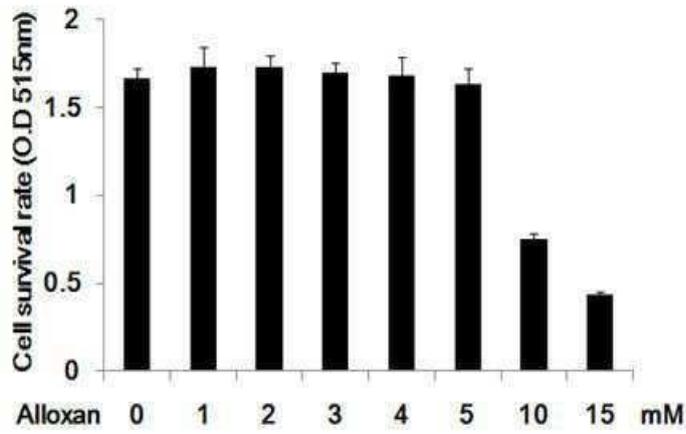
- [0091] 7) Western blot 분석
- [0092] Glucose 유입과 관련이 있는 GLUT4의 발현을 확실히 확인하기 위해서 Western blot을 수행하였다. Alloxan을 처리한 췌장 세포에 갈색거저리 유충 추출물을 처리하여 24시간 배양한 후 세포의 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회 세척 후 cell scraper (SPL Life Science, Korea)로 모은 다음 Cytobuster™ Protein Extraction Reagent (Novagen, ND, USA)를 이용하여 세포를 분쇄한 후, 12000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 회수하였다.
- [0093] 회수한 상층액은 Bio Rad Protein Assay (Bio Rad, CA, USA)로 농도를 측정하고 10 µg/ml의 농도로 맞춘 후 10% SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동 후 PVDF membrane (GE Healthcare, NJ, USA)에 transfer하고, Blotting Grade Blocker (Bio Rad, CA, USA)를 TBST에 녹여 5%의 농도로 만든 다음 이를 이용하여 PVDF membrane을 1시간 동안 상온에서 blocking시켰다.
- [0094] 1차 항체 GLUT4 (calbiochem, CA, USA)는 1:100으로, tubulin (Sigma, MO, USA)은 1:10000의 비율로 희석하여 상온에서 밤새 반응시킨 후 다음날 TBST로 15분씩 4번 세척하였다. 2차 항체 HRP-conjugated secondary antibody (Promega, WI, USA)는 1:3000의 비율로 40분 동안 상온에서 반응 시킨 후 다시 TBST로 15분씩 4번 세척하였다. Western LightningPlus ECL (Perkin Elmer, MA, USA)을 PVDF membrane에 처리 후 암실에서 X-ray 필름(Fujifilm, Japan)으로 감광시켜 GLUT4의 단백질 발현을 확인하였다.

- [0095] 2. 실험결과
- [0096] 1) 췌장세포에 대한 독성 평가
- [0097] 췌장세포(HIT-T15 cell)에 누에 추출물(BME) 및 뽕잎 추출물(이하, 'MAE'이라 함)을 각각 0, 10, 100, 500, 800, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고 24, 48, 72시간 경과 후 세포생존을 확인하였다.
- [0098] 그 결과 도 1에 나타나 있듯이, BME의 경우 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 다소 독성이 있었고, MAE는 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 독성이 있었다.
- [0099] 정상 HIT-T15 cell에서의 TME의 세포독성을 측정하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주한 췌장세포에 TME를 농도별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 24, 48, 72시간 경과에 따른 세포생존률 확인 결과, 최고 농도인 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 96시간 처리시에도 독성이 전혀 없었으므로 TME의 췌장세포에 대한 독성은 없음을 확인할 수 있었다.
- [0100] 2) Alloxan에 의해 손상된 췌장세포에 대한 TME의 항산화 활성
- [0101] HIT-T15 cell에 alloxan으로 당뇨를 유발하기 위해 alloxan 처리 후 세포 반수치사농도를 측정하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주된 췌장세포에 alloxan을 농도별(0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 mM)로 1시간 처리하고 배지 교체 후 23시간 동안 배양한 다음 MTS assay 수행한 결과, 도 2A 내지 도 2C에 나타나 있듯이 10 mM의 농도에서 약 50%의 세포독성을 확인하였고, 추후 췌장세포를 이용한 실험에 10 mM alloxan을 사용하였다.
- [0102] Alloxan 처리에 의해 손상된 HIT-T15 cell에 대한 TME의 항산화 효능을 확인하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주된 췌장세포에 alloxan 1시간 처리 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 배지에 TME를 농도별(500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 24시간 경과시 NO, GST를 측정한 결과, 도 3A 내지 3B에 나타나 있듯이 NO의 경우 TME 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시 약 20%정도 감소함을 확인하였고 GST 활성은 TME 처리시 유의적으로 GST활성이 증가함을 확인하였다.
- [0103] 3) Alloxan에 의해 손상된 췌장세포에 대한 TME의 glucose 감소 및 insulin 분비능 증가
- [0104] Alloxan 처리에 의해 생존률, glucose의 세포내 유입 등이 손상된 HIT-T15 cell에 대한 TME의 효능을 확인하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주된 췌장세포에 alloxan 1시간 처리 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 배지에 TME를 농도별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 24, 48, 72시간 경과시 세포생존률 확인 결과, 도 4A 내지 4C에 나타나 있듯이 alloxan만 처리한 경우에 비해 TME 처리 농도에 의존적으로 세포생존률이 증가되었고 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시 거의 정상과 유사한 수준으로 회복되었으며, glucose 양도 alloxan 처리시 보다 TME 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 후 72시간 경과시 24% 감소하여 거의 정상 수준이었으며, insulin도 alloxan 처리 후 처리 농도 의존적으로 생성량이 증가되어 alloxan 처리 후 동시간대 대비 약 10% 정도 증가되었다.
- [0105] 4) 당뇨유발 동물모델에서 TM 처리에 따른 조직학적 개선 효과
- [0106] Alloxan 처리에 의해 당뇨가 유발된 동물모델에 대한 TM의 효능을 확인하기 위하여 Alloxan으로 당뇨를 유발시킨 동물모델에 TME를 5주간 3000 mg/kg 농도로 경구투여하여 신장의 무게, 췌장 조직을 분석한 결과 소변 기능의 문제가 있는 것으로 보여 신장의 무게(A)를 분석한 결과 도 5A 내지 도 5C에 나타나 있듯이, 신장이 정상군에 비해 커졌으나 TM에서 무게가 감소하지 않았고 췌장조직에 경우 인슐린에 대한 면역조직화학적염색에서 Control개체를 제외하고 췌장섬의 심한 위축이 확인되었다.
- [0107] 위축된 췌장섬은 인슐린 분비세포의 심한 감소를 나타내었다. 췌장섬을 구성하고있는 세포들 중 인슐린 양성세포의 수를 count하여 그 비율을 나타내었다.
- [0108] Control개체에서 인슐린 양성세포의 비율이 100%로 하였을 때 Diabetes, BM, TM개체에서 각각 평균 12.4%, 16.8%, 27.5%를 나타내어 TM에서 다소 개선된 것으로 보인다.

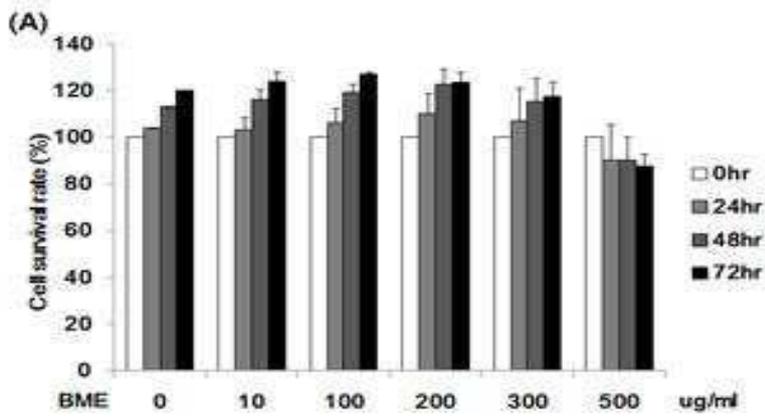
- [0109] 5) 당뇨유발 동물모델에서 TM 처리에 따른 혈액학적 개선 효과
- [0110] Alloxan 처리에 의해 당뇨가 유발된 동물모델에 대한 TM의 효능을 확인하기 위하여 Alloxan으로 당뇨를 유발시킨 동물모델에 TM을 5주간 3000 mg/kg 농도로 경구투여하여 혈액을 분석한 결과 도 6A 내지 6E에 나타나 있듯이, 당뇨군이 정상군에 비해 혈당이 크게 증가하였으나 TM을 처리한 군은 당뇨군에 비해 약 40% 정도 감소되었다.
- [0111] 또한 혈액에서 insulin을 확인한 결과 insulin 분비는 정상군에 비해 당뇨군이 크게 감소하였고, 당뇨군에 비해 누에는 차이가 없으나 TM의 경우 약 26%정도 증가하였다.
- [0112] 인슐린 저항성과 관련이 있는 FFA(B)의 경우 당뇨가 유발이 되면 FFA가 증가하나 누에와 갈색거저리를 경구투여한 경우 FFA가 누에는 20%정도 갈색거저리는 32%정도 감소하였다.
- [0113] 간은 당분을 저장하는 곳으로서 우리 몸에 에너지가 필요할 때에 당분을 방출하는 곳이다. 당뇨병으로 당대사가 이상이 생기면 간이 영향을 받아 지방이 축적되면 비대해지면서 지방간이 된다. 이를 확인하기 위해 본 간수치의 경우 ALT(C), AST(D) 둘 다 정상군에 비해 당뇨군에서 약 50% 크게 증가하였으나 ALT만 누에군과 갈색거저리군에서 감소하였고 AST는 갈색거저리군에서만 감소하는 것을 확인할수 있었다.
- [0114] 6) TME 처리 후 insulin pathway 관련 유전자 발현 증가
- [0115] Alloxan을 처리한 HIT-T15 cell에 TME를 24시간 처리하여 Insulin signaling pathway에 관여하는 인자인 IR과 IRS-1, PI3K, GLUT4의 발현 정도를 실시간(real-time) PCR을 통해 확인해 본 결과, 도 7A 내지 7D에 나타나 있듯이 Insulin signaling pathway에 관여하는 인자인 IR과 IRS-1, PI3K, GLUT4의 발현양이 당뇨유발세포에 비해 크게 증가하여 세포 내 인슐린 저항성이 감소하고 glucose의 세포내 유입 등이 개선됨을 확인할 수 있었다.
- [0116] 7) TME의 GLUT4 단백질 발현 증가
- [0117] 세포 내 glucose의 유입과 관련있는 GLUT4의 단백질 발현을 확인하기 위해 췌장세포에 alloxan 1시간 처리 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 배지에 TME를 농도별(500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 24시간 경과 시 GLUT4의 단백질 발현양을 western blot 분석을 통해 확인한 결과, 도 8에 나타나 있듯이 TME 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 증가하는 것을 확인하였다.
- [0118] 이상 상기와 같이, 본 발명을 통해 TME에 대한 췌장베타세포의 세포보호, 손상 억제 및 인슐린 분비능을 검증함으로써 alloxan에 의해 발생된 산화적 스트레스로부터 췌장베타세포를 보호하여 당뇨병 조절에 도움이 되는 기능성 식품 소재 개발을 위한 가능성을 알아보며, 항당뇨 효능을 입증하여 당뇨병에 식약용으로 사용되어 곤충농가 및 산업체 소득 증대를 기대할 수 있음을 알 수 있다.
- [0119] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

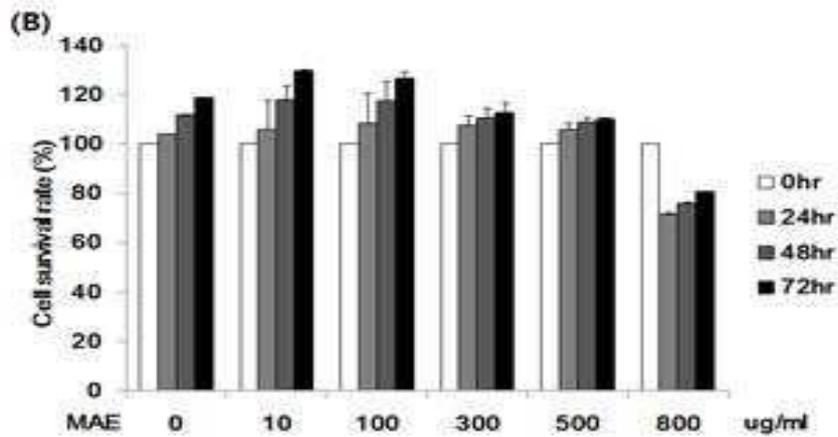
도면1



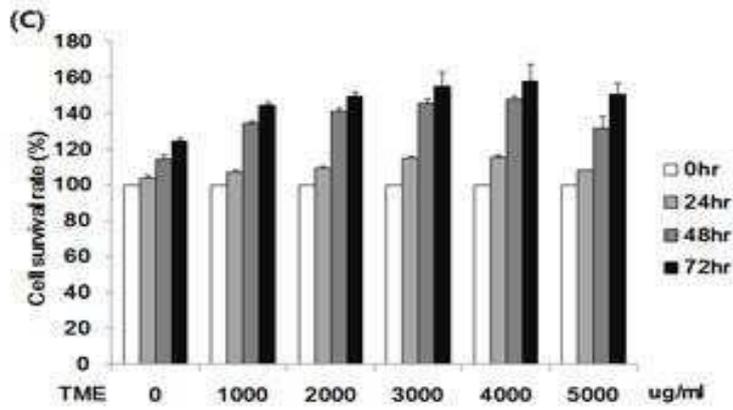
도면2a



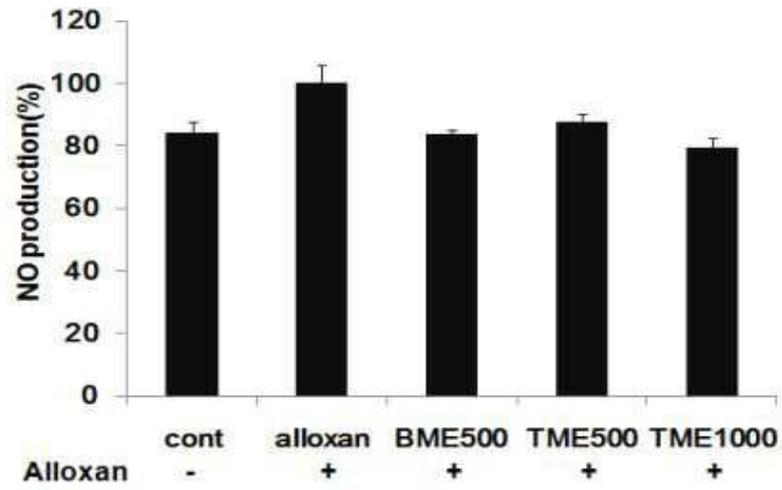
도면2b



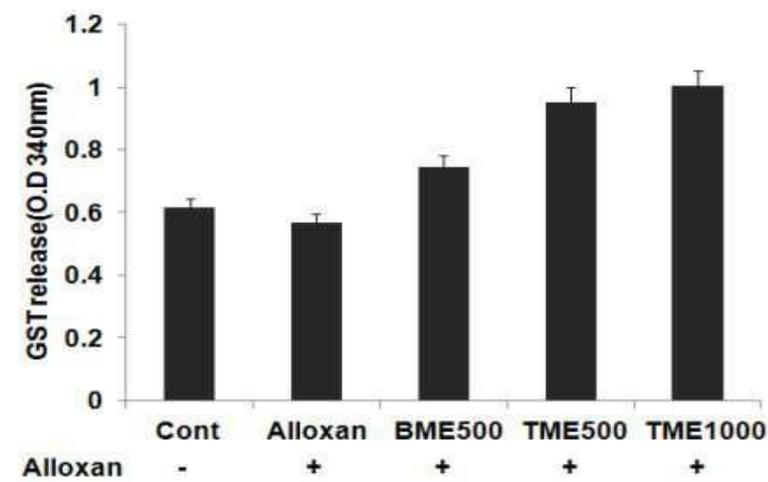
도면2c



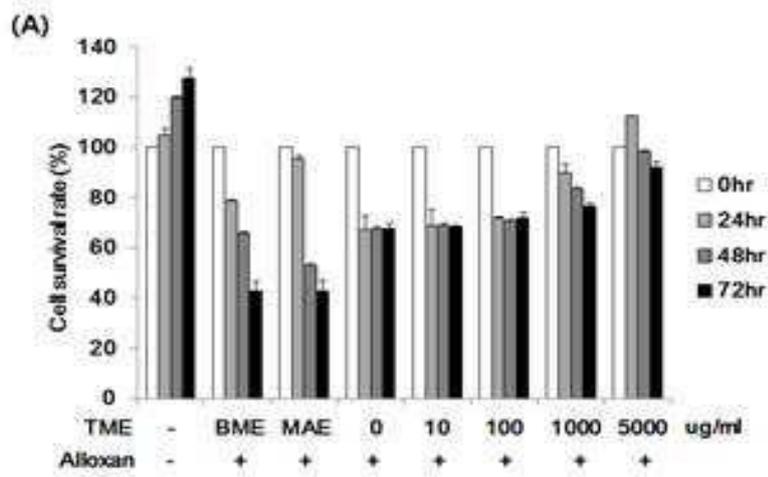
도면3a



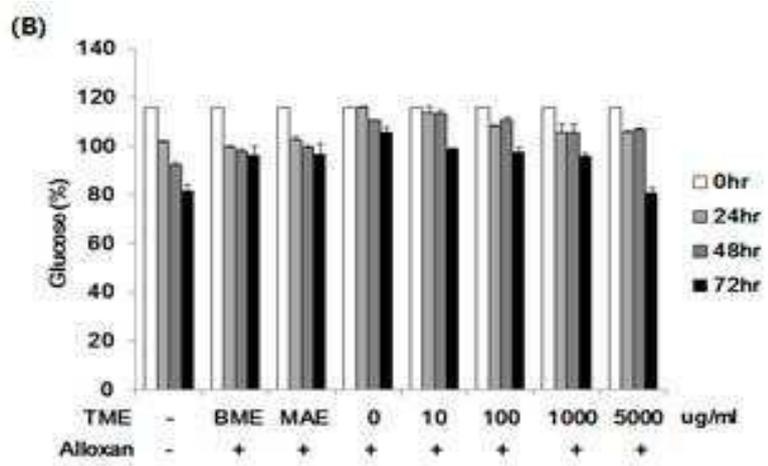
도면3b



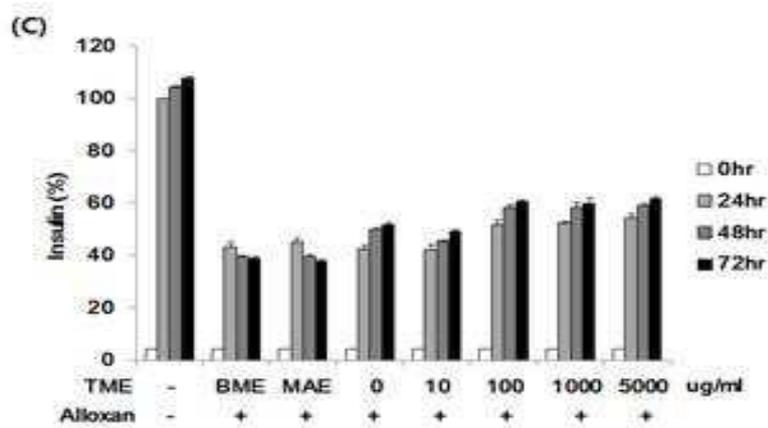
도면4a



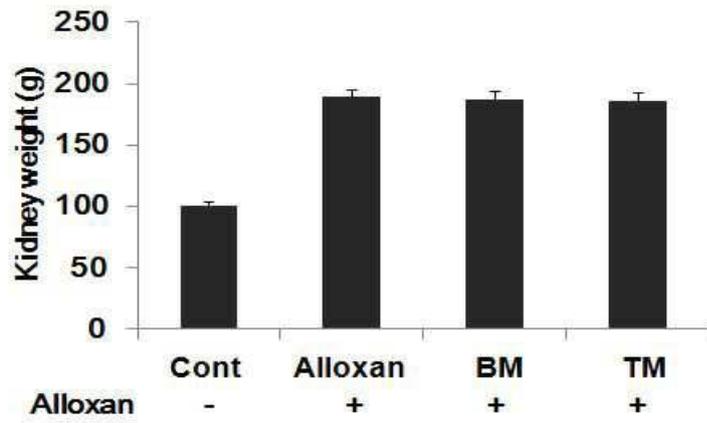
도면4b



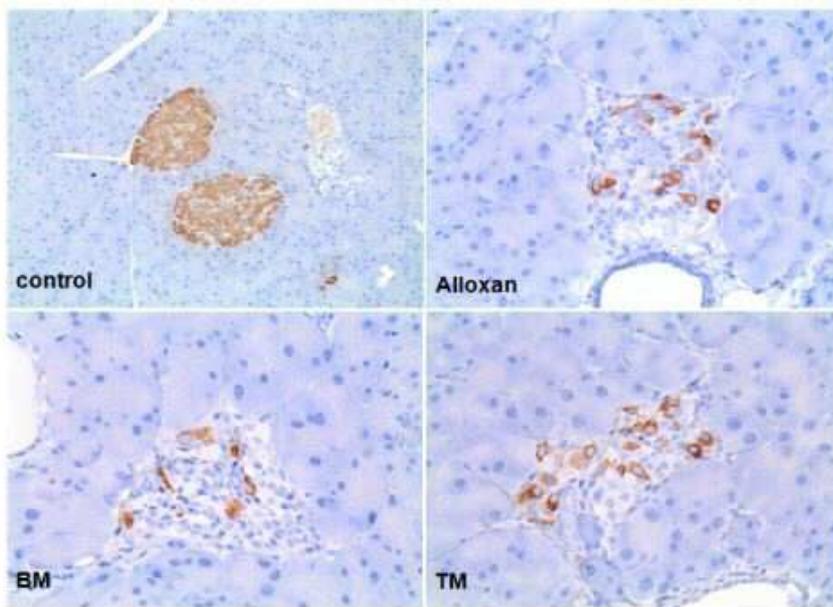
도면4c



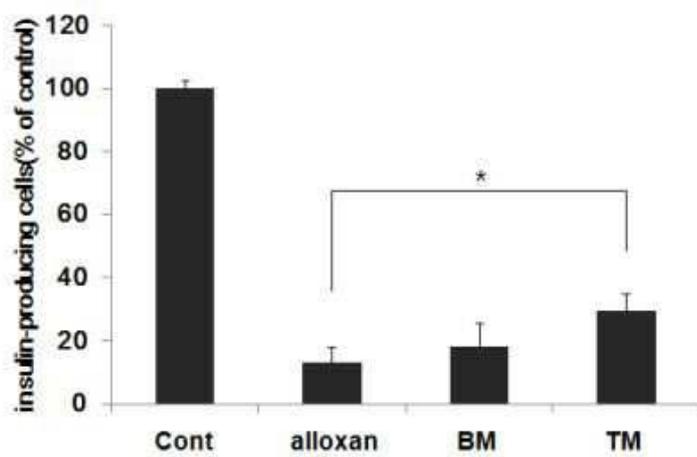
도면5a



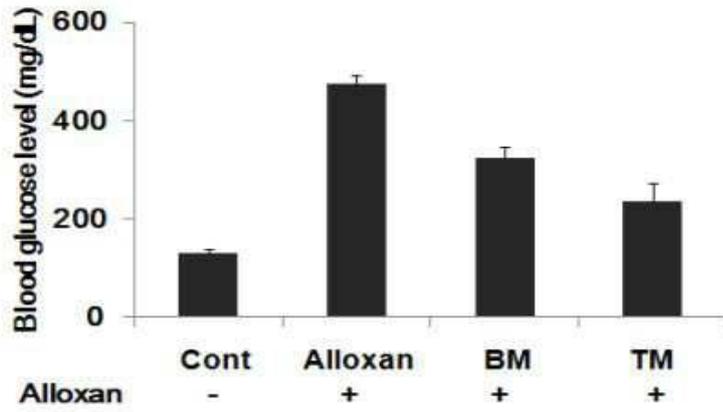
도면5b



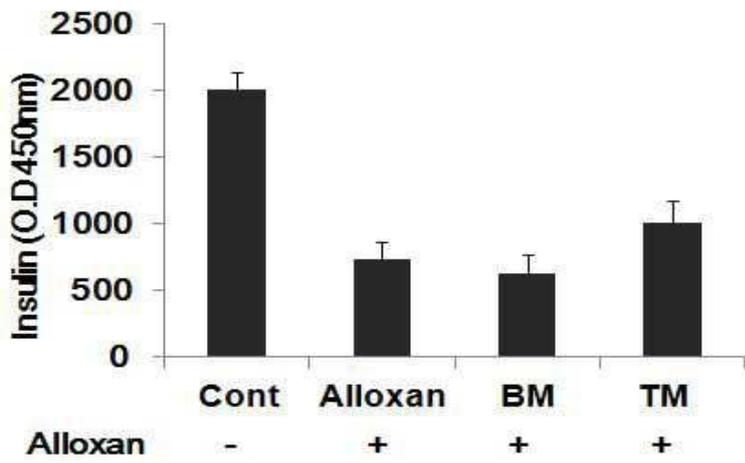
도면5c



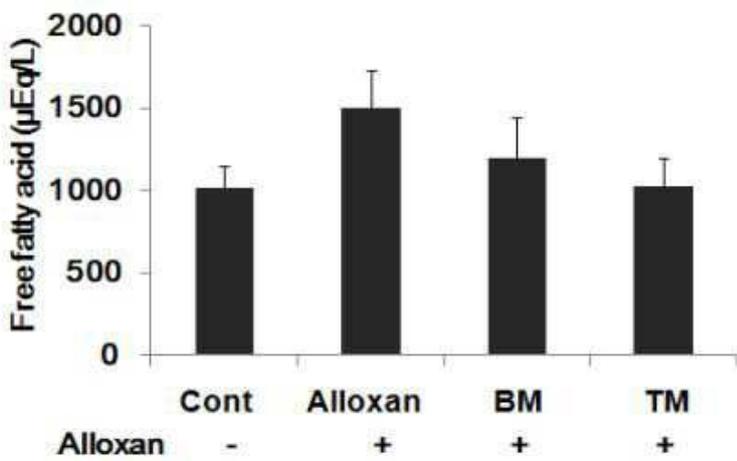
도면6a



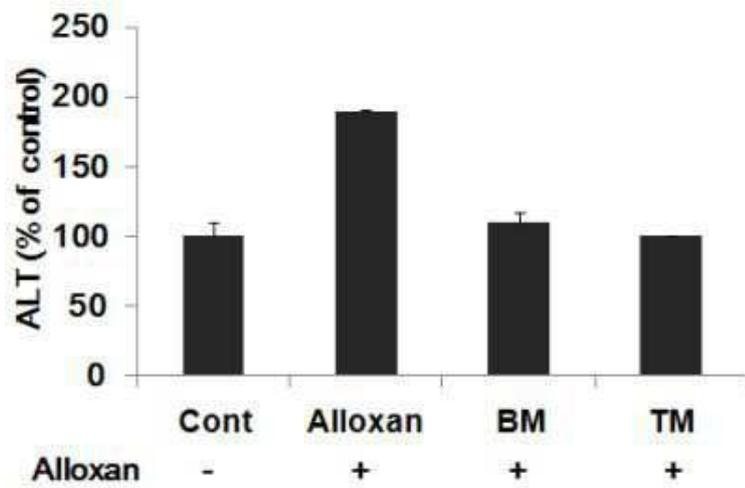
도면6b



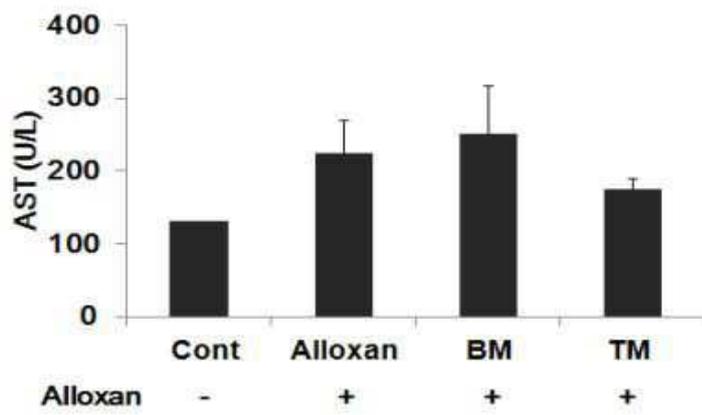
도면6c



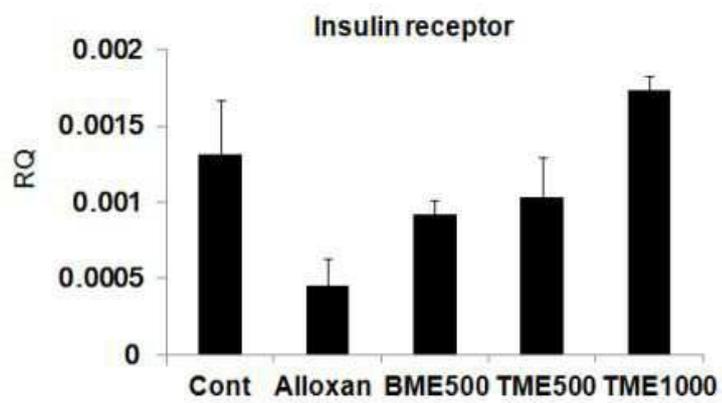
도면6d



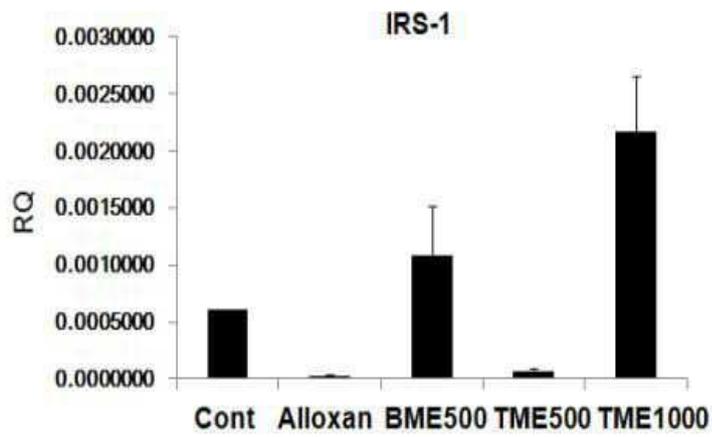
도면6e



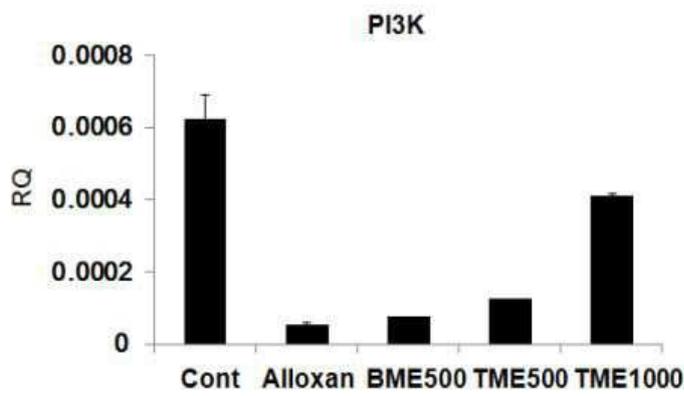
도면7a



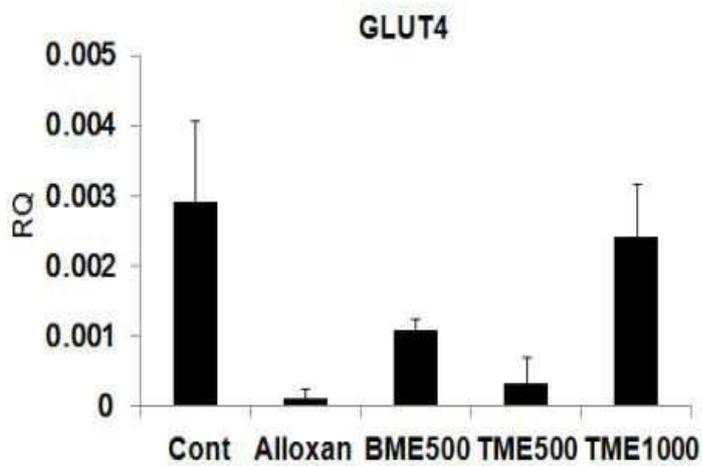
도면7b



도면7c



도면7d



도면8

