

발간등록번호

11-1541000-000772-01

**저분자 가공기술을 이용한 해조류 유래 기능성 항 당뇨
식품의 실용화 기술 개발**

**(Utility technical development of algae origin ability anti-diabetes
food that take advantage of small molecule processing technology)**

(주)서진바이오텍

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “저분자 가공기술을 이용한 해조류 유래 기능성 항 당뇨 식품의 실용화 기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 11 월 30 일

주관연구기관명 : (주)서진바이오텍

주관연구책임자 : 김 학 주

세부연구책임자 : 이 철 원

연 구 원 : 이 강 덕

연 구 원 : 변 연 주

연 구 원 : 관 령

위탁연구기관명 : 부산대학교

위탁연구책임자 : 한 지 숙

요 약 문

I. 제 목 : 저분자 가공기술을 이용한 해조류 유래 기능성 항 당뇨 식품의 실용화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 2005년 국민건강·영양조사(만성질병 편)에서 우리나라 국민의 38.0%가 만성질환에 시달리고 있으며, 그 중 두 번째로 높은 비중을 차지하는 것이 당뇨병임.
- 현재 우리나라의 당뇨병 환자는 전체 인구의 약 9%인 450만 명으로, 최근 20년간 당뇨병 환자의 인구는 500% 정도 증가되어 당뇨병 치료 및 예방에 대한 연구가 시급한 실정임.
- 웰빙 시대에 현대인들의 당뇨병 등과 같은 건강 문제는 새로운 고부가가치의 기능성 식품에 대한 요구를 증대시키고 있으며, 이에 건강 기능성 식품의 시장 규모는 해를 거듭 할수록 확대되고 있음.
- 당뇨병 환자들에서 혈당과 혈청지질 농도의 조절을 도와주고 미량 영양소까지도 공급하며 복용하기 쉬운 건강 보충 식품의 개발이 시급함.
- 농수산 식품의 FTA 협상 요구에 따라 국내 자연산 해조류의 기능성 검증을 통하여 우수종의 경우 종 보존기술과 양식기술을 개발하여, 침체된 수산양식 산업의 활력을 불어넣고 고부가가치 산업으로 발전시켜나가야 함.

1. 국내·외 관련기술의 현황

(1) 국내

- 국내에서 시판되는 당뇨병 치료제에는 외국에서 특허가 만료되는 제네릭 제품을 주로 카피하여 국내에 보급하는 정도의 지극히 소극적으로 당뇨병 치료제를 생산하는데 그치고 있는 실정임.
- 국내 신약으로는 보건복지부가 지원하고 종근당이 개발 중인 국내 최초의 당뇨병치료제이며 '글리타존계' 당뇨병 치료제 약물인 신약 'CKD-501'이 있음. 현재 1상 임상진행 중에 있으며, 전임상 연구결과 세포 핵 내에서 당과 지질의 대사에 관여하는 유전자의 발현을 증가하여 수용체를 활성화시키는 작용이 뛰어나 기존 제품보다 3배 이상 강력한 혈당강하작용을 나타는

것으로 알려져 있다.

○ 삼천당제약에서 당뇨병치료제를 개발하여 SCD-DKY(동용강당령)의 상품명으로 시판중이다.

○ 농촌진흥청 난지농업연구소에서는 양파에 함유되어 있는 프로스타글라딘이 인체의 혈압강하와 당뇨병 치료효과에 탁월하며 몸속에 있는 젖산과 콜레스테롤을 녹여주는 효과가 있음을 발표하였다.

(2) 국외

○ 치열한 시장 속에서 많은 제약사들이 지속적인 신약개발에 엄청난 연구개발 자금을 쏟아붓고 있어 향후 효과 좋은 새로운 제품들이 등장할 것으로 전망됨.

○ 외국 제약사들은 인슐린 흡입형 또는 약물의 장기적 효과지속형 약물 개발에 심혈을 기울여 'GLP-1작용제', 'DPPIV억제제', '듀얼 PPAR 길항제' 등의 계열 약물을 준비 중에 있으며, 인슐린 수용체에 직접 작용해 인슐린 신호전달을 활성화 시키는 물질, 글루코키나아제의 활성을 촉진시킬 수 있는 물질, 지방산 산화 억제제 등의 혈당강하제들을 개발 중임.

○ 이 중에서 조만간 출시가 예상되는 신약으로는 릴리와 아마린의 주사제 'Exenatide', 화이자, 아벤티스, 넥타르사의 인슐린 흡입형 치료제 'Exubera', 아스트라 제네카의 혈당강하제 'Galida' 등이 있다.

○ 옥수수 잎으로부터 항 당뇨 건강소재 개발

○ 글락소 스미스클라인 제약회사(미국)에서 인슐린 민감제(insulin sensitizer)로 아반디아를 개발하여 시판중이다.

○ 다케다 제약회사(일본)에서 악토스를 판매중임 체중증가와 부종 같은 부작용을 일으킬 수 있다.

○ 미국 메타볼렉스(Metabolex) 제약회사가 제2형(성인) 당뇨병 치료제인 메타글리다센(meta-glidasen)을 개발하여 2상 임상시험단계에 있다.

2. 연구목적

해조류로부터 항 당뇨 물질을 탐색하여 각종 기능성을 평가하고, 가장활성이 우수한 해조류에 대해서 가공 및 분리공정기술을 확보한 후 임상시험을 통하여 기능성 식품소재 및 제품화 기술을 개발 한다

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

<p>1차년도</p>	<p>1. 목표</p> <p>해조류유래 항당뇨 및 고농도 포도당으로 유도된 산화스트레스를 개선할 수 있는 기능성 식품소재의 개발</p> <p>2. 세부개발내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 저분자 가공기술을 이용한 해조류의 가공기법의 개발 - 항 당뇨 후보물질의 추출 - 후보 물질들에 대한 물리화학적 특성 검토 - 후보물질들에 대한 각종 기능성 검토(항균,항염증,항비만,항산화,미백 등) - 항 당뇨 물질의 분리정제 - 탐색된 물질의 항 당뇨 활성 및 radical소거 능 검색 - STZ 유도 당뇨 쥐의 혈당강하효과 - 췌장 β-cell line을 이용한 인슐린 분비능 및 항 당뇨 효과 - 고농도 포도당으로 유도된 당뇨병 세포모델에서의 산화스트레스 개선효과
<p>2차년도</p>	<p>1. 목표</p> <p>대량생산공정 개발을 통한 제품화 연구 및 기능성 식품 안전성 검증</p> <p>2. 세부개발내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 정제된 물질의 구조분석 - 원료 가공 및 분리정제 생산기술에 대한 생산수율검증과 경제성 검토 - 응용제품의 개발(기능성 식품 및 화장품) - 대량생산공정 설계 및 개발 - 기능성 항당뇨 식품의 안전성 검증 - 임상시험(Randomized placebo-controlled trial) 연구 설계 - 제 2형 당뇨병 환자의 혈당 및 인슐린 저항성 개선효과 - 제 2형 당뇨병 환자의 혈청지질 및 항산화 체계 개선효과 - 제 2형 당뇨병 환자의 식후 혈당조절 개선효과

IV. 연구개발결과

<1 차년도>

연구내용	연구결과
- 저분자 가공기술을 이용한 해조류의 가공기법의 개발	-수집한 유용 수산자원의 편밀 및 에어밀 이용 30 μ m 크기의 초미세 분말로 가공
- 항 당뇨 후보물질의 추출	-기능성의 평가 후 당, 단백질, 지질분해효소를 이용 가수분해하여 저분자 가공기술을 개발
- 항 당뇨 후보물질의 추출	-동결 건조 및 미세화 공정을 거친 갈조류 종을 유기용매 추출, 원심분리후 상층액을 감압 여과하여 항당뇨 후보물질을 추출.
- 후보 물질들에 대한 물리화학적 특성 검토	-6종의 해조류로부터 추출한 후보물질에 대하여 α -amylase 및 glucosidase에 대한 저해실험을 통하여 항당뇨 활성 확인함.
- 후보 물질들에 대한 각종 기능성 검토(항균, 항염증, 항비만, 항산화, 미백 등)	-6종의 후보물질 중 <i>Ishige okamurae</i> 가 가장 높은 저해활성을 나타내어 잠재적인 항당뇨 후보 물질로 선정.
- 후보물질들에 대한 각종 기능성 검토(항균, 항염증, 항비만, 항산화, 미백 등)	-항균활성 : 0.5mM이상에서 항균활성
- 후보물질들에 대한 각종 기능성 검토(항균, 항염증, 항비만, 항산화, 미백 등)	-항당뇨: 활성의 지표인 α -glucosidase 저해 활성의 농도 의존적으로 증가, α -amylase의 경우 0.08 mg/ml로서 acarbose보다 높은 저해율 확인.
- 후보물질들에 대한 각종 기능성 검토(항균, 항염증, 항비만, 항산화, 미백 등)	-항산화: 간과 적혈구 대사와 관련 효소의 활성도를 대조군과 비교한 결과 유의적으로 증가
- 후보물질들에 대한 각종 기능성 검토(항균, 항염증, 항비만, 항산화, 미백 등)	-항염증: iNOS 및 COX-2의 억제효과로 산화적 스트레스관련 항염증 억제효과 확인.
- 항 당뇨 물질의 분리정제	-항당뇨 유용물질의 유기용매 및 고성능 액체크로마토그래피법을 이용하여 물질을 분리정제함
- 항 당뇨 후보 해조류의 대량생산기법에 관한 연구	국립수산과학원 전략양식소와 대상 해조류 폐에 대한 미팅을 하였으며, 양식관련 기술과 기능성 검토에 관한 공동연구방안을 모색함.

연구내용	연구결과
<ul style="list-style-type: none"> - 탐색된 물질의 항 당뇨 활성 및 radical 소거능 검색 - STZ 유도 당뇨 쥐의 혈당강하효과 - 췌장 β-cell line을 이용한 인슐린 분비능 및 항 당뇨 효과 - 고농도 포도당으로 유도된 당뇨병 세포모델에서의 산화스트레스 개선효과 	<ul style="list-style-type: none"> - 다식, 다갈 증상을 약물처리군과 유사 수준으로 개선, 약물군의 부작용인 체중증가는 나타나지 않음 - 주별 공복 혈당 저하로 인한 혈당개선 효과 - HbA1c가 당뇨대조군의 13.37%보다 유의적으로 낮아 당뇨의 개선에 효과 - GK, G6Pase, PEPCK 활성도 유의적 결과 도출 - 조직중의 TC, TG, FFA 농도를 대조군 및 약물군과 비교 결과, 효과적으로 작용. - 세포내 ROS 생성율은 DPHC 농도 의존적 감소 - HUVECs 실험에서 지질과산화물 생성저해 및 산화 스트레스 감소 확인. - NO level의 감소로 radical 소거효과와 지질 과산화 억제를 통한 산화 스트레스의 개선으로 여러 기능 장애의 해결 및 예방 가능. - 식후혈당의 유의적 감소 - 약물군 대비 낮은 수준의 혈당 유지. - 30mM의 고농도로 처리의 경우 인슐린 분비의 현저한 감소 - DPHC를 처리한 세포가 고농도 포도당만으로 처리 대조군보다 유의적 증가. - 세포의 생존률은 70% 및 81.4%로 재생 - 산화 스트레스로 유도되는 지질 과산화물인 MDA는 0.519 nmol로 대조구에 비해 크게 감소 - 항산화효소(SOD, GSH-px, CAT)의 활성에서 대조군 대비 유의적으로 증가 - 제2형 당뇨 동물을 이용한 항산화 개선효과를 간 및 적혈구 대사 관련 효소의 활성도를 통해 비교한 결과 약물대조군과 비교하여 유의적 증가 - 지질 과산화물 생성에서 유의적 차이 - AST, ALT 및 γ-GTP 모두 대조군대비 유의성 확인 - 혈장 creatine 농도의 대조군대비 유의적 차이 확인

<2 차년도>

연구내용	연구결과
- 정제된 물질의 구조분석	-적외선 스펙트럼, ¹ H, ¹³ C-NMR을 이용 구조 분석 결과, diphloretrohydroxycarmalol임을 확인.
- 원료 가공 및 분리정제 생산기술에 대한 생산수율검증과 경제성 검토	-패 추출물 제조원가의 경우 일일 2톤 처리 시 수율 15%(w/w)이며, 하루에 300kg의 패 추출물을 생산할 경우 kg당 단가는 114,058원으로 확인되었으며, 1g당 114원으로 30일에 3,420원의 원료원가가 발생됨. 따라서 기초 제형비, 포장비, 기타 첨가물 비용 등을 합해도 월 10,000원 이하의 제조원가가 형성되어 경제성이 있는 것으로 판단됨
- 응용제품의 개발(기능성 식품 및 화장품)	-임상실험용 캡슐제형 개발함 -패추출물과 청국장분말을 이용한 항당뇨 식품인 해당환 처방 및 시제품 개발함 -패 추출물 2% 함유 아토피 보습 크림 제형 및 시제품 개발함 -패 추출물 2% 함유 여드름 치료용 세럼 제형 및 시제품 개발함
- 대량생산공정 설계 및 개발	-2톤 처리 생산 공정 설계도 완성 -2톤 처리 생산설비 제작비용 산정하여 경제성 검토시 그 비용을 포함하여 제조원가 산정함 (114,058원/kg).
- 기능성 항당뇨 식품의 안전성 검증	-제2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mic를 이용한 간 및 신장기능에 관해 연구한 결과 혈장의 ALT 값은 약물군과 패군 간에는 유의적 차이가 없었음. -AST 값은 패군은 약물대조군과 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮았으며, 당뇨대조군과 약물군 사이의 유의적 차이는 없었음 γ-GTP는 당뇨대조군에 비해 약물군과 실험군은 유의적 차이를 보였으나, 두 군간에는 차이가 없었음.

연구내용	연구결과
<p>- 임상시험(Randomized placebo-controlled trial) 연구 설계</p> <p>- 제 2형 당뇨병 환자의 혈당 및 인슐린 저항성 개선효과</p> <p>- 제 2형 당뇨병 환자의 혈청지질 및 항산화 체계 개선효과</p>	<p>-Creatinine 배설량을 측정한 결과 당뇨 대조군이 가장 높게 나타나 당뇨병으로 인한 신기능이 장애를 받았으며, 패 군과 약물군은 유의적으로 낮은 수치를 나타내어 신기능 장애에 효과가 있다고 사료됨.</p> <p>-임상실험을 통하여 간기능 안전성과 신장기능 안전성을 연구한 결과 패 추출물의 장기간 섭취가 간기능 검사에서는 인체에 독성작용을 나타내지 않는 것으로 확인됨.</p> <p>-IRB 임상실험을 근거로 임상실험에 필요한 모든 임상 실험 설계를 완성한 후 임상실험을 실시함.</p> <p>-HOMA_{IR}은 패 추출물군의 경우 2.77±0.49 mmol/L에서 2.19±0.62 mmol/L로 큰 감소를 나타내었으며 위약군에서도 2.14±0.37 mmol/L에서 2.00±0.42 mmol/L로 약간 감소하는 것으로 나타나 인슐린 저항성을 개선할 수 있을 것으로 판단됨.</p> <p>-패 추출물군에서 C-reactive protein(CRP)는 실험 전 0.12±0.06 mg/dl에서 실험 후 0.11±0.03 mg/dl로 약간 감소하고, 위약군의 경우는 실험 전 0.14±0.07 mg/dl에서 실험 후 0.15±0.09 mg/dl로 약간 증가하였으며, 정상범위의 농도에서 염증성 반응의 한 지표인 CRP 감소에 영향을 미치는 것으로 판단됨.</p> <p>- 혈장과 적혈구 TBARS 함량 변화를 보면 IOE군은 각각 4.45±1.19 nmol/MDA, 5.72±1.28 nmol/MDA로 지질과산화물 함량이 감소한 반면, 위약군은 5.44±1.92 nmol/MDA, 6.03±1.28 nmol/MDA로 증가. 즉 위약군은 지질과산화가 더 진행된 반면 IOE군은 지질과산화가 위약군에 비해 억제되었음을 알 수 있음.</p>

연구내용	연구결과
<p>- 제 2형 당뇨병 환자의 식후 혈당조절 개선효과</p>	<p>-CAT와 GSH-px 활성, GSH의 경우 위약군에는 감소하거나 소량 증가한 반면, 패 섭취군에서는 증가하는 것으로 나타났음. 특히, GSH-px 활성 증가는 췌장베타세포의 인슐린 분비 반응 촉진에도 기여할 것으로 사료됨.</p> <p>-SOD 활성은 위약군에서는 감소한 반면 패 섭취군에서는 7.66±0.11 unit/mg protein에서 8.16±1.12 unit/mg protein으로 증가함. 패 추출물 섭취는 SOD 활성을 증가시켜 당뇨병 유발 및 진전을 완화할 수 있을 것으로 기대됨.</p> <p>- 이당류인 maltose에 대한 패 추출물의 α-glucosidase에 대한 억제활성을 알아보기 위해 제 2형 당뇨병 환자를 대상으로 oral maltose tolerance test를 실시한 결과 maltose loading 전에 패 추출물을 섭취한 경우가 maltose만 loading 했을 경우보다 혈당 조절이 효과적으로 이루어짐. 특히 30분 혈당은 control에 비해 260.40±46.24 mg/dl로 급격히 상승하였으나, 패 추출물군은 235.10±37.35 mg/dl로 control에 비해 유의적 (p<0.05)으로 낮은 혈당을 나타냄.</p> <p>-소장 내 α-glucosidase에 의한 탄수화물의 흡수는 대개 소장상부에서 신속하게 이루어지게 되어 급격한 식후혈당 상승을 초래함. 따라서 패 추출물의 섭취는 소장내의 α-glucosidase 활성을 억제시킴으로써 혈당 상승 억제 효과를 나타내는 것으로 생각됨.</p>

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 기술적인 측면

○ 본 과제를 통해 확보된 항 당뇨병물질의 명확한 작용기전을 연구함으로써 원료의약품으로서 사용가능성을 타진하고, 후속 임상연구를 통하여 당뇨병 치료와 관련된 천연물 신약으로 판매한다.

○ 본 연구과제 결과로 확보된 원료가공기술 및 분리정제 기술에 관해서는 특허기술을 확보하고, post-genome 시대 선진국에 의해 독점되고 있는 신의약 개발의 국제 경쟁력을 확보하여 기술 예측화를 방지하고 관련 생명 공학 기술력을 향상시키며 독창적인 신의약 개발 기술을 국내에 정착시켜 선진국과 기술 격차를 축소하고 모방 지향적인 국내 의약산업 및 관련 분야를 독창성과 경쟁력을 지닌 고유한 우리 기술 충족으로 세계를 겨냥한 의약품 개발을 앞당길 것으로 예상된다.

○ 기술을 이용하여 개발된 원료는 기능성식품소재로서 식약청의 허가를 득한 후 기능성 식품으로 가공하여 판매한다.

○ 당뇨병 치료 효과외의 기능을 확인함으로써 항비만, 기능성 화장품 소재로서 활용한다.

2. 경제적 · 산업적 측면

○ 본 연구를 통하여 얻어진 신기술의 노하우 축적을 통해 광범위하게 사용되는 의약품 원료의 원활한 공급, 절대 수입에 의존하는 원천물질의 수입대체 효과로 인한 외화절약 및 이의 특허출원(등록)에 의한 외화획득 등의 막대한 경제, 산업적 효과뿐만 아니라 기대하게 이를 통해 500억 원 이상의 수입대체효과와 500억 원 이상의 수출 증대효과가 기대된다.

○ 추가로 국내 수산생물자원을 원료공급원으로서 항 당뇨병효능이 있는 해조류를 양식함으로써 어민들의 수입 증대 및 수출을 통한 국가경쟁력 확보도 예상된다.

○ PPAR- γ 를 활성화시키는 것으로 알려진 글리타존계 당뇨병 치료제의 전 세계 매출액은 약 32억불(Rosiglitazone:15억불, Pioglitazone:17억불)에 이르고 있으며 매년 50% 이상의 높은 성장률을 보이고 있다. 그러나 글리타존류의 인슐린 치료제는 심장과 신장에 부작용을 초래하는 것으로 알려져 있어 대체의약품의 개발이 요구된다. 따라서 신규 PPAR- γ agonist의 개발은 국민의 건강 증진에 기여 뿐 아니라 수입 대체 효과도 크게 작용할 것이다.

○ 천연물을 대상으로 O-GlcNAc 변형 조절물질의 탐색계 확립으로 천연물로부터 고 부가가치성 선도물질의 탐색을 가능하게 하여 천연물의 자원화를 가능하게 한다. 새로운 접근법에 기초한 항당뇨 소재와 같은 신약개발로 관련 생물산업의 활성화와 외화절감 내지 획득 가능성이 있다.

SUMMARY

Anti-diabetic among them activity selected excellent species 6 kind of algae (*Ishige okamurae*, *Sargarssum coreanum*, *Sargarssum fulvellum*, *Sargarssum thunbergii*, *Dictyota dichotoma*, *Myelophycus simplex*) to α - amylase and α - glucosidase inhibition activity. Confirmed enzyme inhibition activity of about 80% from the result *Ishige okamurae* to α - amylase about 50%, α - glucosidase. *Ishige okamurae* extract result concentration that analyze α -glucosidase inhibition activity by 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration after freezing dry while enzyme inhibition activity increased dependently ($P < 0.05$). Experiment group *Ishige okamurae* extract and contrast group acarbose appeared same enzyme inhibition activity of 60% from 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration, and *Ishige okamurae* extract confirmed 60.16% in the case of α -amylase inhibition activity, Acarbose confirmed enzyme inhibition activity of 53%. After meal, as result that measure using mice that does blood sugar letdown effect by STZ and leads to glycosuria, was expose by $35,346 \pm 686.1 \text{ mg}\cdot\text{mins}/\text{dL}$ that feed group $35,049 \pm 927.6 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$, group $41,670 \pm 444.6 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$ that feed distilled water, acarbose that feed *Ishige okamurae* extract. As a result, could confirm that *Ishige okamurae* extract is meal blood sugar letdown effect. Confirmed *Ishige okamurae* extract's cytoprotective effect for cell damage by high concentration glucose (30 mM) by cell viability. The result *Ishige okamurae* extract 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ INS-1 pancreatic β cell's the cell refreshing rate was 60.57%, and when handled *Ishige okamurae* extract 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in HUVECs, the cell refreshing rate was confirmed by 98.8% ($p < 0.05$).

In INS-1 pancreatic β cell when guided Lipid hydroperoxide value measurement handled *Ishige okamurae* extract 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by high concentration glucose(30mM) guided MDA is 0.187 nmoles by, compare to control group MDA concentration 0.364 nmoles and lipid hydroperoxide measurement creation decreased greatly. In cell that the induced ROS (Reactive oxygen species) creation rate handles together *Ishige okamurae* extract compared to cell that treat high concentration glucose by high concentration glucose concentration dependently decrease. Especially, *Ishige okamurae* extract while does the ROS creation rate by 167.35% and decreased much than control group (215.81%) when handled 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05$). HUVECs' the ROS creation rate does *Ishige okamurae* extract by 137.11% when handled 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and decreased much than control group (313.9%). The induced NO (Nitric oxide) creation rate is 167.57% when handle *Ishige okamurae* extract 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in INS-1 cell by high concentration glucose, decreased much compared to control group (216.22%), and the NO creation rate decreased a little compared to control group (168.5%) to 125.4% when handle *Ishige okamurae* extract 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in HUVECs. SOD, is antioxidase, superoxide enzyme that is converted by hydrogen peroxide and oxygen be. When handled *Ishige okamurae* extract 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to HUVECs that process by high concentration glucose (30 mM), displayed SOD vitality (81.6%)

similar to contrast group cellular SOD vitality (100%) that process by 5.5 mM glucoses. It is enzyme that need glutathione by temper that Glutathione peroxidase (GSH-Px). When handled each free medical care by concentration to HUVECs that process by high concentration glucose (30 mM) concentration GSH-px vitality that is high dependently appear. When based contrast group GSH-px activity (100%) that process by 5.5 mM glucoses, GSH-px vitality of *Ishige okamurae* extract 500 μ g/ml displayed the almost similar level with control group by 83.1% to HUVECs that process by high concentration glucose (30 mM). Catalase, is antioxidase, is enzyme that protect cell from oxidant stress by changing hydrogen peroxide that is hazardous substance that is produced by SOD's action to water and oxygen. When handle *Ishige okamurae* extract 50 μ g/ml in HUVECs that process by high concentration glucose (30 mM) activity of 58.6% appears and could confirm that oxidant stress improves. Confirmed by diphlorethohydroxycarmalol(DPHC) according to structure analysis sequence of anti-diabetic active materials purification from *Ishige okamurae* extract.

Antibacterial activity about *Staphylococcus aureus* KCTC 3831, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2513, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Escherichia coli* KCTC 2517 was confirmed according to antibacterial experiment result that use 0.5 mM DPHC. α -glucosidase inhibition activity experiment result, confirmed inhibition activity of 90.97% from DPHC 500 μ g/ml, and α -amylase inhibition activity appeared by 61.66%. DPHC's IC50 about α -glucosidase appeared higher inhibition activity than acarbose by 0.08 mg/mL, IC50 about α -amylase 0.27mg/mL. Was found thing which meal blood sugar letdown effect is much more excellent compared to group (8,700 \pm 118.4 mg \cdot mins/dl) that group that feed DPHC in blood sugar letdown effect in STZ induction diabetic mouse feeds 4,222 \pm 122.3mg \cdot min/dl, distilled water and group (5,875 \pm 212.1 mg \cdot mins/dl) that feed acarbose. Lipid hydroperoxide measurement decreased much compared to control group 0.942 nmole to 0.519 nmoles when MDA concentration handled DPHC 50 μ g/ml in RIN-m5F cells. As result that handle DPHC in HUVECs that process by high concentration glucose (30mM), result such as RIN- m 5 F cells appeared. The induced ROS (Reactive oxygen species) creation rate decreased much than control group (160.0%) to 80.6% when handled DPHC 50 μ g/ml by high concentration(30mM) glucose, and HUVECs' the ROS creation rate decreased very much than control group (275.3%) to 148.8%. As result that compare DPHC treated before and after NO(Nitric oxide) yield to RIN-m5F cells that it is processed that high concentration glucose (30mM), appeared by treated before 217.3%, after 128.2%. To DPHC teated before 337%, after 110.6% in HUVECs NO secretion yield decreased greatly(p<0.05). SOD activity was treated before DPHC 54.09 unit/mg, after 56.71 unit/mg in RIN- m 5 F cells, and for GSH-px vitality, treated before 2.73 unit/mg, after 3.41 unit/mg, catalase activity appeared by before 1.063 μ mole/mg, after 1.084 μ mole/mg. Result that confirm DPHC's apoptosis protection effect by immunocytochemistry method to RIN-m5F cells in diabetes cell model, DPHC was found that check

cellular apoptosis. Result that confirm NF- κ B secretion yield in HUVECs that high concentration glucose is processed, it was 184.6%, and DPHC when handled 25, 50 μ g/ml by each 131.8%, 113.4% decrease.

Measured anti-diabetic effect using diabetic type 2 animal C 57 BLs/KsJ- db/db miced. According to diet intake analysis result, a week Av. intake of *Ishige okamurae* extract group and drug group (Rosiglitazonegroup) was 25~27 g, and control group ate 31 g. Day, according to water intake analysis result, for *Ishige okamurae* extract group, Av. 18.3ml, control group 26ml, drug group (Rosiglitazone) 10ml. Therefore, was found that thirst symptoms improve much in occasion of experimental group. As result that analyze weight change by a week, while weight of *Ishige okamurae* extract group and control group increases slowly, drug group increased rapidly until 3 weeks. Absurd weight gain of drug group is analyzed by thiozolidinedione (TZD) order's drugs side effect. For plasma glucose concentration results of measurements, control group, for 642.9mg/dl, *Ishige okamurae* extract group, 575mg/dl, drug group (Rosiglitazonegroup) by 376.9mg/dl, confirmed that decrease than control group. Confirmed that activity of drug group and *Ishige okamurae* extract group appeared high than Glucokinase(GK) activity analysis result, control group, and G 6 Pase activities decrease in drug group and *Ishige okamurae* extract group than control group. PEPCK activity controls group was high vitality than drug group(Rosiglitazonegroup), and *Ishige okamurae* extract group appeared lower activity than drug group. Result that measure glycogen content in control group and rosiglitazone group, *Ishige okamurae* extract group's liver tissue, control group 166(mg/g liver), drug group is 177(mg/g liver) , *Ishige okamurae* extract group was measured by 191(mg/g liver). Result *Ishige okamurae* extract group that analyze plasma TC, TG, FFA, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol concentration using control group and *Ishige okamurae* extract group, drug group confirmed that decrease liver tissue's lipid store by improving party metabolism effectively. Result that measure SOD, computer aided testing activity in liver tissue and erythrocyte, *Ishige okamurae* extract group heightens enzyme activity related to antioxidation metabolism and improved glycosuria mouse's antioxidation system in liver tissue. Result that measure ROS in db/db mouse liver tissue, *Ishige okamurae* extract group 20%, drug group and control group were created each 52%, 58%. It is 28% of control group 53%, drug group 30%, *Ishige okamurae* extract group ROS concentration of erythrocyte control group 53%, drug group 30%, *Ishige okamurae* extract group, experimental group created the lowest ROS. ALT value of plasma, AST value, γ -GTP, result that analyze creatinine concentration, *Ishige okamurae* extract group were found that effect is in liver and kidney functional disease.

Through clinical demonstration, result that analyze effect that *Ishige okamurae* extract's intake gets in blood sugar of type 2 diabetics and insulin resistance, *Ishige okamurae* extract in case of eat long term in blood pressure control help, and HDL-cholesterol was found that help in serum lipid

improvement because increase. And was found that affect to hyperinsulinemia improvement by insulin resistance, CRP decrease, lipid hydroperoxide inhibition, SOD activity increase, pancreatic beta cell's insulin secretion reaction promotion, and it was no human body toxicity in liver and kidney functional testing. Therefore, is expected to is thought that *Ishige okamurae* extract's intake displays blood sugar rise inhibition effect by controlling small intestine's α -glucosidase activity, and *Ishige okamurae* extract can help in diabetes prevention and therapy. *Ishige okamurae* extract was found that effect is to whitening, wrinkles improvement, inflammation easing as well as glycosuria.

CONTENTS

Chapter 1. Abstract of research and development subject	32
Paragraph 1. Necessity of research and development.....	32
Paragraph 2. Objective of research and development.....	33
Chapter 2. Domestic and foreign technical development present condition	34
Paragraph 1. Domestic technical development present condition.....	34
Paragraph 2. Foreign technical development present condition.....	35
Chapter 3. Research and development contents and result	36
Paragraph 1. Study Contents	36
1. Sample collection.....	36
2. Process of manufacture of <i>Ishige okamurae</i> extract	37
3. Low molecule processing of sample.....	37
4. Anti-diabetic for <i>Ishige okamurae</i> extract and oxidative stress activity analysis.....	37
A. Sample preparation.....	37
B. Biochemical analysis.....	37
(1) Lowry's method	37
(2) DNS method	37
C. Anti-diabetic activity.....	38
(1) α -glucosidase inhibition activity.....	38
(2) α -amylase inhibition activity.....	38
(3) After meal, blood sugar letdown effect measurement.....	38
D. Oxidant stress improvement effect measurement that use diabetes cell model.....	39
(1) Cell culture and processing	39
(2) Cell viability	39
(3) Lipid hydroperoxide measurement.....	40
(4) Intracellular ROS level measurement	40
(5) NO level measurement.....	41
(6) Antioxidase activity measurement	41
E. Statistical analysis	41
5. Diphlorethohydroxycarmalol's separation and purification.....	41
6. Biological activity analysis.....	42
A. Anti-inflammatory.....	42
B. Anti-oxidation activity.....	42
C. Anti-bacteria activity.....	42

D. Anti-fungal activity	43
E. Tyrosinase activity	43
F. Cell toxicity	43
G. NO level	44
H. Collagenase inhibition activity	44
I. Anti-obesity activity	44
7. Purification of anti-diabetic material	44
8. Algae mass production method study	45
9. Anti-diabetic activity and Blood sugar letdown effect analysis	45
A. Material and reagent	45
B. Purification of DPHC	45
C. Anti-diabetic activity and after meal, blood sugar letdown effect measurement	46
(1) Anti-diabetic activity	46
1) α -glucosidase inhibition activity	46
2) α -amylase inhibition activity	46
(2) After meal, blood sugar letdown effect measurement	46
1) Experimental animal and breeding	46
2) Diabetic induction of experimental animal	47
3) STZ induction diabetic mouse's blood sugar letdown effect measurement	47
10. Oxidant stress improvement effect measurement that use diabetes cell model	47
A. Cell culture and processing	47
B. Cell viability	48
C. Lipid hydroperoxide measurement	48
D. Intracellular ROS level measurement	48
E. NO level measurement	49
F. Antioxidase activity measurement	49
G. Statistical analysis	49
11. Apoptosis protection effect measurement of diabetes cell model	50
A. Immunocytochemistry	50
B. Western blot analysis	50
C. Insulin secretion activity measurement	50
12. Anti-diabetic effect measurement of diabetic type 2 animal C 57 BL/KsJ- db/db mice	51
A. Experimental animal and experiment design	51
B. Effect of weight change by diet intake, diet efficiency, a week	52
C. Effect of empty stomach blood sugar concentration change by a week	52

D. Effect to HbA _{1c} concentration	52
E. Plasma glucose concentration measurement	52
F. Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT measurement	53
G. Plasma insulin concentration measurement	53
H. Effect getting in glycometabolism enzyme activity of liver tissue	53
(1) Glucokinase(GK) activity	53
(2) Glucose-6-Phosphatase(G6Pase) activity	53
(3) Phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK) activity	53
I. Effect of liver tissue glycogen content	54
13. Lipid metabolism improvement effect measurement of diabetic type 2 animal C 57 BL/KsJ-db/db miced	54
A. Effect of plasma lipid concentration	54
(1) In plasma total cholesterol concentration measurement	54
(2) In plasma neutral lipid concentration measurement	54
(3) In plasma free fatty acid concentration measurement	54
(4) In plasma HDL-cholesterol concentration measurement	54
(5) In plasma LDL-cholesterol concentration measurement	54
B. Effect getting to liver tissue's lipid concentration	54
14. Antioxidation improvement effect measurement about diabetic type 2 animal C 57 BL/KsJ-db/db miced	55
A. Effect getting to liver tissue's antioxidation metabolic connection enzyme activity	55
(1) Liver tissue's superoxide dismutase (SOD) activity measurement	55
(2) Liver tissue's Catalase (CAT) activity measurement	55
(3) Liver tissue's Glutathione Peroxidase (GSH-Px) activity measurement	55
B. Effect getting to erythrocyte antioxidation metabolic connection enzyme activity	55
(1) Superoxide dismutase (SOD) activity measurement	55
(2) Catalase (CAT)activity measurement	55
(3) Glutathione Peroxidase (GSH-Px) activity measurement	56
C. Effect getting to liver-erythrocyte lipid hyperoxidation concentration	56
(1) Liver tissue's lipid hyperoxidation concentration measurement	56
(2) Lipid hyperoxidation concentration measurement of erythrocyte	56
D. Effect getting to liver-erythrocyte Glutathione concentration	56
(1) Liver tissue's Glutathione concentration measurement	56
(2) Glutathione content measurement of erythrocyte	56
E. Effect getting to liver-erythrocyte ROS concentration	57

(1) Liver tissue's ROS measurement	57
(2) ROS measurement of erythrocyte	57
15. Liver and kidney function measurement of diabetic type 2 animal C 57 BL/KsJ-db/db miced	57
A. AST, ALT, γ -GTP	57
B. Creatinine	57
C. BUN	57
16. Clinical demonstration	57
A. Intake of <i>Ishige okamurae</i> extract effect about blood sugar of Type 2 diabetics and insulin resistance	58
(1) Study design	58
(2) Study target and material	58
(3) Method of study	60
B. <i>Ishige okamurae</i> extract effect about meal blood sugar control	64
(1) Study design	64
(2) Study target and period	64
(3) Method of study	64
17. Production yield rate and economic efficiency examination	65
18. Development of application product	65
19. Mass production process design and development	65
Paragraph 2. Result of study	66
1. Anti-diabetic candidate material search	66
2. Anti-diabetic activity for <i>Ishige okamurae</i> extract and oxidative stress activity analysis	66
A. Anti-diabetic activity and meal blood sugar letdown effect	66
(1) Carbohydrate digestive enzyme inhibition activity	66
(2) After meal, blood sugar letdown effect	69
B. Oxidant stress improvement effect measurement that use diabetes cell model	72
(1) Cell viability	72
(2) Lipid hydroperoxide measurement	73
(3) Intracellular ROS level measurement	74
(4) NO level measurement	76
(5) Antioxidase activity measurement	78
3. Purification and structure analysis	80
4. Diphlorethohydroxycarmalol's antibacterial and antifungal effect separating from <i>Ishige okamurae</i>	81

5. Diphlorethohydroxycarmalol's anti-diabetic and physiology activity analysis separating from <i>Ishige okamurae</i>	81
5-1. Anti-diabetic activity and meal blood sugar letdown effect.....	81
A. Carbohydrate digestive enzyme inhibition activity.....	81
B. After meal, blood sugar letdown effect.....	87
5-2. Oxidant stress improvement effect measurement that use diabetes cell model.....	89
A. Cell viability.....	89
B. Lipid hydroperoxide measurement.....	91
C. Intracellular ROS level measurement.....	92
D. NO level measurement.....	94
E. Antioxidase activity measurement.....	95
(1) Superoxide dismutase (SOD) activity.....	95
(2) Glutathione peroxidase (GSH-px) activity.....	96
(3) Catalase (CAT) activity.....	97
6. Apoptosis protection effect measurement of diabetes cell model.....	98
A. Immunocytochemistry	98
B. Western blot analysis.....	100
(1) NF- κ B	100
(2) iNOS과 COX-2.....	101
C. Insulin secretion activity measurement.....	103
7. Anti-diabetic effect measurement of diabetic type 2 animal C 57 BL/KsJ- db/db miced.....	104
A. Effect of weight change by diet intake, diet efficiency, a week.....	104
B. Effect of empty stomach blood sugar concentration change by a week.....	107
C. Effect to HbA 1 c concentration.....	107
D. Plasma glucose concentration measurement.....	108
E. Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT measurement.....	109
F. Plasma insulin concentration measurement.....	110
G. Effect getting in glycometabolism enzyme activity of liver tissue.....	111
(1) Glucokinase(GK) activity	111
(2) Glucose-6-Phosphatase(G6Pase) activity	112
(3) Phosphenolpyruvate carboxykinase(PEPCK) activity	113
H. Effect of liver tissue glycogen content	114
8. Lipid metabolism improvement effect measurement of diabetic type 2 animal C 57 BL/KsJ- db/db miced.....	115
A. Effect of plasma lipid concentration.....	115

B. Effect getting to liver tissue's lipid concentration·····	116
9. Antioxidation improvement effect measurement about diabetic type 2 animal C 57 BL/KsJ-db/db miced·····	117
A. Effect getting to liver tissue's antioxidation metabolic connection enzyme activity·····	117
B. Effect getting to erythrocyte antioxidation metabolic connection enzyme activity·····	117
C. Effect getting to liver-erythrocyte lipid hyperoxidation concentration·····	119
D. Effect getting to liver-erythrocyte Glutathione concentration·····	120
E. Effect getting to liver-erythrocyte ROS concentration·····	121
10. Liver and kidney function measurement of diabetic type 2 animal C 57 BL/KsJ-db/db miced·····	122
A. AST, ALT, γ -GTP·····	122
B. Creatinine·····	123
C. BUN·····	124
11. Clinical demonstration·····	125
A. Intake of <i>Ishige okamurae</i> extract effect about blood sugar of Type 2 diabetics and insulin resistance·····	125
(1) <i>Ishige okamurae</i> taking medicine match, comparison verification of experimental group and control group·····	125
(2) <i>Ishige okamurae</i> extract intake effect·····	132
B. <i>Ishige okamurae</i> extract effect about meal blood sugar control·····	144
(1) Intake of <i>Ishige okamurae</i> extract effect about blood sugar of Type 2 diabetics·····	144
12. Production yield rate and economic efficiency examination·····	148
A. Manufacturing process·····	148
B. Production yield rate·····	149
C. Manufacturing process plan (10ton)·····	150
D. Production equipment unit cost·····	151
E. Manufacturing cost·····	160
F. Economic analysis·····	161
13. Development of application product·····	162
A. Possibility par for cosmetics raw material·····	162
(1) Tyrosinase activity·····	162
(2) Anti-inflammatory·····	162
(3) Anti-oxidation activity·····	164
(4) Collagenase inhibition activity·····	167
B. Atopy and cosmetics development for pimple treatment·····	168

(1) Development of atopy cosmetics.....	168
(2) Development of pimple cosmetics.....	170
C. Anti-diabetic food development.....	172
(1) Anti-diabetic capsule manufacture to use in clinical demonstration.....	172
(2) Anti-diabetic pill manufacture.....	172
Chapter 4. Target achievement contribution about related field.....	174
1. Research and development target and achievement.....	174
A. Proper year, research and development target.....	174
(1) Final aim.....	174
(2) Proper year, target.....	174
B. Research and development target and achievement.....	174
2. Industrial life cycle , expected position (Selection between A-E) and the basis of an application technology or product.....	175
3. Development technology tendency.....	175
Chapter 5. Research and development result and practical use plan.....	177
1. Production special quality of a development technology.....	177
2. Existing resource practical use.....	177
3. The product competitiveness level of final product	177
4. Study result practical use plan.....	179
Chapter 6. Foreign S & TI collecting in research and development process.....	183
Chapter 7. Reference.....	187

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	32
제 1 절 연구개발의 필요성	32
1. 나날이 성장하는 당뇨병 치료시장	32
가. 고령화와 비만이 당뇨병 확산 원인	32
2. 전 세계 연간 230달러의 시장, 향후 10년 동안 50% 성장 전망	32
제 2 절 연구개발의 목적	33
제 2 장 국내외 기술개발 현황	34
제 1 절 국내 기술개발 현황	34
제 2 절 국외 기술개발 현황	35
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	36
제 1 절 연구내용	36
1. 시료수집	36
2. 패 추출물의 조제	37
3. 시료의 저분자 가공	37
4. 패 추출물에 대한 항 당뇨 및 산화적 스트레스 활성분석	37
가. 시료준비	37
나. 생화학적 특성 검토	37
(1) 단백질 정량 (Lowry's method)	37
(2) 당 정량 (DNS method)	37
다. 항 당뇨 활성측정	38
(1) α -glucosidase 저해활성	38
(2) α -amylase 저해활성	38
(3) 식후혈당 강하효과 측정	38
(가) 실험동물 및 사육	38
(나) 실험동물의 당뇨 유발	38
(다) STZ 유발 당뇨 쥐에 있어서 혈당 강하 효과 측정	39
라. 당뇨병 세포모형을 이용한 산화스트레스 개선효과 측정	39
(1) 세포 배양과 처리	39
(2) 세포 생존율 측정	39
(3) 지질 과산화물 측정	40
(4) Intracellular ROS level 측정	40
(5) NO level 측정	41
(6) 항산화효소 활성 측정	41

마. 통계 분석	41
5. 패에서 diphlorethohydroxycarmalol의 분리 및 정제	41
6. 생리활성 측정 및 기능성 검증	42
가. 항염증	42
나. 항산화 활성	42
다. 항균활성측정	42
라. 항곰팡이 활성 (Antifungal activity)의 측정	43
마. 미백활성	43
바. 세포독성	43
사. NO생성량 측정	44
아. Collagenase 저해 활성 측정	44
자. 항비만 측정	44
7. 항 당뇨 물질의 분리 정제	44
8. 항 당뇨 대상 해조류의 대량생산 기법 연구	45
9. 항 당뇨 활성 및 혈당강하 효과 측정	45
가. 재료 및 시약	45
나. 패로부터 DPHC 분리	45
다. 항 당뇨 활성 및 식후 혈당강하 효과 측정	46
(1) 항 당뇨 활성	46
(가) α -glucosidase 저해활성	46
(나) α -amylase 저해활성	46
(2) 식후혈당 강하효과 측정	46
(가) 실험동물 및 사육	46
(나) 실험동물의 당뇨 유발	47
(다) STZ 유발 당뇨 쥐에 있어서 혈당 강하 효과 측정	47
10. 당뇨병 세포모델을 이용한 산화스트레스 개선효과 측정	47
가. 세포 배양과 처리	47
나. 세포 생존율 측정	48
다. 지질 과산화물 측정	48
라. Intracellular ROS level 측정	48
마. NO level 측정	49
바. 항산화효소 활성 측정	49
사. 통계분석	49
11. 당뇨병 세포모델의 apoptosis보호 효과 측정	50
가. Immunocytochemistry	50

나. Western blot 분석	50
다. 인슐린 분비능 측정	50
12. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 항당뇨 효과 측정	51
가. 실험동물 및 실험 디자인	51
나. 식이섭취량, 식이효율, 주별 체중변화에 미치는 영향	52
다. 주별 공복혈당 농도변화에 미치는 영향	52
라. HbA1c 농도에 미치는 영향	52
마. 혈장 글루코스 농도 측정	52
바. 내당능 (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) 측정	53
사. 혈장 인슐린 농도 측정	53
아. 간조직의 당대사 효소활성에 미치는 영향	53
(1) Glucokinase(GK) 활성도	53
(2) Glucose-6-Phosphatase(G6Pase) 활성도	53
(3) Phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK) 활성도	53
자. 간 조직 글리코겐 함량에 미치는 영향	54
13. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 지질대사 개선 효과 측정.....	54
가. 혈장 지질농도에 미치는 영향	54
(1) 혈장 총 콜레스테롤 농도 측정	54
(2) 혈장 중성지질 농도 측정	54
(3) 혈장 유리지방산 농도 측정	54
(4) 혈장 HDL-콜레스테롤 농도 측정	54
(5) 혈장 LDL-콜레스테롤 농도 계산	54
나. 간조직의 지질농도에 미치는 영향	54
14. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 항산화 개선 효과 측정	55
가. 간조직 항산화 대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향	55
(1) 간조직의 Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정	55
(2) 간조직의 Catalase (CAT) 활성도 측정	55
(3) 간조직의 Glutathione Peroxidase (GSH-Px) 활성도 측정	55
나. 적혈구 항산화 대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향	55
(1) 적혈구의 Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정	55
(2) 적혈구의 Catalase (CAT) 활성도 측정	55
(3) 적혈구의 Glutathione Peroxidase (GSH-Px) 활성도 측정	56
다. 간·적혈구 지질과산화물 농도에 미치는 영향	56
(1) 간조직의 지질과산화물 농도 측정	56
(2) 적혈구의 지질과산화물 농도 측정	56

라. 간 · 적혈구 Glutathione 농도에 미치는 영향	56
(1) 간조직의 Glutathione 함량 측정	56
(2) 적혈구의 Glutathione 함량 측정	56
마. 간 · 적혈구 ROS 농도에 미치는 영향	57
(1) 간조직의 ROS 측정	57
(2) 적혈구의 ROS 측정	57
15. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 간 및 신장기능 측정.....	57
가. AST, ALT, γ -GTP	57
나. Creatinine.....	57
다. BUN	57
16. 임상실험	57
가. 패 추출물의 섭취가 제2형 당뇨병환자의 혈당 및 인슐린 저항성에 미치는 영향 ..	58
(1) 연구 설계	58
(2) 연구 대상 및 재료	58
(가) 연구대상 및 기간	58
(나) 실험재료	59
(다) 연구진행 절차	59
① 연구절차	59
② 패 추출물의 섭취방법	60
(3) 연구방법	60
(가) 일반 사항 및 임상적 특성	61
(나) 신체계측 및 혈압 측정.....	61
(다) 식이섭취 조사	61
(라) 혈당 및 당화혈색소 측정	61
(마) 혈청지질농도 측정	61
(바) 인슐린 분비능 측정	62
(사) 인슐린 저항성 측정	62
(아) C-reactive protein 측정	62
(자) 지질과산화물 함량 측정	62
(차) 항산화 효소 활성도 측정	62
① Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정	62
② Catalase (CAT) 활성도 측정	62
③ Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성도 측정	63
(카) Glutathione (GSH) 함량 측정	63
(타) 간기능 검사	63

(파) 신장기능 검사	63
(4) 통계분석	63
나. 패 추출물이 식후 혈당 조절에 미치는 영향	64
(1) 연구실제	64
(2) 연구 대상 및 기간	64
(3) 연구 방법	64
(가) 일반사항 및 임상적 특성	64
(나) 신체 계측 및 혈압	64
(다) 혈당 측정	64
17. 생산수율과 경제성 검토	65
18. 응용제품의 개발	65
19. 대량생산공정 설계 및 개발	65
제 2 절 연구결과	66
1. 항 당뇨 후보물질 탐색	66
2. 패 추출물에 대한 항 당뇨 활성 및 산화적 스트레스개선효과.....	66
가. 항당뇨 활성 및 식후 혈당강하 효과	66
(1) 탄수화물 소화효소 저해활성	66
(가) α -glucosidase 저해활성	66
(나) α -amylase 저해활성	67
(2) 식후혈당 강하효과	69
(가) STZ 유발 당뇨 쥐에 있어서 혈당 강하 효과.....	69
나. 당뇨병 세포모델을 이용한 패 추출물의 산화스트레스 개선효과	72
(1) 세포 생존율	72
(2) 지질 과산화물 측정	73
(3) Intracellular ROS level 측정	74
(4) NO level 측정	76
(5) 항산화효소 활성 측정	78
(가) HUVECs	78
① Superoxide dismutase (SOD) 활성	78
② Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성	79
③ Catalase 활성	79
3. 패로부터 항당뇨 후보물질의 분리정제 및 구조분석	80
4. 패로부터 분리한 diphlorethohydroxycarmalol의 항균 및 항진균 효과	81
5. 패로부터 분리한 diphlorethohydroxycarmalol의 항당뇨 및 생리활성 분석	81
5-1. 항당뇨 활성 및 식후 혈당강하 효과	81

1) 탄수화물 소화효소 저해활성	81
(1) α -glucosidase 저해활성	81
(2) α -amylase 저해활성	82
2) 식후혈당 강하효과	87
(1) STZ 유발 당뇨쥐에 있어서 혈당 강하 효과	87
5-2. 당뇨병 세포모형을 이용한 DPHC의 산화스트레스 개선효과	89
1) 세포 생존율	89
2) 지질 과산화물 측정	91
3) Intracellular ROS level 측정	92
4) NO level 측정	94
5) 항산화효소 활성 측정	95
(1) Superoxide dismutase (SOD) 활성	95
(2) Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성	96
(3) Catalase (CAT) 활성	97
6. 당뇨병 세포 모델에서의 DPHC의 apoptosis 보호 효과	98
1). Immunocytochemistry	98
2).Western blot 분석	100
(1) NF- κ B 발현	100
(2) iNOS와 COX-2 발현	101
3). 인슐린 분비능 측정	103
7. 제 2형 당뇨동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 항당뇨 효과	104
1). 식이섭취량, 식이효율, 주별 체중변화에 미치는 영향	104
2). 주별 공복혈당 농도변화에 미치는 영향	107
3). HbA1c 농도에 미치는 영향	107
4). 혈장 글루코스 농도 측정	108
5). 내당능 (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) 측정	109
6). 혈장 인슐린 농도 측정	110
7). 간조직의 당대사 효소활성에 미치는 영향	111
(1) Glucokinase(GK) 활성도	111
(2) Glucose-6-Phosphatase(G6Pase) 활성도	112
(3) Phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK) 활성도	113
8). 간조직 글리코겐 함량에 미치는 영향	114
8. 제 2형 당뇨동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 지질대사 개선 효과.....	115
1). 혈장 지질농도에 미치는 영향	115
2). 간조직의 지질농도에 미치는 영향	116

9. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 항산화 개선 효과	117
1). 간조직 항산화 대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향	117
2). 적혈구 항산화 대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향	117
3). 간 · 적혈구 지질과산화물 농도에 미치는 영향	119
4). 간 · 적혈구 Glutathione 농도에 미치는 영향	120
5). 간 · 적혈구 ROS 농도에 미치는 영향	121
10. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 간 및 신장 기능	122
1). AST, ALT, γ -GTP	122
2). Creatinine	123
3). BUN	124
11. 임상실험 결과.....	125
가. 패 추출물의 섭취가 제2형 당뇨병 환자의 혈당 및 인슐린 저항성에 미치는 영향	125
(1) 패 추출물군과 위약군의 종질성 검증 (Before treatment)	125
(가) 일반사항 및 임상적 특성	125
① 일반사항	125
② 임상적 특성	125
(나) 신체 계측치 및 혈압	127
(다) 생활 습관 및 영양소 섭취상태	129
① 생활 습관 특성	129
② 영양소 섭취 상태	129
(2) 패 추출물 섭취효과 (After treatment)	132
(가) 신체 계측치 및 혈압 변화	132
(나) 영양소 섭취 상태 변화	133
(다) 혈당 및 당화혈색소 변화	135
(라) 혈청지질 변화	136
(마) 인슐린 분비능 변화	137
(바) 인슐린 저항성 변화	137
(사) C-reactive protein 변화	138
(자) 지질과산화물 변화	140
(차) 항산화 효소 활성 및 Glutathione 농도 변화	140
(카) 간기능 안전성 검증	143
(타) 신장기능 안전성 검증	143
나. 패 추출물이 식후 혈당 조절에 미치는 영향	144
(1) 제 2형 당뇨병 환자에 있어서 패 추출물 섭취의 식후혈당강하 효과	144
(가) 일반사항 및 임상적 특성	144

(나) 신체 계측치 및 혈압	144
(다) 혈당에 미치는 영향	145
12. 생산수율과 경제성 검토	148
(가) 생산공정	148
(나) 생산수율	149
(다) 생산공정 설계도(10톤).....	150
(라) 생산설비단가	151
(마) 제조원가(패각분말 10톤/일 처리기준).....	160
(바) 경제성분석	161
13. 응용제품의 개발	162
가 화장품 원료로서 사용 가능성 평가	162
(1) 미백기능성	162
(2) 항염증	162
(3) 항산화	164
(4) 주름억제	167
나 패 원료 추출물을 이용한 아토피 및 여드름 치료용 화장품 개발	168
(1) 아토피성 피부질환 치료용 화장품의 개발	168
(2) 여드름용 제품의 개발	170
다. 패 원료 추출물을 이용한 항당뇨 식품개발	172
(1) 임상실험용 항당뇨 캡슐제조	172
(2) 하당뇨용 식품 샘플제조	172
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서 기여도	174
1. 연구개발 목표 및 달성도	174
가. 당해 연도 연구개발 목표	174
(1) 최종목표.....	174
(2) 당해 연도 목표.....	174
나. 연구개발 목표 및 달성도	174
2. 수명주기상 신청기술 또는 제품의 예상되는 위치(A-E 중 선택) 및 그 근거.....	175
3. 개발기술 동향	175
가. 현재 유사기술 연구개발 및 제품화 현황(기업체명과 기술명)	175
나. 개발 완료 후 예상되는 최종제품의 형태.....	175
다. 개발기술의 예상되는 향후 동향	176
라. R&D개발 완료 후 단독으로 제품화 가능유무 및 핵심기술 및 주변기술 기여도.....	176
제 5 장 연구개발과 성과 및 성과활용 계획	177
1. 개발기술의 생산특성	177

2. 기존 자원 활용 정도	177
3. 최종 제품의 제품경쟁력 수준.....	177
4. 연구 성과 활용계획	179
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	183
제 7 장 참고문헌	187

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 나날이 성장하는 당뇨병 치료시장

가. 고령화와 비만이 당뇨병 확산 원인

○ 전 세계적인 고령화와 비만 현상으로 당뇨병이 국제적인 건강 위협이 되고 있음. 한 연구의 추정치에 따르면 미국의 경우만도 연간 1000억 달러의 비용이 투입되고 있어, 실리콘밸리와 도처에 있는 바이오기업들의 진입을 촉진시키고 있음.

○ 남성의 경우 11%, 여성의 9%가 인슐린을 생성하지 못하거나 활용하지 못하는 당뇨병을 앓고 있음. 국제 당뇨병협회에 따르면 현재 2억4600만 명에 달하는 당뇨병 환자가 2025년에는 3억8000만 명에 이를 것으로 예측되고 있으며, 미국 내에도 2100만 명, 캘리포니아에는 영화감독 조지 루카스 · 여배우 할리 베리 등이 포함된 200만 명의 당뇨병 환자가 있다고 밝힘. 당뇨병은 미국 내 연간 20만 명의 사망자를 발생시키고 있을 뿐만 아니라, 시력을 잃게 하거나 하반신을 절단해야만 하게 만들고, 간질환과 신경손상 등까지 일으키고 있음.

○ 미국 당뇨병협회는 당뇨병이 의료보험 지출에서 연간 1160억 달러의 비용이 들고 있으며, 생산성 저하와 기타 노동 관련 문제로 580억 달러가 추가로 소요되고 있는 것으로 추정.

2. 전 세계 연간 230달러의 시장, 향후 1-년 동안 50% 성장 전망

○ 이러한 사실들은 관련 회사들에게는 커다란 비즈니스 기회임. 시장조사기관인 프로스 터앤드 설리반은 당뇨병 치료와 연관 제품이 적어도 전 세계에서 연간 230억 달러의 매출실적을 올리고 있는 것으로 추정했으며, 샌프란시스코를 기반으로 하고 있는 상업은행 버릴 앤드 컴퍼니의 애널리스트는 이 시장이 향후 10년 동안 50%는 성장할 것으로 내다봄. 또 당뇨병에 걸릴 확률이 높아지고 있는 환경으로 인해 더욱 성장할 것이라고 전망.

○ 미국 제약 연구 및 제조회사 협회는 2007년 당뇨병 치료제 개발이 95건 이루어져, 2006년 66건에 비해 높아졌다고 밝힘. 미국 사우스 샌프란시스코 바이오 무역협회인 베이 바이 오가 실시한 최근 조사에 따르면, 실리콘밸리 인근에만도 20여 개의 회사들이 당뇨병 시장 진출을 모색하고 있는 것으로 알려졌다.

제 2 절 연구개발의 목적

- 2005년 국민건강·영양조사 (만성질환편)에서 우리나라 국민의 38.0%가 만성질환에 시달리고 있으며, 그 중 두 번째로 높은 비중을 차지하는 것이 당뇨병임.
- 현재 우리나라의 당뇨병 환자는 전체 인구의 약 9%인 450만 명으로, 최근 20년간 당뇨병 환자의 인구는 500% 정도 증가되어 당뇨병 치료 및 예방에 대한 연구가 시급한 실정임.
- 웰빙 시대에 현대인들의 당뇨병 등과 같은 건강 문제는 새로운 고부가가치의 기능성 식품에 대한 요구를 증대시키고 있으며, 이에 건강 기능성 식품의 시장 규모는 해를 거듭할수록 확대되고 있음.
- 당뇨병 환자들에서 혈당과 혈청지질 농도의 조절을 도와주고 미량 영양소까지도 공급하며 복용하기 쉬운 건강 보충 식품의 개발이 시급함.
- 농수산 식품의 FTA 협상 요구에 따라 국내 자연산 해조류의 기능성 검증을 통하여 우수 종의 경우 종 보존기술과 양식기술을 개발하여, 침체된 수산양식 산업의 활력을 불어넣고 고부가가치 산업으로 발전시켜나아가야 함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

제 1 절 국내 기술 개발현황

○ 국내에서 시판되는 당뇨병 치료제에는 외국에서 특허가 만료되는 제네릭 제품을 주로 카피하여 국내에 보급하는 정도의 지극히 소극적으로 당뇨병 치료제를 생산하는데 그치고 있는 실정임.

○ 국내 신약으로는 보건복지부가 지원하고 종근당이 개발 중인 국내 최초의 당뇨병치료제이며 '글리타존계' 당뇨병 치료제 약물인 신약 'CKD-501'이 있음. 현재 1상 임상진행 중에 있으며, 전임상 연구결과 세포 핵 내에서 당과 지질의 대사에 관여하는 유전자의 발현을 증가하여 수용체를 활성화시키는 작용이 뛰어나 기존 제품보다 3배 이상 강력한 혈당강화작용을 나타는 것으로 알려져 있다.

○ 삼천당 제약에서 당뇨병 치료제를 개발하여 SCD-DKY(동용강당령)의 상품명으로 시판 중이다.

○ 농촌진흥청 난지농업연구소에서는 양파에 함유되어 있는 프로스타 글라딘이 인체의 혈압강화와 당뇨병 치료효과에 탁월하며 몸속에 있는 젖산과 콜레스테롤을 녹여주는 효과가 있음을 발표하였다.

○ 국내외 연구현황

연구기관	연구개발내용	연구개발성과활용현황
경희대학교	토종약초로부터 당뇨병 치료용 식품의약 개발	· 특허출원 · 일화, 동아제약 등의 산업체와의 공동연구를 통한 혈당치료용 천연물 신약 제품화 개발 계획
경상대학교	버섯균사체 액체배양 추출물로부터 혈당강화 소재 개발	· 혈당강화 소재를 다량 생산할 수 있는 버섯균, 배지 조성 및 배양·기술 개발(특허출원 및 기술 이전)
동신대학교	죽력을 주약재로 활용한 경구투여용 당뇨병 치료약물 개발	· 기술이전 및 신공정 개발 · 지적재산권(국내출원 및 국내등록) · 제품개발(시제품개발 및 상품화 출시)
풀무원건강생활(주)	잎새버섯 및 흰목이를 이용한 당뇨조절용 기능성식품 개발	· 흰목이, 잎새버섯 유래 분획물을 이용하여 항당뇨 시제품의 개발 · 국내외 특허 출원
인제대학교	마름으로부터 항당뇨 및 항암 기능성 식품 소재 개발	· 국내 특허 출원 및 등록 · 마름 추출물을 소재로 캡슐과 식사대용식 제품시도 · 건강기능성 식품 개발에 관한 기술을 기화제약(주)에 기술이전 계획

제 2 절 국외 기술 개발현황

- 치열한 시장 속에서 많은 제약사들이 지속적인 신약개발에 엄청난 연구개발 자금을 쏟아 붓고 있어 향후 효과 좋은 새로운 제품들이 등장할 것으로 전망됨.
- 외국 제약사들은 인슐린 흡입형 또는 약물의 장기적 효과지속형 약물 개발에 심혈을 기울여 ‘GLP-1작용제’, ‘DPPIV억제제’, ‘듀얼 PPAR길항제’ 등의 계열 약물을 준비 중에 있으며, 인슐린 수용체에 직접 작용해 인슐린 신호전달을 활성화 시키는 물질, 글루코키나아제의 활성을 촉진시킬 수 있는 물질, 지방산 산화 억제제 등의 혈당강하제들을 개발 중임.
- 이 중에서 조만간 출시가 예상되는 신약으로는 릴리와 아마린의 주사제 'Exenatide', 화이자, 아벤티스, 벡타르사의 인슐린 흡입형 치료제 'Exubera', 아스트라 제네카의 혈당강하제 'Galida'등이 있다.
- 옥수수 잎으로부터 항 당뇨 건강소재 개발.
- 글락소 스미스클라인 제약회사(미국)에서 인슐린 민감제(insulin sensitizer)로 아반디아를 개발하여 시판중이다.
- 다케다 제약회사(일본)에서 악토스를 판매중임 체중증가와 부종 같은 부작용을 일으킬 수 있다.
- 미국 메타볼렉스(Metabolex) 제약회사가 제2형(성인) 당뇨병 치료제인 메타글리다센(metaglidasen)을 개발하여 2상 임상시험단계에 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용

1. 시료수집

실험에 사용한 갈조류는 2008년 12월 ~ 2009년 9월 사이에 제주도 연안에서 채집하여 제주대학교 해양의생명과학부에서 동정 받아 물로 수세하여 염분과 협잡물을 제거하고 동결 건조하여 사용하였다. 채집하여 추출에 이용된 갈조류의 목록은 Table 1, Fig. 1에 제시하였다.

Table 1. Brown algae list used in an experiment.

Scientific name	Korean name
<i>Ishige okamurae</i>	괘
<i>Sargarssum coreanum</i>	큰잎모자반
<i>Sargarssum fulvellum</i>	모자반
<i>Sargarssum thunbergii</i>	지층이
<i>Dictyota dichotoma</i>	참그물바탕말
<i>Myelophycus simplex</i>	바위수염



Fig. 1 Photograph of domestic brown algae 6 kinds used in an experiment.

2. 폐 추출물의 조제

동결 건조한 갈조류 6종을 곱게 갈아 각각 1 g을 취한 후 80% 메탄올 100 ml에 혼합하여 상온의 shaking incubator에서 24시간동안 추출한 후 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 잔사를 제거한 상층액을 취하였다. 상층액을 감압여과한 후 이를 80% 메탄올 추출 시료로 사용하였다.

3. 시료의 저분자 가공

수집하여 건조한 해조류는 핀밀을 통하여 분쇄한 후 에어밀을 이용하여 30µm 크기의 초미세분말로 가공한 후 직접 실험에 이용하여, 기능성을 평가하고, 이 시료에 각종 상용효소(당분해 효소, 단백질 분해 효소, 지질분해효소 등)를 이용하여 가수분해 시켜 가공한다.

4. 폐 추출물에 대한 항당뇨 및 산화적 스트레스 활성분석

가. 시료준비

본 실험에 사용한 폐는 제주도 해안에서 채취하였고, 표면에 붙은 소금, 착생식물, 모래를 제거하기 위해 수돗물로 수차례 세척하고, 정화된 물로 다시 헹군 뒤 -20℃에서 보관하였다. 동결 건조의 과정을 거친 후 분말 화하여 80% 메탄올로 3회 추출한 뒤 감압 농축하여 -80℃ deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

시약과 효소는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였고, HUVECs은 (주)영메디칼, INS-1 cell은 인제대학교 백인제연구소에서 각각 분양받아 실험에 사용하였다.

그 외 사용된 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

항산화활성 및 흡광도를 측정하기 위해 흡광광도계 (Shimadzu UV-2401, Kyoto, Japan)를 사용하였으며, 혈당 측정을 위해 간이 혈당계 (Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 사용하였다. 그리고 현재 제 2형 당뇨병 환자들에게 가장 널리 사용되고 있고, 탄수화물 소화에 관여하는 효소인 α-glucosidase 억제 작용에 기인하는 acarbose는 (주)바이엘코리아로부터 제공받아 2℃의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. 생화학적 특성 검토

(1) 단백질 정량 (Lowry's method)

단백질 정량은 Lowry's 법을 이용하여 시료액 20 µl 와 lowry's solution I 200 µl 잘 섞은 후 10분간 반응시킨 다음에 lowry's solution II 20 µl을 첨가 30분간 방치 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. BSA 표준 용액을 이용하여 표준곡선을 작성하였다(1, 2).

(2) 당 정량 (DNS method)

환원당 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)와 Rochelle염으로 발색하여 흡광도를 측정하는 당 정량법이다. 시료액 100 µl와 DNS 시약 200µl 잘 섞은 후 15분간 끓이고 15분간 냉각시킨다.

546 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose 표준 용액을 이용하여 표준곡선을 작성하였다(3).

다. 항당뇨 활성 측정

(1) α -glucosidase 저해활성

다당류가 단당류로 분해되는 경로의 억제능을 알아볼 수 있는 assay로 Watanabe의 방법에 따라 측정하였다. PBS에 2 g/L BSA(bovine serum albumin), 0.2 g/L NaN_3 와 함께 효소 (0.7U)를 용해시켜 효소용액을 만든다. *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 PBS에 5 mM 농도로 용해하여 기질용액을 만든 후 효소용액 0.5 ml에 시료 0.1ml를 넣어 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 전의 흡광도 측정 후 5분간 실온에 방치, 기질용액 0.5 ml를 넣고 5분간 반응 후 다시 흡광도를 측정하였다. 저해율 계산은 아래 식을 사용하였다(4).

$$\text{Inhibitory rate(\%)} = 100 - (0 \text{ time과 } 5\text{분 변화량}) / 100\text{-대조구의 흡광도 변화}$$

(2) α -amylase 저해활성

α -amylase 저해활성은 α -glucosidase 저해활성에서 설명된 것과 같은 방법에 따라 측정하였다. PBS 50 ml에 0.1 g BSA와 0.01 g/L NaN_3 , 효소 0.2857 g을 용해시켜 효소용액을 만든다. *p*-nitrophenyl- α -D-maltopentoglycoside를 PBS에 5 mM 농도로 용해하여 기질용액을 만든 후 효소용액 0.5 ml에 시료 0.1 ml를 넣어 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응 전의 흡광도 측정 후 5분간 실온에 방치, 기질용액 0.5 ml를 넣고 5분간 반응 후 다시 흡광도를 측정하였다. 저해율 계산은 아래 식을 사용하였다(4).

$$\text{Inhibitory rate(\%)} = 100 - (0 \text{ time과 } 5\text{분 변화량}) / 100\text{-대조구의 흡광도 변화}$$

(3) 식후혈당 강하효과 측정

(가) 실험동물 및 사육

동물 실험을 위하여 4주령의 ICR mouse 42마리를 (주)중앙실험동물(서울시 서초구)에서 구입하여 1주일간 일반식이로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 실험군은 증류수군 2군, acarbose 투여군 2군, 패 추출물 투여군 2군으로 모두 6군이며, 각 군당 실험동물은 각각 7마리씩 나누어 한 케이지에 3-4마리씩 사육하였다. 사육실의 온도 및 습도는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ 로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등을 하였으며, 07:00~19:00시에 물을 켜 두었다. 물과 식이는 제한 없이 자유 공급하였다.

(나) 실험동물의 당뇨 유발

ICR mice에게 고형사료 (Constant Nutrition, 미국)를 공급하여 평균체중이 35~40 g이 되게 사육한 후, 12시간 공복 상태의 ICR mice에게 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 용해시킨

streptozotocin (STZ, Sigma Co., USA, 60 mg/kg of body weight)을 복강에 주사하여 당뇨를 유발하였다. STZ 투여 1주일 후 공복상태의 ICR mice 꼬리정맥으로부터 채혈하여 간이혈당계로 측정한 혈당이 250 mg/dl 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하여 실험에 사용하였다.

(다) STZ 유발 당뇨쥐에 있어서 혈당 강하 효과 측정

증류수군은 ICR mice에 soluble starch (2 g/kg, Sigma Co., USA)를, acarbose 투여군은 soluble starch (2 g/kg) 및 acarbose (100 mg/kg)를, 패 추출물 투여군은 soluble starch (2 g/kg) 및 패 추출물 (500 mg/kg)을 증류수에 용해하여 12시간 절식시킨 ICR mice의 경구에 투여하였다. 투여 후 정해진 시간 (0, 30, 60, 120분)에 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 각 시점의 혈당 증가치를 계산하여 혈당증가곡선을 구하고, 혈당증가곡선의 면적 (area under the curve, AUC)을 계산하였다.

라. 당뇨병 세포모델을 이용한 산화스트레스 개선효과 측정

(1) 세포 배양과 처리

INS-1 (Rat pancreatic β -cell line, Passages number 30-40) 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS, 11.1 mM 포도당, 10 mM HEPES, 2.5 mM mercaptoethanol, streptomycin 100 μ g/ml, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, penicillin 100 units/ml (pH 7.4)을 포함하는 RPMI 1640 배지를 이용하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 phosphate buffered saline으로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심 분리해서 집적된 세포를 배지에 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells, Passages number 3-8)는 (주)영메디칼 (MC1133, 부산시 동구)에서 passage 3번의 T-75cm² flask를 구입하여 실험에 사용하였다. HUVECs가 80% 이상 confluent 해지면 subculture 하여 passage 3-8번까지 사용하였으며, EBM-2 Bullet Kit를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. EBM-2 배지는 사용 전 EGM-2 SingleQuots (10% fetal bovine serum, Hydrocortisone, hFGF-B, vEGF, R3-IGF-I, ascorbic acid, hegf. GA1000, heparin)를 넣고 잘 섞어서 사용하였다.

(2) 세포 생존율 측정

INS-1 cell 세포 생존율 측정은 세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml 로 seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 30 mM 고농도 포도당으로 처리하여 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 100 μ l 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) solution을 각 well에 주입

하여 37°C에서 4시간 재 배양하였다. Medium에서 MTT solution을 제거하고 100 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO)를 주입하고 30분 동안 incubation한 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(5, 6, 7)

HUVECs 생존률은 Fautz 등의 방법으로 살아있는 세포가 neutral red에 염색되는 특성을 이용하여 측정하였다. 24-well plate (1×10^6 cells/well)에 세포를 주입하여 부착시키고, seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 30 mM 고농도 포도당으로 처리하여 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 20시간 동안 배양한 후, 24 well plate의 배지를 제거하고, 1.14 mmol/L의 neutral red가 포함된 배지를 200 μ l씩 넣고 3시간 동안 배양한 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 2번 세척하였다. 세포에 acetic acid (1%, v/v)와 ethanol (50%, v/v)을 함유하는 300 μ l의 cell lysis buffer [50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L dithiothreitol, Triton X-100 (1%, v/v)]을 넣어 15분간 배양시켜 세포로부터 neutral red를 방출시킨 후 염색된 정도를 측정하기 위해서 세포 용해 산물을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 취해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 지질 과산화물 측정

지질 과산화 정도는 thiobarbituric acid 반응물질 생산량 (TBARS)에 의해 Fraga등의 방법으로 측정되었다. 세포는 96-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml 로 seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 고농도 30 mM 농도로 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 또는 20시간 동안 재 배양한 후 각 well당 200 μ l의 media 상층액을 코닝튜브에 담아 1시간 incubation한 후 400 μ l의 TBARS solution을 넣어서 섞어주고, 95°C에서 20분간 boiling하였다. cooling하면서 다시 섞어준 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상층액으로 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질 과산화물은 malondialdehyde (MDA)의 양으로 환산하여 계산하였다(8, 9).

(4) Intracellular ROS level 측정

DCF-DA은 세포에서 에세틸기를 제거하고, 그것이 세포내의 radical (주로 hydrogen peroxide)에 정량적으로 반응하여 DCF 형광물질로 변화되는 것을 원리로 측정하였다. 결국, DCF-DA는 산화적 스트레스에 있어 ROS의 발생을 측정함을 원리로 하였다. 세포가 confluence 상태가 되면 96-well blank plate에 well당 2×10^4 cells/ml 로 seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 30 mM 고농도로 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 또는 20시간 동안 배양한 후, 배양된 media를 제거하고, 세포는 PBS로 두 번 세척하였다. 세포에 100 μ m의 DCF-DA를 넣어 15분, 다시 60분 동안 실온에서 incubation하여, DCF-DA fluorescence 상승률은 flowcytometer로 측정하였다.

(5) NO level 측정

세포는 96-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml 로 seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 30 mM 농도로 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 또는 20시간 동안 재 배양한 후 상층액을 취해 측정하였다. 상층액의 NO 함량은 Griess반응으로 측정하였다. 50 μ l의 상층액에 같은 양의 Griess reagent [0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid]를 넣어서 섞어주고, 실온에서 10분 동안 incubation하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(5, 7, 11).

(6) 항산화효소 활성 측정

세포가 confluence 상태가 되면 10-mm dish에 dish당 2×10^5 cells/ml 로 seeding 하여 2시간 incubation 한 후 1 ml 고농도 포도당을 처리하여 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양된 media를 제거하고, 세포는 PBS로 두 번 세척하였다. 세포를 ice 상태에서 5초 동안 전기분해한 후 $10,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리한 상층액을 따서 실험에 사용하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin의 standard와 Bradford의 방법을 이용해 측정하였다. Superoxide dismutase (SOD) 활성은 pyrogallol의 자동산화측정에 의해 결정되었다. SOD활성 1 unit은 pyrogallol 자동산화의 비율을 저해하는 효소의 양으로 나타내었다. GSH-peroxidase (GSH-px) 활성은 Lawrence와 Burk 등의 방법으로 측정하며, 활성 1 unit는 1분당 1 mM의 NADPH가 산화되는 효소의 양으로 나타내었다. Catalase 활성은 Aebi의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 2.0 ml에 조효소액 0.05 ml를 가하여 혼합한 후 25°C에서 3분간 방치한 후 10 mM H₂O₂ 용액 1.0 ml를 가하여 혼합하고 즉시 240 nm에서 15초간 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안 1 μ M의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하여 효소활성을 측정하였다(12, 13).

마. 통계 분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 각 시료간의 유의성은 one-way ANOVA(analysis of variance)로 사전 검증한 후 Duncan's multiple range test에 의해 사후 검정하였다.

5. 패에서 diphlorethohydroxycarmalol의 분리 및 정제

Diphlorethohydroxycarmalol의 분리 및 정제는 허 등 (2008)의 방법에 준하여 실시하였다. 동결 건조한 후 분말화 한 패 500 g을 취한 후 80% 메탄올에 혼합하여 상온의 shaking incubator에서 24시간동안 추출한 후 $3,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 잔사를 제거한 상층액을 취하였다. 이러한 과정을 3회 반복한 후 얻어진 상층액을 감압여과하여 메탄올을 제거하

였다. 농축하여 얻은 추출물을 물에 용해시킨 후에 n-hexane, chloroform, ethyl acetate 그리고 butanol의 순으로 용매 분획을 실시하였고, 최종적으로 ethyl acetate 분획물을 선택하여 55 × 400 mm의 유리관에 75-150 μm 직경의 silica gel을 충전한 컬럼에 ethyl acetate에서 얻은 분획물을 주입하고 chloroform:methanol을 50:1에서 0:1 비율로 용리시켜 활성성분을 얻었다. 활성성분을 25×300의 유리관에 25-100 μm 직경의 sephadex LH-20을 충전한 컬럼에 다시 주입하여 70% 아세톤으로 용리시켜 활성성분을 얻었다. 이 활성성분은 다시 고성능 액체크로마토그래피 (Acetonitrile : water = 15 : 85, 유속 = 1.0 ml/min, 10×250 mm C-18 컬럼)를 이용하여 정제하였다(14).

6. 생리활성 측정 및 기능성 검증

가. 항염증

항염증은 COX-2 assay kit를 사용하여 screening을 하며, 세포주를 이용한 실험으로는 Raw 264.7 cell line (murine macrophage)을 이용하여, MTT assay, NO (Nitric oxide) secretion assay, Interleukin-6 (IL-6) secretion assay, PGE₂ secretion assay, iNOS, COX-2 expression 등의 방법을 사용하였다(5, 6, 7).

나. 항산화 활성

항산화활성을 측정하기 위해 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity, Superoxide anion scavenging activity, Ferric thiocyanate activity를 측정한다. DPPH법은 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 환원되어 생긴 자색이 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 노랑색으로 탈색되는 정도를 517nm에서 측정하고, SOD활성은 β-NADH를 전자공여체로, NBT (nitro blue tetrazolium)를 기질로 사용한 반응 용액 하에 생성된 blackish blue formaza과 PMS (phenazine methosulphate)가 반응하여 생성된 푸른 착물을 560nm에서 측정한다. 그리고 Linoleic acid를 기질로 한 과산화반응에서 지질 과산화물과 녹색의 ferrous thiocyanate가 반응하여 생성된 붉은색의 ferric thiocyanate을 500nm에서 측정한다(15, 16).

다. 항균활성측정 (Antimicrobial activity) 측정

추출한 시료에 대한 항균활성의 측정방법은 filter paper disk method (Advantec, Toyo, 8 mm, Japan)를 이용하여 최초의 기본균주로 *Staphylococcus aureus* KCTC 3831, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2513, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Escherichia coli* KCTC 2517, *Bacillus subtilis* KCTC 1021 6종류 성장억제를 관찰함으로써 확인한다. 활성 측정법은 다음과 같다 ; 시험균주를 37°C로 TSB에서 mid-logarithmic phase 까지 배양한다. 항균활성을 측정하고자 하는 시료들은 일정농도를 취하여 멸균된 증류수 (50 μl)에 녹인 후, paper disk에 흡수시켜 건조한다. 배양한 균주는 원심분리 (10분, 2,000 × g)한 후 0.1 M phosphate buffer (PBS, pH 6.7)로 3회 반복하여 세척한 후 배양한 균액 100 μ

L ($A_{570 \text{ nm}} = 0.1$)를 Trypticase Soy Agar (TSA)에 도말하고 준비한 paper disk를 배지 위에 일정간격으로 정치시켜 37°C에서 18 시간동안 배양하여 항균활성을 측정한다. 표준시료로는 시중에서 유통되고 있는 항생제를 선택하여 활성의 세기를 측정, 비교하도록 한다. 이후 항균활성의 유무에 따라 G(+) 균주 5종, G(-) 균주 5종 및 병원성 세균 5종을 선택하여 계속적으로 항균활성을 측정하도록 한다(17).

라. 항곰팡이 활성 (Antifungal activity)의 측정

항곰팡이 활성은 *Candida albicans* KCTC 7965,를 사용한다. Potato dextros agar plates (PDA)에서 전 배양한 *C. albicans*를 potato dextros broth (PDB)에 접종시킨 후 30°C에서 48시간 동안 배양하여 1×10^6 CFU/mL이 되도록 준비한다. 곰팡이액 100 μL 와 100 μL 0.01 % 초산에 녹인 시료를 96 well plate에 각각 주입한 후, 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 620 nm에서 O.D.값을 측정하여 활성의 정도를 확인한다. 표준시료로는 시중에서 유통되고 있는 항생제를 선택하여 활성의 세기를 측정, 비교하도록 한다(17).

마. 미백활성

멜라닌 합성과정의 속도결정단계를 촉매하는 tyrosinase의 DOPA 산화반응에 대한 활성제해를 측정하여 미백 성분의 효과를 평가한다(18, 19, 20). 1 mM L-tyrosine : 50 mM potassium phosphate : D.W. = 10 : 10 : 9 의 비율로 혼합한 반응 혼합액(tyrosine buffer) 170 μL 에 test sample 10 μL 와 20 μL 의 mushroom tyrosinase 수용액(1000 Unit/mL)을 첨가하여 최종 반응액이 200 μL 가 되도록 96-well microplate에 넣는다. 이 반응액을 25 °C에서 30분간 배양한 후 microplate reader VERSA max (Molecular Devices, CA, USA)에서 490 nm의 파장으로 dopachrom 생성량을 측정한다. 이 효소의 활성단위(U)는 위에서 언급한 조건하에서 분당 1 μmole 의 dopachrome을 생성하는 효소의 양으로 정한다.

Tyrosinase 저해활성 %는 다음의 방정식으로 구한다.

$$\% \text{ Inhibition} = \{1 - A_{\text{samp.}} - A_{\text{ctrl.}}\} / A_{\text{std.}} \times 100$$

$A_{\text{samp.}}$: sample를 넣었을 때의 흡광도 값

$A_{\text{ctrl.}}$: sample만 첨가하고 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도 값(sample color control)

$A_{\text{std.}}$: sample없이 효소만 넣었을 때의 흡광도 값

바. 세포 독성

Raw 264.7 cells을 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 다음 약제를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 구한다. 0.5 mg/ml의 MTT 50 μL 를 처리하고, 4시간 배양한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO 50 μL 에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader로 540

nm에서 흡광도를 측정한다(11).

사. NO생성량 측정

NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정한다. 6 well plate에 cells 을 분주하고 약물을 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치. LPS처치 후 6, 12, 18, 24시간에 세포배양 상등액 100 μl 를 취하여, Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H_2O) 100 μl 와 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader로 흡광도를 측정한다(5, 6, 7).

아. Collagenase 저해 활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 ninhydrin방법을 변형하여 사용하였다(21, 22). 50mM Tris-HCl buffer 50 μl 에 Collagenase(1 mg/ml) 10 μl 과 시료액 10 μl 을 혼합 후 37°C에서 10분간 방치한 후 6 mg/ml gelatin 500 μl 을 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 효소반응을 종지시키기 위해 10% TCA(trichloroacetic acid) 500 μl 을 첨가한 후 10분 방치하였다.

이 반응액을 50 μl 취하여 ninhydrin 용액 500 μl 첨가 후 10분간 끓이고 얼음에서 5분간 냉각시킨다. 가수분해 되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 50% 1-propanol 1000 μl 을 가하여 얼음에서 15분간 방치 후 원심분리하였다. 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

자. 항 비만 측정

생체의 실험으로 전지방세포(preadipocyte)인 3T3-L1 세포가 지방세포의 대사과정을 연구하는데 널리 이용되고 있다. 3T3-L1 세포를 배양액을 이용하여 5%로 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 온도는 37°C로 배양한다. 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제(antibiotics)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)을 사용하며, 2-3 일 간격으로 배양세포 포면을 인산염완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 세척한 후 0.5% 트립신(trypsin)을 넣고 처리하여 세포를 탈착시켜 계대 배양한다. 세포를 개별 실험에 사용할 때는 분화유도물질인 인슐린 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), dexamethasone (DEX, 0.25 μM), 1-methyl-3-methyl xanthine (MIX, 0.5mM) 이 함유된 분화유도 배양액으로 교환하여 1-3일간 배양하여 지방세포로 분화를 유도한다. 배양 3일 후 인슐린만 함유하는 배지로 2-3일간 배양한 후 인슐린을 제거한 배양액으로 바꾼다. 중성지방으로 유입되는 포도당 측정 실험이나 포도당 산화 실험 실에는 10-12일 째에 저농도 (5mM) 포도당을 함유한 배양액으로 배양한다. 항비만 효과 물질 처리는 분화유도 전 혹은 분화유도 후에 처리한다.

7. 항당뇨 물질의 분리 정제

저분자 가공된 해조류를 이용하여 용매를 사용하여, 추출한 후, TLC를 실시하고, 그 결과

를 바탕으로 해서, open column에서 Silica gel을 충전하여 분리 정제를 실시하고, HPLC의 역상 column과 역상 충전물(C₁₈)이 대량으로 충전된 Prep 장비를 이용하여 고순도의 시료를 대량으로 분리하여 실험에 이용한다.

8. 항당뇨 대상 해조류의 대량생산 기법 연구

국립수산과학원 생명공학연구소와 협의하여 대상 해조류에 대한 자료 검색과 양식여부 및 기능성 검토에 관한 공동연구방안을 모색하고, 비 양식 해조류에 대해서는 국립수산과학원 제주수산연구소와 제주대학교와 협의하여 양식 기술방안을 연구하며, 연구결과를 토대로 제주도 지자체와 협의하여 제주어민의 소득향상을 위한 구체적 대안을 제시한다.

9. 항당뇨 활성 및 혈당강하 효과 측정

가. 재료 및 시약

본 실험에 사용한 패는 제주도 해안에서 채취하였고, 표면에 붙은 소금, 착생식물, 모래를 제거하기 위해 수돗물로 수차례 세척하고, 정화된 물로 다시 헹군 뒤 -20℃에서 보관하였다. 동결 건조의 과정을 거친 후 분말화하여 80% 메탄올로 3번 추출한 뒤 감압농축하여 -80℃ deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

시약은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), nitroblue tetrazolium (NBT), ethylenediaminetera acetic acid disodium salt (Na₂ EDTA), linoleic acid, ascorbic acid, dimethylsulfoxide (DMSO), bovine serum albumin, streptozotocin (STZ), citric acid, soluble starch, vitamin C 등을 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였고, xanthine oxidase, glutathione reductase, α-amylase, α-glucosidase 등의 효소도 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. iNOS, Bcl-2, Bax, cytochrome *c*의 antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Delaware, CA, USA)에서, caspase-3는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA), anti-actin은 Sigma (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 사용된 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

항산화활성 및 흡광도 특징을 측정하기 위해 흡광광도계 (Shimadzu UV-2401, Kyoto, Japan)를 사용하였으며, 혈당 측정을 위해 간이혈당계 (Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 사용하였다. 그리고 현재 제 2형 당뇨병 환자들에게 가장 널리 사용되고 있고(25), 탄수화물의 소화와 관련하는 효소인 α-glucosidase 억제 작용에 기인하는(26,27) acarbose는 (주)바이엘코리아로부터 제공받아 2℃의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였으며, 인슐린 저항성 개선 및 간의 당신생 억제에 대한 것으로 이에 효과가 있는 rosiglitazone을 Positive control로 사용하고, 이는 (주)글락소 스미스클라인에서 구입하여 2℃의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. 패로부터 DPHC 분리

패의 동결 건조 과정을 거친 후 분말화하여 80% 메탄올로 3번 추출한 뒤 40℃에서 감압

농축하였다. n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol층으로 분리하였고, ethyl acetate 분획물이 이상적인 radical 소거능을 보였기 때문에 이를 사용해 silica gel과 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 생리활성물질을 분리하였다. 최종적으로 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 통해 정제하고 화합물의 구조는 기존 연구에서 NMR spectral data와 비교하여 확인하였다. 분리한 화합물은 diphlorethohydroxycarmalol (DPHC)으로 분자량은 512.0591이고 수율은 0.156%이다.

다. 항당뇨 활성 및 식후 혈당강하 효과 측정

(1) 항당뇨 활성

(가) α-glucosidase 저해활성

다당류가 단당류로 분해되는 경로의 억제능을 알아볼 수 있는 assay로 Watanabe의 방법에 따라 측정하였다(4). PBS에 2 g/L BSA(bovine serum albumin), 0.2 g/L NaN₃ 와 함께 효소 (0.7U)를 용해시켜 효소용액을 만든다. p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside를 PBS에 5 mM 농도로 용해하여 기질용액을 만든 후 효소용액 0.5 ml에 시료 0.1ml를 넣어 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 반응 전의 흡광도 측정 후 5분간 실온에 방치, 기질용액 0.5 ml를 넣고 5분간 반응 후 다시 흡광도를 측정한다. 저해율에 대한 계산은 아래 식을 사용하였다.

$$\text{Inhibitory rate(\%)} = 100 - (0 \text{ time과 } 5 \text{분 변화량}) / 100\text{-대조구의 흡광도 변화}$$

(나) α-amylase 저해활성

α-amylase 저해활성은 α-glucosidase 저해활성에서 설명된 것과 같은 방법에 따라 측정하였다(4). PBS 50 ml에 0.1 g BSA와 0.01 g/L NaN₃, 효소 0.2857 g을 용해시켜 효소용액을 만든다. p-nitrophenyl-α-D-maltopentoglycoside를 PBS에 5 mM 농도로 용해하여 기질용액을 만든 후 효소용액 0.5 ml에 시료 0.1 ml를 넣어 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 반응 전의 흡광도 측정 후 5분간 실온에 방치, 기질용액 0.5 ml를 넣고 5분간 반응 후 다시 흡광도를 측정한다. 저해율에 대한 계산은 아래 식을 사용하였다.

$$\text{Inhibitory rate(\%)} = 100 - (0 \text{ time과 } 5 \text{분 변화량}) / 100\text{-대조구의 흡광도 변화}$$

(2) 식후혈당 강하효과 측정

(가) 실험동물 및 사육

동물 실험을 위하여 4주령의 ICR mouse 42마리를 (주)중앙실험동물(서울시 서초구)에서 구입하여 1주일간 일반식으로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 실험군은 증류수군 2군, acarbose 투여군 2군, diphlorethohydroxycarmalol 투여군 2군으로 모두

6군이며, 각 군당 실험동물은 각각 7마리씩 나누어 한 케이지에 3-4마리씩 사육하였다. 사육실의 온도 및 습도는 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$ 로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등을 하였으며, 07:00~19:00에 불을 켜 두었다. 물과 식이는 제한 없이 자유 공급하였다.

(나) 실험동물의 당뇨 유발

ICR mice에게 고형사료 (Constant Nutrition, 미국)를 공급하여 평균체중이 35~40 g이 되게 사육한 후, 12시간 공복 상태의 ICR mice에게 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 용해시킨 streptozotocin (STZ, Sigma Co., USA, 60 mg/kg of body weight)을 복강에 주사하여 당뇨를 유발하였다. STZ 투여 1주일 후 공복상태의 ICR mice 꼬리정맥으로부터 채혈하여 간이혈당계로 측정된 혈당이 250 mg/dl 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하여 실험에 사용하였다.

(다) STZ 유발 당뇨쥐에 있어서 혈당 강하 효과 측정

증류수군은 ICR mice에 soluble starch (2 g/kg, Sigma Co., USA)를, acarbose 투여군은 soluble starch (2 g/kg) 및 acarbose (100 mg/kg)를, diphlorethohydroxycarmalol 투여군은 soluble starch (2 g/kg) 및 diphlorethohydroxycarmalol (100 mg/kg)를 증류수에 용해하여 12시간 절식시킨 ICR mice의 경구에 투여하였다. 투여 후 정해진 시간 (0, 30, 60, 120분)에 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 각 시점의 혈당 증가치를 계산하여 혈당증가곡선을 구하고, 혈당증가곡선의 면적 (area under the curve, AUC)을 계산하였다.

10. 당뇨병 세포모형을 이용한 산화스트레스 개선효과 측정

가. 세포 배양과 처리

RIN-m5F (Rat pancreatic β -cell line, Passages number 3-5) 세포(29)는 37°C , 95% 공기 및 5% CO_2 상태의 incubator에서 10% FBS, 11.1 mM 포도당, 10 mM HEPES, 2.5 mM mercapto-ethanol, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, penicillin 100 units/mL, pH 7.4 를 포함하는 RPMI 1640 배지를 이용하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 phosphate buffered saline으로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리해서 집적된 세포를 배지에 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells, Passages number 3-6)는 Modern Tissue Technologies Inc (MC1133, Korea)에서 passage 3번의 T-75cm² flask를 구입하였다. HUVECs가 80% 이상 confluent 해지면 subculture 하여 passage 3-6번까지 사용하였으며, EBM-2 Bullet Kit를 이용하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. EBM-2 배지는 사용 전 EGM-2 SingleQuots (10% fetal bovine serum, Hydrocortisone, hFGF-B, vEGF, R3-IGF-I, ascorbic acid, hegf. GA1000, heparin)를 넣고 잘 섞어서 사용하였다.

나. 세포 생존율 측정

RIN-m5F 세포 생존율 측정은 세포가 confluence 상태가 되면 96-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml 로 seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 30 mM 고농도 포도당으로 처리하여 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 100 μ l 3-(4,5-dimethyl -2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) solution을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 재 배양한다. Medium에서 MTT solution을 제거하고 100 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO)를 주입하고 30분 동안 incubation한 후 ELISA plate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(23).

HUVECs 생존율은 Fautz등의 방법으로 살아있는 세포가 neutral red에 염색되는 특성을 이용하여 측정하였다. 24-well plate (1×10^6 cells/well)에 세포를 주입하여 부착시키고, seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 30 mM 고농도 포도당으로 처리하여 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 20시간 동안 배양한 후, 세포의 24 well plate의 배지를 제거하고, 1.14 mmol/L의 neutral red가 포함된 배지를 200 μ l씩 넣고 3시간 동안 배양한 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 2번 세척하였다. 세포에 acetic acid (1%, v/v)와 ethanol (50%, v/v)을 함유하는 300 μ l의 cell lysis buffer [50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L dithiothreitol, Triton X-100 (1%, v/v)]을 넣어 15분간 배양시켜 세포로부터 neutral red를 방출시킨 후 염색된 정도를 측정하기 위해서 세포 용해 산물을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 취해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 지질 과산화물 측정

지질 과산화 정도는 thiobarbituric acid 반응물질 생산량 (TBARS)에 의해 Fraga등의 방법으로 측정되었다(24). 세포는 96-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml 로 seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 30 mM 농도로 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 재 배양한 후 각 well당 200 μ l의 media 상층액을 코닝튜브에 담아 1시간 incubation한 후 400 μ l의 TBARS solution을 넣어서 섞어주고, 95°C에서 20분간 boiling한다. cooling하면서 다시 섞어준 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상층액으로 532 nm에서 흡광도를 측정한다. 지질 과산화물은 malondialdehyde (MDA)의 양으로 환산하여 계산한다.

라. Intracellular ROS level 측정

DCF-DA은 세포에서 에세틸기를 제거하고, 그것이 세포내의 radical (주로 hydrogen peroxide)에 정량적으로 반응하여 DCF 형광물질로 변화되는 것을 원리로 측정한다. 결국, DCF-DA는 산화적 스트레스에 있어 ROS의 발생을 측정한다(10). 세포가 confluence 상태가

되면 96-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml 로 seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 30 mM 고농도로 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양된 media를 제거하고, 세포는 PBS로 두 번 세척한다. 세포에 100 μ m의 DCF-DA를 넣어 15분, 다시 60분 동안 실온에서 incubation하여, DCF-DA fluorescence 상승률은 flowcytometer로 측정하였다.

마. NO level 측정

세포는 96-well plate에 well당 2×10^4 cells/ml 로 seeding 하여 2~3시간 incubation 한 후 포도당을 정상농도 5.5 mM, 30 mM 농도로 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 상층액을 취해 측정하였다. 상층액의 NO 함량은 Griess 반응으로 측정하였다. 50 μ l의 상층액에 같은 양의 Griess reagent [0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid]를 넣어서 섞어주고, 실온에서 10분 동안 incubation하여 550 nm에서 흡광도를 측정한다.

바. 항산화효소 활성 측정

세포가 confluence 상태가 되면 10-mm dish에 dish당 2×10^5 cells/ml 로 seeding 하여 2시간 incubation 한 후 1 ml 고농도 포도당을 처리하여 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양된 media를 제거하고, 세포는 PBS로 두 번 세척한다. 세포를 ice 상태에서 5초 동안 전기분해한 후 $10,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리한 상층액을 따서 실험에 사용한다. 단백질 정량은 bovine serum albumin의 standard와 Bradford의 방법을 이용해 측정한다. Superoxide dismutase (SOD) 활성은 pyrogallol의 자동산화측정에 의해 결정되었다. SOD활성 1 unit은 pyrogallol 자동산화의 비율을 저해하는 효소의 양으로 나타낸다. GSH-peroxidase (GSH-px) 활성은 Lawrence와 Burk등의 방법으로 측정하며, 활성 1 unit는 1분당 1 mM의 NADPH가 산화되는 효소의 양으로 나타낸다. Catalase 활성은 Aebi의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 2.0 ml에 조효소액 0.05 ml를 가하여 혼합한 후 25°C에서 3분간 방치한 후 10 mM H₂O₂ 용액 1.0 ml를 가하여 혼합하고 즉시 240 nm에서 15초간 변화되는 흡광도를 측정한다. 효소의 활성도는 1분 동안 1 μ m의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하여 효소활성을 측정하였다(12, 13).

사. 통계 분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 각 시료간의 유의성은 one-way ANOVA(analysis of variance)로 사전 검증한 후 Duncan's multiple range

test에 의해 사후 검정하였다.

11. 당뇨병 세포 모델의 apoptosis 보호 효과 측정

가. Immunocytochemistry

세포를 PBS로 씻어낸 후, PBS에 paraformaldehyde를 희석시켜 상온에서 20분간 세포를 고정시킨 다음 PBS로 3번 세척하였다. PBS와 1% BSA 용액에 cytochrome c antibody를 1:500으로 희석한 것을 분주하고 37°C에서 1시간동안 incubation 시켰다. PBS로 3번 세척하고 methanol에 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)를 희석시켜 분주한 후 상온에서 20분간 반응시켰다. PBS로 3번 세척한 다음 mount 시약으로 glass를 고정시킨 후 confocal (Zeiss, Germany)로 관찰하였다.

나. Western blot 분석

처리된 세포를 PBS로 씻어내고 trypsin 처리를 하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 수집하였다. 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer [250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% v/v NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (10 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin)]를 첨가하여 ice에 보관하면서 10분마다 1시간동안 vortex한 후, 4°C에서 13,500 rpm으로 15분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 정량하고 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)와 mercaptomethanol을 섞어 sample을 만들었다.

이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer시켰다. 5% skim milk를 함유한 PBS-T (1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 1시간동안 blocking하고 PBS-T로 5분마다 3번 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 상온에서 2시간 또는 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 5분마다 3번 세척하였다. 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody (PBS-T로 1:1000으로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 40분에서 1시간 정도 반응시킨 후, PBS-T로 5분마다 3번 세척하였다. ECL 용액을 적용시킨 다음 암실에서 BioMax MR film (Kodak, USA)에 감광시켜 단백질의 발현을 분석하였다.

다. 인슐린 분비능 측정

인슐린 분비능은 GSIS (glucose stimulated insulin secretion) 방법으로 측정한다(25). 세포가 confluence 상태가 되면 10-mm dish에 dish당 2×10^5 cells/ml 로 seeding 하여 2시간 incubation 한 후 1 ml 고농도 포도당을 처리하여 산화스트레스를 유발하였다. 산화스트레스를 준 세포를 48시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 배양된 media를 제거하고, 세포는 PBS로 한 번 세척한다. 3 mM 포도당, 2% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 넣고 5시간 동안 반응을 시켰다. 그 뒤 5 mM 포도당이 포함된 Krebs-Ringer Buffer (119 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 2.54 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 5 mM

NaHCO₃, 20 mM HEPES, pH 7.4), 25 mM 포도당이 포함된 Krebs-Ringer Buffer를 각각 넣고 1시간 다시 배양한 후 배지를 e-tube에 넣은 다음 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액만을 분리하였다. Rat/mouse Insulin ELISA kit (Lingo Research, MO)를 사용하여 인슐린 단백질 양을 측정하였다.

12. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 항당뇨 효과 측정

가. 실험동물 및 실험 디자인

실험동물은 (주) 중앙실험동물사로부터 C57BL/KsJ-db/db mice 음성 5주령을 구입한 후 2주간 기본식으로 적응시켰다. 적응 기간 후 C57BL/KsJ-db/db mice를 난피법에 따라 정상식이 (AIN-93G)를 공급하는 당뇨대조군(DMC), 정상식이에 0.005% rosiglitason을 보충한 약물대조군(Rosiglitason), 정상 식이에 0.5% Ishige okamurai methanol extract을 보충한 Ishige okamurai 군으로 7마리씩 3군으로 나누 다음, 6주간 실험 식이를 제공하였다.

동물 사육실의 환경은 항온(22±1°C), 항습(50±5%)과 12시간 간격 광주기를 유지하였다. 실험동물은 스테인리스 케이지에 한 마리씩 넣어 사육하였으며, 식이와 식수는 제한 없이 자유롭게 섭취하도록 하였다. 또한 실험 기간 중 식이 보관은 4°C에서 이루어 졌으며 식이는 매일 일정한 시간에 제공하였다. 실험 식이의 조성은 Table 2에 나타내었다. 식이 섭취량과 음수량은 매일 일정한 시간에 잔량을 측정하여 제공한 양에서 뺀 값으로 사용하였다. 실험기간 중 매주 일정한 시간에 체중 및 공복혈당을 측정하였다.

사육 기간이 끝난 후, 마우스는 희생 전 12시간 절식 시킨 다음 ether로 마취시킨 후 70% 에탄올로 복부를 소독한 후 개복하였다. 복부를 개복한 후 멸균 주사기를 사용하여 하대정맥에서 혈액을 채취한 후 헤파린으로 처리한 멸균튜브에 모아 실험에 이용하였다. 채혈 후 PBS 용액으로 관류하여 장기 내 남은 혈액을 제거하였고, 간을 적출하여, 무게를 측정한 다음 -70°C 냉장고에 보관하였다. 장기는 homogenizer(Polytron, PT-MR 3100, Switzedland)로 균질화 하여 시료로 사용하였다.

Table 2. Compositions of the experimental diets(%)

	DMC	Rosiglitazone	<i>Ishige okamurae</i>
Casein	20	20	20
Cornstarch	39.7486	39.7486	39.7486
Dyetrose	13.200	13.200	13.200
Sucrose	10	9.995	9.5
Cellulose	5	5	5
Soybean Oil	7	7	7
t-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
Salt Mix	3.5	3.5	3.5
Vitamin Mix	1	1	1
L-Cystine	0.3	0.3	0.3
Choline Bitartrate	0.25	0.25	0.25
Rosiglitazone		0.005	
<i>Ishige okamurae</i>			0.5
Total (%)	100	100	100

DMC (diabetes mellitus control) : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G semisynthetic diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), ***Ishige okamurai*** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* methanol extract(1g/100g diet)

나. 식이섭취량, 식이효율, 주별 체중변화에 미치는 영향

매주 일정한 시간에 식이섭취량과 음수량을 측정하며, 이때에 체중 증가량을 이용하여 식이효율을 측정하였다.

다. 주별 공복혈당 농도변화에 미치는 영향

매주 일정한 시간을 정하여 공복혈당을 측정하고, 측정시 12시간(PM 09:00 - AM 09:00) 절식 시킨 후, 꼬리 정맥에서 채혈을 한 후 간이혈당계 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) 를 이용하여 공복혈당 농도를 측정하였다.

라. HbA1c 농도에 미치는 영향

희생 후 복부 하대정맥에서 수집한 혈액(Whole blood) 중 일부는 당화헤모글로빈 자동 분석기를 이용하여 당화헤모글로빈(HbA1c) 농도를 측정하는데 사용하였다.

마. 혈장 글루코스 농도 측정

해부 후 하대정맥을 통해 채취한 혈액에서 분리해낸 혈장을 glucose-oxidase와의 반응을

이용한 5분 효소법을 응용한 글루코스 측정용시액(아산제약 kit)을 사용하여 혈장 글루코스 농도를 측정하였다. 혈장에 조제한 반응시약을 첨가하여 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시켜 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 글루코즈 표준시액을 사용하여 위의 방법과 동일한 방법으로 발색시켜 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도 값을 다음 식에 도입하여 혈중 글루코즈 농도를 구하였다.

$$Glucose(mg/dl) = \frac{\text{검체흡광도}}{\text{표준액흡광도}} \times 200$$

바. 내당능 (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) 측정

내당능 측정은 실험식이 공급 6주째에 이루어지며, 이를 실시하기 위해 급여 6주 후 12시간 절식시키고 포도당 용액 (0.5 g/kg BW)를 복강 내 투여한 후 꼬리 정맥 채혈을 통해 혈당변화를 관찰하였다. IPGTT는 Glucometer를 이용하여 glucose-oxidation 방법으로 포도당 투여 후 30, 60, 120분의 혈당 농도 변화를 측정하였다.

사. 혈장 인슐린 농도 측정

헤파린이 처리된 tube에 혈액을 수집한 뒤 원심분리 하여 혈장을 분리하였고, 이를 인슐린 측정에 사용하였다. 인슐린 농도는 ELISA법을 따라 Rat/Mouse Insulin ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

아. 간조직의 당대사 효소활성에 미치는 영향

(1) Glucokinase(GK) 활성도

GK 활성도는 Davidson and Arion 등 (1987)의 방법을 수정 및 보완하여 NAD⁺가 NADH로 환원되는 정도를 측정하였다. 간에서 분리해낸 Cytosol에 반응액으로 50mM Hepes(pH 7.4)에 100mM KCl, 2.5mM DTT, 7.5mM MgCl₂, 10mg/mL BSA, 0.5mM NAD⁺, 4U glucose-6-phosphate, 10mM glucose, 5mM ATP를 첨가한 후 효소원인 세포질을 가하여 37°C, 340nm에서 10분간의 흡광도 변화를 측정하였다. GK 활성도 단위는 Cytosolic protein 1mg당 1분간 생성된 NADH의 nmole로 나타내었다.

(2) Glucose-6-Phosphatase(G6Pase) 활성도

Alegre 등 (1988)의 방법을 수정하여 G6Pase 측정에 이용하였다. 먼저 100mM Hepes (pH 6.5)에 26mM glucose-6-phosphate(pH6.5), 1.8mM EDTA(pH 6.5), 2mM NAD⁺, 0.6IU/mL mutarotase 및 6IU/mL glucose dehydrogenase를 첨가하여 37°C에서 4분간 반응시켰다. 여기에 마이크로솜 분획을 첨가하고 37°C에서 4분간 반응시킨 후 340nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. G6Pase 활성도 단위는 microsomal protein 1mg당 1분간 생성된 NADH의 nmole로 나타내었다.

(3) Phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK) 활성도

PEPCK 활성도는 Bente and Lardy(1976)의 방법에 따라 Oxaloacetate의 생성 정도를 측정

하였다. 50mM Hepes (pH6.5)에 1mM IDP, 1mM MnCl₂, 1mM DTT, 0.25mM NADH, 2mM phosphoenolpyruvate, 50mM NaHCO₃, 및 7.2 U malic dehydrogenase이 섞여 있는 반응액을 첨가한 후 효소원을 가하여 25℃, 340nm에서 2분간의 흡광도 변화를 측정하였다. PEPCK활성도 단위는 Cytosolic protein 1mg당 1분간 생성된 Oxaloacetate의 nmole로 나타내었다.

자. 간조직 글리코겐 함량에 미치는 영향

간조직 글리코겐 함량은 seifer등(1950)의 방법을 수정 및 보완하여 측정하였다. 간조직 1g당 30% KOH 용액을 5배 가한 후 빙냉 상태에서 homogenizer로 분쇄하였다. 이것을 10℃에서 30분간 반응시킨 후 에탄올로 침전시키고 세척한 후 증류수에 녹여 글리코겐 함량 측정에 사용하였다. 글리코겐 함량은 anthrone 시약을 가한 후 100℃에서 10분간 반응시킨 후 620nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

13. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 지질대사 개선 효과 측정

가. 혈장 지질농도에 미치는 영향

(1) 혈장 총 콜레스테롤 농도 측정

총 콜레스테롤은 Allain 등(1974)의 효소법을 응용한 총 콜레스테롤 측정용 시액(아산제약 kit)을 사용하여 정량하였다.

(2) 혈장 중성지질 농도 측정

중성지질은 McGowan 등 (1983)의 효소법을 이용하여 발색법 원리에 따라 중성지질 측정용 시액(아산제약 kit)을 사용하여 측정하였다.

(3) 혈장 유리지방산 농도 측정

혈장 유리지방산 농도는 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 유리지방산 측정용 시액 (NEFA kit, Wako, Japan)을 사용하여 측정하였다.

(4) 혈장 HDL-콜레스테롤 농도 측정

혈장 HDL-콜레스테롤은 HDL-콜레스테롤 측정용 시액(아산제약 kit)을 사용하여 정량하였다.

(5) 혈장 LDL-콜레스테롤 농도 계산

$$LDL = [Total-C] - ([HDL-C]) + [TG] / 5$$

나. 간조직의 지질농도에 미치는 영향

간 조직 지질은 Folch 등(1957)의 방법을 이용해 추출하였고, 효소시액에 유화제인 0.5% Triton X-100와 3mM sodium cholate를 혼합하여 탁도를 제거한 후 혈장 중성지질 및 콜레

스테롤 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

14. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 항산화 개선 효과 측정

가. 간조직 항산화 대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향

(1) 간조직의 Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

SOD 활성도는 Marklund (1974) 방법을 수정하여 알칼리에서 SOD가 pyrogallol의 자동산화물을 억제하는 정도를 측정하였다. 즉, 10mM EDTA를 포함한 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)에 효소원, 7.2mM pyrogallol 용액을 순서대로 잘 섞어 25°C에서 10분간 반응 시킨 후 1N HCl을 첨가하여 반응을 종결시키고 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소원은 간의 상층 분획인 Cytosol을 이용한다. 활성 단위는 효소원을 넣지 않고 10분간 반응 시킨 7.2mM pyrogallol 용액의 자동산화를 50% 억제하는데 필요한 양으로 정하였다(12, 13, 26).

(2) 간조직의 Catalase (CAT) 활성도 측정

CAT 활성도는 Aebi 등 (1974)의 방법을 수정하여 측정하였다. 즉, 50mM potassium phosphate buffer와 효소원을 섞어 25°C에서 5분간 반응시킨 후 0.3M H₂O₂ 용액을 첨가하여 240nm에서 반응 전 흡광도를 측정한 다음, 25°C에서 5분간 더 반응시킨 후 240nm에서 반응 후 흡광도를 측정하여 H₂O₂ 흡광도 변화를 구하였다. CAT 활성단위는 mitochondrial protein 1mg 당 1분간 감소된 H₂O₂의 μmol 로 나타내었다(12, 13, 26).

(3) 간조직의 Glutathione Peroxidase (GSH-Px) 활성도 측정

GSH-Px 활성도는 Paglia 등 (1967)의 방법을 수정 보완하여 H₂O₂를 기질로 이용한 coupled enzyme procedure로 측정하였다. 환원형 glutathione(GSH)은 GSH-Px에 의해 H₂O₂와 반응하여 산화형 glutathione(GSSG)으로 전환되고 이것이 glutathione reductase(GR)와 NADPH에 의하여 환원되는데, 이때 NADPH의 흡광도가 340nm에서 감소하는 정도를 측정하였다. 활성단위는 cytosolic protein 1mg 당 1분간 산화된 NADPH의 nmole로 나타내었다(12, 13, 26).

나. 적혈구 항산화 대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향

(1) 적혈구의 Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

SOD 활성도는 Marklund (1974) 방법을 수정하여 알칼리에서 SOD가 pyrogallol의 자동산화를 억제하는 정도를 측정하였다. 방법은 간조직의 SOD법과 동일하며 효소원은 지질을 침전시키기 위해 적혈구에 ethanol : chloroform (3:5, v/v)을 상층액 부피의 2/5가 되도록 첨가하여 잘 섞고 증류수를 첨가한 후 10,000×g (4°C)에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 취하여 이용하였다.

(2) 적혈구의 Catalase (CAT) 활성도 측정

CAT 활성도는 Aebi 등 (1974)의 방법을 수정하여 측정하였으며, 방법은 간조직의 CAT법과 동일하다.

(3) 적혈구의 Glutathione Peroxidase (GSH-Px) 활성도 측정

GSH-Px 활성도는 Paglia 등 (1967)의 방법을 수정 보완하였으며 방법은 간조직의 GSH-Px와 동일하다.

다. 간 · 적혈구 지질과산화물 농도에 미치는 영향

(1) 간조직의 지질과산화물 농도 측정

간조직의 TBARS 함량은 Ohkawa (1979)등의 방법을 이용하여 간조직 1g에 0.1M potassium phosphate buffer (pH7.4)를 첨가하여 빙냉상태에서 homogenizer로 분쇄하였다. 분쇄물에 8.1% SDS 용액, 증류수를 섞은 후 TBA를 첨가하여 95℃에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 실온으로 냉각시켜 증류수 1ml과 n-butanol : pyridine 용액을 첨가하고, 3,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액의 흡광도를 532nm에서 측정하였다. MDA 표준용액은 적혈구 TBARS와 동일한 방법으로 제조하여 이용하였다(26).

(2) 적혈구의 지질과산화물 농도 측정

적혈구 지질과산화물 함량 측정은 Tarladgis (1964)등의 방법을 수정 보완하였다. 적혈구에 5% TCA와 0.06M TBA를 첨가하여 80℃에서 90분간 반응시켰다. 이것을 실온으로 냉각시켜 2,000rpm, 25℃에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 535nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 표준용액은 TMP를 가수분해하여 조제하였으며, 267nm에서 나온 MDA 표준용액의 흡광도와 MDA 흡광계수로부터 정확한 표준용액의 농도를 계산하였다(26).

라. 간 · 적혈구 Glutathione 농도에 미치는 영향

(1) 간조직의 Glutathione 함량 측정

간 조직에서의 총 Glutathione (GSH)은 Ellman (1959)의 방법에 따라 측정하였고, 그 원리는 반응액 중의 GSH에 의한 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; Ellman's reagent)가 sulfhydryl groups에 의해 환원되어 진한 노란색을 띠는 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid를 형성하는 반응 속도에 근거하였다. 간 조직의 상층액을 취하여 GSH 정량에 사용하였고, 시료와 혼합 반응액 간의 작용을 405nm에서 흡광도 변화로 측정하였다. GSH를 표준물질로 하여 얻어진 기울기로부터 구한 표준곡선과 비교하여 시료의 총 glutathione을 구하였다(27).

(2) 적혈구의 Glutathione 함량 측정

적혈구에서의 총 Glutathione (GSH)은 Ellman (1959)의 방법에 따라 측정하였고, 그 원리는 반응액 중의 GSH에 의한 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB ; Ellman's reagent)가 sulfhydryl groups에 의해 환원되어 진한 노란색을 띠는 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid를 형성

하는 반응 속도에 근거하였다. 방법은 간조직의 GSH와 동일하다(27).

마. 간 · 적혈구 ROS 농도에 미치는 영향

(1) 간조직의 ROS 측정

생성된 활성산소종의 양은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA) fluorescent probe를 이용하여 측정하였다. DCF-DA는 세포에서 에세틸기를 제거하고, 그것이 세포내의 radical (주로 hydrogen peroxide)에 정량적으로 반응하여 DCF 형광물질로 변화되는 것을 원리로 측정하였다. 결국, DCF-DA는 산화적 스트레스에 있어 ROS의 발생을 측정한다. 간 상층액에 DCF-DA를 넣은 후 37℃에서 30분간 incubation 한 후 excitation wavelength는 485nm이고, emission wavelength는 530nm의 필터를 사용하여 형광도를 측정하였다.

(2) 적혈구의 ROS 측정

생성된 활성산소종의 양은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA) fluorescent probe를 이용하여 측정하였다. 방법은 간조직의 ROS 측정법과 동일하다.

15. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 간 및 신장기능 측정

가. AST, ALT, γ -GTP

ALT (Alanine Aminotransferase), AST (Aspartate Aminotransferase)는 Reitman-Frankel의 효소법을 응용한 GPT, GOT 측정용 시액(아산제약 kit)을 사용하여 정량하였다. AST는 기질로 α -Ketoglutaric acid, L-aspartic acid를 사용하였고, ALT는 α -Ketoglutaric acid, DL-alanine을 이용하여 활성시켰으며 505nm에서 측정하였다(28-33).

γ -GTP 측정은 5-Amino salicylic acid법을 응용한 γ -GTP 측정용 시액(아산제약 kit)을 사용하여 정량하였다.

나. Creatinine

혈장 Creatinine 함량의 측정은 Folin-Wo법을 이용하였다. 제단백여액 중에 있는 Creatinine은 alkaline picric acid와 작용하여 황적색의 Creatinine picrate를 형성하는데 이것을 520nm에서 표준용액과 비색정량 하였다(28-33).

다. BUN

혈장 BUN 측정은 Urease-Indophenol 법을 이용하였다. 검체중에 존재하는 요소는 Urease에 의해 생성된 암모니아를 Sodium hypochlorite에 의해 Chloramine화한 후, Nitroprusside Natrium의 촉매작용으로 살리실산나트륨으로 반응시켜서, 청색 Indophenol로 유도하여, 이 정색을 580nm에서 비색측정 함으로서 요소 질소량을 구하였다(28-33).

16. 임상실험

가. 패 추출물의 섭취가 제2형 당뇨병환자의 혈당 및 인슐린 저항성에 미치는 영향

(1) 연구 설계

본 연구는 한국인 제 2형 당뇨병 환자를 대상으로 10주간 패 추출물 (1,600 mg/day) 복용 전 후로 혈액을 채취하여 인슐린 분비능과 혈당, 당화혈색소, 혈청지질, C-reactive protein (CRP) 측정을 통한 연구를 행하고 혈장과 적혈구를 분리하여 지질과산화물, 항산화효소, GSH 농도를 측정하였으며 그 효능 평가를 위해 무작위 실험-대조군 임상시험 (randomized placebo-controlled trial)을 행하였다(Fig. 2).

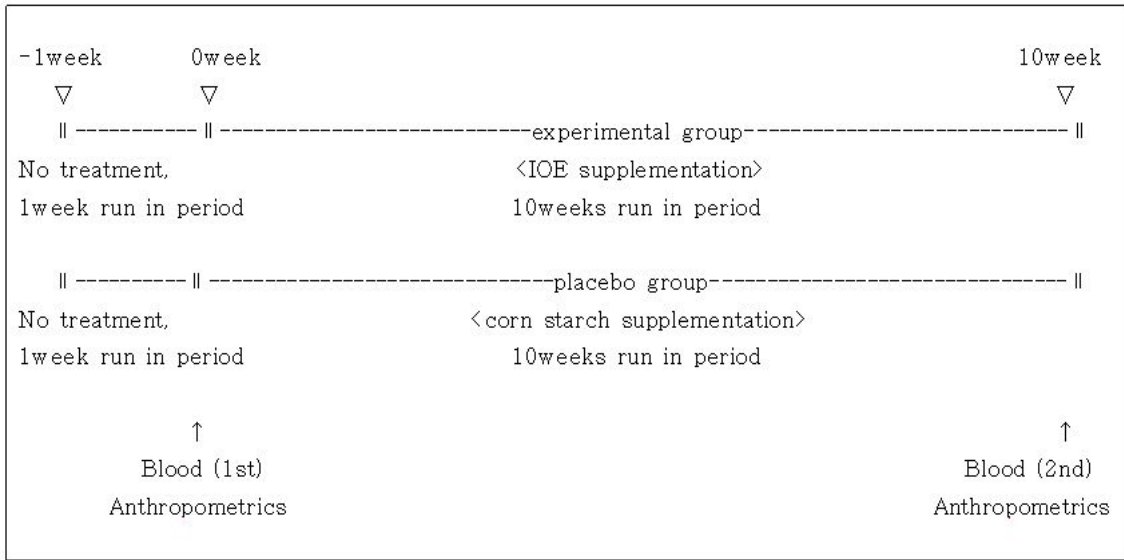


Fig. 2. Experimental design.

Experimental group : *Ishige okamurai* extract 1,600 mg/day, Control (placebo) group : Corn starch 1,600 mg/day

(2) 연구 대상 및 재료

(가) 연구대상 및 기간

본 연구는 양산 H병원 내분비내과에서 미국 당뇨병학회(ADA) 기준에 따라 공복 혈당 126 mg/dl이 이상인 제 2형 당뇨병으로 진단받은 환자들 중 본 연구의 취지에 동의하여 연구에 참여하기로 한 자를 대상으로 하였으며, 인슐린 치료를 받고 있거나 혈당조절이 불안정하거나 신장 또는 간기능 이상이 있는 환자는 제외하였다(Table 3).

Table 3. Inclusion & exclusion criteria of the subjects

Inclusion criteria	Exclusion criteria
Type 2 diabetic patient DM med agent Stable patient of glycemic control Same dosage, same agent No complication Patient over 6~7% HbA1c	Type 1 diabetic patient Insulin agent Unstable patient of glycemic control Renal function disorder Hepatic function disorder Retinopathy , Neuropathy Vegetarian

DM: Diabetes mellitus

연구기간은 2010년 7월 15일부터 2010년 10월 31일까지이며 수시로 모집되는 임상시험자를 실험군과 대조군으로 무작위로 나누고, 그룹별로 임상시험을 10주간 진행하였다. 대상자 모집에서 총60명의 당뇨병 환자가 채혈과 설문조사에 참여하였다.

연구 대상자 중 약물 조절가능성이 있거나 다른 사유로 인하여 도중 불참의사를 밝힌 환자 14명을 제외하여 실제 참여자는 46명이었으며, 실험군 24명, 위약군 22명으로 진행되었다.

(나) 실험재료

본 실험에 사용한 패 추출물 캡슐과 위약캡슐은 주관기업인 (주)서진바이오텍에서 제조 가공하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 패는 제주도 해안에서 채취하였고, 표면에 붙은 소금, 착색물질, 모래를 제거하기 위하여 수차례 세척하고, 정화된 물로 다시 깨끗이 헹구었다. 세척된 패를 건조 분말화 하여 80% 에탄올로 3회 추출 한 뒤 감압 농축하였으며, 이를 동결 건조 하여 200 mg 씩 한 캡슐로 하였으며, 위약군은 동량의 corn starch를 사용하여 제조하였다.

(다) 연구진행 절차

① 연구절차

본 연구는 2010년 7월 15일부터 2010년 10월 31일까지 다음과 같은 절차로 진행하였다.

㉠ 연구 대상자 모두에게 일반사항 및 임상적 특성을 조사하고, 신체 계측, 혈압측정, 식이섭취 조사, 혈당 및 당화혈색소 측정, 공복 인슐린 측정, 혈청지질농도 측정, 지질과 산화물측정, C-reactive protein 측정, 인슐린 저항성 측정, 간기능 검사와 신장기능 검사를 하였다. 식이조사 및 설문조사는 연구자가 직접하였고, 채혈과 생화학적 검사, 항산

화 개선효과 측정은 양산 H병원 진단검사의학과 및 부산대학교 실험실에서 실시하였다.

㉠ 연구대상자는 규정에 따라 선별하였고, 연구의 취지를 설명하고 참여에 동의한 환자를 대상으로 연구 기간 동안 영양제, 한약제, 비타민류 등의 섭취를 금하였으며 식사량과 운동량에 있어 연구전후로 차이 없이 유지할 것을 교육하였다.

㉡ 실험재료는 시각적으로 구분하지 못하도록 연구자가 아닌 사람이 패 추출물 캡슐과 위약 캡슐을 각각 들로 나누어 봉지를 만들고 각 대상자가 무작위로 선택하게 하는 방식으로 하여 무작위, 이중맹검법으로 실험대조군을 분류하였다.

㉢ 10주간의 패 추출물을 섭취한 후 실험군, 위약군 모두에게 신체계측 및 혈압측정, 식이 섭취조사, 혈당 및 당화혈색소 측정, 공복 인슐린 측정, 혈청지질측정, 지질과산화물 측정, C-reactive protein 측정, 인슐린 저항성 측정, 간 기능 검사와 신장기능 검사, 항산화 개선효과 측정 등을 실시하였다.

㉣ 대상자의 혈액은 실험 전과 10주 후에 12시간 공복 상태에서 아침 8시~11시 사이에 정맥혈 10 ml를 채혈하였다. 채혈된 혈액 중 5 ml는 EDTA가 첨가된 Tube에 담아 잘 혼합하였고, 나머지 혈액은 plain tube에 넣어 실온에 30분간 방치한 다음, 원심분리기를 이용하여 2600 rpm에서 15분간 원심 분리 후 혈청 성분만을 분리하였다.

㉤ 채취한 혈액에서 적혈구는 McCord와 Fridovich의 방법에 준하여 분리하였다. 헤파린으로 처리된 혈액을 4℃에서 30분간 방치한 후 2600 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 완전히 제거하기 위해 0.9% 생리식염수로 3회 세척하였다. 세척된 적혈구는 동량의 증류수와 용혈시켰고, 용혈된 적혈구는 희석하여 항산화효소 활성도 측정을 위한 효소원으로 사용하였다.

② 패 추출물의 섭취방법

패 추출물의 섭취는 총 10주간 이루어졌으며 환자의 평소 식습관과 약물을 그대로 유지하면서 패 추출물 캡슐을 섭취하게 하였다. 아침 식사 전, 저녁 식사 전 30분에 패 추출물 200 mg 캡슐 4개씩을 섭취하여 하루 총 1,600 mg을 섭취하도록 교육하였으며, 2주간격으로 전화하여 지속적으로 유지할 수 있도록 교육 및 점검 하였다. 패 추출물의 하루 제공량은 생시료로 환산하면 110 g 정도의 양으로 추출 수율과 패 일일 섭취량을 고려하여 결정하였다.

(3) 연구방법

(가) 일반 사항 및 임상적 특성

당뇨병 환자를 일대일로 면접하여 연령, 성별, 교육정도를 조사하고 생활습관으로는 운동, 흡연, 음주, 보충제 섭취 등을 조사하였다. 대상자의 임상적인 특성으로 치료유형, 당뇨병 유병기간, 합병증 등에 관하여 조사하였다.

(나) 신체계측 및 혈압 측정

연구 시작 시점과 종결 시점에 연구대상자의 신장, 체중을 측정하였고, 계측치로부터 체질량지수 (Body Mass Index: BMI=체중(kg)/신장(m)²), 표준체중 백분율 (Percent Ideal Body Weight : PIBW=usual body weight / ideal body weight × 100)을 산출하였다. 신장은 정면을 본 상태에서 신발을 벗고 직립자세를 취하게 하여 귀와 눈이 수평이 되게 한 후 신장계를 이용하여 측정하였으며, 체중은 얇은 옷만 입은 상태에서 전자저울로 측정하였다. 혈압은 전자 혈압계를 이용하여 최소 5분 이상 안정시킨 대상자가 편하게 앉은 자세에서 수축기와 이완기 혈압을 측정하였다.

(다) 식이섭취 조사

식이섭취조사는 조사 대상자들의 식품 섭취량을 24시간 회상법을 이용하여 평상시 2일간의 식사 섭취량을 조사하였다. 식사조사는 24시간 회상법으로 이루어졌으며 피 조사자의 회상을 돕기 위해 계량기 및 보충제 실물 사진을 제시하여 실시하였고, 음식의 재료, 분량, 조리법을 파악하여 상세히 기록하였다. 섭취 조사 결과는 한국 영양학회에서 개발된 영양평가 프로그램 Can pro 3.0(Computer aided nutritional analysis program)을 이용하여 섭취 음식 입력 후 열량 및 영양소 섭취 상태, 영양소 섭취량을 확인하였다.

(라) 혈당 및 당화혈색소 측정

본 연구 대상자의 혈액은 12시간 금식 후 정맥혈을 채취하여 분석하였으며 공복혈당은 Hexokinase법으로 자동생화학분석기 ADVIA 1650 (Siemens, Germany)로 측정하였고, 장기간의 혈당조절지표로 사용되는 당화혈색소 (Glycosylated hemoglobin, HbA1c)는 TIA (Turbidimetric Immunoassay)법으로 Integra 400 (Roche, Swiss)으로 측정하였다(31-33).

(마) 혈청지질농도 측정

혈청 콜레스테롤은 효소법을 이용하였으며, 중성지방은 Glycerol phosphate oxidase (glycerol 소거법)로, 혈청 HDL-콜레스테롤은 Direct method (항체저해법)로 자동 생화학 분석기인 ADVIA 1650 (Siemens, Germany)으로 분석하였으며 혈청 LDL-콜레스테롤은 Friedward식에 의해 계산하였다.

$$[\text{LDL-Cholesterol} = \text{T-cho} - (\text{HDL-cho}) - (\text{TG}/5)]$$

(바) 인슐린 분비능 측정

공복 인슐린은 CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)법으로 Immulite 2500 (DPC, USA)로 분석하였다.

(사) 인슐린 저항성 측정

인슐린 저항성은 HOMA_{IR} (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance)를 이용하여 측정하였다.

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} = [\text{공복혈당}(\text{mmol/L})] \times (\text{공복인슐린 농도}(\mu\text{IU/ml})) / 22.5$$

(아) C-reactive protein 측정

C-reactive protein은 latex 응집법으로 Integra 400 (Roche, Swiss)로 분석하였다.

(자) 지질과산화물 함량 측정

혈장 및 적혈구 지질과산화물 함량 측정은 Tarladgis등의 방법을 수정 보완하였다(26). 혈액에 5% TCA (trichloroacetic acid)와 0.06M TBA (thiobarbituric acid)를 첨가하여 80°C에서 90분간 반응시켰다. 이것을 실온으로 냉각시켜 2,000rpm, 25°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 535nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 표준용액은 TMP (tetramethoxypropane)을 가수분해하여 조제하였으며, 267nm에서 나온 MDA 표준용액의 흡광도와 MDA 흡광계수로부터 정확한 표준용액의 농도를 계산하였다.

(차) 항산화 효소 활성도 측정

① Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

적혈구의 지질을 침전시키기 위해 샘플 1 ml 당 0.4 ml의 ethanol : chloroform (25:15) 용액을 혼합하여 10,000 rpm으로 원심분리 하였고 여기서 얻은 상층액을 사용하였다. SOD 활성도는 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund 방법으로 측정하였다. 즉 10 mM EDTA를 포함한 50 mM ATris HCl buffer (pH. 8.5) 1.5 ml에 적혈구 0.1 ml을 가한 후, pyrogallol 0.1 ml을 혼합하여 25°C에서 8분간 전 반응시켰다. 여기에 1 N HCl 0.05 ml을 가하여 반응을 종료시키고 25°C, 420nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 산출하였다. 효소활성 단위는 적혈구를 넣지 않고 반응시킨 pyrogallol 용액의 자동산화를 50% 억제하는데 필요한 헤모글로빈 (1 g)으로 정하였다.

② Catalase (CAT) 활성도 측정

CAT 활성도는 Abei등의 방법으로 측정하였다(28-29). 즉 50 mM KPB (pH 7.0) 2.89 ml

에 적혈구 10 μ l를 넣어 25°C에서 5분간 반응시켰다. 여기에 30 mM H_2O_2 100 μ l를 가하여 5분간 반응시킨 후 25°C, 240 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 측정한다. 다음, 25°C에서 5분간 더 반응시킨 후 240 nm에서 흡광도를 재측정하여 H_2O_2 의 흡광도 변화를 구하였다. CAT 활성도는 1 g 헤모글로빈 당 1분간 감소된 H_2O_2 의 μ mol로 나타내었다.

③ Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성도 측정

GSH-px 활성도는 Paglia 등의 방법에 따라 H_2O_2 를 기질로 이용한 coupled enzyme procedure로 측정하였다(29). 환원형 GSH는 GSH-px에 의해 H_2O_2 와 반응하여 산화형 glutathione으로 전환되고, 이것이 glutathione reductase와 NADPH에 의하여 환원되는데, 이때 NADPH의 흡광도가 340 nm에서 감소하는 정도를 측정하였다. 즉 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) buffer 2.6 ml과 30 mM GSH 0.1 ml, 6 mM NADPH 용액 0.1 ml에 H_2O_2 0.1 ml을 넣은 뒤 25°C에서 5분간 전반응시켰다. 여기에 적혈구 0.1 ml을 혼합하여 25°C에서 5분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. GSH-px 활성도 단위는 1 g 헤모글로빈 1분간 산화된 NADPH nmol로 나타내었다.

(가) Glutathione (GSH) 함량 측정

총 GSH 함량 측정은 Ellman 등의 방법을 수정 보완하여 시행하였고, 원리는 반응액 중의 GSH에 의한 2,2'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)가 sulfhydryl groups에 의해 환원되어 진한 노란색을 띠는 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid를 형성하는 반응 속도에 근거하였다. 적혈구를 취하여 GSH 정량에 사용하였고, 시료와 혼합 반응액 간의 작용을 405 nm에서 흡광도 변화로 측정하였다. GSH를 표준물질로 하여 얻어진 기울기로부터 구한 표준곡선과 비교하여 시료의 총 glutathione을 구하였다.

(타) 간기능 검사

AST와 ALT, γ -GTP는 EIA (Enzyme Immunoassay)법으로 ADVIA 1650 (Simens, Germany)으로 분석하였다.

(파) 신장기능 검사

BUN과 Creatinine은 colorimetry법으로 ADVIA 1650 (Simens, Germany)로 분석하였다.

(4) 통계분석

통계 분석은 SPSS 12.0K for Windows를 이용하였고, 항목에 따른 빈도와 백분율 또는 평균과 표준편차로 표시하였다. 일반적·임상적 특성과 흡연, 음주 등 생활 습관에는 χ^2 독립성 검정을 이용하였으며 신체 계측, 혈압측정치, 식이섭취 조사 등의 각 항목 간 점수 차는 독립적 표본의 t-test로 분석하였고, 실험군과 대조군의 패 추출물 섭취 전·후 유의차 검

정은 paired t-test로 분석하였다.

나. 패 추출물이 식후 혈당 조절에 미치는 영향

(1) 연구 설계

본 연구는 한국인 제 2형 당뇨병 환자 10명을 대상으로 한 경구당부하검사 (oral maltose tolerance test)로 패 추출물 4캡슐 (800 mg/회) 복용 10분경과 후 75 g maltose용액을 섭취하게 하여 30분 간격으로 120분간 혈당변화를 보고자 하는 교차실험 (Cross-over trial)이다.

(2) 연구 대상 및 기간

본 연구는 미국 당뇨병학회 (ADA)기준에 따라 공복혈당 126 ml/dl 이상인 제 2형 당뇨병으로 진단받은 환자들 중 본 연구의 취지에 동의하고 10주간의 실험에 참여하였던 환자 중에서 자유의지로 지원한 환자를 대상으로 하였으며, 신장이나 간기능에 이상이 있거나 혈당이 불규칙한 환자는 제외하였고 인원은 각각 10명으로 하였다.

연구기간은 2010년 10월 28일부터 2010년 11월 4일까지이며 총 이틀에 걸친 교차실험으로 진행하였다.

(3) 연구방법

(가) 일반사항 및 임상적 특성

당뇨병 환자를 일대일로 면접하여 연령, 성별을 조사하고 생활 습관으로는 운동, 흡연, 음주, 보충제 섭취 등을 조사하였다. 대상자의 임상적인 특성으로는 치료유형, 당뇨병 유병 기간에 관하여 조사하였다.

(나) 신체 계측 및 혈압 측정

연구 시작 시점에 연구대상자의 신장, 체중, 허리둘레를 측정하였고, 계측치로부터 체질량 지수 (Body Mass Index : BMI =체중(kg)/[신장(m)]²), 표준체중 백분율 (% Ideal Body Weight: PIBW: usual body weight / ideal body weight × 100)을 산출하였다. 신장은 정면을 본 상태에서 신발을 벗고 직립자세를 취하게 하여 귀와 눈이 수평이 되게 한 후 신장계를 이용하여 측정하였으며, 체중은 얇은 옷만 입은 상태에서 전자저울로 측정하였다. 혈압은 전자 혈압계를 이용하여 대상자를 최소 5분 이상 안정시킨 후 편하게 앉은 자세에서 수축기와 이완기 혈압을 측정하였다.

(다) 혈당 측정

Hiroyuki 등의 방법에 따라 12시간 공복 상태의 대상자들의 혈당 검사를 한 뒤, 75 g maltose를 물 150 ml에 타서 3분 이내에 마시게 하였다. 그 후 30분, 60분, 120분에 모세혈관의 혈액을 뽑아 자가 혈당 측정기 (Accu-check, Roche)를 이용하여 측정하였다. 실험 후

일주일간의 안정 기간을 거친 뒤, 패 (800 mg/4캡슐)를 물과 함께 maltose loading 5분 전에 마시게 한 후 전과 동일하게 실험을 실시하였다.

17. 생산수율과 경제성 검토

확립된 저 분자 가공기술법과 추출, 분리정제 공정을 연계하여, 원료에서부터 가공에 이르기 까지 가장 합리적인 생산 공정을 검토하고, 저 비용 고 효율적 생산설비를 구성하기 위한 체계적인 data를 검증한다. 그리고 양식가능 해조류의 경우 생산단가에 대한 경제성을 검토하고, 비양식 해조류의 경우 채취와 관련한 원료 단가, 그리고 양식을 했을 때의 원료단가를 산정하고 경제성 평가를 한다. 아울러 현재 시판되고 있는 항 당뇨제품과 약리효능 평가를 실시하여 생산단가 대비 가격 경쟁력이 가장 높은 제품을 출시한다.

18. 응용제품의 개발

분리정제된 제품을 제조원가 대비 가장 적합한 제품군에 분류하기위해, 순도별 기능별 가격 경쟁력이 높은 원료를 판매하기 위한 응용제품을 개발한다. 대표적으로 고기능성 미백화장품, 아토피성 피부질환용 보습제, 두피케어용 제품 등과 한약처방과 초미세분말 기술을 접목한 고가의 환약형 제품, 그리고 제형 개발을 통한 원료 의약품 등에 응용한다.

19. 대량생산공정 설계 및 개발

앞서 검토된 경제성에 관련된 내용을 근거로 전문가와 상의하여, 고효율의 원료를 생산하기 위한 생산 공정 설계도를 완성하여, 시뮬레이션을 실시하여 최적의 생산 조건을 갖춘 공정을 개발한다.

제 2 절 연구결과

1. 항당뇨 후보물질 탐색

6종류의 해조류 시료를 건조한 후 초미세분말 가공과 추출과정을 거쳐 α -amylase와 α -glucosidase 효소활성 저해 실험을 통하여 항당뇨활성 효과를 확인하였다. α -amylase 저해활성 측정에는 PBS 50 ml에 0.1 g BSA와 0.01g/l NaN_3 와 함께 porcine pancreas α -amylase 0.2857 g을 용해시켜 효소용액을 만들고, p-nitrophenyl- α -D-maltopentoglycoside를 PBS에 5 mM 농도로 용해하여 기질용액을 만든 후 효소용액 50 μ l에 시료 10 μ l를 넣어 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 반응 전의 흡광도 측정 후 5분간 실온에 방치하고, 기질용액 50 μ l를 넣고 5분간 반응 후 다시 흡광도를 측정하여 흡광도 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다. 갈조류 6종 (패, 큰잎모자반, 모자반, 지층이, 참그물바탕말, 바위수염)의 메탄올 추출물의 α -glucosidase와 α -amylase의 저해활성을 측정한 결과를 Fig 3에 나타내었다. α -glucosidase 저해활성의 경우 패, 큰잎모자반 그리고 지층이 추출물에서 50%이상의 저해활성을 나타냈고 그 중 패 추출물에서 약 80%의 아주 우수한 α -glucosidase 저해활성을 나타냈다. 또한 패 추출물은 α -amylase의 저해활성에서도 가장 우수한 활성을 나타냈으며 그 외 나머지 추출물은 40% 이하의 낮은 활성을 나타냈다. 따라서 패 추출물을 잠재적인 항당뇨 소재물질로 선정하여 이후의 실험을 진행하였다.

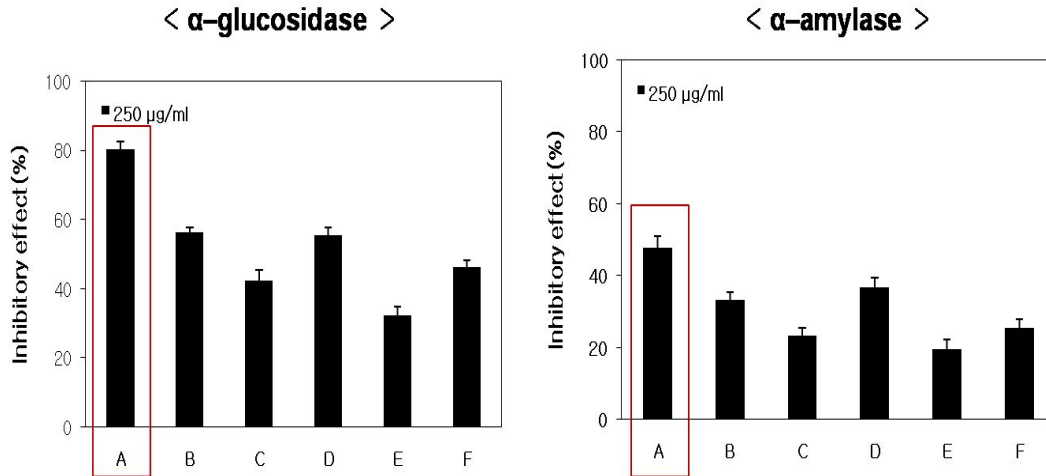


Fig 3. Inhibitory effects of α -glucosidase and α -amylase of brown algae 6 kinds methanol extract.

A: *Ishige okamurae*, B: *Sargarssum coreanum*, C: *Sargarssum fulvellum*, D: *Sargarssum thunbergii*, E: *Dictyota dichotoma*, F: *Myelophycus simplex*

2. 패 추출물에 대한 항당뇨 활성 및 산화적 스트레스개선효과

가. 항당뇨 활성 및 식후 혈당강하 효과

(1) 탄수화물 소화효소 저해활성

(가) α -glucosidase 저해활성

패 추출물의 항당뇨 효과 측정법으로는 현재 제 2형 당뇨병 환자들에게 가장 널리 사용되고 있는 α -glucosidase 저해능 측정법을 사용하였으며, 탄수화물 소화에 관여하는 효소인 α -glucosidase 억제 작용에 기인하는 acarbose를 대조군으로 이용하여 비교 실험하였다. 실험은 패 추출물을 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 측정하였으며 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 저해능은 농도 의존적으로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가됨을 확인할 수 있었다. 패 추출물은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 동일한 농도의 acarbose와 유사한 저해활성을 나타내었다.

식이 중의 전분은 소장에서 α -glucosidase에 의해 분해된 후, 흡수되어 식후 혈당치를 증가시키므로, *in vitro*에서 높은 α -glucosidase 저해활성을 나타낸 패는 *in vivo*에서도 식후 혈당의 급격한 증가를 예방할 수 있으리라 기대된다.

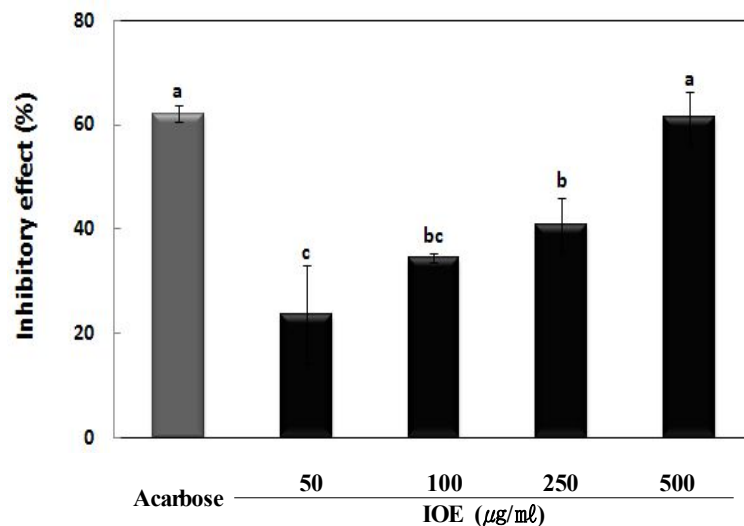


Fig. 4. Inhibitory activity of IOE on α -glucosidase. The final concentration of IOE was 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Each value is expressed as mean \pm SD in triplicate experiments. ^{a-c}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. The concentration of acarbose was 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. IOE: *Ishige Okamura* extract.

(나) α -amylase 저해활성

패 추출물을 이용하여 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 측정하였으며 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 앞서 α -glucosidase 저해활성 측정에서 높은 저해율을 나타내었던 패 추출물은 α -amylase 저해활성 측정에서도 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 저해능이 60.16%로 나타났고, 패 추출물의 저해능은 같은 농도의 acarbose보다 높은 저해율을 나타내었다. 본 실험의 결과로 패의 혈당강하효과가 acarbose와 마찬가지로 탄수화물 소화에 관여하는 효소인 α -amylase 억제 작용에 기인하는 것을 확인하였다.

위의 두 실험을 토대로 α -glucosidase와 α -amylase에 대한 패의 저해효과의 IC₅₀를 측정하였으며 Table 4에 나타내었다. α -glucosidase에 대한 패의 IC₅₀는 0.36 mg/ml이고 α -amylase에

대한 IC50는 0.30 mg/ml로 나타났는데, 이는 각각 0.34 mg/ml와 0.45 mg/mL의 acarbose보다 유사하거나 더 높은 저해율을 나타내었다.

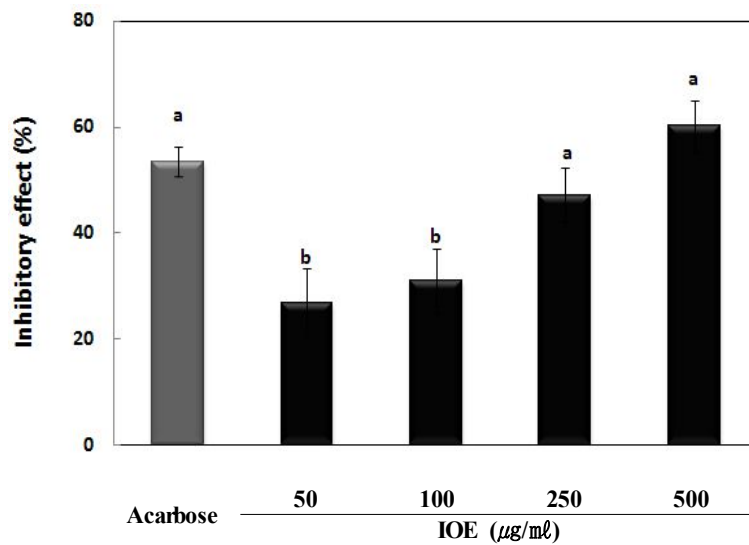


Fig. 5. Inhibitory activity of IOE on α -amylase. The final concentration of IOE was 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Each value is expressed as mean \pm SD in triplicate experiments. ^{a~b}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. The concentration of acarbose was 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. IOE: *Ishige Okamurai* extract

Table 4. IC₅₀ value¹⁾ of inhibitory activity of IOE on α-glucosidase and α-amylase.

Sample	IC ₅₀ (mg/ml)	
	α-glucosidase	α-amylase
Acarbose	0.34±0.02	0.45±0.04
IOE	0.36±0.01	0.30±0.02*

¹⁾IC₅₀ value is the concentration of sample required for 50% inhibition. Each value is expressed as mean±SD (n=3). Significantly different from control at *p<0.05. IOE: *Ishige okamurai* extracts

(2) 식후혈당 강하효과

(가) STZ 유발 당뇨병에 있어서 혈당 강하 효과

α-glucosidase 활성저해 효과와 α-amylase 활성저해 효과에서 높은 저해활성을 나타낸 패 추출물의 식후 혈당 개선효과를 STZ으로 당뇨를 유발한 흰 쥐를 이용하여 측정하였다. 먼저 normal-mice에 시료를 경구 투여한 후 혈당변화를 관찰한 결과를 Fig. 6에 제시하였다. 공복 상태의 증류수군에서 전분 (2 g/kg)을 투여한 후의 혈당 증가는 0, 30, 60, 120분에 각각 138.38, 188.63, 220.13, 190.13 mg/dl 로 나타났으며, 전분과 acarbose (100 mg/kg)를 투여한 군에서는 0, 30, 60, 120분에 각각 121.3, 137.15, 148.5, 121.3 mg/dl, 패 추출물 (500 mg/kg)을 투여한 군에서는 115, 154.5, 168.17, 136.67 mg/dl 로 나타나, 패 추출물 투여군이 증류수 투여군에 비해 식후혈당저하가 효과적으로 일어남을 알 수 있었다. 패 추출물 투여군의 식후 혈당증가곡선의 area under the curve (AUC)는 18,027 ± 500.7 mg · min/dl 로 나타나, 증류수 투여군 (23,344 ± 648.4 mg · min/dl)에 비해 유의적 (p<0.05)으로 작게 나타났으며 acarbose 투여군 (16,255 ± 451.5 mg · min/dl)과 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

다음으로 STZ으로 당뇨를 유발한 흰 쥐에게 패 추출물을 경구 투여한 후 혈당변화를 관찰한 결과를 Fig. 7에 제시하였다. 증류수군에게 전분 (2 g/kg)을 투여한 후의 혈당 증가는 0, 30, 60, 120분에 각각 264, 319.2, 368, 350.2 mg/dl로 나타났으며, 전분과 acarbose (100 mg/kg)를 투여한 군에서는 0, 30, 60, 120분에 각각 268.4, 301.3, 306, 283.7 mg/dl로 나타났다. 전분과 패 추출물 (500 mg/kg)을 투여한 군에서는 254.8, 305.6, 304.2, 277.6 mg/dl로 나타나 대조군인 전분 투여군은 0, 30, 60, 120분에 혈당이 크게 증가된 것으로 나타난 반면 패 추출물 투여군은 대조군에 비해 유의적 (p<0.05)으로 낮은 수준의 혈당을 유지하였다. 패 추출물 투여군의 area under the curve (AUC)는 Table 5에 나타내었다. 패 추출물 투여군은 35,049 ± 927.6 mg · min/dl 로 나타나, 증류수 투여군 (41,670 ± 444.6 mg · min/dl)과 acarbose 투여군 (35,346 ± 686.1 mg · min/dl)에 비해 유의적 (p<0.05)으로 값이 작게 나타났다. 따라서 패 추출물은 당뇨병에 있어서 식후 혈당증가를 저하하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 연, Inoue 등은 식후 최고치 혈당을 강하시키는 약물이 AUC도 감소시키는 효과를 나타내므로, 식후 혈당 개선효과가 탁월하다고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 패 추출물은 식

후 60분의 최고치 혈당을 강하시켰으며, AUC도 유의적 ($p < 0.05$)으로 감소시킨 것으로 나타났다. 당뇨병 예방 및 치료에 있어서는 식후 혈당을 정상치에 가깝게 조절하는 것이 중요하므로, 껌 추출물은 당뇨병의 예방 및 치료에 있어서 유용할 것으로 사료된다.

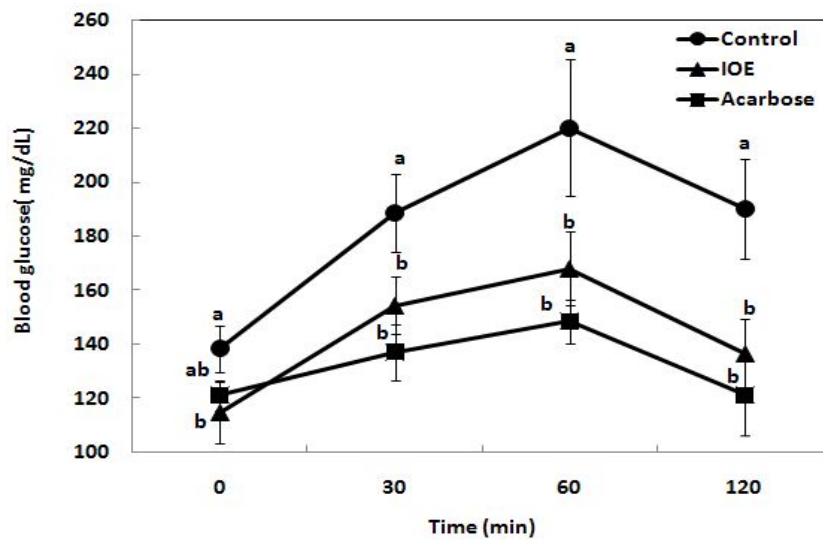


Fig. 6. Blood glucose level after administration of IOE in normal mice. Control (distilled water), acarbose (100 mg/kg) and IOE (500 mg/kg) were co-administered orally with starch (2 g/kg). Each value is expressed as mean±SD of seven mice (n=7). ^{a-b}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. IOE: *Ishige okamurai* extracts

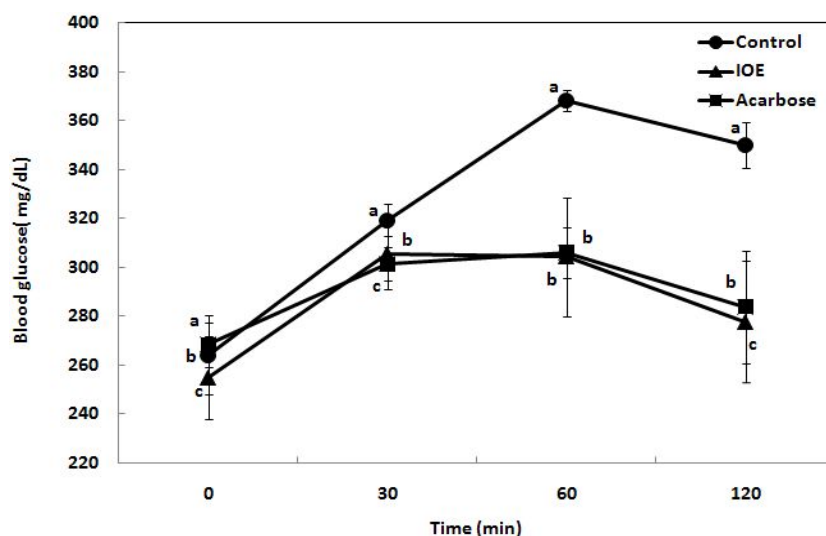


Fig. 7. Blood glucose level after administration of IOE in STZ-induced diabetic mice. Control (distilled water), acarbose (100 mg/kg) and IOE (500 mg/kg) were co-administered orally with starch (2 g/kg). Each value is expressed as mean±SD of seven mice (n=7). ^{a~c}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. IOE: *Ishige okamurai* extracts

Table 5. Area under the curve (AUC) of postprandial glucose responses of normal and STZ-induced diabetic mice

Group ¹⁾	AUC (mg.min/dl)	
	Normal mice	Diabetic mice
Control	23,344 ± 648.4	41,670 ± 444.6
IOE	18,027 ± 500.7 *	35,049 ± 927.6 *
Acarbose	16,255 ± 451.5 *	35,346 ± 686.1 *

¹⁾**Control group:** Starch (2 g/kg) with distilled water was administered orally to a mouse. **Acarbose :** Starch (2 g/kg) with the acarbose (100 mg/kg) was administered orally to a mouse. **IOE :** Starch (2 g/kg) with the *Ishige okamurai* extracts (500 mg/kg) was administered orally to a mouse. Each value is expressed as mean±SD in seven mice (n=7). Significantly different from control at ^{*} $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

나. 당뇨병 세포모델을 이용한 패 추출물의 산화스트레스 개선효과

(1) 세포 생존율

< INS-1 pancreatic β cell >

고농도 포도당에 의한 세포 손상에 대항하는 패 추출물의 보호효과를 Fig. 8에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 세포에서 패 추출물을 분주했을 시 농도 의존적으로 높은 세포 생존율을 보여주었다. 또한, 패 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였을 때, INS-1 세포의 생존율을 60.57% 재생시켰다.

< Human umbilical vein endothelial cells >

고농도 포도당에 의한 세포 손상에 대항하는 패 추출물의 보호효과를 Fig. 9에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 HUVECs에 패 추출물을 분주했을 시 농도 의존적으로 높은 세포 생존율을 보여주었다. 정상농도 (5.5 mM) 포도당으로 사전 처리된 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타내었을 때 패 추출물 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였을 시 HUVECs의 생존도를 98.8% 정도까지 재생시켜 유의적 ($p < 0.05$)으로 우수한 결과를 나타내었다.

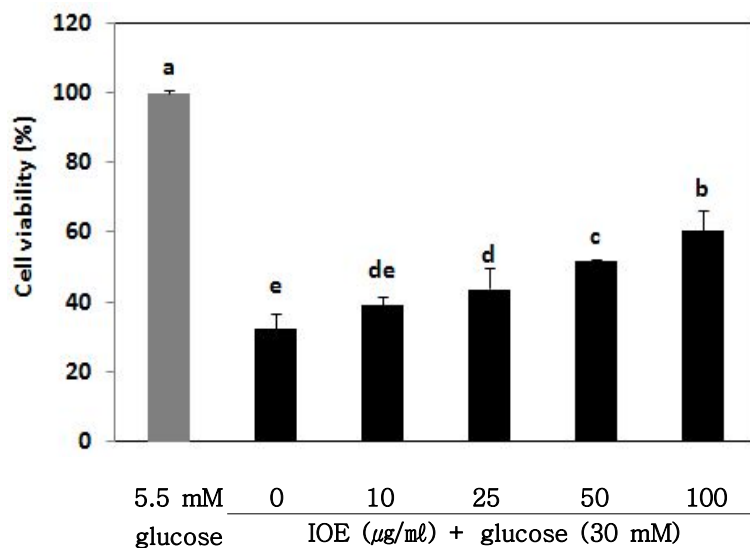


Fig. 8. Effects of IOE on cell viability in high glucose treated INS-1 pancreatic β cells. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts.

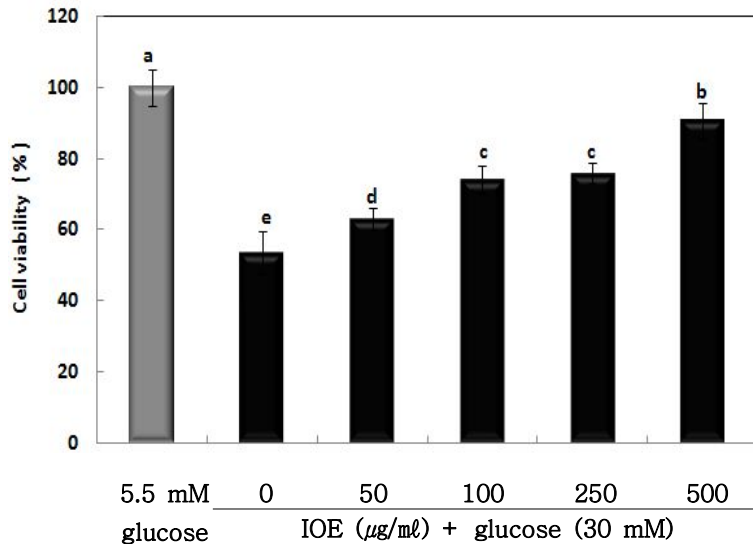


Fig. 9. Effects of IOE on cell viability in high glucose treated HUVECs. Cells in 24 well plates (1×10^6 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 20 hr. Each value is expressed as mean \pm SD ($n=3$). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

(2) 지질 과산화물 측정

< INS-1 cell pancreatic β >

고농도 포도당에 의해 유도된 지질 과산화물가를 Fig. 10에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 INS-1 췌장 β 세포에서 패 추출물 처리군은 농도 의존적으로 낮은 MDA (malondialdehyde) 농도를 나타냄을 볼 수 있다. 특히, 패 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리했을 시 0.187 nmole MDA로, 패 추출물을 처리하지 않았을 때 (0.364 nmole MDA)에 비해 지질 과산화물 생성이 유의적 ($p < 0.05$)으로 크게 감소하는 경향을 나타냈다.

< HUVECs >

고농도 포도당에 의해 유도된 지질 과산화물가를 Fig. 11에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 HUVECs에서 패 추출물을 처리한 세포는 패 추출물을 처리하지 않은 세포에 비해 농도 의존적으로 낮은 MDA (malondialdehyde) 농도를 보였다.

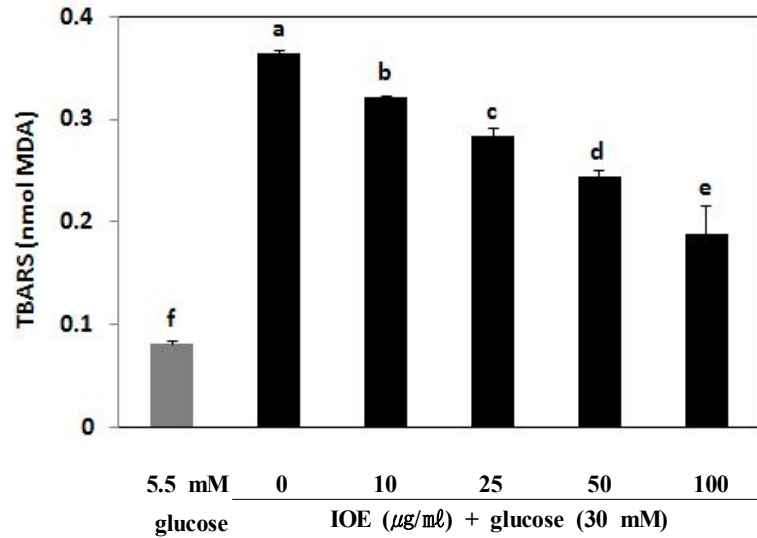


Fig. 10. Effects of IOE on TBARS generation in high glucose treated INS-1 pancreatic β cells. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD ($n=3$). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

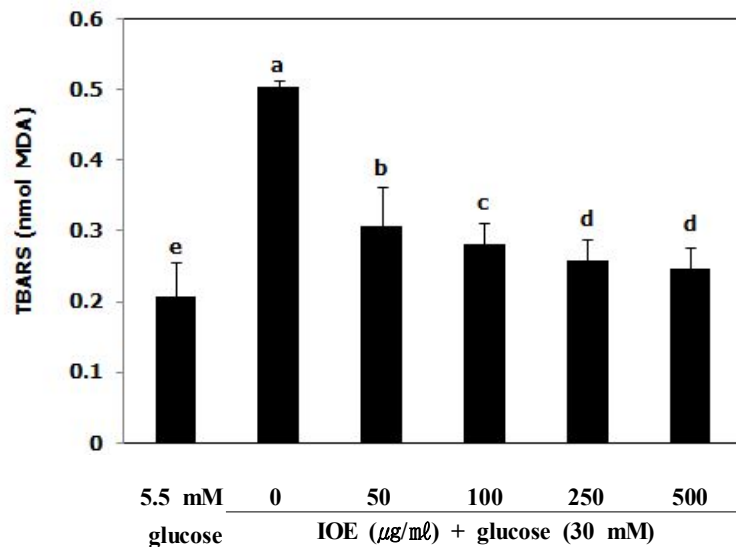


Fig. 11. Effects of IOE on TBARS generation in high glucose treated HUVECs. Cells in 24 well plates (1×10^6 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$) for 20 hr. Each value is expressed as mean \pm SD ($n=3$). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts.

(3) Intracellular ROS level 측정

< INS-1 pancreatic β cell >

고농도 포도당에 의해 유도된 ROS (reactive oxygen species) 생성율을 Fig. 12에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 INS-1 췌장 β 세포에서 ROS 생성율은 고농도 포도당만 처리한 세포에 비해 패 추출물을 함께 처리한 세포에서 농도 의존적으로 감소하였다. 특히, 패 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리했을 시 ROS 생성율은 167.35%로 시료 무첨가군 (215.81%)에 비해 유의적 ($p < 0.05$)으로 크게 감소하는 경향을 나타냈다.

< HUVECs >

고농도 포도당에 의해 유도된 ROS (reactive oxygen species) 생성율을 Fig. 13에 제시하였다. HUVECs의 ROS 생성율은 패 추출물을 분주한 세포에서 농도 의존적으로 감소하였다. 특히, 패 추출물을 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리했을 시 ROS 생성율은 137.11%로, 처리하지 않은 경우 (313.9%)에 비해 매우 감소하는 것으로 나타났다. 이는 지질과산화물 생성 저해와 더불어 산화스트레스를 크게 감소시켜 줄 것으로 사료된다.

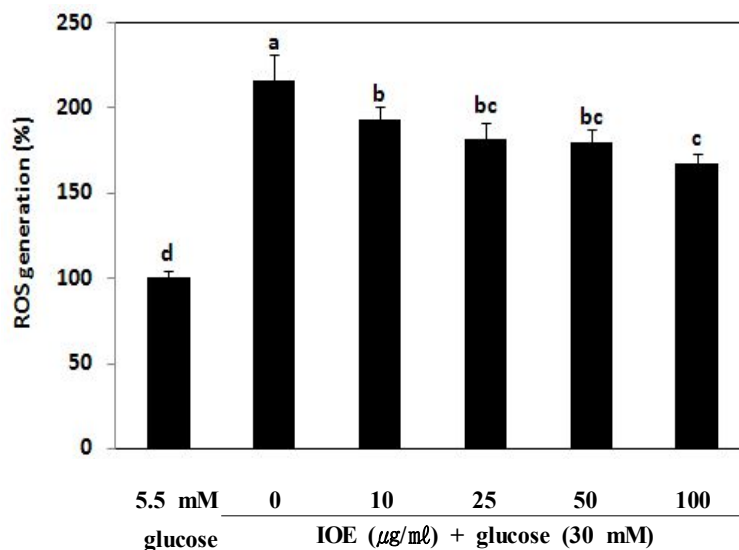


Fig. 12. Effects of IOE on intracellular ROS level in high glucose treated INS-1 pancreatic β cells. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

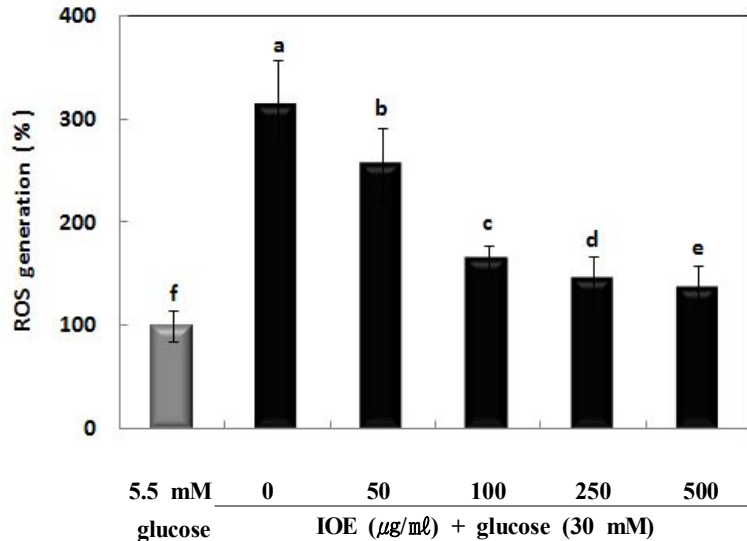


Fig. 13. Effects of IOE on intracellular ROS level in high glucose treated HUVECs. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 20 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

(4) NO level 측정

< INS-1 pancreatic β cell >

고농도 포도당에 의해 유도된 NO (nitric oxide) 생성율을 Fig. 14에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 INS-1 세포에 패 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 경우 NO 생성율은 167.57%로, 시료 무첨가군 (216.22%)에 비해 유의적 ($p < 0.05$)으로 크게 감소하는 경향을 나타내었다. 패 추출물의 radical 소거 효과와 지질 과산화 억제를 통한 산화스트레스의 개선은 당뇨병증을 예방 할 수 있을 것으로 기대된다.

< HUVECs >

고농도 포도당에 의해 유도된 NO (nitric oxide) 생성율을 Fig. 15에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 HUVECs에 패 추출물을 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 경우 NO 생성율은 125.4%로, 시료 무첨가군(168.5%)에 비해 유의적 ($p < 0.05$)으로 감소하는 경향을 나타내었다.

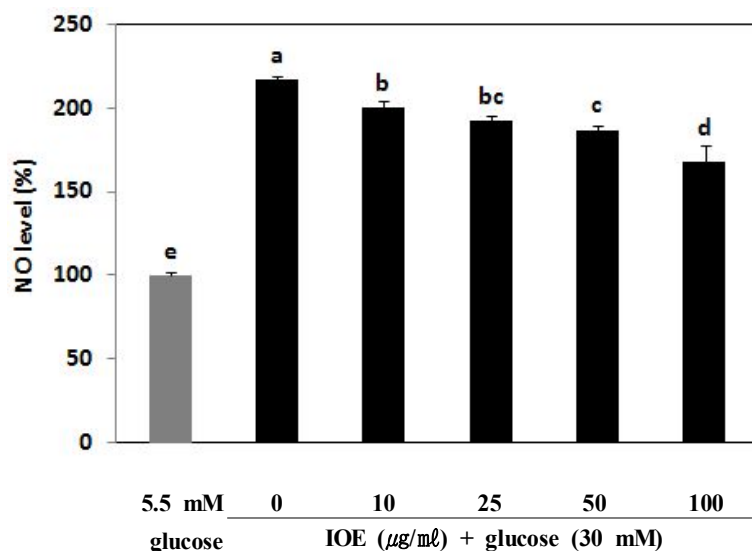


Fig. 14. Effects of IOE on NO level in high glucose treated INS-1 pancreatic β cells. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

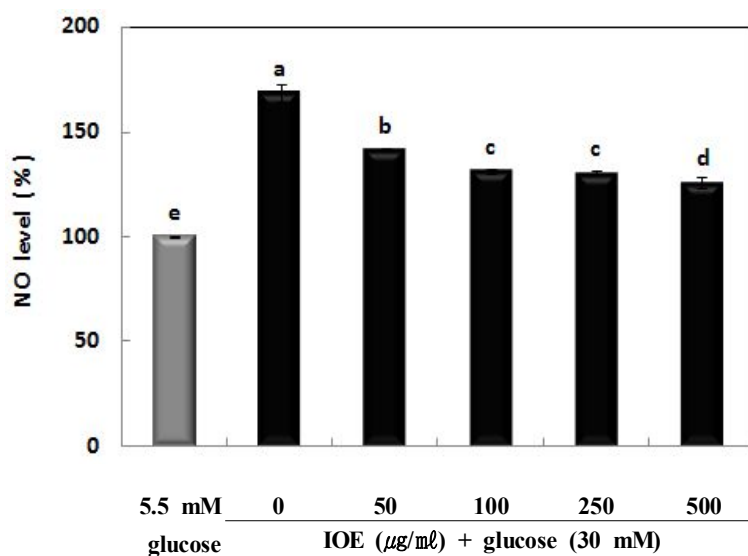


Fig. 15. Effects of IOE on NO level in high glucose treated HUVECs. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 20 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

(5) 항산화효소 활성 측정

(가) HUVECs

① Superoxide dismutase (SOD) 활성

항산화 효소인 SOD는 superoxide를 hydrogen peroxide 와 oxygen으로 전환 시키는 효소로, 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 HUVECs에서 꽤 추출물을 분주했을 시, 시료를 무첨가한 세포보다 농도 의존적으로 높은 SOD 활성을 나타냄을 Fig. 16에서 볼 수 있다. 특히 꽤 추출물을 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하였을 때, 5.5 mM 포도당으로 사전 처리된 대조군 세포의 SOD 활성 (100%)과 유사한 수준의 SOD 활성 (81.6%)을 나타내었다.

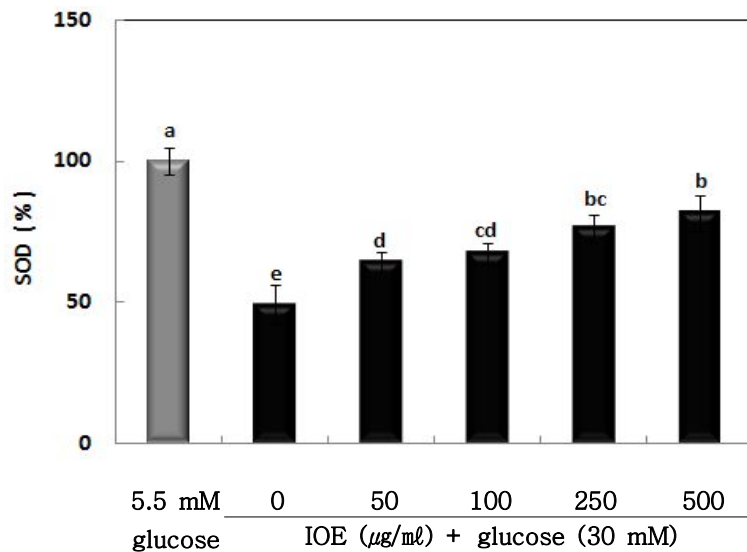


Fig. 16. Effects of IOE on superoxide dismutase (SOD) activity in high glucose treated HUVECs. Cells in 10 mm dishes (2×10^5 cells/dish) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 20 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

② Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성

Glutathione peroxidase (GSH-Px)는 glutathione을 기질로 필요로 하는 효소로, 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 HUVECs에서 각 시료를 농도별로 분주했을 시 농도 의존적으로 높은 GSH-px 활성을 나타냄을 Fig. 17에서 볼 수 있다. 5.5 mM 포도당으로 사전 처리된 대조군 세포의 GSH-px 활성 (100%)을 기준으로, 패 추출물을 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하였을 때 GSH-px 활성은 83.1%로 대조군과 거의 유사한 수준을 나타내었다.

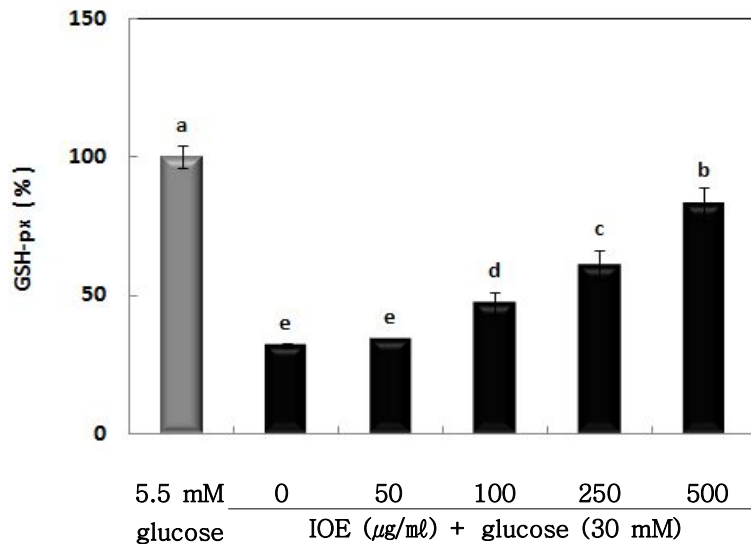


Fig. 17. Effects of IOE on glutathione peroxidase (GSH-px) activity in high glucose treated HUVECs. Cells in 10 mm dishes (2×10^5 cells/dish) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 20 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

③ Catalase 활성

항산화 효소인 catalase는 SOD의 작용에 의해 발생된 유해물질인 과산화수소를 물과 산소로 바꾸어 줌으로써 산화 스트레스로부터 세포를 보호하는 효소로, 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 HUVECs에서 패 추출물을 분주한 세포는 패 추출물을 처리하지 않은 세포보다 높은 catalase 활성을 나타냄을 Fig. 18에서 볼 수 있다. 특히 패 추출물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 시 58.6%의 활성을 나타내어 낮은 농도에서도 높은 활성을 나타내었다.

모든 실험결과 고농도 포도당으로 사전 처리된 HUVECs에서 패 추출물이 처리되었을 때 항산화 효소에 대해 보호효과가 현저히 높게 나타남으로서 산화스트레스가 개선됨을 확인할 수 있었다.

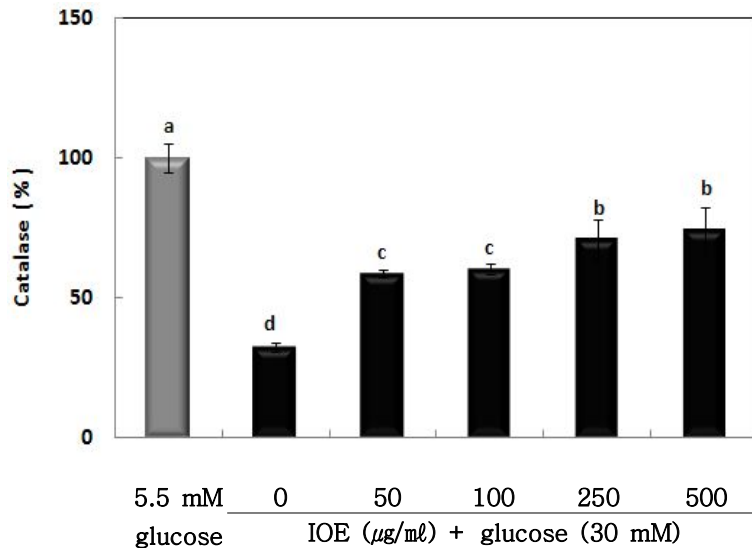


Fig. 18. Effects of IOE on catalase activity in high glucose treated HUVECs. Cells in 10 mm dishes (2×10^5 cells/dish) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of IOE (0, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$) for 20 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. IOE: *Ishige okamurai* extracts

3. 패로부터 항당뇨 후보물질의 분리정제 및 구조분석

6종류의 갈조류 중 α -glucosidase와 α -amylase 저해 활성이 가장 높은 패를 이용하여 항당뇨 물질의 분리 및 정제 하였다. 분리 및 정제 방법은 허 등 (2008)의 방법에 준하여 실시하였다. 동결 건조한 후 분말화 한 패 500 g을 취한 후 80% 메탄올에 혼합하여 상온의 shaking incubator에서 24시간동안 추출한 후 $3,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 잔사를 제거한 상층액을 취하였다. 이러한 과정을 3회 반복한 후 얻어진 상층액을 감압 여과하여 메탄올 제거하였다. 농축하여 얻은 추출물을 물에 용해시킨 후에 n-hexane, chloroform, ethyl acetate 그리고 butanol의 순으로 용매 분획을 실시하였고, 최종적으로 ethyl acetate 분획물을 선택하여 55×400 mm의 유리관에 75-150 μm 직경의 silica gel을 충전한 컬럼에 ethyl acetate에서 얻은 분획물을 주입하고 chloroform:methanol을 50:1에서 0:1 비율로 용리시켜 활성성분을 얻었다. 활성성분을 25×300 mm의 유리관에 25-100 μm 직경의 sephadex LH-20을 충전한 컬럼에 다시 주입하여 70% 아세톤으로 용리시켜 활성성분을 얻었다. 이 활성성분은 다시 고성능 액체크로마토그래피 (Acetonitrile : water = 15:85, 유속 = 1.0 ml/min, 10×250 mm C-18 컬럼)를 이용하여 정제하였다. 이러한 분리 및 정제과정을 그림 1의 모식도로 간략하게 나타내었다. 이 물질에 대한 자외선-가시광선 스펙트럼의 측정값은 UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ) = 232 (3.7), 적외선 스펙트럼의 측정값은 IR (KBr) ν_{max} 3391, 1615, 1498, 1279, 1188, 965, 818 cm^{-1} , 그리고 질량분석 스펙트럼의 측정값은 HREIMS m/z 512.0589 [M]⁺ (calcd for C₂₄H₁₆O₁₃, 512.0591) 이었다. 또한, ¹H-NMR을 이용하여 분석한 결과 δ 1H (mult, J = Hz)는 5.69(1H, s), 6.06 (1H, s), 5.87 (2H, s), 5.87 (2H, s), 5.67 (2H, d, 2), 5.78 (1H, t, 2), 5.67 (2H, d, 2)이었으며, 상기 분석결과로부터 상기물질은 diploretrohydroxycarmalol임을 확인하였다 (Fig. 19, 20, 21).

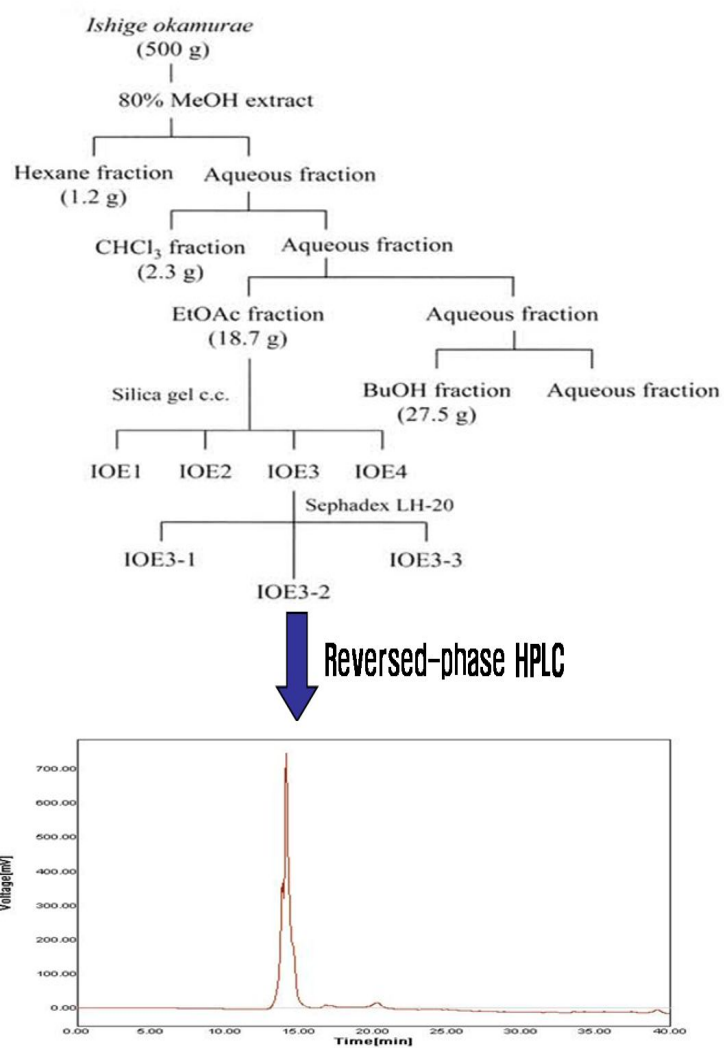
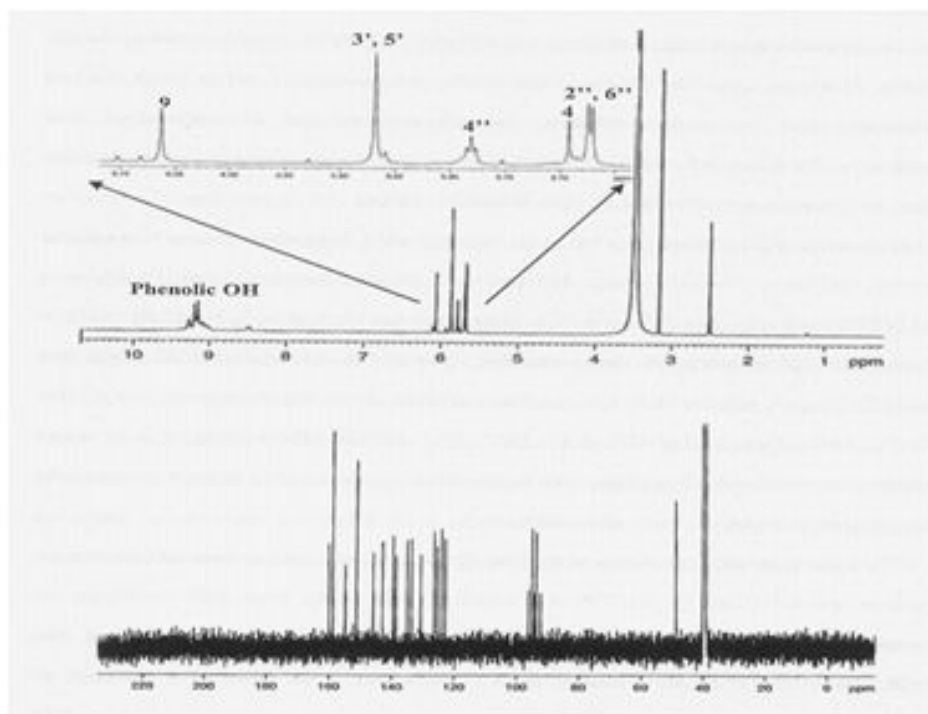


Fig. 19. Separation and purification process diagram of anti-diabetes material from *Ishige okamurae*



Position	¹³ C	¹ H (mult. J=Hz)
1	135.1	
2	125.5	
3	133.8	
4	92.4	5.69 (1H, s)
4a	143.0	
5a	146.0	
6	139.6	
7	138.8	
8	124.1	
9	94.3	6.06 (1H, s)
9a	126.4	
10a	130.7	
1'	122.9	
2', 6'	151.3	
3', 5'	95.0	5.87 (2H, s)
4'	154.9	
1''	160.1	
2'', 6''	93.7	5.67 (2H, d, J=2)
3'', 5''	158.9	
4''	96.1	5.78 (1H, t, J=2)

*500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C.

Fig. 20. Proton and Carbon NMR spectrum of purified anti-diabetes material from *Ishige okamurae*

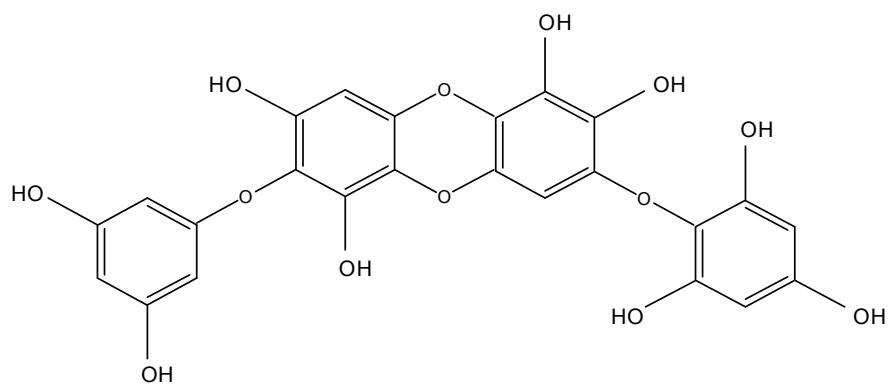


Fig. 21. Structure of diphlorethohydroxycarmalol from *Ishige okamurae*

4. 폐로부터 분리한 diphlorethohydroxycarmalol의 항균 및 항진균 효과

폐로서부터 분리한 DPHC물질에 대한 항균 및 항진균 실험을 실시하였다. 항균과 항진균에 사용된 균주는 *Staphylococcus aureus* KCTC 3831, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913, *Candida albicans* KCTC 7965, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2513, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Escherichia coli* KCTC 2517, *Bacillus subtilis* KCTC 1021 7종류에 대해 실시하였으며, 농도는 0.1mM 동일한 양으로 항균 실험을 하였다. 항균력이 좋은 물질의 경우 0.1mM이하에서도 항균활성이 아주 뛰어나고 그 이상의 농도가 들어갔을 경우 경제성이 맞지 않기 때문에 0.1mM의 고정농도로 활성을 확인하였다. 그 결과 0.1mM 농도에서 7개 균주 모두 활성이 나타나지 않았으며, 0.5mM의 고농도에서 일부 항균에서 활성이 나타났다(Table 6).

Table 6. Antimicrobial activity of DPHC

Strains	DPHC Conc.(mM)	Activity(mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 3831	0.1	-
	0.5	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7913	0.1	-
	0.5	5
<i>Candida albicans</i> KCTC 7965	0.1	-
	0.5	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 2513	0.1	-
	0.5	4
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1925	0.1	-
	0.5	3
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2517	0.1	-
	0.5	6
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	0.1	-
	0.5	-

5. 폐로부터 분리한 diphlorethohydroxycarmalol의 항당뇨 및 생리활성 분석

5-1. 항당뇨 활성 및 식후 혈당강하 효과

1) 탄수화물 소화효소 저해활성

(1) α -glucosidase 저해활성

diphlorethohydroxycarmalol의 항당뇨 효과 측정법으로는 현재 제 2형 당뇨병 환자들에게 가장 널리 사용되고 있는 α -glucosidase 저해능 측정법(28)을 사용하였으며, 탄수화물 소화에 관여하는 효소인 α -glucosidase 억제 작용에 기인하는(27,28) acarbose를 대조군으로 이용하여 비교 실험하였다. 실험은 diphlorethohydroxycarmalol을 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 측정하였으며 그 결과는 Fig. 22에 나타내었다. 저해능은 농도 의존적으로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가됨을 확인할 수 있었다. diphlorethohydroxycarmalol은 낮은 농도에서 acarbose보다 높은 저해효과를 나타내었으며, 특히 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 90.97%의 저해활성을 보여주었다.

식이 중의 전분은 소장에서 α -glucosidase에 의해 분해된 후, 흡수되어 식후 혈당치를 증가시

키므로, *in vitro*에서 높은 α -glucosidase 저해활성을 나타낸 diphlorethohydroxycarmalol은 *in vivo*에서도 식후 혈당의 급격한 증가를 예방할 수 있으리라 기대된다.

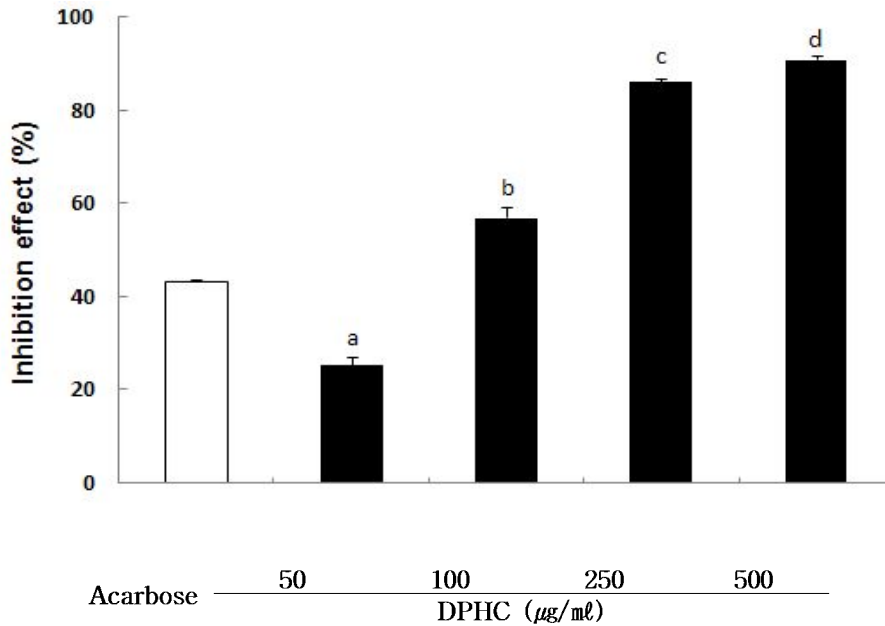


Fig. 22. Inhibitory activity of diphlorethohydroxycarmalol on α -glucosidase. The final concentration of diphlorethohydroxycarmalol was 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$. Each value is expressed as mean \pm SD in triplicate experiments. ^{a-d}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. The concentration of acarbose was 500 $\mu\text{g/ml}$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

(2) α -amylase 저해활성

diphlorethohydroxycarmalol을 이용하여 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 측정하였으며 그 결과를 Fig. 23에 나타내었다. 앞서 α -glucosidase 저해활성 측정에서 높은 저해율을 나타내었던 diphlorethohydroxycarmalol은 α -amylase 저해활성 측정에서도 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 저해능이 61.66%로 나타났고, diphlorethohydroxycarmalol의 저해능은 같은 농도의 acarbose보다 높은 저해율을 나타내었다.

본 실험의 결과로 diphlorethohydroxycarmalol의 혈당강하효과가 acarbose와 마찬가지로 탄화물 소화와 관여하는 효소인 α -amylase 억제 작용에 기인하는 것을 확인하였다.

위의 두 실험을 토대로 α -glucosidase와 α -amylase에 대한 diphlorethohydroxycarmalol의 저해효과의 IC_{50} 을 측정하였으며 Table 6에 나타내었다. α -glucosidase에 대한 diphlorethohydroxycarmalol의 IC_{50} 은 0.08 mg/mL이고 α -amylase에 대한 IC_{50} 은 0.27 mg/mL로 나타났는데, 이는 각각 0.68 mg/mL와 0.71 mg/mL의 acarbose보다 더 높은 저해율을 나타내었다.

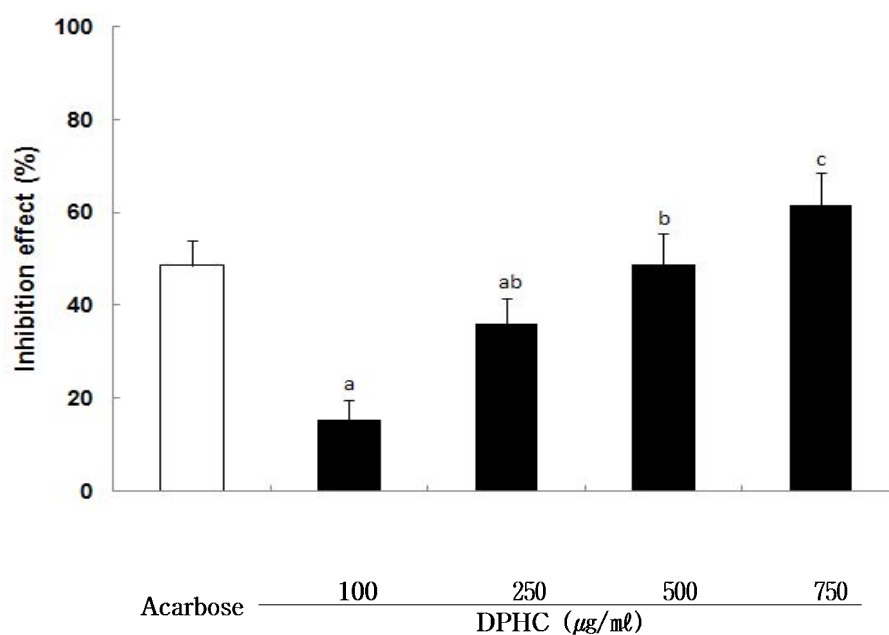


Fig. 23. Inhibitory activity of diphlorethohydroxycarmalol on α-amylase. The final concentration of diphlorethohydroxycarmalol was 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$. Each value is expressed as mean \pm SD in triplicate experiments. ^{a-c}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. The concentration of acarbose was 500 $\mu\text{g/ml}$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

Table 6. IC₅₀ value¹⁾ of inhibitory activity of diphlorethohydroxycarmalol on α-glucosidase and α-amylase

Group	IC ₅₀ (mg/mL)	
	α-glucosidase	α-amylase
Acarbose	0.68 ± 0.03	0.71 ± 0.07
DPHC	0.08 ± 0.01*	0.27 ± 0.08*

¹⁾ IC₅₀ value is the concentration of sample required for 50% inhibition. Each value is expressed as mean \pm SD in triplicate experiments. Significantly different from control at * $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

2) 식후혈당 강하효과

(1) STZ 유발 당뇨쥐에 있어서 혈당 강하 효과

α -glucosidase 활성저해 효과와 α -amylase 활성저해 효과에서 높은 저해활성을 나타낸 diphlorethohydroxycarmalol의 식후 혈당 개선효과를 STZ으로 당뇨를 유발한 흰 쥐를 이용하여 측정하였다. 먼저 normal-mice에 시료를 경구 투여한 후 혈당변화를 관찰한 결과를 Fig. 24에 제시하였다. Normal-mice의 공복혈당을 측정하고 이를 0으로 하여, 증류수군과 acarbose 투여군, diphlorethohydroxycarmalol 투여군의 혈당 증가량을 측정하였다. 공복 상태의 증류수군에서 전분 (2 g/kg)을 투여한 후의 혈당 증가는 30, 60, 120분에 각각 50.25, 81.75, 51.75 mg/dl 로 나타났으며, 전분과 acarbose (100 mg/kg)를 투여한 군에서는 30, 60, 120분에 각각 35.00, 39.00, 15.67 mg/dl, diphlorethohydroxycarmalol (100 mg/kg)을 투여한 군에서는 34.17, 43.00, 6.17 mg/dl 로 나타나, diphlorethohydroxycarmalol 투여군이 증류수 투여군과 acarbose 투여군에 비해 식후혈당저하가 효과적으로 일어남을 알 수 있었다. diphlorethohydroxycarmalol 투여군의 식후혈당증가곡선의 area under the curve (AUC)는 $3,145 \pm 134.2$ mg · min/dl 로 나타나, 증류수 투여군 ($6,708 \pm 112.5$ mg · min/dl)과 acarbose 투여군 ($3,275 \pm 91.9$ mg · min/dl)에 비해 유의적 ($p < 0.05$)으로 작게 나타났다.

다음으로 STZ으로 당뇨를 유발한 흰 쥐에게 diphlorethohydroxycarmalol을 경구 투여한 후 혈당변화를 관찰한 결과를 Fig. 25에 제시하였다. 공복 상태의 혈당을 0으로 하였을 때, 증류수군에게 전분 (2 g/kg)을 투여한 후의 혈당 증가는 30, 60, 120분에 각각 93.00, 98.00, 50.00 mg/dl로 나타났으며, 전분과 acarbose (100 mg/kg)를 투여한 군에서는 30, 60, 120분에 각각 66.00, 65.00, 32.30 mg/dl로 나타났다. 전분과 diphlorethohydroxycarmalol (100 mg/kg)을 투여한 군에서는 33.00, 52.30, 29.30 mg/dl로 나타나 대조군인 전분 투여군은 30, 60, 120분에 혈당이 크게 증가된 것으로 나타난 반면 diphlorethohydroxycarmalol 투여군은 대조군에 비해 유의적 ($p < 0.05$)으로 낮은 수준의 혈당을 유지하였다. diphlorethohydroxycarmalol 투여군의 식후혈당증가곡선의 area under the curve (AUC)는 Table 7에 나타내었다. diphlorethohydroxycarmalol 투여군은 $4,222 \pm 122.3$ mg · min/dl 로 나타나, 증류수 투여군 ($8,700 \pm 118.4$ mg · min/dl)과 acarbose 투여군 ($5,875 \pm 212.1$ mg · min/dl)에 비해 유의적 ($p < 0.05$)으로 작게 나타났다.

따라서 diphlorethohydroxycarmalol은 당뇨쥐에 있어서 식후 혈당증가를 저하하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 연, Inoue 등(47)은 식후 최고치 혈당을 강하시키는 약물이 AUC도 감소시키는 효과를 나타내므로, 식후 혈당 개선효과가 탁월하다고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 diphlorethohydroxycarmalol은 식후 60분의 최고치 혈당을 강하시켰으며, AUC도 유의적 ($p < 0.05$)으로 감소시킨 것으로 나타났다. 당뇨병 예방 및 치료에 있어서는 식후 혈당을 정상치에 가깝게 조절하는 것이 중요하므로(43, 48-52), diphlorethohydroxycarmalol은 당뇨병의 예방 및 치료에 있어서 유용한 것으로 사료된다.

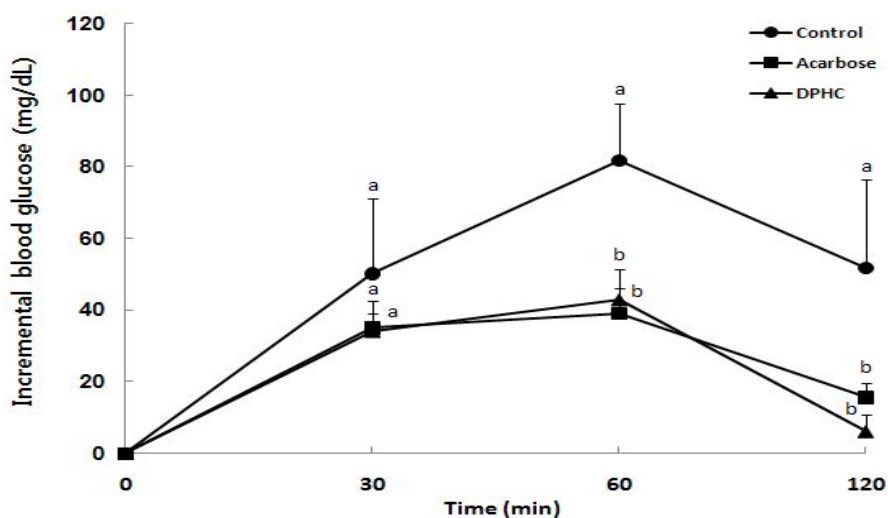


Fig. 24. Incremental blood glucose after administration of diphlorethohydroxycarmalol in normal mice. Control (distilled water), acarbose (100 mg/kg) and diphlorethohydroxycarmalol (100 mg/kg) were co-administered orally with starch (2 g/kg). Each value is expressed as mean±SD of seven mice (n=7). ^{a~b}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

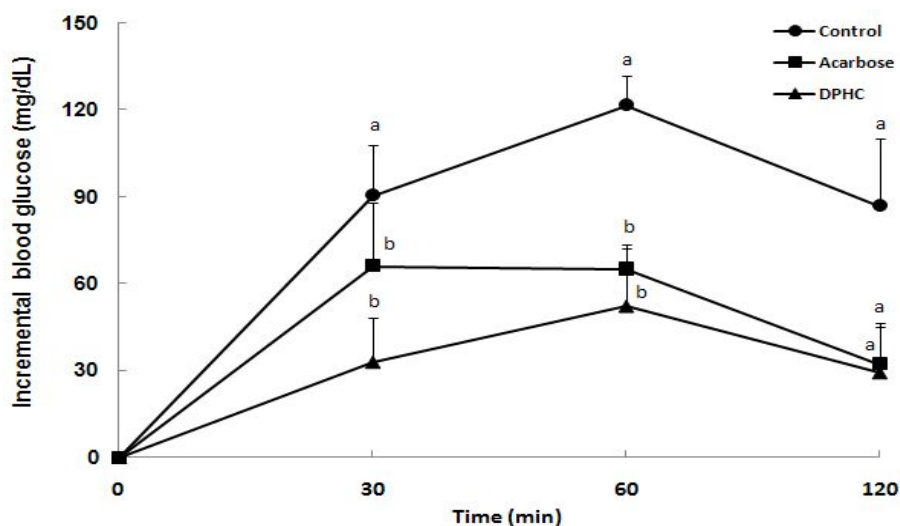


Fig. 25. Incremental blood glucose after administration of diphlorethohydroxycarmalol in STZ-induced diabetic mice. Control (distilled water), acarbose (100 mg/kg) and diphlorethohydroxycarmalol (100 mg/kg) were co-administered orally with starch (2 g/kg). Each value is expressed as mean±SD of seven mice (n=7). ^{a~b}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

Table 7. Area under the curve (AUC) of postprandial glucose responses of normal and STZ-induced diabetic mice

Group ¹⁾	AUC (mg · min/dl)	
	Normal mice	Diabetic mice
Control	6,708 ± 112.5	8,700 ± 118.4
Acarbose	3,275 ± 91.9*	5,875 ± 212.1*
DPHC	3,145 ± 134.2*	4,222 ± 122.3*

¹⁾Control group : (distilled water) Starch (2 g/kg) was administered orally to a mouse. Acarbose : Starch (2 g/kg) with the acarbose (100 mg/kg) was administered orally to a mouse. DPHC : Starch (2 g/kg) with the diphlorethohydroxycarmalol (100 mg/kg) was administered orally to a mouse. Each value is expressed as mean±SD in seven mice (n=7). Significantly different from control at **p* < 0.01. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

5-2. 당뇨병 세포모델을 이용한 DPHC의 산화스트레스 개선효과

1) 세포 생존율

< RIN-m5F cell >

고농도 포도당에 의한 세포의 손상에 대항하는 diphlorethohydroxycarmalol의 보호효과를 Fig. 26에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 RIN-m5F 세포에서 diphlorethohydroxycarmalol을 분주한 세포에서 농도 의존적으로 높은 세포 생존율을 보여주었다. 반면 5.5 mM 포도당으로 사전 처리된 대조군 세포에서 가장 높은 세포 생존율을 나타내었다. 또한, diphlorethohydroxycarmalol 50 µg/ml을 처리하였을 때, RIN-m5F 세포의 생존율을 70% 재생시켰다.

< HUVECs >

고농도 포도당에 의한 세포 손상에 대항하는 diphlorethohydroxycarmalol의 보호활성을 Fig. 27에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 HUVECs에서 diphlorethohydroxycarmalol을 분주했을 시 농도 의존적으로 높은 세포 생존율을 보여주었다. 5.5 mM 포도당으로 사전 처리된 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타내었을 때 diphlorethohydroxycarmalol 50µg/ml을 처리하였을 시 HUVECs의 생존도를 81.4% 정도까지 재생시켜 유의적 (*p*<0.05)으로 높은 결과를 나타내었다.

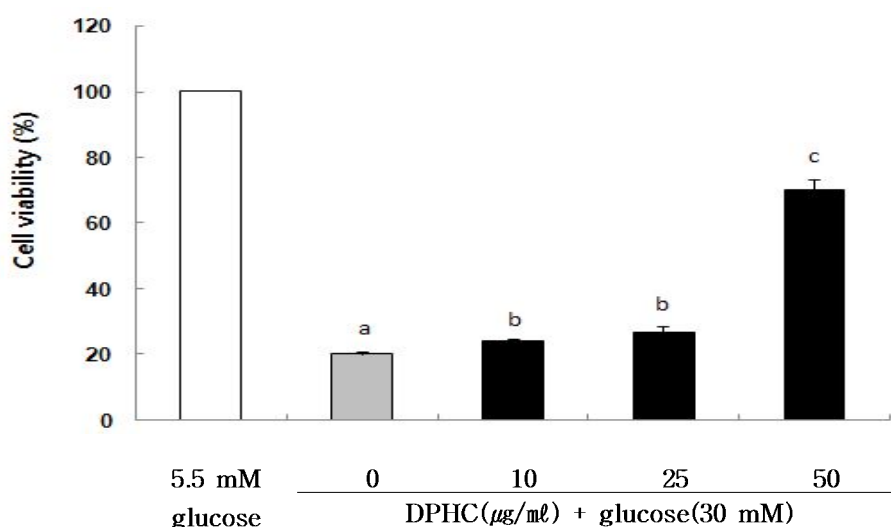


Fig. 26. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on cell viability in high glucose treated RIN-m5F cells. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD ($n=3$). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

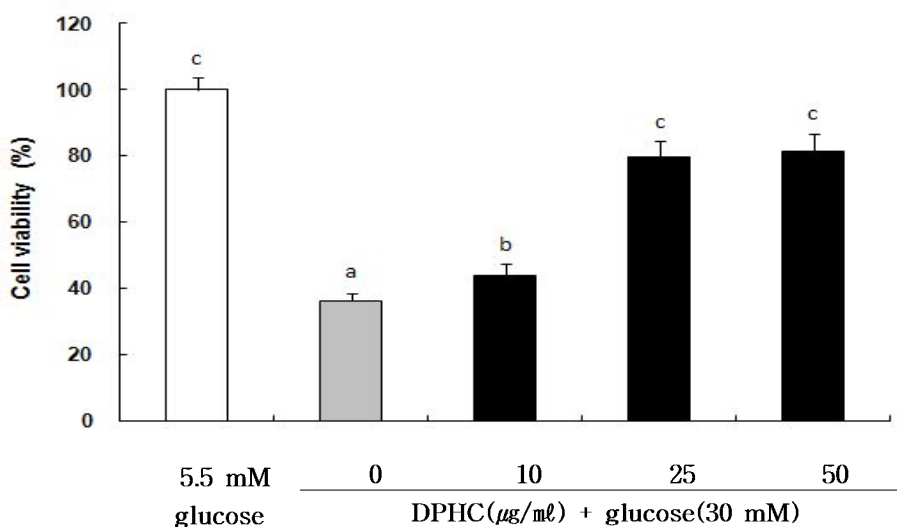


Fig. 27. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on cell viability in high glucose treated HUVECs. Cells in 24 well plates (4×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 20 hr. Each value is expressed as mean \pm SD ($n=3$). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

2) 지질 과산화물 측정

< RIN-m5F cell >

고농도 포도당에 의해 유도된 지질 과산화물가를 Fig. 28에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 RIN-m5F 세포에서 diphlorethohydroxycarmalol은 농도 의존적으로 낮은 MDA 농도를 나타냄을 볼 수 있다. 특히, diphlorethohydroxycarmalol을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리했을 시 0.519 nmole MDA로, diphlorethohydroxycarmalol을 처리하지 않았을 때 (0.942 nmole MDA)에 비해 유의적 ($p < 0.05$)으로 크게 감소하는 경향을 나타냈다. 반면 5.5 mM의 정상농도 포도당으로 사전 처리된 대조군 세포에서는 낮은 MDA 농도를 나타내었다.

< HUVECs >

고농도 포도당에 의해 유도된 지질 과산화물가를 Fig. 29에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 HUVECs에서 diphlorethohydroxycarmalol을 처리한 세포는 농도 의존적으로 낮은 MDA (malondial dehyde) 농도를 보였다. 반면 5.5 mM 정상농도 포도당으로 스트레스를 주지 않은 대조군에서는 낮은 MDA 농도를 나타내었다.

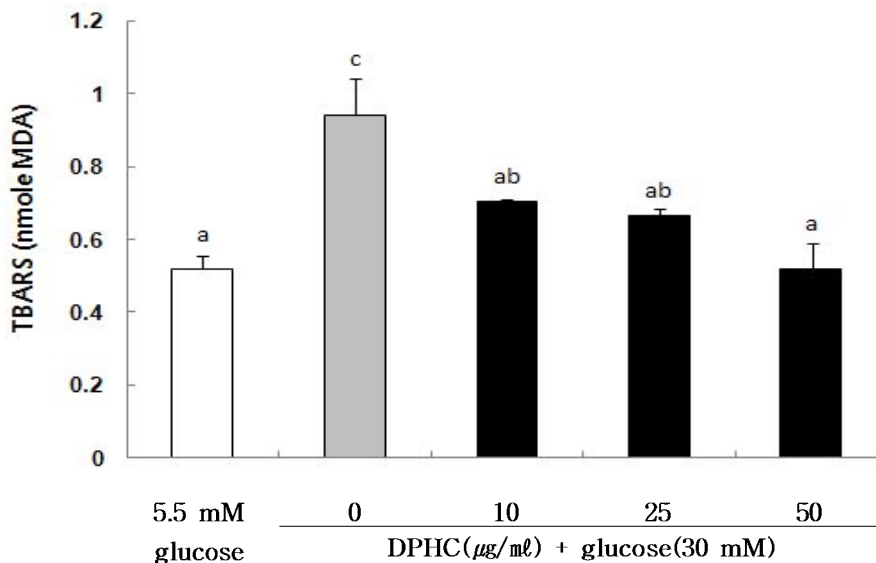


Fig. 28. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on TBARS generation in high glucose treated RIN-m5F cells. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

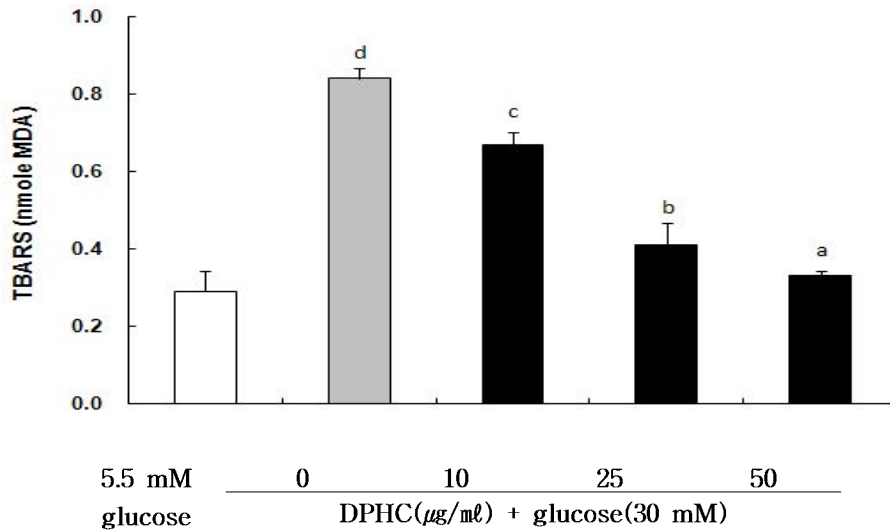


Fig. 29. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on TBARS generation in high glucose treated HUVECs. Cells in 24 well plates (4×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 20 hr. Each value is expressed as mean \pm SD ($n=3$). A value sharing same superscript is not significantly different at $p<0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

3) Intracellular ROS level 측정

< RIN-m5F cell >

고농도 포도당에 의해 유도된 ROS (reactive oxygen species) 생성율을 Fig. 30에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 RIN-m5F 세포에서 ROS 생성율은 diphlorethohydroxycarmalol을 처리한 세포는 농도 의존적으로 감소하였다. 특히, diphlorethohydroxycarmalol을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리했을 시 ROS 생성율은 80.6%로 시료 무첨가군 (160.0%)에 비해 유의적 ($p<0.05$)으로 크게 감소하는 경향을 나타냈다.

< HUVECs >

고농도 포도당에 의해 유도된 ROS (reactive oxygen species) 생성율을 Fig. 31에 제시하였다. HUVECs의 ROS 생성율은 diphlorethohydroxycarmalol을 분주한 세포는 농도 의존적으로 감소하였다. 특히, diphlorethohydroxycarmalol을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리했을 시 ROS 생성율은 148.8%로, 처리하지 않은 경우 (275.3%)에 비해 매우 감소하는 것으로 나타났다. 이는 지질과산화물 생성 저해와 더불어 산화스트레스를 크게 감소시켜 줄 것으로 사료된다.

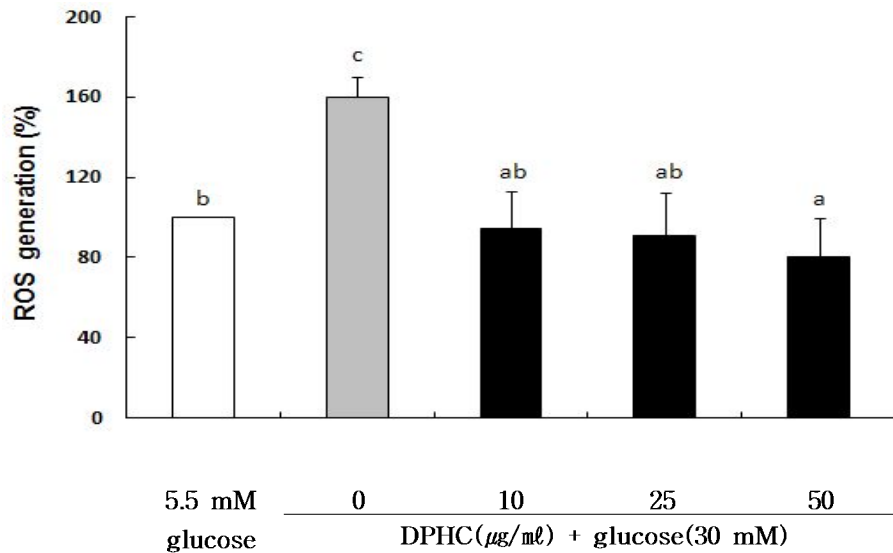


Fig. 30. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on intracellular ROS level in high glucose treated RIN-m5F cells. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

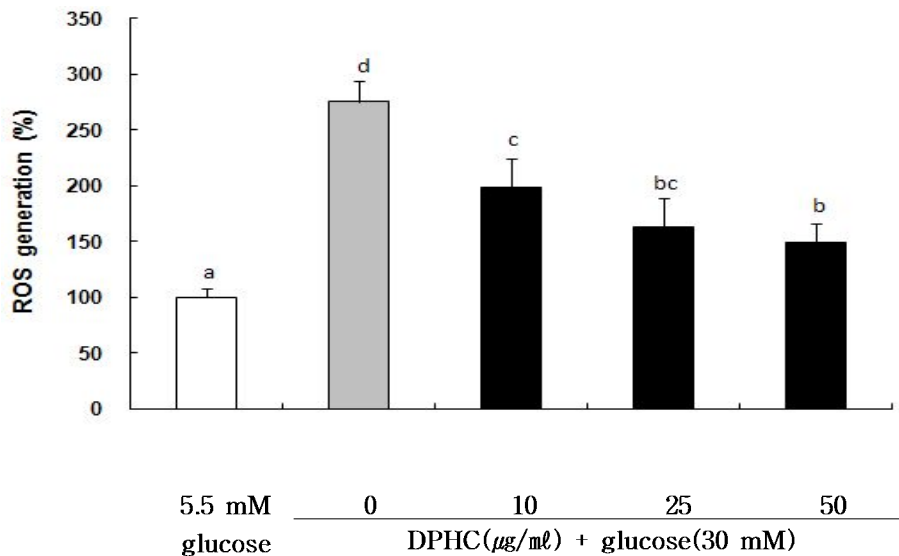


Fig. 31. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on intracellular ROS level in high glucose treated HUVECs. Cells in 96 well plates (4×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

4) NO level 측정

< RIN-m5F cell >

고농도 포도당에 의해 유도된 NO (nitric oxide) 생성율을 Fig. 32에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 RIN-m5F 세포에 diphlorethohydroxycarmalol을 처리한 경우 NO 생성율은 128.2%로, 시료 무첨가군(217.3%)에 비해 유의적 ($p<0.05$)으로 크게 감소하는 경향을 나타내었다. Radical 소거 효과와 지질 과산화 억제를 통한 산화스트레스의 개선은 여러 가지 기능장애의 원인 해결이나 예방 가능성이 있을 것으로 사료된다.

< HUVECs >

고농도 포도당에 의해 유도된 NO (nitric oxide) 생성율을 Fig. 33에 제시하였다. 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 HUVECs에 diphlorethohydroxycarmalol을 처리한 경우 NO 생성율은 110.6%로, 시료 무첨가군(337%)에 비해 유의적 ($p<0.05$)으로 크게 감소하는 경향을 나타내었다. Radical 소거 효과와 지질과 산화억제를 통한 산화스트레스의 개선은 여러 가지 기능장애의 원인 해결이나 예방 가능성이 있을 것으로 사료된다.

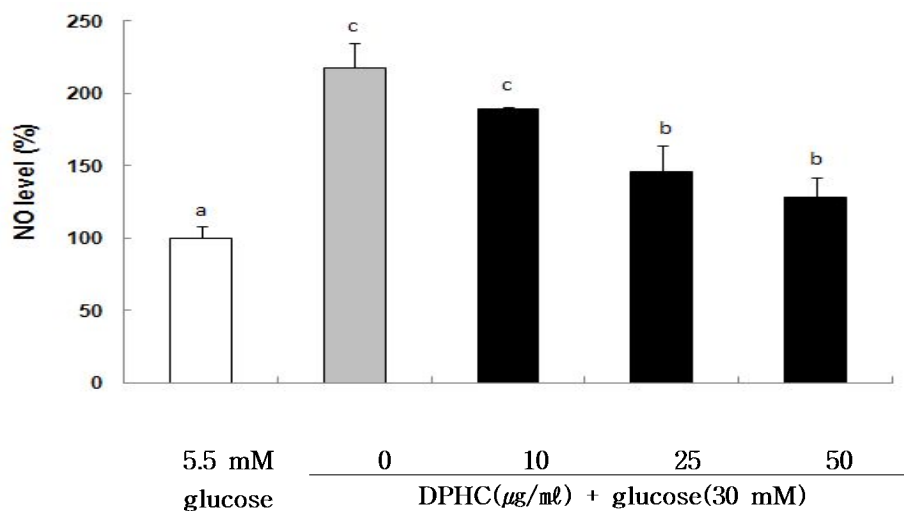


Fig. 32. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on NO level in high glucose treated RIN-m5F cells. Cells in 96 well plates (2×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

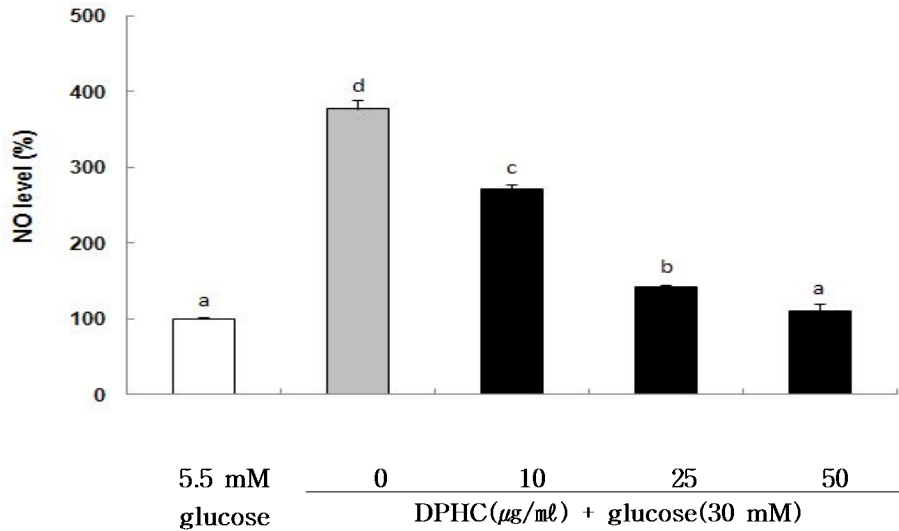


Fig. 33. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on NO level in high glucose treated HUVECs. Cells in 96 well plates (4×10^4 cells/well) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

5) 항산화효소 활성 측정

< RIN-m5F cell >

(1) Superoxide dismutase (SOD) 활성

항산화 효소인 SOD는 superoxide를 순간적으로 hydrogen peroxide 와 oxygen으로 전환 시키는 효소로, 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 RIN-m5F 세포에서 diphlorethohydroxycarmalol을 분주한 세포가 시료를 무첨가한 세포보다 농도 의존적으로 높은 SOD 활성을 나타냄을 Fig. 34에서 볼 수 있다. 특히 diphlorethohydroxycarmalol 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였을 때, 5.5 mM 포도당으로 사전 처리된 대조군 세포의 SOD 활성 (54.09 unit/mg protein min)보다 높은 SOD 활성 (56.71 unit/mg protein min)을 나타내었다.

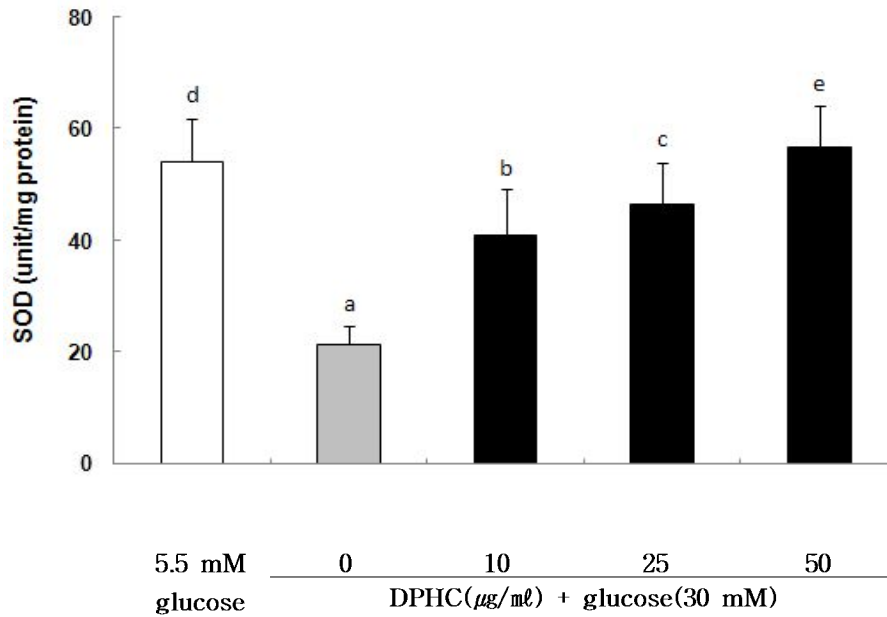


Fig. 34. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on superoxide dismutase (SOD) activity in high glucose treated RIN-m5F cells. Cells in 10 mm dishes (2×10^5 cells/dish) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol. (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

(2) Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성

Glutathione peroxidase (GSH-Px)는 glutathione을 기질로 필요로 하는 효소로, 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 RIN-m5F 세포에서 각 시료를 농도별로 분주했을 시 diphlorethohydroxycarmalol을 분주한 세포는 농도 의존적으로 높은 GSH-px 활성을 나타냄을 Fig. 35에서 볼 수 있다. 5.5 mM 포도당으로 사전 처리된 대조군 세포의 GSH-px 활성 (2.73 unit/mg protein min)보다 높은 GSH-px 활성 (3.41 unit/mg protein min)을 나타내었다.

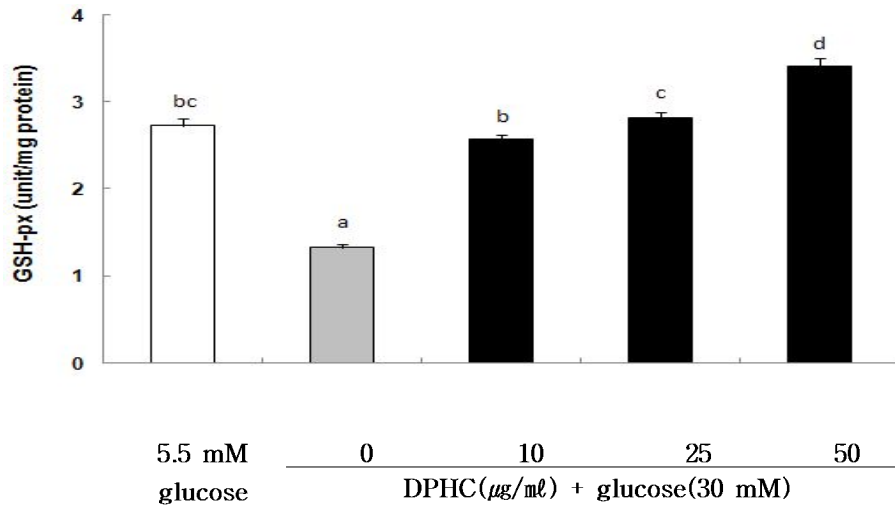


Fig. 35. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on glutathione peroxidase (GSH-px) activity in high glucose treated RIN-m5F cells. Cells in 10 mm dishes (2×10^5 cells/dish) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol. (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

(3) Catalase (CAT) 활성

항산화 효소인 catalase는 SOD의 작용에 의해 발생된 유해물질인 과산화수소를 물과 산소로 바꾸어 줌으로써 산화 스트레스로부터 세포를 보호하는 효소로, 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 RIN-m5F 세포에서 diphlorethohydroxycarmalol을 분주한 세포는 diphlorethohydroxycarmalol을 처리하지 않은 세포보다 높은 CAT 활성을 나타냄을 Fig. 36에서 볼 수 있다. 특히 diphlorethohydroxycarmalol 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 5.5 mM 포도당으로 사전 처리된 대조군 세포의 catalase 활성 (1.063 $\mu\text{mole}/\text{mg protein min}$)과 유사한 catalase 활성(1.084 $\mu\text{mole}/\text{mg protein min}$)을 나타내었다.

모든 실험결과 고농도 포도당으로 사전 처리된 RIN-m5F 세포에서 diphlorethohydroxycarmalol이 투여되었을 때 항산화 효소에 대해 보호효과가 현저히 높게 나타났다.

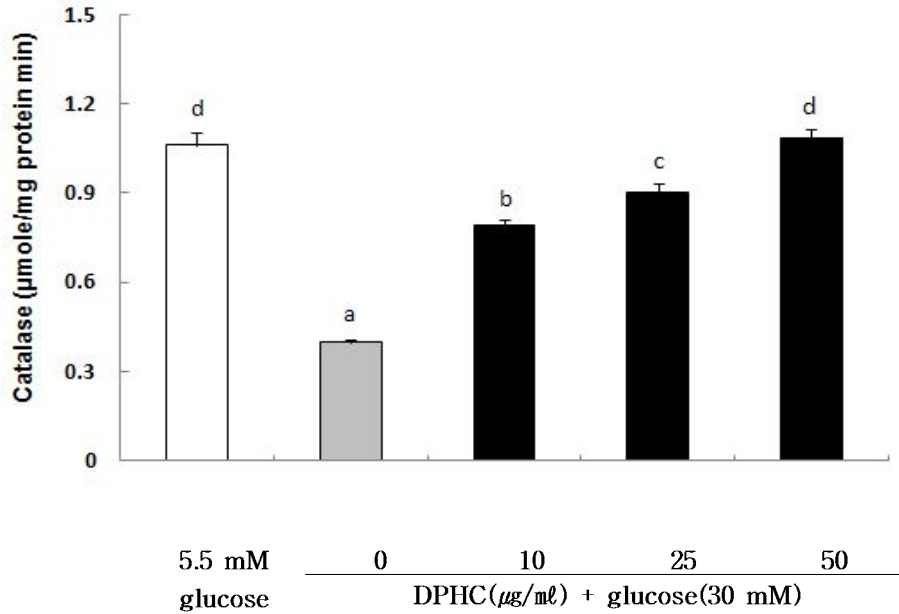


Fig. 36. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on catalase activity in high glucose treated RIN-m5F cells. Cells in 10 mm dishes (2×10^5 cells/dish) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol. (0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hr. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

6. 당뇨병 세포 모델에서의 DPHC의 apoptosis 보호 효과

< RIN-m5F cell >

1) Immunocytochemistry

세포에서 apoptosis가 일어날 경우 미토콘드리아로부터 세포질로 cytochrome c가 유리된다 (53). 고농도 포도당으로 유도된 apoptosis에 있어 diphlorethohydroxycarmalol과 cytochrome c의 관련성을 알아보기 위하여 immunocytochemistry를 시행하였고 Fig. 37에 제시하였다. 고농도 포도당으로 사전 처리된 세포에서는 정상군에 비해 미토콘드리아에서 cytochrome c 유리가 증가되었다. diphlorethohydroxycarmalol을 첨가할 경우 첨가하지 않은 경우보다 cytochrome c 염색이 더 뚜렷한 것으로 보아 diphlorethohydroxycarmalol이 cytochrome c 유리를 저해할 수 있음을 보여주었다.

apoptosis가 일어난 세포에서 가장 일반적으로 관찰되는 현상이 DNA의 절단에 의한 염색질의 응축 현상이기 때문에(54, 55) 포도당으로 처리된 세포의 핵에 있어서 형태적 변화를 관찰하기 위해 immunocytochemistry를 통하여 DAPI 염색을 하였다. 포도당으로 사전 처리된 세포에 diphlorethohydroxycarmalol을 첨가한 결과는 Fig. 38와 같다. 정상 농도의 포도당으로 처리된 세포의 핵은 모양이 둥글고 정상적인 세포의 형태를 지니는 반면, 고농도 포도당으로 처리한 세

포에서는 핵이 수축되고 변형되었으며 apoptotic body를 관찰할 수 있었다. 이에 diphloretohydroxycarmalol을 처리함으로써 대조군과 유사한 형태의 세포 모양을 지니는 것으로 보아, diphloretohydroxycarmalol이 세포의 apoptosis 현상을 저해시키는 것으로 사료된다.

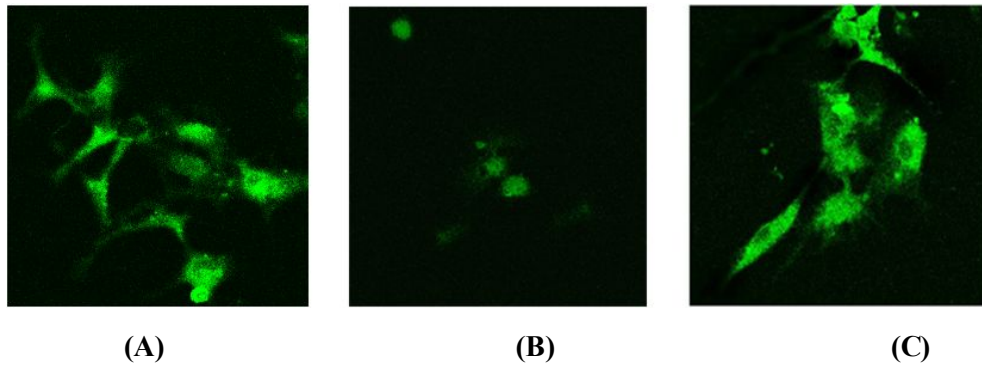


Fig. 37. Immunocytochemical localization of cytochrome c in RIN-m5F cells. Inhibition of high glucose induced release of cytochrome c from mitochondria by diphloretohydroxycarmalol. (A) : Control, (B) : 30 mM glucose, (C) : 30 mM glucose + diphloretohydroxycarmalol 50 µg/ml. Photographs were taken under 400× magnification, using an confocal (Zeiss, Germany).

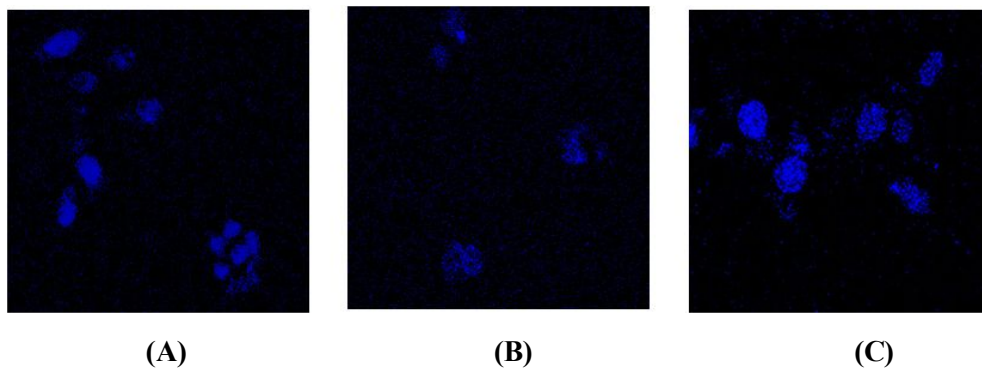


Fig. 38. Morphological analysis of nucleus in RIN-m5F cells. After 24 hr of incubation, cells were collected and stained with DAPI. (A) : Control, (B) : 30 mM glucose, (C) : 30 mM glucose + diphloretohydroxycarmalol 50 µg/ml. Photographs were taken under 400× magnification, using an confocal (Zeiss, Germany).

2) Western blot 분석

< HUVECs >

(1) NF- κ B 발현

고포도당으로 인해 활성화된 NF- κ B (nuclear factor) 발현의 저해효과를 측정하기 위해 western blot 분석을 실시하였고 이를 Fig. 39에 제시하였다. NF- κ B 발현 수준은 정상 농도의 포도당을 처리한 세포보다 고농도 포도당으로 처리된 세포에서 높게 나타났다. 하지만 고농도 포도당으로 사전 처리된 HUVECs에 diphlorethohydroxycarmalol을 처리한 결과 NF- κ B 발현이 유의적 ($p < 0.05$)으로 감소하였다. 고농도 포도당에 의해 NF- κ B 발현이 184.6% 까지 증가하였는데, diphlorethohydroxycarmalol을 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리하였을 때 각각 131.8%, 113.4%로 감소하였다.

NF- κ B는 산화적 스트레스에 반응하는 전달인자로, 세포 손상의 메카니즘 뿐만 아니라 NF- κ B 활성화의 결과로 인한 iNOS와 COX-2의 발현 유도에도 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(59,60). 특히 NF- κ B는 고농도 포도당 조건의 세포에 있어 활성화되고 만성질환 유발에 관여하는데(61,62), diphlorethohydroxycarmalol은 NF- κ B의 발현을 억제하여 이를 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

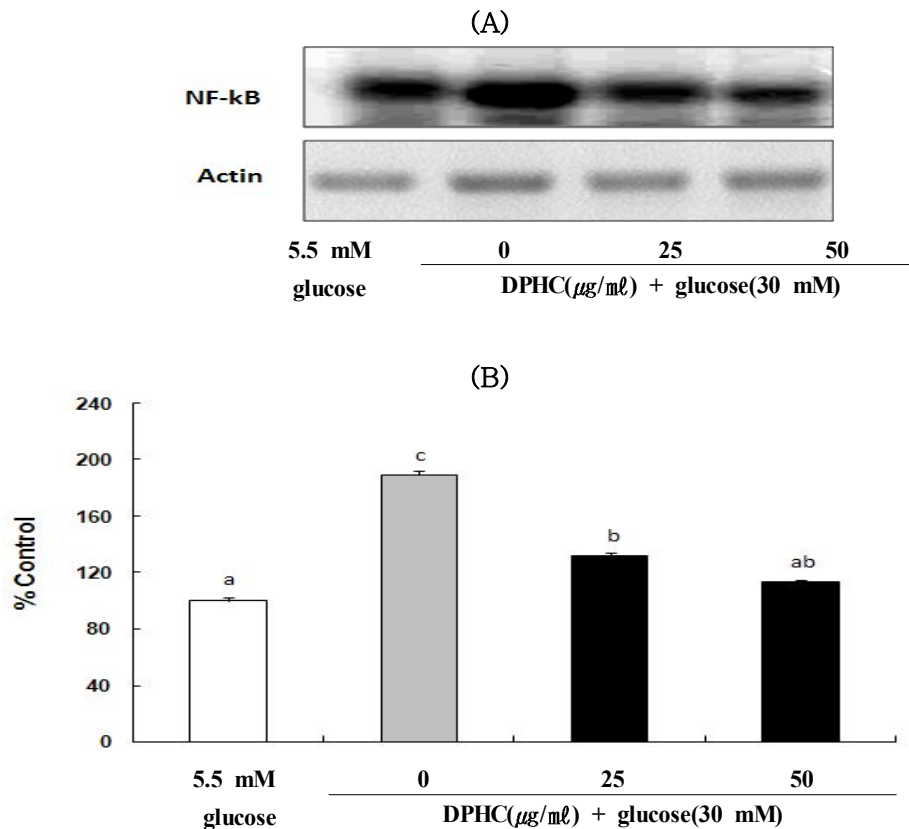


Fig. 39. Change in oxidative stress related gene in HUVECs after high glucose treatment.

Equal amounts of cell lysates (30 μg) were subjected to electrophoresis and analyzed for NF-κB expressions by Western blotting. (A) : Western blot band. (B) : % control. Actin was used as an internal control. Each value is expressed as mean±SD (n=3). ^{a-c}Values with different alphabets are significantly different at p<0.05 as analyzed by Duncan's multiple range test.

(2) iNOS와 COX-2 발현

diphlorethohydroxycarmalol이 고포도당으로 유도된 iNOS (inducible nitric oxide synthase)와 COX-2 (cyclooxygenase 2) 발현을 억제시키는지 측정하기 위해 western blot 분석을 실시하였고 이를 Fig. 40에 제시하였다. iNOS와 COX-2 발현 수준은 정상 농도의 포도당을 처리한 세포보다 고농도 포도당으로 처리된 세포에서 높게 나타났다. 하지만 고농도 포도당으로 사전 처리된 HUVECs에 diphlorethohydroxycarmalol을 처리한 결과 iNOS와 COX-2 발현이 유의적 (p<0.05)으로 감소하였다. diphlorethohydroxycarmalol을 50 μg/ml 처리하였을 때 iNOS는 114.8%, COX-2는 104.4%까지 감소한 것으로 나타났다.

iNOS와 COX-2는 산화적 스트레스와 관계된 만성질환의 원인과 관련된 것으로 알려져 있는데(63), 이는 diphlorethohydroxycarmalol가 iNOS와 COX-2 같은 산화적 스트레스와 관련된 염증 촉진효소의 발현을 억제할 것으로 사료된다.

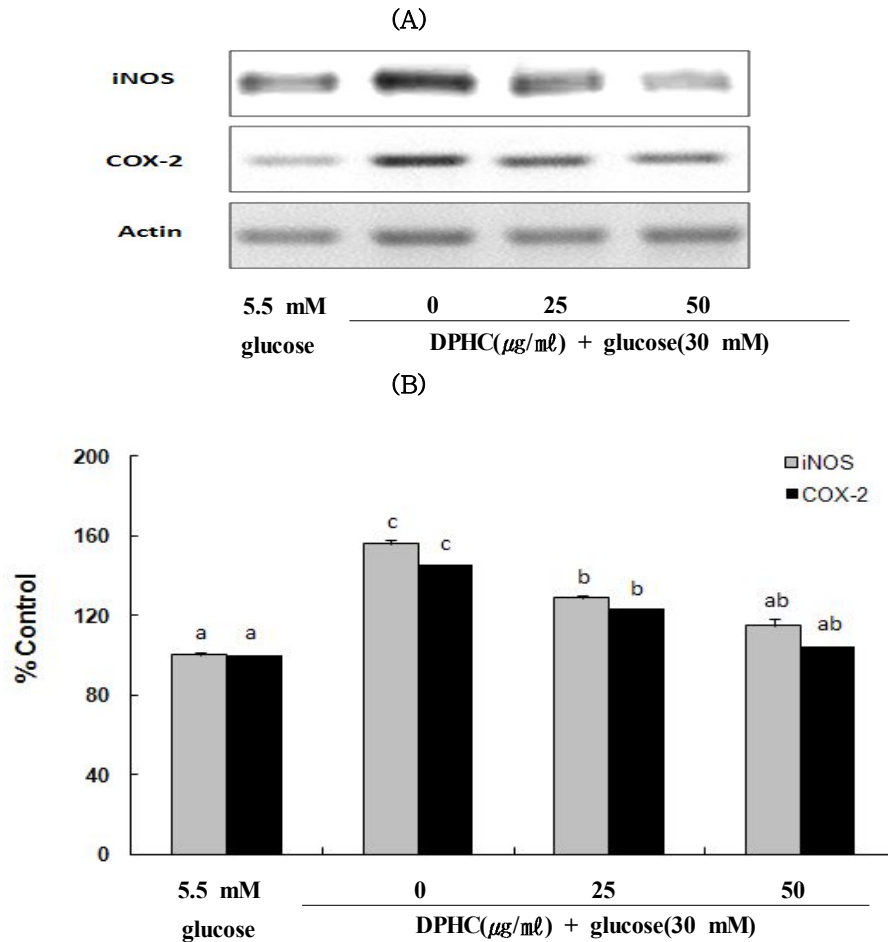


Fig. 40. Change in oxidative stress related gene in HUVECs after high glucose treatment. Equal amounts of cell lysates (30 μg) were subjected to electrophoresis and analyzed for iNOS and COX-2 expressions by Western blotting. (A) : Western blot band. (B) : % control. Actin was used as an internal control. Each value is expressed as mean±SD ($n=3$). ^{a~c}Values with different alphabets are significantly different at $p<0.05$ as analyzed by Duncan's multiple range test.

3) 인슐린 분비능 측정

< RIN-m5F cell >

포도당 농도를 증가시켜 인슐린 분비의 변화를 측정한 결과를 Fig. 41에 나타내었다. 5.5 mM 포도당으로 사전 처리된 대조군에서는 포도당 농도 5 mM에 비해 25 mM에서 인슐린 분비가 2배 정도 증가되었다. 5 mM과 25 mM 각각의 포도당 농도에서 고농도 포도당 (30 mM)으로 사전 처리된 RIN-m5F 세포에서는 인슐린 분비가 현저하게 감소되었고, 특히 포도당 농도를 증가시킬 때 인슐린 분비의 증가는 대조군에 비해 현저히 낮았다. diphlorethohydroxycarmalol을 처리한 세포에서는 인슐린 분비가 고농도 포도당만 처리한 군보다 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가됨을 관찰할 수 있었다.

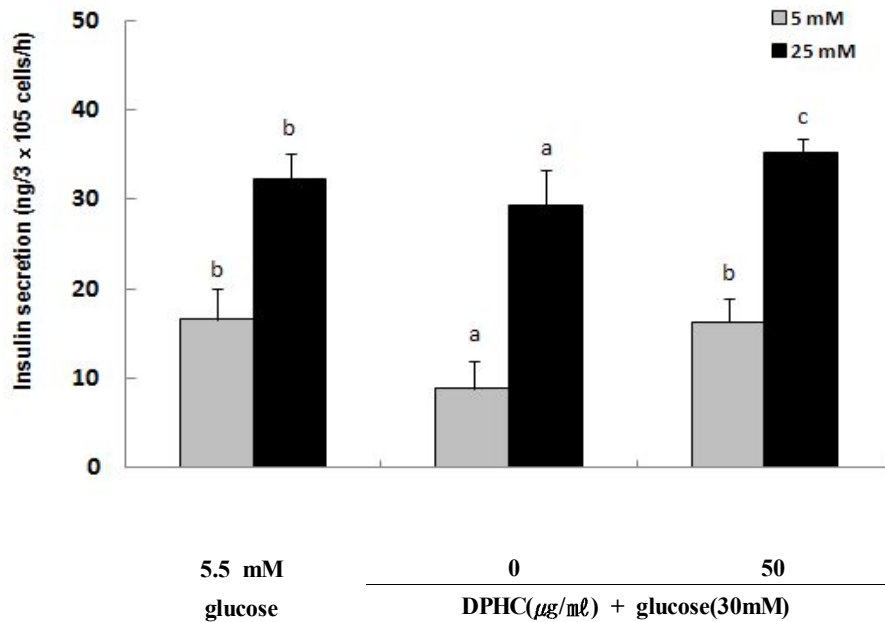


Fig. 41. Effects of diphlorethohydroxycarmalol on insulin secretion in high glucose treated RIN-m5F cells.

Cells in 10 mm dishes (2×10^5 cells/dish) were preincubated with glucose (5.5 mM, 30 mM) for 48 hr, and then incubated with or without indicated concentrations of diphlorethohydroxycarmalol (0, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hr. Insulin secretion from RIN-m5F cells in response to glucose (5 and 25 mM) concentration. Each value is expressed as mean \pm SD (n=3). A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$. DPHC : diphlorethohydroxycarmalol.

7. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 항당뇨 효과

1) 식이섭취량, 식이효율, 주별 체중변화에 미치는 영향

실험기간 동안 주별 식이섭취량을 분석한 결과(Fig. 42) 패와 약물대조군인 rosiglitazone군은 한주 평균 섭취량이 25~27g으로 유의적 차이를 보이지 않았으나, 대조군은 패와 약물군에 비해 31 g으로 유의적 차이를 나타내었다. 일일 음수량 분석 결과(Fig. 43) 패의 일일 음수량은 실험기간 평균 18.3ml로 대조군의 음수량 26ml 보다는 낮은 수치를 나타내지만, 약물대조군인 rosiglitazone의 10ml 보다는 높은 음수량을 보였다. 이 결과 패 추출물이 함유된 식이 섭취는 2형 당뇨 모델인 db/db mice에 있어서 다식 증상을 약물과 유사한 수준으로 개선할 뿐만 아니라 다갈의 증상 또한 약물보다는 낮은 수준이지만 대조군에 비해 개선됐음을 알 수 있었다.

주별 체중변화를 분석한 결과(Fig. 44) 패와 대조군의 체중 증가량은 작은 폭으로 서서히 증가한 반면, 약물군은 3주차 까지 큰 차이로 증가하였으며 6주차에 약간의 감소를 보였으나 전체적으로 지속적인 증가를 보였다. 그 결과 식이효율(Fig. 45)에 있어 다식과 다갈의 증상이 있었음에도 불구하고 대조군의 식이효율은 패군과의 유의적 차이는 없으나 약물군에 있어서 다식·다갈 증세가 없음에도 불구하고 비정상적인 체중의 증가를 보여 유의적 차이를 나타내었다. 이는 약물인 rosiglitazone의 부작용으로 rosiglitazone을 비롯한 thiozolidinedione(TZD) 계열의 약물은 PPAR- γ 를 자극하여 인슐린 감수성을 증가시켜 인슐린 저항성 개선을 통해 혈당조절에 효과적이기는 하지만 지방분화를 활성화 시킴으로써 비만, 부종 및 심부전 등을 유도한다고 보고(30)된바 있으며, 축진된 지방세포의 분화와 연관된 것으로 약물에 의한 지방생성 증가 또는 체액량의 증가에 따른 부종 때문이다(31). 반면 패 급여군은 체중 변화에는 별 영향을 미치지 않는 것으로 짐작된다.

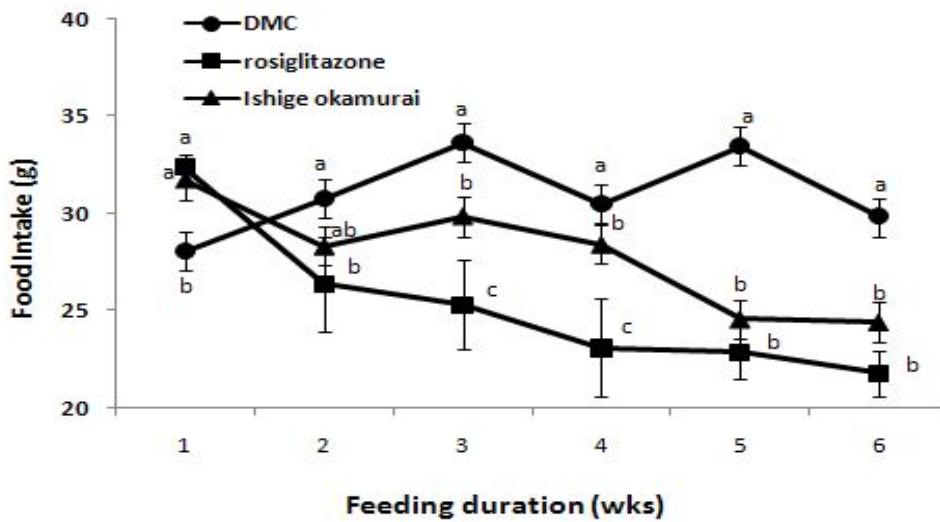


Fig. 42. Weekly changes in food intake of *Ishige okamurai* and rosiglitazone supplemented C57BL/KsJ-db/db mice. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

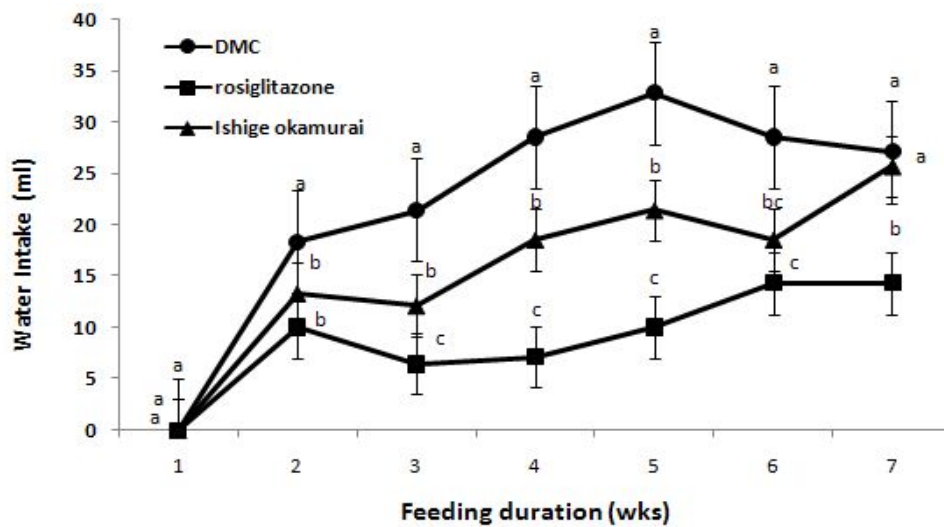


Fig. 43. Water Intake of *Ishige okamurai* and rosiglitazone supplemented C57BL/KsJ-db/db mice. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

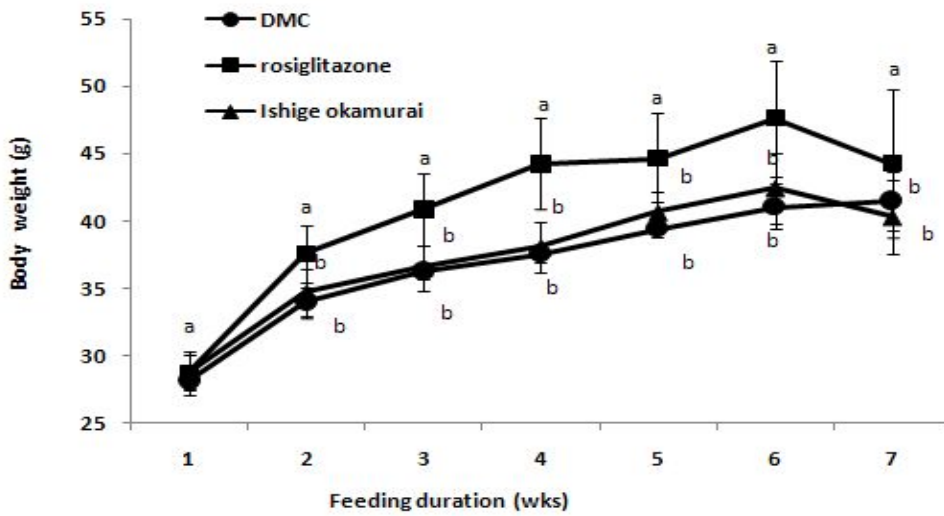


Fig. 44. Weekly changes in body weight of *Ishige okamurai* and rosiglitazone supplemented C57BL/KsJ-db/db mice. Values are means±SE, n=7. ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

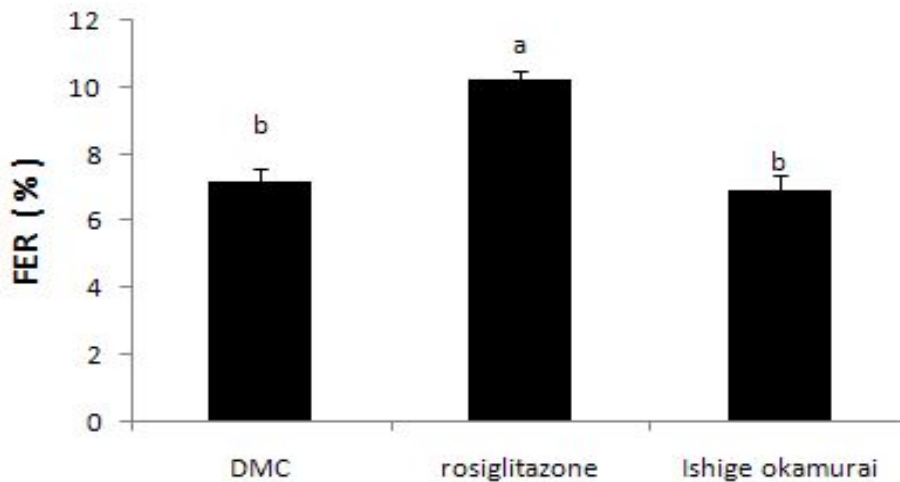


Fig. 45. Feed efficiency ratio of *Ishige okamurai* and rosiglitazone supplemented C57BL/KsJ-db/db mice. Values are means±SE, n=7. ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet). **Feed Efficiency ratio:** Total weight gain(g) / Total food intake(g) × 100

2) 주별 공복혈당 농도변화에 미치는 영향

난피법에 따라 분류된 후 실험시작 전 각 시험군들의 초기 공복혈당 농도는 약 8.5mmol/L 였다. 실험기간 동안의 공복혈당 농도의 변화는 Fig. 46에 나타내었다. 대조군은 실험시작부터 계속적으로 혈당이 증가하는 것으로 나타났지만, rosiglitazone군의 경우 대조군과 유의적인 차이를 보이면서 공복혈당이 안정적으로 유지되며, 3주차 정상범주로 감소되는 것을 볼 수 있었다. 실험식이 보충초기에 패군은 rosiglitazone군과 유사한 양상을 나타내었으나 약물군이 감소하던 3주차부터 미세하게 증가와 감소의 변화가 있었으나 대조군인 당뇨군에 비해 낮은 혈당 농도를 나타내고 있었다. 패군은 약물군인 rosiglitazone군에 비해 주별 공복혈당 농도 변화에 있어 큰 개선을 보이지는 않았지만 당뇨대조군에 비해 유의적인 차이를 보이며 혈당개선에 효과를 보였다. 결과적으로, 앞선 실험 결과 비만증과 같은 부작용을 보이는 약물군에 비해 패군은 안정적인 체중유지를 바탕으로 혈당개선에 대해 효과적이라 볼 수 있다.

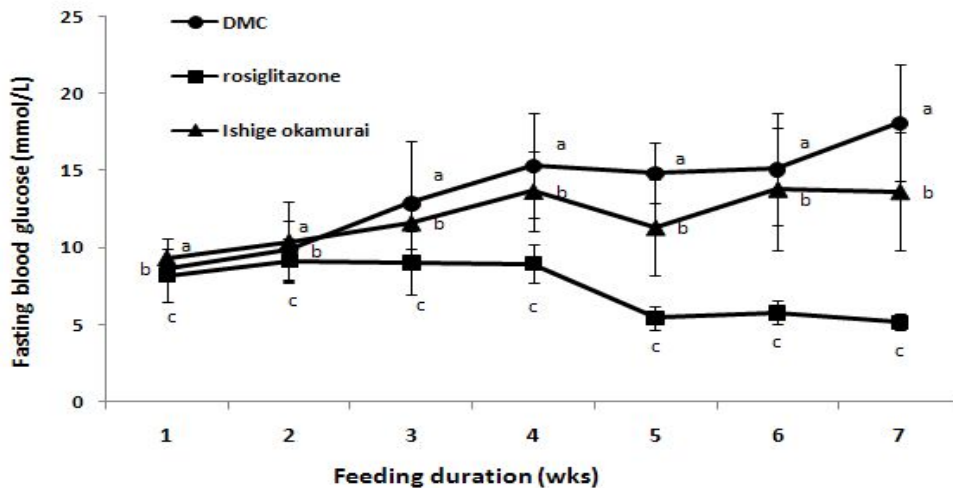


Fig. 46. Weekly changes in fasting blood glucose concentrations of *Ishige okamurai* and rosiglitazone supplemented C57BL/KsJ-db/db mice. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with Ishige okamurai extract(1g/100g diet).

3) HbA1c 농도에 미치는 영향

장기적인 혈당 상태 지표인 HbA1c 측정은 실험 종료 시점인 6주차에 이루어지며, 그 결과는 Fig. 47에 나타내었다. 실험군은 9.48%로, 당뇨대조군의 13.37%보다 유의적으로 낮은 HbA1c 농도를 보이며, 장기적인 혈중 glucose 상태에 있어서 당뇨가 개선되었음을 암시하였고, 약물군은

5.43%로 HbA1c가 큰 폭으로 낮아졌다. HbA1c 수치가 심근경색, 뇌졸중 등 심장질환과 분명한 연관이 있다고 알려져 있으며, 정상은 HbA1c가 5~6%, 당뇨의 경우 7% 이하로 관리하도록 각종 지침¹⁾이 정하고 있다. ADVANCE 연구에서 공격적 전략은 심근경색이나 뇌졸중 등 모세혈관 합병증 예방에 효과를 보이지 못했으며, HbA1c를 공격적으로 낮추면 미세혈관 합병증 예방에는 이익이 있으나 모세혈관 합병증, 즉 심근경색이나 뇌졸중 등 질병 및 사망 감소에는 이익이 없다는 것이다. 이러한 연구에 미루어 보아 약물군의 HbA1c 농도는 5.43%의 급격한 저하는 망막증, 신장병증과 같은 미세혈관 합병증 예방에는 효과가 있으나 심근경색이나 뇌졸중과 같은 모세혈관 합병증 및 사망 감소에는 효과가 없다는 것이다.

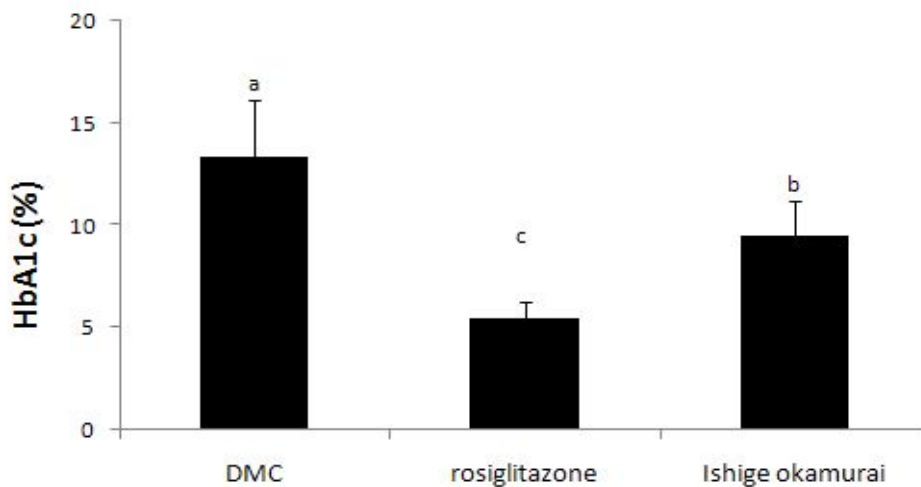


Fig. 47. Blood glycosylated hemoglobin (HbA1c) Level in C57BL/KsJ-db/db mice fed a normal diets containing with rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

4) 혈장 글루코스 농도 측정

실험 마지막 주인 6주차에 하대정맥에서 수집한 혈액을 통해 분리한 혈장을 통해 측정이 이루어졌으며, 그 결과는 Fig. 48에 나타내었다. 당뇨군의 642.9mg/dl와 비교해 볼 때, 패군은 575mg/dl로 혈장 glucose농도가 낮아져 당뇨가 개선되었음을 유추해볼 수 있었고, 약물대조군인 rosiglitazone군 또한 376.9mg/dl로 큰 폭으로 감소하였음을 볼 수 있었다.

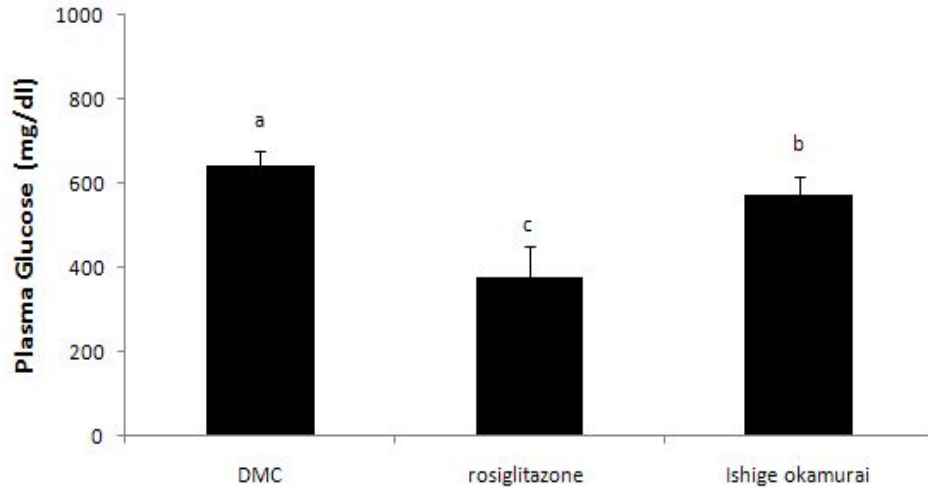


Fig. 48. Plasma glucose level in C57BL/KsJ-db/db mice fed a normal diet containing with rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

5) 내당능 (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) 측정

복강 내 내당능 시험(IPGTT)에서 포도당 복강주사 전 혈당 농도를 기준으로 식후 혈당 농도 변화를 분석한 결과 Fig. 49과 같이 나타내었다. 포도당 투여 30분과 60분 후 약물대조군의 혈당 농도는 당뇨대조군에 비해 유의적으로 상승되었으며, 120분에는 감소하는 경향을 나타내었다. 실험군과 당뇨대조군은 혈당에 큰 차이를 보이지 않았다.

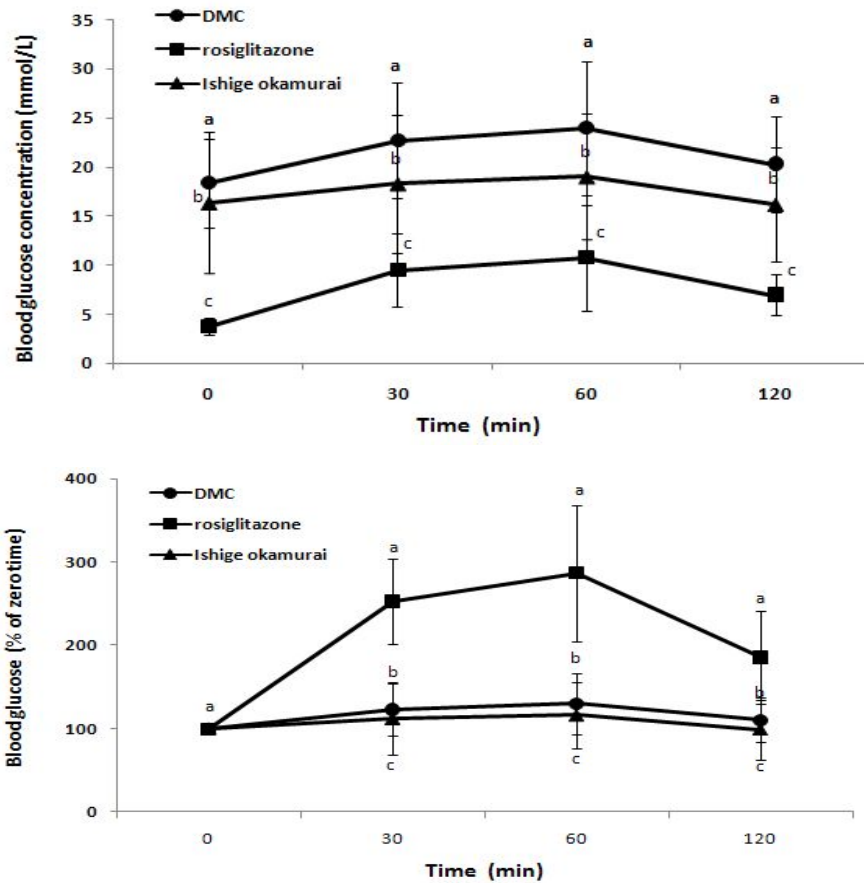


Fig. 49. Effects of *Ishige okamurai* and rosiglitazone supplementation on the IPGTT in C57BL/KsJ-db/db mice. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet). **IPGTT** : intraperitoneal glucose tolerance test.

6) 혈장 인슐린 농도 측정

실험 마지막 주인 6주째 혈장 인슐린 농도를 측정한 결과(Fig. 50), 패균과 약물대조군인 rosiglitazone군에 비해 당뇨군의 인슐린 농도가 유의적 차이를 보이며 높게 나왔다. 이러한 결과는 대부분의 당뇨병 환자에서 관찰되는 바와 같이 인슐린 저항성에 의한 고인슐린 혈증이 유발되었기 때문으로 사료된다. 비만증을 포함하여 유전, 과식, 운동부족, 노화, 음주 또는 정신적인 긴장 등은 인슐린 저항성을 유발하고, 이것은 내당능 장애와 고인슐린 혈증을 초래하며, 고인슐린 혈증은 지질대사 장애, 고혈압 및 관상동맥경화 병인을 일으키는 중요한 원인으로 알려져 있다(25).

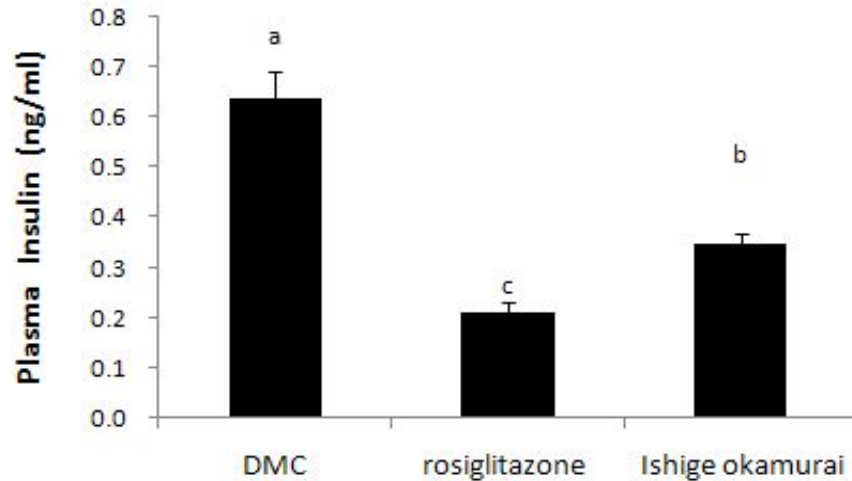


Fig. 50. Plasma insulin level in C57BL/KsJ-db/db mice fed diets containing rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

7) 간조직의 당대사 효소활성에 미치는 영향

(1) Glucokinase(GK) 활성도

간조직에서의 당대사 조절 효소 중 포도당 산화에 관여하는 Glucokinase(GK) 활성도 분석결과는 Fig. 51에 나타내었으며, 당뇨 대조군에 비해 약물대조군과 패군에서 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 간 세포의 GK 활성도 감소는 고혈당이 원인이 되며 인슐린저항성과 관련이 있으며(Matschinsky, 1990; Shimizu, 1988), 공복시와 당뇨병 환자에서 낮으나, 탄수화물 섭취나 당뇨병이 발병된 쥐에게 인슐린을 투여할 경우에 증가한다(Sibrowski, 1981) .

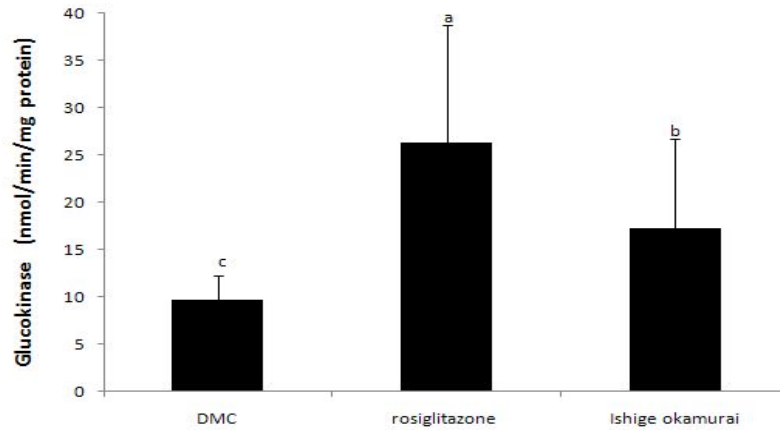


Fig. 51. Glucokinase level in C57BL/KsJ-db/db mice fed diets containing rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with Ishige okamurai extract(1g/100g diet).

(2) Glucose-6-Phosphatase(G6Pase) 활성도

일반적으로 제2형 당뇨병에서는 유리형 글루코오스가 혈액으로 방출되어 혈당을 상승시키는 데, Glucose-6-phosphate을 유리형 글루코오스로 전환시키는 G6Pase 활성도가 당뇨대조군에 비해 약물대조군과 패군에서 유의적으로 감소되었으며, 약물대조군과 패군 사이에는 유의적 차이를 보이지 않았다(Fig. 52).

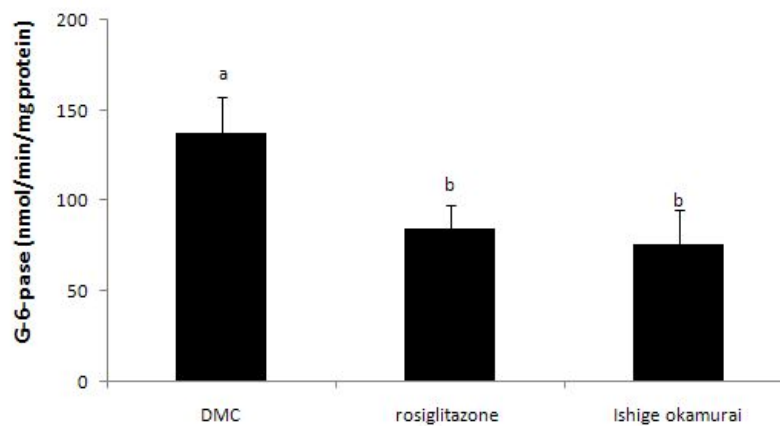


Fig. 52. G6pase level in C57BL/KsJ-db/db mice fed diets containing rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SEM, n=7. ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : AIN-93G semisynthetic diet, **rosiglitazone** : rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : Ishige okamurai ethanol extract(1g/100g diet)

(3) Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 활성도

PEPCK는 옥살로아세트산을 포스포에놀피루브산으로 전환시키는 효소로 당신생 과정에 관여하게 된다. 간조직의 PEPCK 활성도는 당뇨 대조군이 rosiglitazone군보다 유의적으로 높게 나왔으며, 패군이 약물군보다 유의적인 차이를 보이며 낮은 수치를 나타내었다. 즉, 당신생 경로에 관여하는 효소인 G6Pase와 PEPCK 모두 패의 보충에 의해 간조직에서 그 활성도가 유의적으로 감소하였음을 볼 수 있었다(Fig. 53)

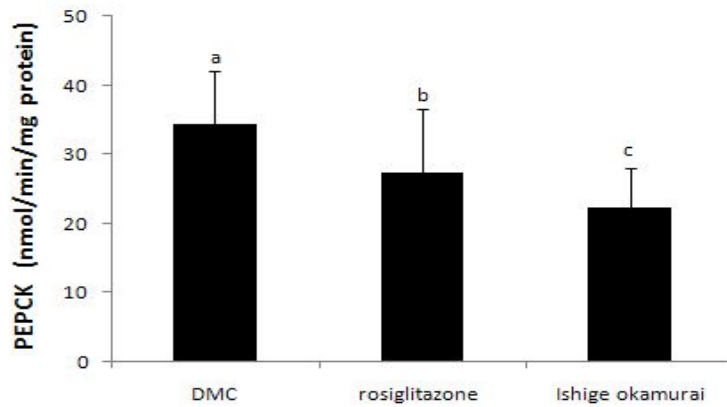


Fig. 53. PEPCK level in C57BL/KsJ-db/db mice fed diets containing rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SEM, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : AIN-93G semisynthetic diet, **rosiglitazone** : rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : *Ishige okamurai* ethanol extract(1g/100g diet)

8) 간조직 글리코젠 함량에 미치는 영향

간조직의 글리코젠은 당뇨병이 악화될수록 과도하게 인슐린을 분비해야 하는 췌장의 β -cell이 점차 파괴되어 제 기능을 상실하게 됨으로써 초래되는 활성화된 glycogen phosphorylase에 의해 감소된다(28). 본 연구에서 당뇨대조군과 rosiglitazone군 및 패군의 간 조직 글리코젠 함량 측정결과는 Fig. 54과 같다. 당뇨대조군이 166인데 반해 약물군은 177, 패군은 191로 각 군간에 있어 유의적인 차이를 보이며 패군이 가장 높은 글리코젠 함량을 나타내고 있었다.

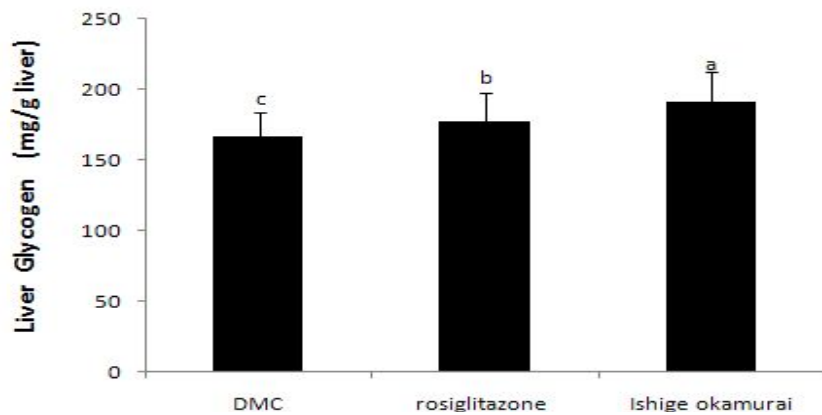


Fig. 54. Effects of *Ishige okamurai* and rosiglitazone supplementation on hepatic glycogen content in C57BL/KsJ-*db/db* mice. Values are means \pm SEM, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($p<0.05$). DMC (diabetes mellitus control) : AIN-93G semisynthetic diet, rosiglitazone : rosiglitazone(0.005g/100g diet), *Ishige okamurai* : *Ishige okamurai* ethanol extract(1g/100g diet)

8. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 지질대사 개선 효과

1) 혈장 지질농도에 미치는 영향

혈장 TG, TC, FFA, HDL-C, LDL-C, AI는 Table 8와 같다. 혈장 TC, TG, FFA 농도를 비교한 결과 패균과 rosiglitazone군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. HDL-콜레스테롤 농도에 있어서는 대조군과 패균 사이에는 유의적인 차이가 있었으나 약물군과 각 군들 사이에는 큰 차이는 없었다. LDL-콜레스테롤 농도는 각 군간에 유의적 차이를 보였으며, 대조군이 가장 높고, 패균, 약물군 순으로 나타났다.

Choi 등(8)은 당뇨병으로 인한 당대사 이상과 지질대사 이상으로 고지혈증이 나타난다고 보고하였으며, Breckenrkdge 등(9)은 당뇨병쥐에서 혈장으로부터 말초조직으로의 중성지질 수송 기전이 원활하지 않아 혈장 중성지질 농도가 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서는 패의 보충 식이가 당대사와 지질대사를 개선하여 비정상적으로 증가된 당뇨병마우스의 혈장 지질 농도를 개선시킨 것으로 판단된다.

Table 8. Effects of *Ishige okamurai* and rosiglitazone supplementation on plasma lipid concentrations in C57BL/KsJ-db/db mice.

	DMC	Rosiglitazone	<i>Ishige okamurei</i>
Total cholesterol (mmol/l)	6.39 ± 0.59 ^a	3.52 ± 0.49 ^b	6.33 ± 0.75 ^a
Triglyceride (mmol/l)	2.28 ± 0.13 ^a	1.40 ± 0.21 ^c	1.67 ± 0.43 ^b
FFA (mmol/l)	2.31 ± 0.33 ^a	1.1 ± 0.52 ^c	1.99 ± 0.21 ^b
HDL-C (mmol/l)	1.19 ± 0.44 ^c	1.43 ± 0.41 ^b	2.33 ± 0.101 ^a
LDL-C (mmol/l)	4.75 ± 0.13 ^a	1.81 ± 0.21 ^c	3.66 ± 0.43 ^b

Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

2) 간조직의 지질농도에 미치는 영향

간조직의 TC농도(Table 9)를 분석한 결과 실험군인 패군은 2.15, 약물대조군인 rosiglitazone군은 2.42, 당뇨대조군은 3.76으로 각 군간에 있어서 유의적 차이를 보였으며, 간조직의 TG농도(Table 9) 또한 각 군간 유의적인 차이를 볼 수 있었다. 일반적으로 정상적인 당대사가 이루어지지 않아 acetyl-CoA가 축적되고 지방 변성이 일어난다. 또한 당뇨로 간조직 내에 지질성분이 축적되어 조직의 중성지질 함량 증가가 나타난다(26). 본 연구결과에서 패 첨가 식이 섭취군이 당뇨대조군에 비해 간조직 중성지질과 총 콜레스테롤 함량이 유의적으로 저하되는데, 이로 보아 패 보충 식이가 당대사를 효과적으로 개선시킴으로써 간조직의 지질 축적을 감소시킨 것으로 사료된다.

Table 9. Effect of *Ishige okamurai* and rosiglitazone supplementation on hepatic lipid concentrations in C57BL/KsJ-db/db mice.

	DMC	Rosiglitazone	Ishige okamurai
Total cholesterol (mmol/l)	3.76 ± 0.11 ^a	2.15 ± 0.16 ^c	2.42 ± 0.5 ^b
Triglyceride (mmol/l)	2.46 ± 0.28 ^a	1.84 ± 0.25 ^c	2.16 ± 0.31 ^b

Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

9. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 항산화 개선 효과

1) 간조직 항산화 대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향

당뇨병 상태에서는 자유라디칼 생성이 증가하고 방어 능력이 저하되기 때문에 조직 손상의 위험성이 높아진다. 따라서 당뇨병의 위험 요소인 만성 합병증과 산화적 스트레스는 밀접한 관련을 가진다 (12). 특히 고혈당 증상이 지속되고 만성화되면 자유라디칼 생성이 증가되어 혈관 내피세포가 손상을 입게 됨으로써 동맥경화를 비롯한 각종 혈관성 합병증이 발생하고 빠르게 진행된다(13). 이러한 자유라디칼의 작용이 일어나지 않도록 하기 위해 생체는 항산화 방어 시스템을 갖추고 있다. 항산화 작용을 하는 효소로는 Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GSH-Px) 등이 있다. 간조직의 항산화 효소 활성도 비교결과는 Table 10와 같다. 간조직 SOD 활성도는 대조군의 23U/mg protein에 비해 약물대조군과 패군은 29, 30으로 유의적으로 증가 하였으나 약물군과 실험군 간에는 유의적 차이가 없었다. 간조직 CAT 활성도에서도 대조군의 1.5 μ mol/min/mg protein에 비해 약물대조군과 패군은 2.4, 2.2로 유의적 증가를 보였다. 그 결과 패 보충 식이가 간조직의 항산화 대사 관련 효소 활성도를 높여 당뇨마우스의 항산화계를 개선시킨 것으로 나타났다.

2) 적혈구 항산화 대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향

적혈구의 항산화 효소 활성도 비교결과는 Table 10와 같다. 적혈구 SOD 활성도는 대조군의 15.06U/mg protein에 비해 약물대조군과 패군은 23과 22로 유의적으로 증가 하였으나 약물군과 실험군 간에는 유의적 차이가 없었다. 적혈구 CAT 활성도에서도 대조군에 비해 약물대조군과 패군은 유의적 증가를 보였다. 그 결과 패 보충 식이가 적혈구의 항산화 대사 관련 효소 활성도를 높여 당뇨마우스의 항산화계를 개선시킨 것으로 나타났다.

Table 10. Effect of *Ishige okamurai* and *rosiglitazone* supplementation on activities of antioxidant enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice.

	DMC	Rosiglitazone	<i>Ishige okamurai</i>
Liver			
SOD (U/mg protein)	23.91 ± 2.51 ^c	29.37 ± 2.1 ^b	31.47 ± 6.55 ^a
CAT (µmol/min/mg protein)	1.56 ± 0.74 ^b	2.39 ± 0.74 ^a	3.79 ± 0.80 ^a
GSH-px (nmol/min/mg protein)	19.33 ± 0.56 ^b	20.14 ± 1.38 ^a	20.02 ± 1.52 ^a
Erythrocyte			
SOD (U/g protein)	15.06 ± 1.05 ^c	23.51 ± 3.08 ^a	22.41 ± 4.91 ^b
CAT (µmol/min/g Hb)	25.62 ± 4.51 ^c	32.51 ± 4.77 ^a	31.88 ± 2.63 ^b
GSH-px (µmol/min/g Hb)	11.54 ± 2.09 ^c	14.96 ± 2.18 ^a	14.02 ± 0.21 ^b

Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet). **SOD**: Superoxide dismutase, **CAT**: Catalase, **GSH-px**: Glutathione peroxidase

3) 간 · 적혈구 지질과산화물 농도에 미치는 영향

간조직의 TBARS 농도는 각군간에 유의적 차이가 있으며, 적혈구의 TBARS 농도는 대조군과 약물군에서는 유의적 차이가 없었으나 실험군에서 가장 낮은 값으로 유의적 차이를 보였고, 그 값은 Fig. 55와 같다.

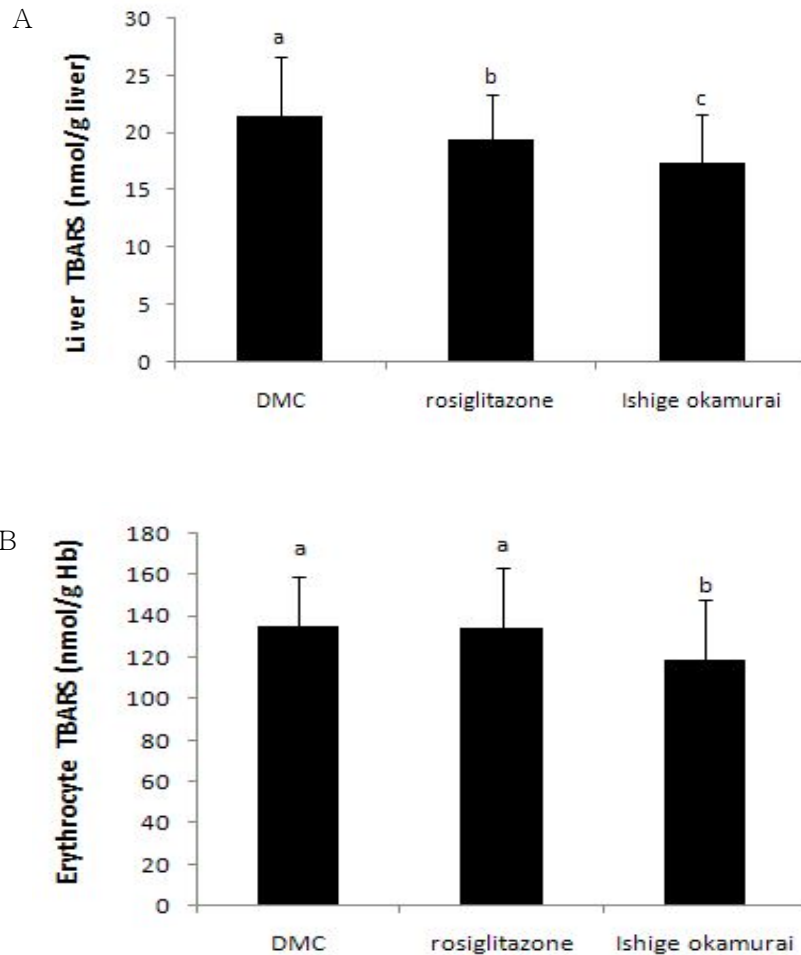


Fig. 55. Effect of *Ishige okamurai* and *rosiglitazone* supplementation on TBARS levels in C57BL/KsJ-db/db mice. Values are means±SE, n=7. ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), ***Ishige okamurai*** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet). **TBARS:** Thiobarbituric acid

4) 간 · 적혈구 Glutathione 농도에 미치는 영향

간 조직에서의 GSH 함량을 측정한 결과는 Fig. 56에 나타내었으며, 패균의 GSH 함량은 약물군과 당뇨대조군에 비해 유의적으로 높게 나왔다. 이러한 GSH의 경향성에 대해, Lee등은 생쥐 조직중에서 에탄올 공급이 GSH에 미치는 영향을 조사한 결과, 간 조직 내에서 GSH의 농도가 감소하고, 지질과산화의 수준이 증가하였으며, 이것은 GSH가 자유라디칼의 직접적인 소거제로서, 또는 지질과산화로부터 세포를 보호하기 위해 GPx의 기질로서 소모되었음을 시사하였으며, 혈장 내에서 GSH를 측정한 결과 GSH의 수준이 증가하여 혈액 내의 유출을 추정하였다 (29).

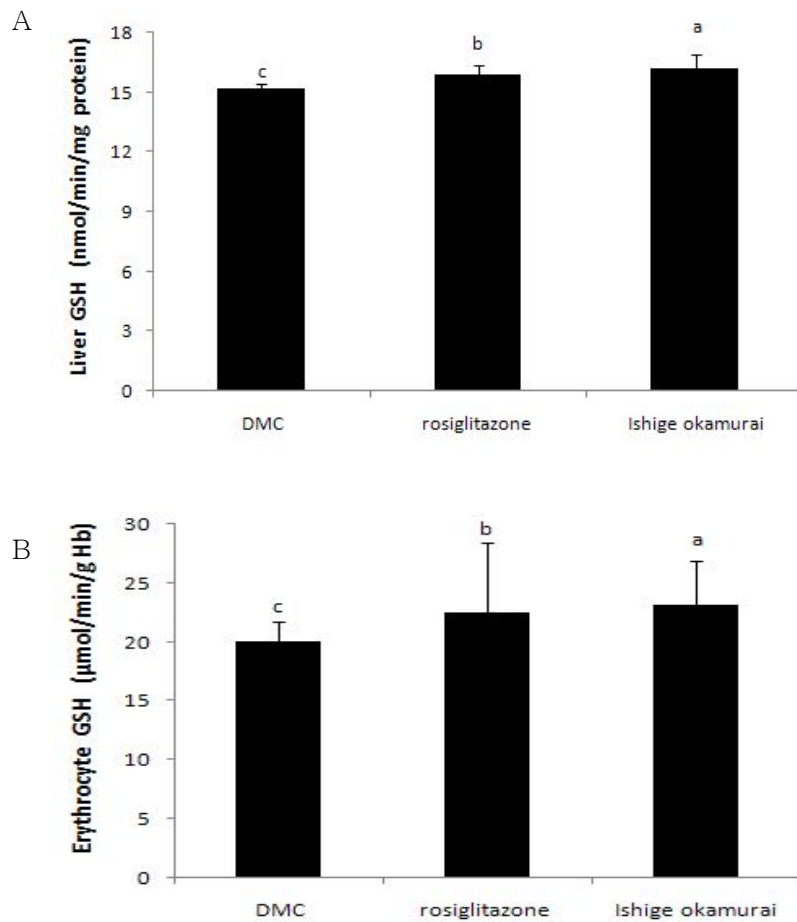


Fig. 56. Effect of *Ishige okamurai* and *rosiglitazone* supplementation on GSH contents in C57BL/KsJ-db/db mice. Values are means±SE, n=7. ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet). **GSH:** Glutathione

5) 간 · 적혈구 ROS 농도에 미치는 영향

ROS (reactive oxygen species) 생성은 Fig. 57에 제시하였다. db/db mouse에 있어서 간의 ROS 생성은 패를 급여한 군에서 20%로 가장 낮은 생성을 보였고, 약물군과 당뇨대조군은 각각 52%, 58%를 나타내었다. 뿐만아니라 적혈구의 ROS 농도 또한 당뇨대조군이 53%, 약물군이 30%, 패를 급여한 군이 28%로 유의적인 차이를 보이며 낮은 활성산소종 생성율을 나타내었다.

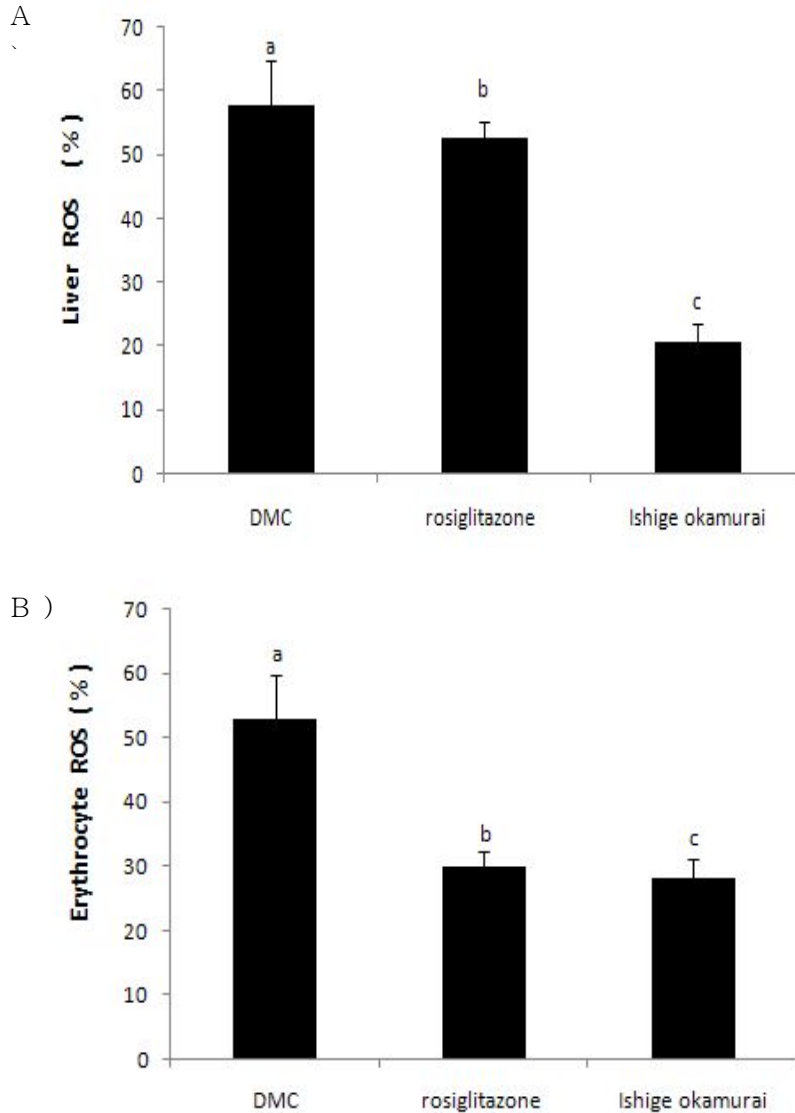


Fig. 57. Effect of *Ishige okamurai* and *rosiglitazone* supplementation on ROS level in C57BL/KsJ-db/db mice. Values are means±SE, n=7. ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet). **ROS**: Reactive Oxygen Species

10. 제 2형 당뇨병 동물 C57BL/KsJ-db/db mice에 있어서 간 및 신장 기능

1) AST, ALT, γ -GTP

혈장의 ALT값은 Fig. 58과 같으며, 약물군과 패군 간에는 유의적 차이가 없으나 두 군과 대조군은 유의적 차이를 보였다. AST 값은 Fig. 59에 나타내었으며 패군은 약물대조군과 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮았으며, 당뇨대조군과 약물군 사이의 유의적 차이는 없었다. γ -GTP는 Fig. 60와 같으며 당뇨대조군에 비해 약물군과 실험군은 유의적 차이를 보였으나, 두군간에는 차이가 없었다.

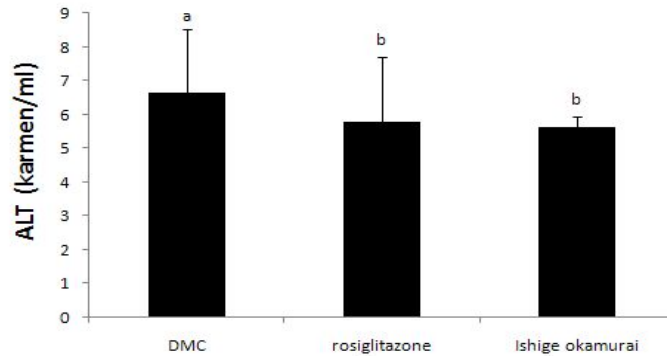


Fig. 58. ALT in C57BL/KsJ-db/db mice fed diets containing rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SE, n=7. ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet). **ALT:** Alanine Aminotransferase

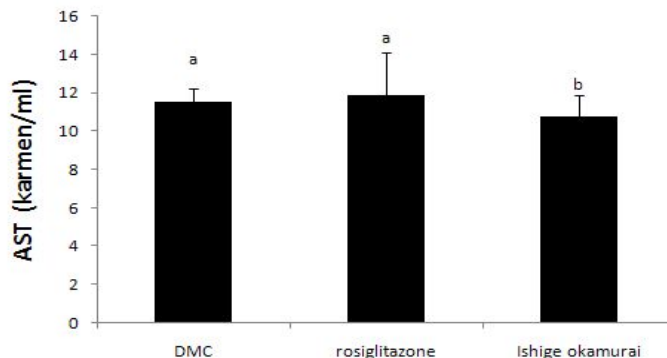


Fig. 58. AST in C57BL/KsJ-db/db mice fed diets containing rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SE, n=7. ^{a-b}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet). **AST:** Aspartate Aminotransferase

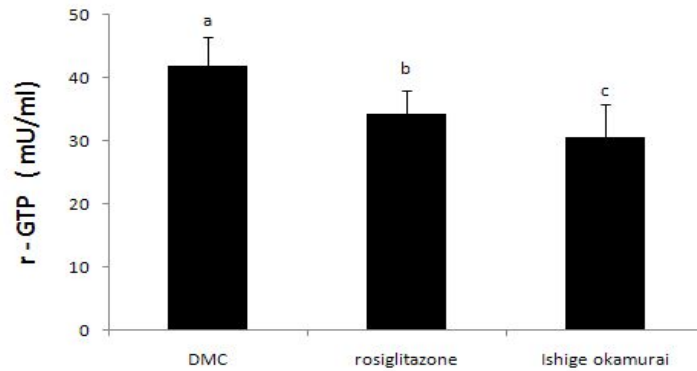


Fig. 60. Y-GTP in C57BL/KsJ-db/db mice fed diets containing rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

2) Creatinine

당뇨병으로 혈관이 장애를 받으면 신사구체의 여과면적이 감소되어 사구체 여과량이 감소하게 되며, 이는 신장기능이 저하되어 점차 신부전 상태에 가까워지는 것을 의미한다. 신사구체에서 여과되어 배설되는 creatinine을 측정하여 신장기능을 평가하는 지표로 사용하였다. 실험결과에서 혈장 creatinine농도는 Fig. 61에 나타내었으며, 당뇨대조군에 비해 약물대조군과 실험군에 있어서는 유의적인 차이를 나타내었다. 당뇨 대조군이 가장 높은 수치로 당뇨병으로 인한 신기능이 장애를 받았다고 판단할 수 있으며, 꽤 첨가 식이와 약물군은 유의적으로 낮은 수치를 나타내어 신기능 장애에 효과가 있다고 사료된다.

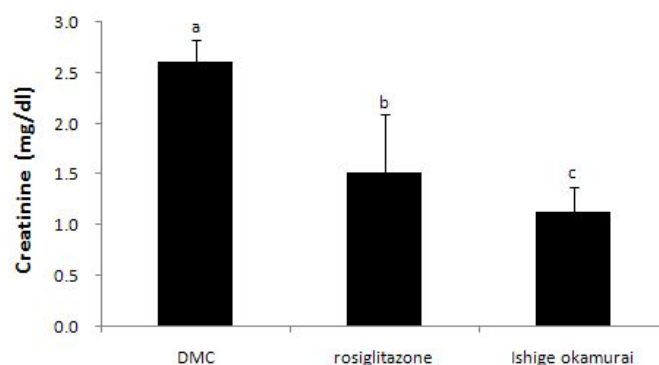


Fig. 61. Blood creatinine level in C57BL/KsJ-db/db mice fed diets containing rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p<0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with *Ishige okamurai* extract(1g/100g diet).

3) BUN

혈중 요소질소량을 알아보는 것으로 신장의 기능을 평가하는 지표이며 그 값은 Fig. 62에 나타내었다.

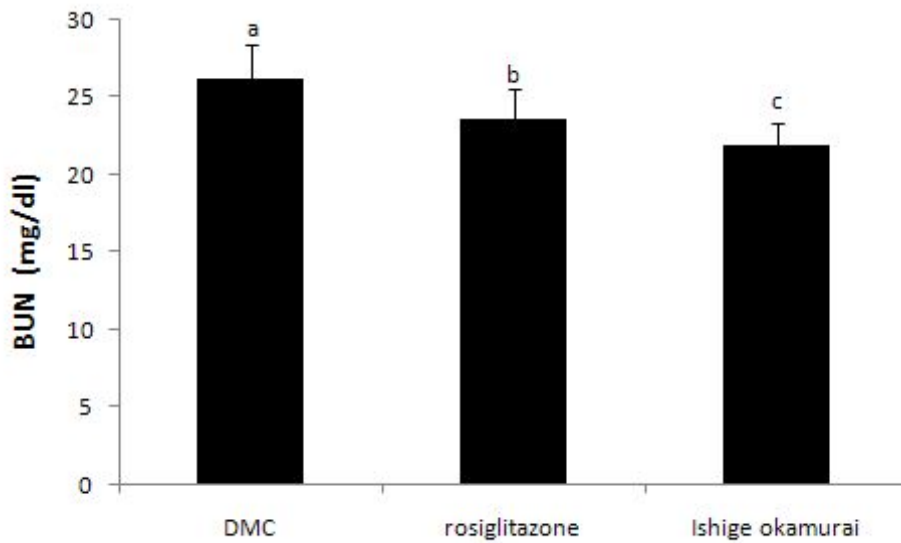


Fig. 62. Blood urea nitrogen level in C57BL/KsJ-db/db mice fed diets containing rosiglitazone and *Ishige okamurai*. Values are means±SE, n=7. ^{a-c}Means not sharing a common letter are significantly different among groups ($p < 0.05$). **DMC (diabetes mellitus control)** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with AIN-93G diet, **rosiglitazone** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with rosiglitazone(0.005g/100g diet), **Ishige okamurai** : C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with Ishige okamurai extract(1g/100g diet).

11. 임상실험 결과

가. 패 추출물의 섭취가 제2형 당뇨병환자의 혈당 및 인슐린 저항성에 미치는 영향

(1) 패 추출물군과 위약군의 동질성 검증 (Before treatment)

(가) 일반사항 및 임상적 특성

① 일반사항

연구대상자는 총 46명으로 패 추출물군에서는 여자 9명(37.5%), 남자 15명(62.5%)이며 위약군에서는 여자 10명(45.5%), 남자 12명(54.5%)으로 그들의 일반적 특성은 Table 11에서 보는 바와 같다. 연령은 패 추출물군은 55.41±10.64세, 위약군은 56.87±10.15세로 전체 평균나이는 56.00±10.33세였으며 연령별로는 패 추출물군에서는 40~49세, 60~69세가 각각 37.5%, 위약군에서는 50~59세가 40.9%로 가장 많았다. 교육 수준은 패 추출물군에서 중졸 54.2%, 고졸33.3%, 대졸이상 12.5%로 조사되었고, 위약군에서는 중졸 54.5%, 고졸31.8%, 대졸이상 13.6%로 조사되었다. 가족 월 평균소득은 패 추출물군에서 200만원 이하가 54.2%, 201~400만원 25.0%, 401~600만원 8.3%, 601만원 이상 12.5%로 조사되었고, 위약군에서는 200만원 이하 50.0%, 201~400만원 31.8%, 401~600만원 4.5%, 601만원 이상 13.6%로 조사되었다. 배우자 여부는 패 추출물군에서 미혼 4.2%, 결혼 79.1%, 이혼 4.2%, 사별 12.5%로 나타났고, 위약군에서는 결혼 86.4%, 미혼 및 이혼 0.0%, 사별 13.6%로 나타났다. 일반적인 특성에 있어서는 패 추출물군과 위약군에서 유의적인 차이가 없어 동질성이 검증되었다.

② 임상적 특성

조사대상자들의 임상적 특성은 Table 12과 같다. 당뇨병의 이환기간은 패 추출물군에서 1년 미만이 25.0%, 1~4년 33.3%, 5~9년 8.4%, 10년 이상이 33.3%로 나타났고, 위약군에서는 1년 미만이 18.2%, 1~4년 18.2%, 5~9년 36.4%, 10년 이상이 27.3%로 나타나 패 추출물군은 1~4년과 10년 이상이 33.3%로 가장 많았으며 위약군의 경우는 5~9년이 36.4%로 가장 많았다. 치료 방법으로는 식사로만 조절하는 경우가 패 추출물군 12.5%, 위약군 13.6%이고, 약물로 조절하는 경우는 패 추출물군 87.5%, 위약군 86.4%로 전체 87.0%가 약물로 당뇨를 치료하는 것으로 나타났다. 조사대상자들의 체중상태를 표준체중백분율(PIBW)에 의해 90% 미만이면 저체중, 90-110% 미만이면 이상체중, 110~120%과체중, 120%이상을 비만으로 정하였을 때, 패 추출물군에서 저체중은 8.3%, 이상체중 25.0%, 과체중 29.2%, 비만 37.5%로 조사되었으며 위약군에서는 저체중 13.6%, 이상체중 36.4%, 과체중 27.3%, 비만 22.7%로 나타나 전체 환자 중 이상체중과 비만이 각각 30.4%로 가장 많았다. 패 추출물군에서는 비만인 경우가 37.5%, 위약군은 이상체중이 36.4%로 가장 큰 비중을 차지하는 것으로 조사되었다. 임상적 특성에서도 두 군 간에 유의적인 차이가 없었으므로 동질성이 검증되었다.

Table 11. General characteristics of the subjects

		N(%)					
Characteristics		IOE (N=24)	Placebo (N=22)	Total (n=46)	χ^2 value	p value	
Age (years)	30~39	1(4.2)	1(4.5)	2(4.3)	6.276	0.151	
	40~49	9(37.5)	3(13.6)	12(26.1)			
	50~59	3(12.5)	9(40.9)	12(26.1)			
	60~69	9(37.5)	6(27.4)	15(32.6)			
	70~75	2(8.3)	3(13.6)	5(10.9)			
	Mean±SD	55.41±10.64	56.87±10.15	56.00±10.33			
Sex	Male	15(62.5)	12(54.5)	27(58.7)	1.334	0.246	
	Female	9(37.5)	10(45.5)	19(41.3)			
Monthly average Income (10,000won/ month)	≤200	13(54.2)	11(50.0)	24(52.2)	0.491	0.921	
	201~400	6(25.0)	7(31.8)	13(28.3)			
	401~600	2(8.3)	1(4.5)	3(6.5)			
	≥601	3(12.5)	3(13.6)	6(13.0)			
Education level	Middle school	13(54.2)	12(54.5)	25(54.2)	0.020	0.990	
	High school	8(33.3)	7(31.8)	15(32.6)			
	Collage and above	3(12.5)	3(13.6)	6(13.0)			
Life partner	Single	1(4.2)	0(0.0)	1(2.2)	1.917	0.590	
	Married	19(79.1)	19(86.4)	38(82.6)			
	Divorced	1(4.2)	0(0.0)	1(2.2)			
	Bereaved	3(12.5)	3(13.6)	6(13.0)			

IOE: *Ishige okamurai* extract

Table 12. Clinical characteristics of the subjects

					N(%)	
Characteristics		IOE (N=24)	Placebo (N=22)	Total (n=46)	χ^2 value	p value
Duration of diabetes (years)	<1	6(25.0)	4(18.2)	10(21.7)	0.543	0.136
	1~4	8(33.3)	4(18.2)	12(26.1)		
	5~9	2(8.4)	8(36.4)	10(21.7)		
	≥10	8(33.3)	6(27.3)	14(30.4)		
Current treatment	Diet	3(12.5)	3(13.6)	6(13.0)	0.13	0.909
	OHA	21(87.5)	19(86.4)	40(87.0)		
Distribution of body weight	Under weight	2(8.3)	3(13.6)	5(10.9)	1.941	0.585
	IBW	6(25.0)	8(36.4)	14(30.4)		
	Over weight	7(29.2)	6(27.3)	13(28.3)		
	Obesity	9(37.5)	5(22.7)	14(30.4)		

IOE: *Ishige okamura* extract, OHA: Oral hypoglycemic agents, IBW: Ideal body weight

(나) 신체 계측치 및 혈압

연구 대상자의 신체계측치 및 혈압은 Table 13와 같다. 남자에서 패 추출물군의 신장은 169.08±6.08 cm 이고 위약군은 166.78±4.89 cm로 패 추출물군이 약간 더 컸으며, 체중에 있어서도 패 추출물군은 70.30±6.93 kg이고 위약군은 68.11±7.27 kg으로 패 추출물군이 더 크게 나타났다. 여자에서 패 추출물군의 신장은 154.56±6.19 cm이고 위약군은 153.83±4.58 cm로 패 추출물군이 약간 더 크게 나타났고, 체중은 패 추출물군 54.56±9.90 kg이고 위약군은 56.17±9.70 kg으로 위약군이 좀 더 큰 값을 보였다. BMI 기준치는 WHO 기준에서는 저체중 18.5 kg/m² 미만, 정상 18.5-24.9 kg/m², 과체중 25.0-30.0 kg/m², 비만이 30.0 kg/m² 이상으로 설정되어 있고, 우리나라 비만학회의 경우 저체중 18.5 kg/m², 정상 18.5-22.9 kg/m², 과체중 23.0-24.9 kg/m², 1단계 비만 25.0-29.9 kg/m², 2단계 비만 30.0 kg/m² 이상으로 한 단계 더 나누어져 있다. BMI 지수의 경우 남자 패 추출물군 24.49±1.64 kg/m², 위약군 24.46±2.21 kg/m²로 패 추출물군은 과체중, 위약군은 정상에 해당하였으며, 여자에서는 패 추출물군이 22.90±4.39 kg/m², 위약군은 23.63±2.97 kg/m²로 둘 다 정상에 해당하였다. 연구 대상자의 혈압적 특성은 남자의 경우 패 추출물군의 수축기 혈압과 이완기 혈압이 각각 126.62±6.45 mmHg, 80.31±4.74 mmHg이며, 위약군은 수축기 혈압과 이완기 혈압은 각각 124.00±4.50 mmHg, 79.22±4.21 mmHg로 나타났다. 여자의 경우 수축기 혈압과 이완기 혈압은 패 추출물군에서 각각 128.00±5.52 mmHg, 79.67±5.59 mmHg였으며, 위약군은 124.33±8.73 mmHg, 79.33±4.63 mmHg로 각각 나타났다. 당뇨병환자의 혈압기준치는 수축기 혈압 130이하, 이완기 혈압 80이하로 두 군 모두 잘 조절되고 있었고 두 군간 유의적인 차이가 없었으므로 동질성이 검증되었다.

Table 13. Anthropometric and blood pressure characteristics of the subjects

	Male (n=27)		Female (n=19)		Total (n=46)	
	IOE (n=15)	Placebo (n=12)	IOE (n=9)	Placebo (n=10)	IOE (n=24)	Placebo (n=22)
Age (years)	54.62±9.05 ¹⁾	56.00±8.50	56.56±13.10	58.17±13.03	55.41±10.64	56.87±10.15
Height (cm)	169.08±6.08	166.78±4.89	154.56±6.19	153.83±4.58	163.14±9.44	161.60±8.02
Weight (kg)	70.30±6.93	68.11±7.27	54.56±9.90	56.17±9.70	62.84±15.52	63.33±10.03
PIBW (%)	116.64±7.82	116.48±10.54	109.05±20.88	112.54±14.16	114.90±11.79	113.04±15.48
BMI (kg/m ²)	24.49±1.64	24.46±2.21	22.90±4.39	23.63±2.97	23.74±3.25	24.13±2.48
WC (inch)	87.14±4.57	86.64±3.47	74.79±7.84	75.78±9.00	82.09±8.60	82.30±8.13
SBP (mmHg)	126.62±6.45	124.00±4.50	128.00±5.52	124.33±8.73	127.18±5.99	124.13±6.23
DBP (mmHg)	80.31±4.74	79.22±4.21	79.67±5.59	79.33±4.63	80.05±4.97	79.27±4.22

¹⁾Mean±SD, IOE: *Ishige okamurai* extract

PIBW: Percentage ideal body weight (usual body weight / ideal body weight *100)

BMI: Body mass index (body weight (kg) / height(m)²)

WC: Waist circumference

SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure

(다) 생활 습관 및 영양소 섭취상태

① 생활 습관 특성

연구 대상자의 흡연, 음주, 운동 등의 생활습관 특성은 Table 14에 나타내었다. 흡연은 지질과산화물을 증가시키고 인슐린 저항성을 유도하여 당뇨병으로 인한 심혈관계합병증 발병의 위험인자로 여겨지고 있으나, 전체 대상자에서 34.8%가 흡연자이고 15.2%가 발병 후 담배를 끊은 상태였다. 비흡연자는 총 50.0%로 폐 추출물군이 41.7%, 위약군이 59.1%로 나타났다. 음주는 전혀 하지 않는 경우가 전체 58.7%로 가장 높게 나타났으나, 주 3회 이상 과도한 음주도 전체 8.7%로 나타났다. 운동 요법은 비만한 제 2형 당뇨병환자들이 식이요법과 병행하면 체중조절에 매우 효과적이며 말초조직의 순환혈류량을 증가시키고 근육 및 지방세포의 인슐린 수용체의 감수성과 인슐린 반응도 증가되어 결과적으로 인슐린의 말초조직에 대한 효과를 향상시킨다. 본 연구에서는 전체 환자에서 운동을 전혀 하지 않는 경우가 39.1%였고 주1~2회 운동하는 경우는 8.7%, 주3~4회 운동하는 경우는 17.4%, 주5회 이상 운동하는 경우도 34.8%로 나타나 운동을 하지 않는 사람보다 하는 사람이 1.5배 이상 많은 것으로 조사되었다. 생활습관에서도 폐 추출물군과 위약군간 유의적인 차이가 없었으므로 동질성이 검증되었다.

② 영양소 섭취 상태

연구대상자의 1일 평균 열량 및 영양소 섭취량은 Table 15과 같다. 당뇨병환자의 열량 섭취량은 폐 추출물군이 1806.55±469.21 kcal, 위약군이 1801.80±491.99 kcal였으며 탄수화물 섭취량의 경우 폐 추출군은 263.83±61.75 g, 위약군은 267.15±68.60 g으로 나타났다.

제 2형 당뇨병 환자에서 식이요법은 치료의 가장 중요한 부분이며, 대한 당뇨병 학회에서는 우리나라 당뇨병 환자를 위하여 열량 영양소의 섭취를 총 열량 중 탄수화물 55~60%, 지방 25~30%, 단백질 15~20%로 권장하고 있다. 본 연구 대상자의 두 군 열량의 구성 비율을 보면 탄수화물 섭취량은 폐 추출물군이 총열량의 60.09%, 위약군의 경우 59.31%를 섭취하고 있는 것으로 나타났고, 단백질 섭취량은 폐 추출물군에서 총 열량의 16.10%, 위약군에서 18.37%로 나타났으며 지방 섭취량은 폐 추출물군이 총 열량의 23.81%, 위약군이 총열량의 22.32%로 권장비율보다 조금 낮은 것으로 나타났다.

다른 영양소에서도 전반적으로 폐 추출물군과 위약군이 비슷한 결과를 나타내 유의적인 차이가 없었으므로 영양소 섭취상태에서 두 군 간의 동질성이 검증되었다.

Table 14. Smoking, drinking and exercise of the subject

N(%)

Characteristics	IOE (N=24)	Placebo (N=22)	Total (n=44)	χ^2 value	p value
Smoking	Non-smoker	10(41.7)	13(59.1)	1.84	0.40
	Ex-smoker	5(20.8)	2(9.1)		
	Smoker	9(37.5)	7(31.8)		
Drinking	None	11(45.8)	16(72.7)	3.51	0.17
	Mild (≤ 2 times/week)	10(41.7)	5(22.7)		
	Heavy (≥ 3 times/week)	3(12.5)	1(4.5)		
Exercise	None	9(37.5)	9(40.9)	1.67	0.64
	1~2times/week	3(12.5)	1(4.5)		
	3~4times/week	3(12.5)	5(22.7)		
	≥ 5 times/week	9(37.5)	7(31.8)		

IOE: *Ishige okamura* extract

Table 15. Daily energy and nutrient intake of the subjects

Nutrients	IOE (n=24)	Placebo (n=22)
Energy (Kcal)	1806.55 ± 469.21 ¹⁾	1801.80 ± 491.99
Carbohydrate (g)	263.83 ± 61.75	267.15 ± 68.60
Protein (g)	70.69 ± 28.46	82.77 ± 36.81
Fat (g)	46.45 ± 29.21	44.68 ± 26.84
Vit A (µg RE)	867.65 ± 549.79	960.62 ± 485.39
Vit B₁ (mg)	1.24 ± 0.61	1.30 ± 0.53
Vit B₂ (mg)	0.98 ± 0.36	1.20 ± 0.53
Vit B₆ (mg)	2.20 ± 0.86	2.56 ± 1.35
Vit C (mg)	109.53 ± 58.72	110.51 ± 44.40
Folate (mg)	283.45 ± 126.96	249.66 ± 80.85
Vit E (mg)	11.28 ± 4.34	14.48 ± 7.96
Ca (mg)	464.40 ± 171.77	510.68 ± 183.71
P (mg)	1012.63 ± 341.86	1119.72 ± 445.37
Fe (mg)	12.90 ± 3.65	15.06 ± 5.71
Zn (mg)	8.71 ± 3.08	9.56 ± 4.53
Fiber (mg)	22.64 ± 9.88	23.66 ± 7.76
Carbohydrate en (%)	60.09 ± 13.93	59.31 ± 12.88
Protein en (%)	16.10 ± 3.11	18.37 ± 4.54
Fat en (%)	23.81 ± 9.83	22.32 ± 9.19

¹⁾Mean±SD, IOE: *Ishige okamura* extract

(2) 폐 추출물 섭취 효과 (After treatment)

(가) 신체계측치 및 혈압 변화

연구 대상자의 폐 추출물 및 위약 섭취 후의 신체 계측치 변화는 Table 16에 나타내었다. 폐 추출물군에서 체중은 실험 전 62.84 ± 15.52 kg에서 실험 후 62.95 ± 10.06 kg로 큰 변화를 보이지 않았으며 위약군의 경우도 63.33 ± 10.03 kg에서 63.07 ± 7.56 kg로 큰 변화를 보이지 않았다. 허리둘레는 폐 추출물군의 경우 실험 전 82.09 ± 8.60 cm에서 실험 후 81.97 ± 8.45 cm로 약간 감소하였고, 위약군은 82.30 ± 8.13 cm에서 82.63 ± 6.64 cm로 약간 증가하였으나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 BMI도 폐 추출물군이 23.74 ± 3.25 kg/m²에서 23.64 ± 3.06 kg/m²로, 위약군은 24.13 ± 2.48 kg/m²에서 24.17 ± 2.41 kg/m²로 약간 감소 또는 큰 변화가 없어 유의적인 차이를 나타내지는 않았다.

혈압의 변화는 폐 추출물군에서 실험 전후 수축기 혈압이 127.18 ± 5.99 mmHg에서 125.91 ± 6.24 mmHg로 약간 감소하였고 이완기 혈압은 80.05 ± 4.97 mmHg에서 79.68 ± 3.31 mmHg로 약간 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았다.

위약군의 경우에 수축기 혈압이 124.13 ± 6.23 mmHg에서 124.87 ± 6.45 mmHg로 약간 상승하였고 이완기 혈압은 79.27 ± 4.22 mmHg에서 79.67 ± 3.54 mmHg로 약간 감소하였으나 유의하지 않았다. 당뇨병환자에 있어 고혈압인 경우 혈압강하제를 복용하고 있어 결론내리기는 조심스러우나 본 연구 결과로 볼 때, 폐 추출물을 장기간 꾸준히 섭취한다면 혈압 조절에 보조 역할로써 약간의 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

Table. 16. Changes in anthropometric characteristics and blood pressure of the subjects after 10 weeks of IOE supplement

Characteristics	IOE (n=24)		Placebo (n=22)	
	Before	After	Before	After
Age (year)	55.41±10.64 ¹⁾		56.87±10.15	
Height (cm)	163.14±9.44	163.00±9.57	161.60±8.02	161.53±7.95
Weight (kg)	62.84±15.52	62.95±10.06	63.33±10.03	63.07±7.56
WC (cm)	82.09±8.60	81.97±8.45	82.30±8.13	82.63±6.64
BMI (kg/m ²)	23.74±3.25	23.64±3.06	24.13±2.48	24.17±2.41
SBP (mmHg)	127.18±5.99	125.91±6.24	124.13±6.23	124.87±6.45
DBP (mmHg)	80.05±4.97	79.68±3.31	79.27±4.22	79.67±3.54

¹⁾Mean±SD, IOE: *Ishige okamurai* extract

BMI: Body mass index (Body weight (kg)/Height(m)²)

WC: Waist circumference

BP: Blood pressure, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure

(나) 영양소 섭취상태 변화

연구대상자의 영양소 섭취상태변화는 Table 17과 같다. IOE군의 패 추출물 섭취 후의 영양소 섭취 변화를 보면 열량은 1806.55±469.21 kcal에서 1870.94±514.79 kcal로 약간 증가하였고 탄수화물의 섭취량도 263.83±61.75 g에서 275.06±76.11 g으로, 단백질 섭취량은 70.69±28.46 g에서 79.95±26.87 g으로 증가하였으나 모두 유의하지는 않았다. 지질의 섭취량 역시 46.45±29.21 g에서 50.10±29.63 g으로 약간 상승하였다. 열량의 비는 탄수화물이 60.09±13.93%에서 58.81±9.99%로 소량 감소하였고, 단백질은 16.10±3.11%에서 17.09±3.37%로 증가 하였으며, 지질은 23.81±9.83%에서 24.10±8.25%로 증가하였다.

비타민 B₂, Ca, Fe의 섭취량은 유의 (p<0.05)하게 증가하였으나 그 밖에 영양소인 비타민 A, B₁, B₆, C, E, folate, P, Zn, fiber는 섭취량이 약간 증가되거나 감소되었으나 유의한 변화는 나타나지 않았다.

Table 17. Changes in daily energy and nutrient intake of the subjects after 10 weeks of IOE supplement

Nutrients	IOE (n=24)		Placebo (n=22)	
	Before	After	Before	After
Energy (Kcal)	1806.55±469.21 ¹⁾	1870.94±514.79	1801.80±491.99	1722.61±248.99
Carbohydrate (g)	263.83±61.75	275.06±76.11	267.15±68.60	262.44±60.99
Protein (g)	70.69±28.46	79.95±26.87	82.77±36.81	78.71±24.80
Fat (g)	46.45±29.21	50.10±29.63	44.68±26.84	36.81±12.80
Vit A (µg RE)	867.65±549.79	881.36±505.01	960.62±485.39	821.50±404.73
Vit B₁ (mg)	1.24±0.61	1.37±0.71	1.30±0.53	1.18±0.28
Vit B₂ (mg)	0.98±0.36	1.24±0.47*	1.20±0.53	1.17±0.41
Vit B₆ (mg)	2.20±0.86	2.54±0.98	2.56±1.35	2.27±0.64
Vit C (mg)	109.53±58.72	148.20±95.43	110.51±44.40	112.54±43.47
Folate (mg)	283.45±126.96	281.90±156.53	249.66±80.85	254.19±98.15
Vit E (mg)	11.28±4.34	16.54±16.49	14.48±7.96	14.49±9.33
Ca (mg)	464.40±171.77	597.98±216.27*	510.68±183.71	525.39±187.24
P (mg)	1012.63±341.86	1175.94±427.07	1119.72±445.37	1069.10±343.82
Fe (mg)	12.90±3.65	15.91±5.56*	15.06±5.71	15.21±5.77
Zn (mg)	8.71±3.08	8.59±2.57	9.56±4.53	8.70±2.57
Fiber (mg)	22.64±9.88	27.85±12.40	23.66±7.76	25.72±7.53
Carbohydrate en (%)	60.09±13.93	58.81±9.99	59.31±12.88	61.90±10.01
Protein en (%)	16.10±3.11	17.09±3.37*	18.37±4.54	18.56±3.98
Fat en (%)	23.81±9.83	24.10±8.25	22.32±9.19	19.54±6.66

¹⁾Mean±SD, IOE: *Ishige okamurai* extract. *p<0.05 by paired t-test

(다) 혈당 및 당화혈색소 변화

대상자의 공복혈당 및 당화혈색소 (Glycosylated hemoglobin, HbA1c)의 변화는 Table 18와 같다. 실험군의 공복혈당은 136.50±31.96 mg/dℓ에서 130.90±29.88 mg/dℓ로 감소하였으며 당화혈색소 역시 7.34±0.78%에서 6.82±0.98%로 유의하게 (p<0.01) 감소하였다. 반면 위약군에서는 공복혈당이 130.70±35.79 mg/dℓ에서 132.30±30.70 mg/dℓ로 약간 증가하였으며, 당화혈색소는 7.30±0.87%에서 7.23±1.24%로 감소하였으나 유의한 차이를 보이지 않았다. 특히, 공복 혈당 뿐 만 아니라 3개월 평균 혈당 관리의 지표인 당화혈색소가 꽤 추출물군에서 유의하게 감소하였으므로 꽤 추출물의 꾸준한 섭취는 혈당 강하에 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

꽤 추출물의 섭취가 어떤 환자들에게 더 효과적인지를 조사하기 위해, 꽤 추출물군에서 공복혈당보다 당 조절 상태에 더 안정적 지표라 할 수 있는 당화혈색소 수치에 따라 각각 2그룹으로 나누어 대상자들의 변화를 살펴보았다. 당화혈색소에 따른 분류는 8%를 기준으로 고당화혈색소군과 저당화혈색소군으로 분류하여 비교한 그림은 Fig. 63과 같다. 고당화혈색소의 경우 실험 전 8.65±0.92%에서 실험 후 8.60±0.85%로 감소를 보였고 저당화혈색소군은 7.12±0.38%에서 6.56±0.53%로 유의하게 (p<0.05) 감소하였다.

Table 18. Changes in blood glucose and glycosylated hemoglobin levels of the subjects after 10 weeks of IOE supplement

	IOE (n=24)		Placebo (n=22)	
	Before	After	Before	After
FBG (mg/dℓ)	136.50±31.96 ¹⁾	130.90±29.88	130.70±35.79	132.30±30.70
HbA1c (%)	7.34±0.78	6.82±0.98**	7.30±0.87	7.23±1.24

¹⁾Mean±SD, IOE: *Ishige okamurai* extract

FBG: Fasting blood glucose, HbA1c: Glycosylated hemoglobin

** p<0.01 by paired t-test

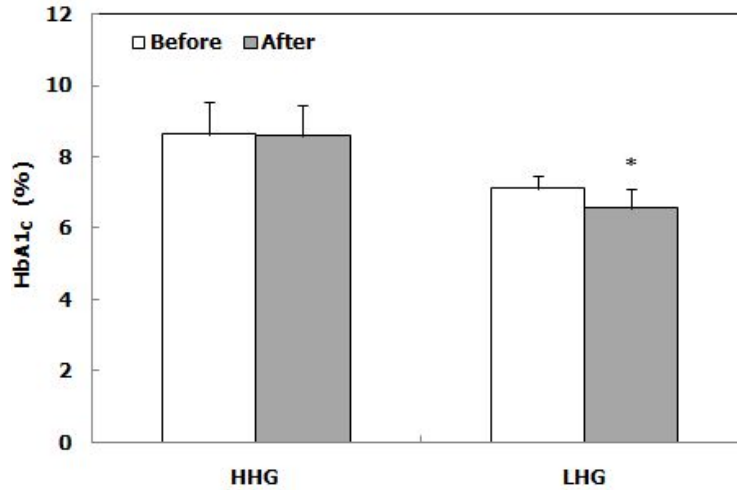


Fig. 63. Changes in glycosylated hemoglobin levels of IOE group after 10 weeks of IOE supplement.

IOE: *Ishige okamurai* extract, HbA1c: Glycosylated hemoglobin, * $p < 0.05$ by paired t-test

HHG: High HbA1c level group (HbA1c $\geq 8\%$), LHG: Low HbA1c level group (HbA1c $< 8\%$)

(라) 혈청지질 변화

대상자의 혈청 지질변화는 Table 19과 같다. 폐 추출물군의 총 콜레스테롤은 186.45 ± 34.65 mg/dl에서 170.36 ± 38.69 mg/dl로 감소하였고, LDL-콜레스테롤은 115.43 ± 27.47 mg/dl에서 108.73 ± 22.36 mg/dl로 감소하였으나 유의하지는 않았으며 위약군에 있어서도 유의한 변화가 없었다. LDL-콜레스테롤의 증가는 동맥경화를 가속화시키고 그 크기가 작을수록 동맥경화 형성이 더욱 가속화되며 인슐린 저항성을 가진 경우 크기가 감소되어 있는데 본 연구대상에 있어 혈청 지질이 매우 높은 환자는 폐 추출물군과 위약군 모두 지질개선제를 복용하고 있어 실험결과 해석이 조심스러우나 폐 추출물은 전반적인 혈청지질은 감소시키고, HDL-콜레스테롤은 증가시켜 혈청 지질개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

Table 19. Changes in serum lipid levels of the subjects after 10 weeks of IOE supplement

	IOE (n=24)		Placebo (n=22)	
	Before	After	Before	After
T-Chol (mg/dl)	$186.45 \pm 34.65^{1)}$	170.36 ± 38.69	175.73 ± 47.75	160.19 ± 59.69
TG (mg/dl)	170.14 ± 26.59	151.31 ± 52.79	156.53 ± 96.89	133.40 ± 75.67
HDL-C (mg/dl)	41.14 ± 7.86	46.82 ± 5.69	42.38 ± 10.56	42.30 ± 10.65
LDL-C (mg/dl)	115.43 ± 27.47	108.73 ± 22.36	108.20 ± 44.15	102.73 ± 39.69

¹⁾Mean \pm SD, IOE: *Ishige okamurai* extract

T-Chol: Total cholesterol, TG: Triglyceride, HDL-C: HDL-cholesterol, LDL-C: LDL-cholesterol

(마) 인슐린 분비능 변화

제 2형 당뇨병의 특징인 인슐린 저항성은 표적장기에서의 인슐린 반응이 제대로 이루어지지 않아 체내에서 더 많은 인슐린을 필요로 하여 고인슐린 혈증을 유발시킨다. 내당능 장애와 당뇨병, 고혈압, 고중성지방혈증, 비만 등 인슐린 저항성 증후군의 유병률이 인슐린 농도가 높아질수록 증가하며, 인슐린 농도가 가장 높은 군에서는 인슐린 농도가 낮은 군에 비해 2가지 이상의 대사 이상이 나타나는 경우가 2.5 배 가량 증가한다고 보고된바 있다. 또한 고인슐린 혈증은 비만과 각 조직 과잉성장의 원인이 되며, 직접적으로 renin-angiotensin system에 영향을 미쳐 혈압을 상승시킬 수도 있다. 이렇듯 인슐린의 항상성을 유지하는 것이 대사 장애를 예방 및 개선하는데 큰 영향을 준다. 따라서 제 2형 당뇨병환자의 대부분에서 나타나는 인슐린 저항성에 의한 고인슐린 혈증을 낮추어 정상에 가까운 상태로 유지하는 것이 제 2형 당뇨 치료의 목적 중 하나라 할 수 있다.

대상자의 인슐린 분비능 변화를 살펴보면 폐 추출물군에서 실험 전 7.66±3.54 uIU/ml이었으나 실험 후 6.45±2.18 uIU/ml로 인슐린 분비가 감소하였고 위약군은 6.03±3.21 uIU/ml에서 5.84±1.90 uIU/ml로 약간 감소하였으나 큰 변화가 없었다. 즉 폐 추출물의 섭취는 인슐린 저항성에 의한 고인슐린 혈증을 개선시킬 수 있으리라 기대된다(Fig. 64).

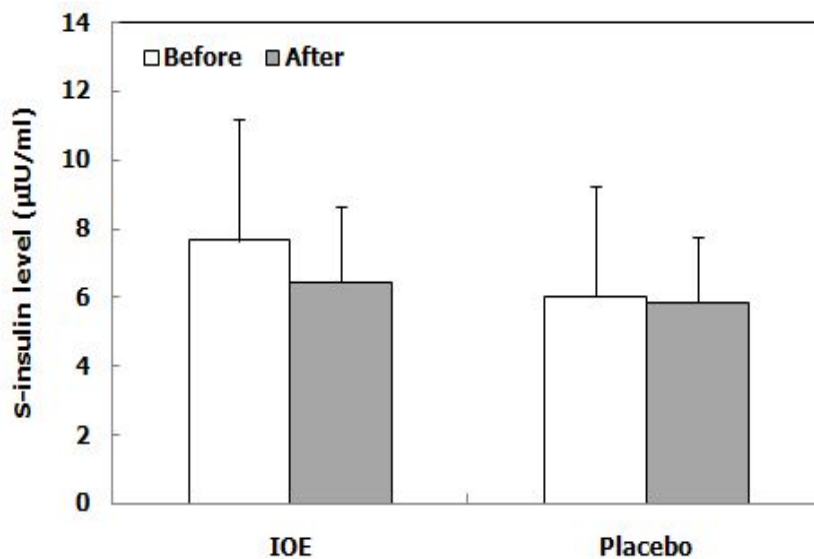


Fig. 64. Changes in serum insulin level of the subjects after 10 weeks of IOE supplement.

IOE: *Ishige okamurai* extract

(바) 인슐린 저항성 변화

Homeostasis model assessment (HOMA)법은 1985년 Mathews 등이 개발 한 것으로 공복 인슐린 및 포도당 농도를 고려하여 인슐린저항성과 췌장 베타세포의 인슐린 분비능 지표를 계산하는 방법이다. HOMA-insulin resistance (HOMA_{IR})는 인슐린 민감도가 낮아지면 높은 값을 가지게 된다. HOMA_{IR}은 폐

추출물군의 경우 2.77 ± 0.49 mmol/L에서 2.19 ± 0.62 mmol/L로 큰 감소를 나타내었으며 위약군에서도 2.14 ± 0.37 mmol/L에서 2.00 ± 0.42 mmol/L로 약간 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 65).

인슐린 저항성은 비만, 운동부족, 정신적 스트레스, 유전적 감수성이 있는 사람에게서 잘 발생하며 복부비만, 지질이상혈증, 고혈압, 미세알부민뇨, 혈액응고이상, 내당능 장애등으로 심혈관질환, 당뇨병에 의한 사망률이 증가한다. 즉 혈당조절과 합병증 관리를 위해서는 인슐린 분비능 뿐만 아니라 인슐린 저항성을 고려한 치료법의 선택이 매우 중요하므로 본 연구의 결과와 같이 인슐린 저항성의 개선이 당뇨병 치료에 매우 도움이 될 것으로 사료된다.

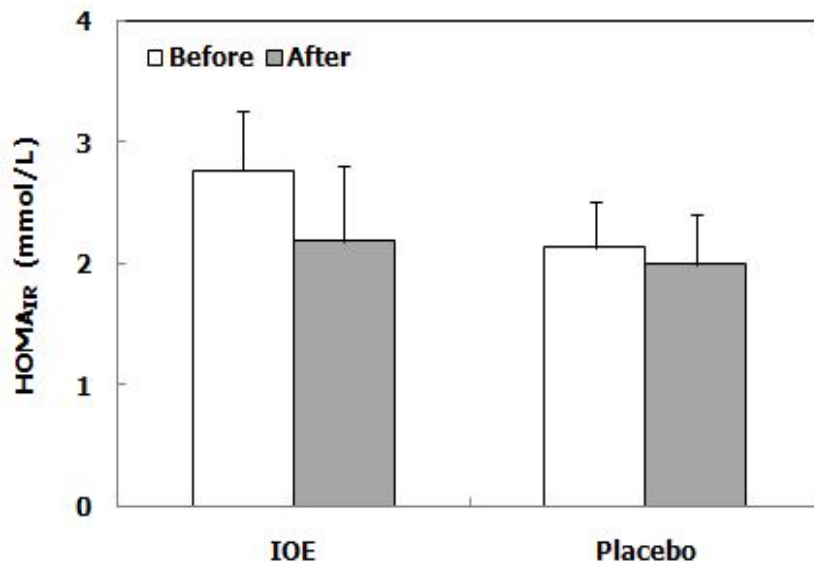


Fig. 65. Changes in HOMA_{IR} of the subjects after 10 weeks of IOE supplement.

IOE: *Ishige okamurai* extract

HOMA_{IR}: Hemeostatic index of insulin resistance

(사) C-reactive protein 변화

C-reactive protein (CRP) 측정은 염증성 또는 조직붕괴성 질환의 존재여부와 그 중증도 판정, 경과 관찰 및 예후 판정을 위해 검사된다. 하지만 CRP 수치만으로 염증성질환을 판정하지는 않으나 본 연구에서는 염증 정도를 개선할 수 있는지에 대해 초점을 두고 변화를 살펴보았다. 연구 대상자의 CRP의 변화는 Fig. 66과 같다. 폐 추출물군에서 CRP는 실험 전 0.12 ± 0.06 mg/dl에서 실험 후 0.11 ± 0.03 mg/dl로 약간 감소하고, 위약군의 경우는 실험전 0.14 ± 0.07 mg/dl에서 실험 후 0.15 ± 0.09 mg/dl로 약간 증가하였다. 따라서 폐 추출물은 정상범위의 농도에서 염증성 반응의 한 지표인 CRP 감소에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

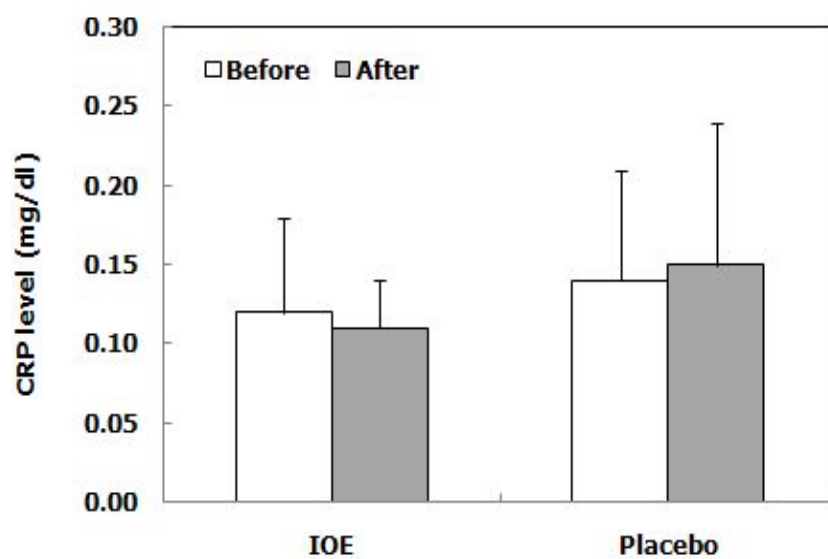


Fig. 66. Changes in C-reactive protein level of the subjects after 10 weeks of IOE supplement.

IOE: *Ishige okamurai* extract

CRP: C-reactive protein

(자) 지질과산화물 변화

혈장과 적혈구에서의 지질과산화물 폐 추출물 섭취 전, 후의 변화는 Fig. 67과 같다. 유리기에 의한 지질과산화는 불포화지방의 이중결합 위치가 재배치되는 과정을 거쳐 일어나는데, 세포내 지질과산화는 peroxisome, lysosomes, endoplasmic reticulum 및 mitochondria 등 세포내 소기관의 병적 및 생리적 소견과 상호연관이 있다. 혈장과 적혈구 TBARS 함량 변화를 보면 IOE군은 각각 4.45 ± 1.19 nmol/MDA, 5.72 ± 1.28 nmol/MDA로 지질과산화물 함량이 감소한 반면, 위약군은 5.44 ± 1.92 nmol/MDA, 6.03 ± 1.28 nmol/MDA로 혈장에서는 증가하였고, 적혈구 TBARS 함량은 IOE군에 비해 그 증가량이 낮았다. 즉 위약군은 지질과산화가 더 진행된 반면 IOE군은 지질과산화가 위약군에 비해 억제되었음을 알 수 있다.

(차) 항산화 효소 활성 및 Glutathione 농도 변화

세포내 유리기 농도의 증가 또는 방어기전의 감소는 세포의 산화적 손상을 초래하므로, 본 실험에서는 폐 추출물을 10주간 섭취한 제 2 당뇨병 환자의 적혈구 항산화 효소 활성도를 측정하여 폐 추출물 섭취가 산소 유리기에 대한 항산화효소계의 방어정도를 어떻게 변화시키는지 살펴보았다. 실험 대상자의 적혈구 항산화효소 활성 및 GSH 농도 변화 결과는 Table 20, Fig. 68 같다.

SOD 활성은 위약군에서는 감소한 반면 폐 섭취군에서는 7.66 ± 0.11 unit/mg protein에서 8.16 ± 1.12 unit/mg protein으로 증가하였다. SOD는 활성이 감소하면 cyto-oxidant의 합성이 증가하여 췌장 베타 세포 손상을 증가시켜 당뇨병의 유발 및 진전을 촉진시킬 수 있다. 따라서 폐 추출물 섭취는 SOD 활성을 증가시켜 당뇨병 유발 및 진전을 완화할 수 있을 것으로 기대된다.

또한 CAT와 GSH-px 활성, GSH의 경우 위약군에는 감소하거나 소량 증가한 반면, 폐 섭취군에서는 증가하는 것으로 나타났다. 특히, GSH-px 활성 증가는 췌장베타세포의 인슐린 분비 반응 촉진에도 기여할 것으로 사료된다.

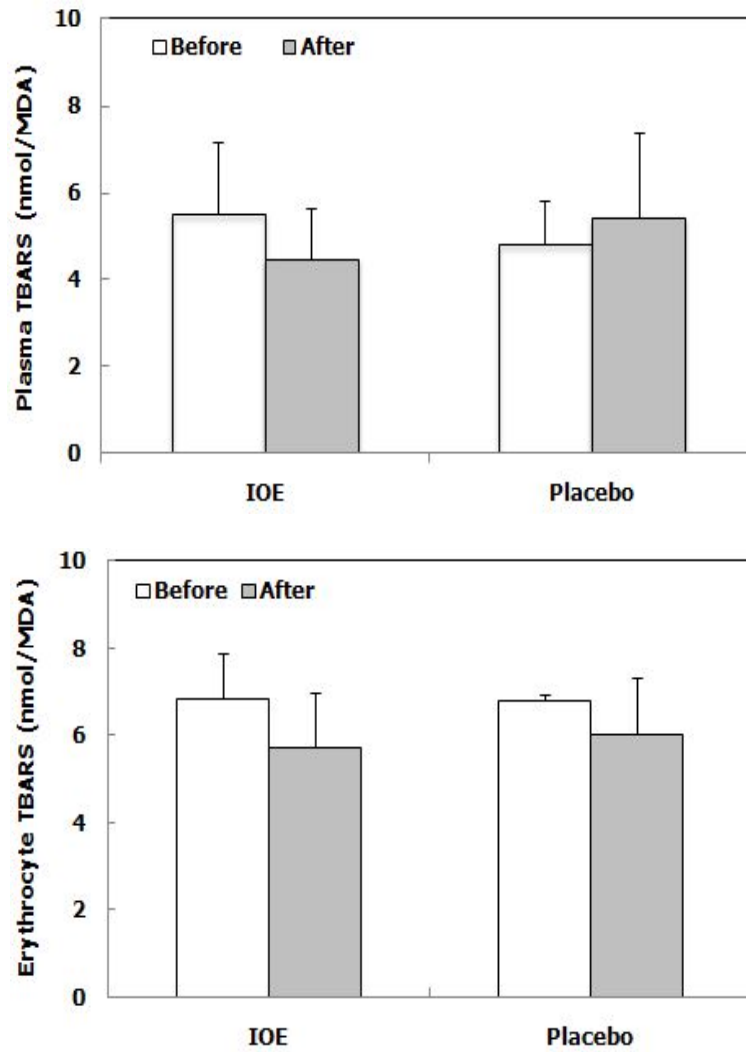


Fig. 67. Changes in TBARS levels of the subjects after 10 weeks of IOE supplement. IOE: *Ishige okamurai* extract; MDA: Malondialdehyde; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substance.

Table 20. Changes in antioxidant enzymes activities of the subjects after 10 weeks of IOE supplement

	IOE (n=24)		Placebo (n=22)	
	Before	After	Before	After
SOD (unit/mg Hb)	7.66±0.11	8.16±1.12	6.68±2.89	5.56±1.21
CAT (μmol/min/mg Hb)	1.16±0.10	1.38±0.17	1.16±0.16	1.18±0.15
GSH-px (nmol/min/mg Hb)	26.05±1.17	27.64±0.68	26.14±0.94	25.93±1.49

IOE: *Ishige okamurai* extract; SOD: Superoxide dismutase; GAT: Catalase; GSH-px: Glutathion peroxidase; Hb: Hemoglobin

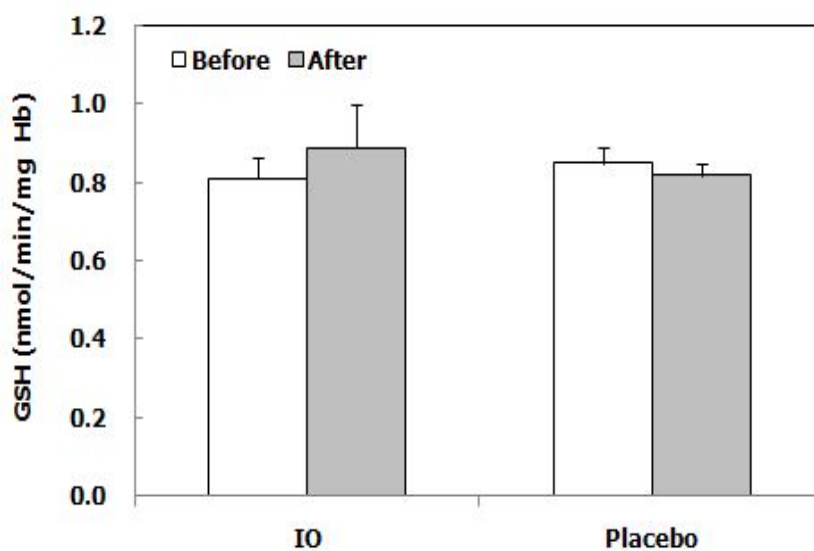


Fig. 68. Changes in glutathione level of the subjects after 10 weeks of IOE supplement.

IOE: *Ishige okamurai* extract; GSH: Total glutathione; Hb: Hemoglobin

(카) 간기능 안전성 검증

약물 또는 특정 식품의 지속적인 섭취에 대한 안전성 검사로 주로 사용되는 간기능 검사는 간세포에서 유출되는 혈중 AST와 ALT 그리고 γ -GTP의 수치를 측정하여 폐 추출물의 섭취에 따른 안전성 검증을 위해 실시하였다(Table 21).

AST의 경우 38 IU/L이하, ALT는 43 IU/L이하, γ -GTP는 11-50 IU/L를 정상 범위로 한다. 간 기능 검사 결과는 Table 21에 나타내었다. 폐 추출물의 10주간 섭취 후 AST는 폐 추출물군에서 22.73 ± 7.68 IU/L에서 18.67 ± 3.16 IU/L로 약간 감소하였으나 유의하지 않았으며 정상범위에 속하였다. ALT는 23.73 ± 9.67 IU/L에서 20.50 ± 8.86 IU/L로 약간 감소하였으나 전후 모두 정상범위에 속하였다.

γ -GTP 경우 24.95 ± 10.05 IU/L에서 21.06 ± 5.71 IU/L로 약간 감소하였으나 모두 정상범위에 속하였다. 위 약군에서도 실험 전 후로 유의한 변화가 없었으며 모두 정상범위에 속하였다. 따라서 폐 추출물의 장기간 섭취가 간기능 검사에서는 인체에 독성작용을 나타내지 않는 것으로 나타났다.

(타) 신장기능 안전성 검증

신장기능 검사로 blood urea nitrogen(BUN)과 Creatinine을 측정하였다. BUN은 urea와 동의어로 취급하며 단백질의 대사산물로 생성된 amino acid는 체내에서 여러 가지 효소에 의해 탈아미노화되어 암모니아로 전환되고 ornithine cycle에 의해 urea로 합성된 후 체순환에 들어가 대부분 신사구체에서 체외로 배설되므로 신장질환과 관계가 깊다. Creatinine은 근육의 수축 에너지로서 creatine phosphate에서 생성된 creatine에서 탈수되어 생긴 대사 최종산물이다. 당뇨병으로 혈관이 장애를 받으면 신사구체의 여과면적이 감소되어 사구체 여과량이 감소하게 되며, 이는 신장 기능 저하로 인해 점차 신부전 상태에 가까워지는 것을 의미한다. 따라서 신사구체에서 여과되어 배설되는 creatinine 측정은 신장 기능을 평가하는 중요한 지표로 사용된다.

신장 기능 검사결과는 Table 22과 같다. 폐 추출물 10주간 섭취 후 BUN은 폐 추출물군에서 14.50 ± 5.03 mg/dl에서 13.19 ± 4.31 mg/dl로 큰 변화가 없었고 정상범위 (5-23 mg/dl)에 속하였다. Creatinine은 남자의 경우 0.88 ± 0.16 mg/dl에서 0.89 ± 0.14 mg/dl로 거의 변화가 없었고 여자의 경우는 0.63 ± 0.05 mg/dl에서 0.65 ± 0.06 mg/dl로 약간 증가하였으나 정상범위 (남자: 0.6-1.4 mg/dl, 여자: 0.5-1.0 mg/dl)에 속하였다. 위 약군에서도 실험 전후로 유의한 변화가 없었으며 모두 정상범위에 속하였다. 따라서 폐 추출물의 장기간 섭취는 신장 기능상의 인체 독성작용을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

Table 21. Changes in AST, ALT and γ -GTP of the subjects after 10 weeks of IOE supplement

	IOE (n=24)		Placebo (n=22)	
	Before	After	Before	After
AST (IU/L)	22.73±7.68 ¹⁾	18.67±3.16	25.73±14.57	22.47±7.54
ALT (IU/L)	23.73±9.67	20.50±8.86	24.93±16.71	23.67±13.64
γ -GTP (IU/L)	24.95±10.05	21.06±5.71	23.93±9.66	23.57±10.48

¹⁾Mean±SD, IOE: *Ishige okamurai* extract

AST: Aspartate transaminase, ALT: Alanine transaminase, γ -GTP: r-Glutamyl transpeptidase

Table 22. Changes in BUN and Creatinine of the subjects after 10 weeks of IOE supplement

	IOE (n=24)		Placebo (n=22)	
	Before	After	Before	After
BUN (mg/dl)	14.50±5.03 ¹⁾	13.19±4.31	13.60±3.96	15.33±5.38
Creatinine (mg/dl)	Male	0.88±0.16	0.89±0.14	0.93±0.14
	Female	0.63±0.05	0.65±0.06	0.73±0.15

¹⁾Mean±SD, IOE: *Ishige okamurai* extract

BUN: Blood urea nitrogen

나. 폐 추출물이 식후 혈당 조절에 미치는 영향

(1) 제 2형 당뇨병 환자에 있어서 폐 추출물 섭취의 식후혈당강하 효과

(가) 일반사항 및 임상적 특성

대상자의 일반사항 및 임상적 특성은 Table 23와 같다. 대상자 10명의 나이는 46.90±8.25세이고 5명이 남성, 5명이 여성으로 구성되었다. 당뇨병 유병기간은 1년 미만인 4명, 1~5년 미만인 경우가 4명, 5~10년 미만인 1명, 10년 이상이 1명이었으며 약물로만 당뇨병을 치료하고 있었다.

(나) 신체 계측치 및 혈압

대상자의 신체계측치 및 혈압은 Table 24와 같다. 대상자의 키는 162.60±7.38cm이었고 체중은 62.50±9.62 kg이었으며 BMI는 23.67±3.57 kg/m²이었다. 허리둘레는 81.28±7.85 cm였으며 수축기혈압은 123.60±5.17 mmHg, 이완기혈압은 79.60±4.72 mmHg로서 당뇨병환자의 혈압목표인 130/80 mmHg를 넘지 않았다.

(다) 혈당에 미치는 영향

이당류인 maltose에 대한 패 추출물의 α-glucosidase에 대한 억제활성을 알아보기 위해 제 2형 당뇨병 환자를 대상으로 oral maltose tolerance test를 실시한 결과를 Fig. 69에 나타내었다. Fig. 69에서와 같이 maltose loading 5분 전에 패 추출물을 섭취한 경우가 maltose만 loading 했을 경우보다 혈당 조절이 효과적으로 이루어졌다. 특히 30분 혈당은 control의 경우 260.40±46.24 mg/dl로 급격히 상승하였으나, 패 추출물군은 235.10±37.35 mg/dl로 control에 비해 유의적 (p<0.05)으로 낮은 혈당을 나타내었다.

소장 내 α-glucosidase에 의한 탄수화물의 흡수는 대개 소장상부에서 신속하게 이루어지게 되어 급격한 식후혈당 상승을 초래한다. 정상인의 경우 소장내의 maltase와 같은 α-glucosidase를 적절히 억제함으로써 식후 급격한 혈당상승을 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 패 추출물의 섭취는 소장내의 α-glucosidase 활성을 억제시킴으로써 혈당 상승 억제 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

제 2형 당뇨병은 인슐린 표적장기에 대한 인슐린의 민감도가 낮아져 내당능이 유발되고 식후 고혈당이 나타나게 된다. 또한 식후 고혈당은 인슐린 민감도를 감소시키고 췌장 기능을 저하시켜 인슐린의 분비를 감소시키므로 당뇨병의 상태를 악화시키고, 대혈관 합병증 및 미세혈관 합병증을 일으킨다. 당뇨병 예방 및 치료에 있어서 식후 혈당을 정상치에 가깝게 조절하는 것이 중요한데, 본 연구의 실험 결과 패 추출물은 당뇨병의 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

Table 23. General and clinical characteristics of the diabetic subjects

Subjects	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Age(year)	39	49	63	41	46	40	44	59	48	40
	Mean±SD					46.90±8.25				
Sex	F	F	F	F	F	M	M	M	M	M
Duration(yr)	1-4	<1	<1	<1	1-4	5-10	1-4	≥10	1-4	<1
Current treatment	OHA	OHA	OHA	OHA	OHA	OHA	OHA	OHA	OHA	OHA

M: Male, F: Female, OHA: Oral hypoglycemic agent

Table 24. Anthropometric and blood pressure characteristics of the subjects

Subjects	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean±SD
Height (cm)	162	150	153	163	163	160	176	169	165	165	162.60±7.38
Weight (kg)	62	67	53	60	44	63	70	78	70	58	62.50±9.62
BMI (kg/m ²)	23.6	29.8	22.6	22.6	16.6	24.6	22.6	27.3	25.7	21.3	23.67±3.57
WC (cm)	76.20	83.82	73.66	81.28	66.04	81.28	86.36	91.44	91.44	81.28	81.28±7.85
SBP (mmHg)	120	132	117	125	123	117	121	128	123	130	123.60±5.17
DBP (mmHg)	78	84	76	70	82	76	79	84	82	85	79.60±4.72

¹⁾Mean±SD

PIBW: Percent ideal body weight, BMI: Body mass index

WC: Waist circumference

SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure

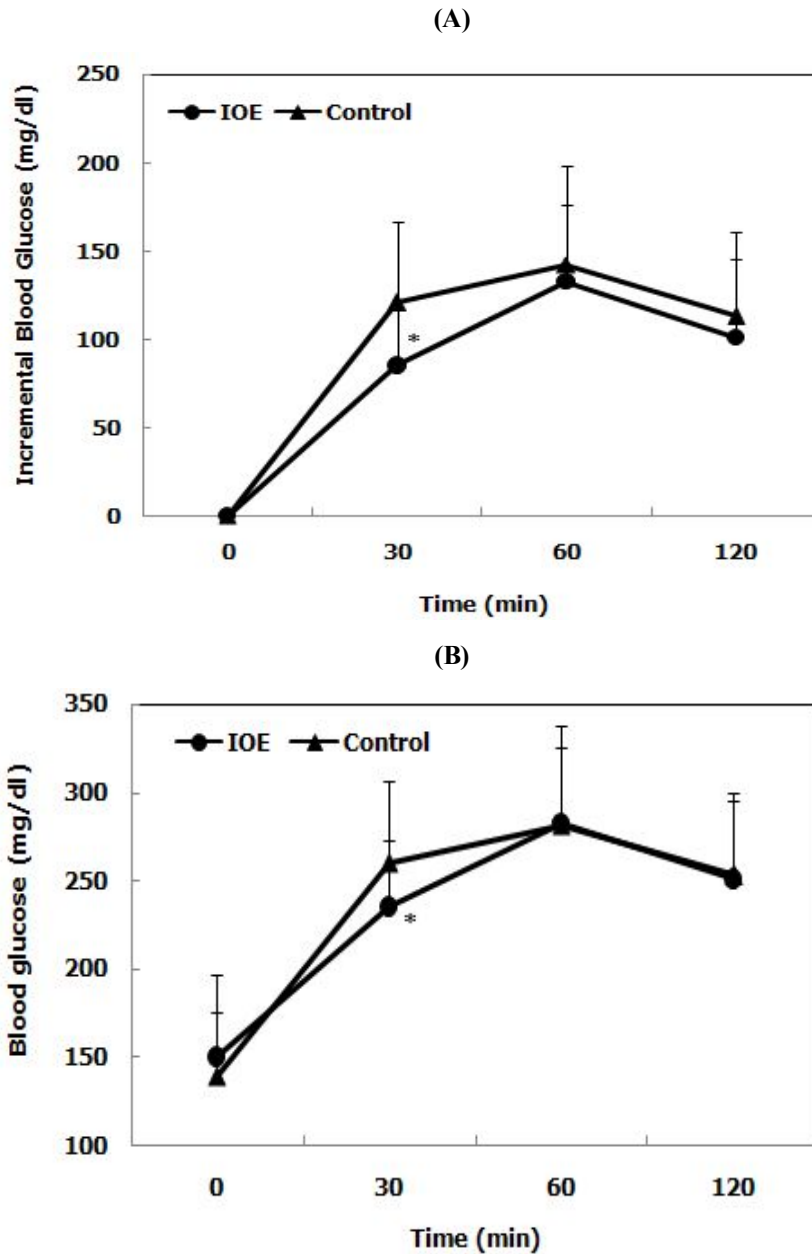


Fig. 69. Effects of IOE on blood glucose levels after oral maltose tolerance test in type 2 diabetes mellitus patients. Control (distilled water) or IOE (800 mg/4 capsule) were administered orally 5 min before maltose loading of 75 g. Each value is expressed as mean±SD of 10 subjects (n=10). Significantly different from control at *p<0.05. IOE: *Ishige okamurai* extract. (A): Incremental blood glucose level, (B): Blood glucose level

12. 생산수율과 경제성 검토

(가) 생산공정(Fig. 70)

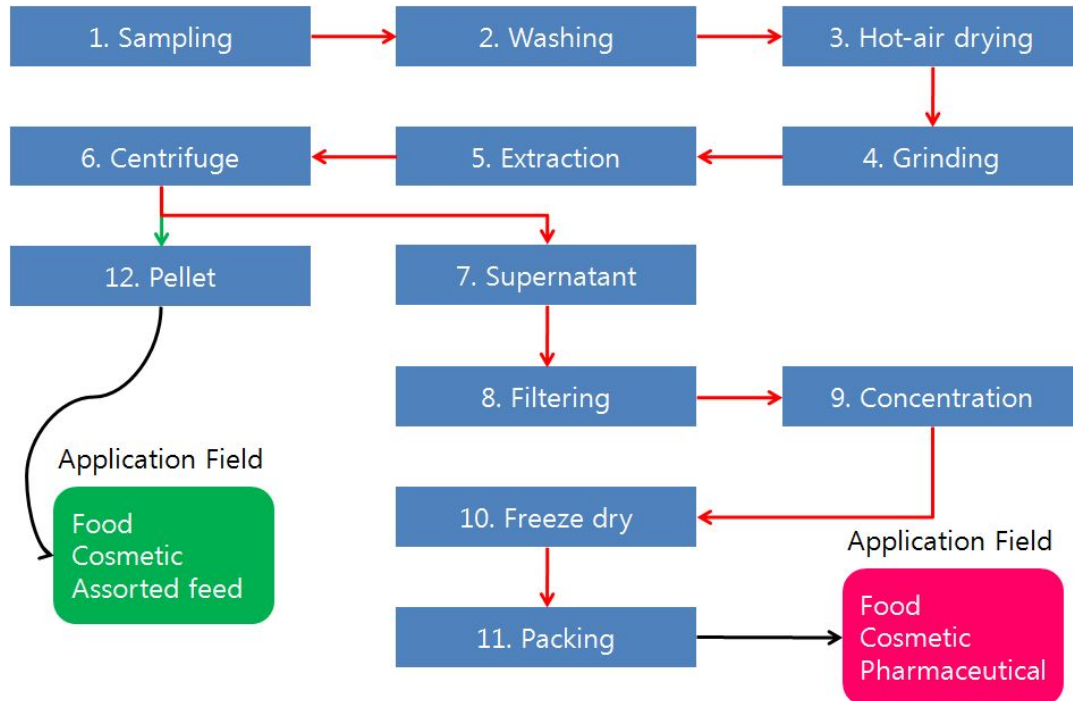


Fig. 70. Manufacturing process by each stage for *Ishige okamurae* extract manufacture.

(1) 시료수집(Sampling) 단계

- 제주도, 전남 완도, 경남 통영 등 각 지역별로 수집한다.

(2) 세척(Washing)

- 수거한 패 원료는 12시간 불림, 이물질 제거작업과 3회 이상 정제수 세척작업을 거쳐 이물질과 염분을 제거한다.

(3) 열풍건조(Hot-air drying)

- 40-50℃에서 열풍건조를 시킨다(수분함량 10% 이하)

(4) 분쇄(Grinding)

- 추출효율을 높이기 위해 분쇄를 한다(100mesh).

(5) 추출(Extraction)

- 80% 주정알코올 사용하여 60rpm으로 40℃에서 3시간 간격으로 2회 교반 추출한다.

(6) 원심분리(Centrifuge)

- 연속 원심분리기를 사용하여 3000rpm으로 연속하여 분리한다.

(7) 여과(Filtration)

- Filter press를 사용하여 상등액인 용매추출물을 여과한다.

(8) 농축(Concentration)

- 80% 주정알코올 제거하기 위하여 50℃에서 감압 농축한다.

(9) 동결건조(Freeze drying)

- 회수된 농축액은 동결 건조한다.

(10) 분말포장(Powder packing)

- 동결건조 분말은 곱게 분쇄한 후 포장기에 포장한다.

(나) 생산수율

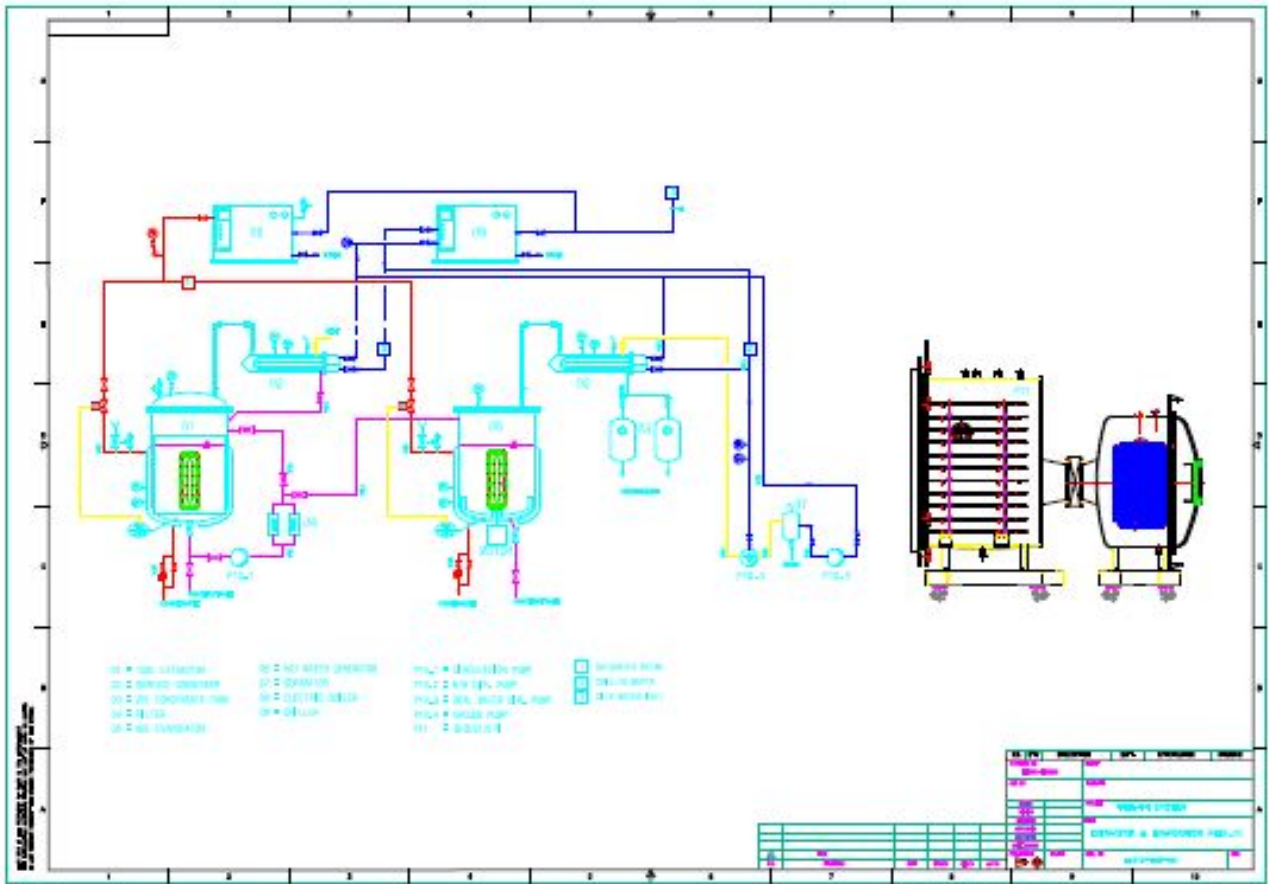
제주도에서 직접 채취한 패 시료를 생물상태로 가져와 이물질을 제거한 후 세척하여 자연건조 상태에서 수분이 제거된 상태의 시료를 기준으로 Wet weight를 저울로 1kg 칭량하였다. 정량한 시료 1kg은 열풍건조기로 40℃에서 함수율 10%로 건조하여 건조중량을 저울로 칭량하였다. 그 결과 약 250±20g의 건조 중량을 확인하였으며, 이 시료를 분쇄한 후 80% 주정알코올로 40℃에서 3시간 동안 가온 교반 추출하여 회전진공증발기로 농축한 후 동결건조기로 건조하여 그 무게를 칭량하였다. 그 결과 약 25±2g의 시료를 회수하였으며, HPLC로 DPHC함량을 분석한 결과 약 2.5±0.2g의 DPHC가 존재하는 것으로 확인 되었다(Table 25).

Table 25. Yield, amount of crude protein and total sugar of conchiolins before and after desalting.

Material	Wet weight(g)	Dry weight(g)	Dry weight(g) after 80% EtOH extraction	Purified DPHC dry weight(g)
<i>Ishige okamurae</i>	1,000	250±20	37.5±2	3.75±0.2
%(w/w)	100	25	3.75	0.375

* Data are expressed as mean ± SD of duplicate determinations.

(다) 생산공정 설계도(10톤)



(라) 생산설비단가

견적내역(Spec. Of Offer)

공 급 내 역	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
1. 10톤 용매저장탱크(ID1940*H3810)	1	58,000,000	58,000,000	
2. 5톤 HOLDING TANK(ID1550*H3100)	1	67,000,000	67,000,000	
3. EVAPORATOR	1	150,000,000	150,000,000	
4. EXTRACTOR	1	80,000,000	80,000,000	
5. 10톤 용매저장탱크(ID1940*H3810)	1	58,000,000	58,000,000	
6. 열풍식건조기	1	60,000,000	60,000,000	
7. 한외 여과장치	1	80,000,000	80,000,000	
8. Filter decanter	1	165,000,000	165,000,000	
9. DISK CENTRIFUGE SYSTEM	1	89,000,000	89,000,000	
10. CANDLE FILTER SYSTEM	1	100,000,000	100,000,000	
11. STRUCTURE	1	100,000,000	100,000,000	
12. PIPING	1	150,000,000	150,000,000	
* 견적 제외 사항 *				
1. 견적 제외 보일러, 컴프레샤 설비 및 배관 Utility				
2. main 전원 인입공사				
3. 공급용수 인입공사 및 저장탱크				
4. 기타 견적서에 명시되지 않은 사항				
5. 포장기				
합 계			1,157,000,000	

세부내역

공 급 내 역	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
1. 10톤 용매저장탱크(ID1940*H3810) 1.1. VESSEL -. Total volume : 12000L -. Working volume : 10000L -. Vessel material : sts316L -. Vessel diameter : ϕ 1940*6T -. Vessel depth : 3810H -. Exhaust vent port, Harvest port 1.2. AGITATION UNIT -. Agitation motor : direct-couple type AC motor, 15Kw, 380V, 3ph, 50/60Hz -. Agitation speed, output speed range : 20rpm -. Flat turbine type impellor (6blades,2 stages) -. Vertical two baffle plates -. Self balanced double mechanical seal : 120 m/m -. Vessel geared motor mount on the top of the vessel 1.3. CONTROL PANNEL -. 재질 : case : sts304 -. ON/OFF SWITCH, power	1	58,000,000	58,000,000	
2. 5톤 HOLDING TANK(ID1550*H3100) 2.1. VESSEL -. Total vaolume : 6200L -. Working volume : 5000L -. Vessel material : sts316L -. Vessel diameter : ϕ 1550 -. Vessel depth : 3100H -. Sirculation port & Harvest port -. Manhole -. Leg pipe -. Buffing; inside/outside #250	1	67,000,000	67,000,000	

공 급 내 역	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
<p>3. EVAPORATOR</p> <p>3.1 VACUUM BATCH EVAPOTATOR</p> <ul style="list-style-type: none"> - Design pressure : F.V~2kg/cm².G - Operating pressure : 680 mmHG/1kg/cm².G (shell/jacket) - Treatment of surface : Buffing(#250(내,외)) <ul style="list-style-type: none"> (1) Type : shell & jacket type vessel (2) Capacity : Totalvolume:6500 LITER : Operatingvolume:5000 LITER (3) Material : STS304 - shell*8t/jacket*6t : STS304 - support lug (4) Dimension : id1600*3048h*8t(shell part) (5) Accessory : Double mechanical seal unit : Anchor & paddle type impellor : Agitator ass'y : Sight & light glass (6) Electric power : 12kw*4p*220/380v*60hz*1/60 (30rpm) (7) Quantity : 1set <p>3.2 SURFACE CONDENSOR</p> <ul style="list-style-type: none"> - Design pressure : Shell side; Full vacuum, tube side : 1kg/cm².G - Operating pressure : Shell side 670mmH tube side : 0.5kg/cm².G - Treatment of surface : ACID pickling <ul style="list-style-type: none"> (1) Type : Shell & tube type heat exchanger (2) Material : STS304 - shell*4t : STS304TP-A : tube OD19.051.2t* *3000L (3) Dimension : id600*3000L (4) Accessory : Sight & light glass (5) Quantity : 1set 	1	150,000,000	150,000,000	

공 급 내 역	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
<p>3.3 CONDENSATE TANK</p> <p>- Design pressure : Full vacuum</p> <p>(1) Type : Vertical vessel</p> <p>(2) Material : STS304 - shell*6t : STS304TP-A-supportlug</p> <p>(3) Capacity : Total volume : 550 LITER : Operating volume : 450 LITER</p> <p>(3) Dimension : id760*1219h</p> <p>(4) Accessory : Sight glass</p> <p>(5) Quantity : 1set</p> <p>3.4 VACUUM PUMP</p> <p>(1) Type : Watering</p> <p>(2) Capacity : 1.5m³/min, 720mmHg</p> <p>(3) Sealing : Single mechanical seal</p> <p>(4) Meterial : sts304</p> <p>(5) Service : Vacuum</p> <p>(6) Quantity : 1set</p> <p>3.5 PIPING</p> <p>(1) Scope : 설치장소기준 10m 이내, 현장배관 공사 경비포함</p> <p>(2) Meterial : STS304TP-A : Vapour line, product line, condensate line, city waterline, hot water line, steam line</p> <p>(3) Accessory : Ball valve류, local gauge</p> <p>3.6 CONTROL & INSTRUMENTS</p> <p>(1) Scope : Control panel, local work</p> <p>3.7 STELL STRUCTURE(설치비 포함)</p> <p>(1) Material : STS304</p> <p>(2) Size : 4m*6m*3m(D*L*H)</p>				

공 급 내 역	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
<p>4. EXTRACTOR</p> <p>4.1 EXTRACTOR</p> <ul style="list-style-type: none"> - Design pressure : 2kg/cm².G - Operating pressure : 1kg/cm².G(shell/jacket) - Treatment of surface : BUFFING (1) Type : shell & jacket type vessel (2) Capacity : Totalvolume : 6500LITER : Operating volume : 5000LITER (3) Material : STS316L - shell*8t/jacket*6t : STS304 - support lug (4) Dimension : id1600*3048h*8t(shell part) (5) Accessory : Double mechanical seal unit : Anchor & paddle type impellor : Agitator ass'y : Sight & light glass (6) Electric power :12kw*4p*220/380v*60hz*1/60 (30rpm) (7) Quantity : 1set <p>4.2 SURFACE CONDENSOR</p> <ul style="list-style-type: none"> - Design pressure : Shell side/tube side : 1kg/cm².G - Operating pressure : Shell sidetube side : 0.5kg/cm².G - Treatment of surface : buffing#250 (1) Type : Shell & tube type heat exchanger (2) Material : STS316L - shell*4t : STS304TP-A : tube OD19.05*1.2t*2000L (3) Dimension : id400*2000L (4) Accessory : Sight & light glass (5) Quantity : 1set 	1	80,000,000	80,000,000	

공 급 내 역	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
<p>4.3 BASKET</p> <p>- Treatment of surface : BUFFING</p> <p>(1) Type : 타공망 type</p> <p>(2) Material : STS316L - shell*6t : STS304TP-A - support lug</p> <p>(3) Capacity : Total volume : 50 LITER : Operating volume : 45 LITER</p> <p>(4) Dimension : id760*1219h</p> <p>(5) Accessory : Lifting lug</p> <p>(6) Quantity : 1set</p> <p>4.4 PUMP</p> <p>(1) type : centrifugal pump</p> <p>(2) Capacity : 120Liter/min. 10m</p> <p>(3) Sealing : Single mechanical seal</p> <p>(4) Material : STS316L</p> <p>(5) Service : Product</p> <p>(6) Quantity : 1set</p> <p>4.5 PIPING</p> <p>(1) Scope : 설치장소기중 30M 이내, 현장배관공사 경비포함</p> <p>(2) material : Sanitary pipe, Product line, Codensite line, city water line, chiller line, steam line</p> <p>(3) Accessory : T.C.V : Safty valve : Reducing valve : Ball valve, local gauge</p> <p>4.5 CONTROL & INSTRUMENTS</p> <p>(1) Scope : Control panel, local work</p>				

공 급 내 역	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
5. 10톤 용매저장탱크(ID1940*H3810) -. Total vaolume : 12000L -. Working volume : 10000L -. Vessel meterial : sts316L -. Vessel diameter : ϕ 1940*6T -. Vessel depth : 3810H -. Exhaust vent port, Harvest port	1	58,000,000	58,000,000	
6. 열풍식건조기 -. TYPE : hot air dryer(Atomizer) -. Material : STS316/sts304 -. Dimension of chamber : 건조용량에 따라 결정 -. Capacity : Evaporator rate-3kg/hr-2000kg/hr -. Consists of Drivin chamber(Cone type) -. Atomizer : Rotary vane type, 1000~30000rpm/ electric motor -. Air supply fan -. Eahaust fan -. Heating system : gas buner, steam buner, electric heater -. Temp. indicating control loop, control loop for rpm -. 집진장치 : Cyclone , bag filter, scrubber, Air knocker	1	60,000,000	60,000,000	
7. 환외 여과장치 -. Capacity : 3ton/hr -. Feed pump(10m ³ *30m) Multi-v 406 220/380v, 2.2kw -. Back washing pump(4m ³ -30m) Multi-v 203 220/380v, 0.75kw -. 316공압 밸브 1.5s, sanitary pipe, valve -. 원수조 탱크 -. 역세, 약품세정탱크	1	80,000,000	80,000,000	

공 급 내 역	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
8. Filter decanter 8.1. 전처리 <ul style="list-style-type: none"> - Speed : 3600rpm - Capacity : 3ton/hr - Control : LCD touch screen color monitor - Pressure vessel - Product feed nozzle - Filterate nozzles - Solid-residue - Overflow and vent nozzle - Heel volume nozzle - Instrumentation nozzle - saddle flange for heel filtration spray jet nozzle - Inspection port - Register - Filter element - Filter medium - Cloth clamp ring - Lower/upper egister support bar 	1	165,000,000	165,000,000	
9. DISK CENTRIFUGE SYSTEM <ul style="list-style-type: none"> - Speed : 6500rpm - Capacity : 0.5ton/hr - Max. RCF : 8000*g or more - SCS/m³ : 25000 or more - Harvest tank : 1000L or more - Extract time : water pressure control 	1	89,000,000	89,000,000	

공 급 내 역	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
10. CANDLE FILTER SYSTEM -. Filter : R-003, 4-19-700/T96Z -. Valve & instrument & skid -. Controller -. 구조물제작 및 설치 -. 공급탱크 5000Liter -. Pump : 75-38m ³ /h at 34-55m -. Dry system -. Transfer screw	1	100,000,000	100,000,000	
11. STRUCTURE -. Material : sts304, ss400 -. Hand rail -. Epoxy paint	1	100,000,000	100,000,000	
12. PIPING -. Ball valves, solenoid valves, and sanitary pip/stainless steel pipes on the other lines -. Other types of valve can be mounted for the special purpose -. 수동 밸브, 자동밸브, 앵글시트 등은 위생용 제품으로 사용 -. 모든 배관자재는 한국공업규격에 합격한 제품 사용을 한다. -. 스팀 라인에 설치되는 배관자재 : 암스트롱 또는 이와 동등한 제품사용 -. 재질 : STS304/STS316L	1	150,000,000	150,000,000	

(마) 제조원가(폐 분말 2톤/일 처리기준)

항 목		산 정 내 역		단 위(천원)	비 고
재료비	원 료 구입비	직접재료비	폐 원료구입비(14,000천원/일)	14,000	300일/년
			기타원료구입비(6,000천원/일)	6,000	
			원료가공비(1,000천원/일)	1,000	
	간접재료비	직접재료비(21,000천원)×10%	2,100	300일/년	
노무비		직접노무비	30,000천원/년×4명=400천원/일	400	300일/년
		간접노무비	직접노무비(400천원/일)×10%	40	
경 비		전력비	2,000천원/일	2,000	300일/년
		연료비	3,000천원/일	3,000	
		운전비	1,000천원/일	1,000	
		수도비	100천원/일	100	
		소모품비	100천원/일	100	
		수선비	200천원/일	200	
		기기감가상각비	600천원/일	600	
		연구개발비	150천원/일	150	
		기타경비	20천원/일	20	
		보험료	20천원/일	20	
일반관리비	영업비	(재료비+노무비+경비)×10%	921.9	300일/년	
이 율	제조생산이윤	(노무비+경비×일반관리비)×15%	2,565.57	300일/년	
제조원가		2ton/일 처리수율 15%= 300kg	34,217.47		
제조원가/kg			114.058		

(바) 경제성분석

패(*Ishige okamurae*)원료는 제주도와 남해안 지역에 자생하는 해조류이다. 패에 대한 연구가 활발히 진행된 것은 2000년대 들어서면서부터이며, 그 이용성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대부분 패에 관한 연구는 항산화와 미백, 항염증에 초점을 맞추고 있으며, 제2형 당뇨병에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 패 원료 양식에 관한 연구는 국립수산물과학원과 패 양식과 관련된 논의를 하였지만, 패에 관한 이용성이 아직 미진하여 양식기술이 개발하여, 어민들에게 보급하여도 수익성 측면에서 어려움이 있어, 수요처가 확보되고 난 이후에 양식기술을 보급하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 따라서 패 원료를 수급하기 위해서는 자생하고 있는 패를 채취하여 사용하여야 하는 어려움이 예상되며, 원료의 개별인증 과정과 수요창출을 위한 노력을 병행할 경우 새로운 어민 소득원으로서의 가능성이 충분할 것으로 예상된다.

현재까지의 결과를 근거로 볼 때 패 추출물을 이용한 항당뇨 식품의 개발 가능성은 매우 높다고 판단되며, 원료수급 문제점만 해결될 경우 기존에 시판되고 있는 제품에 비해 가격 경쟁력 우위에 있을 것으로 판단된다.

앞서 언급한 패 추출물 제조원가의 경우 일일 2톤 처리 시 수율 15%(w/w)이며, 하루에 300kg의 패 원료를 생산한다고 가정할 경우 kg당 단가는 114,058원이다. 1g으로 환산했을 때 114원으로 30일에 3,420원의 원료원가가 발생된다. 따라서 기초 제형비, 포장비, 기타 첨가물 비용 등을 합해도 10,000원 이하로 판매될 수 있어 정상적인 원료공급이 이루어질 경우 경제성은 충분히 있는 것으로 판단된다.

13. 응용제품의 개발

가. 화장품원료로서 사용 가능성 평가

(1) 미백기능성

Tyrosinase는 인체 내의 melanin 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로서 이 효소의 활성을 억제함으로써 melanin 색소의 형성을 막아 피부의 색소 침착을 막을 수 있다. 그러므로 tyrosinase의 활성 저해능을 측정하여 생리활성 물질의 미백효과를 평가할 수 있다. 본 연구에서 사용한 측정법은 식약청에서 고시한 ‘기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인’(5)에 따라 실시하였다. 패 추출물에 대한 tyrosinase 활성 저해능의 측정 결과는 Fig. 35와 같다. 대조군으로 사용한 kojic acid와 arbutin의 농도는 각 0.5mM을 사용하였으며, 패 추출은 80% EtOH로 추출하여 농축한 후 건조한 분말을 사용하였으며, 시료의 농도는 각각 2, 10, 20 μ g을 사용하여 활성 저해능을 비교하였다. 그 결과 kojic acid와 arbutin의 tyrosinase 저해활성은 각각 49%와 30%로 확인되었으며, 패 추출시료의 경우 각 농도별로 33%, 49%, 62%의 저해활성을 확인하였다. 이것은 정제된 대조군과 정제되지 않은 패 추출물의 비교실험으로 대조군에 비해 정제되지 않은 패 추출물의 미백활성이 높은 것으로 확인되었다. 대조군의 시료 농도를 계산해보면 kojic acid의 경우 0.5mM은 71.055 μ g에 해당하는 양이며, arbutin은 136.15 μ g에 해당하는 양이다.

Arbutin에 비해 미백효과가 우수한 kojic acid의 경우 피부트러블을 유발하는 문제로 인하여 최근에는 화장품 원료로 사용을 금지하고 있으며, 안전성이 좋은 arbutin의 경우 월굴나무(Bearberry)에서 추출한 천연 식물 성분으로 현재까지 인체에 대한 부작용이 전혀 없는 안전한 미백 성분으로 기미주근깨의 원인이 되는 멜라닌 생성세포(Melanocyte)에 대해 매우 강한 멜라닌 생성 억제작용을 가지며(34, 35), 자외선 조사에 의한 사람의 일소방지 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 실제 제품화하여 사용할 경우, 미백효과가 낮아 화장품 업계에서는 새로운 미백물질을 개발하는데 주력하고 있다. 따라서 패 추출물의 경우 피부자극시험과 임상실험을 통한 미백효과가 검증, 제형안정성 시험을 통과할 경우, 미백화장품원료로서 향후 arbutin 시장을 대체할 대안이 될 수 있을 것으로 판단된다.

(2) 항염증

염증이 일어나는 과정은 감염성 물질(infectious agents), 허혈(ischemia), 항원-항체 반응, 열 또는 다른 신체적인 상처 등과 같은 수많은 자극에 의하여 유도되는 일련의 반응을 수반하며, 염증반응에는 홍반(erythema), 부종(edema), 압통(tenderness), 통증 등의 임상증상이 나타난다(36).

Arachidonic acid는 cyclooxygenase (COX)에 의해서 생체 내 염증전달 반응에 중요한 역할을 하는 각종 prostaglandin과 혈소판 응집에 관여하는 thromboxane을 생성하는 데, COX 효소는 정상조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 COX-1 효소와 염증과정에서 일시적으로 발현이 증가하는 유도성 효소인 COX-2 효소로 구성되어있다.

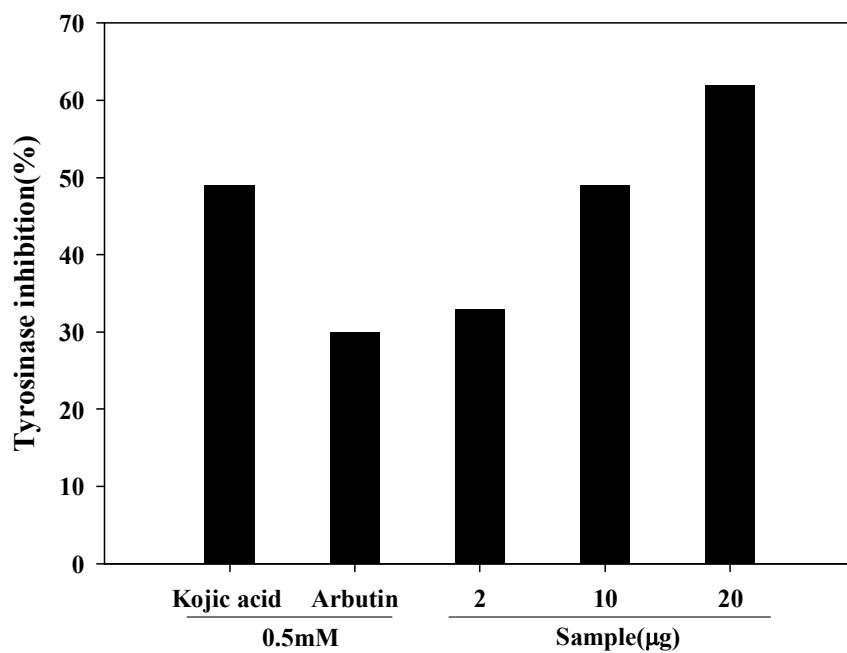


Fig. 71. Tyrosinase inhibition activity of *Ishige okamurae* extractor. Control : kosaic acid and arbutin, Sample : *Ishige okamurae* extract powder 2, 10, 20µg. All experimental date were mean±SD of triple determinations.

COX-1(type 1; constitutive form) 효소는 조직의 구성 요소이며 위장관계를 포함한 조직에 산재하는 것으로 알려져 있다. 이 효소는 각 조직에서 혈류(vascular flow)의 유지, 세포분화(cell division), 점액(mucus)과 중탄산염(bicarbonate)의 생성 등에 관여하는 국소적인 prostaglandin의 양을 조절하는데, 이러한 COX-1 효소의 활성을 NSAIDs (Non Steroidal Analgesic Inflammation Drugs)가 저해함으로써 위 장관과 신장의 부작용 및 항 혈소판 작용(antiplatelet activity)이 나타난다. 즉, COX-1 효소는 염증인자가 퍼지지 않도록 혈액을 응고시키고 피가 잘 통하지 않게 하고 혈관을 수축시키는 물질(Thromboxan A2)을 만들어내는 효소이며, 동시에 위점막이 파괴되지 않도록 점막 보호 물질을 만들어내는 효소다. 반면에, COX-2(type 2; induced form) 효소는 뇌와 신장에서 주로 발견되며, 일부 염증성 세포(inflammatory cells)에서도 발견되고, 특히 염증 부위에서 유도되는 것으로 알려져 있다. COX-2 효소는 염증을 유발하는 물질인 Prostaglandin E2를 생성하는 효소이며 또한 혈전을 예방하고 혈관을 확장하는 물질인 Prostacyclin (Prostaglandin I2)의 생성도 촉진하는 효소이다(37-39)(Fig. 72).

본 연구에서는 미백활성을 측정할 때와 동일한 시료를 사용하였으며, 양성 대조약물인 indomethacin은 10 μ M을 사용하였으며, 패 추출물시료는 각각 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g을 사용하여 항염증 활성을 측정하였다. 그 결과 indomethacin의 COX-2저해율은 50%, 패 추출물시료의 경우 각각의 농도에서 38%, 75%, 94%로 아주 높은 COX-2저해 활성이 나타났다. 따라서 패 추출물 시료의 항염증 효과는 아주 우수한 것으로 확인 되었으며, 이 원료를 사용할 경우 아토피성 피부염이나 염증성 여드름, 피부 트러블 등에 아주 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 제약 원료로서 사용 가능성이 아주 높을 것으로 판단되며, 앞서 설명한 패에서 분리하여 정제한 DPHC물질 외 또 다른 항염증물질이 존재하는 것으로 추정된다.

(3) 항산화

생명체가 산소를 이용한 대사를 할 때 산소분자의 대부분은 세포내의 미토콘드리아에서 respiratory chains을 거치면서 물(H₂O)로 환원되지만 일부의 산소분자들은 부분 환원되는 과정에서 중간대사물(intermediates)을 생성하는데 이들을 reactive oxygen species (ROS)라고 하며 superoxide(O₂⁻), hydroxyl radical (OH[·]), hydrogen peroxide(H₂O₂) 등이 여기에 속한다.

ROS는 화학 반응성이 강하기 때문에 저 농도에서는 세포내 신호전달 물질(signaling molecule) 역할을 하지만 고농도에서는 지질, 단백질, 핵산 등 기존 분자 구조를 변형시켜서 세포의 손상(oxidative injury)을 일으킬 수 있다. 그러므로 산소를 이용하는 모든 생명체는 진화 과정에서 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxide (GPX) 등의 효소나 혹은 vitamin과 같은 물질을 통해서 이들을 소거(scavenge)하여 세포를 보호하고자 하는 기전(antioxidant reserve)을 가지게 되었다. 그러나 ROS의 생성이 과도하거나 또는 antioxidant reserve가 비정상적으로 줄어들면 양자의 균형이 무너지게 되며, 이러한 상태를 oxidative stress라 하며 oxidative injury로 인해 생체조직의 구조와 기능에 이상을 초래할 수 있다. Redox state는 흔히 환원 glutathione과 산

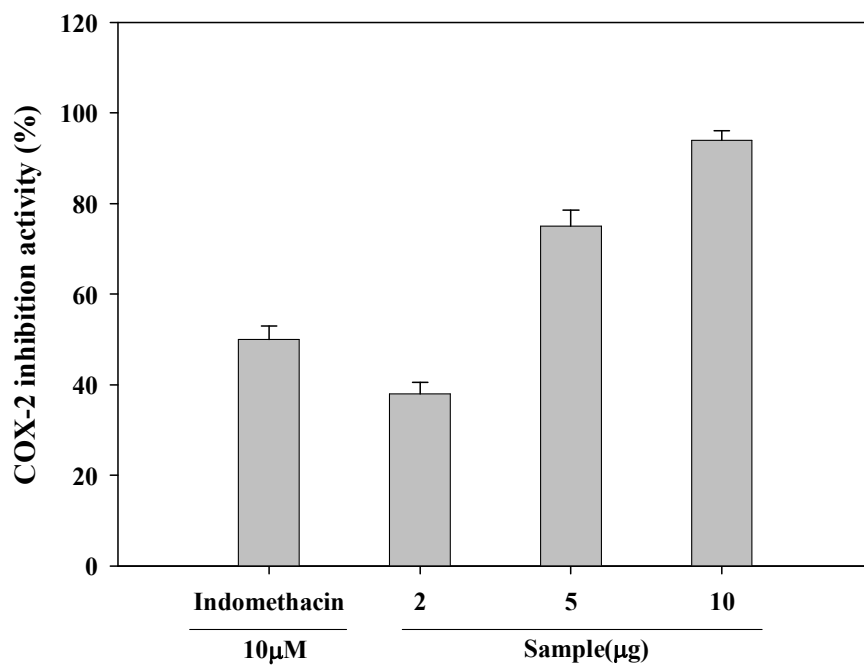


Fig. 72. COX-2 inhibition activity of *Ishige okamurae* extract powder. All experimental data were mean±SD of duplicate determinations.

화 glutathione의 비(GSH/GSSG)로서 표현되는데 이는 세포내 oxidative stress를 나타내는 예민한 지표이다. 활성산소들은 혼자서 존재하거나 활동하는 일이 없다. 이들은 전형적으로 연쇄반응의 산물이며 하나의 활성산소가 다른 활성산소를 생성시킨다. 'superoxide radical (O_2^-)'이라고 불리우는 것은 호흡에 의하여 얻어진 산소가 영양분을 태워서 에너지를 만들 때 발생하는 것이다. Superoxide radical은 세포내의 미토콘드리아에서 끊임없이 발생하는데 체내에서 장시간 머물러 있다. 이는 부대전자를 가진 free radical이며 체내에 가장 많이 존재한다. Superoxide radical이 한 개의 전자를 받아서 'hydrogen peroxide(H_2O_2)'가 된다. Hydrogen peroxide 자체는 그만큼 활성이 높지 않지만 체내에 있는 철이온과 같은 금속이온과 반응하면 즉시 활성력이 강한 'singlet oxygen(O_2)'이나 'hydroxyl radical(OH·)'로 변한다. Hydroxyl radical은 강한 산화력을 가진 활성산소이다(37).

이들 활성산소는 세포구성 성분들에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 함으로써 지질을 산화시키고 단백질도 변성을 초래하여 세포막이 파괴되고, DNA도 손상을 입혀 백내장, 당뇨병, 간염, 신장염, 아토피성피부염, 관절염, 위염, 기미, 주근깨, 주름, 백내장, 파킨슨씨병, 알츠하이머형 치매 등 난치병의 90% 이상을 일으킨다(38). 또한 정상세포의 유전자의 고리를 절단하여 최초의 단일한 암세포를 만드는 발암과정에도 깊게 관여하고 있다. 따라서 최근 암, 당뇨, 뇌질환, 심혈관질환 등 모든 성인병의 원인을 oxidants와 antioxidants의 밸런스의 파괴에 의한 결과로 해석하는 시각이 대두되고 있으며, 이들 질병의 치료 및 예방을 위한 목적으로 항산화 물질에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 항산화 물질의 역할은 크게 금속 이온의 착염화 기능, enzyme 활성과 enzyme 유사활성 물질에 의한 free radical 포집력으로 radical 반응을 종결시켜 이들 활성산소에 의한 지방질 산화 및 DNA의 손상을 억제시킴으로써 동맥경화, 심장병예방, 노화 억제 등의 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

오래 전부터 항산화제로는 효소계열과 비효소계열의 천연 항산화물질들이 많이 사용되어져 왔으나, 가장 실용화 된 것 중의 하나인 tocopherol은 항산화 효과가 비교적 낮은 편이고, BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisol), PG(propyl gallate), TBHQ(tertiary butylhydroquinone)와 같은 합성 항산화제의 경우 일정 수준 이상 섭취 시 여러 질병을 유발하는 것으로 알려져 안전성의 문제가 제기 되면서 규제를 강화하고 있다(39). 또한 사람들은 건강에 대한 욕구의 증대로 인공합성품의 사용을 제한하려는 추세에 있어 안전성의 확보와 각종 질병의 예방 및 치료와 밀접한 관계를 갖고 있는 천연물을 이용한 천연 항산화제 개발이 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 패 추출물이 천연항산화제로서의 역할이 가능한지 그리고 피부노화방지에 일정한 역할을 할 수 있을지에 대해 확인하고자 실험을 진행하였으며, 이미 앞선 결과에서 항산화 능력이 있는 것으로 확인하였지만, 화장품소재로 이용 가능성을 보기위하여 항산화 활성을 DPPH 법으로 분석하였다.

대조군으로는 화장품 원료로 가장 많이 사용되고 있는 ascorbic acid를 사용하였으며, 농도는 $10\mu\text{g}$ 을 사용하였으며, 패 추출물시료는 $2\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$ 를 사용하였다. 그 결과 ascorbic acid는 DPPH

radical scavenging activity가 91%로 확인되었으며, 본 시료의 경우에는 각각 8%, 21%, 36%로 ascorbic acid에 비해 낮은 radical 소거능이 낮은 것으로 확인되었다(Fig. 73). 그러나 본 시료의 경우 ascorbic acid에 비해 낮은 활성을 가지지만 시료의 농도가 증가할수록 radical 소거능이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 보아 화장품원료로 사용할 경우 피부노화예방에는 도움을 줄 수 있는 것으로 확인되었다.

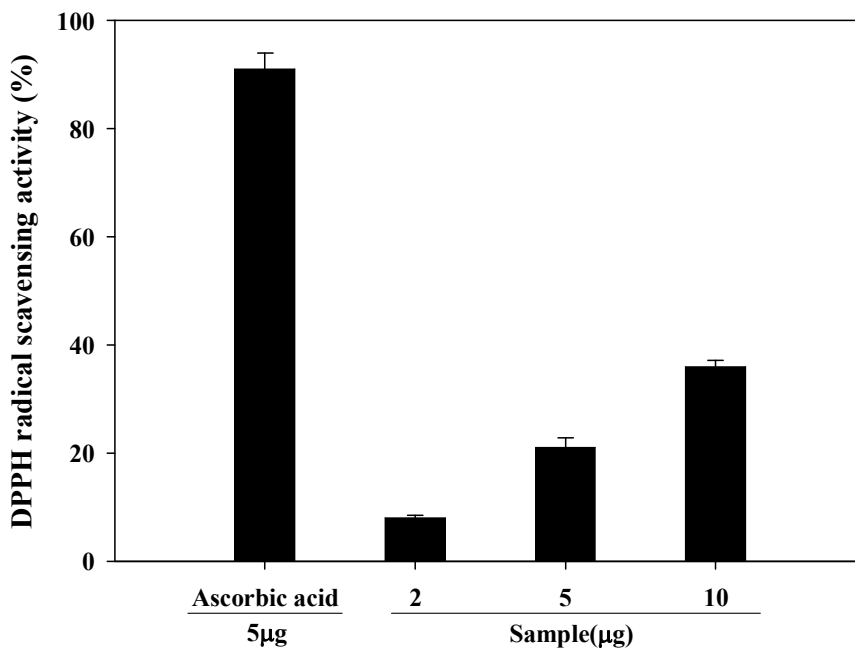


Fig. 73. DPPH radical scavenging activity of *Ishige okamurae* extract powder. All experimental data were mean±SD of duplicate determinations.

(4) 주름억제

피부 진피층에 있는 구조단백질인 콜라겐은 그물과 같은 구조로 피부를 받쳐주고 탄력을 유지시켜주는 역할을 한다. 이러한 콜라겐은 만 20세가 지나면서 콜라겐 생성이 서서히 줄어들게 되고 collagenase 효소 생성이 늘어나면서 진피조직의 붕괴로 인하여 주름이 발생하게 된다. 콜라겐 감소를 유발하는 외부적인 요인으로는 자외선을 들 수 있으며, 자외선 노출로 인한 free radical의 증가는 콜라겐 분해효소를 파괴하고 collagenase 효소생산을 자극하여 콜라겐을 생성시키는 섬유아세포를 손상시켜 피부노화를 촉진시킨다. 그리고 반복된 주름살을 만드는 동작으로 인한 피부의 기계적인 스트레스도 주름생성의 원인이 되며, 나이가 들면서 글리코사아미노글리칸의 합성이 줄어들면서 진피층의 수분을 감소시키는 것도 주름생성의 원인이 된다. 따라서 본 연구에서는 꽤 추출물이 주름의 원인이 되는 collagenase 효소 생성을 억제시킴으로써 주

름을 예방할 수 있는지에 대한 평가를 위해서 collagenase 효소 저해능에 대하여 실험을 실시하였다. 대조군으로는 free radical 소거능이 우수한 ascorbic acid를 사용하였으며, 본 실험에 사용된 패 추출물 시료의 농도는 4 μ g, 10 μ g, 20 μ g을 사용하였다. 대조군으로 사용된 ascorbic acid의 농도는 10 μ g을 사용하였다. 그 결과 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 collagenase 효소 활성 억제율은 14%로 확인되었으며, 패 추출물은 각각 31%, 43%, 53%로 농도 의존적으로 증가하였다. 이러한 결과는 패 추출물이 collagenase 활성을 억제 시키는 효과가 대조군에 비해 우수한 것으로 확인되었다(Fig. 74).

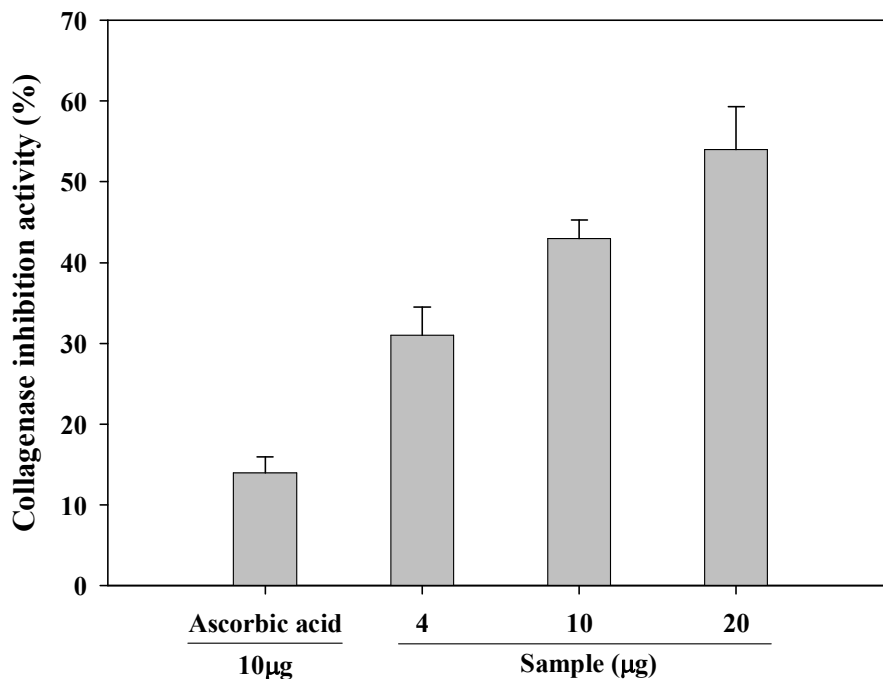


Fig. 74. Collagenase inhibition activity of of *Ishige okamurae* extract powder. All experimental data were mean \pm SD of duplicate determinations.

나. 패 원료 추출물을 이용한 아토피 및 여드름 치료용 화장품 개발

앞선 연구결과로 볼때 패 추출물 원료는 피부노화, 피부 트러블, 미백, 주름예방 등에 상당히 효과적인 것으로 확인되었으며, 특히, 항염증 효과의 경우 의약품 수준으로 평가가 된다. 따라서 이러한 결과를 근거로 아토피와 여드름, 미백, 주름예방에 효과적인 화장품 처방을 개발하였다.

(1) 아토피성 피부질환 치료용 화장품의 개발

현재 출시되고 있는 각종 아토피성 피부질환용 화장품의 경우 거의 대부분 보습효과를 통한

표피 및 진피층의 재생을 유도하는 제품이 대부분이다. 본 연구의 목표는 피부가려움증으로 인한 손상된 표피와 진피층의 염증을 효과적으로 억제하고 보습을 통한 피부재생력을 높이는 데 있다. 이미 설명한 바와 같이 패 원료추출물의 경우 항염증 효과가 우수하며, 손상된 진피층내 collagenase 효소 활성을 억제시키며, 항산화 기능을 통한 피부노화를 예방하는 물질임을 확인하였다. 따라서 패 추출물을 근거로 하여 한방추출물과 화장품 베이스 원료를 적절하게 배합한 처방을 개발하였으며, 시제품을 제조하였다.

(가) 제품사진



Fig. 75. Photography of Atopy cream is contained the *Ishige okamurae* extract.

(나) 제품화를 위한 아토피치료용 화장품의 처방개발

연구결과를 근거로 패 추출물은 항염증 PEG2기전 COX-2에 탁월한 기능을 가진것으로 확인되었다. 따라서 제품화를 위하여 화장품 기초처방과 패 추출물의 효능을 극대화 시킬 수 있는 한방추출물을 더하여 제형개발 및 시제품을 완성하였다(Fig. 75).

(다) 아토피크림제형의 처방 구성

ICID	Ingredient(%)
Water	62.65
Methylparaben	0.20
Disodium EDTA	0.04
Dipotassium Glycyrrhizate	0.05
Glycerin&Glyceryl Acrylate/Acrylic Acid Copolymer(and)Propylene Glycol	3.00
Carbomer	0.16
Stearic Acid	2.00
Cetearyl Alcohol	2.00
Sorbitan Stearate and Sucrose Cocoate	3.00
Polysorbate 60	0.50
Sorbitan Stearate	0.20
Glycerin	5.00
Isohexadecane	2.00
Squalane	3.00
Shea Butter	0.50
Macadamia Nut Oil	1.00
Caprylic/Capric Triglyceride	3.00
Dimethicone	0.50
Tocopheryl Acetate	0.10
Butylparaben	0.05
Propylparaben	0.10
Amisol soft	0.50
Triethanolamine	0.45
Ceramide	5.00
Sodium Hyaluronate	2.00
Fragrance	0.10
Ishige okamurae extractor	0.90
Herb extractor	2.00
Total	100

*한약재 처방구성: 피부보습과 재생촉진을 위한 단계로서 피부에너지를 보해주고, 혈행을 개선시켜 피부의 재생과 염증을 완하시켜 아토피 치료의 마무리를 위한 단계로서 이기약인 진피, 목향, 이혈약인 백급, 활혈기능의 천궁, 보양보혈의 위한 감초, 백출, 하수오, 적작약, 보습, 고삼약인 맥문동, 오미자를 처방하여 열수 추출 후 사용하였다.

(2) 여드름용 제품의 개발

여드름의 병인에 대한 연구는 예전부터 많이 되어 왔으며, 항균과 항염증, 피지억제를 위한

제품들이 주로 많이 개발되어 현재에도 많이 사용되고 있다. 본 처방의 가장핵심적인 처방구성 요소는 여드름치료용 화장품에 유분이 없이 보습을 유지하면서 피지억제를 유도해내고, 염증을 효과적으로 치료하면서 피부재생을 동시에 촉진 시킬 수 있는 제품을 개발하는데 방향을 설정하고 처방구성을 하였다.

(가) 제품사진



Fig. 76. Photography of ACNE serum is contained the *Ishige okamurae* extract.

㉠ 여드름 치료용 제품 처방의 개발

ICID	Ingredient(%)
Water	71.41
Ethanol(95%)	10.00
1,3-Buthylene glycol	5.00
Aminocoat	3.00
Methylparaben	0.13
Natrosol 250H	0.20
KOH	0.10
Dipotassium glyczinate	0.05
Carbopol 940	0.23
Hydrolite 5	1.00
Citric acid	0.02
Na-Citrate	0.01
HCO-60	0.35
Collagen	0.50
Sodium hyaluronic acid	5.00
EGF	1.00
Fermented Herb extractor	2.00
<i>Ishige okamurae</i> extractor	2.00
Total	100

*한약재 처방구성: 피부보습과 재생촉진을 위한 단계로서 피부에너지를 보해주고, 혈행을 개선시켜 피부의 재생과 염증을 완화시켜 여드름 치료의 마무리를 위한 단계로서 황련, 진피, 감초, 오미자, 하수오, 적작약, 녹용, 인삼을 48시간 발효시켜 사용하였다(Fig. 76).

다. 패 원료 추출물을 이용한 항당뇨 식품개발

(1) 임상실험용 항당뇨 캡슐제조

건조된 패 원료 100kg을 100mesh 크기로 곱게 분쇄한 후 80% 에탄올을 사용하여 40℃에서 6시간 3회 추출한 후 농축기를 사용하여 에탄올을 완전히 제거한 후 동결 건조한 시료를 250mg 캡슐에 200mg씩 충전하였으며, 위약군은 corn starch를 200mg씩 충전하여 임상실험에 사용하였다(Fig. 77).

(가) 제품사진



Fig. 77. Photography of sample capsule that is used in clinical demonstration

(나) 제품의 특징

- ① 제품명 : 임상용 패 추출 당뇨캡슐
- ② 복용량 : 아침, 저녁 하루 2회 (4캡슐/1회)
- ③ 패 추출물 함량 : 100%

(2) 항당뇨용 식품 샘플제조

건조된 패 원료 100kg을 100mesh 크기로 곱게 분쇄한 후 80% 에탄올을 사용하여 40℃에서 6시간 3회 추출한 후 농축기를 사용하여 에탄올을 완전히 제거한 후 동결 건조한 시료와 청국장 분말을 8:2로 섞어 혼합한 후 녹두대 크기로 조제하여 건조하였다. 청국장 분말은 콩을 *Bacillus subtilis*로 발효시킨 발효식품으로 정장기능과 항당뇨 효능이 있는 것으로 알려져 있

다. 이제품의 특징은 환 제조시 통상 사용하는 밀가루 풀이나 벌꿀 등을 사용하지 않고 청국장 발효시 생성되는 점액성분을 이용하여 패 분말을 점착시켜 환으로 제조한 것이 특징이다. 특히 당 성분을 사용하지 않기 때문에 당뇨병 환자에게는 가장 합리적인 조제법이라 할 수 있다 (Fig. 78).

(가) 제품사진



Fig. 78. Photography of Haedanghwan product forming by *Ishige okamurae* extract

(나) 제품의 특징

- ① 제품명 : 해당환
- ② 복용량 : 하루 1 개
- ③ 성 분 : 패 추출물 80%, 청국장 분말 20%

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1 연구개발 목표 및 달성도

가. 당해 연도 연구개발 목표

해조류로부터 항 당노 물질을 탐색하여 각종 기능성을 평가하고, 가장활성이 우수한 해조류에 대해서 가공 및 분리공정기술을 확보한 후 임상시험을 통하여 기능성 식품소재 및 제품화 기술을 개발 한다

나. 연구개발 목표 및 달성도

연구목표	목표대비 결과	목표달성도 (%)	비고
<1 차년도> 해조류유래 항당노 및 고농도 포도당으로 유도된 산화스트레스를 개선할 수 있는 기능성 식품소재의 개발	저분자 가공기술을 이용한 해조류의 가공기법의 개발함	100	주관
	항 당노 후보물질의 추출 및 특성을 검토하고 종류별의 해조류(<i>Ishige okamurae</i>) 선정	100	"
	후보물질들에 대한 각종 기능성 검토(항균, 항염증, 항산화, 미백 등)함	100	"
	항 당노 물질의 분리정제기술 개발함	120	"
	항 당노 후보 해조류의 대량생산기법에 관한연구	100	"
	탐색된 물질의 항 당노 활성 및 radical소거 능 검색	100	위탁
	STZ 유도 당노 쥐의 혈당강하효과 확인함	100	"
	췌장 β -cell line을 이용한 인슐린 분비능 및 항 당노 효과를 확인함	100	"
<2 차년도> 대량생산공정 개발을 통한 제품화 연구 및 기능성 식품 안전성 검증	고농도 포도당으로 유도된 당뇨병 세포모델에서의 산화스트레스 개선효과를 확인함	100	"
	정제된 물질의 구조분석(DPPH분리)함	100	주관
	원료 가공 및 분리정제 생산기술에 대한 생산수율검증과 경제성 검토함	100	"
	- 응용제품의 개발(기능성 식품 및 화장품)함	100	"
	대량생산공정 설계 및 개발(도면, 예상단가)	100	"
	기능성 항당노 식품의 안전성 검증함	100	위탁
	임상시험(Randomized placebo-controlled trial) 연구 설계	100	"
	제 2형 당뇨병 환자의 혈당 및 인슐린 저항성 개선효과 확인함	100	"
제 2형 당뇨병 환자의 혈청지질 및 항산화 체계 개선효과 확인함	100	"	
제 2형 당뇨병 환자의 식후 혈당조절 개선효과 확인함	100	"	

다. 기술의 핵심 내용

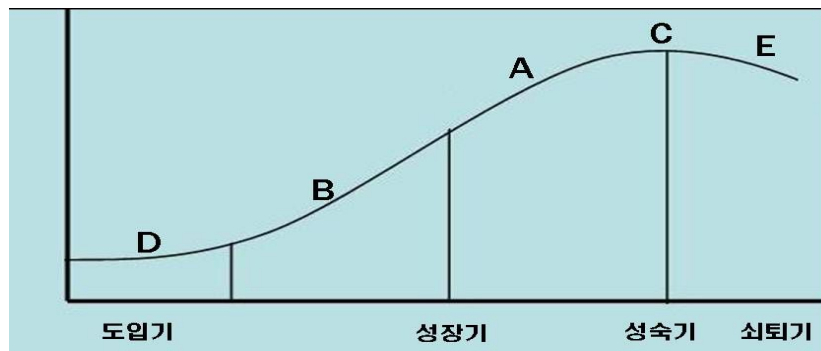
가. 고기능성 해조류의 발굴과 원료물질인 해조류 특유의 비린내를 가공 단계에서 제거함으로써 해조류의 이용성을 높일 수 있다.

나. 저분자화 가공기술을 도입함으로써 분리정제과정 비용을 효과적으로 줄일 수 있다.

다. 고 순도의 향당노 물질을 대량생산하는 기술을 개발함으로써 고부가가치의 원료의약품의 생산이 가능하다.

라. 저분자화 가공기술을 통해 얻어진 부산물들의 기능성을 검토하여 응용제품을 개발함으로써 부수적인 수입은 물론 자원의 재활용 가능성을 높일 수 있다.

2. 수명주기(Life Cycle Time)상 신청기술 또는 제품의 예상되는 위치(A~E 중 선택) 및 근거



본 과제외의 경우 원료물질을 2000년대 초반부터 서서히 초미세화 및 나노가공기술이 대두되면서, 금속이나 옥돌, 머드 등 딱딱한 소재 가공에 주로 많이 이용되어왔다. 최근 들어 생물을 대상으로 가공하는 기술이 축적되면서, 시장 진입을 시도하고 있지만, 아직은 고온으로 인한 원료물성의 변화와 원료물질에 대한 정확한 정보 없이 가공을 하기 때문에 발생하는 손실 등을 감안하면 아직 성장을 향한 준비 단계(B단계) 수준으로 보면 된다. 그리고 이 기술은 각종 효소들을 첨가하여 저분자화 과정을 빠르게 진행하기 위하여 반응면의 비표면적을 크게 해줌으로서 기능성 물질을 직접 해조류로부터 추출하는 것 보다 더 많이 유도해 낼 수 있다는 장점을 가지고 있다.

3. 개발기술 동향

가. 현재 유사기술 연구개발 및 제품화 현황(기업체명과 기술명)

해조류를 이용하여 저분자 분체 가공기술과 효소반응을 통한 향 당노 물질의 개발을 한 예는 현재 찾아 볼 수 없고, 대개 용매로 추출하여 각종 기능성을 확인한 연구결과는 많다. 본사에서는 선행연구를 통해 저분자 가공기법을 이용하여 해조류 가공을 실시한 바 있고, 똑같은 원료물질로부터 2배 이상의 기능성 물질이 추출됨을 확인할 수 있었다.

나. 개발 완료 후 예상되는 최종제품의 형태(종류가 여러 가지인 경우 3가지 정도만 기

술함)

- (1) 본 제품의 약리기전과 적합한 한약처방을 가미한 항 당뇨 및 다이어트식품
- (2) 기능성 화장품
- (3) 원료의약품

다. 개발기술의 예상되는 향후 동향

유기물에 대한 나노분말 가공기술은 개발이 되어 있으나 전 세계적으로 실용화까지는 아직 기술적으로 많은 한계를 가지고 있다. 따라서 당분간은 초미세분말 가공기술수준이 향후 5년 이상 계속 진행 될 것으로 전망되며, 본 기술은 이러한 분체 가공 기술을 근거로 현재 개발 예정인 저분자체 가공기술을 이용한 항 당뇨제품의 최적화 공정조건을 확립 할 예정이다.

라. R&D개발 완료 후 단독으로 제품화 가능유무 및 핵심기술 및 주변기술 기여도

R&D 개발 완료 후 원료가공과 관련 된 양산체제를 구축하게 되면 앞서 언급한 제품 군으로 시장 진입을 할 예정이다. 현재 본사가 구축하고 있는 판매 유통처가 전국 3,000여 곳의 한의원과 및 관련 학회와 제휴를 하고 있어, 항 당뇨 물질의 실용화가 달성된다면, 유통시장에 접목하기에는 아주 호재가 될 것으로 생각된다. 아울러 개발된 핵심 기술은 해조류를 이용하여 기능성 물질을 screening하는데 모범사례가 될 것으로 판단되며, 이 기술을 바탕으로 해양생물자원의 이용 가능성을 높여 줌으로서 어민소득 증대에 크게 기여할 것으로 판단 된다.

- 신청과제 개발완료나 제품화 후 발생할 기술의 응용가능성 및 확장가능성

제품화공정기술은 해조류 뿐만 아니라 식물이나 한약제 가공 기술에도 많은 영향을 줄 것으로 판단되며, 이 기술을 바탕으로 한약의 제형변화를 통한 소비를 촉진시킴으로서 침체된 한방의료시장에 활기를 불어 넣을 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

1. 개발기술의 생산특성

- 생산형태(완제품, 반제품, 부품 중) 및 최종제품에 사용이 예상되는 핵심원재료 리스트
제품의 형태는 원료물질의 형태로 가공되며, 핵심적인 원재료는 선행연구결과에서 일부 해조류에서 효능이 우수한 해조류를 발견하였지만, 확실한 임상 자료가 나올 때 까지 핵심 원재료의 공개는 불가능함.
- 핵심원재료의 가격(현재시점)과 과거 가격추이 및 조달 측면상 용이성
원재료의 가격은 톤 당 5,000,000만원 수준이고, 조달은 매우 용이 한 편임
- 생산규모(대규모, 소규모, 대규모 생산 시설의 필요성 등)와 원료투입 및 예상 Lead-Time
과제가 선정될 경우 초기 구매물량이 2년간 실험에 사용할 분량을 매입하여야 하기 때문에 대략 1톤 정도는 소요될 것으로 판단 된다.

2. 기존 자원 활용정도

- 기존 사업아이템과 R&D과제의 연관정도
현재 본사는 화장품제조업체로서 주로 천연물을 대상으로 그 기능을 검증하고 원료물질을 탐색하고 있다. 그리고 연구소의 경우 면역의학연구를 위해 설립되었고, 천연물 신약, 기능성 화장품, 기능성 식품 소재개발에 주력하고 있기 때문에 본 과제와는 밀접한 관계를 가지고 있다.
- 기존 생산라인(설비포함) 예상 활용정도(100%) 및 근거
현재 본사에서 보유하고 있는 생산라인은 소규모 생산 단위의 시설로 본 연구를 위해 시제품 제작이나 추출 분리정제 등과 관련해서 100% 활용이 가능하다. 그리고 8월말 경에 생산 설비 시설이 들어올 예정이기 때문에 소규모 설비의 사용빈도가 낮아질 것으로 예상됨.
- 원재료 및 개발설비 공용화정도(100%) 및 근거
기존 회사보유 설비의 경우 각 부서간 공용화되어 사용하고, 원료사용내역을 부서별로 기재하게 되어있기 때문에 공용화에는 전혀 문제가 없을 것으로 생각된다.

3. 최종제품의 제품경쟁력 수준

- 예상 경쟁사 및 유사제품과 비교하여 제품경쟁력 정도 작성
해조류 유래 혈당강하 제품은 거의 전무한 실정이고, 원료의약품의 경우에도 경쟁력을 가진 유사 제품을 찾아 볼 수 없다. 현재 해조류를 이용하여 후코이단을 추출하는 방법은 제주

도 삼다원(주)에서 기술을 보유하고 있고, JW Biotech는 나노미터 분자 크기로 추출하는 기술을 보유하고 있는 것으로 소개되고 있으나, 상품화되어 판매되고 있는 양이 적어 영세성을 면치 못하고 있다.

○ 파급효과

<기술적 측면>

- 해조류를 활용한 항당뇨 물질의 스크리닝기술의 개발이 가능하다.
- 항당뇨 관련 해조류들에 대한 다양한 작용기전을 규명할 수 있다.
- 효소 및 초미세분말 가공기술을 활용한 해조류 시료처리 방식의 개발이 가능하다.
- 해조류 특유의 비릿 내를 제거함으로써 제품 제형의 다양성을 확보할 수 있다.
- 해조류가공기법의 개발과 이를 활용한 항당뇨 원료물질의 생산 공정 개발이 가능하고 다양한 제품화기술을 확보
- 기능성이 우수한 품종을 확보할 경우 종 보존 기술과 새로운 양식기술개발이 가능하다.

<경제적·산업적 측면>

- 수입에 의존하는 원천물질의 수입대체 효과 및 수출을 통한 외화획득 가능하다.
- 단순임가공수준에서 벗어나 해조류 가공의 새로운 기법이 도입됨으로서 수산생물의 대중화에 기여하고, 고부가가치산업 전환으로 어민소득증대가 가능하다.
- 기능성 식품소재 및 원료의약품으로 사용될 경우 외국과의 원천기술 경쟁에서 경쟁력 우위를 확보하여 각종 기반 산업의 활성화가 기대된다.
- 제품화가 이루어질 경우 고용창출 효과가 기대된다.

<사회문화적인 측면>

- 당뇨병은 심각한 질환이지만 우리가 극복할 수 있는 질병으로 환자들이 인식하는 계기를 마련함으로써 환자들에게 희망의 메시지를 보낼 수 있다.
- 수산자원에 대한 새로운 인식을 고취시킴으로서 수산식품에 대한 구매의욕을 고취 시킬 수 있다.
- 해양자원의 개발과 보존이 국가경쟁력을 높일 수 있다는 인식을 심어주게 된다.

○ 활용방안

<기술적인 측면>

- 본 과제를 통해 확보된 항 당노물질의 명확한 작용기전을 연구함으로써 원료의약품으로서 사용가능성을 타진하고, 후속 임상연구를 통하여 당뇨병 치료와 관련된 천연물 신약으

로 판매한다.

- 본 연구과제 결과로 확보된 원료가공기술 및 분리정제 기술에 관해서는 특허기술을 확보하고, post-genome 시대 선진국에 의해 독점되고 있는 신의약 개발의 국제 경쟁력을 확보하여 기술 예측화를 방지하고 관련 생명 공학 기술력을 향상시키며 독창적인 신의약 개발 기술을 국내에 정착시켜 선진국과 기술 격차를 축소하고 모방 지향적인 국내 의약산업 및 관련 분야를 독창성과 경쟁력을 지닌 고유한 우리 기술 충족으로 세계를 겨냥한 의약품 개발을 앞당길 것으로 예상된다.

- 기술을 이용하여 개발된 원료는 기능성식품소재로서 식약청의 허가를 득한 후 기능성 식품으로 가공하여 판매한다.

- 당뇨병 치료 효과외의 기능을 확인함으로써 항비만, 기능성 화장품 소재로서 활용한다.

<경제적·산업적 측면>

- 본 연구를 통하여 얻어진 신기술의 노하우 축적을 통해 광범위하게 사용되는 의약품 원료의 원활한 공급, 절대 수입에 의존하는 원천물질의 수입대체 효과로 인한 외화절약 및 이의 특허출원(등록)에 의한 외화획득 등의 막대한 경제, 산업적 효과뿐만 아니라 기대하게 이를 통해 500억 원 이상의 수입대체효과와 500억 원 이상의 수출 증대효과가 기대된다.

- 추가로 국내 수산생물자원을 원료공급원으로서 항 당뇨병효능이 있는 해조류를 양식함으로써 어민들의 수입 증대 및 수출을 통한 국가경쟁력 확보도 예상된다.

- PPAR- γ 를 활성화시키는 것으로 알려진 글리타존계 당뇨병 치료제의 전세계 매출액은 약 32억불(Rosiglitazone:15억불, Pioglitazone:17억불)에 이르고 있으며 매년 50% 이상의 높은 성장률을 보이고 있다. 그러나 글리타존류의 인슐린 치료제는 심장과 신장에 부작용을 초래하는 하는 것으로 알려져 있어 대체의약품의 개발이 요구된다. 따라서 신규 PPAR- γ agonist의 개발은 국민의 건강 증진에 기여 뿐 아니라 수입 대체 효과도 크게 작용할 것이다.

- 천연물을 대상으로 O-GlcNAc 변형 조절물질의 탐색계 확립으로 천연물로부터 고부가가치성 선도물질의 탐색을 가능하게 하여 천연물의 자원화를 가능하게 한다. 새로운 접근법에 기초한 항당뇨 소재와 같은 신약개발로 관련 생물산업의 활성화와 외화절감 내지 획득 가능성이 있다.

4. 연구성과 활용계획

- ▶ 본 과제를 통해 확보된 항 당뇨병물질의 명확한 작용기전을 연구함으로써 원료의약품으로서 사용가능성을 타진하고, 후속 임상연구를 통하여 당뇨병 치료와 관련된 천연물 신약으로 판매한다.

- ▶ 본 연구과제 결과로 확보된 원료가공기술 및 분리정제 기술에 관해서는 특허기술을 확보하고, post-genome 시대 선진국에 의해 독점되고 있는 신약 개발의 국제 경쟁력을 확보하여 기술

예속화를 방지한다.

▶ 관련 생명 공학 기술을 향상시키며 독창적인 신약 개발 기술을 국내에 정착시켜 선진국과 기술 격차를 축소하고 모방지향적인 국내 의약산업 및 관련 분야를 독창성과 경쟁력을 지닌 고유한 우리 기술 충족으로 세계를 겨냥한 의약품 개발을 앞당길 것으로 예상된다.

▶ 기술을 이용하여 개발된 원료는 기능성식품소재로서 식약청의 허가를 득한 후 기능성 식품으로 가공하여 판매한다.

▶ 당뇨병 치료 효과외의 기능을 확인함으로써 항비만, 기능성 화장품 소재로서 활용한다.

▶ 본 연구를 통하여 얻어진 신기술의 노하우 축적을 통해 광범위하게 사용되는 의약품원료의 원활한 공급, 절대 수입에 의존하는 원천물질의 수입대체 효과로 인한 외화절약 및 이의 특허출원(등록)에 의한 외화획득 등의 막대한 경제, 산업적 효과뿐만 아니라 기대하게 이를 통해 500억 원 이상의 수입대체효과와 500억 원 이상의 수출증대효과가 기대된다.

▶ 추가로 국내 수산생물자원을 원료공급원으로서 항 당뇨병효능이 있는 해조류를 양식함으로써 어민들의 수입 증대 및 수출을 통한 국가경쟁력 확보도 예상된다.

▶ PPAR- γ 를 활성화시키는 것으로 알려진 글리타존계 당뇨병 치료제의 전 세계 매출액은 약 32억불(Rosiglitazone:15억불, Pioglitazone:17억불)에 이르고 있으며 매년 50%이상의 높은 성장률을 보이고 있다. 그러나 글리타존류의 인슐린 치료제는 심장과 신장에 부작용을 초래하는 하는 것으로 알려져 있어 대체의약품의 개발이 요구된다. 따라서 신규 PPAR- γ agonist의 개발은 국민의 건강 증진에 기여 뿐 아니라 수입대체 효과도 크게 작용할 것이다.

▶ 천연물을 대상으로 O-GlcNAc 변형 조절물질의 탐색계 확립으로 천연물로부터 고 부가가치성 선도물질의 탐색을 가능하게 하여 천연물의 자원화를 가능하게 한다. 새로운 접근법에 기초한 항당뇨소재와 같은 신약개발로 관련 생물산업의 활성화와 외화절감 내지 획득 가능성이 있다.

가. 기대효과

○ 기술적 측면

▶ 해조류를 활용한 항당뇨 물질의 스크리닝기술의 개발이 가능하다.

- ▶ 항당뇨 관련 해조류들에 대한 다양한 작용기전을 규명할 수 있다.
- ▶ 효소 및 초미세분말 가공기술을 활용한 해조류 시료처리 방식의 개발이 가능하다.
- ▶ 해조류 특유의 비릿 내를 제거함으로써 제품 제형의 다양성을 확보할 수 있다.
- ▶ 해조류가공기법의 개발과 이를 활용한 항당뇨 원료물질의 생산 공정 개발이 가능하고 다양한 제품화기술을 확보
- ▶ 기능성이 우수한 품종을 확보할 경우 종 보존 기술과 새로운 양식기술개발이 가능하다.

○ 경제 · 산업적 측면

- ▶ 수입에 의존하는 원천물질의 수입대체 효과 및 수출을 통한 외화획득 가능하다.
- ▶ 단순임가공수준에서 벗어나 해조류 가공의 새로운 기법이 도입됨으로서 수산생물의 대중화에 기여하고, 고부가가치산업 전환으로 어민소득증대가 가능하다.
- ▶ 기능성 식품소재 및 원료의약품으로 사용될 경우 외국과의 원천기술경쟁에서 경쟁력 우위를 확보하여 각종 기반 산업의 활성화가 기대된다.
- ▶ 제품화가 이루어질 경우 고용창출 효과가 기대된다.

○ 사회 · 문화적 측면

- ▶ 당뇨병은 심각한 질환이지만 우리가 극복할 수 있는 질병으로 환자들이 인식하는 계기를 마련함으로써 환자들에게 희망의 메시지를 보낼 수 있다.
- ▶ 수산자원에 대한 새로운 인식을 고취시킴으로서 수산식품에 대한 구매의욕을 고취시킬 수 있다.
- ▶ 해양자원의 개발과 보존이 국가경쟁력을 높일 수 있다는 인식을 심어주게 된

시장규모

구 분	현재의 시장규모 (2006년)	예상 시장규모 (2012년)
세계시장규모	약 205억 \$	약 474억\$
한국시장규모	약 1,500	약 3,300
※ 산출근거 : 한국기술은행 “당뇨병 치료기술” 자료 참조		

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

No.	논문명	학술지명	저자	발행년	권	호	시작 페이지	끝 페이지	발행기관
1	Diphlorethohydroxycarmalol, isolated from the brown algae <i>Ishige okamurae</i> , protects against radiation-induced cell damage in mice	Food and chemical toxicology	Ahn, M. ; Moon, C. ; Yang, W. ; Ko, E. J. ; Hyun, J. W. ; Joo, H. G. ; Jee, Y. ; Lee, N. H. ; Park, J. W. ; Ko, R. K.	2011	49	4	864	870	Elsevier Science B.V., Amsterdam.
2	<i>Ishige okamurae</i> ameliorates hyperglycemia and insulin resistance in C57BL/KsJ-db/db mice	Diabetes research and clinical practice	Min, K.H. ; Kim, H.J. ; Jeon, Y.J. ; Han, J.S.	2011	93	1	70	76	Elsevier Science Publishers B.V. ; Elsevier Science Pub. Co
3	Protective effect of diphlorethohydroxycarmalol isolated from <i>Ishige okamurae</i> against high glucose-induced-oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells	Food and chemical toxicology	Heo, S.J. ; Hwang, J.Y. ; Choi, J.I. ; Lee, S.H. ; Park, P.J. ; Kang, D.H. ; Oh, C. ; Kim, D.W. ; Han, J.S. ; Jeon, Y.J. ; Kim, H.J. ; Choi, I.W.	2010	48	6	1448	1454	Pergamon ; Elsevier Science Ltd
4	Fucoanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages	European journal of pharmacology	Kim, K.N. ; Heo, S.J. ; Yoon, W.J. ; Kang, S.M. ; Ahn, G. ; Yi, T.H. ; Jeon, Y.J.	2010	649	1	369	375	North-Holland ; Elsevier Science Ltd
5	Fucoanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway	Toxicology in vitro	Kim, K.N. ; Heo, S.J. ; Kang, S.M. ; Ahn, G. ; Jeon, Y.J.	2010	24	6	1648	1654	Pergamon ; Elsevier Science Ltd
6	Inhibitory effect of diphlorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage	Food and chemical toxicology	Heo, S.J. ; Ko, S.C. ; Kang, S.M. ; Cha, S.H. ; Lee, S.H. ; Kang, D.H. ; Jung, W.K. ; Affan, A. ; Oh, C. ; Jeon, Y.J.	2010	48	5	1355	1361	Pergamon ; Elsevier Science Ltd
7	Anti-inflammatory Mechanism of Seaweeds in Murine Macrophage	Food science and biotechnology	Pan, Cheol-Ho ; Kim, Eun-Sun ; Um, Byung-Hun ; Lee, Jae-Kwon	2009	18	3	813	817	Korean Society of Food Science and Technology
8	Anti-inflammatory effect of <i>Ishige okamurae</i> ethanolic extract via inhibition of NF- κ B transcription factor in RAW 264.7 cells	Phytotherapy research	Kim, Moon-Moo ; Rajapakse, Niranjana ; Kim, Se-Kwon	2009	23	5	628	634	John Wiley & Sons, Ltd.
9	Diphlorethohydroxycarmalol isolated from <i>Ishige okamurae</i> , a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice	European journal of pharmacology	Heo, S.J. ; Hwang, J.Y. ; Choi, J.I. ; Han, J.S. ; Kim, H.J. ; Jeon, Y.J.	2009	615	1	252	256	North-Holland ; Elsevier Science Ltd

10	Phlorotannins from <i>Ishige okamurae</i> and their acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory effects	Journal of functional foods	Yoon, N.Y. ; Lee, S.H. ; Yong-Li ; Kim, S.K.	2009	1	4	331	335	Elsevier
11	Anti-inflammatory effect of <i>Ishige okamurae</i> ethanolic extract via inhibition of NF-kappaB transcription factor in RAW 264.7 cells.	Phytotherapy research	Kim, Moon-Moo ; Rajapakse, Niranjana ; Kim, Se-Kwon	2009	23	5	628	634	Heyden & Son ; J. Wiley
12	Ishigoside, a New Glyceroglycolipid Isolated from the Brown Alga <i>Ishige okamurae</i>	Biotechnology and bioprocess engineering	Zou, Yanping ; Li, Yang ; Kim, Moon-Moo ; Lee, Sang-Hoon ; Kim, Se-Kwon	2009	14	1	20	26	Korean Society for Biotechnology and Bioengineering
13	Evaluation of diphlorethohydroxycarmalol isolated from <i>Ishige okamurae</i> for radical scavenging activity and its protective effect against H ₂ O ₂ -induced cell damage	Process biochemistry	Heo, S.J. ; Jeon, Y.J.	2009	44	4	412	418	Elsevier Applied Science
14	Identification of Chemical Structure and Free Radical Scavenging Activity of Diphlorethohydroxycarmalol Isolated from a Brown Alga, <i>Ishige okamurae</i>	Journal of microbiology and biotechnology	Heo, Soo-Jin ; Kim, Jong-Pyung ; Jung, Won-Kyo ; Lee, Nam-Ho ; Kang, Hahk-Soo ; Jun, Eun-Mi ; Park, Soon-Hye ; Kang, Sung-Myung ; Lee, Young-Jae ; Park, Pyo-Jam ; Jeon, You-Jin	2008	18	4	676	681	The Korean Society for Applied Microbiology and Biotechnology
15	Radical scavenging capacity and cytoprotective effect of enzymatic digests of <i>Ishige okamurae</i>	Journal of applied phycology	Heo, Soo-Jin ; Jeon, You-Jin	2008	20	6	1087	1095	Springer Netherlands
16	Structure of Intertidal Macroalgal Community at the Yeonpyeongdo Islets, Korea	Journal of fisheries science and technology	Choi, Han-Gil ; Yoo, Hyun-Il ; Song, Hong-In	2008	11	3	159	165	The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science
17	A methoxylated fatty acid isolated from the brown seaweed <i>Ishige okamurae</i> inhibits bacterial phospholipase A ₂	Phytotherapy research	Cho, Ji-Young ; Gyawali, Yadav P. ; Ahn, Sun-Hee ; Khan, Mohammed N. A. ; Kong, In-Soo ; Hong, Yong-Ki	2008	22	8	1070	1074	John Wiley & Sons, Ltd.
18	Antioxidant Efficacy of Extracts from a Variety of Seaweeds in a Cellular System	Ocean science journal	Kim, You-Ah ; Kong, Chang-Suk ; Um, Young-Ran ; Lee, Jung-Im ; Nam, Taek-Jeong ; Seo, Young-Wan	2008	43	1	31	37	The Korean Society of Oceanography

19	Cancer Chemopreventive Effects of Korean Seaweed Extracts	Food science and biotechnology	Lee, Saet-Byoul ; Lee, Joo-Young ; Song, Dae-Geun ; Pan, Cheol-Ho ; Nho, Chu-Won ; Kim, Min-Cheol ; Lee, Eun-Ha ; Jung, Sang-Hoon ; Kim, Hyung-Seop ; Kim, Yeong-Shik ; Um, Byung-Hun	2008	17	3	613	622	Korean Society of Food Science and Technology
20	Antioxidant effects of phlorotannins isolated from <i>Ishige okamurae</i> in free radical-mediated oxidative systems	Journal of biotechnology	Zou, Y. ; Qian, Z.J. ; Li, Y. ; Kim, M.M. ; Lee, S.H. ; Kim, S.K.	2008	136	suppl	S579	S580	Elsevier Science Publishers
21	Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from <i>Ishige okamurae</i> in Free Radical Mediated Oxidative Systems	Journal of agricultural and food chemistry	Zou, Yanping ; Qian, Zhong-Ji ; Li, Yong ; Kim, Moon-Moo ; Lee, Sang-Hoon ; Kim, Se-Kwon	2008	56	16	7001	7009	American Chemical Society
22	An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of <i>Ecklonia cava</i>	Carbohydrate polymers	Athukorala, Y. ; Jung, W.K. ; Vasanthan, T. ; Jeon, Y.J.	2006	66	2	184	191	Applied Science Publishers ; Elsevier Science Ltd
23	Inhibition of bacterial phospholipase by methoxylated fatty acid isolated from the brown seaweed <i>Ishige okamurae</i>	한국양식학회	Cho, J.Y. ; Gyawali, Y.P. ; Ahn, S.H. ; Khan, M.N.A. ; Kong, I.S. ; Hong, Y.K.	2006	2006	5	212	213	Korean Aquaculture Society
24	Inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase and integrase of a carmalol derivative from a brown Alga, <i>Ishige okamurae</i>	Phytotherapy research	Ahn, M.-J. ; Yoon, K.-D. ; Kim, C. Y. ; Kim, J. H. ; Shin, C.-G. ; Kim, J.	2006	20	8	711	713	John Wiley & Sons, Ltd.
25	Screening for Angiotensin 1-Converting Enzyme Inhibitory Activity of <i>Ecklonia cava</i>	Journal of food science and nutrition	Athukorala, Yasantha ; Jeon, You-Jin	2005	10	2	134	139	The Korean Society of Food Science and Nutrition
26	Isolation of antifouling active pyroglutamic acid, triethyl citrate and di-n-octylphthalate from the brown seaweed <i>Ishige okamurae</i>	Journal of applied phycology	Cho, Ji-Young ; Choi, Jae-Suk ; Kang, Se-Eun ; Kim, Joong-Kyun ; Shin, Hyun-Woung ; Hong, Yong-Ki	2005	17	5	431	435	Kluwer Academic Publishers

27	Isolation of Diphlorethohydroxycarmalol from a Brown Alga <i>Ishige okamurae</i>	Natural medicines = 生藥學雜誌	Toume, K. ; Miyata, M. ; Egawa, K. ; Nose, K. ; Hayashi, M. ; Komiyama, K. ; Ishibashi, M.	2004	58	2	79	80	JAPANESE SOCIETY OF PHARMACOGNOSY
28	Studies on chemical constituents from marine brown alga <i>Ishige okamurae</i> (I)	中國海洋藥物= Chinese journal of marine drugs	Tang, Haifeng ; Yi, Yanghua ; Yao, Xinsheng	2003	22	4	8	12	Shandong sheng hai yang yao wu ke xue yan jiu suo Zhongguo hai yang yao wu za zhi bian ji bu
29	Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and antiviral activity of Korean seaweed extracts	Journal of applied phycology	Ahn, Mi-Jeong ; Yoon, Kee-Dong ; Kim, Chul Young ; Min, So-Young ; Kim, Yong-ung ; Kim, Hyun Jin ; Kim, Jeong Ha ; Shin, Cha-Gyun ; Lee, Chong-Kyo ; Kim, Tae Gyun ; Kim, Seung Hee ; Huh, Hoon ; Kim, Jinwoong	2002	14	5	325	329	Kluwer Academic Publishers
30	Relationship of CO ₂ concentrations to photosynthesis of intertidal macroalgae during emersion	Hydrobiologia	Gao, Kunshan ; Ji, Yan ; Aruga, Yusho	1999	398		355	359	Kluwer Academic Publishers
31	High Tocopherol Content in a Brown Alga <i>Ishige okamurae</i>	Fisheries science : FS	Nakamura, T. ; Nagayama, K. ; Kawaguchi, S.	1994	60	6	793		JAPANESE SOCIETY OF FISHERIES SCIENCE

제 7 장 참고문헌

1. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265~275.
2. Laurent B., Maria J.S., Frederic M., Christian M., Evelyne L., Michel G., 2001. Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128: 389-400
3. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350~356
4. 박지희등 2009. 갈근에서 분리한 화합물의 α -glucosidase와 α -amylase 활성 저해 효과 *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 17(5): 357-362
5. 식품의약품안전청 ‘기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인’(2003)
6. 식품의약품안전청 ‘미용관련 기능성시험, 건강기능식품 시험법 가이드’(2004)
7. 식품의약품안전청 ‘기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인’(2005)
8. Choi, J. S;Yokazawa, T., Oira, H. 1983. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana* *J. Nat. Pharmacol.* 32 2822,
9. Breckenridge, W C., Little, J A., Steiner, G., Chow, A;Poapst, M. 1978. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II *N. Eng. J. Med.* 298 1256
10. 나선택 2009 LONICERAE FOLIUM의 항산화효과 탐색 및 RAW 264.7 세포에서 항산화기전을 통한 산화적 스트레스·염증반응 억제효과 연구 동국대학교
11. Virador, V.M., Kobayashi, N., Matsunaga, J. and Hearing, V.J. 1999. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation, *Anal. Biochem.* 270, pp207-219
12. Baynes JW (1991) Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* , 제 40권 , pp.405-421
13. Hammers, HD 1991 Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic

retinopathy. (et al.). *Proc Nat Acad Sci USA* 제 88권 pp.11555-11558

14. 허수진등 2008 Identification of Chemical Structure and Free Radical Scavenging Activity of Diphlorethohydroxycarmalol Isolated from a Brown Alga, *Ishige okamurae*. *J. Microbiol. biotechnol.* 18(4), 676-681
15. 박성민, 이계원, 조영호 (2008) 대황 추출물의 항산화 활성 및 MMP-1저해 활성 *Journal of Life Science* Vol. 18, No. 12 1700-170
16. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200
17. 식품의약품안전청, “제10. 일반성분시험법 10-3-1” 식품공전 제2권(2010)
18. 이윤희, 임남훈, 정민석, 김중희, 심상수 (2005) 미백 기능성 성분의 혼합물에 대한 미백 활성 및 안정성에 관한 연구 *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* Vol. 31, No. 4 295-304
19. 유영근, 정민석, 최종완, 김중희 (2005) 마황 추출물의 미백효과에 관한 연구 *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* Vol. 31, No. 2 153-159
20. 손애량, 이승자 (2000) 미백화장품 효능 검증에 관한 고찰 *한국미용학회지* 제6권 제1호 pp 239-254
21. Qi W., Chen L., Chenglei L., Hui C., Liu S. 2009. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. *Applied biochemistry and biotechnology* Vol. 160(1) 129-139
22. 최원식, 장도연, 남석우, 어진용, 이경주 (2008) 세포내 멜라닌 생성 및 Collagease와 Elastase 에 대한 Coenzyme Q10 유도체들 억제활성 *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51(3), 164-170
23. 최정식 2010 RIN-m5F 세포에서 야관문이 포도당 독성에 대한 세포 보호 효과와 인슐린 분비 및 유전자 발현에 미치는 영향 대전대학교
24. 임태진, 임상철 랫드 간세포 일차배양에서 양파 추출물이 수은에 의해 유도된 독성 및 지질과산화에 미치는 영향 *한국환경농학회지* 제24권 제2호 (2005. 6) pp.146-152
25. Choi JM, Koo SJ. 2000. Effect of β -glucan from *Agaricus blazei* Murill on blood glucose and lipid composition in db/db mice. *Korean. J. Food Sci. Technol.* 32(6), 1418-1425

26. Nikkila, E.A. 1973 Triglyceride metabolism in diabetes mellitus. *Progress in Biochemical Pharmacology* 8, 271-299
27. 정 종운, 이 윤호, 강 성길 (2003). 가시오가피약침이 당뇨유발억제 및 신장보호활성에 미치는 영향. *대한침구학회지* 20(3): 1 - 14.
28. Rhee SJ 1996 Effects of Vitamin E and Selenium on the Antioxidative Defense System in Streptozotocin - induced Diabetic Rats. *Korean J. Nutr.* 29(1) : 22-31,
29. Lee, J.W. 1991 Effects of ethanol administration on glutathione and lipid peroxide levels in rat liver and cerebellum. *Food Nutr.* 20, 285-292.
30. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K. 1998 Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J. Clin. Invest.* 101: 1354 - 61
31. Lebovitz HE, Banerji MA 2007 Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2007. *Diabetes Care* 30: Suppl 1; S4-S41
32. IDF Clinical Guidelines Task Force. Global guideline for type 2 diabetes. Brussels: International Diabetes Federation. 2005.
33. Ryden L, Standl E, Bartnic M, et al. 2007 Guidelines on diabetes, pre-diabetes and cardiovascular diseases: executive summary. *Eur. Heart. J.* 28: 88-136,
34. Nihei, K and Kubo, I. 2003 Identification of oxidation product of arbutin in mushroom tyrosinase assay system. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 2409-2412
35. 37. 김선미, 손경훈, 윤미옥, 이정표, 양성준, 김재희, 양우겸, 김영대, 허문영, 최상숙, 세포 신호전달기전을 이용한 미백화장품의 미백효과 평가방법 연구. *식품의약품안전청연구보고서 제8-1권: 769-777 (2004)*
36. 대한병리학회 대구·경북 지부학회. 간추린 병리학. 서울 : 정문각 (2000) 대한병리학
37. Gao, I, Igarashi, K., & NuKina, M. 2000 Three new phenylethanoid glycosides from *Caryopteris incana* and their antioxidative activity. *Chemical and Farmaceutical Bllletin* 48: 1075-1078

38. Aruoma, O.I. 1994 Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and chemical Toxicology* 62: 671-683
39. Madavi, D.L., & Salunkhe, D.K. 1995 Toxicological aspects of food antioxidant. *Food antioxidants* New York: Marcel Dekker 267

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 수산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 수산기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.