

발 간 등 록 번 호

안내서-0125-02

국민의 더 건강한
내일을 위한 정부혁신

보다 나은 **식약처**

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘혈당조절에 도움을 줄 수 있음’ 편

2019. 6.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

건강기능식품 기능성 평가 가이드
(‘혈당조절에 도움을 줄 수 있음’편)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 ‘예’라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 ‘예’에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 ‘예’라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2019년 6 월 일 담당자 확 인(부서장) 이 혜 영		

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2019년 6월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2012-1-006	2012.11.	제정
2	안내서-0125-01	2017.6.1.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.)
3	안내서-0125-02	2019.6.	개정 (기능성 시험방법 등 업데이트)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 Ⅰ 서 론	4
 Ⅱ 일반적 사항	4
1. 개요	4
2. 보건학적 중요성	10
 Ⅲ 기능성 시험 방법	11
1. 바이오마커의 선정	11
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	16
3. 시험 설계 시 고려사항	26
 Ⅳ 참고문헌	30

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

건강기능식품법률 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능	기능성 원료
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능	

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

구분	기능성 내용	인정기준
질병발생 위험 감소 기능 ¹⁾	○○발생위험 감소에 도움을 줌	기반연구 자료를 통해 생리학적인 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험 (RCT)에서 확보되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리학적인 효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인되어야 함) ※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인

- 1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우 인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과 간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에 의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함
- 2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지개선을 나타내는 경우 인정

약 어

ADA	america diabetes association
CCK	cholecystokinin
DB	double blind
DCCT	diabetes control and complication trial
DPP-4	dipeptidyl peptidase 4
ELISA	enzyme linked immunoabsorbant assay
GH	growth hormone
GK	glucokinse
GIP	gastric-inhibitory polypeptide
GLP-1	glucagon like peptide-1
GTT	glucose tolerance test
GSK3	glycogen synthase kinase 3
IFG	impaired fasting plasma glucose
IGT	impaired glucose tolerance
IPGTT	intra peritoneal glucose tolerance test
IR	insulin receptor
IVGTT	intra venous glucose tolerance test
WHO	world health organization
OGT	oral glucose tolerance
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PEPCK	phosphoenol pyruvate carboxykinase
PI3-K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PTP-1B	protein-tyrosine phosphatase 1B
RCT	randomized controlled trial
RIA	radio immuno assay
SGLT-1	sodium glucose transporter-1
SSA	significant scientific agreement
UKPDS	united kingdom prospective diabetes study

I

서론

이 가이드라인은 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품 안전처의 기능성(혈당 조절에 도움을 줄 수 있음) 평가 원칙 및 기준 등을 알림으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II

일반적 사항

1. 개요

가. 혈당

우리 몸은 정상적인 기능을 유지하기 위하여 에너지를 필요로 하고, 이 에너지는 혈액 속의 영양소를 이용하여 생산된다. 혈액 속 영양소 중에서 가장 효과적인 에너지원은 포도당이며, 포도당은 적혈구와 뇌세포의 에너지원으로 중요한 원료이다. 혈액 속의 포도당을 혈당이라고 하며, 혈당은 항상 일정수준으로 유지되어야만, 우리 몸에 원활하게 에너지를 공급할 수 있다.

음식물로 섭취한 탄수화물은 소장에서 흡수되어 일단 간으로 이동한다. 간은 흡수된 영양소 중 포도당을 바로 혈액으로 내보내고, 아미노산 등의 영양소는 체내에서 쓰일 수 있도록 포도당으로 분해하거나 전환한다. 생성된 포도당은 혈액으로 방출되어 체내에서 에너지원으로 사용된다. 혈액 속 포도당은 세포 안으로 들어가 에너지를 만들어 내는데, 신경세포를 제외하고 인슐린이 혈당을 세포로 들어갈 수 있도록 신호를 보내 에너지를 만들 수 있도록 한다(그림 1).

나. 혈당의 대사조절기전

혈당은 모든 세포의 기본적인 에너지원으로서 체내 여러 대사와 호르몬에 의해 일정하게 유지된다. 포도당의 흡수 조절, 당 대사, 췌장의 베타세포 기능, 인슐린 신호전달체계 등이 혈당 조절에 관여한다(그림 2). 대표적인 호르몬으로는 인슐린과 글루카곤이 있으며, 혈당 저하 시 글루카곤이 분비되어 간에 저장된 포도당을 혈액으로 방출시켜 혈당을 정상 수준

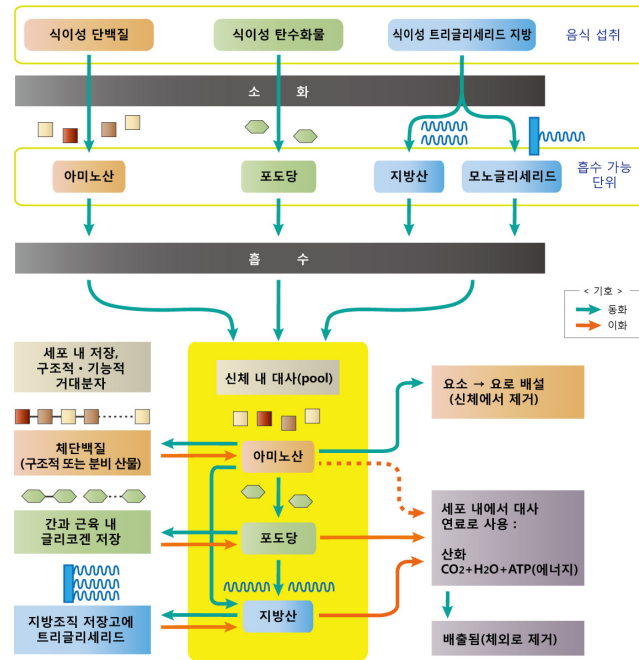


그림 1. 영양소 대사 경로

[출처 : Lauralee Sherwood, 인체생리학, 라이프사이언스, 2011]

으로 유지하도록 도와준다. 반대로 혈당 상승 시에는 췌장에서 인슐린이 분비되어, 포도당을 간에 저장하고, 각 조직의 세포에서 포도당 이용을 촉진하여, 혈당 수준을 다시 정상으로 조절한다.

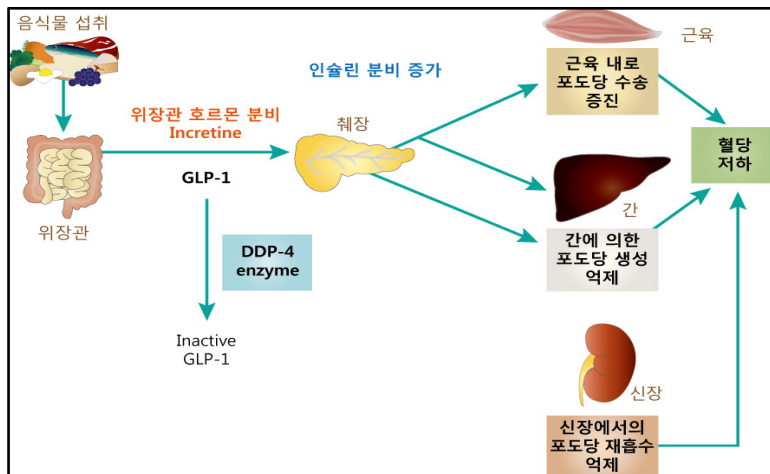


그림 2. 혈당 대사 조절 기전

(1) 포도당 흡수 조절 기전

포도당의 흡수는 식이로 섭취한 탄수화물이 소장 내 소화 효소를 통해 장내에서 일차로 흡수가 되며, 조직에서의 사용을 위해 세포 내로 운반되게 된다. 또한 혈당 증가 시 신장에서는 포도당 재흡수를 증가시켜 신장에서 에너지원으로 일부 사용되며, 나머지는 체내 글리코젠으로 전환시키게 된다.

(2) 혈당 조절 호르몬 및 단백질

(가) 인슐린

식후 혈액의 포도당 농도가 증가하면 췌장 내 베타 세포(β -cell)는 인슐린을 분비한다(그림 3). 인슐린은 포도당의 세포 유입을 향상시키고, 조직 내 글리코젠으로 저장 또는 지방산으로 전환시키는데 핵심적인 역할을 하게 된다.

(나) 글루카곤

혈당 감소 시 췌장 내 알파 세포(α -cell)는 글루카곤을 분비하며, 글루카곤은 간 내 글리코젠을 포도당으로 분해하여 혈당을 증가시킨다. 글루카곤은 또한 지방의 분해를 유도하여 유리지방산이 혈액으로 방출되도록 한다.

(다) 소화호르몬

글루카곤양펩티드-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)은 인크레틴 중 하나로, 장내 영양소와 혈당 농도에 자극을 받아 분비되는 호르몬으로 인슐린 분비를 유도한다. 글루카곤양펩티드-1은 인크레틴의 90% 이상의 역할을 담당하고 있으며, 상부 소화기관의 운동저하, 식욕억제 등의 기능과 더불어 베타세포를 증식시키는데도 관여한다. 체내에서는 DPP-4 (dipeptidyl peptidase 4)에 의해 분해되기 때문에 GLP-1 유사제 및 DPP-4 억제제가 혈당조절제로 사용되고 있다.

(라) 아디포넥틴

아디포넥틴은 지방세포에서 분비되어 근육, 간, 혈관과 같은 말초조직에서 인슐린 작용을 향상시킨다. 간 내에서 당신생합성, 지방산 축적을 저해하고, 에너지 사용을 증가시켜, 혈당을 소비하도록 하며, 궁극적으로 인슐린 저항성을 저해하고, 혈당 개선에 도움을 준다(그림 4).

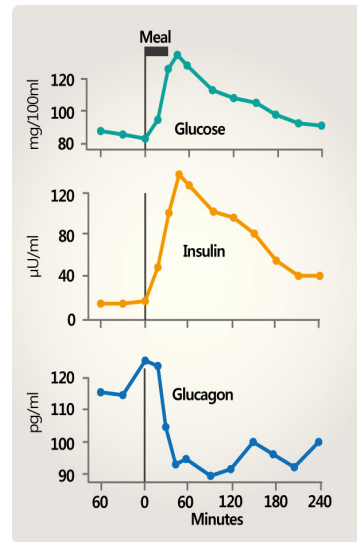


그림 3. 정상인에서의 혈당 농도와 인슐린 농도의 상관관계

[출처 : Lauralee Sherwood, 인체생리학, 라이프사이언스, 2011]

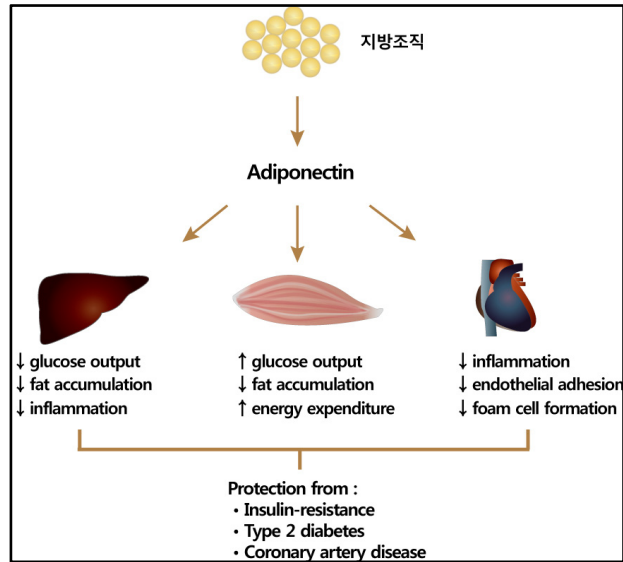


그림 4. 아디포넥틴의 체내 대사 조절 기능

[출처 : Menzaghi et al., Diabetes 56:1198-1209, 2007]

(3) 췌장 베타세포 기능

췌장의 랑게르한스섬(Langerhans islet)은 다른 호르몬들을 분비하는 세 가지 종류의 세포를 가지고 있다. 가장 많은 세포는 베타세포(β -cell)로 인슐린(insulin)호르몬을 분비하고 알파 세포(α -cell)는 글루카곤(glucagon)호르몬을 분비하며 델타 세포(δ cell)는 소마토스타틴(somatostatin, 성장억제호르몬)을 생성한다. 췌장 세포에서 분비되는 인슐린과 글루카곤에 의해 주로 혈당 조절이 이루어지기 때문에 췌장 베타세포의 정상적인 기능은 혈당 조절 시 필수적이다.

(4) 당 대사

혈당 수준에 의해 세포내에서는 해당과정 또는 당신생과정을 진행하게 된다. 세포 내 포도당 부족 시에는 간 내 글리코젠 분해, 당 신생작용을 진행하게 되며, 당 신생 작용시 phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK), glucose-6-phosphate가 핵심 기전 요소로 작용한다. 에너지 사용을 위한 해당과정에서는 glucokinse(GK)가 핵심 효소로 작용한다(그림 5).

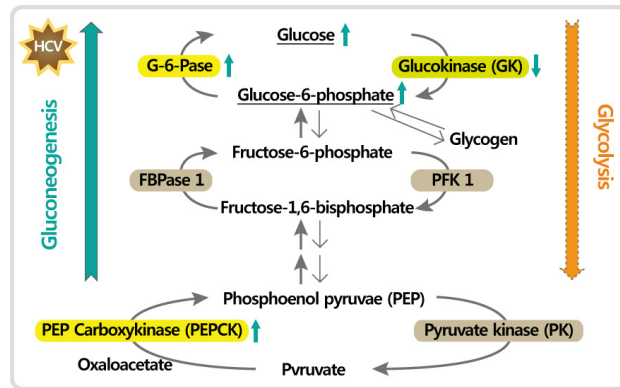


그림 5. 간 내 당 대사 기전

[출처 : Shoji et al., Fornt Microbiol. 10:2:278, 2012]

(5) 인슐린 신호전달체계

정상인의 경우 혈당 증가 시 췌장에서 인슐린이 분비되고, 각 조직의 세포막에 있는 인슐린 수용체(insulin receptor, IR)가 결합한다. 인슐린 수용체와 결합시 세포내 GLUT-2 혹은 GLUT4 등의 운반체가 이동하게 되며, 세포 내로 유입된 혈당에 의해 PI3K, PTP1B, GSK3 등의 일련의 신호전달체계를 통해 혈당을 조절하게 된다.

다. 당뇨의 진단 기준

최근 개정된 2018 미국당뇨학회 및 2015 대한당뇨병학회 당뇨병 진단 기준은 표 1과 같다.

표 1. 2018년 미국당뇨학회(ADA) 및 2015 대한당뇨병학회 당뇨병 진단 기준

진단기준	2018 미국당뇨학회(ADA) 및 2015 대한당뇨병학회 진료지침위원회
정상혈당	1. 최소 8시간 공복 상태에서 혈장혈당 100 mg/dL 미만 2. 75 g 경구포도당부하 2시간 후 혈장혈당 140 mg/dL 미만
고위험군	1. 공복혈당장애: 공복혈장혈당 100~125 mg/dL 2. 내당능장애: 75 g 경구포도당부하 2시간 후 혈장혈당 140~199 mg/dL 3. 당화혈색소: 5.7~6.4%
당뇨병	1. 당화혈색소 6.5% 이상 2. 8시간 이상 공복혈장혈당 126 mg/dL 이상 3. 75 g 경구포도당부하 2시간 후 혈장혈당 200 mg/dL 이상

(1) 정상혈당

공복혈당이 100 mg/dL 이하이며, 식후 2시간 혈당은 140 mg/dL 이하로 제한하고 있다.

(2) 고위험군

(가) 공복혈당장애

당뇨로 분류되지는 않지만 공복혈당이 100~125 mg/dL 사이의 혈당을 공복혈당장애 (IFG: impaired fasting plasma glucose)로 정의한다.

(나) 내당능장애

식후 2시간 혈당이 140~199 mg/dL인 경우를 내당능장애(IGT: impaired glucose tolerance)로 구분한다.

(3) 당뇨병의 혈당

공복 시 혈당이 126 mg/dL(7.1 mmol/L) 이상이거나, 식후 2시간 혈당은 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 이상인 경우를 당뇨병으로 구분한다.

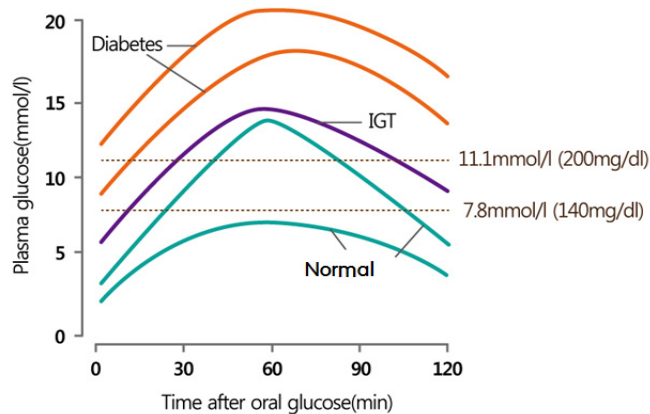


그림 6. 경구내당능검사에 나타나는 정상, 내당능장애 및 당뇨병의 혈당변화

[출처: 건강기능식품 기능성평가 가이드라인, 2012]

2. 보건학적 중요성

가. 혈당 조절의 의의

정상적인 상태에서는 식사 후 혈당이 일시적으로 올라가지만, 인슐린에 의하여 다시 정상 수준으로 내려가게 된다. 그러나 췌장에서 인슐린 분비가 잘 안되거나, 분비가 되더라도 그 기능을 제대로 하지 못하게 되면, 식사 후 혈당이 정상 수준으로 내려가지 않게 된다. 즉 체내에서 포도당을 에너지원으로 사용하지 못하고, 밖으로 배출하게 된다. 만성 고혈당은 합병증 및 사망률과 밀접하게 연관이 있으며, 특히 혈관과 신경에 손상을 주어 혈액순환과 신경기능 이상을 초래한다. 백내장, 지방간, 급·만성 감염증, 심혈관계질환 등을 유도하며, 만성합병증 중 미세혈관 합병증은 당뇨병성망막병증, 당뇨병성신증을 유발한다.

혈당을 정상으로 유지하기 위해서는 무엇보다 식이 조절이 중요하다. 식이 조절은 식사 후 혈당을 정상 수준으로 유지하는 데 중요한 역할을 한다. 소화 흡수가 빠른 단순당(과일, 설탕, 꿀, 청량음료 등)은 혈당을 급격하게 높여 좋지 않은 반면, 식이섬유소가 풍부한 잡곡, 현미, 채소 등은 당질 흡수가 느리게 일어나 혈당이 높아지는 속도를 늦추어 혈당 조절에 도움을 줄 수 있다. 또한 식사를 천천히 하는 습관이나 과식하지 않는 습관은 정상 혈당 유지에 많은 도움을 줄 수 있다. 또한 30분 정도 중간 강도의 운동과 건강한 식사로 제 2형 당뇨병 위험률을 크게 낮출 수 있다.

Ⅲ

기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구유형별 바이오마커

혈당 건강 기능성을 확인하기 위한 바이오마커는 혈당 수준 측정 지표와 혈당 조절 인자 지표로 구분할 수 있으며, 각 바이오마커 별 측정 가능한 시험 연구 유형은 다음 표 2와 같다.

표 2. 혈당관련 기능성식품 평가를 위한 바이오마커의 분류

구분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		In vitro	In vivo	Human
혈당수준	공복혈당(혈장)		○	○
	식후혈당(혈장)		○	○
	경구당부하검사(OGTT)		○	○
	당화혈색소(HbA1c)		○	○
포도당 흡수	GLUT2	○	○	
	SGLT1	○	○	
	alpha-glucosidase	○	○	
	alpha-amylase	○	○	
호르몬 및 관련단백질	인슐린		○	○
	HOMA-IR			○
	아디포넥틴	○	○	○
	GLP-1	○	○	○
	DPP-4	○	○	○
베타세포기능 (β -cell function)	세포생활성	○	○	
	공복 혈장 C-펩티드	○	○	
	세포 및 조직 인슐린 함유도	○	○	
	세포 및 조직 인슐린 합성능	○	○	
당대사	PEPCK	○	○	
	Glucose-6-phosphatase	○	○	
	Glucokinase	○	○	
	GLUT-4	○	○	
인슐린 신호전달	IR	○	○	
	PI3K	○	○	
	PTP1B	○	○	
	GSK3	○	○	

나. 바이오마커 설명

(1) 혈당수준

(가) 공복혈장혈당(fasting plasma glucose)

최소한 8시간 금식 후 정맥혈에서 측정한 혈당농도(plasma glucose)를 mmol/L 또는 mg/dL로 표시한다. 사람과 실험동물에 모두 적용된다.

(나) 식후혈장혈당(postprandial glucose)

식후 혈당농도는 엄밀한 의미에서 OGTT의 실험결과 중 120분에 나타나는 혈당농도를 지칭하며 2h-glucose(식후 2시간 후 혈당)으로 표시될 수 있다.

(다) 내당능검사(경구당부하검사)

내당능검사는 대표적으로 경구당부하검사(oral glucose tolerance test, OGTT)로 실시하며, 당뇨병의 정확한 진단 및 치료 방침을 설정하기 위해 시행한다.

(라) 당화혈색소(HbA1c)

적혈구에 있는 혈색소(hemoglobin)의 일부인 HbA1c는 혈구의 생존 기간동안 서서히 포도당과 비효소적으로 결합하여 당화되므로 HbA1c의 당화정도는 혈구의 생존기간인 혈중 포도당 농도를 가늠하게 한다. 그러므로 당화혈색소는 혈당 조절을 표현하는 가장 기본적인 지표로 널리 이용되고 있으며, 당화혈색소의 값(glycated hemoglobin value)으로 지난 수 주일 동안의 혈당농도를 추정할 수 있다.

(2) 혈당 조절 기전 지표

(가) 포도당 흡수 조절 기전

① GLUT 2

장내 포도당의 흡수에 관련된 지표로는 GLUT-2(glucose transporter-2, 당수송체)가 있다. 인슐린 저항성에 중요한 요소이며, GLUT-2의 비정상적 기능은 췌장의 베타세포에서의 인슐린 분비를 감소시킨다.

② SGLT 1

SGLT-1(Sodium glucose transporter-1)은 주로 장 세포와 신장 세포에서 포도당 운반을 담당한다. 나트륨-포도당 공동 수송체를 억제시켜 직접적으로 포도당의 체외 배출에 관여하게 된다.

③ α -glucosidase

탄수화물이 소장 내 소화 효소를 통해 포도당의 형태로 생성되며, α -glucosidase가 대표적인 당분 소화효소로 작용한다. 이에 α -glucosidase 활성의 저해는 탄수화물 소화속도를 조절하여 식후 혈당 상승을 억제하는 것을 의미한다.

④ α -amylase

탄수화물이 소장 내 소화 효소를 통해 포도당의 형태로 생성되며, α -amylase에 의해 이당류나 단당류로 분해된다. 이에 α -amylase 활성의 저해는 탄수화물 소화속도를 조절하여 식후 혈당 상승을 억제하는 것을 의미한다.

(나) 혈당 조절 호르몬 및 단백질

① 인슐린

인슐린은 혈당이 정상 범위 이상으로 높아졌을 때 췌장 β 세포에서 분비되는 호르몬이다. 포도당이 말초 조직에서 에너지원으로 사용될 수 있도록 한다. 이에 적절한 인슐린의 분비는 혈당 조절에 필수적이다.

② HOMA-IR

HOMA-IR(homeostasis model assessment for insulin resistance)은 인슐린 저항성에 대한 농도를 공복 혈당과 공복 인슐린 농도를 측정하여 계산한 값이다. 비교적 정확도가 높아 임상시 빈번하게 활용되고 있으며, 인슐린 저항성이 높으면 계산 수치가 증가한다.

③ 아디포넥틴

아디포넥틴은 지방세포에서 분비되며, 근육, 간, 혈관 등의 말초조직에서 인슐린 작용을 향상시키는데 관여한다. 간 내에서 당 신생 합성, 지방산 축적을 저해하고, 에너지 사용을 증가시켜, 혈당을 소비하도록 한다. 인슐린 감수성을 증가시키는데 효과적인 것으로 보고되고 있다.

④ GLP-1

GLP-1은 인크레틴 중 하나로, 장내 영양소와 혈당 농도에 자극을 받아 분비되는 호르몬이며, 인슐린 분비를 유도한다. 상부 소화기관의 운동 저하, 식욕 억제 등의 기능과 더불어 췌장 β -세포 증식에도 관여한다.

⑤ DPP-4

DPP-1은 GLP-1을 분해하여 활성을 감소시키는 역할을 하고 있으므로, DPP-4 억제제가 혈당 조절제로 사용되고 있다.

(다) 췌장 베타세포 기능

췌장 베타세포 기능은 췌장세포의 생활성(viability) 측정, 췌장 베타세포의 인슐린 분비 측정, 혈중 C-펩티드 수준 분석을 통해 판단할 수 있다.

① 세포생활성

췌장의 이자섬은 인슐린을 분비하는 세포들과 분비를 조절하는데 관여되는 장치들이 모여 있는 중요한 내분비기관이므로 세포의 생활성을 직접적으로 측정하여 생리기능을 판단할 수 있다. 세포 생활성은 세포증식검사와 세포사멸 검사로 진행할 수 있다.

② 공복 혈장 C-펩티드

인슐린은 췌장의 베타세포에서 prepro-insulin→pro-insulin으로 합성되며, 이는 다시 인슐린과 C-펩티드로 나뉘어진다. 혈중 C-펩티드는 혈액 속에서 반감기가 짧은 인슐린 대신 인슐린 분비능을 보는 지표로 활용할 수 있으며 제1형 당뇨 진단 시 의의가 있다.

③ 세포 및 조직 인슐린 함유도 및 합성능

췌장 베타세포에서 인슐린 함량정도와 합성능은 인슐린 분비능의 직접적인 연관이 있다. 이에 기능성 식품의 투여로 인한 베타세포의 기능을 측정하는 지표가 된다.

(라) 당 대사

① PEPCK

세포 내 포도당 부족 시에는 간 내 글리코겐 분해, 당 신생작용을 진행하게 되며, 피루베이트에서 포스포에놀 피루베이트(PEP) 전환 시 핵심 효소로 작용하면서 당 신생작용시 PEPCK의 발현이 증가된다.

② Glucose-6-phosphatase

세포 내 포도당 부족 시에는 간 내 글리코겐 분해, 당 신생작용을 진행하게 되며, 당 신생작용시 최종 포도당 합성 시 필요한 glucose-6-phosphatase 효소의 발현도가 증가하게 된다.

③ Glucokinase

에너지 사용을 위한 해당과정에서는 GK(glucokinase) 활성이 증가하고, 포도당을 피루베이트로 전환시키게 된다.

④ GLUT-4

해당과정에서는 근육 등의 말초조직으로 혈당 이동을 증가시키는 GLUT-4 발현이 증가하고, 세포 내로 당을 이동시켜 에너지로 사용하게 한다.

(마) 인슐린 신호전달체계

① IR

포도당 수송, 글리코겐 생합성, 세포분열 등 인슐린의 다양한 기능이 수행되려면, 인슐린은 세포 표면의 인슐린 수용체(IR)에 결합 후 세포내로의 다양한 신호전달과정을 필요로 한다. 세포막에서의 인슐린과 인슐린 수용체 결합 후 최종적으로 세포질에 존재하는 포도당 운반체를 세포막 근처로 이동시키고 세포내로 혈당 유입을 촉진하게 되므로 인슐린 수용체의 정상적인 기능은 혈당 조절에 필수적이다.

② PI3K

인슐린 신호전달체계에는 대표적으로 PI3K 신호전달경로가 있으며, PI3K(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)는 PTP-1B(protein-tyrosine phosphatase 1B)와 GSK3(glycogen synthase kinase 3) 등 하위의 신호전달물질에 신호를 전달하고, 혈액 내 포도당을 세포 내로 이동시키는 GLUT4의 발현에 영향을 미치게 된다.

③ PTP1B

PTP1B는 인슐린 신호전달체계 중 생체 내 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하고 있으나, 이상 작용 발현시 당뇨 발병에 영향을 미치게 된다. 당뇨 유발 쥐에서 PTP1B의 발현이 증가하고, 인슐린 민감도가 감소하게 되어 PTP1B 활성 저해는 혈당 조절에 도움을 준다.

④ GSK3

GSK3는 글리코겐 합성에 관여하는 신호전달 단백질로서 글리코겐 합성효소를 주된 타겟으로 하고 있으며, GSK3에 의해 글리코겐 합성효소가 인산화가 되면 세포내 글리코겐 합성이 저해된다. 이에 GSK3 발현 저해 시 세포내 당 대사 촉진에 도움을 준다.

2. 주요 바이오마커의 측정방법

가. 혈당수준

(1) 혈당

혈당의 측정은 oxalate와 fluoride가 들어있는 실험관에 채혈하여 혈장을 분리한 다음 혈당분석기(glucose analyser, 예, Backman glucose analyser)로 분석한다. 그러나 이 방법은 일상적이고 지속적으로 혈당을 측정하기 어렵기 때문에 시중에 상품화 되어 있는 다양한 종류의 capillary type의 휴대용 혈당측정기 (glucometer)를 이용하여 간편하고 신속하게 혈당을 측정할 수 있다. 다만 capillary type의 휴대용 혈당측정기로 측정한 혈당의 값은 혈류에서 즉시 얻은 sample을 측정하기 때문에 혈당측정기를 이용하여 측정한 값보다 다소 (약 7% 이내) 높을 수 있음을 감안 하여야 한다. 실험중인 동물모델에서는 다량의 혈액을 채취하기 어렵기 때문에 꼬리정맥에 작은 상처를 내어 정맥혈을 채혈하여 glucometer로 혈당을 측정한다. 실험에 많이 이용되는 설치류(rat, mouse)들은 낮에 먹이를 잘 섭취하지 않으므로 아침 일정한 시간에 먹이를 제거하고 4~5시간 경과 후 혈당을 측정한다.

(2) 내당능 검사(glucose tolerance test)

각 시간별 혈당농도를 그래프에서 선으로 나타내고 0~180분 사이에 나타나는 그래프의 면적(AUC, incremental area under the curve)을 비교하거나 최고 혈당 농도와 180분 후의 혈당농도로 판단한다.

· 경구당부하검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

사람의 경우 금식 후 75 g의 포도당을물에 녹여 5~15분 동안 마시게 한 후 30, 60, 90, 120분 후에 혈당농도를 측정한다.

(3) 당화혈색소(HbA1c)

당화혈색소 분석은 HPLC법, 전기영동법, boronic acid 컬럼법, TBA법, 면역측정법 등이 있으나, 보통 자동화기기에 의해 측정되고 있다(예, DCA 2000, Gothenburg, Sweden). 엄밀히 하면 HbA1c값이란 HPLC 법에서 측정한 결과를 지칭하는 간격 용어이며 DCA 2000으로 측정한 결과를 당화혈색소(glycated hemoglobin)값으로 부른다. HbA1c의 측정값은 %로 표시되며 DCCT (Diabetes Control and Complication Trial, Diabetes

Control and Complication Research group, 1993)과 UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study, 1998)을 표준으로 하는 것을 권장한다.

나. 혈당 조절 기전 지표

(1) 포도당 흡수

(가) GLUT-2 발현도 측정

세포를 이용하여 real time RT-PCR을 통해 유전자 발현도를 분석하거나, 동물조직에서의 유전자 발현과 단백질 정량을 실시한다.

① real time RT-PCR

세포를 6-well plate에 분주하여 후보물질을 함유한 배지에서 48시간 동안 배양한다. KRBB-HEPES 완충액으로 2회 세척하고 1시간 동안 KRBB-HEPES 완충액으로 배양한 후, 총 RNA를 추출한다. M-MLV 역전사 효소를 이용해서 5 ug의 RNA로부터 cDNA를 합성한다. cDNA를 합성 후, fluorometric thermal cycler를 이용해 증폭시킨다. 이후 $\Delta\Delta C_t$ 방법으로 상대적 정량을 한다.

② 단백질정량

후보소재 처리 24시간 후 lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0.5mM PMSF, 0.5mM DTT)를 가하여 4℃에서 30분 동안 sonication을 실시하여 시료를 얻는다. 시료는 SDS-PAGE를 이용하여 분리한 다음, polyvinylidene fluoride membrane으로 transfer 한다. Membrane에 특이적 1차 항체를 붙인 후 horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체를 붙인다. 항원-항체 결합은 chemiluminescence kits을 통해 확인한다.

(나) SGLT-1 발현도 측정

동물의 공장 점막세포를 긁어내어 10 mM HEPES/Tris buffer(pH 7.5)에 부유시킨 후 3,000 rpm에서 2분 동안 균질화 한다. 그 후 4℃에서 15분간 1,500 rpm에서 원심분리 한다. 상등액은 다시 45분간 30,000rpm에서 원심분리하고, pellet를 10 mM HEPES/Tris buffer에 재부유한 다음 단백질 농도를 측정한다. Glutaraldehyde를 넣고 1시간동안 37℃에서 코팅한 immune plate에 well 당 100 μ L의 점막세포 단백질을 넣고 시험물질과 함께 37℃에서 2시간동안 배양한다. Plate 세척 후 0.5% 카제인으로 blocking를 시킨 후, 1차

항체로 SGLT-1(1:1000)을 처리하고, 2차 항체로 anti-rabbit IgG(1:2000)를 처리하고, substrate solution을 넣고 15분간 반응시킨다. 그 후 1M H₂SO₄를 넣어 반응을 중지시키고, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

(다) α -glucosidase 활성 억제 측정

소장 α -glucosidase는 소장점막 미세융모막에 존재하는 효소로서 다당류의 탄수화물을 단당류로 분해하는 탄수화물의 소화에 필수적인 효소이다. Alpha-glucosidase 저해제로 알려진 아카보스(acarbose)는 인슐린과 같이 저혈당 활성을 갖는 것이 아니라, 소장내의 점막에서 다당류를 분해하는 α -glucosidase를 억제하여 소장 내에서 탄수화물의 소화 흡수율을 저하시킴으로써 식후혈당을 감소시킨다고 보고된다. 기능성식품 중 acarbose와 같은 α -glucosidase 활성억제 작용이 있는 것으로 판단되는 것들은 이 효소의 억제 정도를 측정하는 것으로 기능성을 판단한다. Alpha-glucosidase 활성억제 측정은 실험관 내에서 기질과의 반응역학분석(kinetic analysis)하는 방법과 소화관 내에서 sucrose의 분해흡수를 억제하는 것을 측정하는 OGTT로 검사하는 in-vivo 검사법을 이용한다.

① α -glucosidase (from *Bacillus stearothermophilus*) 활성억제 측정법

Alpha-glucosidase(EC 3.2.1.20) 50 units과 PIPES buffer(0.1M, pH 6.8) 1 mL을 enzyme bottle에 넣어 50 units/mL 용액을 만든 후 1/100 dilution하여 20 mL씩 반응에 사용한다. 합성 기질인 PNP-glycoside(p-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside) 2 mM을 PIPES buffer(0.1M, pH 6.8)에 첨가한 후 α -glucosidase 활성 억제 실험을 할 시료를 다양한 농도로 섞는다. 그 혼합액에 enzyme solution을 20 mL씩 첨가하여 0.01 unit/500 mL(total reaction volume) 농도가 되게 한다. 그리고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 0.64% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine solution(pH 10.7)을 1 mL을 첨가하여 반응을 종결시킨다. 분광광도계를 이용하여 기질인 PNP-glycoside로부터 유리되어 나오는 반응 생성물인 p-nitrophenol을 400 nm에서 측정하여 α -glucosidase 활성 억제를 확인한다.

② Kinetic analysis of α -glucosidase(from *Bacillus stearothermophilus*) inhibition:

Alpha-glucosidase 활성 억제 실험에서 효과가 있는 시료의 inhibition mode를 분석하기 위해 기질인 PNP-glycoside(0.125-2 mM)를 시료의 몇 가지 다른 농도에 대하여 각각 반응시킨다. 그 외에 조건들은 상기 서술한 assay 방법과 동일하게 수행하며 대조실험으로는 시료를 반응에 첨가하지 않고 효소와 기질만을 반응시킨다. 그리고 다양한 농도의 p-nitrophenol을 미리 측정하여 표준곡선을 그린 후, 각각의 다른 시료농도에 대하여 얻어진

흡광도수치를 표준곡선의 방정식에 대입하여 반응의 최종 산물인 p-nitrophenol의 양을 계산한다. 이러한 방법으로 산출된 값들은 $1/\text{PNP-G}(\text{mM})$ 을 X축으로, $1/V(\text{mM}/\text{min})$ 을 Y축으로 하여 Lineweaver-Burk plot으로 다시 작성하며 α -glucosidase에 대한 PNP-glycoside의 K_m 값을 구한다.

③ Intestinal disaccharidase inhibition assay:

Rat intestinal acetone powder 100 mg을 0.9% NaCl solution 3 mL에 첨가한 후 30초간 12회 얼음 위에서 sonication하고, 12000 rpm에서 30분 간 원심 분리한다. 상층 액만을 바로 assay에 사용하거나 -20°C 에 보관한다. Rat intestinal disaccharidase에 대한 substrate는 sucrose(40 mM), maltose(6 mM), isomaltose (4 mM)를 사용하고 PIPES buffer(0.1M, pH 6.8)에서 다양한 농도로 시료를 첨가하여 inhibition assay를 수행한다. 37°C 에서 20분간 반응시킨 후 Glucose-Trinder solution을 1 mL 넣고 다시 10분간 37°C 에서 반응시킨다. 끓는 물에 2분간 담가 두어 반응을 종결 시키고, 각각의 기질로부터 유리되어 나오는 glucose를 505 nm에서 측정한다.

(라) α -amylase

효소 활성 측정을 위해서는 전분의 점도변화에 의한 측정법을 사용한다. 먼저 1.0% 전분을 조제하여 시험관에 넣고 20°C 에 되도록 둔다. 그 후 α -amylase를 첨가하고, 정확히 3분간 20°C 에서 반응시킨다. 96 mM 3,5-Dinitrosalicylic acid solution를 첨가하여, 100°C 에서 15분간 가열하고 발색시킨다. 충분히 냉각한 후, 증류수를 가하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

(2) 혈당 조절 호르몬 및 단백질

(가) 인슐린

사람의 경우 정상 혈장 인슐린 농도는 75 g OGTT 실시 2시간 후 240 pmol/L (40 mU/L), 5시간 후 132 pmol/L(22 mU/L)이다. 금식 후 혈장인슐린 농도(fasting plasma insulin concentration)는 동맥혈과 정맥혈이 다르나, 정맥혈의 경우 13-39 mU/L를 정상 범위로 보고 있다. 측정을 위해서는 채혈혈액에서 혈장을 분리한 후 RIA kit 나 ELISA kit를 이용하여 분석한다. 분석방법은 kit 제조회사의 manual에 따른다. RIA 경우 $^{125}\text{-I}$ 가 표지된 human insulin(2,000 Ci/mmol, Amersham Corp, Arlington Height, IL)을 human serum albumin이 포함되어 있는 0.5M phosphate buffer에 희석시킨 후 100 μL 를 취하여 동량의 tracer와 함께 standard 또는 측정하고자 하는 혈청이 담긴 시험관에 섞는다. 여기에

200 μ L의 γ -globulin (1.6%/ 0.9% saline)과 1 mL의 polyethylene glycol (20% in 0.2M phosphate buffer)를 넣은 후 하루 동안 반응시키고 4℃에서 2,500 rpm/min으로 25분간 원심분리 시킨 다음 상층액을 버린 나머지 pallet을 γ -counter로 측정한다.

(나) HOMA-IR

HOMA-IR은 공복 혈당과 공복 인슐린 농도를 측정하여 계산한다.

$$\text{HOMA-IR} = \text{공복 인슐린 } (\mu\text{U/mL}) \times \text{공복 혈당}(\text{mg/dL}) / 405$$

(다) 아디포넥틴

아디포넥틴은 지방 세포 및 지방조직을 통한 단백질 정량으로 발현도를 측정할 수 있으며, 혈청 분석을 통한 serum assay가 가능하다.

① 단백질 정량

지방조직은 cold lysis buffer(50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% Triton X-100)를 이용하여 균질화 한다. 균질화 한 시료는 SDS gel에서 전기영동 한 후, polyvinylidene fluoride membrane으로 transfer 한다. 그 후에는 일반적인 웨스턴 블롯과 같은 방법으로 하며, 1차 항체(1:1000) 및 2차 항체(1:5000~1:10000) 사용한다. 최종 단백질 정량은 ECL를 통해 확인한다. 단백질 정량 결과, 발현이 증가 할수록 인슐린 감수성이 개선된 것으로 판단한다.

② 혈액 분석

혈액 분석시에는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하며, 제조사의 manual을 따르도록 한다.

(라) GLP-1

혈중 GLP-1의 측정은 ELISA kit 및 radioimmunoassay를 이용하도록 하며, 제조사의 manual을 따른다.

(마) DPP-4

DPP-4 활성 측정을 위해서는 상용 inhibitor screening kit를 사용하며, 기질과 효소 병행처리로 효소의 활성을 측정하게 된다. 프로토콜은 제조사의 manual을 따른다.

(3) 췌장 베타세포 기능

췌장의 랑게르한스섬은 인슐린을 분비하는 세포들과 이의 분비를 수행하거나 조절하는데 관여되는 여러 장치들이 모여 있는 중요한 내분비기관이다. 건강한 성인의 췌장에는 1백만 개 정도의 이자섬이 존재하나 부피로는 췌장 전체의 2% 정도이며 조직의 무게로는 약 1.5 g 정도밖에 되지 않는다. 실험동물로 많이 이용되는 흰쥐에는 약 5000개의 이자섬이 존재한다. 이자섬에는 인슐린을 분비하는 베타세포들이 중심부에 존재하는 반면 글루카곤을 분비하는 알파세포와 소마토스타틴을 분비하는 델타세포는 주변부에 존재한다. 정상 성인의 췌장에서 islet cell들의 구성비율을 보면 베타세포가 전체의 70~80%에 이르기 때문에 베타세포의 인슐린 합성과 분비 및 생존여부(viability)를 측정하는 것이 기능성식품에 의한 베타세포의 기능변화 여부를 설명해 줄 수 있는 지표로 이용될 수 있다. 또한 베타세포의 인슐린 분비기능은 베타세포에 포함된 인슐린 함량정도, 인슐린 mRNA발현정도 등을 측정하여 평가할 수 있다. 베타세포기능을 측정하기 위한 방법은 표 3와 같다.

표 3. 베타세포 기능 측정항목과 측정방법

	측정항목	측정방법
생활성 (viability)	세포증식검사	PCNA(proliferating cell nuclear antigen) 면역조직화학법 BrdU-incorporation 측정법
	세포사멸검사	TUNEL 검사법
인슐린 분비	인슐린함유 비교측정	Insulin 면역조직화학법 (세포)
	인슐린합성 비교측정	Insulin RNA 발현측정 insulin-in situ hybridization (세포) insulin northern blot 분석(조직)

(가) 췌장세포의 생활성(viability) 측정

① 세포사멸 측정(TUNEL Assay)

인슐린 분비세포의 사멸을 확인하기 위하여 TUNEL 분석을 하며, 이 과정은 In Situ Cell Detection Kit를 사용한다. 먼저 배양된 세포를 4% paraform-aldehyde로 실온에서 2시간 고정된 후 PBS를 이용하여 수세하고, 세포내 투과성을 높이기 위하여 protease로 37℃에서 30분간 반응시킨다. 이후 TUNEL 반응액을 첨가하고 37℃에서 60분간 반응시키고 PBS를 이용해 수세한다. 손상된 DNA에 결합된 dUTP를 검출하기 위하여 anti-POD로 37℃에서 30분간 반응시킨 후 DAB(diaminobezidine)를 이용하여 광학 현미경으로 관찰하며 발색한다.

② 세포증식 측정

베타세포 증식은 증식세포의 핵에서 나타나는 단백질인 PCNA 또는 Ki67에 대한 항체를 이용하여 면역염색을 실시한다. 면역염색법은 전술한 것과 같다.

(나) 혈중 C-펩티드 수준

측정을 위해서는 채혈혈액에서 혈장을 분리한 후 RIA kit 나 ELISA kit를 이용하여 분석한다. 분석방법은 kit 제조회사의 manual에 따른다.

(다) 췌장세포의 인슐린 분비능(함유도 및 합성능)

베타세포에 존재하는 insulin 또는 insulin합성의 표적자인 insulin-mRNA를 측정하는 것은 기능성식품의 투여로 인한 베타세포의 기능을 측정하는 좋은 지표가 될 수 있다. 조직 내 insulin peptide는 면역조직화학적 방법으로 분석하며 insulin mRNA는 in-situ hybridization 법 및 northern blot analysis로 측정할 수 있으나, 이는 절대값이 아닌 실험군간의 상대비교를 나타내는 것이다.

① Insulin 면역조직화학적 방법

실험동물을 희생시킨 동물에서는 혈액을 채취하고 췌장조직을 절취하여 무게를 측정하고 고정액에 담거나 액체질소에 보관한다. 고정액에 담긴 조직은 면역조직화학적 방법과 in-situ hybridization을 위하여 paraffin에 포매 후 조직절편을 작성한다. 조직절편에서 인슐린 세포와 glucagon 세포 등을 관찰하기 위하여 면역조직화학적 방법을 시행한다. 면역세포화학 기법은 avidin-biotin-peroxidase complex 법을 이용한다. 한편 필요에 따라 베타세포 내 인슐린분자의 위치를 추적하기 위하여 insulin immunogold labeling을 시행할 수 있다. 전자현미경적 면역세포화학법은 immunogold법을 이용한다.

- ABC 법:

모든 실험동물은 마취시킨 후 복강을 열고 췌장을 적출하여 Bouin액 고정시킨다. 면역세포화학법에 이용할 조직은 Bouin액을 사용하여 16시간 고정 후 탈수, 투명, 침투의 과정을 거친다. Paraffin에 포매된 조직은 4 μ m 두께로 절단하여 poly-L-lysine coated slide에 부착시킨다. 면역세포화학법은 avidin-biotin-peroxidase complex법에 의해 진행한다. 조직절편을 0.5% H₂O₂ 용액으로 30분간 반응시켜 조직 내에 존재하는 peroxidase를 제거하고 5% normal goat serum으로 처리한다. 일차항체는 mouse monoclonal anti-human insulin antibody (1:1000)를 이용하여 4℃에서 16시간 반응시킨다. 2차 항체로서 insulin의 경우 biotin이 표지된 horse anti-mouse IgG (1:400)로 60분간 실온에서 반응시킨다. 이어서 ABC(1:200)로 60분간 실온에서 처리

시키고, 3,3' diaminobenzidin tetrahydrochloride(DAB)로 발색시킨다. 모든 염색 과정에서 항상 정상대조군, 실험군, 당뇨군을 동시에 처리하여 염색정도를 같게 한다.

- Immunogold 표지법:

투과전 자현미경용 조직은 4℃에서 1-2 mm³ 크기로 절단하여 4% PFA 용액에 4℃에서 4시간 고정하고 다음의 두 가지 방법으로 포매 한다. 즉 일부조직은 고정이 끝난 후 0.1M phosphate buffer로 세척하고 탈수과정을 거쳐 Epon resin으로 포매하고, 나머지 조직은 4℃에서 탈수과정을 거쳐 Unicryl로 포매하고 -20℃에서 7일간 자외선으로 중합시킨다. 중합이 끝나면 조직을 ultramicrotome을 이용하여 70 nm 두께의 초박절편을 만들고 collodion 막을 입힌 nickel grid에 부착한다. 췌장 베타세포의 미세구조와 분비과립의 형태 및 인슐린농도 등을 관찰하기 위하여 protein A-gold complex를 이용한 immunogold 표지법을 시행한다. 조직의 비특이적인 반응을 제거하기 위하여 1% ovalbumin으로 실온에서 30분간 처리 후 guinea pig anti-insulin 항체(1:100)로 4℃에서 16시간 반응시키고, 0.01M PBS로 세척하고 10 nm gold 입자가 결합된 protein A 복합물로 50분간 반응시킨다. 조직상의 대조를 위하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색을 시행하고 투과전자현미경으로 관찰한다.

② In situ hybridization

In situ hybridization을 위한 조직은 4% PFA용액에 4℃에서 4시간 고정 후 0.1M phosphate buffer에 세척하고 면역세포화학법 염색용 조직처리와 같은 과정을 거쳐 작성된 박편을 silanized slide에 부착시킨다. In situ hybridization은 insulin mRNA에 대한 cDNA를 이용하여 DNA-RNA hybridization을 시행한다. 파라핀에 포매된 췌장조직을 proteinase K(10 µg/mL in 0.1M Tris buffered 0.05M EDTA pH 8.0)로 37℃에서 10분간 처리한 후 조직 내에 남아 있는 proteinase K를 제거하기 위하여 4℃에서 0.4% PFA로 20분간 처리한다. 이어서 37℃에서 2XSSC, 12.5XDenhart's, sodium pyrophosphate, 0.25% SDS, 5% Dextran sulfate로 구성된 hybridization용액으로 1시간 prehybridization 시킨 후 동일한 hybridization용액에 digoxigenin이 표지된 rat insulin probe(30base, oligodioxynucleotide)를 5~10 ng/cm² 되게 첨가하고 37℃에서 16시간 결합(hybridization)시킨다. hybridization이 끝난 후 37℃에서 4XSSC, 2XSSC, 1XSSC로 처리하고 증류수와 0.1M Tris buffer로 세척하여 post-hybridization을 시행한다. 이어서 digoxigenin의 비특이적 반응을 제거하기 위하여 1% bovine serum albumin이 포함된 0.1M Tris buffer 용액으로 처리하고 alkaline phosphate가 표지된 anti-digoxigenin 항체(1:500)로 실온에서 45분간 반응시킨다. 발색을 위하여 4-nitro blue tetrazoline chloride(NBT)와 X-phosphate (5-bromo-4-chloro- 3-indolyl-phosphate, BCIP)를

1 mL당 5 μ L, 3.65 μ L 씩 NBT/BCIP buffer에 첨가하여 37°C 암소에서 4시간 반응시킨다.

③ RNA분리 및 베타세포에 대한 Northern blot 분석

- Total RNA isolation

Total RNA 분리는 본 실험에 사용될 시료들에 solution D를 더하여 균질화 한 후, 15분 동안 완전히 용해시킨다. 이를 다시 각각 tube에 옮겨 2M sodium acetate/phenol/CIAA를 0.1/1/0.2의 volume으로 더하여 섞은 후 15분 동안 ice에 방치한 후, 원심 분리하여, 상층을 얻고 동량의 isopropanol을 더하여 -70°C에서 보관한다. 이를 다시 원심분리하고, 얻어진 pellet을 70% 에탄올로 세척한 후 건조시킨다. 분리된 RNA는 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 읽어 정량 한다.

- RNA 전기영동과 Northern blot

각 실험군의 췌장조직에서 분리한 RNA를 5% 이상의 agarose formaldehyde gel로 전기영동 한다. 췌장에서 분리한 total RNA를 10 μ g 이상의 농도로 하여 20×MOPS와 formaldehyde, formamide, DEPC water를 넣고 65°C에서 15분간 가열하여 loading한다. 이후에 20×SSC buffer를 transfer buffer로 nylon membrane으로 16시간 이상 transfer한다. Transfer가 끝난 후 membrane을 2×SSC로 수세하고 여과지에 말리고 prehybridization 용액으로 42°C에 약 2시간 정도 incubation한다. 이를 다시 Dig-labeling된 insulin probe가 적당량 첨가된 hybridization buffer로 교환한 후 역시 42°C에서 16시간 정도 hybridization한다. Hybridization 된 membrane은 2×SSC/0.5% SDS, 2×SSC/0.1% SDS, 0.1×SSC/0.5% SDS로 37°C에서 수세한 후 alkaline phosphatase가 표지된 anti-digoxigenin antibody를 실온에서 60분간 incubation한 후 NBT/BCIP로 발색한다.

(4) 당 대사

(가) PEPCK 및 G6Pase(glucose-6-phosphatase)

① RNA 발현 측정

총 RNA 발현도 측정은 real-time PCR을 이용하여 분석한다. 먼저 총 RNA를 추출하고, cDNA를 합성한다. 사용하는 프라이머는 통상 GeneBank의 gene sequences를 따라 디자인하도록 한다. cDNA를 합성 후, fluorometric thermal cyclers를 이용해 증폭시킨다. 이후 $\Delta\Delta C_t$ 방법으로 상대적 정량을 한다.

② 단백질 발현측정

동물 유래 간 조직에서의 PEPCK 및 glucose-6-phosphatase 발현 정도의 측정은 웨스턴 블롯 방법을 이용한다. 먼저 간 조직을 cold RIPA lysis buffer(50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 이용하여 용해시킨 후 4°C에서 14,000 g로 15분 동안 원심분리 한다. 상등액은 단백질을 분석하고, 50 μ g의 단백질을 SDS-PAGE에 전기영동 한다. 전기영동 후 PVDF membrane으로 transfer하여, PEPCK(1:900)과 G6Pase(1:500)에 대한 1차 항체를 인큐베이션 한다. 이후 2차 항체 반응 후 ECL chemiluminescence 로 단백질 발현을 측정하게 된다.

(나) glucokinase(GK)

Glucokinase 활성 측정을 위해서는 상용 screening kit를 사용하며, 기질과 효소 병행 처리로 효소의 활성을 측정하게 된다. 프로토콜은 제조사의 manual을 따른다.

(다) GLUT-4

세포를 이용하여 real time RT-PCR을 통해 유전자 발현도를 분석하거나, 동물조직에서의 유전자 발현과 단백질 정량을 실시한다. 방법은 전술한 바와 같다.

(5) 인슐린 신호전달체계

인슐린 신호전달체계에 관여하는 인슐린 수용체, PI3K, PTP-1B, GSK3는 모두 세포 배양 후 후보소재 및 인슐린 처리를 통해 단백질 정량을 준비하여 전술한 대로 시험한다. PTP-1B의 경우 유도 물질로 알려진 palmitate를 후보 소재와 함께 처리하여 확인할 수 있으며, PTP-1B의 발현도가 감소할수록 인슐린 감수성이 증가하여 결국 glucose uptake 또한 증가되었음으로 판단한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관 시험

(1) 시험계

Isolated islet 또는 primary beta cell 등 췌장 내분비세포를 사용한다.

(2) 바이오마커

세포의 기능(인슐린 분비) 또는 형태적 변화(cell viability), Thymidine uptake, 세포사멸 등을 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

나. 동물 시험

(1) 실험동물

1형 및 2형 당뇨병모델 또는 유전적 당뇨병모델을 사용한다.

- ① 1형 당뇨병 모델 : streptozotocin을 정맥 내에 투여하여 베타 세포 파괴
- ② 2형 당뇨병 모델 : 갓 태어난 흰쥐에 streptozotocin(35 mg/kg)을 처리하여 인슐린 분비반응은 나타나지 않고, glucagon과 somatostatin세포의 분비 장애를 유발
- ③ 유전적 당뇨병 모델
 - **db/db mouse** (제2형 당뇨병모델, 비만형)
4번 염색체에 leptin 수용체 유전자인 Lepr에서 point mutation시켜 신호전달 능력을 감소
 - **ob/ob mouse** (제2형 당뇨병모델, 비만형)
leptin의 대사이상을 일으켜 비만, 당뇨, 내당능, 혈중 인슐린 증가

- **Non-obese diabetic (NOD) mice** (제1형 당뇨병모델)
자가면역에 의한 인슐린 의존형 당뇨병 발현, 췌장 베타세포의 선택적 파괴를 의미하는 hypoinsulinemia 및 hyperglucagonemia를 보임
- **GK rat**
Wister계 쥐에서 경구당부하 시험으로 내당능 불량을 지표로 선택교배에 의해 확립된 계통(인슐린분비 부족)
- **Zucker fatty rat**
알비노 쥐 13C계와 흑색쥐 M계의 교잡종 13M계의 돌연변이로 발견된 비만 모델(내당능 이상)
- **OLETF 쥐**
당뇨와 내당능을 지표로 선택교배를 반복하여, 비만의 진행과 더불어 고인슐린 혈증을 동반하는 내당능 저하가 나타나며, 60주 후부터는 혈장 인슐린 분비가 저하되어 내당능이 더욱 악화
- **KK 마우스**
일본에서 애완용 동물로 사육되던 마우스를 근교배하여 당뇨병 발병
- **BB rat**
자연발증 인슐린의존형 당뇨병 모델동물로 Wistar rat에서 유래

(2) 시험설계

실험동물을 대상으로 식이에 혼합하여 시험물질을 공급하거나, 강제경구 투여할 수 있다.

※ 정맥투여, 복강투여 등의 투여 방법은 적합하지 않다.

(3) 바이오마커

혈당, 인슐린, 베타세포기능, glucose transporter, alpha-glucosidase 등 다양한 바이오마커를 측정할 수 있다.

(4) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

다. 인체적용시험

(1) 시험대상

(가) 시험대상자(예시)

혈당이 정상(공복혈당 100 mg/dL 미만, 식후혈당 140 mg/dL 미만)에서 당뇨 전단계(공복혈당 100~125 mg/dL, 식후혈당 140~199 mg/dL)에 속하며 약물을 복용하지 않는 자를 대상으로 한다.

* 공복혈당이 126~140 mg/dL 미만에 속하는 자가 일부(윤리적으로 허용되는 범위) 포함될 경우 약물을 복용하거나 약물 처방이 필요한 자는 반드시 제외되어야 함

(나) 대상자 제외기준(예시)

- 18세 이하의 미성년자, 65세 이상의 고령자
- 임신중인 여성
- 최근 3개월 이내 혈당강하제를 투여받은 경험이 있는 사람
- 갑상선 기능이 비정상인 사람
- 위장관 기능에 이상이 있는 사람
- 다른 질병으로 인하여 지속적인 치료 또는 투약을 받고 있는 사람
- 일주일 4번 이상의 지속적인 음주를 하는 사람
- 선천적으로 당분해 효소의 결핍이 있는 사람

(2) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(Randomized, Controlled Trial; RCT)를 기본으로 하며, 필요한 경우 교차시험(cross-over test)이 시도될 수 있으나 충분한 휴약(wash-out) 기간을 고려하여 설정한다.

※ 모든 인체적용시험의 기간은 12주 이상으로 한다. 이는 alpha-glucosidase 억제제와 같이 섭취 효과가 2시간 이내에 나타날 수 있는 기능성식품이라 하더라도 지속적 효과가 의심되는 경우 10주 이상의 시간이 요구되는 것으로 판단되기 때문이다.

(3) 바이오마커

인체적용실험에서는 혈당관련 바이오마커는 공복혈당, 내당능, 식후혈당, 당화혈색소 등을 측정할 수 있으며 인슐린 관련 바이오마커로는 혈장 인슐린, C-peptide 농도의 측정만이 가능하며, 베타세포내의 인슐린 분비나 합성 측정은 부적합하다.

(4) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

VI

참고문헌

1. 건강기능식품 기능성평가 교육프로그램 개발, 식품의약품안전청, 2008
2. 건강기능식품의 기능성시험가이드, 한국보건공정서연구회, 2004
3. 건강기능식품 기능성평가 가이드, 식품의약품안전처, 2012
4. 건강기능식품 기능성평가 해설서, 식품의약품안전청, 2008
5. 김미경 외, 건강기능식품, (주)교문사, 2010
6. Choudhury M., Qadri I., Rahman S.M., C/EBP β is AMP kinase sensitive and up-regulates PEPCCK in response to ER stress in hepatoma cells., Mol Cell Endocrinol. 331:102-108, 2011
7. Chuengsamarn S, Rattanamongkolgul S, Luechapudiporn R, Phisalaphong C, Jirawatnotai S. Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes. Diabetes Care. 35(11):2121-7, 2012
8. de Bem GF, Costa CA, Santos IB, Cristino Cordeiro VDS, de Carvalho LCRM, de Souza MAV, Soares RA, Sousa PJDC, Ognibene DT, Resende AC, de Moura RS. Antidiabetic effect of Euterpe oleracea Mart. (açai) extract and exercise training on high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats: A positive interaction. PLoS One. 13(6):e0199207, 2018
9. Ha do T, Trung TN, Hien TT, Dao TT, Yim N, Ngoc TM, Oh WK, Bae K., Selected compounds derived from Moutan Cortex stimulated glucose uptake and glycogen synthesis via AMPK activation in human HepG2 cells. J Ethnopharmacol. 131(2): 417-424, 2010
10. Ha do T, Tuan DT, Thu NB, Nhiem NX, Ngoc TM, Yim N, Bae K., Palbinone and triterpenes from Moutan Cortex (Paeonia suffruticosa, Paeoniaceae) stimulate glucose uptake and glycogen synthesis via activation of AMPK in insulin-resistant human HepG2 Cells. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19(19):5556-5559, 2009
11. Ida S, Murata K, Betou K, Kobayashi C, Ishihara Y, Imataka K, Uchida A, Monguchi K, Kaneko R, Fujiwara R, Takahashi H. Effect of trelagliptin on vascular endothelial functions and serum adiponectin level in patients with type 2 diabetes: a preliminary single-arm prospective pilot study. Cardiovasc Diabetol. 15(1):153, 2016
12. Ighodaro OM, Akinloye OA. Anti-diabetic potential of Sapium ellipticum

- (Hochst) Pax leaf extract in Streptozotocin(STZ)-induced diabetic Wistar rats. BMC Complement Altern Med. 17(1):525, 2017
13. Ito Y, Fukui M, Kanda M, Morishita K, Shoji Y, Kitao T, Hinoi E, Shirahase H. Therapeutic effects of the allosteric protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor KY-226 on experimental diabetes and obesity via enhancements in insulin and leptin signaling in mice. J Pharmacol Sci. 137(1):38-46, 2018
 14. Jiang G, Zhang BB., Glucagon and regulation of glucose metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab. 284(4):E671-E678, 2003
 15. Jové M, Planavila A, Sánchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vázquez-Carrera M., Palmitate induces tumor necrosis factor- α expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor- κ B activation. Endocrinology. 147(1):552-561, 2006
 16. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K., Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. J Clin Invest. 116(7):1784-1792, 2006
 17. Kim DH, Kim SJ, Yu KY, Jeong SI, Kim SY1. Anti-hyperglycemic effects and signaling mechanism of *Perilla frutescens* sprout extract. Nutr Res Pract. 12(1):20-28, 2018
 18. Lauralee Sherwood, 인체생리학, 라이프사이언스, 2011
 19. Liu CY, Huang CJ, Huang LH, Chen IJ, Chiu JP, Hsu CH. Effects of green tea extract on insulin resistance and glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes and lipid abnormalities: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial. PLoS One. 9(3):e91163, 2014
 20. Luna-Vital DA, Gonzalez de Mejia E. Anthocyanins from purple corn activate free fatty acid-receptor 1 and glucokinase enhancing in vitro insulin secretion and hepatic glucose uptake. PLoS One. 13(7):e0200449, 2018
 21. Müller U, Stübl F, Schwarzingen B, Sandner G, Iken M, Himmelsbach M, Schwarzingen C, Ollinger N, Stadlbauer V, Höglinger O, Kühne, Lanzerstorfer P, Weghuber J. In Vitro and In Vivo Inhibition of Intestinal Glucose Transport by Guava (*Psidium Guajava*) Extracts. Mol Nutr Food Res. 62(11): e1701012, 2018
 22. Nasirian F, Dadkhah M, Moradi-Kor N, Obeidavi Z. Effects of *Spirulina platensis* microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in diabetic rats. Diabetes Metab Syndr Obes. 11:375-380, 2018

23. Okamoto T, Kanemoto N, Ban T, Sudo T, Nagano K, Niki I., Establishment and characterization of a novel method for evaluating gluconeogenesis using hepatic cell lines, H4IIE and HepG2. Arch Biochem Biophys. 491(1-2):46-52, 2009
24. Oh J, Jo SH, Kim JS, Ha KS, Lee JY, Choi HY, Yu SY, Kwon YI, Kim YC. Selected tea and tea pomace extracts inhibit intestinal α -glucosidase activity in vitro and postprandial hyperglycemia in vivo. Int J Mol Sci. 16(4):8811-25, 2015
25. Oh SJ. Glucagon-like peptide-1 analogue and dipeptidyl peptidase-IV inhibitors. J Kor Endocr Soc. 21(6):437-447, 2006
26. Pamela C. Champe 등, 생화학, 도서출판 신일북스, 2009
27. Parvaneh L, Meshkani R, Bakhtiyari S, Mohammadtaghvaei N, Gorganifiruzjaee S, Taheripak G, Golestani A, Foruzandeh M, Larijani B, Taghikhani M., Palmitate and inflammatory state additively induce the expression of PTP1B in muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. 396(2):467-471, 2010
28. Rozenberg K, Rosenzweig T. Sarcopoterium spinosum extract improved insulin sensitivity in mice models of glucose intolerance and diabetes. PLoS One. 13(5):e0196736, 2018
29. Sharmin T, Rahman MS, Mohammadi H. Investigation of biological activities of the flowers of Lagerstroemia speciosa, the Jarul flower of Bangladesh. BMC Complement Altern Med. 8(1):231, 2018
30. Shikhman AR, Brinson DC, Valbracht J, Lotz MK., Transport in Human Articular Chondrocytes Cytokine Regulation of Facilitated Glucose. J Immunol. 167(12):7001-7008, 2001
31. Stuart Ira Fox, 생리학 10판, 라이프사이언스, 2008
32. Tang D, Liu L1, Ajiakber D, Ye J, Xu J, Xin X, Aisa HA. Anti-diabetic Effect of Punica granatum Flower Polyphenols Extract in Type 2 Diabetic Rats: Activation of Akt/GSK-3 β and Inhibition of IRE1 α -XBP1 Pathways. Front Endocrinol (Lausanne). 9:586, 2018
33. Yamamoto N, Kawabata K, Sawada K, Ueda M, Fukuda I, Kawasaki K, Murakami A, Ashida H., Cardamonin Stimulates Glucose Uptake through Translocation of Glucose Transporter-4 in L6 Myotubes. Phytother Res. 25(8):1218-1224, 2011
34. Yamamoto N, Ueda M, Kawabata K, Sato T, Kawasaki K, Hashimoto T, Ashida H., Artemisia princeps Extract Promoted Glucose Uptake in Cultured L6 Muscle Cells via Glucose Transporter 4 Translocation. Biosci Biotechnol Biochem.

74(10):2036-2042, 2010

35. Yeo CR, Lee SM, Popovich DG., Ginseng (*Panax quinquefolius*) Reduces Cell Growth, Lipid Acquisition and Increases Adiponectin Expression in 3T3-L1 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* p9, 2011
36. Yip SC, Saha S, Chernoff J., PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem Sci.* 35(8):442-449, 2010
37. Xia C, Goud A, D’Souza J, Dahagam C, Rao X, Rajagopalan S, Zhong J. DPP4 inhibitors and cardiovascular outcomes: safety on heart failure. *Heart Fail Rev.* 22(3):299-304, 2017

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서) - ‘혈당조절에 도움을 줄 수 있음’ 편 -

발 행 인 : 이동희

편 집 위 원 장 : 황인균

편 집 위 원 : 이해영, 권용관, 허수정, 서은채, 국주희, 김준영,
이미영, 오재명, 황경미, 방수진, 이요아, 정혜진,
김선후, 송진희

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2019년 6월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구팀

(043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430)

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘혈당조절에 도움을 줄 수 있음’ 편



【부패. 공익신고】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 국민신문고 > 부패.공익신고” 코너
- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고센터 > 부패.공익신고 상담” 코너