

GOVP1200611770

109/150

최 종  
연구보고서

202059-3

곤충유래 간(肝)기능 보호물질 탐색 및  
대량사육 모델 시스템 개발

Development of Hepatoprotective Materials from Insect  
and Construction of Mass Rearing System

연구 기관  
한국생명공학연구원

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “곤충유래 간(肝)기능 보호물질 탐색 및 대량사육 모델 시스템 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 10 월 14 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원  
총괄연구책임자 : 박 호 용(생명연)  
위탁연구책임자 : 정 규 식(경북대)  
연 구 원 : 정 태 숙(생명연)  
연 구 원 : 박 두 상(생명연)  
연 구 원 : 이 우 송(생명연)  
연 구 원 : 박 미 자(생명연)  
연 구 원 : 서 명 철(생명연)  
연 구 원 : 남 기 범(생명연)  
연 구 원 : 윤 미 애(생명연)  
참 여 기 업 : (주)인섹트바이오텍

# 요 약 문

## I. 제 목

곤충유래 간(肝)기능 보호물질 탐색 및 대량사육 모델시스템 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구의 배경

○ 1992년 리우선언 이후 생물다양성 협약이 체결되면서 세계 각국은 자국의 이익을 위해 환경생태계 보호 차원뿐만 아니라 생물자원의 무기화라는 국가 전략적 차원에서 보유 생물자원의 발굴, 가치평가 및 활용을 위한 노력이 점점 치열해지고 있다. 그 중 신규물질을 포함한 생리활성물질의 확보는 지적재산권 보유와 직결되므로 제약산업, 농업을 비롯한 관련 산업의 경쟁력에 미치는 영향이 대단히 큰 것으로 판단된다.

현존 지구상의 생물 중 가장 많은 종을 차지하고 있는 곤충은 뛰어난 환경적응력으로 인해 전세계 도처에 성공적으로 서식하고 있다. 수 년 전부터 선진국들을 중심으로 무한한 응용잠재력을 지니고 있는 곤충을 차세대 유용생물자원으로 활용하려는 노력이 산·학·연의 체계적 협동연구체제로 매우 활발히 수행되고 있다. 이와 같은 관점에서 상대적으로 좁은 국토면적과 빈약한 부존자원을 지니고 있는 우리나라의 경우 곤충으로부터 유용물질을 발굴하고, 이를 관련 산업에 활용하여 국가 경쟁력을 강화하려는 본 연구개발의 필요성은 여러 측면에서 매우 시급하고도 절실하게 요청되는 상황이다.

또한, 우리나라에서 현재 심각한 주요 성인병 질환으로 인식되고 있는 간(肝)질환, 고지혈증, 동맥경화, 암의 예방 또는 치료에 효과를 지닌 천연물 유래 기능성물질의 개발 수요가 증대되면서 곤충과 같은 새로운 소재를 활용할 경우, 이미 많은 연구가 이루어진 식물, 미생물 등에 비해 기존에 알려지지 않은 새로운 종류의 천연물질을 도출할 수 있는 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다. 본 연구진은 다양한 종류의 곤충자원으로부터 간기능 보호 및 고지혈증 예방, 치료용 생리활성물질을 탐색하였으며, 본 과제를 통해 생리활성물질의 분리 및 특성 연구 및 약효 검색

등 실용화를 위한 결과획득을 목표로 본 연구과제를 수행하였다. 또한 유용물질 생산이 확인된 곤충의 경우 대량 인공사육 체계를 구축하고, 이를 농가에 기술이전하는 방법으로 실질적인 농가소득 증대 및 실용화로의 연결을 시도하고자 하였다. 본 연구의 필요성을 여러 가지 측면에서 검토하면 다음과 같다.

#### 가. 기술적 측면

- 곤충의 풍부한 다양성에 근거한 곤충유래 생리활성물질 탐색, 분리 및 특성 분석을 통해 생물자원 유래 물질특허 및 신소재 관련 생명공학 원천기술 및 핵심기술을 보유할 수 있음.

- 유용 생체활성물질 대량생산을 위해선 물질특성 및 용도에 따라 유기합성, 재조합 미생물이용, 대상곤충의 대량사육을 통한 추출 등의 방법이 있으며, 특히 경제적인 대량사육체계 구축은 해당기술 개발 즉시 희망농가에 보급하여 산업화하는데 현실적이고 필수적인 기술임.

#### 나. 경제·산업적 측면

- 본 연구개발을 통해 국내토착 생물자원의 발굴, 가치평가 및 활용으로 국가보유 생물자원의 산업적 이용을 증대시키고, 신 산업군을 창출하여 국가경제에 기여함.

- 특히 유용물질 생산이 확인된 대상곤충의 대량사육시스템을 개발, 농가에 보급하고, 관련기업과 유기적으로 연계된 시스템을 구축, 운용함으로써 안정적이고 지속적인 농가소득 향상에 획기적으로 기여할 수 있음.

- 본 연구개발 기술의 보급이 정상적으로 이루어졌을 경우, 개략적으로 타 작목에 비해 수배 이상의 농가소득 증대가 예상되어, 국내 농촌경제 및 관련산업의 경쟁력 강화에 큰 도움을 줄 것으로 기대됨.

#### 다. 사회·문화적 측면

- 전통적으로 우리나라는 양봉, 양잠과 같은 농업곤충의 산업적 사육에 문화적으로 매우 친밀한 정서를 지니고 있으며, 최근 친환경적인 농업을 요구하는 국내·외 사회적 분위기에도 부합함.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 연구개발의 최종목표와 내용

국내토착 곤충자원으로부터 간(肝)기능 보호물질을 탐색·분리하고, 이를 이용한 식품 및 의약품료 소재를 개발하며, 산업화를 고려한 유용곤충의 대량생산 모델 시스템을 구축함과 동시에, 관련기업들과 유기적 연계를 통하여 안정적이고 지속적인 농가소득의 획기적 증대에 기여함.

#### 2. 단계별 연구개발 목표 및 내용

##### 가. 대상곤충자원 확보 및 곤충유래 간기능 보호 물질 탐색, 분리 및 특성분석

###### 1) 대상곤충자원의 확보

지금까지 생약자원이나 민간요법 등에서 식품의약 효능이 알려진 곤충 및 본 연구진에 의해 서식지와 행태 특성을 기준으로 선정된 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)등 약 5종의 곤충을 선정하고 확보함. 대상 곤충은 본 연구진이 보유 또는 사육 곤충이용, 야외현지 채집 및 분양을 통해 확보하였고, 계통보전은 기 구축된 시설 및 기술을 이용하여 연구개발의 전 과정에 활용함.

###### 2) 생체외(*in vitro*) 간섬유화모델 시스템 확보 및 활성물질 탐색

섬유화 조절 유전자인 TGF- $\beta$ 의 down stream인 3TP, SBE, RII 프로모터 유전자의 stable cell line 제조. 곤충시료 추출액으로부터 3TP, SBE, RII 프로모터 발현세포주를 활용한 TGF- $\beta$  단백질 발현조절 검색을 수행함.

###### 3) 곤충유래 간(肝) 기능 보호물질의 탐색, 분리, 특성분석

영양적 측면에서 건강증진 효과 뿐 만 아니라, 간질환(간경변 등) 예방, 치료용 기능성물질의 탐색은 건강식품원료, 생약원료, 식품첨가제로의 활용을 목적으로 1 종 이상의 활성물질 함유 시료를 선별함. 기 확보된 *in vitro* 활성검색 시스템을 이용하여 용매추출, column chromatography, HPLC 방법으로 활성물질을 분리·정제함.

## 나. 곤충유래 기능성물질의 생체효능 검정 및 유용곤충의 인공대량사육 시스템 개발

### 1) 생체효능 검증을 위한 활성분획의 대량분리 체계 확립

생체효능 검증을 위해서는 대량의 활성물질이 필요하므로 활성물질의 대량 생산 또는 활성분획의 대량 분리 방법을 확립함.

### 2) 곤충유래 간(肝) 기능 보호물질의 생체효능 검정

급성 간염유화 모델시스템을 중심으로 사염화탄소/LPS/알코올/sodium cholate/DEN으로 유도한 간염유화 모델동물에서 생체 효능 검정 및 간 보호 및 섬유화 억제 기전 연구를 통한 선도물질을 도출하고 *in vitro*와 *in vivo* 결과를 비교 분석함.

이후 생체내(*in vivo*) 효능 검정시스템을 위주로 후속 연구를 진행함.

### 3) 유용곤충의 인공대량사육 시스템 개발

효능이 탁월한 간(肝) 기능 보호물질을 함유하고 있는 것으로 확인된 유용곤충의 대량사육을 통하여 산업화를 고려한 경제적 대량생산 시스템 구축의 핵심기술을 확보함. 대상곤충의 생리적 또는 생태적 특성과약, 휴면타파, 인공사료 및 대체사료의 개발, 적합한 사육환경조건 결정, 높은 밀도의 집단사육에 따르는 병리학적, 미생물적 모니터링 기준을 구축함.

## 다. 곤충유래 간(肝)기능 보호물질의 산업화기술 개발 및 유용곤충 대량사육 모델시스템 구축

### 1) 곤충유래 간(肝) 기능 보호물질의 산업화기술 개발

탐색, 분리, 특성분석 및 관련 간질환에 대해 생체활성이 우수한 것으로 효능이 평가된 곤충유래 기능성물질을 식품의약 등의 원료로 활용하기 위한 효능 및 독성, 안전성 검정 등 각종 요구사항을 충족시키는 자료를 확보함. 또한 이들 물질을 간경변, 암 등의 질환에 효과적인 식품 및 의약품원료로 산업화하기 위한 시제품을 개발함. 이와 관련하여 관련물질, 제형 및 용도에 대한 특허를 국내외에 출원, 등록하여 지적재산권을 확보함.

### 2) 유용곤충 대량사육 모델시스템 구축

간경변, 동맥경화, 고지혈증 등에 효능을 나타내는 기능성물질이 확인된 곤충을 본 연구진의 기술지도를 받은 농가에서 대량사육함으로써 관련 물질의 산업화를 위한 안정적이고 경제적인 원료수급 물량을 확보함. 또한 개발한 대량생산 시스템을 희망농가에 보급하고 안정적이고 지속적인 수요공급계약을 장기적으로 체결하여, 관련 기업과 농가 모두에게 경제적 수익을 도모하는 기술 및 공정연계를 통하여 새로운 형태의 고수익 농업 창출을 실현함.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발 결과

#### 가. 대상곤충자원의 확보, 곤충유래 기능성물질의 탐색, 분리 및 특성분석

##### 1) 대상곤충자원의 확보 및 기능성물질의 탐색, 분리 및 특성분석

가) 인공사육, 야외 채집 등의 방법에 의해 흰점박이꽃무지, 장수풍뎅이, 잣나무넓적잎벌 등 생약자원이나 민간요법 등에 의해 식품의약 효능이 알려진 곤충자원을 확보하였다.

나) 확보된 곤충자원을 대상으로 하여 간손상, 동맥경화, 고지혈증 등 성인병 예방, 치료용 기능성물질 탐색을 실시하였다. 그 결과 흰점박이꽃무지로부터 우수한 간보호 효과를 볼 수 있었으며, 사염화탄소를 투여한 Wistar rat 모델에서 급성 간독성에 대한 치료효과를 조사하는 방법으로서 column chromatography와 ultra-filtration system 등을 이용하여 우수한 간보호활성을 보이는 분획을 분리하였다. 분리된 물질은 ultrafiltration에 의해 분자량 1000 Da 이하로 나타나는 수용성 물질로서 Ninhydrin 반응에 음성으로 나타나며 250 nm에서 UV 흡수를 나타내었다. 그 외에 ACAT (Acyl-CoA cholesterol acyltransferase), Lp-PLA<sub>2</sub> (Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub>) 등의 시스템을 이용하여 흰점박이꽃무지, 잣나무넓적잎벌, 갈색거저리 등으로부터 1종의 신규 ACAT 저해제 Acantol을 포함하는 5종의 compound를 분리하고 특성을 규명하였다.

다) 생체외(in vitro) 간섬유화 모델 확보 및 활성물질 탐색  
섬유화 조절인자인 TGF- $\beta$ 의 down stream인 3TP, SBE, RII 프로모터 유전자 stable cell을 확보하고 이를 이용하여 곤충시료 추출물로부터 상기 프로모터 발현세포주를 활용한 TGF- $\beta$  단백질 발현조절 검정을 수행하였다.

##### 2) 곤충유래 기능성물질의 생체효능검정 및 작용기작 규명

###### 가) 곤충유래 기능성물질의 생체효능 검정

흰점박이꽃무지 유충으로부터 분리된 간보호 활성물질은 간섬유화 인자인 TGF- $\beta$  처리에 의해 발현 유도되는 SMAD Binding Element 활성의 저해기작과는 다른 과정에 의해 활성을 나타내는 것으로 보인다. 사염화탄소 처리에 의한 간손상 보호효과를 100 mg/kg의 농도에서 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 간손상에 의해 증가되는 혈액 내 GPT 및 GOT 수치의 감소효과를

타나내었다. 또한 SD 랫드를 이용한 독성시험에서 1250-5000 mg/kg의 dose에서 부작용을 보이지 않는 안전한 물질로 판명되었다. 알코올로 유도한 간병변에 대한 효능시험에서 50 mg/kg과 100 mg/kg의 용량으로 투여시 4주간의 alcohol diet만을 투여한 부형제대조군에 비해 소엽중심성의 지방변화가농도 의존적으로 억제된 것을 볼수 있었으며 혈청중의 간손상 지표에 대한 분석에 있어서도 GOT 및 GPT가 통계학적으로 유의성 있게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

### 3) 곤충유래 기능성물질의 산업화기술 개발 및 유용곤충 농가대량사육체계 구축

#### 가) 곤충유래 기능성물질의 산업화기술 개발

흰점박이꽃무지의 유충으로부터 산업적으로 응용 가능한 수용성 물질의 추출과 동결건조 후 용매 불용성 분획의 확보 및 ultrafiltration system을 이용한 추출물의 대량 제조기술을 확보함으로써 대량생산이 가능케 하였다. Ultrafiltration system을 이용한 활성분획의 대량추출 과정에서 가장 문제가 되었던 filter의 막힘을 줄이기 위하여 1차 수용성 추출물의 동결건조 후 alcohol 가용성 분획을 제거하는 과정을 통해 filtration의 효율을 극대화 할 수 있었으며, 이 방법에 따라 연구실에서 실시된 분리과정에 비해 100배 이상의 scale up이 가능하였으며, 동결건조 된 흰점박이꽃무지 유충 1 kg당 약 40 g 이상의 간보호 활성물질을 분리할 수 있었다.

#### 나) 유용곤충의 인공사육체계 구축 및 농가대량사육

*In vivo* 실험을 통하여 우수한 간보호 활성을 나타내는 흰점박이꽃무지의 인공대량사육을 실시하였다. 대량사육을 위한 인공사료 개발을 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 방법을 이용하여 톱밥과 쌀겨의 발효에 유용한 미생물을 동정하였다. 그 결과 톱밥과 쌀겨를 2:1의 비율로 하여 *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Bacillus smithii* 등 유용성이 확인된 각 미생물을 발효보조제로 첨가한 발효과정을 통하여 우수한 흰점박이꽃무지 유충의 성장 및 생존율을 나타내는 발효사료를 개발방법을 확보하였다. 또한 이를 기초로 하여 대전 인근의 농가에서 연구원과 농협, 농가가 함께 참여하는 대량의 발효사료 제조와 발효사료를 이용한 흰점박이꽃무지 유충의 대량사육을 실시함으로써 실제적인 농가기술이전을 완수하였다.

## 2. 연구개발결과의 활용에 대한 건의

본 연구의 결과를 통하여 확보한 흰점박이꽃무지 유래의 간보호 활성물질은 추가적인 연구를 통하여 기업체로의 기술이전 및 산업화와 더불어 농가소득 증대 및 유용곤충에 대한 신 산업군 창출이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 이 물질을 건강보조제 또는 식품의약제로 개발하는



과정에서 국가적으로 요구되는 안정성을 확보하기 위해서 동물실험을 포함하는 많은 종류의 검정 실험이 요구되고 있으며 그 과정에 많은 연구비가 추가로 요구된다. 또한 곤충을 대량사육하고자 하는 농가와와 꾸준한 교류와 더불어 인공사료를 위한 발효첨가제의 안정적 공급방안과 추가적으로 발생할 수 있는 병리적, 안정적 사육에 대한 보조가 필요하며 이러한 부분들에 대한 지속적인 연구지원 방안의 확보가 필요한 것으로 판단된다.

# SUMMARY

## I. TITLE

Development of hepatoprotective materials from insect and construction of mass rearing system

## II. PURPOSE OF THE RESEARCH

Insects constitutes the largest group of extant organism, and perhaps their individual number account for as 80% of all known fauna and are important components of the natural ecosystem. Therefore, they are suggested to bo a useful sources of bioactive materials. At this research we tried to screen some hepatoprotective materials from various insect resources. For this purpose, we tested *in vitro* hepatic fibrosis model system, acute hepatic fibrosis system using CCl<sub>4</sub> induced hepatic damage in rat, and several enzyme inhibitors engaged in fatty liver formation. We also tried to construct mass rearing system of useful insect for sources of useful materials and for support the increasement of incomes of rural community by transfer the useful insect mass rearing technique.

## III. RESULTS AND SCOPE OF THE RESEARCH

### 1. Isolation and characterization of hepatoprotective materials from insect.

For the purpose of isolate hepatoprotective materials from insect, several insect extracts were tested under *in vitro* and *in vivo* hepatic fibrosis model system followed by solvent extraction, liquid chromatography, and ultrafiltration. Hydrophilic low molecular weight materials were isolated from the larvae of *Protaetia brevitarsis* which showed protective effect on CCl<sub>4</sub> induced hepatic damaged rat. It found to cause significant decrease in the blood GPT and GOT value which increased by hepatic damage on 100 mg/kg dose however, no side effect were monitored by single administration of the sample on the dose of 1250-5000 mg/kg. It also showed protective effect by dose dependent manner compared control animals which administrated only alcohol diet through the tested 4 weeks by histopathological observation and GPT and GOT values in the blood.

## 2. Isolation and characterization of fatty liver formation inhibitors.

Three kinds of acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACAT) and a Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) inhibitors were isolated from the solvent extract of *A. parki*, *P. brevitarsis*, and *T. molitor*. They are identified as E-3-(4-hydroxyphenyl)propen-1-ol, Acantol, dioctyl phthalate (new), and 9,12 octadecadienoic acid by spectroscopic data analysis and compared with literatures.

## 3. Establishment of mass production system for the hepatoprotective material from the larvae of *P. brevitarsis*.

Mass production process of the hepatoprotective material from the larvae of *P. brevitarsis* was established through water extraction of the dried larvae, lyophilization, and ultrafiltration system. At this process we overcome the major problem by elimination of alcohol soluble fractions of water extract first which plugged the filter and achieved optimization of the process. By this, it was possible that scaled up more than hundred fold compared to laboratory scale. We could get 40 g of final product per a kilogram of dried *P. brevitarsis* larvae.

## 4. Construction of mass rearing system of useful insect.

A rearing system for *P. brevitarsis* larvae has been developed using fermented sawdust and rice bran. To enhance the efficiency of fermentation, microbes related to fermenting process were surveyed using PCR amplification, DGGE, and partial 16S rDNA sequence analysis through the fermentation process which was added the naturally composting sawdust as source of microbe. Again, fermentation was done using microbes as fermentation additives which proposed acting important roles through fermentation, speculated from the information of DGGE profile, such as *Bacillus* sp., *Geobacillus* sp., *Streptomyces* sp. and *Rhanelia* sp. Usefulness of them as diet for larvae was tested and so that stable supply of fermentation diet was possible. Mixing ratio of 2:1 for sawdust and rice bran turned out to be appropriate. When we compare fermentation product with matured rice-straw which is a major diet for larvae of *P. brevitarsis*, average weight of larva was increased by 1.6g and 2.5g as a result of 4-week rearing, and viability of larva was 90% and 92% respectively, which showed the possibility as superior diet. We also get a similar result through production of fermented diet and mass rearing the insect in the field.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	<b>13</b>
<b>Chapter 2. State of the Art Report</b> .....	<b>17</b>
<b>Chapter 3. Contents and Results of Research</b> .....	<b>18</b>
1. Methods of research .....	18
1) Insects	
2) Isolation and characterization of of hepatoprotective materials	
3) Functional analysis of hepatoprotective material isolated from insect	
4) Development of mass rearing system for useful insect	
2. Results .....	32
1) Isolation and characterization of hepatoprotective materials from insect resources	
(1) Screening of hepatoprotective materials from insect resources	
(2) Isolation of hepatoprotective materials from <i>P. brevitarsis</i> and development of mass production technique	
(3) Functional analysis of hepatoprotective material isolated from <i>P. brevitarsis</i>	
(4) Isolation and characterization of fatty liver formation inhibitors from insects	
2) Development of mass rearing system for <i>P. brevitarsis</i> .....	69
(1) Development of artificial diet for <i>P. brevitarsis</i>	
(2) Pathological monitoring of <i>P. brevitarsis</i>	
(3) Rearing of <i>P. brevitarsis</i> in the rearing room	
(4) Mass rearing of <i>P. brevitarsis</i> in the field	
<b>Chapter 4. Accomplishment and contribution</b> .....	<b>81</b>
<b>Chapter 5. Prospects for application</b> .....	<b>83</b>
<b>Chapter 6. References</b> .....	<b>85</b>

# 목 차

제 1장	연구개발 과제의 개요 .....	13
제 2장	국내외 기술개발 현황 .....	17
제 3장	연구개발 수행 내용 및 결과 .....	18
1.	연구수행 방법 .....	18
	가. 곤충유래 간기능 보호물질 탐색, 분리 및 특성규명 .....	18
	1) 유용곤충자원의 확보 .....	18
	2) 곤충유래 간기능 보호물질의 탐색, 분리 및 특성규명 .....	18
	3) 곤충유래 간기능보호물질의 생체효능 검정 .....	24
	4) 유용곤충의 인공대량사육 모델시스템 개발 .....	28
2.	연구수행 결과 .....	32
	가. 곤충유래 간기능 보호물질의 탐색, 분리 및 특성규명 .....	32
	1) 곤충유래 간기능 보호물질의 탐색 .....	32
	2) 흰점박이꽃무지로부터 간기능보호물질의 분리 및 산업화 기술개발 .....	38
	3) 곤충유래 간기능 보호물질의 생체효능 검정 .....	48
	4) 곤충유래 지방간 형성 억제물질의 분리 및 특성규명 .....	60
	나. 유용곤충의 인공대량사육 시스템 개발 .....	69
	1) 흰점박이꽃무지 대량사육용 인공사료 개발 .....	69
	2) 흰점박이꽃무지 사육과정의 병리적 모니터링 .....	74
	3) 흰점박이꽃무지의 실내인공사육 .....	76
	4) 흰점박이꽃무지의 야외 대량인공사육 .....	78
제 4장	목표달성도 및 관련분야에서의 기여도 .....	81
제 5장	연구개발결과의 활용계획 .....	83
제 6장	연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보 .....	84
제 7장	참고문헌 .....	85

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

최근 지구환경생태계 보전 차원의 생물학적 다양성 보전을 위한 세계적인 움직임과 함께, 유전자원의 확보 및 생물소재 개발이라는 산업적, 경제적 측면에서 유용생물자원의 확보를 위한 국가간의 자원확보 경쟁이 치열해지고 있다. 현존하는 지구상의 생물 중 가장 많은 종을 차지하고 있는 곤충은 지구 생태계의 선점자로서 전 세계의 다양한 환경조건에서 번성하고 있다.

곤충이 고생대 때부터 지금까지 타 생물들에 비해 압도적으로 번성할 수 있었던 이유는 수분손실이 적고 단단하고 가벼운 몸 구조를 가지고 있어 활동에너지 효율이 높을 뿐만 아니라 유충과 성충간 섭식요구 먹이가 달라 서로 경쟁이 없고 휴면, 변태 등을 통해 저온, 고온, 건조 등의 외부환경 및 물리적 장애나 외부침입 병원체에 대해 강한 자체방어능력을 보유하고 있기 때문이다.

곤충의 이러한 특성을 이용하여 신 기능 생물소재나 생체활성물질을 탐색 개발하는 연구가 활발히 진행되어 왔으며 곤충이용 기술 및 산업은 오래전부터 인간이 널리 이용해 온 꿀벌이나 누에 등 식품이나 섬유소재, 환경오염 지표생물용 등의 분야에서 이용되고 있다. 최근에는 생명공학기술의 발달과 함께 초과리를 이용한 분자생물학적 연구의 유전자 소재와 거미줄을 이용한 항공우주복 섬유개발, 생체접착제, 인공피부, 화장품용 천연색소, 반딧불 유전자이용 생체발광시스템 개발 등에 이용되고 있다. 특히 곤충유래생체활성물질을 이용한 순환기 질환치료제와 항생제, 소염제, 면역기능조절제, 항암제 개발을 위한 연구가 시도되고 있다.

만성간질환은 국내에서 성인병 및 사망의 중요한 원인으로서 한국보건사회연구원의 '2001년 국민건강·영양조사'에 의하면 우리나라 인구의 사망원인 구조의 4위로서 전체 사망자의 8%가 간질환에 의한 것으로 조사되었다. 간은 완충능력이 큰 기관으로 질환의 초기단계에 자각증상이 없어 질병이 상당히 진전된 상태에 발견되는 경우가 많을 뿐 아니라 효과적인 치료제 및 진단방법이 부족한 실정이다. 간 질환의 원인으로는 알코올, 약물, 화학약품, 바이러스성 간염, 담도질환과 같은 대사성질환, 자가면역성 질환 등이 있으나 그 원인을 알 수 없는 경우도 많다. 또한 간은 인체에서 혈액의 저장과 순환, 혈액양 조절과 방어해독작용의 중추로서 최근 산업화에 따른 유해물질의 증가에 노출되는 기회가 증가되면서 끊임없는 해독작용에 시달리고 있으며 특히 정신적 스트레스의 증가와 과음, 흡연 등의 원인에 의해 간손상을 증가시킴으로서 면역체계의 이상의 초래와 더불어 다른 질병의 원인이 되는 경우가 늘어나고 있다.

대부분의 만성간질환에 있어서 질환의 예후에 중대한 영향을 미치는 여러 합병증과 간암 등이 일단 간섬유화 (hepatic fibrosis)와 간경변으로 진행된 이후에 발생하는 경우가 대부분이므로 간섬유화의 과정에 대한 이해와 간섬유화의 진전을 억제하는 치료제의 개발이 필요한 실정이다. 현재 임상에서 사용되고 있는 간질환 조절약으로는 1970년대 독일 Madaus사에서 서양에서 전통적으로

간질환에 사용되었다고 알려진 마리아영경귀 (Silybum marianum)으로부터 분리한 Silymarin, 미국 Park Davis사의 Ara-AMP, 이탈리아 Selvi사의 Carbaica등과 1980년대 중국 중약연구소에 한 방에서 강장제로 사용되어온 오미자(Schizandrae fructus)로부터 분리된 Schizandrin C의 합성동족체인 DDB등이 사용되고 있으나 부작용이나 치료효과가 떨어지는 등의 문제점을 보이고 있다. 따라서 보다 경제적이고 안전한 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 우리나라에는 오래전부터 간 질환에 대한 민간요법이 많이 사용되고 있으나 그 약효에 대한 과학적인 분석과 약효성분의 동정 및 부작용들에 대한 연구가 부족한 실정으로서 비교적 만성 간 질환자가 많은 현실에 비추어 볼 때 이 분야에 대한 연구에 의해 경쟁력 있는 후보물질의 개발이 가능할 것으로 사료된다. 최근 간 섬유화 및 경화와 관련된 분자적 기전이 자세하게 연구되면서 세포, cytokine 및 extracellular matrix(ECM)간의 복잡한 상호작용에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. 손상을 받은 간세포는 kupffer 세포에 의해 phagocytosis되고 이로서 활성화된 kupffer 세포는 각종 cytokine을 분비하여 간성상세포를 활성화 시킨다는 것이 일반적인 기전으로서 손상된 간세포가 직접적으로 간성상세포를 활성화 시킨다는 autocrine 작용에 대한 보고도 있다. 즉 여러 가지 원인에 의해 간세포가 손상을 받아 세포사멸 (apoptosis)가 일어나면 TGF- $\beta$ 1이 발현되고 이로 인해 간성상세포가 활성화 되며, 활성화된 간성상세포에 의해 TGF- $\beta$ 1이 다시 발현되어 간세포의 사멸이 더욱 유발되는 악순환이 진행될 수 있다.

TGF- $\beta$ 1은 25 kDa의 dimer로서 불활성의 전구체로 합성되어지며 여러 가지 자극에 의해 활성화된다. 활성화된 TGF- $\beta$ 가 세포안으로 정보를 전달하기 위한 수용체로는 T $\beta$ R-I 과 T $\beta$ R-II인 두 종류가 있으며 이는 서로 비슷한 구조를 가지고 있는데 짧은 세포밖영역, 한개의 세포관통영역, 세린/트레오닌키나아제를 가진 세포 안 영역으로 되어있다. T $\beta$ R-II는 항상 활성화되어 있으며, TGF- $\beta$ 가 결합하게 되면 T $\beta$ R-II에 의해 T $\beta$ R-I의 키나아제 영역에 작용을 미치는 GS영역이라는 특이한 구조가 인산화 되고 T $\beta$ R-I의 세린/트레오닌키나아제가 활성화되어 세포 안으로 정보 전달이 일어난다. 활성화된 T $\beta$ R-I는 Smad를 개재하여 세포 안으로 정보를 전달한다. Smad는 포유류에서는 8종류(Smad 1-8)가 있는데 R-Smad, Co-Smad, I-Smad의 3종류로 크게 분류된다. R-Smad(receptor-regulated Smad)는 T $\beta$ R-I에 직접 결합하여 인산화가 되며 TGF- $\beta$ 의 정보를 전하는 R-Smad는 Smad2와 Smad3의 두 가지가 있다 Co-Smad(common mediator Smad)는 포유류에서는 Smad4만이며, TGF- $\beta$ 의 정보전달경로와 공유하여 R-Smad와 복합체를 형성한다. I-Smad(inhibitory Smad)는 Smad6과 Smad7이 포유류에 존재하며 R-Smad, Co-Smad의 정보전달을 억제한다. Smad는 세포질 안에 부유하여 존재하는 것은 아니다. R-Smad인 Smad2와 Smad3은 SARA(Smad anchor for receptor activation)라 하는 세포막결합단백질에 결합하여 세포막 근처에 존재하며 수용체에 의해 활성화되기 쉬운 상태로 존재한다. R-Smad인 Smad2와 Smad3이 인산화 되면 Co-Smad인 Smad4와 복합체를 형성하게 된다. 이는 핵 안으로 이동하여 전사인자로서 작용을 하게된다. TGF- $\beta$ 는 세포의 증식 조절에 있어 대표적인 억제인자로서 상피세포, 혈관내피세포

포, 혈구세포, 임파구 등에 대해서 강한 증식억제 효과를 나타낸다. 암의 50%는 상피세포에서 유래하는데 소화관 상피세포는 분열 후 TGF- $\beta$ 의 작용으로 세포주기를 정지시키는 정보가 전달되어 과도하게 증식되지 않도록 조절되고 있다. 그러므로 TGF- $\beta$  수용체나 정보전달기구에 이상이 생겨 TGF- $\beta$ 에 불응하게 됨으로써 세포 증식이 과도하게 일어나는 것이 암화과정의 한가지 원인이 되는 것이다. 이렇듯 TGF- $\beta$ 는 암으로 되는 억제인자인 동시에 세포밖 기질의 생산촉진작용을 하는데 TGF- $\beta$ 를 첨가하면 세포에서 fibronectin이나 콜라겐등의 기질단백질 생산이 항진된다. 또한 PAI-1(plasminogen activater inhibition-1)등의 기질을 분해하는 효소의 억제 단백질도 TGF- $\beta$ 에 의해 조절되므로 결국 전체 기질이 뚜렷하게 축적된다. 기질 생산항진의 결과는 암화되는 좋은 모지를 만드는 계기가 되므로 TGF- $\beta$ 는 섬유화에 의한 간접적인 발암 촉진인자도 될 수 있다. 실제 간과 폐의 섬유화 진행과정에서 TGF- $\beta$ 의 생산항진이 인정되고 있다.

아직까지 우리나라의 만성간질환은 대부분 음주나 간염바이러스에 의한 것으로 외국과 비교하여 볼 때 상대적으로 대사증후군에 의한 NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease)가 큰 문제가 되지 않았던 측면이 있다. 간은 정상적으로 위장관을 통해 흡수되어 운반된 지질의 대사가 주로 이루어지는 곳으로 여러 가지 원인에 의해 간무게의 5% 이상의 과도한 지방축적이 일어날 수 있다. NAFLD는 간내 과도한 지방축적을 특징으로 하며 대부분 증상이 없고 임상적 경과가 비교적 경미하여 큰 관심을 끌지 않았으나 최근 서구 여러나라에서 비만이 국가적인 보건문제로 대두되면서 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 우리나라에서도 사회경제적 발전과 생활양식이 서구화되면서 비만과 대사증후군 환자가 증가하고 있고 이로 인한 간질환에 대한 비율이 높아지고 있는 실정이다. 이에 따라 간질환 뿐만 아니라 뇌졸중, 고혈압 등과같은 심혈관계 질환과 관련된 지질 대사조절물질에 대한 관심이 증가하고 있다. 이와 관련된 치료제의 개발을 위해서 이러한 일련의 발병과정에서 중요한 역할을 담당하는 효소의 활성을 조절하는 방법에 의한 치료 방법들이 제시되고 있으며 그 중 Acyl-CoA : Cholesterol acyltransferase (ACAT), Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) inhibitor의 탐색, Low Density Lipoprotein (LDL) antioxidant의 탐색이 유용하게 이용되고 있다. ACAT은 free cholesterol로부터 cholesteryl ester (CE)를 합성하는데 필요한 효소로서 cellular free sterol의 농도를 조절한다. ACAT는 2 개의 isozyme이 존재하며, ACAT1은 분자량 약 50 kDa으로 간의 Kupffer 세포, 소장의 용모세포 이외(non-mucosal cell) 부분, 신장세포, 부신수질세포 등에 광범위하게 존재하고, ACAT2는 분자량 약 46 kDa으로 오직 간세포와 소장의 용모세포에만 존재한다. ACAT1은 세포막의 콜레스테롤을 일정한 농도로 유지하는데 관여한다면, ACAT2는 세포내부의 콜레스테롤을 에스테르화하고 지단백질로 분비하는 기능을 담당한다.

ACAT에 의해 합성된 CE는 cytosolic droplet 형태로 저장됨으로서 ACAT은 free sterol의 toxicity로부터 cell을 보호하는 역할도 한다. 그러나 과도한 CE의 형성은 macrophage 내에 CE의 축적을 가져오고 결과적으로 초기 atherosclerotic lesion의 특징이라고 할 수 있는 foam cell



의 형성이 촉진된다. 따라서 과도한 CE의 형성을 억제하고자 하는 전략의 일환으로서 ACAT 저해제가 지질대사 치료제의 기능을 나타낸다.

Lp-PLA<sub>2</sub>는 platelet-activating factor acetylhydrolyase로도 알려져 있는 serine phospholipase로써 약 80%가 LDL에 존재하고 나머지는 high density lipoprotein (HDL)과 very low density lipoprotein (VLDL)에 분포하며 monocytes, macrophages, T-lymphocytes와 mast cell에 의해 주로 생성되는 phospholipase A<sub>2</sub> superfamily의 secreted calcium-independent member이고 분자량은 45 kDA이다. 동맥벽에 LDL, 특히 ox-LDL의 축적은 동맥경화의 가장 중요한 초기단계로 알려져 있다. 동맥경화 병변에서 산화된 LDL이 검출되거나 LDL이 생체내에서 어떤 기작에 의해 산화되는지는 명확하게 밝혀지지 않았다. LDL이 산화/변형되기 전까지 Lp-PLA<sub>2</sub>는 LDL에 잠복상태로 부착되어 있다가 LDL이 산화되면 활성화되어 산화된 phosphatidylcholine을 oxidized fatty acid와 lysophosphatidylcholine (lyso-PC)로 분해한다.

그 결과 생성된 두 가지 분해산물의 농도가 높아지면 macrophage proliferation과 endothelial dysfunction을 유발한다. Lp-PLA<sub>2</sub>는 고콜레스테롤증 환자에서 관상동맥질환의 독립적인 위험요인으로서, pro-inflammatory agent로 제안되고 있으며, 최근 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제의 투여로 동맥경화 모델동물인 Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbit의 지방선(fatty streak)생성이 현저하게 감소된 사실로부터 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제가 동맥경화 예방 및 치료의 target으로 주목받고 있다.

그간 간질환 치료제의 탐색을 위하여 미생물, 식물 등을 이용하여 많은 연구가 이루어져 있으나 재료 확보의 어려움 등으로 인하여 곤충에 대한 탐색은 거의 시도된 바가 없는 상황이다. 본 연구에서는 곤충의 풍부한 다양성에 근거한 새로운 천연물 동맥경화 치료제 개발을 위하여 기존에 알려진 생약곤충과 여러 곤충자원에 대한 TGF- $\beta$  신호전달과정에 대한 저해제 탐색을 위한 *in vitro* system, 사염화탄소등으로 급성간독성을 유발시킨 rat를 이용한 *in vivo* system, 그리고 지질대사조절물질에 대한 target으로 ACAT과 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제 탐색 등에 대한 조사를 실시하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

흰점박이꽃무지 유충 또는 다른 곤충자원을 이용하여 간보호물질이나 당뇨에 대한 치료 물질 등을 개발하고자 하는 연구가 다양하게 시도되고 있으나 많은 경우에 유충 자체를 이용하거나 용매를 통한 추출물을 얻고자 하는 단계에 머물러 있다. 또한 본 연구에서 밝힌 바와 같이 대량추출과정상에 어려움과 간보호작용을 효과적으로 검증하는 시스템의 부재 등의 원인으로 인하여 아직까지 효과적인 개발이 이루어지지 않고 있다.

Silymarin 등과 같이 천연물로부터 분리된 간질환에 대한 치료물질이 알려져 있으나 정확한 작용 기작이 아직 밝혀지지 않고 있을 만큼 간질환 치료제에 대한 연구는 아직 풀어야 할 문제가 많은 분야이다.

최근 간질환의 분자적 메커니즘이 밝혀지기 시작하면서 여러 가지 target에 대한 특이적인 저해제를 탐색하고자 하는 연구가 국내외에 소개되고 있으며 본 연구에서 시도된 TGF- $\beta$ 1의 신호전달과정에 대한 저해제를 탐색하고자 하는 시도도 이러한 새로운 시도 중 한가지로 볼 수 있다.

그러나 많은 경우 연구의 재료로 미생물과 식물등에 집중하고 있으며 높은 다양성과 종특이성을 가진 곤충의 경우 재료확보의 어려움과 상대적으로 알려지지 않은 연구분야로서 국내외적으로 이 분야에 집중적인 연구를 시도하는 그룹이 거의 없는 실정이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 연구수행 방법

#### 가. 곤충유래 간기능 보호 물질 탐색, 분리 및 특성분석

##### 1) 유용곤충자원의 확보

연구에 이용된 5종의 곤충은 생약자원이나 민간요법 등에서 식품의약 효능이 알려진 곤충 및 본 연구진에 의해 간보호 효과가 조사된 곤충을 위주로 선정하였으며, 곤충의 확보는 기존 본 연구진이 보유하고 있는 곤충을 이용하거나, 야외현지 채집 등의 방법에 의해 수행되었다.

##### 2) 곤충유래 간기능 보호물질의 탐색, 분리 및 특성규명

#### 가) 생체의 간 섬유화모델 시스템의 확보 및 활성화검정

##### (1) Transient TGF- $\beta$ 조절 프로모터를 응용한 특이 억제제 검정계 확립

TGF- $\beta$  조절 프로모터인 3TP, SBE, RII유전자에 luciferase를 도입하여 사멸에 관여하는 단백질 조절물질을 집중적으로 탐색하여 세포배양기술 및 전임상 단계에서의 다양한 동물연구 및 검정을 통하여 사람과 유사한 기본 세포사멸 데이터와 더불어 세포퇴행성 변성에 관여하는 병리기전을 규명하고자 하였다. 간암세포주인 HepG2, Hep3B와 음성대조군으로서 지방암 세포주인 MCF-7에다가 transient 유전자 발현기법으로 TGF- $\beta$  조절 프로모터를 응용하여, TGF- $\beta$  조절 특이 억제제의 도출이 가능한 검정계를 확보하였다. 동시에 또한 최근 ERK 및 JNK 활성화로 인한 세포사멸은 궁극적으로 모든 질병의 근원인 경화로 이행된다는 사실로부터 세포배양계에서 TGF- $\beta$  억제물질 발굴과 동시에 이 물질들이 특이적으로 ERK 및 JNK 활성도를 동시에 조절하는지를 조사하여 유전형질(TGF- $\beta$ , Smad-3 혹은 HGF 발현중심으로)이 선택적으로 발현된 마우스 상에서의 나타나는 형질과 비교 검색하여 난치성 질환인 간질환 모델을 확보할 수 있는 근거를 마련하였다.

##### (2) *In vitro* 간보호 활성화 검정

#### (가) $\beta$ -galactosidase activity assay

$\beta$ -galactosidase gene을 reporter로 이용하여 살아있는 세포의 활성화에 비례하는  $\beta$

-galactosidase activity를 측정하므로써 간접적으로 세포 증식에 대한 목적하는 활성 물질의 세포 저해 활성을 측정한다. 하루 배양한 HepG2 cell에  $\beta$ -galactosidase 유전자를 transfection 시키기 위하여 lipopectin과  $\beta$ -galactosidase 유전자를 HepG2 cell에 첨가하여 6 시간 동안 반응시킨 뒤, 배양 배지를 Complete Minimum Essential Medium(MEM)으로 바꾸고 하루밤 배양한다. 목적하는 활성물질에 30 분간 노출시키고, 하룻밤 더 배양하면서 세포를 회복시킨 뒤, 회수하여 원심분리한 상등액을 crude 효소액으로 사용하여  $\beta$ -galactosidase activity를 측정한다.

(나) TGF- $\beta$  처리에 의한 SMAD Binding Element (SBE) activation assay

TGF- $\beta$ 를 HepG2 세포에 처리하면 SMAD family가 activation 되고 SMAD signal에 의해 regulation 되는 유전자들의 발현이 up 또는 down regulation을 받게 된다. 이러한 일련의 과정 중에서 TGF- $\beta$ 도 자체 세포 내에서 유도 발현되어 autocrine으로 자신의 SMAD related signaling을 stimulation 시킨다. SMAD Binding element(SBE) based luciferase activity assay는 TGF- $\beta$ 에 의해 구조적으로 SBE luciferase gene이 활성화되도록 설계되었으며, 활성물질을 처리할 경우, SMAD와 SBE 사이에 정상적인 결합을 방해하는 정도에 따라 luciferase activity가 서로 다르게 나타나게 된다.

SBE-Luciferase gene을 HepG2 cell에 transfection시키고 TGF- $\beta$ 를 처리하여 SMAD Binding Element (SBE)가 활성화되면서 유도적으로 luciferase 유전자를 발현시킨다. 이 과정에서  $\beta$ -galactosidase gene을 동시에 transfection시켜 internal control로 사용하여 이  $\beta$ -galactosidase 활성을 최종적으로 luciferase activity를 calibration하는데 이용한다.

HepG2 cell을 6 well plate에 접종하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 하루밤 배양하여 60-70% 정도 생육하였을 때, opti-MEM으로 세척하고 800  $\mu$ l의 opti-MEM을 첨가해 둔다. 미리 만들어둔  $\beta$ -galactosidase, SBE luciferase, lipofectin 용액을 6 well에 200  $\mu$ l씩 모두 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 6 시간동안 반응시키면서 DNA를 transfection 시킨다. 반응 후 배양액을 complete MEM으로 바꿔주고 24 시간동안 배양한다. MTT assay에서 결정된 농도의 활성 물질을 30분 동안 처리한 뒤, TGF- $\beta$  1  $\mu$ l (5 ng)를 첨가하여 24 시간 반응시키고 세포를 회수한다. 세포는 luciferase lysis buffer에 현탁하여 원심분리 후 상등액을 취하여 crude enzyme solution으로 하고 luminometer에서 얻어진 luciferase (A),  $\beta$ -galactosidase activity (B)로 최종적으로 luciferase activity (C)를 계산한다.

$$\text{Luciferase activity (C)} = \frac{A}{B}$$

## 나) *In vivo* 간보호 활성 검증

### (1) 실험동물 및 방법

실험동물은 특정병원체 부재 (SPF) Wistar 수컷 랫드를 사용하였으며, 입수 시 주령은 5주령, 입수 시 체중은 100-120 g을 사용하였다. 동물입수 후 7일간 동물실내에서 순화시켰다. 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 본 시험은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12 시간으로 설정된 실험동물 사육실에서 실시되었다. 사료는 실험동물용 고품사료와 멸균된 물을 자유섭취시켰다.

### (2) 시험군의 구성 및 시험물질의 투여

시료의 간 손상에 대한 보호 효과를 관찰하기 위하여 랫드를 이용하여 사염화탄소로 유도한 급성 간손상 시험을 실시하였다. 실험군의 구성은 한 그룹 당 각각 5 마리의 랫드에 대하여 4-6 일 동안 시료를 경구 투여하고, 시험 마지막 날 10% 사염화탄소를 1 ml/kg body weight로 복강 투여를 실시한 후, 24 시간이 지난 후에 부검을 실시하였다. 후대정맥에서 채혈한 후 혈청을 분리하여 간 손상 혈청 marker에 대한 검사를 실시하였으며, 육안적인 부검 소견을 관찰한 후, 간 조직을 채취하여 10% 중성포르말린에 고정하였다. 고정된 간조직은 통상적인 조직처리과정을 거친 후, 파라핀 포매를 실시하였으며, 각각의 간조직들은 4 µm로 조직절편을 만들어 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색하여 광학현미경에서 병리조직학적 검사를 실시하였다. 간조직의 손상 정도는 inflammatory cell infiltration (I.F.), necrosis 그리고 fatty change 등의 관찰을 실시하였으며, fatty change의 소견은 central vein을 중심으로 일어난 손상의 정도에 따라서 normal (정상), weak (10 % 이하손상), mild (10-30% 손상), moderate (30-60% 손상), severe (60% 이상 손상) 등의 단계로 표시하였다.

## 다) Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제 활성 측정

### (1) LDL 분리

사람의 혈장으로부터 초원심분리기(Beckman LB-70M Ultracentrifuge)를 이용하여 LDL을 분리하였다. 먼저 혈액원에서 가져온 혈장에 0.04% EDTA, 0.05% NaN<sub>3</sub>, 0.015% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 넣어 혈장에 있는 지단백질의 변성을 막는다. 100,000 x g (55.2 Ti, 45,000 rpm), 4℃에서 20 시간 동안 초원심 분리하였다. 상층에 떠있는 chylomicron과 VLDL을 걷어내고 나머지 하층은 다음과 같은 식에 의해 NaBr (heavy density solution)을 이용해서 밀도를 1.063 g/ml로 맞추었다.

$$V2 = \frac{V1 \times D - D1}{D2 - D}$$

V2: volume of heavy density solution

V1: initial volume of solution

D: required density (1.063)

D1: original density

D2: density of heavy solution (1.40)

이를 다시 100,000 x g, 4°C에서 24 시간 동안 초원심 분리한 후, 상층에 떠있는 노란색의 LDL을 분리했다. 이 LDL을 PBS (10 mM, pH 7.4)로 투석하여 고농도의 NaBr을 제거하고, 4°C에서 보관하면서 1 개월 이내에 사용하였다.

## (2) Lp-PLA<sub>2</sub> 활성 분석

사람의 혈장으로부터 분리한 LDL을 사용하여 곤충 sample 추출 시료를 대상으로 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제를 탐색하였다. Lp-PLA<sub>2</sub>의 활성 측정 표준 조건은 반응액 200 µl에 2.16 mM EDTA, 8 mM PBS (pH 7.4)와 10 µM PAF (<sup>3</sup>H] PAF 0.05 µCi/tube)와 LDL 4-5 µg을 포함한다. 유기용매에 녹여있는 20 µl [<sup>3</sup>H] PAF (250 µCi, 21.50 Ci/mmol)와 12.5 µM Cold-PAF 2.5 µl를 질소가스 하에서 용매를 완전히 제거한 후 2.7 mM EDTA를 포함하는 10 mM PBS (pH 7.4) 3.2 ml를 첨가하여 micellar 형태의 기질을 준비한다 (A). 시험관에 희석한 LDL 20 µl (약 4-5 µg)와 10 µM PAF를 포함한 (A)용액 160 µl, DMSO에 녹인 시료 20 µl (최종 농도 100 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 15 분간 반응시킨 후, chloroform/methanol(2:1) 용액 600 µl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 대조군에는 시료대신 DMSO 20 µl를 첨가하고, 양성대조군은 GlaxoSmithKline으로부터 분양받은 Lp-PLA<sub>2</sub> 활성저해물질인 SB-381320 (IC<sub>50</sub> = 55 nM)을 사용하였으며, 공시험은 효소원 대신에 20 µl PBS를 첨가한 것을 사용하였다. Bligh와 Dyer의 방법에 의해 1,500 x g에서 3 분간 원심분리하여 유기용매층과 물층을 분리했다. 상층액(물층) 250 µl를 취하고 250 µl chloroform을 첨가하여 위의 실험을 반복하였다. 최종 상층액 100 µl를 취해서 scintillation vial에 넣고 scintillation cocktail (Lumagel, Lumac Co.) 3 ml을 첨가하여 liquid scintillation counter (1450 Microbeta Trilux, Wallac Oy, Turku, Finland)를 이용하여 1-O-hexadecyl-[acetyl-<sup>3</sup>H(N)]-phosphatidylcholine으로부터 생성된 [<sup>3</sup>H] acetate를 측정하였으며, 활성 저해도는 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{활성 저해도(\%)} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{Sample (cpm)} - \text{Background (cpm)}}{\text{Control (cpm)} - \text{Background (cpm)}} \right]$$

## 라) 아실-코에이: 콜레스테롤 전이효소 (ACAT)에 대한 저해 활성

### (1) ACAT 효소원의 제조

ACAT 효소원으로는 흰 쥐(male Sprague-Dawley 150-200 g)의 간을 적출하였다. 1 g의 간을 5 ml의 균질화 용액(0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4, 0.1 mM EDTA 및 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol)에 균질화하였다. 이 균질액을 4°C에서 3,000 x g 로 10분 동안 원심분리하고, 얻어진 상층액을 4°C에서 15,000 x g 로 15분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 초원심분리기를 이용하여 (Beckman) 4°C에서 100,000 x g 로 1 시간 동안 원심분리하여 마이크로솜 pellet을 얻은 후, 이를 3 ml의 균질화 용액에 현탁시키고 4°C에서 100,000 x g로 1 시간 동안 원심분리하였다. 얻어진 pellet을 1 ml의 균질화 용액에 현탁시켰다. 얻어진 현탁액 중의 단백질 농도를 Lowry 등의 방법으로 측정하고, 단백질 농도를 4 내지 8 mg/ml로 조절하였다. 얻어진 현탁액을 deep-freezer (Biofreezer, Forma Scientific Inc.)에 보관하였다.

사람 ACAT1과 사람 ACAT2는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 사람 ACAT1과 ACAT2의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 baculovirus 발현체제를 이용하여 사람 ACAT1과 ACAT2 단백질을 얻었다. 먼저, 사람 간 cDNA library screening을 통하여 얻어진 hACAT-1과 hACAT-2의 cDNA를 baculovirus 전달 벡터에 삽입하고, sf-9 세포에 도입하여 바이러스를 제조하였다. 그 후, plaque purification 방법으로 사람 ACAT-1과 사람 ACAT-2의 재조합 바이러스를 분리한 후 3 차례의 증폭과정을 거쳐 바이러스배양액의 역가를 높였다. 단백질 발현효율이 좋은 Hi-5 cell에 재조합 바이러스를 감염다중도(Multiplicity of Infection)가 1이 되도록 감염시킨 후 27°C에서 하루 동안 진탕배양하였다. 이렇게 hACAT-1과 hACAT-2가 각각 과량 발현된 Hi-5 세포들로부터 마이크로솜 분획을 분리하기 위하여 500 x g에서 15 분간 원심분리하여 세포들을 모으고 hypotonic buffer에서 급냉동 급해동 방법으로 세포를 깬 후 100,000 x g에서 한 시간 동안 초원심 분리하였다. 얻어진 마이크로솜 분획들은 단백질 농도가 8 mg/ml이 되도록 hypotonic buffer로 현탁하여 사용 전까지 저온냉동고에 보관하였다.

### (2) ACAT 저해 활성 측정

아세톤에 1 mg/ml의 농도로 용해된 콜레스테롤 용액 6.67  $\mu\text{l}$ 를 아세톤중의 10 % 트리톤 WR-1339(Sigma Co.) 6  $\mu\text{l}$ 와 혼합하고, 질소가스를 이용하여 아세톤을 증발시켜 제거하였다. 얻어진 혼합물에 증류수를 가하여 콜레스테롤의 농도가 30 mg/ml가 되도록 조절하면서 콜레스테롤 수용액을 제조하였다. 10  $\mu\text{l}$ 의 콜레스테롤 수용액에 10  $\mu\text{l}$ 의 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.4), 5  $\mu\text{l}$ 의 0.6 mM bovine serum albumin, microsome 10  $\mu\text{l}$ , sample 10  $\mu\text{l}$  및 45  $\mu\text{l}$ 의 DW를 가하여 총 90  $\mu\text{l}$ 인 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 37°C 수욕에서 30 분 동안 pre-incubation 하였다. 10  $\mu\text{l}$ 의 (1-<sup>14</sup>C)올레일-CoA 용액(0.05  $\mu\text{Ci}$ , 최종 농도: 10  $\mu\text{M}$ )을 상기 pre-incubation mixture에 가하고,

생성된 혼합물을 37°C water bath에서 30 분동안 반응시켰다. 혼합물에 500  $\mu\text{l}$ 의 이소프로판올:헵탄 혼합물(4 : 1 (v/v)), 300  $\mu\text{l}$ 의 헵탄 및 200  $\mu\text{l}$ 의 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4)을 가하고, 혼합물을 vortex로 격렬하게 혼합한 후, 상온에서 2분 동안 방치하였다. 200  $\mu\text{l}$ 의 생성된 상층액을 scintillation bottle에 넣고, scintillation solvent (Lumac) 4 ml을 가하였다. 이 혼합물의 방사선량을 1450 Microbeta liquid scintillation counter, Wallacoy, Finland)로 측정하였다. ACAT 활성은 1 분 동안 단백질 1 mg 당 합성된 콜레스테릴 올레이트 피코몰(피코몰/분/mg 단백질)로 계산하였다.

#### 마) 곤충유래 간(肝)기능보호 물질의 탐색, 분리, 특성분석

확보된 곤충의 전체 혹은 일부분을 이용하여 간보호, 간경화 등의 질환을 대상으로 위에 설명한 TGF- $\beta$  조절 프로모터를 응용한 특이 억제제 검정(*in vitro* 시스템) 및 급성 간보호(*in vivo*) 활성 검색방법을 이용하여, 활성물질을 함유하는 곤충시료를 선별하고, 매 단계 활성 검색을 통해 silica gel chromatography, reverse phase silica gel chromatography(C-18), size exclusion chromatography, ion exchange chromatography, 용매 추출법, flash chromatography와 HPLC 등을 이용하여 활성물질을 분리·정제한 후, 분광학적인 방법 (Mass, IR, UV/Visible, 2D-NMR spectroscopy, X-ray crystallography) 및 이화학적인 방법으로 생리활성물질의 화학적 구조 및 활성물질의 특성을 분석하였다.

#### 바) 간기능보호 물질의 대량분리

동결건조 한 흰점박이꽃무지 유충을 mixer를 이용하여 분말화한 다음 건조중량 1 kg 당 20 L의 증류수와 20,000 unit의 protease (Arazyme, Insect Biotech)을 첨가하여 현탁한 후, 상온에서 2 시간 처리하고 이를 대용량 원심분리기(Kansai N0-140)를 이용하여 10,000 x g로 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 산업용 동결건조기 (코바이오텍)를 이용하여 상등액을 동결건조한 다음, 메탄올을 첨가하여 메탄올 가용 부분과 메탄올 불용성 부분으로 분리하였다. 메탄올 불용성 부분을 건조한 후 증류수를 첨가하여 녹이고, filter paper로 여과하여 찌꺼기를 제거하고 molecular cut-off 10 kDa를 가지는 polysulfone ultra-filtration cassette (Sartorius)를 이용하여 filtrate를 수집하고 이를 동결건조하여 냉동 보관하면서 실험에 이용하였다. 메탄올 가용성 분획은 감압건조한 후 냉장 보관하면서 활성검정에 이용하였다.



### 3) 곤충유래 간보호 물질의 생체효능 검정

#### 가) 단회투여 독성 시험

##### (1) 실험동물 및 사육조건

###### (가) 실험동물

특정병원체 부재 (SPF) 5주령의 암·수 SD 랫트를 오리엔트 (서울특별시 금천구 가산동 459-24번지)로부터 공급받아 입수 후 동물실에서 약 7 일간 검역 및 순화시켰으며, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 선발하여 시험에 사용하였다.

###### (나) 환경조건

본 시험에 사용된 랫드는 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , 조명시간 12 시간 (08:00 점등 - 20:00 소등)으로 설정된 자동 온습도 조절 장치가 설치된 경북대학교 수의과대학 병리학교실의 동물실에서 순화 및 사육되었다. 전 시험기간 동안 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 사육 환경의 변동은 없었다.

###### (다) 사육환경 모니터링

시험기간 중 동물실의 온·습도는 자동온습도 조절 장치에 의하여 조절되었으며, 환경조건은 정기적 (3개월 1회)으로 측정되었다. 환경 측정 결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

###### (라) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

전 시험기간 동안 폴리카보네이트제 사육상자 (240W×390L×175H mm)에 5 마리 이하씩 수용하였다. 개체식별은 유성 매직펜을 이용한 미부 표식법과 사육상자별 개체 식별카드 표시법을 이용하였다.

###### (마) 사료 및 물

사료는 실험동물용 고품사료 (PMI Nutrition International, 505 North 4th Street Richmond, In 47374, USA)를 방사선조사 (13.2 kGy) 멸균하여 자유 섭취시켰다. 물은 상수도수를 물병을 이용하여 자유 섭취시켰다.

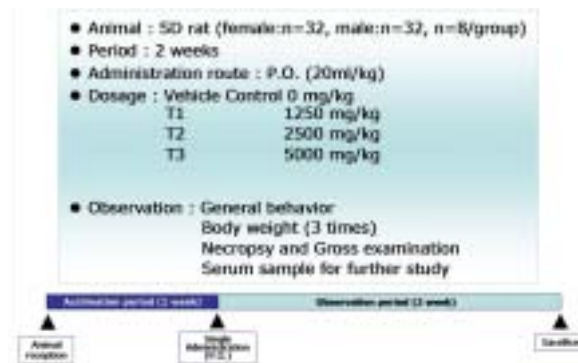
(2) 시험군의 구성 및 투여

SD 계통의 암컷 (131.5-147.3 g) 및 수컷 (173.8-193.7 g) 랫드를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 각 개체별로 폴리카보네이트 사육상자에 수용하였다. 시험물질인 흰점박이꽃무지의 간보호 활성분획을 1250, 2500 그리고 5000 mg/kg 용량으로 투여하였으며, 대조군에는 용매인 증류수만을 1회 투여한 후 2주간 관찰하였다.

(3) 관찰 및 검사항목

(가) 체중 측정

모든 동물에 대하여 투여 개시 직전에 1회, 투여 개시 후 매주 2회씩 2 주간, 그리고 부검 당일 체중을 측정하였다.



(나) 조직병리학적 검사

모든 시험동물에 대하여 충분히 방혈시킨 다음, 주요 장기를 적출하고 10% 중성포르말린 용액에 고정시켰다. 충분한 고정을 거친 모든 장기조직은 조직처리를 거친 후 파라핀 포매기에서 포매하여 4 $\mu$ m의 절편을 만들어 hematoxylin & eosin으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

나) 알코올로 유도한 간병변에 대한 효능시험

(1) 실험동물 및 사육조건

(가) 실험동물

특정병원체 부재 (SPF) 5주령의 수컷 Wistar 랫드를 오리엔트 (서울특별시 금천구 가산동 459-24번지)로부터 공급받아 입수 후 동물실에서 약 7 일간의 검역 및 순화시켰으며, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 선발하여 시험에 사용하였다.

(나) 환경조건

본 시험에 사용된 랫드는 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , 조명시간 12시간 (08:00 점등 - 20:00 소등)으로 설정된 자동 온습도 조절 장치가 설치된 경북대학교 수의과대학 병리학교실의 동물실에서 순화 및 사육되었다. 전 시험기간 동안 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 사육 환경은 변동은 없었다.

(다) 사육환경모니터링

시험기간 중 동물실의 온·습도는 자동온습도 조절 장치에 의하여 조절되었으며, 환경조건은 정기적 (3개월 1회)으로 측정되었다. 환경 측정 결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

(라) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

전 시험기간 동안 폴리카보네이트제 사육상자 (240W×390L×175H mm)에 5 마리 이하씩 수용하였다. 개체식별은 유성 매직펜을 이용한 미부 표식법과 사육상자별 개체 식별카드 표시법을 이용하였다.

(마) 사료 및 물

사료는 실험동물용 고품사료 (PMI Nutrition International, 505 North 4th Street Richmond, In 47374, USA)를 방사선조사(13.2 kGy) 멸균하여 자유 섭취시켰다. 물은 상수도수를 물병을 이용하여 자유 섭취시켰다.

(2) 시험군의 구성 및 투여

Wistar 계통의 수컷 (164.9-176.5 g) 랫드를 각 군당 20 마리씩 사용하였다. 각 개체별로 폴리카보네이트 사육상자에 수용하였다. 시험군의 구성은 다음과 같다. Control 군 (C group)은 control diet를 급여하고 대조물질인 생리식염수를 투여하였고, 부형제 대조군 (A group)은 alcohol diet를 급여하면서 대조물질인 생리식염수를 투여하였으며, 시험군인 PB50 group은 alcohol diet와 시험물질 PB를 50 mg/kg 용량으로 투여하였고, 그리고 시험군인 PB100 group은 alcohol diet와 시험물질 PB를 100 mg/kg의 용량으로 투여하였다. 매 1회 4 주간 경구투여를 실시하였으며, 시험 실시 2 주와 4 주 후에 각각 희생시켰다. 본 시험에 사용된 alcohol diet는 Liber-Decarli model로 alcoholic liver disease의 연구에 널리 사용되고 있으며 각 diet의 조성은 Table 1과 같다.

- Animal : Wistar rat (male:n=80, n=20/group)
- Period : 4 weeks

Group	Treatments
C	Control diet + Saline p.o. (6 times/week)
A	Alcohol diet + Saline p.o. (6 times/week)
PB 50	Alcohol diet + PB 50 mg/kg p.o. (6 times/week)
PB 100	Alcohol diet + PB 100 mg/kg p.o. (6 times/week)



Table 1. Basal composition of experimental diets

Ingredients	Control diet	Ethanol diet
Casein (100 mesh)	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn oil	8.5	8.5
Olive oil	28.4	28.4
Safflower oil	2.7	2.7
Maltose Dextrin	115.2	25.6
Cellulose	10.0	10.0
Salt Mix #210011	8.75	8.75
Vitamin Mix #310011	2.5	2.5
Choline bitartrate	0.53	0.53
Xanthan gum	3.0	3.0
<b>total</b>	221.78	132.18
add	1 l water	95% EtOH 67.3 ml
		1 l water

### (3) 관찰 및 검사항목

#### (가) 체중 측정

모든 동물에 대하여 투여 개시 직전에 1회, 투여 개시 후 매주 3회씩 4 주간, 그리고 부검 당일 체중을 측정하였다.

(나) 조직병리학적 검사

모든 시험동물에 대하여 충분히 방혈시킨 다음, 주요 장기를 적출하고 10% 중성포르말린 용액에 고정시켰다. 충분한 고정을 거친 모든 장기조직은 조직처리를 거친 후 파라핀 포매기에서 포매하여 4  $\mu$ m의 절편을 만들어 hematoxylin & eosin으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

(다) 통계학적 방법

얻어진 자료에 대한 통계분석은 다중비교검정법을 실시하였다. 평균치에 대하여는 Bartlett 검정으로 homogeneity를 검사하여 균질성이 있는 경우에 부형제 대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 검사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett's t-test를 실시하였다. Bartlett 검정 결과 균질성이 인정되지 않으면 순위한 데이터를 이용한 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis's H test를 실시하고,  $p < 0.05$ 인 경우 Dunnett's test를 이용하여 군간의 유의차를 조사하였다. 이러한 분석은 통계프로그램인 GraphPad InStat (version 3.05, GraphPad Software Inc.)를 이용하여 실시하였다. 검정의 위험율은 5% 및 1%로 정하였다.

#### 4) 유용곤충의 인공대량사육 모델시스템 개발

##### 가) 흰점박이꽃무지 사육을 위한 인공사료 개발

(1) 톱밥발효

톱밥의 발효를 위하여 신선한 포플러톱밥과 쌀겨를 큰 플라스틱용기(가로 100 cm x 세로 50 cm x 높이 40 cm)에 2 : 1의 비율로 넣고 미생물원으로 20% (v/v)의 자연발효톱밥을 첨가하거나 약 0.5% (v/v)의 미생물배양액을 첨가한 후, 60-70% 정도의 수분을 제공하여 골고루 섞었다. 수분의 증발을 방지하기 위하여 플라스틱용기의 위를 덮은 상태로 실온에서 발효를 진행하면서 2 일에 한번씩 골고루 뒤집었다. 발효 진행상황을 점검하기 위하여 발효통의 온도를 측정하였으며 발효 중의 미생물상 변화의 검출을 위하여 시료를 채취한 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 연구에 사용된 톱밥은 전북 남원시 소재 제제소인 '용산톱밥'에서 구입하였다.

(2) 발효톱밥의 효과 검정

발효가 완료된 톱밥을 흰점박이꽃무지 1-2령 유충의 먹이로 이용하여 3-4주간 사육하면서 유충의 무게변화, 발생과정, 생존율 등을 조사하였다. 유충의 성장은 최초 100마리 유충의 총 무게와 사육 중 살아있는 유충의 총 무게 및 각 개체의 평균무게로 나타내었고 3주 동안 체중, 생존수, 발생령기를 매주 측정하였다.

### (3) 발효산물에서 total DNA 추출

발효과정에서 수집한 톱밥으로부터 Yeast 등의 방법(Biological Procedures Online 1: 40-47)을 응용하여 전체 DNA를 추출하였다. 먼저 1 g의 시료에 1 ml의 추출 완충액(100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 1.5M NaCl)을 섞은 다음 유리구 0.5 g(직경 1 mm)을 첨가한 다음 진동기로서 15 분간 강하게 진동시켰다. 그 후 20% SDS(sodium dodesyl sulfate)를 100  $\mu$ l 첨가하여 5 초간 추가적으로 진동하였다. 65°C, 1 시간 처리 후 6,000  $\times$  g에서 10 분간 원심분리하여 그 상등액을 새로운 원심관에 옮기고, 1/2 부피의 30% PEG (polyethylene glycol)/1.6 M NaCl을 첨가하여 원심관을 수회 뒤집어 섞은 후 상온에서 2 시간 처리하였다. 그 후 다시 10,000  $\times$  g에서 원심분리하고 그 침전물을 80  $\mu$ l의 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)으로 녹이고, 최종농도 0.5 M potassium acetate를 첨가한 다음, 4°C에서 5 분간 반응하고 16,000  $\times$  g에서 30 분간 원심분리하였다. 원심분리 후 그 상등액을 새로운 튜브에 옮긴 후 37°C에서 1시간 RNase를 처리한 다음 DNA를 2배 부피의 무수에탄올을 첨가하여 16,000  $\times$  g에서 30 분간 원심분리하였다. 그 결과 얻어진 침전물을 다시 70% 에탄올로서 세척한 다음 50  $\mu$ l의 TE 완충액으로 용해시켰다.

### (4) PCR에 의한 진핵세균 16S rDNA 단편의 증폭

PCR을 위한 반응물은 다음과 같은 조성으로 50 $\mu$ l의 반응을 실시하였다. 1  $\mu$ l의 전체 DNA 추출물(50-500 ng/ $\mu$ l)에 10배의 Taq DNA 중합효소 완충액(MgCl<sub>2</sub> 첨가) 5  $\mu$ l, 2.5 mM의 dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 5  $\mu$ l, 3.2 pmol의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 각각 5  $\mu$ l, 1-2 단위의 Taq DNA 중합효소(Promega, USA)를 첨가하여 최종 50  $\mu$ l 반응액이 되도록 증류수를 더하였다. 프라이머들은 진핵세균의 16S rDNA의 V3 부위에 해당하는 193 뉴클레오티드 증폭을 위해 합성하였다. DGGE를 위한 특이 primer로 primer 1의 5'에 아래 G-C clamp sequence가 추가된 primer를 사용하여 PCR를 수행하였다.

primer 1 (forward) 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG -3'

(*E. coli* 16s rDNA position 341-358)

primer 2 (reverse) 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'

(*E. coli* 16s rDNA position 534 -517)

G-C clamp 5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G  
-3'

PCR 반응은 94°C에서 5 분간의 변성(denaturation)을 수행한 후 94°C에서 5 분의 변성, 65°C에서 1 분의 어닐링(annealing), 72°C에서 3 분의 연장(extension)을 20회 반복하였고 이 반복구간에서 2반복 당 어닐링 온도가 1°C씩 감소시켰다. 다시 94°C에서 5 분의 변성과 55°C에서 1 분의 어닐링, 72°C에서 3 분의 연장을 10회 반복하고 마지막으로 72°C에서 10 분간 연장으로 마무리하고 4°C에서 유지되었다.

#### (5) DGGE 분석과 DGGE 단편의 염기서열 분석

PCR 산물의 DGGE 분석은 Dcode 시스템(Bio-Rad, USA)을 이용하여 분석하였으며, 30%-70% (100% = 7 M 요소(urea) 및 40% deionized formamide)의 화학적 선형 구배가 형성된 8% (w/v) 아크릴아마이드 젤(acrylamide/bis-acrylamide 37.5 : 1 w/w)을 이용하였다. 전기영동은 20  $\mu$ l의 PCR 산물을 로딩(loading) 후 TAE 완충액(40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1m M EDTA, pH 7.4)에서 60°C, 12 시간 동안 60 V의 전압하에서 실시하고 전기영동 후 젤을 SYBR green 1에서 30 분간 염색하였다. 그 결과 발효 초기, 중기 및 말기에서 서로 다른 세균들의 밴드가 나타나는 것을 볼 수 있으며, 그 중 발효 개시 4-10 일 사이에 나타나는 밴드들을 중점적으로 분석하였다.

#### (6) 미생물 종 검정

DGGE에 의해 분리된 band를 선별하여 수술용 칼로 band 부분만 잘라내어 microtube에 넣은 후 20  $\mu$ l의 증류수를 첨가하여 2 일간 -4°C 냉장고에서 보관하여 DNA를 용출하였다. 용출된 용액을 template DNA로 이용하여 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG -3'(E. coli 16s rDNA position 341-358)를 forward primer로 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'(E. coli 16s rDNA position 534 -517)를 reverse primer로 사용하여 94°C에서 3 분간 pre-denature시킨 후 총 30 cycles (denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, extension at 68°C for 1 min) PCR을 수행하였다.

증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기 영동하여 150~200 bp 사이의 band를 확인하였고 이를 Big dye cycle sequencing system으로 부분적 염기서열을 결정하였다. 이 과정에서 염기서열이 확인되지 않은 template는 위와 같은 PCR을 행한 PCR product로 pGEM-T Easy Vector(Promega, Wis. USA)에 ligation 한 후 Nova Blue competent cell을 이용하여 형질전환하고 ampicillin(50  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB 평판배지에서 배양하여 재조합 클론을 확인하였다. 재조합 클론은 Plasmid Purification kit (QIAquick)를 사용하여 순수 DNA만을 모았다. 이를 분석하여 부분적 염기서열을 결정하였다.

Sequencing에 의해 밝혀진 염기서열을 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 입력하여 gene bank에 수록된 16S rDNA nucleotide sequence와 비교하여 상동성을 알아보고 유연관계를 phylogenetic tree로 조사하였다.

## 나) 흰점박이꽃무지 유충의 대량사육 및 농가 기술이전

### (1) 발효사료의 대량제조 및 이를 이용한 흰점박이꽃무지 유충의 대량 야외사육

미생물 발효촉진제와 톱밥과 쌀겨를 이용하여 대량의 발효사료 제조를 야외 조건에서 수행하였다. 먼저 통풍이 원활한 비닐하우스에 가로 × 세로 × 높이 = 120 cm × 240 cm × 60 cm의 나무틀을 만들고 약 1,200 L의 톱밥과 쌀겨를 2:1의 비율로 채운 다음, 각 0.5%의 미생물 배양액 (OD<sub>600</sub>=1.0)을 첨가하고 약 65-70%의 수분 함량이 되도록 하여 골고루 섞어주었다. 상기 사료는 매 2 일 마다 1회씩 뒤집어주어 호기적 환경을 유지하였으며, 적절한 수분공급과 함께 발효사료의 온도를 조사하였다. 또한 포플러 톱밥을 사용한 경우와 더불어 참나무톱밥을 재료로 사용하여 동일한 방법으로 실시하였다. 하우스내의 온도는 주간에 약 28-35℃, 야간의 경우 15-20℃ 정도로 유지되었으며 약 5 주간의 기간을 거쳐 발효가 완료되었다. 발효가 완료된 시료를 이용하여 흰점박이꽃무지 유충의 먹이로의 유용성을 검정하였으며, 이때 자연 상태에서 흰점박이꽃무지 유충의 먹이로 가장 많이 이용되는 썩은 볏짚을 인근 농가에서 확보하여 동일한 방법으로 급여하여 발효사료의 유용성을 확인하고자 하였다.

### (2) 흰점박이꽃무지 유충의 야외 대량 사육 및 농가 기술이전

흰점박이꽃무지 유충을 야외 환경에서 사육하기 위하여 위에서 제시된 나무틀 내에 약 30-35 cm 두께로 발효 사료를 공급하고 1 m<sup>2</sup>의 면적당 500-700 마리의 유충의 밀도가 되도록 유충을 투입한 후 5 주간 사육하였으며 매주 유충의 체중을 측정하였다. 5 주 후 전체 유충을 회수하여 생존율을 조사하였다. 이상의 야외 톱밥발효 및 대량사육은 대전시 대덕구 신탄진 농협 (조합장 김옥환)의 협조 하에 대덕구 이현동 347번지 김진환씨의 비닐하우스에서 실시하였다. 톱밥의 발효 및 곤충의 사육 전 기간에 농협의 직원과 농가의 김진환씨가 함께 참여하여 실질적 기술이전이 이루어 질 수 있도록 하였다.



## 2. 연구수행 결과

### 가. 곤충유래 간기능 보호물질 탐색, 분리 및 특성분석

#### 1) 곤충유래 간기능 보호물질의 탐색

##### 가) 대상곤충자원의 확보

본 연구에 이용된 5종의 곤충 중 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)와 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)는 본 연구진에서 이미 수년간 실험실내 인공사육 되어 왔고 민간에서 굽벵이라는 통칭으로 불리어지며 간보호 효과가 있는 것으로 알려져 시중에 고가에 거래되고 있는 실정이다 (유충 kg당 15-20만원). 잣나무넓적잎벌 (*Acantholyda parki*)과 말매미 (*Cryptotympana coreana*)는 일부 전통민방의 재료로 사용되고 있으나 인공사육은 개발되어 있지 않고 야외채집에 의해 다량의 시료를 확보하였다. 갈색거저리 (*Tenebrio molita*)는 본 연구실에서 수년간 누대사육 되어 왔으며 본 실험을 위하여 대량으로 사육하여 이용하였다.

##### 나) 생체의 (in vitro) 간섬유화모델 시스템 확보 및 활성물질 탐색

(1) TGF- $\beta$  signaling promotor gene transfection에 의한 stable cell의 제조

(가) Transient TGF- $\beta$  조절 프로모터를 이용한 특이 억제제의 검정계 확립

TGF- $\beta$  하위 부위인 SBE, 3TP, RII를 특이적으로 억제하는 ligand가 선택적으로 smad 2와 Smad 3를 조절하는지를 조사하기 위하여 immuno-blotting을 실시하였으며, 직접적으로 Adenovirus 바이러스가 부착된 Smad 3 유전자를 직접 해당 세포주에 감염시킨 후 phospho-type의 Smad 2, Smad 3 발현정도를 관찰하였으며, 동시에 p-tyrosine이 동일 ligand로 조절되는지를 확인하였다. 따라서 Smad 2와는 작용하지 않으면서, 특이적으로 Smad 3를 선택적으로 억제하여 세포의 재생은 물론이고, 염증 치유와 섬유화 억제제 기능을 동시에 가지는 검정계를 확립하였다.

(나) SBE, 3TP, RII 유전자 Transfection에 의한 Stable 세포주 확립

HepG2, Hep3B, MCF7 세포주에다가 TGF- $\beta$  Transcription factor 프로모터인 Smad binding element, 3TP, RII와 pCl-neo DNA와 같이 co-transfection을 실시하여 G418(Geneticin) 600-1500  $\mu$ g 량으로 양을 점점 증가시키면서 저항성이 있는 세포 colony를 선별하여 expansion된 유전자 발현정도를 확인하였다. 이 세포주는 transient 발현시험의 효율성 제고와 지속적인 발현시험법을 이용하는 방법으로, 간편하면서도 동시에 빠른 시험법으로서 대량 검정모델로서 사용하기에 우수한 시스템으로 판단된다. 따라서 향후 섬유화 조절 기전연구에 막대한 예산절감과 초고속 섬유화 억제제 검정법에 절대적으로 필요한 간섬유화 억제제의 검정계를 확립한 것이다 (Fig. 1).

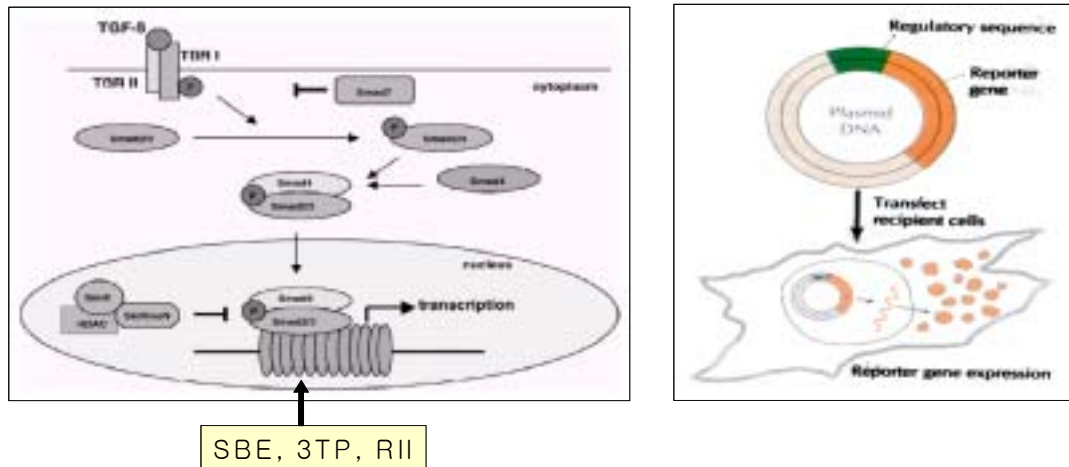


Fig. 1. Schematic diagram of *in vitro* hepatic fibrosis model system.

(2) *In vitro* 간보호 활성 검정

예비 실험 결과에서 여러 가지 본 연구에 이용된 다섯 가지 곤충을 포함한 여러 곤충시료로서 사염화탄소에 의한 간손상모델 쥐 (rat)에서 간보호 작용을 조사한 결과, 민간에서 간 보호 치료제로 널리 쓰이고 있는 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 유충과 장수풍뎅이 유충에서 간보호 효과가 있는 것으로 조사되었으며, 그 중 흰점박이꽃무지 유충이 우수한 간보호 작용을 나타내었다. 따라서 흰점박이꽃무지 유충시료 (PB)를 대상으로 확립된 생체의 간섬유화모델 시스템을 이용하여 활성검색과 활성물질의 분리를 시도하였다 (Fig. 2)

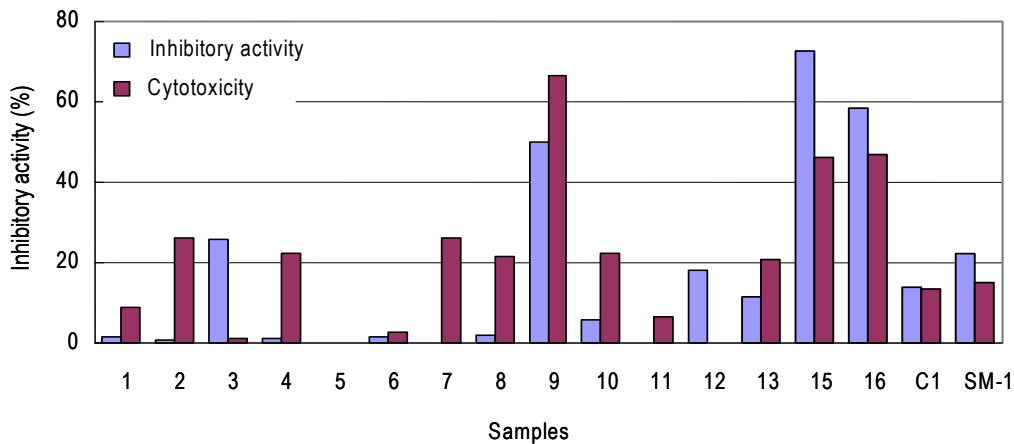


Fig. 2. Screening of insect extracts on *in vitro* hepatic fibrosis model system.

(1-16, samples; SM-1, silymarin)

(가) TGF- $\beta$  처리에 의한 SMAD Binding Element (SBE) activation assay

간보호 활성을 나타내는 흰점박이꽃무지 (PB) 시료를 여러 가지 방법으로 추출하여 TGF- $\beta$  처리에 의한 SMAD Binding Element (SBE) activation assay에 이용하였다. 각각의 fraction은 열탕추출액 (A), 열탕추출액을 butanol 용매분획한 butanol층 (B), 열탕추출액의 butanol 용매분획의 물층 (C), 그리고 PB의 동결건조 후 dry-power (D)이다. 흰점박이꽃무지 시료 (PB)에 대한 MTT, MTS 또는 SRB assay를 통하여 세포 생존을 측정한 후, 본 실험에서는 기본적으로 50- 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 활성검정을 시도하였다. 4 개의 시료 분획에 대하여 luciferase gene을 transfection한 HepG2 세포에 50  $\mu\text{g/ml}$ 와 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 활성물질을 처리하고 TGF- $\beta$ 로 reporter gene을 activation 시킨 뒤, TGF- $\beta$ 의 영향 및 활성물질 처리 전·후, 농도별로 세포에 미치는 영향을 조사하였다. TGF- $\beta$  처리를 하지 않았을 경우에는 luciferase gene 이 유도 발현되지 않았으며, 활성물질 처리시 열탕추출액 (A)과 butanol층 (B)은 농도 의존적으로 저해활성이 나타남을 확인할 수 있었으며, 특히 열탕추출액의 활성이 매우 높게 나타났다 (Fig. 3).

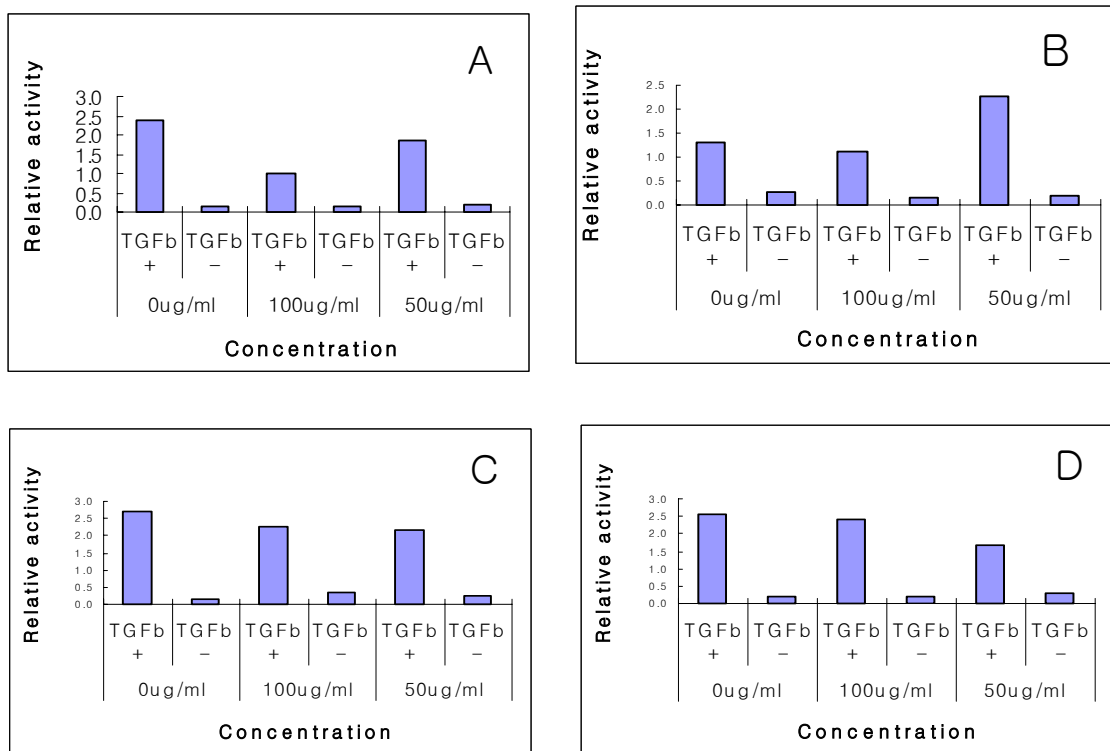
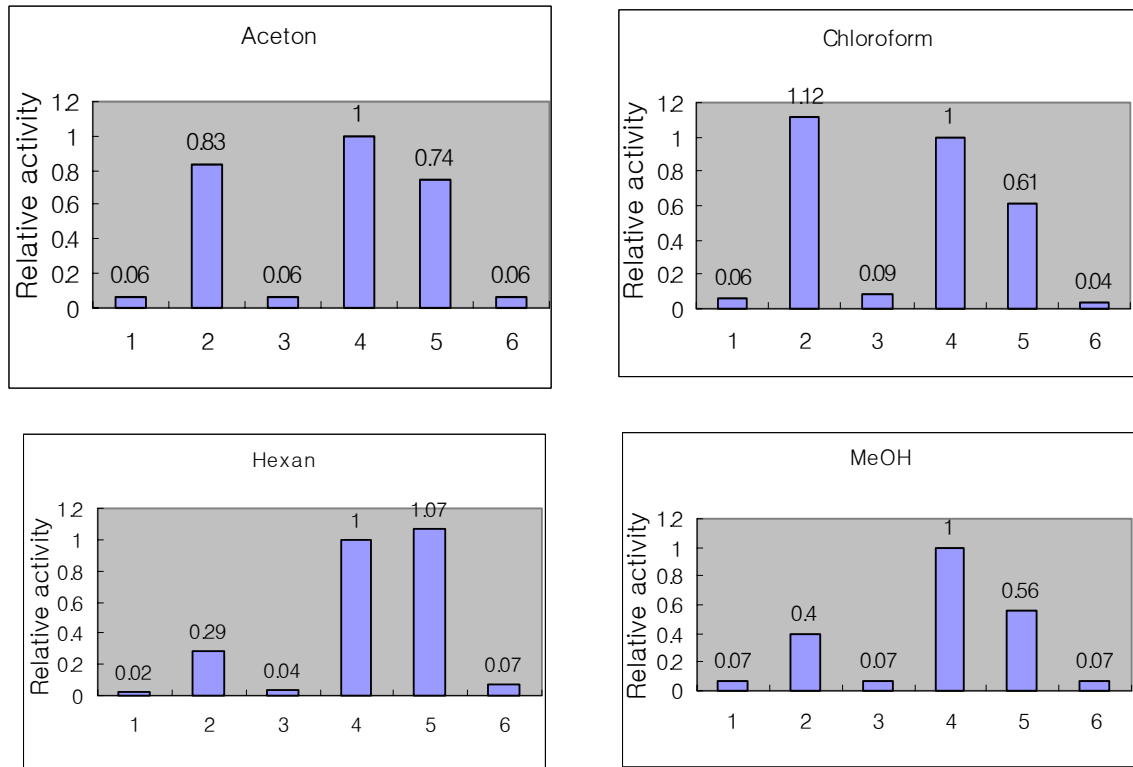


Fig. 3. SMAD Binding Element (SBE) activation assay of various *P. brevitarsis* extracts.

한편 PB 시료를 chloroform, acetone, methanol 등의 각종 용매를 이용하여 추출물을 획득한 후, 각 추출물의 활성을 조사하였다. chloroform과 acetone 추출물에서 미약한 저해활성을 나타내었으며, methanol 추출물이 가장 강한 저해활성을 나타내었으나, 농도의존적이지 못하였다 (Fig. 4). 따라서 그림 4의 결과와 함께 활성물질은 비교적 극성물질임을 추측할 수 있었다.



	(-)					
	control			control		
	1	2	3	4	5	6
TGF- $\beta$	-	+	-	+	+	-
시료		50 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml		100 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml

Fig. 4. SMAD Binding Element activation assay of various solvent extracts of *P. brevitarsis*.

#### 다) *In vivo* 간보호 활성 검정에 의한 간보호 활성물질 탐색

##### (1) 흰점박이꽃무지 추출물의 초기 분획화 및 간보호 활성 검정

여러 가지 곤충시료를 이용한 *in vivo* 예비실험에서 흰점박이꽃무지 유충의 동결건조 분말 (PB) 400 - 800 mg/kg을 투여시 매우 우수한 간보호 효과를 나타내었다 (Fig. 5). 또한 흰점

박이꽃무지 유충의 열탕추출물을 200 - 400 mg/kg 투여시에도 우수한 간보호 효과를 나타내었으나 (Fig. 6), 유기용매를 이용한 추출물에서는 활성이 급격하게 감소하는 것을 볼 수 있었다 (data not shown). 따라서 흰점박이꽃무지에서의 간보호 활성물질은 수용성인 것으로 판단되었으며, 차후 분리과정을 수용성 물질을 중심으로 실시하였다.

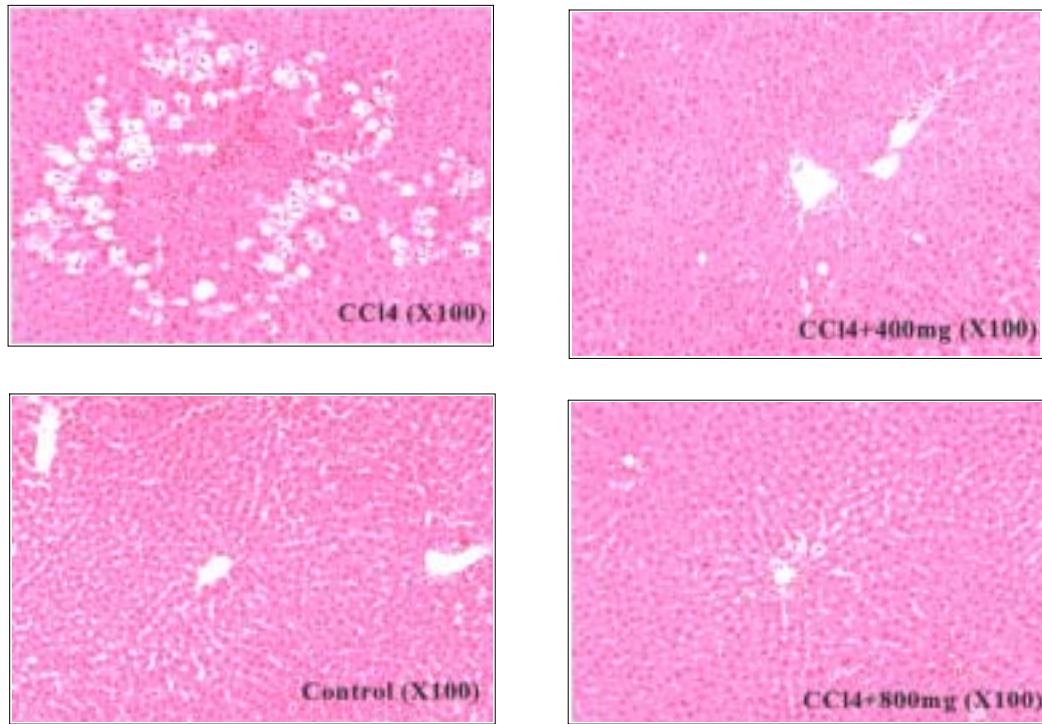


Fig. 5. Hepatic protective effect of *P. brevitarsis* hole body in  $\text{CCl}_4$ -induced hepatic damage.

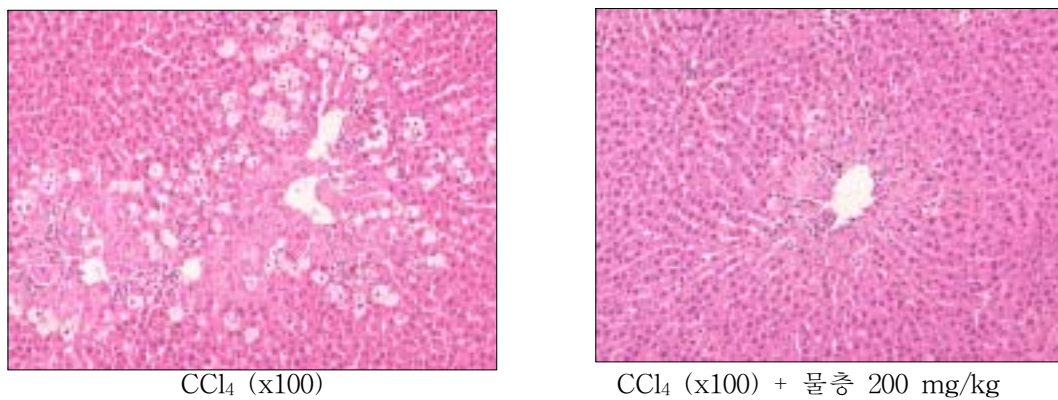


Fig. 6. Hepatic protective effect of water extracts of *P. brevitarsis* in  $\text{CCl}_4$ -induced hepatic damage.

라) 곤충시료로부터 지방간 형성 억제물질 (ACAT, Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제) 탐색

(1) 곤충시료로부터 ACAT 저해제 탐색

ACAT는 2 개의 isozyme이 존재하며, ACAT1은 분자량 약 50 kDa으로 간의 Kupffer 세포, 소장의 용모세포 이외(non-mucosal cell) 부분, 신장세포, 부신수질세포 등에 광범위하게 존재하고, ACAT2는 분자량 약 46 kDa으로 오직 간세포와 소장의 용모세포에만 존재한다. ACAT1은 세포막의 콜레스테롤을 일정한 농도로 유지하는데 관여한다면, ACAT2는 세포내부의 콜레스테롤을 에스테르화하고 지단백질로 분비하는 기능을 담당한다. 지방간은 간기능 손상의 근본원인이며, 콜레스테롤대사는 주로 간에서 이루어지는데, ACAT 저해제 탐색을 통해 세포나 조직내에 콜레스테롤이 에스테르화되어 축적되는 것을 막아 자연스러운 배설을 촉진하여, 간에 고지혈이 축적되는 지방간을 억제하고자 한다.

목표로 한 다섯 가지 곤충 시료를 이용하여 rat liver microsomal ACAT에 대한 저해활성을 조사하여 본 결과, 잣나무넓적잎벌 (*A. parki*) 유충의 methanol 분획과 acetone 분획에서 각각 59%와 89%의 높은 저해활성이 나타내었으며 (Table 1), 이 외에도 흰점박이꽃무지 유충 (*P. brevitarsis*)과 말매미의 추출물에서도 저해활성이 나타났다. 따라서 본 연구에서는 우선 잣나무넓적잎벌과 흰점박이꽃무지를 대상으로 추가적인 활성물질의 분리, 정제를 수행하고자 하였다.

Table 1. Inhibitory effects of various solvent extracts of insect resources on ACAT

Samples (0.1 mg/ml)	Inhibition (%)			
	MeOH Ex.	Hexane Ex.	EtOAc Ex.	Acetone Ex.
<i>A. dichotoma</i>	0	0	20	0
<i>P. brevitarsis</i>	6	21	21	16
<i>A. Parki</i>	59	22	46	<b>89</b>
<i>C. coreana</i>	9	24	24	15
<i>T. molita</i>	0	0	0	0

(2) 곤충시료로부터 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제 탐색

목표로 한 다섯가지 곤충 시료를 이용하여 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해활성을 조사하여 본 결과, 각 100 µg/ml의 농도에서 처리하였을 때, 잣나무넓적잎벌 유충과 흰점박이꽃무지 유충, 갈색거저리유충 등의 용매 분획에서 우수한 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해활성을 나타내었다 (Table 2).

Table 2. Inhibitory effects of various solvent extracts of insect resources on Lp-PLA<sub>2</sub>

Samples (0.1 mg/ml)	Inhibition (%)				
	MeOH Ex	Hx Ex	EtOAc Ex	Water Ex	Acetone Ex
<i>A. dichotoma</i>	0	0	13	16	0
<i>P. brevitarsis</i>	24	<b>69</b>	34	13	58
<i>A. Parki</i>	29	<b>63</b>	53	4	45
<i>C. coreana</i>	0	54	53	9	<b>60</b>
<i>T. molita</i>	19	56	30	0	0

## 2) 흰점박이꽃무지로부터 간기능 보호물질의 분리 및 산업화 기술 개발

### 가) 흰점박이꽃무지로부터 활성분획의 확보

간기능 보호물질의 탐색에 의해 흰점박이꽃무지 유충의 수용성 추출물이 Wistar rat를 이용한 *in vivo* 실험에서 우수한 간보호 활성을 나타내었으며, 이를 대상으로 하여 간보호 활성물질을 확보하고자 하였다. 간보호 활성물질의 탐색과정에서 메탄올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 등의 용매로서 시료를 추출하고 각각을 건조하여 간보호활성을 조사하였을 때, 부탄올 추출물에서 약한 간보호 활성이 나타났으나, 다른 용매추출물에서는 활성을 확인할 수 없었다. 수용액상의 흰점박이꽃무지 간보호 활성분획의 획득을 위하여 동결건조 된 유충 100 g 당 2 L의 증류수를 첨가한 다음 골고루 현탁하고, 이를 13,000 x g에서 20 분간 원심분리하여 상등액과 침전물로 나누었다. 각각의 분획을 동결건조한 후 *in vivo* 간보호 활성을 측정된 결과, 상등액 (Pb-DW)에 우수한 간보호 활성이 나타남을 확인할 수 있었다. 증류수를 이용한 추출 과정에서 추출효과의 증가를 유도하기 위하여 시료 100 g 당 1000 unit의 protease를 첨가하였을 때 (Pb-DWP) 보다 증가된 추출이 가능하였다 (Fig. 7). 시료를 decoagulation buffer (30 mM trisodium citrate, 26 mM citric acid, 20 mM EDTA, and 15 mM sodium chloride, pH 4.6)에서 추출하였을 때에도 우수한 추출효과를 보였지만 (PB Buf), salt의 제거 등의 문제점이 있어서 증류수를 이용하여 추출하는 것이 유리한 것으로 판단하였다.

Pb-DWP 시료를 동결건조 후 물로 용해시키고, 이를 증류수만을 이용하여 sephadex G-25 column chromatography를 수행하여 얻은 분획을 용출되는 순서에 따라 4 가지 (Pb-DWP 1-4)로 구분하여 각 100-300 mg/kg의 양으로 활성조사를 실시하였을 때 Pb-DWP 1과 2 분획을 실험동물인 Wistar rat에 급여시 mild fatty change와 inflammatory cell infiltration의 소견이 나타나는 것과 비교하여 Pb-DWP 3 분획의 급여시에는 정상의 소견을 보이는 우수한 간보호 활성을 확인하였다 (Fig. 8).

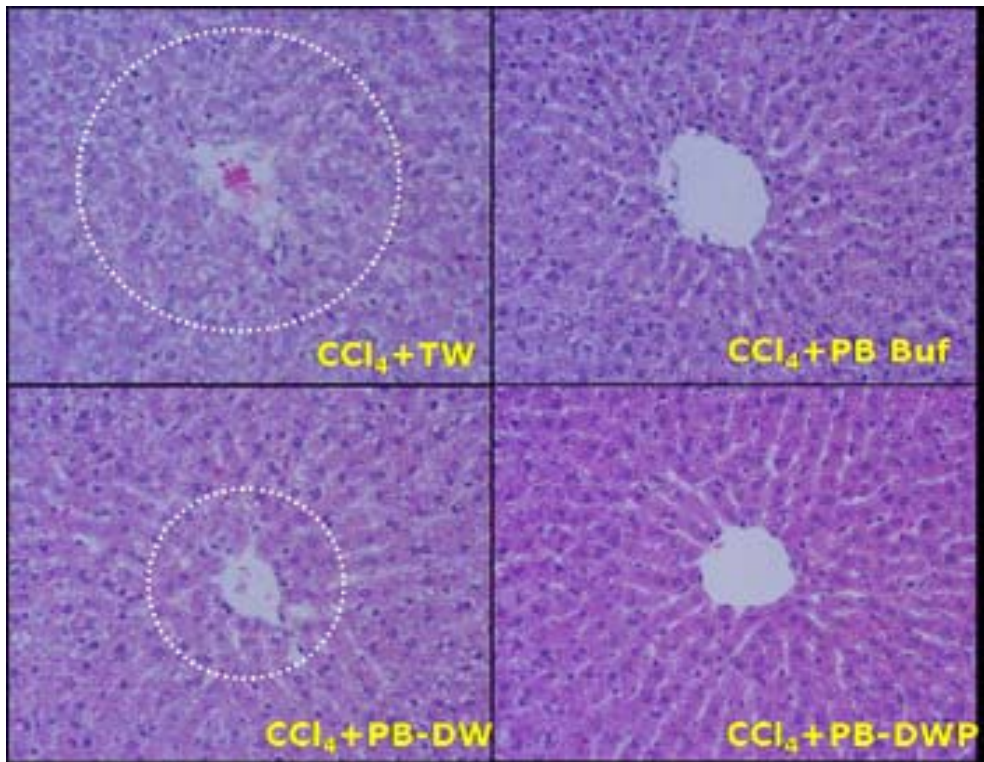
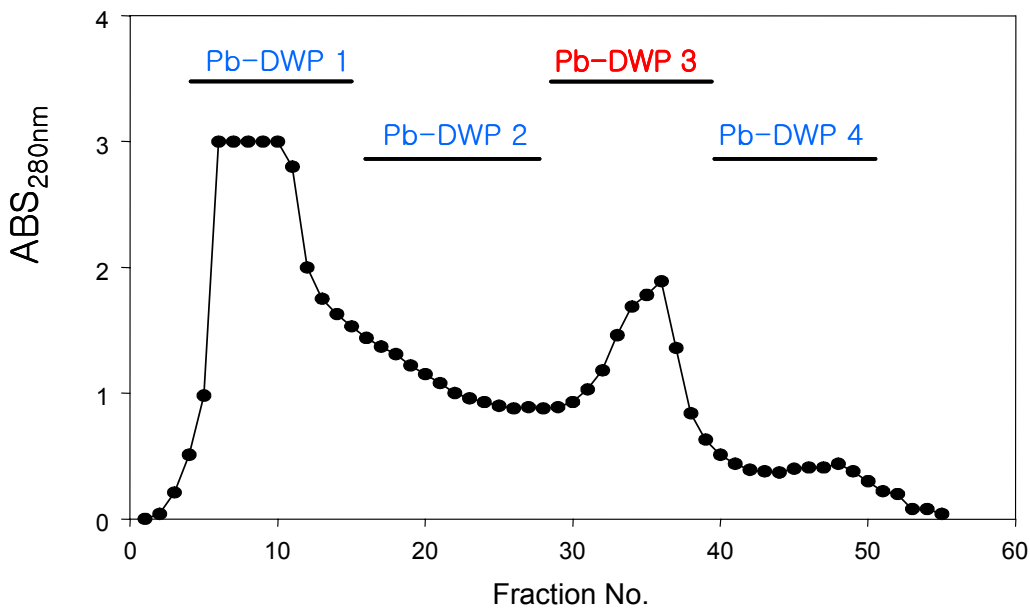


Fig. 7. 사염화탄소 투여에 따른 급성간독성과 흰점박이꽃무지 시료의 간손상 보호효과 CCl<sub>4</sub>+ Tap; 사염화탄소처리 및 tap water 급여, CCl<sub>4</sub> + PB3-3; 사염화탄소처리 및 buffer 추출물의 sephadex column 활성분획 급여, CCl<sub>4</sub> + PB-DW; 사염화탄소처리 및 물 추출물 급여, CCl<sub>4</sub> + PB-DWP; 사염화탄소처리 및 protease 처리 물 추출물 급여





Group	A	B	C	D	E	F
Treatment	TW + Olive oil	Pb-DWP 1 + CCl <sub>4</sub>	Pb-DWP 2 + CCl <sub>4</sub>	Pb-DWP 3 + CCl <sub>4</sub>	Pb-DWP 4 + CCl <sub>4</sub>	TW + CCl <sub>4</sub>
Leison	Normal	FC (mild) I.F. (weak)	FC (mild) I.F. (weak)	Normal	FC (mild) I.F. (mid)	FC (mild) I.F. (mod)

Fig. 8. Sephadex-G25 column chromatography (A) 및 각 분획의 간보호활성조사 (B).

Gel filtration에 의해 4개의 분획으로 나누었으며 활성조사 시 group D (Pb-DWP3)에서 가장 우수한 활성이 나타남. (I.F.; inflammatory cell infiltration, FC; fatty change, Nc; necrosis. nor; normal, mid; mild, mod; moderate, sev; severe)

Pb-DWP 3 분획을 수집 후 동결건조하고 다시 물로 용해한 후 100% 물로서 평형화된 C-18 reversed-phase column에 도입하고 물로 충분히 세척한 후 10 - 50%의 methanol을 이용하여 단계적으로 용출하였다 (Fig. 9). 그 결과 얻어진 용출분획 (C1-C7)을 수집하여 동결건조 또는 감압건조하고, 각 분획의 간보호 활성을 측정하였을 때 가장먼저 용출되는 C1 분획에서 normal~ weak fatty change (FC)와 inflammatory cell infiltration (I.F.)의 소견으로서 정상치에 가까운 우수

한 간보호 활성이 나타내었으며, 조사된 농도의 다른 분획 (C2-C7)에서는 moderate~severe FC, I.F.) 및 necrosis의 소견으로 간보호활성이 나타나지 않았다.

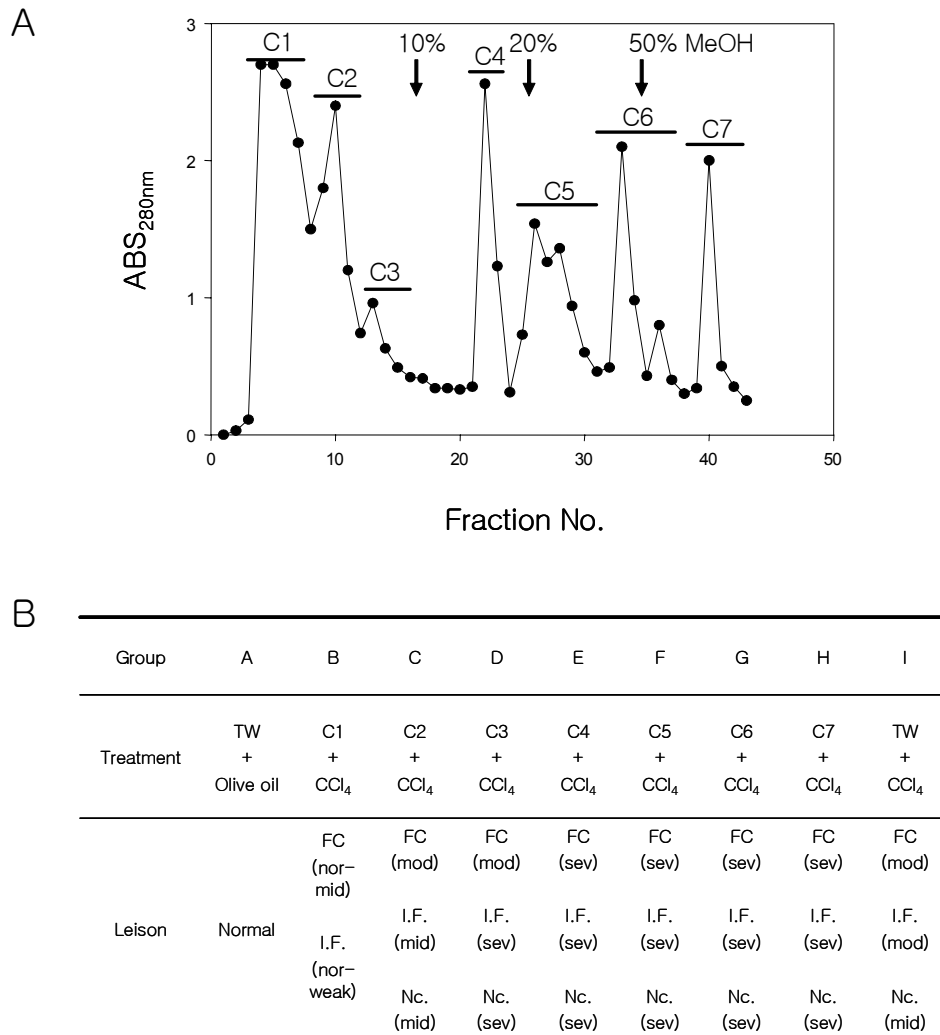


Fig. 9. C-18 reversed-phase column chromatography (A) 및 각 분획의 간보호활성조사 (B). (I.F.; inflammatory cell infiltration, FC; fatty change, Nc; necrosis. nor; normal, mid; mild, mod; moderate, sev; severe)

C-18 reversed-phase chromatography를 통해 얻어진 C1 분획의 추가적인 분리정제를 위하여 anion-exchange column인 Resource Q column을 이용하였다. 20 mM로 평형화된 column에 C1 시료를 물로 녹여 도입하고, 4 배의 column volume의 물로 세척한 후, 0-0.2 M NaCl linear gradient로서 용출하였으며, 연이어 0.5 M NaCl 농도로서 최종 용출하였을 때 분리되는 분획들 (R1-R4)을 수집하여 간보호활성을 측정하였다. 그 결과 R1-R3 분획에서 weak~severe FC, I.F.,

Nc. 등의 소견으로 나타나는 반면 R4 분획 (0.5 M NaCl 용출 분획)에서 정상치에 가까운 우수한 간보호활성을 확인할 수 있었다 (Fig. 10). R4 분획에 대한 이 활성분획에 대한 각 단계별 분리정제 과정을 Fig. 11에서 도식화하여 나타내었다.

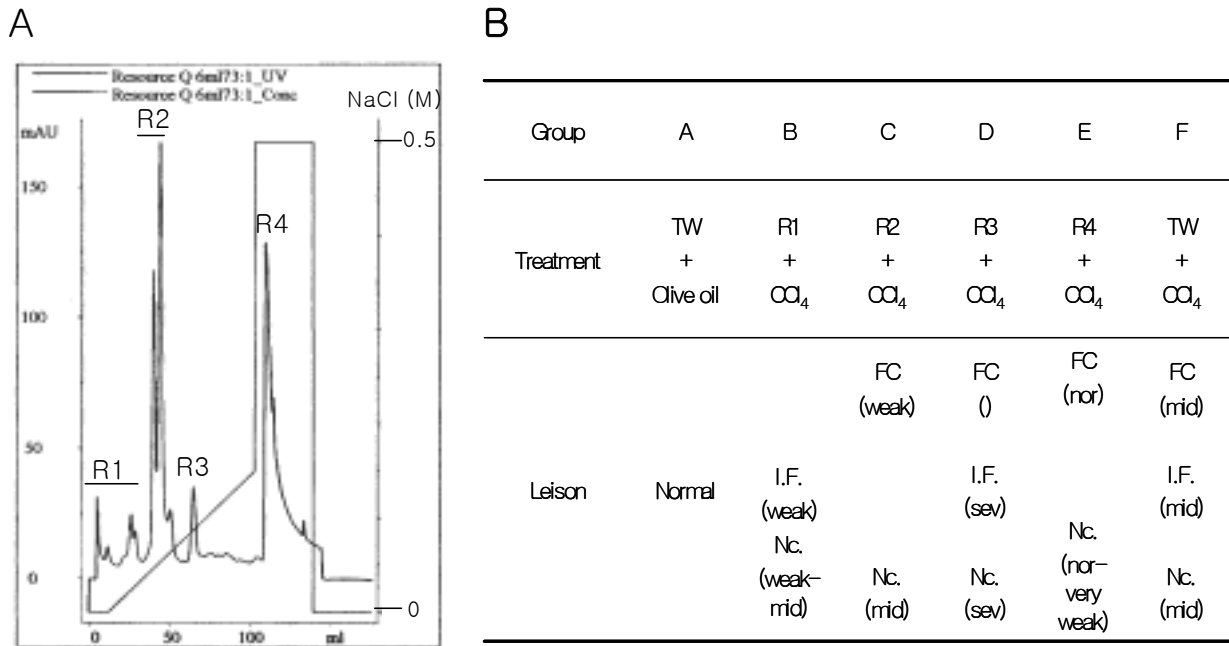


Fig 10. Resource A ion-exchange column chromatography (A) 및 각 분획의 간보호활성조사 (B). (I.F.; inflammatory cell infiltration, FC; fatty change, Nc; necrosis. nor; normal, mid; mild, mod; moderate, sev; severe)

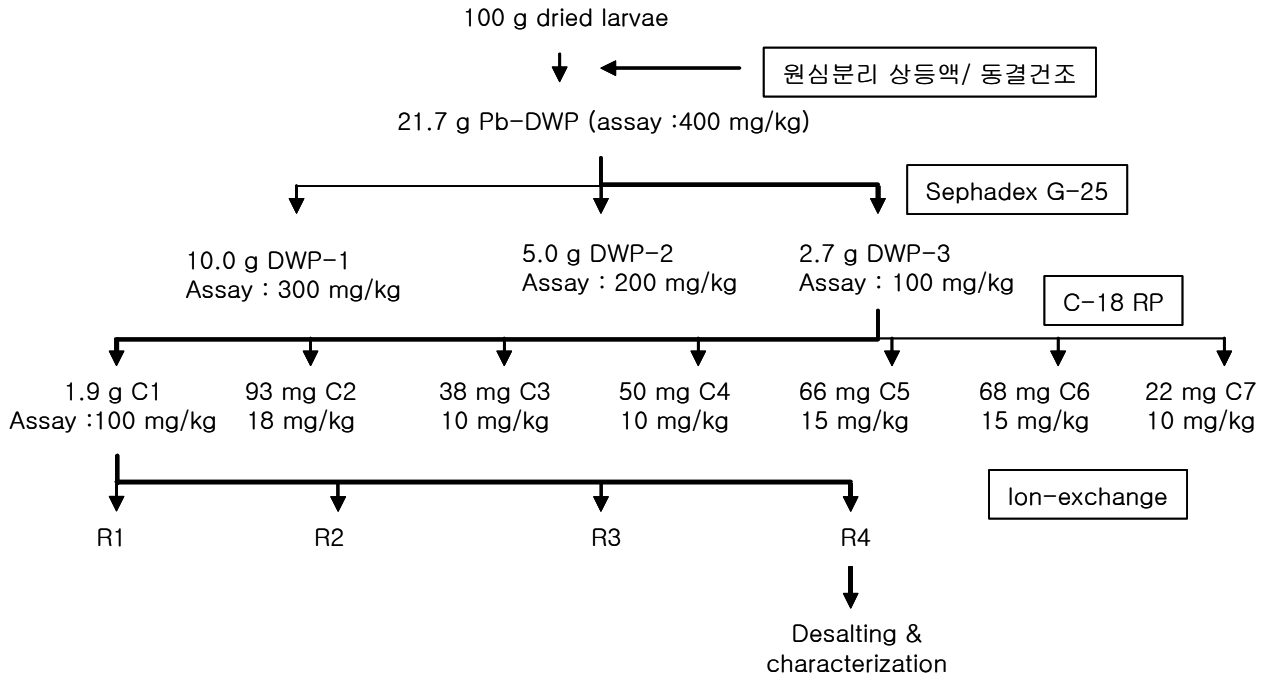


Fig 11. 흰점박이꽃무지로부터 간보호 활성물질 분리 단계 및 활성조사 용량

#### 나) 흰점박이꽃무지 간보호 활성분획의 대량분리방법 개발

원활한 간보호활성의 검정과 활성물질의 대량생산을 위해서는 위에서 시도한 방법보다 간편하고 대량분리가 가능한 방법의 개발이 필수적으로 요구된다. 따라서 본 연구진에서는 유충의 물추출액인 Pb-DWP 시료를 ultra-filtration system (Minimate TFF capsule)과 메탄올 분획 및 column chromatography를 이용하여 대량으로 분리할 수 있는 과정을 개발하였다.

확보된 Pb-DWP 추출액을 filter paper로서 여과한 다음 0.8  $\mu\text{m}$  cellulose acetate filter로서 다시 한번 여과하였다. 이 과정을 통해 확보된 추출액을 100 kDa, 10 kDa, 1kDa의 cut-off를 가지는 Minimate TFF capsule (Pall Co., USA)과 peristaltic pump를 이용하여 70 ml/min의 유속에서 filtration을 실시하면 2 L의 시료를 처리하는데 100 kDa filtration 과정에서 약 3-4 시간, 10 kDa 과정에서 5-6 시간, 그리고 1 kDa filtration 과정에서 약 15 시간 정도가 소요된다 (Fig. 12). 이러한 처리속도는 향후 filter system의 용량을 늘림으로서 scale-up이 가능하며 확보되는 시료의 무게와 향후 정제과정을 Fig. 13에서 나타내었다.



Fig. 12. Minimate TFT capsule을 이용한 ultra-filtration.

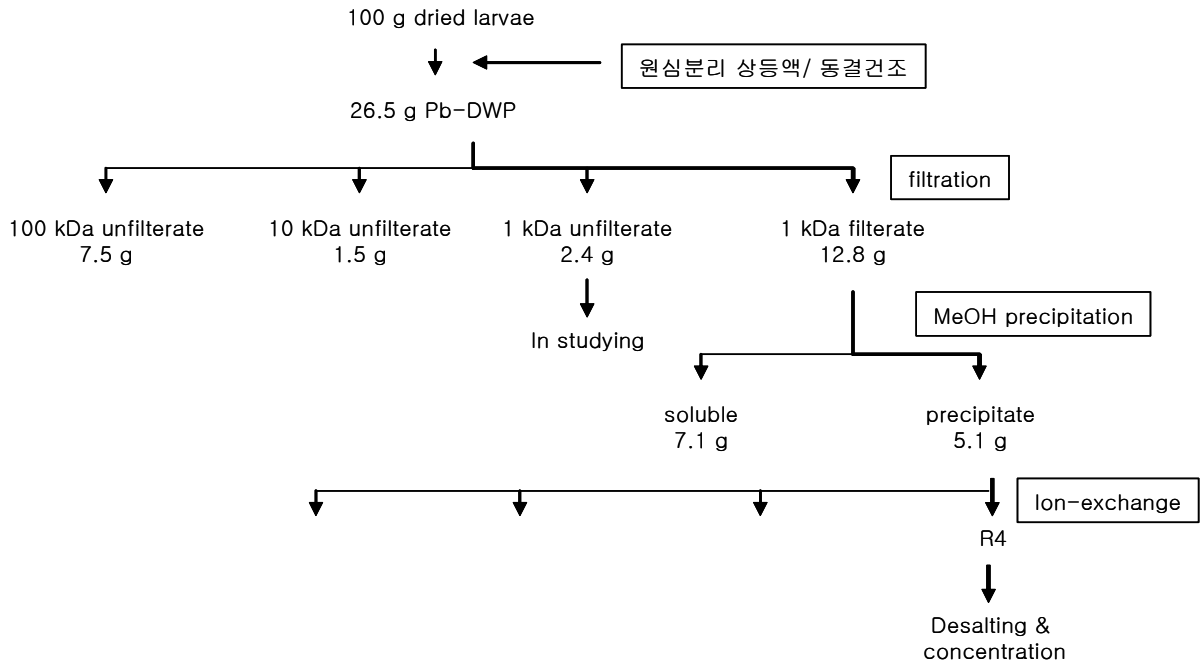


Fig. 13. 흰점박이꽃무지로부터 간보호활성물질의 대량분리를 위한 단계.

1 kDa filtrate와 1,10, 100 kDa retentate에서 간보호활성을 조사하였을 때 400 mg/kg의 dose에서 1 kDa filtrate와 1 kDa retentate에서 우수한 간보호 활성이 나타남으로 보아 흰점박이꽃무지에서 간보호활성을 나타내는 물질은 수용성이며 분자량이 1 kDa 이하일 것으로 예상된다 (data not shown). 그 중 우수한 활성과 더불어 많은 양을 차지하는 1 kDa filtrate를 동결건조한 후 수집하여 methanol로서 추출하였을 때 methanol에 가용성인 fraction과 불용성인 fraction으로 구분할 수 있으며 각 fraction을 건조한 후 물로 녹여 정제과정에서 사용한 Resource Q anion-exchange chromatography로서 분리하였을 때 간보호활성을 나타내는 0.5 M NaCl 용출분획이 대부분 methanol 불용성분획에서 나타나는 것을 볼 수 있으며 (Fig. 14) 결과적으로 흰점박이꽃무지 유충으로부터 증류수 추출과 ultra-filtration, methanol fractionation 및 ion-exchange chromatography 과정을 통하여 간보호 활성분획을 대량 확보할 수 있다.

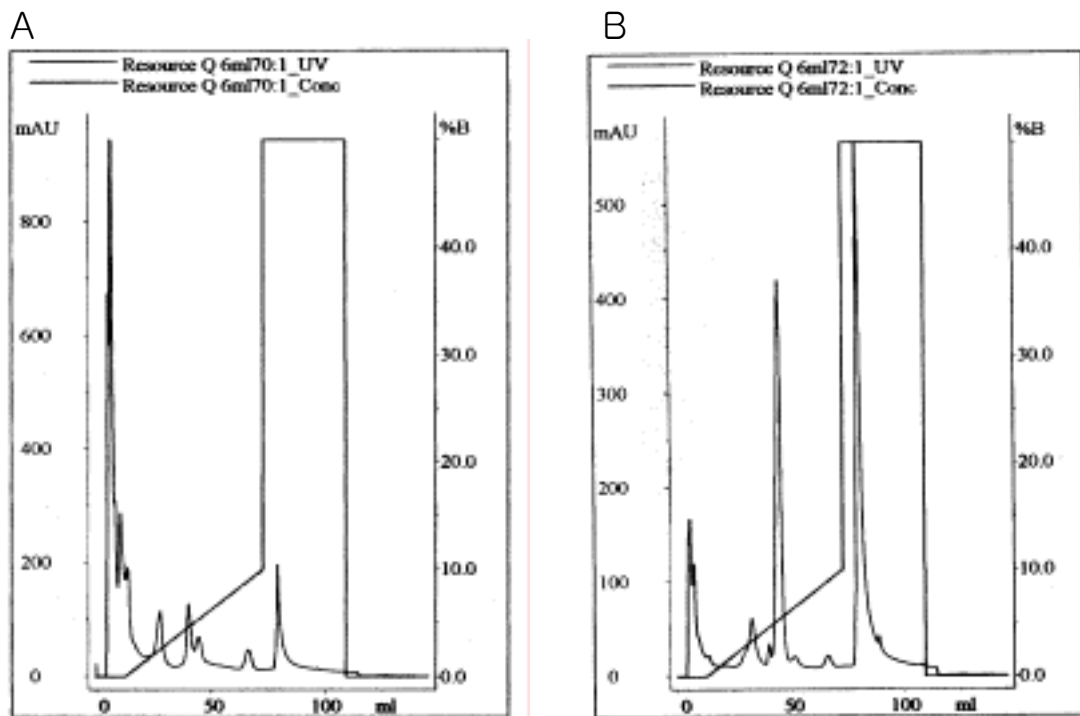


Fig. 14. 흰점박이꽃무지 추출물 (1 kDa 이하)의 methanol 가용부 (A) 및 불용부 (B)에서 활성분획의 존재양상을 Resource Q ion-exchange로서 확인할 때 0.5 M NaCl 용출분획이 대부분 methanol 불용부에서 나타남.

#### 다) 흰점박이꽃무지로부터 분리된 활성물질의 특성규명

간보호 활성을 나타내는 R4 fraction은 분자량 1 kDa 이하로서 이 물질은 methanol에는 거의 녹지 않는 강한 수용성을 나타내며 기존의 천연물 정제방법 및 liquid chromatography 방법들에 의해서도 완전한 정제가 어려움이 있었다. 아미노산의 존재 여부를 확인하기 위한

Nunhydrin 반응에서 음성으로 나타나 아미노산 혹은 펩타이드 성분은 아닌 것으로 사료된다. 또한 Bio-LC를 이용한 당당류 분석에 의해서도 당류의 검출이 거의 나타나지 않았다. UV-spectrum을 조사하였을 때 약 250 nm의 영역에서 흡수과장이 나타나는 것으로 조사되었다 (Fig. 15).

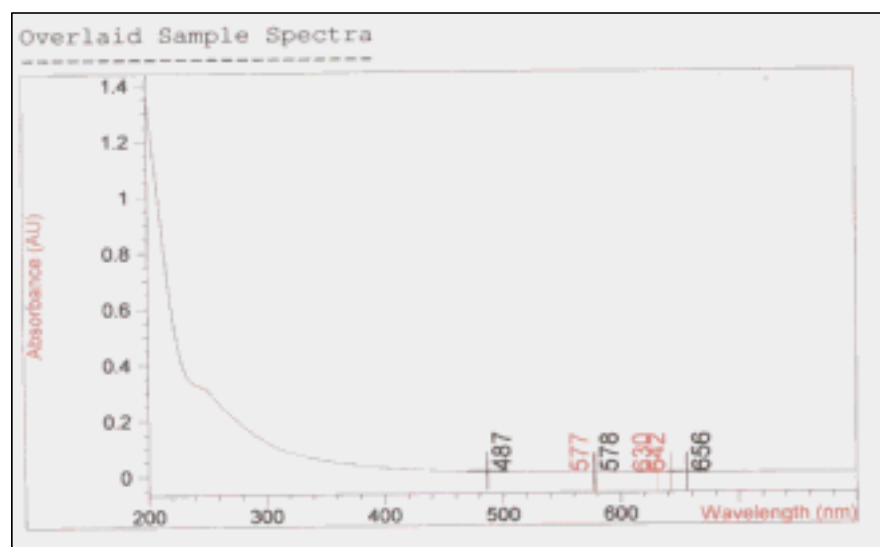


Fig. 15. UV absorbance spectra of R4 fraction isolated from *P. brevitarsis*.

#### 라) 실용화를 고려한 흰점박이꽃무지 간보호 활성물질의 대량 확보

흰점박이꽃무지 유충으로부터 간보호 활성분획을 대량으로 확보할 수 있는 방법으로 scale-up하여 기존에 분리량에 비해 50-100배에 해당하는 양의 활성분획을 분리하였다. 먼저 유충 건조중량 1 kg당 20 L의 증류수와 20,000 unit의 protease (Arazyme)를 넣고 골고루 현탁 한 후 체 (0.3 mm)를 이용하여 부유물과 입자가 큰 침전물을 제거하였다. 그 후, 대용량 원심분리기를 이용하여 상등액을 분리하고 동결건조하였다. 원심분리 상등액을 이용하여 ultrafiltration을 실시할 경우 filter가 쉽게 막히기 때문에 동결건조된 분말에 메탄올을 처리하여 메탄올 가용성 부분을 2-3회에 걸쳐 추출하고 메탄올 불용성의 침전물을 골고루 퍼서 잘 말린 후 최초 부피의 1/2의 증류수를 가하여 현탁하고 원심분리에 의한 상등액을 확보하였다. 원심분리 상등액을 filter paper로써 1차 여과한 다음 ultrafiltration system을 이용하여 저분자의 간보호 활성물질을 최종 확보하고 (Fig. 16) 동결건조하여 보관하면서 추후의 동물실험에 이용하였다 (Fig. 17). 이러한 방법에 의해 1 kg의 건조된 흰점박이꽃무지 유충으로부터 최종적으로 약 40 g 정도의 간보호 활성분획을 얻을 수 있다.

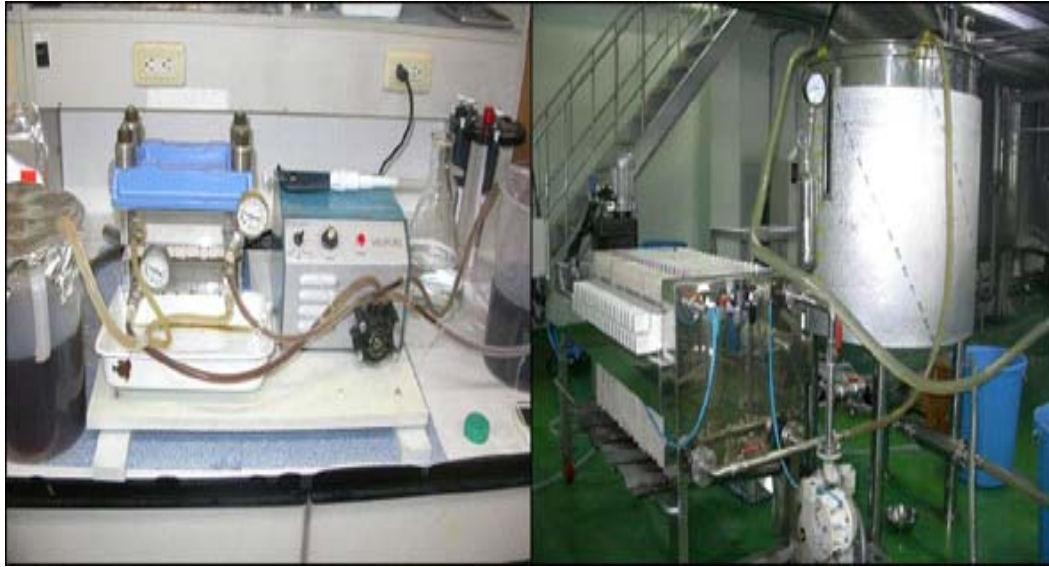


Fig. 16. Ultra-filtration system. 연구실에서 사용되는 5-20 L scale (좌)과 산업용으로 이용되는 100-2000 L scale (우).



Fig. 17. 산업용 동결건조기를 이용한 흰점박이꽃무지 수용성 추출물의 동결건조.



### 3) 끈충유래 간기능 보호물질의 생체효능 검증

#### 가) 흰점박이꽃무지 추출물의 간보호 효과

흰점박이꽃무지 유충의 간보호 활성 성분은 생체의 간섬유화모델 시스템을 이용한 활성 측정에서는 특이적 활성을 나타내지 않았다 (data not shown). 이러한 결과로 보아 분리된 물질은 간섬유화 인자인 TGF- $\beta$  처리에 의해 발현 유도되는 SMAD Binding Element (SBE) activation의 저해과정과는 별도의 기작에 의한 활성을 나타내는 것으로 보인다.

실험동물을 이용하여 사염화탄소 처리에 의한 간손상 보호효과를 각 활성조사 과정에서 이용하였으며 실험의 대조구로서 시중에 시판되고 있는 silymarin을 30 mg/kg 농도에서 사용하였다. 현재 까지 진행된 마지막 정제산물인 ion-exchange에 의한 0.5 M NaCl 용출분획은 탈염과정이 완전하지 않아 정확한 양을 산출하기 어려운 점이 있어서 조정제 단계의 C-18 reversed phase chromatography에서의 C1 fraction을 100 mg/kg의 농도에서 간손상 보호효과를 비교하였다. 그 결과 각각 5마리의 rat를 이용한 2회의 반복실험에서 C1 fraction을 급여하였을 때(Fig. 18D) 2회 모두 normal-weak inflammatory cell infiltration의 손상의 소견으로 사염화탄소 처리군(Fig. 18 A)에서 보여주는 것과 같은 심각한 간손상과 비교할 때 우수한 간보호활성을 나타내었으나 positive control로 이용한 silymarin의 경우 30 mg/kg 농도에서 normal-weak의 보호효과를 나타나는 경우와 더불어 mild inflammatory cell infiltration과 weak necrosis의 손상이 나타나는 경우도 존재하였다 (Fig. 18 B, C).

간손상에 의해 증가되는 혈액 내 GPT 수치를 조사하였을 때 C1 fraction 처리 시 2회 반복한 각 5 마리의 처리구에서  $110.8 \pm 5.36$ ,  $123.4 \pm 24.31$  (IU/ml)로 유사한 간보호활성을 보인 반면 silymarin 처리시  $105 \pm 10.78$ ,  $153 \pm 52.00$  (IU/ml)으로 두 실험군간의 차이가 나타났으며, 이러한 결과는 GOT 값에서도 유사하였다 (Fig. 19). 이 차이는 silymarin이 통상적으로 급성 간독성 실험에 사용되는 예가 많지 않다는 점에서 두 가지 물질 모두 좀 더 장기적인 간보호 효과 및 농도의존성 효과 등에 대한 추가적인 조사가 필요하며, 흰점박이꽃무지로부터 분리한 물질이 간보호 또는 치료제로서의 가능성이 매우 높음을 보여주어 다음 단계 연구로 흰점박이꽃무지 추출물의 대량 확보 및 급성 독성실험과 알콜에 대한 독성실험을 진행하였다.

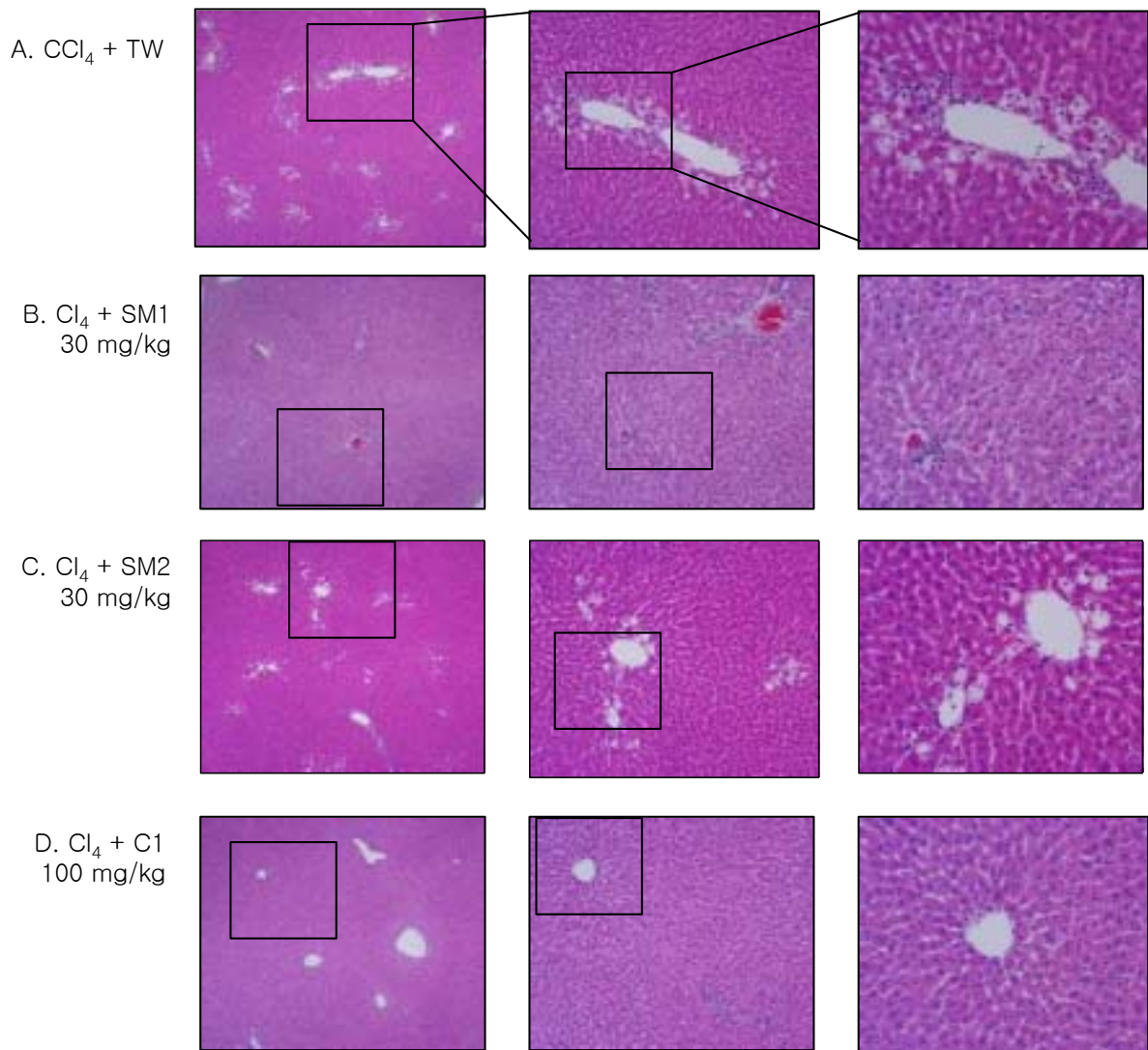


Fig. 18. 흰점박이꽃무지로부터 분리된 간보호물질 (C1)의 효능검정. C1의 경우 각 시험구에서 유사한 간보호효과가 나타났으며 silymarin (SM)의 경우 30 mg/kg의 농도에서 약간의 편차 (SM1, SM2)가 존재함.

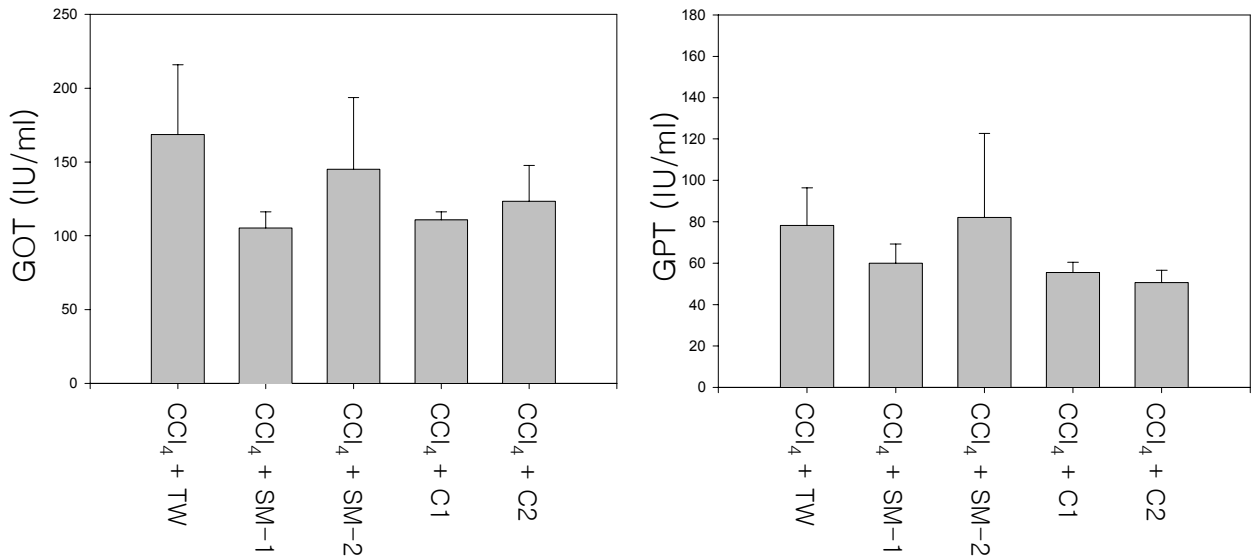


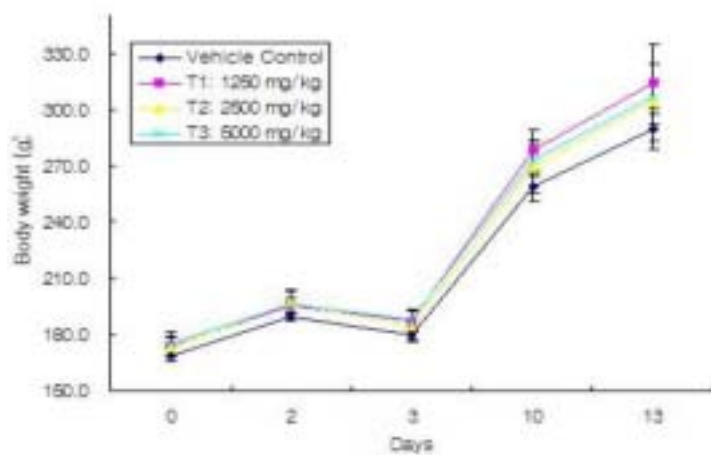
Fig. 19. 흰점박이꽃무지에서 분리된 간보호활성물질 처리시 혈액내 GOT 및 GPT 변화. (TW, Tap water; SM-1 and 2, 30 mg/kg silymarin treatment; C1 and C2, 100 mg/kg C1 fraction treatment)

#### 나) 흰점박이꽃무지 추출물의 단회투여 독성시험

특정병원체 부재 (SPF) 5주령의 암·수 SD 랫트를 이용한 독성시험에서 1250-5000 mg/kg의 dose로서 독성시험을 실시하였을 때, 시험기간 동안 폐사한 동물은 없었으며, 특이적인 임상증상을 나타낸 동물은 관찰되지 않았다. 체중은 시험 종료 시, 시험 개시 시점에 비해 40-50%의 증가를 보였으며, 군간 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 20). 부검시 육안적인 관찰 및 조직병리학적 관찰에서 대조군 및 투여군 모두 외관과 내부장기에 어떠한 이상이나 병변이 발견되지 않았다 (Table 3-Table 6).

이상의 결과를 종합하면, 흰점박이꽃무지 추출물은 고용량인 5000mg/kg 에서도 어떠한 부작용 및 사망 소견을 나타내지 않는 것으로 볼 때 무해용량으로 판단되나 반복투여 독성시험을 통해서 임상적용이 가능한 용량을 설정하는 것이 적절하다고 판단된다.

(a) male



(b) female

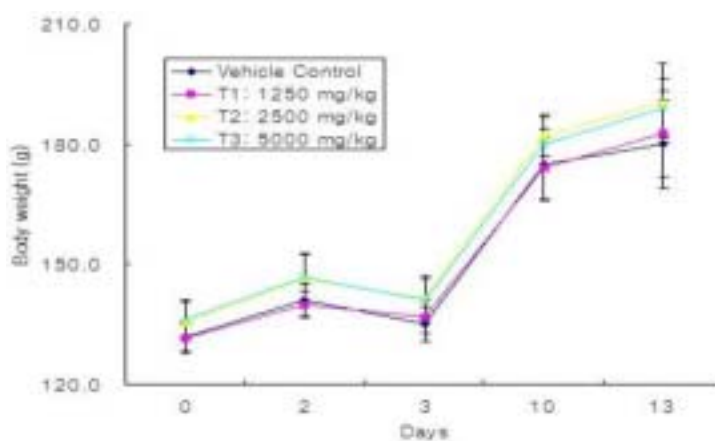


Fig 20. Changes in body weights of rats during administration with the administration with the extract of PB.

Table 3. Gross findings of male rats examined at 2 weeks (group summary).

GROUP DOSE : (mg/kg)	INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
	V. CONTROL 0	T1 1250	T2 2500	T3 5000
BRAIN				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
HYPOPHYSIS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
LIVER				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SPLEEN				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
HEART				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
LUNG				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYMUS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYROID GLAND-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYROID GLAND-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SALIVARY GLAND				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
TESTIS-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
TESTIS-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
PROSTATE				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SEMINAL VESICLE				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%

(END OF REPORT)

Table 4. Gross findings of female rats examined at 2 weeks (group summary).

GROUP	INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			
	V. CONTROL	T1	T2	T3
DOSE : (mg/kg)	0	1250	2500	5000
BRAIN				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
HYPOPHYSIS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
LIVER				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SPLEEN				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
HEART				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
LUNG				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYMUS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYROID GLAND-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYROID GLAND-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SALIVARY GLAND				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
OVARY-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
OVARY-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
UTERUS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO GROSS FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%

(END OF REPORT)

Table 5. Histopathological findings of male rats examined at 2 weeks (group summary).

INCIDENCE OF HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS				
GROUP	V. CONTROL	T1	T2	T3
DOSE : (mg/kg)	0	1250	2500	5000
BRAIN				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
HYPOPHYSIS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
LIVER				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SPLEEN				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
HEART				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
LUNG				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYMUS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYROID GLAND-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYROID GLAND-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SALIVARY GLAND				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
TESTIS-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
TESTIS-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
PROSTATE				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SEMINAL VESICLE				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%

(END OF REPORT)

Table 6. Histopathological findings of female rats examined at 2 weeks (group summary).

GROUP DOSE : (mg/kg)	INCIDENCE OF HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS			
	V. CONTROL 0	T1 1250	T2 2500	T3 5000
BRAIN				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
HYPOPHYSIS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
ADRENAL GLAND-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
ADRENAL GLAND-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
LIVER				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SPLEEN				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
KIDNEY-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
KIDNEY-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
HEART				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
LUNG				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYMUS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYROID GLAND-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
THYROID GLAND-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
SALIVARY GLAND				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
OVARY-LEFT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
OVARY-RIGHT				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%
UTERUS				
No. of Observations	8	8	8	8
NO HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS	8 100%	8 100%	8 100%	8 100%

(END OF REPORT)



### 다) 흰점박이꽃무지 추출물의 알코올로 유도한 간병변에 대한 효능시험

시험기간 동안 폐사한 동물은 없었으며, 특이적인 임상증상을 나타낸 동물은 관찰되지 않았다. 체중은 시험 종료시 시험 개시 시점에 비해 40-50 %의 증가를 보였으며, 군간 통계적인 유의성은 나타나지 않았으나, alcohol diet를 섭취한 군에서 체중 증가량이 control diet를 섭취한 군과 비교하였을 때 감소한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 21). 부검시 육안적인 관찰에서 대조군 및 흰점박이꽃무지 추출물 (PB) 투여군 모두 외관과 내부장기에 어떠한 이상이나 병변이 발견되지 않았다. 혈액생화학적 검사 결과알코올 다이어트 급여 4주후 시험 물질인 PB를 투여한 군에서 부형제대조군이 알코올 다이어트 투여군과 비교하였을 때 통계학적으로 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 GOT (AST) 및 GPT (ALT)의 혈중 농도 감소가 관찰되었다 (Fig. 22). 한편, 간의 정상적인 기능을 나타내는 혈청중 total protein과 albumin 측정값은 Control diet를 급여한 군에 비해서 Alcohol diet를 급여한 군에서 낮게 나타났으나, 시험물질인 PB를 투여한 군에서는 통계학적 유의성은 관찰되지 않았으나 부형제대조군과 비교하였을 때 PB에 의한 간 보호 기능이 있는 것으로 판단된다 (Fig. 23).

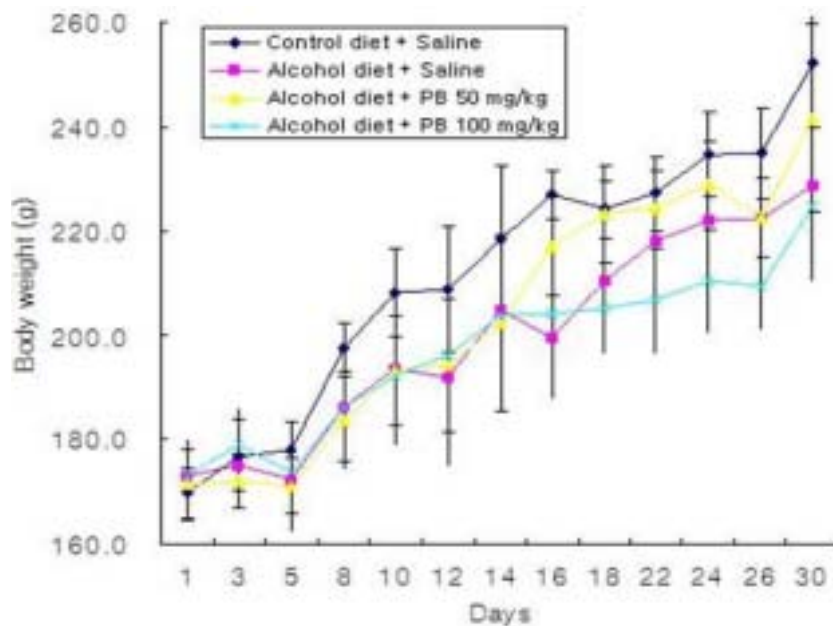
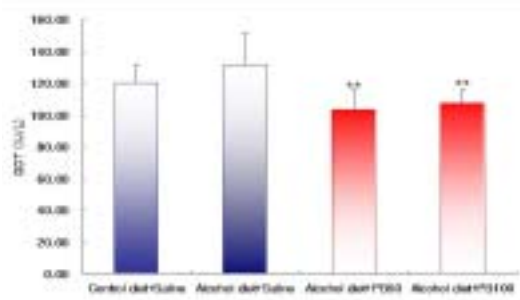


Fig 2. Changes in body weights of rats with the administration with alcohol diet and the extract of PB.

(a) GOT



(b) GPT

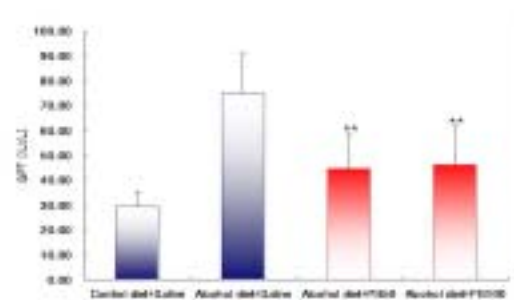
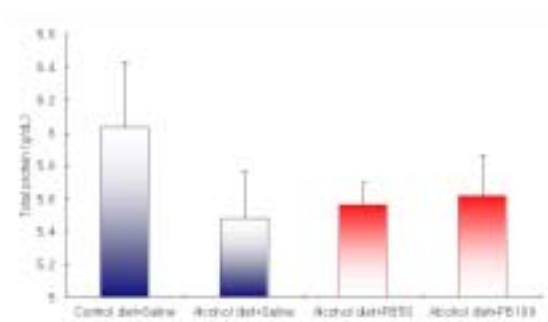


Fig 22. Changes in serum GOT and GPT values of rats with the administration with alcohol diet and the extract of PB for 4 weeks. \*\*:p<0.01, significant difference from the value for Alcohol diet+Saline.

(a) Total protein



(b) Albumin

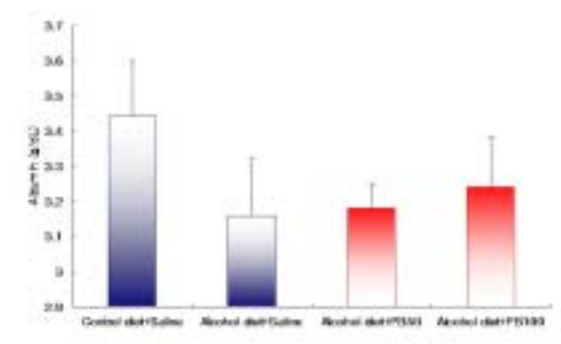
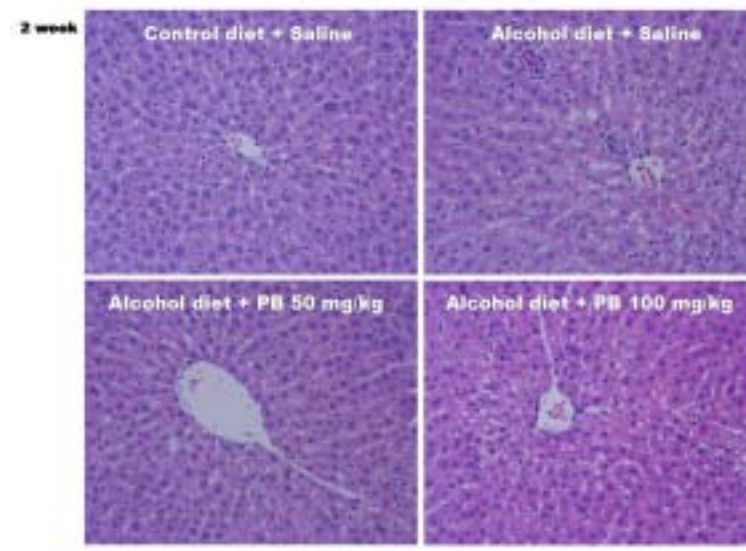


Fig 23. Changes in serum total protein and albumin values of rats with the administration with alcohol diet and the extract of PB for 4 weeks.

조직병리학적 관찰 결과 control diet 급여군과 비교하여 alcohol diet 급여 2 주후부터 소엽중심성의 지방변성이 모든 alcohol diet 급여군에서 관찰되었으며, 급여 4 주후의 간의 조직병리학적 소견에서는 alcohol diet만을 급여한 부형제 대조군과 비교하였을 때, PB 투여군에서 소엽중심성의 지방변화가 경미한 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 이러한 알코올로 유도한 간손상 랫드 동물 모델에서 PB는 농도 의존적으로 소엽중심성의 지방변화를 억제하는 효과를 나타내는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 24 and Table 7).

(a)



(b)

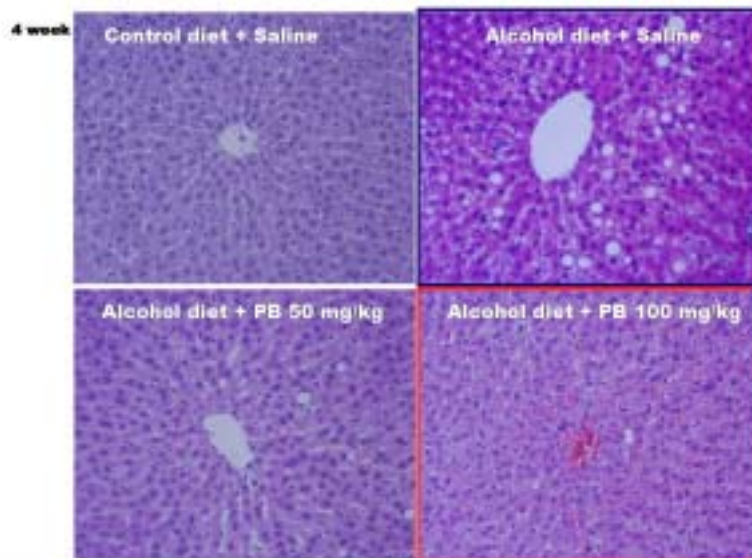


Fig 24. Histopathological changes in alcohol-induced rat liver. (a) 2 weeks after alcohol diet administration. The microvacoular fatty changes were observed around the centrilobular lesion in all alcohol diet group. (b) 4 weeks after alcohol diet administration. The lesion of the PB treated group reveals more mild fatty change than Alcohol diet + Saline group. It was considered that the effect of PB for alochol-induced rat liver showed dose-dependent manner. HE.  $\times 66$ .

Table 7. The results of histopathological findings of the alcohol diet-induced rat liver.

Group	2 weeks	4 weeks
Control diet	Normal	Normal
Alcohol diet	Fatty Change 0~1+	2+
Alcohol diet + PB 50mg/kg	Fatty Change 1+	1 ~ 2+
Alcohol diet + PB 100mg/kg	Fatty Change 1~2+	1+ ~

Alcohol diet 급여로 유도한 alcohol liver disease (ALD) 동물 모델은 alcohol abuse로 인한 다양한 조직에서의 alcohol의 독작용에 대한 연구를 위해서 널리 이용되고 있으며, 간은 그 중에서 가장 중요한 표적장기라고 할 수 있다. ALD의 발생에 대한 정확한 병리기전은 아직까지 밝혀진 것이 없지만, alcohol의 섭취 정도와 다양한 위험 요소들에 의한 것이라고 일반적으로 알려져 있다. 설치류에 있어서 장기간에 걸친 알코올의 투여는 간의 지방변화, 괴사, 유괴사, 염증 등을 일으킨다고 알려져 있으며, 더 나아가서는 경미한 간 섬유화를 유발하기도 한다. 이러한 ALD에 대해서 간보호 효과가 있을 것으로 판단되는 시험물질인 PB를 Liber-Decarli model로 유도한 랫드를 이용한 동물모델 시험에 있어서 50 mg/kg와 100 mg/kg의 용량으로 투여한 결과 alcohol diet 급여 4주 후 alcohol diet만을 투여한 부형제대조군에 비해서 시험물질을 투여한 군에서 소엽 중심성의 지방변화가 시험물질 농도 의존적으로 억제된 것을 관찰할 수 있었다. 혈청중의 간손상 지표에 대한 분석에 있어서도 알코올 다이어트만을 투여한 부형제 대조군에 비해서 GOT 및 GPT가 통계학적으로 유의성있게 ( $p < 0.01$ ) 억제된 것을 관찰하였으며, 간기능 정도를 나타내는 지표인 total protein과 albumin의 측정값은 통계학적 유의성은 인정되지 않았으나, 부형제 대조군에 비해서 증가한 경향을 관찰할 수 있었다. 또한, 4 주간의 반복적인 시험물질의 투여는 시험동물의 기타 장기에 아무런 독작용을 나타내지 않았으며, 이러한 결과를 종합해 볼 때, 본 시험물질은 반복 경구투여시 100mg/kg 농도에서는 내부장기에 어떠한 이상이나 병변 없이 간보호 효과를 가지는 물질로 판단된다.

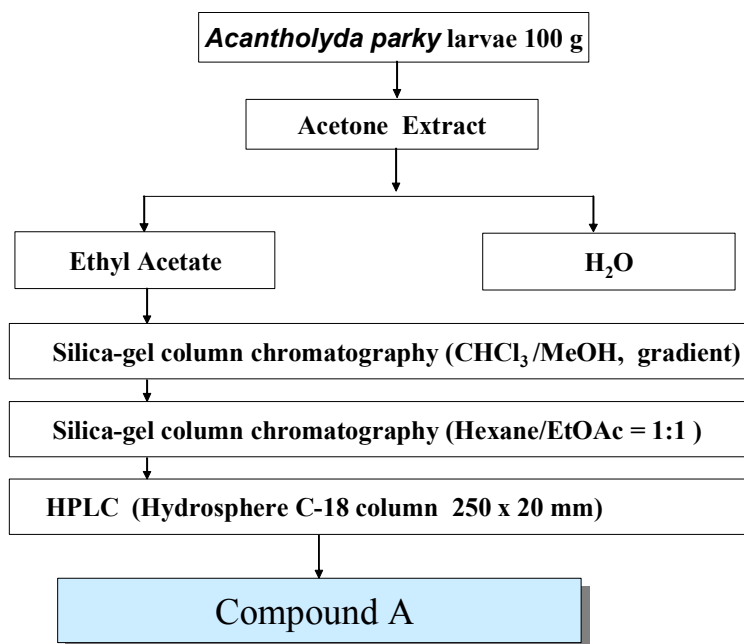
#### 4) 곤충유래 지방산 형성 억제물질의 분리 및 특성규명

##### 가) 잣나무넓적잎벌 유충으로부터 ACAT 저해제의 분리 및 특성규명

(1) 잣나무넓적잎벌 유충으로부터 ACAT 저해제, E-3-(4-hydroxyphenyl) propen-1-ol)의 분리 및 특성규명

##### (가) 잣나무넓적잎벌로부터 ACAT 활성 저해제 분리

동결건조된 잣나무넓적잎벌 유충 100 g을 분쇄기로서 분쇄하여 분말로 만들고 이를 3 L의 acetone에 넣어 48 시간 교반하여 filter paper로서 여과하였다. 여과된 상등액을 감압 건조하여 13 g의 시료를 획득하였다. 이를 hexane, ethyl acetate, water로서 partition하여 활성을 검정한 결과, ethyl acetate 분획에서 높은 활성이 검출되었다. 활성분획을 silica gel column chromatography에서 chloroform/methanol gradient로서 분리하고 활성이 나타난 분획을 2차 silica gel column chromatography (hexane : ethyl acetate= 1 : 1)를 이용하여 분리하였다. 그 결과 얻어진 활성분획으로부터 reverse phase HPLC (Hydrosphere C18, 250 x 20 mm, MeOH: H<sub>2</sub>O = 80 : 20)를 이용하여 순수물질 A를 분리하였다 (Fig. 25).



.Fig. 25 Isolation scheme of ACAT inhibitor from *A. parki*.

(나) 잣나무넓적잎벌로부터 분리된 활성물질의 구조분석

1) 물성 : 무정형 백색분말

2) 분자량: 150.1

3) 분자식: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>

4) <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 7.22 (2H, d, J=8.7 Hz, H-2, H-6), 6.71 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3, H-5), 6.51 (1H, d, J=15.9 Hz, H-7), 6.15 (1H, dt, J=10.5, 6.1 Hz, H-8), 4.14 (1H, d, J=6.1 Hz, H-9).

5) <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 158.6 (C-4), 131.9 (C-7), 129.8 (C-1), 128.6 (C-2, C-6), 126.5 (C-8), 116.4 (C-3, C-5), 63.9 (C-9).

6) EIMS (rel. int.) m/z [M]<sup>+</sup> 150 (55), 107 (98), 94 (40), 77 (20)

이 compound의 입체구조는 proton NMR data와 보고된 두 가지 isomer에 대한 문헌 자료를 비교하여 *E*-isomer인 *E*-3-(4-hydroxyphenyl)propen-1-ol로 결정되었다 (Table 8, Fig. 26).

Table 8. <sup>1</sup>H-NMR Data for *E*-p-Coumaryl alcohol, *Z*-p-Coumaryl alcohol and compound A

	Proton	<i>E</i> -isomer(s)	<i>Z</i> -isomer(s)	compound A
Chemical shift	A	6.51	6.43	6.49
	B	6.15	5.66	6.15
	C	4.17	4.33	4.17
	2,6	7.22	7.06	7.22
	3,5	6.71	6.76	6.70

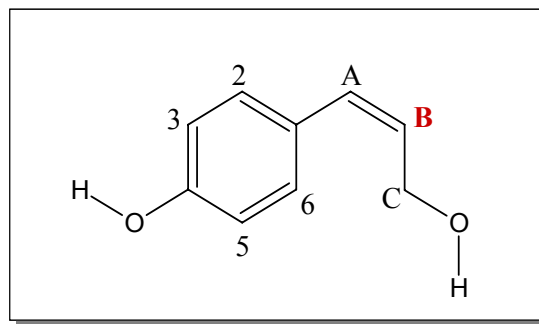
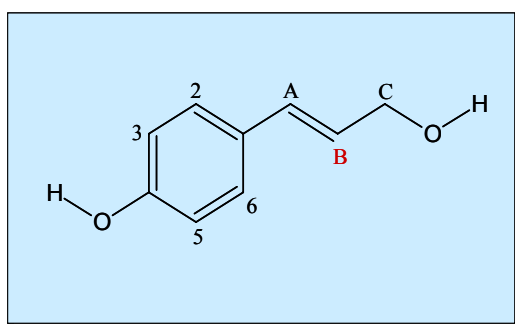


Fig. 26. Structure of *E*-3-(4-hydroxyphenyl)propen-1-ol isolated from *A. parky* and structure of *Z*-3-(4-hydroxyphenyl)propen-1-ol.

(다) E-3-(4-hydroxyphenyl) propen-1-ol의 ACAT 저해 활성

분리된 E-p-Coumaryl alcohol의 rat microsomal ACAT 저해활성은 IC<sub>50</sub> 값이 181  $\mu$ M이었고 (Fig. 27), E-p-Coumaryl alcohol의 ACAT 저해활성이 밝혀진 최초의 보고이다.

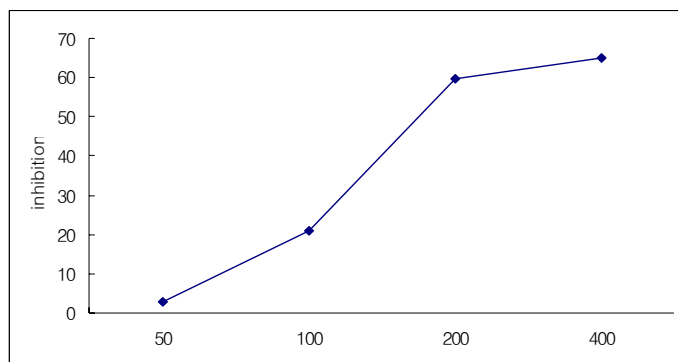


Fig. 27. Inhibitory activity of rat liver microsomal ACAT by E-3-(4-hydroxyphenyl)propen-1-ol.

(2) 잣나무넙적잎벌로부터 신규의 ACAT 저해제, Acanthol 1의 분리 및 특성규명

(가) ACAT 저해제의 분리

동결건조된 잣나무넙적잎벌 유충 100 g을 분쇄기로서 분쇄하여 분말로 만들고 이를 3 L의 acetone에 넣어 48 시간 교반하여 filter paper로서 여과하였다. 여과된 상등액을 감압 건조하여 13 g의 시료를 획득하였다. 이를 hexane, ethyl acetate, water로서 partition하여 활성을 검정한 결과, ethyl acetate 분획에서 높은 활성이 검출되었다. 활성분획을 silica-gel column chromatography에서 chloroform/methanol gradient로서 분리하고 활성이 나타난 분획을 2차 silica-gel column chromatography (hexane : ethyl acetate= 1 : 1)를 이용하여 분리하였다. 그 결과 얻어진 활성분획으로부터 reversed phase HPLC (Hydrosphere C18, 250 x 20 mm, MeOH: H<sub>2</sub>O = 80 : 20)를 이용하여 순수물질 B를 분리하였다 (Fig. 28).

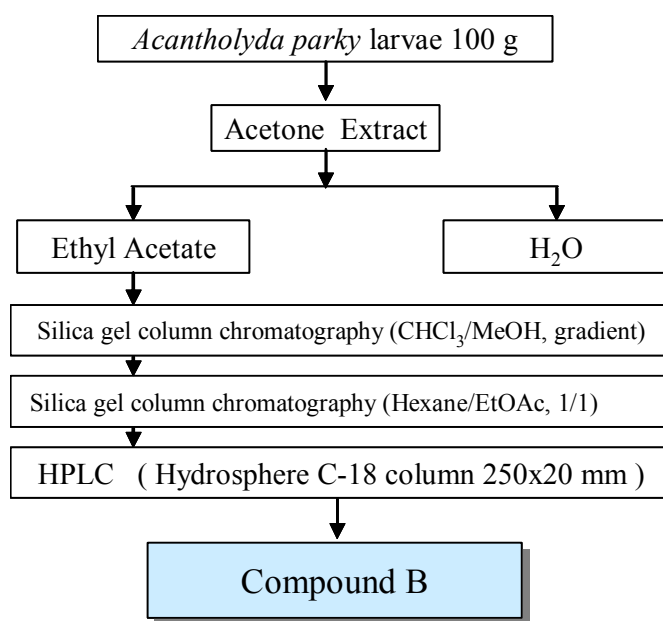


Fig. 28. Isolation scheme of ACAT inhibitor from *A. parki*.

(나) 활성물질의 구조분석

- 1) 물성 : 무정형 백색분말
- 2) 분자량: 414
- 3) 분자식:  $C_{29}H_{50}O$
- 4)  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz) 5.35 (1H, t,  $J = 2.75$  Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3), 2.27 (2H, m, H-4), 2.00 (2H, dt,  $J = 12.70, 3.15$  Hz, H-12), 1.82 (1H, m, H-8), 1.98 and 1.51 (2H, m, H-7), 1.84 and 1.01 (2H, dt,  $J = 9.65, 3.50$  Hz, H-1), 1.81 and 1.25 (2H, m, H-16), 1.51 (1H, m, H-27), 1.58 (2H, m, H-15), 1.51 (3H, m, H-11 and H-21), 1.32 (4H, m, H-24 and H-25), 1.36 (1H, m, H-20), 1.25 and 1.00 (2H, m, H-2), 1.10 (2H, m, H-26), 1.08 (1H, m, H-17), 1.00 (3H, s, H-19), 0.96 (2H, m, H-9 and H-14), 0.90 (6H, d,  $J = 6.45$  Hz, H-23 and H-22), 0.87 (3H, d,  $J = 6.55$  Hz, H-29), 0.86 (3H, d,  $J = 6.60$  Hz, H-28), 0.68 (3H, s, H-18)
- 5)  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 125 MHz) 141.43(C-5), 122.37(C-6), 72.40(C-3), 42.91(C-4), 40.45(C-12), 32.27(C-8), 32.58(C-7), 37.92(C-1), 28.90(C-16), 28.68(C-27), 24.96(C-15), 21.76(C-11), 32.58(C-21), 36.86(C-24), 24.49(C-25), 36.46(C-20), 31.67(C-2), 40.19(C-26), 56.82(C-17), 20.06(C-19), 57.44(C-14), 50.81(C-9), 19.69(C-23), 19.38(C-22), 23.48(C-29), 23.23(C-28), 12.53(C-18), 37.18(C-10), 42.99(C-13).



6) EIMS (rel. int.)  $m/z$  414 [ $M^+$ ], 396(15), 386(100), 368(70), 353(65), 329(20), 301(60), 275(85), 255(40), 247(25), 231(35), 213(50), 159(40), 107(60), 95(50), 81(45), 55(50).

이 compound의 입체구조는 proton NMR data와 보고된 기타 analogs compounds 에 대한 문헌 자료를 비교하여 Acanthol 1로 결정되었다 (Fig. 17).

이 compound의 입체구조는 proton NMR data와 보고된 기타 analogs compounds 에 대한 문헌 자료를 비교하여 Acanthol 1로 결정되었다 (Fig. 29).

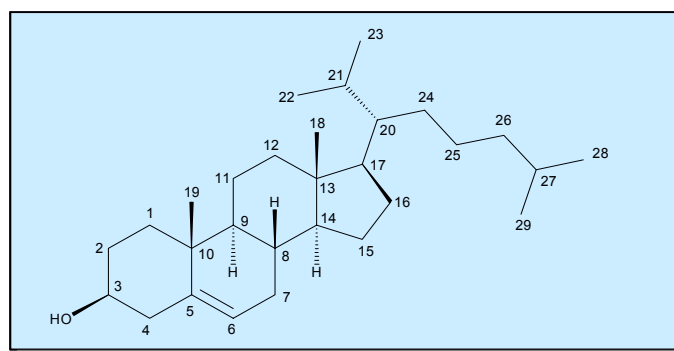


Fig. 29. Structure of Acanthol 1 isolated from *A. parky*.

(다) Acanthol 1 의 ACAT 저해 활성

분리된 Acanthol 1의 rat microsomal ACAT 저해활성은  $IC_{50}$  값이 281  $\mu M$ 이었다.(Table 9), 사람 ACAT-1과 ACAT2의 저해활성은 각각 177  $\mu M$ 과 131  $\mu M$ 로 나타났다.

Table 9. 아칸톨 1의 ACAT에 대한 저해활성

효소원	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
쥐간 ACAT	281
사람 ACAT-1	177
사람 ACAT-2	131

## 나) 흰점박이꽃무지로부터 ACAT 저해제 분리 및 특성규명

### (1) 흰점박이꽃무지로부터 ACAT 저해제의 분리

동결건조된 흰점박이꽃무지 유충 200 g을 분쇄기로 분쇄하여 분말로 만들고, 이를 4 L의 물을 가하여 8 시간동안 열탕추출한 다음 filter paper로서 여과하였다. 여과 상등액을 동결건조한 후 순차적으로 hexane, ethyl acetate, butanol 등의 용매를 이용하여 분획한 후, 활성을 검정한 결과 butanol 분획에서 높은 활성이 검출되었다. 활성분획을 silica gel column chromatography에서 chloroform/methanol의 용매계를 이용하여 분리하고, 활성이 나타난 분획을 2차 silica gel column chromatography를 이용하여 분리하였다. 그 결과 얻어진 활성분획으로부터 reverse phase HPLC (Hydrosphere C18, 250 x 20 mm, MeOH: H<sub>2</sub>O = 90 : 10)를 이용하여 순수 물질 B를 분리하였다 (Fig. 30).

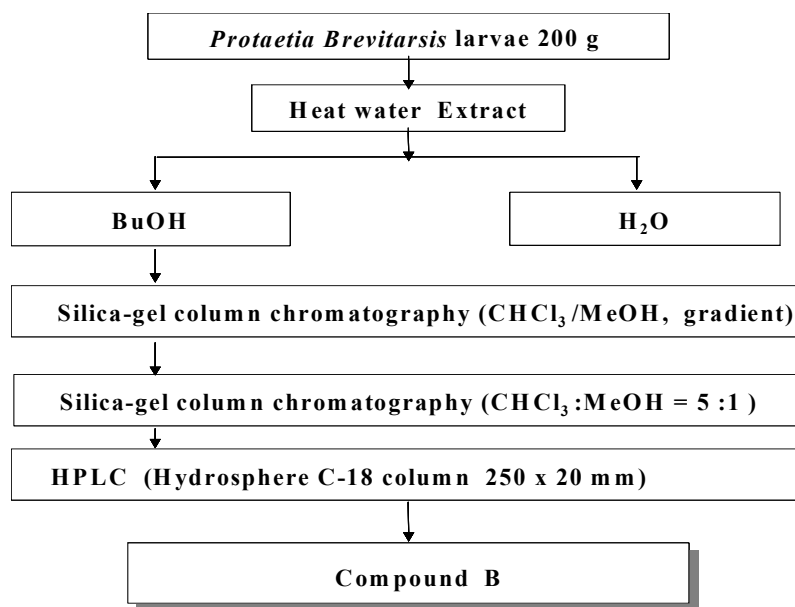


Fig. 30. Isolation scheme of ACAT inhibitor from *P. brevitarsis*.

### (2) 흰점박이꽃무지로부터 분리된 ACAT 활성 저해물질의 구조 분석

- 1) 물성 : 무색 유성액체
- 2) 분자량: 390
- 3) 분자식: C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>

- 4)  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7.69 (2H, dd,  $J=4.1, 7.2$  Hz, H-11, H-11'), 7.51 (2H, dd,  $J=4.1, 7.2$  Hz, H-12, H-12'), 4.20 (4H, d,  $J=9.2$  Hz, H-1, H-1'), 1.66 (2H, m, H-2, H-2'), 1.42 (4H, m, H-3, H-3'), 1.39 (4H, m, H-4, H-4'), 1.29 (4H, m, H-5, H-5'), 0.90 (6H, m, H-6, H-6'), 1.23 (4H, m, H-7, H-7'), 0.86 (6H, m, H-8, H-8').
- 5)  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  169.7 (C-9, C-9'), 132.4 (C-10, C-10), 130.8 (C-12, C-12'), 128.8 (C-11, C-11'), 68.1 (C-1, C-1'), 38.7 (C-2, C-2'), 30.3 (C-3, C-3'), 29.6 (C-4, C-4'), 23.0 (C-5, C-5'), 14.0 (C-6, C-6'), 23.7 (C-7, C-7'), 10.9 (C-8, C-8'),
- 6) EIMS (rel. int.)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  391 (10), 279 (85), 167 (90), 149 (100), 113 (80), 73 (85), 57(90)

$^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ , HomoCOSY, HMQC, HMBC 등의 NMR data와 MS data 및 보고된 문헌 자료를 참고하여, 이 compound B의 구조를 dioctyl phthalate로 결정하였다 (Fig. 31).

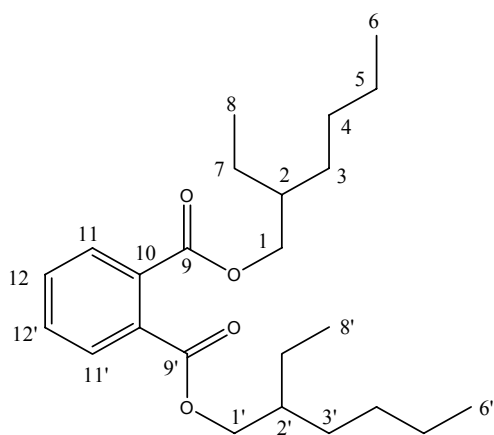


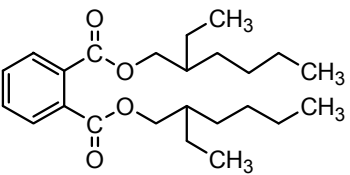
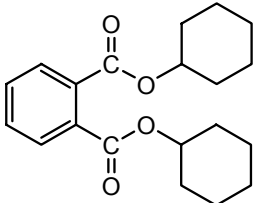
Fig. 31. Structure of dioctyl phthalate isolated from *P. brevitarsis*.

(3) 흰점박이꽃무지로부터 분리된 dioctyl phthalate 및 그 유도체의 ACAT 저해활성

흰점박이꽃무지에서 분리된 dioctyl phthalate와 그 유도체들(dibutyl phthalate, diphenyl phthalate, benzyl butyl phthalate, diallyl , dimethyl phthalate, dimethyl isophthalate, dipropyl phthalate, diethyl phthalate, dicyclohexyl phthalate)을 수집하여 ACAT 저해활성을 조사한 결과, dioctyl phthalate는 약한 ACAT 저해활성( $\text{IC}_{50} = 286 \mu\text{M}$ )을 나타내는 반면, 유도체 중의 하나인 cyclohexyl phthalate는 매우 강한 저해활성( $\text{IC}_{50} = 8.6 \mu\text{M}$ )을 나타내었다. 한편, dioctyl phthalate는 잉여의 cholesterol을 HDL에서 LDL로 운반하는 단백질인 cholesteryl ester transfer

protein (CETP) 활성 저해능이 매우 높음( $IC_{50} = 5.7 \mu M$ )을 관찰하였으며, 흔히 모든 phthalate를 독성이 있는 물질만으로 제시하는 것에 비해 phthalate 유도체들을 이용한 기능성식품, 식품의약 및 의약품 개발을 위한 좋은 기초 자료를 제시한 것으로 판단된다.

Table 10. ACAT and CETP inhibitory activities of dioctyl phthalate and dicyclohexyl phthalate.

Compounds	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	
	ACAT	CETP
 <p>Dioctyl phthalate</p>	286	5.7
 <p>Dicyclohexyl phthalate</p>	8.6	36.0

#### 다) 갈색거저리로부터 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해활성을 보이는 linoleic acid의 분리

연구에 이용된 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레목 거저리과의 유충으로서 밀과 같은 저장곡류의 주요 해충이며 실험동물과 조류의 사료로 이용되기도 한다. 아직까지 특정 약용효과에 대해서는 보고되어 있지 않다.

곤충추출물의 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해활성검색 결과 우수한 활성을 나타내는 갈색거저리를 선택하였으며 65 g의 갈색거저리 건사체를 메탄올 추출과 연이은 hexan 분배에 의하여 hexan 층으로부터 5.6 g의 추출물을 획득하였으며 silica-gel column chromatography와 RP-HPLC로서 순수 분리하였다.

분자구조 규명을 위한 기기분석결과는 하기와 같으며 발표된 문헌과 비교하여 본 결과 9,12 octadecadienoic acid로 판명되었다.

Compound - <sup>1</sup>H-NMR: 0.88(t, 3H, J=7 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.40(m, 14H, 7CH<sub>2</sub>), 1.63(quint., 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 1.98-2.08(m, 4H, 2CH<sub>2</sub>-CH=CH), 2.35(t, 2H, J= 7 Hz, CH<sub>2</sub>-COOH), 2.77

(t, 2H, J= 6 Hz, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 5.27-5.45(m, 4H, 2CH=CH). 11.10(weak peak, COOH), EI-Mass: [M<sup>+</sup>], m/e =280.

분리된 linoleic acid 화합물은 Lp-PLA<sub>2</sub> 에 대한 IC<sub>50</sub>치가 각각 277 μM로 나타나 비교적 낮은 저해활성을 나타내었고 (Fig. 32) 여러 가지 종류의 linoleic acid analogues에 대한 활성의 조사에서도 대체로 낮은 저해활성이 나타났다. 다만 cis 형의 isomer에 비해 trans 형이 조금 더 우수한 저해활성을 보여주었다 (Table 11).

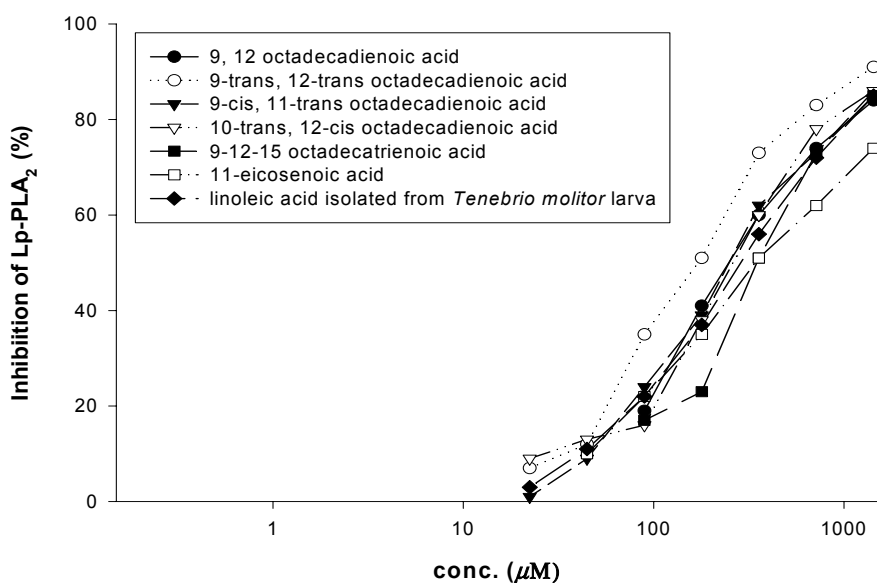


Fig. 32. Lp-PLA<sub>2</sub> inhibitory effect of linoleic acid isolated from *T. molitor* and its isomers.

Table 11. IC<sub>50</sub> values of linoleic acids on Lp-PLA<sub>2</sub>.

Compound	IC <sub>50</sub> (μM)
9, 12 octadecadienoic acid <sup>a</sup>	277
9, 12 octadecadienoic acid	290
9-trans, 12-trans octadecadienoic acid	182
9-cis, 11-trans octadecadienoic acid	265
10-trans, 12-cis octadecadienoic acid	269
9-12-15 octadecatrienoic acid	354
11-eicosenoic acid	354

<sup>a</sup> 9,12 octadecadienoic acid was isolated from *Tenebrio molitor* larva

## 나. 유용곤충의 인공대량사육 시스템 개발

### 1) 흰점박이꽃무지 대량사육용 인공사료 개발

흰점박이꽃무지는 한국, 중국, 시베리아 동부 등지에 분포하는 종으로, 썩은나무나 초가집의 지붕, 낙엽, 퇴비나 건초더미, 유기물이 풍부한 토양속에서 서식하는 부식성 곤충이다. 흰점박이꽃무지를 포함하는 꽃무지류의 유충은 간 질환을 치료하는 민간요법에 이용되어 왔으며, 본 연구실 등에서 인공사육기술이 개발되어 있다. 그러나 기존에 인공사육방법이 벚짚을 자연상에서 발효하여 사용하거나 톱밥에 시중에 판매되는 다른 목적의 발효촉진제를 첨가하여 사용하는 방법들로서 낙농농가의 증가로 벚짚의 확보가 어렵고 가격이 상승하였을 뿐 아니라, 흰점박이꽃무지의 먹이로 사용할 수 있는 벚짚의 발효가 시간적, 공간적으로 어려움이 있어서 흰점박이꽃무지의 생리생태적 특성에 적합하게 최적화된 새로운 발효방법이 요구되고 있다. 본 연구에서는 우선 자연상에서 발효가 진행중인 톱밥에 존재하는 미생물 균총을 이용하여 발효를 수행하고 발효가 끝난 재료들을 직접 사육에 이용하여 효능을 검정하였으며 나아가 유용발효미생물을 선별 조합하여 새로운 발효조건 및 발효촉진제를 제공하고자 하였다.

#### 가) 톱밥발효

흰점박이꽃무지 유충의 사육시 발효톱밥만을 먹이로 공급하였을 때 장수풍뎅이 등의 경우와 달리 성장이 저해되거나 매우 느리게 나타난다. 따라서 톱밥 발효시 톱밥과 함께 쌀겨를 첨가하여 발효미생물의 성장 증가 및 영양적 문제를 해결하고자 하였다. 예비실험으로서 톱밥과 쌀겨의 비율은 2 : 1 (v/v)의 조건이 가장 양호하였으며 4 : 1 이하의 비율에서는 발효효율 및 발효산물의 영양적 가치가 매우 낮아졌다.

발효과정에 유용한 미생물의 탐색을 위해서 자연상에서 발효가 진행중인 톱밥을 미생물의 공급원으로 사용하였으며 이에 대한 대조구로서 톱밥과 쌀겨만을 첨가하여 동일조건에서 발효를 진행하였다 (Fig. 33).



Fig. 33. 흰점박이꽃무지 인공사료 개발을 위한 톱밥발효

발효에 소요된 시간은 약 21-25 일이었으며, 그 과정에서 발효톱밥의 온도변화는 3-5 일에 55-60℃에 도달하였고, 15 일 정도 경과하였을 때 1차 발효가 끝나는 양상을 나타내었다 (Fig. 34). 발효과정 중 각 단계에서 시료를 채취하여 초저온냉동고에 보관 후, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 등의 방법을 이용하여 발효과정 중 균총의 변화 및 발효에 유효한 미생물의 동정에 이용하였다.

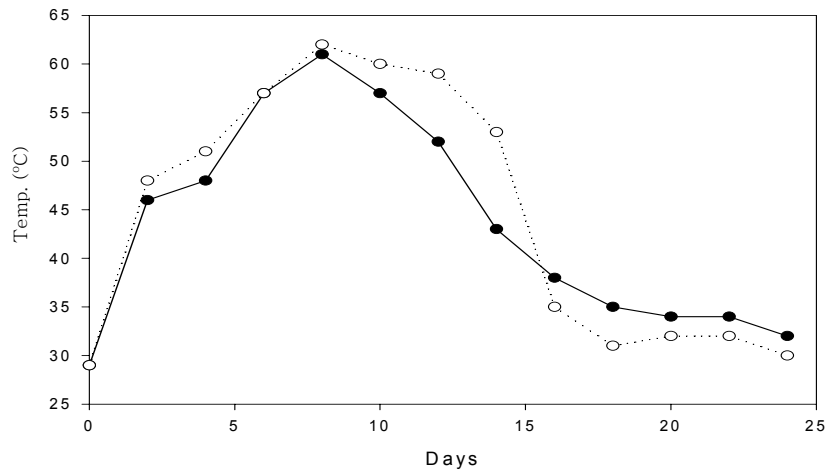


Fig. 34. 인공사료개발을 위한 발효과정에서 시간에 따른 온도변화.

(-●-; 쌀겨 + 톱밥, -○-; 쌀겨 + 톱밥 + 발효톱밥 미생물원 첨가)

#### 나) 발효톱밥의 유용성 검증

발효가 완료된 톱밥의 유용성을 검증하기 위하여 발효톱밥과 발효된 볏짚, 상업용으로 판매되는 톱밥을 먹이로 하여 사육하였을 때 톱밥과 쌀겨만을 이용한 발효군(B)은 사육 3주만에 유충의 생존률이 8%대로 떨어질 뿐 아니라 개체의 무게증가도 가장 낮았다. 그러나 자연발효중인 톱밥을 미생물원으로 첨가한 발효군(A)의 경우 개체의 무게증가는 1.1 g으로서 시중에 판매되는 발효톱밥의 1.4 g에 비해 약간 낮았으나 생존률에서 86%로서 57%의 유충생존률을 보인 시중판매 톱밥에 비해 안정적임을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 볏짚을 이용할때보다 생존률에서는 약간 떨어지지만 유충의 성장을 감안할 때 상당히 효율적 사료로 이용할 수 있음을 보여주었다 (Fig. 35)

각 사료에 대한 유충의 발달상황을 살펴보아도 A 실험군의 경우 안정적으로 3령에 도달하는 비율이 높게 나타났으며 (Table 12) 4주후의 결과에서 용화에 이르는 비율도 타 실험군에 비해 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다.

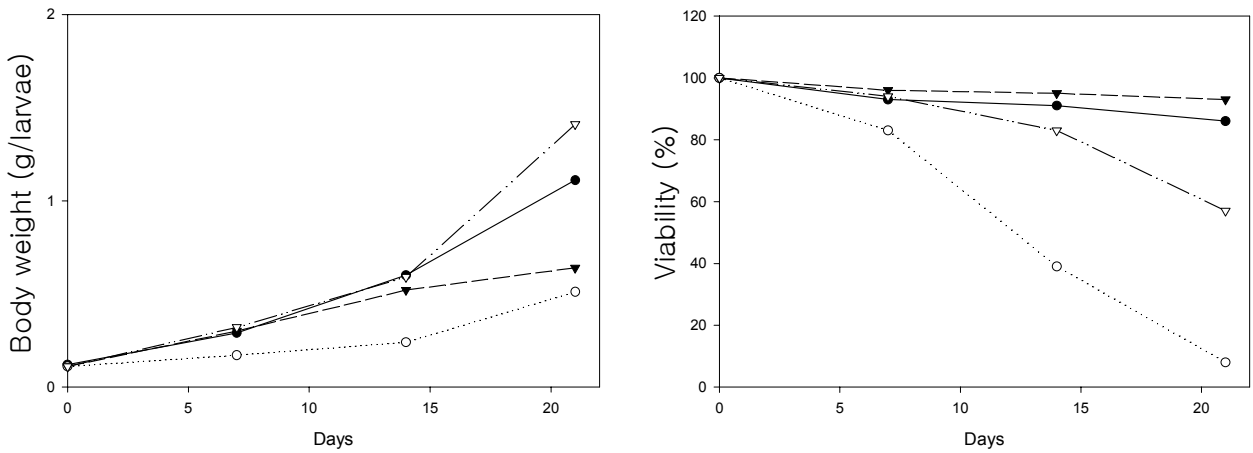


Fig. 35. 발효톱밥을 이용한 유충의 성장 및 생존률의 조사.

(-○-; 톱밥 + 쌀겨, -●-; 톱밥 + 쌀겨 + 발효톱밥 미생물원 첨가, -▼-; 발효 벚짚, -▽-; 시판되는 발효톱밥)

Table 12. 발효톱밥의 인공사료로서 유용성 검증

1-2령 유충 100마리를 대상으로 사육하였을 때 유충의 무게, 생존률의 변화를 1주일 단위로 조사함 (A; 톱밥 + 쌀겨 + 발효톱밥 미생물원 첨가, B; 톱밥 + 쌀겨, C; 발효벚짚, D; 시판되는 발효톱밥)

Day		Sample	A	B	C	D
0	령기	1령	50	50	50	50
		2령	50	50	50	50
		3령	0	0	0	0
		Total	100	100	100	100
		무게 (g/larvae)	0.12	0.11	0.11	0.11
7	령기	1령	35	33	10	35
		2령	58	50	86	59
		3령	0	0	0	0
		Total	93	83	96	94
		무게 (g/larvae)	0.29	0.17	0.30	0.32
14	령기	1령	9	10	0	10
		2령	50	29	80	42
		3령	32	0	15	31
		Total	91	39	95	83
		무게 (g/larvae)	0.60	0.24	0.52	0.59
21	령기	1령	1	3	0	1
		2령	41	4	49	17
		3령	45	4	44	40
		Total	86	8	93	57
		무게 (g/larvae)	1.11	0.51	0.64	1.41



### 다) 유용발효균에서 미생물 군총의 변화

위 결과에서 나타나듯이 자연 발효중인 톱밥을 발효에 첨가하였을 때 다른 미생물원을 첨가하지 않았을 때 보다 우수한 결과가 나타나는 것으로 보아 자연발효중 톱밥의 미생물들이 발효에 긍정적인 영향을 미친 것으로 예상할 수 있다. 톱밥의 발효과정에서 중요하게 작용하는 미생물들을 알아보기 위하여 각 발효단계에서 채취한 시료로부터 DNA를 추출하고 PCR을 통하여 16S rDNA의 특정단편을 증폭하였으며 이를 DGGE 방법으로 분석하였다 (Fig. 36).

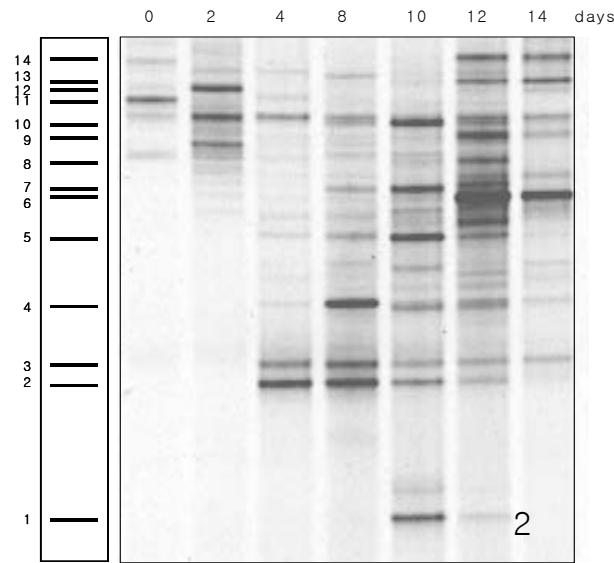


Fig. 36. 발효과정의 미생물군의 변화를 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 방법을 이용하여 조사함.

그 결과 발효 초기와 발효 중기, 그리고 발효말기에서 서로 다른 미생물들이 주로 나타나는 것을 볼 수 있으며 이 중 명확하게 나타나는 band들을 잘라내어 elution한 다음 이를 PCR로서 증폭하여 각 DNA 단편들의 염기서열을 결정하고 database 검색을 통하여 가장 높은 상동성을 보이는 type strain을 결정하였다 (Table 13).

발효과정에 나타나는 미생물들은 *Bacillus* 속의 미생물들이 가장 많이 차지하고 있으며 일부 고온성 *Streptomyces*속의 미생물과 *Rahnella* 속, *Pseudomonads* 속의 균주들이 99.3% 이상의 상동성으로 나타났으며 많은 미생물들이 기존에 밝혀진 type strain과는 낮은 상동성을 가지고 있는 것으로 조사되었다. 이들 중 발효가 진행되면서 점차 증가하여 주로 발효 중기에서 나타나는 미생물들을 선별하여 보면 *B. coagulans*, *G. thermoleovorans*, *S. bikiniensis*, *B. smithii*, *B. circulans* 등 고온성 미생물들이 주를 이루고 있다.

## 라) 발효에 유용한 미생물의 선별 및 이용

발효과정에서 조사된 균주들 중 일부를 이용하여 효율적 발효를 수행할 수 있는 방법을 강구하기 위하여 각 미생물의 조합에 의한 발효를 수행하고 그 효능을 검정하였다. 미생물의 조합은 조사된 균주들 중 퇴비발효등에 보고된 자료를 참고로 하여 *Bacillus*속의 미생물과 *Geobacillus*속의 미생물을 기본으로 하였고 일부 *Streptomyces*속 균주와 *Rahnella*속 균주를 첨가하는 방법으로 구성하였다 (Table 14).

Table 13. 발효과정에서 나타나는 미생물의 상동성 검색에 의한 동정

Band	Most closely related organism	Percentage of 16s rDNA	Taxonomic group <sup>b</sup>
		sequence similarity (no. of bases) <sup>a</sup>	
1	<i>Bacillus coagulans</i>	99.3 (161)	<i>Bacillus</i>
2	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	95.6 (162)	<i>Geobacillus</i>
3	<i>Bacillus coagulans</i>	95.2 (127)	<i>Pseudomonas</i>
4	<i>Streptomyces bikiniensis</i>	99.3 (143)	<i>Streptomyces</i>
	<i>Streptomyces somaliensis</i>	99.3 (143)	
5	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	87.1 (163)	NK
6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	96.4 (167)	<i>Stenotrophomonas</i>
7	<i>Bacillus smithii</i>	99.3 (165)	<i>Bacillus</i>
8	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	96.8 (159)	<i>Ureibacillus</i>
9	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	89.9 (159)	NK
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	89.9 (159)	
10	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	99.3 (166)	<i>Bacillus</i>
	<i>Bacillus circulans</i>	99.3 (166)	
11	<i>Rahnella aquatilis</i>	100 (164)	<i>Rahnella</i>
12	<i>Rahnella aquatilis</i>	100 (164)	<i>Rahnella</i>
13	<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	95.5 (158)	NK
14	<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	99.0 (145)	NK

Table 14. 발효과정에 나타난 미생물을 이용한 효과적인 발효조건 탐색

	조합 I	조합 II	조합 III
Microorganisms	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus circulans</i>
	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>
	<i>Bacillus smithii</i>	<i>Bacillus smithii</i>	<i>Bacillus smithii</i>
		<i>Streptomyces somaliensis</i>	<i>Rhanelia auuatilis</i>

미생물을 이용한 발효시 온도변화 및 발효산물의 pH 변화는 최초 실험과 유사하였으며 발효가 완료된 시료를 잘 말린 후 저온실에 보관하면서 유충을 이용한 인공사료로서의 효용성을 조사하였다 (Table 15). 그 결과 세가지 실험군 모두 톱밥과 쌀겨만 첨가하여 발효를 실시한 경우 (IV)보다 3주까지의 성장률을 보면 두배 정도의 유충 성장을 보이는 것으로 조사되었다 (4주 실험의 경우 I, II, III 실험군에서는 유충이 성장을 거의 멈추는 경우가 많으므로 차이가 있음).

*Streptomyces*속의 미생물 첨가시(II)는 생존률과 성장 모두에서 기본적인 조합(I)에 비해 효용성이 떨어지는 것으로 나타났고 *Rhanelia*속 균주의 첨가시(III)는 유충의 생존률이 떨어지는 반면 유충의 성장속도는 다른 실험군에 비해 약간 높게 나타났다. 이상의 실험결과는 동정된 미생물의 type strain을 이용한 결과로서 자연발효나 우수한 인공발효에서 직접 분리되는 미생물을 이용할 때 좀 더 양호한 결과를 얻을 가능성도 열려 있으며 조사된 미생물을 발효촉진제의 형태로 조제하여 안정적이고 재현성이 높은 발효가 가능할 수 있다.

## 2) 흰점박이꽃무지의 병리적 모니터링

자연환경에서 흰점박이꽃무지는 대개의 경우 연 1회 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 생활방식 때문에 인공사육에서도 연중 사용가능한 성충의 확보에 어려움이 있다. 많은 경우에서 3령으로 완전히 자란 유충이 용화하지 않는 경우가 발생하며 자연스럽게 용화가 일어나는 경우는 사육 유충의 10% 내외일 뿐 아니라, 장기간 유충으로 머물러 있는 경우 질병이 발생할 빈도가 매우 높아진다. 가장 많은 질병의 형태는 유충의 표면에 흑갈색의 반점이 생겨나 점차 수와 범위가 늘어가며 결과적으로 유충의 사멸을 일으킬 뿐 아니라 사육환경의 오염으로 다른 개체의 감염을 유발하게 된다.

흰점박이꽃무지의 경우 유충을 이용하여 간보호 물질을 확보하기 때문에 실내의 경우 부화 후 4주 정도면 3령충을 확보할 수 있고 그 중 일부만 성충확보가 가능하면 되지만 좀 더 안정적인 성

충확보를 위해서라도 용화하지 않는 현상에 대한 고찰이 필요하다. 이런 현상에 대해 명확한 실험적 극복방안은 아직까지 제시되지 못하고 있는 실정이다. 다만, 월동에 들어간 유충의 경우, 월동 후 발병률이 매우 낮고 성충으로의 변태율이 월동에 들어가지 않은 유충보다 월등히 높다는 현상으로부터 저온처리와 인위적인 월동환경을 조성함으로써 문제를 해결하고자 하는 연구를 진행 중에 있다.

Table 15. 유효 발효 미생물군 탐색 효능검정

발효시료		I	II	III	IV	
0	령기	1령	100	100	100	100
		2령	0	0	0	0
		3령	0	0	0	0
		Total	100	100	100	100
		무게	0.4	0.4	0.4	0.4
7	령기	1령	82	76	54	86
		2령	18	17	40	0
		3령	0	0	0	0
		Total	100	93	94	86
		무게	10.4	9.2	8.9	3.9
14	령기	1령	0	0	1	2
		2령	98	84	89	75
		3령	0	0	0	0
		Total	98	84	90	79
		무게	47.0	41.2	48.0	13.2
21	령기	1령	0	0	0	0
		2령	12	12	5	24
		3령	86	71	78	47
		Total	98	83	83	71
		무게	114.0	101.7	126.0	54.1
28	령기	1령	0	0	0	0
		2령	0	0	1	3
		3령	94	80	77	67
		Total	94	80	78	70
		무게	237.2	209.6	210.6	141.4

### 3) 흰점박이꽃무지의 실내인공사육

#### 가) 사육조건

흰점박이꽃무지는 알, 유충, 번데기, 성충의 단계를 거치는 생활사를 갖기 때문에 큰 맥락에서 유충시기와 성충시기로 나누어, 사육방법 또한 별도로 하였다 (Fig. 37.)

#### (1) 알

성충은 깨어난지 1주일 정도면 교미를 시작하여 산란을 한다. 성충을 인공사료로 채운 플라스틱 상자내에 먹이와 함께 사육하면 인공사료내에 산란을 하고 산란된 알은 그 상태에서 부화를 한다. 약 1주일 간격으로 알이 통과할 만한 mesh의 체를 이용하여 거르면 인공사료로부터 부화 후 성장이 시작된 유충을 얻을 수 있다.

#### (2) 유충

각 령별 크기에 따라 cage의 크기는 달리한다. 균집 밀도에 따라, 먹이의 부식정도에 따라 조절하며, 먹이를 갈아주는 날짜별 횟수 또한 조절한다. 1-2령은 작은 플라스틱 상자 (25 x 15 x 15)에, 3령은 플라스틱 cage (45 x 25 x 25 cm)를 사용하였고 각 상자당 200-300마리의 유충을 넣어 사육하였다 (Fig. 38).

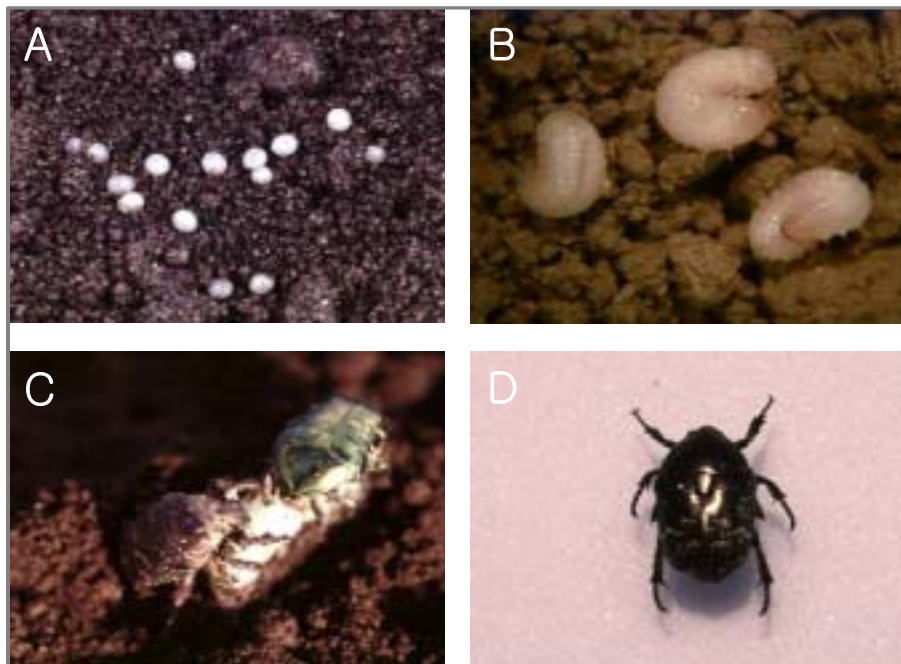


Fig. 37. 흰점박이꽃무지의 생활사. A; egg, B; larvae, C, D; adult

먹이는 톱밥의 발효에 의해 확보한 인공사료를 D.W와 혼합, 고무 섞어 습한 상태를 유지하며 사용하며 대체로 3령의 경우 먹이를 갈아주는 주기는 1-2령때는 2주에 1회, 3령은 매주 1회

간격으로 실시하였다. 특히 사료의 습도를 유지하기 위하여 환기에 필요한 공간을 제외한 나머지를 호일로 덮어두었다.

### (3) 번데기

종령이 된 유충은 몸이 노란색으로 변하고 계란모양으로 된 방을 만든 후 그 속에서 탈피를 하여 번데기가 된 후 약 한달 정도가 지난 후 성충으로 된다. 번데기가 된 방은 외부 침입자로부터 자신을 보호 해주며 일정한 습도와 온도를 유지시켜주는데 중요한 역할을 함으로 번데기 방이 파손되지 않게 하는 것이 중요하다. 유충먹이를 갈아줄 때 확인되며, 확인된 번데기는 별도의 다른 cage에 옮겨 보관한다. 그리고 번데기가 cage의 벽에 붙어 번데기를 형성한 경우, 그대로 두고 유충의 서식 cage를 옮겨준다. 생태환경 유지를 위해 번데기 주위에 약간의 사료나 배설물을 습도를 유지하며 놓아주는 것 역시 필요하다.

### (4) 성충

성충은 주행성으로 낮에 주로 활동하며 일정량의 광조건을 맞추어 주어야 산란에 지장을 주지 않는다. 자연상태에서는 적절한 교미와 산란을 마친 개체들은 약 2-3달 정도 생존 후 죽게 되는 반면 산란에 실패한 개체들이나 산란을 적게 한 개체들은 수명이 좀 더 긴 경향을 보인다. 최초 번데기에서 우화된 성충은 적갈색모양에 군데군데 흰점이 박혀있고, 번데기 방에서 나온 성충을 발효톱밥 인공사료에 놓아주면 안으로 파고 들어가는 습성이 있다. 1-2주가 지나면 나와 먹이섭취를 하며 교미와 산란을 한다. 먹이는 주로 배를 공급하며 작은 petri dish에 적정량 잘라 발효톱밥 표면에 놓아주고, 산란율을 위해 당성분과 단백질함량이 많은 계란흰자와 바나나를 섞은 먹이를 공급하면 산란기간과 산란수가 증가한다.



Fig. 38. 사육실내에서 대량사육중인 흰점박이꽃무지 유충

#### 4) 흰점박이꽃무지의 야외 대량인공사육

툽밥 발효에 관련된 미생물의 분석과 유용성 검토 결과를 바탕으로 야외에서의 대량인공 사육을 실시하였다. 특히 본 연구는 대전시 대덕구 신탄진 농협의 협조에 의해 대청호변의 농가에서 직접 실시하여, 야외사육의 유용성 검토와 더불어 실질적인 농가기술이전이 가능할 수 있도록 하였다 (Fig. 39, Fig. 40).



Fig. 39. 농가 (대덕구 이현동 김진환씨 비닐하우스)에 설치된 나무틀에서 흰점박이꽃무지 사료의 야외 발효 모습.

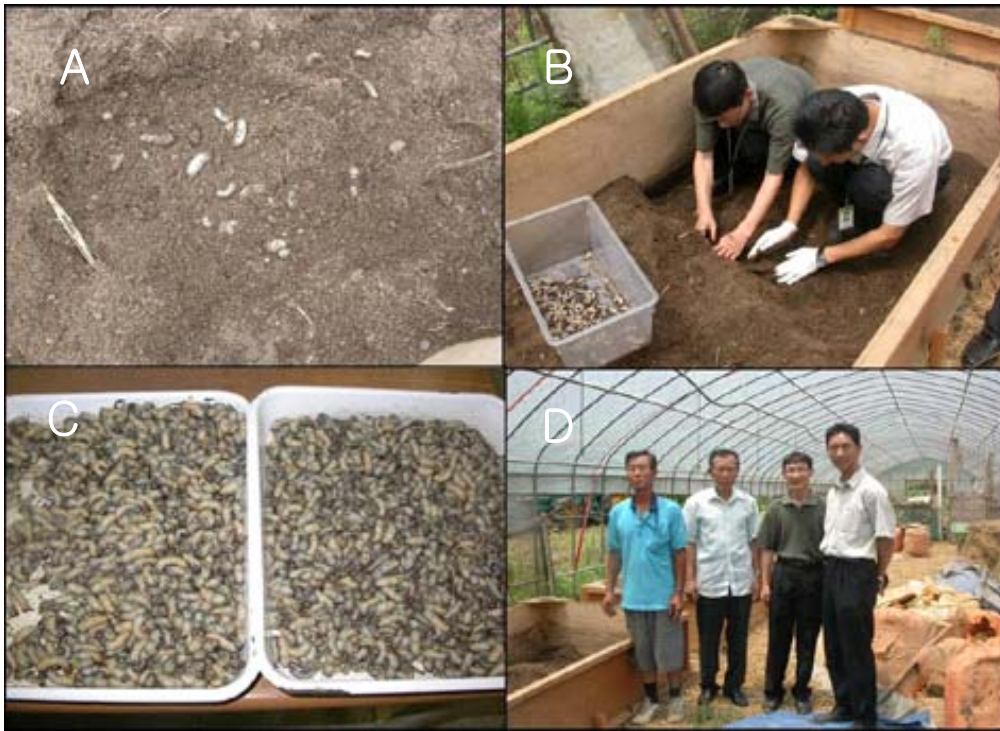


Fig. 40. 흰점박이꽃무지 유충의 야외 사육 및 사육 후 유충의 회수

먼저 통풍이 원활한 비닐하우스에 가로×세로×높이 = 120cm × 240cm × 60cm의 나무틀을 만들고 약 1,200L의 톱밥과 쌀겨를 2:1의 비율로 채운 다음, 각 0.5% (v/v)의 1번 발효균 (Table 14 참조) 미생물 배양액(OD<sub>600</sub>=1.0)을 첨가하고 약 65-70%의 수분 함량이 되도록 하여 골고루 섞어주었다. 상기 사료는 매 2일 마다 1회씩 뒤집어주어 호기적 환경을 유지하였으며 적절한 수분공급과 함께 발효사료의 온도를 조사하였다. 또한 포플러 톱밥을 사용한 경우와 더불어 참나무톱밥을 재료로 사용하여 동일한 방법으로 실시하였다. 톱밥의 발효는 4월말부터 약 5주간 실시하였으며, 그 동안 하우스내의 온도는 주간에 약 28-35℃, 야간의 경우 15-20℃정도로 유지되었다. 발효가 완료된 사료를 이용하여 사육실내에서 흰점박이꽃무지 유충의 먹이로의 유용성을 검정하였으며, 이때 자연상태에서 흰점박이꽃무지 유충의 먹이로 가장 많이 이용되는 썩은 벧짚을 동일한 방법으로 급여하여 발효사료의 유용성을 확인하고자 하였다. 그 결과, 본 연구에서 시도한 발효사료를 먹이로 하였을 때 흰점박이꽃무지 1령 유충의 생존율과 체중이 4주간의 사육결과 90%의 생존율과 평균체중 2.38g/마리로 나타나 썩은 벧짚을 먹였을 때의 90% 생존율과 1.62g/마리의 체중과 비교하였을 때 우수하고 안정적인 사료로 사용될 수 있는 것으로 판단되었다. 또한, 참나무톱밥을 재료로 사용하였을 때에도 92%의 생존율과 평균체중 2.55g/마리의 체중으로 나타나 포플러 톱밥 외에도 참나무톱밥을 사용하는 방법도 유용한 것으로 판단되었다 (Table 16).



Table 16. 발효사료를 이용한 흰점박이꽃무지의 사육 중 생존율 및 체중 변화

일수 (days)	시험구 1 <sup>a</sup>		시험구 2 <sup>b</sup>		시험구 3 <sup>c</sup>	
	생존율(%)	평균체중 (g/마리)	생존율(%)	평균체중 (g/마리)	생존율(%)	평균체중 (g/마리)
0	100	0.004	100	0.004	100	0.004
7	95	0.14	94	0.16	96	0.12
14	92	0.42	93	0.45	95	0.24
21	90	0.94	93	1.02	93	0.88
28	90	2.38	92	2.55	90	1.62

a : 포플러 톱밥+쌀겨+미생물 촉진제로 구성된 발효 시료

b : 참나무 톱밥+쌀겨+미생물 촉진제로 구성된 발효 시료

c : 썩은 벗짚 시료

흰점박이꽃무지 유충을 야외 환경에서 사육하기 위하여 상기에서 제시된 나무틀 내에 약 30-35cm 두께로 발효 사료를 공급하고 1m<sup>2</sup>의 면적당 500-700마리의 유충의 밀도가 되도록 나무틀 당 약 2,000마리의 흰점박이꽃무지 1령 유충을 투입하여 사육하였을 때, 5주간의 사육에 의해 대부분의 1령 유충이 3령 노숙 유충으로 성장한 것을 볼 수 있었으며 평균체중은 2.1g/마리, 생존율은 90% 이상인 것으로 조사되었다. 야외사육은 6월-7월 초 사이에 실시되었다.

발효는 성충이 나오는 시기인 4월말-5월초 사이에 실시하는 것이 적당한 것으로 사료되며, 다 자란 3령 유충의 경우 초기에 키운 유충은 목적에 따라 회수를 하고 후기에 키운 유충은 월동을 시켜 다음해 봄에 번데기와 성충이 되도록 유도한 다음 망을 씌워 성충이 날아가지 않도록 조절한다. 우화한 성충은 과일이나 젤리 또는 산란수를 높이기 위해서는 삶은 계란, 바나나를 곱게 갈아 녹인 한천과 섞어서 균한 고체상의 단백질 먹이로 공급하여 발효사료가 도포된 노지 또는 플라스틱 상자나 나무틀로 제한된 공간에서 산란을 유도할 수 있다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년차	연구 개발 목표	달성 내용	달성도
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곤충자원의 확보</li> <li>- 간기능 보호물질의 탐색, 분리 및 특성분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 생약지원이나 민간요법 등에서 식품의약 효능이 알려진 흰점박이꽃무지, 장수풍뎅이, 잣나무넓적잎벌, 말매미, 갈색거저리등 5종의 곤충을 실내사육, 야외현지채집 등에 의해 확보함</li> <li>- 생체외 (<i>in vitro</i>) 간섬유화모델 시스템을 확보하고 활성물질의 탐색을 실시함</li> <li>- 간질환 예방 치료용 기능성물질의 탐색에 의해 활성물질 함유시료를 선별하고 분리를 실시하였으며 활성물질의 특성분석을 실시함</li> <li>- 질환모델 동물을 이용한 <i>in vivo</i> 활성검정을 실시함</li> </ul>	100%
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 간기능 보호물질의 대량분리체계 확립</li> <li>- 생체효능 검정</li> <li>- 유용곤충의 인공대량사육 시스템 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 흰점박이꽃무지 유충으로부터 간보호 활성물질을 분리하고 대량분리체계를 확립함</li> <li>- 분리된 간보호 활성물질을 <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> system에서 효능검정을 실시함</li> <li>- 간보호활성이 검정된 흰점박이꽃무지 유충의 대량생산을 위한 인공사료개발, 실내 대량사육 모델을 구축하고 병리적 모니터링을 통한 효율성을 제고함</li> </ul>	100%
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 간기능 보호물질의 산업화기술 개발</li> <li>- 유용곤충 대량사육 모델시스템 개발 및 농가기술 이전</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 산업화를 염두에 둔 간기능 보호물질의 대량분리공정을 구축함</li> <li>- 간기능 보호물질의 단회투여 독성시험, 알콜올로 유도한 간경변에 대한 효능시험을 실시함</li> <li>- 대량사육을 통한 관련물질의 산업적 생산을 위한 안정적, 경제적 원료수급방안을 확립함</li> <li>- 농협 및 농가를 통한 대량생산시스템의 기술이전을 실시함</li> </ul>	100%

본 과제 수행을 통하여 얻은 결과들은 유용곤충으로부터 간기능 보호물질의 개발과 실용화에 기여할 것으로 기대되며 그 과정에서 농가소득증대에 실제적으로 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 흰점박이꽃무지로부터 분리된 간기능 보호물질은 동물시험을 통해 안전한 물질로 판단되

며 대량생산에 대한 연구를 통해 산업화가 가능한 scale의 생산이 확인된 점이 중요한 성과의 하나이다. 또한 곤충의 대량사육을 위한 톱밥 등의 값싼 재료로부터 간편하고 안정적인 인공사료를 확보하는 방법을 구축함으로써 실제 농가에서 쉽게 이용할 수 있는 기초를 마련한 것으로 보이며 농협과 농가를 통한 야외대량사육을 함께 실시함으로써 기술이전이 가능함을 확인한 것도 큰 의미가 있다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용 계획

1. 곤충유래 간보호물질을 이용한 건강보조식품 및 식품의약품 소재로 활용하는 분야는, 본 연구를 통해 개발된 시제품이 식약청의 인허가를 취득하는 것을 포함하여 관련 제반 후속 사항들이 수행되면, 관련기업을 통한 실용화를 추진할 것임.

2. 본 연구를 통하여 평가된 국내토착 곤충자원의 산업적 이용가능성 확인을 통하여 국가보유 생물자원의 중요성을 인식하고, 효율적 보전 및 대량인공사육을 통한 환경친화적 이용방안 수립을 위한 자료로 활용함.

3. 본 연구의 결과를 더욱 효율적으로 활용하기 위해 추가적으로 요구되는 곤충유래 간보호물질의 효능 및 안전성 검증을 위한 동물실험, 독성시험, 인허가에 필요한 후속연구들이 요청됨.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 수행하면서 해외정보 수집을 위해 중국 운남성 및 해남성 등을 직접 방문하여 관련 기관 및 전문가 면담을 실시함. 중국의 경우 곤충자원을 이용한 식품의약 및 의약품의 개발이 상대적으로 활발히 이루어지고 있으나, 간보호물질로 구체적 효능이 입증된 제품화된 사례는 매우 적은 상황임. 또한 곤충자원을 이용한 관련제품의 실용화가 한국의 경우에서 보다 비교적 용이하다고 판단됨. 또한 브라질의 경우 BioLatina 참석 등을 통하여 관련정보 수집, 기관방문, 전문가 면담을 실시한 결과 곤충자원을 이용한 의약품 및 식품의약 개발에 관한 관심이 매우 높은 것을 확인함. 참고적으로 2005년 7월 전 세계의 언론에 소개된 세계미래학회의 보고서에 따르면 2030년 기준의 미래기술 예측 보고서에서 주요 10대기술 중 가운데 하나가 ‘곤충으로부터 신약을 개발’하는 것이 포함되어 있을 정도임.

## 제 7 장 참고문헌

### [곤충사육]

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Embe, and E.C. Bottger. 1989. Isolation and complete direct nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for the 16S ribosomal RNA. *Nucleic acids Res.* 17: 7843-7853
- Hastings, R., 1999. Application of Denaturing gradient gel electrophoresis to microbial ecology. Ed. Environmental monitoring of bacteria. Edited by C. Edwards., Humana Press.
- Kim, C.-H., J.-S. Lee, M.-S. Go and K.-T. Park. 2002. Ecological characteristics of *Protaetia orientalis* submarmorea (Burmeister) (Coleoptera: Cetoniidae)
- Park, H.Y., S.S. Park, H.W. Oh and J.I. Kim. 1994. General characteristics of the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis* reared in the laboratory. *Kor. J. Entomol.* 24: 1-5.
- Yeates, C., M.R. Gillings, A.D. Davison, N. Altavilla, and D.A. Veal. 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biologica Procedures Online* 1: 40-47
- Zhang, Z. L. 1984. Economic insect fauna of China. Fasc 28: 26-28 pp. Science, Beijing.

### [*In vitro* 간보호 활성 검정]

- Hansen, M.B., SE Nielsen, and K Berg. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods*, May 1989; 119(2): 203-10.
- Luigi J. C. Jonk, Susumu Itoh, Carl-Henrik Heldin, Peter ten Dijke, and Wiebe Kruijer. Identification and Functional Characterization of a Smad Binding Element (SBE) in the JunB Promoter That Acts as a Transforming Growth Factor-, Activin, and Bone Morphogenetic Protein-inducible Enhancer. *J. Biol. Chem.*, Aug 1998; 273: 21145 - 21152.

- Marcin Stopa, Dirk Anhuf, Lara Terstegen, Petros Gatsios, Axel M. Gressner, and Steven Dooley. Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in Transforming Growth Factor (TGF- $\beta$ )-induced Activation of Smad7. The TGF- $\beta$  response element of the promoter requires functional Smad Binding Element and E-Box sequences for transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, Sep 2000; 275: 29308 - 29317.
- Norwitz, E. R., S Xu, J Xu, LB Spiryda, JS Park, KH Jeong, EA McGee, and UB Kaiser. Direct binding of AP-1 (Fos/Jun) proteins to a SMAD binding element facilitates both gonadotropin-releasing hormone (GnRH)- and activin-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH receptor gene. *J. Biol. Chem.*, Oct 2002; 277(40): 37469-78.
- Shattil, S. J., M Cunningham, T Wiedmer, J Zhao, PJ Sims, and LF Brass. Regulation of glycoprotein IIb-IIIa receptor function studied with platelets permeabilized by the pore-forming complement proteins C5b-9. *J. Biol. Chem.*, Sep 1992; 267: 18424 - 18431.
- Skehan, P., R Storeng, D Scudiero, A Monks, J McMahon, D Vistica, JT Warren, H Bokesch, S Kenney, and MR Boyd. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, Jul 1990; 82(13): 1107-12.
- Vistica, D. T., P Skehan, D Scudiero, A Monks, A Pittman, and MR Boyd. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.*, May 1991; 51(10): 2515-20.

#### **[*In vivo* 간보호활성 검정]**

- Semin. Liver Dis., 1990 ;10(1):20-9.
- Arenson, D. M., Friedman, S. L. and Bissell, D. M., Formation of extracellular matrix in normal rat liver: lipocytes as a major source of proteoglycan. *Gastroenterology.*, 1988 ;95(2):441-7.
- Bedossa P, Houglum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M., Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis?. *Hepatology.*, 1994;19(5):1262-71.
- Claman, H. N., Mast cells and fibrosis. The relevance to scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 1990 ;16(1):141-51.
- Friedman, S. L., Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver.

Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M. and Chagoya, de Sanchez V., Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1994 ;1200(2):93-9.

Jeong W. I, Lee C. S, Park S. J, Chung J. Y, Jeong K. S. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res.*, Mar-Apr 2002 ;22(2A):869-77.

Rojkind, M. and Perez-Tamayo, R., Liver fibrosis. *Int Rev Connect Tissue Res.*, 1983 ;10:333-93.

Saile, B., Matthes, N., Knittel, T. and Ramadori, G., Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology.*, 1999 ;30(1): 196-202.

Wu, J. and Norton, P. A., Animal models of liver fibrosis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1996 ;31:1137-1143.

Zimmermann, A., Zhao, D. and Reichen, J., Myofibroblasts in the cirrhotic rat liver reflect hepatic remodeling and correlate with fibrosis and sinusoidal capillarization. *J. Hepatol.*, 1999 ; 30(4):646-52.

#### **[Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제 탐색]**

Glass, C. K. and Witztum, J. L., Atherosclerosis : The road ahead. *Cell.*, 2001 ;104:503-516.

Hurt-Camejo. E., Camejo, G., Peilot, H., Oorni, K. and Kovanen, P., Phospholipase A<sub>2</sub> in vascular disease. *Circ. Res.*, 2001 ;89: 298-304.

Packard, C. J., O'Reilly, S. J., Caslake, M. J., McMahan, A. D., Ford, I., Cooney, J., Macphee, C. H., Suckling, K. E., Krishna, M., Wilkinson, F. E., Rumley, A. and Lowe. G. D. O., Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> as independent predictor of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.*, 2000 ;343: 1148-1155.

Ross, R., Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, 1999 ;340: 233-241.



### [ACAT 저해제 탐색]

Chang, T.Y., Catherine C.Y. Chang, Dong Cheng, Acyl-Coenzyme A : Cholesterol acyltransferase. *Auu. Rev. Biochem.*, 1997 ;66:613-618.

Chang, T.Y., Chang, C. C. Y., Roles of Acyl-Coenzyme A: Cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2001 ;12(3): 289-296.

Drago R. Sliskovic, Joseph A. Picard, Brian R. Krause, ACAT Inhibitors : The search for a Novel and Effective Treatment of Hypercholesterolemia and Atherosclerosis. *Progress in Medicinal Chemistry*, Vol., 39, 121-171. Edited by F. D. King and A. W. Oxford

John R. Burnett, Lisa J. Wilcox, Murray W. Huff, Acyl coenzyme A :Cholesterol acyltransferase inhibition and hepatic apolipoprotein B secretion. *Clinica Chimica Acta.*, 1999; 286:231-242.

Kimberly F. Buhman, Michel Accad, Robert V. Farese Jr., Mammalian acyl-CoA: Cholesterol acyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 2000 ;1529:142-154.

### [독성시험 및 알코올 유도 간병변에 대한 효능시험]

Altavilla D, Marini H, Seminara P, Squadrito G, Minutoli L, Passaniti M, Bitto A, Calapai G, Calo M, Caputi AP, Squadrito F. Protective effects of antioxidant raxofelast in alcohol-induced liver disease in mice. *Pharmacology*. 2005; 74: 6-14.

Apte UM, McRee R, Ramaiah SK. Hepatocyte proliferation is the possible mechanism for the transient decrease in liver injury during steatosis stage of alcoholic liver disease. *Toxicol Pathol*. 2004; 32: 567-576.

Arteel GE, Marsano L, Mendez C, Bentley F, McClain CJ. Advances in alcoholic liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17: 625-647.

Arteel .E. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology* 2004;24: 778-790.

Brunt E.M. Pathology if steatigeoatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16: 691-707.

Bykov IL, Vakeva A, Jarvelainen HA, Meri S, Lindros KO. Protective function of complement against alcohol-induced rat liver damage. *Int Immunopharmacol* 2004;4: 1445-1454.

Deaciuc IV, Peng X, D'Souza NB, Shedlofsky SI, Burikhanov R, Voskresensky IV, de Villiers WJ. Microarray gene analysis of the liver in a rat model of chronic, voluntary alcohol intake. *Alcohol* 2004;32:113-127.

- Diehl AM. Liver disease in alcohol abusers: clinical perspective. *Alcohol* 2002;27: 7-11.
- Iseri OA, Liber CS, Gottlieb LS. The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am J Pathol* 1996;48: 535-555.
- Ishak KG, Zimmerman HJ, Ray MB. Alcoholic liver disease: Pathologic, pathogenetic and clinical aspects. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15: 45-66.
- Liber CS, Decarli LM. Animal models of ethanol dependence and liver injury in rats and baboons. *Fed Proc* 1976;35: 1232-1236.
- Tsukamoto H, Reidelberger RD RD, French SW, Largman C. Longterm cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat. *Am J Physiol* 1984;247: R595-R599.

## 주 의

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