

최      중  
연구보고서

마름으로부터 항당뇨 및 항암 기능성 식품  
소재 개발

Anti-diabetic and Anti-cancer Agents from  
*Trapa japonica* Flerov.

연구기관

인제대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “마름으로부터 항당뇨 및 항암 기능성 식품 소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 9 월 30일

주관연구기관명 : 인제대학교

총괄연구책임자 : 김 정 인

세부연구책임자 : 김 묘 정

연 구 원 :

강민정, 정숙희, 주희정,

유성자, 김현아, 이수경,

한송희, 송영섭, 이미영,

홍정희, 박지영, 한은경,

조희영, 김미경, 김정선,

윤영혜, 탁민혜, 황진우

협동연구기관명 : 중앙대학교

협동연구책임자 : 장 정 순

참여기업명 : 기화제약(주)

# 요 약 문

## I. 제 목

마름으로부터 항당뇨 및 항암 기능성 식품 소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

마름으로부터 부작용이 없고, 생리활성이 뛰어난 당뇨병 치료·예방 및 항암 소재를 개발하고자 함

### 2. 연구의 필요성

#### 가. 기술적 측면

- 1) 부작용이 없으면서 효능이 우수한 항당뇨, 항암 기능성 소재의 개발
  - 가) 현재 당뇨병 치료에 사용되고 있는 경구 혈당강하제는 혈당 강하 효능은 우수하지만 장기 복용 시 저혈당, 심장 손상, 복통 등 여러 가지 부작용을 수반하고 있음.
  - 나) 국내 대학병원들에 내원하는 암 환자 중 53%가 식품, 약초, 민간요법을 시행하고 있으나 대부분 과학적 검증을 거치지 않은 조약한 형태로 공급되고 있음.
  - 다) 따라서 부작용이 없는 천연물 유래 혈당강하제를 개발할 필요성이 절실하여, 현재 전 세계적으로 연구를 하고 있지만 효능이나 경제적 측면에서 그 가치가 떨어지는 경우가 많음.
  - 라) 마름은 민간요법에서 당뇨병 및 암 치료의 목적으로 섭취해 왔음. 그러나 항당뇨 및 항암 효과에 대한 과학적인 연구는 거의 이루어지지 않았음.
  - 마) 따라서 마름을 이용한 부작용이 없고, 항당뇨, 항암효과가 우수한 기능성 소재를 개발할 수 있을 것임.
- 2) 지속적으로 저가로 공급이 가능한 기능성 소재의 개발

가) 현재 사용되고 있는 당뇨병 치료제 및 항암 치료제는 대부분 수입품으로 환자들에게 경제적인 부담을 주고 있으며, 당뇨병 및 암 치료제 모두 의료비 재정압박의 원인이 되고 있음.

나) 이전에는 주로 마름의 과육만 식용으로 하였으며 경제적인 목적으로 사용하지 않았음. 민간요법으로 일부 환자들이 당뇨 치료 및 암 치료의 목적으로 목을 제조하거나, 건조분말을 제조하여 섭취해 왔음. 과육은 식용으로 사용하고 생리활성 물질이 풍부한 껍질로부터 항당뇨, 항암 소재를 개발하면 저가로 대체의약품 생산할 수 있음.

3) 기능성 소재의 개발과 항당뇨, 항암 효과 규명

가) 마름으로부터 항당뇨, 항암 활성 성분을 분리·동정하여 기능성제품 개발에 활용될 필요성이 있음.

나) 개발된 소재의 항당뇨, 항암 효능을 검증하고 그 메커니즘을 규명하여 경쟁력있는 제품으로 개발할 필요성이 절실함.

나. 경제·산업적 측면

1) 생산자는 부가가치가 높아 경제성이 있고, 소비자에게는 저렴한 가격의 제품개발

가) 당뇨병 치료약물 및 항암 약물은 환자 및 가족들에게 큰 경제적인 부담이 되고 있어, 효능이 우수하며 저렴한 가격의 기능성 소재의 개발이 필요함.

나) 마름은 자생력과 번식력이 강하며 우리나라 전역에 분포되어 있음. 마름으로부터 항당뇨, 항암 소재를 개발하여 효능을 확인하면, 부가가치가 증대하여 농민의 소득 증대로 직결될 수 있음.

다) 특히 현재까지 버려지던 껍질에 활성성분이 함유되어 있어, 껍질로부터 기능성 소재를 개발하면 부산물이 없는 친환경적인 제품임.

2) 당뇨병 및 암환자의 증가로 인한 삶의 질 저하 및 생산성 저하현상의 개선을 위해 필요

가) 당뇨병 환자 및 암 환자의 증가는 활동성과 생산성의 손실을 초래하여 경제, 산업 활동에 막대한 악영향을 미침.

나) 양 질환 모두 완치법이 확립되어 있지 않아 병이 발생하게 되면 거의 전 생애에 걸쳐 앓게 되므로 의료비 부담의 증가, 경제활동 감소 등의 사회·경제적 문제를 야기함.

3) 수입대체를 위한 국내에서 생산 가능한 소재의 개발이 필요

가) 현재 사용되고 있는 당뇨병 및 암 치료제는 대부분 원료 또는 완제품을 외국으로부터 수입하므로 외화유출이 심각함.

나) 따라서 마름으로부터 경제성이 큰 고부가가치 상품을 개발하면 수입 대체 효과를 기대할 수 있음.

다. 사회·문화적 측면

- 1) 당뇨병환자의 수가 급격히 증가하고 있어 사회 문제가 됨.
- 2) 현재 당뇨병은 완치법이 개발되어 있지 않고 있으며, 치료에는 약물요법과 함께 식사요법 및 운동요법을 병행하는 것이 필수적임.
- 3) 최근 암 발생 추이는 사회적으로 가장 왕성한 활동을 하는 40-50대에 증가되는 경향을 보이고 있어 사회적 손실이 더욱 심각함.
- 4) 따라서 당뇨병 예방 및 치료기능과 항암효과가 우수한 천연 소재의 개발이 절실히 필요함.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 마름의 항당뇨 효과 규명

가. *In vitro*에서 혈당조절 및 당뇨합병증 예방효과 조사

- 1) 탄수화물 소화효소 저해활성 조사
  - Yeast  $\alpha$ -glucosidase의 저해활성 측정
- 2) *In vitro*에서 유리라디칼 소거능 조사
  - DPPH법을 이용하여 측정
- 3) *In vitro*에서 aldose reductase 저해활성 조사
  - 마름의 용매획분별 aldose reductase 저해활성 측정

나. 동물모델계에서 혈당저하 효과 규명

- 1) Streptozotocin(STZ)-유발 당뇨흰쥐에 있어서 식후 혈당 저하효과 규명
  - 전분 투여 후 마름의 식후 혈당조절 효과를 측정함
  - 시간별 혈당증가치 및 혈당증가곡선의 면적 비교
- 2) 제2형 당뇨동물에 있어서 마름의 항당뇨 효과 규명
  - 4주령의 db/db mouse에게 6주간 시료 공급
  - 공복 혈당, 인슐린, 혈액 지질 profile, 당화헤모글로빈 농도 측정

- 혈청 BUN, creatinine을 측정하여 신장 기능에 미치는 영향 조사
- 간조직의 지질과산화물, carbonyl 농도, glutathione 농도, 항산화효소계 활성 측정
- 신장조직의 aldose reductase 활성 및 lens의 sorbitol 농도 측정
- 동물의 간 및 신장조직의 혈당 관련 유전자 발현수준 조사

#### 다. 당뇨병환자에 있어서 마름의 항당뇨 효과 조사

- 1) 당뇨병환자에 있어서 마름이 식후 혈당 조절에 미치는 영향 조사
  - 13인의 제2형 당뇨병환자를 대상으로 마름 주정추출물의 식후 혈당 조절효과를 측정.
  - 절식한 환자에게 가용성 탄수화물 50g을 함유하는 쌀밥만 섭취시키거나, 쌀밥과 함께 3g의 마름추출물을 섭취하고 식후 240분까지 혈당을 측정.
  - 혈당 증가곡선의 면적(AUC)을 계산하였음.
- 2) 제2형 당뇨병환자에 있어서 개발된 소재의 임상적용
  - 제2형 당뇨병환자 20인을 두 군으로 나누어 실험군은 마름과우더를 10% 함유하는 곡류선식 70g(보리:현미:메밀:마름=36:27:27:10)을, 대조군은 동일한 영양소를 제공하는 아침식사를 3개월 동안 섭취.
  - 신체계측 : 체중, 체질량 지수(BMI), 체지방, 혈압
  - 혈당조절 효과 : 공복 혈당, 인슐린, 당화 헤모글로빈, fructosamine, HOMA-IR
  - 내당능 개선효과 : 포도당(75g) 부하 후, 혈당과 인슐린 농도 측정
  - 지질대사 개선효과 : 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 동맥경화지수, 유리지방산(FFA)
  - 항산화능 : 혈장 지질 과산화물, 적혈구 SOD 및 catalase, GSH-px 활성

## 2. 마름의 항암 효과 규명

### 가. 암 세포주에서의 항암 효능 스크리닝

- 1) 세포독성
  - 암 세포주 배양: 위암, 자궁암 세포주
  - MTT assay, Trypan blue dye excusion assay를 통한 세포 성장 억제 연구
  - Flow cytometry 분석을 통한 세포 사멸 연구

- 2) 기존 항암 약제와의 분석
  - Taxol, cisplatin, adriamycin 등 기존 항암제제와 시너지효과 검색
- 3) 프로티움 연구를 통한 효능 관련된 목적 단백질 동정

나. 동물모델에서의 항암 효과 규명

- 1) 분리된 활성 분획의 세포사멸효과를 측정
  - ICR 마우스에게 복강암 발생 유도
  - 유효 성분 투여에 따른 *in vivo* 항암 효능 확인 및 효능 규명을 위한 조직학적, 분자생물학적 연구

다. 개발된 소재의 항암 효능 확인 및 그 기전 규명

- 1) 동물모델계에서 제2세부과제에서 개발된 항암 소재의 효능 확인
  - 항암보조제로서의 효능 검증: 항암 기능 및 수명연장 효과
- 2) 분자생물학적 연구를 통한 작용 메카니즘 연구
  - 항산화 역할 연구: theoredoxin계 역할 규명
- 3) 분자생물학적 연구를 통한 작용 메카니즘 연구
  - 면역조직화학 염색을 통한 목적 단백질의 *in vivo* 발현 양상 및 역할 분석

### 3. 마름의 유효 활성성분의 분리 및 동정

가. 마름 추출물에서 활성물질의 1차 분리

- 1) 전분분해 효소 저해, 항산화, 항암 등 생리활성을 가지는 분획 1차 분리
- 2) LH-20 column chromatography를 이용하여 유효성분 분획

나. 유효 활성물질 분리, 동정 및 특성연구

- 1) 항당뇨, 항암 활성물질의 순수 분리
  - Semi-prep. HPLC를 이용하여 유효성분을 순수하게 분리
- 2) 유효 활성물질의 구조 분석
  - NMR, LC-MS, IR 등을 이용하여 분리된 활성물질의 동정
- 3) 유효 활성물질의 전분분해효소 저해 특성

- Inhibition kinetics를 이용하여 효소저해 메카니즘과 IC<sub>50</sub> 값 분석

#### 4. 유효 활성을 이용한 식품소재 개발

가. 마름으로부터 유효 활성물질의 분리방법 최적화

- 1) 분리단계 최소화, 경제적 분리방법 탐색
- 2) 유효 활성성분이 고농도로 함유된 분획을 효과적으로 얻기 위한 방법 모색

나. 유효 활성물질의 물리화학적 안정성 분석

- 1) 고온에서의 안정성
- 2) pH 및 금속이온에 따른 안정성

다. 유효 활성물질의 기능성 식품소재로서의 개발

- 1) 완제품: 캡슐, 식사대용식(선식) 개발
- 2) 식품원료: 파우더 개발

라. 식품소재의 생리활성 분석

- 1) 식품소재로 개발된 제품의 항당뇨, 항암 활성 측정

### IV. 연구개발 결과

#### 1. 마름의 항당뇨 효과 규명

가. *In vitro*에서 혈당조절 및 당뇨합병증 예방효과 조사

- 1) 탄수화물 소화효소 저해활성 측정
  - 마름 추출물의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 0.5 mg/mL의 농도에서 100% methanol 및 80% ethanol 추출물이 각각 46.6%, 35.0%로 나타났으며, 표준품인 acarbose의 저해활성은 29.7%로 나타났음.
- 2) *In vitro*에서 유리라디칼 소거능 조사
  - 마름 추출물의 항산화능을 DPPH법으로 측정한 결과 메탄올(93.1%),

acetone(93.3%), 70% 에탄올(92.0%), 물 추출물(89.9%)의 유리 라디칼 소거능이 0.05 g/L 농도에서 표준품으로 사용한 비타민 C(96.3%)와 유사한 활성을 나타내었으며, isopropyl alcohol과 ether 추출물의 항산화능이 다소 낮은 것으로 나타났음.

- 마름 부위별 항산화능을 측정한 결과, 0.2 g/L농도에서 마름 전체와 껍질 추출물은 94.4% 및 94.5%의 활성을 나타내어 표준품인 비타민 C(96.9%)와 유사한 활성을 나타내었다. 마름의 유리기 소거능이 높은 것은 마름껍질에서 비롯되는 것으로 보이며, 과육에도 다소 유리기 소거능이 존재하였음.

3) *In vitro*에서 aldose reductase 저해활성 측정

- 메탄올 추출물 농도 0.1 및 0.05 g/L에서 AR 저해활성은 각각 73.6%, 56.6%로 나타났음.
- 마름 추출물의 rat lens aldose reductase에 대한 저해활성의 IC<sub>50</sub>는 0.09 g/L로 나타나, 강력한 저해활성을 나타내었음.

나. 동물모델계에서 혈당저하 효과 규명

1) STZ-유발 당뇨병에 있어서 식후 혈당 저하효과 규명

- 당뇨병에 있어서 전분(1g/kg)과 함께 마름추출물(0.5g/kg)을 섭취한 경우, 식후 30, 60, 90, 120분에 혈당 증가치가 전분만 섭취한 경우에 비해 유의적으로 낮게 나타났음.
- 식후 혈당변화 곡선의 면적은 대조군이 11,285±601 mg·min/dL(mean±SD), 마름 추출물 투여군이 7,992±581 mg·min/dL로 나타나 두 군 사이에 유의적인 차이가 있었음(p<0.05).

2) Db/db mouse에 있어서 마름의 항당뇨 효과 규명

가) 마름의 섭취는 체중과 식이섭취량에 유의적인 영향을 주지 않았음.

나) 혈당조절 효과

- 마름의 장기간 섭취는 당화 헤모글로빈 농도와 공복혈당을 유의적으로 감소시켰으며(p<0.05), 혈장 인슐린농도를 감소시키는 경향을 나타내었음.

다) 지질대사 및 신장기능 개선 효과

- 혈장 중성지방 농도는 마름 섭취군은 107.3±9.5 mg/dL로 나타나 대조군(138.5±8.4 mg/dL) 보다 유의적으로 낮게 나타났으며(p<0.05), 혈장 총 콜레스테롤 농도 또한 마름 섭취군은 159.7 ± 5.1 mg/dL로 나타나 대조군(182.4±8.6 mg/dL) 보다 유의적으로 낮게 나타났음(p<0.05).

- 대조군과 마름 섭취군의 혈장 HDL-콜레스테롤 농도, BUN 및 크레아티닌 농도는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났음.
- 라) 지질과산화물 및 항산화 효소계 활성화
  - 마름군의 간조직 TBARS 함량( $4.2 \pm 0.3$  nmol MDA/mg protein)은 대조군( $5.8 \pm 0.7$  nmol MDA/mg protein)에 비해 유의적으로 감소하였음 ( $P < 0.05$ ).
  - 간조직의 catalase 활성은 마름군이  $9.9 \pm 0.3$  U/mg protein, 대조군이  $7.7 \pm 0.1$  U/mg protein로 나타나, 마름군이 유의적으로 증가하였음 ( $p < 0.001$ ).
  - 마름군의 간조직의 SOD 활성( $27.8 \pm 1.7$  U/mg protein)은 대조군( $22.5 \pm 0.7$  U/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였으며, 특히 마름의 섭취는 Cu,Zn-SOD의 활성을 유의적으로 증가시켰음( $p < 0.05$ ).
  - 마름군의 간조직의 glutathione 농도( $0.38 \pm 0.05$   $\mu$ g/mg)는 대조군( $0.32 \pm 0.04$   $\mu$ g/mg liver)에 비해 유의적으로 증가하였음( $p < 0.05$ ).
  - 마름군의 단백질 carbonyl 농도는 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었음.
  - 마름 섭취는 신장조직의 aldose reductase 활성 및 lens의 sorbitol 농도를 감소시키는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 없었음.
- 마) 유전자 발현수준
  - 마름군의 간조직에서 GLUT4 mRNA expression( $163.3 \pm 8.4\%$ )과 insulin receptor의 gene expression( $150.9 \pm 8.2\%$ )이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음( $p < 0.01$ ).
  - 마름의 섭취는 Cu,Zn-SOD mRNA expression( $146.2 \pm 6.2\%$ )과 catalase mRNA expression( $134.9 \pm 5.2\%$ )을 대조군에 비해 유의적으로 증가시켰음( $p < 0.01$ ). Mn-SOD 및 GSH-px의 gene expression은 마름군과 대조군 사이에 유의적 차이가 없었음.
  - 신장조직의 aldose reductase mRNA expression은 대조군과 마름군간에 유의적 차이가 없었음.

#### 다. 당뇨병환자에 있어서 마름의 항당뇨 효과 조사

##### 1) 당뇨병환자에 있어서 마름이 식후 혈당 조절에 미치는 영향 조사

- 13인의 제2형 당뇨병환자가 쌀밥(가용성 전분 50g)만 섭취한 경우 식후 90분에 혈장 포도당 농도 증가치가 최고치에 도달하였음. 마름 주정추출물 3g을 쌀밥과 함께 섭취한 경우, 식후 30, 60, 90, 120, 180분의 혈당증가치가 쌀밥만 섭취한 경우에 비해 유의적으로 낮았음( $p < 0.05$ ). 마름 주정

- 추출물을 쌀밥과 함께 섭취한 경우, 식후 60분의 인슐린 증가치가 쌀밥만 섭취한 경우에 비해 유의적으로 낮았음( $p < 0.05$ )
- 마름섭취군에 있어서 식후 혈당 증가곡선의 면적(AUC)은  $8,098 \pm 932$   $\text{mg} \cdot \text{min}/\text{dL}$ 로 대조군( $14,181 \pm 1,012$   $\text{mg} \cdot \text{min}/\text{dL}$ )에 비해 유의적으로 감소하였음( $p < 0.05$ ).
- 2) 제2형 당뇨병환자에 있어서 마름의 장기간 섭취가 나타내는 당뇨병 개선효과
- 대조군( $n=10$ )과 마름군( $n=10$ ) 모두 체중, 허리둘레, 체지방지수, 체지방이 3개월 간의 마름 함유 선식제품 섭취(마름 7g/d)기간 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았음. 마름군의 경우 장기간의 마름제품 섭취는 수축기혈압을 유의적으로 감소시켰음.
  - 마름군에 있어서, 마름 섭취 전의 공복 혈당과 인슐린 농도는  $142.2 \pm 10.2$   $\text{mg}/\text{dL}$  및  $12.5 \pm 2.4$   $\mu\text{U}/\text{mL}$ 이었으나, 섭취 기간 후 유의적으로 감소하여  $126.3 \pm 10.5$   $\text{mg}/\text{dL}$  및  $10.4 \pm 3.1$   $\mu\text{U}/\text{mL}$ 로 나타남(혈당  $p < 0.001$ , 인슐린  $p < 0.05$ ). 마름의 장기간 섭취는 HOMA-IR( $p < 0.01$ ), 혈장 fructosamine 및 당화헤모글로빈 농도( $p < 0.05$ )를 유의적으로 감소시켰음.
  - 마름의 장기간 섭취는 공복상태에서 glucose 75g을 섭취한 후 120분의 혈당 및 인슐린 증가치를 유의적으로 억제하여, 내당능 개선효과를 나타내었음.
  - 마름제품 섭취 전의 혈청 콜레스테롤 및 중성지방 농도는 각각  $213.9 \pm 32.2$   $\text{mg}/\text{dL}$ ,  $204.5 \pm 73.8$   $\text{mg}/\text{dL}$ 이었으며, 마름제품을 섭취한 후 유의적으로 감소하여 각각  $202.8 \pm 35.0$   $\text{mg}/\text{dL}$ ,  $192.2 \pm 70.4$   $\text{mg}/\text{dL}$ 로 나타남( $p < 0.05$ ). 마름의 섭취는 HDL-콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도에 유의적인 변화를 주지 않았으나, 동맥경화지수(Triglycerides/HDL-cholesterol)를 유의적으로 감소시켰음( $p < 0.01$ ). 마름제품의 섭취는 유리지방산 농도를 유의적으로 감소시켰음.
  - 마름의 장기간 섭취는 혈장 TBARS 함량을 유의적으로 감소시키고, 적혈구 SOD 활성을 유의적으로 증가시켰음( $p < 0.05$ ).

## 2. 마름의 항암 효과 규명

### 가. 암세포주에서의 항암 효능 스크리닝

#### 1) 세포독성

- 암 세포주들에서 마름 추출물의 임의의 농도로 처리하여 항암 세포 활성을 MTT assay방법 및 세포독성의 형태학적 관찰을 통해 항암 효능이

유효한 추출물 분획을 선발하였고, 향후 연구를 위한 처리조건을 결정하였음.

- Flow cytometry 분석을 시행한 결과, 마름 hexane 분획을 처리하였을 때 비 처리군과 비교하여 현저한 subG1기 분획의 증가가 관찰되어 apoptosis가 일어났음을 알 수 있었음.

## 2) 기존 항암 약제와의 반응성 검색

- 분리된 마름 분획 중 물추출물 및 70% 에탄올추출물에서 기존 항암 약제들(Taxol, cisplatin, adriamycin)과 동시에 처리했을 때 암세포 살해 synergy 효과를 보였음.
- MDA-MB-231 세포주에서는 물추출물은 cisplatin과, 70% 에탄올추출물은 taxol 및 cisplatin과 상승 효과를 보였고 MCF-7세포에서는 물추출물이 단독 사용시에 비하여 탁월한 synergy 효과를 보였음.
- 약제내성 세포주에서는 70% 에탄올추출물이 가장 우수한 항암 활성을 보였으나 adriamycin 내성 세포에 대해서는 마름 추출물이 기존의 다른 항암제들과 마찬가지로 특별한 효능을 보이지 못하였음.

## 3) 프로티움 연구를 통한 효능 발현과 관련된 목적 단백질 동정

- 스크리닝을 위한 기초 연구로 마름 분획추출물의 항암활성 조사에 사용되는 암 세포주의 하나인 MCF-7세포에서 표준 reference protein map을 작성하였고 thioredoxin계 항산화효소인 peroxiredoxin 2 등 일부 단백질들을 동정하였음.

## 나. 동물모델에서의 항암 효과 규명

### 1) 마름 추출물 용매획분의 항암 활성 검증

- 항암 효능이 확인된 마름 추출물의 용매획분을 추가 분리하여 항암 활성을 검증하였음. 각 시료 처리 군들에서는 현저한 암 세포 살해 경향을 보였음. 시료 처리 농도별로 큰 차이를 보이지 않았으며, hexane 분획을 선택하여 동물 모델에서의 항암 효과 검증에 이용하였음.

### 2) 발암 동물 모델 수립 및 *in vivo* 효능 분석

- 복수암 세포주 S-180 세포를 마우스 복강 내에 주입하여 악성 복수생성을 통한 발암을 유도하였으며, 2주째까지 대부분의 마우스에서 대량 복수가 발생하였고, 성공적으로 복수암 발암 모델을 수립하였음. 악성 복수의 형태를 동반한 복수암 마우스에 있어서 대조군의 평균 생존 기간은  $16.3 \pm 0.8$ 일로 나타났으며, 마름 hexane 분획투여군의 평균 생존기간은  $35.1 \pm 1.1$ 일로 유의적으로 길게 나타났음. 마름 hexane 분획투여군의 복수량 감소 정도는  $3.2 \pm 1.2$  g으로 감소하는 경향을 나타내었으며 생존기간을

2배 정도 연장하는 항암 효과를 보였음.

3) 항암 효능 관련 단백질 분석

- Western blot에서 종양억제단백질인 retinoblastoma protein은 마름추출물 처리에 의하여 탈 인산화된 형(dephosphorylated form)이 증가되었으며 이를 통하여 암 세포 억제가 일어나는 것으로 보였음.
- Proto-oncogene인 cyclin D1은 마름추출물 처리에 의하여 단백질 발현이 감소하였는데 이 또한 암 세포 성장 억제 기전으로 보임. Cdk4는 cyclin D1을 substrate로 하는 인산화 효소인데 본 조건에서는 변화가 없어서 주 효소인 cdk4는 변화가 없고 substrate인 cyclin D1의 발현 변화만으로 조절하는 것으로 보임. 이 결과들은 기존 항암 화학요법제의 작용 기작과 유사한 것으로 보였음.

4) 항암 효능 관련 단백질 동정 및 기능 분석

- 프로티움 분석을 통하여 vimentin, cytokeratin 19, glutathion S-transferase:increase, cathepsin D등을 동정하였음.

다. 개발된 소재의 항암 효능 확인 및 그 기전 규명

1) 동물모델계에서 제2세부과제에서 개발된 항암 소재의 효능 확인

- S-180 암 세포의 복강내 전 처치를 통해 발암율을 높은 복수암 마우스 모델을 사용하였음.
- 마름 추출물은 마우스에서 복수 생성 억제 및 생존 기간 연장 등으로 암 억제 효과를 보였음. 복수 억제 효과는 마름 추출물 투여 마우스에서의 마우스 무게가 마름 투여 후 거의 늘지 않아서 대부분 33-35g에 머물렀으나 마름을 투여 하지 않은 마우스에서는 대부분 계속 증가하여 56-58g에 이르렀고 모두 조기 폐사 하여 본 실험 조건에서는 현저한 항암 효능을 보여주었음.
- 생존 기간 면에서도 암화동물의 대조군(saline, DMSO만 투여군)은 11-21일에 걸쳐 있으나, 마름 투여군의 평균 생존기간은 최장 36일로 현저히 길게 나타났음.
- 본 실험 결과들은 마름 추출물이 cytostatic한 계열의 항암 약제에 속할 가능성을 시사하고 있음.

2) 분자생물학적 연구를 통한 작용 메카니즘 연구

가) 항산화 역할 연구: theoredoxine 역할 규명

- Peroxidase활성을 NADPH의 산화도를 측정하여 분석 하였으나 거의 유도되지 않았음. 따라서 본 효소계는 다른 약제에서와는 달리 본 연구조건에서는 전통적인 항산화제로서는 역할을 하지 않는 것으로 보

임. 면역조직화학염색을 통한 분석 결과 peroxiredoxin 효소는 인간 유방암 세포에서도 발현이 증가되었음.

나) Stable transfectant를 이용한 theoredoxin 산화 효소계의 역할 규명

- 마름 추출물에 의한 항암 효과 발생 시 암 세포에서 손상 단백질이 많아지면서 세포 사멸에 이르는데 peroxiredoxin II가 chaperon단백질로서 작용하여 단백질 손상을 줄이면서 항암 효능 감소로 이어지는 것으로 보임. Peroxiredoxin II 과 발현 세포에서는 ubiquitination도 적게 일어났음.
- 마름에 의한 항암 효능은 단백질 분해와 연관되고 단백질 분해는 ubiquitin-proteasome system을 이용함을 확인 할 수 있었음.
- PARP 발현 양상을 조사한 결과 마름 추출물의 암 세포 살해 기작은 apoptosis를 통하여 일어남을 재검증하였다. 프로티움 분석을 통한 목적단백질을 추가로 동정하였음.

### 3. 마름의 유효 활성성분의 분리 및 특성 연구

가. 마름 추출물에서 활성물질의 분리 및 동정

- 마름 용매 추출물의 생리활성  
마름의 과피를 80% ethanol로 추출한 후 극성에 따라 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous 추출물로 계통분획한 후 각 추출물의 활성을 비교한 결과 DPPH 라디칼 소거능 및 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 모두 ethylacetate 추출물에서 가장 우수하게 나타났음.
- 마름으로부터 유효활성성분의 순수분리  
마름의 ethylacetate 추출물로부터 LH-20 column chromatography와 C<sub>18</sub> semi-preparative HPLC를 이용하여 4가지의 유효활성성분을 순수 분리하였음.
- 유효활성성분의 동정  
LC/MS, IR, NMR을 이용하여 순수분리된 4가지의 유효성분이 gallotannin 계열의 물질임을 확인하였으며 그 구조는 각각 gallic acid, 1,2,6-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose, tellimagrandin II 및 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose로 동정하였음.

나. 마름에서 분리한 유효 활성물질의 *in vitro* 생리활성

- 유효활성성분의 생리활성  
순수 분리된 4가지의 유효활성성분 중 gallic acid의 항산화효과가 가장 우

수하였으며 ( $IC_{50}=60\text{mg/mL}$ ), tellimagrandin II에서 가장 뛰어난 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 나타내었음( $IC_{50}=0.38\text{mg/mL}$ ).

- 유효성분의 효소저해 특성

Tellimagrandin II의 yeast  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해특성을 살펴본 결과, 효소농도, 기질농도 및 첨가된 BSA의 농도가 증가함에 따라 저해도가 감소하여 단백질에 비특이적인 tight binding inhibition 및 경쟁적 저해를 하는 것으로 판단되었음.

다. 마름 중 유효 활성물질의 함량

- (주)기화제약에서 공급받은 열풍 건조한 마름으로부터 제조한 ethanol 추출물과 창녕에서 수확한 후 냉동 건조된 마름으로부터 제조한 ethanol 추출물 중의 유효활성성분의 함량은 각각 9.2%와 14.5%였으며 열풍건조 시 고온에 의하여 일부 활성성분의 분해가 일어나 함량 감소가 야기된 것으로 추정됨. 유효성분 각각의 함량을 (주)기화제약에서 제공받은 마름분말 1kg당 수율로 환산할 경우 gallic acid는 1.5g, 1,2,6-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose는 1.5g, tellimagrandin II은 1.9g, 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose는 3.3g으로 나타났음.

#### 4. 마름의 유효 생리활성을 이용한 기능성 식품소재 개발

가. 마름으로부터 유효 활성물질의 분리방법 최적화

- 마름으로부터 유효 생리활성 물질을 기능성 식품소재로 개발하기 위해 추출방법을 최적화시킨 결과, 마름분말에 80% 주정을 첨가하여 pH를 4(약산성)에 맞춘 후 40°C이상의 온도에서 24시간동안 2회 추출하는 것이 14.7%수율의 최적조건으로 판단됨.

나. 유효 활성물질의 물리화학적 안정성 분석

- 마름 유래 생리활성물질의 물리화학적 안정성 분석을 위해 온도와 pH 및 금속에 대한 안정성을 살펴본 결과, 고온(100°C)에서 장시간(20시간) 방치할 경우 큰 분자량의 gallotannin 성분은 대부분 분해되어 불안정하였으며 산성이나 중성 pH보다 알칼리성 pH에 방치할 경우 대부분의 유효활성성분이 파괴되었음. 따라서 가공 시 마름 추출물의 pH를 중성 및 약산성으로 유지하며 고온에서의 처리시간은 가능한 줄이고 저온으로 처리하는 것이 유효생리활성성분의 분해를 최소화시킬 것으로 판단됨.

다. 유효 활성물질의 기능성 식품소재로서의 개발

- 본 연구결과를 바탕으로 마름 추출물을 이용하여 기능성식품으로 개발해 본 결과, 마름 추출물의 유효 성분이 주로 gallotannin 성분이고 쓴맛이 강한 특성을 가지고 있어 정제보다는 캡슐형태의 제품이, 단일제품보다는 선식과 같은 분말식품에 첨가한 제품이 유리할 것으로 판단되었으며 마름 추출물에 대한 독성 평가가 보완된다면 마름 추출물을 이용한 다양한 건강기능식품으로의 개발이 가능하다고 사료됨.

## V. 활용에 대한 건의

1. 본 연구결과를 바탕으로 국내 특허를 3건 출원하고, 1건 등록하였으며, 향후 기술 이전하여 산업화할 것임.
2. 소비자의 선호도가 높은 제품을 개발하고 대량생산 할 수 있도록 기초자료를 제공할 것임.
3. 마름 추출물의 효능은 종양 특이성이 있는 것으로 보이고 위암에는 효능이 없으나 자궁암, 유방암 등 부인과 종양 및 복강 내 전이된 암에는 치료제로서의 가능성을 보이고 있음. 향후의 연구는 이들 종양을 중심으로 추가 연구 및 산업화 가능성을 추구해야 할 것으로 사료됨. 또한 항암 약제 개발 시 thioredoxin 효소계 중에서 peroxiredoxin II 효소가 chaperon protein으로 항암 효능을 조절하는 중요한 표적임을 밝혔으므로 향후 이 단백질을 표적으로 한 표적 항암제 개발에 활용 할 수 있을 것으로 사료됨.

## SUMMARY

The prevalence of diabetes mellitus is increasing in the general population, and it has been the fifth leading cause of death among Koreans. Controlling blood glucose levels as close to normal and preventing diabetic complications are the major goals in the treatment of diabetes mellitus. Intensive glycemic control is essential for risk reduction of diabetes-related complications, which are the major causes of premature death among patients with diabetes. Dyslipidemia and oxidative stress are also related with risk for diabetic complications. Although oral hypoglycemic agents are used to treat diabetes, the chronic use of these agents can result in side effects. Therefore, numerous studies have evaluated natural products with hypoglycemic effect, as alternative hypoglycemic agents for diabetes to be used in addition to conventional treatments. Cancer is the first leading cause of death among Koreans. *Trapa japonica* Flerov. has been traditionally used to treat cancer and diabetes without scientific evidences. The previous studies showed that *Trapa japonica* Flerov. exerts strong antioxidant effect *in vitro*. Thus it could be effective in preventing cancer and improving diabetes mellitus.

The objectives of this study is to elucidate antidiabetic and anticancer effects of *Trapa japonica* Flerov. and develop value-additive products. This project consists of three subjects to fulfill the objectives. The first subject is to elucidate antidiabetic effect of *Trapa japonica* Flerov. *in vitro* and *in vivo* and determine efficacy of the products containing *Trapa japonica* Flerov. in the patients with type 2 diabetes mellitus. The second is to determine the anticancer effect of *Trapa japonica* Flerov. *in vitro* and *in vivo* and elucidate the mechanisms of action by molecular biological methods. The third is to isolate and identify the bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov. and develop functional food materials.

### **1. Elucidation of antidiabetic effect of *Trapa japonica* Flerov. in animal model of diabetes and in the patients with type 2 diabetes mellitus.**

#### **A. Inhibition of *Trapa japonica* Flerov. against carbohydrate digestion enzyme *in vitro* and *in vivo***

- Alpha-glucosidase inhibitory activity *in vitro*

Yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of extracts of *Trapa japonica* Flerov. were measured using  $p$ -nitrophenyl- $\alpha$ -glucopyranoside as substrate. Methanol and 80% ethanol extract showed strong inhibitory activities compared with Acarbose.

**- Effect of *Trapa japonica* Flerov. on postprandial hyperglycemia in diabetic rats**

The effect of the methanol extract of *Trapa japonica* Flerov. on the postprandial increase in blood glucose levels was studied in streptozotocin-induced diabetic rats using a carbohydrate load test. Oral administration of *Trapa japonica* Flerov. (0.5 g/kg) significantly decreased incremental blood glucose levels at 30, 60, 90, and 120 min ( $p < 0.05$ ) after an oral ingestion of starch (1 g/kg). The area under the glucose response curve (AUC) of the *Trapa japonica* Flerov. group significantly decreased compared to that of the control group.

**B. Effect of chronic feeding *Trapa japonica* Flerov. on glycemic control and lipid metabolism in db/db mice**

**- Glycemic control**

The effect of chronic feeding of *Trapa japonica* Flerov. was studied in an animal model of type 2 diabetes. Four-week-old db/db mice were fed AIN-93G diet or diet containing 10% *Trapa japonica* Flerov. powder for 6 weeks. Consumption of *Trapa japonica* Flerov. significantly decreased fasting plasma glucose and glycated hemoglobin and tended to decrease plasma insulin. Chronic consumption of *Trapa japonica* Flerov. significantly increased mRNA expression of hepatic GLUT4 and insulin receptor.

**- Control of dyslipidemia and antioxidative effect**

Chronic consumption of *Trapa japonica* Flerov. significantly decreased plasma triglyceride and total cholesterol levels. Hepatic TBARS levels of *Trapa japonica* Flerov. was significantly lower than the control group. *Trapa japonica* Flerov. significantly increased hepatic glutathione level and SOD activity.

**C. Antidiabetic effect of *Trapa japonica* Flerov. in the patients with type 2 diabetes mellitus**

- **Acute effect of *Trapa japonica* Flerov. on postprandial glycemic response**

The effect of 95% ethanol extract of *Trapa japonica* Flerov. on postprandial glucose was studied in 13 patients with type 2 diabetes mellitus. Each subject ingested cooked rice containing 50g of available carbohydrates alone or rice with *Trapa japonica* Flerov. extract (3 g) after an 12hr overnight fast. Consumption of *Trapa japonica* Flerov. extract significantly decreased postprandial blood glucose levels at 30, 60, 90, 120, 180 min and AUC of glycemic response curve compared with the control group. Consumption of *Trapa japonica* Flerov. extract significantly decreased postprandial plasma insulin levels at 60 min. The data suggest that acute ingestion of *Trapa japonica* Flerov. extract could be effective in controlling postprandial hyperglycemia in diabetic patients.

- **Beneficial effect of chronic consumption of *Trapa japonica* Flerov. in diabetic patients**

Twenty patients with uncomplicated type 2 diabetes consumed meal replacement containing milled barley, brown rice, buckwheat and *Trapa japonica* Flerov. powder in the ratio of 36:27:27:10 (TJF group, 70 g/d) or standard breakfast (control group) for 3 months. The amounts of carbohydrates, fat, protein and dietary fiber contained in the grain products and the regular breakfast were similar. BMI, waist circumference and body fat content of the TJF group were not significantly different from those of the control group. Consumption of *Trapa japonica* Flerov. significantly decreased systolic blood pressure, fasting plasma glucose, insulin, fructosamine, glycated hemoglobin and HOMA-IR. Consumption of *Trapa japonica* Flerov. significantly decreased plasma triglycerides, total cholesterol, FFA, and TBARS and atherogenic index and increased RBC SOD activity. Consumption of *Trapa japonica* Flerov. improved glucose tolerance. Thus *Trapa japonica* Flerov. could decrease risk for diabetic complications by improving hyperglycemia and dyslipidemia and antioxidative activity.

2. **Investigation of the anticancer effect of *Trapa japonica* Flerov. *in vitro* and *in vivo* and elucidation of the mechanisms of action by molecular biological methods.**

## **A. Anticancer effects screening of *Trapa japonica* extracts**

### **- Anticancer effects screening in cancer cell lines**

Cytotoxic effects were evaluated by MTT assay and morphologic observation in the cancer cells treated with *Trapa japonica* extracts. Most effective fractions-hexane fraction was one of them- were determined based on cytotoxic analysis. Apoptosis was observed in *Trapa japonica* extracts-treated cells determined by flow cytometric analysis in that sub G1 fraction was markedly increased.

### **- Synergy evaluation with conventional anticancer drugs**

Conventional anticancer drugs were shown to be synergic with *Trapa japonica* extracts. Among the extracts, the water extract was synergic with cisplatin in MDA-MB-231 cells and the 70% ethanol extract was synergic with Taxol and cisplatin in MCF-7 cells. In drug resistant cells the 70% ethanol extract was most effective but all extracts were ineffective in adriamycin-resistant cells.

### **- Effector protein identification by proteomics**

Effector proteins were identified by proteomics as a basic reference protein map with effect of *Trapa japonica* extracts. Peroxiredoxin 2, a thioredoxin enzyme system was identified as an effector protein.

## **B. Anticancer effects validation of *Trapa japonica* extracts**

### **- Evaluation of sub-fractions isolated the screened fraction**

Further screenings were done to define the most effective fraction. Hexane fraction was defined as the candidate for following *in vivo* trial in tumor bearing animal model.

### **- Animal tumor model development**

Human peritoneal sarcoma cell line S-180 was used to develop cancer in mouse. S-180 cells cultivated in flask culture were inoculated into mouse peritoneal space by intraperitoneal injection(IP). Successful tumor development was determined by the occurrence of significant ascites and weight increase which signifies a malignant process. Survival time spanned  $16.3 \pm 1.1$  days in tumor bearing mice. By contrast, mean survival time was  $35.1 \pm 1.1$  days in hexane fraction-treated tumor bearing mice. These results showed that *Trapa japonica* extracts has a significant anticancer efficacy.

- **Molecular biologic work to study the molecular mechanisms of action**

Effector proteins were analyzed by Western blot. Retinoblastoma protein(RB), a tumor suppressor was dephosphorylated by *Trapa japonica* extracts and becomes an active regulator of cell cycle progression and acts as cancer cell growth inhibition. A proto-oncogene, cyclin D1 was decreased by *Trapa japonica* extracts and also deserved as being inhibitory to cell growing. Cdk4, a partner for cyclin D1 was not changed. These results suggested that tumor growth inhibition was executed by cell cycle arrest in G1/S transition controlled by RB. These were similar with the effects of other anticancer drugs.

- **Target protein identifications**

Several proteins such as vimentin, cytokeratin 19, glutathion S-transferase:increase, cathepsin D were identified by proteomic analysis.

C. ***In vivo* anticancer drug validation of *Trapa japonica* and determination of molecular mechanisms**

- ***In vivo* anticancer drug validation with animal tumor model**

Tumor bearing rate was increased in mouse model by *in vivo* activation of S-180 cells in mouse peritoneal space in addition to *in vitro* flask culture. Based on the 2nd year data animal studies were followed by grouping including solvent-DMSO group. A significant antitumor effects were observed in *Trapa japonica* extracts-treated group. In this study survival time reached upto 36 days in *Trapa japonica* extracts-treated mice comparing 11-21 days of survival in control mice. These data confirmed the anticancer efficacy of *Trapa japonica*. and suggested that it may belong to a cytostatic anticancer agent.

- **Study of molecular mechanism:**

*Trapa japonica* did not appear to influence activity of peroxiredoxin 2. Expression of peroxiredoxin 2 was increased in human breast cancer tissues.

- **Determination of target protein expression**

A stable transfectant in which peroxiredoxin 2 (prx2) overexpressed was established in cervical cancer cell line HeLa and used to assess the role of prx2 in executing anticancer action by *Trapa japonica*. The result with prx overexpressed cells showed that peroxiredoxin 2 overexpressing

HeLa cells live longer than control cells with the treatment of *Trapa japonica*. Further experiments showed that peroxiredoxin 2 acts as chaperon protein and inhibits protein degradation induced by *Trapa japonica*. Ubiquitination was decreased in peroxiredoxin overexpressing cells. These results showed peroxiredoxin 2 protects cancer cells from the attack of anticancer agents such as *Trapa japonica* extract.

### **3. Purification and characterization of bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov.**

#### **A. Purification and identification of bioactive compounds from the extract**

##### **- Bioactivities of the solvent extracts**

Eighty percent ethanol extract was prepared from the fruit shell of *Trapa japonica* Flerov. and fractionated by a series of extraction using hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, and water. Among the fractions, ethylacetate extract showed both of strong DPPH radical scavenging activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity.

##### **- Purification of bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov.**

Four kinds of effective bioactive compounds were purified using LH-20 column chromatography and C<sub>18</sub> semi-preparative HPLC from ethylacetate extract.

##### **- Identification of bioactive compounds**

Purified bioactive compounds are identified as gallic acid, 1,2,6-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose, tellimagrandin II, and 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose using LC/MS, IR, and NMR analyses.

#### **B. *In vitro* bioactivity of bioactive compounds purified from *Trapa japonica* Flerov.**

##### **- Bioactivity of purified compounds**

Among four bioactive compounds, gallic acid showed the strongest antioxidant activity (IC<sub>50</sub>=60mg/mL) and tellimagrandin II showed the most effective inhibitory activity against yeast  $\alpha$ -glucosidase (IC<sub>50</sub>=0.38mg/mL).

##### **- Enzyme inhibition property of bioactive compound**

Enzyme inhibition of tellimagrandin II against  $\alpha$ -glucosidase was decreased as the concentration of enzyme, substrate, and BSA added increased,

showing the inhibition was related with tight binding inhibition and competitive inhibition.

**C. Contents of bioactive compounds in the fruits of *Trapa japonica* Flerov.**

- The contents of bioactive compounds in the ethanol extract of fruits from Gihwa company (hot-air dried) and harvested from Changnyung, Korea (freeze-dried) were 9.2% and 14.5%. Low content of the extract from hot-air dried fruits may be due to the exposure to high temperature during drying process where some of bioactive compounds could be degraded. The contents of gallic acid, 1,2,6-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose, tellimagrandin II, and 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose in 1kg of hot-air dried powder of the fruits supplied from Gihwa company were 1.5g, 1.5g, 1.9g, and 3.3g, respectively.

**4. Development of functional food materials using bioactive *Trapa japonica* Flerov.**

**A. Optimization of extraction procedure from *Trapa japonica* Flerov.**

- The optimized condition for the extraction of bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov. is two times extraction using 80% ethanol as solvent at a temperature of 40°C and pH of 4 for 24hr.

**B. Physicochemical stability of bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov.**

- Physicochemical stabilities of bioactive compounds against temperature, pH and metal ion were determined. High molecular weight gallotannins were easily degraded during an incubation at high temperature (100°C) for 20hr and most of active compounds were destroyed at alkaline pH. Therefore, to avoid high temperature and high pH during the process is helpful to maintain the bioactive compounds.

**C. Development of functional food materials using bioactive compounds**

- On the basis of this study capsule type product and meal replacement such as *Sunshik* are recommended because the major gallotannin compounds have bitter taste. Toxicity evaluation is prerequisite for more application to functional foods.

The results on this study elucidated **antidiabetic and anticancer effect of *Trapa japonica* Flerov.**

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Outlines</b> -----	30
Session 1. Research Objectives -----	30
Session 2. Research Necessity -----	30
Session 3. Research Scopes -----	35
<b>Chapter 2. International and Domestic Technology Status</b> -----	39
Session 1. International and Domestic Status -----	39
Session 2. Problems -----	40
Session 3. Solutions for the problems -----	41
<b>Chapter 3. Methods and Results</b> -----	42
Session 1. Overall design of the study -----	42
Session 2. Materials and methods -----	45
Session 3. Results and discussions -----	67
<b>Chapter 4. Achivement and Contribution to related fields</b> -----	144
Session 1. Achivements -----	144
Session 2. Contribution to related fields -----	147
Session 3. Contrubution to the related fileds -----	149
Session 4. Outcome of the study -----	151
<b>Chapter 5. Application of Results</b> -----	153
Session 1. Necessity of additional research -----	153
Session 2. Application to other studies -----	153
Session 3. Methods for manufacturing -----	154
<b>Chapter 6. Information collected from overseas</b> -----	155
<b>Chapter 7. References</b> -----	160

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	30
제 1 절 연구개발 목적 -----	30
제 2 절 연구개발 필요성 -----	30
1. 연구개발의 필요성 -----	31
가. 기술적 측면 -----	31
나. 경제·산업적 측면 -----	33
다. 사회·문화적 측면 -----	34
제 3 절 연구개발 범위 -----	35
1. 연구개발 목표와 내용 -----	35
2. 연차별 연구개발 목표와 내용 -----	36
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	39
제 1 절 국내외 현황 -----	39
1. 당뇨병 및 암환자의 급증 -----	39
가. 전 세계의 당뇨병 환자 증가 추세 -----	39
나. 암 환자의 증가 -----	39
2. 당뇨병 및 암환자의 약물요법의 부작용 -----	39
3. 국내·외 관련기술 -----	40
제 2 절 문제점 -----	40
제 3 절 문제점의 해결방안 -----	41
1. 부작용이 없는 천연소재의 개발 -----	41
2. 원료의 가격이 저렴하고 지속적으로 공급이 가능함 -----	41
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	42
제 1 절 연구개발 추진체계 -----	42
1. 1차년도 -----	43

2. 2차년도 -----	44
3. 3차년도 -----	44
<b>제 2 절 연구개발 수행내용 -----</b>	<b>45</b>
1. 마름의 영양성분 분석 -----	45
2. 마름의 항당뇨 효과 규명 -----	45
가. <i>In vitro</i> 에서 혈당조절 및 당뇨합병증 예방효과 조사 -----	45
나. 동물모델계에서 혈당저하 효과 규명 -----	46
다. 당뇨환자에 있어서 마름의 항당뇨 효과 조사 -----	49
3. 마름의 항암효과 규명 -----	53
가. 암 세포주에서의 항암효능 스크리닝 -----	53
나. 기존 항암약제와의 synergy효과 분석 -----	54
다. 프로티움 연구를 통한 효능 관련 목적 단백질 동정 -----	54
라. 마름 추출물 세부 분획의 항암 활성 검증 -----	55
마. 동물 모델에서의 <i>in vivo</i> 효능 분석 -----	55
바. 발암동물 모델 개발 및 효능 분석 -----	56
사. 분자생물학적 연구를 통한 작용 메커니즘 규명 -----	57
아. 면역조직화학 염색을 통한 목적 단백질의 <i>in vivo</i> 발현 양상 및 역할 분석 -----	58
4. 유효 생리활성 물질 분리·동정 및 특성 -----	58
가. 마름 추출물의 생리활성 분석 -----	58
나. 마름 추출물의 유효 생리활성물질의 분리 및 동정 -----	60
<b>제 3 절 연구개발 수행결과 -----</b>	<b>67</b>
1. 마름의 영양성분 분석 -----	67
2. 마름의 항당뇨 효과 규명 -----	69
가. <i>In vitro</i> 에서 혈당조절 및 당뇨합병증 예방효과 조사 -----	69
나. 동물모델계에서 혈당저하 효과 규명 -----	71

다. 당뇨환자에 있어서 마름의 항당뇨 효과 -----	79
3. 마름의 항암효과 -----	89
가. 암 세포주에서의 항암효능 스크리닝 -----	89
나. 기존 항암약제와의 synergy효과 분석 -----	93
다. 프로티움 연구를 통한 효능 관련 목적 단백질 동정 -----	95
라. 마름 추출물 용매 희분의 항암 활성 검증 -----	96
마. 동물 모델에서의 in vivo 효능 분석 -----	97
바. 유효성분 투여에 따른 항암 효능 확인 및 효능 규명을 위한 분 자 생물학적 연구 -----	98
사. 개발된 소재의 항암 효능 확인 및 기전 규명 -----	99
아. 분자생물학적 연구를 통한 작용 메커니즘 연구 -----	101
자. 면역 조직화학 염색을 통한 목적 단백질의 in vivo 발현양상 --	106
4. 유효 생리활성 물질 분리·동정 및 특성 -----	106
가. 마름 추출물의 각 분획별 수율 -----	106
나. 마름추출물의 생리활성 측정 -----	106
다. 마름으로부터 유효생리활성 물질의 정제 -----	108
라. 마름의 유효생리활성 성분의 구조 분석 -----	112
마. 마름의 유효생리활성 성분의 생리활성 -----	125
바. 마름 추출물의 생리활성물질 함량분석 -----	129
5. 마름 유래의 생리활성물질의 기능성 식품소재로의 개발 -----	130
가. 마름으로부터 유효 생리활성물질의 추출방법 최적화 -----	130
나. 마름 유래 유효 생리활성물질의 물리화학적 안정성 분석 -----	136
다. 마름 유래 유효 생리활성물질의 기능성 식품소재로의 개발 ----	139
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----</b>	<b>144</b>
<b>제 1 절 목표달성도 -----</b>	<b>144</b>
1. 1차년도 -----	144

2. 2차년도 -----	145
3. 3차년도 -----	146
제 2 절 연구개발목표의 달성도 -----	147
1. 연구평가의 착안점 및 달성도 -----	147
제 3 절 관련분야 기여도 -----	149
제 4 절 연구성과 -----	151
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	153
제 1 절 추가연구의 필요성 -----	153
제 2 절 타 연구에의 응용 -----	153
제 3 절 기업화 추진방안 -----	154
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	155
제 1 절 항당뇨 효능 관련 해외과학기술정보 -----	155
제 2 절 항암 효능 관련 해외과학기술정보 -----	157
제 3 절 유효물질 분리, 동정 관련 해외과학기술정보 -----	159
제 7 장 참고문헌 -----	160

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발 목적

마름으로부터 부작용이 없고, 생리활성이 뛰어난 당뇨병 치료·예방 및 항암 소재의 개발

### 제 2 절 연구개발 필요성

□ 마름이란?



Fig. 1. *Trapa japonica* Flerov.

#### ○ 마름의 특성

① 마름(*Trapa japonica* Flerov., Fig. 1)은 한국 전역에 분포하고 있는 수생식물로 잎꼭지가 두껍고 속이 비어 물위로 떠오르는 성질이 있어 물에 떠서 자라는 한해살이 풀임.

② 마름의 속명(屬名) *Trapa*는 라틴어에서 따온 말로 마름의 씨가 옛 방어 무기처럼 생겼기 때문인데 열매가 익으면서 양쪽 끝이 뾰족해져 날카로운 가시가 됨(Fig. 1). 속은 백색의 과육으로 차 있어 생으로 먹을 수 있고, 물에서 따는 밤 같다고 하여 물밤(water chestnut) 또는 말밤이라고 함. 우리나라를 비롯하여 일본, 중국과 러시아, 몽골 등 북반구에 널리 분포함.

③ 이전부터 열매를 찌거나 삶아서 먹고 죽을 끓여 먹는 등 식량으로 이용하여 왔으며, 한방에서는 이 열매를 능실(菱實), 수율(水栗)이라고도 하는데 민간요법에서는 항암작용이 있는 것으로 알려져 있음.

#### ○ 마름의 효능

마름 열매는 민간요법에서 위장병, 치질, 식도암, 자궁암, 당뇨병 등의 치료에 사용되어 왔음(鄧元錐, 1976; 정보성, 1984). 마름 열매를 물로 달여서 마시면 각종 암치료에 효과가 있고 특히 위암, 식도암, 자궁암에 효과가 있는 것으로 전해져 오고 있으나, 과학적으로 그 효능을 규명한 연구는 미비한 실정임(www.okmedi.net).

#### ○ 마름의 분포

마름은 한국 전역에 널리 분포하고 있으며 저수지나 연못, 늪지대에서 흔히 볼 수 있는 수생식물임. 마름의 종류 및 생태에 대한 보고(Chung, et al., 1987)에 따르면 우리나라에는 총 7가지의 마름이 서식하며 이 중에서 Japonica type이 주종을 이루고 있음. 마름을 재배하기 위해서는 가을에 열매가 익으면 마르지 않도록 저장했다가 봄에 물을 뺀 진흙 논에 뿌리고 싹이 돋아나면 물을 대어 재배함.

### 1. 연구개발의 필요성

- 당뇨병환자의 혈당 조절과 합병증 치료에 있어서 시너지효과를 가지는 천연물 유래 고부가가치 기능성 소재의 개발
- 천연물로부터 개발되어 부작용이 없는 항암 기능성 소재의 개발
- 항당뇨, 항암효능이 뛰어나며, 경제성이 커서 국내 수요는 물론 외국으로 수출이 가능한 소재의 개발

#### 가. 기술적 측면

- 1) 부작용이 없으면서 효능이 우수한 항당뇨, 항암 기능성 소재의 개발
  - 가) 2005년 한국인 사망 요인 중 암은 제1위, 당뇨병은 제5위를 차지하고 있음.
  - 나) 현재 당뇨병 치료에 사용되고 있는 경구 혈당강하제는 혈당 강하 효능

은 우수하지만 장기 복용 시 저혈당, 심장 손상, 복통 등 여러 가지 부작용을 수반하고 있음.

- 다) 따라서 부작용이 없는 천연물 유래 혈당강하제를 개발할 필요성이 절실하여, 현재 전 세계적으로 연구를 하고 있지만 효능이나 경제적 측면에서 그 가치가 떨어지는 경우가 많음.
- 라) 우리나라 암 환자의 경우 대부분 진행된 상태로 내원하여 초기 수술적 치료가 불가능하여 항암제 치료가 유일한 치료방법이 됨.
- 마) 전통적인 항암제 사용 시 오심, 구토, 골수억제, 간 및 신기능 장애 등 막심한 부작용으로 치료를 계속할 수 없는 경우가 많음.
- 바) 이에 따라 항암 효능이 있으면서 부작용이 적은 생약성분들이 개발의 대상이 되고 있음.
- 사) 국내 대학병원들에 내원하는 암 환자 중 53%가 식품, 약초, 민간요법을 시행하고 있음(이건세 외, 1998). 그러나, 대부분 과학적 검증을 거치지 않은 조약한 형태로 공급되고 있음.
- 아) 마름은 민간요법에서 당뇨병 및 암 치료의 목적으로 섭취해 왔음. 그러나 항당뇨 및 항암 효과에 대한 과학적인 연구는 거의 이루어지지 않았음.
- 자) 따라서 마름을 이용하면 부작용이 없고, 항당뇨, 항암효과가 우수한 기능성 소재를 생산할 수 있을 것임.

## 2) 지속적으로 저가로 공급이 가능한 기능성 소재의 개발

- 가) 현재 사용되고 있는 당뇨병 치료제는 대부분 다국적 제약회사의 제품으로 환자에게 경제적인 부담을 주고 있음. 또한 항암 치료제는 대부분 수입품으로 단가가 고가이므로, 암 환자에게 큰 경제적인 부담을 주고 있으며, 당뇨병 및 암 치료제 모두 의료비 재정압박의 원인이 되고 있음.
- 나) 이전에는 주로 마름의 과육만 식용으로 하였으며 경제적인 목적으로 사용하지 않았음. 민간요법으로 일부 환자들이 당뇨치료 및 암 치료의 목적으로 묵을 제조하거나, 건조분말을 제조하여 섭취해 왔음. 과육은 식용으로 사용하고 껍질로부터 항당뇨, 항암 소재를 개발하면 저가로 대체의약품 생산할 수 있음.

## 3) 기능성 소재의 개발과 항당뇨, 항암 효과 규명

- 가) 실제로 국내 대부분의 암환자가 1종 이상의 약초 등 대체 약품 혹은 기능성 식품을 섭취하고 있음.
- 나) 임상에서 사용되는 약물로는 기생충약인 levamisol, 엽산유도체인

leukovorin 등은 그 자체로는 항암 효능은 미미 하지만 부작용이 적고 항암 보조 효과는 상당하여 국내외에서 많이 투여되고 있음. 특히 leukovorin은 항암 증진 효과 외에 정상세포 보호 작용이 있어 대장암, 골수암 등에는 항암제와 함께 표준 치료약이 되었음.

다) 그러나, 암 환자의 숫자가 증가되고 있고 암의 종류가 다양한 만큼, 여러 천연물로부터 항암제 및 항암보조제를 개발하는 연구의 필요성이 절실함.

라) 마름으로부터 항당뇨, 항암 활성 성분을 분리·동정하여 기능성제품 개발에 활용할 필요성이 있음.

마) 따라서, 개발된 소재의 항당뇨, 항암 효능을 검증하고 그 메카니즘을 규명하여 경쟁력있는 제품으로 개발할 필요성이 절실함.

#### 나. 경제·산업적 측면

1) 생산자는 부가가치가 높아 경제성이 있고, 소비자에게는 저렴한 가격의 제품개발

가) 당뇨병 치료약물은 대부분 다국적 기업 제품이므로 경제적 부담이 큰 실정임. 항암 약물의 경우도 단가가 고가이어서 환자 및 가족들에게 큰 경제적인 부담이 되고 있어, 효능이 우수하며 저렴한 가격의 기능성 소재의 개발이 필요함.

나) 마름은 자생력과 번식력이 강하고 우리나라 전역에 분포되어 있으나, 현재까지 그 경제적 가치에 대해서는 관심을 별로 두지 않았음. 그러나 마름으로부터 항당뇨, 항암 소재를 개발하여 효능을 확인하면, 부가가치가 증대하여 농민의 소득 증대로 직결될 수 있음. 특히 현재까지 버려지던 껍질에 활성성분이 함유되어 있어, 껍질로부터 기능성 소재를 개발하면 부산물이 없는 친환경적인 제품임.

2) 당뇨병 및 암환자의 증가로 인한 삶의 질 저하 및 생산성 저하현상의 개선을 위해 필요

가) 당뇨병은 현재까지 완치법이 개발되어 있지 않고, 병이 진전됨에 따라 망막손상, 심혈관계질환, 신장병과 같은 합병증이 나타나고 유병기간이 길어 활동성과 생산성의 손실이 다른 질환에 비하여 상대적으로 커서, 경제, 산업활동에 막대한 악영향을 미침.

나) 암 환자의 경우는 발견 시기에 따라 차이는 있지만, 수술, 방사선요법, 항암화학요법 등의 치료과정을 거치며 투병에 집중해야하므로 정상적인 사회생활이 어려우며 생산성이 저하됨(Rosenberg SA, 1997).

다) 양 질환 모두 완치법이 확립되어 있지 않아 병이 발생하게 되면 거의 전 생애에 걸쳐 앓게 되므로 의료비 부담의 증가, 경제활동 감소 등의 사회 경제적 문제를 야기함(Ahmedzai SH, 2000).

3) 수입대체를 위한 국내에서 생산 가능한 소재의 개발이 필요

가) 현재 사용되고있는 당뇨병 및 암 치료제는 대부분 원료 또는 완제품을 외국으로부터 수입하므로 외화유출이 심각함.

나) 따라서 마름으로부터 경제성이 큰 고부가가치 상품을 개발하면 수입대체 효과를 기대할 수 있음.

#### 다. 사회·문화적 측면

1) 당뇨병환자의 수가 급격히 증가하고 있어 사회 문제가 됨

가) 당뇨병 환자는 우리나라에서 300~500만명 정도로 예상되며, 당뇨병은 2005년 한국인 사망요인 중 5위를 차지하고 있음(통계청, 2005). 암은 국내에서 전 인구 4명 중 1명의 발생을 보이며, 한국인 사망 요인 중 1위를 차지하고 있음.

나) 건전하지 못한 식생활, 운동부족, 스트레스 등으로 인해 당뇨병 유병율은 급속히 증가하는 추세에 있어, 환자의 삶의 질 저하는 심각한 사회적, 문화적 문제를 초래하고 있음.

2) 현재 당뇨병은 완치법이 개발되어 있지 않고 있으며, 치료에는 약물요법과 함께 식사요법 및 운동요법을 병행하는 것이 필수적임.

가) 현재까지 당뇨병의 완치에 기여할 수 있는 식사요법은 아직 확립되어 있지 않으며, 건강 상태가 악화된 당뇨병환자에 있어서 엄격한 식사요법을 항상 지키는 것이 현실적으로 어려움. 따라서 당뇨 치료 활성이 큰 천연 소재를 개발하고 당뇨 치료식이에 활용하는 것이 매우 중요함,

나) 영양과잉 및 운동부족 등으로 인해 내당능 장애, 고지혈증, 비만을 특징으로 하는 인슐린저항성 증후군이 급증하고 있고, 이는 당뇨병 및 심장순환계질환으로 이환되는 경우가 많아, 식이와 생활습관의 변화를 통한 당뇨병 예방 시스템의 확립 필요함.

다) 따라서 당뇨병의 예방 및 치료기능이 있는 천연 소재의 개발이 절실히 필요함.

3) 암 발생이 급격히 증가하고 있어, 이로인한 사회적 손실이 심각함.

가) 최근 암 발생 추이는 사회적으로 가장 왕성한 활동을 하는 40~50대에

증가되는 경향을 보이고 있어 사회적 손실이 더욱 심각함.

나) 마름은 오래전부터 우리나라 및 중국에서 향당뇨 및 항암 효과가 알려져 있어 민간에서 약용으로 사용되어 왔음. 이러한 경험적인 사용 외에 이들의 효능을 과학적으로 연구된 바가 미미하여 국외의 경우 주로 일본과 중국, 방글라데시 등 일부 아시아권 국가에서 마름의 생리활성에 관해 연구된 논문이 보고 되었지만 그 내용이 in vitro 항산화 활성 및 세포독성에 대한 기초적인 자료만을 제시할 뿐 제품으로 개발하려는 구체적이며 체계적인 연구는 미비한 실정이었음.

다) 따라서 암의 예방 및 치료기능이 있는 천연 소재의 개발이 절실히 필요함.

### 제 3 절 연구개발 범위

#### 1. 연구개발 목표와 내용

마름으로부터 부작용이 없고 경제적인 천연물 유래 향당뇨 소재 및 항암 소재의 개발

#### 2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003)	<input type="checkbox"/> 마름의 항당뇨 효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ In vitro 항산화능 측정             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 마름의 항산화능을 DPPH법을 이용하여 측정하여 항산화능이 우수한 분획을 선별</li> </ul> </li> <li>○ Aldose reductase 저해활성 측정             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 마름의 용매획분 별 aldose reductase 저해활성을 측정하여 IC<sub>50</sub>를 구함.</li> </ul> </li> <li>○ 전분분해효소 저해활성 측정             <ul style="list-style-type: none"> <li>- α-Glucosidase 저해활성을 분석하고 활성이 우수한 획분을 선별함</li> <li>- IC<sub>50</sub>를 구하고 활성이 우수한 획분을 선별함</li> </ul> </li> <li>○ 동물모델계에서 혈당 저하 효과 규명             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 당뇨쥐에 있어서 전분 투여 후 마름의 식후 혈당 조절 효과를 측정</li> </ul> </li> </ul>
	<input type="checkbox"/> 마름의 항암 효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 암세포주에서의 항암 효능 스크리닝             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암 세포주 배양: 위암, 자궁암 세포주</li> <li>- 암세포 살해능력 검증: MTT assay를 통한 세포 성장 억제 연구, flow cytometry 분석을 통한 세포 사멸 연구</li> </ul> </li> <li>○ 기존 항암 약제와의 반응성 검색             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Taxol, adriamycin cisplatin 등 기존 항암제제와 시너지효과 검색</li> </ul> </li> <li>○ 프로티움 연구를 통한 효능 발현과 관련된 목적 단백질 동정</li> </ul>
	<input type="checkbox"/> 마름의 유효 활성물질의 1차 분리	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 마름의 영양성분 분석             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전분, 아미노산, 지방산조성, 식이섬유 등</li> </ul> </li> <li>○ 마름 추출물에서 활성 물질의 1차 분리             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전분분해효소 저해, 항산화, 항암 등 생리활성을 가지는 분획을 1차 분리</li> <li>- Gel permeation chromatography, recycling HPLC 를 이용하여 유효성분 분획</li> </ul> </li> </ul>

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2004)	<input type="checkbox"/> 마름의 당뇨병 개선효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 당뇨 동물을 대상으로 한 장기실험             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제2형 당뇨병 동물 모델인 db/db mouse에게 6주간 시료 공급</li> </ul> </li> <li>○ 혈당조절효과 및 지질대사 개선효과 조사             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공복 혈당, 인슐린, 혈액 지질 profile, 당화헤모글로빈 농도 측정</li> <li>- 혈청 BUN, creatinine을 측정하여 신장기능에 미치는 영향 조사</li> </ul> </li> <li>○ 당뇨병증 개선효과 조사             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aldose reductase 활성, sorbitol 및 glutathione 함량, 지질과산화물 함량과 항산화효소계 활성 측정</li> </ul> </li> <li>○ Aldose reductase와 항산화효소계 중 마름 활성성분의 장기 섭취로 인해 유의적인 변화를 나타낸 조직의 효소는 mRNA expression을 측정하여, 유전자 수준에서의 변화를 조사함</li> <li>○ 제2형 당뇨병환자에 있어서 식후혈당 조절효과 조사             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 쌀밥과 마름 주정추출물 섭취 시 식후 혈당치 변화 측정</li> </ul> </li> </ul>
	<input type="checkbox"/> 마름의 항암 효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 분리된 활성 분획의 세포사멸효과를 측정하여 제 2세부 과제에 자료 제공</li> <li>○ 동물 모델에서의 in vivo 효능 분석             <ul style="list-style-type: none"> <li>- ICR mouse에게 복강암 발생 유도</li> <li>- 유효 성분 투여에 따른 항암 효능 확인</li> <li>- 효능 규명을 위한 조직학적, 분자생물학적 연구 실시</li> </ul> </li> </ul>
	<input type="checkbox"/> 마름의 유효 활성물질 분리, 동정 및 특성연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항당뇨, 항암 활성물질의 순수 분리             <ul style="list-style-type: none"> <li>- GPC, recycling HPLC, TLC, HPLC 등을 이용하여 유효성분을 순수하게 분리</li> </ul> </li> <li>○ 유효 활성물질의 구조 분석             <ul style="list-style-type: none"> <li>- NMR, GC-MS, LC-MS, MALDI-TOF/MS 등을 이용하여 분리된 활성물질의 동정</li> </ul> </li> <li>○ 유효 활성물질의 전분분해효소 저해 특성             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibition kinetics를 이용하여 효소저해 메카니즘과 IC<sub>50</sub> 값 분석</li> </ul> </li> </ul>

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2005)	□ 개발된 소재의 임상적 적용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 당뇨병자 20인을 대상으로 제2세부과제에서 개발된 항당뇨 기능성 소재의 효능 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제품 레시피 확립</li> <li>- 실험군과 대조군으로 나누어 시료를 3개월간 복용 시킴</li> </ul> </li> <li>○ 당질 및 지질대사 개선효과 규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 복용 전, 후에 공복 혈당, 혈당 조절호르몬, 당화 헤모글로빈, fructosamine 및 혈액 지질 profile, 혈압 측정, 내당능 개선효과 조사</li> </ul> </li> <li>○ 혈청의 지질과산화물, 단백질 카보닐함량 및 적혈구의 항산화효소계 활성을 측정함</li> </ul>
	□ 개발된 소재의 항암 효능 확인 및 그 기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동물모델계에서 개발된 항암소재의 효능 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항암 보조제로서의 효능 검증: 항암 기능 및 수명 연장효과 확인</li> </ul> </li> <li>○ 분자생물학적 연구를 통한 작용 메카니즘 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항산화 역할 연구: theoredoxin계 역할 규명</li> </ul> </li> <li>○ 면역조직화학 염색 등을 통한 목적 단백질의 in vivo 발현 양상 및 역할 분석</li> </ul>
	□ 유효 활성성분을 이용한 식품소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 마름으로부터 유효 활성물질의 분리방법 최적화               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분리단계 최소화, 경제적 분리방법 탐색</li> <li>- 유효 활성성분이 고농도로 함유된 분획을 효과적으로 얻기 위한 방법 모색</li> </ul> </li> <li>○ 유효 활성물질의 물리화학적 안정성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 고온에서의 안정성</li> <li>- pH에 따른 안정성</li> </ul> </li> <li>○ 유효 활성물질의 기능성 식품소재로서의 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 완제품: 캡슐, 선식 개발</li> <li>- 식품원료: 파우더</li> </ul> </li> <li>○ 식품소재의 생리활성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품소재로 개발된 제품의 항당뇨, 항암 활성을 측정하여 산업화에 응용</li> </ul> </li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 현황

#### 1. 당뇨병 및 암환자의 급증

##### 가. 전 세계의 당뇨병 환자 증가 추세

- 1) 전 세계적으로 1994년에 1억1천만명 이었고, 2010년에는 2억3천9백만명으로 약 2.2배의 증가를 예상하고 있음(www.biozine.kribb.re.kr).
- 2) 우리나라 당뇨병환자는 300-500만명 정도로 추정됨. 당뇨병 유병율은 현재 전 인구의 10%로 추정되며, 당뇨병은 한국인 사망요인 중 5위를 차지하고 있음. 식생활 및 생활습관의 서구화와 관련하여 유병율은 더욱 급증할 것으로 예상됨

##### 나. 암 환자의 증가

미국과 우리나라에서 암은 사망원인 1위를 점하는 주요질환이고 심장병 등의 타 질환은 지난 50년간 사망률이 절반까지 감소하였는데 암에 의한 사망률은 오히려 증가하는 추세임(Parker *et al.*, 1996).

#### 2. 당뇨병 및 암환자의 약물요법의 부작용

가. 당뇨병환자 중 10%를 차지하는 제1형 당뇨병환자는 인슐린 요법을 실시하고, 90%를 차지하는 제2형 당뇨병환자는 경구혈당강제 요법을 실시하고 있음.

나. 경구혈당강제제는 설폰요소계, 비구아나이드,  $\alpha$ -glucosidase 억제제 등으로 분류됨. 설폰요소계는 췌장의 베타세포로부터 인슐린 분비를 촉진하는데, 심혈관계에 부작용을 일으킬 수 있으며, 비구아나이드계는 간에서 당 신생(gluconeogenesis) 및 글리코겐 분해를 억제하는데, 신장기능 또는 심혈관계 기능이 저하된 환자들에게서 유산혈증(lactic acidosis)을 유발할 수 있음.  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 소장에서 탄수화물의 소화를 억제하여 식후혈당의 상승을 저해하는데, 복부팽만, 구토, 복통 등의 부작용이 있음.

다. 암 치료의 가장 좋은 방법은 수술적 절제이나 우리나라의 경우 대부분의 환자가 진행된 상태로 내원하여 초기 수술적 치료가 불가능한 경우가 많음. 이 경우 항암화학요법이 유일한 치료방법이 되는데 오심, 구토, 골수억제, 간 및 신기능 장애 등 막심한 부작용으로 치료를 계속할 수 없는 경우가 많음. 이에

따라 항암제와 병용 투여시 효능을 증진시키는 항암보조제에 대한 모색이 있어 기생충약인 levamisol, 엽산유도체인 leukovorin이 개발되어 국내외에서 상당한 효과를 보이고 있음. 특히 leukovorin은 항암 증진 효과 외에 정상세포 보호 작용이 있어 대장암, 골수암 등에는 항암제와 함께 표준 치료약이 되었음. 그러나, 암환자의 숫자가 증가되고 있고 암의 종류가 다양한 만큼, 여러 천연물로부터 항암제 및 항암보조제를 개발하는 연구의 필요성이 절실함.

### 3. 국내·외 관련기술

- 가. 국내에서 이루어진 마름의 생리활성에 관한 연구는 거의 전무한 실정임. 오히려, 최근 저수지나 호수에 마름의 급속한 번식으로 인한 마름의 방제에 관한 논문이 보고되어 있음(Choi, et al., 1997).
- 나. 국내특허로는 마름의 진분 제조방법(한은중, 특허출원 2002-0084984) 정도가 있을 뿐이고 마름의 생리활성에 관한 특허는 전무한 상태임. 다만, 마름의 강한 항산화효과를 화장품에 응용하려는 시도가 있었을 뿐임(Kim, et al., 1997).
- 다. 국외의 경우 주로 일본과 중국, 방글라데시 등 일부 아시아권 국가에서 마름의 생리활성에 관해 연구된 논문이 보고되었지만 그 내용이 in vitro 항산화 활성 및 세포독성에 대한 기초적인 자료만을 제시할 뿐 기능성 제품으로 개발하려는 구체적이며 체계적인 접근은 미비한 실정임(Rahman, et al., 2000; Kosuge et al., 1986).
- 라. 따라서 마름의 항암, 항당뇨 효능에 관한 과학적인 연구를 수행하고 기능성 소재를 개발하면 비교우위를 점할 수 있음.

## 제 2 절 문제점

1. 기존의 당뇨 및 암 치료제는 가격이 비싸 지속적으로 복용하기 어려움.
2. 혈당강하제는 부작용이 있으며, 복용 기간이 지속됨에 따라 약물의 효능이 감소될 수 있음. 따라서 부작용 없는 천연물 유래 혈당조절 소재의 발굴이 절실함.
3. 대부분의 당뇨환자들은 망막 손상, 순환계 장애, 신경 장애, 신장병 등 당뇨 합병증으로 고통받으며 생명의 위협을 받고 있음. 고혈당과 산화적 스트레스, 그리고 aldose reductase가 관여하는 polyol pathway 생성물 축적이 당뇨 합병증의 주요인으로 보고되고 있으나, 대부분의 당뇨치료제는 합병증 예방 치료제 보다 주로 혈당강하제에 집중되어 있음.
4. 일부 당뇨 및 암환자들은 자생식물, 곤충류 등을 사용한 민간요법을 실시하고 있으나 과학적인 근거가 부족함. 따라서 민간요법으로 이용될 수 있는 천연물로부터

- 효능이 우수한 소재의 개발과 함께 과학적인 기전의 규명이 절실히 필요함.
5. 대부분의 항암제는 치명적인 부작용을 갖고 있음. 따라서 효과는 그대로 유지하면서 부작용을 줄일 수 있는 방안이 절실히 필요함. 이것이 국내 대부분의 암환자가 1종 이상의 약초 등 대체 약품 혹은 기능성 식품을 섭취하는 이유임.

### 제 3 절 문제점의 해결방안

현재의 당뇨치료제 및 암치료제가 가지고 있는 문제점을 해결할 수 있는 방법으로 마름으로부터 항당뇨 및 항암 소재의 개발이 가장 적합

#### 1. 부작용이 없는 천연소재의 개발

- 가. 예비연구 결과, 마름은 탄수화물 소화효소 저해활성이 우수하여 혈당조절 효과가 있을 것으로 기대됨. 당뇨환자의 치료에 있어서 혈당조절은 가장 중요한 목표임.
- 나. 마름은 항산화 활성이 우수하여 당뇨 합병증 개선효과가 기대됨.
- 다. 예비연구 결과, 마름은 암세포에 대해 강한 세포사멸효과를 나타내어 항암효과가 기대됨.

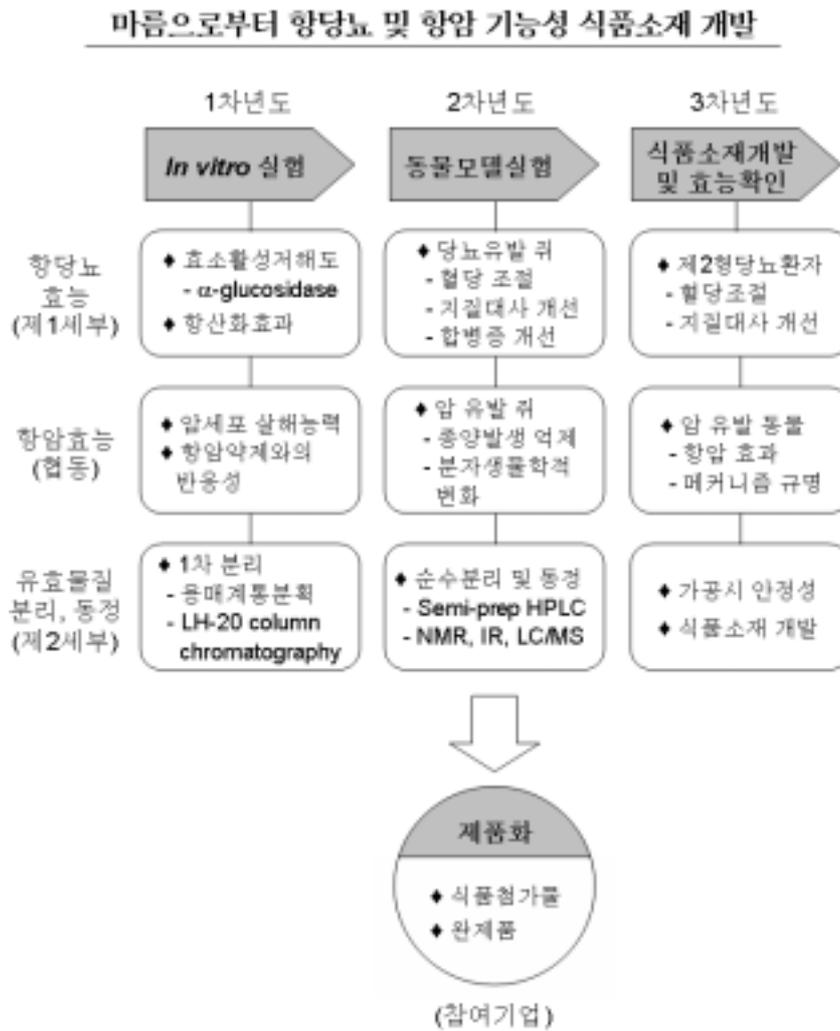
#### 2. 원료의 가격이 저렴하고 지속적으로 공급이 가능함

- 가. 마름은 우리나라 전역에 분포하고 있고 재배조건이 까다롭지 않아 저렴한 원료를 지속적으로 공급할 수 있음.
- 나. 마름의 항당뇨, 항암 활성성분을 분리, 동정하고, 그 작용 메커니즘을 규명하면 국제 시장에서 경쟁력 있는 제품의 생산에 활용할 수 있음. 협력업체인 기화제약(주)는 약초 및 자생식물에서의 기능성 식품 및 약제 개발의 경험이 풍부하여 산업화가 조기에 가능할 것임.

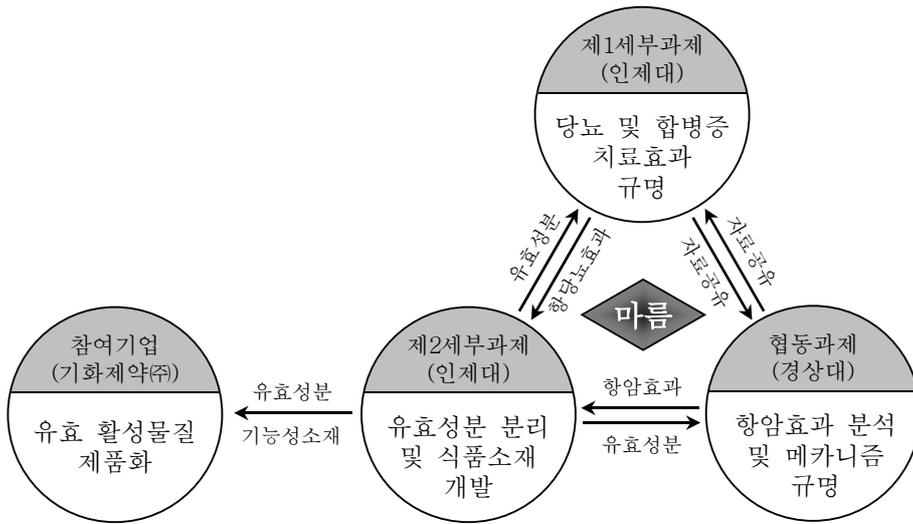
### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 연구개발 추진체계

□ 총괄



□ 과제간의 유기성



1. 1차년도

가. 1세부과제

마름 및 용매획분의 in vitro 항산화효과 및 aldose reductase 저해활성을 조사하고, 마름 추출물의 혈당강하효과를 당뇨 동물모델을 대상으로 한 단기실험을 통하여 조사한다.

나. 제2세부과제

마름 및 용매획분의 in vitro 탄수화물 분해효소 저해활성을 조사한다. 마름으로부터 유효 생리활성물질을 1차 분리하여 제1세부과제 및 협동과제에 제공, 항당뇨 및 항암활성을 측정한다.

다. 협동과제

암세포주에서 암 세포 살해능력을 조사하여 항암효능을 스크리닝하고, 기존 항암 약제와의 반응성을 검색한다.

## 2. 2차년도

### 가. 1세부과제

2세부과제에서 분리한 유효성분 분획의 당뇨 증세 치료 및 합병증 개선효과를 당뇨 동물모델을 대상으로 한 장기 실험을 통하여 조사하고 그 메카니즘을 규명한다.

### 나. 2세부과제

마름의 1차 분획으로부터 항당뇨, 항암 유효 성분을 분리, 동정한다. 분리된 유효성분을 제1세부과제 및 협동과제에 제공, 항당뇨 및 항암활성을 측정한다.

### 다. 협동과제

발암 동물 모델을 수립하고 1차년도에 스크리닝하여 2세부과제를 통하여 분리한 분획의 *in vivo* 항암 효능을 탐색하고 조직학적, 분자생물학적 연구를 통하여 분석한다.

## 3. 3차년도

### 가. 1세부과제

제2세부과제에서 개발한 항당뇨 소재의 당뇨병 개선 효능을 제2형 당뇨환자를 대상으로 한 임상시험을 통하여 확인한다.

### 나. 2세부과제

마름으로부터 분리한 항당뇨, 항암 유효 성분의 고온 및 pH에 대한 안정성을 확인하여 기능성 식품소재(완제품 및 식품원료)로 개발하며, 제1세부과제 및 협동과제와 연계하여 제품의 항당뇨 및 항암 효과를 확인한다. 참여기업과 연계하여 기능성 식품 및 식품소재를 개발한다.

### 다. 협동과제

암 세포주 및 발암동물 모델에서 제2세부과제에서 개발된 기능성 소재의 항암 효능을 검증하고 분자생물학적 연구를 통하여 메카니즘을 규명한다.

## 제 2 절 연구개발 수행내용

### 1. 마름의 영양성분 분석

마름의 일반성분 분석은 AOAC법에 의하여 분석하였고, 아미노산 및 지방산 조성을 분석하였다.

### 2. 마름의 항당뇨 효과 규명

#### 가. In vitro에서 혈당조절 및 당뇨합병증 예방효과 조사

##### 1) 탄수화물 소화효소 저해활성 측정

마름을 동결건조한 후 100% 메탄올 및, 80% 에탄올로 추출하여 감압 농축하였다. 시료의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 Watanabe 등의 방법에 따라 측정하였다. 50 $\mu$ l yeast  $\alpha$ -glucosidase에 시료추출물 10 $\mu$ l를 가하고 OD<sub>405</sub>를 측정하였다. 5분 후에 기질(para-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucoopyranoside)을 50 $\mu$ l 첨가하고 실온에서 5분간 반응시키고 OD<sub>405</sub>를 측정하여 흡광도 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다.

##### 2) In vitro에서 유리라디칼 소거능 조사

마름의 물, 메탄올, 70% 에탄올, acetone, isopropyl alcohol 추출물의 in vitro 항산화능을 DPPH법을 이용하여 수소공여능으로 측정하였다(Blois, 1958). 마름의 부위별(전체, 껍질, 과육) 메탄올 추출물을 제조하고, 희석배수를 달리한 용액의 항산화능을 DPPH법을 이용하여 측정하였다. 시료 30 $\mu$ l에  $2 \times 10^{-4}$ M DPPH (1,1-diphenyl-picrylhydrazyl)를 가하고, 10분후에 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 흡광도를 대조구의 흡광도와 비교하여 라디칼소거율(%)로 표시하였다. 표준품으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

##### 3) In vitro에서 aldose reductase 저해활성 측정

당뇨병 합병증 예방, 치료효과를 조사하기 위해 시료의 aldose reductase 저해활성을 Hayman & Kinoshita법(1965)으로 측정하였다. 체중 250-300g의 SD 계 rat을 heart puncture로 희생시킨 후, lens를 채취하였다. Lens에 0.1M phosphate buffer saline(pH7.4)을 10배 첨가하여 homogenate하여 5,000g $\times$ 10min centrifuge한 후 상등액을 취하였다. D,L-glyceraldehyde를 기질

로 사용하고, beta-NADPH를 가하여 30°C에서 3분간 반응시키면서, 30초 간격으로 340nm에서 흡광도를 측정하였으며, 단백질 양은 Lowry법으로 측정하고 IC<sub>50</sub>를 구하였다.

## 나. 동물모델계에서 혈당저하 효과 규명

### 1) STZ-유발 당뇨쥐에 있어서 식후 혈당 저하효과 규명

체중 250-300g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에게 0.1M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 streptozotocin(Sigma Co., USA)을 복강에 주사함으로써 (65mg/kg BW) 당뇨를 유발하였다. 1주일 뒤 공복시에 혈액을 꼬리정맥에서 채취하여 간이혈당계로(Glucotrend, Roche, Germany) 혈당을 측정하여 200~400mg/dL에 해당되는 동물을 선별하여 두 군으로 나누었다(n=12). 동물을 16시간 절식시킨 후 대조군에게는 전분용액(1g/kg)을 마름군에게는 전분용액(1g/kg) 및 마름 메탄올 추출물용액(0.5g/kg)을 각각 gastric intubation하였다. 경구투여 후 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240분에 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 간이혈당계로 3회 측정하여 혈당변화를 관찰하였다. 식후혈당곡선의 면적(Area under the curve, AUC)를 계산하였다. 모든 수치는 평균±표준편차로 나타내었다. 두 군사이의 유의성은 Student's t-test로 분석하였다( $\alpha=0.05$ ).

### 2) 제2형 당뇨동물에 있어서 마름의 항당뇨 효과 규명

#### 가) 실험동물 및 식이조성

생후 4주된 제2형 당뇨모델 수컷 db/db mouse(n=12)를 두 군으로 나누어, AIN-93G basal 식이 및 동결건조 마름을 10% 함유한 식이를 6주간 섭취시켰다. 식이별 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유의 함량을 동일하게 하였고, 복합당과 단순당의 섭취 비율도 유사하도록 하였다(Table 1). 동물에게 식이는 *ad libitum*으로 공급하였고, 사육실의 온도 및 습도는 20~25°C, 50~60%로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다.

Table 1. Composition of basal and *Trapa japonica* Flerov. diets

Ingredient	Basal diet (%)	<i>Trapa japonica</i> Flerov. diet (%)
Corn starch	39.75	33.09
Dextrinized cornstarch	13.20	13.20
Casein	20.00	18.88
Sucrose	10.00	10.00
Alpha-cellulose	5.00	2.81
Mineral mixture	3.50	3.50
Vitamin mixture	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25
Tert-butyl hydroquinone	0.0014	0.0014
Soybean oil	7.00	6.97
<i>Trapa japonica</i> Flerov.*	-	10.00

\*Freeze-dried

#### 나) 혈액 및 혈장분석

실험 동물의 체중 및 식이 섭취량은 주 2회 측정하였다. 해당 식이 섭취 6주째, 14시간 절식시킨 동물을 희생시켰다. 혈액 당화헤모글로빈은 크로마토그래피법에 의해 측정하였고, 혈장 포도당, 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, BUN 및 creatinine 농도는 효소법으로 측정하였다. 인슐린 농도는 radioimmunoassay법으로 측정하였다.

#### 다) 당뇨병증 개선효과 조사

##### (1) 간조직의 지질과산화물 농도 및 carbonyl 농도 측정

간 조직의 지질과산화물의 측정은 Ohkawa 등(1979)의 방법을 이용하여, thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하였고 표준용액으로는 1,1,3,3,-tetramethoxypropane(TMP)을 사용하였다. 간 조직의 단백질 carbonyl 농도는 DNPH(2,4-di-nitrophenyl hydrazine)를 이용한 Oliver 등(1987)의 방법을 이용하여 측정하였다.

## (2) 간조직의 Glutathione 농도 측정

간 조직의 glutathione 농도는 Richardson과 Murphy 등(1975)의 방법을 이용하여 측정하였다. 시료와 4% sulfosalicylic acid를 반응시킨 후 2,500rpm에서 10분동안 원심분리시킨 후 상등액을 취하고 disulfide reagent를 가하여 412nm에서 흡광도를 측정하였다.

## (3) 간조직의 항산화효소계 활성 측정

간 조직에서의 superoxide dismutase(SOD) 활성은 Marklund 등(1974)의 방법을 이용하여 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색으로 측정하였다. Catalase 활성은 Aebi법(1984)으로 측정하였으며, 효소 활성은 1분 동안 1 $\mu$ mole의 기질을 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였다. Glutathione peroxidase(GSH-px) 활성은 Lawrence와 Burk(1976)의 방법에 의해 측정하였고, 1unit는 1분간 1 $\mu$ mole의 NADPH를 산화시키는 효소의 양으로 정의하였다.

## (4) 신장조직의 aldose reductase 활성 및 lens의 sorbitol 농도 측정

신장조직의 aldose reductase 활성을 Hayman & Kinoshita법(1965)으로 측정하였고, lens의 sorbitol 농도는 sorbitol dehydrogenase를 이용하여 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다.

## 라) 동물의 간 및 신장조직의 유전자 발현수준 조사

마름의 장기간 섭취가 항산화 효소, aldose reductase, insulin receptor, glucose transporter(GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 조사하였다. 동물의 간, 신장조직의 total RNA를 TRI reagent를 사용하여 분리하였다. 분리된 total RNA를 1.2% formaldehyde-agarose gel에 fractionation한 후 Hybond N+ nylon membrane에 transfer하였다. Target gene의 <sup>32</sup>P-labeled cDNA를 probe로 사용하여 northern blot hybridization을 실시하였다.

## 마) 통계처리

모든 측정치는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, 두 군간의 유의적인 차이 검증은 t-test를 사용하였다(p<0.05).

## 다. 당뇨병환자에 있어서 마름의 항당뇨 효과 조사

### 1) 당뇨병환자에 있어서 마름이 식후 혈당 조절에 미치는 영향 조사

#### 가) 환자 선별

마름 주정추출물의 식후 혈당 조절효과를 측정하기 위하여 제2형 당뇨병환자를 모집하였다. 평균나이는  $59.4 \pm 1.3$ 세, 유병기간  $7.6 \pm 1.3$ 년, BMI  $24.1 \pm 0.6$  kg/m<sup>2</sup>, 공복혈당  $142.6 \pm 16.8$  mg/dL 및 당화헤모글로빈 농도는  $7.5 \pm 0.8\%$ 인 당뇨병환자 13명(남7, 여6)을 선별하였다.

#### 나) 식후 혈당 개선효과

마름의 단기 복용이 식후 혈당에 미치는 영향을 조사하기 위하여 12시간 절식한 환자의 공복시 정맥 혈액을 채취한 후, 가용성 탄수화물 50g을 함유하는 쌀밥만 섭취시키거나, 쌀밥과 함께 3g의 마름추출물을 섭취시켰다. 식후 240분까지 30-60분 간격으로 정맥혈액을 채취하고, 정맥혈액을 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 포도당은 효소법으로 측정하였고, 인슐린은 radioimmunoassay법으로 측정하였다, 각 시점별 측정치는 공복시 수치와 비교하여 증가치를 계산하고 혈당 증가곡선 및 인슐린 증가곡선의 면적(AUC)을 계산하였다. 각 시점별 증가치와 AUC의 유의성 검정은 paired t-test로 실시하였다( $p < 0.05$ ).

#### 다) 통계처리

모든 측정치는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, 두 군간의 유의적인 차이 검증은 t-test를 사용하였다( $p < 0.05$ ).

### 2) 제2형 당뇨병환자에 있어서 마름의 장기간 섭취효과

#### 가) 환자 선별

20인의 제2형 당뇨병환자를 대상으로 마름의 당뇨병개선 효과를 규명하였다. 당뇨병환자는 경구혈당강하제를 복용하고 있는 환자 중 다음의 조건을 만족하는 자로 하였다.

- 나이 : 35-75세
- 체질량지수 :  $19-32$ kg/m<sup>2</sup>
- 공복 혈당 :  $126-270$ mg/dL
- 당화헤모글로빈 :  $>6.5\%$

나) 마름함유 선식제품의 개발

마름함유 선식은 보리, 현미, 메밀, 마름을 혼합하여 제조하였다(Fig. 2). 보리, 현미, 메밀을 각각 1회 세척하여, 1.5배 분량의 물에 수침하였다(보리 40분, 현미 50분, 메밀 40분간). 곡류를 각각 steaming한 후(3 kg/m<sup>2</sup>, 30분간). 건조시키고 110°C에서 4분간 볶은 후, 분쇄하였다(90 mesh). 보리, 현미, 메밀을 4:3:3의 비율로 혼합하였다. 마름은 1회 세척한 후 동결건조하고 분쇄하였다(90 mesh). 마름의 농도가 5%, 10%, 15% 되게 혼합곡류와 마름을 혼합하여 선식제품을 개발하였다. 개발된 제품의 관능검사는 선식제품과 증류수를 1:3의 비율로 혼합하여 미리 훈련된 15인의 panel이 색(color), 향(flavor), 조직감(texture), 맛(taste), 종합적기호도(overall quality)를 5점법으로 조사하여, 나쁘다(1점) - 가장 좋다(5점)으로 평가하였다. 유의성 검정은 분산분석(ANOVA) 및 Turkey's test로 실시하였다(p<0.05). 관능 검사결과 10% 마름 함유 선식제품이 가장 우수하게 나타나 70g 단위로 포장하여, 당뇨병 개선효과 규명 시험에 사용하였다.

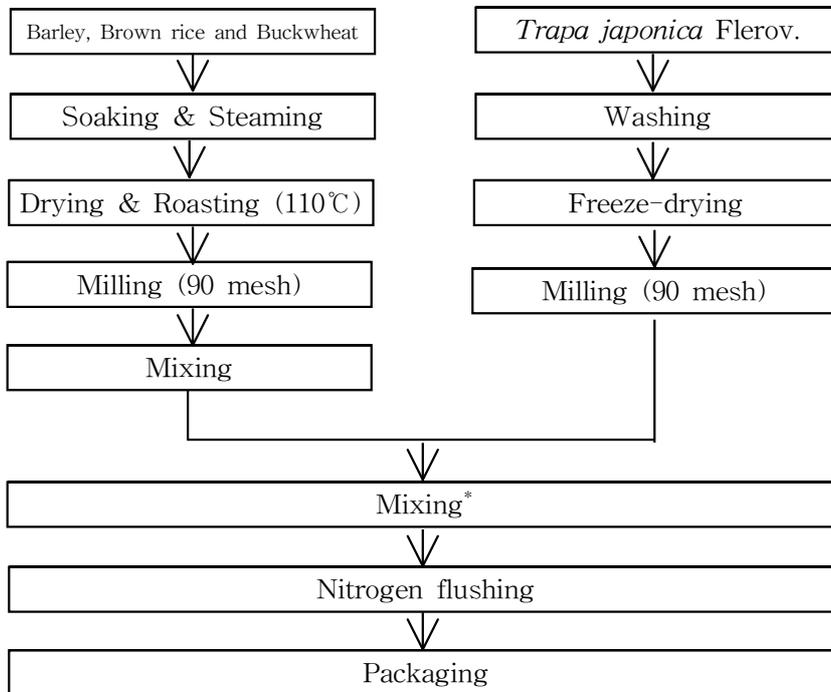


Fig. 2. Manufacturing process of meal replacement containing barley, brown rice, buckwheat and *Trapa japonica* Flerov. powder.

\* *Trapa japonica* Flerov. powder is added at the concentration of 5%, 10% and 15%.

**다) 마름제품의 당뇨병 개선효과 조사**

실험에 참가한 당뇨병 환자는 모두 설펜유레아계 경구혈당강하제를 복용하고 있었다. 실험대상자를 random하게 2군으로 나눈 후, 3개월간 실험군에게는 마름을 10% 함유한 곡류선식(70 g/day)을 아침식사 대용식으로 제공하고, 대조군에게는 동일한 양의 영양소와 에너지를 제공하는 표준 아침 식사 식단(standard meal)을 제공하였다. 마름 함유 혼합곡류식이의 일반성분 및 식이섬유질 함량은 Table 2에 나타내었다.

실험군은 선식 70g을 우유 200mL와 함께 아침식사로 12주간 복용하였다. 선식 70g에 함유된 영양소와 에너지 함량을 Table 2에 나타내었다. 대조군에게 제공한 표준아침식사 식단은 곡류군 2교환 (밥 140g), 저지방 어육류군 0.5교환 (닭고기, 쇠고기, 돼지고기 등 육류 20g 또는 가자미, 광어, 대구, 동태, 병어, 복어, 조기, 참도미, 참치 등 생선 25g), 채소군 1교환 (배추 김치 30g 및 시금치 등 채소 35g), 우유 200mL이었다. 실험기간 동안 환자는 본인이 복용해 온 설펜유레아계 경구혈당강하제를 지속적으로 복용하였고, 일상적인 식생활과 life style을 유지하였으며, 실험기간 동안 복부팽만감, 구토, 저혈당 등의 불편한 사항을 보고하도록 하였다.

마름제품 복용 전과 3개월간의 실험기간 후에 신체계측을 실시하고, 혈압을 측정하였다. 실험기간 전, 후에 공복상태의 정맥혈액을 채취하여, 당화헤모글로빈, 혈당 및 혈장 프락토사민(fructosamine), 인슐린, 총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도를 측정하였다. 혈장 지질 과산화물 함량과 적혈구의 항산화효소계 활성을 측정하였다. 포도당 부하검사는 공복시에 75 g의 포도당을 섭취시킨 후, 포도당 부하 2시간 후에 채혈하여 혈당 및 인슐린 농도를 측정하였다.

**Table 2. Nutrient and energy content of grain product containing *Trapa japonica* Flerov**

Nutrient	Carbohydrates	Protein	Fat	Energy
Amount	51.8 g	7.1 g	1.2 g	246 kcal

\*Amount contained in 70g of the product

**(1) 신체계측**

실험기간 전, 후에 신장 및 체중을 측정하여 체질량지수(body mass index, BMI)를 구하였고, 허리둘레, 혈압을 측정하여 변화 정도를 조사하였다. 체지방은 체지방계(TBF-105, Tanica, Japan)를 사용하여 측정하

였다.

### (2) 혈당조절 효과

채혈 전날 밤 10시 이후에는 금식시킨 후, 다음날 아침 공복 상태에서 정맥 혈액을 채취하였다. 당화헤모글로빈을 크로마토그래피법으로 측정하였다. 채혈한 샘플은 3,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 혈장을 수집하였다. 혈당을 효소법으로 측정하고, 혈장 인슐린 농도를 radioimmunoassay법으로, fructosamine 농도를 효소법으로 측정하였다. 제2형 당뇨병 환자의 당뇨병 유발 원인인 인슐린 저항성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 HOMA-IR(공복혈당 X 공복 인슐린 / 405) 을 계산하였다. 간기능을 측정하기 위하여 GOT(glutamate oxaloacetate transaminase), GPT(glutamate pyruvate transaminase)를, 신장기능을 측정하기 위하여 BUN(blood urea nitrogen), creatinine을 효소법으로 측정하였다.

### (3) Glucose tolerance

공복상태의 환자의 정맥 혈액을 채취한 후, 75g의 포도당을 섭취시키고, 120분에 정맥혈을 채취하였다. 공복 시 및 포도당 부하 120분 후의 혈당을 효소법으로, 혈장 인슐린을 radioimmunoassay로 측정하였다. 혈당 및 인슐린 농도의 증가치를 계산하였다.

### (4) 지질대사 개선효과

혈장 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도 및 유리지방산(free fatty acids, FFA) 농도를 효소법으로 측정하였다. 동맥경화지수(Triglycerides/HDL-콜레스테롤)를 구하였다.

### (5) 지질과산화물 및 항산화 효소계 활성화

혈장의 지질과산화물 함량은 Ohkawa 등의 방법을(1979) 이용하여 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하였고, 표준용액으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)을 사용하였다. 적혈구에서의 산화정도는 Choi 등의 방법을(1994) 이용하여 conjugated diene 생성량으로서 산화정도를 측정하였으며, 초기에 비례적으로 생성량이 증가할 때의 양을 단위시간당 흡광도 변화율로써 계산하였다. SOD 활성은 pyrogallol의 자동산화를 억제하는 SOD의 antioxidant capacity를 측정하였다. Catalase 활성은 적혈구를 hydrogen

peroxide로 처리한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 측정하여 구하였다. Glutathione peroxidase 활성은 t-butylhydroperoxide에 의해 glutathione을 산화시킨 후, 산화된 glutathione이 glutathione reductase와 NADPH의 존재하에 다시 glutathione으로 환원될 때 감소된 NADPH 농도를 측정하여 구하였다.

#### 다) 통계처리

대조군과 마름군별로 실험 전 및 3개월의 실험기간 종료 후의 측정치의 차이(difference)를 구하고, difference간의 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하여 실시하였다( $p < 0.05$ ).

### 3. 마름의 항암효과 규명

#### 가. 암 세포주에서의 항암효능 스크리닝

##### 1) 암 세포주 배양

국내 호발 암종에 대한 평가를 위하여 각 세포주들(MCF-7, MDA-MB-231)을 계대 배양하여 마름 추출물을 처리하였다.

##### 2) 암 세포 살해능력 검증

###### 가) MTT assay를 통한 IC<sub>50</sub>농도 결정

배양된 암세포를 분주한 후 추출된 시료를 DMSO에 용해시켜 배지에 처리 후에 거두어 PBS에 용해된 MTT(tetrazolium salt)시약과 반응시키고 각 well에 DMSO를 가하여 녹인 후 4시간 경과하여 MTT가 환원되도록 한 후 상등액의 흡광도를 540nm에서 측정하여, 그 값이 대조군에 비하여 50%, 25% 감소된 조건을 효과 판정 기준으로 삼아 실험하였다.

###### 나) 세포독성의 형태학적 관찰

세포의 수가 감소하면서 각 세포들의 형태가 응축하고 세포막 표면이 매끄럽지 못하고 패인 부분이 생기면서 부착력을 잃고 떠오르면 세포 사멸 단계로 진입하고 있다고 판단하였다.

##### 다) Flow cytometry

마름 시료를 처리하고 조건에 맞게 배양된 암세포를 10<sup>6</sup>개가 되도록 수집하

여 에탄올로 고정된 후 cycle TEST PLUS DNA reagent kit(Becton Dickinson)을 이용하여 세포를 propidium iodide(PI)로 염색한 후 FACS Vantage를 이용하여 분석하였다.

#### **나. 기존 항암 약제와의 synergy효과 분석**

마름 추출물의 기존 항암 약제와의 상승효과를 조사하기 위하여 MTT법을 이용하여 마름 추출물과 기존 항암약제와의 시너지 효과를 검증하였다. 사용된 기존 항암 약제들로는 Taxol, cisplatin, adriamycin이었으며 마름 추출물은 물추출물, 70% 에탄올추출물 분획을 이들 약제와 함께 24시간 배양하여 MTT법으로 세포 독성을 검증 하였다. 아울러 항암 치료 실패의 가장 많은 원인이 투여된 항암 약제에 내성을 보이는 경우이므로 항암 약제 내성 세포주에 대하여도 항암효능을 parent세포와 동일하게 스크리닝하고 결과들을 서로 비교하여 항암 효능을 판정 하였다.

#### **다. 프로티움 연구를 통한 효능 관련 목적 단백질 동정**

분리된 활성성분이 처리된 암 세포에서 효능발현과 연관되어 발현이 변화하는 단백질의 분리 동정을 하였다.

##### **1) 프로티움 분석의 시료 전처리**

세포를 거두어 lysis buffer를 가하여 완전 용해한 후 trichloroacetic acid(TCA)로 침전시켜 원심 분리하였다. Ethyl ether로 TCA를 제거한 다음 질소가스로 ethyl ether를 제거하고, 침전물을 lysis buffer에 녹여 사용하였다.

##### **2) Isoelectric focusing(IEF)**

각 peptide전하 차에 의한 일차 분리를 위하여 Strip holder에 IPG strip을 넣고, 준비된 시료와 rehydration buffer를 가하여 밤새 rehydration 시켰다. 이를 IPG Phor(Pharmacia)에 걸고 500V에서 1시간, 800V에서 1시간, 8,000V에서 4시간 이상 전기를 걸어주어 총 40,000Vhr가 되도록 하였다. 이렇게 하여 Isoelectric focusing이 끝난 strip으로 각 peptide질량 차에 의한 이차 분리를 위하여 second dimensional electrophoresis를 수행하였다.

##### **3) Second dimensional electrophoresis & Visualization**

IEF로 분리한 strip을 7%-18%의 SDS-PAGE gradient gel을 사용하여 전기영동 한 후, 은 염색이나 Coomassie blue 염색으로 단백질을 발색 후 이미지 분석 소프트웨어(PDQuest)를 이용하여 발현 패턴을 분석하고, 동정을 위한 후

보 스폿을 결정한 후 MALDI-TOF mass spectrometry (MS)를 수행하였다.

#### 4) 단백질 가수 분해와 peptide mapping fingerprinting

겔상에서 오려내어 분리한 단백질을 trypsin으로 처리하여 peptide를 얻어내고 이를 MALDI-TOF MS에서 peptide mapping fingerprinting을 수행하여 각 peptide의 질량 값들을 구하고 이 자료를 바탕으로 MS-Fit등의 protein database에 접속하여 단백질의 성상을 규명하였다.

#### 라. 마름 추출물 세부 분획의 항암 활성 검증

항암 효능이 확인된 마름 추출물들로부터 제조한 극성별 용매획분인 buthane(Bu), hexane, ethanol, chlorform 및 aqueous획분의 항암 효능을 탐색하기 위하여 암 세포주 MCF-7 및 복수암 세포주 S-180에 각 획분을 처리하여 MTT 법으로 암 세포 활성을 조사하였다. 각 용매분획은 DMSO에 용해하여 실험에 사용하였다. 분리된 활성 분획의 세포사멸효과를 측정하여 제2세부과제에 자료로 제공 하였다.

#### 마. 동물 모델에서의 in vivo효능 분석

##### 1) 마우스에서의 암 발생 유도

In vitro 실험에서 강력한 항암 효과가 나타난 분획인 hexane분획을 in vivo 효능 규명 실험에 사용하였다. 암 세포주인 S-180세포를 6-7주령 ICR female mouse(B.W. 25.2g)의 복강 내에 주입하여 복수암을 발생시켜 암 모델로 하였다. 복수암 발암의 성공유무는 악성 복수의 생성 유무로 판단하였다. 유방암 세포주 MCF-7, 위암 세포주 SNU-1 등도 시도 하였으나 유의한 암 발생 효과를 보이지 않아서 본 연구조건에서는 제외 하였다. S-180세포는 약 1/3은 adherent cell로 나머지 2/3는 floating cell로 구성 되어있는데 양 분획 간에 발암 능력에 차이가 있을 수 있으므로 adherent cell을 기계적으로 분리하여 floating cell과 균등하게 섞이도록 교반하여 마리당  $10^6$  개의 S-180암 세포를 복강 내에 주사하고 사육하였다. 복강 내에 투입된 암세포들은 복강 내에 monolayer로 정착하여 만들므로 암 세포 성장 조건이 in vitro에서의 flask내 배양과 유사할 것으로 추정하여 마름 추출물의 투여 농도는 in vitro 농도를 참조하여, 동물에게 hexane 추출분획을 2.5  $\mu$ L씩 각기 200  $\mu$ L 생리식염수에 녹여 복강 내에 주사하고 사육하였고 항암효과는 동물의 생존기간과 복수량 감소를 측정하여 조사하였다.

## 2) 항암 효능 확인 및 효능 규명을 위한 조직학적, 분자생물학적 연구

### 1) Western blotting

처리된 시료를 0.5% NP-40이 포함된 lysis buffer로 완전 용해 후 단백질 정량 후 동일한 양을 10% SDS-PAGE gel에 load하여 분리하고 nitrocellulose 막에 옮긴 후 목적 단백질의 항체를 각기 1시간 incubation한 후 2차 항체를 각기 1시간 가한 후 ECL kit를 이용하여 발색하였다.

### 2) Ubiquitination assay

Ubiquitination 유무 및 정도를 알기위하여 목적 단백질을 nitrocellulose막에 옮기고 옮겨진 nitrocellulose 막을 끓는 물에 5분간 담가서 막위의 단백질들의 변성을 유도하고 항 ubiquitin항체를 1시간 incubation하고 2차항체 및 ECL을 가하여 발색하여 관찰하였다.

## 바. 발암 동물모델 개발 및 효능분석

### 1) 동물모델 수립

癌化 동물 모델(animal tumor model)을 통하여 마름 추출물의 항암 효능 검증 실험을 시행하였다. 마우스에서 복강 내에 복수를 생성하는 복수암 모델을 수립하기 위하여 육종암 세포주인 S-180을 RPMI-1640배지에서 계대 배양한 후 마우스의 복강 내에 일차 접종하여 약 1주정도 사육하여 복수가 생성되기 시작하면 복수액을 다시 추출하여 계대 배양하였다. 이렇게 활성화된 암 세포를 마우스의 복강 내에 무균 처리한 주사로 접종하여 2주정도 사육하여 악성 복수를 생성하였다. In vitro 실험에서 규명한 IC<sub>50</sub> 값에 근거하여 마름 추출물을 무균 처리 하여 복강 내 주사하고 사육하면서 마우스의 몸무게 및 생존기간을 관찰하여 항암 효능의 판단 자료로 삼았다. 성공적인 암화의 결정은 육안 관찰에 의한 복수의 생성 및 복강 내 암 세포의 증식 등으로 판단하였다. 복강 내 암 세포는 복수 내 암 세포가 희석되어 농도가 낮으므로 복수 채취 후 spin하여 시험관 최하부에 모인 세포 성분을 조직병리학적으로 현미경 관찰하여 존재 유무를 결정 하였다.

### 2) 항암 기능 분석

마름 추출물은 DMSO에 녹여서 만들었으며 10 $\mu$ l-, 20 $\mu$ l-/1 ML saline의 농도로 실험에 사용하였다. 대조군은 saline투여군, 10 $\mu$ l-, 20 $\mu$ l-DMSO/1 ML saline으로 복강 내 접종을 하였으며 마름 처리군은 각 9마리, 대조군은 각 2마리씩 사용하였다.

항암효능 판정은 1) 복수 생성억제 2) 생존기간으로 판단하였는데 복수 생성억제는 육안관찰, 복부 지름 및 몸무게의 변화로 판단하였고 생존기간은 시료 접

중 일부부터 폐사하는 날까지로 하였다. 효과 판정 기준은 마름 처리군 에서 대조군에 비하여 1) 복수 생성이 최소 25%이상 감소된 경우나 2) 생존 기간이 최소 25%이상 늘어난 경우 유의한 효능이 있는 것으로 간주하였다.

#### 사. 분자생물학적 연구를 통한 작용 메커니즘 규명

##### 1) 항산화 역할 연구: theoredoxin계 역할 규명

###### 가) 항산화 기능 분석

암 세포에 마름을 처리하고 활성 산소 제거 능력을 peroxidase활성에 의한 NADPH의 산화도로 보고 기질의 산화 및 환원에 따른 spectromtry의 흡광도를 340nm 파장에서 측정하여 분석조사 하였다.

###### 나) Stable transfectant를 이용한 theoredoxin 산화효소계의 역할 규명

자궁암 세포주(HeLa)에 본 효소계 중의 하나인 peroxiredoxin II효소의 유전자를 인위적으로 이입(transfection)시키고 이를 과발현(overexpression)시켜 마름의 항암 효과 발생에 본 효소가 어떤 역할을 하는지 조사 하였다.

HeLa세포(HeLa)를 RPMI-1640배지에서 배양하면서 pCDNA III vector내에 peroxiredoxin II 유전자를 삽입 후 Lipofectamine에 용화시켜 transfection한 후 G418존재 하에 계대 배양하여 stable transfectant를 수립하였다(HeLa-prx라 칭함). 이렇게 수립된 stable transfectant에 parent cell을 control cell로 하여 마름 추출물을 처리하여 실험하였다.

###### 다) Western blot을 이용한 관련 단백질들의 발현 및 조절 기작 규명

마름 효능 관련에 관련될 것으로 추정되는 단백질들의 발현변화를 western blot을 통하여 조사하였다.

마름 추출물에 의한 항암 효과 발생 시 암 세포에서 손상 단백질이 많아지면서 세포 사멸에 이를 것으로 보이는데 chaperon 단백질들의 발현이 증가되어 단백질 손상을 줄이면 항암 효능 감소로 이어지게 된다. 또한 손상된 단백질이 많은 경우 ubiquitination이 많이 일어난다.

이런 사실들을 바탕으로 마름 추출물의 항암 효능에 단백질 분해시스템(proteolytic system)이 관여할 것으로 보고 이것을 증명하기 위하여 HeLa 및 HeLa-prx 세포들에 마름, 항암제 taxol 및 proteasome inhibitor인 MG-132 등을 처리 후 ubiquitin western blot을 시행하여 각 세포군에서 ubiquitination의 차이를 조사 하였다. 마름의 항암 작용 기작을 규명하기 위하여 flow cytometry 및 apoptosis의 최종 단계의 마커인 PARP의 발현양상을 western blot으로 조사하였다.

#### 아. 면역조직화학염색을 통한 목적 단백질의 in vivo 발현양상 및 역할 분석

암 세포에서 chaperon 단백질의 과다 발현은 항암 약제로부터의 공격으로부터 암세포를 지켜주는 역할을 할 수 있으므로 치료 실패의 원인이 될 수 있다. 이를 확인하기 위하여 인체의 암 조직에서의 발현 정도를 immunohistochemistry로 확인하였다.

### 4. 유효 생리활성 물질 분리·동정 및 특성

#### 가. 마름 추출물의 생리활성 분석

##### 1) 마름재료

본 연구의 재료로 사용한 마름은 두 가지로써 마름으로부터 생리활성성분의 분리에 사용한 마름은 (주)기화제약에서 제공받은 것으로 마름 열매를 열풍건조한 후 분말화한 것이며, 마름으로부터 생리활성성분의 추출조건 확립 및 안정성 분석, 시제품제작은 경상남도 창원군에서 수확한 마름 열매를 냉동건조한 후 분말화하여 사용하였다. 마름 분말은 냉동실에 보관하며 사용하였다.

##### 2) 마름열매의 80% ethanol 추출물 제조

일정량의 마름분말을 칭량한 후 비커에 넣고 시료의 10배(v/w)에 해당하는 80% ethanol을 첨가하여 12시간 동안 교반, 2회 추출한 후 여과지 (No.40, Whatman)로 여과하였다. 그 여과액을 합하여 진공회전농축기(Rotavapor, Buchi Labor technik AG, Switzerland)를 사용하여 50℃에서 감압농축시킨 후 건조하여 수율을 계산하였다.

##### 3) 계통분획

마름의 80% ethanol 추출물 일정량에 20배(v/w)의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 넣고 증류수와 동량의 *n*-hexane을 가하여 진탕한 후 방치시켜 분액여두로 분획하였다. *n*-Hexane 층을 분리한 후 남아있는 수용액층에 다시 동량의 *n*-hexane을 가하여 같은 방법으로 총 3회 분획하였다. 용매의 극성에 따라 chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol을 같은 방법으로 3회씩 각각 순차적으로 가하여 분획하였고, 남아있는 부분을 aqueous분획으로 하였다 (Fig. 3).

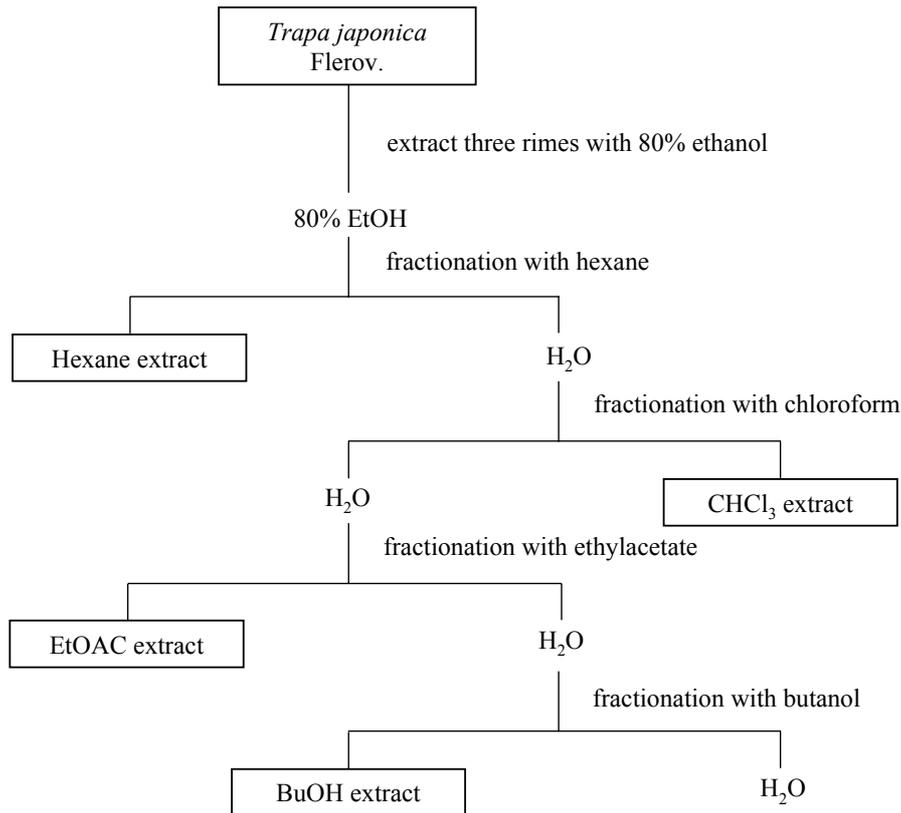


Fig. 3. Solvent fractionation of the fruits from *Trapa japonica* Flerov.

#### 4) 마름추출물의 생리활성 측정

##### 가) DPPH free radical 소거활성

Choi와 Kwak의 방법을 변형하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다. 먼저 96-well plate에 시료를 농도별로 5 $\mu$ L씩 넣고 에탄올로 용해시킨 0.1mM의 DPPH 용액을 245 $\mu$ L 첨가하여 최종 부피가 250 $\mu$ L가 되도록 하였다. 대조구는 시료 대신 DMSO를 같은 비율로 첨가하였다. 이를 실온에서 20분간 반응시킨 후 micro-plate reader (SynergeHT, Bio Tek, USA)를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 L-ascorbic acid를 사용하였고 항산화 활성은 대조구에 비하여 흡광도의 감소를 억제하는 정도로 측정하였다. 또한 대조군과 비교했을 때 50%저해되는 샘플의 농도를 IC<sub>50</sub>로 나타내었다.

#### 나) $\alpha$ -Glucosidase 저해활성

마름의 탄수화물 소화효소 저해활성을 측정하기 위해  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 Wang과 Kim등의 방법에 따라 측정하였다. 먼저 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 100 $\mu$ L에 25 $\mu$ L yeast  $\alpha$ -glucosidase(0.7U/mL)와 시료 10 $\mu$ L를 96-well plate에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 예열한 다음 5분 후 0.5%(w/v) pNPG 125 $\mu$ L를 넣고 micro-plate reader를 이용하여 400nm에서 5분간 반응시키면서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도 변화로부터  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 계산하였다. 표준물질로는 acarbose를 사용하였고 효소의 활성은 흡광도 증가 속도(기울기)로 계산하였다. 마름추출물이 포함되지 않은 대조구의 효소활성과 비교하여 효소활성 저해도를 계산하였다. 또한 대조군과 비교했을 때 효소의 활성이 50%저해되는 시료의 농도를 IC<sub>50</sub>로 나타내었다.

### 나. 마름 추출물의 유효 생리활성물질의 분리 및 동정

#### 1) 유효생리활성물질의 1차 분리

마름 추출물에서 탄수화물 소화 효소 저해, 항산화, 항암 등의 생리활성을 나타내는 1차 분획을 얻었다. 마름 추출물 중 생리활성효과가 가장 높게 나타난 시료를 선택하여 liquid chromatography(LC)을 이용하여 주분획을 얻었다. LC 방법에 사용되는 컬럼 및 장치는 다음과 같다.

#### 가) LH-20 column chromatography

항산화 활성 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 좋은 ethylacetate 추출물을 sephadex LH-20 (Amersham Bioscience, Sweden) resin을 이용하여 column chromatography를 실시하였다. 먼저 resin을 50% methanol 200mL에 2시간 동안 swelling시킨 후 glass column(30 $\times$ 2.5cm)에 채워 12시간 동안 안정화시켰다. 추출물은 50% methanol에 용해시켜 40%(w/v)의 농도로 column에 2mL loading하였다. 이동상으로는 50%, 75%, 100% methanol을 사용하여 단계적으로 methanol의 비율을 증가시키는 step-wise 용출법을 사용하였다. 분획은 9분 간격으로 Fraction collector(FC205, Gilson, France)를 이용하여 받았으며 받은 분획은 methanol로 10배 희석하여 280nm에서 흡광도를 측정한 후 analytical HPLC로 성분을 확인하였다. 비슷한 성분의 분획을 모아 진공 상태에서 용매를 건조시켰으며 이 후 semi-preparative HPLC 시료로 사용하였다 (Fig. 4).

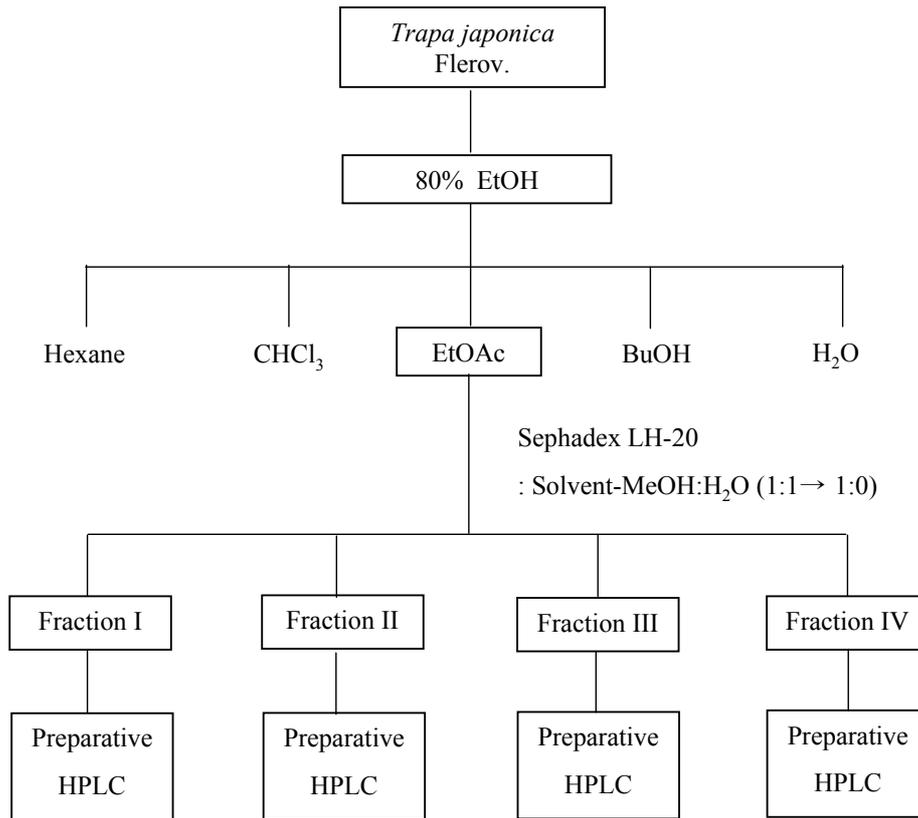


Fig. 4. Procedure for the purification of bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov.

#### 나) Analytical HPLC-DAD 분석

HPLC는 DAD detector가 장착된 Agilent 1100 series(USA)를 사용하였다. Column은 gemini 5 $\mu$  C<sub>18</sub> column(250 $\times$ 4.6mm, Phenomenex, USA)를 사용하였고 이동상은 0.05%(v/v) TFA를 첨가한 물을 A용매로 0.05%(v/v) TFA가 첨가된 acetonitrile을 B용매로 사용하였다. DAD detector는 205, 254, 280, 그리고 320nm를 동시에 사용하여 측정하였으며 flow rate는 1mL/min으로 시료는 5 $\mu$ L씩 주입하였다. Gradient 조건은 B용매를 0-30%로 40분간 직선적으로 증가시켰으며, 각 성분의 최대 흡수 파장은 190-400nm 범위에서 측정하였다.

#### 2) 유효생리활성물질의 순수 분리

마름 추출물에서 탄수화물 소화 효소 저해, 항산화, 항암 등의 생리활성을 나

타내는 물질을 순수분리하였다. 1차 분리한 분획을 liquid chromatography(LC)로 순수분리하였다. LC방법에 사용되는 컬럼 및 장치는 다음과 같다.

#### 가) Semi-preparative HPLC 분석

Sephadex LH-20 column chromatography로 얻은 Fraction I, II, III, IV를 2차 정제하기 위하여 semi-preparative HPLC를 이용하였다. Column은 gemini 10 $\mu$  C<sub>18</sub> column (250 $\times$ 10.0mm, Phenomenex, USA)를 사용하였고 이동상은 0.05%(v/v) TFA를 첨가한 15%(v/v) acetonitrile을 A용매로 0.05%(v/v) TFA가 첨가된 100%(v/v) acetonitrile을 B용매로 사용하였다. 시료의 검출은 320nm에서 수행하였으며 flow rate는 3mL/min, 시료는 25 $\mu$ L씩 주입하였다. Gradient 조건은 B용매를 10-20%, 20분 전후로 시료에 따라 수정하였다.

### 3) 분리된 생리활성 물질의 구조분석

#### 가) FT-IR

물질의 functional group을 측정하기 위하여 적외선 분광기(FT-IR)를 사용하였다. 파장의 범위는 400에서 4000cm<sup>-1</sup>까지로 설정하였으며 시료전처리 과정, 즉 고체시료 2mg에 KBr을 넣어 pellet을 만든 후 분석에 이용하였다.

#### 나) LC/MS

물질의 분자량은 Agilent LC/MSD(HP 1101)이 장착된 LC-ESI를 사용하여, Owen방법으로 측정하였다. Column은 HPLC 분석 시 사용한 column과 동일한 C<sub>18</sub> reverse-phase(5 $\mu$ ) column (250 $\times$ 4.6mm, Phenomenex, USA)를 사용하였고, 이동상으로는 0.4%(v/v) formic acid가 포함된 물(A용매)와 100% acetonitrile(B용매)를 사용하였다. Gradient 조건은 0-3분간 0%B, 3-30분간 0-30%B, 30-40분간 30-40%B 조건을 사용하였다. Mass 측정은 ESI(Electro spray ionization)방식으로 dry gas (nitrogen) flow = 10L/min; nebulizer pressure = 30psi; drying gas temperature = 350 $^{\circ}$ C; capillary voltage = 2500V; fragmenter voltage = 100V; mass range = 100-1000Da 조건으로 negative ion mode에서 측정하였다.

#### 다) NMR

물질의 구조분석을 위하여 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR(JNM-ECX 400, JEOL Co., Japan)을 수행하였다. 또한 탄소에 결합된 수소의 개수를 측정하기 위하여 DEPT를 실시하였다. 시료 10mg을 methanol-d<sub>4</sub>(CD<sub>3</sub>OD)에 용해시켜

400MHz에서 측정하였으며 TMS (tetramethylsilane, (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si)를 기준물질로 사용하였다.

#### 4) 분리된 생리활성 물질의 효소 저해 특성

##### 가) α-Glucosidase 저해활성

마름의 α-glucosidase에 대한 저해활성은 앞에서 기술한 바와 같이 측정하였다.

##### 나) α-Glucosidase 저해 특성

α-Glucosidase 저해활성이 우수한 tellimagrandin II에 대한 저해 특성을 다음과 같이 조사하였다. 우선 효소 및 기질농도별 저해 특성을 알아보기 위하여 위와 같은 반응을 0.01mg/mL-0.05mg/mL의 효소농도와 2-20mg/mL까지의 기질 농도별로 측정하였다. 또한, 기타 외부 단백질의 첨가 시 저해 감소 효과를 알아보기 위하여 소 혈청 단백질인 bovine serum albumin(BSA)를 농도별로 첨가하여 BSA 농도에 따른 저해활성의 감소 정도를 비교해 보았다. 효소 25μL, 샘플 10μL, 버퍼 90μL, 기질 125μL은 동일하게 넣고, BSA 첨가하는 경우만 버퍼를 95μL에서 25μL BSA첨가량을 제외한 65μL를 첨가하여 측정하였다.

#### 5) 마름 유래의 생리활성물질 정량분석

Gallic acid 정량은 Hagerman와 Inoue 방법을 약간 수정하여 사용하였다. Tannin이 함유된 시료 5mg을 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mL에 녹인 후 질소가스로 시험관 내부를 치환하여 밀봉한 다음 100°C dry oven에서 24시간 동안 방치하였다. 시험관을 식힌 후 증류수로 10배 희석한 다음 미리 준비한 0.667%(w/v) rhodanine용액(사용직전에 methanol에 녹여서 준비)에 200mL의 시료를 넣고 잘 혼합하였다. 정확히 5분 후 0.5N KOH용액 200mL를 넣고 2분 30초 후에 반응액 140mL를 취하여 증류수 860mL를 첨가하였다. 5분간 방치한 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 6) 마름 유래의 생리활성물질의 기능성 식품소재로의 개발

##### 가) 마름으로부터 유효 생리활성물질의 생산방법 최적화

마름 유래의 유효생리활성물질이 고농도로 포함된 분획을 효율적으로 얻기 위한 방법을 모색하였다. 마름을 기능성 식품소재로 개발하기 위해서는 유효생리활성물질의 생산방법을 최적화 시키는 것이 중요한데 본 실험에서는

산업적으로 효율성을 증대시킬 수 있는 추출온도 및 용매조건, 그리고 추출 횟수를 선정하고자 유효생리활성 물질의 함량을 비교하여 최적화시킬 수 있는 추출방법을 확립하였다.

#### (1) 시료준비

창녕에서 수확한 마름 열매를 동결건조한 후 생리활성이 높은 껍질부분을 분쇄하여 분말화 한 후 냉동실에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

#### (2) 추출 온도에 따른 흡광도 비교

먼저 0, 20, 50, 80, 100% 주정용액을 각각 준비하여 마름 2g에 시료의 10배(v/w)에 해당하는 20mL의 용매를 첨가하여 shaking incubator에서 20시간 동안 교반하여 추출하였다. 추출온도는 상온인 27℃부터 40, 50, 60, 70℃까지 실시하였으며 추출이 끝난 시료는 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 278nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험은 3반복하여 그 평균을 결과로 나타내었다.

#### (3) 추출 용매에 따른 유효생리활성 물질의 함량비교

온도별 추출에서 적합한 온도(40℃)를 정한 후 그 온도에서 0, 20, 50, 80, 100% 주정농도별 추출물을 얻은 다음 HPLC로 분석하여 각 유효생리활성 물질의 함량을 비교하였다. 또한 열수추출물, 즉 마름 파우더 1.5g에 100mL의 증류수를 첨가하여 100℃ 끓는 물에서 10분간 추출한 것도 함께 비교하였다.

#### (4) 추출 횟수에 따른 유효생리활성 물질의 함량비교

추출횟수에 따른 유효생리활성 물질의 함량을 비교하기 위해 가장 추출이 잘되는 조건으로 1, 2, 3차 추출하여 비교분석하였다. 추출방법은 마름 2g에 시료의 10배(v/w)에 해당하는 20mL의 80%주정을 첨가하여 40℃ shaking incubator에서 20시간 동안 교반 및 추출하였으며 1차 추출이 끝나면 원심분리하여 상등액을 분리한 후 침전물에 다시 20mL의 80% 주정을 첨가하여 2, 3차 추출하였다. 추출이 끝난 시료는 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 HPLC로 분석하였다.

#### (5) 추출 pH에 따른 유효생리활성 물질의 함량비교

추출 pH에 따른 유효생리활성 물질의 함량을 비교하기 위해 가장 추출이 잘되는 조건에서 pH 별로 추출하여 비교분석하였다. 추출방법은 마름 2g에 시료의 10배(v/w)에 해당하는 20mL의 80%주정을 첨가하여 4

0°C shaking incubator에서 20시간 동안 교반 및 추출하였으며 80% 주정은 각각 pH 2, 4, 7, 10, 12로 맞춘 후 사용하였다. 추출이 끝난 시료는 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 HPLC로 분석하였다.

#### 나) 마름 유래 유효 생리활성물질의 물리화학적 안정성 분석

마름 유래의 유효 생리활성물질을 기능성 식품소재로 가공 시 겪게 되는 고온 및 극한 pH에서의 안정성 및 금속에 대한 안정성을 확인하고자 상온(30°C)과 고온(100°C)에서 금속이온 존재 여부에 따라, 여러 가지 pH(pH2~10까지)에 따라 일정 시간동안 방치한 후 각 성분의 농도변화를 HPLC로 분석하였다.

##### (1) 시료준비

앞서 수행된 최적조건을 바탕으로 추출물을 제조하였다. 즉, 일정량의 마름을 칭량한 후 비커에 넣고 시료의 10배(v/w)에 해당하는 80%주정을 첨가하여 40°C에서 20시간동안 2회 추출하였다. 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 그 상등액을 진공회전농축기(Rotavapor, Buchi Labor technik AG, Switzerland)를 사용하여 50°C에서 감압 농축시킨 후 건조하여 시료로 사용하였다.

##### (2) 물리화학적 안정성

온도에 대한 안정성을 살펴보기 위하여 상온인 30°C와 고온인 100°C에서 그 안정성을 비교하였다. 먼저 마름추출물 0.4g에 50% 에탄올 10mL를 첨가하여 4% 마름 용액을 제조한 다음 물 20mL에 마름 용액 500μL를 첨가하여 추출물의 최종농도가 0.1%가 되도록 한 다음 30°C와 100°C에서 각각 24시간 방치한 후 활성성분의 농도변화를 HPLC로 분석하였다. pH에 따른 안정성은 또한 상온 30°C와 고온 100°C에서 증류수 20mL에 4% 마름 용액 500μL을 넣은 후 HCl 혹은 NaOH를 첨가하여 pH를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10로 맞춘 후 각 온도에서 24시간 방치한 후 활성성분의 농도변화를 HPLC로 분석하였다. 금속에 대한 안정성은 1mM CuSO<sub>4</sub>가 첨가된 증류수에 마름 용액을 앞과 동일한 방법으로 첨가하여 방치한 후 비첨가군과 비교하였다.

#### 다) 마름 유래 유효 생리활성물질의 기능성 식품소재로의 개발

마름 유래의 유효 생리활성 물질을 포함하는 기능성 식품소재를 생산한 후 참여기업은 (주)기화제약과 연계하여 기능성식품의 한 형태인 캡슐 시제품을 제작하였다. 사용된 시료는 마름 유래 유효 생리활성물질이 고농도로 포

함된 80% 주정추출물을 이용하였으며 추출물을 캡슐제조기에 넣어 캡슐 형태로 시제품을 완성하였다.

### 제 3 절 연구개발 수행결과

#### 1. 마름의 영양성분 분석

마름의 일반성분 분석결과는 다음과 같다(Table 3, 4, 5). 마름 성분 중 58.1%가 탄수화물이었으며, 식이섬유 함량은 21.9%로 나타나 마름은 식이섬유의 좋은 급원으로 나타났다. 조단백질과 조지방의 함량은 각각 10.1%, 0.3%로 나타났다.

마름 과육에는 아미노산 중 glutamate, histidine, arginine 함량이 높게 나타났고, 껍질에는 histidine 함량이 비교적 높게 나타났다. 마름 과육의 지방산 중 oleic acid 함량이 57.99%로 높게 나타났고, 껍질에는 myristoleic acid 함량이 72.98%로 높게 나타났다.

Table 3. Chemical composition of *Trapa japonica* Flerov.

	Amount (g/100g)
Water	7.1
Fat	0.3
Protein	10.1
Carbohydrates	58.1
Dietary fiber	21.9
Ash	2.5

Table 4. Amino acid composition of *Trapa japonica* Flerov.

Amino acid	Kernel (% in sample)	Shell (% in sample)
Asp.	0.032	0.004
Thr.	0.013	0.002
Ser.	0.019	0.003
Glu.	0.069	0.007
Pro.	0.013	0.009
Gly.	0.018	0.002
Ala.	0.019	0.005
Val.	0.016	0.003
Ile.	0.016	0.004
Leu.	0.024	0.003
Tyr.	0.016	0.006
Phe.	0.024	0.004
His.	0.048	0.024
Lys.	0.014	0.007
Arg.	0.044	0.003
Total	0.385	0.085

Table 5. Fatty acid composition of *Trapa japonica* Flerov.

Fatty acids	% total fatty acid	
	Kernel	Shell
Myristoleic acid (C <sub>14:1</sub> )	-	72.98
Magaric acid (C <sub>17:0</sub> )	18.22	-
Stearic acid (C <sub>18:0</sub> )	7.63	-
Oleic, Elaidic acid (C <sub>18:1</sub> )	57.99	10.73
Linoleic, Linoleladic acid (C <sub>18:2</sub> )	-	5.57
Linolenic acid (C <sub>18:3</sub> )	-	6.23
Arachidic acid (C <sub>20:0</sub> )	7.01	-
Behenic acid (C <sub>22:0</sub> )	9.15	4.49

## 2. 마름의 항당뇨 효과 규명

### 가. In vitro에서 혈당조절 및 당뇨합병증 예방효과 조사

#### 1) 탄수화물 소화효소 저해활성 측정

마름 추출물의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 0.5 g/L의 농도에서 100% methanol 및 80% ethanol 추출물이 각각 46.6%, 35.0%로 나타났으며, 표준품인 acarbose의 저해활성은 29.7%로 나타났다(Table 6).

Table 6. Inhibitory activities of *Trapa japonica* Flerov. against  $\alpha$ -glucosidase

Sample	$\alpha$ -glucosidase inhibitory activity (%)
100% methanol	46.6
80% ethanol	35.0
Acarbose	29.7

#### 2) In vitro에서 유리라디칼 소거능 조사

마름의 물, 메탄올, 70% 에탄올, acetone, isopropyl alcohol 추출물의(0.05g/L) in vitro 항산화능을 DPPH법을 이용하여 수소공여능을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 메탄올(93.1%), acetone(93.3%), 70% 에탄올(92.0%), 물 추출물(89.9%)의 유리 라디칼 소거능이 표준품으로 사용한 비타민 C(96.3%)와 유사한 활성을 나타내었으며, isopropyl alcohol과 ether 추출물의 항산화능이 다소 낮은 것으로 나타났다(Fig. 5).

농도별로 희석한 마름 메탄올 추출물의 항산화능을 DPPH법으로 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 0.2 g/L농도에서 마름 추출물은 94.4%의 활성을 나타내어 표준품인 비타민 C(96.9%)와 유사한 활성을 나타내었다. 마름 껍질 추출물은 94.5%의 활성을 나타낸 반면 마름 과육 추출물의 활성은 22.7%로 나타나, 마름의 유리기 소거능이 높은 것은 마름껍질에서 비롯되는 것으로 보이며, 마름 과육에도 다소 유리기소거능이 존재하였다. 추출물의 농도별 유리기 소거능은 마름 전체 및 껍질의 경우 0.05, 0.1, 0.22 g/L농도에서 유리기 소거능이 유사하였으며, 0.025, 0.01 g/L농도에서 농도 의존적으로 유리기 소거능이 감소하였고, 과육의 경우, 0.01~0.2 g/L의 농도에서 농도 의존적으로 유리기 소거능이 변화하였다. 따라서 마름은 항산화능이 아주 높아 당뇨 합병증의 예방, 치료 효과가 있으리라 기대되며, 활성성분은 주로 껍질에 존재한다고 사료된다.

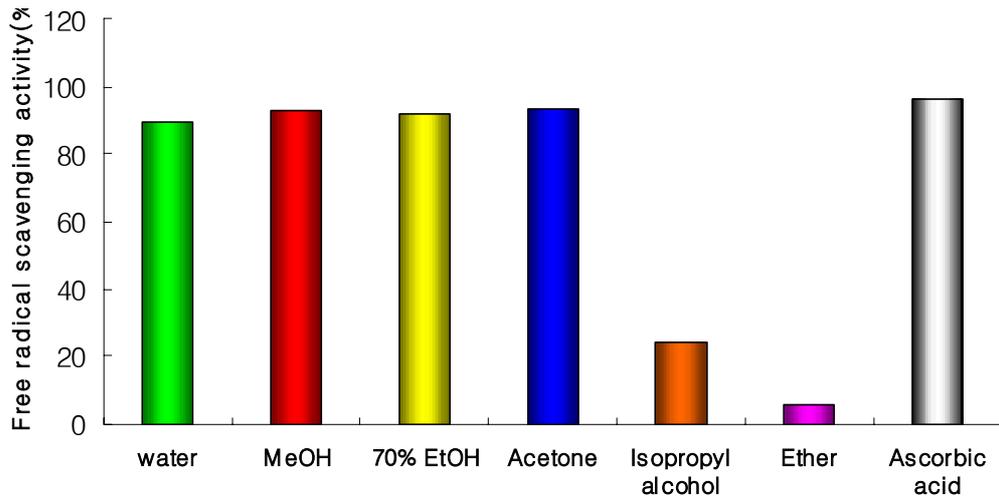


Fig. 5. Free radical scavenging effect of various solvent extracts of *Trapa japonica* Flerov.

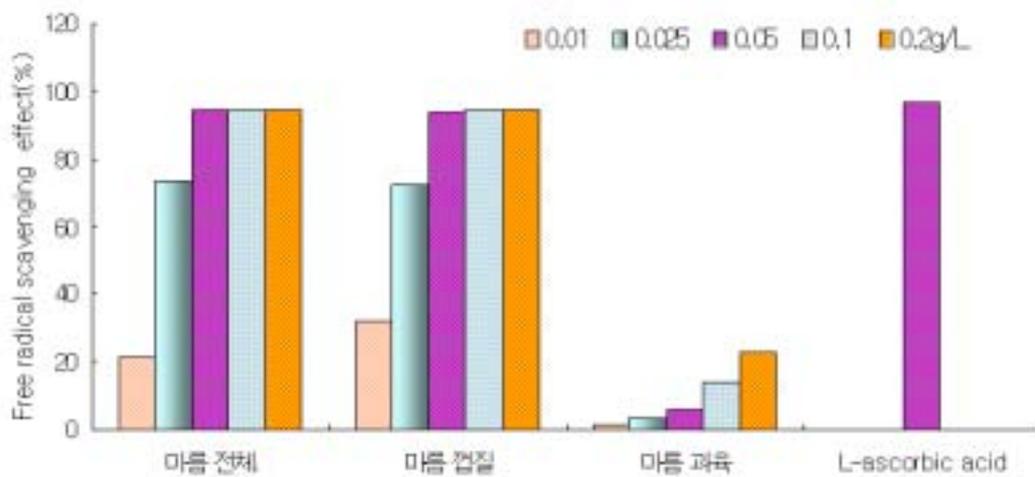


Fig. 6. Free radical scavenging effect of methanol extract of various parts of *Trapa japonica* Flerov.

### 3) In vitro에서 aldose reductase 저해활성 측정

마름의 당뇨 합병증 저해활성을 in vitro에서 조사하기 위해 마름 메탄올 추출물의 aldose reductase 저해활성을 Hayman & Kinoshita법으로 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 시료 농도 0.1 및 0.05 g/L에서 AR 저해활성은 각각

73.6%, 56.6%로 나타났다. 마름 추출물의 rat lens aldose reductase에 대한 저해활성의 IC<sub>50</sub>는 0.09 g/L로 나타나, 강력한 저해활성을 나타내었다.

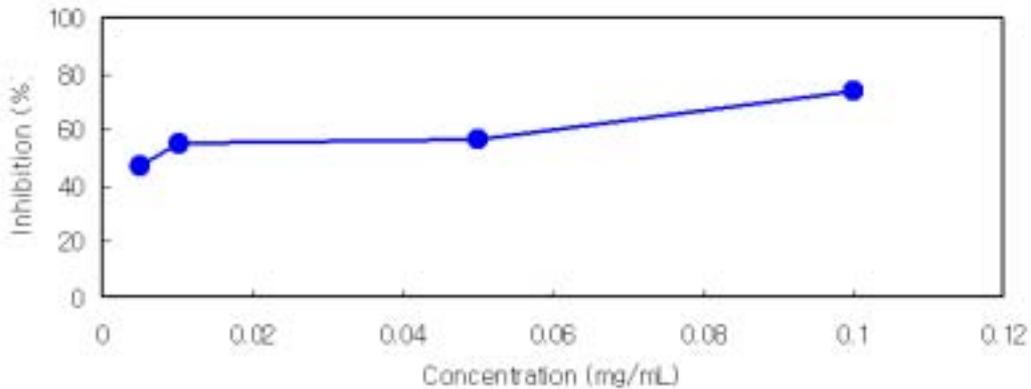


Fig. 7. Inhibitory activity of *Trapa japonica Flerov* against aldose reductase.

#### 나. 동물모델계에서 혈당저하 효과 규명

##### 1) STZ-유발 당뇨쥐에 있어서 식후 혈당 저하효과 규명

당뇨쥐에 있어서 대조군의 혈당치는 전분 섭취 후 90분에 81.1±5.9 mg/dL로 증가하여 최고치에 도달하였다. 식후 30, 60, 90, 120분에 혈당 증가치는 마름 추출물군이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 8).

식후 혈당변화 곡선의 면적은 대조군이 11,285±601 mg·min/dL, 마름 추출물 투여군이 7,992±581 mg·min/dL로 나타나, 두 군 사이에 유의적인 차이가 있었다(p< 0.05, Table 7). 따라서 마름 추출물은 in vivo에서 식후 혈당증가를 저하하는 효과가 있음을 확인하였다. 식후 혈당을 조절하는 유효성분을 장기간 섭취할 경우, 인슐린 민감도를 증가시켜, 공복혈당 및 당화혈색소 농도를 감소시켜 당뇨병 치료에 도움이 되고, 혈당치를 가능한 정상치에 가깝게 조절할 경우 심혈관계 합병증의 예방 및 치료에 도움이 되는 것으로 알려져 있다.

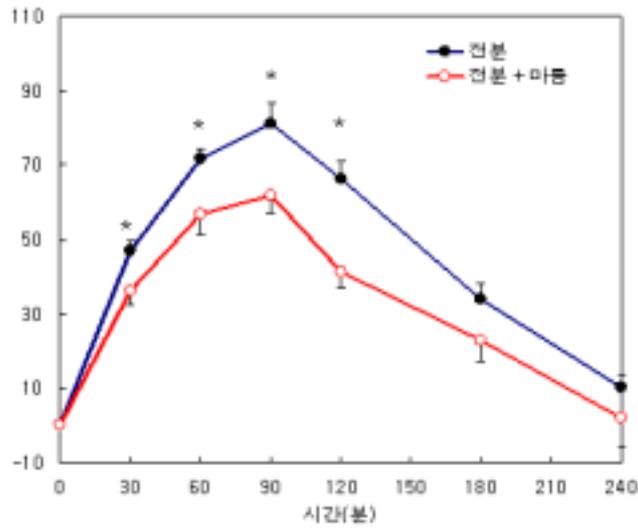


Fig. 8. Increase of blood glucose after administration of *Trapa japonica* Flerov. extract in STZ-induced diabetic rats.

\*significantly different at  $p < 0.05$ .

Table 7. Area under the curve (AUC) of postprandial glucose responses of streptozotocin-induced diabetic rats

Group	AUC (mg · min/dL)
Control	11,285 ± 601
<i>Trapa japonica</i> Flerov.	7,992 ± 581*

\* $p < 0.05$

## 2) 제2형 당뇨동물에 있어서 마름의 항당뇨 효과 규명

### 가) 체중 및 식이섭취량

6주간의 마름식이 섭취 후 대조군의 체중은  $35.7 \pm 1.0$  g, 식이섭취량은  $4.1 \pm 0.2$  g/day 이었으며, 마름의 섭취는 체중과 식이섭취량에 유의적인 영향을 주지 않았다(Table 8).

**Table 8. Body weight and food intake of control and *Trapa japonica* Flerov. groups**

Group	Control	<i>Trapa japonica</i> Flerov.
Final body weight (g)	35.7 ± 1.0	33.4 ± 0.9
Food intake (g/day)	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.2

**나) 혈당조절 효과**

Db/db mouse 있어서 마름의 장기간 섭취는 당화 헤모글로빈 농도와 공복 혈당을 유의적으로 감소시켰으며(p<0.05, Table 9), 혈장 인슐린 농도를 감소시키는 경향을 나타내었다. 마름의 섭취는 공복 혈당 및 장기간 혈당조절 정도를 나타내는 당화 헤모글로빈의 농도를 유의적으로 감소시켜 혈당 조절에 효과를 나타내었으며, 당뇨치료에 도움을 줄 것으로 사료된다.

**Table 9. Fasting blood glycated hemoglobin, plasma glucose and insulin levels of control and *Trapa japonica* Flerov. groups**

Group	HbA1c (%)	Glucose (mg/dL)	Insulin (ng/mL)
Control	6.9 ± 0.3	405.8 ± 15.7	2.8 ± 0.3
<i>Trapa japonica</i> Flerov.	6.1 ± 0.1*	346.3 ± 19.6*	2.3 ± 0.4

\*p<0.05

**다) 혈액 지질 profile 및 신기능 개선효과**

혈장 중성지방 농도는 마름 섭취군은 107.3±9.5 mg/dL로 나타나, 대조군 (138.5±8.4 mg/dL) 보다 유의적으로 낮게 나타났으며(p<0.05, Fig. 9), 혈장 총 콜레스테롤 농도 또한 마름 섭취군은 159.7 ± 5.1 mg/dL로 나타나, 대조군(182.4 ± 8.6 mg/dL) 보다 유의적으로 낮게 나타났다(p<0.05). 대조군과 마름 섭취군의 혈장 HDL-콜레스테롤 농도는 유의적인 차이가 없었다. 당뇨동물에 있어서 장기간 마름의 섭취는 혈장 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 감소시켜, 미세혈관 및 대혈관계 당뇨합병증 예방에 기여하리라고 사료된다. 대조군 및 마름 섭취군의 혈장 BUN 및 크레아티닌 농도는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 10).

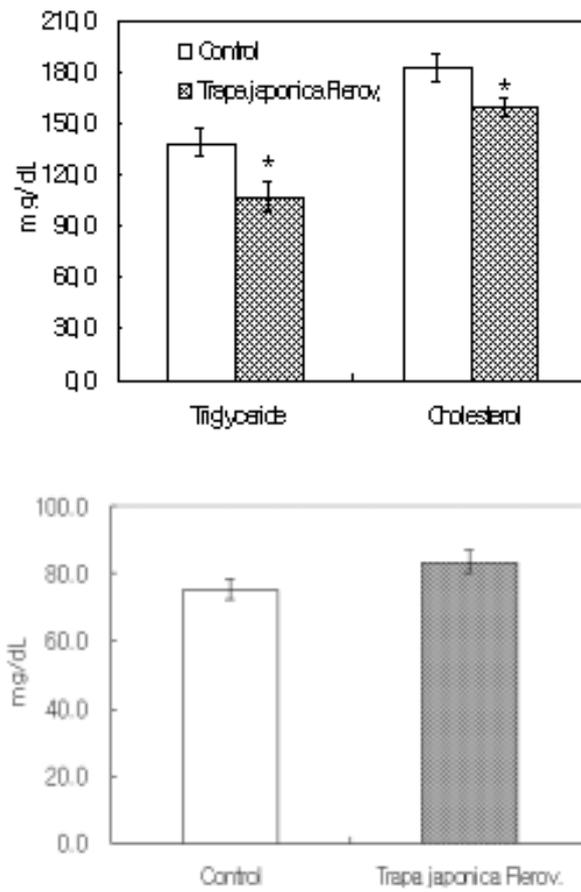


Fig. 9. Fasting plasma triglyceride, cholesterol and HDL-cholesterol levels of control and *Trapa japonica* Flerov. groups.

Table 10. Fasting plasma blood urea nitrogen (BUN) and creatinine levels of control and *Trapa japonica* Flerov. groups

Group	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Control	26.3 ± 3.2	0.5 ± 0.2
<i>Trapa japonica</i> Flerov.	25.7 ± 3.5	0.4 ± 0.1

라) 당뇨병병증 개선효과

(1) 간조직 지질과산화물 농도 및 항산화 효소 활성

마름군의 간조직 TBARS 함량( $4.2 \pm 0.3$  nmol MDA/mg protein)은 대조군( $5.8 \pm 0.7$  nmol MDA/mg protein)에 비해 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.05$ , Table 11) 간조직의 catalase 활성은 마름군이  $9.9 \pm 0.3$  U/mg protein, 대조군이  $7.7 \pm 0.1$  U/mg protein로 나타나, 마름군이 유의적으로 증가하였다( $p < 0.001$ ). 마름군의 간조직의 SOD 활성( $27.8 \pm 1.7$  U/mg protein)은 대조군( $22.5 \pm 0.7$  U/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였으며, 특히 마름의 섭취는 Cu,Zn-SOD의 활성을 유의적으로 증가시켰다 ( $p < 0.05$ , Fig. 10). 마름의 섭취로 인한 지질 과산화물의 감소 및 SOD와 catalase 활성의 증가는 당뇨 합병증의 예방 및 치료 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

Table 11. Hepatic TBARS level, catalase and GSH-px activities of control and *Trapa japonica* Flerov. groups

Group	TBARS (nmol MDA/mg protein)	Catalase (U/mg protein)	GSH-px (U/mg protein)
Control	$5.8 \pm 0.7$	$7.7 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.1$
<i>Trapa japonica</i> Flerov.	$4.2 \pm 0.3^*$	$9.9 \pm 0.3^{***}$	$1.9 \pm 0.3$

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

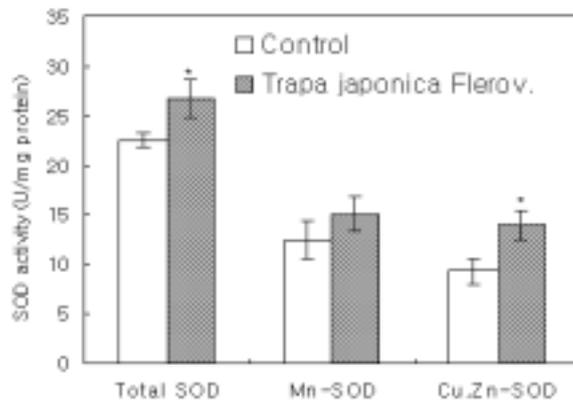


Fig. 10. Hepatic SOD activities of control and *Trapa japonica* Flerov. groups.

(2) 간조직의 Glutathione 및 carbonyl 농도

마름군의 간조직의 glutathione의 농도( $0.38 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{mg liver}$ )는 대조군( $0.32 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{mg liver}$ )에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ , Fig. 11). Glutathione은 hydroxyl radical과 singlet oxygen을 소거하고 glutathione peroxidase 효소의 기질로 작용한다. 따라서 마름군의 glutathione 농도의 증가는 당뇨동물에 있어서 생체 방어 및 항산화효소 활성 증가에 도움을 줄 것으로 사료된다. 마름군의 단백질 carbonyl 농도( $2.4 \pm 0.4 \mu\text{M carbonyl}/\text{mg protein}$ )는 대조군( $2.7 \pm 0.5 \mu\text{M carbonyl}/\text{mg protein}$ )에 비해 감소하는 경향을 나타내었다(Table 12).

Table 12. Hepatic carbonyl level of control and *Trapa japonica* Flerov. groups

Group	Carbonyl ( $\mu\text{M}/\text{mg protein}$ )
Control	$2.4 \pm 0.4$
<i>Trapa japonica</i> Flerov.	$2.7 \pm 0.5$

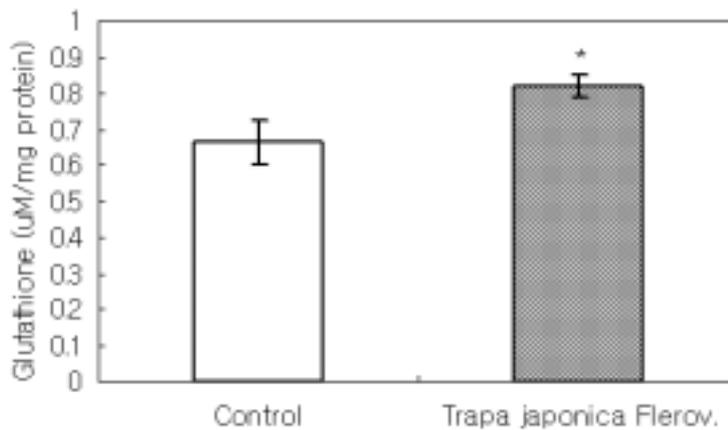


Fig. 11. Hepatic glutathione levles of control and *Trapa japonica* Flerov. groups.

(3) 신장조직의 aldose reductase 활성 및 렌즈의 sorbitol 농도  
 마름 섭취는 신장조직의 aldose reductase 활성 및 lens의 sorbitol 농도를 감소시키는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 없었다(Table 13).

Table 13. Renal aldose reductase activity and sorbitol levels of lens of control and *Trapa japonica* Flerov. groups

Group	Renal aldose reductase activity (nM/min/mg protein)	Sorbitol of lens ( $\mu$ M/mg protein)
Control	5.6 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.3
<i>Trapa japonica</i> Flerov.	5.2 $\pm$ 0.8	2.0 $\pm$ 0.3

마) 제2형 당뇨병동물의 간 및 신장조직의 유전자 발현수준

(1) 간조직 GLUT4 및 insulin receptor의 gene expression

마름의 장기간 섭취가 insulin receptor, glucose transporter(GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. 마름군의 GLUT4 mRNA expression은 간조직에서 163.3 $\pm$ 8.4%로 대조군(100.0 $\pm$ 12.3%)에 비해 유의적으로 증가되었으며(p<0.01, Fig. 12), insulin receptor의 gene expression 또한 마름군(150.9 $\pm$ 8.2%)이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다(p<0.01). 따라서 마름은 GLUT4 및 insulin receptor의 gene expression을 증가시켜, 혈당 개선효과를 나타내는 것으로 사료된다.

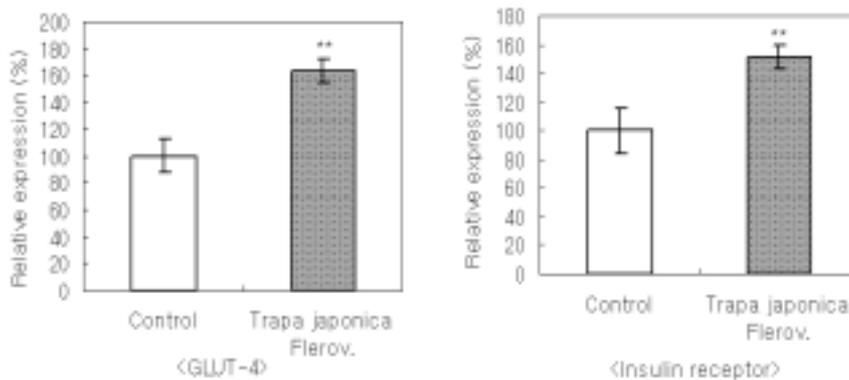


Fig. 12. Expression of GLUT4 and insulin receptor mRNA in liver of control and *Trapa japonica* Flerov. group.

\*\*p<0.01

(2) 간조직 항산화효소의 gene expression

마름의 장기간 섭취가 간 조직의 Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, catalase 및 GSH-px의 gene expression에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. 마름군의 Cu,Zn-SOD mRNA expression은 146.2±6.2%로 대조군 (100.0±12.8%)에 비해 유의적으로 증가되었으며(p<0.01, Fig. 13), catalase mRNA expression은 마름군이 134.9±5.2%로 대조군에 비해 유의적으로 증가되었다(p<0.01, Fig. 14). Mn-SOD 및 GSH-px의 gene expression은 마름군과 대조군 사이에 유의적 차이가 없었다. 따라서 마름은 Cu,Zn-SOD 및 catalase 효소의 gene expression을 증가시켜, 항산화능을 증가시키는 것으로 사료된다.

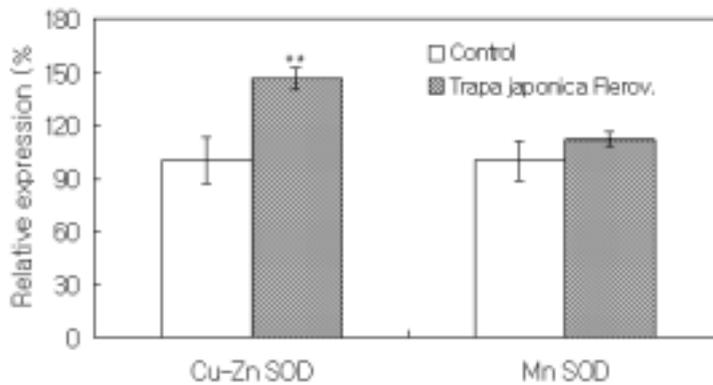


Fig. 13. Expression of Cu-Zn SOD and Mn SOD mRNA in liver of control and *Trapa japonica* Flerov. groups.

\*\*p<0.01

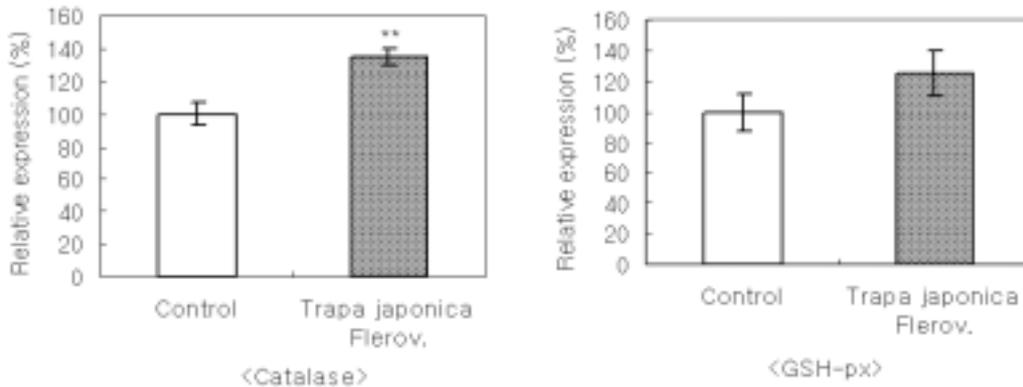


Fig. 14. Expression of catalase and GSH-px mRNA in liver of control and *Trapa japonica* Flerov. groups.

### (3) 신장조직 aldose reductase의 gene expression

마름의 장기적인 섭취가 신장조직의 aldose reductase의 gene expression에 미치는 영향을 조사한 결과 aldose reductase mRNA expression은 대조군과 마름군간에 유의적 차이가 없었다(Fig. 15).

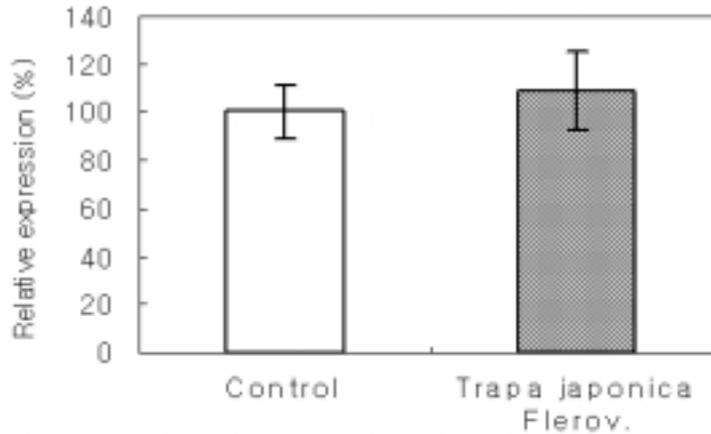


Fig. 15. Expression of aldose reductase mRNA in kidneys of control and *Trapa japonica* Flerov. groups.

#### 다. 당뇨병환자에 있어서 마름의 항당뇨 효과

##### 1) 당뇨병환자에 있어서 마름 추출물의 단기간 섭취가 식후 혈당 및 인슐린 변화에 미치는 영향

마름 주정추출물의 수율은 9.65%를 나타내었다. 13인의 제2형 당뇨병환자가 쌀밥만 섭취한 경우 식후 90분에 혈장 포도당 농도 증가치가  $101.3 \pm 10.7$  mg/dL로 최고치에 도달하였으며, 마름추출물 3g을 쌀밥과 함께 섭취한 경우 식후 90분에 혈당 증가치가  $63.4 \pm 8.7$  mg/dL을 나타내어 혈당증가치가 유의적으로 낮았다(Fig. 16). 마름추출물을 쌀밥과 함께 섭취한 경우, 식후 30, 60, 90, 120, 180분의 혈당증가치가 쌀밥만 섭취한 경우에 비해 유의적으로 낮았다( $p < 0.05$ ). 마름섭취군에 있어서 식후 혈당 증가곡선의 면적(AUC)는  $8,098 \pm 932$  mg · min/dL로 대조군( $14,181 \pm 1,012$  mg · min/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Table 14).

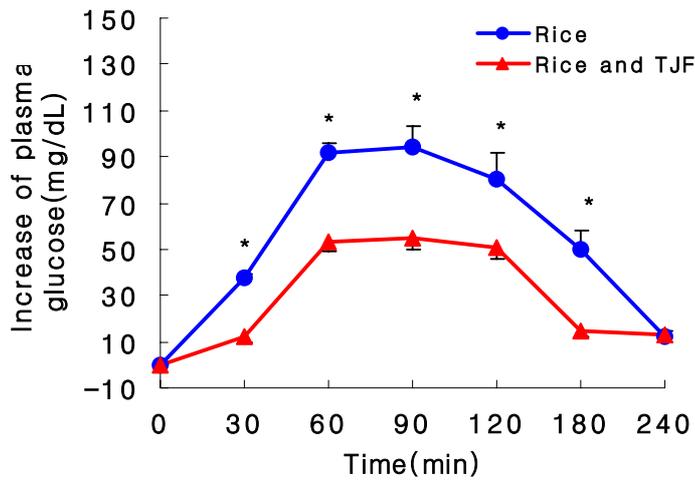


Fig. 16. The mean plasma glucose responses after consumption of rice and *Trapa japonica* Flerov. extract(TJF).

Table 14. Area under the curve (AUC) of postprandial glucose responses of diabetic patients

Group	AUC (mg · min/dL)
Control	14,181±1,012
<i>Trapa japonica</i> Flerov.	8,098±932*

\*p < 0.05

마름추출물 3g을 쌀밥과 함께 섭취한 경우 식후 60분의 인슐린 증가치가 쌀밥만 섭취한 경우에 비해 유의적으로 낮았다(p<0.05, Fig. 17). 마름섭취군에 있어서 식후 인슐린 증가곡선의 면적(AUC)은 2,364±894  $\mu\text{U} \cdot \text{min}/\text{dL}$ 로 대조군(1,817±639  $\mu\text{U} \cdot \text{min}/\text{dL}$ )에 비해 감소하는 경향을 나타내었다(Table 15). 따라서 마름은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 억제하여 탄수화물 소화를 부분적으로 지연함으로써 식후 혈당의 급격한 상승을 억제하여 당뇨병 예방 및 치료에 이용할 수 있는 우수한 효과가 있다고 사료된다.

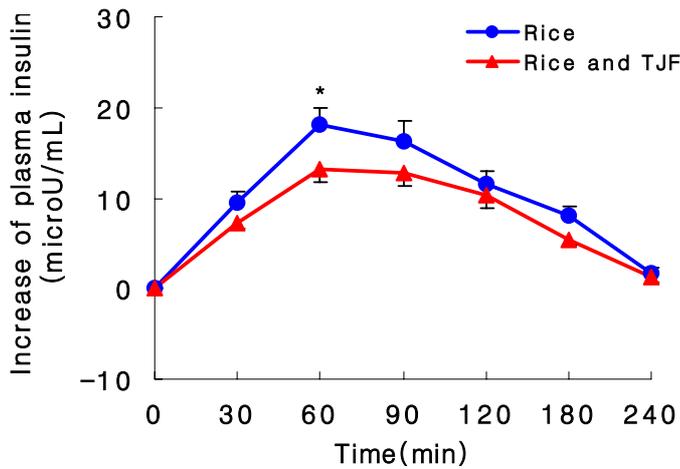


Fig. 17. The mean plasma insulin responses after consumption of rice and *Trapa japonica* Flerov. extract(TJF).

Table 15. Area under the curve (AUC) of postprandial insulin responses of diabetic patients

Group	Insulin ( $\mu\text{U} \cdot \text{min}/\text{dL}$ )
Control	2,364±894
<i>Trapa japonica</i> Flerov.	1,817±639

\*p < 0.05

## 2) 제2형 당뇨병환자에 있어서 마름의 장기간 섭취효과

### 가) 마름 함유 선식제품의 관능검사

마름을 각각 5%, 10%, 15% 함유한 선식제품의 색(color), 향(flavor), 조직감(texture), 맛(taste), 종합적기호도(overall quality)를 5점법으로 조사한 결과를 Table 16에 나타내었다. 마름을 5%, 10%, 15% 함유한 선식제품의 색은 각각 3.5±0.7, 3.7±0.6, 3.7±0.9점으로 나타났으며, 향은 3.4±0.8, 3.6±0.6, 3.3±0.6점으로 나타나 3 종류의 제품간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 마름을 5%, 10%, 15% 함유한 선식제품의 조직감은 3.9±0.9, 3.8±0.7, 3.2±0.6점으로 나타나, 5% 및 10% 제품이 15% 제품보다 유의적으로 우수하게 나타났다(p<0.05). 15% 함유 제품의 경우 조직감이 거칠게 느껴져서

점수가 낮게 나타났다. 마름을 5%, 10%, 15% 함유한 선식제품의 맛은 3.6±0.6, 4.0±0.8, 3.1±0.6로 나타나, 10% 제품이 15%제품보다 유의적으로 우수하게 나타났으며, 5% 제품과 15% 제품 간에는 유의적인 차이가 없었다. 마름을 5%, 10%, 15% 함유한 선식제품의 종합적 기호도는 3.5±0.5, 3.9±0.3, 2.9±0.6로 나타나, 5%와 10% 제품이 15% 제품보다 유의적으로 우수하게 나타났다. 따라서 관능검사 결과 조직감과 맛, overall palatability가 우수하면서 마름 함량이 높은 10% 마름 함유제품을 장기간 섭취가 당뇨병 개선에 미치는 영향을 조사하는 연구에 사용되는 최종제품으로 선정하였다.

**Table 16. Sensory evaluation of meal replacement containing milled barley, brown rice, buckwheat and *Trapa japonica* Flerov.<sup>1</sup>**

Product	5%	10%	15%
Color	3.5±0.7	3.7±0.6	3.7±0.9
Flavor	3.4±0.8	3.6±0.6	3.3±0.6
Texture	3.9±0.6 <sup>a2</sup>	3.8±0.7 <sup>a</sup>	3.2±0.6 <sup>b</sup>
Taste	3.6±0.6 <sup>ab</sup>	4.0±0.8 <sup>a</sup>	3.1±0.6 <sup>b</sup>
Overall palatability	3.5±0.5 <sup>a</sup>	3.9±0.3 <sup>a</sup>	2.9±0.6 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Mixed grain was prepared by mixing barley, brown rice, and buckwheat in the ratio of 4:3:3. Meal replacements were prepared by adding *Trapa japonica* Flerov. powder to the mixed grain at the concentration of 5%, 10%, and 15%.

Scoring system: 1 = Very poor; 2 = Poor, 3 = Average; 4 = Good; 5 = Excellent

<sup>2</sup>Numbers with different superscripts are significantly different at P<0.05.

#### 나) 일반사항 및 신체계측

실험은 제2형 당뇨병환자 20인(남 7인, 여 13인, 평균 나이 66.0 ± 6.6세)을 대상으로 실시하였다. 당뇨병환자를 random하게 대조군(남 3인, 여 7인)과 마름 섭취군(TJF, 남 4인, 여 6인)으로 나누어 실험을 실시하였다. 대조군과 마름군의 유병기간, 신장, 체중 체질량지수를 Table 17에 나타내었다.

Table 17. Characteristics of patients with type 2 diabetes mellitus

	TJF* group	Control group
Age (yr)	68.1 ± 4.8	64.1 ± 8.2
Duration of diabetes (yr)	5.1 ± 2.1	4.8 ± 2.1
Body weight (kg)	56.2 ± 5.4	56.9 ± 8.7
Height (cm)	155.1 ± 6.0	156.2 ± 8.2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.4 ± 2.7	23.4 ± 3.3

\* *Trapa japonica* Flerov.

20인의 당뇨병환자 모두 실험종료 시점까지 실험에 참가하였고, 부작용을 보고한 환자는 없었다. 실험 시작 전 마름섭취군의 체질량지수는 23.4±2.7 kg/m<sup>2</sup>이었으며, 3개월 후의 체질량지수는 23.4±2.4 kg/m<sup>2</sup>로 실험 기간 전, 후의 차이는 -0.4±0.6 kg/m<sup>2</sup>로 나타났다(Table 18). 대조군의 경우 실험 기간 전, 후의 체질량지수 차이가 -0.2±0.6 kg/m<sup>2</sup>로 나타나, 대조군과 마름군 사이에 유의적인 차이가 없었다. 대조군과 마름군 모두 체중, 허리둘레, 체지방이 실험 기간 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았다. 실험기간 전, 후에 수축기 혈압 차이는 마름군이 -7.6±6.6 mmHg, 대조군이 -1.4±5.9 mmHg로 나타나, 두 군간에 유의적인 차이가 있었다(p<0.05). 이완기 혈압은 대조군 (-1.4±4.7 mmHg)과 마름군(-1.8±2.1 mmHg) 모두 실험 기간 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았다.

**Table 18. Anthropometric measurement and blood pressure of TJF and control groups**

	TJF group			Control group		
	Pre	Post	Difference <sup>1</sup>	Pre	Post	Difference
Body weight (kg)	56.2±5.3	55.3±5.7	-0.9±1.3	56.9±8.7	56.4±8.5	-1.8±1.5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.4±2.7	23.0±2.4	-0.4±0.6	23.4±3.3	23.2±3.3	-0.2±0.6
Waist circumference(cm)	84.9±3.5	84.1±4.1	-0.8±1.9	85.2±7.6	84.7±7.6	-0.5±3.6
Body fat (%)	30.0±6.1	29.2±5.8	-0.8±3.0	30.3±6.4	30.4±6.4	0.1±1.1
Systolic blood pressure (mmHg)	144.3±21.3	136.7±21.6	-7.6±6.6	131.1±16.6	129.4±15.7	-1.4±5.9 <sup>*2</sup>
Diastolic blood pressure (mmHg)	80.6±11.2	78.8±11.1	-1.8±2.1	74.5±10.5	73.1±7.4	-1.4±4.7

<sup>1</sup>Difference between Pre and Post measurement

<sup>2</sup>Differences of TJF group and control group are significantly different at p<0.05.

**다) 혈당조절 효과**

장기간의 마름 선식섭취가 혈당조절에 미치는 영향을 Table 19에 나타내었다. 마름군에 있어서, 마름 섭취 전의 **공복 혈당과 인슐린 농도**는 142.2±10.2 mg/dL 및 12.5±2.5 μU/mL이었으나, 섭취 기간 후 **유의적으로 감소하여** 126.3±10.5 mg/dL 및 10.4±3.1 μU/mL로 나타났다(혈당 p<0.001, 인슐린 p<0.05). **인슐린저항성 진단지표인 HOMA-IR 또한** 섭취 전, 후에 각각 4.4±1.1, 3.3±1.1로 복용 기간 후 **유의적으로 감소하였다**(p<0.01). **혈장 fructosamine (365.1±27.9 μmol/L) 및 당화헤모글로빈 농도(7.6±0.8%) 또한 마름 섭취 후에 유의적으로 감소하였다**(340.5±26.3 μmol/L, 7.1±0.6%, p<0.05). 대조군의 경우 실험 전, 후의 혈당, 인슐린 및 HOMA-IR, fructosamine, 당화헤모글로빈 농도 사이에 유의적인 차이가 없었다. 이는 마름이 α-glucosidase 저해활성을 나타내어, 장기적으로 인슐린 요구도를 감소시키게 되어 혈당 조절효과를 나타낸 것으로 사료된다.

Table 19. Glycemic control of TJF and control groups

	TJF group			Control group		
	Pre	Post	Difference <sup>1</sup>	Pre	Post	Difference
Plasma glucose (mg/dL)	142.2±10.2	126.3±10.5	-15.9±7.0 <sup>***4</sup>	143.6±13.8	141.4±14.4	-2.2±7.7
Plasma insulin (μU/mL)	12.5±2.5	10.4±3.1	-2.1±1.8 <sup>*2</sup>	13.2±1.9	12.9±2.3	-0.3±1.8
HOMA-IR	4.4±1.1	3.3±1.1	-1.1±0.6 <sup>**3</sup>	4.7±0.7	4.5±1.1	-0.1±0.7
Plasma fructosamine (μmol/L)	365.1±27.9	340.5±26.3	-24.6±28.7 <sup>*</sup>	365.2±33.1	361.7±29.4	-3.5±11.6
HbA <sub>1c</sub> (%)	7.6±0.8	7.1±0.6	-0.5±0.1 <sup>*</sup>	7.7±0.7	7.6±0.7	-0.1±0.3

<sup>1</sup>Difference between Pre and Post measurement

<sup>2</sup>Differences of TJF group and control group are significantly different at p<0.05.

<sup>3</sup>Differences are significantly different at p<0.01.

<sup>4</sup>Differences are significantly different at p<0.001.

**라) 포도당 부하시 혈당 조절효과**

장기간의 마름 선식섭취가 포도당 부하시 혈당 및 인슐린 농도에 미치는 영향을 Table 20에 나타내었다. 마름군에 있어서, 포도당 부하 120분의 혈당 증가치는 실험 전에 비하여 실험 종료 후 유의적으로 감소하였으나 (-12.8±9.7 mg/dL, (p<0.05), 대조군에서는 차이가 없었다. 포도당 부하 120분의 인슐린 농도 증가치 또한 마름군에 있어서 실험 전에 비하여 실험 종료 후 유의적으로 감소하였으나(-2.7±2.0 μU/mL, p<0.05), 대조군에서는 차이가 없었다. 이는 **마름의 장기간 섭취로 인해 인슐린 저항성이 개선되어 내당능이 개선** 된 것으로 사료된다. 당뇨병자에 있어서 공복혈당의 조절 뿐 아니라 식후 고혈당의 조절은 **당뇨합병증의 개선**에 있어서 매우 중요한 것으로 알려져 있으므로, 마름의 섭취로 인한 내당능의 개선은 당뇨병 증의 예방과 개선에 기여할 것으로 사료된다.

**Table 20. Postprandial glucose and insulin responses of TJF and control groups**

	TJF group			Control group		
	Pre	Post	Difference <sup>1</sup>	Pre	Post	Difference
▲ Glucose <sup>2</sup> (mg/dL)	119.0±30.6	106.2±36.9	-12.8±9.7* <sup>4</sup>	116.6±30.6	115.1±26.2	-0.2±2.9
▲ Insulin <sup>3</sup> (μU/mL)	10.8±5.1	8.1±3.7	-2.7±2.0*	10.6±5.5	10.4±7.4	-0.2±2.9

<sup>1</sup>Difference between Pre and Post measurement

<sup>2</sup>Incremental plasma glucose 120 min after ingestion of 75g glucose

<sup>3</sup>Incremental plasma insulin 120 min after ingestion of 75g glucose

<sup>4</sup>Differences of TJF group and control group are significantly different at p<0.05.

#### 마) 지질대사 개선효과

마름의 장기 복용이 혈장 지질 profile에 미치는 영향을 Table 21에 나타내었다. 마름군에 있어서 마름제품 섭취 전의 **공복 혈청 콜레스테롤 농도**는 213.9±32.2 mg/dL이었으며, 3개월 동안 마름제품을 섭취한 후 유의적으로 감소하여 202.8±35.0 mg/dL로 나타났다(p<0.05). 마름군에 있어서 마름섭취 전의 **혈청 중성지방 농도**는 204.5±73.8 mg/dL이었으며, 3개월 동안의 실험기간 후 192.2±70.4 mg/dL로 **유의적으로 감소되었다**(p<0.05). 대조군의 경우 실험 전, 후의 중성지방, 총콜레스테롤 농도 사이에 유의적인 차이가 없었다. 마름군과 대조군 모두 HDL-콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도는 실험기간 전, 후에 유의적인 차이가 없었으나, 마름군의 경우 **동맥경화지수** (Triglycerides/HDL-Cholesterol)가 실험 전(5.11±1.67)에 비해 실험 후에 (4.66±1.70) **유의적으로 감소하였다**(p<0.01). 마름군에 있어서 마름섭취 전의 **유리지방산(FFA) 농도**는 876±211 uEq/L이었으며, 3개월 동안의 실험기간 후 829±181 uEq/L로 **유의적으로 감소되었다**(p<0.05). 대조군의 경우 실험 전, 후의 유리지방산 농도 사이에 유의적인 차이가 없었다. 당뇨병자는 중성지방 농도가 증가하고 HDL-콜레스테롤이 감소하는 지질대사 이상이 일어난다. 인슐린저항성이 증가한 경우 지방조직에서 중성지방 합성을 방해하여 혈중 유리지방산 농도를 증가시킨다. 이러한 이상지혈증 (dyslipidemia)은 당뇨 합병증인 관상동맥 질환의 원인이 된다. 제2형 당뇨병 환자에게 마름제품을 3개월간 섭취시킨 경우, 중성지방과 콜레스테롤 농도를 감소시켰다. 마름의 섭취는 HDL-콜레스테롤 농도에는 유의적인 차이를 주지 않았으나, 당뇨병자의 심혈관계 합병증의 risk과 관련성이 큰 **동맥경**

화지수(Triglycerides/HDL-Cholesterol)를 유의적으로 감소시켰다. 따라서 마름의 장기간 섭취는 당뇨 합병증의 예방 및 개선 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

Table 21. Plasma lipid profile of TJF and control groups

	TJF group			Control group		
	Pre	Post	Difference <sup>1</sup>	Pre	Post	Difference
Plasma triglyceride (mg/dL)	204.5±73.8	192.2±70.4	-12.3±11.0 <sup>*3</sup>	201.4±67.9	198.7±66.7	-2.7±7.1
Total cholesterol (mg/dL)	213.9±32.2	202.8±35.0	-11.1±16.6 <sup>*</sup>	210.4±27.9	213.8±24.4	3.4±10.5
HDL-cholesterol (mg/dL)	41.7±5.9	43.0±6.1	1.4±3.0	42.8±8.7	42.4±8.6	-0.4±2.0
LDL-cholesterol (mg/dL)	128.2±25.3	120.9±23.6	-9.5±9.8	122.3±21.4	119.6±21.6	-2.7±9.3
Free fatty acid (uEq/L)	876±211	829±181	-47±50 <sup>*</sup>	864±233	8369±230	4±43
Atherogenic index <sup>2</sup>	5.11±1.67	4.66±1.70	-0.45±0.42 <sup>**4</sup>	4.96±2.26	4.99±2.42	0.03±0.27

<sup>1</sup>Difference between Pre and Post measurement

<sup>2</sup>Atherogenic index = Triglycerides/HDL-Cholesterol

<sup>3</sup>Differences of TJF group and control group are significantly different at p<0.05.

<sup>4</sup>Differences are significantly different at p<0.01.

#### 바) 간기능 및 신장기능 개선효과

마름 제품의 장기 복용은 간기능 지표인 GOT 및 GPT 활성화에는 유의적인 변화를 주지 않았으며(Table 22), 신장기능 지표인 BUN, creatinine 농도 역시 유의적인 차이가 없었다(Table 23).

Table 22. Plasma GOT and GPT activities of TJF and control groups

	TJF group			Control group		
	Pre	Post	Difference <sup>1</sup>	Pre	Post	Difference
GOT (IU/L)	28.1±5.9	30.5±5.5	2.4±4.1	30.7±4.4	31.0±4.7	0.3±4.7
GPT (IU/L)	23.5±7.7	24.4±6.0	0.9±4.3	24.3±8.4	25.3±4.5	1.0±5.7

Difference between Pre and Post measurement

Table 23. Plasma levels BUN and creatinine levels of TJF and control groups

	TJF group			Control group		
	Pre	Post	Difference <sup>1</sup>	Pre	Post	Difference
BUN (mg/dL)	16.4±3.0	15.9±3.5	-0.5±1.6	17.9±3.9	16.3±5.5	-1.6±5.7
Creatinine (mg/dL)	1.02±0.19	1.08±0.32	0.06±0.39	1.03±0.16	1.14±0.28	0.11±0.34

Difference between Pre and Post measurement

사) 지질 과산화 및 항산화 효소계 활성화에 미치는 영향

마름군의 마름 섭취 전의 혈장 TBARS 함량은 3.72±1.22 μmol MDA/L이었으나, 실험기간 후 3.29±1.19 μmol MDA/L로 유의적으로 감소하였다 (Table 24, p<0.05). 마름추출물은 in vitro에서 강한 항산화 활성을 나타내었으며, in vivo에서도 이러한 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 적혈구 conjugated diene 함량은 마름군과 대조군 모두 실험기간 전, 후에 유의적인 차이가 없었다. 마름군의 마름 섭취 전의 적혈구 SOD 활성은 2.02±0.39 IU/mgHb이었으나, 실험기간 후 2.14±0.43 IU/mgHb로 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 적혈구의 catalase 활성과 glutathione peroxidase 활성은 마름군과 대조군 모두 실험기간 전, 후에 유의적인 차이가 없었다. 당뇨병자에 있어서 지질과산화는 당뇨합병증을 유발하는 주요 인자이므로, 마름의 장기간 섭취로 인한 지질 과산화물의 감소와 SOD 활성 증가는 당뇨 합병증의 예방 및 치료 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

Table 24. Antioxidantive the activity of TJF and control groups

	TJF group			Control group		
	Pre	Post	Difference <sup>1</sup>	Pre	Post	Difference
TBARS ( $\mu\text{mol MDA/L}$ )	3.72 $\pm$ 0.41	3.29 $\pm$ 0.34	-0.43 $\pm$ 0.11 <sup>*2</sup>	3.60 $\pm$ 0.33	3.54 $\pm$ 0.30	-0.06 $\pm$ 0.13
Conjugated diene( $\mu\text{M}$ )	10.3 $\pm$ 1.1	8.2 $\pm$ 0.7	-1.1 $\pm$ 0.5	9.8 $\pm$ 0.9	9.1 $\pm$ 0.6	-0.7 $\pm$ 0.5
SOD (IU/mgHb)	2.02 $\pm$ 0.13	2.14 $\pm$ 0.14	0.12 $\pm$ 0.04 <sup>*</sup>	1.99 $\pm$ 0.10	2.01 $\pm$ 0.10	0.02 $\pm$ 0.02
Catalase (K/gHb)	147.8 $\pm$ 7.0	159.7 $\pm$ 6.8	11.9 $\pm$ 5.7	139.9 $\pm$ 6.4	154.1 $\pm$ 7.4	14.2 $\pm$ 5.8
GSH-px (IU/gHb)	29.3 $\pm$ 10.0	33.1 $\pm$ 7.4	3.8 $\pm$ 10.6	32.3 $\pm$ 8.9	34.1 $\pm$ 8.6	1.8 $\pm$ 10.3

<sup>1</sup>Difference between Pre and Post measurement

<sup>2</sup>Differences of TJF group and control group are significantly different at p<0.05.

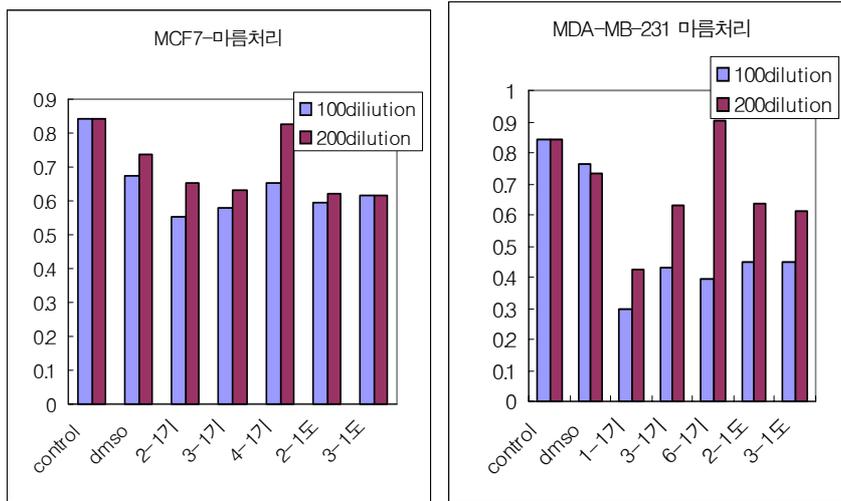
### 3. 마름의 항암효과

#### 가. 암 세포주에서의 항암효능 스크리닝

##### 1) 암 세포 살해능력 검증

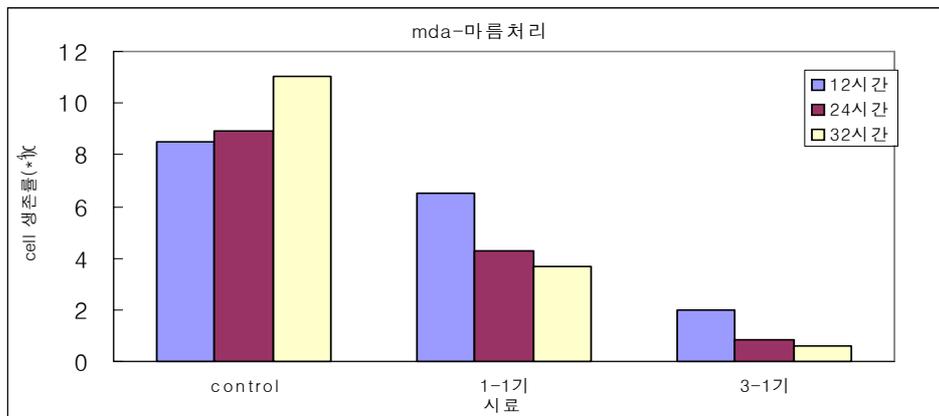
##### 가) MTT assay를 통한 IC<sub>50</sub> 농도 결정

암 세포주들에서 마름 추출물의 임의의 농도로 처리하여 항암 세포 활성을 스크리닝하여 항암 효능이 유효한 추출물 분획을 선발하였고 향후 연구를 위한 처리조건 및 IC<sub>50</sub>농도를 결정하였다. 24시간 처리시 IC<sub>50</sub>에 근접한 수치를 보이므로 24시간을 처리 기준으로 하였고, 물추출물(1-1기) 및 70% 에탄올 추출물(3-1기)을 후보 분획으로 삼았다(Fig. 18, 19).



A) B)

**Fig. 18. Screening of anticancer effects of various effects of various extracts from *Trapa japonica* Flerov. on cancer cell lines. (A) MCF-7 breast cancer cell line (B) MDA-MB-231 breast cancer cell line. 1-1(water, Market A), 2-1(methanol, Market A), 3-1(70% ethanol, Market A), 4-1(acetone, Market A), 5-1(isopropyl alcohol, Market A), 6-1(ether, Market A), 1-1(water, Market B), 2-1(methanol, Market B), 3-1(70% ethanol, Market B)**



**Fig. 19. Cytotoxic effects of *Trapa japonica* Flerov. extracts on cancer cells with different time interval determined by MTT assay. mda; (MDA-MB-231), 1-1(water, market A), 3-1(70% ethanol, Market A)**

나) 세포독성의 형태학적 관찰

MTT assay로 결정된  $IC_{50}$  농도 및 처리조건으로(24시간 처리) 마름 추출물을 암 세포주에 처리 하였을때 암 세포수의 감소, 암 세포 형태의 변화 및 배지 접시에의 부착력(adherence)감소를 보여서 현저한 항암 효능을 확인 하였다(Fig. 20, 21).

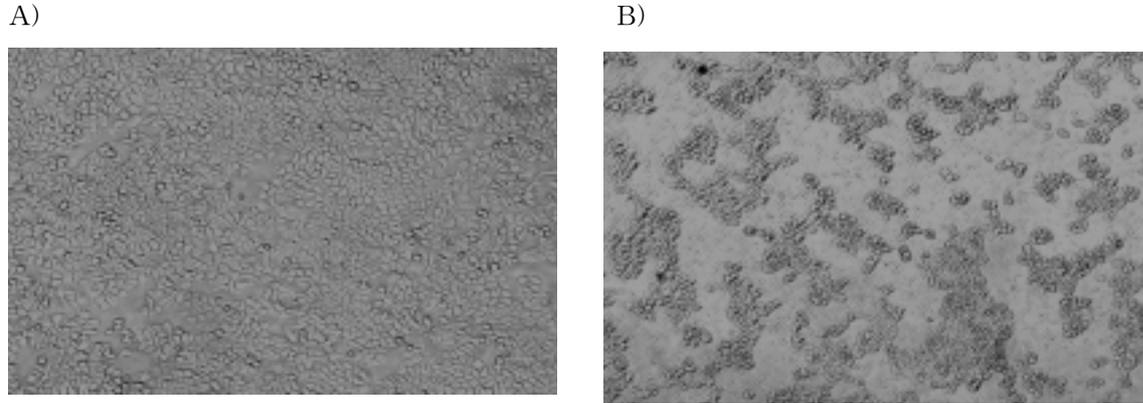


Fig. 20. Cytotoxic effects by *Trapa japonica* Flerov. extract on MCF-7 cells determined by MTT assay. A) control, B) Treatment of *Trapa japonica* Flerov. extract (3-1) .

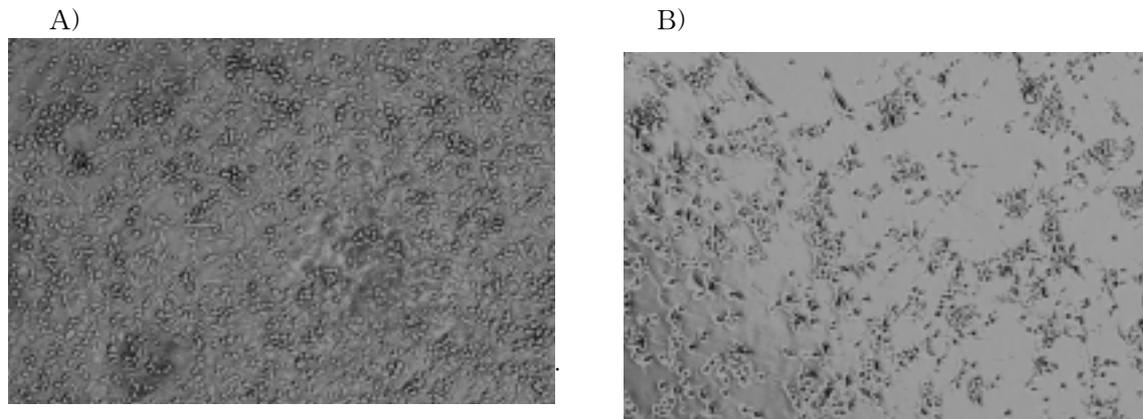


Fig. 21. Cytotoxic effects by *Trapa japonica* Flerov. extract on MDA-MD-231 cells determined by MTT assay. A) control, B) Treatment of *Trapa japonica* Flerov. extract (3-1)

다) Flow cytometry 분석을 통한 apoptosis 및 세포주기 분석

MCF-7세포에서 마름 추출물의 항암 효능 기작을 규명하기 위하여 flow cytometry 분석을 시행하였다. 마름 hexane분획을 36시간 처리(5 µl/ml)하였을 때 비 처리군과 비교하여 현저한 subG1기 분획의 증가가 관찰되어 apoptosis가 일어났음을 시사하였다(Fig. 22). Table 25에 마름 처리에 의하여 일어난 세포주기 분획 변화를 나타내었다. G1(subG1포함)기는 45.7%에서 94.1%로 현저히 늘어났고, 반면 S기 43.1%에서 2.88%로 감소하여 현저한 성장 억제가 일어났음을 보여주고 있다.

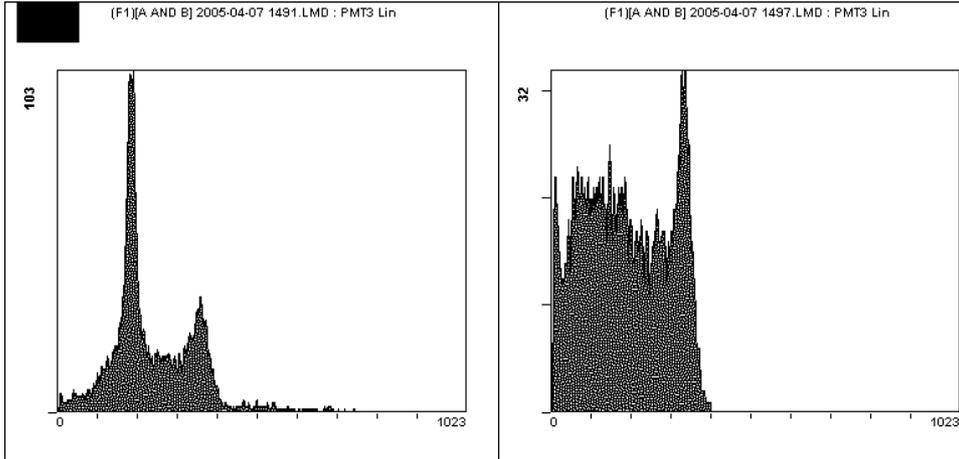


Fig. 22. Flow cytometric analysis of MCF-7 cells.  
Control(left), *Trapa japonica* Flerov.-treated(right)

Table 25. Cell cycle analysis of MCF-7 cells with *Trapa japonica* Flerov. treatment

Phase	Control (%)	<i>Trapa japonica</i> Flerov.-treated (%)
G1(subG1포함)	45.7	94.1
G2	11.3	3.06
S	43.1	2.88

나. 기존 항암약제와의 synergy 효과 분석

1) 최근 암치료에 2가지 이상의 약제를 혼합 사용하여 치료 성적 상승효과 (synergy)를 얻고 각 약물의 부작용의 중복을 피하여 치명적인 부작용의 발생을 막는 치료법을 사용하고 있다. 이에 따라 현재 임상에서 많이 사용되는 항암 약제들과의 병용 투여 하였을 때 상승효과(synergy)가 있는지 조사 하였다. 사용된 기존 항암 약제들로는 Taxol, cisplatin, adriamycin 등 이었으며 마름 추출물은 물추출물(1-1기), 70% 에탄올추출물(3-1기)을 이들 약제와 함께 24 시간 배양하였다.(Fig. 23) MDA-MB-231세포주에서는 1-1분획은 cisplatin과, 3-1분획은 taxol 및 cisplatin과 상승 효과를 보였다. MCF-7세포에서는 1-1분획이 단독 사용시에 비하여 탁월한 synergy 효과를 보였다. MCF-7세포에서 단독 사용 시 우수한 항암 활성을 보였던 3-1은 synergy 효과를 보여주지 못하였다.

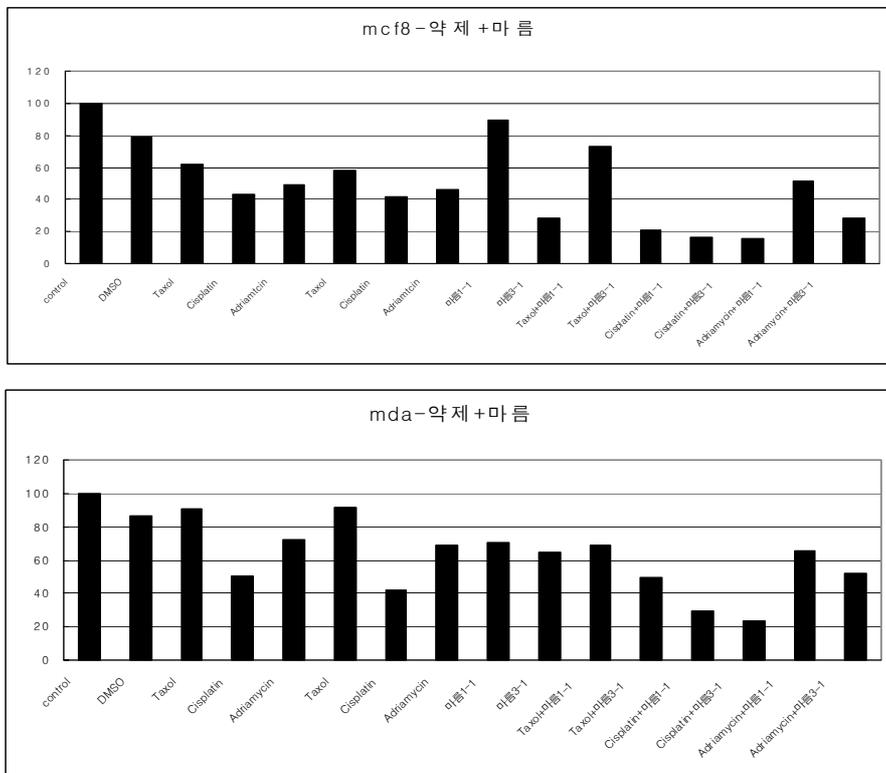
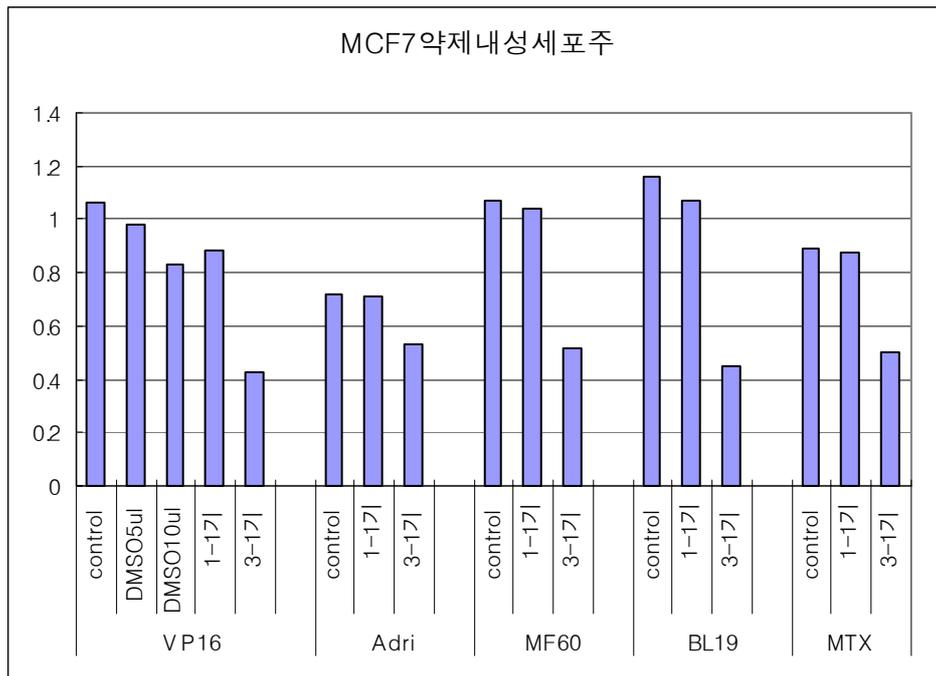


Fig. 23. Synergy evaluation with extract of *Trapa japonica* Flerov. and conventional anticancer drugs determined by MTT assay. MCF-7 breast cancer cell line (mcf8), MDA-MB-231breast cancer cell line (mda)

2) 항암약제 내성 세포주에서의 스크리닝

항암 약제에 내성을 가진 유방암 세포주 5종에 항암 활성이 검증된 분획 1-1기 및 3-1기를 24시간 처리하여 항암 활성을 MTT법으로 측정 하였다. (Fig. 24)

약제내성 세포주에서는 3-1기 분획이 가장 우수한 항암 활성을 보여서 향후 진행성 암 환자 치료 약제 개발에 가장 유망한 분획으로 보인다. Adriamycin 내성 세포에 대하여는 기존의 다른 항암제들과 마찬가지로 특별한 효능을 보이지 못하였는데 이는 adriamycin이 항암 약제내성의 각 약제를 두루 포함하는 다제 약제 내성(multidrug resistance)를 유도하기 때문인 것으로 보인다.



**Fig. 24. Cytotoxic effects by *Trapa japonica* Flerov. extract on drug-resistant breast cancer cells determined by MTT assay.** MCF-7 breast cancer cell line(parent cells), VP-16; VP-16-resistant cells, Adri;Adriamycin-resistant cells, MF60; mitoxantrone-resistant cells, BL19; bleomycin-resistant cells, MTx; methotrexate-resistant cells, 1-1(water, market A), 3-1(70% ethanol, Market A)

## 다. 프로티옴 연구를 통한 효능 관련 목적 단백질 동정

### 1) 프로티옴 분석

본 연구에서는 마름 추출물 처리에 따른 effect associated target molecule을 찾아서 추출물의 작용기작을 밝히는 기반 연구로 삼고자 하여 프로티옴 연구를 통하여 암 세포에서의 단백질 발현을 조사 하였다. 스크리닝을 위한 기초 연구로 마름 분획추출물의 항암활성 조사에 사용되는 암 세포주의 하나인 MCF-7세포에서 표준 reference protein map을 작성 하였고 HeLa세포에서 마름 처리 후 변화하는 단백질들을 동정 하였다. 대표예인 peroxiredoxin 2의 peptide peak는 다음과 같다(Fig. 25, 26). 여기서 동정된 단백질들은 마름의 작용기전 연구에 기반이 되는 자료들인데 본 연구에서는 메카니즘 분석에 본 peroxiredoxin 2의 역할에 대하여 조사하였다.

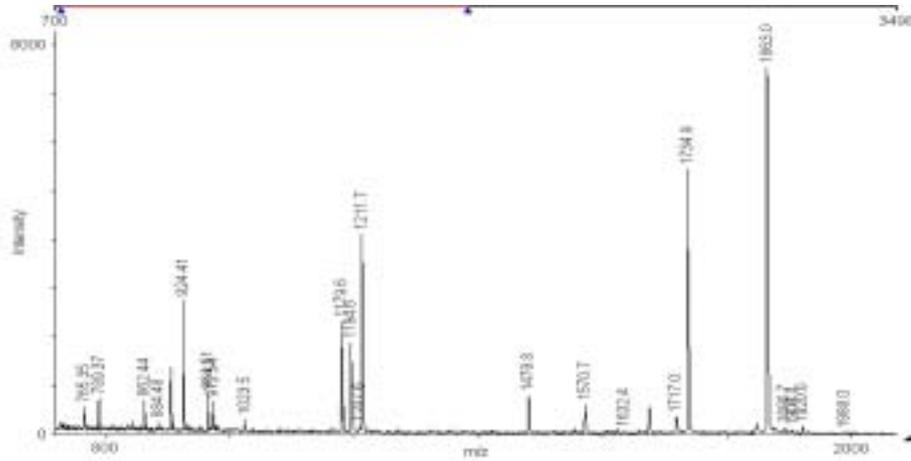
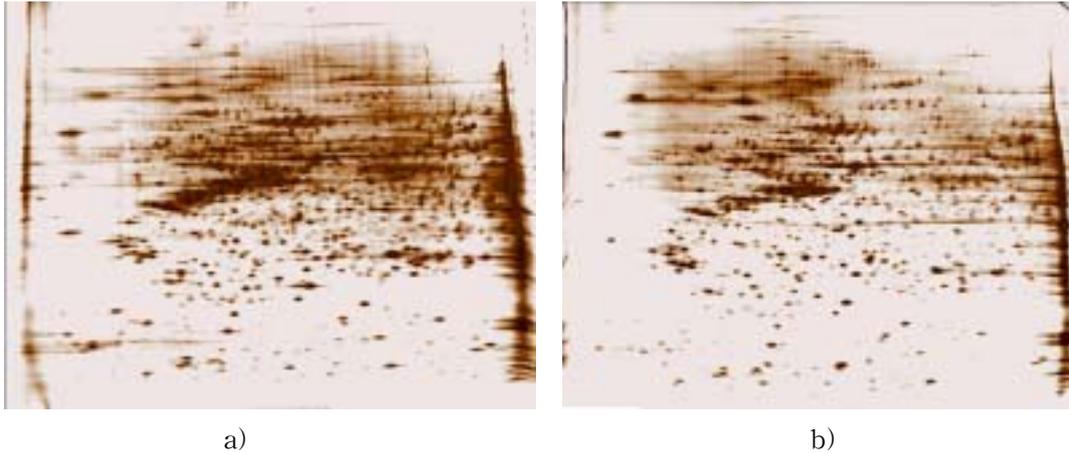


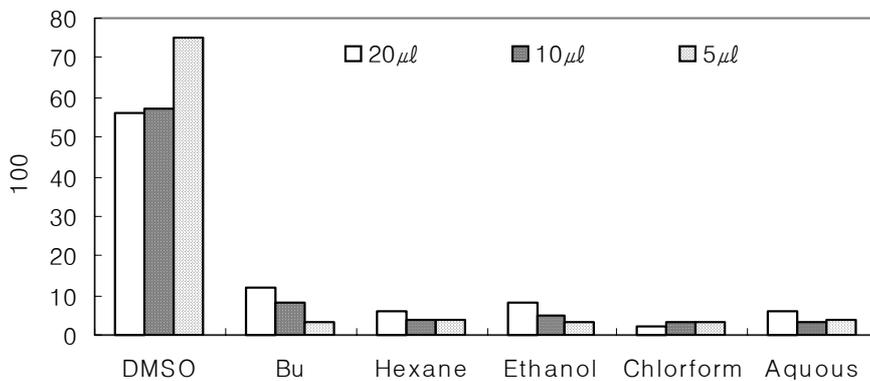
Fig. 25. Peptide mass peak of isolated peroxiredoxin 2



**Fig. 26. Two-dimensional electrophoresis of HeLa cells with *Trapa japonica* Flerov.** a) control, b) treatment with *Trapa japonica* Flerov.(24hr) (Increase: vimentin, cytokeratin 19, glutathion S-transferase, Decrease: cathepsin D)

**라. 마름 추출물 용매 획분의 항암 활성 검증**

36시간 배양 후 현미경하 관찰한 결과 각 시료 처리 군들에서는 현저한 암 세포 살해 경향을 보였다. 시료 처리 농도별로 큰 차이를 보이지 않았으며 최소 농도인 5 $\mu$ l/mL 혹은 그이하의 농도에서도 충분한 암 세포 살해 능력을 가지고 있음을 보여주었다(Fig. 27, 28). 본 연구결과에 따라 가장 우수한 항암 효과를 보여주고 있는 hexane 분획을 선택하여 동물 모델에서의 항암 효과 검증에 이용하였다.



**Fig. 27. Anti-cancer effect of solvent fractions of *Trapa japonica* Flerov. in MCF-7 cell measured by MTT assay.**

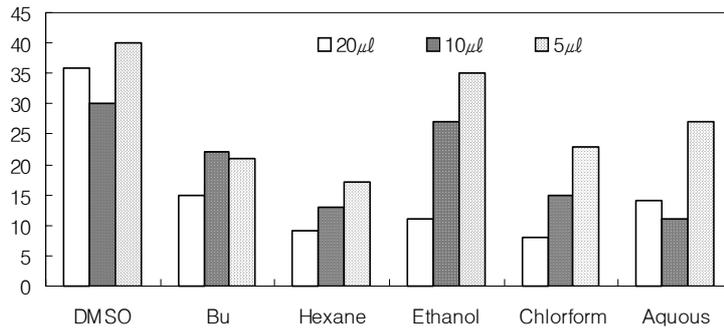


Fig. 28. Anti-cancer effect of solvent fractions of *Trapa japonica* Flerov. in S-180 cell measured by trypan blue dye exclusion.

마. 동물 모델에서의 in vivo 효능 분석

1) ICR마우스에서 복강암 발생 유도

S-180 세포의 복강내 주입이 이루어진 대부분의 마우스에서 주입 1주째 복수가 발생하였고 2주째까지 대부분의 마우스에서 대량 복수가 발생하였으며 평균 무게는 35.2 g을 나타내어 성공적인 복수암 발생 유도 경향을 보였다.

복수암 발생 후의 초기 실험에서 악성 복수의 형태를 동반한 복수암 마우스에 있어서 대조군의 평균 생존 기간은  $16.3 \pm 0.8$ 일로 나타났으며, 마름 hexane 분획 투여군의 평균 생존기간은  $35.1 \pm 1.1$ 일로 유의적으로 길게 나타났다(Fig. 29). 마름 hexane 획분 투여군의 복수량 감소 정도는  $3.2 \pm 1.2$  g으로 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 마름 hexane추출물은 복강암 마우스에서 생존기간을 2배 정도 연장하는 항암 효과가 있음을 나타내었다.

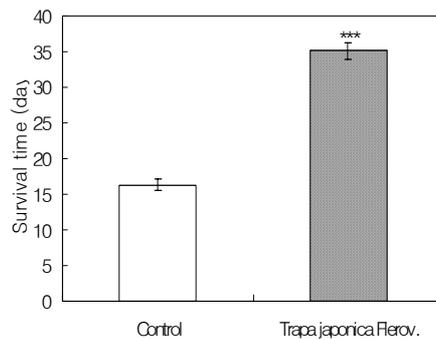


Fig. 29. Survival days of tumor bearing mice treated with *Trapa japonica* extract (right) compared with control solution(left).

마. 유효 성분 투여에 따른 항암 효능 확인 및 효능 규명을 위한 분자 생물학적 연구

1) 항암 효능 관련 단백질 분석

Western blot상에서 종양억제단백질인 retinoblastoma protein(RB)은 마름 추출물 처리에 의하여 단백질양이 줄면서 탈 인산화된 형(dephosphorylated form)이 증가하는 것을 보여주었다(Fig. 30). 따라서 탈 인산화된 RB가 세포주기고착, 세포사 등에 관여함을 고려하면 마름의 항암 효과에 본 단백질도 항암 효능에 역할을 담당함을 시사한다. RB의 partner인 cyclin D1은 마름 추출물 처리에 의하여 감소하였는데 cyclin D1이 암 세포 증식에 관여함을 고려할 때 이것 역시 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. Cdk4는 cyclin D1을 substrate로 하는 인산화 효소인데 본 조건에서는 변화가 없어서 주 효소는 변화가 없고 substrate의 발현만으로 조절하는 것으로 보인다. 이 결과들은 flow cytometry연구 결과인 마름의 항암 효과는 세포주기 중 G1에서 S기로의 이행을 억제하는 것에 의한다는 것과 일치하고 그 억제 기능을 RB탈인산화 및 cyclin D1감소에 의해서 발생함을 보여 주었다. 본 자료는 후술하는 peroxiredoxin의 역할과 연계되어 본 연구를 통하여 밝혀낸 중요한 작용기작의 하나이다. 또한 이런 기작은 기존 항암 화학요법제의 작용 기작과 유사함을 보이는데 향후 마름 추출물로부터 항암 화학요법제를 개발할 수 있는 기초자료로 제시하였다.

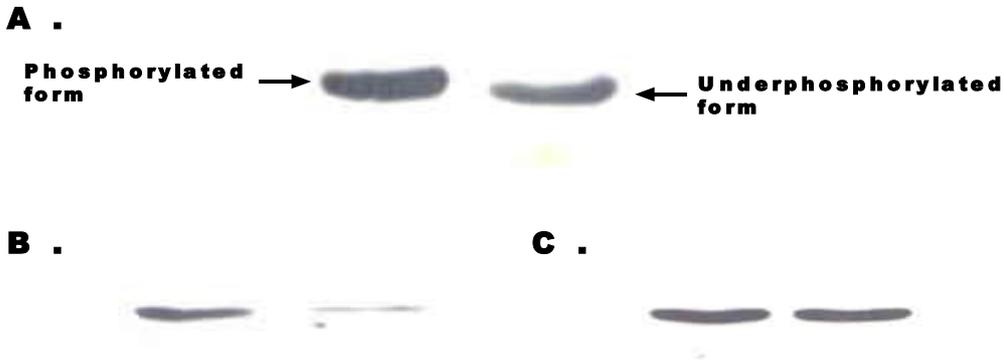
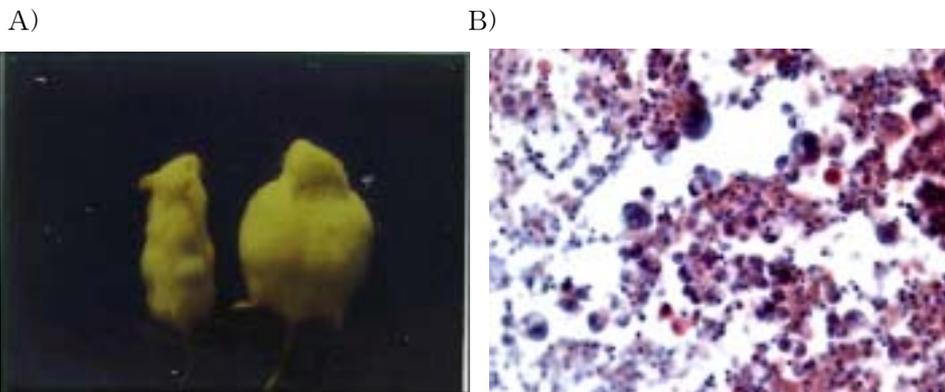


Fig. 30. Western blot analysis of retinoblastoma (A), cyclin D1(B), cdk4 (C) proteins. control(left), *Trapa japonica* Flerov-treated(right).

## 사. 개발된 소재의 항암 효능 확인 및 기전 규명

### 1) 발암 동물모델 수립

본 실험에서는 복강 내 접종한 ICR 마우스 중 접종 2주 후에 27마리 중 19마리에서 복수가 성공적으로 형성되었으며(Fig. 31-a), 6마리는 2차 접종 후 생겼으며 2마리는 복수 생성 실패로 실험에서 제외하였다. 복수 생성 마우스에서 복수 검사 결과 채취된 복수 내에서 암 세포들이 성공적으로 증식됨을 확인하였다(Fig. 31-b). 복수암은 인간에서 소화기암에 병발되어 흔하게 발생하므로 향후의 인체 투여 모델 개발에도 좀더 유리할 것으로 사료된다. 대상동물의 암화(tumor development)율이 높고 암에 의한 사망률도 편차가 적어서 향후 유사연구에는 본 동물 모델이 유리할 것으로 사료된다. 암화 발생에서 S-180 세포를 체외에서만 계대 배양 후 직접 접종하는 방법은 암화 성공률이 낮고 마우스 복강 내에 이차 배양하여 활성화 시킨 후에 접종하는 것이 암화 성공률이 높음을 알 수 있었다.



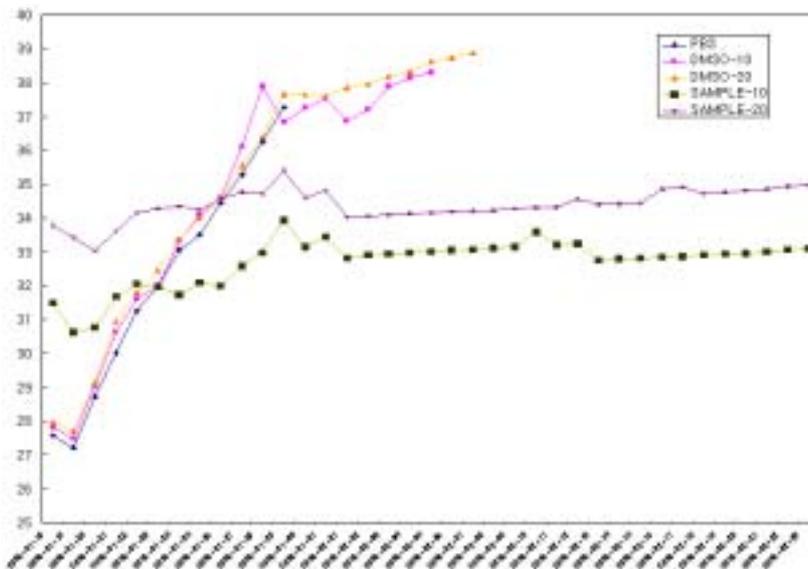
**Fig. 31. a) Development of tumor bearing mouse.** S-180 cells were inoculated into peritoneal space of the mouse. Ascites was developed after 2 weeks. **b) Cytology of asites.** It shows that malignant cells were clustered and it verifies a successful development of cancer in the mouse peritoneum.

### 2) 동물모델계에서 항암 소재의 효능확인

본 연구에서의 결과는 마름 추출물은 마우스에서 복수 생성 억제 및 생존 기간 연장 등으로 상당한 암 억제 효과를 보였다. 복수 억제 효과는 마름 추출물 투여 마우스에서의 마우스 무게가 마름 투여 후 거의 늘지 않아서 대부

분 33-35g에 머물렀으나 마름을 투여 하지 않은 마우스에서는 대부분 계속 증가하여 56-58g에 이르렀고 모두 조기 폐사하여 본 실험 조건에서는 현저한 항암 효능을 보여주었다(Fig. 32). 생존 기간 면에서도 암화동물의 대조군(saline, DMSO만 투여군)은 11-21일에 걸쳐 있으나, 마름 투여군의 평균 생존기간은 최장 36일로 현저히 길게 나타났다(Fig. 33).

이 결과들은 본 실험에 사용된 **마름 추출물이 큰 부작용 없이 마우스 암의 치료 효과를 기대할 수 있음을 시사한다.** 항암 약제로 성공 하기 위해서는 항암 효과 이외에 host에 심각한 부작용이 발생하지 않아야 하는데 본 연구 결과는 향후 인체 실험에 좋은 기반 자료가 될 것으로 보인다. 본 실험에서는 모든 마우스가 결국은 폐사 하였는데 이점은 마름 추출물이 항암효능은 있으나 완치에까지 이를 정도로 강력하지는 않을 수도 있음을 시사한다. 이 결과로 보면 본 실험조건에서는 마름이 cytostatic한 계열의 항암약제에 속할 가능성을 시사한다. 그러나 본 실험에서의 결과로 아직 일반화 할 수는 없고 향후 좀 더 광범위한 조건에서의 스크리닝이 필요하다. 현재 인간에 사용되는 항암약제의 효과율이 대개 20%전후에 머물고 있고 인간 복수암의 경우 난치성으로 완치되는 예가 거의 없는 점 등으로 유추해 보면 마름 추출물은 복강내 전이된 난치성 암에 상당한 항암 효능을 가지고 있다고 할 수 있다.



**Fig. 32. Anti-tumor efficacy of *Trapa japonica* Flerov. extract in tumor bearing mice.** Significant antitumor effects determined by mouse weight were noted in the *Trapa japonica* extract treated groups (sample-10, sample-20). x-axis shows survival days and y-axis shows mouse weight(g).

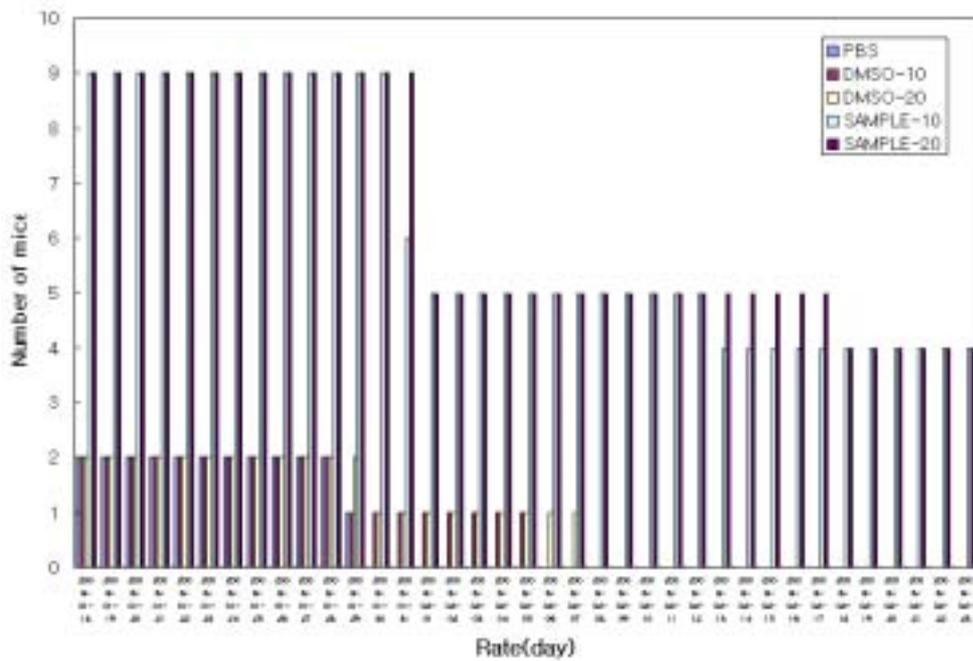


Fig. 33. Effect of *Trapa japonica* Flerov. extract on life span of tumor bearing mice. Significant antitumor effects determined by survival day were noted in the *Trapa japonica* extract treated group (sample-10, sample-20). X-axis shows survival days and y-axis shows numbers of mice alive.

아. 분자생물학적 연구를 통한 작용 메카니즘 연구

1) 항산화 역할 연구: theoredoxin계 역할 규명

Thioredoxin계 항산화효소계는 세포내의 여러 단백질을 산화 등의 스트레스로부터 보호하는 chaperon 단백질로서의 역할이 알려져 있어 최근에 주목을 받고 있는 단백질이다. Thioredoxin(peroxiredoxin)계 항산화효소계가 마름 처리에 의하여 변화를 일으킴을 프로티움 분석 등을 통하여 밝힌 바 있다. 본 peroxiredoxin 효소계는 암 세포에서의 역할은 전혀 밝혀진 바가 없어서 효소의 발현이 마름의 항암 효능에 어떤 기작을 통하여 영향을 미치는지 알 수 없었다. 본 효소계는 전통적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리에 의하여 유도되어 활성 산소 등을 제거하는 항산화 기능을 한다고 이전에 여러 연구를 통하여 알려져 있었다. 본 연구에서는 마름을 처리하고 활성 산소 제거 능력을 peroxidase활성을 NADPH의 산화도를 340nm 흡광도를 측정하여 분석조사 하였으나 거의 유도되지 않아서 본 효소계는 다른 약제에서와는 달리 본 연구조건에서는 전통적인 항산화제로서는 역할을 하지 않는 것으로 보인다.

## 2) Stable transfectant를 이용한 theoredoxin 산화 효소계의 역할 규명

Peroxiredoxin 항산화효소가 활성화된 HeLa-prx는 parent cell인 HeLa에 비하여 peroxiredoxin의 발현이 증가되었음을 확인 하였으며, 마름 추출물 처리 시 HeLa-prx세포에서는 HeLa parent cell에서 비하여 약 24-48시간 사이에 암 세포 살해능력(cytotoxicity)이 감소된 경향을 보였다(Fig. 34). 48시간 이후는 양 세포군 사이에 차이가 없이 거의 동시에 세포들이 접착력을 잃고 사멸하여 본 효소는 사멸의 마지막 단계에서는 특별한 역할을 하지 않는 것으로 보인다. 이 결과는 peroxiredoxin효소가 마름 등의 항암 물질의 공격으로부터 일정 기간에 세포를 외부 스트레스로부터 보호 할 수 있음을 시사한다. 인간에서 항암 치료 시 많은 경우에 항암약제에 내성이 발생하여 결국은 치료에 실패하게 된다. Peroxiredoxin 효소의 발현은 이러한 내성 획득에 관여 할 것으로 보이고 이 효소의 발현조절은 향후 항암 치료법 개발에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

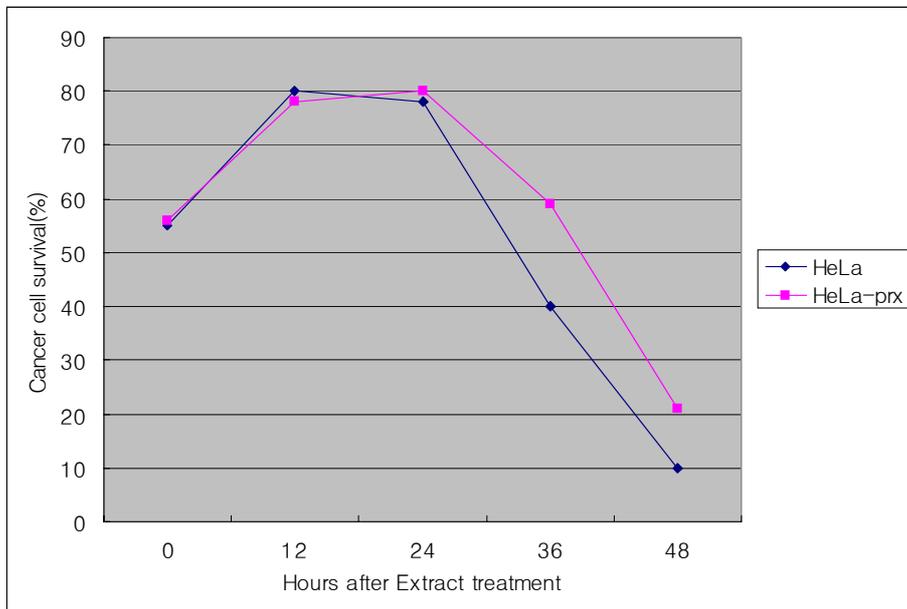


Fig. 34. Cytotoxicity assessed by MTT assay with treatment of *Trapa japonica* Flerov extract. HeLa: parent cell, HeLa-prx: stable transfectant

## 3) Western blot을 이용한 관련 단백질들의 발현 및 조절 기작 규명

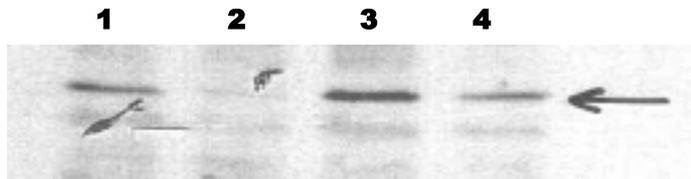
Chaperon 단백질은 단백질 분해를 통하여 각종 세포내 단백질 발현을 조절하고 이를 통하여 각종 세포내 현상 조절에 관여한다. 마름의 암 세포에서의 항암 효능은 여러 복잡한 단백질의 생리 활성 변화를 동반할 것이라는 것은 명

백하브로 효과에 연관된 단백질들의 발현 양상을 조사 하고 chaperon 단백질로서 Peroxiredoxin의 역할을 조사 하였다.

**가) Peroxiredoxin의 cyclin D1에 대한 chaperon 단백질로서의 역할 규명**

Peroxiredoxin의 cyclin D1에 대한 역할을 규명하기 위하여 HeLa와 HeLa-prx 세포에서의 cyclin D1의 발현을 비교한 결과, 양 세포군에서 모두 단백질 양이 감소는 되었으나 HeLa-prx에서는 cyclin D1의 감소 경향이 작았다(Fig. 35).

Cyclin D1은 암 세포 성장에 매우 중요한 역할을 하는 proto-oncogene으로 (Musgrove EA등) 유방암 세포에서 마름 처리에 의하여 발현이 감소됨을 보고 한바 있는데 본 연구의 HeLa 세포에서도 마름 처리에 의하여 단백질 발현이 감소되었다.



**Fig. 35. Cyclin D1 protein expressions in HeLa cells.**

Lane 1;HeLa, 2;HeLa+*Trapa japonica* Florov.(TJF) extract, 3;HeLa-prx, 4;HeLa-prx +TJF extract

이 결과는 마름 추출물의 공격으로부터 살아남는 기작에 이 단백질을 이용하고 있음을 보여주고 있다. 즉 이 cyclin D1 proto-oncogene의 보존에 peroxiredoxin효소가 chaperon protein으로 역할을 하여 단백질 분해를 지연 시켜 단백질 수준을 유지하는 것으로 보인다.

마름 추출물에 의한 항암 효과 발생 시 암 세포에서 손상 단백질이 많아지면서 세포 사멸에 이를 것으로 보이는데 chaperon 단백질들의 발현이 증가되어 단백질 손상을 줄이면 항암 효능 감소로 이어지게 된다. 또한 손상된 단백질이 많은 경우 ubiquitination이 많이 일어난다.

나) HeLa 및 HeLa-prx 세포들에 있어서 단백질 분해시스템 규명

마름 추출물이 단백질 분해시스템(proteolytic system)에 미치는 영향을 규명하기 위해 각 세포군에서 ubiquitination의 차이를 조사한 결과는 다음과 같다.

HeLa-prx세포(Lane 5)에서는 parent cell(Lane 1)에 비하여 ubiquitination이 적게 일어나서 peroxiredoxin이 과발현된 HeLa-prx에서 마름 처리에 의한 단백질 손상이 적게 일어나고 있음을 보여주고 있다. 아울러 대표적인 항암제인 taxol을 처리하면 양군에서 ubiquitination이 증가하였으나 역시 HeLa-prx세포에서 ubiquitination이 감소된 경향을 보였다. Ubiquitination된 단백질은 결국 proteasome에서 단백질 분해가 일어나는데, proteasome inhibitor (MG-132) 처리에 의하여 ubiquitination이 양군에서 더욱 증가하여 마름에 의한 항암 효능은 단백질 분해와 연관되고 단백질 분해는 ubiquitin-proteasome system을 이용함을 확인 할 수 있었다(Fig. 36).

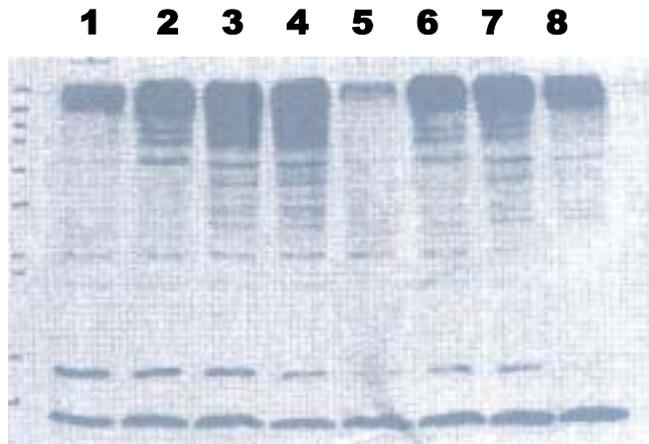
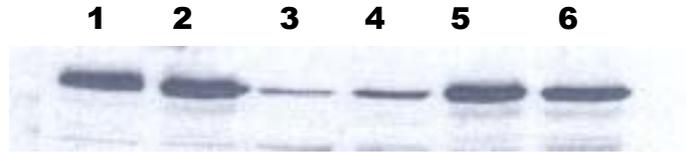


Fig. 36. Ubiquitinations in HeLa cells with *Trapa japonica* Flerov. taxol or MG-132. Lane 1;HeLa, 2;HeLa + TJF extract, 3;HeLa+taxol, 4;HeLa+MG-132, 5;HeLa-prx, 6;HeLa-prx + TJF extract, 7;HeLa-prx-taxol, 8;HeLa-prx +MG-132

다) HeLa 세포에 있어서 cdk4 단백질 발현

Cyclin D1의 중요한 파트너인 cdk4의 단백질 발현도 조사 하였는데 유방암 세포에서는 마름 처리에 의하여 변화가 없었으나 HeLa 세포에서는 이와는 달리 cdk4 단백질 발현이 감소하였고 peroxiredoxin 효소의 발현 유무에는

영향을 받지 않았다(Fig. 37). 이 결과는 마름에 의한 항암 효능의 기작이 각 암 세포에 따라 차이가 있음을 나타낸다.

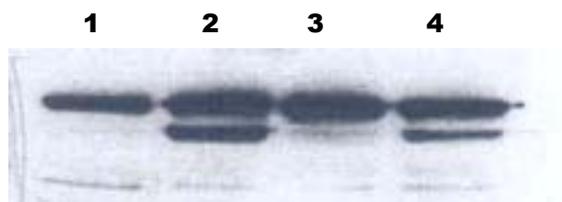


**Fig. 37. cdk4 protein expressions in HeLa cells.**

Lane 1;HeLa, 2;HeLa-prx, 3;HeLa+TJF extract, 4;HeLa-prx+TJF extract,  
5;HeLa+taxol, 6;HeLa-prx +taxol

#### 라) PARP 단백질 발현

마름의 항암 효능은 다른 항암 약제와 비슷하게 apoptosis를 통하여 세포 사멸을 유도하여 생긴다고 보고 flow cytometry 및 apoptosis의 최종 단계의 마커인 PARP의 발현 양상을 조사하였다. FACS에서는 마름 처리에 의하여 subG1의 분획이 현저히 증가하였고 PARP에 대한 western blot에서는 PARP의 활성형 조각이 검출되어 본 연구조건에서의 암 세포 살해 기작은 apoptosis를 통하여 일어남을 보였다. 역시 peroxiredoxin이 과발현된 HeLa-prx세포에서는 PARP fragment의 발현량이 적은 경향을 보였다. 이 결과는 세포 배양 중에 관찰된 현상- HeLa-prx cell은 parent cell에 비하여 마름 처리에 의하여 세포사멸이 적은 것-을 설명 할 수 있는 강력한 증거이다. Fig. 38에서 윗부분의 밴드는 intact PARP를 나타내고 apoptosis와는 관련이 없다. 아랫부분의 fragment(lane 2, 4)부분이 apoptosis에 관여한다.



**Fig 38. PARP protein expressions in HeLa cells.**

Lane 1;HeLa, 2;HeLa+TJF extract, 3;HeLa-prx, 4;HeLa-prx+TJF extract

자. 면역조직화학염색을 통한 목적 단백질의 *in vivo* 발현양상

암 세포에서 chaperon 단백질의 과다 발현을 확인하기 위하여 인체의 암 조직에서의 발현 정도를 immunohistochemistry로 측정한 결과는 Fig. 39에 나타내었다. 인체 유방암 조직에서의 발현예로 우측의 사진은 peroxiredoxin 효소의 강한 발현을 보여주는 전형적인 염색 예이다. 본 연구 결과는 유방암에서 항암제 사용 시 본 효소의 발현 유무에 따라 항암 효과가 달라 질수 있음을 시사한다.

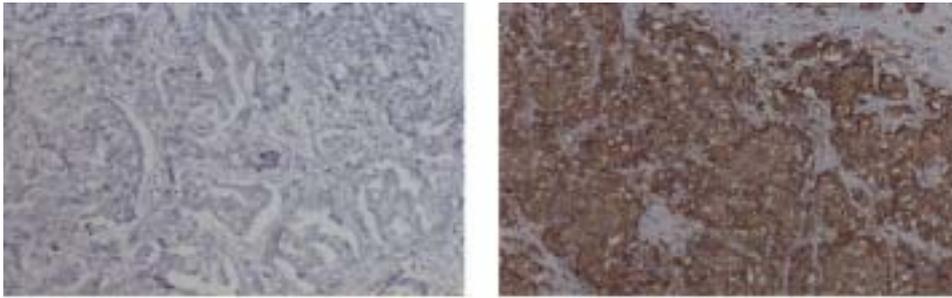


Fig. 39. Immunohistochemistry analysis in breast cancer tissue with rabbit polyclonal anti-peroxiredoxin 2 antibody.

4. 유효 생리활성 물질 분리·동정 및 특성

가. 마름 추출물의 각 분획별 수율

마름의 80% 에탄올 추출물의 수율은 8.3%였으며, 마름 80% 에탄올 추출물의 용매 회분별 수율은 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, aqueous 층이 각각 4.5%, 3.7%, 29.3%, 15.3%, 15.0%로 ethyl acetate 추출물의 수율이 가장 좋았다.

나. 마름추출물의 생리활성 측정

1) DPPH radical 소거활성

DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 517nm에서 강한 흡수 band를 보이나 phenolic화합물과 같이 수소에 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응을 하게 되면 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게

된다. 마름 80% 에탄올 추출물의 free radical 소거활성은 40.5%로 나타났으며, 표준품으로 사용한 L-ascorbic acid의 free radical 소거활성(48.1%)보다 다소 낮은 값을 나타내었다. 여러 가지 용매로 계통분획한 각 추출물의 free radical 소거활성을 비교해 본 결과, ethyl acetate 추출물이 61.5%로 가장 좋았으며, 그 다음으로 *n*-butanol 26.6% 순이었다(Table 26).

## 2) $\alpha$ -Glucosidase 저해활성

$\alpha$ -Glucosidase의 저해 활성이 높을 경우 장내에 존재하는  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 억제하여 전분을 섭취하였을 때 당뇨병 환자의 혈당량의 급격한 상승을 억제하는 효과를 기대할 수 있다. 마름 80% ethanol 추출물의  $\alpha$ -glucosidase 저해율은 92.2%였다(Table 26). 표준품으로 사용한 acarbose는  $\alpha$ -glucosidase를 37.3% 저해하였다. 계통분획한 각 추출물의 활성을 비교해 본 결과, ethyl acetate 추출물이 94.0%로 가장 좋았으며, 그 다음으로 *n*-butanol 82.6% 순이었다.

**Table 26. DPPH free radical scavenging activity and yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of the extracts from *Trapa japonica* Flerov.**

Samples	Free radical scavenging activity <sup>a)</sup> (%)	Yeast $\alpha$ -glucosidase Inhibitory activity <sup>b)</sup> (%)
80% ethanol extract	40.5	92.2
Hexane fraction	14.7	69.8
Chloroform fraction	10.5	73.3
Ethyl acetate fraction	61.5	94.0
Butanol fraction	26.6	82.6
Aqueous fraction	8.5	60.1
Ascorbic acid	48.1	
Acarbose		37.3

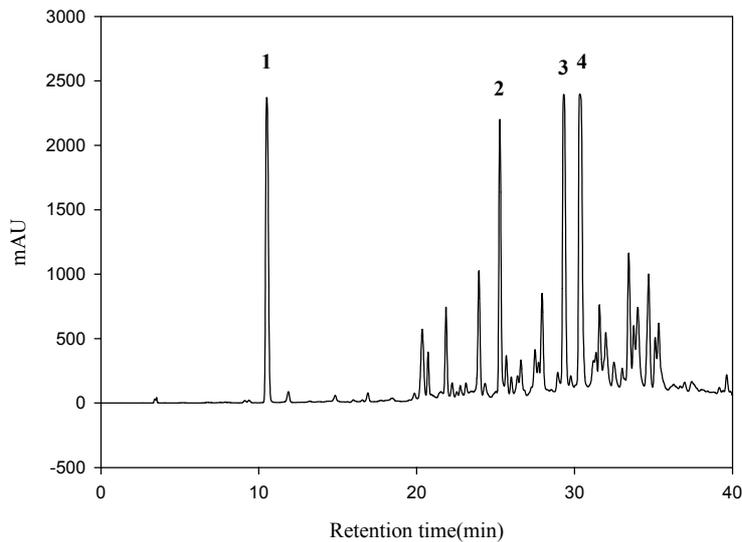
<sup>a)</sup>The activities were measured with the sample concentration of 0.2 mg/mL.

<sup>b)</sup>The activities were measured with the sample concentration of 0.1 mg/mL.

## 다. 마름으로부터 유효생리활성 물질의 정제

### 1) LH-20 column chromatography

마름으로부터 유효생리활성 물질을 분리하기 위하여 ethyl acetate 추출물을 LH-20 column chromatography로 1차 정제하였다. 먼저 ethyl acetate 추출물을 HPLC로 분석한 결과 생리활성이 있는 4개의 major peaks를 확인하였으며 (Fig. 40) 각 성분별로 순수분리하기 위하여 우선 LH-20 column chromatography로 1차 정제하였다. 용매로 50%-75%-100% methanol을 사용하여 분석한 결과 Fig. 41a와 같은 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 성분이 유사한 분획을 모아 Fraction I, II, III, IV로 명명하였고 이들의 생리활성을 측정하였다. DPPH radical 소거활성을 상대비교한 결과, Fraction I에서 가장 우수한 활성을 보였고 (Fig. 41b),  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 Fraction I과 III에서 가장 활성이 좋은 것을 알 수 있었다 (Fig. 42).



**Fig. 40.** HPLC analysis of ethyl acetate extract from *Trapa japonica* Flerov. Column, C<sub>18</sub> column; solvent A, water(0.05% TFA); solvent B, acetonitrile (0.05% TFA); and gradient, 0-30%B in 40min. **1**, gallic acid; **2**, trigalloylglucose; **3**, tellimagrandin II; and **4**, tetragalloylglucose.

## 2) Semi-preparative HPLC

LH-20 column chromatography로 얻은 4개의 Fraction을 순수 분리하기 위하여 semi-preparative HPLC로 2차 정제하였다. Fraction I은 6분, Fraction II는 8분, Fraction III는 11분, Fraction IV는 7분 전후에 나타나는 major peak를 순수하게 정제하였다 (Fig. 43).

## 3) Analytical HPLC

Semi-preparative HPLC로 정제한 성분들의 순도를 확인하기 위해 analytical HPLC로 분석해본 결과, Fraction I는 10.5분, Fraction II는 25.4분, Fraction III는 29.5분, Fraction IV는 30.2분에 순수한 단일피크를 얻을 수 있었으며 각각의 성분을 compound 1, compound 2, compound 3, compound 4로 명명하였다.

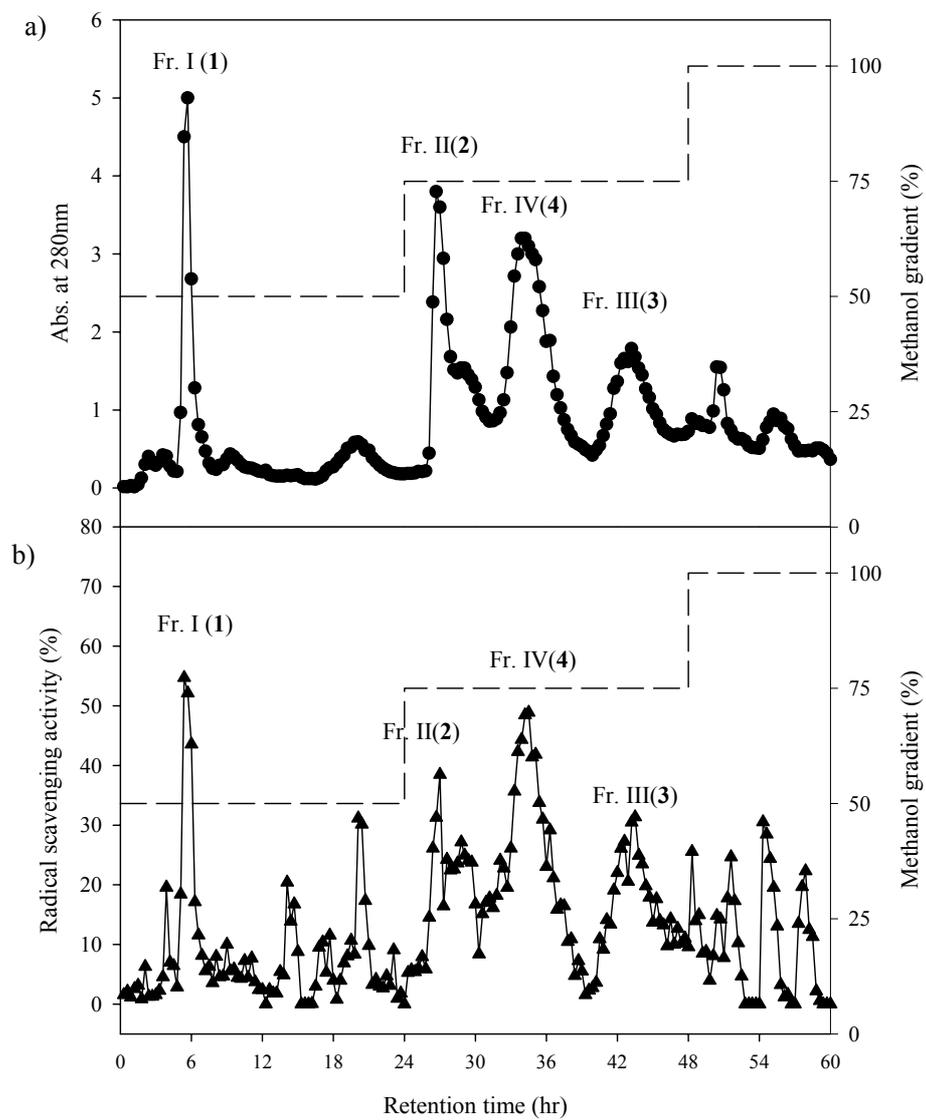


Fig. 41. LH-20 column chromatography(a) of ethyl acetate extract from *Trapa japonica* Flerov. and DPPH free radical scavenging activities(b) of its fractions. (Column size, 2.5×30cm; solvents, 50, 75, and 100% methanol)

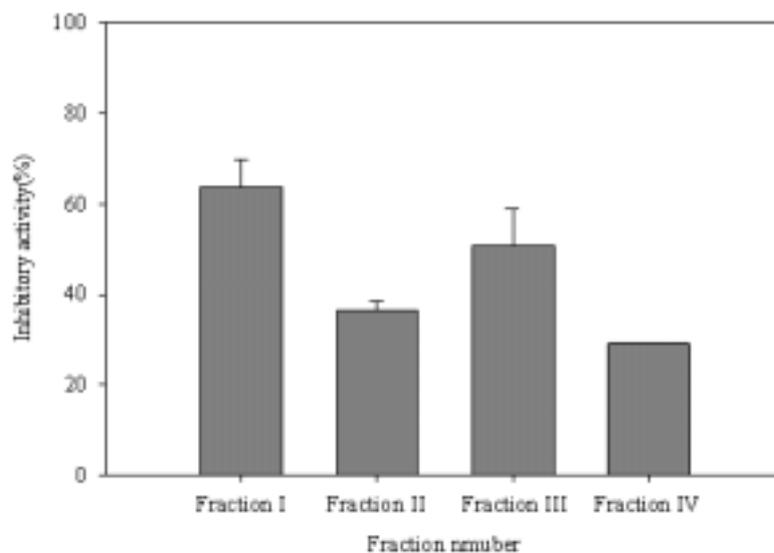
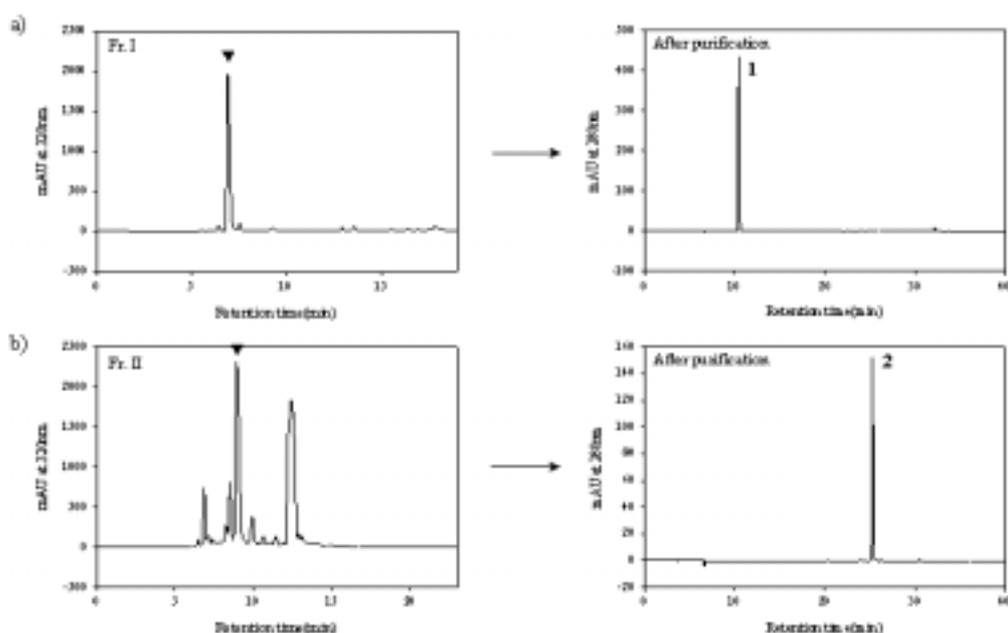
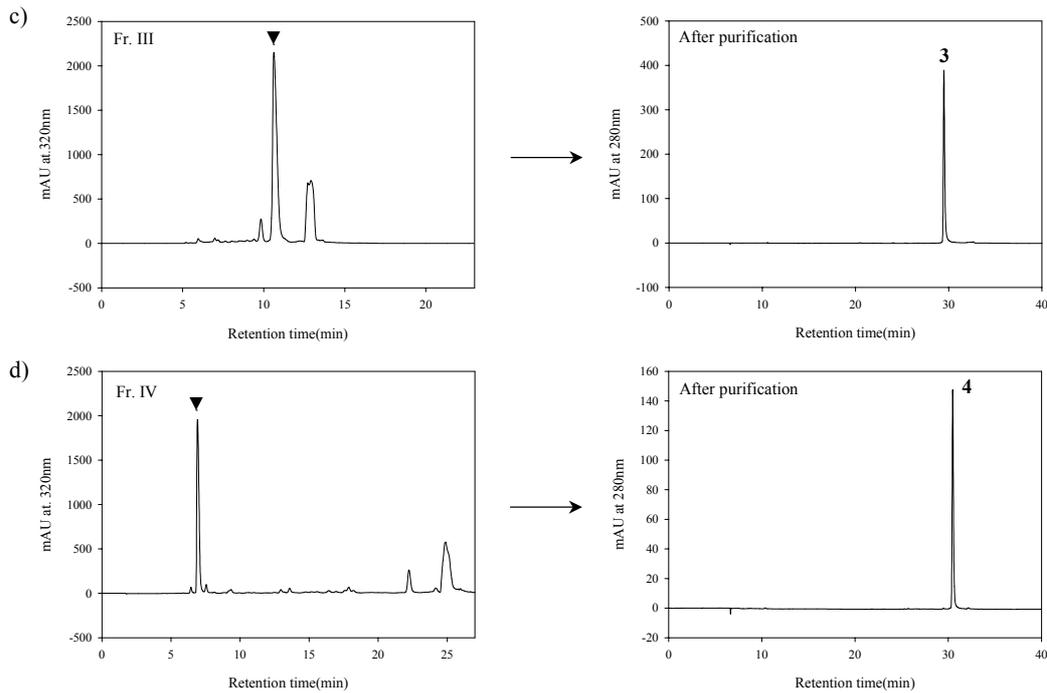


Fig. 42. Yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of the fraction from LH-20 column chromatography.





**Fig. 43. Purification of the bioactive compounds by using preparative HPLC.** a) Fraction I, b) Fraction II, c) Fraction III, and d) Fraction IV. **1**, gallic acid; **2**, trigalloylglucose; **3**, tellimagrandin II; and **4**, tetragalloylglucose.

#### 라. 마름의 유효생리활성 성분의 구조 분석

##### 1) UV-spectra

순수 분리된 물질의 최대흡수 스펙트럼을 190에서 400nm에서 분석한 결과 compound **1**은 272nm, compound **2**는 278nm, compound **3**은 278nm, compound **4**는 278nm에서 최대흡수를 나타냈으며 이는 gallotannin에서 보이는 일반적인 최대흡수파장과 일치하였다(Fig. 44).

##### 2) FT-IR

Compound **1**에 대한 FT-IR을 실시한 결과 Fig. 45와 같았으며 1036, 1159, 1269, 1313, 1348, 1433, 1456, 1548, 1622, 1649  $\text{cm}^{-1}$ 에서 흡수피크를 나타내 gallic acid의 IR spectrum과 동일하였다.

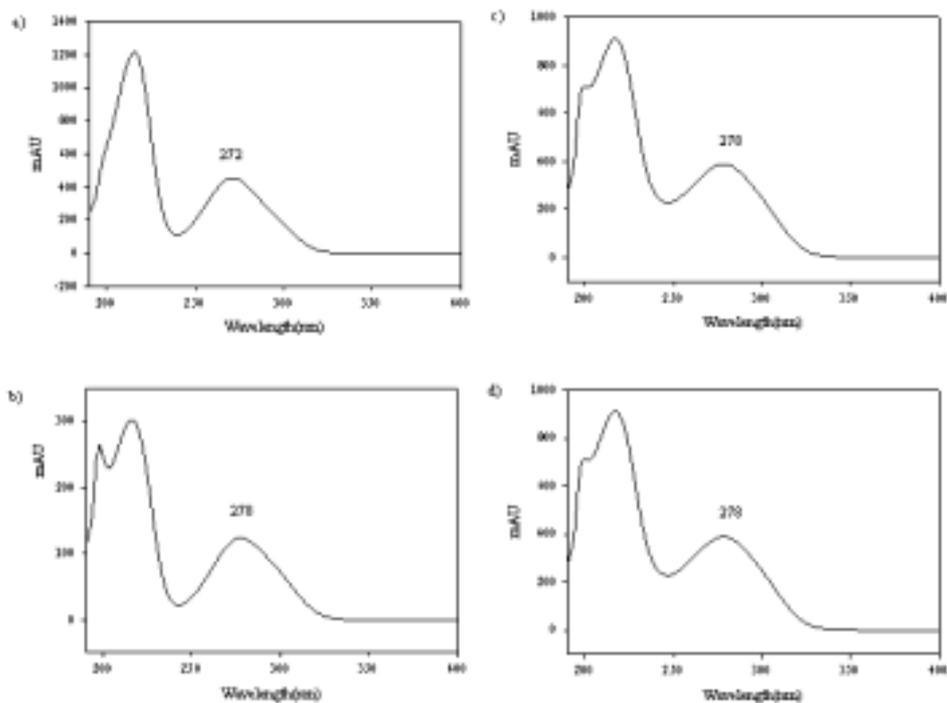


Fig. 44. UV spectra of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov. a) gallic acid(1); b) trigalloylglucose(2); c) tellimagrandin II(3); and d) tetragalloylglucose(4).

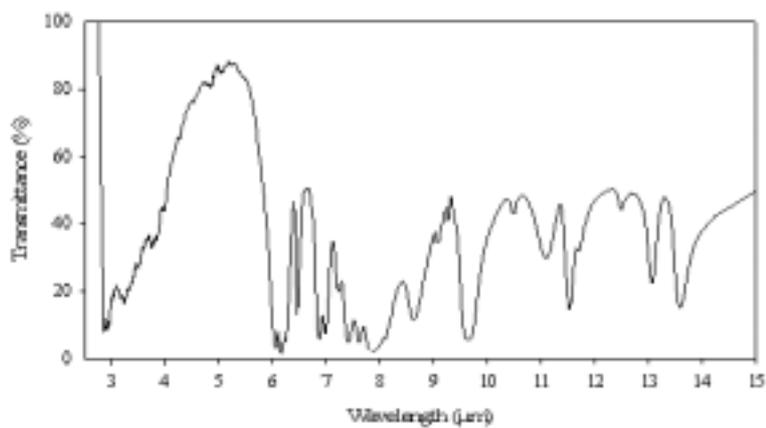
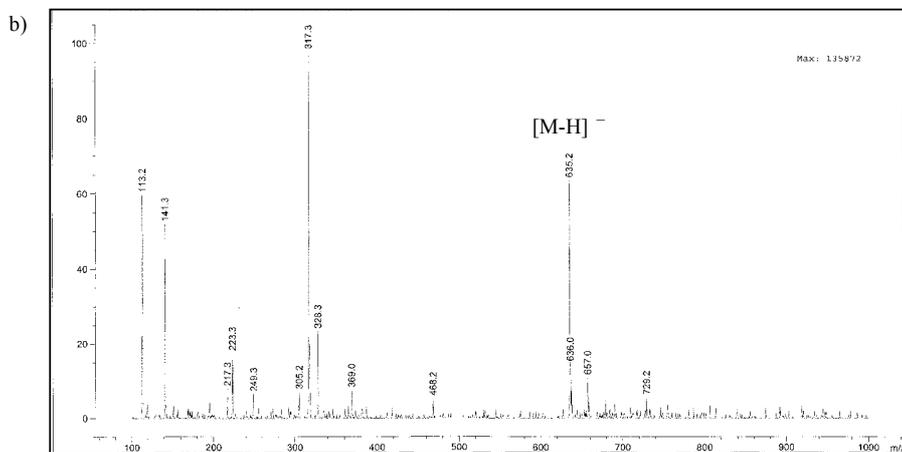
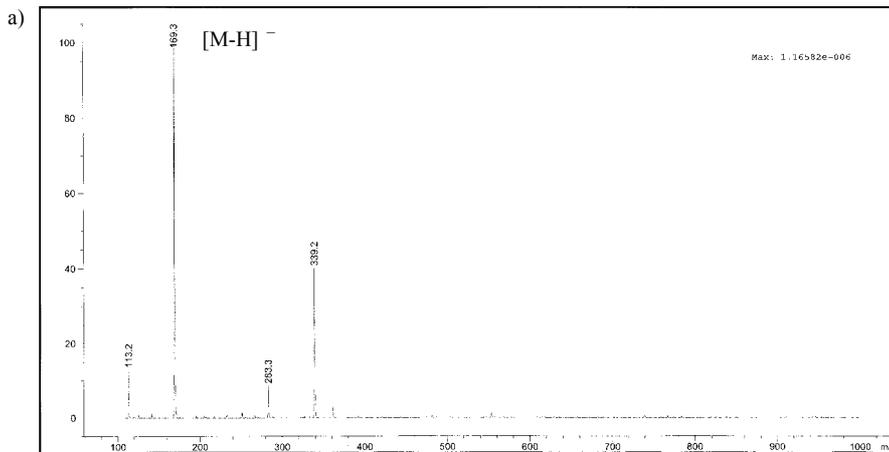


Fig. 45. IR spectrum of gallic acid(1).

### 3) LC/MS

LC/MS를 사용하여 순수 분리된 4개 물질의 분자량을 측정하였다(Fig. 46). LC/MS 측정을 위하여 ESI 및 negative ion mode를 사용하였다. 그 결과, compound 1은 169([M-H]<sup>-</sup>), compound 2는 635([M-H]<sup>-</sup>), compound 3은 937([M-H]<sup>-</sup>), 그리고 compound 4는 787([M-H]<sup>-</sup>)의 *m/z* 값을 확인하였으며 각각 170, 636, 938, 그리고 788의 분자량을 가진 물질임을 알 수 있었다. 이 값들은 gallic acid(1), trigalloylglucose(2), tellimagrandin II(3), tetragalloylglucose(4)의 분자량과 일치하였다(Table 27).



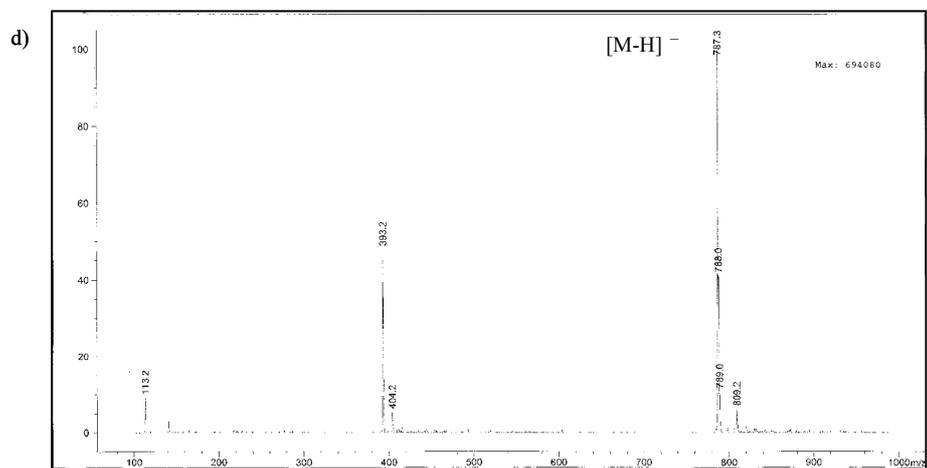
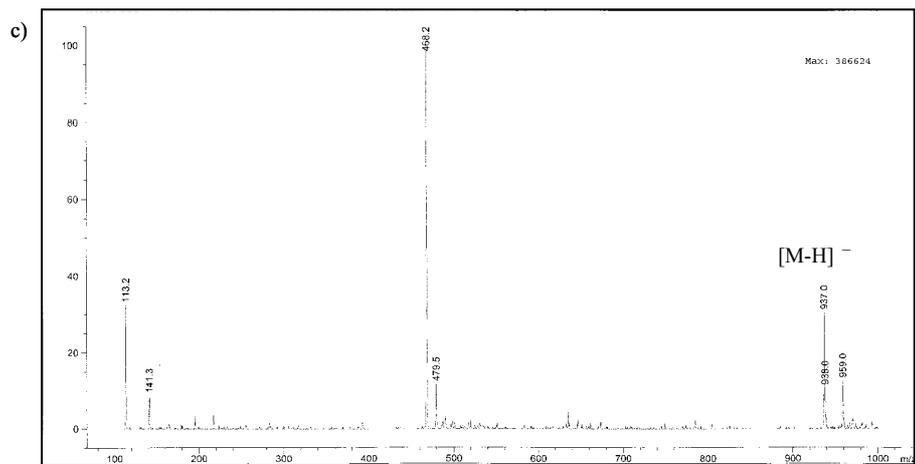


Fig. 46. LC/MS spectra of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov. a) gallic acid(1); b) trigalloylglucose(2); c) tellimagrandin II(3); and d) tetragalloylglucose(4).

Table 27. Mass data of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov.

Compounds	Name	Exact mass M (calc.)	$m/z$ for [M-H] <sup>-</sup>	HPLC ret. time (min)
1	Gallic acid	170	169	10.5
2	Trigalloylglucose	636	635	25.4
3	Tellimagrandin II	938	936	29.5
4	Tetragalloylglucose	788	787	30.2

#### 4) NMR

<sup>1</sup>H와 <sup>13</sup>C NMR을 사용하여 순수 분리된 물질의 탄소와 수소의 유기적인 관계를 살펴보았다(Fig. 47, Table 28-30). Compound 1은 <sup>1</sup>H NMR의 경우 7.062 ppm에서 유일한 singlet peak를 나타냈으며 이는 gallic acid의 2,6-hydrogen에 의한 것으로 판단된다. <sup>13</sup>C NMR의 경우 122.021, 110.293, 146.358, 139.536, 그리고 170.447 ppm에서 chemical shifts를 보였으며 이는 gallic acid의 C1, C2,6, C3,5, C4, 그리고 C7에 의한 것으로 판단되며 이상의 결과는 보고된 gallic acid의 NMR 자료와 일치하였다(Fig. 48a). Compound 2, 4에서는 <sup>1</sup>H NMR의 경우 7 ppm 근처에서 각 물질에 결합된 galloyl group의 개수와 같은 singlet peak를 확인하였으며, <sup>13</sup>C NMR에서는 galloyl group 및 glucose에 의한 chemical shifts를 확인할 수 있었다(Fig. 48b,d). 이 결과는 β-D-glucopyranose에 galloyl group이 3개 및 4개가 결합된 1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucose 및 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose의 NMR결과와 일치하였다. Compound 3은 <sup>1</sup>H NMR의 경우 galloyl group과는 다른 위치인 6.49, 6.62 ppm에서 singlet의 chemical shifts를 나타내었으며 이는 두개의 galloyl group이 산화되어 수소 2개가 제거된 hexahydroxy-diphenoyl(HHDP)의 6,6'-hydrogen에 의한 것으로 판명되었다(Fig. 48c). 따라서, compound 3은 pentagalloylglucose와 유사한 구조로 수소 2개가 제거된 trigalloyl-HHDP-glucose 즉, tellimagrandin II로 판명되었다. 일반적으로 glucose에 여러개의 galloyl group이 에스테르화되면 gallotannin으로 정의하며 galloyl group이 산화되어 생성된 HHDP가 포함된 경우 ellagitannin으로 정의하며 이들을 모두 hydrolysable tannin이라 한다. 따라서, compound 1, 2, 4는 gallotannin으로, compound 3는 ellagitannin으로 구분할 수 있으며 이들의 구조는 Fig. 46에 나타내었다.

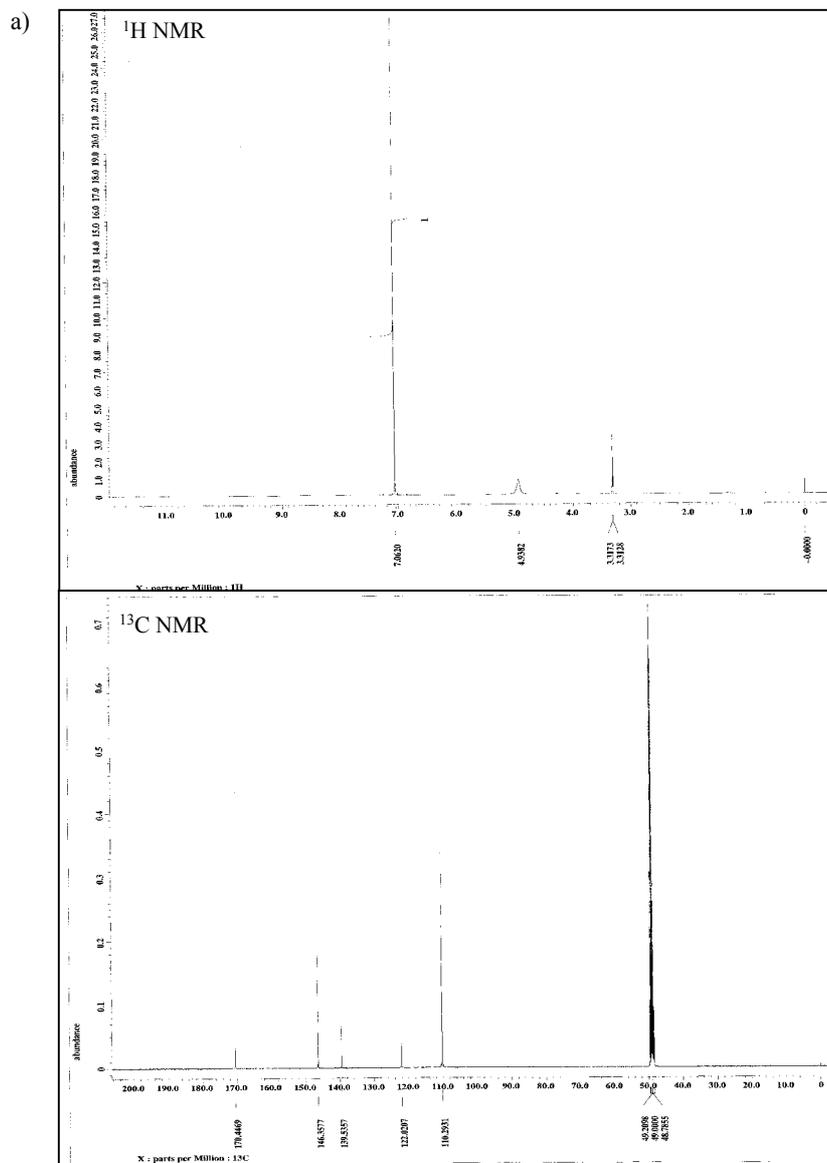


Fig. 47.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov. a) gallic acid(1); b) trigalloylglucose(2); c) tellimagrandin II(3); and d) tetragalloylglucose(4).

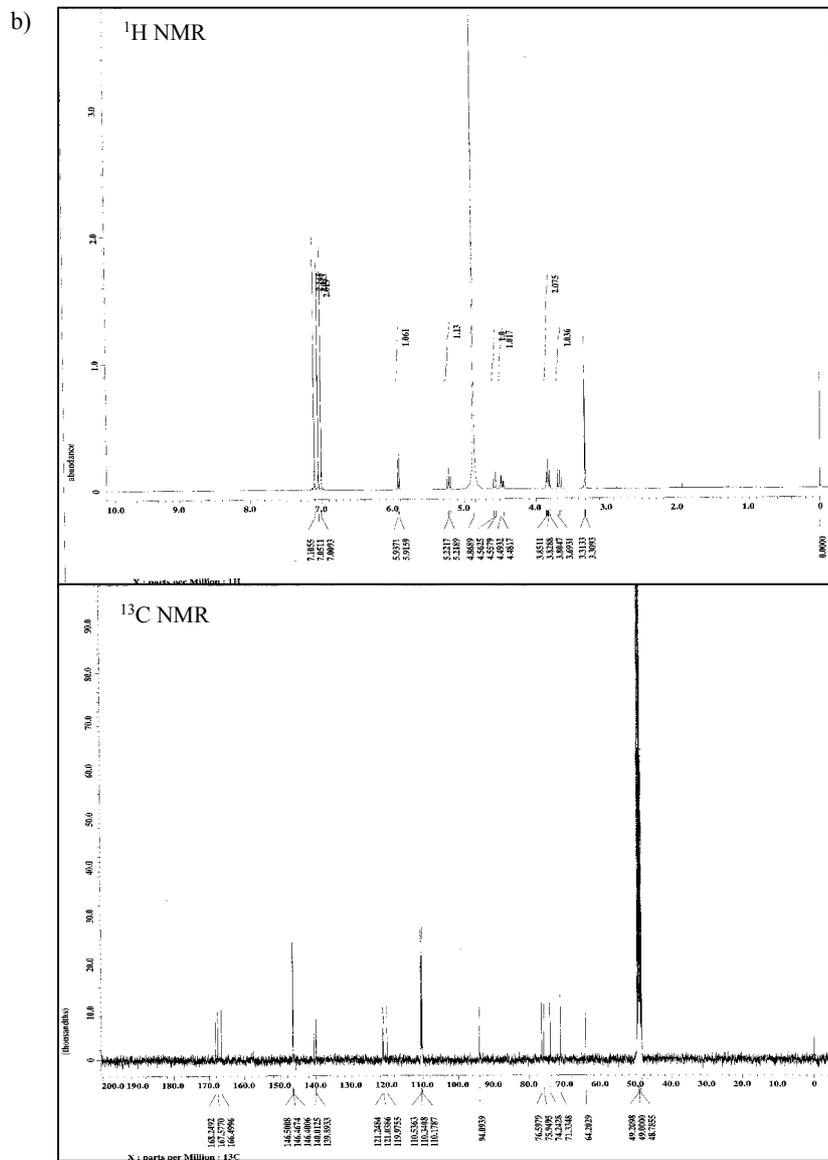


Fig. 45. Continued.



d)

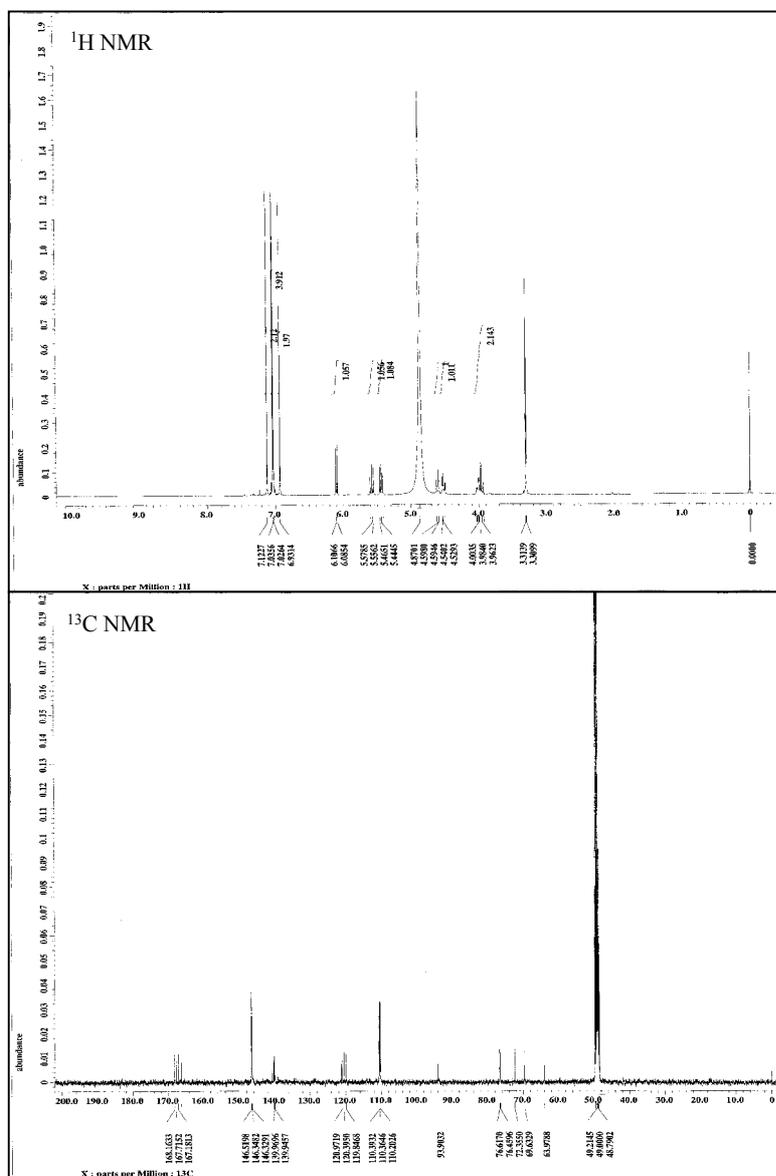


Fig. 47. Continued

Table 28. <sup>1</sup>H NMR data of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov.

Position	Mult.	GA(1) <sup>a)</sup>		TriGG(2)		TetraGG(4)	
		$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J(\text{H,H})$ in Hz	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J(\text{H,H})$ in Hz	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J(\text{H,H})$ in Hz
Glc-1	<i>d</i>			5.926	8.48(1,2)	6.096	8.32(1,2)
Glc-2	<i>dd</i>			5.220	9.60(2,3)	5.443	9.84(2,3)
Glc-3	<i>dd</i>			3.840	9.06(3,4)	5.580	8.92(3,4)
Glc-4	<i>dd</i>			3.670	9.74(4,5)	3.961	9.88(4,5)
Glc-5	<i>ddd</i>			3.828	4.56(5,6a)	4.019	4.36(5,6a)
Glc-6a	<i>dd</i>			4.472	12.13(6a,b)	4.520	12.16(6a,b)
Glc-6b	<i>dd</i>			4.575	1.82(5,6b)	4.611	1.60(5,6b)
Gall-2,6	<i>s</i>	7.062					
1-Gall-2,6	<i>s</i> (2H)			7.009		7.026	
2-Gall-2,6	<i>s</i> (2H)			7.051		6.931	
3-Gall-2,6	<i>s</i> (2H)					7.036	
6-Gall-2,6	<i>s</i> (2H)			7.106		7.123	

<sup>a)</sup>GA, gallic acid; TriGG, trigalloylglucose; and TetraGG, tetragalloylglucose.

Table 29. <sup>13</sup>C NMR data of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov.

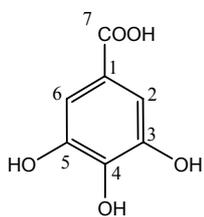
Position	$\delta_c$ (ppm)		
	GA(1) <sup>a)</sup>	TriGG(2)	TetraGG(4)
Glc-1		94.094	93.903
Glc-2		74.243	72.355
Glc-3		75.950	76.460
Glc-4		71.335	69.633
Glc-5		76.598	76.617
Glc-6		64.203	63.979
Gall-1	122.021		
Gall-2,6	110.293		
Gall-3,5	146.358		
Gall-4	139.536		
Gall-7	170.447		
1-Gall-1		119.976	119.847
1-Gall-2,6		110.536	110.570
1-Gall-3,5		146.467	146.520
1-Gall-4		140.570	140.670
1-Gall-7		166.499	166.309
2-Gall-1		121.039	120.395
2-Gall-2,6		110.341	110.365
2-Gall-3,5		146.401	146.329
2-Gall-4		140.013	140.189
2-Gall-7		167.577	167.181
3-Gall-1			120.972
3-Gall-2,6			110.393
3-Gall-3,5			146.348
3-Gall-4			139.970
3-Gall-7			167.715
6-Gall-1		121.248	121.210
6-Gall-2,6		110.179	110.203
6-Gall-3,5		146.501	146.534
6-Gall-4		139.893	139.946
6-Gall-7		168.249	168.163

<sup>a)</sup>GA, gallic acid; TriGG, trigalloylglucose; and TetraGG, tetragalloylglucose

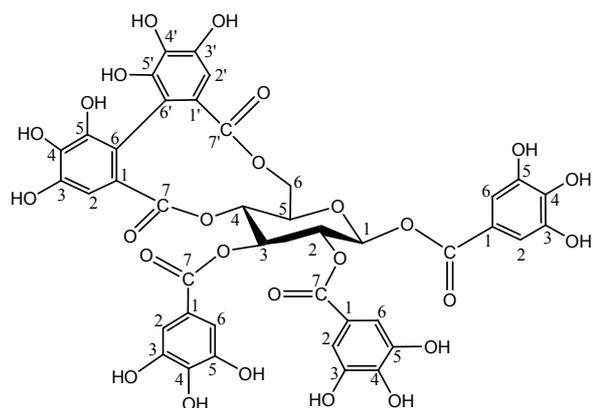
Table 30. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of tellimagrandin II(3).

	No.	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
Glucose	1	6.11(d) $J_{1,2} = 8.32$	94.13
	2	5.54 (dd) $J_{2,3} = 9.63$	72.41
	3	5.76 (t) $J_{3,4} = 9.86$	73.58
	4	5.23 (t) $J_{4,5} = 10.03$	71.25
	5	4.43 (ddd) $J_{5,6a} = 6.96$ $J_{5,6b} = 1.00$	74.00
	6a	5.38(dd) $J_{6a,b} = 13.62$	63.71
	6b	3.93(dd)	
Galloyl	1		119.69, 120.26, 120.38
	2,6	7.05, 6.95, 6.92 (2H,s)	110.37, 110.49, 110.56
	3,5		146.22, 146.37, 146.55
	4		140.06, 140.27, 140.75
	7		166.16, 166.86, 167.53
HHDP	1,1'		125.70, 126.21
	2,2'		116.47, 116.63
	3,3',5,5'		144.82(2), 145.89, 145.93
	4,4'		137.64, 137.67
	6,6'	6.49, 6.62 (1H, s)	108.23, 108.59
C=O			169.16, 169.53

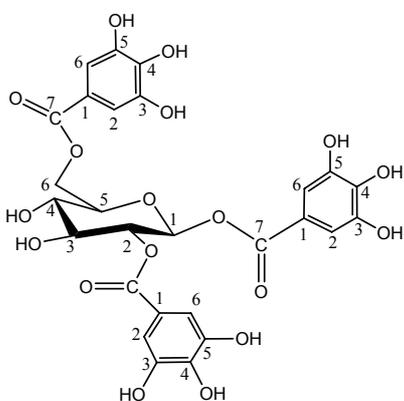
a)



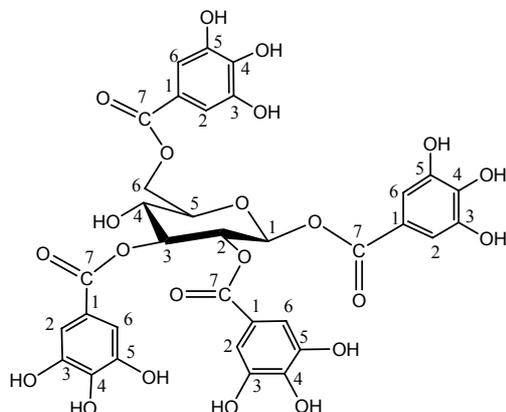
c)



b)



d)



**Fig. 48. Chemical structures of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov. a) gallic acid(1); b) 1,2,6-tri-*O*-galloyl-D-glucose(2); c) tellimagrandin II(3); and d) 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-D-glucose(4).**

## 마. 마름의 유효생리활성 성분의 생리활성

### 1) DPPH free radical 소거능

순수 분리된 물질의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH 방법을 사용하여 표준품인 L-ascorbic acid와 free radical 소거능을 비교하였다(Fig. 49). 각 물질의 IC<sub>50</sub>값을 비교해 본 결과 gallic acid(1) > tetragalloylglucose(4) > tellimagrandin II(3) > trigalloylglucose(2) > L-ascorbic acid의 순으로 free radical 소거능이 우수하였으며 그 값은 각각 60, 81, 100, 135 µg/mL로 L-ascorbic acid의 194 µg/mL보다 우수하였다. 이 결과는 He 등의 논문과 일치하였으며 gallic acid의 경우 L-ascorbic acid와 마찬가지로 SOD 유사활성과 DPPH radical 소거능이 탁월하여 천연항산화제로 널리 알려져 있는 물질이며, trigalloylglucose, tellimagrandin II, tetragalloylglucose 또한 항산화능이 우수한 것으로 밝혀져 마름의 항산화제로서의 개발가능성이 충분할 것으로 사료된다.

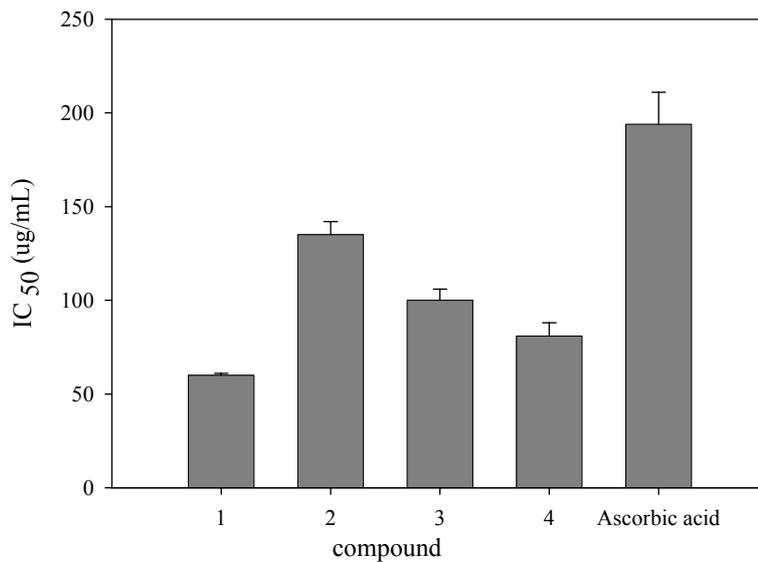


Fig. 49. DPPH free radical scavenging activity of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov. 1, gallic acid; 2, trigalloylglucose; 3, tellimagrandin II, and 4, tetragalloylglucose.

## 2) $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성

순수 분리된 4가지 물질의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 IC<sub>50</sub>값을 측정한 결과, 효소농도 0.01 mg/mL에서 trigalloylglucose는 0.51±0.04, tetragalloylglucose는 0.38±0.02, 그리고 tellimagrandin은 0.278±0.006  $\mu$ g/mL로 나타났으며, 효소농도 0.025 mg/mL에서는 각각 5.6±0.5, 2.4±0.1, 그리고 0.97±0.06  $\mu$ g/mL로 tellimagrandin II가 가장 우수한 저해활성을 보였으며 저해도가 매우 우수하였다(Table 31). 반면 gallic acid 및 acarbose는  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성이 상당히 낮았다. 이 결과는 galloyl group이 증가할수록 저해활성이 증가된다는 보고와 일치하였다. 또한 trigalloylglucose, tellimagrandin II, tetragalloylglucose 모두 효소의 저해활성이 효소농도가 증가할수록 낮아지는 현상을 확인할 수 있었으며 이는 tight binding inhibition에 의한 결과일 것으로 추정된다(Fig. 50). 위의 세가지 물질은 기존에 보고된  $\alpha$ -glucosidase 저해제인 acarbose 등과 비교할 때 월등히 뛰어난 저해활성을 보였으며, 혈당조절과 같은 항당뇨 효과가 보고되어 있어 마름의 ethyl acetate 추출물이 당뇨예방 및 치료에 도움이 될 것으로 사료된다.

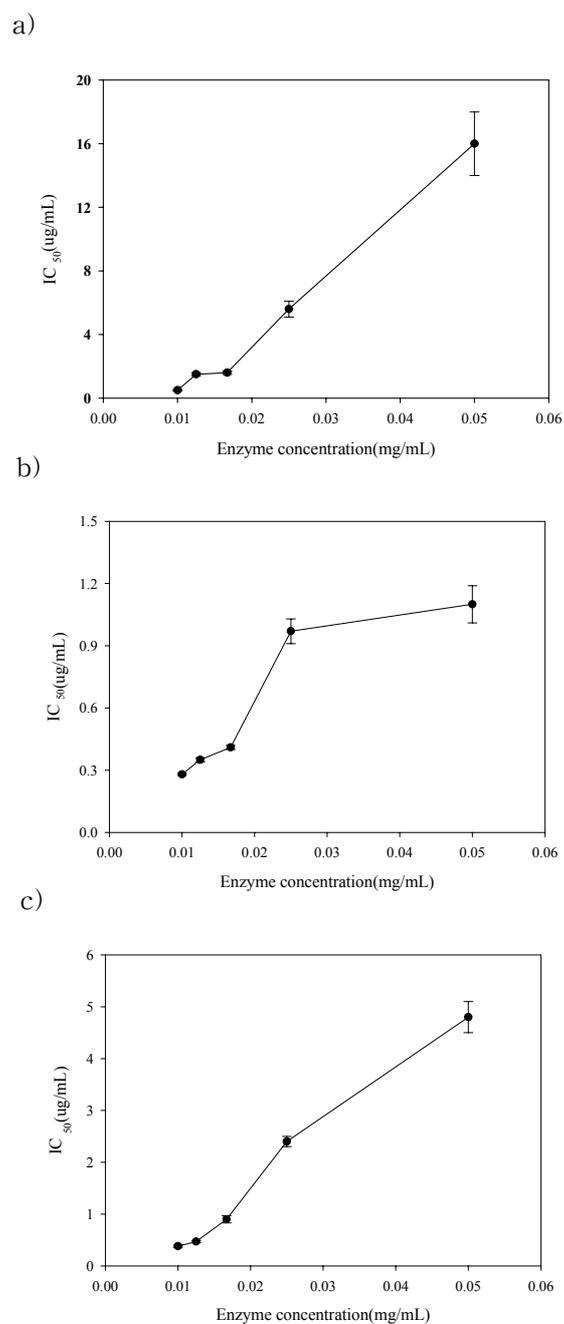
**Table 31. Yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity<sup>a)</sup> of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov.**

Compound <sup>b)</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	
	Enzyme 0.01 mg/mL	Enzyme 0.025 mg/mL
GA(1)	- <sup>c)</sup>	-
TriGG(2)	0.51 ± 0.04	5.6 ± 0.5
Telli II(3)	0.278 ± 0.006	0.97 ± 0.06
TetraGG(4)	0.38 ± 0.02	2.4 ± 0.1

<sup>a)</sup>Substrate concentration is 1.0 mg/mL.

<sup>b)</sup>GA, gallic acid; TriGG, trigalloylglucose, Telli II, tellimagrandin II; TetraGG, tetragalloylglucose.

<sup>c)</sup>No significant inhibition.



**Fig. 50. Effect of enzyme concentration on the IC<sub>50</sub> of the purified bioactive compounds from *Trapa japonica* Flerov. against  $\alpha$ -glucosidase from yeast. a) trigalloylglucose(2), b) tellimagrandin II(3), and c) tetragalloylglucose(4). Substrate concentration is 1.0 mg/mL.**

### 3) $\alpha$ -Glucosidase 저해 특성

가장 우수한 효소 저해 활성을 나타낸 tellimagrandin II의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해 특성을 살펴보기 위하여 효소농도별, 기질농도별, 그리고 첨가된 BSA의 농도별 저해활성을 비교해 보았다. 앞에서 살펴본 바와 같이 효소 농도가 증가할수록 저해활성이 감소하는 것을 알 수 있었으며(Fig. 50), 기질농도가 증가할수록 저해활성이 감소하다가 일정해지는 것으로 보아 tellimagrandin II는 기질과 경쟁적 관계에 있는 것으로 판단되었다(Fig. 51). 효소반응액에 외래단백질인 BSA를 첨가한 결과 BSA의 첨가량이 증가할수록 tellimagrandin II에 의한 효소저해활성이 감소하는 것으로 나타났는데(Fig. 52) 이는 tannin 계열의 물질이 일반적으로 단백질과의 결합이 용이한 것으로 알려져 있어 BSA와 tellimagrandin II가 결합하여 결과적으로 저해제의 농도를 감소시킨 결과로 해석된다.

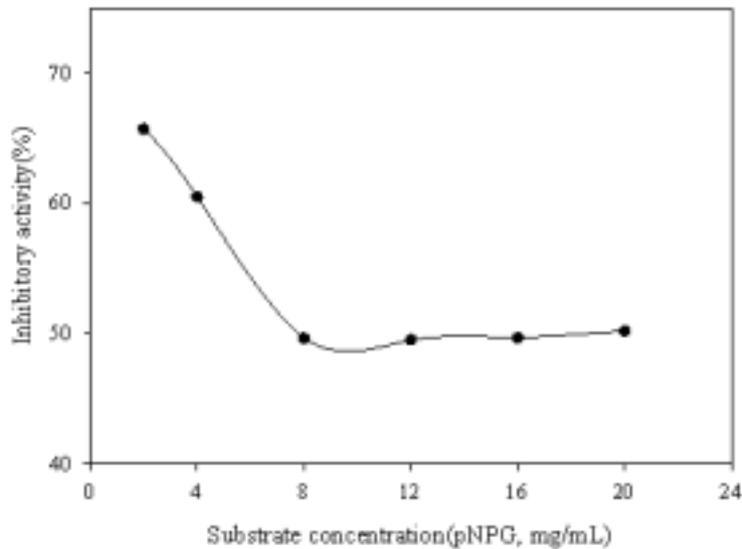


Fig. 51. Effect of substrate(pNPG) concentration on the inhibitory activity of tellimagrandin II(3) against  $\alpha$ -glucosidase from yeast. Enzyme concentration is 0.01 mg/mL.

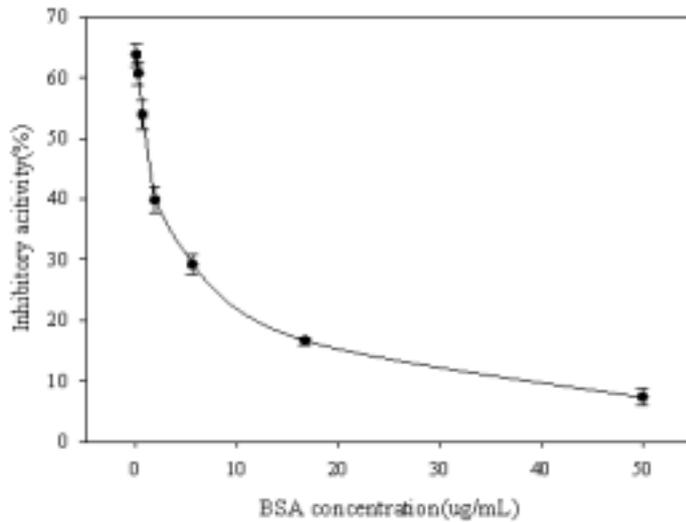


Fig. 52. Effect of bovine serum albumin(BSA) concentration on the inhibitory activity of tellimagrandin II(3) against  $\alpha$ -glucosidase from yeast. Enzyme concentration is 0.01mg/mL and substrate concentration is 1mg/mL.

#### 바. 마름 추출물의 생리활성물질 함량분석

Rhodanine 시약을 이용하여 전체 gallotannin의 함량을 비교해 본 결과, (주)기화 제약에서 제공받은 열풍건조된 마름 분말의 80%에탄올 추출물의 경우 19.8%인데 반하여 창녕에서 수확한 마름의 경우는 29.0%로 냉동건조 분말의 gallotannin의 함량이 많았다(Table 32). 또한 순수 분리된 각 compound의 표준곡선을 이용하여 80% 주정추출물에 포함된 각 성분의 함량을 정량분석한 결과, (주)기화 제약에서 제공받은 마름의 경우 4개의 주요 hydrolysable tannin(GA, TriGG, Telli II, TetraGG)이 9.24%, 창녕에서 수확한 마름의 경우 14.51%로 창녕 마름의 함량이 높았으며 두 가지 모두 tetragalloylglucose의 함량이 3.76 및 7.55%로 가장 높았다(Table 32). 4가지 성분의 총합보다 80% 주정추출물의 gallotannin 함량이 거의 두 배인 것으로 보아 순수 분리된 4가지 성분 이외의 gallotannin이 다량 포함된 것으로 사료된다. 각각의 함량을 (주)기화 제약에서 제공받은 마름분말 1kg당 수율로 환산할 경우 gallic acid(1)은 1.5g, 1,2,6-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose(2)는 1.5g, tellimagrandin II(3)은 1.9g, 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose(4)는 3.3g으로 나타났다.

Table 32. Compositions of the purified bioactive compounds from the 80% ethanol extract of *Trapa japonica* Flerov.

	Contents (%)	
	Gihwa <sup>a)</sup>	Changnyeong <sup>b)</sup>
80% ethanol extract	19.75 <sup>c)</sup>	29.00 <sup>c)</sup>
GA(1) <sup>d)</sup>	1.65	0.10
TriGG(2)	1.64	3.49
Telli II(3)	2.19	3.37
TetraGG(4)	3.76	7.55
Total <sup>e)</sup>	9.24	14.51

<sup>a)</sup>from hot air-dried powder of whole fruits obtained from Gihwa company.

<sup>b)</sup>from freeze-dried powder of the shell of fruits harvested in Changnyeong, Gyongnam, Korea.

<sup>c)</sup>Contents were measured by gallic acid determination method (Rhodinine method).

<sup>d)</sup>GA, gallic acid; TriGG, 1,2,6-tri-galloyl- $\beta$ -D-glucose; Telli II, tellimagrandin II; and TetraGG, 1,2,3,6-tetragalloyl- $\beta$ -D-glucose.

<sup>e)</sup>Sum of the contents of GA, TriGG, Telli II, and TetraGG.

## 5. 마름 유래의 생리활성물질의 기능성 식품소재로의 개발

### 가. 마름으로부터 유효 생리활성물질의 추출방법 최적화

#### 1) 추출 온도에 대한 영향

마름분말로부터 여러 가지 주정농도를 사용하여 온도별로 생리활성성분의 추출효율을 비교하였다(Fig. 53). Gallotannin의 최대흡수파장인 278nm에서 각 추출액의 흡광도를 측정한 결과, 추출 온도가 증가할수록 흡광도가 증가하였으며 주정농도별로는 50%주정에서 가장 높은 흡광도를 보였으며 그 다음으로 80%주정에서 높은 흡광도를 보였다. 그러나, HPLC 분석결과 50% 주정보다는 80% 주정에서 유효성분이 더 많이 추출되어 이 후 80% 주정을 추출용매로 사용하였으며 온도가 증가할수록 유효성분의 추출이 증가하지만 고온에서 작

업할 경우 처리 비용이 증가하게 되고 용매의 취급 시 안전상의 문제도 있으므로 여러 가지 측면을 고려해볼 때 40°C가 가장 적절한 추출온도로 판단되었다.

## 2) 주정 농도에 대한 영향

추출온도 40°C에서 0, 20, 50, 80, 100% 주정농도별 추출물과 100°C 열수추출물의 유효성분 함량을 정량 분석하였다(Fig. 54). 그 결과, gallic acid를 제외한 주요 gallotannin의 함량은 80% 주정에서 가장 높았으며 추출용매별로 비교해볼 때 gallic acid는 물의 함량이 높을 때 많이 추출된 반면 trigalloylglucose, tellimagrandin II, tetragalloylglucose는 주정농도가 높을수록 추출이 잘 되는 것으로 확인되었다. 열수추출의 경우에도 유효성분의 추출이 비교적 잘 이루어졌으나 80% 주정에 비하여 낮은 함량을 나타내었다. 따라서 주정의 추출 최적 농도는 80%로 확인되었다.

## 3) 추출 횟수에 대한 영향

추출횟수에 따른 유효생리활성 물질의 함량을 비교하기 위하여 80% 주정을 용매로 이용하여 40°C에서 1, 2, 3차 추출하여 그 함량을 비교하였다(Fig. 55). 그 결과, 각 유효성분의 함량이 추출횟수가 증가할수록 감소하는 것을 알 수 있었으며 전체 gallotannin의 함량을 비교하여 보면 1차 추출(1.67mg/mL)에 비하여 2차 추출(0.79mg/mL)은 47%, 3차 추출(0.09mg/mL)은 5.4%로 감소하였다. 따라서 추출횟수는 2회 추출이 가장 적당한 것으로 판단되었다.

## 4) 추출 pH에 따른 유효생리활성 물질 함량비교

추출용매의 pH에 따른 유효생리활성 물질의 함량을 비교하기 위해 80% 주정에 마름분말을 첨가한 후 pH를 2, 4, 7, 10, 12로 맞추어 추출하였다. 추출된 유효성분의 함량을 HPLC로 분석, 정량한 결과 pH 4에서 추출효율이 가장 높았으며 그 다음은 pH 7이었다(Fig. 56). 따라서, 용매의 pH는 약산성 혹은 중성이 적당한 것으로 판단되었다.

이상의 결과로부터 마름분말에 80% 주정을 첨가하여 pH를 4(약산성)으로 맞추는 후 40°C 이상의 온도에서 24시간 동안 2회 추출하는 것을 최적 추출조건으로 정하였다.

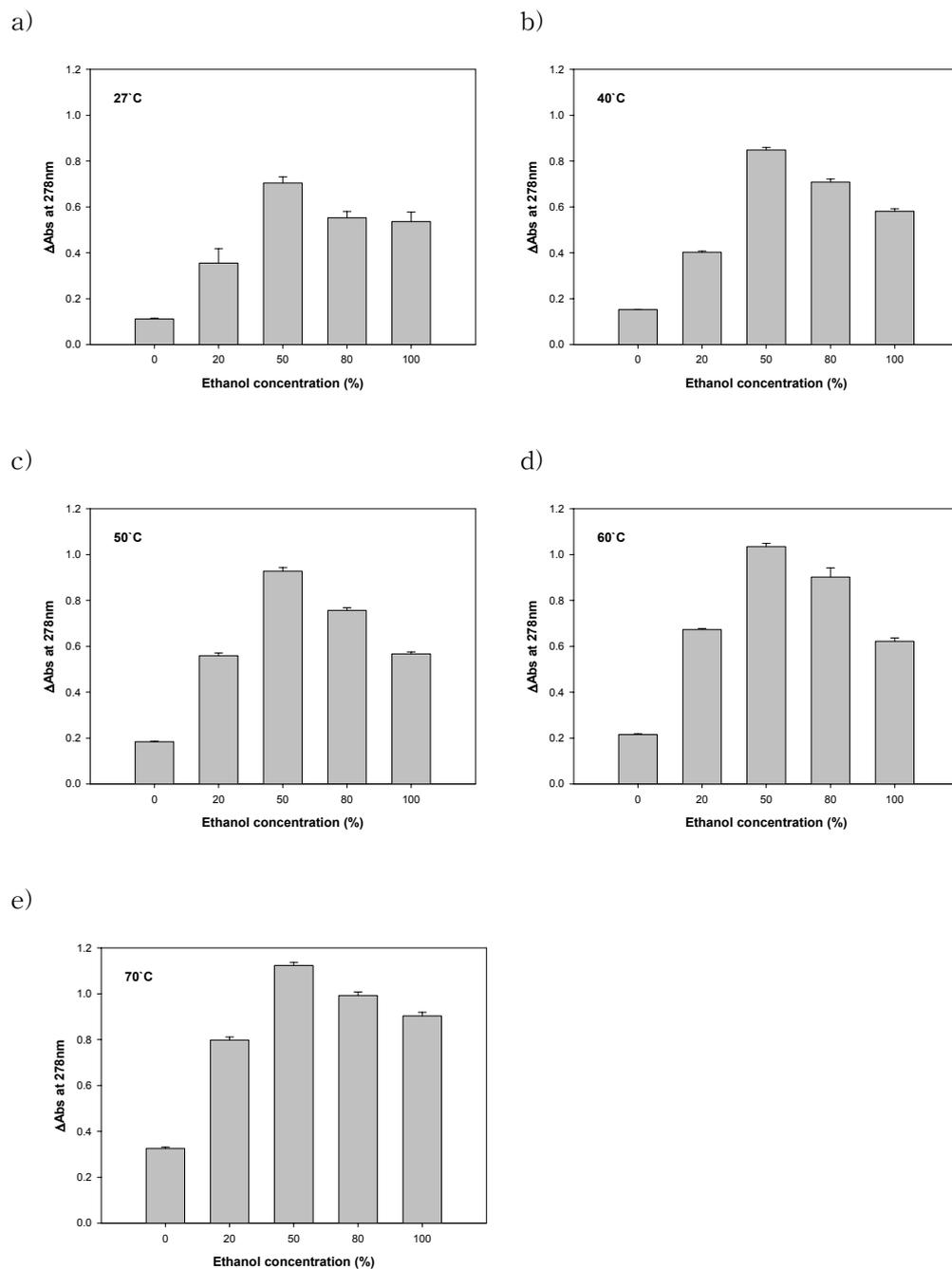
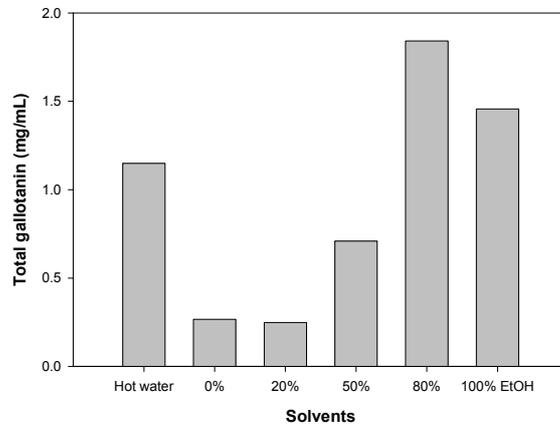
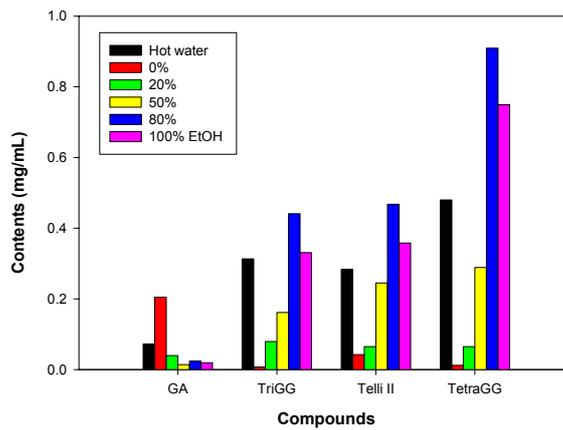


Fig. 53. Effect of temperature on the extraction of gallotannins from *Trapa japonica* Flerov. with various concentration of ethanol concentration. a) 27°C, b) 40°C, c) 50°C, d) 60°C, and e) 70°C

a)

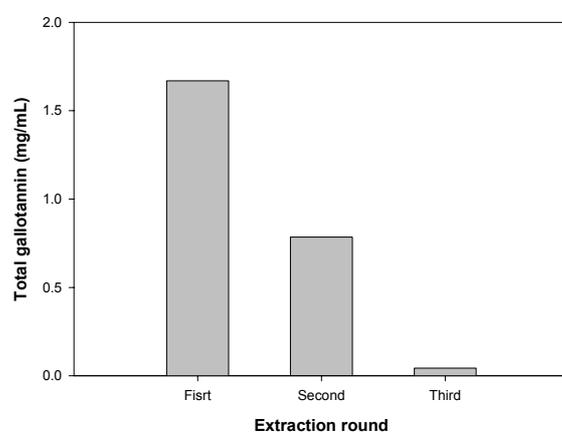


b)



**Fig. 54. Effect of ethanol concentration and hot water on the extraction of gallotannins from *Trapa japonica* Flerov. at 40°C. a) Total amount of major four compounds, and b) amount of each compound; GA, gallic acid; TriGG, trigalloylglucose; Telli II, tellimagrandin II; and TetraGG, tetragalloylglucose.**

a)



b)

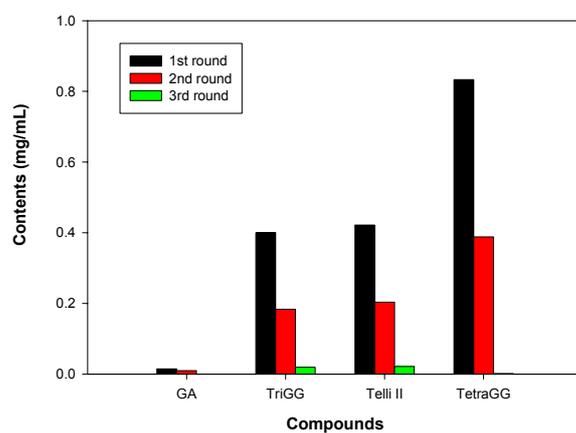
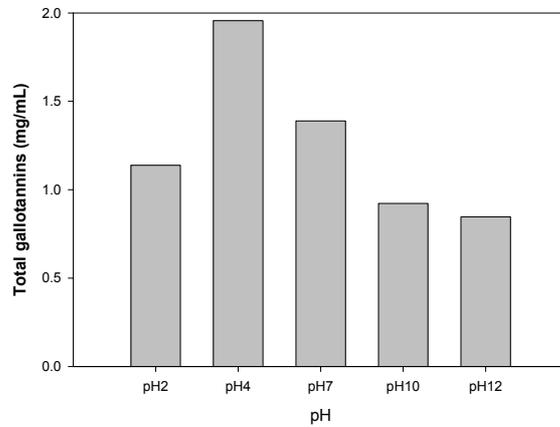


Fig. 55. Effect of repeated extraction on the extraction of gallotannins from *Trapa japonica* Flerov. with 80% ethanol solution at 40°C. a) Total amount of major four compounds, and b) amount of each compound; GA, gallic acid; TriGG, trigalloylglucose; Telli II, tellimagrandin II; and TetraGG, tetragalloylglucose.

a)



b)

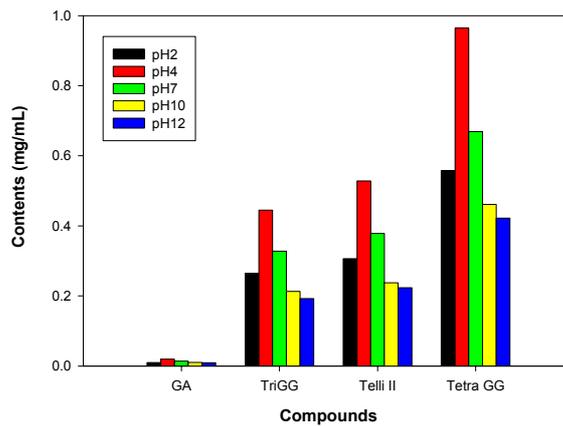


Fig. 56. Effect of pH on the extraction of gallotannins from *Trapa japonica* Flerov. with 80% ethanol solution at 40°C. a) Total amount of major four compounds, and b) amount of each compound; GA, gallic acid; TriGG, trigalloylglucose; Telli II, tellimagrandin II; and TetraGG, tetragalloylglucose.

## 나. 마름 유래 유효 생리활성물질의 물리화학적 안정성 분석

### 1) 마름추출물의 수율

마름추출물의 물리화학적 안정성 분석을 위해 40g의 마름분말로부터 앞에 언급한 최적추출조건으로 추출한 후 농축, 건조한 결과 5.9g의 주정 추출물을 얻을 수 있었으며 **14.7% 수율**을 나타내었다.

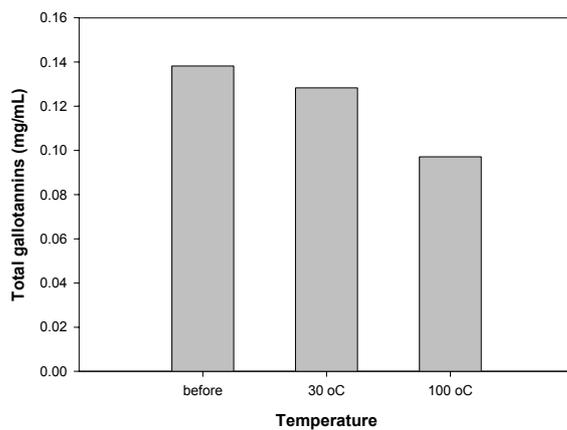
### 2) 온도 안정성

마름열매의 주정추출물을 증류수에 1 mg/mL의 농도로 용해시킨 후 30℃와 100℃에서 24시간 동안 방치한 후 유효성분의 함량 변화를 HPLC로 분석하였다. 유효성분의 전체함량은 30℃에서 방치한 시료의 경우 방치하기 전과 비교하여 92.8%가 남아있어 큰 차이가 없었으나 100℃에서 방치한 경우는 70.3%로 감소하여 고온에서 다소 불안정한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 57a). 각 유효성분의 함량을 비교하면 30℃의 경우 큰 차이가 없었으나 100℃에서 방치한 경우는 상당량의 trigalloylglucose, tellimagrandin II, tetragalloylglucose가 분해되어 다량의 gallic acid가 생성된 것을 볼 수 있었다(Fig. 55b). 즉, 분자량이 큰 gallotannin의 경우는 고온에서 쉽게 가수분해되어 기본 구성단위인 gallic acid로 전환됨을 알 수 있었으며 따라서, 가공 시 고온에서 처리하는 공정이 포함될 경우 최종제품에서 유효성분의 함량변화가 예상된다. 이 결과는 Table 29에 제시된 바와 같이 (주)기화제약에서 제공받은 열풍건조한 마름분말로부터의 주정추출물은 유효성분의 전체함량은 적은 반면 gallic acid의 양이 다소 많은 결과와도 상응한다. 따라서, 마름 과피를 건조할 경우 냉동건조와 같은 비가열식 건조를 수행하는 것이 유효성분의 파괴를 최소화하는데 유리할 것으로 판단된다.

### 3) 금속이온에 대한 안정성

마름열매의 주정추출물을 1 mM의  $\text{Cu}^{2+}$ 이온이 포함된 증류수에 1 mg/mL의 농도로 용해시킨 후 30℃와 100℃에서 24시간 동안 방치한 후 유효성분의 함량 변화를 HPLC로 분석하였다. 유효성분의 전체함량 및 각 성분의 함량은 30℃에서 방치한 시료의 경우 방치하기 전과 큰 차이가 없었으나 100℃에서 방치한 경우는 전체함량이 58.0%로 감소하였고 각 성분의 함량 또한 온도 안정성의 경우와 같이 분자량이 큰 성분들은 거의 대부분 가수분해되어 일부가 gallic acid로 전환된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 58). 1 mM의  $\text{Cu}^{2+}$ 이온이 포함된 경우 고온에서의 분해가 더 촉진되었으나 전반적인 경향은 순수한 물에 용해된 시료의 경우와 비슷하였다. 즉, 금속이온이 존재할 경우 고온에서 유효성분의 분해가 다소 촉진되었으나 저온에서는 큰 영향을 볼 수 없었다.

a)



b)

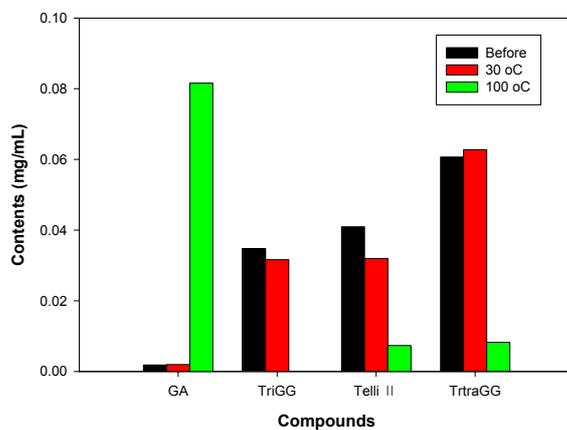
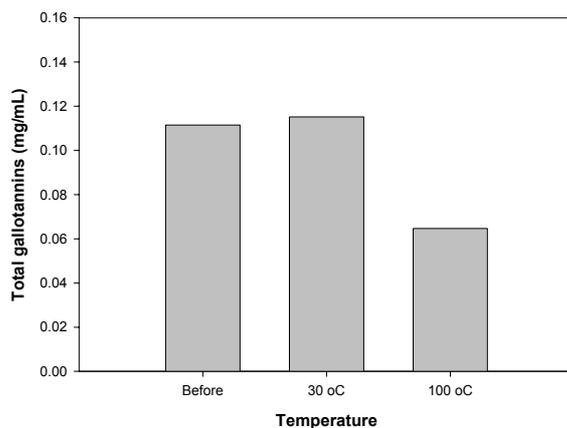


Fig. 57. Temperature stability of gallotannins extracted from the fruits of *Trapa japonica* Flerov. Ethanol extract was dissolved in distilled water at the concentration of 1 mg/mL and incubated at 30°C or 100°C for 24hr. a) Total amounts of four major compounds, and b) amount of each compound; before, before incubation; GA, gallic acid; TriGG, trigalloylglucose; Telli II, tellimagrandin II; and TetraGG, tetragalloylglucose.

a)



b)

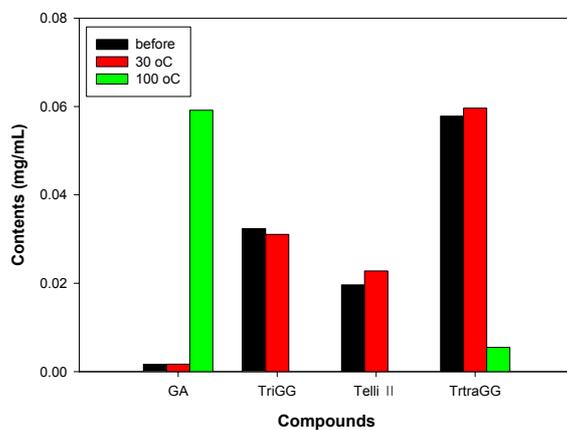


Fig. 58. Stability of gallotannins extracted from the fruits of *Trapa japonica* Flerov. in the presence of copper ion. Ethanol extract was dissolved in 1 mM  $\text{Cu}^{2+}$  solution at the concentration of 1 mg/mL and incubated at 30°C or 100°C for 24hr. a) Total amounts of four major compounds, and b) amount of each compound; before, before incubation; GA, gallic acid; TriGG, trigalloylglucose; Telli II, tellimagrandin II; and TetraGG, tetragalloylglucose.

#### 4) pH 안정성

마름열매의 주정추출물을 증류수에 1 mg/mL의 농도로 용해시킨 후 pH를 2-10으로 조정하여 30°C와 100°C에서 24시간 동안 방치한 후 유효성분의 함량 변화를 HPLC로 분석하였다. 유효성분인 gallotannins들은 특히 높은 pH에서 불안정하여 각 온도에서 방치하기 전부터 상당량의 유효성분이 분해된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 59a). 즉, pH가 8이상일 때부터 분해가 진행되어 pH10에서는 대부분이 분해되는 것을 확인할 수 있었으며 따라서, 각 온도에서 방치한 후의 결과도 높은 pH에서는 대부분의 유효성분이 분해되었다(Fig. 59b,c). 중성이나 산성의 pH에서는 비교적 안정하여 30°C에서 방치하였을 경우 함량의 변화가 크지 않았으나 고온(100°C)에서는 pH에 관계없이 큰 분자량의 gallotannin들이 대부분 분해되었으며 대신 일부분이 gallic acid로 전환된 관계로 gallic acid의 양이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 59). 따라서, 마름의 유효성분은 알칼리조건보다는 중성이나 산성조건에서 저온에서 가공시 안정하며 알칼리조건에서는 처리온도와 상관없이 쉽게 파괴되어 적용이 곤란할 것으로 판단된다.

이상의 결과로부터 마름 과피의 주정추출물을 기능성 식품 소재로 가공 시 **중성 및 약산성에서 저온으로 처리**하는 것이 유효활성성분의 분해를 최소화시킬 수 있으며 고온에서의 처리시간을 가능한 한 줄이고 특히 온도에 상관없이 알칼리조건은 피하는 것이 유리할 것으로 판단된다.

#### 다. 마름 유래 유효 생리활성물질의 기능성 식품소재로의 개발

마름은 식품의약품안전청에서 인정한 식품원료로서 본 연구에서 혈당 조절 및 당뇨병 개선효과와 항산화 효과, 항암 효과 등 여러 생리활성이 in vivo 및 in vitro에서 입증되었으며, 마름으로부터 분리한 유효생리활성물질인 gallotannin 또한 다양한 생리활성이 보고되어 있어 건강보조 식품 또는 당뇨병 혹은 항암 치료제로의 개발가능성이 충분한 것으로 사료된다. 그러나, 마름의 추출물 및 응용 제품을 기능성 식품으로 상업화하기 위해서는 개별인정형 건강기능식품으로의 인증이 필요하며 이를 위하여 마름 추출물의 독성평가가 필수적으로 선행되어야 할 것이다. 마름 추출물이 개별인정형 건강기능식품소재로 인증을 받을 경우 응용가능한 제품의 하나로 캡슐 형태의 시제품을 제조하였다(Fig. 60). 마름 추출물의 유효성분은 주로 gallotannin 성분이고 쓴맛이 강한 특성 때문에 정제보다는 캡슐형태의 제품이 유리할 것이라 판단되며 선식과 같은 분말식품에 함께 첨가한 제품이 가능할 것이라 사료된다. 제1세부과제에서 당뇨환자를 대상으로 마름의 장기섭취가 혈당조절 및 지질대사 개선에 미치는 영향을 조사한 연구에서는 보리, 현미, 메밀, 마름을 혼합한 선식제품을 사용하였다(Fig. 60).

a) Before incubation

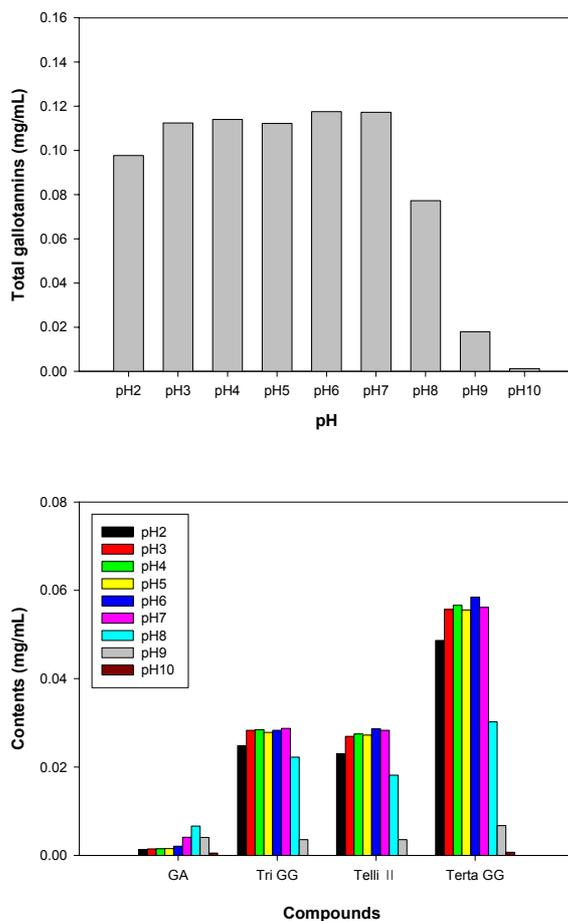


Fig. 59. pH stability of gallotannins extracted from the fruits of *Trapa japonica* Flerov. The pH of ethanol extract solution (1 mg/mL) was adjusted from 2 to 10 and the solution was incubated at 30°C(b) or 100°C(c) for 24hr. Left panel, total amounts of four major compounds; and right panel, amount of each compound; GA, gallic acid; TriGG, trigalloylglucose; Telli II, tellimagrandin II; and TetraGG, tetragalloylglucose.

b) After incubation at 30°C

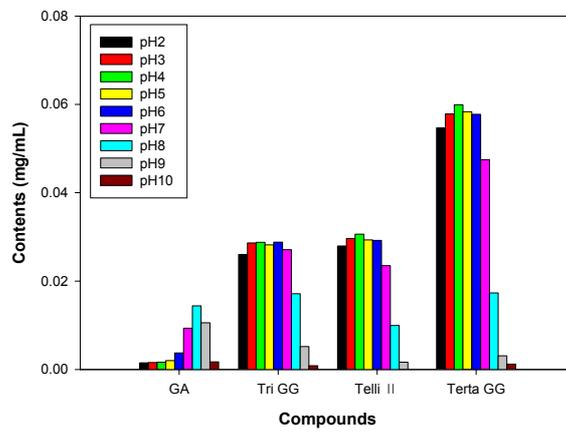
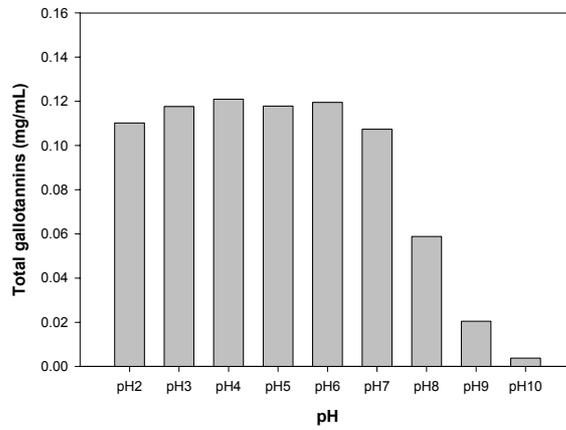


Fig. 59. Continued.

c) After incubation at 100°C

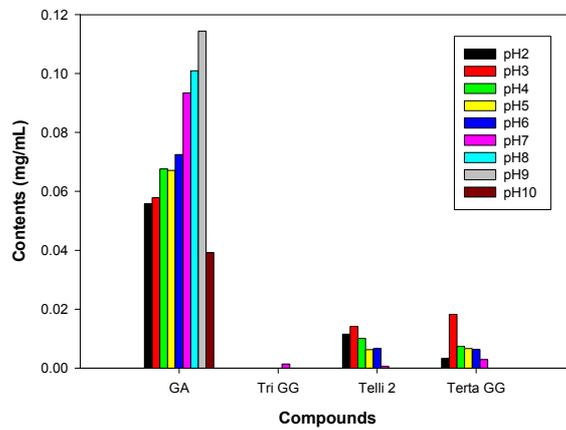
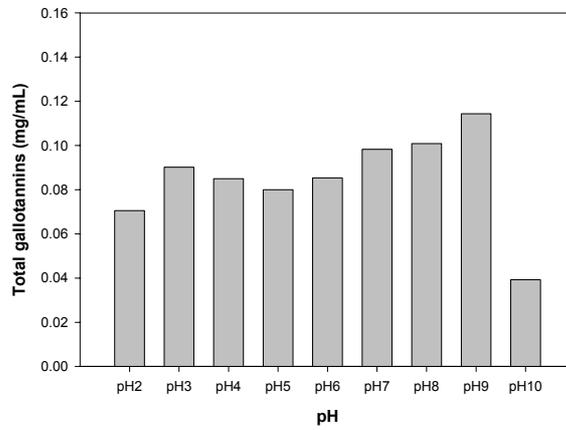
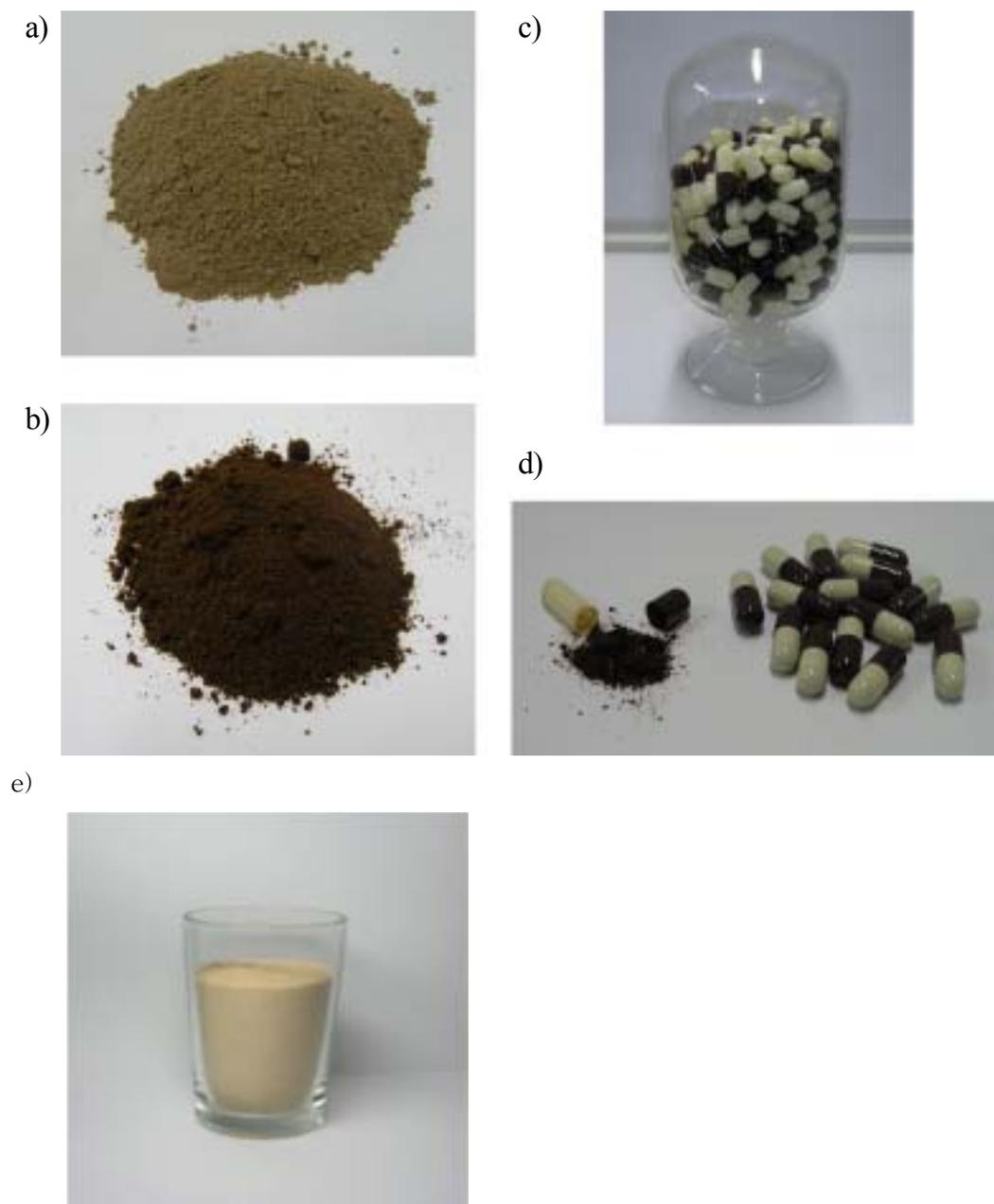


Fig. 59. Continued.



**Fig. 60. Products from the fruits of *Trapa japonica* Flerov.** a) Powder of dried fruits, b) powder of ethanol extract from the fruits, c) and d) trial product in a form of capsule containing ethanol extract powder e) grain products containing *Trapa japonica* Flerov. powder.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연차별 목표달성도

#### 1. 1차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

연구내용	추진일정												결과 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<b>제1세부과제:</b>														
○ 마름 용매획분의 in vitro 항산화 효과 조사														100
○ 마름 용매획분의 aldose reductase 저해활성 조사														100
○ 시료의 in vivo 혈당 조절 효과 규명 -동물실험(단기)														100
<b>제2세부과제:</b>														
○ 마름추출물 제조														100
○ 마름의 영양성분 분석														100
○ 탄수화물 분해효소 저해 활성 측정														100
○ 유효 활성물질 1차 분리														100
<b>협동과제:</b>														
○ 자료수집														100
○ 암세포주에서의 항암효능 스크리닝														100
○ 암세포 살해능력 검증														100
○ 기존 항암 약제와의 반응성 검색														100
○ 프로티움 분석을 통한 효능 발현과 관련된 목적 단백질 동정														100
총 진도율														100

2. 2차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

연구 내용	추진 일정												결과 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<b>제1세부과제:</b>														
○ 당뇨 동물의 사육 및 장기 동물 실험 실시														100
○ 샘플의 생화학적 측정 및 통계 처리														100
○ 시료의 in vivo 혈당 조절 효과 규명 - 단기 인체적용시험														100
<b>제2세부과제:</b>														
○ 유용성분 분리 및 정제														100
○ 유용성분의 구조분석														100
○ 유용성분의 탄수화물 분해효소 저해 특성 규명														100
<b>협동과제:</b>														
○ 동물모델 정립														100
○ 동물모델에서의 효능분석														100
○ 발굴된 표적단백질의 기능 분석														100
총 진도율														100

3. 3차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

연구내용	추진 일정												결과 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<b>제1세부과제:</b>														
○ 당뇨병자에 있어서 항당뇨 기능성 소재의 효능 확인														100
○ 당질 및 지질대사 개선효과 규명														100
○ 당뇨합병증 예방효과 규명														100
<b>제2세부과제:</b>														
○ 유용성분 분리 최적화														100
○ 유용성분의 물리, 화학적 안정성 분석														100
○ 유용성분의 기능성 식품소재로의 개발														100
○ 식품소재의 생리활성 분석														100
<b>협동과제:</b>														
○ 개발된 기능성 소재의 항암효과 확인														100
○ 항암 작용기작 규명														100
<b>총 진도율</b>														100

## 제 2 절 연구개발목표의 달성도

### 1. 연구평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점, 척도 및 달성도		
	착 안 사 항	척도 (점수)	달성도 (점수)
최종평가	○ 항당뇨, 항암 활성 성분의 분리 및 동정	25	25
	○ 항암, 항당뇨 활성 소재의 개발 (완제품, 식품원료)	15	15
	○ 개발된 제품의 당뇨치료 효과 규명	30	30
	○ 개발된 항암 소재의 항암효과 및 메카니즘 규명	30	30
<b>총 점</b>		100	100

#### ○ 항당뇨, 항암 활성 성분의 분리 및 동정

마름의 과피 추출물로부터 항당뇨, 항암 및 항산화 활성이 있는 분획을 얻은 후 4가지의 유효성분을 순수 분리하여 구조를 규명하였음. 유효활성성분은 각각 gallic acid, 1,2,6-tri-*O*-galloyl-D-glucose, tellimagrandin II 와 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-D-glucose로 확인되었음.

#### ○ 항암, 항당뇨 활성 소재의 개발 (완제품, 식품원료)

마름 유래의 유효 생리활성성분을 포함하는 기능성 식품소재로서의 개발을 위하여 마름 과피의 주정추출물을 제조하여 분말형태의 제품을 개발함. 또한, 환자가 쉽게 복용할 수 있는 완제품으로 캡슐형태의 시제품을 제작하였으며 파우치의 경우는 유효생리활성성분이 고온에서 불안정한 문제가 있었고 타블렛은 유효활성성분이 탄닌 계열이므로 쓴맛이 강하여 적당하지 않은 것으로 판단되었음. 건강기능제품으로서 마름 성분을 첨가한 식사대용식(선식)을 제조하여 인체적용시험을 실시한 결과 우수한 항당뇨 효능을 나타내었음.

#### ○ 개발된 제품의 당뇨치료 효과 규명

마름 추출물을 이용하여 동물모델계에서 혈당저하 효과를 규명하였음. STZ-유발 당뇨쥐에 있어서 대조군의 혈당치는 전분 섭취 후 90분에 최고치에 도달하였고, 식 후 30, 60, 90, 120분에 혈당 증가치는 마름 추출물군이 대조군에 비해 유의적으로

낮게 나타났으며, 식후 혈당변화 곡선의 면적은 대조군과 마름 추출물 투여군 사이에 유의적인 차이가 있었음( $p < 0.05$ ). 또한 제2형 당뇨병동물에 있어서 마름의 섭취는 체중과 식이섭취량에 유의적인 영향을 주지 않으면서 당화 헤모글로빈 농도와 공복 혈당을 유의적으로 감소시켰고, 혈장의 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 유의적으로 감소시켰음. 지질과산화물 측정 결과 마름군의 간조직 TBARS 함량은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며( $p < 0.05$ ), SOD 및 GSH-px 활성을 유의적으로 증가시켰음( $p < 0.05$ ). 당뇨병환자에 있어서 마름이 식후 혈당 조절에 미치는 영향을 조사한 결과 마름추출물을 쌀밥과 함께 섭취한 경우, 식후 30, 60, 90, 120, 180분의 혈당증가치가 쌀밥만 섭취한 경우에 비해 유의적으로 낮았으며( $p < 0.05$ ), 마름섭취군에 있어서 식후 혈당 증가곡선의 면적(AUC)은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음( $p < 0.05$ ).

제2형 당뇨병환자를 대상으로 마름의 장기 섭취 효과를 조사한 결과, 10% 마름함유 곡류선식제품(70g/day) 섭취 3개월 후 부작용 없이 혈당, fructosamine, HbA1c, 인슐린 및 인슐린 저항성 지표인 HOMA-IR 값이 유의적으로 낮게 나타났으며, 중성지방, 총콜레스테롤 및 동맥경화 지수는 마름섭취군이 유의적으로 낮았음. 마름제품의 섭취는 혈장 TBARS 농도를 유의적으로 감소시켰고, 적혈구 SOD활성을 증가시켰음. 따라서 마름의 장기간 섭취는 고혈당 및 이상지혈증(dyslipidemia)을 개선하고 항산화능을 증가시켜 당뇨병 및 당뇨합병증을 개선하는 효과가 우수하다고 사료됨.

#### ○ 개발된 항암 소재의 항암효과 및 메카니즘 규명

MTT assay 및 세포독성의 형태학적 관찰을 통해 항암 효능이 유효한 추출물 분획을 선별하여 향후 연구를 위한 처리조건을 결정하였음. Flow cytometry 분석을 시행하여 선별된 마름 hexane분획을 처리하였을 때, 비 처리군과 비교하여 현저한 subG1기 분획의 증가가 관찰되어 apoptosis가 일어났음을 알 수 있었음. 분리된 마름 분획 중 일부에서 기존 항암 약제들(Taxol, cisplatin, adriamycin)과 동시에 처리 시 암 세포 살해 synergy 효과를 보였음. MCF-7세포에서 표준 reference protein map을 작성하였고 thioredoxin계 항산화효소인 peroxiredoxin 2 등 일부 단백질들을 동정하였고, 동물모델에서의 항암 효과 규명을 위해 항암 효능이 확인된 마름 추출물의 세부 분획을 추가 분리하여 항암 활성을 검증하였음. 복수암 세포주 S-180 세포를 마우스 복강 내에 주입하여 악성 복수생성을 통한 발암을 유도하였으며 2주째 까지 대부분의 마우스에서 대량 복수가 발생하여 성공적으로 복수암 발암 모델을 수립하였음. 항암 효능 관련 단백질 분석, 동정 및 기능 분석을 통하여 vimentin, cytokeratin 19, glutathion S-transferase:increase, cathepsin D등을 동정하였으며, 2세부과제에서 개발된 항암소재의 효능을 동물모델계에서 확인하였음. Thioredoxin계 역할 규명을 통하여 항산화 역할을 연구하고 stable transfectant를 이용한 thioredoxin 산화 효소계의 역할을 규명하여 분자생물학적 연구를 통한 작용 메카니즘을 연구하였음.

## 제 3 절 관련분야 기여도

### 1. 기술적 측면

- 가. 마름의 생리활성을 입증하여 특허 3건을 출원하였으며 1건을 등록하였음.
- 나. 체계적인 연구가 거의 전무한 마름의 생리활성 및 활성성분에 관한 데이터베이스를 구축하였음.
- 다. 당뇨병 치료 및 합병증 예방효과가 우수한 소재를 개발하였으며, 부작용 없이 지속적으로 섭취할 수 있는 혈당 조절 및 당뇨합병증 개선용 제품 개발을 위한 기초자료를 제공하였음.
- 라. 동물 실험을 통하여 본 마름 추출물이 *in vivo*에서도 충분한 항암 효능을 발휘함을 증명하여 향후 국내 자생 식물들을 이용한 신약 개발에 일조를 할 것으로 판단됨.
- 마. 본 연구와 유사한 동물 모델 수립에서 성공적인 동물 암 모델 수립에도 도움을 줄 수 있을 것으로 보임.
- 바. 인간에서의 항암 약제의 투여에 의한 항암 치료 시 암 세포의 약제에 대한 내성 획득이 궁극적인 치료 실패 원인을 감안 하면 본 연구에서의 발견은 향후 항암 약제 개발에 중요한 표적이 될 수 있음. 즉 thioredoxin 효소계의 억제제는 항암 치료제로 이용이 가능함을 뜻함. 실제로 heat shock protein 90 등 몇몇 chaperon protein 억제 물질이 항암제로 개발되어 소개되고 있음 (Chiosis G, Dai C 등).
- 사. 작용기작 확인을 위한 분자생물학적 연구에서 밝힌 항암 작용기작으로 주목할 만한 것은 항암효능에 관련이 있을 것으로 추정되어 동정된 thioredoxin 효소계의 역할임. 본 연구를 통하여 인체의 암조직에서도 본 효소가 발현되고 있음을 밝혔고 암 세포에서 그 역할을 밝히고자 하였음. 기존의 연구들은 세포들은 외부에서의 스트레스 극복에 본 효소계를 이용하는 것으로 알려 졌으나 본 연구의 결과를 통하여 기존에 알려진 항산화 기능 보다는 손상 단백질의 분해를 억제하는 chaperon 단백질로서의 역할을 통하여 마름의 항암 효능을 조절하고 있음을 밝혔음.

## 2. 경제·산업적 측면

- 가. 마름의 항당뇨 및 항암 효과를 규명하였고 활성성분을 분리·동정함으로써 마름의 우수성을 홍보하여 마름의 소비를 증가시키고 농가의 소득 증가에 기여할 것으로 사료됨.
- 나. 혈당강하 및 항암 소재의 개발로 수입에 의존하고 있는 약물 및 기능성식품의 수입대체 효과 및 환자의 의료비 절감 효과를 기대할 수 있음.
- 다. 현재 국내 당뇨병 치료제 시장 규모는 경구용과 인슐린 주사제를 포함하여 연간 약 1,300억원 수준으로, 개발된 제품의 판매 및 기술 이전을 통해 이들의 약 1%를 대체한다고 할 경우 13억원의 수익 창출이 기대됨.
- 라. 원료 및 완제품의 수출로 외화획득을 할 것으로 기대됨.
- 마. 당뇨병 및 암이 급증하고 있는 현재 이의 예방과 개선효과가 있는 제품의 개발로 국민의 건강을 유지하고, 삶의 질 향상에 기여할 수 있을 것임.
- 바. 당뇨병 개선 및 암 예방을 통해 국민 경제활동을 촉진시켜 경제성 증대 효과가 나타날 것임.

## 제 4 절 연구성과

### 1. 국제학술회의 발표

초록제목	학회기관	발표연도
Separation of antioxidative compounds from <i>Trapa japonica</i> Flerov.	한국식품영양과학회 국제심포지엄	2004.11
Inhibitory activity of <i>Trapa Japonica</i> Flerov. against $\alpha$ -glucosidase	한국식품과학회 국제학술대회	2005.06
Purification and characterization of bioactive compound from <i>Trapa japonica</i> Flerov.	한국식품과학회 국제학술대회	2006.06

### 2. 국내학술회의 발표

초록제목	학회기관	발표연도
Effect of extract of <i>Trapa japonica</i> Flerov. on postprandial glucose in patients with type 2 diabetes mellitus	한국식품영양과학회 학술대회	2003.11
Hypoglycemic and free radical scavenging effects of <i>Trapa japonica</i> Flerov. extracts in vitro	한국영양학회 학술대회	2004.05
Effect of <i>Trapa japonica</i> Flerov, in glycemic control and plasma lipid profiles in db/db mice	대한지역사회영양학회 학술대회	2005.04
Antioxidative effect of <i>Trapa japonica</i> Flerov. in db/db mice	대한지역사회영양학회 학술대회	2005.04
Anticancer effect of <i>Trapa japonica</i> Flerov, in MCF-7cells	대한지역사회영양학회 학술대회	2005.04
Peroxiredoxin II protects cancer cells in a way of proteasome inhibition.	대한 암학회 학술대회	2006.06

### 3. 특허

구분	특 허 명	국가명	출원번호 /등록번호	출원일 /등록일
출원	마름추출물을 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물	대한 민국	10-2004- 0032522	2004.05.14
출원	항산화 활성을 갖는 마름 추출물을 포함하는 조성물	대한 민국	10-2004- 0033787	2004.05.13
출원	마름추출물을 포함하는 지질대사 개선 및 당뇨병에 의한 합병증 예방 및 치료용 조성물	대한 민국	10-2005- 0039419	2005.05.11
등록	마름추출물을 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물	대한 민국	등록결정 (2006.07.11)	

### 4. 기타

수상명	수상기관	수상연도	비고
대한지역사회영양학회 춘계학술대회 우수논문발표상	대한 지역사회 영양학회	2005	Effect of <i>Trapa japonica</i> Flerov. on glycemic control and plasma lipid profiles in db/db Mice
한국식품과학회 국제학술대회 우수포스터상	한국식품 과학회	2006	Purification and characterization of bioactive compound from <i>Trapa japonica</i> Flerov.

## 제5장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

1. 본 연구를 통하여 마름 추출물의 항당뇨 및 항암활성에 대한 긍정적인 결과를 얻었으나 식품의약품안전청의 건강기능성식품에 대한 개별인정형 인증을 위하여 마름 추출물의 독성 평가가 향후 수행되어야 함.
2. 마름 추출물은 위암 세포주 SNU-1에서는 약간의 항암 효능을 보였으나 western blot상에서 cyclin D1, retinoblastome 단백질, PARP 등은 변화를 보이지 않아 위암에는 항암 효능이 강하지 않은 것으로 보임. 그러나 자궁암 세포주(HeLa)에서는 in vitro에서 강력한 항암 효능을 보였고 동물 실험에서도 복수암에서 강력한 항암 효능을 보여서 마름 추출물은 종양 특이성이 있는 것으로 보이고 이들 결과로 보면 향후 자궁암, 유방암 등 부인과 종양 및 복강 내 전이된 암의 치료제로서의 가능성을 보이고 있어 향후의 연구는 이들 종양을 중심으로 추가 연구 및 산업화 가능성을 타진할 필요가 있음.
3. 마름의 유효활성성분인 gallotannin의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해효과는 매우 우수하며 tight binding inhibition의 저해 형태를 보이는 것으로 밝혀졌으며 향후 임상적 적용을 위해서는 효소저해 메카니즘에 대한 보다 정확한 규명이 필요함.
4. 본 연구에서는 생리활성성분을 포함한 마름 추출물을 소재로 캡슐과 식사대용식(선식)의 제품을 시도하였으며 향후 보다 다양한 종류의 건강기능성식품을 개발할 필요가 있음.
5. 마름을 이용한 건강기능성 소재를 산업적으로 생산하기 위해서는 재료의 안정적인 공급이 필수적임. 현재 농가에서는 마름을 재배하고 있지 않지만 연못 혹은 논과 같은 습지에서 마름을 대량으로 경작할 수 있는 재배방법에 관한 연구도 필요함.

### 제 2 절 타 연구에의 응용

1. 마름 추출물의 유효활성성분인 gallotannin은 항당뇨 및 항암활성뿐만 아니라 강

력한 항산화활성을 나타내므로 이를 이용한 식품소재로의 개발 및 화장품 등으로의 응용이 가능할 것으로 사료됨.

2. 항암 약제 개발 시 thioredoxin 효소계 중에서 peroxiredoxin II 효소가 항암 효능을 조절하는 중요한 표적임을 밝혔으므로 향후 이 단백질을 표적으로 한 표적 항암제 개발에 활용할 수 있을 것임.
3. 유효활성성분인 gallotannin의 강력한 효소저해 활성을 이용하여  $\alpha$ -glucosidase 이외의 효소에 대한 저해제로 응용 가능함.

### 제 3 절 기업화 추진방안

1. 마름의 유효활성성분을 포함하는 추출물을 건강기능식품에 응용하기 위해서는 우선 식품의약품안전청의 개별인정형 인증을 획득하여야 함. 본 연구를 통하여 마름의 항당뇨 및 항암 활성을 in vitro 및 in vivo에서 규명하였으며 유효활성성분을 분리하여 동정하였으나 개별인정형 인증을 위하여 향후 마름 추출물의 독성평가를 수행하여야 함.
2. 마름 추출물을 이용한 다양한 종류의 건강기능식품을 개발하여야 함. 본 연구에서는 시제품으로 캡슐 및 당뇨환자를 위한 식사대용식(선식)을 제조하여 보았으며 알콜음료로의 개발도 유망할 것으로 판단됨. 그러나 마름의 유효활성성분이 고온 및 알칼리에서 불안정하여 살균과 같은 중간 처리과정에서의 제약이 따르므로 이를 해결할 수 있는 방법을 모색할 필요가 있음.
3. 마름을 이용한 건강기능성식품의 개발에 관한 기술의 우선 실시권은 기화제약(주)에 있음. 따라서 개별인정형 인증을 획득한 후 기화제약(주)에 기술 이전을 추진할 계획임.
4. 이후 기화제약(주)의 판매망을 활용하여 개발된 제품의 매출을 증대시킬 계획임.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 항당뇨 효능 관련 해외과학기술정보

1. 바나바(Banaba) 잎은 항당뇨 효과를 나타내는 corosolic acid를 함유하고 있는 것으로 알려져 있음. SGTI사는 바나바 잎에서 추출한 corosolic acid를 1% 함유한 GlucoTrim™제품을 생산하고 있으며, 1998년 Tokyo Jikeikai Medical School의 임상시험(two placebo-controlled crossover trial) 결과 GlucoTrim을 섭취 후 부작용 없이 혈당 수준이 감소하는 것을 발표하였음.
2. Fenugreek(호로파) 또한 항당뇨 효과가 있는 것으로 나타났음. 호로파의 높은 식이섬유 함량은 위에서 gel을 형성하여 gastric emptying을 늦추고 포도당 흡수를 지연시키는 것으로 알려졌다. 임상시험(double-blind, placebo-controlled study)에서 식사 조절 및 운동만 한 그룹과 호로파 씨의 hydroalcoholic extract를 일일 1mg씩 제공하는 실험군으로 나누어 비교한 결과 2개월 후 호로파 씨의 유효 성분이 제2형 당뇨병환자에 있어서 혈당을 개선시키고 인슐린 저항을 감소시키는 것으로 나타났음 (Gupta et al., 2001). Acatris 사는 호로파의 냄새없는 추출물인 FenuLife 제품 시판중이며, 제품에 대한 임상 시험의 시작 단계에 있음. 호로파를 함유한 또 다른 제품이 Technical Sourcing International(Missoula, MT)사에서 Promilin™ 라는 제품으로 시판되고 있음. Promilin™는 호로파에서 추출한 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile)를 함유하는 아미노산의 생리활성 복합체이며, 포도당 섭취 후 4-OH-Ile이 인슐린 방출을 증가시킴으로써 동물 실험에서 glucose tolerance를 개선시키고, 혈당 상승을 감소시키는 것으로 나타났음 (Broca et al., 1999).
3. 혈당 수준이 상승하면 산화적 스트레스가 증가하며 이러한 상관관계는 당뇨병환자들의 심혈관계 합병증 위험도가 높아지는 것을 설명함. Pycnogenol®은 강력한 항산화능을 지니는 프랑스산 소나무 껍질의 추출물로 만든 제품으로, 당뇨병환자들을 대상으로 한 임상시험(double-blind, placebo-controlled, randomized, multi-center study)에서 Pycnogenol을 당뇨 치료와 병행한 결과 placebo군에 비해 혈당이 유의적으로 낮아짐을 확인하였음 (Ximing et al., 2004). 또한 Pycnogenol의 성분은 60세 이하 당뇨 환자들의 blindness 주원인이 되는 당뇨병성 신증의 progression을 정지시키거나 지연시키는 것으로 나타났으며, 유럽에서 1,000명이 넘는 사람들

을 대상으로 한 임상시험에서Pycnogenol이 시각 손상을 예방하는 retina 모세혈관의 leaky를 seal하는 것으로 발표되었음 (Schönlau and Rohdewald, 2002).

4. 일본에서 전통적으로 당뇨치료에 사용되는 Maitake 버섯을 이용한 여러 동물실험 및 임상시험에서 혈당조절 효능을 확인하였음. 2-4주간 제2형 당뇨 환자 5인을 대상으로 한 임상시험에서 SX-fraction을 함유하는 maitake 분말을 섭취시킨 결과 혈당 수준이 30-63% 감소함을 확인하였음 (Konno et al., 2001). Maitake Products, Inc.는 2달간 14명의 당뇨환자들을 대상으로 한 임상시험에서 maitake 버섯의 fraction을 함유한 보충제 섭취 한달 후 공복혈당 및 당화헤모글로빈 수치가 유의적으로 감소하고, 체중, 콜레스테롤 및 중성지방 농도 또한 감소하는 것을 확인하였음.
5. 콩 단백질은 여러 동물 및 임상시험에서 항당뇨 효능을 지니고 있는 것으로 발표되었음. Solbar(Ashdod, Israel)사는 콩 단백질인 Solcon S와 콩 isoflavones인 Solgen 40을 생산하였으며, 두 제품을 대상으로 임상시험을 실시하였음. Solcon S와 Solgen 40을 모두 함유한 보충제를 폐경 후 여성들에게 섭취시킨 결과 인슐린 저항 및 혈당이 개선되었으며 콜레스테롤이 감소됨을 확인하였음 (Jayagopal et al., 2002).
6. 마우스, 흰쥐, 토끼를 이용한 동물실험에서 bitter melon(학명: Momordica charantia, 여주)가 혈중 포도당 수준을 감소시키는 것으로 나타났으며, 임상시험(two controlled short-term trials) 결과 제2형 당뇨환자에게서 혈당 및 당화헤모글로빈 수치가 감소하는 것으로 나타났음 (Welhinda et al., 1986; Baldwa et al., 1977). 다른 임상시험(two small, uncontrolled trials)에서는 11주간 7명의 환자에게 bitter melon을 섭취시킨 결과 glucose tolerance가 개선되는 것으로 나타났음 (Srivastava et al., 1993; Leatherdale et al., 1981).
7. 인삼의 종류인 Panax ginseng 및 American ginseng은 당뇨 치료에 사용되고 있음. 고혈당 마우스를 이용한 동물실험에서 Panax ginseng이 혈당 수준을 감소시키는 것으로 나타났으며(Oshima et al., 1985) 제2형 당뇨환자들을 대상으로 한 8주간의 임상시험에서 American ginseng은 공복혈당, 당화헤모글로빈 및 식후혈당 수준을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났음 (Sotaniemi et al., 1995; Vuksan et al., 2001).
8. Gymnema sylvestre(당살초)는 Ayurveda에서 널리 사용되는 천연식물로, 몇몇 임상시험(non-randomized controlled clinical trials)에서 당살초 추출물을 제공받은

그룹이 conventional treatment만 제공받은 그룹에 비해 혈당조절이 개선됨을 확인하였으며, 인슐린을 투여하는 환자들의 인슐린 요구도를 감소시키는 것으로 나타났다 (Shanmugasundaram et al., 1990; Baskaran et al., 1990).

9. 알로에 gel을 42일간 하루 2회씩 각각 15mL 제공한 당뇨병환자에 있어서 실시한 임상시험(placebo-controlled, single-blind)에서 43%의 환자가 혈당이 감소하는 결과를 나타내었으며, 44%의 환자는 중성지방 농도가 감소하는 것을 나타내었음 (Yougchaiyudha et al., 1996). Bunyapraphatsara 등은 glibenclamide 복용 시 혈당 및 중성지방 수준이 변화가 없었던 당뇨병환자들의 48%가 알로에 vera juice 섭취 후 혈당이 감소하는 결과 및 실험참가자의 52%는 중성지방이 감소하는 것을 발표하였음 (Bunyapraphatsara et al., 1996).
10. 당뇨병환자에 있어 천연물을 이용한 치료의 예는  $\alpha$ -lipoic acid(ALA)의 사례에서도 찾아볼 수 있음. 15명의 환자를 대상으로 한 임상시험에서 하루 600mg의 ALA를 3주간 복용시킨 결과 당뇨병성 신경증의 주요 증후가 감소되었고, 하지(下肢)운동 및 감각신경이 개선된 것을 확인하였음 (Ziegler et al., 1999). 또한 Mayo Clinic과 Russian medical center의 공동 연구에서 ALA의 혈관내 주입은 당뇨병성 신경증의 작열감, 통증, 따끔거림, 그리고 저림 증상을 감소시키는 결과를 발표하였음 (Ametov et al., 2003).

이상의 예로 볼 때 다양한 식물유래 생리활성 물질로부터 당뇨병환자의 혈당 개선에 유용한 성분을 발굴하여 제품화 하는 연구가 활발하게 진행 중임. 따라서, 본 연구결과 항당뇨 및 항산화능이 우수한 마름을 이용한 기능성 식품소재로의 개발은 유용할 것이라 사료됨.

## 제 2 절 항암 효능 관련 해외과학기술정보

1. 마름과 유사 속의 식물인 *Trapa bispinosa*의 과육에서 항암 효능이 발견되어 연구가 진행되었음. 전통적으로 중국 한방에서 사용되어 오던 치료 약제 중에 본 식물체가 포함되어 있어 1986년 일본의 연구자를 중심으로 여기에서 자궁암 암 세포주 HeLa에서 *in vitro*의 항암 효능을 확인 하여 보고하였음. 항암 효능은 cytostatic하였고 세포 주기 고착 효과 등을 보여 주어 향후 연구 가치가 있다고 보고하였음. 항암 효능은 배양 중인 암 세포의 성장억제 관찰만으로 결론을 내었으며 효능에 관한 기작 연구는 없었음. 연구 아이디어는 본 연구과제와 비슷하였으

나 본 연구와는 달리 apoptosis를 보여주지 않아서 본 연구 주제인 마름 보다는 항암 효능이 적은 것으로 보임 (Yakugaku, 1986).

2. 본 연구에서 동정되어 마름의 항암 효능에 중용한 역할을 하는 것으로 규명된 peroxiredoxin효소에 관한 연구들으로써 peroxiredoxin효소들이 폐암 조직에서 발현이 증가되어 있고 이 것 때문에 암 세포의 생존과 증식에 도움을 준다는 내용이 보고됨. 이 보고는 본 연구의 결과와 상당 부분 일치하고 향후 마름 추출물의 항암 효능이 폐암에도 유효할 것임을 시사하며 향후 연구 확대에 도움을 줄 수 있는 내용임 (Respirology, 2006).
3. *Helicobacter pylori* 세균이 peroxide reductase로 작용하여 oxidative stress 하에서의 misfolding을 방지하는 chaperon 기능을 갖는다는 내용으로 *H. pylori*의 생존 기작 중의 하나를 규명한 논문으로 본 연구에서 마름 등의 항암물질로부터 암 세포가 살아남는 기작연구에 참조가 되는 연구임 (Chuang et al., 2006).
4. Peroxiredoxin II가 유방암 세포주에서 방사선 치료에 저항하게 하는데 주된 역할을 한다는 연구임. 본 연구 내용과 유사한 연구로 미국에서 수행되었음 (Wang et al., 2005).

## 제 3 절 유효물질 분리, 동정 관련 해외과학기술정보

### 1. 마름으로부터 분리하여 보고된 생리활성물질들

가. Trapain 등 : 마름의 과피로부터 탄닌을 분리하여 ellagitannin, eugenin(I), 1,2,6-trigalloyl glucose, 1,2,3,6-tetragalloyl glucose와 1,2,3-trigalloyl-6-digalloyl glucose를 동정하였으며 ethylacetate층으로부터 trapain II를 분리하였음 (Nonaka et al., 1981).

나. Trapainin 등 : 마름의 잎으로부터 탄닌을 분리하여 gemin D, tellimagrandin I, pedunculagin, casurinin, cornurinin A, capltothin B과 cornusiin D 등을 동정하였음 (Hatano et al., 1990).

### 2. Gallotannin의 기타 생리활성

본 연구에서 유효활성성분으로 규명된 gallotannin의 생리활성에 관한 연구는 많이 알려져 있으며 rat Intestinal  $\alpha$ -glucosidase 저해, antibiotic, 항산화, 항암 및 항바이러스 효과 등의 생리활성이 보고되었음. 주요 gallotannin의 종류로는 gallic acid, trigalloylglucose, tetragalloylglucose, pentagalloyl glucose 및 tellimagrandin I, II 등이 있으며 각 성분의 주요 생리 활성은 다음과 같음.

가. Gallic acid : Gallic acid와 gallic acid 유도체인 methyl gallate는 혈전응집억제제로서 효능이 탁월하고 항암 효과가 뛰어난 것으로 보고되었음 (Lim et al., 2003; Kolodziej et al., 2005).

나. Tellimagrandin II : Tellimagrandin II는  $\beta$ -secretase(BACE1)의 비경쟁적 저해제로 알려져 있으며, *Helicobacter pylori*균에 대한 항균효과를 가지는 것으로 보고되었음 (Lee et al., 2005; Funatogawa et al., 2004).

다. Pentagalloyl glucose : Pentagalloylglucose은 항염증 및 세포성장 저해에 관한 연구가 보고되었으며,  $\alpha$ -glucosidase를 저해하며 인슐린 수용체와 결합하여 포도당 대사를 활성화 시키는 등 당뇨병 예방 및 치료에 우수한 효능을 가진 물질로 보고되었음 (Feldman et al., 2001; Lee et al., 2004; Niemetz et al., 2001; Cannell et al., 1998; Feldman et al., 1999).

## 제 7 장 참고문헌

- Aebi H. Catalase in vitro *In* : Method in Enzymology. *Academic press, Grlando, Florida*. 105 : 121 (1984)
- Ahmedzai SH, Walsh D. Palliative medicine, modern cancer care. *Semin Oncol*. 27(1) : 1-6 (2000)
- Ahn YJ, Lee CO, Kweon JH, et al. Growth-inhibitory effects of Galla Rhois-derived tannins on intestinal bacteria. *J Appl Microbiol*. 84 : 439-443 (1998)
- Ametov AS, et al. The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: the SYDNEY trial. *Diabetes Care*. 26(7) : 2227 (2003)
- Baldwa VS et al. Clinical trial in patients with diabetes mellitus of an insulin-like compound obtained from plant sources. *Upsala J Med Sci*. 82 : 39-41 (1977)
- Baskaran K et al. Antidiabetic effect of a leaf extract from *Gymnema sylvestre* in non-insulin dependent diabetes mellitus patients. *J Ethnopharmacology*. 30 : 295-305 (1990)
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 26 : 1199-1200 (1958)
- Brand JC, Colariuri S, Crossman S, Allen AY, Truswell AS. Low glycemic index carbohydrate foods improve glucose control in NIDDM. *Diabetes Care*. 14 : 95 (1991)
- Broca C., et al. 4-Hydroxyisoleucine: Experimental Evidence of its Insulinotropic and Antidiabetic Properties. ©1999 the American Physiological Society
- Bunyaphatsara, Yongchaiyudha et. al. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice II. Clinical trial in diabetes mellitus patients in combination with Glibenclamide. *Phytomedicine*. (1996)
- Cannell RJP, Farmer P, and Walker JM. Purification and characterization of pentagalloylglucose, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor/antibiotic from the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *Biochem. J*. 255 : 937-941 (1998)
- Chiosis G, Caldas Lopes E, Solit D. Heat shock protein-90 inhibitors: a chronicle from geldanamycin to today's agents. *Curr Opin Investig Drugs*. 7(6) : 534-41 (2006)
- Choi JS, Kim JS, Lim HK, Kwak HH, Cho KY. Study on the seed germination

- characteristics of *Trapa japonica* FEROV. *Kor. J. Weed Sci.* 17(4) : 413-420 (1997)
- Chuang MH, Wu MS, et al. The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21;103(8) : 2552-7 (2006)
- Chung YH, Choi HK, Suh KH, Shin H. Numerical taxonomic study of the nuts of genus *Trapa* in Korea. *Kor. J. Plant Tax.* 17(1) : 45-54 (1987)
- Dai C, Whitesell L. HSP90 : a rising star on the horizon of anticancer targets. *Future Oncol.* 1(4) : 529-40 (2005)
- Feldman KS and Sahasrabudhe K. Ellagitannin chemistry. Synthesis of tellimagrandin II and a dehydrodigalloyl ether-containing dimeric gallotannin analogue of coriariin A. *J Org Chem.* 64 : 209-216 (1999)
- Feldman KS, Sahasrabudhe K, Lawlor MD, et al. In vitro and in vivo inhibition of LPS-stimulated tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion by the gallotannin  $\beta$ -D-pentagalloylglucose. *Bioorg Med Chem Lett.* 11(14) : 1813~1815 (2001)
- Feldman KS, Sambandam A, Lemon ST, et al. Binding affinities of gallotannin analogs with bovin serum albumin : ramifications for polyphenol-protein molecular recognition. *Phytochemistry.* 51(7) : 867-872 (1999)
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 38(12) : 1543-52 (2005)
- Fukuda T, Ito H, and Yoshida T. Antioxidative polyphenols from walnut (*Juglans resia* L.). *Phytochemistry.* 63(7) : 795-801 (2003)
- Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, et al. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol.* 48(4) : 251-261 (2004)
- Fuwa HA. New method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem.* 41 : 583 (1954)
- Grever MR, Chabner BA. Cancer drug discovery and development. In : DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, cds. *Cancer : Principles and practice of oncology*, Fouth Edition. 1 : 385-394 (1997)
- Gupta A, et al. Effects of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a double blind placebo controlled study. *J Assoc Physicians India.* 49 : 1057-1061 (2001)
- Ha AW, Kim HM. The study of lipid-peroxidation, antioxidant enzymes, and the

- antioxidant vitamins in NIDDM patients with microvascular-diabetic complications. *Kor. J. Nutr.* 32(1) : 17-23 (1999)
- Hanato T, Ogawa N, Kira R, et al. Tannins of Cornaceous plants. I. Cornusiin A, B and C, dimeric monomeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins. *Chem Pharm Bull.* 37(8) : 208 (1989)
- Hatano T, Okonogi A, Yazaki K, et al. Trapanins A and B, Oligomeric hydrolyzable tannin from *Trapa japonica* Flerov. *Chem Pharm Bull.* 38(10) : 2707-2711 (1990)
- He Q, Shi B, Yao K, et al. Synthesis of gallotannins. *Carbohydr Res.* 335 : 245-250 (2001)
- Immenschuh S, Baumgart-Vogt E. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxid Redox Signal.* 7(5-6) : 768-77 (2005)
- James M, Crabbe C, Derek Goode. Aldose reductase: a window to the treatment of diabetic complications. *Progress in Retinal and Eye Research.* 17(3) : 313-383 (1998)
- Jaouhari JT, Lazrek HB, Seddik A, Jana M. Hypoglycaemic response to *Zygophyllum baetulum* extracts in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Ethnopharm.* 64 : 211-217 (1999)
- Jayagopal V et al. Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 25(10) : 1079-14 (2002)
- Jenkins DJA, Wolever DM, Taylor RH, Barker H, Fieden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Alexandra BA, Goff DV. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.* 34(3) : 362-366 (1981)
- Kawamoto H, Mizutani K, and Nakatsubo F. Binding nature and denaturation of protein during interaction with galloylglucose. *Phytochemistry.* 46(3) : 473-478 (1997)
- Kim HY. In vitro inhibitory activity on rat intestinal mucosa  $\alpha$ -glucosidase by rice hull extract. *Korean J Food SCI Technol.* 29(3) : 601-608
- Kim MJ, Ahn YJ, Kim MK, et al. Rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of Leguminous seed extracts. *Agri Chem Biotechnol.* 44(1) : 1-5 (2001)
- Kim BJ, Kim JH, Kim HP, Heo MY. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging

- activity. *Intern. J. Cosmet. Sci.* 19 : 299-307 (1997)
- Konno, S et al. A possible hypoglycemic effect of maitake mushroom on type 2 diabetic patients. *Diabetic Med.* 18 (2001)
- Kosuge T, Yokota M, Sugiyama K, Okamoto A, Saito M, Yamamoto T. Studies on Chinese medicines used for cancer. III. Cytotoxic constituent against HeLa cells in the fruit of *Trapa bispinosa* Roxb. *Yakugaku Zasshi.* 106(2) : 183-185 (1986)
- Kwak CS, Lim SJ, Kim SA, et al. Antioxidative and Antimutagenic effects of Korean Buckwheat, Soghum, Millet and Job's Tears. *J Kor Soc Food Sci Nutr.* 33(6) : 921-929 (2004)
- Lawrence RA, Burk F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 71 : 952 (1976)
- Leatherdale BA, et al. Improvement in glucose tolerance due to *Momordica charantia* (karela). *Br Med J.* 282 : 1823-1824 (1981)
- Lee HJ, Lee BJ, Lee DS, et al. DPPH radical scavenging effect and in vitro Lipid Peroxidation Inhibition by *Potulaca oleracea*. *Kor J Biotechnol Bioeng.* 18(3) : 165-169 (2003)
- Lee HJ, Seong YH, Bae KW, et al.  $\beta$ -Secretatase(BACE1) Inhibitors from *Sanguisorbae Radix*. *Arch Pharm Res.* 28(7) : 799-803 (2005)
- Lee SJ, Lee HM, Ji ST, et al. 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-D-glucose blocks endothelial cell growth and tube formation through inhibition of VEGF binding to VEGF receptor. *Cancer Lett.* 208(1) : 89-94 (2004)
- Lee SJ and Ji ST. Effect of *Paeonia laticiflora* extract on  $\alpha$ -glucosidase. *Nat Prod Sci.* 10(5) : 224-227 (2004)
- Lee, L., Huang, Y., Kandaswami, C., and Lee, M. Flavonoids inhibit the invasive potential of tumor cells via the modulation of focal adhesion kinase. *Proc AACR* . 42 : 4274 (2001)
- Li Y, Kim J, Li J, et al. Natural anti-diabetic compound 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-D-glucopyranose binds to insulin receptor and activates insulin-mediated glucose transport signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 336(2) : 430-437 (2005)
- Lim MY, Park YH, Son DJ, et al. Antiplatelet activity of gallic acid and methyl gallate. *Food Sci Biotechnol.* 13(6) : 806-809 (2003)
- Marklund, S. and Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase.

- Eur. J. Biochem.* 47 : 469 (1974)
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 : 426-428 (1959)
- Musgrove EA. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors.* 24(1) : 13-19
- Niemetez R and Gross GG. Enzymology of gallotanin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry.* 66 : 2001-2011 (2005)
- Niemetez R, Schilling G, and Gross GG. Ellagitannin biosynthesis: oxidation of pentagalloylglucose to tellimagrandin II by an enzyme from *Tellimagrandiflora* leaves. *Chem Commun.* 35~36 (2004)
- Nonaka GI, Matsumoto Y, Nishioka I. Trapain, a New Hydrolyzable Tannin from *Trapa Japonica* Flerov. *Chem Pharm Bull.* 29(4) : 1184-1187 (1981)
- Ohkawa, H., Ohisi, N., and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95 : 351 (1979)
- Oloff, A. and Friend, S. H. Molecular targets for drug development. *In* : DeVita VT, editor *Cancer : Principles and Practise of Oncology* ed 5. Philadelphia : Lippincott-Raven. p. 3115 (1997)
- Oliver, C. N., Ahn, B., Moerman, E. J., Goldstein, S., and Stadman, E. R. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 262 : 5348 (1987)
- Oshima, Y et al. Isolation and hypoglycemic activity of panaxans I, J, K and L, glycans of *Panax ginseng* roots. *J Ethnopharmacology.* 14(2-3) : 255-9 (1985)
- Owen RW, Haubner R, Hull WE, et al. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem Toxicol.* 41 : 1727-1738 (2003)
- Ozawa T, Lilley TH, and Halsam E. Phenol interactions: Astringency and the loss of astringency in ripeing fruit. *Phytochemistry.* 26(11) : 2937-2942 (1987)
- Parker, S. L., et al. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J. Clin.* 46 : 5-27 (1996)
- Rahman, M. M., Mosaddik, M. A., Wahed, M. I. I., and Haque, E. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Trapa bispinosa*. *Fitoterapia.* 71 : 704-706 (2000)
- Park JH, et al. Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung. *Respirology* 11(3) : 269-275 (2006)
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine.* 38 : 1543-1552 (2005)
- Rosenberg, S. A. Principles of cancer management: Biological therapy. *In* :

- DeVita VT, editor Cancer: Principles and practise of oncology ed 5. Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 349 (1997)
- Salminen JP, Ossipov V, Lojonen J, et al. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 864 : 283-291 (1999)
- Schwartz, S. E. and Levine, G. D. Effect of dietary fiber on intestinal glucose absorption and glucose tolerance in rats. *Gastroenterology*. 79 : 833 (1980)
- Schönlau, F. and Rohdewald, P. The review contains results of 5 clinical studies with Pycnogenol® showing the efficacy of Pycnogenol® supplementation for patients with diabetic retinopathy. *International Ophthalmology*. 24: 161-171 (2002)
- Shanmugasundaram ERB et al. Use of *Gymnema sylvestre* leaf extract in the control of blood glucose in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Ethnopharmacology*. 30 : 281-294 (1990)
- Sotaniemi BA, et al. Ginseng therapy in non-insulin dependent diabetic patients: effects on psychophysical performance, glucose homeostasis, serum lipids, serum aminoterminalpropeptide concentration, and body weight. *Diabetes Care*. 18 : 1373-1375 (1995)
- Srivastava Y et al. Antidiabetic and adaptogenic properties of *Momordica charantia* extract. *Phytother Res*. 7 : 285-289 (1993)
- Swanston-Flatt, S. K., Day, C., Flatt, P. R., Gould, B. J., and Balley, C. J. Glycaemic effects of traditional European plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Research* 10(2) : 69-73 (1989)
- Theodros, P. M. and Helmut, S. Assay of glutathione, glutathione sulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Method. Enzymol*. 77 : 373 (1981)
- Toda M, Kawabata J, and Kasai T. Inhibitory effects of ellagi- and gallotannins on rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase complexes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65(3) : 542-547 (2001)
- Torrance, C. J., Devente, J. E., Jones, J. P., and Dohm, G. L. Effects of thyroid hormones on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. *Endocrin*. 138 : 1204-1214 (1997)
- Tsai, A. C., Vinik, A. I., and Lo, G. S. Effect of soy polysaccharide on postprandial plasma glucose, insulin, glucagon, pancreatic polypeptide, somatostatin, and triglyceride in obese diabetic patients. *Am. J. Clin. Nutr*. 45 :

- 596 (1987)
- Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orłowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 9(17) : 6316-25 (2003)
- Vuksan Vet al. Konjacmannan and American ginseng: emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr.* 20 : 370S-380S (2001)
- Wang T, Tamae D, LeBon T, Shively JE, Yen Y, Li JJ. The role of peroxiredoxin II in radiation-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 15 : 65(22) : 10338-10346 (2005)
- Wang Y, Ma L, Li Z, et al. Synergetic inhibition of metal ions and genistein on  $\alpha$ -glucosidase. *FEBS Lett.* 576(1-2) : 46-50 (2004)
- Watanabe, J., Kawabata, J., and Kurihara, H. Isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Tochu-cha. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 : 177-178 (1997)
- Welhinda J, et al. Effect of Momordica charantia on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. *J Ethnopharmacology.* 17 : 277-282 (1986)
- Ximing, Liu, et al. Antidiabetic effect of Pycnogenol® French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sciences.* 75(21) : 2505-2513 (2004)
- Kosuge T., Yokota M., Sugiyama K., Okamoto A., Saito M., Yamamoto T., Studies on Chinese medicines used for cancer. III. Cytotoxic constituent against HeLa cells in the fruit of *Trapa bispinosa*. *Yakugaku Zasshi.* 106(2) : 183-185 (1986)
- Yildiz, D., Tulay, A., Zeynep, A., and Hasan, I. Effect of oxidative on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 51 (10) : 1360-1362 (2002)
- Yoshiaki, Y. Inhibition of intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia by Moranoline and its N-alkyl derivatives. *Agric. Biol. Chem.* 52 : 121-128 (1998)
- Yougchayudha, Rungpitarangs et. al. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice. I. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. *Phytomedicine.* 3 : 241-243. 9 (1996)
- Ziegler, D et al. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 107(7) : 421-430 (1999)
- 김성연. 약물과 당뇨병. *당뇨병.* 17 (2) : 19-24 (1993)
- 김응진. Current therapy of diabetes with oral antidiabetogenic agents. *당뇨병.* 1

(1) : 13-15

鄧元錐. 中草藥治療癌腫. 北京:藥要書刊. p. 103 (1976)

박중열. 당뇨병성 혈관기능이상의 발생에 있어 고혈당 및 인슐린저항성의 역할 (세포내 신호전달체계의 이상을 중심으로). 당뇨병. 23 (3) : 223-229 (1999)

이건세, 안형식, 이영성, 구범환. 암 환자의 대체 요법 실태. 대한암학회지. 30(2) : 203-213 (1998)

장정순, 양중일, 장세호, 이원섭, 이종석, 안명주, 박병규. 유방암세포주에서 고농도 5-fluorouracil의 세포주기 조절효과. *Immune Network* . 2(1) : 60-64 (2002)

장정순. Research capsule : Cell cycle regulation and the new anticancer treatment strategy. 제 24회 대한암학회 학술대회. 서울 (1998)

정보성. 원색 천연약물 대사전. 서울:남성당. p. 271 (1984)

최정섭, 오정임, 황인택 등. 96-well plate를 이용한 DPPH free radical 소거활성 측정과 그 응용. *Kor J Pestic Sci.* 7(2) : 92-99 (2003)

통계청. <http://www.nso.go.kr>

한은중. 마름, 올방개 전분의 제조방법 및 이에 의해 제조된 전분. 한국특허 출원. 2002-0084984 (2002)