

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001744-01

배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명 및 우수성 평가 연구

(Identification of the gastrointestinal protective efficacy and
superiority of Baechu Kimchi, Baek Kimchi, Dongchimi and Kakdugi)

농림축산식품자료실



0014346

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명 및 우수성 평가 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012년 12월 29일

덕성여자대학교

연 구 진

연구기관명 : 덕성여자대학교

연구책임자 : 김 건 희

책임연구원 : 김 건 희

연 구 원 : 조 순 덕

연구기관명 : 인하대학교

책임연구원 : 이 운 규

연구기관명 : 세종대학교

책임연구원 : 심 순 미

요 약 문

I. 제 목

배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명 및 우수성 평가 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분(s-methylmethionine, SMM)을 규명하고, 기능성 성분으로서의 최적의 조건을 확립하고자 하였다. 동물모델을 이용하여 위장보호 유효성분에 대한 효능평가를 수행하고, In vitro 생체모방시스템 및 in vivo 동물시험을 통해 기능성 식품으로서의 생체 이용율을 평가하여 지표물질로서의 SMM을 규명하고자 하였다. 이와 같이 김치의 과학적인 기능성 규명을 통해 한식의 우수성 및 과학적 정보를 제공하며, 식품산업을 한 단계 도약시켜 세계 시장으로 나아갈 수 있는 계기를 마련하고자 하였다.

- 배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명
- 동물모델을 이용한 배추 및 무유래 유효성분의 위장보호 효능평가
- Biokinetics model system 적용을 통한 배추 및 무유래 유효성분의 생체이용율 평가

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 배추 및 무의 s-methylmethionine(SMM) 최적 분석조건 및 최종 가공조건 확립

2. 배추의 가공조건별(신선배추/절임배추, 백김치/김치) s-methylmethionine(SMM) 성분 규명
3. 무의 가공조건별(신선무/절임무, 동치미/깍두기) s-methylmethionine(SMM) 성분 규명
4. 김치의 발효단계에 따른 s-methylmethionine(SMM) 성분 규명
5. 배추 및 김치 유래 위장보호 유효성분에 대하여 알코올성 위염동물모델과 비알코올성 위염 동물모델 제작 후 위장보호에 대한 효능평가를 수행 및 작용기작 규명
6. 알코올성(HCL, ethanol) 위염동물모델과 비알코올성(indomethacin) 위염 동물모델의 제작방법과 이를 활용한 유효성평가 시스템 확립
7. 작용기작을 규명하기 위해 염증관련 cytokine의 분석 및 immunohistochemistry을 통해 조직에서의 염증인자 확인
8. In vitro 생체모방시스템을 이용하여 배추 및 무 유래 s-methylmethionine(SMM)의 생체 유용성(bioavailability) 평가

IV. 연구개발결과

- 배추 및 무의 가공조건별 SMM 성분 분석 및 김치의 발효단계에 따른 SMM 성분분석 결과, 발효초기의 SMM 함량이 가장 높았으며, 발효가 진행됨에 따라 SMM 함량이 감소하는 경향을 보임
- 배추 및 김치 등으로 대별되는 식품에 대해 이를 이용한 위장보호효과에 대해선 indomethacin를 활용한 비알코올 위염동물모델이 보다 적절함을 확인하였음
- SMM이 농도 의존적으로 위장보호효과가 있음을 확인하였음. 또한, 배추에서는 그 효과가 없었으나 백김치, 무 및 동치미는 위장보호효과가 유의적으로 높음을 확인하였음. 이러한 위장보호효과를 확인하기 위하여 첫 번째, 육안적 소견 두 번째, 조직학적 소견 세 번째, 세포주를 이용한 소견을 통해 단계적으로 규명할 수 있음을 확인하였음. 특히 세포주로서는 인간 위점막세포인 AGS 세포주가, 염증인자로서는 iNOS가 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였음
- S-methylmethionine(SMM) standard의 소화과정 중에 안정성은 식이가 공급되지 않은 상태(Fasted condition)에서 0.68%, 기본식이와 함께 섭취한 상태(Fed condition)에서 0.65%로 서로 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 에너지 제공 식이에서 소화 안정에 영향을 받지 않는 것으로 보임

- 동결건조 배추의 SMM의 bioaccessibility는 10.8%로 나타났음. SMM의 소장세포 내에서의 흡수는 15분 이내에 이루어지고, 다른 수송 단백질의 영향을 받지 않고 수송되는 것으로 나타났음. 또한 역수송 기작은 나타나지 않았음

V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 연구성과

- ✓ 학회 포스터 발표(6건 발표완료 / 1건 발표예정)
 - 위염동물모델을 이용한 SMM의 위장보호효과. 한국미생물생명공학회. 2012년 6월27-29일, 부산 BEXCO
 - HPLC를 이용한 백김치의 저장기간 중 s-methylmethionine (SMM) 함량분석. 한국식품조리과학회 국제 학술대회 및 정기총회, 2012년 11월 9일, 충북대학교 학연산 공동기술연구원
 - 김치의 발효정도에 따른 s-methylmethionine (SMM) 함량. 한국식품조리과학회 국제 학술대회 및 정기총회, 2012년 11월 9일, 충북대학교 학연산 공동기술연구원
 - 김치의 저장기간 중 s-methylmethionine (SMM) 함량. 한국식품영양학회 동계학술대회, 2012년 12월 13일, 서울교육문화회관 가야금홀
 - 무의 가공조건 및 저장기간에 따른 위장보호 효능 성분분석. 한국식품영양학회 동계학술대회, 2012년 12월 13일, 서울교육문화회관 가야금홀
 - Efficacy test of methyl methionine sulphonium chloride on indomethacin induced gastric mucosal damage in rats. 한국프리라디칼학회/NCEED 국제학술대회. 2012년 11월11일. 인하대병원
 - SMM의 생체이용률에 관련된 연구 결과 일부를 2013년 국제학술대회(IFIT, Institute of Food Technologists)에서 발표 예정임
- ✓ 논문발표(1편 게재, 1편 심사중, 4편 투고예정)
 - Determination of SMM in Brassica vegetables by High Performance Liquid Chromatography. Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University Vol. 12 (2013. 2)
 - “Digestive stability of Sulfur-Methyl-L-Methionine (SMM) and its bioaccessibility in

Kimchi cabbages using a simulated digestion model system” 논문을 Journal of the Science of Food and Agriculture 투고하여 심사 중임

- 배추김치, 백김치, 깍두기, 동치미 등 김치 종류 및 저장기간에 따른 이화학적 품질특성과 SMM 분석결과에 대한 결과를 토대로 논문 작성중이며 2013년 국제 저명학술지에 투고예정임
- “Intestinal transport mechanisms of Sulfur-Methyl -L-Methionine (SMM)”을 작성 중에 있으며 2013년 국제 저명학술지에 투고예정임
- “위염동물모델을 이용한 SMM의 위장보호효과”와 관련된 연구결과를 토대로 논문을 작성중에 있으며 2013년 초에 국제 저명학술지에 투고예정임
- “배추, 백김치, 무, 동치미의 위장보호효과”와 관련된 연구결과를 토대로 논문을 작성중에 있으며 2013년 초에 국제 저명학술지에 투고예정임

○ 연구성과 활용계획

- ✓ 무에 함유된 SMM의 위장건강효과에 대한 과학적인 평가를 통해 동치미와 깍두기에 대한 기능적 우수성과 세계적으로도 사이드 메뉴로서의 유용성을 알릴 수 있을 것으로 사료됨
- ✓ 김치류의 기능성을 과학적으로 규명함에 따라 김치의 건강상 가치에 대한 우수성 확인
- ✓ 연구결과를 토대로 체계적이고 적극적인 마케팅 및 홍보전략 수립
- ✓ 김치류의 기능성을 과학적으로 규명함에 따라 김치의 우수성 홍보 및 소비문화 확산
- ✓ 한식 홍보를 위한 기초자료 마련 및 한식에 대한 인지도 제고
- ✓ 본 연구결과를 토대로 김치류의 s-methylmethionine(SMM)에 대한 기능성을 과학적으로 규명함에 따라 관련 산업의 홍보효과를 증진시킬 수 있을 것임
- ✓ 배추 및 무의 SMM의 소화과정 중 분리성 및 생체 접근성에 대한 과학적 규명을 통해 배추 무의 식이이용률을 확보하였음
- ✓ 본 연구를 통해 확립된 유효성평가 시스템과 위염동물모델을 통해 향후 김치 등으로 대별되는 식품에 대해 보다 객관적이며 검증력이 높은 연구가 진행될 수 있을 것으로 사료됨

SUMMARY

S-Methylmethionine is a derivative of methionine with the chemical formula $[(\text{CH}_3)_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CHNH}_3\text{CO}_2]^+$. It is also known for its anti-ulcer factor, which is extracted from cabbages and other green vegetables, since its deficiency was thought to be a possible cause of gastric ulcers. It has other pharmacological properties such as anti-inflammatory, analgesic, hypolipidemic, and radio-protective. Since SMM was first isolated from cabbages, it has been identified in plants such as asparagus, green tea and various *Brassica* vegetables.

The metabolism of SMM was known to be closely associated with sulfur-containing compounds. It is because that the detachment of a methyl group from SMM forms methionine and enzymatic hydrolysis of SMM produces dimethyl sulfide. SMM is regarded as a major metabolite of methionine and also can be synthesized from methionine and S-adenosylmethionine. It is also reported to act as a reserved form of methionine. The synthesis of SMM reduces both the concentration of free methionine and its active derivative, S-adenosylmethionine. Even though many researchers have reported on bioactive components of some plant foods, SMM was not clearly identified for its physiological activities and biochemical properties.

This research attempts to investigate the gastro-protective agents (SMM) in the ingredients of Kimchi cabbage, baik kimchi (white kimchi), dongchimi (watery radish kimchi) and kkakdugi (cubed radish kimchi), and tries to find out the optimal condition to maximize the function of such agents. By using animal models, assessment on the effectiveness of the gastro-protective agents was conducted. Then, through an in vitro biomimetic system and in vivo animal testing, the bioavailability as functional foods was evaluated to establish SMM as index materials. By exploring the scientific functions of kimchi, this research aims to show the merits of Korean foods, provide scientific information on them, and prepare a stepping stone for Korean foods to advance into the global market by activating the Korean food industry.

The results of this study are as follows.

1. By analyzing the SMM contents based on the processing conditions of cabbage and radish, and based on the fermentation stage of kimchi, the research found out that the contents were highest during the early stage of fermentation, and then tended to decrease as fermentation progressed.
2. Indomethacin (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) induced gastric mucosal damage animal model was established and tested the efficacy of SMM as well as chinese cabbage, Baek-kimchi, white radish, Dong-chi-mee.
3. SMM pretreatment at the indomethacin induced gastric mucosal damage rat model resulted in a decrease in gastric damage area and iNOS expression. It also protective effect on programmed cell death in AGS cell line.
4. Pretreatment of Baek-kimchi, white radish, Dong-chi-mee reduced the gastric mucosal damage, respectively, in the indomethacin induced gastritis animal model.
5. Recovery of SMM was 0.68 and 0.65% for fasted and fed in vitro digestion, respectively; indicating that digestive stability of SMM was not affected by dietary energy or food matrix during digestion.
6. The bioaccessibility of SMM from kimchi cabbages, efficient transfer of SMM from Kimchi cabbages to aqueous fraction, was through salivary, gastric, and small intestinal phase in fasted condition, indicating 8.83, 14.71, and 10.88%, respectively.
7. Results from our study suggest that dietary SMM, a component of food sources is more bioavailable than SMM by itself.

CONTENTS

SUMMARY 7

Chapter 1 Outline of Research Project 11

Chapter 2 State of the Art Report 15

Chapter 3 Research Performed and Results 18

Chapter 4 Research Attainments and Contributions to Related Fields 76

Chapter 5 Application Plans for Research Results 77

Chapter 6 References 78

Appendix 82

목 차

요 약 문	3
제1장 연구개발과제의 개요	11
제1절 연구개발의 필요성	11
제2절 연구개발의 목표 및 범위	14
제2장 국내외 기술개발현황	15
제3장 연구개발 수행내용 및 결과	18
제1절 연구수행방법	18
1. 배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명 ...	18
2. 동물모델을 이용한 배추 및 무유래 유효성분의 위장보호 효능 평가	27
3. Biokinetics model system 적용을 통한 배추 및 무유래 유효성분의 생체 이용을 평가	30
제2절 연구내용 및 결과	35
1. 배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명 ...	35
2. 동물모델을 이용한 배추 및 무유래 유효성분의 위장보호 효능 평가	54
3. Biokinetics model system 적용을 통한 배추 및 무유래 유효성분의 생체 이용을 평가	71
제4장 연구목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	76
제5장 연구개발결과의 활용계획	77
제6장 참고문헌	78
부록	82

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성

한식은 건강과 웰빙을 지향하는 음식으로 세계 식품소비의 트렌드에 부합하는 만큼 세계인이 함께 즐길 수 있는 잠재력이 충분하다. 소비 트렌드는 건강·웰빙지향, 편의화, 감성소비 등이 주요 추세로 건강과 자연식품에 대한 관심 증가 및 간편한 외식 뿐만 아니라 최고급 음식 취향 등 기호가 다양화 되고 있다. 이 밖에도 한식은 곡물, 채소류, 육류, 해산물, 어조류 등 재료의 폭이 넓고 다양하다. 최근에는 복잡한 사회생활, 인터넷 및 통신의 급격한 발달로 모든 사회현상들이 빠르게 진행되고 있으며 이에 따라 현대인들은 과중한 업무에서 오는 스트레스, 불규칙한 식생활, 과음, 과식 등의 건강 장애요인이 많은 실정이다. 소화기계 질환은 암과 같은 치명적인 수준의 질병은 아니지만 우리나라 환자에게 가장 흔한 만성 질환 가운데 하나임. 보건 복지부가 발표한 ‘2005년 상병 분류별 외래환자 조사’의 결과에 따르면, 병원 외래를 찾는 환자가 가장 많이 호소하는 증상 1위가 손상, 중독 및 외인에 의한 특정 기타 결과이며, 2위가 신생물(neoplasm, 종양), 3위가 소화기계 질환이었다.

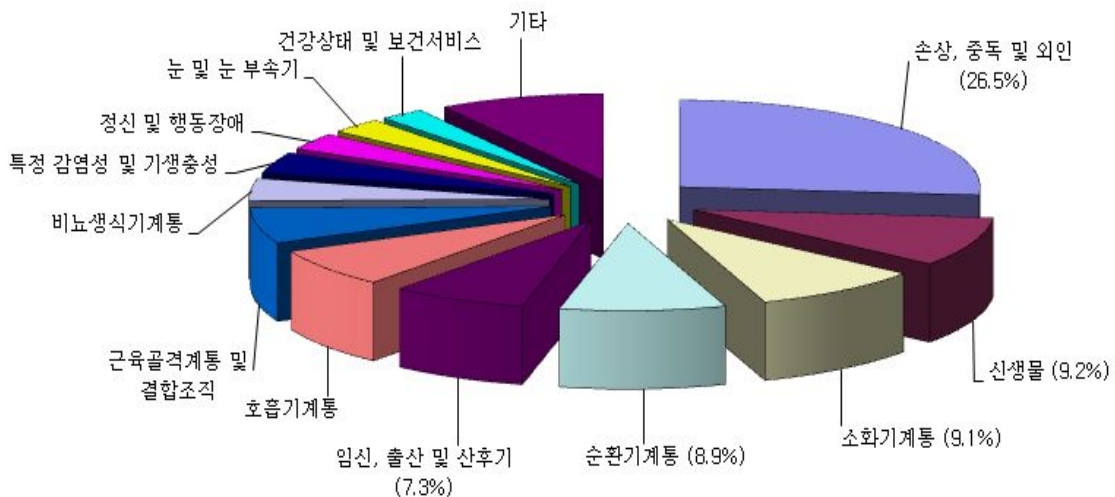


Fig. 1-1. 2005 상병 분류별 퇴원 환자 구성 추이

소화성 궤양은 세계 인구의 4~5%가 일생동안 한번 이상 경험하게 되는 가장 흔한 소화기질환

으로 위궤양, 십이지장 궤양 등이 있다. 과거에는 중년이후의 연령층에서 주로 발병하였으나 최근에는 문화의 발달, 복잡한 사회생활, 스트레스 등 여러 요인이 원인이 되어 연령층이 10대 까지 낮아지고 있는 추세이다. 특히, 위산과 펩신의 작용으로 상부 소화관이 손상을 받아 발생한 위염 및 위궤양은 우리나라 뿐 아니라 세계적으로도 발생빈도가 높은 질환 중 하나이다. 동양인들은 다른 인종에 비해 위장병의 발병률이 높으며, 특히 한국인의 위장병비율이 단연 많은 것으로 보고되고 있다. 우리나라의 소화기계 질환의 발생비율은 전체 인구 중 약 20%에 달한다고 보고되고 있으며 그 중에서도 위염, 이, 십이지장궤양을 비롯한 위암에 이르기까지 우리 인간의 소화기계에서 생기는 질환이 다른 장기에서 생기는 질환보다도 매우 많은 실정이다. 소화성 궤양은 위산과 펩신의 작용으로 상부소화관이 손상을 받아 발생한 결손이 위점막근층 이하까지 침범한 상태를 말한다. 소화성 궤양으로 고통 받고 있는 환자는 미국의 경우 약 400~600만명에 이르며 환자의 거의 반 이상이 *Helicobacter pylori*(*H. pylori*)에 감염되어 있다고 알려져 있다. 또한 우리나라를 비롯한 많은 개발도상국가에서도 내과 내원 환자의 상당수가 소화성 궤양으로 진단되며 이들 중 70% 이상이 *H. pylori*에 감염되어 있다. 위내에 염산이 존재한다는 사실은 이미 150여년전 William Beaumont에 의해 주장되어온 이래 많은 연구를 통해 위산이 위점막 손상과 위궤양을 일으키는 가장 주된 원인이라고 인식되어 왔다. 대부분의 위궤양환자가 산의 과다분비를 나타내지 않고, 십이지장궤양환자 중의 상당수가 정상적인 산분비를 보임에 따라 위·십이지장 점막 손상이 산분비와 관계없이 일어날 수 있다는 사실이 알려지게 되었다.

국내의 위염 및 위궤양 치료제의 연구는 대체로 외국에서 연구 중인 신약 또는 후보물질의 모형을 기초로 하여 그 유도체를 합성 검색하는 연구가 대부분이다. 유도체물질을 합성할 때도 작용기전에 관한 연구정보가 빈약하여 유사화합물을 연구하는 외국연구팀의 문헌정보에 의존하는 경우가 많으므로 신약개발에 어려움이 많다. 또한 치료제 대부분이 의약품(유도체 합성물질)이며, 지속적인 복용시 2차 적인 부작용이 나타날 수 있다. 따라서 천연 식물자원에서 유래하는 위장기능 보호 및 증진 유효성분 및 소재 개발이 필요하다. 위기능 조절 및 개선에 효능이 있는 식물성 천연물 소재는 flavonoid, saponin, tannin 등이 보고되고 있으나, 아직까지 위기능 조절과 관련하여 개발된 기능성 식품소재는 그리 많지 않으며 그 기능 또한 합리적으로 검증받지 못한 것이 많이 있다.

1950년 Cheny는 신선한 cabbage에서 항소화관궤양식이성 인자(antipetric ulcer dietary

factor)인 지용성 비타민의 일종인 s-methylmethionine(SMM)이 존재한다고 보고하였고, McRorine(1954), Challenger(1954) 등이 이 물질을 분리 동정하였다. 그 후, SMM은 ulcer 치료에 효능이 있는 것으로 알려져 vitamin U라고 명명되기 시작하였다. SMM은 아미노산의 유도체로 장내에서 산의 분비와 효소작용을 도와주며, 항궤양성 인자로 세포치료를 갖는 것으로 보고되고 있다. 또한, SMM은 면역작용 촉진작용도 있는 것으로 알려져 있는데, 이는 SMM이 백혈구 및 식세포의 식균 작용을 향상시키기 때문으로 보고되고 있다. SMM은 아미노산의 유도체로서 상온에서 불안정하여 sulfhydryl 함유물인 S-methylmethionine-sulphonium-chloride(MMSC) 형태로 존재함. MMSC는 위장의 점액형성을 촉진하며 세포 손상을 중재하는 산소과생 free radical과 결합하여 단백질 형성에서 중요한 역할을 하여 위·십이지장의 치유를 촉진하는 것으로 알려지고 있다. SMM의 생리활성물질로서의 효과는 MMSC로 분리·합성된 물질로 규명된 결과이며 아직까지 식물성 식품재료의 SMM 함량에 대해서는 정확한 정보가 부족한 실정이다. 특히 식품으로써 인간 섭취형태에 의해 SMM에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

생리활성 물질들을 식품자체로 섭취하는 비중이 높아지고 있으며, 따라서 식품으로부터의 기능성 성분 섭취를 극대화할 수 있는 방안을 모색할 필요성이 증가하고 있다. 한식은 다양한 재료와 양념으로 이루어진 가장 자연식에 가까운 음식으로 세계적으로 인정을 받고 있으며, 이로 인해 영양적 균형과 맛에 대한 선호도 또한 높은 것으로 나타나고 있다. 한식은 건강식으로 영양학적 우수성, 다양한 식재료와 조리법 등을 지니고 있어 세계화될 가능성은 높으나 이를 산업화 및 세계화하려는 노력이 미흡하였다. 한류 열풍과 더불어 우리나라의 전통음식인 김치, 장류 등의 발효식품과 두부 등 기능적이면서 칼로리는 낮은 우리 음식에 대한 관심이 증가하고 있음에도 체계적이고 적극적인 마케팅 및 홍보전략 등이 아직은 미흡한 실정이다. 김치는 소금에 절인 배추, 무 등에 고춧가루, 파, 마늘, 생강, 젓갈 등 부재료를 첨가하여 발효·숙성시킨 우리나라의 대표적인 발효 식품으로 김치 숙성은 원료자체와 제조 환경으로부터 혼합된 다양한 미생물에 의해 이루어지며, 재료 중의 탄수화물, 아미노산 등으로부터 산미, 지미, 방향을 내는 저분자 물질들이 생성됨으로써 김치의 독특한 맛과 향이 생성된다.

김치 및 매운맛을 최소화한 백김치에 대한 s-methylmethionine(SMM)의 비교 연구를 통해 김치의 위건강 개선효과를 극대화 할 수 있다고 사료된다. 이에 김치의 처리 단계 및 가공조건별 유효물질의 변화 양상을 분석하고, 김치의 종류별로 s-methylmethionine(SMM) 함량을 평가하는 연구가 매우 필요하다. 또한 동물모델을 이용한 배추 및 무 유래 유효성분의 위장보호 효능평가

와 생체 유용성 평가를 통해 김치의 건강상 가치에 대한 재평가 및 재조명을 받을 수 있을 것으로 기대한다.

제2절 연구개발의 목표 및 범위

연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배추 및 무의 s-methylmethionine(SMM) 최적 분석조건 및 최종 가공조건 확립 ○ 배추의 가공조건별 s-methylmethionine(SMM) 성분 규명 : 신선배추/절임배추, 백김치/김치 등 ○ 무의 가공조건별 s-methylmethionine(SMM) 성분 규명 : 신선무, 절임무, 동치미, 깍두기 등 ○ 김치의 발효단계에 따른 s-methylmethionine(SMM) 성분 규명 : 발효초기(pH 5.0<), 발효중기(pH 4.2~4.5), 발효말기(<pH 4.0)
<p>동물모델을 이용한 배추 및 무유래 유효성분의 위장보호 효능평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배추 및 김치 유래 위장보호 유효성분에 대하여 알코올성 위염동물모델과 비알코올성 위염 동물모델 제작 후 위장보호에 대한 효능평가를 수행 및 작용기작 규명 ○ 알코올성(HCL, ethanol) 위염동물모델과 비알코올성(indomethacin) 위염동물모델의 제작방법과 이를 활용한 유효성평가 시스템 확립 ○ 작용기작을 규명하기 위해 염증관련 cytokine의 분석 및 immunohistochemistry을 통해 조직에서의 염증인자 확인
<p>Biokinetics model system 적용을 통한 배추 및 무유래 유효성분의 생체이용율 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ In vitro 생체모방시스템을 이용하여 배추 및 무 유래 s-methylmethionine(SMM)의 생체 유용성(bioavailability) 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 인체소화기관을 연속적으로 모방한 모델 시스템 (생체모방시스템)에 적용해 배추 및 무 유래 s-methylmethionine(SMM)의 식물 조직내에서의 분리성, 소화중의 안정성 및 생체인자와의 상호작용을 평가 - 가공조건별 s-methylmethionine(SMM)의 안정성 평가 - In vitro시험법에 의해 소장에서의 흡수성 및 흡수 기작 규명

제2장 국내외 기술개발현황

(1) 국내 연구 현황

항위궤양성 인자로 알려진 SMM에 관한 연구는 주로 러시아, 일본 등지에서 시작되어 이제 본격적인 연구에 돌입하고 있으나, 아직 국내에서는 식용을 목적으로 하는 SMM에 관한 연구에 대해서는 본 연구팀을 제외하고는 연구가 거의 이루어지지 않은 상황이다. 우리나라와 같이 소화기계 위장질환의 발생 비율이 전체 인구의 약 20%를 차지하고 있고, 십자화과 채소를 비롯한 다양한 채소와 과일의 생산 및 소비량이 높은 상황에서 국민의 주 식생활 급원 식품의 생리활성 효과에 대한 탐색은 매우 필요한 연구이다. 본 연구팀은 항위궤양성 인자로 추정되는 SMM 성분 분석법을 확립하고 다양한 채소류에서의 SMM 분석을 통한 정량연구를 수행하여 유효성분이 다량 함유한 채소 후보군을 확보하였다. 또한, 식물자원을 이용한 항위염 및 항궤양 효과 측정을 위해 HCl-ethanol 위손상 보호효과, indomethacin 위손상 보호효과, 유문결찰 궤양에 대한 보호효과, spirin-ligation 궤양에 대한 보호효과 등의 *in vitro* 및 *in vivo* 연구방법을 구축하였다.

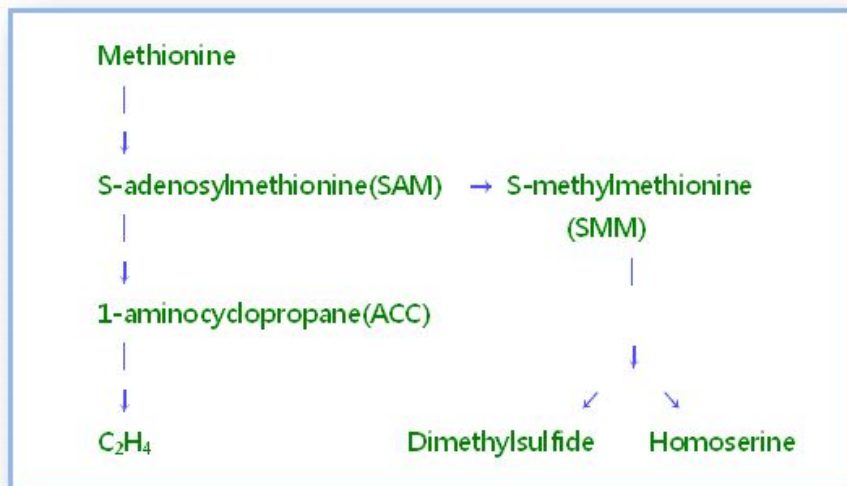
(2) 국외 연구 현황

1950년 Cheny는 신선한 cabbage에서 항소화관궤양식이성 인자(antipetric ulcer dietary factor)인 s-methylmethionine이 존재한다고 보고하였고 McRorine(1954), Challenger(1954)등이 이 물질을 분리 동정하였다. 이후에 SMM의 임상적 효과에 대한 연구가 계속되면서 십이지장궤양, 위궤양 및 위산분비 억제 등에 대한 효과가 보고되어 항 위궤양성 인자로 의.약학분야에 알려지기 시작하였다. 식품에 함유된 SMM에 대해서는 1990년에 들어와 러시아 과학자들이 식물성 식품에 있어 SMM에 대한 연구를 시작하면서 본격적인 관심이 집중되기 시작하였다. 러시아의 Academy of Science의 Bakh Institute of Biochemistry를 중심으로 SMM의 생리적인 역할에 대한 연구가 시작되었다.

일본에서는 1984년 교토대학의 Kozo Ohtsuki 등이 일본 차잎에서의 dimethylsulfide(DMS)의 전구물질로써의 SMM에 대한 보고가 시작된 이래 상온에서 안정물질형태인 methyl-methioninesulfonium chloride(MMSC)을 이용한 다양한 동물실험에 대한 연구가 계속되어오고 있다. 일본의 경우에는 우리나라와 같이 배추 등의 십자화과 채소(Brassica vegetables)의

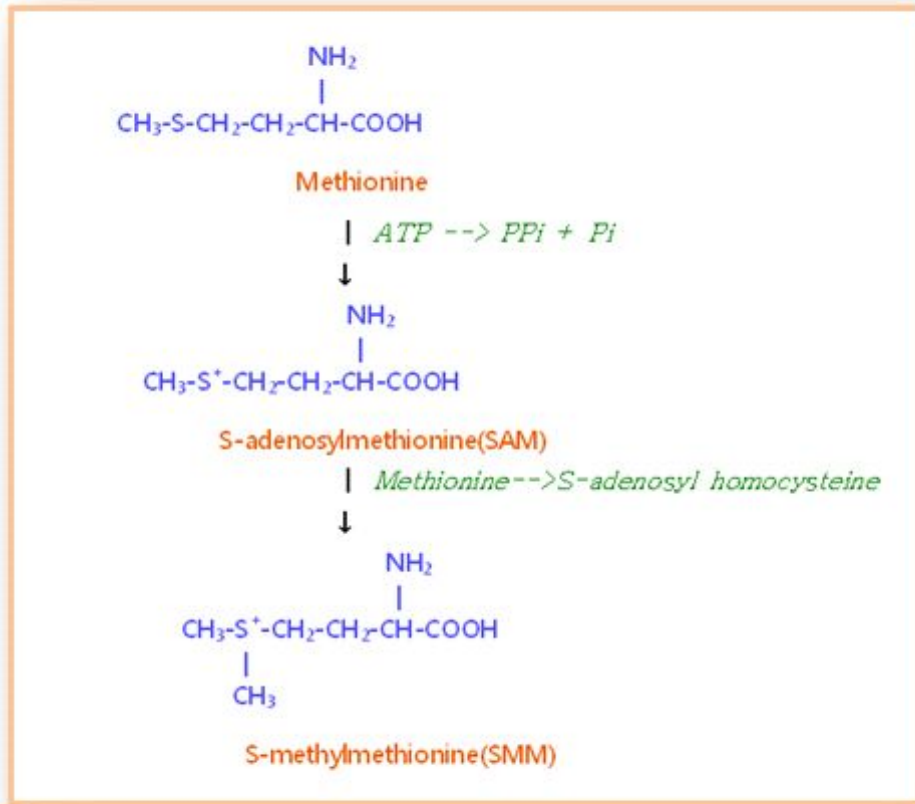
이용이 높고 건강식품에 대한 관심이 고조되어 기능성 식품소재로서의 SMM에 대한 연구가 이루어져 왔다. 그러나 1998년까지 SMM에 대한 정확한 분석방법이 확립되지 않아 이에 대한 연구의 필요성이 제기되었고, Hokkaido National Agricultural Experiment Station에서 이 연구를 본격적으로 진행하게 되었다. 최근 미국 및 유럽에서 십자화과 채소인 양배추의 향암효과가 cabbage에 함유된 SMM에 의한 것으로 추정되면서 앞으로 이에 대한 연구가 확대 될 것으로 사료된다.

SMM은 아미노산의 유도체(amino acid derivatives)로서 상온에서 불안정하여 MMSC 형태로 존재함. SMM은 항궤양성 인자(antiulcer factor)로 세포 치료력을 가진 allantoin(산의 산화생성물)으로 보고되고 있다. 이는 주로 십자화가 채소인 cabbage family에서 발견되고 있다. 그 외에도 녹차 및 녹색 채소류에서 다소 발견되기도 하나 다른 많은 식품에는 존재하지 않는 것으로 알려지고 있다. SMM은 우리 인체의 필수 아미노산중 하나인 methionine을 전구체로 하여 S-adenosyl-methionine(SAM)을 거쳐 식물효소인 methionines-methyltransferase에 의해서 합성이 촉진된다. 식물체내에서의 SMM 생합성 과정은 다음과 같다.



Methionine은 s-adenosylmethionine(SAM)으로 전환된 후 SMM을 합성하거나 1-amino-cyclopropane(ACC)을 거쳐 ethylene(C₂H₄)을 합성한다. Ethylene은 식물호르몬(plant regulator)으로 식물의 성장과 더불어 자연적으로 생성·방출된다. SMM의 분해산물인 dimethylsulfide는 녹차류에서 해초류같은 냄새(laver-like odor)의 주성분으로 보고되고 있다.

Methionine에서 SMM이 합성되는 화학적 과정은 다음과 같다.



SMM의 생리활성에 대해서는 면역체계 안정화 및 촉진, 피부와 내부기관(식도, 위, 장, 췌장 등)의 ulcer 치료효과, 유기체의 세포대사 촉진작용 등이 보고되고 있다. SMM의 면역작용 촉진은 많은 실험에서 입증되었는데 이는 SMM이 백혈구 및 식세포의 식균 작용을 향상시키기 때문으로 보고되고 있다. SMM의 안정된 화합물 형태로 존재하는 S-methylmethionine-sulphonium-chloride(MMSC)는 sulfhydryl 화합물로서 sulfhydryl 함유물은 위장의 점액형성을 촉진하며 세포 손상을 중재하는 산소과생 free radical과 결합하여 단백질 형성에서 중요한 역할을 하여 위, 십이지장의 손상, 부식 및 ulcer 치유를 촉진하는 것으로 알려져 있다.

제3장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 연구수행방법

1. 배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명

1-1. 백김치, 김치, 동치미 및 깍두기 제조

가. 배추를 이용한 김치 제조

실험에 사용한 배추는 전라남도 해남 배추(동풍)로 개체 당 생체중량은 약 3.03 kg 이었다.



Fig. 3-1. 배추김치 및 백김치 담금용 재료

1) 배추김치

배추를 다듬고 4등분하여 20% 소금물에 6시간 절인 후, 3회 세척하였다. 1시간 탈수 후, 미리 준비해 둔 부재료를 넣어서 김치를 제조하였다. 부재료는 절임배추 100 g에 대하여 파 3.1 g, 고

춧가루 2.3 g, 마늘 1.5 g, 생강 0.4 g, 멸치액젓 3.0 mL를 넣어 버무렸다. 그리고 polyethylene 플라스틱 용기에 약 1포기씩 지퍼백에 밀봉 포장한 후, 4℃에서 8주간 저장하였다.



Fig. 3-2. Preparation procedure for Kimchi Cabbage.

2) 백김치

배추를 2등분하고 10% 소금물에 6시간 정도 절인 다음 흐르는 물로 2회 행군 후 1시간 동안 탈수시켰다. 부재료인 무, 배, 마늘, 생강은 채를 썰어 혼합한 후 배추잎의 사이사이에 혼합된 부재료를 넣어 겹잎으로 감쌌다. 양념은 절임배추 100 g에 대하여 무 10.0 g, 배 5.0 g, 마늘 2.0 g, 생강 1.0 g, 설탕 1.0 g을 첨가하였으며 백김치 담금 소금물을 절임배추와 1:1(w/v) 비율로 하여 polyethylene 플라스틱 용기에 약 1포기씩 지퍼백에 밀봉 포장한 후, 4℃에서 8주간 저장하였다.



Fig. 3-3. Preparation procedure for Baik Kimchi.

나. 무를 이용한 김치 제조

본 실험에 사용한 동치미 담금용 무는 2012년 6월 농산물 도매시장에서 약 2.26 kg 정도의 제주도 생산 무를 구입하여 사용하였다.



Fig. 3-4. 동치미 및 깍두기 담금용 재료

1) 동치미

무는 다듬은 후 양쪽 끝을 4 cm 잘라내고 2×2×6 cm 크기의 직육면체로 절단하여 1%의 소금을 뿌려 건염법으로 한 시간 절인 후 부재료와 혼합하였다. 부재료인 마늘과 생강은 잘게 마쇄하였고, 배는 채썰어 넣었으며, 과는 4 cm 길이로 썰어 사용하였다. 무 100 g 당 마늘 1 g, 생강 0.5 g, 배 8.9 g, 과 2 g를 넣고, 소금물 1.5배(w:v) 부은 후 4℃에서 보관하면서 8주간 발효 숙성시켰다.

2) 깍두기

일정한 크기의 무를 선정하고 깨끗하게 씻은 다음 잔뿌리를 제거한 후 세로로 2등분 후 정육

면체(2×2×2 cm)로 자른다. 썰어놓은 무 100 g당 고춧가루 2 g, 마늘 1 g, 생강 0.5 g 및 새우젓 2 g의 비율로 부재료 및 양념을 준비하여 잘 섞은 다음 무를 넣고 골고루 혼합한다. 정제된 굵은 소금을 각두기의 최종염도를 2%로 맞추기 위해 첨가한 후 모든 재료와 잘 섞이도록 버무린다.

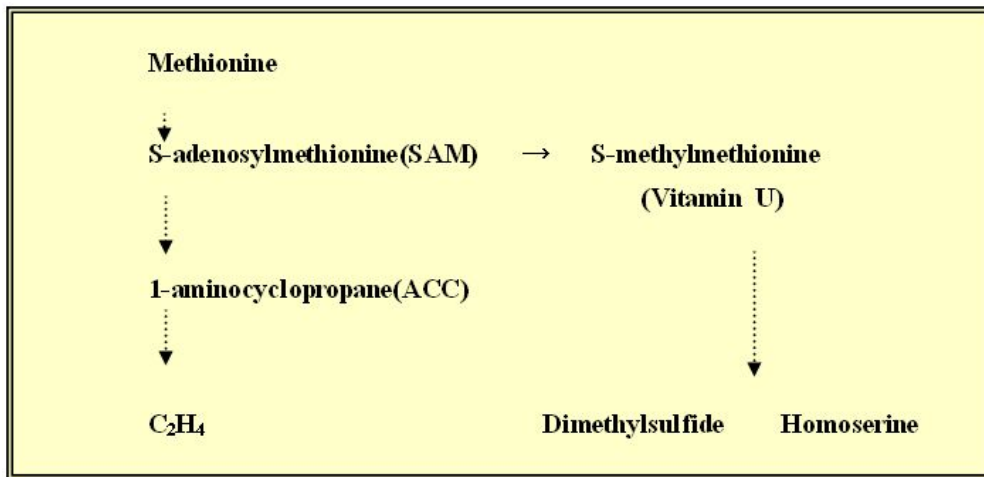


Fig. 3-5. Preparation procedure for Dongchimi and Kkakdugi.

1-2. 배추 및 무의 s-methylmethionine(SMM) 정성 및 정량 분석

가. Vitamin U 합성과정

Vitamin U, 즉 S-methylmethionine은 우리 인체의 필수 아미노산중 하나인 methionine을 전구체로하여 S-adenosylmethionine(SAM)을 거쳐 식물효소인 methionines-methyltransferase에 의해서 합성이 촉진된다. 식물체내에서 vitamin U 합성과정은 아래와 같다.





Methionine은 S-adenosylmethionine(SAM)으로 전환된 후 vitamin U를 합성하거나 1-amino-cyclopropane(ACC)을 거쳐 ethylene(C₂H₄)을 합성한다. Ethylene은 식물호르몬(plant regulator)으로 식물의 성장과 더불어 자연적으로 생성·방출된다. 이러한 ethylene은 과일 및 채소류 등의 농산물에 성숙 및 품질에 좋은 영향을 주는 반면 수확 후 농산물에 노화 (senescence), 갈변 등 다양한 품질저하를 초래하기도 한다. S-methylmethionine의 분해산물인 dimethylsulfide는 녹차류에서 해초류같은 냄새(laver-like odor)의 주성분으로 보고되고 있다. 식물에서 S-adenosylmethionine은 novel mass-spectrometric methods에 의해 측정될 수 있으며 chloroplast에서 DMSP(3-dimethylsulfoniopropionate)로 전환되기도 한다. S-adenosyl-methionine은 빠르게 흡수되어 간과 신장에 축적되며 optical 형태 중 L형이 많이 이용되고 D형과 L형을 함께 투약하면 D형의 소화, 흡수가 촉진된다.

나. HPLC 분석

○ 추출용매, 추출방법 등 S-methylmethionine 분석 조건

- ✓ 본 연구팀의 선행연구에서 우리나라에서 많이 소비되고 있는 배추를 대상으로, 건조방법을 달리하여 품종 및 부위별로 SMM 함량변화를 조사한 결과, 건조방법에 따른 함량변화는 동결건조 처리군이 SMM 최대 보존효과를 보여줌에 따라 본 연구에서는 시료를 동결건조 후 사용하였다.
- ✓ 동결건조한 시료에 80% 에탄올을 넣고 3시간 동안 방치 후 whatman 110 mm ϕ 로 여과시키고, 회점감압농축기를 이용하여 농축시켰다. 농축시료에 0.2 N sodium citrate buffer 용액을 가하고 3분동안 초음파처리를 한 후 시료액을 Sep-pak C18과 0.45 μ m filter로 다시 한 번 여과한 용액을 분석용 시료로 사용하였다.

- 동결건조 시료 2 g + 80% EtOH 50 ml
- 3시간 동안 shaking(20 $^{\circ}$ C, RPM 220)
- Filter(Whatman 110 mm ϕ)
- 회전 감압 농축기(35 $^{\circ}$ C)를 이용하여 10 ml로 농축
- 농축 시료 10 ml + 0.2 N-Sodium citrate Buffer Sol. (pH 2.2) 10 ml
- ultrasonic 초음파 처리(3분, 20 $^{\circ}$ C)
- 5 ml Syringe + Sep-pak C18(Waters) + 0.45 μ m filter(Whatman 6779-1302 PVDF syringe filter)로 여과
- 처음 3 ml 버리고 2 ml 분석시료 사용(screw cap vial)

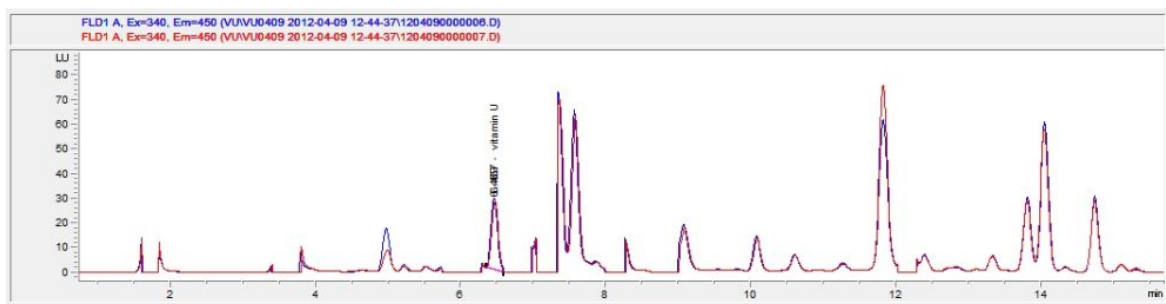


Fig. 3-6. 전처리시간(3 hr/24 hr)에 따른 분석결과

○ SMM 분석을 위한 HPLC 분석조건

- ✓ SMM의 정성 및 정량을 위해 사용한 HPLC의 분석조건은 Table 1과 같다. 시료 중의

SMM 농도는 시료를 일정량 취하고 전처리하여 시험용액을 제조 후 고속액체크로마토그래프에 주입•분석하여 표준용액의 성분과 머무름 시간이 일치하는 피크의 면적값을 해당표준 물질의 검량선에 대입하여 농도를 구하였다.

- ✓ 표준용액 조제 : SMM 표준품 19.97 mg을 정밀히 달아 100 mL 용량의 volumetric flask에 취하고 0.1 N HCl로 용해시켜 1000 µmol 농도로 만들어 표준원액을 0.1 N HCl로 희석하여 10, 50, 100, 125 µmol 농도가 되도록 만든 후 HPLC에 주입하여 얻은 농도 별 피크면적으로 회귀곡선을 작성하여 검정곡선을 얻었다.

Table 3-1. HPLC system for analysis of S-methylmethionine (SMM)

Instrument	Agilent 1100 (Agilent Technologies, USA)		
Column	Zorbox Eclipse AAA-C18, 5 µm, 4.6 mm x 150 mm		
Flow rate	2 mL/min		
Detector	FLD (ex. 340 nm, em. 450 nm)		
Temperature	40°C		
Mobile phase	A - 40 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.6-7.8 with 10 N NaOH solution B - Acetonitrile : Methanol : Water (45:45:10)		
Gradient condition	Time (min)	A (%)	B (%)
	Initial	0	0
	1.86	0	0
	18.11	43.3	56.7
	18.57	0	100
	22.29	0	100
	23.21	0	0
	26	100	0
Injector program	Draw 2.5 µl from vial 1 (borate pH 10) Draw 0.5 µl from vial (amino acid sample = sequence vial) Mix 3 µl in air, max speed 2x wait 0.5 min Draw 0 µl from vial 4 (needle wash using water in uncapped vial) Draw 0.5 µl from vial 2 (OPA) Mix 3.5 µl in air, max speed 6x Draw 0 µl from vial 4 (needle wash using water in uncapped vial) Draw 0.5 µl from vial 3 (FMOC) Mix 4 µl in air, max speed 6x Draw 32 µl from vial 5 (Water with cap) Mix 18 µl in air, max speed 2x Inject		

다. 통계분석

본 연구에 대한 자료는 SPSS(statistical package social science, version 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 ANOVA test와 Duncan's multiple range test로 시료 간 유의성을 검정하였으며, 상관성 분석은 이변량 상관분석(bivariate correlation analysis)으로 두 변수간 유의성을 검정하였다.

1-3. 김치의 캡사이신 분석

○ 분석방법

☞ 동결 건조시킨 분말시료를 취한 후 MeOH로 진탕기에서 진탕한 후, 농축수기에 여과하여 감압건조하였다. 핵산 50 ml에 녹여 분액여두에 옮긴 후 80% MeOH 50 ml 씩 3회 가하여 MeOH 층을 회수하였다. 500 ml 분액여두에 옮겨 포화 NaCl 150 ml를 가하고 디클로로메탄을 50 ml씩 2-3회 가하여 추출하였다. 디클로로메탄층을 모아 무수황산나트륨을 가하여 여과하여 농축하였다. 디클로로메탄을 2 ml에 녹여 0.45 μm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 하였다. 표준용액은 Capsaicin 표준품 10 mg을 100 ml 용량플라스크에 취하고 디클로로메탄으로 녹인 후 이 용액을 디클로로메탄으로 희석하여 사용하였다. 분석을 위해 Gas Chromatography 8790A FID, Agilent(USA)을 사용하였으며, Column; BP-1, 주입부 온도; 320℃, 검출기 온도; 350℃, Column oven Temp.; 280℃(1분) → 2.5℃ 씩 300℃(2분), carrier gas; N₂ 등의 조건으로 분석하였다.

1-4. 품질특성

가. 수분함량(%)

수분측정은 105℃ 상압가열건조법으로 2 g 정도의 시료를 취하여 105℃의 drying oven에서 수분을 제거한 후 칭량하여 수분함량을 산출하였다.

$$\text{수분(\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

W₀ : 칭량병의 무게(g)
W₁ : 시료와 칭량병의 무게(g)
W₂ : 건조 후의 시료와 칭량병의 무게(g)

나. 염도(salinity, %)

건더기와 국물을 이용하여 마쇄한 다음 디지털 염도계(SB-2000, Gimisanggung, Korea)를 이용하여 염도를 측정하였다.

다. pH 및 총산도

국물과 건더기가 동량이 되도록 채취하여 믹서로 마쇄한 후 cheese cloth로 여과하여 고형물을 걸러낸 액을 분석용 시료로 사용하였다. pH는 pH meter를 사용하여 실온에서 측정하였고, 산도는 시료액 1 ml를 취하여 증류수로 50배 희석시킨 후 0.1% phenolphthalein 지시약(0.5 ml)을 첨가하고 0.1 N NaOH 용액으로 적정하였으며(30초간 미홍색이 지속될 때 까지), 소비된 NaOH 용액을 lactic acid(% , w/v)량으로 표시하였다.

$$\text{산도(젖산\%)} = \frac{0.1\text{N NaOH 용액의 적정 ml} \times F \times 0.0090}{\text{시료량(ml)}} \times 100$$

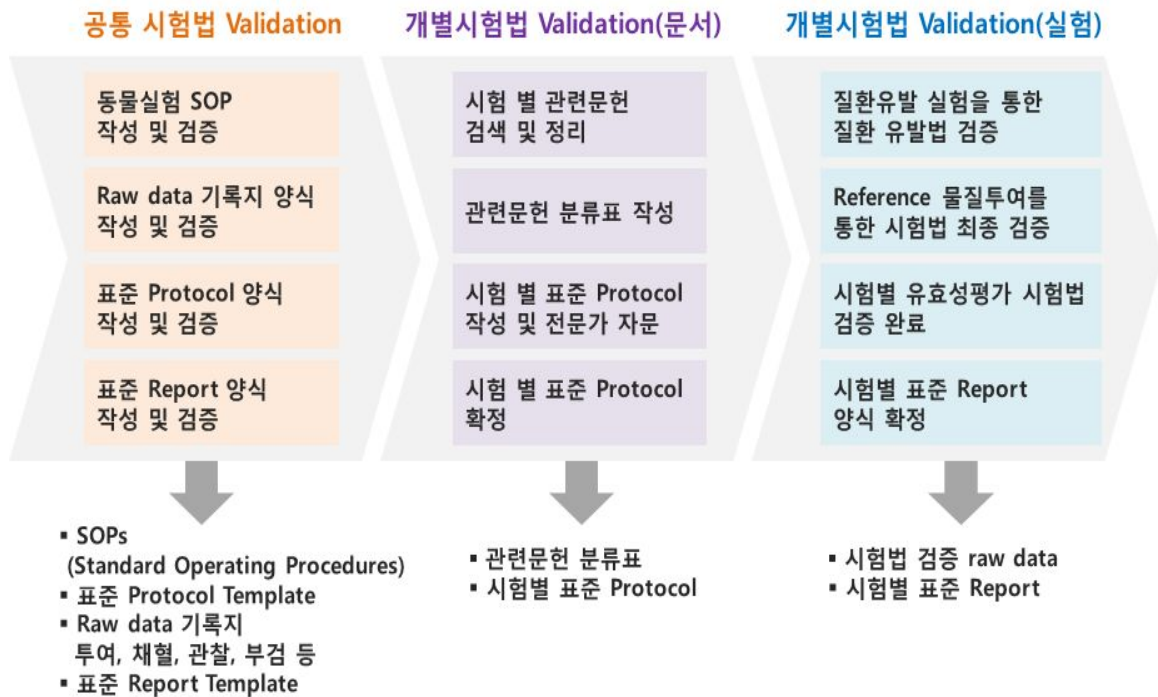
F는 0.1N NaOH 용액의 역가(factor)

0.1N NaOH 용액 1 ml은 젖산 0.0090 g에 해당

2. 동물모델을 이용한 배추 및 무유래 유효성분의 위장보호 효능 평가

2-1. 유효성평가 시스템에 대한 Validation

연구실에 확립되어 있는 유효성평가 관련 문서 및 실험을 바탕으로 한식의 유효성검증에 보다 적합하도록 개별시험법을 확립할 예정이며 이에 대한 절차는 다음과 같다.



2-2. 알코올성 위염동물모델(HCL.EtOH induced gastritis model) 제작 및 시험물질의 효능 평가

가. 개요

1) 투여물질 : 화학적 처리를 통한 위염 모델 확립을 위해 HCL, EtOH을 사용한다. (Ethanol이 직접적으로 위점막을 자극하고 점막하 근육층에 부종을 유발시켜 일시적인 허혈상태를 발생 시킴으로써 산화적 손상으로 인한 세포의 괴사를 유발함과 동시에 HCl이 위점막에 직접적인 자극을 가하고 위운동을 항진하여 급성위염을 일으킨다.)

2) 종 및 계통 : 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 실험결과의 해석 및 평가에 용이한 SD계통의 rat를 사용한다.

- 3) 성별/주령 : female/6주령(순화기간 1주일)
- 4) 투여경로 : 사람에게 대한 노출경로중의 하나로 경구투여를 선택한다.
- 5) 투여법 : - 대조군 : 음수를 매일 경구 투여한다.
- 위염유발군 : HCL(150mM), EtOH(60%)를 1회 경구 투여한다.

나. 부검

- 1) 투여 종료 후 호흡마취(이소플루란)을 실시하고 개복하여 채혈 후 위를 적출한다.
- ✓ 채혈 : 복대정맥에서 채혈하며, 채혈 즉시 혈액을 4℃ 에 보관.
모든 채혈이 끝나면 centrifuge 13,000rpm 4℃ 에 돌려 serum을 분리.
- ✓ 위 : 위의 조직 전체를 제거하여 넓게 펼친다.
넓게 펼쳐진 위의 육안관찰을 위해 사진촬영 후 일부는 10%NBF에 고정, 일부는 얼림.

다. 관찰 항목

- 1) 일반증상 및 사망/빈사동물 관찰 : 시험 기간 중 모든 동물에 대하여 1일 1회 이상 일반증상을 관찰한다.
- 2) 체중측정 : 시험기간 중 주1회 개체 별 체중을 측정한다. 시험기간 중 체중측정은 매 측정시 오차를 최소화하기 위해 동일한 요일과 시간대에 동일한 저울을 사용하여 측정한다.

라. 위의 손상정도 측정

시험물질의 투여가 종료되면 호흡마취(이소플루란)을 실시한 후 복부를 절개, 위를 적출한다. 적출한 위는 절반을 잘라 생리식염수로 세척한 후 넓게 펼쳐 핀으로 고정한다. 고정한 위는 육안관찰을 위해 사진촬영을 실시한다. 10% NBF에 고정한 위는(24시간 이내) block용 카세트에 담기 위해 trimming을 실시하고 paraffin block 및 H&E staining을 제작한다.(paraffin block 및 H&E staining은 인하대병원 병리과에 의뢰) 사진촬영 결과와 H&E staining결과를 분석하여 위의 손상정도를 측정한다.

2-3. 비알코올성 위염동물모델(indomethacin induced gastritis model) 제작 및 시험물질의 효능 평가

가. 개요

- 1) 투여물질 : 화학적 처리를 통한 위염 모델 확립을 위해 indomethacin을 사용한다. Indomethacin을 투여하게 되면 위운동의 향진, 위액분비의 향진, 위혈류의 저하 등으로 인해 위 손상이 일어나게 된다.
- 2) 종 및 계통 : 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 실험결과의 해석 및 평가가 용이한 SD계통의 rat를 사용한다.
- 3) 성별/주령 : female/6주령(순화기간 1주일)
- 4) 투여경로 : 사람에게 대한 노출경로중의 하나로 경구투여를 선택한다.
- 5) 투여법 : - 대조군 : 음수를 매일 경구 투여한다.
 - 위염유발군 : indomethacin을 1회 경구 투여한다.
 - 위염예방군 : 실험 개시일로부터 시험물질을 매일 경구 투여한다.
 - 대조약물예방군 : 실험 개시일로부터 대조약물을 매일 경구 투여한다.
 - 위염치료군 : 시험물질을 매일 경구 투여한다.
 - 대조약물치료군 : 대조약물을 매일 경구 투여한다.

나. 부검

- 1) 투여 종료 후 호흡마취(이소플루란)을 실시하고 회복하여 채혈 후 위를 적출한다.
 - 채혈 : 복대정맥에서 채혈하며, 채혈 즉시 혈액을 4℃ 에 보관.
 - 모든 채혈이 끝나면 centrifuge 13,000 rpm 4℃ 에 돌려 serum을 분리.
 - 위 : 위의 조직 전체를 제거하여 넓게 펼친다.
 - 넓게 펼쳐진 위의 육안관찰을 위해 사진촬영 후 일부는 10%NBF에 고정, 일부는 얼림.

다. 관찰 항목

- 1) 일반증상 및 사망/빈사동물 관찰 : 시험 기간 중 모든 동물에 대하여 1일 1회 이상 일반증상을 관찰 한다.
- 2) 체중측정 : 시험기간 중 주1회 개체 별 체중을 측정한다. 시험기간 중 체중측정은 매 측정시 오차를 최소화하기 위해 동일한 요일과 시간대에 동일한 저울을 사용하여 측정한다.

라. 측정 항목

1) 위의 손상정도 측정

✓ 10% NBF에 조직을 고정한 후 paraffin block을 만들어 H&E staining을 실시하고 손상정도에 따라 점수를 나누어 도표로 비교하여 본다.

2) 위 세포에서 iNOS 발현 측정

✓ immunohistochemistry : paraffin block에서 section하여 slide를 만든 후 iNOS에 대한 면역염색을 실시하고, 이를 통해 조직의 어느 부분에서 어느 정도의 iNOS가 발현되는지를 확인한다.

3) 위상피세포를 이용한 테스트 물질의 세포성장 및 사멸억제 효과 측정

3. Biokinetics model system 적용을 통한 배추 및 무유래 유효성분의 생체이용률 평가

3-1. 인체소화기관을 연속적으로 모방한 *in vitro* 생체모방 시스템 적용을 통한 배추의 s-methylmethionine(SMM)의 bioavailability 평가

동결건조시킨 일정량의 배추 시료를 취하여 인간의 소화기관을 모방한 생체 모방 시스템에 적용하였다.

가. *In vitro* 생체모방시스템 적용

각 시료는 소화평가모델에 적용하여 일정시간 동안 인공 소화액에 연속 배양하였고 배양 단계별 소화산물의 일정 양을 취하여 HPLC로 SMM의 함량을 분석하였다. 일정량의 시료를 20 mM phosphate buffer에 용해시킨 후 salivary phase를 모방하기 위해 210 μ L amylase(0.2 mg/mL in 20 mM phosphate buffer), 그리고 산화방지를 위해 50 μ L BHT를 함께 혼합하였다 shaking water bath (37°C, 150 rpm). pH를 salivary phase 조건에 맞게 맞춰주었다 (표 3-2), (표 3-3). 이어 질소기체를 처리한 샘플들을 shaking water bath (37°C, 150 rpm)에 5분 동안 배양시켰다. 연속적으로 위액의 조건을 만들기 위해, 280 μ L pepsin(3 mg/mL in 100 mM NaHCO₃)을 첨가하였고, pH는 0.1M HCL을 첨가하므로써 최종 위액의 pH로 조정된 후 샘플들을 shaking water bath (37°C, 150 rpm)에 배양하였다 (표 3-2), (표 3-3). Small intestinal를 모방하기 위해 100mM NaHCO₃로 pH 5.3으로 맞추고 220 μ L Pancreatic

juice (Pancreatin(0.4 mg/mL in 20 mM phosphate buffer) + Lipase(0.2 mg/mL in 20 mM phosphate buffer))와 220 μ L Bile acid (2.4 mg/mL in 220 μ L Bile acid)을 샘플에 첨가하였다. 그리고 0.1M NaOH를 첨가하여 pH를 적정하고 shaking water bath (37°C, 150 rpm)에 배양 하였다 (표 3-2), (표 3-3). Salivary, Gastric, Small intestinal phase의 시험관 내 소화 모델 체계 3단계가 끝난 후에 20 mM phosphate buffer와 질소기체 약간을 이용하여 모든 처리군의 최종부피를 똑같이 맞춰주었다. 그 후 시료의 상층액을 미립자 잔여물로부터 분리해내기 위해 4°C에서 3000 rpm으로 30분간 원심분리 하였다. 상층액은 다음 분석 때 까지 -20°C에서 보관하였다. 각각의 시료를 0.45 μ m PVDF Syringe filter 로 필터한 후 HPLC 분석에 이용하였다.

나. 에너지 식이 제공에 따른 bioaccessibility의 차이를 비교하기 위한 Fast와 Fed condition에 따른 인체 생리화학적 소화기관을 모방한 model system 조건은 다음과 같다.

Table 3-2. In vitro 생체모방시스템 Fasted 조건

Fasted condition		
Sample	s-methylmethionine (SMM) or 동결건조 배추	증류수
	20 mg	70 mg
Salivary phase	pH 6 \pm 0.5 / 5min	
Gastric phase	pH 2 \pm 0.5 / 30min	
Small intestinal phase	pH 6 \pm 0.5 / 1hr	

Table 3-3. In vitro 생체모방시스템 Fed 조건

Fed condition		
Sample	s-methylmethionine (SMM) or 동결건조 배추	Standard meal (단백질: 68.0 g, 지방: 39.4 g, 당질: 294.0 g)
	20 mg	70 mg
Salivary phase	pH 7 \pm 0.5 / 5 min	
Gastric phase	pH 3 \pm 0.5 / 1 hr	
Small intestinal phase	pH 7 \pm 0.5 / 2 hr	

다. 인체 생리화학적 소화기관을 모방한 *In vitro* digestion

다음 표 3-4의 B (Guyton, Textbook of medical physiology, 1991) 에 근거 하여 실험을 진행하였다.

Refs.	A (Silverthorn et al., Human physiology, 1998)	B (Guyton, Textbook of medical physiology, 1991)	C (National Institute for Public Health and Environment, 2004)
Ingestion of food	2.0	2.5	1.5
Saliva	1.5	1.0	1.0
Gastric juice	2.0	1.5	2.0
Bile	0.5	1.0	1.0
Pancreatic juice	1.5	1.0	2.0

3-2. 세포실험을 통한 소장에서의 SMM 흡수성 평가

가. Caco-2 cell을 이용한 SMM standard의 intestinal transport와 세포 축적률을 평가

1) SMM의 세포 축적률 평가

한국세포주은행에서 분주 받은 Caco-2(passage # 36-38) 세포를 계대배양한 후 12 well monolayer plate에 0.046×10^6 의 density로 분주하여 세포가 confluent될 때까지 5% CO₂, 37°C조건에서 배지를 교체하면서 incubation 시켰다. confluent 한 세포의 배지를 제거하고 phosphate buffered saline로 세척한 뒤 37°C에서 농도별 (10, 50, 25, 10 ppm), SMM 100 ppm 과 37°C, 4°C에서 시간별 (15, 30, 45, 60분) 조건에 따라 실험을 진행하였다. 배양액을 채취한 후 Trypsin EDTA를 0.5 mL 분주 후 37°C에서 4분간 배양한 뒤 세포를 떼어내어 HPLC로 분석하였다.

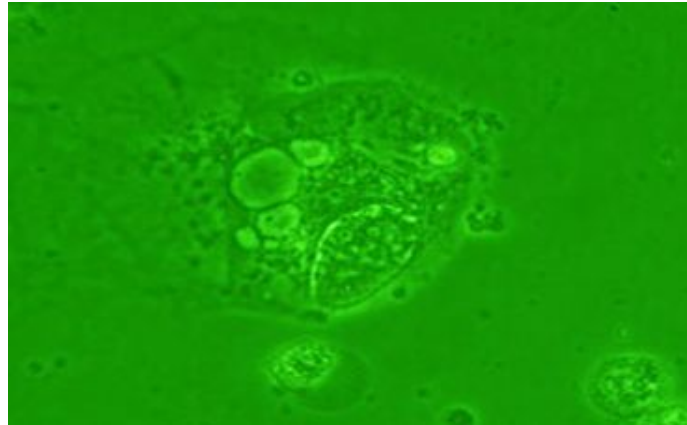


Fig. 3-7. Caco-2 cell

2) SMM의 intestinal transport 평가



Fig. 3-8. Trans-epithelial electric resistance (TEER).

한국세포주은행에서 분주 받은 Caco-2(passage # 36-38) 세포를 계대배양한 후 12 transwell plate에 2×10^5 의 density로 분주하여 세포가 confluent될 때까지 5% CO₂, 37°C 조건에서 apical and basal culture medium을 교체하면서 incubation 시켰다. confluent된 후 2~3주 이내에 Trans-epithelial electric resistance (TEER) 값을 측정하여 250Ω 이상일 때 실험을 진행하였다.

Apical and basal 부분의 배지를 제거한 후 phosphate buffered saline으로 세척하였다. 소장세

포의 apical membrane과 basolateral membrane에 각각 존재하는 수송단백질들 (SGLT1과 glucose transporter protein, p-glycoprotein)의 억제제인 phloridzin, verapamil 50 uM와 함께 100 ppm의 SMM을 세포 배양액에 각각 처리하여 apical에 0.5 mL 분주하고, basal에는 배지를 1.5 mL 분주한 후 60분간 incubation 시켰다. Apical과 basal에 있는 배지를 80% 에탄올과 1:1 희석하여 3분간 sonicating 하였다. 각각의 시료를 0.45 µm PVDF Syringe filter 로 필터한 후 HPLC 분석에 이용하였다.

나. s-methylmethionine(SMM)의 HPLC 분석조건

In vitro 생체 모방실험과 세포실험을 통해 얻은 샘플들을 0.45 µm PVDF Syringe filter로 필터한 후 HPLC 분석을 하였다. 분석 조건은 다음과 같다.

Table 3-5. HPLC condition

Instrument	1260 Infinity Quaternary LC (Agilent Technologies, USA)		
Column	Zorbox Eclipse AAA-C18, 5 µm, 4.6 mm x 150 mm		
Flow rate	2 mL/min		
Detector	FLD (ex, 340 nm, em, 450 nm)		
Temperature	40°C		
Mobile phase	A - 40 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.6-7.8 with 10 N NaOH solution B - Acetonitrile : Methanol : Water (45:45:10)		
Gradient condition	Time (min)	A (%)	B (%)
	Initial	0	0
	1.86	0	0
	18.11	43.3	56.7
	18.57	0	100
	22.29	0	100
	23.21	0	0
	26	100	0
Injector program	Draw 2.5 µl from vial 1 (borate pH 10) Draw 0.5 µl from vial (amino acid sample = sequence vial) Mix 3 µl in air, max speed 2x wait 0.5 min Draw 0 µl from vial 4 (needle wash using water in uncapped vial) Draw 0.5 µl from vial 2 (OPA) Mix 3.5 µl in air, max speed 6x Draw 0 µl from vial 4 (needle wash using water in uncapped vial) Draw 0.5 µl from vial 3 (FMOC) Mix 4 µl in air, max speed 6x Draw 32 µl from vial 5 (Water with cap) Mix 18 µl in air, max speed 2x Inject		

제2절 연구내용 및 결과

1. 배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명

1-1. 배추의 가공조건별 품질특성 및 SMM 성분분석

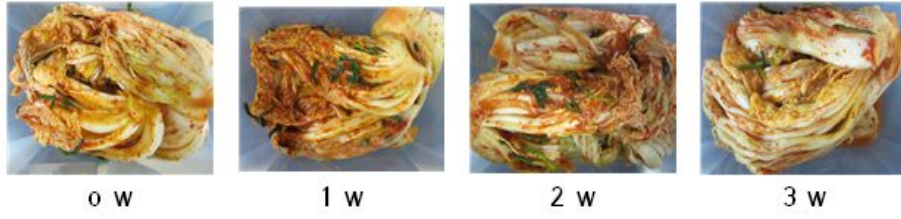
가. 배추의 가공조건별 품질특성

김치의 발효는 김치의 재료가 가지는 효소와 다양한 유산균에 의해 각종 유기산들이 생성되면서 신맛이 나게 된다. 따라서, 김치의 pH와 총산도는 김치의 주요품질지표라 할 수 있다. 김치 및 백김치 제조 후 4℃에서 8주 동안 저장하면서, 저장기간에 따른 pH, 총산도, 염도 및 SMM 함량 등을 측정하였다. 염도는 절임배추 1.17%에서 김치 저장 중 1.75~2.75%의 염농도를 나타내었으며, 백김치의 경우 초기 2.1%에서 저장기간 동안 1.61~1.93%의 염농도를 나타내었다(Fig. 3-10). 김치 실험결과, pH는 초기 5.24에서 저장 2주 후 4.40으로 감소하였으며, 저장 8주후에는 3.84로 감소하였다. 총산도는 pH와는 반대로 저장 초기 0.36%에서 저장 8주 후 1.26%로 점차 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3-11). 백김치도 김치와 비슷한 결과로, pH는 발효기간의 경과와 더불어 초기 급격히 감소하였다가 차츰 완만해지는 경향을 보였으며, 총산도는 초기 0.09%에서 저장 말기 0.77%로 점차 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3-12).

Table 3-6. Water content(%) in Kimchi Cabbage and Baik Kimchi during fermentation at 4℃

	storage time (weeks)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Kimchi	89.95	90.08	89.86	89.39	90.67	90.10	89.44	89.24	90.00
Cabbage	±1.05	±0.75	±0.41	±0.78	±0.01	±0.60	±0.21	±0.31	±0.18
Baik	92.62	92.68	92.57	92.92	92.87	93.77	93.44	93.48	93.70
Kimchi	±0.52	±1.52	±0.10	±0.28	±0.14	±0.01	±0.11	±0.27	±0.04

* 신선배추; 94.74±0.57, 절임배추; 94.09±0.98

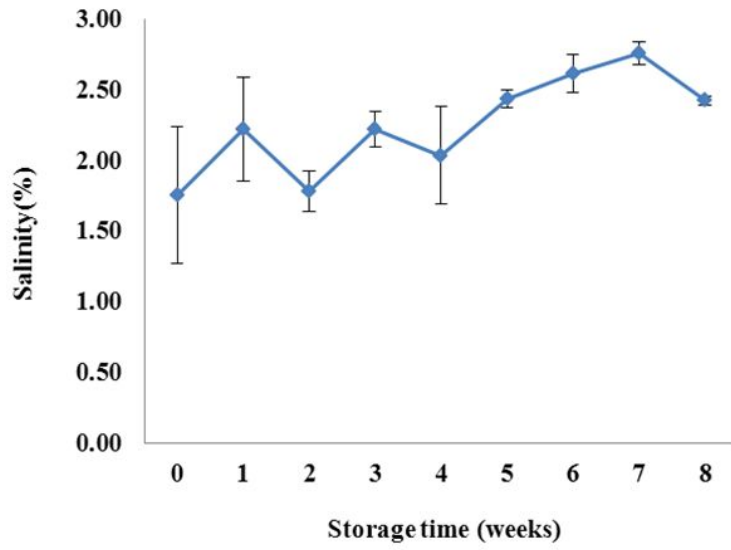


① Kimchi Cabbage

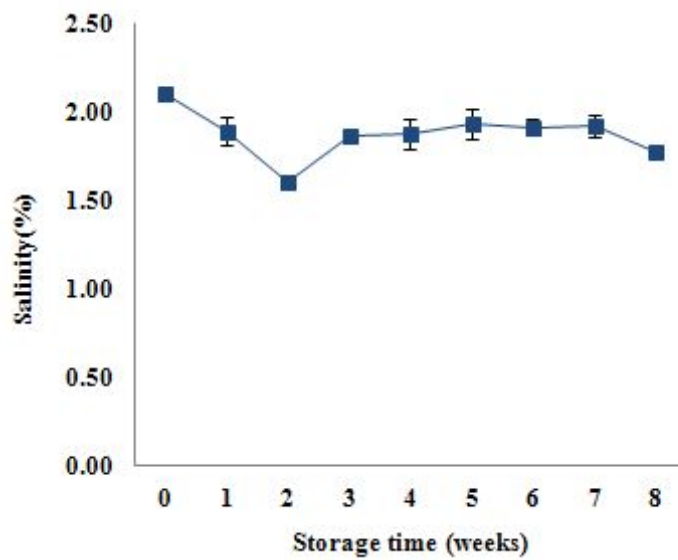


② Baik Kimchi

Fig. 3-9. 김치 저장기간에 따른 외관변화.



① Kimchi Cabbage



② Baik Kimchi

Fig. 3-10. Changes in salinity of Kimchi Cabbage and Baik Kimchi during fermentation at 4°C.

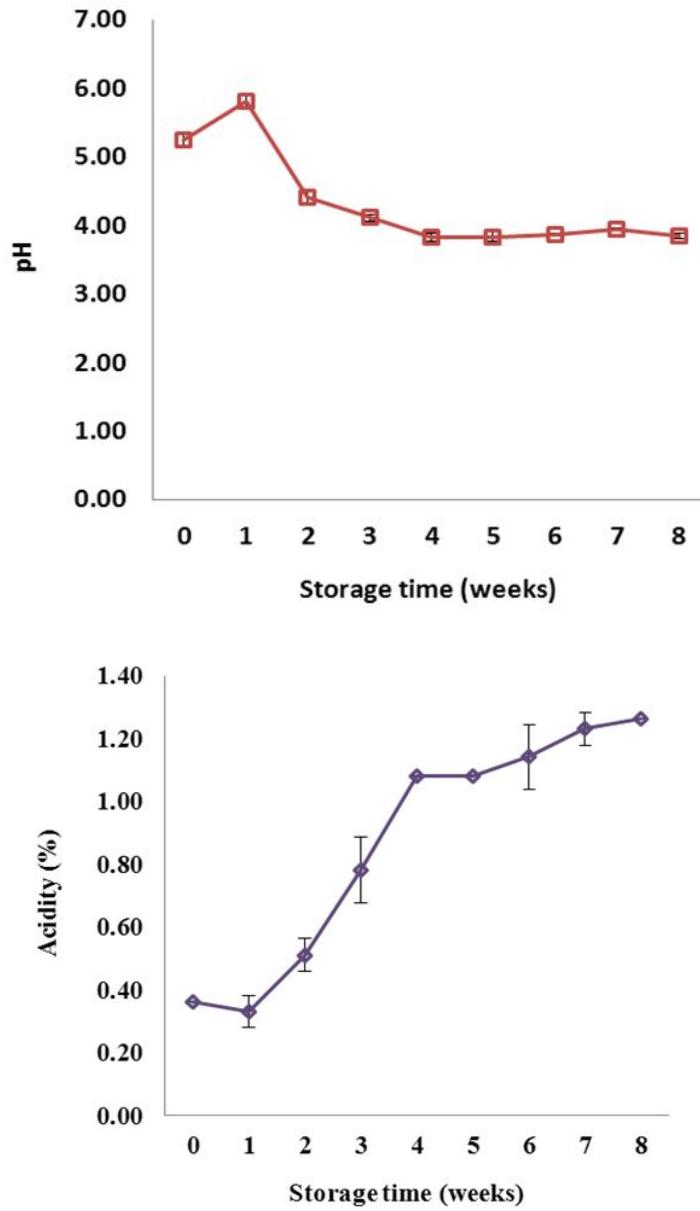


Fig. 3-11. Changes in pH and acidity of Kimchi Cabbage during fermentation at 4°C.

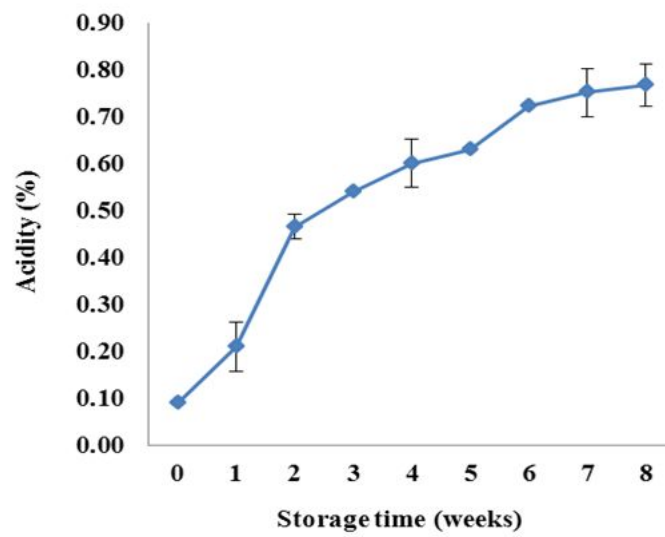
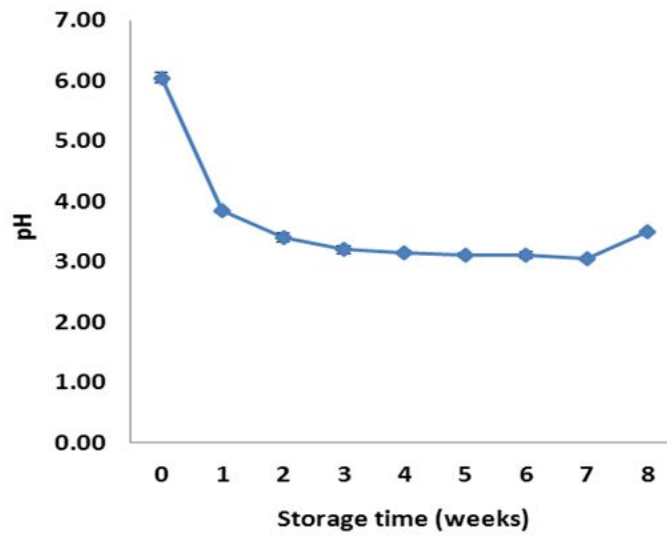


Fig. 3-12. Changes in pH and acidity of Baik Kimchi during fermentation at 4°C.

나. 배추의 가공조건별 SMM 성분 분석

김치는 우리나라의 대표적인 저장발효식품으로 세계적으로 주목 받고 있는 건강식품 중 하나이다. s-methylmethionine(SMM)은 항케양성 인자로, 위액분비 억제작용 및 케양조직의 재생 촉진작용이 있는 지용성 인자로 알려져 있다. 김치의 저장 중 SMM 분석결과, 김치 제조 후 57.85 ± 1.75 mg/100 g DW를 나타내었으며, 저장 4주 후 54.04 ± 0.78 mg/100 g DW로 감소하였고, 저장 말기에는 46.90 ± 0.84 mg/100 g DW를 나타내어 저장기간이 경과함에 따라 SMM 함량은 다소 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3-15). 백김치의 저장 중 SMM 분석결과, 저장기간에 따라 김치의 경우와 유사한 경향을 보였다. 백김치 제조 후 81.89 ± 13.07 mg/100 g DW를 나타내었으며, 저장기간이 경과함에 따라 SMM 함량은 감소하여 저장 8주 후에는 39.05 ± 4.54 mg/100 g DW로 초기에 비해 약 52.3% 감소하였다. 이 때, 생배추는 75.73 ± 2.90 mg/100 g DW, 절임배추는 71.21 ± 0.97 mg/100 g DW 함량을 보였다.

본 연구팀에서 배추의 품종별, 부위별 SMM 함량을 분석한 결과, 배추의 품종과 부위에 따라 차이가 있음을 확인하였다. 동풍배추(Winter Pride)의 겉잎(outward leaf)에서 12.70 mg/100 g, 55일 배추의 속잎(core leaf)에서 18.60 mg/100 g으로 SMM 함량이 가장 높게 나타났다. 또한, 동풍배추(Winter Pride)와 55일 배추의 young seedling과 fully grown stages에서의 SMM 함량의 변화를 분석한 결과, young seedling 동안 동풍배추(Winter Pride)는 $2.2 \sim 16.2$ mg/100 g FW, 55일 배추는 $6.2 \sim 18.8$ mg/100 g FW의 함량을 보였고, 25°C에서 발아를 시작한 이후 2일째 가장 높은 함량을 보였다. Fully grown stage에서는 약 3개월 간의 재배 후 배추의 부위별 SMM 함량을 측정된 결과, SMM 함량은 배추의 품종과 부위에 따라 영향을 받았다. SMM 함량이 leafy 부분이 mid-rib 부분보다 동풍배추에서는 2.5-9.0배 높았고, 55일 배추에서는 1.7-4.3배 높았다. 동풍배추에서는 core 부분에서의 SMM 함량이 가장 높았고, 반면 55일 배추에서는 outward leaves에서 가장 높았다.

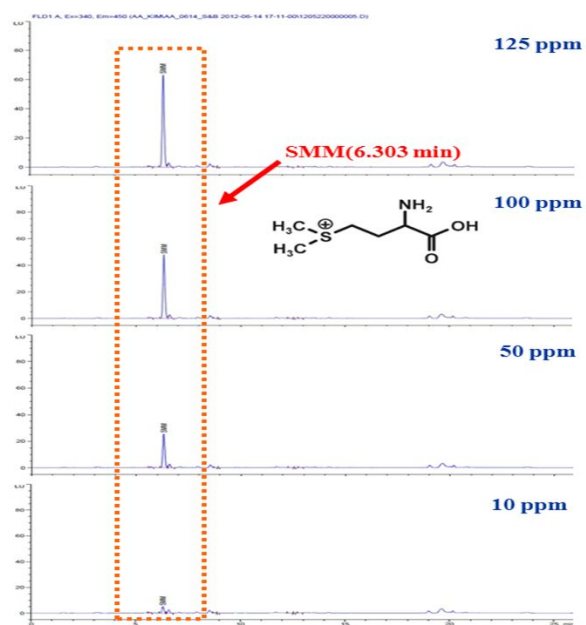


Fig. 3-13. HPLC-FLD chromatograms of standard solution.

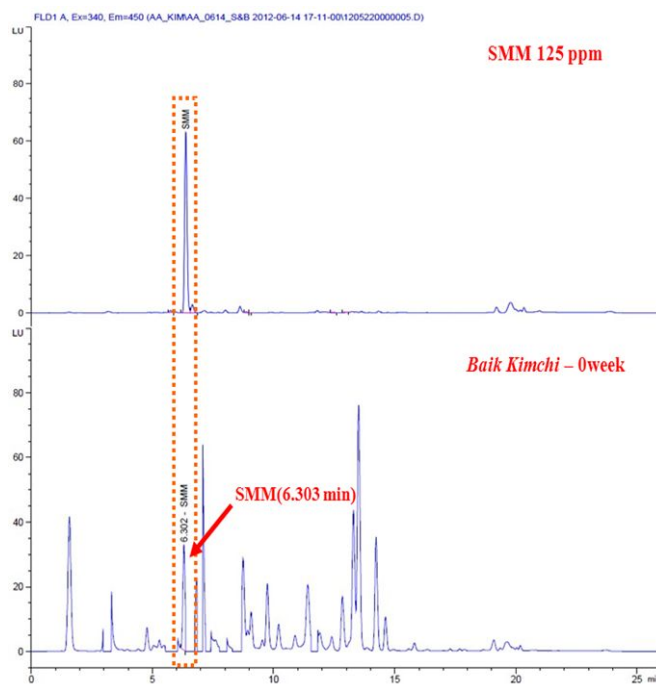
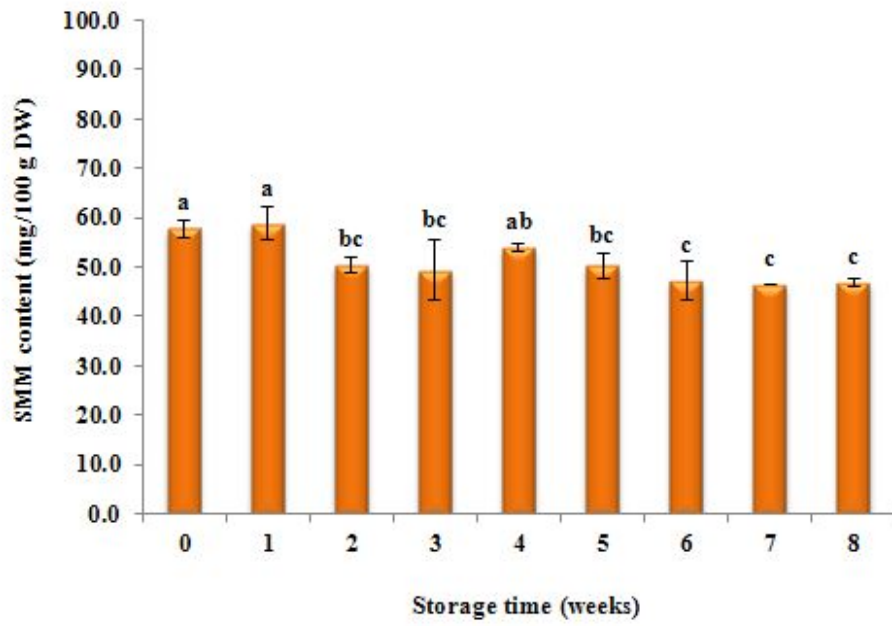
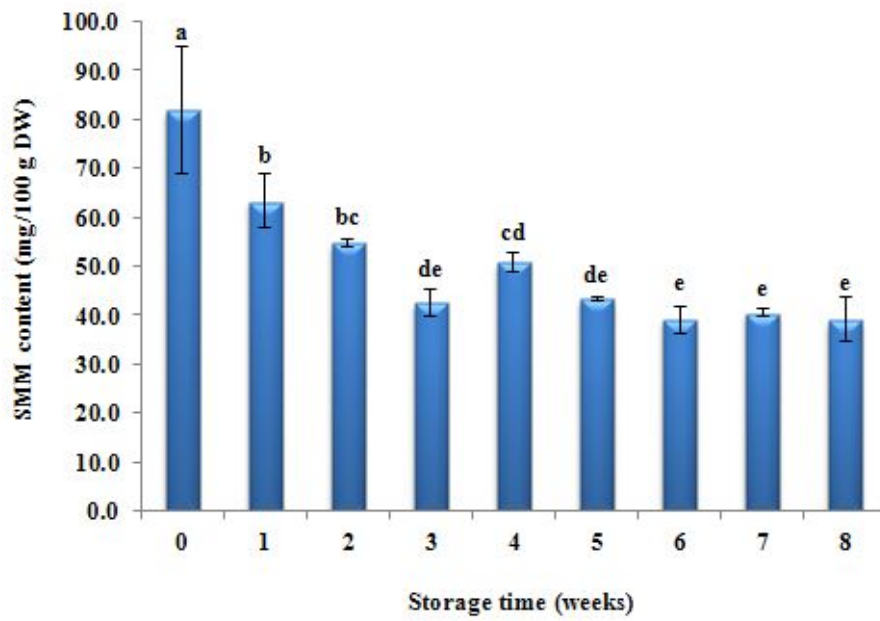


Fig 3-14. HPLC-FLD chromatograms of standard solution(125 ppm) and Baik Kimchi - 0 week.



① Kimchi Cabbage



② Baik Kimchi

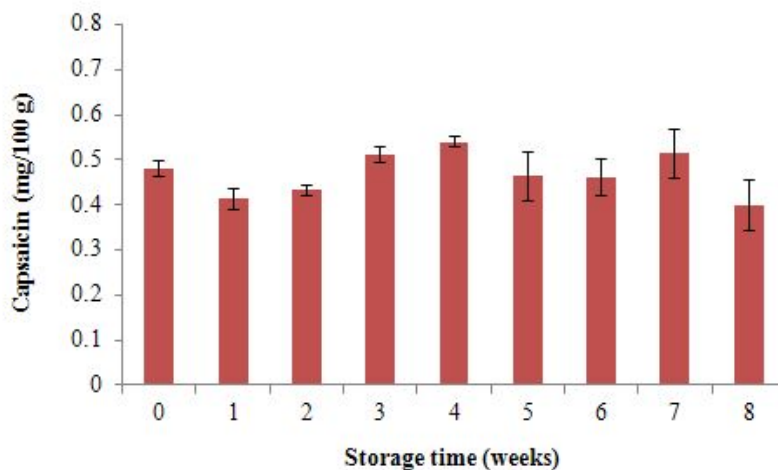
Fig. 3-15. SMM content in Kimchi Cabbage and Baik Kimchi during fermentation at 4°C.

다. 캡사이신 함량에 따른 SMM 함량 차이 분석

고춧가루의 매운성분인 캡사이신은 위액분비 촉진, 살균작용, 면역세포의 활성화 증진, 비만억제, 지구력 증진 등의 효과가 있다고 연구되어 있다. 캡사이신과 관련하여 구 등(1996)의 연구에서 고춧가루 첨가량이 배추김치 품질에 미치는 영향을 살펴본 결과는 다음과 같다. 일반적으로 순한맛 품종과 고capsaicin 품종 그리고 고춧가루를 첨가하지 않은 김치 제조 후 품질변화를 비교한 결과, 초기 pH는 고춧가루의 첨가량에 따라 약 pH 4.6까지 낮아졌으나 고춧가루 무첨가군은 약 6.3의 높은 pH 값을 보였다. 산도의 경우는 초기에는 고춧가루의 첨가량 증가에 따라 0-0.6%까지 높아졌으며 발효 4일부터는 첨가량이 많을수록 산도의 증가가 빨라져 발효 후기에는 시료간의 산도 차이가 약 0.6%가 되었다. 고추가 배추김치의 발효에 미치는 가장 중요한 인자는 캡사이신 함량이 아닌 환원당의 함량으로 추정되며 환원당의 함량이 낮은 고춧가루를 사용하면 김치의 발효를 지연시킬 수 있을 것으로 여겨지며 캡사이신의 양은 김치발효에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다. 본 연구에서 김치의 저장기간에 따른 캡사이신 함량을 분석한 결과는 다음 표 3-7과 같다. 저장 8주 동안 0.40-0.54 mg/100 g의 캡사이신 함량을 보였으며, SMM과의 상관성 분석결과 $r^2=-0.055$ 으로 상관성이 없는 것으로 확인되었다.

Table 3-7. Capsaicin(mg/100 g) in Kimchi Cabbage during fermentation at 4°C

	storage time (weeks)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Capsaicin	0.48	0.41	0.43	0.51	0.54	0.46	0.46	0.51	0.40
(mg/100 g)	±0.02	±0.02	±0.01	±0.02	±0.01	±0.06	±0.04	±0.06	±0.06



1-2. 무의 가공조건별 품질특성 및 SMM 성분분석

가. 무의 가공조건별 품질특성

동치미와 깍두기 제조 후 4℃에서 8주 동안 저장하면서, 저장기간에 따른 pH, 총산도, 염도 및 SMM 함량 등을 측정하였다. 실험결과, 염도는 저장기간 동안 동치미의 경우 초기 1.16%에서 말기 1.46%로 완만하게 증가하는 경향을 나타내었으며, 깍두기의 경우 1.51~1.65% 사이의 염농도를 나타내었다(Fig. 3-17). 깍두기와 동치미 모두 pH는 발효기간의 경과와 더불어 초기 급격히 감소하였다가 완만해지는 경향을 보였으며, 총 산도는 동치미는 초기 0.09%에서 저장 말기 0.54%, 깍두기는 초기 0.21%에서 저장 말기 1.05%로 점차 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3-18, Fig. 3-19).

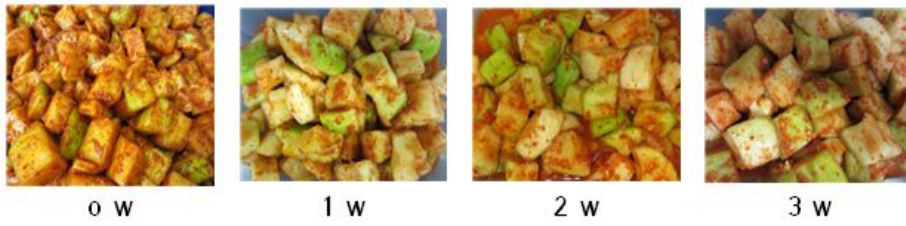
Table 3-8. Water content(%) in Dongchimi and Kkakdugi during fermentation at 4℃

	storage time (weeks)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Dongchimi	91.32 ±0.12	91.45 ±0.27	92.41 ±0.48	93.08 ±0.51	93.44 ±0.06	93.54 ±0.21	93.75 ±0.20	93.47 ±0.00	93.59 ±0.13
Kkakdugi	88.94 ±0.18	89.47 ±0.12	89.30 ±0.05	90.59 ±0.20	90.60 ±0.08	91.23 ±0.27	91.80 ±0.02	91.96 ±1.68	92.02 ±0.04

* 신선무; 93.96±0.28, 절임무; 91.76±0.01

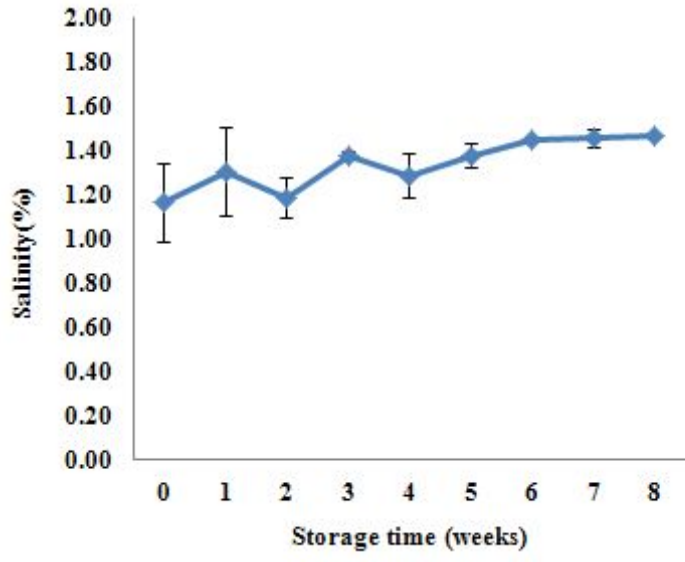


① Dongchimi

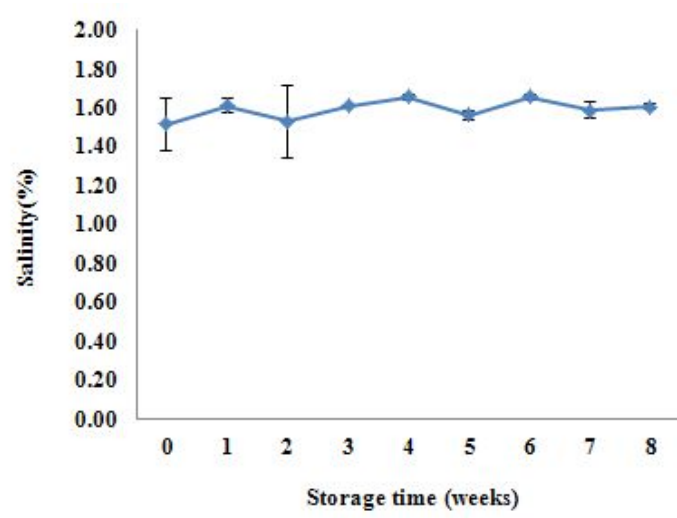


② Kkakdugi

Fig. 3-16. 동치미, 깍두기 저장기간에 따른 외관변화



① Dongchimi



② Kkakdugi

Fig. 3-17. Changes in salinity of Dongchimi and Kkakdugi during fermentation at 4°C.

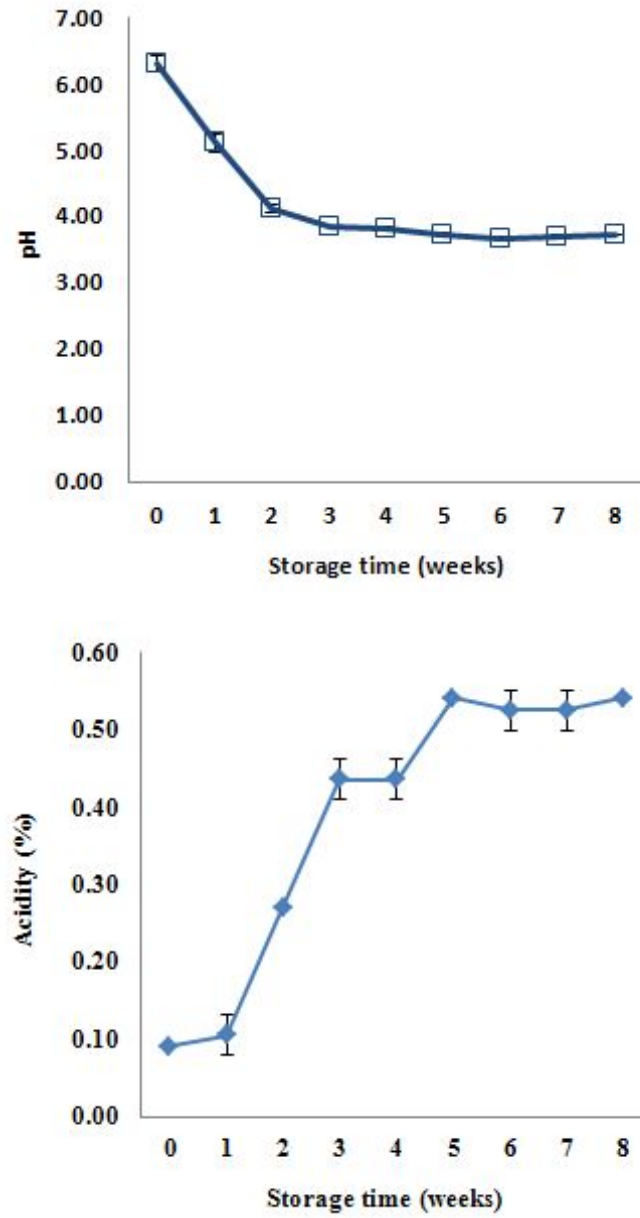


Fig. 3-18. Changes in pH and acidity of Dongchimi during fermentation at 4°C.

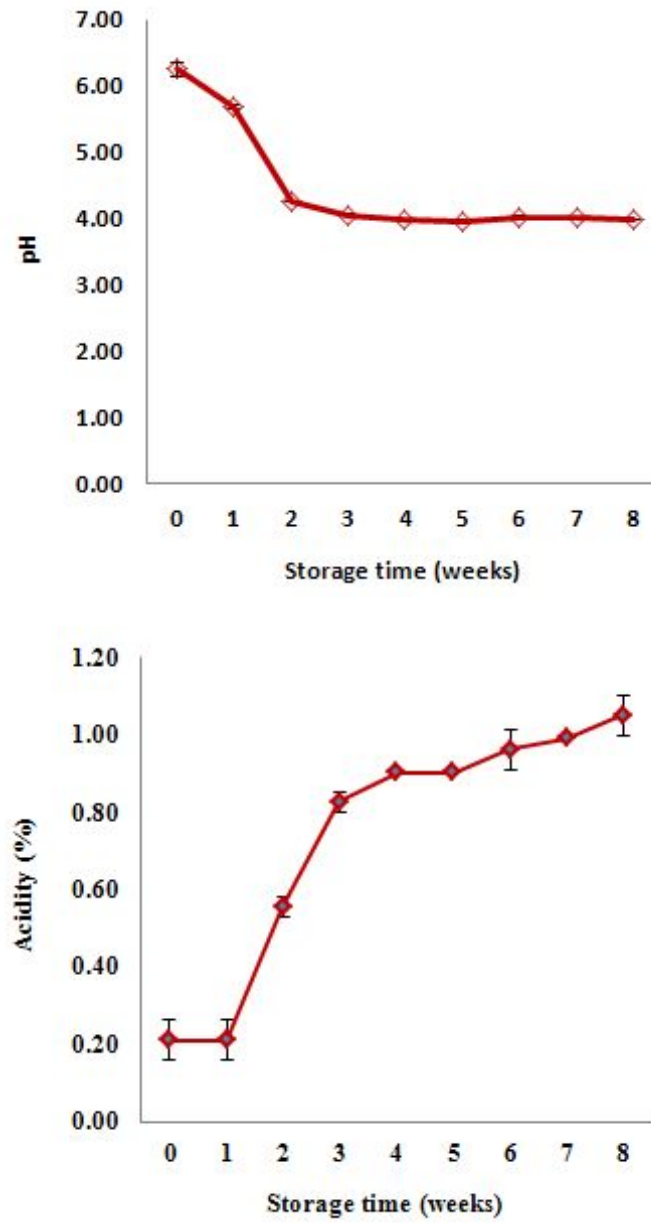
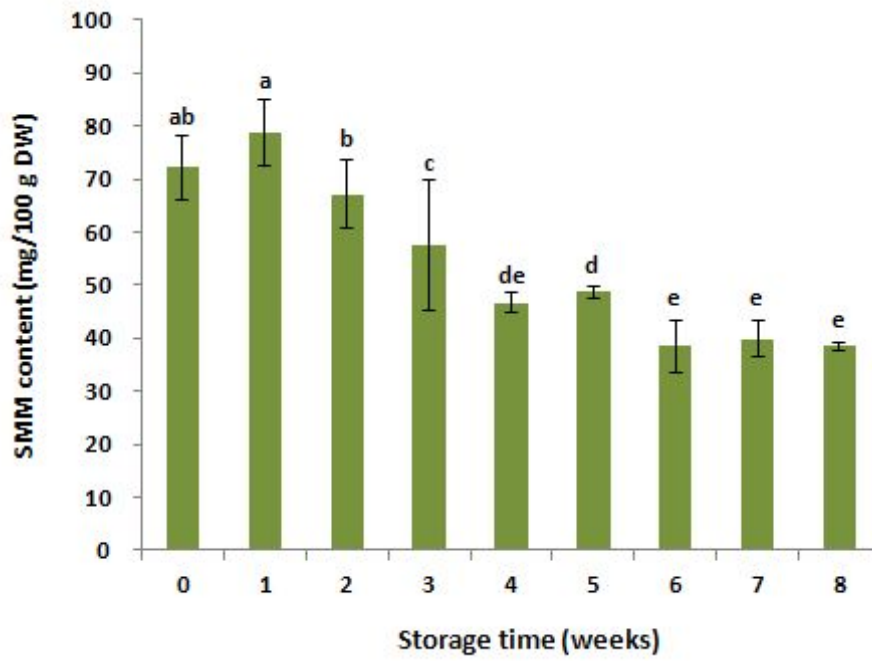


Fig. 3-19. Changes in pH and acidity of Kkakdugi during fermentation at 4°C.

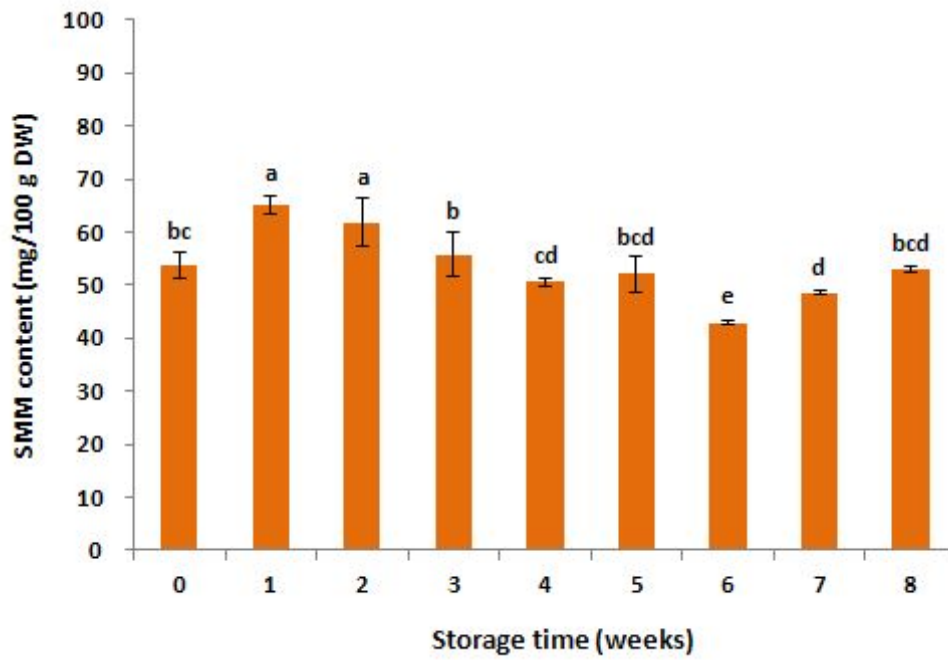
나. 무의 가공조건별 SMM 성분 분석

무는 소화를 돕고 배속을 편안하게 하는 diastase를 포함한 많은 효소가 있으며 알칼리성 식품으로 세계적으로도 다양하게 이용되는 채소이다. 우리나라에서는 매운 음식이나 환자들을 위한 죽에 부식으로써 동치미와 깍두기가 주로 많이 제공 된다. 본 연구에서는 다량 섭취가 가능한 동치미와 깍두기를 대상으로 저장기간에 따른 위장 보호 효과가 있는 s-methylmethionine (SMM) 함량 분석을 통해 건강식품으로서의 역할을 확인하고자 연구를 진행하였다. 동치미와 깍두기의 저장 중 SMM 분석결과, 신선 무 77.80 ± 9.37 mg/100 g DW, 절임무 79.71 ± 4.65 mg/100 g DW에서 동치미와 깍두기 제조 후 각 72.20 ± 6.03 mg/100 g DW와 53.77 ± 2.60 mg/100 g DW를 나타내었으며, 저장기간이 경과함에 따라 SMM 함량은 다소 감소하여 저장 8주 후에는 동치미는 38.44 ± 0.75 mg/100 g DW, 깍두기는 53.03 ± 0.56 mg/100 g DW로 감소하는 경향을 보였다. 무에 함유된 SMM의 위장건강효과에 대한 과학적인 평가를 통해 동치미와 깍두기에 대한 기능적 우수성과 세계적으로도 사이드 메뉴로서의 유용성을 알릴 수 있을 것으로 사료된다.

SMM함량과 비교를 위해 배추(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*), 무(*Raphanus sativus* L.), 양배추(*Brassica oleracea* var. *capitata*), 적겨자채(*Brassica juncea* L.), 케일(*Brassica oleracea* var. *acephala*) 등 십자화과 채소의 SMM 함량을 분석한 결과는 다음과 같다. SMM 함량은 무가 77.80 ± 9.37 mg/100 g DW로 가장 높았고, 배추 75.73 ± 2.90 mg/100 g DW, 양배추 68.10 ± 3.32 mg/100 g DW, 케일 66.14 ± 11.58 mg/100 g DW, 적겨자채 28.88 ± 0.84 mg/100 g DW의 순으로 나타났다(Fig. 3-21). Kim의 연구에서 건강채소로 알려진 식물들에 대해 SMM을 분석한 결과에서는 시금치가 45.2 mg/100 g DW으로 가장 높은 함량을 보였고, 케일 23.4 mg/100 g DW, 섬쑥부쟁이 19.8 mg/100 g DW, 겨자채 19.6 mg/100 g DW, 브로콜리 18.9 mg/100 g DW, 아스파라거스 18.7 mg/100 g DW 등의 함량을 보였다 (Kim 2003b).



① Dongchimi



② Kkakdugi

Fig. 3-20. SMM content in Dongchimi and Kkakdugi during fermentation at 4°C.

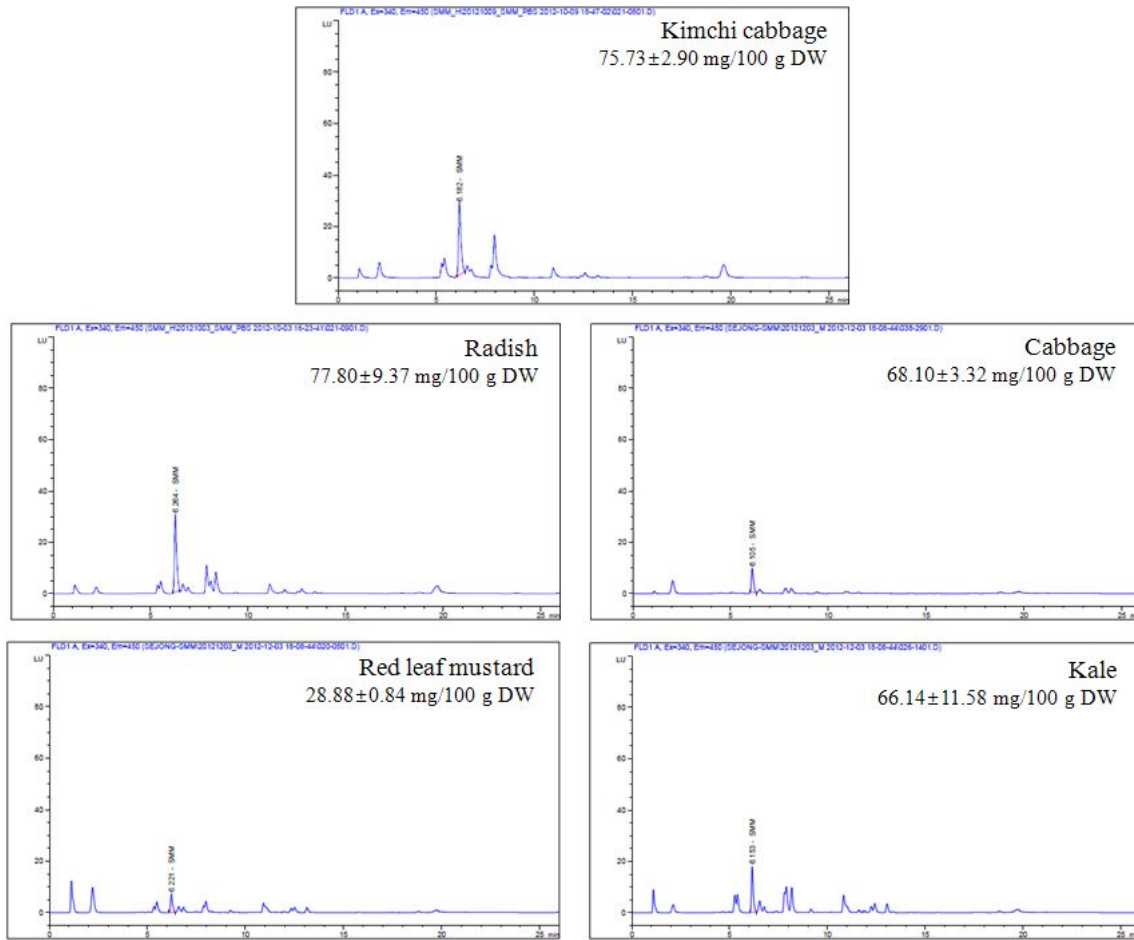


Fig. 3-21. HPLC-FLD chromatograms of cabbage, red leaf mustard, kale and radish.

1-3. 김치의 발효단계에 따른 SMM 성분분석

지금까지 알려진 김치에 대한 생리기능성은 다음과 같다(Bae & Lee, 2008). 김치는 발효 중 생성된 젖산, 유기산과 김치 재료의 식이섬유소, 살아있는 생균체인 유산균에 의한 정장작용으로 변비 및 대장암 예방효과가 있으며, vitamin C, β -carotene, phenol compound, chlorophyll 등이 많아 항산화작용을 가지므로 노화를 억제하고, 혈중 지질농도 감소효과를 나타내며, 특히 김치의 재료 중 고춧가루의 매운 성분인 capsaicin은 항비만 효과의 중요 역할을 담당하며 마늘, 무, 생강, 파 등도 비만억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 그 외에도 혈전용해 효과, 항고혈압효과, 항돌연변이, 항암효과 등 김치의 우수한 생리기능성들이 많은 연구를 통해 입증되고 있다. 우리나라 고유의 전통발효 식품인 김치에 대한 기능성을 새롭게 확인하기 위한 연구가 필요하며, 이러한 연구결과를 토대로 김치와 더불어 한식의 우수성을 알리며 산업화하기 위한 노력이 필요하다. S-methylmethionine (SMM)은 항산화관류양식이성 인자로 위장의 점액형성을 촉진하며 세포 손상을 중재하는 산소과생 유리기와 결합하여 단백질 형성에서 중요한 역할을 하여 위, 십이지장의 손상, 부식 및 ulcer 치유를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 김치의 발효단계에 따른 SMM 함량 변화를 확인하고자 하였다. 2007년 농림부에서 설정한 김치의 숙성도 표준지표를 참고하여, 김치의 숙성정도를 발효초기(pH 5.0 이상), 발효중기(pH 4.2-5.0), 발효말기(pH 4.0 이하) 3단계로 구분하였다. 김치 제조 후 4°C에서 8주 동안 저장하면서, 발효정도에 따른 pH, 총산도, 염도 및 SMM 함량 등을 측정하였다(Table 3-9). 실험결과, pH는 초기 5.53 ± 0.33 에서 발효기간이 경과할수록 점차 감소하여 저장 말기에는 3.89 ± 0.06 을 나타내었고, 총산도는 pH와 반대의 경향을 보여 초기 $0.35 \pm 0.04\%$ 에서 발효 마지막 단계에서는 $1.19 \pm 0.09\%$ 로 증가값을 보였다. 염도는 1.99~2.60%의 농도를 나타내었다. 김치의 발효정도에 따른 SMM 분석결과 초기 발효단계(58.33 ± 2.16 mg/100 g DW)에 비해 중간발효단계(51.03 ± 0.62 mg/100 g DW)에서는 13.00% 감소하였고, 마지막 단계(46.92 ± 0.49 mg/100 g DW)에서는 19.57% 감소하여 발효 진행에 따라 다소 감소하는 경향이였다(Fig. 3-22).

Table 3-9. Changes in pH, acidity and salinity of Kimchi Cabbage during fermentation at 4 °C

	Degree of fermentation		
	Early (pH 5.0<)	Middle (pH 4.2-4.5)	Late (<pH 4.0)
pH	5.53±0.33	4.26±0.17	3.89±0.06
Acidity(%)	0.35±0.04	0.65±0.17	1.19±0.09
Salinity(%)	1.99±0.46	2.00±0.27	2.60±0.09

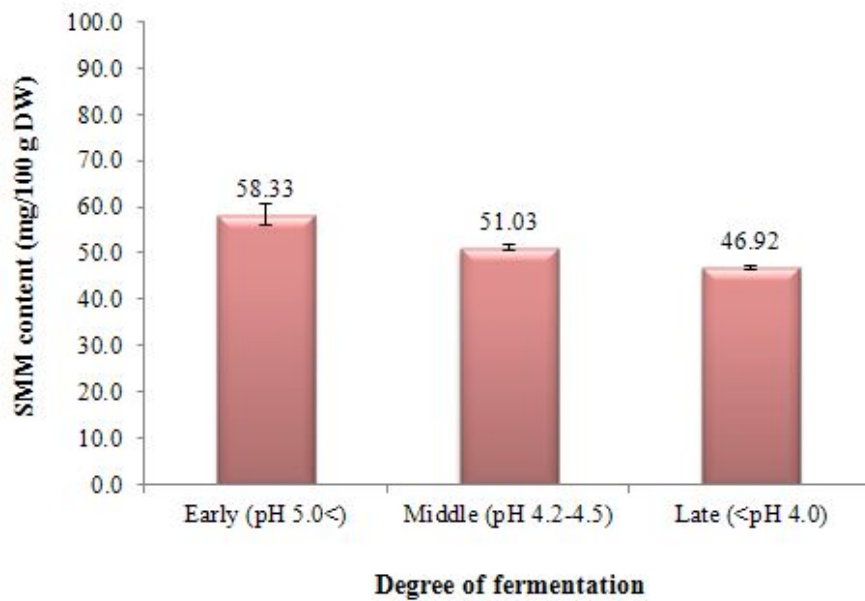


Fig. 3-22. SMM content in Kimchi Cabbage during fermentation at 4°C.

2. 동물모델을 이용한 배추 및 무유래 유효성분의 위장보호 효능 평가

2-1. 위염동물모델을 활용한 유효성평가 시스템 확립

- ✓ 유효성평가에 수반되는 제반 서류들을 조건에 맞게 모두 구비 하였다 (시험계획서, 시험물질보관서, 입고기록지, 관찰기록지, 체중기록지, 부검기록지, 시험보고서 등).
- ✓ 위의 서류들과 함께 시험계획서부터 시험보고서에 이르기까지 유효성평가에 수반되는 제 과정에 대해서 전체 시스템을 시험 운영하였으며 이를 통해 효과적인 유효성평가 시스템을 확립하였고 최종보고서를 작성하였다 [별첨].

2-2. 알코올성 위염동물모델 제작 및 protocol 확립

(1) 군구성

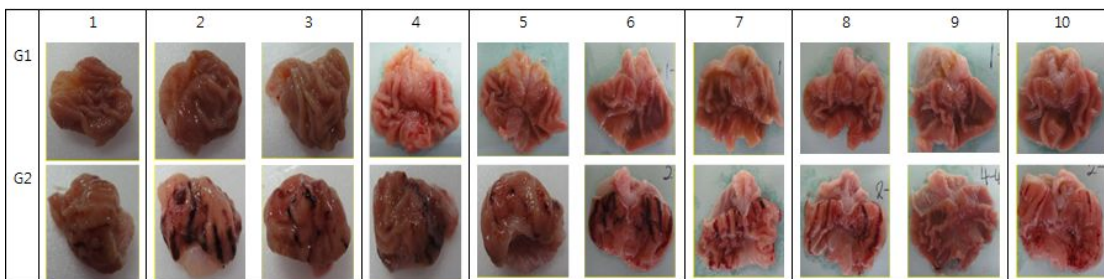
Group	Animals	0.15M HCL in 70% EtOH (ml)	Number	Sex
G1 (negative con)	SD rat 7 week	-	10	M
G2 (vehicle con)		1.5	10	M

* 투여경로: 경구투여

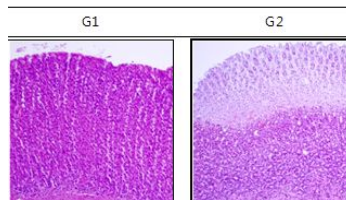
* 0.15M HCl(in 70% EtOH) 1.5ml을 rat에 경구투여한 후 1시간 후에 동물을 개복하여 위조직을 관찰한다.

(2) 결과

- 육안결과 : G2군 대부분의 위에서 심한 염증이 나타남을 확인할 수 있었다.



- 조직결과 : 병리학적 관찰을 해본 결과 G2군 모두에서 염증을 확인할 수 있었다.



- 알코올성 위염동물모델은 확립이 되었다. 그러나 염증병변이 심해 식품에 대한 평가로는 적절하기 못한 것으로 판단되었다.

2-3. 비알코올성 위염동물모델 제작, protocol 및 positive drug 확립

(1) 군구성

Group	Animals	Indomethacin (mg/kg)	Number	Sex
G1 (negative con)	SD rat 7 week	-	10	M
G2 (vehicle con)		25	10	M
G3 (positive con)		25	10	M

G1 : non disease

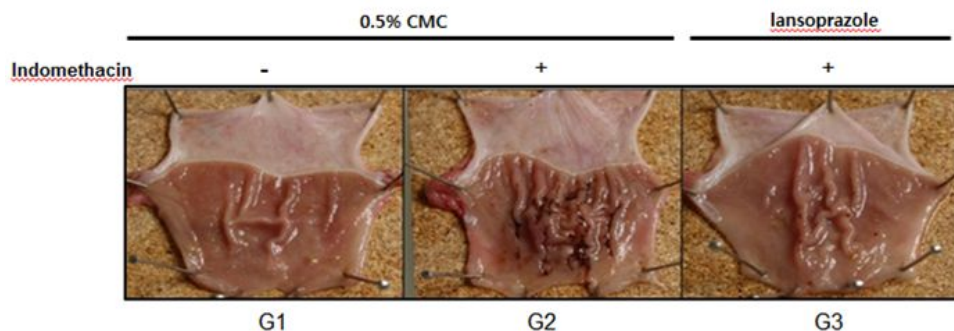
G2 : indomethacin 25mg/kg

G3 : lansoprazole 100mg/kg + indomethacin 25mg/kg

*indomethacin(25mg/kg)을 rat에 경구투여한 후 7시간 후에 동물을 개복하여 위조직을 관찰함.

(2) 결과

- 육안결과 : indomethacin 처리군에서 염증반응을 확인할 수 있었으며, lansoprazole에 의해 개선되는 것을 확인할 수 있었다.



2-4. SMM의 위장보호 효과에 대한 유효성평가 수행

✓ 확립된 위염동물모델중 병변이 더 뚜렷하고 균일한 비알코올성 위염동물모델로 실험을 진행하였다.

(1) 군구성

Group	Animals	MMSC dose (mg/kg)	Number	Sex
G1 (negative con)	SD rat 7 week	-	10	M
G2 (vehicle con)		-	10	M
G3 (test article)		0.25	10	M
G4 (test article)		1	10	M
G5 (test article)		4	10	M
G6 (positive con)		-	10	M

G1 : non disease
 G2 : indomethacin 25mg/kg
 G3 : SMM 0.25mg/kg + indomethacin 25mg/kg
 G4 : SMM 1mg/kg + indomethacin 25mg/kg
 G5 : SMM 4mg/kg + indomethacin 25mg/kg
 G6 : lansoprazole 100mg/kg + indomethacin 25mg/kg

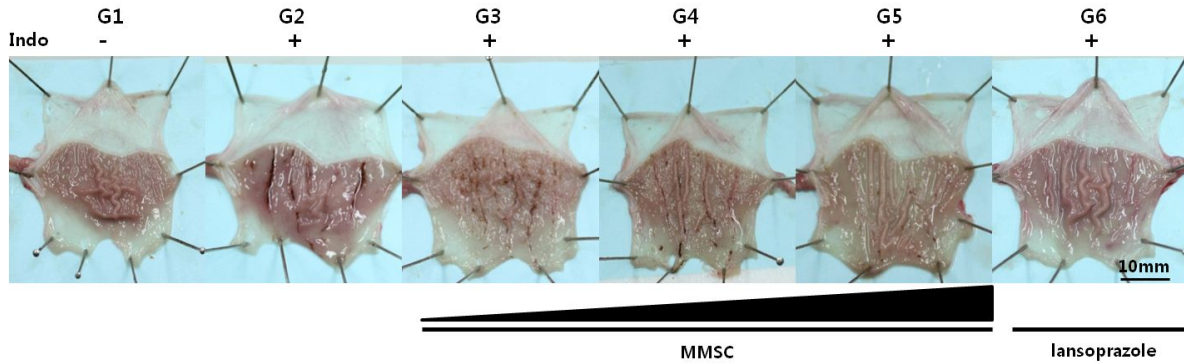
-treatment volume : 10ml/kg

(2) Time line

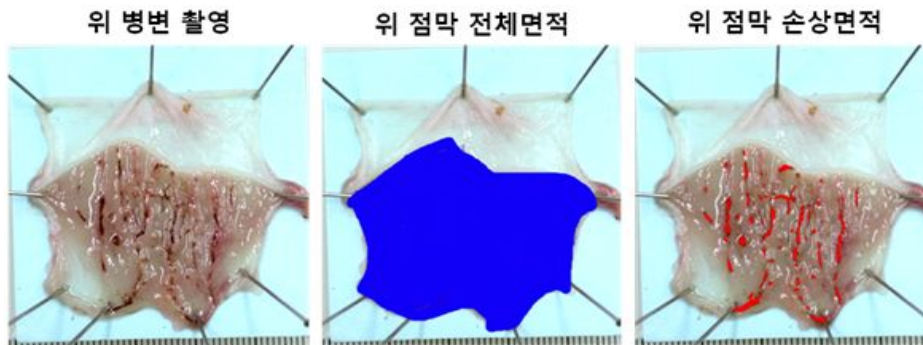
Acclimatization 1week	1day		2day	
	Vehicle con		D.W. 07:30	Indomethacin 25mg/kg administration [08:00]
MMSC		MMSC 07:30		
Positive con		lansoprazole 07:30		
Fast		15:00	15:00	Sacrifice

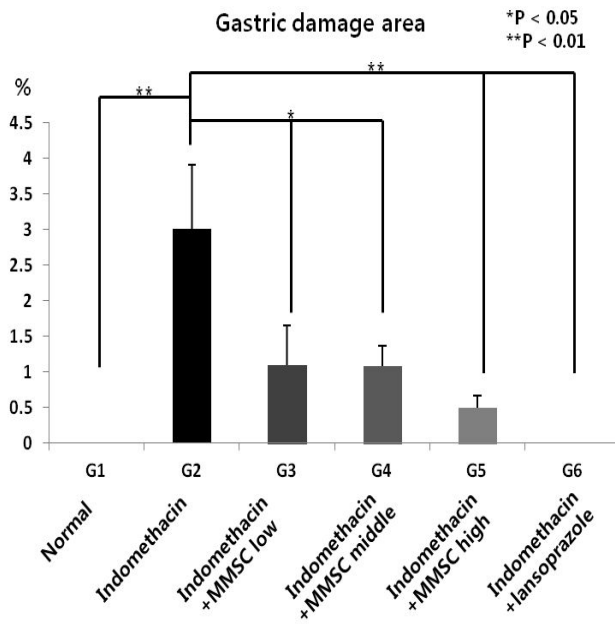
- (3) 개체별 목록표 (별첨 : 최종보고서)
- (4) 투여, 부검시간표 (별첨 : 최종보고서)
- (5) 임상관찰기록지 (별첨 : 최종보고서)
- (6) 결과

- 육안결과 : 비교 결과 위 손상 유발그룹 (G2)에서는 위에 선명한 점막손상과 띠 모양의 출혈뿐 아니라, 위 전체에 출혈성 점막손상도 관찰되었음. 육안적 소견으로 볼 때, MMSC low, middle dose 투여 (G3, G4,)그룹은 위 손상 유발 군 (G2)에 비해 병변 부위가 소량 감소하는 것을 확인하였으며, high dose 투여 (G5)그룹에서는 검붉은 선의 병변 부위가 다량 감소함을 확인 할 수 있었다.



- 육안결과의 수치화 : 염증의 정도를 (병변면적/전체점막면적) x 100 으로 환산하여 군간 비교를 실시하였다.

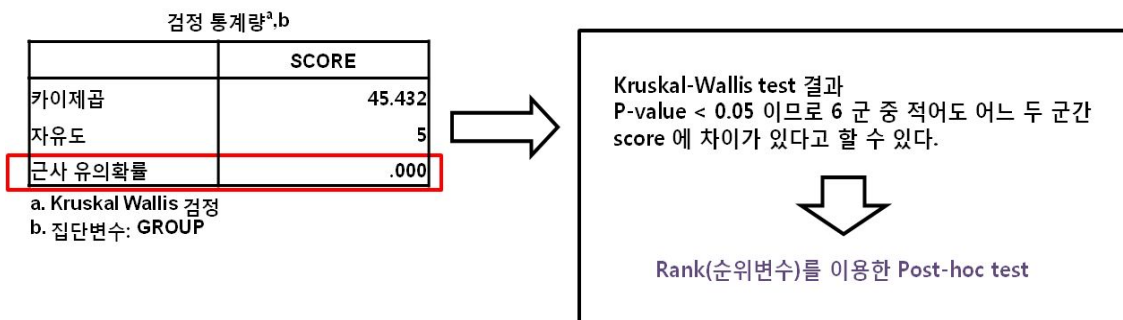




Group	Test article	Damage area (%)
G1	-	0.0
G2	-	3.01 ± 0.90
G3	MMSC low	1.09 ± 0.56
G4	MMSC middle	1.09 ± 0.28
G5	MMSC high	0.50 ± 0.17
G6	lansoprazole	0.0

- 도표의 통계학적 분석 : 통계는 일반적으로 많이 사용하는 SPSS 분석 프로그램을 사용하여 처리하였다. 시험 분석에 사용되는 통계 방법은 동물실험의 특성상 충분한 N수 확보의 어려움이 있으므로, 비모수적 검정 방법을 사용하였다.

Kruskal-Wallis test



사후검정

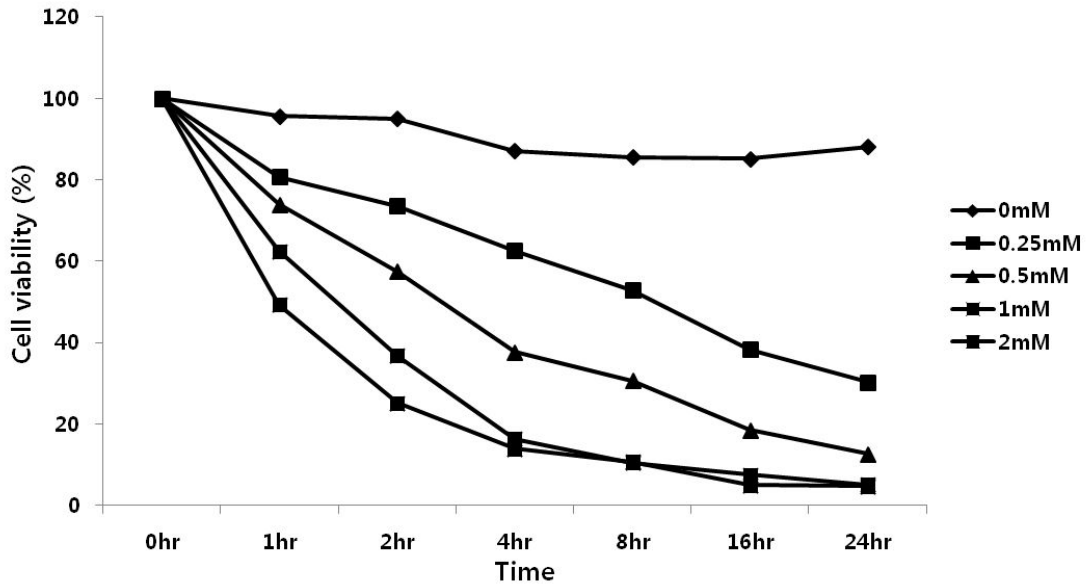
다중 비교
Rank of SCORE
Tukey HSD

(I) GROUP	(J) GROUP	평균차(I-J)	표준오차	유의확률	95% 신뢰구간	
					하한값	상한값
1	2	-38.750000 ^a	3.841850	.000	-50.10067	-27.39933
	3	-26.400000 ^a	3.841850	.000	-37.75067	-15.04933
	4	-31.400000 ^a	3.841850	.000	-42.75067	-20.04933
	5	-23.450000 ^a	3.841850	.000	-34.80067	-12.09933
	6	.000000	3.841850	1.000	-11.35067	11.35067
2	1	38.750000 ^a	3.841850	.000	27.39933	50.10067
	3	12.350000 ^a	3.841850	.025	.99933	23.70067
	4	7.350000 ^a	3.841850	.406	-4.00067	18.70067
	5	15.300000 ^a	3.841850	.003	3.94933	26.65067
	6	38.750000 ^a	3.841850	.000	27.39933	50.10067
3	1	26.400000 ^a	3.841850	.000	15.04933	37.75067
	2	-12.350000 ^a	3.841850	.025	-23.70067	-9.9933
	4	-5.000000 ^a	3.841850	.783	-16.35067	6.35067
	5	2.950000 ^a	3.841850	.972	-8.40067	14.30067
	6	26.400000 ^a	3.841850	.000	15.04933	37.75067
4	1	31.400000 ^a	3.841850	.000	20.04933	42.75067
	2	-7.350000 ^a	3.841850	.406	-18.70067	4.00067
	3	5.000000 ^a	3.841850	.783	-6.35067	16.35067
	5	7.950000 ^a	3.841850	.319	-3.40067	19.30067
	6	31.400000 ^a	3.841850	.000	20.04933	42.75067
5	1	23.450000 ^a	3.841850	.000	12.09933	34.80067
	2	-15.300000 ^a	3.841850	.003	-26.65067	-3.94933
	3	-2.950000 ^a	3.841850	.972	-14.30067	8.40067
	4	-7.950000 ^a	3.841850	.319	-19.30067	3.40067
	6	23.450000 ^a	3.841850	.000	12.09933	34.80067
6	1	.000000	3.841850	1.000	-11.35067	11.35067
	2	-38.750000 ^a	3.841850	.000	-50.10067	-27.39933
	3	-26.400000 ^a	3.841850	.000	-37.75067	-15.04933
	4	-31.400000 ^a	3.841850	.000	-42.75067	-20.04933
	5	-23.450000 ^a	3.841850	.000	-34.80067	-12.09933

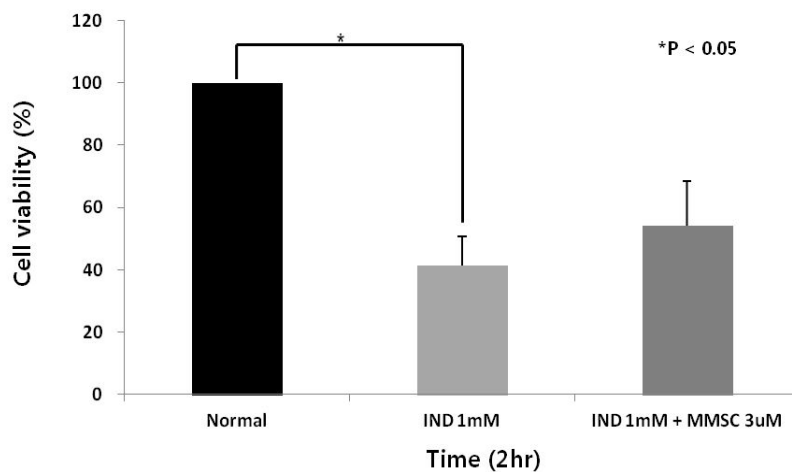
^a. 평균차는 0.05 수준에서 유의합니다.

사후 검정 결과
Group 2와 Group 1, Group 3, Group 4,
Group 5, Group 6 간의 score에서 유의성
있는 차이를 보였다.

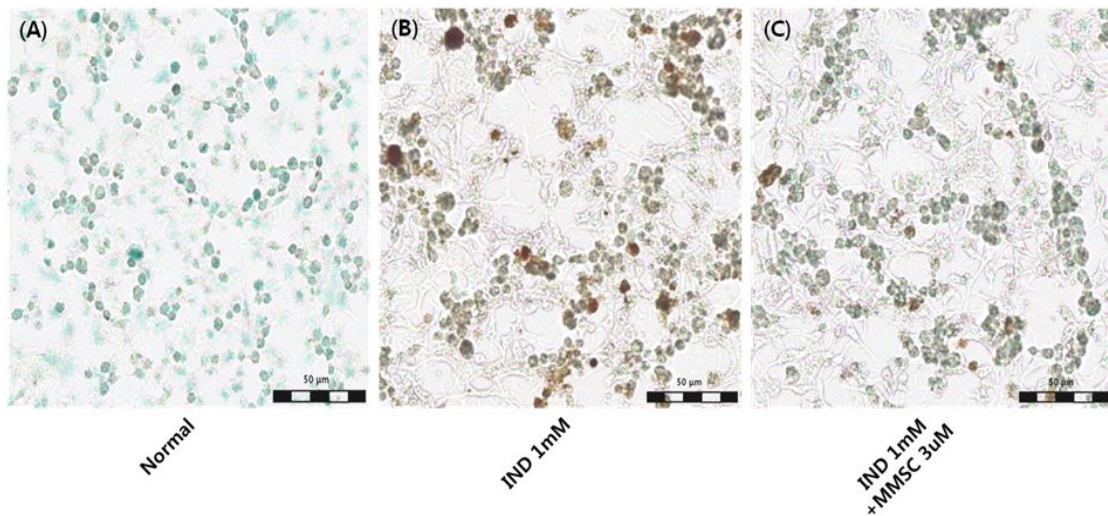
- H&E staining을 통한 조직학적 분석 : 분석결과 위 손상 유발 그룹 (G2)에서 위 점막조직이 많이 손상된 것을 확인 할 수 있었으며, negative control (G1)그룹과 비교하여 위 손상 유발 군은 국소적으로 허혈성 손상이 많은 것을 확인할 수 있었음. MMSC 투여 (G3, G4, G5)그룹에서는 증상이 호전되는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중 high dose 투여 (G5)그룹의 증상이 가장 호전되는 것을 확인하였다.



- in vitro에서 indomethacin의 cytotoxicity test : SMM의 효능을 테스트 하기 전 indomethacin의 농도, 시간별 독성을 확인하기 위해 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 시간 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mM 농도 때의 cell viability를 측정하였다.
- in vitro에서 SMM의 효과 확인을 위해 cell viability를 측정 : MMSC 3uM을 treat한 후 30분 뒤에 indomethacin 1 mM 을 treat하여 cell viability를 측정하였으며, 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 시간의 간격을 두고 관찰한 결과 2시간이 경과한 후의 cell viability가 가장 좋은 것을 확인하였다.



- in vitro에서 SMM의 효과 확인을 위해 TUNEL staining을 실시 : Normal, indomethacin 1mM, indomethacin 1mM + MMSC 3uM, 3개 그룹으로 나누어 실험한 결과 normal 에서는 apoptosis 가 확인되지 않았으며, indomethacin 1mM 그룹에서는 갈색으로 staining된 apoptosis 양이 많은 것을 확인하였음. Indomethacin 1mM + MMSC 3uM 그룹은 indomethacin 1 mM과 비교한 결과 갈색으로 staining된 부분이 상대적으로 줄어든 것을 확인하였다.



2-5. 동결건조 배추 및 무의 위장보호 효과에 대한 유효성평가 수행

- ✓ 확립된 위염동물모델중 병변이 더 적절한 비알코올성 위염동물모델로 실험을 진행함.
- ✓ 동결건조 시료는 건조된 시료를 막자사발을 이용하여 곱게 간 후 채로 걸러 미세한 분말 형태로 만든 후 튜브에 넣고 테잎으로 밀봉하여 투여당일까지 deep freezer에 보관하였다.
- ✓ 동결건조 시료는 성인 (60kg) 일일섭취량을 기준하여 rat 1마리당 (200g) 투여량으로 환산한 후 투여 할 수 있는 최대 농도인 6배를 투여하도록 하였다.

구분	동결건조 투여량 (1x) mg / 200g rat	동결건조 투여량 (6x) mg / 200g rat
생배추	18	108
백김치	25	150
생무	16	96
동치미	24	144

(1) 군구성

Group	Animals	동결건조 시료 투여량(mg/kg)	Number	Sex
G1 (Negative con)	SD rat 7 week	-	10	M
G2 (vehicle con)		-	10	M
G3 (생배추)		540	10	M
G4 (백김치)		750	10	M
G5 (생무)		480	10	M
G6 (동치미)		720	10	M
G7 (Positive con)		-	10	M

G1 : non disease

-treatment volume : 10ml/kg

G2 : indomethacin 25mg/kg

G3 : 생배추 시료 + indomethacin 25mg/kg

G4 : 백김치 시료 + indomethacin 25mg/kg

G5 : 생무 시료 + indomethacin 25mg/kg

G6 : 동치미 시료 + indomethacin 25mg/kg

G7 : lansoprazole 100mg/kg + indomethacin 25mg/kg

(2) Time line

Acclimatization 1week	1day		2day	
	Vehicle con		D.W. 07:30	↓
동결건조 시료		07:30	↓	
Positive con		lansoprazole 07:30	↓	
Fast		15:00	15:00	Sacrifice

(3) 개체별 목록표

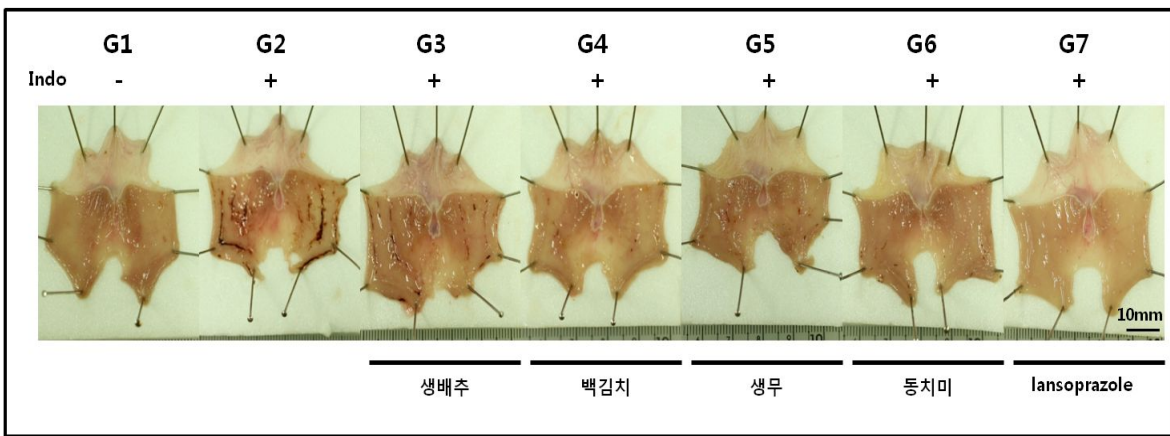
Group	Ear tag	Start weight(g)	DOB	TODAY	Day	Weeks	Sex
G1	601	170.1	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	602	168.5	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	603	168.3	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	604	159.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	605	157.7	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	606	156.7	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	607	162.7	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	608	162.5	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	609	167.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	616	172.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
G2	611	157.4	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	612	167	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	613	160.6	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	614	161.8	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	615	163.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	610	159.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	617	169.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	618	162.5	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	619	170.3	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	620	169.4	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
G3	621	161.7	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	622	165.5	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	623	172.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	624	155.4	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	625	165.3	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	626	162.3	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	627	165.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	628	162.8	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	629	164.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	630	167.9	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
G4	631	162.9	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	632	168.8	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	633	168	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	634	167.3	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	635	160.5	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	636	165.7	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	637	162.8	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	638	151.4	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	639	168.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	640	168.6	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
G5	641	164.3	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	642	165.1	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	643	164.6	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	644	160.5	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	645	162.7	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	646	167.5	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	647	165.3	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	648	158.8	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	649	167.6	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	650	165.5	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
G6	651	160.5	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	652	166.1	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	638	174.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	654	157.8	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	655	165.1	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	656	167.7	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	657	164.3	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	658	160.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	659	161.4	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	660	157.1	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
G7	641	173.7	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	662	168.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	663	163.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	664	160.8	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	665	160.8	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	666	162.6	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	667	164.4	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	668	159	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	669	158.2	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M
	670	160.3	2012-10-01	2012-11-19	49	7.0	M

(4) 투여, 부검시간표

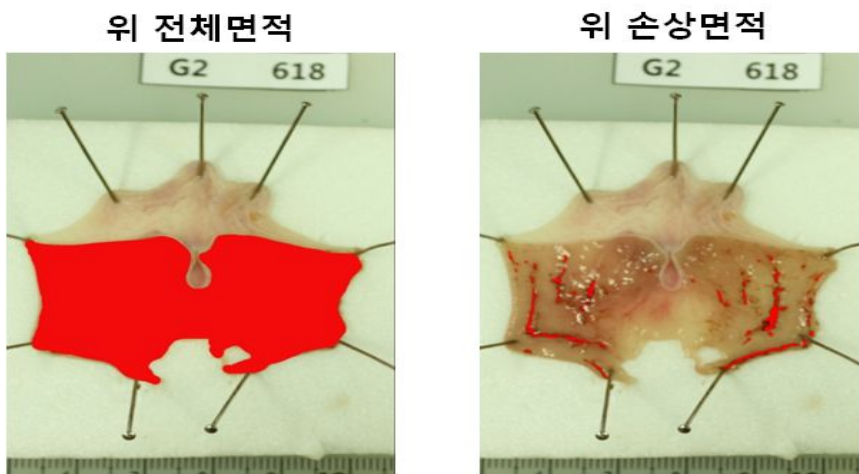
Group	Ear tag	건조시료 & lansoprazole treat	indomethacin treat	Autopsy start
G1	601	8:30	9:00	15:00
G2	611	8:33	9:03	15:03
G3	621	8:36	9:06	15:06
G4	631	8:39	9:09	15:09
G5	661	8:42	9:12	15:12
G6	651	8:45	9:15	15:15
G7	641	8:48	9:18	15:18
G7	662	8:51	9:21	15:21
G6	652	8:54	9:24	15:24
G5	642	8:57	9:27	15:27
G4	632	9:00	9:30	15:30
G3	622	9:03	9:33	15:33
G2	612	9:06	9:36	15:36
G1	602	9:09	9:39	15:39
G1	603	9:12	9:42	15:42
G2	613	9:15	9:45	15:45
G3	623	9:18	9:48	15:48
G4	633	9:21	9:51	15:51
G5	643	9:24	9:54	15:54
G6	638	9:27	9:57	15:57
G7	663	9:30	10:00	16:00
G7	664	9:33	10:03	16:03
G6	654	9:36	10:06	16:06
G5	644	9:39	10:09	16:09
G4	634	9:42	10:12	16:12
G3	624	9:45	10:15	16:15
G2	614	9:48	10:18	16:18
G1	604	9:51	10:21	16:21
G1	605	9:54	10:24	16:24
G2	615	9:57	10:27	16:27
G3	625	10:00	10:30	16:30
G4	635	10:03	10:33	16:33
G5	645	10:06	10:36	16:36
G6	655	10:09	10:39	16:39
G7	665	10:12	10:42	16:42
G7	666	10:15	10:45	16:45
G6	656	10:18	10:48	16:48
G5	646	10:21	10:51	16:51
G4	636	10:24	10:54	16:54
G3	626	10:27	10:57	16:57
G2	610	10:30	11:00	17:00
G1	606	10:33	11:03	17:03
G1	607	10:36	11:06	17:06
G2	617	10:39	11:09	17:09
G3	627	10:42	11:12	17:12
G4	637	10:45	11:15	17:15
G5	647	10:48	11:18	17:18
G6	657	10:51	11:21	17:21
G7	667	10:54	11:24	17:24
G7	668	10:57	11:27	17:27
G6	658	11:00	11:30	17:30
G5	648	11:03	11:33	17:33
G4	638	11:06	11:36	17:36
G3	628	11:09	11:39	17:39
G2	618	11:12	11:42	17:42
G1	608	11:15	11:45	17:45
G1	609	11:18	11:48	17:48
G2	619	11:21	11:51	17:51
G3	629	11:24	11:54	17:54
G4	639	11:27	11:57	17:57
G5	649	11:30	12:00	18:00
G6	659	11:33	12:03	18:03
G7	669	11:36	12:06	18:06
G7	670	11:39	12:09	18:09
G6	660	11:42	12:12	18:12
G5	650	11:45	12:15	18:15
G4	640	11:48	12:18	18:18
G3	630	11:51	12:21	18:21
G2	620	11:54	12:24	18:24
G1	616	11:57	12:27	18:27

(6) 결과

- 육안결과 : 비교 결과 위 손상 유발그룹 (G2)에서는 위에 선명한 점막손상과 띠 모양의 출혈뿐 아니라, 위 전체에 출혈성 점막손상도 관찰되었음. 육안적 소견으로 볼 때, 생배추 투여 (G3)그룹은 위 손상 유발 군 (G2)에 비해 병변 부위가 소량 감소하는 것을 확인하였으며, 백김치, 생무, 동치미 투여 (G4, G5, G6)그룹에서는 검붉은 선의 병변 부위가 다량 감소함을 확인 할 수 있었다.

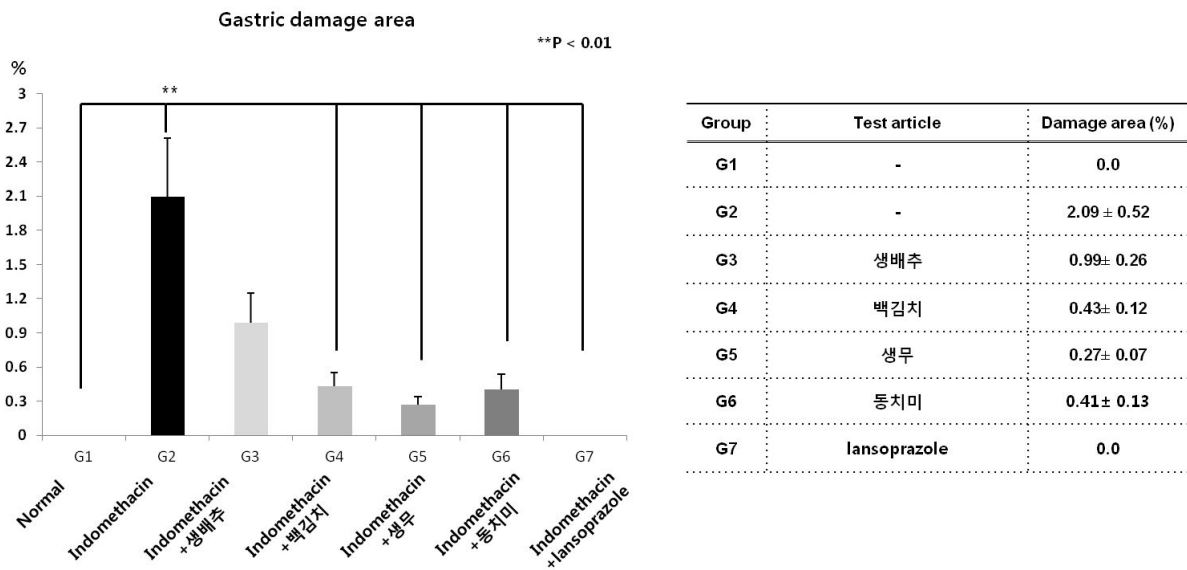
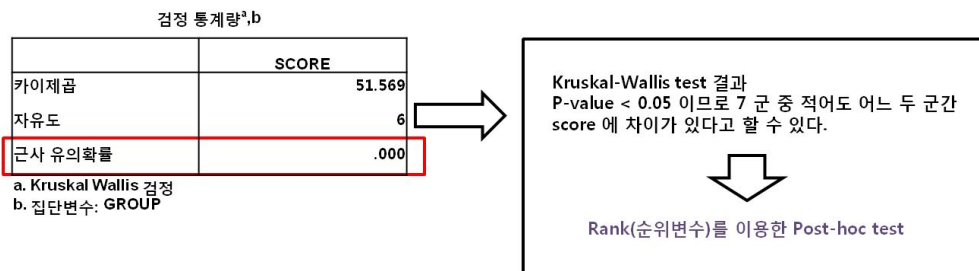


- 육안결과의 수치화 : 염증의 정도를 (병변면적/전체점막면적) x 100 으로 환산하여 군간 비교를 실시하였다.



- 도표의 통계학적 분석 : 통계는 일반적으로 많이 사용하는 SPSS 분석 프로그램을 사용하여 처리하였음. 시험 분석에 사용되는 통계 방법은 동물실험의 특성상 충분한 N수 확보의 어려움이 있으므로, 비모수적 검정 방법을 사용하였다.

Kruskal-Wallis test



사후검정

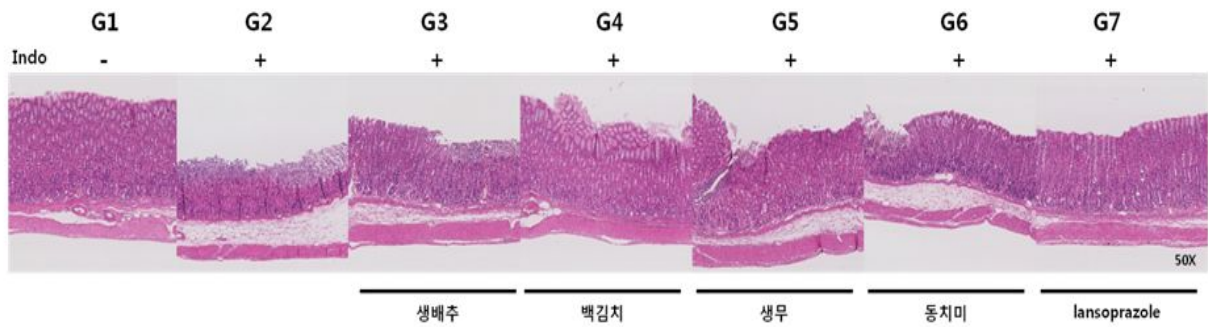
다중 비교
Rank of SCORE
TukeyHSD

(I) GROUP	(J) GROUP	평균차(I-J)	표준오차	유의확률	95% 신뢰구간	
					하한값	상한값
1	2	-48.70000 [†]	4.730499	.000	-63.10723	-34.29277
	3	-39.90000 [†]	4.730499	.000	-54.30723	-25.49277
	4	-30.65000 [†]	4.730499	.000	-45.05723	-16.24277
	5	-26.60000 [†]	4.730499	.000	-41.00723	-12.19277
	6	-29.15000 [†]	4.730499	.000	-43.55723	-14.74277
	7	.000000	4.730499	1.000	-14.40723	14.40723
	2	1	48.700000	4.730499	.000	34.29277
3		8.800000	4.730499	.514	-5.60723	23.20723
4		18.050000	4.730499	.006	3.64277	32.45723
5		22.100000	4.730499	.000	7.69277	36.50723
6		19.550000	4.730499	.002	5.14277	33.95723
7		48.700000	4.730499	.000	34.29277	63.10723
3		1	39.900000	4.730499	.000	25.49277
	2	-8.800000	4.730499	.514	-23.20723	5.60723
	4	9.250000	4.730499	.453	-5.15723	23.65723
	5	13.300000	4.730499	.089	-1.10723	27.70723
	6	10.750000	4.730499	.274	-3.65723	25.15723
	7	39.90000 [†]	4.730499	.000	25.49277	54.30723
	4	1	30.65000 [†]	4.730499	.000	16.24277
2		-18.05000 [†]	4.730499	.006	-32.45723	-3.64277
3		-9.250000	4.730499	.453	-23.65723	5.15723
5		4.050000	4.730499	.978	-10.35723	18.45723
6		1.500000	4.730499	1.000	-12.90723	15.90723
7		30.65000 [†]	4.730499	.000	16.24277	45.05723
5		1	26.60000 [†]	4.730499	.000	12.19277
	2	-22.10000 [†]	4.730499	.000	-36.50723	-7.69277
	3	-13.300000	4.730499	.089	-27.70723	1.10723
	4	-4.050000	4.730499	.978	-18.45723	10.35723
	6	-2.550000	4.730499	.998	-16.95723	11.85723
	7	26.60000 [†]	4.730499	.000	12.19277	41.00723
	6	1	29.15000 [†]	4.730499	.000	14.74277
2		-19.55000 [†]	4.730499	.002	-33.95723	-5.14277
3		-10.750000	4.730499	.274	-25.15723	3.65723
4		-1.500000	4.730499	1.000	-15.90723	12.90723
5		2.550000	4.730499	.998	-11.85723	16.95723
7		29.15000 [†]	4.730499	.000	14.74277	43.55723
7		1	.000000	4.730499	1.000	-14.40723
	2	-48.70000 [†]	4.730499	.000	-63.10723	-34.29277
	3	-39.90000 [†]	4.730499	.000	-54.30723	-25.49277
	4	-30.65000 [†]	4.730499	.000	-45.05723	-16.24277
	5	-26.60000 [†]	4.730499	.000	-41.00723	-12.19277
	6	-29.15000 [†]	4.730499	.000	-43.55723	-14.74277

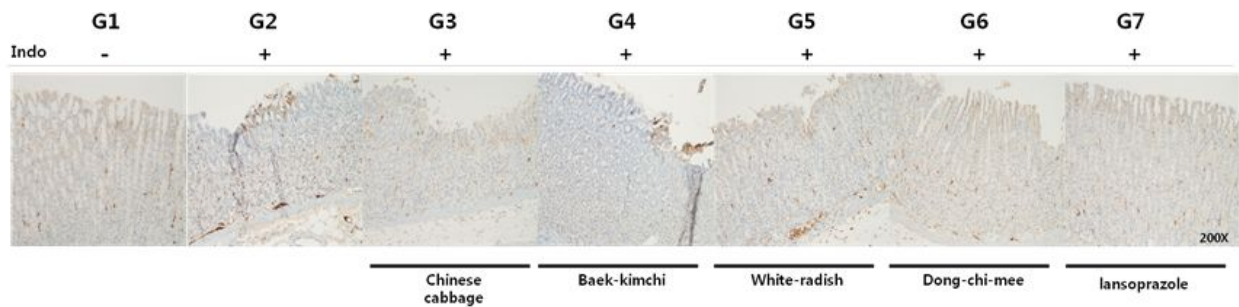
*. 평균차는 0.05 수준에서 유의합니다.

사후 검정 결과
Group 2와 Group 1, Group 4, Group 5, Group 6, Group 7 간의 score에서 유의성 있는 차이를 보였다.

- H&E staining을 통한 조직학적 분석 : 분석결과 위 손상 유발 그룹 (G2)에서 위 점막조직이 많이 손상된 것을 확인 할 수 있었으며, negative control (G1)그룹과 비교하여 위 손상 유발 군은 국소적으로 허혈성 손상이 많은 것을 확인할 수 있었음. 생배추 투여 (G3)그룹에서는 병변이 약간 호전되는 것을 확인할 수 있었으며, 백김치, 생무, 동치미 투여 (G4, G5, G6)그룹의 증상이 가장 호전되는 것을 확인하였다.



- 대표적인 염증인자인 iNOS를 확인하기 위해 immunohistochemistry를 실시 : 측정결과 위 손상 유발 (G2)그룹에서 negative control (G1) 그룹보다 i-NOS의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 육안염증정도와 유사하게 생배추 투여군에서는 iNOS의 발현이 약간 줄어들었으나 백김치, 생무, 동치미 투여 (G4, G5, G6)그룹에서는 위손상유발그룹과 비교해 iNOS의 발현이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.



- 생배추, 배추김치, 백김치, 무, 깍두기, 동치미의 일일 섭취량은 각각 6.7, 90.3, 0.5, 20.3, 9.2, 2.5 g으로 배추김치, 깍두기를 포함한 기타 김치류의 1일 섭취량이 123.9 g 이라고 할 때(국민건강영양조사 보고서, 2005), 총 1일 섭취량을 체중 200 g의 실험동물에 외삽하면 생배추, 백김치, 생무, 동치미가 각각 18, 25, 16, 24g 이며 이의 6배 되는 양을 CMC에 잘 용해시켜 단일 투여 하였다. 배추 및 무에서 SMM의 생체이용률 약 10%를 고려한다면 10배에 해당하는 양을 실험동물에 투여해야 하는데, 동물에 투여된 양은 성인기준 1인당 1일 배추 및 무와 이의 김치 섭취량의 보다 약 4배정도 양임에도 불구하고 비알콜성 위염모델에서 염증 완화로 위장보호효능을 보임을 확인하였다.

3. Biokinetics model system 적용을 통한 배추 및 무유래 유효성분의 생체이용율 평가

3-1. 생체 모방 시스템을 통한 s-methylmethionine(SMM) standard의 Digestive stability 평가

s-methylmethionine(SMM) standard의 Digestive stability를 알아보기 위해 생체모방 시스템에 적용하여 평가하였다 (Fig. 3-23). Fasted 와 Fed condition에서 실험한 SMM standard의 Digestive stability는 각각 0.68%, 0.65%로 서로 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 이는 에너지를 제공할 때(Fed)와 그렇지 않을 때(Fasted) 서로 차이가 없는 것으로 보인다.

HPLC 크로마토그램에서 SMM digestion 전 과 후 의 peak를 보면 digestion 후에 SMM peak 앞쪽으로 무언가 확인되지 않는 물질이 검출 되었다. 이는 소화과정 중 각종 소화효소, pH 및 그 외 체액 등으로 인해 SMM이 다른 물질로 분해되거나 변형되는 것으로 보인다 (Fig. 3-24).

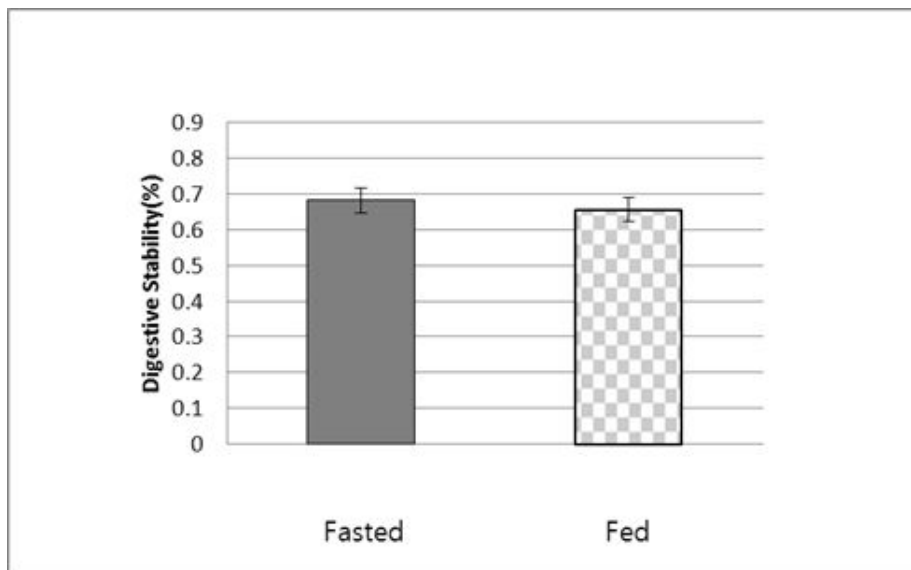


Fig. 3-23. Fasted, Fed 조건에 따른 SMM standard의 digestive stability.

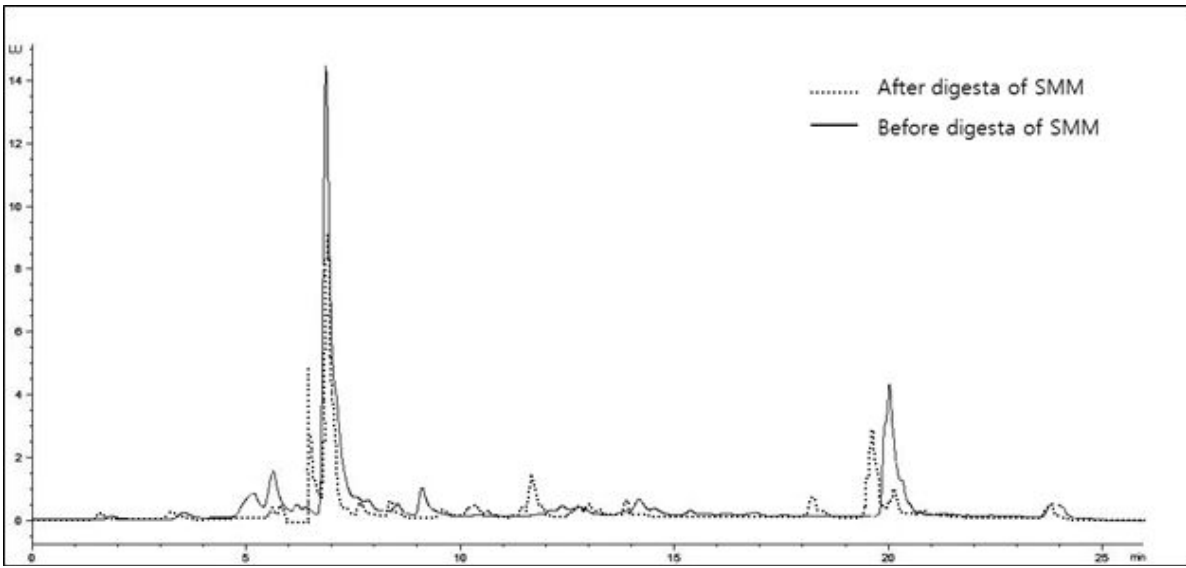


Fig. 3-24. SMM STD의 In vitro digestion 전과 후 HPLC chromatogram.

3-2. 생체 모방 시스템을 통한 동결건조 배추의 s-methylmethionine (SMM)의 recovery 평가

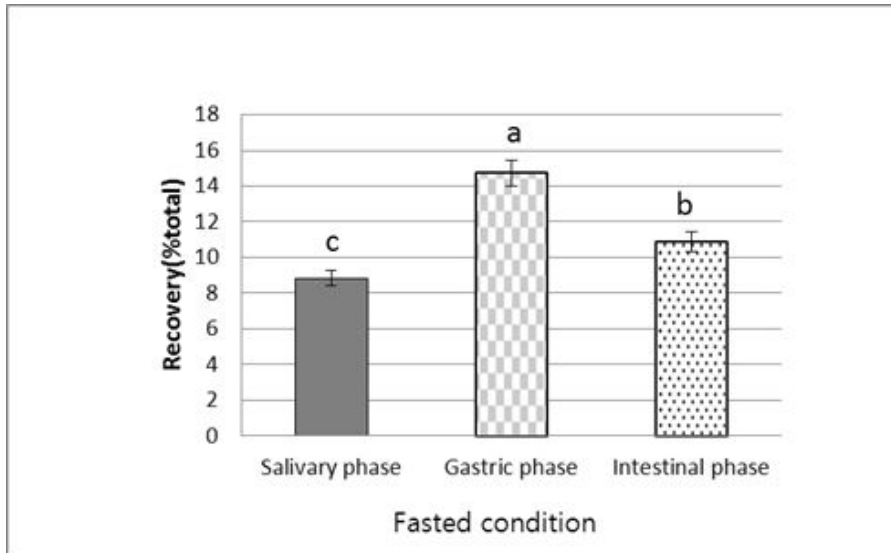


Fig. 3-25. Fasted condition에서 동결건조 배추의 recovery 평가.

동결건조 배추의 연속적인 *in vitro* 생체모방시스템을 적용하여 입, 위, 소장 소화액에서의 SMM의 안정성을 평가하였다. 위 그래프는 SMM의 recovery를 나타낸 것이다.

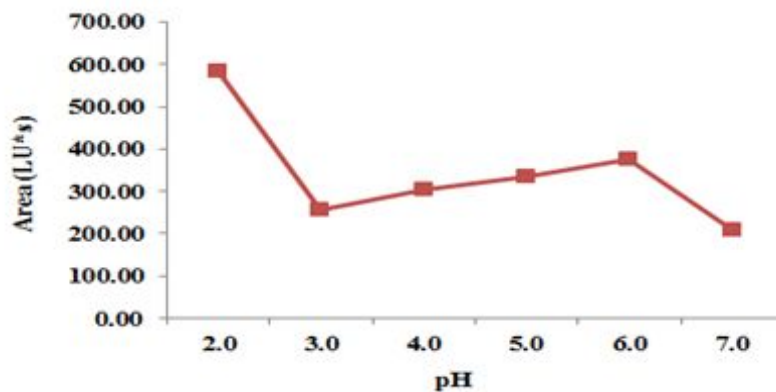


Fig. 3-26. pH 변화에 따른 100 ppm 농도의 SMM 검출 정도.

salivary phase에서 8.83%의 SMM이 용출되었고 Gastric phase에서 14.71%로 증가 되었다. 반면에 intestinal phase에서는 10.88%로 SMM이 다시 줄어들었다. 이는 Salivary phase에서

는 소화 소화의 부족으로 동결건조 배추의 분해가 잘 일어나지 않아 SMM이 적게 용출되고, 아래 그래프를 보면 침샘의 조건인 pH 6.9에서 실험하였으므로 SMM의 함량이 낮게 측정된 것으로 보인다. 반면에 Gastic phase에서는 SMM의 함량이 증가하였는데 이는 위에서 공결건조 배추에 위액 분비로 인해 분해되면서 SMM이 용출되고, pH 2.0의 조건으로 실험 하였기에 높게 검출되었을 것으로 추정한다. intestinal phase에서는 SMM이 줄어들었는데 이는 위장에서 소장으로 넘어가면서 소화효소, 체액 등 여러 생체적인 요인과 산화에 의해 SMM이 변형되고 소장의 pH 6의 조건에서 pH 2일 때보다 SMM이 낮게 검출되는 경향으로 인해 이러한 결과가 나타난 것으로 보인다 (Fig. 3-26).

3-3. Caco-2 cell을 이용한 SMM의 intestinal transport 평가

배양 온도와 시간에 따른 SMM의 세포 축적률을 알아보기 위해 37°C, 4°C와 15, 30, 45, 60분 배양한 시료를 분석 하였다 (Fig. 3-27). 37°C, 4°C조건에서 세포에 축적된 SMM의 함량은 서로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 소장세포에 존재하는 효소 및 수송단백질이 억제되는 4°C 배양 조건에서 차이가 없는 걸로 보아 SMM은 세포 수송단백질의 영향을 받지 않는 것으로 추론 된다. 시간에 따른 SMM의 세포 축적률은 15분 이후로 차이가 보이지 않았는데 이는 SMM 흡수가 15분 이내에 완료되는 것으로 생각된다.

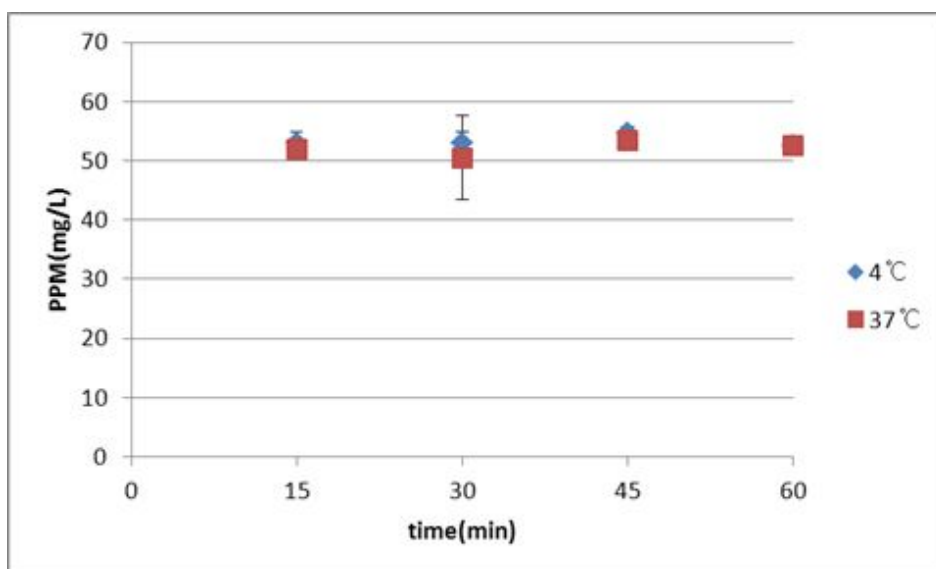


Fig. 3-27. 배양 온도와 시간에 따른 SMM의 세포 축적률.

수송단백질인 당 흡수에 관여하는 SGLT1과 glucose transporter protein를 저해하는 phloridzin, 역수송 기작을 담당하는 p-glycoprotein의 억제제인 verapamil를 각각 처리한 Caco-2 trans-port 실험으로 소장세포에 의한 SMM의 수송방법을 알아본 실험이다 (Fig. 3-28). basal w/o inhibitor(대조군) 과 phloridzin, verapamil 처리군 각각 39.7%, 39.9%, 38.8%로 서로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. SMM의 역수송 기작은 이루어지지 않는 것으로 판단된다.

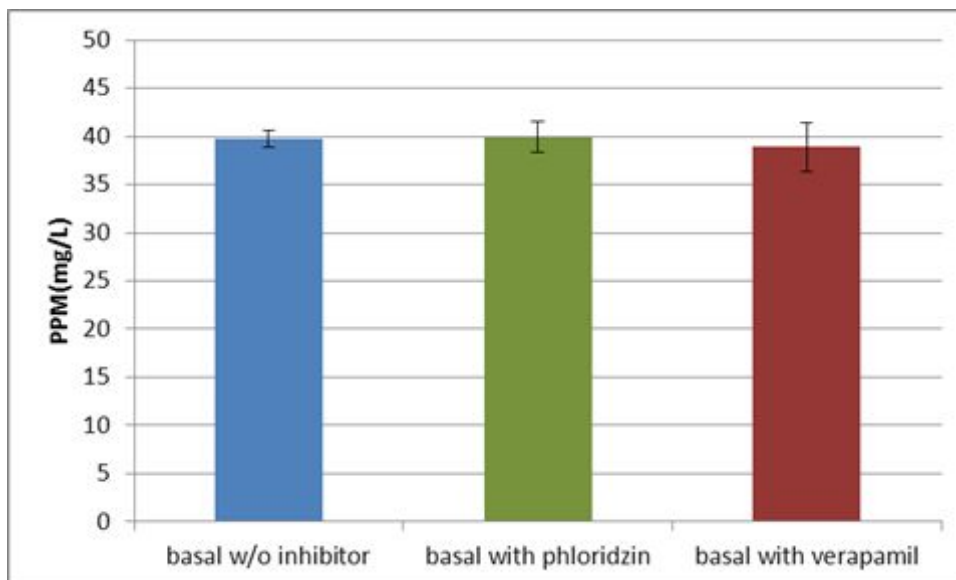


Fig. 3-28. Caco-2 세포내에서 수송단백질 저해제가 SMM 가 SMM의 흡수에 미치는 영향.

제4장 연구목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

세부과제명	연구개발의 내용	연구수행내용 및 기여도
배추김치, 백김치, 동치미 및 깍두기 주재료의 위장보호 효능 성분 규명	배추 및 무의 SMM 최적 분석조건 및 최종 가공조건 확립	- 배추 및 무의 SMM 분석조건 확립 및 가공조건을 확립하였음
	배추의 가공조건별 SMM 성분 규명	- 생배추, 절배추, 배추김치, 백김치 등 배추를 이용한 가공조건별 SMM 성분분석 완료
	무의 가공조건별 SMM 성분 규명	- 생무, 절임무, 깍두기, 동치미 등 무를 이용한 가공조건별 SMM 성분분석 완료
	김치의 발효단계에 따른 SMM 성분 규명	- 김치의 발효단계별 SMM 성분분석 완료
동물모델을 이용한 배추 및 무유래 유효성분의 위장보호 효능평가	배추 및 김치 유래 위장보호 유효성분에 대하여 알코올성 위염동물모델과 비알코올성 위염 동물모델 제작 후 위장보호에 대한 효능평가를 수행 및 작용기작 규명	- 알코올성 및 비알코올성 위염동물모델에 대한 제작 프로토콜을 확립하였음 - 이를 이용한 유효성평가 시스템을 확립하였음 - 향후 진행될 효력시험에 대한 기반을 구축하였음
	알코올성(HCL, ethanol) 위염동물모델과 비알코올성(indomethacin) 위염동물모델의 제작방법과 이를 활용한 유효성평가 시스템 확립	- 배추 및 김치유래 위장보호의 주요성분으로 보고되고 있는 SMM의 위장보호에 대한 효력시험을 수행하였음 - 배추, 김치, 무, 동치미에 대한 위장보호효과에 대한 효력시험을 수행하였음
	작용기작을 규명하기 위해 염증관련 cytokine의 분석 및 immunohistochemistry를 통해 조직에서의 염증인자 확인	- SMM이나 김치 및 동치미 등의 항염증 효과에 대한 분석을 다각도로 진행하였음 - Immunohistochemistry를 통한 iNOS 발현양상과 인간 위점막세포인 AGS세포를 통한 세포성장효과가 가장 유의미한 분석인자임을 확인하였음
Biokinetics model system 적용을 통한 배추 및 무유래 유효성분의 생체이용률 평가	In vitro 생체모방시스템을 이용하여 배추 및 무 유래 s-methylmethionine(SMM)의 생체 이용성(bioavailability) 평가	- 식물소재의 SMM의 생체 이용률을 평가하여 식이이용성을 평가함 - SMM의 소장세포내 흡수기작 규명을 통해 생체이용률을 높일 수 있는 방안을 모색함

제5장 연구개발결과의 활용계획

- 무에 함유된 SMM의 위장건강효과에 대한 과학적인 평가를 통해 동치미와 깍두기에 대한 기능적 우수성과 세계적으로도 사이드 메뉴로서의 유용성을 알릴 수 있을 것으로 사료됨
- 김치류의 기능성을 과학적으로 규명함에 따라 김치의 건강상 가치에 대한 우수성 확인
- 연구결과를 토대로 체계적이고 적극적인 마케팅 및 홍보전략 수립
- 김치류의 기능성을 과학적으로 규명함에 따라 김치의 우수성 홍보 및 소비문화 확산
- 한식 홍보를 위한 기초자료 마련 및 한식에 대한 인지도 제고
- 본 연구결과를 토대로 김치류의 s-methylmethionine(SMM)에 대한 기능성을 과학적으로 규명함에 따라 관련 산업의 홍보효과를 증진시킬 수 있을 것임
- 배추 및 무의 SMM의 소화과정 중 분리성 및 생체 접근성에 대한 과학적 규명을 통해 배추 무의 식이이용률을 확보하였음
- 본 연구를 통해 확립된 유효성평가 시스템과 위염동물모델을 통해 향후 김치 등으로 대별되는 식품에 대해 보다 객관적이며 검증력이 높은 연구가 진행될 수 있을 것으로 사료됨

제6장 참고문헌

- Arechkina, L.Ia., Skorobogatova, E.P. and Bukin, V.N. 1979. The mechanism of action of S-methylmethionine. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 15:12-17.
- Bae, M.S. and Lee, S.C. 2008. Preparation and characteristics of Kimchi with added *styela clava*. *Korean J. Food Cookery Sci.* 24:573-579
- Baum, H.J., J.T. Madison, and J.F. Thompson. 1983. Feedback inhibition of homoserine kinase from radish leaves. *Phytochemistry* 22:2409-2412.
- Beena V. Shetty, Albina Arjuman, Aparna Jorapur et al. Effect of Extract of Benincasa Ispida on Oxidative Stress in Rats with Indomethacin Induced Gastric Ulcers. *India J Physiol Pharmacol* 2008; 52(2) : 178-182
- Bourgis, F., S. Roje, M.N. Nuccio, D.B. Fisher, M.C. Tarczynski, C. Li, C. Herschbach, H. Rennenberg, M.J. Pimenta, T.L. Shen, D.A. Gage, and A.D. Hanson. 1999. S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell* 11:1485-1497.
- Bukin, V.N. and V.E. Anisimov, 1973. Vitamin U: priroda, svoistva, primeneniye (vitamin U: nature, features and application). p. 160.
- Challenger, F. and B. Hayward. 1954. The occurrence of a methylsulphonium derivative of methionine (β -aminodimethyl- γ -butyrosulfonine) in asparagus. *Biochemical. J.* 330th Meeting (4):58.
- Cho, S.Y., Lim, D.Y., Kang, M.H., Yoon, H-R., Kim, G-H., Lee, Y.S. and Jeong, C.S. 2006. Antigastric and antiulcerative activities of water extracts derived from *Scutellaria baicalensis*. *J. Applied Pharmacology* 14:171-177.
- Elbers, A.R., Vos, J.H., Hemke, G. and Hunneman, W.A. 1995. Effect of hammer mill screen size and addition of fibre or S-methylmethionine-sulphonium chloride to the diet on the occurrence of oesophagogastric lesions in fattening pigs. *Vet Rec* 137:290-293.
- Gessler, N.N., A.A. Bezzubov, E.M. Podlepa, and V.Y. Bykhovskii. 1991. S-methylmethionine (vitamin U) metabolism in plants. *Appl. Biochem. Microbiol.* 27:192-199.
- Gessler, N.N., L.I. Kharchenko, T.E. Pavlovskaya, and V.Y. Bykhovskii. 1996. Radioprotective effects of S-methylmethionine (vitamin U). *Appl. Biochem. Microbiol.* 32:599-601.
- Giovanelli, J., S.H. Mudd, and A.H. Datko. 1980. The biochemistry of plants: a comprehensive

treatise 5:453-505.

- Green, R.C. and N.B. Davis. 1960. Biosynthesis of S-methylmethionine in the jack bean. *Biochim. Biophys. Acta.* 43:360-362.
- Hattula, T. and B. Granroth. 1974. Formation of dimethyl sulphide from S-methylmethionine in onion seedlings. *J. Sci. Fd Agric.* 25:1517-1521.
- Hisato Deguchi, Keiji Yasukawa, Toshihide Yamasaki et al. 2011. Nitroxides Prevent Exacerbation of Indomethacin-induced Gastric Damage in Adjuvant Arthritis Rats. *Free Radical Biology & Medicine* 51:1799-1805.
- Hong, EY and Kim, GH. 2006. Changes in Vitamin U, Amino acid and sugar levels in Chinese Cabbages during storage. *Korean J. Food Preservation* 13:1-7.
- Hong, EY. and Kim, GH. 2005. 김치 발효 숙성중의 Vitamin U 및 아미노산 함량의 변화. *한국식품저장유통학회지* 12:411-416.
- Hong, EY. and Kim, GH. 2005. Biofunctionality of isothiocyanates in *Brassica* vegetables. *Annals of Plant Resources Research* 4:193-208.
- Jae Joon Lee, Hyun Suk Choi, Jeong Hwa Lee. 2005. The Effects of Ethylacetate Fraction of *Sanguisorba officinalis* L. on Experimentally-induced Acute Gastritis and Peptic Ulcers in Rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34(10):1545-552.
- James, F., Nolte, K.D. and Hanson, A.D. 1995. Purification and properties of S-adenosyl-L-methionine: L-methionine S-methyltransferase from *Wollastonia biflora* leaves. *J Biol Chem* 270:22344-22350.
- Kim, GH. 2003. Change in levels of vitamin U and amino acids in Korean Chinese Cabbages under various drying methods. *J. Fd Hyg. Safety.* 18: 243-250.
- Kim, GH. 2003. Determination of vitamin U in food plants. *Food Sci. Technol. Res.* 9:316-319.
- Kim, GH. 2009. Changes in Vitamin U Levels of Chinese Cabbages(*Brassica rapa/campestris L.ssp.pekinensis*) at Young Seedlings and Fully Grown Stages. *Hort. Environ. Biotechnol.* 50:427-432.
- Kim, YK., Ishii, G. and Kim, G-H. 2004. Isolation and identification of glucosinolates in edible parts of Chinese cabbages(*Brassica campestris* L. *ssp* *Peckinensis*). *Food Sci. Technol. Res.* 10:469-473.
- Kiribuchi, T. and T. Yamanishi. 1963. Studies on the flavor of green tea: part IV. Dimethyl sulfide

- and its precursor. *Agr. Biol. Chem.* 27:56-59.
- Kontrek, S.J., Borozowsky, T. and Radecki, T. 1983. Protective action of omeprazole, a benzimidazole derivative on gastric mucosal damage by aspirin and ethanol in rats. *Digestion* 27:159-164.
- Kurebatashi, Y., Ikeda, T. and Osada, Y. 1988. Cytoprotective action of cimetidine against HCl-Ethanol-induced gastric lesion in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 46:17-25.
- Larina, T.V., N.N. Gessler, A.A. Bezzubov, and L.G. Elizarova. 1991.
- Leung, C.P. and W.K.H. Leung. 1989. Determination of vitamin U and its degradation products by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 479:361-367.
- Madison, J.T. and J.T. Thompson. 1976. Threonine synthetase from higher plants: stimulation by S-adenosylmethionine and inhibition by cysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:684-691.
- Mark W. Babyatsky, Michelle Debeaumont, Lars Thim and Daniel K. Podolsky. 1996. Oral Trefoil Peptides Protect Against Ethanol- and Indomethacin-Induced Gastric Injury in Rats. *GASTROENTEROLOGY* 110:489-497.
- Maw, G.A. 1981. The chemistry of the sulfonium group. p. 704-770.
- McRorie, R.A., G.L. Sutherland, M.S. Lewis, A.D. Barton, M.R. Glazener, and W. Shive. 1954. Isolation and identification of a naturally occurring analogue of methionine. *J. Am. Chem. Soc.* 76:115-118.
- Mizui, T. and Doteuchi, M. 1983. Effect of polyamines on acidified HCl-ethanol induced gastric lesion in rats. *Jap. J. Pharmacol.* 33:939.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Yagi, N., Arai, M., Nakamura, Y., Kaneko, T., Yoshida, N. and Kondo, M. 1995. Effect of a novel histamine H₂ receptor antagonist, IT-066, on acute gastric injury induced by ischemia-reperfusion in rats, and its antioxidative properties. *Eur. J. Pharmacol.* 294:47-54.
- Paglia, E. D. and Valentine, W. N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70:158-169.
- Robert, A. 1977. Cytoprotection by prostaglandins *Gastroenterology* 77:761-767.
- Roediger, W.E., Babidge, W. and Millard, S. 1996. Methionine derivatives diminish sulphide damage to colonocytes- implications for ulcerative colitis. *Gut* 39:77-81.
- Sakamoto, K., Inoue, A., Nakatani, M., Kozuka, H., Ohta, H. and Osajima, Y. 1996.

- S-methylmethionine sulfonium in fruits of citrus hybrids. *Biosci Biotechnol Biochem* 60:1486-1487.
- Shay H., Komarov S.S., Fels S.S. and Meranze D. 1945. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5:43-61.
- Soll A.H. and Isenberg J.I. 1983. Duodenal ulcer diseases. In: Sleisinger MH, Fordtran FS (eds). *Gastrointestinal Disease*. Philadelphia, WB Saunders, 625-672.
- Tae Young Oh, Gook Jun Ahn, Seul Min Choi, Byoung Ok Ahn, Won Bae Kim et al. 2005. Increased Susceptibility of Ethanol-treated Gastric Mucosa to Naproxen and Its Inhibition by DA-9601, an Artemisia Asiatica Extract. *World J Gastroenterol* 11(47):7450-7456.
- Takigawa, S. and G. Ishii. 1998. Establishment of vitamin U determination and its application. Annual Research Report. National Agricultural Research Center for Hokkaido Region. p. 66-67.
- Tamotsu Matsushashi, Michiro Otaka, Masaru Odashima et al. 2007. Protective Effect of a Novel Rice Extract Against Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rat, *Dig. Dis. Sci.* 52:434-441.
- Trossat, C., Rathinasabapathi, B., Weretilnyk, E.A., Shen, T.L. Huang, Z.H., Gage, D.A. and Hanson, A.D. 1998. Salinity promotes accumulation of 3-dimethylsulfoniopropionate and its precursor S-methylmethionine in chloroplasts. *Plant Physiology* 116:165-171.
- Uchida, M., Kawano, O., Misaki, N. and Irino, O. 1989. Healing process of acetic acid-induced gastric ulcer and gastric mucosal prostaglandin E generation level in rats. *J. Pharmacol.* 50:366.
- Uehara, S., Sojiri, S., Takahashi, M. and Watanabe, Y. 1994. Determination of taurine, L-glutamine, vitamin U and L-aspartic acid in pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Yakugaku Zasshi* 114:697-703.
- Watanabe, T., Ohara, S., Ichikawa, T., Saigenji, K. and Hotta, K. 1996. Mechanisms for cytoprotection by vitamin U from ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 41:49-54.
- Yoshida, N., Yoshikawa, T., Iinuma, S., Arai, M., Takenaka, S., Sakamoto, K., Miyajima, T., Nakamura, Y., Yagi, N., Naito, Y., Mukai, F. and Kondo, M. 1996. Rebamipide protects against activation of neutrophils by Helicobacter pylori. *Dig. Dis. Sci.* 41:1139-1144.

부록

Indomethacin 유도 위 손상 동물모델에서 Methyl
Methionine Sulphonium Chloride의 위장보호 효과 규명



시험책임자 진술서

시험제목: Indomethacin 유도 위 손상 모델에서 MMSC의 위장보호 효과규명

최종보고서에 기술된 시험의 절차와 결과는 시험계획서에 규정된 내용과 시험기관의 표준작업수순서를 준수하여 시험책임자의 책임 하에 수행되었다.

시험기관 기관명 : 인하대학교 의학전문대학원 특성화교실 발생유전체학실
연락처 : 032-890-1182
주소 : 인하대병원 인천시 중구 신흥동 3가 정석빌딩 구관 A동 8층

시험책임자 성명 이 운 규 (서명) 2012년 12월 일

목 차

시험책임자 진술서-----	2
목차-----	3
1. 요약-----	5
2. 시험개요-----	6
2.1 시험제목-----	6
2.2 시험목적-----	6
2.3 시험기준-----	6
2.4 시험의뢰자-----	6
2.5 시험일정-----	6
2.6 시험동물-----	6
2.7 사육조건-----	7
3. 시험재료 및 방법-----	8
3.1 시험물질 1-----	8
3.2 시험물질 2-----	8
3.3 첨부용제-----	8
3.4 조제-----	8
3.5 시험방법-----	8
4. 관찰항목-----	9
4.1 사망 및 임상증상 관찰-----	9
4.2 위염소견(육안)-----	9
4.3 H&E staining을 통한 병리학적 소견-----	9
4.4 위 조직에서의 i-NOS 측정-----	9
4.5 Cell viability 측정-----	9
4.6 TUNEL staining을 통한 apoptosis 확인-----	9
5. 시험결과-----	10
5.1 사망 및 임상증상 관찰 (Table1, Appendix2)-----	10
5.2 위염소견(육안) (Figure1, Table2, Appendix4-5)-----	10
5.3 H&E staining을 통한 병리학적 소견 (Figure2. A)-----	11

5.4 위 조직에서의 i-NOS 측정 (Figure2. B)-----	11
5.5 Cell viability 측정 (Figure3. A-B)-----	11
5.6 TUNEL staining을 통한 apoptosis 확인 (Figure3. C)-----	11
6. 고찰 및 결론-----	12
7. 참고문헌-----	13
8. FIGURES-----	15
FIGURE 1. EFFECT OF MMSC ON INDOMETHACIN-INDUCED GASTRIC MUCOSAL DAMAGE-----	15
FIGURE 2. EFFECT OF MMSC ON HISTOLOGICAL EVALUATION AND EXPRESSION OF INOS IN INDOMETHACIN-INDUCED GASTRIC MUCOSAL DAMAGE-----	16
FIGURE 3. EFFECT OF MMSC ON THE CELL VIABILITY AND TUNEL STAINING OF INDOMETHACIN-INDUCED AGS CELLS-----	17
9. TABLES-----	18
TABLE 1. EXPERIMENT SUMMARY OF ANIMAL MORTALITY AND CLINICAL OBSERVATIONS-----	18
TABLE 2. CHANGES IN GROSS APPEARANCE OF THE GASTRIC DAMAGE AREA-----	18
10. APPENDICES-----	19
APPENDIX 1. INDIVIDUAL ANIMAL LIST-----	19
APPENDIX 2. INDIVIDUAL ANIMAL CLINICAL OBSERVATIONS-----	20
APPENDIX 3. INDIVIDUAL ANIMAL AUTOPSY SCHEDULE-----	21
APPENDIX 4. INDIVIDUAL ANIMAL GASTRIC DAMAGE AREA-----	22
APPENDIX 5. INDIVIDUAL GASTRIC MUCOSA DAMAGE AREA (%)-----	25

1. 요약

Methyl Methionine Sulphonium Chloride (MMSC) 는 채소류, 특히 양배추, 에 풍부하게 함유된 성분으로서 예로부터 위장관과 같은 소화기계통의 기관에 그 효능이 있다고 알려져 왔다. 이는 건강식품으로 세계적으로 주목 받고 있는 김치류에도 함유된 성분으로서 김치가 소화력에 도움을 준다는 학설에 기반하였을 때 매우 중요한 내용이라 할 것이다. 현재까지 동물모델을 통한 MMSC의 생물학적 효능평가에 대한 기초정보는 아직까지 부족한 면이 많다. 특히, MMSC의 위장보호 효과에 대한 과학적 규명이 더 필요한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 indomethacin 으로 유도된 위점막손상 동물모델을 이용하여 MMSC의 위장보호의 효과를 규명하고자 하였다.

위점막손상 동물모델을 통한 MMSC의 효능을 규명하기 위하여 다음과 같이 총 6개의 그룹을 구성하여 효능평가를 수행하였다. (1) 정상 대조군, (2) 위점막손상 유도군 (3) MMSC 투여군 (저용량 단일 투여군: 0.25 mg/kg), (4) MMSC 투여군 (중간용량 단일 투여군: 1 mg/kg), (5) MMSC투여군 (고용량 단일 투여군: 4 mg/kg MMSC:), (6) 양성대조군(100 mg/kg Lansoprazole). 이 중 정상 대조군을 제외한 나머지 군은 25mg/kg 용량의 indomethacin을 투여하여 위점막손상을 유도하였으며, MMSC 투여 그룹과 양성대조군의 위점막손상 유도는 MMSC와 양성대조군 투여 후 30분 이후에 이루어졌다. Indomethacin 투여 후 6시간이 지난 후 동물을 사해하여 위점막손상의 유도 및 각 그룹에서의 MMSC의 효과를 확인하였다.

육안적 검사를 통한 소견으로는 MMSC를 저용량, 중간용량, 고용량으로 단일 투여한 그룹이 indomethacin만 투여한 위점막손상 그룹에 비해 위 손상 부위가 감소하였음을 확인하였다. 또한, 이미징 장비를 통해 더 세밀하게 위손상면적, 손상된 정도를 나타낸 스코어를 계산하여 분석한 결과 MMSC 농도 의존적으로 위손상면적이 감소함을 확인할 수 있었다. 위산분비량 역시 MMSC농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 위조직 절편의 H&E 염색을 이용해 조직학적인 위 손상 scoring을 체크해 본 결과 MMSC를 고용량으로 투여한 그룹이 중간용량, 저용량으로 투여한 그룹보다 더 효과적으로 위점막 손상을 감소시켰음을 확인하였다. 대표적인염증인자인 iNOS의 면역염색을 통하여 MMSC의 효과를 확인한 결과 MMSC를 투여한 그룹이 indomethacin만 투여한 위점막손상 그룹에 비해 뚜렷하게 iNOS 발현을 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다. 인체 위 점막 세포인 AGS 세포에서 indomethacin 투여에 따른 세포성장 억제효과를 확인하였으며, MMSC가 이러한 세포성장 억제효과를 감소시키는 것을 또한 확인하였다. 그리고 TUNEL 분석을 통해 이러한 억제효과가 세포자멸의 억제에 의한 것임을 확인하였다.

결론적으로 본 효능평가를 통해 indomethacin으로 유도된 위 점막손상이 MMSC에 의해 효과적으로 손상이 억제됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 indomethacin으로 유도한 위 점막손상 동물모델을 이용하여 향후 배추 및 무 유래 김치의 위장보호 효과에 대한 과학적 규명의 필요성 및 시급성을 확인시켜 주었다.

측정항목

- 위염소견 (육안)
- 조직 병리 (H&E)
- 위 조직의 i-NOS 발현양 측정 (immunohistochemistry)
- Cell viability
- TUNEL assay

2. 시험개요

2.1 시험제목

Indomethacin 유도 위 손상 모델에서 MMSC의 위장보호 효과규명

2.2 시험목적

본 시험은 배추 및 무에 함유된 유효 성분인 MMSC에 대한 위 손상 모델에서의 유효성을 평가하여 소화기질환에 '근거 중심'의 유효성 평가를 시행하는 것으로 SD rat에 Indomethacin을 단기간 처리하여 염증을 유발시킨 위 손상 모델에서 손상 억제 효과를 평가하기 위하여 실시하였다.

2.3 시험기준

본 시험은 위 손상 보호 효과와 관련된 논문을 토대로 작성한 시험계획서에 따라 실시하였다.

2.4 시험의뢰자

-

2.5 시험일정

시험 개시일:	2012년 08월 19일
동물 입수일:	2012년 08월 29일
군분리:	2012년 08월 30일
투여 및 측정일:	2012년 09월 03일 ~ 2012년 09월 04일
실험종료일:	2012년 09월 05일
최 종 보 고 서:	2012년 11월 30일

2.6 시험동물

2.6.1	종 및 계통:	SD rat (Male)
2.6.2	시험계 선정사유:	본 시험에 사용하는 SD rat은 전세계적으로 자주 사용되는 모델로 유효성평가 시험에 적당한 실험동물로서 Indomethacin 유도 위 손상 모델에 대한 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있기에 선정하였다.
2.6.3	공급원 및 생산자:	(주)오리엔트바이오 가평센터 (경기도 가평군 북면 목동리 699-13)
2.6.4	입수 시 주령 및 체중범위:	약 6주령, 평균체중 200 (g) ± 20%
2.6.5	검역 및 순화:	입수 후 약 7일간 (건강한 동물만 시험에 제공)

2.6.6	개체식별	그룹별로 각 사육상자에 시험번호, 시험군 및 성별을 기록한 개체식별카드를 부착하였다.
2.6.7	시험물질 투여 시 주령 및 체중범위:	약 7주령 평균체중 220 (g) ± 20%
2.6.8	주문 동물 수:	70마리
2.6.9	사용 동물 수:	60마리

2.7 사육조건

2.7.1	사육실	인하대학교 의과학연구소 생명과학연구실 2층 청정동물실 (Specific Pathogen Free)
2.7.2	환기횟수	최소 10회/시간
2.7.3	온도 및 습도 범위	22±4°C, 50±20% (RH)
2.7.4	조명시간 및 조도	12시간 점등 (조명: 08:00~20:00), 조도: 150~300 Lux
2.7.5	사육상자	폴리설포네이트재질 사육상자 [160Wx363Dx143H(mm)]: 순화기간 [160Wx363Dx143H(mm)]: 본 시험기간
2.7.6	사육상자 당 동물 수	3마리 이하 사육상자 바닥에 고압증기멸균(121 °C, 20분)된 깔짚 (BETA CHIP®, Northeastern products Co., USA)을 깔아
2.7.7	사육관리	분, 뇨를 처리하였으며 주 2회 교환하고 물병은 매일 교환하여 주었다.
2.7.8	사료의 종류 및 명칭	설치류용 방사선 조사 고형사료(PMI LabDiet®5053, USA)
2.7.9	사료의 공급	급이기를 이용한 자유섭취
2.7.10	사료의 분석	사료구입 시 첨부된 분석 성적서를 통하여 일반 성분의 조성과 오염물질 유무를 확인한 후 사용하였다.
2.7.11	음수의 종류	역삼투압 처리 후 자외선 유수살균기 및 고압증기로 멸균한 상수도수
2.7.12	음수의 공급	폴리설포네이트 재질 음수병(250 mL)을 이용한 자유섭취 음수 중 오염물질의 분석은 6개월마다 정기적으로 “먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙(환경부령 제276호, 2008.)”에 정한 바에 따라 공
2.7.13	음수의 분석	인시험기관(시험기관 명)에 분석을 의뢰하여 시험의 결과에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

3. 시험재료 및 방법

3.1 시험물질 1

3.1.1	명칭:	MMSC (DL-Methionine methylsulfonium chloride)
3.1.2	공급원:	SIGMA
3.1.3	Lot No.:	BCBD9147V
3.1.4	외관 및 성상:	백색 분말
3.1.5	성분(함량):	(3-Amino-3-carboxypropyl) dimethyl sulfonium chloride
3.1.6	순도:	99.0%
3.1.7	입수일:	2012-08-20
3.1.8	입수량:	50g
3.1.9	안정성:	권장하는 보관 상태에서는 안정함
3.1.10	유효기간:	-
3.1.11	보관조건:	밀폐하여 상온보관
3.1.12	취급 시 주의사항:	특이사항 없음

3.2 시험물질 2

3.2.1	명칭:	Lansoprazole(시판 대조물질)
3.2.2	공급원:	SIGMA-ALDRICH
3.2.3	Lot No.:	BCBC8368V
3.2.4	외관 및 성상:	백색 분말
3.2.5	성분(함량):	Lansoprazole
3.2.6	순도:	100%
3.2.7	입수일:	2012-02-01
3.2.8	입수량:	1g
3.2.9	보관조건:	개봉 후 밀봉하여 냉장보관
3.2.10	취급 시 주의사항:	특이사항 없음

3.3 첨부용제

3.3.1	명칭:	D.W
3.3.2	공급원:	-
3.3.3	Lot No.:	-
3.3.4	외관 및 성상:	무색 투명한 액체
3.3.5	보관조건:	실온보관

3.4 조제

시험물질을 D.W에 적정농도로 용해 시킨 후 투여하였다. 조제한 시험물질의 분석은 실시하지 않았다.

3.5 시험방법

Indomethacin에 의한 위 손상 모델		
3.5.1	하루 절식 후, 25mg/kg의 Indomethacin을 bicarbonate)에 현탁 시켜 gavage로 intragastric	0.5% CMC(3% sodium administration)하고 6시간

후에 부검하였다.

군구성 및 투여용량

시험군	시험동물	질환 유발 물질	시험물질	투여용량 (mg/kg)
G1	SD rat	-	-	-
G2		Indomethacin 25mg/kg	-	-
G3			MMSC 저용량	0.25
G4			MMSC 중간용량	1
G5			MMSC 고용량	4
G6			Lansoprazole	100

*G1 : D.W

*투여액량(volume) : 10ml/kg

*G2 : Indomethacin 25mg/kg + D.W

*G3-G5 : Indomethacin 25mg/kg + 시험물질

*G6 : Indomethacin 25mg/kg + lansoprazole

- 3.5.3 투여부위 및 투여방법
시험 물질인 MMSC는 Indomethacin 투여 30분 전에 gavage로 투여하고, Indomethacin을 gavage로 투여하였다. 개체별로 체중을 측정하여 체중에 비례한 투여량을 결정하였다.
- 3.5.4 투여방법 선택이유
6시간이라는 짧은 시간 동안 위에 직접적인 손상을 주기 위하여 직접 위에 gavage를 이용하여 투여하였다.
- 3.5.5 투여횟수 및 투여기간
시험 물질들은 1회 경구 투여하였다.

4. 관찰항목

4.1 사망 및 임상증상 관찰

모든 동물에 대하여 투여 및 시험 종료시간까지 사망 또는 빈사발생여부 및 임상증상을 관찰하였다.

4.2 위염소견(육안)

이소플루란을 통한 호흡마취를 실시한 후 복부를 절개하여 복대정맥에서 채혈을 실시하였다. 채혈 후 위를 적출하여 1/2를 절개한 후 멸균생리식염수로 세척하고 넓게 펼쳤다. 육안 관찰을 위해 사진촬영을 실시하고, 조직병리를 위해 10% NBF에 고정하였다. 고정시킨 조직은 다음날 trimming을 실시하고 paraffin block 제작 및 H&E staining을 실시하였다.

4.3 H&E staining을 통한 병리학적 소견

시험물질 투여, 6시간이 경과 후 이소플루란을 통한 호흡마취를 실시하고 채혈한 후 위 조직을 10 % 중성완충포르말린용액 (10% neutral buffered formalin)에 고정하였다. 고정된 조

직을 일정한 두께로 측정된 다음, 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4~5 μ m의 조직절편을 제작한 후 일반적인 염색방법인 Hematoxylin & Eosin 염색(H&E stain)을 실시하여 염증의 조직병리학적 소견(염증세포의 침윤, 상피세포의 구조파괴 등의 조직병리학적 인 변화)을 관찰하였다.

4.4 위 조직에서의 i-NOS 측정

H&E staining을 실시하여 염증의 조직병리학적 소견(염증세포의 침윤, 상피세포의 구조파괴 등의 조직병리학적인 변화)을 관찰한 후 각 그룹별로 slide를 선별하여 Immunohistochemistry (IHC)를 실시하였다. IHC는 Deparaffin, Target retrieval, Staining, Dehydration, Slide mounting 순으로 진행하였으며, 갈색으로 Staining된 부분을 확인하여 염증발현인자인 i-NOS를 측정하였다.

4.5 Cell viability 측정

인체 유래 위점막 세포인 AGS cell을 이용하여 cell viability를 측정하였다. Indomethacin 1mM을 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 시간 동안 treat하여 cell이 입는 damage를 시간대별로 측정하였으며, indomethacin 1Mm을 treat하기 30분 전에 MMSC 3uM을 treat한 후 2시간 후의 cell의 viability를 측정하였다.

4.6 TUNEL staining을 통한 apoptosis 확인

AGS cell을 이용하여 TUNEL staining을 실시하였다. Chamber slide에 cell을 배양한 후 normal, indomethacin 1mM, indomethacin 1mM + MMSC 3uM로 그룹을 나눈 후 treat 2 시간 후에 염색을 실시하였다. TUNEL staining은 ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (MILLIPORE)을 사용하였으며, 갈색으로 Staining된 부분을 확인하여 apoptosis를 확인하였다.

5. 시험결과

5.1 사망 및 임상증상 관찰 (Table1, Appendix2)

모든 동물에 대하여 투여 및 시험 종료시간까지 사망 또는 빈사발생여부 및 임상증상을 관찰한 결과 특별한 임상증상이 관찰되지 않았다.

5.2 위염소견(육안) (Figure1, Table2, Appendix4-5)

실험 종료 후 부검 시, 위를 적출하여 위벽 단면을 촬영하여 indomethacin에 의한 위 손상 및 시험물질의 위 손상 보호 효과를 육안으로 확인하였다. 대부분의 위 손상 유발그룹 (G2)에서는 위에 선명한 점막손상과 띠 모양의 출혈뿐 아니라, 위 전체에 출혈성 점막손상도 관찰되었다. 육안적 소견으로 볼 때, MMSC low, middle dose 투여 (G3, G4)그룹은 위 손상 유발 군 (G2)에 비해 병변 부위가 소량 감소하는 것을 확인하였으며, high dose 투여 (G5) 그룹에서는 검붉은 선의 병변 부위가 다량 감소함을 확인 할 수 있었다. 검붉은 선의 위 점막 손상 부위를 Microscope Software AxioVision LE 를 사용하여 %로 나타낸 후 비교하여 본 결과, MMSC low, middle dose 투여 (G3, G4)그룹은 G2에 비해 유의적인 감소효과가 있

었으나 (*P<0.05 VS G2), high dose 투여 (G5)그룹에 비해 유의적인 감소효과가 적은 것을 (**P<0.01 VS G2)를 확인할 수 있었다.

5.3 H&E staining 을 통한 병리학적 소견 (Figure2. A)

실험 종료 후 위 조직을 일반적 조직 처리 과정을 거쳐 고정하고 파라핀 포매하여 조직 절편을 제작한 후 H&E 염색을 실시하였다. 조직병리학적 결과로 볼 때, 위 손상 유발 그룹 (G2)에서 위 점막조직이 많이 손상된 것을 확인 할 수 있었으며, Negative control (G1)그룹과 비교하여 위 손상 유발 군은 국소적으로 허혈성 손상이 많은 것을 확인할 수 있었다. MMSC 투여 (G3, G4, G5)그룹에서는 증상이 호전되는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중 high dose 투여 (G5)그룹의 증상이 가장 호전되는 것을 확인하였다.

5.4 위 조직에서의 i-NOS 측정 (Figure2. B)

실험 종료 후 위 점막 조직에서 염증과 관련된 중요한 marker인 TNF-a, i-NOS의 발현 양을 immunohistochemistry 방법으로 측정하였다. 대체적으로 위 손상 유발 (G2)그룹에서 negative control (G1) 그룹보다 TNF-a, i-NOS의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. MMSC low, middle dose 투여 (G3, G4)그룹은 위 손상 유발 (G2)그룹보다 발현이 다소 감소하는 양상을 보였지만, high dose 투여 (G5)그룹에서는 TNF-a, i-NOS의 발현 양이 다량 감소하는 것을 확인하였다. 피실험자에게 임의로 갈색으로 staining된 TNF-a, i-NOS의 발현부위를 비교하여 본 결과 MMSC 투여 그룹 중 G5, G4, G3의 순으로 TNF-a, i-NOS의 발현이 줄어드는 것을 확인하였다.

5.5 Cell viability 측정 (Figure3. A-B)

AGS cell에 MMSC 3uM을 treat한 후 30분 뒤에 indomethacin 1mM 을 treat하여 cell viability를 측정하였다. 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 시간의 간격을 두고 관찰한 결과 2시간이 경과한 후의 cell viability가 가장 좋은 것을 확인하였다.

5.6 TUNEL staining을 통한 apoptosis 확인 (Figure3. C)

AGS cell에서 viability를 측정한 결과를 토대로 AGS cell에서 TUNEL staining을 진행하였다. Normal, indomethacin 1mM, indomethacin 1mM + MMSC 3uM, 3개 그룹으로 나누어 실험한 결과 normal 에서는 apoptosis가 확인되지 않았으며, indomethacin 1mM 그룹에서는 갈색으로 staining된 apoptosis 양이 많은 것을 확인하였다. Indomethacin 1mM + MMSC 3uM 그룹은 indomethacin 1mM 와 비교한 결과 갈색으로 staining된 부분이 상대적으로 줄어든 것을 확인하였다.

6. 고찰 및 결론

본 실험은 위 손상 유도 모델에서 MMSC의 위 손상 예방 효과를 보고자 실시하였다. 시험군은 negative control (G1), vehicle control (G2), MMSC low dose 투여 군 (G3), MMSC middle dose 투여 군 (G4), MMSC high dose 투여 군 (G5), positive control (G6) 총 6군으로, 군 당 SD rat 10 마리씩 구성하여 실험을 진행하였다. 위 손상은 indomethacin 25mg/kg를 단회 경구 투여함으로써 유발하였다.

육안적인 소견 결과, 대부분의 위 손상 유발그룹 (G2) 에서는 위에 선명한 점막손상, 띠 모양의 출혈과 위 전체에 허혈성 점막손상이 관찰되었다. 이 결과는 다른 논문에서 indomethacin에 의한 위 손상의 육안 소견과 일치한다. Indomethacin으로 유도한 급성 위 손상은 위 운동의 항진, 위액분비의 항진, 위혈류의 저하 등으로 인해 위 손상이 일어나게 된다.

본 실험 결과, 육안 소견에서는 MMSC 투여 (G3, G4, G5) 그룹의 위 점막 손상이 위 손상 유발 (G2) 그룹과 비교하였을 때 감소하는 것을 확인하였으며, 그 중 MMSC high dose 투여 (G5) 그룹의 점막 손상이 가장 많이 완화되는 것을 확인하였다.

대표적인 염증관련 마커인 TNF- α , i-NOS의 발현양을 immunohistochemistry로 측정된 결과, MMSC high dose 투여 (G5) 그룹에서 위 손상 유발 그룹 (G2) 보다 TNF- α 와 i-NOS의 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

Cell viability의 경우 2시간이 경과한 후 MMSC를 투여한 AGS cell의 viability가 가장 높은 것을 확인하였다. 2시간 이후에는 indomethacin의 영향으로 cell viability가 감소하는 경향을 보였으며 8시간이 경과한 후에는 cell viability가 indomethacin만 treat한 그룹의 viability와 비슷하게 떨어지는 것을 확인하였으며, TUNEL staining에서는 indomethacin 1mM + MMSC 3 μ M 그룹이 indomethacin 1mM 보다 갈색으로 staining된 부분이 상대적으로 줄어든 것을 확인하였다.

본 시험 결과, indomethacin으로 유도된 위 점막손상이 MMSC의 위점막세포손상 및 염증인자생성등의 억제효과로 위장보호효과에 직접적인 영향을 미치는 것을 확인하였다.

결과적으로, MMSC는 indomethacin으로 유도한 위 점막손상 동물모델에서의 위 점막손상을 보호함으로써 향후 배추 및 무 유래 김치의 또 다른 기능성 성분에 대한 과학적 규명의 길을 열어주었고, 위장보호에 좋은 예방성분으로서의 사용 가능성을 보여주었다

7. 참고문헌

Beck*, t., P.L., Xavier*,†, §, R., Lu §, N., Nanda*, t., N.N., Dinauer¶, M., Podolsky*, t., D.K., & Seed § , t., B. (2000). Mechanisms of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. *Gastroenterology*, 119(3), 699-705.

Hippisley-Cox, J., Coupland, C., & Logan, R. (2005). Risk of adverse gastrointestinal outcomes in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: Population based nested case-control analysis. *Bmj*, 331(7528), 1310-1316.

KIM, G. H. (2003). Determination of vitamin U in food plants. *Food Science and Technology Research*, 9(4), 316-319.

Kim, J. J., Kim, N., Lee, B. H., Kang, J. M., Seo, P., Lim, M. K., . . . Lee, S. H. (2010). Risk factors for development and recurrence of peptic ulcer disease. *The Korean Journal of Gastroenterology*, 56(4), 220-228.

Lanas, A. (2008). Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Research and Therapy*, 10(2), 4.

Motawi, T. K., Abd Elgawad, H. M., & Shahin, N. N. (2008). Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. *Journal of Biomedical Science*, 15(3), 405-412.

Radhakrishna, P. N., Suganthan, D., Seshadri, C., & Santhakumari, G. (1978). Anti-gastric ulcer activity of nimbidin. *The Indian Journal of Medical Research*, 68, 169.

Sandhya, P., & Varalakshmi, P. (1998). Effect of lipoic acid administration on gentamicin-induced lipid peroxidation in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 17(6), 405-408.

Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 387-437.

Somasundaram, S., Hayllar, H., Rafi, S., Wrigglesworth, J., Macpherson, A., & Bjarnason, I. (1995). Review: The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: A review and a hypothesis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 30(4), 289-299.

Souza, M. H. L. P., Mota, J. M. S. C., Oliveira, R., & Cunha, F. (2008). Gastric damage induced by different doses of indomethacin in rats is variably affected by inhibiting

iNOS or leukocyte infiltration. *Inflammation Research*, 57(1), 28-33.

Syam, A. F., Sadikin, M., Wanandi, S. I., & Rani, A. A. (2009). Molecular mechanism on healing process of peptic ulcer. *Acta Med Indones*, 41(2), 95-98.

Tamura, T., Yokoyama, T., & Ohmori, K. (2001). Effects of diacerein on indomethacin-induced gastric ulceration. *Pharmacology*, 63(4), 228-233.

Wallace, J. L., & Miller, M. J. S. (2000). Nitric oxide in mucosal defense: A little goes a long way. *Gastroenterology*, 119(2), 512-520.

Watanabe, T., Ohara, S., Ichikawa, T., Saigenji, K., & Hotta, K. (1996). Mechanisms for cytoprotection by vitamin U from ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 41(1), 49-54.

Wolfe, M. M., Lichtenstein, D. R., & Singh, G. (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *New England Journal of Medicine*, 340(24), 1888-1899.

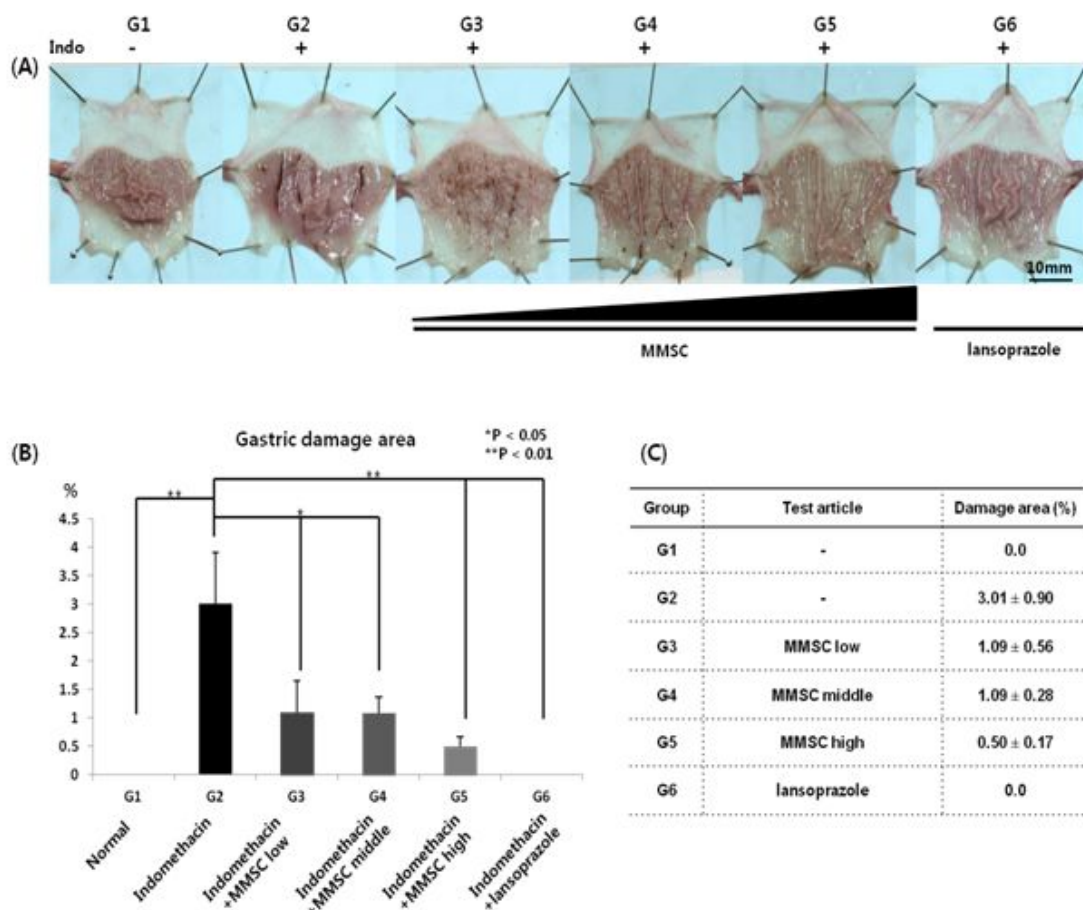
Yeomans, N. D., Tulassay, Z., Juhász, L., Rácz, I., Howard, J. M., van Rensburg, C. J., . . . Hawkey, C. J. (1998). A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *New England Journal of Medicine*, 338(11), 719-726.

Yokotani, K., Okuma, Y., & Osumi, Y. (2012). Inhibition of vagally mediated gastric acid secretion by activation of central prostanoid EP3 receptors in urethane-anaesthetized rats. *British Journal of Pharmacology*, 117(4), 653-656.

Zapata-Colindres, J. C., Zepeda-Gómez, S., Montaña-Loza, A., Vázquez-Ballesteros, E., de Jesús Villalobos, J., & Valdovinos-Andraca, F. (2006). The association of helicobacter pylori infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 20(4), 277.

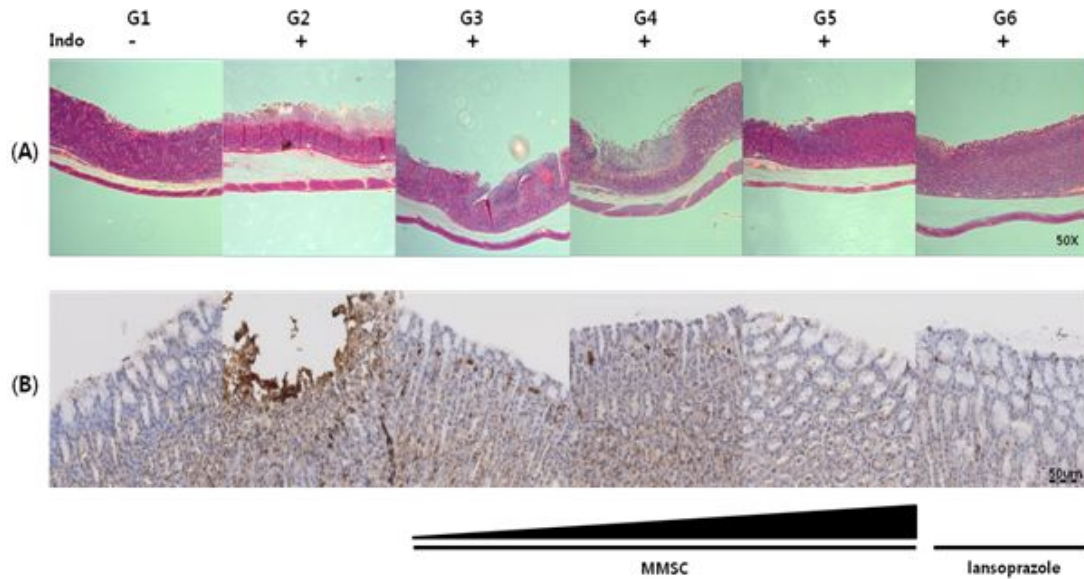
8. FIGURES

FIGURE 1. Effect of MMSC on indomethacin-induced gastric mucosal damage



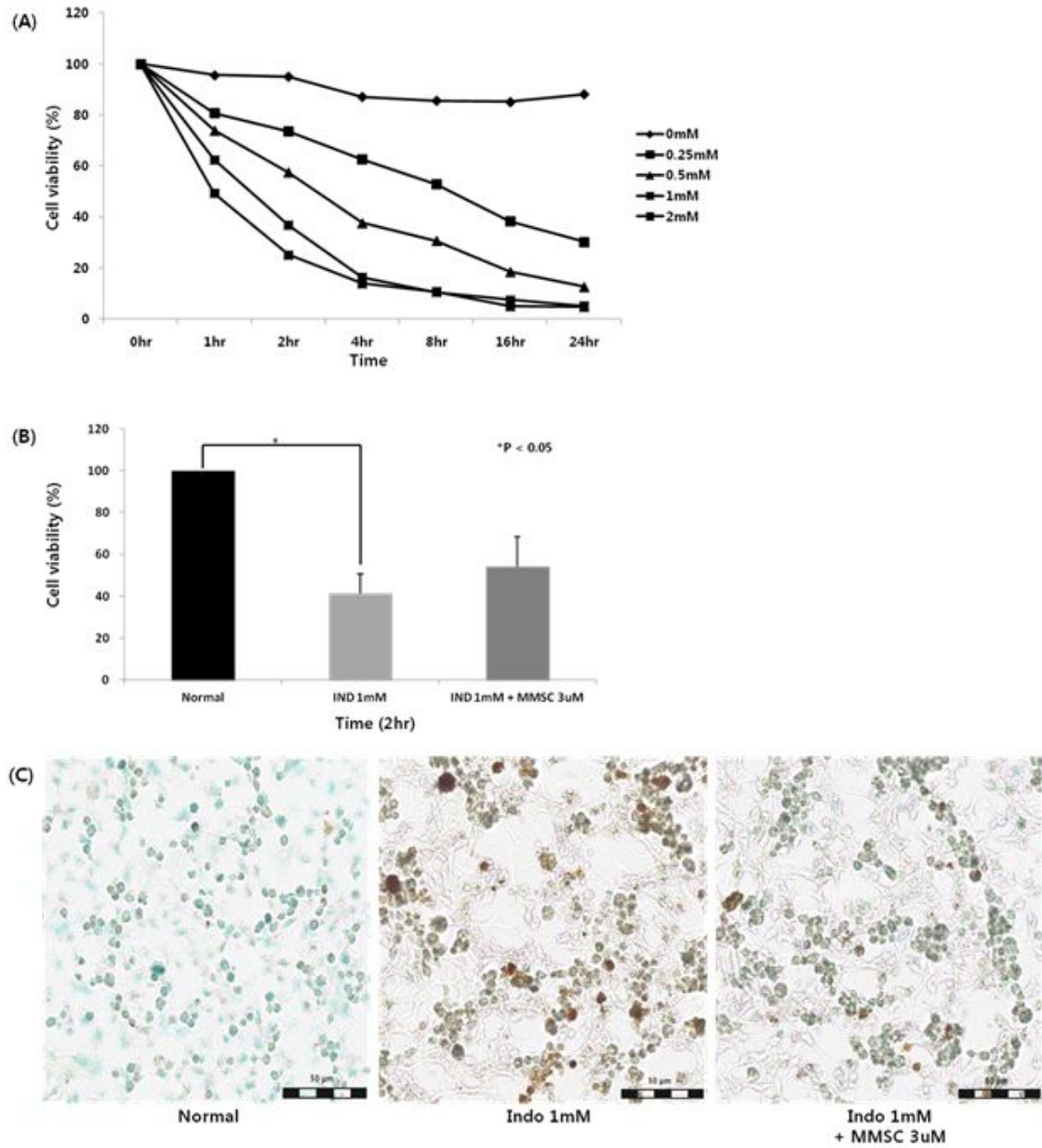
(A) Gross appearance of gastric lesions induced by indomethacin. (B) Quantitative analysis of gastric damage scoring. (C) The results are expressed in mean \pm SEM. G1: Normal, G2: 25 mg/kg Indomethacin, G3: 25 mg/kg Indomethacin + 0.25 mg/kg MMSC, G4: 25 mg/kg Indomethacin + 1 mg/kg MMSC, G5: 25 mg/kg Indomethacin + 4 mg/kg MMSC, G6: 25 mg/kg Indomethacin + 100 mg/kg Lansoprazole.

FIGURE 2. Effect of MMSC on histological evaluation and expression of iNOS in indomethacin-induced gastric mucosal damage



(A) H&E staining (x100). (B) Expression of iNOS was confirmed by immunohistochemistry (x200). G1: Normal, G2: 25 mg/kg Indomethacin, G3: 25 mg/kg Indomethacin + 0.25 mg/kg MMSC, G4: 25 mg/kg Indomethacin + 1 mg/kg MMSC, G5: 25 mg/kg Indomethacin + 4 mg/kg MMSC, G6: 25 mg/kg Indomethacin + 100 mg/kg Lansoprazole.

FIGURE 3. Effect of MMSC on the cell viability and TUNEL staining of indomethacin-induced AGS cells



(A) Damage to cells depended on doses of indomethacin and time-sequence. (B) Presence and absence of 3 uM MMSC treatment 2 h before the indomethacin treatment were compared. (C) The induction of apoptosis by AGS cells was confirmed by TUNEL assay. Condensed and marginated chromatin was labeled to be stained dark brown in AGS cell line (x250).

9. TABLES

TABLE 1. Experiment summary of animal mortality and clinical observations

Group	No. of animals	Mortality	Clinical Observations
	Male	Male	Male
G1	10	N	N
G2	10	N	N
G3	10	N	N
G4	10	N	N
G5	10	N	N
G6	10	N	N

N: normal

TABLE 2. Changes in gross appearance of the gastric damage area

Group	Test article	Damage area (%)
G1	-	0.0
G2	-	3.01 ± 0.90
G3	MMSC low	1.09 ± 0.56
G4	MMSC middle	1.09 ± 0.28
G5	MMSC high	0.50 ± 0.17
G6	lansoprazole	0.0

The results are expressed in mean ± SEM (n=10).

10. APPENDICES

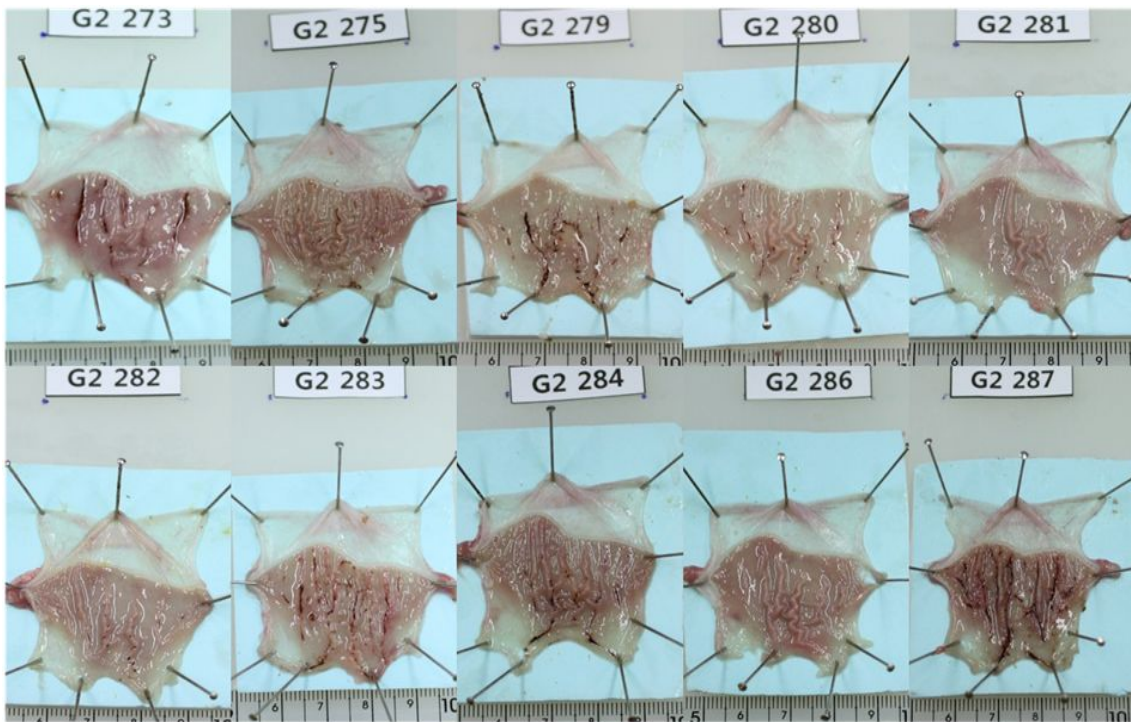
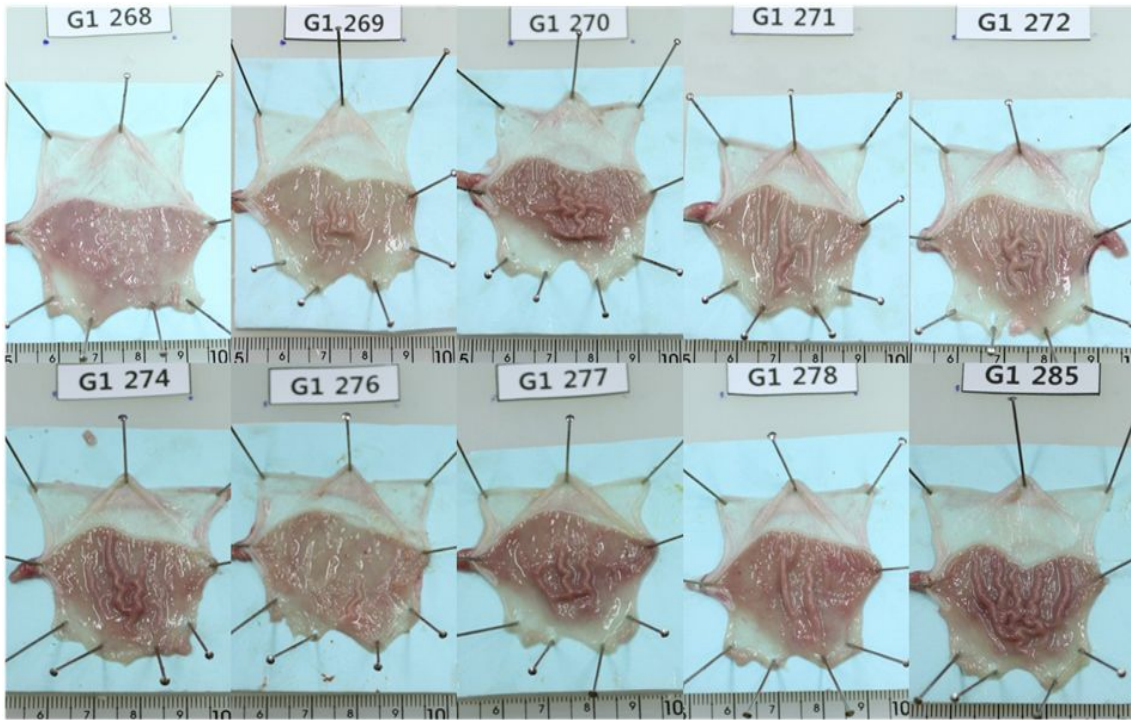
APPENDIX 1. Individual Animal list

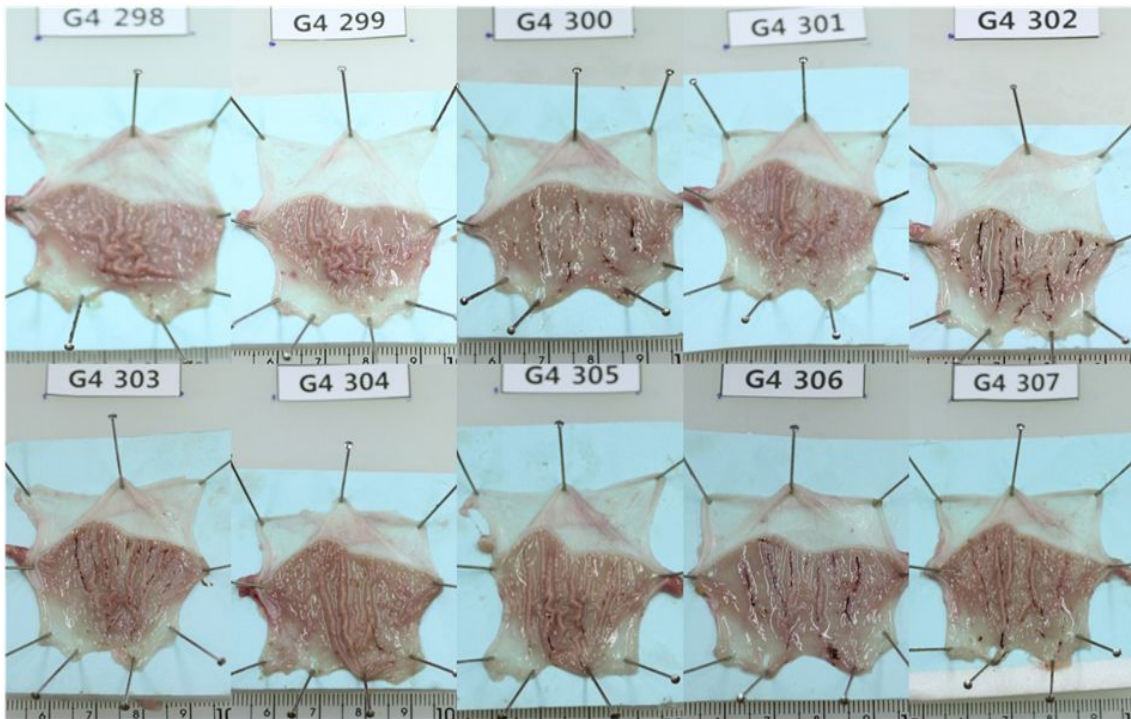
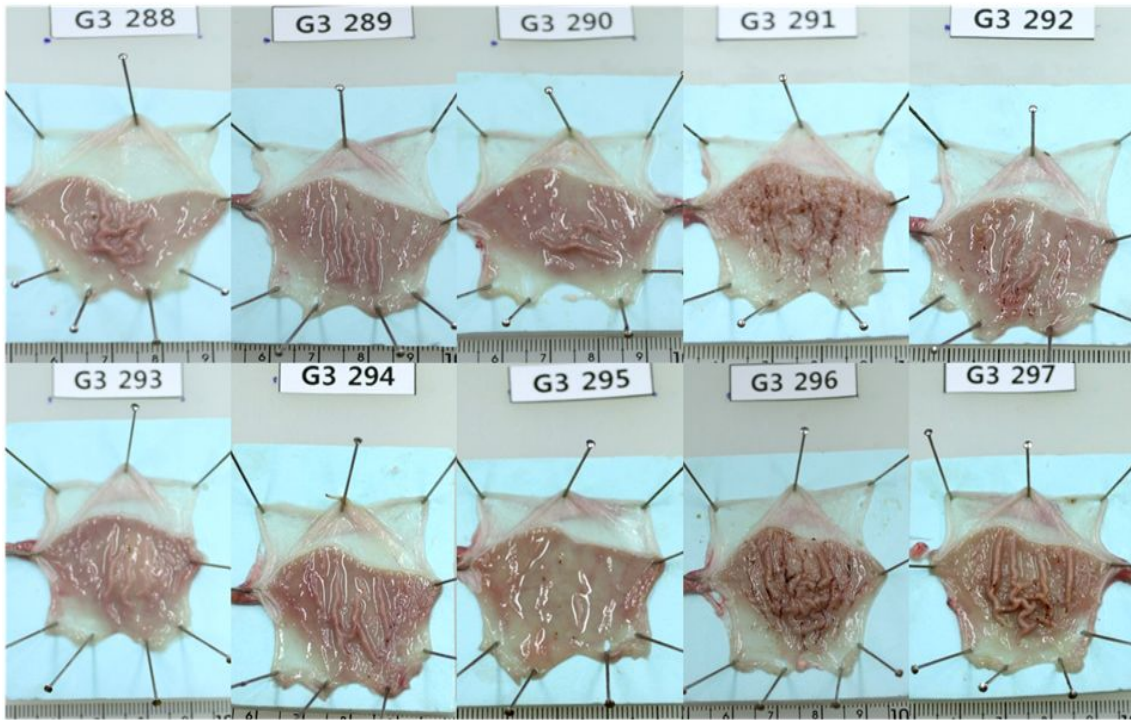
Group	Ear tag	Start weight(g)	DOB	TODAY	Day	Weeks	Sex
G1	268	192.7	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	269	187.2	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	270	188.5	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	271	191.2	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	272	195.2	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	278	201.8	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	274	187.8	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	285	202.7	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	276	190.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
277	196.5	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M	
G2	273	177.2	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	279	197.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	280	190.9	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	281	197.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	282	200.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	283	199.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	284	192.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	275	188.8	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	286	193.7	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
G3	287	194.1	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	288	197.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	289	192.1	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	290	189.7	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	291	193.7	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	292	188.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	293	184.2	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	294	204.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	295	196.9	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
G4	296	200	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	297	200	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	298	196.9	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	299	199.5	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	300	196.2	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	301	197.5	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	302	193.2	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	303	192.2	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	304	195.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
G5	305	191.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	306	190.5	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	307	188.5	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	308	202.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	309	199.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	310	186.4	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	311	190.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	319	202.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	313	192.7	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
G6	314	190.1	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	315	190.4	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	316	198	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	317	196.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	318	199.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	312	181	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	320	184.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	321	197.3	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	322	195.1	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
G6	323	190.2	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	324	203.5	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	325	190.6	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	326	202.5	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M
	327	197.8	2012-07-18	2012-09-04	48	6.9	M

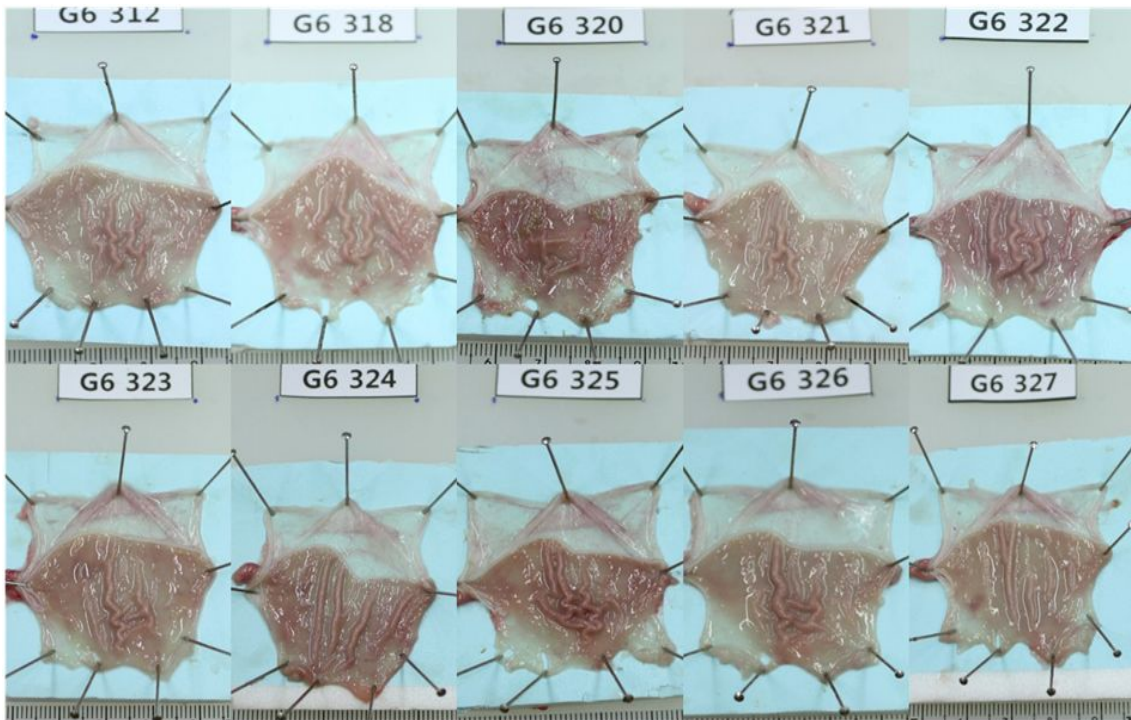
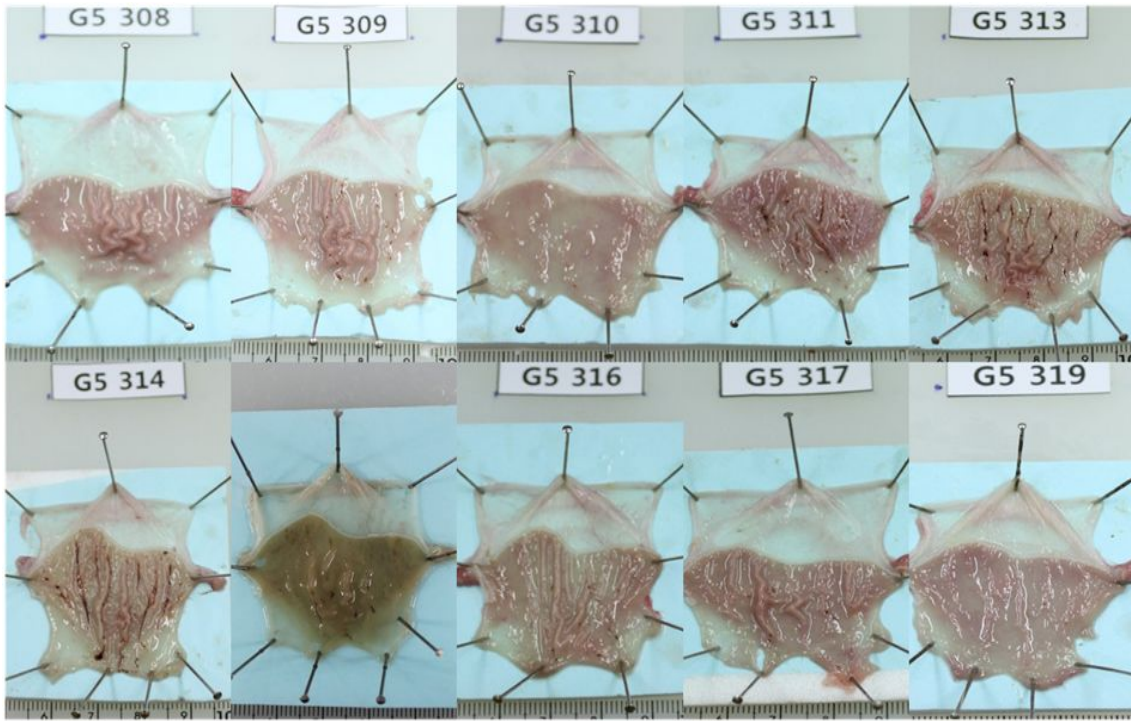
APPENDIX 3. Individual Animal autopsy schedule

	Group	Ear tag	MMSC & lansoprazole treat	indomethacin treat	Autopsy start	
09-04	G1	268	8:00	8:30	14:30	
	G2	273	8:05	8:35	14:35	
	G3	288	8:10	8:40	14:40	
	G4	298	8:15	8:45	14:45	
	G5	308	8:20	8:50	14:50	
	G6	318	8:25	8:55	14:55	
	G6	312	8:30	9:00	15:00	
	G5	309	8:35	9:05	15:05	
	G4	299	8:40	9:10	15:10	
	G3	289	8:45	9:15	15:15	
	G2	279	8:50	9:20	15:20	
	G1	269	8:55	9:25	15:25	
	G1	270	9:00	9:30	15:30	
	G2	280	9:05	9:35	15:35	
	G3	290	9:10	9:40	15:40	
	G4	300	9:15	9:45	15:45	
	G5	310	9:20	9:50	15:50	
	G6	320	9:25	9:55	15:55	
	G6	321	9:30	10:00	16:00	
	G5	311	9:35	10:05	16:05	
	G4	301	9:40	10:10	16:10	
	G3	291	9:45	10:15	16:15	
	G2	281	9:50	10:20	16:20	
	G1	271	9:55	10:25	16:25	
	G1	272	10:00	10:30	16:30	
	G2	282	10:05	10:35	16:35	
	G3	292	10:10	10:40	16:40	
	G4	302	10:15	10:45	16:45	
	G5	319	10:20	10:50	16:50	
	G6	322	10:25	10:55	16:55	
	09-05	G1	278	8:00	8:30	14:30
		G2	283	8:05	8:35	14:35
G3		293	8:10	8:40	14:40	
G4		303	8:15	8:45	14:45	
G5		313	8:20	8:50	14:50	
G6		323	8:25	8:55	14:55	
G6		324	8:30	9:00	15:00	
G5		314	8:35	9:05	15:05	
G4		304	8:40	9:10	15:10	
G3		294	8:45	9:15	15:15	
G2		284	8:50	9:20	15:20	
G1		274	8:55	9:25	15:25	
G1		285	9:00	9:30	15:30	
G2		275	9:05	9:35	15:35	
G3		295	9:10	9:40	15:40	
G4		305	9:15	9:45	15:45	
G5		315	9:20	9:50	15:50	
G6		325	9:25	9:55	15:55	
G6		326	9:30	10:00	16:00	
G5		316	9:35	10:05	16:05	
G4		306	9:40	10:10	16:10	
G3		296	9:45	10:15	16:15	
G2		286	9:50	10:20	16:20	
G1		276	9:55	10:25	16:25	
G1		277	10:00	10:30	16:30	
G2		287	10:05	10:35	16:35	
G3		297	10:10	10:40	16:40	
G4		307	10:15	10:45	16:45	
G5		317	10:20	10:50	16:50	
G6		327	10:25	10:55	16:55	

APPENDIX 4. Individual Animal Gastric Damage Area







APPENDIX 5. Individual gastric mucosa damage area (%)

group	ear tag	Gastric area (pixel)	Lesion area (pixel)	damage area (%)	damage area (%) (average)
G1	268	-	0	0	0
	269	-	0	0	
	270	-	0	0	
	271	-	0	0	
	272	-	0	0	
	278	-	0	0	
	274	-	0	0	
	285	-	0	0	
	276	-	0	0	
277	-	0	0		
G2	275	37198	757	2.04	3.01
	279	38172	1402	3.67	
	273	43558	1534	3.52	
	280	39136	577	1.47	
	281	39824	55	0.14	
	282	38437	300	0.78	
	283	39524	3394	8.59	
	284	41943	957	2.28	
	286	33768	127	0.38	
287	31034	2242	7.22		
G3	288	41722	46	0.11	1.09
	289	44729	105	0.23	
	290	43112	57	0.13	
	291	46712	1104	2.36	
	292	42299	519	1.23	
	293	34258	35	0.10	
	294	40186	145	0.36	
	295	45552	85	0.19	
	296	36046	2065	5.73	
297	38543	194	0.50		
G4	298	46020	53	0.12	1.09
	299	37196	252	0.68	
	300	41007	495	1.21	
	301	38274	105	0.27	
	302	39730	1113	2.80	
	303	36179	734	2.03	
	304	39412	106	0.27	
	305	39958	220	0.55	
	306	46295	915	1.98	
307	34247	326	0.95		
G5	308	44447	25	0.06	0.50
	309	41333	161	0.39	
	310	43806	14	0.03	
	311	38438	235	0.61	
	313	43868	467	1.06	
	314	38859	673	1.73	
	315	39341	275	0.70	
	316	46538	121	0.26	
	317	52474	73	0.14	
319	53186	19	0.04		
G6	318	-	0	0	0
	312	-	0	0	
	320	-	0	0	
	321	-	0	0	
	322	-	0	0	
	323	-	0	0	
	324	-	0	0	
	325	-	0	0	
	326	-	0	0	
327	-	0	0		