

최종 및 연구성과보고서

최 종 보 고 서

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “김치의 건강기능성 메카니즘 규명 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2014 년 08 월 09 일

부산대학교 산학협력단

연 구 진

연구기관명 : 부산대학교 산학협력단

연구책임자 : 박 건 영

책임연구원 : 박 건 영

연 구 원 : 최 영 현

연 구 원 : 정 지 강

연 구 원 : 송 가 락

연구보조원 : 김 희 영

연구보조원 : 이 가 영

연구보조원 : 최 은 옥

책임연구원 : 함 기 백

연 구 원 : 김 은 희

연 구 원 : 박 중 민

연 구 원 : 박 상 호

연 구 원 : 정 미 경

연구보조원 : 나 파 판

연구보조원 : 한 영 민

책임연구원 : 강 순 아

연 구 원 : 조 은 주

연 구 원 : 김 미 자

연 구 원 : 김 명 속

연구보조원 : 최 지 명

연구보조원 : 심 문 희

연구보조원 : 왕 천

요 약 문

| | | | | |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----|-----|
| 연구과제명 | 김치의 건강기능성 메커니즘 규명 연구 - 김치의 항암 메커니즘 및 항산화 기능성 연구 - | | | |
| 연구책임자 | 소 속 | 부산대학교 생활환경대학 | 성 명 | 박건영 |
| 연구목표 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 김치의 항암기능성 메커니즘 연구 및 동물, 인체 실험을 통한 항암기능성(헬리코박터균 감염 위염 및 위암과 대장암) 검증 ○ 김치의 항산화 효과, 대사증후군(항비만) 효과 및 항노화 효과와 기작 연구 | | | |
| 연구내용 | <p>- 연구개발의 목적 및 필요성</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 김치의 항암 기능성 및 그 메커니즘 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 김치가 항암기능성이 있는지의 효과 연구와 그 기능성을 높이는 김치제조가 필요함 - 항암김치의 항암기작과 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>, 인체 실험을 통한 확인연구가 필요함 ○ 김치의 항산화 기능성과 이에 관련된 항노화, 항치매, 항비만 효과와 그 기능성 기작 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 김치의 기능성 중 항산화와 관련된 항노화 및 항비만 효과 측정이 필요함 - 김치의 건강기능성 중 항암, 항산화 및 항비만 효과가 확인되고 SCI 등 학술지에 보고되면 김치의 세계화에 중요한 역할을 할 수 있음 <p>- 연구개발 내용 및 범위</p> <p><1세부></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 항암 김치의 제조 및 이의 암예방 및 항암 기능성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 동물실험을 이용한 항암(암전이, 대장암) 효과 검증 - 인체 실험을 통한 장건강 개선 효과 기능성 검증 - Cellular system에서 암세포 성장 억제효과 및 항암 메커니즘 규명 <p><2세부></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 김치의 헬리코박터균 감염 및 이에 연관된 항염증 및 항암 효능 검증 <ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> 전임상 효능평가 및 분자생물학적인 기전 규명 - 염증성 대장염 및 대장암에 대한 임상 효능 및 약리기전 규명 <p><3세부></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ C57BL/6 mice로 고지방 식이 비만을 유도 후, 비만개선 및 체지방감소효과 ○ Cellular system에서 산화적 스트레스 개선에 따른 항산화/항노화 효과 측정 ○ 신경세포 보호 효능과 <i>in vivo</i>에서의 노화에 따른 인지능력 개선 효과 및 작용 메커니즘 규명 <p>- 연구개발 결과</p> <p><1세부></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 스타터, 죽염 등의 부재료 조절을 통한 항암 기능성 김치의 레시피 개발과 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 실험을 통해 암전이, 대장암 억제 효과 및 메커니즘 규명 | | | |

- 항암 기능성 김치의 임상시험을 통한 인체 대장 건강증진 효과 검증
 - 김치 및 김치 부재료의 활성성분(Sulforaphane, Isorhamnetin, 3-(4'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl)propionic acid (HDMPPA), *Zanthoxylum schinifolium* leaves ethanol extract(EEZS))의 항염증 및 항암 효능 기작 검증
- <2세부>
- *H. pylori*를 처리한 위암 세포주에서 동결건조 김치의 항염증, 항암활성 및 암전이 억제 효능 확인
 - *H. pylori*에 의한 위염 및 위암 유발 동물모델에서 항암 김치의 효능 확인
 - 항암 김치의 염증성 대장염에 대한 임상효능 확인
- <3세부>
- 고지방식이로 비만을 유도한 C57BL/6 마우스를 이용하여, 항암김치의 체지방 축적 억제효과 및 혈중지질의 변화를 관찰하여 비만에 대한 예방 효능 측정
 - Cellular system 및 Alzheimer's disease 동물 모델로 김치의 항산화/항노화 효과 및 인지능력 개선효과를 확인하였고, 그 중에서 특히 항암김치의 효능을 측정

- 연구 성과 및 성과활용 계획

| 구분 | 연구논문 | 학술발표 | 지식재산권 | 기술이전/제품화 | 기타 | 계 |
|------|-----------------------------|-----------------------|-------|----------|----|----|
| 1차년도 | 5 (SCI(E): 2, KSCI: 3) | 8 (국외: 3, 국내: 5) | 0 | 0 | 0 | 13 |
| 2차년도 | 13 (SCI(E): 8, KSCI: 5) | 13 (국외: 4, 국내: 9) | 2 | 0 | 5 | 33 |
| 총계 | 18 (SCI(E): 10, KSCI: 8) | 21 (국외: 7, 국내: 14) | 2 | 0 | 5 | 46 |

이 연구 결과로부터 김치의 우수성이 과학적으로 증명되었고, SCI 논문 등으로 발표되고 정부 및 TV, 신문 등에 연구 결과를 홍보하므로 김치세계화에 중요하게 활용하도록 함

기대효과

- 김치의 암예방 및 항암기능성을 질환 동물모델과 인체실험을 통해 검증하고 메카니즘을 규명하며, 김치의 섭취와 관련해서 논란이 되고 있는 건강문제에 대한 기능성을 증명하고, 김치의 우수성을 검증함으로써 김치의 우수성이 국내외적으로 홍보됨
- 한국인의 암발생을 억제하고, 항염증 및 항산화능 기반 항종양 및 항산화 식품으로서의 역할증대 뿐 아니라 장기적인 투여에 따른 소비의 확산 및 의학적, 경제적, 산업적 효과가 매우 크며 국민 보건향상에 기여하게 됨

SUMMARY

| | |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Research title | <p>Investigation into the Mechanisms of Health Functionalities of Kimchi</p> <p>- Anticancer Mechanisms and Antioxidative Functionalities of Kimchi -</p> |
| Research objectives | <ul style="list-style-type: none"> ○ Researches on mechanisms of anticancer functionality (<i>Helicobacter pylori</i> induced gastritis and gastric cancer and colon cancer) of kimchi and evaluation of its anticancer efficacy through animal and human researches ○ Mechanistic researches on anti-oxidation and anti-aging effects of kimchi, and effects of kimchi on metabolic syndrome (anti-obesity efficacy) |
| Research | <p>- The purpose and necessity of research and development</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Researches on anti-cancer functionality of kimchi and its mechanism <ul style="list-style-type: none"> - Anti-cancer efficacy of kimchi and manufacture of kimchi with improved functionality are required - Researches on anti-cancer mechanism of anti-cancer kimchi and confirmative researches using <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> and clinical test ○ Anti-oxidative functionality of kimchi, its related anti-aging, anti-dementia and anti-obesity effects and mechanistic researches on the functionalities <ul style="list-style-type: none"> - Evaluations on anti-aging and anti-obesity efficacy of kimchi are needed - Confirmation of such functionality of anti-cancer, anti-oxidation and anti-obesity of kimchi and publication of those results to SCI-rated journals may play a role in globalization of kimchi <p>- Content and scope of research</p> <p><Part 1></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Manufacture of anticancer kimchi and evaluation of its cancer-prevention mechanisms and anti-cancer efficacy <ul style="list-style-type: none"> - Examination on anti-proliferation effect of kimchi on cancer cells and its anti-cancer mechanisms - <i>In vivo</i> anticancer (colorectal cancer, metastasis) effect of kimchi - Evaluation of intestinal health-promoting effects of anticancer kimchi through clinical tests <p><Part 2></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ To determine the effects of the kimchi on the regulation of <i>H. pylori</i> infection, <i>H. pylori</i>-associated inflammation and carcinogenesis <ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i>, <i>in vivo</i> preclinical study and the mechanism research - Human clinical study on the bowel function <p>< Part 3 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Inhibitory effect on fat accumulation in high fat diet induced obesity model by use of C57BL/6 mice ○ Antioxidative and anti-aging effect of the kimchi extract <i>in vitro</i> and cellular system. ○ Protective effect of kimchi against glial cell and Alzheimer's disease (AD) mouse model induced by amyloid beta and study on protective mechanisms from AD. <p>- Results</p> <p><Part 1></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of anti-cancer kimchi recipes by adjustment of subingredients such |

| | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>as starter probiotics and bamboo salt, and mechanistic research on its suppressive effects against colitis, colorectal cancer and metastasis through <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> experiments</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Evaluation of intestinal health-promoting effects of anticancer kimchi through clinical tests ○ Evaluation of anti-inflammatory and anti-cancer effects of active compound of kimchi and its sub-ingredients (Sulforaphane, Isorhamnetin, 3-(4'-hydroxyl-3', 5'-dimethoxyphenyl)propionic acid (HDMPPA)), <i>Zanthoxylum schiniifolium</i> leaves ethanol extract(EEZS)) <p><Part 2></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ We demonstrated the mechanisms of anti-inflammatory, anti-metastasis, anti-cancer effects of the kimchi in human gastric cancer cells. ○ We observed the cancer-preventive effect of the kimchi in <i>H. pylori</i>-infected, <i>H. pylori</i>-associated gastric carcinogenesis animal model. ○ The treatment with the kimchi improved the microbiota and the function of the intestine in the human clinical study <p><Part 3></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Treatment of anticancer kimchi in high fat diet induced mice affected on decrease of fat cell size and fatty liver through histological analysis. These data suggest that anticancer kimchi may be important functional material in preventing obesity. ○ The present results indicated that anticancer kimchi showed protective roles from oxidative stress and Alzheimer's disease (AD) under cellular and <i>in vivo</i> Aβ-induced AD models. <p>- Research utilization and its plan</p> <p>The health benefits of kimchi, especially anticancer, anti-oxidation, anti-obesity effects and possible prevention of dementia were studied in this project. These results could be reported, and this can stimulate the globalization of kimchi.</p> |
| Benefits | <ul style="list-style-type: none"> ○ Cancer-preventive and anti-cancer efficacy of kimchi were evaluated by animal model and clinical tests, and their mechanisms were examined. Functionalities of kimchi against health concerns associated with administration of kimchi were also examined so that excellence of kimchi could be proved. ○ Taken together, kimchi may contribute to reduce cancer incidence in Korea, and play a role as an anti-tumor and anti-oxidation food on the basis of anti-inflammatory and anti-oxidation, induction of apoptosis, cell cycle arrest, etc. The health benefits of kimchi are proved by the results of this project. The kimchi industry could be expanded, and consumption of kimchi increased by Koreans and foreigners. This can stimulate the globalization of kimchi. |

CONTENTS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Research abstract..... | 10 |
| 1 st year research activities..... | 12 |
| 1. Research objectives..... | 12 |
| 2. Research study and perform a range..... | 13 |
| 3. Research result..... | 16 |
| < Part 1 > | |
| - Manufacture of kimchi..... | 16 |
| - Effects of baechu kimchi of different ingredients on suppression of AOM/DSS-induced colorectal cancer in Balb/c mice..... | 17 |
| - Mechanistic research of anti-inflammatory and anticancer activity of active compounds of kimchi (glucoraphanin and sulforaphane)..... | 24 |
| - Making an improved anti-cancer kimchi (research on starter) | 35 |
| < Part 2 > | |
| - Research of anti-cancer activity on gastric cancer cells..... | 41 |
| - Anti-oxidative effects of freeze-dried kimchi..... | 43 |
| - Anti-inflammatory effects of freeze-dried kimchi | 44 |
| - Anti-metastatic effects of frozen-dried kimchi | 45 |
| - Examination of <i>in vivo</i> anti-cancer activity | 46 |
| < Part 3 > | |
| - Oral toxicity test of kimchi..... | 52 |
| - Anti-oxidation effects of anti-cancer kimchi..... | 57 |
| - Anti-adipogenic effects on 3T3-L1 preadipocytes | 61 |
| - Alleviation of oxidative stress..... | 65 |
| - Anti-aging effects on cellular system | 68 |
| - Effects of kimchi extracts on cognitive ability improvement <i>in vivo</i> | 70 |
| 4. Presentation of the research..... | 75 |
| 5. 1 st year statement of research funds..... | 78 |
| 6. Important modifications in research progress | 79 |
| 2 nd year research activities..... | 80 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Research objectives..... | 80 |
| 2. Research study and perform a range..... | 82 |
| 3. Research result..... | 83 |
| < Part 1 > | |
| - Standardization of anti-cancer kimchi (research on brined baechu cabbage with different types of salt and brining methods) | 83 |
| - Effects of kimchi manufactured by starter, bamboo salt brining and anti-cancer functionality kimchi recipes on suppression of metastasis (<i>in vivo</i>) and colorectal cancer(<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>)..... | 90 |
| - Research of intestinal health-promoting effect of kimchi in health adults (clinical test) | 104 |
| - Mechanism of anti-cancer activity of kimchi active compounds on cellular system..... | 109 |
| < Part 2 > | |
| - Evaluation of changes in inflammatory factors and apoptosis upon treatment of anti-cancer kimchi in <i>H. pylori</i> -infected mouse model | 138 |
| - Changes in colon function upon treatment of anti-cancer kimchi (clinical test) | 142 |
| < Part 3 > | |
| - Anti-obesity and weight loss effects of kimchi extract..... | 163 |
| - Alleviation of oxidative stress of kimchi extract..... | 169 |
| - Anti-aging effects of kimchi extract..... | 170 |
| - Protective effect of kimchi extract on neurons in cellular system..... | 172 |
| - Effects of anti-cancer kimchi extracts on cognitive ability improvement <i>in vivo</i> | 174 |
| 4. Presentation of the research..... | 179 |
| 5. 2 nd year statement of research funds..... | 184 |
| 6. Important modifications in research progress | 185 |

연구개발보고서 초록

| | | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------|
| 과 제 명 | (국문) 김치의 건강기능성 메카니즘 규명 연구 - 김치의 항암 메카니즘 및 항산화 기능성 연구 - (영문) Investigation into the Mechanisms of Health Functionalities of Kimchi - Anticancer Mechanisms and Antioxidative Functionalities of Kimchi - | | |
| 연 구 기 관 | 부산대학교 산학협력단 | 연 구 자 | (소속) 부산대학교 |
| 참 여 기 관 | - | 책 임 자 | (성명) 박 건 영 |
| 연 구 비 | 계 | 320,000,000 원 | 총 연 구 기 간 2012 년 8 월 10 일부터 2014 년 8 월 9 일까지 (24 개월) |
| 참 여 연 구 원 | 22 명 (연구책임자: 1 명, 책임연구원: 3 명, 연구원: 10 명, 연구보조원 8 명) | | |

○ 연구개발 목표 및 내용

- 김치의 항암기능성 메커니즘 연구 및 동물, 인체 실험을 통한 항암기능성 검증
- 김치의 헬리코박터 균 감염 연관 전암병소 및 위암예방 기능규명 및 이에 연관된 항염증 및 항암 효능을 세포주 모델, 동물 모델을 통해 규명
- 현대인의 대표적인 질환인 생활습관병(대사증후군)을 예방 할 수 있는 김치의 영양생리학적 생리활성 규명 및 항산화/항노화 효과 및 메카니즘 연구

○ 연구 결과

<1세부>

- 스타터, 죽염 등의 부재료 조절 및 발효방법을 통한 항암 기능성 김치의 레시피 개발과 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 암전이 및 대장암 억제 효과 및 메커니즘 규명
- 항암 기능성 김치의 임상시험을 통한 인체 대장 건강증진 효과 검증
- 김치 및 김치 부재료의 활성성분의 항염증 및 항암 효능 (Sulforaphane, Isorhamnetin, 3-(4'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl)propionic acid (HDMPPA), *Zanthoxylum schinifolium* leaves ethanol extract(EEZS)) 및 메카니즘 검증

<2세부>

- *H. pylori*를 처리한 위암 세포주에서 동결건조 김치의 항염증, 항암활성 및 암전이 억제 효능 확인
- *H. pylori*에 의한 위염 및 위암 유발 동물모델에서 항암 김치의 효능 확인
- 항암 김치의 염증성 대장염에 대한 임상효능 확인

<3세부>

- 고지방식으로 비만을 유도한 C57BL/6 마우스를 이용하여, 항암김치의 식이효율 감소, 체지방축적 억제효과 및 혈중지질 중 콜레스테롤의 유의적인 감소효과를 보였고 당 조절에도 유의적인 변화를 관찰하여 비만에 대한 예방 효능이 우수함
- Cellular system에서 항산화/항노화 효과를 측정된 결과 김치의 산화적 스트레스 개선을 통한 항산화 및 항노화 효과가 뛰어났으며, 특히 항암김치의 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었음. 이를 통하여 AD 동물 모델을 확립하여 항암김치의 인지능력 향상 효과를 살펴본 결과 Aβ로 인한 인지능력 손상에 대해 항암김치 투여군의 인지능력 개선 효과 역시 우수한 것이 됨

○ 연구 성과 및 성과활용 계획

- 연구 성과

| 구분 | 연구논문 | 학술발표 | 지식재산권 | 기술이전/제품화 | 기타 | 계 |
|------|-----------------------------|-----------------------|-------|----------|----|----|
| 1차년도 | 5 (SCI(E): 2, KSCI: 3) | 8 (국외: 3, 국내: 5) | 0 | 0 | 0 | 13 |
| 2차년도 | 13 (SCI(E): 8, KSCI: 5) | 13 (국외: 4, 국내: 9) | 2 | 0 | 5 | 33 |
| 총 계 | 18 (SCI(E): 10, KSCI: 8) | 21 (국외: 7, 국내: 14) | 2 | 0 | 5 | 46 |

- 성과 활용 계획

본 연구에서는 김치의 건강 기능성 효과와 그 메커니즘을 연구하였다. 기능성중 가장 중요한 항암 효과와 항산화성, 대사성증후군(비만), 노화억제, 인지능력 증진 및 치매예방 가능성이 이 연구를 통해 확인되었다. 항암 효과를 증진시키기 위해 기존의 항암 기능성 김치에 starter(*L. plantarum*)와 죽염(3회)을 사용하여 항암 기능성이 증진된 김치가 제조되었고, 그의 기능성과 메커니즘이 이 연구를 통해 밝혀졌다. 이 연구 결과로부터 김치의 우수성이 과학적으로 증명되었고, SCI 논문 등으로 발표되므로(예정은 9편이었는데 18편이 발표됨) 김치 세계화에 중요한 역할을 하였다고 생각한다. 학계에서 김치의 우수성이 발표되고, 일반인들에게 TV나 신문 등 홍보 계통을 통해 알려지므로 국내인은 기능성이 높은 김치 제조법을 배우게 되고, 김치의 우수성을 확인하므로, 김치 소비가 늘며, 국민 건강, 특히 암, 비만, 노화, 치매 등을 예방하는 효과가 높아지리라고 본다. 세계인(SCI 논문)과 국내인(학술논문지 및 TV, 신문 등)에게 홍보하므로 김치의 우수성 홍보와 김치 세계화에 이 연구 결과들을 잘 활용할 수 있다.

I. 1차년도 연구실적

1. 연구 목표 및 연구 수행내용

1. 연구개발 최종 목표 및 주요 내용

- 김치의 항암기능성 메커니즘 연구
- 동물, 세포 실험을 통한 대장암 예방 및 항암 기능성 검증
- 김치의 헬리코박터(*H. pylori*) 균 감염 연관 위축성 위염과 위암 및 이에 연관된 항염증 및 항암 효능을 세포주 모델, 동물 모델을 통해 규명
- 항암 김치의 식품안전성 검사
- 김치의 항산화/항노화 효과 및 노화에 따른 인지능력 개선 메커니즘 연구

2. 세부과제별 연구 목표 및 내용

제 1세부 과제 : 항암김치의 제조 및 김치의 암예방 및 항암 메카니즘 연구

- 항암김치의 제조 및 이의 암예방 및 항암 메카니즘 규명
 - 표준화 된 항암 기능성 김치의 개발 및 제조 확립
 - 여러 가지 cellular system에서 암세포 성장 억제효과 검증
 - 암세포의 전이 억제 효과 및 apoptosis 유도 효과 검증
 - 전이 억제, apoptosis 유도, cell cycle arrest 관련 유전자들을 이용한 항암 메카니즘 규명
- 김치의 암예방 및 대장 환경 개선 효과 검증
 - 마우스 모델을 이용한 김치의 대장암 억제 효과 검증

제 2세부 과제 : 김치의 헬리코박터(*H. pylori*) 균 감염 및 이에 연관된 항염증 및 항암 효능 연구

- 전임상 효능평가(*in vitro*)
 - *H. pylori*를 처리한 위암 세포주에서 김치의 항염증, 항산화 및 항암활성 측정
 - 상기 세포주에서 MMPs 등의 발현 및 활성도 등을 측정하여 김치의 암전이 억제효능을 확인
 - 김치의 발암 연관 미세환경변화 제어기능
- 전임상 효능평가(*in vivo*)
 - 동물 모델을 선정하여 헬리코박터 균을 감염시킨 후, 16주간 공급하면서 위염이나 위

암 발생시, 그 예방 여부를 확인

- 체중 및 식이 섭취량 측정과 투여에 따른 대사변화 및 위염진전 제어 기능 측정
- 위적출에 따라 병변확인 및 조직 병리학적 검사, 분자생물학적 활성기전 규명

○ 분자생물학적인 기전 규명

- 부검 후 얻은 조직에서 RNA/protein을 추출하여 대표적 염증관련 유전자들의 발현 유무 검정
- Western blot analysis를 통한 대표적 염증관련 단백질들의 발현 유무 검정
- 염증이냐 암화 과정 관련 cytokine들의 분석

제 3세부 과제 : 김치의 대사증후군 개선 효과 및 항산화/항노화효과 연구

○ 항암김치의 식품안전성 평가 (독성시험)

- SPF ICR 마우스를 이용한 급성 경구 독성시험
- SD계 흰쥐에 대한 아급성 경구 독성시험

○ 3T3-L1 지방세포 분화억제효과 규명 (*in vitro* study)

- 3T3-L1 cell culture에 의한 지방분화실험 및 oil red O staining
- Triglyceride 축적효과 및 지방합성효소활성(GPDH)활성측정

○ *In vitro* 항산화 활성 및 산화적 스트레스 개선에 따른 항노화 효과 측정

- *In vitro*에서의 라디칼 소거능 비교
- Cellular system에서의 산화적 스트레스 개선을 통한 항산화 및 항노화 효과
- 노화를 유도하는 산화적 스트레스에 관여하는 인자의 mRNA 및 단백질 발현 측정

○ 신경세포 보호 효과 및 *in vivo*에서의 인지능력 개선에 따른 작용 메커니즘 규명

- Cellular system에서의 신경세포 보호 효과 측정
- Alzheimer's disease (AD) 동물모델을 이용한 행동변화 측정
- AD 유발에 관여하는 인자의 mRNA 및 단백질 발현 측정

2. 연구범위 및 연구수행 방법

| 연구 범위 | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <1세부> | | |
| 표준화 된 기능성 김치의 개발 및 제조 조건 확립 | 선행 연구된 레시피 및 스타터를 이용하여 기능성 김치 개발 | 선행 연구되어진 레시피를 이용하여 기능성 김치를 제조한다. 김치에 첨가할 유산균을 분리하여 유산균이 probiotics로서의 조건을 갖추는지 확인하는 내산 |

| | | |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | 성, 내담즙산성, 열안정성 실험을 수행한다. |
| 항암김치의 플라보노이드 물질 분석 | LC-MS를 이용하여 항암김치의 플라보노이드 물질 분석 | 재료를 달리하여 제조한 김치의 대사산물(metabolites)을 분석하기 위하여 김치 메탄올 추출물과 Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) system 을 이용하여 분석한다. 질량분석기는 LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, USA), ultra performance liquid chromatography (UPLC) 는 Accela (Thermo Scientific, USA) 를 사용한다. 컬럼은 ACQUITY BEH C18, 2.1x100 mm, 1.7 μm (Waters), 컬럼 온도는 40℃ 로 설정한다. Flow rate 은 0.3 ml/min, sample 은 5 μL 씩 injection 한다. |
| 전이억제, apoptosis 유도, cell cycle arrest 관련 유전자들을 이용한 항암 메카니즘 규명 | 십자화과 채소에 함유된 대표적인 기능성 물질 중의 하나인 sulforaphane과 전구체인 glucoraphanin의 항염증 및 항암 활성을 비교하고, 그들의 분자생물학적 기전을 연구 | MTT assay, DAPI staining, Flow cytometry, 세포주기 빈도 분석, western blot analysis, PARP 단백질의 단편화 분석 등의 실험을 수행한다. |
| 마우스 모델을 이용한 김치의 대장암 억제 효과 검증 | AOM/DSS induced colitis-associated colon cancer model을 이용하여 Balb/c mice에서 김치가 염증성 대장암을 억제하는지 알아본다. | 동물실험모델: 6주령 male Balb/c mouse 에 azoxymethane(AOM, Sigma, USA)을 생리식염수와 혼합하여 10 mg/kg mouse body weight 으로 복강투여하고, 2주 후 부터 4주간, 1일 1회씩 총 28회에 걸쳐 김치추출물을 zonde를 이용하여 경구투여한다. AOM 투여 2주 후가 되는 시점 부터 dextran sulfate sodium(DSS, MPBio, USA)를 1주간 음수로 투여시킨 후 2주간 휴식기를 가지고, 또 다시 1주간 DSS를 음수로 투여시킨 후 2주간 휴식기를 가지는 방법으로 실시한다. 총 8 주간의 시험 기간 후 부검한다. Control 군 및 김치 처리군에 공급할 DSS는 음수에 2 % 농도에 맞게 교반하여 조제하였으며, mL/kg과 상관없이 2 % DSS 용액을 공급한다. 김치 메탄올 추출물의 mouse 투여 농도는 저농도와 고농도로 나누어 각각 성인의 하루 김치 섭취량이 100 g (저농도), 300 g (고농도) 이라고 하였을 때 mouse에 투여할 양으로 환산하여 정하며, 각각 0.63 g/kg, 1.89 g/kg mouse body weight 이 되도록 조제한다. |

| | | |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | 모든 시료는 매 회 경구투여 직전에 농도에 맞게 증류수와 혼합하여 조제한다. |
| <2세부> | | |
| 위세포주에 대한 항암 활성 연구 | 세포독성을 MTT assay 등으로 규명한다. | 위암 세포주 및 염증관련 세포주에서 <i>H. pylori</i> 를 감염시킨 후의 암세포에 대한 세포독성을 통해 김치의 암세포 억제 효능이 있는지와 김치를 동시 또는 전처치에 따른 세포독성을 확인한다. |
| 암전이 억제능 연구 및 항암활성 기전 연구 | 염증관련 지표의 변화 및 각종 암관련 유전자와 암억제 유전자의 발현을 관찰하기 위한 측정방법으로 ELISA, RT-PCR, 및 Western blot이 이용되며, 전이 관련 인자를 확인하기 위해 RT-PCR과 zymography 등의 방법이 이용된다. | - 위암 세포주 및 염증관련 세포주에서 <i>H. pylori</i> 감염시킨 후의 각종 염증 연관 지표의 변화를 관찰하고 이때 동결 건조 김치의 전처치 및 동시투여에 따른 변화를 측정한다. - 위암 세포주에서 <i>H. pylori</i> 감염시킨 후의 세포독성과 감초 추출물 동시 또는 전처치에 따른 MMTs (MMP-2, MMP-3, MMP-9 및 MT-MMP1)의 변화를 측정한다. - 위암 세포주에서 <i>H. pylori</i> 감염시킨 후의 변화와 동결 건조 김치를 동시 또는 전처치에 따른 변화를 각종 암유전자 및 암억제 유전자의 발현을 통하여 규명한다. |
| 동물모델 항암활성 연구 | <i>H. pylori</i> 감염 생쥐모델 프로토콜 : <i>H. pylori</i> 감염을 더 잘 일어나게 하기 위해 proton pump inhibitor (PPI)를 1회/일, 3일 동안 매일 복강주사로 투여 후, <i>H. pylori</i> 감염시킨다. <i>H. pylori</i> 균은 oral gavage로 감염시키며, 이틀에 한번씩 하루 절식 후 총 4번 감염시킨다. 해당 주에 부검하여 <i>H. pylori</i> 감염에 의한 염증 및 adenoma 형성을 관찰하고, 그에 대한 김치의 효능을 관찰한다. | <i>H. pylori</i> 감염 생쥐모델에서 감염에 따른 위상피세포의 변화 (급/만성 염증, 만성 위축성 위염, 장형화생 및 암발생)에 대하여 동결 건조 김치가 예방 또는 발생억제를 하는 지를 알아보기 위한 동물모델 연구를 시행한다. |
| <3세부> | | |
| 산화적 스트레스 개선에 따른 항산화 효과 측정 | <i>In vitro</i> 상에서 여러 가지 라디칼 소거능을 측정하고, 산화적 스트레스에 민감한 세포 모델인 LLC-PK ₁ 세포를 이용하여 김치 시료의 항산화 효과를 측정한다. | - DPPH, O ₂ ⁻ , ·OH, NO에 대한 라디칼 소거능을 측정한다. - LLC-PK ₁ cell에 generator를 처리하여 산화적 스트레스가 유발된 세포에 김치추출물 처리한 후 MTT assay, TBARS, griess reagent를 이용하여 세포 생존율, 지질과산화, NO 생성 억제 효과 등을 측정한다. |
| 식품 안전성 평가 | 급성 경구 독성시험, 아급성 경구 독성 | - ICR계의 4주령 된 수컷 마우스를 이 |

| | | |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (독성시험) | 시험 | <p>용하여 급성 독성시험은 고용량군 (400 mg/kg), 중간용량군 (200 mg/kg), 저용량군 (100 mg/kg)을 투여 농도로 설정하고, 아급성 경구독성 시험은 1,000 mg/kg을 투여 농도로 설정 하여 관찰 (적정시기의 김치를 이용).</p> <p>- 동물의 일반상태, 중독증상 및 사망 유무를 대조군과 비교 관찰하고, 체중 측정, 해부 관찰하며 혈액학적 검사를 하여 간독성검사 시행.</p> |
| 지방세포 분화 억제 효과 | 3T3-L1 지방세포 분화억제효과 규명 | <p>3T3-L1 cells을 10% FBS, penicillin/streptomycin (Sigma) 함유된 DMEM (GIBCO) 으로 배양하여 Preadipocyte를 분화시킨 후 시료에 의한 증식도, Triglyceride accumulation, GPDH activity 측정, Oil red O staining 을 하여 세포 관찰.</p> |
| 신경세포 보호 효과 및 <i>in vivo</i> 에서의 인지능력 개선 | Cellular system에서의 신경세포 보호 효과 측정 및 ICR mouse에 amyloid β 처리로 뇌손상 및 인지능력 저하를 유도한 후 활성분획물의 인지능력 개선효과 및 행동변화에 미치는 효과 측정 | <p>- C6 cell에서 H₂O₂ 및 amyloid beta (Aβ) 처리에 따른 세포생존율에 미치는 효과 검토</p> <p>- 신경세포 손상에 관여하는 인자의 mRNA 및 단백질 발현을 RT-PCR과 western blot을 통해 분석</p> <p>- Object location test, object recognition test, Morris water maze test를 이용한 행동변화 측정</p> <p>- 뇌, 간, 신장 등의 조직의 NO와 지질 과산화에 미치는 효과</p> <p>- AD 유발에 관여하는 인자의 protein 발현 측정을 western blot을 이용하여 측정</p> |

3. 세부연구수행 결과(구체적으로 기술)

-제1세부과제-

가. 김치의 제조

본 연구실에서 선행 연구된 항암 기능성 김치 레시피(길정하. 암예방 및 항암 김치의 개발과 항암 기전 연구. 2004. 부산대학교 박사학위논문, 표 1)를 이용하여 만든 김치의 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 김치의 항암 기능성을 평가하였다.

표 1. 표준김치, 암예방김치, 항암김치 레시피

| Ingredients | SK | CPK | ACK |
|-------------------------------|-------|-------|-------|
| Brined Baechu cabbage | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Red pepper powder | 3.5 | 5.0 | 2.5 |
| Crushed garlic | 1.4 | 2.8 | 2.8 |
| Crushed ginger | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| Anchovy juice | 2.2 | 2.2 | - |
| Radish | 13.0 | 11.0 | 11.0 |
| Green onion | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Sugar | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Mustard leaf | - | 5.0 | 7.5 |
| Chinese pepper | - | 0.1 | 0.1 |
| Pear | - | 2.8 | 2.8 |
| Mushroom and sea tangle juice | - | 2.5 | 5.0 |
| Final salt concentration(%) | 2.5 | 2.5 | 2.2 |

SK: Standardized kimchi, CPK: Cancer preventive kimchi, ACK: Anticancer kimchi.

항암김치의 주재료인 배추는 항암기능성을 더욱 증진시킨다고 알려진 바 있는 유기농배추를 사용하였으며(표준김치는 일반배추 사용), 김치를 저장하는 용기는 본 연구실에서 선행연구를 통하여 김치를 저장하는데에 가장 적합한 용기로 증명된 공기투과성 Mirafresh 용기를 사용하여 저장하면서 김치의 기능성이 가장 증대되는 시점인 pH 4.3일 때 실험에 사용하였다.

나. 재료를 달리하여 제조한 배추김치의 AOM/DSS로 유도된 Balb/c 마우스에서의 대장암 억제 효과

대장암 유발을 위하여 시험 첫 날 male Balb/c 마우스에 azoxymethane(AOM)을 10 mg/ kg mouse body weight으로 복강투여하고, 시험 시작 2주가 되는 시점부터 4주간, 1일 1회씩 총 28회에 걸쳐 김치 추출물을 경구투여하였다. AOM 투여 2주 후부터 2주간 DSS를 음수에 2%로 맞추어 마우스에 공급하고, 2주간 휴식기를 거친 후 다시 2주간 2% DSS를 음수로 공급하고, 다시 2주간 휴식기를 가진 후 부검하였다.

1) 사망률 및 임상 증상

Control군 2, 3, 4번 마우스가 실험 기간 중 (7주차)에 사망하였다. 세 마리를 제외한 모든 동물에서는 사망 또는 빈사동물이 관찰되지 않았으며, 임상증상 또한 관찰되지 않았다.

2) 체중

실험 기간 동안 마우스의 체중 변화는 그림 1에 나타내었다. Normal군은 다른 군들에 비하여 실험 기간 내내 체중이 가장 높았으며, 그 외 다른 군들은 모두 비슷한 체중을 나타내었다. AOM과 DSS를 투여하지 않은 normal군은 시간이 경과할수록 체중이 정상적으로 증가한 반면, AOM으로 대장암이 유발된 후 DSS를 음수로 공급한 3주차와 6주차에 normal군을 제외한 모든 군의 체중이 감소함을 볼 수 있었는데, 이는 DSS 투여로 인한 것으로 보이며, 이러한 경향은 DSS를 이용한 동물 실험에서 항상 발견된다.

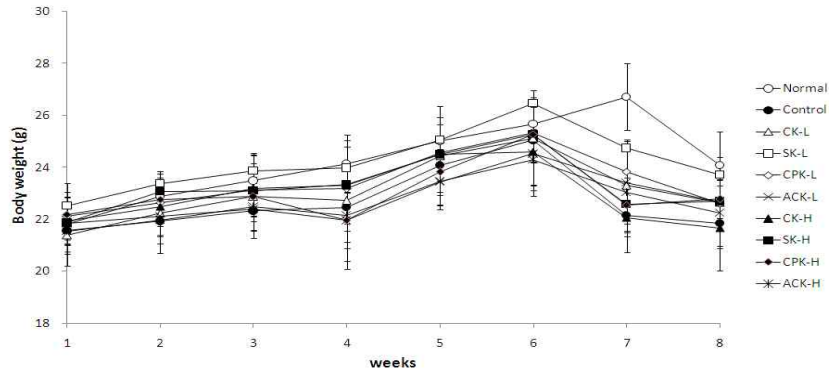


그림 1. 그룹별 체중변화

3) 대장 길이 및 대장 무게/길이 비율

AOM/DSS를 이용하여 대장암을 유발한 마우스의 대장을 적출하여 길이와 무게를 측정함으로써 염증과 관련된 대장암으로 인한 장기의 변화를 관찰하였다. AOM과 DSS로 대장암을 유발하면 정상적인 대장보다 길이는 짧게 나타나고, 궤양성 대장염 또는 대장암이 발생하면 조직의 변화 및 경직화로 인해 무게가 약간 증가하는 경향을 보인다. 따라서 대장 무게/길이 비율 값이 작을수록 대장암 억제에 효과가 있다고 볼 수 있다. 대장 길이 및 대장 무게/길이 비율은 그림 2에 나타내었다.

대장 길이를 비교해 본 결과 control군이 7.1 ± 0.6 cm로 normal군이 7.7 ± 0.6 cm인 것과 비교하여 길이가 유의적으로 감소함을 확인하여 DSS로 인한 궤양성 대장암이 유발되었음을 알 수 있었다(p<0.05). 시판김치를 처리한 군의 대장 길이는 저농도(CK-L)에서 7.3 ± 0.3 cm, 고농도(CK-H)에서 7.2 ± 0.2 cm로 나타났다. 저농도의 표준김치(SK-L), 암예방김치(CPK-L), 항암김치(ACK-L) 처리군은 각각 7.3 ± 0.2, 7.3 ± 0.2, 7.4 ± 0.5 cm로 나타났고, 고농도에서는 SK-H 7.3 ± 0.3, CPK-H 7.4 ± 0.7, ACK-H 7.7 ± 0.4 cm로 나타나 항암김치군이 저농도, 고농도 모두에서 가장 길었으며, 특히 항암김치 고농도군(ACK-H)이 가장 길게 나타났다. 이 값은 정상군인 normal군의 대장 길이와 비슷한 값이다.

대장의 무게/길이 비율에서, normal군은 21.2 ± 6.4 mg/cm, control군에서는 43.5 ± 5.5 mg/cm, 시판김치군은 저농도에서 42.0 ± 7.2 mg/cm, 고농도에서 45.5 ± 8.0 mg/cm로 나타났다. 저농도의 표준김치, 암예방김치, 항암김치군의 대장의 무게/길이 비율은 39.8 ± 4.5, 39.2 ± 4.4, 37.2 ± 7.3 mg/cm로 나타났고, 고농도에서는 42.6 ± 4.9, 41.1 ± 5.7, 36.2 ± 5.9 mg/cm로 항암김치군의 대장 무게/길이 비율이 낮게 나타났으며, 특히 항암김치 고농도군에서 가장 낮게 나타났다. 항암김치 고농도군은 control군에 비해 유의적인 억제율을 보였다(p<0.05). 한편 항암김치를 제외한 시판김치, 표준김치, 암예방김치는 고농도군보다 저농도군에서 오히려 대장 무게/길이 비율이 낮게 나타났는데, 이를 보면 김치를 많이 먹고 해서 무조건 더 대장암에 효과를 보이는 것은 아닌 것으로 보인다. 그러나 항암김치는 저농도일 때보다 고농도일 때 효과가 더 좋게 나타나, 이에 대한 확인 연구가 필요하겠다.

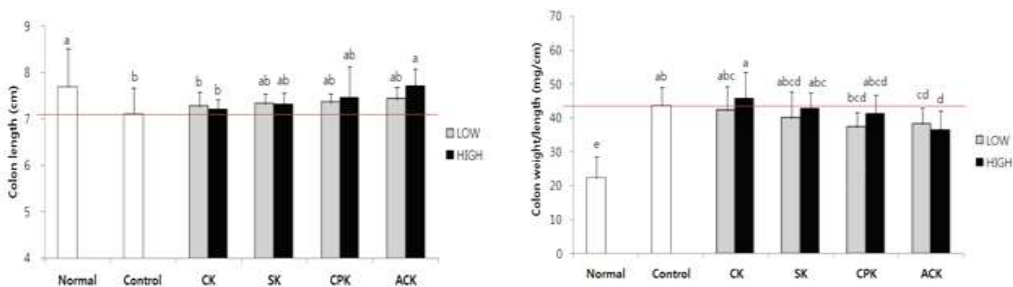


그림 2. 대장 길이 및 대장 길이/무게 비율

4) 대장 조직 내 종양 개수

AOM/DSS에 의해 유발된 대장암이 유발된 대장 조직 내의 종양 개수는 그림 3에 나타내었다. Control군은 24.6 ± 2.5 개로 가장 많은 개수를 나타내었다. 시판김치, 표준김치, 암예방김치, 항암김치 처리군의 저농도에서의 종양 개수는 각각 22.8 ± 3.9 , 23.5 ± 4.7 , 20.4 ± 5.0 , 15.6 ± 3.1 개, 고농도에서는 각각 20.5 ± 3.8 , 18.4 ± 4.9 , 17.7 ± 4.5 , 14.1 ± 2.8 개로, 모든 김치 처리군의 종양 개수는 고농도군에서 저농도군보다 더 적게 나타났다. 그 중에서도 항암김치 고농도군에서 유의적으로 가장 적은 종양 개수를 나타내었으며 ($p < 0.05$), control군에 비하여 42.7%의 억제율을 보였다. 이 종양 개수 데이터를 마우스가 아닌, 사람이 김치를 먹을 때로 해석해보면 사람이 하루에 시판김치, 표준김치, 암예방김치를 300 g 먹었을 때 보다 항암김치를 100 g 먹었을 때의 대장암 억제 효력이 더 크다고 할 수 있다. 따라서 김치 섭취는 일반적으로 대장 종양 형성을 막는 효과가 있으나, 재료를 조절하여 기능성을 높인 김치의 섭취는 그렇지 않은 김치보다 소량으로 대장 종양 형성을 억제할 수 있다고 할 수 있다.

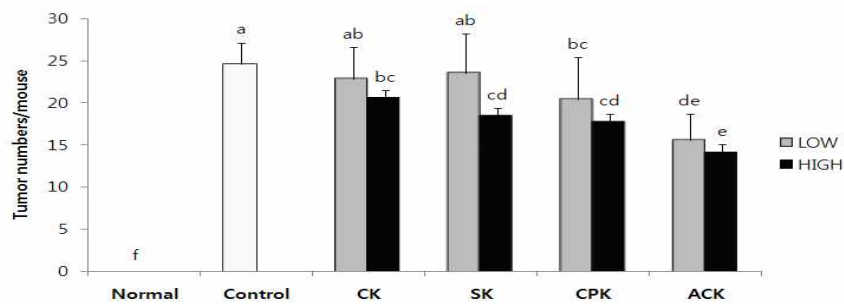


그림 3. 대장 내 종양 개수

5) 대장 조직의 병리학적 관찰

대장 조직을 병리학적으로 관찰한 사진을 그림 4에 나타내었다. 대장암을 유발시킨 마우스의 대장 조직은 정상적인 장 조직의 장샘(intestinal glands) 세포들이 사라지고 점막의 종양을 나타내며, 조직 내 암세포들이 침윤하였다. Control군은 종양의 발생과 암세포들의 침윤 정도가 높게 나타났다. 김치 처리군들 중 시판김치 처리군(CK-L, CK-H) 마우스의 대장 조직 내 암세포들의 침윤 능력은 control군보다 더 높았다. 한편 시판김치를 제외한 모든 김치 처리군들에서 control군보다 낮은 침윤 정도를 보였으며, 고농도군은 저농도군보다 더욱 낮은 정도를 보여 정상 장 세포의 암세포화 및 암세포의 침윤 능력을 억제시키는 것으로 나타났다. 특히 항암김치 고농도군(ACK-H)에서 억제능력이 크게 나타났다.

또한 대장 조직 내 상피세포의 모양은 control군, 시판김치 처리군에서 심하게 종양모양으로 변형되었으나 그 외 다른 김치 처리군들은 그에 비하여 약하게 변형되었다. 표준(SK), 암예방김치(CPK), 항암김치(ACK)의 고농도군이 저농도보다 더 약하게 변형되었으며 특히 항암김치 고농도군의 상피세포의 변형이 가장 약하게 나타나 정상 대장 조직과 유사한 모양을 형성하였다.

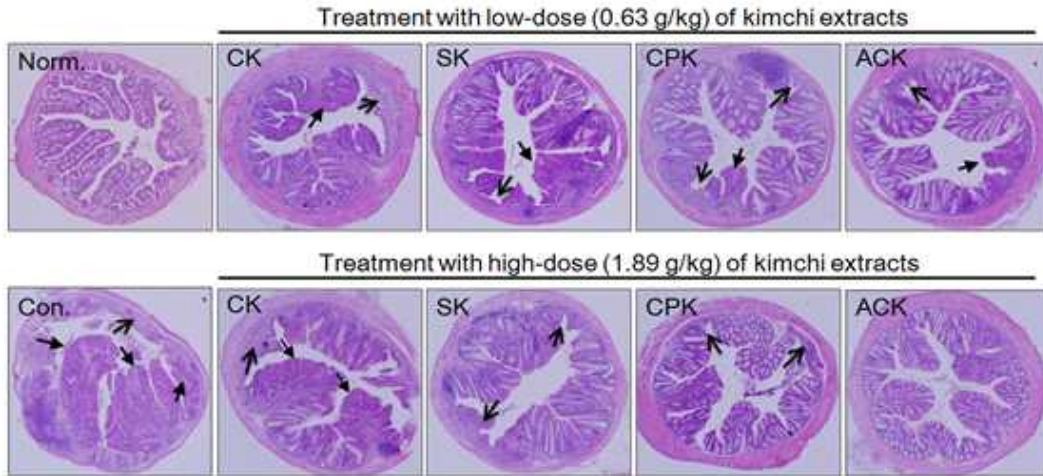


그림 4. 대장 조직 단면
(→: 염증 형성 부위, →: 종양 형성 부위.)

6) Serum pro-inflammatory cytokines

Pro-inflammatory cytokine인 IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-17A 의 측정 결과는 그림 5에 나타내었다. IL-6, TNF- α 는 normal군에서 각각 26.3 ± 6.6 , 20.5 ± 1.5 pg/mL, control군에서 137.6 ± 13.8 , 115.1 ± 7.5 pg/mL 로 나타나 IL-6, TNF- α 의 발현이 normal군에 비해 control군이 유의적으로 상승하였다 ($p < 0.05$). 모든 김치 처리군은 control군보다 낮은 수치를 나타내었고, 김치 처리군들 중 저농도군보다 고농도군에서 더 낮은 수준을 보였으며, 특히 항암김치는 저농도군에서 IL-6 83.5 ± 10.2 pg/mL, TNF- α 78.6 ± 5.4 pg/mL, 고농도군에서 IL-6 78.5 ± 8.6 pg/mL, TNF- α 75.1 ± 3.7 pg/mL 로 저농도군, 고농도군 모두에서 가장 낮은 수준을 나타내었다. 가장 낮은 수준을 보인 항암김치 고농도군은 control군에 비하여 IL-6 43.0%, TNF- α 34.8% 의 억제율을 나타냈다. IL-12, IL-17A 수준은 normal군이 각각 56.0 ± 23.7 , 800.0 ± 344.6 , 699.6 ± 7.5 pg/mL, control군은 273.0 ± 25.7 , 3915.6 ± 458.8 , 1006.9 ± 16.6 pg/mL 로, 세 가지 cytokine에서 normal군에 비해 control군에서 유의적으로 상승하였다 ($p < 0.05$). 이들 세 가지 cytokine 에서도 모든 김치 처리군이 control군에 비하여 낮은 수치를 나타내었으며, 저농도군보다 고농도군이 낮게 나타났다. 특히 항암김치가 다른 김치 처리군들에 비하여 낮게 나타났다. 항암김치군에서 IFN- γ , IL-12, IL-17A 의 발현은 저농도군: 174.8 ± 16.6 , 1571.9 ± 174.2 , 934.0 ± 13.7 pg/mL 고농도군: 151.8 ± 5.7 , 1421.9 ± 515.8 , 861.1 ± 18.5 pg/mL 로 저농도군, 고농도군 모두에서 가장 낮은 수준을 나타내었다. 이들 세 가지 cytokines에서 가장 낮은 수준을 나타낸 항암김치 고농도군은 control군에 비하여 IFN- γ , IL-12, IL-17A 의 발현에서 44.4, 63.7, 14.5% 의 억제율을 보였다. 따라서 항암김치는 다른 김치에 비하여 이러한 염증 관련 cytokines의 분비를 가장 낮게 함으로 인하여 대장의 염증 및 염증과 관련된 대장암의 유발을 억제하는 것으로 보인다.

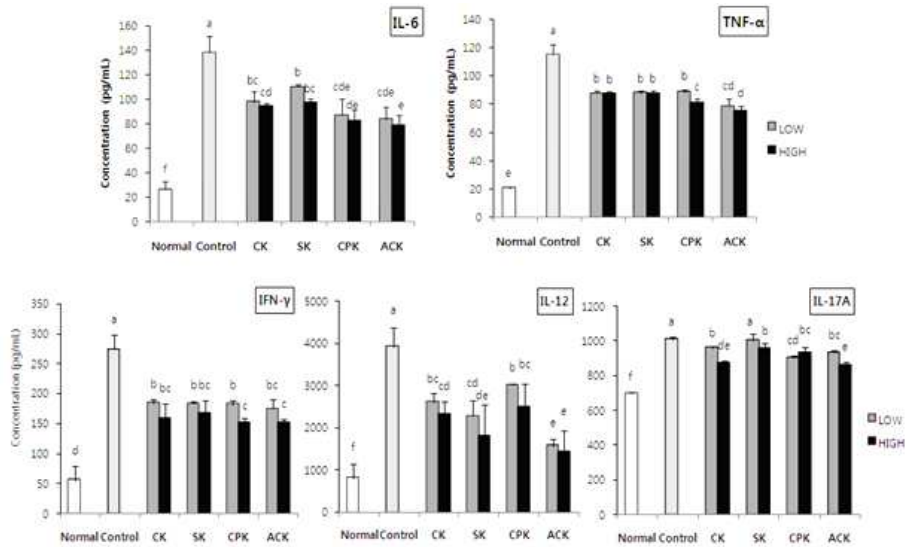


그림 5. 혈청을 이용한 사이토카인 분석

7) 대장 조직의 mRNA 및 단백질 발현

(1) Pro-inflammatory cytokines의 mRNA 및 단백질 발현

RT-PCR 실험 결과 대장 조직 내 pro-inflammatory cytokines의 mRNA 발현 수준은 그림 6에 나타내었다. RT-PCR은 김치 처리군들 중 고농도군만 선택하여 실험하였다.

IL-6와 TNF- α 의 mRNA 발현에서 normal군이 control군에 비하여 유의적으로 상승하였다($p < 0.05$). IL-6에서 모든 김치 처리군들이 control군보다 낮은 수준을 보였으며, 시판김치, 표준김치, 암예방김치는 비슷한 수준을 보였다. 향암김치는 다른 김치 처리군에 비하여 유의적으로 가장 낮은 수준을 나타내었다 ($p < 0.05$). TNF- α 에서도 모든 김치 처리군이 control군보다 낮은 수준을 보였으며, 특히 향암김치가 유의적으로 가장 낮게 나타났다($p < 0.05$). IFN- γ , IL-12, IL-17A의 mRNA 발현에서도 normal군에 비해 control군에서 유의적으로 상승하였다($p < 0.05$). IFN- γ 에서는 시판김치를 제외한 모든 김치군들이 control군에 비하여 낮게 나타났으며, 이들 중에서도 암예방김치가 가장 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). IL-12와 IL-17A에서는 모든 김치 처리군이 control군보다 낮게 나타났다. IL-12의 mRNA 발현에서 다른 김치 처리군에 비하여 표준김치와 향암김치를 처리한 군이 비슷한 수준으로 가장 낮은 수준을 보였으며, IL-17A에서는 암예방김치가 가장 유의적으로 낮은 수준을 보였다($p < 0.05$).

향암김치는 IL-6, TNF- α , IL-12에서, 암예방김치는 IL-17A, IFN- γ 에서 가장 낮은 수준을 나타내었으므로, 염증 관련 cytokines를 통하여 확인하였을 때, 기능성 재료를 이용하여 만든 김치가 그렇지 않은 김치에 비하여 염증 또는 염증관련 암의 억제 효과가 더 높다고 할 수 있겠다.

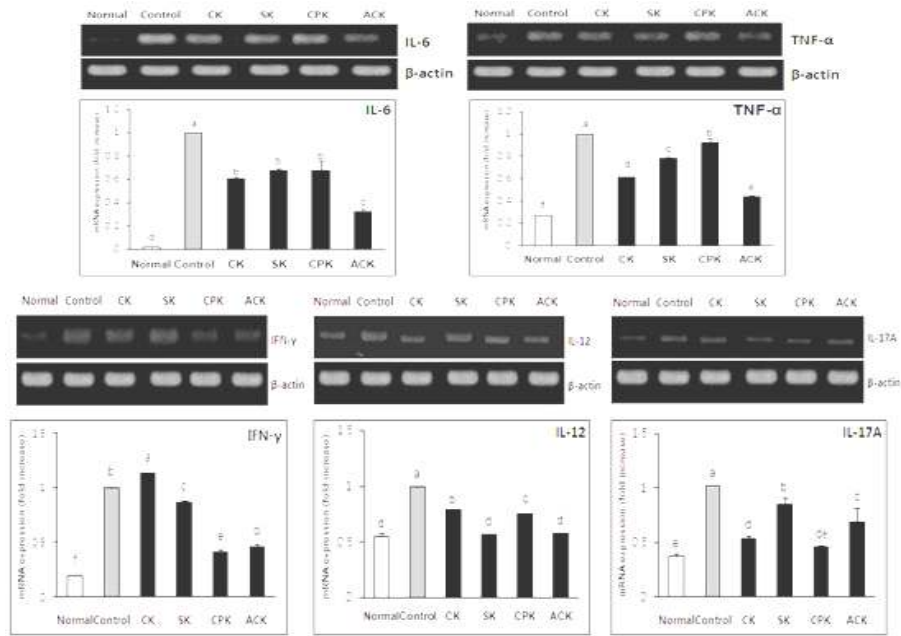


그림 6. 대장 조직을 이용한 사이토카인 mRNA 발현

(2) 대장 조직에서 iNOS 와 COX-2 의 mRNA 및 단백질 발현

iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 수준 또한 pro-inflammatory cytokines의 mRNA와 비슷한 결과를 나타냈다(그림 7). iNOS와 COX-2 모두에서 normal군에 비해 control군에서 발현 수준이 유의적으로 상승하였고($p < 0.05$), 모든 김치 처리군은 control군에 비하여 유의적으로 낮은 수준을 나타냈다($p < 0.05$). iNOS에서는 암예방김치와 항암김치가 control군에 비해 유의적으로 가장 낮은 발현 수준을 보였으며($p < 0.05$), mRNA 발현 억제율이 암예방김치 54.2%, 항암김치 54.9%로 나타났다. COX-2에서는 표준김치의 mRNA 발현 억제율이 57.1%, 암예방김치 57.5%, 항암김치 59.6%로 비슷하게 낮은 수준을 나타내었다.

Western blot 실험을 통해 대장 조직 내 염증 관련 유전자(iNOS, COX-2)의 발현량을 측정하였다(그림 8). Western blot은 김치 처리군들 중 고농도군만 선택하여 실험하였다. iNOS와 COX-2의 단백질 발현량은 normal군에 비하여 control군에서 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 모든 김치 처리군에서 iNOS의 단백질 발현량이 control군에 비하여 유의적으로 감소하였는데, 특히 항암김치군에서 iNOS 단백질 발현 억제율이 65.3%로 가장 낮은 수준을 나타냈으며, 이는 normal군과 비슷한 수준이다. COX-2의 단백질 발현량도 김치 처리군 모두 control군에 비하여 감소하였으며, 암예방김치와 항암김치군에서 유의성을 보였다. 특히 항암김치군에서 COX-2의 단백질 발현 억제율이 50.2%로 가장 낮은 수준을 나타내었다. 염증이 유발된 장 점막과 대장의 암세포에서 발현이 증가되는 iNOS와 COX-2의 발현이 김치, 특히 항암김치에서 가장 낮게 나타나, 항암김치는 다른 김치들에 비하여 DNA의 손상이나 종양을 생성을 더욱 억제시키며, 암을 억제하는 기능성을 가지는 것을 알 수 있었다.

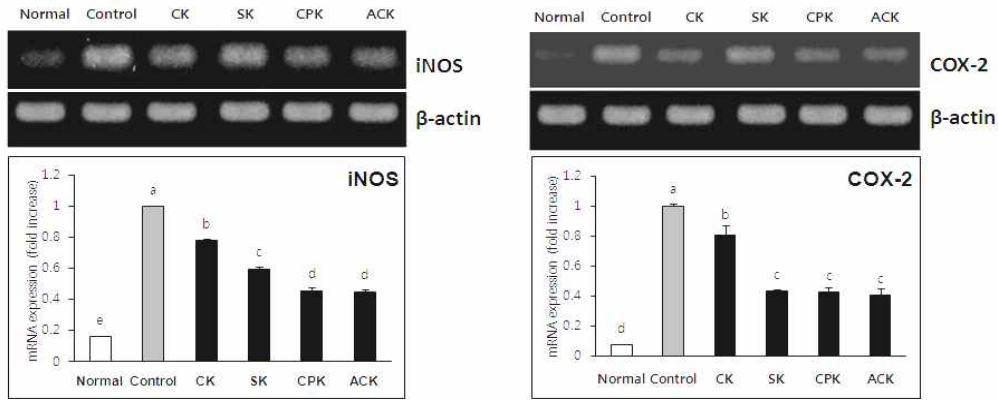


그림 7. 대장 조직을 이용한 iNOS 와 COX-2 mRNA 발현 수준

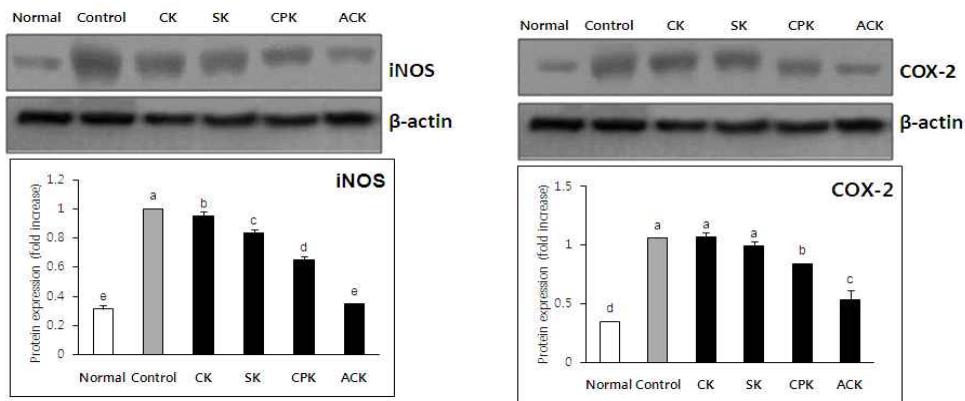


그림 8. 대장 조직을 이용한 iNOS 와 COX-2의 단백질 발현 수준

(3) p53 및 p21 의 mRNA 및 단백질 발현

p53 및 p21의 mRNA 발현은 그림 9에 나타내었다. p53과 p21의 mRNA 발현은 control군이 normal군에 비해 감소하였다. p53은 control군이 normal군보다 더 낮게 나타났지만 군간의 유의성은 나타나지 않았다. p21의 발현은 control군이 normal군에 비하여 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 하지만 p53의 mRNA 발현은 시판김치를 제외한 모든 김치 처리군들에서, p21의 mRNA 발현은 모든 김치 처리군들에서 control군에 비하여 유의적으로 높은 수준을 나타내었으며($p < 0.05$), 특히 향암김치군에서 가장 높게 나타났다.

p53과 p21의 단백질 발현은 그림 10에 나타내었다. mRNA 발현 때와 마찬가지로 control군이 normal군에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). p53의 단백질 발현은 시판김치, 표준김치와 암예방김치, 향암김치군 순으로 높게 나타났다. p21의 단백질 발현은 시판김치, 표준김치, 암예방김치군에서 control군에 비하여 높았으나 세 군간의 큰 차이는 없었고, 향암김치군이 다른 김치 처리군들보다 발현이 증가하였다. 이로써 대부분의 김치는 암세포와 종양의 생성을 억제하며, 특히 향암김치는 그 억제 능력이 가장 뛰어나 대장암에 특히 효력이 있는 것으로 보인다.

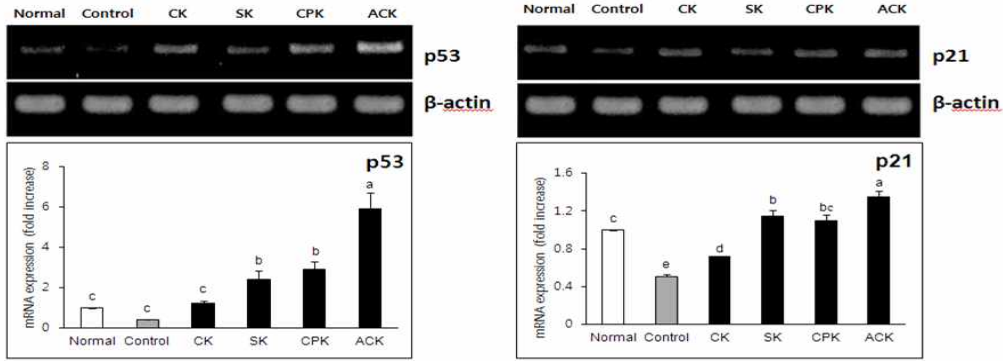


그림 9. 대장 조직을 이용한 p53 과 p21 유전자의 mRNA 발현

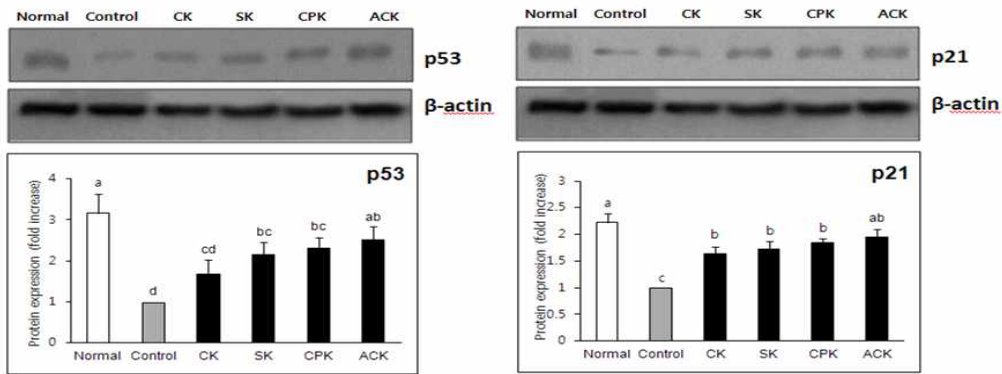


그림 10. 대장 조직을 이용한 p53 과 p21 유전자의 단백질 발현

다. 김치 활성물질(Glucoraphanin과 Sulforaphane)의 항염증 및 항암활성에 관한 기전 연구

십자화과 식물(ruciferous vegetables)에는 glucosinolates라고 부르는 isothiocyanates (ITCs)의 thioglycoside 전구물질(precursor)이 풍부하게 함유되어 있다. 김치 속의 glucosinolate 분석을 통해 확인된 물질과 김치 속 glucosinolates myrosinase (β -thioglucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.147)에 의하여 가수분해되어 전환되는 ITCs의 대표적인 물질 중의 하나인 sulforaphane과 전구체인 glucosinolate 중에서 가장 많은 양이 확인된 1 peak (glucoraphanin, 그림 11)의 항염증 및 항암활성을 비교하고, 그들의 분자생물학적 기전을 연구하고자 한다. 이를 위하여 우선 glucoraphanin과 sulforaphane의 항암활성을 인체 방광암세포(5637 human bladder cancer cells)에서 비교하였으며, 항암활성이 높게 나타난 sulforaphane의 암세포증식억제 기전을 조사하였다.

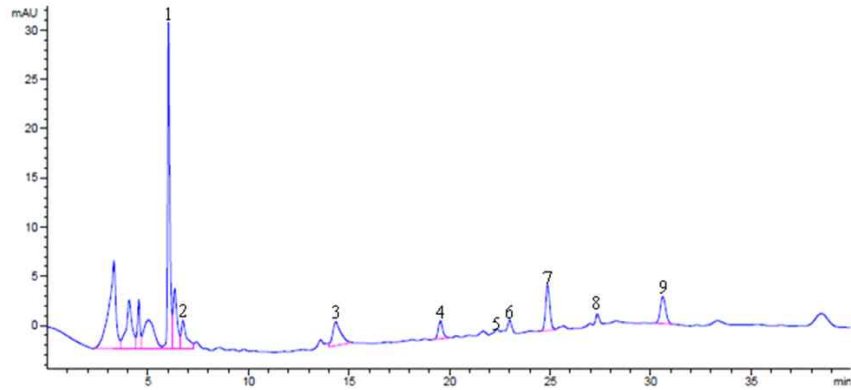


그림 11. 김치의 glucosinolates HPLC chromatogram

1) 5637 세포에서 glucoraphanin과 sulforaphane의 항암활성 비교

실험에 사용된 5637 인체 방광암세포는 한국생명공학연구소(KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 암세포의 배양을 위해 RPMI-1640 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5%, CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 성장배지의 교환을 매 48시간마다 실시하여 적정 수의 세포를 유지하였다.

→ 5637 세포에서 glucoraphanin 및 sulforaphane의 항암활성 비교를 위하여 MTT assay를 실시하였다. MTT assay를 위하여 세포 배양용 6 well plate에 3×10^5 개/ml로 5637 세포를 분주하고 glucoraphanin과 sulforaphane를 배지에 희석하여 각 well 당 적정 농도 및 적정 시간 동안 처리하였다. 처리가 끝난 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Ameresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 37°C에서 3시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 생성된 formazan을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

▶ Glucoraphanin 및 sulforaphane의 처리에 따른 5637 세포 증식에 미치는 영향을 조사한 결과, 그림 12에서 알 수 있듯이 sulforaphane의 처리 농도 및 시간 의존적으로 증식억제 효과를 보였으며, 특히 20 μM 농도의 48시간 처리군에서 약 60% 정도의 증식억제 효과가 있었으나 glucoraphanin 처리군에서는 200 μM 농도의 48시간 처리까지 5637 세포의 증식에 큰 변화를 관찰할 수 없었다.

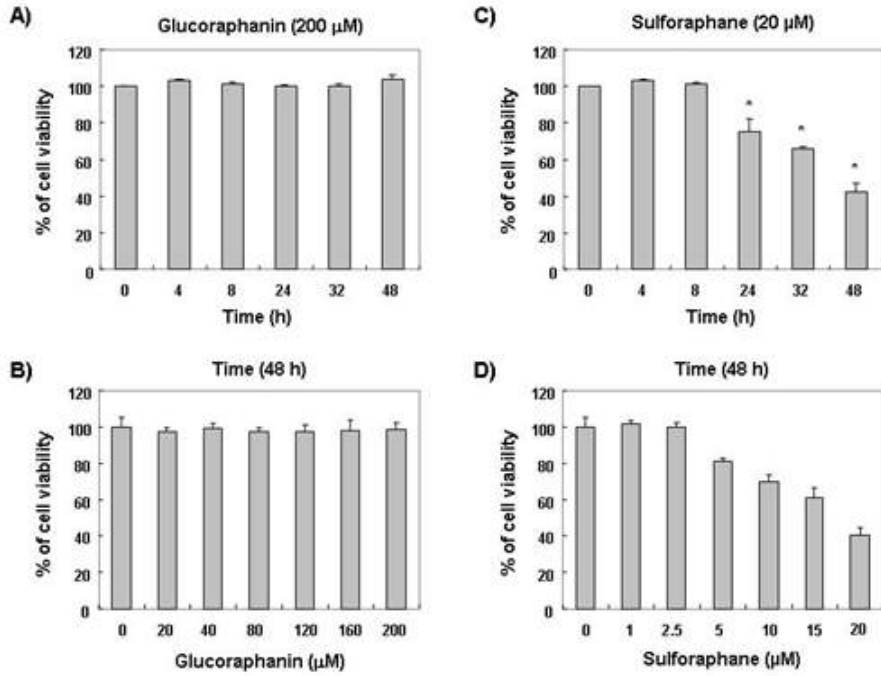


그림 12. 인체 방광암세포(5637 human bladder cancer cells)의 증식에 미치는 glucoraphanin (A & B) 및 sulforaphane (C & D)의 영향

2) Glucoraphanin과 sulforaphane의 복합처리가 5637 세포의 증식에 미치는 영향

그림 12의 결과를 바탕으로 glucoraphanin과 sulforaphane의 복합 처리에 의한 5637 세포 증식 억제 효과의 여부를 조사하기 위하여 200 μM의 glucoraphanin에 20 μM의 sulforaphane을 48시간 동안 동시 또는 단독 처리한 후 MTT assay를 실시하였다.

→ 그림 13의 결과에서 알 수 있듯이 glucoraphanin과 sulforaphane의 복합처리의 경우 5637 세포의 증식억제 경향성은 sulforaphane 단독 처리군에 비하여 유의적인 차이점을 발견할 수 없었다.

▶ Sulforaphane은 glucoraphanin에 비하여 매우 강력한 항암활성을 보인 반면 glucoraphanin의 항암활성은 매우 낮은 것으로 나타났으며, 두 물질의 복합처리에 의한 증식억제 상승효과도 관찰되지 않았다.

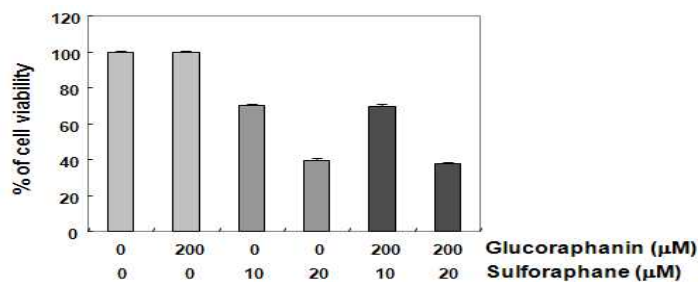


그림 13. Glucoraphanin과 sulforaphane의 복합처리가 5637 인체 방광암세포의 증식에 미치는 영향

3) Sulforaphane에 의한 5637 세포의 apoptosis 유발

이상의 결과에서 sulforaphane이 glucoraphanin에 비하여 강력한 항암활성을 나타내었기에 sulforaphane에 의한 5637 세포의 증식억제가 자가세포사멸(apoptosis) 유도와의 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 핵의 형태 변화 유무와 세포주기의 sub-G1기에 속하는 빈도의 측정 등 두 가지 실험방법을 적용하였다.

① DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

Apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 sulforaphane이 처리된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 phosphate buffered saline (PBS)를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution으로 10분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 cytospin을 이용하여 slide glass에 부착하였다. 세포가 부착된 slide glass를 PBS로 2~3회 정도 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정한 후 2.5 µg/ml 농도의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 처리하여 상온에서 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

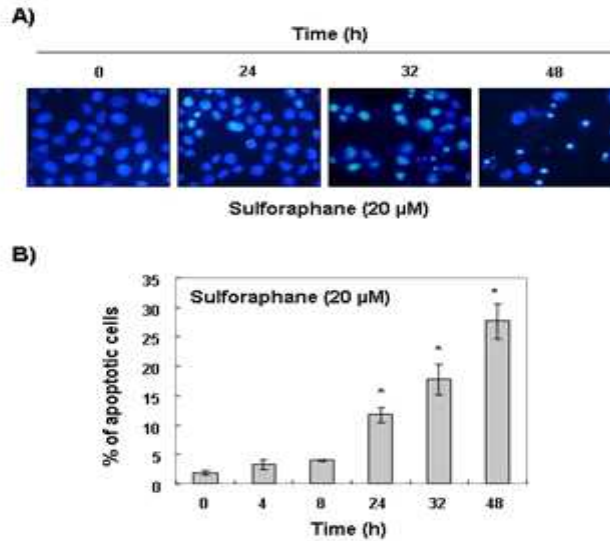


그림 14. Sulforaphane 처리에 의한 5637 인체 방광암세포의 apoptosis 유발

→ 20 µM의 sulforaphane이 함유된 배지에서 배양된 5637 세포를 고정시킨 후 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하여 형광현미경하에서 관찰한 결과, sulforaphane이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상적으로 염색이 되었으나 sulforaphane 처리 시간의 증가에 따라 전체적인 핵의 밀도 감소와 더불어 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질(chromatin) 응축에 의한 apoptotic body 형성의 증가가 관찰되었다(그림 14A).

② Flow cytometry 분석

5637 세포에서 sulforaphane이 유발하는 apoptosis의 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 정상 및 sulforaphane이 처리된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하였다. 준비된 세포는 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson)를 적용시켜 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software 및 ModFit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

→ 20 µM의 sulforaphane이 처리된 5637 세포를 대상으로 DNA flow cytometry를 이용하여 apoptosis가 유발되었을 것으로 예상되는 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도를 측정된 결과는 그림 14B에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 정상배지에서 자란 5637 세포에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 약 2.3%로 매우 낮았으나 sulforaphane 처리 시간의 증가에 따라 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도가 증가하여 24시간 및 48시간 처리군에서는 각각 13.1% 및 27.5% 정도로 증가되었다.

▶ 이상의 결과는 sulforaphane의 처리에 의한 5637 세포의 증식억제 현상은 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 보여주는 것이다.

4) Sulforaphane에 의한 5637 세포의 G2/M arrest 유발

다음은 sulforaphane에 의한 5637 세포의 증식억제가 세포주기 특정 시기의 교란과 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 상기에서 제시한 flow cytometry 분석에 의하여 나타난 결과를 바탕으로 sub-G1기의 세포 빈도를 제외한 나머지 세포들의 분포도를 조사하였다.

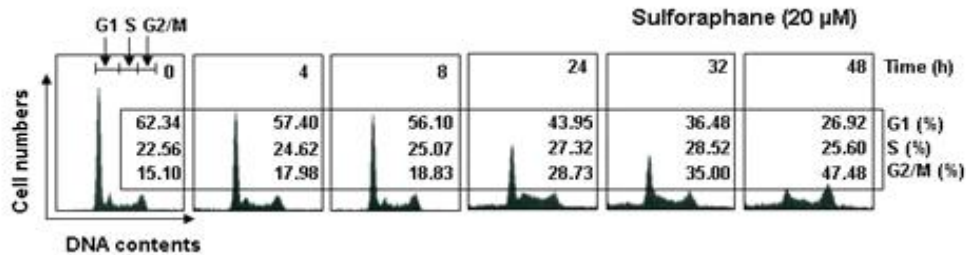


그림 15. 5637 인체 방광암세포의 세포주기 분포도에 미치는 sulforaphane의 영향

→ 20 μM의 sulforaphane이 함유된 배지에서 다양한 시간 동안 배양된 5637 세포를 대상으로 세포주기 빈도를 분석한 결과, sulforaphane이 처리되지 않은 배지에서 배양된 세포의 경우 G1기에 해당되는 빈도는 62.34% 정도였으며, S기 및 G2/M기에 해당되는 세포는 각각 22.56% 및 15.10%로 나타났다(그림 15). 그러나 sulforaphane의 처리 시간이 길어질수록 G1기에 해당되는 세포의 빈도는 점차 감소하여 24시간 및 48시간 처리군에서 각각 43.95% 및 26.92%로 나타났으며, S기에 해당되는 세포의 빈도는 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 G1기의 세포 빈도가 줄어들수록 상대적으로 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 점차 증가되어 24시간 및 48시간 처리군에서 각각 1.9배 및 3.2배로 증가되었다.

▶ 이상의 결과는 sulforaphane의 처리에 의한 5637 세포의 증식억제 현상은 세포주기 G2/M arrest 유발과 연관성이 있음을 보여주는 것이며, 이러한 G2/M arrest는 apoptosis 유발과 연계성을 가지는 것임을 알 수 있었다.

5) Sulforaphane에 의한 5637 세포의 mitotic arrest 유발

Sulforaphane에 의한 5637 세포의 G2/M arrest가 G2 및 M기 중 어느 부분에서 특이적으로 유발되었는지의 여부를 조사하기 위하여 G2-M기의 전이에 관여하는 주요 유전자들의 발현 변화를 조사하였다.

→ 이를 위하여 그림 9의 실험과 동일 조건에서 배양된 세포를 대상으로 Western blot analysis를 실시하였다. 이를 위하여 준비된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 총 단백질을 분리하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 사용방법에 준하여 정량 후 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 동량의 sample을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 antibody를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 Enhanced Chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다.

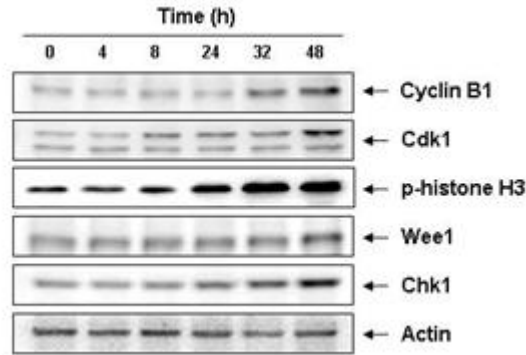


그림 16. 5637 인체 방광암세포에서 G2-M phase 관련 조절 인자들의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향

▶ 그림 16의 결과에서 알 수 있듯이, sulforaphane 처리 시간의 증가에 따라 G2기에서 M기로의 전이를 촉진하는 cyclin B1 단백질의 발현이 매우 증가되었으며, cyclin B1과의 결합을 통하여 활성이 증가되는 cyclin-dependent kinase (Cdk) 1 (Cdc2)의 발현도 동반 상승되었다. 특히 mitotic arrest의 marker 단백질인 histone-3 10번 serine기의 인산화도 sulforaphane 처리 시간의 증가에 따라 매우 증가되어 sulforaphane 처리에 의한 G2/M arrest 현상은 M기, 즉 mitotic arrest에 의한 것임을 알 수 있었다. 한편 Cdk의 인산화를 조절하는 kinase 중의 하나인 Wee1의 발현 및 G2/M기와 연관된 DNA damage 조절에 중요한 checkpoint kinase (Chk) 1과 Chk1의 상위 조절자인 ataxia telangiectasia mutated (ATM)의 발현 증가도 동반되었음을 알 수 있었다.

→ 따라서 sulforaphane에 의한 5637 세포의 증식 억제효과는 G2 arrest가 아닌 mitotic arrest와 관련이 있음을 알 수 있었다.

6) Sulforaphane에 의한 5637 세포의 caspase 활성 증가 및 PARP 단백질의 단편화

Sulforaphane에 의한 5637 세포의 apoptosis 유도에 대한 기전 연구를 위하여 apoptosis 유도에 핵심적인 역할을 하는 caspase의 발현 및 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 caspase 중 extrinsic apoptotic pathway의 개시에 중요한 caspase-8, intrinsic apoptotic pathway의 개시에 중요한 caspase-9 및 caspase-8 및 -9에 의하여 활성화되는 effector caspase 중의 하나인 caspase-3의 발현 및 활성 변화와 활성화된 caspase-3의 대표적인 기질 단백질인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 단편화 유발 여부를 조사하였다.

→ Caspase의 발현 변화를 조사하기 위해서는 상기와 동일한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 Western blot analysis를 실시하였으며, caspase 활성 변화를 조사하기 위해서는 150 µg의 단백질이 함유된 50 µl의 sample에 기질 100 µM이 함유된 reaction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl를 혼합하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 여기에 caspases 종류에 따른 기질 5 µl를 첨가하여 37°C, 암실에서 3시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고 caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다.

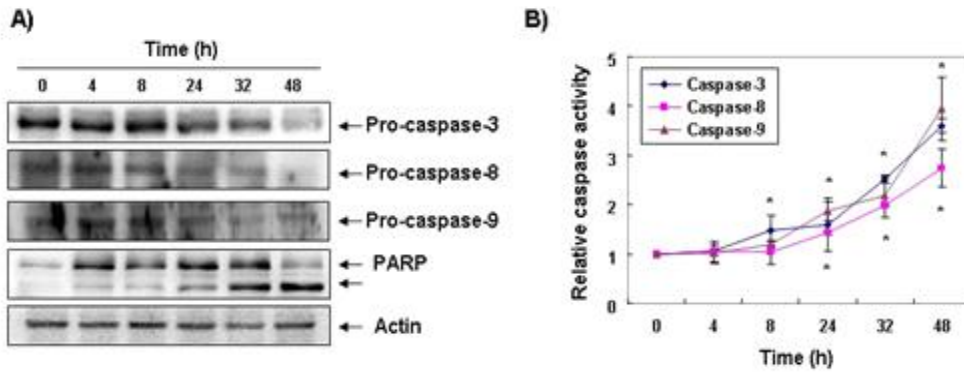


그림 17. 5637 인체 방광암세포에서 sulforaphane 처리에 따른 caspase의 활성화 증가 및 PARP 단백질의 단편화

▶ 그림 17의 결과에서 알 수 있듯이 sulforaphane에 처리에 의하여 불활성형인 pro-caspase-3, -8 및 -9 단백질의 발현은 sulforaphane 처리 시간 의존적으로 감소되었으나 뚜렷한 활성형의 단백질 발현 증가를 정확히 관찰하기는 어려웠다(그림 17A). 비록 활성형 단백질의 발현 변화는 관찰이 어려웠으나 불활성형 발현 감소는 이들 caspase의 활성형 증가를 대별할 것으로 생각되어 in vitro caspases activity assay를 통하여 이들 caspase의 활성 정도를 직접 분석한 결과, sulforaphane 처리에 의하여 caspase-3, -8 및 -9의 활성이 처리 시간 의존적으로 증가하여 48시간 처리군에서는 각각 3.6배, 2.8배 및 3.9배 증가하는 것으로 나타났다(그림 17B). 또한 활성화된 caspase-3에 의하여 특이하게 분해가 일어나서 apoptosis 유발에 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 표적 단백질로서 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 PARP 발현의 감소와 함께 단편화 현상이 관찰되었다(그림 17A).
 → 이러한 결과는 sulforaphane에 의한 5637 세포의 apoptosis 유도는 caspase 활성화 증가가 관련되어 있음을 의미한다.

7) Sulforaphane에 의한 5637 세포의 apoptosis 유발에 미치는 caspase 활성화 저해제의 영향

다음은 sulforaphane에 의한 5637 세포의 apoptosis 유도가 caspase 활성화 의존적으로 일어나는지의 여부를 조사하였다.

→ 이를 위하여 대표적인 pan-caspase inhibitor인 z-VAD-fmk (CalBiochem, San Diego, CA, USA)가 sulforaphane에 의한 apoptosis를 억제할 수 있을지를 조사하였다.

▶ 먼저 핵의 형태 변화를 관찰한 결과, 그림 18A에 나타난 바와 같이 sulforaphane 처리에 의하여 증가된 염색질 응축에 의한 apoptotic body 형성이 z-VAD-fmk 선처리에 의하여 현저하게 감소되었으며, sulforaphane 처리에 의한 PARP 단백질의 단편화도 z-VAD-fmk 선처리에 의하여 억제되었음을 알 수 있었다(그림 18B). 또한 동일 조건에서 sulforaphane에 의한 apoptotic sub-G1의 빈도 증가가 z-VAD-fmk 선처리에 의하여 유의적으로 감소하였으며(그림 19A), 이는 sulforaphane에 의한 5637 세포의 세포증식 억제 차단과 연계성이 있었다(그림 19B).

→ 이상의 결과는 sulforaphane에 의한 5637 세포의 apoptosis 유도가 caspase 활성화 증가 의존적으로 이루어짐을 의미한다.

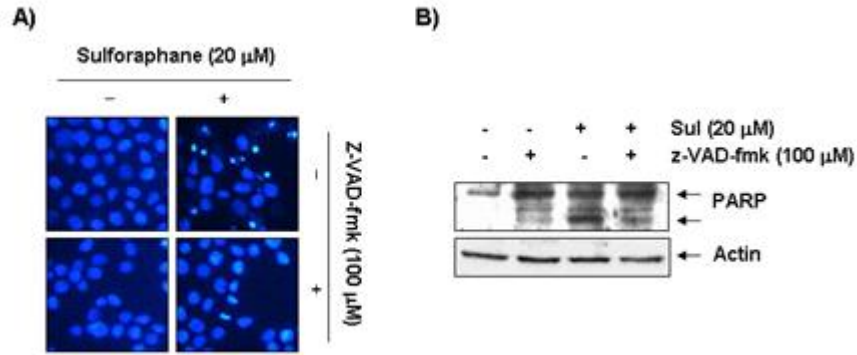


그림 18. Sulforaphane 처리에 의한 5637 인체 방광암세포의 염색질 응축 및 PARP 단편화에 미치는 pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk의 영향

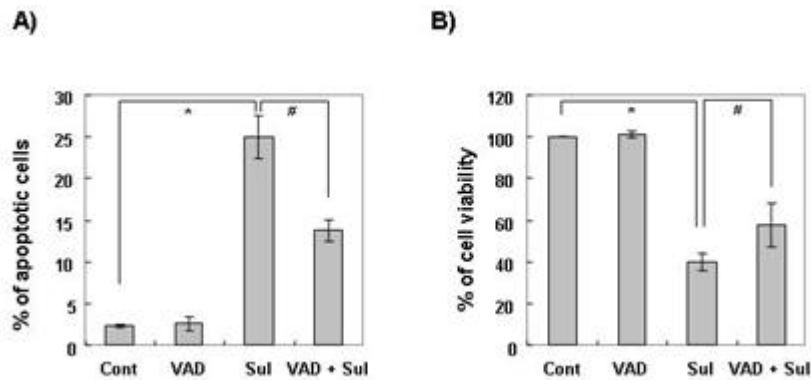


그림 19. Sulforaphane 처리에 의한 5637 인체 방광암세포의 apoptosis 유발 및 증식억제에 미치는 pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk의 영향

8) Sulforaphane에 의한 5637 세포의 apoptosis 유발과 ROS 및 미토콘드리아 기능과의 상관성

: Sulforaphane의 항암활성에 대한 추가적인 기전 연구를 위하여 sulforaphane에 의한 5637 세포의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 여부와 이와 연관된 미토콘드리아의 기능을 조사하였다.

→ 이를 위하여 5637 세포를 적정량 분주하여 안정화시킨 후, 20μM의 sulforaphane을 처리한 후 적정시간 간격으로 ROS의 생성 여부를 10 μM의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 사용하여 37° C 암조건에서 15분간 염색하고, flow cytometer를 이용하여 sulforaphane 처리에 따른 ROS 생성 여부를 확인하였으며, 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP, Ψm) 변화의 여부를 조사하기 위해서는 dual-emission potential-sensitive probe인 10 μM의 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1)를 이용하여 37° C, 암하에서 30분간 염색 후 flow cytometer를 이용하여 분석하였다.

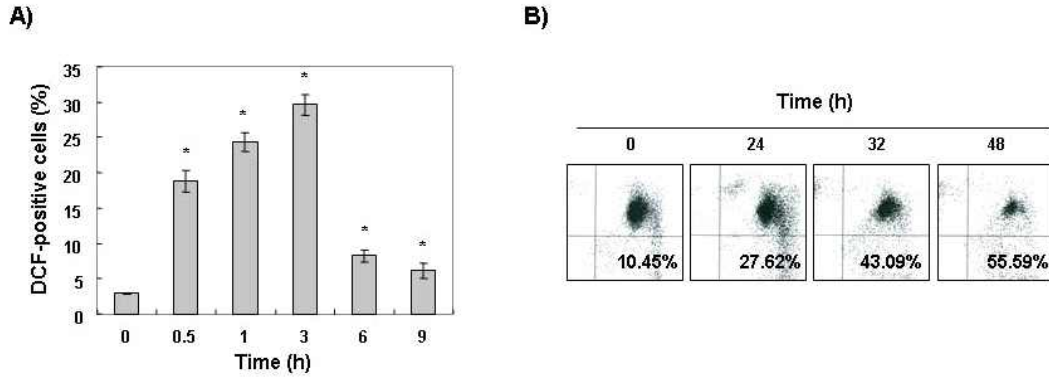


그림 20. 5637 인체 방광암세포에서 sulforaphane 처리에 의한 ROS 생성의 증가 및 미토콘드리아 기능의 손상

▶ 그림 20A의 결과에서 알 수 있듯이 sulforaphane이 처리된 5637 세포에서, 처리 30분 이내부터 ROS의 생성량이 증가하여 3시간 처리 후 대조군에 비하여 약 30배 정도로 증가되었다. 그 후 시간의 경과에 따라 ROS의 생성량은 점차 감소되어 9시간 이후부터는 대조군 수준으로 감소되었다. 즉 sulforaphane 처리 초기 단계에 ROS의 생성량이 매우 증가되었음을 알 수 있었다. MMP의 경우 sulforaphane 처리 24시간 이후부터 유의적인 소실 현상이 감소되어 48시간 처리군에서는 약 5배 이상의 MMP 소실을 관찰할 수 있었다(그림 20B). 이는 미토콘드리아막이 depolarization되어 미토콘드리아막이 hyperpolarization되었음을 보여주는 것으로 sulforaphane의 처리에 의하여 미토콘드리아의 기능 손상이 초래되었음을 의미하는 결과이다.

→ 이상의 결과는 sulforaphane 처리에 의한 ROS 생성이 미토콘드리아 기능 손상에 기여했을 가능성을 보여주는 결과로 해석할 수 있다.

9) Sulforaphane에 의한 5637 세포의 ROS 생성에 미치는 ROS 생성 저해제의 영향

: 그림 20의 결과에서 관찰된 ROS 생성과 연관된 미토콘드리아 기능 손상이 직접적으로 연관되어 있는지의 여부를 조사하였다.

→ 이를 위하여 대표적인 ROS scavenger인 N-acetyl L-cysteine (NAC)을 전처리한 후 적정시간 동안 sulforaphane을 처리하고 ROS의 생성 정도 및 MMP의 변화를 비교하였다.

▶ 그림 21A의 결과는 10 mM의 NAC을 2시간 동안 선처리한 후 sulforaphane을 3시간 동안 처리한 후 ROS의 생성 정도를 비교한 것으로, NAC 만을 처리한 경우에도 대조군에 비하여 ROS 생성량이 감소되었으며, sulforaphane 단독 처리군과 비교할 경우, 거의 대조군 수준으로 ROS 생성량이 감소되어 NAC에 의한 ROS 생성의 차단이 효과적으로 이루어지고 있음을 보여주었다. 이를 바탕으로 10 mM의 NAC을 2시간 동안 선처리한 후 sulforaphane을 48시간 동안 처리한 후 MMP의 변화 정도를 관찰한 결과는 그림 21B에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이, sulforaphane 단독 처리군에서 관찰된 MMP의 소실이 NAC 선처리에 의하여 현저하게 억제되었음을 알 수 있었다.

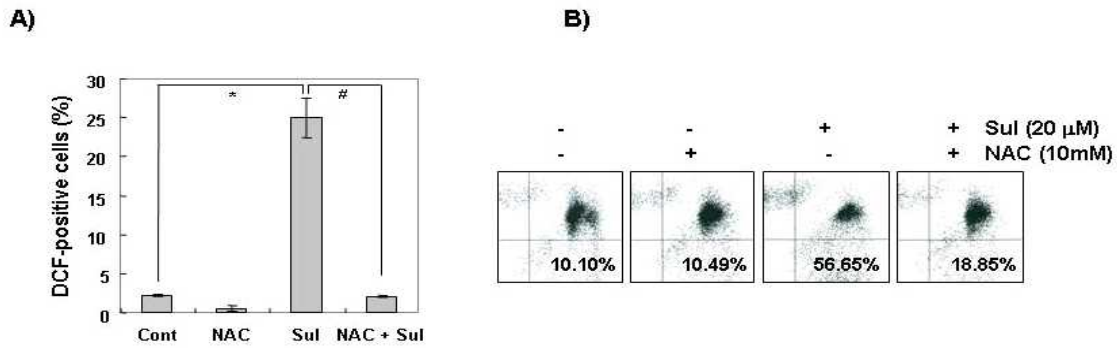


그림 21. 5637 인체 방광암세포에서 sulforaphane 처리에 의한 ROS 생성의 증가 및 미토콘드리아 기능의 손상에 미치는 ROS 생성 저해제의 영향

→ 이상의 결과는 sulforaphane 처리에 의한 MMP 소실이 ROS 생성 의존적으로 이루어지고 있을 가능성을 보여주는 것이다.

10) Sulforaphane에 의한 5637 세포의 apoptosis 유발에 미치는 ROS의 중요성

: 그림 21의 결과에서 관찰된 ROS 생성 의존적 MMP의 소실, 즉 미토콘드리아 기능의 손상이 apoptosis 유발과 직접적인 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다.

→ 이를 위하여 NAC을 2시간 전처리한 후 48시간 동안 sulforaphane이 처리된 5637 세포 핵의 형태적 변화, PARP 단편화에 미치는 영향, flow cytometry 분석에 의한 apoptosis의 정량적 분석 및 MTT assay에 의한 생존율 등을 조사하였다.

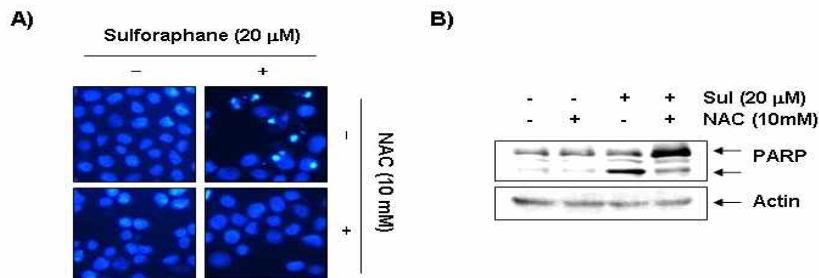


그림 22. 5637 인체 방광암세포에서 sulforaphane 처리에 의한 염색질 응축 및 PARP 단편화에 미치는 ROS 생성 저해제의 영향

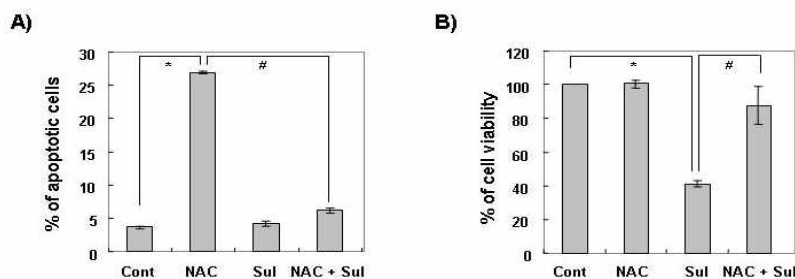


그림 23. Sulforaphane 처리에 의한 5637 인체 방광암세포의 apoptosis 유발 및 증식 억제에 미치는 ROS 생성 저해제의 영향

- ▶ ① Sulforaphane에 의한 5637 세포 핵의 형태적 변화에 미치는 ROS 차단의 효과: 그림 22A에 나타난 바와 같이 NAC의 선처리에 의하여 sulforaphane 단독 처리에 의한 염색질 응축 및 apoptotic body 형성의 증가가 거의 완벽하게 차단되었다.
 - ▶ ② Sulforaphane에 의한 5637 세포의 PARP 단편화에 미치는 ROS 차단의 효과: 그림 22B에 나타난 바와 같이 NAC의 선처리에 의하여 sulforaphane 단독 처리에 의한 PARP 단편화가 효과적으로 차단되었다.
 - ▶ ③ Sulforaphane에 의한 5637 세포의 sub-G1 빈도 증가에 미치는 ROS 차단의 효과: 그림 23A에 나타난 바와 같이 NAC의 선처리에 의하여 sulforaphane 단독 처리에 의한 apoptotic 빈도의 증가가 거의 대조군 수준으로 억제되었다.
 - ▶ ④ Sulforaphane에 의한 5637 세포의 증식억제에 미치는 ROS 차단의 효과: 그림 23B에 나타난 바와 같이 NAC의 선처리에 의하여 sulforaphane 단독 처리에 의한 세포증식 억제 효과가 유의적으로 차단되었다.
- 이상의 결과는 5637 세포에서 sulforaphane 처리에 의한 apoptosis의 유발이 ROS 생성 의존적으로 이루어지고 있음을 보여주는 것이다. 즉 sulforaphane 처리에 의한 초기 ROS의 생성 증가가 미토콘드리아의 기능 손상을 유발하였으며, 이로 인한 apoptotic 활성 신호가 시작되었음을 보여 주는 결과이다.

11) Sulforaphane에 의한 5637 세포의 mitotic arrest 유발에 미치는 ROS의 중요성

: 이상의 결과에서 sulforaphane 처리에 의한 5637 세포의 apoptosis의 유발은 ROS 생성 의존적으로 이루어지고 있음을 확인하였기에, sulforaphane 처리에 의한 5637 세포의 mitotic arrest 역시 ROS 생성 의존적으로 이루어지는지를 조사하였다.

→ 이를 위하여 NAC을 2시간 전처리한 후 48시간 동안 sulforaphane이 처리된 5637 세포에서 분리된 단백질을 이용한 Western blot 분석 및 flow cytometry 분석에 세포주기 분포도의 정량적 변화를 조사하였다.

▶ 그림 24A의 결과에서 알 수 있듯이 sulforaphane 처리에 의하여 증가된 cyclin B1과 Cdk1의 발현 및 histone H3의 인산화 증가가 NAC 선처리에 의하여 거의 대조군 수준으로 억제되었으며, sulforaphane 처리에 의한 G2/M기에 속하는 세포의 빈도 역시 대조군 수준과 유사하게 나타났다(그림 24B).

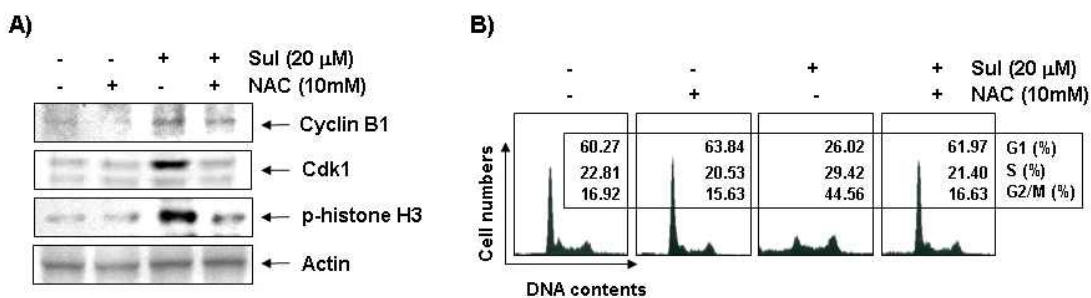


그림 24. Sulforaphane 처리에 의한 5637 인체 방광암세포의 mitotic arrest에 미치는 ROS 생성 저해제의 영향

→ 이는 5637 세포에서 sulforaphane 처리에 의한 mitotic arrest 역시 ROS 생성 의존적으로 이루어지고 있음을 보여주는 것이다.

이상의 결과는 ITCs 계열의 대표적인 물질 중에 하나인 sulforaphane은 인체방광암 5637 세포에서 ROS 생성 의존적으로 mitotic arrest와 apoptosis를 유발시킴으로서 강력한 항암 효능을 지니고 있음을 의미한다. 비록 몇몇 선행연구에서 sulforaphane에 의한 apoptosis 유발이 ROS 생성 의존적으로 이루어지고 있다고 보고된 바 있으나, ROS 의존적으로 암세포의 mitotic arrest가 유발된다는 점은 최초로 보

고되는 결과이다.

라. 기능성이 증진된 항암 김치 제조 -스타터(starter) 연구

항암 기능성 김치 레시피에 probiotic 기능을 가지는 유산균을 스타터(starter)로서 첨가하여 그 기능을 더욱 증진시킬 수 있다. 유산균은 맛있는 김치로부터 직접 분리한 *Lactobacillus plantarum*과 *Leuconostoc mesenteroides*를 $10^6/g$ 으로 첨가하여 제조한다. 내산성, 내담즙성 등의 기능성 실험을 통하여 이 두 가지 유산균의 probiotic 효과 및 이들을 첨가한 김치의 효과를 알아보았다.

1. 스타터 선정(위산 및 담즙산에 대한 내성, 열안정성)

Probiotics로 이용되기 위한 미생물의 조건으로서 생체에 대한 안전성, 제조 및 유통과정의 안정성 및 보존성, 장관내 소화효소와 위산 및 담즙산에 대한 내성, 열 안정성, 유해세균 항균력 등이 요구된다.

1) 실험에 사용된 균주

실험에 사용한 5 가지 균주는 아래와 같다.

Lactobacillus plantarum PNU (전주지역에서 제조한 맛과 기능성이 좋은 김치에서 분리동정, KCTC 11352P), *Lactobacillus plantarum* (본 연구실의 항암김치 레시피로 제조한 김치에서 분리동정), *Leuconostoc mesenteroides* PNU (본 연구실의 항암김치 레시피로 제조한 김치에서 분리동정, KCTC 11353P), *Lactobacillus sakei* (본 연구실의 항암김치 레시피로 제조한 김치에서 분리동정), *Lactobacillus Rhamnosus* GG(ATCC 53103)

2) 분리 균주의 내산성 및 내담즙산성

장관 내 소화효소와 위산 및 담즙산에 대한 내성을 측정하였다(그림 25). 분리균주의 내산성을 측정한 결과 가장 높은 내성을 보인 균주는 *Lactobacillus plantarum* PNU이며 다음으로 *Lactobacillus plantarum* PNU와 *Leuconostoc mesenteroides*의 혼합, *Leuconostoc mesenteroides* PNU, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* GG 순으로 나타나는 것을 관찰하였다. 담즙산에 대한 내성을 측정 결과 *Leuconostoc mesenteroides* PNU, *Lactobacillus plantarum* PNU와 *Leuconostoc mesenteroides*의 혼합, *Lactobacillus plantarum* PNU, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus sakei* 순으로 나타났다. *Lactobacillus plantarum* PNU의 위산에서의 생존율이 유의적으로 가장 높게 나타났고($p < 0.05$), *Leuconostoc mesenteroides* PNU의 담즙산에서의 생존율이 유의적으로 높게 나타났고($p < 0.05$). 이는 유용한 생균제가 장내에서 그 기능을 다하기 위해서 장내 위장의 낮은 pH와 소장의 담즙에 대한 강한 내성을 보여야 한다는 점을 고려할 때 두 가지 균주가 바람직한 특성을 지니고 있음을 알 수 있다. 또한 위산에 강한 내성을 갖는 *Lactobacillus plantarum* PNU균주와 담즙산에 강한 내성을 갖는 *Leuconostoc mesenteroides* PNU를 혼합할 경우 위산 뿐만 아니라 담즙산 환경 모두에 강한 내성을 가질 수 있을 것으로 기대된다.

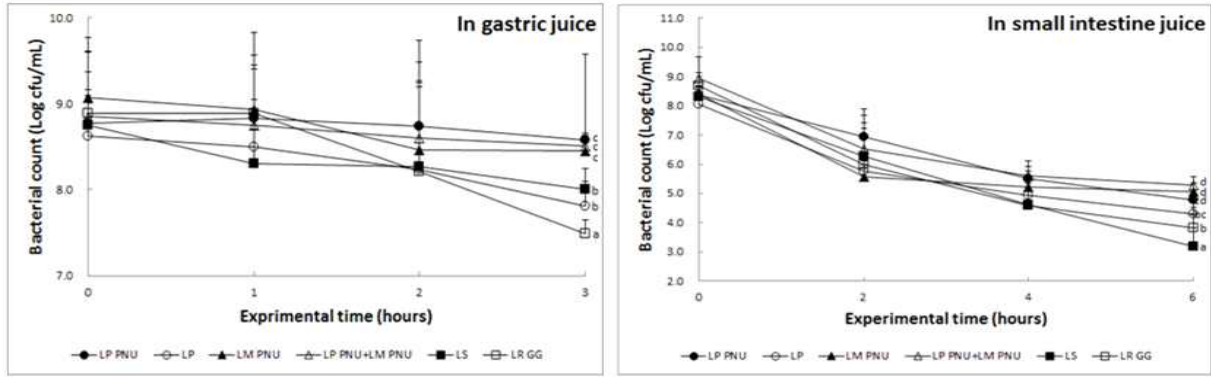


그림 25. 분리균주의 내산성 및 내담즙산성

3) 열안정성 측정

55° C의 항온수조에서 장시간동안 가열하며 시간별 유산균 생존율의 변화를 조사한 결과는 그림 26에 나타난 바와 같다. *Lactobacillus plantarum* PNU가 가장 높은 생존율을 보였으며 *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum* PNU와 *Leuconostoc mesenteroides* PNU의 혼합, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* 순으로 나타났다. 따라서 *Lactobacillus plantarum* PNU, *Leuconostoc mesenteroides* PNU를 항암김치에 첨가할 스타터로 적합할 것으로 보인다.

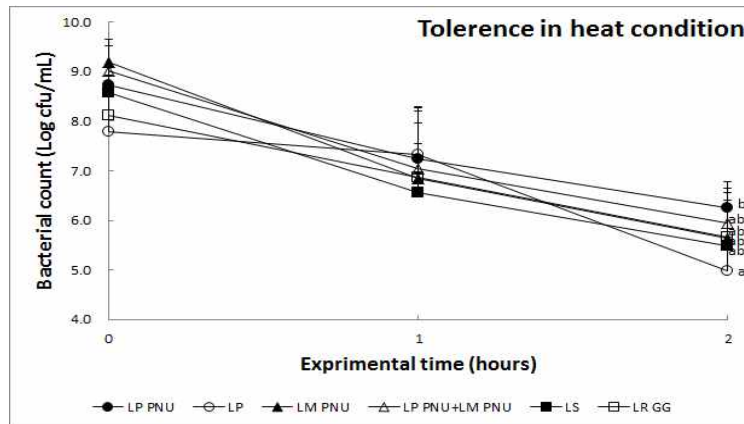


그림 26. 분리균주의 열안정성

2. 스타터 첨가 김치의 발효 특성 및 기능성

1) 스타터 첨가 김치의 제조

김치 제조에 사용된 친환경배추는 강원도 평창에서 재배한 충광으로 (주)광주김치 감칠배기에서 제공받아 사용하였다. 갓은 여수 돌산갓을 구입하였으며 겨우살이 추출물은 (주)아이에스푸드(부산 기장군)에서 구입하였다. 이 외에 고춧가루(주)영양 F&S, 경북 영양), 멸치액젓(주)대상, 충남 천안), 설탕(제일제당, 인천), 산초가루(전원식품, 경기도 김포시), 마늘, 생강, 무, 배, 버섯, 다시마 등은 부산 금정구 구서동의 E마트에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 김치는 부산대학교 김치연구소의 항암김치 레시피를 이용하여 제조하였으며, 유산균 starter는 10⁶ cfu/g의 농도로 조절하여 양념소에 첨가하여 혼합하였다. 이에 따라 총 6종의 김치, 즉 단

일 starter를 첨가한 김치(LPpnuK, LP3099K, LMpnuK), 두가지 starter를 1:1의 비율로 혼합하여 첨가한 김치(LPpnu/LMpnuK, LP3099/LMpnuK), 자연발효 김치(NK)가 제조되었다. 제조한 각 김치를 15°C에서 6일간 보관하며 일정기간마다 시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

2) pH 및 산도의 변화

김치에서의 starter 첨가에 따른 발효기간 중의 pH 및 산도의 변화는 그림 27에 나타난 바와 같다. 발효 초기에는 pH 및 산도가 김치 간 큰 차이를 보이지 않고 발효의 진행속도가 비슷하였다. 반면, 발효 2일 부터 starter 첨가 김치와 자연발효 김치 사이에 큰 차이를 보이며 starter 첨가 김치에서 pH의 감소와 산도의 증가속도가 빠른 것으로 나타났다($p < 0.05$).

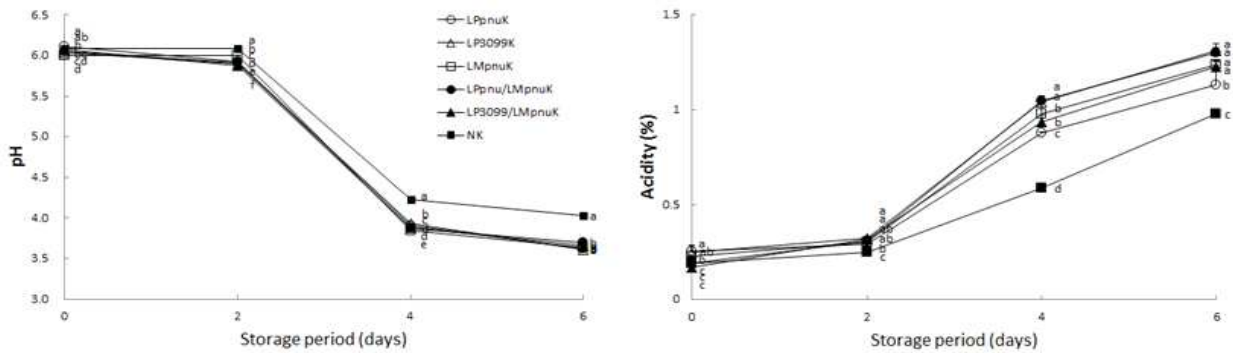


그림 27. 스타터 첨가 김치의 pH 및 산도 변화

3) 총호기성세균 및 유산균 수 변화

각 김치의 발효일수 경과에 따른 총호기성 세균 및 유산균수의 변화를 조사하여 그림 28에 나타내었다. 총호기성 세균은 발효초기에 starter를 첨가한 김치에서 자연발효 김치보다 높은 것으로 나타났으나 이후 자연발효 김치에서 빠른 증가율을 보이며 발효 4일째에는 starter 첨가 김치보다 높은 총호기성 균수를 보였다($p < 0.05$). 그러나 발효 6일차에는 모두 10^8 cfu/mL 수준으로 상승하였고, 각 김치 간 유의한 차이를 보이지 않았다.

총 *Leuconostoc* sp.의 경우 자연발효 김치는 발효 초기 3.5×10^3 cfu/mL에 비해 LMpnuK는 5.0×10^6 cfu/mL으로 높은 균수를 관찰 할 수 있었고 발효가 진행됨에 따라 *Leuconostoc*을 첨가한 김치들 (LMpnuK, LPpnu/LMpnuK, LP3099/LMpnuK)는 1.5×10^8 cfu/mL까지 상승하였다. 나머지 김치들에서는 발효 2일차부터 비슷한 변화양상을 보이며 큰 차이는 보이지 않았다. 총 *Lactobacillus* sp.는 제조 즉시에는 *Lactobacillus*를 첨가한 김치에서 높은 수를 보였으나($p < 0.05$) 발효 2일차부터는 큰 차이를 보이지 않았고, 발효 6일차에 모두 1.3×10^8 cfu/mL으로 상승하여 유의적인 차이가 없었다.

Starter 첨가 김치의 경우 발효초기부터 유산균의 수가 높고 완만한 변화를 보이는 반면, starter를 첨가하지 않은 김치는 급격한 변화를 나타내었다.

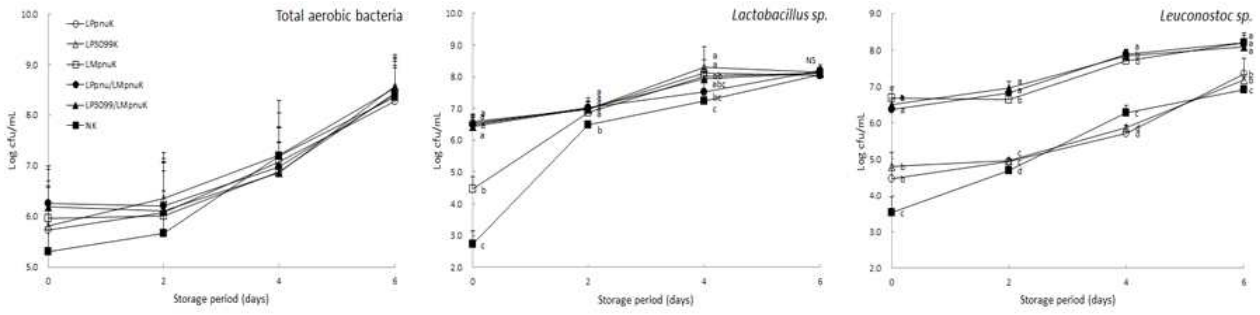


그림 28. 총호기성 세균, *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp. 수 변화

4) 조직감 변화

탄력성은 그림 29에 나타난 바와 같이, 발효기간 중 starter를 첨가한 김치가 자연발효 김치보다 높은 탄력성을 보였다. 발효 4일차와 6일차에 pH 4 이하로 떨어진 starter 첨가 김치가 pH 4 이상을 유지하는 자연발효 김치보다 조직감 측정에서 높게 나타났다.

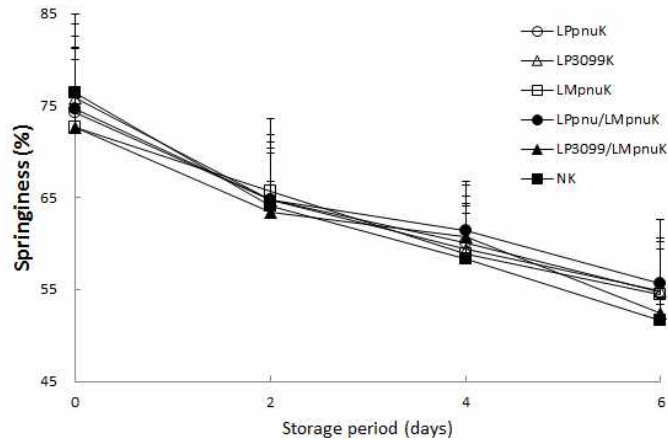


그림 29. 조직감 변화

5) 관능검사

각각의 다른 starter와 자연발효 김치를 15°C에서 4일간 발효시켜 관능검사를 실시하였다. 그 결과 starter를 첨가한 김치가 자연발효 김치보다 종합적 평가와 조직감 항목에서 더 높은 점수로 평가되었다 (그림 30). 종합적 평가에서 가장 높은 점수를 받은 김치는 LMpnuK(5.9)였으며 NK가 4.8으로 가장 낮은 점수를 받았다. 조직감은 NK에서 5.1으로 나타난 반면, starter 첨가 김치에서는 LPpnuK; 5.3, LP3099K; 5.2, LMpnuK; 5.6, LPpnu/LMpnuK; 5.9, LP3099/LMpnuK; 5.8으로 나타나 starter 첨가 김치가 더 높은 점수를 받았다. 그리고 *Lactobacillus*와 *Leuconostoc* 혼합한 starter 첨가 김치에서 단일 starter만 첨가한 김치보다 종합적 평가에서 높은 점수를 받은 것으로 나타났으며 LP3099를 첨가한 김치보다 LPpnu를 단독 또는 혼합으로 첨가한 김치에서 모두 높은 점수를 받았다. 자연발효 김치는 쓴맛이나 군덕맛 등의 부정적인 척도를 나타내는 항목에서 starter 첨가 김치에 비해 높은 점수를 받았다. Starter 첨가 김치는 군덕맛의 점수가 낮고 탄산맛의 점수가 높은 것으로 평가되었다. 이것으로 starter의 첨가가 김치의 시원한 맛은 높이면서 군덕맛과 쓴맛을 낮추어 관능적인 만족도를 높이는 것으로 나타났다. 또한 조직감 역시 starter를 첨가하지 않을 때 보다 높게 나타나 김치의 조직은 물러지지 않으면서 맛을 증진시키는 것을 확인하였다.

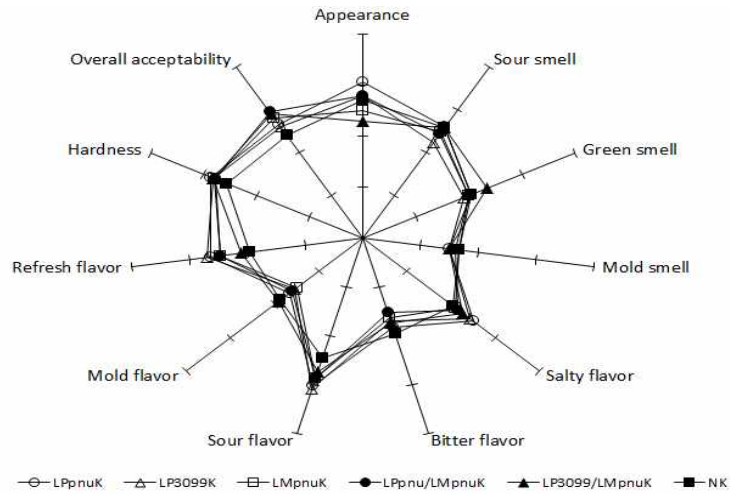


그림 30. 관능검사

6) DPPH 및 hydroxyl radical 소거능

15°C에서 4일간 숙성한 김치의 추출물의 DPPH radical 소거능 측정 결과를 그림 31에 나타내었다. 측정 결과 각 김치의 DPPH radical 소거 효과는 LPpnuK의 경우 60.6%, LP3099K는 59.6%, LMpnuK는 58.1%, LPpnu/LMpnuK는 54.5%, LP3099/LMpnuK는 51.3%을 나타내었고, NK가 40.9%의 소거능을 나타내어 유산균 starter 첨가 김치가 유의적으로 높은 DPPH radical 소거능을 나타냄을 확인하였다($p < 0.05$). 특히 LPpnuK가 다른 김치에 비해 가장 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었고, 이는 NK에 비해 약 1.5배 정도 높았다. 2가지 균주를 혼합하여 사용한 김치의 경우 단독 균주 사용 김치에 비해 그 소거능이 다소 감소하긴 하였으나, 이 역시 NK에 비해 유의적으로 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었다($p < 0.05$).

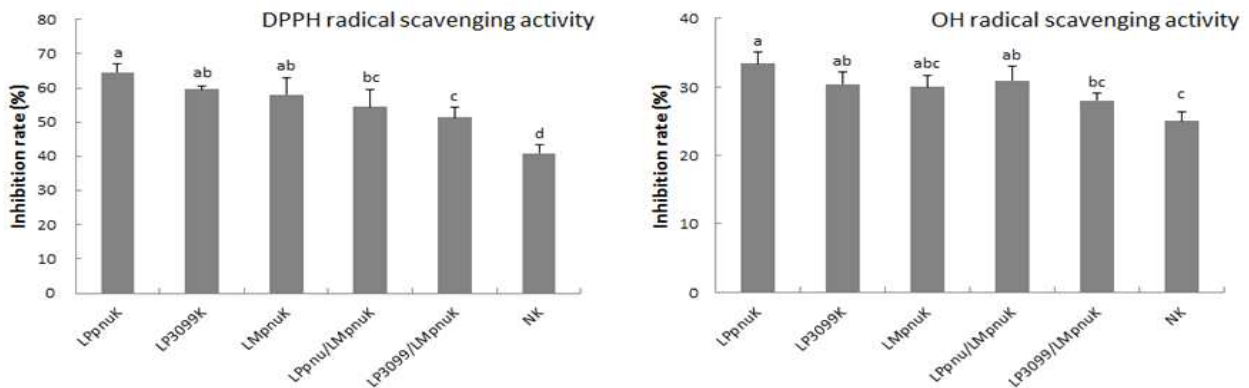


그림 31. DPPH 및 Hydroxyl radical 소거능

Hydroxyl radical 소거능은 DPPH radical 소거능 결과와도 동일하게 NK에 비해 starter 첨가 김치에서 hydroxyl radical 소거능이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 각 김치의 hydroxyl radical 소거능은 LPpnuK에서 33.4%, LP3099K는 30.4%, LMpnuK는 30.0%, LPpnu/LMpnuK는 30.9%, LP3099/LMpnuK는 28.0%, NK는 25.1%로 나타났다. LPpnuK에서 가장 hydroxyl radical 소거능이 높았고, single starter 김치에서 mixed starter 김치보다 높은 소거효과를 확인하였다. 본 실험결과 LP3099를 첨가한 김치보다 LPpnu를 첨가한 김치에서 유의적으로 높은 hydroxyl radical 소거능을 보여 LPpnu starter의 뛰어난 항산화효과를 확인하였다.

7) HCT-116 및 HT-29 인체 대장암 세포에서의 암세포 성장 저해 효과

본 연구에서는 starter 첨가 김치의 HCT-116 인체 대장암 세포에 대한 성장 억제 효과를 알아보기 위해 MTT-assay 방법으로 암세포 저해율을 측정하였다(그림 32). 그 결과 자연발효 김치(NK)의 암세포 성장 저해율은 63.4%이었으나 Starter 첨가 김치의 암세포 성장 저해율은 단일 starter 김치인 LPpnuK는 77.1%, LP3099K는 72.6%, LMpnuK는 72.9%이었으며, 혼합 starter 김치인 LPpnu/LMpnuK는 72.1%, LP3099/LMpnuK는 70.6%로 나타났다. 모든 starter 첨가 김치에서 자연발효 김치보다 유의적으로 높은 성장 저해율을 나타냈고($p < 0.05$), starter 첨가 김치 중 가장 높은 저해율을 보인 것은 LPpnuK이었다.

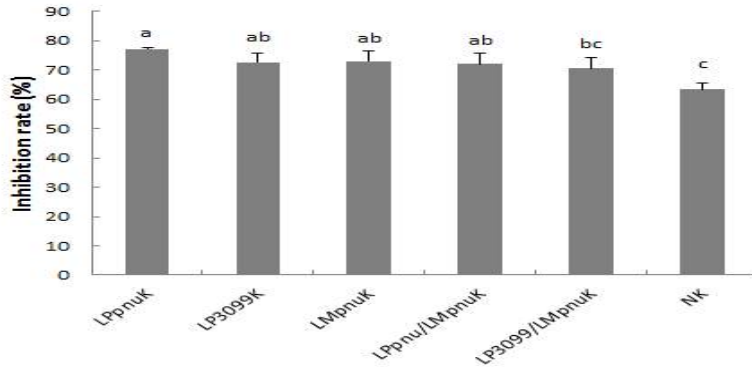


그림 32. HCT-116 인체 대장암세포에서의 암세포 성장 저해효과

각 김치의 추출물을 HT-29 인체 대장암 세포에 처리한 결과(그림 33), NK(51.9%)에 비해 starter 첨가 김치에서 유의적으로 높은 암세포 성장 저해율을 보였으며($p < 0.05$), 그 중 가장 높은 효과를 나타낸 것은 LPpnuK(68.8%)이었다. 또한 단일 starter 김치인 LP3099K는 64.1%, LMpnuK는 64.2%이었으며, 혼합 starter 김치인 LPpnu/LMpnuK는 60.1%, LP3099/LMpnuK는 59.6%의 암세포 성장 저해율을 나타내어 HCT-116 세포에서와 같이 단일 starter 김치가 혼합 starter 김치 보다 높은 암세포 성장 저해 효과를 가지는 것으로 나타났다.

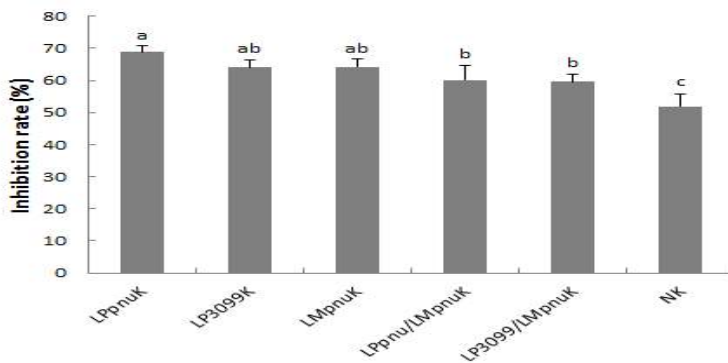


그림 33. HT-29 인체 대장암세포에서의 암세포 성장 저해효과

8) 아포토시스, p53, p21 및 염증에 관련된 유전자 발현에 미치는 효과

Bax 및 Bcl-2 mRNA 유전자의 발현: 김치 추출물 처리에 따른 HT-29 세포에서의 Bax 및 Bcl-2 유전자의 mRNA의 발현을 관찰한 결과(그림 34), Bax mRNA는 모든 김치에서 유전자 발현이 유의하게 증가하였고, Bcl-2는 유의하게 유전자 발현이 감소하였다($p < 0.05$). 가장 높은 효과를 보인 것은 LPpnuK와 LP3099K로 역시 단일 starter 김치에서 효과가 높았으며, LPpnu를 starter로 이용한 김치에서 LP3099를

이용한 김치보다 높은 효과를 보여주었다. NK에 비해 starter를 첨가한 김치에서의 감소한 anti-apoptotic Bcl-2의 발현과 증가된 pro-apoptotic Bax의 발현은 김치에 첨가된 starter가 HT-29 대장 암세포의 아포토시스 유도에 더 큰 효과를 나타내었다고 하겠다.

p53 및 p21 mRNA 유전자의 발현: 김치 추출물을 처리한 후 p53, p21의 발현을 관찰한 결과, p53, p21 모두에서 가장 높은 발현을 보인 것은 LPpnuK이었으며 NK에 비해 p53은 약 2.0배, p21은 약 1.8배 높은 발현량을 보였다. LP3099K는 NK에 비해 p53은 약 2.0배, p21은 약 1.5배 높은 발현 효과를 보였다. 이상의 결과로 starter 첨가 김치 추출물이 p53, p21의 발현을 증가시켜 대장암 세포의 세포 증식 억제에 영향을 미치는 것을 확인하였고 특히 단일 starter를 이용한 김치에서 그 효과가 높은 것으로 나타났다.

iNOS 및 COX-2 mRNA 유전자의 발현: Starter 김치가 가지는 염증 유전인자의 발현억제 효과를 조사하기 위해 iNOS와 COX-2 mRNA 발현 변화를 측정하였다. Starter 첨가 김치에서 자연발효 김치보다 iNOS와 COX-2의 유전자 발현이 감소되었고, LPpnuK가 iNOS와 COX-2의 유전자 발현을 가장 많이 감소시키는 것으로 나타났다.

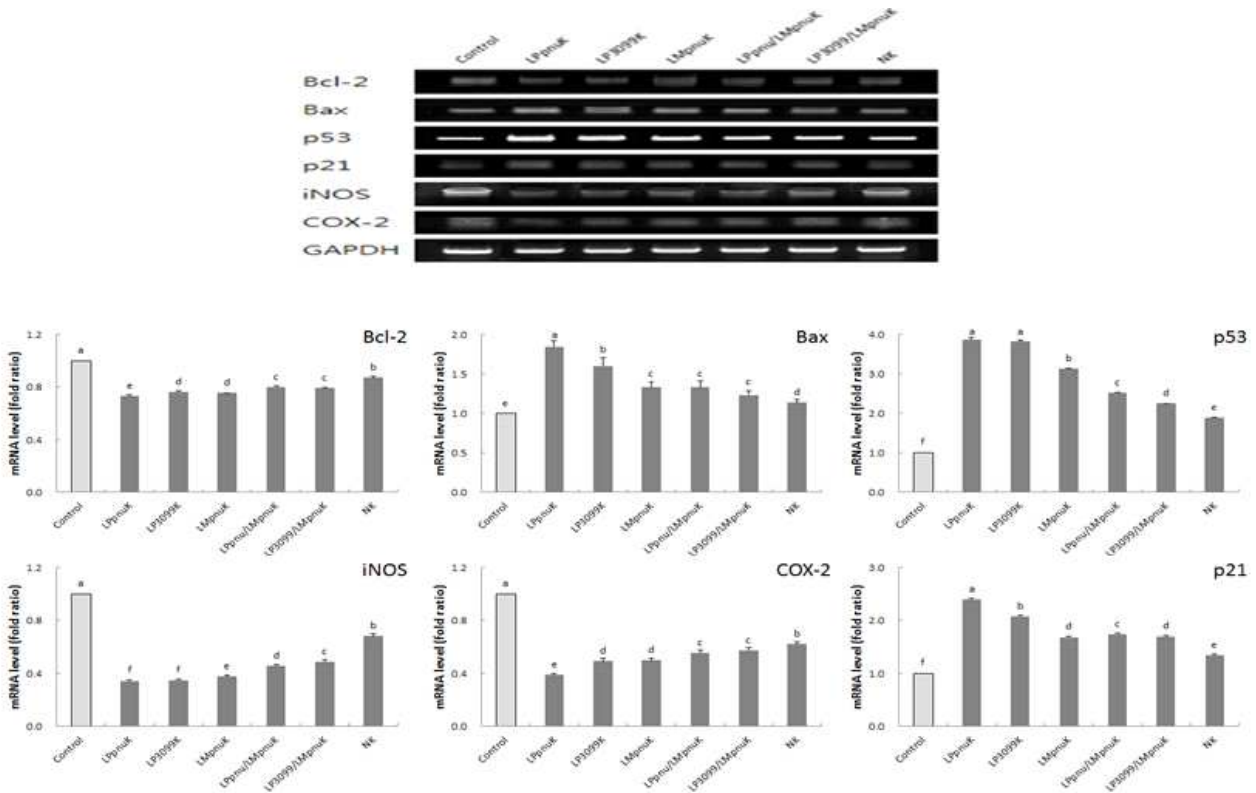


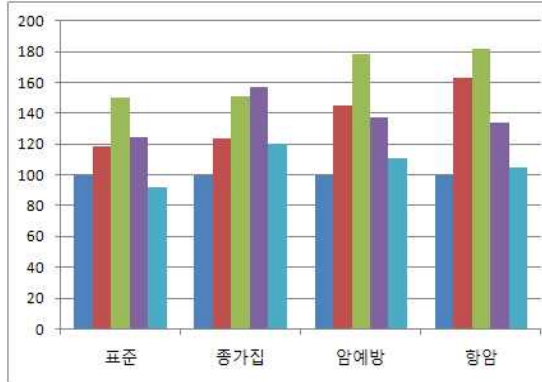
그림 34. HT-29 인체 대장암세포에서의 apoptosis, p53, p21, 염증 관련 유전자 발현

-제2세부과제-

가. 위암 세포주에 대한 항암 활성 연구

(1) 동결건조김치 농도와 세포주에 따른 세포 독성 관찰

A



B

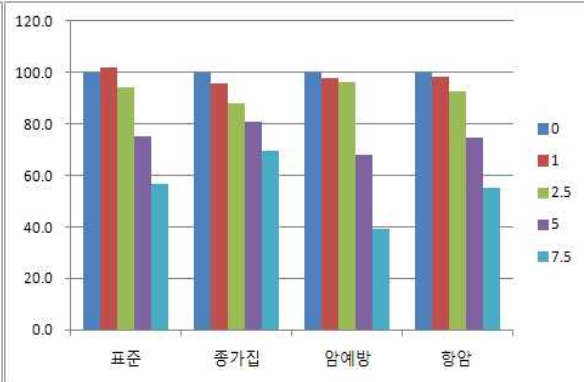
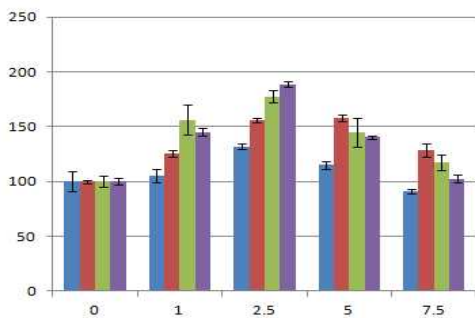


그림 35. 동결 건조 김치의 정상위점막세포와 위암세포주에서의 그룹별 세포 사멸 효과 (A, 정상위점막세포주; B, 위암세포주)

동결 건조 김치의 위암 세포주에 대한 항암 활성을 살펴보기 위해 정상위점막세포인 RGM-1 세포와 위암세포주인 AGS 세포를 사용하여 동결 건조 김치 4 종류를 세포에 처리하여 세포독성을 살펴보았다. 표준 김치와 대조군으로 사용한 종가집 김치, 그리고 항암 김치와 암예방 김치를 각각 0, 1, 2.5, 5, 7.5 mg/ml의 농도로 처리한 결과, 이들 김치들은 정상위점막세포인 RGM-1 세포에서는 세포 독성을 나타내지 않고 오히려 24 시간 후에는 약간의 세포 성장이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 위암세포주인 AGS 세포에서는 정상세포와는 다른 반응이 나타나는 것을 관찰하였다. 표준 김치와 종가집 김치는 비슷한 양상으로 5 g/ml와 7.5 mg/ml에서 약 20%와 40% 정도의 암세포의 세포사멸을 유도하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, 암예방과 항암 김치의 경우, 5 mg/ml의 경우 40 % 정도의 세포사멸을 유도하였고, 7.5 mg/ml의 농도에서 60 % 정도로 암세포의 세포사멸을 유도하는 것을 관찰하였다 (그림 35).

A



B

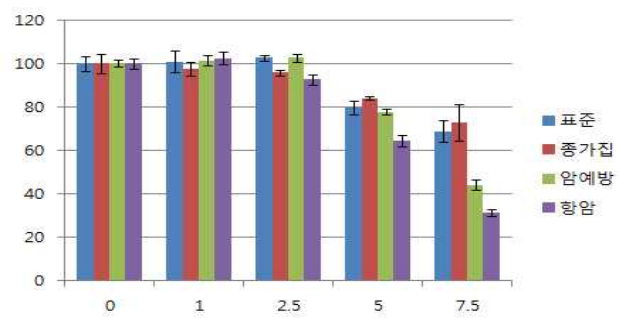
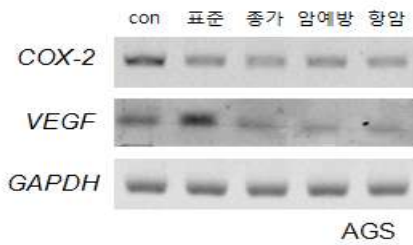


그림 36. 동결 건조 김치의 정상위점막세포와 위암세포주에서의 농도별 세포 사멸 효과 (A, 정상위점막세포주; B, 위암세포주)

이는 농도별로 비교했을 때 더욱 확실하게 알 수 있는데, 5와 7.5 mg/ml의 같은 농도로 비교해 보면, 항암 김치가 위암세포주에 대해서 다른 표준, 종가집, 암예방 김치에 비해서 위암세포주에 대한 세포 사멸 효과가 두드러지는 것을 관찰할 수 있다 (그림 36).

이와 같은 결과는 항암 김치가 표준 김치나 대조군으로 사용된 종가집 김치에 비해서 정상세포에는 아무런 영향 없이 위암세포만을 선택적으로 사멸시키는 능력이 있다는 것을 의미한다. 이에 대한 기전을 연구하기 위하여 세포 사멸에 관한 단백질들의 발현을 PCR과 Western blot을 통해 알아보았다.

A



B

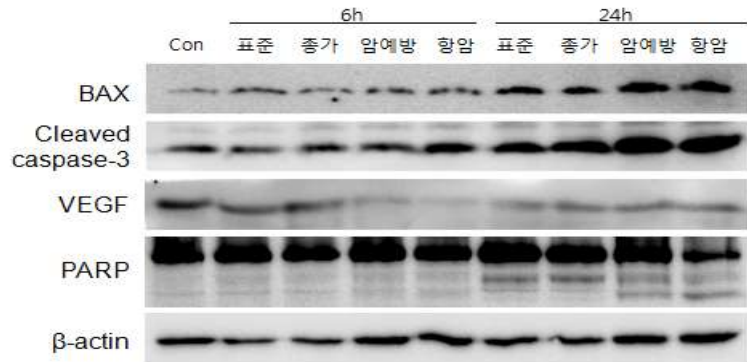


그림 37. 위암세포주에서 동결 건조 김치 처리에 따른 세포 사멸 관련 유전자 발현 (A, RT-PCR; B, Western blot analysis)

위암세포주인 AGS 세포에서 4 종류의 동결 건조 김치를 처리한 후 1시간 뒤에 RNA를 분리하여 염증 관련인자인 COX-2와 VEGF를 분석해본 결과, control에 비하여 표준, 증가, 암예방, 항암김치 모두 COX-2 저해 효능을 나타냄을 관찰하였고, VEGF의 경우 표준김치는 효능이 없었고, 증가, 암예방, 항암 김치에서 그 저해효능을 나타내었고, 그중 암예방과 항암김치가 뛰어난 저해효능을 보임을 확인할 수 있었다 (그림 37A). 6시간과 12시간에 단백질을 추출한 후 세포 사멸이 유도될 때 발현이 증가하는 cleaved caspase-3, Bax, PARP cleavage의 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그림 37B 결과에서 보듯이 암예방과 항암 김치에서 표준과 증가집 김치보다 세포 사멸과 관련된 유전자가 12시간에서 훨씬 많이 증가되어 있는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 위암세포주에서 암예방과 항암 김치를 처리 했을 때 세포사멸이 일어나는 것은 apoptosis를 통해 일어난다는 것을 알 수 있었다.

나. 동결 건조 김치의 항산화 작용 규명

(1) DPPH radical 측정을 통한 동결 건조 김치의 직접적 항산화능 규명

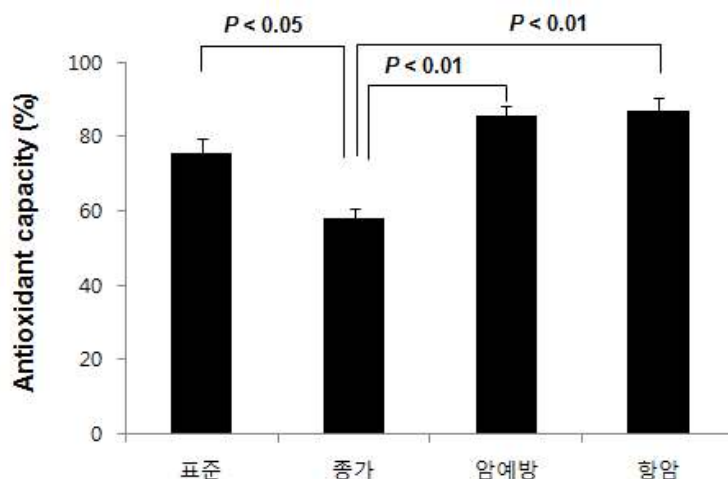


그림 38. DPPH radical 측정을 통한 동결 건조 김치의 직접적 항산화능 규명

동결 건조 김치의 항산화 효과를 알아보기 위해서 DPPH radical 제거 효능을 측정하였다. 측정 결과

그림 38에서 보듯이 표준과 증가집(증가) 김치를 비교했을 때 표준 김치가 높은 항산화 효능을 나타내었고 네 종류의 김치를 비교 했을 때 표준과 증가 김치보다 암예방과 항암 김치가 유의미하게 높은 항산화 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 위암세포주에서 사멸효과를 나타내는 7.5 mg을 처리했을 때 암예방과 항암김치 그룹에서 80%의 DPPH radical 제거 효능을 관찰할 수 있었다.

(2) 동결 건조 김치의 세포 보호 효소 발현 유도

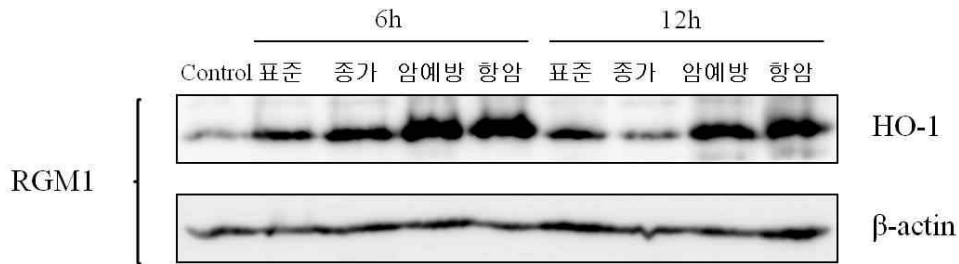


그림 39. RGM1 세포주에서 동결 건조 김치 처리에 따른 HO-1의 발현

동결 건조 김치에 의한 화합물이나 다른 독소에 대한 체내 방어기전 역할 미치는 영향을 알아보기 위하여 위점막정상세포(RGM-1)에 4 종류의 김치를 처리한 후에 대표적인 항산화 효소인 Heme oxygenase 1 (HO-1) protein expression을 확인하였다(그림 39). 동결 건조 김치를 처리한 후 6시간과 12시간에서 HO-1의 발현을 확인하였는데 표준과 증가집 김치도 control에 비해서 발현양이 증가하였지만 암예방과 항암 김치 처리 그룹에서 훨씬 더 많이 HO-1의 발현양이 증가하는 것을 알 수 있었다.

다. 동결 건조 김치의 항염증 작용 규명

헬리코박터 필로리는 만성 위염과 소화성 궤양 재발의 중요한 원인이 되며 위암 및 위림프종과 관련이 있는 전염력이 있는 세균으로 위점막에 염증 반응을 일으킨다. 그 기전으로 직접적 기전 및 간접적 기전으로 구분할 수 있는데, 직접적 기전은 헬리코박터에서 분비되는 여러 세포독성인자가 위상피세포에 손상을 주는 것, 헬리코박터에 의해 생성된 암모니아가 위점막 손상을 일으키는 것, 그리고 헬리코박터 파이로리로부터 호중구를 끌어드릴 수 있는 화학주성인자가 점막내로 흡수되어 혈액내 호중구의 점막 침윤을 유도하는 것 등이며, 간접적 기전은 위상피세포에서 화학주성인자의 분비가 증가하게 되어 염증세포가 침윤하는 것이다. 또한, 산소 라다칼의 증가로 인한 산화적 스트레스의 증가, 산화성 DNA 손상 증가, 상피세포 증식 및 세포사멸이 증가된다. 이러한 작용으로 만성위염에서 위축성 위염 및 장상피화생으로 변환되며, 여기에 여러 환경적 인자 및 유전적 인자가 더해지면 장형의 위암이 발생할 수 있다. 따라서 헬리코박터 필로리 균에 의한 염증 반응을 4종류의 동결김치들이 억제 및 예방할 수 있는지를 살펴보았다. 동결 건조 김치의 항염증 효과를 알아보기 위하여, 먼저 위 정상세포(RGM1)에 4 종류의 동결김치를 1시간 전 처리한 후 대표적 위 염증 유발 인자인 *H. pylori* (HP)를 10 MOI로 6시간과 24시간 처리하고 RNA와 protein을 분리하여 염증관련인자들의 발현을 살펴보았다. 전사레벨에서 염증유발 및 억제를 알아보기 위하여 RT-PCR를 실시하여 염증관련 효소인 iNOS, TNF- α , IL-8, Cox-2, IL-1 β 등의 발현을 관찰하였다. 그 결과, HP 그룹에 비해 항암 김치를 처리한 군에서 대표적인 염증관련 효소인 iNOS와 TNF- α 의 발현이 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 40A). 특히, 항암김치에서는 iNOS의 발현이 많이 감소하였고 TNF- α 는 HP와 비교하여 네종류의 김치 모두에서 발현양이 감소함을 관찰할 수 있었다. Prostaglandin E2를 생성함으로써 염증을 매개하는 인자인 COX-2, angiogenesis에 있어서 대표적인 인자로 알려져 있는 VEGF 및 대표적인 염증성 사이토카인 IL-8에서는 RNA 레벨에서는 유의미한 차이를 관찰할 수는 없었다 (data not shown).

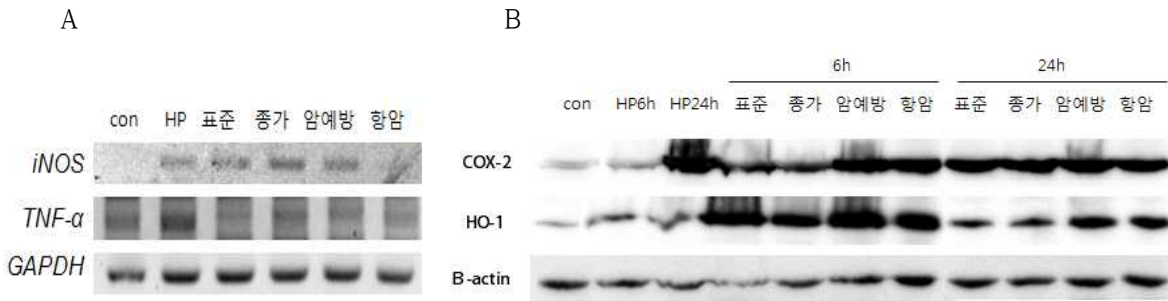


그림 40. *H. pylori*에 의한 염증관련인자 변화 측정

또한, 염증 관련 단백질인 COX-2의 발현을 Western blot으로 알아보았는데 *H. pylori*를 처리한 후 24시간에 COX-2의 발현이 많이 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 4 종류의 김치를 한시간 전처리하고 6시간과 24시간 후에 COX-2의 발현을 보았을 때 *H. pylori* 24h에 비해 COX-2의 발현이 약간 감소한 것을 볼 수 있었다. 세포 보호 효과를 보기위해 HO-1의 발현양도 조사하였는데 *H. pylori* 처리후 이른 시간이 6시간째에 굉장히 많이 증가하였다가 24시간에는 감소하는 것을 관찰하였고, 이 때 표준 및 증가김치는 현저하게 감소된 반면에 암예방과 항암김치 그룹에서는 HO-1의 발현 증가가 유지되는 것을 확인함으로써 암예방과 항암김치가 항산화 효능이 뛰어난을 보여준다 (그림 40B).

라. 동결 건조 김치의 항전이 작용 규명

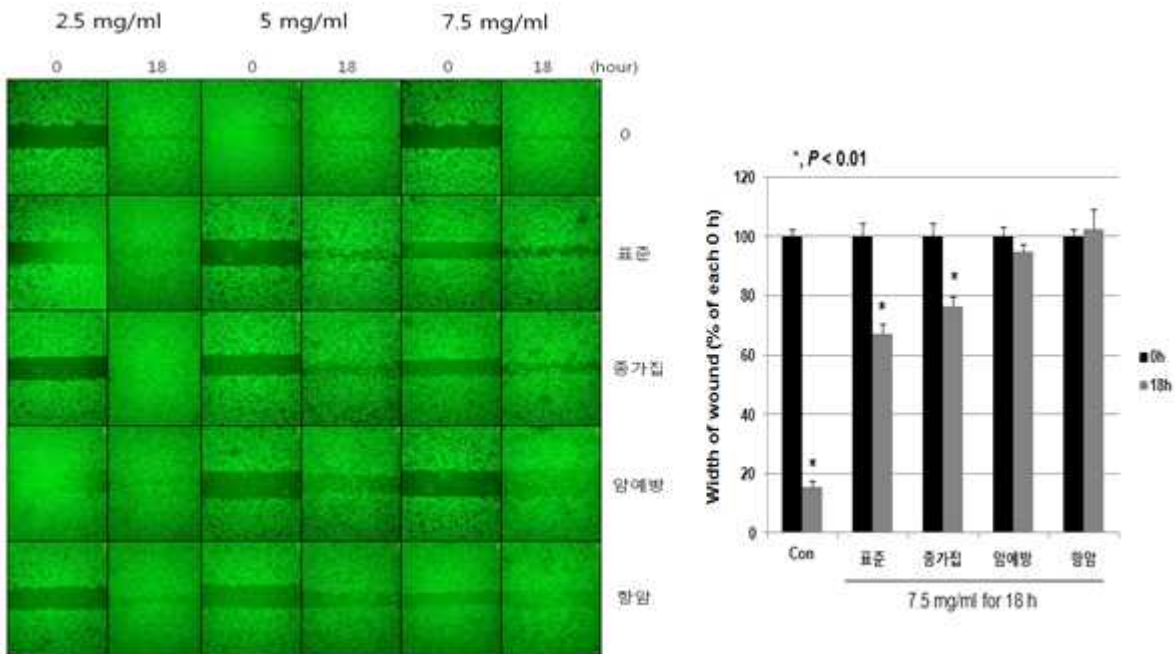


그림 41. Wound healing assay를 통한 항전이 효능 측정

동결 건조 김치의 암전이 억제 효능을 살펴보기 위하여 invasive한 위암세포주로 알려진 MKN28 세포를 이용하여 wound migration assay를 수행하였다. 4 종류의 동결 건조 김치 모두 저농도인 2.5 mg에서는 control에 비해서 별 다른 효과가 없었지만 5mg과 7.5mg에서는 암세포의 migration이 김치 처리에 의해서 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 농도가 가장 높은 7.5 mg/ml에서 표준과 증가집 김치는

migration 저해 효능이 control과 비교하여 큰 차이가 나지 않았지만, 암예방과 항암김치 처리군에서 다른 김치에 비해 항전이 효능이 큰 것을 확인할 수 있었다 (그림 41).

마. 동물 모델 항암 활성 연구

표 2. 동물 모델 군 구성

| 시험군 | 시험동물 | 질환유발 | 시험물질 | 투여용량 (mg/kg) | 동물 수 |
|-----|---------|---------------------------------------------------|---------------|--------------|------|
| G1 | C57BL/6 | Helicobacter pylori (1X10 ⁸ CFU/mouse) | Vehicle | | 20 |
| G2 | | | Vehicle | | 30 |
| G3 | | | 항암김치1 | 100 g* | 20 |
| G4 | | | 항암김치2 | 300 g | 20 |
| G5 | | | Ecabet sodium | 30 mg/kg | 20 |

* 농도 산정 기준: 100 g/60 kg (사람)의 투여 용량을 마우스 기준으로 계산하여 투여하였음.

헬리코박터 필로리 균이 더 잘 감염되게 하기 위하여 proton pump inhibitor (20mg/kg)를 i.p injection 으로 1회/일, 3일 동안 투여하였다. 두 번째 PPI 투여 후 절식 시작하여 하루 절식시킨 후, 세 번째 PPI 를 i.p로 준 다음에, 약 1시간 후, 헬리코박터 균을 gavage로 감염시켰다. 감염시키고 30분 후에 다시 diet를 공급하였다. 그 다음날 다시 18~24시간 절식후, 헬리코박터 균을 접종하였다. 총 4번의 감염을 이틀에 한번씩, 하루 절식 후에 유발하였다. 24주 후 부검하여 *H. pylori*에 의하여 염증이 생겼는지 관찰하고, 그에 대한 시험 물질의 효능을 관찰하였다. 7월 8일에 36주 부검을 통하여 *H. pylori*에 의한 adenoma 형성을 관찰하고, 시험 물질의 억제 효능이 있는지를 관찰하였다. 실험군은 표 2 와 같이 구성 하였다.

(1) 헬리코박터 파일로리 감염 사실 확인

헬리코박터 파일로리 감염 동물 모델을 진행하면서 헬리코박터 파일로리가 마우스 위점막에 제대로 접종되었는지를 확인하기 위하여 헬리코박터 파일로리 감염 12주째에 무작위로 마우스를 선별하여 확인 하였다(그림 42). 부검 후 12주차에는 육안으로 확인되는 염증이나 병변은 관찰되지 않았으나, 위점막을 배양해 본 결과, 부검한 마우스 모두에서 헬리코박터 파일로리가 혐기성 배양 조건에서 액체 배지와 고체 배지 모두에서 배양되는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 실험에 사용된 마우스들이 헬리코박터 파일로리에 모두 감염되었고, 실험이 끝난 후에 헬리코박터 파일로리에 의한 위염 및 위암 소견과 함께 그에 대한 동결 건조 김치의 효능을 관찰할 수 있다는 확증이며, 이는 24주나 36주가 지난 이후에 헬리코박터 파일로리가 감염되지 않아 disease control이 확실치 않을 수 있는 불확실성을 배제할 수 있다는 실험 결과이다.

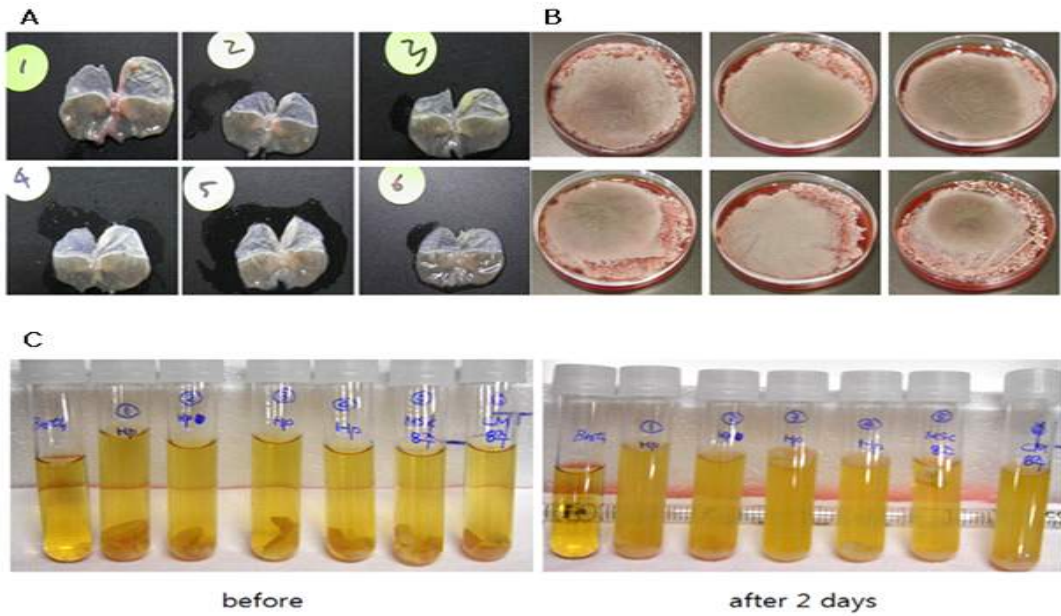


그림 42. 헬리코박터 파일로리 감염 동물 모델에서 감염 사실 확인 (A, gross feature; B, 고체 배지에서 *H. pylori* 배양 결과; C, 액체 배지에서 *H. pylori* 배양 결과)

(2) 헬리코박터 파일로리 처리에 따른 체중, 음수량, 사료량

시험물질인 동결 건조 김치의 헬리코박터 파일로리에 의한 위염 및 위암에 대한 개선 효능을 평가하기 위하여 C57BL/6를 이용하여 헬리코박터 파일로리 감염 모델에 관한 동물실험을 실시하였다. 헬리코박터 파일로리 균이 더 잘 감염되게 하기 위하여 4주령의 어린 C57BL/6 mouse를 사용하여 proton pump inhibitor (20mg/kg)를 i.p injection으로 1회/일, 3일 동안 투여하였다.

두 번째 PPI 투여 후 절식 시작하여 하루 절식시킨 후, 세 번째 PPI를 i.p로 준 다음에, 약 1시간 후, 헬리코박터 파일로리를 마우스당 1×10^9 CFU/ml의 농도로 100 μ L씩 gavage로 감염시켰다. 감염시키고 30분 후에 다시 diet를 공급하였다. 그 다음날 다시 18~24시간 절식 후, 헬리코박터 균을 접종하였다. 총 4번의 감염을 이틀에 한번씩, 하루 절식 후에 유발하였다. 감염이 끝나면, 헬리코박터 균에 의한 염증을 더 심화시키기 위하여 7.5 % NaCl이 함유된 high salt diet를 투여하였다. 시험물질인 동결 건조 김치는 이미 보고된 선행 연구 결과들을 참고하여 체중 60 kg의 성인 하루 100 g 또는 300 g을 섭취하는 양으로 계산하여 음수로 투여하였다. 음수와 high salt diet는 1주일에 두 번 교체하였으며, 일주일에 한 번씩 체중을 측정하였다.

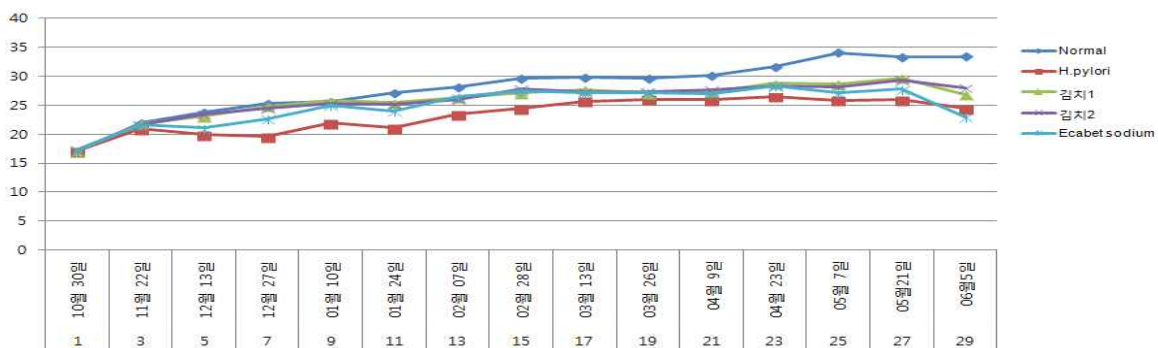


그림 43. 그룹별 mouse body weight

그림 43에서 볼 수 있듯이, 실험 시작과 헬리코박터 파일로리 감염이 끝난 이후에도 Normal 그룹과 헬리코박터 그룹이 체중차이가 나는 것을 관찰할 수 있었고, 김치 투여군에서 헬리코박터 그룹보다 약간 체중이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. Normal group을 제외하고는 헬리코박터 군에 의한 위염을 심화시키기 위해서 high salt diet를 투여하므로 마우스가 섭취한 음수량과 사료량이 증가되어 있는 양상을 확인할 수 있었다. 이와 같은 동물 실험은 PPI injection과 *H. pylori* 감염이 2012년 11월 8일까지 끝났고, 24주차에서 sacrifice해서 분석을 수행하였다. 비교 약물으로는 임상에서 사용되는 ecabet sodium을 투여하였다. 헬리코박터군 감염 24주 후 부검하여 *H. pylori*에 의하여 염증이 생겼는지 관찰하였고 그에 대한 동결 건조 김치의 효능을 관찰하였고, 36주 후 부검을 통하여 *H. pylori*에 의한 adenoma 형성을 관찰하고, 동결 건조 김치의 발암과정 억제 효능이 있는지를 관찰할 예정이다.

(3) *H. pylori* 감염 마우스모델에서 감염과 김치 처리에 따른 육안 소견과 병리 소견

헬리코박터 감염 24 후에 일부 부검을 하여 위를 적출하였다. 육안 소견을 살펴보면 헬리코박터 감염 그룹에서는 ulceration과 장형화생, 그리고 염증반응을 나타내는 적변현상을 확인할 수 있었으나, 항암김치 처리군 특히 100 g보다 300 g 처리군에서 정상 그룹과 같이 위 상태가 좋은 것을 관찰할 수 있었다 (그림44).

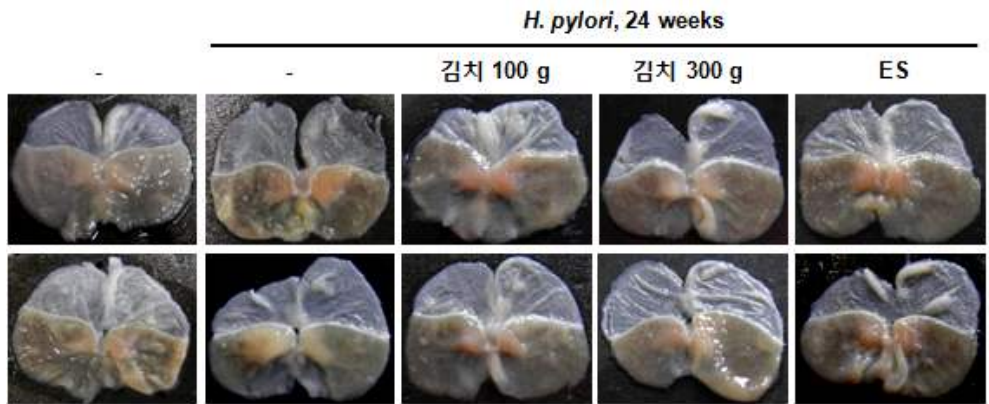


그림 44. 그룹별 육안소견

좀 더 자세히 관찰하기 위하여 적출한 stomach을 formaldehyde에 고정시킨 후 H&E staining을 하여 pathology를 관찰하였다. 헬리코박터 그룹에서는 염증세포들의 침윤, erosion, ulceration 등의 병변을 관찰하였고, 임상에서 쓰이는 ecabet soduim 처리 그룹도 비슷한 정도로 헬리코박터에 의해서 위손상이 일어난 것을 확인하였다. 그러나 김치 처리군에서 그러한 병변이 호전되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 저농도보다 고농도 처리 김치 그룹에서 확연한 호전을 관찰하였다 (그림 45).

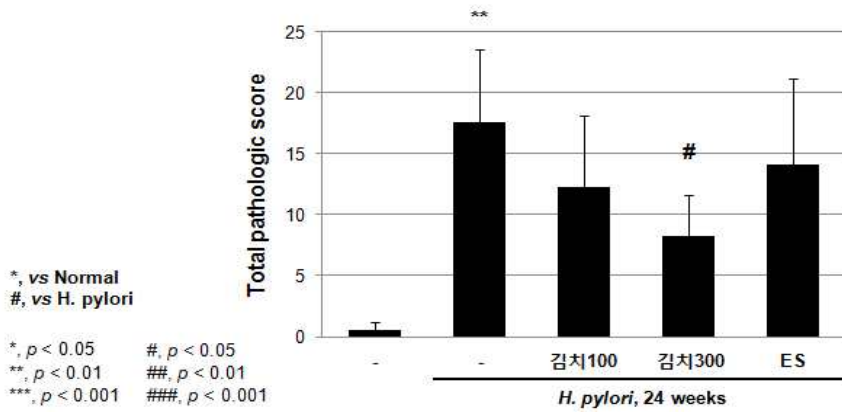
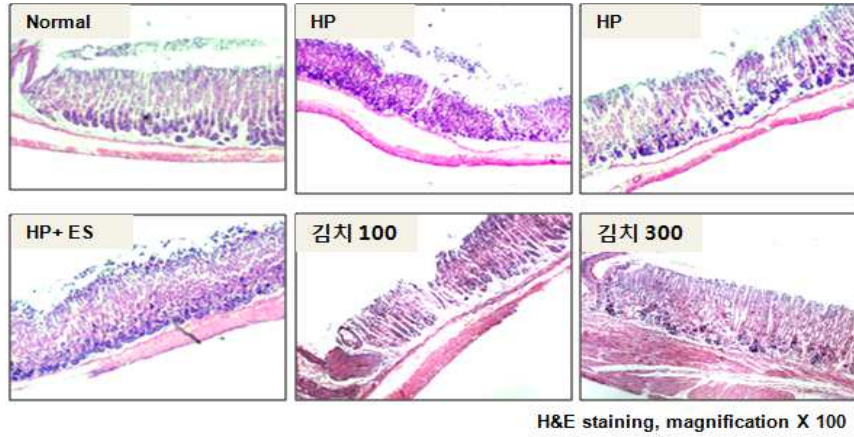


그림 45. 그룹별 병리소견

(4) *H. pylori* 감염 마우스모델에서 김치 농도에 따른 염증 및 세포독성인자 규명

항암김치의 헬리코박터 감염에 의한 위손상에 대한 보호 효능을 검증하기 위하여 mouse serum을 이용하여 염증유도인자인 PGE₂와 lipid peroxidation marker로서 산화적 스트레스의 척도인 malondialdehyde (MDA)의 level을 측정하였다. 예상대로 헬리코박터 그룹에서 정상그룹보다 높은 PGE₂와 MDA level을 나타내었다. 이때 ecabet sodium은 거의 영향을 주지 않았으며, 항암김치는 농도 의존적으로 이들 PGE₂와 MDA level을 감소시키는 것을 확인하였다 (그림46).

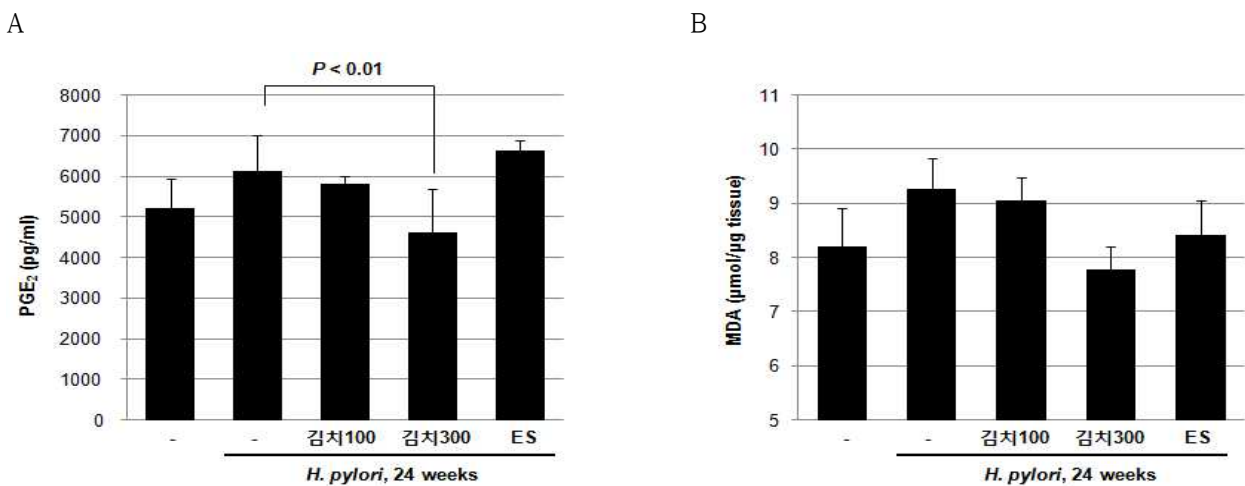


그림 46. 그룹별 PGE₂ level (A)과 MDA level (B)

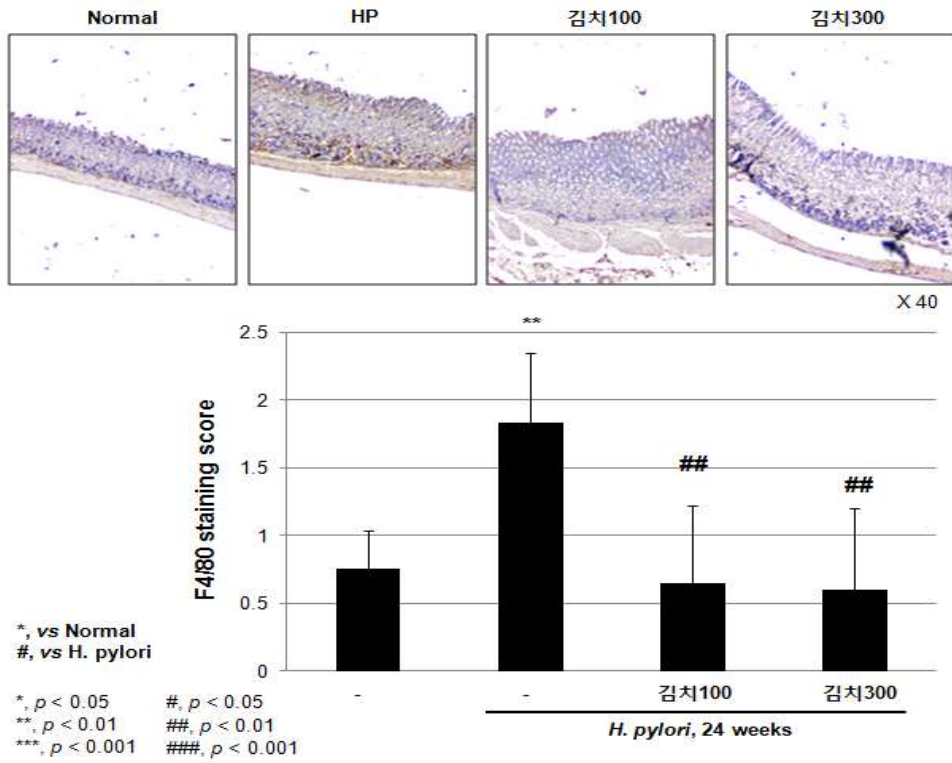


그림 47. 그룹별 F4/80 염색 결과

다음으로 염증세포인 macrophage를 염색할 수 있는 F/80 염색을 통하여 염증반응의 정도를 측정하였다. 그림 47에서 볼 수 있듯이, 헬리코박터 그룹에서 macrophage infiltration이 통계적으로 유의하게 증가되어 있는 것을 확인하였고, 이러한 염증세포의 침윤이 김치 처리 그룹에서 저농도에서도 통계적으로 유의하게 정상 수준으로 떨어져 있을 것을 관찰하였다. 염증반응의 가장 대표적 단백질인 COX-2를 확인하기 위하여 동물 조직으로부터 단백질을 추출하여 Western blot을 수행하였다. 저농도 항암김치 처리군에서는 별다른 효능을 보이지 않았지만 300 g의 항암김치 처리군에서는 COX-2의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 대표적인 항산화 효소로서 세포보호효능을 보이는 효소인 HO-1의 경우 300 g의 김치보다는 100 g에서 더 많이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 48).

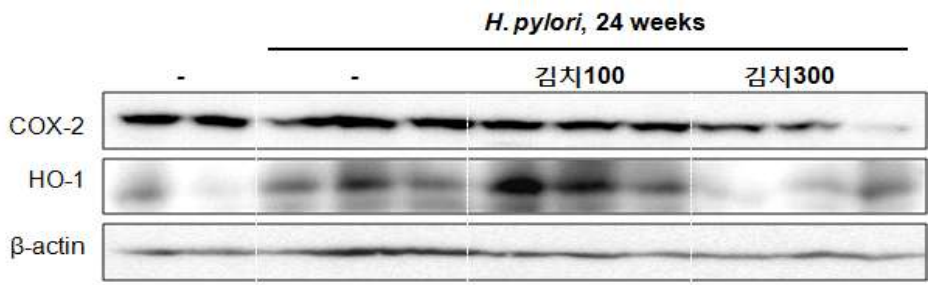


그림 48. 그룹별 PAS 염색 결과

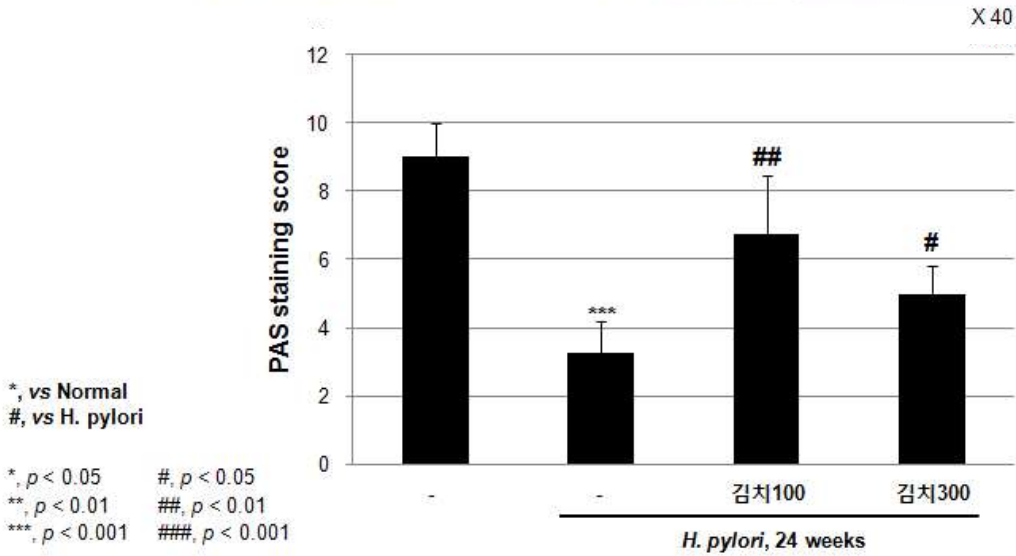
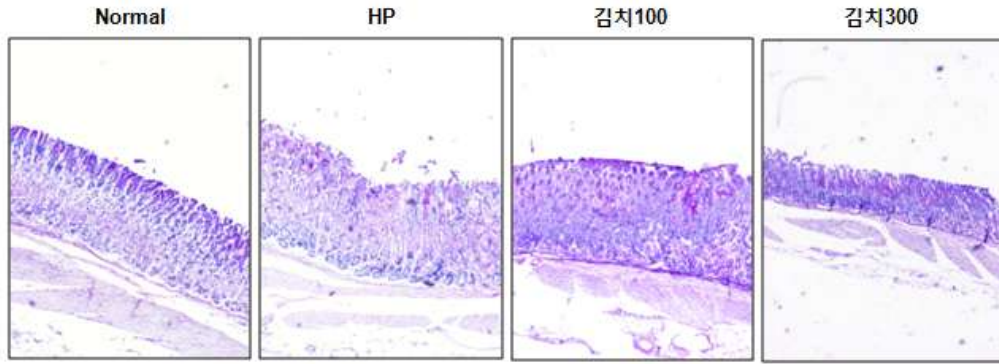


그림 49. 그룹별 PAS 염색 결과

이때 항암김치가 단순히 염증 반응만을 억제하는지 아니면 host 자체의 보호 효능도 증가시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 위점막층의 mucin을 염색할 수 있는 PAS staining을 수행하였다. 그 결과, 헬리코박터 감염 그룹에서는 보호 효능을 나타낼 수 있는 점막층이 손상되어 PAS 염색이 현저하게 감소되어 있었고, 항암김치 처리그룹에서 그러한 점막 손상이 통계적으로 유의하게 보호되어 있는 것을 관찰하였다 (그림 49).

(5) *H. pylori* 감염 마우스모델에서 김치 처리에 따른 육안 소견 (36주)

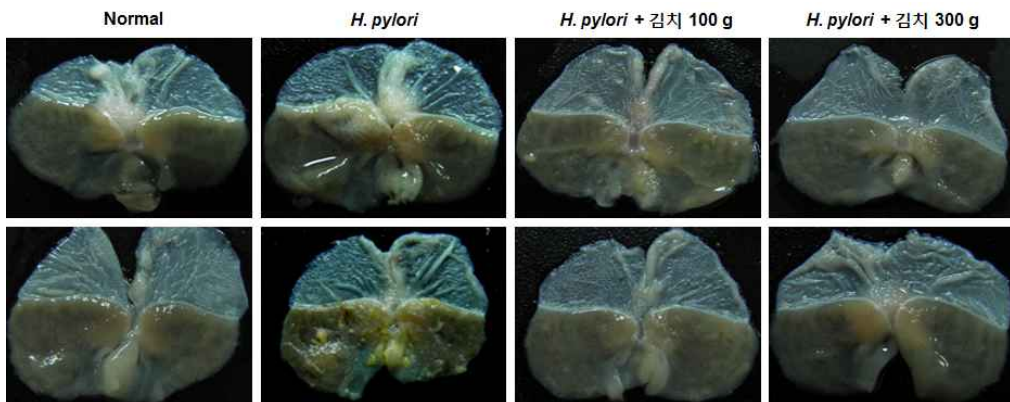


그림 50. 36주 그룹별 육안소견

36주간의 실험 후 부검을 실시하였다(2013. 7.8). 김치 농도 의존적으로 헬리코박터 파일로리에 의한 병변에 대해 보호 효과를 보이는 결과를 육안적으로 확인하였으며, 혈액, 조직 등을 이용한 실험이 계속 이어질 예정이다 (그림 50).

-제3세부과제-

가. 김치의 안전성 검증

1. ICR계 마우스에 대한 급성 경구 독성시험

1) 폐사율

마우스에 대한 경구투여 시 대조군과 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 100, 200, 400 mg/kg 투여군에서 시험물질 투여 후 1일부터 14일까지 시험 전 기간을 통하여 사망한 예는 관찰되지 않았다(표 3).

표 3. Mortality of ICR mice treated orally with SK-L and ACK-L

| Group ¹⁾ | Dose (mg/kg) | Days after treatment | | | | | | | | | | | | | | Final Mortality ²⁾ |
|---------------------|--------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|-------------------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | |
| SK-L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| | 400 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| ACK-L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| | 400 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |

1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi

2) Values are expressed as dead number/total number of animals.

2) 체중변화

모든 시험군에서 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료를 투여 후 꾸준히 체중이 증가하였으며, 6일째와 9일째 100 mg/kg 와 400 mg/kg 투여군에서 약간의 체중감소를 보였으나 14일째에는 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다. 마우스에 대한 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료 3개 용량으로 경구 투여한 군에서 대조군에 비하여 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 투여 용량군 사이의 체중변화는 용량 의존성을 나타내지 않았다 (표 4). 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료를 투여한 군에서 체중의 증가가 더디게 일어나는 것을 볼 수 있었다.

표 4. Body weights of ICR mice treated orally with SK-L and ACK-L

| Group ¹⁾ | Dose (mg/kg) | No. of animals | Days after treatment(g) | | | | | |
|---------------------|--------------|----------------|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 14 |
| SK-L | 0 | 5 | 26.1±1.1 | 27.4±1.0 | 29.6±1.7 | 30.1±1.7 | 30.9±1.8 | 32.4±1.9 |
| | 100 | 5 | 27.2±1.4 | 28.1±1.1 | 28.9±2.0 | 29.2±1.3 | 30.2±1.9 | 32.1±2.0 |
| | 200 | 5 | 26.8±1.6 | 27.9±2.0 | 30.3±1.7 | 30.9±1.5 | 31.3±1.1 | 32.9±1.3 |
| | 400 | 5 | 27.8±0.8 | 28.0±1.4 | 28.9±1.6 | 29.5±1.6 | 30.7±2.0 | 31.8±1.6 |
| ACK-L | 0 | 5 | 26.1±1.1 | 27.4±1.0 | 29.6±1.7 | 30.1±1.7 | 30.9±1.8 | 31.4±1.9 |
| | 100 | 5 | 28.5±1.3 | 29.6±0.8 | 29.9±2.2 | 30.6±2.0 | 31.3±2.6 | 32.1±2.3 |
| | 200 | 5 | 27.3±1.5 | 29.7±2.0 | 30.2±2.0 | 30.2±1.6 | 31.1±1.1 | 31.9±1.9 |
| | 400 | 5 | 28.7±1.1 | 29.3±1.7 | 30.4±1.3 | 30.8±1.8 | 30.9±0.9 | 31.8±1.1 |

1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi

3) 일반증상

마우스에 대한 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료 투여 후 대조군에 비해 특이적으로 관찰된 일반증상의 변화는 없었다 (표 5).

표 5. Clinical signs in ICR mice treated orally with SK-L and ACK-L

| Group ¹⁾ | Dose (mg/kg) | Signs observation | | | | | |
|---------------------|--------------|-------------------|----------------|---------------------------------|----------------------------|-------------|-------|
| | | Appears normal | Prone position | Decrease of locomotive activity | Decreased respiration rate | Lacrimation | Death |
| SK-L | 0 | 5/5 ²⁾ | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 100 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 200 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 400 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| ACK-L | 0 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 100 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 200 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 400 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi

2) Number of animals with the sign/total number of animals examined.

4) 육안적 해부소견

마우스에 대한 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료의 투여에 의하여 해부시 육안적으로 시료 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 병변을 관찰하지 못하였다 (표 6). 표준김치(SK-L)를 400mg/kg 으로 투여 한 군에서 간조직의 유의적 무게 증가가 있었으나 병변은 없었다. 또한 표준김치

(SK-L)를 400mg/kg 으로 투여 한 군에서 신장무게가 유의적 무게 증가가 있었으나 병변은 없었다. 항암 김치(ACK-L) 시료의 400mg/kg 투여와 표준김치(SK-L)를 100mg/kg 와 200mg/kg 으로 투여군에서 신장의 무게가 증가하였으나 육안으로의 병변은 없었다.

표 6. Organ weights in ICR mice treated orally with SK-L and ACK-L

| Group ¹⁾ | Dose (mg/kg) | Organ(g) | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | Liver | Kidney | Testis |
| SK-L | 0 | 1.37 ± 0.10 | 0.16 ± 0.02 | 0.09 ± 0.01 |
| | 100 | 1.50 ± 0.15 | 0.23 ± 0.03 | 0.13 ± 0.02 |
| | 200 | 1.49 ± 0.14 | 0.29 ± 0.02* | 0.11 ± 0.02 |
| | 400 | 1.69 ± 0.10* | 0.28 ± 0.03* | 0.13 ± 0.01* |
| ACK-L | 0 | 1.37 ± 0.10 | 0.16 ± 0.02 | 0.09 ± 0.01 |
| | 100 | 1.58 ± 0.12 | 0.20 ± 0.04 | 0.11 ± 0.02 |
| | 200 | 1.62 ± 0.20 | 0.21 ± 0.02 | 0.14 ± 0.01* |
| | 400 | 1.56 ± 0.11 | 0.22 ± 0.02* | 0.13 ± 0.02 |

1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi

All values are expressed as mean ± S.D.

* Significantly different from the control value (*: p < 0.05)

5) 결 론

이상의 결과로 시험물질인 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료는 경구투여 시 마우스에서 아무런 급성독성을 나타내지 않았고, LD50값은 마우스에서 경구투여 최고용량 400 mg/kg 이상일 것으로 사료 된다.

2. SD계 흰쥐에 대한 아급성경구독성시험 연구 결과

1) 일반증상 및 사망동물

시험 전 기간 동안 대조군을 포함한 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료 투여군 모두에서 사망한 동물은 없었다 (표 7). 또한 모든 동물에서 시험물질 투여후 자발적인 운동 및 호흡율의 증가 등과 같은 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며 최종투여일에 실시한 안구검사에서도 특이한 안구부위의 이상소견은 관찰되지 않았다 (표 8).

표 7. Mortality in rats orally treated with SK-L and ACK-L for 14 days

| Group | Dose (mg/kg) | Days after treatment | | | | | | | | | | | | | | Final Mortality ²⁾ | |
|-------|--------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|-------------------------------|-----|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | | 14 |
| SK-L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| | 1,000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| ACK-L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |
| | 1,000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 |

1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi

2) Values are expressed as dead number/total number of animals.

표 8. Clinical signs in rats orally treated with SK-L and ACK-L for 14 days

| Group ¹⁾ | Dose (mg/kg) | Signs observation | | | | | |
|---------------------|--------------|-------------------|----------------|---------------------------------|----------------------------|-------------|-------|
| | | Appears normal | Prone position | Decrease of locomotive activity | Decreased respiration rate | Lacrimation | Death |
| SK-L | 0 | 5/5 ²⁾ | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 1,000 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| ACK-L | 0 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| | 1,000 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

- 1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi
 2) Number of animals with the sign/total number of animals examined.

2) 체중변화

시험물질을 투여한 후 14 일 동안 체중 변화를 관찰하였을 때, 대조군 및 시험물질 투여군에서 시간이 경과함에 따라 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다 (표 9). 시험물질 투여군은 대조군에 비하여 체중이 증가하였으나, 이는 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료의 치료 효과로 인정되며 시험물질의 부작용으로 인정되지 않았다. 시험물질 투여에 따른 외견상의 임상소견은 발견되지 않았으며 사료섭취량과 음수량도 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

표 9. Body weight of rats orally treated with SK-L and ACK-L for 14 days

| Group ¹⁾ | Dose (mg/kg) | No. of animals | Days after treatment(g) | | | | | |
|---------------------|--------------|----------------|-------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 14 |
| SK-L | 0 | 5 | 156.3±2.9 | 185.4±3.6 | 190.2±9.7 | 201.3±13.4 | 202.4±14.0 | 203.5±18.5 |
| | 1,000 | 5 | 159.1±4.6 | 183.8±5.2 | 197.2±10.1 | 205.4±19.7 | 208.4±20.6 | 208.6±20.1 |
| ACK-L | 0 | 5 | 156.3±2.9 | 185.4±3.6 | 190.2±9.7 | 201.3±13.4 | 202.4±14.0 | 203.5±18.5 |
| | 1,000 | 5 | 152.6±2.6 | 180.9±4.5 | 192.8±10.2 | 199.4±20.1 | 206.7±16.9 | 206.1±18.4 |

- 1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi
 All values are expressed as mean ± S.D.

3) 혈액학적 검사

혈액학적 검사 소견은 표 10에 요약하였다. 적혈구 용적을 제외한 모든 혈액학적 검사 항목에서 투여군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (표 10).

표 10. Levels of hematological analysis in rats orally treated with SK-L and ACK-L for 14 days

| Group ¹⁾ | Dose (mg/kg) | WBC | RBC | HB | HCT | MCV | MCH | MCHC | PLT |
|---------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| SK-L | 0 | 10.2 ±3.5 | 7.7 ±1.2 | 14.9 ±0.9 | 45.7 ±2.2 | 59.4 ±1.9 | 19.8 ±0.2 | 33.4 ±1.5 | 877.3 ±126.5 |
| | 1,000 | 12.9 ±4.3 | 7.0 ±0.9 | 15.2 ±1.0 | 45.3 ±3.4 | 60.2 ±1.2 | 20.8 ±0.6 | 34.1 ±0.7 | 803.4 ±197.3 |
| ACK-L | 0 | 10.2 ±3.5 | 7.7 ±1.2 | 14.9 ±0.9 | 45.7 ±2.2 | 59.4 ±1.9 | 19.8 ±0.2 | 33.4 ±1.5 | 877.3 ±126.5 |
| | 1,000 | 13.1 ±2.4 | 7.6 ±1.1 | 15.1 ±0.9 | 44.6 ±2.2 | 61.3 ±1.4 | 20.9 ±0.3 | 35.1 ±1.0 | 767.4 ±204.7 |

1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi

All values are expressed as mean ± S.D.

WBC, white blood cell count (103/mm³); RBC, red blood cell count (106/mm³); HB, hemoglobin (g/dl); HCT, hematocrit (%); MCV, mean corpuscular volume (fl); MCH, mean corpuscular hemoglobin (pg); MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration (%); PLT, platelet (106/mm³)

4) 혈액생화학적 검사

시험물질에 의한 혈액생화학적검사 결과를 표 11에 요약하였다. 모든 혈액생화학적 검사 항목에서 투여군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (표 11).

표 11. Levels of serum biochemical analysis in rats orally treated with SK-L and ACK-L for 14 days

| Group ¹⁾ | Dose (mg/kg) | Protein (g/dL) | ALB (g/dL) | BUN (mg/dL) | Creatinine (mg/dL) | Globulin (g/dL) | A/G Ratio | AST (IU/L) | ALT (IU/L) | ALP (U/L) |
|---------------------|--------------|----------------|-------------|--------------|--------------------|-----------------|-------------|---------------|---------------|----------------|
| SK-L | 0 | 5.3 ±1.0 | 2.8 ±0.5 | 15.9 ±2.6 | 0.5 ±0.1 | 2.5 ±0.5 | 1.2 ±0.2 | 82.1 ±19.9 | 34.5 ±11.6 | 221.3 ±45.5 |
| | 1,000 | 5.2 ±0.3 | 3.2 ±0.2 | 15.9 ±3.5 | 0.5 ±0.1 | 1.9 ±0.3 | 1.4 ±0.3 | 83.4 ±20.1 | 30.9 ±10.1 | 201.4 ±27.7 |
| ACK-L | 0 | 5.3 ±1.0 | 2.8 ±0.5 | 15.9 ±2.6 | 0.5 ±0.1 | 2.5 ±0.5 | 1.2 ±0.2 | 82.1 ±19.9 | 34.5 ±11.6 | 221.3 ±45.5 |
| | 1,000 | 5.4 ±0.6 | 3.4 ±0.4 | 15.3 ±2.9 | 0.5 ±0.1 | 2.0 ±0.3 | 1.5 ±0.1 | 81.3 ±14.8 | 31.2 ±9.9 | 199.8 ±29.4 |

1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi

All values are expressed as mean ± S.D.

5) 육안소견 및 장기중량의 변화

시험물질 투여에 의한 육안 소견상 이상이 있는 개체는 관찰되지 않았다. 모든 투여 군에서 시험물질 투여에 의한 변화는 인정되지 않았다 (표 12).

표 12. Organ weights in rats orally treated with SK-L and ACK-L for 14 days

| Group ¹⁾ | Dose (mg/kg) | Organ(g) | | |
|---------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| | | Liver | Kidney | Testis |
| SK-L | 0 | 7.68±0.74 | 0.77±0.04 | 1.48±0.08 |
| | 1,000 | 7.33±0.55 | 0.76±0.03 | 1.50±0.02 |
| ACK-L | 0 | 7.68±0.74 | 0.77±0.04 | 1.48±0.08 |
| | 1,000 | 7.34±0.37 | 0.75±0.01 | 1.49±0.11 |

1) SK-L : Standard Kimchi, ACK-L : Anti-cancer Kimchi

All values are expressed as mean ± S.D.

6) 결론

이상과 같이 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료에 대한 아급성독성시험에서 체중, 일반증상, 사료 섭취량, 음수량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 소견, 장기 중량, 병리조직학적 검사 등에서 특이한 독성병변은 관찰되지 않았으며, 본 시험조건에서 표준김치(SK-L)와 항암김치(ACK-L) 시료의 SD 계 흰쥐에 대한 14 일간 반복 경구 투여 시 무관찰 부작용량은 1,000 mg/kg 이상인 것으로 인정되었다.

나. 항암김치의 항산화효능

1) Total phenolic content

총 페놀함량은 항암김치>표준 김치 순이었고, 항암김치는 9.38 µg Tannic acid equivalent/mg Extract 이었고 표준 김치는 5.03 µg Tannic acid equivalent/mg Extract 이었다 (그림 51).

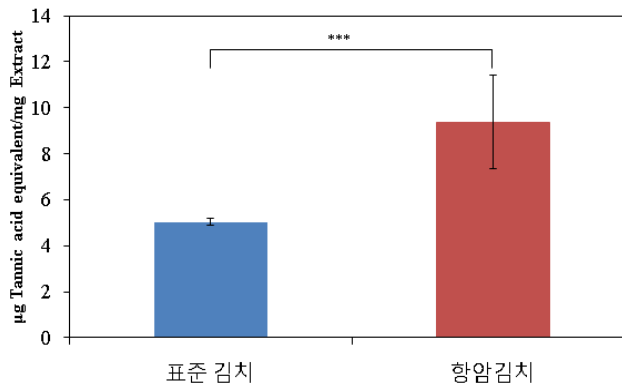


그림 51. 표준김치 및 항암김치의 총 폴리페놀 함량

2) DPPH analysis

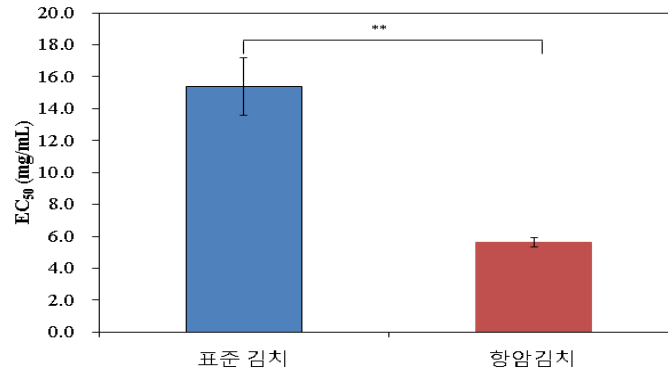


그림 52. 표준김치 및 항암김치의 DPPH 라디칼 소거능

DPPH의 소거능력을 EC₅₀로 나타내었을 때 항암김치>표준 김치 순서로 나타났고, 항암김치는 5.61 mg/mL이었고 표준 김치는 15.39 mg/mL로 나타났다 (그림 52).

3) ABTS assay

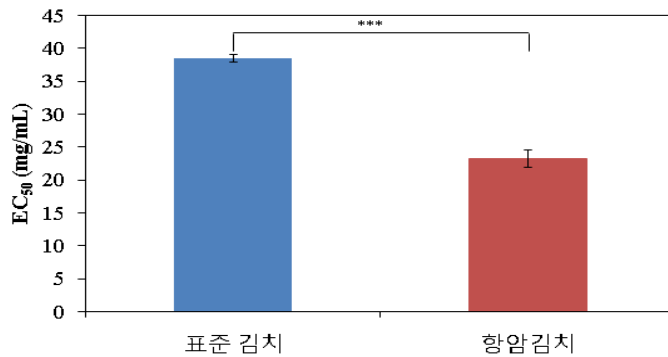


그림 53. 표준김치 및 항암김치의 ABTS 양이온 소거능

ABTS 양이온 라디칼 소거능을 EC₅₀로 나타내었을 때 항암김치>표준 김치 순으로 나타났고, 항암김치는 23.19 mg/mL이었고 표준 김치는 38.52 mg/mL이었다 (그림 53).

4) FRAP assay

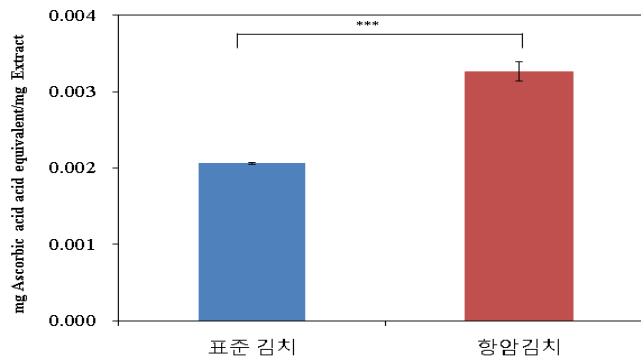


그림 54. 표준김치 및 항암김치의 환원력

시료의 환원력을 실험해 본 결과, 항암김치>표준 김치 순으로 나타났다. 항암김치는 0.002mg Ascorbic

acid equivalent/mg Extract 이었고 표준 김치는 0.003 mg Ascorbic acid equivalent/mg Extract 이었다 (그림 54).

5) ORAC assay

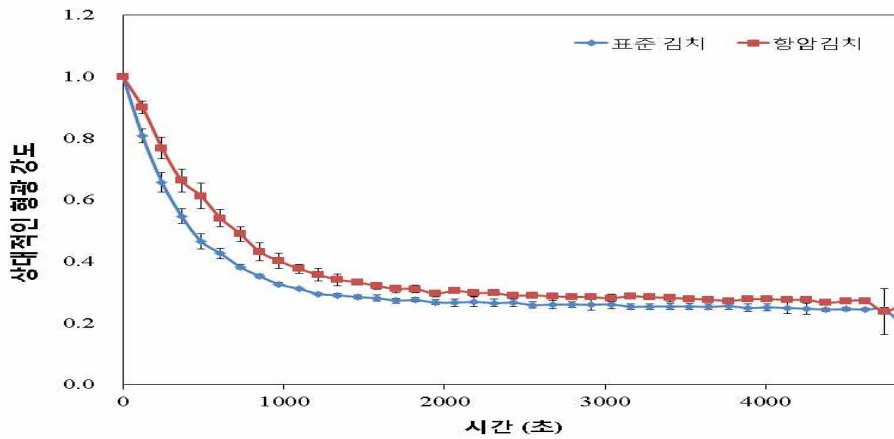


그림 55. 표준 김치 및 항암김치의 시간경과에 따른 상대적인 형광강도

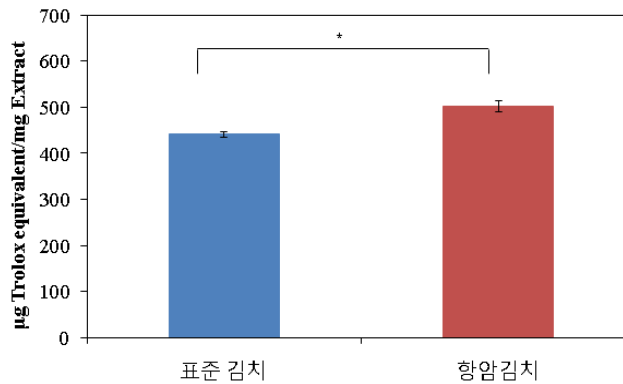


그림 56. 표준 김치 및 항암김치의 ORAC값

표준 김치 및 항암김치를 0.05 mg/mL (50ppm) 동량을 처리하였을 때, 항산화력을 나타내는 것으로, 동량의 처리시 항암김치>표준 김치 순으로 나타났다. 항암김치는 502.01±12.7 µg Trolox equivalent/mg Extract 이고 표준 김치는 441.16±5.4 µg Trolox equivalent/mg Extract 이었다 (그림 55,56).

6) 항암김치의 라디칼 소거능 측정

(1) DPPH 소거능 측정

전자공여 측정에 사용된 DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되는데 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대하여 소거활성을 기대할 수 있다.

그림 57에서 살펴보면 모든 김치 실험군에서 농도 의존적으로 DPPH 소거능이 증가하는 양상을 보였다. 전반적으로 시판김치보다 표준김치, 암예방김치 및 항암김치의 효과가 농도별로 높은 것으로 나타났다. 1000 µg/mL 농도에서는 시판김치를 제외한 나머지 군에서 모두 89.7% (표준김치), 92.6% (암예방김치), 91.1% (항암김치)의 높은 DPPH 소거능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

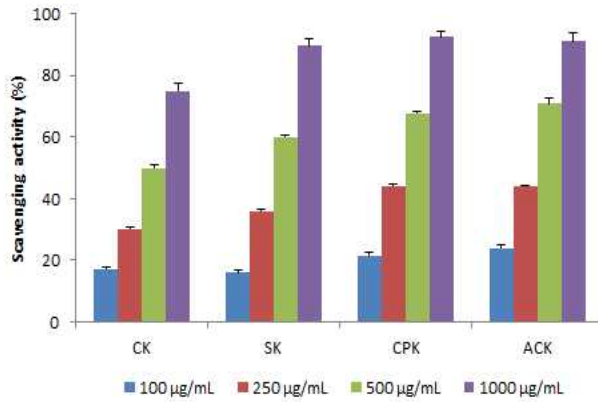


그림 57. 김치의 DPPH 소거능

(2) ·OH 소거 효과

·OH는 세포에 손상을 주는 가장 반응성이 크고 강력한 free radical로, 세포막의 지질과산화 반응을 일으키고, 특히 DNA 및 결합조직 기질에 심각한 손상을 야기하는 것으로 알려져 있다. 이러한 ·OH는 fenton반응에 의해 O_2^- 와 H_2O_2 로부터 생성되며 RNS인 ONOO⁻의 분해에 의해 생성되기도 한다. ·OH의 직접적인 소거효과는 radical에 의한 세포 손상 예방에 중요하다. 표준김치 및 항암김치의 ·OH 소거효과를 살펴보면 모든 김치군 및 실험 농도에서 85% 이상의 높은 ·OH 소거 효과를 나타냈다. ·OH 소거능의 경우에는 500 µg/mL 농도의 암예방김치의 ·OH 소거 효능이 90% 이상으로 가장 높은 것을 나타냈다 (그림 58).

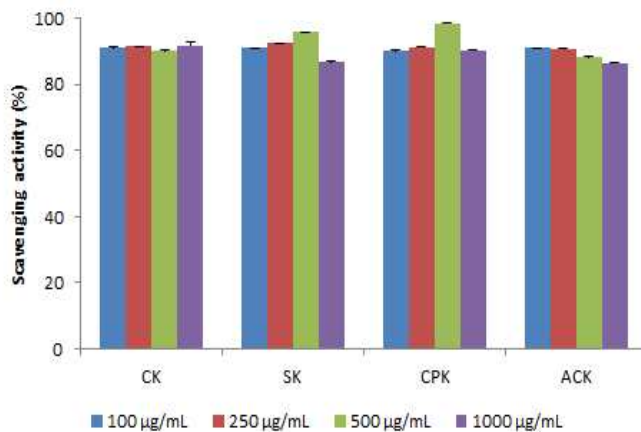


그림 58. 김치의 ·OH 소거 효과

(3) NO 소거 효과

NO는 생체 속에 항상 소량의 일정 농도로 생성되어 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관의 긴장도 조절, 혈관확장, 혈소판 응집 등 다양한 생리 기능을 나타낸다. 그러나 과다하게 생성된 NO는 O_2^- 와의 결합으로 ONOO⁻를 생성하여 필수 단백질, 지질, 핵산, 아미노산 등과 같은 세포 내 물질들을 불활성화 시키게 되어 과잉으로 생성된 NO를 제거하게 되면 free radical의 독성으로부터 보호효과를 기대할 수 있다. 전체적으로 시료에서 NO 소거능이 크게 나타나지 않았으나 항암김치의 경우 500 µg/mL 농도에서 50%가 넘는 소거능을 보였으며, 1000 µg/mL농도에서는 86.9% 소거능을 나타내어 매우 뛰어난 효과를 보였다 (그림 59).

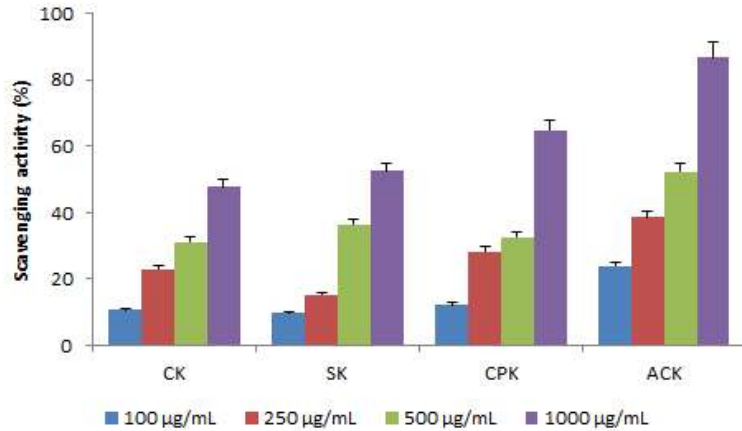


그림 59. 김치의 NO 생성 억제 효과

다. 3T3-L1 전 지방세포주의 지방세포분화 억제능 검증

1) 3T3-L1 지방세포의 세포독성

물과 에탄올에 녹인 표준김치와 항암김치의 전지방세포의 생존율에 미치는 효과를 측정된 결과(그림 70, 71), 시료를 첨가하지 않은 대조군에 물에 녹인 표준김치와 항암김치의 경우 10, 25, 50, 100, 200, 500 µg/mL 처리함에 따라 200µg/mL 농도까지는 유의적인 차이가 없었고, 500 µg/mL 농도에서는 표준김치와 항암김치가 각각 88.1%, 79.5%로 나타나 대조군과 비교하여 유의적으로 차이가 나타났다(그림 60). 그러나 표준김치의 경우는 12% 감소, 항암김치의 경우는 20.5%가 감소하여서 세포독성수준은 아닌 것으로 사료되어 표준김치나 항암김치나 3T3-L1 지방세포에 세포독성에 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다.

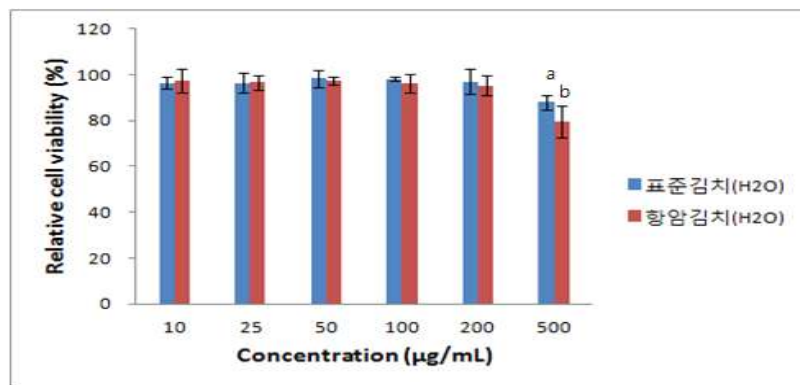


그림 60. 물에 녹인 표준김치와 항암김치의 농도별 3T3-L1 전지방세포의 생존율

에탄올에 표준김치와 항암김치를 녹인 경우, 전지방세포의 생존율에 미치는 효과를 측정된 결과(그림 61), 시료를 첨가하지 않은 대조군에 물에 녹인 표준김치와 항암김치의 경우 10, 25, 50, 100, 200, 500 µg/mL 처리함에 따라 표준김치의 경우는 200µg/mL 농도에서 83.4%의 세포생존율을 보였고, 500µg/mL에서는 75.6%의 생존율을 보여 대조군에 비해 유의적으로 차이가 났다. 항암김치의 경우는 100µg/mL에서 88%, 200µg/mL에서 75.8%, 500µg/mL에서는 73.9%의 세포생존율을 보여 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 그러나 표준김치의 경우 500µg/mL 처리농도에서 24.4%감소하고, 항암김치에서는 같은 농도에서

26.1% 감소하여 3T3-L1 전지방세포에 세포독성에 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다.

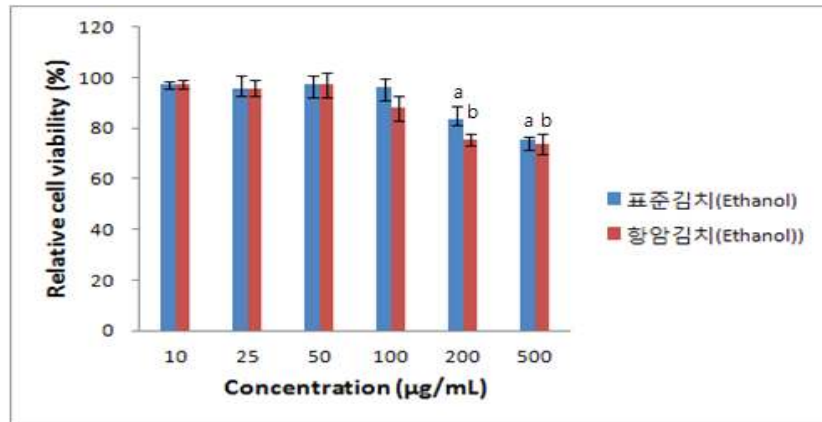


그림 61. 에탄올에 녹인 표준김치와 항암김치의 농도별 3T3-L1 전지방세포의 생존율

2) 3T3-L1 지방세포의 중성지방생성 억제에 관한 항암김치의 효능

물과 에탄올에 녹인 항암김치의 3T3-L1 지방세포 중성지방생성 억제에 관한 효능을 측정된 결과 (그림 62,63), 물에 녹인 표준김치와 항암김치의 중성지방 억제능을 Oil Red O 염색을 하여 관찰한 결과, 지방세포분화군(B)의 경우는 많은 중성지방생성으로 인해 염색이 많이 되었고, 표준김치의 경우는 농도 25, 50, 100 µg/mL 처리함에 따라 농도 의존적으로 감소하였고(C, D, E), 항암김치의 경우도 농도 의존적으로 감소되었는데(F, G, H) 표준김치와 항암김치의 각각의 농도에서 비교해 보면 항암김치가 표준김치 처리보다 더 강력하게 중성지방축적을 감소하는 것으로 관찰되었다(그림 62).

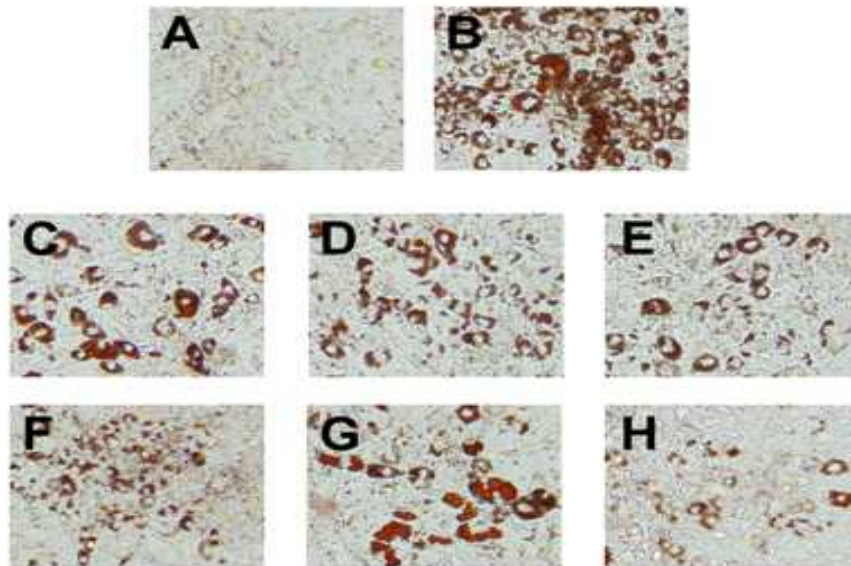


그림 62. 물에 녹인 항암김치의 농도별 3T3-L1 지방세포 중성지방 억제 효능

A: 3T3-L1 전지방세포, B: 3T3-L1 지방세포분화, C: 3T3-L1 지방세포분화시 표준김치 25 µg/mL 처리, D: 3T3-L1 지방세포분화시 표준김치 50 µg/mL 처리, E: 3T3-L1 지방세포분화시 표준김치 100 µg/mL 처리, F: 3T3-L1 지방세포분화시 항암김치 25 µg/mL 처리, G: 3T3-L1 지방세포분화시 항암김치 50 µg/mL 처리, H: 3T3-L1 지방세포분화시 항암김치 100 µg/mL 처리, 100배 확대

에탄올에 녹인 표준김치와 항암김치의 중성지방억제능을 Oil Red O 염색을 하여 관찰한 결과, 지방세포분화군(B)의 경우는 많은 중성지방생성으로 인해 염색이 많이 되었고, 표준김치의 경우는 농도 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리함에 따라 농도의존적으로 감소하였고(C, D, E), 항암김치의 경우도 농도의존적으로 감소되었는데(F, G, H) 표준김치와 항암김치의 각각의 농도에서 비교해 보면 항암김치가 표준김치 처리보다 더 강력하게 중성지방축적을 감소하는 것으로 관찰되었다(그림 63).

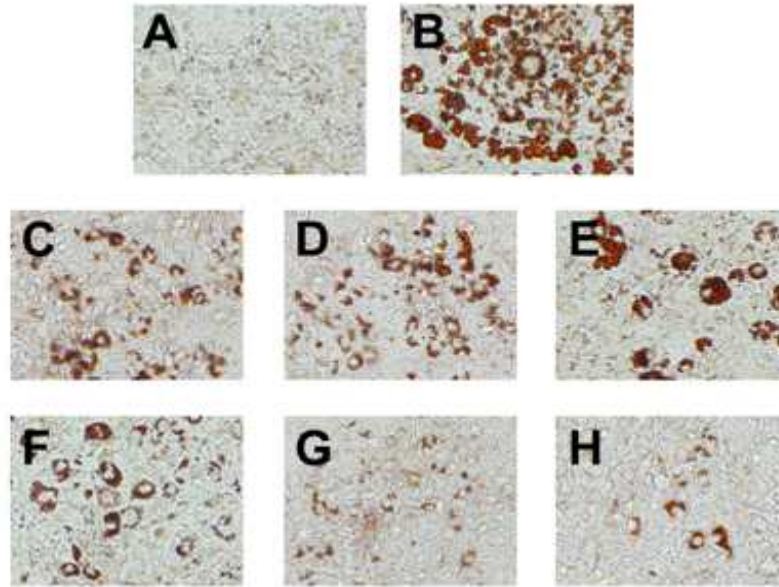


그림 63. 에탄올에 녹인 항암김치의 농도별 3T3-L1 지방세포 중성지방 억제 효능

A: 3T3-L1 전지방세포, B: 3T3-L1 지방세포분화, C: 3T3-L1 지방세포분화시 표준김치 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리, D: 3T3-L1 지방세포분화시 표준김치 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리, E: 3T3-L1 지방세포분화시 표준김치 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리, F: 3T3-L1 지방세포분화시 항암김치 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리, G: 3T3-L1 지방세포분화시 항암김치 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리, H: 3T3-L1 지방세포분화시 항암김치 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리, 100배 확대

3) 3T3-L1 지방세포의 중성지방생성 억제에 관한 항암김치의 효능

물과 에탄올에 녹인 항암김치의 3T3-L1 지방세포 중성지방생성 억제에 관한 효능을 측정하였다(그림 64,65). 물에 녹인 표준김치와 항암김치의 중성지방 축적 억제능을 관찰한 결과(그림 64), 표준김치의 경우도 지방 분화군에 비해 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 유의적으로 중성지방 축적을 억제하는 것을 알 수 있었다. 항암김치의 경우도 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 지방 분화군에 비해 유의적으로 중성지방 축적을 억제하였고, 각각의 농도에서 중성지방축적 억제율을 비교하였을 때 표준김치보다 항암김치가 각각의 농도에서 유의적으로 감소함을 알 수 있었다.

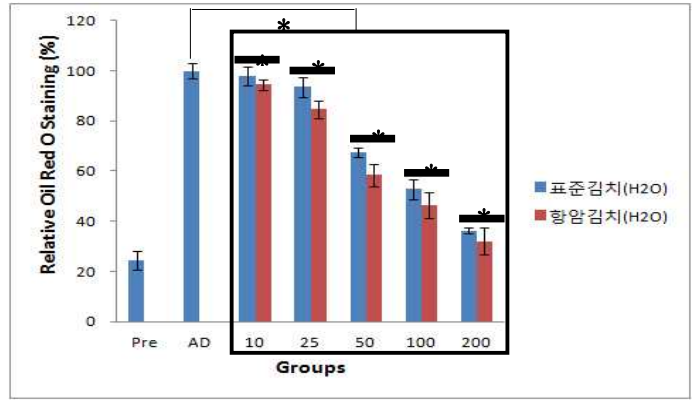


그림 64. 물에 녹인 항암김치의 농도별 3T3-L1 지방세포 중성지방 억제 효능

Pre: 3T3-L1 전지방세포, AD: 3T3-L1 지방세포분화

에탄올에 녹인 표준김치와 항암김치의 중성지방 축적 억제능을 관찰한 결과 (그림 65), 표준김치의 경우도 지방분화군에 비해 25, 50, 100, 200 µg/mL 처리군에서 유의적으로 중성지방 축적을 억제하는 것을 알 수 있었다. 항암김치의 경우도 10, 25, 50, 100, 200 µg/mL 처리군에서 지방 분화군에 비해 유의적으로 중성지방 축적을 억제하였고, 각각의 농도에서 중성지방 축적 억제율을 비교하였을 때 표준김치보다 항암김치가 각각의 농도에서 유의적으로 감소함을 알 수 있었다.

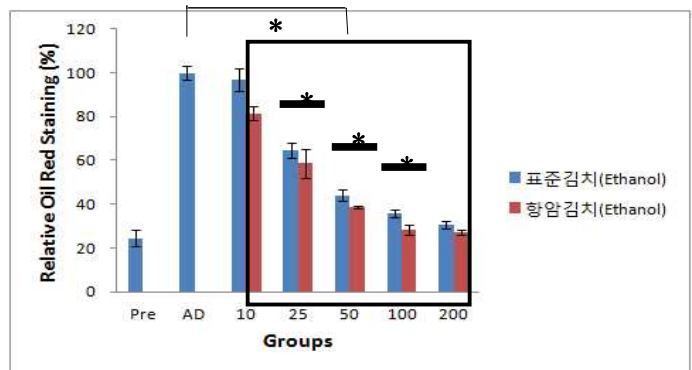


그림 65. 에탄올에 녹인 항암김치의 농도별 3T3-L1 지방세포 중성지방 억제 효능

Pre: 3T3-L1 전지방세포, AD: 3T3-L1 지방세포분화

4) 결론

본 연구결과, 표준김치와 항암김치의 항산화능 비교를 위해 총 phenolic 농도, 자유라디칼 소거능을 검증하기 위한 DPPH 분석, ABTS 분석, 또한 환원력을 측정하기 위한 FRAP assay 및 수용성물질의 항산화력을 측정할 수 있는 ORAC assay를 통해, 항암김치의 월등한 항산화력을 관찰하였고, 지방세포주로 알려진 3T3-L1 지방세포주의 분화를 표준김치와 항암김치가 모두 감소시킴을 관찰할 수 있었다. 특히 항암김치의 항비만능력이 월등하였고 에탄올에 녹였을 때가 물에 녹였을 때 보다 더 큰 항비만능을 보이는 것으로 사료된다.

라. 산화적 스트레스 개선효과 측정

Renal proximal tubule cell은 free radical에 매우 민감한 세포이다. 본 실험에 사용된 LLC-PK1 pig renal tubular cell은 네프론에서 유도된 MDCK darby canine kidney epithelial cell보다 산화적 스트레스에 더욱 민감한 세포이므로 LLC-PK1 세포에 free radical 다양한 generator로 radical 생성을 유도하여 산화적 손상을 일으킨 후 이에 대한 개선 효과를 살펴봄으로써 시료의 산화적 스트레스 개선에 의한 항산화 효과를 살펴보았다. LLC-PK1 세포를 1×10^5 cell/mL로 96 well plate에 분주한 후 세포가 안정화되면 radical generator인 AAPH (10 mM), pyrogallol (250 μ M), SNP (500 μ M), SIN-1 (1 mM)을 각각 24시간 동안 처리한 후 김치 시료를 다시 24시간 동안 처리한다. 그 후 MTT assay를 통해 산화적 스트레스 개선 효과를 측정하였다.

1) AAPH에 의한 산화적 스트레스 개선효과

Free radical initiator로 사용된 AAPH는 hydrophilic azo compounds 중 하나로 다른 효소 작용이나 생리적 변화없이 단분자적으로 변성된다. 이렇게 변성된 AAPH는 두 carbon radical은 다른 carbon radical과 다시 결합하여 안정적인 구조를 취하기도 하지만 대부분은 산소와 반응하여 peroxy radical을 생성하게 되고, 이 peroxy radical은 세포의 손상을 유발하고, 생체 내 단백질, 지질 등에 산화적 스트레스를 주는 요인으로 작용하게 된다. 따라서 LLC-PK1 세포에 AAPH 처리를 한 후 세포 생존율 및 지질과산화 정도를 측정하여 LLC-PK1 cell에 대한 표준김치 및 항암김치의 산화적 스트레스 개선효과를 살펴보았다. AAPH만을 처리한 control군의 세포 생존율은 45.6% 였으나 각 시료를 처리함으로써 세포 생존율이 농도 의존적으로 회복되는 양상을 보였다 (그림 66).

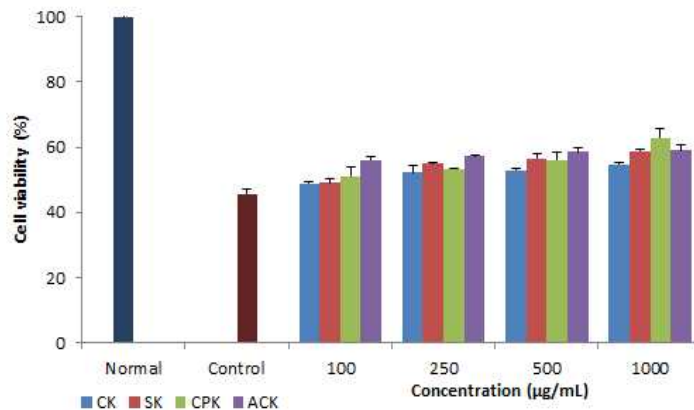


그림 66. LLC-PK₁ 세포에서 AAPH에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 김치의 보호효과

전체적으로 높은 세포 생존율의 변화는 나타나지 않았으나, 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 양상이 나타났다. 특히 항암김치의 경우 100 μ g/mL의 낮은 농도에서부터 시판김치, 표준김치 및 암예방김치의 500 μ g/mL 농도 처리군 보다 높은 세포 생존율을 나타냈다. 그러나 1000 μ g/mL 농도의 경우는 암예방김치가 60% 이상으로 가장 높은 세포 생존율을 보였다.

2) Pyrogallol에 의한 산화적 스트레스 개선효과

Pyrogallol은 H₂O₂의 전구체로 수용액 상태일 때 빠른 자동산화과정을 통해 O₂-를 생성하고, 이렇게 생성된 ROS는 동맥경화 및 혈관 관련 여러 질환의 병리적 매개 물질로 작용하게 된다. 그림 67은 pyrogallol을 처리한 LLC-PK1 세포에 대한 김치의 보호 효과를 세포 생존율로 살펴본 결과이다.

Pyrogallol만을 처리하여 O_2^- 가 유발된 control군의 경우 69.1%의 세포 생존율을 보인 반면 각 김치시료를 처리하였을 때 농도가 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 로 증가할수록 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 본 실험에서는 표준김치 및 암예방김치보다 시판김치 및 향암김치의 효과가 우수하였다. 표준김치는 가장 높은 처리 농도인 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 77.5%의 세포 생존율을 나타냈고, 암예방김치는 80.4%의 세포 생존율을 나타냈다. 그러나 시판김치의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서도 85.2%의 높은 세포 생존율을 나타내 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 95.7%로 normal군의 수준까지 세포 생존율을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 향암김치의 경우도 250과 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 약 88%의 세포 생존율을 나타냈으며, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 93.6%의 세포 생존율을 보였다. 이 결과로 미루어 보아 시판김치 및 향암김치가 pyrogallol에 의해 유발된 O_2^- 에 의한 산화적 스트레스를 효과적으로 개선하는 것으로 사료된다.

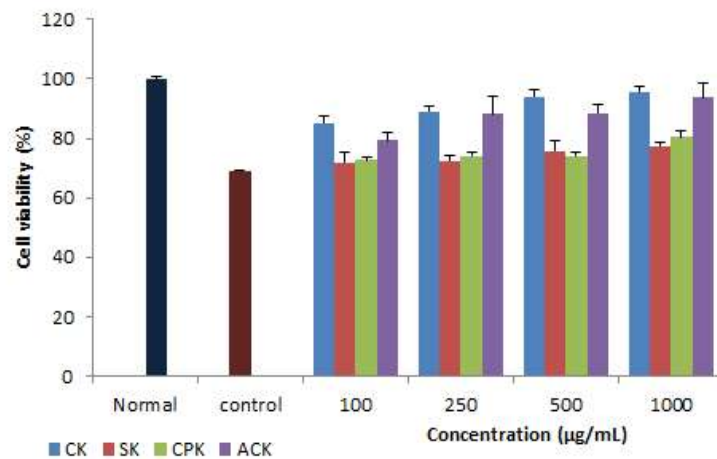


그림 67. LLC-PK₁ 세포에서 pyrogallol에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 김치의 보호효과

3) SNP에 의한 산화적 스트레스 개선효과

SNP는 nitrosodium ion을 함유해 가시광선에 노출될 때 NO를 생성하는 화합물로, 이에 의해 생성된 NO는 인체에서 중요한 생리적 조절인자로 작용하지만 고농도의 NO는 반응성 산화물질로 전환되어 세포에 병적인 손상을 유발한다. NO가 세포 생존에 미치는 영향은 농도와 세포 종류에 따라 다르게 나타나는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 고농도에서는 세포 생존율에 해로운 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. NO에 의한 산화적 스트레스 개선 효과를 살펴보기 위해 LLC-PK1 세포에 SNP처리로 NO를 유발해 산화적 스트레스를 가한 후 이에 대한 김치의 세포 보호 효과를 확인하였다. 그림 68에서 SNP만을 처리한 control군은 세포 생존율이 30.3%로 감소하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 확인할 수 있었다. 이에 대한 김치 시료 처리군의 세포 생존율을 살펴보니, 표준김치의 경우 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지는 약 50% 수준을 나타내고, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 77.5%의 세포 생존율을 나타냈다. 이에 비해 시판김치, 암예방김치, 향암김치의 경우 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 약 70%, 80%, 90%의 이상의 세포 생존율을 나타냈다. 또한 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 normal 수준 이상의 세포 생존율을 보여 세포 보호 효과를 넘어서 증식 효과가 탁월한 것을 확인할 수 있었다.

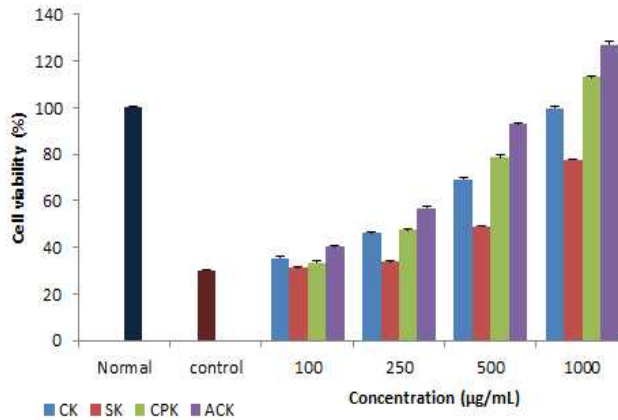


그림 68. LLC-PK₁ 세포에서 SNP에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 김치의 보호효과

4) SIN-1에 의한 산화적 스트레스 개선효과

SIN-1은 NO와 O₂⁻를 생성하고 이들은 급속히 반응하여 ONOO⁻를 형성하며 이는 강력한 cytotoxic oxidants로 분해되기 때문에 독성효과를 나타내게 된다. LLC-PK1 세포에 SIN-1을 처리하여 ONOO⁻에 의한 산화적 스트레스를 유발시킨 후 이에 대한 김치의 보호 효과를 세포 생존율을 통해 살펴보았다 (그림 69). SIN-1만을 처리한 control군은 세포 생존율이 67.7%로 감소하였다. 이에 대해 김치시료를 처리한 실험군 모두 세포 생존율이 농도의존적으로 증가하는 양상을 나타냈다. 표준김치와 암예방김치의 경우 1000 µg/mL 농도에서 약 80% 수준의 세포 생존율을 나타냈다. 반면 시판김치와 항암김치는 100 µg/mL의 낮은 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타냈고, 500 µg/mL 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내 1000 µg/mL 농도에서는 normal 수준으로 세포 생존율을 회복시키는 것을 확인할 수 있었다.

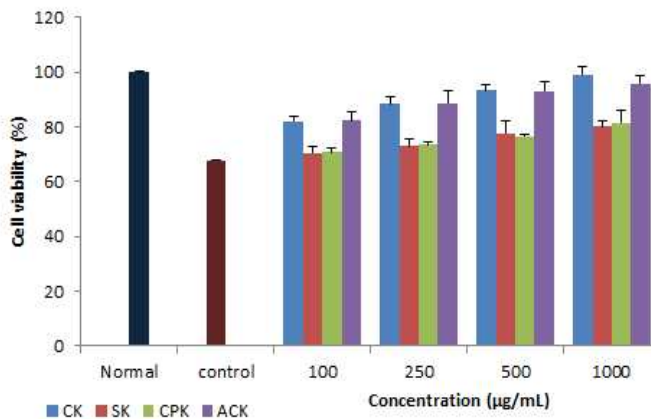


그림 69. LLC-PK₁ 세포에서 SIN-1에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 김치의 보호효과

5) NO 생성 억제 효과

NO가 필요 이상으로 생성되면 독성으로 인한 세포에 산화적 손상을 유발하게 된다. 이러한 NO에 대한 표준김치와 항암김치의 생성 억제 효과를 살펴보았다. LLC-PK1에 SIN-1을 처리하여 NO를 생성시키고 생성된 NO의 양을 griess 시약을 사용하여 측정하였다. 그 결과, SIN-1만을 처리한 control군은 57.3%의 NO를 생성한 반면 500 µg/mL 농도의 김치를 처리하였을 때 표준김치는 40.8%, 항암김치는 30.2%로 항암김치의 경우 아무것도 처리하지 않은 normal군의 NO 생성량 (26.8%)과 유사한 수치까지 NO 생성을 낮추는 것을 확인할 수 있었다 (그림 70).

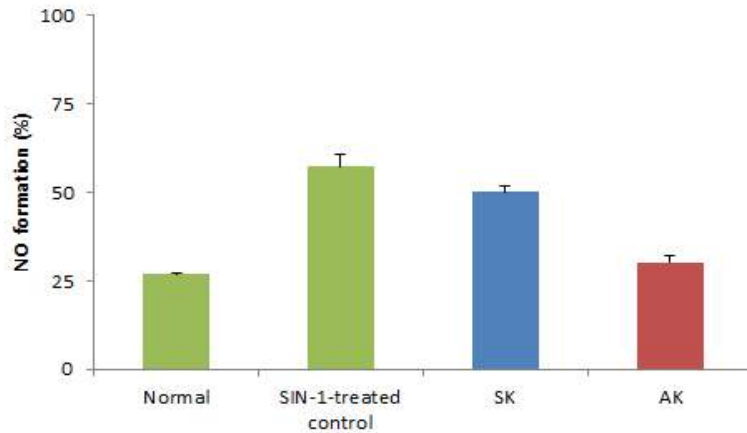


그림 70. LLC-PK₁ 세포에서 김치에 의한 NO 생성 억제 효과

마. Cellular system에서의 항노화 효과 측정

Human diploid fibroblast (HDF) 세포는 in vitro 세포 배양과정에서 계속 자라지 못하고 제한된 회수로 분열한 후 세포의 증식 및 성장을 정지하는데, 이러한 현상을 세포노화라고 한다. in vitro에서 노화된 HDF는 in vivo에서 노화된 HDF와 같은 형태를 보여주며 유전자의 발현양상도 유사한 것으로 보고되어 HDF는 human cells에서 노화관련 분자 변화를 연구하기 위해 세포노화의 전형적인 실험 모델로써 사용되어진다. 그리하여 WI-38 human diploid fibroblast cell을 이용하여 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발한 뒤 김치의 항노화 효과를 검토하였다.

1. Premature senescence에 대한 김치의 보호효과

1) 시료 전처리를 통한 세포노화에 대한 보호효과

WI-38 cell에 먼저 시료를 24시간 동안 처리하여 세포를 보호한 뒤 고농도의 H₂O₂ 300 μM을 60분간 가하여 생체 내에서 세포의 premature senescence (PS)를 유도한 후 세포 생존율을 측정하여 대한 김치의 노화 예방 효과를 검토하였다. WI-38 cell에 300 μM의 H₂O₂만을 처리한 control군의 경우 세포 생존율이 54.0%로 normal군에 비해 약 50% 정도 감소되어 세포 노화가 유도되었음을 확인할 수 있었다. 반면 김치 시료를 처리함에 따라 PS control (PSC)군에 비해 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였다. 표준김치의 경우 250 μg/mL 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 1000 μg/mL 농도에서는 약 90%에 달하는 세포 생존율을 보였다. 표준김치를 제외한 나머지 김치시료의 경우 100 μg/mL의 낮은 농도에서 92.3% (시판김치), 91.5% (암예방김치), 94.9% (항암김치)의 세포 생존율을 나타내며 그 이상의 농도에서는 normal 수준으로 세포 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (그림 71).

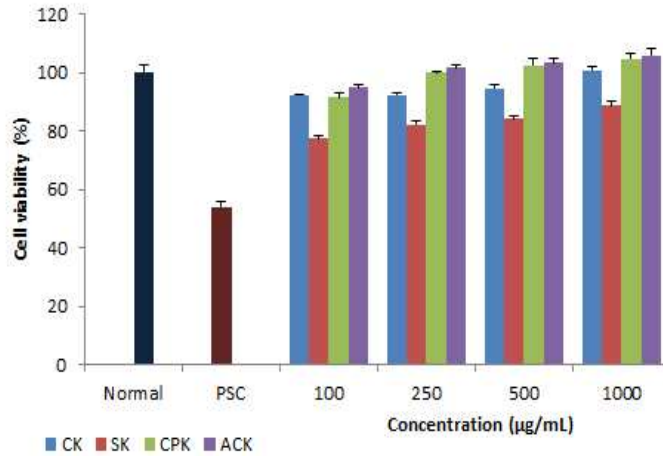


그림 71. H₂O₂에 의해 유발된 조기노화에 대한 김치 시료 전처리에 의한 WI-38 세포 보호효과

2) 시료 후처리를 통한 세포노화에 대한 보호효과

WI-38 cell에 먼저 H₂O₂ 50 µM을 60분간 처리하여 세포의 PS를 유도한 후 시료를 24시간 후처리하여 세포 생존율과 지질 과산화 정도를 통하여 김치의 항노화 효과를 검토하였다. 그림 72에서 WI-38 cell에 H₂O₂만을 처리한 control군의 경우 세포 생존율이 65.4%로 세포 노화가 유도되었음을 확인할 수 있고, 반면 김치를 농도별로 처리함에 따라 PSC군에 비해 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 1000 µg/mL 농도에서는 모든 김치 시료 처리군에서 85% 이상의 높은 세포 생존율을 나타냈다. 그 중에서 항암김치의 경우는 100 µg/mL의 낮은 농도에서 84.1%의 높은 농도를 나타내고 모든 실험농도에서 가장 높은 세포 생존율을 보였다.

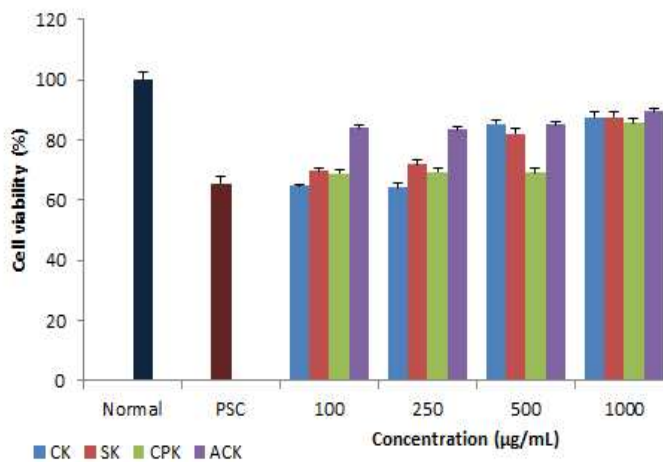


그림 72. H₂O₂에 의해 유발된 조기노화에 대한 김치 시료 후처리를 통한 WI-38 세포 보호효과

2. 김치의 수명연장 효과

본 연구에서는 세포노화의 실험모델의 일종인 WI-38 cell을 이용하여 세포의 생리학적 노화와 산화적 스트레스에 의한 노화 과정에서 세포의 수명에 김치 시료가 미치는 효과 차이를 살펴보았다.

1) 생리학적 노화에 대한 세포 수명 연장 효과

WI-38 cell에 대한 발효단계별 김치의 세포 수명 연장효과를 살펴보기 위해 young, middle age-group

의 WI-38 cell을 사용하여 시간이 경과에 따른 생리학적 노화에 대한 김치의 세포 수명 연장효과를 살펴보았다 (표 13). Young age group에서 PDL 26의 세포가 PDL 38로 현재까지 지속적으로 배양되고 있다. 또한 Middle age group의 경우는 PDL 42에서 PDL 43으로 계속 성장 중이다. 생리학적 노화 세포의 경우 지속적으로 성장이 이루어지고 있고, 앞으로 연구 종료일까지 지속적으로 배양하면서 세포가 사멸할 시점까지 지켜볼 계획이다.

표 13. 김치가 세포 수명에 영향을 미치는 효과 측정

| | Life span | |
|--------|---------------|----------------|
| | Young age PDL | Middle age PDL |
| Normal | 26 → 38 (진행중) | 42 → 43 (진행중) |
| CK | 26 → 38 (진행중) | 42 → 43 (진행중) |
| SK | 26 → 38 (진행중) | 42 → 43 (진행중) |
| CPK | 26 → 38 (진행중) | 42 → 43 (진행중) |
| ACK | 26 → 38 (진행중) | 42 → 43 (진행중) |

2) 산화적 스트레스에 대한 세포 수명 연장 효과

WI-38 cell을 young, middle age-group으로 나누어 각각의 group에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스에 의한 세포 노화를 유도하고 세포의 수명을 측정함으로써, 김치 시료의 세포 수명 연장 효과를 검토하였다. Young, middle age-group에서 H₂O₂를 처리하여 PS를 유도한 WI-38 cell에 대한 김치의 세포 수명 연장효과를 살펴보면, 먼저 PDL이 26인 young age-group cell의 경우 H₂O₂만 처리한 군은 세포노화로 인해 PDL 28에서 더 이상 성장을 하지않는 것을 확인할 수 있었다. 반면, H₂O₂를 처리한 후 김치를 처리하여 연속적으로 배양한 군에서는 PDL이 현재 29으로 증가하였다. 또한, PDL이 42인 middle age-group의 cell은 H₂O₂만 처리했을 때 세포노화로 인해 PDL 42로 성장하지 않음을 볼 수 있었고, H₂O₂를 처리한 후 김치 시료를 처리하여 연속적으로 배양한 군을 대조군에 대해 PDL이 43으로 증가하는 것으로 나타났다으며 현재 지속적으로 배양이 진행중이다 (표 14).

표 14. 김치가 H₂O₂로 인한 산화적손상을 받은 세포의 수명에 영향을 미치는효과 측정

| | Life span | |
|-------------------------------|---------------|----------------|
| | Young age PDL | Middle age PDL |
| H ₂ O ₂ | 26 → 28 | 42 → 42 |
| CK | 26 → 29 (진행중) | 42 → 43 (진행중) |
| SK | 26 → 29 (진행중) | 42 → 43 (진행중) |
| CPK | 26 → 29 (진행중) | 42 → 43 (진행중) |
| ACK | 26 → 29 (진행중) | 42 → 43 (진행중) |

바. *In vivo*에서 김치(표준김치, SK) 추출물의 인지능력 향상 효과

Amyloid precursor protein (APP)로부터 유래되는 40~42개의 아미노산 잔기로 이루어진 amyloid beta (Aβ)는 Alzheimer's disease (AD) 환자의 뇌 내의 노인반에 축적되는 주요물질로, AD 발병에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다. 그러므로 본 연구에서는 ICR mouse를 이용하여 뇌에 Aβ₂₅₋₃₅를 주입

하여 AD 동물 모델을 확립하였다. 실험군은 총 4가지 군으로 설정하였으며 (normal, control, 100, 200), normal군에는 뇌에 A β 25-35대신 생리식염수를 주입하였고, 나머지 세 군에는 A β 25-35를 주입하였다. 또한 normal과 control군에는 음용수, 나머지 실험군에는 표준김치 추출물을 농도별로 100 mg/kg, 200 mg/kg을 각각 100과 200군에 2주간 위내투여를 실시하였다. 전 실험기간 동안 체중을 측정하였으며, 또한 위내투여 1주일 이 되는 시점부터는 물체인지, T-maze, Morris water maze 실험 등의 행동 실험을 통해 mouse의 행동변화를 측정하였다.

1) 체중 변화 추이

실험 첫 날부터 마지막 날까지 체중의 변화량을 측정하였다 (그림 73). 실험기간동안 전 실험군에서 체중이 꾸준히 증가하였으며 유의적 변화를 보이지 않았다. 또한 1주일 이 지난 후 식염수 및 A β 25-35를 뇌에 주입한 시점에서 모든 실험군이 건강한 상태로 체중이 계속적으로 증가하는 양상을 나타냈다.

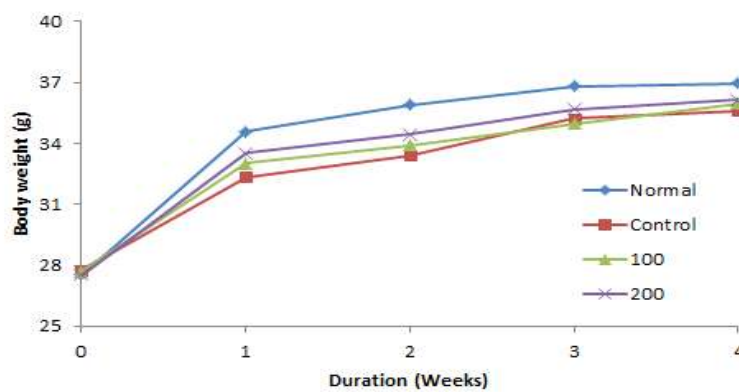


그림 73. 실험 기간 중 체중 추이 변화

2) 행동실험을 통한 인지능력 향상 효과

(1) 물체인지 실험을 통한 물체 인지능력 향상 효과

물체인지 실험은 간단하고 빠르며 유용한 방법으로 새로운 환경에 노출된 실험동물의 자연적이고 탐구적인 능력에 기초를 두고 있다. 이전에 봤던 물체와 새로운 물체 사이에 탐구력의 차이는 기억 행동의 지표로써 수행되며 단기 기억의 모델로써 이용되어 진다. Mouse에게 동일한 두 물체를 제시하면 자연스럽게 호기심이 유발되어 두 물체를 탐지하게 되는데 이 때 통상적으로 두 물체를 탐지하는 횟수가 비슷하다. 24시간 후 두 물체 중 하나를 새로운 물체로 대체 시키면 일반적으로 mouse는 새로운 물체에 대해 더 많은 호기심을 가지는 습성 때문에 새로운 물체를 탐지하는 횟수가 더 증가하게 된다. 그러나 기억력이 손상된 mouse는 새로운 물체와 기존의 물체를 구분해내지 못해 두 물체 간 탐지 횟수에 큰 차이를 나타내지 않게 된다. 따라서 본 실험에서는 A β 25-35에 의하여 유도된 뇌 손상 모델에 2주간 김치 추출물을 위내투여한 후 물체인지 실험을 통해서 인지능력 향상에 보호 효과가 있는지 확인해 보았다 (그림 74). Control군의 경우에는 기존의 물체와 새로운 물체를 인지하는 비율이 각각 50.8%와 49.5%로 기존 물체와 새로운 물체에 대한 인지도의 차이를 보이지 않았다. 이는 A β 25-35에 의한 기억 손상으로 인해 새로운 물체임을 인지하지 못한 것으로 보여진다. 반면, 새로운 물체를 인지하는 비율이 Normal군은 61.0%, 100, 200군은 각각 70.8%, 64.3%로 새로운 물체에 대한 호기심으로 접촉 빈도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서는 normal군보다 김치 추출물이 새로운 물체에 대한 호기심 정도가 더 큰 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 보아 김치 추출물이 A β 25-35에 의한 뇌 손상에 대한 인지능력 향상 효과가 있다고 사료되어 진다.

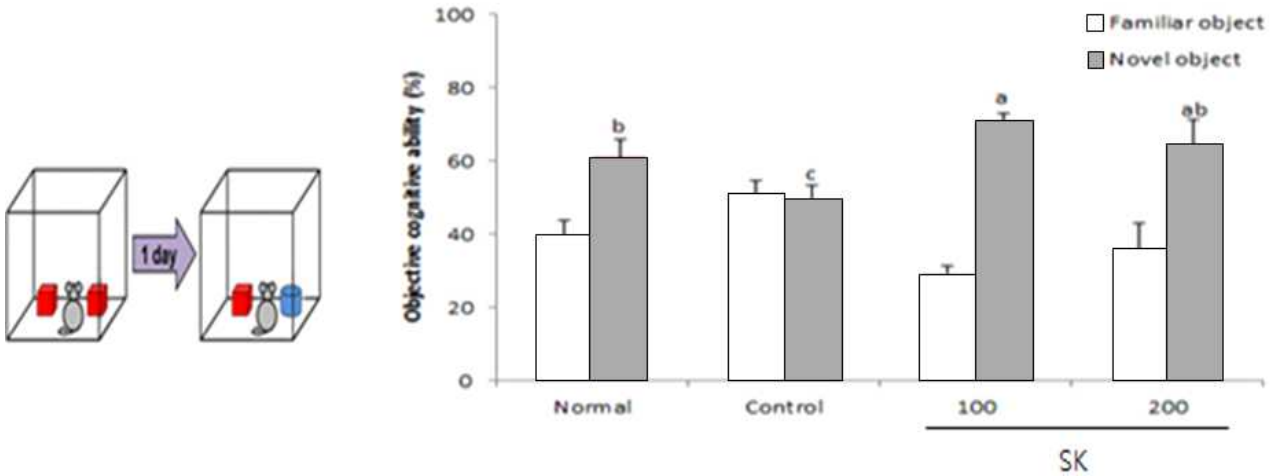


그림 74. 물체 인지 결과값이 백분율 변화

(2) T-maze 실험을 통한 공간 인지능력 향상 효과

Mouse는 새로운 물체뿐 아니라 새로운 공간에 대한 호기심이 많은 동물이다. 이런 점을 착안하여 T-maze 실험을 실시하였다. Mouse를 T-maze의 출발지점에 두고 실험 첫 날은 오른쪽과 왼쪽 길 중에 오른쪽 길을 막아 왼쪽 길에만 들어갈 수 있도록 하였다. 24시간 후에 막았던 오른쪽 길을 열어 새로운 길로 들어가는 횟수를 기록한다. 새로운 길에 대한 호기심을 비율 (%)로 나타내었을 때 normal군은 56.2%였고, control군은 49.6%로 나타났다. 반면 김치 추출물을 투여한 100과 200군은 각각 57.5%, 58.7%로 높은 공간인지능력을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (그림 75).

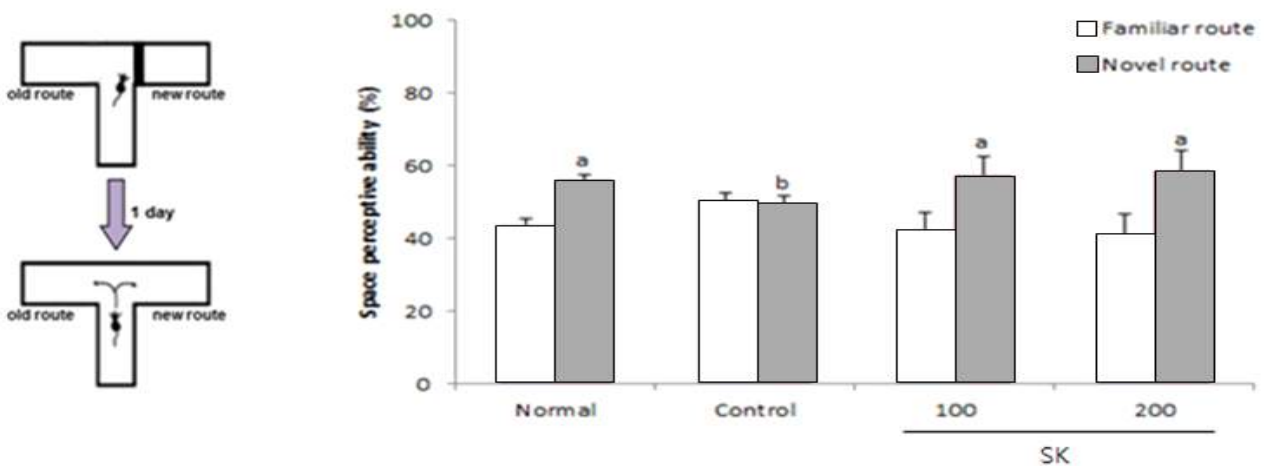


그림 75. T-maze에서의 공간 인지 능력 측정

(3) Morris water maze 실험을 통한 공간 인지 능력 향상 효과

Mouse는 천부적으로 공간기억능력 및 수영능력이 상당히 뛰어난 것으로 알려져 있다. 또한, mouse의 해마는 다른 동물과 비교해 상대적으로 크므로, 해마 의존적 공간학습 능력을 평가하는 수중미로 실험을 시행하였다. Morris의 수조미로는 동물의 공간학습능력과 그에 대한 기억능력을 검사하기 위해서 사용하는 과제로서, 주로 유기체가 주변에 있는 여러 단서들을 사용하고 기억하는 능력, 즉 공간준거기억

을 측정하는 것이라고 알려져 있다. 또한 학습시행을 실시한 지 24시간 후에 다시 학습이 이루어지기 때문에 동물이 전날까지 학습했던 내용을 잘 기억하고 이 기억에 따라 학습의 효율성이 결정되기 때문에 이 과제는 장기기억력을 측정하는 것이라고 할 수 있다. 따라서 T-maze 실험과 물체인지 실험을 통하여 확인된 단순 기억력 증진 효과보다 좀 더 수준이 높은 기억력을 요구하는 수중미로 실험을 통해 김치 추출물이 학습과 기억력에 미치는 영향을 검사하였다.

그림 76은 Morris water maze 실험동안에 mouse가 도피대에 도달하는 시간의 변화추이를 나타낸 것이다. 훈련 기간이 지남에 따라 도피대에 도달하는 시간이 줄어든 것을 확인할 수 있었지만, Aβ25-35을 투여한 control군은 도피대에 도달하는 시간이 다른 실험군에 비해 가장 길게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 반면 김치 추출물을 투여한 100과 200군에서는 마지막 도피대 도달 시간이 normal군과 유사하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 200군은 normal군보다 전체적으로 도피대 도달 시간이 낮아 인지능력 향상에 큰 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 김치 추출물의 위내투여 실시로 Aβ 25-35에 의한 인지능력 손상을 보호하여 mouse가 도피대의 위치를 인지하고 찾아가는 시간이 줄어든 것으로 보이고, 따라서 mouse의 인지능력 손상에 보호 효과를 나타낸 것이라 사료된다.

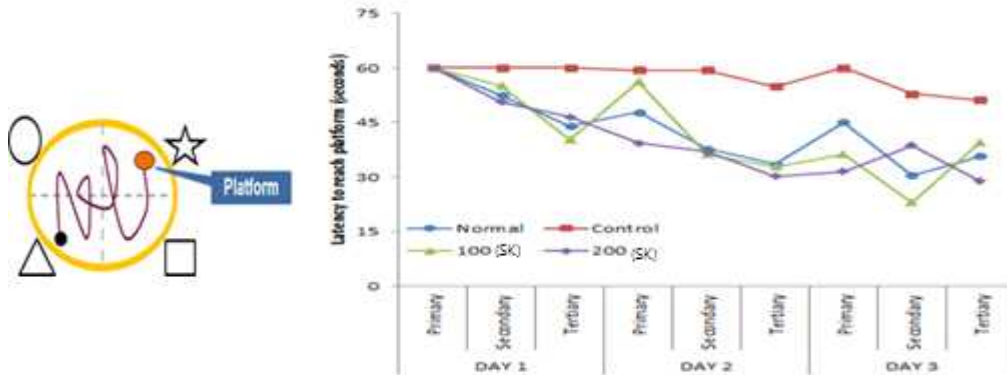


Fig. 76. 3일 동안 도피대로 mice의 도달 시간 변화 추이

4일 째 진행된 실험에서 도피대를 치우고 도피대가 있었던 사분면에 mouse가 머문 시간을 측정하였다 (그림 82). Control군이 머문 시간은 10.4%인 반면 100과 200군에서는 도피대가 있었던 사분면에 머문 시간이 유의적으로 증가하여 27.0%, 22.4%를 나타냈다. 김치 추출물을 투여한 두 군 모두 normal 수준 (22.4%)으로 도피대가 있었던 사분면에 머무르는 것으로 확인되었다. 도피대가 존재하던 사분면에 머무른다는 것은 mouse가 네 개의 사분면에 붙여진 표식을 인지하고 도피대가 있었던 사분면을 기억하고 있으며 도피대를 찾기 위해 그 사분면에 머문 것으로 학습과 기억력을 나타내는 것이라 볼 수 있다. 이전 두 실험 결과로 김치 추출물의 공간학습 및 기억능력 향상을 확인할 수 있었다. 또 다른 실험은 mouse가 도피대를 찾아가는 것이 인지능력이 아닌 운동능력이나 시각능력으로 인한 것인지를 알아보기 위해 물 속에 도피대를 숨겨놓은 상태에서 도피대를 찾아가게 하는 실험과 도피대로 보이도록 설치한 후 도피대를 찾아가도록 실험을 실시하였다. 숨겨진 도피대를 찾아가도록 하였을 때 normal군 및 김치 추출물 투여군은 control군보다 도피대를 찾아가는 시간이 빨랐고, 노출된 도피대를 찾아가도록 하였을 때는 normal군을 비롯한 control군과 김치 추출물을 투여한 100과 200군 모두 도피대를 찾아가는 시간에 유의적인 차이가 없었다 (그림 77, 78). 이로 인해 Morris water maze 실험에서 두 데이터 값이 운동능력의 차이나 시각적 차이로 인한 문제가 아닌, 기억력 손상으로 인한 공간인지능력의 차이로 인해 일어나는 것임을 확인할 수 있다. 이상의 실험 결과를 통해 김치 추출물이 인지능력 손상에 대한 보호효과가 있고 학습과 기억능력에도 영향을 미친다고 사료되어 진다.

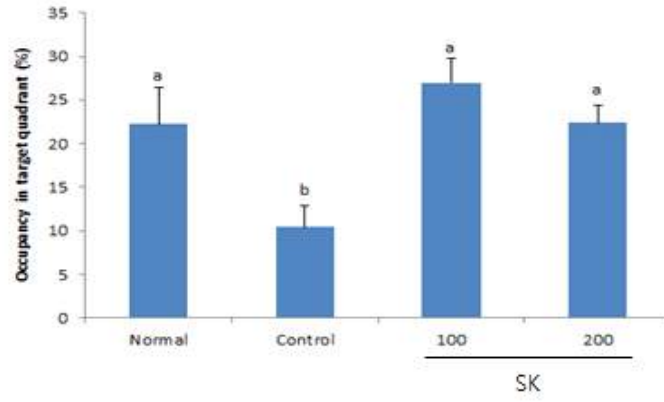


Fig. 77. 도피대가 있던 사분면에 머무르는 시간 비율 측정

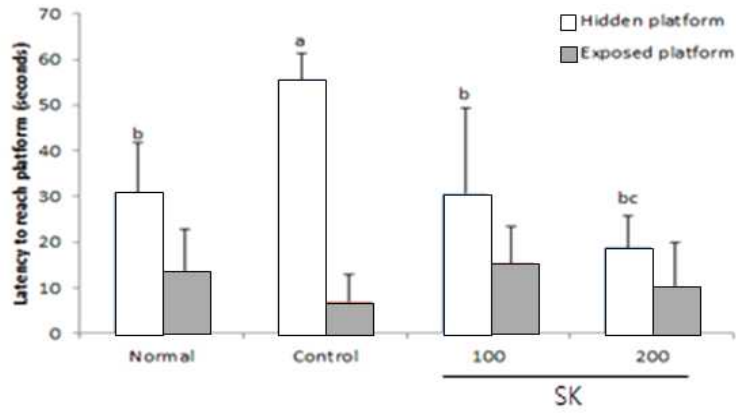


그림 78. 노출된 도피대 및 숨겨진 도피대로의 도달 시간 측정

4. 연구성과

가. 기술적 연구성과 기재

○ 연구성과(건수로 표기)

| 구분 | 연구논문 | 학술발표 | 지식재산권 | 기술이전/ 제품화 | 기타 | 계 |
|------|---------------------------|---------------------|-------|--------------|----|----|
| 1차년도 | 5 (SCI(E): 2, KSCI: 3) | 8 (국외: 3, 국내: 5) | 0 | 0 | 0 | 13 |

<1 세부>

-연구논문- (SCI(E): 2, KSCI: 2)

- Hee-Young Kim, Jia-Le Song, Hee-Kyung Chang, Soon-Ah Kang, Kun-Young Park. 2014. Chemopreventive Effect of Kimchi against Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Induced Colorectal Carcinogenesis in Mice. *J Med Food* 17: 833-841. (SCI)
- Hyun Soo Park, Min Ho Han, Gi-Young Kim, Sung-Kwon Moon, Wun-Jae Kim, Hye Jin Hwang, Kun Young Park and Yung Hyun Choi. 2014. Sulforaphane induces reactive oxygen species-mediated mitotic arrest and subsequent apoptosis in human bladder cancer 5637 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 64: 157-165. (SCI)
- 김희영, 길정하, 박건영. 2013. 한국산 및 일본산 배추를 이용하여 제조한 한국식 김치와 일본식 김치의 품질 특성과 기능성 비교. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 520-526. (KSCI)
- 봉연주, 정지강, 박건영. 2013. 김치 유산균 starter를 이용한 김치의 발효 특성 및 기능성 증진 효과. 한국식품영양과학회 *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1717-1726. (KSCI)

-학술발표- (국외: 2, 국내: 5)

- Hee-Young Kim, Soon-Ah Kang, Kun-Young Park. Kimchi suppressed AOM/DSS induced colitis-associated colon cancer in Balb/c mice. *Experimental Biology* 2013. (2013. 04. 20~24, Boston, USA)
- Yung Hyun Choi : Induction of reactive oxygen species-dependent mitotic arrest and apoptosis by sulforaphane in human bladder cancer 5637 cells. 2014 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA (2014.04.05.-09)
- Hee-Young Kim, Kun-Young Park. Preventive effects of kimchi on AOM/DSS induced colitis-associated colon cancer. The 17th Annual meeting of Korean society of cancer prevention(한국암예방학회). (2012. 11. 09~10, 서울)
- Guk Heui Jo, Kun Young Park and Yung Hyun Choi ; Sulforaphane induces apoptosis in human bladder cancer T24 cells via mitochondria-dependent and ER stress-related signaling pathway. 2013년도 한국생명과학회 제54회 정기총회 및 국제학술대회, 경남 사천 LIG 인재니움(2013.10.17.-18)
- Guk Heui Jo, Gi-Young Kim, Sung-Kwon Moon, Wun-Jae Kim, Kun Young Park and Yung

Hyun Choi : Sulforaphane induces apoptosis in T24 human urinary bladder cancer cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway: the involvement of endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling pathway. 2014 생화학분자생물학회 국제학술대회, 코엑스, 서울(2014.05.14-16)

<3 세부>

-연구논문- (KSCI: 1)

- 최지명, 이상현, 박건영, 강순아, 조은주. 2014. 아밀로이드 베타에 의해 유도된 인지 및 기억능력 손상에 대한 김치의 보호 효과. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 360-366. (KSCI)

-학술발표- (국외: 1, 국내: 2)

- Eun Ju Cho, Boh Kyung Kim, Ji Myung Choi, Soon Cheol Ahn, Kun Young Park, Soon Ah Kang. Kimchi attenuates cellular oxidative stress induced by peroxyntirite. *Experimental Biology* 2013. (2013. 04. 20~24, Boston, USA)
- Ji Myung Choi, Kun Young Park, Soon Ah Kang, Eun Ju Cho. Kimchi improves abilities of memory and cognition impaired by amyloid beta₂₅₋₃₅. 2013 International symposium and annual meeting of the KSABC (한국응용생명화학학회). (2013. 06. 27~29, 부산)
- Mi-Ja Kim, Dong Sool Yu, Sun Haye Ha, Ji-Hoon Paek, Eun Ju Cho, Kun Young Park, Soon Ah Kang. Effect of antioxidant activity and Anti-obesity Effects in 3T3-L1 Differentiation of Anticancer Kimchi. *한국식품과학회* (2013. 08. 28~30, 천안).

나. 경제·사회적 연구 성과 기재(정책활용, 홍보, 교육지도 등)

- 정책활용

최근 한국인의 암 발생율은 평균 수명 81세까지 살게 될 경우 36%를 차지하고, 치료를 받는 암환자가 100만 명에 달하고 있음. 김치는 한국인의 주요 부식이므로 암예방(항암) 김치의 제조와 이들의 기능성 확인은 대국민 암예방 및 암환자용 김치로 대치할 수 있기에 국가 정책 수립 및 경제적, 국민 보건적 측면에서 대단히 중요함. 또한 김치는 항산화 효과, 대사성 증후군 조절 및 뇌질환 예방 효과도 관찰되었으므로 이에 대한 메카니즘 확인 연구를 하여 이러한 효과를 이용한 정책 활용이 가능하다고 하겠음. 그러므로 이 연구 결과를 SCI논문, TV, 김치 업체 등에 홍보한다면 제시될 결과는 경제 사회적으로 매우 중요한 impact를 가질 것으로 보임.

- 언론홍보 및 대국민교육

김치가 위암의 원인이 된다는 역학조사도 있었던 바, 김치의 위암 및 대장암 예방 효과에 대한 정확한 메카니즘과 효능을 국민을 대상으로 홍보할 수 있음. 본 연구에서 항암김치는 위암(*Helicobacter pylori*에 의한 위암) 및 위염 억제 효과가 *in vivo* 실험을 통해 확인되었고, 항암김치 고농도는 *in vivo*에서 대장암 억제 효과를 나타내었음. 이 연구의 지속적인 결과는 언론 및 대국민 교육에 매우 중요한 결과임. 김치의 제조방법에 따라 효능의 차이가 있을 수 있으므로 김치 제조 시 사용되는 재료의 선정과 김치 제조법을 대국민 교육을 행하고 김치의 섭취를 장려시킴으로써 암을 비롯한 질병을 감소시키며 이를 국민에게 홍보 할 수 있음.

다. 기타

해당 없음.

5. 1차년도 용역연구비 집행내역서

(단위 : 천원)

| 비 목 | 용역연구비 | 계 | 1세부과제 | 2세부과제 | 3세부과제 | 비고 | |
|--------|------------|------------|-----------|-----------|----------|----------|--|
| 인건비 소계 | 48,137.28 | 48,137.28 | 9,705 | 9,705 | 21,353.4 | | |
| 책임연구원 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 연구원 | 19,380 | 19,380 | 3,876 | 3,876 | 7,752 | | |
| 연구보조원 | 24,871.68 | 24,871.68 | 3,886 | 3,886.2 | 11,658.6 | | |
| 보조원 | 3,885.6 | 3,885.6 | 1,942 | 1,942.8 | 1,942.8 | | |
| 경비소계 | 104,367.72 | 104,367.72 | 28,495 | 28,495 | 48,647 | | |
| 경비 | 국내여비 | 6,120 | 6,120 | 2,000 | 2,000 | 2,040 | |
| | 국외여비 | 6,600 | 6,600 | 1,800 | 1,800 | 3,000 | |
| | 유인물비 | 1,999 | 1,999 | 899 | 500 | 600 | |
| | 전산처리비 | 1,800 | 1,800 | 600 | 600 | 600 | |
| | 시약 및 재료비 | 79,848.72 | 79,848.72 | 22,567.12 | 21,195 | 36,086.6 | |
| | 회의비 | 6,000 | 6,000 | 2,000 | 1,800 | 2,200 | |
| | 임차료 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 교통통신비 | 2,000 | 2,000 | 600 | 600 | 800 | |
| | 감가상각비 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 일반관리비 | 7,495 | 7,495 | 2,375 | 1,800 | 3,320 | |
| 계 | 160,000 | 160,000 | 50,000 | 40,000 | 70,000 | | |

6. 중요 연구변경 사항

- 2세부과제 책임자의 소속이 가천대학교에서 차의과학대학교로 변경됨.
- 3세부과제 책임자의 소속이 서울벤처대학원대학교에서 호서대학교 벤처전문대학원으로 변경됨.
- 연구비 사용 비목 변경하였음.
 - 제 1세부: 교통통신비에서 국내여비로 예산변경. 유인물비에서 전산처리비 및 시약 및 재료비로 예산변경. 국외여비에서 재료비, 유인물비, 전산처리비로 예산변경. 재료비에서 유인물비로 예산 변경.
 - 제 2세부: 국외 여비에서 재료비로 예산변경. 교통통신비, 유인물비, 전산처리비에서 재료비로 예산변경.
 - 제 3세부: 재료비 및 수용비에서 기술정보비로 예산 변경. 재료비에서 수용비 및 기술정보활동비(자문비)로 예산 변경.

II. 2차년도 연구실적

1. 연구 목표 및 연구 수행내용

1. 연구개발 최종 목표 및 주요 내용

- 항암 김치의 제조 방법 확립 및 항암기능성 메커니즘 연구
- 동물 실험을 통한 대장암 예방 및 항암 기능성 검증
- 김치의 헬리코박터(*H. pylori*) 균 감염 연관 위축성 위염과 위암 및 이에 연관된 항염증 및 항암 효능을 세포주 모델, 동물 모델, 임상연구를 통해 규명
- 김치의 대사증후군 예방 효과 및 신경세포 보호 효과 및 *in vivo*에서의 인지능력 개선에 따른 작용 메커니즘 규명

2. 세부과제별 연구 목표 및 내용

<1 세부>

- 표준화 된 항암 기능성 김치의 개발 및 제조 방법 확립
 - 1차 년도에 진행한 김치 레시피 개발과 관련하여 스타터 첨가의 표준화 조건 확립
 - 소금의 종류(죽염 등) 및 절임 방법을 달리하여 기능성이 증진된 배추김치의 절임 조건 확립.
 - 개발된 김치의 이화학적 특성 및 미생물학적 추적 검사 실시
 - 김치의 기능성 지표 물질 측정 및 선정
 - 개발된 레시피는 기존 레시피와 비교를 거쳐 기능성을 검증함
 - 검증된 레시피는 향후 연구를 위한 시료로 사용하기 적합하도록 표준화된 제조 조건을 확립
 - 일정한 품질의 김치를 향후 연구를 위해 제공
- Cellular system에서 암세포 성장 억제효과 및 메카니즘 검증
 - HT-29 인체 대장암 세포 및 여러 가지 암세포에서의 김치 추출물 또는 활성성분의 성장 억제 효과 관찰
 - Apoptosis, cell cycle arrest 등에 따른 성장억제 메카니즘 연구
 - 전이 억제 효과 및 apoptosis 유도 효과 검증
 - 전이 억제, apoptosis 유도, cell cycle arrest 관련 메카니즘 연구
- 동물 모델을 이용한 김치의 암예방 및 장내 환경 개선 효과 검증
 - 마우스 모델을 이용, Colon-26-M3.1 tumor cell을 이식하여 김치의 항전이 효과와 대장염, 대장암 동물모델을 통해 염증 및 암 억제 효과 및 이에 따른 메카니즘 연구

- 인체 실험을 통한 혈액분석, 대장 균총의 변화 및 장내 유해 효소(β -glucosidase, β -glucuronidase 등)의 관찰과 이에 따른 대장 환경 개선 효과 검증

<2 세부>

○ 전임상 효능평가(*in vitro*)

- *H. pylori*를 처리한 위암 세포주에서 김치의 항염증, 항산화 및 항암활성 측정
- 상기 세포주에서 MMPs 등의 발현 및 활성도 등을 측정하여 김치의 암전이 억제효능을 확인
- 김치의 발암 연관 미세환경변화 제어기능

○ 전임상 효능평가(*in vivo*)

- 동물 모델을 선정하여 헬리코박터 균을 감염시킨 후, 16주간 공급하면서 위염이나 위암 발생시, 그 예방 여부를 확인
- 체중 및 식이 섭취량 측정과 투여에 따른 대사변화 및 위염진전 제어 기능 측정
- 위적출에 따라 병변확인 및 조직 병리학적 검사, 분자생물학적 활성기전 규명

○ 분자생물학적인 기전 규명

- 부검 후 얻은 조직에서 RNA/protein을 추출하여 대표적 염증관련 유전자들의 발현 유무 검정
- Western blot analysis를 통한 대표적 염증관련 단백질들의 발현 유무 검정
- 염증이나 암화 과정 관련 cytokine들의 분석

○ 인체적용 시험 (*clinical trial*)

- 피험자를 두 그룹으로 나누고 placebo 및 김치 샘플을 7주간 투여한 후 지원자의 microbiome 변화 분석 및 측정하여 IBD 및 colon cancer prevention에 도움이 되는 요인들을 도출시킴

<3 세부>

- C57BL/6 mice로 고지방 식이 비만을 유도 후 항암김치의 항비만 효과 및 고지방식이에 의한 체지방 축적 억제효과연구
- LLC-PK₁ cell에서의 산화적 스트레스 개선에 의한 항산화 효과에 대한 mRNA 및 단백질 발현 측정
- WI-38 cell을 이용한 항노화 효과 및 수명연장 효과 및 mRNA 및 단백질 발현 측정
- C6 cell에서 H₂O₂ 및 amyloid beta (A β) 처리에 따른 세포생존율 및 ROS에 미치는 효과검토

- *In vivo*에서 항암김치 추출물의 인지능력 향상효과 측정 및 뇌 조직에서의 지질과산화 측정

2. 연구범위 및 연구수행 방법

| 연구범위 | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <1 세부> | | |
| 표준화 된 항암 기능성 김치의 개발 및 제조 확립 | 선행 연구된 레시피 및 소금의 종류를 달리하여 기능성 김치 개발 | - 선행 연구되어진 레시피를 modify하여 기능성 김치를 제조 - 절임 배추에 사용할 소금의 종류를 달리하여 기능성이 더욱 증진된 김치를 만들 수 있는 소금을 염도, 산도, 항산화능 측정 등의 실험을 통해 탐색 |
| Apoptosis, 항염증 효능 검증 | 김치 및 십자화과 채소에 함유된 기능성물질의 항염증 및 항암활성을 비교하고, 그들의 분자생물학적 기전을 연구 | EMSA, ELISA, MTT assay, DAPI staining, Flow cytometry, western blot analysis, PARP 단백질의 단편화 분석 등의 실험을 수행 |
| 세포주기 진행 억제 기전 연구 | 세포 주기 연구를 통하여 세포 사멸 기전 연구 | FACScan flow cytometry system, Western blotting, RT-PCR, <i>In vitro</i> kinase assay 등의 방법으로 실험 수행 |
| 동물 모델 및 인체 실험을 통한 김치의 암예방 및 장내 환경 개선 효과 검증 | 마우스 모델을 이용한 항전이 효과 검증 및 동물 모델 및 인체 실험을 통한 대장암 예방 및 대장 환경 개선 효과 검증 | - 마우스 모델을 이용, colon-26-M3.1 tumor cell을 꼬리정맥에 이식하여 김치의 항전이 효과 검증 - 동물 모델 및 건강한 성인에 일정기간 김치를 섭취하게 한 후, 대장 내 여러 가지 대장암관련 지표 및 대장내 환경 지표 측정 |
| <2 세부> | | |
| 김치의 염증성 대장염 및 대장암발생에 대한 임상효능 평가 및 구체적인 약리기전 규명 | IND 승인 후 CRF 작성 및 윤리위원회를 거쳐 IRB 승인 후 monitoring 한다. | - 의약품 임상시험계획 승인신청을 위해 기준 및 시험방법, 독성시험, 약리시험 자료 수집 - 임상시험 승인신청 (IND) : 수집자료 검토, 식약청 검토 후 자료 보완 - Case Report Form (CRF) 작성 및 참여 임상시험기관의 윤리위원회 통과 - 임상시험 피험자의 사례를 수집하기 위한 CRF를 작성하고 임상시험 계획서를 각 임상기관의 IRB에 상정하여 각 임상기관에서 본 임상시험 승인받음. - 수집된 CRF가 source document와 차이가 없는지를 monitoring 함. - 임상시험 피험자의 사례를 CRF로 수집 |

| | | 하여 filing함. |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <3 세부> | | |
| <i>In vivo</i> 체지방 감소 효과 | <i>In vivo</i> 상에서 대사증후군 비만 동물모델을 통하여 항암김치의 체지방 감소효과 검증 | <ul style="list-style-type: none"> - 대사증후군 비만 동물모델에서 체지방 감소 개선효과 - C57BL/6 mice 종을 이용하여 고지방 식이로 비만을 유도 후, 비만 개선 효과 관찰. - 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율, 지방조직의 중량 측정 - 지방세포크기 측정, 혈중 지질, leptin함량 측정 |
| 산화적 스트레스 개선에 따른 항산화/항노화 효과 측정 | LLC-PK ₁ , WI-38 세포를 이용하여 김치 시료의 항산화, 항노화 효과를 측정 | <ul style="list-style-type: none"> - LLC-PK₁ cell에서 김치 추출물의 항산화 효과에 따른 mRNA 및 단백질 발현 측정 - WI-38 세포를 이용한 김치 추출물의 세포 수명 연장 효과 측정 및 항노화 효과에 따른 mRNA 및 단백질 발현 측정 |
| 신경세포 보호 효과 및 <i>in vivo</i> 상에서 인지능력 향상 효과 검증 효과 | C6 glial cell에서 김치 추출물의 세포 보호 효과 및 <i>In vivo</i> 상에서 Alzheimer's disease 동물 모델에서 항암김치의 인지능력 향상 효과 측정 | <ul style="list-style-type: none"> - C6 cell의 H₂O₂ 및 Aβ에 의한 산화적 스트레스에 대한 김치 추출물의 보호 효과 측정 및 ROS 생성 억제능 측정 - <i>In vivo</i>에서 항암김치 추출물의 인지능력 향상 효과를 통한 인지능력 향상효과 및 뇌 조직에서의 지질 과산화 효과 측정 |

3. 세부연구수행 결과(구체적으로 기술)

-제1세부과제-

가. 표준화된 항암 기능성 김치의 개발 및 제조 방법 확립

제 1차년도에서 개발된 starter 김치에 소금 종류 및 절임방법(3회 죽염 사용)을 조정하여 항암기능성 김치를 제조하였다.

김치 제조시 배추의 절임 방법은 소금을 녹인 물(염수)에 담가 절이는 염수법과, 소금을 배추 사이에 켜켜이 넣어서 절이는 건염법, 그리고 이 두 가지 방법을 함께 사용하는 혼합법 등이 있다. 염수법을 사용할 시 소금의 낭비가 우려되며, 반면 건염법은 소량의 소금으로 물 없이도 절일 수 있으나 표준화 된 방법이 현재까지는 없다. 따라서 본 연구를 통해 염수법, 혼합법, 그리고 건염법을 통해 배추김치 제조시 가장 적합한 절임 조건을 확립하고, 항암김치의 기능성을 더욱 증진시키는 조건을 찾고자 하였다. 또한 소금의 종류에 따라 배추김치의 기능성이 달라질 수 있기 때문에, 항암김치 제조에 가장 적합한 소금을 찾기 위해 연구하였다.

1) 염수법, 혼합법 및 건염법을 사용한 배추 절임

절임방법을 달리한 절임배추의 최종염도는 표 15 에 나타난 바와 같다. 제간수 천일염을 이용하여 배추 무게 2배의 물에 10%에 해당하는 소금을 사용한 염수법과 혼합법은 동일한 양의 소금을 사용하였다. 그 결과 염수법을 이용한 B는 1.02%, 혼합법을 이용한 B+D는 1.97%의 염도를 보여 유의적인 차이가 있었다($p < 0.05$). 반면 절임에 사용된 소금의 양은 건염법의 경우 염수법 및 혼합법의 1/2 이었는데 건염법을 이용

한 D는 2.33%로 가장 높은 염도를 나타냈다. 절임 단계에서 건염법의 사용은 소금의 사용을 대폭 감소시킬 수 있을 것이다. 절임 시 문제가 될 수 있는 배추 줄기와 잎의 염도를 각 절임방법을 달리하여 비교 측정해 보았다. 건염법을 이용한 D는 줄기와 잎 간 염도의 차이가 0.19% 정도로 아주 낮은 반면, 염수법과 혼합법을 이용한 B와 B+D는 각각 0.45%와 0.62%로 나타났다. 이를 통해 건염법이 염수법이나 혼합법에 비해 줄기와 잎이 고루 절여 일정한 품질의 김치를 생산하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

절임방법에 따르는 배추 조직의 탄력성을 측정한 결과(표 15), B는 64.7%, B+D는 66.7%, D는 68.1%로 절임방법에 따른 유의적인 차이는 없었다. 이로써 건염법을 이용하면 줄기와 잎의 염도 차이를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 소금의 사용을 감소시킬 수 있고 배추 조직의 탄력성에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 건염법은 폐 염수의 발생이 없어 산업적 이용가치가 높을 것으로 생각된다.

표 15. 절임 방법을 달리한 절임배추의 염도 및 탄력성

| | | B ¹⁾ | B+D ²⁾ | D ³⁾ |
|-------------|----------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Salinity | Whole | 1.02±0.02 ^c | 1.97±0.04 ^b | 2.33±0.14 ^a |
| | Leaf (A) | 1.52±0.07 ^b | 2.07±0.06 ^a | 2.06±0.04 ^a |
| | Stem (B) | 1.07±0.03 ^c | 1.45±0.07 ^b | 2.24±0.13 ^a |
| | (A-B) | 0.45±0.08 ^b | 0.62±0.03 ^a | -0.19±0.06 ^c |
| Springiness | | 64.7±0.71 ^{NS} | 66.7±2.18 | 68.1±2.47 |

¹⁾B: Baechu cabbage brined for 10 hours by brining method using 10% solar salt without bittern.

²⁾B+D: Baechu cabbage brined for 10 hours by brining and dry salting method using 10% solar salt without bittern.

³⁾D: Baechu cabbage brined for 10 hours by dry salting method using 10% solar salt without bittern.

^{a-c} Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range tests.

2) 죽염과 건염법을 사용한 배추 절임

현재 죽염을 이용한 건염법의 표준화 또는 상용화 된 조건에 대한 연구가 미비하여 죽염을 이용한 건염 절임 시 소금의 양을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 이를 위해 배추 무게 2, 3, 4%의 소금을 이용한 건염법으로 15시간 동안 배추를 절였다. 그 결과 절임배추의 염도는 D-BS2와 D-BS3에서 각각 1.34, 1.48%로 절임배추로서 적절한 염도로 나타났다(표 16). 15시간 건염 절임의 경우 5%의 제간수 천일염을 이용한 절임배추의 염도가 1.42%인 것에 비해 죽염을 사용하면 제간수 천일염보다 더 적은 소금으로 제간수 천일염과 비슷한 수준의 염도를 나타냈다. 죽염 농도에 따른 절임배추의 탄력성은 D-BS2, D-BS3, D-BS4에서 각각 82.5, 78.6, 75.08%로 죽염 농도에 따른 유의적인 차이는 없었다. 이로써 2, 3% 죽염을 사용하여 절임배추를 제조해도 탄력성에 부정적인 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 죽염의 가격이 제간수 천일염에 비해 다소 높기 때문에 김치를 제조할 때 경제성 측면에서 부정적인 인식으로 인해 이용률이 낮았다. 하지만 건염법으로 죽염절임을 하면 제간수 천일염을 이용할 때 보다 1/10~1/7배까지 소금의 양을 감소시킬 수 있기 때문에 경제적인 면에서도 부담감 없이 죽염을 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

표 16. 절임법과 소금(1회 죽염) 농도를 달리한 절임배추의 염도와 탄력성

| | | D-BS2 ¹⁾ | D-BS3 ²⁾ | D-BS4 ³⁾ |
|-------------|----------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Salinity | Whole | 1.34±0.01 ^c | 1.97±0.04 ^b | 2.33±0.14 ^a |
| | Leaf (A) | 1.10±0.03 ^b | 2.07±0.06 ^a | 2.06±0.04 ^a |
| | Stem (B) | 0.85±0.04 ^c | 1.45±0.07 ^b | 2.24±0.13 ^a |
| | (A-B) | 0.25±0.07 ^b | 0.62±0.03 ^a | -0.19±0.06 ^c |
| Springiness | | 64.7±0.71 ^{NS} | 66.7±2.18 | 68.1±2.47 |

¹⁾D-BS2: Beachu cabbage brined for 15 hours by dry salting method using 2% bamboo salt baked once.

²⁾D-BS3: Beachu cabbage brined for 15 hours by dry salting method using 3% bamboo salt baked once.

³⁾D-BS4: Beachu cabbage brined for 15 hours by dry salting method using 4% bamboo salt baked once.

^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

^{NS} Not significantly different

3) 여러 가지 소금으로 절인 김치의 항산화 효과

발효 1주일의 김치 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거능을 확인한 결과는 그림 79에 나타내었다. BS3K(3회죽염 사용 김치)의 소거효과가 가장 높았고 이어서 BS1K(1회죽염 사용 김치), SS-BK, GSK, SSK, PSK 순으로 나타나, BS3K의 항산화 효과가 가장 높게 나타났다. 특히 SS-BK와 SSK의 차이가 심하였는데 천일염소금에서 간수가 있느냐, 없느냐의 차이가 큰 영향을 끼치는 것으로 나타났다. 천일염이 정제염에 비해 다른 무기성분의 함량이 높으므로 소금에 포함된 미량원소 함량에 따라 또는 가공방법에 따라 건강 기능성에 영향을 끼치는 것으로 나타났으며 *Lactobacillus plantarum* 에 대한 소금 종류별 항균 효과가 구운 소금에서 높았다는 보고와 비슷한 경향을 보인다. 죽염은 소금의 유해물질은 법제하고 천연미네랄은 그대로 유지하는 것으로 다른 소금에 비해 높은 알칼리성이 있고 -OH, -Cl을 풍부하게 함유하고 있다. 죽염은 산화를 억제하여 노화를 방지하는 효과도 있으며, 특히 피부의 산화노화과정 중에 피부노화를 과속화 시키는데 항산화능력이 강한 죽염이 피부세포에 대한 산화보호효과도 있으며 주름살도 줄이고 건강한 피부를 갖게 해주는 기능성을 가지고 있어 기능성 김치 제조시 절임용 소금으로 사용하기에 적합할 것으로 생각된다.

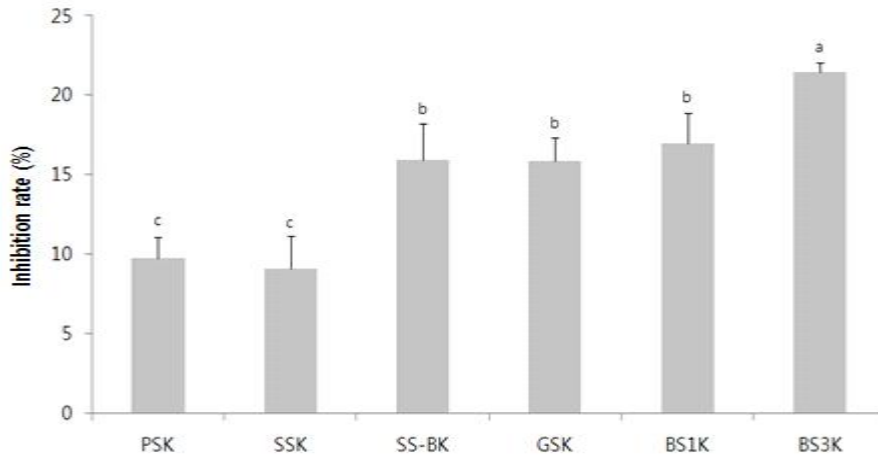


그림 79. 여러 가지 소금으로 절인 김치 메탄올 추출물(1 mg/mL)의 DPPH 라디칼 소거능

PSK: Kimchi prepared by purified salt,

SSK: Kimchi prepared by natural solar salt,

SS-BK: Kimchi prepared by solar salt without bittern,

GSK: Kimchi prepared by Guwun (baked) salt,

BS1K: Kimchi prepared by bamboo salt baked once,

BS3K: Kimchi prepared by bamboo salt baked three times

^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

4) 여러 가지 소금으로 절인 김치의 항암효과 (HT-29 human colon carcinoma cell)

MTT assay 수행 결과 BS3K의 저해율이 35%로 가장 높았고 이어서 BS1K 28%, SS-BK 28%, GSK 25%, SSK 10%, PSK 8% 순으로 나타났다 (그림 80). 본 실험에서는 BS3K가 HT-29 인체 대장암세포에서 항암 효과가 높게 나타났으며 BS1K와 SS-BK의 항암효과도 좋은 것으로 나타났다. 죽염은 구운 횟수가 많을수록 항 돌연변이 및 항암효과가 높았고 천일염에 비해 구리, 망간, 아연, 인, 칼륨 및 철의 함량이 높았다고 보고된바 있다. 죽염을 사용하여 김치제조에 활용한다면 암세포 성장을 억제하는 성분이 높은 기능성김치의 제조가 가능할 것으로 사료된다. 김치제조 시에 사용하는 소금의 종류가 배추속의 생리활성 물질 생성에 영향을 미쳐서 암세포 성장 억제 효과의 차이를 일으키므로 항암효과가 달라지는 것으로 보인다.

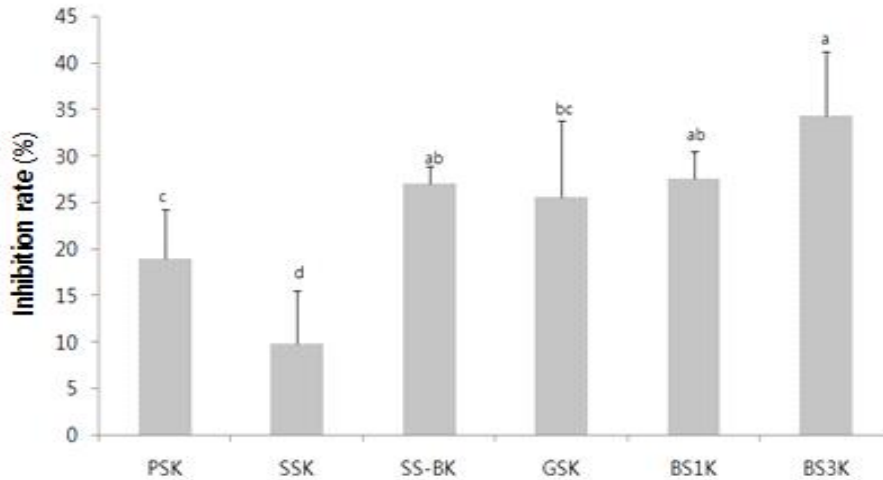


그림 80. 여러 가지 소금으로 절인 김치 메탄올 추출물(2 mg/mL)의 HT-29 인체 대장암세포 성장 억제 효과

PSK: Kimchi prepared by purified salt, SSK: Kimchi prepared by natural solar salt, SS-BK: Kimchi prepared by solar salt without bittern, GSK: Kimchi prepared by Guwun (baked) salt, BS1K: Kimchi prepared by bamboo salt baked once, BS3K: Kimchi prepared by bamboo salt baked three times.

^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

5) 여러 가지 소금으로 절인 김치의 항염증효과 (RAW 264.7 대식세포)

(1) Nitric Oxide (산화질소) 함량 측정

염증반응에 관여하는 주요 세포는 macrophage로 알려져 있으며 여러 자극이나 면역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 활성화 되어 proinflammatory cytokine, nitric oxide(NO)와 prostagladin E₂ (PGE₂)를 생성함으로써 통증, 부종, 열 등의 염증반응을 유발하고 염증부위로 면역세포의 이동을 촉진시킨다. 이 중 NO는 반응성이 높은 물질로 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유리체로 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등 여러 생물학적인 과정에 관여하며 농도에 따라 세포 기능유지에 중요한 작용을 하기도 하고 세포독성을 일으키기도 한다. 김치 추출물의 항염증 효과를 RAW264.7 대식세포에서의 NO 생성억제 확인한 결과 PSK, SSK, SS-BK, GSK, BS1K, BS3K순으로 NO의 양이 감소하였으며 BS3K는 현저히 감소되는 것으로 나타났다. BS3K 추출물은 RAW264.7 대식세포 내 산화질소 라디칼(NO)을 억제함으로써 염증을 억제하는 것으로 보인다 (그림 81).

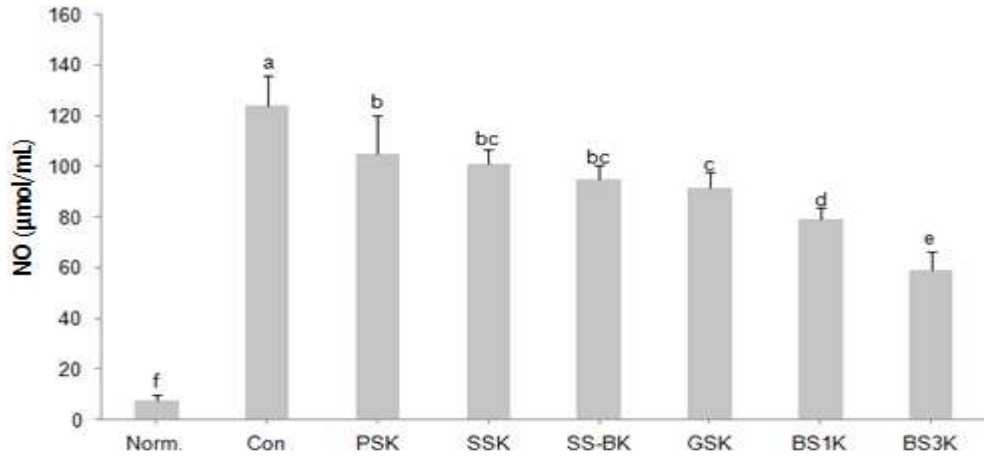


그림 81. 여러 가지 소금으로 절인 김치 메탄올 추출물(2 mg/mL)의 RAW 264.7 cell에서의 NO 함량

PSK: Kimchi prepared by purified salt, SSK: Kimchi prepared by natural solar salt, SS-BK: Kimchi prepared by solar salt without bitter, GSK: Kimchi prepared by Guwun (baked) salt, BS1K: Kimchi prepared by bamboo salt baked once, BS3K: Kimchi prepared by bamboo salt baked three times.

^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

(2) iNOS와 COX-2 의 mRNA 발현

염증 관련 유전자인 iNOS와 COX-2는 염증이 유발된 장 점막과 대장암세포에서 발현이 증가된다. iNOS는 과도한 NO를 생성하고 이는 DNA의 손상을 일으켜 종양을 생성시키거나 촉진시키는 역할을 한다. COX-2는 발암전구물질의 발암물질화를 촉진시키며 신생혈관생성(angiogenesis)을 촉진시킨다. COX-2는 cytokine, 자외선, 세균성 내독소 및 TNF 등과 같은 여러 종류의 pro-inflammatory agent에 의하여 과발현되어 염증뿐만 아니라 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 알아본 결과는 그림 82와 같다. BS3K김치가 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 저해율이 가장 낮은 수준을 나타내었다. 염증이 유발된 장 점막과 대장의 암세포에서 발현이 증가되는 iNOS와 COX-2의 발현이 특히 BS3K에서 가장 낮게 나타나, BS3K는 다른 김치들에 비하여 NO 생성 억제효과 및 iNOS, COX-2 단백질 발현을 효과적으로 저해하여 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다.

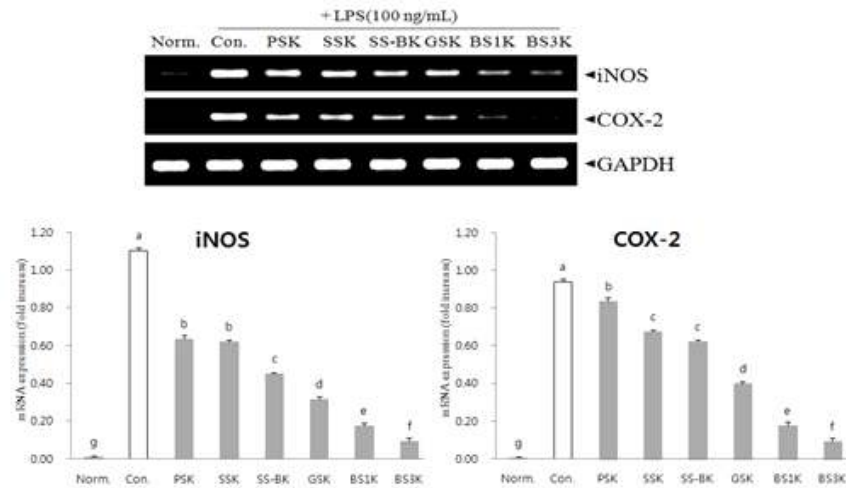


그림 82. 여러 가지 소금으로 절인 김치 메탄올 추출물(1 mg/mL)의 RAW 264.7 cell에서의 iNOS 및 COX-2 의 mRNA 발현

PSK: Kimchi prepared by purified salt, SSK: Kimchi prepared by natural solar salt, SS-BK: Kimchi prepared by solar salt without bittern, GSK: Kimchi prepared by Guwun (baked) salt, BS1K: Kimchi prepared by bamboo salt baked once, BS3K: Kimchi prepared by bamboo salt baked three times.

^{a-g} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range tests.

6) 항암 기능성 김치의 제조 방법 확립

1차년도부터 본 연구까지 이어온 항암김치의 기능성을 증진시킬 수 있는 조건들로 스타터 (*L. plantarum* PNU) 첨가와 3회 죽염을 사용하여 건염법으로 배추를 절여 만든 김치를 최종적인 항암 기능성 김치(항암김치)로 조건을 확립하였다.

(1) 재료 선정

가능한 모든 재료는 유기농으로 하며, 특히 배추는 유기농 배추로 한다. 김치 제조시 들어가는 부재료는 절임배추 100 g 당 고춧가루 2.5, 마늘 2.8, 생강 0.6, 무 11, 쪽파 2.0, 설탕 1, 갓 7.5, 산초 0.1, 배 2.8, 버섯과 다시마 우린 물 5.0, 겨우살이 추출물 0.05 로 첨가한다.

(2) 절임 방법

유기농 배추를 절이는 소금은 3회 죽염을 사용하여 건염법으로 절이며, 완성된 김치의 최종 염도는 2.2%가 되도록 한다.

(3) 스타터

위 연구에서 프로바이오틱 기능성이 증명된 *Lactobacillus plantarum* PNU 를 10^6 CFU/g 으로 맞추어 김치 양념소에 첨가해 김치 제조에 사용한다.

(4) 발효 조건

김치는 적당히 발효하였을 때(pH 4.3 정도) 가장 기능성이 좋다고 알려져 있다. 따라서 김

치를 만든 후 용기 또는 용기에서 발효하는 것과 비슷하게 공기가 통하는 Mirafresh 용기에 저장하면서 발효시켜 적정 pH를 맞춘다. 온도는 0-4℃ 범위의 냉장온도에 저장한다.

나. 스타터, 죽염 절입법을 적용한 항암김치의 암전이(*in vivo*) 및 대장암(*in vitro, in vivo*) 억제 효과

1. *In vivo* 암전이 억제 효과

1차년도에 연구한 스타터(*L. plantarum* PNU)를 첨가하고, 3회죽염을 사용하여 건염법으로 절여 만든 배추김치의 암전이 억제 효과를 알아보기 위하여 동물실험을 진행하였다. 종양전이 억제 효과를 살펴보기 위하여 폐에 대하여 전이력을 획득한 고전이성 조양세포주인 colon 26-M3.1 carcinoma cells를 100units/ml의 penicilin-streptomycin과 7.5%의 FBS가 함유된 EME 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고, 6~7일만에 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 PBS를 넣고 피펫으로 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 100 μl (2.5×10⁴/ml)를 Balb/c 마우스(female)의 꼬리정맥에 주사하였다. 실험 군별로 정상군(Normal), 대조군(Control), 표준김치(SK), 기존 항암김치(Anticancer kimchi, ACK), 3회죽염으로 절입하고 스타터를 첨가하지 않은 항암김치(ACK with 3X bamboo salt, ACBK), 3회죽염으로 절입하고 스타터를 첨가한 항암김치(ACK with 3X bamboo salt and starter, ACBSK)로 총 6군을 설정하였으며, 각 군당 10마리로 구성하였다. 시험 첫 날 암세포를 주사하였고 총 14일간 동결건조된 김치 분말이 혼합된 사료를 자유급식 하도록 하였다. 14일 경과 후 해부를 실시하였으며, 적출한 폐를 Bouin's solution에서 고정시킨 후 종양 군집 수를 계수하였다.

총 시험기간 2 주간 모든 군에서 체중이 증가하는 경향을 보였다(그림 83). Balb/c 마우스를 희생하여 적출한 폐를 Bouin's solution에서 고정시킨 후 종양 군집 수를 계수한 결과는 그림 84, 85와 같다. 정상군에서는 0개, 대조군에서는 127±40 개, SK 71±61 개, ACK 65±64 개, ACBK 60±50 개, ACBSK 47±57 개로 나타나 모든 김치 섭취군들이 대조군에 비하여 종양 전이가 낮게 되었으며, 특히 ACBSK이 가장 낮은 전이 종양 개수를 보였다.

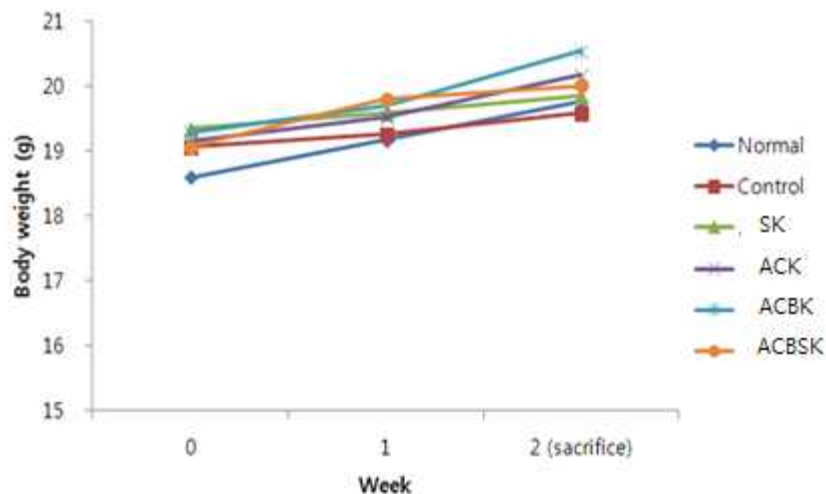


그림 83. 체중변화

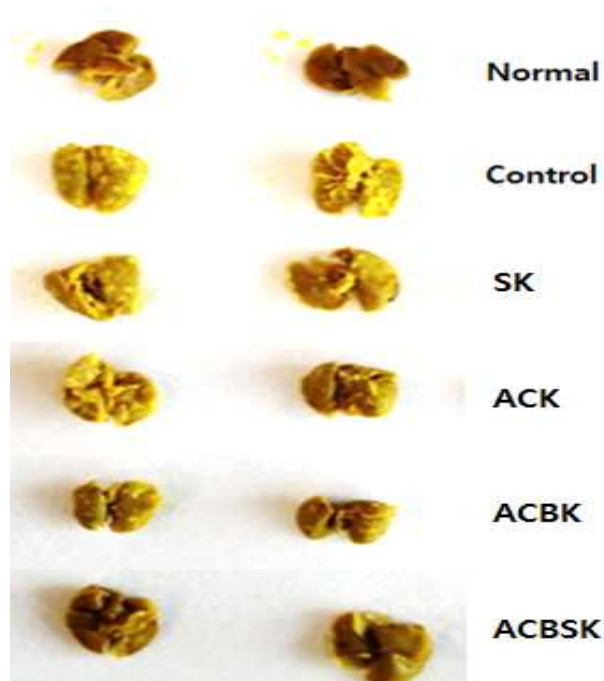


그림 84. 전이된 종양이 형성된 폐

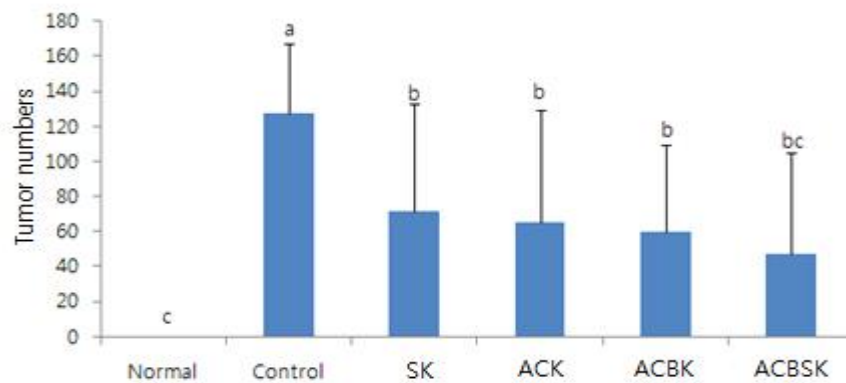


그림 85. 폐에 전이된 종양 개수

심장, 간, 폐, 신장, 비장 등의 장기를 적출하여 무게를 측정한 결과는 표 17에 제시하였다. 심장과 비장은 각 군별 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 간, 폐, 신장에서 유의성이 나타나긴 하였으나 군간 뚜렷한 경향을 보이지는 않았다.

표 17. 장기 무게

| | Heart | Liver | Lung | Kidney | Spleen |
|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Normal | 0.099±0.020 ^{NS} | 0.951±0.069 ^{ab} | 0.128±0.018 ^b | 0.263±0.015 ^b | 0.082±0.016 ^{NS} |
| Control | 0.096±0.007 | 0.962±0.007 ^{ab} | 0.160±0.032 ^{ab} | 0.274±0.013 ^{ab} | 0.088±0.012 |
| SK | 0.107±0.012 | 0.902±0.046 ^{ab} | 0.172±0.059 ^{ab} | 0.274±0.021 ^{ab} | 0.090±0.008 |
| ACK | 0.184±0.252 | 0.888±0.251 ^b | 0.157±0.029 ^{ab} | 0.273±0.018 ^{ab} | 0.092±0.013 |
| ACBK | 0.102±0.010 | 0.920±0.063 ^{ab} | 0.209±0.159 ^a | 0.274±0.016 ^{ab} | 0.092±0.012 |
| ACBSK | 0.103±0.007 | 0.943±0.093 ^a | 0.177±0.048 ^{ab} | 0.287±0.025 ^a | 0.096±0.035 |

2. *In vitro* 대장암 억제 효과

1) HCT-116 및 HT-29 인체 대장암 세포에서의 암세포 성장 저해 효과

김치는 암을 예방하는 식품으로 알려져 있고, 또한 김치의 항돌연변이 활성 및 암세포 증식 억제 효과에 관한 많은 연구들이 보고되었다. 이에 본 연구에서는 각 김치의 HCT-116 인체 대장암 세포에 대한 성장 억제 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 통해 암세포 저해율을 측정하였다(그림 86). 2 mg/mL 농도로 김치의 암세포 성장억제 효과를 측정한 결과는 SK군은 29%, ACK군은 44%, ACBK군은 52%, ACBSK군은 62% 암세포 성장 억제율을 나타내었다. ACBSK군이 유의적으로 높은 저해율을 보였다.

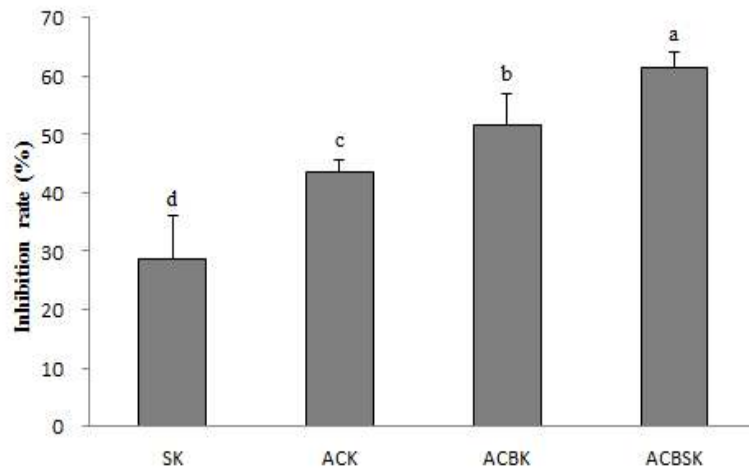


그림 86. 여러가지 김치 메탄올 추출물(2 mg/mL)의 HCT-116 인체 대장암세포의 성장 억제효과

SK : Standard Kimchi, ACK : Anticancer Kimchi, ACBK : Bamboo salt + Anticancer Kimchi, ACBSK : Bamboo salt + Starter + Anticancer Kimchi

a-d Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

각 김치추출물을 HT-29 인체 대장암세포 억제 효과를 관찰한 측정된 결과는 그림 87과 같다. 1 mg/mL 농도에서 SK군(16%)에 비해 항암김치 ACK군(23%), ACBK군(30%),

ACBSK(38%)군에서 유의적으로 높은 암세포 성장 저해율을 보였으며($p < 0.05$), 그 중 가장 높은 효과를 나타낸 것은 ACBSK군이였다. 따라서 항암김치(ACK, ACBK, ACBSK)는 다른 김치에 비해 암을 예방하는 효과가 더 높게 나타날 수 있다고 할 수 있다.

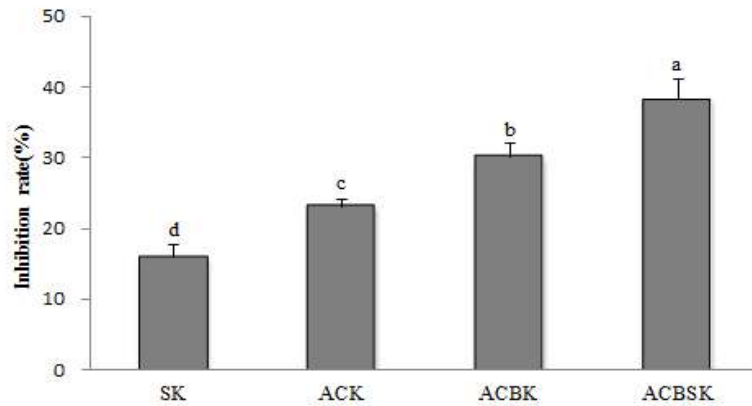


그림 87. 여러 가지 김치 메탄올 추출물(1 mg/mL)의 HT-29 인체 대장암세포의 성장 억제효과

2) Bcl-2 와 Bax 의 mRNA 발현

최근에 apoptosis와 직접적으로 연관되어 암유전자로 분리되는 Bcl-2 유전자에 대한 연구가 여러 항암 실험 연구에서 활발히 이루어지고 있다. Bcl-2 유전자는 원종양유전자(proto-oncogene)로서 apoptosis를 억제하여 세포수명을 연장시켜 다른 암유전자의 영향을 받을 수 있는 기회를 증가시킴으로써 암을 유발시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 Bcl-2 유전자와 직접적으로 작용하여 apoptosis를 촉진하는 유전자로 알려진 Bax는 Bcl-2와 유전자 구조적으로 비슷한데, Bcl-2는 세포 사멸을 억제하고, Bax는 세포 사멸을 유도한다. 이 같은 Bax와 Bcl-2 유전자는 여러 연구에서 상호 보완적으로 암의 발생과정과 밀접한 연관성을 갖는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 김치 메탄올 추출물(1 mg/mL)를 처리한 HT-29 대장암 세포에서 RNA를 분리하여 Bax와 Bcl-2 유전자 발현을 확인한 결과(그림 88), 모든 김치 처리군에서 Bcl-2는 Control군에 비하여 낮은 수치를 나타내었으며, 이들 중에서도 ACBSK군이 유의적으로 가장 낮은 수치를 나타내었다($p < 0.05$). Bax는 모든 김치 처리군이 Control군보다 높게 나타난 가운데 ACBSK군이 가장 유의적으로 높은 발현을 나타냈다($p < 0.05$). 이들 결과를 종합해 볼 때, 천일염을 사용하여 만든 김치(SK, ACK)에 비하여 죽염을 사용하여 만든 김치(ACBK, ACBSK)가 apoptosis를 더 증가시킬 수 있는 것으로 보인다.

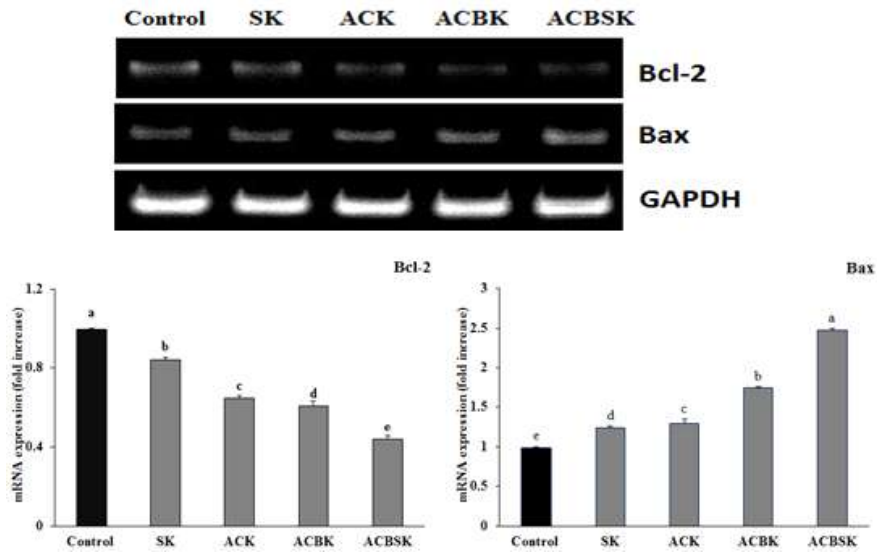


그림 88. 여러가지 김치 메탄올 추출물(1 mg/mL)의 HT-29 인체 대장암 세포에서의 Bcl-1 및 Bax의 mRNA 발현

3) iNOS와 COX-2 의 mRNA 발현

대식세포는 능동 및 수동 면역반응에서 매우 중요한 역할을 가지며 Nitric oxide (NO), prostaglandin (PG) 그리고 pro-inflammatory cytokine들을 포함한 다양한 염증 매개물질들을 조절한다. 이들 중 NO는 생체내에서 생리학적, 병리학적인 조건에서 역할을 가지고 있고, bacteria 를 죽이거나 중양을 제거 시키는 중요한 작용도 한다. 또한 NO는 염증을 유발시키며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다. 최근 임상적, 역학적 및 동물연구 등에서 쓰이고 있는 많은 소염진통제(NSAID)가 대장암 발병 기전에 관여함이 발견되었다. 본 실험에 김치 메탄올 추출물(1 mg/mL)을 처리한 HT-29 인체 대장암세포를 이용하여 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현을 측정된 결과는 그림 89와 같다. iNOS와 COX-2 에서 모든 김치 처리군이 Control군에 비하여 높은 수치를 나타냈다. 김치 처리군들 중에서도 SK군에 비하여 항암김치군(ACK, ACBK, ACBSK)의 iNOS와 COX-2 발현이 감소하였는데, 이는 기능성 재료를 첨가했기 때문인 것으로 보인다. 또한 죽염을 첨가한 김치가 천일염을 이용한 만든 김치보다 죽염을 첨가한 김치, starter를 첨가하지 않은 김치보다 첨가한 김치(ACBSK)가 염증을 유의적으로 더 억제하였다($p < 0.05$).

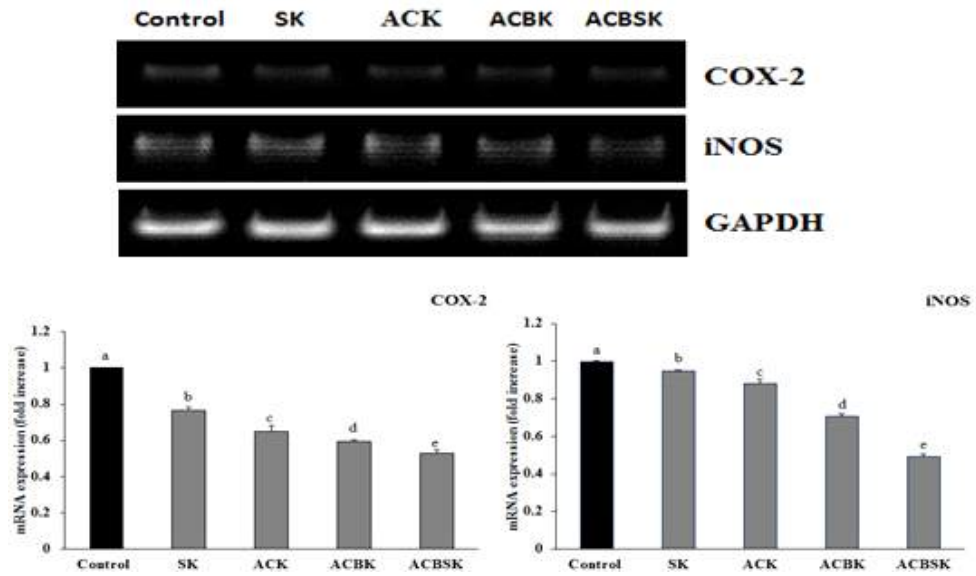


그림 89. 여러가지 김치 메탄올 추출물(1 mg/mL)의 HT-29 인체 대장암세포에서의 COX-2 및 iNOS의 mRNA 발현

4) p53 과 p21 의 mRNA 발현

김치 메탄올 추출물(1 mg/mL)을 처리한 HT-29 인체 대장암세포를 이용하여 p53와 p21의 mRNA 발현을 측정된 결과는 그림 90과 같다. p53과 p21에서 모든 김치 처리군이 Control군에 비하여 낮은 수치를 나타낸 가운데, SK군에 비하여 항암김치군(ACK, ACBK, ACBSK)이 유의적으로 높은 발현을 보였으며, 특히 ACBSK의 p53 및 p21의 mRNA 발현이 가장 높게 나타났다($p < 0.05$).

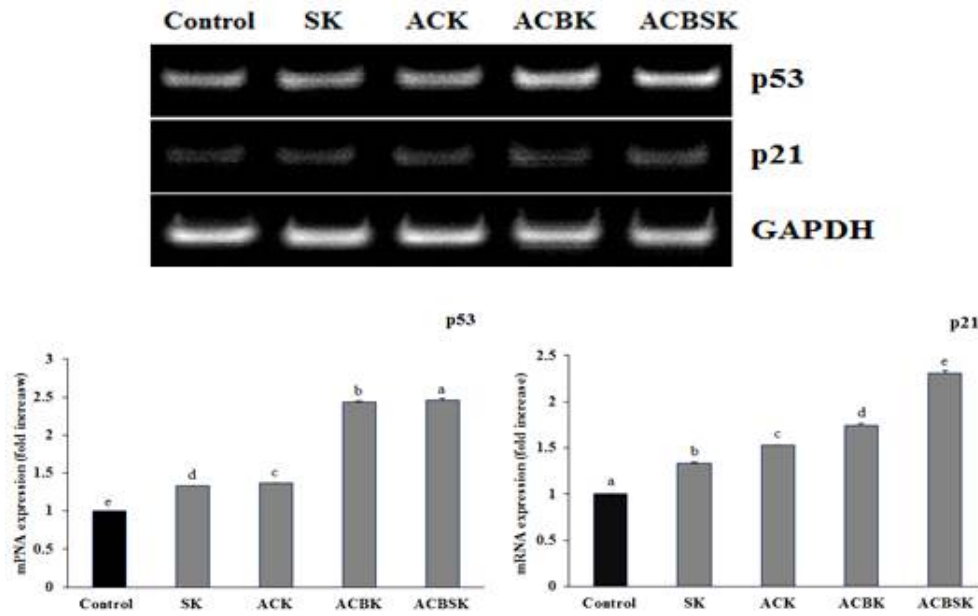


그림 90. 여러가지 김치 메탄올 추출물(1 mg/mL)의 HT-29 인체 대장암세포에서의 p53 및 p21의 mRNA 발현

3. 항암김치의 *In vivo* 대장암 억제 효과

1) 체중 및 장기무게 변화

대장암 예방 실험 동안 모든 마우스의 체중은 실험 직전 20 ± 2 g이었고 실험동안 체중 변화량은 그림 91, 표 18에 나타내었다. 실험동물의 체중은 시험기간이 경과 할수록 증가하는 경향을 보였으나 Normal군은 다른 군들에 비하여 실험 기간 내내 체중이 가장 높고 Control군은 가장 낮았으며, 그 외 샘플 처리한 군들은 모두 비슷한 체중을 나타내었다. Control군과 샘플 처리한 군들은 DSS를 투여하기 전까지 체중 증가를 보였으며 AOM으로 대장암이 유발된 후 DSS를 음수로 공급 후부터 체중 증가가 억제되는 경향을 볼 수 있고 DSS 공급 기간에는 체중이 크게 감소함을 볼 수 있었다. 이는 DSS 투여로 인한 것으로 보이며, 이러한 경향은 DSS를 이용한 동물 실험에서 많이 발견된다. 각 군별로 간, 신장, 비장, 고환의 무게를 측정하한 결과는 표 18에 나타났다. 모든 측정된 장기 무게는 차이가 나타나지 않았으며, 군 간의 유의적인 연관성을 찾기가 어려웠다.

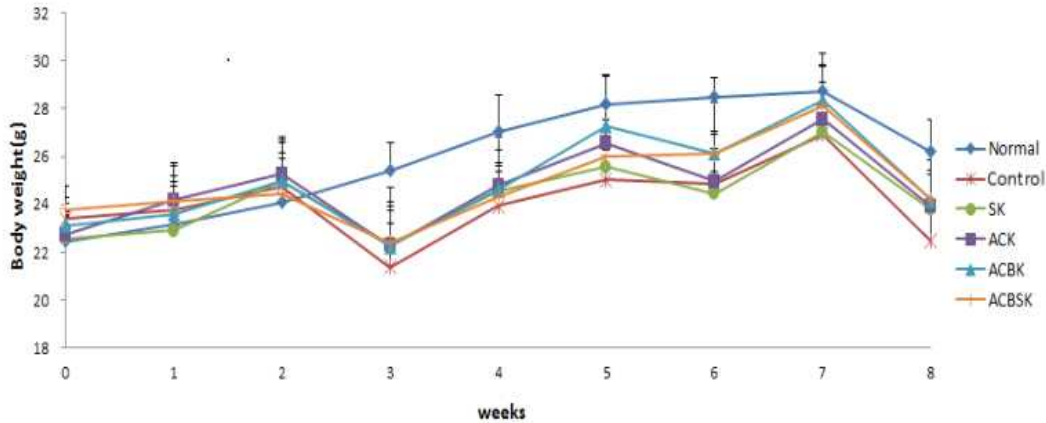


그림 91. 체중 변화

표 18. 체중 및 장기무게

| Groups | Body weight(g) | Relative organ weight(g) | | | |
|---------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Liver | Kidneys | Spleen | Testis |
| Normal | 26.22 ± 0.88 ^a | 1.1 ± 0.1 ^{NS} | 0.4 ± 0.0 ^{NS} | 0.1 ± 0.0 ^{NS} | 0.2 ± 0.0 ^{NS} |
| Control | 22.46 ± 0.73 ^c | 1.2 ± 0.1 | 0.4 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | 0.2 ± 0.0 |
| SK | 23.81 ± 0.78 ^b | 1.1 ± 0.1 | 0.3 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | 0.2 ± 0.0 |
| ACK | 23.90 ± 1.03 ^b | 1.1 ± 0.1 | 0.3 ± 0.0 | 0.1 ± 0.1 | 0.2 ± 0.0 |
| ACBK | 24.17 ± 1.77 ^b | 1.2 ± 0.1 | 0.4 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | 0.2 ± 0.0 |
| ACBSK | 24.17 ± 0.71 ^b | 1.1 ± 0.1 | 0.4 ± 0.0 | 0.1 ± 0.0 | 0.2 ± 0.0 |

^{a-c} Means with the different letters in the column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

2) 대장 길이 및 대장 무게/길이 비율의 변화

AOM과 DSS를 이용하여 대장암을 유발한 실험마우스의 대장을 적출하여 길이와 무게를 측정함으로써 염증과 관련된 대장암으로 인한 장기의 변화를 관찰하였다. 대장암을 유발하면 정상적인 대장보다 길이는 감소하고, 변화 및 경직화로 인해 무게가 증가하는 경향을 보인다. 따라서 대장의 길이와 무게의 비율의 수치가 가벼울수록 대장암 억제에 효과를 볼 수 있다.

대장의 길이 측정 결과는 그림 92에 나타내었다. Normal군(7.9 ± 0.3 cm)에 비해 Control군(6.4 ± 0.3 cm)이 많이 감소하는 것을 확인하였다($p < 0.05$). 이는 DSS로 인한 궤양성 대장암이 유발되었음을 알 수 있었다. SK군에서 6.4 ± 0.3 cm, ACK군, ACBK군, ACBSK군 각각 6.9 ± 0.3 cm, 7.2 ± 0.3 cm, 7.4 ± 0.5 cm로 나타나고 SK군에 비하여 대장 길이가 길게 나타나며 특히 ACBSK군의 순으로 대장 길이가 가장 길게 나타났다($p < 0.05$). 그 결과에 따라 SK군, ACK군, ACBK군과 ACBSK군이 대장암에 예방한 효과를 볼 수 있다.

대장의 무게/길이 비율 결과는 그림 93에 나타내었다. Normal군은 20.1 ± 3.0 mg/cm

로 Control군은 53.2 ± 4.0 mg/cm로 나타나고 샘플 처리한군 SK, ACK, ACBK과 ACBSK 군 각각 48.5 ± 6.9mg/cm, 43.9 ± 7.4 mg/cm, 40.6 ± 5.2 mg/cm과 38.1 ± 5.4 mg/cm로 나타났다($p < 0.05$). 모두 샘플 처리한 군들은 Control군에 비해 유의적으로 감소하고 특히 ACBSK군에서 무게/길이 비율이 가장 낮게 나타났다.

김치를 섭취한 실험마우스는 모두 Control군에 비해 유의적으로 낮게 나타나고 특히 SK군에 비해 함암김치(ACK, ACBK과 ACBSK군)는 대장암 억제 효과 더 좋고 일반 항암 김치(ACK군)에 비하여 3회 죽염로 이용한 항암김치(ACBK과 ACBSK군)는 대장암 억제 효과 더 높게 나타났다. 특히 죽염과 starter를 함께 첨가한 ACBSK군은 대장암 억제 효과가 가장 높은 것으로 확인되었다.

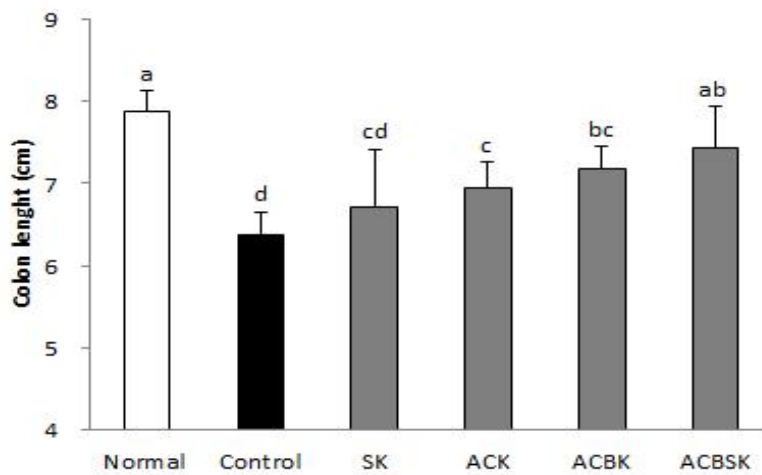


그림 92. 대장 길이 변화

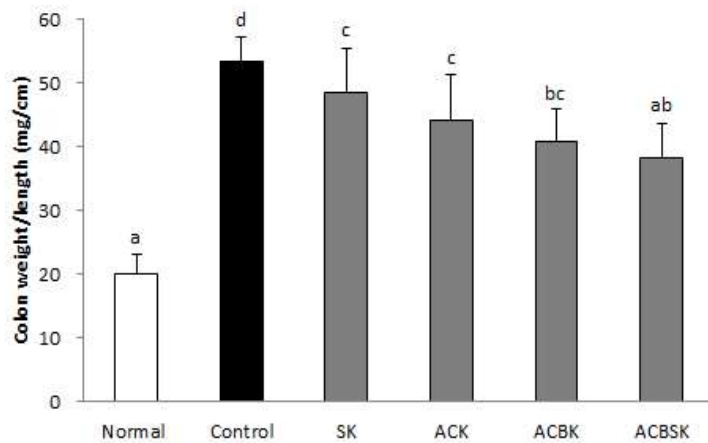


그림 93. 대장 길이/무게 비율 변화

3) 종양 개수

동물실험 8주차에 부검한 후 확인한 마우스의 대장 조직 내 종양 개수는 그림 94에 나

타내었다. 대장의 종양 수는 Control군에서 15.4 ± 1.6 개로 가장 높게 나타났고, 이어서 SK, ACK, ACBK, ACBSK군에서 각각 11.7 ± 1.1 , 9.3 ± 1.8 , 7.9 ± 1.5 , 6.7 ± 1.1 개로 모든 김치 처리군에서 Control군에 비하여 유의적으로 종양의 발생이 감소하였는데 ACBSK가 가장 많이 감소되었다($p < 0.05$).

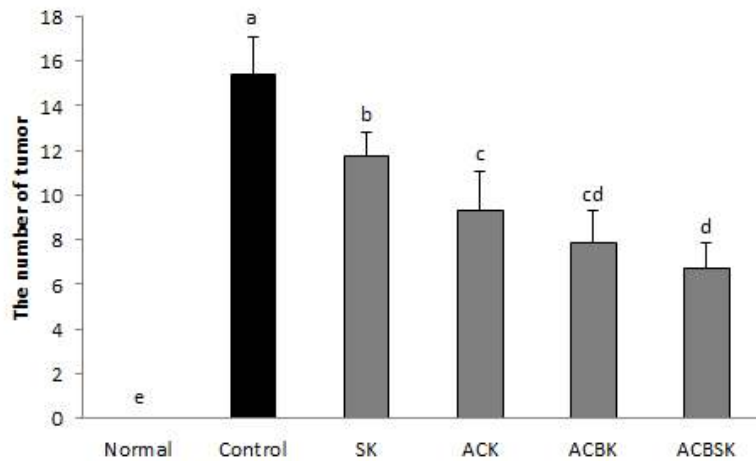


그림 94. 종양 개수

4) 대장 조직의 병리학적 관찰

각 실험군에서 적출한 대장 조직의 손상정도를 알아보기 위하여 H&E 염색을 이용하여 수행한 조직학적 검사결과를 그림 95에 나타내었다. 동물 모델을 이용한 대장암 억제 실험에서는 대장 조직에 암종 또는 종양이 생기는 것을 이용하여 대장암이 유발되었음을 확인한다. Normal군에서는 상피조직의 표면이 정상적인 형태로 관찰되었고, AOM/DSS로 궤양성 대장암을 유발시킨 Control군에서는 대장 조직의 손상 및 염증세포의 침윤이 전반적으로 관찰되었다. 또한 이 군의 조직에서는 점막과 조직 내 세포들이 염증으로 인해 괴사되거나 심하게 변형된 것을 관찰 할 수 있었다. DSS로 유도된 염증성 대장질환에서 대장조직은 심각한 구조의 파괴, 감염세포의 침윤, 궤양 및 근육비대 등을 특징으로 알려져 있는데, 이러한 현상이 Control군에서 확연히 관찰되었다. 반면 시료 투여군은 조직의 손상이 Control군보다 적게 나타났다. SK군에서는 Control군에 비해서 손상 정도가 낮았고, 항암김치군들(ACK, ACBK, ACBSK)은 Control군과 SK군에 비해 대장의 손상 및 염증 부위가 적었다. 또한 죽염을 첨가한 ACBK군과 ACBSK군의 염증 및 손상 정도가 ACK군에 비하여 적게 나타났고, 특히 ACBSK군에서 염증 및 손상이 가장 적었다.

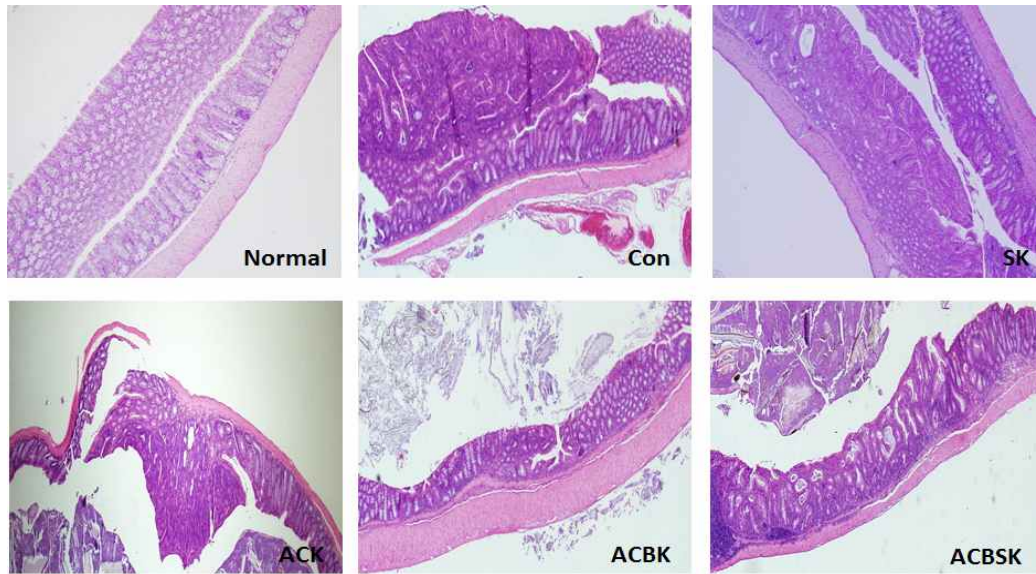


그림 95. 대장 조직의 병리학적 관찰

5) Serum pro-inflammatory cytokines

DSS 유발 대장염에서는 IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 와 같은 pro-inflammatory cytokine들이 증가한다. 마우스의 혈청을 이용하여 수행한 Serum pro-inflammatory cytokines의 분석결과는 그림 96, 97과 같다.

면역 조절 및 염증 반응에 영향을 주어 염증성 병변에서 연관되는 것이 알려져 있는 IL-6의 혈중 농도를 측정된 결과, Normal군 46.2 ± 0.3 pg/mL, Control군은 107.7 ± 1.5 pg/mL를 나타냈다. SK군은 97.1 ± 1.1 pg/mL, ACK군은 80.3 ± 1.3 pg/mL, ACBK군은 77.2 ± 0.7 pg/mL, ACBSK군은 72.6 ± 0.8 pg/mL로 나타나, 샘플 처리군 모두 Normal군보다 높고 Control군보다 낮게 나타났다(그림 96).

IL-1 β 는 주로 대식세포에서 합성되어 T세포와 B세포의 성장과 분화를 자극하며 항체의 생산을 증가시키는 역할을 하고 염증반응을 일으키는데 중요한 역할을 한다. 혈중 IL-1 β 농도는 Normal군 113.1 ± 14.6 pg/mL, Control군은 187.5 ± 12.4 pg/mL를 나타냈다. SK군은 158.8 ± 2.2 pg/mL, ACK군은 154.4 ± 1.1 pg/mL, ACBK군은 147.3 ± 1.4 pg/mL, ACBSK군은 143.1 ± 3.3 pg/mL로 나타났다. 김치 처리군들 모두 Normal군보다 높고 Control군보다 낮은 농도를 보였다(그림 96).

TNF- α 는 대식세포에서 생성되어 면역반응을 증가시킬 수 있고 혈관 성장 자극, 감염, 염증과 창상 치유의 촉진시킬 수도 있다. TNF- α 의 cytokine 측정 결과는 다음과 같다. Normal군 59.9 ± 1.1 pg/mL, Control군은 115.9 ± 2.7 pg/mL를 나타냈다. SK군은 108.9 ± 2.7 pg/mL, ACK군은 106.7 ± 4.2 pg/mL, ACBK군은 101.6 ± 2.4 pg/mL, ACBSK군은 97.9 ± 3.1 pg/mL로 나타나, 김치 처리군들은 모두 Normal군보다 높고 Control군보다는 낮게 나타났다(그림 97).

IFN- γ 는 면역세포의 기능을 향상시키고 식균작용을 상승시키며 인체내 면역을 강하게 조절하고 있다. 혈중 IFN- γ 농도는 Normal군 78.2 ± 1.3 pg/mL의 농도, Control군은 153.0 ± 1.1 pg/mL를 나타냈다. SK군은 136.4 ± 5.3 pg/mL, ACK군은 132.5 ± 3.4 pg/mL, ACBK

군은 129.5 ± 1.4 pg/mL, ACBSK군은 126.8 ± 2.1 pg/mL로 나타났다(그림 97).

위의 모든 pro-inflammatory cytokine 측정 결과를 비교해 보았을 때, 김치 처리군은 Control군 보다 유의적으로 낮게 나타났으며($p < 0.05$), 표준김치(SK)보다 항암김치(ACK, ACBK, ACBSK)의 효과 더 좋게 나타났다. 특히 ACBSK의 pro-inflammatory cytokine 농도를 낮추는 효과가 커서 죽염과 starter첨가가 대장암과 관련한 염증을 낮출 수 있을 것으로 보인다.

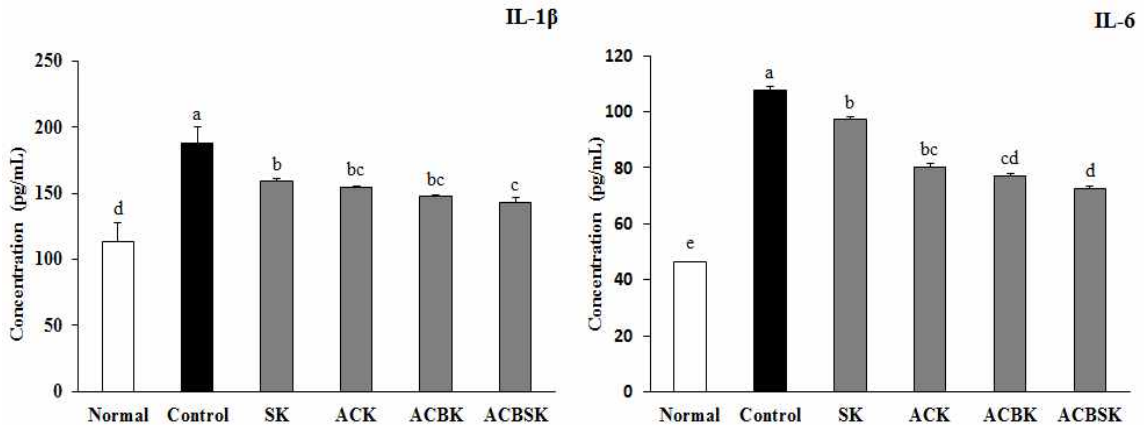


그림 96. 혈청 내 염증성 사이토카인(IL-1β 및 IL-6) 측정

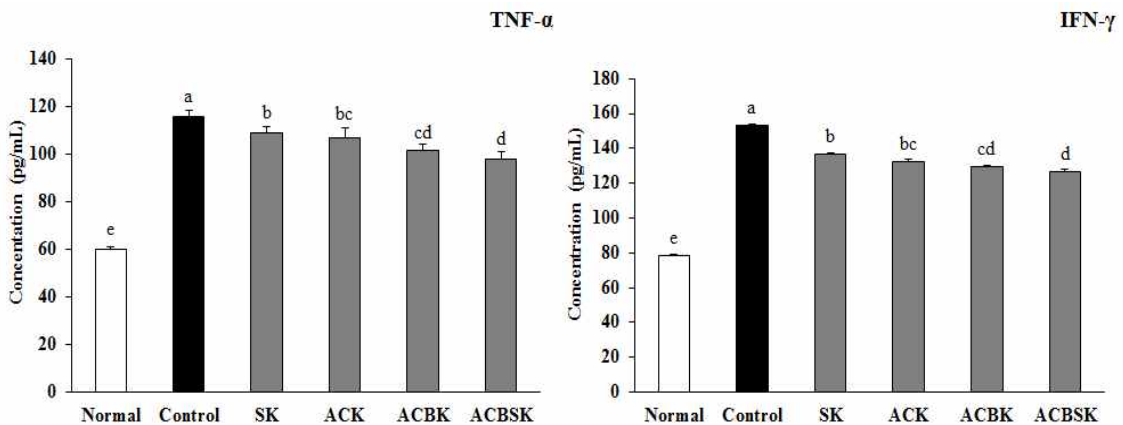


그림 97. 혈청 내 염증성 사이토카인(TNF-α 및 IFN-γ) 측정

6) Pro-inflammatory cytokines의 mRNA 발현

앞서 혈청을 이용하여 pro-inflammatory cytokines 농도를 측정하였는데, 이에 이어서 마우스 조직을 이용하여 이들 pro-inflammatory cytokines의 mRNA 발현을 살펴보았다(그림 98, 99).

그림 98에 나타낸 바와 같이 IL-1β와 IL-6의 mRNA 발현에서 Normal군이 Control군에 비하여 유의적으로 상승하였고($p < 0.05$), 모든 김치 처리군들이 Control군보다 낮은 수준을 보였으며, 천일염을 이용하여 제조된 김치군(SK, ACK) 보다 죽염을 이용하여 제조된 김치군(ACBK, ACBSK)이 더 낮은 발현을 나타냈다($p < 0.05$). 특히 starter를 첨가하고 죽염을 이용하여 제조된 항암김치(ACBSK)가 유의적으로 가장 낮게 나타났다($p < 0.05$).

그림 99에 나타낸 바와 같이 TNF-α와 IFN-γ의 mRNA 발현도 IL-1β, IL-6의 발현과 비

슷한 경향을 나타내어, Control군이 Normal군에 비하여 유의적으로 상승하였다($p<0.05$). 또한 모든 김치군들이 Control군보다 낮은 수준을 보였으며, 이들 중에서도 ACBSK가 가장 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$).

ACBSK는 다른 김치에 비하여 pro-inflammatory cytokines(IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ)의 mRNA 발현이 가장 낮은 수준을 나타내어($p<0.05$), starter 및 죽염의 첨가가 다양한 기능성 부재료의 첨가로 인해 증가된 염증 및 암을 억제하는 효과를 더욱 증진시키는 것으로 보인다.

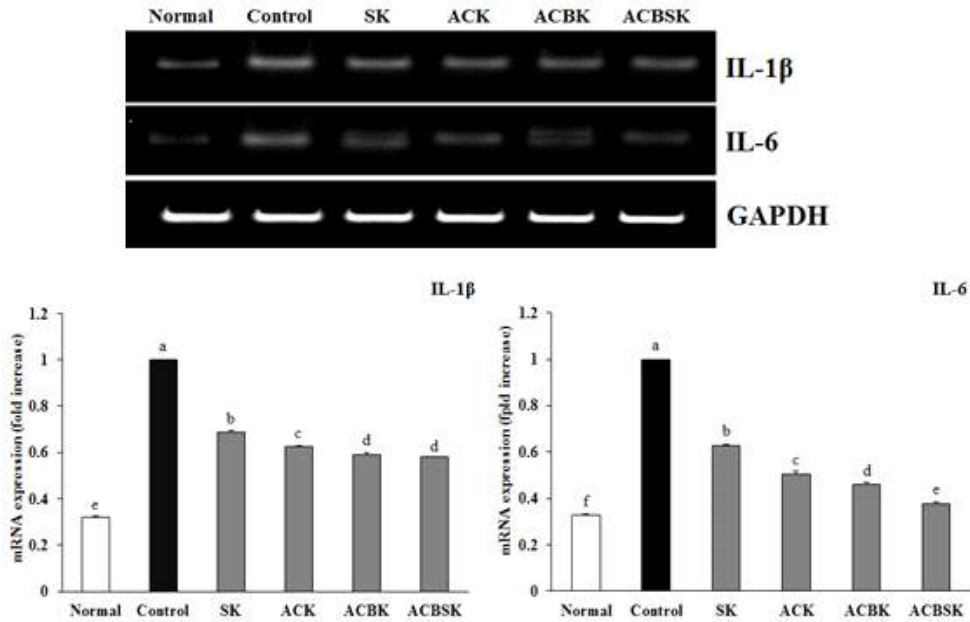


그림 98. 대장 조직 내 염증성 사이토카인(IL-1 β 및 IL-6)의 mRNA 발현

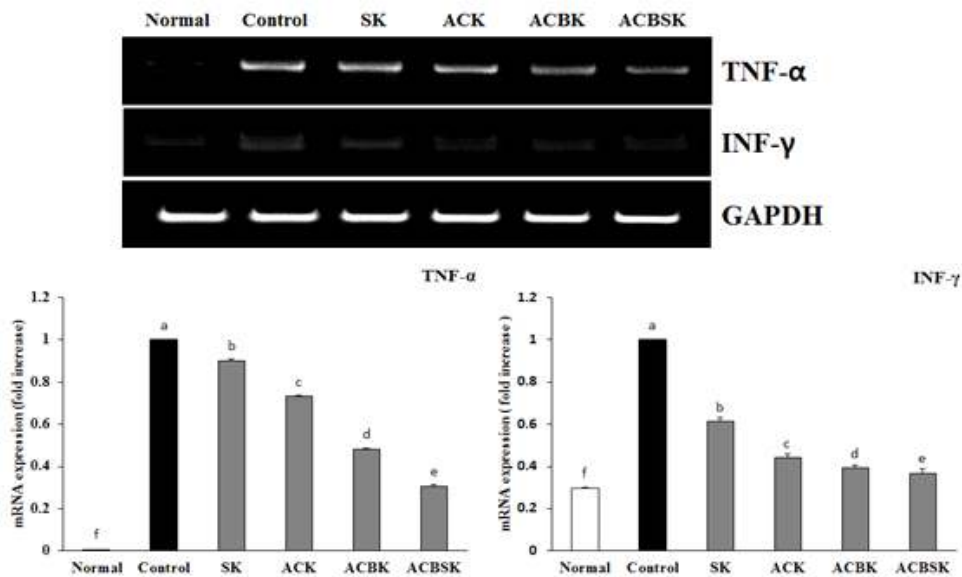


그림 99. 대장 조직 내 염증성 사이토카인(TNF- α 및 IFN- γ)의 mRNA 발현

7) iNOS 와 COX-2 의 mRNA 발현

염증 관련 유전자인 iNOS 와 COX-2는 염증이 유발된 장 점막과 대장암 세포에서 발현이 증가된다. 마우스 대장 조직 내 iNOS 와 COX-2 의 mRNA 발현수준은 그림 100에 나타내었다. 마우스에 AOM/DSS로 염증성 대장암을 유발한 후 김치를 투여하였을 때, 마우스의 대장 조직에서 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 억제됨을 확인하였다($p < 0.05$). 표준김치(SK)군 보다는 항암김치군(ACK, ACBK, ACBSK)의 mRNA 발현이 현저히 감소하였고, 특히 ACBSK에서 가장 낮은 발현을 보였다($p < 0.05$). 따라서 이들 항암김치가 염증성 인자의 발현을 감소시킬 수 있으며, 염증의 감소로 인해 종양 형성이 억제되거나 감소될 수 있을 것으로 생각된다.

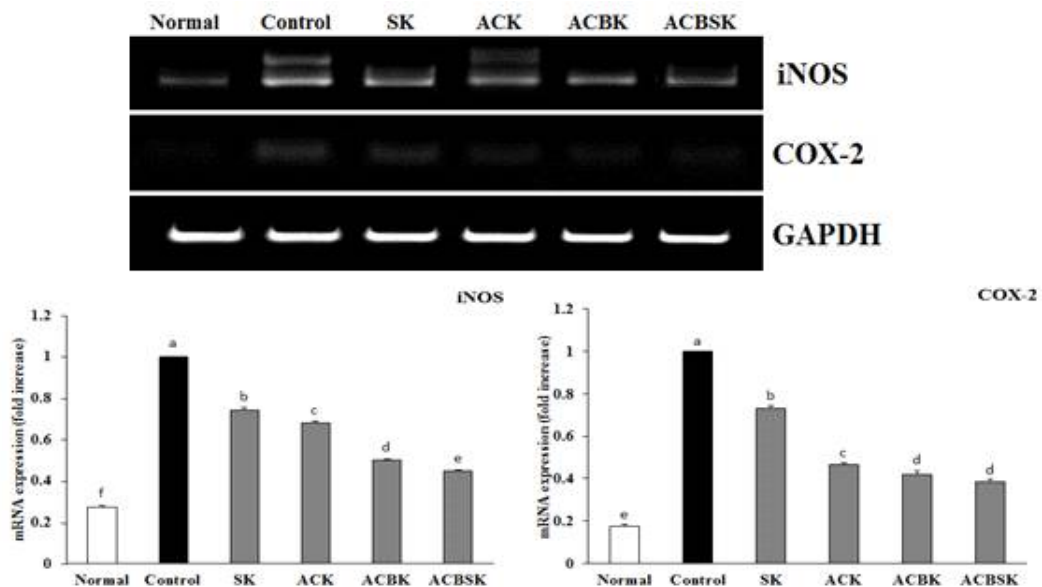


그림 100. 대장 조직 내 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현

8) p53 과 p21 의 mRNA 및 단백질 발현

마우스의 대장 조직에서의 p53 및 p21의 mRNA 발현은 그림 101에 나타낸 바와 같다. Control군에 비하여 김치 투여군에서 모두 p53 및 p21의 mRNA 발현이 증가하였고 ($p < 0.05$), p53에서 가장 높은 mRNA 발현을 보인 것은 ACBSK군과 ACBK군이었으며, p21에서 가장 높은 발현을 보인 것은 역시 ACBSK군이였다. ACBSK군은 SK군에 비해 p53 mRNA 발현에 있어는 약 1.5배 높게 나타났고, p21 mRNA 발현에서는 0.5배 증가하여, SK에 비하여 암세포의 성장을 억제시키고 apoptosis를 유도하는 효과를 더 높게 보임을 확인하였다. 따라서 ACBSK는 대장암을 예방하거나 억제하는데에 탁월한 효과를 보일 것으로 기대된다.

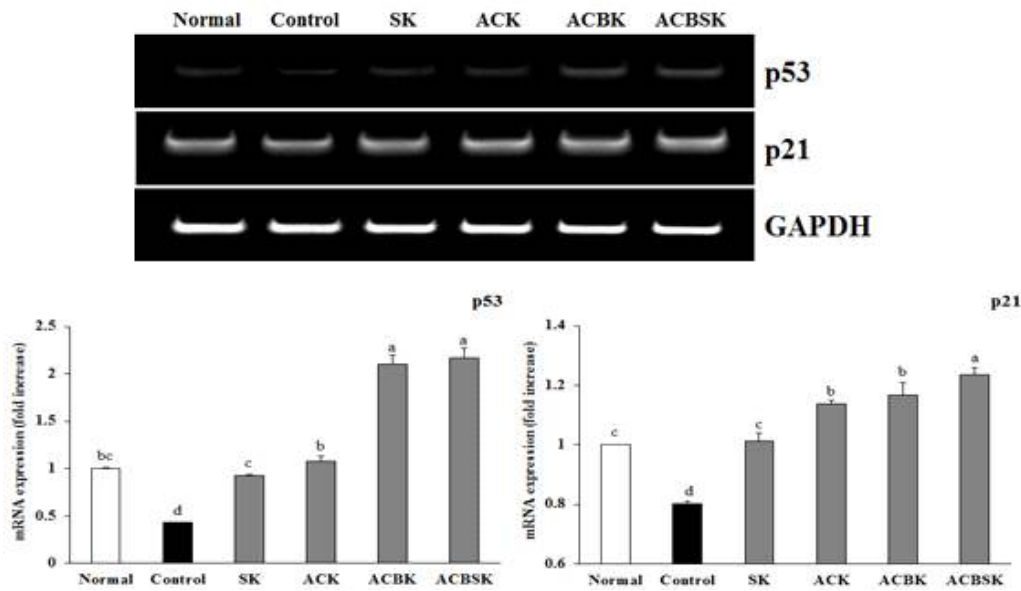


그림 101. 대장 조직 내 p53 및 p21의 mRNA 발현

다. 임상시험 -건강한 성인에 있어서 김치의 대장 건강 증진 확인을 위한 연구-

김치가 인체 대장 건강에 미치는 영향을 알아보기 위하여 임상시험을 수행하였다. 임상시험 대상자는 부산대학교 홈페이지에 공고하여 모집하였다. 모집 조건으로는 현재 부산대학교에 재학중인 만 20세-40세 건강한 성인을 대상으로 하였으며, 만성 질환을 앓고 있거나 장기간 약물을 복용하고 있는 자는 제외하였다. 모집 결과, 총 28 명의 피험자를 최종 선발하였고, 각 군당 14명(남자 9명, 여자 5명)씩 표준김치 섭취군과 항암김치 섭취군으로 무작위 배정하였다. 시험 디자인은 4주간 김치를 매일 한 끼니당 70 g씩 3회 (총 210 g) 섭취하는 평행설계로 하였다. 측정 항목은 신체 계측(신장, 체중, BMI, 체지방량, 체지방률, 골격근량), 혈청분석(total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, AST, ALT, ALP, insulin, leptin, adiponectin, interleukin-6, TNF- α , hs-CRP), 분변 pH 및 유해효소 (β -glucosidase, β -glucuronidase) 활성 분석을 수행하였다. 또한 피험자들이 식사섭취조사지를 작성하도록 하여 식사 패턴을 확인하였다. 신체계측은 InBody 770 신체계측계를 사용하여 측정하였고, 혈액은 임상간호사가 직접 채혈한 후 녹십자랩셀에서 혈청 분석을 하였다. 임상시험은 부산대학교 생명윤리위원회의 심의를 통과하였다(과제 승인번호: PNU IRB/2014_24_HR).

1. 식사섭취패턴 변화

임상시험은 총 4주간 이루어졌으며, 피험자들이 일주일에 3회(주중 2회, 주말 1회)씩 식사섭취조사지를 직접 작성하게 하여, 개인마다 어떤 음식을 얼마나 먹었는지 기입하도록 하여 식사 섭취 패턴을 확인하였다(표 19). 총 섭취 열량은 표준김치군에서 시험 개시일에 1767.8 ± 780.8 kcal 였으나 종료일은 1855.8 ± 776.9 로 증가하였고, 영양소별 열량은 탄수화물이 66.8% 였으나 63.9%로 감소하였으며, 단백질은 18.3%에서 19.8%로, 지질은 14.9%에서

16.3%로 감소하였다. 향암김치군에서는 총 섭취 열량이 시험 개시일에 1589.6 ± 445.8 kcal, 종료일에 1587.0 ± 408.7 kcal로, 크게 차이가 나지 않았다. 영양소별 열량은 시험 개시일에 탄수화물이 65.8%였으나 종료일에 70.5%로 증가하였고, 단백질은 19.1%에서 16.4%로, 지질은 15.1%에서 13.1%로 감소하였다. 식이섬유는 시험 개시일에 표준김치군과 향암김치군이 각각 16.5 ± 9.1 g, 13.1 ± 5.7 g 섭취하였으나 시험 종료일에는 19.2 ± 8.1 g, 16.3 ± 5.1 g 으로 각각 2.7 g, 3.2 g 정도씩 증가하였다. 시험에 참여한 피험자들은 현재 부산대학교에 재학중인 학생들이며, 대부분이 자취생이어서 시험 시작 전에는 끼니를 거르거나 간단하게 때우는 개념의 식사를 하는 경우가 많았는데, 시험에 참여하면서 김치를 섭취하기 위해 이전에 비해 식사를 잘 챙겨먹게 되어 섭취 열량이 다소 높아진 케이스가 많았다. 또한 식이섬유 섭취량도 증가했는데, 이는 김치를 섭취하면서 증가 한 것으로 생각된다.

표 19. 시험 개시일과 종료일의 식사섭취패턴 비교

| | S group | A group |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Initial | | |
| Energy (kcal) | 1767.8 ± 780.8 | 1589.6 ± 445.8 |
| Carbohydrate (g) | 241.5 ± 87.1 (66.8%) | 218.3 ± 62.4 (65.8%) |
| Protein (g) | 66.1 ± 40.4 (18.3%) | 63.5 ± 24.5 (19.1%) |
| Fat (g) | 53.9 ± 29.0 (14.9%) | 50.0 ± 21.2 (15.1%) |
| Fiber (g) | 16.5 ± 9.1 | 13.1 ± 5.7 |
| Final | | |
| Kimchi intake (g/day) | 210 | 210 |
| Energy (kcal) | 1855.8 ± 776.9 | 1587.0 ± 408.7 |
| Carbohydrate (g) | 240.8 ± 88.1 (63.9%) | 242.5 ± 69.6 (70.5%) |
| Protein (g) | 74.7 ± 32.5 (19.8%) | 56.4 ± 16.4 (16.4%) |
| Fat (g) | 61.7 ± 45.1 (16.3%) | 45.0 ± 18.7 (13.1%) |
| Fiber (g) | 19.2 ± 8.1 | 16.3 ± 5.1 |

2. 신체 계측

시험 시작일(initial day)과 끝나는 날(final day) 신체계측을 하였다 (표 20). 표준김치 섭취군과 향암김치 섭취군은 각각 14명(남자 9명, 여자 5명)으로 구성되었고, 평균 나이는 각각 22.6 ± 2.2 세, 24.1 ± 4.8 세였다. 신장은 표준김치군이 167.0 ± 8.0 cm, 향암김치군이 170.0 ± 6.6 cm였다. 두 군 모두 체중, BMI, 체지방량, 체지방률, 골격근량이 약간씩 감소하거나 증가하였는데, 표준김치군은 유의성이 나타나지 않았으나 향암김치군에서는 위 다섯가지 항목에서 모두 유의성을 보였다($p < 0.05$). 향암김치군에서 체중은 70.3 ± 14.7 kg 에서 71.1 ± 14.4 kg로, BMI는 24.1 ± 3.6 kg/m²에서 24.4 ± 3.6 kg/m²로, 골격근량은 28.1 ± 5.6 kg 에서 29.0 ± 5.7 kg로 증가하였으며, 체지방량은 19.8 ± 7.8 kg 에서 19.2 ± 7.9 kg로, 체지방률은 $27.6 \pm 6.7\%$ 에서 $26.5 \pm 6.9\%$ 로 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

표 20. 신체 계측 변화

| Anthropometric parameters | S group | | A group | |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|-----------|------------|
| | Initial ^a | Final ^b | Initial | Final |
| No. of cases (men/women) | 14 (9/5) | | 14 (9/5) | |
| Age (y) | 22.6±2.2 | | 24.1±4.8 | |
| Height (cm) | 167.0±8.0 | | 170.0±6.6 | |
| Body Weight (kg) | 65.6±10.5 | 65.7±10.4 ^{NS} | 70.3±14.7 | 71.1±14.4* |
| BMI (kg/m ²) | 23.6±2.7 | 23.7±3.0 ^{NS} | 24.1±3.6 | 24.4±3.6* |
| Body fat mass (kg) | 18.2±5.1 | 17.6±6.2 ^{NS} | 19.8±7.8 | 19.2±7.9* |
| Body fat percentage (%) | 28.0±7.1 | 26.9±8.4 ^{NS} | 27.6±6.7 | 26.5±6.9* |
| Skeletal muscle mass (kg) | 26.2±5.8 | 26.7±5.9 ^{NS} | 28.1±5.6 | 29.0±5.7* |

All data are means ± SD.

^a Initial data of S or A group were the means of data on 0 week.

^b Final data of S or A group were the means of data on 4 week.

* Significantly different from initial value (P<0.05).

^{NS} Not significant.

3. 혈청 분석

시험 시작 시점(0주)과 끝나는 시점(4주)에 피험자의 혈액을 채취하여 total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, AST, ALT, ALP, insulin, leptin, adiponectin, interleukin-6, TNF- α , hs-CRP 등의 항목 변화를 분석하였다(표 21).

Total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol은 김치를 섭취하면 낮아지고, HDL-cholesterol은 높아지는 경향이 나타난다고 다수의 연구에서 밝혀진 바 있는데, 본 연구에서도 표준김치군과 향암김치군 모두에서 비슷한 경향이 나타났다. Total cholesterol은 표준김치군에서 168±31 mg/dL에서 163±27 mg/dL로 감소하였으나 유의성은 없었고, 향암김치군에서는 171±22 mg/dL에서 153±16 mg/dL로 유의적으로 감소하였다(p<0.05). Triglyceride는 표준김치군이 73±23 mg/dL에서 67±17 mg/dL로 감소하였으나 유의적이지는 않았고, 향암김치군에서는 82±35 mg/dL에서 62±22 mg/dL로 유의적인 감소를 보였다(p<0.05). HDL-cholesterol은 표준김치군에서는 48±8 mg/dL에서 58±9 mg/dL로, 향암김치군에서는 51±8 mg/dL에서 67±11 mg/dL로 증가하여 p<0.01 수준에서 유의성을 보였고, LDL-cholesterol은 표준김치군과 향암김치군 모두 유의적(p<0.05)으로 감소하였다(표준김치군: 105±22 mg/dL → 82±13 mg/dL, 향암김치군: 104±25 mg/dL → 85±14 mg/dL). 간독성 검사로 수행된 AST, ALT, ALP 수치는 특별한 변동 없이 정상 수준으로 나타났고, insulin은 유의적이지는 않으나 두 군 모두 소폭 상승하였다. Leptin은 표준김치군에서는 소폭 상승하고, 향암김치군에서는 소폭 감소하였으나 두 군 모두에서 유의성은 나타나지 않았다. Adiponectin은 두 군 모두 p<0.05 수준에서 유의적으로 증가하였다(표준김치군: 6.6±1.1 μ g/dL → 8.8±2.3 μ g/dL, 향암김치군: 6.5±1.0 μ g/dL → 9.0±2.9 μ g/dL). 염증과의 관계를 확인하기 위한 인자로 High sensitivity C-reactive protein(hs-CRP)를 들 수 있는데, 이는

interleukin-6의 자극에 의해 형성되며, 염증상태 평가에 이용된다. 본 연구에서는 항암김치 군에서 interleukin-6 수치가 유의적으로 감소하였고(1.9 ± 1.0 pg/mL \rightarrow 0.7 ± 0.2 pg/mL), 비록 유의성은 없으나 hs-CRP도 감소하여(0.7 ± 0.7 mg/L \rightarrow 0.5 ± 0.4 mg/L), 표준김치보다 항암김치가 염증을 더 완화하는 작용을 할 수 있는 것으로 사료된다. TNF- α 도 interleukin-6와 함께 대표적인 대장질환에서의 염증성 사이토카인인데, 본 연구에서는 두 김치 섭취군 모두에서 시험 전과 후에 차이를 나타내지 않았다. 그 외의 인자들에서는 특별히 유의성을 나타내는 항목이 발견되지 않았다.

표 21. 혈청 분석

| Serum biomarkers | S group | | A group | |
|----------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|
| | Initial ^a | Final ^b | Initial | Final |
| Total cholesterol (mg/dL) | 168 \pm 31 | 163 \pm 27 ^{NS} | 171 \pm 22 | 153 \pm 16* |
| Triglyceride (mg/dL) | 73 \pm 23 | 67 \pm 17 ^{NS} | 82 \pm 35 | 62 \pm 22* |
| HDL-cholesterol (mg/dL) | 48 \pm 8 | 58 \pm 9** | 51 \pm 8 | 67 \pm 11** |
| LDL-cholesterol (mg/dL) | 105 \pm 22 | 82 \pm 13* | 104 \pm 25 | 85 \pm 14* |
| AST (U/L) | 19 \pm 4 | 18 \pm 5 ^{NS} | 19 \pm 4 | 20 \pm 3 ^{NS} |
| ALT (U/L) | 15 \pm 8 | 14 \pm 6 ^{NS} | 14 \pm 5 | 15 \pm 5 ^{NS} |
| ALP (U/L) | 61 \pm 14 | 61 \pm 16 ^{NS} | 58 \pm 14 | 58 \pm 13 ^{NS} |
| Insulin (μ U/mL) | 6.3 \pm 2.3 | 7.4 \pm 4.4 ^{NS} | 6.6 \pm 1.9 | 8.9 \pm 5.6 ^{NS} |
| Leptin (ng/mL) | 4.2 \pm 1.5 | 4.9 \pm 1.8 ^{NS} | 4.7 \pm 2.1 | 4.6 \pm 2.2 ^{NS} |
| Adiponectin (μ g/mL) | 6.6 \pm 1.1 | 8.8 \pm 2.3* | 6.5 \pm 1.0 | 9.0 \pm 2.9* |
| Interleukin-6 (pg/mL) | 1.4 \pm 0.9 | 1.3 \pm 0.3 ^{NS} | 1.9 \pm 1.0 | 0.7 \pm 0.2* |
| TNF- α (pg/mL) | 1.9 \pm 0.6 | 1.9 \pm 0.3 ^{NS} | 1.7 \pm 0.1 | 1.7 \pm 0.1 ^{NS} |
| hs-CRP ^c (mg/L) | 0.2 \pm 0.2 | 0.2 \pm 0.2 ^{NS} | 0.7 \pm 0.7 | 0.5 \pm 0.4 ^{NS} |

All data are means \pm SD.

^a Initial data of S or A group were the means of data on 0 week.

^b Final data of S or A group were the means of data on 4 week.

^c High sensitivity C-reactive protein

* Significantly different from initial value (p<0.05).

** Significantly different from initial value (p<0.01).

^{NS} Not significant.

4. 분변 pH, 유해효소 (β -glucosidase 및 β -glucuronidase) 활성 변화

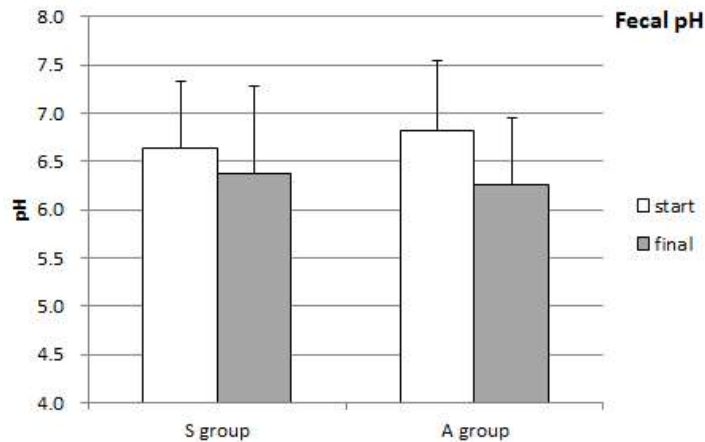


그림 102. 분변 pH 변화

피험자들에게서 대변을 채취받아 분변의 pH와 대장 내 유해 효소의 활성을 시험 전과 후를 비교하였으며, 그 결과는 그림 102, 103과 같다. 대변 샘플은 총 28명의 피험자 중에서 채취하기를 희망하는 자만 자율적인 의지에 따라 표준김치군은 6명(남자 4, 여자 2), 향암김치군은 7명(남자 5, 여자 2)에게서 제공받았다.

대변의 pH는 0주차에 표준김치군이 6.63 ± 0.91 , 향암김치군이 6.82 ± 0.70 이었으나 4주차에는 각각 6.37 ± 0.70 와 6.26 ± 0.73 로, 비록 유의적인 차이는 없었으나 두 군 모두 감소하였다. 이러한 경향은 김치 유산균이 작용하여 대장 내 pH를 낮추었기 때문인 것으로 보인다(그림 102).

β -glucosidase는 배당체를 분해하는 효소로, 배당체는 분해되어 당과 비배당체 부분으로 나누어지는데, 섭취된 식품 중의 배당체는 분해되면 반응성이 증가되고 체내 흡수가 증가된다. β -glucuronidase는 장간 순환 물질의 탈포합에 주로 관여한다. 즉 간에서는 지용성 독성 물질에 글루쿠론산이나 황산 등의 친수성 그룹을 포함시켜 수용성을 증가시킴으로써 장이나 소변으로의 배설을 촉진한다. β -glucuronidase가 장내에 존재하면 포함된 독성 물질이 다시 탈포합되어 지용성이 증가되고, 결과적으로 상피 세포를 통한 체내 흡수가 증가된다. 따라서 이들 두 가지 효소는 장 건강에 유익하지 않고, 오히려 유해하다고 할 수 있다. 본 시험에서 피험자들로부터 제공받은 대변을 이용하여 대변 내 β -glucosidase 및 β -glucuronidase 활성 측정시 사용한 단위 1 unit은 1분 동안 1 μ mol의 p-nitrophenol이 생성되는 양으로 정의하였다. β -glucosidase 활성은 표준김치 섭취군이 0주차에 4.84 ± 0.36 unit/g feces, 4주차에 2.09 ± 0.51 unit/g feces, 향암김치 섭취군이 0주차에 4.71 ± 0.86 unit/g feces, 4주차에 2.20 ± 0.32 unit/g feces로, 두 군 모두 β -glucosidase 활성이 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.01$). β -glucuronidase 활성은 표준김치 섭취군이 0주차에 8.67 ± 1.21 unit/g feces, 4주차에 2.79 ± 1.46 unit/g feces, 향암김치 섭취군이 0주차에 6.83 ± 2.02 unit/g feces, 4주차에 2.05 ± 0.43 unit/g feces로, 두 군 모두 β -glucuronidase 활성이 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.01$)(그림 103).

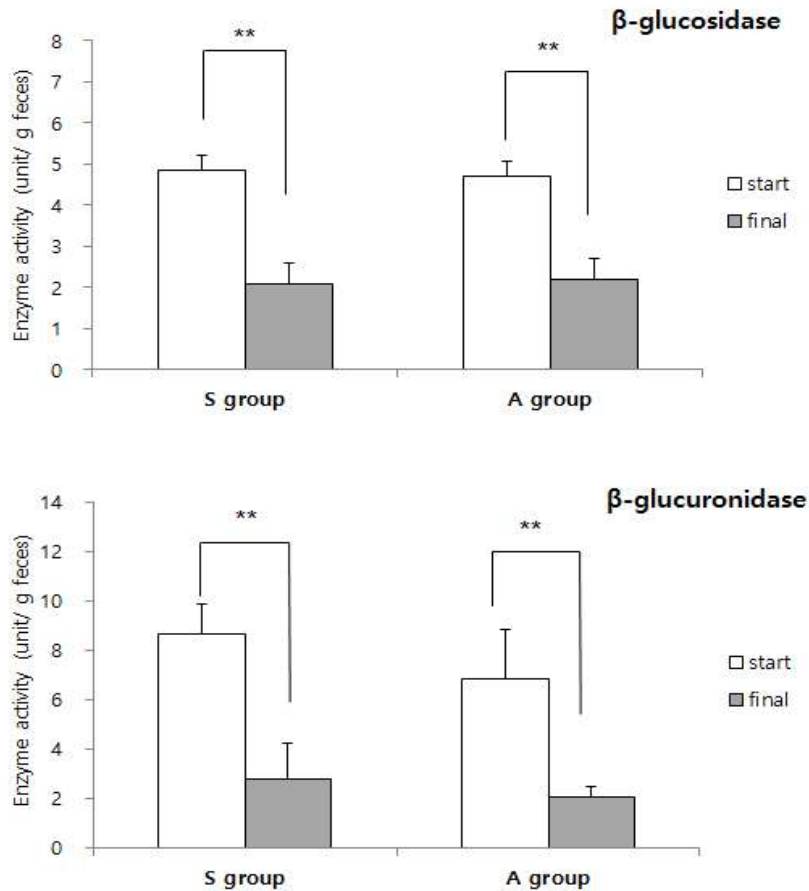


그림 103. 분변 유해효소 β-glucosidase 및 β-glucuronidase 활성 변화

라. Cellular system에서 항암김치 활성물질의 암세포 성장 억제효과 및 메카니즘 검증

재료를 달리하여 제조한 김치를 LC-MS를 이용하여 활성물질(플라보노이드) 분석을 실시하였다. UV 350 nm에서 세 가지 김치의 LC profile을 비교하였을 때 시료간 차이가 있는 피크들이 6-8분대의 앞부분에서 나타났으며 이들 중 6분대와 8분대에 나타난 피크는 표준김치에서는 나타나지 않으나 암예방김치와 항암김치에서는 확연히 나타나 같은 물질일 것이라 예상할 수 있었다(그림 104, 105).

항암김치 시료에서 6-8분대에 나타난 피크들 가운데 RT(retention time) 6.14 , 8.52 의 피크에서 명확한 물질명을 확인할 수 있었다(그림 105). RT 6.14 의 물질은 isorhamnetin-3-O-glucoside, RT 8.52 의 물질은 isorhamnetin 으로 확인되었다. 이들 물질은 갖에서 발견되는 주요 플라보노이드로 알려져 있다. 실제로 표준김치에는 갖이 포함되지 않았으므로 이 두 가지 물질은 갖의 첨가로부터 생긴 물질이라 할 수 있겠다. 한편 isorhamnetin-3-O-glucoside는 발효가 진행됨에 따라 aglycon 형태인 isorhamnetin으로 변화하게 되므로 발효 시간이 경과함에 따라 isorhamnetin의 함량이 더 증가하게 될 것으로 예상된다.

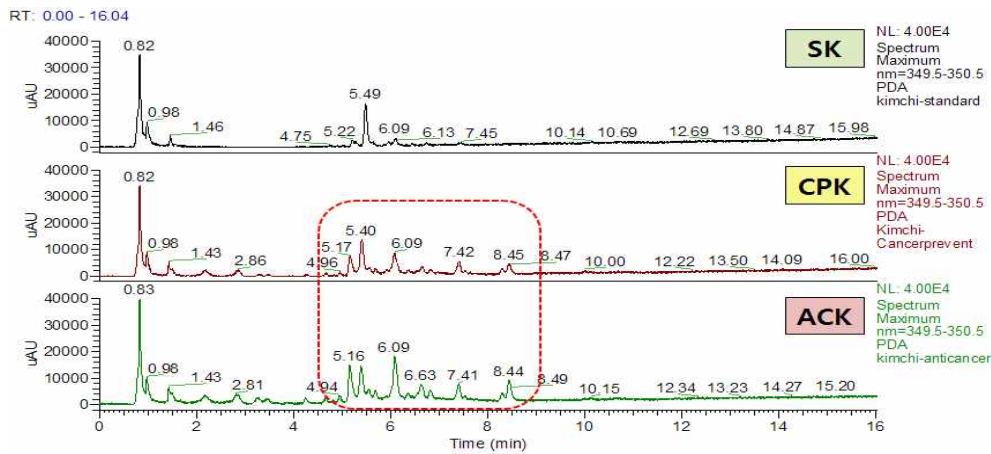


그림 104. 표준김치(SK), 암예방김치(CPK), 항암김치(ACK)의 LC-MS chromatograms

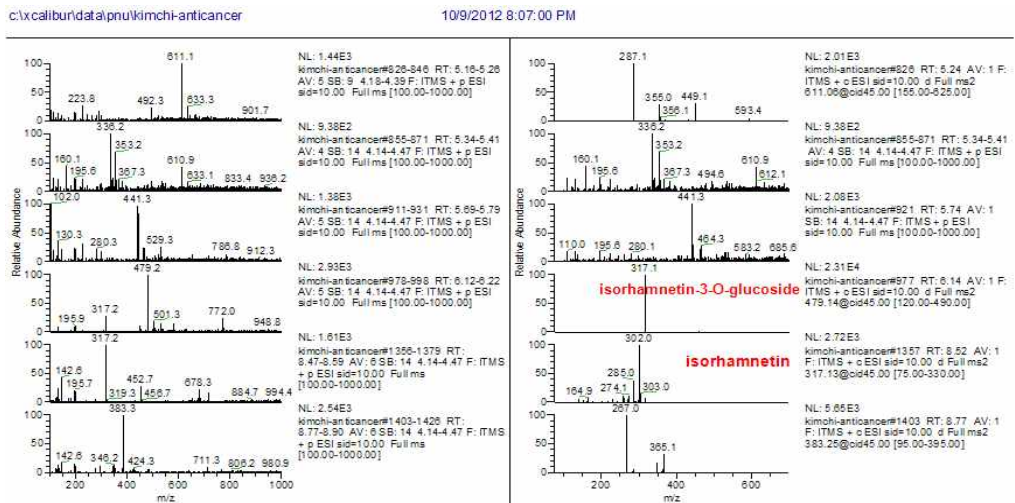


그림 105. 항암김치의 LC-MS chromatogram

1. Isorhamnetin 및 isorhamnetin-3-O-glucoside의 항염증 및 항암활성에 관한 기전 연구

항암김치로부터 분리된 지표물질인 Isorhamnetin 및 Isorhamnetin-3-O-glucoside를 이용하여 항염증 및 항암 활성에 관하여 연구하였다. Isorhamnetin은 항산화, 항암, 항콜레스테롤, 항균 작용이 있다고 보고되어 있다. S-adenosyl methionine과 quercetin은 quercetin 3-O-methyltransferase에 의해 S-adenosylhomocysteine과 isorhamnetin으로 전환된다. 본 연구에서는 isorhamnetin과 당유도체인 isorhamnetin-3-O-glucoside의 항암활성을 비교하고, 그들의 분자생물학적 기전을 연구 하고자 한다. 이를 위하여 우선 인체 대장암 세포(HT-29 human colon carcinoma cell)를 이용하여 항산화 및 apoptosis 효과에 대해 알아보았고, isorhamnetin과 isorhamnetin-3-O-glucoside(그림 106)의 항암활성을 인체 방광암세포(J82, 5637 human bladder cancer cells)에서 비교하였으며, 활성이 높게 나타난 isorhamnetin의 암 세포증식억제 기전을 조사하였다.

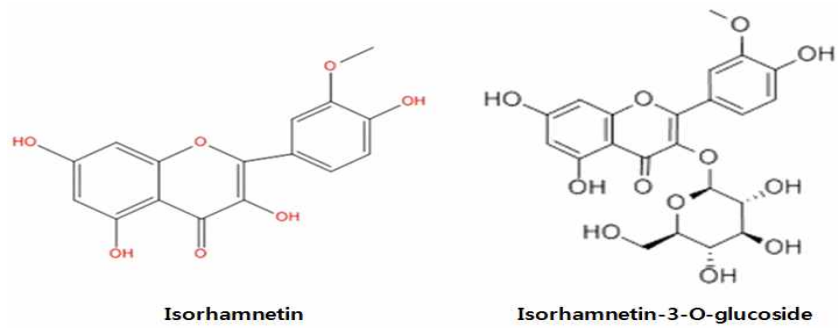


그림 106. Isorhamnetin과 Isorhamnetin-3-O-glucoside의 분자구조

1) Isorhamnetin의 항산화 효과

기능성 부재료를 첨가하여 제조한 암예방김치와 항암김치의 LC-MS 분석을 통해 발견한 물질인 isorhamnetin을 이용하여 DPPH 및 $\cdot\text{OH}$ free radical 소거능을 확인하였다(그림 107). 각 농도별로 처리한 isorhamnetin 에서 농도의존적으로 소거능이 증가하는 경향을 나타내었다. isorhamnetin은 본 실험에서 사용한 김치의 부재료인 갖에 많이 포함되어 있다고 알려져 있으며, 이를 포함한 김치 역시 항산화 효과가 일반 김치보다 높게 나타날 것으로 예측된다.

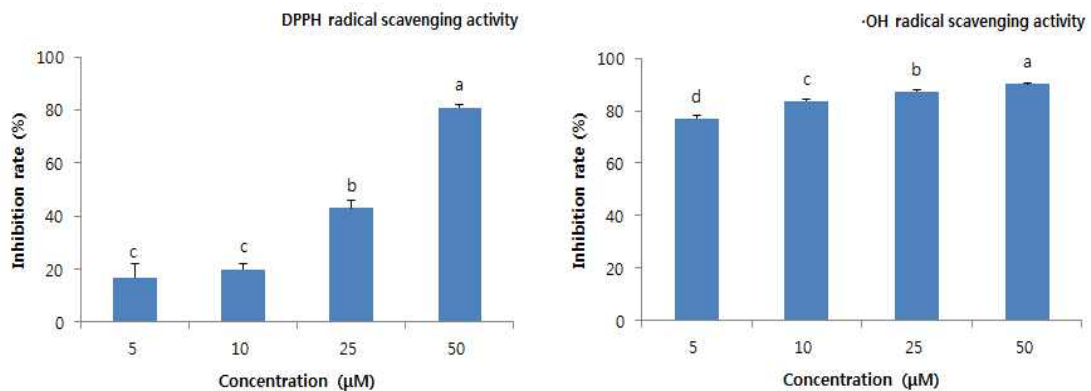


그림 107. Isorhamnetin의 항산화 효과

2) Isorhamnetin의 HT-29 인체 대장암세포에 미치는 효과

(1) Isorhamnetin의 HT-29 인체 대장암세포 성장 억제 효과

Isorhamnetin을 HT-29 인체 대장암세포에 농도별로 처리하여 인체대장암세포의 성장 억제 효과를 MTT assay를 통하여 관찰하였다(그림 108). 그림과 같이 농도가 증가함에 따라 세포의 성장 저해율도 증가하였다. Isorhamnetin은 항산화 기능을 가진 flavonoid로 유명하다. 이러한 항산화물질이 포함된 암예방김치와 항암김치는 김치가 대장암세포의 성장을 억제시켜 암의 발병을 막거나 그 진전을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

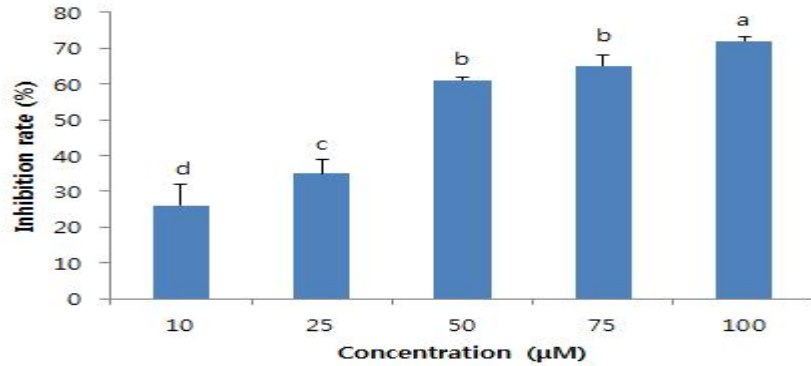


그림 108. Isorhamnetin의 HT-29 인체 대장암세포의 성장 억제 효과

(2) DAPI staining에 의한 HT-29 인체 대장암세포의 핵 형태 관찰

10-100 μM의 isorhamnetin을 각각 처리한 HT-29 인체 대장암세포의 형태를 관찰하였다(그림 109A). 앞서 MTT assay를 통하여 isorhamnetin이 세포의 성장을 억제하는 것(그림 108)을 확인함과 더불어, 이를 육안적으로 관찰하였다. 시료의 농도가 증가함에 따라 세포의 수가 점차 감소하였으며 세포의 모양이 비정상적으로 변화하는 것을 확인하였다. 이러한 현상은 시료의 농도가 증가함에 따라 더 많이 관찰되었다. 이러한 세포 형태의 변화가 세포 독성에 의한 것인지, apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 DAPI staining을 수행하였다. 10-100 μM의 isorhamnetin을 각각 처리한 HT-29 인체 대장암세포의 apoptosis에 의한 세포 핵의 형태를 관찰하였다(그림 109B). 배양한 세포를 고정시킨 후 DAPI staining을 한 후 형광 현미경을 통하여 확인한 결과, isorhamnetin을 처리하지 않은 군에서는 세포의 전체적인 형태와 핵의 모양이 뚜렷하며, 정상적이었으나, 농도별로 isorhamnetin을 처리한 군들에서는 시료의 농도가 증가할수록 핵의 형태가 비정상적이며, DNA의 손상으로 인해 많은 apoptotic body를 생성하여 세포가 apoptosis에 의하여 사멸하였음을 확인할 수 있었다.

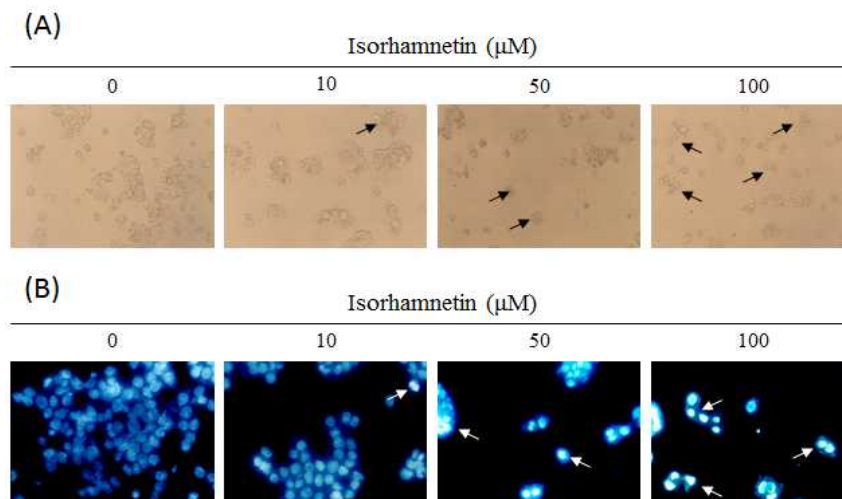


그림 109. Isorhamnetin 처리에 의한 HT-29 인체 대장암세포의 morphology 변화 및 apoptosis에 의한 핵 형태 변화

(3) HT-29 인체대장암세포에서의 Isorhamnetin 처리에 의한 염증 및 apoptosis 관련 유전자의 mRNA 발현 억제

HT-29 인체대장암세포에 Isorhamnetin을 농도별로 10, 50, 100 μM 씩 처리하여 apoptosis 관련 유전자들의 mRNA 발현을 측정하였다 (그림 110). 농도가 증가함에 따라 apoptosis를 억제하는 것에 관여하는 일으키는 것에 관여하는 Bcl-xL, cIAP-1, cIAP-2, XIAP 의 발현은 감소하였고, pro-apoptosis 관련 유전자로 알려진 Bax, caspase-3, caspase-9의 발현은 증가하여 isorhamnetin이 농도 의존적으로 apoptosis 일으킴을 확인할 수 있었다.

한편 그림 111에서 보는 바와 같이 HDAC 2의 단백질 발현은 Isorhamnetin에 의해 억제되는 것으로 보이며 HDAC 9도 감소하는 경향을 보였다. 그러나 김치의 Isorhamnetin은 HDAC inhibitor로 작용할 가능성이 있고 김치 추출물(일반김치, 항암김치)을 이용한 새로운 접근과 농도에 따른 연구 등이 필요할 것으로 생각된다.

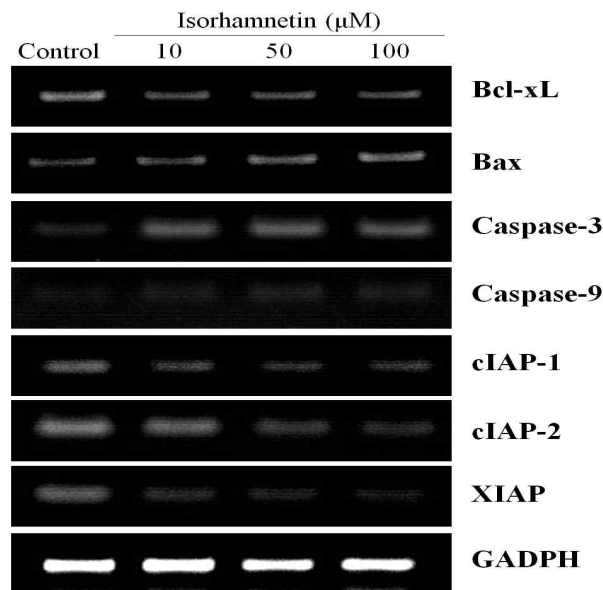


그림. 110. HT-29 인체대장암세포에서의 Isorhamnetin 처리에 의한 apoptosis 관련 유전자의 mRNA 발현

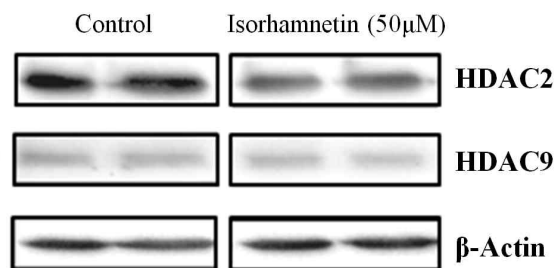


그림 111. Isorhamnetin을 처리한 Caco-2 인체대장암세포에서의 HDAC2, 9의 단백질 발현

3) Isorhamnetin의 J82와 5637 인체 방광암세포에 미치는 효과

(1) J82와 5637 세포에서 Isorhamnetin과 Isorhamnetin-3-O-glucoside의 항암활성 비교

실험에 사용된 J82와 5637 인체 방광암세포는 한국생명공학연구소(KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 암세포의 배양을 위해 J82 세포는 DMEM 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5%, CO₂ 조건 하에서 배양하였고, 5637세포는 RPMI-1640 배지(Gibco-BRL)와 10%의 FBS 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5%, CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 성장배지의 교환을 매 48시간마다 실시하여 적정 수의 세포를 유지하였다.

→ J82와 5637 세포에서 isorhamnetin과 isorhamnetin-3-O-glucoside의 항암활성을 비교를 위하여 MTT assay를 실시하였다. MTT assay를 위하여 세포 배양용 6 well plate에 J82는 2 X 10⁵개/well, 5637은 4 X 10⁵개/well로 세포를 분주하고 isorhamnetin과 isorhamnetin-3-O-glucoside를 배지에 희석하여 각 well 당 적정 농도로 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Ameresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 37°C에서 2시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 생성된 formazan을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

▶ isorhamnetin과 isorhamnetin-3-O-glucoside의 처리에 따른 J82와 5637 세포 증식에 미치는 영향을 조사한 결과, 그림 112에서 알 수 있듯이 isorhamnetin의 처리했을 때는 두 가지 세포에서 모두 증식억제 효과를 보였으나, isorhamnetin-3-O-glucoside를 처리했을 때는 두 가지 세포에서 모두 증식에 큰 변화를 관찰할 수 없었다.

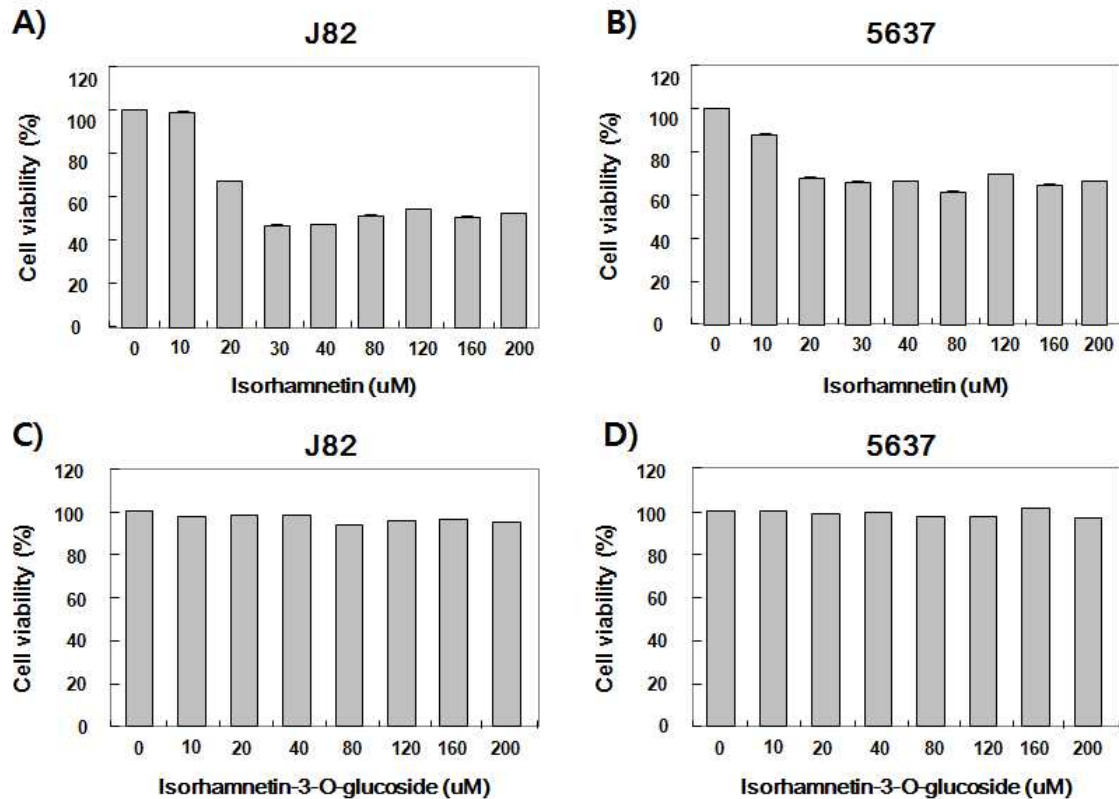


그림 112. 인체방광암세포(J82, 5637 human bladder cancer cells)의 증식에 미치는 Isorhamnetin (A,C) 및 Isorhamnetin-3-O-glucoside(B,D)의 영향

(2) Isorhamnetin과 Isorhamnetin-3-O-glucoside가 J82와 5637 세포의 성장과 형태에 미치는 영향

Isorhamnetin과 isorhamnetin-3-O-glucoside 처리에 의한 J82와 5637 세포의 형태 변화 정도를 살펴보기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 J82는 2×10^5 개/well, 5637은 4×10^5 개/well로 세포를 분주하고 isorhamnetin과 isorhamnetin-3-O-glucoside를 배지에 희석하여 각 well 당 적정 농도로 처리하였다. 48시간동안 배양한 후 isorhamnetin과 isorhamnetin-3-O-glucoside 처리농도에 따른 성장정도와 형태의 변화를 도립 현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

▶그림 113에서 알 수 있듯이 isorhamnetin의 처리 했을 때는 두 가지 세포에서 모두 밀도가 감소하여 성장이 억제되고 형태적 변형이 일어난 것을 확인할 수 있었으나, isorhamnetin-3-O-glucoside를 처리했을 때는 두 가지 세포에서 모두 밀도의 변화가 없고 control과 비교했을 때 형태적 변형이 관찰되지 않았다.

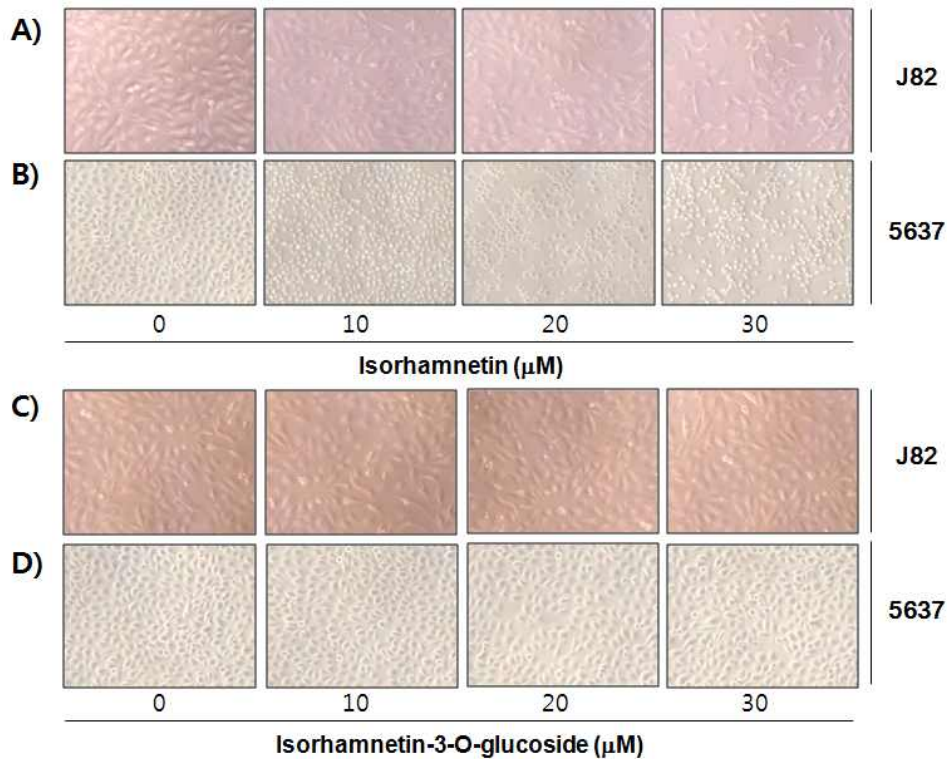


그림 113. 인체 방광암세포(J82, 5637 human bladder cancer cells)의 증식에 미치는 Isorhamnetin (A,C) 및 Isorhamnetin-3-O-glucoside(B,D)의 영향

(3) Isorhamnetin이 J82와 5637 세포의 apoptosis에 미치는 영향

이상의 결과에서 isorhamnetin이 isorhamnetin-3-O-glucoside에 비하여 강력한 항암활성을 나타내었기에 isorhamnetin에 의한 J82와 5637 세포의 증식억제가 자가세포사멸(apoptosis) 유도와의 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 세포주기의 sub-G1기에 속하는 빈도의 측정 방법을 적용하였다.

→ 이를 위하여 J82와 5637 세포에서 isorhamnetin이 유발하는 apoptosis의 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 정상 및 isorhamnetin이 처리된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하였다. 준비된 세포는 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson)를 적용시켜 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software 및 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

→ Isorhamnetin이 처리된 J82와 5637 세포를 대상으로 DNA flow cytometry를 이용하여 apoptosis가 유발되었을 것으로 예상되는 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도를 측정된 결과는 그림 114에 나타난 바와 같다. 정상배지에서 자란 J82와 5637 세포에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 매우 낮았고 최고농도에서도 유의적인 차이는 없었다. MTT assay를 통해 세포의 증식이 억제되는 것과는 달리 농도가 증가하여도 sub-G1기에 해당하는 세포의

빈도가 증가하지 않는 것을 발견하였다.

▶ 이상의 결과는 isorhamnetin의 처리에 의한 J82와 5637 세포의 증식억제 현상은 apoptosis 유발과는 직접적인 연관이 없다는 것을 알 수 있다.

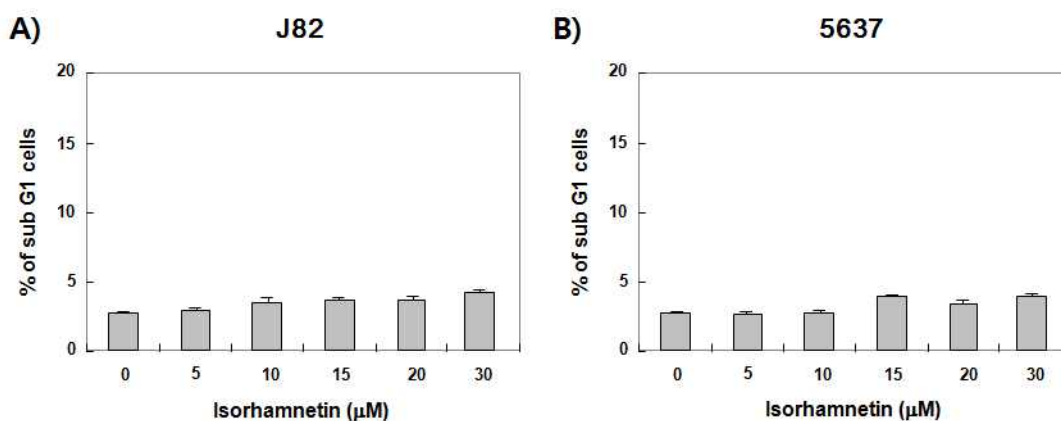


그림 114. Isorhamnetin이 J82와 5637 세포의 apoptosis에 미치는 영향

(4) J82, 5637 세포에서 Isorhamnetin에 의한 G2/M arrest 유발

다음은 isorhamnetin에 의한 J82와 5637 세포의 증식억제가 세포주기 특정 시기의 교란과 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 상기에서 제시한 flow cytometry 분석에 의하여 나타난 결과를 바탕으로 sub-G1기의 세포 빈도를 제외한 나머지 세포들의 분포도를 조사하였다.

→ Isorhamnetin이 다양한 농도로 배양된 J82와 5637 세포를 대상으로 세포주기 빈도를 분석한 결과, J82 세포의 경우 isorhamnetin이 처리되지 않은 배지에서 배양된 세포의 G1기에 해당되는 빈도는 54.25% 정도였으며, S기 및 G2/M기에 해당되는 세포는 각각 19.12% 및 26.63%로 나타났다(그림 115의 A와 C). 그러나 isorhamnetin의 농도가 증가할수록 G1기에 해당되는 세포의 빈도는 점차 감소하여 30 uM 처리군에서 38.43%로 나타났으며, S기에 해당되는 세포의 빈도는 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 G1기의 세포 빈도가 줄어들수록 상대적으로 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 점차 증가되어 30 uM 처리군에서 1.66배로 증가되었다. 5637 세포의 경우 isorhamnetin이 처리되지 않은 배지에서 배양된 세포의 G1기에 해당되는 빈도는 55.95% 정도였으며, S기 및 G2/M기에 해당되는 세포는 각각 18.79% 및 25.36%로 나타났다(그림 115의 B와 D). 그러나 isorhamnetin의 농도가 증가할수록 G1기와 S기에 해당되는 세포의 빈도는 점차 감소하여 30 uM 처리군에서 각각 51.30% 및 15.02%로 나타났다. 그러나 G1기와 S기의 세포 빈도가 줄어들수록 상대적으로 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 점차 증가되어 30 uM 처리군에서 1.32배로 증가되었다.

▶ 이상의 결과는 isorhamnetin의 처리에 의한 J82와 5637 세포의 증식억제 현상은 세포주기 G2/M arrest 유발과 연관성이 있음을 보여준다.

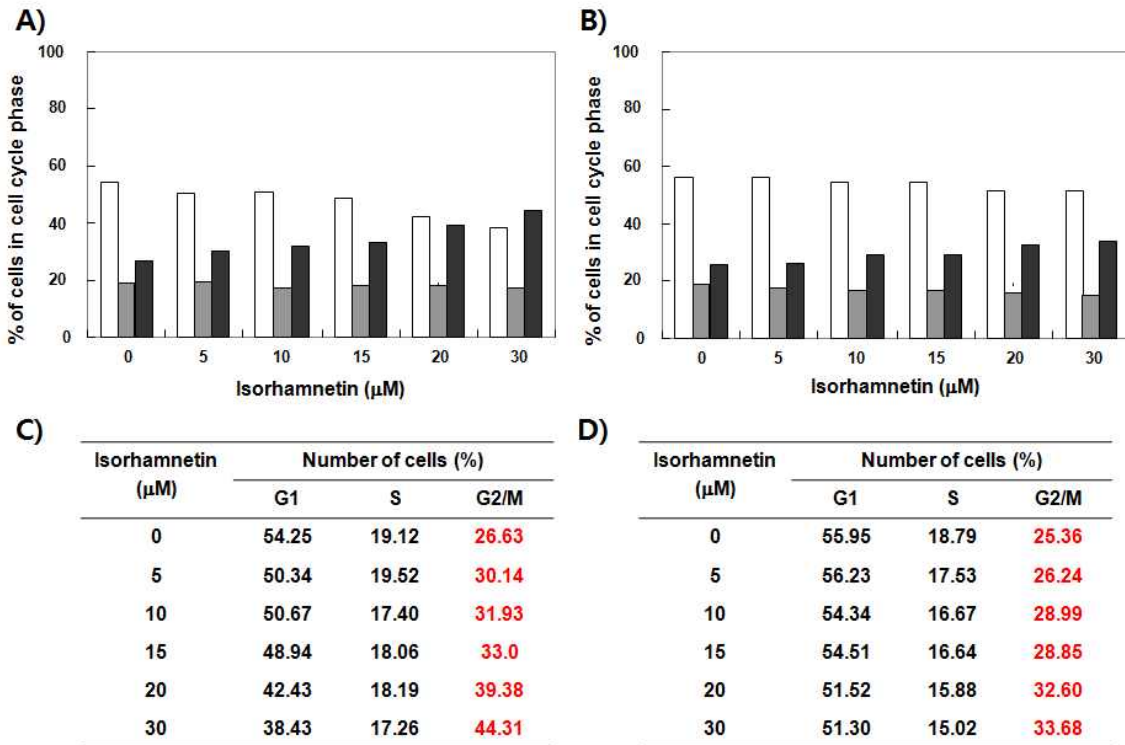


그림 115. Isorhamnetin이 J82(A,C)와 5637(B,D) 세포의 세포 주기 분포도에 미치는 영향

(5) Isorhamnetin에 의한 J82와 5637 세포의 mitotic arrest 유발

Isorhamnetin에 의한 J82와 5637 세포의 G2-M기의 전이에 관여하는 주요 유전자들의 발현 변화를 조사하였다.

→ 이를 위하여 그림 115의 실험과 동일 조건에서 배양된 세포를 대상으로 Western blot analysis를 실시하였다. 이를 위하여 준비된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 총 단백질을 분리하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 사용 방법에 준하여 정량 후 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 동량의 sample을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 antibody를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 Enhanced Chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다.

▶ Isorhamnetin에 의한 방광암 세포의 증식억제는 G2/M arrest 유발과 연관성이 있었기에

세포주기 G2/M 조절 관련 cyclins 및 Cdk의 발현에 미치는 isorhamnetin의 영향을 조사하였다. 그림 116의 A와 B의 결과에서 알 수 있듯이, isorhamnetin 처리농도 증가에 따라 G2기에서 M기로의 전이를 촉진하는 cyclin B1 단백질의 발현이 감소되었고, cyclin A도 감소되었다. 한편 Cdk의 인산화를 조절하는 kinase 중의 하나인 Wee1은 세포가 mitosis로 들어갈 수 있는 조건이 될 때까지 Cdc2의 Tyr15 잔기를 인산화하여 그 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데 이러한 Wee1의 발현 및 G2/M기와 연관된 DNA damage 조절에 중요한 checkpoint kinase (Chk) 1의 발현 증가도 동반되었음을 알 수 있었다. Wee1의 작용과는 반대로 세포주기를 G2기로부터 mitosis로 진행하는데 역할을 하는 Cdc25c는 감소하는 것으로 나타났다. Cdk는 세포증식 억제 신호에 따라 발현이 증가되는 Cdk inhibitor와 결합을 함으로써 그들의 활성이 억제될 수 있다. Cdk inhibitor 중 특히 p21은 DNA 손상과 연계된 종양 억제 유전자 p53 발현증가에 따라 발현이 조절될 수 있는 것으로 알려졌으나 p53 비의존적으로도 조절 받을 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 세포증식 억제 인자에 해당되는 유전자 중 세포주기 조절과 가장 밀접한 관련을 가지는 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 isorhamnetin의 영향을 조사하였다. 본 연구에 사용된 J82와 5637 세포는 p53 mutant type으로 isorhamnetin 처리에 따라 p21의 단백질 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 J82와 5637 세포에서 p21의 단백질의 발현 증가가 p53 비의존적으로 일어날 수 있음을 의미한다.

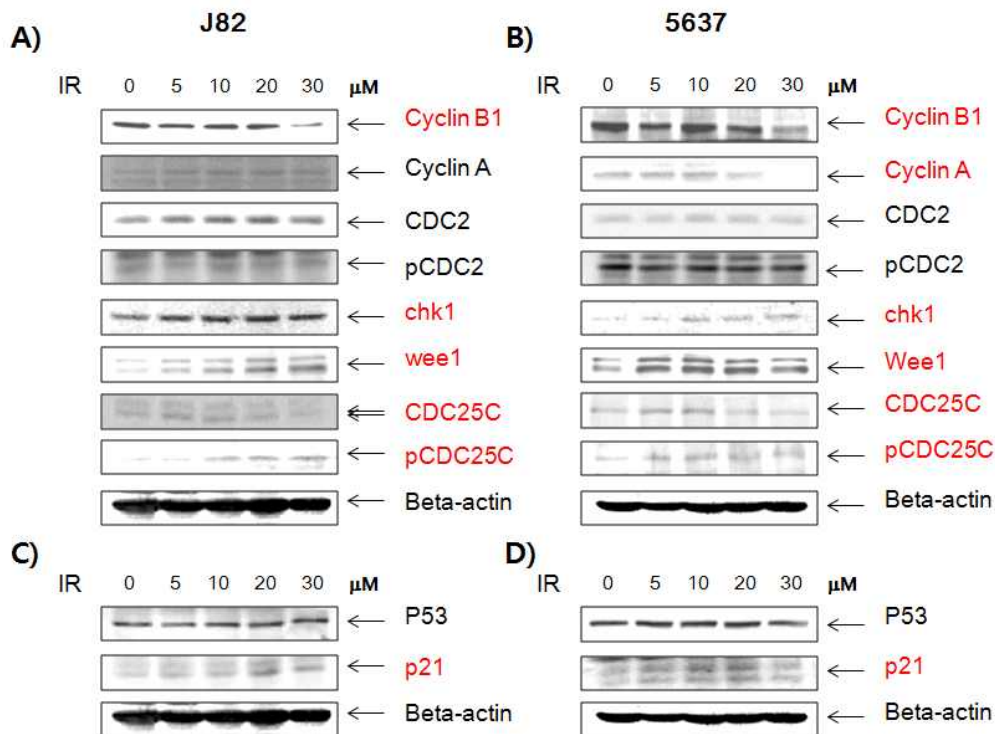


그림 116. Isorhamnetin이 J82(A,C)와 5637(B,D) 세포에서 G2/M기 조절 관련 cyclins 및 Cdk의 발현에 미치는 영향(A,B)과 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 영향(C,D)

(6) J82와 5637 세포에서 Isorhamnetin이 MAPK 활성화에 미치는 영향

Isorhamnetin을 처리했을 경우 J82와 5637 세포 모두 1h에서 p38이 활성화가 되는 것을 확인하였다(그림 117). 그러나 isorhamnetin에 의한 p38의 활성화를 p38 inhibitor인 SB203580(10 uM)을 사용하여 차단하여도 isorhamnetin에 의한 p38의 활성화나 증식억제에는 아무런 영향을 주지 않은 것으로 확인되었다(그림 118). 이러한 결과로 본 연구조건에서 p38은 isorhamnetin에 의한 G2/M arrest에 관여하는 인자는 아니라고 생각된다.

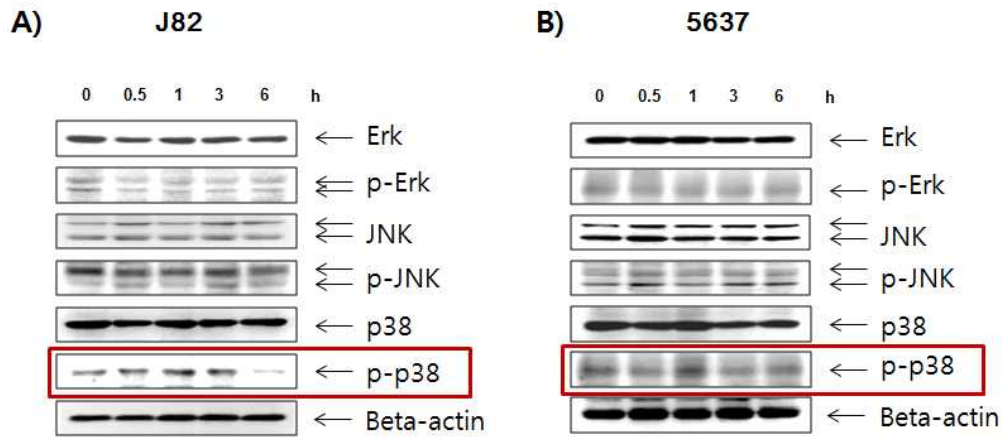


그림 117. J82와 5637 세포에서 Isorhamnetin이 MAPK 활성화에 미치는 영향

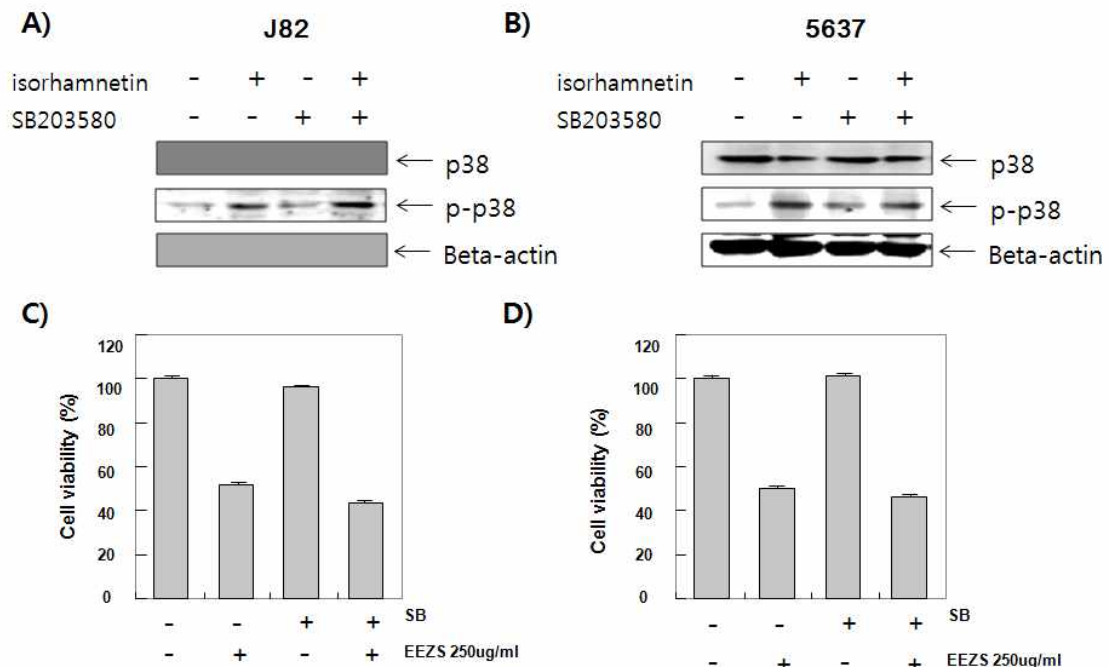


그림 118. p38 inhibitor인 SB203580이 J82와 5637 세포에서 Isorhamnetin에 의해 활성화되었던 p38의 활성화에 미치는 영향

3) 산화적 스트레스 유도 C2C12 근육세포 모델에서 isorhamnetin의 항산화능 및 관련 기전 연구

Isorhamnetin은 강력한 항산화능을 가지며, 심근세포주에서 활성산소종을 제거함으로써 항암효과를 가진다는 연구결과가 밝혀져 있다. 근육세포에서의 isorhamnetin의 항산화활성을 조사하기 위해 세포생존능, 활성산소종의 감소를 확인하고, 이와 관련된 항산화 기전을 연구하고자 한다.

(1) C2C12 세포에서 Isorhamnetin의 세포 독성 확인

실험에 사용된 C2C12 근육세포는 ATCC에서 분양 받았으며, 세포의 배양을 위해 DMEM배지와 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5%, CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

→ C2C12 세포에서 isorhamnetin의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. MTT assay를 위하여 세포 배양용 6 well plate에 1.5 X 10⁵개/ml로 C2C12 세포를 분주하고 isorhamnetin를 배지에 희석하여 각 well 당 적정 농도 및 적정 시간 동안 처리하였다. 처리가 끝난 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Ameresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 37°C에서 3시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 생성된 formazan을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

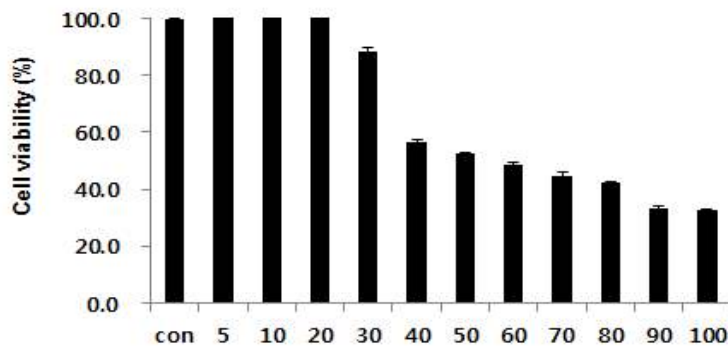


그림 119. Isorhamnetin의 처리에 따른 C2C12 세포에서의 세포 독성

▶ Isorhamnetin의 처리에 따른 C2C12 세포에서의 세포 독성을 확인하였다(그림 119). 30μM 농도에서 약 85%의 세포 생존률을 보였으며, 독성이 없는 30 μM 농도에서 세포실험을 진행하였다.

(2) 산화스트레스에 의한 C2C12 세포의 apoptosis 유발에 미치는 isorhamnetin의 영향

그림 119의 결과를 바탕으로 산화스트레스에 의한 C2C12세포에서의 isorhamnetin 처리시 apoptosis를 차단할 수 있는지 조사하기 위하여 30 μM의 isorhamnetin 1시간 선처리를 하고 hydrogen peroxide 1 mM을 6시간 처리를 한 후 MTT assay를 실시하였다.

→ 그림 120의 결과에서 알 수 있듯이 산화스트레스 유도시 C2C12 세포에서 apoptosis가 유도되었고, isorhamnetin 처리시 이러한 C2C12 세포의 apoptosis를 유의적으로 억제하였음을 알 수 있었다.

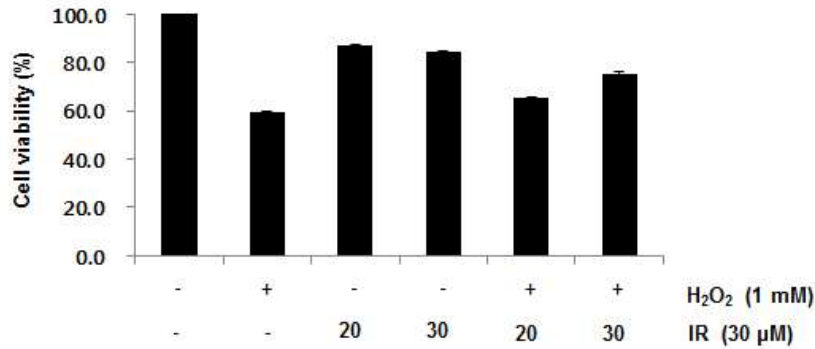


그림 120. 산화스트레스 유도시 isorhamnetin 의 항산화 효과

▶ Isorhamnetin은 30 μM 처리시 산화스트레스에 의한 apoptosis를 약 20% 정도 이상 차단시키는 것으로 보이며, 이는 isorhamnetin의 항산화능을 보여준다.

(3) 산화스트레스에 의한 C2C12 세포에서 ROS의 생성에 미치는 isorhamnetin의 영향

산화스트레스에 의한 C2C12 세포에서의 isorhamnetin 처리시 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 감소시킬 수 있는지 조사하기 위하여 30 μM의 isorhamnetin 1시간 선처리를 하고 hydrogen peroxide 1 mM을 6시간 처리를 한 후 ROS의 생성량을 비교하였다.

→ 그림 121의 결과에서 알 수 있듯이 산화스트레스 처리시 C2C12 세포의 ROS는 6배 정도 증가를 하고, isorhamnetin 처리시 이러한 C2C12 세포의 ROS를 완벽하게 감소시켜 주는 것을 확인할 수 있었다.

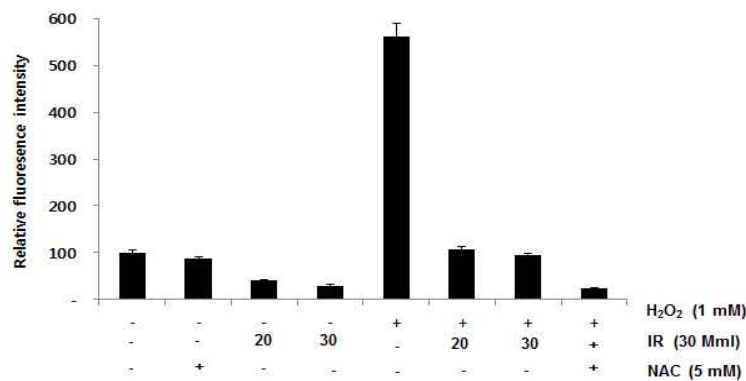


그림 121. 산화스트레스에 의한 C2C12 세포에서의 isorhamnetin 처리시 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성 감소

▶ Isorhamnetin은 산화적 스트레스에 의한 ROS를 완벽하게 감소시키는 것으로 보이며, 이는 isorhamnetin의 강력한 항산화능을 보여준다.

(4) Isorhamnetin에 의한 C2C12 세포의 항산화 관련 단백질 발현

Isorhamnetin에 의한 C2C12 세포의 항산화능 관련 기전 연구의 시도를 위하여 phase II antioxidant enzyme 발현 변화를 조사하였다.

→ 이를 위하여 그림 121의 실험과 동일 조건에서 배양된 세포를 대상으로 Western blot analysis를 실시하였다. 이를 위하여 준비된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 총 단백질을 분리하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 사용 방법에 준하여 정량 후 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 동량의 sample을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 antibody를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) solution (Santa Cruz)을 사용하였다.

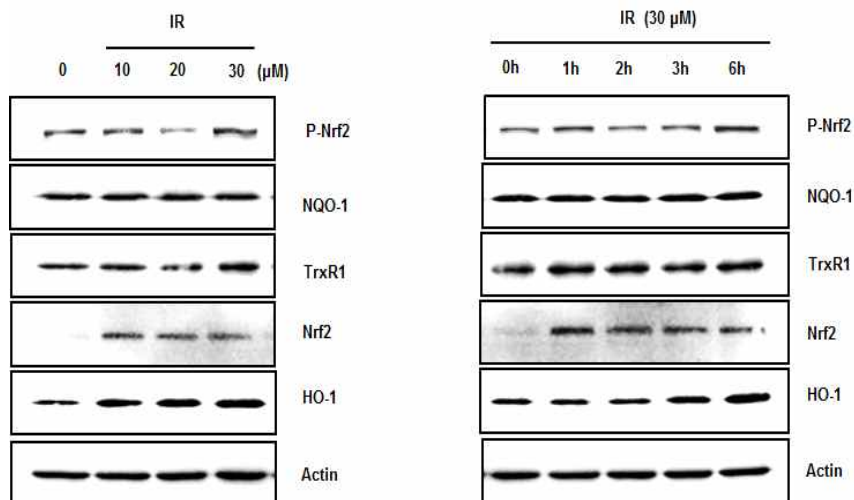


그림 122. Isorhamnetin에 의한 C2C12 세포의 phase II anti oxidant enzyme 발현 변화

▶ 그림 122의 결과에서 알 수 있듯이, isorhamnetin 처리시 농도 및 시간의 증가에 따라 phase II antioxidant enzyme의 발현의 변화가 증가되는 것을 보였다. 대표적인 항산화 작용 단백질인 Hemeoxygenase-1 (HO-1)과 이를 조절하는 Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)의 발현의 증가가 보였으며, p-Nrf2의 발현이 증가하는 것을 알 수 있었다. 아울러 세포질에 존재하는 Thioredoxin reductase-1 (Trxr-1)의 발현 또한 증가하는 것을 알 수 있었다.

→ 세포의 단백질 발현이 증가하는 것으로 보아, 산화스트레스로부터 세포를 보호하고 산화-환원반응을 조절하는 방어기작으로 작용하여, isorhamnetin은 산화스트레스에 의한 세포를 보호하는 것으로 확인하였다.

2. 3-(4'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl)propionic acid의 항염증 활성에 관한 기전 연구

김치는 식이섬유소, 비타민C, 베타카로틴, 유산균, 베타시토스테롤, 무기질과 건강기능성분을 많이 함유하고 있는데, 그 중 김치에서 분리된 3-(4'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl)propionic acid (HDMPPA)는 죽상경화증을 방지하고 항산화 효과 및 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있지만 분자적 메커니즘은 자세히 알려지지 않았다. 따라서 HDMPPA의 항염증 활성에 관한 분자생물학적 기전을 연구하기 위해 BV2 미세교세포에서 LPS에 의해 유도된 염증 반응에 HDMPPA 미치는 영향을 확인하고, NF- κ B, MAPKs, (PI3K)/Akt 신호전달 경로와 관련해서 메커니즘을 조사하였다.

1) BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 세포생존능에 미치는 영향

실험에 사용된 BV2 미세교세포는 Perugia 대학에서 박사 V. Bocchini에 의해 개발된 셀 라인으로 인제 대학교 의과 대학(Busan, Republic of Korea)에서 제공받아 사용하였다. 세포의 배양을 위해 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)과 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5%, CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 성장배지의 교환을 매 48시간마다 실시하여 적정 수의 세포를 유지하였다.

BV2 미세교세포에서 HDMPPA의 세포독성을 확인하기 위해 LPS(500ng/ml)의 존재하에 50-200 μ M의 농도로 24시간 처리하였다. 그림 123에서 볼 수 있듯이, HDMPPA를 처리한 경우 세포생존률이 대조군과 비교했을 때 유의적인 차이를 보이지 않았다. HDMPPA와 LPS를 동시처리했을 때에도 마찬가지로 50-200 μ M의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 HDMPPA의 농도를 50-200 μ M로 정하고 차후의 실험을 진행하였다.

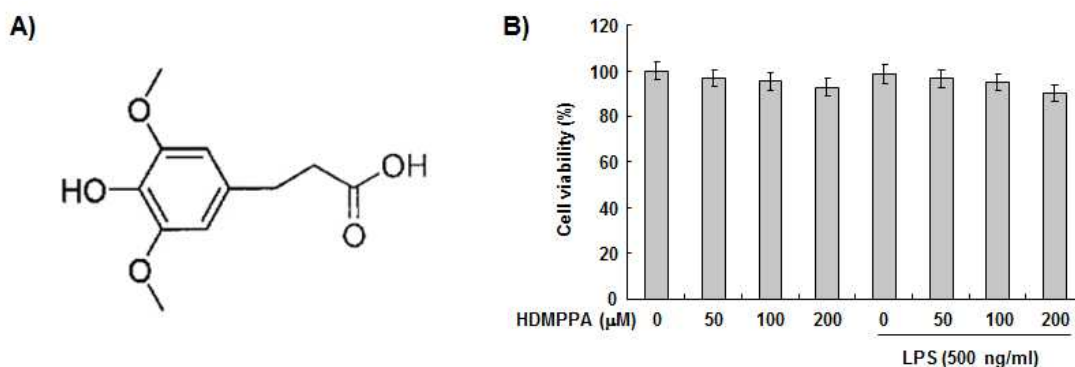


그림 123. 3-(4'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl)propionic acid (HDMPPA)의 분자구조 및 BV2 미세교세포의 증식에 미치는 영향

2) HDMPPA가 BV2 미세교세포에서 LPS로 유도된 NO 소거활성과 PGE₂ 생성 억제에 미치는 영향

HDMPPA의 항염증 활성을 확인하기 위해 활성 질소종(reactive nitrogen species)의 하나인

며, 최근 염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 그림 124의 A에서 볼 수 있듯이, LPS를 단독으로 처리했을 때 대조군과 비교해보면 NO의 생성이 강하게 유도되지만 HDMPPA를 동시처리했을 때 농도의존적으로 NO의 생성이 억제되었다.

PGE₂는 prostaglandin endoperoxide synthase 효소인 COX-2에 의해 합성되는 염증 매개 물질로서 다양한 염증 질환에 기여한다. PGE₂의 생성에 HDMPPA가 미치는 영향을 조사하기 위해 ELISA로 PGE₂의 양을 측정하였다. 그림 124의 B에서 볼 수 있듯이, LPS를 처리했을 때 PGE₂ 생성량이 증가한 반면에 HDMPPA를 처리했을 때 PGE₂ 생성량이 농도의존적으로 감소되었다.

따라서 HDMPPA가 BV2 미세교세포에서 LPS로 유도된 NO와 PGE₂ 생성을 억제하여 항염증 활성을 가지고 있는 것을 확인하였다.

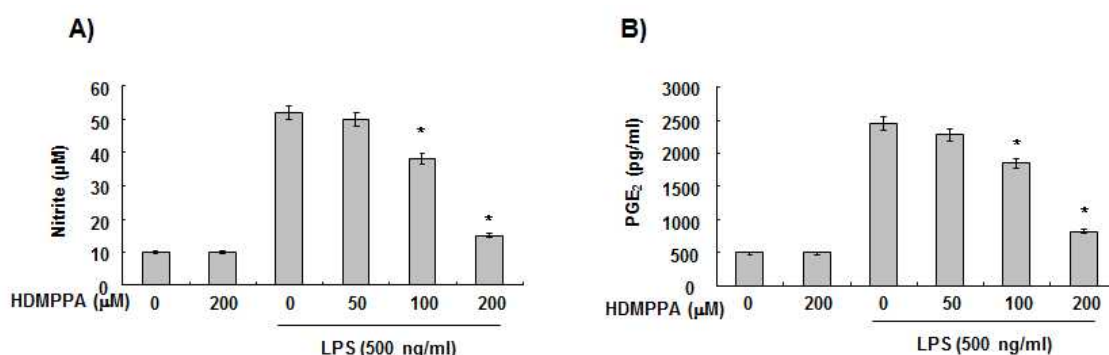


그림 124. LPS를 처리한 BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 nitric oxide 소거활성(A) 및 prostaglandin E2(PGE2) 생성 억제능(B)에 미치는 영향

3) HDMPPA가 BV2 미세교세포에서 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향

iNOS는 평소에는 세포 내 존재하지 않으나 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 여중매개체의 생합성을 촉진한다. 따라서 HDMPPA의 NO생성 억제효과가 iNOS발현의 감소와 관련이 있는지 확인하기 위해 iNOS를 RT-PCR로 mRNA 발현을 확인하였다. 그림 125의 A에서 볼 수 있듯이, HDMPPA는 LPS로 유도된 iNOS의 mRNA 수준을 농도의존적으로 억제했다. 마찬가지로 그림 125의 B에서 iNOS의 단백질 수준에서도 억제했다. 이러한 결과로 HDMPPA가 전사와 번역과정을 억제하여 iNOS의 발현을 억제시킨다는 것을 확인하였다.

COX는 arachidonic acid를 PGE₂로 전환시키는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다. 많은 염증 억제 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성 억제를 나타내며, 이는 COX-2의 생성 및 활성 저해에 의한 것이다. 따라서 HDMPPA의 PGE₂ 생성 억제효과가 COX-2의 발현의 감소와 관련이 있는지 확인하기 위해 COX-2를 RT-PCR로 mRNA 발현을 확인하였다. 그림 125의 A에서 볼 수 있듯이, HDMPPA는 LPS로 유도된 COX-2의 mRNA 수준을 농도의존적으로 억제했다. 마찬가지로 그림 125의 B에서 iNOS의 단백질 수준에서도 억제했다. 이러한 결과로 HDMPPA가 COX-2의 발현 감소를 통해 PGE₂합성을 감소시킨 것을 확인할 수 있었다.

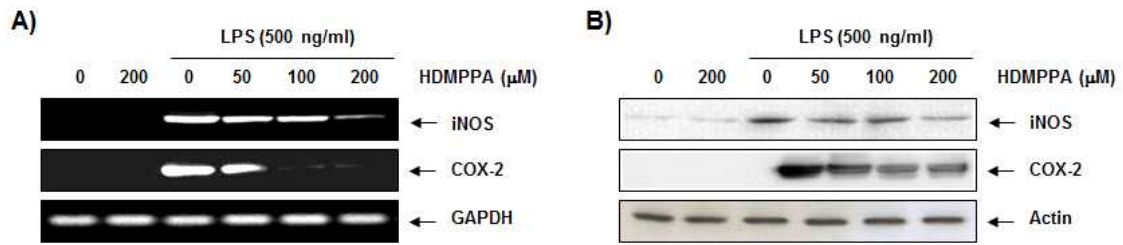


그림 125. BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 iNOS 와 COX-2의 mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향

4) BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향

HDMPPA가 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해서 IL-1 β 와 TNF- α 를 측정하였다. 그림 126의 A와 B에서 볼 수 있듯이, LPS를 처리하지 않았을 때는 이러한 cytokine의 생성량이 아주 낮았지만 LPS로 염증을 유발했을 때 IL-1 β 와 TNF- α 의 분비량이 현저하게 증가되었다. LPS로 증가된 IL-1 β 와 TNF- α 는 HDMPPA를 동시처리했을 때 농도의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

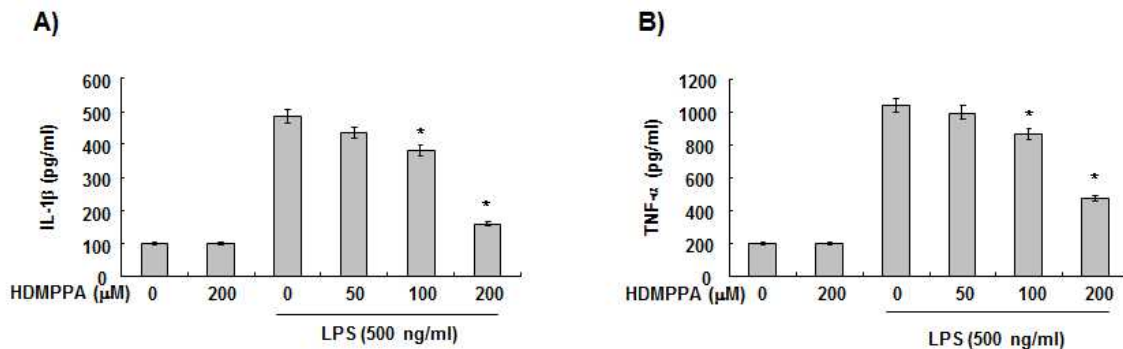


그림 126. BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 염증성 cytokine 생산 억제에 미치는 영향

5) BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 염증성 cytokine의 mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향

HDMPPA가 LPS로 유도된 염증성 cytokine인 IL-1 β 와 TNF- α 의 생성을 억제된 것을 유전자 수준에서도 확인해보았더니 앞의 결과와 유사하게 LPS를 처리했을 때 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현이 증가되었고 HDMPPA를 동시처리했을 때 발현이 두드러지게 감소하였다(그림 127). 이러한 결과로 HDMPPA가 유전자수준의 조절을 통해 염증성 cytokine의 생성을 억제시킨다는 것을 확인하였다.

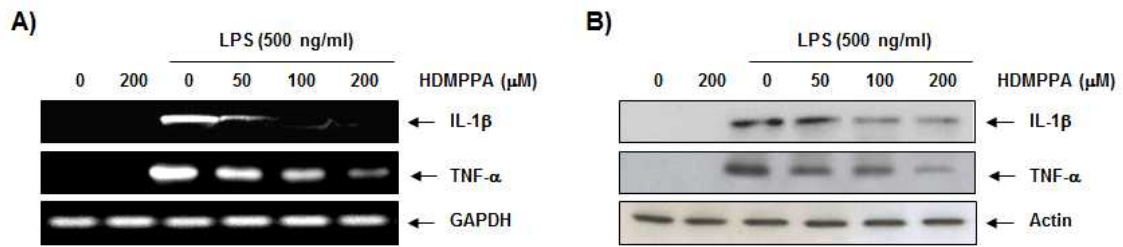


그림 127. BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 IL-1 β 및 TNF- α 의 발현에 미치는 영향

6) BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 NF- κ B와 I κ B- α 의 활성화에 미치는 영향

염증반응에 있어서 NF- κ B는 iNOS 및 COX-2의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 HDMPPA가 면역 매개자와 cytokine의 전사조절에 영향을 주는 NF- κ B 경로를 차단할 수 있는지 확인하기 위해 사이토졸과 핵을 분리하여 핵으로 NF- κ B가 이동하고 I κ B- α 가 감소하는지를 western blot analysis로 확인해보았다. 그림 128의 A에서 볼 수 있듯이 LPS를 단독으로 처리했을 핵으로 NF- κ B의 이동이 증가하지만 HDMPPA를 동시처리했을 때 NF- κ B의 발현이 농도의존적으로 감소되었다. I κ B- α 의 감소는 LPS에 의해 NF- κ B 활성화되는 과정에서 중요하기 때문에 I κ B- α 의 발현도 확인하였다. I κ B- α 는 LPS로 인해 분해되었지만 HDMPPA를 동시처리했을 때 분해되는 것이 예방되었다. 추가적으로 immunocytochemical analysis를 통해 아무것도 처리하지 않은 상태에서 NF- κ B가 사이토졸에서 위치하는데 LPS를 처리했을 때 NF- κ B가 핵안으로 이동하는 것을 확인하였고 HDMPPA를 동시처리했을 때 핵으로의 이동이 감소하는 것을 확인하여 HDMPPA가 NF- κ B가 사이토졸에서 핵으로 이동하는 것을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

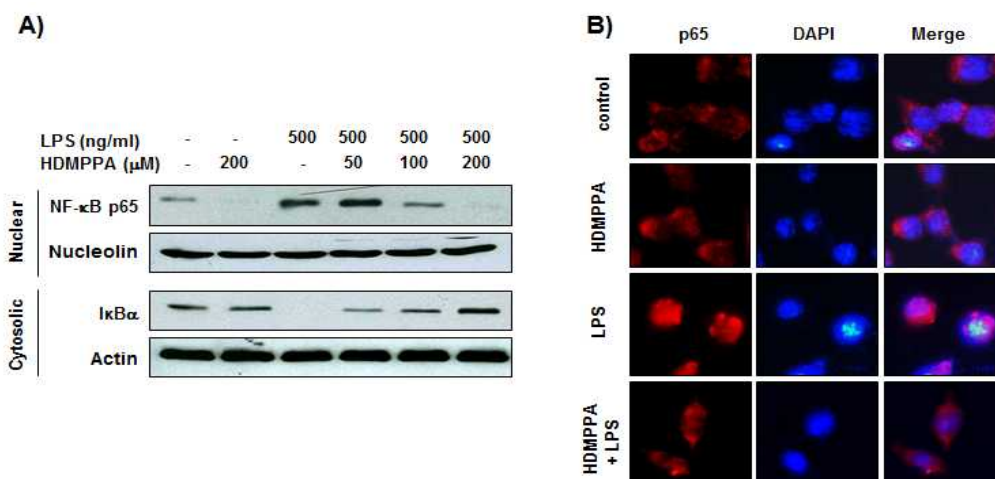


그림 128. BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 NF- κ B의 핵내 축적 및 I κ B α 의 저하에 미치는 영향

7) BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 MAPKs와 Akt의 활성화에 미치는 영향

염증성 반응에서 PI3K/Akt와 MAPKs경로가 중요한 역할을 하기 때문에 이러한 경로를 통해 HDMPPA의 항염증 활성이 일어나는지 확인해보았다. 그림 129에서 볼 수 있듯이 LPS 단독으로 처리했을 때 ERK, JNK, P38을 포함한 MAPKs와 Akt의 발현이 1시간 이내에 증가하였지만 HDMPPA를 동시처리했을 경우에 이러한 활성이 억제되었다. 이러한 결과로 PI3K/Akt와 MAPKs 신호전달 경로가 LPS로 유도된 염증에서 HDMPPA의 항염증 효과와 관련이 있다는 것을 확인하였다.

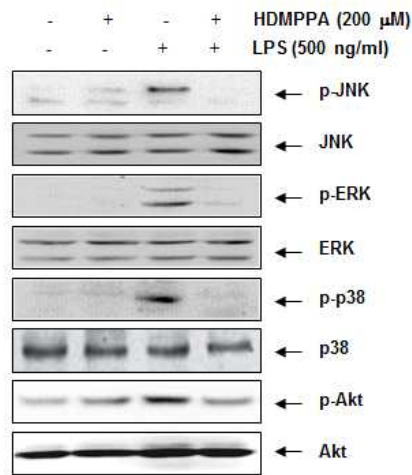


그림 129. BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 MAPK와 Akt 활성화에 미치는 영향

8) BV2 미세교세포에서 HDMPPA가 LPS로 유도된 ROS 생성에 미치는 영향

HDMPPA의 항염증효과와 관련된 메커니즘을 조사하기 위해 HDMPPA가 실험조건에서 산화적 스트레스를 감소시키는지 알아보았다. ROS의 형성을 DCF-DA assay로 확인해본 결과 그림 130의 A에서 볼 수 있듯이, LPS를 처리했을 때 세포내 ROS의 생성이 증가하였지만 HDMPPA를 200 μM로 동시처리했을 때 ROS생성이 유의적으로 감소하였고 HDMPPA만 처리했을 때는 대조군과 비교했을 때 ROS생성에는 영향을 주지 않았다. 이러한 결과로 HDMPPA가 LPS로 유도된 ROS생성을 억제시키는 항산화효과가 있는 것을 알 수 있었다(그림 130).

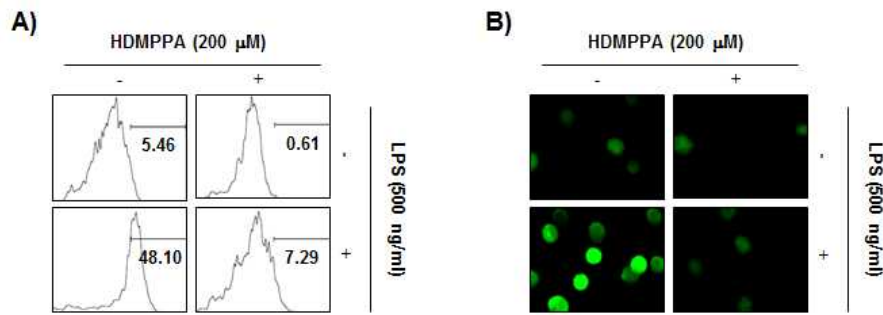


그림 130. BV2 미세교세포에서 LPS 처리에 의해 증가된 ROS 생성에 HDMPPA가 미치는 영향

이상의 결과는 HDMPPA가 ROS 생성을 억제하여 항산화 효과가 있으며, NF-κB, MAPKs, PI3K/Akt 활성 억제를 통해 염증성 cytokine의 분비를 감소시켜 항염증에 효과가 있다는 것을 의미한다.

3. *Zanthoxylum schinifolium* leaves ethanol extract(EEZS)의 항암 활성에 관한 기전 연구

우리나라에서 산초나무는 잎 자체를 국이나 전 등에 사용하였고, 김치에 이용하기도 하며 열매로부터 기름을 짜서 식용, 또는 약재로 사용해왔다. 국내산 산초를 이용한 연구들은 주로 산초 열매를 이용한 것으로 산초나무는 항당뇨, 지질과산화 억제활성, 항혈전 등의 활성이 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 산초나무의 잎(EEZS)을 이용하여 human bladder cancer인 T24와 5637 세포에서 항암활성을 확인하고, (PI3K)/Akt 신호전달 경로와 관련해서 메커니즘을 조사하였다.

1) human bladder cancer(T24, 5637)에서 EEZS가 세포생존능에 미치는 영향

실험에 사용된 T24와 5637 인체 방광암세포는 한국생명공학연구소(KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 세포의 배양을 위해 RPMI-1640 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5%, CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 성장배지의 교환을 매 48시간마다 실시하여 적정 수의 세포를 유지하였다.

T24와 5637 세포에서 EEZS의 증식억제능을 확인하기 위해서 MTT assay를 실시하였다. MTT assay를 위하여 세포 배양용 6 well plate에 T24는 1 X 10⁵개/well, 5637은 2 X 10⁵개/well로 세포를 분주하고 EEZS를 배지에 희석하여 각 well 당 적정 농도로 처리하였다. 48시간동안 배양한 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Ameresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 37°C에서 2시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 생성된 formazan을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

▶ EEZS의 처리에 따른 T24와 5637 세포 증식에 미치는 영향을 조사한 결과, 그림 131에서 알 수 있듯이 10~400 μ g/ml 농도로 처리했을 때 처리농도 의존적으로 증식억제효과가 있는 것을 알 수 있었다. 따라서 두 가지 셀라인 모두 30% 정도의 세포생존율이 나타나는 250 μ g/ml 농도를 실험농도로 설정하였다.

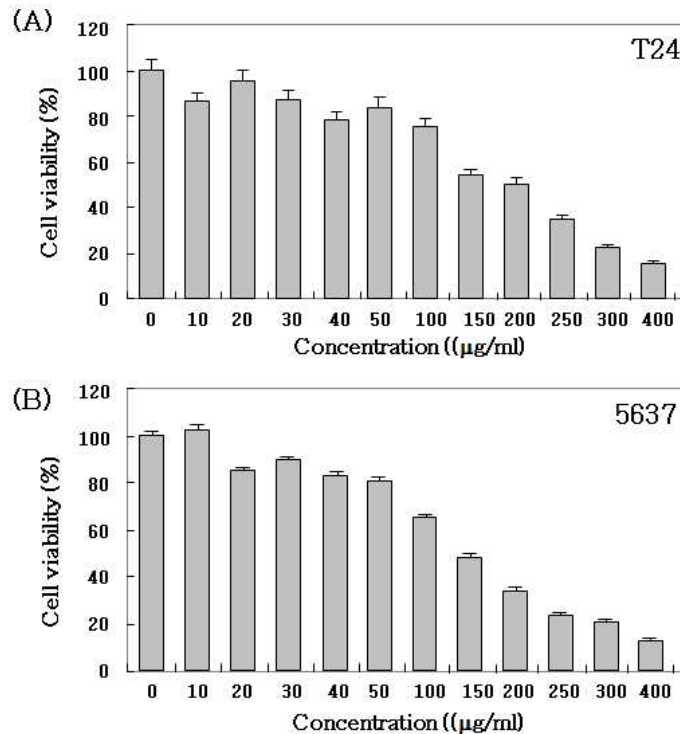


그림 131. 인체방광암세포 T24(A)와 5637(B)의 증식에 미치는 EEZS의 영향

2) EEZS에 의한 T24와 5637세포의 apoptosis 유발

이상의 결과에서 EEZS가 세포의 증식을 억제하여 항암활성이 나타났기 때문에 EEZS에 의해 일어난 두가지 세포의 증식억제가 자가세포사멸(apoptosis) 유도과 연관성이 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 핵의 형태 변화와 세포주기와 apoptosis 세포의 빈도를 측정하였다.

(1) EEZS가 T24와 5637 세포의 성장과 형태, 그리고 핵의 변화에 미치는 영향

EEZS 처리에 의한 T24와 5637 세포의 형태 변화 정도를 살펴보기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 T24는 1×10^5 개/well, 5637은 2×10^5 개/well로 세포를 분주하고 EEZS를 배지에 희석하여 각 well 당 적정 농도로 처리하였다. 48시간동안 배양한 후 EEZS 처리농도에 따른 성장정도와 형태의 변화를 도립 현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

또한 Apoptosis가 유발되었을 경우 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 EEZS가 처리된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 phosphate buffered saline (PBS)를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution으로 10분 동안 고정하였다. 고정된 세포를

cytospin을 이용하여 slide glass에 부착하였다. 세포가 부착된 slide glass를 PBS로 2-3회 정도 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정한 후 2.5 µg/ml 농도의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 처리하여 상온에서 15분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

→ 그림 132의 A와 C에서 알 수 있듯이 EEZS를 처리했을 때 두가지 세포 모두 밀도가 감소하여 성장이 억제되고 형태적 변형이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 또한 EEZS가 함유된 배지에서 배양된 T24와 5637 세포를 고정시킨 후 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하여 형광현미경하에서 관찰한 결과, EEZS가 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상적으로 염색이 되었으나 EEZS 처리 농도의 증가에 따라 전체적인 핵의 밀도 감소와 더불어 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질(chromatin) 응축에 의한 apoptotic body 형성의 증가가 관찰되었다(그림 132의 B와 D).

▶ 이상의 결과로 EEZS의 처리에 의해 T24와 5637 세포의 증식억제 현상이 강하게 유도된다는 것을 알 수 있었다.

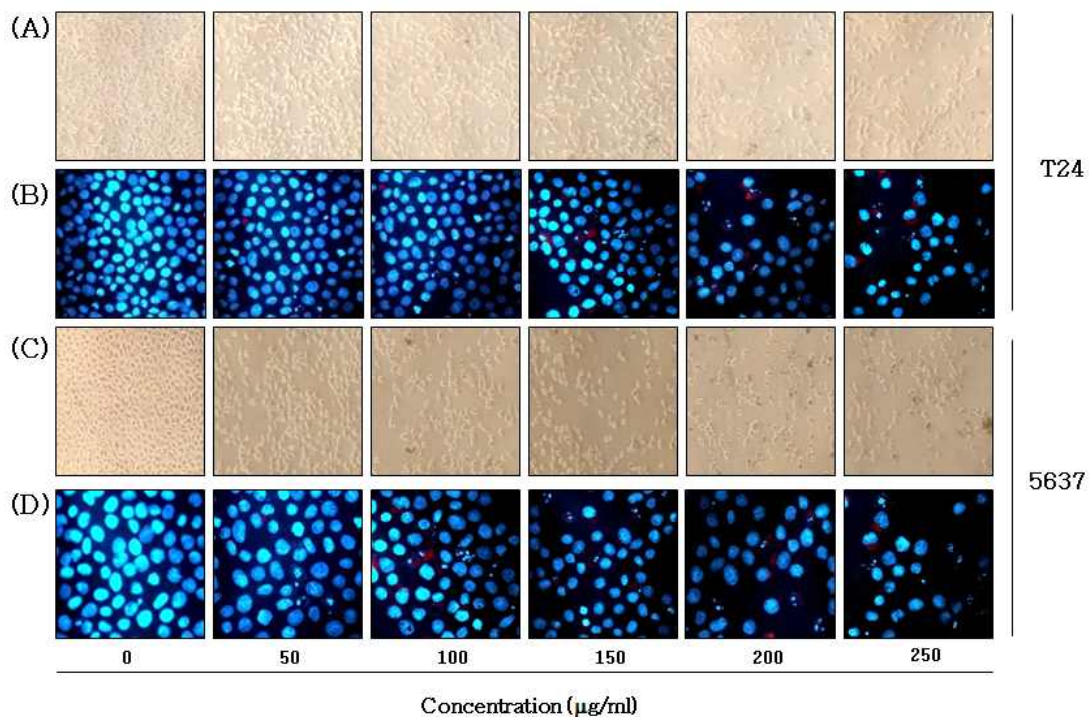


그림 132. 인체방광암세포 T24와 5637의 morphology(A와 C)와 DAPI staining에 의한 세포핵의 형태변화(B와 D)에 미치는 EEZS의 영향

(2) EEZS가 T24와 5637 세포의 세포주기 변화에 미치는 영향

T24와 5637 세포에서 EEZS가 유발하는 apoptosis의 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 정상 및 EEZS가 처리된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을

제거한 후 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하였다. 준비된 세포는 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 FACSCalibur (Becton Dickinson)를 적용시켜 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software 및 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

EEZS에 의한 T24와 5637 세포의 증식억제가 세포주기 특정 시기의 교란과 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 상기에서 제시한 flow cytometry 분석에 의하여 나타난 결과를 바탕으로 sub-G1기의 세포 빈도를 제외한 나머지 세포들의 분포도를 조사하였다.

→ EEZS가 함유된 배지에서 다양한 시간 동안 배양된 T24와 5637 세포를 대상으로 세포주기 빈도를 분석한 결과, G1, S, G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 큰 변화를 관찰할 수 없었다(그림 133).

▶ 이상의 결과는 EEZS의 처리에 의한 T24와 5637 세포의 증식억제 현상은 세포주기 arrest 유발과 연관성이 없다는 것을 알 수 있다.

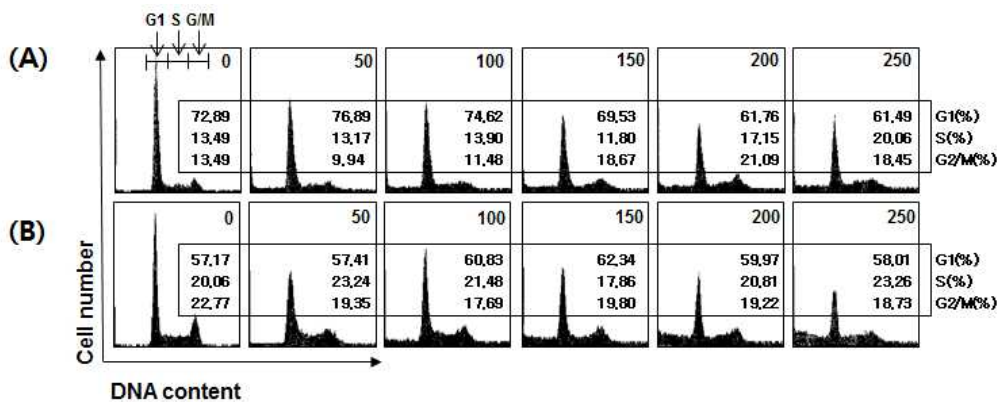


그림 133. 인체방광암세포 T24와 5637에서 세포주기 분포도(A와 B)에 미치는 EEZS의 영향

(3) EEZS가 T24와 5637 세포의 apoptosis 세포빈도에 미치는 영향

→ 또한 apoptosis 유발의 정량적인 분석을 위하여 DNA flow cytometry를 이용해 annexin V positive 세포의 빈도를 측정된 결과 EEZS 처리에 의하여 apoptosis가 유발된 세포를 나타내는 annexin V positive 세포의 빈도가 두가지 셀라인 모두 증가되었다(그림 134).

▶ 따라서 T24와 5637 세포에서 EEZS 처리에 의한 증식억제 및 형태변화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있음을 알 수 있었다.

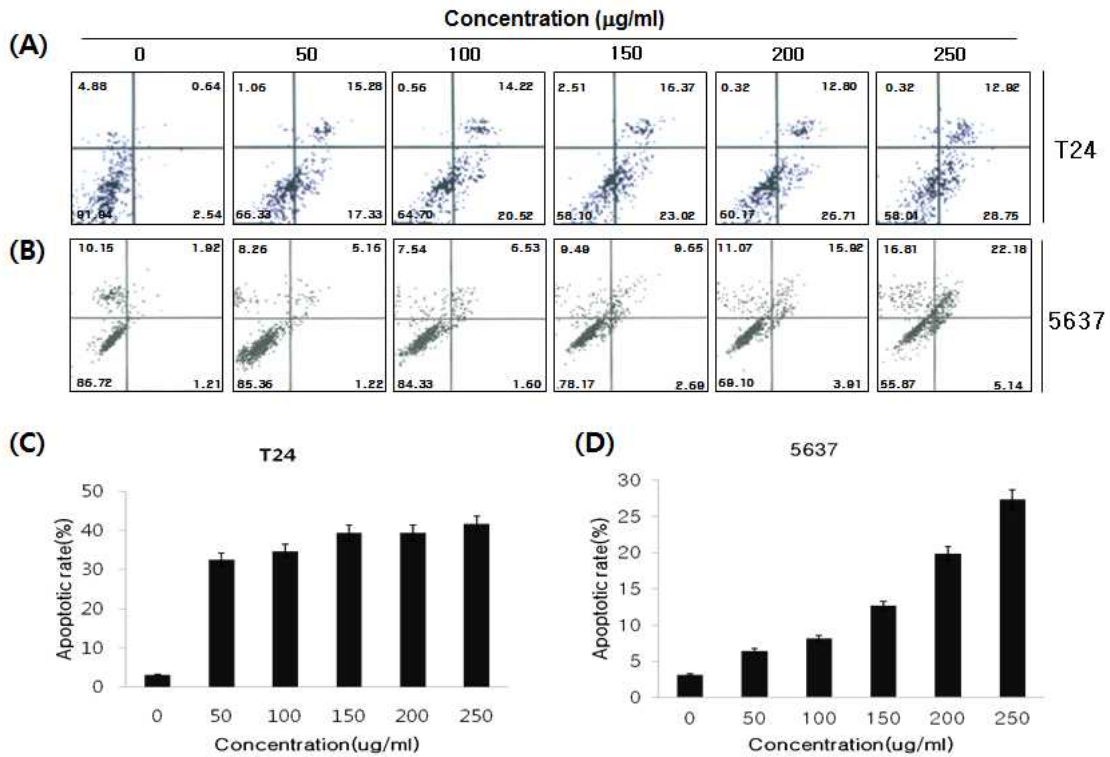


그림 134. 인체방광암세포 T24와 5637의 세포사멸에 미치는 EEZS의 영향

3) EEZS가 T24와 5637 세포의 caspase와 하위단백질에 미치는 영향

EEZS에 의한 T24와 5637 세포의 apoptosis 유도에 대한 기전 연구를 위하여 apoptosis 유도에 핵심적인 역할을 하는 caspase의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 caspase 중 extrinsic apoptotic pathway의 개시에 중요한 caspase-8, intrinsic apoptotic pathway의 개시에 중요한 caspase-9 및 caspase-8 및 -9에 의하여 활성화되는 effector caspase 중의 하나인 caspase-3의 발현 변화와 활성화된 caspase-3의 대표적인 기질 단백질인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)와 beta-catenin의 단편화 유발 여부를 조사하였다. Caspase의 발현 변화를 조사하기 위해서는 상기와 동일한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 Western blot analysis를 실시하였다.

→ 그림 135의 결과에서 알 수 있듯이 EEZS 처리에 의하여 T24는 불활성형인 pro-caspase-3, -8 및 -9 단백질의 발현은 EEZS 처리 농도 의존적으로 감소되었으나 5637은 불활성형인 pro-caspase-3, -8 및 -9 단백질의 발현은 EEZS 처리에 의해 변화가 없었다. 그러나 두가지 셀라인 모두 활성형인 caspase-3, -8 및 -9 단백질의 발현은 EEZS 처리 농도 의존적으로 증가되었다. 또한 활성화된 caspase-3에 의하여 특이하게 분해가 일어나서 apoptosis 유발에 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 표적 단백질로서 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 PARP와 beta-catenin 발현의 감소와 함께 단편화 현상이 관찰되었다(그림 135).

▶ 이러한 결과는 EEZS에 의한 T24와 5637 세포의 apoptosis 유도는 caspase 활성 증가가 관련되어 있음을 의미한다.

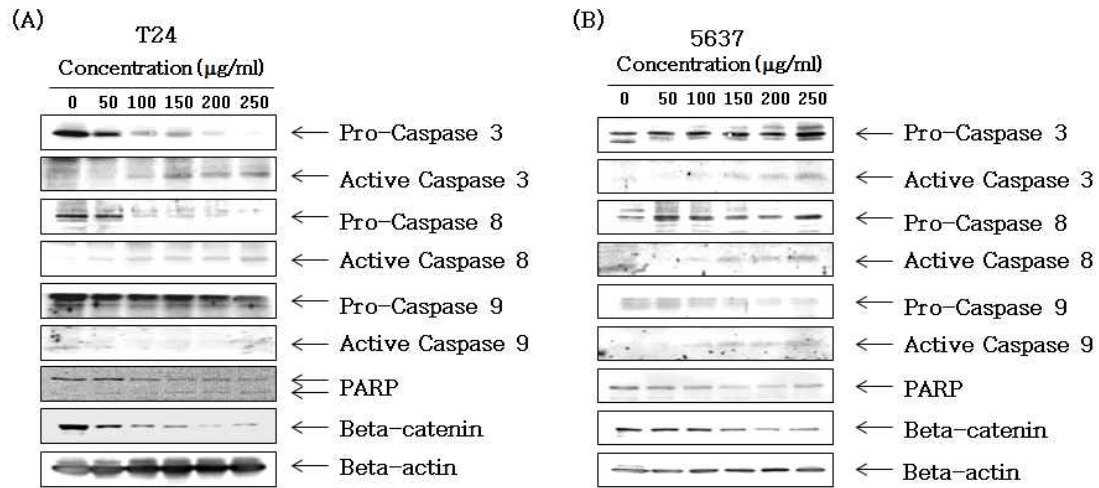


그림 135. 인체방광암세포 T24와 5637에서 caspase와 하위단백질에 미치는 EEZS의 영향

4) EEZS가 T24와 5637 세포의 Death receptors와 IAP family 단백질 발현에 미치는 영향

T24와 5637 세포에서 EEZS 처리에 의한 apoptosis 유발과 관련된 유전자들 중 death receptors 및 ligands와 IAP family에 속한 유전자들의 발현 변화를 western blot 방법을 이용하여 조사하였다.

→ Apoptosis 유발에 있어서 중요한 역할을 하는 caspases의 활성을 억제하는 것으로 알려진 IAP family 중 두가지 셀라인 모두 cIAP-1 및 XIAP, survivin 발현이 EEZS 처리에 의하여 감소하였다(그림 136). 그리고 그림 137에 나타낸 바와 같이 death receptor에 속하는 유전자중 두가지 셀라인 모두 DR4, DR5는 큰 변화가 관찰되지 않았지만 Fas와 FasL의 발현이 증가하였고 T24의 경우에는 Trail의 발현이 증가하였다.

▶ 이는 EEZS의 처리에 의한 apoptosis 유발에 있어서 death receptor와 death ligand의 발현 변화에 따른 extrinsic pathway가 관여하며, caspases가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

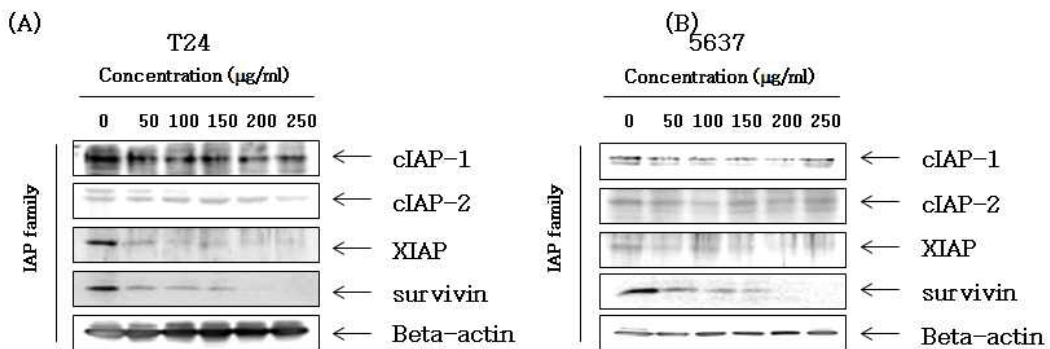


그림 136. 인체방광암세포 T24와 5637에서 IAP family 단백질 발현에 미치는 EEZS의 영향

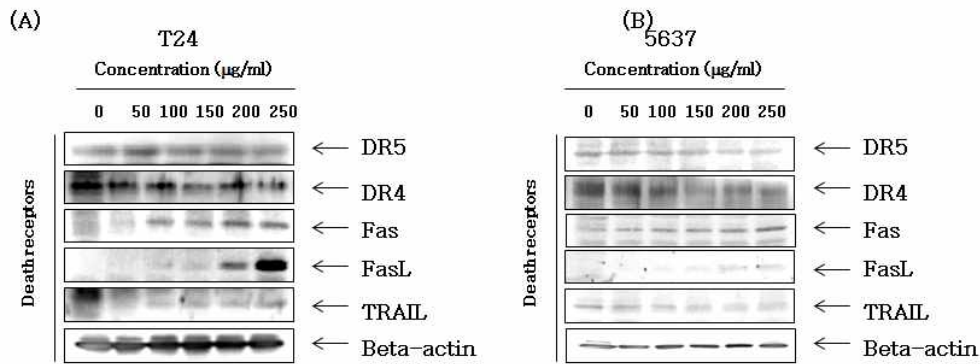


그림 137. 인체방광암세포 T24와 5637에서 Death receptors 단백질 발현에 미치는 EEZS의 영향

5) EEZS가 T24와 5637 세포의 Bcl-2 family 단백질에 미치는 영향

T24는 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 anti-apoptotic 유전자 및 pro-apoptotic 유전자인 Bcl-2, Bcl-XL이 감소하고 Bad의 경우 발현이 증가하였다. 활성화된 caspase-8에 의하여 단편화되어 MMP 손실 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Bid 단백질의 경우에는 EEZS 처리에 의하여 total Bid의 발현이 감소와 함께 단편화된 형태인 tBid의 증가가 유발되었다(그림 138의 A). 5637은 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 anti-apoptotic 유전자 및 pro-apoptotic 유전자인 Bcl-XL이 감소하고 Bad와 Bax의 경우 발현이 증가하였다. 활성화된 caspase-8에 의하여 단편화되어 MMP 손실 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Bid 단백질의 경우에는 EEZS 처리에 의하여 total Bid의 발현이 감소가 유발되었다(그림 138의 B)

▶ 이는 EEZS 처리에 의한 apoptosis 유발에는 extrinsic pathway를 통한 caspase-8의 활성화가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

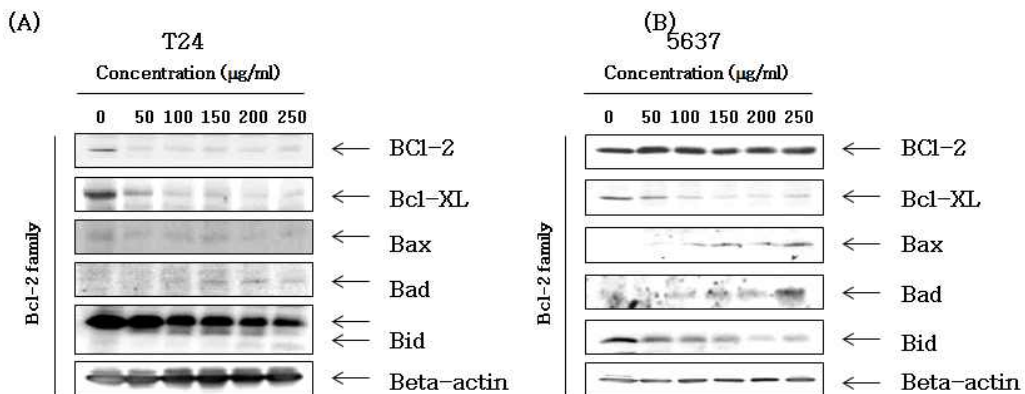


그림 138. 인체방광암세포 T24와 5637에서 Bcl-2 family 단백질 발현에 미치는 EEZS의 영향

6) EEZS가 T24와 5637 세포의 AKT 발현에 미치는 영향

세포 생존에 관여하는 것으로 알려져 있는 Akt 신호전달 경로가 EEZS 처리에 의한 T24와 5637 세포의 apoptosis 유도에 직접 관련되었는지의 여부를 조사하기 위하여 EEZS 처리 시간별 따른 인산화 정도를 조사한 결과 Akt의 인산화가 처리시간에 따라 감소하는 것으로 나타났다(그림 139의 A와 B)

▶ PI3K/Akt 신호전달 경로가 EEZS 처리에 의한 T24와 5637 세포의 apoptosis 유도에 직접 관련한다는 것을 알 수 있었다.

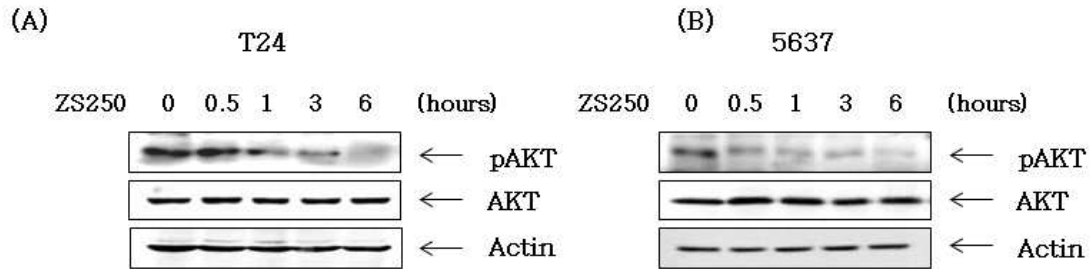


그림 139. 인체방광암세포 T24와 5637에서 AKT 단백질 발현에 미치는 EEZS의 영향

7) EEZS가 T24와 5637 세포의 apoptosis 유발에 미치는 LY294002의 영향

PI3K/Akt 경로의 특이적 저해제를 처리하였을 경우 EEZS 의한 apoptosis 유도에 어떠한 변화가 유발되는지를 여러 가지 실험 방법들을 이용하여 확인해보았다.

→ Akt 경로의 특이적 저해제인 LY294002를 선처리하여 EEZS에 의한 apoptosis 유도에 어떠한 변화가 유발되는지를 여러 가지 실험 방법들을 이용하여 확인한 결과 EEZS만을 처리했을 때보다 세포증식이 더 억제되고 세포사멸 정도가 더 많이 유발되는 것으로 나타났다(그림 140, 141).

▶ T24와 5637 세포에서 EEZS에 의한 apoptosis 유도에 Akt 신호전달 경로가 작용한다는 것을 보여주는 결과이다.

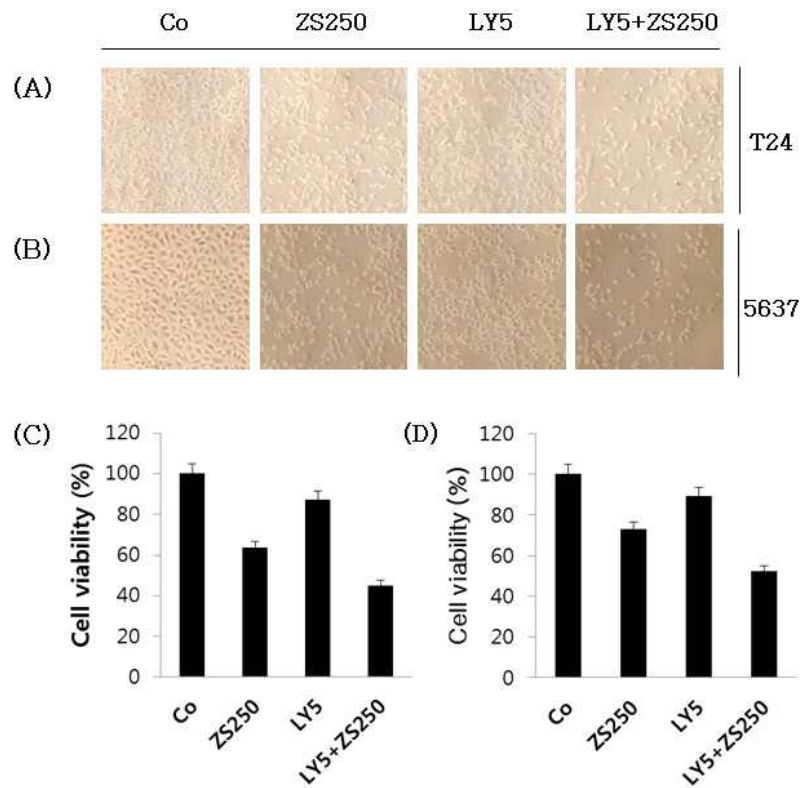


그림 140. 인체방광암세포 T24와 5637에서 EEZS 처리에 의한 증식 억제에 미치는 LY의 영향

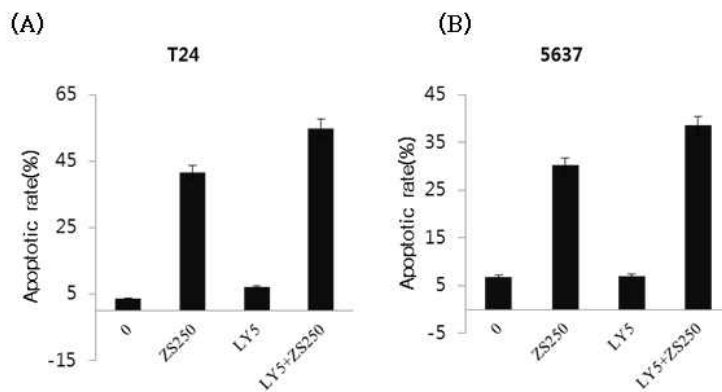


그림 141. 인체방광암세포 T24와 5637에서 EEZS 처리에 의한 apoptosis 유발에 미치는 LY의 영향

☞ 이상의 결과를 살펴볼 때 EEZS 처리에 의하여 유발되는 apoptosis는 extrinsic pathway를 경유한 caspase-8의 활성화에 의하여 생성된 tBid에 의하여 intrinsic pathway의 활성화와 같은 multiple apoptotic pathway에 의하여 조절되며, 이때 caspases 및 PI3K/Akt 신호전달 경로가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

-제2세부과제-

가. *H. pylori* 감염 마우스모델에서의 항암김치의 염증 및 apoptosis 에 대한 효과

1. *H. pylori* 감염 마우스모델에서 항암김치 처리에 따른 육안 소견 및 병리 소견

지난 연차의 24주 부검 결과와 같이 36주 후 부검하여 위를 적출하였다. 육안소견을 살펴 보면 헬리코박터 감염 그룹에서는 ulceration, 염증반응을 나타내는 적변현상을 관찰할 수 있었으나 농도 의존적으로 항암 김치 처리군이 헬리코박터 파일로리 감염에 의한 병변에 대해 보호 효과를 보이는 것으로 나타났다(그림142).

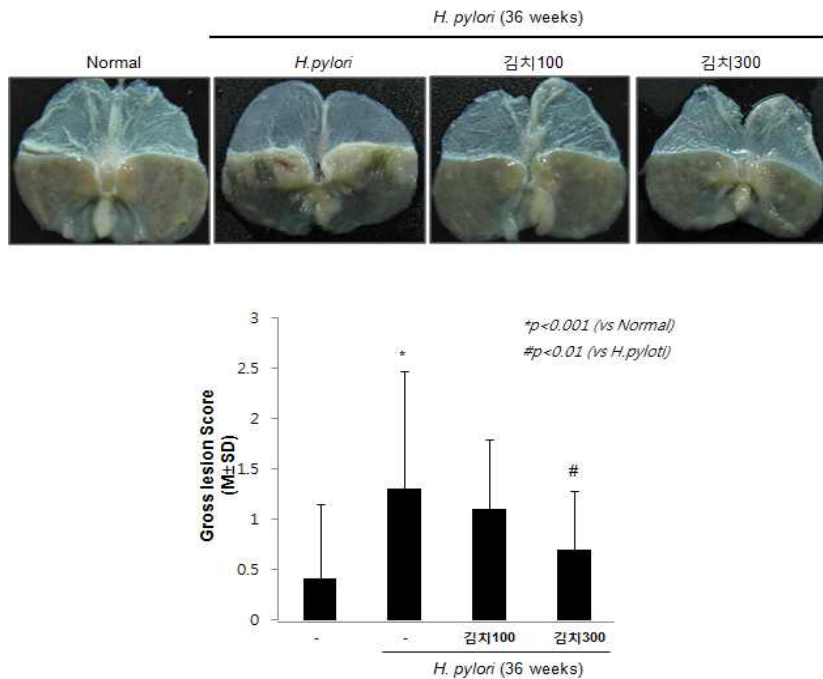


그림 142. 36주 그룹별 육안 소견

좀 더 자세히 관찰하기 위하여 적출한 stomach을 formaldehyde에 고정시킨 후 H&E staining을 하여 pathology를 관찰하였다. 헬리코박터 그룹에서는 염증세포들의 침윤, erosion, ulceration 등 24주에서 관찰하였던 병변보다 심한 병변을 관찰하였다. 그러나 항암 김치 처리군에서 그러한 병변이 호전되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 저농도보다 고농도 처리 김치 그룹에서 확연한 호전을 관찰하였다(그림 143, 144).

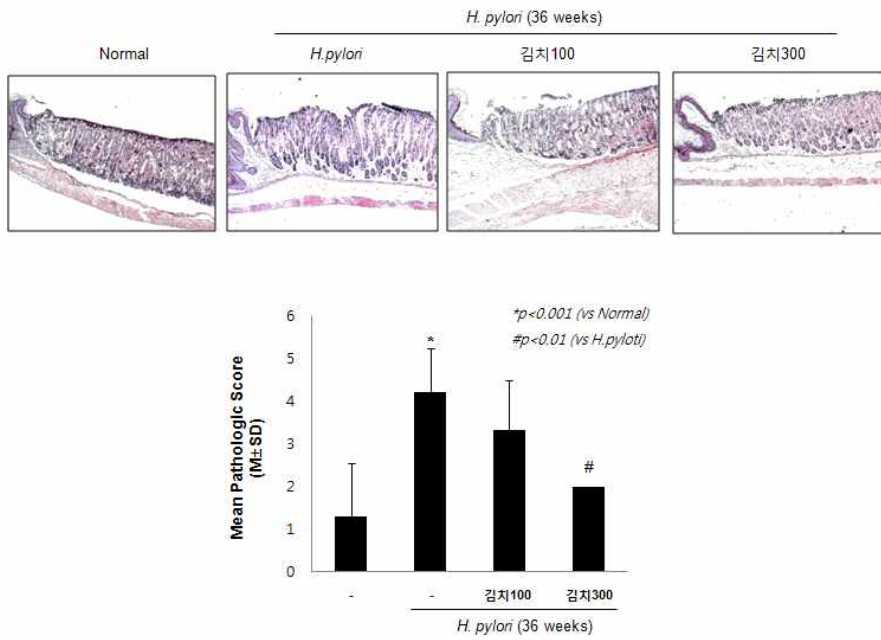


그림 143. 그룹별 병리소견

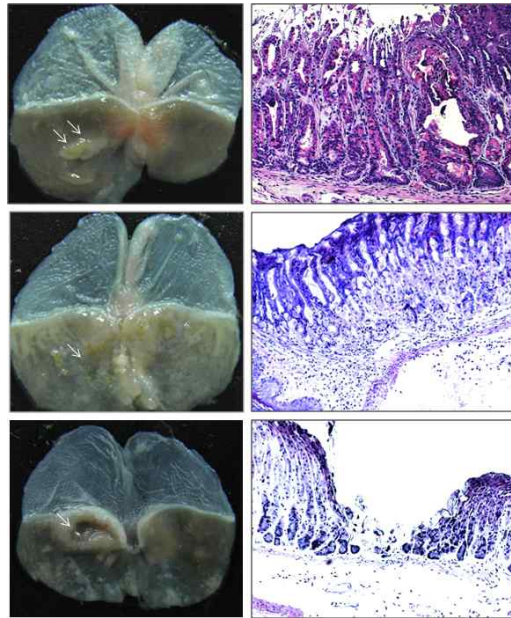


그림 144. 헬리코박터 감염군 위의 육안 및 병리비교

2. H. pylori 감염 마우스모델에서 항암 김치 농도에 따른 염증인자 규명

염증인자 중 대표적인 COX-2와 염증세포인 macrophage를 염색할 수 있는 F4/80 염색을 통하여 염증반응의 정도를 측정하였다. 그림 에서 볼 수 있듯이, 헬리코박터 그룹에서 COX-2 발현과 macrophage infiltration이 통계적으로 유의하게 증가되어 있는 것을 확인하였고 COX-2의 경우 통계적으로 유의하게 정상보다 떨어져 있는 것을 확인할 수 있었으며

염증세포의 침윤이 항암 김치 처리 그룹에서 농도 의존적으로 통계적으로 유의하게 정상 수준으로 떨어져 있을 것을 관찰하였다(그림 145).

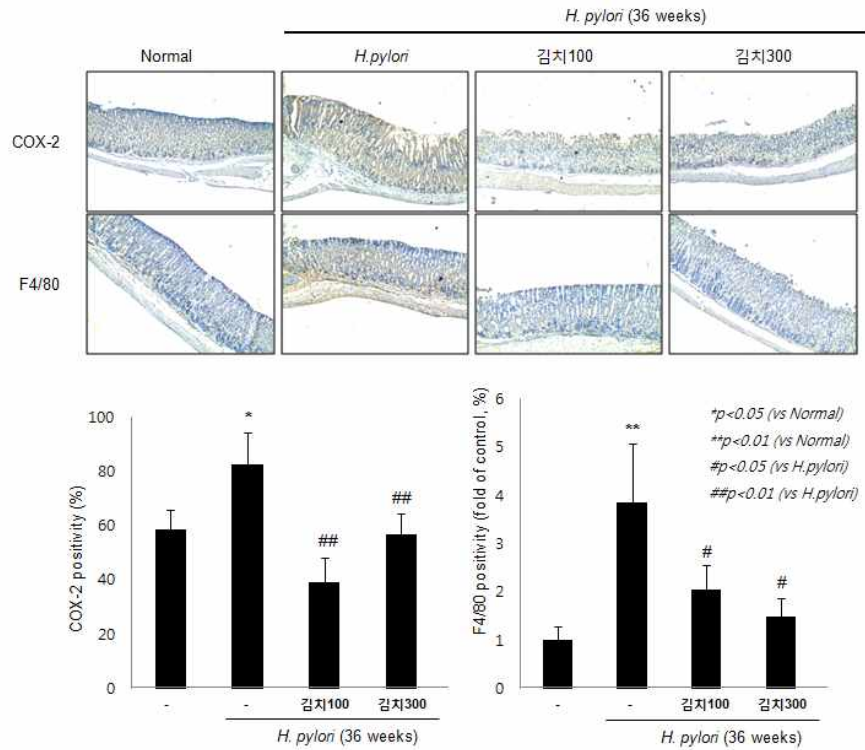
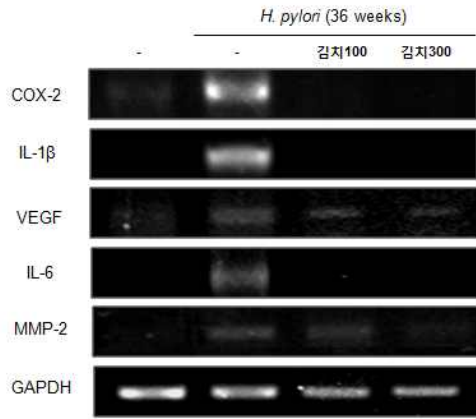


그림 145. 그룹별 COX-2, F4/80 염색 결과

또 분자생물학적 관점에서 동물 조직으로부터 RNA와 단백질을 추출하여 PCR과 Western blot을 수행하였다. 이 결과 또한 항암 김치 처리군에서 COX-2의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(그림 146). 또한, apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 BAX가 줄어드는 것을 확인하였으며 이는 TUNEL assay를 통해서도 확인할 수 있었다(그림 147).

A



B

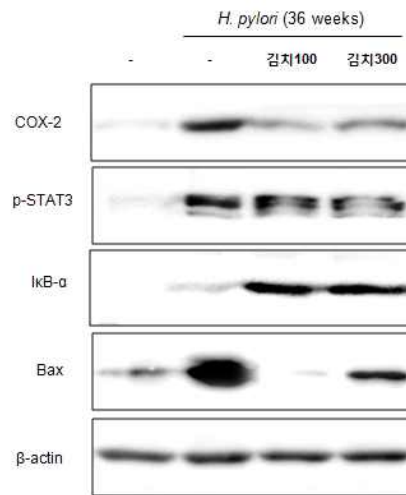


그림 146. 그룹별 염증 및 apoptosis 관련 인자 확인 결과 (A: PCR, B: Western blot)

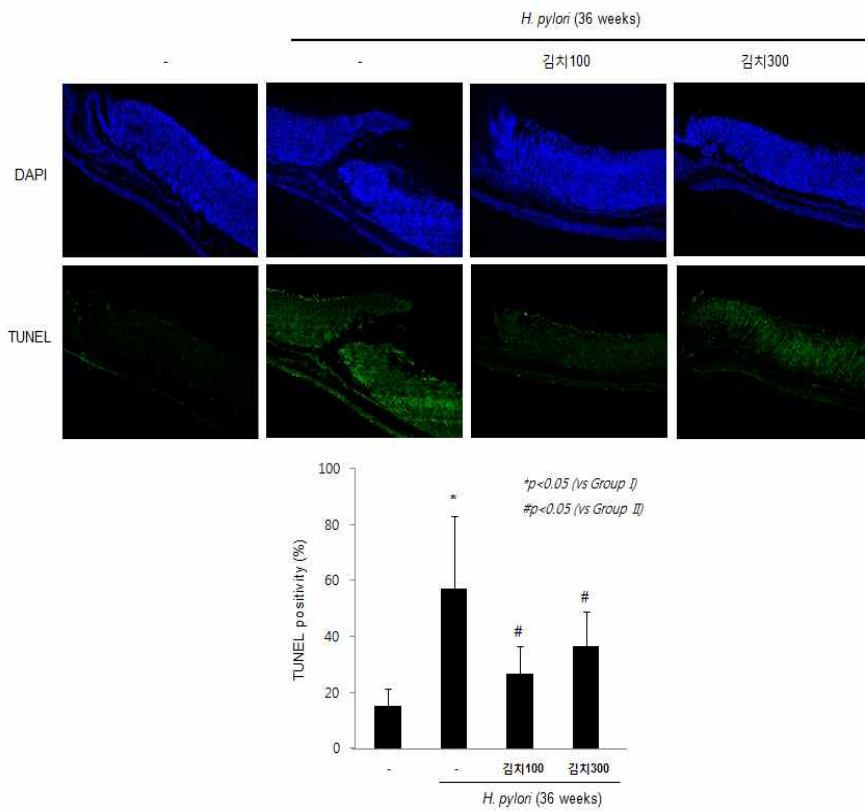


그림 147. 그룹별 TUNEL assay 결과

나. 임상시험 -항암 김치에 의한 대장 기능 변화-

Placebo (표준김치) 섭취 그룹(n=7)과 항암 김치 섭취 그룹(n=7)으로 나누어 7주 동안 하루 3번 김치(225g/per day)를 섭취한 뒤, 장내 미생물 변화 (Microbiota 분석)를 김치 섭취 전후로 분석하였다.

1) Baseline characteristics

성별과 나이, 체중, BMI, 흡연 및 Alcohol consumption은 Placebo 그룹과 항암 김치 그룹에서 모두 차이를 보이지 않았다(표 22).

표 22. 그룹별 기본 정보 및 평균 수치

| | Placebo (n = 7) | 항암김치 (n = 7) | P-value ² |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| Gender (Male / Female) | 3 / 4 | 3 / 4 | 1.000 |
| Age (years) | 36.0 (29.0, 49.0) | 38.0 (27.0, 48.0) | 0.902 |
| Weight (Kg), 0 W | 62.3 (24.7, 73.5) | 74.7 (53.9, 75.3) | 0.710 |
| BMI (Kg/m2),0W | 23.6 (19.6, 29.0) | 24.6 (20.4, 28.9) | 0.902 |
| Weight (Kg), 6 W | 64.2 (54.3, 73.4) | 74.7 (55.3, 76.3) | 0.620 |
| BMI (Kg/m2),6W | 23.6 (20.1, 29.7) | 24.7 (21.0, 29.2) | 0.620 |
| Alcohol consumption (Current drinker / former drinker / non-drinker) | 5 / 0 / 2 | 6 / 0 / 1 | 0.710 |
| Smoking (Current smoker / former smoker / non-smoker) | 1 / 1 / 5 | 0 / 1 / 6 | 0.620 |

¹ Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values).

² Between-group comparisons using Student's t-test or Wilcoxon rank sum test for continuous variables and Chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables.

2) IBS-QOL questionnaire

대부분의 문항에서 placebo 그룹과 항암 김치 그룹에서 모두 유의한 증상의 완화를 보였다(표 23).

‘Q1. 과민성 장증후군으로 배가 아팠다.’ 의 증상 호전 정도가 항암 김치 그룹에서 더 크게 나타났으며 ‘Q3. 과민성 장 증후군으로 대변은 나오지 않으면서 아랫배만 묵직한 증상이 있었다.’ 와 ‘Q4. 과민성 장 증후군 때문에 대변이 평소보다 딱딱해지거나 혹은 묽어졌다’ 의 항목에서 placebo 그룹과 비교하여 증상 호전 정도가 크게 나타났다. ‘Q6. 과민성 장증후군으로 배에 가스가 차서 부글거렸다’ 에서 증상의 호전 정도가 placebo와 평균적인 값은 비슷하지만 개별적으로 증상이 호전되어 보이는 부분이 있는 것으로 나타났다. ‘Q23. 과민성 장증후군 때문에 어디를 가도 화장실 위치를 먼저 확인해야 하는 번거로움이 있었다’ 문항에서는 항암 김치 그룹에서 증상이 호전되어 있는 것을 보였고 ‘Q24. 과민성

장증후군이 더 나빠지는 것은 아닌지 걱정되었다 ‘의 항목에서는 Placebo군에서 보다 항암 김치 그룹에서 증상이 더욱 완화되는 것을 나타냈다. ‘Q26. 과민성 장증후군이 언제 갑자기 나타날지 예측할 수 없어 불안했다 ‘에서는 항암 김치 그룹에서 보다 더 높은 호전 정도를 보여주었다. 종합하면 대부분의 IBS-QOL questionnaire 에서는 Placebo 그룹에서는 아주 미약한 증상의 호전이 있었으며 항암 김치 그룹에서는 보다 더 증상의 호전이 나타났다. 그러나 대부분의 항목들에서 두 그룹 간의 차이가 없을 정도로 비슷한 양상을 보였는데 이는 IBS 의 심리적인 면이 증상에 많은 반영이 된다는 것을 나타내는 것으로 보인다. Placebo 그룹과 항암 김치 그룹에서의 객관적인 parameter 의 변화의 측정이 중요할 것으로 보인다.

표 23. IBS-QOL questionnaire ¹

| | Placebo(n=7) | 항암김치(n=7) | P-value ³ |
|-----------------------------------------------|----------------|----------------|----------------------|
| Q1. 과민성 장증후군으로 배가 아팠다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 1.0(0.0,1.0) | 0.456 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 1.000 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,1.0) | -1.0(-1.0,0.0) | 0.318 |
| P-value ² | 1.000 | 0.125 | |
| Q2. 과민성 장증후군으로 배가 똥똥하고 팽창된 느낌이 들었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 1.0(0.0,2.0) | 0.456 |
| Week 7 | 0.0(0.0,2.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,2.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.259 |
| P-value ² | 0.500 | 0.375 | |
| Q3. 과민성 장증후군으로 대변은 나오지 않으면서 아랫배만 묵직한 증상이 있었다. | | | |
| Week 0 | 0.090(0.0,1.0) | 1.0(0.0,2.0) | 0.318 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | -1.0(-1.0,0.0) | 0.128 |
| P-value ² | 1.000 | 0.125 | |
| Q4. 과민성 장증후군 때문에 대변이 평소보다 딱딱해지거나 혹은 묽어졌다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 1.0(1.0,3.0) | 0.318 |
| Week 7 | 1.0(0.0,2.0) | 0.0(0.0,2.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,2.0) | -1.0(-1.0,0.0) | 0.097 |
| P-value ² | 0.750 | 0.063 | |
| Q5. 과민성 장증후군 때문에 대변보는 횟수가 평소보다 많아졌거나 줄어들었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 1.0(0.0,1.0) | 0.456 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,2.0) | 1.000 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(-1.0,1.0) | 0.535 |
| P-value ² | 0.750 | 0.625 | |

| | | | |
|-----------------------------------------|---------------|---------------|-------|
| Q6. 과민성 장증후군으로 배에 가스가 차서 부글거렸다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 2.0(0.0,2.0) | 0.259 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.620 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,0.0) | 0.0(-2.0,0.0) | 0.383 |
| P-value ² | 0.750 | 0.250 | |
| Q7. 과민성 장증후군으로 밤에 잠을 잘 수 없었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.383 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.456 |
| P-value ² | 0.750 | 1.000 | |
| Q8. 과민성 장증후군 때문에 전신이 피로했다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,2.0) | 0.710 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.000 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,0.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.535 |
| P-value ² | 0.500 | 0.250 | |
| Q9. 과민성 장증후군 때문에 어떤 일에 집중하기 어려웠다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.805 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.805 |
| P-value ² | 0.500 | 1.000 | |
| Q10. 과민성 장증후군 때문에 성욕이 줄어들었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,2.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.902 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.383 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.259 |
| P-value ² | 0.750 | 0.500 | |
| Q11. 과민성 장증후군 때문에 우울했다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 1.000 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.535 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |
| Q12. 과민성 장증후군으로 짜증이 났다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 1.000 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 1.000 | 0.750 | |
| Q13. 과민성 장증후군으로 인해 다른 사람들에 한데 화를 냈다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.902 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |

| | | | |
|-------------------------------------------------|----------------|---------------|-------|
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.000 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |
| Q14. 과민성 장증후군 때문에 신경이 예민해졌다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.902 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 1.000 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.000 |
| P-value ² | 1.000 | 0.750 | |
| Q15. 과민성 장증후군의 증상이 나타날까봐 외출 전에 음식을 먹거나 마시지 않았다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.620 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 1.000 | 0.750 | |
| Q16. 과민성 장증후군 때문에 먹는 음식에 항상 신경을 써야 했다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.902 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.456 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.535 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |
| Q17. 과민성 장증후군 때문에 평소 좋아하는 음식을 먹을 수 없었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.383 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.000 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.128 |
| P-value ² | 1.000 | 0.250 | |
| Q18. 과민성 장증후군 때문에 낯선 장소를 가거나 장거리를 이동하는 것이 꺼려졌다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,2.0) | 0.620 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.090,0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |
| Q19. 과민성 장증후군 때문에 외식하는 것이나 회식하는 것이 꺼려졌다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.456 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.000 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.259 |
| P-value ² | 1.000 | 0.500 | |
| Q20. 과민성 장증후군 때문에 일(직장/집안/학교)에 지장이 있었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.535 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.000 |

| | | | |
|--------------------------------------------------------|---------------|----------------|-------|
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |
| Q21. 과민성 장증후군 때문에 취미 또는 여가활동에 지장이 있었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.902 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.000 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |
| Q22. 과민성 장증후군으로 인해 내가 하찮은 존재라고 여겨졌다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.535 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.383 |
| P-value ² | 0.250 | 1.000 | |
| Q23. 과민성 장증후군 때문에 어디를 가도 화장실 위치를 먼저 확인해야 하는 번거로움이 있었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 1.0(0.0,1.0) | 0.318 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | -1.0(-1.0,0.0) | 0.128 |
| P-value ² | 1.000 | 0.125 | |
| Q24. 과민성 장증후군이 더 나빠지는 것은 아닌지 걱정되었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,2.0) | 0.710 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,0.0) | 0.0(-2.0,0.0) | 0.383 |
| P-value ² | 1.000 | 0.250 | |
| Q25. 과민성 장증후군으로 인한 설사를 참지 못하고 공공장소에서 실수할까봐 걱정스러웠다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.620 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.805 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.456 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |
| Q26. 과민성 장증후군이 언제 갑자기 나타날지 예측할 수 없어 불안했다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 1.0(0.0,2.0) | 0.209 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.620 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | -1.0(-2.0,0.0) | 0.053 |
| P-value ² | 0.750 | 0.125 | |

| | | | |
|-------------------------------------------------------|---------------|---------------|-------|
| Q27. 과민성 장증후군으로 인해 매사에 의욕이 없었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.620 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.000 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 1.000 | 0.500 | |
| Q28. 과민성 장증후군 때문에 대변을 본 후에도 개운하지 않고 곧바로 또 대변을 보고 싶었다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,2.0) | 0.535 |
| Week 7 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.383 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,0.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.805 |
| P-value ² | 0.750 | 0.500 | |
| Q29. 과민성 장증후군 때문에 성관계가 소홀해졌다. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 1.000 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |

¹ Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values). Q1-Q29: 5-point Likert scale, 0 (not at all) - 4 (extremely).

² Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

³ Between-group comparisons using Wilcoxon rank sum test.

3) Questionnaire for health status

‘Q3-8. 1킬로미터 이상 걷는 것’ , Q5-1 일이나 일상적인 활동으로 보내는 시간을 줄였다’ 문항에서는 두 그룹 중 항암 김치 그룹에서 증상이 호전 되었다.’ Q4-4 일이나 다른 일상적인 활동을 하는데 어려움이 있었다.’ 문항에서는 placebo 그룹이 항암 김치 그룹 보다 증상이 호전됨을 나타냈다. ‘Q9-4 귀하는 차분하고 평온하다고 느끼셨습니까?’ ‘Q9-5 귀하는 활력이 넘쳤습니까?’ ‘Q9-7 귀하는 완전히 지쳤습니까?’ 문항에서는 항암 김치 그룹에서 증상이 호전되었다. 그 외의 다른 문항에서는 Placebo 그룹과 항암 김치 그룹 모두 크게 변화나 증상이 호전됨이 보이지 않았다. 하지만 일부 문항에서는 항암 김치 그룹이 Placebo 그룹보다 나은 건강상태가 호전되었다고 나타났으며 이 설문 조사로는 어느 한쪽이 우세하다고 결론을 내리기에는 어려울 것 같다(표 24).

표 24. Questionnaire for health status ¹

| | Placebo(n=7) | 항암김치(n=7) | P-value ³ |
|----------------------------|--------------|--------------|----------------------|
| Q1. 전반적으로 귀하의 건강상태는 어떠합니까? | | | |
| Week 0 | 2.0(2.0,3.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.456 |

| | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|-------|
| Week 7 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,3.0) | 0710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-0.25,2.0) | 0.1(-0.25,2.0) | 0.636 |
| P-value ² | 0.219 | 0.813 | |
| Q2. 일년 전과 비교했을 때, 현재 귀하의 전반적인 건강상태는 어떻습니까? | | | |
| Week 0 | 2.0(0.0,2.0) | 2.0(0.0,2.5) | 0.373 |
| Week 7 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(2.0,3.0) | 0.383 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.535 |
| P-value ² | 0.031 | 0.750 | |
| Q3. 다음 문항들은 귀하가 평상시 하는 활동에 관한 것입니다. 귀하의 건강상태 때문에 이러한 일상적인 활동을 하는 데 제한을 받습니까? 만약 그렇다면, 어느 정도 제한을 받습니까? | | | |
| Q3-1. 격렬한 활동(예: 달리기, 무거운 짐 들기, 격렬한 운동에 참여하기) | | | |
| Week 0 | 1.0(1.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.535 |
| Week 7 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.902 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 0.016 | 1.0 | |
| Q3-2. 다소 힘든 활동(예: 탁자 옮기기, 비로 방 쓸기, 한두 시간 산보하기, 자전거 타기) | | | |
| Week 0 | 1.0(1.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.209 |
| Week 7 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.383 |
| P-value ² | 0.063 | 1.0 | |
| Q3-3. 조금 무거운 시장바구니를 들거나 운반하는 것 | | | |
| Week 0 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.383 |
| Week 7 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.383 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.259 |
| P-value ² | 0.563 | 1.0 | |
| Q3-4. 계단으로 여러 층 걸어 올라가는 것 | | | |
| Week 0 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.710 |
| Week 7 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.456 |
| P-value ² | 0.063 | 0.750 | |
| Q3-5. 계단으로 한 층 걸어 올라가는 것 | | | |

| | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------|-------|
| Week 0 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.456 |
| Week 7 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 1.0 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.0 |
| P-value ² | 0.844 | 1.0 | |
| Q3-6. 허리를 굽히는 것, 무릎을 꿇는 것 | | | |
| Week 0 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.383 |
| Week 7 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.259 |
| P-value ² | 0.016 | 1.0 | |
| Q3-7. 허리와 무릎을 동시에 굽히는 것 | | | |
| Week 0 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.710 |
| Week 7 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 1.0 |
| P-value ² | 0.016 | 1.0 | |
| Q3-8. 1킬로미터 이상 걷는 것 | | | |
| Week 0 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.710 |
| Week 7 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,0.0) | 1.0(0.0,0.0) | 1.0 |
| P-value ² | 1.0 | 1.0 | |
| Q3-9. 200-300미터 정도 걷는 것 | | | |
| Week 0 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.710 |
| Week 7 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 1.0 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 0.813 | 1.0 | |
| Q3-10. 100미터 걷는 것 | | | |
| Week 0 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.710 |
| Week 7 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 1.0 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.383 |
| P-value ² | 0.031 | 1.0 | |
| Q3-11. 혼자 목욕을 하거나, 또는 옷 갈아입는 것 | | | |
| Week 0 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.710 |
| Week 7 | 2.0(2.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 1.0 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 0.313 | 1.0 | |
| Q4. 지난 4주 동안에, 귀하의 신체적인 건강 때문에 귀하의 일이나 일상적인 활동을 하는 데 다음과 같은 문제가 얼마나 자주 있었습니까? | | | |
| Q4-1. 일이나 다른 일상적인 활동으로 보내는 시간을 줄였다. | | | |
| Week 0 | 4.0(3.0,4.0) | 3.0(3.0,4.0) | 0.318 |

| | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------|-------|
| Week 7 | 4.0(2.0,4.0) | 3.0(3.0,4.0) | 0.620 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.456 |
| P-value ² | 0.297 | 0.875 | |
| Q4-2. 원하는 것보다 적은 양의 일을 했다. | | | |
| Week 0 | 4.0(2.0,4.0) | 2.0(2.0,3.0) | 0.318 |
| Week 7 | 4.0(2.0,4.0) | 3.0(2.0,4.0) | 0.383 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.259 |
| P-value ² | 0.156 | 0.375 | |
| Q4-3. 일이나 다른 일상적인 활동 중에서 할 수 없는 것이 있었다. | | | |
| Week 0 | 4.0(3.0,4.0) | 4.0(2.0,4.0) | 0.902 |
| Week 7 | 4.0(3.0,4.0) | 4.0(4.0,4.0) | 0.620 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-2.0,0.0) | 0.259 |
| P-value ² | 0.5 | 0.250 | |
| Q4-4. 일이나 다른 일상적인 활동을 하는 데 어려움이 있었다 (예: 더 노력을 해야 했다). | | | |
| Week 0 | 4.0(3.0,4.0) | 2.0(2.0,3.0) | 0.128 |
| Week 7 | 4.0(3.0,4.0) | 4.0(3.0,4.0) | 0.902 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | -2.0(-2.0,0.0) | 0.026 |
| P-value ² | 1.0 | 0.125 | |
| Q5. 지난 4주 동안에, 정서적인 문제(예: 기분이 좋지 않거나 불안을 느끼는 것) 때문에 귀하의 일이나 일상적인 활동을 하는데 다음과 같은 문제가 얼마나 자주 있었습니까? | | | |
| Q5-1 일이나 다른 일상적인 활동으로 보내는 시간을 줄였다. | | | |
| Week 0 | 3.0(3.0,4.0) | 3.0(2.0,4.0) | 0.902 |
| Week 7 | 4.0(2.0,4.0) | 4.0(3.0,4.0) | 0.902 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,1.0) | -1.0(-1.0,-.0) | 0.383 |
| P-value ² | 0.078 | 0.625 | |
| Q5-2. 원하는 것보다 적은 양의 일을 했다. | | | |
| Week 0 | 4.0(3.0,4.0) | 3.0(2.0,4.0) | 0.209 |
| Week 7 | 4.0(3.0,4.0) | 4.0(2.0,4.0) | 1.0 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-2.0,1.0) | 0.805 |
| P-value ² | 0.313 | 0.438 | |
| Q5-3. 일이나 다른 일상적인 활동을 하는 데 평소처럼 주의를 기울이지 못했다. | | | |
| Week 0 | 4.0(3.0,4.0) | 3.0(2.0,4.0) | |

| | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|-------|
| Week 7 | 4.0(3.0,4.0) | 4.0(3.0,4.0) | 1.0 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-2.0,0.0) | 0.383 |
| P-value ² | 0.063 | 0.250 | |
| Q6. 지난 4주 동안에, 귀하의 신체적인 건강 문제 혹은 정서적인 문제로 인하여, 귀하의 가족, 친구, 이웃 또는 동료들과의 정상적인 사회활동에 어느 정도 지장이 있었습니까? | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 1.0(0.0,2.0) | 0.383 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.902 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.259 |
| P-value ² | 0.031 | 0.5 | |
| Q7. 지난 4주 동안에, 몸에 통증이 얼마나 많이 있었습니까? | | | |
| Week 0 | 1.0(0.0,3.0) | 1.0(1.0,2.0) | 0.902 |
| Week 7 | 0.0(0.0,2.0) | 1.0(0.0,2.0) | 1.0 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-0.1,0.0) | 1.0(0.0,1.0) | 0.165 |
| P-value ² | 0.688 | 0.188 | |
| Q8. 지난 4주 동안에, 귀하는 몸의 통증 때문에 정상적인 일 (집 밖의 일과 집안 일을 포함해서) 을 하는 데 얼마나 지장이 있었습니까? | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,1.0) | 1.0(1.0,1.0) | 0.209 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 1.0 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,0.0) | 1.0(0.0,1.0) | 0.011 |
| P-value ² | 0.219 | 0.063 | |
| Q9. 아래의 질문들은 지난 4주 동안 귀하가 어떻게 느꼈고, 또 어떻게 지냈는지에 대한 설문입니다. 아래의 각 항목에 대하여, 귀하가 느꼈던 것과 가장 가까운 번호에 답해주시오. 지난 4주 동안에, 얼마나 자주 | | | |
| Q9-1. 귀하는 원기 왕성하다고 느꼈습니까? | | | |
| Week 0 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(2.0,3.0) | 0.165 |
| Week 7 | 1.0(1.0,3.0) | 3.0(1.0,4.0) | 0.209 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(-1.0,1.0) | 0.535 |
| P-value ² | 0.879 | 0.813 | |
| Q9-2. 귀하는 아주 초조했었습니까? | | | |
| Week 0 | 3.0(3.0,4.0) | 4.0(2.0,4.0) | 0.902 |
| Week 7 | 4.0(3.0,4.0) | 4.0(2.0,4.0) | 0.620 |

| | | | |
|----------------------------------------------------|---------------|----------------|-------|
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.383 |
| P-value ² | 0.031 | 0.750 | |
| Q9-3. 귀하는 아무것도 당신을 즐겁게 할 수 없 을 정도로 기분이 저조했었습니까? | | | |
| Week 0 | 4.0(3.0,4.0) | 3.0(2.0,4.0) | 0.318 |
| Week 7 | 4.0(3.0,4.0) | 4.0(2.0,4.0) | 0.535 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.456 |
| P-value ² | 0.031 | 0.5 | |
| Q9-4. 귀하는 차분하고 평온하다고 느끼셨습니 까? | | | |
| Week 0 | 1.0(1.0,2.0) | 1.0(1.0,2.0) | 0.805 |
| Week 7 | 1.0(1.0,2.0) | 2.0(2.0,3.0) | 0.073 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | -1.0(-2.0,0.0) | 0.053 |
| P-value ² | 0.188 | 0.063 | |
| Q9-5. 귀하는 활력이 넘쳤습니까? | | | |
| Week 0 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.456 |
| Week 7 | 2.0(1.0,3.0) | 2.0(2.0,3.0) | 0.318 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | -1.0(-1.0,0.0) | 0.053 |
| P-value ² | 0.250 | 0.125 | |
| Q9-6. 귀하는 마음이 많이 상하고 우울했었습니 까? | | | |
| Week 0 | 4.0(3.0,4.0) | 3.0(2.0,4.0) | 0.383 |
| Week 7 | 4.0(4.0,4.0) | 4.0(3.0,4.0) | 0.456 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-1.0,1.0) | 0.620 |
| P-value ² | 0.031 | 0.625 | |
| Q9-7. 귀하는 완전히 지쳤습니까? | | | |
| Week 0 | 3.0(2.0,4.0) | 2.0(1.0,3.0) | 0.456 |
| Week 7 | 4.0(1.0,4.0) | 2.0(2.0,4.0) | 0.902 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,1.0) | -1.0(-1.0,0.0) | 0.259 |
| P-value ² | 0.094 | 0.438 | |
| Q9-8. 귀하는 행복했었습니까? | | | |
| Week 0 | 1.0(1.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.383 |
| Week 7 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(1.0,3.0) | 0.620 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 0.259 |
| P-value ² | 0.188 | 0.625 | |
| Q9-9. 귀하는 피곤함을 느꼈습니까? | | | |
| Week 0 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(1.0,2.0) | 0.805 |
| Week 7 | 2.0(1.0,2.0) | 2.0(2.0,2.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,1.0) | -1.0(-1.0,0.0) | 0.318 |
| P-value ² | 0.250 | 0.313 | |

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|-------|
| Q10. 지난 4주 동안에, 귀하의 신체적인 건강 문제 혹은 정서적인 문제로 인하여, 귀하의 사회활동(예: 친구나 친지 방문하는 것)에 얼마나 자주 지장이 있었습니까? | | | |
| Week 0 | 4.0(2.0,4.0) | 3.0(2.0,4.0) | 0.383 |
| Week 7 | 4.0(3.0,4.0) | 3.0(3.0,4.0) | 0.165 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.805 |
| P-value ² | 0.063 | 1.0 | |
| Q11. 다음 각 항목에 대하여 귀하의 경우는 어디에 해당하는 지 답해 주십시오. | | | |
| Q11-1. 나는 다른 사람보다 쉽게 병에 걸리는 것 같다. | | | |
| Week 0 | 3.0(2.0,4.0) | 2.0(1.0,3.0) | 0.053 |
| Week 7 | 4.0(3.0,4.0) | 3.0(2.0,3.0) | 0.026 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,2.0) | -1.0(-1.0,0.0) | 0.165 |
| P-value ² | 0.5 | 0.313 | |
| Q11-2. 나는 내가 아는 다른 사람들만큼 건강하다. | | | |
| Week 0 | 1.0(1.0,2.0) | 2.0(1.0,3.0) | 0.456 |
| Week 6 | 1.0(1.0,2.0) | 1.0(1.0,3.0) | 0.710 |
| Δ Week 6 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | 0.0(0.0,1.0) | 0.710 |
| P-value ² | 0.063 | 0.875 | |
| Q11-3. 건강이 점점 나빠질 것이라고 예상한다. | | | |
| Week 0 | 4.0(2.0,4.0) | 2.0(2.0,3.0) | 0.073 |
| Week 7 | 3.0(3.0,4.0) | 3.0(2.0,3.0) | 0.259 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(1.0,0.0) | 0.0(-1.0,1.0) | 1.0 |
| P-value ² | 0.5 | 0.625 | |
| Q11-4. 나의 건강상태는 최고로 좋다. | | | |
| Week 0 | 2.0(0.0,2.0) | 3.0(1.0,3.0) | 0.097 |
| Week 7 | 2.0(1.0,3.0) | 2.0(1.0,3.0) | 0.902 |
| Δ Week 7 - 0 | 1.0(0.0,2.0) | 0.0(-1.0,2.0) | 0.620 |
| P-value ² | 0.031 | 0.0625 | |

¹ Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values). Q1, Q2: 5-point Likert scale, 0 (best) - 4 (worst). Q3: 3-point Likert scale, 0 (very much) - 2 (not at all). Q4, Q5, Q9, Q10: 5-point Likert scale, 0 (always) - 4 (not at all). Q6-Q8: 5-point Likert scale, 0 (not at all) - 4 (extremely). Q11: 5-point Likert scale, 0 (absolutely) - 4 (not at all)

² Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

³ Between-group comparisons using Wilcoxon rank sum test.

4) Questionnaire for the degree of IBS symptom

‘Q2. 복부팽만 (붓거나, 똥똥 하거나, 쪼이는 것 같은 느낌)이 어느 정도로 심하십니까?’ , ‘Q3. 귀하의 배변습관에 대해 어느 정도로 만족하십니까?’ ‘Q4. 대체적으로 과민성 장 증후군이 귀하의 삶에 얼마나 지장을 준다고 생각하십니까?’ , ‘Q5. 지난 10일 동안 복통이 있었던 날은 며칠이었는지 기록해 주십시오.’ 문항에서 향암 김치 그룹이 placebo 그룹에 비하여 증상의 호전을 보였다. ‘Q6. 지난 7일간 하루 평균 배변 횟수는 얼마입니까?’ 문항에서는 향암 김치 그룹에서 호전을 보인 반면 placebo 그룹에서는 배변횟수의 호전은 보이지 않았다. 요약하면 증상의 정도는 향암 김치 그룹에서 대체로 호전 되었다 (표 25).

표 25. Questionnaire for the degree of IBS symptom ¹

| | Placebo(n=7) | 향암김치(n=7) | P-value ³ |
|----------------------------------------------------------|---------------|----------------|----------------------|
| Q1. 복통이 어느 정도로 심합니까? | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,5.0) | 1.0(1.0,2.5) | 0.535 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.00) | 1.0(0.0,2.5) | 0.318 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-4.0,0.0) | 0.0(-1.0,0.0) | 1.000 |
| P-value ² | 0.500 | 0.875 | |
| Q2. 복부팽만 (붓거나, 똥똥하거나, 쪼이는 것 같은 느낌)이 어느 정도로 심하십니까? | | | |
| Week 0 | 1.0(0.0,5.0) | 2.5(0.0,4.0) | 0.805 |
| Week 7 | 1.0(0.0,2.5) | 1.0(0.0,4.0) | 1.000 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,1.0) | -1.0(-2.0,0.0) | 0.318 |
| P-value ² | 0.875 | 0.625 | |
| Q3. 귀하의 배변습관에 대해 어느 정도로 만족하십니까? | | | |
| Week 0 | 7.5(5.0,10.0) | 7.5(2.5,9.0) | 0.805 |
| Week 7 | 5.0(2.0,9.00) | 7.5(5.0,9.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.0,2.5) | 1.5(-2.5,2.5) | 0.535 |
| P-value ² | 1.000 | 0.578 | |
| Q4. 대체적으로, 과민성 장증후군이 귀하의 삶에 얼마나 지장을 준다고 생각하십니까? | | | |
| Week 0 | 5.0(0.0,9.0) | 2.5(0.0,5.0) | 0.805 |
| Week 7 | 5.0(0.0,7.5) | 1.0(0.0,4.0) | 0.620 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(-1.5,0.0) | -1.0(-2.5,0.0) | 0.456 |
| P-value ² | 0.750 | 0.188 | |
| Q5. 지난 10일 동안 복통이 있었던 날은 며칠이었는지 기록해 주십시오. | | | |
| Week 0 | 0.0(0.0,2.00) | 1.0(0.0,1.0) | 0.710 |
| Week 7 | 0.0(0.0,1.00) | 1.0(0.0,1.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(-1.0,1.0) | 0.902 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |

| Q6. 지난 7일간 하루 평균 배변 횟수는 얼마 입니까? | | | |
|------------------------------------|----------------|---------------|-------|
| Week 0 | 2.0(1.0,7.0) | 1.0(1.0,2.0) | 0.259 |
| Week 7 | 1.0(1.0,4.0) | 1.5(1.0,10.0) | 0.620 |
| Δ Week 7 - 0 | -1.0(-4.5,0.5) | 0.2(0.0,8.0) | 0.053 |
| P-value ² | 0.219 | 0.125 | |

¹ Median, interquartile range (25%, 75%) in parentheses (all such values). Q1-Q4: Visual analogue scale, 0 (not at all) - 10 (extremely), Q5: day, Q6: number of frequency.

² Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

³ Between-group comparisons using Wilcoxon rank sum test.

5) Subjective global assessment of IBS symptom improvement

Placebo 그룹에서 증상의 호전이 되었다는 대답이 더 많은 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(P =0.462)(표 26).

표 26. Subjective global assessment of IBS symptom improvement

| | Placebo(n=7) | 항암김치(n=7) | P-value ³ |
|--------|---------------------------|-----------|----------------------|
| | (improved / not improved) | | |
| Week 0 | 0 / 7 | 2 / 5 | - |
| Week 7 | 7 / 0 | 2 / 5 | 0.462 |

¹ Between-group comparisons using Chi-square test.

6) Bristol Stool Scale

Placebo 그룹과 항암 김치 그룹에서 처음과 7주 후 모두가 type 4가 가장 많았으며, 두 그룹에서는 처음과 7주후 사이에 유의한 차이가 보이지 않았다(표 27).

표 27. Bristol Stool Scale ¹

| | Placebo(n=7) | 항암김치(n=7) | P-value ³ |
|----------------------|--------------|--------------|----------------------|
| Week 0 | 4.0(4.0,4.0) | 4.0(4.0,6.0) | 0.710 |
| Week 7 | 4.0(4.0,4.0) | 4.0(4.0,5.0) | 0.710 |
| Δ Week 7 - 0 | 0.0(0.0,0.0) | 0.0(0.0,0.0) | 0.710 |
| P-value ² | 1.000 | 1.000 | |

¹ Type 1 (Separate hard lumps, like nuts) / Type 2 (Sausage-shaped, but lumpy) / Type 3 (Like a sausage but with cracks on its surface) / Type 4 (Like a sausage or snake, smooth and soft) /

Type 5 (Soft blobs with clear cut edges) / Type 6 (Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool) / Type 7 (Watery, no solid pieces) (all such values). Median, interquartile

range (25%, 75%) in parentheses (all such values).

² Within-group comparisons using Wilcoxon signed rank test.

³ Between-group comparisons using Fisher's exact test and Wilcoxon rank sum test.

4. 항암 김치 섭취로 인한 장내 미생물 변화

1) 항암 김치 섭취에 따른 장내 미생물 Phylum (문) 분석

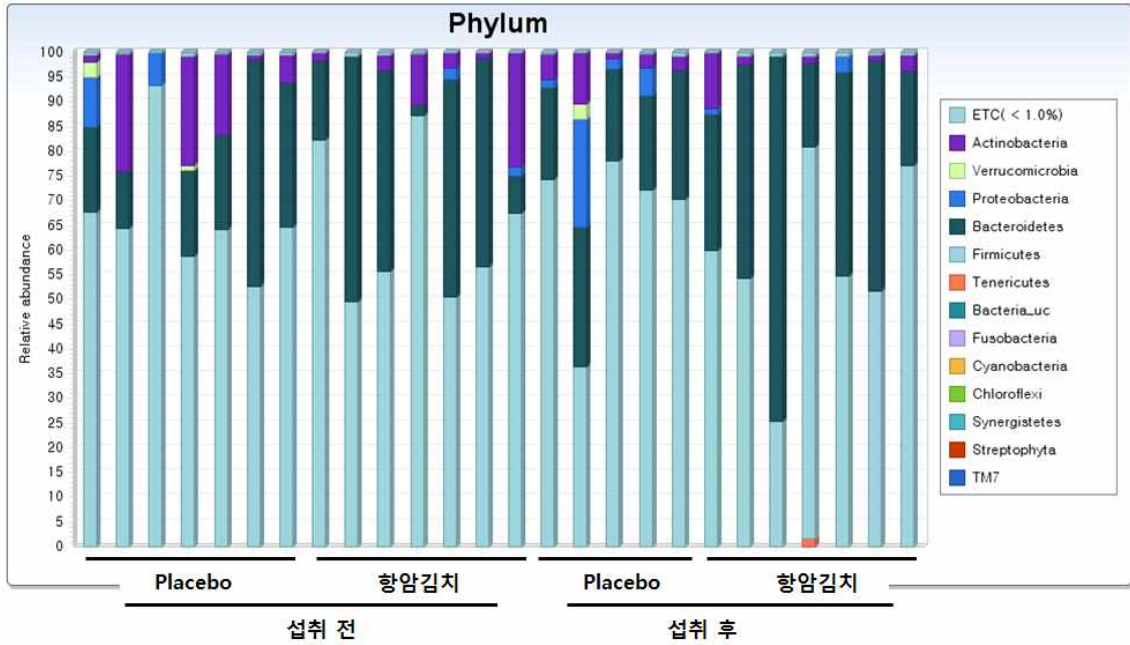


그림 148. 장내 미생물 Phylum (문) 분석

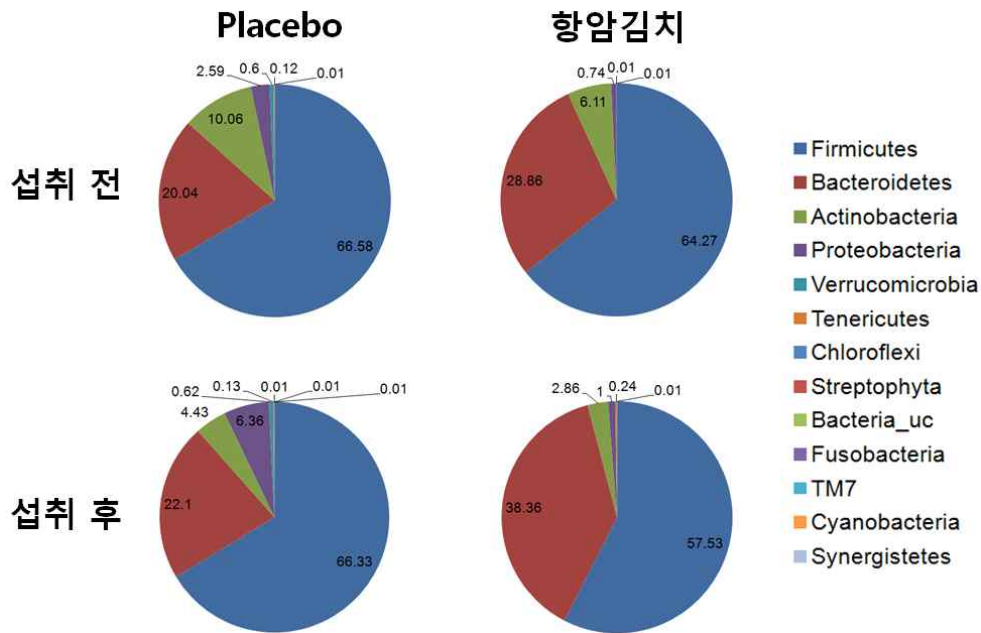


그림 149. 항암김치 섭취로 인한 장내 미생물 변화 (Phylum) 비교

표준 김치 섭취 그룹과 항암 김치 섭취 그룹의 stool을 김치 섭취 전후로 채취하여, 분변에서 DNA를 분리한 뒤 454 Pyrosequencing을 이용하여 장내 미생물의 구성 변화 (Microbiome)를 분석하였다. 먼저 Phylum(문)을 분석한 결과, 항암김치를 섭취한 그룹에서 Firmicutes가 64.27%에서 57.53%로 감소하였고, Bacteroidetes가 28.86%에서 38.36%로 유의미하게 변화하였다. 반면 표준 김치를 섭취한 그룹에서는 Firmicutes (66.58%에서 66.33%), Bacteroidetes (20.04%에서 22.1%) 모두 유의미한 변화를 관찰할 수 없었다. 또한 표준김치와 항암김치 두 그룹 모두에서 Actinobacteria (표준김치: 10.06%에서 4.43%, 항암김치: 6.11%에서 2.86%)가 유의미하게 감소하였다 (그림 148-150).

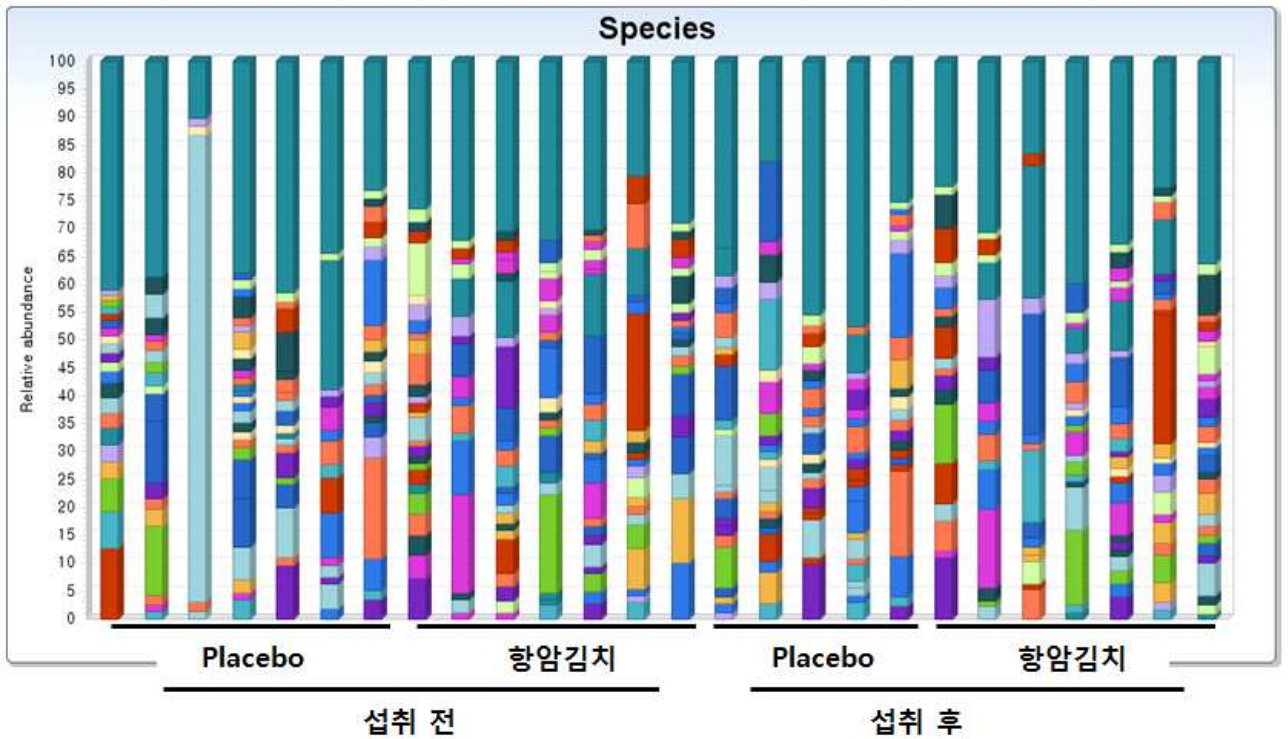


그림 151. 장내 미생물 종 분석

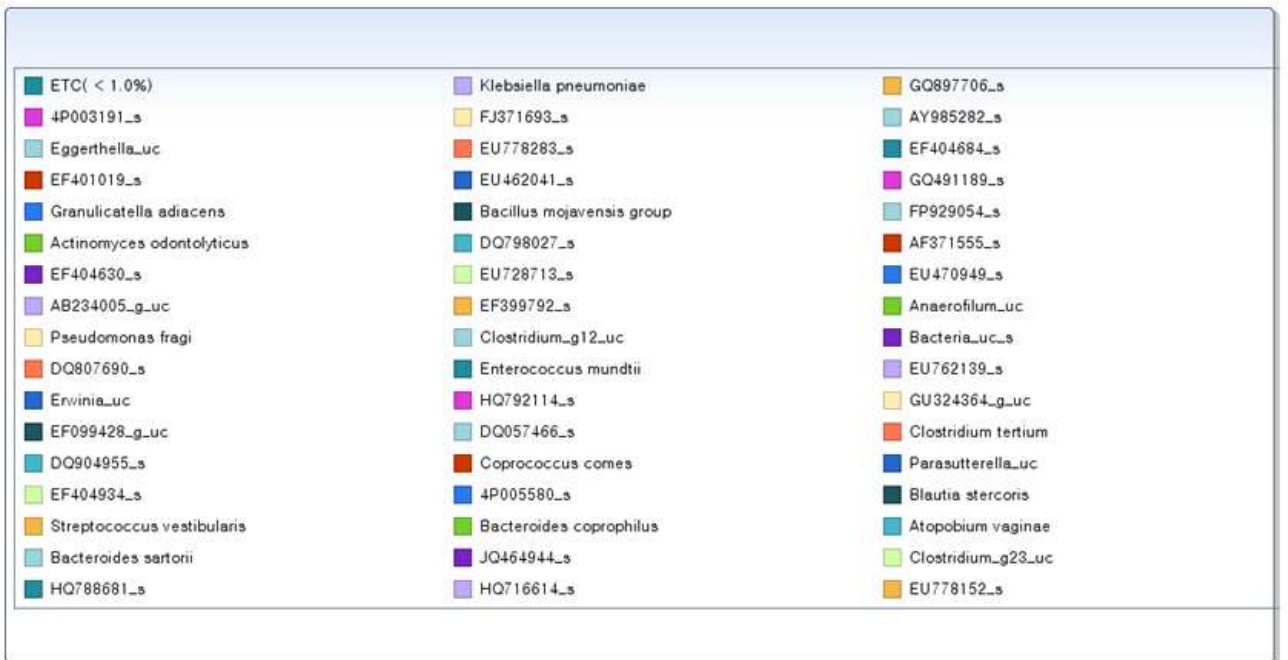


그림 152. 장내 미생물 종 분석

Phylum(문)을 분석한 결과를 바탕으로, 실제적인 장내 미생물 분포를 확인하고, 항암김치 섭취에 의한 장내 미생물 변화를 밝히기 위하여 장내 미생물의 Species 분석을 수행하였다. 먼저 장내에 1,000여종 이상의 미생물 Species가 존재함을 확인하였고 (그림 151, 152), 항암

김치 섭취 전 그룹과 섭취 후 그룹의 장내 미생물 Species 구성변화를 분석하였다. Placebo 그룹의 경우 표준김치를 섭취하기 전과 섭취 후에 유의미한 수준의 Species 변화를 확인하기 어려웠다 (그림 153). 그러나 항암김치를 섭취한 그룹에서는 섭취하기 전과 비교해서 *Prevotella copri*, EU462041_s, *Eubacterium rectale*, DQ796897_s, DQ793299_s, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides coprocola* 등이 유의미하게 증가하였고, *Collinsella aerofaciens* 등이 유의미하게 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 154).

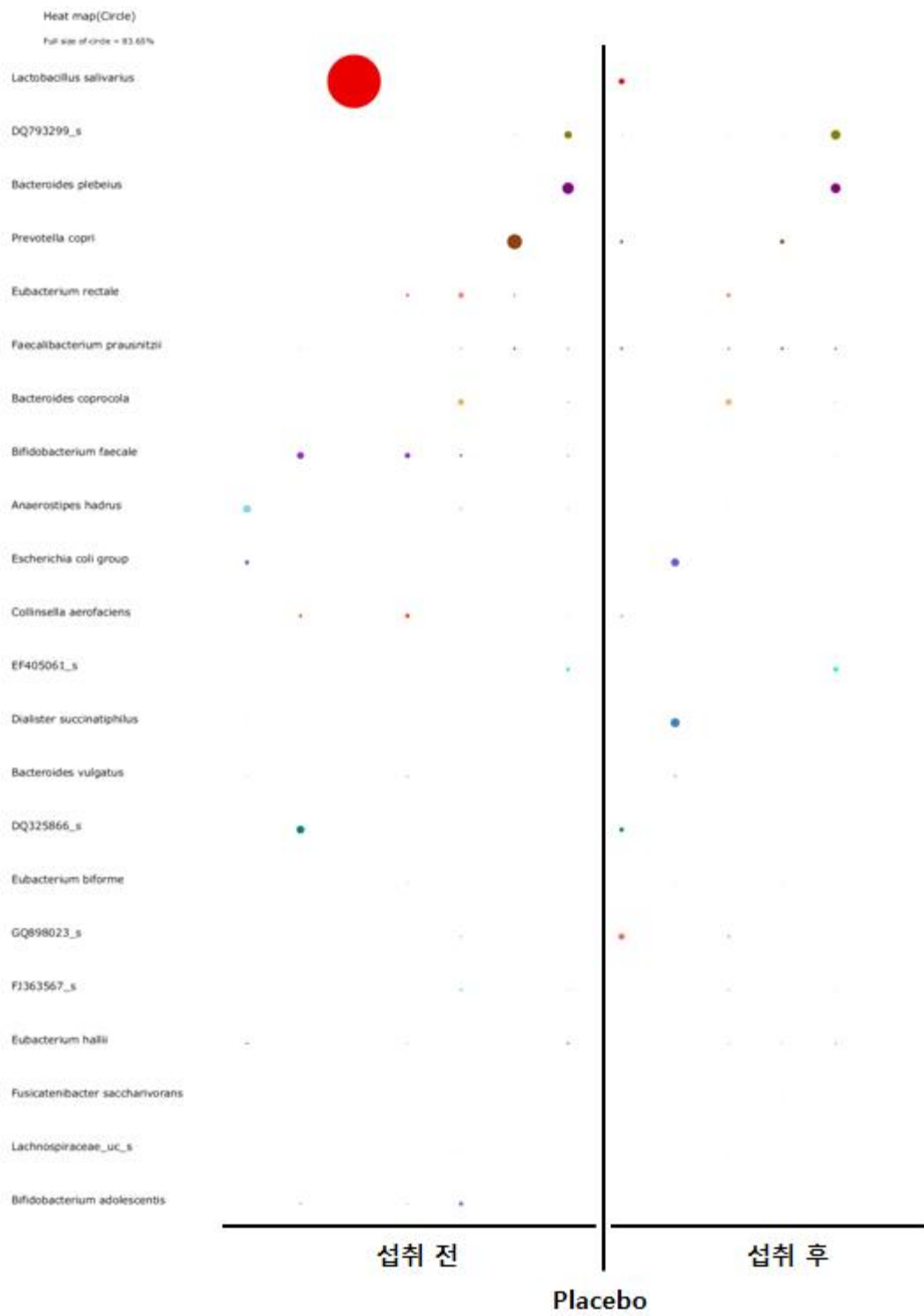


그림 153. Placebo 그룹 표준 김치 섭취로 인한 장내 미생물 변화 (Species) 비교

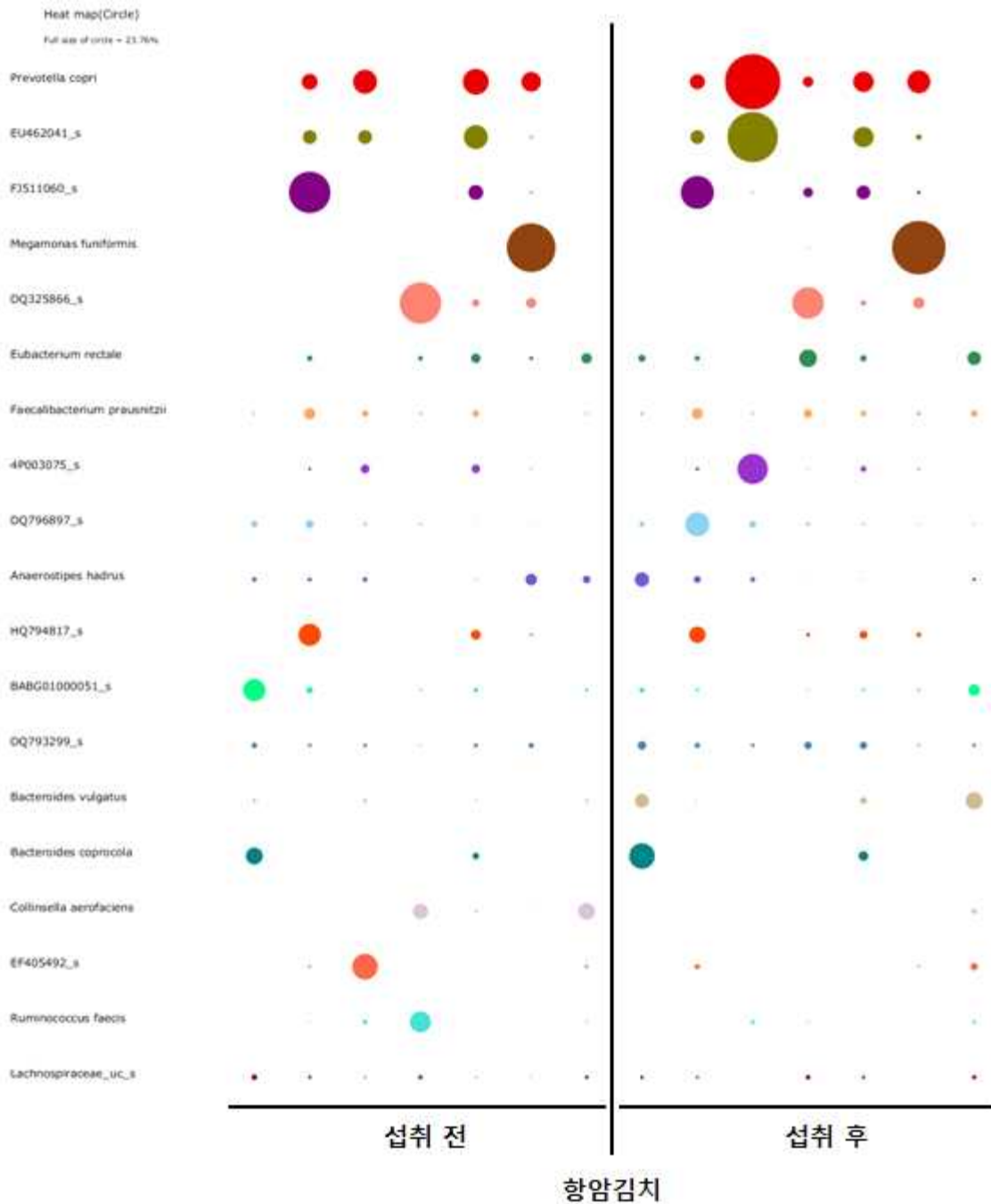


그림 154. 항암김치 섭취로 인한 장내 미생물 변화 (Species) 비교

장내 미생물의 경우 미생물들 간의 balance가 매우 중요한데, 본 실험의 결과, 궤양성 대장염 환자에게 분포가 줄어들어 있는 것으로 알려진 Eubacterium rectale이 항암 김치 섭취에 의해 증가함을 확인 할 수 있었고, 염증성장질환 환자에서 많이 검출되는 황화수소(H₂S)와 황산염 환원균 (sulfate-reducing)인 collinsella aerofaciens가 항암 김치 섭취에 의해 감소함을 확인 할 수 있었다.

본 실험 결과를 종합하여 볼 때, 항암 김치 섭취에 의한 장기능 개선의 가능성을 확인 할 수 있었다. 그러나 김치 섭취 기간이 7주로 짧고, 표본수가 Placebo 그룹 7명, 항암김치 섭취 그룹 7명 밖에 되지 않아 더 많은 수의 표본을 이용한 추가적인 연구가 필요하다고 생각 되어 진다.

-제3세부과제-

가. 김치 추출물의 체지방 감소 및 비만 개선효과

본 시험은 8주 동안 고지방식으로 비만을 유도하는 C57BL/6 마우스를 이용하여, 시험물질 표준김치, 항암김치의 체중증가, 식이효율, 지질변화에 미치는 영향을 관찰함으로써, 비만에 대한 예방 효능을 알아보기 위해 수행하였다. 저지방식이군(정상군, Lean)과 고지방식이 음성대조군(Vehicle)을 두었으며, 양성대조물로 표준김치시험군을 두었으며, 시험물질 항암김치를 각각 250, 500 mg/kg투여군을 설정하였고, 비만유도 56일 동안 경구 반복 투여하여 그 예방효능을 검토하였다.

1) 체중 변화 추이

정상군(Lean)의 경우 음성대조군에 비하여 체중이 8.0g 이상의 체중 차이가 나는 상태에서 시험이 29일차 진행되었으며 양성대조물로 불리는 표준김치 투여를 진행하였을 때 음성대조군 대비 저•고농도군에서 3.3g, 3.8g 각각의 차이를 보였다.

시험군인 항암김치는 음성대조군 대비 저•고농도군에서 4.9g, 6.0g 각각의 차이를 보였다. 시험군 항암김치는 양성대조물 표준김치 대비 저농도군(250mg/kg)은 1.6이 차이를 보였으며, 고농도군(500mg/kg)은 2.2g이 각각의 차이를 보이고 있다. 농도별 저•고농도군에서 변화를 보였으며, 용량의존적으로 체중증가량이 정체가거나 감소하는 것을 보여주었다. (그림 155, 156)

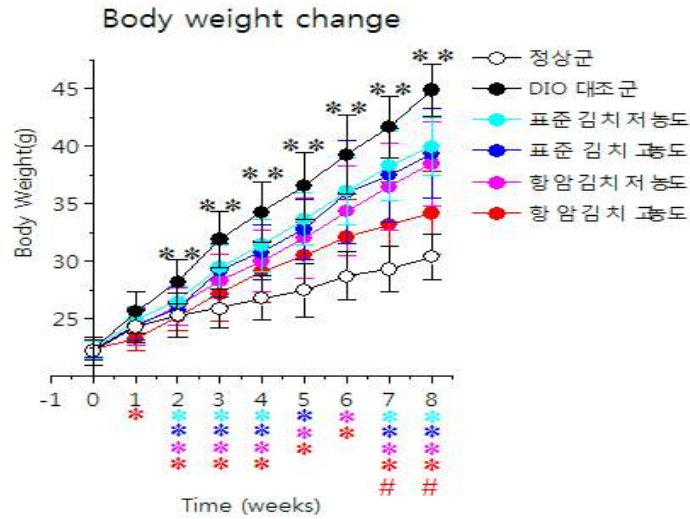


그림 155. 체중변화
 (* vs. DIO 대조군 ** vs. 정상군)

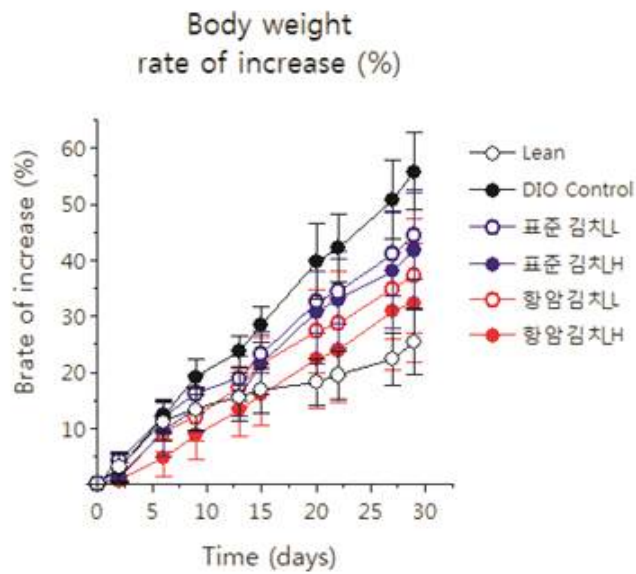


그림 156. 체중증감 변화도

2) 식이섭취량의 변화

DIO 음성대조군이 일평균 3.6g 이상의 식이섭취 상태에서 시험이 진행되었으며 29일간 양성대조물 표준김치를 투여를 진행하였을 때 저·고농도군에서 섭취량이 3.1~3.2g의 섭취 상태가 관찰되었으며, 시험약물 함암김치 저·고농도군에서는 일평균 3.0~3.1g으로 관찰되었다. 이는 체중증가율대비 음성대조군 대비 섭취상태가 낮아 보이는 것으로 관찰되었으며 양성대조물 표준김치와 시험군 함암김치간 대비는 차이를 보이지 않는 상태이다 (그림 157).

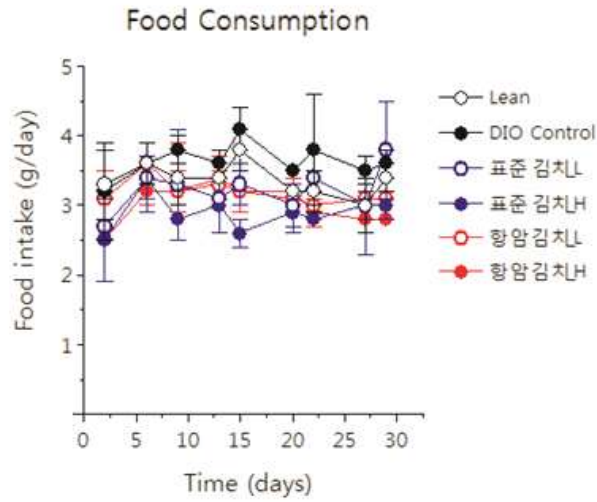


그림 157. 식이섭취량 변화도

3) 식이효율 산출

식이섭취량이 고지방식이 자체에 의해서 정상군 대비 증가하였으나, 시험물질투여와 관련해서 용량 의존적으로 감소하였고, 식이효율도 시험물질 투여용량과 관련해서 떨어진 것으로 보아 시험물질은 식욕억제도 보여지며, 에너지대사를 촉진하는 것으로 사료된다 (그림 158).

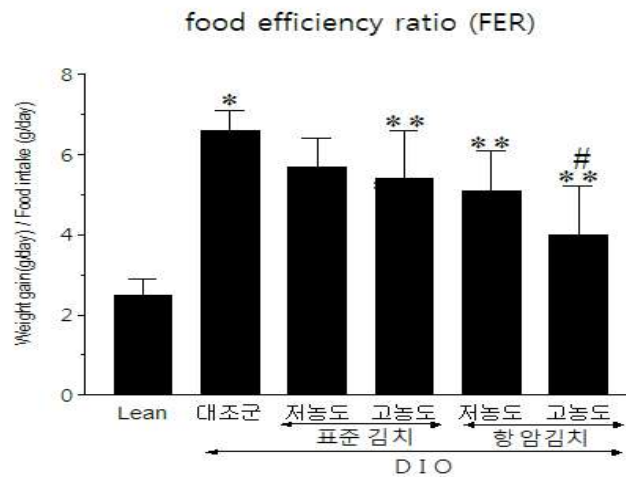


그림 158. 식이효율 변화도

(* vs. 정상군 ** vs. DIO 대조군 # vs. DIO)

4) 장기무게의 변화

대부분의 장기들이 정상군과 음성대조군 간의 무게차이를 보였으며 통계적 유의성 차

이가 나는 상태였다(그림 159). 결과물 중 비만과 관련된 지방부위(Subcutaneous, Peritoneal, Mesentric, Epididymal) 모든 부위에서 유의성 있는 차이를 보였다. 특히 Subcutaneous, Epididymal fat 부위에서는 농도별로 월등히 감소, 억제된 것으로 보여졌다. 주요장기 중 Liver, Heart 조직에서도 차이를 보였는데 이는 비만형 심장비대증과 관련된 장기로 유의적인 비대증 유발된 상태에서 모든 투여 군에서 유의적인 억제 효능을 보여주므로 추후 관련실험에도 기대해 본다 (그림 160).

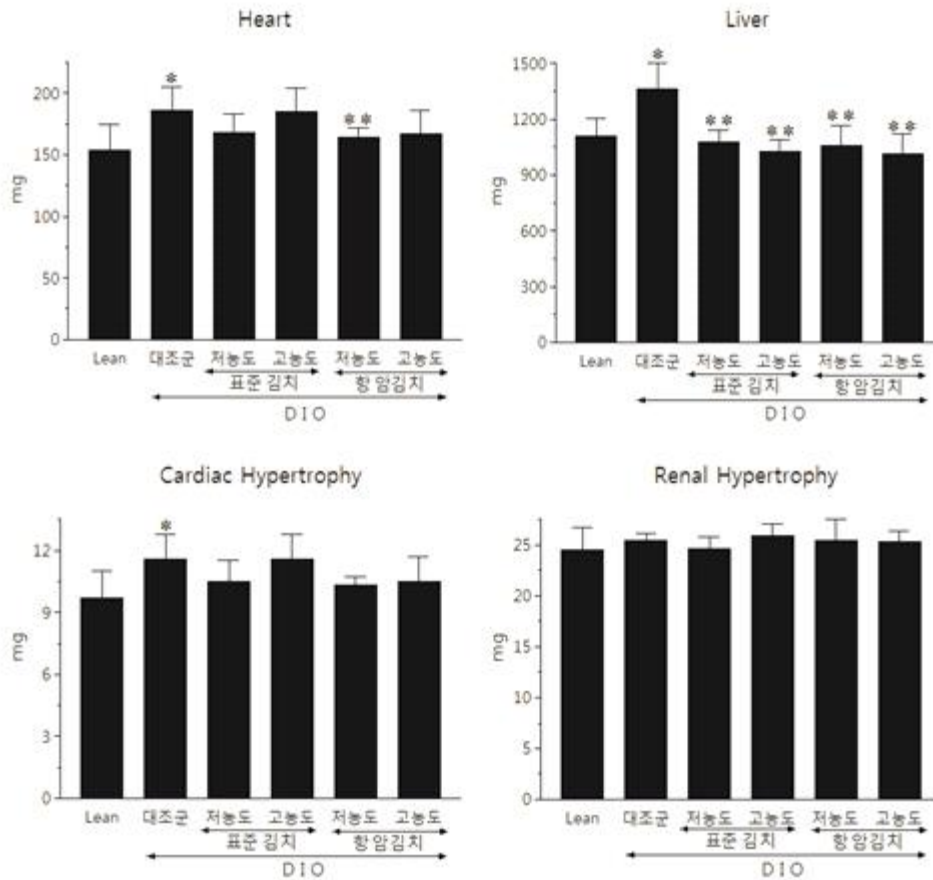


그림 159. 중요 장기 변화
 (* vs. 정상군 ** vs. DIO 대조군 # vs. DIO)

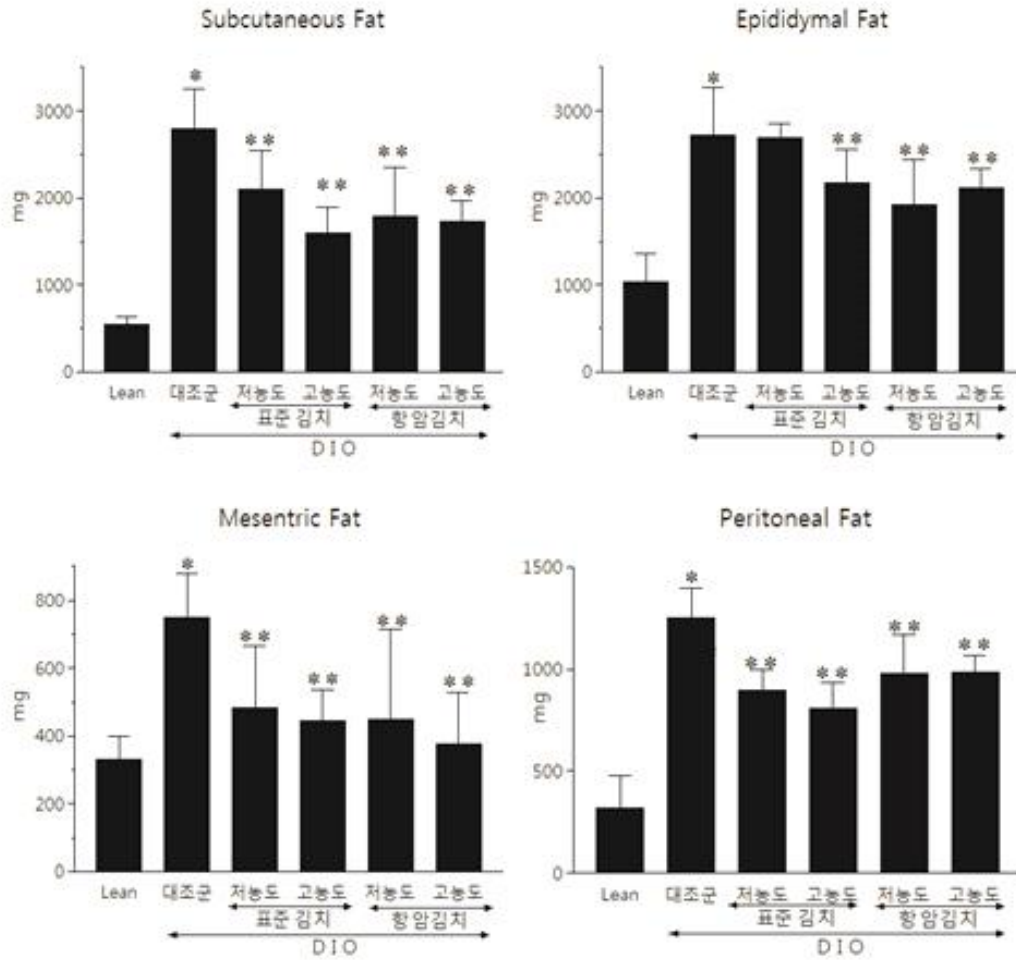


그림 160. 부위별 지방 변화
 (* vs. 정상군 ** vs. DIO 대조군 # vs. DIO)

5) 혈액생화학적 검사

정상군과 음성대조군 비교시 대부분의 질환을 유도되었음을 혈액중 생화학치로 확인할 수 있었다. 특히 콜레스테롤수치에서 음성대조군대비 유의적인 감소, 억제된 결과를 보여줬다. (그림 161)

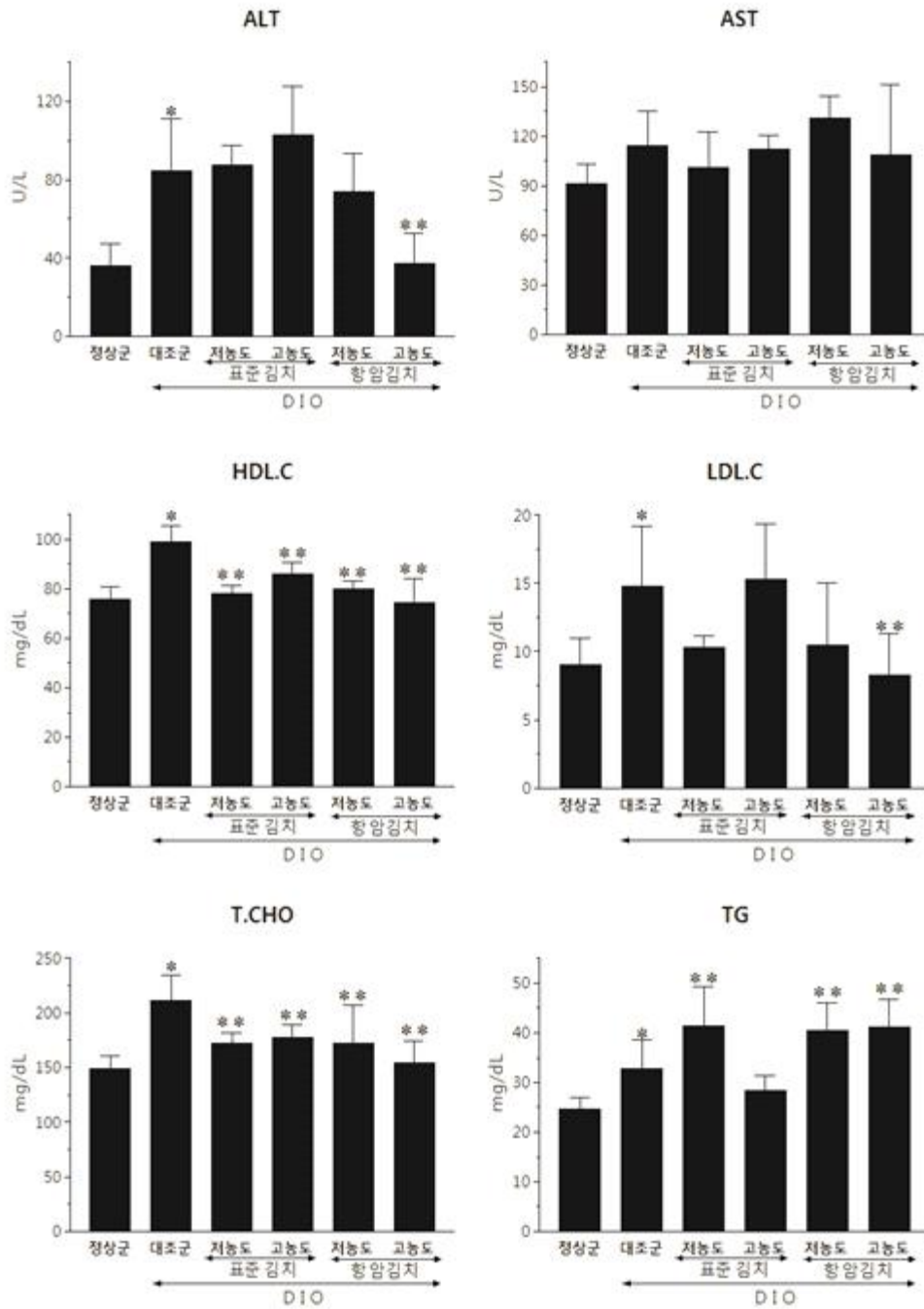


그림 161. 생화학적 변화
 (* vs. 정상군 ** vs. DIO 대조군 # vs. DIO)

6) 조직학적 검사

주요 조직의 H&E stain 이미지는 아래그림에 나타내었다. 전체적으로 질환이 유발된 것으로 보여지며 시험물로 인한 개선되어지는 것으로 보여진다 (그림 162, 163).

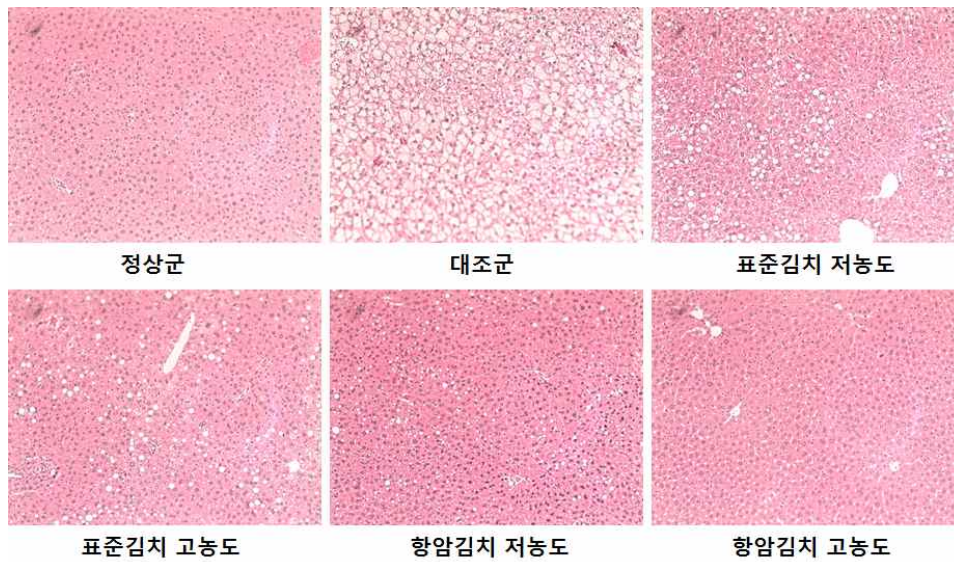


그림 162. 간 조직의 조직학적 변화
Liver tissue / H&E stain (x100)

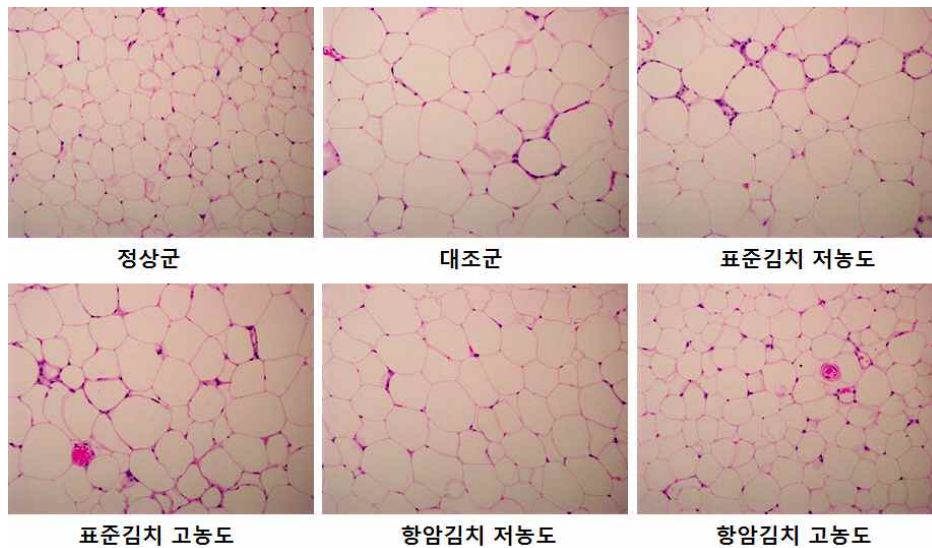


그림 163. 지방조직의 조직학적 변화
Adipo tissue(epididymal fat) / H&E stain (x200)

나. 김치 추출물의 산화적 스트레스 개선 효과 측정

1) mRNA 및 단백질 발현에 미치는 김치 추출물의 효능 측정

ROO⁻, NO, O₂⁻, ONOO⁻를 유발하는 generator인 AAPH, SNP, pyrogallol, SIN-1을 각각 처리하여 세포 생존율 및 NO 생성 억제율을 살펴보았을 때 효과가 좋았던 향암김치를 이용하여 SIN-1을 처리한 후 NO 생성과 관련 있는 염증 인자의 발현 양상을 살펴보았다(그림

164).

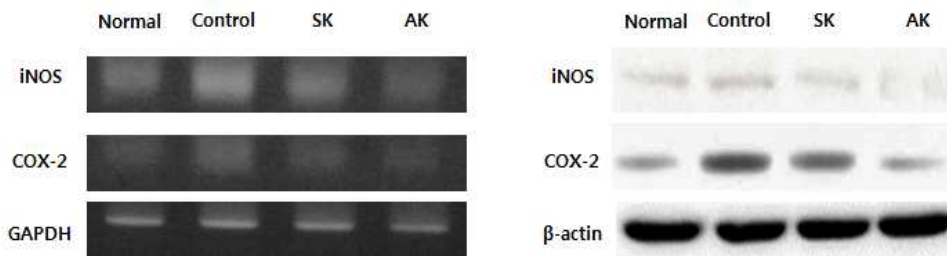


그림 164. LLC-PK₁에서 iNOS, COX-2의 mRNA 및 단백질 발현 양상

SIN-1을 처리한 control군에서 iNOS와 COX-2의 발현이 증가하는 양상을 나타냈으며, 표준 김치와 항암김치를 처리한 군에서 mRNA 및 단백질의 발현이 감소하는 양상을 나타냈다. 특히 항암김치 처리군이 표준김치 처리군보다 iNOS와 COX-2의 발현을 더 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

다. 김치 추출물의 항노화 효과

1) 김치의 수명연장 효과

본 연구에서는 세포노화의 실험모델의 일종인 WI-38 cell을 이용하여 세포의 생리학적 노화와 산화적 스트레스에 의한 노화 과정에서 세포의 수명에 김치 시료가 미치는 효과 차이를 살펴보았다.

(1) 생리학적 노화에 대한 세포 수명 연장 효과

WI-38 cell에 대한 발효단계별 김치의 세포 수명 연장효과를 살펴보기 위해 young, middle age의 WI-38 cell을 사용하여 시간이 경과에 따른 생리학적 노화에 대한 김치의 세포 수명 연장효과를 살펴보았다 (표 28). Young age group에서 PDL 26의 세포가 middle age PDL의 기준인 42를 넘어서 PDL 51까지 진행되었으며, 이 중 항암김치는 normal군과 같은 PDL인 51까지 지속적으로 배양되었다. 또한 Middle age group의 경우는 PDL 42에서 시작하여 현재 PDL 49까지 배양이 진행되었으나 모든 군에서 차이를 보이지 않았다.

표 28. 김치가 세포 수명에 영향을 미치는 효과 측정

| Group | Life span | |
|--------|---------------|----------------|
| | Young age PDL | Middle age PDL |
| Normal | 26 → 51 | 42 → 49 |
| CK | 26 → 49 | 42 → 49 |
| SK | 26 → 50 | 42 → 49 |
| CPK | 26 → 50 | 42 → 49 |
| AK | 26 → 51 | 42 → 49 |

(2) 산화적 스트레스에 대한 세포 수명 연장 효과

WI-38 cell을 young, middle age-group으로 나누어 각각의 group에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스에 의한 세포 노화를 유도하고 세포의 수명을 측정함으로써, 김치 시료의 세포 수명 연장 효과를 검토하였다. Young, middle age에서 H₂O₂를 처리하여 조기노화를 유도한 WI-38 cell에 대한 김치의 세포 수명 연장효과를 살펴보면, 먼저 PDL이 26인 young age cell의 경우 H₂O₂만 처리한 군은 세포노화로 인해 PDL 28에서 더 이상 세포분열을 하지 않고, 사멸하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, H₂O₂를 처리한 후 김치를 처리하여 연속적으로 배양한 군에서는 PDL 34 이상 진행되었으며, 항암김치와 암예방김치를 처리한 군에서는 PDL 38로 수명이 연장되는 것을 확인하였다. 또한, PDL이 42인 middle age-group의 cell은 H₂O₂만 처리했을 때 세포노화로 인해 PDL 42에서 더 이상 수명이 증가되지 않는 반면, H₂O₂를 처리한 후 김치 시료를 처리하여 연속적으로 배양한 군을 대조군에 대해 PDL 43 이상으로 증가하는 것으로 나타났으며, young age group과 마찬가지로 암예방김치와 항암김치가 PDL 44까지 가장 오래 세포가 생존하는 것을 확인할 수 있었다 (표 29).

표 29. 김치가 H₂O₂로 인한 산화적 손상을 받은 세포의 수명에 영향을 미치는 효과 측정

| Group | Life span | |
|-----------------------------------------------|---------------|----------------|
| | Young age PDL | Middle age PDL |
| Normal | 26 → 51 | 42 → 49 |
| H ₂ O ₂ treated control | 26 → 28 | 42 → 42 |
| CK | 26 → 36 | 42 → 43 |
| SK | 26 → 34 | 42 → 43 |
| CPK | 26 → 38 | 42 → 44 |
| AK | 26 → 38 | 42 → 44 |

2) mRNA 및 단백질 발현에 미치는 김치 추출물의 효과 측정

WI-38 세포에 H₂O₂를 처리하여 조기노화를 유도한 군 (PSC)과 항암김치와 시판김치를 500 µg/mL 처리하였을 때의 염증성 인자의 mRNA 및 단백질 발현 양상을 비교해 보았다. PSC군의 경우 H₂O₂의 처리로 인하여 iNOS와 COX-2의 발현이 증가하는 양상을 나타낸 반면 표준김치와 항암김치를 처리한 군은 유의적으로 iNOS와 COX-2의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 COX-2의 경우 mRNA와 단백질 발현 모두에서 항암김치의 효과가 normal군 수준으로 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (그림 165).

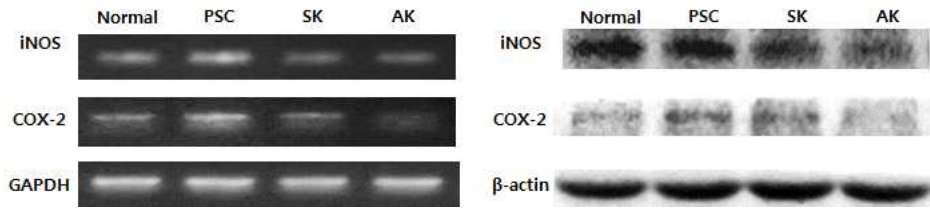


그림 165. WI-38에서 iNOS, COX-2의 mRNA 및 단백질 발현 양상

라. Cellular system에서 김치 추출물의 신경세포 보호 효과 측정

1) H₂O₂에 대한 김치 추출물의 신경세포 보호 효과

김치 추출물의 C6 glial cell에서 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 측정하는 결과이다 (그림 166). 세포 생존율은 normal군이 100%를 기준으로 할 때 H₂O₂를 처리한 control군에서는 54.1%의 세포 생존율을 나타내어 신경 세포가 산화적 스트레스에 의한 손상을 받은 것을 확인할 수 있었다. 표준김치와 항암김치 시료를 처리한 군에서는 control군보다 높은 세포 생존율을 보였으며 1000 μg/mL 농도에서는 표준김치 처리군이 66.8%, 항암김치 처리군이 72.8%의 세포 생존율을 나타내어 표준김치보다 항암김치가 세포 보호효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

DCFDA assay를 통한 ROS 억제 효과를 측정하는 결과 (그림 167)에서 Control군은 처음 측정 시간부터 normal군에 비해 1.6배 이상 높은 ROS가 생성된 것을 확인할 수 있었고, 시간이 지나감에 따라 더욱 ROS 생성량이 증가하는 양상을 나타냈다. 그러나 항암김치 (1000 μg/mL) 처리군의 경우 0시간 측정 시부터 control군에 비해 1.3배 정도 낮은 ROS 생성량을 보였고, 60분 동안의 변화를 살펴보았을 때 ROS 증가의 변화폭이 완만한 것을 확인할 수 있었다. 60분을 기준으로 control군을 100%로 하여 결과를 비교해 보았을 때, normal군의 경우 71.4%의 ROS 생성을 나타냈고, 항암김치를 처리한 결과 74.4%로 항암김치 처리군이 ROS 생성을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

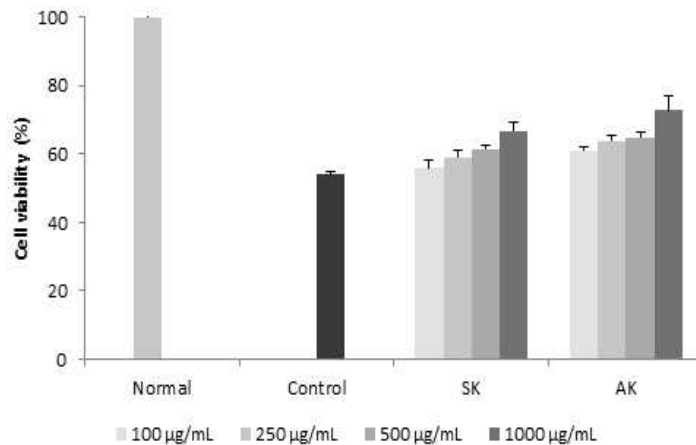


그림 166. C6 cell에서 H₂O₂에 대한 김치 추출물의 세포 보호 효과

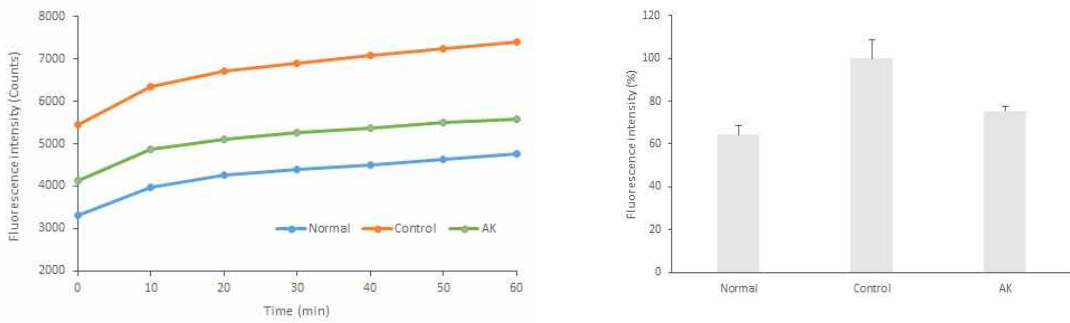


그림 167. C6 cell에서 H₂O₂에 대한 항암김치 추출물의 ROS 생성 억제 효과

2) Aβ에 대한 김치 추출물의 신경세포 보호 효과

C6 glial cell에 Alzheimer's disease의 주요 유발 원인으로 알려진 Aβ에 대한 표준김치 및 항암김치의 세포 보호 효과를 살펴보았다 (그림 168). Aβ를 처리한 control군의 경우 세포 생존율이 43.7%로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 대해 김치 시료를 농도별로 처리한 군의 경우 세포 생존율이 농도 의존적으로 증가하는 양상을 나타내었고, 표준김치를 1000 μg/mL을 처리한 군의 경우 62.9%의 세포 생존율을 나타내었으나, 항암김치를 500 μg/mL을 처리한 군에서 62.7%로 표준김치를 1000 μg/mL 처리하였을 때와 같은 세포 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한 항암김치를 1000 μg/mL 처리하였을 때는 76.0%의 세포 생존율을 나타내었다.

그림 169는 항암김치 추출물 (1000 μg/mL)의 ROS 억제 효과를 알아보기 위해 C6 glial cell을 이용하여 DCFDA assay를 실행한 결과이다. Control군은 시간이 지나감에 따라 normal군에 비해 ROS 생성량이 증가하였고, 이를 통해 Aβ로 인해 산화적 스트레스가 유발되었음을 알 수 있었다. 60분을 기준으로 control군을 100%로 하였을 때 항암김치 추출물을 처리한 결과 normal군과 유사한 수준 (81.7%)으로 항암김치 추출물 처리군 (84.2%)의 ROS 생성이 억제된 것을 확인할 수 있었다.

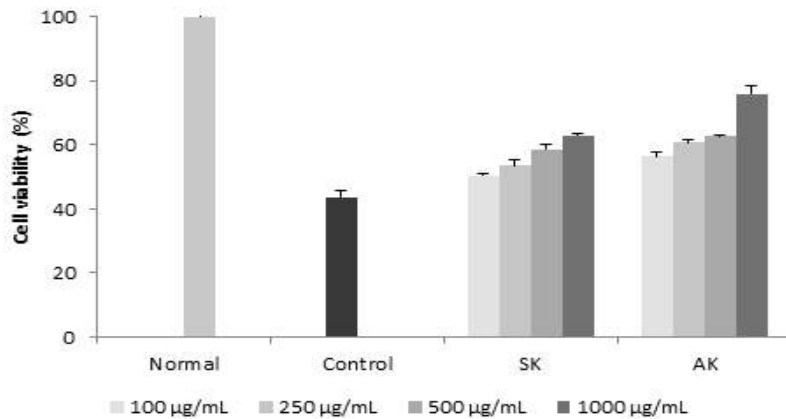


그림 168. C6 cell에서 Aβ에 대한 김치 추출물의 세포 보호 효과

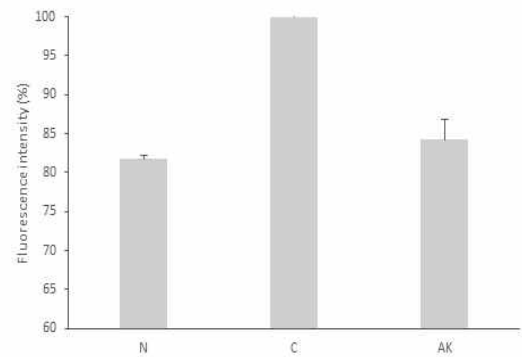
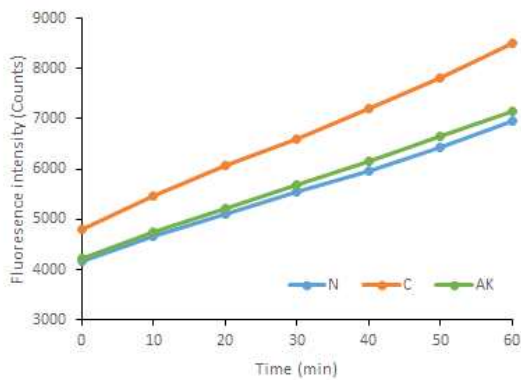


그림 169. C6 cell에서 A β 에 대한 항암김치 추출물의 ROS 생성 억제 효과

마. *In vivo*에서 항암김치 추출물의 인지능력 향상 효과

1차년도에서 표준김치 추출물로 인지능력 향상 효과에 대한 실험을 확인하였고, 2차년도에는 *in vivo*에서 항암김치 추출물이 인지능력에 미치는 영향을 살펴보았다. 실험군은 총 4가지 군으로 설정하였으며 (normal, control, 100, 200), normal군에는 뇌에 A β_{25-35} 대신 생리식염수를 주입하였고, 나머지 세 군에는 A β_{25-35} 를 주입하였다. A β 를 처리한 후 안정기를 2~3일 정도 둔 후 normal과 control군에는 음용수, 나머지 실험군에는 항암김치 추출물을 농도별로 100 mg/kg, 200 mg/kg을 2주 동안 위내투여를 실시하였다. 전 실험기간 동안 체중을 측정하였으며, 또한 위내투여 1주일이 되는 시점부터는 행동실험 (물체인지, T-maze, Morris water maze 실험)을 통해 mouse의 행동변화를 측정하였다.

1) 체중 변화 추이

실험 첫 날부터 마지막 날까지 체중의 변화량을 측정하였다 (표 30). 실험기간동안 전 실험군에서 체중이 꾸준히 증가하였으며 군 간 유의적 변화를 보이지 않았다. 또한 1주일이 지난 후 식염수 및 A β 를 뇌에 주입한 시점에서 모든 실험군이 건강한 상태로 체중이 계속적으로 증가하는 양상을 나타냈다.

표 30. 실험기간 동안의 체중 변화

| Group | Body weight (g) | | | | |
|---------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 0 week | 1 week | 2 week | 3 week | 4 week |
| Normal | 25.4 \pm 1.6 | 27.5 \pm 1.7 | 29.6 \pm 1.8 | 32.4 \pm 2.0 | 33.4 \pm 2.3 |
| Control | 25.6 \pm 1.2 | 28.4 \pm 1.1 | 30.1 \pm 1.3 | 33.1 \pm 1.6 | 34.1 \pm 1.6 |
| 100 | 25.7 \pm 1.0 | 28.3 \pm 1.1 | 29.9 \pm 1.4 | 34.0 \pm 2.5 | 34.2 \pm 2.6 |
| 200 | 25.8 \pm 1.1 | 28.9 \pm 2.0 | 30.0 \pm 2.4 | 34.3 \pm 3.3 | 35.0 \pm 4.1 |

2) 행동실험을 통한 인지능력 향상 효과

(1) 물체인지 실험을 통한 물체 인지능력 향상 효과

Aβ에 의하여 유도된 뇌 손상 모델에 2주간 항암김치 추출물을 위내투여한 후 물체인지 실험을 통해서 기존의 물체가 새로운 물체로 바뀌었을 때 새로운 물체에 대해 탐지 정도가 어느 정도 향상하는지 확인해 보았다. (그림 170). Control군의 경우에는 Aβ에 의한 기억 손상으로 인해 기존의 물체와 새로운 물체를 인지하는 비율이 52.2%와 47.9%로 유사하게 나타나는 경향을 보였다. 그러나 뇌 손상을 받지 않은 normal군은 새로운 물체를 인지하는 비율이 61.1%로 높은 것을 확인할 수 있었고, 항암김치 추출물을 투여한 100, 200군은 각각 59.4%, 61.9%로 새로운 물체에 대한 접촉 빈도가 높은 것을 확인할 수 있었고, 특히 항암김치를 투여한 군은 normal군 수준과 유사한 것을 확인하였다.

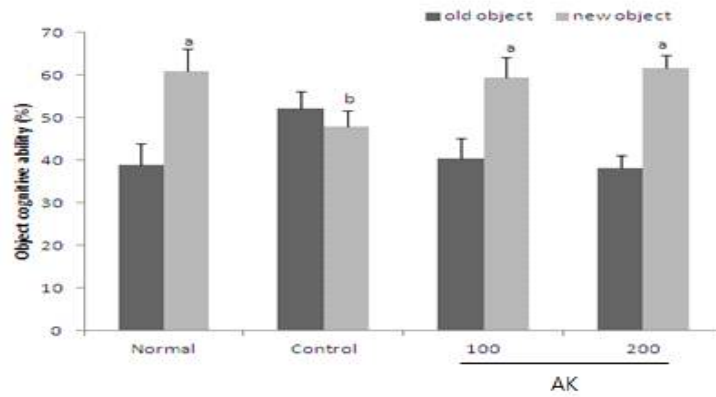


그림 170. 물체 인지 결과값의 백분율 변화 측정

(2) T-maze 실험을 통한 공간 인지능력 향상 효과

또 다른 단기 기억력 측정 실험으로 새로운 길이 나타났을 때에 대한 호기심을 측정하는 실험인 T-maze 실험을 통해 실험을 진행하였다. 새로운 길은 인식하는 비율을 확인해본 결과, normal군은 55.7%였고, control군은 48.2%로 나타났다. 반면 항암김치 추출물을 투여한 100과 200군은 각각 56.0%, 53.8%로 높은 공간인지능력을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (그림 171). 물체인지능력에서 나타난 것과 마찬가지로 항암김치를 투여한 군에서 공간을 인지하는 능력 역시 개선되는 것을 확인할 수 있었다.

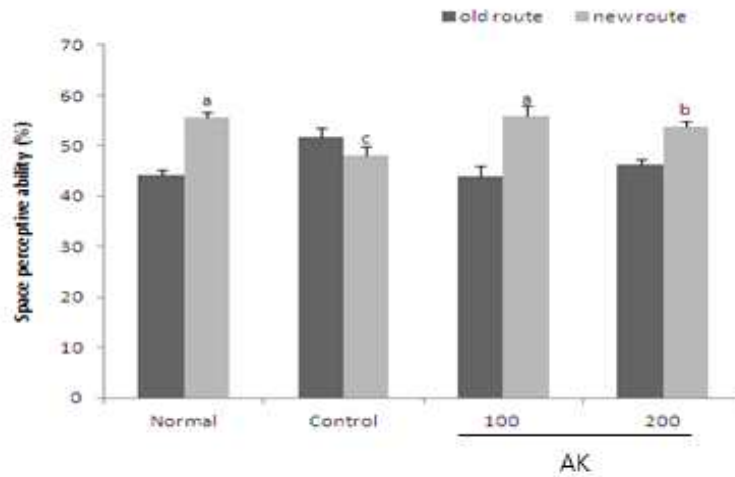


그림 171. T-maze를 통한 공간 인지 능력 측정

(3) Morris water maze 실험을 통한 공간 인지 능력 향상 효과

이전 실험에서 측정한 단순 기억력 증진 효과보다 좀 더 수준이 높은 기억력을 요구하는 수중미로 실험을 통해 향암김치 추출물이 학습과 기억력에 미치는 영향을 확인하였다.

그림 172는 Morris water maze 실험동안에 mice가 도피대에 도달하는 시간의 변화추이를 나타낸 것이다. 훈련 기간이 지남에 따라 도피대에 도달하는 시간이 줄어드는 것을 확인할 수 있었지만, Aβ를 투여한 control군은 도피대에 도달하는 시간 변화 감소의 폭이 가장 적은 것을 확인할 수 있었다. 반면 향암김치 추출물을 투여한 100과 200군에서는 마지막 도피대 도달 시간이 60초 측정 시간 중 20초 정도 만에 도달할 수 있는 것으로 확인되어 normal군과 유사하게 도피대 도달 시간이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 본 실험 결과 1차년도에 실시한 표준김치와 비교하였을 때 향암김치 투여군이 도피대를 찾아 가는 시간이 훨씬 빨라진 것을 확인할 수 있었다.

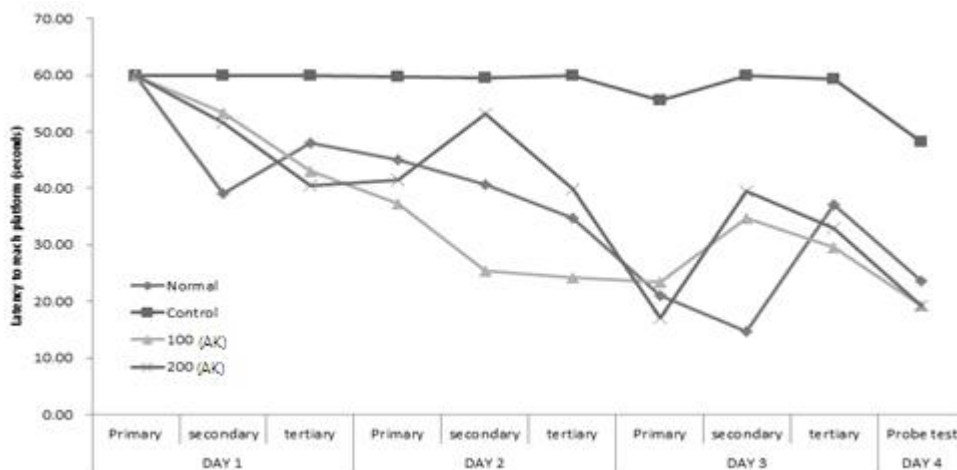


그림 172. Water maze test 기간 동안 mice의 도피대 도달 시간 변화 추이

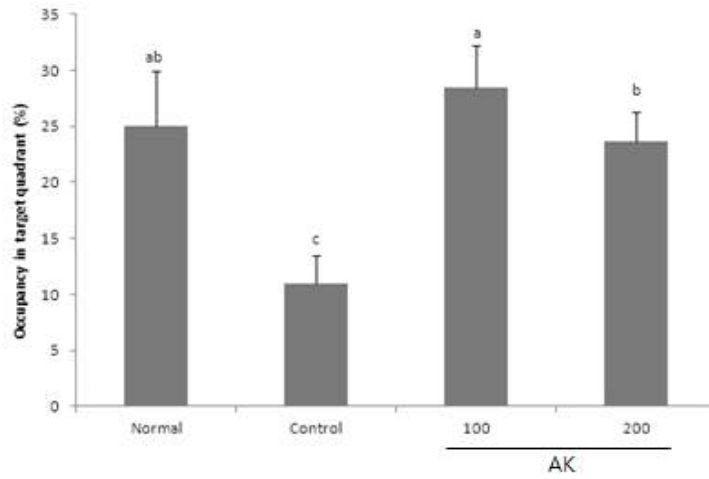


그림 173. 도피대가 있던 사분면에 머무르는 시간 비율 측정

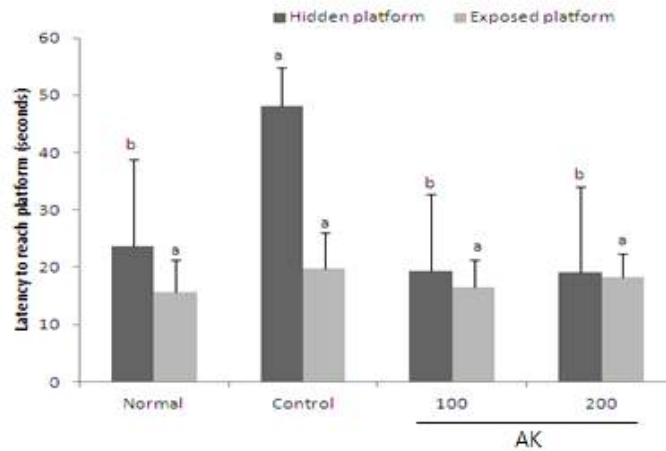


그림 174. 노출된 도피대 및 숨겨진 도피대로의 도달 시간 비교

측정 마지막 날 진행된 실험에서 도피대를 치우고 도피대가 있었던 사분면에 mouse가 머문 시간을 측정하였을 때 (그림 173), Control군이 머문 시간은 11.0%인 반면 100과 200 군에서는 도피대가 있었던 사분면에 머문 시간이 유의적으로 증가하여 28.5%, 23.7%를 나타냈다. 특히 이 역시 항암김치 추출물이 1차년도와 2차년도의 표준김치 추출물 투여군보다 도피대를 기억하고 이를 찾고자 하는 mouse의 특징이 강해진 것을 확인할 수 있었다. 또한 mouse가 기억능력보다 운동능력이나 시각능력으로 인해 도피대를 찾아가는 것인지 확인해 보기 위해 불투명한 물 속에 도피대를 숨겨놓은 상태에서 도피대를 찾아가게 하는 실험과 도피대를 보이도록 설치한 후 도피대를 찾아가도록 실험을 실시하였다. 숨겨진 도피대를 찾아가도록 하였을 때는 normal군 및 항암김치 추출물 투여군은 control군보다 도피대를 찾아가는 시간이 빨랐고, 노출된 도피대를 찾아가도록 하였을 때는 모든 실험군에서

10~20초 내의 빠른 시간에 도피대를 잘 찾아가는 것으로 미루어보아 (그림 174), 운동능력 및 시각적 차이로 도피대를 찾아가는 시간이 차이가 나는 것이 아니라 기억에 의존해 도피대를 찾고자 하는 것임을 확인할 수 있었다. 이상의 실험 결과를 통해 항암 김치 추출물이 인지능력 손상에 대한 보호효과가 있고 특히 항암김치의 투여가 표준김치보다 장기간의 학습과 기억능력에도 효과가 있는 것으로 사료되어 진다.

(4) 뇌 조직의 지질과산화 억제 효과

특히 뇌 조직은 산소 소모량이 높고 산화되기 쉬운 불포화지방산 및 catecholamines 함량이 많은 반면 catalase 및 glutathione peroxidase 등 세포 내 항산화 기전들의 활성이 다른 조직에 비해 낮아서 상대적으로 지질과산화가 쉬운 특성을 지니며 이로 인하여 뇌의 세포손상과 노화에 중요한 역할을 담당한다. 따라서 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유발된 지질과산화에 대한 항암김치의 보호효과를 측정하였다. 뇌에서의 지질과산화 효과를 살펴보면 MDA 수치가 control군 55.1 nmol/mg protein이었고 normal군은 45.8 nmol/mg protein로 $A\beta_{25-35}$ 주입으로 지질과산화가 더 많이 생성됨을 알 수 있었다. 100과 200군에서는 각각 37.7 nmol/mg protein, 37.0 nmol/mg protein의 수치를 확인 할 수 있었고, 시료 투여군에서는 normal군보다 낮은 수치를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 항암김치는 $A\beta_{25-35}$ 에 대하여 뇌에서의 지질과산화에 보호효과가 있음을 확인할 수 있었다 (그림 175).

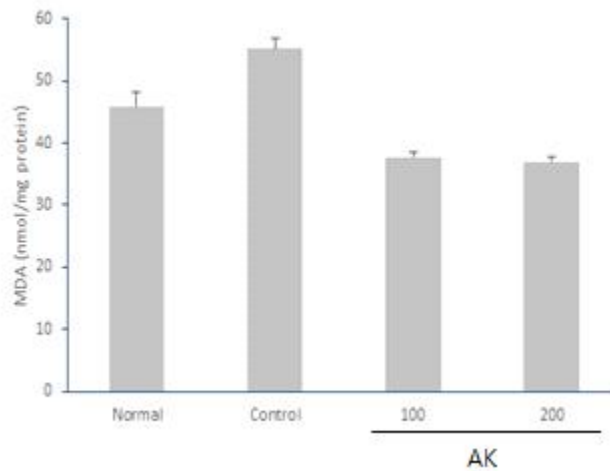


그림 175. 뇌 조직의 지질과산화 억제 효과 측정

4. 연구성과

- 가. 기술적 연구성과 기재
 ○ 연구성과(진수로 표기)

| 구분 | 연구논문 | 학술발표 | 지식재산권 | 기술이전/ 제품화 | 기타 | 계 |
|------|----------------------------|----------------------|-------|--------------|----|----|
| 2차년도 | 13 (SCI(E): 8, KSCI: 5) | 13 (국외: 4, 국내: 9) | 2 | 0 | 5 | 33 |

< 1 세부 >

-연구논문- (SCI(E): 5, KSCI: 2)

- Kun-Young Park, Ji-Kang Jeong, Young-Eun Lee, James W. Daily III. 2014. Health benefits of Kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J Med Food* (SCI). 17: 6-20.
- Guk Heui Jo, Gi-Young Kim, Wun-Jae Kim, Kun-Young Park and Yung Hyun Choi. Sulforaphane induces apoptosis in T24 human urinary bladder cancer cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway: The involvement of endoplasmic reticulum stress and the Nrf2 signaling pathway. *International Journal of Oncology* (2014년 10월 출간 예정)
- Bohkyung Kim, Jia-Le Song, Jae-Hyun Ju, Soon-Ah Kang, and Kun-Young Park. Anticancer Effects of Kimchi at Different Fermentation Time and Ingredients on Human HT-29 Colon Cancer Cells. *Food Sci. Biotechnol* (SCI). 심사중.
- Cui Meizi, Hee-Young Kim, Ji-Kang Jeong, Ji-Hee Hwang, Byung-hee Ryu, Jung-Ho Choi and Kun-Young Park. Anti-Obesity Effects of Kimchi Inoculated with *Leuconostoc mesenteroides* as a Starter in C57BL/6J Mice Fed High-Fat Diet. *Food Sci. Biotechnol* (SCI). 심사중.
- Jeong JW, Jo GH, Kim GY, Kim J, Suh H, Ryu CH, Kim WJ, Park KY and Choi YH. Anti-inflammatory Effects of 3-(4'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl)propionic acid, an Active Component of Korean Cabbage Kimchi, in Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 Microglia. *J Med Food* 심사중.
- 최금혜, 이가영, 봉연주, 정지강, 박건영. 2014. 절임 방법과 소금 종류를 달리하여 제조한 절임 배추의 품질특성 비교. *J Korean Soc Food Sci Nutr* (KSCI). 43: 1036-1041.
- 윤자영, 정지강, 문숙희, 박건영. 2014. 절임 배추와 양념소가 김치 발효에 미치는 영향. *J Korean Soc Food Sci Nutr* (KSCI). 43: 1081-1087.

-학술발표- (국외: 2, 국내: 6)

- Kun-Young Park, Yeon-Ju Bong and Hee-Young Kim. Fermentation Properties and Increased Health Functionality of Kimchi by Kimchi Lactic Acid Bacteria Starters. Experimental Biology 2014. (2014. 04. 26~30, San Diego, USA)
- 초청강의: Kun-Young Park. Health Benefits of Kimchi (Korean Fermented Vegetables) as a Probiotic Food. 일본유산균학회 2014년도 대회 (2014. 7. 17~18, 일본 히로시마시)
- Hee-Young Kim, Jia-Le Song, Ji-Young Lee and Kun-Young Park.. *In vitro* Antioxidative and Anticancer Effects of Isorhamnetin, the Flavonoid Detected from Kimchi. 2013 KFN International Symposium and Annual Meeting (2013. 11. 13~15, 광주)
- Yeon-Ju Bong and Kun-Young Park. Fermentation Properties and Increased Health Functionality of Kimchi by Kimchi Lactic Acid Bacteria Starters. 2013 KFN International Symposium and Annual Meeting (2013. 11. 13~15, 광주)
- 정지강, 윤자영, 김영주, 이경희, 문숙희, 박건영. 김치의 주된 발효에 절임배추와 양념소가 미치는 효과. 2013 KFN International Symposium and Annual Meeting (2013. 11. 13~15, 광주)
- 최금혜, 김소희, 박건영. 소금의 종류를 달리하여 제조한 김치의 품질특성과 기능성. 2013 KFN International Symposium and Annual Meeting (2013. 11. 13~15, 광주)
- Cheol Park, Guk Heui Jo, Jin-Woo Jeong, Gi-Young Kim, Jin-Woo Kim, Hong Suk Juh, Chung Ho Ryu, Wun-Jae Kim, Kun Young Park and Yung Hyun Choi : 7Antiinflammatory Effects of 3-(4'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl)propionic acid, an Active Component of Korean Cabbage Kimchi, in Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 Microglia. 2014 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and the 13th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, 제주 누가빌리지 (2014.06.19.-21)
- Ethanol Extract of Zanthoxylum schinifolium Induce Apoptosis through the Inactivation of PI3K/Akt pathway in 5637 Bladder Carcinoma Cells. 2014년도 한국생명과학회 제55회 정기총회 및 국제학술대회, 부산 해운대 아르피나 (2014.08.28.-29) 발표예정.

-특허- (출원 2)

- 박건영, 봉연주, 정지강, 김희영, 임수복, 최메이지, 이가영. 신규한 스타터 균주 및 이를 이용한 김치를 포함하는 기능성 발효식품의 제조방법 (출원번호: 10-2014-0011377)
- 박건영, 최금혜, 정지강, 최메이지, 이가영. 건염법을 이용한 절임배추 및 그 죽염

절임 배추김치의 제조방법 (출원번호: 10-2014-0067664)

-홍보- (심포지움 2, TV출연 1, 기사 2)

- Plenary lecture: Kun-Young Park. Health Benefits of Kimchi (Korean Fermented Vegetables) as a Probiotic Food. 일본유산균학회 2014년도 대회 (2014. 7. 17~18, 일본 히로시마시)
- 김치와 소금 (부산대 김치연구소 김치 심포지움 개최). 2013. 12. 06. 부산 파라다이스호텔.
- KBS 9시 뉴스 (부산지역방송) 보도. 2013. 12. 06.
- 김치의 혁명 '죽염김치'. 월간 인산의학 2013년 11월호. p. 42-47.
- 김치와 건강, 소금의 역할. 식품저널 2014년 1월호. p. 53.

< 2 세부 >

-연구논문- (SCI(E):1, KSCI: 1)

- Mi Kyung Chung, Jong-Min Park, Young-Min Han, Sung Hun Kwon, Eun Hee Kim, Kun Young Park, Don Haeng Lee, Won Hee Kim and Ki-Baik Hahm, Dietary intervention to prevent *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis and gastric cancer; development of cancer preventive-Kimchi, *HELICOBACTER*. (SCI) 심사중.
- 정미경, 김혜성, 박종민, 김은희, 한영민, 권성훈, 박건영, 함기백, *Helicobacter pylori* 감염과 음식을 통한 치료 접근, Korean Journal of Helicobacter and Upper Gastrointestinal Research. (KSCI) 심사중.

-학술발표- (국외: 1, 국내: 1)

- Mi Kyung Chung, Jong-Min Park, Eun-Hee Kim, Kwang-Hyun Ko, Sung-Pyo Hong, Won-Hee Kim, Kun Young Park, Ki-Baik Hahm, Kimchi prevents *Helicobacter pylori*-induced gastritis and gastric carcinogenesis, 100th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology (2014. 04. 24, Tokyo)
- Mi Kyung Chung, Jong-Min Park, Eun-Hee Kim, Kwang-Hyun Ko, Sung-Pyo Hong, Won-Hee Kim, Kun Young Park, Ki-Baik Hahm, Kimchi prevents *Helicobacter pylori*-induced gastritis and gastric carcinogenesis, The Korean Journal of Gastroenterology (2013. 11. 22, Seoul)

< 3 세부 >

- 연구논문 - (SCI(E): 2, KSCI: 2)

- Boh Kyung Kim, Ji Myung Choi, Soon Ah Kang, Kun Young Park, Eun Ju Cho. Antioxidative effects of kimchi under different fermentation stage on radical-induced oxidative stress. *Nutrition Research and Practice* (SCIE) Accept, 인쇄중.
- Mi-Ja Kim, Eun Ju Cho, Kun-Young Park, Soon Ah Kang. Inhibitory effects in 3T3-L1 differentiation of anticancer kimchi. *Nutrition Research and Practice* (SCIE) 심사중.
- Ji Myung Choi, Soon Ah Kang, Kun Young Park, Eun Ju Cho. Protective effect of kimchi under different fermentation stage from oxidative stress - induced inflammation in C6 glial cell. 한국식품영양과학회지 (KSCD) 심사중.
- 김미자, 김태순, 장기효, 조은주, 박건영, 강순아. 기능성김치의 항산화 활성. 한국식품영양과학회지 (KSCD) 심사중.

- 학술발표 - (국외: 1, 국내: 2)

- Soon Ah Kang, Mi-Ja Kim, Tae-Soon Kim, Ki-Hyo Jang, Eun Ju Cho, Kun-Young Park. Inhibitory effects in 3T3-L1 differentiation of anticancer kimchi. *Experimental Biology* 2014. (2014. 04. 26~30, San Diego, USA)
- Mi-Ja Kim, Dong Sool Yu, Sun Haye Ha, Ji-Hoon Paek, Eun Ju Cho, Kun Young Park, Soon Ah Kang. Effect of Antioxiadant Activity and Anti-obesity Effects in 3T3-L1 Differentiation of Anticancer Kimchi. *Korea Society of Food Science and Technology*. P11-076. (2013. 8. 28~30, Cheonan)
- Ji Myung Choi, Kun Young Park, Soon Ah Kang, Eun Ju Cho. Protective role of Kimchi extract from nitric oxide-induced inflammation in RAW264.7 cell. 2013 KFN International Symposium and Annual Meeting (2013. 11. 13~15, 광주)

<사업화 전략>

본 연구에서 여러 가지(대장암 및 위암을 포함하는 소화기 질환, 비만, 뇌질환 등) 기능성이 증명된 김치를 제조하여 판매하면 우리나라 국민의 건강 증진에 큰 이바지가 될 것으로 생각된다. 최근 우리나라 성인의 암 발생률이 36-38% 정도로 암환자가 점차 증가하고 있다. 통상적으로 섭취하는 김치가 암을 예방하는 효과를 가지고 있지만, 이러한 효과를 더욱 높여 일반인의 암 예방을 도울 뿐 아니라, 김치를 잘 섭취하지 못하는 암환자들이 섭취할 수 있는 김치를 개발하였다는 점에서 상품성이 있을 것으로 보인다. 따라서 김치를 대량 생산할 수 있는 기업에 본 연구에서 확립한 항암김치 제조 레시피를 기술 이전하여 대량 생산이 가능하도록 하여 사업화 할 수 있다. 또한 제품 디자인, 마케팅 등 사업화에 필요한 부분에 대하여 적합한 방법을 모색할 예정이다.

한편, 항암김치에는 30여 가지의 다양한 활성 기능성 물질이 존재하기 때문에 이 지표성분들에 관해 더 연구되어야 하며, 이에 근거하여 표준 규격화 및 기준 시험법 등을 체계적으로

확립할 수 있다.

나. 경제·사회적 연구 성과 기재(정책활용, 홍보, 교육지도 등)

○ 정책활용

김치의 항암, 항산화 효과, 대사증후군 예방 효과 및 메커니즘이 *in vitro*, *in vivo* 및 인체 실험을 통해 밝혀졌기에 농축산식품부 등 국가기관에서 한식세계화를 위한 자료로 직접 이용될수 있음. 또한 SCI 저널 등에 결과물로 발표되므로 김치에 대한 국제적인 과학적 검증은 받게 되므로 국내 또는 국제적으로 김치 홍보에 정책적으로 사용 가능.

TV 또는 신문 등을 통해 건강기능성 김치 제조 방법 및 그 기능이 홍보되므로 김치에 대한 자긍심과 국민 건강 증진에 활용하도록 함. 이는 김치세계화에 중요한 초석이 될 것임.

○ 언론홍보 및 대국민교육

김치가 위암의 원인이 된다는 역학조사도 있었던 바, 김치의 위암 및 대장암 예방 효과에 대한 정확한 메카니즘과 효능을 국민을 대상으로 홍보할 수 있음. 김치의 제조방법에 따라 효능의 차이가 있을 수 있으므로 김치 제조시 사용되는 재료의 선정과 김치 제조법을 대 국민 교육을 행하고 김치의 섭취를 장려시킴으로서 암을 비롯한 질병을 감소시키며 김치를 이용한 암예방을 국민에게 홍보 할 수 있다고 생각됨. 또한 김치의 항산화 효과가 확인되었는데, 항비만, 항노화 효과 특히 인지능력 증진 및 치매 예방에도 김치가 역할을 할 수 있으므로 김치를 많이 먹도록 장려하게 됨. 한국인이 김치에 대한 자긍심과 우수성을 확신할 때 한국을 방문하는 외국인 뿐 아니라 국제적으로도 그 우수성을 알리게 되어 김치 세계화에 큰 역할을 할 수 있으리라고 사료됨.

5. 2차년도 용역연구비 집행내역서

(단위 : 천원)

| 비 목 | 용역연구비 | 계 | 1세부과제 | 2세부과제 | 3세부과제 | 비고 | |
|--------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|
| 인건비 소계 | 48,752.28 | 48,743.97 | 17,078.88 | 10,311.69 | 21,353.4 | | |
| 책임연구원 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 연구원 | 18,504 | 19,025.5 | 7,752 | 3,521.5 | 7,752 | | |
| 연구보조원 | 23,985.48 | 23,930.64 | 9,326.88 | 2,945.16 | 11,658.6 | | |
| 보 조 원 | 6,262.8 | 5,787.83 | 0 | 3,845.03 | 1,942.8 | | |
| 경비소계 | 104,464.51 | 104,464.51 | 25,783.62 | 42,880 | 35,800.89 | | |
| 경비 | 국내여비 | 6,120 | 7,470 | 2,480 | 1,450 | 3,540 | |
| | 국외여비 | 8,600 | 2,656.81 | 0 | 2,656.81 | 0 | |
| | 유인물비 | 1,999 | 1,699 | 899 | 0 | 800 | |
| | 전산처리비 | 1,800 | 1,200 | 600 | 0 | 600 | |
| | 시약 및 재료비 | 77,945.51 | 83,813.7 | 19,204.62 | 38,048.19 | 26,560.89 | |
| | 회의비 | 6,000 | 4,925 | 2,000 | 725 | 2,200 | |
| | 임차료 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | 교통통신비 | 2,000 | 2,700 | 600 | 0 | 2,100 | |
| | 감가상각비 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 일반관리비 | 6,783.21 | 6,783.21 | 2,137.5 | 1,800 | 2,845.71 | | |
| 계 | 160,000 | 159,991.69 | 45,000 | 54,991.69 | 60,000 | | |

6. 중요 연구변경 사항

○ 연구비 사용 비목 변경하였음.

- 제 1세부: 국외여비를 국내여비와 시약 및 재료비로 예산 변경
- 제 2세부: 인건비 세목변경 및 회의비, 국내여비, 국외여비, 유인물비, 전산처리비, 교통통신비를 재료비로 예산변경
- 제 3세부: 국외여비를 국내여비, 유인물비, 교통통신비로 예산 변경

○ 제 2세부에서 예산 사용에 착오가 발생하여, 당초 총 용역연구비 160,000,000 원보다 적은 금액인 159,991,690원을 지출 (총 8,310원이 지출되지 못했음)

○ 3세부과제 학생 연구원인 하선희의 개인사정으로 학업을 중단하게되어 외부연구원인 김명숙 연구원이 참여율을 높여서 추가 학생 연구원 충원 전까지 변경됨(연구원 변경신청서 제출)

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

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