

최 종
연구보고서

미나리 발효액으로부터 간기능 활성화
음료의 개발

Development of a Beverage Stimulating Hepatic
Function from *Oenanthe javanica* Products

주 관 연 구 기 관
전 남 대 학 교

농림수산식품자료실



0016158

농림수산식품부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미나리발효액으로부터 간기능 활성화음료의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 일

주관연구기관명 : 전남대학교
총괄연구책임자 : 박 창 수
세부연구책임자 : 전 우 진
연 구 원 : 황 권 택
연 구 원 : 정 운 재
연 구 원 : 유 양 희
연 구 원 : 최 희 정
연 구 원 : 김 현 지
연 구 원 : 김 은 정
연 구 원 : 강 은 령
협동연구기관명 : 경희대학교
협동연구책임자 : 이 정 민
참 여 기 업 : (주)한 우 물

요 약 문

I. 제 목

미나리발효액으로부터 간기능 활성화음료의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 식품의 약리 기능성 물질 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 허브를 포함한 다양한 유용식물에 대한 관심이 어느 때보다도 높아져 있고, 유용식물을 이용한 신약 개발 및 농업 신소재로 천연물을 이용하려는 노력이 가속화되고 있다.

식품유래의 특정 성분들은 인체의 신경계, 순환계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등 각종 생리기능조절계에 작용하여 직·간접으로 생체조절기능 효과를 나타내므로 이들 특정성분들에 의한 생체조절계 및 생체방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 전인류적 규모의 지속적이고도 가장 자연스러운 건강유지를 위한 강력한 수단이 될 수 있음을 의미한다. 따라서 이들 식품유래의 생체조절기능성 인자들의 작용기구, 작용부위, 구조해석 등의 해명은 대단히 중요하다 하겠으며 이러한 연구들은 하나같이 學際的인 영역의 연계 속에서 가능한 것으로 식품을 통한 건강유지 및 질병예방의 새로운 학술체계의 수립을 의미한다 하겠다.

B형 간염 바이러스는 인체에 특이적으로 감염되는 헤파드나비리대(Hepadnaviridae)계통의 바이러스로서, 세계적으로 약 2억 5천 만명의 인구가 HBV(B형간염)에 감염되어 있다. B형 간염 바이러스는 현재까지 한국 국민의 B형 간염 바이러스 보유율은 8% 정도인데, 이중 15 내지 20% 가 간경변증까지 진행되고 간경변증 환자의 20%정도에서 간암으로 전이되는 것으로 알려져 있으며, 추후 더 이상의 보균자가 발생하지 않더라도 70만명의 간경변증 환자와 14 만명의 간암 환자가 발생할 것으로 추정된다. B형 간염 바이러스의 잠복기는 60 내지 110일 정도이며 다양한 정도의 임상기를 거쳐 90 내지 95%는 완전히 회복된다. 감염에서 회복되지 않는 환자의 경우에는, HBV DNA가 사람 간세포의 게놈 DNA에 동화되어 만성 활동성 간염, 간경변증, 간암 등으로 발전하게 된다. HBV에 의한 만성간염은 다른 질환과 마찬가지로 만성 바이러스 감염증, 임파종 질환 및 만성 신장장애를 일으킨다. 따라서 만성간염은 더욱 강력한 형태의 질환으로 발전하여 결국 환

자를 사망에 까지 이르게 하는 치사율이 매우 높은 질환이다.

미나리는 우리나라 전역에서 자생하고 있으며 중국, 일본 등 아한대에서 열대에 이르는 지역에서 널리 분포하고 식용으로 재배하고 있다. 중국에서는 이미 기원전 2천년 경부터 논미나리, 밭미나리를 재배했다고 알려져 있을 정도로 식품으로서 오랫동안 상용되어진 식물이다. 본 과제에서는 간 기능 개선 및 간염에 효과를 가지는 미나리 함유 유효성분을 건강지향식품화 함으로써 간 이상으로 발생하는 많은 질병의 예방 및 치료에 기여코자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

최종목표를 달성하기 위해 다음과 같이 제 1, 2 세부과제 및 협동과제로 구성하였다.

- 1) 제 1 세부과제: 미나리 발효추출물에서 유효물질/제품의 *in vitro* 활성 측정
 - 미나리 발효추출물/유효성분의 간염억제 및 간 기능 개선에 대한 연구
 - 간염 및 간기능 개선 물질들의 작동 기작의 연구
 - 미나리 추출물에서 독성물질에 대한 연구
 - 미생물 발효를 통한 독성물질의 저감에 대한 연구
 - 미나리 발효추출물의 기능성 증진(다른 화합물과의 상승효과)에 대한 연구

- 2) 제 2 세부과제: 미나리 유효성분의 추출, 발효 및 제품개발에 관한 연구
 - 미나리의 다양한 추출법을 사용, 간 기능 개선 또는 간염 억제 성분의 동정
 - 단일성분, 복합성분의 정제, 동정
 - 추출조건의 최적화 연구
 - 발효 미생물의 선정 및 발효조건의 확립
 - 공업적 생산 최적화 연구
 - 기업과 공동으로 발효액에 대한 기호도에 대한 조사
 - 다양한 형태의 응용제품개발

- 3) 협동과제: 미나리에서 간활성 유효물질/제품의 간기능 활성화에 대한 전임상
 - 추출물 또는 발효물의 간염 및 간기능 개선에 대한 *in vivo* 동물 실험
 - 간염 및 간독성 유발물질에 대한 억제 연구
 - 미나리 추출물의 독성 연구(생존율, LD₅₀)
 - 추출물 또는 발효물의 간독성 시험(생리학적, 면역학적 시험)

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1) 제 1 세부과제: 미나리 발효추출물에서 유효물질/제품의 *in vitro* 활성 측정

본 연구는 미나리의 간기능 개선 효과의 기작을 *in vitro* 실험계에서 규명하는데 초점을 두었다. 우선 제 2세부과제와의 효율적인 관계 형성을 통해 제 2세부과제에서 추출 분획한 물질을 대상으로 실험하였으며 기작 규명을 위해서 B형 간염 바이러스 모델인 HepG2.2.15 간세포주를 사용하였다. 미나리를 대상으로 4가지 용매(Hot-, Cold-water, Ethanol, Methanol)를 사용하여 추출된 분획을 세포독성 검정을 하였는데 본 실험에서 효과가 나타난 ethanol fraction(OJE)의 경우 600 ug/ml의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. 하지만 1000 ug/ml의 농도에서 약 34%의 세포독성이 나타나는 것을 확인하였다. 이 data를 바탕으로 HepG2.2.15 세포로부터 항염증작용을 나타내는 기작을 규명하기 위해 proinflammatory cytokines, NF-kB 활성, virus DNA replication, HBsAg/HBeAg등을 측정한 결과 미나리 추출물은 NF-kB transcription factor의 신호전달체계를 억제하는데 I-kBa의 분해를 억제하여 p65 subunit의 핵으로의 전사를 억제함으로써 염증유발 cytokines의 DNA 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 B형 간염 virus DNA의 replication을 억제하여 viral particle의 형성을 저해하였고 또한 DNA의 발현을 억제함으로써 간염 전파의 원인으로 알려져 있는 HBeAg/HBsAg의 발현 저해하였다. 또한 감염된 세포의 Bax/Bcl-2 ratio를 변화시켜 apoptosis를 유도하는 것으로 나타났다. 이것을 바탕으로 chloroform과 ethyl acetate 층을 대상으로 추가 실험을 하였는데 모두 유사한 결과를 얻었으나 chloroform 층에서 다소 높게 활성이 나타났다. 제 2 세부과제에서 추출물의 활성 성분을 분리한 결과 caffeic acid로 동정되었는데 caffeic acid 5 ug/ml 농도에서 proinflammatory cytokines의 유리를 억제하는 것으로 확인되었고 향후 제품화의 측면에서 보조적인 자료로 활용하기 위해 기존의 간염치료제와의 상승작용을 확인하였다. caffeic acid를 vitamin C와 동시처리하였을 경우 유의적인 효과를 얻지 못하였는데 이것은 caffeic acid의 항산화력이 vitamin C의 효과를 뛰어넘어 서로에게 상승효과를 가져오지 못한 것으로 생각되며 특히 항산화 작용 방식이 유사하여 협조적인 상승효과 또한 얻지 못한 것으로 생각된다. 하지만 lamivudine을 caffeic acid와 사용한 결과 효과적인 상승효과를 확인하였는데 본 실험에서도 확인된 바와 마찬가지로 미나리추출물이 virus DNA replication을 억제한 것을 볼 때 lamivudine의 역전사 억제효과를 효율적으로 지원하여 상호작용하였으리라 생각된다.

본 연구의 결과로부터, 미나리 추출물과 분리동정된 caffeic acid는 NF-kB 신호전달체계를 억제함을 통해 간염의 진행을 효과적으로 억제할 것으로 여겨지며 또한 virus DNA replication을 억제하여 virus의 활성을 저해하는 효과 또한 있는 것

으로 여겨지며 기존에 임상적으로 사용되고 있는 간염치료제와 더불어 보조적인 역할을 담당할 수 있는 제품 개발을 기대하게 된다.

2) 제 2 세부과제: 미나리 유효성분의 추출, 발효 및 제품개발에 관한 연구

본 연구는 화순에서 생육되는 미나리(*Oenanthe javanica* DC.)를 이용하여 간 기능 개선 물질을 동정내고, 그 활성을 확인함과 아울러 건강지향제품으로의 시제품화에 초점을 두었다. 미나리를 대상으로 4가지 용매(Hot-, Cold-water, Ethanol, Methanol)를 사용하여 추출을 실시하였고, 그 중 에탄올 추출물이 가장 많은 페놀성 화합물을 함유하고 있으며, 가장 높은 항산화 활성을 보유하고 있음을 확인하였다. 미나리 ethanol 추출물(OJE)은 추출물의 극성에 따라 hexane, chloroform, ethyl acetate, water순으로 분획한 후 DPPH radical 과 super oxide anion radical 소거실험을 실시한 결과, 가장 높은 활성을 보인 ethyl acetate (OJE-E) 층을 대상으로 thin layer chromatography를 실시하여 높은 항산화 활성을 나타낸 밴드를 확인하고 HPLC로 분리하였다. 미나리의 활성물질은 caffeic acid [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid] 로 확인되었으며, caffeic acid 는 항산화 활성을 가진 물질의 하나로 커피콩, 감자, 채소 등에도 들어있는 것으로 알려져 있다. Caffeic acid 의 간 기능 개선효과를 알아보기 위해 HepG2 세포를 이용하여 *in vitro* assay 를 수행하였다. 세포생존 정도를 측정하기 위해 XTT assay를 수행한 결과 caffeic acid(30-50 ug/mL)를 처리한 세포는 활성산소의 하나인 H₂O₂ 처리에 의한 세포 독성을 유의적으로 억제 하였으며, ROS 농도가 현저히 저하되었다. 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여, MDA, GSH 함량과 SOD, GPx, Catalase, GST활성을 측정하였다. 무처리 대조군과 H₂O₂ 만 처리한 군(HPO), caffeic acid 20 ug/mL 과 H₂O₂ 를 처리한 군(CAL) 그리고 caffeic acid 50 ug/mL 과 H₂O₂ 를 처리한 군(CAH)으로 나누어 실험하였다. 지질 과산화물인 MDA는 H₂O₂ 만을 처리한 HPO 군에서는 다른 실험군 들에 비하여 유의하게 증가하였으며 대조군과 caffeic acid 를 처리한 후 H₂O₂를 처리한 군(CAL, CAH) 간에는 유의차가 없었다. GSH 함량과 SOD, GPx, Catalase, GST 활성은 H₂O₂ 만을 처리한 HPO 군에서는 유의하게 낮은 활성을 보였고, Caffeic acid를 전처리 한 군은 대조군과 유의한 차이가 없었다. 이와 같은 결과는 caffeic acid의 처리가 세포의 산화적 스트레스를 억제하고 있음을 시사한다.

위와 같은 결과를 토대로 동물 실험을 진행하기 위하여, 24마리의 8주령 수컷 rat을 대상으로 *in vivo* assay 를 수행하였다. Caffeic acid(10 mg/kg, 40 mg/kg)를 2주 동안 경구 투여하였으며, 마지막 투여 세 시간 후 CCl₄ 를 경구 투여하여 간독성을 유발시켰다. Rat 에서 수집한 혈액 분석 결과, CCl₄ 만 투여한 Rat 에서는 간

독성 지표인 GOT 와 GPT 수치가 증가하였고 CCl₄ 투여 전 caffeic acid를 경구 투여한 rat 에서는 그 수치가 유의적으로 감소하였으며, 세포 괴사도 감소하였다. Rat의 간과 신장을 균질화 한 후 MDA, GSH 함량과 SOD, GPx, catalase, GST 활성을 측정하여 본 결과, MDA 함량은 CCl₄ 만 처리한 군에서 유의적으로 증가하였으며, GSH 함량과 SOD, GPx, catalase, GST 활성은 유의적으로 낮게 나타났다. 그러나 CCl₄ 투여 전caffeic acid 를 경구 투여한 rat 에서는 이 같은 효과가 보이지 않았으며, 대조군과의 유의차가 없었다.

본 연구의 결과로부터, 미나리로부터 분리된 caffeic acid는 산화적 손상으로부터 세포를 보호하며, CCl₄ 투여로 인해 발생하는 간독성에 대한 억제효과를 갖고 있음을 확인하였다. 따라서, 미나리 에탄올 추출물 또는 이로부터 분리된caffeic acid는 간 기능 개선용 건강지향제품으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

연구를 통하여 미나리 간독성 가능성을 완화시키는 목적으로 발효를 선택하여 기능성향상을 목표로 하였다. 그러나 실험에서 미나리추출물과 발효추출물의 여러 실험을 통한 간보호 활성에 대한 유의적 차이가 없었고 독성자체도 없어 발효보다는 경제성에 의거 직접추출물로 제품화를 하였다. 전체적인 기호도를 고려하여 탄산음료와 이온음료형태로 제제를 하였으며 미나리의 향취가 비교적 강하여 저가이지만 높은 기능성을 위하여 많은 양을 넣지 못하였고 일반 음료의 형태를 빌어 이용성을 높이고자 하였다.

3) 협동과제: 미나리에서 간 활성 유효물질/제품의 간기능 활성화에 대한 전임상

본 연구는 미나리 추출물의 in vivo 생쥐 실험계에서 간 기능개선 효능을 확인하고 추출물과 발효액의 안전성을 확보하는데 초점을 두었다. 미나리 추출물과 분획의 동물독성확인을 위해 ICR mouse를 사용하였고 간염유발에 따른 면역학적 지표와 안전성을 측정하기 위해서는 balb/c mouse를 사용하였다. 먼저 6주령된 ICR mouse 24마리를 4 groups으로 구분하여 0, 1, 2, 5 g/kg 농도를 매일 경구 투여하여 4주동안 미나리 추출물의 독성을 확인한 결과 단 한 마리의 mouse도 죽지않았으므로 일반적인 투여농도에서는 전혀 문제가 되지 않는 것으로 확인하였다. mouse의 장기 및 splenocyte를 통해 염증유발 cytokines을 확인한 결과 면역학적으로도 독성이 나타나지 않았다. 간의 vitamin E의 함량 및 지질산화도를 확인 한 결과도 미나리 추출물의 투여(5g/kg)는 vitamin E의 간보유율을 증대시켰는데 이것은 간과 혈중 산화적스트레스를 미나리 추출물이 완화시킴으로 간에 존재하는 vitamin E의 소비를 억제한 것으로 생각된다. 이것은 lipid peroxidation 결과와 비교해 봐도 일치하는 것으로 미나리 추출물이 간 지질 산화를 억제하는 것으로 나타났다.

간기능 개선을 위해 ConA로 간염을 유발시킨 balb/c mouse에서 면역학적인 지표를 측정하였는데 혈중 PGE2 농도 및 염증관련 cytokines(IL-1b, TNF-a)의 유리를 미나리 추출물이 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 과도한 cytotoxic T 세포의 활성을 정상화 시켜 비정상적인 apoptosis를 억제한 것으로 결과를 얻었다. 하지만 NK 세포에 대한 효과는 확인되지 않았다. 미나리 발효액의 안전성을 확인하기 위해 6주령된 balb/c mouse 24마리를 구입하여 매일 1ml의 발효원액을 4주간 경구 투여 하였다. 발효액의 장기적인 투여는 생리학적/면역학적인 지표에 변화를 가져오지 않았으며 따라서 동물전임상에서는 안전한 것으로 나타났다. ConA로 간염을 유발시킨 쥐에서는 발효액의 투여가 간염의 증상을 다소 감소시키는 것을 확인하였으나 기대했던 만큼 큰 차이는 나타내지 않았다.

본 연구의 결과로부터, 미나리 추출물과 발효액은 전임상 단계에서 매우 안전한 것으로 생리학적/면역학적 지표에 의해 확인 하였으며 장기적인 투여는 ConA로 유발된 간염모델에서 부분적인 효과를 나타내었으므로 기존의 미나리 섭취가 독성으로 인해 간손상을 유발할 수도 있다는 일설에 대해 미나리 제품의 안전성을 확보하였다고 생각되며 또한 발효액도 독성이 나타나지 않았으므로 향후 미나리 관련 제품의 판매 확보와 발효액을 이용한 새로운 제품의 개발이 기대된다.

SUMMARY

I. Title

Development of functional drinks from *Oenanthe javanica* Dc. to enhance hepatic protection

II. Objectives and Significance

Oenanthe javanica Dc. (OJ) is a perennial herb which mostly grows on a dam ground or a streamside and also it is a natural product that was widely used as a medicinal food to treat for jaundice, hypertension, and liver diseases in traditional way. The purpose of the study is to develop the functional food or drinks to enhance hepatic protection from hepatitis or else, to define its action mode for safety purpose, and to accumulate database to help the industrialization in both *in vitro* and *in vivo*.

III. Research Summary

The present study was conducted to investigate the hepatoprotective effects of *Oenanthe javanica* DC. (OJ) against oxidative stress in two experimental models, hepG2 cells for *in vitro* and rats for *in vivo*. The OJ was extracted by hot water (OJH), cold water (OJC), 80% EtOH (OJE) and MeOH (OJM). Of four extracts, OJE contained the relatively large phenolic compound. It also exhibited the high DPPH radical- and superoxide anion radical- scavenging activities with the inhibition of lipid peroxidation. To determine the *in vitro* hepatoprotective effects of OJE and OJH, they were treated to HepG2 cells in the presence of H₂O₂. Compared to the cells with the treatment of OJH, OJE treated cells showed the high viability, suggesting OJE as a better hepatoprotectant. Since OJE had the high hepatoprotective potential, it was further fractionated by partitioning with n-hexane (OJE-H), chloroform (OJE-C), ethyl acetate (OJE-E) and water (OJE-W). In this stage, OJE-E showed the highest amount of phenolic compound and the strongest

antioxidative activities among the other fractions. The fact that OJE and OJE-E revealed the high antioxidant activities, indicates that they have a high concentration of phenolic compounds, which are responsible for their high antioxidant activities. Also, OJE-E exhibited the protective effect against oxidative stress induced by 2mM H₂O₂ in HepG2 cells. Therefore, OJE-E was employed to the next study for the purification of hepatoprotectant by TLC and HPLC.

In determining an action mode of OJE in molecular and cellular basis, HepG2.2.15 cell line was employed, which is transfected by hepatitis B virus (HBV) genome. Cytotoxic level of OJE was determined by MTT assay; then EC₅₀ was determined as 1750 ug/ml of OJE-E. The proinflammatory cytokine(IL-1b and TNF-a) production was reduced to the control level by treatment of 600 ug/ml. The induction of COX-2 was inhibited by OJE treatment in a dose-dependent manner. At the same line, PGE2 level was also reduced by OJE treatment in a dose-dependent manner. Determined by luciferase assay, both NF-kB and AP-1 transcriptional expression induced by LPS was reduced to control level at 600 ug/ml. The degradation of ikBa was blocked by treatment fo 600 ug/ml OJE. These findings suggest that OJE could down-regulate inflammation reaction by inhibiting both NF-kB and AP-1 transcriptional factors, implying that OJE may inhibit inflammation process in hepatitis B virus (HBV)-infected liver cells. Although OJ has been long used for treatment of hepatic disease such as hepatitis and liver cirrhosis, there are reports in controversy referring that it has no effect or aggravate the symptom of hepatic diseases. Thus, in current study, we have evaluated anti-viral effect of OJE in HepG2.2.15 cells. The extracellular secretion of HBeAg and HBsAg from HepG2.2.15 cell was decreased at 600 ug/ml of OJE, indicating that it has blocked the viral expression, evidenced by mRNA level.

in vivo animal study, the immunological and biochemical parameters were applied to ensure the safety of OJE. In survival test, ICR mice have been survived for 4 weeks with 5g/kg/day OJE through oral administration. The function of spleen and liver was same as control, which OJE in long-term treatment would not cause any toxicity at least in animal study. In ConA-induced hepatitis model with balb/c mouse, OJE consumption for 4 weeks showed the reduction in plasma TNF-a, IL-1b, PGE2, and lipid

peroxidation. Consumption of fermented OJ has also revealed no harmful effect on biochemical and immunological parameters. It showed the synergistical effect with vitamin E consumption to remove oxidative stress, but it has no synergistically effect on alleviating inflammation with lamivudine in combination. Based on these results, at least in animal model, it has been demonstrated that OJ extract and its fraction could be used as a functional food to help reduce inflammation reaction in liver.

The hepatoprotectant from OJ was identified as caffeic acid (CA). Caffeic acid [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid], which is a hydroxycinnamic acid derivative, is one of the antioxidative compounds in various agriculture products such as coffee beans, potatoes, grains and vegetables. To determine the antioxidant activities of CA, the DPPH radical- and superoxide anion radical-scavenging activities and the TBARS generation inhibitory activities were examined. In DPPH radical scavenging activity assay, IC_{50} was 5.35 $\mu\text{g/mL}$, and the inhibitory effects on TBARS generation was 76.8% at a dose of 80 $\mu\text{g/mL}$. To investigate the hepatoprotective effects of CA, assays for the H_2O_2 -induced cytotoxicity and the formation of intracellular reactive oxygen species were performed in HepG2 cells. The pretreatment for 24 h with 30~50 $\mu\text{g/mL}$ of CA completely prevented the oxidative stress induced by H_2O_2 . Also, less reactive oxygen species were intracellularly formed with the treatment of CA. When CA was treated in HepG2 cells, the changes in enzymatic antioxidative activities such as superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione-S-transferase (GST), and glutathione peroxidase (GSH-Px) and non-enzymatic antioxidative activities such as glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) were examined. The cells were divided into 4 groups; i) control, ii) 2 mM H_2O_2 , and iii) 2mM H_2O_2 plus 10 $\mu\text{g/mL}$ of CA, and iv) 2 mM H_2O_2 plus 40 $\mu\text{g/mL}$ of CA. The activities of SOD, catalase, GST, GSH-Px and GSH levels in the H_2O_2 group were significantly lower than those of the control group, while H_2O_2 plus CA group stimulated the hepatic enzyme activities and GSH level. The level of MDA which had been increased by H_2O_2 were markedly decreased in the CA pre-treated group.

From these results, we recognized that CA might be considered as a useful agent in the prevention of various liver injuries induced by oxidative stress. Therefore, the capability of CA to protect against CCl_4 -induced hepatotoxicity

and oxidative stress was investigated in rats. In this study, the model of CCl₄-induced acute hepatotoxicity in rats, was employed because this chemical is a potent hepatotoxin and a single exposure can rapidly lead to severe hepatic necrosis and steatosis. As expected, a single oral dose of CCl₄ at 1.25 mL/kg showed the significant hepatotoxicity, as evidenced by a dramatic elevation in the serum GOT and GPT activities and an increased incidence and severity of histopathological hepatic lesions in rats. In addition, CCl₄ treatment produced high levels of oxidative damage, as evidenced by a significant elevation in hepatic MDA level and a significant decrease in GSH concentration and catalase, SOD, GST, and GPx activities, which suggest a role of oxidative stress in CCl₄ hepatotoxicity. However, pre-treatment with CA showed a significant protective effect against CCl₄-induced acute hepatotoxicity and oxidative stress in rats. A single oral dose of CCl₄ at 1.25 mL/kg resulted in a significant increase in the hepatic MDA concentration, indicating increased lipid peroxidation caused by administration of CCl₄. The significant decrease in the hepatic MDA concentration confirms that pretreatment with CA could effectively protect against the hepatic lipid peroxidation induced by CCl₄.

These results indicated that CA from OJ had protective action against H₂O₂-induced hepatotoxicity *in vitro* and CCl₄-induced hepatotoxicity *in vivo*, indicating CA as a useful hepatoprotectant against various liver diseases induced by oxidative stress.

Based upon these results, the ethanolic extract from *O. javanica* DC. were further utilized as the industrial point. The industrial-based extraction and purification procedure was established, and then the drink containing the hepatotactant from *O. javanica* DC. was produced.

TABLE OF CONTENTS

Cover Letter	i
Summary (Korean)	ii
Summary (English)	ix
Table of Contents (English)	xi
Table of Contents (Korean)	xv
Part I. Outline of Research and Development	1
Chapter 1. The Purpose of Research and Development	1
Chapter 2. The Need for Research and Development	2
Chapter 3. The Scope of Research and Development	3
Part II. State-Of-The-Art	4
Part III. Results of Research and Development	9
Chapter 1. <i>In vitro</i> Evaluation of Hepato-Bioactives from <i>O. javanica</i> DC.	9
1. Materials and Methods	9
1) Sample	9
2) Experimental Approach	9
2. Results	B
1) Antioxidative effect of OJ and free radical removal	3
2) <i>in vitro</i> inhibitory effect of OJ on oxidative stress	9
3) Antiinflammatory effect of OJ in HepG2.2.15 cell	52
4) Inhibitory effect of OJ on HBV replication	B
5) Apoptotic effect of OJ in HepG2.2.15 cell	33
6) Antiinflammatory effect of OJE-CF in HepG2.2.15 cell	53

7) Inhibitory effect of OJE–CF on HBV replication	14
8) Synergistic effect of caffeic acid in combination in HepG2.2.15 cell	34

Chapter 2. Isolation and Fermentation of Hepato–Bioactives from *O. javanica* DC. and Its Product Development

1. Materials and Methods	4
1) Sample	4
2) Experimental Approach	4
2. Results	5
1) Analyses of Constituents in <i>O. javanica</i> DC.	5
2) Optimization of Extraction Condition by Solvents	5
3) Optimization of Extraction Condition by Number of Times	4
4) Optimization of Extraction Condition by Methods	5
5) Large Scale Extraction	5
6) <i>In vitro</i> Hepatoprotective Effects of Various Extracts	6
7) Ultrafiltration of Extract from <i>O. javanica</i> DC.	8
8) Solvent Partitioning of Extract from <i>O. javanica</i> DC.	9
9) Isolation of Active Compound	6
10) Structural Analysis and Characterization of Purified Compound	6
11) <i>In vitro</i> Hepatoprotective Effects of Purified Compound	17
12) Optimization of Industrial–Based Extraction	37
13) Industrial–Based Purification	47
14) Product Development and Its Stabilization	5
15) Selection and purification of fermentative bacteria	67
16) Manufacturing prototype and stability test	9

Chapter 3. *In vivo* Evaluation of Hepato–Bioactives from *O. javanica* DC

1. Materials and Methods	8
1) Sample	8
2) Experimental Approach	8
2. Results	9
1) Antiinflammatory effect of OJE in mouse RAW264.7 cells	19
2) Evaluation of OJE for safety	8

3) Evaluation of OJE fraction for safety	101
4) Evaluation of fermented OJ for safety	108
5) Synergistic effect of caffeic acid with other compounds	11
6) <i>in vivo</i> toxicity test of OJ functional fraction	118
7) <i>in vivo</i> hepatic protection effect of OJ functional fraction	118
Part IV. Achievements and Contribution to Related-Field	117
Part V. Application Plan of Obtained Results	130
Part VI. Oversea Technical Information Collected during the Research	132
Part VII. References	134
APPENDIX	
1. Publications	140
2. Patents	142

목 차

제출문	i
요약문(한글)	i
요약문(영어)	ix
목 차(한글)	xi
목 차(영어)	xv
제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구개발의 목적	1
제 2 절 연구개발의 필요성	2
제 1 항 기술적 측면	2
제 2 항 경제·산업적 측면	2
제 3 항 사회·문화적 측면	3
제 3 절 연구개발의 범위	3
제 1 항 미나리 발효추출물에서 유효물질/제품의 <i>in vitro</i> 활성 측정	3
제 2 항 미나리 유효성분의 추출, 발효 및 제품개발에 관한 연구	3
제 3 항 미나리에서 간활성 유효물질/제품의 간기능 활성화에 대한 전임상	3
제 2 장 국내외 기술개발 현황	4
제 1 절 해외의 일반 간염연구 현황	4
제 2 절 국내의 일반 간염연구 현황	5
제 3 절 생약성분의 간염억제 연구동향	7
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	9
제 1 절 미나리 발효추출물에서 유효물질/ <i>in vitro</i> 활성 측정	9
제 1 항 재료 및 방법	9

가. 재료	9
나. 실험방법	9
1) 시료의 항산화 활성	9
2) HepG2 세포에서의 항산화능 측정	10
3) HepG2 세포에서의 MDA 함량 변화 측정	10
4) cytotoxicity 유무는 <i>in vitro</i> test에서 규명	10
5) B형 간염 표면항원에 대한 억제 정도 분석	11
6) 미나리 발효추출물의 항바이러스 작용을 보기 위하여 HBV-DNA 복제 copy number 검색법	11
7) DNA fragmentation assay과 anti-apoptotic 단백질의 발현 측정	11
8) 염증 관련 사이토카인의 생성에 미치는 영향 분석	12
9) NF- κ B의 활성화 측정	12
제 2 항 결 과	13
가. 미나리 추출물 및 간 기능 개선 유용 성분의 항산화 및 free radical 소거능 측정	13
1) 미나리 추출물 및 간 기능 개선 유용 성분의 지질과산화 억제능 측정	13
2) 미나리 추출물 및 간 기능 개선 유용 성분의 DPPH radical 소거능 측정	15
3) 미나리 추출물 및 간 기능 개선 유용 성분의 superoxide anion-radical 소거능 측정	17
나. 미나리 함유 간 기능 향상 유용성분의 <i>in vitro</i> 상에서의 산화적 스트레스 억제효과	19
1) Catalase 활성	19
2) Superoxide Dismutase 활성	20
3) Glutathione-S-transferase	22
4) Glutathione Peroxidase	22
5) Glutathione	23
6) Malondealdehyde	24
다. 미나리 추출물의 HepG2.2.15 간염세포계에서의 항염증효과 측정	25
1) MTT 독성 test	25
2) LPS 로 유도된 HepG2.2.15 세포에서의 proinflammatory cytokine의 발현 억제 측정	26
3) PGE ₂ 의 발현 억제 측정	28
4) OJE 의 COX-2 의 발현 억제 측정	28
5) NF- κ B 와 AP-1 transcription factor의 활성화 및 신호전달체계 억제 효과 측정	29
6) OJE에 의한 I- κ Ba degradation 억제 측정	33

라. 미나리 추출물의 HBV replication 억제효과 측정	31
1) OJE의 HBsAg과 HBeAg의 발현 억제 측정	31
2) OJE에 의한 HBV mRNA 발현 억제 효과 측정	33
마. 미나리 추출물의 간염세포계에서의 apoptosis 효과	33
1) DNA fragmentation assay 측정	33
2) Bcl-2/Bax의 발현 측정	34
바. 클로로포름 분획의 human HepG2.2.15 간염세포계에서의 항염증 효과 측정	35
1) MTT 독성 test	35
2) LPS/PMA 로 유도된 HepG2.2.15 세포에서의 proinflammatory cytokine의 발현 억제 측정	36
3) PGE ₂ 의 발현 억제 측정	38
4) 클로로포름 분획 의 COX-2 의 발현 억제 측정	9
5) NF- κ B 와 AP-1 transcription factor의 활성화 및 신호전달체계 억제 효과 측정	39
6) 클로로포름 분획에 의한 I- κ Ba degradation 억제 측정	41
사. 클로로포름 분획의 HBV replication 억제효과 측정	41
1) OJE의 HBsAg과 HBeAg의 발현 억제 측정	41
2) 클로로포름 분획에 의한 HBV mRNA 발현 억제 효과 측정	43
아. HepG2.2.15 세포에서 caffeic acid와 다른 화합물과의 상승효과 연구	44
1) PGE ₂ 발현 억제에 미치는 영향	44
2) proinflammatory cytokines의 발현에 미치는 caffeic acid와 다른 화합물과 의 상승효과	44
제 2 절 미나리 유효성분의 추출, 발효 및 제품개발에 관한 연구	46
제 1 항 재료 및 방법	46
가. 재료	46
나. 실험방법	46
1) HepG2 세포주 배양	46
2) 미나리 추출물 조제	46
3) 활성물질의 분획	46
4) Silica gel 60에 의한 Prep. TLC	47
5) HPLC	48
6) IR spectroscopy	48
7) FAB mass spectroscopy	48
8) Nuclear magnetic resonance spectroscopy	48
9) 일반성분 분석	48
10) 총 폴리페놀 함량	48

11) 총 플라보노이드 함량	49
12) DPPH radicals 소거능	49
13) Superoxide anion radical 소거능	49
14) 지질과산화 억제능	49
15) 세포독성	50
16) 간 기능 향상능 측정	50
17) 미나리 함유 간 기능 개선 유용물질의 공업적 추출방법	50
18) 미나리 함유 간 기능 개선 유용물질의 공업적 수준에서의 분리 및 정제	50
19) 당액추출물로부터 발효미생물의 선별과 동정	51
20) 선별 미생물을 이용한 미나리발효액으로 유효성분의 추출과 간보호 활성의 비교	51
21) 산업적 순도수준의 정제물질에 대한 소재화 적성 검토 및 시제품 제작	51
제 2 항 결과	52
가. 미나리의 성분분석	52
나. 용매별 추출조건의 최적화	53
다. 추출횟수별 추출조건의 최적화	54
라. 추출방법에 따른 추출조건의 최적화	55
마. 대량 추출방법의 확립	56
바. 추출물별 <i>in vitro</i> 간 기능 개선 효과 비교	56
사. 미나리 추출물의 한외여과	58
아. 미나리 추출물의 용매별 분리	59
자. 활성물질의 분리	63
차. 정제물질의 구조분석 및 물리화학적 성질	66
카. 미나리 함유 유용성분의 <i>in vitro</i> 간기능 개선 효과 측정	71
타. 미나리 함유 간 기능 개선 유용물질의 공업적 추출조건의 최적화	73
파. 미나리 함유 간 기능 개선 물질의 공업적 수준에서의 분리 및 정제	74
하. 당액추출물로부터 발효미생물의 선별과 동정	75
가. 선별 미생물을 이용한 미나리발효액으로 유효성분의 추출과 간보호 활성의 비교	76
나. 건강지향식품으로의 시제품 제작 및 안정성 검사	79
제 3 절 미나리에서 간활성 유효물질/제품의 간기능 활성화에 대한 전임상 연구	83
제 1 항 재료 및 방법	83
가. 재료	83
나. 실험 방법	83
1) cytokines의 측정	8

2) 치사량 (LD ₅₀) 측정 test	48
3) 수명연장효과 (survival test)의 검증	48
4) 미나리의 간염활성추출물의 NK cell 활성화에 미치는 영향성 측정	48
5) T 세포와 B 세포의 증식능력(mitogenesis) 측정	48
6) Th1/Th2 type cytokines 의 분비능력 측정	48
7) 간조직의 lipid peroxidation 측정	48
8) 간조직의 vitamin E 량의 측정	48
9) GOT, GOP 및 혈중 지질의 측정	48
10) PBMC의 산화적 스트레스 측정	48
11) cytotoxic T(Tc) cell의 활성화 측정	48
12) MTT assay	48
13) <i>In vivo</i> 상에서 미나리 간 기능 개선 유용성분의 독성평가	48
14) <i>In vivo</i> 상에서 미나리 간 기능 개선 유용물질의 유효성 평가	48
제 2 항 실험 결과	91
가. 미나리 추출물의 mouse RAW264.7 macrophage cell line에서의 항염증 효과 측정	91
1) MTT 독성 test	91
2) lipopolysaccharide(LPS) 유도된 RAW264.7 세포에서의 TNF- α 의 발현 억제 측정	92
3) OJE의 PGE ₂ 의 발현 억제 측정	92
4) OJE 의 COX-2 의 발현 억제 측정	93
5) NF- κ B 와 AP-1 transcription factor의 활성화 및 신호전달체계 억제 효과 측정	94
6) OJE에 의한 I- κ Ba degradation 억제 측정	94
나. 미나리 추출물의 안전성 평가	96
1) 미나리 추출물 (OJE)의 독성 및 LD ₅₀ 의 결정	96
2) 장기 조직의 무게 측정	98
3) 염증 관련 cytokines의 측정	98
4) 독성 T 세포 (Tc)의 활성화 측정	101
5) SOD와 Catalase의 측정	101
6) NK 세포의 활성화 측정	102
7) hepatic vitamin E 농도 측정	103
8) hepatic lipid peroxidation	103
다. 미나리 단일 및 복합 추출물의 안전성 평가	104
1) 미나리 클로로포름 분획 (CF)의 독성 및 LD ₅₀ 의 결정	104
2) 장기 조직의 무게 측정	105
3) 염증 관련 혈중 cytokines의 유리 측정	106
라. 미나리 발효액의 안전성 확인 연구	108

1) 혈중 GPT와 GOT level 분석	108
2) 혈중 vitamin C 농도 분석	109
3) 혈중 lipid peroxidation 분석	110
4) PBMC 산화적 스트레스에 대한 저항성 분석	111
마. 미나리 활성성분인 caffeic acid와 coumaric acid, lamivudin, interferon- γ 과의 상승효과 확인	111
바. 미나리 유용성분의 <i>in vivo</i> 독성평가	113
사. 미나리 유용성분의 <i>in vivo</i> 간기능 개선 효과	113
1) 체중변화와 장기무게	113
2) 혈액 성분 분석	114
3) 조직병리학적 변화 측정	116
4) 산화적 스트레스 억제능 측정	118
제 4 .장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	127
제 5 .장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	130
제 6 .장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	132
제 7 .장 참고문헌	134
부 록	
1. 발표논문	140
2. 특허출원	142

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

미나리는 우리나라 전역에서 자생하고 있으며 중국, 일본 등 아한대에서 열대에 이르는 지역에서 널리 분포하고 식용으로 재배하고 있다. 중국에서는 이미 기원전 2천년 경부터 논미나리, 밭미나리를 재배했다고 알려져 있을 정도로 식품으로서 오랫동안 식용되어온 식물이다.

미나리는 다습한 땅이나 물이 흐르는 곳에서 자생하고 있는 다년생 초본으로, 수영, 수근 등으로 호칭되기도 하며 미나리과에 속하고 학명은 *Oenanthe javanica*로 알려져 있는데, 오래전부터 민간요법이나 한방에서 다양한 용도로 널리 사용되어 왔다. 항지방간 작용, 간경병 억제 작용, 혈중 콜레스테롤 저하 작용, 해독 작용, 지혈 작용 등의 여러 약리작용을 지니고 있어, 물고기 중독, 혈뇨, 자궁출혈, 고혈압, 불면증 등 여러 질병의 치료에 다양하게 응용되고 있으며, 특히 급만성 간염의 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다(중국 대사전, 상권, pp 1044-1047; 중국 대사전, 2권, pp 1334; 천연약물 대사전, pp 244).

그러나, 미나리를 포함하는 각종 식물의 뿌리, 몸체, 열매 등에 다양하게 분포하는 것으로 알려진 coumarin 계 유도체는 에이즈 바이러스 억제작용(Totani et al., JP 03,227,923): 혈압강하 작용(U. Zutshi et al., Indian J. Exp. Biol. 16, 836(1978); 면역억제작용(H. C. uanget et al., Eur. J. Pharmaco. 198, 211(1991) 등의 다양한 약리작용이 보고되어지고 있으나, 미나리의 B형간염에 대한 깊이 있는 연구는 진행되어진바 없다.

B형 간염 바이러스는 인체에 특이적으로 감염되는 헤파드나비리데(Hepadnaviridae) 계통의 바이러스로서, 세계적으로 약 2억 5천 만명의 인구가 HBV(B형간염)에 감염되어 있다. B형 간염 바이러스는 현재까지 한국 국민의 B형 간염 바이러스 보유율은 8% 정도인데, 이중 15 내지 20%가 간경변증까지 진행되고 간경변증 환자의 20%정도에서 간암으로 전이되는 것으로 알려져 있으며, 추후 더 이상의 보균자가 발생하지 않더라도 70만명의 간경변증 환자와 14만명의 간암 환자가 발생할 것으로 추정된다(I.H. Hu et al., 월간약국 4월호, PP 54-59(1992)). B형 간염 바이러스의 잠복기는 60 내지 110일 정도이며 다양한 정도의 임상기를 거쳐 90 내지 95%는 완전히 회복된다. 감염에서 회복되지 않는 환자의 경우에는, HBV DNA가 사람 간세포의 게놈 DNA에 동화되어 만성 활동성 간염, 간경변증, 간암 등으로 발전하게 된다. HBV에 의한 만성간염은 다른 질환과 마찬가지로 만성 바이러스 감염증, 임파종 질환 및 만성 신장장애를 일으킨다. 따라서 만성간염은 더욱 강력한 형태의 질환으로 발전하여 결국 환자를 사망에 까지

이르게 하는 치사율이 매우 높은 질환이다(Don Ganem et al., Ann. Rev. Biochem. 56, 651(1987); R.P. Beasley et al., Lancet 2, 1129(1981); D. A. Shafritz et al., New England J. Med. 305, 1067(1981); S.N. Zaman et al., Lancet 1, 1357(1985)).

따라서 본 연구그룹에서 개발하고자하는 미나리발효액은 우리나라에 많이 보유하고 있는 간염 바이러스나 생활환경에 의한 간이상으로 발생하는 많은 질병을 예방 및 치료를 목적으로 미나리를 이용한 간보호음료를 개발하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

제 1 항 기술적 측면

- 국내 B형 간염 바이러스 보유율은 8% 로 간질환발생가능성 예고
- B형간염의 치료는 현재 예방백신이외에는 특별치료가 없음
- 현재 간염 및 간질환 치료에 경제적인 손실초래
- 각국에서 간염치료제 개발에 막대한 연구비 투자하는 현실
- 해외에서는 생약추출물에 대한 연구가 많은 진행되었으나 국내의 경우 일부(황칠, 인진쑥, 백화사설초, 용담초, 산두근 등)에서 시도
- 생약추출물에 대한 한의학적인 풍부한 임상결과 보유(중의학, 한의학서적)
- 과학적 검증이 없어 의학계에서는 사용에 대한 부작용 우려 높음
- 고기능성 식품개발의 필요
- 상용 음료개발을 통한 대량소비처의 개발

제 2 항 경제·산업적 측면

- 전세계 B형간염의 치료제 시장규모는 약 20억 달러 규모
- 국내 간염 보조치료제 시장규모만 약 800억원에 달하고 있음.
- 신규 간염치료제 개발에 많은 노력을 하고 있음.
- 미나리의 소비는 김치의 부재료, 생식재료 정도에 한정인 상황
- 미나리의 생산은 연 2기작이며, 대도시 주변에 하우스 재배하는 실정
- 계절상품과 작황에 따른 수급 불균형을 해소 가능하여 농산물 가격 안정화에 기여
- 간염활성화 기능성 음료개발시 새로운 소득장물로서 각광 예상
- 감염보유율이 높은 동남아 지역에 새로운 수출 가능성
- 소비자 기호에 따른 다양한 제품 개발이 가능

제 3 항 사회·문화적 측면

- 우리 농산물로서 기능성 음료를 개발함에 따라 우수성 검증
- 재배 단지화를 통한 지역 특산화
- 청정지역에서 자라는 특징으로 재배단지의 환경 및 관광농업화

제 3 절 연구개발의 범위

본 과제는 간염 및 간 기능 개선에 효과를 가지는 미나리 발효추출물 또는 유효성분을 간염치료의 대체제로서 발효 음료의 개발을 최종목표로 한다. 또한 기능성과 기호성을 갖는 기능성제품으로 개발을 하고자 하며, 발효과정의 최적화를 통하여 기능성을 확보하며 아래와 같은 연구 및 개발을 하고자 한다.

제 1 항 미나리 발효추출물에서 유효물질/제품의 *in vitro* 활성 측정

- 미나리 발효추출물/유효성분의 간염억제 및 간 기능 개선에 대한 연구
- 간염 및 간기능 개선 물질들의 작동 기작의 연구
- 미나리 추출물에서 독성물질에 대한 연구
- 미생물 발효를 통한 독성물질의 저감에 대한 연구
- 미나리 발효추출물의 기능성 증진(다른 화합물과의 상승효과)에 대한 연구

제 2 항 미나리 유효성분의 추출, 발효 및 제품개발에 관한 연구

- 미나리의 다양한 추출법을 사용, 간 기능 개선 또는 간염 억제 성분의 동정
- 단일성분, 복합성분의 정제, 동정
- 추출조건의 최적화 연구
- 발효 미생물의 선정 및 발효조건의 확립
- 공업적 생산 최적화 연구
- 기업과 공동으로 발효액에 대한 기호도에 대한 조사
- 다양한 형태의 응용제품개발

제 3 항 미나리에서 간활성 유효물질/제품의 간기능 활성화에 대한 전임상

- 추출물 또는 발효물의 간염 및 간기능 개선에 대한 *in vivo* 동물 실험
- 간염 및 간독성 유발물질에 대한 억제 연구
- 미나리 추출물의 독성 연구(생존율, LD₅₀)
- 추출물 또는 발효물의 간독성 시험(생리학적, 면역학적 시험)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 해외의 일반 간염연구 현황

- 외국의 최근 및 근래의 연구경향을 보면 신약연구개발 프로젝트의 데이터베이스인 Pharmaproject의 집계에 따르면, 주요 연구대상 신약은 면역증강제, 혈관신생과정 억제제 등의 항암제이며, anti-HIV제를 포함한 항바이러스제의 신약연구는 꾸준히 증가하는 추세
- 다양한 항바이러스제 중에서 활발하게 연구가 진행되고 있는 것은 HIV, HBV, HCV 등이다. HBV의 경우, 예방백신의 보급이 원활하게 이루어져 있어서 위험요소가 많이 제거된 상태이지만, 동남아시아를 비롯한 국가에서는 아직도 많은 환자가 발생하고 있는 상황.
- B형 간염의 경우, 최근 거대 다국적 기업들이 이 분야에 뛰어들면서 연구에 활기를 띄기 시작하였으나, 치료제 개발에 있어서 HBV-RT(hepatitis B virus-reverse transcriptase) 저해제에 대한 부분에 국한되어 있어 새로운 대안이 요구되고 있는 실정이다. 현대의학에서 사용되고 있는 B형 간염에 대한 치료는 인터페론(interferon- α 5), 뉴클레오시드 아날로그(nucleoside analogue)인 라미부딘(Lamivudine), 인터류킨 II (interleukin II) 등이 있음.
- 오랫동안 보편적으로 사용되었던 인터페론과 라미부딘은 미 FDA의 승인을 받은 성분으로 부작용이 적고 바이러스 증식 억제와 ALT 수치의 감소를 보이는 등의 효과가 있다고 알려졌다. 1987년 C형 간염 바이러스가 발견된 이래 HCV는 단백질 작용점이 많아서 연구의 주요 작용점으로 바이러스성 단백질의 저해제를 표적으로 한 연구 등 다양한 연구가 진행중이긴 하지만 아직 초기 단계에 있는 것으로 볼 수 있음.
- FDA로부터 공인받은 만성 B형 간염치료제로는 주사제인 인터페론과 경구 치료제인 라미부딘(lamivudine)이 있으며, HIV의 감염률 및 치명률이 극격히 증가하면서 직접 HIV 환자를 대상으로 각종 시험이 가능하게 되면서 HIV와 마찬가지로 HBV 등 만성 치료제의 연구여건도 풍부해지고 있으며, 뉴클레오시드 아날로그(nucleoside analogue)와 표적화된 안티-바이러스성 약물과 같은 다양한 새로운 시도들이 진행중임.
- 간 섬유화 및 간경화에 효과적인 약물은 아직 없으며, 간질환 보조치료제로 사용 중인 약물로는 실리마린(Silymarin)⁶), Schizadrin⁷), 고미신 A(Gomisin A)

등이 알려져 있으며 1997년 미국의 암젠사는 C형 간염치료제인 인터페론을 상 품화하였으며, 옥스퍼드 글리코사이언스(OGS)사에서 프로테오믹스를 이용, 간암 치료제인 OGT918의 임상을 진행중에 있다. 미국 아이데닉스사는 최근 B형 간 염치료제인 텔비부딘(telbivudine)과 발토시타빈(valtorcitabine)에 대한 2상 및 3 상 임상실험을 진행중임. 스위스 로슈사는 신형 인터페론인 페긴테르페론 α -2a(peginterferon α -2a)와 리바비린(ribavirin)을 함께 생산하고 있는데, 페긴테 르페론은 기존의 인터페론- α 에 고분자 화합물을 부착한 지속성인터페론으로 바 이러스 억제에 지속적인 효과를 보이며 단독으로 사용하는 것보다 리바비린과 병용하여 사용시 C형 간염의 재발률이 더욱 감소한다는 연구결과를 발표.

- 미국 플로리다 대학교 의과대학에서 만성 C형 간염 환자를 대상으로 인터페론과 리바비린을 병용투여, 간염 바이러스를 억제(리바비린은 항 바이러스작용을 하는 합성뉴클레오티드 제제로서 다양한 DNA와 바이 러스에 작용하여 증식을 억제).
- 미국 카이론사 연구팀은 '사이언스' 에 C형 간염바이러스(HCV)가 인체 세포의 표면에 있는 수용체 역할의 CD81단백질과 결합, C형 간염을 일 으킨다는 사실을 발견
- 독일 하노버 의과대학의 크리스티안 트라우트바인 교수는 글락소 웰컴 이 제조 판매하는 B형간염 항바이러스 치료제 제픽스가 '4주간의 복용 결과 B형 간염 바이러스 복제가 억제된 것으로 확인
- 중국에서(B형 간염 보유율 약 15%) 간염백신을 제조하기 위해 당근이 나 완두콩, 바나나, 감자 그리고 채소를 사용하여 C형 간염백신의 자체 발현을 통해 인체에 백신이 흡수되는 기술을 선보임 (<http://www1.kisti.re.kr:9100/contents/servlet/board.uti>)

제 2 절 국내의 일반 간염연구 현황

- 한국인에게 많이 발생하는 B형 간염에 국내에서 간질환에 대한 연구는 B형 간 염에 편중되어 있다. 이는 국내 B형 간염치료제 시장의 규모가 전세계 시장의 약 1/3을 차지
- B형 간염이 아시아 국가의 비중이 높기 때문이며 간암 및 간질환은 수년간 주 요 사망원인으로 언급되었으며, 일본 및 유럽에서도 만성 간질환이 주요 사망원 인중 하나

- WHO의 분류에서도 우리나라는 HBcAg 보유율이 전인구의 약 10% 인 위험국가로, 신생아에게도 예방백신의 접종이 요구되고 있음
- 우리나라 간암환자의 HBcAg 양성율은 평균 약 70%이고, anti-HCV 항체 생성율은 약 16%로 우리나라 간암의 약 80% 이상이 간염바이러스와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있음.
- 높은 간 질환 및 간염을 치료 및 예방하기 위한 높은 수요로 인하여 국내시장이 크기 때문에, 다른 신약과는 달리 국내시장 확보만으로도 크게 성장할 수 있어서, 신규 간질환 치료제의 개발에 많은 연구가 많이 진행되고 있음.
- 2-3년 전까지만 해도 실리마린(silymarin), DDB(Biphenyl Dimethyl Dicarboxylate) 등의 보조치료제에 대한 생체 이용율 개선 등 제제기술 연구와 예방백신 및 진단방법의 개발 등이 치료분야에서 주류를 이어왔지만, 세계 최초 방사성 간암치료제로 한국식품약품안전청(KFDA)으로부터 시판승인을 받은 밀리칸의 개발과 임상시험에서 좋은 효과를 보여준 클레부딘(Clevudin)의 개발을 계기로 신물질 개발에 관심이 높음.
- 현재까지 개발된 간 질환 치료제의 약효는 간염, 지방간 생성 억제, 담즙산 분비 장애개선 및 초기 간경화 발생 억제 등에 있다. 대부분의 약물들은 간경화가 상당히 진행된 경우에는 별로 치료효과가 없고, 또한 간염 바이러스에 선택적으로 작용하는 간염치료제 역시 아직까지 개발이 미진
- 이는 다양한 간장 기능 및 복잡한 간 질환 유발요인으로 인하여 지금까지 정확한 질환의 병리적 상태를 규명하지 못하고 있기 때문
- 현재 간 질환 치료제로 이용되고 있는 약물로는 크게 천연물로부터 분리된 물질과 합성약물 두 가지 그룹이 있다. 그러나, 이러한 약물들의 효과 역시 동물모델에서 유효성을 밝힌 결과는 거의 없고, 간 독성물질에 대한 보호 작용이 임상적으로 유효성을 인정받고 있는 수준이며, 많은 경우 인체에 독성이 있는 것으로 나타나고 있음.
- 국내부광약품은 간세포의 보호 및 재생작용과 항섬유화 효과를 가져 만성간염 및 간경화에 대한 보조치료제로 생약성분의 실리마린과 빌리빈 성분을 함유한 제제를 제품화하였으며, 대전대 한방병원에서는 인진, 창출, 백출, 별갑, 나복자 등의 천연물 약재를 혼합하여 알코올성 지방간, 간암 등의 간질환 치료에 효과가 높은 치료제를 개발하였다. (주)혜파가 드는 야생초인 진주초로 제조된 한약제제인 '혜파가드정'이 2003년 만성?전염성 간염치료 보조제로 제조품목허가를

받았고, 엔도팜은 초파리에서 항생 및 면역조절기능을 갖는 물질을 찾아내어 화학적으로 수식한 물질인 '알로페론'을 주사제형 B형 간염치료제로 개발하기 위하여 임상시험을 진행 중이다. 국내 바이오 벤처기업인 (주)바이오코리아는 집신나물에서 바이러스 증식억제 및 면역조절 기능을 갖는 신물질 'BKL-1'과 'HEPA-3B'를 발굴하여 B형 간염치료제로 개발중에 있음.

- 이밖에도 다양한 선진적인 연구들이 진행되고 있는데

- 한국과학기술원(kist) 유전공학센터 연구팀은 c형간염의 시료 중에서 핵산을 분리시켰을 뿐만 아니라, 이 핵산 중에서 유전자를 합성하는데 성공
 - 산림청 임목육종연구소는 최신의 유전공학기술을 응용해 B형 간염 치료용인 펩타이드 백신 유전자를 포플러 잎에 삽입, 간염 치료용 백신의 원료인 생물체를 저렴하게 생산하는 기술을 개발
 - 간염치료용 백신 생산량을 보다 향상시킨 식물개발이 2-3년내 가능할 것으로 기대
 - 광주과학기술원에서는 현재 DNA 백신과 단백질 백신을 조합하는 방법으로 C형 간염에 대한 예방 및 치료용 백신 개발에 도전하고 있고 특히 지금까지 치료제로 개발됐던 약물들이 작동하지 않는 메커니즘을 규명
- ===> 간염에 대한 연구의 세계적인 동향은 주로 바이러스의 DNA와 구조가 유사한 항바이러스제로서 각종 nucleotide analogue가 연구의 주류를 이루고 있다.
- 또한 지금까지 B형 간염 치료제로는 nucleotide analogue에 대한 연구가 주종을 이루었으나, 이들의 경우는 심한 부작용이 가장 큰 단점으로 지적되고 있다. 한편, nucleotide analogue가 아닌 천연약재로부터 B형 간염 치료제를 개발하고자 하는 연구도 보고되어 있다.

제 3 절 생약성분의 간염억제 연구동향

- 중국, 일본, 인도 등 자체의 전통의학들이 많이 발달한 나라에서 생약에 대한 연구를 집중적으로 전개
- 간 질환 치료제로는 대표적으로 silymarin과 biphenyl dimethyl dicarboxylate, (DDB)가 있다. silymarin은 영경귀 (Silybum marianum)의 씨로부터 추출 분리하여 신약화한 제제

- DDB는 1980년도부터 중국의 중약연구소 (베이징 소재)에서 오미자 (Schizandra chinensis)로부터 분리되어 유사한 구조로 합성된 제제로 현재 국내 임상치료에서 많이 사용. --> silymarin, DDB 등의 약물은 예방제의 개념으로 사용되는 것이 아니라 치료제의 개념으로 사용
- 독일에서는 인터페론을 사용할 수 없는 C형 간염환자를 대상으로 겨우살이(mistletoe)와 green tomato를 함유한 생약추출물의 자체적인 간기능 보호작용을 이용, 직접 투여하여 본 결과 효과가 있다는 결론을 보고 (<http://www.reutershealth.com/wellconnected/doc59.html>)
- 인디안의 황달 치료제로 널리 알려진 Phyllanthus niruri 와 Phyllanthus amarus라는 약용식물의 추출물이 동물실험에서 B형 간염 바이러스의 억제에 매우 효과적인 것으로 보고, 현재 유효성분 분석과 임상시험중
- 일본에서는 Sho-saiko-to라는 7가지 생약조성물이 C형 만성간염환자병의 진행을 억제하는데 효과가 있는 것으로 보고(Yamashiki et al. *Hepatology* 25(6) 1390-1397(1997))
- "Mao-to"라는 생약조성물이 C형 만성간염환자의 치료에서 interferon치료에 의해 유발되는 우울증에 대하여 매우 효과적.(Kainuma M. et al. *Human Psycho-pharmacology* 19, 234-241(2004))
- Metavitamin인 α -lipoic acid이 rat을 모델로 한 실험에서 chloroquine에 유발된 간독성에 저항성이 강한 것으로 보고하고 있다.(Pari. L. and Murugavel. P. *J. Appl. Toxicol.* 24, 21-26, (2004))
- 혼합된 식물추출물이 사람간암세포에서 B형간암세포 표면항원의 발현을 억제하는 것으로 보고하면서 이물질들이 세포자체에 독성도 없을 뿐 아니라 항원과 결합하지도 않는다고 밝히고 있음.(Yeh, S.F.et al. *Phytother. Res.* 17, 89-91(2003))
- coumarin계통의 화합물인 scopoletin을 추출하여 간염억제작용, 간보호작용에 대한 연구가 보고(특허10-342936)
- 식물에 흔하게 존재하는 phenol계통의 화합물인 ferulic acid를 추출하여 B형 간염에 대한 치료효과가 특허로 보고(특10-339155).
- 사염화탄소를 이용한 mouse의 간손상을 유발, 미나리추출물의 투여처리를 통하여 간손상의 억제(이상일 외, *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22(4), 392-7. 1993)
- 미나리 methanol추출물이 알콜대사관련 효소계에 효과가 있다는 보고가 있음.(Park J.C.and Choi J.W. *Phytother. Reserch* 11. 260-262(1997))

- 간질환 치료제인 SCD-UKG(삼천당제약)는 간질환 예방, 치료에 사용된 생약제 대상으로 유효성있는 제제를 취합, 효과가 뛰어난 조성을 배합해 만든 신약후보 물질 -- 동물시험서 기존 치료제보다 급만성 간염과 간경변에 효력이 입증. 2001.12.월 임상 허가 획득, 2002. 4월부터 임상1상 실시 중, 천연화합물간 상승작용으로 단일치료제 부작용이 없고, 만성 간질환에 장기 투여시 효과적일 것으로 예상
- 일부 전문가 그룹에서는 생추출물을 직접 사용할 경우, 심한 황달과 복수를 동반하는 간 부전으로 이행하는 경우도 발생한다고 경고, 이는 돌미나리나 인진쑥에는 간손상을 초래하는 독성물질이 함께 들어있을 것으로 추정

위에서 설명한바와 같이 간염치료제에 많은 노력을 기울이고 있으나 현재 본 연구팀이 개발하고자 하는 연구는 찾아볼 수가 없고 다만 생약추출물로부터 유효성분을 추출, 이를 바탕으로 개발하고 있는 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 미나리 발효추출물에서 유효물질/제품의 *in vitro* 활성 측정

제 1 항 재료 및 방법

가. 재 료

본 실험에 사용된 미나리는 전남 화순군에서 자생하는 것으로 (주)한우물에서 공급받아 사용하였다. MEM medium, Hanks balanced salt solution(HBSS), NBT(nitro blue tetrazolium), DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydraxyl), XTT는 Sigma (St. Louis, MO) 사로부터 구입하였다. 한편 streptomycin, amphotericin B, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(Grand Island, NY)사로부터 구입하여 사용하였다.

본 실험에 사용된 HepG2 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양 받았다. B형 간염 바이러스 유전자를 함유하고 있는 HepG2.2.15 세포주는 연세대학교 의과대학 미생물학 교실로부터 분양받아 사용하였으며 계대배양시 G418을 첨가하여 B형 간염바이러스의 형질을 상실한 세포는 고사되어 제외되도록 하였다.

나. 실험 방법

1) 시료의 항산화 활성

가) DPPH radicals 소거능

Brand-Williams의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료는 에탄올에 녹인 후 10-5000 ug/mL 농도로 준비하였다. 각 농도의 시료 0.05 mL에 0.1 mM DPPH 950 uL를 혼합하였다. 상온에 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 농도별 DPPH radical 소거능 활성은 다음의 식을 이용하여 산출하고, 그 소거능이 50%가 되는 샘플의 농도를 IC₅₀으로 표현하였다.

나) Superoxide anion radical 소거능

Noro의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.5 mM Xanthine과 0.5mM

Tetrazolium blue 를 0.05 mM EDTA를 함유한 50 mM Potassium phosphate buffer(pH7.4)에 잘 혼합하여 기질액을 준비한다. 각 농도로 준비한 시료 0.1 mL에 준비한 기질액 0.9 mL을 넣고 1mL의 xanthine oxidase(0.05 Unit/mL)을 첨가하였다. 37°C에서 30분간 배양한 후, 2N HCl을 2 mL 넣어 반응을 종료한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다) 지질과산화 억제능

Lin의 방법을 변형하여 측정하였다. Linoleic acid 0.1 mL과 Tween 80 0.2 mL, 증류수 19.7 ml을 혼합하여 Linoleic acid emulsion을 제조하였다. Linoleic acid emulsion 1ml에 0.01% FeSO₄ 0.2 mL, 0.56 mM H₂O₂ 0.2 mL, 시료 0.4 mL을 가볍게 섞어주고 37°C에서 14시간 배양 하였다. 0.4% BHT 0.2 mL, 4% TCA 0.2 mL, 0.8% TBA 2 mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 100°C에서 15분간 끓여주었다. Cooling 한 후 3000rpm으로 20분간 원심분리 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) HepG2 세포에서의 항산화능 측정

HepG2 세포를 12개의 T-25 Flask 에 1 x 10⁶/flask 로 seeding 후 24시간 배양한 뒤 4군으로 나누어 처리하였다. 무처리군인 정상군(Con)군과 2 mM 의 H₂O₂만 처리한 군(H₂O₂ 대조군), caffeic acid를 low dose(20 ug/mL) 및 high dose(50 ug/mL)로 각각 처리한 뒤 2 mM의 H₂O₂ 를 재처리한 군(CA-H, CA-L)으로 나누어 각 군당 3반복 실험을 하였다. Caffeic acid를 처리한 다음 24시간 배양하였고, 2 mM H₂O₂ 를 처리하고 24시간 배양한 뒤 세포를 수집하여 catalase activity, superoxide dismutase, glutathione-S-Transferase, glutathione peroxidase 및 total glutathione를 측정하였다.

3) HepG2 세포에서의 MDA 함량 변화 측정

Lysis 한 cell을 대상으로 MDA가 지질 과산화의 분해산물인 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타내는 붉은 색을 535 nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay 방법을 이용하여 측정하였다.

4) cytotoxicity 유무는 *in vitro* test에서 규명

배양 간세포에 MTT(5mg/ml in PBS)용액을 well당 50ul씩 넣은 후, 2시간, 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ 배양시키고, MTT 처리한 plate에 생성된 formazan 결정들을 DMSO용해, 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 간세포의 생존율은 대조군

의 흡광도에 대한 실험군의 비율로 계산하였다.

5) B형 간염 표면항원에 대한 억제 정도 분석

미나리 발효추출물로부터 얻은 샘플이 처리된 HepG2.2.15 세포 배양액을 상판화된 B형 간염 표면항원 검출키트(Auszyme R, Monoclonal, Abbottlab., #1980-24)를 이용, B형 표면항원 생성에 대한 억제정도를 정량적으로 분석.

세포 배양액을 인산염 완충 생리 식염수(pH 7.0)로 최종 흡광도가 1.0 내지 1.5 범위에 들도록 희석(대략 20 - 50배 희석)후, 희석액 0.2ml과 대조용액 0.2ml을 표면항원에 대한 1차 단일항체, HRP(Horse Radish Peroxidase)가 연결된 2차 단일항체가 이미 결합되어 있는 비드와 40℃에서 2시간 동안 각각 반응시킨 후, 비드를 증류수로 3회 세척하여 미결합 물질을 제거. 다음에 과산화수소수가 함유된 O-phenylenediamine 용액 300 μl을 가하고 30분 배양한 후 0.1N HCl 을 가하여 반응을 중지. 대조군과 실험군의 흡광도를 492 nm에서 측정하고, 아래 식을 이용하여 B형 간염 표면 항원 생성 억제 정도를 계산.

억제능(%) = ((대조군의 흡광도-실험군의 흡광도)/대조군의 흡광도) ×100

6) 미나리 발효추출물의 항바이러스 작용을 보기 위하여 HBV-DNA 복제 copy number 검색법

DMEM배지를 제거한 세포를 PBS로 1회 세척한 후 trypsin-EDTA를 처리하고 10분간 37℃에서 반응시켜 분리된 세포를 모아서 PBS로 3회 세척함. CASSuper blood genomic DNA isolation kit를 이용하여 2.2.15 세포의 genomic DNA를 추출하여 TE buffer (pH7.4)에 용해시켜 stock으로 사용하고 이것으로부터 1ug genomic DNA를 따서 PCR 증폭으로 replication 정도를 확인함. PCR 반응은 2.5ul의 10x reaction buffer, 3ul dNTP, 0.5ul sense primer, 0.5ul anti-sense primer, 1.5ul GoldTaq 효소, 2ul의 template(1ug DNA), 15ul RNase/DNase free water로 구성되어 있고 중합반응 과정은 95℃에서 5분의 hot start, 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초, 35회 cycle로 되었으며 마지막에는 72℃에서 5분간 polishing step (final extension)으로 반응을 종결시킴. 이렇게 증폭 생성된 HBV-DNA 10ul를 1% agarose gel에 분주하여 전기영동시킨 후 Ethidium Bromide (EtBr) 용액에 담구어 shaking plate 위에서 20분간 염색시키고 UV 상에서 HBV-DNA의 양을 측정함 (Korba, B.E., et al. *Antiviral. Research* 19, 55-70.(1992))

7) DNA fragmentation assay과 anti-apoptotic 단백질의 발현 측정

Apoptosis는 다른 논문 보고와 같은 방법으로 2.2.15 감염유발 세포주에서 anti-apoptotic에 관련되는 bcl-2와 Bax protein의 발현을 western immunoblot으로 측정하였음. 한편 DNA fragmentation assay로는 1×10^5 cell을 seeding하여 2일간 배양하고 lysis buffer를 처리한다. Ice에서 30분간 shaking하고 4°C에서 15분간 14000g에서 원심분리하여 상등액을 모은후, 50°C에서 4시간 동안 proteinase K를 처리하여 incubation시킨다. Phenol extracion방법으로 DNA를 분리하고 5.0M NaCl과 100% Bopropanol을 첨가하여 잘 섞은 다음 -20°C에서 1시간 방치하고 14000g에서 10분간 원심분리 한다. 상등액을 제거하고 pellet을 RNase A가 용해된 D.W. 50 μ l로 재현탁하고 1.5% agarose gel에서 1 \times TAE buffer로 3-4시간(50V) 전기영동한다. Ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator로 관찰한 후 사진을 찍는다.

8) 염증 관련 사이토카인의 생성에 미치는 영향 분석

염증 관련 사이토카인은 주로 TNF, IL-1 β , IL-4, IL-6등으로서 sandwich ELISA법에 의해 측정함. 우선 first antibody를 96-well plate에 100ul씩 분주하여 18시간동안 4°C에서 보관한 후 3회 PBS-0.05% tween20 용액으로 세척하고 Blocking buffer (1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN₃)를 처리하여 1시간 상온에서 반응시키고 washing buffer로 3회 세척함. 미나리 발효추출물 처리군과 비처리군으로 부터 수득한 배지 100ul를 첨가하여 2시간동안 상온 반응시키고 다시 PBS-0.05% tween20 용액으로 3회 세척한 후 biotin으로 labeling 된 second antibody 100ul를 넣고 상온에서 2시간 반응시키고 다시 같은 용액으로 3회 세척한 후 100ul의 streptoaviding-HRP(horse radish peroxidase)용액을 넣고 20분간 암실에서 반응시키고 다시 3회 세척한 후 100ul의 substrate solution을 넣고 상온에서 20분간 반응시킴. 50ul의 stop solution (2N H₂SO₄)을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 OD450nm에서 발색정도를 측정함.

9) NF-kB의 활성화 측정

NF-kB는 염증반응의 시작에 관여하는 transcription factor로 알려져 있는데 ikB 단백질과 결합하여 비활성화된 상태로 세포질에 존재함. TNF등에 의해 활성화가 유도되면 ikB의 인산화를 거쳐 ubiquitination이 일어나 NF-kB는 ikB로부터 유리되어 핵으로 이동하게 되어 염증 관련 유전자의 발현을 조절하게 됨. 따라서 NF-kB의 translocation은 염증 발생과 진행의 지표로 삼을 수가 있고 western immunoblot으로 측정할 수 있음. 미나리 발효추출물을 처리한 세포를 lysis buffer (0.5M Tris ,10% SDS ,10% Glycerol, 0.1mM PMSF)로 처리한 후

total protein을 추출하고 40ug의 total protein을 SDS PAGE로 전기영동하여 단백질을 PVDF membrane으로 transfer 시키고 nonfat dry milk로 blocking 시킴. TBST (25 mM Tris, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% tween-20, pH 8.0)로 2번 세척하고 anti-NF- κ B 단클론 항체(Santa Cruz, USA)를 처리하여 2시간 상온에서 반응시키고 10분씩 3회 TBST로 세척함. Anti-IgG secondary antibody를 처리하여 1시간 반응시키고 chemilunescence를 위해 1ml ECL solution을 blot에 처리하여 즉시 발현정도를 reader에서 확인함. 이때 NF- κ B와 더불어 ikB의 정량적 측정도 동시에 행하여 비교군으로 삼도록 함.

제 2 항 결 과

가. 미나리 추출물 및 간 기능 개선 유용 성분의 항산화 및 free radical 소거능 측정

1) 미나리 추출물 및 간 기능 개선 유용 성분의 지질과산화 억제능 측정

미나리 추출물을 대상으로 Fe^{2+} 나 thiocyanate에 의해 유도된 linoleic acid의 과산화에 대한 억제활성을 TBA (thiobarbituric acid)로 발색시켜 측정한 결과 ethanol 및 methanol 추출물에서 높은 지질과산화 억제능을 보였다 (Fig.1-1).

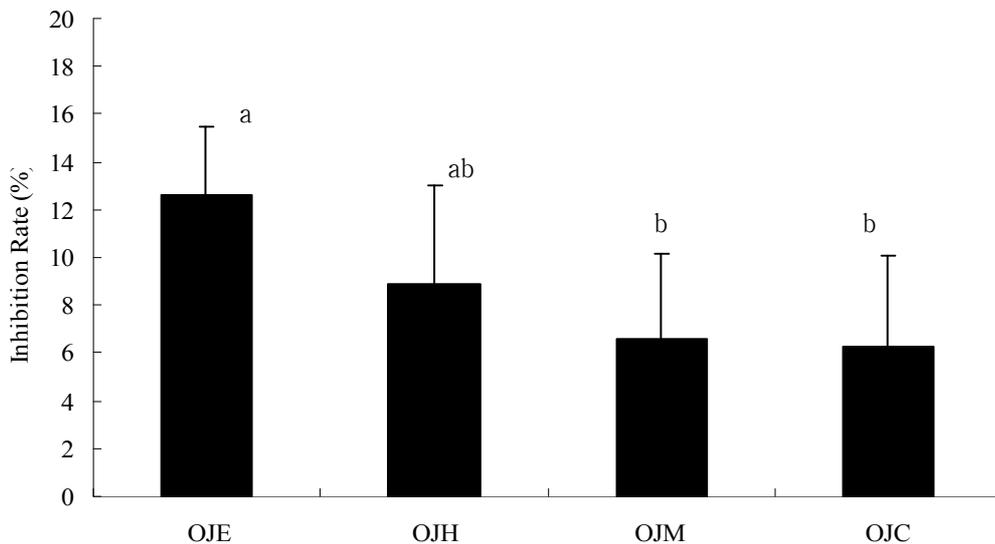


Fig.1-1. Inhibitory effects of various extracts from *Oenanthe javanica* DC. on the formation of TBARS.

Data are presented as mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration was 100 $\mu\text{g/mL}$. OJE: Ethanol extracts from *O. Javanica* DC. OJH: Hot water extracts from *O. Javanica* DC. OJM: Methanol extracts from *O. Javanica* DC. OJC: Cold extracts from *O. Javanica* DC.

미나리 ethanol 추출물의 저분자 획분을 대상으로 hexane, ethylacetate, chloroform 및 물의 4가지 용매를 사용하여 용매별 분리를 실시하여 TBARS assay를 실시한 결과 chloroform 및 ethylacetate 층에서 높은 지질과산화 억제활성을 나타내었다 (Fig.1-2).

미나리 함유 간기능 개선 유효성분인 caffeic acid 를 대상으로 linoleic acid 의 과산화에 대한 억제활성을 TBA (thiobarbituric acid)로 발색시켜 측정된 결과 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 76.82%의 높은 지질과산화 억제능을 보였다 (Fig.1-3)

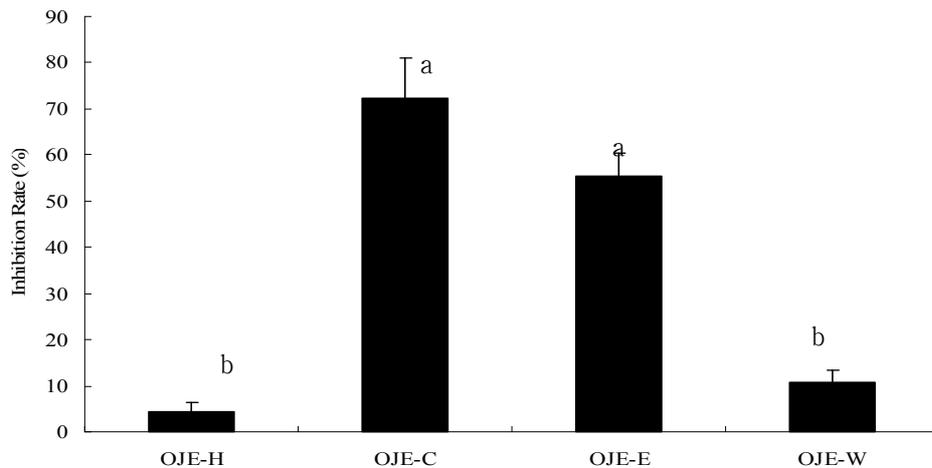


Fig. 1-2. Inhibitory effects of various fractions from ethanol extract (OJE) of *Oenanthe javanica* DC. on the formation of TBARS.

Data are presented as mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration was 450 $\mu\text{g/mL}$. OJE-H: Partitioned with n-hexane from OJE, OJE-C: Partitioned with chloroform from OJE, OJE-E: Partitioned with ethyl acetate from OJE, OJE-W: Partitioned with water from OJE.

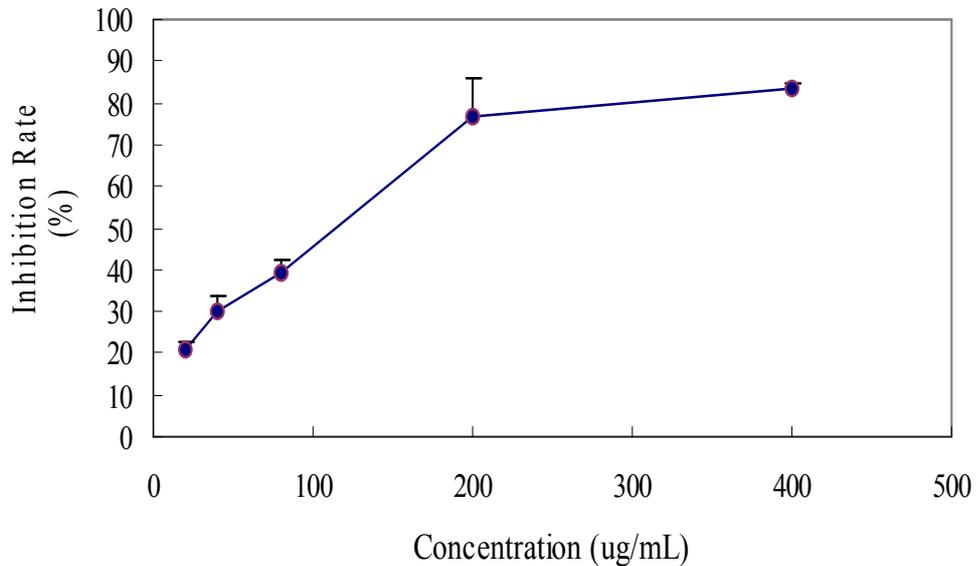


Fig. 1-3. Inhibitory effects of caffeic acid from *Oenanthe javanica* DC. on the formation of TBARS.

2) 미나리 추출물 및 간 기능 개선 유용 성분의 DPPH radical 소거능 측정

DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical 로서 517nm 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이며, 알코올 등에 안정하고 항산화 기작 중 proton-radical scavenger 에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰 할 수 있다. 미나리 추출물 및 정제물을 대상으로 시료 10 ul에 200 uM DPPH/ethanol 190 ul를 가한 후, 37°C, 30분 반응시켜 517nm에서 흡광도를 측정하고 대조구와의 흡광도 감소정도를 측정함으로써 DPPH radical 소거능을 조사하였다 (Table 1). 그 결과 추출용매 중 ethanol 추출물에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이 ethanol 추출물을 대상으로 hexane, chloroform, ethylacetate 및 water 등의 용매를 이용하여 partitioning chromatography를 실시하여 DPPH radical 소거 활성을 검색한 결과 ethylacetate-soluble에서 IC₅₀ 값이 급격히 감소함을 알 수 있었다(Table 2). 이로부터 미나리에서는 DPPH 소거능 물질이 ethylacetate 층에 다량 함유됨을 확인하였다.

Table 1. DPPH radical scavenging activities of various extracts from *Oenanthe javanica* DC. extracts

Extract	IC ₅₀ (ug/mL)
OJE	98.17 ^a
OJM	171.36 ^c
OJH	119.73 ^b
OJC	184.96 ^c

IC₅₀ values defined as signified the concentration of sample necessary to scavenging 50% of DPPH radicals. OJE: Ethanol extracts from *O. Javanica* DC. OJH: Hot water extracts from *O. Javanica* DC. OJM: Methanol extracts from *O. Javanica* DC. OJC: Cold extracts from *O. Javanica* DC.

Table 2 DPPH radical scavenging activities of various fractions from ethanol extract of *Oenanthe javanica* DC.

Extract	IC ₅₀ (ug/mL)
OJE-H	> 300 ^c
OJE-C	118.09 ^b
OJE-E	13.60 ^a
OJE-W	114.30 ^b

IC₅₀ values were signified the concentration of sample necessary to scavenging 50% of DPPH radicals. OJE-H: Partitioned with n-hexane from OJE, OJE-C: Partitioned with chloroform from OJE, OJE-E: Partitioned with ethyl acetate from OJE, OJE-W: Partitioned with water from OJE

미나리로부터 분리된 간 기능 개선 유효물질인 caffeic acid를 대상으로 DPPH radical 에 대한 소거능 측정하였으며, 그 결과는 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 농도인 IC₅₀값이 5.35 ug/mL으로 나타났다(Table 3).

Table 3. DPPH radical scavenging activity of caffeic acid from *Oenanthe javanica* DC.

Compound	IC ₅₀ (ug/mL)
Caffeic acid	5.35

IC₅₀ values were signified the concentration of sample necessary to scavenging 50% of DPPH radicals.

3) 미나리 추출물 및 간 기능 개선 유효 성분의 superoxide anion-radical 소거능 측정

Superoxide anion radical 은 ROS 에서 유래된 가장 대표적인 산소 라디칼로 dismutation 반응 후 hydrogen peroxide 에 의해 반응성이 더 큰 hydroxyl radical로 전환되고, hydroxyl radical 은 생체 거대분자를 손상시키게 되거나, 단백질 구조에 직접적인 변형을 가하여 효소의 불활성을 유도하는 등 물질의 산화와 밀접한 관계를 갖고 있다. 이러한 Superoxide anion radical 에 대한 미나리 추출물 및 caffeic acid의 소거활성을 측정하기 위하여 nitro blue tetrazolium(NBT) 환원법을 이용하였다. 그 결과 ethanol 추출물 및 ethylacetate-soluble에서 높은 소거활성을 확인하였다(Fig. 1-4와 1-5). 한편, caffeic acid의 superoxide anion radical 소거능에 대한 IC₅₀ 값은 67.77 ug/mL으로 나타났다(Table 4).

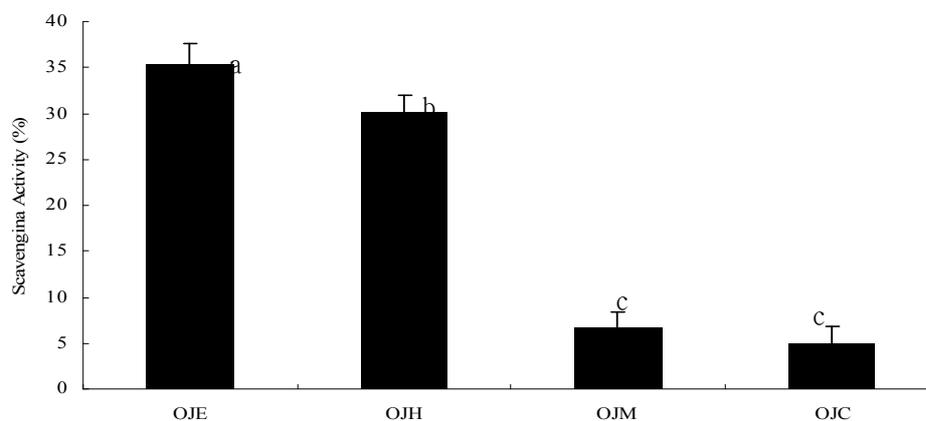


Fig. 1–4. Superoxide anion–radical scavenging activities (%) of various extracts from *Oenanthe javanica* DC.

Data are presented as mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration was 100 μ g/mL. OJE: Ethanol extracts from *O. Javanica* DC. OJH: Hot water extracts from *O. Javanica* DC. OJM: Methanol extracts from *O. Javanica* DC. OJC: Cold extracts from *O. Javanica* DC.

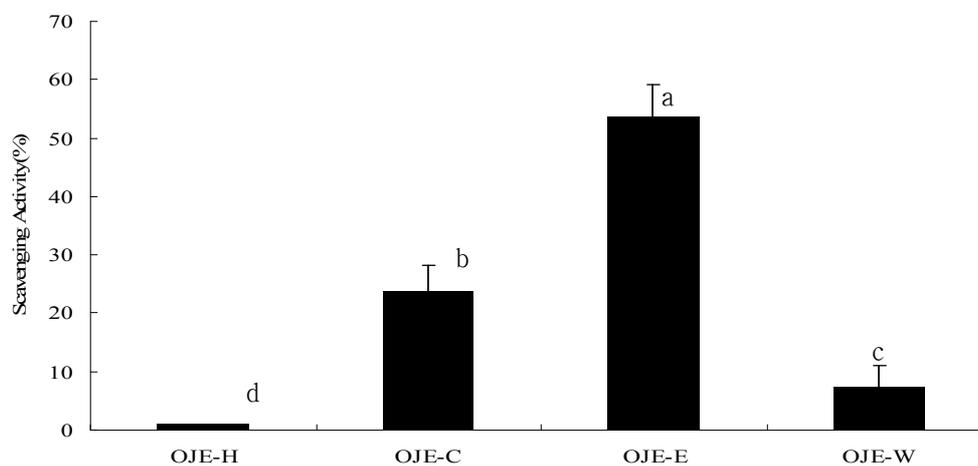


Fig. 1–5. Scavenging activities of various fractions from ethanol extract (OJE) of *Oenanthe javanica* DC. against the superoxide anion radical.

Data are presented as mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration was 100 μ g/mL. OJE–H: Partitioned with n–hexane from OJE,

OJE-C: Partitioned with chloroform from OJE, OJE-E: Partitioned with ethyl acetate from OJE, OJE-W: Partitioned with water from OJE.

Table 4. Superoxide anion radical scavenging activity of caffeic acid from *Oenanthe javanica* DC.

Compound	IC ₅₀ (ug/mL)
Caffeic acid	67.77

IC₅₀ values were signified the concentration of sample necessary to scavenging 50% of DPPH radicals.

나. 미나리 함유 간 기능 향상 유용성분의 *in vitro* 상에서의 산화적 스트레스 억제효과

HepG2 세포를 12개의 T-25 Flask 에 1×10^6 /flask 로 seeding 후 24시간 배양한 뒤 4군으로 나누어 처리하였다. 무처리군인 정상군(Con)군과 2 mM 의 H₂O₂만 처리한 군(H₂O₂ 대조군), caffeic acid를 low dose(20 ug/mL) 및 high dose(50 ug/mL)로 각각 처리한 뒤 2 mM의 H₂O₂ 를 재처리한 군(CA-H, CA-L)으로 나누어 각 군당 3반복 실험을 하였다. Caffeic acid를 처리한 다음 24시간 배양하였고, 2 mM H₂O₂ 를 처리하고 24시간 배양한 뒤 lysis buffer를 사용해 세포를 lysis시켰다. 무처리군의 경우 MEM배지만으로 배양하였으며, lysis 된 세포는 Bradford방법으로 단백질 정량을 한 뒤 항산화 실험을 하였다.

1) Catalase 활성

Catalase의 활성은 commercial assay kit를 이용하여 catalase효소 반응 후 남아있는 H₂O₂ 의 양을 colorimetric방법으로 측정하였다. 효소활성도는 1분 동안에 1 uM 의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양으로 표시하였다. 실험 결과 H₂O₂ 처리군에서 catalase 활성이 감소하였으며, caffeic acid 를 전처리한 군에서는 감소 경향이 나타나지 않았고, caffeic acid를 high dose 로 처리하여 준 군은 아무것도 처리하지 않은 정상군과 비교하여도 그 활성이 증가하였다(Fig. 1-6). 이 결과로부터 H₂O₂에 의해 catalase의 활성 감소가 나타나는데, caffeic acid를 전처리하여 줌으로써 H₂O₂ 에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 항산화효소 활성 감소를 예

방할 수 있음을 알 수 있었다.

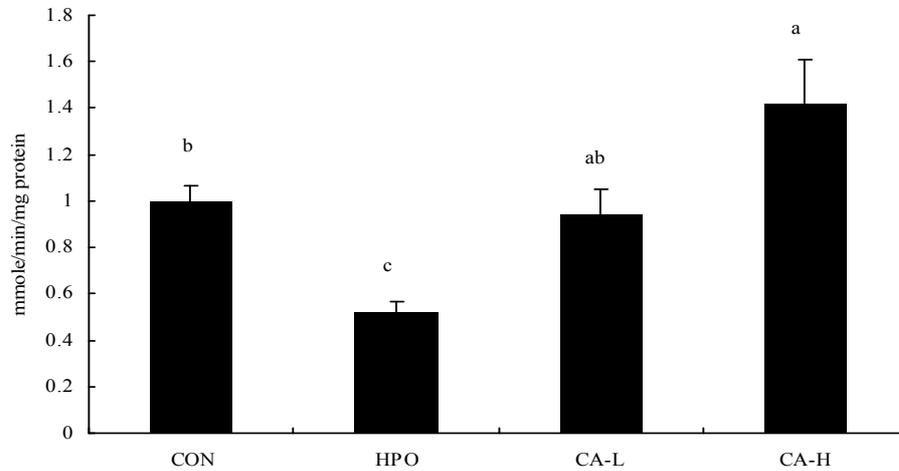


Fig. 1-6. Effect of caffeic acid (CA) on the catalase activity in hydrogen peroxide-induced HepG2 cells.

Each value represents the mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

CON: Normal control group, HPO: Hydrogen peroxide (H_2O_2) control group (2 mM)

CA-L: Caffeic acid (20 μ g/mL) group treated with H_2O_2

CA-H: Caffeic acid (50 μ g/mL) group treated with H_2O_2

2) Superoxide Dismutase 활성

SOD 는 O_2 가 한 개의 전자를 받아들여 불완전 산화된 superoxide anion radical을 hydrogen peroxide로 전환시키는 O_2^{\bullet} 소거 효소이다. SOD 의 활성은 SOD determination assay kit을 이용하여 측정하였다(Fig. 1-7). 실험 결과 H_2O_2 만 처리한 군에서는 정상군(con)과 비교하여 유의적으로 낮은 활성이, caffeic acid 와 H_2O_2 를 모두 처리한 군에서는 정상군(con)과 비교하여 유의적으로 높은 활성이 나타났다. 이는 caffeic acid의 처리가 H_2O_2 에 의한 SOD의 활성 감소를 막음으로써 항산화 효과를 나타내는 것으로 여겨진다.

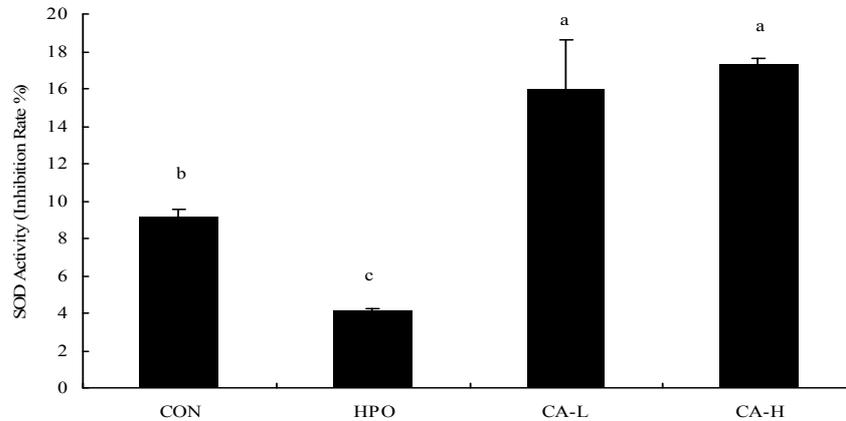


Fig. 1-7. Effect of caffeic acid (CA) on the superoxide dismutase (SOD) activity in hydrogen peroxide-induced HepG2 cells.

Each value represents the mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

CON: Normal control group

HPO: Hydrogen peroxide (H_2O_2) control group (2 mM)

CA-L: Caffeic acid (20 μ g/mL) group treated with H_2O_2

CA-H: Caffeic acid (50 μ g/mL) group treated with H_2O_2

3) Glutathione-S-transferase

GST 활성은 균질화된 조직 20 μ L에 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), 200 mM Glutathione, 100 mM CDNB 를 98:1:1로 혼합한 시료 180 μ L 를 넣고 1분 간격으로 10분간의 반응을 340 nm 에서 측정하였다. 효소활성은 1분간 효소 단백질(mg)이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione 의 분자흡광계수를 이용하여 계산하였다. GST 활성의 측정 결과 caffeic acid를 24시간 처리한 뒤 H_2O_2 를 처리하여 준 군들과 정상군 간에는 유의차가 나타나지 않았으나, H_2O_2 만 처리하여 준 군과는 유의차가 나타났다(Fig. 1-8). 즉 H_2O_2 처리가 항산화 효소 중 하나인 GST 활성을 감소시키나, caffeic acid를 전처리하였을 경우 GST 활성의 감소를 예방함으로써 항산화 효과가 있다고 볼 수 있다.

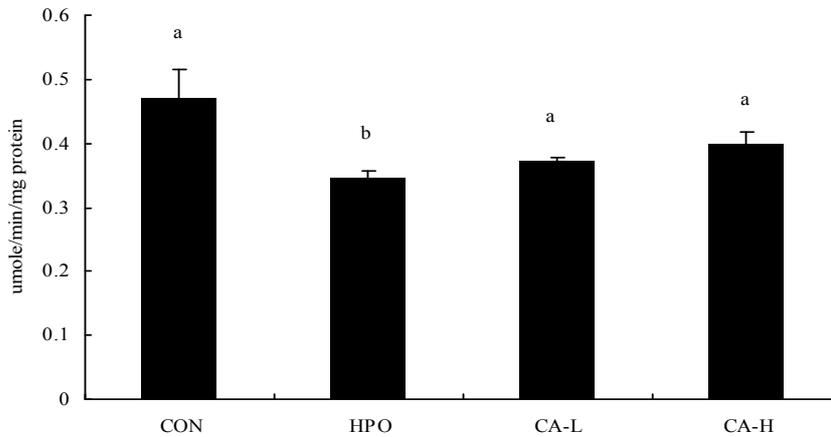


Fig. 1-8. Effect of caffeic acid (CA) on the glutathione-S-transferase (GST) activity in hydrogen peroxide-induced HepG2 cells.

Each value represents the mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

CON: Normal control group

HPO: Hydrogen peroxide (H_2O_2) control group (2 mM)

CA-L: Caffeic acid (20 μ g/mL) group treated with H_2O_2

CA-H: Caffeic acid (50 μ g/mL) group treated with H_2O_2

4) Glutathione Peroxidase

Gpx는 selenium(Se)을 함유하는 항산화계 효소로서 체내에서 NADP⁺ 를 전자수용체로 하여 GSH 를 산화형 GSSG 와 물 그리고 기타 과산화물을 생성하는 반응을 촉매하므로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산소 독을 해독하는 효소이다. Gpx 활성은 commercial assay kit를 이용하여 측정하였다. Gpx assay buffer 890 μ L 와 NADPH assay reagent 50 μ L에 sample 50 μ L를 넣은 뒤 t-Bu-OOH 10 μ L 를 가하여 반응시키고 340 nm 에서 10초 간격으로 6번 측정하였다. 효소 활성은 1분간 1 umole 의 oxidized NADPH 를 생성하는 효소의 양으로 나타내었다. 결과를 보면 앞선 결과들과 마찬가지로 H_2O_2 만 처리하여 준 군에서는 유의적으로 낮은 활성이, caffeic acid를 처리한 뒤 H_2O_2 를 처리한 군에서는 정상과 비슷한 활성이 나타났다(Fig. 1-9). 앞선 결과들과 종합하여 보면 caffeic acid의 전처리가 활성산소로 인한 산화적 스트레스를 예방하여, 항산화 효소들의 활성 감소를 막아주기 때문에 항산화 효과가 있다고 볼 수 있다.

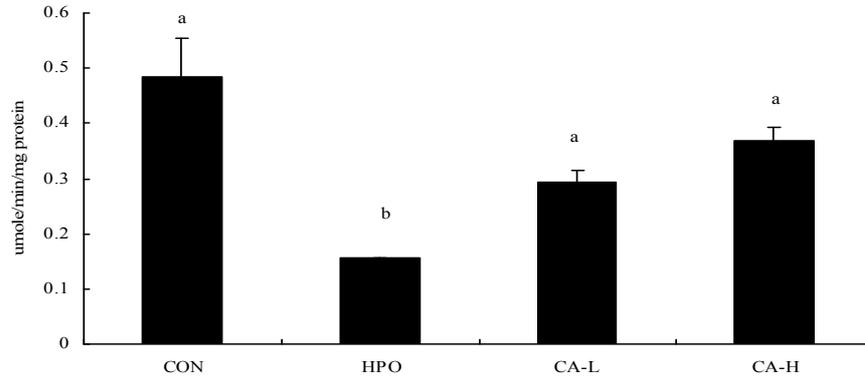


Fig. 1–9. Effect of caffeic acid (CA) on the glutathione peroxidase (GPx) activity in hydrogen peroxide–induced HepG2 cells.

Each value represents the mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

CON: Normal control group

HPO: Hydrogen peroxide (H_2O_2) control group (2 mM)

CA-L: Caffeic acid (20 ug/mL) group treated with H_2O_2

CA-H: Caffeic acid (50 ug/mL) group treated with H_2O_2

5) Glutathione

GSH는 외부의 산화적 세포손상에 대한 방어작용을 나타내는 효소의 기질로 사용되며 세포내 지질과산화물과 이물질 제거, 아미노산 수송 및 저장 등 다양한 세포기능을 수행하는 중요한 물질이다. GSH 함량은 Tietze 의 방법으로 측정하였다. HepG2 세포를 이용하여 GSH 의 양을 측정한 결과 H_2O_2 대조군에서는 다른 군들과 비교하여 GSH 양이 감소하는 경향을 나타냈으며, Caffeic acid 의 전처리에 의해 GSH 양이 정상군과 유사한 수준으로 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 1–10).

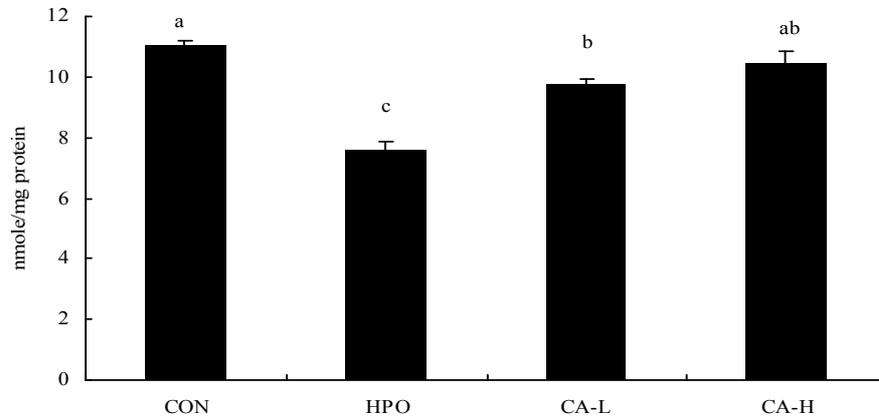


Fig. 1-10. Effect of caffeic acid (CA) on the glutathione (GSH) concentration in hydrogen peroxide-induced HepG2 cells.

Each value represents the mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

CON: Normal control group

HPO: Hydrogen peroxide (H_2O_2) control group (2 mM)

CA-L: Caffeic acid (20 ug/mL) group treated with H_2O_2

CA-H: Caffeic acid (50 ug/mL) group treated with H_2O_2

6) Malondealdehyde

지질과산화는 체내 산화적 손상으로 인한 free radicals 생성의 증가 및 항산화 방어 능력의 감소로 인해 일어난다. 지질과산화 정도는 malondealdehyde의 양을 thibarbituric acid 로 비색정량 하는 방법을 이용하여 측정하였다. MDA의 양을 측정한 결과 H_2O_2 대조군이 다른 군들과 비교하여 MDA 양이 증가하는 경향을 보였으며, caffeic acid의 전처리에 의해 MDA 양이 정상군과 유사한 수준으로 감소하는 것으로 확인되었다 (Fig. 1-11). 이는 다른 실험결과와 마찬가지로 caffeic acid의 전처리가 산화적 손상에 대한 방어효과가 있음을 입증하여 주는 결과이다.

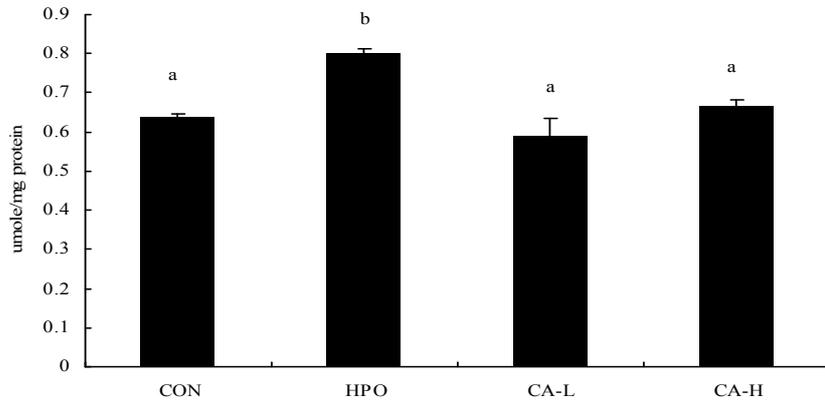


Fig. 1-11. Effect of caffeic acid (CA) on the malondialdehyde (MDA) concentration in hydrogen peroxide-induced HepG2 cells.

Each value represents the mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

CON: Normal control group

HPO: Hydrogen peroxide (H_2O_2) control group (2 mM)

CA-L: Caffeic acid (20 μ g/mL) group treated with H_2O_2

CA-H: Caffeic acid (50 μ g/mL) group treated with H_2O_2

다. 미나리 추출물의 HepG2.2.15 간염세포계에서의 항염증효과 측정

1) MTT 독성 test

Human HepG2.2.15 간염세포는 HepG2 hepatoma 세포에 hepatitis B virus (HBV) 유전자를 stable transfection 시킨 세포로서 지속적으로 HBsAg 과 HBeAg 을 분비하는 능력을 지니고 있어 간염연구에 사용되고 있다. 본 실험에서 MTT test는 RAW264.7 세포와 마찬가지로 미나리 추출물을 농도별로 human HepG2.2.15 세포에 처리한 후 7일 동안 배양하였고 매 2일째 배지와 sample을 교체하였다. 그런 다음 50 μ g/ml MTT 시약을 처리한 후 다시 4시간 배양하고 DMSO로 세포를 용융시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. OJE (80% EtOH)의 경우 800 μ g/ml 농도까지 세포의 생존에 영향을 미치지 않았으며 1000 μ g/ml 의 농도에서 약 29.3% 정도 성장이 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 1-12). 따라서 향후 실험을 위한 적정 농도는 RAW264.7 세포에서와 마찬가지로 100 - 600 μ g/ml 까지 사용하기로 하였다.

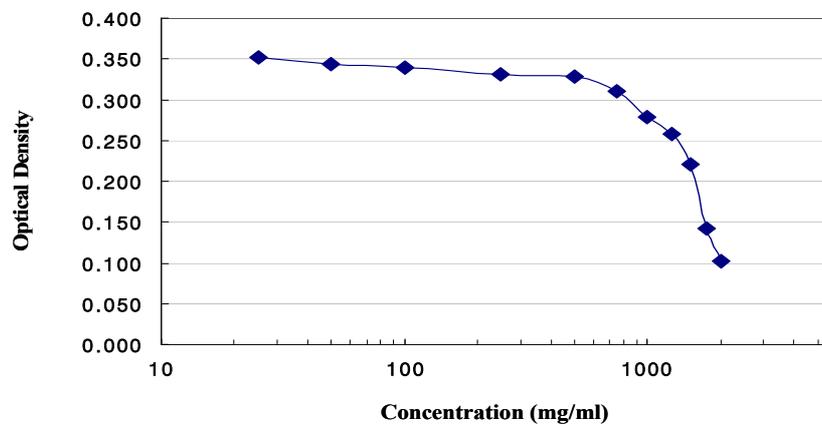


Fig. 1-12. Effect of OJE on HepG2.2.15 cell viability determined by MTT assay.

2) LPS 로 유도된 HepG2.2.15 세포에서의 proinflammatory cytokine의 발현 억제 측정

Proinflammatory cytokines (TNF-a, IL-6, IL-1b)의 발현은 염증반응과 관련하여 중요한 지표로 여겨진다. 본 실험에서는 LPS (1 ug/ml) 와 PMA (20 ng/ml)를 동시에 처리하여 proinflammatory cytokine을 유도하였다. 그 이유로는 최근에 학계에 발표된 것 같이 아마도 HBV 유전자로부터 발현되는 core protein을 포함한 구조 단백질에 의해 숙주세포의 유전자 발현이 억제되는 것으로 예상되고 있다. 따라서 PMA를 동시에 처리했을 경우 proinflammatory cytokine이 발현될 수 있는 것을 여러 preliminary 실험을 통해 알 수 있었다. 본 실험에서는 OJE의 농도를 100 - 600 ug/ml 까지 하여 TNF-a 와 IL-1b level을 측정하였다. TNF-a의 분비는 OJE의 처리에 따라 농도의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-13). 특히 1000 ug/ml의 농도에서는 상당히 억제되는 것을 볼 수 있었는데 이것은 세포의 독성에 의한 것으로 여겨지기 때문에 600 ug/ml 까지 유의성을 두었다. 또한 IL-1b 의 발현도 동시에 확인하였으며 OJE에 의한 발현 억제는 TNF-a와 마찬가지로 농도의존적으로 나타났다 (Fig. 1-14).

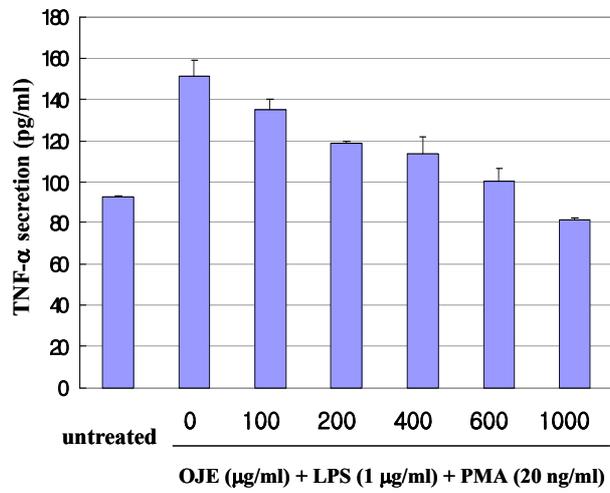


Fig. 1-13. Effect of OJE on TNF- α secretion from LPS- and PMS-stimulated HepG2.2.15 cells

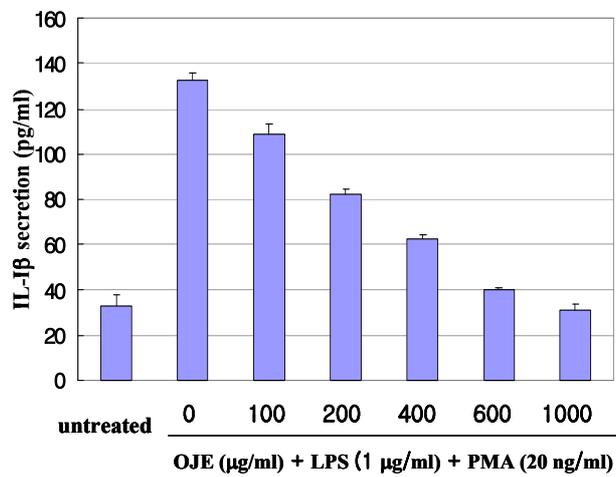


Fig. 1-14. Effect of OJE on IL-1 β secretion from LPS- and PMS-stimulated HepG2.2.15 cells

3) PGE₂ 의 발현 억제 측정

염증반응은 arachidonic acid로부터 prostaglandins(PGs)으로 전환시키는 cyclooxygenase(COX)에 의해 영향을 크게 받는 것으로 여겨지고 있다. 따라서 결과물인 PGE₂의 생성은 COX의 활성을 간접적으로 확인할 수 있는 방법이기도 하다. PGE₂의 농도를 측정한 결과 100 - 600 ug/ml에서 농도의존적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-15).

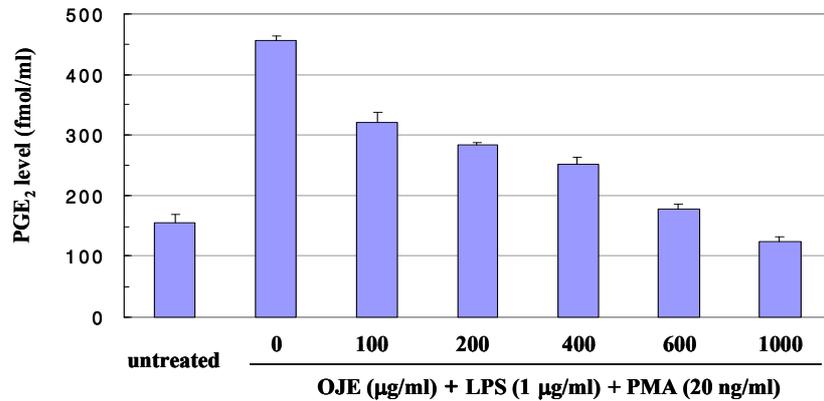


Fig. 1-15. Effect of OJE on PGE₂ secretion from LPS- and PMA-stimulated HepG2.2.15 cells

4) OJE 의 COX-2 의 발현 억제 측정

본 연구에서는 미나리 추출물인 OJE의 항염증 효과를 확인하기 위해 COX-2의 발현에 미치는 영향을 western blot 을 통해 측정하였다. COX-2 protein 발현을 측정한 결과 400 ug/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 1-16). 하지만 세 번의 반복실험을 거쳐도 전체적인 signal이 약하게 확인되는 것을 볼 수 있었는데 아마도 COX-2의 발현이 HBV 유전자의 transfection 과 관련성이 있을 것으로 생각된다.

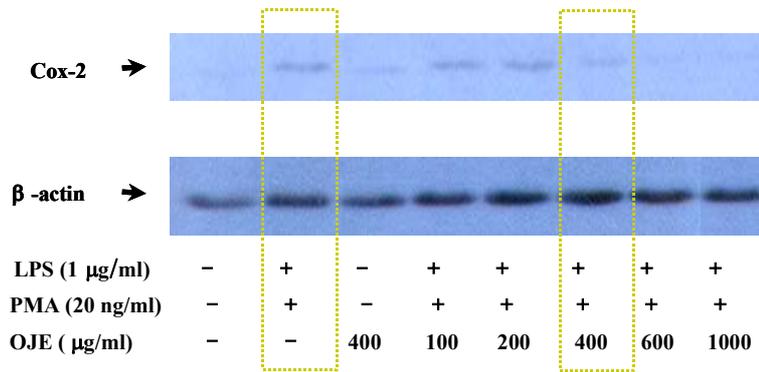


Fig. 1-16. Effect of OJE on Cox-2 protein expression in HepG2.2.15 cells

5) NF- κ B 와 AP-1 transcription factor의 활성화 및 신호전달체계 억제 효과 측정

본 실험에서는 NF- κ B 및 AP-1의 COX-2 발현에 대한 관련성을 확인하고자 luciferase를 발현하도록 유전자 조작된 NF- κ B (pNF- κ B-luciferase)와 AP-1 (pAP-1-luciferase) plasmid를 HepG2.2.15 세포에 transient transfection 시킨 다음 발현정도를 측정하였다. 특이할 점은 세포핵내에 있는 유전자를 발현시키기 위해서는 LPS와 PMA를 동시에 처리하여야 염증관련 유전자 발현을 확인할 수 있었지만 cytosol 에 transient transfection 시킨 plasmid의 경우는 LPS만으로도 활성이 나타남을 알 수 있었다. 이것은 COX-2 유전자도 plasmid 형태로 제작하여 transient transfection을 할 경우 보다 clear한 data를 얻을 수 있을 것으로 기대되었다. NF- κ B 활성화는 100 μ g/ml 이후로 감소하기 시작하여 농도의존적으로 꾸준히 600 μ g/ml 까지 감소하였다 (Fig. 1-17). 이러한 경향은 AP-1 에도 동일하게 나타나고 있음을 알 수 있다 (Fig. 1-18). 이 결과는 OJE가 NF- κ B 신호 전달 체계를 거쳐 COX-2를 조절할 수 있는 가능성을 예시하고 있으며 또한 AP-1을 동시에 활성화시킴으로 신호전달체계를 통한 유전자 조절 능력이 다양하게 나타날 수 있음을 암시하고 있다.

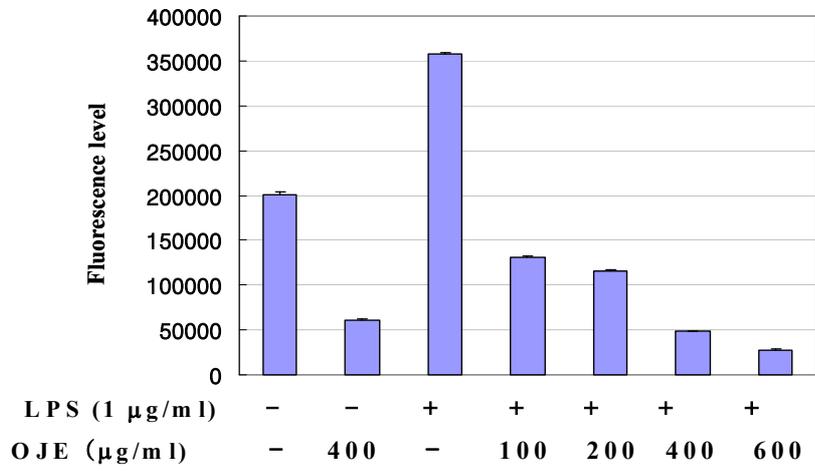


Fig. 1-17. Effect of OJE on NF- κ B transcriptional expression measured by luciferase activity in HepG2.2.15 cells transiently transfected by pNF- κ B-luc.

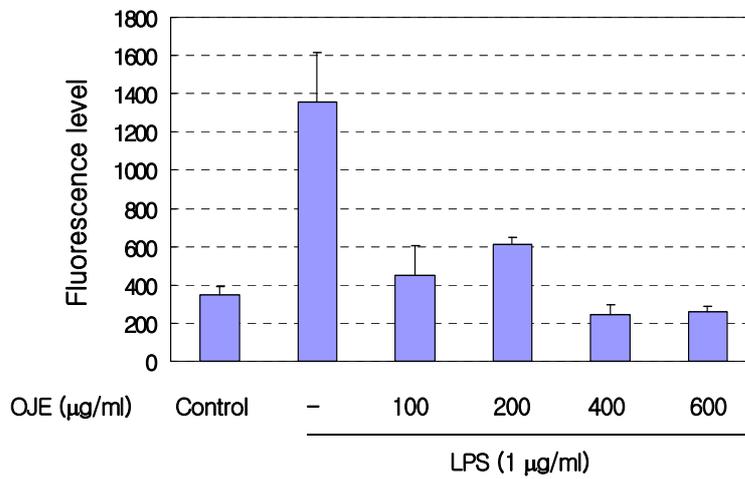


Fig. 1-17. Effect of OJE on AP-1 transcriptional expression measured by luciferase activity in HepG2.2.15 cells transiently transfected by pAP-1-luc.

6) OJE에 의한 I-kBa degradation 억제 측정

NF-kB가 활성화 될 경우 I-kBa는 NF-kB로부터 분리되어 cytosolic degradation 과정을 거치게 된다. 즉 degradation이 일어난다는 것은 I-kBa unit을 제외한 NF-kB (p50/p65) 가 세포핵으로 translocation 되어 유전자 발현을 조절하게 됨을 암시하고 있다. 본 실험에서는 cytosolic I-kBa의 degradation 정도를 측정하여 NF-kB의 활성화를 support 하였다. LPS의 처리는 I-kBa의 분리를 촉진하여 degradation 시켰음을 알 수 있었다. 특이할 만한 것은 LPS 처리없이 OJE만 처리했을 경우에도 I-kBa degradation을 다소 억제함을 볼 수 있었다. LPS 처리 이후 OJE 효과는 농도의존적으로 나타났으나 400 - 600 ug/ml에서 특히 강하게 degradation을 억제하였음을 알 수 있었다 (Fig. 1-18).

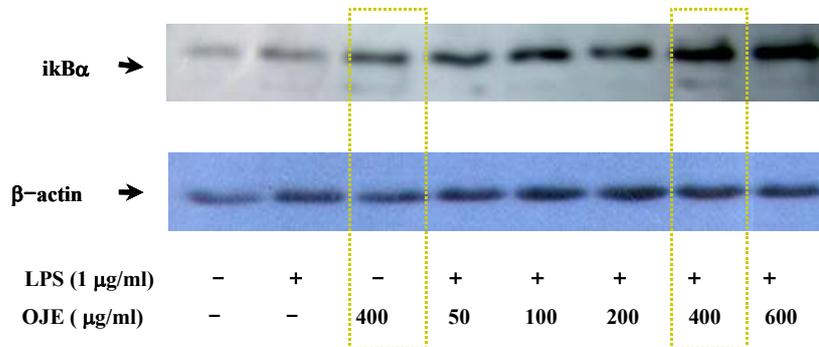


Fig. 1-18. Effect of OJE on inhibition of ikBa degradation in LPS-stimulated HepG2.2.15 cells

라. 미나리 추출물의 HBV replication 억제효과 측정

1) OJE의 HBsAg과 HBeAg의 발현 억제 측정

HepG2.2.15 세포는 B형 간염과 관련하여 지속적으로 HBsAg과 HBeAg을 분비하는 특징을 가지고 있다. B형 간염의 경우 viral DNA보다는 이러한 항원들에 의해 전염이 이루어지기 때문에 항원분비의 억제는 간염전이를 억제할 수 있는 중요한 지표가 된다. 이 세포의 경우 배양과 동시에 분비가 이루어짐으로 달리 LPS 같은 mitogen은 처리하지 않아도 무관하다. 또한 본 실험에서는 임상적으로 현재 가장 많이 사용되고 있는 reverse transcriptase inhibitor인 lamivudine을 positive control로 사용하였다. 대조군의 경우 아주 강하게 두 항원 모두 발현되고

있음을 알 수 있었고 lamivudine의 처리는 이러한 발현을 억제함을 확인하였다. OJE의 처리는 농도의존적으로 항원의 발현을 감소시킴을 알 수 있었다 (Fig. 1-19, 1-20)

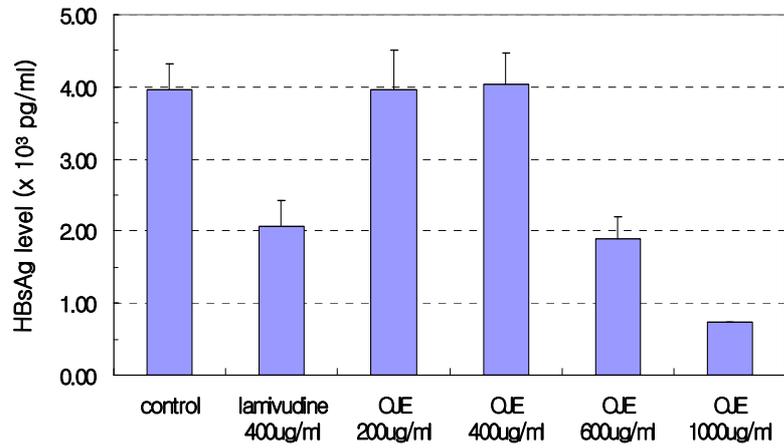


Fig. 1-19. Effect of OJE on HBsAg secretion from HepG2.2.15 cells. Lamivudine was used as positive control.

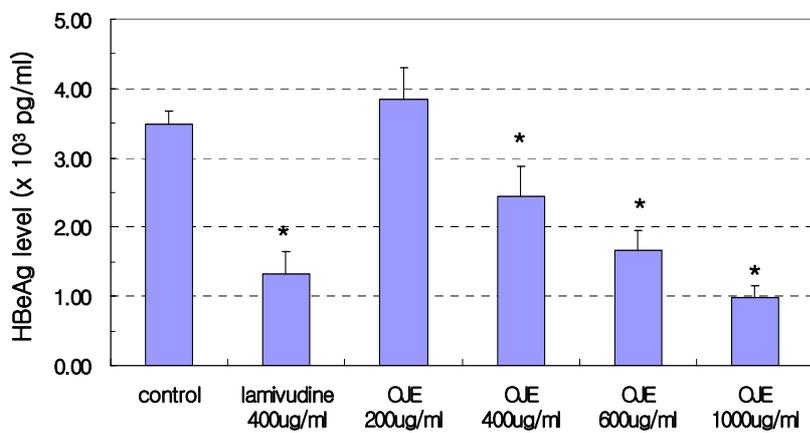


Fig. 1-20. Effect of OJE on HBeAg secretion from HepG2.2.15 cells. Lamivudine was used as positive control.

2) OJE에 의한 HBV mRNA 발현 억제 효과 측정

미나리 80% 에탄올 추출물인 OJE가 유전자 및 transcription factor에 작용할 수 있음을 확인한 바가 있어 HBV 유전자의 발현에도 영향을 미칠 수 있는 지 실험하였다. 이러한 관점은 HBsAg과 HBeAg의 발현에 OJE가 영향을 끼쳤기에 추론할 수 있는 것이기도 하다. 따라서 본 실험에서는 OJE를 농도별로 하여 7일간 배양한 후 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 HBV 유전자 transcription 억제 효과가 있는 지 확인하였다. positive control 로 사용된 lamivudine의 경우 다른 논문에서 발표한 것과 같이 HBV의 발현이 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 1-21). 또한 OJE 400 ug/ml 이상의 농도에서 HBV 발현 억제 효과가 있음을 확인하였다.

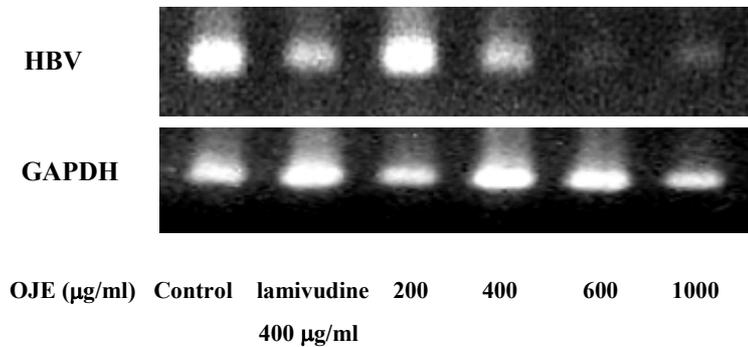


Fig. 1-21. Effect of OJE on HBV replication in HepG2.2.15 cells and RT-PCR was performed to detect HBV mRNA.

마. 미나리 추출물의 간염세포계에서의 apoptosis 효과

1) DNA fragmentation assay 측정

이전의 MTT test에서 OJE 1000 ug/ml 이상의 농도에서 독성이 나타나는 것으로 확인된 바 있다. 여기서의 독성이란 의미는 세포의 수적인 감소만을 측정한 것으로서 감소한 원인에 대해서는 평가되지 않았다. 따라서 미나리 추출물인 OJE에 의해 HepG2.2.15 세포에서의 apoptosis 과정을 측정함으로써 그 원인을 규명하고자 하였다. 비록 저농도에서라도 장기간에 걸쳐 서서히 apoptosis가 진행될 수 있음에 따라 100 - 1000 ug/ml 에 까지 OJE를 처리하여 DNA fragmentation을 확

인하였다 (Fig. 1-22). 다소 미비한 점은 대조군에서도 fragmentation이 나타나기 때문에 실험적인 오차가 있을 가능성이 대두된 다 하겠다. 하지만 전반적으로 OJE의 농도를 증가할 시 DNA fragmentation이 많아지는 경향을 보인다 하겠다.

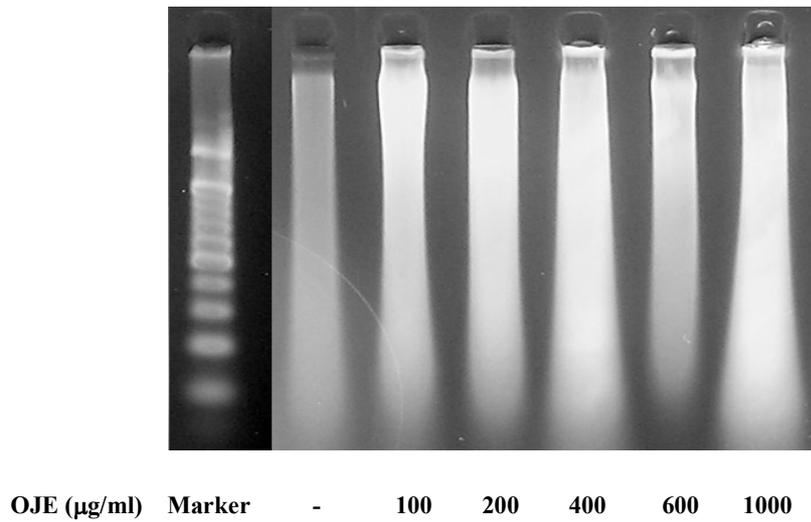


Fig. 1-22. Effect of OJE on DNA fragmentation in HepG2.2.15 cells.

2) Bcl-2/Bax의 발현 측정

Bcl-2는 anti-apoptotic protein이며 Bax는 apoptosis 촉진인자로서 알려져 있다. 따라서 이러한 조절단백질의 발현을 측정함으로써 OJE의 apoptosis 조절효과에 대해 확인하고자 하였다. Bcl-2의 발현은 OJE 농도의 증가에 대해 큰 변화를 나타내지는 않았지만 Bax의 발현은 다소 증가하는 일면을 나타냄에 따라 OJE의 apoptosis 유도효과는 Bcl-2등의 anti-apoptotic factor와는 무관하게 apoptotic factor를 활성화시킴을 알 수 있다 (Fig. 1-23)

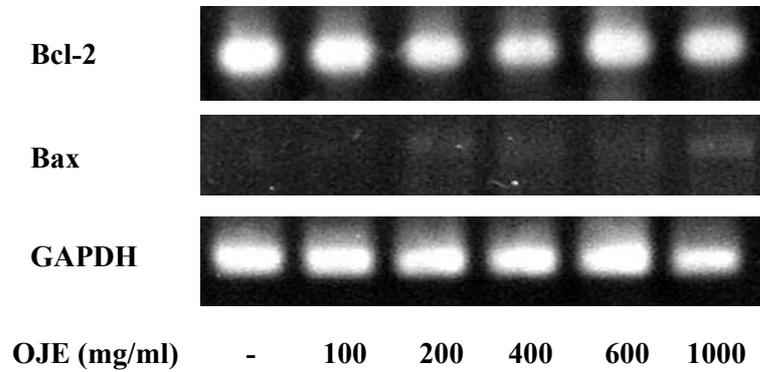


Fig. 1-23. Effect of OJE on apoptotic protein index in HepG2.2.15 cells

바. 클로로포름 분획의 human HepG2.2.15 간염세포계에서의 항염증효과 측정

항산화에 효과가 있는 분획과는 달리 항염증효과는 오히려 클로로포름 분획에서 보다 높게 나타났기 때문에 이에 대한 간염세포에서의 항염효과를 측정하였다.

1) MTT 독성 test

Human HepG2.2.15 간염세포는 HepG2 hepatoma 세포에 hepatitis B virus (HBV) 유전자를 stable transfection 시킨 세포로서 지속적으로 HBsAg 과 HBeAg 을 분비하는 능력을 지니고 있어 간염연구에 사용되고 있다. 본 실험에서 MTT test는 클로로포름 분획을 농도별로 human HepG2.2.15 세포에 처리한 후 7일 동안 배양하였고 매 2일째 배지와 sample을 교체하였다. 그런 다음 50 ug/ml MTT 시약을 처리한 후 다시 4시간 배양하고 DMSO로 세포를 용융시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 클로로포름 분획의 경우 400 ug/ml 농도까지 세포의 생존에 영향을 미치지 않았으며 1000 ug/ml 의 농도에서 약 75% 정도 성장이 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 1-24). 따라서 향후 실험을 위한 적정 농도는 20 - 200 ug/ml 까지 사용하기로 하였다.

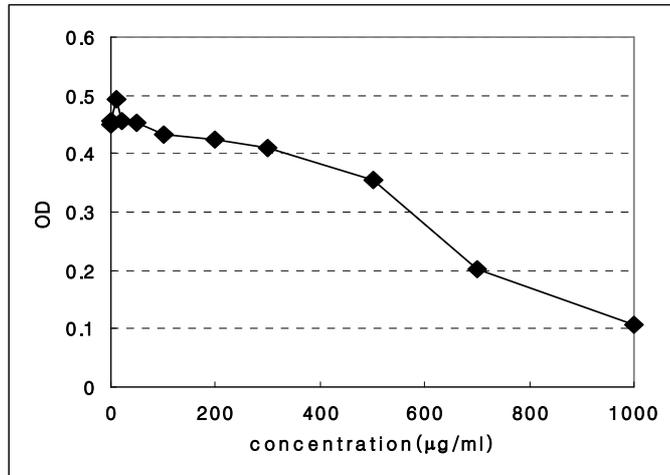


Fig. 1-24. Effect of OJ chloroform fraction (OJE-CF) in HepG2.2.15 cell viability

2) LPS/PMA 로 유도된 HepG2.2.15 세포에서의 proinflammatory cytokine의 발현 억제 측정

Proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1b)의 발현은 염증반응과 관련하여 중요한 지표로 여겨진다. 본 실험에서는 LPS (1 μ g/ml) 와 PMA (20 ng/ml)를 동시에 처리하여 proinflammatory cytokine을 유도하였다. 그 이유로는 최근에 학계에 발표된 것 같이 아마도 HBV 유전자로부터 발현되는 core protein을 포함한 구조 단백질에 의해 숙주세포의 유전자 발현이 억제되는 것으로 예상되고 있다. 따라서 PMA를 동시에 처리했을 경우 proinflammatory cytokine이 발현될 수 있는 것을 여러 preliminary 실험을 통해 알 수 있었다. 본 실험에서는 클로로포름의 농도를 20 - 200 μ g/ml 까지 하여 TNF- α , IL-6 와 IL-1b level을 측정하였다. TNF- α 의 분비는 클로로포름 분획의 처리에 따라 농도 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-25). 특히 100과 200 μ g/ml의 농도에서는 상당히 억제되는 것을 볼 수 있었다. 또한 IL-6와 IL-1b 의 발현도 동시에 확인하였으며 클로로포름 분획에 의한 발현 억제는 TNF- α 와 마찬가지로 농도 의존적으로 나타났다 (Fig. 1-26, 1-27).

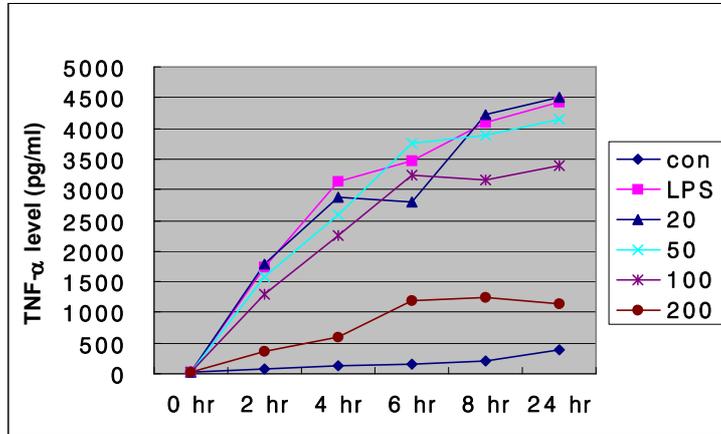


Fig. 1-25. Effect of chloroform fraction on TNF- α secretion from LPS/PMA-stimulated HepG2.2.15 cells

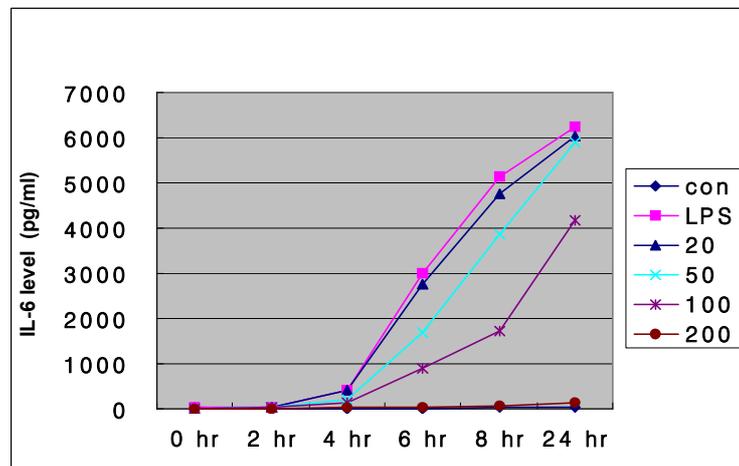


Fig. 1-26. Effect of chloroform fraction on IL-6 secretion from LPS/PMA-stimulated HepG2.2.15 cells

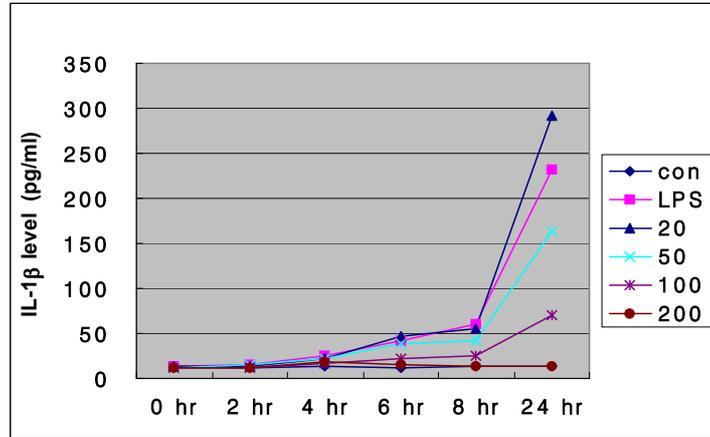


Fig. 1-27. Effect of chloroform fraction on IL-1b secretion from LPS/PMA-stimulated HepG2.2.15 cells

3) PGE₂ 의 발현 억제 측정

염증반응은 arachidonic acid 로부터 prostaglandins(PGs)으로 전환시키는 cyclooxygenase(COX)에 의해 영향을 크게 받는 것으로 여겨지고 있다. 따라서 결과물인 PGE₂ 의 생성은 COX의 활성을 간접적으로 확인할 수 있는 방법이기도 하다. PGE₂ 의 농도를 측정한 결과 50 - 200 ug/ml 에서 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-28).

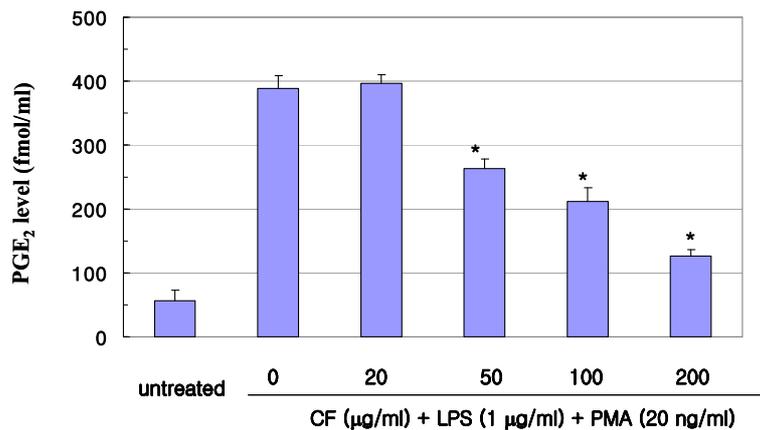


Fig. 1-28. Effect of chloroform fraction on PGE₂ secretion from LPS/PMA-stimulated HepG2.2.15 cells

4) 클로로포름 분획 의 COX-2 의 발현 억제 측정

본 연구에서는 클로로포름 분획의 항염증 효과를 확인하기 위해 COX-2의 발현에 미치는 영향을 western blot 을 통해 측정하였다. COX-2 protein 발현을 측정한 결과 100 과 200 ug/ml 이상의 농도에서 유의성 있게 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 1-29).

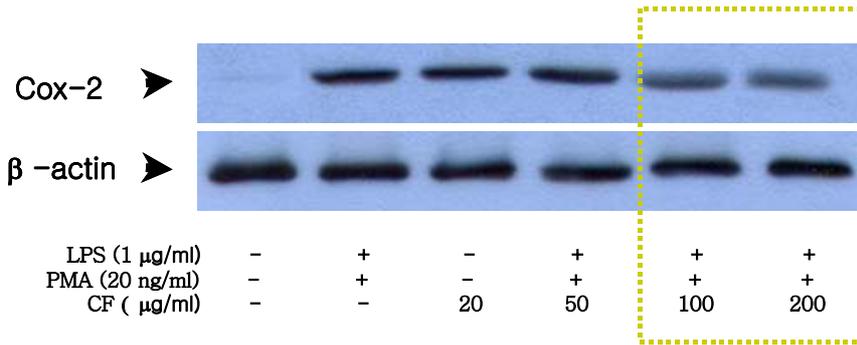


Fig. 1-29. Effect of chloroform fraction on Cox-2 protein expression determined by western blot analysis in LPS/PMA-stimulated HepG2.2.15 cells

5) NF- κ B 와 AP-1 transcription factor의 활성화 및 신호전달체계 억제 효과 측정

본 실험에서는 NF- κ B 및 AP-1의 COX-2 발현에 대한 관련성을 확인하고자 luciferase를 발현하도록 유전자 조작된 NF- κ B (pNF- κ B-luciferase)와 AP-1 (pAP-1-luciferase) plasmid를 HepG2.2.15 세포에 transient transfection 시킨 다음 발현정도를 측정하였다. 특이할 점은 세포핵내에 있는 유전자를 발현시키기 위해서는 LPS와 PMA를 동시에 처리하여야 염증관련 유전자 발현을 확인할 수 있었지만 cytosol 에 transient transfection 시킨 plasmid의 경우는 LPS만으로도 활성이 나타남을 알 수 있었다. 이것은 COX-2 유전자도 plasmid 형태로 제작하여 transient transfection을 할 경우 보다 clear한 data를 얻을 수 있을 것으로 기대되었다. NF- κ B 활성화는 100 ug/ml 이후로 감소하기 시작하여 농도 의존적으로 꾸준히 600 ug/ml 까지 감소하였다 (Fig. 1-30). 이러한 경향은 AP-1 에도 동일하게 나타나고 있음을 알 수 있으나 그 정도는 매우 미약하였다 (Fig. 1-30). 이 결과는 클로로포름 분획이 주로 NF- κ B 신호 전달 체계를 거쳐 COX-2를 조절할 수 있는 가능성을 예시하고 있으며 또한 부분적으로 AP-1을 동시에 활성화시킴으로 신호

전달체계를 통한 유전자 조절 능력이 다양하게 나타날 수 있음을 암시하고 있다.

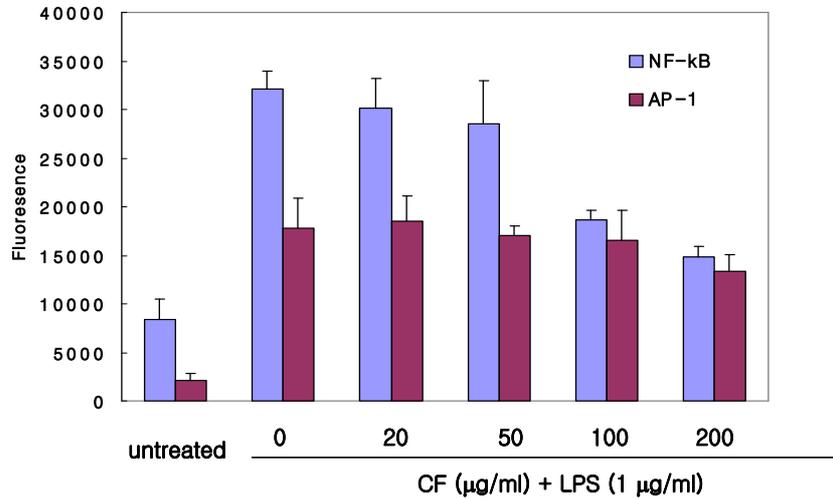


Fig. 1-30. Effect of chloroform fraction on NF-kB and AP-1 transcriptional expression measured by luciferase activity in HepG2.2.15 cell transiently transfected with pNF-kB-luc and pAP-1-luc.

6) 클로로포름 분획에 의한 I-kBa degradation 억제 측정

NF-kB가 활성화 될 경우 I-kBa는 NF-kB로부터 분리되어 cytosolic degradation 과정을 거치게 된다. 즉 degradation이 일어난다는 것은 I-kBa unit을 제외한 NF-kB (p50/p65) 가 세포핵으로 translocation 되어 유전자 발현을 조절하게 됨을 암시하고 있다. 본 실험에서는 cytosolic I-kBa의 degradation 정도를 측정하여 NF-kB의 활성화를 support 하였다. LPS/PMA의 처리는 I-kBa의 분리를 촉진하여 degradation 시켰음을 알 수 있었다. LPS/PMA 처리 이후 클로로포름 분획의 효과는 농도 의존적으로 나타났으나 100 - 200 ug/ml에서 특히 강하게 degradation을 억제하였음을 알 수 있었다 (Fig. 1-31).

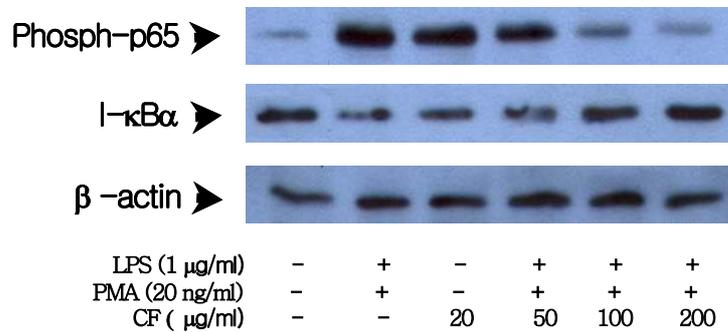


Fig. 1-31. Effect of chloroform fraction on NF- κ B translocation and I κ B α degradation in HepG2.2.15 cells.

사. 클로로포름 분획의 HBV replication 억제효과 측정

1) OJE의 HBsAg과 HBeAg의 발현 억제 측정

HepG2.2.15 세포는 B형 간염과 관련하여 지속적으로 HBsAg과 HBeAg을 분비하는 특징을 가지고 있다. B형 간염의 경우 viral DNA보다는 이러한 항원들에 의해 전염이 이루어지기 때문에 항원분비의 억제는 간염전이를 억제할 수 있는 중요한 지표가 된다. 이 세포의 경우 배양과 동시에 분비가 이루어짐으로 달리 LPS 같은 mitogen은 처리하지 않아도 무관하다. 또한 본 실험에서는 임상적으로 현재 가장 많이 사용되고 있는 reverse transcriptase inhibitor인 lamivudine을 positive control로 사용하였다. 대조군의 경우 아주 강하게 두 항원 모두 발현되고 있음을 알 수 있었고 lamivudine의 처리는 이러한 발현을 억제함을 확인하였다. 클로로포름 분획의 처리는 농도 의존적으로 항원의 발현을 감소시킴을 알 수 있었다 (Fig. 1-32, 1-33)

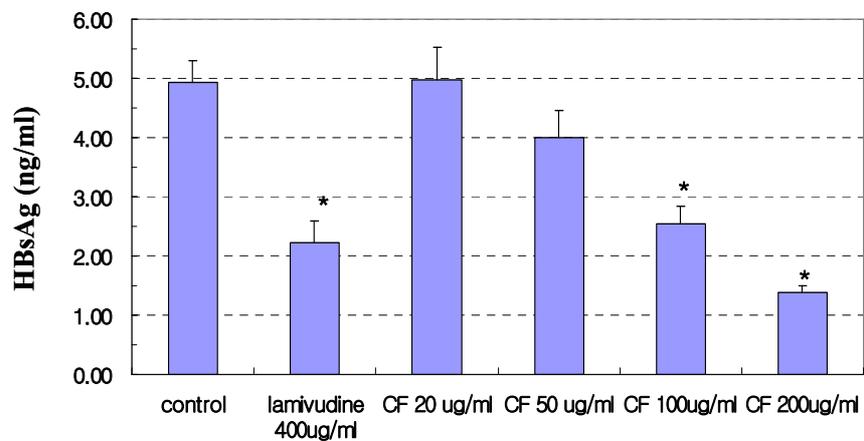


Fig. 1-32. Effect of chloroform fraction on HBsAg secretion from HepG2.2.15 cells

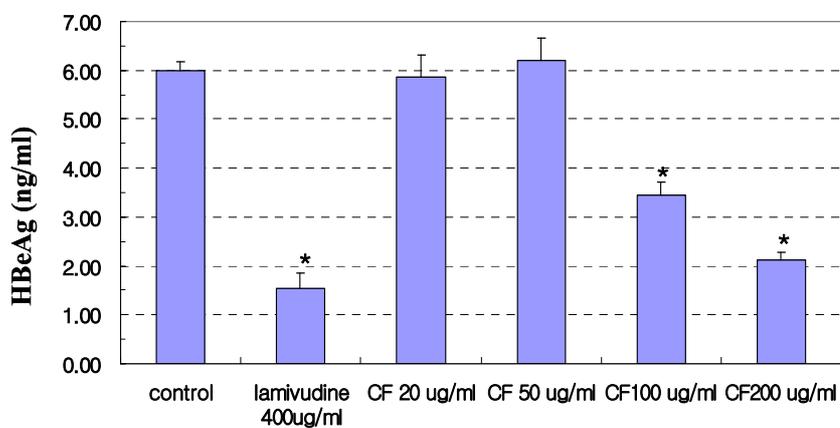


Fig. 1-32. Effect of chloroform fraction on HBeAg secretion from HepG2.2.15 cells

2) 클로로포름 분획에 의한 HBV mRNA 발현 억제 효과 측정

클로로포름 분획이 유전자 및 transcription factor에 작용할 수 있음을 확인한 바가 있어 HBV 유전자의 발현에도 영향을 미칠 수 있는 지 실험하였다. 이러한 관점은 HBsAg과 HBeAg의 발현에 클로로포름 분획이 영향을 끼쳤기에 추론할 수 있는 것이기도 하다. 따라서 본 실험에서는 클로로포름 분획을 농도별로 하여 7일간 배양한 후 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 HBV 유전자 transcription 억제 효과가 있는 지 확인하였다. positive control 로 사용된 lamivudine의 경우 다른 논문에서 발표한 것과 같이 HBV의 발현이 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 1-33). 또한 클로로포름 분획 100 ug/ml 이상의 농도에서 HBV 발현 억제 효과가 있음을 확인하였다.

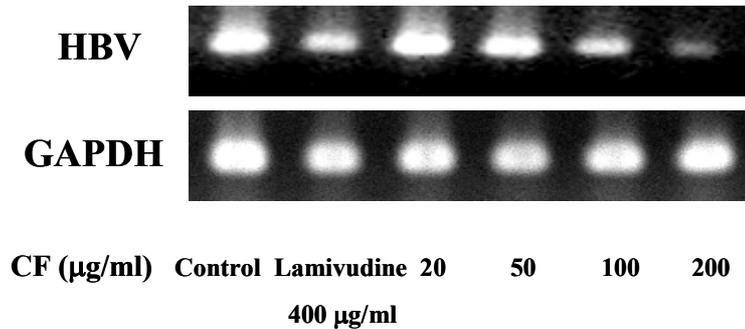


Fig. 1-33. Effect of chloroform fraction on HBV replication in HepG2.2.15 cells

아. HepG2.2.15 세포에서 caffeic acid와 다른 화합물과의 상승효과 연구

1) PGE₂ 발현 억제에 미치는 영향

미나리의 주요 활성 성분이 caffeic acid로 확인되었는데 B형 간염치료에 긍정적인 역할을 하는 항산화제와 역전사효소 억제제인 lamivudine에 대한 상승효과를 연구하는 것은 향후 미나리 활성물질을 이용하여 보조적 기능성식품으로의 개발에 도움이 되리라 생각된다. 본 실험에서 caffeic acid, vitamin C, lamivudine 만을 처리했을 때에는 PGE₂의 유리가 일어나지 않았지만 LPS/PMA를 처리하였을 때 PGE₂의 유리도는 매우 높게 나타났다(Fig. 1-34). 이에 vitamin C와 caffeic acid, lamivudine과 caffeic acid를 동시에 처리하였을 때 모두 PGE₂ 유리 억제효과가

caffeic acid만 처리했을 때 비해 효과적으로 나타났다. 하지만 lamivudine과 함께 처리한 군에서 보다 높은 PGE₂ 억제효과가 관찰되었는데 이것은 HepG2.2.15 세포 내에서 활성을 가지고 있는 B형 간염 바이러스로 인해 염증유발이 지속적으로 이루어지고 있으며 바이러스의 확산을 억제하였을 경우 염증유발도 일정 정도 억제됨을 간접적으로 파악할 수 있겠다.

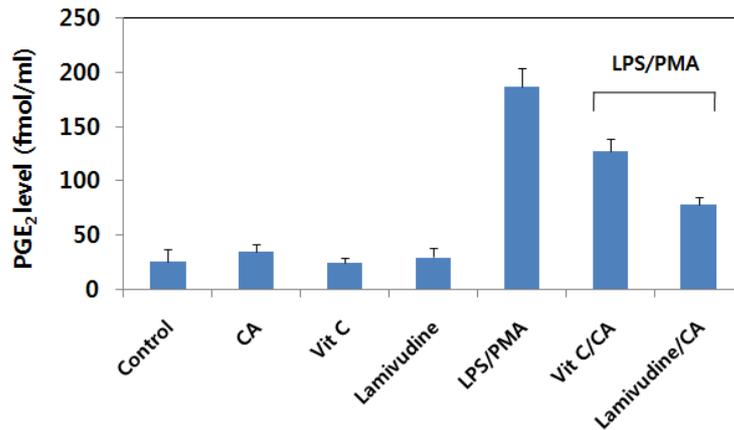


Fig. 1-34. Effect of co-treatment of caffeic acid with vitamin C and lamivudine on PGE₂ secretion from LPS/PMA-stimulated HepG2.2.15 cells

2) proinflammatory cytokines의 발현에 미치는 caffeic acid와 다른 화합물과의 상승효과

proinflammatory cytokines중 대표적인 TNF- α 와 IL-1b의 발현에 미치는 caffeic acid와 vitamin C 및 lamivudine의 상승효과를 확인한 결과 vitamin C와 caffeic acid에 비해 lamivudine과 caffeic acid의 조합이 보다 효율적인 것으로 나타났다 (Fig. 1-35). 이것은 caffeic acid의 항산화효과가 vitamin C보다 훨씬 높은 것으로 보고되고 있는데 아마도 vitamin C의 항산화효과보다 caffeic acid의 효과가 큰 관계로 이미 포화점에 도달하였거나 아니면 caffeic acid에 비해 vitamin C의 작용이 미약하기 때문인 것으로 생각된다. 반면 lamivudine은 본 B형간염 모델에서 바이러스의 복제 및 활성을 억제하는 효과가 있는 것으로 caffeic acid와 혼합해서 사용할 경우 보다 효과적인 상승효과가 있는 것으로 확인되었다.

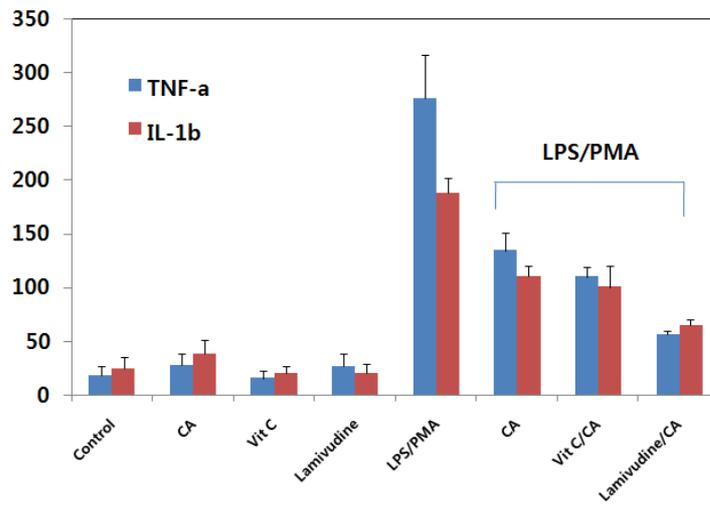


Fig. 1–35. Effect of co-treatment of caffeic acid with vitamin C and lamivudine on proinflammatory cytokine secretion from LPS/PMA-stimulated HepG2.2.15 cells

제 2 절 미나리 유효성분의 추출, 발효 및 제품개발에 관한 연구

제 1 항 재료 및 방법

가. 재료

본 실험에 사용된 미나리는 전남 화순군에서 자생하는 것으로 (주)한우물에서 공급받아 사용하였다. Folin-ciocalteu reagent, DCFH-DA(2',7'-dichlorofluoresceindiacetate), MEM medium, Hanks balanced salt solution(HBSS), H₂O₂, XTT는 Sigma (St. Louis, MO)사로부터 구입하였다. 한편 streptomycin, amphotericin B, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(Grand Island, NY)사로부터 구입하여 사용하였다.

본 실험에 사용된 HepG2 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양 받았다. 발효 및 제품개발을 위하여 (주)한우물에서 당액추출을 위하여 장기추출 저장한 액 시료에서 미생물을 분리하였고 Biomerieux 동정 kit을 이용하여 미생물을 동정하였다. 또한 동정된 미생물로부터 발효된 발효액을 농축, 유효성분을 추출하여 간기능 활성에 대한 변화를 아래 시행하였던 방법과 동일하게 측정하였다.

나. 실험방법

1) HepG2 세포주 배양

HepG2 cell line의 배지는10%(v/v) FBS, 0.5%(v/v), 50 g/ml streptomycin, 50 IU/ml penicillin, 0.125 g/ml fungizone, 3.7 g sodium bicarbonate를 함유한 MEM을 사용하였고, 배양은 37C, 5% CO₂, 95% humid air로 조절된 배양기를 사용하였다. 배지는 2일마다 교환하였으며, confluency 90%에서 subculture를 실시하였다.

2) 미나리 추출물 조제

분말화 된 미나리 50 g을 flask에 넣고 80% ethanol, methanol, 또는 distilled water를 1 L씩 첨가한 후 250℃에서 3 시간 동안 환류 추출한 후 각각을 농축, 동결건조하여 ethanol-, methanol-, 그리고 hot water-extract를 얻었다. Cold water extract의 경우에는 실온에서 4 시간 stirring을 실시하였다.

3) 활성물질의 분획

농축한 ethanol 추출물을 증류수에 분산시킨 후 hexane, chloroform,

ethyl acetate순으로 분획하여 감압 농축하였다(Fig. 1).

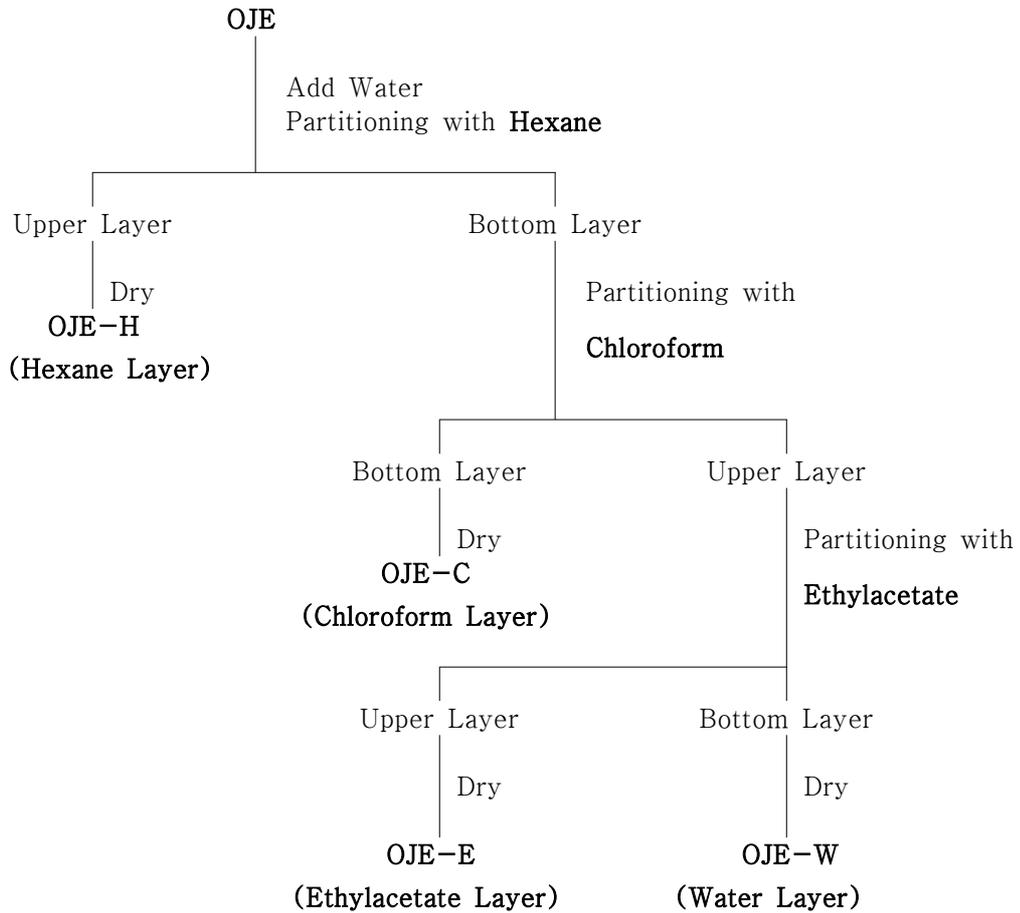


Fig. 2-1. Solvent partitioning of ethanol extract from *Oenanthe javanica* DC.

4) Silica gel 60에 의한 Prep. TLC

활성획분을 농축한 후 목적물질이 잘 분리될 수 있는 조건인 ethyl acetate-hexane-water-formic acid (40 : 20 : 5 : 5, v/v/v/v)의 전개 용매조건으로 silica coated TLC를 실시하여 활성획분을 각각 분리하였다.

5) HPLC

활성획분을 TSK gel ODS-100(reverse phase; 4.6 × 250 mm)에 주입하고 아래와 같은 HPLC 조건에서 30% methanol과 0.1% phosphoric acid의 전개용매를 사용하여 1 mL/min의 유속으로 용출하여 활성획분만을 농축하였다.

Apparatus	Hitachi
Detector	Hitachi L-2400 (UV detector)
Column	TSK gel ODS-100 (reverse phase; 4.6 × 250 mm)
Flow rate	1.0 mL/min
Mobil phase	0.1% Phosphoric acid in 30% MeOH
Injection volumn	10 µl

6) IR spectroscopy

IR 분석은 분리시료에 10배 정도의 곱게 같은 KBr을 넣어 혼합하여 KBr disc를 조제한 후 IR spectrometer(Bomen Michelson Series MB102-C15)를 사용하여 측정하였다.

7) FAB mass spectroscopy

Normal Ion FAB mass system에 의해 정제시료의 분자량을 측정하였다. Matrix는glycerol, 3-nitrobenzyl alcohol을 사용하여 FAB mass spectrometer(VG70-VSEQ)로 측정하였다.

8) Nnuclear magnetic resonance spectroscopy

¹H-NMR, ¹³C-NMR은 분리시료를 MeOD(methyl-d3 alcohol-d1)에 녹인 후 NMR Spectrometer (Bruker AMX-500 NMR)를 사용하여 분리시료의 이화학적 이동(ppm)을 조사하였다.

9) 일반성분 분석

수분, 조단백질, 조지방, 조회분, 식이섬유, 무기질 등의 성분분석은 식품 공진상의 방법에 따라 분석하였다.

10) 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법으로 측정하였다. 각 시료는 1000

ug/mL, 2000 ug/mL의 농도를 이용하였다. 각 농도의 시료 1 mL을 25 mL volumetric flask에 넣고 증류수 9 mL을 첨가한 후, 1 mL의 Folin&Ciocalteu's Phenol Reagent 넣고 잘 섞어 상온에 5분간 방치하였다. 7% Na₂CO₃를 10 mL 넣고 총량이 25 mL이 되도록 증류수를 첨가한 후 23°C에서 90분간 방치하고 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 폴리페놀 함량은 0, 100, 200, 300, 400 ug/mL 농도의 Gallic Acid로 작성된 표준곡선식을 이용하여 산출하였다.

11) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등의 colormetric 방법으로 측정하였다. 각 시료는 1000 ug/mL, 2000 ug/mL의 농도를 이용하였다. 각 농도의 시료 1 mL에 4 mL의 증류수를 첨가하고 5% NaNO₂ 0.3 mL을 넣어 잘 혼합하였다. 상온에 5분간 방치하고 10% AlCl₃ 0.3 mL을 첨가하였다. 상온에 6분간 방치한 후 1M NaOH 2 mL을 넣고, 증류수를 2.4 mL 넣고 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 플라보노이드 함량은 0, 100, 200, 300, 400, 500 ug/mL 농도의 Catechin으로 작성된 표준곡선식을 이용하여 산출하였다.

12) DPPH radicals 소거능

Brand-Williams의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료는 에탄올에 녹인 후 10-5000 ug/mL 농도로 준비하였다. 각 농도의 시료 0.05 mL에 0.1 mM DPPH 950 uL를 혼합하였다. 상온에 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 농도별 DPPH radical 소거능 활성은 다음의 식을 이용하여 산출하고, 그 소거능이 50%가 되는 샘플의 농도를 IC₅₀으로 표현하였다.

13) Superoxide anion radical 소거능

Noro의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.5 mM Xanthine과 0.5mM Tetrazolium blue 를 0.05 mM EDTA를 함유한 50 mM Potassium phosphate buffer(pH7.4)에 잘 혼합하여 기질액을 준비한다. 각 농도로 준비한 시료 0.1 mL에 준비한 기질액 0.9 mL을 넣고 1mL의 xanthine oxidase(0.05 Unit/mL)을 첨가하였다. 37°C에서 30분간 배양한 후, 2N HCl을 2 mL 넣어 반응을 종료한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

14) 지질과산화 억제능

Lin의 방법을 변형하여 측정하였다. Linoleic acid 0.1 mL과 Tween 80 0.2 mL, 증류수 19.7 ml을 혼합하여 Linoleic acid emulsion을 제조하였다. Linoleic

acid emulsion 1ml에 0.01% FeSO₄ 0.2 mL, 0.56 mM H₂O₂ 0.2 mL, 시료 0.4 mL 을 가볍게 섞어주고 37°C에서 14시간 배양 하였다. 0.4% BHT 0.2 mL, 4% TCA 0.2 mL, 0.8% TBA 2 mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 100°C에서 15분간 끓여주었다. Cooling 한 후 3000rpm으로 20분간 원심분리 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

15) 세포독성

세포독성은 Rochem 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 24 wells plate에 2×10^5 cells/well의 세포를 분주한 후 24 시간동안 배양하였다. 이 후 배지를 제거하고 HBSS buffer로 세포를 깨끗이 닦아낸 후, 대상시료가 용해된 serum-free 배지 1 mL을 분주하고 재 배양하였다. 24 시간이 흐른 후 각 well에 0.25 mL의 XTT-PMS 용액(1 mg XTT and 10 g PMS/mL of MEM without phenol red)을 첨가하고 다시 2 시간 배양한다. 세포독성도는 formazan의 형성 정도를 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정함으로써 얻어진다.

16) 간 기능 향상능 측정

시료의 간 보호 활성은 HepG2 cell line을 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주한 후 배양하여 24시간이 되었을 때 아래와 같이 실시하였다. 배양 후 배지를 제거하고 각 well에 시료와 2 mM H₂O₂가 포함되어 있는 serum이 함유되지 않은 배지를 첨가하고 24시간 동안 배양기에서 반응시켰다. 반응 후 시료와 H₂O₂가 함유된 배지를 제거하고 XTT 용액을 넣어 2시간 동안 반응시켰다. 생성된 formazan을 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구는 시료대신 시료를 녹인 용매인 ethanol만을 사용하였으며 양성 대조구로는 ethanol과 2 mM H₂O₂만을 처리하였다.

17) 미나리 함유 간 기능 개선 유용물질의 공업적 추출방법

미나리 5 kg으로부터 간 기능 개선 성분을 공업적으로 대량 추출하기 위해 10 L용 steam jacket이 부착된 추출기를 사용하여 20배의 ethanol로 2시간 동안 추출한 후 ethanol을 제거한 잔사를 동일 추출기를 사용하여 20배의 물로 온도 별, 추출횟수별로 추출하였다.

18) 미나리 함유 간 기능 개선 유용물질의 공업적 수준에서의 분리 및 정제

가) 탈색방법

미나리의 대량추출물에 대한 탈색방법을 활성탄, Diaion HP-20, Diaion HP-21 등 비교적 저가의 흡착제를 사용하여 batch와 open column에서 검토하였다.

나) 한외여과를 이용한 공업적 수준에서의 정제법 확립

탈색시킨 시료를 대상으로 한외여과를 실시하였다. 한외여과장치는 Millipore masterflex를 사용하였고 여과막으로는 1천, 3천, 5천, 1만 등의 MW-cut off column형 막을 사용하여 실시하였다.

19) 당액추출물로부터 발효미생물의 선별과 동정

미나리 발효 미생물을 선별하기 위하여 불미나리 당액제조 용기중에서 미생물을 screening하기로 하였고 현재 제조판매중인 불미나리 액기스는 20% 고과당액(대상)에 마른 불미나리 건조분을 넣고서 침출시킨다. 그리고 이를 (5-10℃)유지저온에서 장기간 숙성 및 발효를 통하여 제품화를 한다. 미나리의 발효에 적절한 미생물은 오랜기간 발효가 진행된 저장용기로부터 sampling하여 미생물을 선별하였다. 동정에서는 기초적인 생화학 시험이 가능한 동정키트를 이용하여 사용하였다.

20) 선별 미생물을 이용한 미나리발효액으로 유효성분의 추출과 간보호 활성의 비교

참여업체에서 screening한 미생물을 이용, 미나리 건조분으로 단일 소재에 peptone을 질소원으로 첨가 30℃에서 7일간 배양시켜 발효시킨후 여액을 걸러 건분을 제거하고 농축시킨 다음 여기에 에탄올을 첨가하여 앞서의 동일한 방법으로 미나리 발효 에탄올 추출물을 얻어 과제 초기에 우려하였던 독성에 대한 검사와 간보호 활성에 대한 비교를 통하여 발효에 대한 정당성 여부를 판별하기로 하였다.

21) 산업적 순도수준의 정제물질에 대한 소재화 적성 검토 및 시제품 제작

미나리 ethanol 추출분말 및 열수추출물 100 mg에 부형제로서 유당 100 mg 및 옥수수 전분 40 mg, 산미제로서 구연산 10 mg을 혼합하여 함량 100 mL의 음료를 제작하였다. 본 제품은 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속한다. 따라서 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가속시험(고온, 고압)을 실시하여 제품의 안정성 및 미생물 검사를 실시하였다.

제 2 항 결 과

가. 미나리의 성분분석

미나리의 뿌리, 줄기, 잎을 대상으로 탄수화물, 지방, 단백질, 회분, 식이섬유 및 수분 함량의 일반성분과 마그네슘, 망간, 철, 구리, 칼륨, 나트륨, 칼슘, 아연 등의 무기질성분을 측정하였다. 그 결과 식이섬유가 다량 함유되어져 있으며 구성당으로는 fructose의 함량이 높았다. 무기질로는 칼륨 및 칼슘이 함량이 상대적으로 높음을 알 수 있었다.

Table 2-1. Major and minor constituents of *Oenanthe Javanica* DC..

Constituent (mg/100 g)	Root	Stem	Leaf	Average
Moisture	88.91	90.07	89.72	89.85
Protein	2.53	0.87	1.42	1.60
Lipid	0.93	0.44	0.32	0.56
Ash	1.18	1.31	3.42	1.97
Dietary Fiber	1.98	2.27	2.07	2.10
Glucose	484.00	705.00	670.00	619.66
Fructose	550.00	966.00	807.00	774.33
Sucrose	80.00	222.00	614.00	305.33
Zn	4.00	0.42	0.72	1.71
Cu	0.19	0.08	0.13	0.13
Fe	62.52	1.60	6.06	23.39
Mn	2.04	1.73	2.26	2.01
Mg	86.61	46.29	73.67	68.85
Ca	128.49	93.93	104.13	108.85
K	236.42	298.08	326.10	286.86
Na	66.10	26.31	54.08	48.83

나. 용매별 추출조건의 최적화

미나리를 대상으로 냉수, 열수, methanol 및 80% ethanol 용매별 추출에 따른 수율을 확인한 결과 아래 표에서와 같이 냉수 추출물(14%)을 제외한 용매에서 얻어진 추출물들은 17-18%의 비슷한 수율을 보였다. 추출수율이 갖는 의미는 아무리 천연추출물의 기능성이 높게 인정된다 하더라도 추출 수율이 낮으면 경제성이 없기 때문이며 이러한 관점에서 현재 국내에서 산업적으로 생산 사용되는 탈지미강 추출물의 추출 수율이 7-10%인 것으로 보아 본 실험에 사용된 미나리는 추출 수율면에서 활용 가능성이 있는 소재로 사료된다.

현재 고령화 질병 예방 및 치료에 관여하는 천연물로부터의 성분검색은

주로 flavonoids, phenolic compounds 등의 저분자 물질의 탐색에 집중되고 있다. 이것은 활성성분의 완전한 구조분석이 가능하고 제품화시 용이성에 기인한다고 할 수 있다. 식물체에 널리 분포되어 있는 페놀성 물질은 다양한 구조와 분자량을 가지며, 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원 반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며 이것들의 phenolic hydroxyl이 단백질처럼 거대분자와 결합을 하여 항산화, 항균, 항암 등의 다양한 생리기능을 가지는 것으로 보고되고 있다. Table 2에 나타난 결과와 같이, phenolic compound 및 flavonoid 함량은 ethanol 추출물에서 가장 높았다. 이에 따라 본 연구에서는 상기에 언급된 결과들을 토대로 주로 저분자 물질을 추출하는 ethanol을 용매로 선택하여 연구를 진행토록 하였다.

Table 2-2. Yields and levels of phenolic compounds and flavonoids of *Oenanthe javanica* DC. extracts

Extract	Yield (%)	Phenolic compound	Flavonoids
		(%)	(%)
OJE	22.21 ± 0.19 ^a	6.29 ± 0.09 ^a	5.59 ± 0.48 ^a
OJM	23.58 ± 1.56 ^a	4.94 ± 0.11 ^b	2.98 ± 0.42 ^c
OJH	23.05 ± 3.74 ^a	4.92 ± 0.15 ^b	4.47 ± 0.45 ^b
OJC	18.82 ± 0.76 ^b	5.06 ± 0.29 ^b	3.32 ± 0.46 ^c

OJE: Ethanol extracts from *O. Javanica* DC. OJH: Hot water extracts from *O. Javanica* DC. OJM: Methanol extracts from *O. Javanica* DC. OJC: Cold extracts from *O. Javanica* DC.

Different letters in the column are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

다. 추출횟수별 추출조건의 최적화

미나리 활성성분 추출방법의 최적화를 위하여 추출횟수별 수율을 검토해 보았다. 그 결과 용매에 따른 수율의 변화는 관찰되지 않았다. 추출횟수에 따른 수율변화를 측정하기 위하여 각 조건에서 1회, 2회, 3회 및 4회 반복추출을 실시한 결과 2회 이상에서는 수율에 변화가 없음을 확인하였다.

Table 2-3. Yields of *Oenanthe javanica* DC. extracts by extraction time

Extract	Yield (%)			
	1	2	3	4
OJE	17.9 ^b	22.2 ^a	21.4 ^a	23.1 ^a
OJM	18.6 ^b	23.6 ^a	23.1 ^a	22.9 ^a
OJH	17.2 ^b	23.0 ^a	24.2 ^a	23.9 ^a
OJC	14.2 ^b	18.9 ^a	18.8 ^a	19.0 ^a

OJE: Ethanol extracts from *O. Javanica* DC. OJH: Hot water extracts from *O. Javanica* DC. OJM: Methanol extracts from *O. Javanica* DC. OJC: Cold extracts from *O. Javanica* DC.

Different letters in the row are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

라. 추출방법에 따른 추출조건의 최적화

미나리의 간 기능 향상 유효성분 추출방법의 최적화를 위하여 일반적인 추출방법인 reflux법에 의해 시료에 대하여 stirring, reflux, sonication의 방법에 의해 미나리 ethanol 추출물의 활성과 수율을 비교해 본 결과 각 방법 간의 유의적 차이가 없음을 알 수 있었다.

Table 2-4. Yields of ethanol extracts by various extraction methods

Extraction Method	Yield (%)
Stirring	23.1 ^a
Reflux	22.3 ^a
Sonication	21.9 ^a

Different letters in the column are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

마. 대량 추출방법의 확립

미나리를 대상으로 다음과 같은 방법으로 추출물을 대량 조제하였다(Fig. 2).

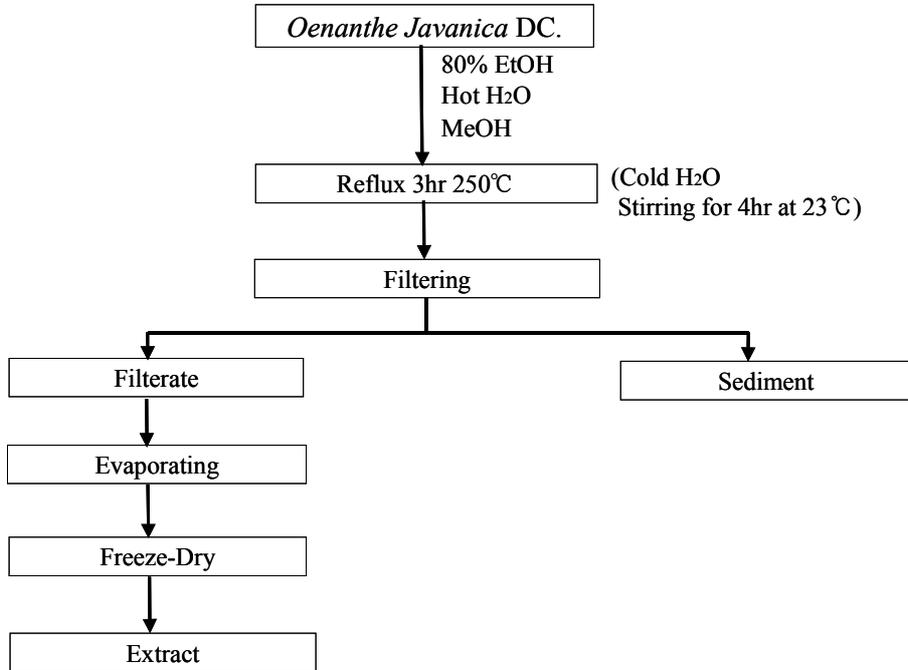


Fig. 2-2. Extraction Scheme.

바. 추출물별 *in vitro* 간 기능 개선 효과 비교

미나리로부터 획득된 열수 및 ethanol 추출물을 대상으로 사람의 간세포 유래 배양세포인 HepG2 세포를 이용하여 간 기능 개선 효과를 검토하였다.

1) 추출물의 세포독성 Test

본 실험에서 간 기능 개선효과를 측정하기에 앞서 열수 및 ethanol 추출물의 cytotoxicity test를 HepG2 세포를 대상으로 진행하였다. 세포독성여부의 검토를 위하여 cell을 2×10^5 cell로 24 well plate에 seeding한 24시간 후 준비된 시료를 0, 100, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 37°C CO_2 incubator에서 배양하고 XTT assay를 시행하였다. ethanol 추출물의 경우 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서도 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 3). 그 반면 열수 추출물에서는 750 mg/mL 의 농도까지는 거의 세포독성을 보이지 않았으나 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서는 세포독성이 나타났다.

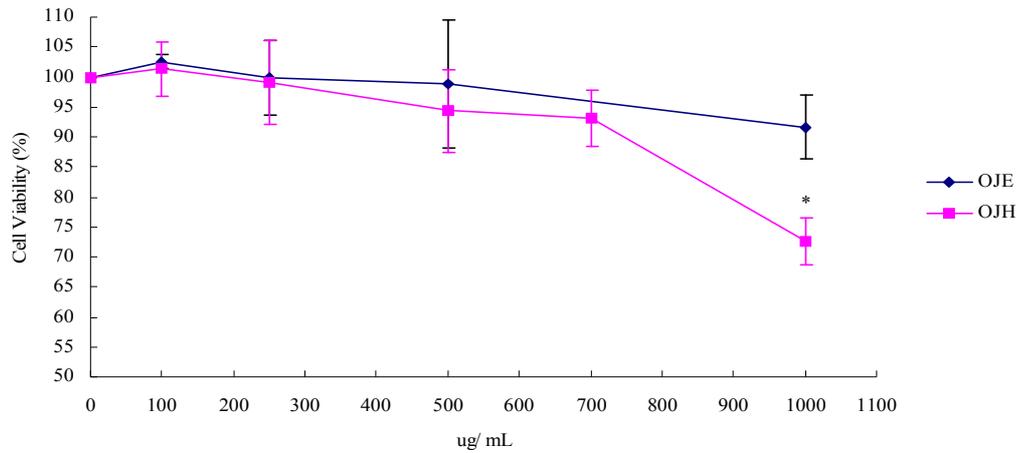


Fig. 2-3. Cytotoxicities of ethanol and hot-water extract from *Oenanthe javanica* DC.

HepG2 cells were precultured in 24-well microplates (2×10^5 cells per well in 1 mL MEM) for 24 h, and then incubated with *O. Javanica* DC. extracts for 24 h. Data are presented as mean \pm SD. The percentage of cell viability in the control group was treated as 100%. * $p < 0.05$ compared to the control. OJE: Ethanol extracts from *O. Javanica* DC. OJH: Hot water extracts from *O. Javanica* DC.

2) 추출물의 간 기능 향상능 검색

상기의 독성테스트를 바탕으로 안전성이 확인된 농도범위에서 각 추출물의 산화억제능을 측정하였다. HepG2 cell을 2×10^5 cells/well로 seeding하고 24시간 후, 2 mM hydrogen peroxide와 미나리 추출물을 처리한 후 XTT test를 실시하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다. 그 결과 에탄올 추출물은 간 손상 억제능을 나타내었으나 열수 추출물은 간 기능 향상 효과를 보유하고 있지 않은 것으로 판명되었다(Fig. 4).

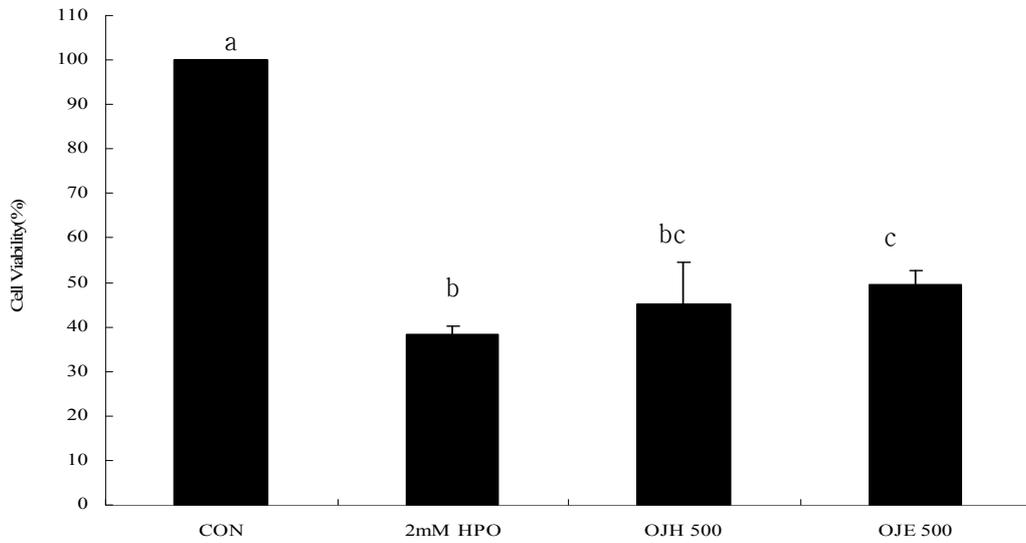


Fig. 2-4. Hepatoprotective effects of extracts from *Oenanthe javanica* DC. in HepG2 cells.

Data are presented as mean \pm SD. The percentage of cell viability in the control group was treated as 100%. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

OJE: Ethanol extracts from *O. Javanica* DC. (500 μ g/mL) OJH: Hot water extracts from *O. Javanica* DC. (500 μ g/mL)

사. 미나리 추출물의 한외여과

미나리 ethanol 추출물의 정제를 위한 전처리 과정으로 분자크기 3 kd의 cartridge를 이용하여 한외여과를 실시하였다. 상기의 방법에 의행 얻어진 두 획분을 대상으로 활성검사를 실시한 결과 상대적으로 저분자인 획분(< 3kd)에서 높은 항산화 활성을 나타내었다(Table 5).

Table 2-5. Antioxidant capabilities and levels of phenolic compounds and flavonoids of fractions of ethanolic extract from *Oenanthe javanica* DC. by ultrafiltration

Fraction	IC ₅₀ (ug/mL)	Phenolic compound (%)	Flavonoids (%)
OJE-A	87.11 ± 1.99 ^a	5.78 ± 0.72 ^a	4.30 ± 0.31 ^a
OJE-B	96.25 ± 3.60 ^b	5.87 ± 0.70 ^a	4.56 ± 0.24 ^a

IC₅₀ values were signified the concentration of sample necessary to scavenging 50% of DPPH radicals.

OJE: Ethanol extracts from *O. Javanica* DC. OJH: Hot water extracts from *O. Javanica* DC. OJM: Methanol extracts from *O. Javanica* DC. OJC: Cold extracts from *O. Javanica* DC.

Different letters in the column are statistically different by Ducan's multiple range test ($p < 0.05$).

아. 미나리 추출물의 용매별 분리

1) 분획별 항산화 활성

미나리 시료의 ethanol 추출물을 대상으로 hexane, ethylacetate, chloroform 및 물의 4가지 용매를 사용하여 용매별 분리를 실시하였다. 간 보호 활성능과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정되는 phenolic compound와 flavonoid 양을 각 분획 별로 검토한 결과, ethylacetate 층에서 월등히 높음을 확인하였다(Table 6).

Table 2-6. Yields and levels of phenolic compounds and flavonoids of various fractions from ethanol extract of *O. javanica* DC.

Extract	Yield (%)	Phenolic compound (%)	Flavonoids (%)
OJE-H	1.91 ± 0.35 ^b	0.12 ± 0.10 ^d	0.31 ± 0.10 ^c
OJE-C	0.52 ± 0.13 ^c	9.78 ± 0.65 ^b	3.12 ± 0.26 ^b
OJE-E	0.64 ± 0.10 ^c	42.29 ± 2.94 ^a	29.98 ± 1.62 ^a
OJE-W	9.29 ± 0.63 ^a	3.43 ± 0.95 ^c	2.95 ± 0.21 ^b

OJE-H: Partitioned with n-hexane from OJE, OJE-C: Partitioned with chloroform from OJE, OJE-E: Partitioned with ethyl acetate from OJE, OJE-W: Partitioned with water from OJE

각 분획물의 항산화 활성을 비교하기 위하여 DPPH-radical 소거 assay를 실시하였다. 그 결과 2차 대사물을 다량 함유하고 있는 ethylacetate-soluble들의 IC₅₀값이 13.6 ug/mL로서 다른 획분에 비해 현저히 낮음을 알 수 있었다(Table 7). 또한 높은 superoxid anion radical 소거능도 ethylacetate-soluble들이 보여주었다(Fig. 5). 그러나 지질과산화에 대한 억제능은 chloroform 층에서 가장 높게 나왔으며 그 다음으로 ethylacetate 층이 높게 나타났다(Fig. 6).

Table 2-7. DPPH radical scavenging activities of various fractions from ethanol extract of *Oenanthe javanica* DC.

Extract	IC ₅₀ (ug/mL)
OJE-H	> 300 ^c
OJE-C	118.09 ^b
OJE-E	13.60 ^a
OJE-W	114.30 ^b

IC₅₀ values were signified the concentration of sample necessary to scavenging 50% of DPPH radicals. OJE-H: Partitioned with n-hexane from OJE, OJE-C: Partitioned with chloroform from OJE, OJE-E: Partitioned with ethyl acetate from OJE, OJE-W: Partitioned with water from OJE

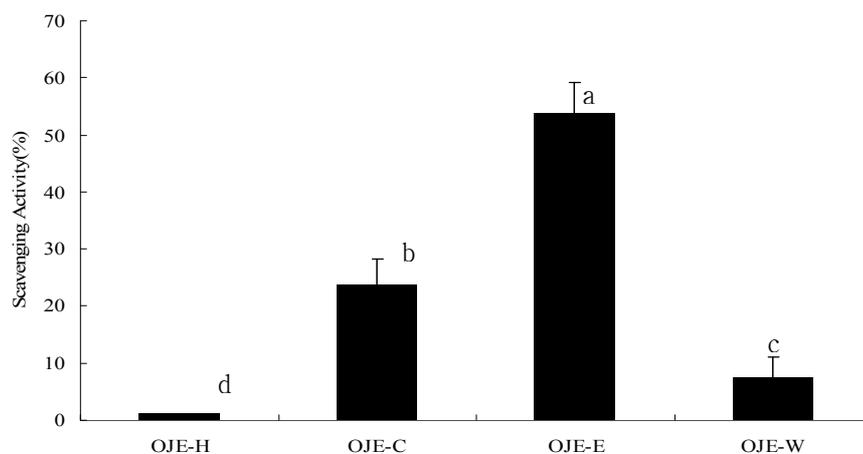


Fig. 2–5. Scavenging activities of various fractions from ethanol extract (OJE) of *Oenanthe javanica* DC. against the superoxide anion radical.

Data are presented as mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration was 100 μ g/mL. OJE-H: Partitioned with n-hexane from OJE, OJE-C: Partitioned with chloroform from OJE, OJE-E: Partitioned with ethyl acetate from OJE, OJE-W: Partitioned with water from OJE.

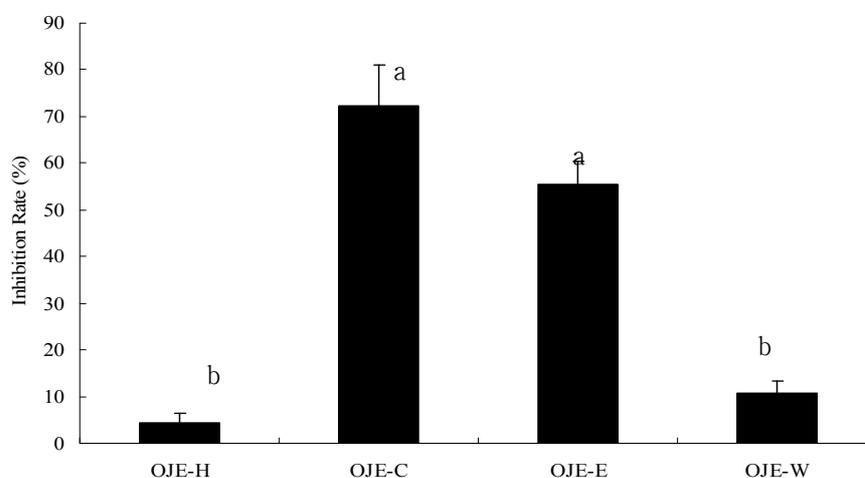


Fig. 2–6. Inhibitory effects of various fractions from ethanol extract (OJE) of *Oenanthe javanica* DC. on the formation of TBARS.

Data are presented as mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration was 450 μ g/mL. OJE-H: Partitioned with n-hexane from OJE, OJE-C: Partitioned with chloroform from OJE, OJE-E: Partitioned with ethyl acetate from OJE, OJE-W: Partitioned with water from OJE.

2) 분획물의 세포독성

기능성 성분 및 항산화 활성이 높아 간 기능 개선능이 예상되는 chloroform- 및 ethylacetat-soluble에 대한 cell line에서의 효과를 확인하기 위한 실험으로 각 시료에 대한 세포독성 효과를 검토하였다. 그 결과 Fig. 9에서 나타난 바와 같이, ethylacetat-soluble의 경우 1000 ug/mL의 농도에서도 세포독성을 나타내지 않았다. 그러나 chloroform-soluble에서는 50 ug/mL의 농도까지는 거의 세포독성을 보이지 않았으나 100 ug/mL 이상에서는 세포독성이 나타났다. 따라서 향후 *in vitro*상에서의 간 기능 향상 assay에서는 시료의 양을 50 ug/mL로 선택했다.

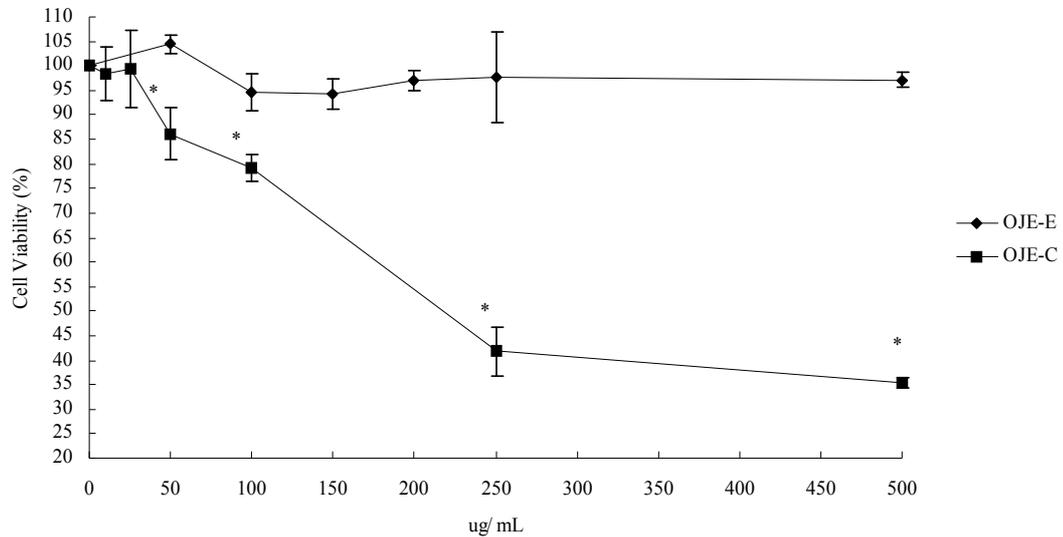


Fig. 2-7. Effects of ethanol extract partitioned with chloroform and ethyl acetate from *Oenanthe javanica* DC. on cell viability.

HepG2 cells were precultured in 24-well microplates (2×10^5 cells per well in 1 mL MEM) for 24 h, and then incubated with *O. Javanica* DC. extracts for 24 h. Data are presented as mean \pm SD. The percentage of cell viability in the control group was treated as 100%. * $p < 0.05$ compared to the control. OJE-E: Ethyl acetate fraction, OJE-C: Chloroform fraction

3) 분획물의 간 기능 향상 효과 측정

HepG2 cell line을 이용한 *in vitro*상에서의 간 기능 활성능을 측정하기 위하여 2 mM H_2O_2 를 세포에 처리하여 간의 산화적 손상을 유도하였다. 이 때 각 획분을 함께 처리하여 그 보호정도를 측정함으로써 간 기능 개선능을 확인하였다. 그 결과 ethylacetate 층에서 높은 간 기능 개선 활성을 나타내었다(Fig. 8).

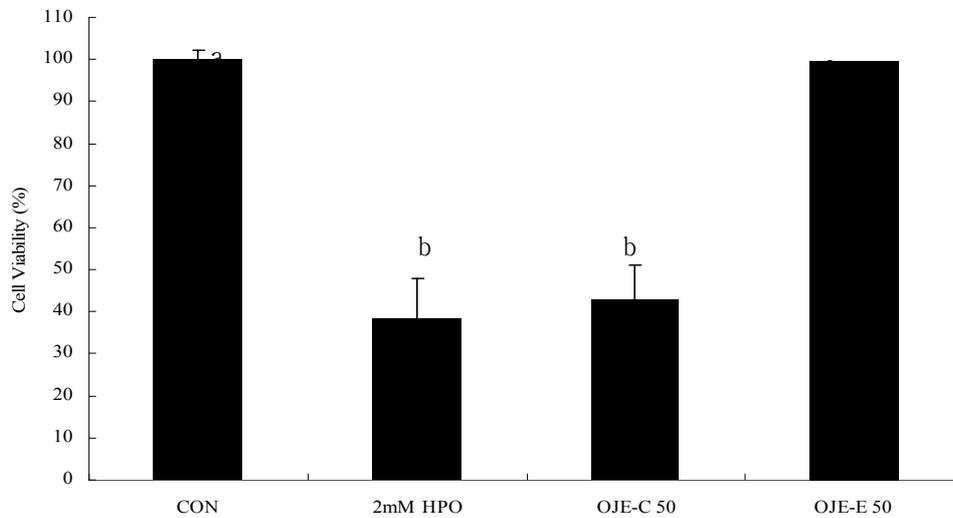


Fig. 2-8. Hepatoprotective effects of ethanol extracts (OJE) partitioned with chloroform and ethyl acetate from *Oenanthe javanica* DC. in HepG2 cells.

Data are presented as mean \pm SD. The percentage of cell viability in the control group was treated as 100%. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

OJE-E: Ethyl acetate fraction (50 μ g/mL), OJE-C: Chloroform fraction (50 μ g/mL)

자. 활성물질의 분리

1) Preparative TLC에 의한 분획

ethyl acetate-hexane-water-formic acid (40 : 20 : 5 : 5, v/v/v/v)의 조건으로 silica coated TLC에서 OJE-E를 전개하여 3개의 분획을 얻었다(Fig. 9). 이들의 R_f 값은 각각 0.31 (OJE-E-1), 0.42 (OJE-E-2), 0.53 (OJE-E-3)이었다. 3 회분을 대상으로 DPPH radical 소거효과 검색이 이루어졌다. OJE-E-1, 2, 및 3의 IC_{50} 값은 각각 29.34, 4.98, 19.31 μ g/mL이었다(Table 8). DPPH radical 소거 assay로부터 두 번째 band(OJE-E-2)에서 상대적으로 높은 자유 라디칼 소거능이 나타남을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 superoxide anion radical 소거능 및 지질과산화 억제능 assay에서도 반복되었다. 즉, R_f 값이 0.42인 band가 상기의 test에서 높은 활성을 나타내었다(Figs. 10, 11).

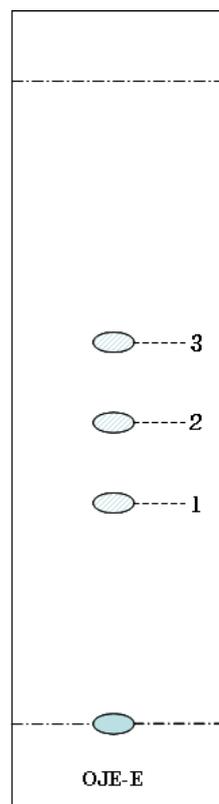


Fig. 2–9. Thin layer chromatogram of ethylacetate fraction from ethanol extract of *Oenanthe javanica* DC.

Thin layer chromatography was performed on 25 DC–Plastik–folien Cellolose F (Merk) plates and developed with ethyl acetate–hexane–water–formic acid (40 : 20 : 5 : 5, v/v/v/v) as developing solvents. Visualization was done by illuminating ultraviolet light (UV, 254 and 365 nm). R_f value : 1 (0.31), 2 (0.42), and 3 (0.53)

Table 2–8. DPPH radical scavenging activities of TLC sub–fractions from ethyl acetate fraction of *Oenanthe javanica* DC.

Extract	IC ₅₀ (ug/mL)
OJE–E–1	29.34 ^b
OJE–E–2	4.98 ^a
OJE–E–3	19.31 ^c

IC₅₀ values were signified the concentration of sample necessary to scavenging 50% of DPPH radicals. OJE–E–1: TLC spot 1 ($R_f=0.31$) OJE–E–2: TLC spot 2 ($R_f=0.42$) OJE–E–3: TLC spot 3 ($R_f=0.53$)

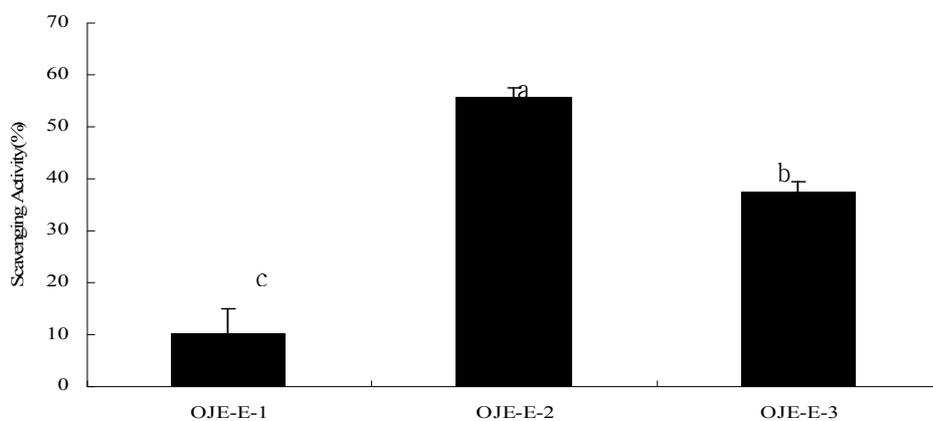


Fig. 2-10. Scavenging activities of TLC sub-fractions from ethyl acetate fraction (OJE-E) of *Oenanthe javanica* DC. against the superoxide anion-radical.

Data are presented as mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Ducan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration was 50 ug/mL.

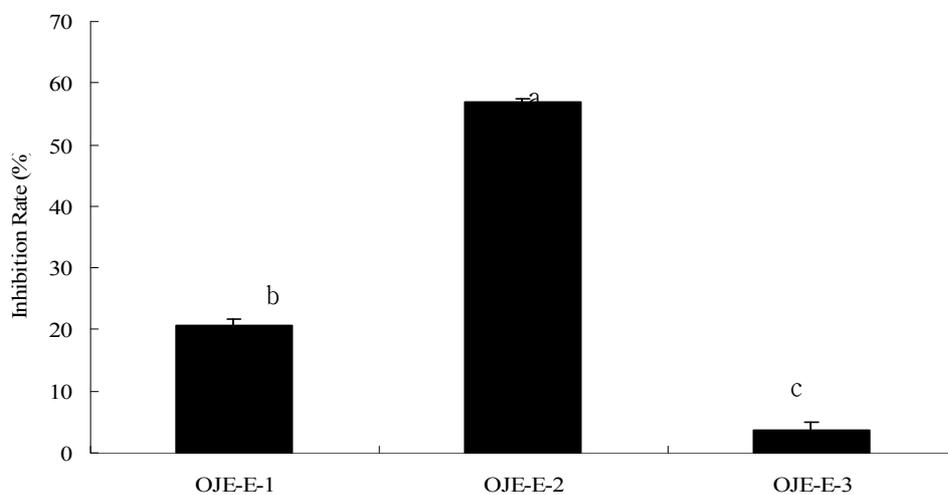


Fig. 2-11. Inhibitory effects of TLC sub-fractions from ethyl acetate fraction (OJE-E) of *Oenanthe javanica* DC. on the formation of TBARS.

Data are presented as mean \pm SD. Different letters above the bar are statistically different by Ducan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration was 250 ug/mL.

2) HPLC 분석

OJE-E-2 band를 끊은 후 methanol로 추출을 실시하였다. 그 후 여과과정과 N₂ gas로 건조과정이 행하여졌다. 이 정제물에 대하여 TSK gel ODS-100 reverse column을 이용하여 HPLC를 행하였다. 그 결과 단일 peak를 나타냄으로써 순수하게 분리되었음을 알 수 있었다(Fig. 12).

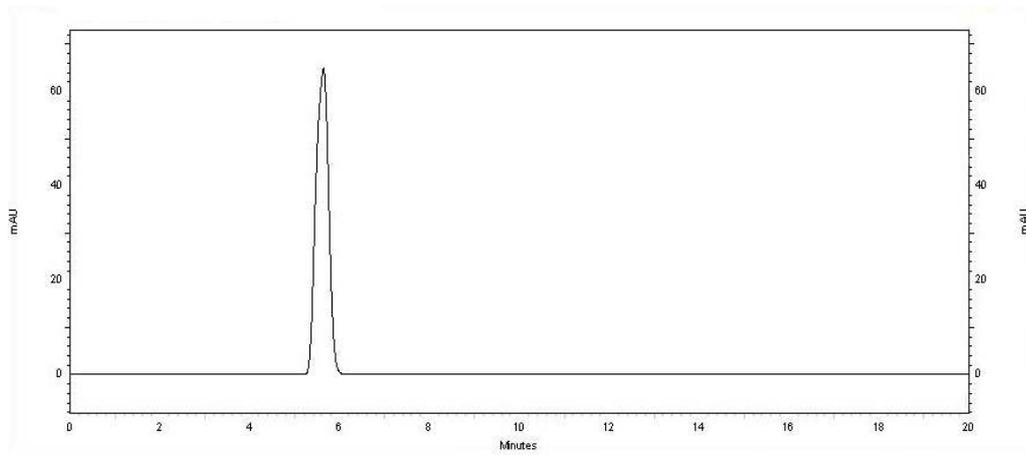


Fig. 2-12. Isolation purified hepatoprotectant from *Oenanthe javanica* DC. extract by HPLC.

The detection was performed at 330 nm. A significant single peak was seen at 5 min. TSK gel ODS-100 reverse column: 4.6 × 250 mm, mobile phase: 30% methanol and 0.1% phosphoric acid, flow rate: 1 mL/min, detector: Hitachi L-2400, injection volume was 10 uL.

차. 정제물질의 구조분석 및 물리화학적 성질

1) 정제물질의 물리화학적 분석

일반성분 분석 중 탄수화물, 단백질, 아미노산, tannin, phenol류, flavonoids류들은 발색반응시약을 이용해 확인하였다. 탄수화물은 0.2% anthrone 황산용액, 5% molish 에탄올용액 및 H₂SO₄을, 단백질과 아미노산은 0.2% ninhydrin 수용액 및 10% enrlich 염산용액을, tannin류는 10% ferric chloride 수용액을, phenol류는 Folin-ciocalteu's 시약과 H₂SO₄을, flavinoid류는 금속 Mg를 소

량 가한 다음 HCl을 가하여 H₂ 발생 및 색깔 변화와 1N NaOH, H₂SO₄와 반응시켜 각각의 색깔의 변화에 따라 정성분석하였다. 그 결과 Folin-ciocalteu's reagent, H₂SO₄, 1N NaOH를 이용한 발색반응에서 양성을 나타내고, anthrone, molish, ninhydrin, enrlich, ferric chloride에 대해서는 음성을 나타냄으로써 이 물질은 phenol성 화합물로 추측된다(Table 9).

Table 2-9. The Reactions with Purified Inflammation-inhibitory Compound from *Oenanthe Javanica DC* and Specific Reagents

Color reaction	
positive reagent	negative reagent
Folin reagent	Anthrone
H ₂ SO ₄	Ehrlich
1N NaOH	Ferric chloride

2) 정제물질의 IR spectrum에 의한 기능기 분석

활성물질의 functional group 확인을 위해 적외선 흡수 분광법을 실시하였다. 하기에서와 같이 3,434 cm⁻¹의 넓은 흡수대는 OH기에 의한 것으로, 1,733과 1,250 cm⁻¹의 파장은 ester의 C=O와 C-O stretching에 의한 것으로 각각 판정되었다. 1,600-1,444 cm⁻¹사이에서는 방향족(C=C) peak를 나타냄으로써 본 활성물질은 OH 작용기 이외에 방향족, ester계의 물질이 포함된 화합물로 추정된다(Fig. 13).

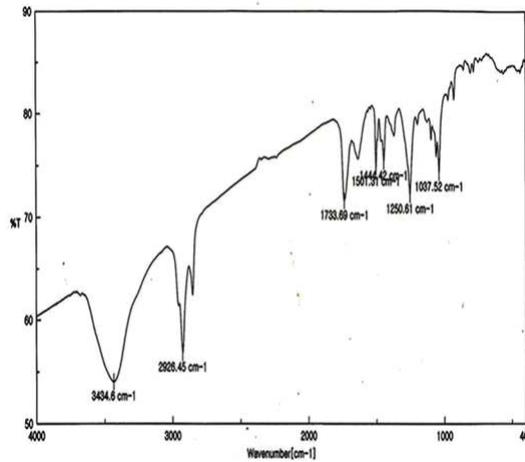


Fig. 13. 2-IR spectrum of Purified Inflammation-inhibitory Compound from *Oenanthe Javanica DC*.

The IR spectra was recorded on Bomen Michelson Series MB. 102-C15. FT-IR spectrometer using a potassium bromide disc.

3) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -NMR에 의한 구조분석

NMR은 분리시료를 MeOD(methyl-d₃ alcohol-d₁)에 녹인 후 분리시료의 화학적 이동(ppm)을 조사하였다. 일반적으로 주파수를 나타내는 횡축의 경우 7 ppm과 8 ppm사이 값에서는 방향족 수소가, 5 ppm이하에서는 지방족 수소가 검출된다. ^{13}C -NMR spectrum의 경우 190-210 ppm에서 aldehyde탄소, 130-165 ppm에서 oxygenated 방향족 탄소, 90-135 ppm에서 non-oxygenated 방향족 탄소, 69-105 ppm에서 oxygenated 지방족 탄소, 55-63 ppm에서 methoxyl 탄소 및 그 이하 ppm에서는 non-oxygenated 지방족 탄소가 검출된다.

본 정제물질의 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -NMR 결과(Figs. 14, 15) 미나리로부터 분리된 간 기능 개선 유효물질은 caffeic acid로 확인되었다(Fig. 16).

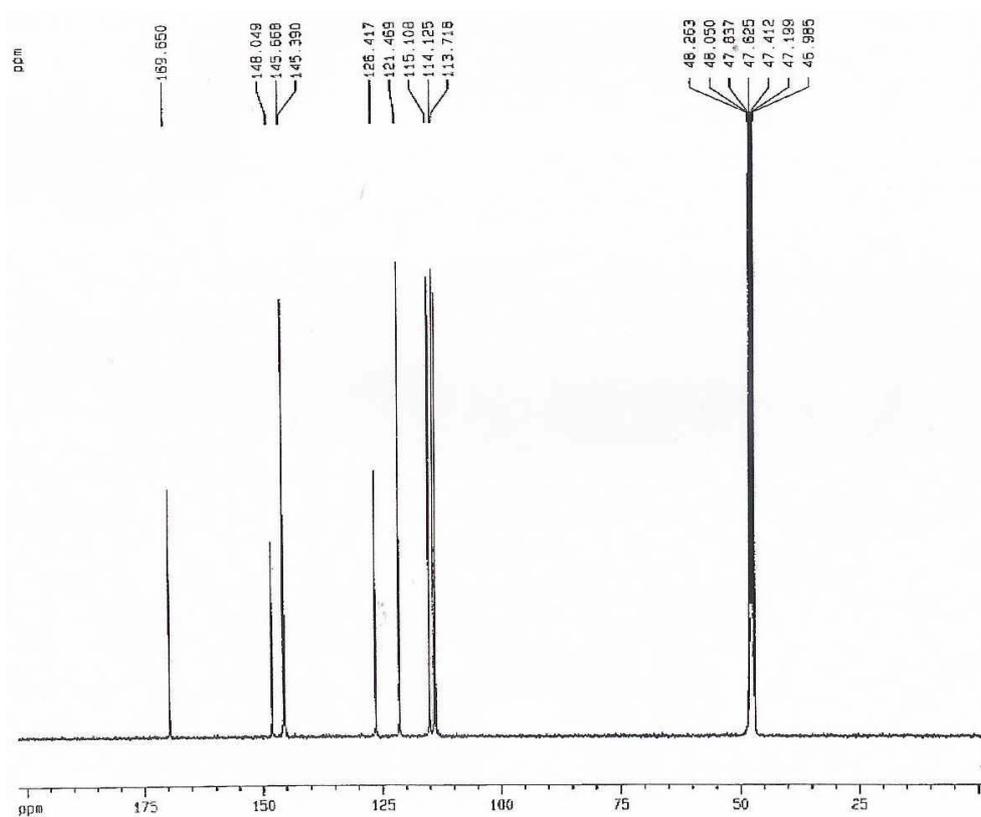


Fig. 2-14. ^{13}C -NMR spectrum of active component from *Oenanthe javanica* DC.

Sample was dissolved in MeOD (methyl- d_3 alcohol- d_1) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-600, Bruker, German) operating at 600 MHz and 25°C.

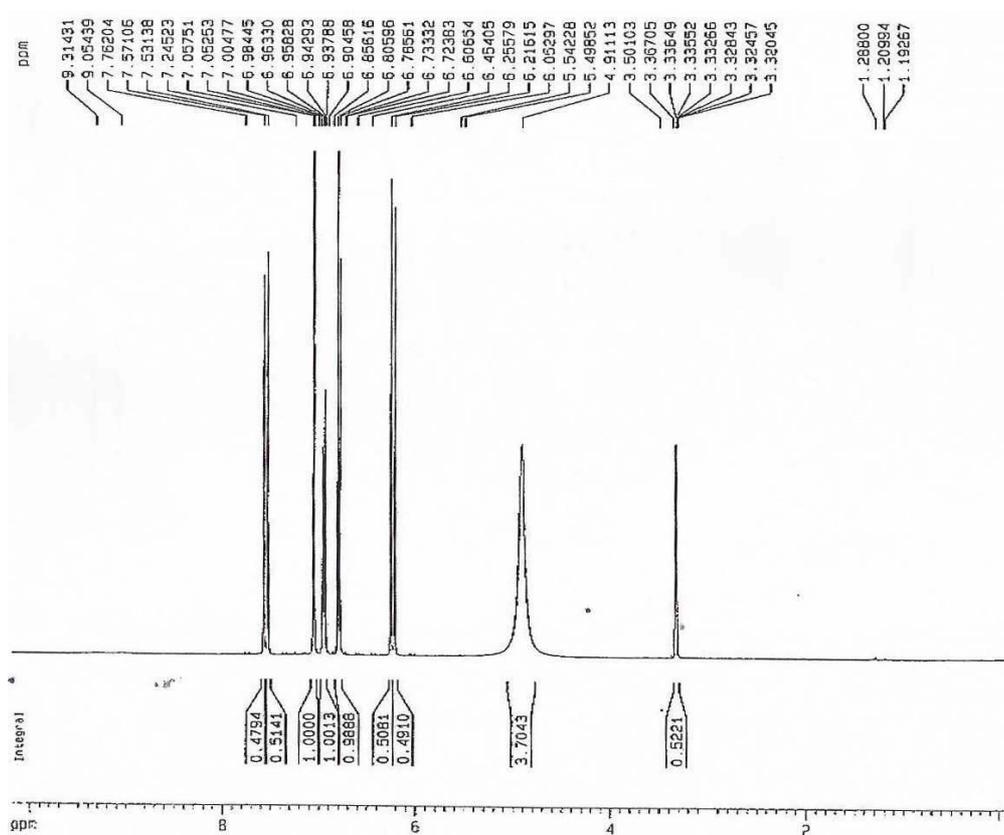


Fig. 2-15. ¹H-NMR spectrum of active component from *Oenanthe javanica* DC.

Sample was dissolved in MeOD (methyl-d₃ alcohol-d₁) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-600, Bruker, German) operating at 600 MHz and 25°C.

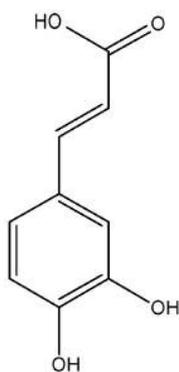


Fig. 2-16. Structure of hepatoprotectant (caffeic acid) from *Oenanthe javanica* DC. against H₂O₂ induced oxidative stress.

카. 미나리 함유 유용성분의 *in vitro* 간기능 개선 효과 측정

본 실험에서 사용된 HepG2 세포는 사람 간세포 유래의 배양세포로서, 분화한 대사기능을 가지고 있고, 약물과 영양성분에 대하여 사람 간세포에서 이루어지고 있는 것과 동일한 양상을 나타내는 많은 보고가 있어 사람의 간장에서의 대사를 연구하는데 있어서 적절한 모델 세포로서 다양하게 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 실험에서는 간암 세포주인 HepG2 세포를 이용하여 항산화 활성에 대한 미나리 함유 간기능 개선 유용성분인 caffeic acid의 효과를 검토 하고자 하였다.

1) 미나리 함유 유용성분의 세포독성 Test

본 실험에서 XTT test는 HepG2 세포를 24 well plate 에 2×10^5 /well 로 seeding한 뒤 caffeic acid를 농도별로 처리하고 24시간 뒤에 XTT 시약을 처리한 다음 다시 2시간 배양한 후 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Caffeic acid의 경우 250 ug/mL 농도까지 세포의 생존에 영향을 미치지 않았으며 500 ug/mL의 농도에서 약 12% 정도 성장이 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 17). 따라서 향후 실험을 위한 적정 농도는 10 - 50 ug/mL 까지 사용하기로 하였다.

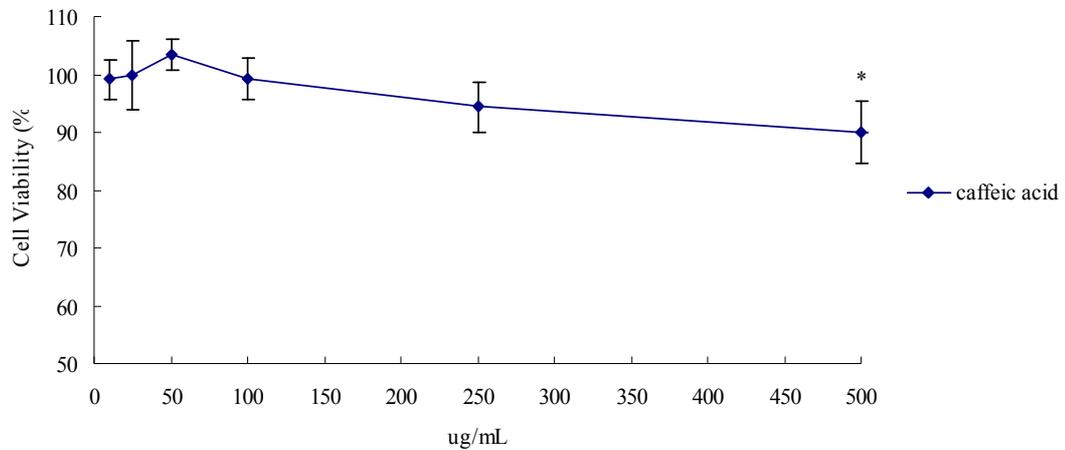


Fig. 2-17. Effects of caffeic acid on cell viability.

HepG2 cells were precultured in 24-well microplates (2×10^5 cells per well in 1 mL MEM) for 24 h, and then incubated with caffeic acid (CA) for 24 h. Data are presented as mean \pm SD. The percentage of cell viability in the control group was treated as 100%. * $p < 0.05$ compared to the control.

2) H₂O₂ 로 유도된 산화적 스트레스에 대한 *in vitro* 보호 효과 측정

본 실험은 미나리로부터 분리 정제된 활성 성분인 caffeic acid의 H₂O₂ 독성에 대한 보호효과를 알아보기 위해 행하여졌다(Fig. 18). 실험 결과 산화적 스트레스 유도에 의해 생존률이 낮아졌으나, caffeic acid를 전처리 함에 따라 농도 의존적으로 생존률이 증가되었다. 이는 caffeic acid가 H₂O₂ 독성에 대한 보호효과가 있음과 함께 항산화 활성이 caffeic acid로 인한 것이었음을 암시하는 결과이기도 하다.

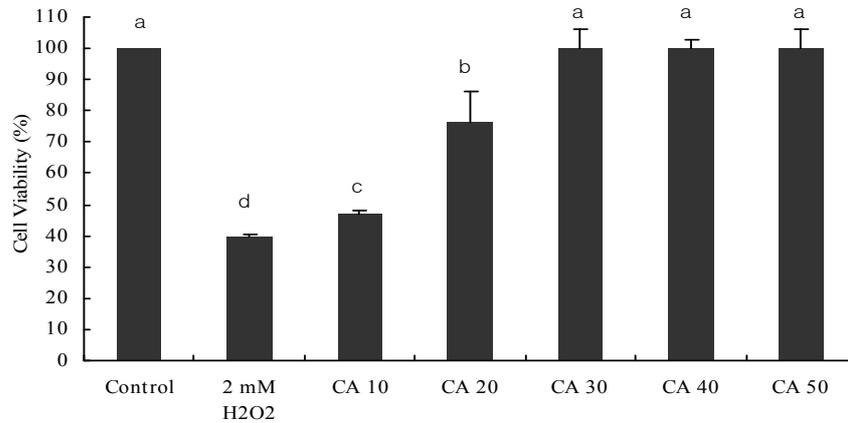


Fig. 2-18. Hepatoprotective effects of caffeic acid (CA) in HepG2 cells.

Data are presented as mean \pm SD. The percentage of cell viability in the control group was treated as 100%. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

3) Intercellular ROS Level 측정

Intercellular ROS level은 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 사용하여 측정하였다. 활성산소류인 O₂⁻, H₂O₂, OH 등에 의해 2',7'-dichlorofluorescein(DCFH)이 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) 로 산화되는 원리를 이용하였다. Caffeic acid 를 전처리한 24 well plate 에 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 농도의 H₂O₂ 를 2시간 처리한 뒤 DCFHDA 시약과 함께 30분간 배양한다. 배양 종료 후 485 nm 여기파장 및 585 nm의 방출파장에서 마이크로플레이트 형광측정기를 사용하여 DCF 형성을 측정하였다. 실험 결과 caffeic acid를 전처리함에 따라 intercellular ROS level이 낮게 나타났으며, 이는 caffeic acid가 세포내의 ROS 형성에 영향을 주어 그 양을 감소시킴을 확인하여 주는 것이다(Fig. 19).

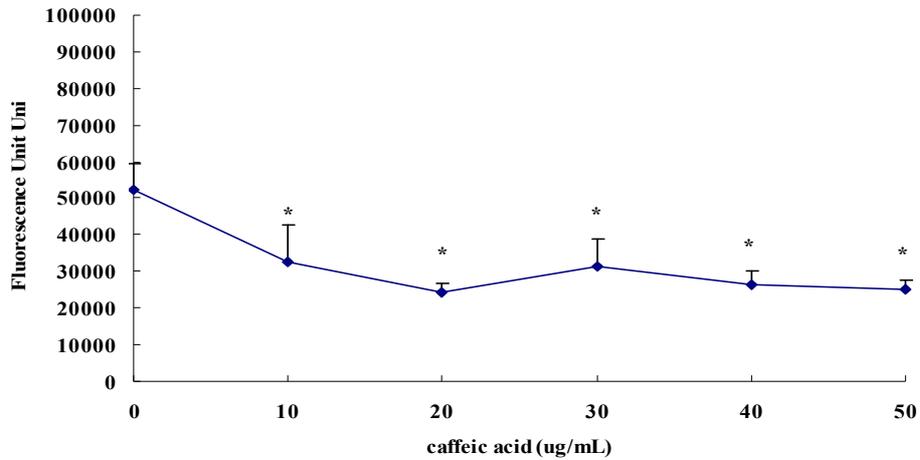


Fig. 2-19. Effect of caffeic acid (CA) on the formation of intracellular ROS.

The reaction took place with 2×10^4 per well and 30 μ M DCF-DA. Data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ compared to the control.

타. 미나리 함유 간 기능 개선 유용물질의 공업적 추출조건의 최적화

미나리 5 kg에 20배의 ethanol을 가한 후 추출 온도별 변화를 관찰하였다. 그 결과 90°C에서 가장 높은 향상율을 나타내었다(Table 10). 한편 시간별로 추출된 획분의 간 기능 향상 활성을 실험실적 추출조건과 비교검토한 결과 추출초기에는 공업적 추출시가 다소 낮은 반면 2시간 이후에는 유사한 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Table 11).

Table 2-10. Effects of Eethanol Extraction Temperature on Hepatoprotective Activity (%) from *Oenanthe Javanica DC*.

	40°C	60°C	90°C
Lab-scale	48	68	92
Bench scale	53	60	89

Lab-scale : 100 g sample, Bench scale : 5 kg sample

Table 2-11. Effects of Ethanol Extraction Time on Hepatoprotective Activity (%) from *Oenanthe Javanica DC.*

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Lab-scale	58	90	89	91	93
Bench scale	73	92	90	94	95

Lab-scale : 100 g sample, Bench scale : 5 kg sample

파. 미나리 함유 간 기능 개선 물질의 공업적 수준에서의 분리 및 정제

미나리의 에탄올 추출물에 대한탈색방법을 활성탄, Diaion HP-20, Diaion HP-21 등 비교적 저가의 흡착제를 사용하여 bench와 open column에서 검토하였다(Table 12, 13). 그 결과 1,000 mg/L의 농도에서 Diaion HP-21 > Diaion HP-20 > 활성탄의 순서로 뚜렷한 탈색효과를 나타내었으며 이들 처리에 의한 활성감소는 보이지 않았다. 또한 이들의 수율 및 정제도를 증가시키기 위해 분자량이 다른 column들을 조합시키면서 공업적 정제조건을 검토하였다(Table 14).

Table 2-12. Effects of Resins on L-Value of Crude Sample Prepared by Batch Type Treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Oenanthe Javanica DC.</i>	66.38	81.56	57.74

Concentration of crude sample : 1,000 mg/L

Table 2-13. Effects of Resins on L-Value of Crude Sample Prepared by Open Column Type Treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Oenanthe Javanica DC.</i>	75.26	94.48	66.59

Concentration of crude sample : 1,000 mg/L

Table 2-14. Changes of Physiological Activity of Crude Sample Treated with Ultrafiltration

Physiological activities	MW cut-off				
	< 1,000	< 3,000	< 5,000	< 10,000	> 10,000
Hepatoprotective Activity (%)	92	35	27	12	15

Concentration of samples was 100 mg/L.

하. 당액추출물로부터 발효미생물의 선별과 동정

현재 미나리를 음용하는 방법 중에서 당액을 넣어서 미나리의 유용성분들을 추출한 액을 이용하는 방법이 있다. 건조미나리를 먹거나 생미나리즙을 먹기 어려운 경우 당액추출물을 얻어 이를 음용함으로써 미나리의 기능성과 음용에 대한 용이성을 다 얻을수 있는 방법이다. 이러한 방법은 다른 많은 과실이나 약초 등 다양하게 사용되어지고 있는 방법이다. 본 과제에서는 야생의 균주를 선택하기 위하여 1차로 20L 규모의 항아리를 이용하여 장기 미나리 당액제조방법을 이용하였고 이 당액제조 액으로부터 적절한 발효가 이루어진 액들로부터 미생물의 분리를 시도하였다.

20L 항아리 용기에 용기의 1/2 정도가 되도록 당액을 넣고 여기에 미나리를 1.5배 되도록 채운다음, 이 항아리를 밀봉하여 평균온도가 10℃정도가 유지되는 차가운 곳에서 보관을 하였다. 이로부터 적어도 1개월 정도의 시간이 경과하였을 때 침출액을 수확하였으며 이를 여과포로 당액과 미나리분을 분리한 다음 여과액을 10-15℃에서 저장을 하였고 3개월 정도의 저장 후에 약간의 탁도가 증가하는 것으로 미생물들의 성장을 확인할 수 있었고 이로부터 여러 종류의 미생물의 분리를 시도하였다.

이액에서 이화학적인 시험결과 pH의 강하가 이뤄진 점을 미뤄 주로 내삼투압성의 유산균이 아닐까 추측하여 유산균 분리배지로 MRS medium(peptone 10.0, Meat extract 5.0, Yeast extract 5.0, D(+)-Glucose 20.0, Dipotassium hydrogen phosphate 2.0, Diammonium hydrogen citrate 2.0, Sodium acetate 5.0, Magnesium sulfate 0.1, Manganous sulfate 0.05/L)을 사용하였다.

내삼투압 환경에서만 성장하는 다른 균주인지를 알아보기 위하여 과량의 당(20%)을 첨가한 배지와 제거한 MRS배지에서 함께 배양 해본 결과 두 배지에서 모두 성장을 하여 고당농도에서도 잘 성장하는 균주로 생각되어졌다. 또한 이들 균주로부터 산생성을 확인하기 위하여 calcium carbonate 5g과 agar 1.5 %을 넣어 배지를 만든 다음 여기에 균을 도말하여 미생물 colony 주위로 clear zone의 생성유무

로 확인하였다.

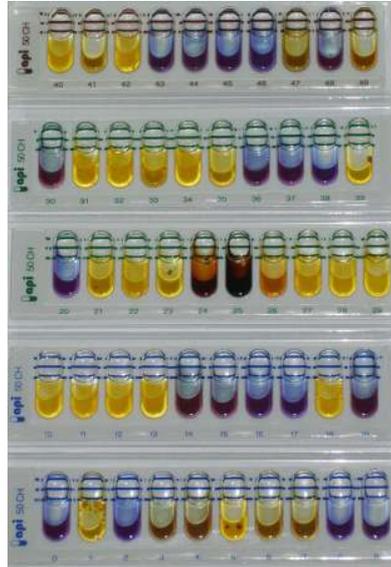


Fig 2-20. Photograph of selected bacteria from the fermented liquids.

발효액에서 나타나는 미생물 균총은 크게 2가지이고 나머지는 높은 당액에서 생존이 어려운 잡균들로 생각되어진다. 높은 당액농도와 낮은 성장온도 때문에 왕성한 성장을 보이지는 못하지만 유산균류들이 주로 우점종을 이루고 있고 일부 효모류가 자라는 정도이다. 이를 관능적으로 추측케 하는 점은 발효초기와 관능적인 검사를 통하여 비교시 산취, 산미, 단향 등이 유의적으로 증진되었음을 보고서 추측할 수가 있었다.

발효균주의 종을 알아보기 위하여 Biomerieux사의 API 동정kit를 이용한 시험한 결과는 위의 Fig 20과 같았고 생리적인 특징을 보면 glycerol-, ERYthritol -, D arabinose -, L arabinose +, Ribose D-ribose +, Dxylose -, L-xylose -, D adonitol -, Methyl-BD-xylopyranoside -, D-galactose +, D glucose +, D fructose +, D mannose +, L sorbose -, Rhamnose -, Dulcitol -, Inositol -, Mannitol +, Sorbitol +, α-Methyl-D-Mannoside +, α-Methyl-D-glucoside -, N-Acetyl-glucosamine +, AMYgbalin +, 등 *Lactobacillus casei*와 유사한 특성을 보이고 있는바 *Lactobacillus casei* sp로 동정되어졌다.(Fig. 20) 또한 대체적으로 *L. casei*가 좋아하는 환경은 높은 당농도가 아니지만 오랜세월 저장을 통하여 또는 장기저장에 따른 온도와 삼투현상에 대하여 아주 느린 속도로 배양되었을 것으로 추정된다.

가. 선별 미생물을 이용한 미나리발효액으로 유효성분의 추출과 간보호 활성의 비교

분리한 균주를 MRS medium에서 배양한 후 이를 20%의 고과당액(대상)이 함유되었고 첨가물질로 건조미나리를 중량대비 10%의 넣고서 30°C에서 7일간 배양, 미나리발효액을 얻었다. 관능적인 면에서 미나리의 고유 향이 있었지만 상큼한 산취와 구수한 발효취가 느껴졌고 발효액의 pH는 초기 6.55에서 4.15로 낮아져 발효액중의 산도는 초기 0.01%에서 발효 7일째 0.17%로 높아져 산취를 느낄수가 있었다. 그리고 발효기간중의 균수를 측정한 결과 발효가 진행하여도 급격한 증가는 이뤄지지 않고 있는데 발효 7일째 최종 균수가 8.6×10^7 로 그리 높지는 않았다. 발효액으로부터 filtration을 통하여 액상부분만을 얻은 다음 일정정도의 진공건조를 통하여 농축하고 나머지 액을 동결건조를 하여 완전한 분말을 얻었고 여기에 80% ethanol을 처리를 통하여 ethanol 추출물과 발효하지 않은 미나리 ethanol 추출물을 가지고 간보호 활성에 대하여 *In vitro* 비교시험을 실시하였다.

human HepG2.2.15 세포에 대한 미나리 ethanol 추출물의 독성시험에서 800 $\mu\text{g/ml}$ 까지 독성이 나타나지 않아 본 시험에서도 이와 준한 비교시험을 시행하였다. Proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1b)의 발현은 염증반응과 관련하여 중요한 지표이며 본 실험에서는 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 와 PMA (20 ng/ml)를 동시에 처리하여 proinflammatory cytokine을 유도하였고, HBV 유전자로부터 발현되는 core protein을 포함한 구조 단백질에 의해 숙주세포의 유전자 발현이 억제되는 것으로 예상되고 있다. 따라서 PMA를 동시에 처리했을 경우 proinflammatory cytokine이 발현될 수 있는 것을 여러 preliminary 실험을 통해 알 수 있었다. 본 실험에서는 미나리ethanol추출물과 미나리발효액 ethanol 추출물의 농도를 800 $\mu\text{g/ml}$ 로 하여 TNF- α 와 IL-1b level을 측정하였다.

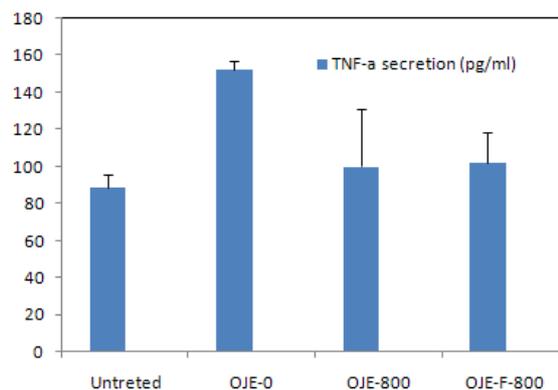


Fig. 2-21. Comparison of TNF- α secretion between OJE and OJE-F

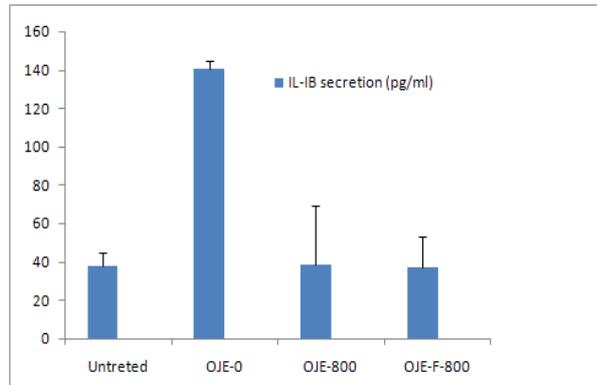


Fig. 2-22. Comparison of IL1 β - α secretion between OJE and OJE-F

그림에서 보는 바와 같이 Fig 21, 22의 TNF- α 와 IL-1b level은 발효 미나리 ethanol 추출액(OJE-F)과 미나리 ethanol 추출액사이에 커다란 차이점을 볼수가 없으며 결과 또한 유의성이 없는 것으로 나타나 있다. 이를 통하여 미나리의 간독성이 1차로 MTT 시험을 통해서 확인하였고 발효를 통해서도 큰 변화가 없는 것을 엿볼 수 있었다.

COX(cyclooxygenase)발현을 통한 PGE₂ 의 발현 억제능도 측정, 비교하여 봤는데, 염증반응은 arachidonic acid 로부터 prostaglandins(PGs)으로 전환시키는 cyclooxygenase(COX)에 의해 영향을 크게 받는 것으로 여겨지고 있다. 따라서 결과물인 PGE₂ 의 생성은 COX의 활성을 간접적으로 확인할 수 있는 방법이기도 하다. PGE₂ 의 농도를 800 ug/ml 에서 측정하였고 이 또한 앞의 TNF- α 와 IL-1b level의 결과와 비슷한 경향을 보였다.

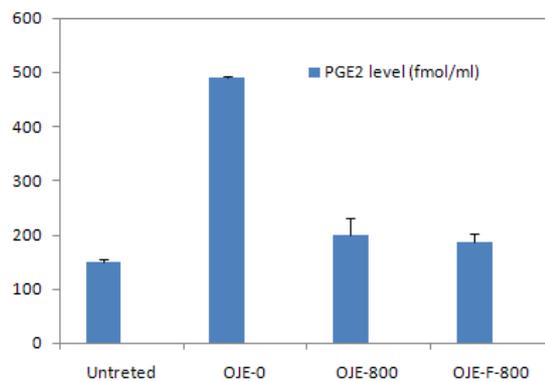


Fig. 2-23. Comparison of PGE₂ level between OJE and OJE-F

따라서 본 과제에서 발효를 통하여 기능성을 향상시키고 특히 일부의 지적에서 나타난 미나리의 간독성에 대한 완화시킬수 있는 방향으로 발효를 이용하기로 하였으나 실제 시험에서는 비발효 미나리추출물에서 독성이 나타나지 않았을 뿐 아니라 발효미생물에서 추출한 성분과 비발효 추출성분과의 유의있는 차이점도 발견하지 못하여 경제성 또한 목표로 하기 때문에 발효부분을 아래 조건부터 생략하여 진행하였다.

나. 건강지향식품으로의 시제품 제작 및 안정성 검사

1) 시제품 제작

미나리로부터 소재화한 분말을 사용하여 120 mL용 드링크제제를 조제하였다. 제품의 향, 맛, 안정성 등을 고려하여 감미제로 올리고당, 벌꿀 등을 이용하였으며 교미제로서 L-글루타민산나트륨을 산미제 및 pH 조절제로 구연산을 사용하였다. 향산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였고 사과산즙을 혼합하여 제품의 식미를 향상시켰다(Table 15). 또한 이와 더불어 대중적인 탄산캔 음료의 개발을 목표로 새로운 formula를 구상하였으며 이에 대한 조성을 보면 정제수 100 mL당 미나리에탄올 추출물 20 mg에 정백당 80 mg, 액상과당 20 mg, 산미제로서 구연산 1.7 mg 및 구연산나트륨 0.5 mg을 혼합하고 이산화탄소를 첨가하여 함량 330 mL의 스포츠 탄산음료를 제작하였다.(Table 16)

본 실험에 적절한 함량을 얻기 위하여 전남대 의대 재학생 25명, 전남대 식영과 석박사 및 학생 45명, 남부대학교 식품영양학과 학생 25명을 대상으로 기호도 조사를 하였고 이를 바탕으로 얻어진 결과이다.

Table 2-15. 미나리 유래 간 기능 개선 유용물질 함유 드링크제제의 배합에

용량: 120 mL 제품유형: 음료 성분: ·미나리 추출분말 : 120 mg ·사과과즙 : 10% ·별꽃 : 0.5% ·구연산 : 0.05% ·비타민 C : 0.05% ·L-글루타민산나트륨 : 0.01% ·니코틴산아미드 : 0.01% ·프럭토올리고당 : 0.01% ·안식향산나트륨 : 0.01%

Table 2-16. 미나리 유래 간 기능 개선 유용물질 함유 탄산음료의 배합예

성분	함량 (mg/100 mL)	비고
미나리 추출물	20	이산화탄소 5 %
정백당	80	
액상과당	20	
구연산	1.7	산미제
구연산나트륨	0.5	
용 량	122.2	

2) 저장유통 적성

드링크제제를 37℃에서 1개월, 가속화 시험을 통하여 shelf life측정을 위해 50℃에서 1주일 저장하면서 미생물 검사와 외관검사를 실시한 결과 Table 17과 18에서와 같이 저장 유통상의 문제점은 발견되지 않았다.

Table 2-17. 제품의 미생물검사

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
37℃, 1개월	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출
50℃, 1주일	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출

Table 2-18. 제품의 외관검사

	침전물	이취	이미	변색
37℃, 1개월	없음	없음	없음	없음
50℃, 1주일	없음	없음	없음	없음



Fig. 2-24. 미나리 추출물 함유 탄산 음료



Fig. 2-25. 미나리 추출물 함유 드링크 음료

제 3 절 미나리에서 간활성 유효물질/제품의 간기능 활성화에 대한 전임상 연구

제 1 항 재료 및 방법

가. 재료

본 실험에 사용된 미나리 추출물은 제 2세부 과제로부터 공급받아 사용하였다. 마우스는 6주령 ICR을 중앙실험동물(주)로부터 구입하여 사용하였고 혈중 cytokines 및 primary splenocyte로부터 유리된 cytokines은 R&D Systems의 ELISA Duosets을 구입하여 측정하였다. 혈중 GPT, GOT의 측정을 위해 Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan)로부터 진단 kits를 구입하여 사용하였고 SOD와 catalase 측정을 위한 kits를 RANDOX (Crumlin, UK) 로부터 구입하였다. Lipid peroxidation 측정을 위해 LPO-CC kit를 Kamiya Biomedical Company (Seattle, WA, USA)로부터 구입하였다. 간염유발을 위해 사용된 ConA와 vitamin E, vitamin C standard grade는 Sigma(St. Louis, USA)로부터 구입하였다.

Primary splenocytes의 배양을 위해 사용된 RPMI1640, Penicillin/Streptomycin, FBS는 GibcoBRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다.

나. 실험 방법

1) cytokines의 측정

염증 관련 사이토카인은 주로 TNF, IL-1 β , IL-4, IL-6등으로서 sandwich ELISA법에 의해 측정하였다. 우선 first antibody를 96-well plate에 100ul 씩 분주하여 18시간동안 4°C에서 보관한 후 3회 PBS-0.05% tween20 용액으로 세척하고 Blocking buffer (1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN₃)를 처리하여 1시간 상온에서 반응시키고 washing buffer로 3회 세척하였다. 미나리 발효추출물 처리군과 비처리군으로부터 수득한 배지 100ul를 첨가하여 2시간동안 상온 반응시키고 다시 PBS-0.05% tween20 용액으로 3회 세척한 후 biotin으로 labeling 된 second antibody 100ul를 넣고 상온에서 2시간 반응시키고 다시 같은 용액으로 3회 세척한 후 100ul의 streptavidin-HRP(horse radish peroxidase)용액을 넣고 20분간 암실에서 반응시키고 다시 3회 세척한 후 100ul 의 substrate solution을 넣고 상온에서 20분간 반응시켰다. 50ul의 stop solution (2N H₂SO₄)을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 OD450nm에서 발색정도를 측정하였다.

2) 치사량 (LD₅₀) 측정 test

수명연장 및 치사량에 관한 연구는 비교적 가격이 저렴한 ICR mouse를 이용하였다. 먼저 ICR mouse를 6마리/group 으로 하여 4 group (총 24마리)으로 나누고 각 group 당 0, 1, 2, 5 g/kg를 각각 경구투여 하여 28일간을 모니터링하면서 쥐에 나타나는 독성을 검정하였다. 전체 24마리로부터 50%인 12마리가 죽는 투여물의 농도를 LD₅₀로 판정하였다

3) 수명연장효과 (survival test)의 검증

ICR mouse를 6마리/group으로 모두 4 groups으로 분류하고 모두 Concanavalin-A (10mg/kg)을 녹인 100ul의 주사액을 ICR mouse의 tail vein에 천천히 주입한 후 24시간을 두게 되면 HBV와 유사한 간염이 형성되게 된다. 간염이 유발된 대조군과 미나리 추출물을 농도별로 0, 1, 2, 5 g/kg에 해당되는 양을 AIN-93M diet에 포함시켜 경구로 투여한 후 12주동안 관찰하여 생존일수를 계산하여 간염으로 인한 치사율을 억제하는 미나리의 수명연장 효과 검증하였다.

4) 미나리의 간염활성추출물의 NK cell 활성화에 미치는 영향성 측정

면역학적 연구는 모두 balb/c mouse를 이용하였다. 먼저 Yak-1세포를 5mg/ml calcinane과 함께 RPMI 배지에 현탁하여 round bottom 96 well plate에 4×10^3 cells/100ul로 분주하고 splenocyte 2×10^5 cells/100ul를 well에 추가로 넣고 800rpm에서 3분간 원심 분리하여 세포간의 접촉도를 높여서 3시간 37°C, 5%CO₂ 에서 배양하였다. 20ul/well의 beads를 첨가하고 fluorescent assay analyzer에서 형광도를 측정하였다.

$$\text{NK activity (\%)} = \frac{[(\text{mean spontaneous} - \text{mean samples}) / (\text{mean spontaneous} - \text{mean maximum})] \times 100}$$

5) T 세포와 B 세포의 증식능력(mitogenesis) 측정

mouse로부터 spleen을 절개하여 forcep으로 마쇄한 후 10% FBS와 Streptomycin/Penicillin을 함유하는 DMEM 배지에 넣고 세척한 후 lysis buffer (0.16 mol/L ammonia chloride Tris buffer, pH7.2)로 적혈구를 용혈시키고 splenocytes 부유액을 만들어 1×10^5 cell/100ul 씩 96 well plate 분주하였다. T 세포 stimulation을 위해 10ug/ml Con-A를 첨가하여 5%CO₂ 배양기에서 20시간 배양하고 B세포의 stimulation을 위해 10ug/ml LPS를 넣고 5%CO₂ 배양기에서 44시간 배양한 후 ³H-thymidine 0.5uCi/well을 첨가하여 DNA incorporation을 시켰다. 4시간 배양 후 cell sample harvester (Cambridge Technology, MA)로 세포를 모으고 5ml의 scintillation cocktail을

혼합하여 liquid scintillation counter (Tri-Carb, Packard, CA)에서 수치를 측정하여 cpm으로 나타내었다.

6) Th1/Th2 type cytokines 의 분비능력 측정

Mouse spleen으로 분리된 splenocytes 1×10^5 cells/100ul를 96 well plate에 분주하고 IL-2, IL-4, INF-r 의 생성을 위해 10ug/ml Con-A 100ul를 각 well에 첨가하여 37°C, 5%CO₂ 배양기에서 배양하여 IL-2는 24시간 후, IL-4는 48시간 후, 그리고 INF-r는 72시간 후 상층액을 수거하여 -70°C에 동결하여 보관하였다. IL-6와 TNF-a의 측정은 10ug/ml LPS 100ul를 각 well에 첨가하여 37°C, 5%CO₂ 에서 배양하여 24시간 이후에 상층액을 조심스럽게 분리하여 ELISA immunoassay 방법으로 정량하였다.

7) 간조직의 lipid peroxidation 측정

Ohkawa 등의 방법을 변형한 LPO-CC kit를 구입하여 측정하였고 간단히 요약하면 10% 간조직 균질액 0.4ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2ml, 20% acetate buffer (pH 3.5) 1.5ml과 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid 1.5ml을 가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 실온에서 n-butanol : pyridine (15:1) 5.0ml과 H₂O 1ml을 첨가하여 잘 섞은 후 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 분홍색의 n-butanol : pyridine 층을 취하여 파장 532nm에서 그 흡광도를 측정한 다음 표준곡선에 준하여 그 함량을 조직 1g당 malondialdehyde nmole로 표시되는데 이것을 percent unit으로 전환하여 사용하였다.

8) 간조직의 vitamin E 량의 측정

0.1g의 간조직을 1ml의 DW에 넣고 균질마쇄하여 butylated hydroxytoluene을 넣고 pentane, ethanol, sodium dodecyl sulfate를 이용하여 vitamin E를 추출한 후 20°C에서 질소가스하에서 증발시키고 0.5ml methanol에 다시 용해시켰다. C18 column (NovaPak, Bedford, MA)을 이용하여 HPLC상에서 vitamin E의 농도를 측정하였다. mobile phase는 methanol:sodium acetate의 비율을 98:2로 하였고, flow rate는 1.5ml/min으로 하였으며 vitamin E의 분출시간은 6.5분이었고 fluorescence detector(Millipore) 는 290nm excitation과 320nm emission 파장으로 하였다.

9) GOT, GOP 및 혈중 지질의 측정

혈액검사 때에 간염의 진단에 가장 중요하게 쓰이는 것으로서 transaminase란 효소의 혈청 내 수치를 측정한 것으로 GOT(AST), GPT(ALT) 두 가지가 있다. 이 두 효소는 간세포 내에 다량 포함되어 있어 간세포가 손상되었을 경우 혈중으로 나오게 된다. 따라서 혈청 속의 수치가 높으냐 낮으냐에 따라 간세포의 파괴 정

도를 파악할 수가 있다. 또한 간이 손상되어 지질 대사가 원활하지 않을 경우 혈중 지질 농도의 변화가 유발됨으로 간염유발 쥐로부터 채취한 혈액의 GOT, GPT, 혈중지질농도를 commercial kits를 구입하여 측정하였다.

10) PBMC의 산화적 스트레스 측정

염증의 발생은 reactive oxygen radicals 등의 산화성 물질의 생성을 자극함으로써 혈중 및 세포내 항산화 물질의 소실을 가져오게 됨. 따라서 혈중 항산화 물질의 농도와 혈중 세포들의 산화성 물질에 대한 영향성을 평가 하기위해 혈중 vitamin C의 농도와 PBMC의 DNA fragmentation을 측정하기 위해 comet assay를 수행하고자 함. 우선 채취한 혈액을 1500rpm 20분간 원심분리하여 혈청과 혈구로 분리하고 혈청을 vitamin C 농도를 분석하기 위해 HPLC를 사용하며 혈구는 다시 PBS로 현탁하여 15ml의 lymphocyte separation medium을 사용하여 PBMC를 분리하여 $1-4 \times 10^4$ 농도로 PBS에 suspension하고 DW에 녹인 1% LMPA(low melting point agarose)를 40°C로 유지한 다음 0.25ml LMPA를 섞은 후 0.5ml를 slide에 분주 한다. 4°C에서 5분간 방치한 후 4°C dark room에서 1시간 동안 lysis한다.

11) cytotoxic T(Tc) cell의 활성 측정

Tc 세포의 활성은 activation 된 Tc 세포의 수를 flow cytometer (FACS)에서 측정하여 그래프화하였다. 먼저 balb/c mouse의 splenocytes를 취한 후 1×10^5 cells/ml로 희석한 후 FITC 형광화된 CD3+/CD8+ 항체를 처리하여 30분간 반응한 후 flow cytometer에서 측정하였고 cell 수를 전체 5,000개 측정을 기준으로 각 quadrant의 %를 나타내었다.

12) MTT assay

전임상 실험에 앞서 염증에 대한 효과가 나타날 지에 대한 기초 연구로서 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포를 이용하여 확인하였다. 우선 미나리 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. MTT(5mg/ml in PBS)용액을 well당 50ul씩 넣은 후, 2시간, 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ 배양시키고, MTT 처리한 plate에 생성된 formazan 결정들을 DMSO용해, 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

13) *In vivo* 상에서 미나리 간 기능 개선 유효성분의 독성평가 가) 실험동물의 사육

180 g 전·후의 총 25마리의 수컷 Sprague-Dawley rat을 구입한 후 일주일간 조명시간을 아침 7시부터 저녁 7시까지 12시간으로, 실내온도 및 습도는 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, $55\pm 15\%$ 로 조절된 사육실에 사육하였다. 실험동물은 7일간 본 사육환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사료는 고형사료(삼양사료), 급수는 수돗물을 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다.

나) 투여용량 및 투여방법

Caffeic acid 0, 10, 40 mg/kg을 corn oil에 녹여 14일간 매일 경구투여 하였다.

다) 일반증상관찰 및 생존율

실험기간동안 1일 1회씩 일반증상 및 사망의 유무에 관하여 관찰·기록하였고, 생존율은 실험완료 후 각 군에서 사망한 개체수를 생존한 개체수로 나누어 백분율로 환산하였다.

14) *In vivo* 상에서 미나리 간 기능 개선 유효물질의 유효성 평가

가) 실험동물 군 분류, 투여용량 및 투여방법

실험동물을 무작위로 각 6마리씩 NC, CC, CFL, CFH 4군으로 나누고, NC군은 corn oil을 14일간 경구투여 하였고, CC 군은 14일간 corn oil을 경구투여 하고 14일째 corn oil 투여 3시간 후에 CCl_4 를 20% corn oil에 1.25 mL/kg의 용량으로 1회 경구투여하였다. CFL군은 14일간 10 mg/kg의 caffeic acid를 경구투여 하고 14일째 동량의 caffeic acid를 경구투여하고 3시간 후에 CCl_4 를 20% corn oil에 1.25 mL/kg의 용량으로 1회 경구투여하였고, FCH군은 caffeic acid를 40 mg/kg 경구투여 하여 같은 방법으로 CCl_4 1회 투여하여 간독성을 유발하였다(표 1).

Table 1. Experimental rat groups

NC	: Normal control rats
CC	: 20% CCl ₄ control rats (1.25 mL/kg)
CFL	: Caffeic acid (10 mg/kg), 20% CCl ₄ (1.25 mL/kg)
CFH	: Caffeic acid (40 mg/kg), 20% CCl ₄ (1.25 mL/kg)

나) 실험동물의 몸무게 변화

실험동물의 몸무게는 경구투여 시작일과 경구투여 마지막일에 측정하였다. 몸무게 증감(Weight gain; g)은 경구투여 마지막일에 측정한 몸무게에서 시작일의 몸무게를 제외하여 환산하였다.

다) 실험동물의 조직무게

14일 경과 후 치사하여 간, 신장, 비장, 정소, 폐, 심장을 적출하여 각 장기중량(g)을 측정하였다.

라) 혈중 생화학적표지물질의 측정

14일간 경구투여한 후 쥐를 치사하여 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 혈청을 획득하여 aspartate transeaminase(GOT), alanine transaminase(GPT), lactate dehydrogenase(LDH), triglyceride(TG), total Cholesterol(T_CHO)와 같은 혈중 생화학표지물질을 측정하였다.

마) 조직병리학적 변화 측정

각 군의 간 조직의 1/4을 24시간동안 10% 포르말린액에 고정하고, 3 - 5 μ m 두께로 파라핀 조직절편을 제작한 후 hematoxylin & eosin 용액을 이용하여 간 조직의 형태학적 변화를 평가하였다.

바) 항산화 효소의 분석

① Catalase

카탈라제 활성은 Aebi 등의 spectrophotometric method 로 분석하였다. 96 well plate를 준비하고, 조직액 10 μ L에 20 mM H₂O₂용액 290 μ L를 첨가하여 microplate reader의 kinetic method를 이용하여 3분간 240 nm에서 흡광도의 변화를

측정하였다. 카탈라아제 효소의 활성은 U/mg protein으로 환산하였다.

② SOD(Superoxide Dismutase)

Superoxide Dismutase 활성은 Ukeda 등의 spectrophotometric method 로 분석하였다. 96 well plate를 준비하고, sample과 blank 2 각 well에 sample 20 μ L 씩 분주하고 blank1과 blank 3 각 well에 ddH₂O 20 μ L 씩 분주한다. 위의 모든 well에 WST-1 용액(1-(4-indophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 200 μ L 씩 분주한 뒤, blank 2와 3에 buffer 20 μ L 씩 분주하고 sample과 blank 1에 xanthine oxidase 용액을 20 μ L 씩 첨가하여 plate mix한 후, 37°C 에서 20분 반응시키고 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 『superoxide anion radical inhibition rate (%) = $\{[(A_{blank 1} - A_{blank 3}) - (A_{sample} - A_{blank 2})] / (A_{blank 1} - A_{blank 3})\} \times 100$ 』 의 계산식을 활용하여 %로 계산하고, SOD 효소활성은 상용화된 SOD 를 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 U/mL 농도로 작성된 표준곡선을 작성하여 U/mg protein으로 환산하였다.

③ Glutathione-S-Transferase(GST)

GST 활성은 Habig 등의 spectrophotometric method 로 분석하였다. 96 well plat를 준비하고, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 196 μ L와 200 mM reduced glutathione 2 μ L, 100 mM CDNB 용액 2 μ L을 혼합한 기질액을 준비하였다. 조직액 20 μ L에 기질액 180 μ L를 첨가하여 5분간 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. GST 효소활성은 U/mg protein으로 계산하였다.

④ Glutathione Peroxidase(GPx)

GPx 활성은 Thomson 등의 spectrophotometric method 로 분석하였다. 96 well plat를 준비하고, 조직액 20 μ L에 3.5 mM reduced glutathione 120 μ L, 2.5 mM NADPH 20 μ L, 0.5 U glutathione reductase 20 μ L를 넣어 잘 혼합한 후, 30 mM tert-butyl hydroperoxide 20 μ L를 첨가하여 반응을 유도하고 5분간 340 nm에서 GPx 효소활성은 U/mg protein으로 계산하였다.

⑤ Glutathione

Glutathion 량은 Griffith 등의 spectrophotometric method 로 분석하였다. 96 well plate를 준비하고, 100 mM Potassium phosphate buffer (pH7.0) 7.54 mL, 6 Unit glutathione reductase 228 μ L, 3 mM DTNB 228 μ L를 혼합하여 기질액을 만들었다. 조직액 10 μ L에 준비한 기질액 150 μ L를 잘 혼합한 후 50 mM NADPH 50 μ L를 첨가하여 반응을 유도하고 5분간 412 nm 에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 조직 내의 GSH량은 GSH 표준곡선을 이용하여 계산하여 μ moles/mg protein으로 나타내었다.

⑥ Thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)

조직액 내의 지질 과산화의 분해산물인 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)는 지질과산화물이 TBA와 반응할 때의 흡광도를 측정하는 Draper 등의 spectrophotometric method로 분석하였다. 30배 희석된 조직액 500 μ L에 15% TCA 250 μ L를 첨가하여 10분간 단백질을 침전시킨다. 4 $^{\circ}$ C, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 500 μ L를 새 1.5 mL 튜브로 옮긴 후 0.375% TBA를 500 μ L 첨가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 100 $^{\circ}$ C에서 30분간 끓이고, ice 상에서 10분간 cooling 하였다. 4 $^{\circ}$ C, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 만을 535 nm에서 흡광도 측정하였다. TBARS는 MDA표준곡선을 이용하여 계산하였고 M/g tissue로 나타내었다.

제 2 항 실험 결과

본 연구과제는 동물모델을 이용한 *in vivo* system에서의 미나리 추출물 (OJE)의 효과를 측정하는데 그 목적이 있다. 하지만 동물모델로 직접 수행하기 전에 동일한 동물인 mouse에서 유래된 RAW264.7 macrophage cell line으로 항염증 효과를 우선적으로 측정하여 *in vivo* test를 보다 원활하게 하고자 하여 *in vitro* test를 수행하였다.

가. 미나리 추출물의 mouse RAW264.7 macrophage cell line에서의 항염증 효과 측정

1) MTT 독성 test

MTT test는 미나리 추출물을 농도별로 RAW264.7 세포에 처리한 후 24시간 경과 후 50 ug/ml MTT 시약을 처리한 후 다시 4시간 배양하고 DMSO로 세로를 용융시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하여 수행하였다. OJH (Hot H₂O)의 경우 1000 ug/ml의 농도에서도 독성이 나타나지 않았으며 세포의 현미경적 관찰에도 대조군에 비해 차이를 발견하지 못했다. OJE (80% EtOH)의 경우 800 ug/ml의 처리까지 차이를 나타내지 않았지만 100 ug/ml의 농도에서 약 34% 정도 성장이 억제됨을 알 수 있었다(Fig.3-1). 따라서 향후 실험을 위한 적정 농도는 600 ug/ml까지 사용하기로 하였다.

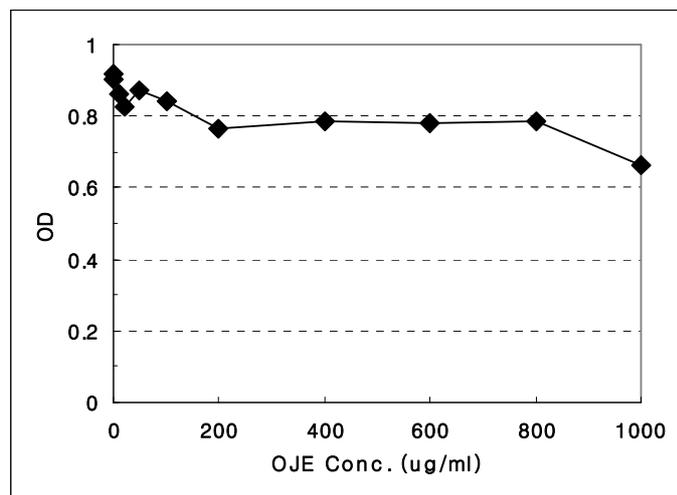


Fig. 3-1. Cytotoxicity test of OJ ethanol fraction (OJE) in RAW264.7 macrophage cell line.

2) lipopolysaccharide(LPS) 유도된 RAW264.7 세포에서의 TNF- α 의 발현 억제 측정

RAW264.7 세포계에서의 TNF- α 분비는 염증발현의 지표로 이용되고 있다. 따라서 LPS에 의해 유도된 TNF- α level을 측정함으로 미나리 추출물 (OJE)의 항염 증효과 유무를 거시적 측면에서 확인할 수 있다. TNF- α level 은 1시간 이후로 꾸준히 증가하여 12시간 정도에서 포화되는 것으로 나타났다. 이러한 TNF- α 의 분비는 OJE의 처리에 따라 농도의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-2). 특히 600 ug/ml의 농도에서는 거의 정상 level로 회복되는 것으로 나타났다.

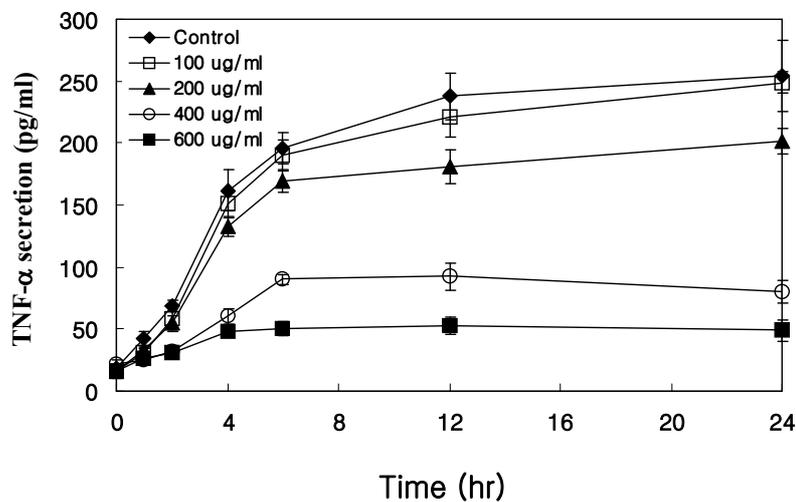


Fig. 3-2. Effect of OJE on TNF- α secretion from LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell line.

3) OJE의 PGE₂의 발현 억제 측정

염증반응은 arachidonic acid로부터 prostaglandins(PGs)으로 전환시키는 cyclooxygenase(COX)에 의해 영향을 크게 받는 것으로 여겨지고 있다. 따라서 결과물인 PGE₂의 생성은 COX의 활성을 간접적으로 확인할 수 있는 방법이기도 하다. PGE₂의 농도를 측정한 결과 주로 400 - 600 ug/ml에서 유의성 높게 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-3).

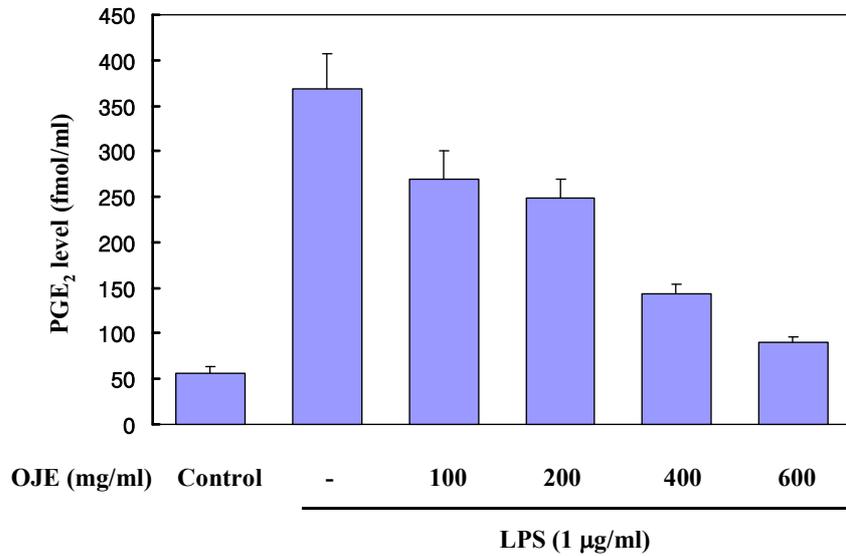


Fig. 3-3. Effect of OJE (0-600 ug/ml) on PGE₂ secretion from LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell line.

4) OJE 의 COX-2 의 발현 억제 측정

COX는 COX-1과 COX-2로 구분되는데 COX-1이 consistent 하게 합성되는 반면 COX-2는 유도되는 특징을 나타내고 있다. 특히 염증관련하여서는 COX-2의 발현이 중요한 역할을 하게 된다. 따라서 본 연구에는 미나리 추출물인 OJE의 항염증 효과를 확인하기 위해 COX-2의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 western blot 과 RT-PCR을 통해 측정하였다. COX-2 protein 발현을 측정한 결과 600 ug/ml 의 농도에서 억제됨을 알 수 있었고 (Fig. 4) mRNA의 발현량도 600 ug/ml에서 억제되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 5). 이것은 OJE의 역할이 최소한 transcription 과 translation 에 영향을 미치고 있음을 인지 할 수 있다.

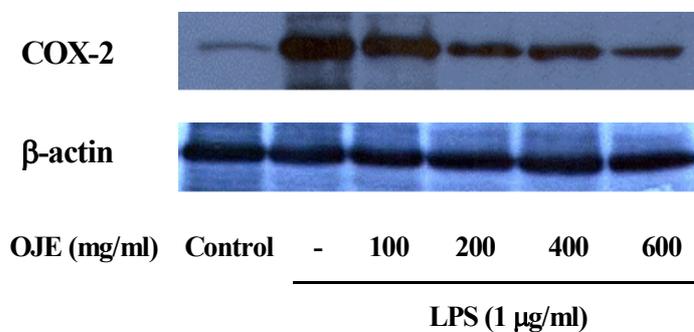


Fig. 3-4. Effect of OJE on COX-2 protein expression in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell line. Twenty microgram of total protein was applied on 12% PAGE.

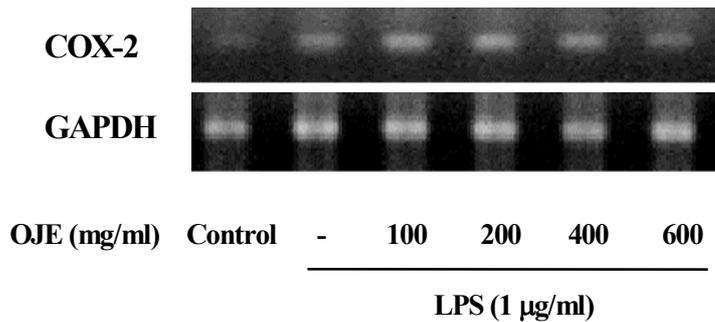


Fig. 3-5. Effect of OJE on COX-2 mRNA expression from LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell line. RT-PCR was performed to detect mRNA and amplified DNA was loaded on 1.0% agarose gel and stained in EtBr.

5) NF- κ B 와 AP-1 transcription factor의 활성화 및 신호전달체계 억제 효과 측정

LPS를 비롯한 염증유발 물질로서 잘 알려져 있는 TNF- α 및 IL-1 β cytokine 수용체는 IKK를 통해 NF- κ B 및 AP-1 transcription factor를 활성화 시킨다. 이렇게 활성화된 transcription factor는 핵내의 유전자와 상호 작용하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 COX-2를 발현시켜 염증반응에 관여하고 있다. 따라서 본 실험에서는 NF- κ B 및 AP-1의 COX-2 발현에 대한 관련성을 확인하고자 luciferase를 발현하도록 유전자 조작된 NF- κ B (pNF- κ B-luciferase)와 AP-1 (pAP-1-luciferase) plasmid를 RAW264.7 세포에 transient transfection 시킨 다음 발현정도를 측정하였다. NF- κ B 활성화는 200 ug/ml 이후로 감소하기 시작하여 600 ug/ml 농도에서 거의 정상수준으로 회복되었음을 관찰하였다 (Fig.3-6). 이러한 경향은 AP-1의 경우 보다 더 두드러지게 나타나고 있음을 알 수 있다 (Fig.3-7). 이 결과는 OJE가 NF- κ B 신호 전달 체계를 거쳐 COX-2를 조절할 수 있는 가능성을 예시하고 있으며 또한 AP-1을 동시에 활성화시킴으로 신호전달체계를 통한 유전자 조절 능력이 다양하게 나타날 수 있음을 암시하고 있다.

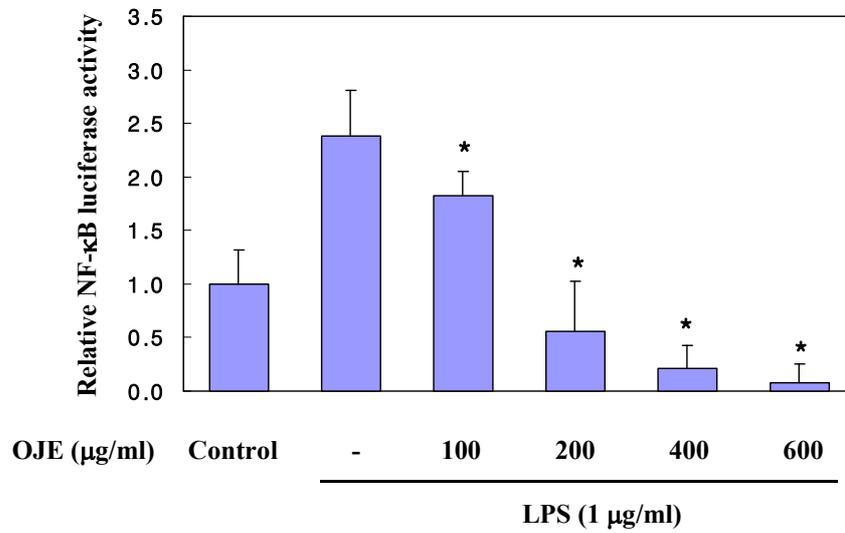


Fig. 3-6. Effect of OJE on NF-κB transcriptional expression from LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell line that was transiently transfected with NF-κB-luciferase plasmid.

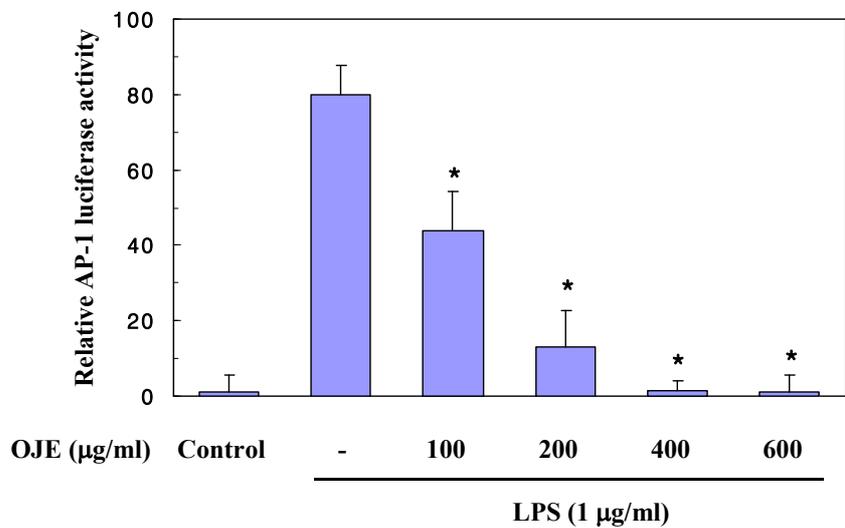


Fig. 3-7. Effect of OJE on AP-1 transcriptional expression from LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell line that was transiently transfected with AP-1-luciferase plasmid.

6) OJE에 의한 I- κ Ba degradation 억제 측정

NF- κ B가 활성화 될 경우 I- κ Ba는 NF- κ B로부터 분리되어 cytosolic degradation 과정을 거치게 된다. 즉, degradation이 일어난다는 것은 I- κ Ba unit을 제외한 NF- κ B (p50/p65)가 세포핵으로 translocation 되어 유전자 발현을 조절하게 됨을 암시하고 있다. 본 실험에서는 cytosolic I- κ Ba의 degradation 정도를 측정하여 NF- κ B의 활성화를 support 하였다. OJE 100 ug/ml의 농도에서는 LPS 처리했을 경우와 차이가 없이 degradation이 발생하였으나 농도의존적으로 degradation이 억제됨을 western blot에 의해 확인하였다 (Fig. 3-8).

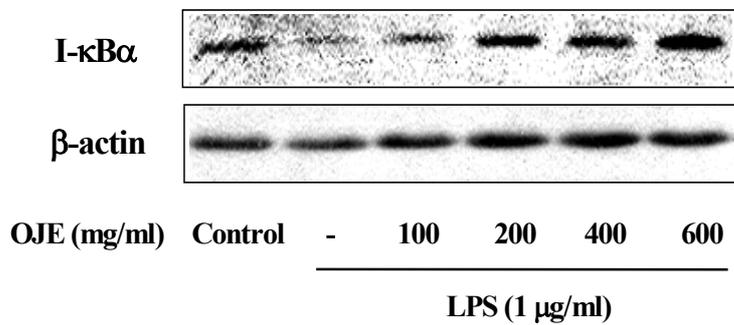


Fig. 3-8. Effect of OJE on I- κ Ba degradation in LPS-stimulated RAW264.7 cell line. Western blot was applied to detect I- κ Ba and 20ug of total protein was loaded on 12% PAGE.

나. 미나리 추출물의 안전성 평가

1) 미나리 추출물 (OJE)의 독성 및 LD₅₀의 결정

6주령된 ICR mouse를 각 group 당 6마리씩 무작위로 분류하여 모두 4 실험군으로 구분하였다. OJE는 동결건조된 powder를 이용하여 control(vehicle 투여군), 1g/kg, 2g/kg, 5g/kg의 농도로 매일 12:00 - 14:00 사이에 group 별로 경구투여 하였다. 일요일은 투여를 하지 않았으며 총 4주에 걸쳐 OJE를 지속적으로 투여하였다. 동물 사육실 온도는 25도, 습도는 60% 로 일정하게 유지 시켰으며 12시간 간격으로 밤낮의 cycle을 자동으로 조절하였다. 음성대조군은 마찬가지로 동일한 환경을 만들어 주기위해 OJE 대신에 saline solution(vehicle)을 동일량 경구투여 하였다. 4주간 경구 투여 후 체중변화 및 각 조직의 무게변화, 그리고 독성 및 관련 질병의 소견이 있는 지를 해부를 통해 검정하였다. 본 실험의 결과를 종합해본 결과 최고 농도인 5g/kg에서도 단 한 마리의 ICR mouse도 사망하지 않았다 (Fig.

3-9). 또한 체중의 변화를 관찰한 결과 대조군과 차이를 보이지 않았으며 각 장기 조직의 무게 또한 변화가 없었다 (Table 1). 장기조직의 손상 여부를 관찰한 결과 조직괴사 및 부종, 염증의 형상은 나타나지 않았고 대조군과 비교해서 전혀 차이를 구별할 수 없었다.

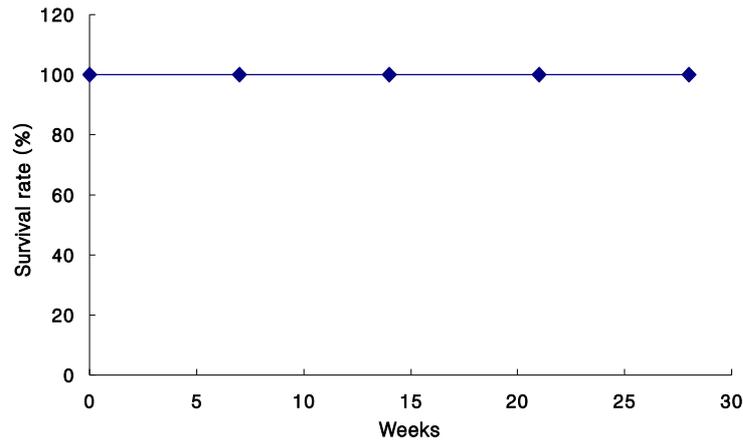


Fig. 3-9. The survival rate of ICR mouse fed 1, 2, 5 g/kg OJE by oral administration for 28 days. None of mice has died with treatment of OJE for 28 days. The data suggest that OJE has no significant toxicity with even high concentration.

Table 3-1. Body weight index during OJE administration for 28 days. There was no significant difference in body weight.

	대조군	1 g/kg 투여군	2 g/kg 투여군	5 g/kg 투여군
Intial body weight (g)	29.6 +/- 1.45	28.5 +/- 0.72	28.7 +/- 0.54	28.2 +/- 1.02
Final body weight (g)	32.2 +/- 1.12	32 +/- 1.2	31.5 +/- 0.89	29 +/- 1.39
Diet intake(g/d/mouse)	5.48 +/- 0.32	4.96 +/- 0.21	5.04 +/- 0.45	5.5 +/- 0.57

2) 장기 조직의 무게 측정

28일간 OJE를 농도별로 투여한 후 ether로 마취시킨 후 blood를 수집하고 원심 분리하여 혈청을 eppendorf tube에 분리하여 cytokine 측정때까지 -70도에서 보관 하였다. 각 조직 장기를 분리한 후 PBS에 3회 씻은 후 무게를 측정하였고 (Table 2) 각 부위를 육안으로 검정하여 질병이나 염증반응, 부종등이 발생하였는 지 관찰 하고 사진 촬영하여 기록을 보존하였다.

Table 3-2. The organ weight of ICR mouse fed OJE for 28 days

	대조군	1 g/kg 투여군	2 g/kg 투여군	5 g/kg 투여군
Spleen	0.126 +/- 0.02	0.109 +/- 0.01	0.098 +/- 0.01	0.114 +/- 0.03
Kidney	0.213 +/- 0.01	0.209 +/- 0.02	0.24 +/- 0.01	0.242 +/- 0.01
Liver	1.733 +/- 0.24	1.617 +/- 0.3	1.738 +/- 0.14	1.93 +/- 0.17
Thymus	0.05 +/- 0.01	0.04 +/- 0.02	0.042 +/- 0.02	0.046 +/- 0.02
Heart	0.16 +/- 0.01	0.128 +/- 0.21	0.154 +/- 0.01	0.163 +/- 0.01
Lung	0.138 +/- 0.05	0.157 +/- 0.01	0.155 +/- 0.01	0.187 +/- 0.03

3) 염증 관련 cytokines의 측정

간염억제 및 간기능 활성화를 측정하기 위해 0.9% saline solution 0.3 ml에 용해시킨 concanavalin A (ConA, 15 mg/kg)로 balb/c mouse (6마리/group) tail vein 에 일주일에 한번씩 4주 동안 주사하여 간염을 유발시켰다. OJE 는 pre- 와 post-treatment로 구분하여 실험하였는데 pre-treatment의 경우 5g/kg OJE를 ConA 투여 일주일 전부터 경구투여 하였고 post-treatment의 경우 4주 동안 ConA를 처리한 후 5g/kg OJE를 경구투여하기 시작하여 8주 동안 유지시켰다. 따라서 total ConA 처리기간은 post-treatment의 경우 총 12주였다. 각각의 투여가 끝나는 시기에 ether로 마취시킨 후 해부하여 blood를 취하여 혈중 proinflammatory cytokine의 변화를 측정하였고 간조직의 괴사에 영향을 미칠 수 있는 면역세포의 과다한 활성을 측정하기위해 spleen을 수거한 후 마쇄하여 splenocyte를 제조하고 cytotoxic T 세포의 활성을 flow cytometry로 확인하였다. 또한 간 조직을 마쇄하여 SOD와 catalase의 활성을 측정하여 oxidative stress에 대한 저항성을 실험하였다.

proinflammatory cytokine의 발현을 통해 측정한 결과 TNF-a의 혈중 농도가

ConA 처리군에서 대조군에 비해 약 18.3배 증가하였고 pre-treatment group의 경우 약 3.2배 정도로 증가하여 대조군에 비해 OJE가 혈중 TNF- α 의 발현 억제효과가 있음을 알 수 있었다. 하지만 post-treatment의 경우 OJE의 처리는 대조군에 비해 큰 차이를 나타내지 않음으로 이미 간 조직이 손상되었을 경우는 회복이 어려운 것으로 판단된다. 따라서 OJE는 예방적 관점에서 보다 효과적으로 여겨진다 (Fig. 3-10). 이러한 경향은 IL-1b의 경우도 마찬가지로 나타났다 (Fig. 3-11). 특이한 점은 혈중 IFN- γ 의 농도가 약 10 배 정도 감소하였는데 이것은 TNF- α 의 증가와 직접적인 관련이 있을 것으로 여겨지는데 Th1 type cytokine인 IFN- γ 는 Th2 type cytokine을 조절하는 역할을 하고 있기 때문에 감소된 혈중 IFN- γ 농도는 TNF- α 의 혈중 농도를 상승시킴으로 감염의 진행을 보다 촉진시킬 것으로 여겨진다. pre-treatment 의 경우 IFN- γ 의 농도가 정상수준으로 회복되는 것을 확인 하였는데 이것의 영향으로 TNF- α 또한 정상수준으로 감소한 것이다 (Fig. 3-12).

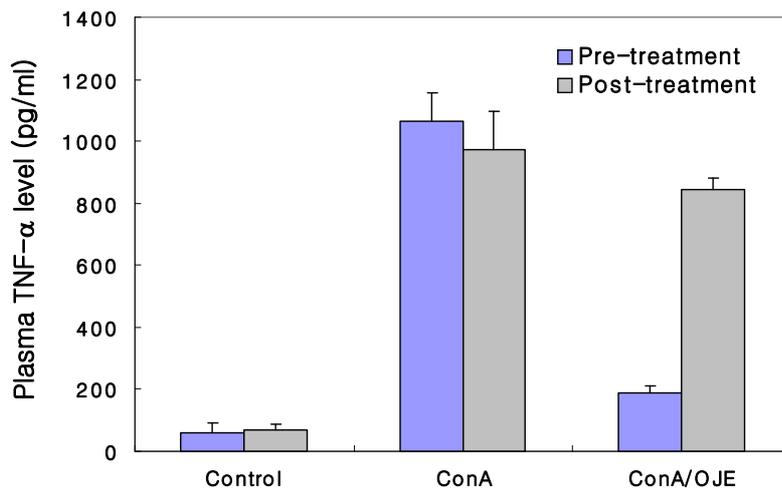


Fig. 3-10. Plasma TNF- α level from balb/c mouse having ConA-induced hepatitis with pre- and post-treatment of 5 g/kg OJE

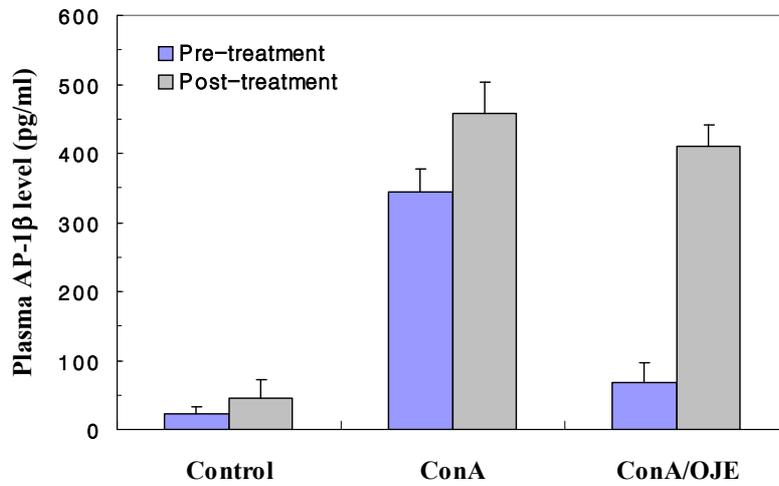


Fig. 3-11. Plasma IL-1 β level from balb/c mouse having ConA-induced hepatitis with pre- and post-treatment of 5 g/kg OJE

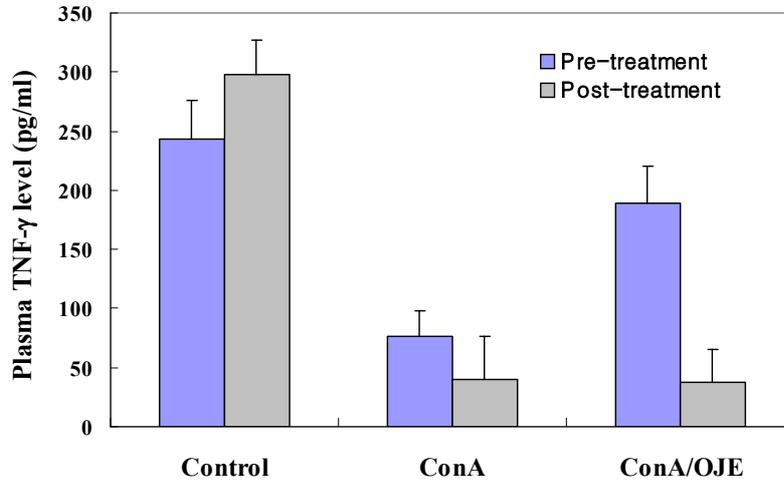


Fig. 3-12. Plasma TNF- γ level from balb/c mouse having ConA-induced hepatitis with pre- and post-treatment of 5 g/kg OJE

4) 독성 T 세포 (Tc)의 활성 측정

cytotoxic T (Tc) 세포의 경우 virus에 감염된 세포를 MHC class I 에 부착된 항원을 인식함으로 감염세포를 공격하여 사멸시키는 방어적 역할을 하는 세포이다. 하지만 그 활성이 지나치거나 과다하게 생성되었을 경우 오히려 괴사 등의 부작용을 유발시키기도 한다. 본 실험에서 CD3+/CD8+ cytotoxic T 세포의 수적 증가를 확인한 결과 ConA를 처리한 군에서 대조군에 비해 약 54%정도 증가한 것을 확인하였다. pre-treatment 의 경우 Tc 수가 정상군보다 다소 적게 나타나 Tc 세포의 활성이 정상적으로 회복되었음을 알 수 있었다 (Fig. 3-13).

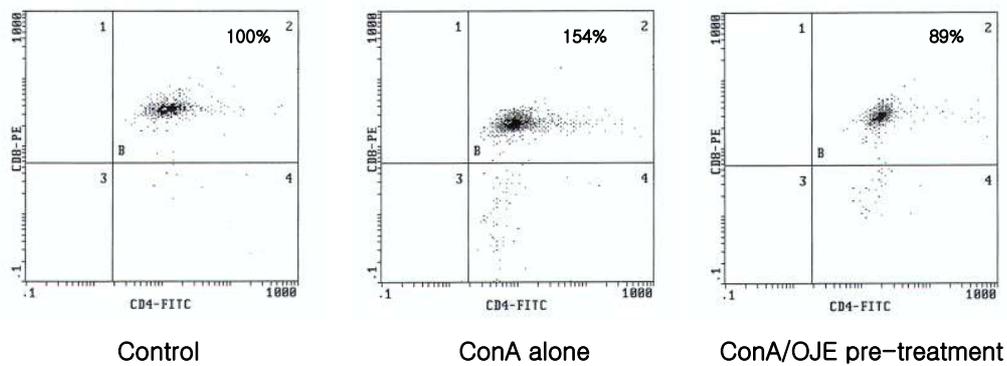


Fig. 3-13. CD3+/CD8+ cytotoxic T cell count from balb/c splenocytes by flow cytometry. Anti-CD3 antibody was labeled with PE and anti-CD8 antibody was labeled with FITC.

5) SOD와 Catalase의 측정

SOD와 catalase는 항산화 효소계의 하나로 세포 내 활성산소 제거에 중요한 역할을 하고 있다. 미나리 에탄올 추출물 (OJE)는 SOD와 catalase의 활성을 증가시켰으나 기대한 만큼 높게 나타나지는 않았다(Fig. 3-14). 이것은 OJE가 NF-kB transcriptional activation 실험에서 입증되었듯이 유전자의 발현조절에 관여하나 그 정도는 약한 것으로 여겨진다. *in vitro* 상에서의 연구(제2세부연구)에서 항산화 효소의 활성이 상대적으로 높게 나타난 것은 직접적인 투여에 의한 것으로 여겨지며 본 연구는 전임상 단계로서 mouse에 장기간 투여하여 대사과정을 거친 후 간에서의 활성을 나타낸 것임으로 다소 낮게 나타난 것으로 생각된다.

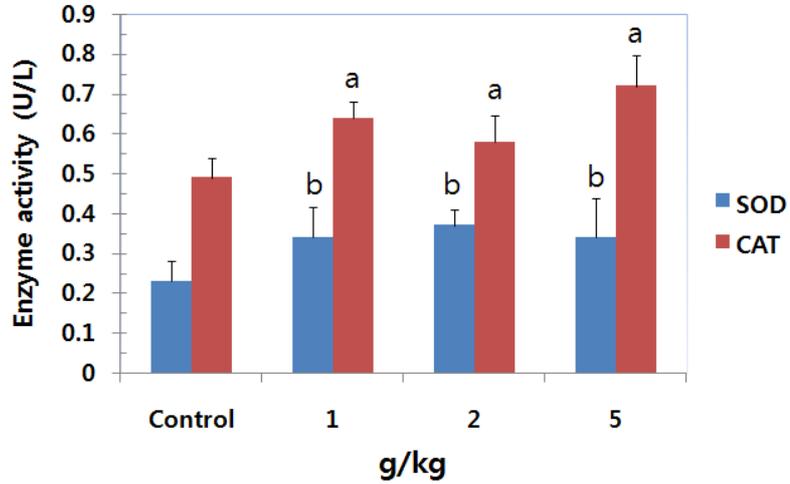


Fig. 3-14. Effect of OJE oral administration on hepatic SOD and catalase(CAT) activity. a,b; significantly different from control ($p < 0.05$)

6) NK 세포의 활성 측정

in vitro 상에서 NK 세포에 대한 OJE (600ug/ml)의 효과는 유의성 있게 나타나지 않았다. 다시 말해 NK 세포의 활성화에 OJE는 관여하지 않는 것으로 확인되었다. 이것은 NK 세포를 과도하게 활성화하여 자가 면역질환으로 연결되는 것을 억제한다는 의미도 포함하고 있다 (Fig. 3-15).

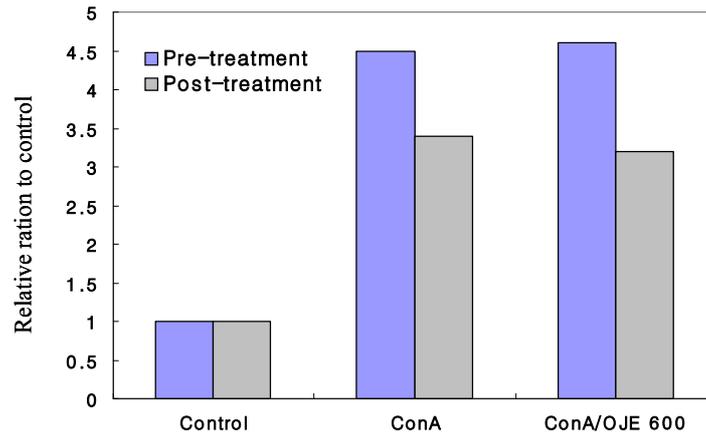


Fig.3-15. Effect of OJE on natural killer(NK) cell activity from balb/c mouse with ConA-induced hepatitis. Treatment and assay was performed *in vitro*.

7) hepatic vitamin E 농도 측정

간에서의 vitamin E의 농도는 산화적 스트레스로 인한 조직에의 손상을 간접적으로 판독할 수 있는 지표로 사용되고 있다. 따라서 항산화제의 함유량이 sample에 높을수록 산화적 스트레스로 인한 vitamin E의 감소를 억제할 수 있기 때문에 sample의 항산화능력을 간접적으로 확인하는 방법이기도 하다. 본 연구에서는 OJE의 농도를 증가함에 따라 hepatic vitamin E의 농도가 증가하는 데 이것은 OJE의 성분에 항산화성을 나타내는 물질이 존재하고 있음을 시사하는 것이다 (Fig. 3-16).

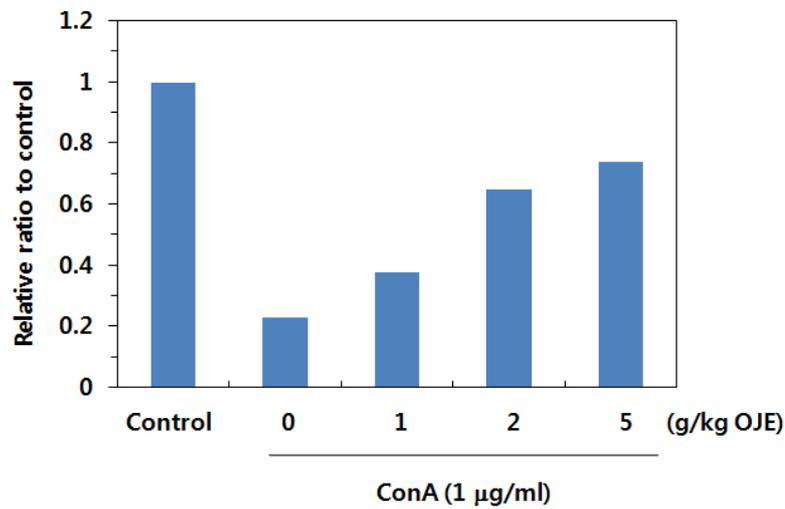


Fig. 3-16. Effect of OJE on vitamin E level in liver with ConA-induced hepatitis

8) hepatic lipid peroxidation

Hepatic lipid peroxidation은 산화적스트레스로 인한 간의 손상을 확인하는 방법으로 과도하게 생성된 lipid peroxides들은 항산화제인 vitamin E 또는 vitamin C등의 물질을 고갈시키고 조직의 손상을 직접적으로 유발시키는 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 미나리 에탄올 추출물을 투여한 쥐로부터 유래된 간조직의 lipid peroxidation을 측정한 결과 미나리 에탄올 추출물의 투여량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3-17). 이러한 결과는 hepatic vitamin E의 농도와 깊은 관계가 있는 것으로 여겨진다.

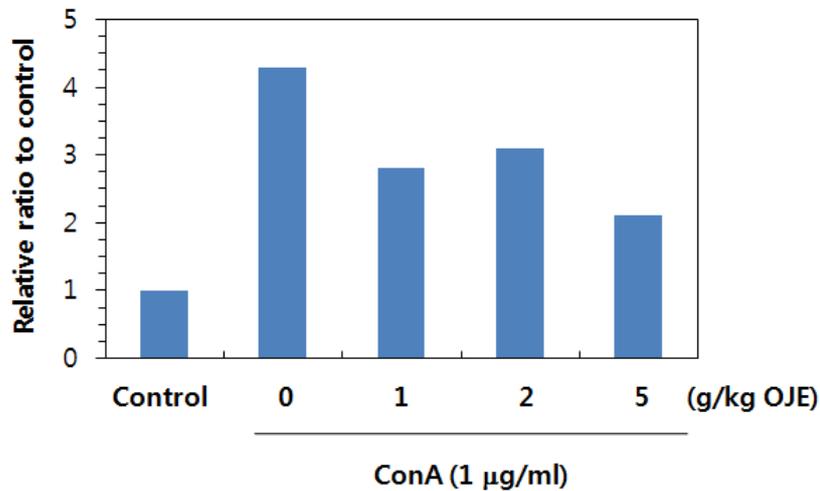


Fig. 3-17. Effect of OJE on lipid peroxidation in liver with ConA-induced hepatitis

다. 미나리 단일 및 복합 추출물의 안전성 평가

1) 미나리 클로로포름 분획 (CF)의 독성 및 LD₅₀의 결정

6주령된 ICR mouse를 각 group 당 6마리씩 무작위로 분류하여 모두 4 실험군으로 구분하였다. 클로로포름 분획은 동결건조된 powder를 이용하여 1g/kg, 2g/kg, 5g/kg의 농도로 매일 12:00 - 14:00 사이에 group 별로 경구투여하였다. 일요일은 투여를 하지 않았으며 총 4주에 걸쳐 클로로포름 분획을 지속적으로 투여하였다. 동물 사육실 온도는 25도, 습도는 60% 로 일정하게 유지 시켰으며 12시간 간격으로 밤낮의 cycle을 자동으로 조절하였다. 음성대조군은 마찬가지로 동일한 환경을 만들어 주기위해 클로로포름 분획 대신에 saline solution을 동일량 경구투여하였다. 4주간 경구 투여후 체중변화 및 각 조직의 무게변화, 그리고 독성 및 관련 질병의 소견이 있는 지를 해부를 통해 검정하였다. 본 실험의 결과를 종합해본 결과 최고 농도인 5g/kg에서도 단 한 마리의 ICR mouse도 사망하지 않았다 (Fig. 3-18). 또한 체중의 변화를 관찰한 결과 대조군과 차이를 보이지 않았으며 각 장기 조직의 무게 또한 변화가 없었다 (Table 3-3). 장기조직의 손상 여부를 관찰한 결과 조직괴사 및 부종, 염증의 형상은 나타나지 않았고 대조군과 비교해서 전혀 차이를 구별할 수 없었다.

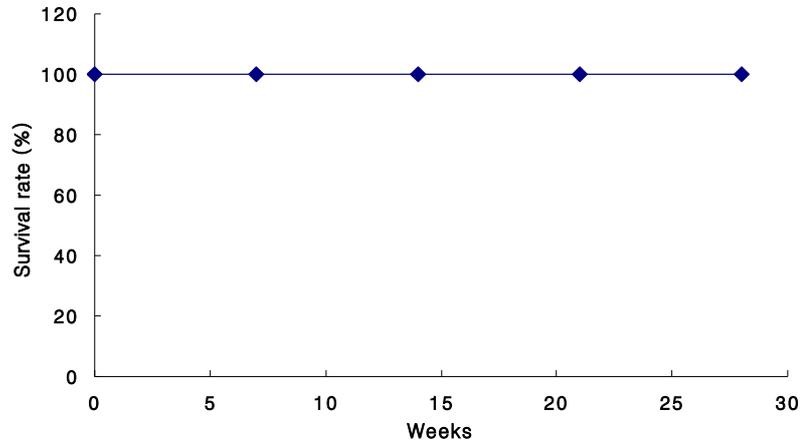


Fig. 3-18. The survival rate of ICR mouse fed 1, 2, 5 g/kg chloroform fraction by oral administration for 28 days. None of mice has died with treatment of chloroform fraction for 28 days. The data suggest that chloroform fraction has no significant toxicity with even high concentration.

Table 3-3. Body weight index during chloroform fraction administration for 28 days.

	대조군	1 g/kg 투여군	2 g/kg 투여군	5 g/kg 투여군
Initial body weight (g)	30.6 +/- 1.07	29.5 +/- 1.22	31.2 +/- 0.97	29.3 +/- 1.42
Final body weight (g)	34.2 +/- 2.12	33.5 +/- 1.43	33.5 +/- 1.89	32.9 +/- 1.749
Diet intake (g/d/mouse)	5.03 +/- 0.22	5.26 +/- 0.41	5.34 +/- 0.25	5.3 +/- 0.34

* There was no significant difference in body weight.

2) 장기 조직의 무게 측정

28일간 클로로포름 분획을 농도별로 투여한 후 ether로 마취시킨 후 blood를 수집하고 원심분리하여 혈청을 eppendorf tube에 분리하여 cytokine 측정때까지 -70도에서 보관하였다. 각 조직 장기를 분리한 후 PBS에 3회 씻은 후 무게를 측정하였고 (Table 3-4) 각 부위를 육안으로 검정하여 질병이나 염증반응, 부종등이 발생

하였는 지 관찰하고 사진 촬영하여 기록을 보존하였다.

Table 3-4. The organ weight of ICR mouse fed chloroform fraction for 28 days

	대조군	1 g/kg 투여군	2 g/kg 투여군	5 g/kg 투여군
Spleen	0.106 +/- 0.01	0.109 +/- 0.01	0.109 +/- 0.01	0.106 +/- 0.02
Kidney	0.224 +/- 0.01	0.219 +/- 0.02	0.22 +/- 0.01	0.22 +/- 0.01
Liver	1.83 +/- 0.31	1.72 +/- 0.21	1.83 +/- 0.17	1.87 +/- 0.13
Thymus	0.05 +/- 0.02	0.05 +/- 0.02	0.052 +/- 0.02	0.056 +/- 0.02
Heart	0.17 +/- 0.01	0.15 +/- 0.02	0.15 +/- 0.02	0.16 +/- 0.02
Lung	0.14 +/- 0.05	0.16 +/- 0.01	0.17 +/- 0.01	0.18 +/- 0.03

3) 염증 관련 혈중 cytokines의 유리 측정

간염억제 및 간기능 활성화를 측정하기 위해 0.9% saline solution 0.3 ml에 용해시킨 concanavalin A (ConA, 15 mg/kg)로 balb/c mouse (6마리/group) tail vein 에 일주일에 한번씩 4주동안 주사하여 간염을 유발시켰다. OJE 는 pre- 와 post-treatment로 구분하여 실험하였는데 pre-treatment의 경우 5g/kg 클로로포름 분획을 ConA 투여 일주일 전부터 경구투여 하였고 post-treatment의 경우 4주 동안 ConA를 처리한 후 5g/kg 클로로포름 분획을 경구투여하기 시작하여 8주동안 유지시켰다. 따라서 total ConA 처리기간은 post-treatment의 경우 총 12주였다. 각각의 투여가 끝나는 시기에 ether로 마취시킨 후 해부하여 blood를 취하여 혈중 proinflammatory cytokine의 변화를 측정하였다.

proinflammatory cytokine의 발현을 통해 측정한 결과 TNF-a의 혈중 농도가 ConA 처리군에서 대조군에 비해 약 18.3배 증가하였고 pre-treatment group의 경우 약 3.2배 정도로 증가하여 대조군에 비해 클로로포름 분획이 혈중 TNF-a의 발현 억제효과가 있음을 알 수 있었다. 하지만 post-treatment의 경우 클로로포름 분획의 처리는 대조군에 비해 큰 차이를 나타내지 않음으로 이미 간 조직이 손상되었을 경우는 회복이 어려운 것으로 판단된다. 따라서 클로로포름 분획은 예방적 관점에서 보다 효과적으로 여겨진다 (Fig. 3-19). 이러한 경향은 IL-1b의 경우도 마찬가지로 나타났다 (Fig. 3-20). 특이한 점은 혈중 IFN-r의 농도가 약 10 배 정도

감소하였는데 이것은 TNF- α 의 증가와 직접적인 관련이 있을 것으로 여겨지는데 Th1 type cytokine인 IFN- γ 는 Th2 type cytokine을 조절하는 역할을 하고 있기 때문에 감소된 혈중 IFN- γ 농도는 TNF- α 의 혈중 농도를 상승시킴으로 감염의 진행을 보다 촉진시킬 것으로 여겨진다. pre-treatment의 경우 IFN- γ 의 농도가 정상수준으로 회복되는 것을 확인 하였는데 이것의 영향으로 TNF- α 또한 정상수준으로 감소한 것이다 (Fig. 3-21).

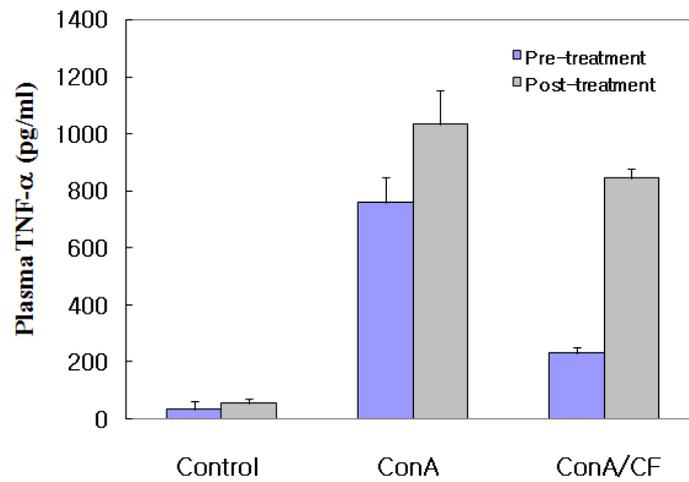


Fig. 3-19. Plasma TNF- α level from balb/c mouse having ConA-induced hepatitis with pre- and post-treatment of 5 g/kg chloroform fraction

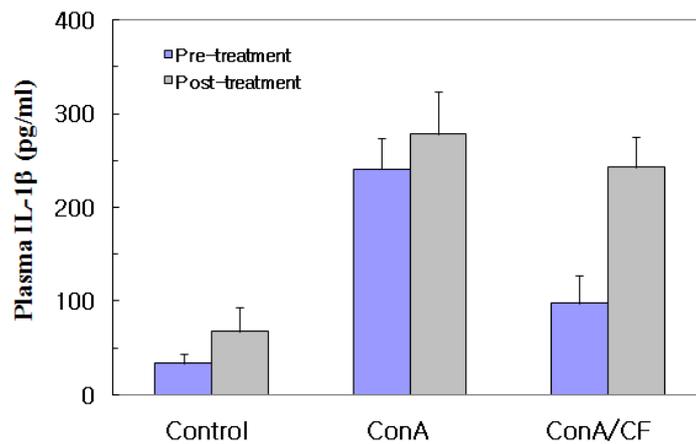


Fig. 3-20. Plasma IL-1 β level from balb/c mouse having ConA-induced hepatitis with pre- and post-treatment of 5 g/kg OJE

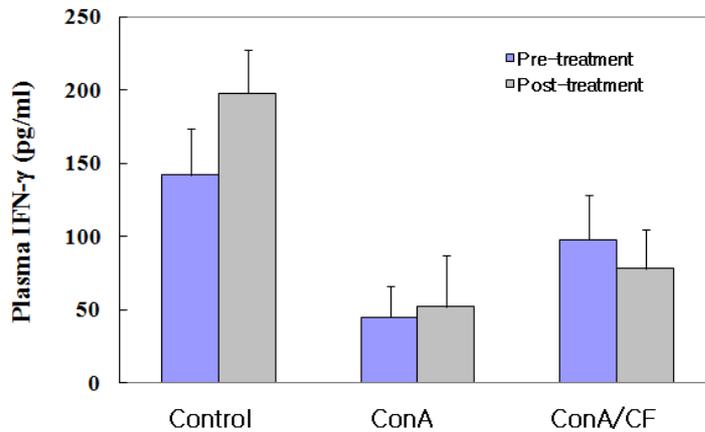


Fig. 3-21. Plasma IFN- γ level from balb/c mouse having ConA-induced hepatitis with pre- and post-treatment of 5 g/kg chloroform fraction

라. 미나리 발효액의 안전성 확인 연구

미나리 발효액을 제 2세부과제로부터 기술 이전 받은 (주)한우물 참여기업으로부터 제공받아 사용하였다. 미나리 발효액은 oligo 당을 함유하고 있어 미나리의 쓴맛이 상당히 감소되어 있었고 balb/c mouse에 1 ml/day 28일간 (일요일은 제외 - 총 투여일은 24일) 구강투여 하여 생화학적 요소를 측정하였다. 투여 직후 mouse의 상태를 관찰한 결과 행동상의 이상은 발견되지 않았으며 정상적인 활동을 하는 것으로 관찰되었다.

1) 혈중 GPT와 GOT level 분석

24일간의 미나리 발효액의 투여는 balb/c mouse에서 간독성을 나타내지 않았다 (Fig. 3-22). 발효액만 투여한 군에서는 GOT와 GPT의 수치는 변화가 없는 반면 ConA로 간염을 유도한 군에서는 GOT와 GPT의 수치가 약 4.6배정도 유의적으로 증가하였다. ConA 유도된 간염군에 미나리 발효액의 투여는 약 12% 정도의 유의적 감소는 나타내었지만 기대한 만큼의 효과는 나타나지 않았다. 이것은 단일 추출물에 비해 발효액으로 만들었을 경우 실제 유효성분 섭취량이 감소하였기 때문으로 생각된다. 하지만 애초의 연구계획에서와 같이 미나리 발효액의 전임상적 간독성은 나타나지 않았다.

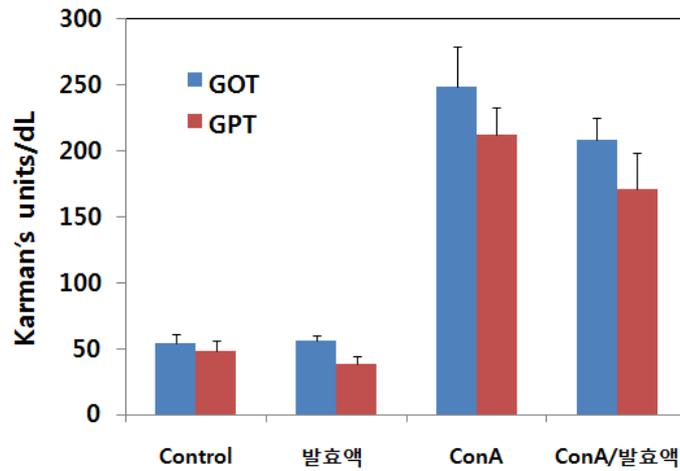


Fig. 3-22. Effect of fermented OJ on plasma GPT and GOT release from liver with ConA-induced hepatitis

2) 혈중 vitamin C 농도 분석

혈중 vitamin C의 농도는 항산화적 방어체계의 하나로서 생체내 산화적 스트레스 유무를 간접적으로 측정할 수 있는 방법이기도 하다. 대체로 간과 같이 지질성분이 많은 조직에서는 vitamin E를 측정하는 반면 혈중에서는 수용성인 vitamin C를 측정하는 것이 일반적이다. 본 연구에서는 미나리 발효액의 장기적 경구투여가 혈중 vitamin C의 농도를 증가시키는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3-23). 이것은 미나리의 발효과정에서 조직이 다소 마쇄 또는 분해되어 세포내에 있던 vitamin C 또는 항산화물질이 유출되어 쥐의 장을 통해 흡수된 것으로 생각된다. 즉 미나리 발효액의 장기적 복용은 항산화 비타민의 보충에 도움이 될 것으로 여겨진다. 또한 ConA를 처리한 군에서는 과도한 산화적 스트레스의 형성으로 혈중 vitamin C의 소모가 극심하게 일어났으며 미나리 발효액의 경구투여는 부분적으로 산화적 스트레스를 제거한 것으로 나타났다.

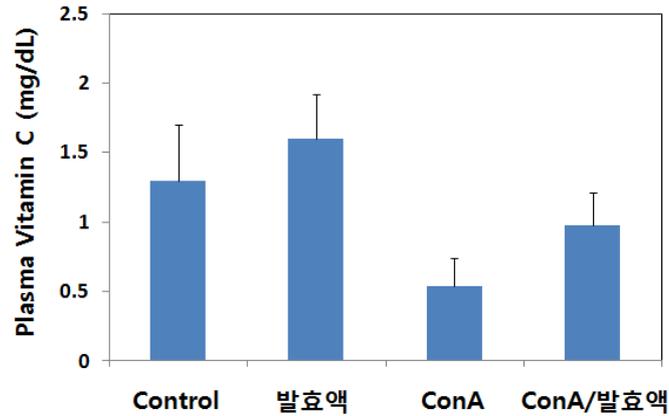


Fig. 3-23. Effect of fermented OJ on plasma vitamin C level in balb/c mouse.

3) 혈중 lipid peroxidation 분석

혈중 lipid peroxidation은 감염의 유발로 인해 발생할 수 있는 산화적 스트레스 정도를 간접적으로 알 수 있는 지표가 된다. 본 실험에서는 MDA의 측정을 LPO-CC kit를 통해 수행한 결과 발효액 투여군에서는 lipid peroxidation이 control 군에 비해 유의적 변화가 없었다 (Fig. 3-24). ConA를 처리한 군에서는 예상대로 lipid peroxidation이 64% 증가한 것으로 나타났으며 ConA/발효액 처리군에서는 ConA만 처리한 군에 비해 13% lipid peroxidation이 감소하였다. 이것은 미나리 발효액이 직접적인 항산화효과를 나타내기 보다는 보조적 역할을 수행하는 정도로 이해된다.

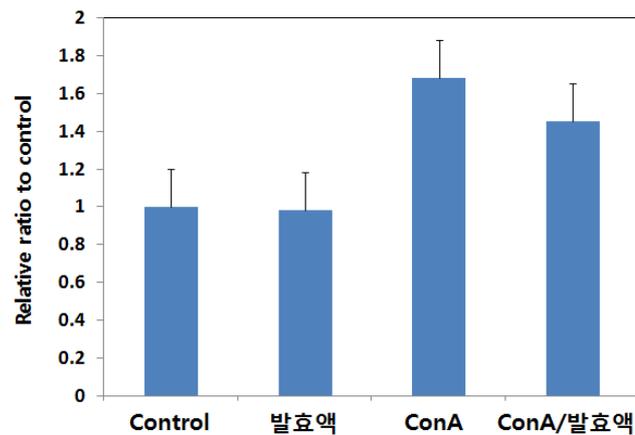


Fig. 3-24. Effect of fermented OJ on plasma lipid peroxidation in

balb/c mouse

4) PBMC 산화적 스트레스에 대한 저항성 분석

미나리 발효액의 면역학적 안전성을 확보하기 위해 혈중세포들에 대한 DNA damage 여부를 comet assay로 확인하였다. 간염으로 인하거나 때로는 투여한 물질이 독성이 있어 산화적 스트레스를 주게되면 혈중 세포들의 DNA가 파괴가 되어 apoptosis 과정을 거치게 된다. 따라서 미나리 발효액의 투여로 인한 안전성과 ConA 유도된 간염에서 미나리 발효액의 효과를 확인하였다. 미나리 발효액 처리군에서는 control군과 비교할 때 DNA damage 효과가 나타나지 않아 장기간(24일) 경구투여 하였을 경우에도 혈중 세포에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 3-25). ConA 처리군에서는 DNA damage가 나타나 실제로 간염으로 인한 혈중 산화적 스트레스가 증가하였음을 알 수 있었다. ConA/발효액의 처리군에서는 ConA 처리군에 비해 감소하는 경향은 나타내었지만 통계적 유의성을 나타내지 않아 미나리 발효액의 경구투여가 손상된 혈중 세포의 회복에는 관여하지 않는 것을 확인하였다.

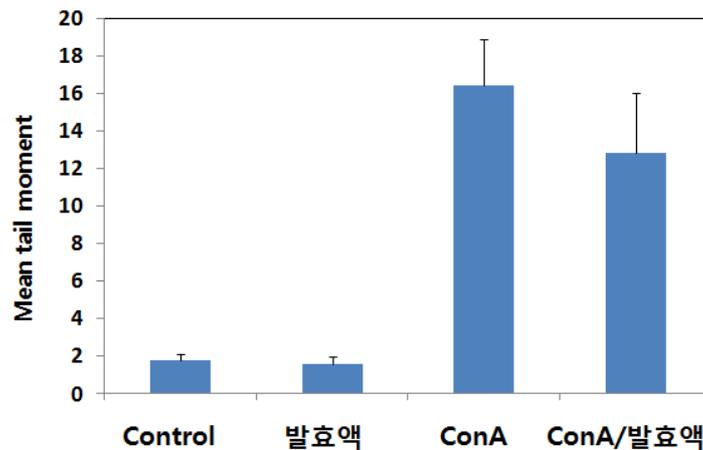


Fig. 3-25. Effect of fermented OJ on DNA damage in PBMC. DNA damage was measured by mean tail moment using the slide comet assay.

마. 미나리 활성성분인 caffeic acid와 coumaric acid, lamivudin, interferon-r 과의 상승효과 확인

제 2세부과제로부터 미나리의 간염 억제 활성 성분으로서 caffeic acid로 확인되

었다. 하지만 미나리에는 coumaric acid를 포함해 여러 성분이 복합적으로 작용할 가능성이 높다. 따라서 본 실험에서는 caffeic acid와 coumaric acid, lamivudin(B형 간염치료제)를 동시 처리하여 상승효과가 있는 지 여부를 확인하였다. 실험은 balb/c mouse의 spleen으로부터 primary splenocytes를 만들어 *in vitro* 상에서 시료를 직접 24 시간 처리하여 염증 관련 cytokines의 발현을 확인하였다 (Fig. 3-26). 실험결과 ConA를 처리한 군에서 caffeic acid와 coumaric acid를 처리한 경우 TNF-a 와 IL-1b의 농도가 caffeic acid만 처리한 군에 비해 유의적으로 감소되었음을 알 수 있다. 이것은 caffeic acid 가 미나리 또는 미나리 발효액의 주성분이지만 coumaric acid도 동시에 작용하여 상승효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있었다. 하지만 lamivudin을 처리한 경우는 caffeic acid와 동시 처리하여도 상승효과가 나타나지 않았는데 이것은 lamivudin의 작용이 B형 간염바이러스의 역전사를 억제하는 기작에 의해 발생되기 때문에 본 연구에서는 B형간염 바이러스 모델이 아닌 ConA로 유도된 경우라서 lamivudin과의 상승효과가 나타나지 않은 것으로 판단된다. 하지만 미나리 추출액의 경우 B형 간염바이러스의 역전사를 억제하는 효과가 있었던 제 1 세부연구의 결과에 비추어 볼 때 향후 B형 간염 바이러스 모델을 이용하였을 경우 lamivudin과의 상승효과 또한 가능할 것으로 기대된다.

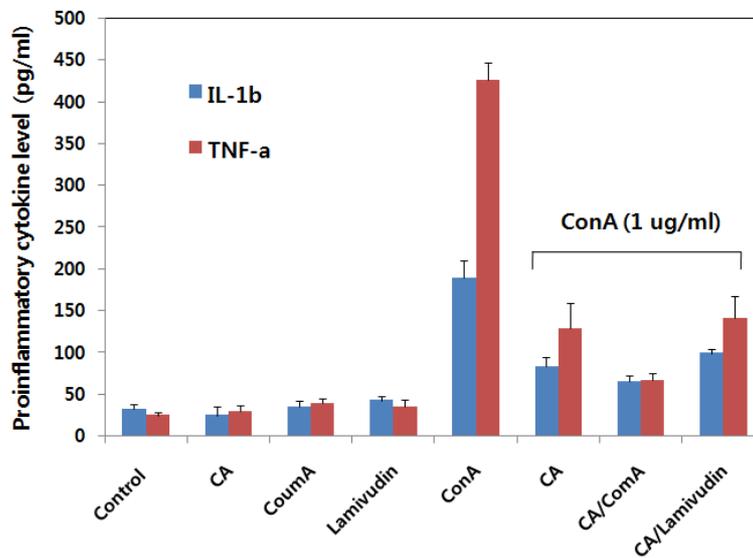


Fig. 3-26. Effect of co-treatment of caffeic acid (CA) with coumaric acid and lamivudin in combination on proinflammatory cytokine release from primary splenocytes of balb/c mouse

바. 미나리 유용성분의 *in vivo* 독성평가

Caffeic acid의 독성을 평가한 흰쥐의 몸무게 변화는 초기 몸무게(initial Wt(g))와 최종 몸무게(final Wt(g)), 체중증가(weight gain(g)) 부분에서 각군의 차이가 없었다. 또한 생존율은 모두 100%를 보여주어 caffeic acid는 40 mg/kg/day 까지 독성이 나타나지 않는 안전한 용량범위임을 확인할 수 있었다(Table 5).

Table 5. Survival rates of experimental rats

Group	Dose (mg/kg, day)	No. of mice	No. of survival	Survival rate (%)
NC	.	6	6	100
CC	.	6	6	100
CFL	10	6	6	100
CFH	40	6	6	100

Each value represents the mean \pm SD of six rats.

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

사. 미나리 유용성분의 *in vivo* 간기능 개선 효과

실험동물로서 10주령의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 군당 6마리씩 control(정상군), CCl₄대조군, CFL(caffeic acid 10 mg/kg/day), CFH(caffeic acid 40 mg/kg/day)군으로 나누어 2주간의 본 실험에 사용하였다. CFL, CFH 군은 caffeic acid를 1일 1회씩 14일간 경구투여 하였고, 마지막 투여 후 3시간째 CFL, CFH, CCl₄ 대조군은 20% CCl₄를 kg 당 1.25 mL 투여하였다. 실내온도 23 \pm 3 $^{\circ}$ C, 12시간 명암주기에서 표준식이와 물을 충분히 공급하였고, 체중은 주2회 측정하였다.

1) 체중변화와 장기무게

체중은 오전 10시경에 측정하였으며, 장기는 CCl₄ 투여 후 24시간째에 부

검하여 채취하였다. 실험동물의 체중변화는 Table 3과 같으며, 실험기간 2주 동안의 체중증가는 각 실험 군 간에 유의한 차이가 없었다. 장기는 간과 신장 좌, 우를 측정하였으며, 무게 측정 결과는 Table 6과 같다. 장기 무게도 실험군별로 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 6. Body weight, liver weight, and kidney weight of experimental rats

Group	Body weight (g)	Liver weight (g)	Kidney (L) weight (g)	Kidney (R) weight (g)
NC	314.20 ± 21.84 ^a	13.82 ± 2.11 ^a	1.11 ± 0.12 ^a	1.13 ± 0.08 ^a
CC	308.11 ± 18.76 ^a	12.46 ± 1.16 ^a	1.09 ± 0.09 ^a	1.13 ± 0.09 ^a
CFL	320.45 ± 11.24 ^a	13.19 ± 0.90 ^a	1.16 ± 0.06 ^a	1.20 ± 0.07 ^a
CFH	309.45 ± 15.65 ^a	12.17 ± 1.18 ^a	1.04 ± 0.07 ^a	1.07 ± 0.03 ^a

Each value represents the mean ± SD of six rats. Different letters on the value are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

2) 혈액 성분 분석

혈액은 부검시 복부를 절개하여 간정맥에서 주사기를 이용하여 채취하였다. 채취한 혈액은 냉장온도에서 24시간 방치 후 3000 rpm 에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청의 생화학적 분석은 commercial assay kit를 이용하여 분석하였다. GOT와 GPT 활성은 CCl₄ 대조군에서 높았고, 다른 군들은 유의적 차이가 없었다. 사염화탄소를 투여하면 간 장애 유발로 인해 GOT와 GPT 활성이 증가하는 경향을 나타내나, 미나리 유효성분인 caffeic acid를 전처리함으로써 GOT 및 GPT 활성치가 유의하게 감소하였음을 알 수 있었다(Table 7). LDL 콜레스테롤, 총 콜레스테롤, 중성지질은 caffeic acid 투여군에서 낮은 경향을 보였다(Table 8).

Table 7. Levels of alanine phosphotase (ALP), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transminase (GPT) in experimental rats

Group	ALP (K-A)	GOT (Karmen/mL)	GPT (Karmen/mL)
NC	38.31 ± 5.47 ^a	108.56 ± 16.87 ^a	32.08 ± 6.01 ^a
CC	33.64 ± 3.32 ^a	156.14 ± 22.98 ^b	65.89 ± 8.17 ^b
CFL	39.65 ± 4.56 ^a	117.49 ± 6.97 ^a	29.15 ± 3.63 ^a
CFH	38.12 ± 5.64 ^a	113.53 ± 14.40 ^a	34.53 ± 15.53 ^a

Each value represents the mean ± SD of six rats. Different letters on the value are statistically different by Ducan's multiple range test ($p < 0.05$)

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

Table 8. Levels of low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), total cholesterol (TCHO), and triacyl glycerol (TG) in experimental rats

Group	LDL	HDL	TCHO	TG
NC	97.20 ± 14.70 ^a	20.25 ± 2.47 ^a	151.78 ± 13.09 ^a	126.21 ± 51.51 ^a
CC	95.84 ± 24.47 ^a	22.19 ± 5.13 ^a	150.51 ± 21.41 ^a	184.05 ± 11.82 ^b
CFL	33.27 ± 5.77 ^b	21.62 ± 1.46 ^a	87.36 ± 7.03 ^b	147.52 ± 39.43 ^a
CFH	40.27 ± 10.55 ^b	20.72 ± 6.26 ^a	85.03 ± 6.94 ^b	132.60 ± 33.48 ^a

Each value represents the mean ± SD of six rats. Different letters on the value are statistically different by Ducan's multiple range test ($p < 0.05$)

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

3) 조직병리학적 변화 측정

사염화탄소로 간독성이 유도된 흰쥐의 각 군의 H&E 염색에 의한 간 조직 박편의 조직병리학적 변화를 비교한 결과 사염화탄소에 의해 간 조직손상이 유발되었으나 caffeic acid 처리군(CF군)에서는 조직 손상이 현저하게 억제되는 것으로 나타났다(Table 9, Fig. 3-27). 이 결과로 미나리로부터 분리된 caffeic acid는 간 기능 개선 효과가 있음을 제시하였다.

Table 9. Effects of caffeic acid pretreatment on CCl₄-induced liver damage in rats.

Parameter	Grades	Groups			
		Control	CCl ₄	CCl ₄ -CA (10 mg/kg)	CCl ₄ -CA (40 mg/kg)
Hepatocyte degeneration/necrosis	-	6	0	1	3
	+	0	0	3	3
	++	0	3	2	0
	+++	0	3	0	0
Fatty change	-	6	0	2	5
	+	0	2	4	1
	++	0	4	0	0
Inflammatory cell infiltration	-	6	1	5	6
	+	0	4	1	0
	++	0	1	0	0
Sinusoidal dilatation	-	6	2	4	6
	+	0	4	2	0

Grades are as follows: - (normal), + (mild), ++ (moderate), and +++ (severe).

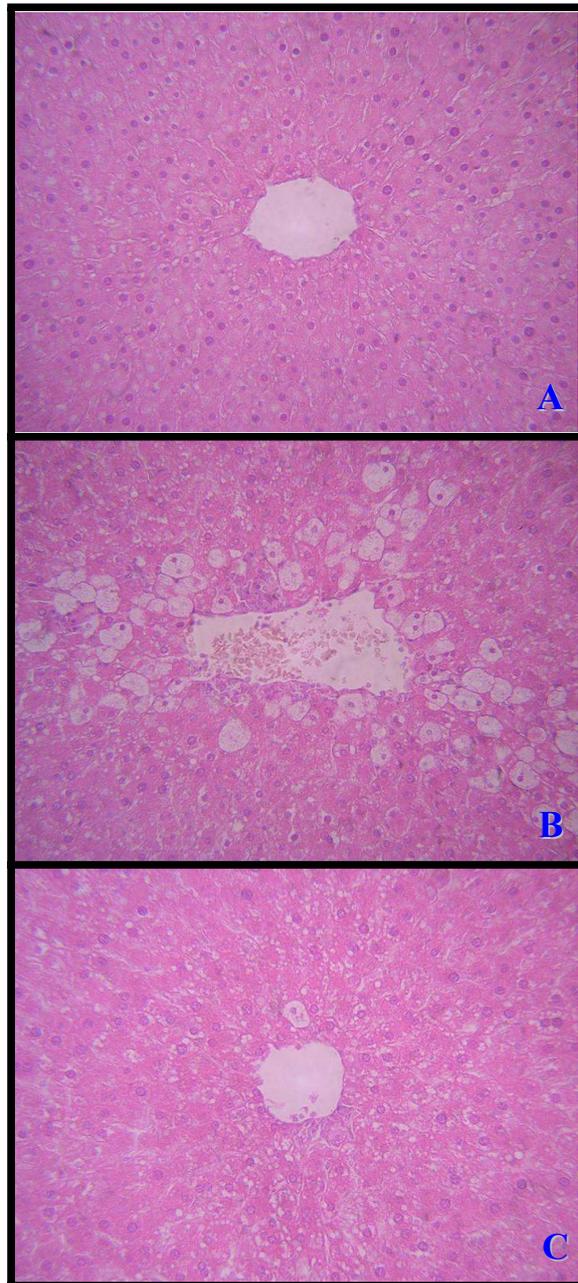


Fig. 3–27. Representative photographs of liver sections from the control (A), CCl₄ (B), and CCl₄–caffeic acid (40 mg/kg) groups stained with hematoxylin & eosin.

(A) a control rat, showing normal appearance. (B) a CCl₄ treated rat, showing extensive necrosis around central vein region, moderate fatty change and mild inflammatory cell infiltration. (C) a CCl₄–caffeic acid (40 mg/kg) treated rat, showing mild hepatocyte necrosis and fatty change.

4) 산화적 스트레스 억제능 측정

간과 신장을 적출하여 차가운 생리식염수에 씻어 혈액을 제거하고, 무게를 측정한 뒤 얼음위에서 작게 잘라 -70°C 에 보관하였다. 냉동 보관 하였던 간과 신장조직에 PBS를 가하여 Teflon homogenizer로 균질화 한 후 실험하였다. 조직 시료의 단백질 분석은 Bradford 방법으로 측정하였다. 사염화탄소는 microsomal mixed function oxidase에 의하여 trichloromethyl radical($\bullet\text{CCl}_3$)로 전환되어 이것이 endoplasmic reticulum 및 세포막과 같은 생체막의 과산화를 일으켜 간 손상을 야기 시키는 것으로 알려져 있다. 그러므로 미나리 추출물의 활성성분인 caffeic acid를 전처리함으로써 사염화탄소의 유독작용이 간, 신장조직에서 어떻게 나타나는지 항산화 실험을 통해 검토하여 보았다.

가) Catalase

Catalase는 대부분의 조직에 존재하는 peroxisome에서 H_2O_2 를 무독성의 H_2O 로 환원시켜 조직 손상을 방어하는 효과가 있으며, catalase 활성은 commercial assay kit를 이용하여 catalase 효소반응 후 남아있는 H_2O_2 양을 colorimetric 방법으로 측정하였다. 효소활성도는 1분 동안에 1 mM의 H_2O_2 를 분해시키는 효소의 양으로 표시하였다. 간에서의 catalase 활성도는 Fig. 3-28에 나타난 바와 같이 CCl_4 대조군이 정상군에 비해 유의하게 낮은 활성을 보인 것으로 나타났으며 이는 CCl_4 독성이 catalase 활성을 저해함을 의미한다. 그러나 caffeic acid를 투여한 군(CF군)에서의 catalase 활성은 정상군과 유의한 차이를 보이지 않거나, 오히려 활성이 더 높아졌음을 알 수 있다. 이러한 경향은 신장의 경우도 같았으며(Fig. 3-29), 따라서 caffeic acid 투여는 CCl_4 독성에 의한 catalase 활성 저해를 억제하였음을 알 수 있었다.

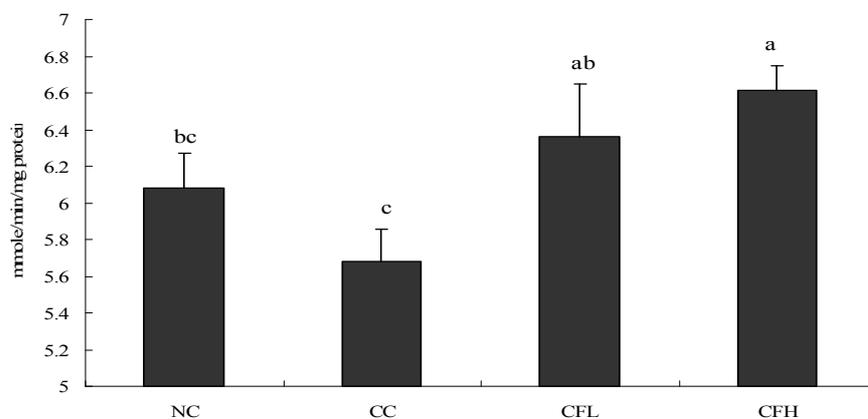


Fig. 3–28. Effects of caffeic acid (CA) on the hepatic catalase activity in CCl₄-induced rat liver.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

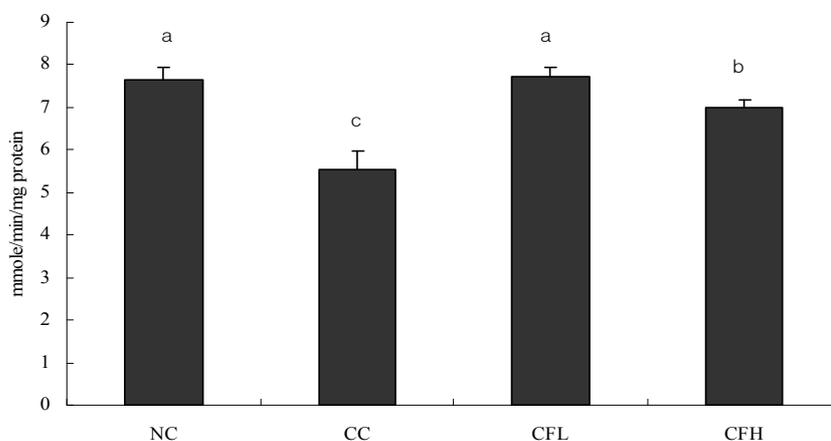


Fig. 3–29. Effects of caffeic acid (CA) on the catalase activity in CCl₄-induced rat kidney.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

나) Superoxide Dismutase

SOD는 O_2 가 한 개의 전자를 받아들여 불완전 산화된 superoxide anion radical을 hydrogen peroxide로 전환시키는 $O_2\bullet$ 소거 효소이다. SOD의 활성은 SOD determination assay kit를 이용하여 측정하였다. 간 조직에서 SOD 활성도를 측정하여 보면 CCl_4 대조군에서의 SOD 활성이 다른 군에 비하여 유의하게 낮았으며, CCl_4 와 caffeic acid 를 모두 처리한 군에서는 CCl_4 대조군 보다는 높은 활성을 나타냈으나, 정상군보다는 낮았다(Fig. 3-30). 신장 조직에서는 CCl_4 대조군의 SOD 활성이 다른 군에 비하여 유의하게 낮았으며, 다른 군들 간에는 유의차가 없었다(Fig. 3-31). 따라서 caffeic acid 투여가 CCl_4 로 인한 간, 신장에서의 SOD 활성 저해를 어느 정도 억제시킴을 알 수 있다.

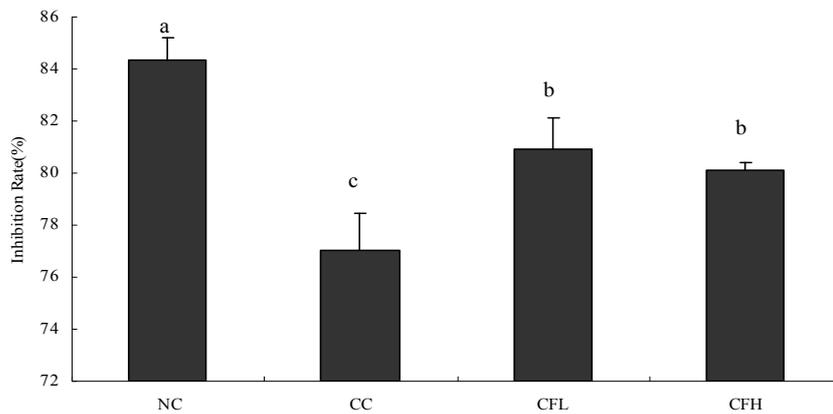


Fig. 3-30. Effects of caffeic acid (CA) on the hepatic superoxide dismutase (SOD) activity in CCl_4 -induced rat liver.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl_4 control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl_4 -administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl_4 -administration

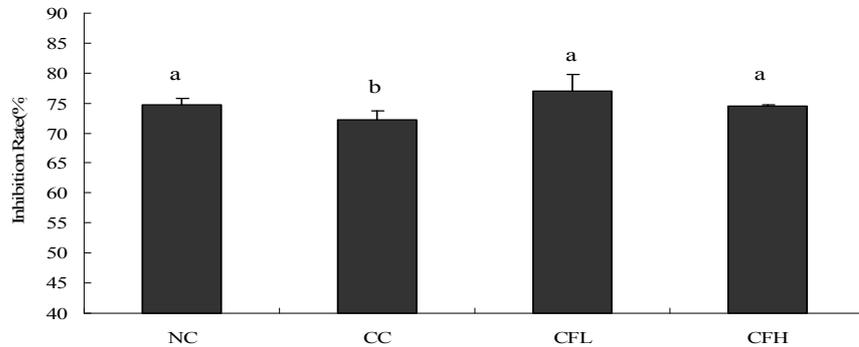


Fig. 3-31. Effects of caffeic acid (CA) on the superoxide dismutase (SOD) activity in CCl₄-induced rat kidney.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

다) Glutathione-S-transferase

GST 활성은 균질화된 조직 20 μ L 에 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), 200 mM Glutathione, 100 mM CDNB 를 98:1:1로 혼합한 시료 180 μ L 를 넣고 1분 간격으로 10분간의 반응을 340 nm에서 측정하였다. 효소활성은 1분간 효소 단백질(mg)이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 분자흡광계수를 이용하여 계산하였다. GST 활성의 측정 결과 caffeic acid를 2주간 투여한 뒤 CCl₄ 를 투여한 군의 활성은 조직간 차이가 좀 있으나, 전체적으로 정상군과 비슷하였다(Figs. 3-32, 3-33). 그러나 CCl₄ 대조군의 활성은 다른 군과 비교하여 유의하게 낮았으며, 이는 caffeic acid의 전처리가 CCl₄ 에 의한 활성의 감소를 예방하였다고 볼 수 있다.

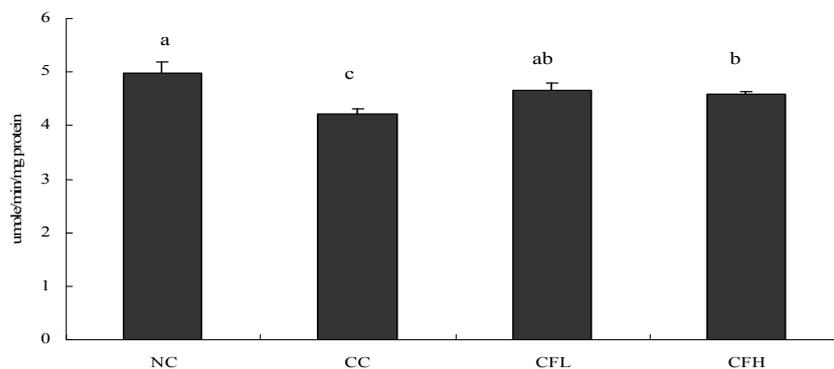


Fig. 3-32. Effects of caffeic acid (CA) on the hepatic glutathione-S-transferase (GST) activity in CCl₄-induced rat liver.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

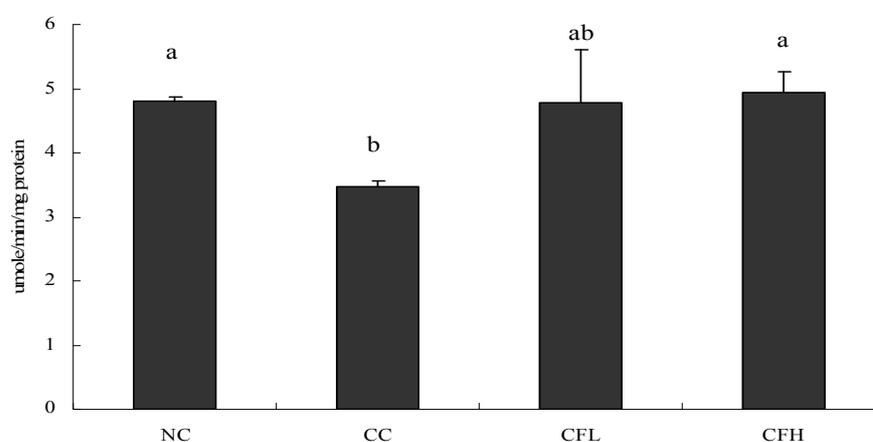


Fig. 3-33. Effects of caffeic acid (CA) on the glutathione-S-transferase (GST) activity in CCl₄-induced in rat kidney.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

라) Glutathione Peroxidase

Gpx는 selenium(Se)을 함유하는 항산화계 효소로서 체내에서 NADP+ 를 전자수용체로 하여 GSH 를 산화형 GSSG 와 물 그리고 기타 과산화물을 생성하는 반응을 촉매하므로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산소 독을 해독하는 효소이다. Gpx 활성은 commercial assay kit를 이용하여 측정하였다. Gpx assay buffer 890 uL 와 NADPH assay reagent 50 uL 에 sample 50 uL 를 넣은 뒤 t-Bu-OOH 10 uL 를 가하여 반응시키고 340 nm 에서 10초 간격으로 6번 측정하였다. 효소 활성은 1분간 1 umole의 oxidized NADPH를 생성하는 효소의 양으로 나타내었다. 결과를 보면 신장조직에서는 각 군들 간에 유의차가 나타나지 않았으나, CCl₄ 대조군에서 그 활성이 낮은 경향을 보였다. 간 조직에서는 CCl₄ 대조군의 활성이 유의하게 낮아 CCl₄ 독성이 Gpx 활성을 저해함을 알 수 있었으며, caffeic acid 를 전처리한 뒤 CCl₄를 처리하여 준 군에서는 CCl₄ 독성에 의한 Gpx 활성 저해가 없었으며, 오히려 정상군보다 높은 활성을 나타내었다(Figs. 3-34, 3-35)

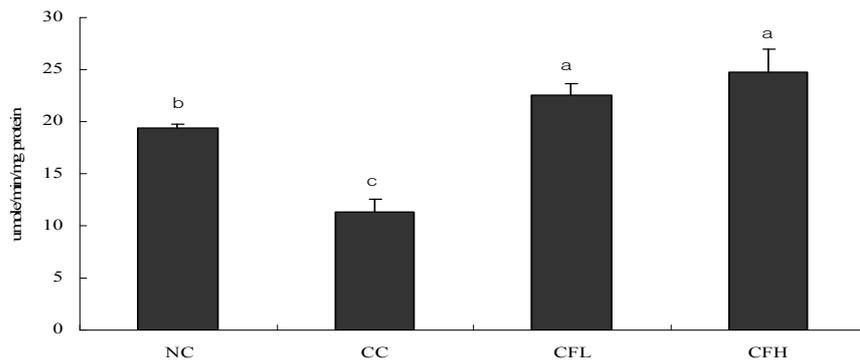


Fig. 3-34. Effects of caffeic acid (CA) on the hepatic glutathione peroxidase (GPx) activity in CCl₄-induced rat liver.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

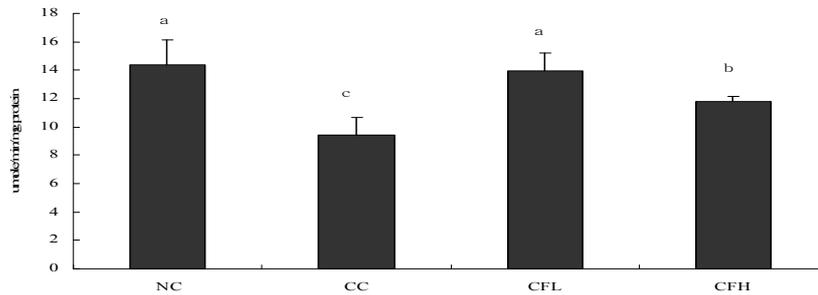


Fig. 3-35. Effects of caffeic acid (CA) on the glutathione peroxidase (GPx) activity in CCl₄-induced rat kidney.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

마) Glutathione

GSH는 외부의 산화적 세포손상에 대한 방어작용을 나타내는 효소의 기질로 사용되며 세포내 지질과산화물과 이물질 제거, 아미노산 수송 및 저장 등 다양한 세포기능을 수행하는 중요한 물질이다. 조직 내 GSH의 양을 측정한 결과 CCl₄ 대조군에서는 다른 군들과 비교하여 GSH 양이 감소하는 경향을 나타냈으며, caffeic acid의 전처리에 의해 GSH 양이 정상군과 유사한 수준으로 증가하는 것으로 확인되었다(Figs. 3-36, 3-37).

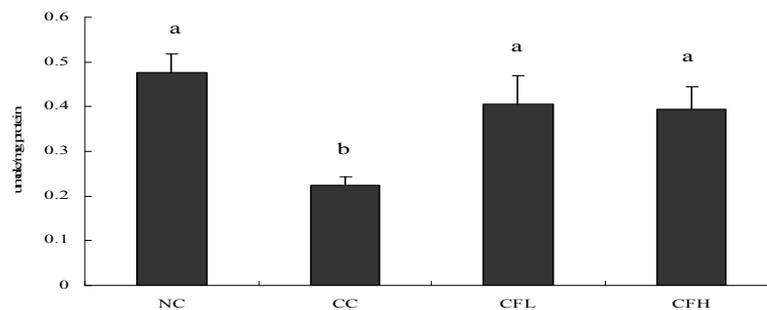


Fig. 36. Effects of caffeic acid (CA) on the hepatic glutathione (GSH) concentration in CCl₄-induced rat liver.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

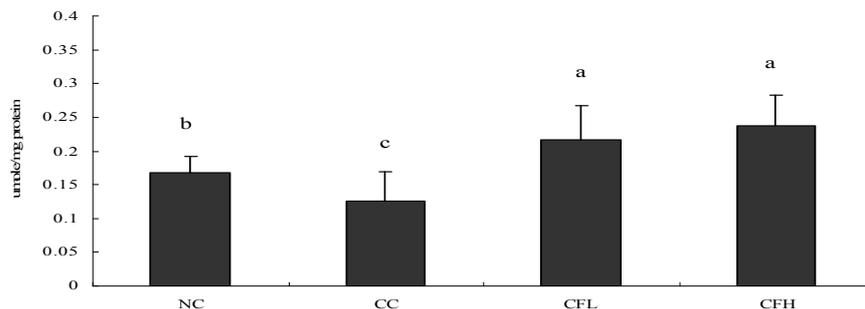


Fig. 3-37. Effects of caffeic acid (CA) on the glutathione (GSH) concentration in CCl₄-induced rat kidney.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

바) Malondealdehyde

지질과산화는 체내 산화적 손상으로 인한 free radicals 생성의 증가 및 항산화 방어 능력의 감소로 인해 일어난다. 지질과산화 정도는 malondealdehyde의 양을 thibarbituric acid로 비색정량하는 방법을 이용하여 측정하였다. 조직 내 MDA의 양을 측정한 결과 CCl₄ 대조군이 다른 군들과 비교하여 MDA 양이 증가하는 경향을 나타냈으며, caffeic acid의 전처리에 의해 MDA 양이 정상군과 유사한 수준으로 감소하는 것으로 확인되었다(Figs. 3-38, 3-39). 이는 다른 실험결과와 마찬가지로 caffeic acid의 전처리가 산화적 손상에 대한 방어효과가 있음을 제시하는 것이다.

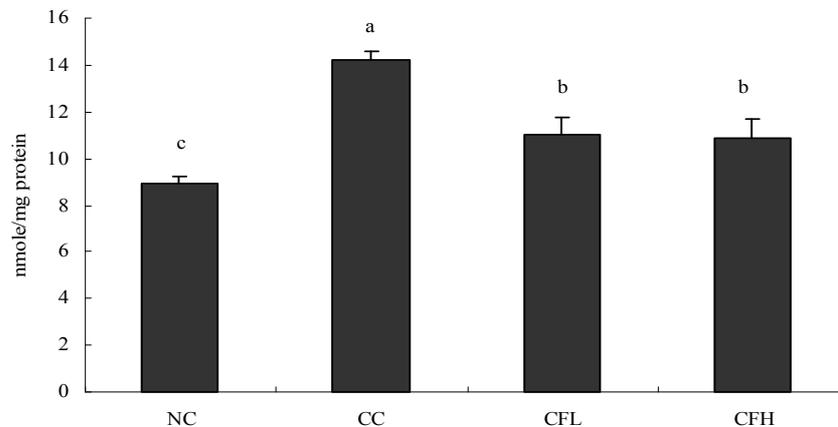


Fig. 3–38. Effects of caffeic acid (CA) on the hepatic malondealdehyde (MDA) concentration in CCl₄-induced rat liver.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Ducan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

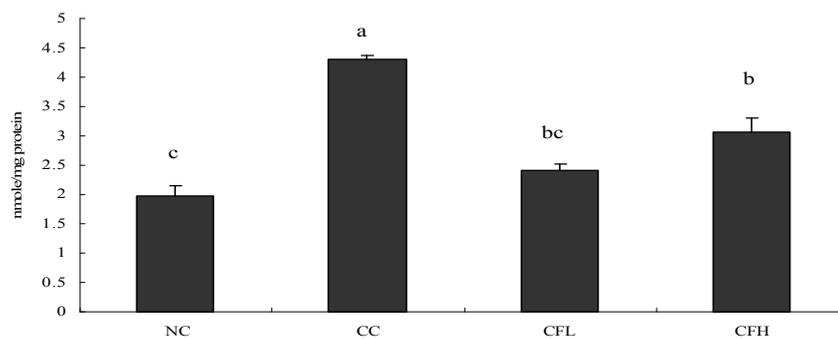


Fig. 3–39. Effects of caffeic acid (CA) on the malondealdehyde (MDA) concentration in CCl₄-induced rat kidney.

Each value represents the mean \pm SD of six rats. Different letters above the bar are statistically different by Ducan's multiple range test ($p < 0.05$).

NC: Normal control rats, CC: CCl₄ control rats, CFL: Rats treated with caffeic acid (10 mg/kg) before the CCl₄-administration, CFH: Rats treated with caffeic acid (40 mg/kg) before the CCl₄-administration

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술

제 1절 연구개발 착안점 및 달성도

1. 연구계획서의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도(2005)	○추출물의 <i>in vitro</i> 활성측정 ○전임상을 통한 독성, 유효성 평가 측정 ○미나리로부터 활성물질의 분리 및 추출조건의 최적화	30 30 40
2차년도(2006)	○단일, 복합물질에 대한 <i>in vitro</i> 활성측정 ○유효물질의 전임상을 통한 면역학적 분석 ○발효 미생물의 선정 및 발효조건의 최적화	30 40 30
3차년도(2007)	○ 발효유효물질의 기능성 증진 ○ 발효유효물질의 독성 및 유효성 평가 ○ 발효제품개발 및 기호성 검토, 응용제품 개발 및 제품의 효과 검정과 경제성 검토	30 30 40
최종평가	○간염억제및 간기능 개선물질의 <i>in vitro</i> 활성분석 ○간보호물질의 동물모델을 통한 면역학적 분석 ○간기능활성화 기능성 제품의 개발	30 30 40

2. 연구시행후의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	달성도 (점수)
1차년도(2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○추출물의 <i>in vitro</i> 활성측정 ○전임상을 통한 독성, 유효성 평가 측정 ○미나리로부터 활성물질의 분리 및 추출조건의 최적화 	100 100 100
2차년도(2006)	<ul style="list-style-type: none"> ○단일, 복합물질에 대한 <i>in vitro</i> 활성측정 ○유효물질의 전임상을 통한 면역학적 분석 ○발효 미생물의 선정 및 발효조건의 최적화 	100 100 100
3차년도(2007)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효물질의 기능성 증진 ○ 유효물질의 독성 및 유효성 평가 ○ 제품개발 및 기호성 검토, 응용제품 개발 및 제품의 효과 검정과 경제성 검토 	100 100 100
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○간염억제및 간기능 개선물질의 <i>in vitro</i> 활성분석 ○간보호물질의 동물모델을 통한 면역학적 분석 ○간기능활성화 기능성 제품의 개발 	100 100 100

제 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

미나리는 우리식탁에서 입맛을 돋우는 신선야채에서부터 다양한 쓰임성이 있는 채소로 영양적인 측면을 넘어 기능적인 측면까지 연구가 되어지고 있다. 예로부터 미나리는 항지방간 작용, 간경변 억제 작용, 혈중 콜레스테롤 저하 작용, 해독 작용, 지혈 작용 등의 여러 약리작용을 지니고 있어, 물고기 중독, 혈뇨, 자궁출혈, 고혈압, 불면증 등 여러 질병의 치료에 다양하게 응용되어져 왔는데 미나리의 간기능에 유효한 기능이 알려져 왔다. 그러나 과학적인 연구가 부족하여 보다 진보된 상품화, 부가가치화가 요원하였었다.

1. 본 연구개발을 통하여 미나리의 이용가능성을 확대하였고 현재 참여기업인 (주) 한우물은 화순에 무농약으로 그것도 JAS 규격에 맞는 무농약 규격을 통과하여 일본 및 해외수출을 준비하고 있음.
2. 앞서 소개했듯이 우리나라의 간질환 환자가 많이 있는바 약물치료를 병행하여야 하겠지만 도움이 되는 식품을 함께 섭취함으로써 건강에 도움이 될 것이며 미나리의 부가가치를 높이는데 기여하였음.
3. 미나리의 기능성을 밝히고 논문 및 전시회 등에 출품하여 우리 농산물의 우수성과 소비진작에 도움을 줬으며 미나리의 기능성을 통하여 국민건강에도 많은 공헌을 하였음.
4. FTA를 통하여 미국, 유럽, 일본, 중국하고의 교역이 늘어날 것이며 우리 고유의 작물이나 가공성, 기능성을 발굴, 양산화하는데 많은 노력을 기울였으며 체계적인 data base를 작성하는데 도움이 됨.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- * 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

1. 연구개발결과

미나리를 이용한 간기능 개선에 확정적인 결과를 얻어 참여업체로서는 기능성을 바탕으로 특화작물 및 기능성 식품으로 등재를 준비하고 있다. 또한 현재 업체는 일본의 JAS 규격에 맞는 무농약 농법으로 미나리를 밭에서 재배하고 있으며 FTA에서 앞서나갈수 있도록 준비를 하고 있으며 향후 지자체와 공동으로 마케팅이나 심층 제품화 사업에 집중할 것이다.

가. 학술발표

1. 김현지, 이정민, 전우진,황권택, 박창수 Ethanol Extract of OJ (*Oenanthe javanica*) Controls Apoptotic Process by Regulating Bcl-2 Family Expression in HBV-Infected HepG2 Cell Line 2006 한국식품과학회 제73차 학술대회
2. 최희정, 전우진, 황권택, 이정민, 김경미, 박창수 In vitro Antioxidative Effects of Ethanolic Extract from *Oenanthe javanica* DC 2006 한국식품과학회 제73차 학술대회
3. 최희정, 전우진, 황권택, 이정민, 김경미, 박창수 Hepatoprotective Effects of Caffeic Acid from *Oenanthe javanica* DC 2006 Annual Meeting and International Symposium
4. Choi HJ, Hwang KT, Lee JM, Kim KM, Park CS, Jun WJ Antioxidative Effects of *Oenanthe Javanica* DC. in HepG2 Cells 2007 Annual Meeting and International Symposium 2007. 6. 22
5. Choi HJ, Park JJ, You YH, Hwang KT, Lee JM, Kim KM, Park CS, Jun WJ Protective Effects of Caffeic Acid Isolated from *Oenanthe Javanica* DC. in Rats Treated with CCl₄ 2007 International Symposium and Annual Meeting 2007. 10. 18

나. 논문게제 및 투고

1. 이정민, 박창수, 김남주, 조동혁, 정민영, 황권택, 김현지, 전우진 Ethanol extract of *Oenanthe javanica* modulates inflammatory response by inhibiting NF- κ B mediated cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophage. *Food Science and Biotechnology* 15(2): 303-307(2006)
2. 이정민, 전우진, 김현지, 최희정, 유양희, 황권택, 이명렬 박창수 Effects of *Oenanthe javanica* on Transcriptional Regulation of COX-2 by Inhibiting Translocation of p65 Subunit in LPS-Stimulated Murine Peritoneal Macrophage. *Food Science and Biotechnology* 15(6): 975-979(2006)

다. 특허출원

- 특허출원번호 10-2008-0034386 전우진, 박창수, 이정민, 황권택, 최희정, 유양희 불미나리에서 간세포 보호 및 간손상 예방 효능을 갖는 카페익산을 추출하는 방법 및 이를 포함하는 기능성 건강지향식품 2008. 4. 14.

2. 활용계획

- 간기능 개선, 간보호 활성화에 우수한 기능성이 있는 미나리를 이용함으로써 향후 많은 이용성을 높일수 있을것이며 업체에 적합한 제품화과정이나 향후 새로운 제형의 개발에 활용코자 함.
- 업체는 1차로 건강기능성에 대한 높은 관심을 가지고 있어 이에 대한 자료조사와 보완을 한다음, 건강기능성 제품으로 등재 신청에 자료로 활용코자 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 간기능 개선이나 간보호활성에 관한 신물질들이 학회 보고를 통하여 꾸준히 보고 되어지고 있다. 이중에서도 천연물에서 추출한 성분들이 간기능 개선에 효과가 많은 것으로 알려졌다.

propolis의 di-O-caffeoyl quinic acid 4가지 성분들이 rat에서 CCl₄-toxicity 나 D-galactosamine (GalN)/lipopolysaccharide (LPS)로 처리에 의한 간손상에 대하여 강력한 간보호 활성이 보이고 있으며 이 물질들은 수용성으로 뛰어난 것으로 알려져 있고 동정결과 위 물질로 알려짐.

2. 천연물의 항산화기능과 간보호활성과는 밀접한 관계를 가지고 있으며 많은 실험들이 이와 같은 맥락에서 연구를 수행하였다. 외국에서 많이 연구되었지만 우리주위에서도 쉽게 찾아볼수 있는 물질들 은행잎 추출물, 강황 추출물들에서도 강력한 항산화 기능과 함께 간보호 활성에 대한 연구 보고들이 속속 올라왔다.

3. 간염치료제로서 많이 쓰이던 lamibudin 이 내성유발율이 높다는 결과가 연구 보고 된적이 있으며 이로 인하여 간염치료에 많은 문제를 가지고 있다는 사실과 우리나라의 보험의약수가 적용에도 영향을 미친다는 보고가 있었다.

4. New England Journal of Medicine(NEJM)에 따르면, 다국적 3상에서 바라크루두가 lamibudine에 비해 뉴클레오시드계열 약제 치료 경험이 없는 HBeAg(B형 간염 e항원) 양성 및 음성 만성 B형 간염 환자에서 우수한 것으로 나타나 내성 발병 환자들에 유리하다는 보고를 하였다.

5. B형 간염바이러스(HBV) 표면항원(HBs 항원)이 양성인 암환자가 화학요법을 받을 때에는 라미부딘이 효과적이라고 미국립보건원(NIH)이 Annals of Internal Medicine(2008; 148: 519-528)에 발표했는데 HBV의 재활성화 및 HBV 관련 질환과 사망의 위험을 낮춰주기 때문이라고 주장하였다.

6. 장기간 대두 단백을 섭취가 신부전이 합병된 2형 당뇨병환자의 심혈관 위험인자

와 신장기능을 개선시키고 간기능 활성화에 도움을 준다고 이란 연구팀이 Diabetes Care(2008; 31: 648-654)에 발표했다. 섭취기간은 4년이며 식사에 들어있는 단백질은 체중 1kg 당 0.8g. 대두단백 섭취군은 동물성 단백질 35%, 대두 단백질 35%, 대두 이외의 식물성 단백질 30%이었고, 대조군은 동물성 단백질 70%, 식물성 단백질 30%로 구성했다. 그 결과, 대두 단백을 먹으면 공복시 혈당치(대두 단백질 섭취군과 대조군의 평균변화 -18 vs +11mg/dL, P=0.03), 혈청총콜레스테롤(-23 vs +10mg/dL, P=0.01), LDL 콜레스테롤(-20 vs +6 mg/dL, P=0.01), 중성지방(-24 vs -5mg/dL, P=0.01)이 모두 유의하게 낮아졌고 또한 대두 단백질 섭취군은 대조군에 비해 혈청 C반응성 단백질치도 유의하게 낮아졌다(P=0.02)고 보고하였다

7. UCSD내과 Martina Buck교수와 Mario Chojkier교수는 간이 섬유화되는 간경변이나 지방간 그리고 섬유화가 관여하는 폐섬유증, 강피증, 화상에 의한 반흔 등은 회복될 수 있다는 결과를 PLoS ONE (2007; 2: e1372)에 발표했다.

섬유화를 회복시키는데는 이러한 병태에서 나타나는 collagen의 과잉축적을 없애는 것이 열쇠인데 마우스 RSK (Ribosomal S-6 Kinase)의 활성을 억제시키자 섬유화의 진행이 차단됐을 뿐만 아니라 이미 손상된 세포도 복구시킬 수 있음을 확인했다. 이번 연구에는 과음하는 사람의 간경변에서 나타나는 간 손상과 유사한 상태를 만들기 위해 약물을 이용해 중증 간장애를 유발시킨 마우스를 이용했다는 보고를 하고 있으며 위와 같이 다양한 간 보호연구에 매진하고 있다.

제 7 장 참고문헌

- (1) Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanism of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65: 166-176 (2002)
- (2) Gumpricht E, Dahl R, Devereaux MW, Sokol RJ. Beta-carotene prevents bile acid-induced cytotoxicity in the rat hepatocyte : Evidence for an antioxidant and anti-apoptotic role of beta-carotene *in vitro*. *Pediatr. Res.* 55: 814-821 (2004)
- (3) Berson A, De Beco V, Letteron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N, Feldmann G, Fromenty B, Pessayre D. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 114: 764-774 (1998)
- (4) Bock KW, Lilienblum W, Fischer G, Schirmer G, Bock-Henning BS. The role of conjugation reactions in detoxication. *Arch. Toxicol.* 60: 22-29 (1987)
- (5) Goldstein JA, Faletto MB. Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. *Environ. Health Perspect.* 100: 169-176 (1993)
- (6) Mitsuyoshi H, Nakashima T, Sumida Y, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Inaba K, Sakamoto Y, Okanoue T, Kashima K. Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 263: 537-542 (1999)
- (7) Chung HK, Choi CS, Park WJ, Kang MH. Radical scavenging activity of grape-seed extracts prepared from different solvents. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 715-721 (2005)
- (8) Sawa T, Akaike T, Maeda H. Tyrosine nitration by peroxynitrite formed nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 275: 32467-32474 (2000)
- (9) Jagetia GC, Reddy TK, Venkatesha VA, Kedlaya R. Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clin. Chim. Acta* 347: 189-197 (2004)
- (10) Ho JN, Lee YH, Park JS, Jun WJ, Kim HK, Hong BS, Shin DH, Cho HY. Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides*

- against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblase. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 1244–1248 (2005)
- (11) Takeyama N, Shoji Y, Ohashi K, Tanaka T. Role of reactive oxygen intermediates in lipopolysaccharide-mediated hepatic injury in the rat. *J. Surg. Res.* 60: 258–262 (1996)
- (12) Vallyathan V, Shi X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung disease. *Environ. Health Perspect.*, 105: 165–177 (1997)
- (13) Till GO, Lutz MJ, Ward PA. Hydroxy radical as autotoxin in chemotactically activated neutrophils. *Biomed. Pharmacother.* 41: 349–354 (1987)
- (14) Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN, Veis-Novack DJ, Linette GP. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1271: 63–66 (1995)
- (15) Skulachev VP. Possible role of reactive oxygen species in antiviral defences. *Biochemistry.* 63: 1438–1440 (1998)
- (16) Von Zglinicki T, Brunk UT. Intracellular interactions under oxidative stress and aging: a hypothesis. *Z. Gerontol.* 26: 215–20 (1993)
- (17) Hema M, Michael TM, Jaynathi S, Holly VR, Jean LC. Overexpression of superoxide dismutase and catalase in immortalized neural cell : toxic effects of hydrogen peroxide *Brain. Re.* 770: 163–168 (1997)
- (18) Anbar M, Neita PA. A compilation of specific biomolecular rate constants for the reaction of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxy radicals with inorganic and organic atoms and hydroxy radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 18: 495–523 (1967)
- (19) Lee YY, Kim HG, Park EH. Activities of Actioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Mol. Cells.* 14: 305–311 (2002)
- (20) Burr AW, Carpenter MR, Hines JE, Gullick WJ, Burt AD. Intrahepatic distribution of transforming growth factor- α (TGF- α) during liver regeneration following carbon tetrachloride induced necrosis. *J. Pathol.* 170: 95–100 (1993)
- (21) Slater TF, Sawyer BC. The stimulatory effects of carbon

- tetrachloride on peroxidative reactions in rat liver fraction *in vitro*. Biochem. J. 123: 815–821 (1971)
- (22) Hsu CT. The role of the sympathetic nervous system in promoting liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄) using the essential hypertensive animal SHR-.J. Auton. Nerv. Syst. 37: 163–174 (1992)
- (23) Weber LWD, Bull M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes : carbon tetrachloride as a toxicological model. Crit. Rev. Toxicol. 33: 105–136 (2003)
- (24) Tamayo RP. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis?. Hepatology. 3: 112–120 (1983)
- (25) Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, Albaon E, Biocca ME, Poli G and Dianzani MU. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride–induced chronic liver damage and cirrhosis. Hepatology. 16: 1014–1021 (1992)
- (26) Deulofeu R, Pares A, Rubio M, Gasso M, Roman J, Gimenez A, Varela–Moreiras G, Caballeria J, Ballesta AM, Mto J and Rodes J. S–Adenosylmethionine prevents hepatic tocopherol depletion in carbon tetrachloride–injured rats. Chin Sci. 99: 315–320 (2000)
- (27) Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. Biochem J. 222: 1 (1984)
- (28) Castro GD, Castro JA. Tryptophan reaction with free radicals arisen from carbon tetrachloride in a model system. A mass spectrometric study. Redox. Rep. 2: 47–54 (1996)
- (29) Manesh, C. Kuttan, G. Anti–tumour and anti–oxidant activity of naturally occurring isothiocyanates. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 22, 193–199 (2003).
- (30) Rhee SG, Kim KH, Chae HZ, Yim MB, Uchida K, Netto LE, Stadtman ER. Antioxidant defense mechanisms: a new thiol–specific antioxidant enzyme. Ann. N. Y. Acad. Sci. 738: 86–92 (1994)
- (31) Castro GD, Castro JA. Tryptophan reaction with free radicals arisen from carbon tetrachloride in a model system. A mass spectrometric study. Redox. Rep. 2: 47–54 (1996)

- (32) Ceballos-Picot I, Witko-Sarast V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thevenin M, Descamps-Latscha B. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic. Biol. Med.*, 21: 845-853 (1996)
- (33) 이우승. 한국의 채소. 경북대학교 출판부, 167-172 (1994)
- (34) 赤松金芳. 新訂和漢藥醫齒藥出版株式會社, 198 (1974)
- (35) 小學館. 中藥大辭典 上海科學技術出版社, 1332-1333 (1981)
- (36) 육창수. 원색한국약용식물도감. 서울: 아카데미서적, 408 (1989)
- (37) 이홍렬. 산지별 미나리의 성분 특성 및 항세균 활성. 전남대학교 박사학위 논문 (2001)
- (38) Yang XB, Huang ZM, Cao WB. Effect of an aqueous extract from *Oenanthe javanica* on rat cardiovascular system. *Chin. Tradit. Herb Drugs*. 10: 47-49 (1998)
- (39) Ji GJ, Cao WB, Yang XB, Huang ZM. Anti-arrhythmic effect of injections of SQ. *Chin. Pharm. J.* 15: 134-138 (1990)
- (40) Zhang JZ, Cao WB, Yang XB, Huang ZM. Anti-anaphylactic effect of the decoction of SQ. *Pharmacol. Clin. Chin. Mat. Med.* 8: 29-32 (1992)
- (41) Yang XB, Huang ZM, Cao WB. Antidiabetic effect of *Oenanthe javanica* flavone. *Acta. Pharmacol. Sin.* 21: 239-242 (2000)
- (42) Yang XB, Huang ZM, Cao WB. Effect of an aqueous extract from *Oenanthe javanica* on rat cardiovascular system. *Chin. Tradit. Herb Drugs* 10: 47-49 (1998)
- (43) Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559 (1999)
- (44) Nishikimi M, Rao A, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosul-phate and molecular oxygen. *Biochemical Biophysical Research Communications.* 46: 849-854 (1972)
- (45) Decker E, Faraji H. Inhibition of lipid oxidation by carnosine. *JAOCS.* 67: 650-652 (1990)
- (46) Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.*

- 27: 502–522 (1969)
- (47) Ryoo YW, Suh SI, Mun KC, Kim BC, Lee KS. *J. Dermatol. Sci.* 27: 162–169 (2001)
- (48) Aebi H, Wyss SR, Scherze B, Skvaril F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur J Biochem.* 48: 137–145 (1974)
- (49) McCord JM. Mutant mice, Cu, Zn superoxidedismutase, and motor neuron degeneration. *Science.* 266: 1586–1587 (1994)
- (50) Habig WH, Jakoby WB, Guthenberg C, Mannervil B, Vanderjagt DL. 2-Propylthiouracil does not replace glutathione for the glutathione transferases. *J. Biol Chem.* 259: 7409–7410 (1984)
- (51) Rochem NW, Rodger GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* 142: 257–265 (1991)
- (52) Zuo L, Clanton TL. Detection of reactive oxygen and nitrogen species in tissues using redox-sensitive fluorescent probes. *Methods Enzymol.* 352: 307–325 (2002)
- (53) Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein–Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254 (1976)
- (54) Janakat S, Al-Merie H. Optimization of the dose and route of injection, and characterisation of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 48: 41–44 (2002)
- (55) Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* Jul;28(1): 56–63 (1957)
- (56) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* Jun;18(6): 499–502 (1972)
- (57) Cristiano F, de Haan JB, Iannello RC, Kola I. Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during

- aging and correlate with cellular damage. *Mech. Ageing Dev.* 80: 93–105 (1995)
- (58) Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL, Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Therapeut.* 43: 139–154 (1989)
- (59) Molander DW, Wroblewski F, La Due JS, Transaminase compared with cholinesterase and alkaline phosphatase an index of hepatocellular integrity. *Clin. Res. Proc.* 3: 20–24 (1955)
- (60) Zimmerman HJ, Seeff LB. Enzymes in hepatic disease. In: Goodley EL. (Ed.), *Diagnostic Enzymology*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp: 1–38 (1970)
- (61) Vaca CE, Wilhelm J, Harms–Rihdsahl M. Interaction of lipid peroxidation product with DNA. A review. *Mutat. Res. Rev. Genet. Toxicol.* 195: 137–149 (1988)
- (62) Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 306: 1–17 (2001)
- (63) Goodyear–Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients. *Am. J. Crit. Care* 11: 543–551 (2002)

부 록

1. 발표 논문

Ethanol Extract of *Oenanthe javanica* Modulates Inflammatory Response by Inhibiting NF- κ B Mediated Cyclooxygenase-2 Expression in RAW 264.7 Macrophage

Jeongmin Lee, Namjoo Kim¹, Dong-Hyeok Cho², Min-Young Chang², Kwon-Tack Hwang, Hyun-Ji Kim, Woojin Jun^{3,4}, and Chang-Soo Park^{1*}

¹Department of Food & Nutrition, Nanyang University, Gwangju 500-824, Korea

²Department of Pathology, Chonnam National University Medical School, Gwangju 501-746, Korea

³Department of Internal Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju 501-746, Korea

⁴Department of Food & Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

⁵BioFood Research Center, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract Effect of *Oenanthe javanica* ethanol extract (OJE) on nuclear factor- κ B (NF- κ B)-mediated inflammatory reaction in RAW 264.7 macrophage cells was investigated. The OJE dose-dependently inhibited secretions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and prostaglandin E₂ (PGE₂) from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells and blocked LPS-induced expression of cyclooxygenase-2. To clarify mechanistic basis for its inhibition of NF- κ B and activator protein-1 (AP-1) activations, effects of OJE on activations of NF- κ B and AP-1 genes by luciferase reporter activity were examined. The LPS-stimulated activations of NF- κ B and AP-1 were significantly blocked by 400 and 600 μ g/ml of OJE, implicating that OJE might regulate gene expression through more than one signaling pathway. Cytosolic degradation of I- κ B α was inhibited by OJE dose-dependently, indicating that the nuclear translocation of p65 was inhibited by OJE. These findings suggest that the inhibition of LPS-stimulated COX-2 expression by OJE is due to its inhibition of NF- κ B activation by blocking I- κ B α degradation, which may be mechanistic basis of anti-inflammatory effects of OJE.

Keywords: *Oenanthe javanica*, PGE₂, NF- κ B, COX-2, inflammation, I- κ B α

Introduction

Prostaglandin E₂ (PGE₂) generated from arachidonic acid through cyclooxygenase (COX) pathway is a major mediator in the regulation of inflammation and immune function (1). The interplay between PGE₂ and other local factors, including inflammatory cytokines, is likely to influence the outcome of inflammatory and immune responses in many cellular systems. The COX, which exists as two isoforms, is the rate-limiting enzyme in prostaglandin production. These isoforms, namely constitutive COX-1 and inducible COX-2, originate from two distinct genes, but are structurally conserved (2, 3). The COX-1 serves as a constitutive enzyme responsible for prostaglandin synthesis that is essential for fluid and electrolyte homeostasis, gastric acid secretion, and platelet aggregation, while COX-2 is induced by inflammatory stimuli such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and lipopolysaccharide (LPS) (4).

Extensive research during the last few years has shown that most inflammatory agents mediate their effects through the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) and that most anti-inflammatory agents suppress NF- κ B activation. Activation of NF- κ B has been recently reported to actually participate in the transcriptional activation of COX-2 gene induced by interleukin (IL)-1, TNF- α , and LPS (5-7). Furthermore, the LPS-induced activation of the COX-2

gene has been shown to be mediated by the inhibitor κ B (I- κ B) kinase (IKK), which specifically catalyzes I- κ B phosphorylation, followed by its degradation and the subsequent NF- κ B nuclear translocation, leading to the stimulation of the *cis*-acting κ B element-mediated transcription (8). In macrophages, NF- κ B, in cooperation with other transcriptional factors, coordinates the expression of genes related to inflammation process such as TNF- α , inducible nitric oxide synthase (iNOS), and COX-2 (9).

Oenanthe javanica, umbelliferae, has been widely used as a medicinal food in China, Japan, and Korea for treatments of jaundice, hypertension, and polydipsia diseases for many years. Although its effect on anti-peroxidation in hepatic tissue was very recently reported, little information is available about the effect of *O. javanica* extract on inflammatory process or how the putative mechanism might involve the inactivation of NF- κ B. The significance of these possibilities led us to explore the effect of ethanol extract of *O. javanica* (OJE) on inflammatory indices such as NF- κ B inactivation, I- κ B α degradation, and COX-2 induction in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cell line.

Materials and Methods

Sample and extraction *O. javanica* obtained from Hanwoonool Co. (Jeollanamdo, Korea) was authenticated by Dr. Woojin Jun at Chonnam National University, and its voucher specimen was deposited at the same institute. Dried *O. javanica* was extracted with 20 volumes of 80% ethanol and filtered. The filtrate was evaporated under

*Corresponding author: Tel: 82-62-220-4314; Fax: 82-62-225-4480

E-mail: doreo5438@daum.net

Received January 9, 2006; accepted March 21, 2006.

Effects of *Oenanthe javanica* on Transcriptional Regulation of COX-2 by Inhibiting Translocation of p65 Subunit in LPS-Stimulated Murine Peritoneal Macrophages

Jeongmin Lee, Hyun-Ji Kim, Heejung Choi¹, Yanghee You², Kwon-Tack Hwang, Myung-Yul Lee³, Chang-Soo Park⁴, and Woojin Jun^{1,5*}

¹Department of Food and Nutrition, Nambu University, Gwangju 506-824, Korea

²School of Education, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

⁴Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

⁵Department of Pathology, Chonnam National University Medical School, Gwangju 501-746, Korea

⁶Human Ecology Research Institute, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract The extracts of *Oenanthe javanica* were evaluated for their effects on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), which is mediated by the translocation of the p65 subunit into the nucleus. Fractions of ethyl acetate and chloroform from 80% ethanol extracts of *O. javanica* exhibited inhibitory effects on the secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α) from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated peritoneal macrophages; however, the aqueous- and hexane-fractions showed no significant effect. The ethyl acetate- and chloroform-fractions also reduced the COX-2 enzyme levels after 24-hr treatment. RT-PCR showed that the mRNA levels of COX-2 decreased following treatment with these fractions, suggesting that COX-2 expression is transcriptionally regulated by these extracts. We examined the effects of the chloroform- and ethyl acetate-fractions on the cytosolic activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B, p65 subunit) and on the degradation of inhibitor- κ B α (I- κ B α) in order to determine the mechanism of COX-2 regulation. The LPS-stimulated activation of the p65 subunit was significantly blocked upon the addition of 50 μ g/mL of these fractions, and the cytosolic I- κ B α degradation process was simultaneously inhibited. These findings suggest that the inhibition of COX-2 expression by the ethyl acetate- and chloroform-fractions may result from the inhibition of p65 translocation by blocking the degradation of I- κ B α ; this may be the mechanistic basis for the anti-inflammatory effects of *O. javanica*.

Keywords: *Oenanthe javanica*, NF- κ B, p65 subunit, COX-2, I- κ B, TNF- α

Introduction

The expression of inducible cyclooxygenase-2 (COX-2), a key enzyme in prostaglandin (PG) biosynthesis, is known to be upregulated in acute/chronic inflammatory diseases, transformed cells, and malignant tissues of lung or colorectal cancer (1-3). Aspirin (acetylsalicylic acid), one of the most commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), exerts its anti-inflammatory effects by inhibiting COX activity. It has been reported that the significant reductions in the risk of certain cancer development found to be associated with NSAID treatment may be related to decreases in COX-2 expression and subsequent PG production (4). COX, which exists as two isoforms, is the rate-limiting enzyme in PG production. These isoforms, constitutive COX-1 and inducible COX-2, originate from two distinct genes but are structurally conserved (5, 6). COX-1 serves as a constitutive enzyme responsible for PG synthesis and it is essential for maintaining fluid and electrolyte homeostasis, gastric acid secretion, and platelet aggregation. COX-2 activation is induced by several stimuli, including tumor promoters, growth factors, tumor necrosis factor- α (TNF-

α), and lipopolysaccharide (LPS) (7).

Nuclear factor- κ B (NF- κ B), the key molecule in the inflammatory response, is a generic term for a dimeric transcription factor that is formed by the dimerization of proteins in the Rel family (8). NF- κ B exerts its activity by regulating the expression of genes that encode inflammatory cytokines, adhesion molecules, chemokines, growth factors, and inducible enzymes, such as COX-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS). The activation of NF- κ B is usually inhibited in the cytoplasm via its association with an endogenous inhibitory protein, I- κ B (an inhibitor of NF- κ B). Upon I- κ B kinase (IKK) or mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, I- κ B undergoes phosphorylation and degradation in the cytoplasm. This facilitates the release of the p65 subunit from the NF- κ B complex, allowing p65 to move to the nucleus of the cell where it binds to the 10-base pair consensus site in DNA promoter regions and subsequently induces transcription (9). In macrophages, NF- κ B cooperates with other transcription factors to coordinate the expression of genes related to the inflammatory response such as TNF- α , iNOS, and COX-2 (3).

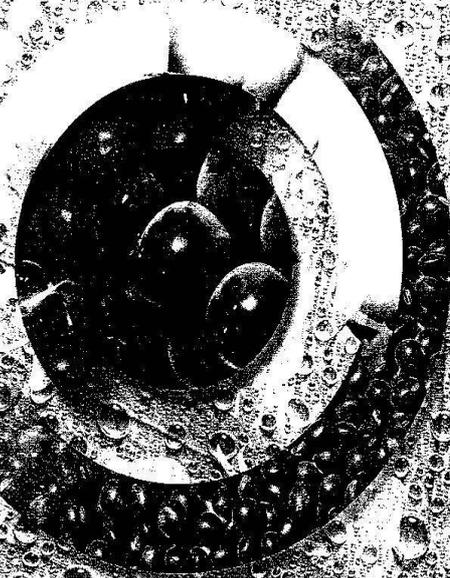
Currently, there is a strong interest in the development of new anti-inflammatory agents that regulate NF- κ B activation and COX-2 expression from plants used in traditional medicine. *Oenanthe javanica* (dropwort) has been widely used as a medicinal food for the treatment of

*Corresponding author: Tel: 82-62-530-1337; Fax: 82-31-780-9226
E-mail: wjju@chonnam.ac.kr
Received September 19, 2006; accepted October 30, 2006

2005 International Symposium and Annual Meeting of
the Korean Society of Food Science and Nutrition

"Nutraceuticals and Food Safety for Well-Being Life"

October 19-21, 2005
YongPyong Resort, Gangwon-do, Korea



Sponsored by

Kangwon-do
Korea Science and Engineering Foundation
Korea Research Foundation
The Korean Federation of Science and Technology Societies
Amway, Amway Korea Ltd.
CJ Corp.
Jeollanamdo Innovation Agency for Strategic Industry
Korea Nokjup Association
M. M. SON Co., Ltd.
RIS Gwangju-Jeonnam Kimchi Industry Promotion Unit
Chuncheon Bioindustry Foundation
Kangwon BIO-NURI

Hosted by

KFSN The Korean Society of Food Science and Nutrition
KFDA Korea Food & Drug Administration

가진 3T3 L1 세포를 이용하여 주목 세포부터 insulin sensitizing agents를 분리, 정제 및 동정하고자 수행되었다. 분쇄한 주목 씨를 70% MeOH 환류 추출, EtOAc 분배, silica gel column chromatography, HPLC 분취 과정을 거쳐 2개의 활성물질을 얻었다. 인슐린 저항유 (2.5µg/ml) 분화 유도용 배지 (Insulin deficient medium: IDM)에서 대조군의 분화율은 10% 인 반면 상기화합물(15 µg/ml)을 첨가하면 분화율은 40%로 증가하였다. 또한 상기 화합물은 insulin 비존재하에서는 분화를 촉진하지 않는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 저자 등은 주목 씨로부터 2개의 insulin sensitizing agents를 분리하였으며 현재 물질 동정 및 생리활성을 조사 중에 있다.

P10-179

수용액상의 식품 혹은 생약제 추출물에 상분리가 일어나지 않도록 인지질을 첨가하는 방법

박순혜, 김일웅, 김시관*

건국대학교 의료생명대학 생명과학부 응용생화학 전공

본 연구는 수용액상의 식품 또는 생약제 추출물에 상 분리가 일어나지 않도록 인지질을 첨가하는 방법을 개발함으로써 인지질의 효능이 보강된 새로운 기능성 식품 혹은 의약품 제조할 수 있는 원천기술을 확보하고자 수행되었다. 수용액상의 식품은 kefir (발효유)를, 생약제는 인삼 물 추출물을 사용하였다. 먼저 대두유에 인지질을 첨가한 대두유-인지질 혼합액 (이하 PCS로 칭함)을 조제한 다음, 상기 2종의 액상 제제와 PCS를 3:1 (v/v)로 혼합, vortexing, 원심분리하여 하층 (수용액층)을 얻었다. 하층에 대하여는 클로로포름-메탄올 혼합액 (2:1, v/v)을 이용, 2상간 분배와 TLC를 수행함으로써 인지질이 함유되어 있음을 확인하였다. PCS 처리 전·후 시료의 지방산 조성을 분석한 결과 kefir의 경우 포화지방산이 불포화 지방산으로 전환됨을 알았다. 한편 PCS로 처리한 인삼 물 추출물의 ginsenosides는 TLC와 HPLC를 이용하여 정성, 정량 분석한 결과 조성과 함량이 변화가 없었다. Kefir 배양액과 인삼 물 추출물로의 인지질 이행율은 대두유에 첨가한 인지질의 비율이 높을수록 정비례하여 증가함을 알 수 있었다. 인지질이 강화된 상기 두 액상 식품은 장기간 보관 중에도 PCS와 수용액상 시료 사이에 층 분리가 일어나지 않고 상·하층의 인지질 함량이 차이가 없는 것으로 보아 본 방법으로 제조한 인지질은 액상 시료 중에 장기간 안정적으로 분포되어 있다는 사실을 알았다. 이상의 결과로부터 본 방법은 수용액상의 식품 또는 생약제 의약품에 상분리가 일어나지 않도록 인지질을 강화시킬 수 있는 새로운 방법으로 이용될 수 있다고 사료된다.

P10-180

국내 유종 kefir의 배양 특성 및 구성 균의 동정

박순혜, 강옥현, 김시관*

건국대학교 의료생명대학 생명과학부 응용생화학 전공

본 연구는 국내의 가정에서 이용되고 있는 Kefir의 구성 균을 동정함과 동시에 그 배양 특성을 조사함으로써 기능성 발효유 제품으로의 적합성을 타진하고자 수행되었다. 일명 티벳 버섯 혹은 우유 버섯으로 알려진 kefir는 국내 권광객이 티벳의 사할에서 분양받아 온 것으로 서울, 인천, 대전, 충주의 가정에서 배양하고 있는 것을 사용하였다. Kefir는 25°C와 37°C에서 32

시간 하면서 배양 특성을 조사하였으며 배양액은 원심분리된 다음 상등액을 취하여 pH와 적정 산도를 조사하였다. 균수 측정은 육안으로도 구분이 가능한 효모와 세균으로만 분류하여 pour plate agar method로 조사하였다. 균 동정은 현미경 관찰을 통하여 효모와 세균으로 구분한 다음 효모는 28S rRNA를, 세균의 경우 16S rRNA를 PCR 증폭하여 열기시열을 결정함으로써 수행하였다. 본 실험에서 사용한 Kefir는 배양적은이 37°C였으며 이 온도에서 32시간 배양하였을 때 pH 3.1, 산도 2.5에 도달하였다. Kefir의 구성균을 동정한 결과 효모인 *Kluyveromyces marxianus*와 세균인 *Enterococcus faecalis*, *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter cerevisiae*인 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터 국내 가정에서 이용되고 있는 kefir에는 ampicillin에 대하여 내성을 나타내는 것으로 알려진 장내세균 *E. faecalis*가 오염되어 있다는 사실을 알았다.

P10-181

고지방 식이 원위의 혈청 지질에 미치는 Chitosan-Ascorbate 함유 홍국의 영향

신진기¹, 이상인², 권중호¹, 김순동³

¹경북대학교 식품공학과, ²계명문화대학 식품영양조리과, ³대구가톨릭대학교 식품산업학부 식품공학전공

Chitosan-ascorbate(CA)를 함유하는 soyfiber beni-koji (SBK) 식이가 고 지방 식이 급여 원위의 혈청 지질함량에 미치는 영향을 조사하였다. 2% SBK+0.15% CA diet(CA2)군과 2% SBK+0.20% CA diet(CA3)군은 high fat diet control(HC)군에 비하여 총체지방이 각각 5.3% 및 9.5%가 감소하였으며, 식이섬유량과 식이효율에서는 유의차가 없었다. CA의 첨가량이 높아짐에 따라 혈청 중성지질의 함량은 CA3군이 HC군 보다 21%가, 총 콜레스테롤 함량은 HC군 보다 22.1~22.7%가, LDL-콜레스테롤 함량은 58.6~64.3%가 감소하였으며, 동맥 경화지수(atherogenic index) 또한 CA의 첨가량이 높아질수록 감소하였다. 각 실험군의 GSH 함량은 HC군과 유의적 차이를 보이지 않았으나 LPO의 함량은 특히 CA3군이 HC군 보다 24% 감소하였다. XOD의 O type 활성에서도 HC군에 비하여 처리군이 낮은 값을 나타내었으며, 특히 CA3군은 HC군 보다 51.6% 수준을 나타내었다. XOD의 O/T(%)는 HC군이 34.0%, 처리군이 21.7~23.5%로 유의적으로 낮은 값이었다(p<0.05). GST 활성도는 HC군이 332.5 units, 처리군이 350.3~355.6 units로써 평균값은 높았으나 유의적인 차이는 없었다.

P10-182

Antioxidant Effects in Various Extracts from *Oenanthe Javanica*

Heejung Choi¹, Kwontack Hwang, Jeongmin Lee¹, Kyungmi Kim², and Woojin Jun.

Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University, ¹Dept. of Food and Nutrition, Nambu University, ²Dept. of Biofood Technology, Ganggyeong Biopolytechnic College

The water celery, *Oenanthe Javanica* D.C is a perennial herb which mostly grows on a damp ground or a streamside. From ancient times, the water celery has widely been used for food or medicine. Recently, studies on the water celery

ABSTRACT BOOK



KOREA-CHINA-JAPAN
INTERNATIONAL
SYMPOSIUM

Forum for world foods

2006
한국식품과학회
제 73차 학술대회 및 정기총회

June 14-16, 2006 Jeju ICC

주최  한국식품과학회
Korean Society of Food Sciences & Technology

후원



농림부



KFIA

한국식품공업협회



한국과학기술재단

한국과학기술단체총연합회

한국학술진흥재단

PII-271

Characterization of Antioxidant Potential of a Aqueous Extract and Its Fractions of *Artemisia capillaris*

Jung-Hee Hong and In-Seon Lee The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Hyo-Joo Lee and Min-A Hong Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University

The antioxidant potential of a aqueous extract of *Artemisia capillaris* and its different fractions was investigated using different reactive oxygen species, nitric oxide and lipid peroxidation assays. Higher superoxide scavenging values were reported for the chloroform and ethyl acetate fractions and their IC50 values were 7.16 and 8.91 µg/mL, respectively. Hydroxyl radical scavenging activities were higher in chloroform and ethyl acetate fractions. Nitric oxide scavenging activities were higher in ethyl acetate fractions. Electron-donating ability of ethyl acetate fraction at IC50 was 4.97 µg/mL. The ethyl acetate fraction showed notable capacity to suppress lipid peroxidation in liver microsomes. Among the fractions, ethyl acetate fraction showed the highest total phenolic content. These results suggest that ethyl acetate fraction of *Artemisia capillaris* can be used in bioactive and functional material.

PII-272

Inhibitory Effect of Fucoidan on Fat Accumulation in 3T3-L1 Adipocyte Cells

Jin-Sil Lee* Dept. of Foodservice Management & Nutrition, Sangmyung University, Mi-Ja Kim Dept. of obesity management, Graduate School of Obesity Science, Dongduk Women's University, Imagine Obesity Research Institute

Many polysaccharides obtained from natural sources are considered to be biological response modifiers and have been shown to enhance various responses such as immune and anticancer. Fucoidans are one of functional polysaccharides and matrix polysaccharides from marine brown algae, consisting of an alpha-L-fucose backbone substituted by sulfate-ester groups and masked with ramifications containing other monosaccharide residues. Also, it has been reported that Fucoidans inhibited cancer and enhanced the immune functions in cell studies. The objective of this study was to evaluate the anti-obesity effects of Fucoidans in 3T3-L1 adipocytes. Treatment of Fucoidans on 3T3-L1 preadipocytes significantly decreased 30% triglyceride content assessed by Oil Red O staining (P<0.05). Fucoidans treatment on 3T3-L1 adipocytes reduced the mRNA expression of acetyl Co A (ACC) and peroxisome proliferators-activated receptor(PPARγ), as known as genes related to fat accumulation, compared to adipocyte control. The results indicate that Fucoidans may be effective in prevent and treatment of obesity.

PII-273

국내산 포도알 이용한 resveratrol 고품유 기능 식품 소재 개발 안본택*, 육현, 강병호, 김동호, 박진서 영동대학교 식품공학과

국내 포도 산업을 발전시키고 FTA제치하에서 포도 농가 소득 보호하기 위하여 국내산 포도 및 가공 부산물을 활용하여 고부가가치 기능성 식품소재 개발하였다. 포도 가공 부산물 중 송이가지(stem)에는 항산화, 항염증, 혈소판 응집억제, 항암 작용 등 유용한 기능성을 가진 resveratrol이 다량 함유되어 있다. 본 연구에서는 포도 및 송이가지를 활용하여 resveratrol이 고농도로 함유된 발효물을 개발하였고 이는 기능성 식품소재로 활용 될 수 있는 리라 기대된다. 국내산 포도 중 켈벌연피, MBA, Sheridan을 사용하여 표본을 평가 한 후 포도 품종별, 발효 온도별, 송이가지 첨가량별로 발효 한 결과 MBA를 사용하여 송이가지를 5%첨가하고 30도에서 발효하였을 경우 resveratrol 함량이 최대 5.32 mg/L까지 높아질 수 있었다. resveratrol 고품유 발효물에는 3.49 µg/L의 polyphenol이 함유되어 있어 항산화효과가 기대되었다. 본 연구의 결과물의 기능성을 알아보기 위하여 DPPH free radical 소거력과 tyrosinase 억제활성은 in vitro상에서 검증하였다. 국내산 포도주 3종과 외국산 포도주 3종을 내교수로 사용하여 항산화효과를 검증한 결과 연구결과물은 국내산에 대해서는 20%이상, 외국산에 대해서는 10% 이상 높은 항산화활성을 보여 기능성이 높음을 알 수 있었다. 또한 tyrosinase 억제 활성을 검증한 결과 국내산 포도주에 비해서는 30%이상, 외국산 포도주와는 비슷한 활성을 보여 추가적인 연구를 통해 기능성 미발효 소재로 활용될 가능성이 있음을 알 수 있었다.

2528 2006년 한국식품과학회

PII-274

In Vivo Immunostimulating Effects of Polysaccharide Isolated from *Curcuma xanthorrhiza*

Ah-Jin Kim*, Yeon-O Kim and Jae-Kwan Hwang Dept. of Biotechnology, Yonsei University

Curcuma xanthorrhiza has been traditionally used as principal food and medicinal materials in some tropical countries. Curcuman-X, polysaccharide isolated from the rhizome of *Curcuma xanthorrhiza*, consisted of galactose (14.0%), rhamnose (2.73%), mannose (12.97%), glucose (50.67%), arabinose (18.69%), and xylose (0.92%) and had an average molecular weight of 33,000 Da. In the present study, we investigated the immunostimulating effects of curcuman-X following oral administration to mice. Curcuman-X significantly increased the phagocytosis of macrophages and also the release of nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in a dose-dependent manner. In addition, the levels of interleukin (IL)-1 and IL-6 in peritoneal macrophages treated with Curcuman-X were higher than those of untreated control mice. Furthermore, the cytolytic activity of spleen cells against YAC-1 cells also increased from 3.18% in control mice to 10.03-18.97% after oral treatment. These results strongly suggest that Curcuman-X given by the oral route confers immunostimulating activity in mice and the possibility of being used as an effective immunomodulator of functional foods and dietary supplements.

PII-275

Ethanol Extract of OJ (*Oenanthe javanica*) Controls Apoptotic Process by Regulating Bcl-2 family Expression in HBV-infected HepG2 Cell Line

Hyun-Ji Kim*, Kwon-Taek Hwang and Jeongmin Lee Dept. of Food and Life Science, Nambu University, Chang-Soo Park and Min-Sun Jung Dept. of Pathology, Chonnam Medical College, Chonnam National University, Woo-Jin Jun Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University

Although *Oenanthe javanica* has been long used for treatment of hepatic diseases such as hepatitis and liver cirrhosis, there are reports in controversy referring that it has no effect or aggravate the symptom of hepatic diseases. In previous reports from our laboratory, OJE (*Oenanthe javanica* EOH extract) has shown its anti-inflammatory effect in LPS-stimulated HepG2.2.15 cell by regulating NF-κB or Cox-2 gene expression. Thus, in current study, we have evaluated regulatory effect of OJE (*Oenanthe javanica*EOH extract) on apoptotic process in HepG2.2.15 cell that were transfected with HBV genome. The extracellular secretion of HBsAg in HBsAg from HepG2.2.15 cell was decreased at 400 and 600 µg/mL of OJE, indicating that it has blocked the viral expression, evidenced by both protein and mRNA level. Interestingly, unlike our expectation, OJE at same concentration inhibited the apoptotic process in HepG2.2.15. DNA fragmentation was reduced and cell cycle arrest was not affected by OJE treatment, coincidentally occurred in no change with cdk2 gene expression. The ratio of Bcl-2 to Bax was increased as detected by RT-PCR, indicating that OJE is able to inhibit apoptosis by regulating Bcl-2 superfamily proteins. In conclusion, at current point, OJE may not act as a suicide for hepatocellular carcinoma cells infected by HBV, instead it may keep the infected cell alive and just inhibit the cellular expression of viral genes, which may be named "static-state".

PII-276

Cultured Mountain Ginseng Water Extracts Stimulating Immune Cells and Inhibiting Cancer Cell Proliferation

Suk-Hwang Oh*, Chen-Oh Oh and Pil-Sung Kang Dept. of Biotechnology, Wooni University, Jae-Whang Kim Macroplants Co., Ltd. Falbokong, Jin Kwon Dept. of Prosthetics and Orthotics, Korea National College of Rehabilitation and Welfare

In this study, a water extract obtained from cultured mountain ginseng (CMG) was evaluated for its stimulation effect on immune cells and its inhibition effect on cancer cell proliferation. The lymphocyte sub-population in mouse spleen *in vivo* was significantly increased by the administration of the CMG extract (2.74 mg/mouse). Interleukin-2 and γ-interferon in the mice serum increased up to 30% in CMG extract administered mice. At the concentration of 10¹¹ mg/mL, nitric oxide increased up to 400% in the macrophage cell line treated with CMG extract. The CMG extract significantly retarded the proliferation of human acute promyelocytic (HL-60), human histiocytic (U937), and mouse lymphocytic (L1210) leukemia cell lines *in vitro* at the concentrations over 2.74-13.7 mg/mL. In addition, CMG extract treatments (1.57 mg/mL and 2.74 mg/mL) lead to the increase of the expression of p53 gene and protein in the cultured U937 leukemia cell line. These results indicate that the water extract of CMG has the activity of both immune cell stimulation and cancer cell growth inhibition.

PII

관대

이

유수

본

연

년

다

가

81

alanin

32.2

mg/g

함유

다.

항

tyrosin

ase

억

제

활

성

30%

이

상

은

비

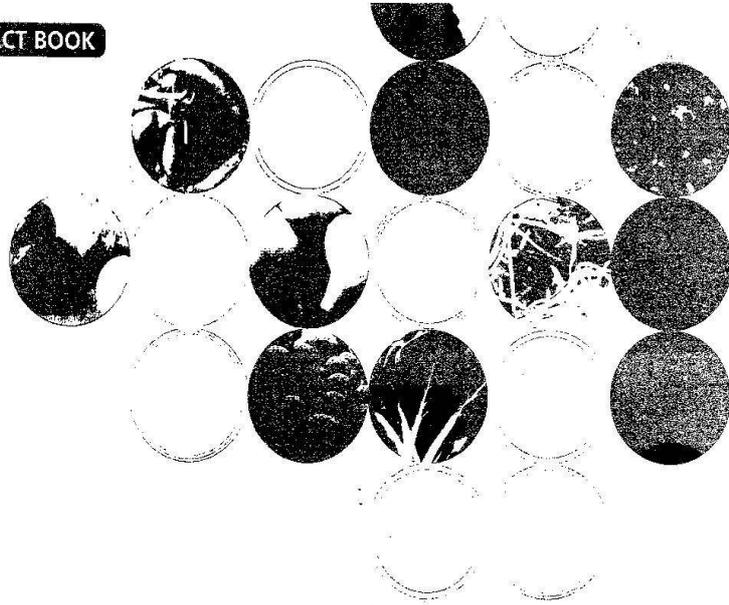
해

30%

이

상

ABSTRACT BOOK



KOREA-CHINA-JAPAN
INTERNATIONAL
SYMPOSIUM

Work for world foods

2006
한국식품과학회
제 73차 학술대회 및 정기총회

June 14-16, 2006 Jeju ICC

주최 한국식품과학회
Korean Society of Food Science & Technology

후원



KFA 한국식품공업협회



한국과학기술단체총연합회

한국식품진흥재단

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

In Vitro Antioxidative Effects of Ethanolic Extract from *Onoclea javanica* DC

Yong Chul School of Education, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea and Jeonmin Lee Dept. of Food and Nutrition, Nambu University, Jeonju 548-749, Korea, Hyeon Kim Dept. of Biofood Technology, Korea Bioprocess Institute, Jeonju 548-749, Korea, Hyeon Kim Dept. of Pathology, Chonnam National University Medical School, Gwangju 501-757, Korea, and Woojin Jun Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University

The antioxidant activities of various fractions from the ethanolic extracts of *Onoclea javanica* DC. were investigated. The 80% ethanol extract (OJE) from *O. javanica* DC. was suspended in water (OJE-W) and then subsequently partitioned with n-hexane (OJE-H), chloroform (OJE-C), and ethyl acetate (OJE-E). The phenolic and flavonoid contents of fractions were compared. The OJE contained significantly higher levels of total phenolics (422.9 µg/mg of dry weight) and flavonoids (299.8 µg/mg of catechin equivalents) than OJE-C (97.8 µg/mg of GAE and 31.2 µg/mg of CAE), OJE-W (34.3 µg/mg, and 29.5 µg/mg), or OJE-H (1.2 µg/mg, and 3.1 µg/mg). To determine the antioxidant capacity of each fraction, DPPH radical and superoxide anion radical-scavenging activities and TBARS generation inhibitory activity were examined. DPPH radical scavenging activity assay, IC₅₀'s of OJE-E, OJE-C, OJE-W, and OJE-H were 13.6 µg/mL, 118.0 µg/mL, 114.3 µg/mL, and 300.0 µg/mL, respectively. The inhibitory effects of fractions on TBARS generation were 74%, 22.2%, 16.6%, and 42%, respectively. Also, the protective effects of OJE were identified on HepG2 cells induced by H₂O₂. Based upon these results, we suggested that OJE-E fraction was responsible for the antioxidant and capacity in *O. javanica* DC.

Apoptosis

Jenny-Hi University of Medicine

Manufacture in Korea

osteoarthritis

gastrointestinal

assay

using

terminal

labeling

increased

by

superoxide

anion radicals

in

cells

in

vitro

assay

using

terminal

labeling

increased

by

superoxide

anion radicals

in

cells

in

vitro

assay

using

terminal

labeling

increased

by

superoxide

항산화제에서 세포사멸에 미치는 퀴나린 추출물의 영향

권영희, 모은경 (주) 대한바이오, 이버라, 이창하, 성정근 충남대학교

본 연구는 퀴나린계와 간암의 치료에 효과가 있다고 알려져 있다. 본 실험에서는 이러한 효과들이 과학적 근거가 없기 때문에 간암세포인 HepG2에 이용하여 퀴나린의 효과를 알아보고자 실시하였다. 퀴나린은 Methanol, Ethane, Ethylacetate, Butanol 순차적으로 추출농축하여 각각의 추출물인 HepG2에 농도별 및 처리별과 처리한 후 MTT를 측정하여 HepG2의 사멸 여부를 측정하였다. 각각의 추출물 중 Butanol과 Ethylacetate에서 효과가 가장 나타났으며 3 배에서 70% 이상이 사멸되었으며, 80 µg 이상에서는 HepG2에 완전 사멸되었음을 확인하였다. 그리고 Ethylacetate 추출물을 분할한 HepG2에 처리한 결과 4배에 관하여서 거의 모든 세포가 사멸되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 보다 4 배에서 8 배까지 분할된 퀴나린에서 확인되는 물질이 것으로 생각된다.

죽은 추출물의 DPPH free radical 소거 활성과 ACE 저해 효과

김은진, 권혁영 전남대학교 식품영양학과

본 연구는 퀴나린계에서 대량과 함께 식품원료로 사용되고 있다. 본 실험에서는 생산되는 퀴나린(*Psychotachys nigra* var. *benensis* Stapf)에 대한 DPPH free radical 소거 활성과 Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해효과를 확인하기 위해 동등 건조된 죽은 분말을 Methanol로 추출한 후 chloroform, ethyl acetate, butanol, 그리고 water 순차적으로 추출하였다. 각 분획별 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 IC₅₀ 값을 비교한 결과, ethyl acetate(0.4 mg/mL) > butanol(0.2 mg/mL) > chloroform(2.3 mg/mL) > methanol(3.4 mg/mL) > water(6.3 mg/mL) 순으로 효과가 높았다. ACE 저해율은 추출물의 농도에 따라 각각 증가하였으며, 1 mg/mL 농도에서 methanol(28.14%) > chloroform(11.56%) > butanol(20.44%) > water(20.19%) > ethyl acetate(7.23%) 순으로 감소하여 저해 활성이 나타났다. 따라서 죽은 추출물이 free radical 소거능을 갖고, ACE 저해 작용을 나타내므로 죽을 함유한 식품의 항산화 및 고혈압 예방을 가질 것으로 사료된다.

Antioxidant and Anticancer Activities of *Picrasma quassioides* (D.Don) Benn. Extracts

Yu Yin, Ying-Shan Jin, Jia Guo, Min-Kyeong Kim, Sung-Hyun Lee and Myeong-Hyeon Wang* Division of Biotechnology, Kangwon National University

Picrasma quassioides (D.Don) Benn. is an important source of bioactive compounds and has been used for folk medicine for many centuries. *P. quassioides* extracts have been demonstrated to be high in antioxidant activity. In this study, we extracted *P. quassioides* with water, 100% MeOH, 70% MeOH, 100% EtOH and 70% EtOH. Then antioxidant activity of these five extracts was measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay and Hydroxyl radical (OH) scavenging assay. The results showed that 70% MeOH and 100% MeOH extract had markedly highest antioxidant capacity in FRAP and OH scavenging assay, respectively. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory assay showed that *P. quassioides* extracts had anti-hypertension ability. Additionally, anti-cancer activity of *P. quassioides* extracts had been demonstrated evidently on human liver cancer cell (HepG2) line *in vitro*. We concluded that *Picrasma quassioides* (D.Don) Benn extracts appeared to have more potential as a health supplement rich in natural antioxidants and merits further intensive study.

***Bacillus subtilis* SLL-2로 제조한 청국장의 발효조건에 따른 생리활성**

조연호*, 성정근 충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과

청국장으로부터 정제된 생리활성 유도체 SLL-2 균주를 분리하여 *Bacillus subtilis* SLL-2로 동정된 청국장의 생리활성기능 변화를 알아보기 위해 발효 시간 및 온도를 달리하여 청국장을 제조한 후 생성되는 정제된 생리활성, Filtration activity, Isoflavone의 함량을 측정하였다. 정제된 생리활성 25°C 24시간 발효된 청국장에서 1.204 µg/ml 가장 크게 생성되었고, 35°C, 72시간 발효된 청국장에서 2.827 µg/ml 가장 많이 생성되었으며, 발효 시간과 온도가 증가할수록 정제된 생리활성이 증가하는 추세를 나타내었다. Filtration activity는 발효 시간과 온도에 따른 변화 없이 발효 온도에 따라 발효 시간이 상승하는 추세를 나타내었다. 발효 온도에 따른 생리활성 함량에 따라 발효 온도에 따라 발효 시간이 증가하는 추세를 보이며 그 이후에는 소폭 하락하는 양 상향을 나타내었다. Fibrin lyase zone의 직경은 동등한 발효시간의 효과를 측정하였을 때 35°C, 48시간 발효된 청국장에서 18.25 mm로서 최적온도가 가장 높았으며 25°C 24시간 발효된 청국장에서 12.50 mm로서 최적온도가 가장 낮았다. Isoflavone의 양은 control 원료에 비해 청국장에서 3배 가까이 상승하는 경향을 나타내었으며, 동일 온도에서는 발효 시간이 증가할수록 상승하는 경향을 보였다. 35°C, 48시간 발효 시에 청국장의 Isoflavone 생성량이 최대인 것으로 25°C, 48시간 발효 시에 최소인 것으로 나타났다. Daidzein 함량은 각각 238.3675 µg/g, 26.5717 µg/g이며, Genistein의 함량은 각각 66.5717 µg/g, 36.6367 µg/g이었다. 청국장의 생리활성 기능에 filtration activity, isoflavone의 생성을 통해 고추하였을 때, 청국장의 생리활성기능을 위한 최적 발효 조건은 35°C, 48-72시간으로 사료되었다.

갈조 성분인 isokouiritigenin(ISL)이 전립선 암세포의 receptor tyrosine kinase signaling에 미치는 영향

정재인*, 최현우, 조한진, 윤정환 한림대학교 식품영양학과, 정영순, 박경균 연세대학교 치과대학 구강생물학과

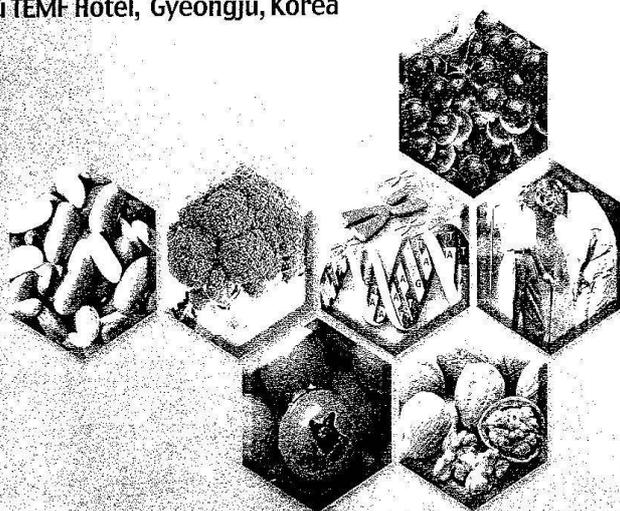
본 연구에서는 갈조 효능이 있다고 알려진 ISL이 전립선 암세포 증식을 억제하는 기전은 세포 증식 작용을 매개하는 중요한 신호전달체인 receptor tyrosine kinase인 insulin-like growth factor-1 receptor(IGF-1R)과 ErbB3 signaling을 중심으로 조사하였다. 전립선암세포인 DU145와 MAT-LyLu(MLL)을 growth factor인 IGF-1 또는 heregulin(HRG)과 ISL로 처리하여 배양한 결과, IGF-1과 HRG은 세포의 증식을 증가시켰으나 ISL은 이 growth factor의 세포 증식 작용을 억제하였다. Western blot을 수행한 결과 ISL은 전립선암세포의 IGF-1R과 ErbB3의 발현을 억제하였다. ISL은 IGF-1R에 의해 유도된 IGF-1R의 tyrosine 잔기의 인산화는 억제시켰고, phosphoinositide 3-kinase(Pi3K)의 regulatory subunit인 p85와 IGF-1R의 결합을 억제하였으며 Akt의 인산화도 억제하였다. 또한 ISL은 DU145 세포에서 HRG에 의해 유도된 ErbB3의 tyrosine 잔기의 인산화, ErbB3와 p85의 결합을 억제하였으며 Akt와 ERK-1/2의 인산화도 억제하였다. 따라서 본 연구의 결과, ISL은 IGF-1R과 ErbB3 신호전달체계를 억제함으로써 전립선 암세포의 증식을 억제하였다는 결론은 내릴 수 있다.

2006 International Symposium and Annual Meeting of
the Korean Society of Food Science and Nutrition

Nutraceuticals and Functional Food for Healthy Aging

October 18 ~ 20, 2006

Gyeongju TEMF Hotel, Gyeongju, Korea



Sponsored by

Korea Research Foundation
The Korean Federation of Science and Technology Societies
California Walnut Commission
American Soybean Association-International Marketing/Korea
Korea Nokjup Association
Newtree Industry Co., Ltd.
CJ Corp.
Nongshim Co., Ltd.
WiniaMando Co., Ltd.
Changnyeong-gun
RIS of Changnyeong Onion & Soy Products Industry

Hosted by

KFN The Korean Society of Food Science and Nutrition
KDA Korea Food & Drug Administration

of genistein might play a role in the prevention of fat accumulation. Also genistein with carnitine had more inhibitory effects of adipogenesis than independence treatment.

P10-207

Antiobesity Effects of Chongkukjang in C57BL/6J Mice Fed a High Fat Diet

So-Hui Seong¹, Ju-Ryoun Soh and Youn-Soo Cha¹

Dept. of Food Science & Human Nutrition, Chonbuk National Univ., Jeonju, 561-756, Korea

This study investigated the effect of Chongkukjang made by a standard method on mice fed a high fat diet. After monitored 5 kinds of Chongkukjangs (0, 7, 22, 31, 49h fermented time different Chongkukjangs) by using 3T3-L1 cell, we found that 22h-fermented Chongkukjang had a best effect on reducing TG content among the all samples. We used non-fermented Chongkukjang as a control. Forty male C57BL/6J mice were divided by a randomized block design into four groups: normal diet group (ND), high fat diet group (HD), high fat diet group with 40% non-fermented Chongkukjang (HDNC), and high fat diet group with 40% 22h-fermented Chongkukjang (HDC). They allowed free access to feed and water for 12 weeks and sacrificed after fasting for 12h. Feed and energy intake were significantly higher in the HDC group than in HD group, but the ND and HDC group didn't show any significant difference in weight gain. Blood glucose concentration was performed in 4, 6, 8, 10, and 12 weeks. In the groups supplementation with Chongkukjang, blood glucose level significantly decreased than in the HD group at 12 weeks. The HDC normalized in epididymis fat and back fat per body weight which are increased by high fat diet. Serum total cholesterol and HDL-cholesterol were significantly decreased than HD group by Chongkukjang supplement. These results were confirmed mRNA expression of enzymes (ACS, CPT-1, ACS, ACC) which is related with lipid metabolism by RT-PCR. These results suggest that Chongkukjang improve the lipid profiles and the other related factor for obesity of C57BL/6J mice.

P10-208

Study on the antioxidant activity of *Hae-Songi* mushroom (*Hypsizigus marmoreus*) extracts

Xiaomei Xu, In-Hak Jeong, Dae-Ryun Kim, Jeon-Ho Park, Jeong-Nam Kim, Eun-Young Park. Faculty of Marine Bioscience and Technology Kangnung National University

"*Hae-Songi*" mushroom is a kind of *Hypsizigus marmoreus*, one of the edible mushrooms. Water extracts of the mushroom fruit-body was investigated for their proximate composition, amino acid contents, β -glucan contents, total phenolic content and antioxidant activities. The measured

antioxidative activities included free radical scavenging activity against DPPH, reducing power, Fe^{2+} chelating ability and SOD activity. Mushroom extracts exhibited *in vitro* antioxidant activities. This mushroom contains high protein (29%, total amino acid contents 204.86mg/g) and free amino acids (46.50mg/g). The mushroom contained β -glucan about 0.11%. At a concentration of 1% extracts solutions (w/v) according to different extraction times, the DPPH free radical-scavenging activity were found to exhibit 89% 92% inhibition. The total phenolic content of these extracts solutions were about 135.46-165.13 μ g of gallic acid equivalents (GAEs)/ mL. But reducing power, Fe^{2+} chelating ability and SOD activity of mushroom extracts were not significantly high. Positive correlations were found between total phenolic content in the mushroom extracts and their antioxidant activities. In this study, it is demonstrated that "*Hae Songi*" mushroom, may possesses good potential for use as a health food, due to their antioxidative capacity.

P10-209

Hepatoprotective Effects of Caffeic Acid from *Oenanthe Javanica* DC. in HepG2 Cells

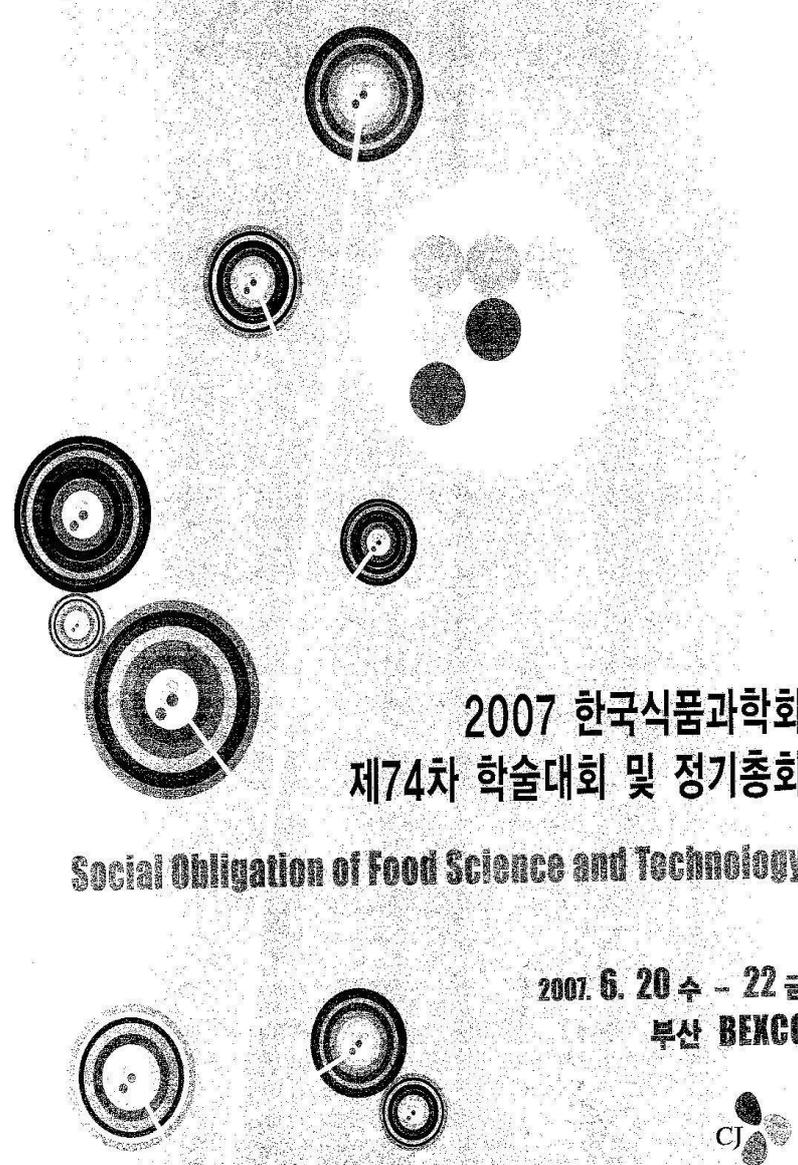
Heejung Choi¹, Kwontack Hwang², Jeongmin Lee², Kyungmi Kim³, Changsoo Park⁴, and Woojin Jun¹. ¹School of Education, Chonnam National University, ²Dept. of Food and Nutrition, Nambu University, ³Dept. of Biotechnology, Korea Biopolytechnic College, ⁴Dept. of Pathology, Chonnam National University Medical School, ⁵Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University

The hepatoprotectant from *Oenanthe javanica* DC. was isolated, and it was identified as caffeic acid (CA). To determine the antioxidant activities of CA, the DPPH radical and superoxide anion radical-scavenging activities and the TBARS generation inhibitory activities were examined by DPPH radical scavenging activity assay, IC_{50} was 3.77 μ g/mL, and the inhibitory effects on TBARS generation was 76.8%. The cell viability of CA and its protective effects against H_2O_2 -induced cytotoxicity were investigated using XTT test in HepG2 cells. Up to the concentration of 200 μ g/mL, no cytotoxic effect was observed compared to the control. The pretreatment for 24 hr with 30-50 μ g/mL of CA completely prevented the oxidative stress induced by H_2O_2 . Also, the intracellular reactive oxygen species formation was measured using DCF-DA. From these results, it is considered that CA from *O. javanica* DC. possesses antioxidant and hepatoprotective effects *in vitro*.

P10-210

In vitro Hepatoprotective Effects of Black Rice against Oxidative Stress

Sangin Shim¹, Jeongmin Lee², Kwontack Hwang², Kyungmi Kim³, Bumshik Hong⁴, Hongyon Cho⁴, Woojin Jun¹. ¹Division of Plant Resources & Environment, Gyeongsang



2007 한국식품과학회
제74차 학술대회 및 정기총회

Social Obligation of Food Science and Technology

2007. 6. 20 수 - 22 금
부산 BEXCO



2007 Gold Sponsor

주최 한국식품과학회

주원 KFA 식품의류공업진흥회

한국식품공업협회

한국과학기술단체 총연합회

농심

한국식품진흥재단
Korea Food Research Institute

Antioxidant and Cellular Defense Actions of a Mixture of Decursin and Decursin Angelate Isolated from *Angelica Gigas* Nakai

Hyee-Soek Kwon* Food Science Institute, School of Food and Life Science, College of Biomedical Science and Engineering, Inje University, In-Young Lee Department of Pharmaceutical Engineering, College of Engineering, Inje University, Min-H Park Food Science Institute, School of Food and Life Science, College of Biomedical Science and Engineering, Inje University, Sang-Woo Hwang Department of Pharmaceutical Engineering, College of Engineering, Inje University, Kyung-Suk Joo and Youe-Hwan Kim Food Science Institute, School of Food and Life Science, College of Biomedical Science and Engineering, Inje University, In-Hoon Kwon Department of Pharmaceutical Engineering, College of Engineering, Inje University, Woo-Sik Jeong Food Science Institute, School of Food and Life Science, College of Biomedical Science and Engineering, Inje University

Protecting cells from oxidative stress and carcinogens through the induction of phase 2 detoxifying and antioxidant defense enzymes is thought to be a primary mechanism of cancer chemoprevention by natural compounds. This process could be mainly achieved by the induction of nuclear transcription factor E2-related factor 2 (Nrf2) which binds to antioxidant response element (ARE) in the promoter region of the defense genes and therefore induces expression of these genes. We purified a mixture of decursin and decursin angelate (purty > 90%) from *Angelica gigas* Nakai with a novel extraction process and techniques of HPLC and HPLC-MS. The purified decursin mixture showed a dose dependent antioxidant activity in the DPPH radical scavenging assay. It activated the ARE-reporter gene activity in HepG2-C8 cell line, a stably transfected human hepatoma cell line with ARE-luciferase gene. It also induced the expression of Nrf2 in HepG2 cells. In addition, it inhibited the proliferation of the cancer cells at high doses. These results indicate that the mixture of decursin and decursin angelate from *Angelica gigas* Nakai might be used as a source of potential natural chemopreventive agents.

Antioxidative Effects *Oenanthe Javanica* DC. in HepG2 Cells

Heungjoo Choi* School of Education, Chonnam National University, Kwontack Hwang and Jeongmin Lee Dept. of Food and Nutrition, Nambu University, Kyungmi Kim Dept. of Biofood Technology, Korea Biopolytechnic College, Changsoo Park Chonnam National University Medical School, Woojin Jun Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University

The hepatoprotectant from *Oenanthe Javanica* DC. was isolated and identified as caffeic acid (CA). To investigate the hepatoprotective effects of CA, the H₂O₂ induced cytotoxicity and the formation of intracellular reactive oxygen species were examined in HepG2 cells. Up to concentration of 250 µg/mL, CA exhibited no cytotoxic effect compared to the control. The pretreatment for 24 h with 30-50 µg/mL of CA completely prevented the oxidative stress induced by H₂O₂. The hepatic enzyme activities such as SOD, catalase, GST, and GSH-Px and non-enzyme activities such as GSH and MDA were examined in HepG2 cells. The cells were divided into 4 groups; control, 2 mM H₂O₂, and 2mM H₂O₂ plus 10 µg/mL of CA, and 2 mM H₂O₂ plus 40 µg/mL of CA. The activities of SOD, catalase, GST, GSH-Px and GSH levels in the H₂O₂ group were significantly lower than those of the control group, while H₂O₂ plus CA group stimulated the hepatic enzyme activities and GSH level. The level of MDA which had been increased by H₂O₂ were markedly decreased in the CA pretreated group. These results suggest that CA from *O. Javanica* DC. may have protective effects on H₂O₂-induced hepatotoxicity *in vitro*.

키토산 올리고당의 두여가 고지방 식이 유도된 흰쥐의 면역능에 미치는 효과

정용훈*, 최세영, 안치선, 조수민, 권태민, 이선경, 박표강, 임병우 건국대학교 의생명과학대학 생명과학부

키토산은 키틴을 탈아세틸화하여 얻어낸 물질로서 셀룰로오즈 다음으로 풍부한 생물자원이지만, 아직 여기까지 생리적 효능을 충분히 활용하지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 키토산을 고지방식이로 비만 유도한 흰쥐에게 투여하여 각종 면역활성에 대한 효능을 평가하고자 하였다. 4주령이 된 수컷 Sprague-Dawley Rat을 대조군, 비만군, 키토산 처리군으로 나누어 4주간 사육하였다. 일주일에서 5회 정해진 시간에 경구투여(200 mg/kg)하였으며, 주 3회 세균을 측정하여 비만 정도를 측정하였다. TNF- α , IFN- γ , iNOS는 western blot과 RT-PCR을 사용하여 protein과 mRNA의 발현양을 측정하였다. 세균은 대조군이 가장 낮았으며, 비만군이 가장 높은 수치를 나타내 대조군과의 차이를 보였다. 키토산 처리군의 경우 예는 비만군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보였다. TNF- α 와 IFN- γ 의 발현양의 경우 spleen과 liver에서 대조군과 비만군에 비해 키토산 처리군이 유의적으로 낮음을 확인할 수 있었다. 하지만, iNOS의 발현량은 비만군과 키토산 처리군에서 유의적인 차이는 보여주지 않았으며, mRNA의 발현량에서는 키토산 처리군이 비만군에 비해 유의적인 차이를 보였다. 이와 같은 연구 결과를 토대로 키토산 올리고당이 고지방식이로 비만 유도된 쥐의 면역활성에 유의적인 조절효과를 나타내는 것으로 판단되었다.

Pyrogenol Inhibits the Differentiation of 3T3-L1 at Post-stage by Modulating PPAR- γ and Adiponectin Expression

Bunjeong Kim*, Jeongmin Lee, Kwontack Hwang and Hyun-Ji Kim Dept. of Food and Nutrition, Nambu University, Woojin Jun Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University

Pyrogenol, a standardized extracts from the bark of the French maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.), consisting of phenolic acids, catechins, taxifolin and pycnogenin, has a wide range of pharmacological effects. This study was designed to investigate the effect of Pyrogenol on adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells at the cellular and molecular levels. For oil-red O staining assay, we added Pyrogenol at various concentrations for adipocyte differentiation. Pyrogenol inhibited the cytoplasmic lipid accumulation at day 9 after induction of differentiation. We examined the expression of adipokines and PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ) during early- and post-differentiation stage. The results suggest that Pyrogenol suppresses the adipogenesis at post stage by inhibiting PPAR- γ and adiponectin expression.

Radical Scavenging Effects of Seolite Chungjukjang Added with Green Tea Powder

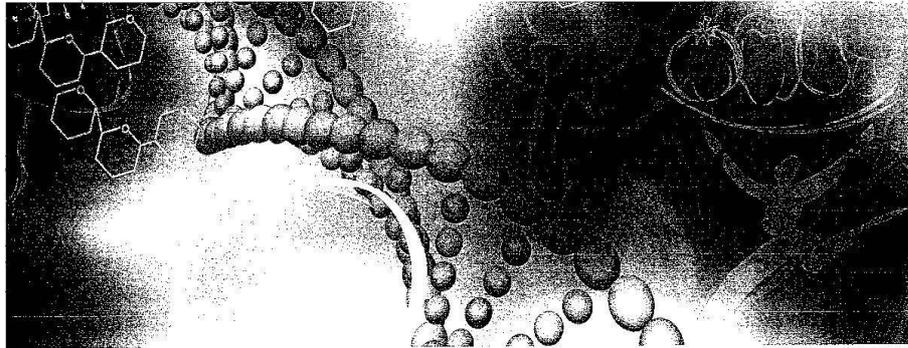
Hyun Young Park* and Eun Ji Cho Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University

Protective effect of Seolite Chungjukjang added with different ratios of green tea (SCG) from oxidative stress by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was evaluated under cellular system using LLC-PK₁ cell. Against peroxyl radical generated by AAPH, Seolite Chungjukjang added with green tea 5% (SCG5.0) showed the highest protective effect from cell death and lipid peroxidation through inhibition of formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In addition, among the ingredients of SCG, green tea exerted the strongest activity against AAPH-induced oxidative stress. Moreover, SCG led to the increase in activity of antioxidative enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase in Chungjukjang; in particular SCG5.0 displayed the highest enzyme activities. It suggests that the addition with green tea to SC leads to the increase in the antioxidative effect of Chungjukjang through protection from lipid peroxidation and elevation in antioxidative enzyme activities.

차가버섯 수용성 생리활성 성분이 아토피 피부염 동물 모델 NC/Nga mice의 면역활성에 미치는 효과

정용훈*, 최세영, 안치선, 한상현, 조아라, 최지은, 임병우 건국대학교 의생명과학대학 생명과학부, 김용태 강원대학교 IT특성화대학, 신봉주 동국대학교 한의학대학

아토피에 대한 면역 치료법은 부신억제 호르몬 제제나 저의선 요법을 통한 DNA합성 억제, 세포파괴성 억제 및 면역억제에 중점을 두고 있으나 이와 같은 치료법들은 여러 부작용을 수반하고 근본적인 치유를 기대하기 어려운 실정이다. 최근 다중 영양소 성분이나 이를 다량 함유한 식이 소재의 피부에 대한 효능연구가 국내외로 활발히 진행되고 있다. 차가버섯은 항산, 항산화, 항암 및 항돌연변이 효과 등으로 인해 기능성 식품 및 건강기능식품으로 각광을 받고 있는데, 본 연구에서는 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga mice에서 차가버섯의 수용성 추출물 투여에 따른 면역능을 비교 분석하고자 하였다. 자연적으로 아토피 피부염이 발생하는 4주령의 NC/Nga mice와 normal control인 Balb/c mice 10마리씩을 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 각 실험군의 체중과 장기의 무게는 유의적인 차이는 없었다. Liver에서의 IFN- γ 와 TNF- α 의 protein 발현은 차가버섯군이 atopy군에 비해 유의적으로 낮은 발현을 나타냈으며, Th2세포에서 생성되는 cytokine인 IL-4의 발현량도 Th2세포에서 생성되는 IgE의 과다한 생성의 경우 단계적 낮아짐을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 볼 때 차가버섯의 수용성 성분 투여가 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga mice의 면역계에서 IL-4와 IgE 억제기능을 통해 영향을 관과 시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.



2007 International Symposium and Annual Meeting
**Metabolic Syndrome and
Functional Foods**

October 17-19, 2007
Carnival Hall, Muju Resort, Korea

Gold Sponsor
The Nutrition Foundation
 栗村財團 (Nongshim Group)

Sponsored by
The Korean Federation of Science and Technology Societies
Korea Food & Drug Administration
Korea Research Foundation
CJ Cheiljedang Co.
US Potato Board
Sejeon Co., Ltd.
Sempio Foods Co.
Amway Korea Ltd.
Korea Ginseng Corp.
American Soybean Association-IM
Jeju Seaweed Industry Development Agency
RIS of Changnyeong Onion & Soy Products Industry
Clinical Trial Center for Functional Foods, Chonbuk Natl Univ Hospital

KFN The Korean Society of Food Science and Nutrition

tor-coated implants: biological activity of the incorporated the expression of TGF- β 1 for at least 14 months. These findings support the critical role of TGF- β 1 in fracture healing.

P8-184
Effect of Different Doses of *Gastrodia elata* in Streptozotocin-induced Diabetic Rats
Gye Yeop Kim¹, Eun Jung Kim, Ki Cheol Sim, Ki Bok Choi, Gi Do Kim. Department of Physical Therapy, College of Health & Welfare of Dongshin University

This study was conducted to evaluate the effects of three different level of dietary of *Gastrodia elata* extract(0.1, 0.25 and 0.5 g/kg) in streptozotocin induced diabetic rat. In the present study, oral administration of *Gastrodia elata* extract for 28 days on the level of serum glucose, total cholesterol, triglycerides, urea, uric acid, creatinine, aspartate amino transferase (AST) and alanine amino transferase (ALT) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats were evaluated. Oral administrations of the *Gastrodia elata* extract significantly decreased serum glucose, total cholesterol, triglycerides, urea, uric acid, creatinine, AST and ALT levels, while increased serum insulin in diabetic rats but not in normal rats ($p < 0.05$). It is concluded that the plant must be considered as excellent candidate for future studies on diabetes mellitus.

P8-185
발아현미·차가버섯 수용성 성분이 아토피 피부염 동물 모델 NC/Nga 마우스의 면역활성에 미치는 효과
최세영¹, 최세영¹, 조수민¹, 권태민¹, 김보희¹, 임병우². 건국대학교 의료생명과학 생명과학부

아토피에 대한 현행 치료법은 DNA합성 억제, 세포중식 억제 및 염증억제에 중점을 두고 있으나 이와 같은 치료법들은 여러 부작용을 수반하고 근본적인 치유를 기대하기 어려운 실정이다. 최근, 발아현미의 특정 영양소 성분이나 이를 다량 함유한 식이 소재의 피부에 대한 효능연구가 국내외로 활발히 진행되고 있다. 발아현미는 항산화 및 재결합성에 효능이 있는 것으로 알려져 있으며 차가버섯은 한압, 항산화, 항당뇨 및 항돌연변이 효과 등으로 인해 기능성 식품 및 건강식품으로 각광을 받고 있는데, 본 연구에서는 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga mice에서 발아현미·차가버섯의 수용성 추출물 투여에 따른 면역조절능을 비교 분석하고자 하였다. 자연적으로 아토피 피부염이 발생하는 4주령의 NC/Nga mice와 normal control인 Balb/c mice 10마리씩 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 각 실험군의 체중과 경기의 무게는 유의적인 차이는 없었다. Liver에서의 IFN- γ 와 STAT1 그리고 TNF- α 의 protein 발현은 발아현미·차가버섯군이 atopy군에 비해 유의적으로 낮은 발현을 나타냈으며, Th2세포에서 생산되는 cytokine인 IL-4에 의한 STAT6의 과잉생성으로 B세포에서 생산되는 IgE의 과다한 생성을 현저하게 저하시키는 것을 확인할 수 있었다. 위와 같은 결과를 볼 때 발아현미·차가버섯의 수용성 성분 투여가 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga mice의 면역계에서 IL-4와 IgE 억제기능을 통해 병변을 완화 시켜줄 수 있음을 확인 할 수 있었다.

P8-186
혈기적 치료에 의해 제조된 녹차의 유용성분 및 생리활성 조사 고친성¹, 조정윤¹, 한선경¹, 박선영¹, 이강락¹, 최차란¹, 박경현¹, 함경식¹. 동국대학교 식품공학과 및 전일염생명과학연구소, ²전남목포시립장, ³전남농업기술원

녹차는 항당뇨, 면역증강, 노화억제 등의 다양한 생리활성을 가진 기능성식품으로 그 체중에 따라 활성 정도에 차이를 나타낸다. 이중 체취한 차엽을 혈기적 치료에 의해 제조된 녹차(혈기치리녹차)는 신경계조 조절기능을 갖는 GABA 성분 함량이 증가되고, 혈압 상승억제 등의 약리 효과가 있다고 보고된 바가 있다. 실험된 동물

실험에서 혈기치리녹차가 일반녹차에 비해 더 높은 항비만 및 콜레스테롤 개선 효과가 있음을 밝혀, 본 연구에서는 혈기치리녹차에 대한 유용성분 함량 및 lipase 저해 등의 생리활성을 조사하였다. 혈기치리녹차의 총 페놀성 화합물 함량은 약 84 mg/g으로 일반녹차와의 그 함량 차이는 거의 없었다. 그러나 5종의 카테킨을 HPLC에 의해 정량 분석한 결과, 혈기치리녹차에서는 EGC를 제외할 C, EC, EGCG, 그리고 ECG 등의 함량이 일반녹차보다 높게 나타났으며, 이 중 C와 EGCG의 함량은 일반 녹차보다 약 1.6배 이상의 큰 함량 차이를 보였다. GABA 농차는 일반녹차보다 DPPH 라디칼 소거에 대한 항산화 활성이 약간 높았으며, 체내 지방 흡수에 관련된 lipase 억제 효과도 약 2배정도 높음을 알 수 있었다.

P8-187
DSS로 유도된 염증성 장질환 동물모델에서 차가버섯 및 침버섯 추출물이 면역조절기능에 미치는 효과
최세영¹, 임병우¹, 정용준¹, 김종대², 전상현¹, 전순희¹. 건국대학교, ²강원대학교

염증성 장질환은 위양성 대장암과 크론병으로 나눌 수 있다. 염증성 장질환의 유병률 및 발병률은 주로 북미 및 북유럽의 백인에서 흔한 질환이지만, 최근에는 우리나라도 식생활의 서구화에 따라 발생 빈도가 증가하고 있는 추세이다. 차가버섯은 소화기계 및 대장암 예방 환자에게 특히 우수한 치료효능을 보인다고 알려져 있으며, 침버섯은 식용으로 많이 사용되는 버섯 중 하나로써 풍미가 뛰어나고 고급버섯종 하나이다. 본 연구에서는 차가버섯과 침버섯의 에탄올 추출물이 DSS로 유도된 염증성 장질환 동물모델에 대한 면역조절 효능을 관찰하고자 하였다. Spleen에서 TNF- α , IL-4, iNOS, IFN- γ , STAT1, STAT6의 protein 발현량을 western blot법을 사용하여 측정하였다. iNOS와 TNF- α 는 침버섯과 차가버섯 에탄올 추출물군이 양성대조군인 DSS군보다 TNF- α , STAT1, iNOS의 발현량이 유의적으로 낮은 것을 확인 하였으며, IL-4와 STAT6의 경우 침버섯 에탄올 추출물군에서 그 발현량이 유의적으로 낮게 나타났다. 차가버섯 에탄올 추출물군에서는 DSS+차가버섯 에탄올 추출물군에서 DSS군보다 IL-4와 STAT6의 protein 발현량이 낮게 나타났다. 위의 결과로 볼 때, DSS로 유도된 염증성 장질환 동물 모델에서 차가버섯, 침버섯의 에탄올 추출물은 염증성 장질환에 있어서 염증을 완화시키는 것으로 사료된다.

P8-188
Protective Effects of Caffeic Acid Isolated from *Oenanthe javanica* DC. in Rats Treated with CCl₄
Heejung Choi¹, Jeongin Park², Yanghee You², Kwontack Hwang³, Jeongmin Lee⁴, Kyungmi Kim⁵, Changsoo Park⁶, and Woojin Jun⁷. ¹School of Education, Chonnam National University, ²Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University, ³Dept. of Food and Nutrition, Nambu University, ⁴Dept. of Medical Nutrition, Kyunghee University, ⁵Dept. of Biofood Technology, Korea Biopolytechnic College, ⁶Dept. of Pathology, Chonnam National University Medical School

In the previous research, caffeic acid (CA), isolated from *Oenanthe javanica* DC, was thought to be useful in the prevention of various liver injuries induced by oxidative stress *in vitro*. Therefore, in the present study, the capability of CA to protect liver against the CCl₄-induced toxicity and the oxidative stress was investigated. The rats were divided into 4 groups: NC (normal control), CC (1.25 ml/kg of CCl₄), CF1 (1.25 ml/kg of CCl₄ plus 10 mg/kg of CA), and CFH (1.25 ml/kg of CCl₄ plus 40 mg/kg of CA). A single oral dose of CCl₄ at 1.25 ml/kg showed the significant hepatotoxicity, as evidenced by a dramatic elevation in the serum GOT and GPT activities, an increased incidence, and a severity of histopathological hepatic lesions in rats. In addition, CCl₄ treatment exhibited a significant elevation in hepatic MDA level, whereas the drastic decrease was found in GSH concentration and catalase, SOD, GST, and

2. 특 허 출 원

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2008.04.14
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(6799)
출원번호 10-2008-0034386 (접수번호 1-1-2008-0265406-05)
출원인명칭 전남대학교산학협력단(2-2004-036577-5)
대리인성명 황이남(9-1998-000610-1)
발명자성명 전우진 박창수 이정민 황권택 최희정 유양희

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(온라인전자출원)" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기점 확인할 수 있으며, 홈 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기 원할 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.(단 홈페이지 회원에 한하여 통지서비스 신청 가능)
2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 특별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라질 수 있습니다.
2-라. 1차 심사결과통지시(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 어떤 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구통지하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도도 이용하실 수 있습니다.
5. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(명장) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이변 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
(예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-6080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

【요약서】

【요약】

본 발명은 불미나리(*Oenanthe javanica* DC)에서 간세포 보호 및 간 손상 예방 효능을 갖는 카페익산을 추출하는 방법 및 이를 포함하는 기능성 건강식품에 관한 것으로, 본 발명에 의한 불미나리로부터 추출 분리한 카페익산은 간세포 보호 및 간 손상 예방 효능을 갖기 때문에 불미나리 추출물 및 그 카페익산을 함유한 분말류, 음료수, 가공 식품류 등과 같은 기능성 건강지향식품에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

불미나리, 카페익산, 간세포, 간 손상, 간 보호, 기능성 식품