

최 종 보 고 서

보안과제(), 일반과제(○),

과제번호; 20060485

버섯균사체 배양물 유래 허혈 및 간 보호 기능성 소재 개발

(Functional materials derived from the cultures
of mushroom mycelia for the protection of ischemic
and liver damage in animals and humans)

기능성 물질 분리·동정

(Isolation of active substances and protection of liver injury)

심근허혈-재관류 손상보호

(Protection of ischemia/reperfusion injury)

경상대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “버섯균사체 배양물 유래 허혈 및 간 보호 기능성 소재개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009년 04월 24일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 하 영 래

세부1연구책임자 : 하 영 래

세부2연구책임자 : 장 기 철

연 구 원 : 김영숙, 장옥진,

김민석, 심수정, 이병우, 김윤아, 이선민, 황광현, 오태우, 문연규, 권애경, 이효형,
김종원, 고유진, 김대진, 김은정, 하유미, 오화민, 고영신, 박철우, 이영남, 김미숙,
이윤화, 이수경, 황지연, 이영민, 박선희, 김미은, 김윤정

협동연구기관명 : (주)HK바이오텍

협동연구책임자 : 김 정 옥

위탁연구기관명 : 인제대학교

위탁연구책임자 : 김 정 인

요 약 문

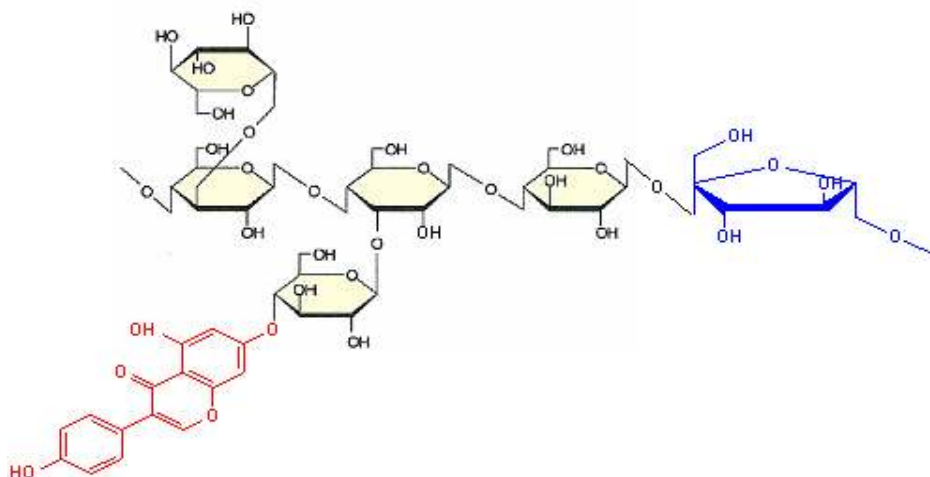
I. 제 목

버섯균사체 배양물 유래 허혈 및 간 보호 기능성 소재 개발 (Functional materials derived from the cultures of mushroom mycelia for the protection of ischemic and liver damage in animals and humans)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

Gluvone (isoflavone-*O*-D-glucan)이 함유된 버섯균사체 배양물을 생산하고 이들 배양물의 간독성 개선 및 허혈-재관류 심장질환 개선 효과 구명을 목적으로 한다.



[전형적인 Gluvone의 추정 분자구조]

2. 연구의 필요성

가. 기술적 측면

- (1) Gluvone은 본 연구진이 콩을 배지로 하여 버섯균사체를 액체배양하여 개발한 물질로 isoflavone (특히 genestein)과 β -D-glucan이 -O- ether화된 신물질이다 (특허 제 0491186호).
- (2) Gluvone은 면역증강 등의 효과를 가지고 있는 물질로 밝혀졌으나, 허혈 및 간 보호 기능성이 있는 것으로 나타났으므로, 이러한 기능성을

실용화하기 위해서는 이에 대한 구체적인 연구가 필요하다.

나. 경제·산업적 측면

- (1) Gluvone은 의약품과 건강보조식품에 널리 사용될 수 있는 기능성 소재로써, 약 650억불 규모로 추정되는 세계시장에서 허혈 및 간 보호 기능이 있는 소재로써 중요하게 활용될 수 있는 소재이다.
- (2) Gluvone에 대한 임상자료와 허혈 및 간 보호 기능에 대한 근거자료는 국내시장확대와 외국으로 제품을 수출하는데 중요하다.
- (3) 생산자는 부가가치가 높아 경제성이 있고, 소비자에게는 저렴한 가격의 제품개발이 필요하다. 현재 시판되고 있는 허혈 및 간 보호 기능성 소재에 비해 본 제품은 버섯균사체에 의해 대량으로 생산될 수 있으므로, 수요의 증가와 함께 소재자체의 원가가 저렴해질 수 있는 장점을 가지고 있다.
- (4) 수입대체를 위한 국내에서 생산이 가능한 소재의 개발이 필요하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 기능성 버섯균사체 배양물 생산

가. 기능성 성분 고 함유 버섯균사체 배양물 생산

- (1) 버섯균주: 신령버섯(*Agaricus Blazei*: AB), 표고버섯(*Lentinus edodes*: LE), 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*: PO), 상황버섯(*Phellinus linteus*: PL)
- (2) 최적 배지조성: 기 선발된 버섯균에 의해 액체배지에서 Gluvone 생성이 최대로 생산될 수 있도록 이미 개발한 배지를 기본으로 하여 여러 가지 전구물질을 첨가함으로써 isoflavone aglycon과 β -D-glucan, Gluvone의 수율을 더욱 높여 최적 액체배지조성을 개발.
- (3) 최적 배양조건: 배양온도 (항온/변온), 통기량, 배양기간

나. 유용소재의 분리·동정 및 배양추출물 조제

- (1) 유용소재의 분리 및 동정
- (2) 유용소재를 다량 함유한 분획 제조: 분자량에 의한 유용소재 다량 함유 분획 제조
- (3) 유용소재를 다량 함유한 농축액 제조

2. 간 독성완화 효과

- 가. 사염화탄소로 유도한 mouse의 간 독성완화
- 나. 알콜 유도 간 손상 보호효과
- 다. 알콜 섭취자의 간 보호 효과 및 작용 mechanism

3. 심근허혈-재관류 손상억제 확인 (*in vivo*)

- 가. 허혈 심근-재관류 동물 모델 확립 및 약효 검증
- 나. 심근세포 배양에 의한 약리작용기전
- 다. 심장이외 혈관에 대한 독성 및 작용

4. 시제품 개발

- 가. 농축액 (과우치, 병)
- 나. 연질캡슐, 분말

IV. 연구개발 결과

1. 기능성 버섯균사체 배양물 생산

가. 버섯균주 선발: 버섯균주를 고체배지(PDA배지)에서 14일간 성장 정도와 액체배지에서 균사성장정도 및 β -glucan의 생성량 등을 근거로 AB를 Gluvone 생산용 버섯균주로 선발하였다. 또한 AB와 유사한 효과를 갖는 LE를 간독성 완화를 위한 임상실험용 시료 생산에 사용하였다.

나. 배양조건 확립

- (1) Gluvone 생성을 유도하기 위하여 기본액체배지[황백당 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0375%, H_2PO_4 0.0375%]에 Soybean paste를 1.0% 첨가하는 것이 가장 우수하였다.
- (2) AB 및 LE를 이용하여 기능성 성분 (Glucone)을 고 함유 할 수 있는 최적 배양 조건은 Brix가 높고, 균사생장이 활발하고 잡균의 오염이 적게 발생하는 25℃에서 5일간, 통기량은 1.5 v/v/m 향온 배양하는 것이었다.

다. 버섯균사체액체배양물의 유효성분 및 구조분석

- (1) Gluvone은 버섯균사체배양물의 고형분에 2% 함유되어 있다.

- (2) 분리된 Gluvone의 총 고형분 함량은 98.3% 였고, carbohydrates 76.6%, protein 19.6%, isoflavone 2.1%, 기타 1.7% 였다.
- (3) Carbohydrate 중 glucose 51%, fructose 47%, ribose 2%로 구성되었다.
- (4) Protein의 아미노산 조성은 Asx, Thr, Ser, Glx, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Iso, Leu, Try, Phe, His, Lys와 Arg로 구성되어 있었으며, 그 구성비는 각각 21.9, 5.7, 4.9, 12.5, 3.6, 7.2, 5.7, 0.9, 3.8, 1.0, 2.8, 4.7, 0.9, 7.8, 4.9, 7.8, 3.9 %였다.
- (5) Isoflavone은 daidzin, genistin, daidzein, genistein으로 구성되어 있었고, 그 구성비는 각각 18.9, 24.4, 37.4, 19.3 %였다.
- (6) 분자량은 Size exclusion chromatography에 의해 약 $9,400 \pm 500$ 이었다.
- (7) ^1H NMR spectroscopy 등의 결과를 종합하여 Gluvone은 isoflavone이 conjugated된 glycoprotein의 물질임을 예측할 수 있었다.

2. Gluvone이 함유된 버섯균사체 배양물의 심근허혈-재관류 완화 효과

가. 손상억제 확인 (심근허혈 조직 검사)

- (1) Sparague-Dawley 계통의 흰쥐 (220 g~250 g)를 심장 허혈 재관류 모델로 만든 후 손상억제 확인한 결과 허혈-재관류 1시간 전에 투여 시 심근경색정도가 줄어드는 것을 보인 것이다. Daidzein 투여에 의해 심근경색이 20% 정도 감소함을 알 수 있었다.
- (2) Daidzein을 5 mg/kg 씩 5일간 경구투여 시 혈압에는 일부 효과를 보이나 심박동수에는 커다란 영향을 주지 않았다. 또한 Daidzein은 좌심실 수축력을 통계적으로 유의하게 증가 시키며 좌심실 발생압력도 증가시켰다.

나. 심근 허혈-재관류 손상에 대한 심근 보호효과

- (1) Gluvone 함유 버섯균사체배양물 (Gluvone으로 줄임)를 투여 전 후 에 혈압에 대한 영향을 살펴본 결과 혈압에 대해 수축기, 이완기 모두 허혈-재관류 손상 쥐에 비해 개선하였고, 평균혈압도 유의하게 개선하였다.
- (2) 좌심실 이완말기 압력 (LVEDP)이 약 10 mmHg 로서 심근 손상 시 나타나는 압력이 Gluvone 투여에 의해 약 50% 정도 줄어 들었고, 좌심실 기능이 회복되면 심근 수축력이 회복되어 단위시간 당 수축능력

(dP/dT)이 증가되는데 이 수치 역시 Gluvone에 의해 유의하게 증가되었다.

- (3) 심박동수와 좌심실 압력을 호전 시키는 결과를 보여 심근경색 시 저하된 심장 기능에 보호 효과를 보였다.

다. 심근 허혈-재관류 손상에 대한 기능개선 및 심근경색 억제

- (1) 재관류 24 시간 후 허혈-재관류 손상에 대한 심장기능의 확인은 Miller catheter를 경동맥을 통해 좌심실까지 삽입하여 측정한 결과 Control, Gluvone, Daidzein 처리구에서 area at risk와 area at risk/LV (%)에 차이가 없었다.

- (2) Gluvone (5 mg/kg)의 투여는 Daidzein (5 mg/kg)의 투여와 비교하여 혈압 (MAP, mean arterial pressure)에 미치는 영향은 I/R (허혈-재관류) 손상 시 저하되었던 혈압 (67 mmHg)을 각각 79 mmHg 로 유의 하게 상승시켰으며 좌심실 수축기압 (LVSP)을 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가시켰으며 또한 Gluvone처리는 Daidzein의 처리보다 다소 증가효과가 낮았으나, control처리보다는 증가 시킨 것을 확인할 수 있었다.

- (3) 작용기전 연구

- (가) 허혈-재관류 손상 보호 작용기전: I/R rm 자체는 NF-kB complex를 cytosol에서 nuclear fraction 으로 이동시켰으나 NF-kB translocation이 Gluvone 처리 군과 Daidzein 투여 군에서 억제됨을 볼 수 있었다. 따라서 Daidzein이 Gluvone 보다 강함을 알 수 있었다.

- (나) 염증성 cytokine 측정: 대표적 염증성 cytokine인 TNF- α 와 IL-6를 kit를 사용하여 측정한 결과 I/R stress는 IL-6 와 TNF- α 모두 현저히 상승되었으나 상대적으로 Daidzein 및 Gluvone 투여 군에서 줄어들었음을 알 수 있었다.

- (다) 심장주변의 중성구 침입에 대한 조직 염색 연구: I/R은 심장 조직에 산화적 스트레스로 인한 neutrophil의 infiltration이 되어 있는 것을 알 수 있으며 이에 반해 Daidzein 이나 Gluvone 투여 군에서는 I/R로 인한 산화적 스트레스가 현저히 줄어들었음을 MPO 활성도와 면역 조직 염색으로 확인 할 수 있었다. 따라서 이들이 산화적 스트레스를 감소시킨다는 사실을 알 수 있었다.

- (라) Caspases-3 활성 측정: Daidzein은 유의하게 ($p < 0.05$) caspase-3 활성도를 억제하는 반면 Gluvone은 통계적으로 유의 하지는 않았으나

Caspases-3 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 이들은 세포의 apoptosis에 관여하는 것을 알 수 있었다.

- (마) 심근세포에서 I/R에 해당하는 산화적 손상을 H₂O₂를 가하여 세포손상을 주고 이에 대한 Gluvone과 Daidzein의 효과를 본 결과 cell viability를 Daidzein과 Gluvone은 각각 5 uM과 2 mg/ml 농도에서 가장 좋은 효과를 보였다. 이러한 결과는 in vivo 결과와도 일치 하는 것으로 생각된다. 또한 NF-κB억제 효과가 cell 에서도 나타나는지를 확인한 바 NF-κB luciferase 활성도가 H₂O₂에 의한 luciferase 활성도를 줄임을 확인하였다.

라. 심근허혈-재관류 손상에 대한 부작용 여부:

- (1) 혈관 반응성: 혈관의 수축과 이완 반응을 physiograph 상에 나타난 것을 tracing 한 결과 약 10-20분간 평형을 유지 한 상태에서 이때 acetylcholine (1 mM)을 투여 하면 내피세포가 존재 할 경우 [endothelium (+)]에는 혈관이 이완을 일으켰으며, 내피세포를 제거 시킨 혈관 [endothelium (-)] 에서는 acetylcholine에 의한 이완 반응이 약함을 알 수 있다.
- (2) 심장조직에 polymorphonuclear 침착억제: 흰쥐의 심장조직에 허혈/재관류 시 neutrophil 등 polymorphonuclear 세포들이 침착되는데 반해 Gluvone 투여 쥐의 경우는 그 침착이 적음을 알 수 있다(P<0.05).
- (3) Gluvone은 혈관반응에 있어서 isoflavone 함유 유무에 상관없이 내피세포 의존적 이완반응을 나타내었으며 심장에 대한 단핵세포의 침착을 억제함에 있어서는 isoflavone 함유한 EtOH 분획 추출물이 효과를 나타내었으며 효과를 나타내는 농도 범위에서는 심장 및 혈관에 부작용을 나타내지 않음을 알 수 있다.

3. Gluvone 함유 버섯균사체 배양물의 간독성 개선 효과

가. 사염화탄소로 유도한 흰쥐의 간 독성 개선효과

- (1) 사염화탄소 투여군의 GOT 및 GPT 활성은 정상대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으나, gluvone, gluvone(-iso), silymarin의 섭취는 사염화탄소 투여군에 비해 GOT 및 GPT 활성을 감소시켰다.
- (2) Gluvone 및 silymarin은 사염화탄소 투여군에 비해 혈장 bilirubin 및 LDH

활성을 감소시켰다.

- (3) Gluvone, gluvone(-iso), silymarin은 간 조직의 TBARS 함량을 감소시키고 glutathione 농도, SOD 및 catalase 활성을 증가시켰다.
- (4) Gluvone 및 silymarin은 사염화탄소 투여로 인한 간 조직의 지방변이(fatty change)를 완화시켰다.

나. 알코올성 간질환 동물모델에 있어서 간 보호 효과 및 작용 mechanism

- (1) GOT, GPT, ALP, LDH 활성은 에탄올의 섭취에 의해 증가되었으나, gluvone 및 silymarin의 섭취는 이를 유의적으로 감소시켰다.
- (2) Gluvone 및 silymarin은 에탄올군에 비해 혈장 HDL-cholesterol을 증가시키고, 간 조직의 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시켰다.
- (3) Gluvone 및 silymarin은 에탄올군에 비해 간 조직의 TBARS 함량을 감소시키고 glutathione 농도를 증가시켰다.
- (4) Gluvone 및 silymarin은 에탄올군에 비해 간 조직의 SOD 및 catalase 활성을 증가시켰고 silymarin은 GSH-px 활성을 증가시켰다.
- (5) Gluvone 및 silymarin은 에탄올군에 비해 혈장 ADH 활성 및 간 조직의 CYP2E1 단백질 발현량을 증가시켰다.
- (6) 에탄올군의 간 조직은 지방변이 및 necrosis가 관찰되었으며, gluvone 및 silymarin군은 지방 변성이 억제되고 necrosis가 관찰되지 않았다.

다. 알코올 섭취자에 있어서 버섯제품의 간보호효과 검증

- (1) 대조군과 Gluvone 함유 표고버섯균사체 배양물 (역시 Gluvone으로 함)군 모두 신체계측치 및 혈압은 15주의 시험기간 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았다.
- (2) Gluvone의 섭취는 혈청 GOT 및 GPT 활성을 감소시키고, γ -GT 활성에는 유의적인 영향을 주지 않았다.
- (3) Gluvone은 혈청 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 감소시켰다.
- (4) Gluvone은 혈청 TBARS을 감소시키고, glutathione 농도를 증가시켰으나, 항산화계 효소 활성에는 유의적인 영향을 주지 않았다.
- (5) Gluvone은 림프구 DNA 손상 및 소변 8-OHdG 농도에 유의적인 영향을 주지 않았다.

4. Gluvone 함유 버섯균사체 배양물의 안전성 평가

가. 유효성분의 단기 투여에 대한 안전성 (mouse에 대한 급성시험): Gluvone 함유 신령버섯균사체 배양물(Gluvone)을 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 사망수를 조사하였고, 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰한 결과 급성독성을 보이지 않았다.

나. 유효성분의 장기 투여에 대한 안전성 (mouse에 대한 아급성시험)

Gluvone에 대한 시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 mouse 사망수 및 임상 증상을 관찰한 결과 사망한 동물은 암수 모두에서 없었으며 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 점차적으로 행동이 정상적으로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 Gluvone이 경구 아급성 독성시험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미하였다.

V. 연구성과 활용계획

1. 활용방안

- 가. 국내외 특허출원을 할 것이다.
- 나. 현장지도 및 교육 자료로 이용할 것이다.
- 다. 버섯균사체를 이용하여 다른 생물전환된 기능성 소재를 생산하는 방법으로 활용할 것이다.
- 라. 가격이 저렴하고 부작용이 없는 허혈 및 간질환 치료제 소재로 개발할 것이다.
- 마. 버섯의 허혈 및 간질환 치료제 자료임을 홍보하여 버섯 소비촉진 자료로 활용할 것이다.

2. 홍보전략

- 가. 국내외 학회에 연구결과 발표할 것이다.
- 나. 국내외 관련 전시회 참여(한국, 미국, 일본, 중국, 유럽)할 것이다.

3. 기존 시장 진입 및 판매전략

- 가. (주)HK바이오텍에 간기능성 보호 효과 개별인증 신청자료로 활용할 것이다.
- 나. (주)HK바이오텍에서 허혈 및 간질환 치료제 소재로 개발 후 타사에 원료 공급할 것이다.
- 다. (주)HK바이오텍 영업망을 통한 판매할 것이다.
- 라. 기능성 식품회사와 제약회사 식품사업부에 원료 공급할 것이다.

4. 수출계획

- 가. 일본: 현재 (주)HK바이오텍의 버섯균사체제품을 수입하여 판매하고 있는 (주)Air-rising을 통해 판매할 계획이다.
- 나. 미국: 동부거점 (뉴욕), 서부거점 (씨애틀), 남부거점 (텍사스) 대형 건강식품 유통망 (GNC 등) 및 제약회사와의 접촉할 계획이다.
- 다. 중국: 항주의 간질환 및 항암환자 협회 (회원수 약 10,000명)에 보급 후, 각 성으로 진출(1차 항주의 간질환 및 항암환자 협회를 통한 판매가 활발해지면, 다른 성에도 공략)할 것이다.
- 라. 동남아: 인도, 말레이시아, 필리핀 등의 국제 박람회 참가를 통한 시장조사 및 홍보를 통한 관련회사 발굴 및 접촉할 것이다.

SUMMARY

The purpose of this study is largely focused on the preparation of submerged-liquid culture of mushroom mycellia, which exhibited activities of protections against chemical-induced rat liver injury and alcohol-abused human liver damage, and rat ischemia-reperfusion injury as well.

Agaricus blazei (AB) and *Lentinus edodes* (LE) were selected for preparation of submerged-liquid cultures, because of their growth rate and/or production ability of β -D-glucan in liquid media containing soybean flake and food grade isoflavones. The liquid cultures were auto-incubated at 53C (pH 5.5) for 3 hrs, followed by filtration. Supernatants were collected and treated with 80% ethanol to obtain precipitate, which is, in turn, treated 3 more times with 80% ethanol. The recovered precipitate was designated as Gluvone sample because of containing Gluvone (isoflavone-O- β -D-glucan) as a active compounds. Gluvone is glycoproteins conjugated with isoflavones which have the approximate molecular weight of 9,400 daltons. Gluvone was composed of 76.6% carbohydrates (51% glucose, 47% fructose 47%, and 2% ribose), 19.6% proteins, 2.1% isoflavones (18.9% daidzin, 24.4% genistin, 37.4% daidzein, and 19.3% genistein) and 1.7% others. Gluvone from AB culture (designate Gluvone sample) was used as a sample for the test of rat ischemia-referpusion injury protection and chemical-induced rat liver injury protection, whereas Gluvone from LE culture (designate GLE sample) was used as a sample for the test of alcohol-abused human liver damage protection.

The protective effects of Gluvone sample on ischemia-reperfusion was examined in rat model. Gluvone improved blood pressure (both systolic and), relative to ischemia-referpusion rats. LVEDP was reduced to 50%, whereas dP/dt value by Gluvone significantly elevated. These results suggest that Gluvone improved the function of hart, suppressed by myocardial infarction. Such activities of Gluvone on ischemia-reperfusion injury in rats might be due to reduction of the translocation of NF-kB complex from cytosol to nuclear, reduction of TNF-a and IL-6 expressions, reduction of oxidative stress, and reduction of cell apoptosis. Gluvone sample did not show any adverse effects on ischemia-referpusion injury in rats when assayed by reactivity in artery and

deposit polymorphonuclear in heart tissues.

The protective effect of Gluvone sample against CCl₄-induced liver damage was studied in rats. Consumption of Gluvone and silymarin significantly decreased plasma bilirubin and LDH activity which were increased by injection of CCl₄. Consumption of Gluvone sample, Gluvone sample without isoflavone(-), and silymarin significantly reduced GOT and GPT activities induced by CCl₄. Gluvone sample, Gluvone sample (-), and silymarin significantly reduced hepatic TBARS, and increased GSH and activities of SOD and catalase.

The protective effect of Gluvone sample against alcohol-induced liver damage was also studied in rats. Consumption of Gluvone and silymarin significantly decreased GOT, GPT, ALP and LDH activities which were increased by chronic consumption of ethanol. Gluvone and silymarin significantly decreased cholesterol, triglyceride and TBARS of liver compared with ethanol group. Gluvone and silymarin increased hepatic activities of SOD and catalase. It was suggested that Gluvone can protect against liver damage by inducing CYP2E1 expression and antioxidant effect. Twenty moderate alcohol drinkers were offered GLE sample or placebo for 15 weeks. Consumption of GLE significantly reduced serum GOT and GPT activities without influencing γ -GT. GLE sample was effective in decreasing serum cholesterol and triglycerides. Consumption of GLE sample reduced plasma TBARS and increased glutathione levels. Thus it could be concluded that GLE sample is useful in improving liver function and controlling hyperlipidemia in alcohol drinkers.

In summary, Gluvone samples could be protect a ischemia-reperfusion injury and a chemical- and/or alcohol-induced liver injury.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines	16
Chapter 2. International and Domestic Technology Status	27
Chapter 3. Methods and Results	32
Chapter 4. Achievement and Contribution to related fields	115
Chapter 5. Application of results	120
Chapter 6. Information collected from overseas	121
Chapter 7. References	122

목 차

제 1 장 연구개발의 개요	16
제 1 절 연구개발 목표	16
1. 최종목표	16
2. 주요 연구개발목표와 내용	16
제 2 절 연구개발 필요성	17
1. 연구개발의 필요성	17
가. 기술적 측면	17
나. 경제·산업적 측면	18
제 3 절 연구개발 범위	19
1. 연차별 연구개발 목표와 내용	19
제 4 절 연구개발 추진체계	23
1. 추진체계도	23
2. 추진체계	24
가. 1차년도	24
나. 2차년도	24
다. 3차년도	25
제 5 절 기대효과	26
1. 기술적 측면	26
2. 경제·산업적 측면	26
제 2 장 국내외 기술개발 현황	27
제 1 절 현황	27
제 2 절 문제점	29

제 3 절 문제점의 해결방안	30
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	32
제 1 절 연구수행 방법	32
제 2 절 연구결과	45
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	115
제 1 절 목표달성도	115
1. 1차년도	115
2. 2차년도	116
3. 3차년도	117
제 2 절 관련분야 기여도	118
1. 기술적 측면	118
2. 경제 · 산업적 측면	118
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	120
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	121
제 7 장 참고문헌	122

제 1 장 연구개발의 개요

제 1 절 연구개발 목표

1. 최종목표

본 연구에서는 “버섯균사체 배양물과 이 배양물에서 유래한 허혈 및 간 독성 완화 기능성물질, 특히 Gluvone(isoflavone-O-glucan)의 생산과 간독성 개선 및 허혈-재관류 심장질환 개선 효과 구명”을 목적으로 한다.



2. 주요 연구개발목표와 내용

연구개발 목표	연구 내용
<input type="checkbox"/> 기능성 성분 고품유 버섯균사체 배양물 생산 조건구명	<input type="checkbox"/> 최적 버섯균의 선발 <input type="checkbox"/> 최적 배지조성의 개발 <input type="checkbox"/> 기능성물질 분리 (Biomarker)
<input type="checkbox"/> 유용소재의 분리·동정 및 구조분석	<input type="checkbox"/> 유용소재의 분리 및 동정 <input type="checkbox"/> 유용소재를 다량 함유한 분획 제조 <input type="checkbox"/> 유용소재를 다량 함유한 농축액 제조
<input type="checkbox"/> 소재에 대한 효능 및 기전 시험 (<i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>)	<input type="checkbox"/> 심근허혈-재관류 손상억제 작용기전 확립 <input type="checkbox"/> 간독성 완화 효과 검증 <input type="checkbox"/> 동물실험(유효성분 안전성 검사)
<input type="checkbox"/> 제품화	<input type="checkbox"/> 알콜섭취자의 간 보호 효과 <input type="checkbox"/> 농축액 (파우치, 병) <input type="checkbox"/> Tablet, 분말

제 2 절 연구개발 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 중요성

- (1) Gluvone은 본 연구진이 개발한 신물질로 원천기술이다.
- (가) Gluvone은 본 연구진이 콩을 배지로 하여 신령버섯균사체를 액체배양하여 개발한 물질 (Figure 1)로 isoflavone (특히 genestein)과 β -D-glucan이 -O- ether화 된 신물질이다 (특허 제 0491186호).
- (나) Isoflavone glycone을 함유하는 배지에서 버섯균사체를 배양함으로써 aglycone을 생성시키고, 버섯균사체로부터 생성되는 β -D-glucan을 함유하면서 isoflavone과 β -D-glucan의 conjugate를 생성시키는 기술로써, 현대인이 필요로 하는 기능성소재와 제품의 개발이 가능한 기술이다.
- (다) 예비실험에서 Gluvone은 면역증강 등의 효과를 가지고 있는 물질로 밝혀졌으나, 허혈 및 간 보호 기능성이 있는 것으로 나타났으므로, 이러한 기능성을 실용화하기 위해서는 이에 대한 구체적인 연구가 필요하다.
- (2) 허혈 및 간 보호 기능이 있는 Gluvone에 관한 구체적이고 체계적인 기초연구는 이를 신기능성 물질로 활용하기 위해서 매우 중요하다.
- (가) 현재까지 Gluvone에 관한 연구는 세포수준에서 그리고 mouse 복수암 모델 수준에서 항암성이 연구되었지만, 허혈 및 간 보호 기능성에 대한 체계적인 연구결과가 없다.
- (나) 허혈 및 간 보호 기능이 있는 Gluvone의 분자량 범위 및 작용기작이 밝혀질 경우 isoflavone이나 β -D-Glucan과 마찬가지로, 이를 함유하는 식품으로 그리고, 건강기능성 소재로 사용할 수 있을 것이다.

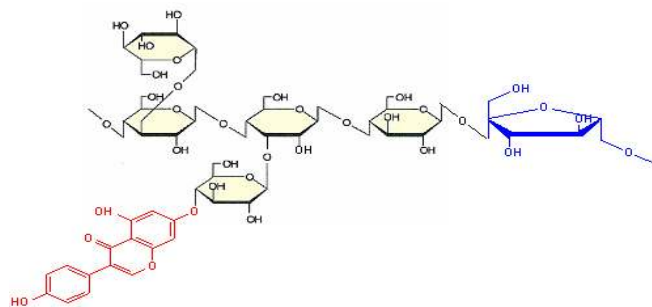


Figure 1. 전형적인 Gluvone의 예상 화학구조.

나. 경제·산업적 중요성

- (1) Gluvone은 의약품과 건강보조식품에 널리 사용될 수 있는 기능성 소재로써, 약 1조 500억으로 추정되는 국내 건강기능성식품시장과 약 650억불 규모로 추정되는 세계시장에서 허혈 및 간 보호 기능이 있는 소재로써 중요하게 활용될 수 있는 소재이다.
- (2) Gluvone에 대한 임상자료와 허혈 및 간 보호 기능에 대한 근거자료는 국내시장확대와 외국으로 제품을 수출하는데 중요하다. Isoflavone과 β -D-glucan의 복합체인 Gluvone은 인구의 고령화와 더불어 현대 성인병인 허혈 및 간기능 손상의 치료와 예방을 위한 기능성소재 (식품)이다.
- (3) 생산자는 부가가치가 높아 경제성이 있고, 소비자에게는 저렴한 가격의 제품개발이 필요하다. 현재 시판되고 있는 허혈 및 간 보호 기능성 소재에 비해 본 제품은 버섯균사체에 의해 대량으로 생산될 수 있으므로, 수요의 증가와 함께 소재자체의 원가가 저렴해질 수 있는 장점을 가지고 있다.
- (4) 갱년기나 성인병 증가로 인한 생산성 저하현상의 개선을 위해 필요하다. 폐경 전후의 여성이나 중·장년층의 경우에 발생하는 성인병인 허혈 및 간기능 저하에 관해서는 병이 진전됨에 따라 보통의 경우 활동성이 저하되고 무기력해짐으로 생산성이 저하됨은 물론 경제·산업에 간접적인 악영향을 미친다.
- (5) 수입대체를 위한 국내에서 생산이 가능한 소재의 개발이 필요하다
 - (가) 현재 사용되고 있는 건강보조식품 소재는, 많은 양을 수입에 의존한다.
 - (나) 최근 국내 허혈 및 간 보호 기능성 소재를 함유한 기능성 식품이 급속히 늘어나는 만큼 외화유출이 심각하여 이를 대체할 수 있는 연구개발이 필요하다.
- (6) 부적절한 식생활습관, 운동부족, 스트레스를 많이 받는 현대인에게 발병하는 성인병인 허혈 및 간 기능 손상의 예방 및 치료가 필요함.
 - (가) 현대 의학의 눈부신 발전에도 불구하고 의학계는 만성 성인병 및 노화 관련 질환에 대해 약물과 수술 외에는 뚜렷한 치료법을 제시하지 못하고 있는 실정이다.
 - (나) 소비자의 건강 개념이 질병 치료에서 예방으로 전환되고 있는 추세이며 최근 고령화 및 소득 수준 향상으로 구매력을 가진 silver층의 질환별 기능성 식품의 수요가 증가하고 있다.
 - (다) 따라서 임상학적 측면에서 안정성이 확보된 천연 물질을 이용한 기능성,

영양성을 가진 구체적인 개념의 식품 개발이 요구되며, 이러한 측면에서 Gluvone에 대한 in vivo, in vitro에서의 체계적인 연구가 필요하다.

(7) 우리나라 국민의 주요 사망원인 중 간질환으로 인한 사망률은 6위를 차지하고 있다. 미국의 경우 간질환으로 인한 사망은 사망원인 중 10위를 차지하고 있다. 따라서 간 보호 효과를 갖는 물질의 개발은 경제적 및 산업적으로 주요한 소재로 사용할 수 있을 것이다.

제 3 절 연구개발 범위

1. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도 (06-07)	□ 주관연구기관 세부 1과제 - 기능성 성분 고탐유 버섯균사체 배양물 생산 조건구명 위탁과제 - 독성완화효과 검증 (동물모델)	○ 배양방법 선정 ○ 배지조성물 개발 ○ 버섯균 선발 ○ 기능성물질 분리 (Biomarker) ○ 사염화탄소로 유도한 mouse의 간 독성완화	○ 액체배양, 고체배양 ○ 기본배지 + 첨가물 ○ 표고, 상황, 신령, 느타리 ○ Gluvone 함량 (분자량에 따른 함량 정량) ○ 혈장 성분 조사 - 혈장 GOT, GPT - ADH 활성 등 ○ 간 조직 관찰 ○ 간보호소재를 대조로 사용
	세부 2과제 - 심근허혈-재관류 손상억제 확인 (in vivo)	○ 허혈 심근-재관류 동물 모델 확립 및 약효 검증	○ 유효농도 범위 설정 ○ 손상억제 확인 ○ 심근허혈 조직 검사 ○ 심근허혈-재관류 손상에 대한 심근 보호효과
	□ 협동연구기관 - 버섯균사체 대량생산	○ 버섯균사체 액체 배양물 대량생산	○ 신령버섯균사체 액체배양물 - 위탁 및 2세부 제공 ○ 기능성 성분 고탐유 배양물 - 1세부로부터 얻은 최적 조건: ● 고체 또는 액체배양 ● 버섯균, 배지조성 등

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차년도 (07-08)	<p>□ 주관연구기관</p> <p>세부 1과제</p> <p>- 배양 추출물로부터 유효성분 분리•동정</p> <p>위탁연구기관</p> <p>- 독성완화효과 검증 (동물모델)</p>	<p>○ 배양추출물 조제</p> <p>○ 분획물 조제</p> <p>○ 일반성분 분석 및 유효성분분석 (특히 Glucosyl 및 이의 분자량, isoflavone 및 β-glucan 함량)</p> <p>○ 알콜 유도 간손상 보호효과</p>	<p>○ 배양물의 추출조건</p> <p>- 고온, 고압 (121℃, 90분)</p> <p>- 상온, 상압 (100℃, 10시간)</p> <p>- Ethanol 추출</p> <p>- 저온침전 (4℃)</p> <p>- Thin-film evaporator</p> <p>☞ 단독 또는 복합</p> <p>○ 용매분획</p> <p>○ Prep-HPLC, TLC, Column chromatography</p> <p>○ 구조동정</p> <p>- UV, IR, NMR, GC/MS 등의 기기분석</p> <p>○ 알콜성 간질환의 간 독성 개선효과 검증</p> <p>- 혈장 GOT, GPT</p> <p>- ADH 활성 등</p> <p>○ 간보호소재를 대조로 사용</p>
	<p>세부 2과제</p> <p>- 심근허혈-재관류 손상억제 작용기전 확립 (<i>in vitro</i>)</p>	<p>○ 심근세포 배양에 의한 약리작용기전</p>	<p>○ <i>in vitro</i> 허혈-산소주입에 따른 단백질의 발현</p> <p>- Cell line</p> <p>- 동물모델 (기전연구)</p>
	<p>□ 협동연구기관</p> <p>- 버섯균사체 배양물 대량생산</p>	<p>○ 버섯균사체 배양물 대량생산</p>	<p>○ 기능성 성분 고함유 배양물</p> <p>- 1차년도에 연구된 최적 조건</p> <p>- 3 KL</p>

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차년도 (08-09)	□ 주관연구기관 세부 1과제 - 유효성분의 구조분석	○ Gluvone 등의 기능성물질 구조 결정	○ prep-HPLC, TLC, Column chromatography에 의한 대량 분리 ○ 구조동정 - UV, IR, NMR, GC/MS 등의 기기분석
	- 유효성분 안전성 검증	○ 동물실험에 의한 급성 및 아급성	○ 혈액분석 ○ 조직검사 ○ 취사율 조사 ○ 기타 독성관련 지표 ○ 용매 분획시 안전성 검사
	위탁연구기관 - 알콜섭취자의 간보호효과 및 작용 mechanism 규명	○ 알콜 섭취자의 간보호효과 ○ 작용 mechanism 규명	○ 알콜섭취자의 간 보호효과 - 혈장 GOT, GPT, GGT - SOD, catalase - Glutathione reduction 활성 - CRP (c-reactive protein) ○ 작용기전 규명 - cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) ○ 간보호소재를 대조로 사용
세부 2과제 - 부작용 검증 (흰쥐 동물모델)	○ 심장이외 혈관에 대한 독성 및 작용	○ 등장성 이완/수축반응 ○ 세포독성 및 부작용검사	
□ 협동연구기관 - 소재화	○ 제품화	○ 액상: 파우치형, 병 ○ 고상: 연질캡슐, 정제, 분말 ○ 제품화 전략	

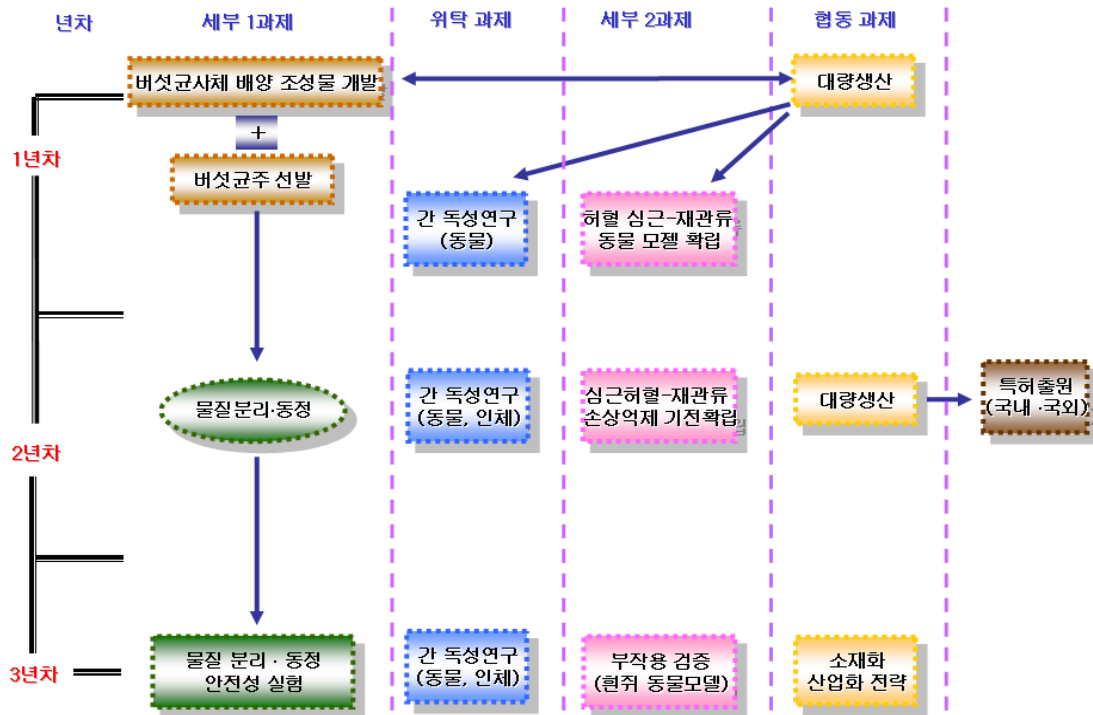
2. 연도별 연구개발의 추진 일정

연도	연구개발의 내용	추진 일정												비고
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1차 년도	기능성 성분 고품유 버섯균사체 배양물 생산 조건 구명	[Progress bar from 1 to 12]												
	-배지조성물	[Progress bar from 1 to 6]												
	-버섯균선발	[Progress bar from 3 to 8]												
	-기능성 물질 분리	[Progress bar from 5 to 12]												
	-배양방법 선정	[Progress bar from 2 to 9]												
	사염화탄소 유도 간독성 연구 (동물)	[Progress bar from 3 to 12]												
	심근허혈-재관류 손상억제 모델 확립 (동물)	[Progress bar from 3 to 12]												
2차 년도	버섯균사체 액체배양물 생산	[Progress bar from 1 to 11]												
	배양추출물로부터 유효성분 분리·동정	[Progress bar from 1 to 12]												
	-배양추출물 조제	[Progress bar from 1 to 3]												
	-분획물조제	[Progress bar from 1 to 4]												
	-일반성분 분석	[Progress bar from 1 to 4]												
	-유효성분 분석	[Progress bar from 2 to 12]												
	알콜유도 간손상 보호 (동물)	[Progress bar from 2 to 12]												
3차 년도	심근세포에서 약리 작용 검증	[Progress bar from 2 to 12]												
	버섯균사체 배양물 대량생산	[Progress bar from 1 to 9]												
	유효성분 구조 분석	[Progress bar from 1 to 12]												
	-Gluvone의 구조	[Progress bar from 3 to 12]												
	유효성분의 안정성 조사	[Progress bar from 4 to 12]												
	-동물에 의한 급성 및 아급성	[Progress bar from 4 to 12]												
	알콜환자의 간보호	[Progress bar from 1 to 12]												
총괄	부작용 검증 (흰쥐)	[Progress bar from 1 to 12]												
	소재화	[Progress bar from 1 to 12]												
	산업화 전략	[Progress bar from 5 to 12]												

제 4 절 연구개발 추진체계

1. 추진체계도

□ 총괄



□ 과제간의 유기성



2. 추진체계

가. 1차년도

(1) 1세부과제

버섯균사체배양조성물 (허혈 및 간 독성 보호 효과용)을 개발하고, 여기에 선발된 버섯균주 (허혈 및 간 독성 보호 효과 소재생산용)를 배양 (최적조건)하여 버섯균사체배양액 추출물을 조제 한다 [(주)HK바이오텍 참여].

(2) 2세부과제

제조한 버섯균사체배양액 추출물에 대한 심근허혈-재관류 손상억제를(*in vivo*) 동물 모델 확립 및 약효 검증을 확인한다.

(3) 위탁과제

제조된 버섯균사체배양액 추출물에 대한 독성완화효과 검증을 사염화탄소로 유도한 mouse의 간독성완화 시험을 통하여 조사한다.

(4) 협동과제

1세부로부터 얻은 최적의 조건을 통하여 버섯균사체 액체 배양물의 대량생산을 통해 위탁 및 2세부에 제공 한다.

나. 2차년도

(1) 1세부과제

개발된 버섯균사체배양액 추출물로부터 소재분획을 실시하고 각 분획에 함유된 일반성분을 분석하고 유효성분을 분리·동정한다.

(2) 2세부과제

제조한 버섯균사체배양액 추출물에 대한 심근허혈-재관류 손상억제(*in vivo*) 작용기전을 심근세포 배양에 의한 약리작용기전을 통하여 확인한다.

(3) 위탁과제

제조된 버섯균사체배양액 추출물에 대한 독성완화효과 검증을 알콜 유도 산손상 보호 효과를 통하여 조사한다.

(4) 협동과제

분리·동정된 소재에 대한 제품개발을 위한 연구를 수행 한다 (다양한 식품, 농축엑기스, 연질캡슐 등의 형태: 재단법인 바이오21센터 및 HK바이오텍 장비활용).

다. 3차년도

(1) 1세부과제

2차 년도에서 분리·동정된 활성성분을 대량으로 함유하는 분획을 대량생산하는 체제를 구축 한다 (참여업체 및 재단법인 바이오21센터의 발효장비 활용). 그리고 제품의 과학적인 근거를 마련하기 위하여 2차 년도에서 분리·동정된 유효성분의 구조분석 및 유효성분에 대한 안전성 검증을 연구 한다.

(2) 2세부과제

제조한 버섯균사체배양액 추출물에 대한 심근허혈-재관류 손상억제(*in vivo*)에 대한 부작용 검증을 흰쥐 동물모델을 통하여 심장이외 혈관에 대한 독성 및 작용을 조사한다.

(3) 위탁과제

분리·동정된 소재에 대한 알콜섭취자의 간 보호 효과 및 작용 mechanism을 간 보호 소재를 대조로하여 규명을 한다.

(4) 협동과제

1세부과제에서 대량생산된 고농도 활성성분 함유 분획을 제품화 한다 (정제, 연질캡슐 등의 형태: 재단법인 바이오21센터 및 HK바이오텍의 장비활용).
∴ 제품에 대한 국내외 특허를 출원한다.

□ 산업화는 본 연구의 참여기업인 (주)HK바이오텍에 기술을 이전하는 것을 원칙으로 한다.

제 5 절 기대효과

1. 기술적 측면

- 가. 버섯균사체 배양물의 허혈 및 간 독성 보호 효과 및 이 효과에 관련 물질 분리 ■동정과 이들 물질의 대량생산 기술이 개발될 것이다.
- 나. 이 기술로 다른 기능성 버섯균사체 배양물 생산할 수 있는 기술이 개발 될 것이다.
- 다. 이들 물질 함유 버섯을 개발이 가능하다.

2. 경제 · 산업적 측면

- 가. 참여 업체의 애로기술 해결로 기업의 매출 증대 및 고용창출이 기대된다.
- 나. 수입되고 있는 isoflavone 소재의 대체로 인한 수입대체효과를 창출할 것이다: 현재 국내 estrogen 결핍과 성인병 치료제 시장은 거의 다국적 제약사가 거의 시장을 장악하고 있다.
- 다. Gluvone생산 기술 개발은 성인병치료제의 수입 대체효과가 기대된다.
- 라. Gluvone을 함유하는 버섯이 개발될 경우 농민의 소득증대를 기대된다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 현황

1. 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	✓	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- 가. Isoflavone과 β -D-glucan의 복합체인 Gluvone은 본 연구진이 세계 최초로 개발한 기술로써 국내에서는 특허가 등록 (2005년)되었으며 미국에는 특허 등록 확정후 공개 중이며, 일본에는 현재 출원 중인 기술이다.
- 나. Gluvone의 일부성분인 isoflavone에 대한 연구는 최근 수년간에 걸쳐 본격적으로 진행되고 있는 세계적인 추세이다. 대두에 함유된 기능성 성분인 isoflavone (genistein, daidzein)의 효능이 빠르게 밝혀지고 있다.
- 다. 2003년 SPINS/Soyatech 보고를 인용, 최근 수년간 isoflavone을 함유한 식품은 높은 신장률을 보여왔으며, 영양보충제에 사용되는 농축 isoflavone의 시장규모는 미국의 경우 소비자가로 환산하여 2002년 3,400만 달러에 달해 1999년보다 100% 증가했으며, 일본은 1,670만 달러 규모 (2002년 기준), 유럽은 4,100만 달러 (2000년 기준)에 달한다.

2. 국내수준

- 가. Gluvone은 본 연구진이 콩을 배지로 하여 신령버섯균사체를 액체배양하여 개발한 물질로 isoflavone (특히 genestein)과 β -D-glucan이 -O- ether화 된 신물질이다 (특허제 0491186호).
- 나. Isoflavone함유 제품은 국내 기능성 식품 시장의 점유율이 향상 (국내 시장 규모: 2000년 약 200억원)되고 있다.
- 다. 콩 이소플라본 함유식품이 앞으로 시장 전망이 매우 밝아, 2003년 한국콩연구회 추계학술발표회에서 콩 이소플라본의 이용 현황과 생산' 이란 제목의 주제발표를 통해 "앞으로 콩 이소플라본이 식품 및 의약품 소재로서 시장 성장성이 매우 높을 것" 이라고 밝혔다.
- 라. "고령화 사회 도래, 식생활 서구화, 환경오염 및 영양섭취 불균형 등 우리의 생활환경이 급변, 만성퇴행성 질환자가 증가할 것으로 예상됨에 따라 이소플라본이 함유된 제품의 소비는 증가할 것으로 예상된다" 고 밝히고 "건강기능식품법의 발효에 따라 이제 이소플라본을 함유한 제품의

가능성을 개별적으로 인정받는 임상실험을 거쳐 이소플라본 제품화가 이루어지면, 시장 성장 가능성은 다른 어떤 신소재보다 기대가 된다” 고 강조했다.

마. 국내에서 이소플라본 생산은 태평양이 최초이며, 이어 신동방, 유젠바이오가 시장에 참여했고, 최근 몇몇 벤처기업에서도 생산하는 것으로 알려져 있으나 아직까지 용도 개발면에서는 미진한 상태다.

3. 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황	
한국	신동방	선플라본	비배당체(100%)
	태평양	대두이소플라본	배당+비배당체
	유젠바이오	유젠플라본	배당+비배당체
일본	후지코	후지프라본	배당체
	기코망	소이악트	비배당체
	도키와	P-40	배당체
미국	ADM	NOVASOY	배당체
	센트럴소아	소리야치	배당체

가. 美·日서 건강식품 소재로 인기가 있다.

나. 신동방이, 이소플라본 비당체 전환기술로 美특허를 획득하였다.

- (1) 국내 최초로 대두중의 유효성분인 이소플라본을 배당체에서 흡수율이 높은 비당체성분 (아글리콘) 형태로 전환하는데 성공하였다.
- (2) 신동방은 현재 국내에서 태평양과 유젠바이오가 이소플라본을 생산하고 있는데 유젠바이오의 경우 연간 39억원의 매출을 예상할 정도로 국내외 시장에서 그 수요량이 점차 증가하고 있는 추세에 있다.
- (3) 신동방 관계자는 “미국과 일본 등지의 업체가 수출하고 있는 이소플라본 가격은 kg당 30만-40만원 선이지만 국내 업체의 판매가는 25~30만원 선으로 가격경쟁력이 충분하다.

다. 태평양

- (1) 시중 유통되고 있는 이소플라본은 95% 이상이 당과 결합되어 있는 glucosides 형태로 판매되고 있는데 당이 결합되어 있는 이소플라본은 당이 해리된 aglycone과의 흡수 정도를 비교해보면 1/3수준인데 비해 태평양에서 생산되는 「이소본」은 aglycone 함량이 이소플라본 함량 100% 중 21% 이상으로 흡수가 빠르고, 캡슐 제조 시 층 분리 현상이 일어나지 않는 메리트도 있다.

제 2 절 문제점

1. 많은 양을 수입에 의존하고 있는 건강보조 식품 소재

현재 사용되고 있는 건강보조식품 소재는, 많은 양을 수입에 의존한다. 최근 국내 허혈 및 간 보호 기능성 소재를 함유한 기능성 식품이 급속히 늘어나는 만큼 외화유출이 심각하여 이를 대체할 수 있는 연구개발이 필요하다. 부적절한 식생활습관, 운동부족, 스트레스를 많이 받는 현대인에게 발병하는 성인병인 허혈 및 간 기능 손상의 예방 및 치료가 필요하다. 현대 의학의 눈부신 발전에도 불구하고 의학계는 만성 성인병 및 노화 관련 질환에 대해 약물과 수술 외에는 뚜렷한 치료법을 제시하지 못하고 있는 실정이다. 소비자의 건강 개념이 질병 치료에서 예방으로 전환되고 있는 추세이며 최근 고령화 및 소득 수준 향상으로 구매력을 가진 silver층의 질환별 기능성 식품의 수요가 증가하고 있다. 따라서 임상학적 측면에서 안정성이 확보된 천연 물질을 이용한 기능성, 영양성을 가진 구체적인 개념의 식품 개발이 요구되며, 이러한 측면에서 Gluvone에 대한 in vivo, in vitro에서의 체계적인 연구가 필요하다.

2. Gluvone에 관한 허혈 및 간 보호 기능성에 대한 체계적 연구 결과 미비

- 가. 허혈 및 간 보호 기능이 있는 Gluvone에 관한 구체적이고 체계적인 기작연구는 이를 신기능성 물질로 활용하기 위해서 매우 중요하다.
- 나. 현재까지 Gluvone에 관한 연구는 세포수준에서 그리고 mouse 복수암 모델 수준에서 항암성이 연구되었지만, 허혈 및 간 보호 기능성에 대한 체계적인 연구결과가 없다. 따라서 인간의 암세포주에서 세포독성, 동물모델에서 항암성, 면역증강성 (macrophage 활성화, NK 세포활성 등) 및 항산화성 등의 기작을 연구할 필요성이 있다. 허혈 및 간 보호 기능이 있는 Gluvone의 분자량 범위 및 작용기작이 밝혀질 경우 isoflavone이나 β -D-Glucan과 마찬가지로, 이를 함유하는 식품으로 그리고, 건강기능성 소재로 사용할 수 있을 것이다.

3. 민간요법은 과학적인 근거가 부족하다.

민간요법으로 이용되는 천연물로부터 효능이 우수한 소재의 개발과 함께 과학적인 기전의 구명이 절실히 필요하다.

제 3 절 문제점의 해결방안

1. 부작용이 없는 천연 소재이다.

- 가. Isoflavone glycone을 함유하는 배지에서 버섯균사체를 배양함으로써 aglycone을 생성시키고, 버섯균사체로부터 생성되는 β -D-glucan을 함유하면서 isoflavone과 β -D-glucan의 복합체를 생성시키는 기술로써, 현대인이 필요로 하는 기능성소재와 제품의 개발이 가능한 기술이다.
- 나. 버섯은 db/db mouse의 간보호 작용이 있다. db/db mouse에게 대조군은 AIN-93G basal 식이를 실험군은 동결건조한 아가리쿠스균사체 추출물을 10% 식이에 첨가하여 6주간 섭취시킨 후 혈장 GOT, GPT 활성을 측정된 결과, GOT 활성이 아가리쿠스균이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다

2. 가격이 저렴하고 지속적으로 대량공급이 가능하다.

- 가. 버섯자실체는 건강보조 식품소재에 관한 우수한 천연소재이지만 재배가 까다롭고 대량생산이 어려워, 가공품의 원료소재로 사용하기에는 제한이 있다.
- 나. 그러나 생산자는 부가가치가 높아 경제성이 있고, 소비자에게는 저렴한 가격의 제품개발이 필요하다. 현재 시판되고 있는 허혈 및 간 보호 기능성 소재에 비해 본 제품은 버섯균사체에 의해 대량으로 생산될 수 있으므로, 수요의 증가와 함께 소재자체의 원가가 저렴해질 수 있는 장점을 가지고 있다
- 다. 그리고 버섯균사체 액체배양물은 대량으로 년 중 생산이 가능하여 저렴한 원료를 지속적으로 공급할 수 있다.

3. 질병 예방 및 치료의 기능을 가진 medical food 개발 기대

Ischemic heart disease는 미국에서만 1,200만명, 전 세계적으로 1억명 이상이 앓고 있으며 허혈성 혈관질환은 국내에서도 환자수가 급증하고 있다. 이들병은 근육에 혈액을 공급하는 관상동맥이 동맥경화에 의해 좁아지면서 혈액공급이 줄어들어 생기는 병이다. 완전히 좁아지지 않은 상태에서 악화와 호전을 반복하는게 협심증이고, 완전히 막혀 혈액공급이 되지 않아서 심장근육이 죽어버리는 것이 '급성심근경색증'이다. 영양적 가치 이외에도 개인의 건강이나 신체적 활동, 정신상태 등에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 질병 예방 및 치료의 기능을 가진 medical food들이 만들어 질 수 있을 것이다.

4. 버섯은 다양한 생리활성 효과가 있어, 허혈 및 간보호 효과 외에도 그에 따른 부작용을 개선할 수 있는 시너지효과가 있다.

가. 항암효과

- (1) 일반적으로 조개느타리, 표고버섯 등에 존재하는 단백질 다당체는 면역체계와 연결되어 간접적으로 종양 증식을 억제시키고 암세포나 유해 병원균을 사멸시키는 macrophage의 수를 증가시키는 것으로 알려져 있다.
- (2) β -1,3 glucan인 Lentinan은 mouse를 이용한 동물실험에서 5-FU 치료로 인한 체중감소를 억제시키고 종양에 의한 독성을 선택적으로 감소시키는 효과를 보였다고 발표되었다. 또한 위암환자를 대상으로 한 임상실험에서 생존기간을 연장하고 식욕부진, 권태감, 오심, 동통 등의 자각증상을 개선시켜준다고 확인되었다.
- (3) 상황버섯, 동충하초, 아가리쿠스 버섯은 최근 이들의 항암성에 대해 많은 주목을 받고 있다.

나. 면역증강효과

- (1) 표고버섯에 존재하는 β -1,3 glucan인 lentinan은 면역계의 host mediated immune response에 관여하여 손상된 면역기능을 회복시켜준다고 보고되었다. 또한 생체 내에서 감염방어 등의 면역기능을 나타내는 보체계 (complement system)를 활성화시킨다고 알려져 있다.
- (2) 느타리, 표고버섯 등에 존재하는 단백질 다당체는 인터페론생성을 촉진시키는 물질의 종양에 대한 생체 고유의 방어력을 높여줌으로써 인터페론의 유도를 활성화시킨다고 보고되었다.

다. 혈중 콜레스테롤 강하 및 체지방감소효과

- (1) 쥐를 이용한 실험에서 표고의 엘리타데닌이 혈중 콜레스테롤과 혈압을 강하시키는 작용이 있음이 보고되었다.
- (2) 느타리버섯의 열수 추출물은 mouse의 체지방을 감소시키는 효과가 있었다.

라. 항바이러스작용

표고의 포자추출물에 인플루엔자 바이러스 저지효과가 있음이 알려져 있다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. 버섯균사체 액체배양물 소재 개발

가. 버섯균주

- (1) PDA 배지에서 버섯균주의 활성화 및 균사생장속도조사: HK바이오텍이 보관중인 표고(*Lentinus edodes*, LE), 상항(*Phellinus linteus*, PL), 신령(*Agaricus blazei*, AB), 느타리(*Pleurotus ostreatus*, PO)균주를 PDA배지상에 접종하여 (접종량: 8 mm i.d. 원형) 25℃의 항온기에서 배양하면서 균사생장 속도를 조사하여 균주를 선발하였다.
- (2) PDA배지상에서 균사생장이 빠른 균주를 선발한 다음, 기본액체배지에서 액체배양하여 고분자 다당체를 다량으로 생성하는 균주를 선발하였다.

나. 버섯균사체배양용 배지조성

(1) 기본 액체배지 (Know-How) 조성:

- (가) 이 배지의 주요 구성분은 농산물이다.
- (나) 농산물을 효소로 처리하여 균사생장촉진물질 및 고순도의 Gluvone의 전구체를 생성하였다.
- (다) KH₂PO₄, MgSO₄ 등을 포함하는 다수의 무기성분을 첨가하였다.

(2) Gluvone 생산을 촉진시키기 위해 기본배지에 추가로 사용될 성분

-탈지 콩, 보리, yeast, 식품첨가용 isoflavone 등

(3) 고순도의 Gluvone 생산을 위한 최적배지조성

상기 기본배지에 여러 가지 전구물질을 첨가하여 최대량의 고순도 Gluvone 소재를 생성하도록 최적배지를 조제하였다.

다. 버섯균의 선발

이들 균주의 선발은 상기 가. (2)의 균주를 나. (1), (2), (3)의 과정에서 개발된 배지에 배양하여 최종적으로 선발하였다.

라. 액체배양조건 확립

(1) 배양조건 확립

(가) 배지조성과 균주는 상기 다. 항에서 선발된 것을 사용하였다.

(2) 최적의 Gluvone 생성조건 구명

(가) 배양 온도: 25℃

(나) 공기공급량: 0, 0.5, 1.0, 1.5v/v/m

(다) 배양기간: 3, 5, 7, 9일

마. 유효성분 분리

(1) Isoflavone

(가) 시료의 추출: 버섯균사체배양물을 균질화 (200 ml, 메탄올), 가열 (5분), 여과를 2회 반복하여 회수한 여액을 40℃에서 진공농축 하였다. 이 농축액에 함유된 지방을 hexane으로 제거한 다음 시료로 사용하였다.

(나) Isoflavone: Isoflavone의 함량은 시료 1 g에 1 N-HCl 3 mL를 가하여 1시간 동안 환류냉각하여 분해한 다음, methanol 15 mL를 첨가하였다. 이 추출액을 냉장고에서 1일 정치 후 상징액을 취해서 membrane filter (0.22 μ m)로 여과한 다음 Franke¹⁾ 등의 방법 μ -LUNA C₁₈ column이 장착 된 HPLC (Young-Lin M-930, Korea)로 genestein과 daidzein을 분석하였다. 이때 사용한 용매는 methanol:1 mM ammonium acetate(6:4, v/v)를 1 ml/min의 flow rate로 분석하며, 255 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) β -D-Glucan

(가) Brix 측정: Brix meter (ATAGO, Japan) 를 이용하여 20℃에서 측정하였다.

(나) Viscosity 측정: Visco meter (Viscobasic+L, Barcelona, Spain)를 이용하여 20℃에서 측정하였다.

(3) 기타 일반성분

일반성분은 식품분석법에 준하여 분석하였다.

바. Gluvone의 생성량 측정

(1) DEAE column chromatography:

제조된 시료 3 ml를 5mM sodium phosphate buffer (pH 7.7)가 충전된

DEAE column (2 cm, 110cm)에 loading 한 후 약 10 ml씩 분획한다. 이때 사용된 mobile phase는 5mM sodium phosphate buffer (5 mM NaH₂PO₄와 5 mM Na₂HPO₄, pH 7.7)이었으며, 총당의 함량은 페놀-황산법으로 470 nm에서 UV흡광도 측정하여 당으로 환산하였다.

(2) TLC:

DEAE column chromatography에 의해 분리된 분획물을 다시 TLC (Silica 60 F-254 plate, 5 × 10 cm)를 사용하여 분리한다. 분획물을 분리하기 위해 test한 여러 가지 혼합용매 중에서 가장 분리가 잘되었다고 판단된 Butanol: Ethanol: H₂O를 5: 3: 3 (v/v/v)을 전개용매로 사용한다. 분리된 밴드가 당 화합물임을 확인하기 위해서 diphenylamine aridine phosphate (DAP)으로 발색시켰으며, UV흡광물질의 존재를 확인하기 위해서는 UV lamp (short wave)조사하였다.

(3) HPLC:

DEAE column chromatography 분획물을 순수 분리하기 위해서 Bio-Sep S2000 column (mobile phase; 20mM sodium phosphate), TSK column (mobile phase; H₂O), C18 column (mobile phase; MeOH: 1mM ammonium acetate 6:4)을 사용한다. Flow rate는 모두 1 ml/min이다. 이때, peak의 detection은 UV 257, 267, 280 nm와 RI detector를 사용하였다.

(4) 정제된 β-D-Glucan의 구성당 조사:

(가) 시료에 Sodium phosphate buffer (20mM, pH 6.5) 5 ml넣고, β-glucosidase (0.2U, 0.1 ml)와 licenase (10U, 0.2 ml)로 분해한 다음, HPLC에서 column (RezoX RCM-Monosaccharise column, 200 × 10 mm)으로 당을 분석하였다.

(나) GC: CuI²⁺ 등의 방법에 준하여 1M H₂SO₄를 사용해 90°C에서 8시간 동안 가수 분해 한 다음, CaCO₃로 중화 하였다. 그 여액을 다시 원심분리하고, 농축시킨 다음 건조하였다. 건조된 시료를 Ac₂O-Pyridine을 이용하여 90°C에서 30분간 acetylation하였다. acetylation 한 후 생성된 alditol acetate는 gas chromatography (model 6890, Agilent Co. Ltd., CA, USA)에 의해 분석 되었고, 이 때 사용한 칼럼은 HP-5 capillary column (25 m × 0.32 mm i.d.)이었으며, helium을 carrier gas로 사용 하였다. 분석조건은 150~240°C에서 행하여 졌고, 온도비율은 분당 2°C/min 이었으며, 최종 온도에서 10 min간 분석하였다.

(5) 분자량 측정:

TSK column이 장착된 HPLC (Dionex사 PDA-100 UV detector와 RI detector, P-680 pump, ASI-100 fraction collector)에서 분자량을 측정한다. 이 때의 mobile phase는 3차 증류수를 사용하며, flow rate은 1 ml/min으로한다. Dextran 표준품과 비교하여 log scale로 계산하였다.

사. 대량생산

(1) 농축기술 개발

(가) 한외여과장치: 적절한 압력을 이용하여, 원액속에 있는 저분자 물질을 UF membrane을 통해서 고분자 물질 및 콜로이드 물질로부터 분리하는 장치이다. 한외여과방식은 다양한 선택적 분리를 수행할 수 있는 반투막과 조절식 압력 활성 장치로서 원액은 지름이 10 Å에서 200 Å내의 구멍으로 이루어진 막을 통하여 흐르게 된다. 따라서 시료에 함유된 β -D-glucan을 분자량에 따라 분리·농축하는데 활용하였다.

(나) 동결농축: 동결농축기술은 용액중의 물을 결정화 (ice화)한 다음, 제거하여 농축하는 기술로 시료를 건조하기 위해 동결건조 방법을 활용하였다.

(2) 정제기술 개발: 반투막과 조절식 압력 활성 장치를 사용함으로써 분자 크기와 분자량이 멤브레인 분화 분자량 이하인 다른 물질은 막을 통과하고 투과물로 나오는 반면에 통과하지 못한 물질은 점차로 원액 흐름속에서 남게되는 기술로써 막의 크기에 따라 분자량 별로 정제가 가능하기에 isoflavone- β -D-glucan을 분리 농축하는데 이용하였다.

(3) 허혈-재관류 및 간기능 보호를 위한 시료 조제: 시료는 Gluvone을 최대한으로 생산할 수 있는 조건에서 배양한 배양물을 자가분해 한 후 여과하여 여액을 얻었다. 여액에 80% ethanol로 처리하여 침전물을 얻고, 이 침전물을 다시 80% ethanol을 3번 처리하여 얻은 침전물 (80% ethanol 침전물: Gluvone 시료 사용)을 시료로 사용하였다. 간보호를 임상실험에 사용한 Gluvone 시료는 안정성을 고려하여 Gluvone을 함유한 LE 배양물을 자가분해하고 여과한 여액을 냉동건조하여 시료 (GLE)로 사용하였다

2. Gluvone 소재의 심근 허혈-재관류 개선 효과

가. 허혈-재관류에 의한 심근경색 유발

Sparague-Dawley 계통의 흰쥐 (220 g~250 g)를 Ketamine (30 mg/kg)과 Xylazine (6 mg/kg)으로 마취 시킨 후 기관지를 절제하여 인공호흡 Catheter를 삽관 하여 Artificial respirator를 통해서 호흡을 유지시킨다. 흉곽을 절개하여 심장을 잘 보이게 한 후상동맥의 Left anterior descending branch (LAD)를 6-0 silk suture로 30분 동안 결찰하여 허혈을 유발시키고, 결찰을 풀어 24시간 동안 재관류를 시켜 심장 허혈 재관류 모델을 만들었다³⁾.

나. 심근경색 정도 정량화 (TTC staining)

재관류 24시간 후에 심장을 절제하여 심실부분을 1mm크기의 Slice를 만든후 1% Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액에 37℃ 에서 10분 동안 Incubation 하여 심근 경색의 크기 (Infarct size)를 측정하였다.

다. 허혈-재관류 모델에서 Lipid peroxidation 측정

Lipid peroxidation 측정은 Yeung⁴의 방법을 통하여 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 생성 정도로 측정한다. 재관류 후에 심근조직을 절제하여 6.5 % trichloroacetic acid (TCA) buffer로 homogenize 하고 reagent buffer (15 % TCA, 0.37 % thiobarbituric acid, 0.25 % HCl)를 첨가하여 잘 혼합한 후 15분간boiling한 다음 식힌 후 2500 x g 에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모아 535 nm에서흡광도를 측정하였다. Malondialdehyde를 standard로 사용하여 TBARS의 생성을 nmol/g wet tissue로 정량하였다.

라. 심근 경색시의 Apoptosis 측정 (TUNEL assay)

허혈-재관류 후에 심장의 대동맥을 통하여 생리식염수를 5분간 관류하여 혈액을 제거하고 4 % paraformaldehyde를 30분 동안 관류 시켜 고정시킨다. 고정된 심근 조직을 paraffin block으로 만들어 Microtome을 이용하여 1mm 두께로 자른 다음 terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) kit를 사용하여 면역조직화학적 염색을 하여 apoptosis 유무를 Confocal microscopy를 통하여 확인하였다.

마. 면역조직화학법

실험 약물 처리 유, 무에 따라 처리한 허혈-재관류 심장조직을 PBS (0.1 M, pH 7.4)로 세척한 후 조직자체의 peroxidase를 제거하기 위해서 과산화수소수가 0.3% 첨가된 methanol에 30분간 처리한 후 0.1 M sodium phosphate buffer (0.1 M PB)에 5분간 3회 수세하고 1차 항체로 40배~80배 희석한 IgG를 4°C에서 overnight 처리한다. 2차 항체는 200 배로 희석한 biotinylated anti-mouse IgG를 실온에서 한 시간 반응시킨 후, peroxidase가 표지된 avidin-biotin complex 용액에서 한 시간 가량 더 반응시킨다. 항체 처리시 각 단계의 수세는 0.1 M PB로 5 분간씩 3 회씩 실시한다. 3,3'-diaminobenzidine으로 발색한 후 hematoxylin으로 대조염색을 하여 현미경으로 조사하였다.

바. 심장세포 (H9C2)에서 Hypoxia-reoxygenation 유도

H₉C₂ cell은 rat 심장에서부터 분리된 myoblast cell line이다. H₉C₂ cell은 10 % fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) 배지에서 72시간 배양한 후 hypoxia-reoxygenation을 유발시킨 그룹과 hypoxia 유발 1시간 전에 Isoquinoline 화합물을 전처리한 후 hypoxia-reoxygenation을 유발시킨 그룹으로 나누어서 실험하였다. Hypoxia 유발은 serum-free media 조건에서 anaerobic chamber를 사용하여 5% CO₂ /95% N₂ gas를 주입하여 6시간동안 hypoxia를 시키고, 12시간 동안 reoxygenation을 시켜서 심장세포의 손상을 유발시킨 후, 심장세포의 hypoxia-reoxygenation에 의한 세포손상은 MTT assay를 시행하여 세포독성을 확인한 다음 TUNEL assay를 시행하여 apoptosis 유무를 확인하고 이어서 HIF-1 α , P53의 acetylation, caspase 활성도를 측정하였다.

사. Gene transfection하여 RT-PCR

심장세포 (H₉C₂)에 HO-1과 HIF-1을 SuperFect transfection reagent (QIAGEN)를 사용하여 transfection한다. HO-1의 발현은 RT-PCR, 또는 Western blot 분석으로 확인한다. Total RNA를 MMLV reverse transcriptase와 dNPT, oligo d(T)를 이용하여 cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA (0.1-0.2 volume)에 HO-1, HIF-1 primer들과 2.5mM dNTP, Taq polymerase (0.3U/ μ l), 10 \times 완충용액을 첨가하여 PCR을 30-35 cycle을 수행한다. PCR 산물을 1.0-1.5% agarose gel에 전기영동하여 증폭된 유전자를 확인하였다.

아. 단백질 추출 및 Western blot

세포로부터 단백질을 추출한다. Bradford법으로 단백질을 정량한 후 10% polyacrylamide gel 전기영동한다. Semi-dry electrotransfer system (1mA/cm²)을 통하여 PVDF membrane에 transfer한다. Membrane을 HO-1 (Santa Cruz), HIF-1 α , NF- κ B, P53 및 GAPDH 등의 항체와 반응시키고, peroxidase-conjugated 이차항체와 반응시킨 후, Enhanced chemiluminescence (ECL)로 발색하였다.

3. Gluvone 소재의 간독성 개선효과

가. Gluvone의 사염화탄소로 유도된 간 독성 개선효과

(1) 실험동물

150-200 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (n=40)에게 AIN-96G semipurified diet를 제공하면서 적응시킨 후 5군으로 나누어 실험에 사용하였다. 동물에게 식이는 ad libitum으로 공급하였고, 사육실의 온도 및 습도는 20~25°C, 50~60%로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다.

(2) 시료 제공 및 간 손상 유발

실험동물은 5군으로 나누어 정상대조군, CCl₄ 투여 대조군, CCl₄ 투여 silymarin군, 사염화탄소 (carbon tetrachloride, CCl₄) 투여 gluvone 소재군 및 gluvone 소재 (-)군으로 나누었다. gluvone 소재군 및 gluvone 소재 (-)군에게는 isoflavone 함유한 gluvone 소재 및 함유하지 않은 gluvone 소재를 750 mg/kg, silymarin군에게는 간 손상 치료제인 silymarin을 200 mg/kg 1일 1회씩 12일간 경구 투여하였다. 또한 정상대조군 및 CCl₄ 투여 대조군에게는 증류수를 1일 1회씩 12일간 경구 투여하였다. 13일째, gluvone 소재 및 gluvone 소재(-)와 silymarin 투여 직후 정상대조군을 제외한 모든 실험군에 사염화탄소 (CCl₄:corn oil=1:1 v/v)를 0.5 mL/kg BW로 복강 주사하여 간독성을 유발하였다. 또한 정상 대조군에게는 동량의 corn oil을 복강 주사하였다. 사염화탄소 투여 후 12시간이 경과한 후, 동물을 12시간 동안 절식시키고, 심장채혈법으로 희생시켰다.

(3) 혈액 분석

혈장 GOT, GPT, ALP 및 LDH 활성을 측정하였으며, 활성은 U/L로 나타내었다. 혈장 bilirubin 농도는 효소법을 이용하여 측정하였다.

(4) 간 조직의 지질과산화물 함량 및 항산화효소계 활성 측정

간 조직의 지질과산화물의 측정은 Ohkawa등⁵⁾의 방법을 이용하여, thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 malondialdehyde (MDA)의 함량을 측정하였고 표준용액으로는 1,1,3,3,-tetramethoxypropane (TMP)을 사용하였다. 간 조직의 total glutathione 농도는 Tieze⁶⁾ 및 Margaret 방법으로 측정하였다. SOD 활성은 알칼리상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund⁷⁾와 Marklund⁸⁾의 방법을 이용하여 측정하였고, 1분 동안 pyrogallol의 자동산화를 50%까지 억제하는데 요구되는 효소의 양을 1 unit로 하였다. Catalase 활성은 Abei법⁹⁾으로 측정하였으며, 효소 활성은 1분 동안 1 μ mole의 기질을 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. Glutathion reductase 활성은 1분당 1 nmole의 NADPH 환원을 촉매하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

(5) 간 조직의 α -tocopherol 농도 측정

간 조직의 α -tocopherol 농도는 HPLC법으로 측정하였다. 간 조직 상층액의 단백질을 ethanol로 제거하고, n-Hexane으로 지방을 추출한 후 rotary evaporator로 hexane을 증발시킨 후, 150 μ l를 취하여 mobile phase (methanol:dichloromethane = 85:15), flow rate는 0.8 ml/min으로 하여 UV/VIS detector를 사용하여 측정하였다.

(6) 조직학적 변화 관찰

간 조직을 10% formalin 용액에 담가 고정시킨 후 파라핀 블록을 만들었다. 파라핀 블록을 잘라 hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학현미경으로 fatty change, gross necrosis 등 병변의 정도를 관찰하였다.

(7) 통계처리

실험의 분석결과는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 표시하였다. 각 군의 평균치의 유의성 검정은 분산분석 (ANOVA)를 사용하여 실시하였고, Tukey's test를 followup test로 사용하였다(p<0.05).

나. Gluvone 소재의 알콜성 간질환 동물모델에 있어서 간 보호 효과

1) 실험동물

150-160 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (n=30)에게 일반 고형사료를 공급하면서 체중이 약 230 g이 될 때까지 사육 환경에 적응시킨 후 5군으로 나누어 실험에 사용하였다. 동물에게 식이는 ad libitum으로 공급하였고, 사육실의 온도 및 습도는 20~25°C, 50~60%로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다.

(2) 시료 제공 및 간 손상 유발

실험동물은 대조군, Pair-fed (PF) 대조군, 에탄올군, gluvone 소재군, silymarin군 (n=6)으로 나누었다. 대조군과 PF 대조군에게는 basal diet를, 에탄올군, gluvone군, silymarin군에게는 Lieber와 Decarli의 알콜 액체식이를 기본으로 한 식이를, 실험식이 1 mL당 1 kcal가 되게 공급하였다 (Table 1). Gluvone 소재군 및 silymarin군은 gluvone 소재 및 간 손상 치료제인 silymarin을 각각 1 g/kg BW, 200 mg/kg BW 수준으로 섭취하도록 알콜 액체식이에 첨가하였다. 에탄올 섭취로 인한 식이섭취량의 차이를 배제하기 위하여 36% 에탄올 급여군 (에탄올군)에게 식이를 자유로이 공급하고, 에탄올군의 식이섭취량만큼 PF 대조군에게 basal diet를 공급하였다. 해당식이를 8주간 섭취시킨 후 동물을 12시간 동안 절식시키고, 심장채혈법으로 희생시켰다.

Table 1. Composition of liquid diet

Ingredient	Basal group (g/L liquid diet)	Ethanol group (g/L liquid diet)
Casein	41.4	41.4
L-cystine	0.5	0.5
DL-metionine	0.3	0.3
Corn oil	8	8
Olive oil	15	15
Xanthan gum	3	3
Choline bitartrate	0.53	0.53
Fiber	10	10
Vitamin mixture	2.55	2.55
Mineral mixture	9	9
Dextrin-maltose	153	64
Ethanol	-	50.4

(3) 간기능 지표 및 혈액과 간조직의 지질함량 분석

혈장 GOT, GPT, ALP 및 LDH 활성을 측정하였으며, 혈장 bilirubin 농도는 효소법을 이용하여 측정하였다. 혈장 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도를 효소법으로 측정하였다. 간조직의 fatty liver 진행도를 조사하기 위하여 총지방을 Floch법을 추출한 후, 콜레스테롤 및 중성지방 농도를 효소법으로 측정하였다. 혈장 ADH 활성은 Bostian 등¹⁰의 방법을 이용하여 측정하였고, 효소 활성은 1분 동안 1 μ mole의 기질을 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

(4) 간 조직의 지질과산화물 함량 및 항산화효소계 활성 측정

간 조직의 지질과산화물의 측정은 Ohkawa 등⁵의 방법을 이용하여, thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 malondialdehyde (MDA)의 함량을 측정하였고 표준용액으로는 1,1,3,3,-tetramethoxypropane (TMP)을 사용하였다. 간 조직의 total glutathione 농도는 Tieze⁶) 및 Margaret 방법으로 측정하였다. 간조직의 total SOD 활성은 Marklund⁷)와 Marklund⁸의 방법을 이용하여 측정하였고, 1분 동안 pyrogallol의 자동산화를 50%까지 억제하는데 요구되는 효소의 양을 1 unit로 하였다. Catalase 활성은 Abei법⁹)으로 측정하였으며, 효소 활성은 1분 동안 1 μ mole의 기질을 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. Glutathione peroxidase 활성은Lawrence¹¹)의 방법을 이용하여 측정하였다.

(5) 간 조직의 CYP2E1 발현 정도 측정

간조직의 microsome을 Peng 등¹²)의 방법에 의해 분리한 후 CYP2E1 발현정도를 western blot으로 측정하였다.

(6) 조직학적 변화 관찰

간 조직을 10% formalin 용액에 담가 고정시킨 후 파라핀 블록을 만들었다. 파라핀 블록을 잘라 hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학현미경으로 fatty change, gross necrosis 등 병변의 정도를 관찰하였다.

(7) 통계처리

실험의 분석결과는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 표시하였다. 각 군의 평균치의 유의성 검정은 분산분석 (ANOVA)를 사용하여 실시하였고, Tukey's test를 followup test로 사용하였다($p < 0.05$).

다. GLE의 알콜 섭취자에 있어서 간 보호 효과

(1) 환자 선별

1일 30 g 이상의 알코올을 섭취하는 20인의 알코올 섭취자를 모집하여, Gluvone 함유 표고버섯균사체 추출물 (GLE) 정제의 간 기능 개선효과를 규명하였다. 실험대상자는 알코올 섭취자 중 다음의 조건을 만족하는 자로 하였다.

(가) 선정기준

- 알코올을 1일 평균 30 g (소주 0.5병 또는 맥주 3잔) 이상을 섭취하며 간질환 관련 약물을 복용하지 않는 자
- 연령: 20-64세
- 체질량지수: 18-30 kg/m²

(나) 제외기준

- 심근경색, 뇌졸중, 위장장애, 당뇨병, 간질환, 암, 선천성질환 등 전문가가 연구에서 제외시켜야 한다고 인정하는 자
- 임신부, 수유부
- 혈액지질 개선, 혈압조절, 간기능 개선 또는 항산화 효과가 기대되는 약물 또는 건강보조식품을 섭취하는 자

(2) 실험디자인

본 연구는 알코올 섭취자 20인을 대상으로 무작위적 (randomization)으로 대조군과 실험군의 두 군으로 나누어 randommized-placebo-controlled study를 실시하였다. 대조군은 유당 정제를, 실험군은 GLE 정제를 아침, 저녁 식사 전 각 1정씩 (174.06 mg GLE 분말/정) 15주간 섭취하도록 하였다. 본 시험에서 제공하는 GLE 정제는 GLE 분말 96.7%, 자당지방산에스테르 0.7%, CI 산화규소 0.7%, 스테아린산마그네슘 0.7%, 히드록시프로필렌메틸셀룰로우스 1.0%, 프로필렌글리콜 0.2%를 함유하고, placebo는 100% 유당으로 제조되었다. GLE 정제와 placebo는 참여기업인 HK바이오텍(주)에서 제공받아 사용하였다. 실험기간 동안 대상자들은 일상적인 식생활과 생활습관을 유지하였다. 실험기간 전, 후에 공복상태의 정맥혈액 및 소변을 채취하여, 실험에 사용하였다.

(3) 신체계측

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

(4) 간기능 지표 및 혈액 지질 profile

간기능을 측정하기 위하여 혈장 glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), γ -glutamyl transferase (γ -GT) 활성을 측정하였다. 혈장 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도를 효소법으로 측정하였다.

(5) 지질과산화물 및 항산화 효소계 활성

혈장의 지질과산화물 함량은 Ohkawa³⁾ 등의 방법을 이용하여 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 malondialdehyde (MDA)의 함량을 측정하였다. 적혈구에서의 산화정도는 Choi 등¹³⁾ 등의 방법을 이용하여 conjugated diene 생성량으로서 산화정도를 측정하였으며, 초기에 비례적으로 생성량이 증가할 때의 양을 단위시간당 흡광도 변화율로써 계산하였다. SOD 활성은 pyrogallol의 자동산화를 억제하는 SOD의 antioxidant capacity를 측정하였다. Catalase 활성은 적혈구를 hydrogen peroxide로 처리한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 측정하여 구하였다. Glutathione 함량은 Ellman¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하여 헤모글로빈 1g 당 μmol 로 나타내었다. Glutathione peroxidase 활성은 t-butylhydroperoxide에 의해 glutathione을 산화시킨 후, 산화된 glutathione이 glutathione reductase와 NADPH의 존재 하에 다시 glutathione으로 환원될 때 감소된 NADPH 농도를 측정하여 구하였다.

(6) 혈장 항산화 비타민 (retinol, α -tocopherols) 및 CRP 측정

Retinol 및 α -tocopherol의 분석은 HPLC에 의해 실시하였다. 혈장 단백질을 ethanol로 제거하고, n-Hexane으로 지방을 추출한 후 rotary evaporator로 hexane을 증발시킨 후, 150 μl 를 취하여 mobile phase (methanol:dichloromethane = 85:15), flow rate는 0.8 ml/min으로 하여 UV/VIS detector를 사용하여 측정하였다. 혈장 C-reactive protein (CRP) 농도는 antihuman CRP mouse monoclonal antibody로 코팅되어진 Pureauto S CRP latex의 응집반응으로 인해 만들어진 면역 복합체를 정량화하는 immunonephelometry 방법으로 측정하였다.

(7) Comet assay 및 소변 8-OHdG 분석

전혈로부터 림프구를 분리한 후, comet assay로 DNA damage 정도를 측정하였다. 24시간 소변을 채취하여 competitive ELISA법으로 8-hydroxyguanine (8-OHdG)을 측정하였다.

(8) 통계처리

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

4. Gluvone 소재의 안전성 연구

가. 단회투여 독성실험 (급성)

- (1) Gluvone 소재 500 mg/kg (15 μ l/30 g), 710 mg/kg (21.3 μ l/30 g), 1,000 mg/kg (30 μ l/30 g), 1,410 mg/kg (42.3 μ l/30 g), 2,000 mg/kg (60 μ l/30 g)의 시료를 각 처리구는 멸균 증류수를 사용하여 stock를 만들어서 희석하여 사용하였고 ICR mouse 암·수 각 각 5마리에 복강투여 (0.2 ml, 1회)하여 시험하였다.
- (2) 측정은 일반증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 부검, 통계학적 분석하였다.

나. 아급성독성시험 (아급성)

- (1) 대조군으로 Saline을 사용하였으며, 저용량 (500 mg/kg=15 μ l/30 g, 1,000 mg/kg=30 μ l/30 g), 고용량 (2,000 mg/kg=60 μ l/30 g)을 ICR mouse 암·수 각 각 10마리에 강제 경구 투여 (0.2ml)하였다. 30일 동안 1주일에 2번 (월, 목)투여하고, 2번 body weight측정 (화, 금)을 측정하고 부검 24시간 전 절식시킨 후 부검하였다.
- (2) 일반증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 사료 섭취량 및 물 섭취량, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 조직병리검사, 장기 적출, 육안적 소견 및 장기중량, 조직병리 검사, 통계학적 분석하였다.

제 2 절 연구결과

1. 버섯균사체 액체배양물 소재 개발

가. 기능성 성분 고함유 버섯균주 선발

- 기능성 성분 (Gluvone)을 고 함유 할 수 있는 균주로 균사체 생장이 우수한 AB (신령버섯)를 최종 균주로 선발하였다.
- Gluvone 생성을 유도하기 위하여 기본액체배지[황백당 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0375%, H_2PO_4 0.0375%]에 Soybean paste를 1.0% 첨가하는 것이 가장 우수하였다.
- AB (신령버섯)을 이용하여 기능성 성분 (Gluvone)을 고 함유 할 수 있는 최적 배양 조건은 Brix가 높고, 균사생장이 활발하고 잡균의 오염이 적게 발생하는 25℃에서 5일간, 통기량은 1.5 v/v/m 항온 배양하는 것이었다.
- 간 보호 임상실험에는 표고버섯(LE)균을 사용하였다.

(1). PDA 배지에서의 버섯균주의 선발

(가) 버섯균주의 배양

연구에 사용한 버섯균주는 Table 2에서와 같이 4종을 사용하였다.

Table 2. Mushroom strains used

연번	일 반 명	학 명
1	표고	<i>Lentinus edodes (LE)</i>
2	상황	<i>Phellinus linteus (PL)</i>
3	신령	<i>Agaricus blazei (AB)</i>
4	느타리	<i>Pleurotus ostreatus (PO)</i>

(나) PDA 배지에서의 버섯균주의 활성화 및 균사생장 조사

버섯균주 (Table 2)를 지름 8 mm 크기로 잘라 제조한 PDA배지의 중앙에

올려놓고 24°C low temperature incubator에서 14일간 성장시키면서 균사생장 속도를 관찰하였다 (Table 3). AB (89.0 mm), PO (89.0 mm)는 생장이 빨랐으나, LE와 PL은 각각 65.2 mm와 55.5 mm로 성장속도가 아주 느렸다.

Table 3. Growth of mushroom mycelia(mm) on PDA media

Mushroom Strains ¹⁾	Incubation (Day)			
	3	7	10	14
AB	11.0±0.5 ²⁾	42.1±2.0	60.5±4.7	89.0 ³⁾ ±0.0
PO	10.0±1.0	46.6±3.2	59.4±3.4	89.0 ³⁾ ±0.0
LE	11.2±0.5	23.1±1.2	43.9±1.4	65.2±1.3
PL	11.2±0.5	15.2±1.2	33.6±2.4	55.5±3.5

¹⁾ AB, *Agaricus Blazei*; PO, *Pleurotus ostreatus*; LE, *Lentinus edodes*; PL, *Phellinus linteus*.

²⁾ Average±S.D. of triplication.

³⁾ The plate was fully covered by mycelia.

(2) 액체 배지에서의 버섯균주의 선발

(가) 액체배지의 조제

황백당 1.2%, MgSO₄·7H₂O 0.0375%, KH₂PO₄ 0.0375%가 첨가된 액체배지를 기본배지로 하였다.

(나) 버섯균사체 액체배양

기본배지 300 ml을 500 ml 용량의 삼각플라스크에 첨가하고 고압멸균 (121°C, 30 min)한 다음, 실온에서 충분히 식힌 후 PDA배지에서 생육한 버섯균주 (1/4 petri dish/△flask)를 지름 5 mm이하로 잘게 잘라 접종하고 shaking incubator (120 rpm, 25°C)에서 배양하였다

(다) 액체배지에서의 버섯균주의 활성화 및 균사생장 조사

버섯균을 14일간 배양하면서 3, 7, 10, 14일에 채취한 배양액 100 ml을 원심분리 (5000 rpm, 4°C)하여 균사체를 회수한 다음, 무게를 측정하였다 (Table 4). 균사생장이 가장 양호한 것은 AB였다. 배양액 (7일 배양)의 다당체인 β-glucan의 함량은 AB처리 (69.1 mg/100 ml)에서 가장

높았으며, 그 다음으로 PO와 LE가 각각 59.6 mg/100 ml, 45.6 mg/100 ml으로 AB보다 낮았다 (Table 5). 균사체와 다당체의 함량이 높은 배양물이 Brix와 viscosity도 높았다.

Table 4. Dry weight of mushroom mycelia (g/100 ml) in the submerged liquid culture incubated at 25°C for various incubation time

Mushroom Strains ¹⁾	Incubation (Day)	
	7	14
AB	6.8±1.2	20.2±2.4
PO	5.4±0,2	17.9±2.3
LE	3.7±1.1	4.2±1.0
PL	2.0±1.1	2.5±0.5

¹⁾ AB, *Agaricus Blazei*; PO, *Pleurotus ostreatus*; LE, *Lentinus edodes*; PL, *Phellinus linteus*.

²⁾ Average±S.D. of triplication.

Table 5. Production of the polysaccharide by the mushroom mycelia in the submerged liquid culture incubated at 25°C for 7 days

Mushroom ¹⁾	Mycelia (g/100 ml)	Brix ²⁾	Viscosity ³⁾ (sec)
AB ¹⁾	6.8±1.2	4.5	22.6
PO	5.4±0,2	4.1	20.6
LE	3.7±1.1	3.5	15.9
PL	2.0±1.1	3.1	11.2

¹⁾ AB, *Agaricus Blazei*; PO, *Pleurotus ostreatus*; LE, *Lentinus edodes*; PL, *Phellinus linteus*.

²⁾ Brix of culture solution was measured with Brix meter.

³⁾ Viscosity of culture solution was measured at 20°C with Ostwald viscometer.

나. 배양 및 반응 조건 구명

(1) 최적 배지조성 개발

(가) 최적 배지조성 개발

- ① 사용균주 : 신령버섯균 (*Agaricus Blazei* AB, 상기에서 선발)
- ② 기본 액체배지: 황백당 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0375%, KH_2PO_4 0.03750%가 첨가된 액체배지
- ③ 기타 성분: 대두박, 효모, 식품 isoflavone
 - 대두박, 효모 (과쇄) 및 식품용 isoflavone을 앞서 언급한 삼각플라스크 배양법으로 대두박에 함유된 isoflavone과 동일한 isoflavone의 함량이 되도록 효모, 식품 isoflavone을 첨가하여 25C에서 7일간 배양하고, 열수 추출한 다음 Brix를 측정하였다 (Table 6). 대두박을 첨가하였을 경우 Brix가 4.1로 가장 높았다. 즉, 대두박은 4.1, 효모는 3.2, 식품용 isoflavone은 2.0이 었다. 효모의 경우 버섯균사체의 배양 속도가 아주 늦었고, 식품용 isoflavone을 사용한 경우 질소원 등의 영양소가 부족하여 생육이 낮았다.
 - 식품용 isoflavone은 질소원을 보충할 경우 좋은 원료가 될 수 있지만, 본 연구에서는 좋은 재료가 되지 못하였다.

Table 6. Effect of isoflavone sources for the production of the polysaccharide by the mushroom mycelia in the submerged liquid culture incubated at 25°C for 7 days

Isoflavone source	Brix ¹⁾
Soybean cake powder	4.1±0.8
Yeast (powder)	3.2±0.5
Isoflavone (Food grade)	2.0±0.3

¹⁾ Brix of culture solution was measured with Brix meter.

(2) 배양 조건 영향

- 상기에 기술한 최적으로 조성된 액체배지를 이용하여 10, 20, 25, 30, 37°C로 조정된 배양실에서 균사체를 3, 5, 7, 9일간 배양시켜 배양 추출물의 Brix를 측정하였다 (Figure 2). 25°C와 30°C에서 5일간 배양하였을 때 Brix가 다른 온도에서 배양한 경우보다 다소 양호하였지만 큰 차이는 없었다. 그러나, 30°C에서는 세균의 생육이 활발해 지므로 잡균오염의 확률이 높고, 균사 성장량은 25°C에 비해 크게 차이가 없었으므로 균사생장이 활발하고 잡균의 오염이 적게 발생하는 25°C에서 5일간 배양하는 것을 최적배양조건으로 선택하였다. 이때 통기량은 1.5 v/v/m로 조절하였다.

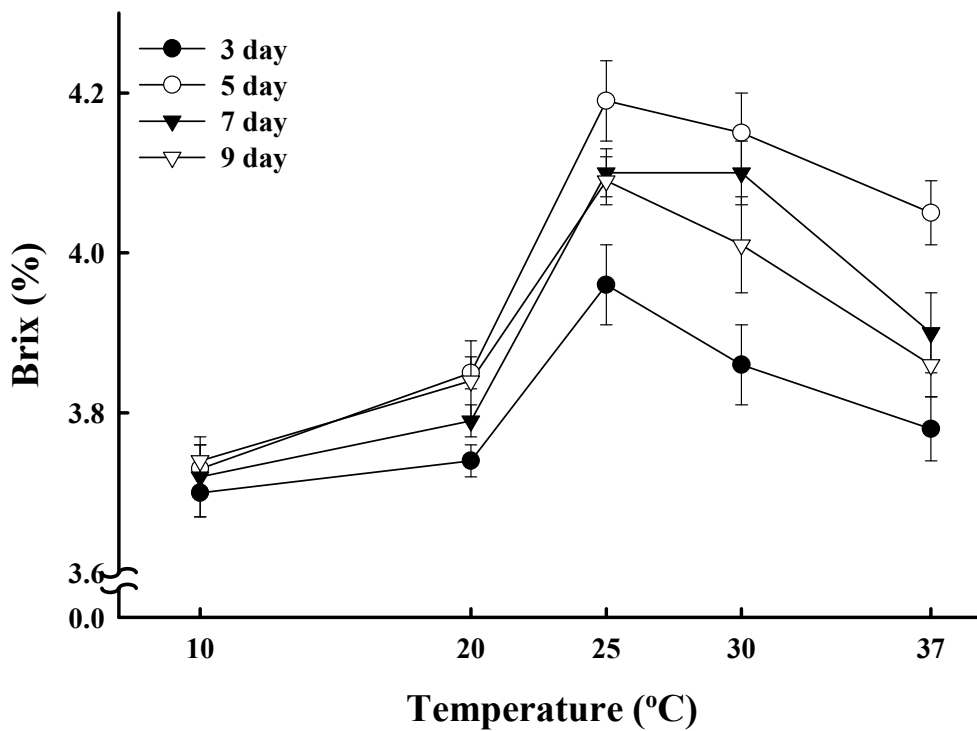


Figure 2. Brix of the submerged liquid culture of AB mycelia cultured at different incubation temperatures and days.

다. Gluvone이 함유된 신령버섯균사체배양물 대량배양

- [AB + isoflavone 배양물] 건조물 4 kg (3 톤 배양액) 제조
- [AB - isoflavone 배양물] 건조물 4 Kg (3 톤 배양액) 제조

(1) 시료의 종류:

- Isoflavone이 함유된 신령버섯액체배양물 [AB + isoflavone 배양물]
- Isoflavone이 함유되지 않은 신령버섯액체배양물 [AB - isoflavone 배양물]

(2) 버섯균사체 액체배양을 위한 시료제조 :

(가) 대두박 시료: 대두박을 원 시료로 사용하여 [AB + isoflavone 배양물] 제조 원료로 사용

(나) 대두박으로부터 isoflavone 제거: 대두박으로부터 isoflavone을 Figure 3과 같은 방법으로 isoflavone을 제거하고 [AB - isoflavone 배양물] 제조 원료로 사용

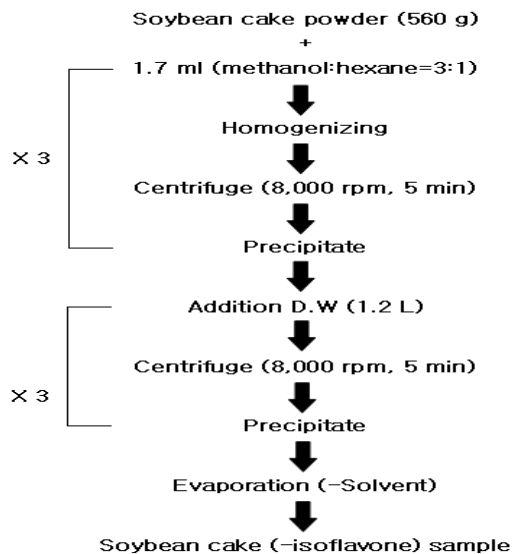


Figure 3. Deisoflavone processes from soybean cake powder.

(다) 대두박에 함유된 isoflavone 함량:

- Isoflavone의 함량은 total isoflavone 함량으로 계산하였다.

(3) 신령버섯균사체 액체 배양물의 대량배양:

(가) 대량배양:

- 제1세부과제에서 연구한 조건으로 5 L 용량의 배양조에서 AB를 배양하여 seed로 하고 이것을 50 L 배양조, 1 kl 배양조, 5.0 kl 용량의 대량배양조로 scale up 하면서 배양하였다
- 배양조는 진주 Bio21센터에 구축한 배양조를 사용하였다.
- 최종 5 kl 배양조에서 4일 간 배양 (120 rpm, 25℃, 0.2 v/v/m) 배양하여 3.5 kl의 배양물을 얻었다.



Figure 4. Feature of fermenter (5 kl) for the production of submerged-liquid culture of *Agaricus blazei*.

- (나) 자가분해: 자가분해는 β -glucan을 분해하여 분자량이 작은 β -glucan을 생산할 목적으로 제1세부과제에서 확인한 방법을 사용하였다 (즉, 53℃, pH 5.5의 배양조건에서 3시간 반응).

(다) 진공농축 및 동결건조

○ 열수추출물 제조 및 농축물 제조:

- 배양기내에서 온도를 100℃에서 3시간 반응시켜 생균을 사멸하고, 유효성분을 용출하였다.
- 용출액을 0.22 μm microfilter가 50장 장착된 진동박막여과 장치로 순환 정제하여 버섯균사 여과고형물 (100 L)과 버섯균사체배양 추출물 (3.4 kl)을 분리하였다.
- 열수추출에 의하여 유효활성물질인 Gluvone이 균사체에서 용액으로 용출되어 나오고 이것을 정제하기 위하여 균사체와 추출액을 분리하여 Brix 40이 되도록 농축하였다 (Figure 5).

○ 동결건조물제조:

- 상기에서 얻은 농축물을 동결건조하여 건조물을 얻었다 (Figure 6).
- [AB + isoflavone 배양물] 건조물 4 kg (3 톤 배양액)과 [AB - isoflavone 배양물] 건조물 4 Kg (3 톤 배양액) 제조함



Figure 5. A concentrate (Brxis 40) of hot-water extract from the submerged-liquid culture by *Agaricus blazei*.



Figure 6. Spray-dried hot-water extract from the submerged-liquid culture by *Agaricus blazei*.

(라) 허혈-재관류 및 간보호 연구를 위한 시료 조제:

시료는 Gluvone을 최대한 생산할 수 있는 조건에서 배양한 배양물을 자가분해 한 후 여과하여 여액을 얻었다 (Figure 7). 여액에 80% ethanol로 처리하여 침전물을 얻고, 이 침전물을 다시 80% ethanol을 3번 처리하여 얻은 침전물 (80% ethanol 침전물: Gluvone 시료 사용)을 시료로 사용하였다. 간보호를 임상실험에 사용한 Gluvone 시료는 안정성을 고려하여 Gluvone을 함유한 LE 배양물을 자가분해하고 여과한 여액을 냉동건조하여 시료 (GLE)로 사용하였다

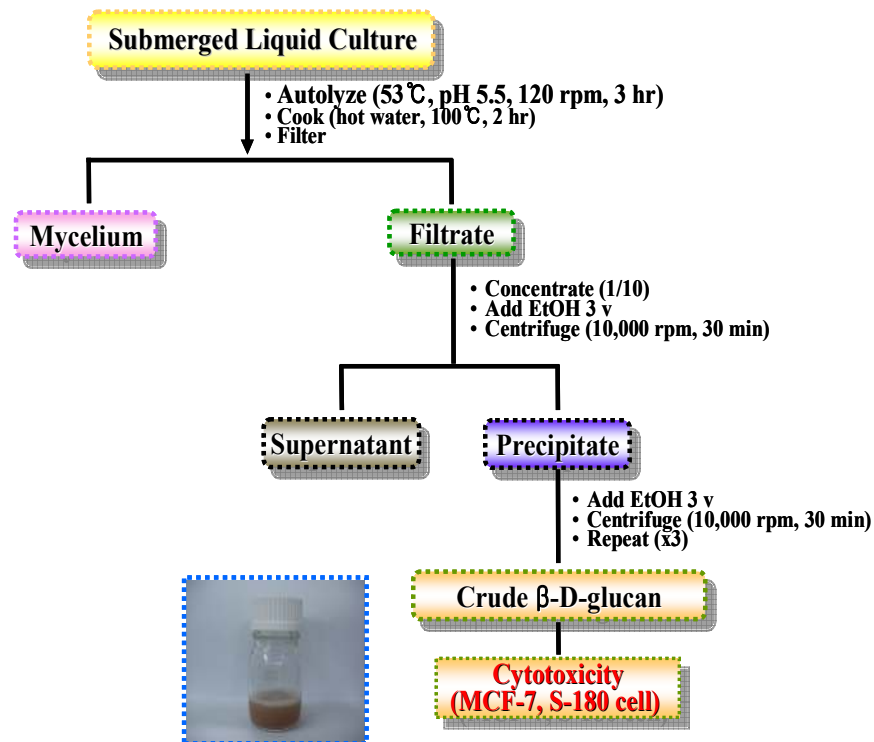


Figure 7. Schematic flow chart for the preparation of samples and Gluvone from the submerged-liquid cultures of *Agaricus blazei* by means of autolysis.

라. Glucone이 함유된 신령버섯균사체액체배양물의 유효성분 및 구조분석

- Molecular weight: 9,4000 Da
- Total carbohydrate 76.6%, total protein 19.6%, total isoflavone 2.1%, others 1.7%
- Monosaccharide: glucose 51%, fructose 47%, ribose 2%
- Isoflavone: daidzin 18.9%, genistin 24.4%, daidzein 37.4%, genistein 19.3%

(1) 신령버섯 배양추출물 및 분획물 조제

(가) 신령버섯 자가분해효소의 최적 활성화 조건 구명

- 시료: 협동과제에서 제공한 신령버섯균사체 액체배양물 원액을 사용하였다 (균사체가 포함되어 있음).
- 자가분해는 거대한 β -Glucan의 분자를 중·저분자로 분해며, 이들 중·저분자는 다양한 생리활성을 갖는다 (즉, 항염증반응, 항산화반응, 면역 활성화반응 등). 따라서 분자가 적을수록 생체 bioavailability가 높기 때문에, 여기서는 자가분해방법으로 배양물의 viscosity를 가장 낮출 수 있는 조건을 연구하였다.
- 신령버섯 균사체 배양물을 53°C와 63°C의 incubator에서 pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5의 다양한 조건으로 1, 3, 5, 15, 24시간 동안 반응시킨 다음 점도변화를 측정하여 자가분해효소 활성을 측정하였다 (Table 7).
- Table 7에서처럼 53°C, pH 5.5의 배양조건에서 3시간 반응 시의 시간당 자가분해 활성이 $\Delta vis/hr$ 5,780 ml/sec로 가장 높게 나타났으며 이후로 활성이 감소하였다.

Table 7. Viscosity changes of the submerged-liquid cultures of *Agaricus blazei* by means of autolysis.

Submerged liquid culture from ¹⁾	React-ion time (hr)	Temp pH	53°C				63°C			
			4.5	5.5	6.5	7.5	4.5	5.5	6.5	7.5
AB	1	2,500 ²⁾	1,900	1,600	3,250	1,500	3,000	1,050	3,100	
	3	3,416	5,780	3,700	3,483	3,666	3,883	1,100	1,083	
	5	2,810	3,440	2,660	2,510	3,440	3,440	3,000	2,790	
	15	1,140	1,156	1,176	1,096	1,146	1,156	1,160	1,183	
	24	712	716	741	756	718	713	731	750	

* viscosity: Δ vis/hr.

¹⁾ AB, *Agaricus blazei*.

²⁾ Average of three experimental data and SD did not exceed 10% of Average.

(나) Gluvone 분획물 (crude- β -D-glucan) 조제

- 시료: 협동연구과제에서 제공한 [AB + isoflavone 배양물] 및 [AB - isoflavone 배양물] 사용하였다.
- 분획물 제조방법:
 - Figure 7에 준하여 버섯균사체 배양물을 열수추출 한 다음, 규조토 여과한 여액을 진공농축 (10배)한 시료 200 g에 80% ethanol 용액이 되도록 3배의 ethanol을 첨가하고 shaking 한 다음, 4°C에서 24시간 동안 방치하여 침전시켰다¹⁵⁾.
 - 침전물과 상등액을 분리하기 위하여 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 제거한 다음, 침전물을 분리하였다.

(2) 분획물로부터 유효성분 분리 및 분석

(가) Sephadex G-75 column chromatography 의한 Gluvone의 분자량 확인

- Figure 7의 방법에 따라 얻어진 Gluvone 분획물 3 ml를 1% NaCl이 충전된 SephadexTM G-75 column (5 cm \times 100 cm)에 loading 한 후 310 drop (10 ml)씩 50개의 fraction을 collection하였다.
- 이때 사용된 mobile phase는 1% NaCl 이었으며, 각 fraction의 UV 흡광도 (280 nm)를 측정하였다. 분자량이 각각 다른 3개의 fraction (fraction #1, #2, #3)을 얻었다. Fraction #1이 가장 높은 흡광도를

나타내었고, 항산화성, 항암성 등을 검증하였을 때, fraction 1이 가장 우수한 활성을 나타내었다 (Figure 8).

○ **Fraction 1을 Gluvone이라 명명하였다.**

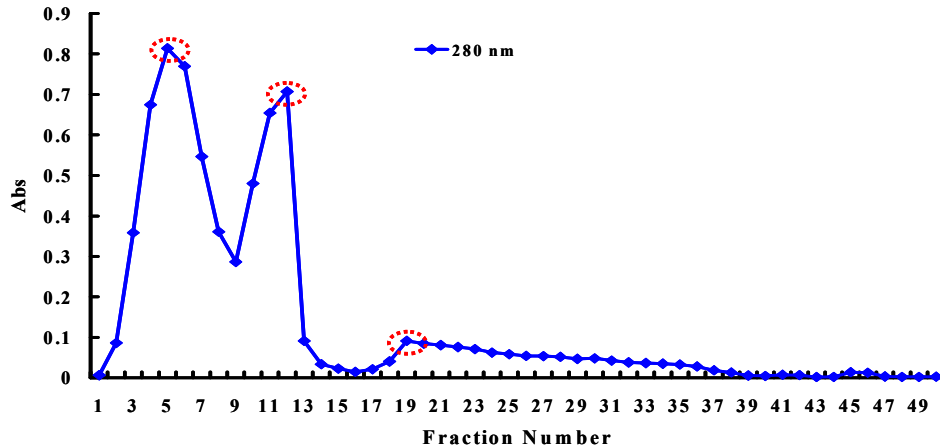


Figure 8. Fractionation of the crude- β -D-glucan from the submerged-liquid cultures of *Agaricus blazei* Murill, which was autolyzed at 53°C (pH 5.5) for 3 hrs by Sephadex G-75 column chromatography. The volume of each fraction was 10 ml.

(나) Gluvone의 구성 성분 분석

① 화학성분 조성

- Table 8는 Gluvone의 중요한 몇가지 화학성분 조성을 나타낸 것이다.
- Gluvone의 총 고형분 함량은 98.3% 였고, carbohydrates 76.6%, protein 19.6%, isoflavone 2.1%, 기타 1.7% 였다.
- **Gluvone은 isoflavone이 conjugation 된 glycoprotein이었다.**

Table 8. Composition of some chemical compounds in Gluvone¹⁾.

Crude Carbohydrate	Total solid (%) ²⁾			Others (%)
	Crude Protein	Isoflavone	Total	
76.6	19.6	2.1	98.3	1.7

¹⁾ Gluvone were isolated from crude- β -D-glucan (after autolysis solution) by SephadexTM G-75 column. The percentage is based on the dry weight.

²⁾ Average of three experimental data and SD did not exceed 10% of Average.

② 구성당 조성 및 결합 bond 결정

○ HPLC에 의한 분석:

- Gluvone 시료 10mg을 가수분해 (10 ml 6N-HCl, 6시간) 한 다음 10 ml의 6N-NaOH로 중화한 후 단당류의 조성을 HPLC [Dionex HPLC, Rezex RCM-Monosaccharide column (200 × 10 mm), Column temp.: 75°C, Bobile phase: Deionized water, Detector: RI, Flow rate: 0.6 ml/min]로 분석하였다¹⁶⁾.
- Gluvone의 구성당을 standard 물질의 retention time과 비교하여 본 결과 glucose, fructose와 ribose의 주요 성분임을 확인 할 수 있었다 (Figure 9).

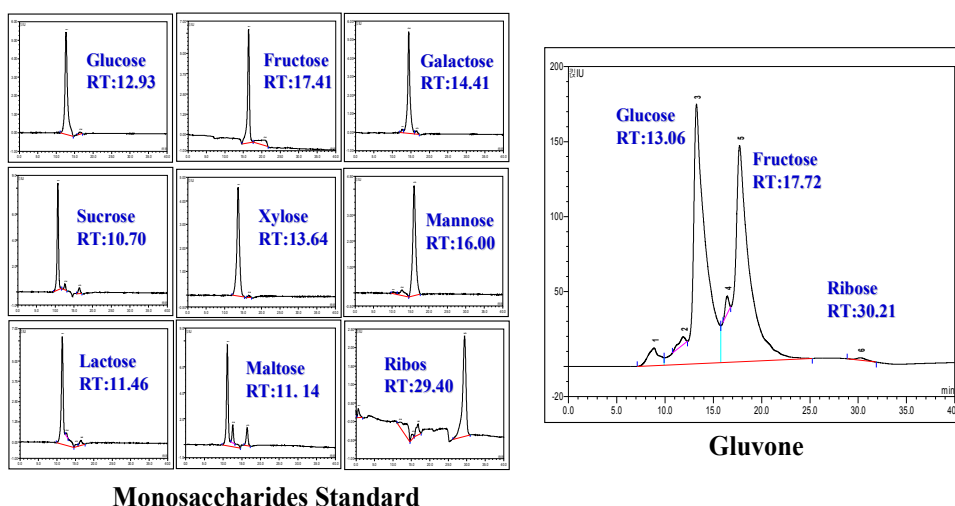


Figure 9. HPLC chromatogram of monosaccharides in Gluvone.

○ GC에 의한 분석:

- 또한, 1M H₂SO₄를 사용하여 90°C에서 8시간 동안 가수분해 한 다음, CaCO₃로 중화하였고, 그 여액을 다시 원심분리하고, 농축시킨 다음 건조하였다. 건조된 시료를 Ac₂O-Pyridine을 이용하여 90°C에서 30분간 acetylation하였다. Acetylation 한 후 생성된 alditol acetate는 gas chromatography (model 6890, Agilent Co. Ltd., CA, USA)에 의해 분석 되었고, 이 때 사용한 칼럼은 HP-5 capillary column (25 m×0.32 mm i.d.)이었으며, helium을 carrier gas로 사용하였다¹⁷⁾. 분석조건은 150~240°C에서 행하여 졌고, 온도비율은 분당 2°C/min 이었으며, 최종 온도에서 10 min간 분석하였다 (Figure 10).

- GC를 이용하여 standard 물질의 retention time과 비교하여 Gluvone의 주요 구성당을 재확인한 결과 Figure 9에서와 같이 glucose, fructose와 ribose의 주요 성분임을 재확인 할 수 있었으며, Figure 10의 standard peak이 각각 두 개씩에서 나오는 것을 볼 수 있었는데 이것은 당의 이성체인 것으로 예상할 수 있었다.

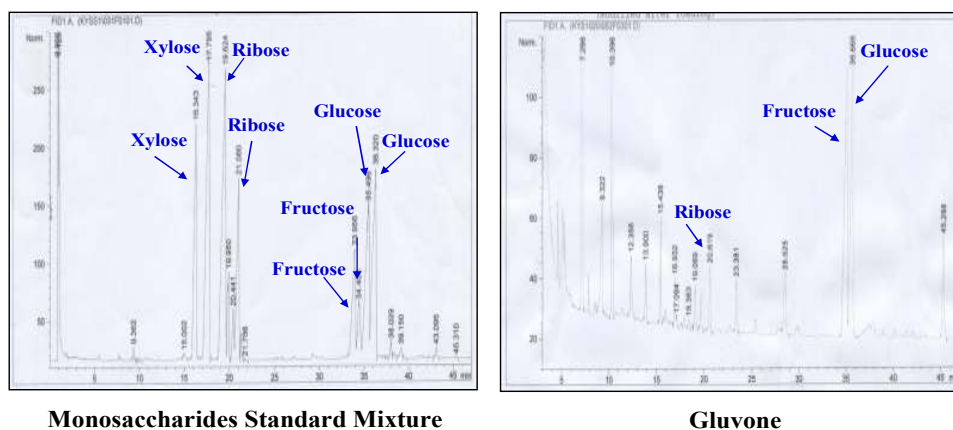


Figure 10. GC chromatogram of monosaccharides in Gluvone.

- Table 9은 Gluvone에 존재하는 glucose, fructose와 ribose의 구성비를 나타낸 결과로 HPLC와 GC를 통해 확인한 바와 같이 glucose 51%, fructose 47%, ribose 2%로 나타났다.

Table 9. Composition of monosaccharides in Gluvone

Monosaccharides ¹⁾	Composition (%) ²⁾
Glucose	51
Fructose	47
Ribose	2
계	100

¹⁾ Used Phenol-H₂SO₄ method and analysis by HPLC and GC.

²⁾ Average of experimental data.

③ 아미노산 조성

- Gluvone 시료 4mg을 6N-HCl 1ml를 가한 다음 N₂ gas를 충전 시킨 후 신속하게 밀봉하여 110°C 오븐에서 24시간 가수분해 시킨 뒤 냉각한 후 탈이온수 (DDW) 3 ml을 첨가한 다음 HCl을 감압으로 제거 (3회

반복 세척)한 다음 건조시키고, 이 시료를 0.3 M lithium hydroxide (pH 2.2)에 용해하고 여과한 다음, 5 ml로 정용한 뒤 0.22 μ m membrane filter로 여과하였다

- 이 여액을 아미노산 분석기 [Hisashia Hirano, Column: Ultrapac 11 cation exchange resin (6 mm \times 200 mm), Buffer flow: 45 ml/hr, Ninhydrin flow: 35 ml/hr, Column temp.: 50~80°C, Buffer step: 4 step, Reaction bath temp.: 130°C, Buffer pH range: 3.2~10.0, Injection volumn: 40 μ l]로 분석하였다.
- 이 결과를 Table 10에 나타내었다. Gluvone의 아미노산 조성은 Asx, Thr, Ser, Glx, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Iso, Leu, Try, Phe, His, Lys와 Arg으로 나타났으며, 이들의 함량은 각각 21.9, 5.7, 4.9, 12.5, 3.6, 7.2, 5.7, 0.9, 3.8, 1.0, 2.8, 4.7, 0.9, 7.8, 4.9, 7.8, 3.9 %로 나타내 특징적으로 함량이 높은 아미노산은 없었다.

Table 10. Composition of amino acid composition in Gluvone

Amino acid ¹⁾	Composition (%) ²⁾
Aspartic acid	21.9
Threonine	5.7
Serine	4.9
Glutamin acid	12.5
Proline	3.6
Glycine	7.2
Alalnine	5.7
Cysteine	0.9
Valine	3.8
Methionine	1.0
Isoleucine	2.8
Leucine	4.7
Tyrosine	0.9
Phenylalanine	7.8
Histidine	4.9
Lysine	7.8
Arginine	3.9
Total	100

¹⁾ Sample was hydrolyzed by HCl solution and analyzed by Auto Amino Acid Analyzer.

²⁾ Average of experimental data.

④ Isoflavone 조성

- Gluvone 시료 10 mg을 가수분해 (10 ml 6N-HCl, 6시간)한 다음 10 ml의 6N-NaOH로 중화한 후 MeOH로 추출한 후 HPLC [Young-Lin M-930, Column: μ -Bondapak C18 (3.9 × 30 cm), Column temp.: 25°C, Mobile phase: 0.1% Ammonium acetic acid:MeOH gradient (2:8 → 8:2), Detector: UV 254nm, Flow rate: 1 ml/min]를 사용하여 Gluvone의 isoflavone 조성을 분석하였다 (Figure 11).
- 표준물질로는 Daidzin, genistin, daidzein, genistein을 이용하였다.
- 표준품인 daidzin과 genistin은 당이 하나 붙어있는 배당체로 retention time이 각각 9.55와 12.66으로 나타났고, 당이 붙지 않은 daidzein, genistein의 retention time은 각각 18.23, 22.27로 나타났으며, Gluvone의 경우 retention time이 9.55, 12.60으로 나타나 daidzin, genistin과 같이 당이 한 분자 붙어있는 배당체와 당이 붙지 않은 daidzein (retention time: 18.08), genistein (retention time: 22.07)으로 구성되어 있음을 확인 하였고 TLC상에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었다.
- Isoflavone의 조성을 살펴본 결과 daidzin, genistin, daidzein, genistein은 각각 18.9, 24.4, 37.4, 19.3 %로 나타났다 (Table 11).

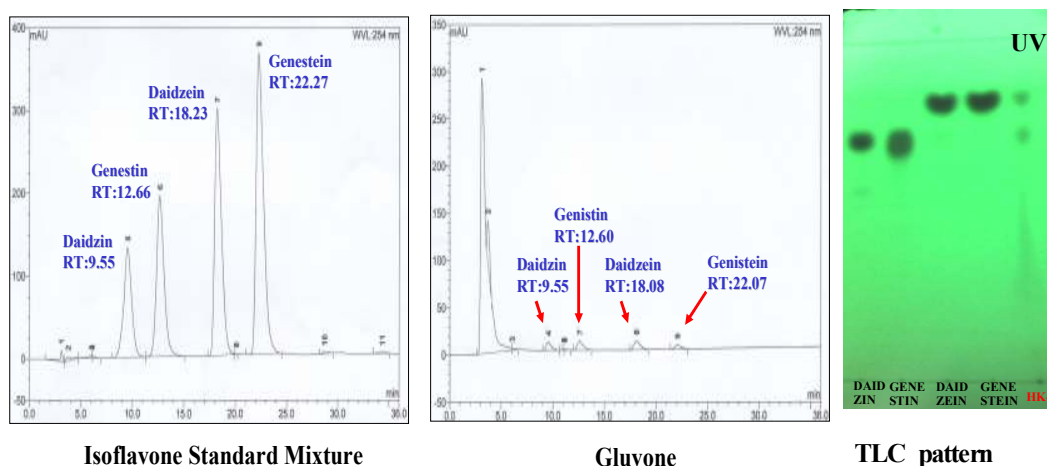


Figure 11. HPLC and TLC chromatogram of isoflavones in Gluvone.

Table 11. Composition of isoflavones in Gluvone

Isoflavones ¹⁾	Composition (%) ²⁾
Daidzin	18.9
Genistin	24.4
Daidzein	37.4
Genistein	19.3
Total	100

¹⁾ Isoflavones were isolated from Gluvone by C₁₈ column.

²⁾ Average of experimental data.

⑤ 분자량 및 구조 분석

- Gluvone 시료를 TSK column (7.8 × 30 cm)이 장착된 Dionex HPLC (P-680 pump, Column temp.: 25°C, Mobile phase: Deionized water, Detector: RI, Flow rate: 1 ml/min)로 분석하였다.
- Standard 물질로는 dextran 5,000, 12,000, 25,000, maltoheptaose, maltotriose를 이용하여 log scale로 계산하였다.
- 분자량 분석 결과를 Figure 12에 나타내었다. Dextran 25,000은 retention time이 8.53, dextran 12,000은 8.87, dextran 5,000은 9.83, maltotriose는 9.98로 나타났다. Gluvone의 retention time은 9.09로 나타나 표준품들의 분자량과 비교하여 log값으로 환산한 결과 Gluvone의 분자량이 약 9,400인 것을 확인 할 수 있었다.
- Gluvone의 분자량은 자가분해 조건에 따라 다소 차이는 났지만 이번 연구에서 사용하고 있는 Gluvone은 분자량이 9,400 ± 500이었다.

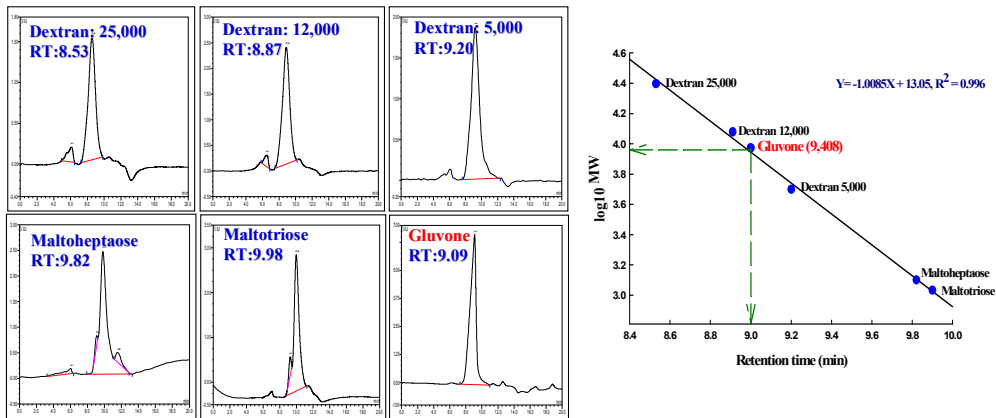


Figure 12. Molecular weight of Gluvone from HPLC run.

마. 허혈-재관류 및 간보호 동물실험에 사용한 Gluvone 시료의 화학적 조성

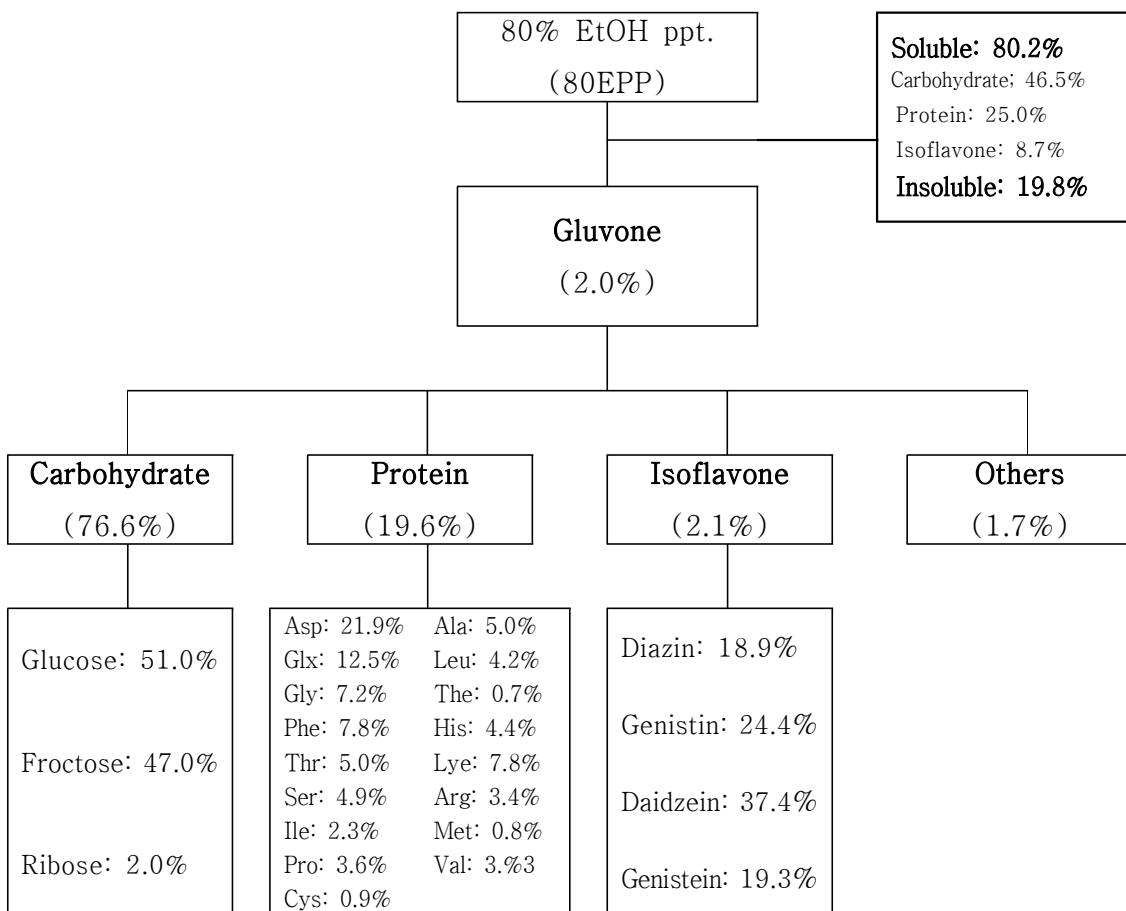


Figure 13 . Composition of some chemical compounds in Gluvone sample.

2. Gluvone 소재의 심근허혈-재관류에 미치는 영향

- Gluvone 소재와 Daidzein은 각각은 심근손상에 대해 억제하는 효과가 있었고, 항산화 효과로 인한 항염 작용, 특히 NF-kB translocation 억제와 염증성 cytokine 억제가 심근경색으로 인한 손상을 억제하여 심근기능의 회복이 있었다.

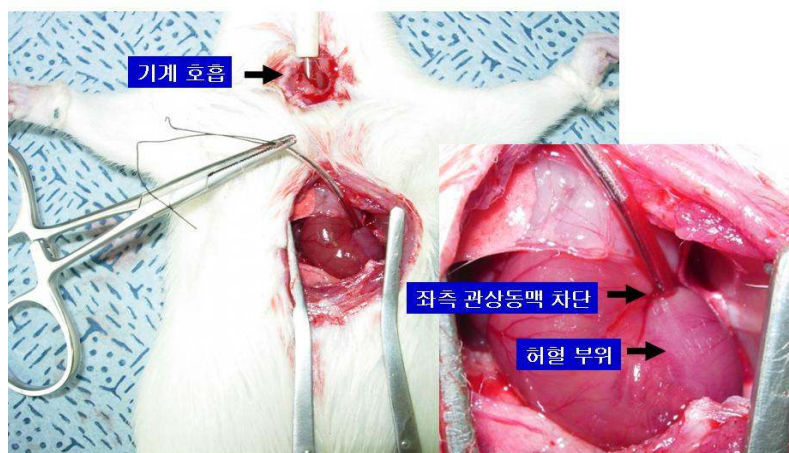
가. 허혈-재관류에 의한 심근경색 유발

Gluvone 소재 시료는 허혈-재관류 손상에 의한 심근 기능을 회복시키는 효과가 있었다.

(1) Sparague-Dawley 계통의 흰쥐의 허혈-재관류에 의한 심근경색 유발

Sparague-Dawley 계통의 흰쥐 (220 g~250 g)를 Ketamine (30 mg/kg)과 Xylazine (6 mg/kg)으로 마취 시킨 후 기관지를 절제하여 인공호흡 Cathether를 삽관 하여 Artificial respirator를 통해서 호흡을 유지시켰다. 흉곽을 절개하여 심장을 잘 보이게 한 후 상동맥의 Left anterior desending branch (LAD)를 6-0 silk suture로 30분 동안 관찰하여 허혈을 유발시키고, 결찰을 풀어 24시간 동안 재관류를 시켜 심장 허혈 재관류 모델을 만들었다¹³⁾.

흰쥐 심장 허혈-재관류 수술



심근 허혈 25 분/재관류 24 시간

Figure 14. 허혈-재관류 연구를 위한 동물모델.

Figure 14는 흰쥐를 사용하여 허혈-재관류 손상에 의한 심근경색 동물 모델을 제작하는 과정이다. 제일 위쪽에 기계호흡이라 표시한 부분은 기관지를 절개한 후 인공적으로 기계에 의해 호흡을 유도 하는 것이고 오른쪽에 심장 부위를 확대하여 보면 좌측관상동맥을 주사바늘 (6-0 SILK사용)로 떠서 고리를 만들어 30분간 죄임으로 피가 통하지 않게 하고 (허혈) 이어서 고리를 풀어주면 (재관류)에 의한 심장 손상을 받게 된다.

(2) 손상억제 확인 (심근허혈 조직 검사)

Figard의¹³⁾ 방법에 의거하여 실험 시 Figure 15에서 보이는 바와 같이 심근경색이 약 60%정도 나타남을 알 수 있다. Figure 15는 Daidzein을 허혈-재관류 1시간 전에 투여 시 심근경색정도가 줄어드는 것을 보인 것이다. Daidzein 투여에 의해 심근경색이 20% 정도 감소함을 알 수 있었다.

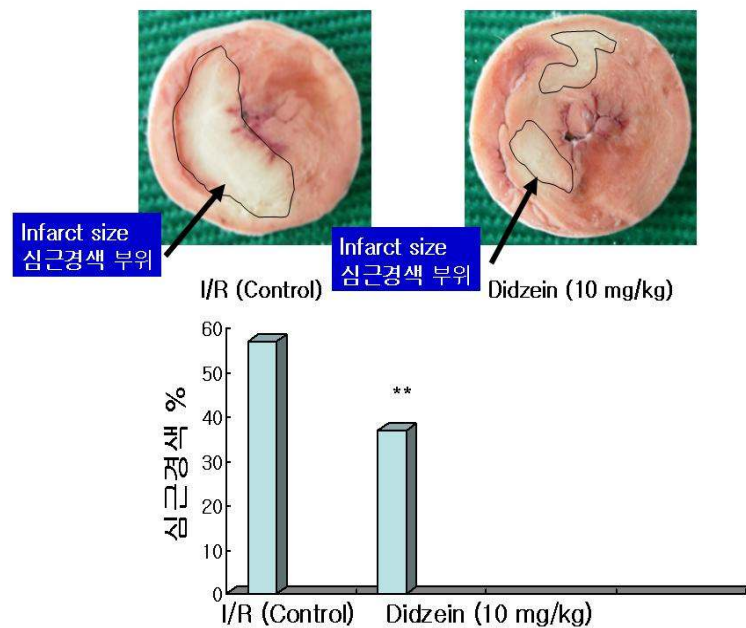
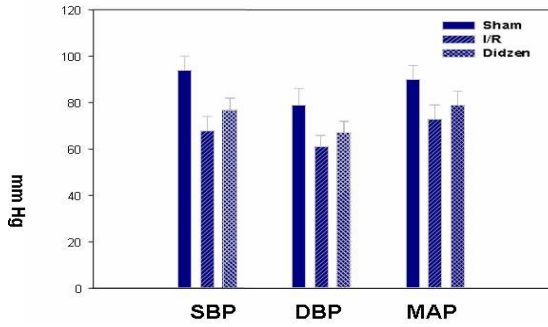


Figure 15. Daidzein에 의한 심근경색 완화효과.

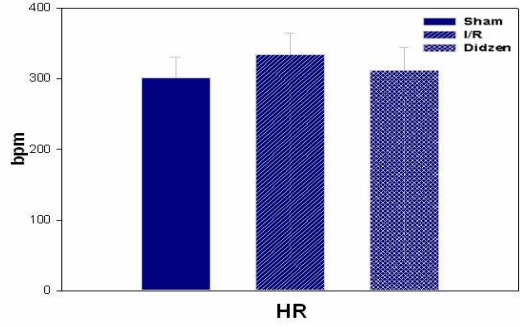
Daidzein을 5 mg/kg 씩 5일간 경구투여 시 혈압, 심박동수에 미치는 영향은 Figure 16에서 보이는 바와 같이 혈압에는 일부 효과를 보이나 심박동수의 변화에는 커다란 영향을 주지 않았다. 또한 daidzein은 좌심실 수축력을 통계적으로 유의하게 증가 시키며 좌심실 발생압력도 증가됨을 보였다.

혈압에 미치는 영향

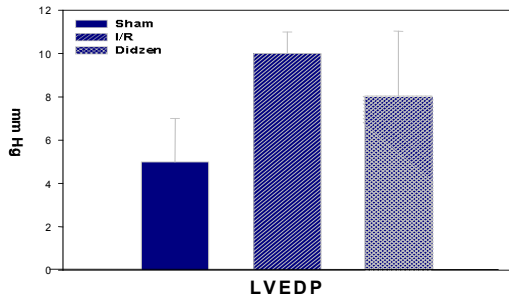


SBP, 수축기 혈압; DBP, 이완기 혈압; MAP, 평균 동맥압

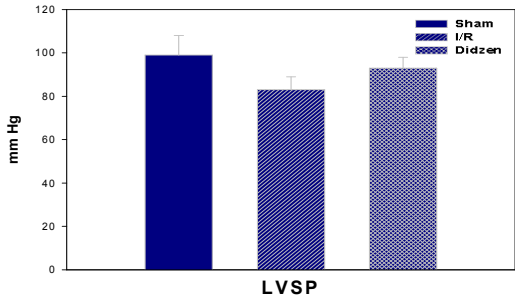
심장 박동수



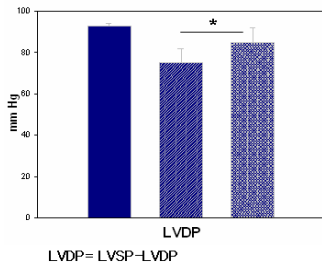
좌심실 이완말기 압력



좌심실 수축기 압력



좌심실 발생 압력



좌심실 수축력 측정

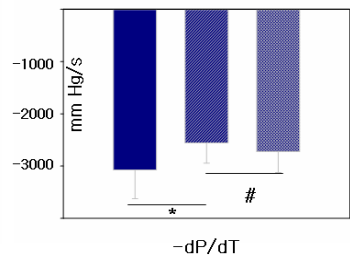
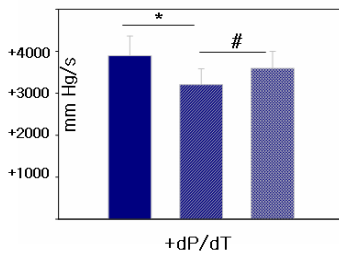


Figure 16. Daidzein의 혈압, 심박동수에 대한 효과.

(3) 심근허혈-재관류 손상에 대한 심근 보호효과

Figure 17은 허혈-재관류에 의한 심근경색을 만든 후 우측 경동맥을 통해 가느다란 카테터를 심장부위까지 삽입하고 바깥쪽을 transducer로 연결하여 심근의 여러 가지 기능을 분석하였다.

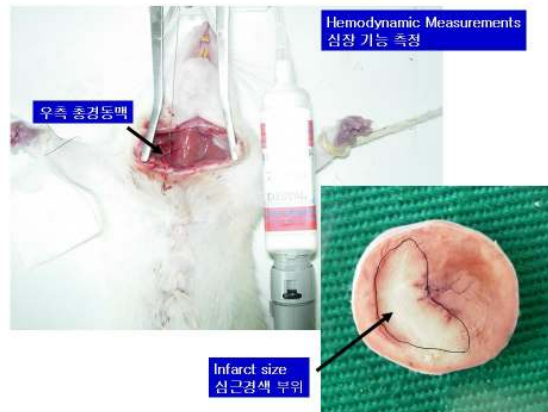


Figure 17. 심근허혈-재관류에 의한 심근경색 동물 모델.

(가) 혈압에 미치는 영향

Gluvone 소재 시료를 투여 전·후 에 혈압에 대한 영향을 살펴보았다. Gluvone 소재 (5 mg/kg, 5 days) 투여는 혈압에 대해 수축기, 이완기 모두 허혈-재관류 손상 쥐에 비해 개선을 가져왔으며 평균혈압도 유의하게 차이를 나타내었다 (Figure 18).

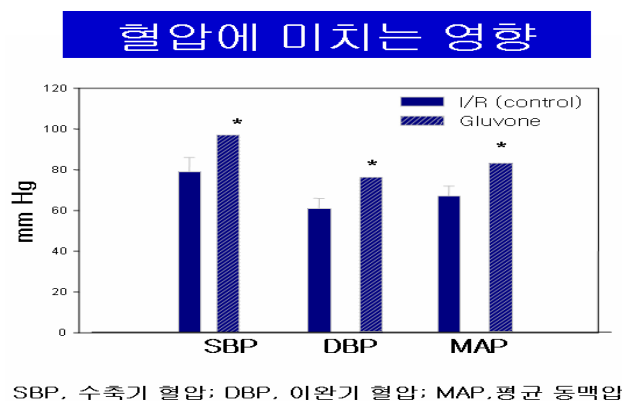


Figure 18. Gluvone 소재가 혈압에 미치는 영향.

(나) 좌심실 수축력 및 이완 말기 압력 측정

Figure 19는 허혈-재관류 손상 시 제일 중요한 내용으로서 심장 손상 시 말기 이완기 압력이 상승된다. 이때 약물치료에 의해 압력이 낮아지게 되면 심장 기능이 회복됨을 의미한다^{18,19}. Figure 19에서 보이는 바와 같이 좌심실 이완말기 압력 (LVEDP)이 약 10 mmHg 로서 심근 손상 시 나타나는 압력이 Gluvone 소재 투여에 의해 약 50% 정도 줄어들었음을 나타내었다. 뿐만 아니라 좌심실 기능이 회복되면 심근 수축력이 회복되어 단위시간당 수축능력 (dP/dT)이 증가되는데 이 수치 역시 Gluvone 소재에 의해 유의하게 증가됨을 알 수 있었다.

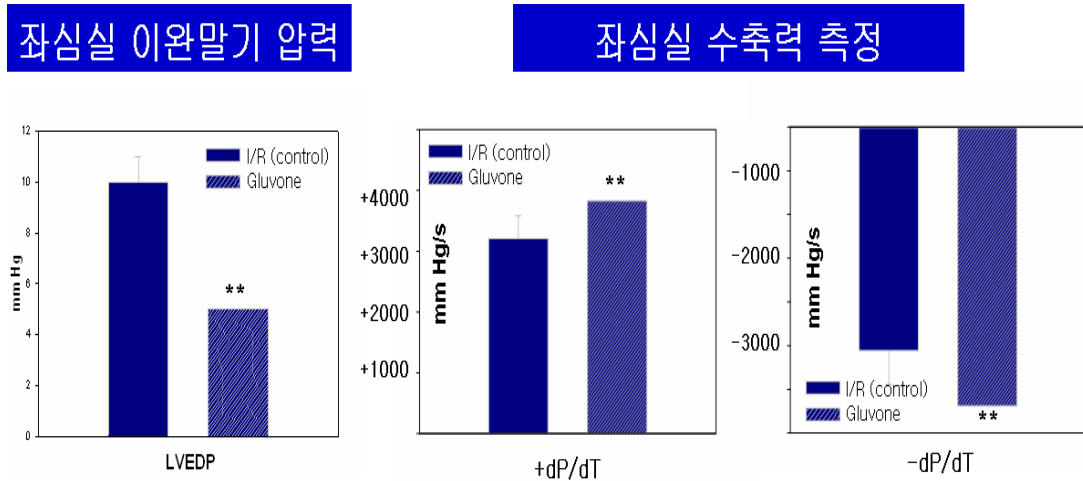


Figure 19. 좌심실 이완말기 압력과 좌심실 수축력에 대한 Gluvone 소재의 효과.

(다) 기타 심장 기능에 대한 효과

Gluvone 소제가 기타 심장기능에 미치는 영향을 살펴본 결과 심박동수와 좌심실 압력을 호전 시키는 결과를 보여 심근경색 시 저하된 심장 기능에 보호 효과를 나타내었다 (Figure 20).

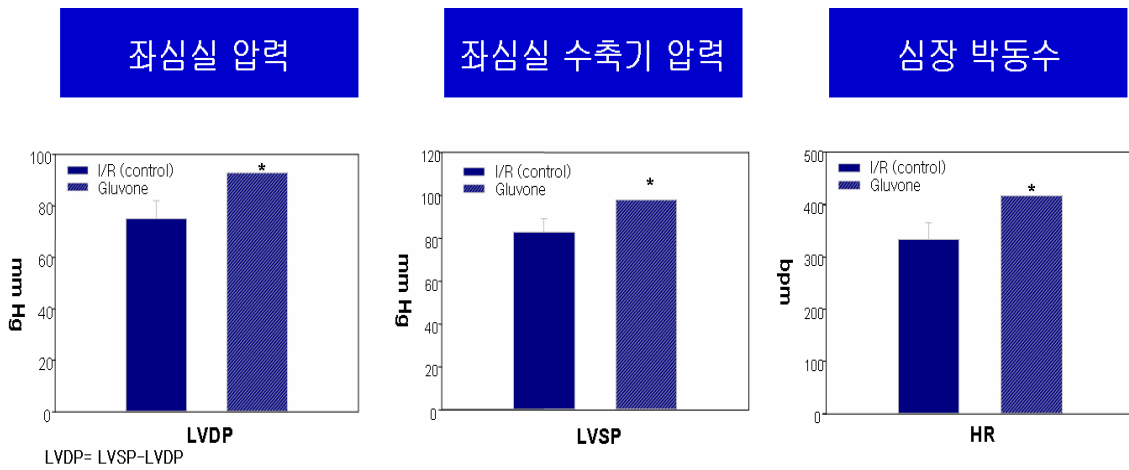


Figure 20. Gluvone 소제의 좌심실 압력과 심장박동수에 미치는 효과.

나. 심근 허혈/재관류 손상 개선 및 심근경색 억제 효과

Gluvone 소재와 Daidzein은 각각 심근손상에 대해 억제하는 효과가 있었고, 항산화 효과로 인한 항염 작용, 특히 NF-kB translocation 억제와 염증성 cytokine 억제가 심근경색으로 인한 손상을 억제하여 심근기능의 회복이 있었다.

(1) 시료: Gluvone이 함유된 배양물로부터 얻은 Gluvone fraction과 Daidzein

(2) 실험동물

(가) Sprague-Dawley계통의 흰쥐 (220 g ~ 250 g)를 Ketamine (30 mg/kg)과 Xylazine (6 mg/kg)으로 마취 시킨 후 기관지를 절제하여 인공호흡 Catheter를 삽관 하여 Artificial respirator를 통해서 호흡을 유지시켰다.

(나) 흉곽을 절개하여 심장을 잘 보이게 한 후상동맥의 left anterior descending branch (LAD)를 6-0 silk suture로 30분 동안 관찰하여 허혈을 유발시키고, 결찰을 풀어 24시간 동안 재관류를 시켜 심장 허혈 재관류 모델을 만들었다.

(다) 수술 후 식이는 ad libitum으로 공급하였고, 사육실의 온도 및 습도는 20~25°C, 50~60%로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등 하였다.

(3) 시료 투여 및 심근경색 정도 정량화 (TTC staining)

(가) 실험군은 Sham control, 허혈-재관류 실험군, Gluvone 소재 투여군, daidzein 투여군으로 구분하였다.

(나) Sham control군의 동물은 관상동맥의 결찰이 없이 마취제만 투여 하였으며 Gluvone 소재와 Daidzein군의 동물은 각각 5 mg/kg양을 20일간 투여하였다.

(다) 재관류 24시간 후에 심장을 절제하여 심실부분을 1 mm크기의 slice를 만든 후 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액에 37°C 에서 10분 동안 incubation 하여 염색한 후 심근 경색의 크기 (Infarct size)를 측정하였다.

(4) 시료처리가 심장의 기능에 미치는 영향

(가) 재관류 24 시간 후 허혈-재관류 손상에 대한 심장기능의 확인은 Miller catheter를 경동맥을 통해 좌심실까지 삽입하여 측정하였다.

- 아래 Table 12는 심근경색손상의 지표로서 control 실험이 잘 되었는지를 검증하는 실험으로 area at risk와 경색크기를 상대적으로 나타내는 표이다.
- 결과에서와 같이 Control, Gluvone 소재, Daidzein 처리구에서 area at risk와 area at risk/LV (%)에 차이가 없음을 알 수 있었다.

Table 12. Area at Risk and Infarct Size

	Control (n=10)	Gluvone 소재 (5 mg/kg, n=8)	Daidzein (10 mg/kg, n=10)
Body weight (g)	245±18	232±16	247±15
LV weight (g)	0.66±0.06	0.61±0.04	0.69±0.06
Area at risk (g)	0.3±0.02	0.28±0.04	0.31±0.07
Area at risk/LV (%)	46±5	45±7	44±6
infarct size (g)	0.17±0.03	0.12±0.01	0.10±0.02

(나) Hemodynamic data:

- 아래 Table 13 에서 보이는 바와 같이 Gluvone 소재 (5 mg/kg)의 투여는 Daidzein (5 mg/kg)의 투여와 비교하여 혈압 (MAP, mean arterial pressure)에 미치는 영향은 I/R (허혈-재관류) 손상 시 저하되었던 혈압 (67 mmHg)을 각각 79 mmHg 로 유의 하게 상승시켰으며 좌심실 수축기압 (LVSP)을 유의성 (p<0.05) 있게 증가시켰다.
- 특히 Daidzein 처리는 심근수축과 이완의 지표인 dP/dt를 통계적으로 유의성 (p<0.05) 있게 증가시키는 반면 Gluvone 소재 처리는 Daidzein의 처리보다 다소 증가효과가 낮았으나, control 처리보다는 증가시켰다.
- 이것은 Gluvone 소재의 용량에 영향이 있을 것으로 사료되어졌다.

Table 13. Hemodynamic Data

	LVSP/LVEDP (mm Hg)	HR (bpm)	\pm dP/dT (mm Hg/s)	SBP/DBP (mm Hg)	MAP (mm Hg)
Sham (n=6)	99 \pm 9/5.6 \pm 2	301 \pm 29	3896 \pm 466/-3074 \pm 553	94 \pm 6/68 \pm 6	77 \pm 5
Control (n=10)	83 \pm 6/10 \pm 3	333 \pm 31	3203 \pm 374/-2579 \pm 340	79 \pm 7/61 \pm 5	67 \pm 5
Gluvone (5 mg/kg, n=8)	97 \pm 9* 9.6 \pm 3	333 \pm 42	3341 \pm 525/-2783 \pm 542	94 \pm 9/70 \pm 7	79* \pm 7
Daidzein (5 mg/kg, n=10)	93 \pm 5/8 \pm 3	312 \pm 32	3592 \pm 403*/-2824 \pm 399*	90 \pm 6/73 \pm 6	79* \pm 6

(5) 작용기전연구

(가) 시료조제:

- 상기 protocol에 따라 행한 실험동물의 각 심장을 적출하여 육안으로 구별되는 허혈 되지 않은 조직 (non-ischemic)과 허혈 위험 조직 (area at risk)을 잘게 썰고 PBS로 균질화시켰다.
- 균질화된 조직을 약 500 × g 로 30 분간 원심분리 하여 pellet을 얻고 이 pellet에 cytosolic extraction reagent I을 넣고 10분간 배양 후 reagent II를 추가하고 반응을 종료하고, 이것을 튜브에 옮긴 후 16000 × g에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액 cytosolic fraction을 얻었다.
- 핵층 (nuclear fraction)을 분리 하기위해 pellet에 nuclear extraction reagent를 첨가하고 40분간 배양 후 16000 × g에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 얻어 이것을 nuclear fraction 시료로 사용하였다.
- 측정 parameters: NF-kB protein의 Western blotting, translocation 및 caspase-3 활성도를 측정하였다.

(나) 허혈/재관류 손상 보호 작용기전

- Figure 21에 보이는 바와 같이 I/R rm 자체는 NF-kB complex를 cytosol에서 nuclear fraction 으로 이동시킴을 알 수 있다. 그러나 NF-kB translocation이 Gluvone 소재 처리 군과 Daidzein 투여 군에서 억제됨을 볼 수 있었다. 따라서 Daidzein이 Gluvone 소재보다 강함을 알 수 있었다.

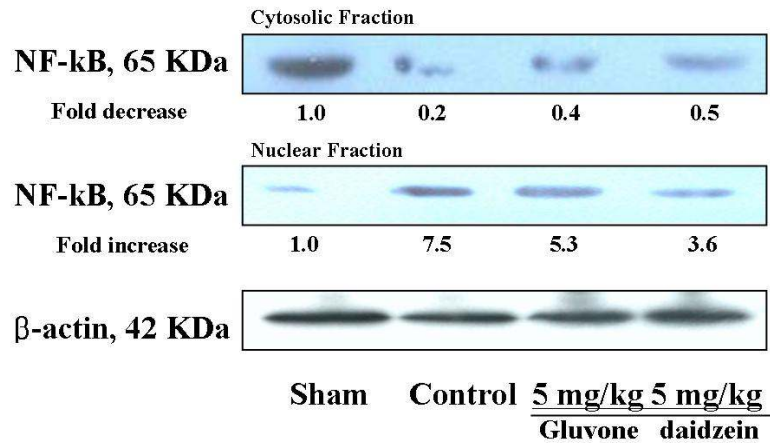


Figure 21. Gluvone 소재 처리 군과 Daidzein 투여 군에 따른 NF-kB의 발현.

(다) 염증성 cytokine 측정

- Gluvone 소재가 염증성 cytokine을 억제하는 지를 확인하기 위하여 대표적 염증성 cytokine인 TNF-α와 IL-6를 kit를 사용하여 측정하였다.
- Figure 22에서 보는 바와 같이 염증성 cytokine인 TNF-α와 IL-6 농도를 혈중에서 I/R 전 (base), I/R 후 1시간 (R1) 및 2 시간 (R2) 뒤에 측정한 결과 Gluvone 소재와 Daidzein이 미치는 영향을 확인한 것이다. R1에서 보이는 바와 같이 I/R stress는 IL-6와 TNF-α 모두 현저히 상승되었으나 상대적으로 Daidzein 및 Gluvone 소재 투여 군에서 줄어들었음을 알 수 있다. 따라서 이들의 효과를 확인하였다.

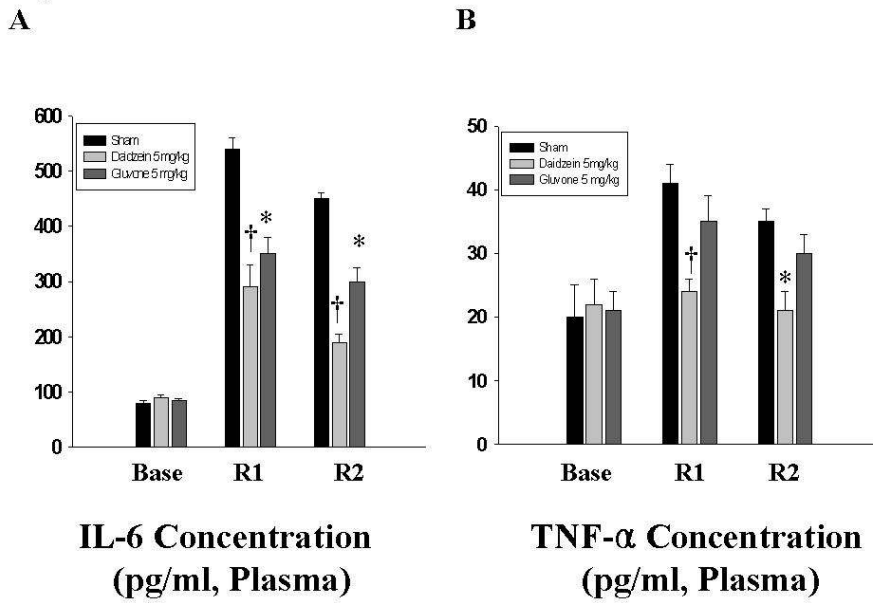


Figure 22. 염증성 cytokine인 TNF- α 와 IL-6의 측정

(라) 심장주변의 중성구 침입에 대한 조직 염색 연구

- Gluvone 소재의 효과는 항산화 작용에 의한다면 적어도 심장의 허혈/재관류 protocol로 인한 심장에 중성구의 침입이 억제 되어야 할 것으로 가정하고^{19,20}), SD 실험 후 paraffin으로 고정한 후 중성구의 침입정도를 시료 투여 군과 투여하지 않은 군의 차이를 확인 하였다.
- Figure 23에서 보는 바와 같이 I/R은 심장 조직에 산화적 스트레스로 인한 neutrophil의 infiltration이 되어 있는 것을 알 수 있으며 이에 반해 Daidzein 이나 Gluvone 소재 투여 군에서는 I/R로 인한 산화적 스트레스가 현저히 줄어들었음을 MPO 활성도와 면역 조직 염색으로 확인 할 수 있었다. 따라서 이들이 산화적 스트레스를 감소시킨다는 사실을 알 수 있었다.

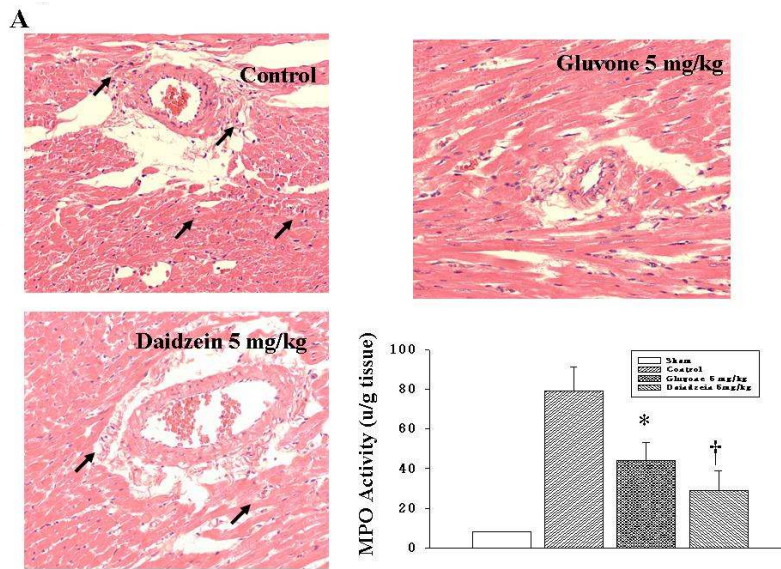


Figure 23. Daidzein 과 Gluvone 소재 투여로 인한 심장주변의 중성구 침입에 대한 조직 염색 연구.

(마) Caspases-3 활성 측정

- I/R 손상은 결국 심근에 apoptosis를 일으켜 기능저하와 심근경색으로 이루어지므로 Gluvone 소재와 Daidzein이 apoptosis에 미치는 영향을 본 것이다.
- Figure 24에서 보는 바와 같이 Daidzein은 유의하게 ($p < 0.05$) caspase-3 활성도를 억제하는 반면 Gluvone 소재는 통계적으로 유의 하지는 않았으나 Caspases-3 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 이들은 세포의 apoptosis에 관여하는 것을 알 수 있었다.

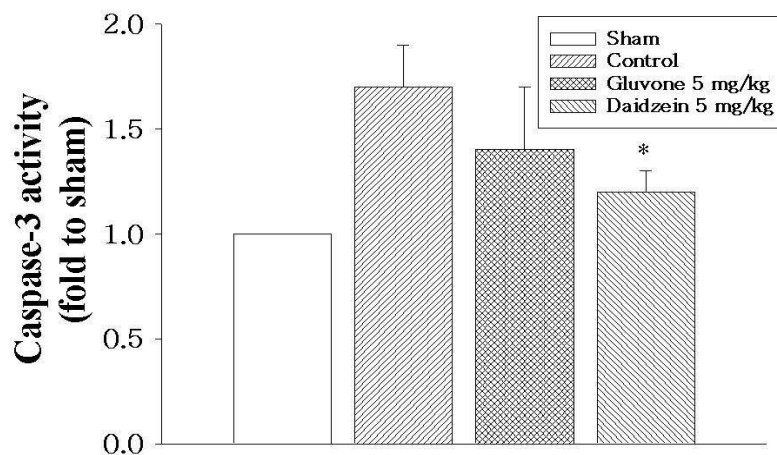


Figure 24. Gluvone 소재와 Daidzein의 Caspases-3 활성 측정.

(바) 심근 허혈/재관류 손상에 대한 Gluvone 소재의 기능개선 및 심근경색 억제 효과 (동물실험)

① 세포: 심근근색세포

② 시료: Gluvone 소재와 Daidzein

③ NF- κ B transfection 및 luciferase 측정

○ NF- κ B luciferase constructs를 미국 펜실베이니아 대학의 P. Koretzky 박사로부터, dominant negative I κ B mutant plasmid는 인디아니대학의 Nakshatri 박사로부터 분양받아 transfection은 Lipofectin을 사용하여 수행하였다.

○ 실험 protocol에 따른 실험 후 PBS에 녹이고 luciferase 활성도를 측정하였다.

○ Figure 25는 심근세포에서 I/R에 해당하는 산화적 손상을 H₂O₂를 가하여 세포손상을 주고 이에 대한 Gluvone 소재와 Daidzein의 효과를 본 것이다. cell viability를 Daidzein과 Gluvone 소재는 각각 5 μ M과 2 mg/ml 농도에서 가장 좋은 효과를 보였다. 이러한 결과는 in vivo 결과와도 일치 하는 것으로 사료된다.

B

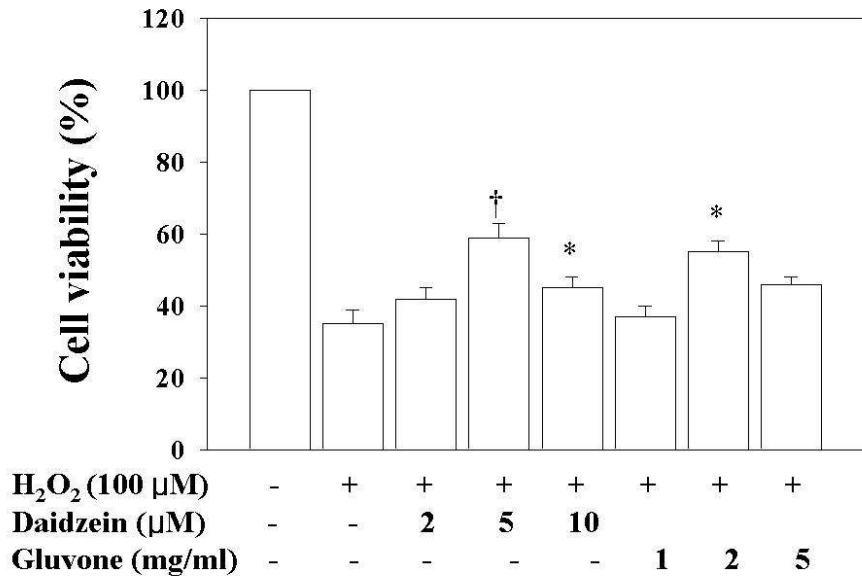


Figure 25. Daidzein과 Gluvone 소재의 cell viability효과.

○ Figure 26은 NF- κ B억제 효과가 cell 에서도 나타나는지를 확인한 바 NF- κ B luciferase 활성도가 H₂O₂에 의한 luciferase 활성도를 줄임을 확인하였다.

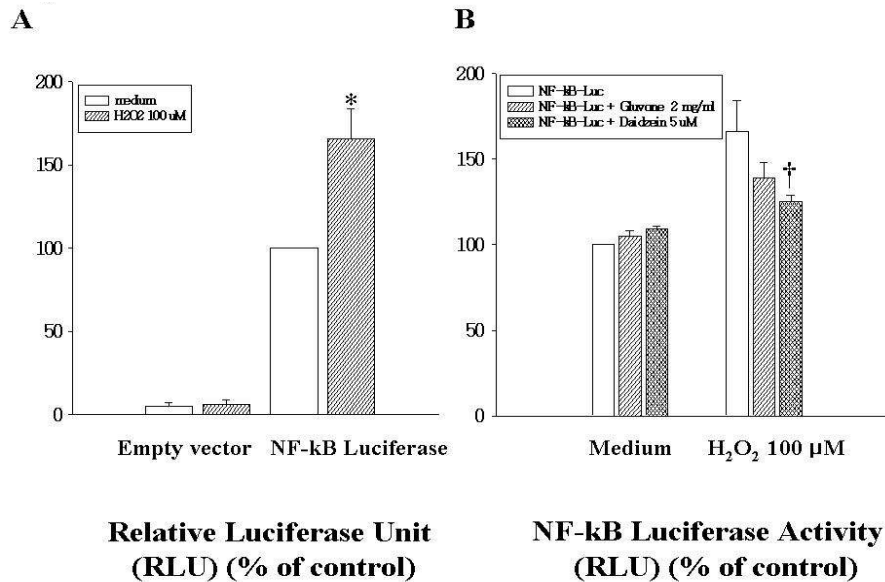


Figure 26. NF- κ B luciferase 활성도가 H₂O₂에 의한 luciferase 활성도.

다. 심근허혈-재관류 손상에 대한 부작용 여부

앞서 실험에서 심근 허혈-재관류 손상 시 isoflavone 함유신령버섯 추출물인 Gluvone 소재가 허혈-재관류로 인해 발생하는 좌심실 기능의 억제와 심근경색에 대한 각각 이로운 효과를 보였기에 이 화합물이 효과를 보이는 농도에서 심혈관계 부작용이 있는 지를 확인하기 위해 흰쥐의 대동맥 혈관을 사용하여 혈관에 대한 반응성을 실험하였다.

(1) 실험동물

Sparague-Dawley 계통의 흰쥐 (220 g~250 g)를 Ketamine (30 mg/kg)과 Xylazine (6 mg/kg)으로 마취 시킨 후 재빨리 흉곽을 열고 대동맥 (thoracic aorta)을 분리해 내었다.

(2) 시료약물 투여에 의한 혈관 반응도

실험 군으로 Sham control, gluvone 소재 투여 군으로 나누었다. sham control 군은 saline만 투여 하였으며 Gluvone 소재 (+)와 Gluvone 소재 (-)를 각각 10 mg/kg 양을 20일 간 경구 투여하였다. 20일간 투여 후 상기

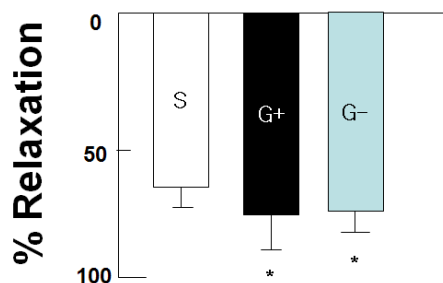
방법에 의해 각각 실험 군 쥐의 흉부 대동맥을 분리 하고 아래의 실험을 하였다 (Figure 27).



Figure 27. 등장성 혈관 반응 측정용 및 생리기록기에 의한 혈관 반응성 측정기.

Krebs 용액이 담겨있는 10 ml용 organ bath에 연속적으로 95% O₂, 5% CO₂ gas가 주입되도록 하고 37°C로 organ bath 외관을 따라 물이 흐르도록 하여 organ bath내 온도가 37°C가 되도록 유지시켰다. 상기에서 분리한 혈관을 0.7 cm 정도 크기의 혈관 절편 고리를 만든 후 1 g 의 장력을 주어 생리기록기에 미세한 움직임 기록할 수 있도록 하기위해 FT03 transducer에 연결하고 혈관 수축제 (Phenylephrine)와 내피세포 의존성 이완제 (Acetylcholine)에 대한 혈관 반응을 조사하고 시료 약물의 효과를 관찰하였다.

(3) 혈관 반응성



Effects of acetylcholine-induced relaxation on rat endothelium intact thoracic aorta isolated from saline (S), gluvone(with isoflavone, G+), and gluvone (without isoflavone, G-)administrated rats. Gluvone administration enhanced Ach-induced relaxation. * p < 0.05

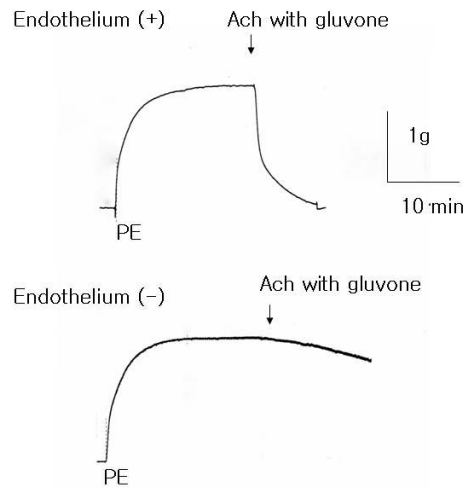


Figure 28. Physiograph 상에서 tracing한 혈관의 수축과 이완 반응.

상기 Figure 28은 혈관의 수축과 이완 반응을 physiograph 상에 나타난 것을 tracing 한 것이다. Figure 28에서 보이는 바와 같이 혈관대동맥을 phenylephrine (PE) 0.1 mM을 투여 하면 수축 반응을 일으킨다. 약 10-20분간 평형을 유지 한 상태에서 이때 acetylcholine (1 mM)을 투여 하면 내피세포가 존재 할 경우 [endothelium (+)]에는 혈관이 이완을 일으킨다. 그러나 내피세포를 제거 시킨 혈관 [endothelium (-)] 에서는 acetylcholine에 의한 이완 반응이 약함을 알 수 있었다.

(4) 심장조직에 polymorphonuclear 침착억제

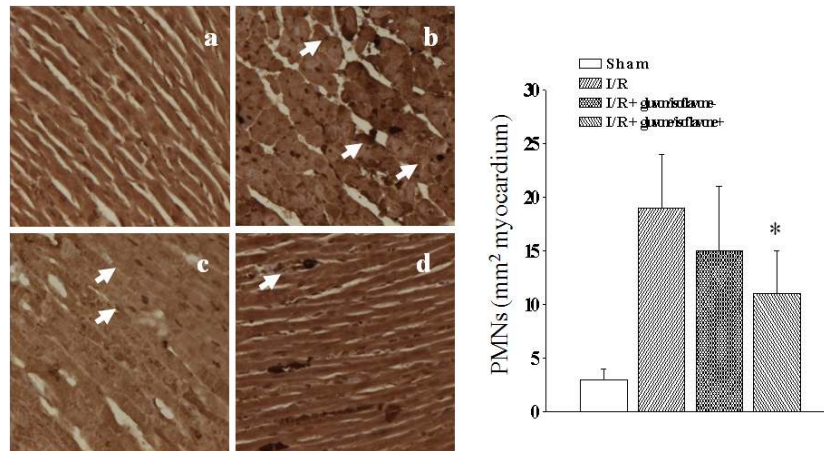


Figure 29. Effect of gluvone on myocardial polymorphonuclear accumulation:

(A) Immunohistochemical staining with monoclonal anti-polymorphonuclear antibody. a) Sham, nonischemic tissue; b) Ischemia and reperfusion control, ischemia/reperfused myocardium; c) Ischemia and reperfusion gluvone (-), d) Ischemia and reperfusion gluvone (+). Gluvone significantly inhibited polymorphonuclear accumulation after ischemia and reperfusion vs. control group. white arrows indicate polymorphonuclears. Values are mean \pm S.E.M. (n=6 in each group). *P<0.05 compared to ischemia and reperfusion control. (B) MPO activity in the area at risk of cardiac tissue samples obtained from sham, ischemia and reperfusion control and gluvone-treated rats. Values are mean \pm S.E.M (n=6 in each group). *P<0.05 compared to ischemia and reperfusion control.

상기 Figure 29는 Gluvone 소재를 투여한 군의 쥐 심장 조직에서 Gluvone 소재 (+)와 Gluvone 소재 (-)를 20일 투여 후 심장에 허혈/재관류를 30분 / 24 시간 후 조직을 PMN antibody로 염색한 결과이다.

Figure 29에서와 같이 흰쥐의 심장조직에 허혈/재관류 시 neutrophil 등 polymorphonuclear세포들이 침착 (b)되는데 반해 Gluvone 투여 (c,d) 쥐의 경우는 그 침착이 적음을 알 수 있었다. 그러나 통계를 나타내었을 때 isoflavone 이 들어 있는 Gluvone 소재 (+)투여 쥐에서 그 작용이 현저하게 줄어들었다 (P<0.05).

종합적으로 볼 때 gluvone 소재는 혈관반응에 있어서 isoflavone 함유 유무에 상관없이 내피세포 의존적 이완반응을 나타내었으며 심장에 대한 단핵세포의 침착을 억제함에 있어서는 isoflavone 함유한 EtOH 분획 추출물이 효과를 나타내었으며 효과를 나타내는 농도 범위에서는 심장 및 혈관에 부작용을 나타내지 않음을 알 수 있다.

3. Gluvone 소재의 간독성 개선 효과에 미치는 영향

- 혈장 GOT 및 GPT 활성은 정상대조군에 비해 알코올 섭취군에서 유의적으로 높게 나타나 알코올 섭취에 의한 간 손상이 일어났으며, gluvone군과 silymarin군에서 간 손상이 억제된 것으로 사료된다
- Gluvone 소재의 섭취는 혈장 ALP 및 LDH 활성을 에탄올군에 비해 유의적으로 감소시켰다. 따라서 Gluvone 소재의 섭취는 만성적인 에탄올 섭취로 인한 간 손상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.
- 에탄올의 만성적인 섭취는 간조직의 지질과산화물 함량을 증가시키고, glutathione 농도 및 항산화계 효소활성을 억제시키나, Gluvone 소재의 섭취가 glutathione 농도 및 항산화계 효소활성의 감소를 억제하고 지질과산화물 함량을 감소시켜, 간 보호작용을 나타내는 것으로 사료된다.

가. Gluvone 소재의 사염화탄소로 유도한 mouse 간 독성 개선 효과 (동물 모델)

Gluvone 소재 시료는 사염화탄소 독성으로 인한 간 손상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료되고, 사염화탄소에 의해 유도되는 지질과산화물 생성을 완화시켜 간 손상을 억제하였다.

(1) 체중 및 식이섭취량

정상군과 CCl₄ 투여 대조군, CCl₄ 투여 silymarin군, CCl₄ 투여 Gluvone 소재군 및 Gluvone 소재 (-)군 사이의 체중, 식이섭취량, 간 무게는 유의적 차이가 없었다 (Table 14).

Table 14. Body weight, Food intake and liver weight

	Body weight (g)	Food intake (g/d)	Liver weight (g)
Normal	195 ± 23	19.4 ± 1.5	8.8 ± 1.2
CCl ₄ -control	174 ± 8	20.4 ± 2.4	9.2 ± 0.4
CCl ₄ -silymarin	165 ± 6	20.6 ± 2.5	8.9 ± 0.7
CCl ₄ -Gluvone 소재	175 ± 15	21.8 ± 1.8	9.7 ± 0.8
CCl ₄ -Gluvone 소재 (-)	183 ± 15	21.2 ± 1.0	9.7 ± 1.5

(2) 혈액 분석

(가) 사염화탄소 투여군의 혈장 GOT 및 GPT 활성은 정상대조군에 비해 유의적으로 높게 나타나 사염화탄소 투여에 의한 간 손상이 일어난 것으로 나타났다. CCl₄-silymarin군의 혈장 GOT 및 GPT 활성은 각각 311.6 ± 29.3 IU/L, 168.0 ± 29.0 IU/L로 CCl₄-control (708.0 ± 95.7 IU/L, 448.9 ± 75.4 IU/L)에 비해 유의적으로 감소하였다. CCl₄-Gluvone 소재의 혈장 GOT 및 GPT 활성은 각각 253.3 ± 29.8 IU/L, 124.1 ± 19.3 IU/L로 CCl₄ control에 비해 유의적으로 감소하였다. CCl₄-Gluvone 소재 (-)의 혈장 GOT 및 GPT 활성은 412.5 ± 54.6 IU/L, 190.4 ± 18.2 IU/L로 나타나 CCl₄-control에 비해 유의적으로 감소하였다 (Figuer 30). CCl₄-Gluvone 소재 (-)군의 GOT 활성은 CCl₄-silymarin군 및 CCl₄-Gluvone 소재에 비해 높게 나타났으나, 활성은 유의적인 차이가 없었다.

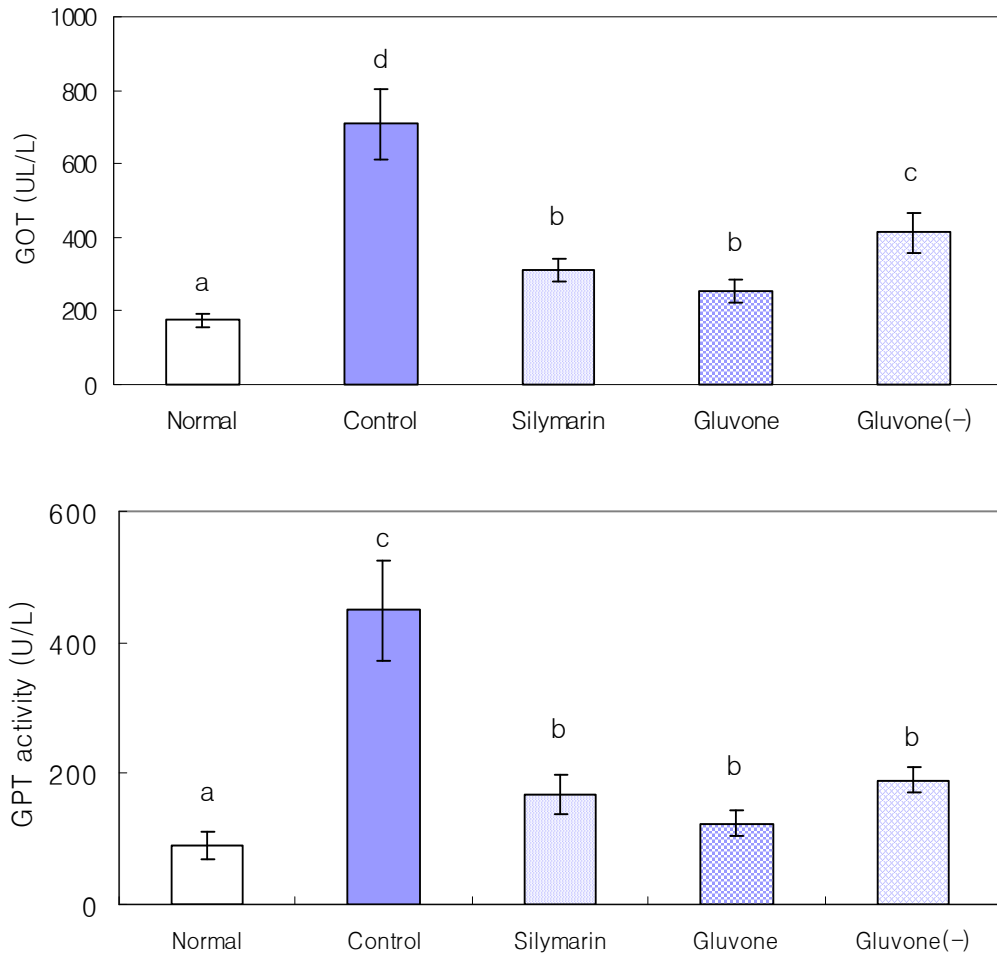


Figure 30. Effects of Gluvone 소재 sample on plasma GOT and GPT activities in CCl₄-treated rats.

(나) 사염화탄소 투여군의 혈장 bilirubin, ALP 및 LDH는 정상대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 (Table 15). CCl₄-silymarin군 및 CCl₄-Gluvone 소재의 혈장 bilirubin은 각각 1.31 ± 0.25 mg/dL, 1.34 ± 0.18 mg/d로 CCl₄-control (1.64 ± 0.18 mg/dL)에 비해 유의적으로 낮게 나타났으나, CCl₄-Gluvone 소재 (-)의 경우 CCl₄-control과 유의적인 차이가 없었다. 혈장 LDH 활성은 CCl₄-silymarin군 (396.3 ± 27.9 U/L)과 CCl₄-Gluvone 소재군 (441.6 ± 58.7 U/L)이 CCl₄-control (574.8 ± 105.7 U/L)에 비해 유의적으로 감소하였다. CCl₄-Gluvone 소재 (-)군(480.3 ± 96.4 U/L)의 경우 CCl₄-control과 유의적인 차이가 없었다. CCl₄-silymarin군 및 CCl₄-Gluvone 소재, CCl₄-Gluvone 소재 (-)의 혈장 ALP 활성은 각각 53.5 ± 6.1 U/L, 54.3 ± 5.5 U/L, $57.4 \pm$

5.5 U/L로 CCl₄-control (58.6 ± 7.3 U/L)과 유의적 차이가 없었다. Gluvone 소재의 섭취는 혈장 GOT, GPT, LDH 활성 및 bilirubin 농도를 CCl₄ control에 비해 유의적으로 감소시켰다. 따라서 Gluvone 소재의 섭취는 독성으로 인한 간 손상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Table 15. Effects of Gluvone 소재 sample on plasma bilirubin, ALP and LDH in CCl₄-treated rats

Treatment	Bilirubin (mg/dL)	ALP (U/L)	LDH (U/L)
Normal	0.99±0.16 ^a	38.8±5.1 ^a	191.4±41.9 ^a
CCl ₄ -control	1.64±0.18 ^c	58.6±7.3 ^b	574.8±105.7 ^c
CCl ₄ -Gluвone 소재	1.34±0.18 ^b	54.3±5.5 ^b	441.6±58.7 ^b
CCl ₄ -Gluвone 소재 (-)	1.38±0.25 ^c	57.4±5.5 ^b	480.3±96.4 ^c
CCl ₄ -silymarin	1.31±0.25 ^b	53.5±6.1 ^b	396.3±27.9 ^b

(3) 간 조직의 지질과산화물 함량

사염화탄소 투여군의 간조직 지질 과산화물 함량은 정상 대조군 (1.88 ± 0.40 nmol MDA/mg protein)에 비해 유의적으로 높게 나타났다. Silymarin (2.96 ± 0.26 nmol MDA/mg protein) 및 Gluvone 소재 (2.93 ± 0.32 nmol MDA/mg protein)의 섭취는 지질 과산화물 함량을 대조군 (3.59 ± 0.69 nmol MDA/mg protein)에 비해 유의적으로 감소시켰으며, isoflavone을 제거한 Gluvone 소재의 섭취 (3.05 ± 0.39 nmol MDA/mg protein)는 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었다 (Figure 31). 사염화탄소는 간조직의 지질과산화물 생성을 유도하여 간 손상을 초래하게 된다²¹⁾. 따라서 Gluvone 소재의 섭취는 사염화탄소에 의해 유도되는 지질과산화물 생성을 완화시켜 간 손상을 억제하는 것으로 사료된다.

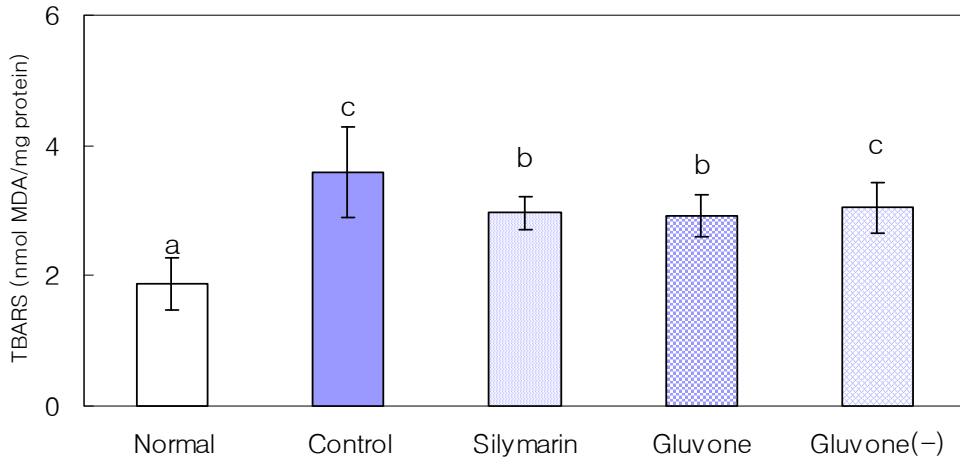


Figure 31. Effects of Gluvone 소재 sample on TBARS in CCl₄-treated rats.

(4) 간 조직의 glutathione 함량 및 항산화효소계 활성

(가) 사염화탄소 투여군 (CCl₄-control)의 간 조직 glutathione 함량은 72.1 ± 10.3 nmol/g protein으로 정상 대조군 (106.6 ± 19.3 nmol/g protein)에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. Silymarin의 섭취 (95.0 ± 7.6 nmol/g protein)는 glutathione 함량을 CCl₄-control군에 비해 유의적으로 증가시켰으며, 정상 대조군과 유의적인 차이가 없었다. Gluvone 소재군 (92.2 ± 9.9 nmol/g protein) 및 isoflavone을 제거한 Gluvone 소재군 (86.0 ± 0.39 nmol/g protein)의 glutathione 함량은 CCl₄-control군에 비해 증가하였으나, 정상 대조군보다 낮게 나타났다 (Table 16).

Table 16. Effects of Gluvone 소재 sample on SOD, catalase and glutathione reductase activities in CCl₄-treated rats

Treatment	SOD (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein/min)	GSH-reductase (nmol/mg protein)
Normal	14.1±0.3 ^c	7.5±1.4 ^c	4.6±1.5
CCl ₄ -control	10.1±1.6 ^a	3.5±0.5 ^a	3.5±1.0
CCl ₄ -Gluvone 소재	12.0±1.7 ^b	4.8±0.8 ^b	4.0±0.8
CCl ₄ -Gluvone 소재 (-)	11.9±0.8 ^b	4.8±0.5 ^b	3.5±0.6
CCl ₄ -silymarin	12.1±1.2 ^b	4.9±0.4 ^b	3.6±0.6

(나) 사염화탄소 투여군의 간 조직 SOD 활성은 정상대조군 (14.1 ± 0.3 U/mg protein)에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. CCl₄-silymarin군, CCl₄-Gluvone 소재 및 CCl₄-Gluvone 소재 (-)의 SOD 활성은 각각 12.1 ± 1.2 U/mg protein, 12.0 ± 1.7 U/mg protein, 11.9 ± 0.8 U/mg protein으로 CCl₄-contro (10.1 ± 1.6 U/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였다.

(다) 사염화탄소 투여군의 간 조직 catalase 활성은 정상대조군 (7.5± 1.4 U/mg protein)에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. CCl₄-silymarin군, CCl₄-Gluvone 소재 및 CCl₄-Gluvone 소재 (-)의 catalase 활성은 각각 4.9 ± 0.4 U/mg protein, 4.8 ± 0.8 U/mg protein, 4.8 ± 0.5 U/mg protein으로 CCl₄-control (3.5 ± 0.5 U/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였다 (Table 16). 따라서 Gluvone 소재 및 isoflavone을 제거한 Gluvone 소재의 섭취는 SOD 및 catalase 활성을 증가시켜 활성산소종을 제거함으로써 지질과산화물 함량을 낮추고 GSH 함량을 증가시켜 간 조직을 산화적 스트레스로부터 보호하는 것으로 사료된다²²⁾.

(5) 간 조직의 α -tocopherol 농도

사염화탄소 투여군 (CCl_4 -control)의 간조직 α -tocopherol 농도는 66.8 ± 15.6 nmol/g tissue로 정상 대조군 (70.75 ± 18.7 nmol/g tissue)에 비해 낮은 경향이 나타났다. Silymarin군, Gluvone 소재군 및 Gluvone 소재 (-)군의 α -tocopherol 농도는 각각 87.3 ± 14.7 nmol/g tissue, 82.3 ± 14.5 nmol/g tissue, 73.8 ± 15.8 nmol/g tissue으로 나타나 정상대조군 및 사염화탄소 대조군과 유의적인 차이가 없었다 (Figuer 32).

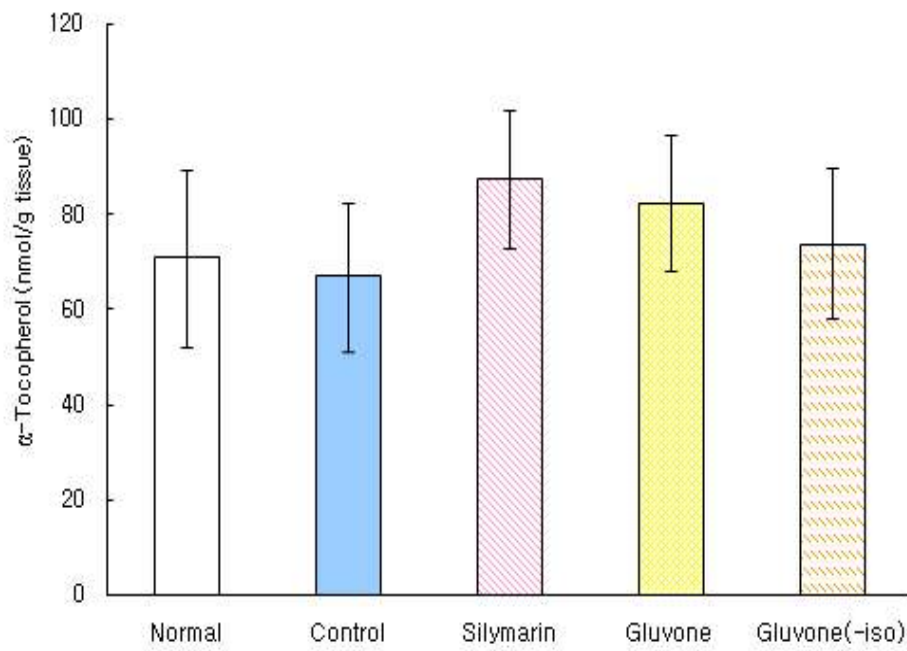


Figure 32. Effects of Gluvone 소재 on α -tocopherol levels in CCl_4 -treated rats.

(6) 조직학적 변화 관찰

사염화탄소로 유발된 간손상에 미치는 Gluvone 소재의 효과를 조직학적으로 관찰한 결과는 Figure 33에 나타내었다. 사염화탄소 투여군은 정상대조군에 비하여 지방변이 (fatty change)가 관찰되어 간손상이 유발되었음을 나타내었다. CCl₄-Gluvone 소재군 및 CCl₄-silymarin군은 CCl₄-control군에 비하여 지방 변성이 억제된 것으로 나타났다 (Figure 33).

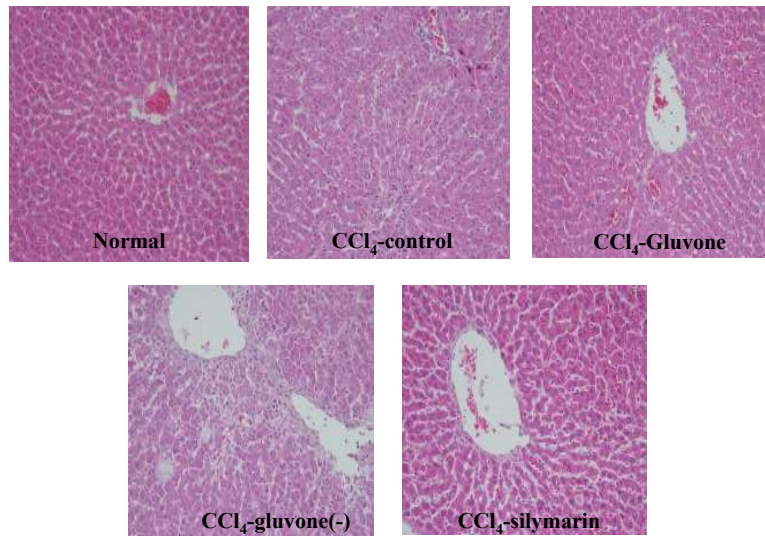


Figure 33. Effects of Gluvone 소재 on histological changes of liver tissue in CCl₄-treated rats.

나. Gluvone 소재의 알콜로 유도한 흰쥐 간 독성완화 효과 검증 (동물 모델)

Gluvone 소재 시료는 알콜 독성으로 인한 간 손상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료되고, 에탄올에 의해 유도되는 지질과산화물 생성을 완화시키고 간조직의 손상을 억제하였다.

(1) 체중 및 식이섭취량

Pair-fed (PF) 대조군의 최종 체중은 대조군 (Control)에 비해 유의적으로 낮았으며, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군의 체중은 PF 대조군보다 유의적으로 낮았다. 식이섭취량은 PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 17). 식이섭취효율 (feed efficiency ratio, FER)은 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군이 대조군에 비해 유의적으로 작게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 17). 간무게는 대조군에 비해 PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군이 유의적으로 작게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 17).

Table 17. Body weight, food intake, FER, and Liver weight in rats

Group	Body weight (g)	Food intake (g/d)	FER* (%)	Liver weight (g)
Control	439 ± 24 ^{c**}	91.8 ± 3.7 ^b	3.84 ± 0.99 ^b	14.7 ± 1.8 ^b
Pair-fed control	352 ± 8 ^b	69.5 ± 1.2 ^a	2.74 ± 0.61 ^{ab}	10.9 ± 0.7 ^a
Ethanol	323 ± 15 ^a	69.6 ± 6.9 ^a	2.05 ± 0.65 ^a	10.6 ± 1.0 ^a
Gluvone 소재	313 ± 15 ^a	71.8 ± 5.8 ^a	1.91 ± 1.02 ^a	10.0 ± 0.7 ^a
Silymarin	303 ± 20 ^a	73.0 ± 5.4 ^a	1.66 ± 0.66 ^a	10.5 ± 1.4 ^a

*Feed efficiency ratio = (Weight gain/food intake) X 100

** $p < 0.05$

(2) 혈장 GOT와 GPT 활성

(가) GOT 활성은 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군이 각각 96.7 ± 20.2 U/L, 117.5 ± 23.8 U/L, 395.8 ± 40.1 U/L, 159.2 ± 11.1 U/L, 157.5 ± 18.6 U/L로 나타났다. 에탄올군의 활성이 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 Gluvone 소재군, silymarin군은 에탄올군에 비해 유의적으로 낮게 나타났고 ($p < 0.01$), PF 대조군, Gluvone 소재군, silymarin군 사이에는 유의적인 차이가 없었다 (Figure 34).

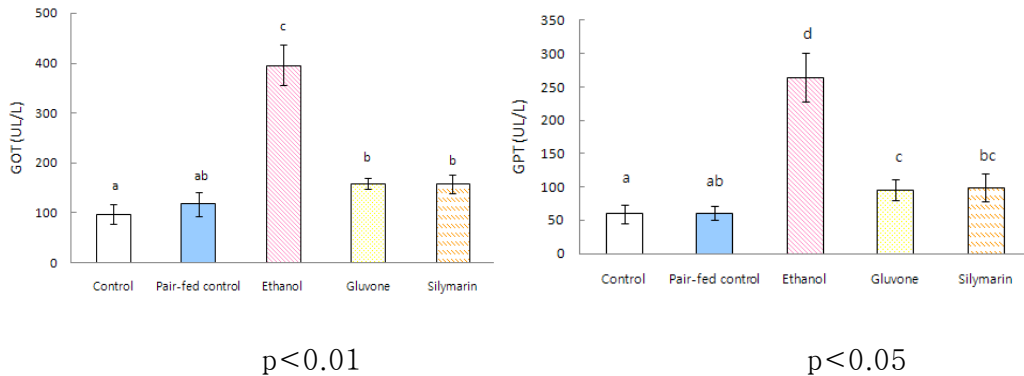


Figure 34. Effects of Gluvone 소재 on plasma GOT and GPT activities in ethanol-fed rats.

(나) GPT 활성은 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군이 각각 59.5 ± 14.0 U/L, 60.7 ± 11.0 U/L, 264 ± 36.6 U/L, 96.0 ± 15.2 U/L, 99.8 ± 20.7 U/L로 나타났다. 에탄올군의 활성이 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, Gluvone 소재군, silymarin군은 에탄올군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 따라서 혈장 GOT 및 GPT 활성은 정상대조군에 비해 알코올 섭취군에서 유의적으로 높게 나타나 알코올 섭취에 의한 간 손상이 일어났으며, Gluvone 소재군과 silymarin군에서 간 손상이 억제된 것으로 사료된다.

(3) 혈장 ALP 및 LDH 활성

대조군, PF 대조군, 에탄올군, silymarin군, Gluvone 소재군의 ALP 활성은 102.3 ± 30.0 U/L, 162.3 ± 30.2 U/L, 363.7 ± 50.1 U/L, 139.2 ± 54.6 U/L, 120.5 ± 41.2 U/L로 나타났다. 에탄올군의 활성이 대조군 및 PF대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, Gluvone 소재군, silymarin군은 에탄올군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$, Figure 35). 대조군, PF 대조군, 에탄올, Gluvone 소재군, silymarin군의 LDH 활성은 545.5 ± 52.2 U/L, 574.2 ± 67.2 U/L, 801.5 ± 40.1 U/L, 517.7 ± 83.0 U/L, 531.8 ± 82.7 U/L로 나타났다. 에탄올군의 활성이 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 Gluvone 소재군, silymarin군은 에탄올군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 따라서 Gluvone 소재의 섭취는 혈장 ALP 및 LDH 활성을 에탄올군에 비해 유의적으로 감소시켰다. 따라서 Gluvone 소재의

섭취는 만성적인 에탄올 섭취로 인한 간 손상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

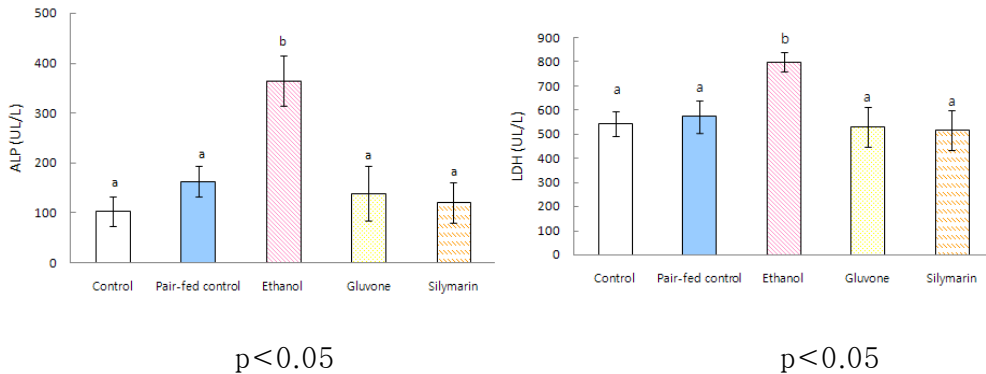


Figure 35. Effects of Gluvone 소제 on plasma ALP and LDH activities in ethanol-fed rats.

(4) 혈중 지질 농도

대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소제군, silymarin군의 콜레스테롤 농도는 83.5 ± 20.0 mg/dL, 80.8 ± 12.2 mg/dL, 91.9 ± 10.3 mg/dL, 93.5 ± 6.0 mg/dL, 97.0 ± 16.6 mg/dL로 나타났다. 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소제군, silymarin군의 중성지방 농도는 108.4 ± 33.3 mg/dL, 92.0 ± 17.0 mg/dL, 91.9 ± 17.7 mg/dL, 109.0 ± 24.4 mg/dL, 98.4 ± 23.5 mg/dL로 나타났다. 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소제군, silymarin군의 HDL-콜레스테롤 농도는 17.2 ± 1.7 mg/dL, 20.8 ± 3.3 mg/dL, 21.8 ± 2.9 mg/dL, 28.5 ± 3.4 mg/dL, 28.3 ± 3.5 mg/dL로 나타났다. HDL-cholesterol 농도는 에탄올군의 HDL-콜레스테롤 농도는 대조군 및 PF 대조군과 유의적인 차이가 없었으며, Gluvone 소제군 및 silymarin군의 HDL-콜레스테롤 농도가 대조군, PF 대조군, 에탄올군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 18).

Table 18. Plasma lipid profiles in ethanol-fed rats

Group	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	Liver triglyceride (mg/g liver)
Control	83.5 ± 20.0	108.4 ± 33.3	17.2 ± 1.7 ^a	5.02 ± 0.40 ^a
PF control	80.8 ± 12.2	92.0 ± 17.0	20.8 ± 3.3 ^a	4.70 ± 0.47 ^a
Ethanol	91.9 ± 10.3	91.9 ± 17.7	21.8 ± 2.9 ^a	6.38 ± 0.57 ^b
Gluвone 소재	93.5 ± 6.0	109.0 ± 24.4	28.5 ± 3.4 ^b	5.33 ± 0.56 ^a
Silymarin	97.0 ± 16.6	98.4 ± 23.5	28.3 ± 3.5 ^b	5.12 ± 0.64 ^a

p<0.05

(5) 간조직의 지질 함량 분석

에탄올군, Gluвone 소재군, silymarin군의 간 조직 총 콜레스테롤 함량은 각각 11.86 ± 1.05 mg/dL, 9.51 ± 0.84 mg/dL, 9.25 ± 1.10 mg/dL로 나타나 대조군 (7.48 ± 0.88 mg/dL) 및 PF 대조군 (7.49 ± 1.18 mg/dL)에 비해 유의적으로 증가하였다 (p<0.05, Table 19). Gluвone 소재군 및 silymarin군의 총 콜레스테롤 함량은 에탄올 군에 비해 유의적으로 감소하였다 (p<0.05). 에탄올군의 간조직 중성지방 함량 (6.38 ± 0.57 mg/g liver)은 대조군 (5.02 ± 0.40 mg/g liver) 및 PF 대조군 (4.70 ± 0.47 mg/g liver), Gluвone 소재군 (5.33 ± 0.56 mg/g liver) 및 silymarin군 (5.12 ± 0.64 mg/g liver)에 비해 유의적으로 높게 나타났다 (p<0.05, Table 19). 만성적인 에탄올 섭취는 간세포 내 중성지방 함유량을 증가시켜 알코올성 지방간을 유발한다고 알려져 있다²³⁾. Gluвone 소재 및 silymarin의 섭취는 간 조직의 중성지방 축적을 유의적으로 억제하였고, 대조군 및 PF 대조군과 유의적 차이가 없었다. 따라서 Gluвone 소재과 silymarin은 알코올 섭취로 인해 간에 축적된 콜레스테롤과 중성지방을 감소시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

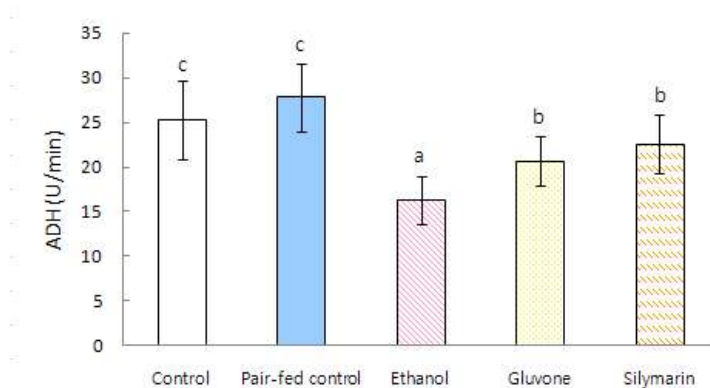
Table 19. Hepatic total cholesterol and triglyceride levels in ethanol-fed rats

Group	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)
Control	7.48 ± 0.88 ^a	5.02 ± 0.40 ^a
PF control	7.49 ± 1.18 ^a	4.70 ± 0.47 ^a
Ethanol	11.86 ± 1.05 ^c	6.38 ± 0.57 ^b
Gluvone 소재	9.51 ± 0.84 ^b	5.33 ± 0.56 ^a
Silymarin	9.25 ± 1.10 ^b	5.12 ± 0.64 ^a

p<0.05

(6) 혈장ADH 활성

혈장 ADH 활성은 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군이 각각 25.3±4.4 nmol/mg protein, 27.8±3.8 nmol/mg protein, 16.3±2.7 nmol/mg protein, 20.7±2.8 nmol/mg protein, 22.6±3.3 U/mg protein으로 나타났다. 에탄올군의 ADH 활성은 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. Gluvone 소재 및 silymarin의 섭취는 에탄올군에 비해 ADH 활성을 유의적으로 증가시켰으나 (p<0.05), 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다 (Figuer 36).



p<0.05

Figuer 36. Effects of Gluvone 소재 on plasma ADH activities in ethanol-fed rats.

(7) 간 조직의 GSH 농도 및 지질과산화물 함량

(가) 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군의 간조직 GSH 농도는 각각 109.5±14.4 nmol/mg protein, 101.8±10.7 nmol/mg protein, 65.3±7.5 nmol/mg protein, 83.0±9.3 nmol/mg protein, 88.2±6.9

nmol/mg protein으로 나타났다. 에탄올군의 GSH 농도는 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며 Gluvone 소재군, silymarin군은 에탄올군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 20).

(나) 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군의 간조직 지질과산화물 함량은 9.3 ± 1.3 nmol MDA/mg protein, 10.5 ± 1.5 nmol MDA/mg protein, 15.6 ± 1.7 nmol MDA/mg protein, 12.1 ± 0.9 nmol MDA/mg protein, 11.1 ± 1.2 nmol MDA/mg protein으로 나타났다. 에탄올군의 TBARS 농도는 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, Gluvone 소재 및 silymarin의 섭취는 에탄올군에 비해 TBARS 농도를 유의적으로 감소시켰다 ($p < 0.05$). Silymarin군의 TBARS 농도는 대조군 및 PF 대조군과 유의적인 차이가 없었으나, Gluvone 소재군의 경우 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 (Table 20).

Table 20. Effects of Gluvone 소재 on levels of hepatic GSH and TBARS in ethanol-fed rats

Group	GSH (nmol/mg protein)	TBARS (nmol MDA /mg protein)
Control	109.5 ± 14.4^d	9.3 ± 1.3^a
PF control	101.8 ± 10.7^{cd}	10.5 ± 1.5^a
Ethanol	65.3 ± 7.5^a	15.6 ± 1.7^c
Gluвone 소재	83.0 ± 9.3^b	12.1 ± 0.9^b
Silymarin	88.2 ± 6.9^{bc}	11.1 ± 1.2^{ab}

$p < 0.05$

(다) 에탄올의 섭취는 간으로부터 GSH의 유출을 증가시켜 조직 내 GSH 농도가 감소하게 되어 유리 라디칼에 의한 지질과산화 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Aykac et al., 1985). 따라서 Gluvone 소재의 섭취는 간 조직의 GSH 농도를 증가시키고, 지질과산화물 농도를 감소시켜 간 보호 효과가 있을 것으로 사료된다.

(8) 간 조직의 항산화효소계 활성

- (가) 간 조직의 SOD 활성은 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군이 각각 17.6 ± 1.0 U/mg protein, 16.8 ± 0.9 U/mg protein, 12.3 ± 1.1 U/mg protein, 14.6 ± 1.2 U/mg protein, 15.7 ± 1.6 U/mg protein으로 나타났다. 에탄올군의 활성이 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며 Gluvone 소재군, silymarin군은 에탄올군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 21).
- (나) Catalase 활성은 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군이 각각 12.1 ± 1.8 U/mg protein, 12.3 ± 2.2 U/mg protein, 8.8 ± 1.4 U/mg protein, 11.7 ± 1.0 U/mg protein, 12.2 ± 1.6 U/mg protein으로 나타났다. 에탄올군의 catalase 활성은 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으나, Gluvone 소재군 및 silymarin군의 catalase 활성은 에탄올군에 비해 유의적으로 증가하였고 대조군 및 PF 대조군과 유의적인 차이가 없었다 (Table 21).
- (다) GSH-peroxidase (GSH-Px) 활성은 대조군, PF 대조군, 에탄올군, Gluvone 소재군, silymarin군이 각각 2.1 ± 0.3 U/mg protein, 1.9 ± 0.2 U/mg protein, 1.4 ± 0.2 U/mg protein, 1.6 ± 0.2 U/mg protein, 2.1 ± 0.3 U/mg protein으로 나타났다. 에탄올군 및 Gluvone 소재군의 GSH-px 활성은 대조군, PF 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, silymarin군의 활성은 에탄올군에 비해 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$, Table 21).
- (마) 따라서 에탄올의 만성적인 섭취는 간조직의 지질과산화물 함량을 증가시키고, glutathione 농도 및 항산화계 효소활성을 억제시키나, Gluvone 소재의 섭취가 glutathione 농도 및 항산화계 효소활성의 감소를 억제하고 지질과산화물 함량을 감소시켜, 간 보호작용을 나타내는 것으로 사료된다.

Table 21. Effects of Gluvone 소재 on activities of SOD, catalase and GSH peroxidase in the liver of rats

Group	SOD (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)	GSH peroxidase (U/mg protein)
Control	17.6±1.0 ^c	12.1±1.8 ^b	2.1±0.3 ^b
PF control	16.8±0.9 ^{bc}	12.3±2.2 ^b	1.9±0.2 ^b
Ethanol	12.3±1.1 ^a	8.8±1.4 ^a	1.4±0.2 ^a
Gluвone 소재	14.6±1.2 ^b	11.7±1.0 ^b	1.6±0.2 ^a
Silymarin	15.7±1.6 ^{bc}	12.2±1.6 ^b	2.1±0.3 ^b

p<0.05

(9) 간 조직의 CYP2E1 발현

간 마이크로솜 CYP2E1 단백질의 발현량은 에탄올군이 대조군 및 PF 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 Gluvone 소재군, Silymarin군이 에탄올군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으나, 대조군 및 PF 대조군보다는 높게 나타났다 (Figure 37). Gluvone 소재의 섭취는 CYP2E1 발현을 억제하여 산화적 스트레스를 감소시켜 지질과산화를 억제하였으며 이는 간손상을 저하시켜 지방간의 생성을 억제 및 개선하는데 유효할 것으로 사료된다.

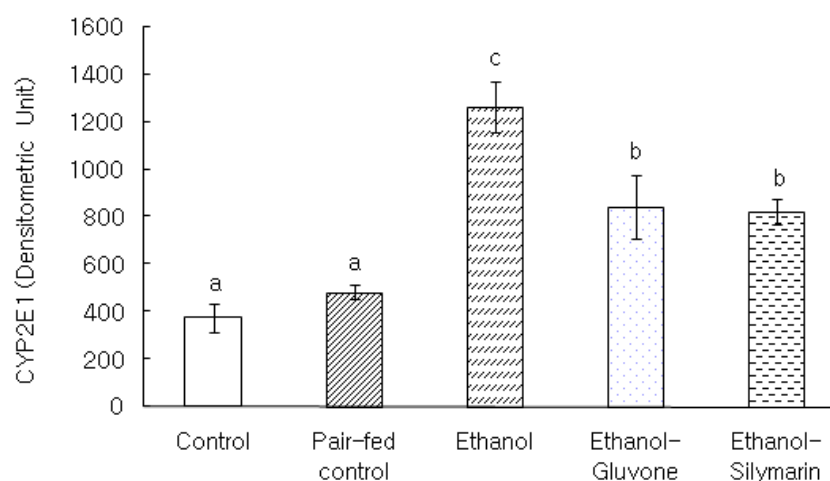


Figure 37. Effects of Gluvone 소재 on hepatic CYP2E1 protein expression in ethanol-fed rats.

(10) 간의 조직학적 변화

만성적인 알코올 섭취로 유발된 간 손상에 미치는 Gluvone 소재의 효과를 조직학적으로 관찰한 결과는 Figure 38에 나타내었다. 에탄올군은 정상대조군에 비하여 지방변이 (fatty change) 및 necrosis가 관찰되어 간손상이 유발되었음을 나타내었다. Gluvone 소재군 및 silymarin군은 에탄올군에 비하여 지방 변성이 억제된 것으로 나타났으며, necrosis는 관찰되지 않아 Gluvone 소재의 섭취는 간손상을 억제시키는 데 도움이 되는 것으로 나타났다.

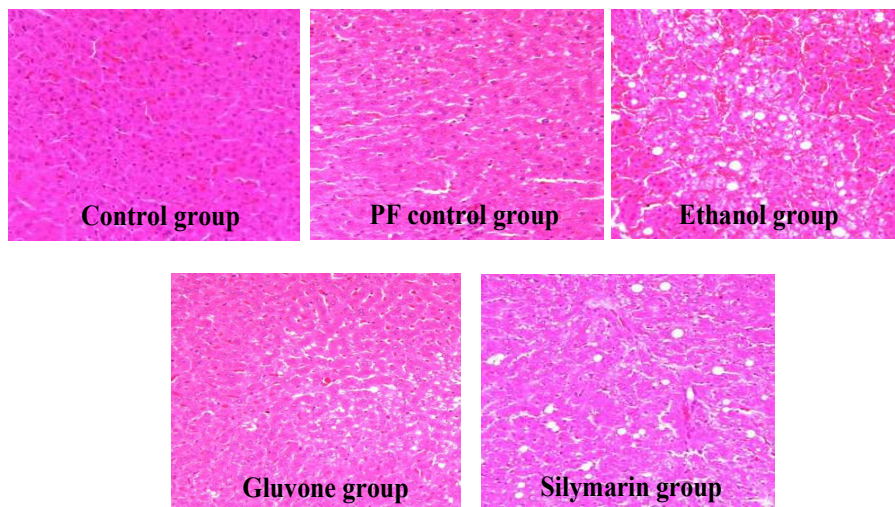


Figure 38. Effects of Gluvone 소재 on histological changes of liver tissue in ethanol-fed rats.

다. GLE의 알콜 섭취자 간 독성완화 효과 검증

α 임상실험에는 Gluvone 소재를 함유한 (2%) 표고버섯 균사체 배양물 (GLE) 정제 또는 분말을 시료로 사용하였다.

(1) 신체계측

20인의 실험대상자 모두 시험종료 시점까지 시험에 참가하였고, 부작용을 보고한 환자는 없었다. 대조군 및 GLE 군의 신체계측 결과 및 혈압은 Table 22에 나타내었다. 시험 시작 전 GLE 정제 섭취군의 체질량지수는 26.0 ± 2.5 kg/m²이었으며, 15주 후의 체질량지수는 25.4 ± 2.4 kg/m²로 시험 기간 전, 후의 차이는 -0.7 ± 1.2 kg/m²로 나타났다 (Table 22). 대조군의 경우 시험

기간 전, 후의 체질량지수가 각각 24.0 ± 3.0 kg/m², 23.7 ± 2.8 kg/m²로 나타나, 섭취 전, 후 유의적 차이가 없었다. 대조군과 GLE군 모두 체중, 허리둘레, 체지방이 시험 기간 전, 후에 유의적으로 변화하지 않았다. GLE군의 수축기 혈압은 시험기간 전, 후 각각 146.5 ± 20.3 mmHg, 145.1 ± 19.5 mmHg로 나타나 유의적 차이가 없었다. GLE군의 이완축기 혈압은 시험기간 전, 후 각각 96.6 ± 19.6 mmHg, 94.2 ± 17.4 mmHg로 나타나 유의적 차이가 없었다. 대조군의 수축기 및 이완기 혈압 또한 시험 전, 후 유의적인 차이가 없었다.

Table 22. Anthropometric measurement and blood pressure of GLE and control groups

	Control group			GLE group		
	Pre	Post	Difference ¹	Pre	Post	Difference
Body weight (kg)	71.6±9.7	71.4±10.0	-0.2±0.9	76.9±6.4	76.2±6.2	-0.7±1.6
BMI (kg/m ²)	24.0±3.0	23.7±2.8	-0.3±1.0	26.0±2.5	25.4±2.4	-0.7±1.2
Waist circumference (cm)	86.4±7.8	87.6±8.4	-1.2±1.7	89.3±6.3	89.9±9.5	0.5±2.3
Body fat (%)	22.7±4.5	21.6±4.8	-1.1±0.8	24.6±4.8	23.3±4.7	-1.2±1.4
Systolic blood pressure (mmHg)	127.1±10.7	126.5±9.9	-0.6±7.2	146.5±20.3	145.1±19.5	-1.4±6.0
Diastolic blood pressure (mmHg)	85.6±8.8	83.6±9.6	-2.0±5.7	96.6±19.6	94.2±17.4	-2.4±4.2

¹Difference between Pre and Post measurement

(2) 간기능 개선효과

- (가) GLE의 장기 복용이 간기능 지표에 미치는 영향을 Table 23에 나타내었다. GLE군에 있어서 섭취 전의 혈청 GOT 활성은 52.3 ± 19.1 IU/L로 나타났으며, 섭취 후에는 43.6 ± 15.5 IU/L로 나타나 유의적으로 감소하였다 (-8.7 ± 8.1 IU/L, $p < 0.05$). LEM군에 있어서 GLE섭취 전의 혈청 GPT 활성은 35.1 ± 18.2 IU/L이었으며, 시험기간 후 29.7 ± 14.2 IU/L로 유의적으로 감소되었다 (-5.7 ± 6.6 IU/L, $p < 0.05$). GLE군의 γ -GT 활성은 섭취 전, 후 각각 39.6 ± 21.1 IU/L, 38.1 ± 15.5 IU/L로 나타나 유의적 차이가 없었다. 대조군의 혈청 GOT, GPT 및 γ -GT 활성은 섭취 전, 후에 유의적인 차이가 없었다.
- (나) 본 연구에서 GLE 정제의 섭취는 혈청 GOT, GPT 활성을 유의적으로 감소시켰다. 따라서 GLE 정제의 장기간 섭취는 알코올 섭취자의 간기능 개선에 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 23. Serum GOT, GPT and γ -GT activities of GLE and control groups

	Control group			GLE group		
	Pre	Post	Difference ¹	Pre	Post	Difference
GOT (IU/L)	47.6±10.1	48.4±10.3	0.8±8.6	52.3±19.1	43.6±15.5	-8.7±8.1* ²
GPT (IU/L)	32.1±12.7	31.9±10.7	-0.2±4.0	35.1±18.2	29.7±14.2	-5.7±6.6*
γ -GT (IU/L)	45.4±16.5	45.9±16.6	-0.5±14.4	39.6±21.1	38.1±15.5	1.5±10.3

¹Difference between Pre and Post measurement

²Differences of GLE group and control group are significantly different at $p < 0.05$.

(3) 지질대사 개선효과

GLE의 장기 복용이 혈청 지질 profile에 미치는 영향을 Table 24에 나타내었다. GLE군에 있어서 시험 시작 전의 혈청 중성지방 농도는 164.2 ± 105.8 mg/dL이었으며, 15주 동안의 시험기간 후 153.0 ± 100.2 mg/dL로 유의적으로 감소되었다 (-11.2 ± 8.4 , $p < 0.05$). GLE군에 있어서 GLE제품 섭취 전의 공복 혈청 콜레스테롤 농도는 184.8 ± 37.4 mg/dL이었으며, 15주 동안 GLE제품을 섭취한 후 유의적으로 감소하여 (-7.1 ± 6.9 mg/dL) 177.7 ± 33.9 mg/dL로 나타났다 ($p < 0.05$). 대조군의 경우 시험 전, 후의 중성지방 및 콜레스테롤 농도는 유의적인 변화가 없었다. GLE HDL-콜레스테롤 농도는 시험 전 후 각각 50.2 ± 9.4 mg/dL, 50.8 ± 8.9 mg/dL로 나타났고, LDL-콜레스테롤 농도는 시험 전 후 각각 100.2 ± 26.8 mg/dL, 101.3 ± 26.2 mg/dL로 나타나 시험 전, 후 유의적 차이가 없었다. 대조군의 경우 시험 전, 후의 HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도 사이에 유의적인 차이가 없었다. 따라서 GLE 정제는 중성지방 및 콜레스테롤 개선효과가 우수한 것으로 나타났다.

Table 24. Serum lipid profile of GLE and control groups

	Control group			GLE group		
	Pre	Post	Difference ¹	Pre	Post	Difference
Plasma triglyceride (mg/dL)	153.5±73.0	155.0±71.8	1.5±11.1	164.2±105.8	153.0±100.2	-11.2±8.4 ²
Total cholesterol (mg/dL)	183.9±25.4	184.2±27.9	0.3±8.2	184.8±37.4	177.7±33.9	-7.1±6.9*
HDL-cholesterol (mg/dL)	49.8±12.0	52.4±11.5	2.6±2.5	50.2±9.4	50.8±8.9	0.6±5.0
LDL-cholesterol (mg/dL)	103.6±31.9	104.6±35.5	1.0±12.2	100.2±26.8	101.3±26.2	1.1±12.0

¹Difference between Pre and Post measurement

²Differences of GLE group and control group are significantly different at p<0.05.

(4) 지질과산화 및 항산화 효소계 활성화에 미치는 영향

(가) 대조군 및 GLE군의 지질과산화물 농도 및 항산화 효소계 활성을

측정한 결과는 Table 25에 나타내었다. GLE군의 시험 전 혈청 TBARS 농도는 5.4±1.1 μmol MDA/L이었으나, 시험기간 후 4.7±1.1 μmol MDA/L로 유의적으로 감소하였다 (-0.8±0.5 μmol MDA/L, p<0.05). GLE군의 적혈구 glutathione 함량은 29.4±5.7 nmol/g Hb이었으나, 시험기간 후 32.7±5.0 nmol/g Hb로 유의적으로 증가하였다 (3.2±3.4 nmol/g Hb, p<0.05). GLE군의 conjugated diene 농도는 시험 전, 후 각각 6.0±1.3 μM, 5.5±1.0 μM로 나타나 유의적 차이가 없었다. 대조군의 TBARS, glutathione 및 conjugated diene 농도는 시험 전, 후 유의적 차이가 없었다. GLE군의 SOD 활성은 섭취 전, 후 각각 7.12±1.2 IU/mgHb, 7.3±1.7 IU/mgHb로 나타나 유의적 차이가 없었다. GLE군의 catalase 활성은 섭취 전, 후 각각 156.9±8.6 K/gHb, 166.9±8.0 K/gHb로 나타났으며, GSH-px 활성은 섭취 전, 후 각각 31.3±4.4 IU/gHb, 32.1±3.8 IU/gHb로 나타나 유의적 차이가 없었다. 대조군의 적혈구 SOD, catalase, GSH-px 활성은 시험 전, 후 유의적 차이가 없었다. GLE군의 혈청 retinol 농도는 섭취 전 48.2±13.4 μg/dL, 섭취 후 50.2±17.2 μg/d로 나타났고, α-tocopherol 농도는 섭취 전, 후 각각 519.6±67.7 μg/dL, 532.3±77.1 μg/dL로 나타나 유의적인 차이가 없었다.

혈청 CRP 농도는 GLE 정제 섭취 전 1.34 ± 0.26 mg/L, 1.28 ± 0.20 mg/L로 나타나 유의적인 차이가 없었다.

- (나) 흰쥐에 있어서 GLE의 섭취는 간 조직의 지질과산화물 농도를 감소시키고, 간 조직의 catalase 및 GSH-px 활성을 개선시키는 것으로 나타났다²⁴⁾. 과도한 알코올의 섭취는 활성산소 생성을 촉진시키고 지질과산화물 농도를 증가시켜 간 손상을 초래하게 된다. 지질과산화물의 감소 및 항산화능의 개선은 알코올 섭취로 인한 간 손상을 예방, 지연시킬 수 있다. GLE은 유리라디칼 소거능 및 항산화능이 우수한 것으로 알려져 있으며²⁵⁾, 항산화능이 우수한 물질은 간기능 개선에 도움을 줄 수 있다. 동물모델계에 있어서 GLE의 섭취는 혈청 GPT 및 γ -GT를 유의적으로 감소시키는 것으로 보고되었다²⁴⁾. 본 연구에서 GLE 정제의 섭취는 지질과산화물 농도를 유의적으로 감소시켰고, GSH 농도를 유의적으로 증가시켰다.
- (다) 따라서 GLE 정제는 지질과산화물 생성을 억제하여, 알코올 섭취로 인한 간 손상 예방에 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 25. Antioxidant status of GLE and control groups

	Control group			GLE group		
	Pre	Post	Difference ¹	Pre	Post	Difference
TBARS (μ mol MDA/L)	4.9 \pm 1.1	4.7 \pm 0.7	-0.2 \pm 0.6	5.4 \pm 1.1	4.7 \pm 1.1	-0.8 \pm 0.5 ^{*2}
GSH (nmol/g Hb)	30.5 \pm 3.8	30.3 \pm 3.5	-0.2 \pm 1.1	29.4 \pm 5.7	32.7 \pm 5.0	3.2 \pm 3.4 [*]
Conjugated diene(μ M)	6.0 \pm 0.9	6.1 \pm 1.2	0.2 \pm 1.1	6.0 \pm 1.3	5.5 \pm 1.0	-0.5 \pm 1.1
SOD (IU/mgHb)	8.7 \pm 1.4	8.1 \pm 1.3	-0.6 \pm 1.9	7.1 \pm 1.2	7.3 \pm 1.7	0.1 \pm 0.7
Catalase (K/gHb)	155.1 \pm 10.5	153.3 \pm 14.1	1.8 \pm 15.8	156.9 \pm 8.6	166.9 \pm 8.0	10.0 \pm 5.2
GSH-px (IU/gHb)	31.5 \pm 4.5	31.9 \pm 4.0	0.4 \pm 2.4	31.3 \pm 4.4	32.1 \pm 3.8	0.8 \pm 2.7
Retinol (μ g/dL)	43.6 \pm 11.4	40.7 \pm 10.4	-2.9 \pm 10.5	48.2 \pm 13.4	50.2 \pm 17.2	1.9 \pm 9.3
α -Tocopherol (μ g/dL)	507.2 \pm 80.9	505.8 \pm 81.6	-1.4 \pm 21.3	519.6 \pm 67.7	532.3 \pm 77.1	12.7 \pm 25.5
CRP (mg/L)	1.40 \pm 0.24	1.34 \pm 0.27	0.06 \pm 0.21	1.34 \pm 0.26	1.28 \pm 0.20	0.06 \pm 0.10

¹Difference between Pre and Post measurement

²Differences of GLE group and control group are significantly different at $p < 0.05$.

(5) DNA damage 정도

GLE의 섭취가 림프구 DNA 손상에 미치는 영향을 Table 26에 나타내었다. 시험 전 LEM군의 head DNA, tail DNA, tail extent moment, tail length는 각각 92.4 ± 2.9 , 9.3 ± 2.5 , 3.9 ± 1.2 , 22.2 ± 6.0 로 나타났고, 시험 후 87.9 ± 10.7 , 9.5 ± 1.2 , 3.4 ± 0.9 , 18.9 ± 8.2 로 나타나 유의적인 차이가 없었다. 대조군의 head DNA, tail DNA, tail extent moment, tail length는 시험 전, 후에 유의적 차이가 없었다.

Table 26. Hydrogen peroxide induced DNA damage of leukocytes

Leucocytes	Control group			GLE group		
	Pre	Post	Difference ¹	Pre	Post	Difference
Head DNA	92.5 ± 1.4	88.7 ± 11.3	3.8 ± 10.8	92.4 ± 2.9	87.9 ± 10.7	4.6 ± 9.6
Tail DNA	9.1 ± 2.5	10.2 ± 3.4	1.2 ± 1.57	9.3 ± 2.5	9.5 ± 1.2	0.3 ± 2.2
Tail extent moment	3.4 ± 0.6	3.03 ± 0.7	-0.3 ± 0.8	3.9 ± 1.2	3.4 ± 0.9	-0.4 ± 1.4
Tail length	20.1 ± 6.5	19.2 ± 8.6	-0.8 ± 6.9	22.2 ± 6.0	18.9 ± 8.2	-3.3 ± 7.5

¹Difference between Pre and Post measurement

GLE군의 소변 8-OHdG 농도는 섭취 전 $2.82 \pm 0.69 \mu\text{g/g creatinin}$, 섭취 후 $2.62 \pm 0.72 \mu\text{g/g creatinine}$ 으로 나타나 섭취 전, 후 유의적 차이가 없었다 (Table 27). 대조군의 소변 8-OHdG 농도는 섭취 전, 후 유의적 차이가 없었다. 따라서 GLE는 DNA damage에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. 따라서 알코올 섭취자에 있어서 GLE는 산화적 스트레스를 경감시켜 간조직을 보호하고, 혈액 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 개선시키는 것으로 사료된다.

Table 27. Urinary 8-OH guanidine levels of LEM and control groups

	Control group			GLE group		
	Pre	Post	Difference ¹	Pre	Post	Difference
8-OHG ($\mu\text{g/g creatinine}$)	3.22 ± 0.75	3.03 ± 0.75	-0.19 ± 0.71	2.82 ± 0.69	2.62 ± 0.72	-0.2 ± 0.62

¹Difference between Pre and Post measurement

4. Gluvone 소재 소재의 안전성

가. 유효성분의 안전성 (mouse에 대한 급성시험)

“Gluvone 소재 소재”는 mouse의 급성 및 아급성 실험에서 독성을 보이지 않았음

(1) 사망 및 임상증상

“Gluvone 소재”에 대한 시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 사망수를 조사하였고 (Table 28), 또한 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (Table 29). 투여 당일부터 7일 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 투여당일 6시간 관찰한 결과 점차적으로 행동이 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 Gluvone 소재가 경구 급성 독성실험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

Table 28. Mortality of mice treated orally with Gluvone 소재 for 7 days

Sex	Dosage (mg/30 g)	Days after treatment								Final mortality	
		0	1	2	3	4	5	6	7		
Male	0	0/5 ¹⁾	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	21.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	42.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	21.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	42.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

¹⁾ Values are expressed as animal numbers (cumulative mortality number of mice/total number of mice).

Table 29. Clinical signs in mice treated, orally with Gluvone 소제 for 7 days¹⁾

Sex	Dosage (mg/30 g)	Clinical sign	Duration (day)								
			0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	0	NAD ²⁾	5	5	5	5	5	5	5	5	
	15	NAD ³⁾	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
	21.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
	30	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
	42.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
	60	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Female	0	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		15	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
			DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
21.3		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
30		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
42.3		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
60		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	

¹⁾ Mice were used in all treatments.

²⁾ NAD: not abnormalities detected.

³⁾ DMA: decrease of motor activity.

(2) 체중

“Gluvone 소재” 시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 몸무게의 변화를 측정하였다 (Table 30). 투여 후 7일 동안 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 2.9 g이 증가하였고, 처리농도 15, 21.3, 30, 42.3, 60 mg에 따라 각각 2.9, 3.7, 3.2, 3.2, 3.1 g이 증가하여 21.3 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다. 또한 암컷에서도 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 1.6 g이 증가하였고, 처리농도에 따라 각각 2.2, 2.0, 1.9, 1.4, 1.7 g이 증가하여 15 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였고, 42.3 mg 처리구에서 몸무게의 증가가 대조구보다 다소 낮았다.

따라서 이 “Gluvone 소재”는 ICR mouse 암컷의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 30. Body weights in mice treated orally with Gluvone 소재 for 7 days¹⁾

Sex	Dosage (mg/30 g)	Days after treatment			
		0	4	7	Gain
Male	0	31.2±1.0 ²⁾	34.9±1.3	34.6±1.6	2.4
	15	31.1±1.3	33.6±1.2	34.0±1.6	2.9 ^{3)a}
	21.3	30.7±1.6	33.5±1.6	34.4±1.4	3.7 ^a
	30	31.9±1.0	34.7±0.9	35.1±0.8	3.2 ^a
	42.3	31.9±1.0	34.7±1.3	35.1±1.7	3.2 ^a
	60	31.2±1.2	33.5±1.0	34.3±1.4	3.1 ^a
Female	0	24.2±1.1	27.5±1.3	25.8±1.2	1.6
	15	24.9±1.0	28.0±0.8	27.1±0.9	2.2 ^a
	21.3	22.3±0.8	24.3±1.2	24.3±0.8	2.0 ^a
	30	24.6±0.8	27.9±0.9	26.5±1.6	1.9 ^a
	42.3	21.1±1.0	24.7±1.7	22.5±0.4	1.4 ^a
	60	22.2±0.8	24.8±1.2	23.9±0.6	1.7 ^a

¹⁾ 5 mice were used in all treatments

²⁾ Mean ± SD.

³⁾ No significantly different from control at p<0.05 by t-test.

(3) 육안적 해부소견

“Gluvone 소재” 시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 장기 (cecum, intestine, stomach, adr. gland, brain, heart, liver, kidney, spleen, testis, thymus)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (Table 31, 32). 시료 투여 후 7일 후 장기를 적출하여 유착, 확장, 종대를 조사한 결과 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

따라서 이 “Gluvone 소재”는 ICR mouse 장기의 유착이나, 확장 및 종대 등에는 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 31. Gross findings in male mice treated orally with Gluvone 소재 for 7 days

Organ	Clinical sign	Dosage (mg/30 g)					
		0	15	21.3	30	42.3	60
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-	-
	NGF ¹⁾	5(100%) ²⁾	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr. gland	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

¹⁾ NGF: No gross finding.

²⁾ () : % of finding from animal number 5.

Table 32. Gross findings in female mice treated orally with Gluvone 소제 for 7 days

Organ	Clinical sign	Dosage (mg/30 g)					
		0	15	21.3	30	42.3	60
Organ	Adhesion	—	—	—	—	—	—
	NGF ¹⁾	5(100%) ²⁾	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr. gland	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement	—	—	—	—	—	—
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

¹⁾ NGF: No gross finding.

²⁾ () : % of finding from animal number 5.

(4) 혈액학적 검사

“Gluvone 소재” 시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일 후에 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (Table 33). 수컷에서 대조구에 비해 42.3 mg까지 RBC, Hb, Hct 및 BLP가 증가하였다. 또한 암컷에서도 RBC, Hb, Hct, 및 BLP가 증가하였다.

따라서 이 “Gluvone 소재”는 mouse의 암수 혈액학적인 인자에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

Table 33. Hematological findings in mice treated orally with Gluvone 소재 for 7 days

Item ¹⁾	Male (mg/30 g)						Female (mg/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60	0	15	21.3	30	42.3	60
WBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.2	10.8	8.1	8.1	8.4	8.2	1.4	0.7	0.7	1.2	0.6	0.9
RBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7.3	7.3	9.4	11	11.4	11.2	7.9	6.1	8.1	7.7	8.6	8.4
Hb (g/dL)	13.3	13.9	14.5	20.1	21.	20.8	15.5	13.6	16.2	16.2	15.8	15.7
Hct (%)	38.6	40.5	48.8	58.2	57.5	58.4	40.5	31.6	42.9	42.3	43.7	44
BLP ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1381	1275	1620	1625	1527	1451	788	1043	1022	1145	1086	1014
MCV	50	52	49	51	51	49	50	49	50	52	49	51
MCH	18.3	18.9	17.8	18.1	18.0	18.4	18.7	20.7	19.2	20.1	18.7	18.6
MCHC	38.2	35.3	34.9	34.6	34.2	34.7	37.2	40.5	38.3	38.2	38	38

¹⁾ WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

나. 유효성분의 안전성 (mouse에 대한 아급성시험)

“Gluvone 소재”에 대한 안전성의 경우
 - 경구 투여 시 아급성 독성을 보이지 않음

(1) 사망 및 임상증상

“Gluvone 소재”에 대한 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 mouse 사망수를 조사하였고 (Table 34), 또한 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (Table 35). 투여 당일부터 4주간 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 점차적으로 행동이 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 시료 “허혈 및 간 보호 기능성 소재-버섯균사체 배양물”이 경구 아급성 독성시험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

Table 34. Mortality of mice treated orally with Gluvone 소재 for 4 weeks

Sex	Dosage (mg/30 g)	Week after treatment					Final mortality
		0	1	2	3	4	
Male	0	0/10 ¹⁾	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

¹⁾ Values are expressed as animal numbers (cumulative mortality number of mice/total number of mice).

Table 35. Clinical signs in mice treated, orally with Gluvone 소재 for 4 weeks¹⁾

Sex	Dosage (mg/30 g)	Clinical sign	Week after treatment				
			0	1	2	3	4
Male	0	NAD ²⁾	10	10	10	10	10
		NAD ³⁾	10	10	10	10	10
	500	DMA	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10
	1000	DMA	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10
	2000	DMA	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10
Female	0	NAD	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10
	500	DMA	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10
	1000	DMA	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10
	2000	DMA	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10

¹⁾ Mice were used in all treatments.

²⁾ NAD: not abnormalities detected.

³⁾ DMA: decrease of motor activity.

(2) 체중측정, 사료 섭취량 및 물 섭취량

“Gluvone 소재” 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 몸무게의 변화를 측정하였다. 4주가 경과하면서 수컷 마우스들의 평균 몸무게는 6.7~9.2 까지 증가하였다. 대조군과 처리군의 평균 몸무게 변화는 없었다. 사료의 섭취량은 대조군의 27.10 g 과 유사하게 섭취하였다. 물의 섭취는 대조군의 47.89 ml 보다는 약간 적게 섭취하는 경향을 나타내었지만 생리작용에 이상을 가져올 정도는 아니었다.

암컷 마우스들은 4주가 경과하면서 평균 몸무게는 2.2~3.1 까지 증가하였다. 대조군과 처리군의 평균 몸무게 변화는 없었다. 사료의 섭취량은 대조군의 24.68 g 과 유사하게 섭취하였으며 물의 섭취는 대조군의 35.56 ml 과 비슷하게 섭취하였다 (Table 36).

Table 36. Body weight, food consumption and water consumption of male mice treated orally with Gluvone 소재 for 4 weeks¹⁾

Sex	Doses ($\mu\text{l/g}$)	Body weight (g)	Food intake (g)	Water intake (ml)
Male	0	37.23 \pm 1.07	27.10 \pm 9.54	47.89 \pm 12.13
	500	37.49 \pm 1.39	26.96 \pm 10.23	39.83 \pm 10.35
	1000	36.02 \pm 1.03	27.01 \pm 9.77	38.83 \pm 9.38
	2000	35.17 \pm 0.81	26.83 \pm 9.67	38.67 \pm 9.63
Female	0	35.43 \pm 1.04	24.68 \pm 9.10	35.56 \pm 9.53
	500	33.58 \pm 0.90	25.24 \pm 9.80	38.33 \pm 11.44
	1000	35.03 \pm 0.86	26.32 \pm 9.20	33.33 \pm 10.67
	2000	34.98 \pm 0.98	25.45 \pm 8.65	37.22 \pm 11.06

¹⁾ Mean \pm S.D of 10 mice.

(3) 육안적 해부소견

“Gluvone 소재” 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 장기 (cecum, intestine, stomach, adr. gland, brain, heart, liver, kidney, spleen, testis, thymus)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (Table 37). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 유착, 확장, 종대를 조사한 결과 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다. 따라서 4주간의 아급성 독성시험에서 “Gluvone 소재”는 ICR mouse 장기의 육안적 소견에 아무런 영향을 미치지 않았다.

Table 37. Gross finding in mice treated orally with Gluvone 소재 for 4 weeks

Sex	Doses (μ l/g)	Liver (g)	Stomach (g)	Spleen (g)	Kindeg (g)	Lung (g)
Male	0	10 ¹⁾ (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	500	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	1000	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	2000	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Female	0	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	500	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	1000	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	2000	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

¹⁾ Values are expressed as animal numbers. (): % of finding.

(4) 장기중량측정

“Gluvone 소재” 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mg /30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성독성시험을 4주간 수행하면서 장기 (간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 무게를 조사하였다 (Table 38). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 무게를 측정한 결과 무게에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

Table 38. Organ weight in male mice treated orally with Gluvone 소재 for 4 weeks

Sex	Doses (μl/g)	Liver (g)	Stomach	Spleen	Kindey		Lung
					R	L	
Male	0	1.75±0.18 ¹⁾	0.26±0.11	0.12±0.02	0.34±0.04	0.33±0.05	0.23±0.02
	500	1.89±0.16	0.23±0.08	0.11±0.01	0.34±0.06	0.35±0.04	0.22±0.03
	1000	1.61±0.19	0.21±0.12	0.10±0.03	0.33±0.04	0.33±0.05	0.21±0.03
	2000	1.71±0.22	0.23±0.10	0.12±0.01	0.34±0.05	0.35±0.04	0.25±0.04
Female	0	1.70±0.17	0.24±0.08	0.11±0.03	0.31±0.02	0.32±0.03	0.22±0.02
	500	1.67±0.16	0.22±0.10	0.12±0.03	0.34±0.05	0.32±0.01	0.23±0.01
	1000	1.78±0.16	0.26±0.08	0.11±0.02	0.37±0.04	0.36±0.03	0.25±0.03
	2000	1.80±0.15	0.22±0.07	0.13±0.01	0.32±0.03	0.31±0.04	0.23±0.02

¹⁾ Mean ±S.D. of 5 mice 4 weeks after treatment

(5) 혈액학적 및 혈액생화학적 검사 검사

“Gluvone 소재” 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (Table 39).

Table 39. Hematological findings in mice treated orally with Gluvone 소재 for 4 weeks¹⁾

Item ²⁾	Male				Female			
	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
WBC (Thous/μl)	3.0	2.8	2.4	2.2	2.8	2.0	3.2	2.5
RBC (Mil/μl)	7.5	7.7	8.6	7.2	8.4	8.5	8.8	7.9
Hb (g/dL)	12.4	12.6	12.7	11.8	13.3	12.8	13.1	12.1
Hct (%)	41.3	42.1	46.5	38.8	43.3	45.8	44.1	43.5
MCV (fL)	41.2	51.6	52.1	50.3	53.8	54.3	55.3	55.7
MCH (pg)	15.8	15.7	14.0	16.1	15.5	15.1	15.3	15.4
MCHC (g/dL)	29.2	30.2	27.5	28.4	28.9	27.5	29.3	28.6
Platelet (Thous/μl)	598	602	721	578	593	555	563	457
Segment (%)	25.2	24.9	25.8	26.3	23.9	21.8	23.6	26.8
Lymphocyte (%)	60.5	57.8	57.8	60.8	66.3	68.9	66.9	66.2
Monocyte (%)	6.3	6.9	7.3	5.7	2.5	4.8	5.7	3.8
Eosinphill (%)	2.8	3.8	2.6	3.4	6.3	5.9	5.2	3.4
Basophil (%)	0.6	0.8	0.8	0.7	1.5	1.2	1.8	0.8

¹⁾ Measured in samples from 4 weeks after treatment.

²⁾ WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

5. 제품화

가. 파우더:

-성상: 신령버섯균사체 액체배양농축물을 동결건조 한 후 spray dryer로 분말화



Figure 39. A typical powder products of Gluvone 소재.

나. 과립:

-성상: 신령버섯균사체 액체배양물을 고압 열수추출, 121℃에서 1시간추출)으로 배양액의 유효성분을 추출한 다음, 0.45 μm membrane filter가 장착된 진동막여과장치로 여과한 농축물 (Brix 40)에 함수결정포도당 (83%), 아스코르빈산 (1.5%), 레몬향 (0.1%), 송이향 (0.1%)를 넣고 과립기에서 과립 제조한 후 동결건조 (수분함량 7% 미만)



Figure 40. A typical granule products of Gluvone 소재.

다. 캡슐:

-성상: 과립형을 캡슐화



Figure 41. A typical capsule products of Gluvone 소재.

라. Tablet:

-성상: 신령버섯균사체 액체배양물을 고압 열수추출, 121℃에서 1시간추출)으로 배양액의 유효성분을 추출한 다음, 0.45 μm membrane filter가 장착된 진동막여과장치로 여과한 농축물 (Brix 40)에 정제고형제인 하이드록시프로메틸셀룰로스 (HPMC) 1%, 자당지방산 에스테르 0.7%, 실리콘알루미늄산나트륨 0.7%, 스테아린산마그네슘 0.7%, PG 0.2%를 첨가하여 황색의 원형정제



Figure 42. A typical tablet products of Gluvone 소재.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 1차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

구분 개발내용	연구 개발 기간												결과(%)	
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
제 1세부과제:														
○기능성 성분 고품유 버섯균사체 배양물 생산 조건구명														
-버섯균 선발														100
-최적배지조성 개발														100
-최적배양조건 설정														100
-기능성 물질 분리														100
제 2세부과제:														
○심근허혈-재관류 손상억제 확인 (<i>in vivo</i>)														
-유효농도 범위 설정														100
-손상억제 확인														100
-심근허혈 조직 검사														100
-심근허혈-재관류 손상에 대한 심근 보호 효과														100
위탁과제:														
○독성완화 효과 검증														
-혈장 성분조사														100
-간 조직 관찰														100
협동연구기관:														
○버섯균사체 대량생산														
-버섯균사체 액체 배양물 대량생산														100
총진도율														100

2. 2차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

구분 개발내용	연구 개발 기간												결과(%)	
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
제 1세부과제:														
○유효성분 분리·동정														
-배양추출물 조제												100
-분획물 조제												100
-일반성분 분석 및 유효성분 분석	100
제 2세부과제:														
○심근허혈-재관류 손상억제 작용기전 확립 (<i>in vivo</i>)														
-심근세포 배양에 의한 약리 작용기전	100
-Cell line	100
-동물모델 (기전연구)	100
위탁과제:														
○독성완화 효과 검증														
-알콜 유도 간손상 보호 효과	100
-알콜성 간질환의 간 독성 개선효과 검증	100
협동연구기관:														
○버섯균사체 배양물 대량 생산														
-대량생산	100
총진도율														100

3. 3차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

구분 개발내용	연구 개발 기간												결과(%)	
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
제 1세부과제:														
○유효성분 구조분석														
-Gluvone 소재 등의 기능성 물질 구조결정														100
○유효성분 안전성 검증														
-동물실험에 의한 급성 및 아급성														100
제 2세부과제:														
○부작용 검증 (흰쥐 동물모델)														
-심장이외 혈관에 대한 독성 및 작용														100
-등장성 이완/수축반응														100
-세포독성 및 부작용 검사														100
-심근허혈-재관류 손상에 대한 심근 보호 효과														100
위탁과제:														
○알콜섭취자의 간보호효과 및 작용 mechanism 규명														
-알콜섭취자의 간보호 효과														100
-작용 mechanism 규명														100
협동연구기관:														
○소재화														
-제품화														80
총진도율														

제 2 절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

가. 버섯균사체 배양물의 허혈 및 간 독성 보호 효과 및 이 효과에 관련 물질 분리·동정과 이들 물질의 대량생산 기술의 개발

나. 이 기술로 다른 기능성 버섯균사체 배양물을 생산할 수 있는 기술 개발

다. 이들 물질 함유 버섯의 개발이 가능

2. 경제 · 산업적 측면

가. 참여 업체의 애로기술 해결로 기업의 매출 증대 및 고용창출이 기대
- 현재 국내 허혈 및 간질환 치료제 시장은 연간 약 1조 500억의 수준으로 이들의 약 5%만 대체한다고 할 경우 약 50억원의 수익 창출

나. 수입되고 있는 isoflavone 소재의 대체로 인한 수입대체효과를 창출
- 현재 국내 estrogen 결핍과 성인병 치료제 시장은 거의 다국적 제약사가 거의 시장을 장악하고 있어 Gluvone 소재는 의약품과 건강보조식품에 널리 사용될 수 있는 기능성 소재로써, 약 1조 500억으로 추정되는 국내 건강기능성식품시장과 약 650억불 규모로 추정되는 세계시장에서 허혈 및 간 보호 기능이 있는 소재로써 중요하게 활용될 수 있으며 연간 약 50억원의 수입대체 효과를 기대

다. Gluvone 소재를 함유하는 버섯이 개발될 경우 농민의 소득증대를 기대
- 버섯균사체배양물의 허혈 및 간 보호 소재는 버섯자실체에도 함유되어 있기 때문에 버섯소비를 증가시켜 버섯재배농가의 소득 증대에 기여 [10억원: 특정 버섯 (아가리쿠스, 느타리, 동충하초) 재배시장이 연간 약 1,000억원 규모로 이의 1% 증대효과]

라. 국민 건강 유지

- 본 연구에서 개발된 허혈 및 간 보호 소재를 지속적으로 복용함으로 허혈 및 간질환 환자의 건강을 유지

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 활용방안

가. 국내외 특허출원을 할 것이다.

나. 현장지도 및 교육 자료로 이용할 것이다.

다. 버섯균사체를 이용하여 다른 생물전환된 기능성 소재를 생산하는 방법으로 활용할 것이다.

라. 가격이 저렴하고 부작용이 없는 허혈 및 간질환 치료제 소재로 개발할 것이다.

마. 버섯의 허혈 및 간질환 치료제 자료임을 홍보하여 버섯소비촉진 자료로 활용할 것이다.

2. 홍보전략

가. 국내·외 학회에 연구결과 발표

나. 국내·외 관련 전시회 참여 (한국, 미국, 일본, 중국, 유럽)

다. TV, 라디오, 신문홍보

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

1. 우리나라에 뿐만 아니라 전 세계적으로 허혈 및 간질환 환자 증가율이 지속적으로 증가하여 전 세계적으로 허혈 및 간질환 치료제 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.
2. 허혈 및 간 기능 보호제의 개발은 합성물질 보다 가격이 저렴하고 부작용이 없는 천연물로부터 알콜성 간질환 (alcoholic liver disease, ALD)등 간 손상을 일으키는 중요한 mechanism을 저해하여 간질환 예방 및 재발을 줄일 수 있는 치료법 개발에 이용할 수 있다는 중요하다는 사실을 알았다.
3. 선진국에 비해 우리나라에서도 많은 과학자들이 허혈 및 간질환 치료제에 관한 연구를 수행하고 있다는 사실은 고무적이었다.

제 7 장 참고문헌

1. Franke, A.A., Custer, L.J., Cerna, C.M., Narala, K.K. 1994. Quantitation of Phytoestrogens in Legumes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 42:1905–1913.
2. Cui, F.J., Tao, W.Y., Xu, Z.H., Guo, W.J., Xu, H.Y., Ao, Z.H., Jin, J. and Wei, Y.Q. 2007. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Bioresource Technol.* 98:395–401.
3. Figard, H., Girard, C., Mougin, F., Demougeot, C., Berthelot, A. 2008. Effects of aqueous hop (*Humulus Lupulus* L.) extract on vascular reactivity in rats: mechanisms and influence of gender and hormonal status. *Phytomedicine.* 15(3):185–193.
4. Yeung, D.K., Leung, S.W., Xu, Y.C., Vanhoutte, P.M., Man, R.Y. 2006. Puerarin, an isoflavonoid derived from *Radix puerariae*, potentiates endothelium-independent relaxation via the cyclic AMP pathway in porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol.* 15;552(1–3):105–111.
5. Ohkawa, H., Ohisi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351–358.
6. Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27(3):502–522.
7. Markund, S., Markund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47:469.
8. Markund, S. 1976. Pyrogallol antioxidation. *CRC handbook of method for oxygen radical reserch.* 243.
9. Abei, H.E. Catalase. 1984. *Methods in enzymatic analysis* 3rd. 3:273.
10. Bostian, K.A., Betts, G.F. 1978. Kinetics and reaction mechanism of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 173:787–798.
11. Lawrence, R.A., Burk, R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 71(4):952–958.
12. Peng, R., Tu, Y.Y., Yang, C.S. 1982. The induction and competitive inhibition

- of a high affinity microsomal nitrosodimethylamine demethylase by ethanol. *Carcinogenesis* 3:1457–1461.
13. Choi, H.T., Kim, E.S., Ham, S.S. 2008. Effects of complex food ingredient composed of garlic and fermented soybean hypocotyl on the serum lipid profiles of the rats fed high-fat diet. *Korean J. Food Sci. Technol.* 467–469.
 14. Ellman, G.S. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70–77.
 15. Dong, Q., Yao, J., Yang, X.T., Fang, J.N. 2002. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research* 337:1417–1421. 14
 16. Pramanik, M., Mondal, S., Chakraborty, I., Rout, D., Islam, S.S. 2005. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Research* 340:629–636.
 17. Rout, D., Mondal, S., Chakraborty, I., Pramanik, M., Islam, S.S. 2005. Chemical analysis of new(1-3)-,(1-6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research* 340:2533–2539.
 18. Mishra, S.K., Abbot, S.E., Choudhury, Z., Cheng, M., Khatab, N., Maycock, N.J., Zavery, A., Aaronson, P.I. 2000. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovasc Res.* 46(3):539–546.
 19. Satake, N., Shibata, S. 1999. The potentiating effect of genistein on the relaxation induced by isoproterenol in rat aortic rings. *Gen Pharmacol.* 33(3):221–227.
 20. Satake, N., Imanishi, M., Keto, Y., Yamada, H., Ishikawa, M., Shibata, S. 2000. Genistein potentiates the relaxation induced by β_1 - and β_2 -adrenoceptor activation in rat aortic rings. *J Cardiovasc Pharmacol.* 35(2):227–233.
 21. Recknagel, R.O. 1983. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Science* 33:401–408.
 22. Park, E.J., Jeon, C.H., Ko, G. 2000. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. *J. Pharm. Pharmacol.* 52:437–440.
 23. Lieber, C.S., Teachke, R., Hasumura, Y., DeCarli, L.M. 1975. Differences in hepatic and metabolic changes after acute and chronic alcohol consumption.

- Fed. Proc. 34:2060–2074.
24. Choi, M.Y., Jung, S.J., Lim, S.S. 1998. Effects of Hot water from *Lentinus edodes* on hepatic functional enzyme activities in the rat fed butter yellow(p-dimethylaminoazobenzene). *Korean J. Food Nitr.* 11:114–122.
 25. Choi, Y., Lee, S.M., Chun, J., Lee, H.B., Lee, J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry* 99:381–387.



Daidzein administration *in vivo* reduces myocardial injury in a rat ischemia/reperfusion model by inhibiting NF- κ B activation

Jong Woo Kim^a, Yong Chun Jin^{b,1}, Young Min Kim^b, Sangho Rhie^a, Hye Jung Kim^b, Han Geuk Seo^b, Jae Heun Lee^b, Yeong Lae Ha^c, Ki Churl Chang^{b,*}

^a Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, 660-751, Republic of Korea

^b Department of Pharmacology, School of Medicine, and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju, 660-751, Republic of Korea

^c Division of Applied Life Sciences, Graduated School, and Institute of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 March 2008
Accepted 1 December 2008

Keywords:
Apoptosis
Daidzein
Myocardial ischemia/reperfusion
Rat
Antioxidant

ABSTRACT

Aims: We tested the hypothesis that daidzein may reduce myocardial damage by both inhibiting the release of cytokines and limiting the nuclear translocation of NF- κ B.

Main methods: Male Sprague–Dawley rats were anesthetized, and the left anterior descending coronary artery (LAD) was ligated for 25 min. Twenty-four hours after reperfusion was established, the hemodynamics and infarct size were examined.

Key findings: Treatment with daidzein (10 mg/kg, i.p.) 1 h prior to the ischemia/reperfusion procedure (I/R) reduced the infarct size by 52.8% ($P < 0.05$). Daidzein also significantly improved I/R-induced myocardial contractile dysfunction by improving the left ventricular diastolic pressure and the positive and negative maximal values of the first derivative of the left ventricular pressure. In addition, daidzein reduced the plasma levels of TNF- α and IL-6 in I/R rats and decreased malondialdehyde levels, myeloperoxidase activity, catalase activity and neutrophil infiltration in I/R rat myocardium. Interestingly, daidzein inhibited I/R-induced myocardial apoptosis by decreasing DNA strand breaks and cleaved caspase-3 activity. Furthermore, daidzein inhibited both the nuclear translocation of NF- κ B in I/R rat hearts and the H₂O₂-induced activation of NF- κ B-luciferase activity in human umbilical vein endothelial cells.

Significance: This study reveals that the administration of daidzein *in vivo* attenuates I/R-induced myocardial damage via inhibition of NF- κ B activation, which in turn may suppress inflammatory cytokine expression.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Many studies have demonstrated the beneficial role of a diet rich in polyphenols in protecting against chronic diseases, particularly those with an inflammatory component where reactive species are formed. Soybeans are known to be a complete food, as they contain proteins, fats, essential amino acids and beneficial secondary metabolites, such as isoflavones and phenolic compounds. The isoflavones in soybeans are thought to be at least partially responsible for the potential health benefits of soy consumption. Epidemiological studies have shown that consumption of soybeans and soy products reduces the risk of human cancer, osteoporosis and cardiovascular diseases (Messina et al., 1994; Potter et al., 1998; Anthony et al., 1997). The three isoflavone aglycones, genistein, daidzein, and glycitein, are each present in four glucosidic forms in soybeans and soy foods. Recently, it has been reported that daidzein exhibits a variety of beneficial effects on human health (Kurzer and Xu, 1997; Bingham et al.,

1998; Setchell and Cassidy, 1999; Clarkson, 2000), including the chemoprevention of cardiovascular diseases and cancer, and it can serve as an alternative for estrogen replacement therapy to prevent and treat osteoporosis in post-menopausal women with bone loss. Myocardial ischemia–reperfusion (I/R) injury is a clinical problem associated with procedures, such as angioplasty, coronary bypass surgery, transplantation and thrombolysis, which are commonly used to re-establish blood flow to minimize damage to the heart due to severe myocardial ischemia. Many studies indicate that nuclear factor- κ B (NF- κ B) plays a pivotal role in myocardial I/R injury (Prantz et al., 2007). Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of daidzein on NF- κ B activation in an *in vivo* rat model of myocardial I/R injury. We tested the hypothesis that daidzein reduces myocardial apoptosis by inhibiting the release of cytokines by limiting the nuclear translocation of NF- κ B.

Methods

Materials

Daidzein was purchased from Sigma (St. Louis, MO). RPMI 1640 and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Mediatech, Inc. (Manassas, VA). Antibodies to NF- κ B p65 and PCNA were purchased

* Corresponding author. Department of Pharmacology, School of Medicine, Gyeongsang National University 92 Chilam-dong, Jinju, Republic of Korea. Tel.: +82 55 7518771; fax: +82 55 759 0609.

E-mail address: kchang@gnu.kr (K.C. Chung).

¹ Jong Woo Kim and Yong Chun Jin contributed equally to this study.

from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). A caspase-3 activity assay kit was purchased from Chemicon International Molecular (Temecula, CA). Catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) assay kits were obtained from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). All other chemicals, including MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], were supplied by Sigma (St. Louis, MO).

Surgical preparation of animals

All animals were maintained in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Published by the US National Institutes of Health (NIH publication NO. 85-23, revised in 1996). Male Sprague–Dawley rats (Samtako Inc, Osan, Korea) weighing 200–250 g were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, i.m.) and xylazine (10 mg/kg, i.m.). The animals were ventilated with room air using a rodent respirator (Type 7025, Ugo Basile, Varese, Italy; tidal volume 8 ml/kg body weight, 60–80 breath/min). Arterial blood pH and gases were maintained within normal physiological limits by adjusting the respiratory rate and tidal volume. The chest was opened by a middle thoracotomy. After pericardiotomy, a 4–0 black silk suture was placed under the left anterior descending (LAD) coronary artery, and the ends of the tie were threaded through a small vinyl tube to form a snare for reversible LAD coronary artery occlusion. After 25 min of ischemia, reperfusion was established by loosening the snare for 24 h. The loosened suture was left in place and then retied for the purpose of evaluating the ischemic area. For biochemical analytical purposes, reperfusion was limited to 1 h (plasma cytokine concentration) or 2 h (plasma cytokine concentration, DNA ladders, caspase-3 activity, etc.) in some animals. The body temperature was constantly maintained between 37 and 38 °C with a heating pad placed under the rats. Following surgery, all animals were housed in cages and maintained on a 12 h night/day cycle and allowed free access to food and water at all times until the experiments began. Cardiac function was analyzed using a 2 F Millar Catheter (Millar instruments, Houston, TX).

Experimental protocol

The rats were assigned to one of three groups. In group A, sham ($n=32$), the ligature was placed under the LAD coronary artery without occlusion. In group B, I/R (vehicle) ($n=50$), the rats were pretreated with vehicle (saline 0.20 ml + DMSO 0.05 ml) before the I/R injury was performed. In group C, the rats were pretreated with daidzein (5 mg/kg, $n=44$ and 10 mg/kg, $n=52$) before the I/R injury was performed. Daidzein or vehicle was administered by intraperitoneal injection 1 h before the start of the procedure. Blood samples (0.3 ml in each group) were collected in tubes containing heparin at 0 h (after anesthesia), 1 h and 2 h after reperfusion for the measurement of cytokine concentrations. The entire sample was immediately centrifuged. Plasma was collected and frozen at -80 °C until analysis.

Determination of area at risk and infarct size

Twenty-four hours after reperfusion was established, the heart function was measured and then, the LAD coronary artery was re-ligated and 2 ml of 1% Evans blue dye was injected via the femoral vein to outline the area at risk (AAR) myocardium. The atria, right ventricles, and major vessels were removed from the hearts. Left ventricles (LV) were then sliced transversely into 2 mm thick slices. To distinguish between ischemic and non-ischemic tissue, the slices were incubated in 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) at 37 °C (pH 7.4) for 20 min. AAR pieces were separated according to the staining and weighed to determine the infarct size as a percentage of the weight of the AAR. AAR was expressed as a percentage of the LV.

Isolation of nuclear and cytoplasmic protein

Two hours after reperfusion was established, the heart samples from AAR were suspended in a buffer that contained 10 mM Tris (pH

7.5), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl and 0.1% Triton X-100 and lysed by homogenization. Nuclei were recovered by microcentrifugation at 7500 rpm for 5 min. The supernatant, which contained the cytoplasmic and membrane protein fractions, was collected and stored at -80 °C for western blot analysis. Nuclear proteins were extracted at 4 °C by gently resuspending the nuclei pellet in buffer that contained 20 mM Tris (pH 7.5), 20% glycerol, 1.5 mM $MgCl_2$, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA and 0.1% Triton X-100, followed by a 1 h incubation at 4 °C with occasional vortexing. After microcentrifugation at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C, the supernatant that contained the nuclear protein fraction was collected. The protein concentration of each sample was measured using a modified Bradford assay.

Western blot analysis

Proteins were separated by polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to a nitrocellulose membrane, and incubated overnight with monoclonal antibodies to NF- κ B p65 at 4 °C. Proteins were detected with a horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (1:5000 dilution in TBS-T containing 5% skim milk powder for 1 h at room temperature) and were visualized using the enhanced chemiluminescence method.

Determination of plasma TNF- α and IL-1 β levels

Concentrations of immunoreactive TNF- α and IL-1 β were determined with an ELISA kit from R&D Systems (Minneapolis, MN) according to the manufacturer's protocol. In brief, the extracted plasma was reacted with the assay reagents in the TNF- α and IL-1 β kits, respectively, and analyzed spectrophotometrically (Infinite® F200, Tecan Group Ltd, Switzerland) at 450 nm. Levels of TNF- α and IL-6 were calculated from the kit standards and expressed as pg/ml plasma.

Estimation of myocardial neutrophil infiltration and myeloperoxidase (MPO) activity in cardiac tissue

To determine the extent of polymorphonuclear neutrophil (PMN) infiltration, the hearts were rinsed free of blood 24 h after establishing reperfusion, and then fixed in 10% formalin. The samples were washed, dehydrated with graded alcohols, and embedded in paraffin. The midventricular cardiac sections were stained with Gill No. 3 Hematoxylin and Eosin. Six hearts from each group were examined. The PMNs in the AAR per high power field (hpf) were counted in five random fields, and the counts were averaged. MPO activity in the ischemic cardiac tissue was determined as described previously (Bradley et al., 1982).

Measurement of caspase-3 activity

The activity of caspase-3 was measured from the samples [sham ($n=4$), vehicle ($n=6$), and daidzein (5 mg/kg, $n=6$; 10 mg/kg, $n=6$)] by using a colorimetric activity assay kit (Chemicon International Molecular, Temecula, CA) according to the manufacturer's instructions. In brief, transmural tissue from the AAR zones was homogenized in ice-cold buffer provided in the kit and centrifuged. After determining the protein concentration, the supernatant was incubated with the caspase-3 substrate, AC-DEVD-NA, on a 96-well-plate. The activity of caspase-3 was determined using a spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 405 nm and the results were expressed as fold-change compared to sham.

DNA isolation and gel electrophoresis

The appearance of DNA laddering was detected using agarose gel electrophoresis. Briefly, freshly frozen tissue samples (30–40 mg each, 2 h after reperfusion) from the AAR zones [sham ($n=4$), vehicle ($n=6$),

Table 1
Summary of hemodynamic measurements in vehicle- and daidzein-treated rats after 24 h reperfusion

	LVEDP (mm Hg)	±dP/dt (mm Hg/s)	MAP (mm Hg)
Sham (n=8)	6±2	3896±366[-3074±45.3]	77±5
Vehicle (n=12)	10±3 [†]	3203±274[-2579±2.40 [†]]	67±5 [†]
Daidzein 5 mg/kg (n=10)	9±3	3341±325[-2783±4.42]	79±7 *
Daidzein 10 mg/kg (n=12)	8±3	3592±303[-2824±2.99*]	79±6 *

LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; ±dP/dt, first derivatives (positive and negative) of LV pressure over time; MAP, mean arterial pressure. All values are mean±SD. [†] P<0.05 vs. sham. * P<0.05 vs. vehicle.

and daidzein (5 mg/kg; n=6; 10 mg/kg, n=6) were minced in 500 µl of lysis buffer (Puregene DNA isolation kit; Gentra Systems, Minneapolis, MN). Homogenized tissue samples were digested with 100 µg/ml of proteinase K at 56 °C for 2 h and incubated with RNase A at 37 °C for 1 h. After incubation, tissues were precipitated and centrifuged at 13,000 g for 5 min. Supernatant containing DNA was precipitated with isopropanol. After centrifugation at 13,000 ×g for 5 min, the resulting DNA pellets were washed with 75% ethanol and dissolved in DNA hydration solution (Promega, Madison, WI). The content of DNA was detected at 260 nm by spectrophotometry (Lambda EZ 210), and 10 µg of the DNA was loaded into a 1.8% agarose gel containing 0.5 µg/ml of ethidium bromide. DNA electrophoresis was carried out at 80 V for 1 h. DNA ladders, an indicator of tissue apoptotic nucleosomal DNA fragmentation, were visualized and photographed under ultraviolet transillumination.

Measurement of MDA levels and activity of CAT

The frozen cardiac tissue samples were weighed and homogenized (1:10, w/v) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) and kept in an ice bath. The amount of MDA and CAT activity was measured, respectively, using commercial kits with a spectrophotometer (Infinite® F200, Tecan Group Ltd, Switzerland).

Cell culture

The protocols using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were approved by the Ethics Committee of Gyeongsang National University Hospital before the experiment. HUVECs were obtained by collagenase digestion of umbilical veins as previously described (Nizamutdinova et al., 2007). The isolated HUVECs were cultured in M199 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) containing 20% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, endothelial cell growth supplement (30 µg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Endothelial cells were identified by their cobblestone appearance and specific staining for Von Willebrand factor (DAKO Co., Carpinteria, CA). Experiments were carried out on HUVECs between passages three and six.

Table 2
Time course of changes of the MAP and HR followed by administration of daidzein in normal heart under sham-operated animals

Time (min)	Sham (n=8)		Daidzein 10 mg/kg (n=8)	
	MAP	HR	MAP	HR
0	84±5	275±3.2	85±4	279±28
10	89±9	285±3.0	86±5	269±32
30	115±8	259±18	99±6	278±35
60	105±11	288±4.5	99±6	271±50

Daidzein (10 mg/kg) and vehicle (sham) were injected via femoral vein in normal anesthetized rats under sham operation. All values are mean±SD. MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate.

Table 3
Comparison of area at risk and infarct size in vehicle- and daidzein-treated rats

	Vehicle (n=12)	Daidzein 5 mg/kg (n=10)	Daidzein 10 mg/kg (n=12)
Body weight (g)	245±38	232±36	247±25
LV weight (g)	0.66±0.06	0.61±0.04	0.69±0.06
Area at risk (g)	0.30±0.02	0.28±0.04	0.31±0.07
Infarct weight (g)	0.17±0.03	0.14±0.01	0.10±0.02
Area at risk/LV (%)	45±5	46±7	45±6
Infarct area/AAR (%)	57±3	50±6	32±9 **

Area at risk and Results are mean±SD from vehicle- and daidzein (5 and 10 mg/kg)-treated group. ** P<0.01 vs. vehicle.

Transfection

Transient transfections with NF-κB-luciferase constructs were performed using Lipofectin (Gibco-BRL, Grand Island, NY) as described previously (Kim et al., 2006). Briefly, 5 × 10⁵ cells were plated in 60 mm dish plates the day before transfection and grown to about 70% confluence. Cells were transfected with empty vector (pGL3 and/or pCDNA3) and 1 µg of NF-κB-luciferase+0.5 µg of pRL-TK-luciferase. Transfection was allowed to proceed for 12 h. The transfected cells were washed with 4 ml of PBS and then stimulated with 100 µM H₂O₂. The cells were continually cultured in serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) until they were harvested. Luciferase activity was normalized using pRL-TK-luciferase activity (Renilla luciferase activity) in each sample.

Luciferase assay

After the experimental treatments, the cells were washed twice with cold PBS, lysed in a passive lysis buffer provided in the dual luciferase kit (Promega), and assayed for luciferase activity using a TD-20/20 luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA) according to the manufacturer's protocol. All transfections were done in triplicate. Data were presented as the ratio of firefly luciferase activity over Renilla luciferase activity.

Cell viability

The cell viability was determined colorimetrically using the MTT reagent. Cells at the exponential growth phase were seeded at 10⁴ cells/well in 24 well plates. After different treatments, 20 µl of a 5 mg/ml MTT solution was added to each well (0.1 mg/well) and incubated for 4 h. The supernatants were aspirated and the formazan crystals in each well were dissolved in 200 µl of dimethyl sulfoxide

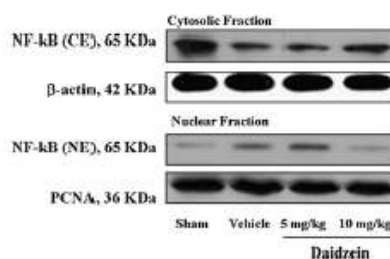


Fig. 1. Effect of daidzein on I/R-induced nuclear translocation of NF-κB. Two hours after reperfusion was established, the nuclear and cytosolic fractions were separately isolated from hearts of each group and NF-κB was detected as described in the Methods. To examine the purity of the nuclear extracts (NE) and cytoplasmic extracts (CE), gels were reprobed with antibodies against β-actin (cytoplasmic marker) and against PCNA (nuclear marker). Blots shown are representative of four experiments with similar results.

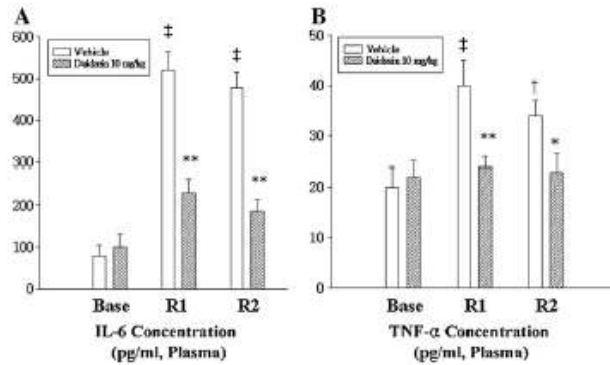


Fig. 2. Effect of daidzein on the production of proinflammatory cytokines. Plasma levels of TNF- α and IL-1 β were measured after 0 h (anesthesia, baseline), 1 h, and 2 h of reperfusion in vehicle- (n=4) and daidzein- (n=6) treated groups. Values are reported as the mean \pm S.D. ^{**}, $P < 0.01$; ^{*}, $P < 0.05$, compared to the vehicle-treated group. [‡], $P < 0.01$, compared to the baseline. R1 and R2 represent 1 h and 2 h after reperfusion was established, respectively.

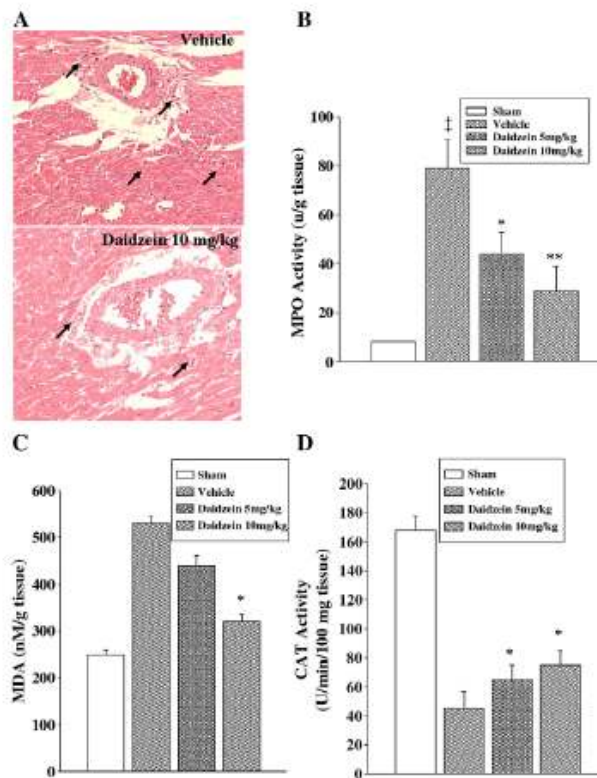


Fig. 3. Effect of daidzein on myocardial PMNs accumulation and antioxidant activity. (A) A representative micrograph ($\times 200$ magnification) of myocardium is shown from vehicle- and daidzein (10 mg/kg)-treated I/R hearts 24 h after reperfusion was established. Infiltrating neutrophils are marked as arrows. Cardiac muscle fiber swelling, hypertrophy and fiber destruction are seen in the vehicle group, but minimal histopathological changes were observed in the daidzein (10 mg/kg)-treated group. (B) MPO activity was measured from the AAR of cardiac tissue samples in sham (n=4), vehicle- (n=6) and daidzein- (5 mg/kg, n=6; 10 mg/kg, n=6) treated rats. (C) MDA levels and (D) CAT activity were measured after harvesting the AAR tissues from sham (n=4), vehicle- (n=6), and daidzein- (5 mg/kg, n=6; 10 mg/kg, n=6) treated rats using a commercial kit. Values are reported as the mean \pm S.D. ^{**}, $P < 0.01$; ^{*}, $P < 0.05$ compared to vehicle. [‡], $P < 0.01$, compared to sham.

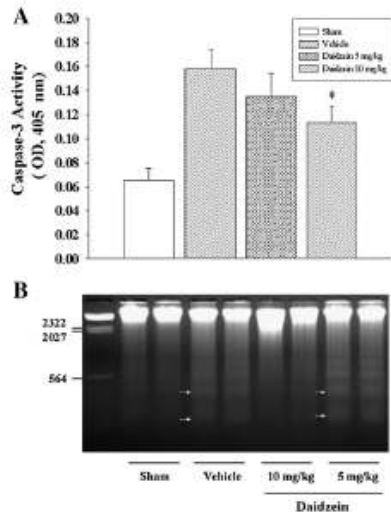


Fig. 4. Anti-apoptotic effect of daidzein in the myocardium after I/R injury. (A) Caspase-3 activity was measured 2 h after reperfusion was established. The reperfused tissue from the AAR zones of each group [sham ($n=4$), vehicle ($n=6$), and daidzein (5 mg/kg; $n=6$, 10 mg/kg; $n=6$)] was homogenized and the supernatant was incubated with caspase-3 substrate as described in the "Methods". (B) The appearance of DNA strand breaks was detected using agarose gel electrophoresis. DNA (10 μ g) was loaded in to a 1.8% agarose gel containing 0.5 μ g/ml ethidium bromide. Apoptotic nucleosomal DNA fragmentations were visualized in the I/R rat heart, which were decreased by daidzein (10 mg/kg) treatment. Values are reported as the mean \pm S.D. \dagger , $P<0.05$, compared to sham. $*$, $P<0.05$, compared to vehicle.

(DMSO) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C, and read at 570 nm on the Microplate Reader (Infinite® F200).

Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm S.D., unless otherwise indicated. Comparisons of parameters among the four treatment groups were made by one-way ANOVA for repeated measures, followed by the Scheffé test. Statistical significance was defined as $P<0.05$.

Results

Effects of daidzein on hemodynamic parameters in myocardial injury

Twenty-four hours after reperfusion was established, a marked increase in LV end-diastolic pressure (LVEDP) and a decrease in the first derivatives (positive and negative) of LV pressure over time (\pm dP/dt) were observed in the vehicle-treated group ($P<0.05$) compared to the sham group. However, the cardiac function had been enhanced in the daidzein-treated groups as demonstrated by the \pm dP/dt values. For example, in the 10 mg/kg daidzein treatment groups, the +dP/dt (mm Hg/s) was increased from 3203 ± 374 to 3592 ± 303 ($P<0.05$, Table 1), and the -dP/dt was also increased from -2579 ± 340 to -2824 ± 299 ($P<0.05$). The mean arterial pressure (MAP) was decreased by about 13% ($P<0.05$) in the vehicle-treated group compared to the sham group. Daidzein (5, 10 mg/kg) treatment significantly restored MAP compared to the vehicle group ($P<0.05$, Table 1). To eliminate the confounding factor in which the loading conditions of the heart may influence \pm dP/dt, we tested whether daidzein ($n=8$) influences heart rate (HR) and MAP in normal hearts under the sham-operated ($n=8$)

conditions. There was no significant difference in the values of HR and MAP between the sham and daidzein (10 mg/kg) groups (Table 2).

Effects of daidzein on myocardial infarct size

No difference was observed in the AAR between the vehicle and daidzein groups as determined by negative staining after reperfusion with Evans blue dye and expressed as a percent of LV (Table 3, AAR/LV), indicating that a comparable degree of ischemic jeopardy existed between vehicle- and daidzein-treated groups after occlusion of the LAD. However, treatment with daidzein (10 mg/kg) significantly reduced the infarct area. For example, the IA/AAR value for the vehicle group was $57 \pm 3\%$, but was $32 \pm 9\%$ for the daidzein group (Table 3, IA/AAR, $P<0.01$).

Effects of daidzein on NF- κ B

As shown in Fig. 1, I/R led to nuclear translocation of the NF- κ B complex from the cytosol. However, NF- κ B nuclear translocation was inhibited concentration-dependently by treatment with daidzein.

Effects on cytokine levels (IL-6 and TNF)

To measure the plasma cytokine levels, two time points were chosen and designated as R1, which means 1 h after reperfusion was established, and R2, which means 2 h after reperfusion was established. As shown in Fig. 2, Fig. 3A and B, daidzein did not affect the basal level of IL-6 and TNF- α . One hour after reperfusion was established, the levels of IL-6 and TNF- α were increased in the vehicle-treated groups, which were significantly ($P<0.01$) reduced in the daidzein-treated groups. Likewise, 2 h after reperfusion was

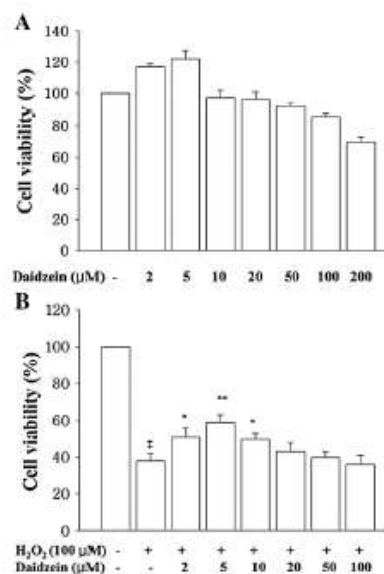


Fig. 5. Effect of daidzein on cell toxicity and survival after H₂O₂ treatment. (A) Concentrations of daidzein up to 100 μ M showed >90% cell survival. (B) Addition of H₂O₂ (100 μ M) into the cell significantly reduced the viability, which was significantly prevented by pretreatment with daidzein (2, 5, and 10 μ M). Values are reported as the mean \pm S.D. from four independent experiments. \dagger , $P<0.01$, compared to control. $*$, $P<0.05$, compared to H₂O₂-treated cells. $**$, $P<0.01$, compared to H₂O₂-treated cells.

established, the levels of IL-6 ($P < 0.01$) and TNF- α ($P < 0.05$) were also significantly reduced in the daidzein (10 mg/kg)-treated group.

Effects on neutrophil infiltration and MPO activity in myocardium

Twenty-four hours after reperfusion was established, no lesions were observed in the sham group (data not shown). In the vehicle-treated group, there was apparent perivascular edema and structural disarray, and many infiltrating neutrophils were observed. However, neutrophil infiltration was remarkably reduced in the daidzein (10 mg/kg)-treated group (Fig. 4A). MPO activity was very low in the sham groups, but markedly increased in the AAR of the I/R group (Fig. 3B). Daidzein, at both 5 mg ($P < 0.05$) and 10 mg/kg ($P < 0.01$), significantly (40–50%) reduced MPO activity in the AAR of the I/R group. To determine if daidzein reduces oxidative stress, the MDA and CAT activity were measured in tissues from the ischemia areas of the I/R hearts. As shown in Fig. 3C, the content of MDA in the control group markedly increased compared with the sham group (530 ± 50 vs. 245 ± 20 nM/g tissue, $P < 0.01$), but daidzein (10 mg/kg) significantly reduced the MDA levels compared with the I/R control (320 ± 40 vs. 530 ± 50 nM/g tissue, $P < 0.05$). Daidzein (5 mg/kg and 10 mg/kg) significantly increased the CAT activity (5 mg/kg, 65 ± 12 vs. 45 ± 13 U/min/100 mg tissue, $P < 0.05$; 10 mg/kg, 76 ± 10 vs. 45 ± 13 U/min/100 mg tissue, $P < 0.05$) (Fig. 3D).

Effects of daidzein on caspase-3 activity

Caspase-3 activity was presented as absolute units, and the vehicle-treated group had about a 2.4-fold increase in caspase-3 activity as shown in Fig. 5A. However, pretreatment with daidzein (10 mg/kg) significantly ($P < 0.05$, 25%) decreased the activity (Fig. 4A). DNA strand breaks were evident in I/R hearts; however, daidzein treated (10 mg/kg but not 5 mg/kg)-hearts had reduced amount of DNA laddering (Fig. 4B).

Effects of daidzein on cellular toxicity and cell viability in HUVECs

As shown in Fig. 6A, only high concentrations of daidzein (200 μ M) reduced the cell viability. Thus, we used up to the 100 μ M

concentration to measure the effect of daidzein against H_2O_2 -induced cytotoxicity. The addition of H_2O_2 (100 μ M) into the cell significantly reduced the viability that was significantly increased by pretreatment with daidzein (2, 5, and 10 μ M, $P < 0.05$).

Inhibition of H_2O_2 -induced NF- κ B activity

H_2O_2 (100 μ M) increased NF- κ B-luciferase activity by approximately 1.6-fold over that of the untreated control (Fig. 6A). Daidzein (5 μ M, but not 2 μ M) efficiently inhibited NF- κ B luciferase activity in HUVEC cells activated by H_2O_2 ($P < 0.05$, Fig. 6B).

Discussion

In the present study, we demonstrated that administration of daidzein significantly improved cardiac function and reduced infarct size in I/R rat hearts *in vivo*. The beneficial effect of daidzein treatment in the I/R condition can be represented by the preservation of left ventricular function as reflected by a significant increase in the indices of contraction (+dP/dt) and relaxation (-dP/dt), and a decrease in preload (LVDP). It has been reported that the process of I/R injury is characterized by an inflammatory response in which neutrophils and monocytes/macrophages play an important role. Activated neutrophils release a variety of cytotoxic substances, such as oxygen-derived free radicals and proteases (Jordan et al., 1999), and activated monocytes/macrophages are the main source of production of inflammatory cytokines in the ischemic heart. These substances released from activated leukocytes directly mediate vascular endothelial dysfunction and myocardium injury. We observed a significant reduction in the infiltration of neutrophils into the ischemic myocardium in daidzein-treated animals, suggesting a potential mechanism by which daidzein protects the heart from I/R-induced myocardial infarction.

We also confirmed that reperfusion after ischemia led to the activation of NF- κ B, increased the plasma level of pro-inflammatory mediators and enhanced infiltration of neutrophils to the infarct area, which resulted in cardiac contractile dysfunction and ischemic damages in the I/R model *in vivo* (Chandrasekar and Freeman, 1997;

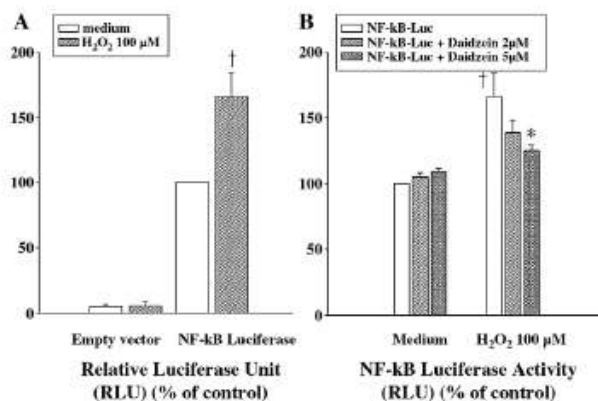


Fig. 6. Inhibition of H_2O_2 -induced NF- κ B-luciferase activity by daidzein in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). (A) Cells were transfected with empty vector or 1 μ g of NF- κ B-luciferase+0.5 μ g of pRL-TK-Luciferase. (B) Cells were allowed to recover for 24 h and then treated with 100 μ M of H_2O_2 with/without daidzein (2, 5 or 10 μ M), and harvested 2 h post-treatment. Luciferase activities are presented as the fold activation relative to that of the untreated cells. Values are reported as the mean \pm SD from four independent experiments. * $P < 0.05$, compared to control; † $P < 0.05$, compared to NF- κ B-Luc.

Shimizu et al., 1998). Therefore, we believe that the protective effects of daidzein could be due, in large part, to the suppression of the inflammatory response via inhibition of NF- κ B activation. This notion was further supported by *in vitro* experiments. When we measured NF- κ B luciferase activity *in vitro* in endothelial cells activated with H₂O₂, daidzein significantly inhibited the activation of NF- κ B. This observation that daidzein effectively inhibited NF- κ B-luciferase activity in HUVECs activated with H₂O₂ emphasizes an important issue, in that endothelial cells are also a target for the action of daidzein, since endothelial cell damage may worsen the I/R-induced injury. Furthermore, the serum levels of daidzein in humans who consume three meals per day containing soy milk or a single soy meal can reach maxima of 4.6 and 41 μ M, respectively (Xu et al., 1995; King and Bursill, 1998). The concentration of daidzein that effectively inhibited NF- κ B-luciferase activity in H₂O₂-activated HUVECs was 5 μ M, which is almost comparable with the plasma concentration found in frequent soy-consumers. Although we did not test the effect of daidzein on rat myocardial coronary endothelial cells in this I/R model, it can be strongly speculated from the HUVEC experiments that daidzein can inhibit NF- κ B activation in myocardial endothelial cells. This may also contribute to the prevention of the infiltration of neutrophils into ischemic areas of the heart as shown in the daidzein-treated animals. Therefore, inhibition of NF- κ B is one of the possible mechanisms by which daidzein may reduce I/R injury.

Another important finding is that daidzein inhibited caspase-3 activity, which opens the possibility that daidzein could inhibit apoptosis. In fact, it has been established that, following I/R, cell death occurs via apoptosis in many organs including the myocardium (Nizamutdinova et al., 2008; Wu et al., 2008; Ben-Ari et al., 2007). In I/R injury, apoptotic cell loss manifests itself during the reperfusion period due to the slowly orchestrated execution of the apoptotic cell death program. Indeed, we confirmed by a DNA laddering experiment that daidzein actually reduced apoptosis. However, how daidzein inhibits myocardial apoptosis in the I/R condition needs to be further investigated. Based on the present findings, it is quite evident that daidzein showed beneficial effects in rat myocardial I/R. The question that remains is what is the mechanism by which daidzein inhibits NF- κ B activation? We believe the antioxidant action of daidzein may have played a critical role in the reduction in inflammation following I/R. Indeed, some anti-inflammatory flavonoids have been shown to inhibit the activation of NF- κ B, and the effect has been linked to their antioxidant properties (Chen et al., 2005; Rangan et al., 1999). During I/R injury, the return of oxygen to ischemic tissues is accompanied by an increased production of reactive oxygen species (ROS). Studies on whole hearts and isolated cells have shown that a burst of ROS generation occurs within the first minutes after hypoxic and ischemic tissues are reoxygenated (Ferrari et al., 1998) due to the reactivation of mitochondrial respiration (Ambrosio and Tritto, 1999). ROS generation results in tissue, lipid and protein oxidation (Cho et al., 2000; Moon et al., 2004). Therefore, antioxidants scavenging ROS blunt or eliminate I/R injury *in vivo* and *in vitro* (Cho et al., 2000; Breda et al., 1989). We found that daidzein reduces MDA and increases catalase activity in I/R rat hearts, which indirectly supports the idea that daidzein reduces oxidative stress. Although daidzein clearly reduced inflammatory markers in the present study, it does not establish it as an anti-inflammatory agent. Therefore, some other mechanism(s) might be involved in reducing the infarct size, which results in fewer inflammatory stimuli and reduced levels of cytokines.

In summary, we demonstrated that the *in vivo* administration of daidzein reduced myocardial infarct size and improved cardiac function after I/R injury. Daidzein inhibited the nuclear translocation of NF- κ B, suppressed the production of inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6, decreased infiltration of neutrophils into ischemic areas, reduced MDA levels and MPO activity, and increased CAT activity in I/R hearts. We conclude that the mechanisms through which daidzein consumption provides myocardial protection may be the inhibition of NF- κ B activation, cytokine production and the

infiltration of monocytes. These findings suggest that daidzein can be used as a therapeutic agent where NF- κ B activation is the main cause of disease, such as inflammation.

Acknowledgments

This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

References

- Ambrosio, G., Tritto, I., 1999. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *American Heart Journal* 138 (2), 569–575.
- Anthony, M.S., Carlson, T.B., Bullock, B.C., Wagner, J.D., 1997. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (11), 2524–2531.
- Ben-Ari, Z., Pappo, O., Chepurko, Y., Yasovich, N., Offen, D., Shainberg, A., Leshem, D., Salkes, J., Vidne, B.A., Hochhausser, E., 2007. Bax ablation protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Liver Transplantation* 13 (8), 1381–1388.
- Bingham, S.A., Atkinson, C., Coward, A., 1998. Phyto-estrogens: where are we now? *British Journal of Nutrition* 79 (5), 393–406.
- Bradley, P.P., Pischke, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology* 78 (3), 206–209.
- Breda, M.A., Drinkwater, D.C., Laks, H., Bhuta, S., Corno, A.F., Davtyan, H.G., Chung, P., 1989. Prevention of reperfusion injury in the neonatal heart with leukocyte-depleted blood. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 97 (5), 654–665.
- Chandrasekar, B., Freeman, G.L., 1997. Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Letters* 401 (1), 30–34.
- Chen, J.C., Ho, F.M., Chao, P., Dawn Lee, C., Jeng, K.C., Hsu, H.B., Lee, S.T., Wen, T., Wu, L., WSW, 2005. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *European Journal of Pharmacology* 521 (1–3), 9–20.
- Cho, A., Graves, J., Reidy, M.A., 2000. Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20 (12), 2527–2532.
- Carlson, B., 2000. Soy phytoestrogens: what will be their role in postmenopausal hormone replacement therapy? *Menopause* 7 (2), 71–75.
- Ferrari, R., Agnoletti, L., Comini, L., Gaia, G., Bachetti, T., Cargnoni, A., Cecconi, C., Curello, S., Viooli, O., 1998. Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure. *European Heart Journal* 19, B2–B11 (Suppl B).
- Frantz, S., Tillmanns, J., Kuhlencordt, P.J., Schmidt, I., Adanek, A., Dienesch, C., Thum, T., Gerondakis, S., Erd, G., Bauersachs, J., 2007. Tissue-specific effects of the NF- κ B subunit p50 on myocardial ischemia–reperfusion injury. *American Journal of Pathology* 171 (2), 507–512.
- Jordan, J.E., Zhao, Z.Q., Vinten-Johnsen, J., 1999. The role of neutrophils in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 43 (4), 869–878.
- Kim, H.J., Iyoi, I., Park, J.M., Chung, J.I., Shin, S.C., Chung, K.C., 2006. Antocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- α -induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF- κ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion *in vivo*. *FEBS Letters* 580 (5), 1391–1397.
- King, R.A., Bursill, D.B., 1998. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 67 (5), 867–872.
- Kurzer, M.S., Xu, X., 1997. Dietary phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition* 17, 353–381.
- Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D.R., Barnes, S., 1994. Soy intake and cancer risk—a review of the *in-vitro* and *in-vivo* data. *Nutrition and Cancer* 21 (2), 113–131.
- Moon, S.K., Cha, B.Y., Kim, C.H., 2004. ERK1/2 mediates TNF- α induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF- κ B and AP-1: involvement of the Ras dependent pathway. *Journal of Cellular Physiology* 198 (3), 417–427.
- Nizamutdinova, I.T., Jin, Y.C., Kim, J.S., Yean, M.H., Kang, S.S., Kim, Y.S., Lee, J.H., Seo, H.C., Kim, H.J., Chung, K.C., 2008. Paeonol and paeoniflorin, the main active principles of *Paeonia albiflora*, protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Planta Medica* 74 (1), 14–18.
- Nizamutdinova, I.T., Oh, H.M., Min, Y.N., Park, S.H., Lee, M.J., Kim, J.S., Yean, M.H., Kang, S.S., Kim, Y.S., Chung, K.C., Kim, H.J., 2007. Paeonol suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor- α -stimulated human umbilical vein endothelial cells by blocking p38, ERK and NF- κ B signaling pathways. *International Immunopharmacology* 7 (3), 343–350.
- Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H.Y., Stillman, R.J., Shay, N.E., Brdman, J.W., 1998. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition* 68 (6 Suppl), 1375S–1379S.
- Rangan, G.K., Wang, V., Tay, Y.C., Harris, D.C., 1999. Inhibition of NF- κ B activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PIC. *American Journal of Physiology* 277 (5 Pt 2), F779–F789.

- Setchell, K.D., Cassidy, A., 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition* 129 (2), 758S–767S.
- Shimizu, N., Yoshiyama, M., Omura, T., Hanatani, A., Kim, S., Takeuchi, K., Iwao, H., Yoshikawa, J., 1998. Activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats. *Cardiovascular Research* 38 (1), 116–124.
- Wu, D., Chen, X., Ding, R., Qiao, X., Shi, S., Xie, Y., Hong, Q., Feng, Z., 2008. Ischemia/reperfusion induce renal tubule apoptosis by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and L-type Ca channel opening. *American Journal of Nephrology* 28 (3), 487–499.
- Xu, X., Harris, K.S., Wang, H.J., Murphy, P.A., Hendrich, S., 1995. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *Journal of Nutrition* 125 (9), 2307–2315.