

발간등록번호
--------

11-1543000-001225-01
----------------------

고랭지 작물인 국화과와 천년초의 플라본과 칼슘을  
고함유한 추출물을 이용한

항산화 및 항당뇨 기능성 쌀과 간식의 산업화

(Functional Rice and Convenient Food Industrialization of Calcium and Flavone-rich Extract Acting on Anti-oxidation and Anti-diabetes from Mountainous Herbs Compositae and Opuntia Humifusa Study on the Meat Grading System)

농업회사법인 강성바이오(주)

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고랭지 작물인 국화과와 천년초의 플라본과 칼슘을 고함유한 추출물을 이용한 항산화 및 항당뇨 기능성 쌀과 간식의 산업화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 12월 16일

주관연구기관명 : 농업회사법인 (주)강성바이오

주관연구책임자 : 이 윤 식

세부연구기관명 : 경희대학교

세부연구책임자 : 이 경 태

협동연구기관명 : 상지대학교

협동연구책임자 : 박 회 준

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 최 명 숙

## 요 약 문

### I. 제 목

고랭지 작물인 국화과와 천년초의 플라본과 칼슘을 고함유한 추출물을 이용한 항산화 및 항당뇨 기능성 쌀과 간식의 산업화

### II. 연구성과 목표 대비 실적

구분 (연도)	연구개발 최종목표	목표대비 실적
2014.	국화과 식물 및 천년초의 플라본, 폴리페놀, 식이섬유, 칼슘 고함유 추출물· 유효성분을 이용한 제형쌀 제조 및 항비만/항당뇨 효과 연구	
12.	(1) 국화과 식물 및 천년초의 추출물· 유효성분의 제형쌀 개발	기능성 제형쌀 시제품을 제조하여 동물 시험 및 임상시험에 사용함
15. ~	(2) 국화과 식물 및 천년초 추출물· 유효성분의 항염증 효과연구	염증매개물질인 NO가 유의적으로 감소함
2015.	(3) 국화과 식물 및 천년초 추출물· 유효성분의 항비만 효과연구	동물시험 결과, 체중과 총 콜레스테롤 농 도가 유의적으로 감소함
12.		
16.	(4) 국화과 식물 및 천년초 추출물· 유효성분의 항당뇨 효과연구	동물시험 결과, 공복혈당이 유의적으로 감소함. 임상시험 결과, 당화혈색소가 유의적으로 감소(p=0.009)

### III. 연구개발의 목적 및 필요성

#### 1. 연구개발의 목적

본 연구과제의 최종 목적은 고랭지 작물인 국화과 및 천년초 노지작물의 폴리페놀 고함유 추출물을 제조하여 항산화 및 항당뇨의 기능성 쌀 개발 및 간식의 산업화 임. 항비만 및 항당뇨 개선에 도움이 되며 섭취가 가능한 제형쌀, 건강기능식품 및 보조식을 개발하여 국민 건강 향상에 이바지하고, 삶의 질을 높이며 농가의 고수의 창출에 기여하고자 함.

#### 2. 연구개발의 필요성

최근 급속한 생명과학 발달은 인간수명 연장에 상당히 기여하고 있으나, 근본적인 식생활 및 생활양식의 문제점으로 인해 여전히 많은 성인병 환자를 양산하고 있어 이들의 건강관리 및 치료문제가 사회적으로 심화되고 있음.

현대사회에서 식생활의 서구화, 산업화, 공업화 및 정신적 스트레스 가중 등으로 인해 증가되고 있는 각종 대사성질환의 예방 및 개선책으로 건강기능식품 개발 필요성이 대두되었음.

쌀을 주식으로 하는 한국인은 탄수화물섭취량이 다른 민족에 비해 높으므로 대사성질환을 예방할 수 있는 기능성 쌀 개발이 필요함.

본 연구에서 한국인의 주식인 기능성 천연물로 성형한 기능성 성형쌀의 혈당, 혈중 및 체지방조절 기능이 입증될 경우 국민건강개선 뿐만 아니라 농가소득에도 크게 기여 할 수 있음

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

##### 1. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항당뇨 쌀 개발

- 국화과 식물로부터 항산화, 항당뇨, 항비만 추출물 및 미세 분말화 제조법을 확립하여 기능성 제형쌀 시제품 제조
- 섬쑥부쟁이 Caffeoylquinic Acid 고함유 추출물의 비만에 대한 효과
- 곤달비 추출물의 항당뇨 효과
- 애기땅빈대의 HPLC 분석 및 peroxynitrite 소거효과

##### 2. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항염증, 항비만 및 항당뇨 효과 연구

- 세포실험을 이용한 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항비만 효과 확인
- 동물실험을 이용한 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항당뇨/항비만 효과 확인
- 대식세포에 대한 독성 평가
- 염증 매개 물질 감소를 통한 항염증 효과 확인
- 유전자 발현 조절을 통한 항염증 작용기전 규명

##### 3. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분을 함유한 제형쌀의 항비만 및 항당뇨 임상시험 연구

- 신체 계측치 비교, 영양섭취량 조사
- 신체계측 및 체지방 변화
- 혈중 지질 농도 변화, 혈중 당대사 관련 지표 변화
- 염증성 cytokine 농도 변화
- 지방세포분비 호르몬 수준 변화
- 간 및 신장 기능 관련 지표 변화
- 항산화 효소 활성도 및 과산화물 수준 변화



## V. 연구개발결과

### 1. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분 함유 기능성 쌀의 항당뇨/항비만 효과 연구

#### (가) 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분 함유 기능성 쌀의 비만 억제 검색

- 지방세포로 분화시킨 3T3-L1 세포에 당노쌀을 처리한 경우 고농도에서 유효한 지방축적 억제 효과를 보였음. 반면 현미쌀은 억제효과를 보이지 않았음
- 지방대사에 미치는 영향을 확인하기 위한 glucose uptake 실험에서 두 시료 모두 유의적인 효과를 보이지 않았음
- 당노쌀의 지방 축적 억제 효과 기전을 확인하기 위하여 지방분해 효소 (LPL, HSL, 그리고 ATGL), 지방세포화 전사인자 (PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ ) 및 지방세포화 유전자 (aP2, adiponectin, FAS, perilipin 및 FABP4)의 발현에 대한 효과를 확인하였으나 유의적인 효과를 보이지 않았음
- 본 세포실험 결과를 종합해 볼 때 당노쌀의 비만 억제 효과는 크지 않은 것으로 판단됨

#### (나) 동물실험을 이용한 항당뇨/항비만 효과 확인

- 기능성 성형쌀과 현미 보충으로 체중 및 체중증가량이 유의적으로 크게 감소되었고, 식이 효율도 유의적으로 낮아져 이들 2종 쌀 소재는 체중 감량 및 식이효율에 효과적인 것으로 보임.
- 체지방량 측정 결과, 기능성 성형쌀군과 현미군에서 견갑골, 부고환, 신주위, 장간막 및 피하 백색지방 무게가 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 감소되었음. 결과적으로 복부 및 총 백색지방 무게가 감소되어 기능성 성형쌀과 현미 모두 탁월한 체지방량 저하 효능을 발휘하였다고 판단됨
- 공복혈당은 기능성 성형쌀군과 현미군에서 HFD군에 비해 유의적으로 낮아져 혈당 개선 효과가 제시되었음
- 혈장지질수준 비교결과, 기능성 성형쌀 및 현미군은 혈장 총콜레스테롤, LDL-C, nonHDL-C/HDL-C, 동맥경화지수 (AI) 및 Apo B 농도가 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 감소되는 효과를 보였음. 기능성 성형쌀 및 현미 보충으로 HDL-콜레스테롤, HTR 및 apo A-I 농도가 HFD군에 비해 유의적으로 증가되는 효능이 제시되었음
- 본 동물시험 결과를 종합해 볼 때 기능성 성형쌀 및 현미 소재는 체중, 식이효율 및 체지방 감량효과가 뛰어났으며 혈장지질 및 공복혈당 수준도 개선시켰음. 따라서 기능성 성형쌀 및 현미 소재는 고식이유도 비만동물에서 체지방 및 혈당조절에 유효한 소재임이 입증되었으며 체지방 감량, 혈당 저하 및 혈중지질개선용 식품소재로서 개발가능성이 크다고 판단됨

### 2. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분 함유 기능성 쌀의 항염증 효과 연구

- LPS로 활성화 시킨 RAW 264.7 대식세포에서 당노쌀과 현미쌀은 염증 매개 물질인 NO의 생성을 유의적으로 감소시켰으며, 이는 NO 생성 조절 효소인 iNOS 발현 억제를 통해 나타났음. 그러나 세포 독성이 없는 농도 내에서는 NO 생성 저해 IC<sub>50</sub> 값을 구할 수는 없었음

- LPS로 활성화 시킨 RAW 264.7 대식세포에서 당노쌀과 현미쌀은 염증 매개 물질인 PGE<sub>2</sub> 생성에는 영향을 주지 않았음
- iNOS의 발현을 조절하는 염증 전사인자 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 활성화에는 영향을 주지 않았음
- DPPH assay를 통해 직접적인 라디칼 제거 능력을 확인해보았으나 당노쌀과 현미쌀 모두 유의적인 효과를 보이지 않았음
- 본 세포실험 결과를 종합해 볼 때 당노쌀과 현미쌀은 대식세포에서 항염증 효과는 크지 않은 것으로 판단됨

### 3. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분을 함유한 제형쌀의 항비만 및 항당뇨 임상시험 연구

- 신체계측 및 체지방 측정 결과에서는 8주간 백미, 기능성 강화 성형쌀, 현미 섭취에 의한 유의적인 변화가 관찰되지 않았음.
- 혈장 지질농도 분석 결과, RBR군의 HDL-콜레스테롤 농도가 기능성 강화 성형쌀 섭취 8주 후 증가하는 경향을 보였고, 혈장 HDL-콜레스테롤 또한 RBR군에서 증가하는 경향이 관찰되었음.
- 2~3개월 간의 혈당 상태를 반영하는 당화혈색소 (HbA1c)는 기능성 강화 성형쌀과 현미를 섭취한 RBR군, BR군에서 각 실험물질 섭취 후 유의적으로 감소하였고, 특히 RBR군에서 더욱 유의적으로 감소한 것으로 관찰되었음 (p=0.09). 이를 통해 기능성 강화 성형쌀의 섭취는 대사증후군 대상자의 당 개선에 영향을 미치는 것으로 사료됨.
- 8주간 백미를 섭취한 WR군의 혈중 MCP-1, PAI-1 수준이 증가하는 경향을 보였고, adiponectin 수준은 감소하는 경향을 보였음. 이를 통해 대사증후군에서 발생하는 adipokine dysregulation은 기능성 강화 성형쌀이나 현미 섭취에 의해 완화될 수 있을 것으로 사료됨.
- 항산화 효소 활성화도 중 적혈구 SOD 활성화도는 시험물질 섭취 8주 후, BR군 > RBR군 > WR군 순으로 제시되었고, 적혈구 catalase와 GSH-Px 활성화도는 백미 섭취에 의해 유의적으로 감소한 것으로 나타나, 체내 항산화 체계의 항상성 유지에는 백미보다 현미나 기능성 강화 성형쌀의 섭취가 도움이 될 것으로 판단됨.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- 세포수준에서 항염증, 항산화, 항비만 및 항당뇨 검색법 확립 및 다른 시료의 검색에 사용할 수 있음
- 동물 실험을 통한 항비만 및 항당뇨 효능을 확인할 수 있음
- 이러한 약리작용의 기전을 규명할 수 있으며 향후 특정 약물/식품의 표적으로 개발 할 수 있음.
- 인체시험 결과를 종합해 볼 때 기능성 강화 성형쌀의 섭취는 대사증후군 개선에 일부 유효한 소재임이 입증되었으며 기능성 식품소재로 개발가능성이 높다고 판단됨.

## SUMMARY

### 1. Studies on the anti-diabetic and anti-obesity effects of the functional molded rice and brown rice

#### 1-1. The obesity inhibitory effects of the functional molded rice and brown rice obesity

– After 3T3-L1 cells were differentiated into adipocytes, cells were treated with functional molded rice and brown rice. Then we found that treated with functional molded rice at high concentration only significantly reduced the fat accumulation, whereas and brown rice did not show any effects.

– Both functional molded rice and brown rice did not show any significant effects on glucose uptake in adipocytes

– In order to determine the fat suppression effect and its mechanisms of the functional molded rice and brown rice, we investigated the expressions of enzymes (LPL, HSL, and ATGL), transcription factors (PPAR- $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ ) and lgene (aP2, adiponectine, FAS, perilipin and FABP4). We did not find any effects on the expressions of these factors.

– Based on these cellular results, we found that the functional molded rice and brown rice did not show significant diabetic effects.

#### 1-2. Effects of the functional molded rice and brown rice on anti-diabetic and anti-obesity effects in diet-induced obese mice

– The objective of this study was to determine the effects of the two functional molded rice and brown rice on lipid metabolism in type 2 diabetic animals

– The unctional molded rice and brown rice-treated groups showed significantly lower body weight and white adipose tissue weights than the HFD-treated control group

– The unctional molded rice or brown rice-treated groups significantly decreased plasma total cholesterol, APO B levels and increased the plasma HDL-cholesterol/total-cholesterol ratio (HTR) compared to the HFD-treated control group

– The unctional molded rice or brown rice-treated groups significantly reduced the fasting blood glucose (FBG) levels

– Taken together, these results of the animal experiments showed that functional molded rice and brown rice reduced body weight, feed efficiency and body fat, and improved plasma lipid and fasting blood glucose levels.

## 2. Anti-inflammatory and anti-oxidative effect of functional molded rice and brown rice

– Our results indicate that functional molded rice or brown rice do not inhibit the production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).

– Functional molded rice and brown rice do not suppressed iNOS protein expression, and the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B and AP-1 at non-cytotoxic concentration.

– Functional molded rice and brown rice do not show any radical scavenging effects using DPPH assay.

– Based on these results, these functional molded rice and brown rice do not show any effects on anti-inflammatory and anti-oxidative effects

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development

Chapter 3. Contents and results of study

Chapter 4. Purpose achievement and contribution degree on field of the study

Chapter 5. Achievement of the study and application plan of the results

Chapter 6. Collected foreign scientific technology information for studying

Chapter 7. Current status of research installation

Chapter 8. Reference

## 목 차

### 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

- 제 1 절 연구개발의 목적
- 제 2 절 연구개발의 필요성
- 제 3 절 연구개발 범위

### 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- 제 1 절 국화과 식물 및 천년초 추출물/유효성분의 항당뇨 쌀 개발
- 제 2 절 국화과 식물 및 천년초 추출물/유효성분의 항산화, 항비만 효과 연구
- 제 3 절 국화과 식물 및 천년초 추출물/유효성분을 함유한 제형쌀의 항비만 및 항당뇨 임상시험 연구

### 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 제 1 절 연구목표의 달성도
- 제 2 절 관련분야에의 기여도

### 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 제 1 절 연구개발 성과
- 제 2 절 성과활용 계획

### 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 7 장 연구시설·장비 현황

### 제 8 장 참고문헌

## 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

### 제 1 절 연구개발의 목적

고랭지 작물인 국화과와 천년초의 플라본과 칼슘을 고함유한 추출물을 이용한  
항산화 및 항당뇨 기능성 쌀과 간식의 산업화

- 국화과 산채류의 추출물의 폴리페놀 성분분리, 효능 및 함량결정을 통하여 항당뇨 기능성 쌀 개발을 수행하고자 한다.
- 국화과 및 천년초 노지작물의 플라본, 폴리페놀, 식이섬유, 칼슘 고함유 추출물의 제조방법과 항당뇨 개선 및 혈당저하 약리효과 규명하고자 한다.
- 국화과 노지식물 및 천년초의 폴리페놀 고함유 추출물의 제조, 활성성분의 분리 및 함량평가를 하고자 한다.
- 식이섬유, 칼슘 및 플라본 고함유 추출물로부터 얻은 성분의 당뇨개선 효과 규명하고자 한다.
- 국화과 및 천년초의 추출물 및 분말 생체로부터 항비만 및 당뇨개선 및 진정 효능 물질을 첨가한 국내 최초의 제형쌀 및 보조식품의 대량제조 판매 및 산업화에 기여하고자 한다.
- 항비만 및 항당뇨 개선에 도움이 되는 섭취가 가능한 제형쌀 건강기능식품 및 보조식 개발하여 국민 건강을 향상하고, 삶의 질을 높이며 농가의 고수익 창출에 기여하고자 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 비만, 당뇨병, 그리고 대사증후군

- 최근 급속한 생명과학 발달은 인간수명 연장에 상당히 기여하고 있으나, 근본적인 식생활 및 생활양식의 문제점으로 인해 여전히 많은 성인병 환자를 양산하고 있어 이들의 건강관리 및 치료문제가 사회적으로 심화되고 있음.
- 우리나라의 경우, 총 섭취열량 중 지방급원 에너지 비는 과거 14%에서 최근 약 20% 이상으로 증가되었고, 쌀을 주식으로 하는 식문화권에 의해 탄수화물 섭취비율도 높은 편임. 이러한 지방의 소비증가 추세 및 총 에너지 섭취비율 중 당질 섭취 증가는 비만, 당뇨병, 동맥경화증 등을 포함한 대사증후군의 발병증가를 유도하고 있음.
- 대사증후군(metabolic syndrome)의 정의 및 기준은 아직도 정립 단계에 있으나, 복부 비만(민족성 특성을 고려한 허리둘레 기준치 적용)이 있으면서 고중성지방혈증, 낮은 HDL-콜레스테롤, 고혈압, 당뇨병(또는 높은 공복혈당)의 4가지 대사 이상 중 2개 이상을 가지며, 생활습관성 질환을 동반하는 복합 위험인자군으로 정의함 (2004. 5. International Diabetes Federation, IDF).
- 즉, 당뇨병, 동맥경화증, 고혈압 등은 각기 다른 질환으로 보이나, 체지방 증가 및 비만에 의해 초래되는 '인슐린 저항성'이 이들의 공통 병인으로 작용하여 '대사증후군'으로 분류되고 있음.

### 2. 대사증후군 관련 건강기능식품 개발 현황 및 문제점

- 전 세계적으로 '병원균 없는 전염병'인 비만 및 이로 인한 대사성질환의 급속한 확산이 사회문제가 되고 있으며 우리나라도 성인비만 뿐 아니라 소아비만이 급증하고 있어 어린이 먹거리 안전을 위한 정책이 2009년 3월부터 시행되고 있음. 특히 노령화 사회 대비 및 국민의 건강과 삶의 질 향상을 위해 생활습관병인 대사증후군 제어기술은 국가 차원에서 육성해야 할 21세기 당면 과제임.
- 미국뿐만 아니라 국내에서도 대사증후군의 급증으로 개인의 의료비 지출 증가에 의한 국가 의료재정이 급격히 상승하고 있음 (의료비 지출 2004년 5조 1천억원 → 2010년 11조 2천억원 이상)
- 대사증후군은 질환의 진행기간 동안 지속적인 약물복용이 필요하므로 치료 후보물질을 개발하는데 안전성 확보가 무엇보다 중요한 요소임. 그러나 현재 개발 및 판매되고 있는 대부분의 약물은 부작용을 타나내는 것으로 보고되고 있음



쌀을 주식으로 하는 한국인은 탄수화물섭취량이 다른 민족에 비해 높으므로 대사성질환을 예방할 수 있는 기능성 쌀 개발이 필요함

### 3. 연구의 필요성

#### 가. 사회·문화적 측면

○ 현대사회에서 식생활의 서구화, 산업화, 공업화 및 정신적 스트레스 가중 등으로 인해 증가되고 있는 각종 대사성질환의 예방 및 개선책으로 건강기능식품 개발 필요성이 대두되었음.

○ 이러한 사회분위기에 편승하여 대사성질환을 예방/개선하기 위한 식품의 개발 및 수입판매가 증가되고 있으며, 이와 함께 부작용의 피해도 증가하고 있음. 한 예로, 2002년 중국산 다이어트 식품의 섭취 후 간기능 장애를 일으켜 사회적 물의를 빚었던 식품('옥미'와 '미황', 중국산)의 경우 식품의약품안전청에 의하면 간기능 손상물질인 '펜플루라민'이 함유되어 있음에도 불구하고 국내 수입업체가 정식 수입통관 과정을 거쳐 들여온 제품인 것으로 확인된 바 있음. 인터넷이나 케이블TV 쇼핑몰의 확산과 함께 안전성 및 기능성이 검증되지 않은 다이어트 식품의 판매가 음성적으로 이루어질 경우 국민의 건강에 미치는 피해가 심각할 것으로 생각됨.

#### 나. 경제·산업적 측면

○ 비만은 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화증 등의 성인성 만성퇴행성질환의 발생률을 높여 총 의료비 중 에서 비만관련 질환 의료비가 차지하는 비중이 높은 것으로 알려져 있는데, 선진국의 경우 총 국민의료비의 2-7%가 과체중 및 비만에 의해 발생하고 있음.

○ 이처럼 비만을 비롯한 대사증후군은 전 세계적으로 의료비의 지출을 상승시키고 노동력의 저하로 인해 개인뿐만 아니라 국가적으로도 큰 손실을 가져오므로 이들을 예방하거나 지연시킬 수 있는 예방프로그램 개발이 절실히 필요함.

○ 전 세계 당뇨병 시장 규모는 2008년에는 150억불(24조원)으로 조사되었고, 2018년에는 350억불(42조원)에 이를 것으로 추정됨. 국내는 2005년 2,000억 원에서 2008년에는 3,400억 원으로 가파르게 증가하고 있는 추세임.

○ 따라서 전 세계적으로 의학, 약학, 식품, 서비스업 등 산업계 전반에 있어서 항비만, 항당뇨, 항동맥경화 및 치료를 위한 소재발굴이나 방법에 대한 연구와 투자가 진행되고 있으며, 향후 대사성질환 관련 시장의 확대 가능성을 크게 시사하고 있음.

○ 만성 대사성질환을 예방하는 식품개발기술이 마련될 경우 사회적 비용 절감 효과도 매우 클 것으로 예상됨. 2005년 자료 기준에 의하면 미국의 비만 관련 사회적 비용은 1,470억불 이며 한국의 경우는 15억불에 달함.

## 다. 기술적 측면

- 대사성질환은 이미 전 세계적으로 심각한 사회문제가 되고 있으며, 의료비 증가 및 사회구성원의 질병이환 또는 사망에 의한 개인적·국가적 손실이 막대할 것으로 예상됨. 따라서 대사성질환 예방 및 치료를 위한 다양한 건강기능식품이나 약물이 개발되고 있으나, 약물의 경우 부작용이 문제가 되고 건강기능식품의 경우에도 인체에 적용하였을 때 그 효과가 미미한 경우가 많음. 따라서 부작용이 없고 유효성이 우수한 식품유래 항비만 및 혈당강하 기능성 소재 개발이 절실히 필요함.
- 최근 생명공학기술의 발전에 따른 새로운 대사증후군 관련 유전자의 발견 및 새로운 기전 등이 다각도로 밝혀지고 있으므로 이와 동반된 다양한 기능성 물질 개발이나 특허출원이 증가 될 것으로 전망됨.
- 본 연구에서 한국인의 주식인 기능성 천연물로 성형한 기능성 성형쌀의 혈당, 혈중 및 체지방조절 기능성이 입증될 경우 국민건강개선 뿐만 아니라 농가소득에도 크게 기여 할 수 있음

## 제 3 절 연구개발 범위

- 제 1세부과제 : 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항당뇨 쌀 개발

가. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항산화·항염증 효과 연구

나. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분을 함유한 제형쌀의 항비만 및 항당뇨 임상시험

- 제 1협동과제 : 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항산화·항비만 효과 연구

가. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항산화 효과 연구

나. 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분을 항비만 효과 연구

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### ○ 국화과 caffeoylquinic acid 성분과 항비만효과

비만은 고혈압, 동맥경화, 당뇨병 등 유발요인이므로 세계적으로 의학학적 관심이 여기에 집중되고 있다. 고지방식이 또는 고칼로리식을 하면 고지혈증 및 비만이 일어나고 산화적 스트레스와 염증이 증가한다고 한다 (Dandonna et al., 2007). 비만에서 일어나는 산화적 스트레스는 reactive oxygen species (ROS)의 증가에 기인한 지질과산화에 따르는 조직손상을 유발하는 동시에 proinflammatory cytokine인 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin-6 (IL-6)를 증가시켜 염증이 일어난다(Dandonna et al., 2004). 또, macronutrient intake는 산화적 및 염증성 스트레스(oxidative and inflammatory stress)를 유도하고, 이것과 아테롬성 동맥경화(atherosclerosis)와 인슐린 저항성과의 관련성이 알려진 바 있다.(Dandonna et al., 2007) 산화적 스트레스가 atherosclerosis, hypertension, hyperlipidemia, diabetes 등을 일으키나 vitamine E와 같은 항산화제를 처리하면 동맥경화 위험이 감소된다고 한다(Kunitomo et al., 2007). Antioxidant supplementation은 과체중의 젊은 성인에서 운동으로 유도된 산화적 스트레스를 저하시킨다고 보고된 바 있다(Vincent et a., 2006). Hogan등(2010)은 anthocyanin, flavonol, catechin, procyanidin 등을 포함하는 고품량 폴리페놀의 grape pomace antioxidant extract가 식이성으로 유도된 비만 생쥐에서 체중과 plasma C-reactive protein(CRP)를 측정하였을 때 체중 감소효과는 미약하였으나 항염증효과를 나타낸다고 보고했다.

caffeoylquinic acid(CQ)를 함유하는 산채류의 간보호효과(Choi et al., 2005), peroxynitrite소거효과(Nugroho et al., 2010), 항경련효과(Folch et al., 1957) 등은 보고된 바 있다. 한국의 많은 산채류는 CQ 고함유에 기인한 peroxynitrite 소거효과를 나타내는 것으로 추정된다. 산채류는 매우 많은 부피를 차지하므로 이를 제형으로 만들어 쉽게 복용할 수 있는 dietary supplement로서의 제형 개발이 필요하다. 또한, 산채의 편리한 복용을 위하여 활성물질 고함유 추출물 제법 개발이 필요하다. 근래 산채로 이용되고 있는 섬쑥부쟁이(*Aster glehni*, Compositae)의 30% 에탄올 추출물이 CQ를 고함유하는 사실 HPLC 분석으로 확인하였다(데이터 미제시). HPLC로 정량했을 때 식물건중당 함량으로 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 3-O-caffeoylquinic acid, 3-O-*p*-coumaroylquinic acid 추출물 중의 함량으로서 약 38.8%이었으므로, 이 CQ가 풍부한 30% EtOH 추출물을 이용해서 고지방식이 흰쥐에서 체중, 고지혈증, 동맥경화 위험지수 및 항산화활성에 미치는 효과도 연구되었다.

### ○ 국화과 Ligularia속 식물 생리활성

곤달비(*Ligularia stenocephala* (Maximovicz) Matsumura)는 한국의 고냉지에서 자생하는 식물로서 국화과의 다년생 초본식물이다. 곤달비는 특히 한국의 대관령에서 자생하고 산채로서 이용되고 있기 때문에 이 지역의 농가에서 재배하고 있다. 이 지역에서 근연식물로서 산채로 이용되고 있는 것은 곰취(*L. fischeri* (Ledeb.) Turczaninow)와 넘취(한대리곰취, *L. fischeri* var. *spiciformis*)가 있다(Ko, 2003).

곰취는 이 지역에서 가장 널리 산채로 이용되고 있고 한편 곤달비와 넘취도 산채로 이용되고 있다. 곤달비의 어린 잎을 식용 및 약용의 목적으로 이용하고 있는데 전초 혹은 뿌리를 보익, 진정 및 부인병 등에 약으로 사용되기도 한다(Kim 1996).

곤달비를 곰취와 넘취와 구별되는 다른 약용도를 모색하려 한 바 이미 알려진 성분들에 대해 기술되고 있다. Wang 등은(2000) 3종의 eremophilanolide-type sesquiterpene계 성분을 분리한 바 있으며, Hwang 등(2000)은 추가적으로 3종의 유사 성분을 분리하고 특히 이 중 furanologularenone 성분이 LPS로 유도한 마크로파지 세포에서 NO 생성 억제효과를 나타낸다고 하였다. Choi 등(2007)은 곰취 추출물이 콜라겐으로 유도한 관절염 생쥐의 산화적 스트레스를 예방한다고 보고한 바 있다. 넘취의 성분에 대해서는 이미 저자들이 acyclic diterpene 성분으로 spiciformisin a 및 b, triterpene으로 monocyclosqualene (Lee et al., 2002), sesquiterpene으로 6-oxoeremophilanolide(Park et al., 2000)와 백혈병 세포의 분화 유도효과를 나타내는 intermedeol 등을 보고한 바 있다(Jeong et al., 2002). 그리고 넘취의 dicaffeoylquinic acid 성분이 간보호 효능, 지질과산화 억제효과를 나타내는 화합물인 것으로 보고되었다.(Choi et al., 2005; Choi et al., 2004).

이와 같이 곰취와 넘취에 대해서는 비교적 자세히 연구되어 있으나 이의 근연식물인 곤달비의 식물화학적 연구결과를 찾은 결과 주로 benzofuran 유도체로서 monomeric-, dimeric- 및 polymeric benzofuran 들이 다수 보고되었지만, 생리활성이 대한 연구를 보고는 없었다(Toyota et al., 2005; Yan et al., 2005). 곤달비를 당뇨병에 유효한 산채 및 건강기능성식품으로 개발하기 위하여 우선 스트렙토조토신으로 유도한 당뇨병 및 당뇨병 고지혈에 유효한지를 알기 위한 연구를 하기도 하였다.

### ○ 애기땅빈대와 peroxynitrite 소거효과

애기땅빈대(*Euphorbia supina* Rafin)는 한국에서 자생하는 식물로 대극과(Euphorbiaceae)에 속하는 1년생 초본식물이다. 이 식물은 마당, 길 옆에 간혹 자라는 식물로 땅바닥을 기며 붉은 빛이 도는 식물이다. 이의 근연식물로는 땅빈대(*E. humifusa*), 큰땅빈대(*E. maculata* L.)가 있으나 한국에서는 애기땅빈대가 가장 흔하다(Cha et al., 1996; Ko & Jeon, 2003). 애기땅빈대의 전초는 만성기관지염, 출혈, 급성전염성간염에 의한 황달, 장염에 의한 설사, 치질, 위장염, 어혈 등에 효과가 있다고 알려져 있다(An et al., 2007; Cha et al.). 현재까지 애기땅빈대로부터 분리된 화합물로는 scopoletin, p-hydroxybenzaldehyde, methyl gallate, gallic acid, quercetin, avicularin, juglanin, astragaln 등과 같은 성분이 있다(An et al., 2007).

Peroxynitrite( $\text{ONOO}^-$ )는 reactive nitrogen species(RNS)의 일종으로서 superoxide anion radical( $\bullet\text{O}_2^-$ )과  $\bullet\text{NO}$ 의 반응결과 생성될 수 있는 반응성이 큰 산화제이다(Pryor and Squadrito, 1996). Peroxynitrite의 과다생성은 지질과 단백질의 과산화, 세포독성, 신경독성 등을 초래할 수

있으며 고콜레스테롤 혈증, 동맥경화, 비만, 당뇨병 등을 일으킬 수 있다고 한다(Patcher et al., 2005; Drel et al., 2007; Korda et al., 2008).

특히 최근에는 위장질환과 관련하여 위장상피세포에 의한 NO 생산 및 *Helicobacter pylori*에 의한 NO 생산으로 이의 과다한 생성이 소화관질환을 일으키는 것으로 알려졌다(Jang et al., 2009). 그 기전으로 역시 NO가  $\bullet\text{O}_2^-$ 와 결합하여 ONOO $^-$ 를 생성시키며 이것은 계속하여 프로톤화한 후  $\bullet\text{NO}_2^-$ 와  $\bullet\text{OH}$ 로 개열하며, 이 중 후자가 조직손상을 일으키므로 소화성궤양의 발병원인이 되고 있다(Radi et al., 1991; Rachmilewitz et al., 1994). 더욱이 ONOO $^-$ 를 불활성화하는 endogenous enzyme이 결여돼 있기 때문에(Kim et al., 2004) ONOO $^-$ 소거제의 개발은 중요하다.

그러므로, 최근에는 현재 주로 임상에서 사용되는 cimetidine, ranitidine, famotidine과 같은 H<sub>2</sub>-antagonist나 omeprazole, rabeprazole과 같은 proton pump inhibitor 이외에 peroxy-nitrite scavenger와 같은 소화성궤양 치료제를 얻고자 노력하는 추세가 있다. 특히 도토리, 딸기, 산딸기, 포도, 복분자 등에 많이 함유된 ellagic acid는(Alvarez-Suarez et al., 2011; Silva Beserra et al., 2011) NO 생성과 cytokine-induced ROS generation 억제기전에 의해 항궤양활성을 나타낸다고 보고되어 왔다(Silva Beserra et al., 2011). 그러므로 peroxy-nitrite scavenging effect가 현저한 효과를 나타내는 추출물이나 화합물의 발견과 이용은 소화성궤양 치료효과를 나타내는 약물개발에서도 유리하다.

Ellagic acid는 두 gallic acid가 에스테르 결합한 polyphenol의 하나로서 4개의 phenolic hydroxyl group을 가진다. 또 본 연구 중 acylated flavonoid glycoside인 astragalol 6''-gallate와 isoquercitrin 6''-gallate를 애기땅빈대로부터 처음으로 분리하였다. 그러므로 본 연구에서는 애기땅빈대에 함유된 폴리페놀 성분 조성을 밝히기 위하여 본 연구에 착수하였다. 본 보고에서는 애기땅빈대로부터 폴리페놀 성분의 동정, 정량 및 그 분석법의 validation 및 peroxy-nitrite 소거효과에 대해 기술한다. 또 애기땅빈대의 추출방법과 추출용매에 따른 추출물과 그 폴리페놀 성분의 peroxy-nitrite 소거효과를 비교할 뿐 아니라 각 성분의 구조-활성 상관관계에 대해서 기술한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 국화과 식물 및 천연초 추출물·유효성분의

#### 항당뇨 쌀 개발 : 세부 1과제

##### 1. 섬썩부쟁이 Caffeoylquinic Acid 고함유 추출물의 비만에 대한 효과

###### 가. 재료 및 실험방법

본 실험에는 CQ가 풍부한 섬썩부쟁이 30%-EtOH 추출물을 동물실험에 사용하였다. 또 한국의 민간에서 섬썩부쟁이는 동맥경화, 감기, 염증 등에 사용되고 있기 때문에 이 추출물이 고지방 식이 흰쥐에서 이 추출물이 비만, 고지혈증, 동맥경화 위험지수 개선 효과가 있는지 실험하였다.

흰쥐의 비만 유도를 위하여 약 6주간 Table 1과 같은 조제시료로 사육하였다. 처리군에서는 고지방 식이 2주째부터 4주간 oral jonde로 경구투여하여 체중, 고지혈증 및 산화적 스트레스에 대한 효과를 관찰하였다.

###### 나. 실험결과

실험 결과, Table 2에 제시한 바와 같이 Control 군은 비처리군에 비해 3주째부터 유의성 있는 체중증가효과를 보였다. 비만 유도 흰쥐에서 실험시작 후 6주에 체중이 정상군에 비해 18.5% 증가효과가 나타났다.

30% EtOH 추출물은 100mg/kg 및 200mg/kg의 경구투여로 농도의존적인 체중감소효과가 나타났다. 특히 200mg/kg의 투여에 의해 6주째에 9.0%의 체중감소효과가 나타났다.

지방조직 무게의 비교실험 결과에서 고지방 식이군은 후복강 지방조직과 부고환 지방조직의 무게를 현격히 증가시킨 것을 알 수 있었으며, 처리군에서는 농도의존적으로 이들 중량을 감소시킨 것으로 나타났다.

혈청지질 농도를 조사한 결과가 Table 3에 나타내었다. 혈청 total lipid, phospholipid, triglyceride의 농도가 고지방 식이로 증가하였으나 추출물의 투여로 감소되는 현상을 보였다. 이상의 실험결과 섬썩부쟁이 추출물은 식이로 유도된 비만과 고지혈증에 유효한 것으로 나타났다.

한편, 고지혈증은 소장에서 중성지질의 합성과 chylomicron의 분비증가, 간장에서 중성지방의 합성증가, VLDL, LDL-cholesterol의 합성 및 분비증가, HDL-cholesterol의 합성감소 및 lipase의 활성감소로 인한 말초조직에서의 중성지방의 제거감소에 기인한다.<sup>17,18)</sup> Table 4에서 나타낸 바와 같이 고지방 식이로 total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol이 증가하고, HDL-cholesterol은 감소하였다. 이로부터 산출된 동맥경화 위험지수가 정상쥐가 0.41이던



것이 control 군에서는 1.98로 매우 증가되었다. 100mg/kg 과 200mg/kg 처리군에서는 1.63과 1.09로 동맥경화 위험지수가 현저히 개선되는 것으로 나타났다. 식이로 유도된 비만은 염증 및 동맥경화 유발시킬 수 있다고 한다.<sup>1)</sup>

동맥경화는 산화적 스트레스로 촉발되며, 산화적 스트레스는 라디칼성 혹은 비라디칼성의 reactive oxygen radical (ROS) 등으로 인해 일어나며, 이러한 라디칼을 발생시키는 시스템으로는 mitochondrial electron-transfer system, NAD(P)H oxidase, xanthine oxidase, cyclooxygenase, lipoxygenase, NO synthase, myeloperoxidase 등이 있다. 체내 antioxidant defense system에는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, peroxidase 등이 있고, 그 외 non-enzyme 의 항산화제로는 tocopherol, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene, glutathione, flavonoid 등 다양하다.<sup>3)</sup> 그러므로, CQ 고함유 추출물이 고지방식으로 초래된 동맥경화 위험지수를 감소시킨 것은 그 항산화적 역할 때문으로 생각된다.

산화적 스트레스란 ROS로 인해 세포의 불포화 지방산이 과산화하여 조직이 손상되는 지질 과산화를 지칭한다. 이러한 지질과산화로 인하여 malondialdehyde(MDA)와 같은 thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS)의 농도를 측정함으로써 산화적 스트레스를 파악할 수 있다. Fig. 3에 나타내었듯이, 고지방 식이 흰쥐에서 지질과산화와 hydroxyl radical 농도는 크게 증가되었고 SOD 활성은 감소되었다. 이렇게 고지방 식이로 증가된 산화적 스트레스에 대하여 섬썩부쟁이 추출물 100mg/kg의 투여로는 유의성있는 영향을 주지는 못하였으나 200mg/kg의 투여에서는 감소효과를 나타내었다.

현재 미 FDA에서 승인된 적이 있었던 비만억제제로 ephedrine과 caffeine이 있다고 하나 이의 복용에 따르는 부작용이 적지 않다. 또 현재 지방분해 효소 lipase 억제효과를 갖는 orlistat와 식욕중추 억제효과를 갖는 sibutramine이 시판되고 있으나 이 약물들도 부작용이 있다. 천연물에서 비만억제제 개발에 관한 노력을 하여 현재 green tea에 대한 항비만효과에 관한 연구가 가장 많이 이루어져 있다. Green tea에 함유된 caffeine과 catechin류가 단독으로 혹은 복합으로 작용하여 그 항비만효과가 나타난다고 하며, epigallocatechin gallate(EGCG)와 같은 green tea catechin류가 동물모델에서 효과가 있으며, 이러한 효과는 감소된 adipocyte 분화, 지질 흡수 및 lipogenesis, 그리고 증가된  $\beta$ -oxidation와 관련이 있다고 한다 그 외에도 *Cucurbita moschata*의 water-soluble extract, licorice의 flavonoid oil 등 항비만효과가 보고되었다.

또한 Hogan 등(2010)은 grape pomace antioxidant extract와 같은 항산화제 투여가 식이로 유도된 비만 쥐의 산화적 스트레스와 염증에 효과가 있었으나 체중감소효과는 미약하다고 하였다. 그러나, 본 실험에서는 CQ 고함유 추출물 투여로 고지방식으로 인한 체중, 지방조직무게, 고지혈증, 동맥경화 위험지수 및 산화적 스트레스의 증가를 모두 억제하였다. CQ류는 강한 항산화제로서 free radical-scavenging effect, NO생성 억제효과, peroxynitrite-scavenging effect 작용을 나타내는 것으로 알려져 있으므로, 이러한 기작이 식이성으로 비롯된 동맥경화 위험지수, 산화적 스트레스 및 체중감소효과에 기여한 것으로 이해되었다.

Table 1. Composition of basal and high-fat diet

Ingredient	Basal Diet (%)	Hyperlipidemic Diet (%)
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn Starch	15.0	15.0
Sucrose	50.0	34.5
Fiber <sup>1)</sup>	5.0	5.0
Corn oil	5.0	-
AIN-mineral Mixture <sup>2)</sup>	3.5	3.5
AIN-vitamin Mixture <sup>3)</sup>	1.0	1.0
Choline Bitartate	0.2	0.2
Beef Tallow	-	20.5

<sup>1)</sup> Cellulose : Sigma Co. LTD., USA

<sup>2)</sup> Mineral mixture based on the pattern of Rogers and Haper(1965) contain the following (g/kg diet): calcium phosphate dibasic 500.0, sodium chloride 74.0, potassium citrate monohydrate 220.0, potassium sulfate 52.0, magnesium oxide 24.0, magnesium carbonate 3.5, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose, finely powered make 1,000

<sup>3)</sup> Vitamin mixture(g/kg diet): thiamine HCl 0.6, biotin 0.02, riboflavin 0.6, cyanocobalamine 0.001, pyridoxine HCl 0.7, retinyl acetate 0.8, nicotinic acid 3.0, DL-tocopherol 3.8, Ca-pantothenate 1.6, 7-dehydrocholesterol 0.0025, folic acid 0.2, methionine 0.005, sucrose, finely powered make 1,000

Table 2. Effect of the *Aster glehni* extract on the body weight in rats fed basal and high-fat diets

Treatment	Dose (mg/kg)	Week (g)					
		1	2	3	4	5	6
Untreated		135.7±2.1 <sup>a</sup>	158.6±1.5 <sup>ab</sup>	179.6±1.3 <sup>c</sup>	196.3±2.6 <sup>c</sup>	235.9±1.9 <sup>c</sup>	261.6±3.7 <sup>d</sup>
Control		138.6±1.7 <sup>a</sup>	161.2±2.8 <sup>a</sup>	200.7±1.5 <sup>a</sup>	241.8±3.3 <sup>a</sup>	261.2±3.2 <sup>a</sup>	309.7±2.4 <sup>a</sup>
30% EtOH ext.	100	139.2±2.2 <sup>a</sup>	158.7±1.6 <sup>ab</sup>	192.8±2.3 <sup>b</sup>	239.7±2.6 <sup>a</sup>	258.3±2.1 <sup>a</sup>	291.2±3.5 <sup>b</sup>
	200	136.3±1.8 <sup>a</sup>	156.9±2.1 <sup>b</sup>	193.6±1.7 <sup>b</sup>	231.3±4.5 <sup>b</sup>	250.2±3.8 <sup>b</sup>	281.8±2.6 <sup>c</sup>

Rats were rendered obese by high fat diet for six weeks and orally treated with the extract for consecutive four weeks. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05).

Table 3. Effect of the *Aster glehni* extract on the concentration of serum lipids in rats fed high-fat diet

Treatment	Dose (mg/kg)	Total lipid	Phospholipid	Triglyceride
		mg/dl		
Normal		231.4±50.6 <sup>c</sup>	116.4±21.7 <sup>bc</sup>	57.2±8.54 <sup>c</sup>
Control		391.7±49.3 <sup>a</sup>	146.7±20.3 <sup>a</sup>	164.9±7.16 <sup>a</sup>
30% EtOH ext.	100	385.3±37.6 <sup>a</sup>	139.4±19.2 <sup>ab</sup>	160.7±8.25 <sup>a</sup>
	200	337.8±40.8 <sup>a</sup>	113.2±15.3 <sup>c</sup>	141.8±9.16 <sup>b</sup>

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different(p<0.05).



Table 4. Effect of the *Aster glehni* extract on serum cholesterol and atherogenic index in rats fed high-fat diet

Treatment	Dose (mg/kg)	Cholesterol (mg/dl)				AI
		Total	HDL	LDL	VLDL	
Normal		60.4±1.97 <sup>d</sup>	42.8±2.16 <sup>a</sup>	6.16±1.71 <sup>d</sup>	11.4±1.71 <sup>c</sup>	0.41±0.019 <sup>d</sup>
Control		106.3±9.57 <sup>a</sup>	35.6±1.43 <sup>c</sup>	37.7±6.63 <sup>a</sup>	33.0±1.43 <sup>a</sup>	1.98±0.143 <sup>a</sup>
30% EtOH ext.	100	95.2±7.25 <sup>b</sup>	36.2±1.39 <sup>c</sup>	26.9±4.48 <sup>b</sup>	32.1±1.65 <sup>a</sup>	1.63±0.119 <sup>b</sup>
	200	82.6±6.19 <sup>c</sup>	39.4±2.11 <sup>b</sup>	14.8±3.03 <sup>c</sup>	28.4±1.83 <sup>b</sup>	1.09±0.087 <sup>c</sup>

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

AI(Atherosclerosis Index) = (total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL cholesterol

LDL-C = [Total cholesterol - (HDL-C + Triglyceride/5)], VLDL-C = Total cholesterol - (HDL-C + LDL-C)

## 2. 곤달비 추출물의 항당뇨 효과

### 가. 체중변화, 물 및 사료 섭취량에 미치는 영향

당뇨병의 증세로서 실험동물의 체중은 감소하며, 물과 식이의 섭취량이 증가하게 된다. Table 5에 나타내었듯이 STZ를 투여한 쥐는 투여하지 않은 정상쥐에 비해 체중이 심하게 감소되었으며 물과 식이의 섭취량이 매우 현저히 증가하였다. 곤달비의 추출물을 투여한 군에서는 이러한 현상을 완화시켰으며 농도의존성이 관찰되었다.

### 나. 혈중 Glucose 함량에 미치는 영향

당뇨병의 가장 중요한 특징은 혈액 중의 포도당의 농도가 매우 현저히 증가하는 것이다. STZ를 투여한 흰쥐는 혈중 포도당 농도가 매우 높아진 것을 알 수 있었다. 곤달비 100mg/kg, 200mg/kg을 투여한 흰쥐는 혈중 포도당의 농도를 각각 21.2%, 49.3% 감소시켰다. 이 실험으로 곤달비가 당뇨병에 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

### 다. Oral glucose tolerance test에 미치는 영향

본 실험결과는 당내성 실험의 결과로서 혈당이 과다할 때 당의 세포내 흡수속도를 측정된 결과이다. 경구로 포도당만을 투여한 흰쥐의 혈당은 점점 증가하여 120분에 최대의 혈당을 나타내었다.

곤달비 추출물의 처리군에서 비교적 고른 혈중 포도당 농도를 나타내어 곤달비의 경우 최고 46.0%의 혈당강하효과를, 최저 34.9%의 혈당강하효과를 나타내었다(Fig. 2).

### 라. 혈청 중 중성지질 함량에 미치는 영향

고지혈증은 동맥경화증의 지수로서 소장에서 중성지질의 합성과 chylomicron의 분비증가, 간장에서 중성지방의 합성 증가, VLDL, LDL-Cholesterol 합성 및 분비증가, HDL-Cholesterol의 합성 감소 및 lipase의 활성 감소로 인한 말초조직에서의 중성지방의 제거 감소에 기인한 것이다(Miller, 1978).

본 실험에서는 STZ로 당뇨성 고지혈증을 유도된 흰쥐에서 total cholesterol 혈중 함량이 현저히 증가되던 것이 곤달비 추출물의 투여로 감소하였다. 곤달비 200mg/kg의 투여군의 혈청 중성지방 감소효과는 67.3%로 매우 큰 효과를 나타내었다.

#### 마. 혈청 중 Cholesterol 함량과 동맥경화 위험지수에 미치는 영향

고콜레스테롤증은 결국 동맥경화를 일으키기 쉬운 것으로 알려져 있다. 또, LDL의 산화는 lipid peroxide와 oxygen free radical을 증가시키고 이들 분자들은 endothelial cell에 독성을 미치며, 산화된 LDL은 혈관벽에 쉽게 부착되어 혈관세포를 손상시켜 혈관조직을 변형시킴과 동시에 변형된 세포의 분열을 촉진시켜 주변의 산화 LDL, 혈소판 및 macrophage가 혈관 벽에 더 쉽게 부착되도록 돕는다고 알려져 있다(Steinberg, 1997). 한편, HDL은 콜레스테롤 대사에 기여하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 혈청 LDL 농도 값이 높을수록, HDL 농도 값이 낮을수록 동맥경화 위험지수는 높아지게 된다.

STZ를 단독으로 처리한 군은 혈청 total cholesterol과 LDL-cholesterol이 매우 현저히 증가되었으며, HDL-cholesterol도 약간 증가가 인정되었다.

곤달비의 추출물의 투여는 이를 완화시켰다. 각 추출물의 100mg/kg의 투여는 통계적 유의성이 관찰되지 않았으나 200mg/kg에서는 유의성있게 혈청 total cholesterol과 LDL-cholesterol을 감소시켰으며 혈청 HDL-cholesterol의 큰 변화는 나타나지 않았다. 동맥경화 위험지수는 각 추출물의 투여로 크게 완화되었다.

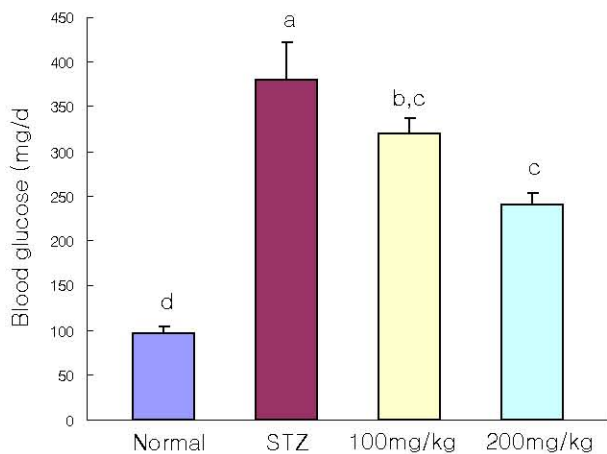


Fig. 1. Effect of the MeOH extract of *L. stenocephala* leaves on the blood glucose concentration in the STZ-induced hyperglycemic rat

<sup>1)</sup> Values are expressed mean  $\pm$  S.D. for groups of six experiments. <sup>2)</sup> Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

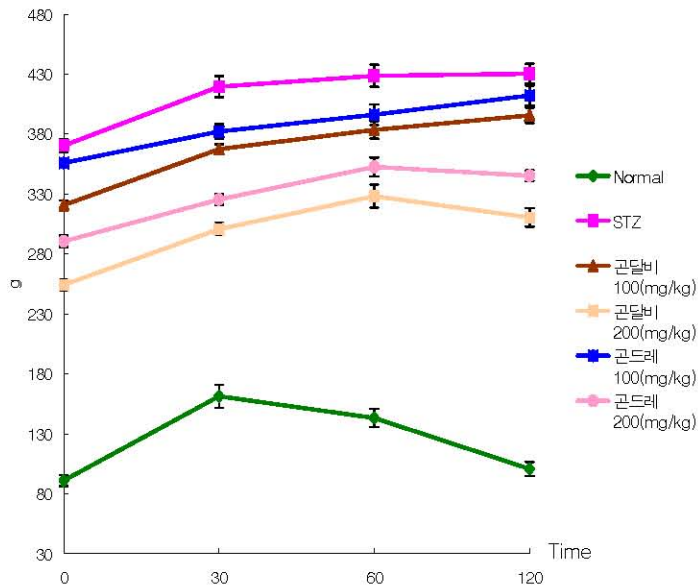


Fig. 2. Glucose tolerance by MeOH extract of *L. stenocephala* leaves in the STZ-induced hyperlipidemic rat

<sup>1)</sup>Values are expressed mean  $\pm$  S.D. for groups of six experiments. <sup>2)</sup>Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

Table 5. Effect of the MeOH extract of *L. stenocephala* leaves on the gains of body weight, water consumption and food intake in STZ-induced hyperglycemic rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Water consumption (ml/day/rat)	Food intake (g/day/rat)
Untreated		70.6 $\pm$ 6.89 <sup>a,1,2)</sup>	36.7 $\pm$ 9.23 <sup>d</sup>	22.3 $\pm$ 6.24 <sup>a</sup>
STZ		- 28.0 $\pm$ 7.40 <sup>d</sup>	118.7 $\pm$ 20.9 <sup>a</sup>	38.7 $\pm$ 7.26 <sup>a</sup>
MeOH extract	100	- 10.4 $\pm$ 5.01 <sup>c</sup>	93.8 $\pm$ 8.26 <sup>bc</sup>	31.2 $\pm$ 7.35 <sup>ab</sup>
	200	13.0 $\pm$ 8.60 <sup>b</sup>	79.6 $\pm$ 10.3 <sup>c</sup>	28.8 $\pm$ 3.47 <sup>ab</sup>

Fifty mg/kg of STZ-in 0.2ml 0.01M-citrate buffer (pH 4.5)-was injected into tail vein. Rats were orally administered with the MeOH extract at 100 and 200 mg/kg dose daily for consecutive two weeks after STZ-induced hyperlipidemic state. The rats were sacrificed two weeks later for the last administration. The assay procedure was described in the experimental methods; <sup>1)</sup>Values are expressed mean $\pm$ S.D. for groups of six experiments. <sup>2)</sup> Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

Table 6. Effect of the MeOH extract of *L. stenocephala* leaves on the serum triglyceride concentration of STZ-induced hyperglycemic rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Total triglyceride (mg/dl)
Untreated		76.3 $\pm$ 7.28 <sup>a,1,2)</sup>
STZ		137.7 $\pm$ 6.27 <sup>a</sup>
MeOH extract	100	103.8 $\pm$ 5.34 <sup>bc</sup>
	200	96.4 $\pm$ 4.29 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Values are expressed mean  $\pm$  S.D. for groups of six experiments. <sup>2)</sup>Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

Table 7. Effect of the MeOH extract of *L. stenocephala* leaves on the serum total-, LDL-, HDL-cholesterol and atherosclerotic index in STZ-induced hyperglycemic rats

Treatment	Dose mg/kg	Total	LDL	HDL	AI
		mg/dl			
Untreated		65.3±6.27 <sup>c,1,2)</sup>	14.1±3.49 <sup>c</sup>	35.7±3.06 <sup>d</sup>	0.83±0.09 <sup>b</sup>
STZ		147.4±5.19 <sup>a</sup>	76.2±19.8 <sup>a</sup>	43.3±2.25 <sup>bc</sup>	2.41±0.25 <sup>a</sup>
MeOH extract	100	123.8±4.59 <sup>ab</sup>	56.9±15.3 <sup>ab</sup>	46.5±3.11 <sup>abc</sup>	1.67±0.48 <sup>ab</sup>
	200	104.6±5.17 <sup>b</sup>	38.2±11.7 <sup>b</sup>	50.3±1.43 <sup>a</sup>	1.08±0.40 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Values are expressed mean ± S.D. for groups of six experiments. <sup>2)</sup> Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 3. 예기땅빈대의 HPLC 분석 및 peroxynitrite 소거효과

#### 가. 화합물의 동정

예기땅빈대를 환류추출하여 얻은 MeOH 추출물을 분획하여 ether 분획, EtOAc 분획 및 BuOH 분획을 각각 얻어서 역시 분석과 assay를 위한 시료로 사용하였다. EtOAc 분획으로부터 식물화학적 분리를 통해 gallic acid, gallic acid methyl ester, avicularin, astragalin, juglanin, isoquercitrin 6''-O-gallate, astragalin 6''-O-gallate (An et al., 2007) 및 ellagic acid(Cha et al., 2003)를 얻었다. 이들 화합물은 용점과 선광도 및 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR spectral data와 비교하여 동정할 수 있었다. 이들 분리된 화합물도 역시 HPLC 분석과 peroxynitrite scavenging assay 수행을 위한 시료로 사용하였다. 본 분리과정을 통해 동정된 화합물 외에도 ONOO<sup>-</sup> scavenging assay에 사용된 4종 화합물(quercetin, kaempferol, isoquercitrin, hyperoside)의 구조를 Fig. 3에 나타내었다.

화합물 3과 5는 acylated flavonoid glycoside에 속하는 화합물로 확인되었다. Acylated flavonoid glycoside에는 phenylpropanoyl, galloyl 혹은 acetyl기와 같은 acyl기가 당에 에스테르 결합한 화합물의 일군을 지칭한다. Liu 등 (1997)은 astragalin, astragalin 2''-gallate, astragalin 6''-gallate, astragalin 2'',6''-gallate의 <sup>13</sup>C-NMR spectral data를 비교하여 <sup>13</sup>C-NMR assignment하였다. 화합물 5는 Liu 등(1997)의 보고에 따라 astragalin 6''-gallate로 확인되었다. 이 화합물은 kaempferol의 3번 위치에 D-glucose가 결합하고 gallic acid가 D-glucose의 6''-위치에 결합한 화합물이다.

화합물 3의 <sup>1</sup>H-NMR data와 <sup>13</sup>C-NMR data를 나타내었듯이 화합물 5와 매우 유사한 chemical shift 값을 나타내었으나 그 aglycone이 kaempferol 대신에 quercetin이다. 특히 B-ring에서 δ 7.44 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2'), 6.73 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 7.57 (1H, dd, J = 1.8, 8.4 Hz, H-6')에서 catechol 고리에 의한 피크를 잘 알 수 있다. 그러므로, 화합물 3은 isoquercitrin 6''-gallate로 동정되었으므로 그 NMR assignment를 실험항에 나타내었다.

#### (나) HPLC 법의 최적화 및 타당성 검증

HPLC 법에 대한 최적화는 4가지 변수, 즉 이동상 조성, 기울기 용리, 컬럼 온도 및 UV 파장을 고려하여 설정되었다. 용매로서 H<sub>2</sub>O, MeOH, CH<sub>3</sub>CN의 혼합물을 우수한 분리, 최적의 이동상, 그리고 더욱 경제적이고 환경친화적인 용매를 선택하기 위해 조사하였다. 이동상 용매로서 Solvent A는 H<sub>2</sub>O, Solvent B는 MeOH-CH<sub>3</sub>CN(60:40)을 사용했을 때 더 나은 분리능과

피크 모양을 나타내었다. Solvent A와 Solvent B에 0.05% TFA를 첨가했을 때 더욱 분리능을 개선했는데 이는 폴리페놀 화합물의 이온화를 막기 때문인 것으로 생각된다.

여러가지 기울기 용리 프로그램을 이용하여 폴리페놀 화합물의 넓은 영역의 극성 크기를 갖는 화합물을 HPLC chromatogram에서 검출하고자 하였다. 이를 검토하는 중에 (A)/(B) = 85/15(0min) → 35/65(35min, hold for 5min) → 0/100(42min, hold for 5min)의 gradient elution program과 1.0mL/min의 흐름속도 및 컬럼 온도 40°C가 선택되었다. 이와 같은 조건이 보다 나은 분리와 보다 일정한 머무름 시간을 가능하게 하였다. 검출 파장으로 254, 280 및 360nm를 이용하여 분석하였을 때 254nm가 동시분석을 위해 유리한 것으로 나타났기 때문에 254nm의 고정된 파장이 화합물 검출을 위해 선택되었다.

Table 8에 나타내었듯이, 본 HPLC 법은 직선성, 감도, 정밀성, 안정성 및 정확성을 조사함으로써 검증되었다. 6개 농도의 데이터로부터 산출된  $R^2$ 값은 0.9997이상이었으므로 방정식의 직선성이 인정되었다.

Table 9에서 보듯이, 일내변동 시험에서는 피크면적의 RSD 치가 0.26 - 1.83% 범주에 있었으므로 충분히 정밀하고 안정하였다. 회수율이 94.02 - 102.38%에 있었으므로 이 방법이 충분히 정확한 것을 평가된다. 결국, 본 방법은 애기땅빈대의 동시분석을 위해 이용될 수 있는 것으로 간주되었다.

#### (다) 폴리페놀 함량과 추출물의 peroxynitrite 소거효과

Table 10에는 추출용매, 추출방법에 따라 얻어진 5종으로부터 분석하여 얻은 8종 화합물의 함량을 나타낸 것이다. 또, Fig. 4는 MeOH 추출물과 그 분획물의 HPLC chromatogram을 나타낸 것이다. 우선 폴리페놀 총합을 볼 때 환류추출하여 얻은 MeOH extract가 60.94mg/g으로 가장 높았다. 초음파 추출하여 얻은 추출물은 이보다 함량이나 낮았으나 그 순서는 H<sub>2</sub>Oextract (43.94mg/g) > 70% MeOH extract(33.25mg/g) > 30% MeOH extract (32.99mg/g) > MeOH extract (30.57mg/g) > EtOH extract (27.84mg/g)으로 나타났다.

이상에서 초음파추출시 H<sub>2</sub>O단독 용매나 H<sub>2</sub>O가 첨가된 70% MeOH나 30% MeOH가 바람직한 용매로 생각된다.

환류추출하여 얻은 MeOH 추출물 중에는 ellagic acid가 15.64mg/g, isoquercitrin 6''-O-gallate가 16.99mg/g, astragalin 6''-O-gallate가 13.72mg/g으로 상대적으로 매우 높게 함유되어 있었다. 이들 중 ellagic acid는 gallic acid 두 분자가 축합하여 형성된 화합물이며, isoquercitrin 6''-O-gallate와 astragalin 6''-O-gallate는 각각 isoquercitrin과 astragalin의 D-glucose의 C-6에 gallic acid가 에스테르 결합한 화합물이다. Gallic acid와 gallic acid ester는 각각 5.40mg/g, 3.12mg/g으로 함유되어 있었다, 나머지 3종 화합물인 avicularin, astragalin, juglanin은 비교적 소량 함유되어 있는 것으로 나타났으며 isoquercitrin은 검출되지 않았다. 분획물간 총 폴리페놀 함량을 비교해 볼 때 EtOAc 분획에 232.8mg/g으로서 가장 높았고 BuOH 분획에 103.3mg/g이었으나 ether 분획에는 상대적으로 매우 낮은 함량이었다.

Table 11에는 0.08, 0.40, 2.00, 10.0µg/ml에서 ONOO<sup>-</sup>소거활성을 나타낸 것이다. IC<sub>50</sub>를 비교하였을 때 Ether 분획(7.88µg/mL) > MeOH extract(4.43µg/mL) > EtOAc 분획(1.53µg/mL) > BuOH 분획(1.55µg/mL)의 순으로 나타났다. 이 중 EtOAc 분획과 BuOH 분획은 양성대조약물인 L-penicillamine보다 낮은 IC<sub>50</sub>치를 나타내었다. 이 두 분획의 높은 ONOO<sup>-</sup>소거활성은 폴리페놀의 높은 함유량과 관련이 있는 것으로 생각된다.



### (라) 성분의 peroxynitrite 소거효과

ONOO<sup>-</sup> scavenging assay에 사용한 화합물은 본 연구 중 애기땅빈대에서 분리된 8종 화합물 이외에 kaempferol, quercetin, hyperoside 및 isoquercitrin을 실험에 사용하여 총 12종 화합물에 대한 peroxynitrite scavenging assay를 실험하여 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 특히 IC<sub>50</sub>를 µg/mL로 나타낸 것은 추출물 및 분획물의 IC<sub>50</sub>값과 비교할 수 있도록 한 것이었으며, µM 단위로 나타낸 것은 구조-활성 상관관계를 비교할 수 있도록 한 것이다.

12종의 화합물 중 ellagic acid는 0.89µM의 IC<sub>50</sub>치를 보여 ONOO<sup>-</sup> 소거효과가 매우 강한 화합물로 확인되었다. astragalin 6''-O-gallate와 isoquercitrin 6''-O-gallate의 IC<sub>50</sub>는 각각 1.43µM과 1.75µM의 수준을 보여 이 수치는 astragalin(8.66µM)과 isoquercitrin(2.52µM)의 값뿐 아니라 gallic acid(7.23µM)보다 낮은 값이다. 즉, 두 flavonol 3-O-glucoside에 gallic acid가 결합함으로써 ONOO<sup>-</sup> 소거효과는 강하게 나타났다. 이러한 gallic acid가 결합한 플라보노이드 화합물 중에 녹차에서 분리되어 (-)-epigallocatechin gallate, (-)-epigallocatechin와 같은 화합물이 알려져 그 항산화효과가 잘 알려져 있다.

Table 9에는 본 실험에 사용한 화합물을 gallic acid-type, kaempferol-type 및 quercetin-type으로 나누어서 나타내었다. 이 중 플라보놀의 B-ring에 quercetin은 kaempferol보다 수산기를 하나 더 가져 catechol ring을 소유하므로 더 활성이 강한 것으로 추측된다. Pyrogallol 고리를 가지는 gallic acid의 결합은 그 활성을 더욱 크게 하는 것으로 해석되었다.

Peroxynitrite의 과다생성은 고콜레스테롤 혈증, 동맥경화, 비만, 당뇨병과 같은 질병을 일으킬 뿐아니라(Patcher et al., 2005; Drel et al., 2007; Korda et al., 2008) 위궤양을 비롯한 소화성 궤양(Alvarez-Suarez et al., 2011; Silva Beserra et al., 2011) 및 Crohn's disease와 같은 대장성 궤양을 비롯한 소화관질환을(Rosillo et al., 2011) 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히, ellagic acid는 여러 궤양 발병 모델에 유효한 것으로 알려져 있을 뿐 아니라(Silva Beserra et al., 2011) Chron's disease와 같은 대장성궤양 치료에도 효과가(Rosillo et al., 2011) 있는 것으로 알려져 있다. NO의 과다생성이나 이에 따른 ONOO<sup>-</sup>의 과다생성 역시 위장관 궤양을 일으킬 수 있다고 알려져 있기 때문에 본 실험에서 밝혀진 ONOO<sup>-</sup>의 소거효과는 위장관 궤양의 치료와 예방에 유익할 것으로 예상된다. 또 애기땅빈대가 민간에서 위장관질환에 유효한 것으로 알려진 것은 폴리페놀의 높은 함량 높은 ONOO<sup>-</sup> 소거효과에 기인한 것으로 추측된다.

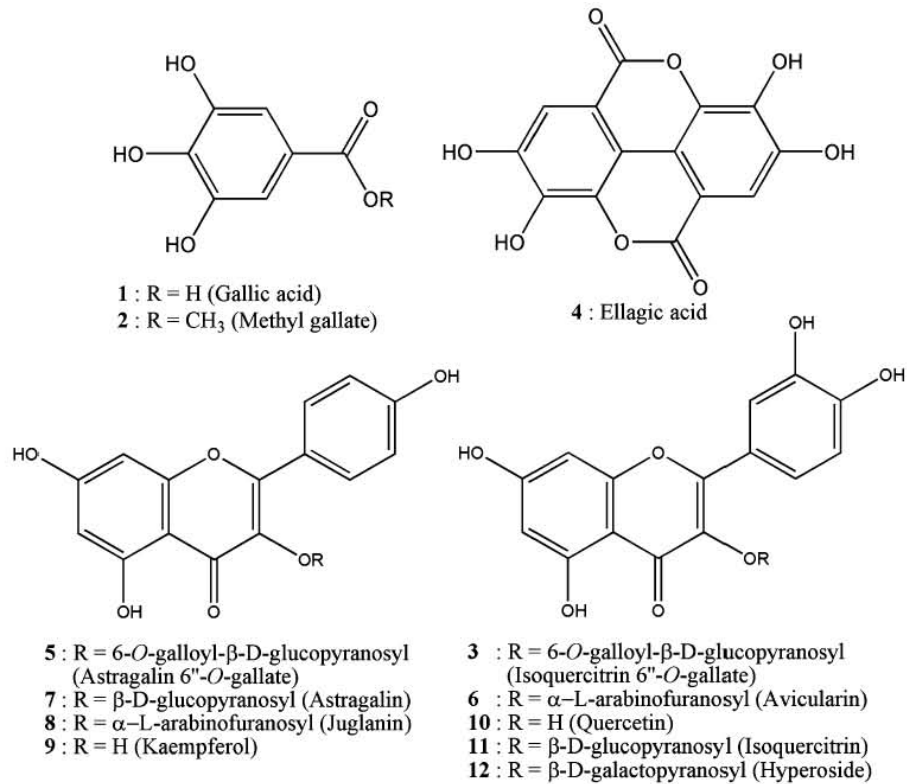


Fig. 3. Structure of polyphenols used for HPLC analysis or peroxynitrite-scavenging assay.

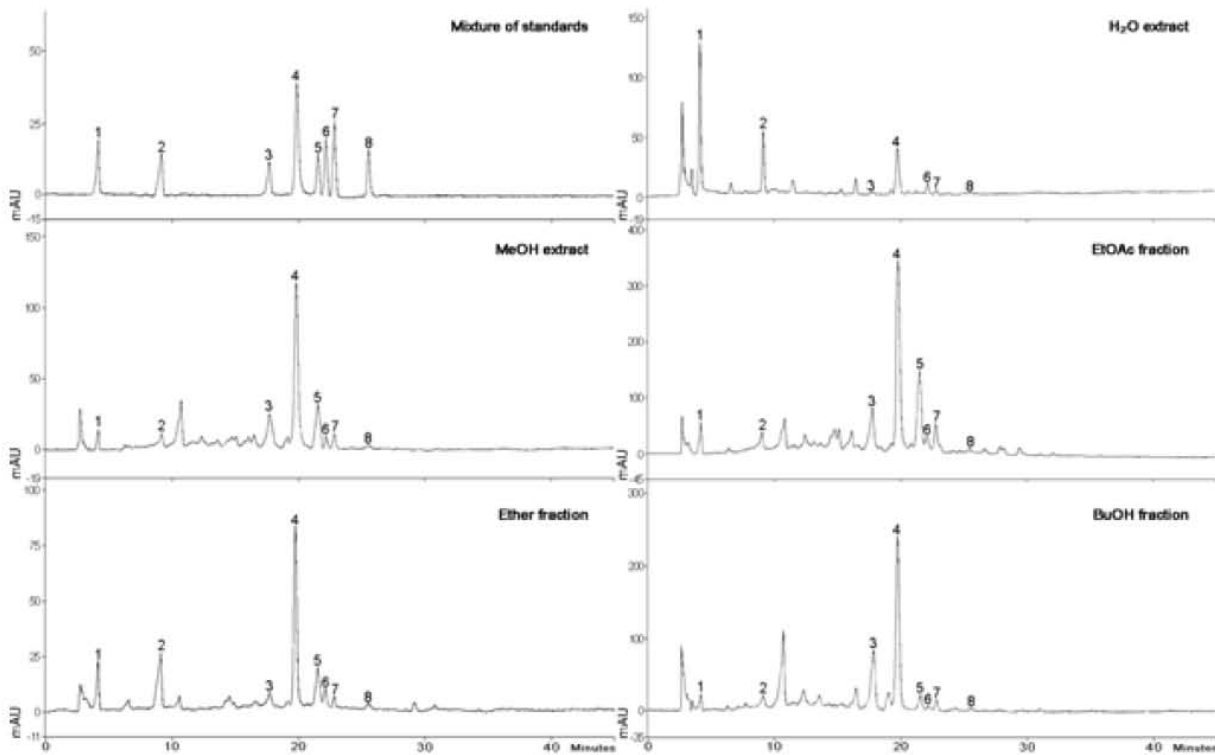


Fig. 4. HPLC chromatograms of mixed standards, extracts and fractions of *E. supina*.

**Table 8.** Linearity of standard curves and detection/quantification limits for the standard compounds

No	Standard compounds	Calibration equation (linear model) <sup>a</sup>	Linear range (µg/ml)	R <sup>2b</sup>	LOD <sup>c</sup> (µg/ml)	LOQ <sup>d</sup> (µg/ml)
1	Gallic acid	$y = 145.021x+33.587$	1.56-50.00	0.9997	0.80	2.68
2	Gallic acid methyl ester	$y = 228.517x+56.229$	1.56-50.00	0.9997	0.41	1.37
3	Isoquercitrin 6''-gallate	$y = 170.598x+42.468$	1.56-50.00	0.9999	0.63	2.10
4	Ellagic acid	$y = 589.979x+72.816$	1.56-50.00	0.9998	0.13	0.44
5	Astragalín 6''-gallate	$y = 255.632x+54.871$	1.56-50.00	0.9999	0.37	1.24
6	Avicularin	$y = 247.289x+65.751$	1.56-50.00	0.9999	0.34	1.14
7	Astragalín	$y = 460.649x+65.398$	1.56-50.00	0.9999	0.18	0.61
8	Juglanin	$y = 182.691x+58.731$	1.56-50.00	0.9998	0.50	1.67

<sup>a</sup>y, peak area at 254nm; x, concentration of the standard (µg/ml); <sup>b</sup>R<sup>2</sup>, correlation coefficient for 6 data points in the calibration curves (n=4); <sup>c</sup>LOD, limit of detection (S/N=3); <sup>d</sup>LOQ, limit of quantification (S/N=10).

**Table 9.** Precision and recovery data of each analyte

Analyte	Precision test					Recovery test					
	$t_R$ (min)	Intra-day variability RSD (%)		Inter-day variability RSD (%)		Initial conc. (µg/ml)	Amount added (µg)	Concentration after addition(µg/ml)		Recovery (%)	RSD (%)
		$t_R$	Area	$t_R$	Area			Expected	Measured		
Gallic acid	4.16	0.33	0.85	0.84	2.83	7.019	6.250	13.27	13.58	102.38	0.89
Gallic acid methyl ester	9.11	0.20	1.60	1.05	2.59	4.057	6.250	10.31	9.86	95.65	1.98
Isoquercitrin 6''-gallate	17.73	0.03	0.71	1.40	1.07	22.09	25.00	47.09	45.83	97.32	0.93
Ellagic acid	19.79	0.06	0.26	1.34	1.20	20.33	25.00	45.33	44.92	99.09	0.40
Astragalín 6''-gallate	21.56	0.13	0.72	1.29	1.21	17.83	25.00	42.83	40.23	94.02	0.77
Avicularin	22.18	0.12	1.48	1.31	2.33	3.892	3.125	7.017	6.89	98.12	0.76
Astragalín	22.87	0.11	1.37	1.27	2.88	2.724	4.375	7.099	6.90	97.20	0.52
Juglanin	25.50	0.15	1.83	0.81	4.71	1.281	1.563	2.843	2.77	97.34	1.00



**Tabel 10.** Content of analytes in the lyophilized extracts and fractions of *E. humifusa* (mg/g)

Analyte	Extracts						Et
	MeOH*	EtOH*	70% MeOH*	30% MeOH*	H <sub>2</sub> O*	MeOH**	
Gallic acid	2.62 (0.67)	1.38 (0.30)	2.87 (0.90)	5.51 (1.60)	29.03 (10.31)	5.40 (1.33)	8.50
Gallic acid methyl ester	3.17 (0.81)	1.22 (0.26)	6.34 (2.00)	10.11 (2.93)	8.44 (3.00)	3.12 (0.77)	10.76
Isoquercitrin 6''-gallate	5.67 (1.45)	6.40 (1.38)	7.98 (2.51)	2.88 (0.83)	0.72 (0.26)	16.99 (4.17)	3.53
Ellagic acid	11.16 (2.84)	11.95 (2.57)	10.23 (3.22)	10.20 (2.96)	3.56 (1.26)	15.64 (3.84)	10.37
Astragalin 6''-gallate	0.96 (0.24)	0.68 (0.15)	0.57 (0.18)	n.d.	n.d.	13.72 (3.37)	8.14
Avicularin	4.82 (1.23)	4.31 (0.93)	3.78 (1.19)	3.26 (0.95)	1.63 (0.58)	2.99 (0.73)	2.56
Astragalin	1.25 (0.32)	1.29 (0.28)	0.87 (0.27)	0.75 (0.22)	0.36 (0.13)	2.10 (0.51)	0.68
Juglanin	0.93 (0.24)	0.63 (0.13)	0.61 (0.19)	0.36 (0.10)	0.26 (0.09)	0.99 (0.24)	0.89
Total	30.57 (7.79)	27.84 (5.99)	33.25 (10.47)	32.99 (9.57)	43.94 (15.60)	60.94 (14.96)	45.42

\*Extracted on an ultrasonication, \*\*Extracted under reflux, Values in the parentheses are content of analytes in the dried plant materials

**Table 11.** Peroxynitrite–scavenging effect of the MeOH extract of *Euphorbia humifusa* and its fractions

Sample	Peroxynitrite-scavenging (%)				IC <sub>50</sub> (µg/ml)
	0.08 µg/ml	0.40 µg/ml	2.00 µg/ml	10.0 µg/ml	
MeOH extract	3.75±6.08*	4.35±1.71	36.11±2.45	81.76±0.45	4.43
Ether fraction	0.98±1.56	3.29±1.65	16.11±5.20	62.14±3.32	7.88
EtOAc fraction	7.87±3.14	12.99±0.05	65.21±4.34	95.60±0.35	1.53
BuOH fraction	9.80±0.02	15.71±2.81	63.16±3.74	91.17±0.23	1.55
L-Penicillamine	-	31.01±0.08	51.79±2.50	76.05±1.05	1.86

\*Value represents mean ± S.D. (n = 2). - (not tested)

**Table 12.** Peroxynitrite–scavenging effect of the phenolics in *E. supina*

Type	Compound	Peroxynitrite-scavenging (%)				IC <sub>50</sub>	
		0.08 µg/ml	0.40 µg/ml	2.0 µg/mL	10 µg/mL	µg/ml	µM
Gallic acid-type	Gallic acid	5.66±1.13*	30.53±4.80	68.01±0.97	96.77±0.37	1.23	7.23
	Gallic Me	18.82±6.89	33.15±4.17	79.85±1.07	97.68±1.22	0.97	5.27
	Ellagic acid	18.01±4.62	52.12±7.31	78.76±6.99	94.44±1.12	0.27	0.89
Kaempferol-type	Kaempferol	3.58±1.88	28.95±6.18	92.50±1.45	99.41±0.11	0.92	3.21
	Astragalin	23.77±6.29	36.66±4.64	42.50±2.02	74.38±1.18	3.88	8.66
	Juglanin	11.03±2.40	19.76±1.00	35.04±2.21	51.39±2.86	9.32	22.3
	Astragalin 6-gallate	25.69±4.29	40.16±2.62	73.93±1.58	96.11±1.48	0.86	1.43
Quercetin-type	Quercetin	6.88±4.22	47.44±8.90	82.68±3.79	94.82±1.49	0.51	1.69
	Hyperoside	9.97±1.58	26.94±3.29	75.62±4.85	95.70±0.27	1.15	2.48
	Isoquercitrin	3.97±2.57	25.17±4.11	76.71±3.55	94.58±1.49	1.17	2.52
	Avicularin	15.95±4.13	19.63±4.93	59.24±0.20	90.48±1.53	1.62	3.73
	Isoquercitrin 6-gallate	32.01±7.31	36.55±14.04	69.42±1.31	96.49±0.58	1.05	1.75
Cysteine-type	L-Penicillamine	-	44.89±3.85	72.47±2.12	90.85±1.89	0.69	4.62

\*Value represents mean ± S.D. (n = 2).

## 제 2 절 국화와 식물 및 천연초 추출물·유효성분의 항산화, 항비만 효과 연구 : 협동 1과제

### 1. 고령지 작물 및 천연초 성분 함유 기능성 짚의 비만 억제 검색

#### 가. 재료 및 실험방법

##### (1) 3T3-L1 지방세포에 대한 세포독성 평가

3T3-L1 지방전구세포는 ATCC로부터 구입하였으며, 사용한 배지는 DMEM 배지에 10% FBS와 1%의 1%의 Penicillin(100 U/ml)/Streptomycin(100 µg/ml)을 첨가한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였음. 3T3-L1 지방전구세포를 96 well에 well 당 5x10<sup>4</sup> 개씩 분주하고 24시간 배양한 후, 현미 및 당노출 추출물을 농도별로 처리하였음. 24시간 배양한 후에 MTS용액 20 µl/well을 세포 배양액에 첨가하여 4시간 동안 배양하였음. 490 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포의 생존율을 측정하였음

##### (2) 3T3-L1 지방세포의 분화 유도

3T3-L1 지방전구세포의 지방 세포로의 분화는 60 mm dish에 5×10<sup>6</sup> 세포를 분주하여 세포가 충분히 밀집되게 배양하였음. 2일 후 0.5 mM IBMX, 1 µM dexamethasone, 10 µg/ml insulin (MDI solution), 및 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 2일 동안 배양함으로써 분화를 개시한 다음, 10 µg/ml insulin 및 10% FBS만을 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 2일 동안 분화를 진행시켰음. 그 이후로는 10% FBS만을 포함하는 DMEM배지에서 배양함으로써 세포 내 지방적 (lipid droplet)을 형성하는 지방세포로 분화시켰으며, 지방 세포의 분화 정도는 Oil Red O를 사용하여 확인하였음

##### (3) Oil red O 염색 및 지방축적 측정

60-mm dish에서 표시된 농도의 현미 또는 당노출 추출물과 동시에 MDI solution을 처리하여 3T3-L1을 분화시킨 후, PBS로 세척하고, 4% paraformaldehyde로 고정하였음. Oil red O는 0.5 g을 100 ml의 isopropanol에 녹여 stock solution 을 만들어 사용하였음. 0.5% Oil red O 용액과 isopropanol을 6:4의 비율로 희석한 염색액을 고정된 지방세포에 처리하여 1시간 반응시킨 후, 60% isopropanol로 세척한 다음, D.W.로 다시 세척하여 광학 현미경으로 관찰하였음. 또한, 세포 내에 축적된 지방을 정량하기 위하여 oil red O로 염색한 세포에 isopropanol을 첨가하여 색소를 용해시켜 회수한 다음, 490 nm에서의 흡광도를 spectrophotometer에서 측정함으로써 세포 내에 축적된 지방을 정량하였음

##### (4) Glucose uptake 측정

현미 또는 당노출 추출물 처리에 따른 3T3-L1 지방전구세포의 glucose uptake 변화는 glucose uptake colorimetric assay kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)을 이용하여 수행하였음.

3T3-L1 세포를 96-well plates에  $1 \times 10^5$  cells/ml로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 24시간 더 배양하였음. 배양된 세포는 2% BSA가 포함되어 있는 KRPH (Krebs ringer phosphate HEPES)로 교체하였음. 40분 후, 1  $\mu$ M의 인슐린과 현미 또는 당노쌀 추출물을 처리하여 20분 동안 더 배양한 다음 10 mM 2-deoxy-glucose를 20분간 처리하였음. 세포에 Assay buffer 8  $\mu$ l와 enzyme mix A 2  $\mu$ l를 처리한 후 37°C에서 1시간 동안 반응한 후 extraction buffer를 이용해 세포추출물을 회수하였음. 85°C에서 40분간 가열한 후 차갑게 식혔으며 neutralization buffer를 첨가하였다. 500 rpm에서 10초간 원심분리하고 상층액을 취하였으며, 각각의 well에 glutathione reductase 20  $\mu$ l, DTNB [5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] 16  $\mu$ l, recycling mix 2  $\mu$ l를 첨가한 후 40분 동안 반응을 시켰으며 spectrophotometer를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였음

### (5) Real time-PCR 시험

Easy Blue<sup>®</sup>kits(IntronBiotechnology)를 이용하여 Kit의 protocol에 따라 전체 cellular RNA를 추출하였다. 각각의 시료에서 MuLV reverse transcriptase, 1mM dNTP 그리고 random primer 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l를 이용하여 500 ng의 RNA를 역전사하여 cDNA를 얻었다. cDNA 100 ng에 SYBR premix Taq polymerase와 5'와 3' primers 0.2  $\mu$ M을 포함한 전체 부피 20  $\mu$ l의 시료를 thermal cycler dice real time system를 이용하여 PCR 분석을 하였음. 타깃 유전자의 발현은 GAPDH 발현 값으로 보정하여 표현하였음.

## 나. 실험결과

### (1) 3T3-L1 지방세포에 대한 세포독성 평가

3T3-L1에 당노쌀과 현미쌀 추출물을 농도별(1-500  $\mu$ g/ml)로 처리한 후 24시간 동안 배양하여 세포 독성을 평가하였음. 현미쌀 추출물은 100  $\mu$ g/ml에서 당노쌀 추출물은 500  $\mu$ g/ml에서부터 현저한 세포독성을 보였음(그림 5). 세포독성 평가로부터 지방분화 억제 활성 검색 농도를 1, 10, 100  $\mu$ g/ml 설정하여 추후 실험을 진행하였음

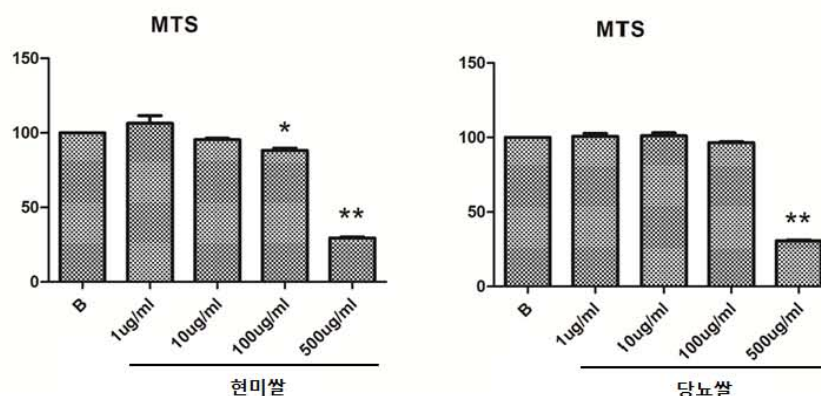


Figure 5. Effects of 현미쌀 and 당노쌀 on cell viability in 3T3-L1 cells. Cells were treated with various concentration of 현미쌀 or 당노쌀 extracts for 24 h. Cell viability was determined using MTS assay. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. the control group.



## (2) 현미쌀과 당노쌀의 지방세포 분화 억제 효과

현미쌀과 당노쌀의 지방세포 분화에 대한 효과를 확인하기 위해 3T3-L1세포에 현미쌀과 당노쌀 추출물을 독성이 없는 농도로(현미쌀: 1, 10  $\mu\text{g/ml}$ , 당노쌀: 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) MDI와 동시에 처리하여 지방세포의 분화에 미치는 영향을 확인하였음. 지방세포로 분화 정도는 Oil red O염색으로 지질 적을 염색한 후, isopropanol로 용출하여 정량하였음. 그 결과, 현미쌀을 처리한 경우, 유의적인 억제활성을 관찰 할 수 없었음. 당노쌀의 경우 100  $\mu\text{g/ml}$ 처리 군에서 약 30%의 감소효과를 보였음(그림 6)

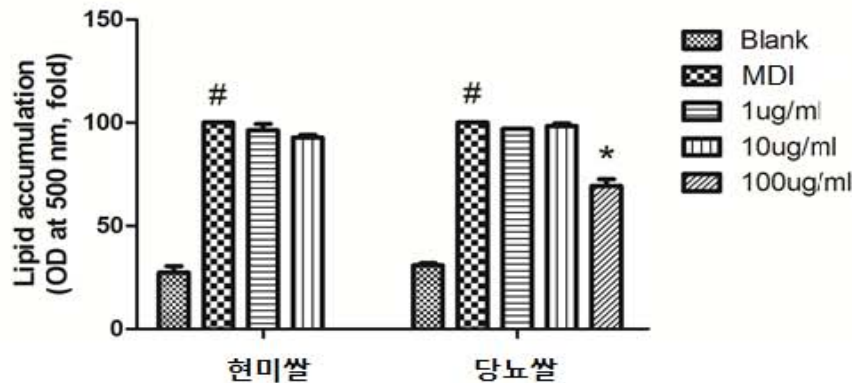


Figure 6. Effects of 현미쌀 and 당노쌀 on intracellular lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Confluent 3T3-L1 preadipocytes differentiated into adipocytes in medium containing different concentrations of 현미쌀 and 당노쌀 extract for 7 days (from day 0 to 7). Oil-red O staining was performed on day 7. MDI: fully differentiated-adipocytes (0.5 mM IBMX, 1  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin). Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. # $p < 0.05$  vs. the control group; \* $p < 0.05$  vs. the differentiated group

## (3) 현미쌀과 당노쌀의 glucose uptake 조절 효능

지방세포에서 glucose uptake는 인슐린의 신호전달체계에 의해 세포질에서 세포막으로 이동하는 glucose transporter-4(Glut-4)에 의해 이루어짐(1, 2). 지방세포와 근육조직에서 Glut isoform인 Glut-1과 Glut-4가 주로 작용하여 glucose uptake에 관여함. Glut-1은 지방세포, 근육세포, 그리고 많은 다른 세포에도 존재하는데 인슐린의 존재에 관계없이 세포막에 존재함. 이와 달리 Glut-4는 세포질에 분포되어 있다가 인슐린의 존재 시 세포막으로 이동하여 glucose uptake를 용이하게 하는 것으로 알려져 있음(3-6). 지방세포로 유입된 포도당은 해당과정을 통해 triglyceride의 전구물질인 glyceraldehyde-3-phosphate를 생성하게 되고 다시 dihydroxyacetone-phosphate를 거쳐 glycerol로 전환하게 되며 이것은 지방산과 결합하여 triglyceride로 합성되어 지방구를 형성하게 됨. 따라서 지방세포 내로 포도당의 유입은 지방세포의 분화와 세포내 지방의 축적에 중요한 역할을 함. 본 연구에서 현미쌀과 당노쌀의 지방대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 2-deoxyglucose(2-DG)의 세포내 축적량을 측정함으로써 glucose uptake를 측정하였음. 분화된 3T3-L1 지방세포에서 세포 내 포도당의 유입은 농도에 따라 전혀 변화가 나타나지 않음(그림 7).

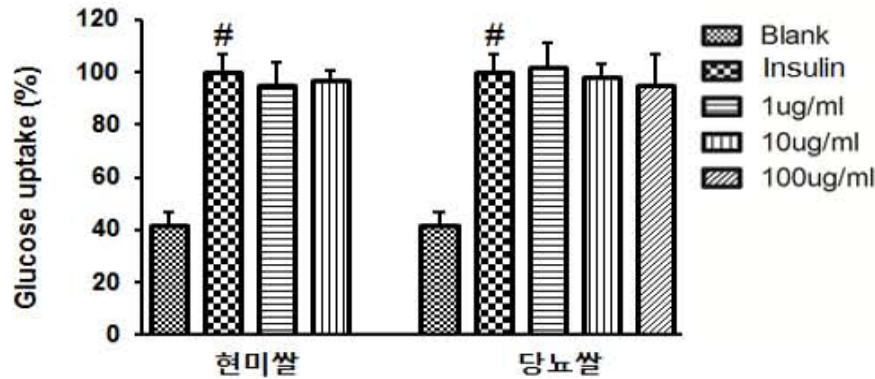


Figure 7. Effects of 현미쌀 and 당노쌀 on glucose uptake. 3T3-L1 cells were serum-starved for 24 h in DMEM, and then challenged with 현미쌀 and 당노쌀 extract or with insulin (100 nM) for 20 min, and thereafter assayed for the uptake of 2-deoxyglucose by the cells. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. #p < 0.05 vs. the control group.

#### (4) 당노쌀의 지방분해 효소 발현에 미치는 영향

당노쌀의 경우, 100  $\mu$ g/ml에서 유의적인 지방 축적이 억제될 보임에도 불구하고 glucose uptake에는 영향을 미치지 않는 결과로 미루어 보아 당노쌀의 경우 세포 내 지방의 분해를 촉진하는 것으로 예상됨. 지방대사에 관여하는 지방분해 효소는 LPL, HSL, 그리고 ATGL의 3가지 정도로 알려져 있음(7-9). 3T3-L1 지방세포에서 LPL, HSL, 그리고 ATGL의 mRNA 발현을 확인한 결과, 당노쌀 처리에 따른 발현증가 효과는 나타나지 않았음(그림 8)

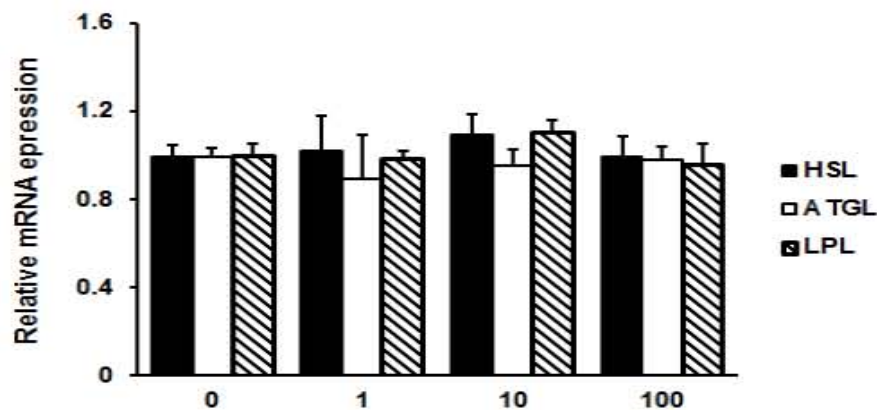


Figure 8. Effects of 당노쌀 on adipocyte-specific gene expression in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with various doses (0, 1, 10, and 100  $\mu$ g/ml) of 당노쌀 extract. After 7 days, the mRNA expression levels of HSL, ATGL and LPL were measured using qRT-PCR.

#### (5) 당노쌀의 지방세포화 전사인자 (adipogenic transcription factor) 발현 조절 효능

지방전구세포가 지방세포로 분화하는 과정에는 세포의 유전자 발현양상 변화가 일어남. 분화 단계에서 지방세포 특이 전사인자들의 경우에도 분화과정에 따라 발현량에 변화가 나타남. 특히, peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR- $\gamma$ )와 CCAAT enhancer binding protein alpha(C/EBP $\alpha$ )는 지방전구세포에서 지방 세포로의 분화에 있어 가장 핵심적인 기능을 담당한다고 알려져 있는 전사조절인자임(10, 11). 당노쌀의 지방세포 분화 억제 기전을 확인하기 위해 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현에 미치는 영향을 확인하였음. 지방세포 분화 유도 시



PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현이 증가하였음. 하지만 농도별로 당노쌀을 처리한 세포에서는 감소 효과가 나타나지 않았음(그림 9)

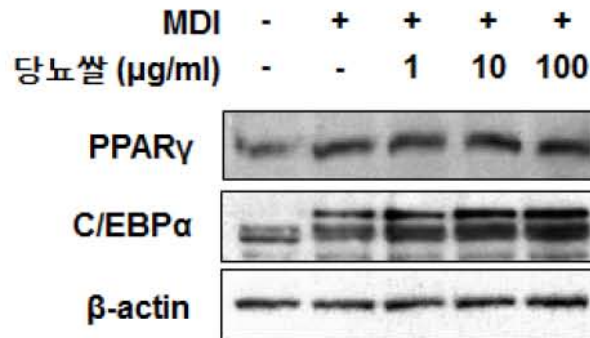


Figure 9. Effects of 당노쌀 on major adipogenic transcriptional factor expression in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with various doses (0, 1, 10, and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) of 당노쌀 extract. After 7 days, the protein expression levels of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  were measured by Western blotting using specific antibodies.  $\alpha$ -Actin was used as an internal control.

#### (6) 당노쌀의 adipogenic 유전자 발현 조절 효능

지방조직 특이 유전자로 밝혀진 fatty acid binding protein(aP2)는 PPAR- $\gamma$ 의 표적유전자로 지방조직에서 지방합성에 관여하는 adipogenic enzyme 중 하나로 잘 알려져 있음(12-14). 또한 adiponectine, fatty acid synthetase(FAS), perilipin, fatty acid binding protein 4(FABP4) 등의 단백질들이 지방세포 분화 시 발현되는 전사인자에 의해 발현이 증가되어 지방의 축적 및 대사에 관여함(15-17). 따라서 aP2, adiponectine, FAS, perilipin, 및 FABP4의 발현에 당노쌀이 미치는 영향을 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하였음. 지방분화 시 aP2, adiponectine, FAS, perilipin 및 FABP4 mRNA가 현저히 증가하였으나 당노쌀 추출물 처리 시 감소효과를 보이지 않았음(그림 10). 상기 결과를 종합해 볼 때 당노쌀의 비만 억제 효과는 크지 않은 것으로 판단됨

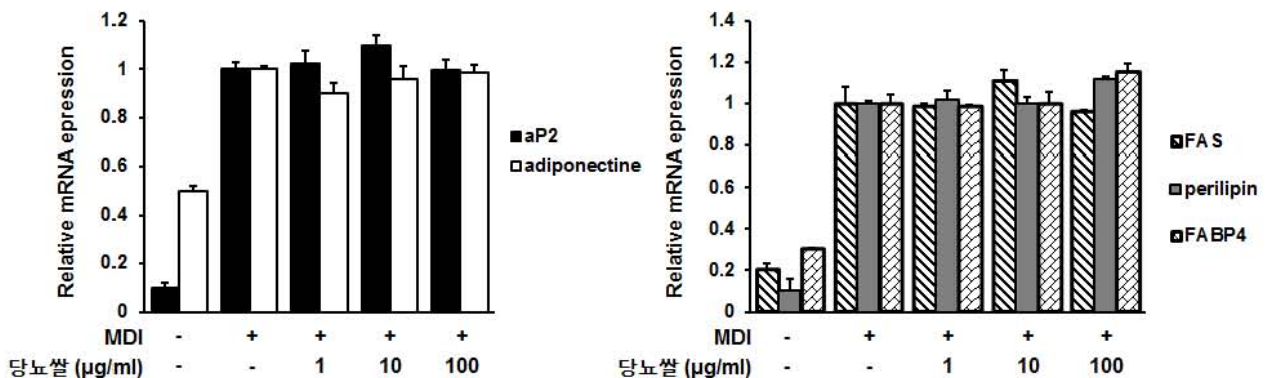


Figure 10. Effects of 당노쌀 on major adipogenic gene expression in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with various doses (0, 1, 10, and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) of 당노쌀 extract. After 7 days, the mRNA expression levels of HSL, ATGL and LPL were measured using qRT-PCR.

## 2. 최저 화합물의 동물실험을 이용한 함당노/함비만 효과 확인

## 가. 재료 및 실험방법

### (1) 동물실험 디자인 및 실험식이 조성

#### (가) 동물사육 실시

실험동물은 고지방식이 섭취 시, 비만 및 당뇨가 유도되는 동물모델인 C57BL/6J 마우스 (♂, 4주령, Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA)를 국내 (주)오리엔트사를 통해 수입하여 실험에 사용하였고 동물실험 디자인은 Figure 11과 같음. 1주간 pellet형태의 lab. chow 식이를 제공 하여 사육환경에 적응시킨 후 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 실험동물을 정상식이 (AIN-93 diet)를 급여한 normal diet (ND,  $n=10$ )군, 비만과 비만 합병증을 유도하기 위해 고지방식이 (60% fat)를 급여한 high-fat diet (HFD,  $n=20$ )군, 기능성 성형쌀군 (HFD+reconstituted brown rice, RBR,  $n=13$ ) 및 현미군 (HFD+brown rice, BR,  $n=13$ )으로 배분하여 각각의 실험식이를 12주간 급여하며 사육함. 동물 사육실의 환경은 항온 ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 항습 ( $50 \pm 5\%$ ) 그리고 6시부터 18시까지의 dark-light cycle로 일정한 조건을 유지하였고, 개개의 cage 안에서 사육하였으며, 실험식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였음 (ad libitum). 식이 섭취량은 매일 기록하고 체중은 1주일 간격으로 측정하였음.

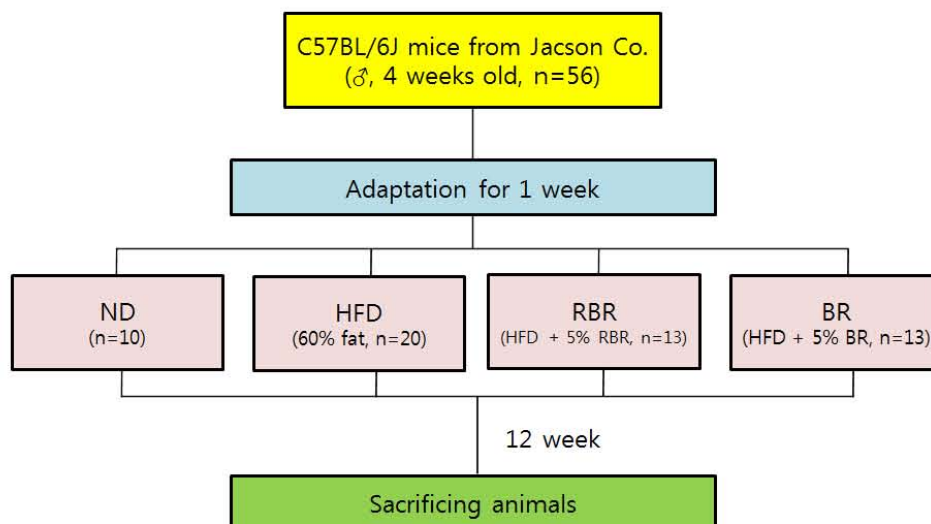


Figure 11. Experimental design for effects of reconstituted brown rice and brown rice in high-fat fed C57BL/6J mouse

(ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice)

ND군, HFD군, 기능성 성형쌀군 및 현미군의 실험식이의 조성은 Table 13과 같음. 유효실험 소재인 기능성 당뇨쌀 및 현미는 (주)강성바이오에서 제공받아 고지방식이에 각각 5%씩 첨가하여 마우스 식이를 급여하였음



Table 13. Composition of experimental diets.

Group Ingredient(g)	ND (n=10)	HFD (n=20)	RBR (n=13)	BR (n=13)
	Normal diet (AIN-93)	High-fat diet (60%fat)	HFD + 5% RBR	HFD + 5% BR
Casein	200	265	259.3	260.2
Corn starch	397.486	0	0	0
Sucrose	100	90	89.7	89.7
Maltodextrin	132	160	121.2	120.1
Cellulose	50	65.6	63.3	63.9
Soybean oil	70	30	29.9	29.9
Lard	0	310	307.6	307.3
Mineral mix(93)	35	48	47.9	47.8
Calcium phosphate, dibasic	0	3.4	3.4	3.4
Vitamin mix(93)	10	21	20.9	20.9
TBHQ, antioxidant	0.014	0	0	0
L-cystine	3	4	4.0	4.0
Choline bitartrate	2.5	3	3.0	3.0
<b>Reconstituted brown rice</b>	0	0	49.9	0
<b>Brown rice</b>	0	0	0	49.8
Total(g)	1,000	1,000	1,000	1,000
Total energy (kcal)	3,800	5,100	5,033	5,035

ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice.

#### (나) 시료수집

- ◆ 실험기간 동안 2주마다 12시간 절식 후, 마취 없이 꼬리 채혈하여 혈중 지질 농도 및 혈당을 측정하였음
- ◆ 사육 종료시점에 마우스들을 12시간 절식시킨 후 isoflurane (Baxter, USA) 흡입을 통해 1차 마취를 시켰고 복부 하대 정맥 (inferior vena cava) 으로부터 공복 혈액을 채취하였음. 채취된 혈액은 heparin으로 처리된 시험관에 바로 수집하여, 1,000×g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 혈장을 수집하였고 시료 분석 시까지 -70°C에 보관하였음
- ◆ 각 실험동물의 장기조직 (간, 신장 및 근육)은 PBS (phosphate buffered saline) 용액에 수차례 헹군 후 물기를 제거하여 칭량하였음. 부고환 백색지방 (epididymal white adipose tissue), 신주위 백색지방 (perirenal white adipose tissue), 견갑골간 백색지방과 갈색지방 (interscapular white and brown adipose tissue), 장간막 백색지방 (mesenteric white adipose tissue), 피하 백색지방 (subcutaneous white adipose tissue) 및 후복강 백색지방 (retroperitoneum white adipose tissue) 조직도 적출하여 PBS 용액에 헹군 후 물기를 제거하여 각각 칭량하였음. 간 조직은 각종 효소활성도 측정용으로 분리 수집하여 액체질소에 급냉시킨 후 시료 분석시까지 -70°C에서 보관하였음

## (2) 공복혈당 변화 및 glucose tolerance 측정

- 실험기간 12주 동안 2주 간격으로 12시간 절식 후 꼬리정맥을 통해 얻은 공복 혈액을 glucose analyzer (Glucocard test strip, Arkray, Japan)를 이용하여 공복 혈당을 측정하였음
- 12시간 절식 후 포도당 용액을 체중 kg당 0.5 g씩 복강 내로 투여한 후 각각 0, 30, 60 및 120분 경과 후에 꼬리정맥을 통해 혈액을 수집하여 glucose analyzer (Glucocard test strip, Arkray, Japan)로 혈당량을 측정하였음

## (3) 혈장 지질 분석

### (가) Total-cholesterol 정량

혈장 총 콜레스테롤 정량은 Allain 등 (1974)의 효소법을 응용한 측정용 시액 (아산제약 kit)을 사용하였음. 혈장 콜레스테롤은 cholesteryl ester (CE) 및 유리콜레스테롤 두 형태로 존재하므로, 이들 전체를 정량하기 위하여 CE를 cholesterol esterase에 의해 지방산과 유리 콜레스테롤로 전환시켰음. 이렇게 전환된 유리콜레스테롤은 cholesterol oxidase에 의해  $H_2O_2$ 와  $\Delta^4$ -cholestenon으로 전환시키고, 이 중  $H_2O_2$ 를 peroxidase 및 phenol, 4-amino-antipyrine과 혼합하여 적색으로 발색시킨 후, 500 nm에서 흡광도를 측정하여 콜레스테롤 표준용액 (300 mg/dL)과 비교하여 정량하였음

### (나) Triglyceride 정량

혈장 중성지질은 McGowan 등 (1983)의 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 중성지방 측정용 시액 (아산제약 kit)을 사용하여 측정하였음. 혈장 내 중성지질은 lipoprotein lipase (LPL)에 의해 글리세롤과 지방산으로 분해됨. 이 중 글리세롤은 ATP와 glycerol kinase (GK)의 작용으로 L- $\alpha$ -glycerophosphate를 형성하며, 이것은  $O_2$  및 glycerophosphooxidase (GPO)와 반응하여  $H_2O_2$ 를 발생시켰음. 여기에 peroxidase와 4-amino-antipyrin을 처리하여 적색으로 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 글리세롤 표준곡선과 비교하여 정량하였음

### (다) 유리지방산 정량

혈장 유리지방산은 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 유리지방산 측정용 시액 (Non-esterified fatty acid, NEFA kit, Wako, Osaka, Japan)을 사용하여 측정하였음. 우선 혈장 유리지방산에 acyl coenzyme A synthetase를 작용시켜 Acyl-CoA, AMP 및 pyrophosphoric acid를 생성시킨 후, 여기에 acyl coenzyme A oxidase를 첨가하여 2,3-Trans-enoyl-CoA 및 과산화수소를 생성시켰음. 이를 peroxidase와 4-아미노안티피린 및 N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulforopyl)-*m*-toruidine 으로 처리하여 적색으로 발색시킨 후 555 nm에서 흡광도를 측정하여 유리지방산 표준곡선과 비교하여 정량하였음

### (라) HDL-cholesterol 정량

혈장 HDL-cholesterol (HDL-C)은 HDL-C 측정용 시액 (아산제약 kit)을 사용하여 측정하였음. 혈장 100  $\mu$ L를 취하여 인텅스텐 나트륨 500  $\mu$ g과 염화마그네슘 1 mg을 처리하면 인텅스텐산과 마그네슘 양이온의 작용으로 지단백 중 apo B를 포함하는 LDL 및 VLDL이 침전됨

(Warnick, 1982). 이를 원심분리한 후 상층액에 남은 HDL 중의 총콜레스테롤과 같은 방법으로 발색반응시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하고, 콜레스테롤 표준용액 (50 mg/dL)과 비교하여 정량하였음

#### (마) Apolipoprotein 정량

혈장 apolipoprotein A-I (apo A-I) 및 apolipoprotein B (apo B) 농도는 apo A-I과 apo B 측정용 kit (日東紡績株式會社, Japan)를 사용하여 측정하였음. 혈장 3  $\mu$ L에 R-1 시약 300  $\mu$ L를 가하고 37°C에서 5분간 반응시키고 R-2 시약 100  $\mu$ L를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 항원항체 반응에 의해 생성된 응집물의 탁도를 apo A-I 은 800 nm에서 apo B는 600 nm (VERSAmax, Molecular devices Co, USA)에서 흡광도를 측정하고 apolipoprotein 표준용액과 비교하여 정량하였음

#### (바) nonHDL-cholesterol, HTR, LDL-cholesterol 및 AI (동맥경화지수) 계산

혈장 nonHDL-cholesterol 정량은 혈장 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤의 차이를 계산하였고, atherogenic index (AI, 동맥경화지수) 및 HTR은 다음 공식에 의해 계산되었음

$$\text{nonHDL-cholesterol} = (\text{Total-cholesterol}) - (\text{HDL-cholesterol})$$

$$\text{AI} = ([\text{Total-C}] - [\text{HDL-C}]) / [\text{HDL-C}]$$

$$\text{LDL} = ([\text{Total-cholesterol}] - [\text{HDL-cholesterol}]) - (\text{triglyceride}/5)$$

$$\text{HTR} = ([\text{HDL-C}]/[\text{Total-C}]) \times 100$$

### (4) 간 조직 효소원 분리

간 조직 0.5 g을 0.1 M triethanolamine, 0.02 M EDTA (ethylenediamine tetracetate, pH 7.4), 0.002 M DTT (dithiothreitol)가 포함된 완충용액으로 균질화 (Glascoll, 099CK44, USA)한 후, 1000 $\times$ g에서 15분간 원심 분리하여 상층액만 다시 10,000 $\times$ g에서 15분간 원심 분리하였음. 이 중 상층액과 분리된 하층 침전물 mitochondria 분획에 완충용액을 첨가하여 10,000 $\times$ g (4°C)에서 15분 동안 재원심 분리하였음. 상층액은 105,000 $\times$ g (4°C)에서 1시간 초원심 분리 (Beckman, Optima TLX-120, USA)하여 상층액의 세포질 분획을 얻음. 이때 SOD 활성도 분석용은 앞서 적혈구 효소원 분리 방법과 동일하게 지질을 침전시키기 위해 ethanol:chloroform (5:3)을 상층액 부피의 2/5가 되도록 첨가하여 10,000 $\times$ g (4°C)에서 10분 동안 원심 분리한 후 상층액을 취하여 얻었음. microsomal 분획은 상층액의 세포질 분획과 분리된 pellet에 동일 완충용액을 첨가하여 105,000 $\times$ g (4°C)에서 1시간 동안 다시 초원심 분리한 후 pellet을 1 mL 완충용액에 녹여 -70°C에 보관하였음

### (5) 지질대사 효소 활성도 측정

#### (가) $\beta$ -oxidation 활성도 측정

$\beta$ -oxidation 활성도 측정은 palmitoyl-CoA를 기질로 하여  $\text{NAD}^+$ 가 NADH로 환원되는 정도를 측정하였음. 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 940  $\mu$ L, 100 mM KCN 10  $\mu$ L, 0.33 M DTT 5  $\mu$ L, 1.5% BSA (1.5g/100 mL) 5  $\mu$ L, 2% Triton X-100 (2 g/100 mL) 10 $\mu$ L, 10 mM CoA 10  $\mu$ L, 1 mM FAD 10  $\mu$ L 및 20 mM  $\text{NAD}^+$  10  $\mu$ L 반응액에 mitochondria 분획 5  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 5분간 전반응 시킨 후 5 mM palmitoyl-CoA 5  $\mu$ L를 첨가하여 37°C, 340 nm에서 5분 동

안의 흡광도 변화를 측정하였음.  $\beta$ -oxidation 활성도 단위는 mitochondria protein 1 mg 당 1분간 생성된 NADH의 nmol로 나타내었음.

(나) Fatty acid synthase (FAS) 활성도 측정

625 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 200  $\mu$ L, 20 mM EDTA 50  $\mu$ L, 20 mM  $\beta$ -mercaptoethanol 50  $\mu$ L, 165  $\mu$ M acetyl-CoA 200  $\mu$ L, 500  $\mu$ M malonyl-CoA 200  $\mu$ L 및 500  $\mu$ M NADPH 200  $\mu$ L를 첨가하고 세포질 분획 (50~100  $\mu$ g) 100  $\mu$ L를 섞어 30°C에서 2분간 반응시킨 후 흡광도 감소량 측정하였음. FAS 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg당 1분간 산화된 NADPH의 nmol로 나타내었음

(다) Glucose-6-phosphase Dehydrogenase (G6PD) 활성도 측정

G6PD 활성도는 NADP<sup>+</sup>가 NADPH로 환원되는 정도를 측정하였음 (Pikaneen, 1997). 3.3 mM MgCl<sub>2</sub>를 함유하는 55 mM Tris-HCl (pH 7.8) 900  $\mu$ L에 6 mM NADP<sup>+</sup> 40  $\mu$ L, 0.1 M glucose-6-phosphate 40  $\mu$ L, 그리고 효소원 20  $\mu$ L (50~137  $\mu$ g의 단백질)를 순서대로 첨가한 후 340 nm (25 °C)에서 90초 동안 NADPH의 흡광도 변화를 측정하였음. G6PD 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg당 1분간 생성된 NADPH의 nmol로 나타내었음

(라) Malic enzyme (ME) 활성도 측정

ME (EC 1.1.1.40) 활성 측정은 Ochoa (1955)의 방법에 준하여 측정하였음. 즉, 0.4 M triethanolamine (pH 7.4), 30 mM malic acid, 0.12 M MgCl<sub>2</sub>, 3.4 mM NADP를 함유한 반응액 1 mL에 2 mL의 cytosol 분획을 가하여 반응을 개시하였음. 27°C에서 2분간 반응시킨 후 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하였고, 효소 활성은 1분간 생성된 NADPH의 양으로 나타내었음

(6) 당대사 효소 활성도 측정

(가) Glucokinase (GK) 활성도 측정

GK 활성도는 NAD<sup>+</sup>가 NADH로 환원되는 정도를 측정하였음. 83.33 mM Hepes-NaOH (pH 7.4) 600  $\mu$ L에 1M KCl 100  $\mu$ L, 2.5 mM DTE (dithioerythritol) 100  $\mu$ L, 75 mM MgCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ L, 10 mg/mL BSA 50  $\mu$ L, 50 mM NAD<sup>+</sup> 10  $\mu$ L, 1000 unit glucose-6-phosphate dehydrogenase 10  $\mu$ L, 1 M glucose 10  $\mu$ L를 첨가한 후 세포질 분획 10  $\mu$ L를 가하여 37°C, 10분간 전반응시킨 후 500 mM ATP 10  $\mu$ L를 첨가한 후 340 nm에서 10분간 흡광도 변화를 측정하였음. GK 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg당 1분간 생성된 NADH의 nmol로 나타내었음

(나) Glucose-6-phosphatase (G6Pase) 활성도 측정

G6Pase 활성도 측정은 Alegre 등 (1988)의 방법을 수정·적용함. 131.6 mM Hepes (pH 6.5) 765  $\mu$ L에 18 mM EDTA (pH 6.5) 100  $\mu$ L, 265 mM glucose-6-phosphate glucose dehydrogenase를 각각 0.6 IU/mL와 6 IU/mL 되도록 첨가하여 37°C에서 4분간 전반응 시켰음. 여기에 microsome 분획 (15  $\mu$ g) 5  $\mu$ L를 가하여 37°C에서 4분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였음. G6Pase 활성도 단위는 microsomal protein 1 mg당 1분간 생성된 NADPH의 nmol로 나타내었음 (nmol NADPH oxidized/min/mg protein)



## (7) 통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 컴퓨터 통계 프로그램 중 하나인 SPSS package program (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago)을 사용하여 산출되었음. 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였고 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해  $p < 0.05$  이상의 수준에서 사후검정을 실시하였으며, 또한 ND군과 HFD군간의 유의성 검정을 위해 Student's t-test를 실시하였음. 모든 결과는  $\text{mean} \pm \text{S.E.}$  (standard error)로 표시하였음

## 나. 실험결과

### (1) 식이성 비만동물에서 기능성 성형쌀 보충이 체중 및 식이효율에 미치는 영향

- Final body weight 및 body weight gain은 고지방식이를 급여한 대조군 (HFD)이 ND군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, 기능성 성형쌀 및 현미군은 HFD군에 비해 final body weight 및 body weight gain이 유의적으로 크게 감소하였음(그림8)
- 1일 평균 식이섭취량(g/day)은 모든 군간 비교에서 차이가 없었으나, 체중증가량의 유의적 차이로 인해 식이효율(FER, food efficiency ratio)은 HFD군이 ND군에 비해 유의적으로 높았고, 기능성 성형쌀 및 현미군의 FER이 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었음(그림12)

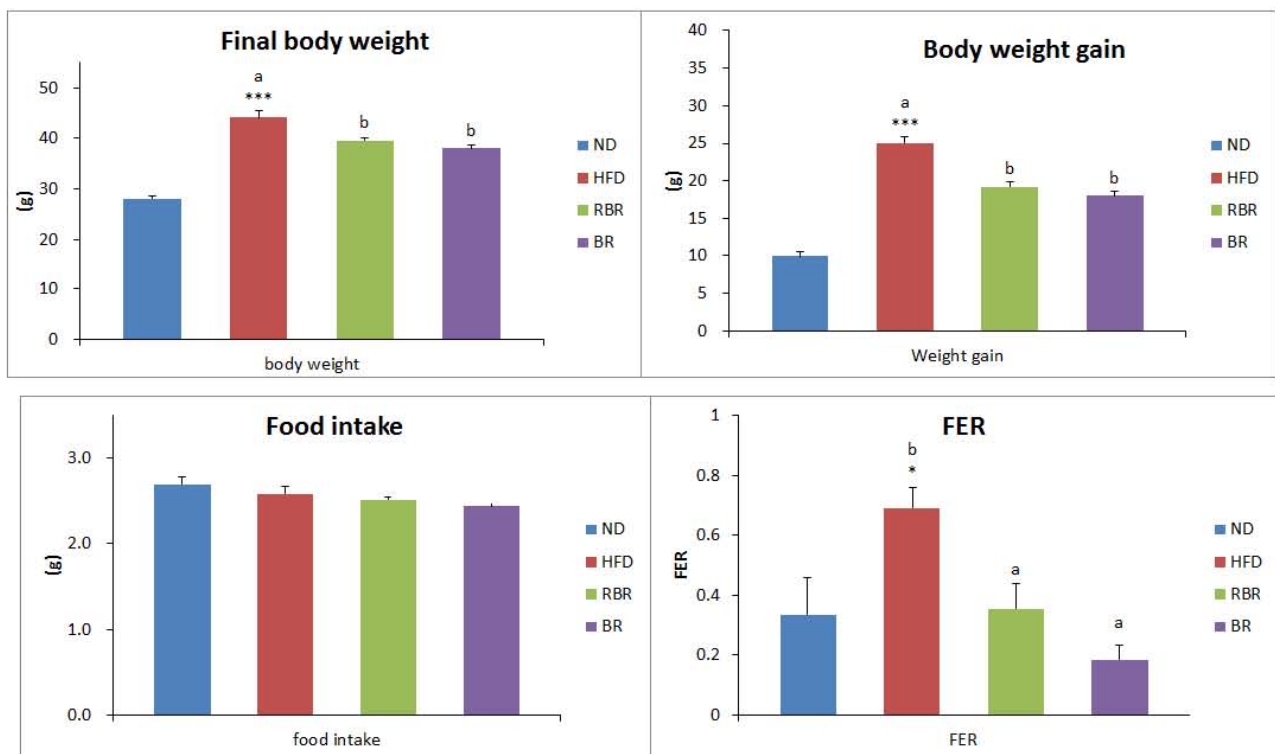


Figure 12. Effect of reconstituted brown rice and brown rice on changes of body weight and FER in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 12 weeks. Data are mean  $\pm$  SE. t-test between ND and HFD groups: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . ANOVA among HFD, RBR and BR groups: <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among groups at  $p < 0.05$ . ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice. FER, food efficiency ratio = body weight gain / food intake.

## (2) 식이성 비만동물에서 기능성 당뇨쌀 보충이 장기무게에 미치는 영향

- 단위체중당 간조직 무게는 ND군과 HFD군간에 차이가 없었으며, 또한 HFD, RBR 및 BR 군 간에서도 간 무게에 차이가 없었음(그림 9)
- 단위체중당 신장 무게는 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 감소하였으며, 현미군의 신장 무게는 HFD군에 비해 유의적으로 높았음(그림 9)
- 단위체중당 근육 무게는 ND군에 비해 고지방식을 먹은 HFD군이 유의적으로 감소하였으며, 기능성 성형쌀군과 현미군의 근육 무게는 HFD군에 비해 유의적으로 증가되었음 (그림 13)

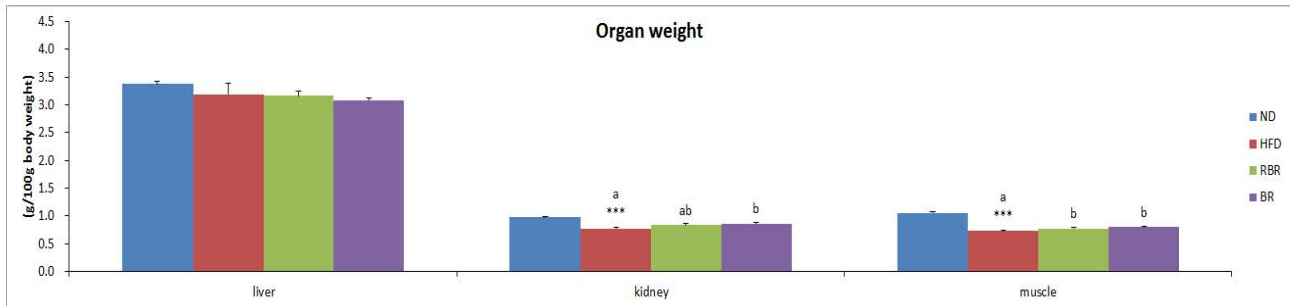


Figure 13. Effect of reconstituted brown rice and brown rice on changes of organ weight in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 12 weeks. Data are mean  $\pm$  SE. t-test between ND and HFD groups: \*\*\* $p < 0.001$ . ANOVA among HFD, RBR and BR groups: <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among groups at  $p < 0.05$ . ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice.

- 12주간의 실험물질 급여 후 지방무게를 비교한 결과, HFD군은 ND군에 비해 견갑골, 부고환, 신주위, 장간막, 복부, 피하 및 후복강 백색지방들의 무게가 모두 유의적으로 증가하였으며, 결과적으로 총 백색지방 무게 또한 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 높았고 견갑골 갈색지방조직 무게도 HFD군이 ND군에 비해 유의적으로 높았음(Table 14)

**Table 14.** Effect of reconstituted brown rice and brown rice on changes of organ weight in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 12 weeks.

	ND	HFD	RBR	BR
	Organ weights (g/100g body weight)			
Liver	3.38 $\pm$ 0.04	3.19 $\pm$ 0.20	3.16 $\pm$ 0.08	3.08 $\pm$ 0.05
Kidney	0.98 $\pm$ 0.02	0.78 $\pm$ 0.02 <sup>***a</sup>	0.84 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.86 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
Muscle	1.06 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.02 <sup>***a</sup>	0.77 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.80 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Interscapular WAT	1.51 $\pm$ 0.10	3.31 $\pm$ 0.15 <sup>***b</sup>	2.93 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	2.97 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
Interscapular BAT	0.36 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.03 <sup>***b</sup>	0.40 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
Epididymal WAT	3.37 $\pm$ 0.17	6.43 $\pm$ 0.29 <sup>***b</sup>	5.70 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	5.51 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
Perirenal WAT	0.41 $\pm$ 0.04	1.10 $\pm$ 0.07 <sup>***b</sup>	0.83 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Mesenteric WAT	0.78 $\pm$ 0.09	1.99 $\pm$ 0.23 <sup>***b</sup>	1.21 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.03 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Retroperitoneum WAT	0.95 $\pm$ 0.06	1.55 $\pm$ 0.11 <sup>***b</sup>	1.50 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>
Subcutaneous WAT	1.33 $\pm$ 0.10	3.57 $\pm$ 0.24 <sup>***b</sup>	2.59 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.32 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
Visceral WAT	5.51 $\pm$ 0.33	10.27 $\pm$ 0.77 <sup>***b</sup>	7.70 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	8.39 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>
Total WAT	8.35 $\pm$ 0.46	17.15 $\pm$ 0.95 <sup>***b</sup>	13.22 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	13.68 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>

Data are mean  $\pm$  SE. t-test between ND and HFD groups: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

ANOVA among HFD, RBR and BR groups: <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among groups at  $p < 0.05$ .

ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice. WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue. Visceral WAT = Epididymal WAT + Perirenal WAT + Mesenteric WAT + Retroperitoneum WAT; Total WAT = Interscapular WAT + Visceral fat + Subcutaneous fat.

- ◆ HFD군과 기능성 성형쌀 및 현미 군 간의 지방무게를 비교한 결과, 견갑골, 부고환, 신주위, 장간막, 복부, 피하 및 총 백색지방들의 무게가 기능성 당뇨쌀 및 현미군에서 HFD군에 비해 유의적으로 낮았음. 후복강 백색지방조직 무게는 기능성 당뇨쌀군에서 HFD군에 비해 유의적 감소를 보였음. 따라서 기능성 성형쌀군과 현미군 모두 탁월한 체지방량 저하 효능을 보였음(Table 14)

### (3) 식이성 비만동물에서 기능성 당뇨쌀 보충이 혈당 농도 변화에 미치는 영향

- ◆ 최종 실험식이 급여기간인 12주차의 공복혈당은 HFD군이 ND군에 비해 유의적으로 높았으며, HFD에 기능성 성형쌀 및 현미가 보충된 군들에서는 HFD군에 비해 12주차 공복혈당이 유의적으로 감소되었음(그림 14)
- ◆ 실험식이 급여기간동안 6주차 및 10주차에는 기능성 성형쌀군이 HFD군보다 혈당이 높았지만, 대체로 HFD군의 혈당이 다른 군들에 비해 높은 추세를 보였으며, 기능성 성형쌀 및 현미군은 ND군에 비해 혈당이 높았지만 HFD군에 비해서는 대체로 낮은 혈당 농도를 보였음(그림 14). 한편, 실험종료 시점인 12주차를 제외하고 나머지 사육기간 동안에는 식이군 간 혈당농도의 유의적 차이는 없었음

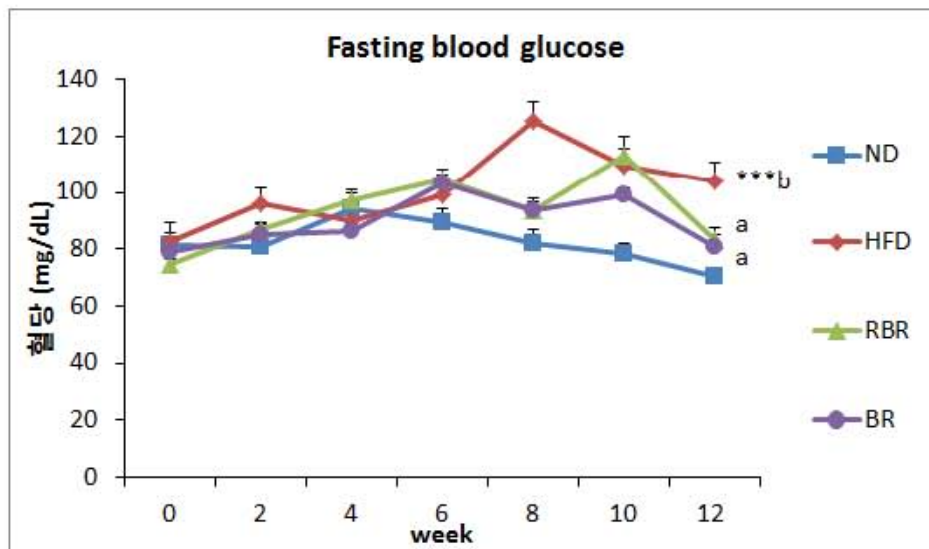


Figure 15. Effect of reconstituted brown rice and brown rice on changes of blood glucose concentration in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 12 weeks. Data are Mean  $\pm$  SE. t-test between ND and HFD groups: \*\*\*\* $p$  < 0.001. ANOVA among HFD, RBR and BR groups: <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among groups at  $p$  < 0.05. ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice.

### (4) 식이성 비만동물에서 기능성 당뇨쌀 보충이 glucose tolerance에 미치는 영향

- ◆ 식후혈당량 변화를 측정하고자 실험식이 급여 11주차에 당부하검사 (glucose tolerance test)를 실시하였으며 혈당 측정 zero time의 혈당 농도를 100으로 기준하여 각 시간대의 혈당량을 나타내었음(그림 15)
- ◆ 모든 식이군의 혈당은 당부하 30분 후에 최고치를 나타낸 후 60분과 120분 후에 점차 감소되었으며, 정상식이 급여군(ND)은 고지방식이 대조군(HFD)에 비해 높은 식후 혈당 저하능 패턴을 보였으나 유의적 차이는 없었음
- ◆ 한편, HFD, 기능성 성형쌀 및 현미군들 간에서는 식후 혈당 저하능의 차이가 관찰되지 않았음



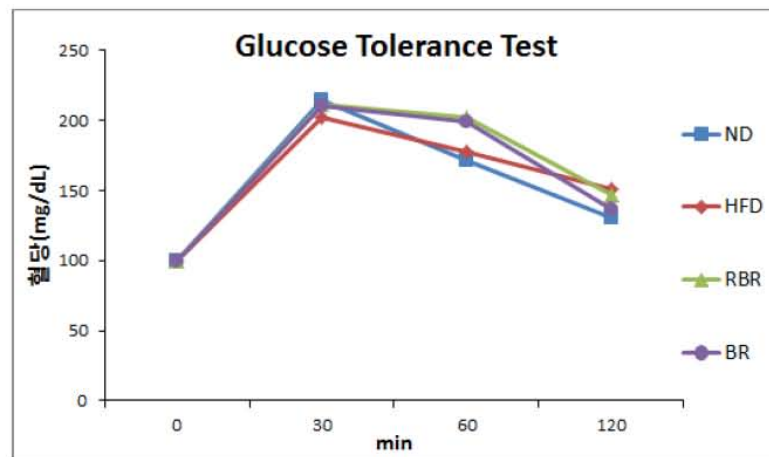


Figure 15. Effect of reconstituted brown rice and brown rice on glucose tolerance in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 12 weeks. Data are mean  $\pm$  SE. t-test between ND and HFD groups. ANOVA among HFD, RBR and BR groups: Means not sharing a common letter are significantly different among groups at  $p < 0.05$ .

ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice.

#### (5) 식이성 비만동물에서 기능성 당노쌀 보충이 혈장 지질수준에 미치는 영향

- 실험식이 급여기간 동안의 혈장 총콜레스테롤 농도 변화를 살펴보면, ND군은 거의 일정 수준을 유지하는데 반해, HFD, 기능성 성형쌀 및 현미군들은 식이급여기간이 지속될수록 대체로 증가되는 추세를 보였음(그림 16). 식이급여 12주차의 총콜레스테롤 농도는 HFD군이 ND군에 비해 유의적으로 높았으며, 기능성 당노쌀 및 현미군은 HFD군에 비해 총콜레스테롤 농도가 유의적으로 감소되는 것으로 제시되었음

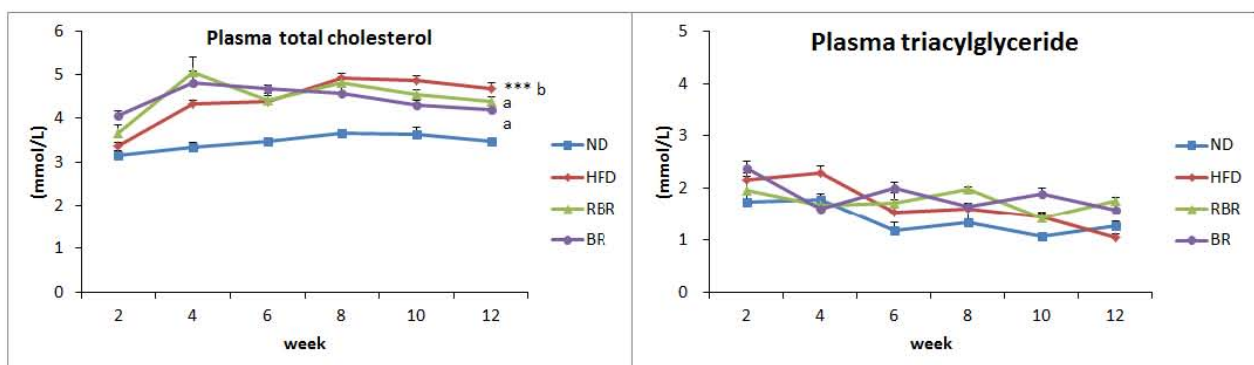


Figure 16. Effect of reconstituted brown rice and brown rice on plasma total cholesterol and triglyceride concentrations in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 12 weeks. Data are mean  $\pm$  SE.

t-test between ND and HFD groups:  $***p < 0.001$ . ANOVA among HFD, RBR and BR groups: <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among groups at  $p < 0.05$ . ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice.



- ◆ 실험식이 급여기간 동안의 혈장 중성지방 농도 변화는 식이급여가 지속될수록 혈장 중성지방 농도가 모든 군들에서 낮아지는 추세를 보였음(그림16). 혈장 중성지방 농도는 군간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았으나 실험식이 급여기간동안 HFD군에서 ND군에 비해 높았으며, 식이급여가 지속될수록 기능성 성형쌀 및 현미군과 HFD군간에는 큰 차이가 나타나지 않았음
- ◆ 12주간 동물사육 종료 후 실험동물의 복부하대정맥에서 채취한 혈장의 지질농도 비교분석 결과는 Table 15과 같음
- ◆ 복부정맥을 통해 채취한 혈장 총콜레스테롤 농도 비교결과는 앞서 언급한 꼬리채혈을 통한 혈장 농도비교 결과와 유사하게 HFD군이 ND군에 비해 유의적으로 높았고 기능성 성형쌀(RBR) 및 현미(BR)군은 HFD군에 비해 유의적으로 감소되는 효과를 보였음. 반면, 혈장 중성지방 및 유리지방산 농도는 실험군들간 차이가 없었음
- ◆ HFD군에서는 혈장 총콜레스테롤 뿐 아니라 LDL-C, nonHDL-C/HDL-C, 동맥경화지수인 AI (atherogenic index) 및 Apo B 수준이 ND군에 비해 모두 유의적으로 높았으며, HFD에 시험 유효소재가 보충된 RBR 및 BR군에서는 모든 혈장지질수준이 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었음

**Table 15.** Effect of reconstituted brown rice and brown rice on changes of plasma lipid profile in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 12 weeks

	ND	HFD	RBR	BR
	Organ weights (g/100g body weight)			
TG (mmol/L)	1.27±0.09	1.03±0.08	1.75±0.08	1.58±0.11
FFA (mmol/L)	0.68±0.04	0.50±0.03	0.97±0.05	1.06±0.03
Total-C (mmol/L)	3.48±0.05	4.69±0.11 <sup>***b</sup>	4.38±0.12 <sup>a</sup>	4.20±0.08 <sup>a</sup>
LDL-C (mmol/L)	1.83±0.08	2.69±0.10 <sup>***b</sup>	1.98±0.06 <sup>a</sup>	1.87±0.05 <sup>a</sup>
HDL-C (mmol/L)	1.65±0.09	2.00±0.05 <sup>**a</sup>	2.30±0.08 <sup>b</sup>	2.41±0.05 <sup>b</sup>
nonHDL-C/HDL-C	1.05±0.08	1.35±0.05 <sup>**c</sup>	0.87±0.02 <sup>b</sup>	0.78±0.03 <sup>a</sup>
HTR	49.28±1.79	42.73±0.99 <sup>**a</sup>	53.44±0.46 <sup>b</sup>	56.31±0.80 <sup>c</sup>
AI	1.05±0.08	1.35±0.05 <sup>**c</sup>	0.87±0.02 <sup>b</sup>	0.78±0.03 <sup>a</sup>
ApoA-I (mg/dL)	29.91±0.38	30.75±0.47 <sup>*a</sup>	31.16±0.16 <sup>b</sup>	34.58±0.20 <sup>b</sup>
ApoB (mg/dL)	8.45±0.56	9.81±0.97 <sup>*b</sup>	5.35±0.41 <sup>a</sup>	4.70±0.72 <sup>a</sup>
ApoB/ApoA-I	0.29±0.02	0.32±0.03	0.18±0.01	0.14±0.01

Data are mean ± SE. t-test between ND and HFD groups: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . ANOVA among HFD, RBR and BR groups: <sup>abc</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among groups at  $p < 0.05$ . ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice.

Total-C, Total cholesterol; TG, triglyceride; ApoA-I, apolipoprotein A-I; ApoB, apolipoprotein B; HTR, [(HDL-C)/Total-C]×100; nonHDL-C=(Total-C)-(HDL-C); AI, Atherogenic index, [(Total-C)-(HDL-C)]/HDL-C.

- ◆ 혈장 HDL-콜레스테롤 및 apo A-I 농도는 HFD군이 ND군에 비해 유의적으로 증가되었고, 성형쌀(RBR) 및 현미(BR)군은 HFD군에 비해 HDL-콜레스테롤, 총콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤 비율(HTR) 및 apo A-I 수준이 유의적으로 증가되어 되었음. 이러한 성형쌀(RBR) 및 현미(BR)군의 기능으로 동맥경화위험인자(AI, atherogenic index)마커도 감소시키는 것으로 결과를 유도하였음

#### (6) 식이성 비만동물에서 기능성 당노쌀 보충이 지질대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향

- ◆ 간조직에서 측정된 지질대사 관련 효소활성도 비교 결과는 Table 16에 제시되었음
- ◆ 간조직  $\beta$ -oxidation 활성도는 ND군과 HFD군간 차이가 없었으나, 성형쌀(RBR) 및 현미(BR)군에서는 HFD군에 비해  $\beta$ -oxidation 활성도가 유의적으로 높아져 지방산 산화가 증가된 것으로 제시되었음
- ◆ 한편, 간조직 지방산 합성에 관여하는 FAS(fatty acid synthase) 활성도는 모든 실험군들간 차이는 없었고, G6PD(glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 ME(malic enzyme) 활성도는 HFD군이 ND군에 비해 유의적으로 감소되었으나, 고지방식이군들(HFD, RBR 및 BR)간 차이는 관찰되지 않았음

**Table 16.** Effect of reconstituted brown rice and brown rice on hepatic lipid-regulating enzymes activities in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 12 weeks .

	ND	HFD	RBR	BR
$\beta$ -oxidation (nmol/min/mg protein)	63.39±9.14	63.55±4.70 <sup>a</sup>	92.91±6.44 <sup>b</sup>	97.46±4.82 <sup>b</sup>
Fatty acid synthase (nmol/min/mg protein)	8.14±1.75	6.71±1.62	7.01±0.29	6.93±0.33
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (nmol/min/mg protein)	10.07±1.32	8.64±1.17 <sup>*</sup>	11.29±1.65	9.83±0.56
Malic enzyme (nmol/min/mg protein)	41.03±2.44	25.47±2.85 <sup>*</sup>	22.37±1.42	21.79±1.37

Data are mean ± SE. t-test between ND and HFD groups: <sup>\*</sup>*p* < 0.05.

ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice.

#### (7) 식이성 비만동물에서 기능성 당노쌀 보충이 당대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향

- ◆ 간조직에서 측정된 당대사 관련 효소활성도 비교 결과는 Figure 17에 제시되었음
- ◆ 간조직 당신생에 관여하는 효소인 G6Pase 활성도는 모든 실험군들간 차이가 없었음
- ◆ 혈장의 glucose uptake와 glucose 인산화에 관여하는 효소인 GK(glucokinase) 활성도는 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 증가되었으며, 기능성 성형쌀군과 현미군은 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었음

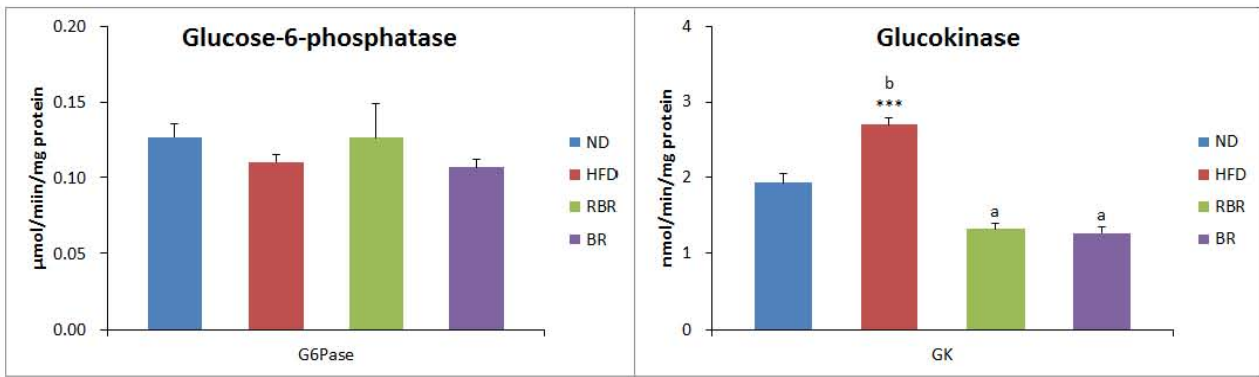


Figure 17. Effect of reconstituted brown rice and brown rice on hepatic glucose-regulating enzymes activities in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 12 weeks. Data are mean  $\pm$  SE. t-test between ND and HFD groups: \*\*\* $p < 0.001$ . ANOVA among HFD, RBR and BR groups: <sup>ab</sup>Means not sharing a common letter are significantly different among groups at  $p < 0.05$ . ND, normal diet (AIN-93); HFD, high-fat diet (60% fat); RBR, HFD + 5% reconstituted brown rice; BR, HFD + 5% brown rice.

### 3. 고령지 작물 및 천년초 성분 함유 기능성 쌀의 항염증 효과 검색

#### 가. 재료 및 실험방법

##### (1) 재세포 배양

RAW 264.7세포를 10% FBS 및 penicillin (100  $\mu$ g/ml), streptomycin (100 U/ml)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>조건을 유지하여 배양하였음

##### (2) RAW 264.7 대식세포에 대한 세포독성 평가

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1 x 10<sup>5</sup> cells/ml로 분주하여 24시간 배양한 후 여러 농도의 시료 용액을 배지에 희석하여 첨가하였음. 24시간 후 MTT 시약 (5 mg/ml)을 50  $\mu$ l씩 처리한 후 4시간 동안 차광된 곳에서 배양하였음. Well 당 DMSO 200  $\mu$ l를 처리하여 불용성 MTT formazan을 녹인 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였음

##### (3) Nitrite 양의 측정

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 2 x 10<sup>5</sup> cells/ml로 분주하여 24시간 배양한 후 여러 농도의 시료 용액을 배지에 희석하여 첨가하였음. 24 시간 후 세포 배양액을 수집하여 Griess reaction을 이용하여 RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양을 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였음. 세포 배양액 100  $\mu$ l와 Griess reagent[1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid 와 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl]를 100  $\mu$ l씩 혼합 하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm 에서 흡광도를 측정하였음

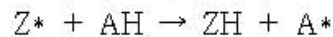


#### (4) PGE<sub>2</sub> 양의 측정

RAW 264.7 세포를 24 well plate에  $2 \times 10^6$  cells/ml로 분주하여 24시간 배양한 후 여러 농도의 시료 용액을 배지에 희석하여 첨가하였음. 24 시간 후 세포 배양액을 수집하여 assay design kit의 지시에 따라 PGE<sub>2</sub> 양을 정량하였음

#### (5) DPPH radical scavenging activity 측정

진한 보라색을 띠는 Diphenylpicrylhydrazyl이 항산화제에 의해 Diphenylpicrylhydrazine으로 환원되면서 구조적인 변화로 인해 색깔이 사라지는 것을 517nm의 파장에서 분광흡광계를 이용하여 관찰하였음. 즉, DPPH를 Z\*라 하고 항산화제를 AH라 했을 때,



의 반응을 통해 물질의 항산화 능력을 측정할 수 있음. 매탄올에 녹인 150 μM의 DPPH용액을 현미쌀과 당뇨쌀 추출물 450 μl와 30분간 실온에서 반응시키고 분광흡광계로 517 nm의 파장에서의 흡광도를 측정하였음

#### (6) 통계학적 분석

실험치의 값은 mean ± S.D. 로 나타냈으며 분석은 Student's *t*-test로 유의성을 나타내었다.

### 나. 실험결과

#### (1) 대식세포에서 세포독성 평가

RAW 264.7 대식세포에서 당뇨쌀과 현미쌀의 세포독성을 평가하기 위해 여러 농도의 당뇨쌀과 현미쌀 추출물을 처리 한 후 MTT assay를 수행하였음. 당뇨쌀과 현미쌀은 250 μg/ml에서 현저한 세포 독성을 보였음(그림 18). 이 결과를 바탕으로 독성이 없는 농도를 설정하여 추후 항염증 효과 검색을 수행하였음

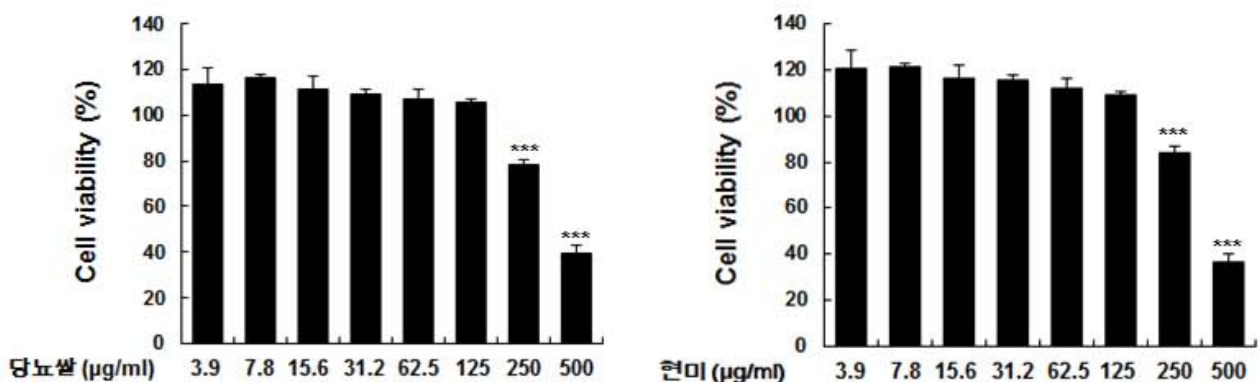


Figure 18. Effects of 당뇨쌀 and 현미쌀 on cell viability in RAW 264.7 macrophages. Cell viability of RAW 264.7 cells after incubation in the presence of various concentrations of 당뇨쌀 and 현미 for 24 h. Cell viability was measured using an MTT assay. Data represent the mean ± SD of three independent experiments.

### (2) 당노쌀과 현미쌀 추출물의 NO 생성 억제 효과

RAW 264.7 대식세포는 LPS 처리 시 다양한 염증 매개 물질들의 생성을 유도하여 염증 반응을 일으킴. NO는 대표적인 염증 매개 물질로서 산화적 스트레스를 유도하여 조직 손상, 유전자 변이 및 신경 손상을 일으키는 것으로 알려져 있음(18). 당노쌀과 현미쌀 추출물을 각각 15, 30, 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 전처리 한 후 염증유도 물질로서 LPS를 처리하였음. 양성대조군으로는 L-arginine과의 기질 경쟁에 의해 iNOS 저해제로 알려진 L-NIL을 사용하였음. LPS에 의해 세포 상등액 내 NO의 생성이 현저히 증가하였으며, 당노쌀과 현미쌀 추출물을 처리한 경우 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 25 %의 NO 감소효과를 보였음(그림 19)

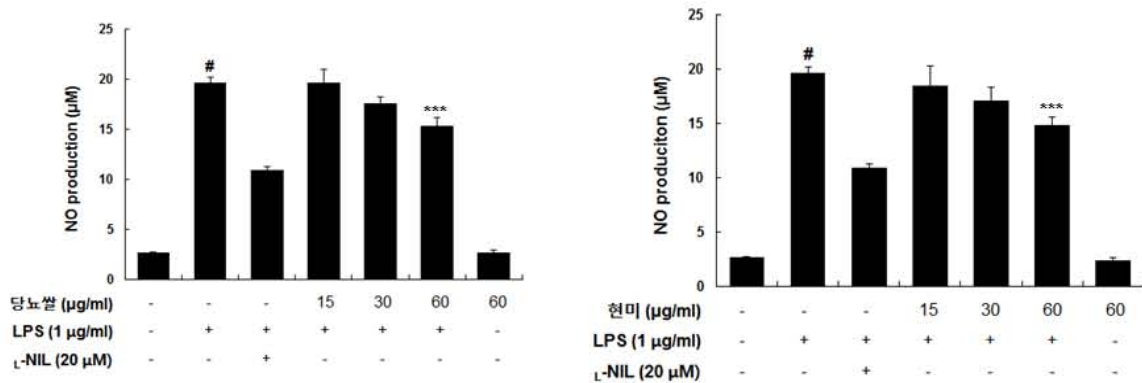


Figure 19. Effects of 당노쌀 and 현미 on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with or without the indicated concentration of 당노쌀 and 현미 for 1h and then incubated with LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24h. NO levels in culture media were determined using Griess reaction. L-NIL ( $20 \mu\text{M}$ ) was used as assay positive control for NO production. Values represent the means  $\pm$  SDs of three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. the control group;

### (3) 당노쌀과 현미쌀 추출물의 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과

다수의 항염증 약물들의 작용기전은 prostaglandin 합성을 억제하여 통증을 경감시키며, 이는 COX-2의 생성 및 효소 활성 저해에 의한 것으로 알려져 있음(19). 당노쌀과 현미쌀의 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과를 평가하기 위해 RAW 264.7 대식세포에 당노쌀과 현미쌀 추출물을 각각 15, 30, 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 전처리 한 후 염증유도 물질로서 LPS를 처리하였음. LPS에 의해 PGE<sub>2</sub>의 생성이 현저하게 증가하였으나 당노쌀과 현미쌀 추출물은 유의적인 감소효과를 보이지 않았음(그림 20)

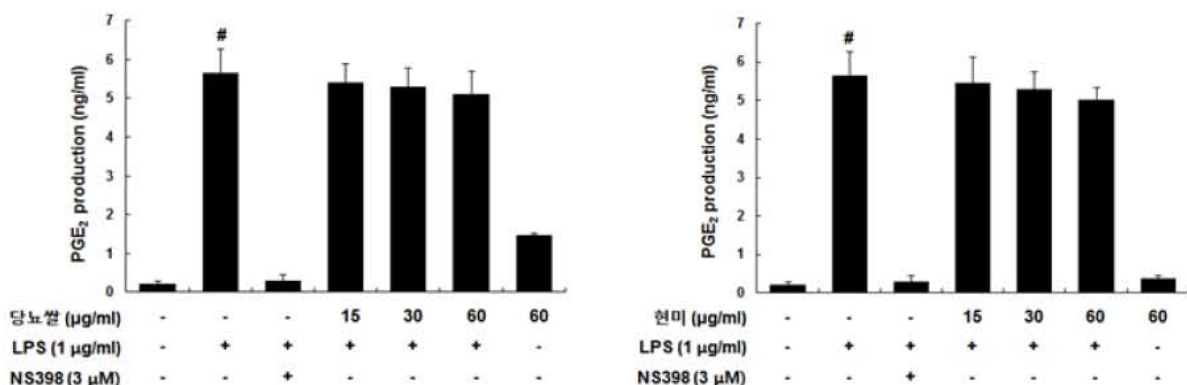


Figure 20. Effects of 당노쌀 and 현미 on LPS-induced PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with or without the indicated concentration of 당노쌀 and 현미 for 1h and then incubated with LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24h. PGE<sub>2</sub> levels in culture media were determined using EIA kits. NS298 ( $3 \mu\text{M}$ ) was used as assay positive control for PGE<sub>2</sub> production. Values represent the means  $\pm$  SDs of three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. the control group;



#### (4) 당노찰과 현미찰 추출물의 iNOS mRNA 발현 조절 효과

염증 상황에서 염증 매개 인자인 NO의 생성은 iNOS 단백질에 의해 조절됨(20). 따라서 당노찰과 현미찰 추출물의 NO 생성 억제 효과가 iNOS의 발현과 관련성이 있는지 확인하기 위해 iNOS mRNA 발현을 확인하였음. LPS에 의해 뚜렷하게 유도된 iNOS의 mRNA 발현이 당노찰과 현미찰 추출물을 처리하였을 때 고농도 군에서 유의적으로 억제하는 것을 확인하였음(그림 21)

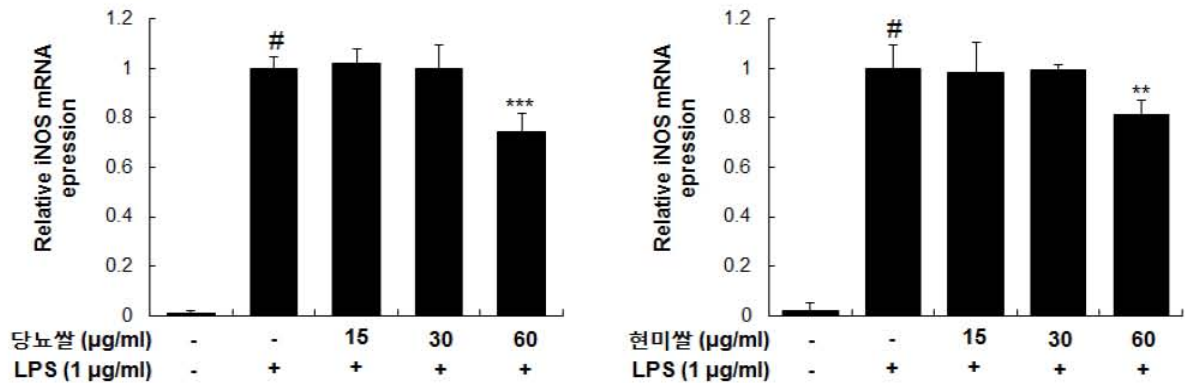


Figure 21. Effects of 당노찰 and 현미 on LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with or without the indicated concentration of 당노찰 and 현미 for 1h and then incubated with LPS (1 µg/ml) for 4h. iNOS mRNA expression was determined using qRT-PCR. Values represent the means  $\pm$  SDs of three independent experiments. #p < 0.05 vs. the control group; \*\*\*p < 0.001 vs. LPS-stimulated group.

#### (5) 당노찰과 현미찰 추출물이 NF- $\kappa$ B와 AP-1 전사인자 활성화에 미치는 영향

NF- $\kappa$ B와 AP-1은 세포 분화, 염증 반응, 세포 부착 등에 관련된 여러 유전자들의 발현에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자임. 활성화된 NF- $\kappa$ B와 AP-1은 핵 내에서 표적 유전자의 promoter regions에 결합하여 iNOS 등의 여러 염증 매개 물질의 전사를 촉진함(21,22). 따라서 당노찰과 현미찰의 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 활성화를 억제하는지 알아보기 위해 luciferase assay를 수행하였음. RAW 264.7 대식세포에 일시적으로 pNF- $\kappa$ B-Luc와 pAP-1-Luc plasmid를 transfection 시킨 후 당노찰과 현미찰 추출물을 처리하였음. 당노찰과 현미찰 추출물은 LPS에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B와 AP-1 의존적인 luciferase 효소의 발현에 대해 영향을 미치지 않았음(그림 22). 따라서 당노찰과 현미찰 추출물은 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 전사활성을 감소시키지 못함을 확인하였음

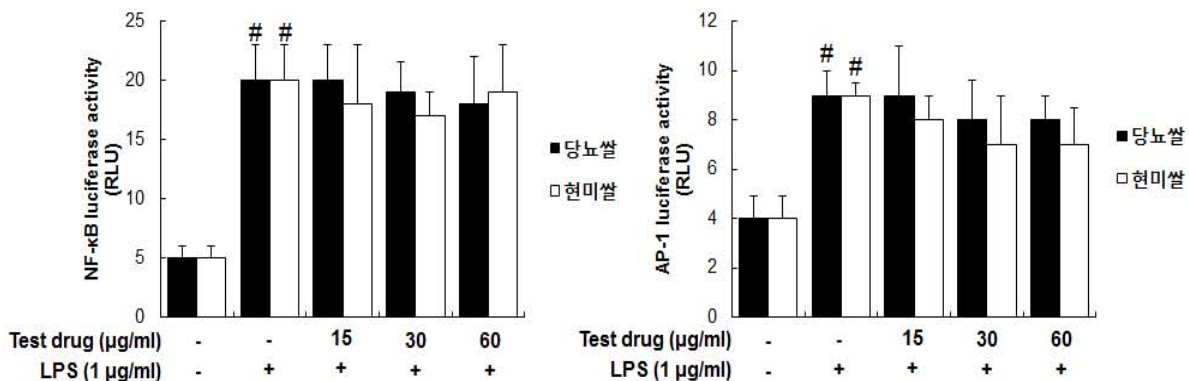


Figure 22. Effects of 당노찰 and 현미 on LPS-induced NF- $\kappa$ B and AP-1 transcriptional activities in RAW 264.7 cells. Cells were transiently co-transfected with pNF- $\kappa$ B-Luc or pAP-1-Luc plasmid with pRL-TK plasmid using lipofectamine. Cells were pretreated with 당노찰 or 현미찰 extract for 1h and then stimulated with LPS (1 µg/ml) for 18 h. Luciferase activity levels were determined using Promega luciferase assay system. Values represent the means  $\pm$  SDs of three independent experiments. #p < 0.05 vs. the control group

### (6) 당노쌀과 현미쌀 추출물의 항산화 효과

당노쌀과 현미쌀 추출물의 직접적인 라디칼 제거 능력을 보기 위해 DPPH assay를 수행하였다. 이 결과 토코페롤은 높은 라디칼 제거 능력을 보였으나, 당노쌀과 현미쌀 추출물은 60  $\mu\text{g/ml}$ 에서도 큰 영향을 미치지 못했음(그림 23). 본 실험을 통해 당노쌀과 현미쌀 추출물은 라디칼을 직접적으로 제거하지는 못하는 것으로 관찰되었음

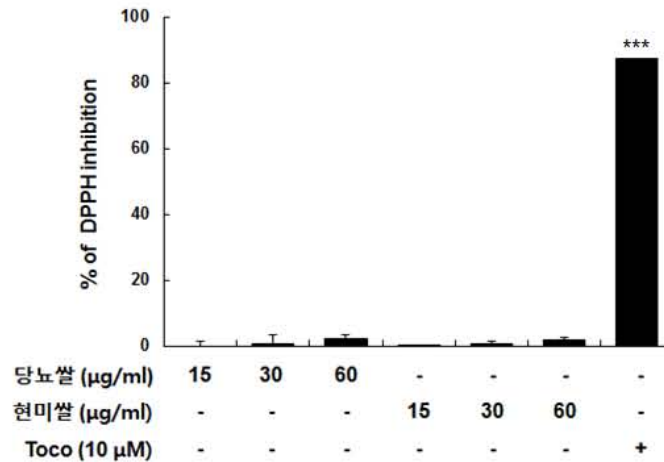


Figure 23. Radical scavenging activity of 당노쌀 and 현미쌀 extract. Scavenging of the DPPH radical: The reduction capability of DPPH radical was determined by the decrease in its absorbance at 517 nm induced by antioxidants. Due to rapid hydrogen donating ability of DPPH, it reacts with antioxidants and gets converted into 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazine and hence shows decrease in absorbance.  $\alpha$ -Tocopherol (10  $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control. Values represent the means  $\pm$  SDs of three independent experiments. \*\*\* $p < 0.05$  vs. the control group.

### 제 3 절 국화과 식물 및 천연초 추출물·유효성분을 함유한 제형쌀의 항비만 및 항당뇨 임상시험 연구 : 위탁 2과제

#### 가. 연구 수행 방법

##### (1) 인체시험실시를 위한 인체시험심의위원회 (IRB) 신청 및 승인획득

(가) 인체시험 시료 조성 및 지표물질 함량 분석 정리 및 요약

(나) 인체시험실시계획서 작성 (연구관련 개요, Study design, 유효성 평가 항목 및 방법, 통계 분석 원칙 및 방법, 실행역할분담, 연구추진일정, 피험자 설명문 및 동의서, 피험자 보상에 관한 규약 등을 포함) 및 관련 자료 제출

(다) 경북대학교 생명윤리위원회 IRB 심의위원 구성

(라) 인체시험 실시계획에 대한 승인 (KNU 2015-50)

##### (2) 인체시험 수행 내용 및 방법

(가) 인체시험 적용시료를 총괄연구기관으로부터 제공받음.

- 문헌 조사 및 동물을 이용한 당뇨 예방 및 개선 효능검정 결과를 참조하여 적정섭취량을 결정하여 본 인체시험에 적용

(나) 인체시험 대상자 모집 및 인체시험 실시

###### ① 인체시험 대상자 모집

본 연구는 2015년 3월부터 2015년 5월까지 3개월 동안 공고문을 통하여 일반 시민들의 자발적인 지원을 받았음. 시험의 임상 피험자 선정기준은 다음과 같음.

###### ② 선택 기준

- 심각한 질병이 없는 42세 이상 66세 미만의 남녀
- 건강인 및 반 건강인(준 건강인)에 속하며 의학적부적격 사유가 없는 대상자  
: 체질량지수 (BMI)  $\geq 23$  & 공복혈당  $\geq 100\text{mg/dL}$
- 자의로 참여결정 및 주의사항 준수를 서면으로 동의한 자

###### ▷ 제외 기준 :

- 이노제를 복용하고 있는 고혈압 환자
- 공복 혈당이 150 mg/dl 이상이거나 경구혈당강하제 또는 인슐린을 사용하고 있는 당뇨병 환자



- 심장, 신장, 간, 갑상선, 뇌혈관 질환이 있는 경우
- 당뇨병, 위장관계 질환, 통풍, 포르피리아가 있는 경우
- 우울증, 정신분열증, 알콜 중독증, 약물중독 등의 정신질환자
- 혈당조절용 및 타 건강기능식품을 복용하고 있는 경우
- 최근 5년 이내에 암의 진단 및 치료를 받은 적이 있는 경우
- 천식 및 기타 알레르기 질환이 있는 경우
- 최근 6개월 이내 수술 병력이 있는 경우
- 저녁 회식이 잦아 음주를 자주해야 하는 경우
- 직장 및 개인 일정이 다양하여 기능성 식품 섭취일정을 따르기가 어려운 경우

### ③ 참여대상자 준수사항

- 참여기간 동안 주어진 시험 물질을 매일 2회 섭취해야 함
- 참여 전·후에 실시하는 신체계측과 채혈·채뇨에 응하여야 함
- 참여 전·후 각각 1회의 설문조사에 응하여야 함
- 연구 기간 동안 진행되는 모니터링에 성실히 답변하여야 함

### (다) 인체시험 디자인 및 모니터링

○ 본 연구는 기능성 강화 성형쌀의 체지방 및 혈당 조절 효능 검정을 위한 인체시험으로, 42-66세 사이의 과체중 또는 비만이면서 공복혈당이 100 mg/dL 이상의 반건강인 성인 남녀를 대상으로 8주간 이중맹검, 무작위 배정, 위약대조로 진행되었음. 대상자는 총 37명을 무작위로 배정하였고, 시험기간 중 WR군에서 1명이 개인적인 사유로 탈락하여 각 군당 12명으로 실험이 진행되었음 (Figure 24). 문헌 조사 및 동물을 이용한 당뇨 예방 및 개선 효능검정 결과를 참조하여 적정섭취량을 결정하여 본 인체시험에 적용하였고, 1일 섭취량은 Table 17과 같음.

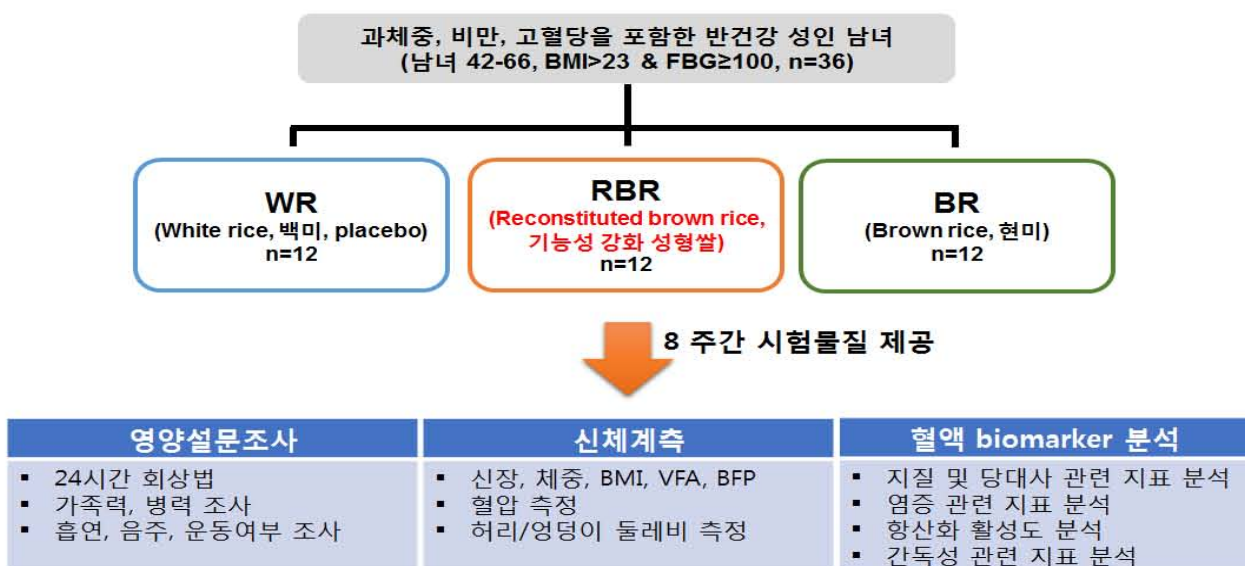


Figure 24. Experimental design for human experiment.

BMI: Body mass index, FBG: fasting blood glucose, VFA: visceral fat area, BFP: body fat percentage.

Table 17. 인체시험 각 실험군의 1일 섭취량

Group	물질	1일 섭취량		비고
		serving (g)	회	
제1군	WR군 - placebo (white rice, 백미)	100% 일반미	180~200 g	섭취기간:8주 1일 2회 섭취
제2군	RBR군 (Reconstituted brown rice, 기능성 강화 성형쌀)	30% 현미 + 천연물 기능성 성분		
제3군	BR군 (Brown rice, 현미)	30% 현미 + 70% 일반미		

○ 본 연구는 인체시험 계획서, 피험자 동의서와 피험자 설명문 및 공고문이 경북대 산학협력단의 인체시험 심의위원회 (IRB : Institutional Review Board)에서 심의 및 승인된 후 실시되었음.

○ 대상자들은 시험기간 8주 동안 일상적인 식생활 및 생활습관을 유지하도록 하였음. 인체시험 피험자 모니터링은 2주 1회 전화로 시험 식품의 섭취 여부, 시험기간 중 나타날 수 있는 부작용 또는 불편사항 (설사, 장내가스 발생, 어지러움, 복통, 구토 등)을 조사하였음.

(라) 인체시험 대상자 방문 및 시료수집

#### ① 방문일정

총 3회 (0, 4, 8주) 방문을 통해 영양설문지와 24시간 식사일지 작성, 신체계측, 체성분 측정, 허리 둘레와 엉덩이 둘레 측정, 혈압, 공복혈당을 측정하였음.

#### ② 시료수집

시험 전 (0주) 및 시험 후 (8주)에 12시간 공복 후 공복혈액과 소변을 채취하였음. 채취된 혈액은 헤파린으로 처리된 시험관에 바로 수집하였고, 1000×g, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리한 후, 시료 분석 시까지 -70°C에 보관하였음.



Figure 25. 신체 계측 및 채혈

### (3) 실험 분석 및 측정 방법

#### (가) 설문조사 결과정리

○ 설문조사 내용 (시험시작 전, 종료 후 2회)

- 영양소 섭취상태 : 24시간 회상법, 3일간 식사기록 조사 후 한국인 영양섭취기준치에 대한 백분율, 영양 질적지수, 영양소 적정섭취 비율 등을 분석.
- 영양제 섭취여부, 흡연여부, 음주여부, 시력, 합병증 유무, 유병기간, 과거 병력, 가족력, 운동 정도

○ 인체시험대상자의 영양섭취상태 설문조사 결과정리 및 통계처리는 Can Pro (한국영양학회) 와 엑셀 프로그램을 이용하여 결과 정리 및 ANOVA 통계 처리하였음.

#### (나) 신체 계측 및 체성분 분석

주원메디컬사 (한국)의 X-Scan 체성분 분석기를 이용하여 측정하였음.

#### (다) 혈압 변화 분석

OMRON DALIAN사 (중국)의 혈압계를 이용하여 측정하였음.

#### (라) 생화학적 바이오마커 측정

○ 모든 biomarker들의 분석을 위해 시험기관 방문을 통해 시험개시 전, 종료 후 2회에 걸쳐 채혈, 채노 및 계측을 실시하여 얻은 검체로 실시함.

##### ① 혈장 지질 측정

##### ㉠ Total-cholesterol 정량

혈장 총 콜레스테롤 정량은 Allain 등 (1974)의 효소법을 응용한 측정용 시약 (아산제약 kit) 을 사용하였음. 혈장 콜레스테롤은 cholesteryl ester (CE) 및 유리콜레스테롤 두 형태로 존재하므로, 이들 전체를 정량하기 위하여 CE를 cholesterol esterase에 의해 지방산과 유리 콜레스테롤로 전환시켰음. 이렇게 전환된 유리콜레스테롤은 cholesterol oxidase에 의해  $H_2O_2$ 와  $\Delta^4$ -cholestenon으로 전환시키고, 이 중  $H_2O_2$ 를 peroxidase 및 phenol, 4-amino-antipyrine과 혼합하여 적색으로 발색시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하여 콜레스테롤 표준용액 (300 mg/dL) 과 비교하여 정량하였음.

##### ㉡ Triglyceride 정량

혈장 중성지질은 McGowan 등 (1983)의 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 중성지방 측정용 시약 (아산제약 kit)을 사용하여 측정하였음. 혈장 내 중성지질은 lipoprotein lipase (LPL) 에 의해 글리세롤과 지방산으로 분해됨. 이 중 글리세롤은 ATP와 glycerol kinase (GK)의 작용으로 L- $\alpha$ -glycerophosphate를 형성하며, 이것은  $O_2$  및 glycerophosphoxidase (GPO)와 반응하여  $H_2O_2$ 를 발생시켰음. 여기에 peroxidase와 4-amino-antipyrin을 처리하여 적색으로 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 글리세롤 표준곡선과 비교하여 정량하였음.

## ㉔ HDL-cholesterol 정량

혈장 HDL-cholesterol (HDL-C)은 HDL-C 측정용 시액 (아산제약 kit)을 사용하여 측정하였음. 혈장 100  $\mu$ L를 취하여 인텡스텐 나트륨 500  $\mu$ g과 염화마그네슘 1 mg을 처리하면 인텡스텐산과 마그네슘 양이온의 작용으로 지단백질 중 apo B를 포함하는 LDL과 VLDL이 침전됨 (Warnick, 1982). 이것을 원심분리한 후 상층액에 남은 HDL 중의 콜레스테롤을 총콜레스테롤과 같은 방법으로 발색반응 시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하고, 콜레스테롤 표준용액 (50 mg/dL)과 비교하여 정량하였음.

## ㉕ Free fatty acid (FFA) 정량

혈장 FFA는 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 유리지방산 측정용 시액 (Non-esterified fatty acid, NEFA kit, Wako, Osaka, Japan)을 사용하여 측정하였음. 우선 혈장 유리지방산에 acyl coenzyme A synthetase를 작용시켜 Acyl-CoA, AMP 및 pyrophosphoric acid를 생성시킨 후, 여기에 acyl coenzyme A oxidase를 첨가하여 2,3-Trans-enoyl-CoA 및 과산화수소를 생성시켰음. 이를 peroxidase와 4-아미노안티피린 및 N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulforopyl)-m-toruidine으로 처리하여 적색으로 발색시킨 후 555 nm에서 흡광도를 측정하여 유리지방산 표준곡선과 비교하여 정량하였음.

## ㉖ 아포지단백질 정량

혈장 apolipoprotein A-I (apo A-I) 및 apolipoprotein B (apo B) 농도는 apo A-I, apo B 측정용 kit (日東紡績株式會社, Japan)를 사용하여 측정하였음. 혈장 3  $\mu$ L에 R-1 시약 300  $\mu$ L를 가하고 37°C에서 5분간 반응시키고 R-2 시약 100  $\mu$ L를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 항원항체 반응에 의해 생성된 응집물의 탁도를 apo A-I, apo B 각각 800nm, 600nm에서 흡광도를 측정하였음.

## ㉗ Phospholipids (PL)측정

혈장 인지질 측정용 시액 (SICDIA L PL reagent, 新洋化學藥品株式會社, Japan)을 사용하여 측정하였음.

## ㉘ Non-HDL cholesterol, HTR 및 AI (동맥경화지수) 계산

혈장 Non-HDL콜레스테롤 농도는 total cholesterol 농도에서 HDL-cholesterol 농도를 제하여 계산되었고, 동맥경화지수 및 HTR은 다음 공식에 의해 계산되었음 (Yamajaki, 1990).

$$- \text{HTR} (\%) = [(\text{HDL-cholesterol})/(\text{Total-cholesterol})] \times 100$$

$$- \text{Atherogenic index, AI} = [(\text{Total-cholesterol})-(\text{HDL-cholesterol})]/\text{HDL-cholesterol}$$

## ② 공복혈당측정

공복혈당 농도는 12시간 절식한 피험자들의 공복 정맥혈을 채취하여 혈액자동분석기 (Cholestech LDX System, USA)를 이용하여 측정하였으며 또한 자가 혈당 측정계 (글루코닥터 슬림, (주)그린메디칼)를 이용하여 12시간 절식한 피험자들의 손끝에서 공복혈당을 측정하였음.



### ③ 당화혈색소 (HbA<sub>1c</sub>) 측정

HbA<sub>1c</sub> 농도는 Alere Afinion HbA<sub>1c</sub> test cartridge (주엘리어헬스케어)를 이용하여 0주 및 8주에 채혈한 공복 혈장으로 측정하였음. HbA<sub>1c</sub>는 hemoglobin β-chain과 N-terminal valine 및 포도당의 carbonyl group간의 가역적 축합에 의해 생긴 schiffbase가 Amadori 산물로 변형된 것인데, 이것의 농도는 혈중 포도당 농도와 양의 상관관계를 가지며, 2~3개월간의 혈당 조절 상태를 파악할 수 있음.

### ④ 혈장 포도당 농도 (plasma glucose) 측정

혈장 포도당 함량 측정을 위해 상업용 glucose 측정용 시액 (Asan kit, Korea)을 사용하였음. Glucose는 glucose oxidase의 작용에 의해 gluconic acid와 hydrogen peroxide가 되고 hydrogen peroxide는 peroxidase를 생성하고 phenol과 4-aminoantipyrine을 산화적으로 축합시켜 키논형 적색 색소를 생성함. 이러한 원리를 이용하여 혈장 200 μl에 효소시액 3 ml을 가하여 37°C, 5분간 반응시킨 후 500 nm에서 생성된 키논형 적색 색소의 흡광도를 측정하여 glucose 표준용액과 비교하여 정량하였음.

### ⑤ 당대사 관련 호르몬 및 지표: Insulin, C-peptide, Glucagon 측정 및 인슐린 감수성 지표 (HOMA-IR)

- 인슐린과 C-peptide는 proinsulin의 효소적 분해산물로서 C-peptide 함량은 인슐린 그 자체보다 인슐린 분비의 가치 있는 지표로 보고되고 있음. 장 Insulin, glucagon, C-peptide는 Multiplex detection kit (Merck, USA)를 사용하여 측정하였음.
- 인슐린 감수성 지표인 HOMA-IR는 [공복인슐린(uU/ml)×공복포도당(mmol/L)]/22.5로 계산하여 구함.

### ⑥ 혈장 adipokine 함량 측정

혈장 adiponectin, leptin, resistin, IL-6, TNF-α, MCP-1 및 PAI-1의 함량 측정은 Multiplex detection kit (Merck, USA) 및 Luminex 200 Labmap system (Luminex Corp, USA)을 사용하였음.

### ⑦ 혈장 GOT 및 GPT 활성도 측정

간독성 지표이자 간세포 손상과 밀접한 관련이 있는 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 활성도는 Reitman 등 (1957) 등의 효소법을 이용한 GOT 및 GPT 측정용 시액 (Asan kit, Korea)을 사용하여 측정하였음. GOT의 경우 L-aspartate와 α-ketoglutarate, GPT의 경우 D,L-alanine과 α-ketoglutarate 기질을 37°C, 5분간 preincubation시키고, 혈장 10μl를 첨가하여 37°C에서 GOT는 60분, GPT는 30분 반응시킨 뒤 혈장의 효소에 의해 기질이 pyruvate로 전환되며, 이 pyruvate를 2,4-dinitrophenylhydrazine과 20분간 실온에 반응시켜 0.4N NaOH를 가하면 비색으로 발색되며, 이를 피루브산 리튬의 표준곡선과 비교하여 505nm에서 활성도를 측정하였음.

### ⑧ 신장 기능 관련 실험: BUN, Creatinine, Albumin

신장 기능과 밀접한 관련이 있는 albumin 및 blood urine nitrogen (BUN) 활성도는 albumin

및 BUN 측정용 시액 (Asan kit, Korea)을 사용하여 측정하였고, 소변 creatinine은 creatinine 측정용 시액 (Asan kit, Korea)을 사용하였음.

⑨ 항산화 관련 지표: 적혈구 SOD, catalase, GSH-Px, GT 활성도 및 지질과산화물 (TBARS), Hydroperoxide ( $H_2O_2$ ) 측정

- Superoxide dismutase (SOD): 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund의 방법(1974)으로 측정함. 효소활성 단위는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 pyrogallol 용액의 자동산화를 50% 억제하는 단백질의 양으로 정함.
- Catalase(CAT): Abei (1974)의 방법을 이용하여,  $H_2O_2$ 의 흡광도 변화와  $H_2O_2$ 의 몰흡광계수로  $H_2O_2$ 의 농도를 구한 다음 감소된  $H_2O_2$ 를 nmol/min/mg protein으로 계산하여 그 효소활성도를 측정함.
- Glutathione peroxidase (GSH-Px): Paglia와 Valentine의 방법(1967)으로 산화형 glutathione이 glutathione reductase와 NADPH에 의하여 환원될 때 NADPH의 흡광도가 340 nm에서 감소하는 정도를 측정함. 효소활성 단위는 1분간 1 nmol의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양으로 나타냄.
- Glutathione reductase (GR): GSSG가 NADPH와 GR의 작용으로 GSH로 환원될 때, NADPH가 감소되는 정도를 340 nm에서 측정함.
- 지질과산화물 함량 측정(TBARS 분석): 적혈구 지질과산화물 함량 측정은 Tarladgis 등 (1964)의 방법을 이용함. MDA 표준용액은 tetramethoxypropane을 가수분해하여 조제하여 TBA-MDA chromopore 표준곡선을 얻고, 이 곡선으로부터 TBA 반응물질의 양을 MDA equivalent로 산출함.
- 과산화수소 함량 측정 (Hydrogenperoxide,  $H_2O_2$ ): 적혈구 과산화수소 함량 측정은 Wolff 등 (1994)의 방법을 이용함. 과산화수소(hydrogenperoxide,  $H_2O_2$ )는 ferrous( $Fe^{2+}$ ) 이온을 ferric( $Fe^{3+}$ ) 이온으로 산화시킴. FOX reagent를 이용하여 560 nm에서  $H_2O_2$  생성 정도를 측정함.

#### (마) 통계 분석

본 연구의 모든 실험결과는 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 각 실험군당 평균과 표준오차로 나타내었고, 각 군간 평균차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하였음. 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의하여  $p < 0.05$  수준에서 검정하였음 (Steel and Torrie, 1960). 또한 각 군별 시험 전·후의 수치비교 및 대조군(백미군) 대비 기능성 성형쌀과 현미군의 수치비교를 위해 Student's t-test를 실시하였음. P 값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 의미가 있는 것으로 판단하였으며, 모든 측정값은  $mean \pm S.E.$  (standard error)와 함께 표시하여 나타내었음.

#### (마) 연구원의 역할

참여 연구원은 역할을 분담하여 인체시험을 진행하였으며 대상자 모집과 4주마다 대상자 방문 시에는 모든 연구원이 참여하였음. 대상자 방문 시, 설문조사, 혈당 측정, 신체 계측, 혈압 등의 역할을 나누어 인체시험을 원활히 진행하였으며 2주마다 모니터링을 실시하였음.

## 나. 연구 수행 결과

### (1) 신체 계측치 비교

인체시험 시작 전, WR (백미, 대조군), RBR (기능성 강화 성형쌀) 및 BR (현미) 군의 baseline 신체 계측 결과는 다음 Table 18와 같음. 인체시험 실시 전 대상자들의 연령, 체중, 체질량지수 (body mass index, BMI), 체지방률 (Body fat percentage, BFP), 허리 둘레, 엉덩이 둘레, 허리/엉덩이 둘레비 (waist-hip ratio, WHR), 혈압 및 공복혈당 (fasting blood glucose, FBG) 은 군간 유의적 차이가 나타나지 않았음.

**Table 18. Baseline characteristics**

	WR (Placebo)	RBR	BR
N	12	12	12
Age	55.64±1.82	52.56±0.85	56.72±1.66
Body weight (kg)	67.00±2.92	71.58±3.21	68.06±2.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.70±0.74	26.98±0.80	26.01±0.65
BFP (%)	32.01±1.07	30.20±1.99	30.63±1.57
Systolic BP (mmHg)	131.50±6.34	130.73±4.49	132.67±4.76
Diasolic BP (mmHg)	76.75±3.60	77.55±3.95	76.50±2.56
Waist (cm)	82.13±2.78	88.71±2.49	84.88±1.36
Hip (cm)	98.13±1.36	100.74±1.84	97.79±0.96
WHR	0.84±0.02	0.88±0.02	0.87±0.01
FBG (mg/dL)	106.75±5.10	113.45±13.39	107.17±3.23

Values are the mean±S.E.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, RB: Brown rice, BMI: Body mass index, BFP: Body fat percentage, BP: Blood pressure, WHR: Waist-hip ratio, FBG: Fasting blood glucose.

### (2) 시험 물질 섭취 전·후 영양섭취량 조사

인체시험 시작 전과 후, 24시간 회상법에 따라 조사된 평균 영양소 섭취량은 각각 Table 19 (시험 전)과 Table 20 (시험 후)과 같음. 시험물질 섭취 전·후 모든 그룹의 에너지, 단백질, 지질, 탄수화물, 주요 비타민과 무기질, 콜레스테롤 및 식이섬유소 섭취량은 유의적인 차이가 없었음.

**Table 19. Nutrients intake in subjects with metabolic syndrome by 24h dietary recall before the trial**

	WR (Placebo)	RBR	BR
energy (kcal/day)	1609.77±68.75	1543.80±105.66	1558.10±96.51
protein (g/day)	48.09±4.63	50.42±5.91	53.91±6.07
fat (g/day)	27.17±1.91	30.62±6.71	33.43±3.74
carbohydrate (g/day)	272.07±14.79	251.22±12.59	266.68±18.02
fiber (g/day)	5.57±0.56	4.83±0.75	7.00±0.75
Ca (mg/day)	469.01±53.25	344.34±42.83	423.63±54.89
P (mg/day)	696.35±68.42	621.12±68.19	809.85±98.84
Fe (mg/day)	8.94±0.89	10.28±1.34	11.85±1.26
Na (mg/day)	2422.79±289.16	2511.94±279.53	2540.83±254.19
vit A (mg/day)	745.31±253.17	657.07±129.81	742.25±126.41
vit B1 (mg/day)	0.77±0.09	0.61±0.07	0.86±0.11
vit B2 (mg/day)	0.76±0.09	0.62±0.09	0.85±0.11
vit B6 (mg/day)	1.40±0.15	1.26±0.10	1.54±0.18
vit C (mg/day)	94.97±24.00	81.48±24.39	110.04±23.73
folate (µg/day)	181.30±21.34	150.33±23.19	151.50±18.94
vit E (mg/day)	6.57±0.77	7.38±1.70	11.01±1.42
cholesterol (mg/day)	167.65±35.12	204.16±53.68	206.88±44.92

Values are the mean±S.E.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice.

**Table 20. Nutrients intake in subjects with metabolic syndrome by 24h dietary recall after the trial**

	WR (Placebo)	RBR	BR
energy (kcal/day)	1794.94±103.19	1751.08±158.56	1801.92±95.49
protein (g/day)	54.60±4.55	60.79±7.54	62.27±4.81
fat (g/day)	32.12±7.76	32.66±5.50	34.71±3.98
carbohydrate (g/day)	311.93±23.34	291.63±22.28	302.06±14.05
fiber (g/day)	5.69±0.65	5.26±0.69	6.67±0.64
Ca (mg/day)	411.65±39.79	400.01±45.11	527.96±103.86
P (mg/day)	720.86±58.20	820.55±82.11	958.98±75.93
Fe (mg/day)	13.20±3.11	10.86±1.66	13.18±0.96
Na (mg/day)	2996.45±538.20	3087.27±460.16	3423.12±287.87
vit A (mg/day)	556.99±73.43	618.77±93.95	598.75±71.77
vit B1 (mg/day)	1.14±0.18	0.84±0.12	1.02±0.10
vit B2 (mg/day)	0.78±0.11	0.67±0.10	0.84±0.09
vit B6 (mg/day)	1.68±0.18	1.43±0.18	1.83±0.15
vit C (mg/day)	109.00±17.95	77.33±12.28	90.36±14.89
folate (µg/day)	203.86±30.06	234.45±32.05	216.07±27.39
vit E (mg/day)	7.39±1.57	7.89±1.06	10.68±1.14
cholesterol (mg/day)	176.51±41.50	169.16±46.80	157.76±31.87

Values are the mean±S.E.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice.



### (3) 시험 물질 섭취 전·후 신체계측 및 체지방 변화

8주간 시험물질 섭취 전·후, 대상자들의 체중, 체지방률 (Body fat percentage, BFP), 체질량지수 (BMI), 허리 둘레, 엉덩이 둘레, 및 허리/엉덩이 둘레비 (waist-hip ratio, WHR) 측정결과는 다음 Table 5와 같음. 체중, 체지방률, 체질량지수, 허리 및 엉덩이 둘레와 WHR은 군간 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 각 군 내에서도 시험물질 섭취 전·후의 차이는 나타나지 않았음 (Table 21).

시험물질 섭취 후 대상자들의 복부 내장지방 면적, 근육 무게는 군 간 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 각 군 내에서도 시험물질 섭취 전·후에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았음. (Table 22). 또한 대상자들의 혈압 측정결과에서도 백미, 기능성 성형쌀 및 현미 섭취에 따른 군 간 유의적인 차이는 나타나지 않았고, 각 군 내 전·후 비교에서도 유의적인 차이가 나타나지 않았음 (Table 23).

**Table 21. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of body weight, BFP, BMI, and WHR-related body measurements in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
Body weight (kg)	Before	67.00±2.92	71.58±3.21	68.06±2.05	0.478
	After	67.36±3.03	71.00±3.08	67.95±2.09	0.609
	p-value <sup>2</sup>	0.932	0.897	0.971	
BFP (%)	Before	32.01±1.07	30.20±1.99	30.63±1.57	0.705
	After	31.88±1.04	30.79±1.77	30.68±1.52	0.820
	p-value <sup>2</sup>	0.930	0.826	0.982	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Before	25.70±0.74	26.98±0.80	26.01±0.65	0.445
	After	25.76±0.78	26.59±0.62	25.90±0.61	0.645
	p-value <sup>2</sup>	0.953	0.703	0.905	
Waist (cm)	Before	82.13±2.78	88.71±2.49	84.88±1.36	0.142
	After	80.38±2.41	86.17±2.15	82.88±1.25	0.138
	p-value <sup>2</sup>	0.639	0.449	0.290	
Hip (cm)	Before	98.13±1.36	100.74±1.84	97.79±0.96	0.293
	After	97.25±1.86	99.33±1.73	97.17±1.35	0.584
	p-value <sup>2</sup>	0.708	0.582	0.710	
WHR	Before	0.84±0.02	0.88±0.02	0.87±0.01	0.164
	After	0.83±0.02	0.87±0.02	0.85±0.01	0.195
	p-value <sup>2</sup>	0.715	0.621	0.426	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice, BFP: Body fat percentage, BMI: Body mass index, WHR: Waist-hip ratio.

**Table 22. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of fat area and muscle weights in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
visceral fat area (VFA, cm <sup>2</sup> )	Before	88.08±9.43	110.92±9.55	102.83±4.40	0.149
	After	87.00±10.37	114.58±10.17	103.33±6.13	0.114
	p-value <sup>2</sup>	.939	.795	.948	
Muscle weight (kg)	Before	40.82±2.21	45.97±2.67	43.53±2.21	0.312
	After	41.03±2.16	45.23±2.56	43.43±2.12	0.099
	p-value <sup>2</sup>	0.947	0.844	0.974	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice.

**Table 23. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of blood pressure level in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
Systolic BP (mmHg)	Before	131.50±6.34	130.73±4.49	132.67±4.76	0.967
	After	131.42±6.33	138.75±4.24	126.25±4.19	0.224
	p-value <sup>2</sup>	0.993	0.208	0.323	
Diastolic BP (mmHg)	Before	76.75±3.60	77.55±3.95	76.50±2.56	0.975
	After	76.50±3.09	80.08±3.97	75.25±3.13	0.589
	p-value <sup>2</sup>	0.958	0.656	0.760	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice, BP: Blood pressure.

#### (4) 시험 물질 섭취 전·후 혈중 지질 농도 변화

시험물질 섭취에 따른 전혈의 HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 총콜레스테롤 및 중성지방 측정 결과는 다음 Table 8과 같음. 8주간 백미, 기능성 성형쌀 및 현미 섭취에 의한 혈중 LDL-콜레스테롤, 총콜레스테롤 및 중성지방 수준은 유의적인 변화는 나타나지 않았으나, RBR군의 혈중 HDL-콜레스테롤 농도는 기능성 성형쌀 섭취 8주 후 증가하는 경향을 보임 (p=0.057) (Table 24, Figure 26).

시험물질 섭취에 따른 혈장 지질 농도 변화는 다음 Table 25 및 Figure 27와 같음. 시험 물질 섭취 전·후 혈장 유리지방산, 중성지방, 총콜레스테롤, nonHDL-콜레스테롤, Apo A I, Apo B, 및 인지질 (phospholipid) 수준은 WR군, RBR군 및 BR군간 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 각각의 시험물질 섭취 전·후 비교 시에도 유의적 차이가 없었음. 반면, 8주간의 기능성 강화 성형쌀 섭취는 혈장 HDL-콜레스테롤 수준을 증가시키는 경향을 보였으며 (p=0.063), 이는 전혈 HDL-콜레스테롤 결과와도 유사한 것으로 나타남. 동맥경화지수 (atherogenic index, AI)와 총콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율 (HDL-C/Total-C ratio, HTR)은 시험물질 섭취에 의한 유의적인 차이가 나타나지 않았음.

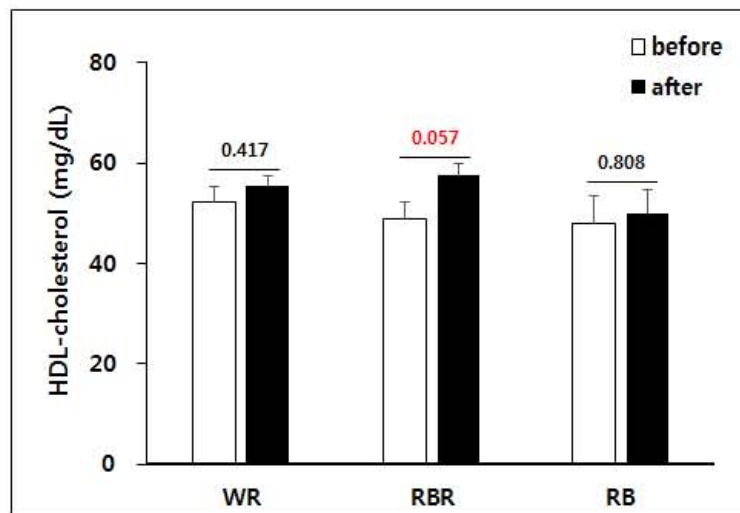
**Table 24. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of whole blood lipids concentrations in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
HDL-cholesterol (mg/dL)	Before	52.27±3.05	48.90±3.49	48.00±5.50	0.696
	After	55.44±1.97	57.50±2.40	49.83±4.87	0.217
	p-value <sup>2</sup>	0.417	<b>0.057</b>	0.808	
LDL-cholesterol (mg/dL)	Before	119.80±12.26	115.40±9.36	129.29±6.05	0.661
	After	109.10±14.74	117.20±13.96	125.33±7.34	0.677
	p-value <sup>2</sup>	0.584	0.916	0.696	
Total cholesterol (mg/dL)	Before	131.14±11.46	156.38±11.28	153.14±18.10	0.393
	After	140.14±11.29	144.30±22.16	159.50±14.63	0.789
	p-value <sup>2</sup>	0.586	0.659	0.795	
Triglyceride (mg/dL)	Before	191.36±12.38	186.20±7.78	204.00±6.82	0.512
	After	184.60±11.07	185.80±12.17	197.29±3.87	0.697
	p-value <sup>2</sup>	0.691	0.978	0.409	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, RB: Brown rice, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein

**Figure 26. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on HDL-cholesterol level in subjects with metabolic syndrome**

Values are the mean±S.E.

t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, RB: Brown rice, HDL: High density lipoprotein.

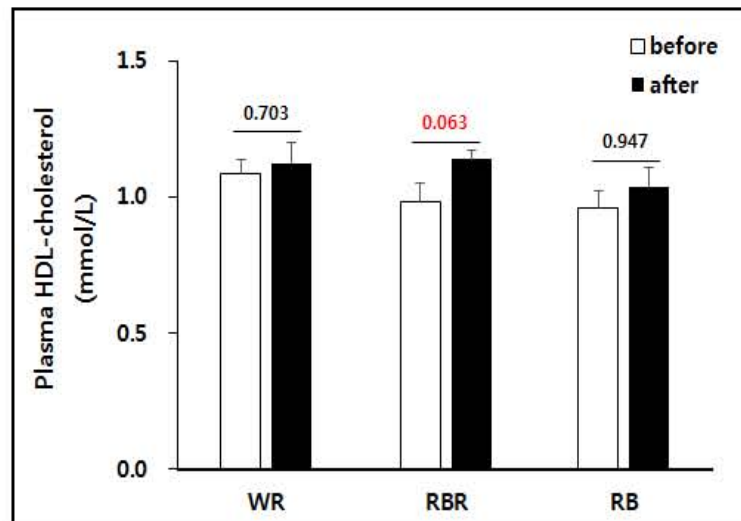
**Table 25. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of plasma lipids concentrations in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
FFA (mmol/L)	Before	0.36±0.04	0.35±0.09	0.33±0.05	0.950
	After	0.25±0.04	0.27±0.03	0.26±0.06	0.953
	p-value <sup>2</sup>	0.069	0.443	0.388	
Triglyceride (mmol/L)	Before	1.75±0.17	1.59±0.15	1.81±0.17	0.611
	After	1.65±0.12	1.41±0.16	1.66±0.14	0.432
	p-value <sup>2</sup>	0.306	0.817	0.135	
Total-cholesterol (mmol/L)	Before	4.70±0.32	4.78±0.24	5.25±0.20	0.253
	After	4.64±0.30	4.75±0.25	5.04±0.17	0.488
	p-value <sup>2</sup>	0.891	0.942	0.422	
HDL-cholesterol (mmol/L)	Before	1.09±0.05	0.98±0.07	0.96±0.06	0.334
	After	1.12±0.08	1.14±0.03	1.04±0.07	0.617
	p-value <sup>2</sup>	0.703	<b>0.063</b>	0.947	
nonHDL-cholesterol (mmol/L)	Before	3.74±0.31	3.75±0.24	4.19±0.22	0.402
	After	3.58±0.32	3.77±0.28	4.20±0.17	0.228
	p-value <sup>2</sup>	0.721	0.973	0.972	
Apo A I (mg/dL)	Before	128.34±3.30	126.35±3.81	116.40±3.95	0.065
	After	124.17±3.62	127.73±4.01	120.19±3.68	0.380
	p-value <sup>2</sup>	0.404	0.806	0.490	
Apo B (mg/dL)	Before	73.00±5.26	73.28±4.10	84.88±2.99	0.157
	After	69.79±5.99	71.47±4.00	81.57±3.60	0.170
	p-value <sup>2</sup>	0.691	0.755	0.514	
HTR (%)	Before	22.50±1.69	21.81±1.92	18.06±1.62	0.186
	After	23.82±2.00	23.07±2.10	18.33±1.34	0.096
	p-value <sup>2</sup>	0.631	0.662	0.898	
AI	Before	3.49±0.40	3.95±0.42	4.05±0.33	0.582
	After	3.51±0.39	3.70±0.47	4.28±0.32	0.428
	p-value <sup>2</sup>	0.963	0.701	0.790	
Phospholipid (mmol/L)	Before	2.70±0.12	3.06±0.19	3.16±0.20	0.158
	After	2.52±0.08	2.75±0.07	2.86±0.15	0.080
	p-value <sup>2</sup>	0.213	0.150	0.238	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice, FFA: Free fatty acid, HDL: High density lipoprotein, Apo A I: Apolipoprotein A I, Apo B: Apolipoprotein B, HTR = (HDL-C/Total-C)×100, AI: Atherogenic index, [(Total-C)-(HDL-C)]/HDL-C.



**Figure 27. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on change of plasma HDL-cholesterol level in subjects with metabolic syndrome.**

Values are the mean±S.E.

t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, RB: Brown rice, HDL: High density lipoprotein.

#### (5) 시험 물질 섭취 전·후 혈중 당대사 관련 지표 변화

인체시험 전·후 공복 혈당, 당화혈색소 (HbA1c)를 비롯한 당대사 관련 지표 측정 결과는 다음 Table 26과 같음. 8주간 백미, 기능성 강화 성형쌀 및 현미 섭취에 의한 공복혈당 농도는 군간 및 군내 유의적인 변화가 없었고, 혈장 포도당 농도 또한 시험물질 섭취에 의한 변화가 나타나지 않았음. 또한 혈장 인슐린, 글루카곤, C-peptide, 및 HOMA-IR도 군간 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 각 군 내 섭취 전·후 비교에서도 변화가 나타나지 않았음.

한편, 당화혈색소 농도는 8주간 기능성 강화 성형쌀 섭취에 의해 실험 전에 비해 실험 후 유의적으로 감소하였고 ( $p = 0.009$ ), 현미 섭취에 의해서도 당화혈색소 농도가 유의적으로 감소하였음 ( $p = 0.035$ ).



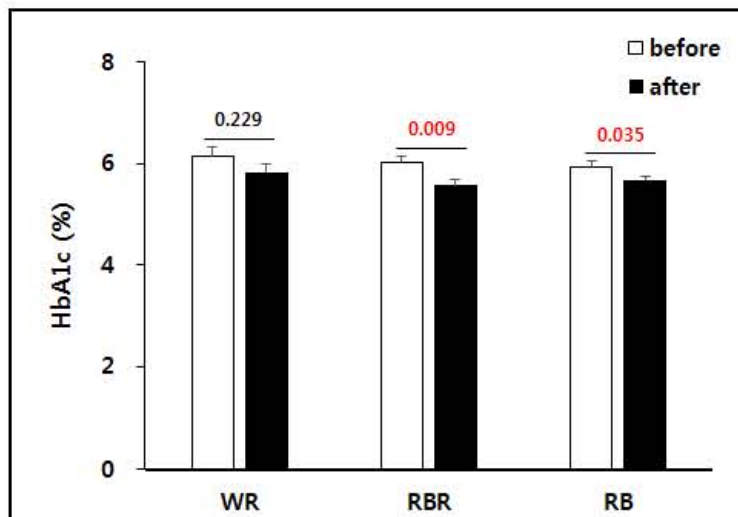
**Table 26. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of fasting whole blood glucose, HbA<sub>1c</sub>, and HOMA-IR in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
FBG (mg/dL)	Before	106.75±5.10	113.45±13.39	107.17±3.23	0.813
	After	115.50±5.86	108.09±5.88	111.83±3.66	0.612
	p-value <sup>2</sup>	0.272	0.718	0.350	
HbA <sub>1c</sub> (%)	Before	6.14±0.19	6.03±0.11	5.95±0.10	0.619
	After	5.83±0.17	5.58±0.11	5.68±0.07	0.391
	p-value <sup>2</sup>	0.229	<b>0.009</b>	<b>0.035</b>	
plasma glucose (mg/dL)	Before	5.52±0.28	5.35±0.13	5.45±0.12	0.619
	After	5.92±0.25	5.29±0.20	5.66±0.07	0.120
	p-value <sup>2</sup>	0.306	0.817	0.135	
Insulin (ng/mL)	Before	0.64±0.09	0.58±0.11	0.65±0.08	0.844
	After	0.92±5.86	0.70±0.10	0.76±0.10	0.398
	p-value <sup>2</sup>	0.117	0.438	0.393	
Glucagon (pg/mL)	Before	55.60±3.93	65.54±5.14	66.64±7.76	0.352
	After	48.86±3.57	64.20±9.99	64.89±7.94	0.318
	p-value <sup>2</sup>	0.223	0.907	0.876	
C-peptide (ng/mL)	Before	1.61±0.19	2.26±0.73	2.06±0.12	0.629
	After	1.82±0.24	1.91±0.25	2.02±0.14	0.814
	p-value <sup>2</sup>	0.517	0.657	0.824	
HOMA-IR	Before	0.14±0.02	0.15±0.03	0.16±0.02	0.897
	After	0.23±0.05	0.19±0.03	0.21±0.02	0.693
	p-value <sup>2</sup>	0.119	0.272	0.138	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, RB: Brown rice, FBG: Fasting blood glucose, HbA<sub>1c</sub>: Hemoglobin A<sub>1c</sub>, HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance.



**Figure 28. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on HbA<sub>1c</sub> level in subjects with metabolic syndrome.**

Values are the mean±S.E.

t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, RB: Brown rice, HbA<sub>1c</sub>: Hemoglobin A<sub>1c</sub>.



## (6) 시험 물질 섭취 전·후 염증성 cytokine 농도 변화

인체 시험 전·후 지방세포에서 분비되는 염증성 cytokine인 MCP-1, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도 변화는 Table 27과 같음. 혈장 IL-6와 TNF- $\alpha$  수준은 시험물질 섭취에 의한 변화가 나타나지 않은 반면, MCP-1 수준은 시험물질 섭취 8주 후 세 실험군에서 전반적으로 증가하는 경향을 보이는 가운데 WR군에서 백미 섭취에 의해 유의적으로 증가하였으며 ( $p=0.024$ ) 혈장 PAI-1 수준도 WR군에서 증가하는 경향이 나타남 ( $p=0.053$ ).

**Table 27. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and PAI-1 levels in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
IL-6 (pg/mL)	Before	1.27±0.12	1.16±0.10	1.12±0.21	0.780
	After	1.65±0.18	1.41±0.26	1.40±0.18	0.667
	p-value <sup>2</sup>	0.134	0.377	0.329	
MCP-1 (pg/mL)	Before	162.15±20.21	164.29±22.29	163.11±14.46	0.997
	After	255.90±31.25	246.67±34.36	249.85±40.32	0.983
	p-value <sup>2</sup>	<b>0.024</b>	.057	.064	
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Before	2.52±0.41	2.27±0.17	1.97±0.21	0.370
	After	3.63±0.46	3.35±0.32	3.31±0.92	0.777
	p-value <sup>2</sup>	0.090	0.067	0.208	
PAI-1 (pg/mL)	Before	59.62±7.72	58.22±4.92	58.17±3.79	0.979
	After	84.24±9.16	69.99±10.15	67.93±3.34	0.362
	p-value <sup>2</sup>	<b>0.053</b>	0.312	0.073	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice, MCP1: Monocyte chemotactic protein 1, IL-6: Interleukin-6, TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ , PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1.

## (7) 시험 물질 섭취 전·후 지방세포분비 호르몬 수준 변화

지방세포에서 분비되는 호르몬인 leptin, resistin 및 adiponectin의 혈중 수준은 다음 Table 12와 같음. 혈장 leptin과 resistin 수준은 모든 군에서 실험 전·후의 차이가 없었으며 실험군간 차이도 나타나지 않았음 (Table 28). 한편, 지방세포에서 특이적으로 발현하여 분비되는 호르몬으로서 염증을 차단하여 당뇨병, 동맥경화증 및 비만을 예방하는 것으로 보고된 adiponectin은 백미를 섭취한 WR군에서만 감소하는 경향을 보였으며 ( $p=0.052$ ), RBR군과 BR군에서는 시험물질 섭취 전·후 유의적인 변화가 관찰되지 않았음.

**Table 28. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of leptin, resistin, and adiponectin levels in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
Leptin (ng/mL)	Before	5.16±0.72	5.21±0.92	5.53±1.18	0.957
	After	8.36±1.63	5.18±0.82	7.96±2.11	0.325
	p-value	0.080	0.982	0.340	
Resistin (pg/mL)	Before	47.82±3.68	56.82±6.27	55.07±7.86	0.173
	After	43.78±2.61	50.81±8.40	50.81±10.16	0.774
	p-value	0.374	0.579	0.743	
Adiponectin (ng/mL)	Before	39.38±3.99	24.82±5.37	29.82±6.08	0.230
	After	27.54±3.38	20.41±3.72	26.90±7.77	0.653
	p-value	<b>0.052</b>	0.507	0.770	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice.

#### (8) 시험 물질 섭취 전·후 간 및 신장 기능 관련 지표 변화

간독성 지표이자 간세포 손상과 밀접한 관련이 있는 혈장 GOT와 GPT 활성화도 비교 시, 백미와 기능성 강화 성형쌀 섭취에 의한 유의적인 변화는 나타나지 않음. 반면, BR군은 현미 8주 섭취에 의해 혈장 GOT 수준이 유의적으로 감소되었고 (p=0.016), 혈장 GPT도 감소하는 경향을 보였으나 (p=0.054), 세 군 모두 GOT, GPT는 정상 수준으로 나타남. 신장 기능 관련 지표인 혈장 albumin 및 BUN 수준과 urine creatinine은 8주간 시험물질 섭취에 의한 군간·군내 유의적인 차이는 관찰되지 않았음 (Table 29).

**Table 29. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of plasma GOT, GPT, albumin, BUN and levels in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
GOT (Karmen/ml)	Before	16.79±1.24	17.86±3.07	19.61±1.73	0.652
	After	15.27±1.29	15.51±1.11	14.91±0.66	0.926
	p-value <sup>2</sup>	0.406	0.479	<b>0.016</b>	
GPT (Karmen/ml)	Before	11.58±1.42	12.98±3.13	14.70±2.35	0.675
	After	8.25±1.49	9.45±1.04	9.16±1.50	0.806
	p-value <sup>2</sup>	0.121	0.297	<b>0.054</b>	
plasma albumin (mmol/L)	Before	4.59±0.03	4.69±0.05	4.68±0.05	0.143
	After	4.69±0.06	4.76±0.04	4.82±0.03	0.172
	p-value <sup>2</sup>	0.712	0.067	0.448	
BUN (mmol/L)	Before	15.40±1.46	14.31±2.02	12.17±1.11	0.348
	After	13.87±1.50	13.04±2.25	13.86±1.60	0.934
	p-value <sup>2</sup>	0.472	0.678	0.391	0.934
Creatinine (mg/dL)	Before	9.57±1.45	8.45±1.91	5.39±0.58	0.118
	After	6.92±1.21	6.28±1.13	6.70±1.03	0.922
	p-value <sup>2</sup>	0.671	0.691	0.306	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice, GOT: glutamic oxaloacetic transaminase, GPT: glutamic pyruvic transaminase, BUN: blood urine nitrogen.

### (9) 시험 물질 섭취 전·후 항산화 효소 활성도 및 과산화물 수준 변화

8주간 시험 물질 섭취에 의한 적혈구 항산화 효소 활성도 변화는 Table 30에 제시하였음. 시험 물질 섭취 전 항산화효소 활성도는 세 군간 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 8주간 시험 물질 섭취 후, 현미를 섭취한 BR군은 백미를 섭취한 WR군보다 SOD 활성도가 유의적으로 증가하였고, 기능성 성형쌀을 섭취한 RBR군은 WR군보다 SOD 활성도가 증가하는 경향을 보였음. 또한 백미를 섭취한 WR군은 실험 전·후 비교에서 적혈구 catalase와 GSH-Px 활성도가 유의적으로 감소한 것으로 관찰됨 (Table 30, Figure 29). 적혈구의 지질 과산화물 (TBARS)과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량 측정 결과, 세 시험물질에 의한 유의적인 변화는 나타나지 않았음 (Table 30).

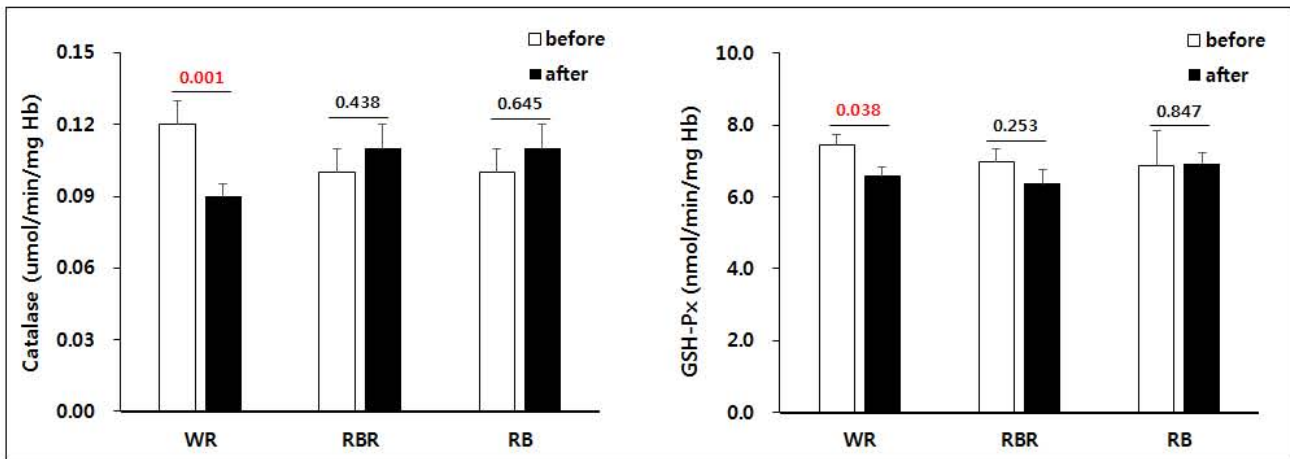
**Table 14. Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on changes of erythrocytic antioxidant enzyme activities in subjects with metabolic syndrome**

		WR (Placebo)	RBR	BR	p-value <sup>1</sup> (ANOVA)
SOD (unit/mg Hb)	Before	2.07±0.11	2.02±0.06	2.19±0.04	0.361
	After	2.02±0.04 <sup>a</sup>	2.19±0.09 <sup>ab</sup>	2.29±0.06 <sup>b</sup>	0.030
	p-value <sup>2</sup>	0.713	0.132	0.272	
Catalase (umol/min/mg Hb)	Before	0.12±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.166
	After	0.09±0.005	0.11±0.007	0.11±0.010	0.273
	p-value <sup>2</sup>	<b>0.001</b>	0.438	0.645	
GSH-Px (nmol/min/mg Hb)	Before	7.45±0.29	6.99±0.35	6.86±0.99	0.390
	After	6.60±0.25	6.38±0.38	6.94±0.31	0.473
	p-value <sup>2</sup>	<b>0.038</b>	0.253	0.847	
GR (nmol/min/mg Hb)	Before	4.52±0.37	4.54±0.25	4.84±0.48	0.803
	After	4.41±0.24	4.77±0.29	5.01±0.24	0.274
	p-value <sup>2</sup>	0.788	0.564	0.756	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/mg Hb)	Before	0.17±0.00	0.16±0.01	0.17±0.00	0.347
	After	0.17±0.00	0.17±0.00	0.17±0.00	0.240
	p-value <sup>2</sup>	0.482	0.092	0.592	
TBARS (umol/g Hb)	Before	0.32±0.00	0.31±0.00	0.32±0.01	0.219
	After	0.31±0.01	0.32±0.01	0.33±0.00	0.198
	p-value <sup>2</sup>	0.204	0.171	0.105	

Values are the mean±S.E.

<sup>1</sup>ANOVA among 3 groups, <sup>2</sup>t-test between before and after trial in each group. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at p<0.05.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, BR: Brown rice, SOD: Superoxide dismutase, GSH-Px: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase



**Figure 29.** Effect of reconstituted brown rice (RBR) supplementation on erythrocytic catalase and GSH-Px activities in subjects with metabolic syndrome.

Values are the mean ± S.E.

t-test between before and after trial in each group.

WR: White rice (Placebo), RBR: Reconstituted brown rice, RB: Brown rice, GSH-Px: glutathione peroxidase.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 1 절 연구목표의 달성도

구분 (연도)	세부연구 목표	평가의 작안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2014.	국화과 식물 및 천년초 추출물· 유효성분 의 항당뇨 쌀 개발	국화과 식물 및 천년초 작물의 재배를 통한 품질관리	100	천년초 재배 품질관리 매뉴얼 수립
		국화과 식물 및 천년초 작물의 유효성분을 함유한 분말을 이용한 쌀제형화	100	쌀제형화 제조기술 공정설계 및 대량생산 시스템 구축 및 양산 Scale 재현성 검증
		국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분 분말을 함유한 제형쌀의 안정성 평가 및 품질연구	90	제형쌀의 안정성 평가 매뉴얼 수립 및 품질연구 방안 검토
12.	국화과 식물 및 천년초 추출물· 유효성분 의 항산화 효과 연구	국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 생리활성 연구	100	섬썩부쟁이 항비만 효과 및 곤달비 추출물의 항당뇨 효과 시험 진행
15. ~		세포실험을 이용한 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항산화 효과 확인	100	당뇨쌀 추출물의 직접적인 라디칼 제거 능력을 보기 위해 DPPH assay 수행
2015.		국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 안정성 평가	100	3T3-L1 지방세포에 대한 세포독성 평가 진행 RAW 264.7 대식세포에 대한 세포독성 평가 진행
12.		HPLC 분석의 검증방법 (회수율 95-105%)	100	애기땅빈대의 HPLC 분석 및 peroxynitrite 소거효과 시험
16.	국화과 식물 및 천년초 추출물· 유효성분 의 항염증 효과 연구	국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 염증 매개물질 생성 감소효과 능력 (IC <sub>50</sub> 100 ug/ml이하)	100	당뇨쌀 추출물의 NO 생성 억제 효과 시험 진행
		염증 매개 유전자 발현 조절 능력 확인 유무	100	당뇨쌀 추출물의 PGE <sub>2</sub> 생성 억제 효과 및 iNOS mRNA 발현 조절 효과 시험진행
		관련 염증 조절 기전 발굴 유무	100	당뇨쌀 추출물이 NF-κB와 AP-1 전사인자 활성화에 미치는 영향

구분 (연도)	세부연구 목표	평가의 작안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
	국화과 식물 및 천년초 추출물· 유효성분 의 항산화 효과 연구	활성 라디칼 감소 능력 평가 (IC <sub>50</sub> 100 µg/ml이하)	100	당뇨쌀 추출물의 직접적인 라디 칼 제거 능력을 보기 위해 DPPH assay를 수행
		세포에서 ROS 및 NO 제거능 평가 (IC <sub>50</sub> 100 µg/ml이하)	100	당뇨쌀 추출물의 NO 생성 억제 효과 시험 진행
2014.	12. 국화과 식물 및 천년초 추출물· 유효성분 의 항비만 효과 연구 ~ 15.	세포실험을 이용한 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항비만 및 항당뇨 효과 확인	100	지방세포 분화 억제 효과, 지방분해 효소 발현에 미치는 영향 및 glucose uptake 조절 효능 시험 진행
2015.		동물실험을 이용한 국화과 식물 및 천년초 추출물·유효성분의 항비만 및 항당뇨 효과 확인	100	체중 및 식이효율 및 장기무게에 미치는 영향, 혈당농도 혈장 지질수준에 미치는 영향 시험 진행
12. 16.	국화과 식물 및 천년초 추출물· 유효성분 을 함유한 제형쌀의 항비만 및 항당뇨 임상 연구	IRB의 신청 및 임상지원 당뇨환자 모집	100	총 37명을 무작위로 배정하여 8주간 임상시험을 진행
		진정효과 수준 (ED <sub>50</sub> 100mg/kg 이하)	100	염증성 cytokine 농도변화, 지방 세포분비 호르몬 변화 시험 진행
		항비만효과 (ED <sub>50</sub> 100mg/kg 이하)	100	신체 계측치 비교, 영양 섭취량 조사, 당대사 관련 시험 진행
		간보호효과 (ED <sub>50</sub> 100mg/kg 이하)	100	신장 기능 관련 지표변화 시험 진행



## 제 2 절 관련분야에의 기여도

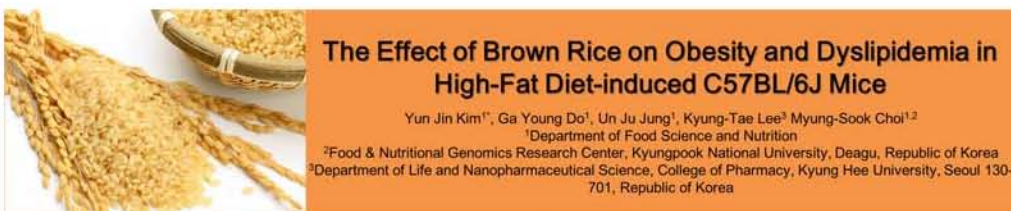
- 국화과 식물 및 천년초의 추출물을 그대로 이용하는 것이 아니라 정형쌀 제조 기술로 항비만 및 항당뇨 개선에 도움이 되는 섭취가 가능한 재형쌀 건강기능식품 및 보조식 개발의 가능성을 높여 국민 건강을 향상 시키고, 삶의 질을 높이며 농가의 고수의 창출이 기대됨.
- 당뇨 억제효능 갖는 건강기능 재성형 쌀 및 보조식품 개발, 당뇨환자를 위한 항산화 및 항염증성, 신경성 및 스트레스성 장기 손상 완화제의 제품화 및 신장 및 간장 보호하여, 당뇨성 합병증의 증상을 완화하는 섭취가 용이한 식품개발의 소재로써 활용가치가 있음.
- 국화과 식물 및 천년초의 폴리페놀, 풍부한 식이섬유, 미네랄, 각종 비타민을 포함한 영양 성분의 항산화활성을 이용한 제품 다각화 및 신경안정 효과를 이용한 편리한 제품 출시에 따른 매출액 증진도 기대됨.
- 고랭지 재배 식물의 풍부한 영양소 및 미네랄을 함유한 기능성 재성형쌀 및 복용이 간편한 보조제품 생산이 기대됨.
- 비만은 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화증 등의 성인성 만성퇴행성질환의 발생률을 높여 의료비의 지출을 상승시키고 노동력의 저하로 인해 개인뿐만 아니라 국가적으로도 큰 손실을 가져오는데 이들을 예방하거나 지연시킬 수 있는 예방프로그램 개발에 활용가치가 있음.
- 기능성 쌀 시장은 약 8,000억원 정도의 규모로 지속적인 발전 가능성이 있으며, 본 기술은 다양한 기능성 식품 분야에 전반저공로 적용이 가능하다. 또한 본 기술로 개발된 기능성 재형 쌀은 기존의 기능성 쌀 생산 방법과 다른 계약 재배로 생산하기 때문에 원가 절감에 효과가 있으며, 증대된 상품성으로 영농인의 수입 증대에 기대할 수 있다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 1. 학술발표 : 1건

No	발표자	발표제목	발표일시	장소/국명	비고
1	김윤진 외 4인	The Effect of Brown Rice on Obesity and Dyslipidemia in High-Fat Diet-induced C57BL/6J Mice	2015년 8월 24일	알펜시아 컨벤션 센터	



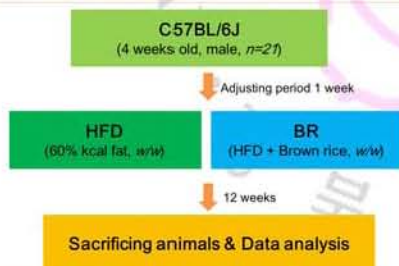
#### Abstract

Efficacy of brown rice that is rich in dietary fiber with various bioactive components was tested using high-fat diet (HFD)-induced obese mice. Male C57BL/6J mice (4-weeks-old) were fed HFD (60% kcal fat) or HFD supplemented with brown rice (5%, w/w; BR) for 12 weeks. The mice were supplied with the food and water freely during experiment period. Interestingly, food intake was not significantly different, but final body weight and weight gain were significantly higher in the HFD group than in the BR group. Interscapular white adipose tissue (WAT) and visceral fat including epididymal WAT, perirenal WAT, retroperitoneum WAT and mesenteric WAT were also dramatically reduced in the BR group compared with the HFD group. In addition, the BR group decreased the levels of triacylglyceride, total cholesterol and apolipoprotein B in plasma, while it increased apolipoprotein A-1 and HDL-cholesterol levels. From these results, we suggest that brown rice can improve obesity and dyslipidemia via the reductions of body weight and fat accumulation as well as improvement of plasma lipid profile.

#### Introduction

Recently the number of obesity is steadily increased by high fat diet. Obesity causes complicating diseases like diabetes and dyslipidemia, and make a trouble in people's life. Brown rice has a rich dietary fiber with various bioactive components and has the effect of preventing obesity.

#### Materials and method



#### Results and Discussion

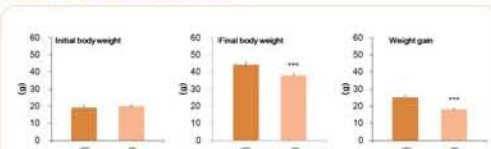


Fig 1. Effect of brown rice on changes of body weight in C57BL/6J mice for 12 weeks. Data are means±SE. \*\*\*p<0.001, HFD vs BR, high-fat diet(HFD, 60% fat) and HFD supplemented with Brown rice(BR, 5%)

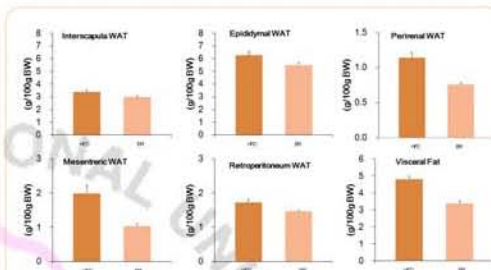


Fig 2. Effect of brown rice on adipose tissue weight in C57BL/6J mice for 12 weeks. Data are means±SE. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, HFD vs BR, high-fat diet(HFD, 60% fat) and HFD supplemented with Brown rice(BR, 5%)  
 WAT, white adipose tissue  
 Visceral fat, sum of epididymal, perirenal, mesenteric and retroperitoneum WAT weight

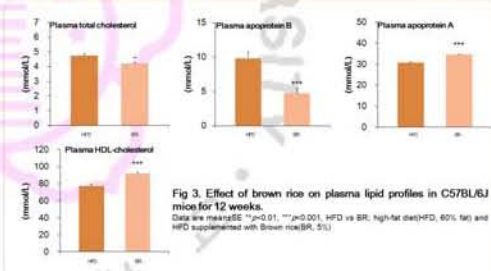


Fig 3. Effect of brown rice on plasma lipid profiles in C57BL/6J mice for 12 weeks. Data are means±SE. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, HFD vs BR, high-fat diet(HFD, 60% fat) and HFD supplemented with Brown rice(BR, 5%)

#### Conclusion

From these results, we suggest that brown rice can improve obesity and dyslipidemia via the reductions of body weight and fat accumulation as well as improvement of plasma lipid profile.

## 2. 홍보실적 : 1건

No	홍보유형	매체명	제목	일시	비고
1	중앙TV방송	KBS 1TV	6시 내고향	2015. 11. 04.	

## 3. 전시회 참가 : 2건

No	유형	전시품목	제목	일시	비고
1	박람회	기능성 쌀	2015 한가위 명절선물 상품전	2015. 08.26.~08.29.	
2	박람회	기능성 쌀	제 4회 강원푸드 박람회	2015. 11.04.~11.07.	

## 제 2 절 성과활용 계획

성과목표	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업 화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍 보 전 시	기타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
연구종료후 성과목표	1	1	2	1	2			3	1			2	
종료 1차년도			1	1	1			1					
종료 2차년도	1	1	1		1							1	
종료 3차년도								1					
종료 4차년도									1				
종료 5차년도								1				1	
합 계	2	2	4	2	3			5	2	4	3	4	

## 제 6 장   참고문헌

- Ray H, Pinteur C, Frering V, Beylot M, Large V. Depot-specific differences in perilipin and hormone-sensitive lipase expression in lean and obese. *Lipids Health Dis* 2009;8:58.
- Knutson VP. The release of lipoprotein lipase from 3T3-L1 adipocytes is regulated by microvessel endothelial cells in an insulin-dependent manner. *Endocrinology* 2009;141:693-701.
- Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya I, Yao-Borengasser A, Phanavanh B, Lecka-Czernik B, Rasouli N, Kern PA. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J Lipid Res* 2006;47:2444-2449.
- Bogan JS, Mckee AE, Lodish HF. Insulin-responsive compartments containing GLUT4 in 3T3-L1 and CHO cells: regulation by amino acid concentrations. *Mol Cell Biol* 2001;21:4785-4806.
- Czech MP, Corvera. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 1999;274:1865-1868.
- Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking: location! location! location! *J Biol Chem* 1999;274:2593-2596.
- Rea S, James DE. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 1997;46:1667-1677.
- Jiang B, Yang Y, Jin H, Shang W, Zhou L, Qian L, Chen M. Astragaloside IV attenuate lipolysis and improves insulin resistance induced by TNF  $\alpha$  in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 2008;22:1434-1439.
- Holm C. Molecular mechanisms regulating hormonesensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1120-1124.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR is required for differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;4:611-617.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM: Cross-regulation of C/EBPalpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipo-genesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 1999;3:151-158.
- Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM. The structure activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem* 1996;39:665-668.
- Rousseau V, Becker DJ, Ongemba LN, Rahier J, Henquin JC, Brichard SM. Developmental and nutritional changes of ob and PPAR gamma 2 gene expression in rat white adipose

tissue. *Biochem J* 1997;321:451–456.

– Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1302:93–109.

– Furuhashi, M. and Hotamisligil, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7: 489–503.

– Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Matsubara, K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem*

*Biophys Res Commun* 1996;221,286–289.

– Martinez-Botas, J., Anderson, J. B., Tessier, D., Lapillonne, A. and Chang, B. H. J. 2000. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr<sup>db/db</sup>* mice. *Nat Genet* 2000;26:474–479.

– Weisz, A., Cicatiello, I. and Esumi, H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- $\gamma$ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L arginine. *biochem. J.* 1996;316:209–215.

– Masferrer, J., Zweiflen, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isacson, P.C. and Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*1994;91:3228–3232.

– Michel T, Feron O: Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.* 1997;100:2146–2152.

– Uwe S: Anti-inflammatory interventions of NF- $\kappa$ B signaling: potential applications and risks. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:1567–1579.

– Guha, M., and Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 2001;13:85–94.

– Alvarez-Suarez, J. M., Dekanski, D., Ristic, S., Radonjic, N. V., Petronjevic, N. D., Giampieri, F., Astolfi, P., Gonzalez-Paraimas, A. M., Buelga, C., Tulipani, S., Quiles, J. L., Mezzetti, B., Battino, M., Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase, *PLoS One* 6: e25878 (2011)

– An, R. B., Kwon, J. W., Kwon, T. O., Chung, W. T., Lee, H. S., Kim, Y. C., Chemical constituents from the whole plants of *Euphorbia supina* Rafin, *Kor. J. Pharmacogn.* 38: 291 ~295 (2007).

– Cha, B. C., Lee, H. W., Lim, T. J., Antioxidative constituents and activities of Acorn hull and chestnut hull, *Yakhak Hoeji* 47: 212–217 (2003).

– Cha, B. C., Kim, J. A., Lee, Y. S., Cytotoxic activities of *Panax ginseng* and *Euphorbia humifusa* in human brain tumor cells, *Kor. J. Pharmacogn.*, 27: 350–353 (1996).



- Choi, E.M. 2007. *Ligularia fischeri* leaf extract prevents the oxidative stress in DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis. *Journal of Applied Toxicology* 10: 198–203
- Choi, J., J.K. Park, K.T. Lee, K.K. Park, W.B. Kim, J.H. Lee, H.J. Jung and H.J. Park. 2004. Inhibitory Effect of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and its Active Component, 3,4-Dicaffeoylquinic acid on the Hepatic Lipid Peroxidation in Acetaminophen-Treated Rat. *Nat. Prod. Sci.* 10: 182–189.
- Choi, J., J.K. Park, K.T. Lee, K.K. Park, W.B. Kim, J.H. Lee, H.J. Jung and H.J. Park. 2005. In vivo antihepatotoxic effects of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and the identification of the active component, 3,4-dicaffeoylquinic acid. *J. Med. Food* 8: 348 – 352.
- Choi, J., Park, J. K., Lee, K. T., Park, K. K., Kim, W. B., Lee, J. H., Jung, H. J., and Park, H. J. (2005) In vivo antihepatotoxic effect of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and of the active component, 3,4-dicaffeoylquinic acid. *J. Med. Food.* 8: 348–352.
- Dandona, P., Ghanim, H., Chaudhuri, A., Dhindsa, S., and Kim, S. S. (2007) Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance, *Exp. Mol. Med.* 42: 245–253.
- Dandona, P., Aljada, A., and Bandyopadhyay, A. (2004) Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes, *Trends in immunol.* 25: 4–7.
- Drel, V. R., Patcher, P., Vareniuk, I., Pavlov, I., Lyzogulbov, V. V., Grovez, J. T., and Obrosova, I. G., A peroxynitrite decomposition catalyst counteracts sensory neuropathy in streptozotocin-diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 569: 48–58 (2007)
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H.(1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Boil. Chem.* 226: 497–509.
- Friedewald, W.T., R.I. Levy and D.S. Fredrickson. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 24: 499–502.
- Hogan, S., Canning, C., Sun, S., Sun, X., and Zhou, K. (2010) Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice, *J. Agric. Food Chem.* 58: 11250–11256.
- Hwang, B.Y., J.H. Lee, T.H. Koo, Y.S. Hog, J.S. Ro, K.S. Lee and J.J. Lee. 2002. Furanoligularenone, an eremophilane from *Ligularia fischeri*, inhibits the LPS-induced production of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> in macrophage RAW 264.7 cells. *Planta Med.* 68: 101–105.
- Jang, S. H., Lim, L. W., Kim, H.,  $\beta$ -Carotene inhibits *Helicobacter pylori*-induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in human gastric epithelial AGS cells, *Journal of Physiology and Pharmacology* 60: 131–137 (2009).
- Jeong, S.H., S.J. Koo, J. Choi, H.J. Park, J. Ha and K.T. Lee. 2002. Intermedeol isolated from the leaves of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* induces the differentiation of human

- acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Planta Med.* 68: 881 – 885.
- Kim, T.J. 1996. *Korean Resources Plants*, The Publishing Center of Seoul National University, Seoul, pp. 242 – 243.
  - Kim, J. Y., Jung, K. J., Choi, J. S., Chung, H. Y., Hesperetin: A potent antioxidant against peroxynitrite, *Free Radical Research* 38: 761–769 (2004).
  - Ko, K. S., Jeon, E. S., *Ferns, fern-allies and seed bearing plants of Korea*, Iljin-Sa, Seoul (2003).
  - Korda, M., Kubant, R., Patton, S., and Malinski, T., Leptin induced endothelial dysfunction in obesity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295: 1514–1521 (2008).
  - Kunitomo, M. (2007) *Oxidative stress and atherosclerosis*, *Yakugaku Zasshi* 127: 1997–2014.
  - Lee, K.T., S.J. Koo, S.H. Jung, J. Choi, H.J. Jung and H.J. Park. 2002. Structure of three new terpenoids, spiciformisins a and b, and monocyclosqualene, isolated from the herbs of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and cytotoxicity. *Arch. Pharm. Res.* 25: 820 – 823.
  - McGowan, M.W., J.D. Artiss, D.R. Strandbergh and B. Zak. 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 29: 538–542.
  - Miller, N.E. 1978. The evidence for the antiatherogenicity of high density lipoprotein in man. *Lipid.*, 13, 914 – 919.
  - Noma, A., K. Nezu-Nakayama, M. Kita and H. Okabe. 1978. H Simultaneous determination of serum cholesterol in high- and low-density lipoproteins with use of heparin.  $Ca^{2+}$ , and anion-exchanger resin. *Clin. Chem.* 24: 1504–1508.
  - Nugroho, A., Lee, K. R., Alam, M. B., Choi, J. S., and Park, H. J. (2010) Isolation and quantitative analysis of peroxynitrite scavengers from *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Arch. Pharm. Res.* 33: 703–708 (2010).
  - Park, H. J., S.H. Kwon, K.O. Yoo, I.C. Sohn, K.T. Lee and H.K. Lee. 2000. Sesquiterpenes from the leaves of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*. *Planta Med.* 66: 783 – 784.
  - Patcher, P., Obrosova, I. G., Mabley, J. G., and Szabo, C., Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr. Med. Chem.* 12: 267–275 (2005).
  - Pryor, W. and Squadrito, G., The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide, *Am. J. Physiol.* 268: L699–L722 (1996).
  - Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A., Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266: 4244 –4250 (1991).
  - Rachmilewitz D., Karmeli F., Eliakim R., Stalnikowicz R., Ackerman Z., Amir G., Stamler J. S., Enhanced gastric nitric oxide synthase activity in duodenal ulcer patients, *Gut*, 35: 1394–1397 (1994).

- Richmond, W. 1976. Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis. *Clin. Chem.* 22: 1579–1588.
- Silva Beserra, A. M. S., Caleri, P. I., Carmo Souza, M., Santos, R. A. N., Silva Lima, J. C., Silve, R. M., Balogun, S. O. B., Oliveira Martins, D. T., Gastroprotective and ulcer–healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats, *J. Agric. Food Chem.* 59: 6957–6965 (2011).
- Toyoda, K., Y. Yaoita and M. Kikuchi. 2005. Three new dimeric benzofuran derivatives from the roots of *Ligularia stenocephala* Matsum. *Et Koidz. Chem. Pharm. Bull.* 53: 1555 – 1558.
- Vincent, H. K., Bourguignon, C. M., Vincent, K. R., Weltman, A. L., Bryant, M., and Taylor, A. N. (2006) Antioxidant supplementation lowers exercise–induced oxidative stress in young overweight adults, *Obesity* 14: 2224–2235.
- Wang, W.S., K. Gao and Z.J. Jia. 2000. Eremophilenolides from *Ligularia fischeri*. *Planta Med.* 66: 189 – 191.
- Yan, F.L., A.X. Wang and Z.J. Jia. 2005. Three new isopropenyl benzofurans from *Ligularia stenocephala*. *Pharmazie* 60: 155 – 159.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품 기술료사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림축산 기술료사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.