

발간등록번호

11-1541000-001369-01

검정옥수수 Polyphenol로부터 당뇨 및 당뇨합병증 억제 소재 개발  
(Development of Materials for Prevention of  
Diabetes and It's Complications from Purple Corn Polyphenol)

주관연구기관명  
한림대학교 산학협력단

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “건정옥수수 Polyphenol로부터 당노 및 당노합병증 억제 소재 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명 : 한림대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 임순성

세부연구책임자 : 이재용

세부연구책임자 : 강영희

세부연구책임자 : 류옥현

연 구 원 : 김진규, 이민영

이수경, 김태현

홍수희, 김성현

강민경, 강상욱

김정례, Jins Li

참 여 기 업 : (주) 에스엔디

연 구 원 : 안수영, 정숙

전병중, 정해태

권상우, 맹철호

# 요 약 문

## I. 제 목

김정옥수수 Polyphenol로부터 당뇨 및 당뇨합병증 억제 소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

당뇨병은 인슐린의 부족으로 혈액 중의 포도당(혈당)이 정상인보다 그 농도가 높아져서 소변에 포도당을 배출하는 만성질환으로 국내에서도 현재 최소 500만명의 환자 추정되며, 당뇨병으로 인한 사망률은 Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 국가 중 최고 수준이며 현재 우리나라의 사망원인 중 4위로 올라섰다. 이 병의 사회적비용도 만만찮은데 국민건강보험 총 진료비의 20%를 차지하며 이 병에 걸린 환자의 1인당 평균 진료비는 일반인의 3배에 달하고 있으며, 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 당뇨병은 그 자체로도 심각한 질병이지만, 치료되지 않은 상태로 지속되면 신경장애, 신장질환, 안질환 및 심혈관계 질환과 같은 합병증을 초래하며 이로 인해 하지실단, 말기 신부전증, 시력상실, 심근경색 및 결국 사망을 초래한다.

따라서 본 연구는 김정옥수수 추출물로부터 당뇨 및 당뇨합병증을 억제할 수 있는 유효물질을 규명하고, 과학적으로 표준화된 추출물 원료를 대상으로 전임상 평가/기전규명 및 임상시험을 통하여 혈당 조절 및 당뇨합병증 질환을 억제할 수 있는 기능성식품 개별인정의 소재를 개발하는데 기반이 되는 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	김 정 옥 수 수 의 polyphenol 분리/ 분석 및 in vitro 당도 및 당뇨합병 증 억제능 평가	김정옥수수 추출물의 추출조건 확립 및 in vitro 항당뇨 및 당뇨합병증에 대한 활성평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>활성분획물의 최적의 추출조건 확립</li> <li>in vitro 항당뇨 및 당뇨합병증 활성평가</li> </ul>
		김정옥수수 성분 및 활성 비교 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내 개발 김정옥수수 종자의 기초 활성 비교분석</li> <li>LC-MS/MS를 이용한 안토시아닌 성 분 구명 및 HSCCC로 김정옥수수 주요 안토시아닌 성분 분리</li> <li>Polyphenolic 추출 분획물에 대한 TIC, HPLC, MPLC 등으로 분리</li> </ul>
	김 정 옥 수 수 의 polyphenol의 웨 장메다세포 보호 및 재생 활성 분 석 및 활용연구	김정옥수수 polyphenol의 웨장 메다세포 보호활성 및 기전을 2 형 당뇨모델인 db/db mouse에 서 분석함 - 혈당, insulin, 당화혈색소, 경구내당능 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>2형 당뇨모델인 db/db mouse에 김정옥수수 polyphenol을 7주간 섭 취시키고, 혈당, insulin, 당화혈 색소, 경구당내성을 분석한 결과 현재 처방되고 있는 Glimpiride 보다 모든 면에서 우수한 것으로 나타났음</li> </ul>
		- 웨장에서 ROS(활성산소), 세 포사, 세포성장 및 세포사 관 련 단백질 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>웨장메다세포박편을 anti-insul in antibody로 연색한 결과 건정 옥수수 polyphenol을 섭취시킨 db/ db mouse에서는 베타세포가 죽지 않고 살아있었고 대조군이나 Glim piride 처리군에서는 베타세포가 많이 죽어있는 것을 발견하여 김 정옥수수 polyphenol이 웨장 베타 세포 보호효과가 우수하다는 것을 발견하였음</li> </ul>
김 정 옥 수 수 의 당 도 및 당뇨합병증	김정옥수수 추출물의 신성 당 노합병증에서 유래한 사구체경	<ul style="list-style-type: none"> <li>김정옥수수 안토시아닌 성분의 신 장 mesangial cell의 증식에 대한 효</li> </ul>	

의 건강기능식품 소재로서의 역할 규명 및 개발	화 억제능 조사	과 ▪ mesangium의 결체조직성장인자와 matrix의 생성
	건정옥수수 추출물의 신성 당 노함병증에서 유효한 사구체경 화 억제능 기전연구	▪ 신성 당뇨병에서 건정옥수수 안토 시아닌 성분의 사구체경화 억제능 에 대한 기전 조사

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	김 정 옥 수 수 의 polyphenol 분리/ 분석 및 in vitro 당뇨 및 당뇨합병 증 억제능 평가	활성과 연계된 김징옥수수 우수 종 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>1차년도에서 선발된 우수종을 교잡하여 재배된 207종의 김징옥수수를 향산화, polyphenol 함량, 항당뇨합병증 활성 등의 효능이 있는 각 활성별 우수종을 선발</li> </ul>
		활성을 갖는 Polyphenol 성분의 분리 및 구조규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>안토시아닌 이외의 항당뇨합병증 활성을 갖는 polyphenol 화합물을 HPLC 및 MPLC로 분리하여 NMR 및 MS로 구조를 규명</li> </ul>
		단리화합물에 대한 활성평가 및 추출성분 분양	<ul style="list-style-type: none"> <li>Polyphenol 성분에 대한 알도스 환원효소 억제효능, 최종당화산물 억제효능, 단백질 다이도신 탈 인산화 효소 억제효능을 평가하여 활성 성분을 규명</li> </ul>
	김 정 옥 수 수 의 polyphenol의 웨 장메다세포 보호 및 재생 활성 분 석 및 활용연구	STZ로 췌장을 손상시킨 ICR mouse에서 김징옥수수 polyphenol의 웨장메다세포 보 호 활성 및 기전을 분석함	<ul style="list-style-type: none"> <li>혈당, 당화혈색소(HbA1c), 경구내당능 분석(Oral glucose tolerance test, OGTT)</li> <li>혈중 insulin 농도 측정, 췌장 무게 측정</li> </ul>
	김징옥수수의 당 뇨 및 당뇨합병증 의 건강기능식품 소재로서의 역할 규명 및 개발	김징옥수수 추출물의 신성 당뇨 합병증에서 유래한 사구체경화 억제기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>염증반응과의 연결고리</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>김징옥수수 안토시아닌 성분의 고혈당에 의한 염증인자 ICAM-1과 MCP 1 생성 조사</li> <li>각 김징옥수수 추출물의 사구체경화에 대한 효능 탐색</li> </ul>
		김징옥수수 추출물의 신성 당뇨 합병증에서 유래한 동맥경화증 억제능 및 혈관신생작용에 대한 효능	<ul style="list-style-type: none"> <li>김징옥수수 butanol추출물의 신성 동맥경화증 초기단계 조사</li> <li>신성당뇨에 의한 혈관신생작용 조사</li> </ul>
	임상시험: 혈당조절용 건강 기능식품소재로의 개발을 위한 임상 시험	다수의 정상인을 대상으로 단기 및 장기(8주에 걸쳐) 혈당강하 능을 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>2형 당뇨치료제인 metformin과 혈당강하능을 비교 분석</li> </ul>
	임상시험계획서의 작성 및 한림 대 춘천성심병원 IRB 심사	<ul style="list-style-type: none"> <li>한림대춘천성심병원 내분비내과 류옥현 교수 주관으로 김징옥수수 polyphenol 추출물의 정상인에서 혈당조절효과에 대한 임상시험계</li> </ul>	

			<p>획서를 작성하였으며, 한림대 춘천성심병원 IRB심사를 통과하여 임상시험이 실시되었음</p>
		<p>김정옥수수 polyphenol 추출물 캡슐 제조</p>	<p>▪ 김정옥수수 polyphenol 추출물 파우더를 구입하여 춘천바이오산업진흥원의 GMP시설을 활용하여 캡슐(500 mg)을 제조하였음</p>
		<p>단기 임상시험</p>	<p>각 군당 20명 건강인(공복혈당 120이하)에 캡슐을 투여하고 포도당 75g을 투여한 다음 30분, 60분, 90분, 120분에 혈당변화를 측정함</p> <p>▪ 음성대조군(cellulose 300mg 캡슐)</p> <p>▪ 양성대조군(Metformin 300 mg 캡슐)</p> <p>▪ 실험군(김정옥수수 polyphenol 300 mg 캡슐)으로 나누어 실험수행</p>
		<p>장기 임상시험</p>	<p>▪ 각 군당 20명 건강인(공복혈당 120이하)에 매일 아침 식후 1캡슐 투여하는 방법으로 8주간 지속하였음.</p> <p>▪ 8주후 포도당 75g을 투여한 다음 30분, 60분, 90분, 120분에 혈당 변화를 측정함</p> <p>▪ 음성대조군 (cellulose 300mg캡슐)</p> <p>▪ 양성대조군 (Metformin 300mg캡슐)</p> <p>▪ 실험군(김정옥수수폴리페놀 300 mg캡슐)으로 나누어 실험수행</p>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	길정옥수수의 polyphenol 분리/ 분석 및 in vitro 당도 및 당도함량 증 억제능 평가	활성 추출분획물의 구조 동정 및 대량 추출법 확립 / 활성성 분 분양	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 세부과제에서 우수한 활성을 갖는 성분 에 대해 칼럼크로마토그래피, TIC 및 HPLC, MPLC, CPC 등으로 추출물을 분리하여 세부과제에 분양하여 활성을 확인</li> <li>▪ 2차년도에서 규명하지 못한 polyphenol 화합물을 NMR, UV, MS, IR 등의 분석기기를 이용하여 화합물 구조를 규명</li> </ul>
		제품의 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 장기보존 시험: 저장조건에서 사용 기한을 설정하기 위하여 장기간에 걸쳐 물리적, 완전성, 화학적, 미생물학적 안정성 및 내용물과 용기의 적합성에 대하여 제형에 따른 적절한 기준 및 시험방법과 시험조건에서 시험</li> </ul>
	증 억제능 평가	시제품 제작 및 제품/산업화 방안 강구(제형연구, 캡슐제 작, 봉해도 시험)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ polyphenol 분획물에 부형제 (microcrystalline cellulose 등)등을 넣어 제조방법에 따라 캡슐을 제조</li> <li>▪ Capsule 제제의 봉해도 시험 -1분간에 29~32회 왕복, 진폭 53~57 mm 상하로 운동 시험기 미커에 넣는 시험액의 양은 시험기가 가장 위로 올라왔을 때 시험기의 망면이 액면 아래로 15 mm이상 떨어지도록 하고 가장 아래로 내려갔을 때 비커의 바닥으로부터 25 mm 이상으로 시험기가 완전히 잠기지 않도록 함.</li> </ul>
길정옥수수의 polyphenol의 웨 상메다세포 보호 및 재생 활성 분 석 및 활용연구	메다세포배양에서 길정옥수수 polyphenol의 혈당강하 및 세 포보호 기전연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ins-1 웨상메다세포배양에서 cytokines (human IL-1:β 1 μg/l, INF-γ :5 μg/l, TNF-α: 5 μg/l) 이나 palmitate (0.5 mmol/l)로 apoptosis를 유도하고, 이때 길정 옥수수 polyphenol을 여러 농도로 첨가하면서 세포보호효과를 TUNEL</li> </ul>	

			<p>assay로 apoptosis 정도를 측정하여 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ins-1 웨장메다세포배양에서 건정옥수수 polyphenol을 여러 농도로 첨가하면서 세포 내 ROS(활성산소)농도를 측정</li> </ul>
		<p>기능성식품화를 위한 건정옥수수 polyphenol의 안전성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>db/db mouse에서 건정옥수수 polyphenol을 8주 투여한 후 장기를 식출하여 육안으로 검사하고 무게를 측정</li> <li>혈액을 채취하여 혈액의 총콜레스테롤, LDL콜레스테롤, HDL콜레스테롤을 측정</li> <li>간독성은 AST, ALT를 측정하여 분석</li> <li>신장독성은 BUN을 측정하여 분석</li> <li>웨장을 식출하여 박편조직슬라이드를 제조하고 islet에서 anti-insulin antibody로 immunostaining하여 메다세포의 세포사를 분석</li> </ul>
<p>김정옥수수의 당뇨 및 당뇨병증의 건강기능식품 소재로서의 역할 규명 및 개발</p>		<p>당뇨합병증과 연결된 지하된 혈관 신생작용의 회복 (in vitro 세포실험)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>신장세포 mesangial cells와 혈관 내피세포의 세포배양</li> <li>신장세포를 33 mM glucose에 의한 고혈당으로 배양하여 신성당뇨합병증 유도실험을 실시함</li> <li>-신장세포의 conditional media를 혈관 내피세포와 배양하여 당뇨합병증에 의한 신장 혈관 및 사구체 모세혈관의 혈관 신생작용을 조사함 - 일부는 2차년도 후반기에 실시하여 김정옥수수의 안토시아닌이 고혈당으로 인하여 지하된 혈관신생작용을 활성화시킨다는 것을 규명한</li> <li>-이에 대한 김정옥수수 안토시아닌의 신성 당뇨병증에서 혈관 신생작용 기전연구를 실시함</li> <li>-관련된 다양한 cytokines과 growth factors의 관련성을 조사함: H</li> </ul>

		<p>IF와 VEGF의 연결 고리를 파악</p> <p>-혈관신생작용과 관련하여 혈관 내피세포의 세포사멸을 조사하고, 관련된 apoptotic factors를 측정함: MAPK와 ASK의 측정, apoptotic bodies 측정</p> <p>-ATT 측정, Hoechst 염색법, Western blot 분석, real time-PCR 분석, ELISA 분석 및 세포면역학적인 염색법을 도입함</p>	
	<p>신성당뇨합병증의 혈관 신생작용의 억제작용 확인 (in vivo 동물실험)</p>	<p>▪ 견정옥수수 안토시아닌의 경구투여를 통하여 db/db 당뇨쥐의 혈당 조절을 측정함-본 실험의 일부는 2차년도 후반기에 실시되었음</p> <p>-사구경화작용의 일부는 2차년도 연구 결과에 삽입하였음</p> <p>-신장 filtration barrier를 지탱하는 nephrin과 podocin의 역할 규명</p> <p>-당뇨합병증에서는 이러한 barrier proteins이 손상을 당할 것으로 기대하고 견정옥수수 안토시아닌이 proteins들의 발현을 정상화시키는지 조사함</p> <p>-사구경화와 관련된 collagen의 생성과 관련된 CTGF의 발현 등을 조사함: Western blot과 조직면역학적인 기법 도입: 관련된 단백질 발현과 분비 측정함</p> <p>-ELISA 기법 도입: 염증반응에 관련된 매개물질 측정함</p> <p>▪ 당뇨합병증의 혈관신생작용에 대한 견정옥수수 안토시아닌의 억제활성 in vivo 연구</p> <p>-Western blot 분석과 조직면역학적인 분석을 통하여 VEGF와 HIF 인자의 발현을 측정함</p> <p>공초현현미경을 사용하여 혈관신</p>	

			<p>생작용을 직접 조사함</p> <p>-혈관내피세포의 세포사멸에 대한 인자: caspase, Bcl2, Bax 등을 신장조직에서 측정함</p>
--	--	--	--

#### IV. 연구개발결과

### 건정옥수수의 Polyphenol 분리/분석 및 in vitro 항당뇨 및 당도함명증 억제능 평가

#### 1. 우수 활성을 갖는 김정옥수수 개발을 위한 기초 활성 시험 및 우수종 선발

- 강원도 옥수수시험장(홍천소재)으로부터 353종의 김정옥수수를 분양받아 HPLC를 이용한 성분 패턴분석과 항산화 활성(ABTS 라디칼 소거법, DPPH 법), Rat Lens Aldose Reductase (RLAR) 억제활성, PTP1B 억제효능, AGEs (advanced glycation end-products) 활성 등을 분석하여 우수종 53종을 선발하였으며 이를 기초로 교잡하여 얻은 306종에 대한 활성을 재검하여 현재, 태국에서 재배 중에 있음
- 최종 5종의 색찰교 선발

#### 2. 추출, 분획 및 고수율 추출 조건 수립

- 일부 활성시험에서 안토시아닌 성분뿐만 아니라 다른 polyphenol에서도 우수한 활성을 나타내어 성분이 존재하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ethyl acetate, BuOH 등으로 순차 추출하여 polyphenolic 성분은 EtOAc 분획물에 주로 추출되어 이 분획물을 RP-18 충전제를 활용하여 medium pressure LC로 다양한 메탄올 수용액의 농도를 조절하여 활성 성분을 분리

#### 3. LC-MS/MS를 이용한 안토시아닌 성분 분석 및 HSCCC를 이용한 주요성분 분리

- High Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)로 주요 안토시아닌 성분을 분리하여 활성 건성 및 각 세부과제에 주요 성분 분양.
- 건정옥수수 함유 주요 안토시아닌 성분은 cyanidin 3 glucoside (1), pelargonidin-3-glucoside (2), peonidin-3-glucoside (3), cyanidin-3-(6"-malonylglucoside) (4), pelargonidin-3-(6"-malonylglucoside) (5), cyaniding-3-(dimalonylglucoside) (6), cyanidin 3-(6-acetylglucoside) (7), peonidin 3 (6" malonylglucoside) (8) 규명

#### 4. 우수 활성을 갖는 김정옥수수 종을 선발하기 위해 기초 활성 시험을 통한 우수종 선발

- 강원도 옥수수시험장으로부터 김정옥수수를 분양받아 HPLC를 이용한 성분 패턴분석과 항산화 활성(ABTS 라디칼 소거법, DPPH 법), Rat Lens Aldose Reductase (RLAR) 억제활성, PTP1B 억제효능, AGEs(advanced glycation end products) 활성 등을 분석하여 각 활성별 우수종을 선발
- 기초로 교잡하여 얻은 306종에 대한 활성을 재검하였고, 3차를 거쳐 우수종을 선발하여 최종 5종의 색찰교를 확정하여 대량생산을 위한 품종신고 전까지 연구 진행하였음. 현재 태국에서 재배 중에 있음

## 5. 추출, 분획 및 고수율 추출 조건 확립

- 반응표면 분석법(Response Surface Methodology)을 이용하여 최적의 추출조건을 확립
- 추출온도(°C)는 40~60°C, 추출시간(hr)은 7.5~9.0 시간, 추출 용매의 농도(%)는 32~34%, 추출 용매의 비율은 1:12~1:15의 비율 - 추출 수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 안토시아닌 함량이 높게 나온

## 6. Non-anthocyanin 성분 분리 및 구조규명

- prothocatechuic acid (1), vanillic acid (2), 2,4,6-trihydroxy benzoic acid (3), p-hydroxycinnamic acid (4), ferulic acid (5), hirsutrin (6), 3'-methoxy hirsutrin (7) 규명

## 7. 활성평가 - 분리된 anthocyanin, polyphenol 성분을 대상으로 당뇨, 항당뇨합병증 효능을 평가

- 당뇨 및 합병증 억제능 평가를 실시하여 2종의 우수활성
- 당뇨: polyphenol 성분 중에서 3'-methoxy hirsutrin 물질에서 우수한 활성을 보임
- 항당뇨합병증: anthocyanin 성분 중에서 cyanidin 3 (6 malonyl glucoside) 물질에서 우수한 활성을 보였음. polyphenol 성분 중에서 hirsutrin 물질에서 우수한 활성을 보임.

## 8. HSCCC (High speed counter-current chromatography)를 이용하여 대량추출법을 확립하고 세부과제에 활성성분을 분량

## 9. 캡슐 시제를 개발 (안정성 평가 및 붕해도실험)



## 김정옥수수 polyphenol의 췌장메타세포 보호 및 재생 활성 분석 및 활용연구

### 1. 김정옥수수 polyphenol의 췌장 베타세포 보호활성 및 기전을 2형 당뇨병모델인 db/db mouse 분석

- 2형 당뇨병모델인 db/db mouse에 김정옥수수 polyphenol을 7주간 섭취시키고, 혈당, insulin, 당화혈색소, 경구당내성을 분석한 결과 현재 처방되고 있는 Glimpiride보다 모든 면에서 우수한 것으로 나타났음

### 2. 췌장에서 ROS(활성산소), 세포사, 세포성장 및 세포사 관련 단백질 분석

- 췌장 메타세포 박편을 anti-insulin antibody로 염색한 결과 김정옥수수 polyphenol을 섭취시킨 db/db mouse에서는 메타세포가 죽지 않고 살아있었고 대조군이나 Glimpiride처리군에서는 메타세포가 많이 죽어있는 것을 발견하여 김정옥수수 polyphenol이 췌장 메타세포 보호효과가 우수하다는 것을 발견하였음

### 3. 마우스에서 기초 독성 검사

- 2형 당뇨병모델인 db/db mouse에 Purple Corn Polyphenols (10mg/kg/day)을 경구로 7주간 투여 후에 행동양상 관찰, 각 장기의 상태를 육안으로 분석한 결과 독성이 없음을 확인

### 4. STZ로 췌장을 손상시킨 ICR mouse에서 김정옥수수 polyphenol의 췌장메타세포 보호 활성 및 기전 분석

- 당화혈색소(HbA1c) 측정, 혈중 인슐린 농도 측정, 췌장부게 측정, 경구 내당능검사(OGTT)
- 8주간 섭취 후 STZ-당뇨군 및 STZ-양성대조군(glimpiride)에 비해 STZ-실험군(김정옥수수 추출물)에서 다소 통계적으로 유의하게 당화혈색소가 감소하였으며, 내당능검사 (OGTT)에서 혈당강화효과가 우수하였으며, 혈중인슐린 농도가 다른 군에 비해 다소 증가한 것으로 보였으나 통계적 유의성은 없었음

### 5. 김정옥수수 폴리페놀의 당뇨치료 효능 분석 및 기능성 식품화를 위한 기초 안전성 평가

- 대조군(무처리군), 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물, 국내산 김정옥수수 추출물 HP20을 8주간 db/db mouse에 처리 시 공복혈당 지하 효과는 페루산 10% 추출물, 국내산 김정옥수수 추출물 HP20을 10mg/kg/day 처리한 군이 피니톨 (100mg/kg/day), 자누비아 (280mg/kg/day) 처리군과 유사하였음. 페루산 10% 추출물, 국내산 김정옥수수 추출물 HP20이 피니톨에 비해 10배, 자누비아에 비해 28배의 적은량으로도 유사한 혈당지하효과를 갖는다는 것을 밝혔음
- OGTT(경구내당능), 당화혈색소(HbA1C)는 자누비아가 가장 우수하였으며, 피니톨과 페루산

10% 추출물, 국내산 김장옥수수 추출물 HP20 처리군은 유사하게 감소활성이 다소 약하였으나 상대적인 처리농도가 28배나 낮아서 비교하기는 어렵다.

- 대조군(부처리군), 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물, 국내산 김장옥수수 추출물 HP20의 8주처리 후 췌장, 간, 신장, 신장, 췌장의 부계에서 차이는 나타나지 않았으며, 육안상의 색깔이나 외양의 차이를 볼수 없었으며, ALT, AST, BUN의 차이가 없어서 간 및 신장 독성이 없다는 것을 보여주었음

- 국내산 김장옥수수 추출물 HP20은 혈액내 LDL-Cholesterol을 증가시켰으나 total cholesterol은 크게 변화시키지 않았으며, 오히려 TG(triacy glycerol)를 대조군과 같은 농도로 유지시켰음. 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물은 대조군 (untreated)에 비해 LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, total cholesterol의 혈액 내 농도를 변화시키지 않았으나, TG의 농도는 상당히 감소시켰음.

#### 6. 메타세포배양에서 김장옥수수 polyphenol의 혈당강하 및 세포보호 기전연구

- 췌장 islet을 anti-insulin antibody로 면역염색화학적 분석 결과 PCV(김장옥수수 10% polyphenol) 처리군에서는 약 80%이상의 세포가 insulin을 발현하는 세포도 확인되어 췌장메타세포 보호효과가 우수함을 보여주었음.

## 당뇨합병증으로 인한 활성손상과 사구체경화의 퇴치를 위한 김장옥수수 소재개발

### 1. 고혈당에 의한 사구체경화에 대한 김장옥수수의 효능

- 33mM 포도당으로 처리된 mesangial cell condition medium에서 배양된 혈관내피세포는 VCAM-1, E-selectin, integrin $\beta$ 1의 발현을 상당히 촉진함
- VCAM-1, E-selectin, integrin $\beta$ 1은 JAK family인 Tyk2에 의해 발현이 증가하는 것을 확인함

### 2. 사구체 섬유증에 대한 김장옥수수의 in vivo 억제효능

- 고혈당으로 인한 신장 당뇨합병증에서 mesangium의 팽창으로 인한 신장 경화증에 김장옥수수 추출물은 억제 효과가 있는 것으로 확인함
- 김장옥수수 추출물은 IL-8-Tyk2-STAT으로 이어지는 염증성 signaling을 억제하고, 사구체에서 염증과 관련한 세포들의 침윤과 부착을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인함

### 3. 사구체 경화와 신성 염증반응에 대한 김장옥수수의 in vivo 억제효능

- 김장옥수수 추출물은 사구체 내피세포에서 leukocyte recruitment와 adhesion을 억제하는 효과가 있는 것을 확인함
- 김장옥수수 추출물은 사구체에서 염증과 관련하여 대식세포들의 침윤과 신장 염증을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인함

## 임상시험 (단기 및 장기)

### 1. 정상인에서 단기 경구내당능 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석

▪ 분석결과 A군 및 C군에 비해 B군에서 95%신뢰도로 통계적으로 유의성있게 glucose 투여 후 120분에서 혈당 강하 효과가 나타났으며, 이는 김정옥수수 안토시아닌추출물이 정상인에서 처방약인 metformin보다 혈당강하효과가 있음을 보여줌

### 2. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 경구내당능 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석

▪ 8주간 섭취시킨 후 장기 경구내당능 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석결과 A군 및 C군에 비해 B군에서 95%신뢰도로 통계적으로 유의성있게 glucose 투여 후 120분에서 혈당 강하 효과가 나타났으며, 이는 김정옥수수 안토시아닌추출물이 정상인에서 처방약인 metformin보다 혈당강하효과가 있음을 보여줌

### 3. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 당화혈색소혈중인슐린농도 및 혈당 분석

▪ 8주간 섭취시킨 후 혈중 당화혈색소(HbA1c), 인슐린농도 및 혈당을 분석한 결과 당화혈색소 및 혈당은 정상인이어서 변화가 없었으나 혈중인슐린 농도는 김정옥수수 안토시아닌 추출물 투여군에서 다소 높았으나 개체 간 표준편차가 높아 통계적 유의성은 없었음

### 4. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 체중, 허리둘레 및 혈압의 분석

▪ 8주간 섭취시킨 후 체중, 허리둘레 및 혈압을 분석한 결과 통계적으로 유의성이 있는 차이를 나타내지 않았음

### 5. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 혈중 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, tryglyceride를 분석

▪ 8주간 섭취시킨 후 혈중 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, tryglyceride를 분석한 결과 통계적으로 유의성이 있는 차이를 나타내지 않았음

### 6. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 부작용 분석

▪ 8주간 섭취시킨 후 부작용을 분석한 결과 특별한 부작용을 보여주지 않았음

### 7. 정상인에 각 군당 20명씩 A군(cellulose 300 mg) B군(김정옥수수 polyphenol 추출물 300 mg) C군(Metformin 300 mg)을 단기 및 장기(8주간) 투여하면서 여러 인자를 측정한 결과 B군(김정옥수수 polyphenol 추출물 300 mg)에서 단기 및 장기 내당능검사 (Oral Glucose

Tolerance Test)의 혈당강하효과가 통계적으로 유의성있게 나타나서 김장옥수수 polyphenol 추출물의 혈당강하 효능을 확인할 수 있었음

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 당뇨병성 신장심유증 억제용 천연물신약 개발을 위한 김장옥수수추출물 소재 활용이 가능 할 것으로 보이며, 지식재산권 확보하였으며, 현재 합병증 치료제 니비, 신규 천연물소재로 적절한 후보로 판단됨.

◎ 김장옥수수추출물을 함유하는 당뇨병성 신장심유증 억제용 조성물, 등록번호 : 1010635240000

2. 효능극대화의 기술적인 배경과 효능 평가부분의 객관적 자료 활용을 위한 특허화

3. 혈당조절용 건강기능식품소재로의 개발을 위한 단기 및 장기 임상시험 결과를 바탕으로 개별인정 건강기능식품 원료 신청 및 캡슐제품개발 내용 활용한 품목제조신고로 신속한 상품화 가능.

4. 2012년 개별인정 건강기능식품 원료 신청예정

5. 김장옥수수로부터 유래된 안토시아닌 추출물과 분획물의 당뇨병성 혈관성 질환의 예방과 개선을 위한 제품개발로 효능을 지닌 고소득 작물로서 김장옥수수 재배농장의 활성화와 농가 소득증대

6. 김장옥수수의 가공과정개선으로 유효성분이 증가된 공법의 개발로 일반 옥수수 대체비율 상승

7. 새로운 기능성소재 및 신약개발로 수입대체의 효과와 국내외 수출의 판로개척

8. 당뇨병 및 당뇨병성 신장심유증의 예방과 개선에 대한 효능에 인각하여 한의학과 약학 관련 산업발전 및 국민건강증진을 가져오게 되고, 이들 질환의 유발을 현저히 감소시키는 효과를 얻어 국민건강 차원의 의도비 실감이라는 경제적 사회적 이득을 기대

9. 본 연구성과를 토대로 지속적 연구수행으로 궁극적으로 임상시험을 성공적으로 통과하여 신규 2형 당뇨치료제로 개발될 경우 새로운 약제로 수입대체 효과 뿐 아니라 현재 시판되는 약제보다 활성이 우수한 당뇨치료제로서 세계시장에서 막대한 부를 창출할 수 있을 것으로 기대

## SUMMARY

### I. Title

Development of Materials for Prevention of Diabetes and It's Complications from Purple Corn Polyphenol

### II. Scope & Contents

1. Optimization of Extraction Conditions of Anthocyanins from *Zea mays* L. by Response Surface Methodology
2. Aldose Reductase Inhibitory Activity of the compounds from the *Zea mays* L.
3. Protein tyrosine phosphatase 1 $\beta$  (PTP1 $\beta$ ) inhibitory compounds from *Zeamays*L.
4. Purple corn anthocyanins dampened high-glucose-induced mesangial fibrosis and inflammation : possible renoprotective role in diabetic nephropathy
5. Purple corn anthocyanins retard diabetes-associated glomerulosclerosis in mesangial cells and db/db mice

### III. Results

1. Optimization of Extraction Conditions of Anthocyanins from *Zeamays*L. by Response Surface Methodology

Extraction characteristics of Purple corn (*Zeamays*L.) and functional properties of corresponding extract were monitored by response surface methodology (RSM). The experiment was carried out in accordance with a central composite design (CCD) five level and four variable approach. The optimum combination of solvent concentration (Ethanol and acid), extraction temperature and time for the maximum extraction of phenolic compounds, Response of

phenolic compounds such as total poly phenol content (TPC) and total anthocyanins content (TAC) were determined by the spectrophotometer assay.

The maximum extraction yield of 10.33% was obtained under the specific extraction conditions, such as extraction temperature 58.87°C, extraction time 7.53 hr, solvent concentration 32.31%, and solvent volume 17.65 (1:V). The maximum TPC was 7.89 mg/g at 29.29°C, 8.99 hr, 33.67%, and 10.25 (1:V). Also, The maximum TAC was 82.44 mg/l. at 45.22°C, 7.85 hr, 34.14%, and 22.97 (1:V). Base on superimposition of three dimensional RSM with respect to extraction yield, TPC, and TAC obtained under the various extraction conditions, the optimum ranges of extraction conditions were found to be extraction temperature of 30-60°C, extraction time of 7.5-9.0 hr, solvent concentration of 32-34%, and solvent volume of 10-20 (1:V). At the random conditions (40°C, 8hr, 33% EtOH, 1:15 solvent volume) within the optimum extraction ranges, yield, TPC, and TAC were predicted as 5.76%, 4.58 mg/g, and 42.28 mg/l., respectively.

## 2. Aldose Reductase Inhibitory Activity of the compounds from the ZeamaysL.

7 phenolic compounds (compounds 1-7) and 8 anthocyanins (compounds 1-8) were isolated. These compounds were investigated via rat lens aldose reductase (RLAR) inhibitory assays. hirsutrin showed most potent RLAR inhibitory potency with IC50 values of 4.78µM. The refore, the Zea mays L.-derived hirsutrin may have a potential therapeutics against diabetic complication.

## 3. Protein tyrosine phosphatase 1β (PTP1β) inhibitory compounds from ZeamaysL.

To search for new types of PTP1β inhibitors, bioactivity-guided isolation and purification of the EtOAc and BuOH soluble fraction of ZeamaysL.Ethanol extract, using an invitro PTP1β inhibitory assay. In an attempt to identify bioactive components, five anthocyanins (cyanidin 3 glucoside, pelagonidin 3 glucoside, peonidin 3 glucoside, cyanidin 3-(6''-malonylglucoside), peonidin 3-(6''-malonylglucoside)), seven polyphenols (protocatechuic acid, vanillic acid, 2,4,6-trihydroxy benzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, ferulic acid, hirsutrin, 3'-methoxyhirsutrin) were isolated and the chemical structures there in were elucidated on the basis of spectroscopic evidence and comparison with published data.

These components were investigated PTP1β activity assays, cyanidin 3-(6''-malonylglucoside), and 3'-methoxyhirsutrin showed most potent PTP1β inhibitory potency with 42.06 and 64.04 µM respectively. As a result, this compound could be offered as a leading compound for further study as a new natural products drug for diabetes mellitus.

#### 4. Purple corn anthocyanins dampened high-glucose-induced mesangial fibrosis and inflammation : possible renoprotective role in diabetic nephropathy

Purple corn has been classified as a functional food rich in anthocyanins possessing potential disease-preventive properties. This study examined whether purple corn anthocyanins (PCA) mainly comprised cyanidin 3-glucoside and cyanidin-3-(6''-malonylglucoside) can attenuate high-glucose (HG)-promoted mesangial cell (MC) proliferation and matrix accumulation, major features of diabetic glomerulosclerosis. Human renal MC were cultured for 3 days in media containing 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or media containing 33 mM glucose in the absence and presence of 1-20 µg/ml PCA. The HG exposure of MC caused substantial increases in connective tissue growth factor (CTGF) expression and collagen IV secretion with mesangial hyperplasia, which were repealed by adding PCA. PCA boosted HG-plummeted membrane type-1 matrix metalloproteinase expression and dampened HG-elevated tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 expression through disturbing transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )-SMAD signaling, facilitating extracellular matrix degradation. This study further revealed that PCA ameliorated HG-inflamed mesangial inflammation accompanying induction of intracellular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) responsible for CTGF expression. The induction of intracellular cell adhesion molecule-1 and MCP-1 was mediated via TGF- $\beta$  signaling, which was suppressed by PCA. In addition, the HG-promoted CTGF expression entailed nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling involved in MCP-1 transcription. The HG - TGF- $\beta$  induction was blocked in the presence of a NF- $\kappa$ B inhibitor, and the nuclear NF- $\kappa$ B translocation was blunted by a TGF  $\beta$  receptor 1 inhibitor. PCA dampened NF  $\kappa$ B translocation in HG exposed MC. These results demonstrate that there was a crosstalk between TGF- $\beta$ -SMAD and NF- $\kappa$ B pathways in the diabetes-associated mesangial fibrosis and inflammation, which appeared to be severed by PCA.

#### 5. Purple corn anthocyanins retard diabetes associated glomerulosclerosis in mesangial cells and db/db mice

Purpose Diabetic glomerulosclerosis is the hardening of the renal glomeruli that can lead to kidney failure. In the early stage of glomerulosclerosis occur renal mesangial expansion and renal filtration dysfunction. Purple corn has been classified as a functional food and is rich in anthocyanins exerting potential disease-preventive activities. The in vitro study using human renal mesangial cells examined that anthocyanin-rich purple corn butanol fraction (PCB) can attenuate high glucose

(HG)-promoted mesangial cell proliferation and matrix accumulation. Methods Cells were cultured for 3 days in media containing 33 mM glucose in the presence of 1-0 Ig/ml PCB. In the in vivo animal study, db/db mice were treated with 10 mg/kg anthocyanin rich polyphenolic extracts of purple corn (PCE) for 8 weeks. Results HG enhanced mesangial production of the fibrosis biomarkers of collagen IV and connective tissue growth factor (CTGF), which was markedly attenuated by adding PCB. Such mesangial fibrosis entailed interleukin-8 activation via eliciting Tyk2-STAT signaling pathway. PCB dampened HG-promoted mesangial hyperplasia that appeared to be attributed to increased expression of platelet-derived growth factor. The 8-week administration of PCE lowered plasma glucose level of db/db mice and ameliorated severe albuminuria. Moreover, PCE lessened collagen fiber accumulation in kidney glomeruli and CTGF expression via retarding TGF- $\beta$  signaling. Protein expressions of nephrin and podocin, key proteins for filtration barrier function of the glomerular capillary wall, were repressed by treating mice with PCE. Conclusion Purple corn may be a potent therapeutic agent for the treatment for diabetes-associated glomerulosclerosis accompanying proteinuria and kidney filtration dysfunction.

# CONTENTS

CONTENTS.....	2
SUMMARY.....	-18
CONTENTS.....	22
Chapter 1. Introduction on the project.....	28
Section 1. Aim to research.....	28
Section 2. Need for research.....	28
1. Society needs.....	-28
2. Economy, industry needs.....	-29
3. Technology needs.....	30
Section 3. Scope of research.....	31
Chapter 2. Present state of technological development.....	-39
Section 1. State of technological development.....	-39
Section 2. State of market development.....	40
1. Overseas.....	-40
2. Domestic.....	-41
Chapter 3. Results and discussion.....	42
Section 1. Materials and methods.....	42
1. Materials .....	-42
2. Analytical HPLC patterns and measurement total polyphenol content...	-42
3. Structural elucidation.....	-43
4. in vivo antidiabetes.....	-43
5. in vivo antidiabetic complications.....	-43
6. Prediction of optimum extraction conditionby using RSM.....	-44
7. Selection of great species purple corn.....	-47
8. Effect of purple corn extract against diabetic and protective pancreatic cells in type 2 diabetic db/db mice.....	49

9. Antidiabetes activities of purple corn polyphenol of STZ-mouse.....	49
10. Measurement of safety.....	50
11. Studies of purple corn extract reducing blood glucose and protective mechanism of beta cells.....	50
12. Purple corn retard diabetes-associated glomerulosclerosis in mesangial cells.....	50
13. Purple corn dampened high-glucose-induced mesangial fibrosis and inflammation : possible renoprotective role in diabetic nephropathy. ....	51
14. Purple corn alleviates diabetes-associated glomerular monocyte activation and macrophage infiltration.....	52
15. Clinical trial.....	53
16. Measurement of stability.....	54
17. Setting Standards and Specifications.....	55
18. Make trial product.....	55
Section 2. results and discussion.....	56
1. Analytical HPLC patterns and measurement total polyphenol content.....	56
2. Structural elucidation.....	57
3. in vivo antidiabetes.....	65
4. in vivo antidiabetic complications.....	67
5. Prediction of optimum extraction condition by using RSM.....	71
6. Selection of great species purple corn.....	77
7. Effect of purple corn extract against diabetic and protective pancreatic cells in type 2 diabetic db/db mice.....	<b>95</b>
8. Antidiabetes activities of purple corn polyphenol of STZ-mouse.....	99
9. Measurement of safety.....	<b>102</b>
10. Studies of purple corn extract reducing blood glucose and protective mechanism of beta-cells.....	110
11. Purple corn retard diabetes-associated glomerulosclerosis in mesangial cells.....	113
12. Purple corn dampened high glucose induced mesangial fibrosis and inflammation : possible renoprotective role in diabetic nephropathy. ....	125
13. Purple corn alleviates diabetes-associated glomerular monocyte activation and macrophage infiltration.....	129
14. Clinical trial.....	140
15. Measurement of stability.....	146
16. Setting Standards and Specifications.....	<b>147</b>
17. Make trial product.....	147
Chapter 4. Achievement rate of study and contribution of similar field.....	150

Section 1. Achievement rate of study.....	-150
1. Achievement rate of study: 1st phase.....	150
2. Achievement rate of study: 2nd phase.....	152
3. Achievement rate of study: 3rd phase.....	153
Section 2. Contribution rate of similar field in technological development.....	-157
Chapter 5. Outcome of study results.....	-159
Section 1. Outcome.....	159
Section 2. Application plan of the outcome.....	169
Chapter 6. Information of overseas scientific research trend.....	171
Chapter 7. References.....	-173

# 목 차

제 출 문.....	1
요 약 분.....	2
SUMMARY.....	18
CONTENTS.....	-22
목 차.....	-25
제 1 장 연구개발과제의 개요.....	28
제 1 절 연구개발의 목적.....	-28
제 2 절 연구개발의 필요성.....	-28
1. 사회적인 필요성.....	28
2. 경제 • 산업적 필요성.....	29
3. 기술적인 필요성.....	30
제 3 절 연구내용 및 범위.....	31
1. 연차별 연구개발의 목표 및 내용.....	-31
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	39
제 1 절 국내 • 외 기술개발현황.....	39
제 2 절 국내 • 외 시장현황.....	40
1. 국내 시장 현황.....	40
2. 국외 시장 현황.....	41
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	-42
제 1 절 재료 및 연구방법.....	-42
1. 재료.....	42
2. HPLC Pattern 분석 및 총 Polyphenol 함량 측정.....	42

3. 김정옥수수 구조 동정.....	43
4. 항당뇨 효과측정.....	-43
5. 항당뇨합병증효과 측정.....	-43
6. 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용한 최적의 추출조건 확립.....	44
7. 우수종 선별.....	-47
8. 김정옥수수 polyphenols의 항당뇨활성 및 췌장세포보호 효과를 2형 당뇨병 모델 동물인 db/db mouse에서 분석.....	-49
9. STZ-mouse에서 김정옥수수 폴리페놀의 당뇨치료 효능 분석.....	-49
10. 안전성 평가.....	-50
11. 베타세포배양에서 김정옥수수 polyphenol의 혈당강하 및 세포보호 기전연구.....	50
12. 고혈당에 의한 사구체 경화에 대한 김정옥수수 추출물의 억제능.....	-50
13. 고혈당에 의해 유도된 사구체 섬유증에 대한 김정옥수수의 억제효능.....	-51
14. 사구체 경화와 당뇨병성 신장병증의 염증반응에 대한 김정옥수수의 억제효능.....	-52
15. 임상시험 .....	-53
16. 안정성 평가.....	-54
17. 기준규격 설정.....	-55
18. 시제품 제작.....	-55
제 2 실 연구결과.....	-56
1. HPLC Pattern 분석 및 총 Polyphenol 함량 측정.....	-56
2. 김정옥수수 구조 동정.....	-57
3. 항당뇨 효과측정.....	65
4. 항당뇨합병증효과 측정.....	67
5. 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용한 최적의 추출조건 확립.....	-71
6. 김정옥수수 우수종 선별.....	-77
7. 김정옥수수 polyphenols의 항당뇨활성 및 췌장세포보호 효과를 2형 당뇨병 모델 동물인 db/db mouse에서 분석.....	95
8. STZ-mouse에서 김정옥수수 폴리페놀의 당뇨치료 효능 분석.....	-99
9. 안전성 평가 .....	102
10. 베타세포배양에서 김정옥수수 polyphenol의 혈당강하 및 세포보호 기전연구.....	-110
11. 고혈당에 의한 사구체 경화에 대한 김정옥수수 추출물의 억제능.....	-113
12. 고혈당에 의해 유도된 사구체 섬유증에 대한 김정옥수수의 억제효능.....	-125
13. 사구체 경화와 당뇨병성 신장병증의 염증반응에 대한 김정옥수수의 억제효능.....	-129
14. 임상시험.....	-140
15. 안정성 평가.....	-146
16. 기준규격 설정.....	-147
17. 시제품 제작.....	-147

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	150
제 1 절	실 연구개발 목표의 달성도.....	150
1.	1차년도 연구개발목표에 대한 달성도.....	150
2.	2차년도 연구개발목표에 대한 달성도.....	152
3.	3차년도 연구개발목표에 대한 달성도.....	153
제 2 절	실 관련분야의 기술발전에의 기여도.....	157
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	159
제 1 절	실 연구개발 성과.....	159
제 2 절	실 성과 활용계획.....	169
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	171
제 7 장	참고문헌.....	173

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

당뇨병은 인슐린의 부족으로 혈액 중의 포도당(혈당)이 정상인보다 그 농도가 높아져서 소변에 포도당을 배출하는 만성질환으로 국내에서도 현재 최소 500만명의 환자 추정되며, 당뇨병으로 인한 사망률은 Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 국가 중 최고 수준이며 현재 우리나라의 사망원인 중 4위로 올라섰다. 이 병의 사회적비용도 만만찮은데 국민건강보험 총 진료비의 20%를 차지하며 이 병에 걸린 환자의 1인당 평균 진료비는 일반인의 3배에 달하고 있으며, 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 당뇨병은 그 자체로도 심각한 질병이지만, 치료되지 않은 상태로 지속되면 신경장애, 신장질환, 안질환 및 심혈관계 질환과 같은 합병증을 초래하며 이로 인해 하지절단, 말기 신부전증, 시력상실, 심근경색 및 결국 사망을 초래한다.

따라서 본 연구는 견정옥수수로부터 당뇨 및 당뇨합병증을 억제할 수 있는 단일분질을 확보하고, 기전을 통해서 당뇨 및 당뇨합병증 억제 기능이 나타나는지 규명하여, 당뇨 및 당뇨합병증 질환을 억제, 치료 할 수 있는 고기능성 소재를 개발하는데 있어서 기반이 되는 연구를 수행하고자 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 사회적인 필요성

◆ 당뇨병은 인슐린의 부족으로 혈액 중의 포도당(혈당)이 정상인보다 그 농도가 높아져서 소변에 포도당을 배출하는 만성질환

◆ 국내에서도 현재 최소 500만명의 환자 추정

- 당뇨병으로 인한 사망률은 Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 국가 중 최고 수준이며 현재 우리나라의 사망원인 중 4위로 올라섰음

이 병의 사회적비용도 만만찮은데 국민건강보험 총 진료비의 20%를 차지하며 이 병에 걸린 환자의 1인당 평균 진료비는 일반인의 3배에 달함

◆ 당뇨병 등의 성인병은 지속적인 관리를 통해 개선 가능한 질환이나 이로 인한 국가차원의 경제적인 손실 또한 매년 의료비, 생산액 손실비를 포함해 매년 증가하는 추세

◆ 개발기술은 직접적인 가치보다는 국민 삶의 질 향상, 건강한 삶의 유지, 의료비 절감 등 간접적인 가치가 크기 때문에 국가차원에서 관심과 지원이 필요한

◆ 인류수명 증가 및 서구화 생활패턴의 변화에 의해 성인병 당뇨병의 발병률이 급증하고 있음.

- 현재 세계인구의 5% 정도 (2억명)

- 미국, 유럽 및 일본의 당뇨병 환자는 현재 약 2,600만명에서 2007년에는 약 3,500만명으로 증가예상

◆ 당뇨병은 그 자체로도 심각한 질병이지만, 치료되지 않은 상태로 지속되면 신경장애, 신장 질환, 안질환 및 심혈관계 질환과 같은 합병증을 초래하며 이로 인해 하지절단, 말기 신부전증, 시력상실, 심근경색 및 결국 사망을 초래함.

- 심장순환계 관련 질환의 위험률이 2-4배 증가

- 신부전증 환자의 40%가 당뇨병에 기인

- 족부전단의 50%가 당뇨 합병증에 기인

- 시력상실의 50%가 당뇨병에 기인

◆ 신장병증 역시 매우 흔하여 당뇨병 합병증의 가장 중요한 사망 원인으로 꼽히고 있음.

당뇨병 환자는 정상인에 비해 신부전증의 위험이 약 20배 높은 것으로 확인.

- 신장합병증은 과다한 알도스 환원효소 또는 산화적 스트레스에 의해 유발되는 것으로 보고되고 있음.

◆ 이와 같이 막대한 사회적인 • 경제적 손실을 초래하는 당뇨, 당뇨합병증과 같은 질환을 예방하는 차원에서 무작용이 없는 식품으로 해결할 수 있다면 국민건강과 건강한 삶의 유지에 엄청난 파급효과를 가져올 것으로 보임

## 2. 경제 • 산업적 필요성

◆ 당뇨병 치료제의 세계시장 규모는 2000년에 약 88억불이었으며, 매년 10% 증가 추세에 있어 2020년에는 약 200억불에 달할 것으로 예상된다.

◆ 당뇨와 관련해 지출된 식간접 경비 규모가 매년 1,300억불에 달하며, 사망원인 4위에 랭크되어 있음.

◆ 국내의 경우 1999년 약 300억원의 치료제 시장을 갖는 것으로 보고되었음.

### 3. 기술적인 필요성

- ◆ 현재 성인형 당뇨병의 치료방법으로 식사요법, 운동요법, 인슐린 치료와 더불어 sulfonlurea제, biguanide제,  $\alpha$ -glucosidase 억제제, thiazolidinedione계 약물등이 사용되고 있음. 그러나 이들 약물의 부작용이 보고되고 있으며, 당뇨병 환자의 50% 이상이 현재 상용중인 약물로는 치료효과가 별로 없는 실정임.
- ◆ 많은 약물들이 간독성, 심장독성, 비만, 부종 등의 부작용이 있어 새로운 당뇨병 치료제의 개발이 시급한 실정임.
- ◆ 성인형 당뇨병의 다양한 병인과 병리학적 특성의 복합성 및 심장순환계와 같은 다른 성인형 질환 발병과의 연계성 때문에 새로운 당뇨병 치료제 개발의 중요성이 급격히 부각되고 있음.

### 제 3 절 연구내용 및 범위

#### 1. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	김정옥수수의 polyphenol 분리/분 석 및 in vitro 당도 및 당뇨합병 증 억제능 평가	김정옥수수 추출물의 추출조건 확립 및 in vitro 항당뇨 및 당뇨합병증에 대한 활성평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>활성분획물의 최적의 추출조건 확립</li> <li>in vitro 항당뇨 및 당뇨합병증 활성평가</li> </ul>
		김정옥수수 성분 및 활성 비교 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내 개발 김정옥수수 종자의 기초 활성 비교분석</li> <li>LC-MS/MS를 이용한 안토시아닌 성 분 구명 및 HSCCC로 김정옥수수 주요 안토시아닌 성분 분리</li> <li>Polyphenolic 추출 분획물에 대한 TLC, HPLC, MPLC 등으로 분리</li> </ul>
	김정옥수수의 poly phenol의 웨장메 다세포 보호 및 재생 활성 분석 및 활용연구	김정옥수수 polyphenol의 웨장 메다세포 보호활성 및 기전을 2 형 당뇨모델인 db/db mouse에 서 분석함 - 혈당, insulin, 당화혈색소, 경구내당능 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>2형 당뇨모델인 db/db mouse에 김정옥수수 polyphenol을 7주간 섭 취시키고, 혈당, insulin, 당화혈 색소, 경구내당능을 분석한 결과 현재 처방되고 있는 Glimpiride 보다 모든 면에서 우수한 것으로 나타났음</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>웨장에서 ROS(활성산소), 세 포사, 세포성장 및 세포사 관 련 단백질 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>웨장메다세포박편을 anti-insul in antibody로 염색한 결과 김정 옥수수 polyphenol을 섭취시킨 db/ db mouse에서는 메다세포가 죽지 않고 살아있었고 대조군이나 Glim piride 처리군에서는 메다세포가 많이 죽어있는 것을 발견하여 김 정옥수수 polyphenol이 웨장 메다 세포 보호효과가 우수하다는 것을 발견하였음</li> </ul>
	김정옥수수의 당	김정옥수수 추출물의 신성 당	김정옥수수 안토시아닌 성분의 신

노 및 당뇨합병증 의 건강기능식품 소재로서의 역할 규명 및 개발	노합병증에서 유래한 사구체경 화 억제능 조사	장 mesangial cell의 증식에 대한 효 과 ▪ mesangium의 결체조직성장인자와 matrix의 생성
	김징옥수수 추출물의 신성 당 노합병증에서 유래한 사구체경 화 억제능 기전연구	▪ 신성 당뇨에서 김징옥수수 안토 시아닌 성분의 사구체경화 억제능 에 대한 기전 조사

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	김 정 옥 수 수 의 polyphenol 분리/ 분석 및 in vitro 당도 및 당도합병 증 억제능 평가	활성과 연계된 김정옥수수 우수 종 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>1차년도에서 선발된 우수종을 교잡하여 재배된 207종의 김정옥수수를 향산화, polyphenol 함량, 항당도합병증 활성 등의 효능이 있는 각 활성별 우수종을 선발</li> </ul>
		활성을 갖는 Polyphenol 성분의 분리 및 구조규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>안토시아닌 이외의 항당도합병증 활성을 갖는 polyphenol 화합물을 Hplc 및 mpic로 분리하여 NIR 및 MS로 구조를 규명</li> </ul>
		단리화합물에 대한 활성평가 및 추출성분 분량	<ul style="list-style-type: none"> <li>Polyphenol 성분에 대한 알도스 환원효소 억제효능, 최종당화산물 억제효능, 단백질 다이도신 탈 인산화 효소 억제효능을 평가하여 활성 성분을 규명</li> </ul>
	김 정 옥 수 수 의 polyphenol의 웨 장메타세포 보호 및 재생 활성 분 석 및 활용연구	STZ로 췌장을 손상시킨 ICR mouse에서 김정옥수수 poly phenol의 웨장메타세포 보호 활성 및 기전을 분석함	<ul style="list-style-type: none"> <li>혈당, 당화혈색소(HbA1c), 경구내당능 분석(Oral glucose tolerance test, OGTT)</li> <li>혈중 insulin 농도 측정, 췌장 무게 측정</li> </ul>
	김정옥수수의 당 도 및 당도합병증 의 건강기능식품 소재로서의 역할 규명 및 개발	김정옥수수 추출물의 신성 당뇨 합병증에서 유래한 사구체경화 억제기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> <li>염증반응과의 연결고리</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>김정옥수수 안토시아닌 성분의 고혈당에 의한 염증인자 ICAM-1과 MCP 1 생성 조사</li> <li>각 김정옥수수 추출물의 사구체경화에 대한 효능 탐색</li> </ul>
		김정옥수수 추출물의 신성 당뇨 합병증에서 유래한 동맥경화증 억제능 및 혈관신생작용에 대한 효능	<ul style="list-style-type: none"> <li>김정옥수수 butanol추출물의 신성 동맥경화증 초기단계 조사</li> <li>신성당뇨에 의한 혈관신생작용 조사</li> </ul>
	임상시험: 혈당조절용 건강 기능식품소재로의 개발을 위한 임상 시험	다수의 정상인을 대상으로 단기 및 장기(8주에 걸쳐) 혈당 강하 능을 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>2형 당뇨치료제인 metformin과 혈당 강하능을 비교 분석</li> </ul>
		임상시험계획서의 작성 및 한림 대 춘천성심병원 IRB 심사	<ul style="list-style-type: none"> <li>한림대춘천성심병원 내분비내과 류옥현 교수 주관으로 김정옥수수 polyphenol 추출물의 정상인에서 혈당조절효과에 대한 임상시험계</li> </ul>

			<p>획서를 작성하였으며, 한림대 춘천성심병원 IRB 심사를 통과하여 임상시험이 실시되었음</p>
		<p>김정옥수수 polyphenol 추출물 캡슐 제조</p>	<p>▪ 김정옥수수 polyphenol 추출물 파우더를 구입하여 춘천바이오산업진흥원의 GMP시설을 활용하여 캡슐(500 mg)을 제조하였음</p>
		<p>단기 임상시험</p>	<p>각 군당 20명 건강인(공복혈당 120이하) 에 캡슐을 투여하고 포도당 75g을 투여한 다음 30분, 60분, 90분, 120분에 혈당변화를 측정함</p> <p>▪ 음성대조군(cellulose 300mg 캡슐)</p> <p>▪ 양성대조군(Metformin 300 mg 캡슐)</p> <p>▪ 실험군(김정옥수수 polyphenol 300 mg 캡슐)으로 나누어 실험수행</p>
		<p>장기 임상시험</p>	<p>▪ 각 군당 20명 건강인(공복혈당 120이하)에 매일 아침 식후 1캡슐 투여하는 방법으로 8주간 지속하였음.</p> <p>▪ 8주후 포도당 75g을 투여한 다음 30분, 60분, 90분, 120분에 혈당 변화를 측정함</p> <p>▪ 음성대조군 (cellulose 300mg캡슐)</p> <p>▪ 양성대조군 (Metformin 300mg캡슐)</p> <p>▪ 실험군(김정옥수수폴리페놀 300 mg캡슐)으로 나누어 실험수행</p>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	길정옥수수의 polyphenol 분리/ 분석 및 in vitro 당도 및 당도함량 증 억제능 평가	활성추출분획물의 구조동정 및 대량 추출법 확립 / 활성성분 분양	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 세부과제에서 우수한 활성을 갖는 성분에 대해 칼럼크로마토그래피, TIC 및 HPLC, MPLC, CPC 등으로 추출물을 분리하여 세부과제에 분양하여 활성을 확인</li> <li>▪ 2차년도에서 규명하지 못한 polyphenol 화합물을 NMR, UV, MS, IR 등의 분석기기를 이용하여 화합물 구조를 규명</li> </ul>
		제품의 안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 장기보존 시험: 저장조건에서 사용 기한을 설정하기 위하여 장기간에 걸쳐 물리적, 완전성, 화학적, 미생물학적 안정성 및 내용물과 용기의 적합성에 대하여 제형에 따른 적절한 기준 및 시험방법과 시험조건에서 시험</li> </ul>
	증 억제능 평가	시제품 제작 및 제품/산업화 방안 강구(제형연구, 캡슐제 작, 봉해도 시험)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ polyphenol 분획물에 부형제 (microcrystalline cellulose 등)등을 넣어 제조방법에 따라 캡슐을 제조</li> <li>▪ Capsule 제제의 봉해도 시험 -1분간에 29~32회 왕복, 진폭 53~57 mm 상하로 운동 시험기 비커에 넣는 시험액의 양은 시험기가 가장 위로 올라왔을 때 시험기의 망면이 액면 아래로 15 mm이상 떨어지도록 하고 가장 아래로 내려갔을 때 비커의 바닥으로부터 25 mm 이상으로 시험기가 완전히 잠기지 않도록 함.</li> </ul>
길정옥수수의 polyphenol의 웨 장메다세포 보호 및 재생 활성 분 석 및 활용연구	메다세포배양에서 길정옥수수 polyphenol의 혈당강하 및 세 포보호 기전연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ins-1 웨장메다세포배양에서 cytokines (human IL-1: <math>1 \mu\text{g}/\text{l}</math>, IL-6: <math>5 \mu\text{g}/\text{l}</math>, TNF-<math>\alpha</math>: <math>5 \mu\text{g}/\text{l}</math>) 이나 palmitate (<math>0.5 \text{ mmol}/\text{l}</math>)로 apoptosis를 유도하고, 이때 길정옥수수 polyphenol을 여러 농도로 첨가하면서 세포보호효과를 TUNEL</li> </ul>	

			<p>assay로 apoptosis 정도를 측정하여 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ins-1 웨장배다세포배양에서 김정옥수수 polyphenol을 여러 농도로 첨가하면서 세포내 ROS(활성산소)농도를 측정</li> </ul>
		<p>기능성식품화를 위한 김정옥수수 polyphenol의 안전성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>db/db mouse 및 STZ처리 SD rat에서 김정옥수수 polyphenol을 8주 투여한 후 장기를 직출하여 육안으로 검사하고 무게를 측정</li> <li>혈액을 채취하여 혈액의 총콜레스테롤, LDL콜레스테롤, HDL콜레스테롤을 측정</li> <li>간독성은 AST, ALT를 측정하여 분석</li> <li>신장독성은 BUN을 측정하여 분석</li> <li>췌장을 직출하여 박편조직슬라이드를 제조하고 islet에서 anti-insulin antibody로 immunostaining하여 베타세포의 세포사를 분석</li> </ul>
<p>김정옥수수의 당뇨 및 당뇨병증의 건강기능식품 소재로서의 역할 규명 및 개발</p>	<p>당뇨합병증과 연결된 지하된 혈관 신생작용의 회복 (in vitro 세포실험)</p>	<p>신장세포 mesangial cells와 혈관 내피세포의 세포배양</p> <p>신장세포를 33 mM glucose에 의한 고혈당으로 배양하여 신성당뇨 합병증 유도실험을 실시함</p> <p>-신장세포의 conditional media를 혈관 내피세포와 배양하여 당뇨합병증에 의한 신장 혈관 및 사구체 모세혈관의 혈관 신생작용을 조사함 - 일부는 2차년도 후반기에 실시하여 김정옥수수의 안토시아닌이 고혈당으로 인하여 지하된 혈관신생작용을 활성화시킨다는 것을 규명한</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>이에 대한 김정옥수수 안토시아닌의 신성 당뇨병증에서 혈관 신생작용 기전연구를 실시함</li> <li>-관련된 다양한 cytokines과 growth factors의 관련성을 조사함: H</li> </ul>	

			<p>IF와 VEGF의 연결 고리를 파악</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-혈관신생작용과 관련하여 혈관 내피세포의 세포사멸을 조사하고, 관련된 apoptotic factors를 측정함: MAPK와 ASK의 측정, apoptotic bodies 측정</li> <li>-ATT 측정, Hoechst 염색법, Western blot 분석, real time-PCR 분석, ELISA 분석 및 세포면역학적인 염색법을 도입함</li> </ul>
		<p>신성당뇨합병증의 혈관 신생작용의 억제작용 확인 (in vivo 동물실험)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 견정옥수수의 안토시아닌의 경우 투여를 통하여 db/db 당뇨쥐의 혈당 조절을 측정함-본 실험의 일부는 2차년도 후반기에 실시되었음</li> <li>-사구체경화작용의 일부는 2차년도 연구 결과에 삽입하였음</li> <li>-신장 filtration barrier를 지탱하는 nephrin과 podocin의 역할 규명</li> <li>-당뇨합병증에서는 이러한 barrier proteins이 손상을 당할 것으로 기대하고 견정옥수수 안토시아닌이 proteins들의 발현을 정상화시키는지 조사함</li> <li>-사구체경화와 관련된 collagen의 생성과 관련된 CTGF의 발현 등을 조사함: Western blot과 조직면역학적인 기법 도입: 관련된 단백질 발현과 분비 측정함</li> <li>-ELISA 기법 도입: 염증반응에 관련된 매개물질 측정함</li> <li>▪ 당뇨합병증의 혈관신생작용에 대한 견정옥수수 안토시아닌의 억제활성 in vivo 연구</li> <li>-Western blot 분석과 조직면역학적인 분석을 통하여 VEGF와 HIF 인자의 발현을 측정함</li> <li>공초현현미경을 사용하여 혈관신</li> </ul>

			<p>생작용을 직접 조사함</p> <p>-혈관내피세포의 세포사멸에 대한 인자: caspase, Bcl2, Bax 등을 신장조직에서 측정함</p>
--	--	--	--

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 · 외 기술개발현황

당뇨병은 다양한 발병기전에 의하여 발병되므로 그 치료법 또한 다양할 수밖에 없으며, 더구나 기존의 고식적인 치료법만으로 만족할 만한 효과를 보지 못하는 경우도 많기에 새로운 치료법이 요구된다. 당뇨병치료제 연구는 당뇨병 환자의 90% 이상을 차지하는 제2형 당뇨병 치료제를 중심으로 기술개발이 활발히 이루어지고 있다. 인슐린 요법은 그 효과가 확실하지만 매일 주사를 맞아야 하는 번거로운 때문에 약물요법이 인슐린 요법보다 선호되는 경향이 있으나, 실폰요소제는 경우에 따라서 그 효능에 한계가 있고 또 비구아니드 제제는 유산증 같은 부작용을 초래할 수 있기에 그 적응증이 더욱 제한적이다. 따라서 기존 약제들을 보완하거나 능가할 수 있는 약제의 개발이 요구되고 있다.

현재 당뇨병 인구 또한 급증하고 있는 추세여서 당뇨병 치료제에 대한 수요가 늘어가고 있는 현실에 비추어 보면 향후 당뇨병 치료제 시장은 더욱 확대될 것으로 기대된다. 또한 현재 시판되고 있는 주요 당뇨병 치료제는 부작용으로 인하여 더욱 안전한 당뇨병 신약 개발이 요구되고 있으며, 2025년에 이르면 전 세계적으로 당뇨환자가 약 3억 명에 달할 것으로 예상되므로 당뇨병 치료제의 개발은 가속화될 것으로 예상된다. 국내에서는 제약기업과 바이오 벤처기업을 중심으로 천연물질을 이용한 치료제 개발이 활발히 이루어지고 있다.

◆ 2004년 6월을 기준으로 기존 당뇨병 치료에 사용되던 제품의 신약재심사 기간이 단축됨에 따라 국내에서는 신약 개발과 더불어 제네릭 의약품이 크게 증가하고 있으며, 기존에 시장을 지배했던 Aventis사의 아마릴의 제네릭 약품이 글리네피드(한미약품), 글라디엠(유한양행), 글리벤(동아제약), 네오마릴(종근당) 등이 출시되어 판매 중에 있다.

◆ 국내에서는 성인형 당뇨병에서 발생하는 인슐린 저항성을 규명하는 연구가 학계에서 일부 진행 중이며, 굴겉질이나 뽕나무 잎 등과 같은 천연물에서 유래된 물질을 대상으로 혈당강화제를 개발하는 과제가 진행되고 있다.

◆ 한국식품개발연구원에서는 생약소재에서 추출한 MB550 화합물이 AMPK를 활성화 시켜 지방조직과 근육조직에서 지방에너지를 소비함으로써 혈당감소효과 및 비만치료효과를 갖는다고 발표되었다.

현재 선진제약회사에서는 새로운 작용기전을 갖거나 기존 치료제의 단점을 보완하는 신규 성인형 당뇨병 치료제들이 개발진행 중에 있다. 대표적으로 인슐린 분비 촉진효과를 갖는 약물로 non-sulfonylurea계 약물과 dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) 저해제를 비롯한 glucagon like peptide 1 (GLP 1) 작용 증가제가 있으며, 인슐린의 작용을 증가하는 약물로

non-thiazolidinedione (non-TZD) 계열 약물, glucogen synthase kinase-3 (Gsk-3) 저해제, protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) 저해제 등이 있으며, Prou사의 Integrity 자료를 분석해 보면 2004년 7월 100개의 화합물이 전인상 이상을 진행 중인데 많은 화합물들이 인슐린 저항성을 극복하는 방향으로 개발되고 있고 최근에 GLP 1 receptor agonist (5건)와 DPP-IV 저해제 (7건)에 대한 연구가 활성화 되고 있다. 인슐린 분비를 촉진시키는 대표적 약물인 non-sulfonylurea계 약물로는 repaglinide, netoglinide, JTT-608, BTS67,572 등이 있으며, 이들 화합물은 췌장 베타세포에 기존 sulfonylurea계 약물의 binding site와는 다른 site에 결합하여 insulino 분비를 촉진시킨다. 또한 새로운 기전의 인슐린 분비촉진제인 GLP-1 system은 최근 연구가 가장 활발히 진행되고 있는 분야로 GLP-1은 혈중농도에 의존적으로 분비되어서 저혈당 부작용의 개선은 물론 베타세포의 재생효과, gastric emptying 억제효과, glucagon secretion 억제효과, satiety 유도 등 다양한 작용기전은 가지고 있는 것으로 확인되었다.

## 제 2 절 국내 · 외 시장현황

### 1. 국내 시장 현황

◆ 국내의 경우 식단의 서구화와 비만인구의 증가로 당뇨병 환자가 계속 증가하여, 1960년대 0.2%에 불과하던 당뇨병 환자비율이 1990년대에는 3% 이상으로 증가하는 등 환자수가 급격히 증가하고 있음

◆ 국내 인구 중 당뇨발생 가능성이 높은 사람을 포함한 혈당환자는 약 500만명으로 추정

◆ 국내의 유병 인구를 예측해 보면, 2010년을 기준으로 전체 인구의 약 10%인 약 500만명 정도가 당뇨병 환자로 예측되었으며, 2030년에는 약 14.4%가 당뇨병 환자로 예측되고 있음.

#### ◆ 국내 당뇨 관련 시장

- 국내 당뇨 관련 시장은 연평균 12.5%의 성장률로 성장하여 2005년에 1,299억원에서 2015년에 4,218억원의 시장을 형성할 것으로 전망됨

	2005년	2010년	2015년	연평균 성장률 (05~15)
당뇨시장 (단위 : 억 원, %)	1,299	2,341	4,218	12.5

◆ 당뇨 치료제 시장은 매년 약 12.5% 이상으로 성장하고 있으므로, 당뇨 치료제 시장은 더욱 키질 것으로 예상됨.

## 2. 국외 시장 현황

◆ 대사성 질환이 형성하고 있는 세계시장 규모 중, 당뇨병 및 고혈압 치료제 시장이 가장 높은 비중을 차지하고 있으며, 향후 당뇨병 치료제의 시장규모는 해마다 큰 폭의 증가가 예상되고 있음

◆ 세계보건기구와 국제당뇨연맹은 전 세계 당뇨병 환자가 1985년 3천 만 명, 1995년 1억 3천 5백 만 명, 2000년 1억 7천 만 명으로 증가하였고, 2025년에는 최소한 3억 명에 이를 것으로 예측하고 있으며, 당뇨병환자의 약 90%가 제2형 당뇨병 환자인 것으로 보고되어 있음

◆ 세계 당뇨 관련 시장은 연평균 12.5%의 성장률로 성장하여 2005년에 182억 달러에서 2015년에 602억 달러의 시장을 형성할 것으로 전망됨

	2005년	2010년	2015년	연평균 성장률 (05~15)
당뇨시장 (단위 : 백만 달러 %)	18,559	33,444	60,267	12.5

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 재료 및 연구방법

#### 1. 재료

본 연구에서 사용된 우수종 선별 시료는 강원도 옥수수 시험장으로부터 분양받은 1차(2009년) 353종, 2차(2010년) 306종을 제공 받았고, 3차(2011년) 300종을 제공받아서 실험에 이용하였다. 김장옥수수(Purple corn)의 성분 분석은 서울 소재의 브릴리언드프로젝트(주)로부터 구입하여 추출성분의 함량을 높이기 위해 Diaion HP 20을 충전 물질로 하여 불로 수회 수세하여 당 및 불순물 등을 정제한 후 흡착되어 있는 페놀성 성분을 EtOH로 washing하여 phenolic 성분이 풍부한 추출 분획물을 얻어, 분리 정제하여 본 연구에 이용하였으며, 분석에 사용된 시약은 Sigma사에서 구입하여 이용하였다.

#### 2. HPLC Pattern 분석 및 총 폴리페놀함량 측정

##### 가. HPLC Pattern 분석

Anthocyanin 성분을 규명하기 위하여 Finnigan Surveyor HPLC system (Thermo Quest, San Jose, CA)을 이용하여 역상 Capcell Pak C18 UG 120 S5 칼럼 (4.6×150 mm I.D., 4  $\mu$ m; Shiseido Co., Ltd, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 사용된 이동상은 5% formic acid (A)와 100% MeOH를 다음과 같은 용배 비율기로 분석하였다. 20% B: 7 min, 20% B: 15 min, 25% B: 32 min, 50% B: 36 min, 100% B: 38 min, 100% B: 40 min, 20% B: 45 min, 20% B.

##### 나. 총 Polyphenol 함량 측정

총 폴리페놀의 함량 (Total polyphenol content)은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis방법으로 측정하였다. 시료 0.5 ml에 1 N Folin-Ciocalteu reagent 0.5 ml을 가하여 혼합, 3분간 정지한 다음 10 ml의 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액을 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 정지한 후 분광광도계(spectrophotometer, secoman, USA)를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하고, Gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 ( $\text{mg/g}$ )로 구하였다.

### 3. 김장옥수수 구조 동정

#### (1) Anthocyanin 유효성분 HSCCC분석

HSCCC 분석을 통해 분리한 안토시아닌 주요 성분은 각 세부과제에 활성용으로 분양하였으며 또한, Diaon HP-20으로 처리한 것과 처리전의 조 추출물과 함께 활성 효능평가를 실시하였다.

#### (2) Non-anthocyanin 성분의 분리 및 구조규명

김장옥수수의 ethyl acetate 분획물을 대상으로 RP C-18 column chromatography를 통하여 얻어진 non-anthocyanin 화합물을 분리 정제하여 구조 규명하였으며, 활성 효능평가를 실시하였다.



Purification of Polyphenol by Medium Pressure Liquid chromatography.

### 4. 항당뇨효과 측정

#### 가. PTP1B

PTP1B 효소 활성은 기질인 para-nitrophenyl phosphate (p-NPP)을 사용하여 측정. 50 mM citrate buffer (pH6.0), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA 그리고 1 mM DTT이 포함되어진 완충용액에 20 mM p-NPP, PTP1B (0.05 µg) 그리고 추출물 및 활성성분을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 10 N NaOH 10 µl를 첨가하여 반응을 종결. p-nitrophenol은 405 nm에서 흡광도를 측정. 효소 저해율(%)은 완충용액에 효소와 기질만 넣고 반응시켜 측정한 값을 100%로 하고 효소만 넣어 측정한 값을 0%로 하여 계산한 후 이에 대한 비율로 나타내었다.

### 5. 항당뇨합병증효과 측정

#### 가. AGEs (최종당화산물)생성 저해능 측정

50 mg/mL의 BSA와 5 mM Methyl glyoxal solution를 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4) 첨가한 후 0.02% sodium azide를 가하여 반응기간 동안 박테리아 생성을 방지. 37°C에서 5일 동안 반응시킨 후 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 형광도(Ex: 355, Em: 460nm)를 측정. 양성 대조물로는 aminoguanidine을 이용하여 활성을 비교하였다.

#### 나. R1AR 활성 측정

효소원의 조제는 원추의 수정체를 직출하고, 그 습중량에 따라 일정량의 phosphate buffer를 가하고 homogenizer를 이용하여 균질화. 이를 4°C에서 원심 분리한 후 그 상등액을 취하여 ammonium sulfate로 40%까지 포화시키고 원심분리한 상등액을 얻고 그 상등액을 다시 70%가

되도록 ammonium sulfato를 가하여 용해시킨 다음 원심 분리하여 얻어진 pellet을 최소량의 buffer에 현탁시킨 후 24 시간 동안 투석을 실시해서 효소원으로 사용. 위에서 조제한 효소원과 dl glyceraldehyde를 기질로 하여 반응시키고 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정. 양성대조물로는 aldose reductase 억제제로 알려진 quercetin을 사용하여 효능을 비교하였다.

## 6. 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용한 최적의 추출조건 확립

### 가. 추출조건 최적화를 위한 실험계획

자색 옥수수의 최적 추출 조건을 확립하기 위해 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM)을 사용하였으며 예비실험의 결과를 바탕으로 중심합성계획(central composite design)을 실시하였다. 즉 추출공정의 독립변수( $X_0$ )는 추출온도 (20~60 °C,  $X_1$ ), 추출 시간 (4~12 hr,  $X_2$ ), 추출 용매의 농도 (20~40%,  $X_3$ ), 추출 용매의 비율 (8~24%,  $X_4$ )에 대한 실험범위를 선정하여 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하였으며 표 1에 나타내었다. 또한 이들의 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 추출 수용, 폴리페놀 함량, 안토시아닌 함량으로 이를 3회 반복하여 측정하면 후 각각 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석에 의한 최적조건의 예측은 statistical analysis system(SAS version 9.1) program을 이용하였으며, 회귀분석 결과 인계선이 최대선이거나 최소선이 아니고 안장선일 경우에는 등선분석을 하여 최적선을 구하였다. 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{21}X_2X_1 + b_{22}X_2^2 + b_2X_3X_4 + b_2X_3X_2 + b_2X_3X_3 \quad (\text{수식 1})$$

또한, 반응표면 그래프는 Sigma plot (version 10.0, Systat Software Inc, USA)을 사용하여 나타냈다.

### 나. 추출 및 수용 측정

자색옥수수 시료를 각각 1g씩 15ml tube에 넣은 후, 상위의 실험계획법을 통하여 추출을 실시하였다. 추출에 이용한 Ethanol은 각 조건별로 비율을 맞추었으며, anthocyanin의 구조적 특성상 안정을 위해 각 용매별로 0.01% HCl을 첨가함으로써 anthocyanin의 변성을 억제하였다. 이렇게 하여 얻어진 추출물은 고효율 원심 농축 시스템(EZ-2 plus, Genevac, UK)으로 감압농축 및 건조 후 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 고품분 수용(%)로 나타내었다.

표 1. 중심합성계획에 따른 자색옥수수(*Zea mays* L.)의 최적 추출을 위한 반응표면분석과 조건별 수율, 총 폴리페놀 함량 및 안토시아닌 함량

$X_0$	독립변수 (independent variables)				종속변수 (response variables)		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$
1	30 (1)	6 (1)	25 (1)	12 (1)	6.00	5.91	55.16
2	50 (1)	6 (1)	25 (1)	12 (1)	7.65	3.40	32.06
3	30 (1)	10 (1)	25 (1)	12 (1)	6.00	6.55	65.20
4	50 (1)	10 (1)	25 (1)	12 (1)	6.70	5.17	47.71
5	30 (1)	6 (1)	35 (1)	12 (1)	5.85	6.32	66.17
6	50 (1)	6 (1)	35 (1)	12 (1)	8.50	2.04	16.61
7	30 (1)	10 (1)	35 (1)	12 (1)	6.15	8.08	77.94
8	50 (1)	10 (1)	35 (1)	12 (1)	7.30	3.70	34.71
9	30 (1)	6 (1)	25 (1)	20 (1)	6.30	4.42	41.02
10	50 (1)	6 (1)	25 (1)	20 (1)	7.75	6.64	67.21
11	30 (1)	10 (1)	25 (1)	20 (1)	6.25	6.33	63.39
12	50 (1)	10 (1)	25 (1)	20 (1)	8.10	6.17	65.81
13	30 (1)	6 (1)	35 (1)	20 (1)	6.35	5.75	58.94
14	50 (1)	6 (1)	35 (1)	20 (1)	9.25	3.62	70.81
15	30 (1)	10 (1)	35 (1)	20 (1)	6.35	6.30	61.96
16	50 (1)	10 (1)	35 (1)	20 (1)	9.00	4.87	69.92
17	20 (2)	8 (0)	30 (0)	18 (0)	5.75	3.41	20.63
18	60 (2)	8 (0)	30 (0)	18 (0)	9.10	3.80	21.07
19	40 (0)	4 (2)	30 (0)	18 (0)	5.95	4.64	40.02
20	40 (0)	12 (2)	30 (0)	18 (0)	6.00	4.63	37.48
21	40 (0)	8 (0)	20 (2)	18 (0)	6.40	6.22	52.90
22	40 (0)	8 (0)	40 (2)	18 (0)	5.75	4.92	71.46
23	40 (0)	8 (0)	30 (0)	8 (2)	2.70	6.63	60.04
24	40 (0)	8 (0)	30 (0)	24 (2)	6.35	5.72	56.32
25	40 (0)	8 (0)	30 (0)	18 (0)	5.75	4.95	45.34
26	40 (0)	8 (0)	30 (0)	18 (0)	5.78	4.34	35.13
27	40 (0)	8 (0)	30 (0)	18 (0)	5.73	4.28	40.88

<sup>1)</sup>  $X_1$ , 추출 온도 (°C);  $X_2$ , 추출 시간 (hr);  $X_3$ , 추출 용매의 농도 (\*);  $X_4$ , 추출 용매의 비율 (1:1);  $Y_1$ , 추출 수율 (%);  $Y_2$ , 총 폴리페놀 함량 (mg/g);  $Y_3$ , 총 안토시아닌 함량 (mg/L)

#### 다. 총 Polyphenol 함량 측정

총 폴리페놀의 함량 (Total polyphenol content)은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin Denis방법으로 측정하였다. 시료 0.5 mL에 1 N Folin Ciocalteu reagent 0.5 mL을 가하여 혼합, 3분간 정치한 다음 10 mL의 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 정치한 후 분광광도계(spectrophotometer, secoman, USA)를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하고, Gallic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 (mg%)도 구하였다.

#### 라. 총 Anthocyanin 함량 측정

자색옥수수 추출물의 총 안토시아닌 함량 측정 (Total anthocyanin content)은 Turker와 Erdogdu의 방법을 사용하였다. 반응표면분석의 조건으로 추출한 27개의 추출물 1ml에 0.025 M potassium chloride buffer (pH1.0) 1ml 혹은 0.4 M sodium acetate buffer (pH 4.5) 1 ml를 각각 혼합하여 반응액의 흡광도 값을 510nm와 700nm에서 측정하였다. 자색옥수수의 총 안토시아닌 함량(mg/L)은 cyanidin-3-glucoside의 몰흡광계수 ( $\epsilon=26,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )를 이용하여 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Anthocyanin content (mg/L)} = \frac{A \times MW \times 1,000}{\epsilon \times V}$$

$$A \text{ (흡광도)} = (A_{530nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{530nm} - A_{700nm})_{pH4.5}$$

MW (cyanidin-3-glucoside의 분자량)=449.2.

V=추출물의 부피

#### 마. 최적 추출조건의 예측

조건별 각 추출물의 최적 추출조건 예측은 추출 수율, 총 polyphenol 함량 및 총 anthocyanin 함량에 대한 contour map superimposing 하였을 때 중복되는 부분의 범위에서 최적 추출조건 범위를 예측하였다.

## 7. 우수종 선별

### 가. 추출

본 실험에서 사용된 자색옥수수 (*Zea mays*, L.)는 강원도 옥수수시험장에서 공급받아 시료로 사용하였으며, 구입한 시료를 45°C 온도에서 열풍건조 시킨 후, 건조된 시료는 분쇄기 (Kaiser, JL-500, Joylife)를 사용하여 0.5mm 이하 크기로 분쇄한 후 채에 걸러 입자의 크기를 고르게 하였다. 이 분말 상태의 자색 옥수수는 0.2 mm PE film에 밀봉 포장 후 20°C의 암소에 보관하면서 실험에 사용하였다. 또한 추출용매로 사용한 주정 (순도 94.5%)은 Dae jung Co. (4020-2210) 에서 구입하였으며, 분석에 사용한 시약은 일급이상 시약을 사용하였다. 분쇄한 김장옥수수 1g에 주정 10ml을 넣어 초음파로 추출하였다.

1차 시료 (359종), 2차 시료 (306종), 3차 시료 (207종) 받아 실험에 이용하였다.

### 나. Anthocyanin 한량 측정

Anthocyanin 성분을 규명하기 위하여 Finnigan Surveyor HPLC system (Thermo Quest, San Jose, CA)을 이용하여 역상 Capcell Pak C18 UG 120 S5 칼럼 (4.6×150 mm I.D., 4 μm; Shiseido Co., Ltd, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 사용된 이동상은 5% formic acid (A)와 100% MeOH를 다음과 같은 용매 기울기로 분석하였다. 20% B: 7 min, 20% B: 15 min, 25% B: 32 min, 50% B: 36 min, 100% B 38 min, 100% B: 40 min, 20% B: 45 min, 20% B.

### 다. 총 폴리페놀함량 측정

AOAC의 Folin-Denis법으로 측정하였다. 건조 시료 일정량을 일정농도로 희석하여 각종 분석에 이용하였다. 시료 0.25 mL에 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 2.0 mL 가하고 5분간 실온에 방치 한 후 Folin-Denis 시약을 0.75 mL 가하고 증류수 7.0mL을 넣고 1시간 정치 한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallate의 농도를 달리하여 조제한 후 표준 곡선을 작성하고 모든 처리는 3회 반복하여 측정하였다.

### 라. 총 플라보노이드함량 측정

건조 시료 일정량을 일정농도로 희석하여 각종 분석에 이용하였다. 시료 1mL에 증류수 4mL 과 5% NaNO<sub>2</sub>을 0.3 mL 가하고 5분간 실온에 방치 한 후 10% AlCl<sub>3</sub>를 0.3 mL 가하고 6분간 실온에 방치한다. 1M NaOH를 2mL을 넣고 증류수 2.4mL 넣고 반응시킨다. 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin의 농도를 달리하여 조제한 후 표준 곡선을 작성하고 모든 처리는 3회 반복하여 측정하였다.

### 마. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS (2,2'-azino bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid))는 2 mM 농도로 3.5 mL

potassium persulfate와 혼합하여 3차 증류수 10 ml에 용해시킨 후 3차 증류수 290 ml을 첨가하여 30배 희석시킨 다음 overnight 하여 ABTS 라디칼 생성을 유도. 추출물 10  $\mu$ l와 ABTS 라디칼 용액 290  $\mu$ l를 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정. 추출물의 라디칼 소거활성은 ABTS 라디칼을 50% 소거시키는데 필요한 농도를 계산하여 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었다.

## 바. AGEs (최종당화산물)생성 저해능 측정 및 RLAR 활성 측정

### (1) AGEs (최종당화산물)생성 저해능 측정

50 mg/ml의 BSA와 5 mM Methyl glyoxal solution를 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4) 첨가한 후 0.02% sodium azide를 가하여 반응기간 동안 박테리아 생성을 방지. 37°C에서 5일 동안 반응시킨 후 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 형광도(Ex: 355, Em: 460nm)를 측정. 양성 대조물로는 aminoguanidine을 이용하여 활성을 비교하였다.

### (2) RLAR 활성 측정

효소원의 조제는 원질의 수침체를 식출하고, 그 습중량에 따라 일정량의 phosphate buffer를 가하고 homogenizer를 이용하여 균질화. 이를 4°C에서 원심 분리한 후 그 상등액을 취하여 ammonium sulfate로 40%까지 포화시키고 원심분리한 상등액을 얻고 그 상등액을 다시 70%가 되도록 ammonium sulfate를 가하여 용해시킨 다음 원심 분리하여 얻어진 pellet을 최소량의 buffer에 현탁시킨 후 24 시간 동안 투석을 실시해서 효소원으로 사용. 위에서 조제한 효소원과 dl glyceraldehyde를 기질로 하여 반응시키고 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정. 양성대조물로는 aldose reductase 억제제로 알려진 quercetin을 사용하여 효능을 비교하였다.

## 사. 최종 선별 된 우수종 (색찰교 5종)

색찰교(15번) 및 색소생산력 52번의 총 6개의 자색옥수수종자(kernel)을 분쇄기(Kaiser, JL 500, JoyLife)를 사용하여 0.5mm 이하 크기로 분쇄한 후 체에 쳐서 입자의 크기를 고르게 하였다. 곱게 분쇄된 옥수수 분말 50g을 반응표면분석을 통해 얻어진 추출조건 (40°C, 8시간, 33% 주정 (0.1% HCl), 1:10의 비율)으로 추출하였고, anthocyanin의 불안정한 구조를 위해 각 시료가 들어있는 tube에 은박지로 감아 빛의 투과를 억제하였다. 추출을 끝내고 20분동안 3000rpm에서 centrifuge하여 얻어진 상등액을 농축 및 동결 건조하여 추출량을 얻은 후, HP20 column을 통하여 당과 유기산 및 기타 불순물들을 제거한 후, 다시 농축 및 동결건조 실시하여 총 수율 확보하였다. 얻어진 HP20 전 추출물과 HP20 추출물을 HPLC를 이용한 패턴비교, 총 폴리페놀 함량(total polyphenol content) 및 총 안토시아닌 함량 (total anthocyanin content) 비교하였다.

8. 김장옥수수 polyphenols의 항당뇨활성 및 췌장세포보호 효과를 2형 당뇨병 모델 동물인 db/db mouse에서 분석

8주간 자옥수수 추출물을 섭취시키면서 혈당, 당화혈색소, 인슐린분비 등을 측정하였다. 실험 동물은 5주령 db/db mouse 수컷을 중앙실험동물(주)로부터 구입하여 동물 사육실 온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50\pm 5\%$ , 명암주기 12시간(명주기: 07:00-19:00)이 조절되는 동물 사육실에서 사육하였다. 1주 동안 환경에 충분히 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 김장옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 체중변화, 혈당변화, 당화혈색소 (HbA1c)의 변화, 단기내당능(OGTT)의 변화, 췌장 베타세포의 변화를 측정하였고, 김장옥수수 polyphenols 정제물의 Ins-1 beta cells매양에서 세포독성 및 인슐린 분비능 실험을 실시하였다.

(1) 세포의 생존력(cell viability)의 측정

햄스터 판크레아스의 베타세포주인 HIT-T15를 10% FBS, 2mM L-glutamine, 100 IU of penicillin-G and 100ug/ml of streptomycin를 포함하는 RPMI1640매지를 이용하여 5%  $\text{CO}_2$  37°C 배양기에서 배양한다. 24well plates에 세포를 80%까지 도달했을 때 위해 여러 농도의 천연물을 첨가한다. 세포 생존력은 MTT assay에 의해 분석한다.

(2) 인슐린 분비능 실험

HIT-T15 세포주를 24well plates에 배양하여 천연물을 농도별로 처리하고 24시간 후에 glucose가 없는 Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer (KRB Buffer, [115 mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.56 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2mM  $\text{MgSO}_4$ , 20mM  $\text{NaHCO}_3$ , 16mM HEPES pH 7.4])에서 30분 preincubation 하였다. 11.1mM glucose를 포함하는 KRB로 바꾸고 60분간 배양한다. 세포배양액을 3000g에서 5분간 원심 분리한 다음 상층액을 Rat Insulin Kit (SHIBAYAGI, Japan)로 측정한다.

9. STZ-mouse에서 김장옥수수 폴리페놀의 당뇨치료 효능 분석

8주간 자옥수수 추출물을 섭취시키면서 혈당, 당화혈색소, 인슐린분비 등을 측정하였다. 실험 동물은 5주령 db/db mouse 수컷을 중앙실험동물(주)로부터 구입하여 동물 사육실 온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50\pm 5\%$ , 명암주기 12시간(명주기: 07:00-19:00)이 조절되는 동물 사육실에서 사육하였다. 1주 동안 환경에 충분히 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 8주간 섭취시키는 동안 STZ-mouse의 체중변화, 혈당변화, 내당능검사(OGTT) 변화, 당화혈색소(HbA1c) 변화, 췌장무게 변화, 혈중 인슐린 농도에서의 변화 측정하였다.

10. 안전성 평가 (db/db-mouse에서 김장옥수수 폴리페놀의 당도치표 효능 분석 및 기능성 식품화를 위한 기초 안전성 분석)

8주간 자옥수수 추출물을 섭취시키면서 혈당, 당화혈색소, 인슐린분비 등을 측정하였다. 실험 동물은 5주령 db/db mouse 수컷을 중앙실험동물(주)로부터 구입하여 동물 사육실 온도 22±2°C, 습도 50±5%, 명암주기 12시간(명주기: 07:00-19:00)이 조절되는 동물 사육실에서 사육하였다. 1주 동안 환경에 충분히 순화시킨 후 실험에 사용하였다.

실험군을 대조군, 양성대조군(피니톨), 양성대조군(자누비아), 페루산 안토시아닌 10%, 국내산 안토시아닌 HP-20, 국내산 안토시아닌 HP20 의 6군으로 나누고 각 군당 8마리씩 분리하였다. 군당 아래의 농도로 증류수에 녹여 매일 1회 존대를 사용하여 경구 투여하였다.

샘플번호	1	2	3	4	5
군	대조군	피니톨	자누비아	페루산10%	국내산HP20
처리농도	-	100mg/kg/day	280mg/kg/day	10mg/kg/day	10mg/kg/day
군당마리수	8마리	8마리	8마리	8마리	8마리

11. 베타세포배양에서 김장옥수수 polyphenol의 혈당강하 및 세포보호 기전연구

Ins-1 웨장베타세포배양에서 apoptosis를 유도하고, 이때 김장옥수수 polyphenol을 여러 농도로 첨가하면서 세포보호효과를 측정하려 했으나 보다 실질적인 세포보호기전을 보기위해서 db/db mouse에서 김장옥수수 10% polyphenol (PCA)을 10 mg/kg/day로 8주간 경구투여 후 에 췌장을 적출하고 각 5개의 islet를 분리하여 anti insulin antibody, anti glute2 antibody, anti glucagon antibody를 사용하여 췌장 islet를 면역연색화학분석을 실시하였다.

12. 고혈당에 의한 사구체 경화에 대한 김장옥수수 추출물의 억제능

세포배양

- 일차 배양 된 사람 신장세포인 mesangial cells은 clonetics사에서 구입하여 실험에 이용하였다. 신장의 mesangial cells과 epithelial cells은 10% fetal bovine serum이 첨가된 DMEM으로 배양하였다.

- 혈관내피세포(HUVEC)는 collagenase 효소를 이용하여 사람의 태중의 정맥에서 추출하였다. 혈관내피세포의 일차배양은 EGF와 hydrocortison, 10% fetal bovine serum이 첨가된 MEM99에서 배양함. 90% confluency에서 혈관내피세포는 계대 배양하여 증식시켰다. 실험에 이용될 혈관내피세포는 passage 7 이하에서 사용하였다.

- 33 mM의 고농도 glucose를 첨가한 DMEM 또는 M199 배양액에서 mesangial cell 및 혈관내피세포를 배양하여 당뇨 조건을 유도하고, 여기에 김정옥수수 안토시아닌 추출물을 처리하여 당뇨병성 신장병증의 억제능을 규명하고 관련기전을 확인하였다.
- 고농도의 glucose에 의하여 세포에 초래될 수 있는 삼투압과 관련한 사항에 대한 대조군 (osmotic control)으로 27.5 mM mannitol(+5.5 mM glucose)을 첨가한 배양액에서 실험을 실시하였다.
- 세포배양실험에서 High glucose condition으로 유도된 mesangial cell의 사구체경화현상을 유도하기 위해서는 3일간, 혈관내피조직의 손상을 위해서는 5일간 고농도 glucose 배양이 필요하다. (미세혈관 및 신장 만성당뇨 합병증 유발)

### 13. 고혈당에 의해 유도된 사구체 섬유증에 대한 김정옥수수의 억제효능

#### 가. High glucose condition에서 신장세포의 증식과 미세혈관의 손상에 대한 억제능 조사

- MTT 분석으로 mesangial cells의 증식과 혈관내피세포인 HUVEC의 사멸을 조사
- 자주색의 formazone의 생성을 570 nm 파장에서 측정함
- 신장세포의 고혈당에 의한 과증식을 조사하고 김정옥수수 추출물을 처리하였을때의 증식 억제활성은 MTT 방법을 사용

#### 나. 만성 고혈당에 의한 당뇨병 합병증의 스트레스에 의한 신장세포에서의 다양한 유도단백질 발현조절에 대한 연구를 수행

#### 다. 고혈당의 합병증에 직접적으로 관련된다고 보는 다양한 단백질 효소와 신호전달체제에 직접적으로 관여할 것으로 보는 단백질 발현 또는 활성화 측정함

- 웨스턴블롯과 면역화학적 분석을 통하여 혈관손상을 초래하는데 관여한다고 보고되고 있는 eNOS, NADPH oxidase, caspase, bcl-2와 bax의 발현과 활성을 측정함.  
신호전달과정의 MAPK와 p53, cJun등의 핵전사인자의 활성화를 조사함

#### 라. 만성 고혈당에 의한 사구체경화증과 인슐린 저항성과 유사효과 측정

- 웨스턴블롯과 면역화학적 분석을 위하여 을 통하여 사구체경화와 관련된 결합조직의 증식을 측정하는 CTGF의 발현과 collagen의 발현을 조사함.  
ECM 기질의 분해효소인 matrix metalloenzymes (MMP)와 TIMP의 역할을 규명함.

#### 마. MMP의 활성화에 대해서 zymography와 mRNA를 측정하기 위한 RT-PCR 기법을 도입함

- gelatin zymography, reverse zymography, fibrinogen zymography를

바. 고혈당의 신성 당뇨병증에 직접적으로 관련된다고 보는 다양한 단백질의 신호전달계에 직접적으로 관여할 것으로 보는 TGF-β와 SMAD의 단백질 발현 또는 활성화를 측정

사. 김정옥수수의 안토시아닌에 의한 사구체경화를 억제할 수 있는 mesangial cells의 ECM과 cytokines의 관련성을 연구함

- 웨스턴블롯과 ELISA방법을 통한 cytokine 발현량 측정
- 김정옥수수의 안토시아닌과 사구체경화에 의해 유도되는 interleukin, TNF, TGF 등과의 관련성을 연구함
- JAK과 STAT의 활성화를 측정하여 김정옥수수의 안토시아닌에 의한 신호전달과정의 차단효과를 측정함

아. 신장세포 mesangial cells의 고혈당에서의 배양

- 세포 배양후 길어낸 매지를 혈관내피세포 배양에 이용하여 단백질 이용한 동맥경화 초기단계를 조사
- 세포 배양후 길어낸 매지를 혈관내피세포 배양에 이용하여 혈관신생작용 조사

#### 14. 사구체 경화와 당뇨병성 신장병증의 염증반응에 대한 김정옥수수의 억제효능

가. db/db 마우스를 이용한 당뇨병성 신경화증 억제 효능.

db/db 마우스는 렙틴 수용체의 돌연변이로 인해 고혈당, 고인슐린혈증, 다식, 비만, 인슐린 저항성, 고렙틴혈증, 다양한 대사적 이상을 특징으로 하는 동물 모델로 제2형 당뇨병 환자와 유사한 증상을 보이므로 당뇨병과 관계된 대사이상의 연구에 유용하게 사용되는 모델이다.

- 동물을 대조군인 db/m, 당뇨 유발 모델 그룹인 db/db, db/db+자색옥수수 추출물 군의 세 그룹으로 나눈 후, 1주일간의 적응기간을 거쳐 8주간 10mg/kg의 자색 옥수수 추출물을 투여하였다.

8주후 실험동물을 희생하여 신장을 적출하고, 신장 사구체의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

## 15. 임상시험 (혈당조절용 건강기능식품소재로의 개발을 김장옥수수 폴리페놀의 정상인에서 혈당조절 임상시험)

임상시험계획서의 작성 및 한림대 춘천성심병원 IRB 심사 - 한림대춘천성심병원 내분비내과 류옥현 교수 주관으로 김장옥수수 polyphenol 추출물의 정상인에서 혈당조절효과에 대한 임상시험계획서를 작성하였으며, 한림대 춘천성심병원 IRB심사를 통과하여 임상시험이 실시되었다.

김장옥수수 polyphenol 추출물 캡슐 제조 - 김장옥수수 polyphenol 주정추출물 파우더를 구입하여 캡슐(300 mg)을 제조하였다.

### 가. 임상 시험 대상과 방법

#### 제외 기준

- ◎ 간, 신장, 내분비계, 혈액종양 (암), 정신질환, 심혈관계 질환(협심증, 심근경색, 뇌경색)이 있거나 과거력이 있는 자
- ◎ 물질의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론씨 병)이나 위장관계 수술(단, 단순 맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자
- ◎ 임상실험실검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자 (AST, ALT > 정상범위 상한치의 1.25배, Cr>1.5mg/L)
- ◎ 활력징후에서 수축기 혈압이 90 mmHg 미만이거나 160 mmHg를 초과하는 자 또는 이완기혈압이 60 mmHg 미만이거나 110 mmHg를 초과하는 자
- ◎ 첫 섭취일 전 2주 이내에 혈당에 영향을 줄 수 있는 전문의약품(당뇨병약, 인슐린, 스테로이드계 제제, 도파민, 도부타민계 약물, 여성호르몬제)이나 한약을 복용 (단, 시험자의 판단에 따라 다른 조건이 합당한 경우는 인체시험에 참여할 수 있음.)
- ◎ 첫 섭취일 전 2개월 이내에 타 임상시험에 참여한 자
- ◎ 첫 섭취일 전 1개월 이내에 전혈 헌혈을 하였거나, 2주 이내에 성분헌혈을 한 자
- ◎ 지속적으로 음주(21 units/week 초과)를 하거나 인체시험기간 중 금주할 수 없는 자
- ◎ 임상실험실 검사 결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험자가 인체시험 참여에 부적합하다고 판단한 자

### 나. 단기 임상 시험

각 군당 20명 건강인(공복혈당 120이하) 에 캡슐을 투여하고 포도당 75g을 투여한 다음 30분, 60분, 90분, 120분에 혈당변화를 측정하였다.

- 음성대조군(CELLULOSE 300mg 캡슐)
- 양성대조군(Metformin 300 mg 캡슐)
- 실험군(김장옥수수 polyphenol 300 mg 캡슐)으로 나누어 실험수행

다. 장기 임상시험

- 각 군당 20명 건강인(공복혈당 120이하)에 매일 아침 식후 1캡슐 투여하는 방법으로 8주간 지속하였음.
- 8주후 포도당 75g을 투여한 다음 30분, 60분, 90분, 120분에 혈당 변화를 측정함
- 음성대조군(CELLULOSE 300mg 캡슐)
- 양성대조군(METFORMIN 300 mg 캡슐)
- 실험군(김정옥수수 폴리페놀 300 mg 캡슐)으로 나누어 실험수행

장기 임상 시험 진행 일정

방문주수 항목	0주	2주	4주	8주
동의서 작성	●			
군배정	●			
신체검진(키, 몸무게, 허리둘레)	●			●
활력징후(혈압, 맥박)	●			●
Electrolyte (Na K Cl)	●			●
소변검사(UA)	●			●
공복혈당검사	●	●	●	●
지질검사	●			●
당화혈색소검사	●			●
심전도검사	●			●

0주째 내원하여 활력징후와 선별검사(간기능, 신기능, 소변검사, 전해질검사, 심전도)를 시행하여 이상 소견이 없으면 동의서를 작성하고, 무작위로 실험군을 배정하여 임상시험을 진행한다.

라. 통계처리

단기효과 판정을 위해 SPSS package 이용하여 mean ± SEM(Standard Error of Mean)로 나타내어 유의성 검증은 ANOVA 분석을 통하여 실시하고자 한다. 장기효과 판정을 위해 Student's t test를 이용하여 대조군과 실험군(김정옥수수)을 비교한다.

16. 안정성 평가

장기보존 시험: 저장조건에서 사용 기한을 설정하기 위하여 장기간에 걸쳐 물리적, 완전성, 화학적, 미생물학적 안정성 및 내용물과 용기의 적합성에 대하여 제형에 따른 적절한 기준 및 시험방법과 시험조건에서 시험을 실시한다. 시험자는 온도관리가 되는 안전한 보관 장소에 검체를 보관한다. 정해진 보관 기간에 따라서 검체 검사를 실시한다.

음료 제품으로의 가능성 파악 - 김정옥수수 추출물 300mg PC/180ml 증류수 넣어 녹인 후 0-3

개월 동안 실온에 방치 하였다. (빛 차단시킴)

캡슐 제품으로의 가능성 파악 - 4°에서 5개월간 보관하였다. 1개월마다 시료를 채취하여 30% Methanol에 1mg/ml 농도로 녹여 폴리페놀 함량을 측정하였다.

## 17. 기준규격 설정

김정옥수수 (보라색 분말), 건조 함량 4% 이하, 성분 확인은 Thin Layer Chromatography으로 확인하였다.

성상	보라색 분말
건조 함량	4% 이하

## 18. 시제품 제작

### ① 분해도 측정

항온조를  $37 \pm 2^\circ$ 로 가열하여, 1 캡슐 당 피플콘 시료 225mg, 부형제 Cellulose 75mg을 넣고, 1 분간에 40rpm으로 왕복, 진폭 53~57 mm 상하로 20분간 운동하였다.

-시험기 비키에 넣는 시험액의 양은 시험기가 가장 위로 올라왔을 때 시험기의 망면이 액면 아래로 15 mm 이상 떨어지도록 하고 가장 아래로 내려갔을 때 비키의 바닥으로부터 25 mm 이상으로 시험기가 완전히 잠기지 않도록 한다.

### ② 캡슐 제작

김정옥수수 추출물의 특성을 고려하여 소비자에게 이필할 수 있는 캡슐로 제형을 선정, 제작 하였다.

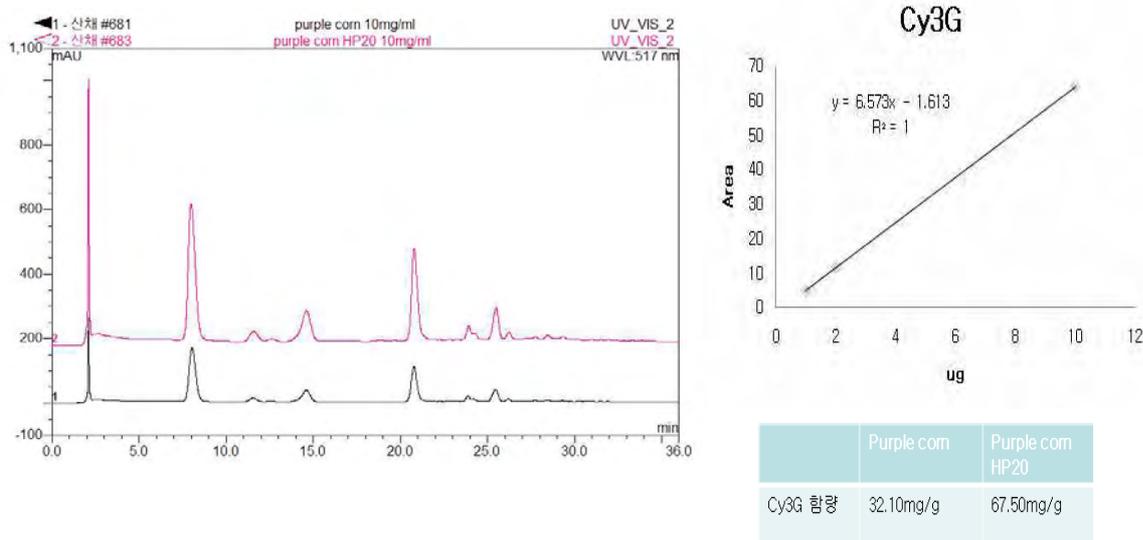
## 제 2 절 연구결과

### 1. HPLC Pattern 분석 및 총 Polyphenol 함량 측정

Anthocyanin 성분을 규명하기 위하여 Finnigan Surveyor HPLC system (Thermo Quest, San Jose, CA)을 이용하여 분석하였다. 김장옥수수추출물과 추출성분의 함량을 높이기 위해 Diaion HP-20을 충전물질로 하여 물로 수회 수세하여 당 및 불순물 등을 정제한 후 흡착되어 있는 페놀성 성분을 EtOH로 washing하여 phenolic 성분이 풍부한 추출물 (HP20 김장옥수수) HPLC Pattern 분석 결과 Cyanidin 3 glucoside 함량이 건정옥수수에서는 32.10mg/g, HP20 건정옥수수는 67.50mg/g 함량을 가지는 것으로 확인되었다.

총 Polyphenol 함량 측정 결과 100g에 들어 있는 Polyphenol 함량은 김장옥수수추출물에서는 14.84g/100g, HP20 건정옥수수는 36.83g/100g 함량을 가지는 것으로 확인되었다.

(a)



(b)

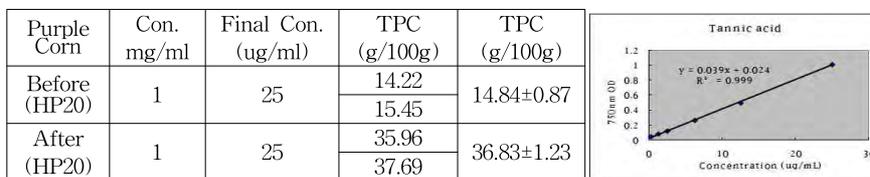


Fig. 1. Change of anthocyanin (a) and total phenol (b) contents after the treatment with HP-20

## 2. 김장옥수수 구조 동정

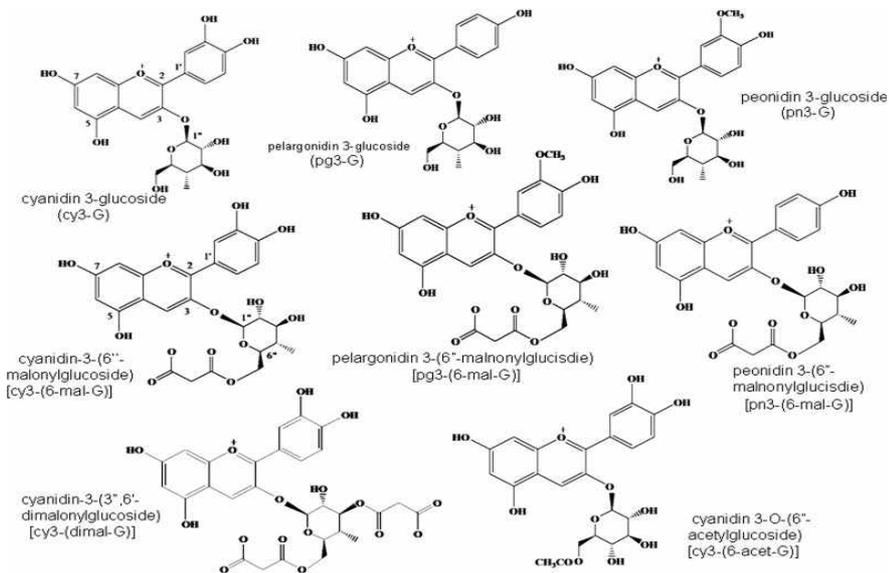
### 가. Anthocyanin 유효성분 HSCCC분석

안토시아닌 분석 결과 Table 1과 Fig 2와 같이 8개의 안토시아닌 화합물을 규명하였다. Cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-(6"-malonylglucoside), pelargonidin-3-(6"-malonylglucoside), cyanidin-3-(dimalonylglucoside), cyanidin-3-(6-acetylglucoside), peonidin-3-(6"-malonylglucoside).

Table 1. Identification of the major anthocyanins detected in the kernel of purple corn

Compound <sup>1</sup>	<i>R<sub>t</sub></i> (min)	UV-Vis $\lambda$ max (nm)	LC-ESI-MS		Structure
			[M] ( <i>m/z</i> )	Fragments [M-H] ( <i>m/z</i> )	
1	7.45	515, 279	449	287	Cyanidin 3-glucoside
2	10.47	504, 278	433	271	Pelargonidin 3-glucoside
3	12.98	515, 279	463	301	Peonidin 3-glucoside
4	18.47	517, 280	535	449, 287	Cyanidin 3-(6"-malonylglucoside)
5	21.73	504, 350, 264	519	271	Pelargonidin 3-(6"-malonylglucoside)
6	22.02	525, 279	621	287	Cyanidin 3-(dimalonylglucoside)
7	23.38	517, 279	549	301	Peonidin 3-(6"-malonylglucoside)
8	24.13	525, 279	491	287	Cyanidin 3-(6-acetylglucoside)

<sup>1</sup>Compounds 1-8 were identified based on photo diode array absorbance and mass fragmentation pattern.



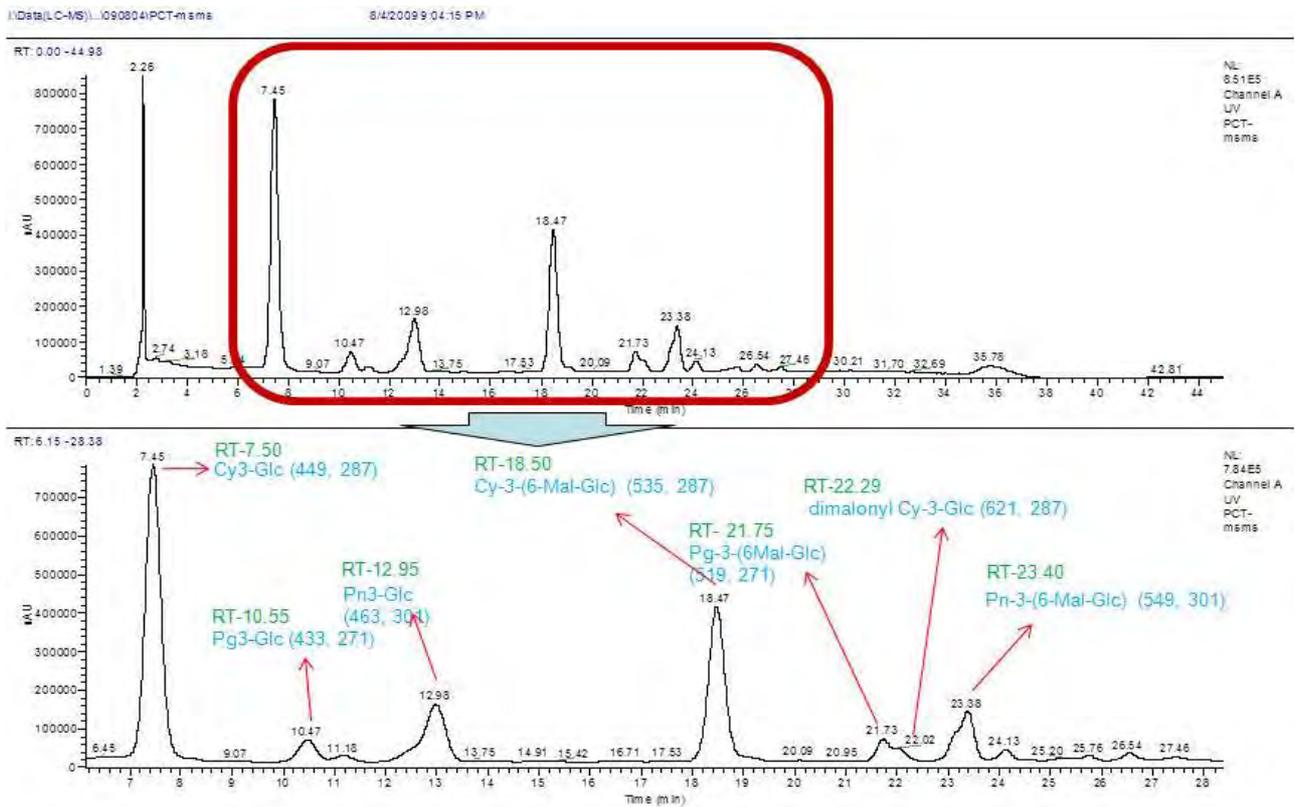
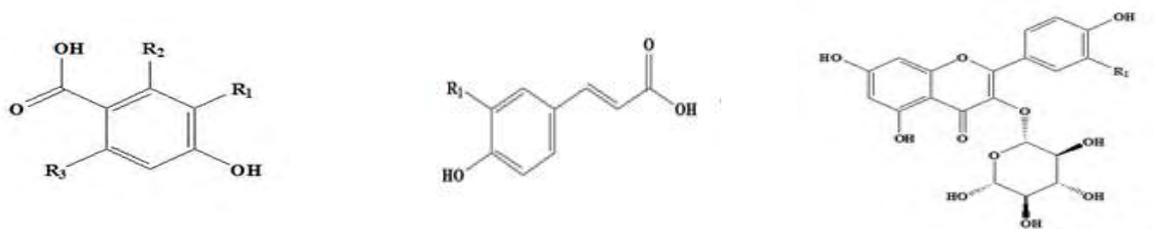


Fig. 2. HPLC chromatograms of peaks detected at 520 nm for EtOH extracts from the kernel of purple corn. The peaks were identified by comparison with the reference standards or by the LC-MS/MS data.

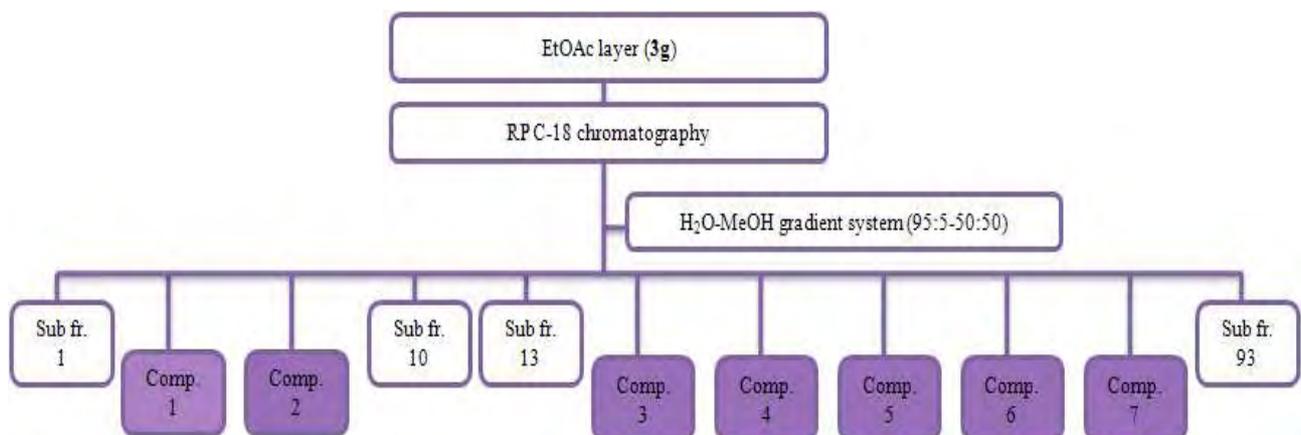
나. Non-anthocyanin 성분의 분리 및 구조규명

건정옥수수주의 ethyl acetate 분획물을 대상으로 RP C 18 column chromatography를 통하여 얻어진 non anthocyanin 화합물을 분리 정제하여 fig 3.와 같이 규명하였다. Compound 1 (protocatechuic acid, 5.1mg), compound 2 (vanillic acid, 12.6mg), compound 3 (2,4,6-trihydroxy benzoic acid, 6.5mg), compound 4 (2,4,6-trihydroxy benzoic acid, 17.2mg), compound 5 (4-hydroxycinnamic acid, 15.0mg), compound 6 (ferulic acid, 5.5mg), compound 7 (quercetin derivatives, 4.5mg), compound 8 (quercetin derivatives, 16.5mg), compound 9 (quercetin derivatives, 14.2mg), compound 10 (hirsutrin, 21.0mg), compound 11 (3'-methoxyhirsutrin, 20.0mg), compound 12 (cinnamic acid derivatives, 15.1mg), compound 13 ((cinnamic acid derivatives, 15.1mg)을 얻었으며 분리된 화합물은 <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR, MS 데이터를 통하여 구조를 규명하였다.



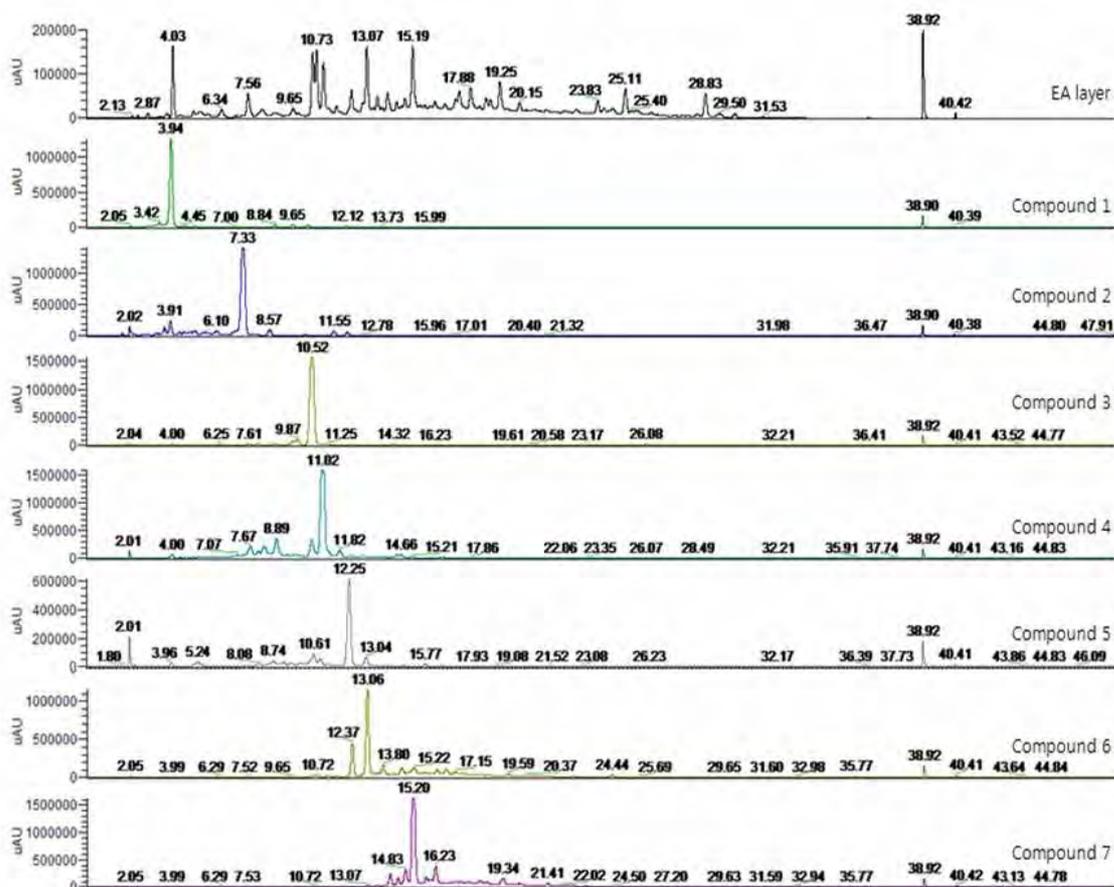
- |   |  |   |
|---|--|---|
| 1. R <sub>1</sub> OH protocatechuic acid                    | 4. R <sub>1</sub> =H p-hydroxycinnamic acid      | 6. R <sub>1</sub> OH hirsutrin                          |
| 2. R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub> vanillic acid           | 5. R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub> ferulic acid | 7. R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub> 3'-methoxyhirsutrin |
| 3. R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH, R <sub>3</sub> OH |  |   |
| 2,4,6 trihydroxybenzoic acid                                |  |   |

Fig. 3. Structures of non-anthocyanin compounds isolated from the purple corn kernel: prothocatechuic acid (1), vanillic acid (2), 2,4,6 trihydroxy benzoic acid (3), p-hydroxycinnamic acid (4), ferulic acid (5), hirsutrin (6), 3'-methoxy hirsutrin (7).



### LC/MS analysis method

Classification	Condition
Machine	ThermoLC/MS
Mobliephase	A - MeOH B - 1% Formic acid
Gradient(A%)	0 min (20%), 7 min (20%), 15 min (25%), 21 min (32%), 32 min (50%), 36 min (100%), 38 min (100%), 40 min (20%), 45 min (20%)
Flow Rate	0.7 mL/min
Injection Volume	10ul
Detector Wavelength (nm)	520 nm, 280 nm
Column	C 18 column (4.6 mm x 150 mm, L.D. 10um, Shiseido)



Chromatographic profile of the purple corn ethanol extraction EtOAc layer isolation compounds 1-7 at 280 nm.

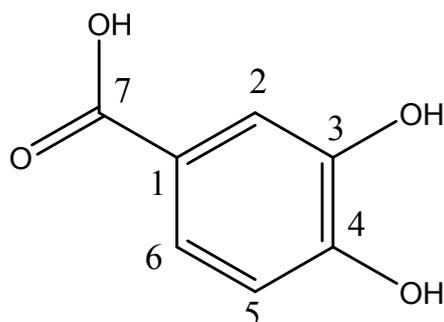
### Compound 1

EI-MS ( $m/z$ ): 154 [M]<sup>+</sup>, 109 [M-COOH]<sup>+</sup>

UV (Acetonitrile,  $\lambda_{max}$  nm): 259 (max), 274

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 400MHz):  $\delta$  7.32 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-2), 7.28 (1H, dd,  $J = 8.14$  Hz, 1.5 Hz, H-6), 6.77 (1H, d,  $J = 8.18$  Hz, H-5);

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO, 400MHz):  $\delta$  168.15 (-COOH), 150.85 (C-4), 145.73 (C-3), 122.72 (C-6), 122.47 (C-1), 117.38 (C-2), 115.99 (C-5)



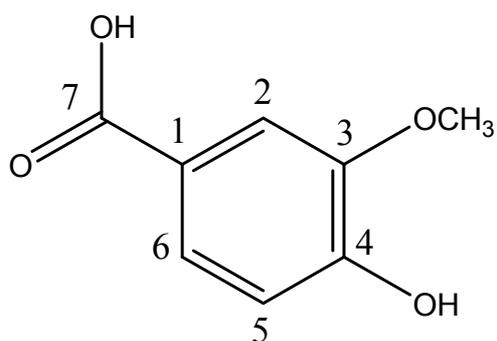
### Compound 2

EI-MS ( $m/z$ ): 169 [M-H]<sup>-</sup>, 123 [M-COO]<sup>-</sup>

UV (Acetonitrile,  $\lambda_{max}$  nm): 260 (max), 292

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 400MHz):  $\delta$  7.35 (2H, m, H-2 and H-6), 6.84 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5), 3.80 (3H, s, OCH<sub>3</sub>);

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO, 400MHz):  $\delta$  167.59 (-COOH), 151.43 (C-4), 147.56 (C-3), 123.82 (C-6), 121.97 (C-1), 115.36 (C-2), 113.03 (C-5), 55.87 (OCH<sub>3</sub>)



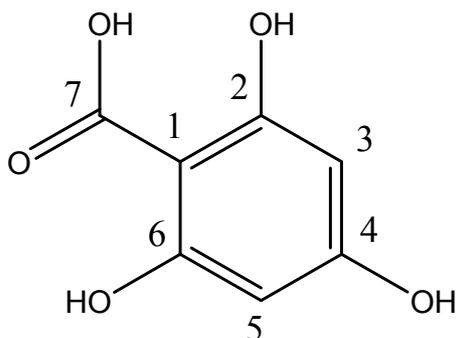
### Compound 3

EI-MS ( $m/z$ ): 171 [M-H], 126 [M-COOH]

UV (Acetonitrile,  $\lambda_{\text{max}}$ , nm): 242 (max), 298

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 400MHz):  $\delta$  5.83 (2H, s, H3-5)

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO, 600MHz):  $\delta$  191.37 (-COOH), 167.75 (C-4), 164.59 (C-2, C-6), 104.99 (C-1), 94.59 (C-3, C-5)



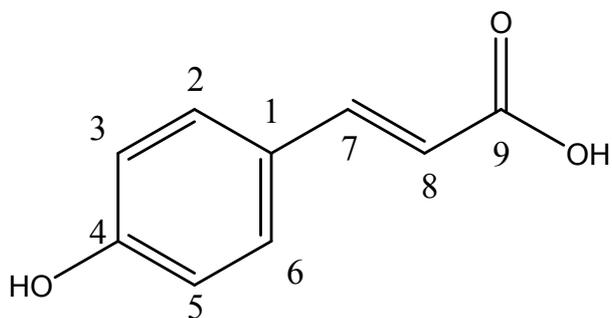
### Compound 4

EI-MS ( $m/z$ ): 165 [M-H], 120 [M-COOH]

UV (Acetonitrile,  $\lambda_{\text{max}}$ , nm): 243 (max), 309

$^1\text{H-NMR}$  (MeOH, 400MHz):  $\delta$  7.53 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H 7), 7.38 (2H, d,  $J=8.0$  Hz, H 2 and H-6), 6.79 (2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-3 and H-5), 6.42 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO, 600MHz):  $\delta$  168.84 (-COOH), 160.45 (C-4), 145.02 (C-7), 130.96 (C-2, C-6), 126.11 (C-1), 116.60 (C-3, C-5), 116.20 (C-8)



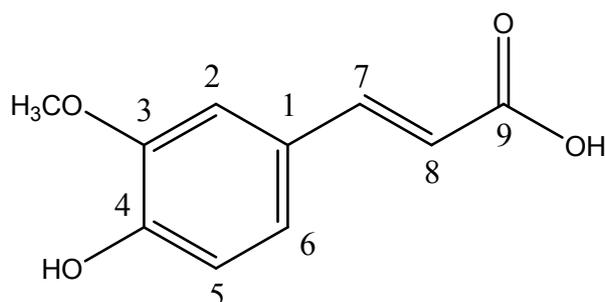
## Compound 5

EI-MS ( $m/z$ ): 194 [M], 149 [M-COOH]

UV (Acetonitrile,  $\lambda_{max}$ , nm): 251 (max), 326

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 400MHz):  $\delta$  7.25 (1H, d,  $J = 16.0$ , H-7), 7.06 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2 and H-6), 6.85 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-3 and H-5), 6.12 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-8), 3.68 (3H, s, OCH<sub>3</sub>);

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO, 600MHz):  $\delta$  168.47 (-COOH), 149.53 (C-3), 148.37 (C-4), 144.92 (C-7), 126.24 (C-1), 123.27 (C-6), 116.13 (C-3), 115.97 (C-8), 111.60 (C-2), 56.15 (OCH<sub>3</sub>)



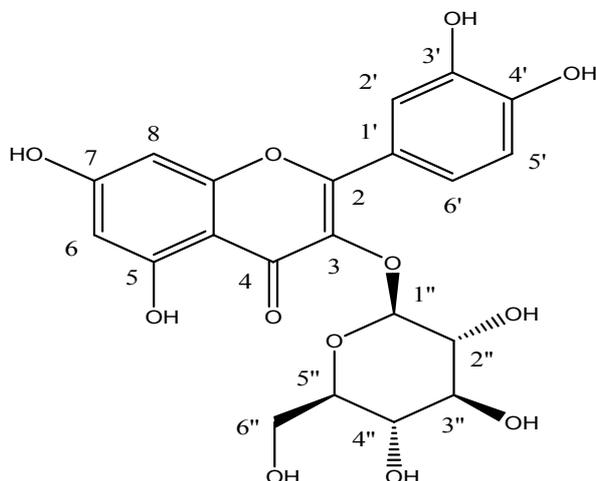
## Compound 6

EI-MS ( $m/z$ ): 302 [M-glucose]

UV (Acetonitrile,  $\lambda_{max}$ , nm): 258, (max) 353, 380

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 400MHz):  $\delta$  7.59 (1H, d,  $J = 2.0$ , H-2'), 7.53 (1H, d,  $J = 2.0$ , H-6'), 6.84 (1H, d,  $J = 9.0$ , H-5'), 6.39 (1H, d,  $J = 2.0$ , H-8), 6.20 (1H, d,  $J = 2.0$ , H-6), 5.46 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-1''), 3.22-3.79 (6H, m, H-Glc);

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO, 400MHz):  $\delta$  178.26 (C-4), 164.93 (C-7), 162.08 (C-5), 157.47 (C-2), 157.10 (C-9), 149.29 (C-3'), 145.63 (C-4'), 134.16 (C-3), 122.46 (C-1'), 122.02 (C-6'), 117.08 (C-5''), 116.06 (C-2''), 104.84 (C-10), 101.64 (C-1''), 99.50 (C-6), 94.35 (C-8), 78.44 (C-5'''), 74.94 (C-4'''), 72.68 (C-2'''), 71.31 (C-3'''), 61.82 (C-6''')



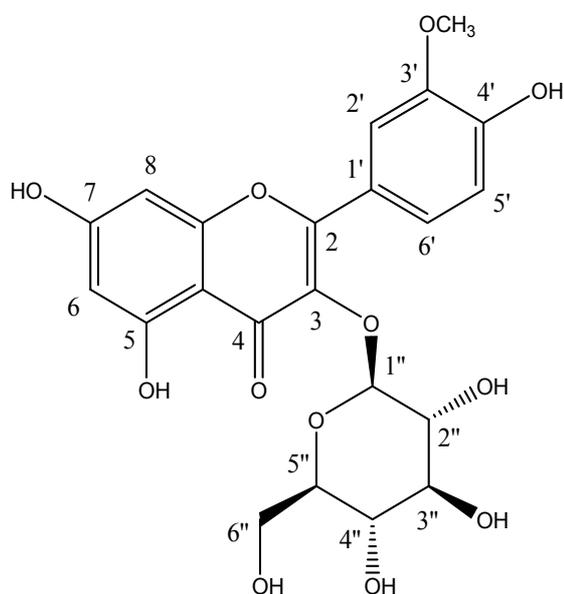
## Compound 7

EI-MS ( $m/z$ ): 316 [M-glucose]

UV (Acetonitrile,  $\lambda_{max}$ , nm): 261, (max) 359

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 400MHz):  $\delta$  7.95 (1H, d,  $J = 2.0$ , H-2'), 7.51 (1H, d,  $J = 2.0$ , H-6'), 6.92 (1H, d,  $J = 9.0$ , H-5'), 6.45 (1H, d,  $J = 2.0$ , H-8), 6.21 (1H, d,  $J = 2.0$ , H-6), 5.57 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-1''), 3.84 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.22 - 3.71 (6H, m, H-Glc);

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO, 400MHz):  $\delta$  177.77 (C 4), 164.52 (C 7), 161.58 (C 5), 156.75 (C 2), 156.66 (C-9), 149.76 (C-3'), 147.23 (C-4'), 133.31 (C-3), 122.39 (C-1'), 121.43 (C-6'), 115.57 (C 5'), 113.82 (C 2'), 104.41 (C 10), 101.11 (C 1''), 99.08 (C 6), 94.07 (C 8), 77.81 (C-5''), 76.76 (C-4''), 74.69 (C-2''), 70.15 (C-3''), 60.93 (C-6''), 56.02 (OCH<sub>3</sub>)



### 3. 항당뇨효과 측정

#### 가. PTP1B

HSCCC 분석을 통해 분리한 안토시아닌 주요 성분은 각 세부과제에 활성용으로 분양하였으며 또한, Diaon HP-20으로 처리한 것과 처리전의 조 추출물 PTP1B(단백질 디로신 포스다파아제 1B) 억제 효능을 평가하였다.

PTP1B 억제 활성에서는 cyanidin-3-(6-malonyl-glucoside)이 비교적 우수한 활성을 나타내었다.

Table 2. Inhibitory effects of purple corn extracts and anthocyanins against PTP1B

Sample	Concentration ( $\mu$ g/ml)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
Suramin	5	64.32	3.58
	2.5	46.46	
	1	10.69	
Purple corn ex.	100	19.10	-
Purple corn HP20	100	39.45	
Cyanidin 3 glucoside	100	32.95	
peonidin-3-glucoside	100	25.76	-
pelargonidin 3 glucoside	100	55.05	224.97
	50	13.35	
	10	1.09	
cyanidin 3 (6 malonyl glucoside)	50	91.73	41.94
	10	36.24	
	5	18.54	
peonidin-3-(6-malonyl-glucoside)	100	34.72	-

Non-anthocyanin compound의 항당뇨 활성을 검색하기 위해 PTP-1 $\beta$  억제 활성을 측정하여 그 결과를 나타내었다(Table 3). 3' methoxyhirsutin의 경우 억제율이 85.89%로서 대조군인 Suramin의 64.32%의 억제율보다 높은 활성을 가지는 것으로 나타났다. 또한, ferulic acid도 대조군과 유사한 활성을 나타내었다.

Table 3. Inhibition effect compounds isolated from purple corn on PTP1 $\beta$

	sample	Inhibition (%) at 100 $\mu$ g/ml
Control	Suramin	64.32
	Protocatechuic acid (1)	14.46
Non-anthocyanins	Vanillic acid (2)	7.60
	2,4,6-trihydroxybenzoic acid (3)	25.27
	p-hydroxycinnamic acid (4)	42.46
	Ferulic acid (5)	64.53
	Hirsutin (6)	30.30
	<b>3'-methoxyhirsutin (7)</b>	<b>85.89</b>

#### 4. 항당뇨합병증효과 측정

##### 가. AGEs (최종당화산물) 생성 저해능 측정

AGEs 효능은 Diaion HP-20으로 처리한 시료는 다른 시료에 비해 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. 따라서 purple corn 시료의 활성에 관여하는 성분은 안토시아닌 이외에 다른 페놀성 화합물로 판단된다. PTP1B 억제 활성에서는 cyanidin-3-(6-malonyl-glucoside)이 비교적 우수한 활성을 나타내었다.

Table 4. Inhibitory effects of purple corn extracts and anthocyanins on AGEs formation.

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
Aminoguanidine	196.08	69.21	113.82
	98.04	48.96	
	19.61	24.95	
purple corn crude ex.	196.08	20.61	-
purple corn HP20	196.08	45.67	-
cyanidin-3-glucoside	19.61	7.90	-
peonidin-3-glucoside	19.61	5.59	-
pelargonidin-3-glucoside	19.61	9.18	-
cyanidin-3-(6-malonyl-glucoside)	19.61	17.44	-
peonidin-3-(6-malonyl-glucoside)	19.61	5.70	-

김정옥수수 ethyl acetate 분획물에서 분리된 non-anthocyanin 화합물은 전체적으로 AGE를 억제하는 것으로 나타났으며, 그 중 2,4,6-trihydroxy benzoic acid와 hirsutrin이 우수한 활성을 나타내었다. Table 5. 최종당화산물과 알도스환원효소의 억제효능 AR 억제효능을 갖는 화합물은 Hirsutrin으로 밝혀졌다.

Table 5. Inhibitory Effects of compounds isolated from the corn of *Zea mays*, L on Advanced glycation of end products

Non-anthocyanin compounds		AGEs Inhibition (%)
Control	Aminoguanidine <sup>11</sup>	14.18
	Protocatechuic acid (1)	-
	Vanillic acid (2)	-
	2,4,6 trihydroxy benzoic acid (3)	47.16
Non anthocyanins	p-hydroxycinnamic acid (4)	15.68
	Ferulic acid (5)	21.24
	<b>Hirsutrin (6)</b>	<b>34.70</b>
	3'-methoxyhirsutrin (7)	28.64

<sup>11</sup>Inhibition rate was calculated as percentage with respect to the control value and expressed as meanstandard deviation of triplicate experiments. <sup>12</sup> Aminoguanidine was used as positive control.

나. RIAR 활성 측정 (Aldose reductase)

Aldose reductase 효소에 대한 억제활성은 Table 6에서 보는 바와 같이 Diaon HP 20으로 처리한 조추출물이 상대적으로 우수한 활성을 나타내었다. 다른 활성의 결과와 마찬가지로 purple corn 추출물의 항당뇨 활성과 관련된 성분은 안토시아닌 이외에 다른 phenolic 성분들이 관련된 것으로 판단된다. 따라서 현재 Purple corn의 다른 페놀성 성분을 분석 중에 있다. 안토시아닌 성분 중에서는 cyanidin-3-(6-malonyl-glucoside)가 우수한 활성을 나타내었다.

Table 6. Inhibitory effects of purple corn extracts and anthocyanins against RIAR

Sample name	Concentration (µg/mL)	Rat Lens Aldose Reductase	
		Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (µM)
Quercetin	4	58.41	9.84
	2	33.78	
	0.4	1.09	
Purple corn 추출물	40	39.47	
Purple corn HP20	40	77.41	22.2
		49.40	
		18.98	
Cyanidin-3-glucoside	40	47.72	-
peonidin-3-glucoside	40	13.21	-
pelargonidin-3-glucoside	40	36.98	-
cyanidin-3-(6-malonyl-glucoside)	40	78.11	51.14
	20	29.90	
	4	5.01	
peonidin-3-(6-malonyl-glucoside)	40	-	-

김정옥수수 ethyl acetate 분획물에서 분리된 non-anthocyanin 화합물은 전체적으로 AR 억제하는 것으로 나타났으며, 그 중 3'-methoxyhirsutrin와 hirsturin이 우수한 활성을 나타내었다.

Table 7. Inhibitory Effects of non-anthocyanin compounds isolated from the corn of *Zea mays*. L on rat lens aldose reductase

Non anthocyanin compounds	Concentration (ug/ml)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (uM)
Protochatechuic acid (1)	10	3.22	
Vanillic acid (2)	10	20.34	-
2,4,6-trihydroxy benzoic acid (3)	10	73.73	
170	5	48.14	34.88
	1	16.95	
	10	77.81	
p-hydroxycinnamic acid (4)164	5	43.73	36.70
	1	13.76	
	10	77.25	
Ferulic acid (5) 194	5	49.83	21.49
	1	11.15	
	10	86.69	
<b>Hirsutrin (6) 464</b>	<b>5</b>	<b>76.15</b>	<b>4.93</b>
	<b>1</b>	<b>27.56</b>	
	10	89.74	
3'-methoxyhirsutrin (7) 478	5	73.67	6.02
	1	16.43	
	10	82.99	
Quercetin <sup>a)</sup>	5	67.91	11.62
	1	30.34	

Inhibition rate was calculated as percentage with respect to the control value and expressed as meanstandard deviation of triplicate experiments. The concentration of each test sample giving rise to 50% inhibition of activity (IC<sub>50</sub>) was estimated from the least-squares regression line of the logarithmic concentration plotted against inhibitory activity. a) Quercetin was used as positive control.

## 5. 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용한 최적의 추출조건 확립

### 가. 추출조건 최적화를 위한 실험계획

자색 옥수수의 최적 추출 조건을 확립하기 위해 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM)을 사용하였으며 예비실험의 결과를 바탕으로 중심합성계획(central composite design)을 실시하였다. 즉 추출공정의 독립변수( $X_i$ )는 추출온도 (20~60 °C,  $X_1$ ), 추출 시간 (4~12 hr,  $X_2$ ), 추출 용매의 농도 (20~40%,  $X_3$ ), 추출 용매의 비율 (8~24%,  $X_4$ )에 대한 실험범위를 선정하여 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하였으며 표 1에 나타내었다. 또한 이들의 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 추출 수율, 폴리페놀 함량, 안토시아닌 함량으로 이를 3회 반복하여 측정하면 후 각각 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석에 의한 최적조건의 예측은 statistical analysis system(SAS version 9.1) program을 이용하였으며, 회귀분석 결과 일계절이 최대절이거나 최소절이 아니고 안장절일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다. 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{21}X_2X_1 + b_{22}X_2^2 + b_{23}X_3X_2 + b_{24}X_4X_2 + b_{25}X_5X_2 \quad (\text{수식 1})$$

또한, 반응표면 그래프는 Sigma plot (version 10.0, Systat Software Inc, USA)을 사용하여 나타냈다.

### 나. 추출 및 수율 측정

반응표면모델식(response surface model equation)으로 표현했을 때의 결과는 Table 8, 같이 나타났으며, 여기에서의  $R^2$ 는 0.8004로 10% 이내에서 유의성이 인정되었다. 또한 Table 9, 에 나타나 있듯이 자색 옥수수 추출물의 분석 결과 추출조건은 추출 온도는 58.87°C, 추출 시간은 7.53시간, 추출 용매의 농도는 32.31%, 추출 용매의 비율은 1:17.65일 때 10.33 %의 추출 수율을 얻을 수 있을 것으로 나타났으며, 예측된 정상점은 안장점으로 조건에서 벗어날수록 총 수율이 감소하는 경향을 보였다. 추출조건의 영향은 큰 차이를 보이지 않았으나 그 중 추출온도에 더 영향을 받는 것으로 나타났다. Table 10.

**Table 8.** 반응표면분석을 통한 자색 옥수수의 추출조건에 관한 다항식

종속변수	반응표면분석을 통하여 얻어진 이차다항식 <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup>	유의성
추출 수율 (%)	$Y_1=29.279167-0.538500X_1-0.842500X_2-0.823000X_3-0.01083$	0.8004	0.0192
	$3X_1-0.006002X_{12}-0.007188X_1X_2+0.059427X_2^2-0.004625X_1X_3-$		
	$0.003125X_2X_3+0.010508X_3^2+0.004219X_1X_1^2+0.014844X_2X_1-0.$		
총 폴리페놀 함량(mg/g)	$003437X_3X_1-0.0077997X_1^2$	0.7863	0.0266
	$Y_2=12.967917+0.236917X_1-0.119583X_2-0.184667X_3-1.22104$		
	$2X_1-0.001699X_{12}-0.000781X_1X_2+0.021901X_2^2-0.013988X_1X_3+$		
총 안토시아닌 함량 (mg/L)	$0.003563X_2X_3+0.012854X_3^2+0.16953X_1X_1^2-0.021797X_2X_1-0.0$	0.7768	0.0325
	$07281X_3X_1+0.029538X_1^2$		
	$Y_3=412.389167+0.248000X_1-4.349167X_2-14.648667X_3-23.73$		
	$7500X_1-0.027356X_{12}-0.058562X_1X_2+0.341094X_2^2-0.079975X_1$		
	$X_3 0.072875X_2X_3-0.288875X_3^2+0.279406X_1X_1^2 0.230156X_2X_1+$		
	$0.099687X_3X_1+0.388867X_1^2$		

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub>, 추출 온도 (°C); X<sub>2</sub>, 추출 시간 (hr); X<sub>3</sub>, 추출 용매의 농도 (%); X<sub>1</sub>, 추출 용매의 비율 (1:V); Y<sub>1</sub>, 추출 수율 (%); Y<sub>2</sub>, 총 폴리페놀 함량 (mg/g); Y<sub>3</sub>, 총 안토시아닌 함량 (mg/L)

**Table 9.** 자색 옥수수 추출조건 중 최대도 얻을 수 있는 예상수준과 이에 대한 최대 반응량

종속변수	독립변수				최대값	형태
	X <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	X <sub>3</sub> <sup>3)</sup>	X <sub>1</sub> <sup>4)</sup>		
추출 수율 (%)	58.87	7.53	32.31	17.65	10.33	안 장 질
총 폴리페놀 함량(mg/g)	29.29	8.99	33.67	10.25	7.89	안 장 질
총 안토시아닌 함량 (mg/L)	45.22	7.85	34.14	22.97	82.44	안 장 질

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub>, 추출 온도 (°C); X<sub>2</sub>, 추출 시간 (hr); X<sub>3</sub>, 추출 용매의 농도 (%); X<sub>1</sub>, 추출 용매의 비율 (1:V); Y<sub>1</sub>, 추출 수율 (%); Y<sub>2</sub>, 총 폴리페놀 함량 (mg/g); Y<sub>3</sub>, 총 안토시아닌 함량 (mg/L)

**Table 10.** 자색옥수수의 추출조건에 대한 회귀모델에 대한 회귀분석

추출 조건	F-ratio			
	$X_1$ <sup>1)</sup>	$X_2$ <sup>2)</sup>	$X_3$ <sup>3)</sup>	$X_4$ <sup>4)</sup>
추출 수율 (%)	8.09	3.34	0.40	3.44
총 폴리페놀 함량(mg/g)	3.76	2.60	3.12	3.15
총 안토시아닌 함량 (mg/L)	1.90	4.29	2.83	2.98

<sup>1)</sup> $X_1$ , 추출 온도 (°C); <sup>2)</sup> $X_2$ , 추출 시간 (hr); <sup>3)</sup> $X_3$ , 추출 용매의 농도 (%); <sup>4)</sup> $X_4$ , 추출 용매의 비율 (1:1);  $Y_1$ , 추출 수율 (%);  $Y_2$ , 총 폴리페놀 함량 (mg/g);  $Y_3$ , 총 안토시아닌 함량 (mg/L)

또한, 자색옥수수 추출시 시료에 대한 추출온도 ( $X_1$ , °C), 추출시간 ( $X_2$ , hr), 추출 용매의 농도 ( $X_3$ , %), 추출 용매의 비율 ( $X_4$ , 1:x)이 추출 수율 (%)에 미치는 영향을 알아보기 위해 Sigma plot program을 사용하여 3차원 그래프로 나타내었다. (fig 4.) 시료에 대한 추출온도가 높은 경우 수율이 증가하는 경향을 나타냈으며, 추출 시간과 추출 용매의 비율은 어느 정도 관여 하나 추출 용매의 농도는 추출 수율에 관여하지 않음을 알 수 있었다. 이는 대구수산물 열수추출조건 최적화 연구(이명삼 외, Food engineering process vol 10, No.4, pp. 248-255)에서 추출에서 추출 용매의 양이 증가할수록 수율이 증가하며 추출온도에도 영향을 받는다는 보고와 비슷하였다. 그러나 홍월식 양배추의 추출조건 최적화(김현구 외, 한국식품 영양과학회 vol 34, No.15, pp. 1625-1632)에 대한 보고에서 시료에 대한 추출 용매의 양과 추출온도는 추출 수율에 있어 비교적 적은 영향을 미친다고 고하여 본 실험의 결과와는 다소 다른 경향을 나타내었다.

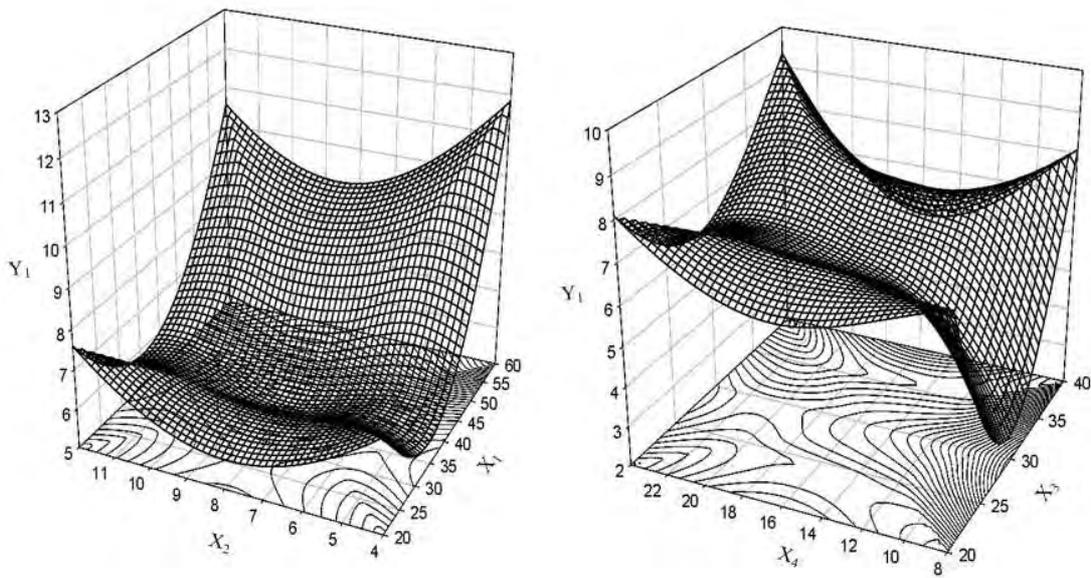


Fig 4. 추출 조건에 대한 자색옥수수 추출물의 반응표면 그래프

$X_1$ , 추출 온도 ( $^{\circ}\text{C}$ ):  $X_2$ , 추출 시간 (hr):  $X_3$ , 추출 용매의 농도 (%):  $X_4$ , 추출 용매의 비율 (1:N):  $Y_1$ , 추출 수율 (%)

다. 총 Polyphenol 함량 측정

반응표면모델식(response surface model equation)으로 표현했을 때의 결과는 Table 8.와 같이 나타났으며, 여기에서의  $R^2$ 는 0.7863로 10% 이내에서 유의성이 인정되었다. Table 9.에 나타나 있듯이 자색 옥수수 추출물의 분석 결과 추출조건은 추출온도는 29.29 $^{\circ}\text{C}$ , 추출시간은 8.99 시간, 추출 용매의 농도는 33.67%, 추출 용매의 비율은 1:10.25일 때 7.89 mg/g의 총 폴리페놀 함량을 얻을 수 있을 것으로 나타났으며, 예측된 정상점은 안장점으로 나타났다. 또한, 추출조건에의 영향에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 그 중 추출온도에 더 영향을 받는 것으로 나타났다 (Table 10.). 자색옥수수 추출 시 시료에 대한 추출온도 ( $X_1$ ,  $^{\circ}\text{C}$ ), 추출시간 ( $X_2$ , hr), 추출 용매의 농도 ( $X_3$ , %) 추출 용매의 비율 ( $X_4$ , 1:N)이 총 폴리페놀 함량(mg/g)에 미치는 영향을 알아보기 위해 Sigma plot program을 사용하여 그래프로 나타내었다(fig 5). 시료에 대한 추출온도가 낮으며, 추출 용매의 비율이 높을수록 총 폴리페놀 함량이 증가하는 경향을 보였다.

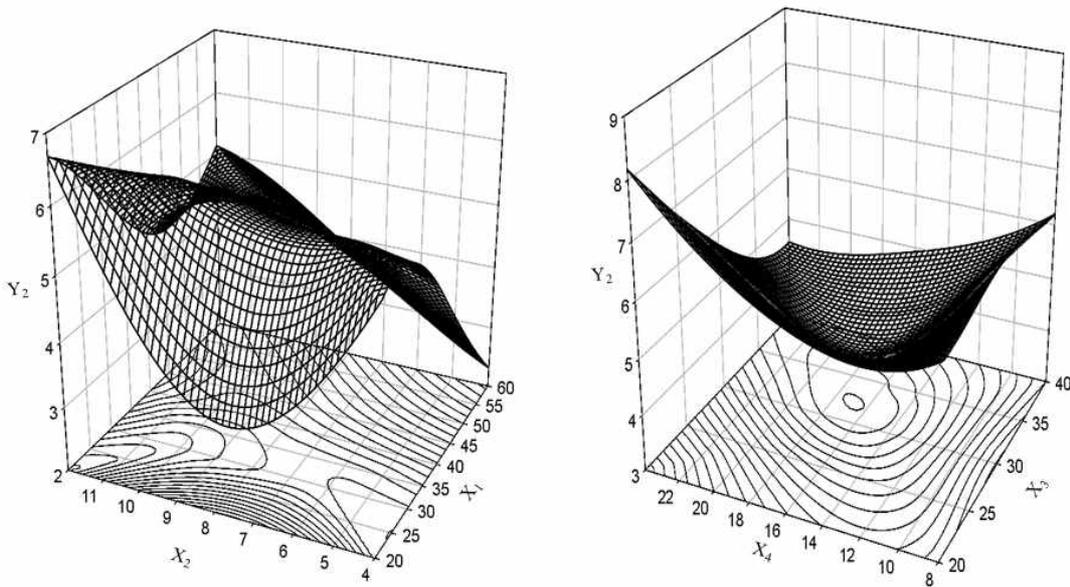


fig 5. 총 폴리페놀 함량에 대한 자색옥수수 추출물의 반응표면 그래프

$X_1$ , 추출 온도 ( $^{\circ}\text{C}$ );  $X_2$ , 추출 시간 (hr);  $X_3$ , 추출 용매의 농도 (%);  $X_4$ , 추출 용매의 비율 (1:V);  $Y_2$ , 총 폴리페놀 함량 (mg/g)

#### 라. 총 Anthocyanin 함량 측정

반응표면모델식(response surface model equation)으로 표현했을 때의 결과는 Table 8.와 같이 나타났으며, 여기에서의  $R^2$ 는 0.7768로 10% 이내에서 유의성이 인정되었다. Table 9.에 나타나 있듯이 자색 옥수수 추출물의 분석 결과 추출조건은 추출온도는 45.22 $^{\circ}\text{C}$ , 추출시간은 7.85 시간, 추출 용매의 농도는 34.14%, 추출 용매의 비율은 1:22.97일 때 82.44 mg/L의 총 안토시아닌 함량을 얻을 수 있을 것으로 나타났으며, 예측된 정상점은 안장점으로 나타났다. 또한, 추출조건에 대한 영향에서는 추출시간에 더 영향을 받는 것으로 나타났다 (Table 10). 자색 옥수수 추출 시 시료에 대한 추출온도 ( $X_1$ ,  $^{\circ}\text{C}$ ), 추출시간 ( $X_2$ , hr), 추출 용매의 농도 ( $X_3$ , %) 추출 용매의 비율 ( $X_4$ , 1:V)이 총 안토시아닌 함량(mg/L)에 미치는 영향을 알아보기 위해 Sigma polt program을 사용하여 그래프로 나타내었다(fig 6). 시료에 대한 추출시간과 추출 용매의 비율이 높을수록 총 안토시아닌 함량이 증가하는 경향을 보였다.

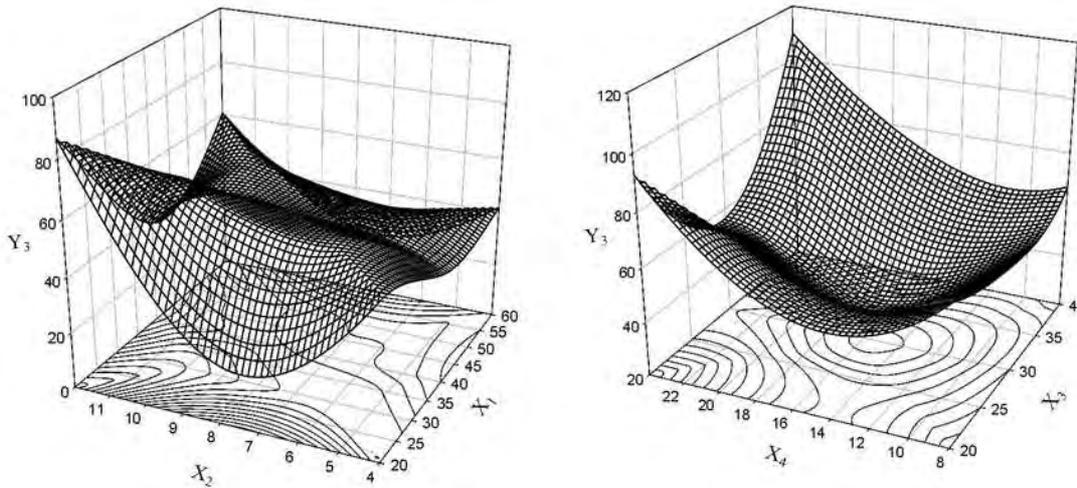


fig 6. 총 안토시아닌 함량에 대한 자색옥수수 추출물의 반응표면 그래프

$X_1$ , 추출 온도 ( $^{\circ}\text{C}$ );  $X_2$ , 추출 시간 (hr);  $X_3$ , 추출 용매의 농도 (%);  $X_4$ , 추출 용매의 비율 (1:N);  $Y_3$ , 총 안토시아닌 함량 (mg/l.)

#### 나. 최적 추출조건 예측

자색옥수수 추출물의 최적 추출조건을 설정하기 위하여 추출온도, 추출시간 추출 용매의 농도 및 추출 용매의 비율을 달리한 조건별 추출물의 추출 수율, 총 폴리페놀 함량 및 총 안토시아닌 함량에 대한 반응표면을 superimposing하여 추출물의 특성을 모두 만족시켜 주는 추출 조건 범위를 중복되는 부분으로 하여 추출조건을 예측하였다.

그 결과, 추출물의 최적화를 위한 추출조건 범위로 추출온도( $^{\circ}\text{C}$ )는 40~60 $^{\circ}\text{C}$ , 추출시간(hr)은 7.5~9.0 시간, 추출 용매의 농도(%)는 32~34%, 추출 용매의 비율은 1:12~1:15의 비율로 예측되었다.

Table 11. 자색옥수수의 최적 추출 조건

추출 조건	최적 추출 조건
추출 온도 ( $^{\circ}\text{C}$ )	40-60
추출 시간 (hr)	7.5-9.0
추출 용매 농도 (%)	32-34
추출 용매 비율 (1:N)	1:12-1:15

## 6. 우수종 선별

### 가. 추출

본 실험에서 사용된 자색옥수수 (*Zea mays*, L.)는 강원도 옥수수시험장에서 공급받아 시료로 사용하였으며, 구입한 시료를 45°C 온도에서 열풍건조 시킨 후, 건조된 시료는 분쇄기 (Kaiser, JL-500, Joylife)를 사용하여 0.5mm 이하 크기로 분쇄한 후 체에 걸러 입자의 크기를 고르게 하였다. 이 분말 상태의 자색 옥수수는 0.2 mm PE film에 밀봉 포장 후 20°C의 압소에 보관하면서 실험에 사용하였다. 또한 추출용매로 사용한 주정 (순도 94.5%)은 Dae jung Co. (4020-2210) 에서 구입하였으며, 분석에 사용한 시약은 일급이상 시약을 사용하였다. 분쇄한 검정옥수수 1g에 주정 10ml을 넣어 초음파로 추출하였다.

1차 시료 (359종), 2차 시료 (306종), 3차 시료 (207종) 받아 실험에 이용하였다.

### 나. Anthocyanin 함량 측정

359종의 옥수수 시료를 520 nm에서 측정하여 Total antocyanin 면적값을 Table 12에 나타내었다. Total antocyanin 면적값이  $40 \times 10^6$ 인 것이 15개 확인 되었다. 그 중에서 158번이 가장 많은 안토시아닌함량을 가지고 있었으며 520 nm에서의 네인 피크 6개를 확인하였다. 상대적으로 안토시아닌 pattern 종류가 다양한 것을 시료 비교하여 53종을 선정하여 활성을 평가하였고 각 세부과제에 분양하였다.

Table 12. Total antocyanin area of extracts from *zea mays* L. (1차년도)

No.	Area ( $10 \times 10^6$ )	No.	Area ( $10 \times 10^6$ )	No.	Area ( $10 \times 10^6$ )	No.	Area ( $10 \times 10^6$ )	No.	Area ( $10 \times 10^6$ )
1	15	73	15	145	14	217	22	289	21
2	14	74	19	<b>146</b>	<b>48</b>	218	38	290	27
3	14	75	14	147	13	219	14	291	32
4	17	76	15	148	39	220	22	292	13
5	25	77	12	149	15	221	18	293	20
6	15	78	12	150	12	222	19	294	17
7	16	79	11	151	11	223	28	295	22
8	11	80	10	152	14	224	36	296	26
9	15	81	10	153	12	225	22	297	13
10	13	82	11	154	18	226	18	298	22
11	19	83	10	155	32	227	18	299	22
12	16	84	10	<b>156</b>	<b>48</b>	228	28	300	32
13	19	85	10	157	21	229	23	301	31
14	25	86	13	<b>158</b>	<b>84</b>	230	22	302	15
15	17	87	12	159	27	231	23	303	20
16	17	88	10	160	27	232	19	304	22
17	14	89	11	161	34	233	21	305	39
18	17	90	11	162	14	<b>234</b>	<b>40</b>	306	30
19	18	91	10	<b>163</b>	<b>72</b>	235	29	307	28

20	19	<b>92</b>	<b>42</b>	164	19	236	21	308	19
21	29	93	11	165	28	237	11	309	21
<b>22</b>	<b>42</b>	94	11	166	24	238	22	310	24
23	16	95	9	167	29	239	29	311	22
24	14	96	10	168	19	240	16	312	9
25	13	97	8	169	14	241	19	313	17
26	37	98	12	170	22	242	17	314	7
27	24	99	10	171	14	243	22	315	22
28	18	100	13	172	16	244	23	316	21
29	18	101	10	173	14	245	27	317	20
30	17	102	8	174	12	246	23	318	22
31	22	103	9	175	8	247	21	319	15
<b>32</b>	<b>45</b>	104	20	176	12	248	17	320	23
33	20	105	12	177	14	249	16	321	16
34	13	106	14	178	18	250	24	322	18
35	22	107	11	179	15	251	25	323	17
36	21	108	10	180	15	252	14	324	8
37	24	109	11	181	19	253	10	325	29
38	17	110	11	182	15	254	7	326	16
39	13	111	28	183	28	255	14	327	22
40	13	112	16	184	29	256	12	328	18
41	34	113	8	185	12	257	25	<b>329</b>	<b>41</b>
42	21	114	16	186	13	258	9	330	34
43	14	115	10	187	10	259	20	331	15
44	12	116	9	188	12	260	15	332	17
45	24	117	14	189	8	261	28	333	17
46	15	118	24	190	14	262	30	334	19
47	16	119	20	191	16	263	25	335	22
48	16	120	8	192	22	264	28	336	25
49	15	121	15	193	14	265	15	337	15
50	15	122	21	194	30	266	15	<b>338</b>	<b>42</b>
51	17	123	16	195	25	267	28	339	13
52	36	124	9	196	29	268	20	340	21
53	15	125	12	197	23	269	15	341	8
54	17	126	11	198	21	270	13	342	20
55	12	127	15	199	17	271	22	343	17
56	21	128	17	200	22	272	24	344	30
<b>57</b>	<b>51</b>	129	13	201	17	273	38	345	27
58	24	130	10	202	20	274	21	346	23
59	18	131	13	203	16	275	18	347	17
60	13	132	29	204	20	276	16	348	23
61	23	133	16	205	38	<b>277</b>	<b>45</b>	<b>349</b>	<b>55</b>
62	30	134	16	206	20	278	32	350	20
63	12	135	35	207	32	279	21	351	22
64	10	136	11	208	15	280	21	352	19
65	13	137	31	209	16	281	17	353	25
66	19	138	24	210	26	282	24	354	27
<b>67</b>	<b>60</b>	139	13	211	12	<b>283</b>	<b>47</b>	355	26
68	26	140	12	212	19	284	24	356	30
69	16	141	17	213	19	285	22	357	21

70	13	142	9	214	29	286	27	358	15
71	12	143	12	215	20	287	20	359	21
72	13	144	12	216	26	288	16		

Table 13. Total antocyanin area of extracts from *zea mays* L. (3차년도)

Sample No.	Area ( $10 \times 6$ )	No.	Area ( $10 \times 6$ )	Sample No.	Area ( $10 \times 6$ )	Sample No.	Area ( $10 \times 6$ )	Sample No.	Area ( $10 \times 6$ )
1	2.2	46	0.8	91	0.6	136	1.5	181	1.0
2	1.3	47	0.2	92	0.7	137	x	182	0.6
3	0.5	48	1.1	93	0.5	138	0.6	183	0.6
<b>4</b>	<b>2.5</b>	49	0.9	94	0.7	139	0.3	184	1.7
<b>5</b>	<b>2.4</b>	<b>50</b>	<b>4.1</b>	95	0.8	140	0.4	185	1.0
<b>6</b>	<b>2.7</b>	51	1.7	96	0.5	141	0.3	186	1.5
7	0.8	52	0.7	97	0.9	142	0.6	187	0.4
8	0.5	<b>53</b>	<b>5.2</b>	98	0.6	143	0.7	188	0.4
9	1.1	54	0.5	99	0.6	144	0.4	189	0.8
10	1.7	55	1.4	100	0.3	145	0.6	190	1.8
11	0.6	56	0.4	<b>101</b>	<b>3.4</b>	146	0.3	191	0.9
12	1.4	57	1.0	102	0.8	147	0.4	<b>192</b>	<b>4.7</b>
13	1.3	58	0.1	<b>103</b>	<b>2.3</b>	148	0.3	193	0.1
<b>14</b>	<b>2.8</b>	<b>59</b>	<b>3.2</b>	104	1.0	149	0.1	194	1.1
15	1.0	60	0.8	105	0.6	150	0.2	195	1.1
16	1.9	<b>61</b>	<b>2.8</b>	106	1.0	151	0.3	196	2.1
<b>17</b>	<b>3.0</b>	62	2.1	107	0.3	152	x	197	1.1
18	1.3	63	0.2	108	0.9	153	0.1	198	0.5
19	1.0	64	0.7	109	0.8	154	0.1	<b>199</b>	<b>2.8</b>
<b>20</b>	<b>2.5</b>	65	0.6	<b>110</b>	<b>5.1</b>	155	0.4	200	1.0
21	2.3	66	0.2	<b>111</b>	<b>2.4</b>	156	0.1	201	0.9
<b>22</b>	<b>2.5</b>	67	1.0	112	0.1	157	x	<b>202</b>	<b>2.4</b>
23	1.3	68	0.2	113	0.3	<b>158</b>	<b>2.9</b>	203	1.6
24	0.6	69	1.6	114	0.3	159	1.8	204	1.7
<b>25</b>	<b>2.8</b>	70	0.6	115	0.8	160	1.6	205	0.5
26	1.6	71	0.1	116	0.4	161	0.8	206	0.7
27	1.3	72	0.9	117	0.5	162	0.7	207	0.8
28	0.2	73	1.0	118	0.3	163	1.3		
29	0.4	74	0.3	119	0.3	164	1.1		
30	0.4	75	0.3	120	0.1	165	1.4		
31	0.9	76	0.2	121	0.8	166	0.3		
32	0.4	77	0.5	122	2.2	167	0.3		
33	1.2	78	0.4	123	0.5	168	0.1		
34	0.2	79	0.7	124	1.3	169	0.1		
35	1.5	80	0.8	125	0.6	170	0.3		
36	1.0	81	1.1	126	0.8	171	0.4		
37	1.1	82	0.5	127	0.4	172	1.0		
38	2.2	83	0.6	128	0.7	173	1.6		
39	1.4	84	1.1	129	0.8	174	0.5		
40	0.3	85	0.7	130	0.6	175	x		

41	0.9	86	0.9	131	0.5	176	1.1
42	0.4	87	0.7	132	1.2	177	1.2
43	0.4	88	0.2	133	0.7	178	1.6
44	0.4	89	0.2	134	1.5	179	x
45	0.4	90	0.1	135	2.1	180	0.5

안토시아닌 면적값이 가장 큰 20종을 선발하였으며 그 중에서 53번 시료가 가장 많은 양의 안토시아닌을 함유하고 있었다.

다. 총 폴리페놀함량 측정 & 총 플라보노이드함량 측정

다양한 활성을 평가하기 위하여 상대적으로 안토시아닌 함량이 높고, HPLC 크로마토그램에서 피크 pattern이 다양한 것을 시료 비교하여 53종을 선정하였다. 선정된 53종을 대상으로 먼저 총페놀 함량 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. Table 14에서 보는 바와 같이 페놀 함량 80mg/g이상인 것은 60, 283번 플라보노이드 함량 80mg/g이상인 것은 11, 29, 30, 60, 67, 100, 133, 283번 이었다.

Table 14. Total phenol content and Total Flavonoid contents of *Zea mays* L. (mg/g) (1차년도)

Sample No.	Total flavonoids	Total Polyphenols	Sample No.	Total flavonoids	Total Polyphenols
5	62.5	21.6	132	62.5	33.6
11	82.5	45.6	133	97.5	51.2
12	65.0	32.0	137	62.5	20.0
20	67.5	49.6	158	60.0	28.8
22	77.5	32.0	165	60.0	20.0
26	70.0	49.6	170	72.5	40.2
29	85.0	32.0	184	55.0	23.2
30	95.0	31.2	196	60.0	21.6
32	72.5	44.8	206	60.0	22.4
35	65.0	41.6	224	60.0	28.8
37	60.0	26.4	234	50.0	44.0
41	67.5	40.0	235	57.5	50.4
42	62.5	23.2	250	57.5	25.6
51	65.0	20.0	251	40.0	53.6
52	70.0	28.0	257	55.0	25.6
57	70.0	40.6	261	62.5	22.4
58	67.5	28	277	55.0	27.2
<b>60</b>	<b>98.0</b>	<b>132</b>	<b>283</b>	<b>95.0</b>	<b>87.2</b>
62	65.9	36.6	291	75.0	59.2
67	87.5	55.2	300	65.0	22.4
73	67.5	38.4	303	50.0	33.6
74	65.0	32.8	311	52.5	46.4
86	77.5	28.8	320	62.5	27.2
92	65.0	16.0	344	62.5	35.2

100	85.0	30.4	349	70.0	40.0
111	60.0	21.6	355	65.0	20.8
118	72.5	23.2			

Total polyphenol content & ABTS radical scavenging ability of extracts from *Zea mays* L.  
(2차년도)

TPC	1.5% 상	ABTS	20% 상	TPCmg /g	ABTS	20% 상	TPCmg /g	ABTS	20% 상	TPCmg /g
17	1.59	4	25.47	1.27	101	26.07	1.39	282	47.51	1.56
18	1.73	5	29.01	1.36	104	23.93	0.99	283	31.42	1.46
21	1.96	11	29.94	1.36	105	44.83		290	48.39	1.07
22	2.04	12	21.86	1.03	106	29.27	1.32	291	36.78	1.00
33	1.66	17	25.41		109	29.04	1.44	292	32.65	1.52
38	1.96	18	31.57		110	23.37	1.22	293	50.06	1.18
49	2.05	21	37.56		111	22.75	1.10	294	41.35	0.96
61	1.61	22	47.33		117	40.83	0.96	295	24.91	1.14
64	2.23	26	27.56	1.45	118	26.06	0.75	296	37.75	0.95
65	1.83	30	31.80	1.47	119	33.44	0.71	297	43.02	0.86
78	1.58	31	22.79	1.36	134	24.82	1.13	298	45.05	1.79
79	3.09	33	35.29		137	21.57	0.67	299	28.60	1.37
82	1.63	37	25.23	1.26	143	38.28	1.49	300	56.48	1.36
91	1.84	38	41.22		145	24.30	1.18	302	66.85	1.54
105	1.72	40	34.07	1.49	146	21.66	1.19	303	59.99	1.43
147	1.91	42	21.34	1.30	147	47.60		304	59.20	1.26
148	3.15	49	52.73		148	24.65		305	67.73	1.46
149	2.51	50	26.22	1.34	149	38.01		306	24.65	1.14
150	2.20	58	24.24	1.40	150	26.85		조합1	92.09	
151	2.08	59	27.03	1.43	151	34.85		조합2	92.09	
157	1.65	61	33.31		157	26.14		조합3	91.65	
162	2.18	64	47.85		163	25.97		조합2	91.74	
163	2.00	65	40.99		167	24.30		7\17 페루C ob Sloop \5	90.68	
167	2.19	69	23.84	1.46	169	22.89			92.09	
169	1.81	77	27.79	1.39	174	30.36				
174	1.87	78	37.27		178	24.65	1.30			
282	1.56	79	63.26		189	20.60	1.16			
292	1.52	81	30.35	1.43	204	34.41	0.97			
298	1.79	82	32.73		221	32.03	1.11			
302	1.54	84	28.43	1.34	223	20.34	1.14			
조합1	12.82	85	29.88	1.01	225	21.48	0.85			
조합2	15.35	86	22.85	1.49	262	41.79	0.82			
조합3	22.07	88	27.62	1.20	263	34.32	0.87			
조합2	17.03	89	20.17	1.37	264	28.69	0.97			

7A17 페루C ob Sloop V5	3.99	91	35.41		275	32.39	0.92
페루 원본 알곡	1.06	100	25.17	1.15	281	32.47	1.02

Table 15. Total polyphenol content of ethanol extracts from *Zea mays L.* (3차년도)

Sample No.	TPC (mg/g)	Sample No.	TPC (mg/g)	Sample No.	TPC (mg/g)	Sample No.	TPC (mg/g)	Sample No.	TPC (mg/g)
1	68.55	46	76.62	91	106.22	136	75.28	181	103.53
2	71.24	47	84.02	<b>92</b>	<b>138.51</b>	137	0.00	182	97.48
3	81.33	48	100.17	<b>93</b>	<b>137.17</b>	138	99.50	183	115.64
4	98.82	49	86.71	94	102.86	139	85.37	<b>184</b>	<b>125.06</b>
5	98.15	50	90.08	95	90.75	140	94.79	185	104.20
6	86.71	51	98.82	96	93.44	141	82.68	<b>186</b>	<b>127.75</b>
7	89.40	52	71.24	97	102.19	142	63.84	187	120.35
8	82.68	53	100.17	98	112.28	143	57.11	<b>188</b>	<b>142.55</b>
9	88.73	54	82.68	<b>99</b>	<b>128.42</b>	144	86.71	189	110.26
10	58.46	55	84.02	100	81.33	145	80.66	190	110.93
11	86.04	56	79.99	101	92.10	146	89.40	191	110.26
12	71.24	57	104.20	102	82.00	147	75.28	<b>192</b>	<b>126.40</b>
13	69.22	58	78.64	103	79.31	148	65.19	193	106.22
14	76.62	59	75.95	104	94.79	149	83.35	194	112.28
15	74.60	60	63.84	105	69.90	150	74.60	195	72.59
16	80.66	61	111.60	106	93.44	151	83.35	<b>196</b>	<b>139.86</b>
17	88.73	62	82.00	107	79.31	152	0.00	<b>197</b>	<b>145.24</b>
18	77.30	63	70.57	108	109.59	153	53.08	<b>198</b>	<b>131.11</b>
19	84.70	64	94.11	109	79.99	154	88.06	<b>199</b>	<b>137.17</b>
20	88.73	65	85.37	110	86.71	155	94.79	200	98.15
21	77.30	66	88.06	111	97.48	156	70.57	201	114.97
22	79.31	67	86.04	112	59.80	157	0.00	<b>202</b>	<b>123.04</b>
23	81.33	68	88.73	113	92.10	158	122.37	<b>203</b>	<b>141.88</b>
24	93.44	69	83.35	114	81.33	159	96.13	<b>204</b>	<b>135.82</b>
25	100.17	70	102.86	115	86.71	<b>160</b>	<b>169.46</b>	205	110.93
26	71.91	71	69.90	116	84.70	161	73.26	<b>206</b>	<b>132.46</b>
27	110.93	72	91.42	117	86.71	162	122.37	207	72.59
28	84.02	73	83.35	118	91.42	163	79.31		
29	98.15	74	75.95	119	88.73	164	95.46		
30	79.31	75	100.17	120	88.73	<b>165</b>	<b>129.10</b>		
31	66.53	76	76.62	121	93.44	166	102.86		
32	86.71	77	99.50	122	66.53	167	92.77		
33	71.24	78	49.04	123	113.62	168	94.79		
34	78.64	79	86.04	124	88.73	169	93.44		
35	81.33	80	101.51	125	56.44	170	90.08		

36	73.26	81	92.10	126	96.13	171	112.95
37	78.64	82	75.28	127	60.48	172	93.44
38	72.59	83	84.70	128	97.48	173	98.15
39	82.68	84	112.28	129	87.39	174	83.35
40	64.51	85	121.70	130	67.20	175	0.00
41	93.44	86	115.64	131	76.62	176	86.04
42	86.71	<b>87</b>	<b>151.97</b>	132	67.20	177	110.26
43	86.71	88	114.30	133	78.64	178	103.53
44	79.31	<b>89</b>	<b>125.06</b>	134	88.06	179	0.00
45	67.20	90	92.10	135	104.20	<b>180</b>	<b>124.39</b>

3차년도 207개의 김장옥수수 ethanol 추출물의 total polyphenol 함량을 측정하였다. 표준시약으로는 gallic acid를 사용하였다. 다양한 종류의 김장 옥수수 207종을 대상으로 상위 20% 이내 우수한 polyphenol 함량을 갖는 87, 89, 92, 93, 99, 160, 165, 180, 184, 186, 188, 192, 196, 197, 198, 199, 202, 203, 204, 206 등의 시료 20종을 선정하였다. 특히, anthocyanin 함량, total polyphenol 함량과 ABTS 라디칼 소거능과는 시료 상관관계가 없었다.

마. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능력은 166.7ug/ml 농도에서 측정하였다(Table 16). 대조약물로는 Trolox를 사용하였다. 다양한 종류의 김장 옥수수 359종을 대상으로 166.7 ug/ml 농도에서 ABTS 라디칼 소거능이 80% 이상으로 우수한 항산화 활성을 나타내는 시료 26종을 선정하였다. 일반적으로 안토시아닌 색소가 고 농도로 함유되어 있으면 항산화 활성이 우수한 것으로 알려져 있다. 359종 사이에서 67, 146, 349가 안토시아닌 함량도 높고, ABTS 라디칼 소거능력도 높았다.

Table 16. ABTS radical scavenging ability of extracts from *Zea mays* L. (1차년도)

Sample Concentration (166.7ug/ml.)									
No.	inhibitio n	No.	inhibitio n	No.	inhibitio n	No.	inhibitio n	No.	inhibitio n
1	60.65	73	77.84	145	86.21	217	55.39	289	42.79
2	69.2	74	69.49	146	84.76	218	/	290	42.92
3	72.39	75	71.59	147	82.08	219	50.36	291	72.9
4	87.32	76	46.09	148	/	220	55.68	292	24.76
5	51.16	77	39.49	149	85.99	221	44.54	293	42.03
6	31.23	78	/	150	65.17	222	45.93	294	34.4
7	63.7	79	63.48	151	/	223	53.5	295	39.5
8	62.61	80	36.81	152	84.4	224	70.09	296	44.59
9	54.13	81	36.09	153	48.62	225	38.58	297	39.47
10	94.2	82	50.94	154	40.57	226	42.87	298	77.72
11	59.28	83	32.97	155	39.11	227	39.16	299	45.55
12	89.42	84	32.9	156	50.07	228	43.31	300	48.65
13	62.39	85	42.75	157	50.44	229	46.94	301	86.66
14	70.51	86	59.13	158	73.66	230	37.63	302	47.39

15	67.83	87	53.19	159	57.62	231	41.49	303	53.93
16	59.42	88	42.32	160	51.09	232	39.08	304	41.99
17	56.96	89	63.55	161	45.57	233	51.68	305	48.53
18	85.36	90	31.51	162	27.94	234	42.14	306	44.77
19	91.23	91	26.11	163	38.97	235	42.29	307	72.05
20	/	92	26.48	164	44.48	236	43.09	308	46.36
21	69.49	93	15.17	165	42.45	237	50.73	309	58.6
22	75.72	94	29.66	166	17.34	238	39.81	310	60.76
23	50.65	95	34.71	167	45.94	239	45.85	311	71.18
24	46.96	96	46.95	168	38.9	240	34.79	312	86.53
25	55.58	97	42.96	169	52.98	241	46.29	313	51.89
26	64.49	98	56.75	170	86.07	242	35.23	314	72.39
27	45.72	99	42.38	171	46.59	243	43.96	315	40.03
28	55.65	100	64.95	172	4.79	244	40.03	316	47.09
29	79.86	101	35.7	173	41	245	46.07	317	48.54
30	77.39	102	32.51	174	47.82	246	52.33	318	49.83
31	61.16	103	34.33	175	37.3	247	41.56	319	33.45
32	58.77	104	54.86	176	32.66	248	37.19	320	71.32
33	75.07	105	41.58	177	42.89	249	31.08	321	39.08
34	50.22	106	47.68	178	47.31	250	57.93	322	36.04
35	85.8	107	37.45	179	45.28	251	44.03	323	39.81
36	29.06	108	39.62	180	/	252	45.13	324	38.84
37	46.74	109	61.47	181	63.5	253	26.86	325	49.02
38	67.97	110	33.96	182	45.14	254	33.04	326	/
39	68.84	111	49.06	183	40.93	255	58.37	327	58.8
40	45.94	112	60.23	184	53.05	256	56.77	328	59.36
41	54.28	113	73.22	185	36.65	257	56.92	329	/
42	62.9	114	43.54	186	58.27	258	47.02	330	54.73
43	73.91	115	46.66	187	64.8	259	40.1	331	33.82
44	51.96	116	78.45	188	/	260	43.01	332	50.58
45	79.71	117	82.15	189	45.59	261	57.35	333	38.23
46	56.09	118	56.17	190	38.07	262	64.12	334	33.31
47	46.52	119	37.08	191	40.73	263	52.99	335	60.95
48	37.17	120	53.12	192	52.77	264	58.15	336	73.62
49	77.1	121	65.53	193	43.96	265	36.97	337	32.48
50	61.16	122	50.8	194	45.42	266	39.59	338	54.5
51	41.74	123	48.91	195	47.74	267	47.46	339	46.19
52	63.33	124	25.18	196	54.66	268	43.74	340	28.65
53	67.25	125	/	197	37.56	269	29.62	341	33.7
54	88.7	126	68.58	198	41.41	270	28.6	342	46.64
55	76.3	127	70.17	199	45.56	271	38.72	343	34.19
56	67.68	128	50	200	74.38	272	49.06	344	40.36
57	78.7	129	70.9	201	63.83	273	53.49	345	33.51
58	65.29	130	38.46	202	59.61	274	49.27	346	37.9
59	66.74	131	72.79	203	35.45	275	44.76	347	30.47
60	73.99	132	62.77	204	43.45	276	35.15	348	45.94
61	60	133	91.15	205	42.87	277	69.07	349	81.8
62	62.03	134	83.02	206	60.92	278	70.53	350	35.97
63	38.1	135	93.83	207	/	279	49.71	351	33.35
64	74.71	136	75.18	208	64.19	280	33.12	352	39.12

65	78.12	137	41.8	209	84.06	281	53.13	353	35.25
66	62.1	138	42.16	210	78.31	282	69.07	354	33.42
67	90	139	84.18	211	45.13	283	45.14	355	52.81
68	65.36	140	79.9	212	59.46	284	50.84	356	42.85
69	82.1	141	93.03	213	35.95	285	45.14	357	54.49
70	64.35	142	46.15	214	57.06	286	43.84	358	34.2
71	35.22	143	86.36	215	33.48	287	32.14	359	34.61
72	65.36	144	8.13	216	48.91	288	62.81	Trolox 16.7ug/ ml.	97.38

ABTS 라디칼 소거능력은 33.3 ug/ml 농도에서 측정하였다. 대조약물로는 Trolox를 사용하였다.

Table 17. ABTS radical scavenging ability of ethanol extracts from *Zea mays L.* (3차년도.)

Sample No.	Inhibition(%)								
1	58.71	46	6.70	91	16.91	136	26.70	181	9.27
2	41.03	47	7.04	92	22.23	137	x	182	20.43
3	39.91	48	25.15	93	21.29	138	15.54	183	19.23
4	75.28	49	17.77	94	17.94	139	10.64	184	11.93
5	75.79	50	5.49	95	35.62	140	14.59	185	2.06
6	60.00	51	-2.66	96	42.92	141	25.32	186	9.61
7	55.45	52	-20.43	97	33.30	142	-6.70	187	4.72
8	42.40	53	42.92	98	22.06	143	-3.78	188	1.46
9	46.70	54	-21.63	99	11.85	144	-3.86	189	18.20
10	58.71	55	14.33	100	5.41	145	3.95	190	53.82
11	51.76	56	9.44	101	7.98	146	25.67	191	44.55
12	53.13	57	10.82	102	9.70	147	33.39	192	36.14
13	39.14	58	-42.32	103	28.93	148	17.68	193	13.48
14	19.14	59	26.87	104	11.16	149	20.09	194	17.17
15	19.14	60	-14.42	105	20.43	150	26.70	195	20.43
16	38.03	61	2.15	106	32.02	151	16.91	196	26.44
17	55.62	62	29.70	107	11.16	152	x	197	14.59
18	37.42	63	34.51	108	19.06	153	-6.44	198	-0.60
19	22.40	64	5.32	109	22.40	154	-1.12	199	16.22
20	25.58	65	10.39	110	42.23	155	22.40	200	7.90
21	50.99	66	15.54	111	13.91	156	10.21	201	14.25
22	43.86	67	49.27	112	9.96	157	x	202	12.02
23	27.38	68	-14.16	113	6.44	158	33.22	203	19.06
24	16.31	69	48.41	114	11.85	159	16.82	204	42.92
25	57.17	70	16.39	115	8.15	160	11.33	205	15.97
26	24.72	71	-13.22	116	1.63	161	8.41	206	14.51
27	39.48	72	13.56	117	8.76	162	6.70	207	12.36
28	10.04	73	42.58	118	11.50	163	27.98		
29	30.99	74	12.36	119	21.80	164	-8.24		

30	21.12	75	18.97	120	-8.24	165	19.57
31	24.81	76	19.91	121	10.13	166	37.00
32	29.18	77	29.96	122	16.48	167	28.67
33	23.78	78	21.46	123	16.57	168	44.64
34	4.89	79	23.78	124	15.02	169	28.67
35	15.28	80	23.35	125	9.61	170	30.99
36	21.12	81	17.34	126	9.36	171	23.35
37	29.61	82	21.37	127	5.84	<b>172</b>	<b>46.78</b>
38	14.42	83	40.26	128	16.31	173	32.53
39	13.48	84	30.64	129	34.42	174	24.98
40	17.00	85	26.44	130	18.20	175	x
41	1.63	86	27.55	<b>131</b>	<b>51.50</b>	<b>176</b>	<b>63.43</b>
42	2.06	87	19.06	<b>132</b>	<b>54.08</b>	<b>177</b>	<b>52.96</b>
43	19.48	88	19.91	133	16.22	<b>178</b>	<b>48.93</b>
44	8.24	89	6.87	134	28.15	179	x
45	-0.26	90	4.55	135	31.76	180	10.21

33.3ug/mL 농도에서 ABTS 라디칼 소거능이 상위 20% 이내 우수한 항산화 활성을 나타내는 20종을 선정하였으며 그 중에서 4, 5, 6, 17, 25종은 안토시아닌 함량도 높고, ABTS 라디칼 소거능력도 우수하였다.

#### 마. AGEs (최종당화산물)생성 저해능 측정 및 RLAR 활성 측정

선정된 53종의 시료에 대해 항당뇨 활성을 평가하기 위해 AGEs 및 RLAR 억제 활성을 측정하였다(Table 18). AGEs는 98.04ug/ml에서 측정하였으며 대조약물로 사용된 aminoguanidine은 35.36% 억제율을 나타내었으며 대부분의 시료에서 억제율이 낮게 나타났다.

Rat Lens Aldose Reductase(RLAR)실험 농도는 10ug/ml에서 측정하였다. 대조구로는 quercetin을 이용하였고, 86.90% 억제된 것을 확인하였다. 선정된 시료 20과 60번은 36.06 및 45.87%로 우수한 억제 활성을 나타내었다.

Table 18. Inhibitory effects of *Zea mays* on RLAR and AGEs

Sample No.	ARI	AGE	Sample No.	ARI	AGE
	Inhibition (%) at 10 ug/ml.	Inhibition (%) at 98.04 ug/ml.		Inhibition (%) at 10 ug/ml.	Inhibition (%) at 98.04 ug/ml.
5	15.61		132	7.10	
11	16.19		133	9.04	
12	<b>5.43</b>	-	137	-	-
20	<b>36.06</b>	3.62	158	11.03	-
22	21.64	-	165	-	-
26	11.60		170	5.56	
29	18.93		184	2.34	
30	20.71	-	196	9.52	-
32	9.93	-	206	3.34	-
35	28.13	-	224	8.26	-

37	26.00	-	234	-	-
41	22.37	6.85	235	-	-
42	12.60	-	250	9.60	-
51	-	-	251	-	-
52	16.31	-	257	14.77	-
57	20.48	-	261	7.97	-
57	8.27	-	277	14.36	-
60	<b>45.87</b>	-	283	14.02	-
62	4.26	-	291	22.37	-
67	18.85	-	300	12.38	-
73	3.82	-	303	12.24	-
74	2.52	-	311	5.34	-
86	5.93	-	320	2.67	-
92	-	-	344	-	-
100	15.55	-	349	11.85	-
111	22.09	-	355	13.32	-
118	18.11	-			

강원도 옥수수 시험장에서 분양받은 359종에 기초 활성과 제2, 3 세부과제에서 수행된 인슐린 분비 촉진 및 신장세포 MIT에서 우수한 활성을 나타낸 결과와 함께 항산화, 안토시아닌 함량, 성분 pattern 등을 서열화 하여 정보를 제공 하였으며 이를 기초로 옥수수 시험장에서 교잡한 후 재배하여 수확된 김장옥수수 306 종의 낱알을 재 분양 받았다. 306종의 각 낱알을 1.5 g 씩 분쇄하여 15 ml 주정에 0.01% HCl (1.2 M)을 첨가하여 추출 한 후 페놀함량 및 항산화 효능을 평가하여 기초 정보를 제공하였으며 이러한 data를 가지고 재 교잡하여 2010년 1월 태국에서 우수 종을 선발하기 위해 재배 중에 있다.

207개의 자색옥수수 Ethanol 추출물의 최종 당화산물을 측정하였다. 대조약물로는 aminoguanidine을 사용하였다. (3차년도)

Table 19. Inhibitory effects of ethanol extracts from *Zea mays* L. on the formation of advanced glycation end products (AGEs) (3차년도)

Sampl e No.	AGEs IC <sub>50</sub> (ug/ ml)	Sampl e No.	AGEs IC <sub>50</sub> (ug/ml)						
1		46		91	<b>136</b>	<b>0.14</b>	181		
2	-	47	-	92	-	137	-	182	-
3	-	48	-	93	-	138	-	<b>183</b>	<b>1.96</b>
4	-	49	-	94	-	139	-	184	-
5	-	50	-	95	-	140	-	<b>185</b>	<b>1.16</b>
6		51		96	<b>141</b>	<b>0.03</b>	<b>186</b>	<b>1.93</b>	
7		52		97	<b>142</b>	<b>2.8</b>	187		
8	-	53	-	<b>98</b>	<b>3.33</b>	143	-	188	-
9	-	54	-	99	-	144	-	189	-
10	-	55	-	100	-	145	-	<b>190</b>	<b>5.67</b>
11		56		101		146		191	

12	-	57	-	102	-	147	-	<b>192</b>	<b>6.2</b>
13	-	58	-	103	-	148	-	193	-
14	-	59	-	104	-	149	-	194	-
15	-	60	-	105	-	150	-	195	-
16	-	61	-	<b>106</b>	<b>0.66</b>	151	-	196	-
17	-	62	-	107	-	152	-	197	-
18	-	63	-	108	-	153	-	198	-
19	-	64	-	109	-	154	-	199	-
20	-	65	-	110	-	155	-	<b>200</b>	<b>0.07</b>
21	-	66	-	111	-	156	-	201	-
22	-	67	-	112	-	157	-	<b>202</b>	<b>5.51</b>
23	-	68	-	113	-	158	-	<b>203</b>	<b>1.65</b>
24	-	69	-	114	-	159	-	204	-
<b>25</b>	<b>0.15</b>	70	-	115	-	160	-	205	-
26	-	71	-	116	-	161	-	206	-
27	-	72	-	117	-	162	-	207	-
28	-	73	-	118	-	163	-	-	-
29	-	74	-	119	-	164	-	-	-
30	-	75	-	120	-	<b>165</b>	<b>0.56</b>	-	-
31	-	76	-	121	-	166	-	-	-
32	-	77	-	122	-	167	-	-	-
33	-	78	-	123	-	168	-	-	-
34	-	79	-	124	-	169	-	-	-
35	-	80	-	125	-	<b>170</b>	<b>0.4</b>	-	-
<b>36</b>	<b>3.65</b>	81	-	126	-	171	-	-	-
37	-	82	-	127	-	172	-	-	-
38	-	83	-	128	-	173	-	-	-
39	-	84	-	129	-	174	-	-	-
40	-	85	-	130	-	175	-	-	-
41	-	86	-	131	-	176	-	-	-
42	-	87	-	132	-	<b>177</b>	<b>7.03</b>	-	-
43	-	88	-	133	-	<b>178</b>	<b>7.67</b>	-	-
44	-	89	-	134	-	179	-	-	-
45	-	90	-	135	-	180	-	-	-

AGE 활성을 나타내는 시료 25, 36, 98, 106, 136, 141, 142, 165, 170, 177, 178, 183, 185, 186, 190, 192, 200, 202, 203의 19종을 선정하였다. 특히, 165, 186, 192, 202, 203 종은 polyphenol 함량도 높으면서 AGE 효능도 뛰어났다.

Table 20. Aldose reductase inhibition effects of ethanol extracts from *Zea mays* L. (3 차년도)

No.	RIAR inhibitor (%)								
1	71.09	46	54.01	91	80.13	136	72.82	181	81.64
2	65.35	47	58.96	92	77.61	137	-	182	68.61

3	47.33	48	72.43	93	70.17	138	75.04	183	61.01
4	65.84	49	66.09	94	69.91	139	70.25	184	75.80
5	75.59	<b>50</b>	<b>84.70</b>	95	72.18	140	71.93	185	71.93
6	59.85	51	72.28	96	66.97	141	75.88	186	75.80
7	57.08	52	59.31	97	62.14	<b>142</b>	<b>83.07</b>	187	76.60
8	48.71	53	71.09	98	76.62	143	71.64	188	77.61
9	66.98	54	54.31	99	71.45	144	74.66	189	76.39
10	72.33	55	48.02	<b>100</b>	<b>81.92</b>	<b>145</b>	<b>84.03</b>	<b>190</b>	<b>87.77</b>
11	66.39	56	51.41	101	71.20	146	70.29	191	77.48
12	31.73	57	63.21	102	70.94	<b>147</b>	<b>82.31</b>	<b>192</b>	<b>97.02</b>
13	57.33	58	58.68	103	70.30	148	80.29	193	74.29
14	64.90	59	79.10	104	71.40	149	80.55	<b>194</b>	<b>86.89</b>
15	51.53	60	46.92	105	64.16	<b>150</b>	<b>85.29</b>	<b>195</b>	<b>84.58</b>
16	67.18	<b>61</b>	<b>85.13</b>	<b>106</b>	<b>90.15</b>	<b>151</b>	<b>81.81</b>	<b>196</b>	<b>84.79</b>
<b>17</b>	<b>90.20</b>	62	80.34	107	76.28	152		197	78.49
18	41.14	63	63.16	108	73.58	153	71.76	198	81.13
19	68.17	64	64.10	109	67.19	154	59.83	199	81.55
20	74.50	65	65.68	110	81.77	155	68.45	200	77.94
21	67.97	66	58.89	111	72.25	156	71.13	201	78.15
<b>22</b>	<b>82.13</b>	67	64.40	112	49.86	157	-	<b>202</b>	<b>82.94</b>
23	53.32	68	76.24	113	63.40	158	80.80	203	81.43
24	68.07	69	71.03	114	79.69	159	76.68	204	79.66
25	72.13	70	72.69	115	71.97	160	80.13	205	66.13
26	62.48	71	55.60	116	68.94	161	71.64	206	69.54
27	79.50	72	71.67	117	80.78	<b>162</b>	<b>83.53</b>	207	75.55
28	56.24	73	75.68	118	77.04	163	75.21		
29	62.77	74	64.62	119	80.40	164	76.26		
30	61.34	75	51.67	120	61.65	165	71.51		
31	57.38	76	67.91	121	63.21	166	72.18		
32	61.09	77	57.82	122	75.90	167	69.24		
33	50.94	78	54.53	123	65.25	168	75.67		
34	18.61	79	71.41	<b>124</b>	<b>89.54</b>	169	72.65		
35	59.26	80	74.19	125	77.08	170	65.08		
36	20.05	81	61.97	126	60.89	171	65.46		
37	80.54	82	60.98	127	56.87	172	73.07		
38		83	65.30	<b>128</b>	<b>84.03</b>	173	70.63		
39	55.69	84	65.38	129	71.68	174	73.03		
40	22.48	85	57.18	130	68.53	175	-		
41	41.19	86	65.21	131	77.90	176	80.63		
42	61.09	87	73.25	132	76.34	177	79.29		
43	64.16	88	72.74	133	80.38	178	76.89		
44	62.03	89	74.23	134	78.15	179			
45	64.80	90	65.34	135	71.85	180	75.29		

207개의 감성옥수수 ethanol 추출물의 Rat lens aldose reductase를 측정하였다. 대조약물로는 Quercetin을 사용하였으며, ARI 활성을 나타낸 결과 활성이 우수한 17, 22, 50, 61, 100, 106, 124, 128, 142, 145, 147, 150, 151, 162, 190, 192, 194, 195, 196, 202의 시료 20 종을 선정하였다. 선정된 시료중에서 **192, 202**번은 polyphenol 함량이 높으면서 AGE 및 ARI의 억제효능도 우수한 결과를 나타내어 항당뇨합병증 우수종으로 개발 가능성이 높은 것을 생각

된다.

특히, 이러한 결과를 볼때 김장옥수수수의 안토시아닌성분보다는 polyphenol성분이 최종당화산물 및 알도스환원효소 억제효능에 관여하는 것으로 판단된다.

사. 최종 선별 된 우수종 (색찰교 5종)

색찰교(1-5번) 및 색소생산력 52번 의 총 6개의 자색옥수수수 종자(kernel)을 분쇄기(Kaiser, JL-500, Joylife)를 사용하여 0.5mm 이하 크기로 분쇄한 후 체에 쳐서 입자의 크기를 고르게 하였다. 곱게 분쇄된 옥수수 분말 50g을 반응표면분석을 통해 얻어진 추출조건 (40℃, 8시간, 33% 주정 (0.1% HCl), 1:10의 비율)으로 추출하였고, anthocyanin의 불안정한 구조를 위해 각 시료가 들어있는 tube에 은박지로 감아 빛의 투과를 억제하였다. 추출을 끝내고 20분동안 3000rpm에서 centrifuge하여 얻어진 상층액을 농축 및 동결 건조 하여 추출량을 얻은 후, HP20 column을 통하여 당과 유기산 및 기타 불순물들을 제거한 후, 다시 농축 및 동결건조 실시하여 총 수율 확보하였다. 얻어진 HP20 전 추출물과 HP20 추출물을 HPLC를 이용한 패턴비교, 총 폴리페놀 함량(total polyphenol content) 및 총 안토시아닌 함량 (total anthocyanin content) 비교하였다.

(1) 수율 측정

fig 7. 우수종 HP20 전 추출물과 HP20 추출물 수율 비교

HP20 전

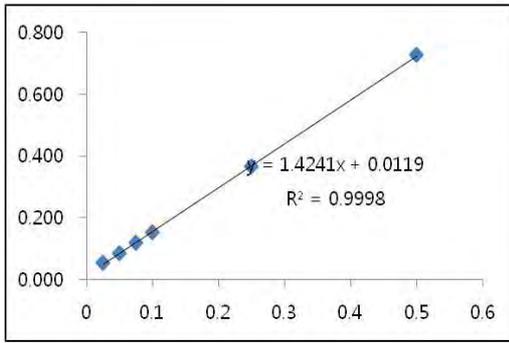
	total weight (g)	bottle weight (g)	sample weight (g)	yield (%)
색찰교1	12.623	9.44	3.183	6.366
색찰교2	12.203	9.484	2.719	5.438
색찰교3	12.529	9.451	3.078	6.156
색찰교4	12.266	9.604	2.662	5.324
색찰교5	12.171	9.689	2.482	4.964
색소생산력52	12.02	9.404	2.616	5.232

HP20 후

	total weight (g)	bottle weight (g)	sample weight (g)	sample weight (mg)	Yield (%)
색찰교1	11.498	11.076	0.422	422	0.844
색찰교2	11.489	11.069	0.42	420	0.840
색찰교3	11.427	11.023	0.404	404	0.808
색찰교4	11.45	11.096	0.354	354	0.708
색찰교5	11.408	10.987	0.421	421	0.842
색소생산력52	11.468	11.048	0.42	420	0.840

수율 측정 결과 색찰교 1번이 높은 수율을 보였다.

(2) Total phenol content(TPC) 함량



sample		TPC (mg/g)
HP20 안한것	색차교1	2.27
	색차교2	1.66
	색차교3	2.21
	<b>색차교4</b>	<b>2.82</b>
	색차교5	1.42
	색소생산력52번	2.22
HP20 한것	색차교1	7.61
	색차교2	5.42
	색차교3	8.58
	색차교4	5.56
	색차교5	4.42
	<b>색소생산력52번</b>	<b>9.53</b>

fig 8. 우수종 HP20 전 추출물과 HP20 추출물 TPC 함량 비교

폴리페놀함량 측정 결과 색차교 4번과 색소생산력 52번이 많은 함량을 보였다.

(3) Total Anthocyanin content 함량

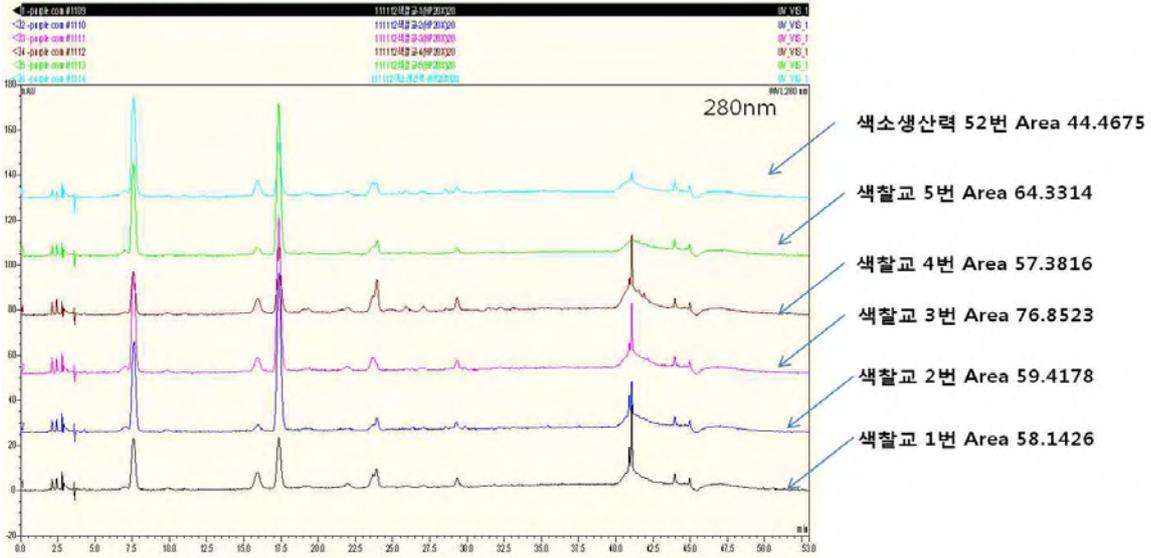
sample		515nm (pH1.0)	700nm (pH1.0)	515nm (pH4.5)	700nm (pH4.5)	A value	TAC(mg/100g)
HP20 안한것	색차교1	0.2064	0.0817	0.1276	0.0831	0.0802	21.44
	색차교2	0.1642	0.0816	0.1229	0.0822	0.0419	11.19
	색차교3	0.2030	0.0816	0.1308	0.0835	0.0740	19.77
	<b>색차교4</b>	<b>0.2396</b>	<b>0.0818</b>	<b>0.1383</b>	<b>0.0856</b>	<b>0.1051</b>	<b>28.08</b>
	색차교5	0.1677	0.0811	0.1219	0.0825	0.0472	12.62
	색소생산력52번	0.2084	0.0814	0.1323	0.0842	0.0788	21.06
HP20 한것	색차교1	0.5080	0.0826	0.1738	0.0878	0.3394	90.69
	색차교2	0.3041	0.0821	0.1675	0.0898	0.1443	38.56
	색차교3	0.5499	0.0836	0.1965	0.0997	0.3695	98.73
	색차교4	0.3163	0.0827	0.1968	0.0927	0.1295	34.59
	색차교5	0.3021	0.0824	0.1717	0.0912	0.1391	37.17
	<b>색소생산력52번</b>	<b>0.6107</b>	<b>0.0824</b>	<b>0.2233</b>	<b>0.0969</b>	<b>0.4019</b>	<b>107.38</b>

fig 9. 우수종 HP20 전 추출물과 HP20 추출물 안토시아닌 함량 비교

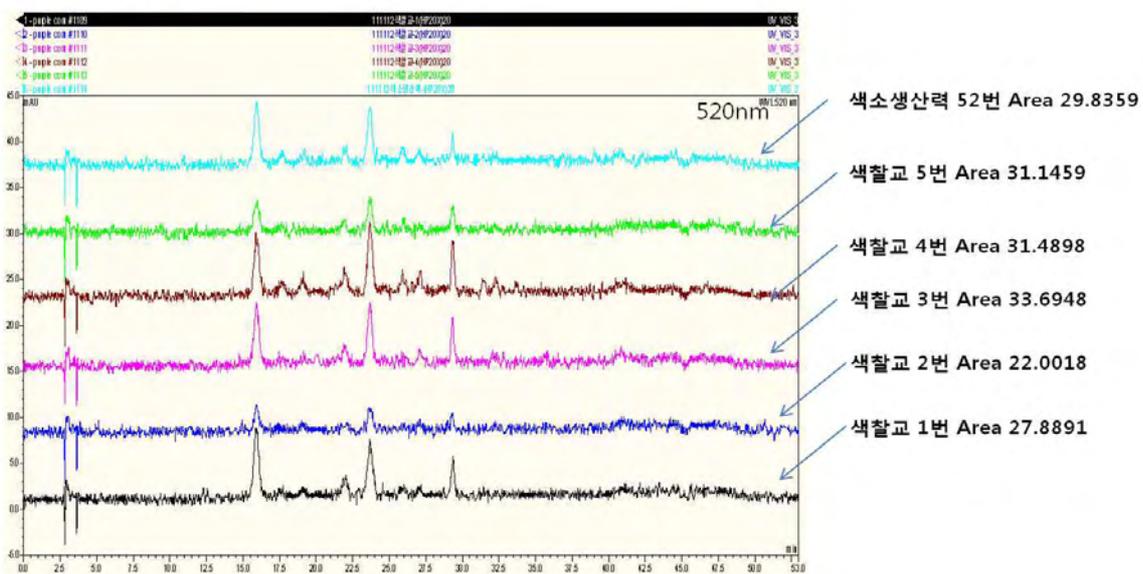
안토시아닌 함량 측정 결과 색차교 4번과 색소생산력 52번이 많은 함량을 보였다.

(4) 색차교 5종과 색소생산력 52번과 HPLC Pattern 분석

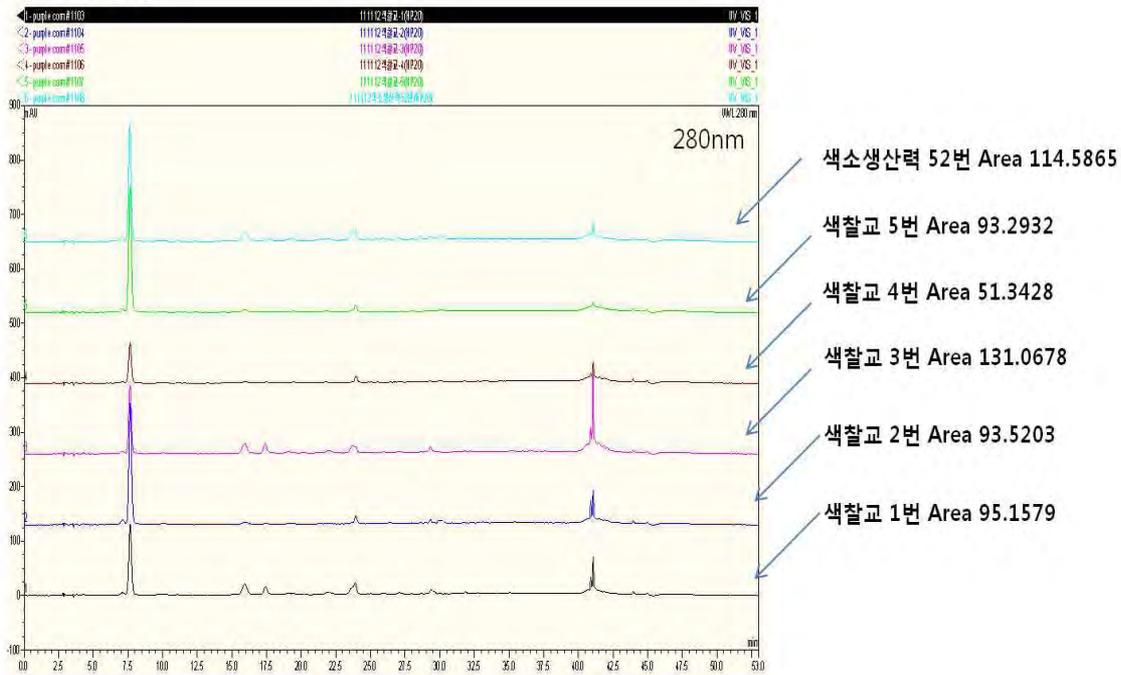
HP20 안 한것



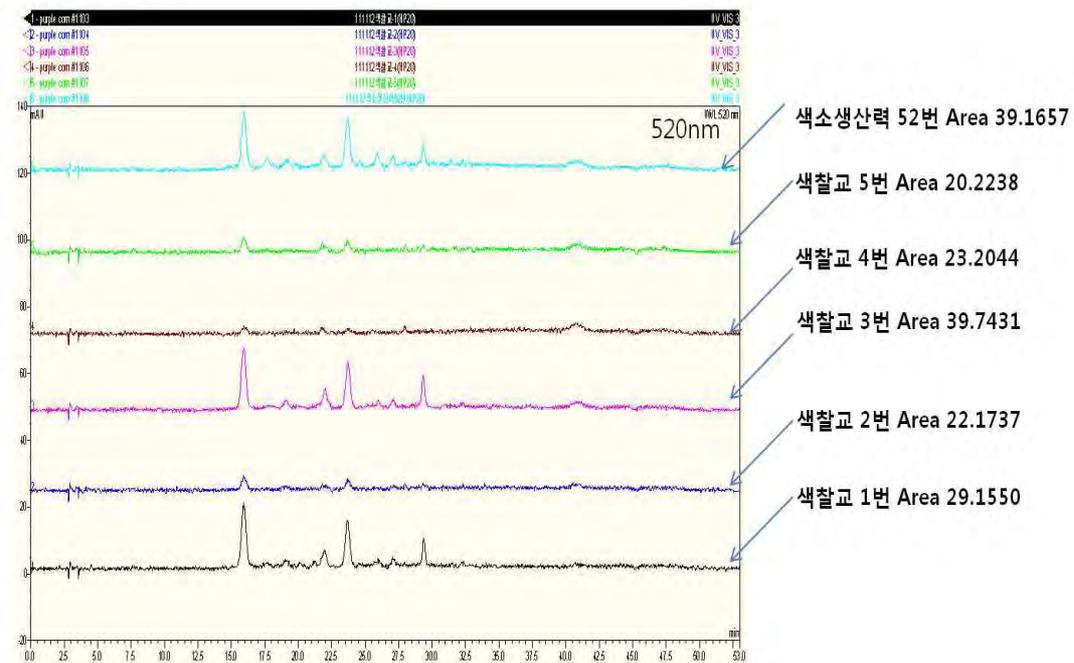
HP20 안 한것



# HP20 한것



# HP20 한것



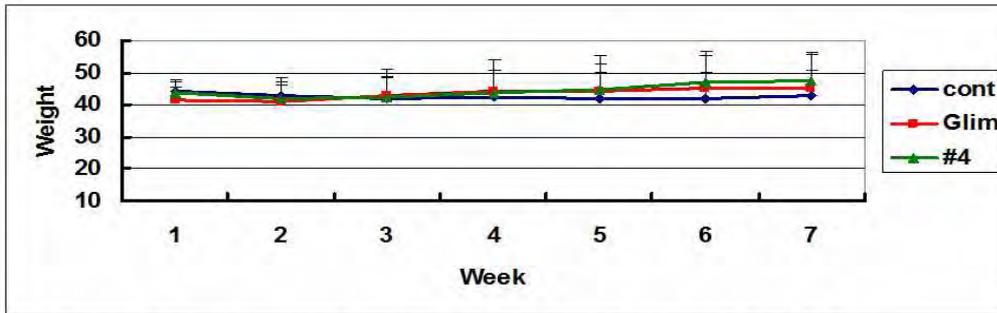
sample		LC area (mAU)	
		280nm	520nm
HP20 안한것	색차교1	58.1426	27.8891
	색차교2	59.4178	22.0018
	<b>색차교3</b>	<b>76.8523</b>	<b>33.6948</b>
	색차교4	57.3816	31.4898
	색차교5	64.3314	31.1459
	색소생산력52번	44.4675	29.8359
HP20 한것	색차교1	95.1579	29.1550
	색차교2	93.5203	22.1737
	<b>색차교3</b>	<b>131.0678</b>	<b>39.7431</b>
	색차교4	51.3428	23.2044
	색차교5	93.2932	20.2238
	색소생산력52번	114.5865	39.1657

Fig 10. 우수종 HP20 전 추출물과 HP20 추출물 폴리페놀 함량, 안토시아닌 함량 HPLC 패턴 비교 분석

7. 김정옥수수 polyphenols의 항당뇨활성 및 췌장세포보호 효과를 2형 당뇨병 모델 동물인 db/db mouse에서 분석

김정옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 체중변화, 혈당변화, 당화혈색소 (Hb1c)의 변화, 단기내당능(OGTT)의 변화, 췌장 베타세포의 변화를 측정하였고, 김정옥수수 polyphenols 정제물의 Ins-1 beta cells매양에서 세포독성 및 인슐린 분비능 실험을 실시하였다.

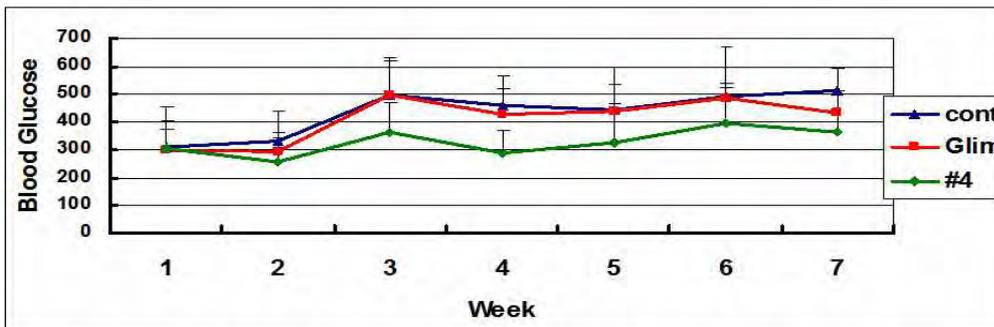
가. 김정옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 체중변화



Cont: 무처리, Glim: glimepiride (positive control), Purple Corn Polyphenols (#4)

fig 11. 김정옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 체중변화

나 김정옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 혈당변화

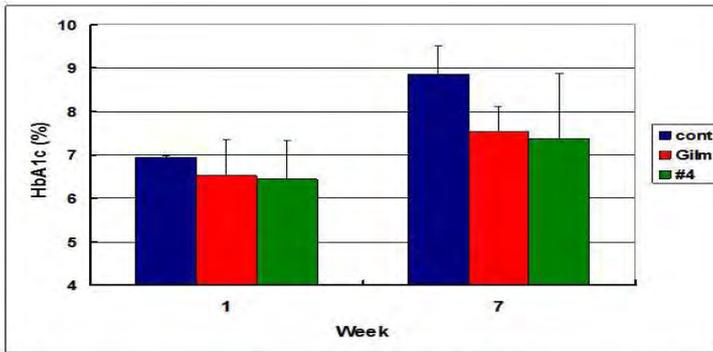


Cont: 무처리, Glim: glimepiride (positive control), Purple Corn Polyphenols (#4)

fig 12. 김정옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 혈당변화

Purple Corn Polyphenols (#4)이 양성대조군인 Glimepiride보다 혈당 지하 능력이 우수하다는 것이 입증되었음

다. 김장옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 당화혈색소 (HbA1c)의 변화

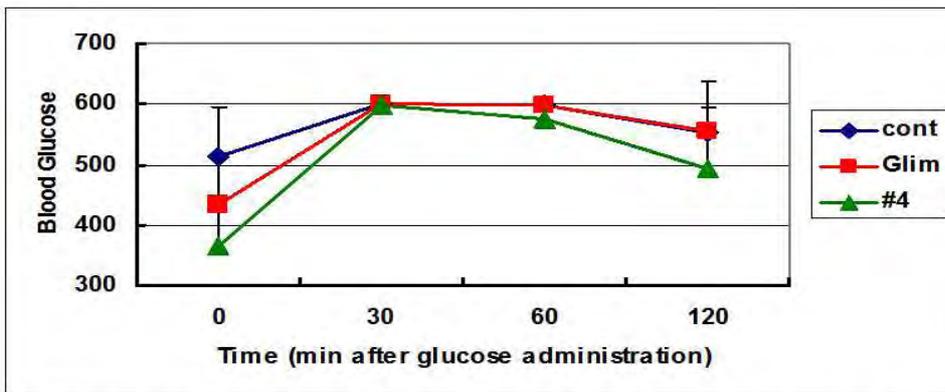


Cont: 무처리, Glim: glimepiride (positive control), Purple Corn Polyphenols (#4)

fig 13. 김장옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 당화혈색소 (HbA1c)의 변화

당화혈색소(HbA1c)의 농도는 #4 Purple Corn Polyphenols이 양성대조군인 Glim과 보다는도 약간 낮은 것으로 나타나 #4 Purple Corn Polyphenols이 장기적인 혈당지하 능력이 우수하다는 것이 입증되었음

라. 김장옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 단기내당능(OGTT)의 변화



Cont: 무처리, Glim: glimepiride (positive control), Purple Corn Polyphenols (#4)

fig 14. 김장옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 단기내당능(OGTT)의 변화

Oral glucose tolerance test (OGTT)는 단기적인 내당능력을 보여주는 지표인데 #4 Purple Corn Polyphenols이 양성대조군인 Glimepiride보다 혈당을 더 잘 감소시킨다는 결과를 보여주었고, 이는 단기적인 내당능력이 우수하다는 것이 입증되었음

나. 김장옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 췌장 베타세포의 변화

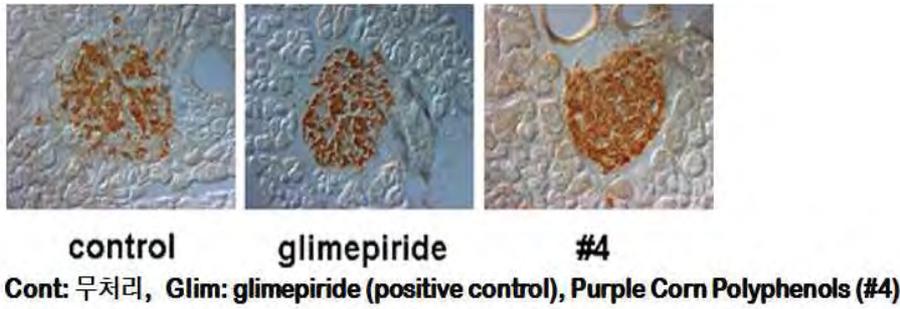
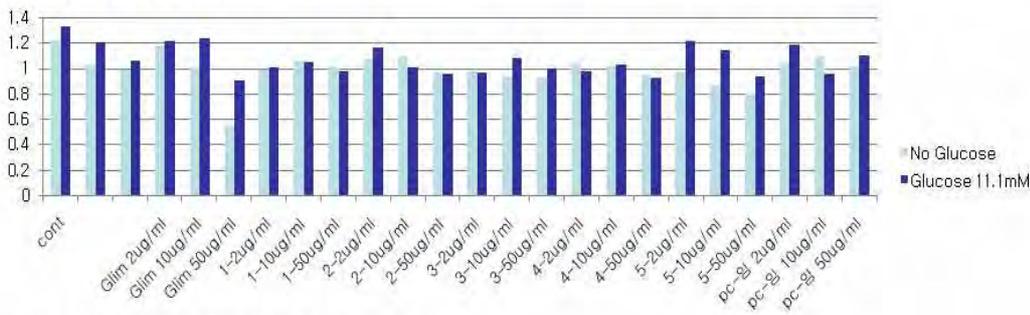


fig 15. 김장옥수수 polyphenols를 7주간 처리하는 동안 db/db mouse의 췌장 베타세포의 변화

2형 당뇨병 모델인 db/db mouse의 대조군(무처리군)에서는 pancreas islet의 insulin분비 세포(베타세포)의 수가 islet내에서 상당히 감소되었으나 양성대조군인 glimepiride 처리군에서는 다소 유지되었으며, #4 Purple Corn Polyphenols 처리군에서는 뚜렷하게 유지된 것이 관찰되어, #4 Purple Corn Polyphenols이 인슐린을 분비하는 베타세포를 보호한다는 사실이 입증되었음

바. 김장옥수수 polyphenols 정제물의 Ins-1 beta cells매양에서 세포독성 및 인슐린 분비 효과

### 정제물의 세포독성 (MTT)



### 정제물의 인슐린 분비 (Ins-1 cell)

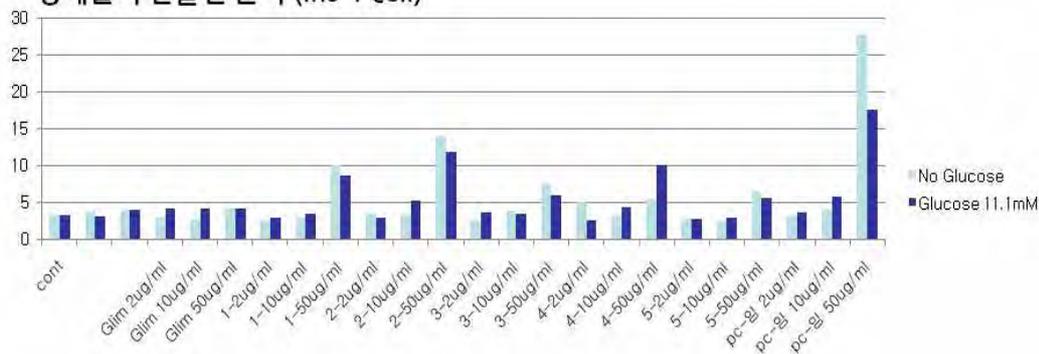


fig 16. 세포독성 및 인슐린 분비 효과

cyanidin 3 glucoside (1), peonidin 3 glucoside (2), pelargonidin 3 glucoside (3), cyanidin 3 (6 malonyl)glucoside (4), pelargonidin 3 (6 malonyl)galactoside (5) Cont (부처리군), 양성대조군(Glim), PC 입 (purple corn polyphenols)

Ins-1 beta cells배양에서 길정옥수수 polyphenols 정제물은 세포독성을 거의 보여주지 않았고, 오히려 양성대조군인 Glimpirido가 50 µg/ml에서 독성을 보여주었다. 길정옥수수 polyphenols 정제물 중에는 peonidin 3 glucoside (2)가 가장 인슐린 분비능이 우수하였고, cyanidin 3 glucoside (1), cyanidin 3 (6 malonyl)glucoside (4)가 그다음 순으로 우수하였으나 정제 전 polyphenols보다는 인슐린 분비능이 낮았다.

사. 마우스에서 기초독성 검사

2형 당뇨병모델인 db/db mouse에 #4 Purple Corn Polyphenols (10mg/kg/day)을 경구로 7주간 투여 후에 행동양상 관찰, 각 장기의 상태를 육안으로 분석한 결과 독성이 없음을 확인하였음

8. STZ-mouse에서 김정옥수수 폴리페놀의 당뇨치료 효능 분석

8주간 섭취시키는 동안 STZ mouse의 체중변화, 혈당변화, 내당능검사(OGTT) 변화, 당화혈색소(HbA1c) 변화, 체장부게 변화, 혈중 인슐린 농도에서의 변화 측정하였다.

가. 8주간 섭취시키는 동안 STZ-mouse의 체중변화

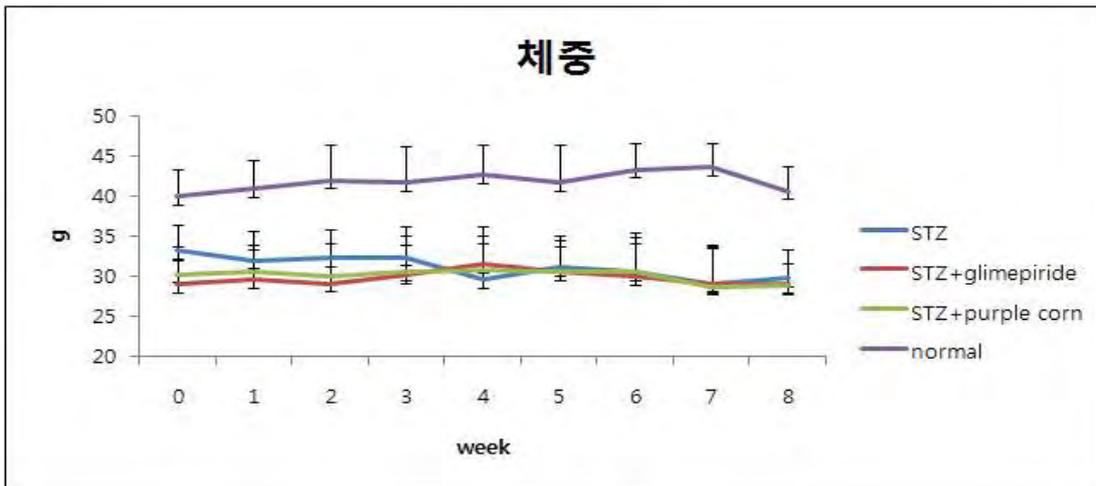


fig 17. 8주간 섭취시키는 동안 STZ-mouse의 체중변화

8주간 섭취 시 STZ-당뇨군, STZ-양성대조군(glimepiride), STZ-실험군(김정옥수수 추출물)의 체중은 약 30-35 g으로 유지되었으며, 군간의 특별한 차이는 나타나지 않았음. STZ를 처리하지 않은 정상군은 약간 체중이 크게 40g 정도도 유지되었다.

나. 8주간 섭취시키는 동안 STZ-mouse의 혈당변화

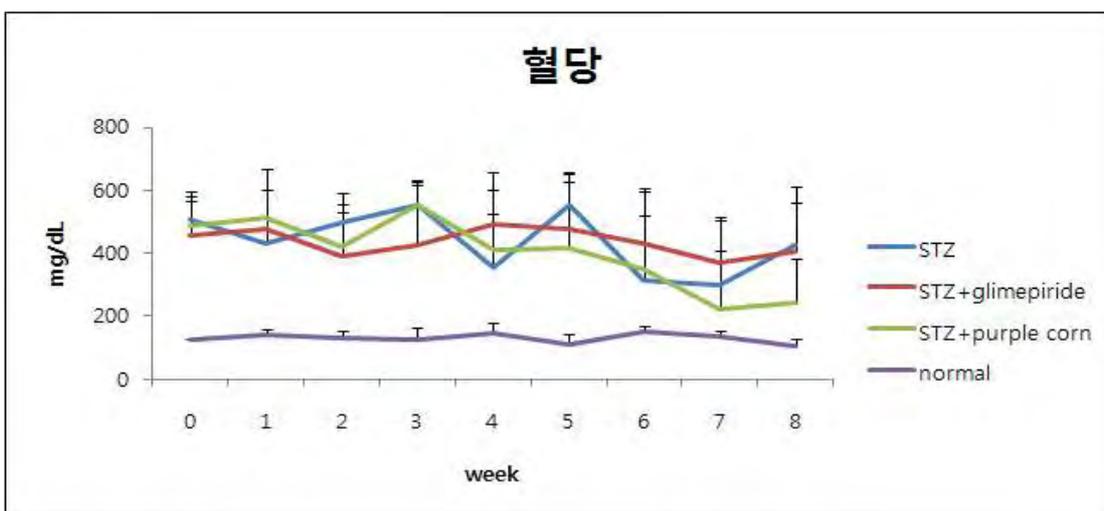


fig 18. 8주간 섭취시키는 동안 STZ mouse의 혈당변화

8주간 섭취 시 STZ-당뇨군 및 STZ-양성대조군(glimepiride)에 비해 STZ-실험군(검정옥수수 추출물)에서 7, 8주에서 혈당감소가 나타났으나 개체간의 표준편차가 커서 통계적 유의성은 없었다.

다. 8주간 섭취시키는 동안 STZ-mouse의 내당능검사(OGTT) 변화

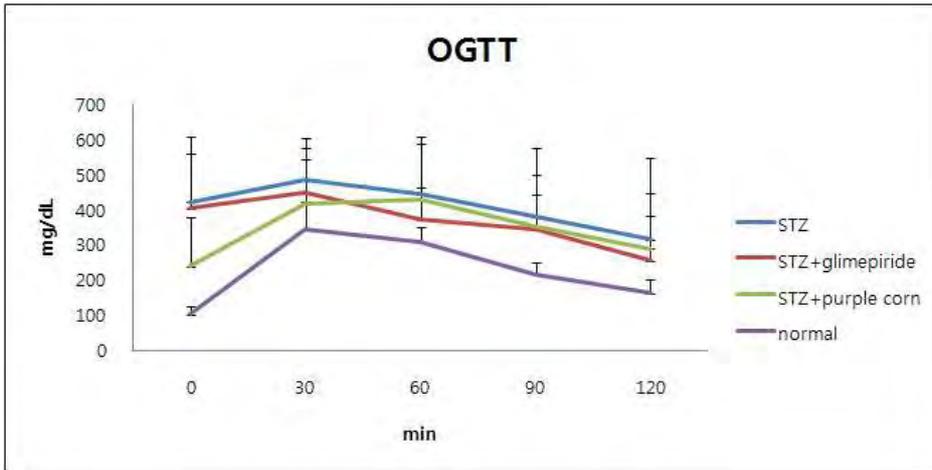


fig 19. 8주간 섭취시키는 동안 STZ-mouse의 내당능검사(OGTT) 변화

8주간 섭취 시 STZ 당뇨군, STZ 양성대조군(glimepiride), STZ 실험군(검정옥수수 추출물)의 내당능검사결과 STZ 실험군(검정옥수수 추출물)에서 혈당강화패턴이 정상과 유사하였으며 혈당강화효과의 면적도 가장 넓게 나타나서 내당능이 있는 것으로 나타났다.

라. 8주간 섭취시키는 동안 STZ-mouse의 당화혈색소(HbA1c) 변화

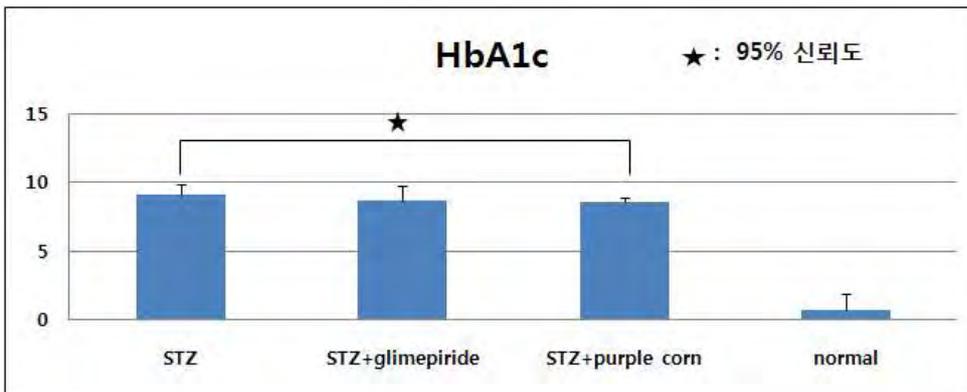


fig 20. 8주간 섭취시키는 동안 STZ-mouse의 당화혈색소(HbA1c) 변화

8주간 섭취 시 STZ 당뇨군 및 STZ 양성대조군(glimepiride)에 비해 STZ 실험군(검정옥수수 추출물)에서 95%의 통계적 유의성으로 당화혈색소의 감소가 나타났다

나. 8주간 섭취 후 STZ-mouse의 췌장무게 변화

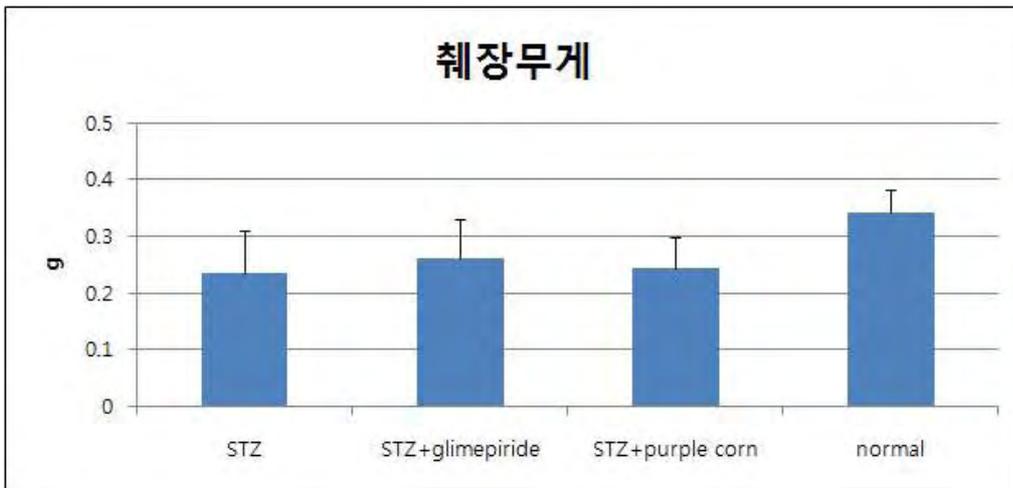


fig 21. 8주간 섭취 후 STZ-mouse의 췌장무게 변화

8주간 섭취 후 STZ-당뇨군 및 STZ-양성대조군(glimepiride), STZ-실험군(검정옥수수 추출물)에서 췌장무게의 차이는 나타나지 않았음

바. 8주간 섭취 후 STZ-mouse의 혈중 인슐린 농도에서의 변화

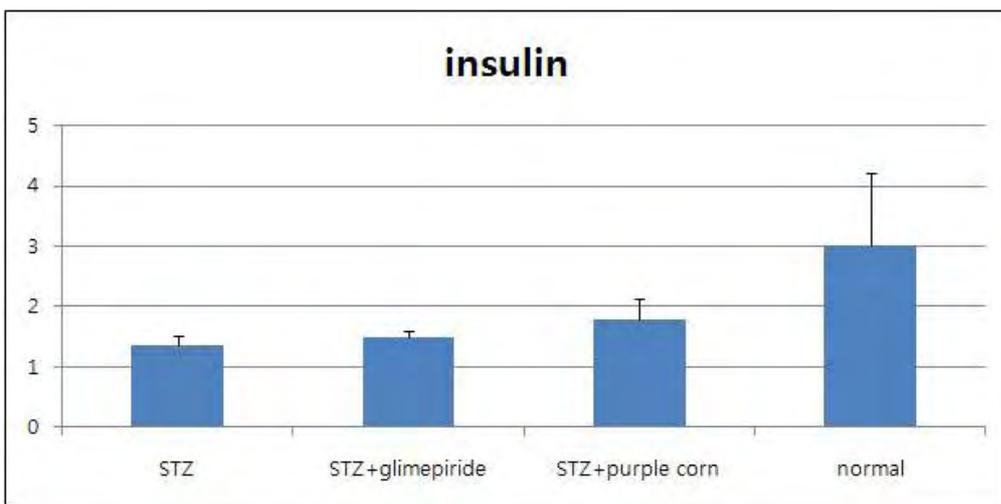


fig 22. 8주간 섭취 후 STZ-mouse의 혈중 인슐린 농도에서의 변화

8주간 섭취 후 STZ-당뇨군 및 STZ-양성대조군(glimepiride)에 비해 STZ-실험군(검정옥수수 추출물)에서 다소 혈중인슐린 농도가 다소 증가하였으나 통계적 유의성은 없었음.

8주간 섭취 후 STZ 당뇨군 및 STZ 양성대조군(glimepiride)에 비해 STZ 실험군(검정옥수수 추출물)에서 다소 통계적으로 유의하게 당화혈색소가 감소하였으며, 내당능검사 (OGTT)에서 혈당강화효과가 우수하였으며, 혈중인슐린 농도가 다른 군에 비해 다소 증가한 것으로 보였으나 통계적 유의성은 없었음

9. 안전성 평가 (db/db mouse에서 건정옥수수 폴리페놀의 당뇨치료 효능 분석 및 기능성 식품화를 위한 기초 안전성 분석)

가. 8주간 섭취시키는 동안 db/db-mouse의 체중변화

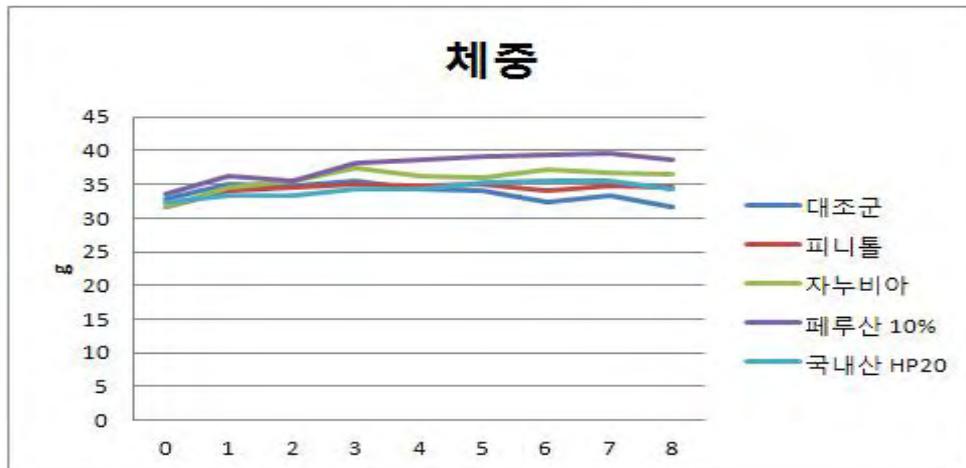


fig 23. 8주간 섭취시키는 동안 db/db mouse의 체중변화

8주간 섭취하는 동안 대조군, 양성대조군1(피니톨), 양성대조군2(자누비아), 페루산10% (페루산 건정옥수수 추출물), 국내산 HP-20 (페루산 건정옥수수 추출물)의 체중은 약 32-40 g으로 유지되었으며, 군간의 특별한 차이는 나타나지 않았음.

나. 8주간 섭취시키는 동안 db/db-mouse의 사료섭취량

8주간 사료섭취량은 대조군, 양성대조군1(피니톨), 양성대조군2(자누비아), 페루산10% (페루산 건정옥수수 추출물), 국내산 HP-20 (페루산 건정옥수수 추출물)은 7.5-8 g 정도이였으며, 자누비아 처리군에서 4-6주까지 사료섭취량이 다소 감소한 것 이외에는 군간의 특별한 차이는 나타나지 않았음.

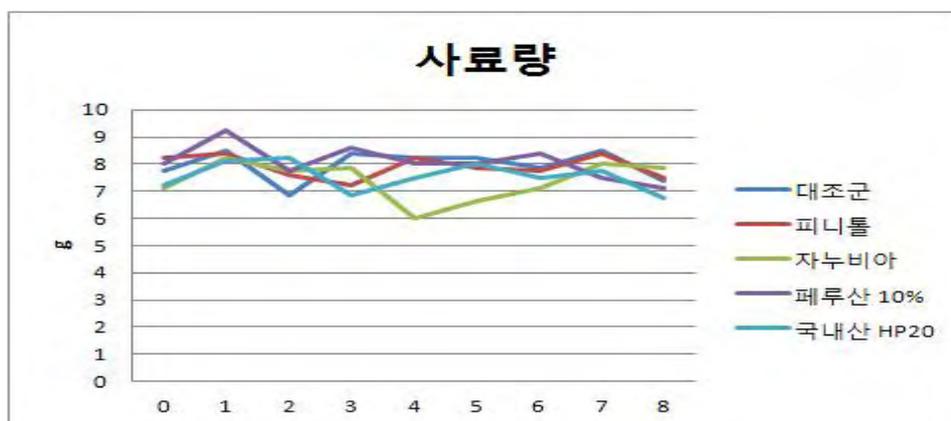
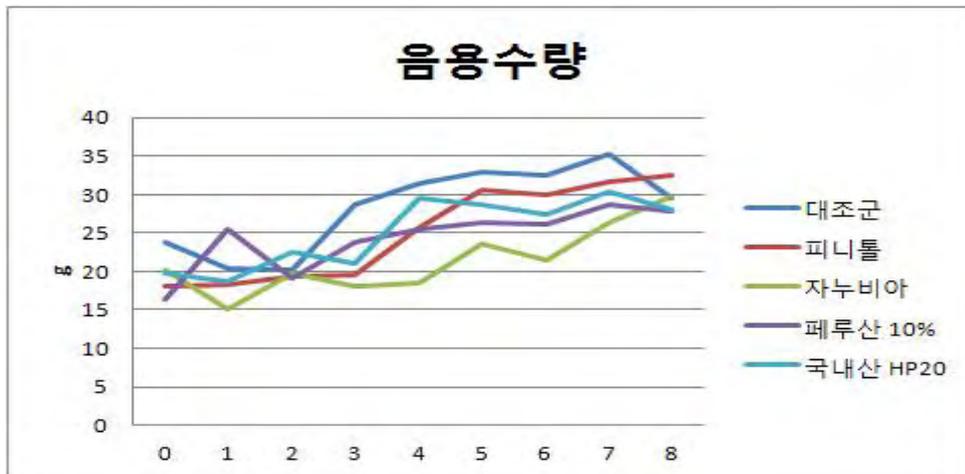


fig 24. 8주간 섭취시키는 동안 db/db mouse의 사료섭취량

다. 8주간 섭취시키는 동안 db/db-mouse의 음용수 섭취량



8주간 음용수 섭취량은 대조군에서 3-8주까지 30-35 g으로 다소 많았으며, 자누비아 치리군에서 3-8주까지 18-30 g으로 다소 적었으며, 다른 치리군에서는 25-30 g으로 비슷하였음

라. 8주간 섭취시키는 동안 db/db-mouse의 공복 혈당변화



fig 25. 8주간 섭취시키는 동안 db/db-mouse의 공복 혈당변화

8주간 섭취하는 동안 대조군은 4주째에 공복혈당이 500으로 증가하였으나, 양성대조군1(8주간 섭취하는 동안 대조군, 양성대조군1(피니톨), 양성대조군2(자누비아), 페루산10% (페루산 김정옥수수 추출물), 국내산 HP-20 (국내산 김정옥수수 추출물)의 공복혈당은 6주째까지 400이하를 유지하다가 7-8주에서는 450정도가 되었으며, 양성대조군과 김정옥수수 치리군간의 차이는 보이지 않았음. 양성대조군 (피니톨, 자누비아) 및 김정옥수수 치리군 등(페루산 김정옥수수 추출물 10%, 국내산 김정옥수수 추출물 HP-20)에서 혈당감소효과가 거의 비슷하였음

나. 8주간 db/db-mouse의 경구당부하(OGTT, oral glucose tolerance test) 변화

경구당부하검사는 동물을 16시간 동안 절식시키고 D glucose를 2g/kg 씩 경구 투여한 다음 안와정맥총에서 0분, 30분, 60분, 120분에 각각 채혈하여 혈당을 측정하였다.

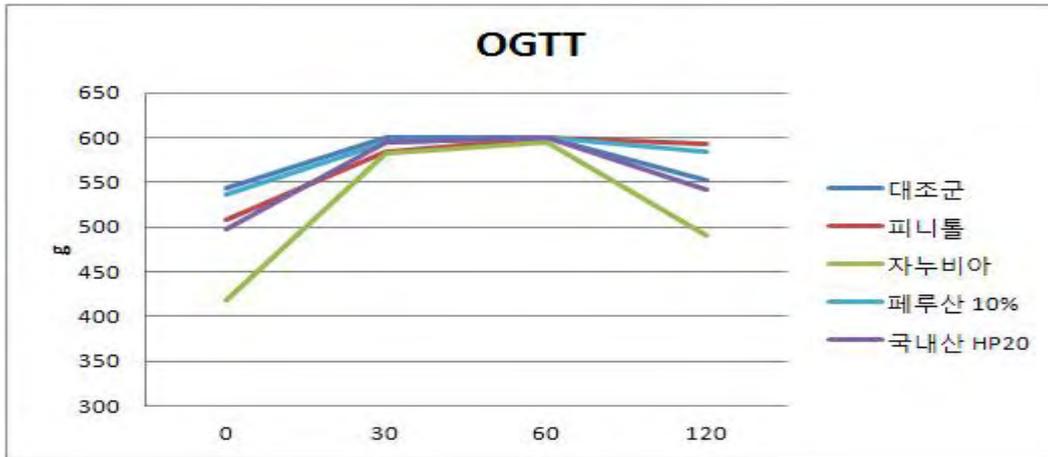


fig 26. 8주간 db/db mouse의 경구당부하(OGTT, oral glucose tolerance test) 변화

8주간 섭취시 대조군, 양성대조군, 실험군(김정옥수수 추출물)의 경구당부하 검사결과 대조군, 양성대조군1(피니톨), 페루산10% (페루산 김정옥수수 추출물)에서는 혈당감소가 거의 나타나지 않았고, 양성대조군2(자누비아)가 혈당강화활성이 가장 우수하였으며, 국내산 HP-20 (국내산 김정옥수수 추출물)의 혈당강화효과를 어느정도 보여주었음

바. 8주간 섭취시키는 동안 db/db-mouse의 당화혈색소(HbA1c) 변화

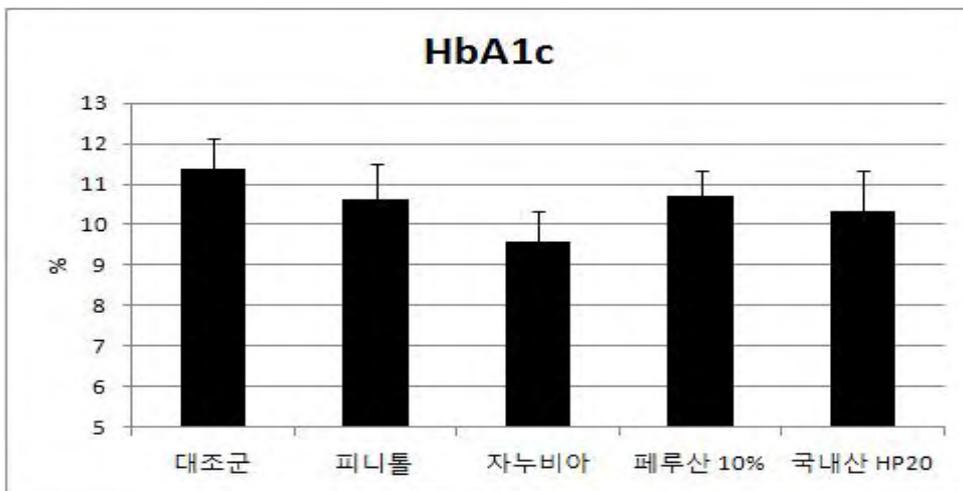


fig 27. 8주간 섭취시키는 동안 db/db-mouse의 당화혈색소(HbA1c) 변화

8주간 섭취 시 대조군이 당화혈색소 수치가 예상대로 가장 높았고, 자누비아가 가장 우수하였으며, 페루산 10%와 피니톨은 비슷하였으며, 국내산 HP 20은 자누비아 다음으로 당화혈색소가 낮았음

사. 8주간 섭취시킨 후 db/db-mouse의 혈액내 insulin 농도

체혈한 혈액은 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 분리하고 insulin ELISA KIT (shibayagi, Japan)를 이용하여 측정하였다.

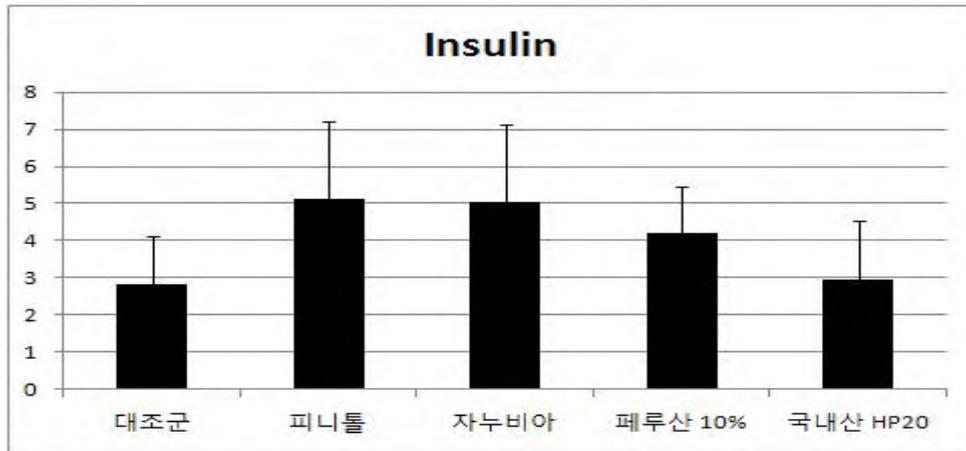
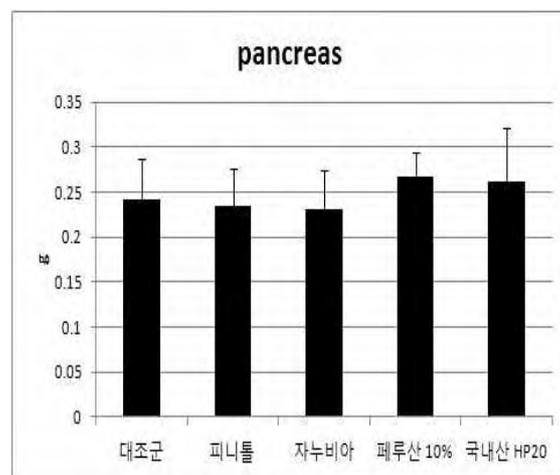
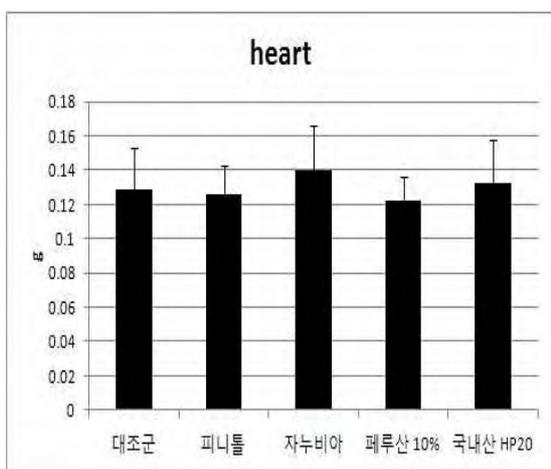


Fig 28. 8주간 섭취시킨 후 db/db mouse의 혈액내 insulin 농도

8주간 섭취 후 대조군이 당화혈색소 수치가 예상대로 가장 낮았고, 자누비아, 피니톨이 혈액 내 인슐린 농도가 높았으며, 페루산 10% 과 국내산 HP20은 그들보다 낮았음

아. 8주간 섭취 후 db/db mouse의 장기부게 변화

각각의 장기를 식춘한 후 PBS로 충분히 세척하고 물기를 제거한 다음 지방 등을 깨끗하게 정리하여 무게를 측정하였다.



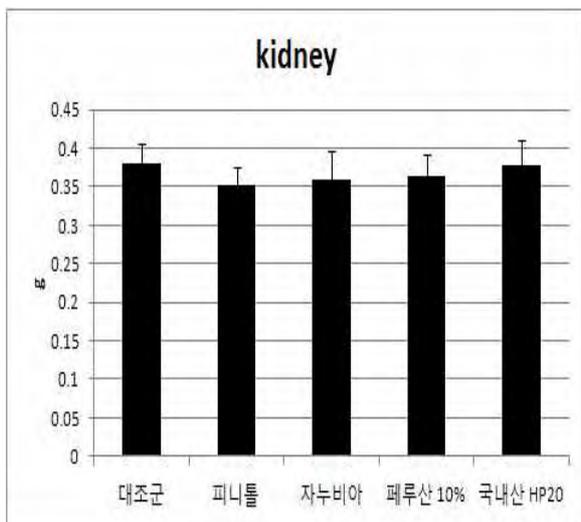
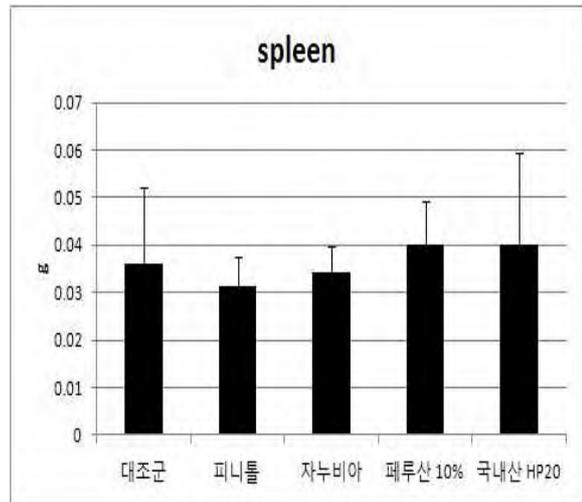
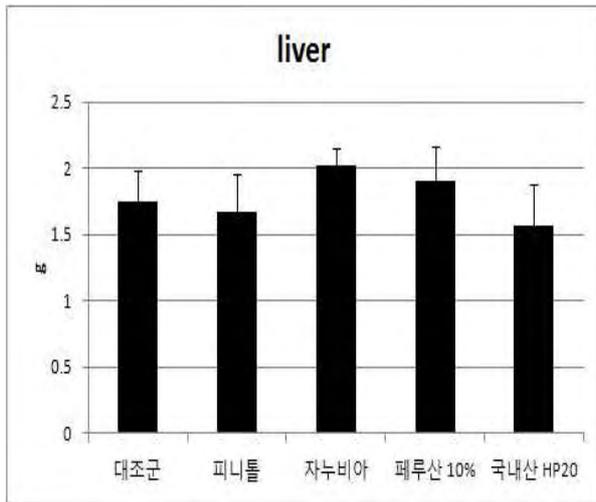


Fig 29. 8주간 섭취 후 db/db mouse의 장기무게 변화

8주간 섭취 후 대조군, 양성대조군(glimepiride), 김장옥수수 추출물 실험군(김장옥수수 추출물)에서 간, 심장, 신장, 췌장의 무게에서 차이는 나타나지 않았으며, 육안상의 색깔이나 외양의 차이를 볼 수 없었음

자. 8주간 섭취 후 db/db-mouse의 기초안전성 분석

안와정맥을 이용하여 혈액을 600ul 뽑아서 혈청을 분리하고 RUC 혈액생화학 기기를 이용하여 ALT, AST, BUN 를 분석하였다.

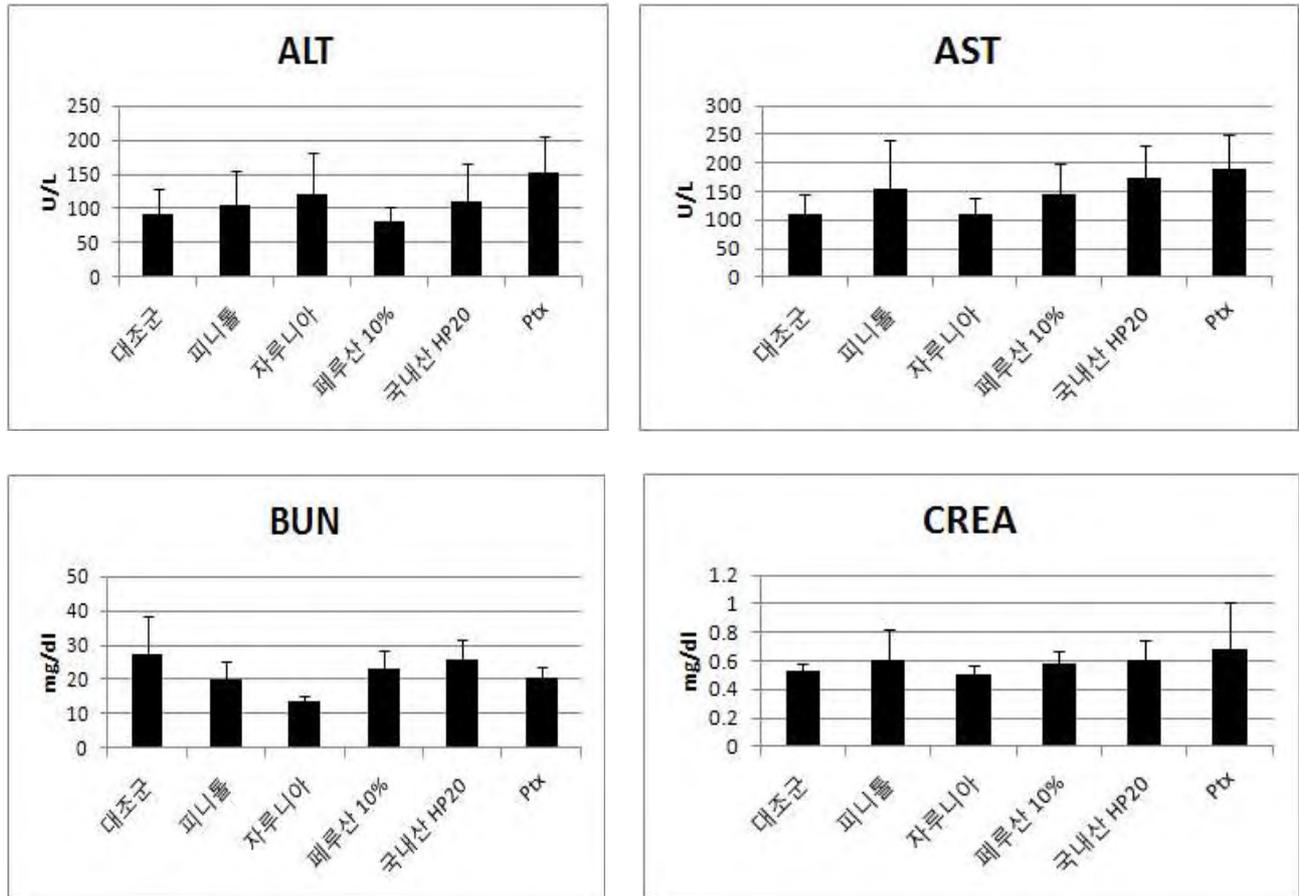


fig 30. 8주간 섭취 후 db/db-mouse의 기초안전성 분석

8주간 섭취 후 대조군, 양성대조군(glimepiride), 김징옥수수 추출물 실험군(김징옥수수 추출물)에서 ALT, AST, BUN의 차이는 나타나지 않았으며, 간 및 신장 독성이 없다는 것을 보여 주었음

차. 8주간 섭취 후 db/db-mouse의 혈액내 콜레스테롤 분석

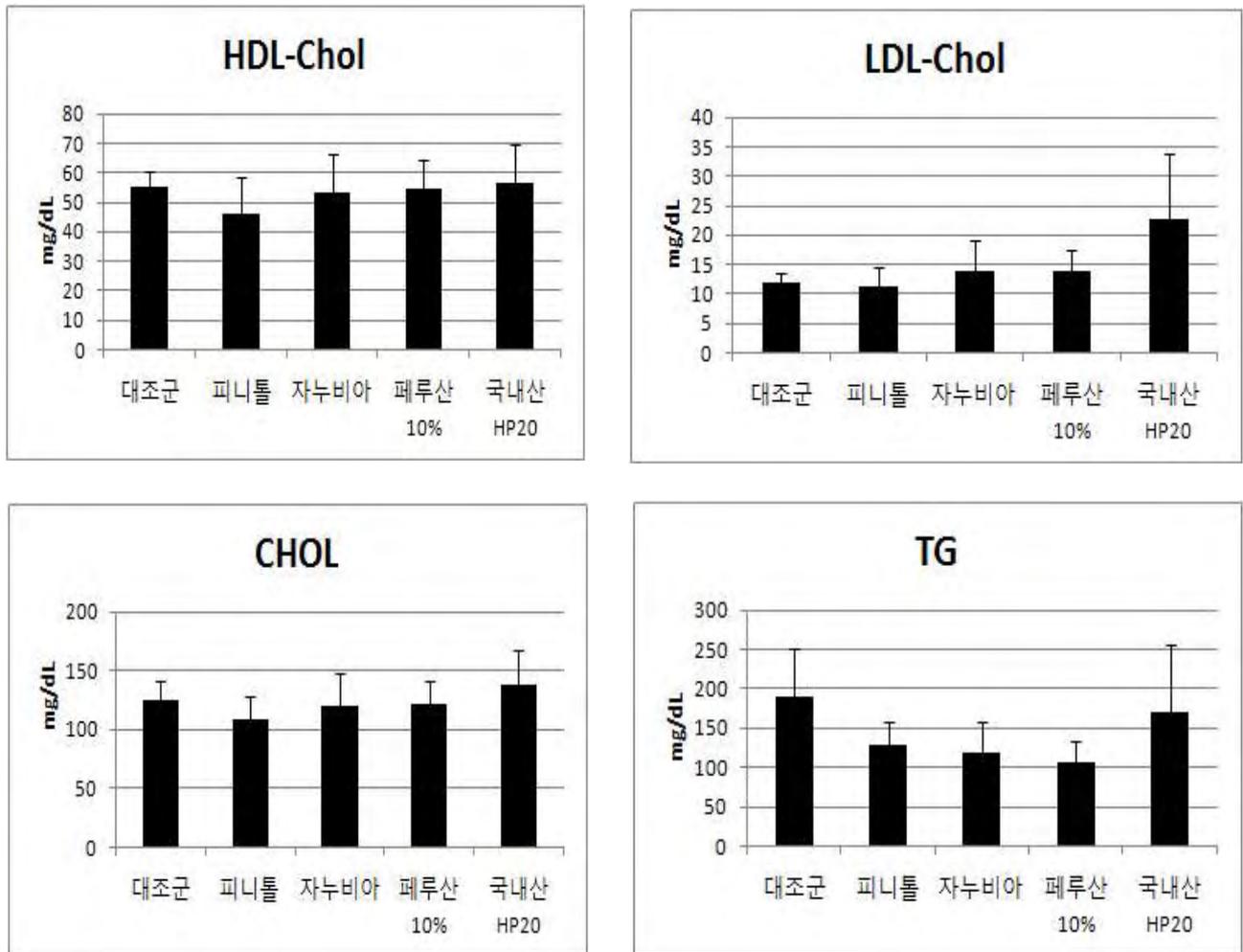


Fig 31. 8주간 섭취 후 db/db mouse의 혈액내 콜레스테롤 분석

국내산 감정옥수수 추출물 HP20은 혈액내 LDL-Cholesterol을 증가시켰으나 total cholesterol은 크게 변화시키지 않았으며, 오히려 TG(triacy glycerol)를 대조군과 같은 농도로 유지시켰음. 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물은 대조군 (untreated)에 비해 LDL cholesterol, HDL cholesterol, total cholesterol의 혈액 내 농도를 변화시키지 않았으나, TG의 농도는 상당히 감소시켰다.

대조군(무처리군), 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물, 국내산 김장옥수수 추출물 HP20을 8주간 db/db mouse에 처리 시 공복혈당 저하 효과는 페루산 10% 추출물, 국내산 김장옥수수 추출물 HP20을 10mg/kg/day 처리한 군이 피니톨 (100mg/kg/day), 자누비아 (280mg/kg/day) 처리군과 유사하였음. 페루산 10% 추출물, 국내산 김장옥수수 추출물 HP20이 피니톨에 비해 10배, 자누비아에 비해 28배의 적은량으로도 유사한 혈당저하효과를 갖는다는 것을 밝혔다.

OGTT(경구내당능), 당화혈색소(HbA1C)는 자누비아가 가장 우수하였으며, 피니톨과 페루산 10% 추출물, 국내산 김장옥수수 추출물 HP20 처리군은 유사하게 감소활성이 다소 약하였으나 상대적인 처리농도가 28배나 낮아서 비교하기는 어렵다.

대조군(무처리군), 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물, 국내산 김장옥수수 추출물 HP20의 8주처리 후 췌장, 간, 심장, 신장, 췌장의 무게에서 차이는 나타나지 않았으며, 육안상의 색깔이나 외양의 차이를 볼수 없었으며, ALT, AST, BUN의 차이가 없어서 간 및 신장 독성이 없다는 것을 보여주었다.

국내산 김장옥수수 추출물 HP20은 혈액내 LDL-Cholesterol을 증가시켰으나 total cholesterol은 크게 변화시키지 않았으며, 오히려 TG(triacy glycerol)를 대조군과 같은 농도로 유지시켰음. 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물은 대조군 (untreated) 에 비해 LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, total cholesterol의 혈액 내 농도를 변화시키지 않았으나, TG의 농도는 상당히 감소시켰다.

10. 메타세포배양에서 김장옥수수 polyphenol의 혈당강하 및 세포보호 기전연구

가. 췌장 islet을 anti insulin antibody로 면역연색화학적 분석 결과

**insulin**

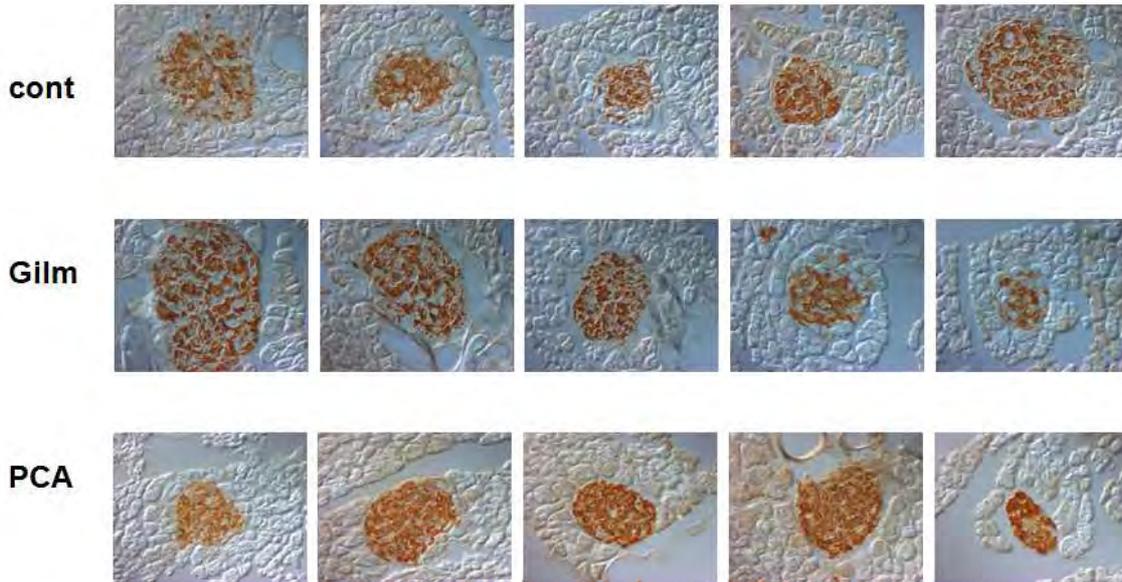


fig 32. 췌장 islet을 anti insulin antibody로 면역연색화학적 분석 결과

대조군(부처리군)와 양성대조군(glimepiride)의 경우는 islet에 insulin은성인 세포(베타 세포가 아닌 세포)가 많았으나 (염색되 않은 세포)가 많았으나 (약 40-50%) PCA(김장옥수수 10% polyphenol) 처리군에서는 약 80%이상의 세포가 insulin을 발현하는 세포로 확인되어 췌장메타세포 보호효과가 우수함을 보여주었다.

나. 췌장 islet을 anti-glucagon antibody로 면역염색화학적 분석 결과

## Glucagon

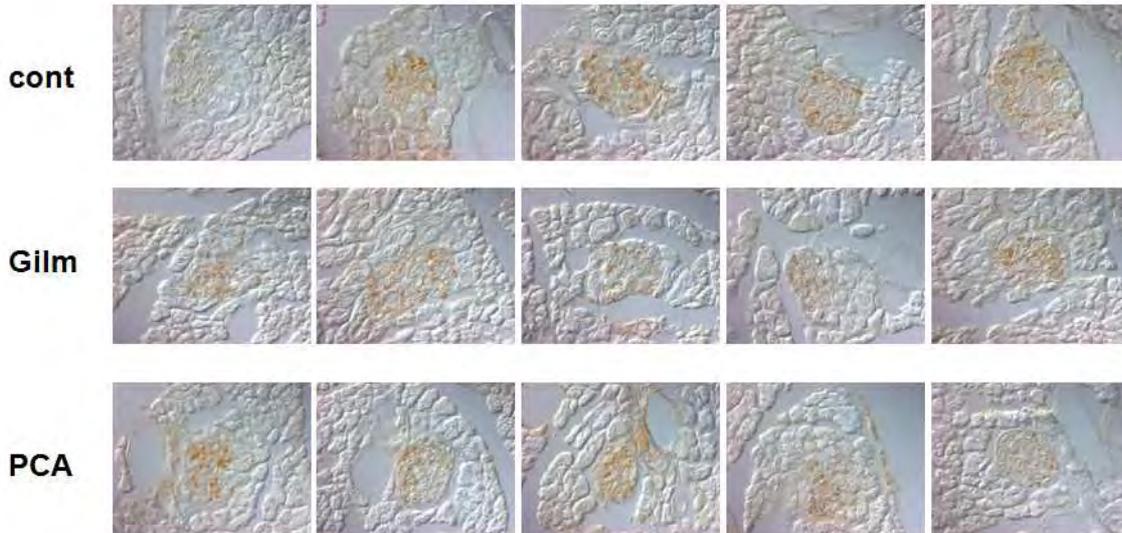


fig 33. 췌장 islet을 anti glucagon antibody로 면역염색화학적 분석 결과

대조군(무처리군)와 양성대조군(glimepiride), PCA(김정옥수수수 10% polyphenol) 처리군에서 islet에서 glucagon의 발현정도 및 세포분포(알파 세포)도 거의 차이가 없었음. 이 결과는 김정옥수수수 10% polyphenol이 glucagon을 분비하는 알파세포의 성장 및 보호에는 관여하지 않는다는 사실을 나타내주고 있음

다. 췌장 islet을 anti-glut2 antibody로 면역염색화학적 분석 결과

## GLUT2

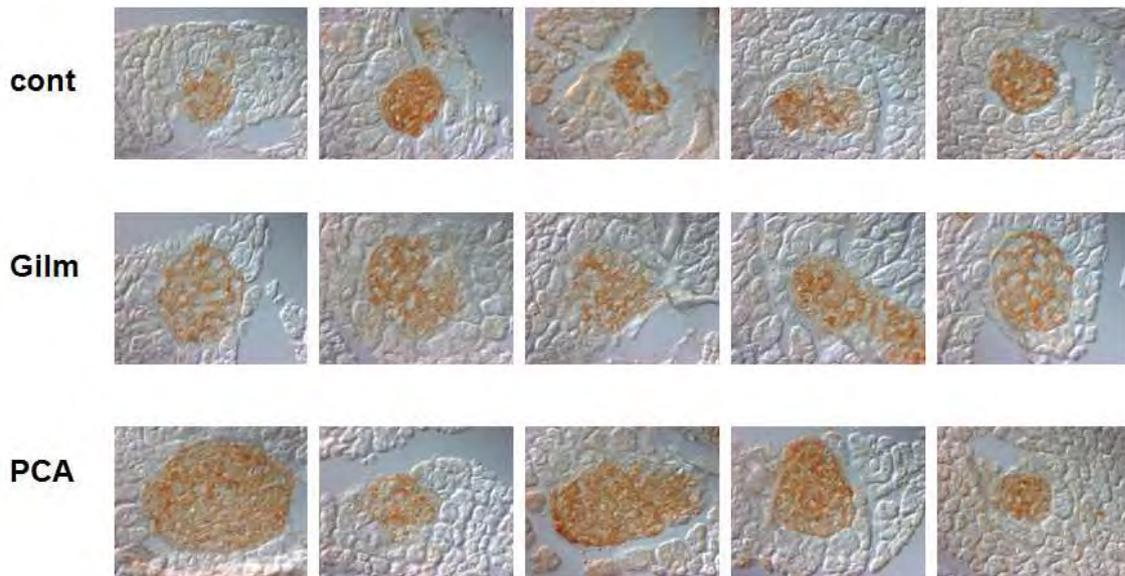
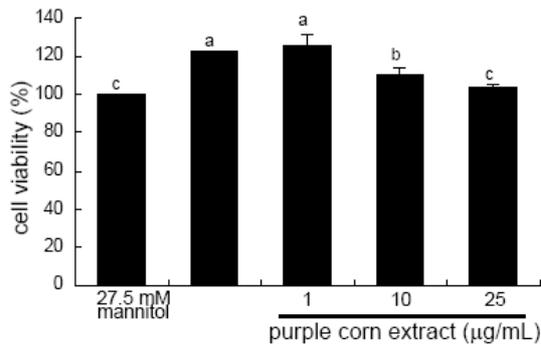


fig 34. 췌장 islet을 anti-glut2 antibody로 면역염색화학적 분석 결과

대조군(무처리군)와 PCA(김정옥수수수 10% polyphenol) 처리군의 경우는 islet에 glut2 양성인 세포가 많았으나 (염색된 세포)가 많았으나 양성대조군 (glibenclamide)에서는 glut2 양성인 세포가 다소 감소하는 것으로 보여, insulin 분비제인 glibenclamide가 췌장 islet에서 glut2 (glucose transporter)의 발현을 감소시킨 것으로 나타났음. 그 원인은 현재로서는 정확하지 않지만 아마도 glibenclamide의 처리에 의한 췌장 islet 베타세포의 고갈 또는 세포사가 대조군 및 PCA 처리군 보다 더 많이 일어났기 때문으로 추정됨

11. 고혈당에 의한 사구체 경화에 대한 김징옥수수 추출물의 억제능

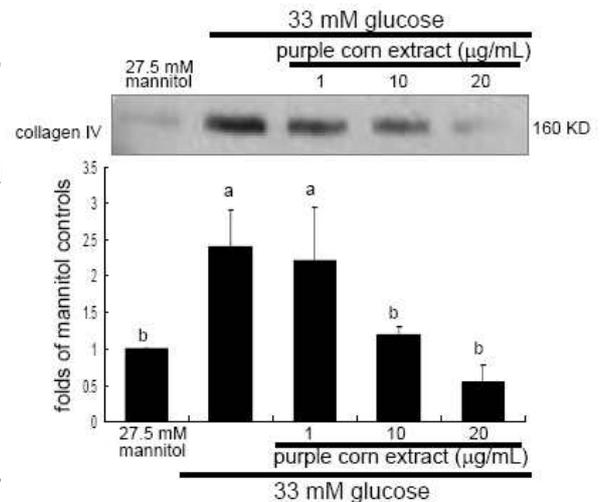


**Fig. 35:** Cell viability of human renal mesangial cells (HRMC) challenged with 33 mM glucose in the absence and presence of purple corn extracts. HRMC were treated with 1-25 µg/mL purple corn ethanol extracts for 3 d in the culture media of 33 mM glucose. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. Values are means ± SEM (n=5) and expressed as percent cell survival relative to mannitol controls (cell viability= 100%). Values not sharing a letter

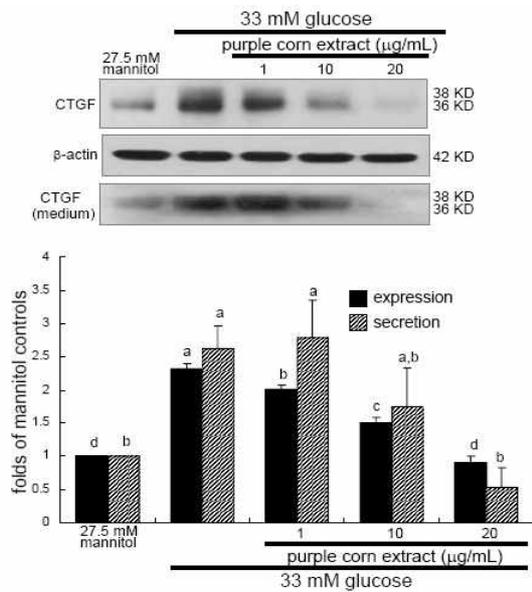
are different at P<0.05.

**Fig. 35에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 mesangial cells의 증식을 초래하였고, 김징옥수수 추출물은 처리하게 되면 증식이 농도의존식으로 억제한다는 사실이 확인되었다. 그 억제효능은 10 µg/ml. 이상의 농도에서 유의적으로 나타났다.

**Fig. 36:** Collagen type IV secretion of human renal mesangial cells (HRMC) challenged with 33 mM glucose in the absence and presence of purple corn extracts. HRMC were treated with 1-20 µg/ml. purple corn ethanol extracts for 3 d in the culture media of 33 mM glucose. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. For the secretion of collagen type IV, culture media were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis with a primary antibody against collagen type IV. The bar graphs (means ± SEM, n=3) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at P<0.05.



**Fig. 36에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 예비실험에서 고농도 포도당 매지에 신장세포를 3일간 배양시키면 충분한 신장조직의 matrix 변화를 가져온다는 사실이 규명되었다. 김징옥수수 추출물은 mesangial cells은 고혈당에 의하여 촉진되는 신장조직의 matrix인 collagen type IV의 형성을 억제한다는 사실을 보여주었다. 그 효능은 mesangial cells의 증식 억제능과 유사하였다. 이로서 10 µg/ml. 농도 이상의 김징옥수수 추출물은 당뇨병증으로 인한 사구체경화작용과 신장 불능에 대한 억제활성소재로 활용될 수 있다는 것을 제시하였다.

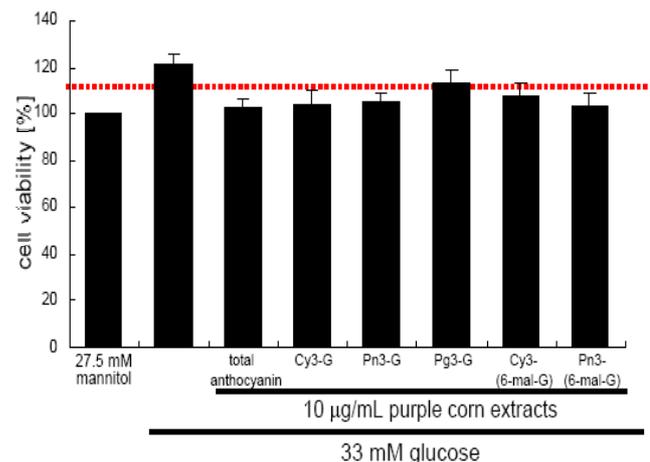


**Fig. 37:** Inhibitory effects of purple corn extracts on levels of expression and secretion of connective tissue growth factor (CTGF) in high glucose-stimulated human renal mesangial cells (HRMC). HRMC were challenged with 1-20 μg/ml purple corn extracts for 3 d in the culture media of 33 mM glucose. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. After HRMC culture protocols, cell extracts or culture media were subjects to SDS-PAGE and Western blot analysis with a primary antibody against CTGF. β-Actin protein was used as an internal control. The bar graphs (means ± SEM, n=3) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Respective values not sharing a letter are

different at P<0.05.

**Fig. 37에 대한 고찰:** Fig. 2에서와 같이 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 mesangial cells의 증식과 함께 connective tissue growth factor (CTGF)의 발현 뿐만 아니라 분비도 촉진하였다. 여기에 김징옥수수 추출물 10 μg/ml 이상의 농도를 처리하게 되면 mesangial cells의 CTGF의 발현과 분비를 억제한다는 사실이 확인되었다. 이로써 김징옥수수 추출물은 당뇨병증으로 인한 사구체경화작용에 직접적인 영향을 줄 수 있는 신장결체조직의 증식에 대한 억제활성소재로 활용될 수 있다는 것을 제시하였다.

**Fig. 38:** Cell viability of human renal mesangial cells (HRMC) challenged with 33 mM glucose in the absence and presence of various anthocyanins extracted from purple corn extracts. HRMC were treated with 10 μg/ml of each anthocyanin for 3 d in the culture media of 33 mM glucose. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. Values are means ± SEM (n=5) and expressed as percent cell survival relative to mannitol controls (cell viability= 100%).

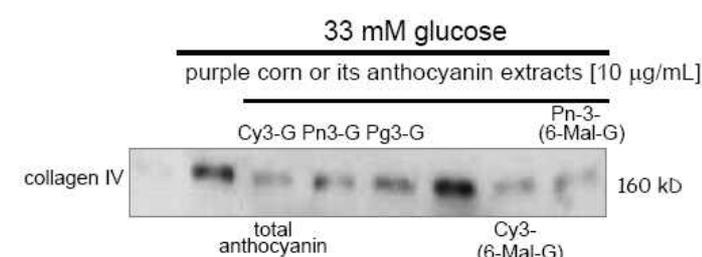


Cy3-G, cyanidin 3-glucoside; Pn3-G,

peonidin 3-glucoside; Pg3-G, polargonidin 3-glucoside; Cy3-(6-mal-G), cyanidin 3-(6-malonyl-glucoside); Pn3-(6-mal-G), Peonidin 3-(6-malonyl-glucoside).

**Fig. 38에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 상기 김징옥수수 추출물을 이용한 연구결과에서 33mM 포도당은 mesangial cells의 과증식을 초래하였고, 김징옥수수 추출물을 처리하게 되면 증식이 농도의존적으로 억제한다는 사실이 확인되었다. 그 억제효능은 10

µg/ml 이상의 농도에서 유의적으로 나타난다는 사실을 규명하였다. 후속연구에서 김정옥수수 추출물에서 안토시아닌 성분을 추출하여 어느 안토시아닌 성분이 이러한 억제활성을 발휘하는지를 조사하였다. 그 결과도 고혈당에 의한 mesangial cell 과증식 억제활성은 Pn3-(6-mal-G) > Cy3-G > Pn3-G > Cy3-(6-mal-G) > Pg3-G 순서이다. 여기서 Pg3-G는 억제활성을 발휘하지 못하였지만 추출된 안토시아닌 혼합물은 상당한 억제활성을 나타내었다.

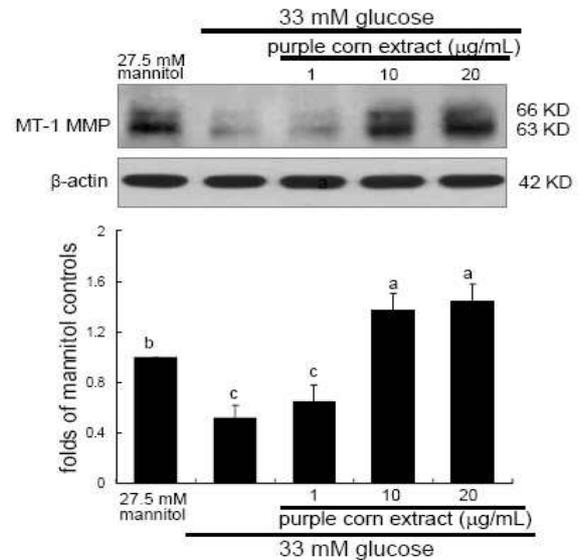


**Fig. 39:** Collagen type IV secretion of human renal mesangial cells (HRMC) challenged with 33 mM glucose in the absence and presence of various anthocyanins extracted from purple corn extracts. HRMC were treated with 10 µg/ml of each purple corn anthocyanin

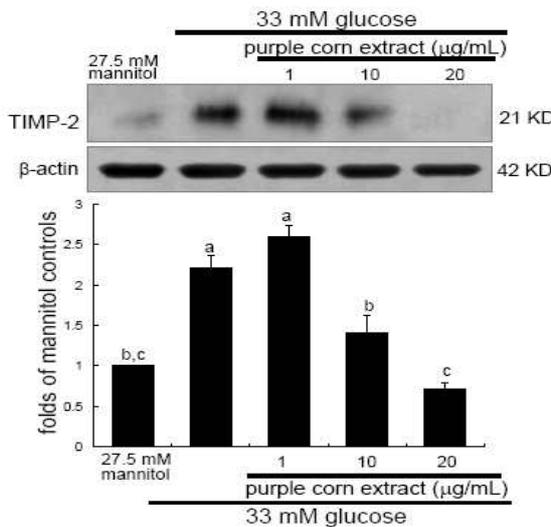
for 3 d in the culture media of 33 mM glucose. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. For the secretion of collagen type IV, culture media were subjected to SDS PAGE and Western blot analysis with a primary antibody against collagen type IV.

**Fig. 39에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 상기 김정옥수수 추출물을 이용한 실험에서 고농도 포도당 매지에 신장세포를 3일간 배양시키면 충분한 신장조직의 collagen matrix 변화를 가져온다는 사실이 규명되었다. 김정옥수수 추출물에서 추출한 안토시아닌 혼합물은 mesangial cells에서 고혈당에 의하여 촉진되는 신장조직의 matrix인 collagen type IV의 분비를 상당히 억제하였다. 안토시아닌 각각의 성분에 의한 collagen 분비에 대한 조사결과에서 Pg3-G를 제외하고는 모든 안토시아닌은 고혈당에 의하여 촉진된 mesangial cells의 collagen 분비를 상당히 억제시킨다는 것을 보여주었다. 이러한 억제활성은 mesangial cells의 과증식 억제능과 유사하였으며 안토시아닌 10 µg/ml 농도에서 이루어졌다. 따라서 김정옥수수 추출물의 당뇨병증으로 인한 사구체경화작용과 신장 섬유증에 대한 억제활성은 함유된 안토시아닌의 생리활성에 의하여 이루어지며 기능성 식품소재로 활용될 수 있다는 것을 제시하였다.

**Fig. 40:** Western blot data showing expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT-1 MMP) in human renal mesangial cells (HRMC) treated with purple corn extracts under high glucose conditions. HRMC were challenged with 1-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  purple corn ethanol extracts, and then exposed to 33 mM glucose for 3 d. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol for 3 d as osmotic controls. After HRMC culture protocols, cell extracts were subjected to SDS PAGE and Western blot analysis with a primary antibody against MT-1 MMP.  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. The bar graphs (means  $\pm$  SEM,  $n=3$ ) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at  $P<0.05$ .



**Fig. 40에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 사구체경화와 결체조직의 matrix 증식은 matrix를 분해하는 효소의 활성이 감소하였기 때문으로 생각된다. 본 연구에서는 고혈당의 상황에서 matrix를 분해하는 matrix metalloproteinase(MMP)의 활성을 조사하였다. 연구결과에서 33mM 포도당은 mesangial cells의 MT-1 MMP의 발현을 감소시켰다. 여기에 김정옥수수 추출물을 처리하게 되면 MT-1 MMP의 활성을 증가시켰다. 이로서 김정옥수수 추출물은 당뇨병증에서 나타나는 신장조직의 경화를 matrix를 분해시키는 MMP의 활성을 증가시키므로써 신부전증과 같은 신성당뇨합병증을 억제시킬 수 있는 활성소재로 제시되었다.

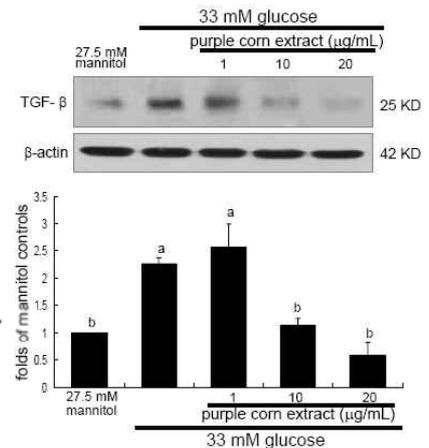


**Fig. 41:** Western blot data showing expression of tissue inhibitor of MMP (TIMP)-2 in human renal mesangial cells (HRMC) treated with purple corn extracts under high glucose conditions. HRMC were challenged with 1-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  purple corn ethanol extracts, and then exposed to 33 mM glucose for 3 d. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol for 3 d as osmotic controls. After HRMC culture protocols, cell extracts were subjected to SDS PAGE and Western blot analysis with a primary antibody against TIMP-2.  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. The bar graphs (means  $\pm$  SEM,  $n=3$ ) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at  $P<0.05$ .

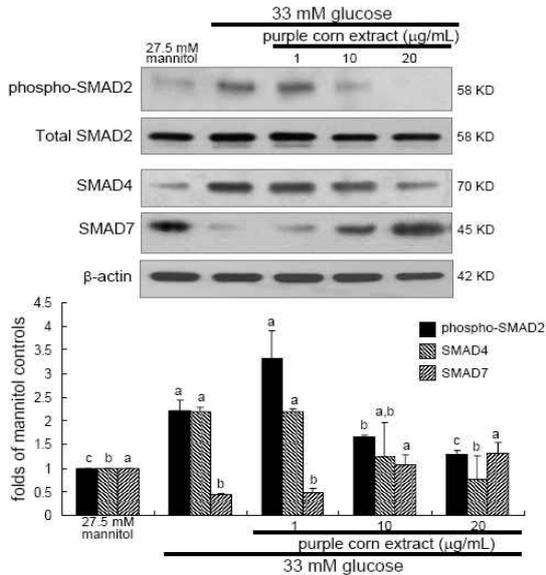
**Fig. 41에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. Fig. 4에서 언급되었듯이 사구체경화와 결체조직의 matrix 증식은 matrix를 분해하는 효소의 활성이 감소하였기

때문으로 생각된다. 본 연구에서는 고혈당의 상황에서 MMP의 활성을 억제시키는 조직인자인 TIMP-2의 활성을 조사하였다. MT-1 MMP의 활성과 반대로 고혈당은 TIMP-2의 발현을 증가시켰고 김정옥수수 추출물은 반대로 억제하는 효과를 보여주었다. 이로서 김정옥수수 추출물은 당뇨병증에서 나타나는 신장조직의 경화를 matrix를 분해시키는 MMP의 활성이 감소되는 것을 TIMP-2의 활성을 감소시키므로서 MMP의 활성을 증가시켜 신장 섬유증과 사구체경화증과 같은 신성당뇨합병증을 억제시킬 수 있는 활성소재도 제시되었다.

**Fig. 42:** Expression inhibition of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  in human renal mesangial cells (HRMC) treated with purple corn extracts under high glucose conditions. HRMC were treated with 1-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  purple corn ethanol extracts, and then stimulated with 33 mM glucose for 3 d. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol for 3 d as osmotic controls. After HRMC culture protocols, cell extracts were subjected to SDS PAGE and Western blot analysis with a primary antibody against TGF- $\beta$ .  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control.

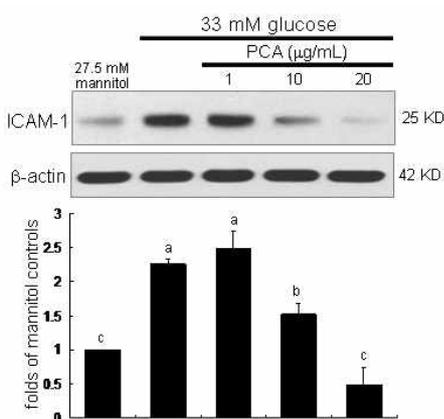


**Fig. 42에 대한 고찰:** 고농도 포도당 매지에 신장세포를 3일간 배양시키면 CTGF와 collagen type IV의 발현과 생성을 촉진하여 충분한 신장조직의 matrix 변화를 가져온다는 사실이 규명되었다. 본 연구에서는 사구체경화와 신장 섬유증과 같은 신성 당뇨병증을 초래하는 matrix의 축적에 대한 김정옥수수 추출물의 억제능에 대한 기전 연구를 실시하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 mesangial cells의 단백질 발현과 관련된 신호전달체계의 TGF- $\beta$ 의 활성을 고혈당 매지 3일이 지나서 촉진시켰다. 여기서 콜라겐의 분비와 혈관간 세포증식과 관련된 TGF- $\beta$ 의 활성을 김정옥수수 추출물이 차단시킨다는 것이 규명되었다. 본 연구에서 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상 농도에서 김정옥수수 추출물은 TGF- $\beta$ 의 발현을 억제하였다. 이로서 김정옥수수 추출물은 당뇨병증으로 인한 신장 조직 경화와 증식과 관련된 신호전달 유전자 단백질의 활성과 발현을 억제하여 사구체경화작용과 신장 섬유증으로의 신호전달과정을 차단하는 소재도 활용될 수 있을 것으로 증명되었다.



**Fig. 43:** Inhibition of SMAD2 phosphorylation, SMAD4 expression and enhancement of SMAD7 expression in human renal mesangial cells (HRMC) treated with purple corn extracts under high glucose conditions. HRMC were treated with 1-20 μg/ml purple corn ethanol extracts, and then stimulated with 33 mM glucose for 3 d. Cells were also incubated in 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol for 3 d as osmotic controls. After HRMC culture protocols, cell extracts were subjects to SDS-PAGE and Western blot analysis with a primary antibody against phosphorylated SMAD2, SMAD2, SMAD4 and SMAD7. β-Actin protein was used as an internal control.

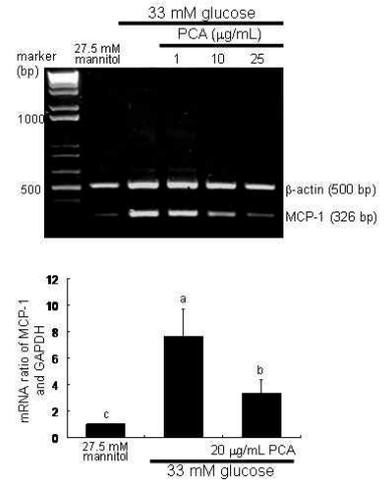
**Fig. 43에 대한 고찰:** 본 연구에서는 사구체경화와 신장 섬유증과 같은 신장 당뇨병증을 초래하는 matrix의 증식에 대한 김징옥수수 추출물의 억제능에 대한 기전 연구로서 TGF-β 신호전달과정에도 흥미를 두었다. Fig. 6에서 보여주었듯이 고혈당은 TGF-β의 발현을 증가시켜 TGF-β의 신호전달체계가 고혈당에 의하여 가동되었다는 것을 알 수 있다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 배양 3일이 지나서 mesangial cells에서 TGF-β의 downstream에 위치하고 있는 SMAD2의 활성을 증가시켰다. 뿐만 아니라 인산화된 SMAD2와 결합하여 핵내로 이동하는데 관여하는 SMAD4의 발현도 증가시켰다. 이에 반해 억제활성을 가지는 SMAD7의 발현은 급격히 소실되었다. 이러한 고혈당의 효능은 10 μg/ml이상의 농도인 김징옥수수 추출물에 의하여 억제되는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 김징옥수수 추출물은 단백질 과합성을 초래하는 TGF β SMAD으로 이어지는 신호전달과정을 차단시키는 것으로 규명되었다. 이로서 김징옥수수 추출물은 당뇨병증으로 인한 조직 경화와 증식과 관련된 TGF-β 신호전달 시스템을 교란 또는 차단하는 소재로 활용될 수 있다는 것을 확인하였다.



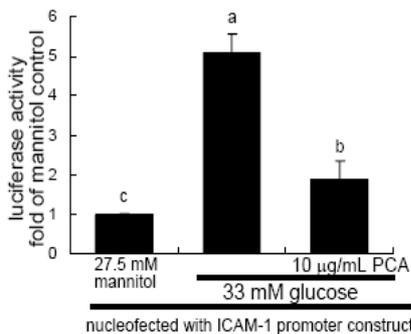
**Figure 44:** Inhibition of induction of inflammatory ICAM-1 protein by purple corn anthocyanins (PCA) in human renal mesangial cells (HRMC) under high 3 d-glucose conditions. Additionally, HRMC were incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. Cell lysates were used for Western blot analysis with a primary antibody against ICAM-1. β-Actin protein was used as an internal control. The bar graph (mean ± SEM, n=3) in the bottom panel represent densitometric results. Values not sharing a letter are different at P<0.05.

**Figure. 44에 대한 고찰:** 33mM 포도당 배지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 염증인자도 작용하는 mesangial cells의 ICAM-1의 발현을 증가시켰고, 김징옥수수 안토시아닌을 처리하게 되면 염증인자의 발현이 농도의존적으로 억제한다는 사실이 확인되었다. 그 억제효능은 10 μg/ml. 이상의 농도에서 유의적으로 나타났다.

**Figure 45:** Inhibition of induction of inflammatory MCP-1 mRNA by purple corn anthocyanins (PCA) in human renal mesangial cells (HRMC) under high 3 d-glucose conditions. Additionally, HRMC were incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. RT-PCR (upper panel) and real-time PCR (bottom panel) showing mRNA levels of MCP-1 in PCA-treated and 33 mM glucose-stimulated HRMC.  $\beta$ -Actin genes was used as an internal control for the co-amplification with MCP-1 (3 separate experiments). The bar graphs (means  $\pm$  SEM, n=3) represent quantitative results obtained from a luminometer. Values not sharing a letter are different at  $P < 0.05$ .



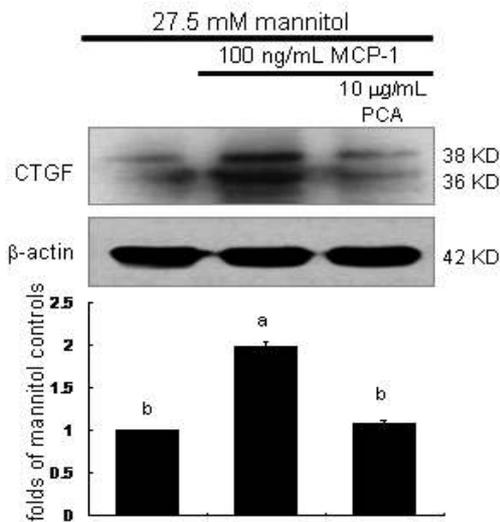
**Figure 45에 대한 고찰:** 33mM 포도당 배지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 고농도 포도당 배지에 신장세포를 3일간 배양시키면 MCP-1 염증인자의 전사단계에서의 발현을 증가시킨다는 것이 규명되었다. 이로서 고혈당은 신장조직에 염증을 초래한다는 것을 보여주고 있다. 이에 검정옥수수 안토시아닌은 고혈당에 의하여 촉진되는 신장조직의 염증을 억제한다는 사실을 보여주었다. 이로서 10 µg/ml 농도 이상의 검정옥수수 안토시아닌은 당뇨병증으로 인한 염증에 대한 억제활성소재로 활용될 수 있다는 것을 제시하였다.



**Figure 46:** Suppression of promoter activity of ICAM-1 by purple corn anthocyanins (PCA) in human renal mesangial cells (HRMC) under high 3 d-glucose conditions. Additionally, HRMC were incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. HRMC were nucleofected with a luciferase-harboring-ICAM-1 promoter construct. Transfected mesangial cells (HRMC) were incubated with 33 mM glucose for 3 d in presence of 10 µg/ml PCA.

Transfected cells were incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. Promoter activity was assessed using luciferase reporter gene assay. The bar graphs (means  $\pm$  SEM, n=3) represent quantitative results obtained from a luminometer. Values not sharing a letter are different at  $P < 0.05$ .

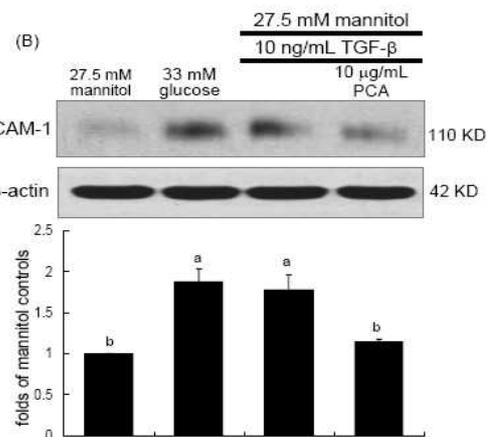
**Figure 46에 대한 고찰:** 33mM 포도당 배지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. Figure 1에서와 같이 33mM 포도당은 mesangial cells의 염증반응을 촉진하고 여기에 검정옥수수 추출물 10 µg/mL 이상의 농도를 처리하게 되면 ICAM-1 전사단계에서 promoter활성을 증가시켜 mesangial cells의 염증반응을 억제한다는 사실이 확인되었다.



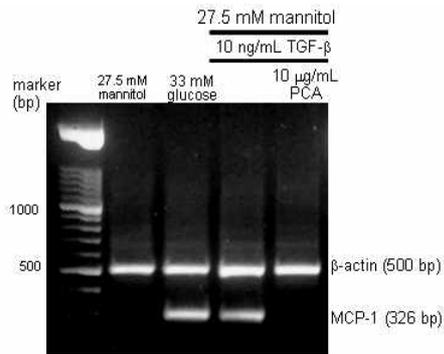
**Figure 47:** Effects of purple corn anthocyanins (PCA) on connective tissue growth factor (CTGF) induction by MCP-1. Human renal mesangial cells (HRMC) were treated for 3 d with 100 ng/ml human recombinant MCP-1 in absence and presence of 10 µg/ml PCA. Also, HRMC were incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. Cell extracts were employed for Western blot analysis with a primary antibody against CTGF.  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM, n=3) in the bottom panels represent densitometric results, and respective blot data were obtained from 3 separate experiments.

**Figure 47에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 사구체경화와 결체조직의 matrix 증식은 CTGF의 발현이 증가되었기 때문으로 생각된다. 본 연구에서 이러한 사구체경화는 고혈당의 상황에서 염증반응이 촉진되어 나타난다는 가설로 시작되었다. 연구결과에서 mesangial cells의 CTGF 발현은 염증인자인 MCP-1에 의하여 발현이 촉진되었다. 여기에 김정옥수수 안토시아닌을 처리하게 되면 CTGF의 발현은 감소되었다. 이로서 김정옥수수 안토시아닌은 당뇨병증에서 나타나는 신장조직의 염증반응으로 인하여 matrix를 형성시키는 CTGF의 활성을 억제시키므로 신부전증과 같은 신장당뇨합병증을 억제시킬 수 있는 활성소재도 제시되었다.

**Figure 48:** Effects of purple corn anthocyanins (PCA) on induction of ICAM-1 by TGF- $\beta$ . Human renal mesangial cells (HRMC) were treated for 3 d with 10 ng/ml human recombinant TGF- $\beta$  in absence and presence of 10 µg/ml PCA. Also, HRMC were incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. Cell extracts were employed for Western blot analysis with a primary antibody against ICAM-1 (B).  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM, n=3) in the bottom panels represent densitometric results, and respective blot data were obtained from 3 separate experiments.

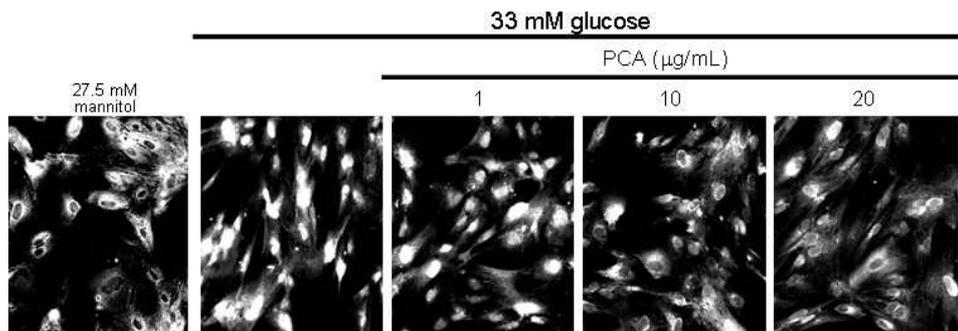


**Figure 48에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. Figure 1와 3에서 언급되었듯이 고혈당은 염증인자 ICAM-1의 발현을 증가시켰다. 그리고 선행연구에서 TGF- $\beta$ 는 사구체경화와 결체조직의 matrix 증식에 직접적인 역할을 발휘한다는 사실을 증명하였다. 본 연구에서는 TGF- $\beta$ 에 의한 고혈당에서 촉진되는 염증인자의 발현을 조사하였다. 고혈당에 의한 ICAM-1의 발현과 비슷하게 TGF- $\beta$  그 자체는 ICAM-1의 발현을 증가시켰고 김정옥수수 안토시아닌은 억제하는 효과를 보여주었다. 이로서 사구체경화와 염증반응은 서로 연관성이 있다는 것이 증명되었고 TGF- $\beta$ 에 의한 염증반응을 김정옥수수 안토시아닌은 이것을 차단하여 사구체경화를 억제할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.



**Figure 49:** Effects of purple corn anthocyanins (PCA) on induction of MCP-1 by TGF- $\beta$ . Human renal mesangial cells (HRMC) were treated for 3 d with 10 ng/mL human recombinant TGF- $\beta$  in absence and presence of 10 mg/mL PCA. Also, HRMC were incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. RT-PCR showing mRNA levels of MCP-1 in 100 ng/mL TGF- $\beta$ -treated and 33 mM glucose-inflamed HRMC.  $\beta$ -actin genes was used as an internal control for the co-amplification with MCP-1 (3 separate experiments).

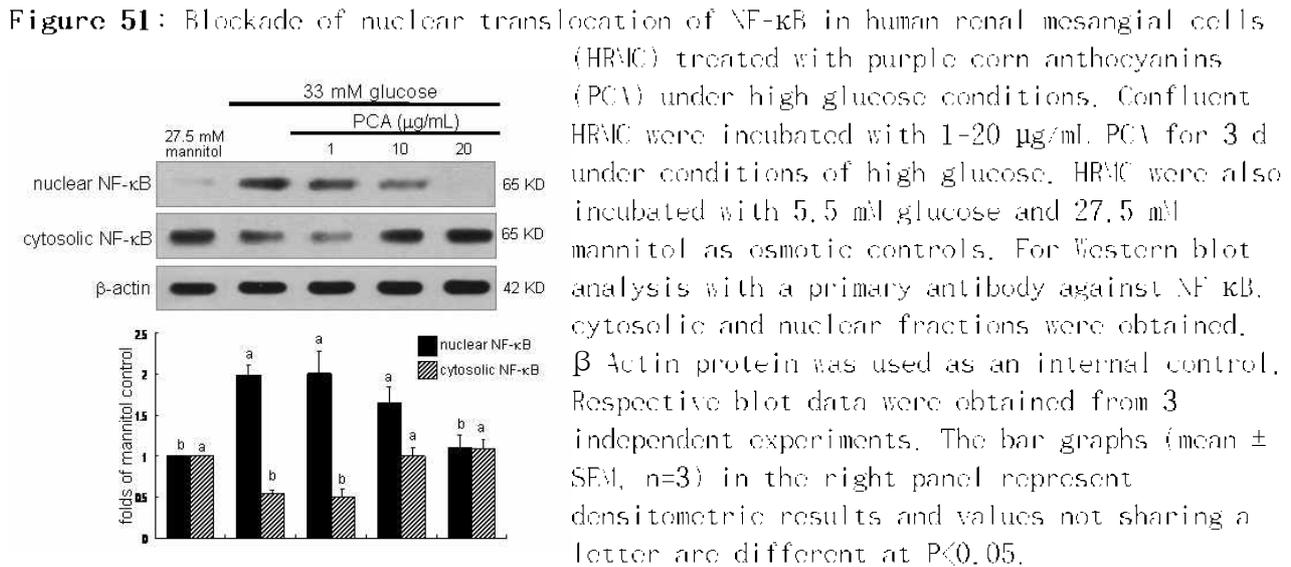
**Figure 49에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. Figure 2에서 언급되었듯이 고혈당은 염증인자 MCP-1 mRNA의 발현을 증가시켰다. 본 연구에서는 TGF- $\beta$ 에 의한 고혈당에서 촉진되는 염증인자인 MCP-1의 발현을 조사하였다. 고혈당에 의한 MCP-1의 발현이 촉진되는 것과 같이 TGF- $\beta$  그 자체는 MCP-1의 발현을 증가시켰고 김정옥수수 안토시아닌은 억제하는 효과를 보여주었다. 이로서 사구체경화와 염증반응은 서로 연관성이 있다는 것이 증명되었고 TGF- $\beta$ 에 의한 염증반응을 김정옥수수 안토시아닌이 차단시키고 사구체경화를 억제할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.



**Figure 50:** Blockade of nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in human renal mesangial cells (HRMC) treated with purple corn anthocyanins (PCA) under high glucose conditions. Confluent HRMC were incubated with 1-20  $\mu$ g/mL PCA for 3 d under conditions of high glucose. HRMC were also incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. Immunocytochemistry was conducted to visualize nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. Antibody localization was detected with FITC-conjugated anti-rabbit IgG. Magnification: 200-fold.

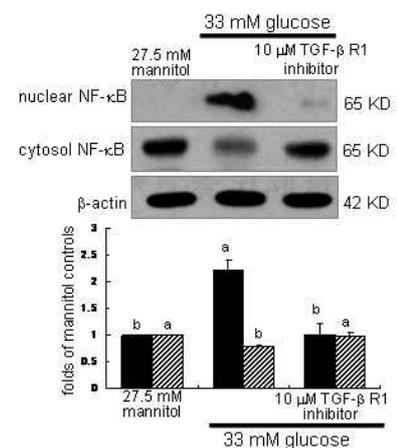
**Figure 50에 대한 고찰:** 본 연구에서는 사구체경화와 신장 섬유증과 같은 신장 당뇨병증은 초래하는 matrix의 증식에 대한 김정옥수수 안토시아닌의 억제능에 대한 기전 연구로서 염증반응의 NF- $\kappa$ B 신호전달과정에 역전을 누었다. 고혈당은 NF- $\kappa$ B의 활성을 증가시켜 NF- $\kappa$ B의 신호전달체계가 고혈당에 의하여 가동되었다는 것을 알 수 있다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 배양 3일이 지나서 mesangial cells에서 NF- $\kappa$ B의 nuclear translocation을 증강시켰다. 이러한 고혈당의 효능은 10  $\mu$ g/mL이상의 농도인 김정옥수수 안토시아닌에 의하여 역전되는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 김정옥수수 안토시아닌은 염증반응에 직접적으로

관여하는 NF- $\kappa$ B 신호전달과정을 차단시키는 것으로 규명되었다. 이로서 김정옥수수 안토시아닌은 당뇨병증으로 인한 염증반응 신호전달시스템을 교란하여 사구체경화와 신장섬유화를 억제하는 소재로 활용될 수 있다는 것을 확인하였다.



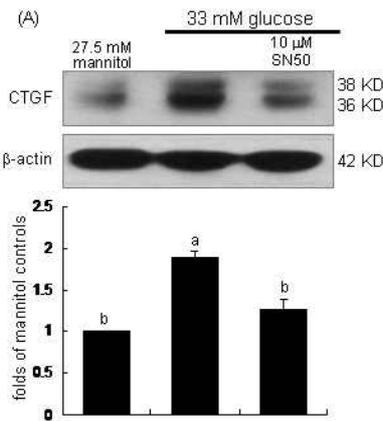
**Figure 51에 대한 고찰:** 본 연구에서는 사구체경화와 신장 섬유증과 같은 신성 당뇨병증을 초래하는 matrix의 증식에 대한 김정옥수수 안토시아닌의 억제능에 대한 기전 연구로서 염증반응의 NF- $\kappa$ B 신호전달과정에 역점을 두었다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 대양 3일이 지나서 mesangial cells에서 NF- $\kappa$ B가 핵내로 이동되어 활성화되는 것을 알 수 있다. 이러한 핵내로의 이동은 10  $\mu$ g/mL이상의 농도인 김정옥수수 안토시아닌에 의하여 차단되는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 김정옥수수 안토시아닌은 염증반응에 직접적으로 관여하는 NF- $\kappa$ B 신호전달을 억제시키는 것으로 규명되었다. 다시 말해서 김정옥수수 안토시아닌은 고혈당으로 인한 염증반응 신호전달시스템을 교란하여 사구체경화와 신장섬유화를 억제하는 소재로 활용될 수 있다는 것을 확인하였다.

**Figure 52:** Blockade of nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in human renal mesangial cells (HRMC) treated with 10  $\mu$ M TGF- $\beta$  R1 inhibitor. Confluent HRMC were incubated with 1-20  $\mu$ g/ml PCA for 3 d under conditions of high glucose. HRMC were also incubated with 5.5 mM glucose and 27.5 mM mannitol as osmotic controls. For Western blot analysis with a primary antibody against NF- $\kappa$ B, cytosolic and nuclear fractions were obtained.  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. Respective blot data were obtained from 3 independent experiments. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM, n=3) in the right panel represent densitometric results and values not sharing a letter are different at P<0.05.



**Figure 52에 대한 고찰:** 본 연구에서는 사구체경화와 신장 섬유증과 같은 신성 당뇨병증을 초래하는 matrix의 증식에 대한 김정옥수수 안토시아닌의 억제능에 대한 기전 연구로서

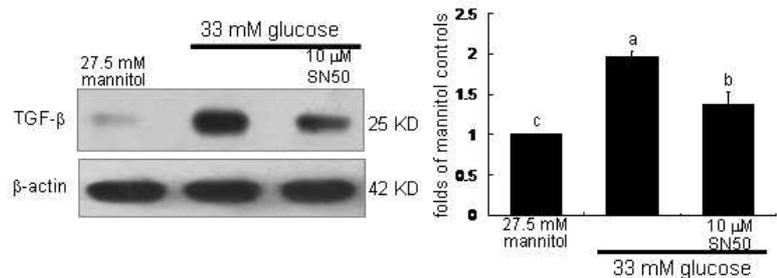
염증반응의 NF-κB 신호전달과정에 역침을 두었다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 매양 3일이 지나서 mesangial cells에서 NF-κB가 핵내로 이동되어 활성화되는 것을 알 수 있다. 이러한 핵내로의 이동은 10 μM의 농도인 TGF-β inhibitor에 의하여 억제되는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 TGF-β은 염증반응에 직접적으로 관여하는 NF-κB의 활성화에 직접 관여한다는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 고혈당으로 인한 염증반응은 사구체경화에 관련된 TGF-β의 신호전달시스템에 의하여 촉진될 수 있다는 것을 알 수 있으며 염증을 유발하는 기전과 사구체경화와 관련된 기전은 서로 작동한다는 것을 알 수 있다.



**Figure 60:** Inhibition of connective tissue growth factor (CTGF) in NF-κB inhibitor SN50 treated human renal mesangial cells (HRMC). HRMC were incubated with 33 mM glucose for 3 d in presence of 10 μM SN50 or 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls. For protein expression of CTGF, Western blot analysis was conducted using a primary antibody against CTGF. β-Actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean ± SEM, n=3) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at P<0.05.

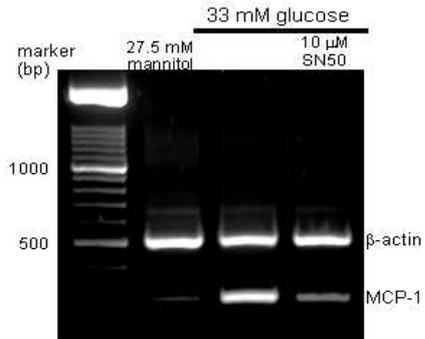
**Figure 60에 대한 고찰:** 본 연구에서는 신성 당뇨병증으로 인한 사구체경화를 초래하는 matrix의 증식의 CTGF의 발현에 염증반응의 NF-κB 신호전달이 관여하는 지를 조사하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 매양 3일이 지나서 mesangial cells에서 CTGF의 발현이 증가되었다. 이것은 10 μM의 농도인 NF-κB inhibitor에 의하여 억제되는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 CTGF 발현은 염증반응에 직접적으로 관여하는 NF-κB에 의하여 억제된다는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 고혈당으로 인한 염증반응은 사구체경화에 관련된 CTGF의 발현을 촉진시킬 수 있다는 것을 알 수 있다.

**Figure 61:** Inhibition of TGF-β in NF-κB inhibitor SN50-treated human renal mesangial cells (HRMC). HRMC were incubated with 33 mM glucose for 3 d in presence of 10 μM SN50 or 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls. For protein expression of TGF-β, Western blot analysis was conducted using a primary antibody against TGF-β. β-Actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean ± SEM, n=3) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at P<0.05.



**Figure 61에 대한 고찰:** 본 연구에서는 신성 당뇨병증으로 인한 사구체경화를 초래하는 matrix의 증식에 관련된 TGF-β 신호전달시스템에 염증반응의 NF-κB 신호전달이 관여하는 지를 조사하였다. 본 연구결과에서 이미 말한바와 같이 33mM 포도당은 매양 3일이 지나서 mesangial cells에서 TGF-β 활성이 증가되었다. 이것은 10 μM의 농도인 NF-κB inhibitor에

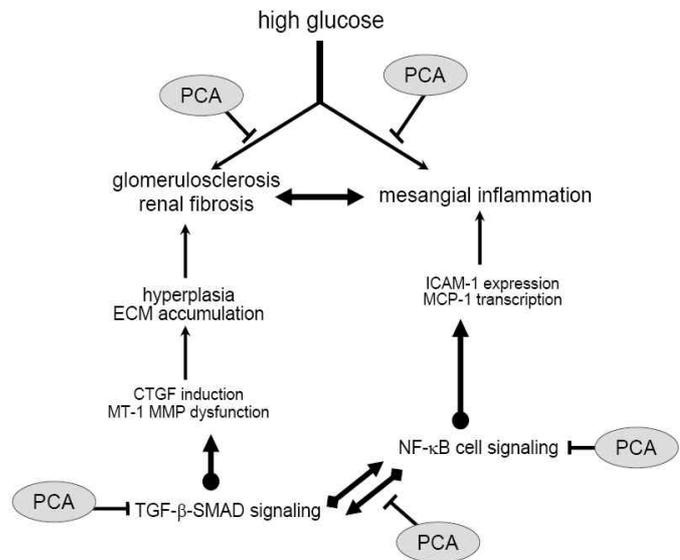
의하여 억제되는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 TGF- $\beta$  신호전달시스템은 염증반응에 직접적으로 관여하는 NF- $\kappa$ B에 의하여 억제된다는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 고혈당으로 인한 염증반응을 촉진시키는 신호전달은 사구체경화에 관련된 TGF- $\beta$  신호전달과정을 촉진시킬 수 있다는 것을 알 수 있다.



**Figure 62:** Inhibition of MCP-1 in NF- $\kappa$ B inhibitor SN50-treated human renal mesangial cells (HRMC). HRMC were incubated with 33 mM glucose for 3 d in presence of 10  $\mu$ M SN50 or 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls. RT-PCR showing the steady state mRNA transcriptional levels of MCP-1 in 10  $\mu$ M SN50-treated and 33 mM glucose stimulated HRMC.  $\beta$  Actin genes was used as an internal control for the co-amplification with MCP-1 (3 separate experiments).

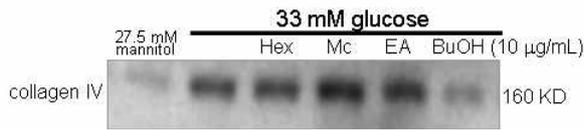
**Figure 62에 대한 고찰:** 본 연구에서는 신장 당뇨병증으로 MCP-1의 발현으로 인한 염증반응에 NF- $\kappa$ B 신호전달이 관여하는 지를 조사하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 매양 3일이 지나서 mesangial cells에서 MCP-1 mRNA의 발현이 증가되었다. 이것은 10  $\mu$ M의 농도인 NF- $\kappa$ B inhibitor에 의하여 억제되는 것을 알 수 있다. 다시 말해서 MCP-1 발현은 염증반응에 직접적으로 관여하는 NF- $\kappa$ B에 의하여 억제된다는 것을 알 수 있다.

**Figure 22:** Schematic diagram showing actions of purple corn anthocyanins (PCA) disturbing crosstalk between mesangial fibrosis and inflammation pathways entailing TGF  $\beta$  and NF  $\kappa$ B. The symbol indicates stimulation due to high glucose or blockade due to supplementation of PCA.



**Figure 63에 대한 고찰:** 본 연구결과에서 고혈당에 의한 신장 당뇨병증의 징후인 사구체경화는 고혈당으로 인한 염증반응과 밀접한 관계를 가지고 있으며 서로의 신호전달과정이 얽혀서 가동되고 있는 것으로 보인다. 이러한 염증 신호전달과정은 김정옥수수 안토시아닌에 의하여 차단되고 신장당뇨합병증인 사구체경화와 신장섬유증을 억제시키는 것으로 규명되었다.

12. 고혈당에 의해 유도된 사구체 경화에 대한 김징옥수수 추출물의 억제능

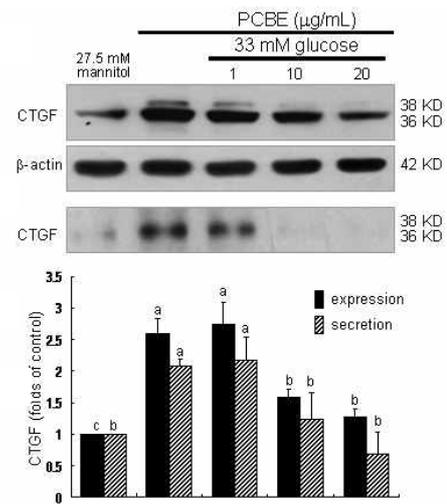


**Figure 64:** Inhibition of high glucose induced collagen IV secretion by purple corn extracts. Human renal mesangial cells were challenged with 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or

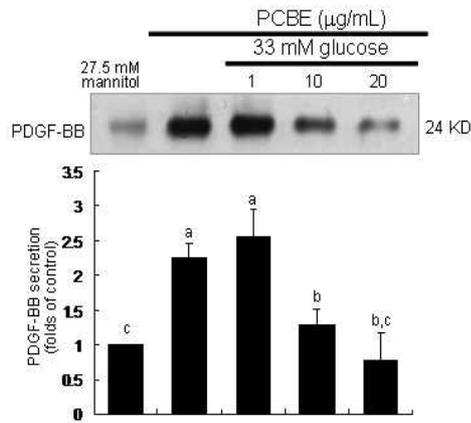
with 33 mM glucose in the absence and presence of 10 µg/ml of individual purple corn extracts in hexane (Hex), methylene chloride (Mc), ethyl acetate (EA) and Butanol (BuOH). Collagen IV secretion was measured by using Western blot analyses with culture media. Representative blots shown are typical of three independent experiments. The bar graphs (mean ± SEM, n=3) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at P<0.05.

**Figure 64에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 예비실험에서 고농도 포도당 매지에 신장세포를 3일간 배양시키면 충분한 신장조직의 matrix 변화를 가져온다는 사실이 규명되었다. 김징옥수수는 다양한 용매에서 추출되었는데 이 중 butanol 추출물은 mesangial cells은 고혈당에 의하여 촉진되는 신장조직의 matrix인 collagen type IV의 형성을 억제한다는 사실을 보여주었다. 이로서 10 µg/mL 김징옥수수 butanol 추출물은 당뇨병증으로 인한 사구체경화작용과 신장 기능에 대한 억제활성소재도 활용될 수 있다는 것을 제시하였다.

**Figure 65:** Inhibition of high glucose-induced mesangial production of connective tissue growth factor (CTGF) by purple corn butanol extracts (PCBE). Human renal mesangial cells were challenged with 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or with 33 mM glucose in the absence and presence of 1-20 µg/ml PCBE. CTGF production was measured by using Western blot analyses with cell lysates or culture media. Representative blots shown are typical of three independent experiments. The bar graphs (mean ± SEM, n=3) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at P<0.05.



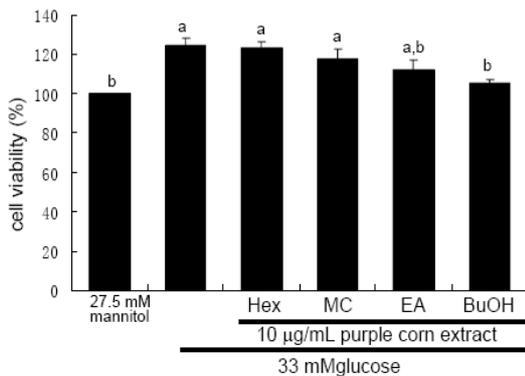
**Figure 65에 대한 고찰:** Figure 14에서와 같이 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 connective tissue growth factor (CTGF)의 발현 뿐만 아니라 분비도 촉진하였다. 여기에 김징옥수수 butanol 추출물 1 µg/ml 이상의 농도를 처리하게 되면 mesangial cells의 CTGF의 발현과 분비를 농도의존적으로 억제한다는 사실이 확인되었다. 이로서 김징옥수수 butanol 추출물은 당뇨병증으로 인한 사구체경화작용에 직접적인 영향을 줄 수 있는 신장결체조직의 증식에 대한 억제활성소재도 활용될 수 있다는 것을 제시하였다.



**Figure 66:** Inhibition of high glucose-induced mesangial secretion of platelet-derived growth factor (PDGF) by purple corn butanol extracts (PCBE). Human renal mesangial cells were challenged with 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or with 33 mM glucose in the absence and presence of 1-20 µg/ml PCBE. PDGF secretion was measured by using Western blot analyses with culture media. Representative blots shown are typical of three independent experiments. The bar graphs (mean ± SEM, n=3) in the bottom panel represent quantitative

results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at  $P < 0.05$ .

**Figure 66에 대한 고찰:** 본 연구에서는 mesangial cells의 증식에 관여하는 것으로 알려진 PDGF의 분비를 조사하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 platelet-derived growth factor (PDGF)의 분비를 촉진하였다. 여기에 김장옥수수 butanol 추출물 1 µg/ml 이상의 농도를 처리하게 되면 mesangial cells의 PDGF 분비를 농도의존적으로 억제한다는 사실이 확인되었다. 이로서 김장옥수수 butanol 추출물은 당뇨병증으로 인한 사구체경화작용에 직접적인 영향을 줄 수 있는 사구체 주변의 mesangial cell 증식에 대한 억제활성소재로 활용될 수 있다는 것을 제시하였다.

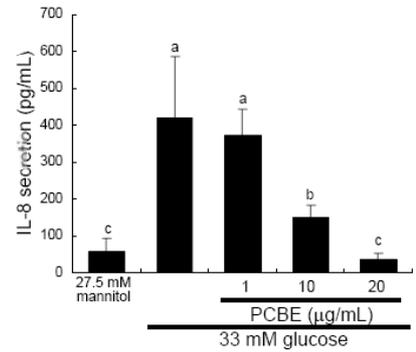


**Figure 67:** Inhibitory effects of purple corn extracts on high glucose-induced mesangial cell proliferation. Human renal mesangial cells were challenged with 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or with 33 mM glucose in the absence and presence of 1-20 µg/ml purple corn extracts in hexane (Hex), methylene chloride (MC), ethyl acetate (EA) and Butanol (BuOH). Values of cell viability and proliferation are mean ± SEM (n=5) and expressed as percent cell survival relative to 27.5 mM mannitol controls

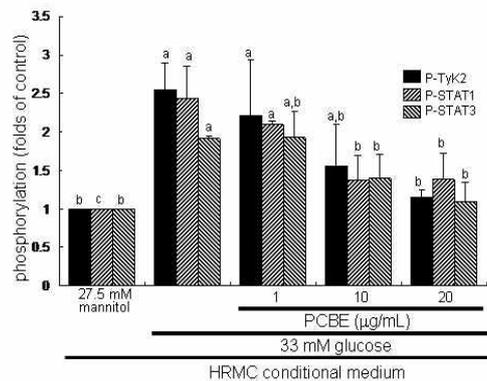
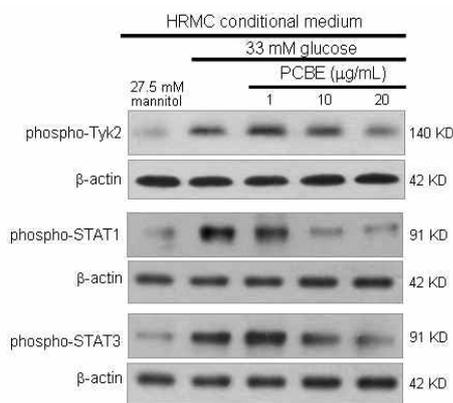
(cell viability=100%).

**Figure 67에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 mesangial cells의 증식을 촉진하였고, 김장옥수수 butanol 추출물을 처리하게 되면 증식이 유의적으로 억제한다는 사실이 확인되었다. 이러한 사실은 Figure 16에서 10 µg/ml butanol 추출물의 PDGF 분비 억제능과 일맥상통하는 것으로 보인다.

**Figure 68:** Inhibition of interleukin (IL)-8 secretion in human renal mesangial cells (HRMC) by purple corn butanol extract (PCBE). Human renal mesangial cells were challenged with 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or with 33 mM glucose in the absence and presence of 1-20 µg/ml PCBE. The IL-8 secretion in HRMC measured by ELISA kits. Respective data represent means±SEM from three independent experiments. Values not sharing a letter are different at P<0.05.



**Figure 68에 대한 고찰:** 33mM 포도당 배지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당은 mesangial cells에서 IL-8의 분비를 촉진시켰다. 여기에 검정옥수수 butanol 추출물을 처리하게 되면 IL-8의 분비를 농도의존적으로 감소시킨다는 사실이 확인되었다. IL-8은 염증성 동맥경화증에서 단핵구의 혈관내피세포 부착을 도모하는데 작용한다는 사실이 보고되고 있어서 검정옥수수 butanol 추출물은 신장 당뇨병증으로 연결된 동맥경화초기단계를 차단시킬수 있는 소재로 활용될 수 있다고 본다.

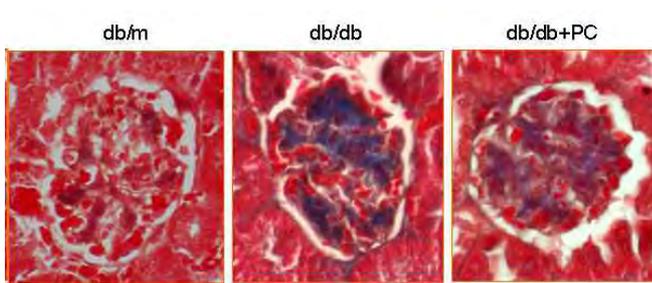


**Figure 69:** Inhibitory effects of purple corn butanol extracts (PCBE) on phosphorylation of Tyk2, STAT1 and STAT3 in human endothelial cells. Human endothelial cells were treated with human renal

mesangial cell conditional medium containing 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or 33 mM glucose. The phosphorylation of Tyk2, STAT1 and STAT3 were measured by using Western blot analyses with cell lysates. The β-actin protein was used as an internal control. Representative blots shown are typical of three independent experiments. β-actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean ± SEM, n=3) in the right panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at P<0.05.

**Figure 69에 대한 고찰:** 33mM 포도당 배지에서 mesangial cells을 3일간 배양한 조건배지 (HRMC conditional medium)를 수확하고 이것을 혈관내피세포에 넣고 24시간 배양하여 혈관내피세포를 활성화 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당으로 처리된 mesangial cells에서 수확한 조건배지에 배양된 혈관내피세포는 VCAM 1과 E selectin의 발현을 상당히 촉진하였다. 여기에 검정옥수수 butanol 추출물을 처리하게 되면 이러한 발현은 농도의존적으로 억제되었다. Figure 19에서 검정옥수수 butanol 추출물이 단핵구의 부착을 억제하는 것은 추출물이 혈관내피세포의 부착분자물질의 발현을 억제하였기 때문으로 간주된다. 이것으로 고혈당으로 인한 신장당뇨합병증은 동맥경화증 초기단계를 유발할 수 있다고 생각되며 검정옥수수 butanol 추출물은 신장 당뇨병증으로 연결된 동맥경화초기단계를 차단시킬수 있는 소재로 활용될 수

있다고 본다.

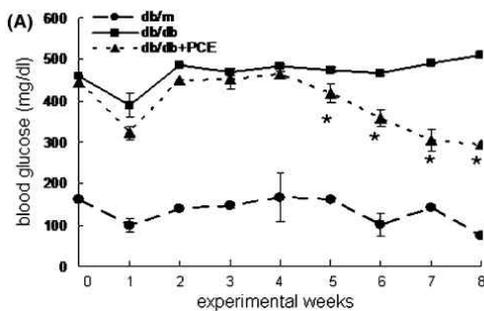


**Figure 70:** Inhibitory effects of purple corn extracts (PC) on high glucose induced mesangial fibrosis in db/db mouse model. Pathological changes of kidney glomerular were observed by Masson-trichrome staining (Light microscopy, 200X). The collagen was stained by blue color and muscle fiber stained by red color. Each photograph is

representative of six animals.

**Figure 70에 대한 고찰:** 본 연구결과는 masson-trichrome 염색법으로 사구체 collagen fibers를 염색한 db/db 당뇨쥐의 해부학적인 data이다. db/db 당뇨쥐의 사구체 부위는 정상적인 쥐에 비하여 collagen 섬유 염색이 진하게 이루어졌다. 여기에 김정옥수수 추출물을 경구투여한 경우에 collagen 섬유의 염색이 상당히 줄어들었다. 이것은 김정옥수수 추출물은 신성 당뇨병증으로 연결된 신장 섬유증을 차단시킬 수 있다는 in vivo 근거를 제공하고 있다.

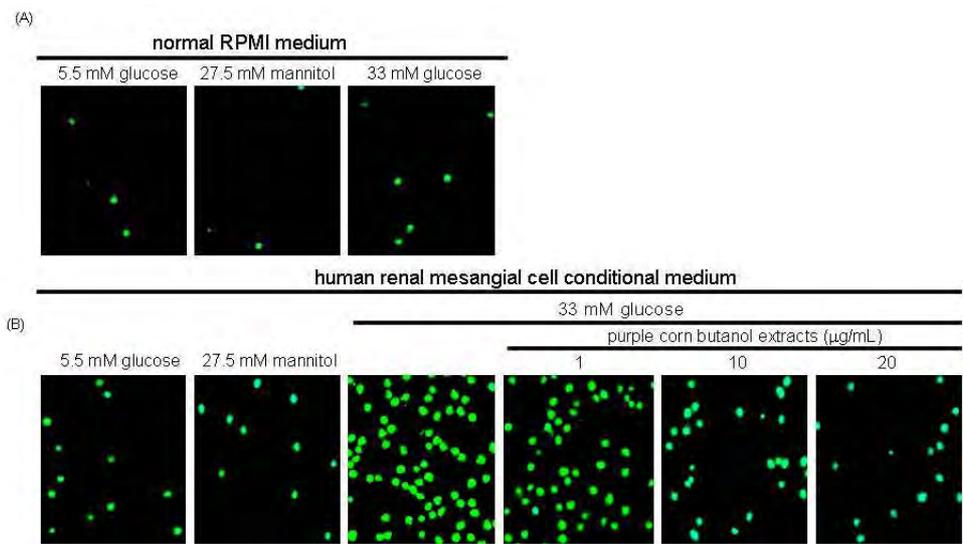
**Figure 71:** Effect of purple corn extracts (PCE) on plasma glucose in diabetic mice.



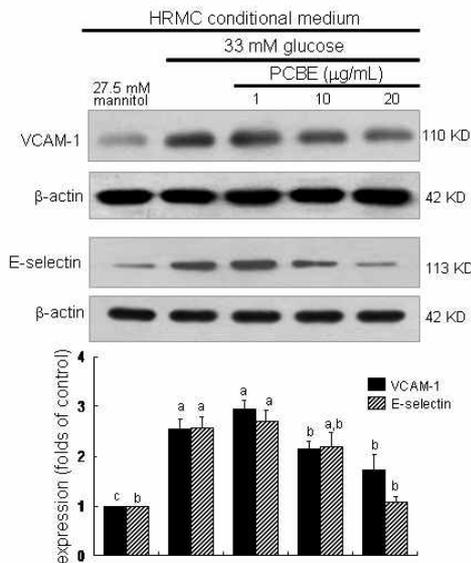
**Figure 71에 대한 고찰:** 본 연구결과는 김정옥수수 추출물을 투여하였을 때 db/db 당뇨쥐의 혈당변화를 8주간 조사한 것이다. 당뇨쥐는 정상쥐의 혈당의 3배이상 증가된 상태이었으며 4주간의 김정옥수수 추출물 경구투여는 당뇨쥐의 혈당을 유의적으로 감소시켰다. 이로서 김정옥수수 추출물은 신성 당뇨병증으로 연결된 사구체경화작용과 신장 섬유증을 차단시킬 수 있다는 in vivo 근거를 제공하고 있다.

13. 사구체 경화와 당뇨병성 신장병증의 염증반응에 대한 김정옥수수의 억제효능

**Figure 72:** Blockade of THP-1 monocyte adhesion onto endothelial cells by purple corn butanol extracts (PCBE). Human endothelial cells were treated with normal RPMI medium or with human renal mesangial cell conditional medium containing 5.5 mM glucose, 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or 33 mM glucose. Fluorescent calcein AM-stained THP-1 monocytes were added and co-cultured with 24 h conditional medium-activated endothelial cell. Microphotographs (3 independent experiments) were obtained using fluorescence microscopy with fluorescent blue filter. Magnification: 200X.



**Figure 72에 대한 고찰:** 33mM 포도당 배지에서 mesangial cells을 3일간 배양한 조건배지 (conditional medium)를 수확하고 이것을 혈관내피세포에 넣고 24시간 배양하여 혈관내피세포를 활성화 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당으로 처리된 mesangial cells에서 수확한 조건배지에 배양된 혈관내피세포는 THP-1 단핵구의 부착을 상당히 촉진하였다. 여기에 김정옥수수 butanol 추출물을 처리하게 되면 단핵구의 부착은 농도의존적으로 억제되었다. 혈관내피세포에 단핵구의 부착은 33mM 포도당이 단순히 함유된 정상적인 배지에서는 증가하지 않았다. 이것으로 고혈당으로 인한 신성당뇨합병증은 동맥경화증 초기단계를 유발할 수 있다고 생각되며 김정옥수수 butanol 추출물은 신성 당뇨병으로 연결된 동맥경화초기단계를 차단시킬수 있는 소재로 활용될 수 있다고 본다.

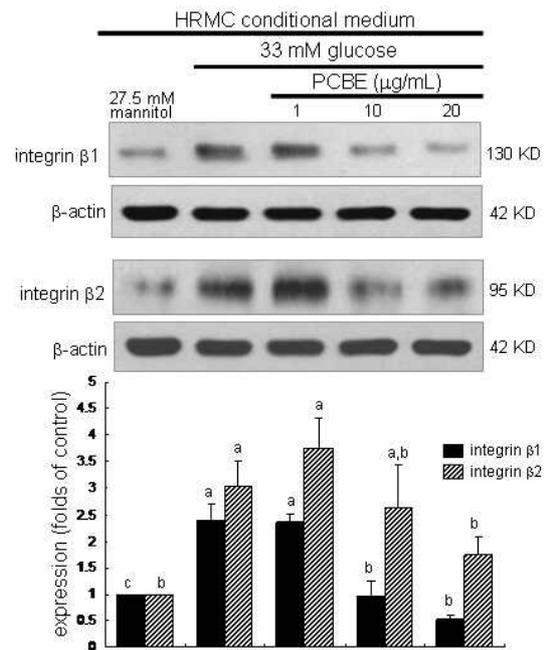


**Figure 73:** Western blot data showing inhibitory effects of purple corn butanol extracts (PCBE) on expression of cell adhesion molecules in human endothelial cells. Human endothelial cells were treated with human renal mesangial cell conditional medium containing 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or 33 mM glucose. The expression levels of VCAM-1 and E-selectin were measured by using Western blot analyses with cell lysates. Representative blots shown are typical of three independent experiments. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM, n=3) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at  $P < 0.05$ .

**Figure 73에 대한 고찰:** 33mM 포도당 배지에서 mesangial cells을 3일간 배양한 조건매지 (HRMC

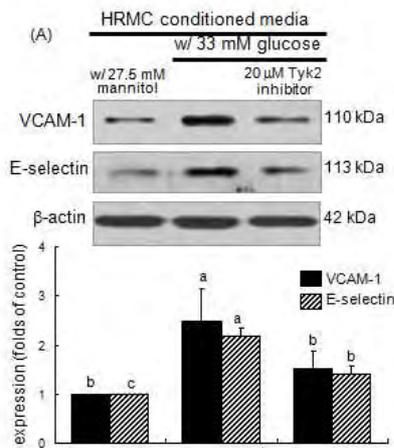
conditional medium)를 수확하고 이것을 혈관내피세포에 넣고 24시간 배양하여 혈관내피세포를 활성화 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당으로 처리된 mesangial cells에서 수확한 조건매지에 배양된 혈관내피세포는 VCAM-1과 E-selectin의 발현을 상당히 촉진하였다. 여기에 김징옥수수 butanol 추출물을 처리하게 되면 이러한 발현은 농도의존적으로 억제되었다. Figure 19에서 김징옥수수 butanol 추출물이 단핵구의 부착을 억제하는 것은 추출물이 혈관내피세포의 부착분자물질의 발현을 억제하였기 때문으로 간주된다. 이것으로 고혈당으로 인한 신장당뇨합병증은 동맥경화증 초기단계를 유발할 수 있다고 생각되며 김징옥수수 butanol 추출물은 신장 당뇨합병증으로 연결된 동맥경화초기단계를 차단시킬수 있는 소재도 활용될 수 있다고 본다.

**Figure 74:** Western blot data showing inhibitory effects of purple corn butanol extracts (PCBE) on expression of integrins in THP-1 monocytes. Human THP-1 cells were treated with human renal mesangial cell conditional medium containing 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or 33 mM glucose. The expression levels of integrin  $\beta 1$  and  $\beta 2$  were measured by using Western blot analyses with cell lysates. Representative blots shown are typical of three independent experiments.  $\beta$ -actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM, n=3) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Values not sharing a letter are different at  $P < 0.05$ .



**Figure 74에 대한 고찰:** 33mM 포도당 배지에서 mesangial cells을 3일간 배양한 조건매지 (HRMC conditional medium)를 수확하고 이것을 THP-1 단핵구에 넣고 24시간 배양하여 단핵구를 활성화 하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당으로 처리된 mesangial cells에서 수확한 조건매지에 배양된 단핵구는 integrin  $\beta 1$ 와  $\beta 2$ 의 발현을 상당히 증가시켰다. 여기에

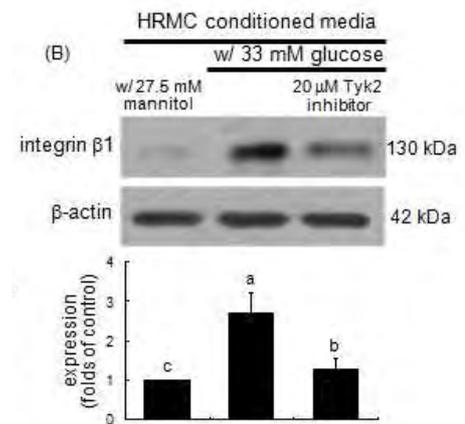
김정옥수수 butanol 추출물을 처리하게 되면 이러한 발현은 농도의존적으로 억제되었다. 김정옥수수 butanol 추출물이 단핵구의 부착을 억제하는 것은 추출물이 단핵구 부착을 도모하는 단핵구 integrins의 발현을 억제하였기 때문으로 간주된다. 이것으로도 고혈당으로 인한 신성당뇨합병증은 동맥경화증 초기단계를 유발할 수 있다고 생각되며 김정옥수수 butanol 추출물은 신성 당뇨병으로 연결된 동맥경화초기단계를 차단시킬수 있는 소재로 활용될 수 있다고 본다.



**Figure 75:** Attenuation of HUVEC expression of VCAM-1 and E-selectin by Tyk2 inhibition in HRMC conditioned media. HRMC were incubated in 5.5mmol/L glucose plus 27.5mmol/L mannitol for osmotic control or 33 mmol/L glucose. HUVEC was treated with 20  $\mu$ mol/L Tyk2 inhibitor added to HRMC conditioned media [with (w/) 27.5 mmol/L mannitol and w/ 33 mmol/L glucose] for 6 h. Cell lysates were subjected to Western blot analysis with a primary antibody of VCAM-1, E-selectin.  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM, n = 3) in the bottom panels represent quantitative results obtained from a densitometer. Respective values not sharing a common letter are different at  $P < 0.05$ .

**Figure 75에 대한 고찰 :** 신장 사구체 세포인 HRMC (Human renal mesangial cell)을 33mM High glucose condition에서 3일간 배양하여 Mesangial cell을 당뇨병성 상태에 놓이게 한 후, medium을 걷어내어 혈관내피세포인 HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)에 처리하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당으로 처리된 mesangial cell condition medium에서 배양된 혈관내피세포는 VCAM-1, E-selectin의 발현을 상당히 촉진하였다. 여기에 20 $\mu$ mol/ml농도의 Tyk2 inhibitor를 처리하였을 때 VCAM-1, E-selectin의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 따라서, Endothelial cell adhesion molecule인 VCAM-1, E-selectin은 JAK family인 Tyk2에 의해 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

**Figure 76:** THP-1 expression of integrin  $\beta 1$  by Tyk2 inhibition in HRMC conditioned media. HRMC were incubated in 5.5mmol/L glucose plus 27.5mmol/L mannitol for osmotic control or 33 mmol/L glucose. THP-1 monocytes was treated with 20  $\mu$ mol/L Tyk2 inhibitor added to HRMC conditioned media [with (w/) 27.5 mmol/L mannitol and w/ 33 mmol/L glucose] for 6 h. Cell lysates were subjected to Western blot analysis with a primary antibody of integrin  $\beta 1$ .  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM, n = 3) in the bottom panels represent quantitative results obtained from a densitometer. Respective values not sharing a common letter are different at  $P < 0.05$ .



**Figure 76에 대한 고찰 :** 신장 사구체 세포인 HRMC (Human renal mesangial cell)을 33mM High glucose condition에서 3일간 배양하여 Mesangial cell을 당뇨병증 상태에 놓이게 한 후, medium을 길어내어 monocyte인 THP-1에 처리하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당으로 처리된 mesangial cell condition medium에서 배양된 THP-1세포는 integrin $\beta 1$  발현을 상당히 촉진하였다. 여기에 20 $\mu$ mol/ml농도의 Tyk2 inhibitor를 처리하였을 때 integrin $\beta 1$ 의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 따라서, adhesion molecule인 integrin $\beta 1$ 은 JAK family인 Tyk2에 의해 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

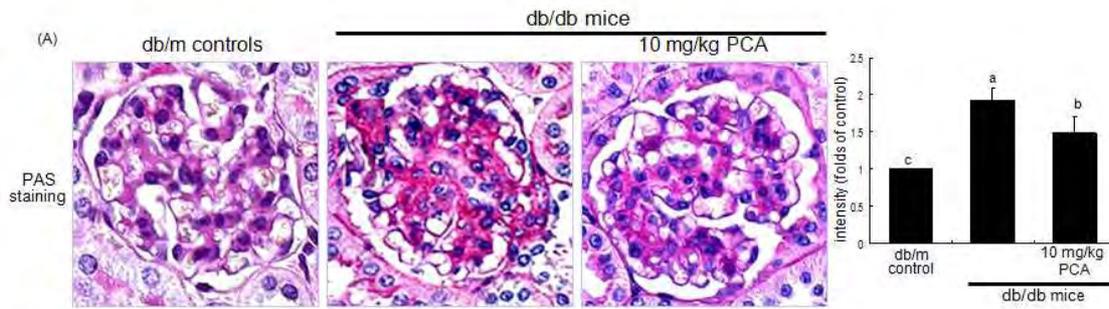


Figure 77: Histological staining of PAS showing diminution of mesangial expansion in db/db mice supplemented with PCA. The db/db mice were orally supplemented with 10 mg/kg PCA daily for 8 weeks. The db/m mice were introduced as control animals. Histological sections of mouse kidneys were stained by using PAS reagents and counterstained with hematoxylin. Each photograph is representative of four animals. The PAS intensity was quantified and shown in right panel. Magnification: X400.

**Figure 77에 대한 고찰 :** 제 2형 당뇨병 모델인 db/db 마우스를 이용하여 8주간 10mg/kg의 농도로 자색 옥수수 추출물을 투여하여 당뇨 합병증으로 일어나는 사구체의 조직학적 변화를 PAS staining 을 통해 확인하였다. db/db 마우스의 신장 조직을 절제하여 mesangium의 확장 정도를 확인한 결과 db/db 마우스에서 자색 옥수수 추출물을 투여하였을 때 mesangium의 팽창이 완화되는 것을 확인하였다. 이것으로 고혈당으로 인한 신장 당뇨합병증에서 mesangium의 팽창으로 인한 신장 경화증 억제 효과가 있는 것으로 확인하였다.

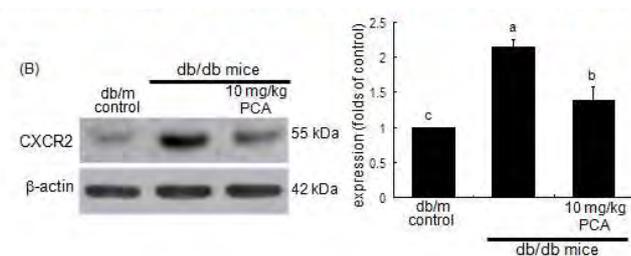
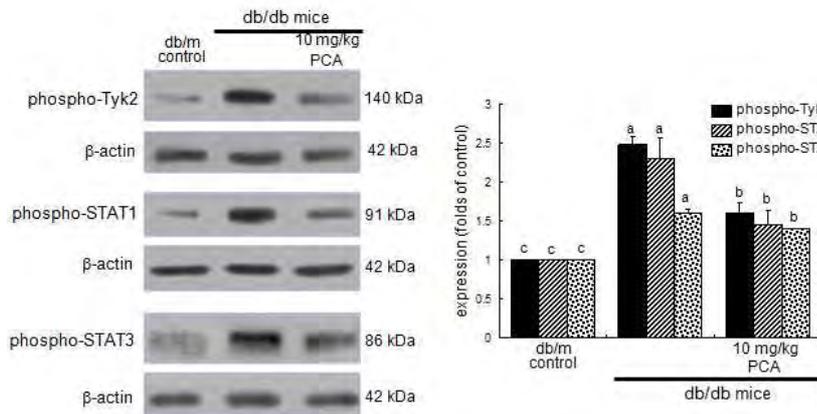


Figure 78: Showing inhibition of CXCR2 induction in db/db mice supplemented with PCA. The db/db mice were orally supplemented with 10 mg/kg PCA daily for 8 weeks. The db/m mice were introduced as control animals. For the measurement of

CXCR2 levels, tissue extracts were subjected to Western blot analysis with a primary antibody against CXCR2.  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. Bands represent 3 separate experiments. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM, n = 3) in the right panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$ .

**Figure 78에 대한 고찰 :** 제 2형 당뇨병 모델인 db/db 마우스를 이용하여 8주간 10mg/kg의 농도로 자색 옥수수 추출물을 투여한 후 신장조직을 절제하여 lysis 하였다. 이때 발현되는 CXCR2의 발현을 western blot 방법을 통하여 확인하였다. 자색옥수수 추출물은

IL-8-Tyk2-STAT으로 이어지는 염증성 signaling을 억제하고, 사구체에서 염증과 관련한 세포들의 침윤과 부착을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인하였다. 선행연구에서 mesangial의 섬유화는 IL 8의 활성화로 인한 Tyk2, STAT 신호전달체계의 활성화로 인해 나타나는 것으로 보고하였다. 이번 연구에서는 단핵구의 침윤과 활성화가 IL 8의 활성화에 의해 하위 신호전달체계를 활성화 시키는지를 확인하기 위해 db/db 마우스의 신장조직 lysate에서 IL-8 receptor인 CXCR2의 발현을 확인한 결과 당뇨병 모델에서 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 자색 옥수수 추출물을 투여한 결과 대조군 수준으로 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

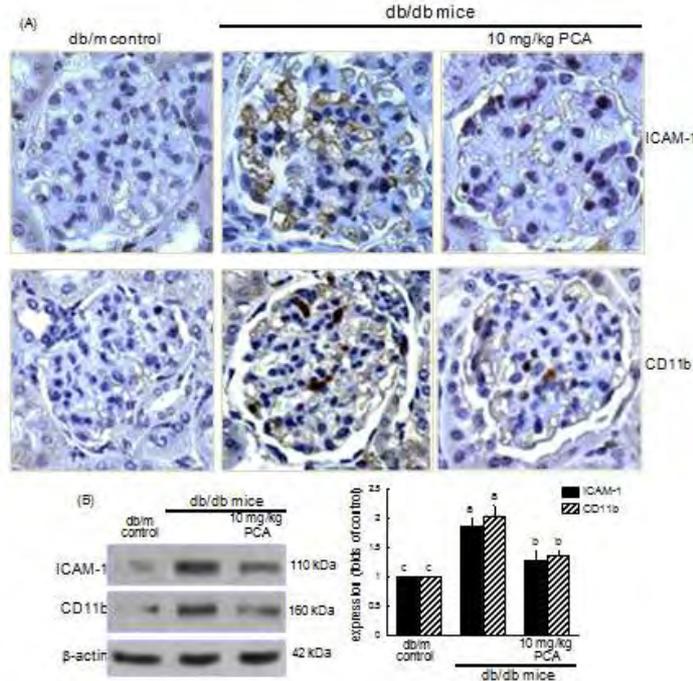


**Figure 79:** Western blot analysis showing inhibition of phosphorylation of Tyk2, STAT1 and STAT3 in db/db mice supplemented with PCA. The db/db mice were orally supplemented with 10 mg/kg PCA daily for 8 weeks. The db/m mice were introduced as a

control. For the measurements of tissue levels of phospho-Tyk2, phospho-STAT1 and phospho-STAT3, tissue extracts were subjected to Western blot analysis with a primary antibody against phospho-Tyk2, phospho-STAT1 or phospho-STAT3.  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. Bands represent 3 separate experiments. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Respective values not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$ .

**Figure 79에 대한 고찰 :** 제 2형 당뇨병 모델인 db/db 마우스를 이용하여 8주간 10mg/kg의 농도로 자색 옥수수 추출물을 투여한 후 신장조직을 추출하여 lysis 하였다. 이때 발현되는 염증성 인자인 Tyk2, phospho STAT1, 3의 발현을 western blot 방법을 통하여 확인하였다. db/db 마우스에서 염증성 인자인 Tyk2의 활성화는 하위 신호전달체계인 phospho STAT1과 phospho STAT3의 을 증가시켰으며, 여기에 자색옥수수 추출물을 투여하였을 때 완화 되는 효과를 보였다. 합병증으로 일어나는 사구체의 조직학적 변화를 PAS staining 을 통해 확인하였다. 따라서 자색옥수수 추출물은 IL-8-Tyk2-STAT으로 이어지는 염증성 signaling을 억제하고, 사구체에서 염증과 관련한 세포들의 침윤과 부착을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인하였다.

**Figure 80:** Immunohistochemical staining showing the adhesion molecule ICAM-1 and the integrin  $\alpha$ I CD11b in db/db mice supplemented with PCA. The db/db mice were orally treated 10 mg/kg PCA for 8 weeks. The db/m mice were introduced as a control. For the measurements of the ICAM-1 and CD11b expression levels, histological sections of mouse kidneys were immunohistochemically stained using anti-mouse ICAM-1 and anti-mouse CD11b and stained with a secondary antibody of 3,3'-diaminobenzidine-conjugated IgG (A). The sections were counter-stained with hematoxylin. The ICAM-1 and CD11b expression levels

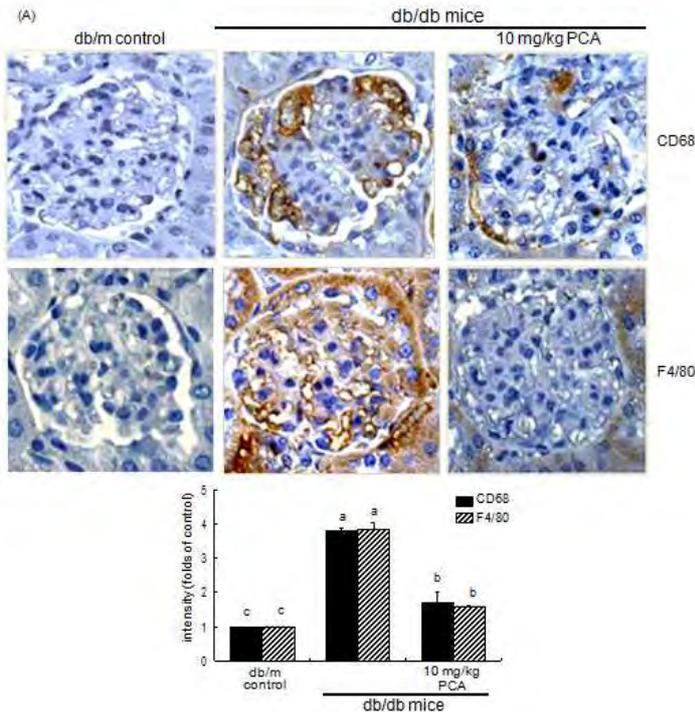


were identified as brown staining. Each photograph is representative of four animals. Magnification:  $\times 400$ . Tissue extracts were subjected to Western blot analysis with a primary antibody against ICAM-1 or CD11b (B).  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. Bands represent 3 independent experiments. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM) in the right panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Respective values not sharing a letter are different at  $P < 0.05$ .

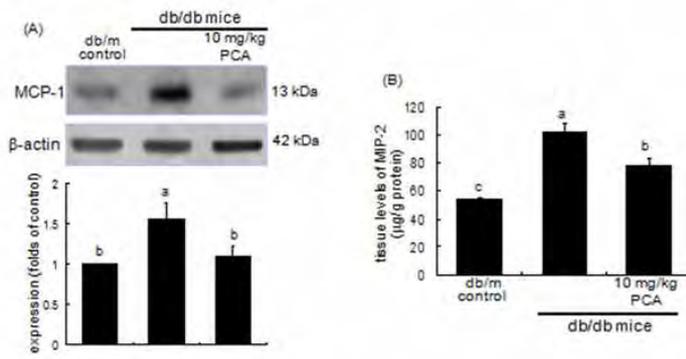
**Figure 80에 대한 고찰 :** 제 2형 당뇨병 모델인 db/db 마우스를 이용하여 8주간 10mg/kg의 농도로 김장 옥수수 추출물을 투여한 후 신장 사구체 조직의 변화를 조직 면역학적 염색을 통해 확인하였다. ICAM-1은 당뇨병성 신장병증에서 세포간의 상호작용과, 부착, macrophage의 침윤을 촉진하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 마우스의 신장 조직 절편에서 ICAM-1과, integrin $\alpha$ I (CD11b)의 발현을 면역조직화학적 염색을 통해 확인한 결과 db/db 마우스 신장 사구체에서 앞선 두 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 여기에 김장옥수수 추출물 투여시 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

이를 뒷받침하기 위해 신장 lysate를 western blot 으로 확인한 결과 면역 염색 결과와 같은 경향으로 나타났다. 따라서, 김장옥수수 추출물은 사구체 내피세포에서 leukocyte recruitment와 adhesion을 억제하는 효과가 있는 것을 확인하였다.

**Figure 810:** Suppression of the macrophage markers of CD68 and F4/80 in db/db mice supplemented with PCA. The db/db mice were orally treated with 10 mg/kg PCA for 8 weeks. The db/m mice were introduced as a control. For the measurements of the CD68 and F4/80 tissue levels, histological sections of mouse kidneys were stained using anti-mouse CD68 and anti-mouse F4/80 and stained with a secondary antibody of 3,3'-diaminobenzidine-conjugated IgG. The sections were counter-stained with hematoxylin. The CD68 and F4/80 levels were identified as brown staining. Each photograph is representative of four animals. Magnification: X400. The CD68 and F4/80 levels were quantified and shown in bottom panel. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM) represent quantitative results. Means not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$ .



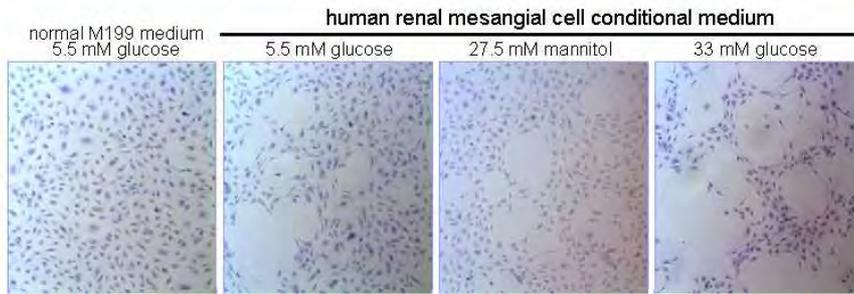
**Figure 81에 대한 고찰 :** 제 2형 당뇨병 모델인 db/db 마우스를 이용하여 8주간 10mg/kg의 농도로 김장 옥수수 추출물을 투여한 후 신장 사구체 조직의 변화를 조직 면역학적 염색을 통해 확인하였다. 본 연구는 당뇨 유발 db/db 마우스의 신장 사구체 조직에서 대식세포의 침윤 정도와, 김장 옥수수 추출물의 대식세포 침윤 억제작용을 알아보기 위해 monocyte/macrophage marker인 CD68과, F4/80의 발현 정도를 면역 조직학적 염색을 통해 확인하였다. 염색을 통해 확인한 결과 db/db 마우스 신장 사구체에서 앞서 두 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 여기에 김장옥수수 추출물 투여시 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 따라서, 김장 옥수수 추출물은 사구체 내피세포에서 monocyte/ macrophage recruitment와 adhesion을 억제하는 효과가 있는 것을 확인하였다.



**Figure 82:** Inhibition of MCP-1 (A) and MIP-2 (B) induction in db/db mice supplemented with PCA. The db/db mice were orally supplemented with 10 mg/kg PCA daily for 8 weeks. The db/m mice were introduced as a control. Tissue extracts were subjected to Western blot analysis with a primary antibody against

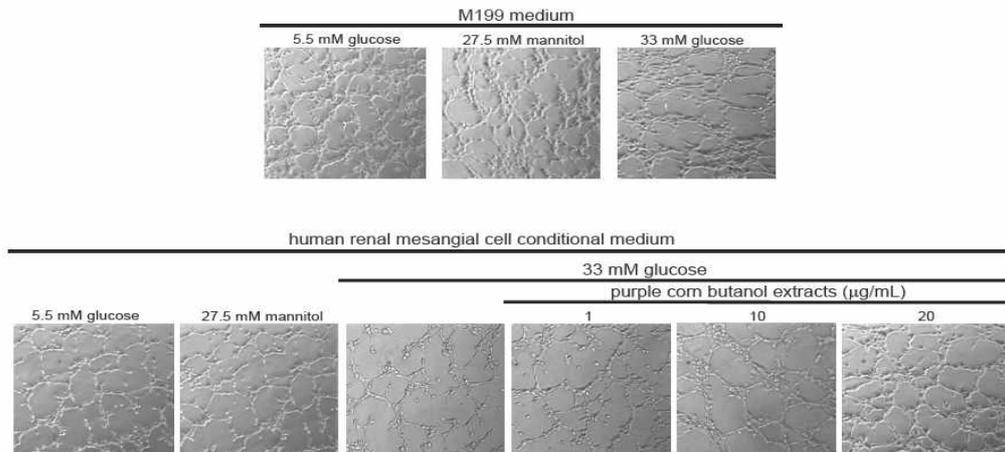
MCP-1 (A).  $\beta$ -Actin protein was used as an internal control. Bands represent 3 separate experiments. The bar graphs (mean  $\pm$  SEM) in the bottom panel represent quantitative results obtained from a densitometer. Tissue MIP-2 level was measured by using a MIP-2 ELISA kit (B). Respective values not sharing a common letter differ,  $P < 0.05$ .

**Figure 82에 대한 고찰 :** 제 2형 당뇨병 모델인 db/db 마우스를 이용하여 8주간 10mg/kg의 농도로 김장 옥수수 추출물을 투여한 후 신장조직을 식출하여 lysis 하였다. 신장 조직 lysate를 가지고 이때 발현되는 MCP-1 and MIP-2 발현을 각각 western blot 방법과 ELISA(Enzyme-Linked immunosorbent assay) 을 통하여 확인하였다. db/db 마우스에서 염증성 cytokine인 단백질 유착 분자 MCP-1과 MIP-2(macrophage inflammatory protein 2)의 발현이 증가하였고, 여기에 건장옥수수 추출물을 투여하였을 때 완화 되는 효과를 보였다. 따라서 김장옥수수 추출물은 사구체에서 염증과 관련하여 대식세포들의 침윤과 신장 염증을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인하였다.



**Figure 83:** Loss of human endothelial cells cultured in conditional medium obtained from human renal mesangial cells (HRMC). Human endothelial cells were treated with human renal mesangial cell conditional medium containing 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or 33 mM glucose. For comparison, human endothelial cells were cultured in normal M199 medium containing 5.5 mM glucose.

**Figure 83에 대한 고찰:** 33mM 포도당 배지에서 신장 사구체 부분의 mesangial cells을 3일간 배양하여 신장세포를 당뇨병증 상태에 놓이게 하였다. 여기서 수확한 배지를 conditional medium으로 하여 혈관내피세포에 넣어서 24시간 함께 배양하였다. 정상적인 포도당을 지닌 배지에 비하여 혈관내피세포는 수직으로 감소되고 서로 물리는 형태로 존재하는 것으로 보인다.



**Figure 84:** Representative images showing enhancing effects of purple corn butanol extracts on endothelial tube formation. Human endothelial cells plated onto matrigel were treated with normal M199 medium or with human renal mesangial cell conditional medium containing 5.5 mM glucose, 5.5 mM glucose plus 27.5 mM mannitol as osmotic controls or 33 mM glucose. After 12 h incubation with 1-20 µg/ml purple corn butanol extracts, cells were fixed and microphotographs (3 independent experiments) were captured. Magnification: x200.

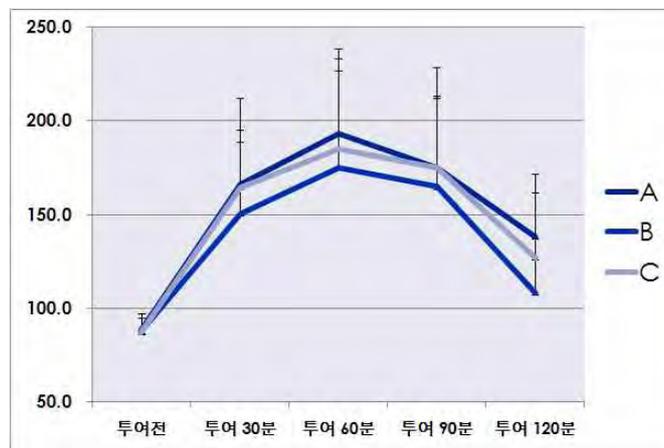
**Figure 84에 대한 고찰:** 33mM 포도당 매지에서 mesangial cells을 3일간 배양한 조건매지 (conditional medium)를 수확하고 이것을 matrigel 위에 분주된 혈관내피세포에 넣고 24시간 배양하여 혈관내피세포의 tube 형성을 조사하였다. 본 연구결과에서 33mM 포도당으로 처리된 mesangial cells에서 수확한 조건매지에 배양된 혈관내피세포의 tube 형성은 감소되었다. 여기에 김정옥수수 butanol 추출물을 처리하게 되면 혈관내피세포의 tube 형성은 농도의존적으로 촉진된다는 것을 보여주었다. 혈관내피세포의 tube 형성은 33mM 포도당을 지닌 정상 매지에서도 약간의 감소현상이 보인다. 따라서 고혈당으로 인한 신성당뇨합병증은 혈관신생작용을 감소하여 사구체경화도 인한 신장기능 불능을 악화시키는 작용을 하는 것으로 파악된다. 만약에 김정옥수수 butanol 추출물이 처리되면 당뇨병으로 인하여 신장기능이 원활하게 작동하지 않고 있던 사구체 역할을 새로운 혈관이 형성되면서 새로운 사구체역할의 혈관으로 활용할 수 있다고 간주된다. 이로서 김정옥수수 butanol 추출물은 혈관신생작용을 회복하여 신성 당뇨병으로 인한 사구체 경화를 완화할 수 있다고 생각된다.

14. 임상시험 (혈당조절용 건강기능식품소재로의 개발을 김정옥수수 폴리페놀의 정상인에서 혈당조절 임상시험)

가. 정상인에서 단기 경구내당능 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석

	투여전	투여 30분	투여 60분	투여 90분	투여 120분	
평균	A	88.5	166.0	193.1	175.0	138.4
	B	87.6	150.6	175.0	164.8	108.3
	C	87.2	164.4	184.9	175.0	126.8
표준편차	A	6.6	29.0	40.1	37.1	33.7
	B	9.8	38.6	52.1	48.9	29.1
	C	10.0	48.1	54.0	53.5	34.9

A: (cellulose 300 mg) B: 김정옥수수안토시아닌추출물: (300 mg) C: Metformin (300 mg)



단기 OGTT (Oral glucose tolerance test)

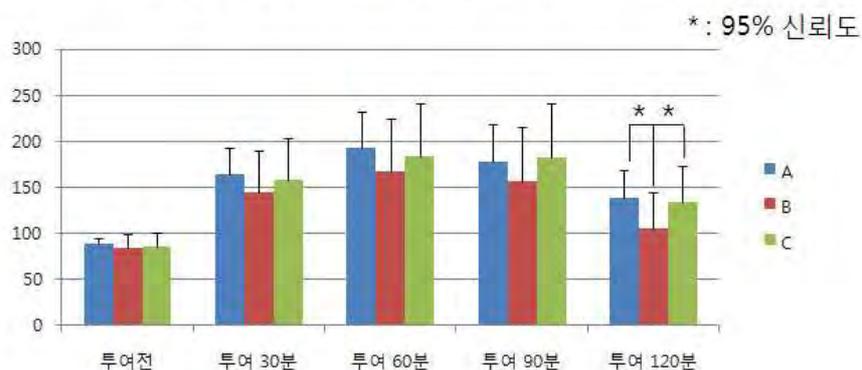


Figure 85. 정상인에서 단기 경구내당능 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석

정상인 각 20명씩 A군(cellulose 300 mg) B군(김정옥수수 안토시아닌추출물 300 mg) C군

(Metformin 300 mg)을 섭취시킨 후 단기 경구내당능 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석결과 A군 및 C군에 비해 B군에서 95%신뢰도로 통계적으로 유의성있게 glucose 투여 후120분에서 혈당 강하 효과가 나타났으며, 이는 견정옥수수 안토시아닌추출물이 정상인에서 처방약인 metformin보다 혈당강하효과가 있음을 보여준다

나. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 경구내당능 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석

OGTT					
군	투여전	투여 30분	투여 60분	투여 90분	투여 120분
A (19명)	91	164	190	173	137
B (18명)	87	148	171	162	110
C (20명)	85	151	174	173	128
표준편차					
A	9.4	32.2	43.3	40.3	35.7
B	12.9	43.8	54.9	51.4	31.6
C	13.7	43.4	57.2	56.0	37.4

A: (cellulose 300 mg) B: 김장옥수수수안토시아닌추출물: (300 mg) C: Metformin (300 mg)

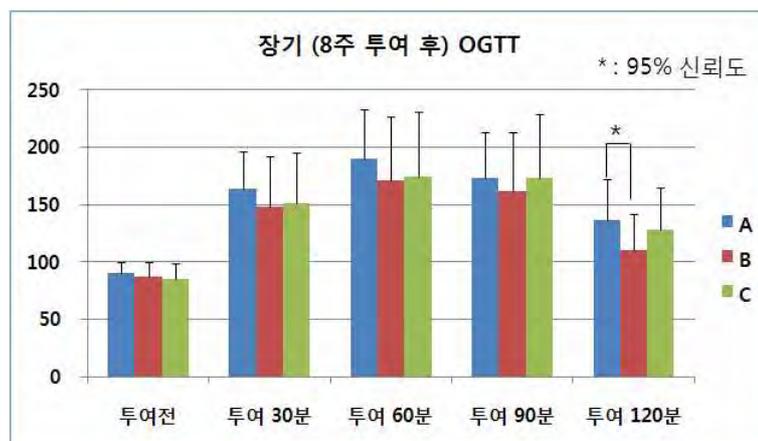
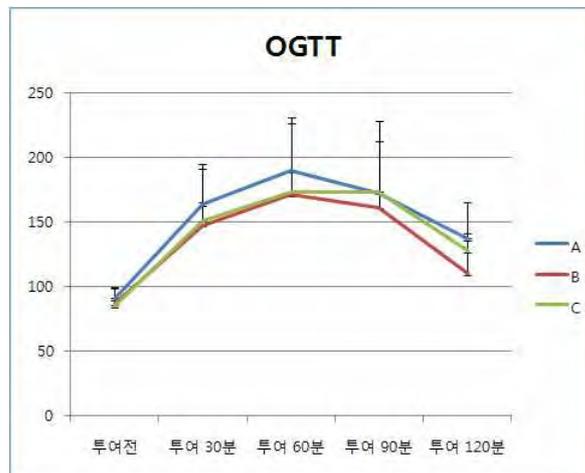


Figure 86. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 경구내당능 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석

정상인 각 20명씩 A군(cellulose 300 mg) B군(김장옥수수수안토시아닌추출물 300 mg) C군(Metformin 300 mg)을 8주간 섭취시킨 후 장기 경구내당능 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석결과 A군 및 C군에 비해 B군에서 95%신뢰도로 통계적으로 유의성있게 glucose 투여 후120분에서 혈당 강하 효과가 나타났으며, 이는 김장옥수수수안토시아닌추출물이 정상인에서 처방약인 metformin보다 혈당강하효과가 있음을 보여준

다. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 당화혈색소혈중인슐린농도 및 혈당 분석

A: (cellulose 300 mg) B: 건정옥수수안토시아닌추출물: (300 mg) C: Metformin (300 mg)

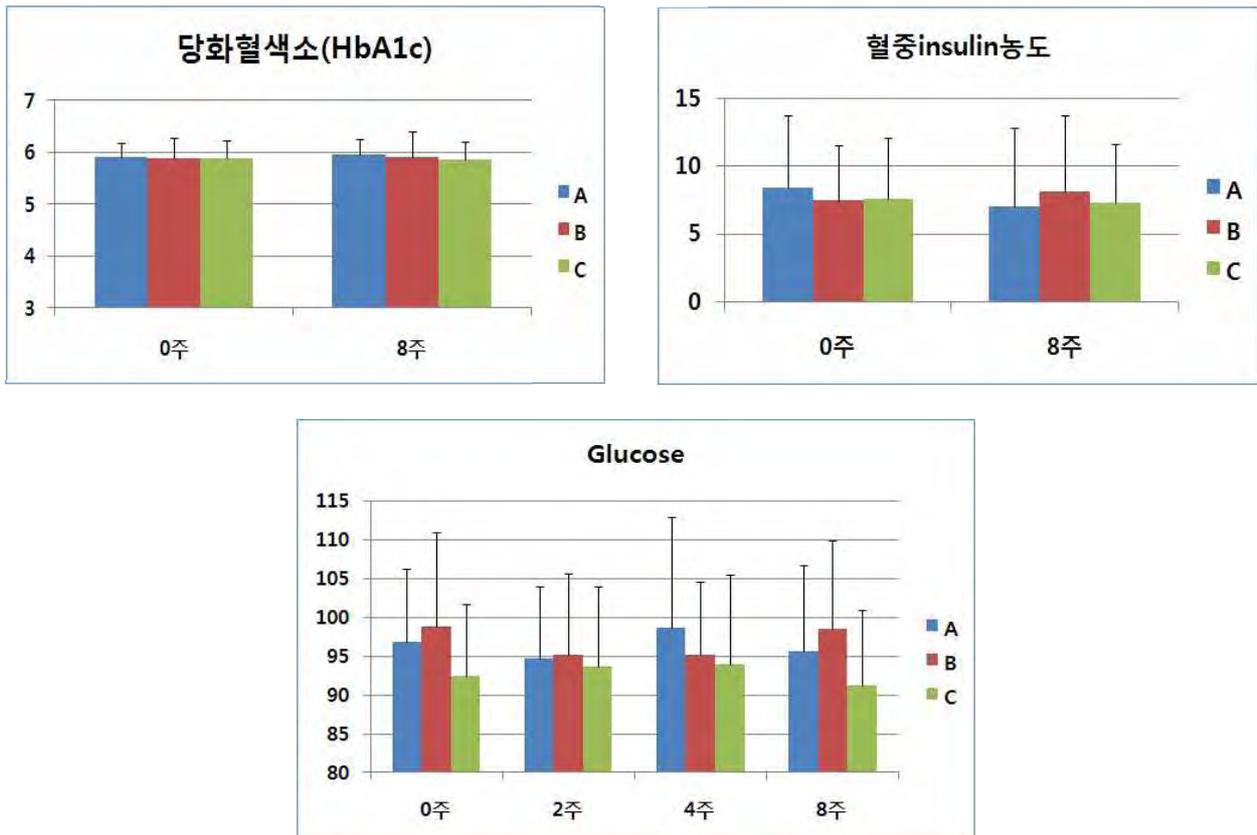
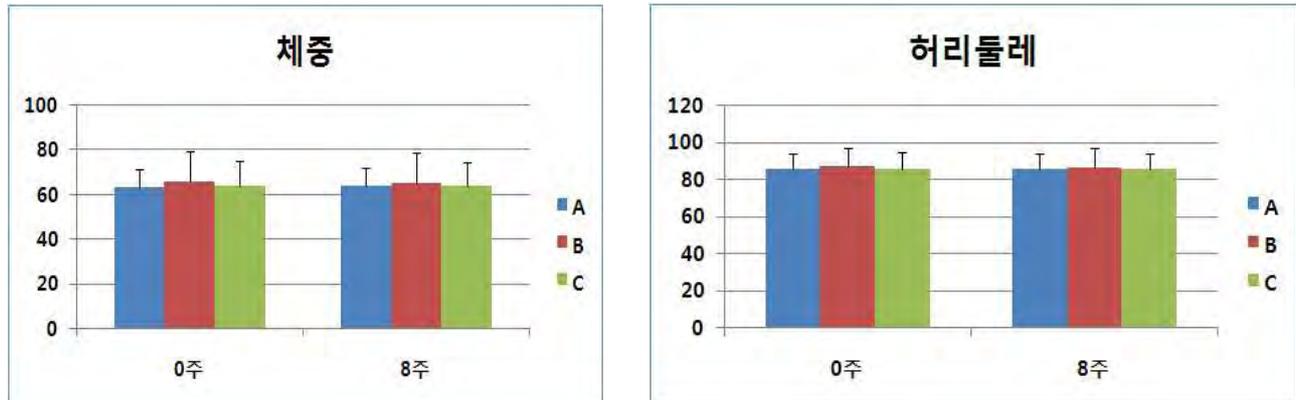


Figure 87. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 당화혈색소혈중인슐린농도 및 혈당 분석

정상인 각 20명씩 A군(cellulose 300 mg) B군(건정옥수수 안토시아닌추출물 300 mg) C군(Metformin 300 mg)을 8주간 섭취시킨 후 혈중 당화혈색소(HbA1c), 인슐린농도 및 혈당을 분석한 결과 당화혈색소 및 혈당은 정상인이어서 변화가 없었으나 혈중인슐린 농도는 건정옥수수 안토시아닌 추출물 투여군에서 다소 높았으나 개체 간 표준편차가 높아 통계적 유의성은 없었음

라. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 체중, 허리둘레 및 혈압의 분석

A: (cellulose 300 mg) B: 건정옥수수안토시아닌추출물: (300 mg) C: Metformin (300 mg)



혈압		
군	0주	8주
A	122.1±9.2/72.1±6.3	118.9±8.8/74.2±6.1
B	128.6±13.9/77.4±6.8	127.4±15.3/78.3±7.4
C	129.0±10.7/77.5±11.2	124.7±8.2/77.1±7.9

Figure 88. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 체중, 허리둘레 및 혈압의 분석

정상인 각 20명씩 A군(cellulose 300 mg) B군(건정옥수수 안토시아닌추출물 300 mg) C군(Metformin 300 mg)을 8주간 섭취시킨 후 체중, 허리둘레 및 혈압을 분석한 결과 통계적으로 유의성이 있는 차이를 나타내지 않았음

나. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 혈중 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, tryglyceride를 분석

A: (cellulose 300 mg) B: 건정옥수수안토시아닌추출물: (300 mg) C: Metformin (300 mg)

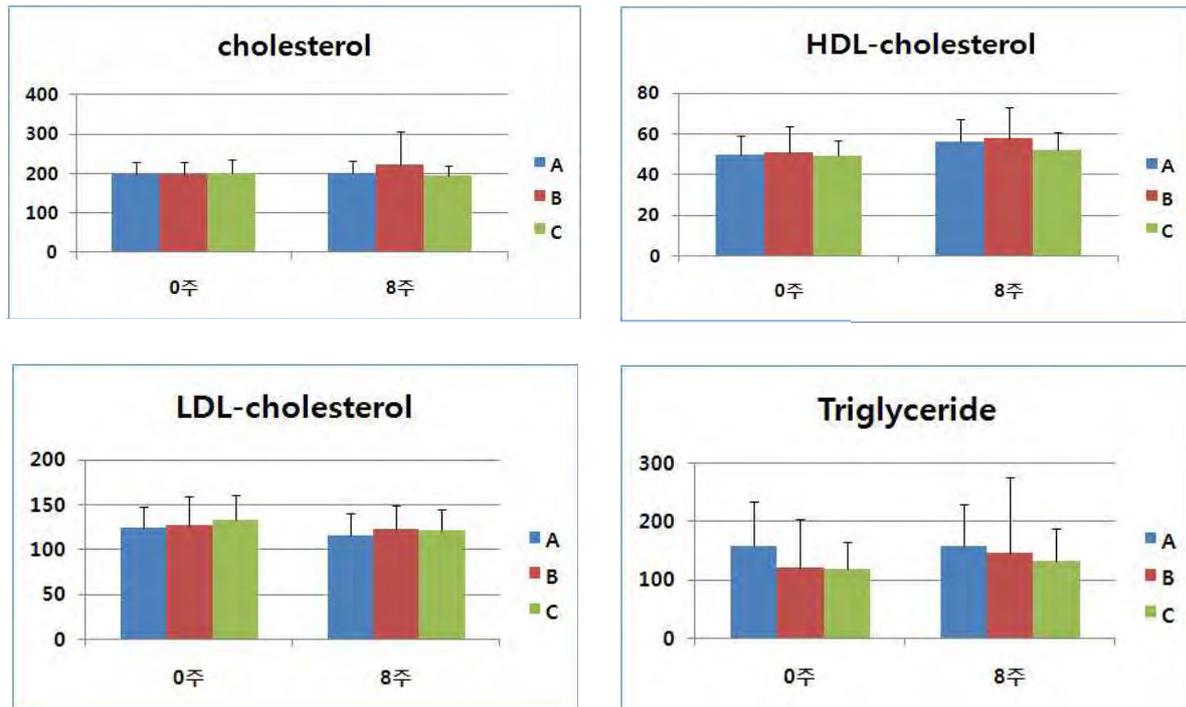


Figure 89. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 혈중 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, tryglyceride를 분석

정상인 각 20명씩 A군(cellulose 300 mg) B군(건정옥수수 안토시아닌추출물 300 mg) C군(Metformin 300 mg)을 8주간 섭취시킨 후 혈중 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, tryglyceride를 분석한 결과 통계적으로 유의성이 있는 차이를 나타내지 않았음

바. 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 부작용 분석

정상인 각 20명씩 A군(cellulose 300 mg) B군(건정옥수수 안토시아닌추출물 300 mg) C군(Metformin 300 mg)을 8주간 섭취시킨 후 부작용을 분석한 결과 특별한 부작용을 보여주지 않았음

정상인에 각군당 20명씩 A군(cellulose 300 mg) B군(건정옥수수 polyphenol 추출물 300 mg) C군(Metformin 300 mg)을 단기 및 장기(8주간) 투여하면서 여러 인자를 측정한 결과 B군(건정옥수수 polyphenol 추출물 300 mg)에서 단기 및 장기 내당능검사 (Oral Glucose Tolerance Test)의 혈당강하효과가 통계적으로 유의성있게 나타나서 건정옥수수 polyphenol 추출물의 혈당강하 효능을 확인할 수 있었음

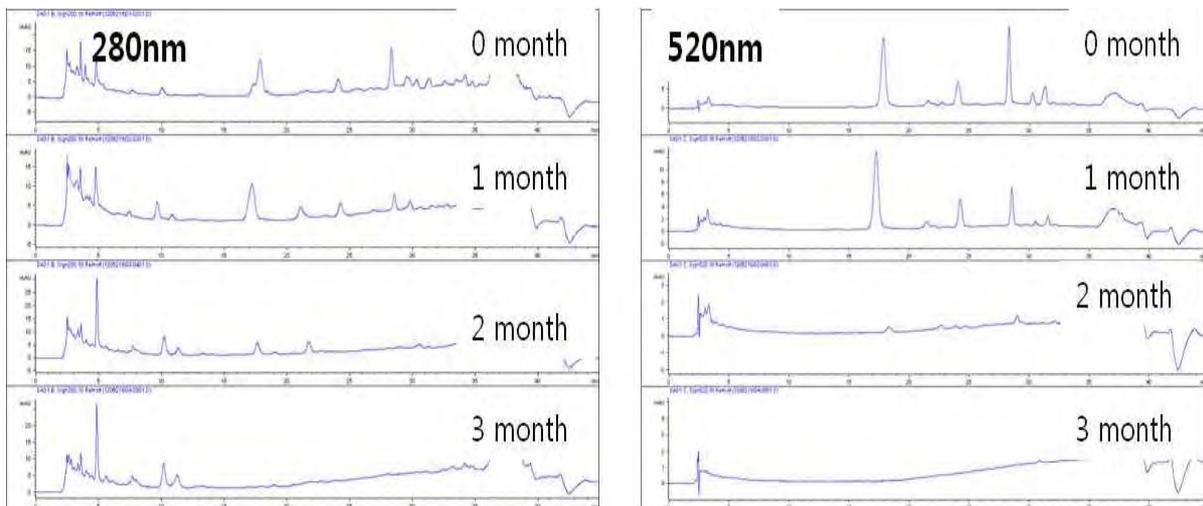
15. 안정성 평가

장기보존 시험: 저장조건에서 사용 기한을 설정하기 위하여 장기간에 걸쳐 물리적, 완전성, 화학적, 미생물학적 안정성 및 내용물과 용기의 적합성에 대하여 제형에 따른 적절한 기준 및 시험방법과 시험조건에서 시험을 실시한다. 시험자는 온도관리가 되는 안전한 보관장소에 검체를 보관한다. 정해진 보관 기간에 따라서 검체 검사를 실시한다.

음료 제품으로의 가능성 파악 - 김정옥수수 추출물 300mg PC/180ml 증류수 넣어 녹인 후 0-3개월 동안 실온에 방치 하였다. (빛 차단시킴)

Month	TPC(mg/g)
0	60.32±0.29
1	57.42±1.09
2	54.21±0.41
3	51.99±2.62

0, 1, 2, 3개월 동안 TPC 함량을 측정 한 결과 시간이 지남에 따라 TPC 양이 줄어들었음을 확인하였다.



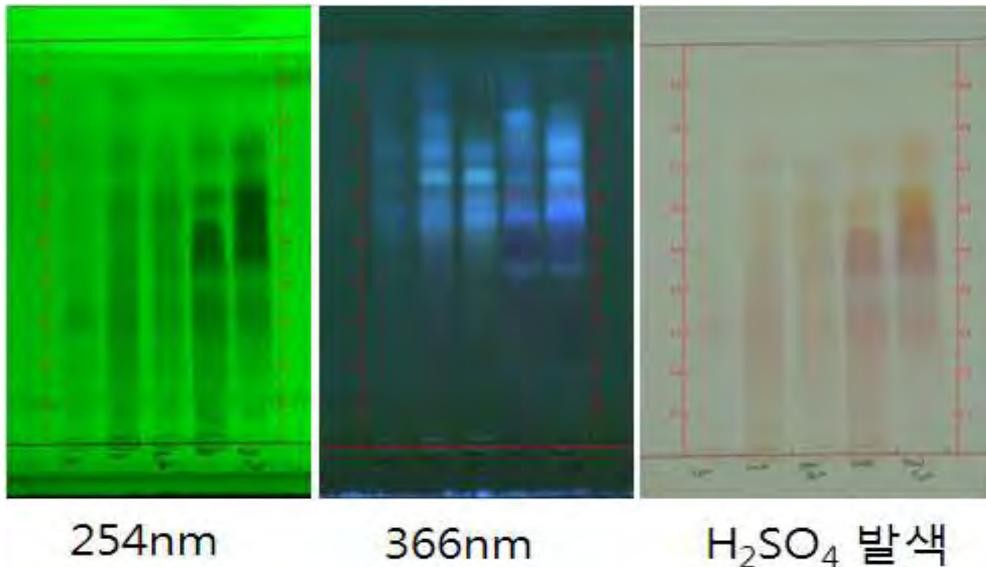
캡슐 제품으로의 가능성 파악 - 4°C에서 5개월간 보관하였다. 1개월마다 시료를 채취하여 30% Methanol에 1mg/ml 농도로 녹여 폴리페놀 함량을 측정하였다.

시료보관	Storage temperature : 4°C Storage period : 3월 04일 ~ 8월 03일 (약 5개월간)
시료처리	시료를 30% MeOH에 1mg/ml로 희석
결과	시료를 약 5개월 간 지표성분의 함량을 측정 - 총폴리페놀 오차 범위 내에서 함량 변화 없음

측정일	TPC (mg/g)
12월 07일	67.53 ± 1.37
1월 04일	64.98 ± 4.35
2월 08일	63.78 ± 2.28
3월 07일	61.11 ± 6.11
4월 11일	65.15 ± 3.46
5월 02일	64.45 ± 4.98

## 16. 기준규격 설정

검정옥수수 (보라색 분말), 건조 감량 4% 이하, 성분 확인은 Thin Layer Chromatography으로 확인하였다. 실험 결과 지표성분 기준 함량은 총 폴리페놀 55-70mg/g으로 확인 되었다.



## 17. 시제품 제작

### 가. 분해도 측정

항온조를 37±2°로 가열하여, 1 캡슐 당 피플콘 시료 225mg, 부형제 Cellulose 75mg을 넣고, 1 분간에 40rpm으로 왕복, 진폭 53~57 mm 상하로 20분간 운동하였다.

-시험기 비키에 넣는 시험액의 양은 시험기가 가장 위로 올라왔을 때 시험기의 망면이 액면 아래로 15 mm이상 떨어지도록 하고 가장 아래로 내려갔을 때 비키의 바닥으로부터 25 mm 이상으로 시험기가 완전히 잠기지 않도록 한다.

(1) 항온조를  $37\pm 2^{\circ}$ 로 가열



(2) 1 캡슐 당 피플론 시료 225mg, 부형제 Cellulose 75mg, 보조통에 캡슐 넣기

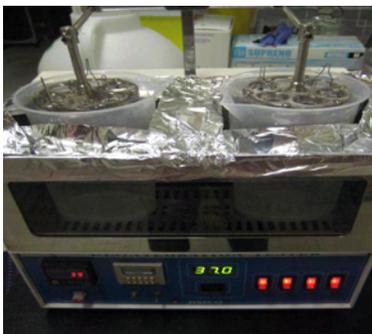


(3) 캡슐을 넣은 보조통을 시험기에 넣는다.

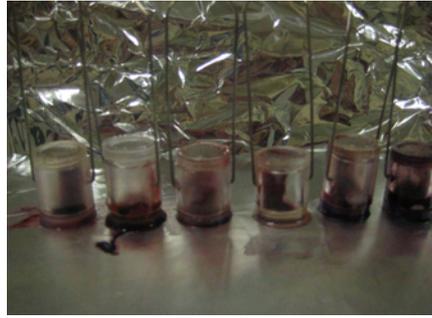
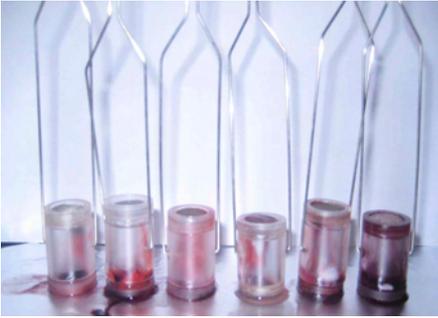


(4) 시험기 셋팅하기

$37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 항온조에서 왕복 40rpm으로 20min분간 상하운동



(5) 20분 후 보통을 꺼내서 캡슐의 붕해를 확인한다.



시료량 (괴플콘 추출물량 mg/capsule)	(붕해 완료된 capsule 수 / 붕해실험 대상 capsule 수)					
	결정 Cellulose			전분		
	50	75	100	30	50	100
200	15/20	20/20	20/20	10/20	14/20	19/20
300	10/20	18/20	20/20	8/20	16/20	18/20

나. 캡슐 제작

추출물의 특성을 고려하여 소비자에게 이필할 수 있는 캡슐로 제형을 선정하고 시제품을 생산완료 하였다.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발 목표의 달성도

#### 1. 1차년도 연구개발목표에 대한 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	김정옥수수의 polyphenol 분리 /분석 및 in vitro 당뇨 및 당뇨합병증 억제 능 평가	건정옥수수 추출물의 추출조 건 확립 및 in vitro 항당 뇨 및 당뇨합병증에 대한 활 성평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 활성분획물의 최적의 추출조 건 확립</li> <li>▪ in vitro 항당뇨 및 당뇨합병 증 활성평가</li> </ul>
		김정옥수수 성분 및 활성 비 교분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 국내 개발 김정옥수수 종자의 기초 활성 비교분석</li> <li>▪ LC MS/MS를 이용한 안토시아 닌 성분 구명 및 HSCCC로 건정 옥수수 주요 안토시아닌 성분 분리</li> <li>▪ Polyphenolic 추출 분획물에 대한 TLC, HPLC, MPLC 등으로 분리</li> </ul>
	김정옥수수의 polyphenol의 취 상베타세포 보호 및 재생 활성 분 석 및 활용연구	김정옥수수 polyphenol의 취 상 베타세포 보호활성 및 기 전을 2형 당뇨모델인 db/db mouse에서 분석함 - 혈당, insulin, 당화혈색 소, 경구내당능 분석	100	2형 당뇨모델인 db/db mouse 에 김정옥수수 polyphenol을 7 주간 섭취시키고, 혈당, insuli n, 당화혈색소, 경구당내성을 분석한 결과 현재 처방되고 있 는 Glimpiride보다 모든 면에 서 우수한 것으로 나타났음
		취상에서 ROS(활성산소), 세 포사, 세포성장 및 세포사 관련 단백질 분석	100	취상 베타세포 막편을 anti i nsulin antibody로 연색한 결과 김정옥수수 polyphenol을 섭취 시킨 db/db mouse에서는 베타세 포가 죽지 않고 살아있었고 대 조군이나 Glimpiride처리군에 서는 베타세포가 많이 죽어있는 것을 발견하여 김정옥수수 poly phenol이 취상 베타세포 보호효

				과가 우수하다는 것을 발견하였음
김정옥수수의 당뇨병 및 당뇨병병증의 건강기능식품소재로서의 역할 규명 및 개발	김정옥수수 추출물의 신성 당뇨병증에서 유래한 사구체경화 억제능 조사	100	신성 당뇨병증에서 유래한 사구체경화 억제능 기전연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 김정옥수수 안토시아닌 성분의 신장 mesangial cell의 증식에 대한 효과</li> <li>▪ mesangium의 결체조직성장인자와 matrix의 생성</li> </ul>
	김정옥수수 추출물의 신성 당뇨병증에서 유래한 사구체경화 억제능 기전연구	100	신성 당뇨병증에서 유래한 사구체경화 억제능 기전연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 신성 당뇨병에서 김정옥수수 안토시아닌 성분의 사구체경화 억제능에 대한 기전 조사</li> </ul>

2. 2차년도 연구개발목표에 대한 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	건정옥수수 수의 polyphenol 분리/분석 및 in vitro 당뇨 및 당뇨합병증 억제능 평가	활성과 연계된 건정옥수수 우수종 선발	100	▪ 1차년도에서 선발된 우수종을 교잡하여 재배된 207종의 건정옥수수를 향산화, polyphenol 함량, 항당뇨합병증 활성 등의 효능이 있는 각 활성별 우수종을 선발
		활성을 갖는 Polyphenol 성분의 분리 및 구조규명	100	▪ 안토시아닌 이외의 항당뇨합병증 활성을 갖는 polyphenol 화합물을 HPLC 및 MPLC로 분리하여 NMR 및 MS로 구조를 규명
		단리화합물에 대한 활성 평가 및 추출성분 분양	100	▪ Polyphenol 성분에 대한 알도스 환원효소 억제효능, 최종당화산물 억제효능, 단백질 다이로신 탈인산화 효소 억제효능을 평가 하여 활성 성분을 규명
	김정옥수수 수의 polyphenol의 웨장베타세포 보호 및 재생 활성 분석 및 활용연구	STZ로 췌장을 손상시킨 ICR mouse에서 건정옥수수 polyphenol의 췌장베타세포 보호 활성 및 기전을 분석함	100	▪ 혈당, 당화혈색소, 경구내당능 분석 ▪ 혈중 insulin, 췌장무게 측정
	건정옥수수의 당뇨 및 당뇨합병증의 건강기능식품소재로서의 역할 규명 및 개발	김정옥수수 추출물의 신성 당뇨합병증에서 유래한 사구체경화 억제기전 연구 ▪ 염증반응과의 연결고리	100	▪ 김정옥수수 안토시아닌 성분의 고혈당에 의한 염증인자 ICAM-1과 MCP-1 생성 조사 - 각 김정옥수수 추출물의 사구체경화에 대한 효능 탐색
		김정옥수수 추출물의 신성 당뇨합병증에서 유래한 동맥경화증 억제능 및 혈관신생작용에 대한 효능	100	▪ 김정옥수수 butanol추출물의 신성 동맥경화증 초기단계 조사 ▪ 신성당뇨에 의한 혈관신생작용 조사
	임상시험: 혈당조절용 건강기능식품소재의 개발을 위한 임상시험	다수의 정상인을 대상으로 단기 및 장기(8주에 걸쳐) 혈당감하능을 평가	100	▪ 2형당뇨치료제인 metformin과 혈당감하능을 비교 분석

3. 3차년도 연구개발목표에 대한 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	김정옥 수수의 polyphenol 분리 /분석 및 in vitro 당뇨 및 당뇨합병증 억제 능 평가	활성추출분획물의 구조동정 및 대량 추출법 확립 / 활성 성분 분양	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>세부과제에서 우수한 활성을 갖는 성분에 대해 칼럼크로마토그래피, TLC 및 HPLC, MPLC, CPC 등으로 추출물을 분리하여 세부과제에 분양하여 활성을 확인</li> <li>2차년도에서 규명하지 못한 polyphenol 화합물을 NMR, UV, MS, IR 등의 분석기기를 이용하여 화합물 구조를 규명</li> </ul>
		제품의 안정성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>장기보존 시험: 저장조건에서 사용 기한을 설정하기 위하여 장기간에 걸쳐 물리적, 완전성, 화학적, 미생물학적 안정성 및 내용물과 용기의 적합성에 대하여 제형에 따른 적절한 기준 및 시험방법과 시험조건에서 시험</li> </ul>
		시제품 제작 및 제품/산입화 방안 강구(제형연구, 캡슐 제작, 봉해도 시험)	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>polyphenol 분획물에 부형제(microcrystalline cellulose 등)등을 넣어 제조방법에 따라 캡슐을 제조</li> <li>Capsule 제제의 봉해도 시험 -1분간에 29~32회 왕복, 진폭 53~57 mm 상하로 운동 -시험기 비키에 넣는 시험액의 양은 시험기가 가장 위로 올라왔을 때 시험기의 망면이 액면 아래로 15 mm 이상 떨어지도록 하고 가장 아래로 내려갔을 때 비키의 바닥으로부터 25 mm 이상으로 시험기가 완전히 잠기지 않도록 한.</li> </ul>
김정옥 수수의 polyphenol의 웨 장메다세포 보호 및 재생 활성 분	메다세포배양에서 김정옥수 수 polyphenol의 혈당강하 및 세포보호 기전연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>ins-1 웨장메다세포배양에서 cytokines (human IL-1:β 1 μg/l, INF-γ :5 μg/l, TNF-α: 5 μg/l) 이나 palmitate (0.5 mmol/l) 처리</li> </ul>	

	<p>식 및 활용연구</p>		<p>1/1)로 apoptosis를 유도하고, 이때 김정옥수수 polyphenol을 여러 농도로 첨가하면서 세포보호효과를 TUNEL assay로 apoptosis 정도를 측정하여 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ins-1 웨장메다세포배양에서 김정옥수수 polyphenol을 여러 농도로 첨가하면서 세포내 ROS (활성산소)농도를 측정</li> </ul>
	<p>기능성식품화를 위한 김정옥수수 polyphenol의 안전성 분석</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>db/db mouse에서 김정옥수수 polyphenol을 8주 투여한 후 장기를 적출하여 육안으로 검사하고 무게를 측정</li> <li>혈액을 채취하여 혈액의 총콜레스테롤, LDL콜레스테롤, HDL콜레스테롤을 측정</li> <li>간독성은 AST, ALT를 측정하여 분석</li> <li>신장독성은 BUN을 측정하여 분석</li> <li>췌장을 식출하여 박편조직슬라이드를 제조하고 islet에서 anti-insulin antibody로 immunostaining하여 메다세포의 세포사를 분석</li> </ul>
<p>김정옥수수의 당뇨 및 당뇨병증의 건강기능식품소재로서의 역할 규명 및 개발</p>	<p>당뇨합병증과 연결된 지하된 혈관 신생작용의 회복 (in vitro 세포실험)</p>	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>신장세포 mesangial cells와 혈관 내피세포의 세포배양 <ul style="list-style-type: none"> <li>신장세포를 33 mM glucose에 의한 고혈당으로 배양하여 신성 당뇨병증 유도실험을 실시함</li> <li>신장세포의 conditional media를 혈관 내피세포와 배양하여 당뇨병증에 의한 신장 혈관 및 사구체 모세혈관의 혈관 신생작용을 조사한 일부는2차년도 후반기에 실시하여 김정옥수수의 안도시아닌이 고혈당으로 인하여 지하된 혈관신생작용을 활성화시킨다는 것을 규명함</li> </ul> </li> <li>이에 대한 김정옥수수 안토</li> </ul>

			<p>시아닌의 신장 당뇨합병증에서 혈관신생작용 기전연구를 실시함</p> <p>관련된 다양한 cytokines과 growth factors의 관련성을 조사함: HIF와 VEGF의 연결 고리를 파악</p> <p>-혈관신생작용과 관련하여 혈관내피세포의 세포사멸을 조사하고, 관련된 apoptotic factors를 측정함: MAPK와 ASK의 측정, apoptotic bodies 측정</p> <p>-MTT 측정, Hoechst 염색법, Western blot 분석, real time-PCR 분석, ELISA 분석 및 세포면역학적인 염색법을 도입함</p>
	<p>신장당뇨합병증의 혈관 신생작용의 억제작용 확인 (in vivo 동물실험)</p>	<p>100</p>	<p>▪ 김정옥수수의 안토시아닌의 경구투여를 통하여 db/db 당뇨 쥐의 혈당 조절을 측정함-본 실험의 일부는 2차년도 후반기에 실시되었음</p> <p>-사구체경화작용의 일부는 2차년도 연구 결과에 삽입하였음</p> <p>-신장 filtration barrier를 지탱하는 nephrin과 podocin의 역할 규명</p> <p>-당뇨합병증에서는 이러한 barrier proteins이 손상을 당할 것으로 기대하고 김정옥수수 안토시아닌이 proteins들의 발현을 정상화 시키는지 조사함</p> <p>사구체경화와 관련된 collagen의 생성과 관련된 CTGF의 발현등을 조사함: Western blot과 조직면역학적인 기법 도입: 관련된 단백질 발현과 분비 측정함</p> <p>ELISA 기법 도입: 염증반응에 관련된 매개물질 측정함</p>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 당뇨병병증의 혈관신생작용에 대한 길정옥수수 안토시아닌의 억제활성 in vivo 연구</li> <li>Western blot 분석과 조직면역학적 분석을 통하여 VEGF와 HIF 인자의 발현을 측정함</li> <li>-공초점현미경을 사용하여 혈관신생작용을 직접 조사함</li> <li>-혈관내피세포의 세포사멸에 대한 인자: caspase, Bcl2, Bax 등은 신장조직에서 측정함</li> </ul>
--	--	--	---

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

### 1. 활용방안

가. 당뇨합병성 신장삼유증 억제용 천연물신약 개발을 위한 김장옥수수추출물 소재 활용이 가능 할 것으로 보이며, 지식재산권 확보하였으며, 현재 합병증 치료제 비비, 신규 천연물소재로 직결한 후보로 판단됨.

◎ 김장옥수수추출물을 함유하는 당뇨합병성 신장삼유증 억제용 조성물.

등록번호 : 1010635240000

나. 혈당조절용 건강기능식품소재로의 개발을 위한 단기 및 장기 인상시험 결과를 바탕으로 개별인정 건강기능식품 원료 신청 및 캡슐제품개발 내용 활용한 품목제조신고로 신속한 상품화 가능.

다. 2012년 개별인정 건강기능식품 원료 신청예정

### 2. 기대효과

가. 기술적 측면

(1) 재배조건에 따라 추출성분의 함량 및 조성이 다른 것으로 추정되며 차후, 제품화를 고려하여 표준화 조건 확보

(2) 유효성분 추출 극대화 가공법 개발로 당뇨병 및 당뇨합병증 개선효과를 갖는 새로운 건강기능성 식품의약소재 생산기술을 확립

(3) 이러한 연구개발 기술을 기반으로 다른 천연물로부터 당뇨 및 당뇨합병증 개선 효능을 갖는 기능성 소재를 지속적으로 발굴 가능하게 할 것으로 기대

나. 경제적·산업적 측면

(1) 본 연구의 성공적 수행으로 김장옥수수의 가공과정개선으로 유효성분이 증가된 공법의 개발과 김장옥수수의 당뇨병 및 당뇨합병증 개선 효과와 그 기전이 구체적으로 규명된다면, 식품으로서 확보된 옥수수 시장 규모에서 기능성 옥수수로 인한 실제적인 농가소득이 기대되며, 김장옥수수의 효능에 대한 인식이 확대된다면 이보다 많은 소득이 보장

(2) 김장옥수수의 효능 극대화를 특허화 하여 기술적인 배경과 효능 평가부분의 객관적 자료로 활용, 새로운 기능성 소재의 제품시장이 창출되는 과정에서 경제적인 수익을 예상

- (3) 당뇨병 및 당뇨병병증의 예방과 개선을 위한 제품개발은 고소득 작물로서 재배농장의 활성화와 농가소득증대를 가져오고 가공 산업체 간의 유기적인 관계를 통한 산업적 파급효과가 기대되며 고부가가치의 효능을 극대화한 건정옥수수 수확이 가능한 기술을 각 농가에 보급함으로써 결국 농가의 소득을 증대시킬 것으로 기대
- (4) 당뇨병 및 당뇨병병증의 예방과 개선에 대한 효능에 입각하여 한의학과 약학 관련 산업발전 및 국민건강증진을 가져오게 되고, 이들 질환의 유발을 현저히 감소시키는 효과를 얻어 국민건강 차원의 의료비 절감이라는 경제적 사회적 이득을 기대
- (5) 본 연구성과를 토대로 지속적인 연구수행으로 궁극적으로 임상시험을 성공적으로 통과하여 신규 2형 당뇨치료제도 개발될 경우 새로운 약제로 수입대체 효과 뿐 아니라 현재 시판되는 약제보다 활성이 우수한 당뇨치료제로서 세계시장에서 막대한 부를 창출할 수 있을 것으로 기대

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 연구개발 성과

### 1. 연구개발 결과

#### 가. 김정옥수수수의 Polyphenol 분리/분석 및 in vitro 항당뇨 및 당뇨합병증 억제능 평가

(1) 우수 활성을 갖는 김정옥수수 개발을 위한 기초활성 시험 및 우수종 선발

▪ 강원도 옥수수시험장(홍천소재)으로부터 353종의 김정옥수수를 분양받아 HPLC를 이용한 성분 패턴분석과 항산화 활성(ABTS 라디칼 소거법, DPPH 법), Rat Lens Aldose Reductase (RLAR) 억제활성, PTP1B 억제효능, AGEs (advanced glycation end-products) 활성 등을 분석하여 우수종 53종을 선발하였으며 이를 기초로 교잡하여 얻은 306종에 대한 활성을 재검하여 현재, 태국에서 재배 중에 있음

▪ 최종 5종의 색찰교 선발

(2) 추출, 분획 및 고수율 추출 조건 수립

▪ 일부 활성시험에서 안토시아닌 성분뿐만 아니라 다른 polyphenol에서도 우수한 활성을 나타내어 성분이 존재하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ethyl acetate, BuOH 등으로 순차 추출하여 polyphenolic 성분은 EtOAc 분획물에 주로 추출되어 이 분획물을 RP-18 충전제를 활용하여 medium pressure LC로 다양한 메탄올 수용액의 농도를 조절하여 활성 성분을 분리

(3) LC-MS/MS를 이용한 안토시아닌 성분 분석 및 HSCCC를 이용한 주요성분 분리

▪ High Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)로 주요 안토시아닌 성분을 분리하여 활성 검정 및 각 세부과제에 주요 성분 분양.

▪ 김정옥수수 함유 주요 안토시아닌 성분은 cyanidin-3-glucoside (1), pelargonidin 3 glucoside (2), peonidin 3 glucoside (3), cyanidin 3 (6"-malonylglucoside) (4), pelargonidin 3 (6"-malonylglucoside) (5), cyanidin-3-(dimalonylglucoside) (6), cyanidin 3-(6-acetylglucoside) (7), peonidin-3-(6"-malonylglucoside) (8) 규명

(4) 우수 활성을 갖는 김정옥수수 종을 선발하기 위해 기초 활성 시험을 통한 우수종 선발

▪ 강원도 옥수수시험장으로부터 김정옥수수를 분양받아 HPLC를 이용한 성분 패턴분석과 항산화 활성(ABTS 라디칼 소거법, DPPH 법), Rat Lens Aldose Reductase (RLAR) 억제활성, PTP1B 억제효능, AGEs(advanced glycation end-products) 활성 등을 분석하여 각 활성별 우수종을 선발

▪ 기초로 교잡하여 얻은 306종에 대한 활성을 재검하였고, 3차를 거쳐 우수종을 선발하여

최종 5종의 색채교를 확정하여 대량생산을 위한 품종신고 전까지 연구 진행하였음. 현재 태국에서 재배 중에 있음

(5) 추출, 분획 및 고수율 추출 조건 확립

- 반응표면 분석법(Response Surface Methodology)을 이용하여 최적의 추출조건을 확립

(6) Non-anthocyanin 성분 분리 및 구조규명

- prothocatechuic acid (1), vanillic acid (2), 2,4,6-trihydroxy benzoic acid (3), p-hydroxycinnamic acid (4), ferulic acid (5), hirsutrin (6), 3'-methoxy hirsutrin (7) 규명

(7) 활성평가 - 분리된 anthocyanin, polyphenol 성분을 대상으로 당뇨, 항당뇨합병증 효능을 평가

- 당뇨 및 합병증 억제능 평가를 실시하여 2종의 우수활성
- 당뇨: polyphenol 성분 중에서 3'-methoxy hirsutrin 물질에서 우수한 활성을 보임
- 당뇨합병증: anthocyanin 성분 중에서 cyanidin-3-(6-malonyl-glucoside) 물질에서 우수한 활성을 보였음. polyphenol 성분 중에서 hirsutrin 물질에서 우수한 활성을 보임.

(8) HSCCC (High speed counter-current chromatography)를 이용하여 대량추출법을 확립하고 세부과제에 활성성분을 분양

(9) 캡슐 시제품 개발 (안정성 평가 및 붕해도실험)



나. 김정옥수수의 polyphenol의 췌장베타세포 보호 및 재생 활성 분석 및 활용연구

(1) 김정옥수수 polyphenol의 췌장 베타세포 보호활성 및 기전을 2형 당뇨병모델인db/db mouse 분석

- 2형 당뇨병모델인db/db mouse에 김정옥수수 polyphenol을 7주간 섭취시키고, 혈당, insulin, 당화혈색소, 경구당내성을 분석한 결과 현재 처방되고 있는 Glimpiride보다 모든 면에서 우수한 것으로 나타났음

(2) 췌장에서 ROS(활성산소), 세포사, 세포성장 및 세포사 관련 단백질 분석

- 췌장 베타세포 박편을 anti-insulin antibody로 염색한 결과 김정옥수수 polyphenol을 섭

취시킨 db/db mouse에서는 메타세포가 죽지 않고 살아있었고 대조군이나 Glimpiride치리군에서는 메타세포가 많이 죽어있는 것을 발견하여 김정옥수수 polyphenol이 췌장 메타세포 보호 효과가 우수하다는 것을 발견하였음

### (3) 마우스에서 기초 독성 검사

- 2형 당뇨병모델인 db/db mouse에 Purple Corn Polyphenols (10mg/kg/day)을 경구도 7주간 투여 후에 행동양상 관찰, 각 장기의 상태를 육안으로 분석한 결과 독성이 없음을 확인

### (4) STZ로 췌장을 손상시킨 ICR mouse에서 김정옥수수 polyphenol의 췌장메타세포 보호 활성 및 기전 분석

- 당화혈색소(HbA1c) 측정, 혈중 인슐린 농도 측정, 췌장무게 측정, 경구 내당능검사(OGTT)
- 8주간 십취 후 STZ-당뇨군 및 STZ-양성대조군(glimpiride)에 비해 STZ-실험군(김정옥수수 추출물)에서 다소 통계적으로 유의하게 당화혈색소가 감소하였으며, 내당능검사 (OGTT)에서 혈당강화효과가 우수하였으며, 혈중인슐린 농도가 다른 군에 비해 다소 증가한 것으로 보였으나 통계적 유의성은 없었음

### (5) 김정옥수수 폴리페놀의 당뇨치료 효능 분석 및 기능성 식품화를 위한 기초 안전성 평가

- 대조군(무처리군), 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물, 국내산 김정옥수수 추출물 HP20을 8주간 db/db mouse에 처리 시 공복혈당 지하 효과는 페루산 10% 추출물, 국내산 김정옥수수 추출물 HP20을 10mg/kg/day 처리한 군이 피니톨 (100mg/kg/day), 자누비아 (280mg/kg/day) 처리군과 유사하였음. 페루산 10% 추출물, 국내산 김정옥수수 추출물 HP20이 피니톨에 비해 10배, 자누비아에 비해 28배의 적은량으로도 유사한 혈당지하효과를 갖는다는 것을 밝혔음

- OGTT(경구내당능), 당화혈색소(HbA1C)는 자누비아가 가장 우수하였으며, 피니톨과 페루산 10% 추출물, 국내산 김정옥수수 추출물 HP20 처리군은 유사하게 감소활성이 다소 약하였으나 상대적인 처리농도가 28배나 낮아서 비교하기는 어렵다.

- 대조군(무처리군), 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물, 국내산 김정옥수수 추출물 HP20의 8주처리 후 췌장, 간, 심장, 신장, 췌장의 무게에서 차이는 나타나지 않았으며, 육안상의 색깔이나 외양의 차이를 볼수 없었으며, ALT, AST, BUN의 차이가 없어서 간 및 심장 독성이 없다는 것을 보여주었음

- 국내산 김정옥수수 추출물 HP20은 혈액내 LDL Cholesterol을 증가시켰으나 total cholesterol은 크게 변화시키지 않았으며, 오히려 TG(triacy glycerol)를 대조군과 같은 농도로 유지시켰음. 양성대조군 (피니톨, 자누비아)과 페루산 10% 추출물은 대조군 (untreated)에 비해 LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, total cholesterol의 혈액 내 농도를 변화시키지 않았으나, TG의 농도는 상당히 감소시켰음.

### (6) 메타세포배양에서 김정옥수수 polyphenol의 혈당강화 및 세포보호 기전연구

- 췌장 islet을 anti-insulin antibody로 면역염색화학적 분석 결과 PCA(김정옥수수 10% polyphenol) 처리군에서는 약 80%이상의 세포가 insulin을 발현하는 세포로 확인되어 췌장메타세포 보호효과가 우수함을 보여주었음.

다. 당뇨합병증으로 인한 활성손상과 사구체경화의 퇴치를 위한 건정옥수수 소재개발

(1) 고혈당에 의한 사구체경화에 대한 김정옥수수의 효능

- 33mM 포도당으로 처리된 mesangial cell condition medium에서 매양된 혈관내피세포는 VCAM-1, E-selectin, integrin $\beta$ 1의 발현을 상당히 촉진함
- VCAM-1, E-selectin, integrin $\beta$ 1은 JAK family인 Tyk2에 의해 발현이 증가하는 것을 확인함

(2) 사구체 섬유증에 대한 김정옥수수의 in vivo 억제효능

- 고혈당으로 인한 신장 당뇨합병증에서 mesangium의 팽창으로 인한 신장 경화증에 김정옥수수 추출물은 억제 효과가 있는 것으로 확인함
- 김정옥수수 추출물은 IL-8-Tyk2-STAT으로 이어지는 염증성 signaling을 억제하고, 사구체에서 염증과 관련한 세포들의 침윤과 부착을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인함

(3) 사구체 경화와 신성 염증반응에 대한 김정옥수수의 in vivo 억제효능

- 김정옥수수 추출물은 사구체 내피세포에서 leukocyte recruitment와 adhesion을 억제하는 효과가 있는 것을 확인함
- 김정옥수수 추출물은 사구체에서 염증과 관련하여 대식세포들의 침윤과 신장 염증을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인함

라. 일상시험 (단기 및 장기)

(1) 정상인에서 단기 경구내당량 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석

- 분석결과 A군 및 C군에 비해 B군에서 95%신뢰도로 통계적으로 유의성있게 glucose 투여 후120분에서 혈당 강하 효과가 나타났으며, 이는 김정옥수수 안토시아닌추출물이 정상인에서 처방약인 metformin보다 혈당강하효과가 있음을 보여줌

(2) 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 경구내당량 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석

- 8주간 섭취시킨 후 장기 경구내당량 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 분석결과 A군 및 C군에 비해 B군에서 95%신뢰도로 통계적으로 유의성있게 glucose 투여 후120분에서 혈당 강하 효과가 나타났으며, 이는 김정옥수수 안토시아닌추출물이 정상인에서 처방약인 metformin보다 혈당강하효과가 있음을 보여줌

(3) 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 당화혈색소혈중인슐린농도 및 혈당 분석

- 8주간 섭취시킨 후 혈중 당화혈색소(HbA1c), 인슐린농도 및 혈당을 분석한 결과 당화혈색소 및 혈당은 정상인이어서 변화가 없었으나 혈중인슐린 농도는 김정옥수수 안토시아닌 추출물 투여군에서 다소 높았으나 개체 간 표준편차가 높아 통계적 유의성은 없었음

(4) 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 체중, 히리둘레 및 혈압의 분석

▪ 8주간 섭취시킨 후 체중, 히리둘레 및 혈압을 분석한 결과 통계적으로 유의성이 있는 차이를 나타내지 않았음

(5) 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 혈중 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, tryglyceride를 분석

▪ 8주간 섭취시킨 후 혈중 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, tryglyceride를 분석한 결과 통계적으로 유의성이 있는 차이를 나타내지 않았음

(6) 정상인에서 장기(8주간 투여 후) 부작용 분석

▪ 8주간 섭취시킨 후 부작용을 분석한 결과 특별한 부작용을 보여주지 않았음

(7) 정상인에 각군당 20명씩 A군(cellulose 300 mg) B군(김정옥수수 polyphenol 추출물 300 mg) C군(Metformin 300 mg)을 단기 및 장기(8주간) 투여하면서 여러 인자를 측정한 결과 B군(김정옥수수 polyphenol 추출물 300 mg)에서 단기 및 장기 내당능검사 (Oral Glucose Tolerance Test)의 혈당강하효과가 통계적으로 유의성있게 나타나서 김정옥수수 polyphenol 추출물의 혈당강하 효능을 확인할 수 있었음

2. 연구 성과

가. 특허 출원 및 등록 실적

국내 출원된 특허의 경우				국내 등록된 특허의 경우			
출원 연도	특허명	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록국	등록번호
2009	퀘장베타세포를 보호하는 활성과 당조절 활성이 수한 흑옥수수 안토시아닌	대한민국	10-2009-0022925	2011	건정옥수수추출물을 함유하는 당노합병성 신장선유증 억제용 조성물.	대한민국	1010635240000
2010	검정옥수수추출물을 함유하는 당노합병성 신장선유증 억제용 조성물.	대한민국	10-2010-0011694				

해외 출원된 특허의 경우				해외 등록된 특허의 경우			
출원 연도	특허명	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록국	등록번호
2009	대사성질환 치료용조성물	세계 (PCT)	PCT/KR 2009/007091				

나. 논문게제 실적

게제연도	논문명	학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
2012	Purple corn anthocyanins dampened high-glucose-induced mesangial fibrosis and inflammation: possible renoprotective role in diabetic nephropathy.	The Journal of nutritional biochemistry (IF 4.538)	2012 Apr;23(4):320-31.	국외	0
2012	Purple corn anthocyanins retard diabetes associated glomerulosclerosis in mesangial cells and db/db mice.	European Journal of nutrition (IF 3.343)	in press [Epub ahead of print]	국외	0
2012	Purple corn anthocyanins	American	In press	국외	0

	inhibit diabetes-associated glomerular monocyte activation and macrophage infiltration	Journal of Physiology Renal Physiology (IF 3.792)			
--	--	---	--	--	--

다. 학술발표실적

번호	논문명	학술대회명	개최일시	개최장소	발표자	국내/국외
1	Purple corn anthocyanins alleviate high glucose-stimulated human mesangial fibrosis	2009년 식품영양과학회	2009. 11	창원	Jing Li, Young-Hee Kang	국내
2	Evaluation of Purple Corns on Inhibition of Aldose Reductase and Antioxidant Activity	2009년 식품영양과학회	2009. 11	창원	Jin Kyu Kim, Soo-Kyeong Lee, Ki Jin Park, Seon Ha Kim, Jeong Eun Kim, Yoon Sil Lee, and Soon Sung Lim	국내
3	A novel compound isoangustone A dampens chronic high glucose-induced mesangial matrix deposition and fibrosis	Experimental Biology 2010	2010. 04	미국	J. Li, E. S. Lee, S. S. Lim and Y-H. kang	국외
4	Purple Corn Anthocyanins Dampened Renal Fibrosis through Bloking TGF- $\beta$ /SMAD Signal Pathway	2010 한국식품과학회	2010. 06	인천	Jing Li, Young Hee Kang	국내
5	On-line Identification of the Antioxidative Constituents in Purple corn by HPLC-UV-MS	2010 Separation Science Singapore	2010. 08	싱가폴	Ha Na Yoon, Tae Hyeon Kim, Jin-kyu Kim, Young Eun Jeon, Soon Sung Lim	국외
6	Inhibitory effects of the Compounds isolated from the kernel of Purple corn ( <i>Zea Mays L.</i> ) on protein tyrosine phosphatase 1B	2010년 한국약용작물학회 심포지엄 및 추계학술발표회	2010. 10	제천	Tae Hyeon Kim, Soo Kyeong Lee, Jin Kyu Kim, Soon Sung Lim	국내
7	Inhibitory effects of the	2010년	2010. 10	제천	Tae Hyeon Kim,	국내

	compounds isolated from Purple corn on aldose reductase and advanced glycation end-products formation	한국약용작물학회 신포지엄 및 추계학술발표회			Seo Kyeong Lee, Jin Kyu Kim, and Soon Sung Lim	
8	Optimization of Extraction Conditions to Obtain Functional From Zea mays L. by Response Surface Methodology	2010 식품영양과학회	2010.10	대구	Tae Hyeon Kim, Se Jin Choi, H Jun Kang, Jin Kyu Kim, Hong Mei Li, Yeon Sil Lee, Soon Sung Lim	국내
9	purple corn antocyanin prevents diabetic renal inflammation and fibrosis through NF-kB signal pathway	2010 한국식품영양 과학회	2010.10	대구	Jing Li, young-Hee kang	국내
10	Optimizing Conditions for Extraction of Polyphenol in Zea mays L. Using Response Surface Methodology	2011 식품영양과학 회	2011.11	부산	Tae Hyun Kim, Jin Kyu Kim, Young Hee Kang, H Jun Kang, Jae Young Lee, Soon Sung Lim	국내
11	Preparative Isolation and Identification of Phenolic Compounds from Zea mays L.	2011 식품영양과학 회	2011.11	부산	Tae Hyun Kim, Jin Kyu Kim, Young Hee Kang, H Jun Kang, Jae Young Lee, Soon Sung Lim	국내
12	Inhibitory Activity of phenolic compounds from Zea mays L. against Aldose Reductase	2011 식품영양과학 회	2011.11	부산	Tae Hyun Kim, Jin Kyu Kim, Young Hee Kang, H Jun Kang, Jae Young Lee, Soon Sung Lim	국내
13	Protein Tyrosine Phosphatase-1 $\beta$ Inhibitory Activities of the Compounds from the Zea mays L.	2011 식품영양과학 회	2011.11	부산	Tae Hyun Kim, Jin Kyu Kim, Young Hee Kang, H Jun Kang, Jae Young Lee, Soon Sung Lim	국내
14	Purple corn Antocyanins Retard	2011	2011.11	부산	Min-kyung Kang,	국내

	Diabetes associated Glomerulosclerosis in Mesangial Cells and db/db mice.	식품영양과학회			Young Hee Kang	
15	Purple corn Extract Alleviated Diabetes-associated Inflammatory Glomerulosclerosis Accompanying Monocyte/macrophage infiltration in diabetic db/db mice.	2011 식품영양과학회	2011.11	부산	Min-Kyung Kang, Young-Hee Kang	국내

라. 인재양성

학위	명	대학교명	학위 취득
석사	3	한림대학교	2010
박사	2		
석사	1	한림대학교	2011
박사	1		
석사	4	한림대학교	2012
박사	2		

마. 수상 및 매스콤 등의 PR

<p>1. 수상</p> <p>① 장려상, 2011년 한국식품영양과학회 구분발표 장려상 Bioactivity guided Isolation and Identification of Phenolic Compound from Zea mays L.</p> <p>2. 매스콤</p> <p>① 2010년 4월 5일 강원일보 "김정 옥수수 당뇨 합병증 억제효과"</p> <p>② 2010년 5월 19일 식품음료신문 김정 옥수수, 혈당 조절에 효과, 안토시아닌 독성 없이 메다 세포 개선</p> <p>③ 2012년 3월 9일 아침 8시 35분 원주 KBS 라디오방송 "상쾌한 아침 원주에서 출발합니다." • 한림대에서 개발한 김정옥수수의 지역산업 부흥을 위하여 지역축제와 사료의 제조를 계획.</p> <p>④ 2012년 4월 2일 강원일보</p>
--



## 제 2 절 성과 활용계획

### 1. 실용화·산업화 계획

건정옥수수 당도 및 당도함병증 억제하는 효능을 증명하였고, 활성을 고이는 유효성분 분리와 구조를 규명하였다. 이러한 효능을 가진 건정옥수수로부터 가공과정개선으로 유효성분이 증가된 공법의 개발과 건정옥수수의 당뇨병 및 당도함병증 개선 효과와 그 기전이 구체적으로 규명된다면, 식품으로서 확보된 옥수수 시장 규모에서 기능성 옥수수도 인한 실제적인 농가소득이 기대되며, 건정옥수수의 효능에 대한 인식이 확대된다면 이보다 많은 소득이 보장 될 것으로 보인다.

건정옥수수의 효능 극대화를 특허화 하여 기술적인 배경과 효능 평가부분의 객관적 자료로 활용, 새로운 기능성 소재의 제품시장이 창출되는 과정에서 경제적인 수익을 예상되며, 재매농장의 활성화와 농가소득증대를 가져오고 가공 산업체 간의 유기적인 관계를 통한 산업적 파급효과가 기대되며 고부가가치의 효능을 극대화한 건정옥수수 수확이 가능한 기술을 각 농가에 보급함으로써 결국 농가의 소득을 증대시킬 것으로 기대된다. 뿐만 아니라 당뇨병 및 당도함병증의 예방과 개선에 대한 효능에 입각하여 한의학과 약학 관련 산업발전 및 국민건강증진을 가져오게 되고, 이들 질환의 유발을 현저히 감소시키는 효과를 얻어 국민건강 차원의 의료비 절감이라는 경제적 사회적 이득을 기대된다. 혈당조절용 건강기능식품소재로의 개발을 위한 단기 및 장기 임상시험 결과를 바탕으로 개별인정 건강기능식품 원료 신청할 것이며, 이 기술을 바탕으로 참여기업 (주) 에스앤디에서는 오송생명과학단지 GMP 시설의 공장 완공 (2013년 3월)과 건정옥수수 개별인정형 기능성식품을 출시 할 예정이다. 뿐만 아니라 연계사업으로 광역연계 백두대간 그린마인사업 (2011-2013)을 진행하고 있으며, 이 사업을 통하여, 당뇨 및 당도함병증 억제용 천연물신약(의약품)으로 개발 할 것이다.

### 2. 기술 확산 계획

당도함병성 신장섬유증 억제용 천연물신약 개발을 위한 건정옥수수추출물 소재 활용이 가능할 것으로 보이며, 지식재산권 확보하였으며, (건정옥수수추출물을 함유하는 당도함병성 신장섬유증 억제용 조성물, 등록번호 : 1010635240000) 현재 합병증 치료제 니비, 신규 천연물소재로 직질한 후보로 판단된다. 뿐만 아니라 혈당조절용 건강기능식품소재로의 개발을 위한 단기 및 장기 임상시험 결과를 바탕으로 개별인정 건강기능식품 원료 신청 및 캡슐제분개발 내용 활용한 분복제조신고로 신속한 상분화 가능 할 것으로 보이며, 2012년 개별인정 건강기능식품 원료 신청예정에 있다. 건정옥수수에 대한 학문적 기초자료는 소개가 되었으며 일반 소비자들을 대상으로 언론 매체를 통한 당뇨에 효과적인 건정옥수수의 우수성을 홍보하였다.

홍보내용 : 2010년 4월 5일 강원일보, “건정 옥수수 당도 함병증 억제효과”

2010년 5월 19일 식품운료신문, 건정 옥수수, 혈당 조절에 효과, 안토시아닌 독성 없이 베타세포 개선  
2012년 3월 9일 아침 8시 35분, 원주 KBS 라디오방송 “상쾌한 아침 원주에서 출발합니다.” 한린대에서 개발한 건정옥수수의 지역산업 부흥을 위하여 지역 술 제조와 사료의 제조를 계획.

2012년 4월 2일 강원일보, 산림에서 소득 찾는 '녹색광산' 만든다. 자색옥수수 당도에 효과

### 3. 지식재산권 확보 계획

#### 가. 특허

김정옥수수 최적의 추출 조건, 우수종 특허화 진행 중

#### 나. 논문 게재

게재연도	논문명	학술지명	Vol. (No. )	국내외 구분	SCI구분
2012	Aldose Reductase Inhibitory Activity of the compounds from the Zea maysL.	J. food and bio chemistry	submit	국외	0
2012	Purple corn anthocyanins protect pancreatic beta cells from cell death in db/db mice.	J. Ethnopharmacology.	submit	국외	0
2012	Anti-diabetic effects of purple corn extract in clinical study	J. Ethnopharmacology.	prepare	국외	0
2012	Optimizing conditions for the extraction of polyphenol in purple corn kernel using Response surface methodology	Bioresource Technology	prepare	국외	0
2012	Protein tyrosine phosphatase 1 $\beta$ (PTP1 $\beta$ ) inhibitory compounds from Zea mays L.	J. food and bio chemistry	prepare	국내	0
2012	Optimizing conditions for the extraction of polyphenol in purple corn husk using Response surface methodology	한국약용작물학회지	prepare	국내	0

SCI 목표 논문 총 7편 중 3편의 논문이 게재 되었고, 위와 같이 4편은 진행 중에 있으며, 비 SCI논문 2편도 지금 진행 중에 있다.

#### 다. 기타

실험에 사용된 옥수수 품종 종자(우수종으로 선별 된 품종 종자)를 정부에 등록 여부에 대한 협의 중에 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 수행하는 과정에서 해외출장조사 계획이 없었다. 다만 연구수행과정에서 수집한 학술정보를 기준으로 외국에서 김정옥수수를 이용한 혈당조절에 대한 연구가 미비한 상태에 있어서 국회의 당뇨 시장현황 및 연구 동향을 기술하였다.

### 국외 시장 현황

- ◆ 대사성 질환이 형성하고 있는 세계시장 규모 중, 당뇨병 및 고혈압 치료제 시장이 가장 높은 비중을 차지하고 있으며, 향후 당뇨병 치료제의 시장규모는 해마다 큰 폭의 증가가 예상되고 있음
- ◆ 세계보건기구와 국제당뇨연맹은 전 세계 당뇨병 환자가 1985년 3천 만 명, 1995년 1억 3천 5백 만 명, 2000년 1억 7천 만 명으로 증가하였고, 2025년에는 최소한3억 명에 이를 것으로 예측하고 있으며, 당뇨환자의 약 90%가 제2형 당뇨병 환자인 것으로 보고되어 있음
- ◆ 세계 당뇨 관련 시장은 연평균 12.5%의 성장률로 성장하여 2005년에 182억 달러에서 2015년에 602억 달러의 시장을 형성할 것으로 전망됨

### 국외 연구 동향

- ◆ 현재 선진제약회사에서는 새로운 작용기전을 갖거나 기존 치료제의 단점을 보완하는 신규 성인형 당뇨병 치료제들이 개발진행 중.
- ◆ 대표적으로 인슐린 분비 촉진효과를 갖는 약물로 non-sulfonylurea계 약물과 dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) 저해제를 비롯한 glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 작용 증가제가 있으며, 인슐린의 작용을 증가하는 약물로 non thiazolidinedione (non TZD) 계열 약물, glucogen synthase kinase 3 (GSK 3) 저해제, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP 1B) 저해제 등이 있음.
- ◆ Prou사의 Integrity 자료를 분석해 보면 2004년 7월 100개의 화합물이 전임상 이상을 진행 중인데 많은 화합물들이 인슐린 저항성을 극복하는 방향으로 개발되고 있고 최근에 GLP-1 receptor agonist (5건)와 DPP IV 저해제 (7건)에 대한 연구가 활성화 되고 있음.
- ◆ 인슐린 분비를 촉진시키는 대표적 약물인 non-sulfonylurea계 약물로는 repaglinide, netoglinide, JTT-608, BTS67,572 등이 있으며, 이들 화합물은 췌장 베타세포에 기존 sulfonylurea계 약물의 binding site와는 다른 site에 결합하여 insulin 분비를 촉진시킴.
- ◆ Sulfonylurea계 약물에서 자주 나타나는 hypoglycemic shock 발생을 감소시키는 이점이 있

는 것으로 보고됨

◆ 또한 새로운 기전의 인슐린 분비촉진제인 GLP 1 system은 최근 연구가 가장 활발히 진행되고 있는 분야로 GLP 1은 혈중농도에 의존적으로 분비되어서 저혈당 부작용의 개선은 물론 베타세포의 재생효과, gastric emptying 억제효과, glucagon secretion 억제효과, satiety 유도 등 다양한 작용기전은 가지고 있음.

## 제 7 장 참고문헌

- Snook, M.F., Widstrom, N.W., Wiseman, B.R., Byrne, P.F., Harwood, J.S. and Costello, C. E. 1995. New C-4"-hydroxy derivatives of maysin and 3'-methoxymaysin isolated from corn silks (*Zea mays*). *J. Agric. Food Chem.* 43,2740-2745.
- SONIA, D.P.T., CELESTINO, S.B. and JULIAN C.R.G. 2002. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J. Sci. Food Agric.* 82,1003-1006.
- Adom, K.K. and Liu, R.H. 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6182-6187.
- Carmela, F., Fausto, b., Michael, N., Giorgio, C. and PATRIZIA, H. 2004. Induction of a popptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O- $\beta$ -glucopyranoside. *Biochem. Pharmacol.* 67, 2047 -2056.
- Dufranc, S.P., Malaisse, W.J. and Sener, A. 1984. Amicromethod for the assay of aldose reductase, its application to pancreatic islets. *Biochem. Med.* 32,99-105.
- Dwanto, V., Wu, X. and Liu, R.H. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50,4959-4964.
- FERGYSO, J.R. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research.* 465,89-111.
- Hayman, S. and Kinoshita, J.H. 1965. Isolation and Properties of Lens Aldose Reductase. *J. Biol. Chem.* 240,877-828.
- HISASHI, M., TOSHIO, M., IWAO, T. and MASAYUKI, Y. 2002. Structural Requirements of Flavonoids and Related Compounds for Aldose Reductase Inhibitory Activity. *Chem. Pharm. Bu* 11 50(6),788-795.
- Jean, H.R., Philippe, T., Monique, Z.H., Louisette, J.M., Andre, D., Alain, F. and Rodolphe, M. 1997. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography. *J. Chromatography A.* 763,345-352.
- KATSUBE, N., IWASHITA, K., TSUSHIDA, T., YMAKI, K. and KOBORI, M. 2003. Induction of a popptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J. Agr*

ic. Food Chem. 51,68-75.

Lee, Y.S., Kang, Y.H., Jung, J.Y., Kang, I.J., Han, S.N., Chung, J.S., Shin H.K. and Lim S.S., 2008. Inhibitory constituents of aldose reductase in the fruiting body of *Phellinus linteus*. Biol. Pharm. Bull. 31,765-768.

Lim, S.S., Jung, Y.J., Hyun, S.K., Lee, Y.S. and Choi, J.S. 2006. Rat lens aldose reductase inhibitory constituents of *Nelumbonuciferastamens*. Phytother. Res, 20,825-

LOO, G. 2003. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. J. Nutri Bio. Chem., 14,64-73.

Milan, S. 2011. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. Toxicol. 4(2).69-77.

MIYAZAWA, M. and HISAWA, M. 2003. Antimutagenic activity of phenyl-propanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). J. Agric. Food Chem. 51,6413-6422.

Okuda J., Miwa I., Inagaki K., Horie T. and Nakayama M. 1982. Inhibition of aldose reductases from rat and bovine lenses by flavonoids. Biochem. Pharmacol. 31,3807-3822.

PIRART, J. 1977. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973. Diabetes Metab. 3,245-256.

ROBERT, Y., SHINJI, T. and NAOFUMI, M. 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. Food Chem. 43,1616-1625.

Son, K.H., Pak, U.N., Chinmoy, S. and Ranjan, B. 2005. A sensitive assay of red blood cell sorbitol level by high performance liquid chromatography: potential for diagnostic evaluation of diabetes. Clinica, Chimica, Acta. 354,41-47.

TOMLINSON, D.R., STEVENS, E.J. and DIEMEL, I.T. 1994. Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications. Trends Pharmacol. Sci., 15, 293-297.

Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H. and Osawa, T. 2003. Dietary cyanidin 3-O-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. J. Nutr. 133(7), 2125 - 2130.

- Lee HT, Kim M, Kim M, Kim N, Billings W FT, D'Agati VD, et al. Isoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury and modulates leukocyte infiltration in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F713 - 22.
- Jung KJ, Go EK, Kim JY, Yu BP, Chung HY. Suppression of age-related renal changes in NF- $\kappa$ B and its target gene expression by dietary ferulate. *J Nutr Biochem* 2009;20:378 - 88.
- Li JJ, Lee SH, Kim DK, Jin R, Jung DS, Kwak SJ, et al. Colchicine attenuates inflammatory cell infiltration and extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:F200 - 9.
- Jing P, Giusti AM. Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) color extract. *Food Chem Toxicol* 2007;72:366 - 8.
- Tomlinson, D.R., Stevens, E.J. and Diemel, L.T. 1994. Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetes complications. *Trends Pharmacol Sci* 15, 292 - 298.
- Varmo, J.D., Mikuni T. and Kinoshita J.H. 1975. Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase. *Science*. 188(4194), 1215-1216.
- Varmo, J.D. and Kinoshita, J.H. 1976. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids - their possible role in the prevention of diabetic cataracts. *Biochem. Pharmacol.* 25,2505-2513.
- Wang, C. K. and Lee, W. H. 1996. Separation, characteristics and biological activities of phenolics in Arca fruit. *J. Agric. Food Chem.* 44,2014-2019.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., and Escalera, L. A., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry., *Talanta*,76:965-977,2008.
- Clifford, M.N., Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden., *JournaloftheScienceofFoodandAgriculture*, 80(7):1063-1072,2000
- Glenda, A. M., Julián, C. R., José, J. P., and Ana, M. G., Extraction and identification of anthocyanins from *Smilaxasperal*. berries., *Food Chemistry*, 94:448 - 56,2006.

Gonnet, J. F., Fenet, B., Cyclamen red colors based on a macrocyclic anthocyanin in carnation flowers., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:22 - 6, 2000.

Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., and Shirai, T., 2001. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine., *Cancer Letter*, 171, 17-25.

Hanrahan, G., Lu, K., Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization., *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36:141 - 151, 2006.

Han, X., Shen, T., and Lou, H., Dietary polyphenols and their biological significance., *International Journal of Molecular Science*, 8:950-

Ikuo, S., Tomoyuki, O., Mami, M., Mio, K., Yoichi, N., and Shu, F., Physiological functionality of purple-fleshed sweet potatoes containing anthocyanins and their utilization in foods., *Japan Agricultural Research Quarterly*, 37:167 - 173, 2003.

Kjell, T., and Øyvind, M. A., Color stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values., *Food Chemistry*, 89:427 - 440, 2005.

Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T., and Hasogawa, M., Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice., *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 11(4):273 - 277, 1996.

Koide, T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasogawa, M., and Terabe, K., Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo., *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 12(4):277 - 280, 1997.

Lee, S. Y., Kang, M. J., Kwon, J. H., Shin, S. R., Lee, G. D., and Kim, K. S., Monitoring of total phenolics, electron donating ability and nitrite scavenging ability in microwave-assisted extraction for angelicagigasnakai., *Food Science and Biotechnology*, 12:491 - 496, 2003.

Parisa, S., Reza, H., Elham, G. and Rashid, J. Effect of heating, UV irradiation and pH on stability of the anthocyanin copigment complex., *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10:267 - 272, 2007.

Park, N. Y., Lee, G. D., Jeong, Y. E., and Kwon, J. H., Optimization of extraction conditions for physicochemical properties of ethanol extracts from *Chrysanthemumboreale*, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 27:585-590, 1998.

Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 2005;16:S30-.3.

Kanwar YS, Wada J, Sun L, Nie P, Wallner EL, Chen S, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. Exp Biol Med (Maywood) 2008;233:4-11.

Pozzi A, Voziyan PA, Hudson BG, Zent R. Regulation of matrix synthesis, remodeling and accumulation in glomerulosclerosis. Curr Pharm Des 2009;15: 1318-.33.

Thraikill KM, Clay Bunn R, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Endocrine 2009; 35:1-.10.

Riser BL, Cortes P. Connective tissue growth factor and its regulation: a new element in diabetic glomerulosclerosis. Ren Fail 2001;23:459-.70.

Kang SW, Choi JS, Bae JY, Li J, Kim DS, Kim JL, et al. Blockade of vascular angiogenesis by *Aspergillus usamii* var. *shirousamii*-transformed *Angelicae gigantis* Radix and *Zizyphus jujuba*. Nutr Res Pract 2009;3:3-.8.

Li J, Lee YS, Choi JS, Sung HY, Kim JK, Lim SS, et al. Roasted licorice extracts dampen high glucose induced mesangial hyperplasia and matrix deposition through blocking Akt activation and TGF  $\beta$  signaling. Phytomedicine 2010;17:800-10.

Kang SW, Choi JS, Choi YJ, Bae JY, Li J, Kim DS, et al. Licorice isoliquiritigenin dampens angiogenic activity via inhibition of MAPK-responsive signaling pathways leading to induction of matrix metalloproteinases. J Nutr Biochem 2010;21: 55-65.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업(해당사업 표기)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업(해당사업 표기)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.