GOVP1200511884

최 종
연구보고서

알코올성 간질환 예방 및 치료용 식용생물자원 함유 phytochemicals의 소재화

Materialization of Preventive and Curing Phytochemicals for Alcoholic Liver Disease from the Edible Bio-Resources

알코올성 간섬유화 억제활성 phytochemicals의 소재화
Materialization of Active Phytochemicals for Repression of Alcoholic Liver Fibrosis
알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phytochemicals의 소재화
Materialization of Active Phytochemicals for Protection of Alcohol-induced Oxidative Liver Damage
알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals의 소재화
Materialization of Active Phytochemicals for Control of Alcohol Induced CYP2E1 Activity
알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals의 소재화
Materialization of Active Phytochemicals for Repression of Alcoholic Fatty Liver

고려대학교
(한서대학교, 삼조셀텍 (주))

농 림 부

자료출처 : 알코올성 간질환 예방 및 치료용 식용생물자원 함유 phytochemicals의 소재화 / 농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “알코올성 간질환 예방 및 치료용 식용생물자원 함유 phytochemicals의 소재화” 과제 (세부과제 “알코올성 간섬유화 억제활성 phytochemicals의 소재화, 알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phyochemicals의 소재화, 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals의 소재화, 알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals의 소재화”) 의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 8일

주관연구기관명 : 고려대학교
총괄연구책임자 : 조홍연
세부연구책임자 : 조홍연
세부연구책임자 : 신동훈
세부연구책임자 : 홍범식
연 구 원 : 김동섭
연 구 원 : 양택훈
연 구 원 : 이유현
연 구 원 : 호진녕
연 구 원 : 김미정
연 구 원 : 김무신
연 구 원 : 최수정
연 구 원 : 이대희
연 구 원 : 장덕철
연 구 원 : 김기복
연 구 원 : 김종식
연 구 원 : 엄윤경
연 구 원 : 최월수
협동연구기관명 : 한서대학교
협동연구책임자 : 김혜경

요 약 문

Ⅰ. 제 목

알코올성 간질환 예방 및 치료용 식용생물자원 함유 phytochemicals의 소재화

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

알코올의 과다섭취로 인한 폐해는 간질환을 비롯하여 각종 질환의 병인이 됨은 물론 개인, 가정, 사회의 정서와 생활에 부정적인 영향을 미침으로써 국가적으로 막대한 경제·사회적 손실을 야기한다. 우리나라의 경우 20세 이상 성인 남자의 음주율은 83.3%로 매우 높고 여성의 음주율 또한 54.9%로 급격히 증가하는 추세에 있으며 술잔돌리기, 이어마시기, 술권유하기, 폭음 등 잘못된 음주문화로 인하여 외국에 비해 과음에 심각하게 노출되어 있다. 그럼에도 정부의 정책대안들 즉, 1995년 1월부터 시행되고 있는 국민건강증진법에서 담배의 경우 한갑당 2원씩을 건강증진기금에 출연하도록 되어 있지만 알코올의 경우는 시행되고 있지 않는 점, 선진국에서 실시되고 있는 주류판매의 면허제가 도입되어 있지 않은 점, 미국 NIH의 NIAAA와 같은 알코올 남용 및 중독을 전문적으로 연구하는 국가연구기관이 전무한 점 등 정부와 국민의 대책과 관심이 미미한 상태에 있을 뿐만 아니라 특히도 알코올성 질환에 대한 학·연·산의 연구도 거의 이루어지지 않고 있는 실정에 있다.

본 연구그룹은 알코올성 질환 중 사망률이 가장 높은 간질환의 예방 및 치료용 phytochemicals을 식용생물자원을 대상으로 탐색하고 이를 의약, 의약식품 및 기능성식품의 원료로 소재화함에 있어, 오랫동안 식품으로 이용되어 온 식용생물자원을 탐색대상으로 정함으로써 최종물질의 안전성을 확보, 의약품 및 기능성식품 소재로 실용화될 확률을 높이고자 하였으며 동시에 국민의 바람직한 식생활 모델의 설정에 기여하고자 하였다. 뿐만 아니라 WTO 체제의 출범으로 인한 시장개방 하에서 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 식용생물자원을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 우리나라는 전통발효식품을 비롯하여 식용생물자원의 수가 많고 전래되어 오고 있는 민간식이요법이 다양하여 기술 선진국과의 특허문제를 야기시키지 않고 경쟁력있는 의약용, 식품용, 화장품용 신소재의 창출이 가능하기 때문이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 단위조합 또는 작목반의 형태로 대량 생산되고 있거나 농·임가에서 중·소규모로 재배되고 있는 식용생물자원들로부터 알코올성 간질환 예방 및 치료용 phytochemicals을 의약, 의약식품, 기능성식품의 중간원료로 소재화하는데 연구개발의 최종목표를 두었다. 연구목표의 성공적 수행을 위해 대표적 알코올성 간질환의 직접적인 병인을 조절할 수 있는 Biomarker에 따라 3개의 세부과제와 1개의 협동과제로 연구과제를 구성하였으며 본 사업을 통하여 수행한 주요 연구개발의 내용 및 범위는 다음과 같다.

(1) 간섬유화 억제활성 phytochemicals를 소재화할 목적으로 HSC-T6 cell 및 Wister albino rat을 이용한 *in vitro* assay계의 구축 및 *in vivo* assay 실험 등을 통한 탐색, 유효성 확인, 안전성 검정 등의 시료 선정 관련 분야와 녹차로부터 간섬유화 억제활성성분의 추출, 정제, 구조해석 및 공업적 추출, 부분정제 등의 소재화 관련 분야로 크게 구분하여, 최종선정시료의 실용화 가능성 검토를 연구개발 내용 및 범위로 하였다.

(2) 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phytochemicals를 소재화할 목적으로 HepG2/2E1 cell 및 ICR mouse를 이용한 *in vitro* assay계의 구축 및 *in vivo* assay 실험 등을 통한 탐색, 유효성 확인, 안전성 검정 등의 시료 선정 관련 분야와 녹차로부터 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 성분의 추출, 정제, 구조해석 및 공업적 추출, 부분정제 등의 소재화 관련 분야로 크게 구분하여, 최종선정시료의 실용화 가능성 검토를 연구개발 내용 및 범위로 하였다.

(3) 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals를 소재화할 목적으로 CYP2E1, cytochrome P450 reductase, cytochrome b_5를 과량 발현시킨 *E. coli*의 membrane fraction 및 ICR mouse를 이용한 *in vitro* assay계의 구축 및 *in vivo* assay 실험 등을 통한 탐색, 유효성 확인, 안전성 검정 등의 시료 선정 관련 분야와 보리로부터 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 성분의 추출, 정제, 구조해석 및 공업적 추출, 부분정제 등의 소재화 관련 분야로 크게 구분하여, 최종선정시료의 실용화 가능성 검토를 연구개발 내용 및 범위로 하였다.

(4) 알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals를 소재화 할 목적으로 HepG2/2E1 cell 및 Sprague-Dawley rat을 이용한 *in vitro* assay계의 구축 및 *in vivo* assay 실험 등을 통한 탐색, 유효성 확인, 안전성 검정 등의 시료 선정 관련 분야와 도라지로부터 알코올성 지방간 억제활성성분의 추출, 정제, 구조해석 및 공업적 추출, 부분정제 등의 소재화 관련 분야로 크게 구분하여, 최종선정시료의 실용화 가능성 검토를 연구개발 내용 및 범위로 하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

알코올성 간질환 예방 및 치료용 식용생물자원 함유 phytochemicals의 소재화를 최종 목적으로 수행한 연구개발 결과를 요약하면 다음과 같다.

(1) 식용생물자원 200 여종을 용매의 극성에 따라 계통추출한 후 각각의 획분에 대하여 간섬유화 억제활성, 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성, 알코올 유도 CYP2E1 조절활성, 알코올성 지방간 억제활성(협동과제)을 검색한 결과 각각 녹차, 녹차, 보리, 도라지가 선정되었다.

(2) 녹차로부터 추출한 간섬유화 억제활성물질은 HSC-T6 cell을 사용한 *in vitro* 실험결과 메탄올 추출물 100 *u*g/ml의 농도에서 약 25%의 억제활성을 나타내었으며 Wister albino rat을 사용한 *in vivo* 실험에서도 조직학적, 생화학적으로 높은 억제활성을 보였다. 분리한 물질을 구조해석한 결과 EGCG로 판명되었고 100 *u*M 농도에서 40% 이상의 알코올성 간섬유화 억제활성을 보였을 뿐만 아니라 DMN으로 처리한 일반 간 섬유화 동물실험에서도 유의성 높은 활성을 보였다(특허출원 제 04-65039).

(3) 녹차로부터 추출한 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성물질은 HepG2/2E1 cell을 사용한 *in vitro* 실험과 ICR mouse를 사용한 *in vivo* 실험에서 각각 약 80%와 약 35%의 보호활성을 나타내었다. 분리한 물질을 구조해석한 결과 ECG로 판명되었고 시판 vitamin E 보다 약 20% 높은 보호활성을 보였으며 이 보호활성의 기전은 ROS 생성저해에 기인함을 알 수 있었다(특허출원 제 04-65040).

(4) 보리로부터 추출한 알코올 유도 CYP2E1 저해활성물질은 CYP2E1을 transduction 시킨 *E. coli* 의 membrane fraction 및 ICR mouse를 사용한 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 각각 약 22% 및 약 90% 저해활성을 나타내었으며 분리 물질을 구조해석한 결과 procyanidin B_3로 판명되었다(특허출원 제 04-64127).

(5) 도라지로부터 추출한 알코올성 지방간 억제활성물질은 HepG2 2E1LNCX cell을 사용한 *in vitro* 실험에서 48%의 높은 지방간 억제활성을 보였으며 Sprague-Dawley rat을 사용한 *in vivo* 실험에서도 대표적인 생화학 지표인 TG의 함량을 대조구에 비해 약 2.5배 감소시키는 효과를 나타내었다. 분리한 물질을 구조해석한 결과 분자량 418의 phthalic acid -diisononylester 또는 hydroxyl alkyl ester 물질로 추정되었다(특허출원 제 04-64128).

본 연구개발 결과의 활용에 대한 건의사항은 없음.

결과의 활용에 대한 사항은 출원한 특허 4 건을 중심으로 참여기업인 삼조셀텍(주)과 향후 긴밀히 협의하여 실용화 관련 연구를 지속적으로 수행할 계획으로 있음.

SUMMARY

Ⅰ. Contents and scope of the project

The aim of the present study was to materialize physiologically bio-active phytochemicals preventive and/or remedy for alcoholic liver disease from natural edible plants. The whole project was consisted of 3 sub-projects and 1 cooperative project organized by major biomarkers for etiological cause of alcoholic liver disease. The contents and scope of each project were as follows:

Sub-project 1 : To materialize bio-active phytochemicals inhibiting alcohol-induced liver fibrosis, HSC-T6 cell line and Wistar albino rats were used for *in vitro* and *in vivo* assay system, respectively. Screening, efficacy confirmation, and safety verification procedures were conducted, and extraction and refining of inhibitory component of liver fibrosis were performed. And then, structure analysis, extraction of industrial level, and partial refining were carried out to examine the possibility of practical use of selected sample, green tea(*Camellia sinensis*).

Sub-project 2 : To materialize bio-active phytochemicals protecting liver cells from oxidative damage, HepG2/2E1 cell line and ICR mouse were used for *in vitro* and *in vivo* assay system, respectively. Screening, efficacy confirmation, and safety verification procedures were conducted, and extraction and refining of protective component of oxidative stress from green tea(*Camellia sinensis*) were performed. And then, structure analysis, extraction of industrial level, and partial refining were carried out to examine the possibility of practical use of selected sample.

Sub-project 3 : To materialize bio-active phytochemicals regulating alcohol-induced CYP2E1, membrane fraction of *E. coli* over-expressed CYP2E1, cytochrome P450 reductase, and cytochrome b5, were used for *in vitro* assay system, and ICR mouse were used for *in vivo* assay system. Screening, efficacy confirmation, and safety verification procedures were conducted, and extraction and refining of CYP2E1 activity regulatory component from barley(*Hordeum vulgare* var. *hexastichon*) were performed. And then, structure analysis, extraction of industrial level, and partial refining were carried out to examine the possibility of practical use of selected sample.

Cooperative project 4 : To materialize bio-active phytochemicals moderating fatty liver induced by alcohol, HepG2/2E1 cell line and Sprague-Dawley rats were used for *in vitro* and *in vivo* assay system, respectively. Screening, efficacy confirmation, and safety verification procedures were conducted, and extraction and refining of inhibitory component of alcoholic fatty liver from Doragi(*Platycodon grandiflorum*) were performed. And then, structure analysis, extraction of industrial level, and partial refining were carried out to examine the possibility of practical use of selected sample.

Ⅱ. Results and Application of the project

Approximately 160 kinds of edible plants were serially extracted according to solvent solubility. Each fraction was screened for the liver fibrosis inhibitory activity, liver cell protective activity against oxidative stress, alcohol-induced CYP2E1 regulatory activity, and alcoholic fatty liver inhibitory activity (cooperative project), and the selected samples were green tea(*Camellia sinensis*), green tea(*Camellia sinensis*), barley(*Hordeum vulgare* var. *hexastichon*), and Doragi(*Platycodon grandiflorum*), respectively. The summary of the results and application of present study are as follows:

Sub-project 1 : The inhibitory component of liver fibrosis extracted from green tea exhibited high inhibitory activity *in vitro* experiment using HSC-T6 cell, as well as *in vivo* experiment using Wistar albino rats. In addition, this component revealed no toxic symptoms. The component was identified as EGCG by structure analysis, and other green tea catechins were also revealed inhibitory activity in liver fibrosis.

Sub-project 2 : The liver protective component against the oxidative stress extracted from green tea exhibited high protective activity *in vitro* experiment using HepG2/2E1 cell line, as well as *in vivo* experiment using ICR mouse. In addition, this component revealed no toxic symptoms. The component was identified as ECG by structure analysis, and other green tea catechins were also revealed protective activity in alcoholic liver damage.

Sub-project 3 : The alcohol-induced CYP2E1 activity regulatory component extracted from barley revealed high regulatory activity *in vitro* experiment using membrane fraction of *E. coli*, as well as *in vivo* experiment using ICR mouse. In addition, this component revealed no toxic symptoms, and the IC_{50} of the isolated component was very low.

Cooperative projective 4 : The inhibitory component of alcoholic fatty liver extracted from Doragi(*Platycodon grandiflorum*)showed high inhibitory activity *in vitro* experiment using HepG2/2E1 cell line, as well as *in vivo* experiment using Sprague-Dawley rats. In addition, this component revealed no toxic symptoms. The component was speculated as phthalic acid- diisononylester or hydroxyl alkyl ester substance with molecular weight of 418 by structure analysis.

Physiologically bio-active phytochemicals from natural edible plants were screened, isolated, characterized and materialized for neutraceuticals.

CONTENTS

Summary (Korean) ····· 2
Summary (English) ····· 6
Contents (English) ····· 9
Contents (Korean) ····· 15

Part 1. The Outline for Research and Development ····· 20

Chapter 1. The Purpose and Limit for Research and Development ····· 20

Chapter 2. The Need of Research and Development ····· 21

Part 2. The Present Condition of Technical Development ····· 25

Part 3. Results and Research Development ····· 26

Chapter 1. Materialization of Active Phytochemicals for Repression of Alcoholic Liver Fibrosis ····· 26
1. Introduction ····· 26
2. Materials and Methods ····· 28
A. Samples and Reagents ····· 28
B. Experimental Approach ····· 28
a. Sample preparation for screening of active phytochemicals ····· 28
b. *In vitro* assay for screening of active phytochemicals ····· 29
c. *In vivo* toxicity test of active phytochemicals ····· 30
d. *In vivo* efficacy assay system ····· 30
e. Extraction and preparation of green tea ····· 33
f. Isolation and purification of active isolate from green tea ····· 34
g. Structure analysis of active isolate from green tea ····· 34
3. Results and Discussion ····· 34
A. Screening of active phytochemicals from edible plants ····· 34
a. First screening of active phytochemicals ····· 34
b. Second screening of active phytochemicals ····· 34
c. *In vivo* toxicity of active phytochemicals ····· 44
d. *In vivo* efficacy assay ····· 45

B. Purification and characterization of active phytochemicals ····· 50
a. Extraction of active phytochemicals from green tea ····· 50
b. Effect of active phytochemicals from green tea in the first silica-gel column chromatography ····· 51
c. Effect of active phytochemicals from green tea in the second silica-gel column chromatography ····· 51
d. Thin-layer chromatography ····· 53
e. Isolation of active phytochemicals from green tea in HPLC ····· 54
C. Structural analysis of collagen type Ⅰ inhibitor ····· 54
D. Collagen type Ⅰ inhibitory activity of isolate from green tea ····· 57
E. Collagen type Ⅰ inhibitory activity of catechins ····· 58

Chapter 2. Materialization of Liver Protective Phytochemicals for Alcoholic Oxidative Damage ····· 59

1. Introduction ····· 59
2. Materials and Methods ····· 60
A. Samples and Reagents ····· 60
B. Experimental Approach ····· 61
a. Sample preparation for screening of liver protective phytochemicals · 61
b. *In vitro* assay of liver protective phytochemicals ····· 62
c. *In vivo* toxicity test ····· 63
d. *In vivo* efficacy assay system for liver protective phytochemicals 63
e. Extraction and separation of green tea ····· 64
f. Purification and isolation of liver protective phytochemical from green tea ····· 66
g. Structural analysis of isolate from green tea ····· 66
3. Results and Discussion ····· 66
A. Screening of liver protective phytochemicals from edible plants ····· 66
a. Screening of liver protective phytochemicals ····· 66
b. *In vivo* toxicity of liver protective phytochemicals ····· 66
c. *In vivo* efficacy assay of liver protective phytochemicals ····· 67
B. Purification and characterization of liver protective phytochemicals ·· 80
a. Extraction of liver protective phytochemicals from green tea ····· 80
b. Effect of liver protective phytochemicals from green tea in silica-gel column chromatography ····· 81
c. Isolation of liver protective phytochemicals from green tea in HPLC · 81

C. Purification and characterization of isolate from green tea ····· 81
D. Protective effect of ECg on alcohol-induced liver demage ····· 81
E. Protective effect of catechins on alcohol-induced liver demage ····· 82

Chapter 3. Materialization of Phytochemicals for Activity Control of Alcohol Induced CYP2E1 Activity ····· 89
1. Introduction ····· 89
2. Materials and Methods ····· 90
A. Samples and Reagents ····· 90
B. Experimental Approach ····· 90
a. Sample preparation ····· 90
b. Determination of CYP2E1 inhibitor assay system ····· 92
c. Acute toxicity of *Hordeum vulgare* var. *hexastichon in vivo* ····· 92
d. CYP2E1 inhibitory activity of *Hordeum vulgare* var. *hexastichon in vivo* ·· 93
e. Preparation of *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ····· 94
f. Isolation and Purification of CYP2E1 inhibitor from *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ····· 95
g. Structural analysis of isolated from *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ····· 97
3. Results and Discussion ····· 97
A. Screening of CYP2E1 inhibitor from edible plants ····· 97
a. First, second screening of CYP2E1 inhibitor from edible plants ····· 97
b. Acute toxicity of *Hordeum vulgare* var. *hexastichon in vivo* ····· 97
c. *In vivo* efficacy assay of *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ····· 97
B. Isolation and Purification of CYP2E1 inhibitor from *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ····· 110
a. Extraction and separation of *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ··· 110
b. Purification and characterization of CYP2E1 inhibitor ····· 111
C. Structural analysis of purified isolate from *Hordeum vulgare*. ····· 112

Chapter 4. Materialization of Active Phytochemicals for Repression of Alcoholic Fatty Liver ····· 116
1. Introduction ····· 116
2. Materials and Methods ····· 118

A. Samples and Reagents ····· 118
B. Experimental Approach ····· 118
a. Sample preparation ····· 118
b. Active phytochemicals assay system for repression of alcoholic fatty liver 120
c. Acute toxicity of *Platycodon grandiflorum in vivo* ····· 120
d. Alcoholic fatty liver repression activity of *Platycodon grandiflorum in vivo* 122
e. Preparation of *Platycodon grandiflorum* ····· 125
f. Isolation and purification of alcoholic fatty liver repression phytochemicals from *Platycodon grandiflorum* ····· 127
g. Structure analysis of alcoholic fatty liver repression phytochemicals from *Platycodon grandiflorum* ····· 127
3. Results and Discussion ····· 127
A. Screening and selection of alcoholic fatty liver repression phytochemicals from edible plants ····· 127
a. Frist screening of alcoholic fatty liver repression phytochemicals from edible plants ····· 127
b. Second screening of alcoholic fatty liver repression phytochemicals from edible plants ····· 127
c. Acute toxicity of *Platycodon grandiflorum in vivo* ····· 137
d. Alcoholic fatty liver repression activity of *Platycodon grandiflorum in vivo* ··· 138
B. Isolation and purification of alcoholic fatty liver repression phytochemicals from *Platycodon grandiflorum* ····· 146
a. Extraction and separation of *Platycodon grandiflorum* ····· 146
b. First silica gel 60 open column chromatography ····· 147
c. Second silica gel 60 open column chromatography ····· 147
d. Prep-Thin layer chromatography ····· 148
e. HPLC ····· 149
C. Structure analysis of purified PG-2a ····· 151

Chapter 5. Materialization of Physiologically Bio-active Substance from Edible Plants for Neutraceuticals ····· 154
1. Introduction ····· 154
2. Optimization of industrial conditions ····· 155
A. Industrial extraction and purification procedures for repression activitor of alcoholic liver fibrosis from green tea ····· 155
B. Industrial extraction and purification procedures for liver protective

phytochemicals from green tea ····· 157
C. Industrial extraction and purification procedures for CYP2E1 inhibitor from *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* ····· 160
D. Industrial extraction and purification procedures for Alcoholic fatty liver repression phytochemicals from *Platycodon grandiflorum* ····· 162
3. Partial purification method of phytochemicals at the bench-scale level ····· 165
A. Partial purification of alcoholic liver fibrosis-inhibitory phytochemicals from green tee at the bench-scale level ····· 165
a. Fractionation of methanol extracts from green tee using organic solvents ····· 165
b. Decolorization of methanol fractions ····· 165
c. Ultrafiltration ····· 166
d. Diaion HP-20 open column chromatography ····· 166
B. Partial purification of alcoholic liver protective phytochemicals from green tee at the bench-scale level ····· 169
a. Fractionation of methanol extracts from green tee using organic solvents ····· 169
b. Decolorization of methanol fractions ····· 169
c. Ultrafiltration ····· 170
d. Diaion HP-20 open column chromatography ····· 170
C. Partial purification of CYP2E1 inhibitory phytochemicals from *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* at the bench-scale level ····· 173
a. Fractionation of methanol extracts from *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* using organic solvents ····· 173
b. Decolorization of methanol fractions ····· 173
c. Diaion HP-20 open column chromatography ····· 174
D. Partial purification of alcoholic fatty liver repression phytochemicals from *Platycodon grandiflorum* at the bench-scale level ····· 177
a. Fractionation of methanol extracts from *Platycodon grandiflorum* using organic solvents ····· 177
b. Decolorization of methanol fractions ····· 177
c. Silica gel 60 open column chromatography ····· 178

Chapter 6. Quality Evaluation of Each Partially Purified Compounds from Edible Plants for Neutraceuticals ····· 181
1. Materials and Methods ····· 181
A. Production of beverage ····· 181
B. Production of capsule ····· 181
C. Production of granule ····· 181
2. Results ····· 181
A. Production of beverage ····· 181
B. Production of capsule ····· 183
C. Production of granule ····· 184
D. Appearance of end-product and contamination of microorganism ···· 185

Part 4. Achievements of Purpose and Rest of Relative Field ····· 187

Chapter 1. Purpose of Research and Development and Achievement ····· 187

Chapter 2. The Rest of Relative Field ····· 191

Part 5. Results of Research and Development and Applicative Plan ····· 192

Part 6. Collection of Foreign Informations ····· 193

Part 7. References ····· 195

APPENDIX Ⅰ. Publications ····· 200
APPENDIX Ⅱ. Patent ····· 219

목 차

요약문 (한글) ····· 2
요약문 (영어) ····· 6
목 차 (영어) ····· 9
목 차 (한글) ····· 15

제 1장 연구개발과제의 개요 ····· 20

제 1절 연구개발과제의 목적과 범위 ····· 20

제 2절 연구개발의 필요성 ····· 21

제 2장 국내외 기술개발 현황 ····· 25

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 26

제 1절 알코올성 간섬유화 억제활성 phytochemicals의 소재화 ····· 26
1. 서 설 ····· 26
2. 재료 및 방법 ····· 28
가. 재료 및 시약 ····· 28
나. 실험방법 ····· 28
1) 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 검색 시료 조제 ····· 28
2) 알코올성 간섬유화 억제활성 *in vitro* assay계 ····· 29
3) 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 *in vivo* 안전성 실험 ····· 30
4) 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 *in vivo* 유효성 assay계 ····· 30
5) 녹차로부터 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 추출 및 분획 ····· 33
6) 녹차로부터 간섬유화 억제활성물질의 분리 및 정제 ····· 34
7) 녹차 함유 간섬유화 억제활성물질의 구조분석 ····· 34
3. 결과 및 고찰 ····· 34
가. 식용식물소재로부터 알코올성 간섬유화 억제활성물질 검색 ····· 34
1) 알코올성 간섬유화 억제활성물질 1차 검색 ····· 34
2) 알코올성 간섬유화 억제활성 시료의 2차 검색 ····· 34
3) 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 *in vivo* 안전성 실험 ····· 44
4) *In vivo*에서의 알코올성 간섬유화 억제활성 ····· 45

나. 녹차 함유 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 정제 ····· 50
1) 녹차의 methanol 추출 및 유기용매 분획 ····· 50
2) 1차 silical-gel column chromatograpy ····· 51
3) 2차 silical-gel column chromatograpy ····· 51
4) Prep-Thin layer chromatography ····· 53
5) HPLC ····· 54
다. 정제물질의 구조해석 ····· 54
라. 녹차로부터 분리된 EGCG의 collagen type Ⅰ 억제활성 ····· 57
마. 시판 카테킨류의 collagen type Ⅰ 억제활성 ····· 58

제 2절 알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phyochemicals의 소재화 ··· 59
1. 서설 ····· 59
2. 재료 및 실험방법 ····· 60
가. 재료 및 시약 ····· 60
나. 실험방법 ····· 61
1) 알코올성 간세포 보호활성물질 검색용 시료의 조제 ····· 61
2) 간세포 보호활성 *in vitro* assay계 ····· 62
3) 알코올에 의한 간세포 보호활성물질의 *in vivo* 독성실험 ····· 63
4) *In vivo*에서의 시료에 의한 cytochrome P450 2E1 저해활성 측정 ····· 63
5) 선정시료 녹차의 methanol 추출 및 유기용매 분획 ····· 64
6) 녹차로부터 알코올에 의한 간손상 보호물질의 분리 및 정제 ····· 66
7) 녹차 함유 알코올성 간손상 보호물질의 구조분석 ····· 66
3. 결과 및 고찰 ····· 66
가. 식용생물자원으로부터 알코올 간손상 보호물질의 검색 및 시료의 선정 66
1) 식용생물자원으로부터 알코올성 간손상 보호물질의 1차 검색 ····· 66
2) 선정시료 녹차의 *in vivo* 독성 실험 ····· 66
3) 선정된 간세포 보호활성물질의 *in vivo* 유효성 실험 ····· 67
나. 선정된 간세포 보호활성물질의 정제 ····· 80
1) 녹차에서 간세포 보호활성물질의 탐색을 위한 1차 물질 분리 ····· 80
2) 1, 2차 Silical-gel 60 column chromatography에 의한 녹차 methanol 추출물질의 분리 ····· 81
3) HPLC에 의한 *Camellia sinensis* methanol 추출물의 활성물질 분리 · 81
다. 정제물질의 구조분석 및 동정 ····· 81
라. 녹차로부터 분리된 epicatechin gallate(Ecg)의 간세포 보호활성 ····· 81
마. 녹차 카테킨류들의 in vitro 간세포 보호활성 ····· 82

제 3절 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals의 소재화 ····· 89
1. 서설 ····· 89
2. 재료 및 실험방법 ····· 90
가. 재료 및 시약 ····· 90
나. 실험방법 ····· 90
1) CYP2E1 저해활성물질 검색용 시료의 조제 ····· 90
2) CYP2E1 저해활성활성 *in vitro* assay계 ····· 92
3) CYP2E1 저해활성물질의 *in vivo* 독성 실험 ····· 92
4) CYP2E1 저해활성물질의 *in vivo* 유효성 실험 ····· 93
5) 선정 시료 보리의 메탄올 추출 및 유기용매 분획 ····· 94
6) 보리로부터 CYP2E1 활성억제물질의 분리 및 정제 ····· 95
7) 정제물질의 구조분석 및 동정 ····· 97
3. 결과 및 고찰 ····· 97
가. 식용식물로부터 CYP2E1 저해활성물질 검색 ····· 97
1) 식용식물로부터 CYP2E1 저해활성물질의 1차, 2차 검색 ····· 97
2) 선정된 보리 methanol 추출물 *in vivo* 독성 실험 ····· 97
3) *In vivo*에서의 CYP2E1 저해활성 ····· 97
나. 보리 함유 CYP2E1 저해활성물질의 정제 ····· 110
1) 보리의 methanol 추출 및 유기용매 분획 ····· 110
2) 보리로부터 CYP2E1 저해활성물질의 분리 및 정제 ····· 111
다. 정제물질의 구조해석 ····· 112

제 4절 알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals의 소재화 ····· 116
1. 서설 ····· 116
2. 재료 및 실험방법 ····· 118
가. 재료 및 시약 ····· 118
나. 실험방법 ····· 118
1) 알코올성 지방간 억제활성물질 검색 시료의 조제 ····· 118
2) 알코올성 지방간 억제활성 *in vitro* assay계 ····· 120
3) 알코올성 지방간 억제활성물질의 *in vivo* 안전성 실험 ····· 120
4) *In vivo*에서의 알코올성 지방간 억제활성 측정 ····· 122
5) 선정시료 도라지 methanol 추출 및 유기용매 분획 ····· 125
6) 도라지로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 분리 및 정제 ····· 127
7) 도라지 함유 알코올성 지방간 억제활성물질의 구조 분석 ····· 127

3. 결과 및 고찰 ····· 127
가. 식용식물로부터의 알코올성 지방간 억제활성물질의 검색 ····· 127
1) 식용식물로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 1차 검색 ····· 127
2) 알코올성 지방간 억제활성 시료의 2차 검색 ····· 127
3) 알코올성 지방간 억제활성물질의 *in vivo* 안전성 ····· 137
4) *In vivo*에서의 알코올성 지방간 억제활성 ····· 138
나. 도라지 함유 알코올성 지방간 억제활성물질의 정제 ····· 146
1) 도라지의 methanol 추출 및 유기 용매 분획 ····· 146
2) 1차 silica gel 60 open column chromatography ····· 147
3) 2차 silica gel 60 open column chromatography ····· 147
4) Prep-Thin layer chromatography ····· 148
5) HPLC ····· 149
다. 정제물질의 구조해석 ····· 151

제 5절 알코올성 간질환 예방 및 치료용 식용생물자원 함유 phytochemicals의 소재화 ····· 154
1. 서설 ····· 154
2. 활성 phytochemicals의 추출조건 최적화 및 공업적 수준의 정제방법 확립 ·· 155
가. 녹차로부터 간섬유화 억제활성물질의 공업적 추출 및 정제 ····· 155
나. 녹차로부터 간세포 보호활성물질의 공업적 추출 및 정제 ····· 157
다. 보리로부터 CYP2E1 저해활성성분의 공업적 추출 및 정제 ····· 160
라. 도라지로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 공업적 추출 및 정제 162
3. 활성 phytochemicals의 bench-scale 수준적 부분정제방법 확립 ····· 165
가. 녹차(Camellia sinensis)로부터 간섬유화 억제물질의 bench-scale 수준적 부분정제방법 ····· 165
1) 녹차 methanol 추출물의 유기용매 분획 ····· 165
2) Methanol 분획물의 탈색 ····· 165
3) Ultrafiltration ····· 166
4) Diaion HP-20 open column chromatography ····· 166
나. 녹차(Camellia sinensis)로부터 간세포 보호활성 성분의 bench-scale 수준적 정제방법 ····· 169
1) Methanol 추출물의 hexane 및 chloroform ····· 169
2) Methanol 분획물의 탈색 ····· 169
3) Ultrafiltration ····· 170
4) Diaion HP-20 open column chromatography ····· 170

다. 보리(Horedeum vulgare)로부터 CYP2E1 저해활성 성분의 bench-scale 수준적 정제방법 ····· 173
1) 보리 methanol 추출물의 유기용매 분획 ····· 173
2) Methanol 분획물의 탈색 ····· 173
3) Diaion HP-20 column chromatography ····· 174
라. 도라지(Platycodon grandiflorum)로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 bench-scale 수준적 정제방법 ····· 177
1) Methanol 추출물의 hexane 및 acetone 분획 ····· 177
2) Methanol 분획물의 탈색 ····· 177
3) Silica gel 60 open column chromatography ····· 178

제 6절 알코올성 간질환용 phytochemicals의 기능성 식품화 ····· 181
1. 재료 및 방법 ····· 181
가. 드링크제 제작 ····· 181
나. 연질 캡슐 제작 ····· 181
다. 과립제 제작 ····· 181
2. 결 과 ····· 181
가. 드링크제 제작 ····· 181
나. 연질 캡슐 제작 ····· 183
다. 과립제 제작 ····· 184
라. 제품의 외관 및 안정성 검사 ····· 185

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 187

제 1절 연구개발 목표 달성도 ····· 187

제 2절 관련분야에의 기여도 ····· 191

제 5장 연구개발결과의 활용계획 ····· 192

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 193

제 7장 참고문헌 ····· 195

부록 Ⅰ. 학회 발표 및 논문 발표 ····· 200
부록 Ⅱ. 특 허 ····· 219

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발과제의 목적과 범위

최근 식품성분에 대해 새로운 관점에서 계통적, 조직적인 연구가 발전함에 따라 식품기원의 특정 성분들이 인체의 신경계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등 각종 생리기능조절계에 작용하여 직·간접으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 이들 특정성분들에 의한 생체조절계 및 생체방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 전인류적 규모의 지속적이고도 가장 자연스러운 건강유지를 위한 강력한 수단이 될 수 있음을 의미한다. 식품에 도입되고 있는 생체조절성 3차기능은 질병을 발병의 전단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고령화 사회에서 기능성식품 및 의약식품의 수요가 합성의약품을 상회할 것으로 예측되고 있기도 하다.

본 연구개발과제의 목적은 알코올성 질환 중 사망률이 가장 높은 간질환의 예방 및 치료용 phytochemicals을 식용생물자원을 대상으로 탐색하고 이를 의약, 의약식품 및 기능성식품의 원료로 소재화함에 있어, 오랫동안 식품으로 이용되어 온 식용생물자원을 탐색대상으로 정함으로써 최종물질의 안전성을 확보, 의약품 및 기능성식품 소재로 실용화될 확률을 높이고자 하며 동시에 국민의 바람직한 식생활 모델의 설정에 기여하고자 한다. 뿐만 아니라 WTO 체제의 출범으로 인한 시장개방 하에서 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 식용생물자원을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 우리나라는 전통발효식품을 비롯하여 식용생물자원의 수가 많고 전래되어 오고 있는 민간식이요법이 다양하여 기술 선진국과의 특허문제를 야기시키지 않고 경쟁력있는 의약용, 식품용, 화장품용 신소재의 창출이 가능한 강점을 가지고 있다.

이를 위해 본 연구그룹이 정한 과제의 범위는 국내에서 단위조합 또는 작목반의 형태로 대량 생산되고 있거나 농・임가에서 중・소규모로 재배되고 있는 식용생물자원들로부터 알코올성 간질환 예방 및 치료용 phytochemicals을 의약, 의약식품, 기능성식품의 중간원료로 소재화시키는데 요구되는 탐색기술, 소재생산기술, 제품화기술 등을 개발하는데 있다. 즉 대표적 알코올성 간질환의 직접적인 병인을 조절할 수 있는 biomarker에 따라 3개의 세부과제(알코올성 간섬유화 억제활성 phytochemicals의 소재화, 알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phytochemicals의 소재화, 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals의 소재화)와 1개의 협동과제(알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals의 소재화)로 연구과제를 구성하여 알코올성 간질환의 예방, 개선 및 치료용 소재를 실용화시키는데 연구의 범위를 두고 있다.

제2절 연구개발의 필요성

본 연구그룹은 대표적 알코올성 간질환인 지방간 및 간경변의 직접적 병인으로 작용하고 있는 extracellular matrix(ECM) protein, 활성산소종(reactive oxygen species : ROS), cytochrome P450 2E1(CYP2E1) 및 liver fatty acid binding protein(L-FABP)을 biomaker로 이용하여 알코올성 간질환 예방 및 치료용 phytochemicals를 탐색하고 이를 소재화하는데 연구의 최종 목표를 두고 있다. 각 세부과제별 연구개발의 기술적 필요성을 기술하면 다음과 같다.

(제 1 세부과제) 알코올성 간섬유화 억제활성 phytochemicals의 소재화 : 간섬유화(liver fibrosis)와 간경변(cirrhosis)은 각종 간질환의 병리학적 경로에 있어 최종 단계의 질환으로 받아 들여지고 있다. 정상적인 간세포의 섬유화 과정은 hepatic stellate cells(HSCs, lipocytes, fat-storing cells, Vit.A-storing cells, Ito cells)이 1차적으로 활성화되면서 collagen type I 을 비롯한 ECM protein들이 합성, 분비됨으로써 발병하는 비교적 단순한 과정이지만 HSCs의 활성화에 관여하는 인자들 및 이들의 기작과 matrix protein들의 생합성, 분비 및 분해에 관련된 연구는 부분적으로 보고되고 있을 뿐 명확히 규명되어 있지 않다. 현재 간섬유화의 예방 및 치료에 있어 중점적으로 연구되고 있는 분야는 크게 ① HSCs의 활성화를 되돌리거나 억제시키는 연구, ② ECM protein들의 합성을 억제 또는 ③ 생성된 ECM protein들의 분해를 촉진시키는 연구, ④ collagenase 등의 matrix metalloproteinases(MMPs) gene의 발현을 증가시키는 연구 및 ⑤ tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMPs)와 같은 MMPs 저해인자들의 함량을 감소시키는 연구 등으로 구분할 수 있다. 이들 중 간경변환자의 치료용 의약은 주로 ③ ④ ⑤항, 간섬유화 예방용 소재는 ① ②항과 관련된 기작의 해명 및 물질의 개발에 연구의 관심이 모아지고 있다. 한편 간섬유화에 있어 알코올의 작용은 oxidative stress에 의해 c-myb, NF-κB가 유도되거나 IGF, TGFβ1, cytokine 등이 관여하여 stellate cell을 활성화시키는 것으로 일부 밝혀지고 있다. 따라서 알코올은 간섬유화 과정의 초기 핵심단계에 관여하고 있을 뿐만 아니라 식용생물자원은 이미 anti-oxidative phytochemicals의 보고로 알려져 있기 때문에 알코올성 간섬유화 억제물질의 검색과 소재화는 실용화될 가능성이 매우 높은 과제라 할 수 있다.

(제 2 세부과제) 알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phyochemicals의 소재화 : 알코올은 간내 산화시 필수적으로 활성산소종을 생성한다. 따라서 알코올에 의한 간손상은 활성산소종에 의한 손상이라 할 수도 있다. 이들은 주로 MEOS계의 CYP2E1에 의해 생성되나 일부는 다른 계에서도 생성되어 대부분은 간내 존재하는 antioxidant(GSH 등) 또는 antioxidant enzyme(SOD 등)에 의해

소거되지만 잔존할 경우 간 손상의 주요 원인물질로 작용한다. 활성산소종들 중 $O_2^{-}\cdot$, ·OH, H_2O_2 및 1-hydroxyethyl radical(HER)은 CYP2E1에 의해 주로 생성되지만 ADH계에 의한 redox shift와 acetaldehyde로부터 aldehyde oxidase 및 xanthine oxidase에 의해 $O_2^{-}\cdot$, ·OH 등이 생성된다. 이들은 간의 지질을 과산화시킴으로써 간의 섬유화에 관여하고, 단백질을 carbonyl화하여 transferrin, ferritin 등의 간 단백질 변성과 지방간을 촉진시키며, 간세포의 DNA를 fragmentation시킨다. 특히 hydroxy radical과 alcohol의 반응에 의해 생성되는 hydroxyethyl radical은 간내에 이들을 소거하는 효소계가 존재하지 않기 때문에 최근 간손상의 핵심 radical로 주목을 받고 있다. 따라서 알코올성 간질환의 예방 및 치료용 소재개발에 있어 활성산소종의 생성억제 물질, 생성된 활성산소종의 소거 물질 또는 활성산소종의 산화적 손상에 대한 세포보호성 물질의 검색 및 소재화는 알코올성 간질환의 예방에 있어 중심과제라 할 수 있다.

(제 3 세부과제) 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals의 소재화 : CYP2E1은 NADPH-cytochrome P-450 reductase와 함께 microsomal ethanol-oxidazing system(MEOS)에서 알코올의 산화에 핵심적인 역할을 수행하고 있다. 급성 알코올의 섭취시 ADH에 의해 산화되어 acetaldehyde로 전환되는 반면 알코올 중독자 또는 만성 알코올 섭취자의 경우 CYP2E1이 관여하면서 acetaldehyde의 생성과 동시에 HER을 비롯한 수종의 ROS를 생성한다. 특히 알코올의 만성섭취에 의해 inducible form으로 유도된 CYP2E1은 각종 radical을 과량생성함으로써 GSH에 의해 소거되지 않고 지질과산화를 비롯하여 활성산소에 의한 손상을 일으킨다. CYP2E1이 유도되는 정도와 MDA 생성량 증가, ferritin으로부터 철의 유리량 증가에 의한 지질 과산화는 직접적인 관련을 갖고 있으며, 만성적으로 알코올을 섭취한 실험동물 및 사람에 있어 CYP2E1의 활성은 크게 증가하고 있다. 알코올에 의해 유도된 CYP2E1의 양은 drug 대사에도 영향을 미쳐 정상적인 microsomal detoxication 활성을 증가시킴으로써 과량의 약물투여를 유발하여 약물증독증상의 원인이 되기도 한다. 따라서 알코올성 간질환 중 지질의 과산화에 의한 간질환 및 활성산소에 의한 간손상을 예방하기 위한 phytochemicals의 소재화에 있어 이들의 직접적인 원인으로 작용하는 CYP2E1의 생합성과 활성을 조절할 수 있는 물질의 검색은 필수적이라 할 수 있다.

(협동과제) 알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals의 소재화 : 장쇄 지방산은 생체조직의 주요 에너지 급원인 동시에 막에 존재하는 지방이나 다른 지방 합성에 필수적인 영양소이다. 일부 세포들은 지방산을 합성하여 이용하기도 하지만 대부분 세포들은 혈액에서 공급되는 지방산을 이용한다. 지방산은 소수성 물질이므로 수용성인 혈액에서 세포막까지 운반되기 위하여 알부민과 결합되어 운반된다. 그러나 알부민은 세포막을 통과할 수 없고 세포내는 수용성 환경이므로 지방

산이 세포막을 통과한 후 세포내 소기관까지의 이동에는 지방산 결합단백질(fatty acid binding protein, FABP)과 결합하여 이동한다. Liver FABP(L-FABP)는 장쇄 지방산에만 결합하며 세포내 전체 단백질의 3~8%를 차지하는 단백질군으로 지방산을 이용하는 많은 조직에서 밝혀졌다. 이 중에서 간, 심장, 소장 및 지방조직에 존재하는 FABP는 지방과 관련된 식이나 약제에 의하여 영향을 받는 것이 보고되어 지방산의 이용과 대사에서 FABP가 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다. 알코올의 장기 섭취는 지방산의 산화를 억제하고 에스테르화를 증가시켜 지방간을 유도하여 간 조직내의 콜레스테롤 대사, 단백질 합성 및 분비 등에 영향을 미쳐 간기능 저하를 초래한다. 특히, 알코올은 체내에 흡수된 후 약 80%가 간에서 산화되므로 알코올섭취에 의하여 FABP 중에서 L-FABP의 변화가 가장 클 것으로 기대된다. 따라서 본 연구는 알코올성 지방간에서 L-FABP의 역할 및 작용단계를 규명하고, FABP 발현과 활성을 강화시키는 phytochemicals을 식용생물자원을 대상으로 검색하고 이를 소재화시킴으로써 알코올성 지방간 예방 및 치료용 의약, 의약식품 및 기능성 식품으로 상업화시키는데 있어 핵심적 내용이라 할 수 있다.

한편 경제·산업적 측면에 있어 무엇보다도 식용생물자원으로부터 고부가가치성 물질의 창출은 WTO 체제 출범이후 국내 농림업을 유지 발전시키는 대안 중의 하나이다. 국내 식용생물자원은 가격의 등락이 심한 1차 산물로 이들의 생산과 관련된 농·임업과 가공제조업을 연계시킴으로써, 생산농가의 영농의욕을 고취시키고 소득을 높이면서 식용생물자원 가격의 안정화를 기할 수 있기 때문에 전체적인 소비자물가의 안정에 기여도가 클 것으로 예상할 수 있다. 또한 1차 상품인 식용생물자원을 고부가가치성 물질로 소재화함으로써 낮은 시장 경쟁성을 높일 수 있고 이는 타 약용작물, 공예작물에도 적용 가능한 모델이기 때문에 농촌경제의 발전을 획기적으로 도모할 수 있다. 한편 약리·생리활성 물질의 탐색과 소재화는 기술의존도가 높은 무공해산업종으로 향후 국내산업의 재편과정에서 중추적인 역할을 담당하게 될 것으로 예상된다. 특히 제조공정상 하나의 시설로 다양한 제품의 생산이 가능하고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종 생산의 특성을 지니는 중소기업형 산업으로 분류할 수 있다. 우리 고유의 자원으로부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 먹어 온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 유기합성에 의한 신규물질들보다 안전성의 확보가 용이하다. 따라서 의약과 식품용 leading compound의 연구개발과 실용화에 있어 기술선진국보다 비교우위에 있다고 볼 수 있다. 물질에 따라서는 현재 수입되고 있는 유사소재를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 고령화 사회에서 질병예방용 식품과 의약품의 수요증가와 함께 거대 수출품목이 될 것으로 예측된다. 의약분업의 실시와 함께 최근에 이르러 의약

품의 판매량 감소와 식품산업의 물류비 증가로 수익악화에 처한 국내 제약과 식품업체들이 식품과 의약품의 특성을 공유하는 새로운 영역의 제품들을 도입하게 됨으로써 다시 경쟁력을 갖게 될 것이며 이는 국내 생물산업 육성이라는 국가정책에 부응하는 계기가 될 것이다. 한국보건사회연구원은 음주로 인한 경제사회적 손실(1997년)을 질병 및 각종 사고의 의료비, 생산성 손실 등을 포함하여 약 9조 7,840억원으로, 이는 우리나라 GNP의 2.8%에 해당하는 것으로 추정하고 있다. 뿐만 아니라 우리나라의 알코올 소비량은 년 2~3%씩 증가추세를 보이고 있고 20세 이상 여성의 음주율 또한 1986년 20.6%에서 1998년 54.9%로 급격히 증가함에 따라 알코올에 의한 질병 예방과 만성음주자의 치료용 의약, 의약식품 및 기능성 식품의 개발이 절실히 요구되고 있는 시점이다.

사회·문화적 측면에 있어 본 연구개발과제의 필요성은 과다한 알코올 섭취가 간질환을 비롯하여 식도암, 만·급성 췌장염, 고지혈증, 당뇨, 백혈구감소, 골다공증, 면역기능저하 등 인체의 거의 모든 질환에 관여하고 있다. 미국의 Center for Disease Control은 병으로 인한 사망자 중 알코올로 인한 사망이 식도암 75%, 만성췌장염 60%, 구강인두후두암 및 간경변 50%, 급성췌장염 42% 순으로 높음을 밝힌 바 있다. 특히 만성 과음자는 알코올성 간질환, 알코올성 지방간, 알코올성 간경변, 알코올성 심근증, 알코올성 위염 등으로 사망할 확률이 높다. 우리나라의 경우 1995년 음주관련 사망자는 전체사망자의 20.4%를 점하고 있으며 음주관련사망자 중 간 관련 사망자는 37%로 사망 1위를 나타내고 있는 바 간 질환별로는 간암 6.8%, 간경변 23.7%, 기타 간질환 6.5%를 보이고 있다. 한편 우리나라 알코올리즘 유병률은 남자 45.6%, 여자 2.2%이며 이 중 알코올 의존 유병률은 구미 선진국과 비슷하지만 알코올 남용 유병률은 상대적으로 매우 높아 앞서 기술한 바와 같이 잘못된 음주문화로 과음에 심각하게 노출되어 있음을 시사한다. 과도한 음주는 반사회적 행동, 정신장애, 기타 약물남용, 강박신경증, 우울 및 자살 등 음주자 개인에게 위험을 야기시킬 뿐만 아니라 가족 구성원들의 정서와 생활에 부정적인 영향을 미쳐 가족응집력 및 생활 만족도가 낮고 심한 경우에는 가정폭력과도 밀접한 관련을 나타내고 있다. 사회적으로도 과도한 음주는 근로자의 결근 일수를 증가시키고 생산성에 영향(미국의 경우 과음 근로자의 업무 생산성 저하율 : 21%~25%)을 주고 있다. 우리나라의 경우 알코올 폐해의 사회경제적 비용 중 질병, 사고 및 숙취로 인한 생산성 손실비용이 5조 8,611억원으로 전체의 59.9%에 해당하며 이는 질병 및 사고로 인한 직·간접적 의료비 9,900억원(10.1%)의 6배, 조기사망에 의한 손실비용 2조 8,774억원(29.4%)의 2배에 달하고 있다. 이상에서와 같이 알코올성 간질환의 예방 및 치료용 소재를 개발하고 이를 이용한 의약식품, 기능성식품 등의 상품화는 개인 및 가정적인 측면에서는 물론 사회 및 국가적인 측면에서도 절실히 요구되는 연구개발 분야라 할 수 있다.

제2장 국내외 기술개발 현황

국내 알코올성 간질환에 관한 연구는 주로 의과대학의 병리학, 약리학 교실 및 대학병원의 소화기내과와 대학의 식품영양학 및 약학 관련 연구실을 중심으로 일부 수행 중에 있다. 주 연구내용은 실험동물에 알코올을 급여한 후 간과 혈액 중에 함유되어 있는 생화학적 지표들(aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, 중성지방, cholesterol, malon야ldehyde 등)을 분석하고 알코올에 의한 이 지표들의 변화를 추적하면서 대상 천연물 또는 식품들이 알코올에 의한 간손상억제에 미치는 영향을 간접적으로 검토하고 있다.

최근 문제시되었던 숙취해소 음료의 개발은 ADH, 또는 ALDH의 활성화 효능을 갖는 물질을 *in vitro* 상에서 검색하는 수준에 그치고 있다. 국내 알코올 관련 국가전문연구기관은 없으며 정부는 2001년까지 7개 광역시에 「알코올중독재활상담센터」를 설치하고 년차적으로 종교기관 등에 위탁하여 확대 설치할 계획으로 있다. 한편 한국주류공업협회의 출연으로 2000. 4. 26일 출범한 (재)한국음주문화연구센터의 알코올 중독자의 치료·재활·예방을 위한 지원·연구사업이 활성화될 경우 국내에서도 이 분야의 연구개발사업의 발전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

미국의 경우 NIH의 NIAAA를 비롯하여 National Alcohol Research Centers Program에 Indiana대학을 포함한 15개의 대학 및 연구기관이 연구개발에 참여하고 있으며 Research Society of Alcoholism을 비롯한 6개의 알코올 관련 site가 개설 운영되고 있다. 알코올과 간에 관한 연구들 중 알코올성 지방간에서의 지방대사 이상에 대한 연구는 지난 20 여년 간 활발히 진행되었고, FABP에 대한 연구 또한 최근 10 여년 일본, 유럽, 미국 등지에서 집중적으로 수행되고 있다. 고지방식이로 인한 지방간에서의 L-FABP에 대한 연구도 몇몇 연구자에 의하여 보고 되었으나 알코올에 의한 지방간에서의 L-FABP의 역할 및 변화에 대한 보고는 거의 전무한 실정이다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 알코올성 간섬유화 억제활성 phytochemicals의 소재화

1. 서 설

간섬유화(liver fibrosis)와 간경변(cirrhosis)은 각종 간질환의 병리학적 경로에 있어 최종 단계의 질환으로 받아 들여지고 있으며, 특히 간섬유화는 간질환으로 인한 사망원인 중 가장 큰 비중을 차지하고 있다. 서구 사회에서는 간경화 병인의 50%가 알코올 과량섭취에 기인하고 있으며, 국내의 경우도 20세 이상 남성에서 83%로 매우 높다. 뿐만 아니라 우리나라도 여성의 음주인구가 급격히 증가하고 있어 알코올성 간섬유화 예방 및 치료 물질에 대한 연구 및 개발이 시급한 실정이다.

알코올의 간 내 산화기전은 ① alcohol dehydrogenase(ADH)에 의한 경로와 ② microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)의 두가지로 나뉜다. 각 경로에서의 결과물인 아세트알데하이드(acetaldehyde)는 매우 독성이 강하며, 알콜성 간질환의 주원인 물질로 알려져 있다. 이 물질은 생체내 많은 효소와 단백질의 변형을 야기시키면서 동시에 간성상세포(hepatic stellate cell, HSCs)에서 collagen type I 합성을 자극하여 간섬유화의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 최근 간섬유화 관련 알코올의 작용은 oxidative stress에 의해 c-*myb*, NF-κB가 유도되거나 IGF, TGFβ1, cytokine 등이 관여하여 HSCs를 활성화시키는 기전이 일부 밝혀지고 있다. 또한 알코올 섭취 후 간에서의 지방축적은 만성 간질환으로 진행하는 대표적인 경우로 혈청내 중성지방의 증가는 간에서 VLDL의 증가를 나타내는 지표가 되며, 간 내에서 각종 지방 대사산물과 과산화지질의 대사과정들은 알데히드의 생성원인이 되기도 한다.

한편 간섬유화 또는 간경변은 각종 간질환의 병리학적 경로에 있어 최종 경로로 받아들여지고 있으며 정상적인 간세포의 섬유화 과정은 hepatic stellate cells(HSCs, lipocytes, fat-storing cells, Vit.A-storing cells, Ito cells)이 1차적으로 활성화되면서 collagen type I을 비롯한 ECM protein들이 합성, 분비됨으로써 발병하는 비교적 단순한 과정이지만 HSCs의 활성화에 관여하는 인자들 및 이들의 기작과 matrix protein들의 생합성, 분비 및 분해에 관련된 연구는 부분적으로 보고되고 있을 뿐 명확히 규명되어 있지 않다. 현재 간섬유화의 예방 및 치료에 있어 중점적으로 연구되고 있는 분야는 크게 ① HSCs의 활성화를 되돌리거나 억제시키는 연구, ② ECM protein들의 합성을 억제 또는 ③ 생성된 ECM

protein들의 분해를 촉진시키는 연구, ④ collagenase 등의 matrix metalloproteinases(MMPs) gene들의 발현을 증가시키는 연구, ⑤ tissue inhibitor of metalloproteinase와 같은 MMPs 저해인자들의 함량을 감소시키는 연구 등으로 구분할 수 있으나 식용생물자원이 함유하고 있는 간섬유화 또는 간경화 예방 및 치료용 phytochemicals에 관한 연구 및 개발 보고는 없다.

녹차(*Camellia sinensis*)는 기원전 3,400년 경 중국의 황제 신농씨가 최초로 해독제로 썼다는 전설이 '식경'에 기록되어 있는 것으로 보아 오랜 옛날부터 우리 인간들이 약초로 이용해 온 것을 짐작할 수 있다. 우리나라의 '동의보감'에도 녹차는 "기를 내리고 숙식을 소화하며 머리를 맑게 하고 소변을 편하게 하며 소갈을 그치고 잠을 적게 하여 독을 푼다"라고 적혀 있다. 녹차는 차나무과에 속하는 상록교목 또는 관목으로 잎은 품종과 착생위치에 따라 변이가 크지만 길이가 6~20 cm, 나비가 3~4 cm 정도의 긴 타원형으로 끝이 뾰족하며 가장자리에 작은 톱니가 있다. 잎의 질은 단단하고 약간 두꺼우며 표면은 윤이 나고, 품종에 따라 잎 빛깔의 농담 및 주름에 다소 차이가 있으며 자색, 황색, 갈색 등 여러 가지가 있다. 어린 잎의 뒷면에는 고운 털이 나며, 색깔은 녹색, 황색, 홍색, 자색 등 품종에 따라 다르고, 꽃은 새순의 끝 또는 잎 겨드랑이에 1~3개가 붙어 8월 하순부터 12월까지 피고, 꽃잎은 6~8쪽으로 흰색 또는 담홍색이다. 녹차의 주요 성분으로 폴리페놀(카테킨, 카테킨 산화물, 플라보놀), 카페인, 다당류, 항산화 비타민(Vit. C, Vit. E, β-카로틴), γ-aminobutylic acid, 사포닌, 미네랄(아연, 망간, 불소, 셀레니움) 등의 성분이 있는데 그 중 카테킨(catechins) 성분이 가장 많이 함유되어 있다. 카테킨은 최근 암, 성인병, 식중독 등의 예방, 유해산소를 제거하는 항산화 소재로 세계 각국에서 가장 각광을 받고 있다. 카테킨은 떫은 맛을 내는 성분으로 기타 식물 중에는 포도 껍질이나 떫은 감에 함유되어 있다. 녹차 중에 함유된 카테킨인 에피갈로카테킨갈레이트(epigallocatechin-3-gallate, EGCG), 에피갈로카테킨(epigallocatechin, EGC), 에피카테킨갈레이트(epicatechin-3-gallate, ECG), 에피카테킨(epicatechin, EC)의 4 종류는 자연계에서 차잎에만 특이하게 다량 함유되어 있는 성분이다. 이러한 녹차 중의 카테킨은 화학구조상 페놀성 수산기(-OH)를 복수로 가지고 있어 '폴리페놀(polyphenol)'이라고도 하며, 카테킨이 플라바놀(flabanol)에 속해 있는 관계로 '차후라보노이드'로 불려지는 경우도 있다. 녹차 폴리페놀은 콜레스테롤을 낮추고, 동맥경화와 고혈압을 낮추는 효능이 있으며 항암 효능이 있는 것으로 알려진 바 있으나 알코올성 간섬유화 예방에 있어 collagen type Ⅰ을 억제하는 효과가 있음이 보고되어진 바는 없다.

따라서 본 연구에서는 알코올성 간섬유화를 예방함에 있어 collagen type Ⅰ을 억제할 수 있는 미량소재를 200 여종의 식용식물로부터 분리, 정제하여 활성본체의 구조와 특성을 규명하고 실용화 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

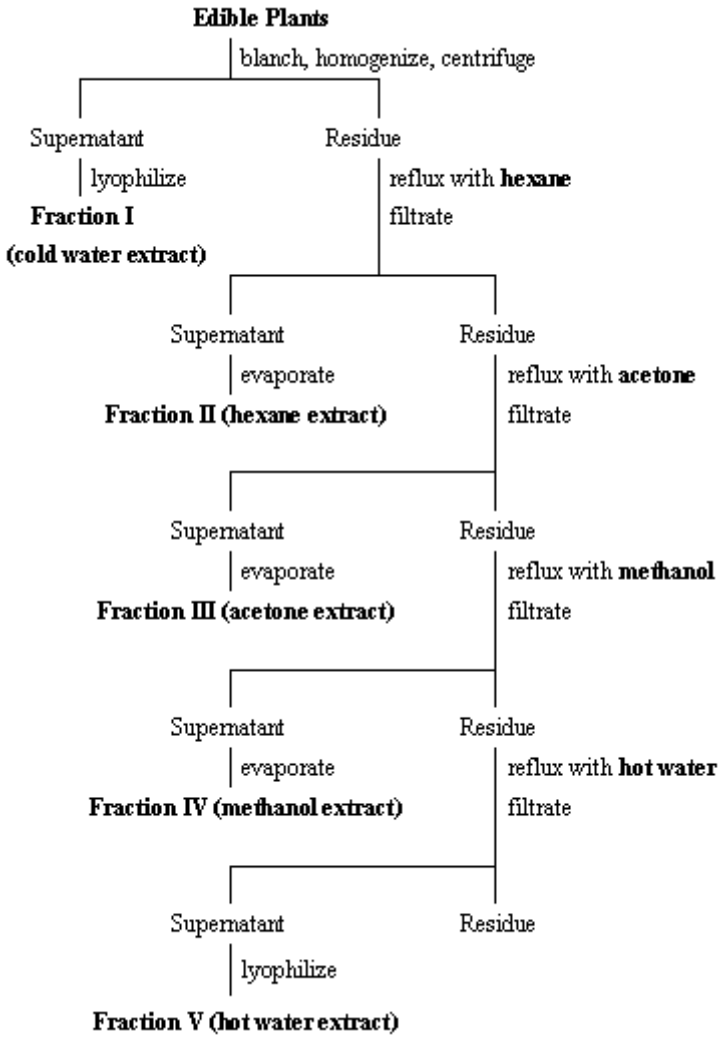
가. 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 국내산 식용식물 200 여종은 서울 시내 백화점, 경동시장, 수협 등지에서 산지가 표시된 것만을 구입 또는 공급받아 사용하였다. 최종 선별된 녹차는 (주)태평양에서 제공받아 사용하였다. 실험에 사용된 흰쥐의 간 성상세포주인 HSC-T6 cell은 Mount Sinai Medical Center, NY, Dr. Friedman으로부터 제공받았으며, DMEM(Dulbecco's modified eagle medium), FBS(fetal bovine serum), antibiotics 등은 Gibco-BRL사(Grand Island, USA), sodium bicarbonate, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide), DMSO(dimethyl sulfoxide), casein(sodium salt from bovine milk), L-hydroxyproline, chloramin-T 등은 Sigma사(St. Louis, USA)로부터, Nonradioactive acetaldehyde는 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI., USA)로부터 구입하였으며 collagen type Ⅰ antibody는 Abcam Co.(Cambridge, UK) 제품을 사용하였다. 본 실험에서 사용된 동물은 6~7주령의 Wister계 수컷 흰쥐로 (주)샘타코에서 분양받아 사용하였으며, 실험동물은 온도 22±2℃, 습도 55~60%에서 1일 12시간씩 점등 하에, 물과 사료를 자유로이 급식시키면서 사육하였다.

나. 실험 방법

1) 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 검색 시료 조제

각각의 시료는 Scheme 1-1의 방법에 따라 100℃에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고 동결건조한 다음 5,000 rpm에서 5분, 6,000 rpm에서 5분, 7,000 rpm에서 20분간 homogenizer(IKA Labotechnik Co. Ultra-turrex T50, Germany)로 파쇄한 후 5,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 냉수추출획분(Fr.Ⅰ)으로 하였다. 침전물은 동결건조 후 극성도에 따라 hexane, acetone, methanol, hot water 순으로 2시간 동안 환류 추출한 후 각각을 농축, 동결건조하여 Fr. Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ,Ⅴ의 용매별 추출획분을 조제하였다.



Scheme 1-1. Systematic extraction procedure for various edible plants.

2) 알코올성 간섬유화 억제활성 *in vitro* assay계

알코올성 간섬유화 억제활성물질을 검색하기 위해 collagen type I 억제활성을 ELISA 방법에 근거하여 조건을 검토한 후 Scheme 1-2, 1-3과 같은 assay계를 확립하였다. 흰쥐의 간 성상세포주인 HSC-T6 cell(Mount Sinai Medical Center, NY, Dr. Friedman)을 1.5×10^4 cells/well로 24 well에 seeding하고 37°C에서 40시간 동안 배양한 후 175 μM의 acetaldehyde, β-aminopropionitrile fumarate(100 μg/ml), L-ascorbic acid(50 μg/ml)를 첨가하여 24시간 배양하였다.

이 배양액을 carbonate/bicarbonate buffer(pH 9.6)으로 희석한 후, ELISA 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. Immuno-well plate에 0.01% glutaraldehyde를 100 ㎕씩 분주하고 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 증류수로 plate를 세척한 후 물기를 제거하였다. 상기의 희석배양액을 분주하여 2시간 반응시킨 후 다시 plate를 세척한 후 blocking solution(0.5% BSA)으로 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 collagen type I polyclonal antibody를 1 : 4,000(0.5% BSA)으로 희석, 100 ㎕씩 분주하고 37°C에서 1시간 반응시켰다. Anti-rabbit IgG conjugated peroxidase를 1 : 8,000으로 0.5% BSA에 희석하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 각 단계에서 plate는 세 번씩 세척과 물기제거를 반복하였다. 기질[(TMB 10 mg/ml DMSO, 3% H_2O_2, 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.1)]을 well 당 100 ㎕씩 첨가하여 15분간 반응시키고, 1 M의 황산을 50 ㎕씩 첨가하여 반응을 완전히 중단시킨 후 microplate reader(Model 550, BIO-RAD laboratories, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 *in vivo* 안전성 실험

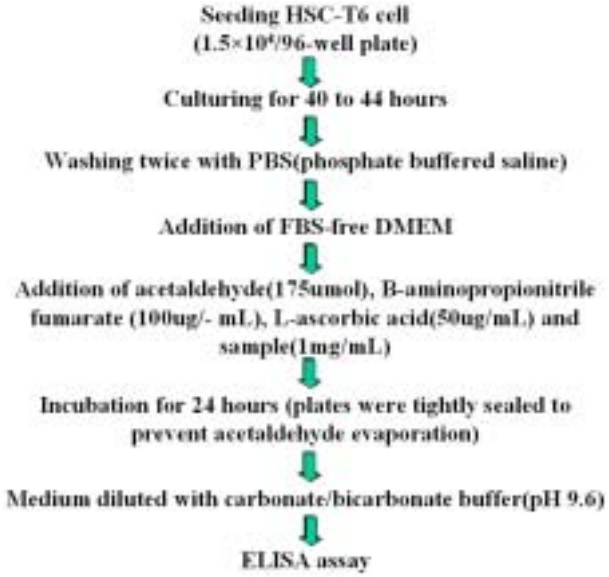
1차 검색에서 선정된 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 안전성 여부를 확인하기 위하여 산수유, 솔잎, 녹차 methanol 추출물을 0, 1,500, 3,000 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 흰쥐(male, 4 weeks old)에 음용수 형태로 4주 동안 공급하였다. 4주 동안의 체중변화를 관찰하고 최종일까지 생존한 마리 수를 측정 후 백분율로 표시하였다.

4) 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 *in vivo* 유효성 assay계

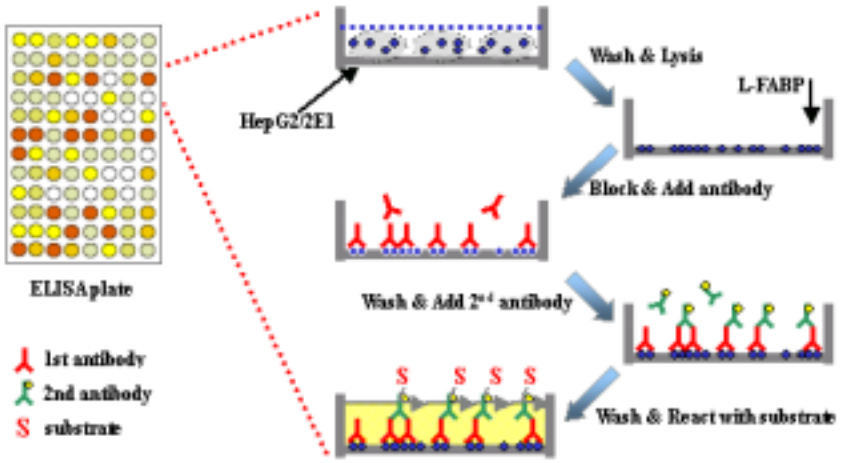
간경화 모델을 유도하기 위하여 체중 240 ± 7 g 정도의 수컷 Wister 흰쥐를 각 군당 8마리씩 대상으로 하여, dimethylnitrosamine(DMN) 10 mg/kg body weight(0.15 mol/l pyrogen free sterile NaCl에 희석)를 1일 1회씩 주당 3일 연속으로 일정한 시간에 복강으로 투여하였다. 본 실험은 4주간 지속되었으며, 시료는 1.5 mg/L와 3 mg/L의 농도로 음용수에 섞어 공급되었고, 대조군은 생리식염수를 투여하였다. 희생 후 간을 적출하고, 간 무게의 10배 부피 0.5 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 균질화한 후 실험에 사용하였다.

가) 혈청과 간내 과산화 지질 측정

과산화지질 측정은 균질화된 조직과 혈청 0.5 ml에 10% trichloroacetic acid 3.5 ml을 혼합한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 0.6% thiobarbituric acid reagent(0.25 N HCl과 즉시 혼합하여 제조)와 다시 혼합하고, 15분간 100°C 수조에서 반응시킨 후 흡광도 532 nm에서 측정하였다.



Scheme 1-2. *In vitro* collagen type Ⅰ assay system in HSC-T6 cell.



Scheme 1-3. ELISA assay system for detecting collagen type Ⅰ.

나) 혈청내 GOT(glutamic oxaloacetate transaminase, AST), GPT(glutamate pyruvate transaminase, ALT) 및 콜레스테롤 측정

간경화 모델 흰쥐에서 간 독성 여부를 확인하기 위하여 혈청에서 GOT 및 GPT의 활성을 측정하였다. GOT 또는 GPT 기질을 1 ㎖씩 시험관에 넣고 37℃ 수조에서 2~3분간 가온한 뒤 증류수로 5 배 희석된 혈청을 0.2 ㎖씩 넣은 후 37℃ 수조에서 GOT의 경우 60분, GPT의 경우 30분간 반응시킨 다음 발색액 2,4-dinitrophenyl- hydrazine을 1 ㎖씩 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 후 0.4 N NaOH을 10 ㎖씩 넣어 반응을 중지시켰다. 반응 중지 30분 후 505 nm에서 증류수를 blank로 하여 표준액, 검체 및 대조군의 흡광도를 측정하고 여기서 얻은 검량곡선을 이용하여 효소의 활성 단위로 환산하였다. 콜레스테롤의 함량은 cholesterolester hydrolase, cholesterol oxidase 및 hydrogen peroixdase를 이용한 효소법으로, 혈청과 기준액(300 ㎎/㎗)을 20 ㎕씩 넣고 효소시약 3 ㎖을 혼합한 후 37℃의 수조에서 15분간 반응시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다) 혈청과 간의 hydroxyproline 측정

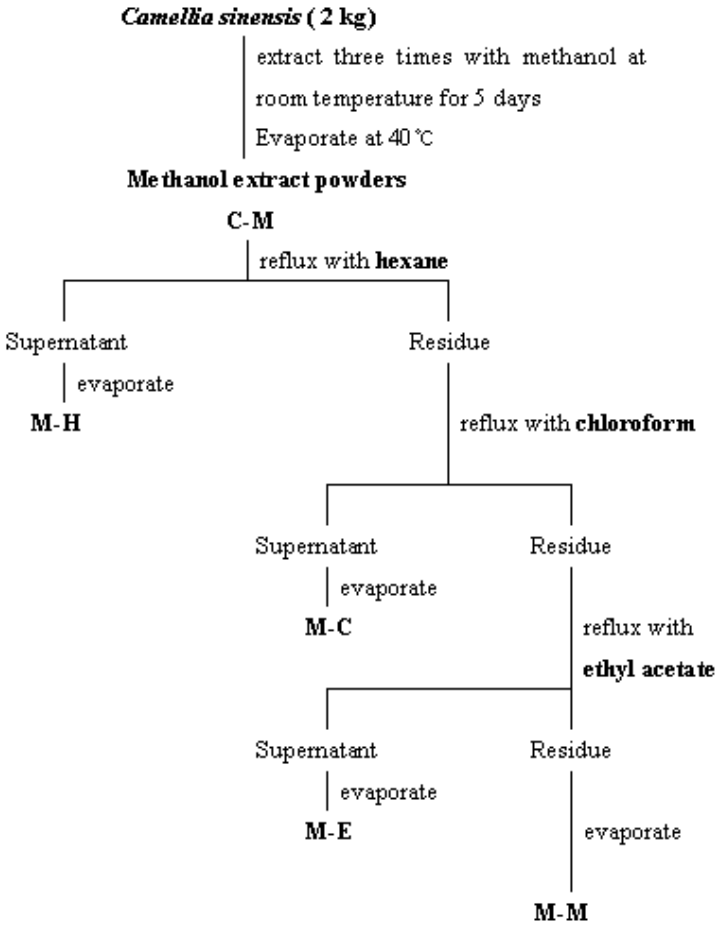
Collagen의 증감을 정량할 수 있는 지표인 hydroxyproline assay를 사용하여 알코올성 간섬유화 억제활성을 측정하였다. 균질화된 조직을 6 N 염산에서 110°C에서 16시간 동안 가수분해시킨 후, 이를 다시 100°C 수조에서 증발시켜 산을 제거하고, 잔여물을 증류수에 희석, 일정 부피가 되게 하였다. 50% isopropanol 1.2 ml을 첨가하고 혼합한 후 chloramine-T solution과 혼합하여 10분간 실온에 방치하였다. 반응계에 *p*-dimethylamino-benzaldehyde(60% perchloric acid)를 넣고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 흡광도 558 nm에서 측정하였다.

라) 조직염색법

상기에서 희생된 흰쥐의 적출된 간을 10% formaldehyde에 고정하여, 농도별 알코올로 탈수시키고, 파라핀으로 embedding한 후 파라핀 고정 조직을 Microme HM 340E로 7 ㎛ 두께의 절편을 작제한 다음 슬라이드 글라스에서 Mayer's hematoxylin and eosin 염색을 실시, 간조직의 변화를 검경하였다.

5) 녹차로부터 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 추출 및 분획

대량으로 구입한 녹차를 100℃에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성화시키고, hand mixer로 곱게 마쇄한 후 2 kg의 녹차 조말을 methanol 10배 부피로 4℃에서 2주 동안 정치시키면서 2회 추출한 후 감압농축하여 녹차 methanol 추출물을 조제하였다. 추출물로부터 methanol을 완전히 제거한 후 hexane, chloroform, ethylacetate를 각각 5배 부피로 환류 추출함으로써 각 유기용매별 가용획분을 조제하였다(Scheme 1-4).



Scheme 1-4. Flow sheet for fractionation of active component from *Camellia sinensis*.

6) 녹차로부터 간섬유화 억제활성물질의 분리 및 정제

Chloroform으로 활성화된 silica gel 60 column에 유기용매 분획을 통해 예비 분리되어진 M-M을 chloroform과 methanol을 사용하여 1, 2차 silica gel open column chromatography를 실시하여 활성물질을 분리하였다. 예비실험을 통하여 활성 획분이 분리되는 최적 조건이었던 chloroform : methanol = 3 : 10의 전개용매를 사용, ODS gel plate로 Prep-TLC(Thin Layer chromatography)를 실시하여 4개의 획분으로 분리하였다. HPLC C_{18} column(Luna, 4.6 × 150 mm)에 활성획분을 주입하고 acetonitrile : TFA = 99.95 : 0.05의 전개용매를 사용하여 1 ml/min의 유속으로 용출, 활성획분만을 농축한 후 2차 HPLC를 동일조건에서 실시함으로써 저해물질을 정제하였다.

7) 녹차 함유 간섬유화 억제활성물질의 구조 분석

HPLC로 정제된 물질의 ^{1}H-NMR은 600 MHz, ^{13}C-NMR은 500 MHz에서 시료의 이화학적 이동(ppm)을 측정하였으며, FAB-MS spectrum을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 식용식물소재로부터 알코올성 간섬유화 억제활성물질 검색

1) 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 1차 검색

국내산 식용식물로부터 알코올성 간섬유화 억제용 미량소재를 실용화시키기 위해 1차적으로 앞서 기술한 방법에 따라 조제한 추출물 200 여점을 대상으로 collagen type Ⅰ 억제활성물질을 검색한 결과 산수유, 솔잎, 녹차 등의 methanol 추출물(Fr. Ⅳ)이 높은 억제활성을 나타내었다(Table 1-1).

2) 알코올성 간섬유화 억제활성 시료의 2차 검색

시료의 산지별, 계절별, 품종별 활성변화에 따른 시료선정의 정확성을 기할 목적으로 1차 검색시 활성이 높았던 산수유, 솔잎, 녹차 등을 대량 구입한 후 이들을 대상으로 ELISA assay system을 사용하여 2차 활성검색을 실시한 결과 녹차 methanol 추출물이 가장 높은 collagen type Ⅰ 억제활성을 나타내었다(Fig. 1-1).

Table 1-1. First screening of plant extracts on collagen type Ⅰ production

Sample name		Fr.Ⅳ[a] Inhibitory effect (%)[b]	
Common name	Scientific name	Non-acetaldehyde[c]	Acetaldehyde[d]
O-sue-yu	*Evodia officialis*	16.8	8.5
Sesami	*Sesamum indicum*	0	0
Pine-nut	*Pinus koraiensis*	0	0
Purple perilla	*Penilla sikokiana*	0	2.6
White wesle onion	*Allium fistulosum*	0	0
Kale root	*Brassica oleracea*	0.8	0
Day lily	*Hemerocallis aurantiaca*	0	0
Gardenia seeds	*Gardenia jasminoides*	3.1	0
Bog rhubarb	*Viola diamantica*	0	0
Shallot	*Allium fistulosum*	0	0
Onion	*Allium cepa* L.	0	8.5
Gulfweed (Cheju)	*Sargassum fulbellum*	0	0
Seaweed (stem)	*Undrania pinnatifida*	0	10.9
Dried laver (Shinan)	*Porohyra tenera*	29.5	0
Laver (Nakdong)	*Porohyra tenera*	0	0
Laver (Kaungchun)	*Porohyra tenera*	0	0
Plocamium	*Plocamium telfairae*	0	0
Cudium (Cheju)	-	0	0
Kelp (Jumunjin)	*Laminaria japonia*	0	0

(to be continued)

Sample name		Fr.IV[a] Inhibitory effect (%)[b]	
Common name	Scientific name	Non-acetaldehyde[c]	Acetaldehyde[d]
Citron	*Citrus junos*	4.1	7.6
Epimedii herba tea	*Epimedium koreanum*	6.0	3.6
Safflower	*Carthamus tinctorius*	0	0
Whorled mallow	*Malva verticillate*	0	0
Barley	*Hordeum vulgara* var. *hexstichon*	7.6	0
Pine needles	*Pinus koraiensis*	20.9	23.8
Loqut	*Eribotrya japonica*	0	0
Mugwort	*Artemisia asiatica*	0	0
Plantain	*Plantago asiatica*	4.4	3.0
Gardenia seeds	*Gardenia jasminodes*	6.0	3.4
Arrowroot	*Pueraria jasminoides*	6.6	1.6
Zan-dae	*Adeophora tryphilla* var. *japonica*	7.3	6.9
Trifoliate orange	*Poncirus trifoliata*	12.2	6.6
Araliaceous shrubs	*Acathopanax sessiliflorum*	0.7	9.9
Walnut	*Juglas sinensis*	3.4	0
O-mi-ja	*Schizandra chinensis*	23.0	24.9
Mulberry leaf	*Morus alba*	6.8	4.9
Shan-su-yu	*Comus officinallis*	17	28
Doo-chung (leaf)	*Eucommia ulmoides*	0	2.5

(to be continued)

Sample name		Fr.IV[a] Inhibitory effect (%)[b]	
Common name	Scientific name	Non-acetaldehyde[c]	Acetaldehyde[d]
Clematis (vine)	*Akebia quinata*	0	1.7
Jujube	*Zizyphus jujuba* var. *inermis*	0	11.1
Wild rose	*Rosa rugosa*	0	20.6
Snakegrourd	*Trihosanthes kirilowii*	0	9.4
Kamro (tea)	*Camellia sinensis*	5.9	0.7
Sunflower	*Helianthus annus*	2.8	1.9
Chinese matrimony	*Lycium chinense*	0	0
Cassia	*Cassia tora*	0	0
Sheperd's purse	*Capsella bursapastoris*	0.8	6.9
Orange peel	*Citrus unshiu*	0	0
Kelp (tea)	*Laminari japonica*	1.4	0
Milk vetch	*Astragalus membranaceus*	1.4	0
Chinese quince	*Pseudocydonia sinensis*	1.1	0
Ddang-gui	*Angelica gigas*	4.0	0
Du-duk	*Codonosislanceolata*	0	0
Baloon flower	*Platycodon grandiflorum*	2.4	0
Doo-chung (bark)	*Eucommia ulmoides*	4.7	0
Green tea	*Camellia sinensis*	19.7	26.8
Wild chamomile	*Chrysanthemum morifolium*	10.4	8.4

(to be continued)

Sample name		Fr.IV[a] Inhibitory effect (%)[b]	
Common name	Scientific name	Non-acetaldehyde[c]	Acetaldehyde[d]
Cactus	*Opuntia ficus-indica Mill. saboten* Makino	0	0
Dunggulae (trunk)	*Polygonatum japonicum*	0	0.5
Peppermint	*Menta arvensis* var. *japonia*	3.5	0
Persimmon (leaf)	*Diospyros kaki*	22.6	2.8
Cinnamon	*Cinamomum zeylanicum*	0	0
Mok-dan-pi	*Paeonia suffruticosa Andrews*	0	0
Dried persimmon	*Disopyrus kaki*	0	0
Kum-ang-za	*Rosa laevigaia* Michx.	0	0
Apricot	*Prunus armeniaca* var. Ansu	0.1	0.1
Lotus root	*Erual ferox*	1.2	1.2
Whang-jung	*Polygonatum sibiricum* Red.	0	0
Sweet potato	*Ipomoea batas* L.	0	0
To-sa-za	*Cuscuta jponica*	0	0
Bamboo (extracts)	*Sasamorha purpurascens Nakai* var. *borealis Nakai*	0	0
Peanut	*rchis hypogae*	0	0
Spinach	*Spinacia olercea* L.	7.3	7.3
Leek	*Allium tuberosum* L.	0	0
Bang-poog	*Saposhnikovia divaricat*	0	0
Squash	*Cucubita moschata*	9.8	9.8

(to be continued)

Sample name		Fr.IV[a] Inhibitory effect (%)[b]	
Common name	Scientific name	Non-acetaldehyde[c]	Acetaldehyde[d]
Brown seweed	Endarchne binghamiae	0	0
Big leaf gulfweed	*Sargassum ringgoldinum*	10.8	0
Gar-gar (Cheju)	*Gelidum amansii*	0.4	0
Gar-gar (Wando)	*Gelidum amansii*	0	9.5
Sea lettuce (Kwangchun)	*Enteromorph intenstinalis*	0	14.0
Dried brown seaweed (Ulsan)	*Undrania pinnatifida*	0	14.0
Chicory (leaf)	*Cichorium intybus* L.	0	18.7
Sothistle	lxeris dentata	0	0
Leaf mustard	-	2.4	4.6
Rubia	*Rubia cordifolia* var. *pratensis*	0	2.7
Cauliflower	Brassica oleracea	5.3	2.0
Wornwood	*Artemisia asiatica*	0	0
Caraway	*Carum carvi*	10.7	7.1
Leaf mustard	*Brssic juncea*	0	10.2
Cardamon	*Elettaria cardamomum*	0.5	1.5
Thyme	*Thymus vulgris*	17.3	0
Vitamin (leaf)	-	0	0
Green vitamin	-	16.2	20.8
Brown mustard	*Brssic juncea*	0	0

(to be continued)

Sample name		Fr.IV[a] Inhibitory effect (%)[b]	
Common name	Scientific name	Non-acetaldehyde[c]	Acetaldehyde[d]
Ginger	Zingiber officinale	6.5	4.0
Pak-choi (unripeened)	*Brassica campestris* var.	27.9	0
Gent	-	0	3.7
Mint (unripened)	*Lophanthus rugosus*	0	0
Mint (ripened)	*Lophanthus rugosus*	0	0
Japanese honewat	*Paeonia suffruticosa Andrews*	3.9	9.2
Red papper	*Capsicum annuum*	0	12.7
Red papper (leaf)	*Capsicum annuum*	22.2	8.8
Alpapa	*Medicago sativa* L.	11.0	0
Ginseng (powder)	*Panax ginseng*	0.8	0
Ginseng (tea)	*Panax ginseng*	0	0
Italian beet	*Beta vulgaris* var.	0	0
Broccoli	*Brassica oleracea*	13.3	3.6
Raising bron mustard	*Brassica juncea*	0	0.4
Endiv	*Cichorium endivia*	0	0
Sweet flag	*Acorun calamus*	16.2	0
Japanese honwat (unripened)	*Pimpinella brachycarpa*	20.9	0
Carrot (leaf)	*Daucus carota L.*	13.1	0
Goan-dong-wha	*Petasites japonica*	13.9	0

(to be continued)

Sample name		Fr.Ⅳ[a] Inhibitory effect (%)[b]	
Common name	Scientific name	Non-acetaldehyde[c]	Acetaldehyde[d]
Clova buds	Eugenia carypphyllate	25.8	0
Chive	*Allium schoenoprasum*	0	0
Allspice	*Pimenta dioicalis*	3.9	11.0
Tahibo	*Nougen kazra*	19.2	9.1
Coriander	*Coriandrum sativum*	0	0
Cumin	*Cumium cyminum*	0	0
Dill	*Anethum graveolens*	0	0
Fennel	*Foeniculum vulgare*	0.2	0
Garlic	*Allium sativum*	0	5.8
Garlic (leaf)	*Allium sativum (leaf)*	1.1	11.1
Stalk of a garlic	*Allium sativum (trunk)*	0	0
Galic (unripened)	*Allium sativum*	0	2.3
Trigonella	*Trigonella foenun-racum*	9.6	4.6
Doo-chung (leaf)	*Eucommia ulmoides*	12.8	12.7
Parsley	*Oenanthe siolonifera*	3.5	16.2
Ginseng steamed red	*Panax ginseng*	0	0
Leaf beet	*Beta vulgaris* var.	6.5	4.2
Welsh onin	*Allium fistulosum*	0	0
Nakai	*Sedum sarmentosum*	0	0

(to be continued)

Sample name		Fr.IV[a] Inhibitory effect (%)[b]	
Common name	Scientific name	Non-acetaldehyde[c]	Acetaldehyde[d]
Chinese tam	*Dioscorea batatas Decne*	8.2	16.8
Green papper	*Capsicum annuum* L.	0	0
Paprika	*Capsicum annuum*	0	20.1
Laurel tree (leaf)	*Laurus nobilis*	2.3	1.1
Raddish	*Raphanus sativus*	0	10.7
Anise	*Pimphanus aisum*	0	23.4
Sage	*Salvia officinialis*	1.2	0.6
Hollyhook (root)	*Althaea rosea Car*	0	0
Mongolian dandelion	*Taraxacum platycarpum*	0	4.6
Sweet potato	*Ipomoea batas* L.	2.8	2.2
Cactus	*Opuntia ficus-indica Mill. saboten Makino*	0	0
Dunggulae (leaf)	*Polygonatum japonicum*	0	8.5
Longan	*Longanae Arillus*	0	0
Chinese leek	*Allium tuberosum* L.	0	0
Parlsley	*Petroselinum crispum*	0	0
Corn salad	*Valerrianella locusta*	0	0
Wasabi	*Armoracia runticana*	8.9	1.3
Chili	*Chilicon came*	7.0	0
Majoram	*Origanum hortensis*	10.8	0.8

(to be continued)

Sample name		Fr.Ⅳ[a] Inhibitory effect (%)[b]	
Common name	Scientific name	Non-acetaldehyde[c]	Acetaldehyde[d]
Wild garlic	*Allium monanthum*	0	0
Wild sesami	Perilla frutescrs	0	0
Crown daisy	*Chrysanthemum coronarium*	0	22.0
Poppy-seed	*Papaver somniferum*	0	0
Basil	*Ocimm Basilicum* L.	0	0
Origano	*Origanum vugara* L.	0	1.0
White pepper	*Pipper nigrum* L.	0	0
Crude saponin	*Crude saponin*	0	15.0
Celery	*Apium graveolens* L.	0	0.3
Aralia shoots	*Aralia elata seemann*	0	1.9

[a] Fraction for extracted with methanol

[b] Collagen type Ⅰ inhibitory effect (%) : The percentage of inhibitory effect for each sample was calculated as compared with control.

[c] Hypothesized as the condition of non alcoholic fibrosis.

[d] Hypothesized as the condition of alcoholic fibrosis.

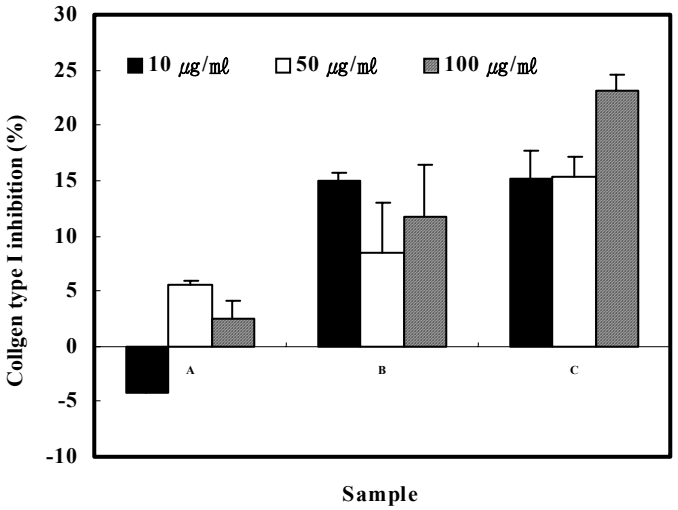


Fig. 1-1. Inhibitory effect of the selected samples on collagen type I in HSC-T6 cell culture medium.

Selected samples were diluted with distilled water. Final concentration of sample was 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL. Data represented the means (n=5) ± S.D..

A : Methanol extracts of *Comus officinalis*(fruit)
B : Methanol extracts of *Pinus koraiensis*(leaf)
C : Methanol extracts of *Camellia sinensis*(leaf)

3) 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 *in vivo* 안전성 실험

시료로 선정된 산수유, 솔잎, 녹차 methanol 추출물의 급성독성을 알아보기 위해 추출물을 0, 1,500, 3,000 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 흰쥐를 사용하여 음용수 형태로 공급한 결과 Table 1-2에 나타난 바와 같이 모든 실험군에서 100% 생존율을 보임으로써 시료의 methanol 추출물에 의한 급성독성은 나타나지 않았다. 이상에서와 같이 1, 2차 *in vitro*와 *in vivo* 안전성 실험의 결과들로부터 최종적으로 시료를 선정하기 위해 *in vivo* 상에서 collagen type I 억제활성을 검토하였다.

Table 1-2. Survival rate of experimental rats

Group	DMN dose (mg / Kg body weight)	Sample dose (g / L)	No. of rat	No. of survival	Survival rate (%)
NC	-	-	8	8	100
DC	10	-	8	8	100
AL	10	1.5	8	8	100
AH	10	3	8	8	100
BL	10	1.5	8	8	100
BH	10	3	8	8	100
CL	10	1.5	8	8	100
CH	10	3	8	8	100

Extracts of *Comus officinalis*, *Pinus Koraiensis* and *Camelia sinensis* were supplied in tap water *ad libitum*. with normal feed for 4 weeks.

NC : Normal(non-fibrotic) control rats with saline i.p. injection
DC : Acute fibrosis control rats with DMN i.p. injection
AL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Camelia sinensis*
AH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Camelia sinensis*
BL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Comus officinalis*
BH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Comus officinalis*
CL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*
CH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*

4) *In vivo*에서의 알코올성 간섬유화 억제활성

실험에 사용한 90~100 g의 4 주령 수컷 Wister 흰쥐는 ㈜샘타코에서 구입하였으며, 고형 사료로 2 일간 적응시킨 후 정상 대조군과 간경화 모델 대조군, methanol로 추출한 시료를 0.15% 급여한 군과 시료를 0.3% 급여한 군으로 나누어 4 주간 사육하였다. 알코올성 간섬유화 억제활성물질을 검색하기 위해 상기의 2차 *in vitro* collagen type Ⅰ 억제활성 검토와 동시에 3점의 시료를 대상으로 과산화지질과 collagen 관련 *in vivo* 실험을 실시함으로써 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 높은 억제활성을 갖는 시료를 최종시료로 선정하고자 하였다.

가) 혈청과 간내 과산화지질 측정

간경화 유도 흰쥐의 혈청과 간에서 과산화지질을 측정한 결과 녹차와 산수유 0.15% 급여군에서 유의성 있게 낮은 과산화지질 억제효과를 나타내었다(Fig. 1-2, 1-3).

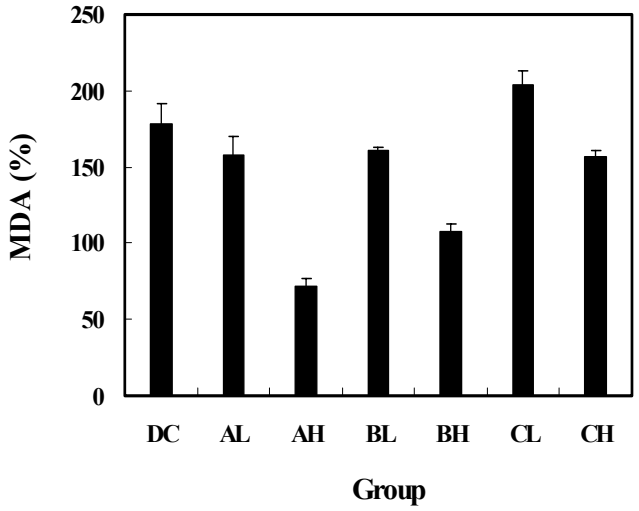


Fig. 1-2. TBARS level in liver tissue.

Lipid peroxides measured in terms of the formation of malondialdehyde, were significantly increased in dimethylnitrosoamine induced fibrotic rats treated with selected samples except AH group. The values given are mean ± S.D..

NC : Normal(non-fibrotic) control rats with saline i.p. injection
DC : Acute fibrosis control rats with DMN i.p. injection
AL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Camellia sinensis*
AH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Camellia sinensis*
BL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Cornus officinalis*
BH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Cornus officinalis*
CL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*
CH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*

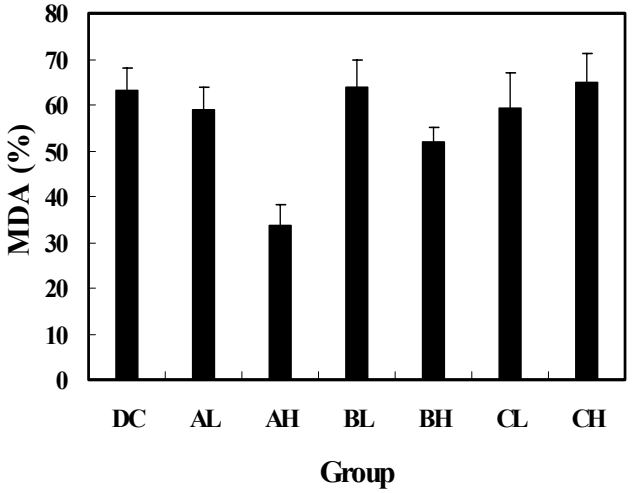


Fig. 1-3. TBARS level in serum.

Lipid peroxides measured in terms of the formation of malondialdehyde, were significantly increased in dimethylnitrosoamine induced fibrotic rats treated with selected samples except AH group. The values given are mean ± S.D..

NC : Normal(non-fibrotic) control rats with saline i.p. injection
DC : Acute fibrosis control rats with DMN i.p. injection
AL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Camellia sinensis*
AH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Camellia sinensis*
BL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Comus officinalis*
BH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Comus officinalis*
CL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*
CH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*

나) ALT, AST 및 콜레스테롤

간손상 정도를 나타내는 ALT, AST 활성을 측정한 결과 녹차 0.3% 급여군에서 정상 대조군과 유사하게 낮은 값을 나타내었으며, 콜레스테롤 수치 또한 녹차 급여군과 산수유 0.3% 급여군에서 낮은 값을 나타냄으로써 녹차 methanol 추출물 급여군이 간경화 유발 대조군과 다른 시료 급여군에 비해 높은 저해활성을 나타내었다(Table 1-3).

Table 1-3. Serum ALT, AST and cholesterol level in experimental groups

Group	ALT (IU / mL)	AST (IU /mL)	Cholestrole (mg / 100mL)
NC	254 ± 26.26	88 ± 22.85	55.39 ± 5.72
DC	2072 ± 83.95	1851 ± 43.21	108.62 ± 12.51
AL	1986 ± 134.50	2013 ± 78.52	92.82 ± 8.80
AH	928 ± 37.45	395 ± 30.14	82.00 ± 5.75
BL	1846 ± 107.65	1707 ± 61.61	116.94 ± 18.09
BH	1989 ± 123.79	1826 ± 59.71	97.81 ± 9.49
CL	1812 ± 118.18	1783 ± 71.17	143.56 ± 14.24
CH	2244 ± 122.71	1657 ± 54.48	196.79 ± 44.61

NC : Normal(non-fibrotic) control rats with saline i.p. injection
DC : Acute fibrosis control rats with DMN i.p. injection
AL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Camellia sinensis*
AH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Camellia sinensis*
BL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Comus officinalis*
BH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Comus officinalis*
CL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*
CH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*

다) Hydroxyproline 측정

간섬유화 억제활성을 검색하기 위해 혈청과 간조직에서 collagen type Ⅰ의 지표 물질인 hydroxyproline을 측정한 결과 혈청에서는 모든 군이 유사한 값을 나타내었으며, 간조직에서는 간경화모델 대조군에 비해 시료 급여군에서 정상 대조군과 유사한 값을 나타내었다. 특히 녹차 0.3% 급여군이 가장 낮은 hydroxyproline 값을 나타내어 녹차 methanol 추출물이 DMN으로 유도된 간경화 모델에서 collagen type Ⅰ을 억제함으로써 간경화를 억제시킬 수 있음을 시사하였다(Table 1-4).

Table 1-4. Hydroxyproline level of serum and liver tissue in experimental groups

Group	Hydroxyproline (serum) (ug / mL)	Hydroxyproline (tissue) (ug / g wet liver)
NC	9.08 ± 0.503	36.6 ± 1.4
DC	9.91 ± 0.509	63.8 ± 5.9
AL	10.41 ± 0.613	57.3 ± 2.1
AH	9.09 ± 0.660	37.0 ± 1.4
BL	9.67 ± 0.130	46.8 ± 1.2
BH	10.45 ± 0.029	60.0 ± 0.8
CL	11.15 ± 0.227	47.7 ± 0.9
CH	10.53 ± 0.525	48.7 ± 1.6

NC : Normal(non-fibrotic) control rats with saline i.p. injection
DC : Acute fibrosis control rats with DMN i.p. injection
AL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Camellia sinensis*
AH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Camellia sinensis*
BL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Comus officinalis*
BH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Comus officinalis*
CL : Fibrotic rats supplied with 0.15% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*
CH : Fibrotic rats supplied with 0.3% of methanol extracts of *Pinus koraiensis*

라) 조직관찰

산수유와 솔잎은 정상군에 비해 간이 손상되었으나, 간경화 모델에 비해서는 간손상이 미미함을 보였고, 녹차는 0.3% 급여시 정상군과 같은 형태를 보임으로써 녹차 methanol 추출물의 높은 간섬유화 억제활성을 확인할 수 있었다(Fig. 1-4).

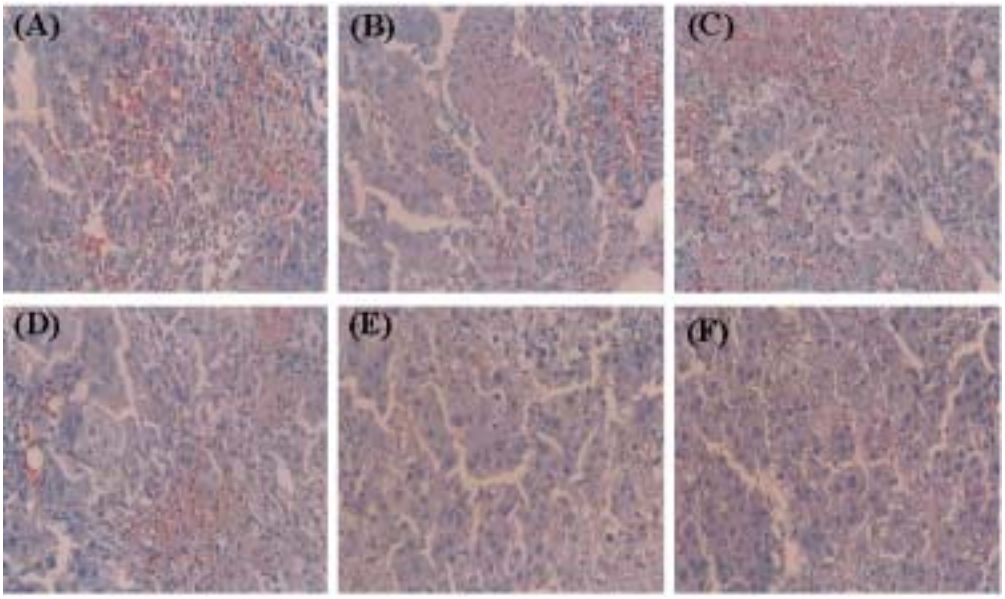


Fig. 1-4. Histologic examination of liver section from rat treated with sample extracts and DMN(×200).

Liver section was stained with hematoxylin & eosin.

A : 0.15% *Pinus koraiensis* B : 0.3% *Pinus koraiensis*

C : 0.15% *Comus officinalis* D : 0.3% *Comus officinalis*

E : 0.15% *Camellia sinensis* F : 0.3% *Camellia sinensis*

나. 녹차 함유 알코올성 간섬유화 억제활성물질의 정제

1) 녹차의 methanol 추출 및 유기용매 분획

간섬유화 억제활성물질을 정제하기 위해 시료로 선정된 녹차를 Scheme 1-4에 기술된 방법에 따라 대량추출을 실시하였다. 녹차 2 kg을 methanol로 추출한 후, hexane, chloroform, ethylacetate로 분획하여 남는 잔사를 methanol 분획으로 하였다. 각 분획별로 collagen type Ⅰ 억제활성을 측정한 결과 Fig. 1-5에서와 같이 ethylacetate 분획물, methanol 분획물 순으로 높은 억제활성을 나타내었다.

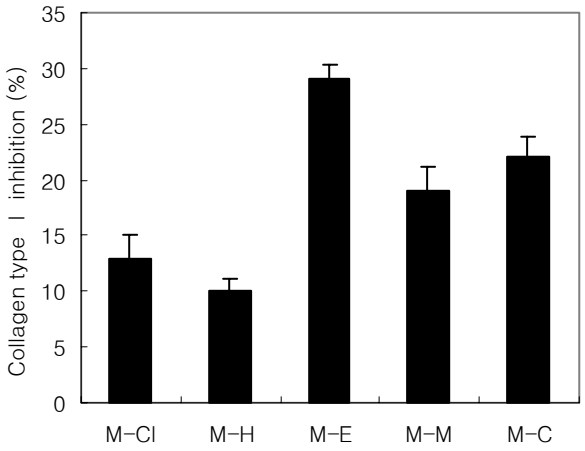


Fig. 1-5. Inhibitory effect of organic solvent extracts from *Camellia sinensis*.

M-Cl : Methanol extract fractionated with chloroform

M-H : Methanol extract fractionated with hexane

M-E : Methanol extract fractionated with ethylacetate

M-M : Methanol dissolved with methanol

M-C : Methanol extract

2) 1차 silica gel 60 open column chromatography

상기의 M-E 분획물을 chloroform과 methanol을 100 : 0부터 0 : 100으로 극성도를 10%씩 변화시키면서 각각 5 bed volume씩 stepwise로 용출시킨 후, 각 획분의 collagen type Ⅰ 억제활성 효과를 검토한 결과, chloroform : methanol = 10 : 90에서 가장 높은 collagen type Ⅰ 억제활성 갖는 획분을 분리하였다(Fig. 1-6).

3) 2차 silica gel 60 open column chromatography

분리된 활성획분을 chloroform과 methanol을 20 : 80, 14 : 86, 12 : 88, 10 : 90, 8 : 92, 6 : 94, 0 : 100 순으로 용출하여 저해활성을 측정한 결과 chloroform : methanol = 12 : 88에서 가장 높은 collagen type Ⅰ 억제활성을 갖는 용출획분을 분리하였다(Fig. 1-7).

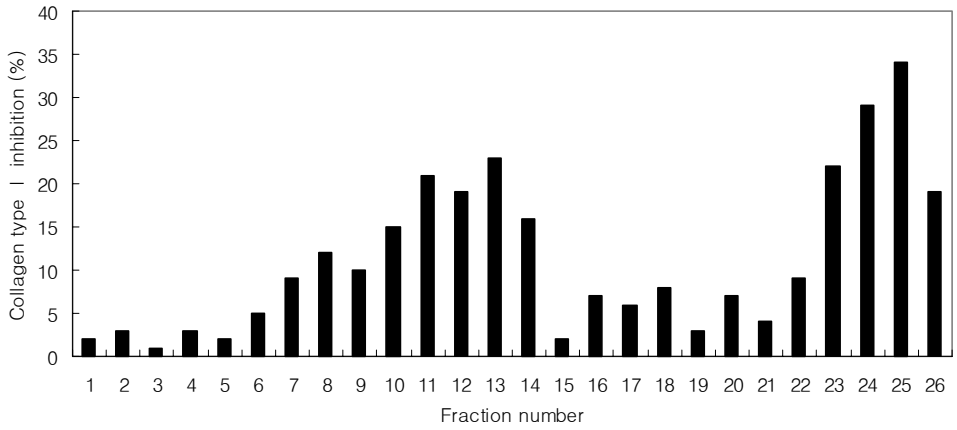


Fig. 1-6. Inhibitory effect of M-E subfractions eluted by the first sillica gel open column chromatography on collagen type I in HSC-T6 cell culture medium.

Inhibitory effect on collagen type I was determined according to the methods previously described in scheme 1-3. Sample concentration was 0.1 ㎎/㎖. Eluants were mixture of $CHCl_3$ and MeOH (100:0 (No. 1), 80:20 (Nos. 2～4), 70:30 (Nos. 5～7), 60:40 (Nos. 8~10), 50:50 (Nos. 11～13), 40:60 (Nos. 14～16), 30:70 (Nos. 17～19), 20:80 (Nos. 20～22), 10:90 (Nos. 23～25), 0:100 (No. 26); v/v).

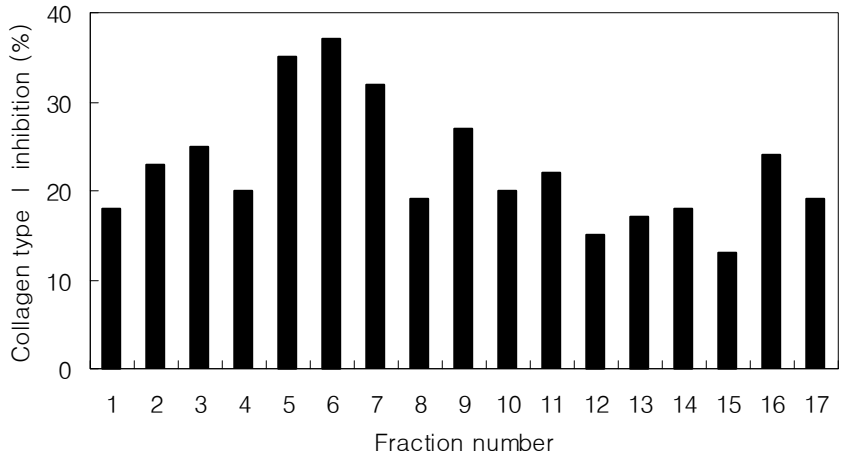


Fig. 1-7. Inhibitory effect of M-E subfractions eluted by the second sillica gel open column chromatography on collagen type I in HSC-T6 cell culture medium.

Inhibitory effect on collagen type I was determined according to the methods previously described in scheme 1-3. Sample concentration was 0.1 ㎎/㎖. Eluants were mixture of $CHCl_3$ and MeOH (20:80 (No. 1), 14:86 (Nos. 2～4), 12:88 (Nos. 5～7), 10:90 (Nos. 8～10), 8:92 (Nos. 11～13), 6:94 (Nos. 14～16), 0:100 (No. 17); v/v).

4) Prep-thin layer chromatography

고활성 상기 획분을 ODS gel plate(20 × 10 cm)에서 chloroform : methanol = 3 : 10의 전개용매로 Prep-TLC를 실시하여 4개의 획분으로 분리한 후 collagen type I 억제활성을 측정한 결과 Fig. 1-8과 같이 R_f치가 가장 낮은 CS-1 획분에서 가장 높은 억제활성을 나타내었다.

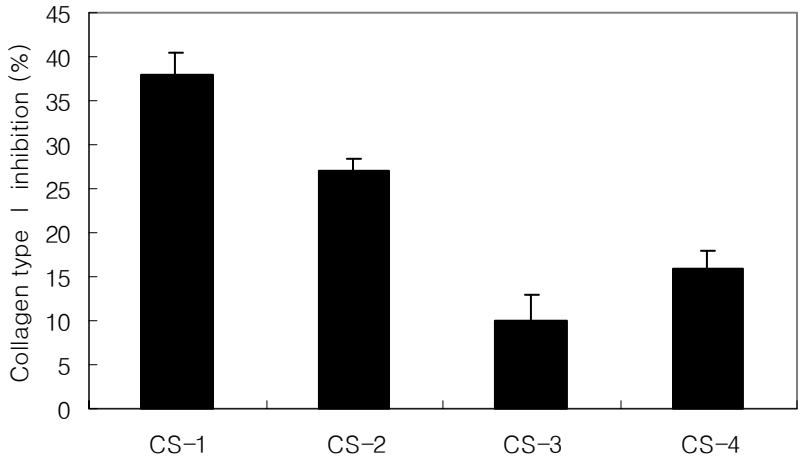


Fig. 1-8. Inhibitory effect of fractions isolated by the TLC on collagen type I in HSC-T6 cell culture medium.

5) HPLC

분리된 활성획분을 C_{18} column(Luna, 4.6 × 150 mm)에 주입하고 acetonitrile : TFA = 99.95 : 0.05의 전개용매를 사용하여 1 ml/min의 유속으로 용출하여 활성획분만을 받아 농축한 후, 2차 HPLC를 동일조건에서 실시한 결과 Fig. 1-9와 같이 비교적 순도가 높은 저해활성물질을 정제할 수 있었다.

다. 정제물질의 구조해석

정제물질을 구조해석하기 위해 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FAB-MS 등을 이용하여 구조분석한 후 chemical library를 이용하여 검색한 결과 EGCG(epigallocatechin-3-gallate)와 유사한 pattern을 보임에 따라 authentic으로 Sigma사의 시판 EGCG를 사용하여 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR 및 HPLC 분석을 실시하였다. 그 결과 Fig. 1-10, 1-11, 1-12와 같이 녹차 methanol 추출물로부터 정제한 시료가 시판 EGCG와 일치함으로써 collagen type I 억제활성물질을 EGCG로 동정하였다.

Fig. 1-9. HPLC analysis of the purified fraction, CS-1, on Luna C_{18} column.

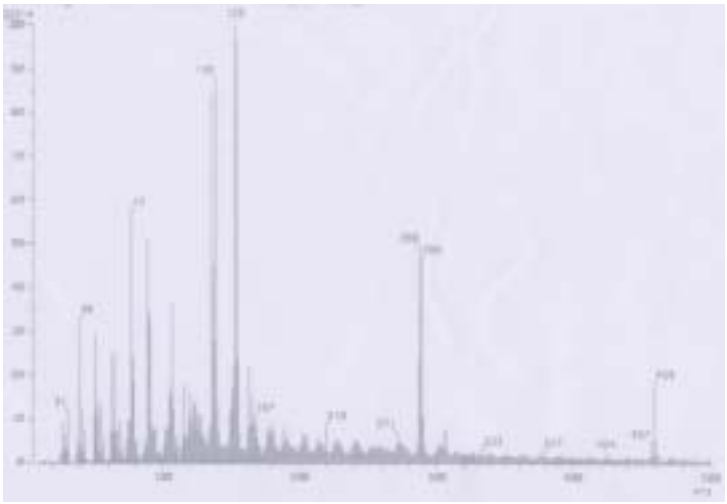


Fig. 1-10. FAB-MS spectrum of collagen type I inhibitor, CS-1, isolated from *Camellia sinensis*.

The spectrum was recorded on positive ion FAB mass spectrometer (JMS-AX505WA, JEOL, Japan).

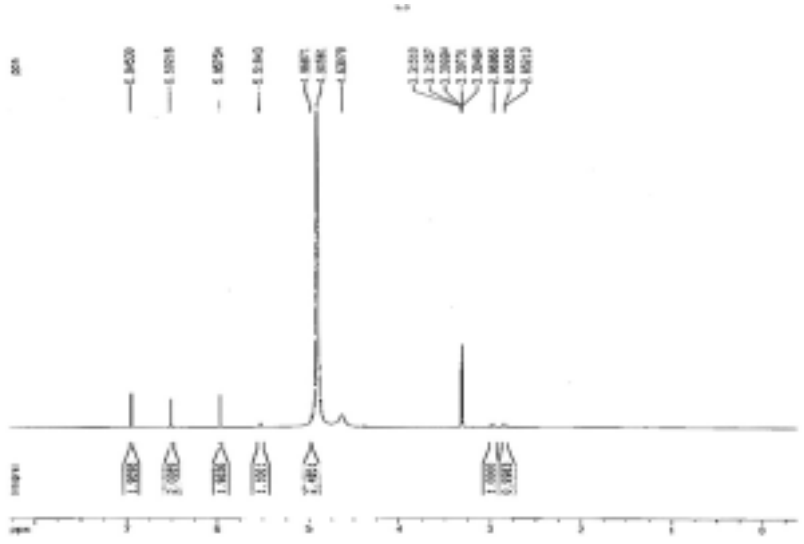


Fig. 1-11. ^{1}H-NMR spectrum of collagen type I inhibitor, CS-1, isolated from *Camellia sinensis*.

CS-1 was dissolved in MeOD (methyl-d3 alcohol-dl) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-500, Bruker, German) operating at 600 MHz and 25℃.

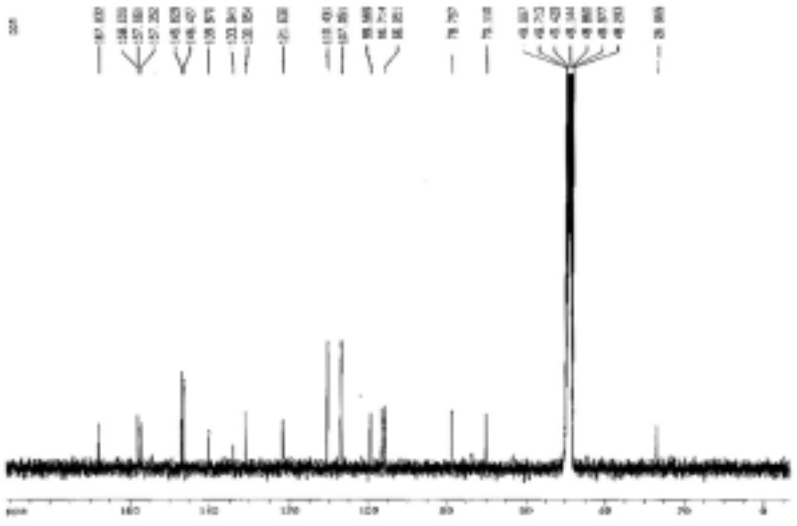


Fig. 1-12. ^{13}C-NMR spectrum of collagen type I inhibitor, CS-1, isolated from *Camellia sinensis*.

CS-1 was dissolved in MeOD (methyl-d3 alcohol-dl) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-500, Bruker, German) operating at 500 MHz and 25℃.

라. 녹차로부터 분리된 EGCG의 collagen type Ⅰ 억제활성

녹차 methanol 추출물로부터 분리한 물질인 EGCG의 collagen type Ⅰ 억제활성을 농도별로 검색함으로써 본 물질의 실용화 가능성을 검토하고자 하였다. 그 결과 Fig. 1-13과 같이 25 uM의 낮은 농도에서도 100 uM의 고농도와 유사한 억제활성을 나타냄으로써 향후 물질의 공업적 대량 생산계 개발여하에 따라 알코올성 간섬유화 억제물질로써 높은 실용화 가능성을 시사하였다.

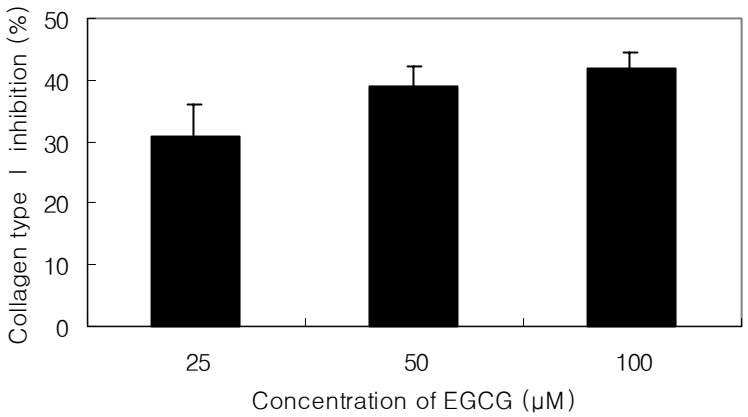


Fig. 1-13. Inhibitory effect of EGCG on collagen type Ⅰ in HSC-T6 cell culture medium.

마. 시판 카테킨류의 collagen type Ⅰ 억제활성

녹차 함유 카테킨 중 EGCG 다음으로 함량이 가장 높다고 알려진 ECG(epicatechin gallate)와 EC(epicatechin)의 시판 표준물질(Sigma Co.)을 사용하여 collagen type Ⅰ 억제활성을 비교하였다. 그 결과 EGCG의 억제활성이 가장 높게 나타났으나 ECG와 EC도 유사한 억제활성을 나타내었다(Fig. 1-14). 따라서 녹차 함유 EGCG 뿐만 아니라 다른 카테킨류도 알코올성 간섬유화 억제물질로 실용화될 가능성이 높음을 시사하였다.

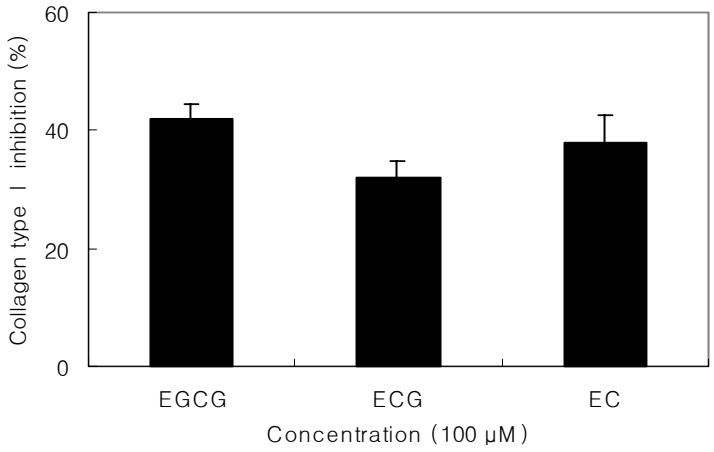


Fig. 1-14. Inhibitory effects of EGCG, ECG and EC on collagen type Ⅰ in HSC-T6 cell culture medium.

제2절 알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phyochemicals의 소재화

1. 서 설

알코올에 의한 간손상은 ①지방간, ②알코올성 간염, ③간경화의 세 가지 주요한 형태로 구분한다. 이들 손상을 야기하는 핵심적 위험요인은 알코올 섭취의 양과 기간으로 남자는 매일 40~80 mg 알코올을 10년에서 20년간 섭취할 경우 지방간을, 80~160 mg 섭취 시 간경화를 초래하며, 여성의 경우는 알코올성 간 손상에 훨씬 민감하여 하루 20 mg 이상일 때 알코올성 간질환을 야기한다. 대부분의 알코올은 간세포의 사이토졸에서 alcohol dehydrogenase에 의해 아세트알데히드로 대사되고, 이 대사물은 사이토졸과 미토콘드리아에 있는 aldehyde dehydrogenase에 의해 다시 분해된다. 두 번째 경로는 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)계에서 일어나는데 알코올 산화의 10%정도를 담당한다. MEOS계는 알코올 산화시 CYP2E1이 관여하게 되고 이 효소는 만성적으로 알코올을 과량 섭취시 유도되는 것으로 알려져 있다.

알코올은 간내 산화시 필수적으로 활성산소종을 생성한다. 따라서 알코올에 의한 간손상은 활성산소종에 의한 손상이라 할 수도 있다. 이들은 주로 MEOS계의 CYP2E1에 의해 생성되나 일부는 다른 계에서도 생성되어 대부분은 간내 존재하는 antioxidant(GSH 등) 또는 antioxidant enzyme(SOD 등)에 의해 소거되지만 잔존할 경우 간 손상의 주요 원인물질로 작용한다. 활성산소종들 중 O_2^{-}·, ·OH, H_2O_2 및 1-hydroxyethyl radical(HER)은 CYP2E1에 의해 주로 생성되지만 ADH계에 의한 redox shift와 acetaldehyde로부터 aldehyde oxidase 및 xanthine oxidase에 의해 O_2^{-}·, ·OH 등도 생성된다. 이들은 간의 지질을 과산화시킴으로써 간의 섬유화에 관여하고, 단백질을 carbonyl화하여 transferrin, ferritin 등의 간 단백질 변성과 지방간을 촉진시키며, 간세포의 DNA를 fragmentation시킨다. 특히 hydroxy radical과 alcohol의 반응에 의해 생성되는 hydroxyethyl radical은 간내에 이들을 소거하는 효소계가 존재하지 않기 때문에 최근 간손상의 핵심 radical로 주목을 받고 있다. 따라서 알코올성 간질환의 예방 및 치료용 소재개발에 있어 활성산소종의 생성억제 물질, 생성된 활성산소종의 소거 물질 또는 활성산소종의 산화적 손상에 대한 세포보호성 물질의 검색 및 소재화는 알코올성 간질환의 예방에 있어 핵심분야이다.

녹차는(*camellia sinensis*) 차나무과에 속하는 상록교목 또는 관목으로 잎은 품

종과 착생위치에 따라 변이가 크지만 길이가 6~20 cm, 나비가 3~4 cm 정도의 타원형으로 끝이 두꺼우며 가장자리에 작은 톱니가 있다. 녹차를 구성하는 카테킨류 중 epicatechin gallate(ECg)는 녹차건량의 3~6%를 차지하는 주요성분이다. 녹차 카테킨류들은 ischemia-reperfusion에 의한 간 손상억제 및 보호효과, 화학물질이나 자외선으로 유도되는 활성산소 관련 질병에 대한 예방 및 완화효과 등과 관련하여 이미 다수 보고되어 있으나, 알코올성 간손상에 대한 *in vitro* 실험의 경우 EGCG가 아라키돈산과 철로 유도한 손상에 효과가 있음이 밝혀져 있을 뿐 직접적인 알코올 투여손상에 대한 보호효과와 EGCG 이외 카테킨류, polyphenol들의 알코올성 간손상에 대한 보호효과는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 200 여점의 식용생물자원의 추출물에 대하여 알코올에 의한 간세포 보호물질의 검색과정에서 가장 높은 활성을 보인 녹차(*camellia sinensis*) 메탄올 추출물로부터 활성물질을 분리하고 그 구조적 특징과 생리·약리적 특성 등을 검토함으로써 소재화를 위한 기초자료를 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

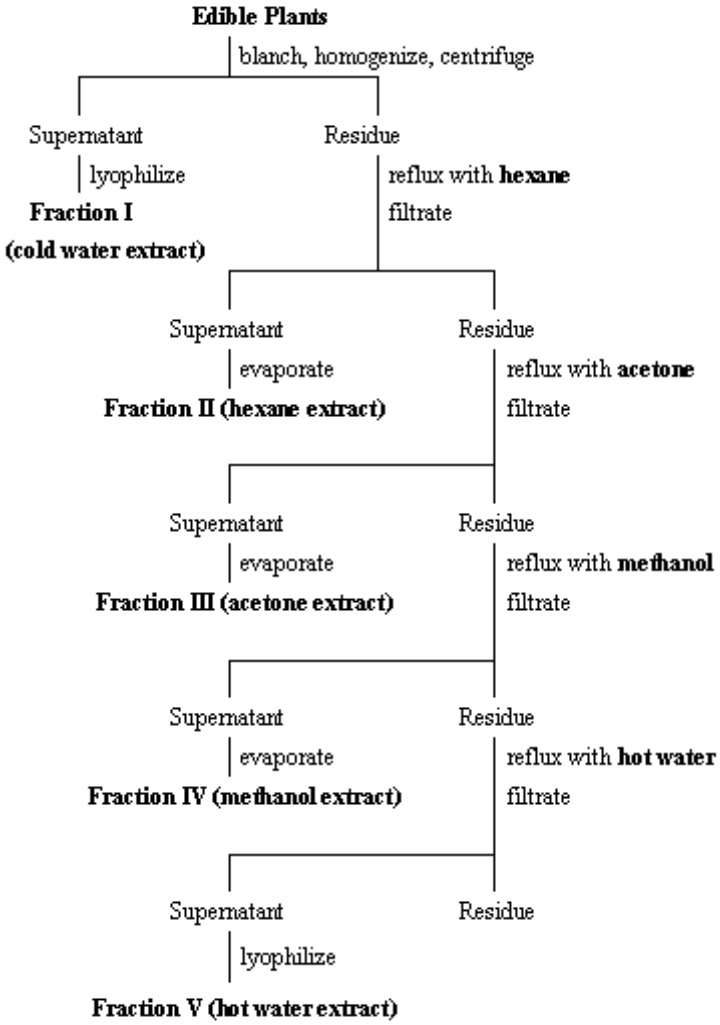
가. 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 국내산 식용생물자원 약 200 여종은 서울 시내 백화점, 경동시장, 수협 등지에서 산지가 표시된 것만을 구입, 또는 공급받아 사용하였다. 최종 선별된 녹차(*Camellia sinensis*)는 (주)태평양에서 공급받아 다단계의 대량추출 과정을 거쳐 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 HepG2/2E1 cell line은 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 분양받아 transfection시킨 것을 사용하였으며, IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium), FBS(fetal bovine serum), antibiotics 등은 Gibco-BRL사(Grand Island, USA), sodium bicarbonate, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide), DMSO(dimethyl sulfoxide), PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate) 등은 Sigma사(St. Louis, USA), G418 sulfate는 Calbiochem(Darmstats, Germany)로부터 구입하였다. 본 실험에서 사용된 동물은 5주령의 SPF, ICR계 수컷 mouse로 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며, 실험동물은 온도 22±2°C, 습도 55~60%에서 1일 12시간씩 점등 하에, 물과 사료를 자유로이 급식시키며 사육하였다.

나. 실험방법

1) 알코올성 간손상 보호활성물질 검색용 시료의 조제

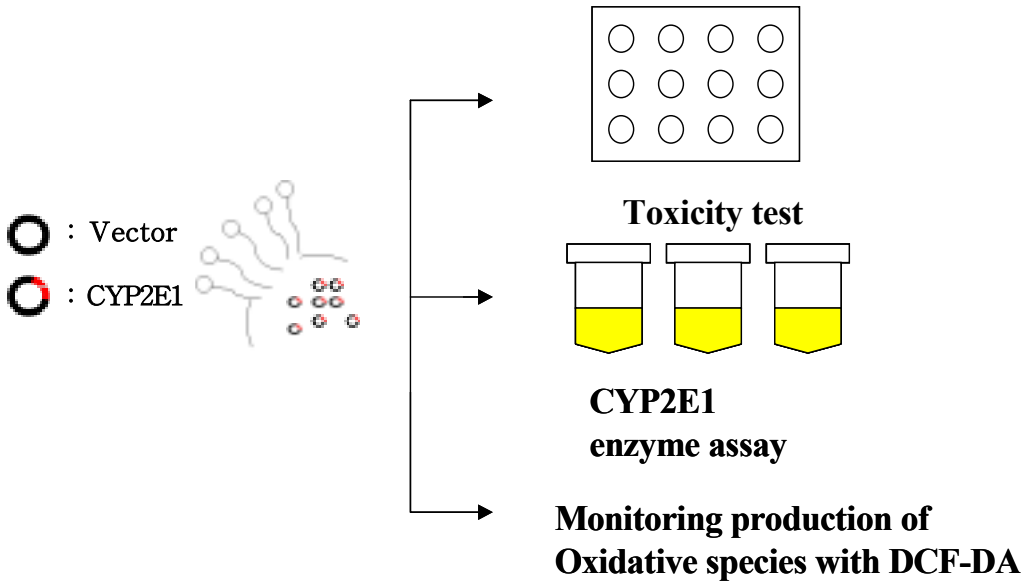
각각의 시료는 Scheme 2-1의 방법에 따라 100°C에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고, 동결건조한 다음 5,000 rpm에서 5분, 7,000 rpm에서 20분간 homogenazer(IKA Labotechnik Co, Ultra-turrex T50, Germany)로 파쇄한 후 5,000 x g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 냉수추출획분(Fr. I)으로 하였다. 침전물은 동결건조 후 극성도에 따라 hexane, acetone, methanol, hot water 순으로 2시간 동안 환류 추출한 후 각각을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III, IV, V의 용매별 추출획분을 조제하였다.



Scheme 2-1. Systematic extraction procedure for various edible plants.

2) 간세포 보호활성 *in vitro* assay계

알코올에 의한 간손상 보호활성 측정용 assay계는 cytochrome P450 2E1이 transfection된 HepG2 cell을 이용하여 Scheme 2-2와 같이 확립하였다. 즉, HepG2/2E1 cell(human hepatocyte cell)을 5 × 10^4 cells/well의 농도로 24 well plate에 5 x 10^4cells/well로 seeding한 후 37°C에서 20시간 동안 배양하고 배지를 제거한 다음 PBS로 세척하였다. 5% FBS를 포함하는 IMDM 900 ㎕을 첨가한 후, 0.01 ㎍/㎖의 PMA와 함께 2% ethanol(final concentration)과 sample(1 mg/ml) 100 ㎕을 첨가하고 24시간과 48시간 경과한 다음 plate를 꺼내어 각각 재처리하였다. 72시간 후 MTT(0.5 mg/ml)를 가하고 37°C에서 2시간 반응시킨 후 형성된 formazane을 DMSO로 녹인 다음 microplate reader를 사용, 흡광도 570 nm, refernce 630 nm에서 측정하였다.



Scheme 2-2. Cytochrome P450 2E1 transfected cell line and assay system for alcohol-induced damage on tranfected cell line.

3) 알코올에 의한 간세포 보호활성물질의 *in vivo* 독성실험

선정된 녹차 methanol 추출물의 급성독성 여부를 확인하기 위하여 ICR mouse (수컷, 5주령)을 이용하여 시료를 0.15%, 0.3%로 사료에 섞어 4주 동안 공급하였다. 4주 간의 체중변화를 관찰하고 최종일까지 생존한 마리 수를 측정한 후 백분율로 표시하였다. 마우스에서 시료의 간 독성 여부를 확인하기 위하여 혈청에서 GOT 및 GPT의 활성을 측정하였다. GOT 또는 GPT 기질을 1 ㎖씩 시험관에 넣고 37℃ 수조에서 2~3분간 가온한 뒤 증류수로 5 배 희석된 혈청을 0.2 ㎖씩 넣은 후 37℃ 수조에서 GOT의 경우 60분, GPT의 경우 30분간 반응시킨 다음 발색액 2,4-dinitrophenyl- hydrazine을 1 ㎖씩 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 후 0.4 N NaOH을 10 ㎖씩 넣어 반응을 중지시켰다. 반응 중지 30분 후 505 nm에서 증류수를 blank로 하여 표준액, 검체 및 대조군의 흡광도를 측정하고 여기서 얻은 검량곡선을 이용하여 효소의 활성 단위로 환산하였다.

4) *In vivo*에서의 시료에 의한 cytochrome P450 2E1 저해활성 측정

실험동물은 5주령, 체중 25g 내외의 ICR mouse를 구입하여 적응시킨 후 난괴법에 의해 정상군과 알코올 실험군으로 각 군당 8마리씩 나눈 다음, 알코올군은 녹차 메탄올 추출물을 공급하지 않는 군과 0.15%, 0.3%의 농도로 녹차추출물을 공급하는 군으로 나누어 액체사료(Lieber-Decarli diet)의 형태로 공급하였다 (Table 2-4, 2-5, 2-6). 알코올은 4주간 전체 섭취 열량의 30%에 이르도록 서서히 상승시켜 공급하였으며 매일 식이섭취량을, 일주일마다 몸무게 변화를 측정하였다. 실험 4주째에 동물을 16시간 절식시킨 후 희생 전 혈액을 복대정맥에서 채혈하고, 희생 후 간을 적출하여 실험에 사용하였다. 적출한 간은 무게를 측정한 다음 냉장온도의 potassium phosphate buffer(pH 7.6)으로 균질화하고 10,000 × g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 108,000 × g에서 60분간 원심분리하였으며 침전물을 상기의 buffer로 다시 균질화하여 microsome으로 사용하였다.

가) 간 내 microsome에서의 P450 양의 측정

수집된 microsome을 30 ㎕씩 취하여 최종 1 ml이 되도록 P450 buffer(0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4 containing 0.1 M EDTA, 20% glycerol, 0.5% sodium cholate, Emulsion 913, 30 ㎛ p-naphthoflavone)와 혼합한 후 소량의 sodium dithionite를 첨가하여 baseline을 설정하고, oxygen-free carbon monooxide를 직접 버블링을 통하여 결합시켜 400 nm에서 500 nm까지 기록한 후, 450 nm와 490 nm의 값의 차이를 통하여 P450의 양을 측정하였다.

나) Microsome의 P4502E1 활성측정

수집된 microsome을 0.3 mg protein씩 취하여 pH 7.6의 phosphate buffer, 1 mM *p*-nitrophenol, NGS generation system과 함께 37°C 수조에서 30분간 반응시켰다. 반응은 20% trichloroacetic acid를 100 ㎕ 첨가함으로써 종결시켰으며, 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액에 2 M NaOH 250 ㎕를 첨가, 발색된 4-nitrocatechol을 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

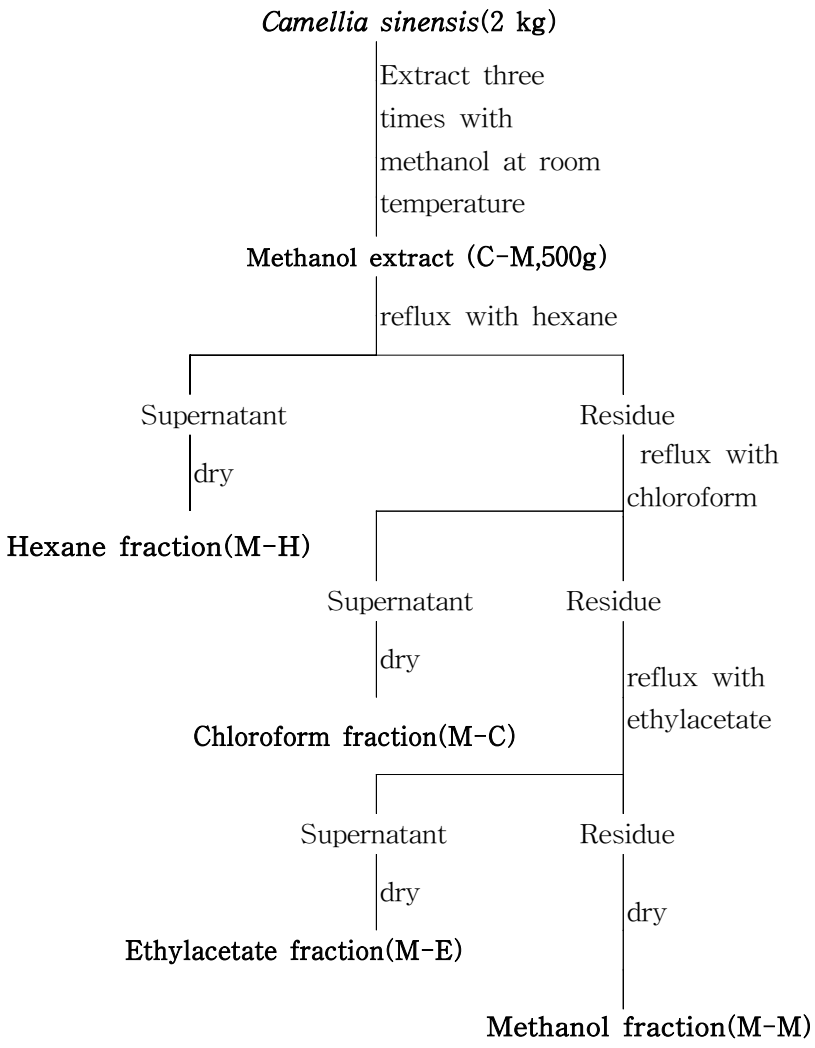
다) Microsome P4502E1 발현량 측정

Microsome에서 P4502E1의 발현량은 immunoblotting으로 측정하였다. 12% SDS gel에 10 ㎍씩 loading 한 후 전개하여, nitrcellulose membrane에 transfer 한 후 anti-mouse 2E1 polyclonal antibody와 4°C에서 약 16시간 동안 반응시킨 후, peroxide linked goat anti-rabbit immunoglobulin과 실온에서 1시간 동안 반응시켜 암실에서 x-ray film으로 현상하였다.

5) 선정시료 녹차의 methanol 추출 및 유기용매 분획

대량의 녹차 잎을 100°C에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고 hand mixer로 곱게 마쇄한 후 1 kg의 녹차 조말을 methanol 4배 부피로 72시간 동안 실온에서 정치시키면서 매 24시간 마다 메탄올을 교체하여 추출한 후, 감압농축하여 녹차 메탄올 추출물을 조제하였다. 추출물로부터 메탄올을 완전히 제거한 후 hexane, chloroform, ethylacetate를 각각 2배 부피로 첨가하여 각 유기용매별 가용획분을 조제하였다(Scheme 2-3).

.



Scheme 2-3. Flow sheet for organic solvent fractionation of methanol extract from *Camellia sinensis.*

6) 녹차로부터 알코올에 의한 간손상 보호물질의 분리 및 정제

Chloroform으로 활성화된 silica gel 60 column에 유기용매 분획을 통해 예비 분리되어 진 M-M을 chloroform과 methanol을 사용하여 1, 2차 silica gel open column의 최적조건인 chloroform : methanol = 10 : 90과 6 : 94의 용매로 각각 용출, 분획, 농축하였다. 상기의 획분을. HPLC C_{18} column (analytical HPLC, 4.5 x 150mm)에 주입하고 TFA와 acetonitrile을 0.05% TFA/H_2O : acetonitrile = 100 : 0~60 : 40의 용매조건과 1 ml/min의 유속으로 용출시키고, 활성획분만을 농축한 후 농축획분을 동일한 조건에서 HPLC를 실시하였다.

7) 녹차 함유 알코올성 간손상 보호물질의 구조분석

HPLC로 정제된 물질의 ^{1}H-NMR은 600 MHz, ^{13}C-NMR은 500 MHz에서 시료의 이화학적 이동(ppm)을 측정하였고, EI-MS와 FAB-MS spectrum을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 식용생물자원으로부터 알코올성 간손상 보호물질의 검색 및 시료의 선정

1) 식용생물자원으로부터 알코올성 간손상 보호물질의 1차 검색

국내산 식용생물자원으로부터 알코올성 간손상 보호물질을 실용화시키기 위해 1차적으로 앞서 기술한 방법에 따라 조제한 추출물 200 여점을 대상으로 HepG2/2E1을 이용한 1차 알코올성 간손상 보호물질을 검색한 결과 오미자, 목단피, 녹차, 산딸기의 메탄올 추출물이 높은 보호활성을 나타내었다(Table 2-1). 이들 네가지 시료를 대상으로 2차검색을 실시한 결과 Fig. 2-1과 같이 오미자를 제외한 3점의 시료가 유사한 값을 나타내었으나, 카테킨의 높은 항산화활성이 보고되어 있는 점을 고려하여 녹차를 최종 시료로 선정하였다.

2) 선정시료 녹차의 *in vivo* 급성 독성 검토

상기에서 시료로 선정된 녹차 methanol 추출물의 급성독성 여부를 확인하기 위하여 0, 1,500, 3,000 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 ICR mouse에 음용수의 형태로 4주동안 공급해 주면서 생존율을 검토한 결과, 모든 군에서 100%의 생존율을 보임으로써 녹차 추출물에 의한 독성은 나타나지 않았다(Table 2-2).

간손상 정도를 나타내는 GOT 및 GTP 활성을 측정한 결과 녹차 0, 1,500, mg/kg 급여군에서 정상 대조군과 유사하게 낮은 값을 나타냄으로써 녹차 methanol 추출물에 의한 독성은 나타나지 않음을 알 수 있었다(Table 2-3).

3) 선정된 간세포 보호활성물질의 *in vivo* 유효성

선정된 간세포 보호물질의 *in vivo* 활성을 검정하기 위해 알코올 식이를 공급하면서 P4502E1의 활성과 발현정도를 측정하였다. 선정시료인 녹차 추출물을 4주간 알코올과 함께 공급한 결과 알코올과 녹차를 함께 공급한 군의 체중 증가가 다른 군에 비해 유의성 있게 다소 낮았으나, 컨트롤군으로 녹차만을 공급했을 경우의 체중증가가 정상적임을 고려할 때, 시료에 의한 독성은 아님을 알 수 있었다 (Table 2-7).

가) 간 내 microsome에서의 P450 양

선정시료 녹차의 P450 content에 대한 영향을 검토하기 위해 간의 microsome 획분을 대상으로 carbon monooxide complex를 형성시킨 후 P450과 P490의 차로써 P450 양을 측정하였다. 녹차만 급여한 경우에 P450의 양이 컨트롤에 비해 유의적으로 증가하였으며, 알코올과 함께 급여하였을 때는 GH군 즉 0.3% 녹차시료 급여군은 알코올 컨트롤군보다 유의적으로 낮았다. 녹차만 급여한 GL, GH군에서의 P450 양의 증가는 P4502E1 뿐만 아니라 다른 P450 계열의 증가도 그 원인으로 보이며, 알코올과 함께 공급했을 경우는 녹차 무첨가구와 낮은 농도(0.15%)에서 대조군보다 높은 값을 보임으로써 알코올에 의한 CYP2E1의 증가현상을 나타내었으나 높은 농도(0.5%)의 녹차 첨가시에는 CYP2E1의 생성이 억제됨에 따라 대조군보다 낮은 값을 나타낸 것으로 해석되었다(Table 2-8).

나) Microsome에서의 P4502E1 활성

상기 선정된 녹차의 CYP2E1 저해활성을 검토하기 위해 간의 microsome 획분을 대상으로 pNP hydroxylation 활성을 측정하였다. 녹차추출물 급여에 의해 알코올 급여군과 비급여군 모두 CYP2E1의 활성이 유의성 있게 저해되었으며 0.3% 녹차 추출물 급여군보다 0.15% 급여군이 낮은 활성을 나타내었다. 특히 알코올 급여군에서의 활성저해는 알코올 비급여 컨트롤과 같이 알코올 급여군의 50% 수준으로 저해됨으로써 간에서의 P450에 의한 활성산소 발생을 현저히 줄일 수 있을 것으로 기대되었다(Fig. 2-2).

다) Microsome에서의 P4502E1의 발현

간에서의 P4502E1의 발현증감을 확인하기 위해 microsome 획분을 대상으로 immunoblotting을 실시한 결과, 알코올 녹차 고농도 급여군에서 P4502E1의 감소를 관찰할 수 있었다(Fig 2-3).

Table 2-1. Screening of protective effect on alcoholic-induced liver injury in HepG2/2E1 cell

Sample name		Protective effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
차조기	*Penilla sikokiana*	4.4
오수유	*Evodia officinalis*	12.2
연근	*Nelumbo nucifera*	0
호박	*Cucurbita moschata*	5.4
동과	*Benincasa cerifiera Savi*	54.3
죽즙	*Sasamorpha purpurasceus*	59.5
황정	*Polygonatum sibiricum Red*	8.1
토사자	*Cuscuta japonica*	39.4
땅콩	*Arachis hypogea*	66.9
살구	*Prunus armeniaca var. ansu*	0
금앵자	*Rosa laevigata Michx*	39.6
곶감	*Disopyrus kaki*	0
부추	*Allium tuberosum*	40.6
가시연밥	*Euryale ferox*	0
시금치	*Spinacia oleracea*	5.7
고구마	*Ipomoea batatas*	3.6
목단피	*Paeonia suffruticosa Andrews*	76.6
흰파	*Allium fistulosum*	34.8
잣	*Pinus koraiensis*	75.9

(to be continued)

Sample name		Protective effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
참깨	*Sesamum indicum*	59.7
알파파	*Medicago sativa*	34.3
어린백경채	*Brassica campestris var. chinensis*	76.3
원추리	*Hemerocallis fulva*	0
치커리	*Cichorium intybus L. var. foliosum*	0
고나	-	0.3
청경채	*Brassica campestris var. chinensis*	2.0
브러커리	*Brassica oleracea*	4.3
어린참나물	*Pimpinella brachycarpa*	0
그린비타민	-	67.7
겨자채	*Brassica nigra*	0
왕궁야채	-	65.7
앤다이브	*Cichorium endivia*	0
비닐하우스갓	*Brassica juncea*	1.7
콘샐러드	*Valerianella locusta*	5.2
당근잎	*Meloidogyne hapia Chitwood*	0
참나물	*Pimpinella brachycarpa*	35.2
파슬리(잎)	*Petroselinum crispum*	39.4
고추잎	*Capsicum anuum*	10.8
접시꽃	*Althaea rosea*	3.1

(to be continued)

Sample name		Protective effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
치커리(잎)	*Cichorium intybus L. var. folisum*	0
곰피	*Entermorpha intestinalis*	0
근대	*Beta vulgaris*	0
오갈피	*Acanthopanax sessiliflorus*	66.3
박하	*Menta arvensis var. japonia*	30.2
감초차	*Glycyrrhiza glabra*	16.9
정향	*Eugenia caryophyllate*	60.5
서양 고추냉이	*Armoracia rusticana*	45.7
타이보	-	0
비닐하우스갓	*Brassica juncea*	1.4
하수오	*Polygonum multiflorum*	0
바실	*Ocimm basilicum*	30.1
카라웨이	*Carum carvi*	6,8
겨자	*Brassica alba*	54.2
녹차	*Camellia sinensis*	79.2
아니스	*Pimpinella aisum*	23.1
민트	*Mentha spp.*	44.0
아욱	*Malva verticillate*	22.3
월계수잎	*Laurus nobilis*	60.0
커리플라워	*Brassica oleracea*	29.3
이태리조대	-	56.6

(to be continued)

Sample name		Protective effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
계피차	*Cinnamomum loureirii*	37.2
둥글레차잎	*Polygoatum japonicum*	32.3
솔잎차	*Pinus densiflora*	60.5
유자차	*Citrus junos*	5.7
결명자차	*Cassia tora*	3.2
석류차	*Punica gratum*	28.3
인삼차	*Panax ginseng*	0
삽주차(창출)	*Atractylodes japoncia*	26.3
보리차	*Hordeum vulgare var. hexastichon*	22.3
잇꽃차(홍화)	*Carthamus tinctorius*	1.2
치자	*Gardenia jasminoides*	65.9
오미자	*Schizandra chinensis*	63.4
쑥	*Artemisia asiatica*	2.4
오갈피	*Acathopanax sessiliflorum*	40.7
옥수수	*Zea mays*	1.3
치커리	*Cichorium intybus.*	0
으름덩굴	*Akebia quinata*	1.4
쌍화차	-	0
칡	*Pueraria thunbergiana*	54.7
잔대	*Adeophora tryphilla var. japonica*	9.5
탱자	*Poncirus trifoliate*	0
호도	*Juglas sinensis*	50.5

(to be continued)

Sample name		Protective effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
삼지구엽 (음양곽)	*Epimedium koreanum*	5.2
감잎	*Diospyros kaki*	54.2
구기자	*Lycium chinense*	10.1
산수유	*Comus officinalis*	35.3
비파잎	*Eribotrya japonia*	24.1
감초	*Glycyrrhiza glabra*	10.3
유자	*Citrus junos*	5.4
질경이	*Plantago asiatica*	13.1
냉이	*Capsella bursa-Pastoris*	56.3
뽕잎	*Morus alba*	2.1
단더섭	*Astragalus membranaceus*	43.2
당귀	*Angelica gigas*	10.1
해당화	*Rosa rugosa*	0
검정콩	*Glycine max*	0
귤피	*Citrus unshiu*	10.3
현미	*Oryzae sativa*	0
오향	*Illicium verum Hooker*	65.2
고수	*Coriandrum sativum*	35.4
무순	*Papharus acanthiformis*	12.0
스파이스	-	72.0

(to be continued)

Sample name		Protective effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
젠트	-	10.8
성숙방아잎 (배초향)	*Lophanthus rugosus*	72.3
시금치	*Spinacia oleracea*	10.3
세이지	*Salvia officinalis*	67.0
카르티몬	-	0
토란죽	*Lecocasia esculenta Schott*	0
장노희	-	0
페넬	*Foeniculum vulgare*	34.9
백리향	*Thymus vularis*	32.3
흑후추	*Pipper nigrum.*	50.7
래디쉬	*Raphanus sativus*	12.0
마늘	*Allium sativum*	0
청들깨잎	-	60.2
냉이	*Capsella bursapastoris*	36.0
갓	*Brassica juncea*	34.0
피망	*Capsicum annuum*	0
팥죽	*Phaseolus angularis*	0
육두구	*Myristica fragranas Houtt*	1.5
사보리	*Satureja hortensis*	0
케일뿌리	*Brassica oleracea*	0

(to be continued)

Sample name		Protective effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
하수오	*Polygonum multiflorum*	0
바실	*Ocimm basilicum*	30.1
카라웨이	*Carum carvi*	6,8
겨자	*Brassica alba*	54.2
녹차	*Camellia sinensis-*	79.2
아니스	*Pimpinella aisum*	23.1
어린들깨잎	*Perilla frutescr*	0
양귀비종자	*Papaver somniferum*	0
울금,심황	*Curcuma longa*	0
잔금	-	0
땅콩	*Arachis hypogaea*	66.93
진저리	*Sargassum thunbergii*	0
백복령	*Poria cocos Wolf*	10.3
이의인	*Coix lacryna-jobi*	36.5
민트	*Mentha spp.*	44.0
아가위	*Crataegus pinnatifida Bunge*	66.2
매실	*Prunus mume*	3.2
Catechin	-	85.6
마	*Dioscorea batatas Decaisae*	0
쿠민	*Cumium cyminum*	63.2
산딸기		74.8

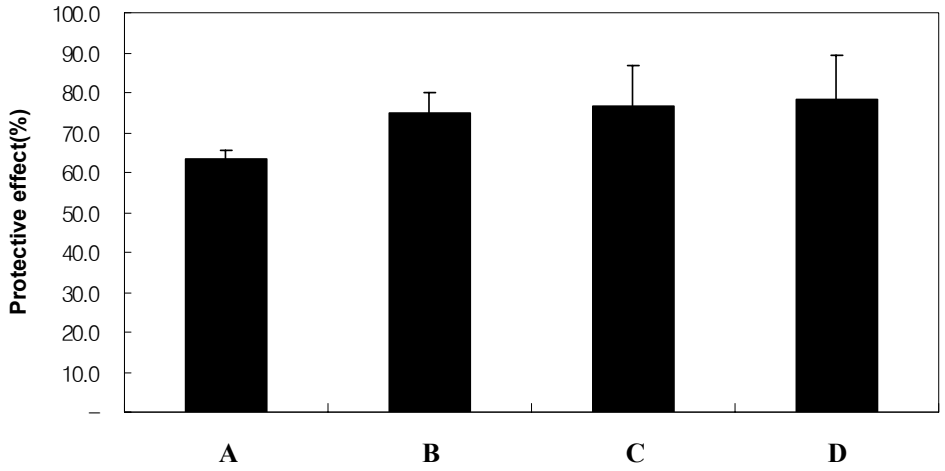


Fig. 2-1. Protective effect on alcohol-induced damage in HepG2/2E1.

A: Methanol extracts of *Schizandra chinensis*

B: Methanol extracts of *Rubus coreanus*

C: Methanol extracts of *Camellia sinensis*

D: Methanol extracts of *Paeonia suffruticosa Andrews*

Table 2-2. Body weight and survival rate of mice orally administrated *Camellia sinensis* on acute toxicity

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	No of mice survived	Survival rate (%)
0 mg/kg	22.718 ± 1.321	32.438 ± 2.331	8	100
1,500 mg/kg	22.730 ± 1.141	32.400 ± 2.822	8	100
3,000 mg/kg	22.800 ± 1.155	28.125 ± 2.149	8	100

Table 2-3. Effect of *Camellia sinensis* methanol extract on GOT and GTP in ICR mouse

	GOT	GPT
0 mg/kg	71.000 ± 7.969	34.200 ± 7.396
1,500 mg/kg	55.125 ± 5.007	31.000 ± 6.505
3,000 mg/kg	65.000 ± 10.863	35.333 ± 3.502

Table 2-4. Composition of liquid diet

Composition (g/liter)	Control	Ethanol
Casein	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5
DL-Methionine	0.3	0.3
Soy bean oil	39.6	39.6
Maltose dextrin	117.7	38.7
Cellulose	10.0	10.0
Mineral mix	8.75	8.75
Vitamin mix	2.5	2.5
Choline bitartrate	0.53	0.53
Xanthan gum	3.0	3.0
Ethanol	-	55.15

Table 2-5. Composition of vitamin mix

Ingredient	Grams/kilogram
Thiamin HCl	0.6
Riboflavin	0.6
Pyridoxine HCl	0.7
Niacin	3.0
Calcium Pantothenate	1.6
Folic acid	0.2
Biotin	0.02
Vitamin B_{12}(0.1%)	10.00
Vitamin A Palmitate (170,000 IU/g)	4.8
Vitamin D3 (400,000 IU/g)	0.4
Vitamin E acetate (500 IU/g)	24.0
Menadione Sodium Bisulfite	0.08
P-Amino Benzoic Acid	5.0
Inositol	10.00
Dextrose	939.0

Table 2-6. Composition of mineral mix

Ingredient	Grams/kilogram
Calcium Phosphate, dibasic	500
Sodium Cloride	74
Potassium Phosphate, monohydrate	220
Potassium Sulfate	52
Magnesium Oxide	24
Manganous Sulfate · H_2O	4.6
Ferrous Sulfate · $7H_2O$	4.95
Zinc Carbonate	1.6
Cupric Sulfate	0.675
Potassium Iodide	0.007
Sodium Selenite	0.01
Chromium Cloride	0.55
Sodium Fluoride	0.06
Sucrose, finely powdered	117.88

Table 2-7. Cumulative energy intake of mice fed experimental diets for 4 weeks

	Week			
	1	2	3	4
Control	23.77±4.18	48.59±8.52	66.14±11.23	86.48±12.68
Ethanol	20.93±3.44	39.89±9.33	61.61±11.22	79.41±13.81
GL	24.21±5.06	43.75±6.16	63.21±4.38	83.32±3.40
EGL	23.99±4.10	43.82±9.10	65.41±9.70	83.27±12.93
GH	22.53±4.25	40.61±4.97	58.11±4.24	76.78±5.42
EGH	20.93±4.53	31.14±4.43	46.45±4.84	61.83±6.43

Extracts of *Camellia sinensis* was supplied in liquid diet(0.15, 0.30%) for 4 weeks. Body weight was measured by weekly. Values were mean ± S.D. of 8 mice in each group.

Control: Normal control mice

Ethanol: Ethanol control mice

GL: Normal mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Camellia sinensis*

GH: Normal mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Camellia sinensis*

EGL: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Camellia sinensis*

EGH: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Camellia sinensis*

Table 2-8. P450 content in mouse liver

(nmol/mg protein)	Control	EtOH
No sample treated	18.30 ± 6.97	38.90 ± 12.63
GL	20.96 ± 7.03	45.43 ± 11.68
GH	32.55 ± 16.14	25.22 ± 4.32

Extracts of *Camellia sinensis* was supplied in liquid diet(0.15, 0.30%) for 4 weeks. Values were mean ± S.E. of 8 mice in each group.

Control: Normal control mice

Ethanol: Ethanol control mice

GL: Normal mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Camellia sinensis*

GH: Normal mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Camellia sinensis*

EGL: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Camellia sinensis*

EGH: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Camellia sinensis*

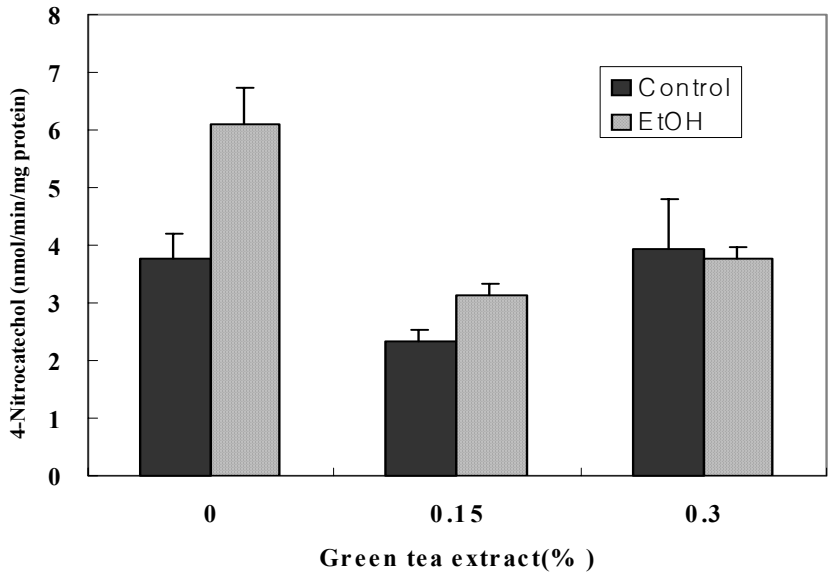


Fig. 2-2. Inhibitory effects of CYP2E1 in microsomal fraction of mouse liver.

Camellia sinensis was supplied in liquid diet with/without ethanol for 4 weeks. Values were mean ± S.D. of 6-8 mice in each group.

Control: Normal control mice

Ethanol: Ethanol control mice

GL: Normal mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Camellia sinensis*

GH: Normal mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Camellia sinensis*

EGL: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Camellia sinensis*

EGH: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Camellia sinensis*

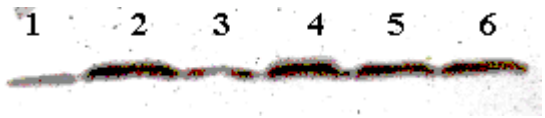


Fig. 2-3. Western blotting of P4502E1 in mouse microsome.

Lane 1: Control, Lane 2: Ethanol, Lane 3: GL.
Lane 4: EGL, Lane 5 : GH, Lane 6: EGH.

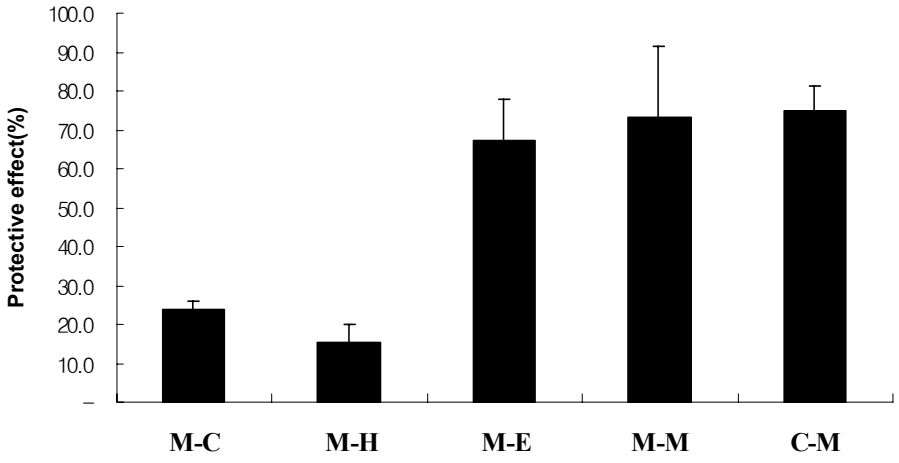


Fig. 2-4. Protective effect of each fraction fractionated from *Camellia sinensis* methanol extract.

M-C: Chloroform extract of *Camellia sinensis*
M-H: Hexane extract of *Camellia sinensis*
M-E: Ethylacetate extract of *Camellia sinensis*
M-M: Methanol extract of *Camellia sinensis*
C-M: Crude methanol extract of *Camellia sinensis*

나. 선정된 간세포보호활성물질의 정제

1) 녹차에서 간세포 보호활성물질의 탐색을 위한 1차 물질 분리

간세포 보호활성물질의 정제를 위해 시료로 선정된 녹차를 Scheme 2-3에 기술된 방법에 따라 대량추출을 실시하였다. 녹차 2 kg을 3회 methanol로 추출하고 hexane, chloroform, ethylacetate로 분획한 후 남는 잔사를 methanol 분획으로 하였다. 각 분획별 세포 보호활성을 측정한 결과 Fig. 2-4에서와 같이 methanol, ethylacetate 순으로 높은 활성을 나타냄에 따라 본 연구에서는 1차적으로 methanol 분획내 함유된 세포보호활성물질을 목표로 다음과 같이 정제를 실시하였다.

2) 1, 2차 Silica gel column 60 open chromatography에 의한 분리

상기의 methanol 분획물을 chloroform과 methanol을 100:0부터 0:100으로 극성도를 10%씩 변화시키면서 각각 5 bed volumn씩 stepwise로 용출시킨 후 각 획분의 간세포보호활성을 검토한 결과 chloroform:methanol=10:90에서 가장 높은 활성을 나타내는 획분을 분리하였다(Fig. 2-5). 분리된 활성획분을 2차 silica gel open chromatography로 30개의 획분을 나누어 용출시킨 후 활성도를 측정한 결과 6 : 94획분에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2-6).

3) HPLC에 의한 활성물질 분리

2차 open silica gel column chromatography에서 보호활성이 높았던 활성획분을 C_{18} column(analytical HPLC, 4.5 × 150 mm)에 주입하고 TFA와 acetonitrile을 0.05% TFA / H_2O : acetonitrile = 100 : 0~60 : 40의 용매조건과 1 ml/min의 유속으로 용출시키고, 활성획분을 농축한 후 농축획분을 동일한 조건에서 HPLC를 실시한 결과 UV 254 nm에서 좌우 대칭의 단일 peak를 얻었다(Fig. 2-7).

다. 정제물질의 구조분석 및 동정

HPLC로 정제된 물질의 ^{1}H-NMR은 600 MHz, ^{13}C-NMR은 500 MHz에서 시료의 이화학적 이동(ppm)을 측정하였으며(Fig. 2-8, 2-9), FAB-MS spectrum을 측정하였다.

라. 녹차로부터 분리된 epicatechin gallate(ECg)의 간세포 보호활성

녹차 methanol 추출물로부터 분리한 물질인 ECg의 알코올에 대한 간세포 보호활성을 시판 항산화제인 vitamin E(50 μM)과 비교함으로써 물질의 실용화 가능성 여부를 검토하고자 하였다. 그 결과 Fig. 2-10과 같이 25 μM의 ECg가 약 10% 높은 보호활성을 나타내었으며, Fig. 2-11에서와 같이 알코올로 인하여 생성하는 활성산소 저해능이 뛰어난 것으로 나타남에 따라 향후 물질의 높은 실용화 가능성을 시사해 주었다.

마. 녹차 카테킨류들의 *in vitro* 간세포 보호활성

상기에서 밝혀진 ECg외의 녹차의 주요 카테킨인 EGCG(epigallocatechin gallate), EC(epicatechin)의 알코올에 대한 *in vitro* 간세포 보호활성을 비교함으로써 녹차의 유용성과 실용화 가능성을 검토하고자 하였다. 그 결과 Fig. 2-12와 같이 25 μM의 농도에서 EGCG와 EC가 ECg와 동일 수준의 보호활성을 보였으며, Fig. 2-13에서와 같이 활성산소 저해능도 역시 뛰어난 것으로 나타남에 따라 녹차 추출물의 높은 실용화 가능성을 시사해주었다.

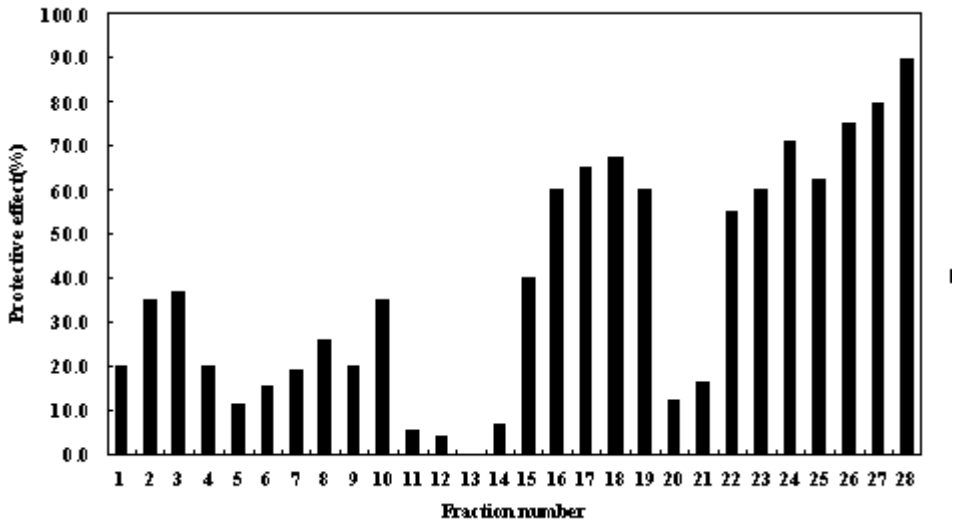


Fig. 2-5. Protective effect of M-M subfractions eluted by the first silica gel open column chromatography on alcohol-induced liver injury in HepG2/2E1 assay system.

Protective effect on alcohol-induced liver injury was determined according to the methods previously described scheme 2-2. Sample concentration was 0.1 mg/ml. Eluants were mixtures of chloroform and methanol (90:10 (No.1-2), 80:20 (No.3-5), 70:30 (No.6-8), 60:40 (No.9-11), 50:50 (No.12-14), 40:60 (No.15-17), 30:70 (No.18-20), 20:80 (No.21-23), 10:90 (No.24-26), 0:100 (No.27-28); v/v).

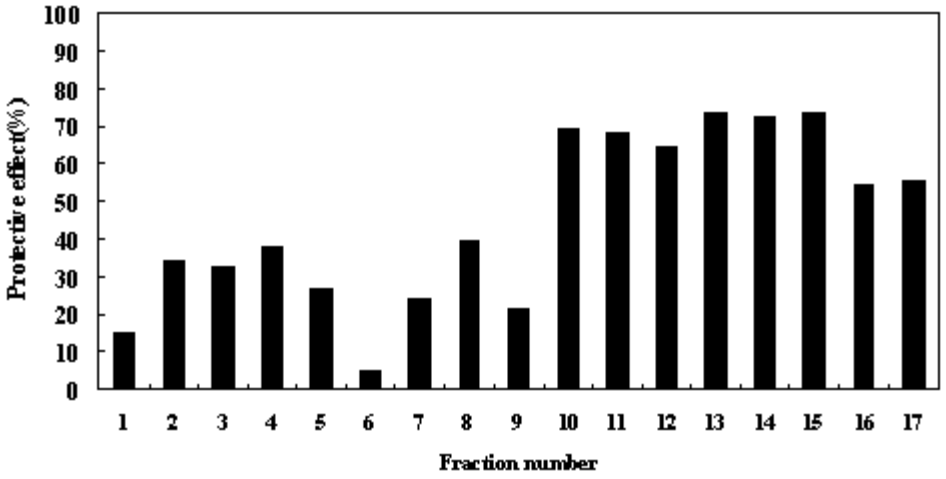


Fig. 2-6. Protective effect of M-M subfractions eluted by the second silica gel open column chromatography on alcohol-induced liver injury in HepG2/2E1 assay system.

Protective effect on alcohol-induced liver injury was determined according to the methods previously described scheme 2-2. Sample concentration was 0.1 mg/ml. Eluants were mixtures of chloroform and methanol (14:86 (No.1-3), 12:88 (No.4-6), 10:90 (No.7-9), 8:92 (No.10-12), 6:94 (No.13-15), 4:96 (No.15-17); v/v).

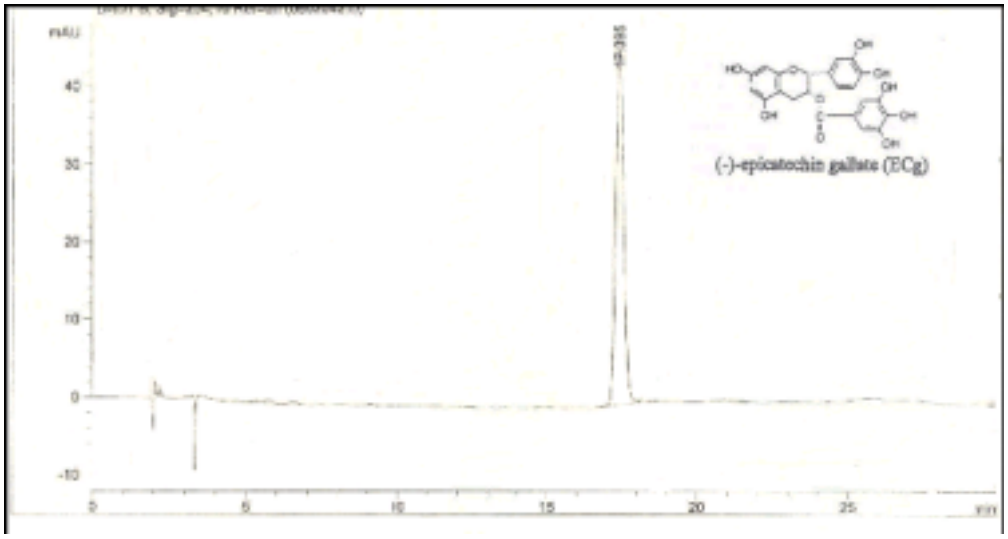


Fig. 2-7. HPLC analysis of the purified fraction from *Camellia Sinensis.*

The HPLC analysis performed with a UV detector (at 254 nm). The column was eluted with the linear gradient of 0~40% acetonitrile and 0.05% TFA at flow rate of 1.0 ml/min. Injection volumn was 10 ㎕.

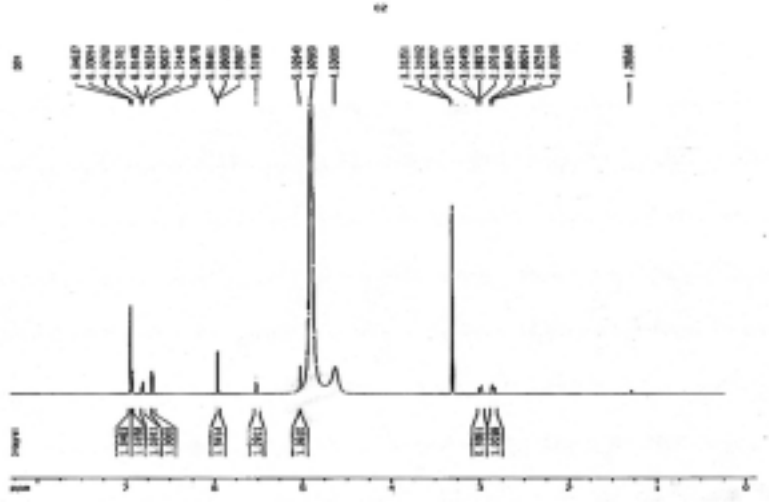


Fig. 2-8. ^{1}H-NMR spectrum of isolated compound from *Camellia sinensis.*

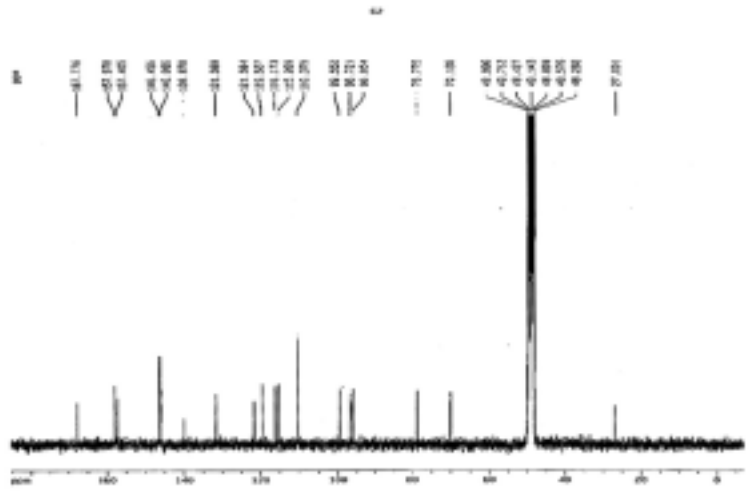


Fig. 2-9. ^{13}C-NMR spectrum of isolated compound from *Camellia sinensis.*

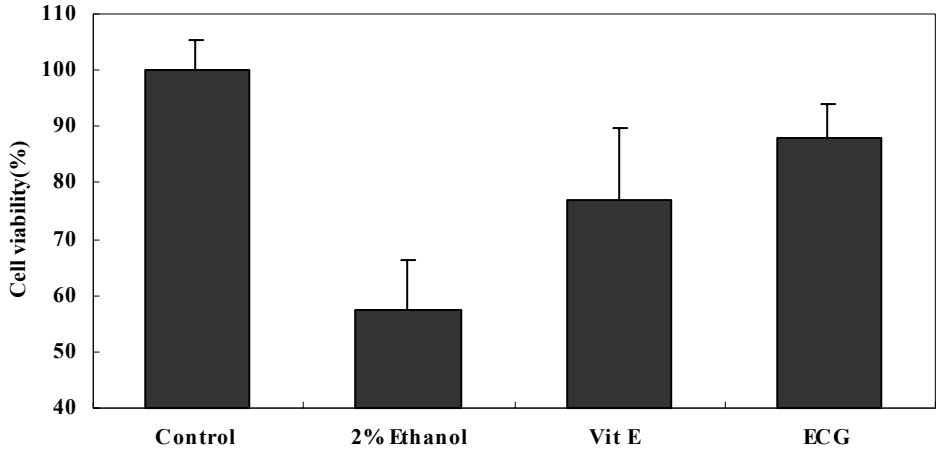


Fig. 2-10. Protective effect of ECg on alcohol-induced damage in HepG2/2E1 cell.

Values indicate mean ± S.D.(n=5), vitamin E conc. is 50 μM, ECg conc. is 25 μM.

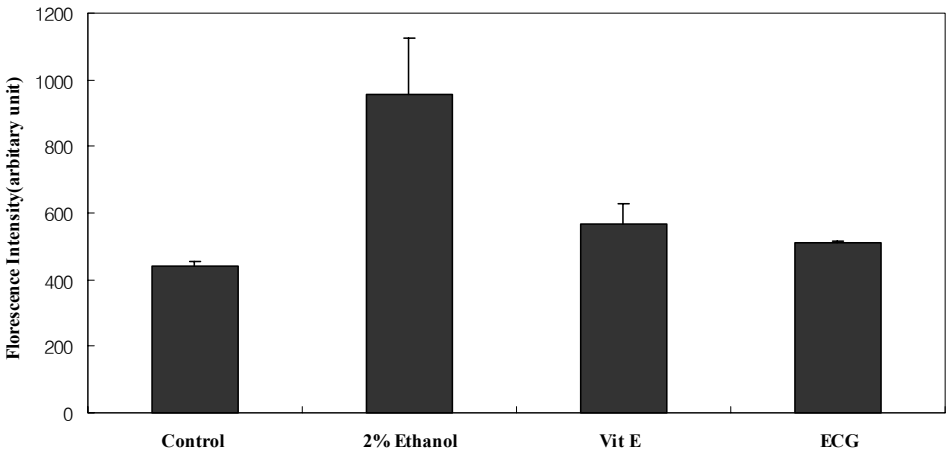


Fig. 2-11. Inhibitory effect of ECg on alcohol-induced ROS production in HepG2/2E1 cell.

Values indicate mean ± S.D.(n=5), vitamin E conc. is 50 μM, ECg conc. is 25 μM.

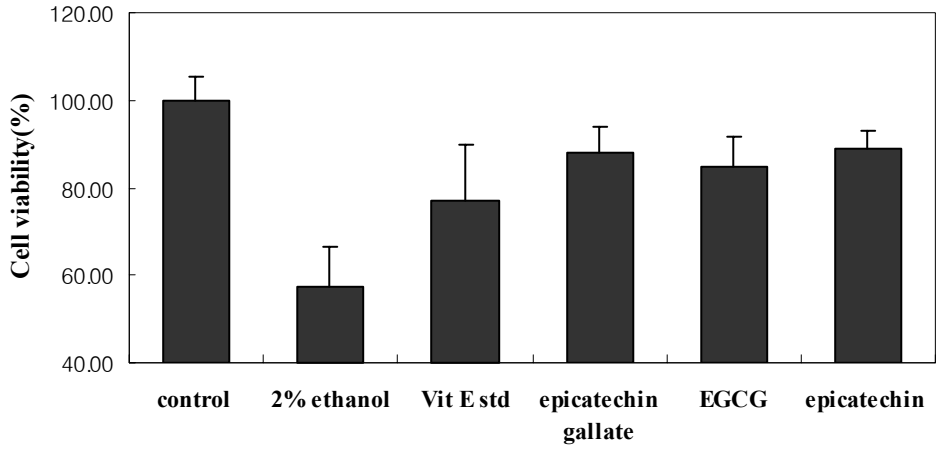


Fig. 2-12. Protective effect of ECg, EGCG, EC on alcohol-induced damage in HepG2/2E1 cell.

Values indicate mean ± S.D.(n=5), vitamin E conc. is 50 μM, ECg, EGCG and EC is 25 μM.

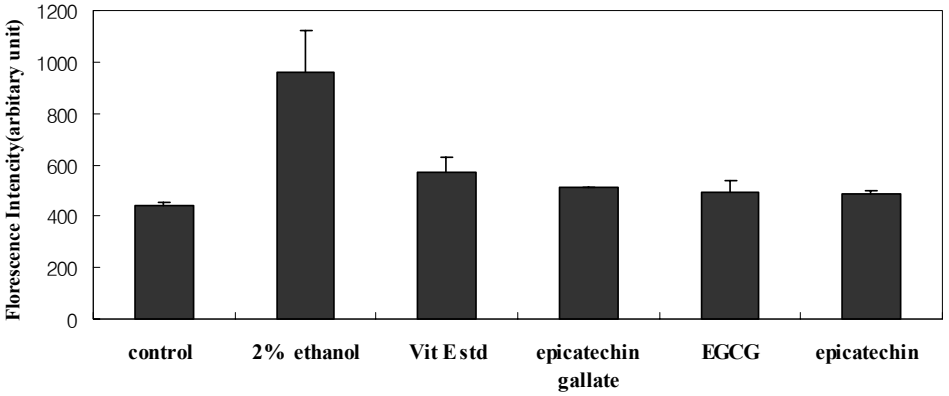


Fig. 2-13. Inhibitory effect of ECg, EGCG and EC on alcohol-induced ROS production in HepG2/2E1 cell.

Values indicate mean ± S.D.(n=5), vitamin E conc. is 50 μM, ECg, EGCG, EC is 25 μM.

제3절 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals의 소재화

1. 서 설

알코올은 그 독특한 약리작용으로 인해 습관성과 의존성이 높으며, 술의 종류나 음주 유형에 관계없이 섭취한 알코올의 양과 기간이 알코올성 간질환의 가장 핵심적인 인자로 알려져 있다. 섭취한 알코올의 일부는 폐와 위장에서도 흡수되지만 대부분은 소장에서 흡수되어 간에서 alcohol dehydrogenase(ADH), cytochrome P450 효소계, catalase 등에 의해 분해된다. 알코올로 인한 간손상은 알코올 산화에 따른 활성산소종의 발생으로 NADH:NAD 비율의 변화, 아세트알데히드 프로테인 어덕트의 형성, CYP2E1의 유도, 그에 따른 1-hydroxyethyl radical(HER)의 형성 등에 의해 일어나게 된다. 대부분의 알코올은 간에서 주로 alcohol dehydrogenase(ADH)와 aldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해 분해되지만 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)계에 의해 10% 정도 알코올이 대사되며 후자의 경우 알코올 산화에 있어 CYP2E1이 관여한다.

CYP2E1은 NADPH-cytochrome P450 reductase와 함께 MEOS에서 알코올의 산화에 핵심적인 역할을 수행하고 있다. 급성 알코올 섭취시 ADH에 의해 산화되어 아세트알데하이드로 전환되는 반면 알코올 중독자 또는 만성 알코올 섭취자의 경우 CYP2E1이 관여하면서 아세트알데하이드의 생성과 동시에 HER을 비롯한 수종의 ROS를 생성한다. 특히 알코올의 만성섭취에 의해 inducible form으로 유도된 CYP2E1은 각종 radical을 과량생성함으로써 GSH에 의해 소거되지 않고 지질과산화를 비롯한 활성산소 손상을 일으킨다. CYP2E1이 유도되는 정도와 malondialdehyde(MDA) 생성량 증가 및 ferritin으로부터 철의 유리량 증가에 의한 지질 과산화는 직접적인 관련을 갖고 있다. 또한 알코올에 의해 유도된 CYP2E1의 양은 drug 대사에도 영향을 미쳐 정상적인 microsomal detoxication 활성을 증가시킴으로써 과량의 약물투여를 유발하여 약물증독증상의 원인이 되기도 한다. 따라서 알코올성 간질환 중 지질의 과산화에 의한 간질환 및 활성산소에 의한 간손상을 예방하기 위한 phytochemicals의 소재화에 있어 이들의 직접적인 원인으로 작용하는 CYP2E1의 생합성과 활성을 억제하고 저해할 수 있는 물질의 검색이 필수적이다.

보리는 주요 재배작물의 하나로 마디가 높고 원줄기는 둥글며 속이 비어 있으며 마디 사이가 길다. 잎자루는 잎집으로 되어 원줄기를 완전히 둘러싸고 녹색으로 털이 없다. 이삭은 줄기 끝에 달리고, 한 이삭에는 15~20개의 마디가 있으며 씨알의 배열이 6줄로 된 여섯줄보리와 세 개의 영화 중 가운데 영화만 여물고 2개의 영화는 퇴화되어, 씨알이 2줄로 배열되는 두줄보리로 나뉜다. 보리의 영화에는 외영과 내영이 있고, 외영의 끝에는 까락[芒]이 달려 있어 보리의 종류나

품종에 따라 이 까락의 길이가 달라진다. 보리는 숙취에 좋다고 알려져 있으며, 숙취의 예방과 치료에는 갈색심이 있는 시커먼 보리를 선택하여 완전한 보리밥이나 보리가 아주 많이 섞인 밥을 항시 지어 먹으면 좋다고 했다. 보리는 폴리페놀성 물질이 함유되어 있고, 이들 화합물은 보리의 내부 배유조직보다 껍질을 포함하는 외층부 및 배아부위에 더 많이 함유되어 있어, 보리 추출물 중에는 높은 항산화성 및 활성산소 소거능을 가지고 있는 것으로 보고되었다. 또한 보리는 콜레스테롤 억제, 당뇨, 심장병 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, CYP2E1 저해효과는 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 360 여점의 식용생물자원 추출물을 대상으로 CYP2E1 저해활성 물질을 검색하였으며, 가장 높은 저해활성을 보인 보리(*Hordeum vulgare*)의 메탄올 추출물로부터 저해물질을 분리하고 실용화 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

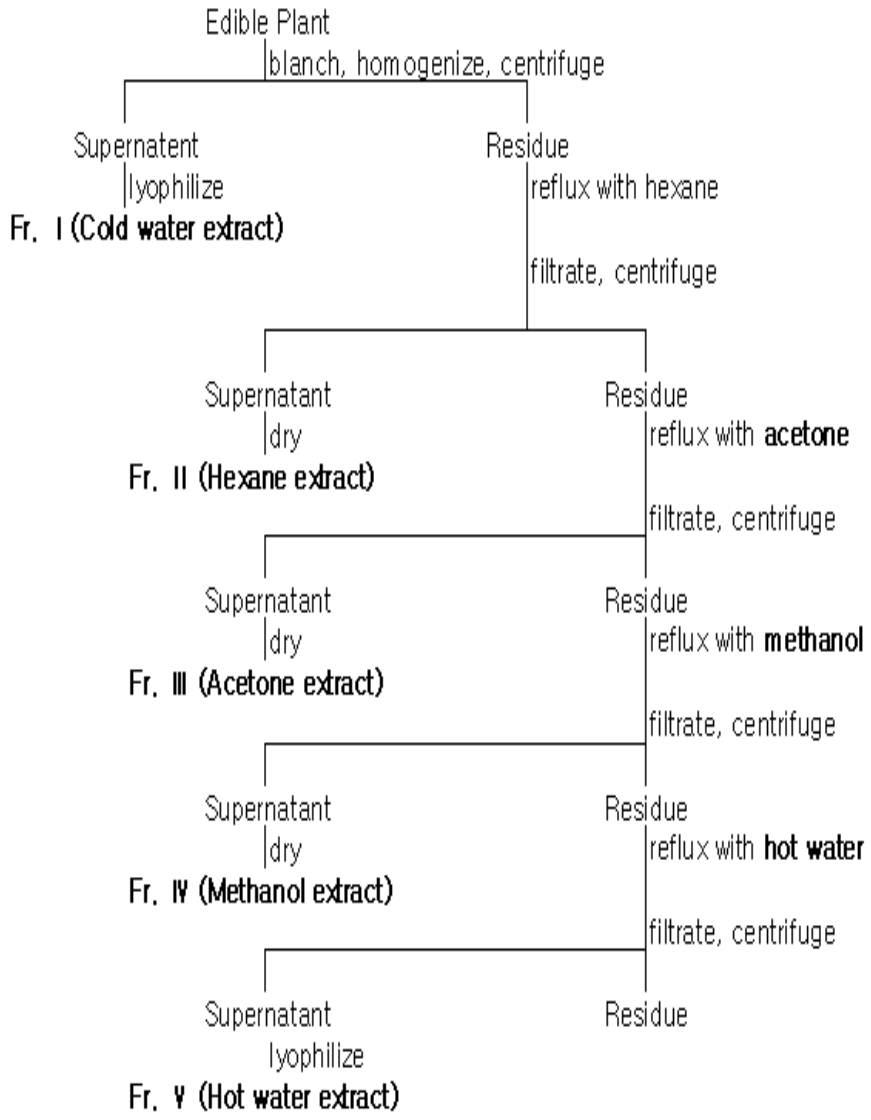
가. 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 국내산 식용생물자원 약 200 여종은 서울 시내 백화점, 경동시장, 수협 등지에서 산지가 표시된 것만을 구입, 또는 공급받아 사용하였다. 최종 선별된 보리는 전남지방에서 공급받아 다단계의 대량추출 과정을 거쳐 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 bactotryptone, yeast extract, bactopeptone 등은 Difco사(Detroit, USA)로부터 구입하였으며, *p*-nitrophenol, β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, D-glucose-6-phosphate는 Sigma사(St. Louis, USA), glucose-6-phosphatate dehydrogenase, bestatin, aprotonin은 Roche사(Indianapolis, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 본 실험에서 사용된 동물은 5주령의 SPF, ICR계 수컷 mouse로 (주)오리엔트에서 분양받아 사용하였으며, 실험동물은 온도 22±2°C, 습도 55~60%에서 1일 12시간씩 점등 하에, 물과 사료를 자유로이 급식시키며 사육하였다.

나. 실험방법

1) CYP2E1 저해활성물질 검색용 시료의 조제

각각의 시료는 Scheme 3-1의 방법에 따라 100°C에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고, 동결건조한 다음 5,000 rpm에서 5분, 7,000 rpm에서 20분간 homogenizer (IKA Labotechnik Co, Ultra-turrex T50, Germany)로 파쇄한 후 5,000 x g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 냉수추출획분(Fr. I)으로 하였다. 침전물은 동결건조 후 극성도에 따라 hexane, acetone, methanol, hot water 순으로 2시간 동안 환류 추출한 후, 각각을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III, IV, V의 용매별 추출획분을 조제하였다.



Scheme 3-1. Systematic extraction procedure for various edible plants.

2) CYP2E1 저해활성물질 *in vitro* assay계

각 식용생물자원에 대한 CYP2E1 저해활성을 측정하기 위해 CYP2E1, cytochrome P450 reductase 및 cytochrome b_5를 과량 발현시킨 *E. coli*의 membrane fraction을 조제한 후 CYP2E1의 기질인 *p*-nitrophenol을 사용하여 CYP2E1의 활성을 측정하였다(Scheme 3-2). 조제된 membrane의 P450 함량은 P450 spectrum으로부터 계산하여 50 pmol씩 실험에 사용하였다. 효소반응계를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.6), 50 pmol membrane fraction, 1 mM *p*-nitrophenol로 최종 volume이 500 ㎕이 되도록 첨가한 후, 37°C 수조에서 5분간 반응시킨 다음 NGS mixture(20 mM $NADP^+$, 20 mM glucose-6-phosphate, 66 mM $MgCl_2$, glucose-6-phosphate dehydrogenase 4 U/ml)를 순차적으로 첨가하여 동일 조건에서 40분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해 20% trichloroacetic acid를 각 반응액에 100 ㎕씩 첨가하고, 5,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액 500 ㎕를 취하여, 2 M NaOH 250 ㎕와 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. CYP2E1의 활성은 product 생성량, 반응시간과 반응에 사용된 P450의 양으로 표현하였으며, 시료에 의한 CYP2E1 저해활성은 아래 식에 따라 환산하였다.

$$\text{Inhibitory effect (\%)} = [1 - (As / Ac)] \times 100$$

As : 시료를 처리한 실험구의 CYP2E1 활성
Ac : 시료를 처리하지 않은 실험구의 CYP2E1 활성

3) CYP2E1 저해활성물질의 *in vivo* 독성실험

선정된 보리 methanol 추출물의 급성독성 여부를 확인하기 위하여 ICR mouse (수컷, 5주령)을 이용하여 시료를 0, 1,500, 3,000 mg/kg으로 사료에 섞어 4주 간의 체중변화를 관찰하고 최종일까지 생존한 마리 수를 측정한 후 백분율로 표시하였다. 마우스에서 시료의 간 독성 여부를 확인하기 위하여 혈청에서 GOT 및 GPT의 활성을 측정하였다. GOT 또는 GPT 기질을 1 ㎖씩 시험관에 넣고 37℃ 수조에서 2~3분간 가온한 뒤 증류수로 5 배 희석된 혈청을 0.2 ㎖씩 첨가 후 37℃ 수조에서 GOT의 경우 60분, GPT의 경우 30분간 반응시킨 다음 발색액 2,4-dinitrophenyl- hydrazine을 1 ㎖씩 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 후 0.4 N NaOH을 10 ㎖ 첨가로 반응을 중지시켰다. 반응 중지 30분 후 505 nm에서 표준액, 검체 및 대조군의 흡광도를 측정하고 검량곡선을 이용하여 효소의 활성 단위를 환산하였다.

Transducted *E.coli* inoculation
↓incubation at 30°C, 250 rpm
↓ for 51 hr
Membrane preparation
↓
Membrane prep, 10 mM KPB, 5 mM p-nitrophenol, DW mixture
↓preincubation at 37°C for 3 min
Add NGS system
($NADP^+$, glucose 6-phosphate, $MgCl_2$, glucose 6-phosphate dehydrogenase)
↓incubation at 37°C for 60 min
Add 20 % TCA soln to stop the reaction
↓cfg at 5,000 rpm for 10 min
Transfer only supernatant to clean tube
↓
Add 2 N NaOH
↓
Measure at A_{535}

Scheme 3-2. *In vitro* assay system for determination of alcohol induced CYP2E1 activity.

4) CYP2E1 저해활성물질의 *in vivo* 유효성 실험

실험동물은 5주령, 체중 25g 내외의 ICR mouse를 구입하여 적응시킨 후 난괴법에 의해 정상군과 알코올 실험군으로 각 군당 8마리씩 나눈 다음, 알코올군은 보리 메탄올 추출물을 공급하지 않는 군과 0.15%, 0.3%의 농도로 보리추출물을 공급하는 군으로 나누어 액체사료(Lieber-Decarli diet)의 형태로 공급하였다 (Table 3-4, 3-5, 3-6). 알코올은 4주간 전체 섭취 열량의 30%에 이르도록 서서히 상승시켜 공급하였으며 매일 식이섭취량을, 일주일마다 몸무게 변화를 측정하였다. 실험 4주째에 동물을 16시간 절식시킨 후 희생 전 혈액을 복대정맥에서 채혈하고, 희생 후 간을 적출하여 실험에 사용하였다. 적출한 간은 무게를 측정한 다음 냉장온도의 potassium phosphate buffer(pH 7.6)으로 균질화하고 10,000 × g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 108,000 × g에서 60분간 원심분리하였으며 침전물을 상기의 buffer로 다시 균질화하여 microsome으로 사용하였다.

가) 간 내 microsome에서의 P450 양 측정

상기에서 조제한 microsome을 30 ㎕씩 취하여 최종 1 ml이 되도록 P450 buffer(0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4 containing 0.1 M EDTA, 20% glycerol, 0.5% sodium cholate, Emulsion 913, 30 ㎛ p-naphthoflavone)와 혼합한 후, 소량의 sodium dithionite로 baseline을 설정하고, oxygen-free carbon monooxide를 버블링에 의해 결합시킨 다음 400 nm에서 500 nm까지 scanning하였다. P450의 양은 450 nm와 490 nm의 흡광도로 측정하였다.

나) Microsome에서의 P4502E1의 활성측정

수집된 microsome을 0.3 mg protein씩 취하여 pH 7.6의 phosphate buffer, 1 mM *p*-nitrophenol, NGS generation system과 함께 37°C 수조에서 30분간 반응시켰다. 반응은 20% trichloroacetic acid를 100 ㎕ 첨가함으로써 종결시켰으며, 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액에 2 M NaOH 250 ㎕를 첨가, 발색된 4-nitrocatechol을 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

다) Microsome에서의 P4502E1의 발현량 측정

Microsome에서의 P4502E1의 발현량은 immunoblotting으로 측정하였다. 12% SDS gel에 10 ㎍씩 loading한 후 전개하여, nitrcellulose membrane에 transfer하고 anti-mouse 2E1 polyclonal antibody와 4°C에서 약 16시간 반응시킨 후, peroxide linked goat anti-rabbit immunoglobulin과 실온에서 1시간 동안 반응시켜 암실에서 x-ray film으로 현상하였다.

5) 선정시료 보리의 메탄올 추출 및 유기용매 분획

대량으로 구입한 보리를 100°C에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고, hand mixer로 곱게 마쇄한 후 1 kg의 보리 조말을 methanol 4배 부피로 72시간 동안 실온에서 shaking시키면서 매 24시간 마다 메탄올을 교체, 추출한 다음, 감압농축 보리 메탄올 추출물을 조제하였다. 추출물로부터 메탄올을 완전히 제거한 후 hexane, chloroform, ethylacetate를 각각 2배 부피로 첨가하여 각 유기용매별 가용획분을 조제하였다(Scheme 3-3).

6) 보리로부터 CYP2E1 활성억제물질의 분리 및 정제

가) Diaion HP20 ion exchange column chromatography

높은 CYP2E1 저해 활성을 보인 methanol 분획물에 대하여 Diaion HP20 ion exchange chromatography를 다음과 같이 실시하였다. 먼저 5% NaOH와 HCl로 수세하고 물로 중화시킨 Diaion HP20 컬럼에 시료인 메탄올 분획을 loading하고 물, 50% 메탄올, 100% 메탄올, 100% 아세톤 순으로 3 bed volume 씩 용출시키고 CYP2E1 저해활성을 측정하여 활성획분을 모아 감압 농축하였다.

나) Sephadex LH-20 column chromatography

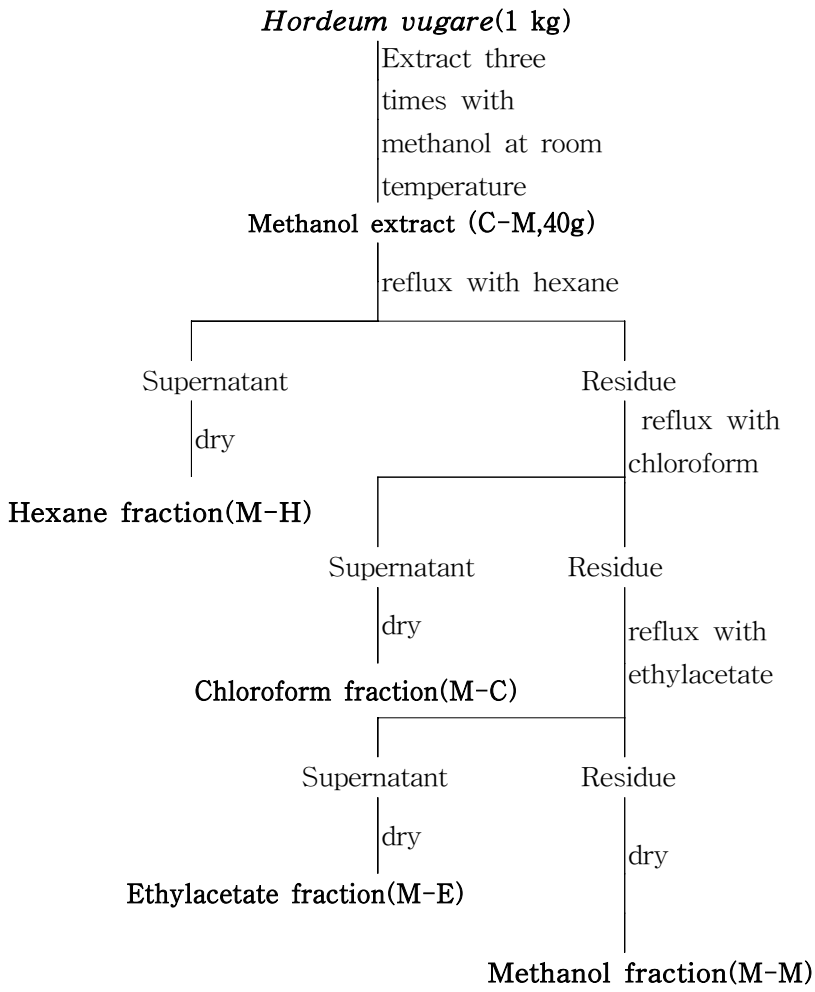
상기의 1차 컬럼에서 높은 CYP2E1 저해활성을 보인 농축 획분에 대하여 Sephadex LH-20로 2차 chromatography를 실시하였다. 50% methanol로 packing된 컬럼을 사용하여 0.3 ml/min의 유속으로 50%~100% 메탄올 농도구배를 사용하여 5 bed volume 용출하였다. 각 획분은 2 ml씩 분획되어 CYP2E1 저해활성 검색 후 활성획분을 농축하였다.

다) Toyopearl HW40 column chromatography

상기에서 CYP2E1 저해활성이 높은 농축 용출획분을 Toyopearl HW-40 컬럼에 도입한 후 100% 메탄올을 사용하여 활성분획을 용출시키고 각각을 농축하였다.

라) HPLC

상기의 활성획분을 μ-Bondapack C_{18}(4.5 × 150 mm) column을 사용하여 TFA와 acetonitrile을 0.05% TFA/H_2O : acetonitrile = 100 : 0~60 : 40의 용매조건에서 1 ml/min의 유속으로 용출시키고, 활성획분만을 농축한 후 동일한 조건에서 2차 HPLC를 실시하였다.



Scheme 3-3. Flow sheet for organic solvent fractionation of methanol extract from *Hordeum vugare*.

7) 정제물질의 구조분석 및 동정

정제된 물질을 ^{1}H-NMR(600MHz)과 ^{13}C-NMR(600MHz) (Brucker German, Advace-600)를 사용하여 이동도를 측정하였으며, Electronic ionization(EI) mass(JEOL, JMS-AX505WA)를 사용하여 구조분석을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 식용식물로부터 CYP2E1 저해활성물질 검색

1) 식용식물로부터 CYP2E1 저해활성물질의 1, 2차검색

국내산 식용생물자원으로부터 CYP2E1 저해활성물질을 검색하기 위해 1차적으로 앞서 기술한 방법에 따라 조제한 추출물 360 여점을 대상으로 human CYP2E1 transduced *E. coli* membrane을 이용한 CYP2E1 저해활성물질을 1차 검색한 결과, 산딸기, 목단피, 보리의 메탄올 추출물이 높은 저해활성을 나타내었다(Table 3-1). 이들 세가지 시료를 대상으로 2차검색을 실시한 결과 보리를 최종 시료로 선정하였다(Fig. 3-1).

2) 선정된 보리 methanol 추출물의 *in vivo* 독성 검토

상기에서 시료로 선정된 보리 methanol 추출물의 급성독성 여부를 알아보기 위해 추출물을 0, 1,500, 3,000 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 ICR mouse에 음용수의 형태로 4주 동안 공급해 주면서 생존율을 검토한 결과, 모든 군에서 100%의 생존율을 보임으로써 보리 추출물의 급성독성은 나타나지 않았다 (Table 3-2). 간손상 정도를 나타내는 GOT및 GTP 활성을 측정한 결과 보리 1,500, 3,000 mg/kg 급여군에서 정상 대조군과 유사하게 낮은 값을 나타냄으로써 보리 methanol 추출물에 의한 간 독성은 나타나지 않음을 알 수 있었다 (Table 3-3).

3) *In vivo*에서의 CYP2E1 저해활성

선정된 CYP2E1 저해활성시료의 *in vivo* 활성을 검정하기 위해 알코올과 활성시료 함유식이를 급여한 후 P4502E1의 활성과 발현정도를 측정하였다. 선정시료인 보리 추출물을 4주간 알코올과 함께 공급한 결과, 알코올과 보리를 함께 공급한 군의 체중 증가가 다른 군에 비해 유의성 있게 낮았으나 컨트롤군으로 보리만을 공급했을 경우의 체중증가가 정상적임을 고려할 때, 시료에 의한 독성은 아님을 알 수 있었다 (Table 3-4).

가) 간 내 microsome에서의 P450 양

선정시료 보리의 P450 content에 대한 영향을 검토하기 위해 간의 microsome 획분을 대상으로 carbon monooxide complex를 형성시킨 후 P450과 P490의 차로서 P450 content를 구하였다. 보리만 급여한 경우에 P450의 양이 컨트롤에 비해 유의적으로 낮았으며, 알코올과 함께 급여하였을때는 알코올 컨트롤보다 유의적으로 낮았다. 보리추출물의 경우는 P450 계열전체에 억제 영향을 미친다고 보여진다(Table 3-8).

나) Microsome에서의 P4502E1 활성

상기에서 선정된 보리의 CYP2E1 저해활성을 간의 microsome 획분을 대상으로 pNP hydroxylation assay를 실시하였다(Fig. 3-2). 알코올 급여군과 비급여군에서 CYP2E1의 활성이 유의있게 저해되었다. 알코올을 비급여군에서 컨트롤군보다 선정시료 급여한 군의 CYP2E1 활성이 낮았으며, 알코올 급여군에서도 선정시료 급여군에서의 CYP2E1 활성억제는 알코올 컨트롤군의 50% 수준으로 저해되었다.(Fig. 3-2).

다) Microsome에서의 P4502E1 발현

간에서 P4502E1의 발현증감을 microsome 획분을 대상으로 immunoblotting을 실시한 결과, 알코올과 보리 급여군에서의 P4502E1의 감소를 관찰할 수 있었다(Fig 3-3).

Table 3-1. Screening of CYP2E1 inhibitory effect of plant extract

Sample		Protective effect(%)		
Korean name	Scientific name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
육두구	*Myristic fragranas Houtt*	5.4	0	0
양귀비종자	*Papaver somniferum*	0	0	0
민트	*Mentha spp.*	0	0	0
관동화	-	0	0	0
천초	-	0	0	0
쪽파	*Allium fistulosum*	13.5	0	0
갓	*Brassica juncea*	0	0	0
양파	*Allium cepa L.*	0	0	0
매실	-	0	0	0
용안육	-	0	0	0
창포	-	0	0	0
올스파이스	*Pimenta dioicalis*	31.1	0	0
마조람	*Origanum vulgara L.*	0	0	0
파슬리	*Petroselinum crispum*	0	0	0
마늘잎	*Allium sativum(leaf)*	0	0	0
흑후추	*Pipper nigrum L.*	0	0	0
생강	*Zingiber officinate*	0	0	0
돈나물	*Sedum sarmentosum*	0	0	0

(to be continued)

Sample		Protective effect(%)		
Korean name	Scientific name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
미나리	*Oenanthe javanica*	0	0	0
사포닌	-	-	0	-
카테킨	-	-	6.3	-
홍삼분말	-	-	0	-
뽕잎	*Morus alba*	14.3	5.1	5.7
오미자	*Schizandra chinensis*	11.8	0	0
산딸기	*Rubus coreanus*	6.7	19.7	26.8
그린비타민	-	10.3	7.4	0
왕궁야채	-	28.0	11.8	0
성숙방아잎	*Lophanthus rugosus*	10.0	5.6	6.3
미성숙방아잎	*Lophanthus rugosus*	0	0.8	0
고나	-	9.9	0	0.8
어린참나물	*Pimpinella brachycarpa*	0	0	0
젠트	-	11.3	7.3	0
장노희	-	28.0	12.8	0
어린백경채	-	1.0	5.8	3.7
로즈마리	*Rosmarinus offrcinalis*	0.9	8.1	0
칠리	*Chilicon carne*	0	9.0	0

(to be continued)

Sample		Protective effect(%)		
Korean name	Scientific name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
정향	*Eugenia carypphyllate*	0.6	0	0
서양고추냉이	*Armoracia rusticana*	0	9.4	0
오레가노	*Origanum vulgara L.*	29.6	6.3	9.7
매실		-	0	0
백후추	*Pipper nigerum L.*	0	0	-
마늘쫑	*Allium sativum (trunk)*	11.6	-	0
쑥갓	*Chrysanthemum coronarium*	0	0	0
달래	*Allium monanthum*	27.8	6.7	0
창취	*Aster scaber Thumb*	0	0	0
고추	*Capsrcum annuum*	0	0	0
검정콩차	*Glycine max*	0	0	0
귤피차	*Citrus unshiu*	0	0	0
던더섬차	*Astragalus membranaceus*	0	0	0
질경이차	*Plantego asiatica*	0	0	0
들국화차	*Chrysanthemum morifolium*	0	0	0
더덕차	*Condonosis lanceolata*	0	0	0
대추차	*Zizyphus jujuba var. inermis*	0	0	0
냉이차	*Capsella bursa-pastoris*	0	0	0

(to be continued)

Sample		Protective effect(%)		
Korean name	Scientific name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
구기자	*Lycium chinense*	0	0	0
도라지	*Platycidon grandiflorum*	0	0	0
모과	*Pseudocydonia sinensis*	0	0	0
하늘타리	*Trihesanthes kirilawii*	0	0	0
호도	*Juglas sinensis*	0	0	0
율무	*Coix lactyma-jobi var. ma-yuem*	0	0	0
생강	-	0	0	0
칡	*Pueraria thunbergiana*	0	0	0
감녹차	-	0	0	0
치커리	*Cicorium intybus*	0	0	0
탱자	*Poncirus trifoliate*	0	0	0
잔대	*Adeophora thyphilla var.japonica*	0	0	0
으름덩굴	*Akebia quinata*	0	0	0
호박	-	0	0	0
쌍화차	-	0	0	0
치자	*Gardenia jasminoides*	0	0	0
연	-	0	0	0

(to be continued)

Sample		Protective effect(%)		
Korean name	Scientific name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
삽주	*Atractylodes japonica*	0	0	0
질경이	*Plantago asiatica*	0	0	0
옥수수	*Zea mays*	0	0	0
은행	-	0	0	0
해바라기	*Helianthus annus*	0	0	0
해당화	*Rosa rugosa*	0	0	0
당귀	*Angelica gigas*	0	0	0
들깨	*Perilla frutescens var. japonica*	0	0	0
우리밀	-	0	0	0
래디쉬	*Raphnus sativus*	10.2	-	0
케일뿌리	*Brassica oleracea*	0	0	0
왕궁야채	-	0	0	0
유자	*Citrus junos*	0	11.4	2.3
솔잎	*Pinus densiflora*	23.9	3.2	-
보리	*Hordeum vulgare var hexastichon*	34.5	19.2	19.5
은행	-	0	-	7.2
둥글레	*Plygoatum japonicum*	4.5	7.6	0

(to be continued)

Sample		Protective effect(%)		
Korean name	Scientific name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
완도 가시파래	*Enteromorpha intenstinalis*	0	0	0
해남파래	-*Enteromorpha intenstinalis*	0	0	0
청각	*Codium fragile*	0	0	0
완도파래	*Enteromorpha intenstinalis*	0	0	0
광천파래	*Enteromorpha intenstinalis*	0	0	0
제주 붉은까막살	*Carpopeltis angusta*	0	0	0
제주 큰잎모자반	*Sargassum ringgoldianum*	0	0	0
제주 갈래곰보	*Meristotheca papulrosa*	0	0	0
제주 갈색 대마리발	*Cladophora wrightiana*	0	0	0
모자반	*Sargassum ringgoldianum*	0	0	0
남제주 모자반	*Sargassum ringgoldianum*	0	0	0
제주 지름몸	-	0	0	0
속초 곰피	-	0	0	0
제주 개몸		0	0	0
제주 팥꼴혁모자반	*Gelidium amansii*	0	0	0
완도 미역 줄거리	*Undrania pinnatifida*	0	0	0
제주 패	*Ishige okamurai*	0	0	0
삼척 곰피	*Enteromorpha intestinalis*	0	0	0

(to be continued)

Sample		Protective effect(%)		
Korean name	Scientific name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
해남 톳	*Hizilia husiforme*	0	-	0
북제주 톳	*Hizilia husiforme*	-	0	-
기장 미역	*Undrania pinnatifida*	-	0	-
제주 감태	*Ecklonia cava*	-	0	-
주문진 다시마	*Laminaria japonica*	0	0	0
강진만산 돌각미역	*Undrania pinnatifida*	0	0	0
북제주 모자반	*Sargassum ringgoldianum*	0	0	0
뜸부기	*Pelvetia wrightii*	-	30.5	-
제주 넙청각	*Codium latum*	0	0	0
제주 말청각	*Codium divaricatum*	0	14.9	0
전남 강진 무공해 청정미역	*Undrania pinnatifida*	0.0	0	0
제주 갈래잎	*Schizymenia dubyi*	0	0	0

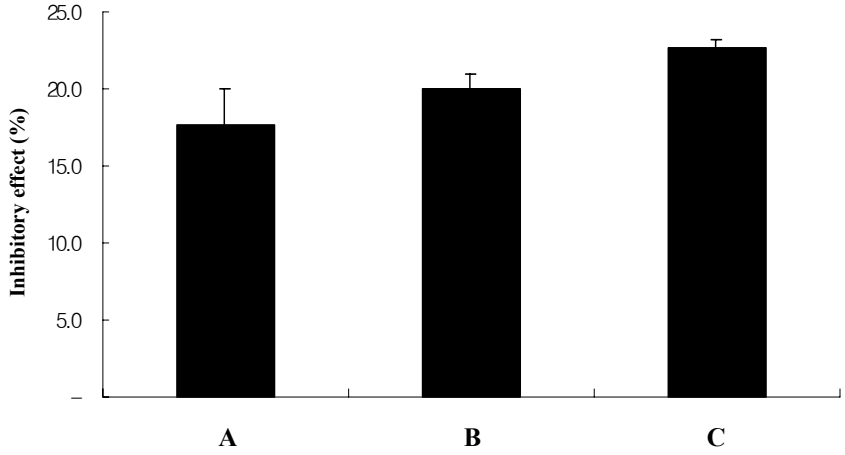


Fig. 3-1. Inhibitory effect of CYP2E1 activity in transduced *E.coli* membrane.

A: Methanol extracts of *Paeonia suffruticosa Andrews*

B: Methanol extracts of *Rubus coreanus*

C: Methanol extracts of *Hordeum vulgare*

Table 3-2. Body weight and survival rate of mice orally administrated *Hordeum vulgare* on acute toxicity

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	No of mice survived	Survival rate (%)
0 mg/kg	22.718 ± 1.321	32.438 ± 2.331	8	100
1,500 mg/kg	22.561 ± 1.132	33.200 ± 2.767	8	100
3,000 mg/kg	22.750 ± 1.100	35.200 ± 2.203	8	100

Table 3-3. Effect of *Hordeum vulgare* methanol extract on GOT and GPT in ICR mouse

	GOT	GPT
0 mg/kg	71.000 ± 7.969	34.200 ± 7.396
1,500 mg/kg	72.200 ± 9.176	41.400± 14.171
3,000 mg/kg	68.833 ± 6.210	37.500± 5.753

Table 3-4. Composition of liquid diet

Composition(g/liter)	Control	Ethanol
Casein	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5
DL-Methionine	0.3	0.3
Soy bean oil	39.6	39.6
Maltose dextrin	117.71	38.7
Cellulose	10	10
Mineral mix	8.75	8.75
Vitamin mix	2.5	2.5
Choline bitartrate	0.53	0.53
Xanthan gum	3	3
Ethanol	-	55.15

Table 3-5. Composition of mineral mix

Ingredient	Grams/kilogram
Calcium Phosphate, dibasic	500
Sodium Cloride	74
Potassium Phosphate, monohydrate	220
Potassium Sulfate	52
Magnesium Oxide	24
Manganous Sulfate · H_2O	4.6
Ferrous Sulfate · $7H_2O$	4.95
Zinc Carbonate	1.6
Cupric Sulfate	0.675
Potassium Iodide	0.007
Sodium Selenite	0.01
Chromium Cloride	0.55
Sodium Fluoride	0.06
Sucrose, finely powdered	117.88

Table 3-6. Composition of vitamin mix

Ingredient	Grams/kilogram
Thiamin HCl	0.6
Riboflavin	0.6
Pyridoxine HCl	0.7
Niacin	3.0
Calcium Pantothenate	1.6
Folic acid	0.2
Biotin	0.02
Vitamin B_{12}(0.1%)	10.00
Vitamin A Palmitate (170,000 IU/g)	4.8
Vitamin D3 (400,000 IU/g)	0.4
Vitamin E acetate (500 IU/g)	24.0
Menadione Sodium Bisulfite	0.08
P-Amino Benzoic Acid	5.0
Inositol	10.00
Dextrose	939.0

Table 3-7. Cumulative energy intake of mice fed experimental diets for 4 weeks

	Week			
	1	2	3	4
Control	23.77±4.18	48.59±8.52	66.14±11.23	86.48±12.68
Ethanol	20.93±3.44	39.89±9.33	61.61±11.22	79.41±13.81
BL	25.23±4.48	45.06±4.52	67.52±5.92	86.99±4.70
EBL	22.31±6.79	40.54±10.21	57.60±12.14	73.79±14.69
BH	22.02±3.81	43.31±5.93	64.02±6.76	86.04±6.03
EBH	19.03±9.60	40.91±10.06	56.22±8.61	70.95±8.52

Extracts of *Hordeum vulgare* was supplied in liquid diet(0.15, 0.30%) for 4 weeks. Body weight was measured by weekly. Values were mean ± S.D. of 8 mice in each group.
Control: Normal control mice
Ethanol: Ethanol control mice
BL: Normal mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Hordeum vulgare*
BH: Normal mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Hordeum vulgare*
EBL: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Hordeum vulgare*
EBH: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Hordeum vulgare*

Table 3-8. P450 content in mouse liver

(nmol/mg protein)	Control	EtOH
No sample treated	18.30 ± 6.97	38.90 ± 12.63
BL	17.00 ± 7.28	17.32 ± 5.74
BH	11.21 ± 3.90	17.86 ± 5.21

Extracts of *Hordeum vulgare* was supplied in liquid diet(0.15, 0.30%) for 4 weeks. Values were mean ± S.D. of 8 mice in each group.
Control: Normal control mice
Ethanol: Ethanol control mice
BL: Normal mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Hordeum vulgare*
BH: Normal mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Hordeum vulgare*
EBL: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.15%) of *Hordeum vulgare*
EBH: Ethanol mice supplied with methanol extract(0.3%) of *Hordeum vulgare*

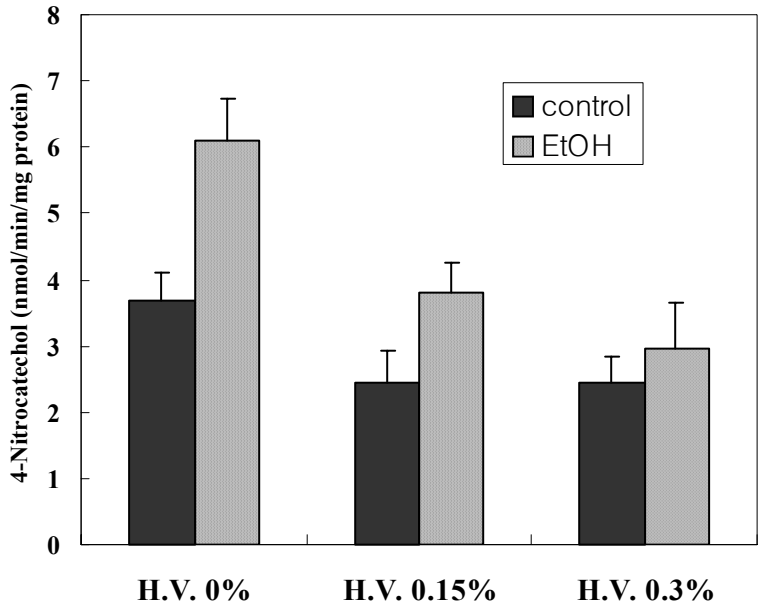


Fig. 3-2. Inhibitory effects of CYP2E1 in microsomal fraction of mouse liver.

Hordeum vulgare was supplied in liquid diet with/without ethanol for 4 weeks. Values were mean ± S.D. of 6-8 mice in each group.

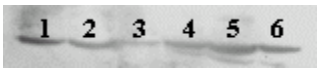


Fig. 3-3. Western blotting of P4502E1 in mouse microsome.

Lane 1: Control, Lane 2: Ethanol, Lane 3: BL.
Lane 4: EBL, Lane 5: BH, Lane 6: EBH.

나. 보리 함유 CYP2E1 저해활성물질의 정제

1) 보리의 methanol 추출 및 유기용매 분획

CYP2E1 저해활성물질을 정제하기 위해 시료로 선정된 보리를 Scheme 3-3에 기술된 방법에 따라 대량추출을 실시하였다. 보리 1 kg을 methanol로 추출한 후, hexane, chloroform, ethylacetate 분획하고 남은 잔사를 methanol 분획으로 하였다. 각 분획별로 CYP2E1 억제활성을 측정한 결과 Fig. 3-4에서와 같이 methanol 분획물, hexane 분획물 순으로 높은 저해활성을 나타내었다.

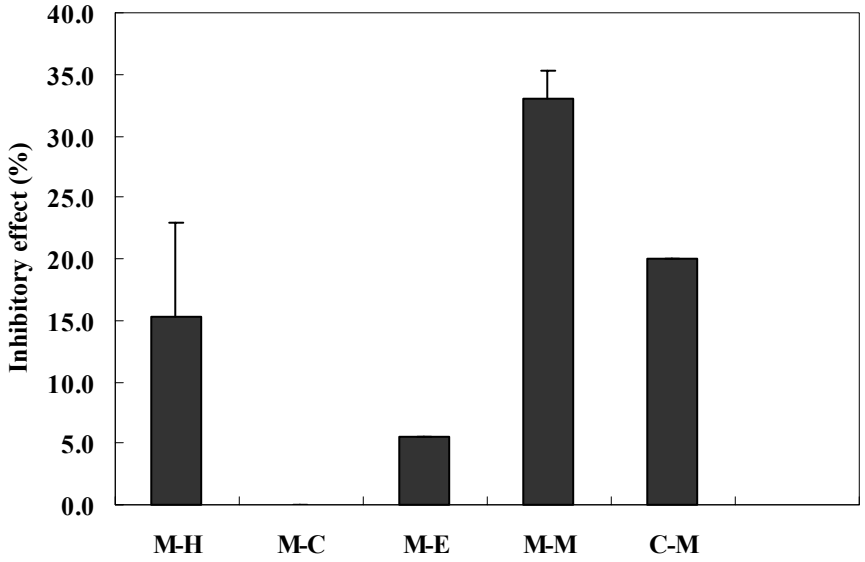


Fig. 3-4. Inhibitory activity of organic solvent extracts from *Hordeum vulgare* var. *hexastichon* on CYP2E1 in *E. coli* membrane.
M-C: Chloroform extract of *Hordeum vulgare*
M-H: Hexane extract of *Hordeum vulgare*
M-E: Ethylacetate extract of *Hordeum vulgare*
M-M: Methanol extract of *Hordeum vulgare*
C-M: Crude methanol extract of *Hordeum vulgare*

2) 보리로부터 CYP2E1 저해활성물질의 분리 및 정제

가) Diaion HP20 ion exchange column chromatography

CYP2E1에 대해 높은 저해활성을 보인 methanol 획분을 정제 1단계로 Diaion HP20 ion exchange chromatography를 실시한 결과 100% methanol, 50% methanol, 100% acetone의 순으로 저해활성능을 보였다(Fig. 3-5).

나) Sephadex LH-20 column chromatography

상기의 1차 컬럼에서 높은 CYP2E1 저해활성을 보인 100% 메탄올 획분을 다시 Sephadex LH-20 chromatography로 2차 컬럼을 실시하였다. 50% methanol로 packing된 컬럼을 사용하여 0.3 ml/min의 유속으로 50%~100% 메탄올 농도 구배로 5 bed volume 용출하고 가장 높은 억제 활성을 보인 fraction I (Nos. 125-140)을 농축하였다(Fig. 3-6).

다) Toyopearl HW40 column chromatography

상기에서 농축한 활성획분을 Toyopearl HW-40 컬럼에 도입한 후 100% 메탄올을 사용하여 활성분획을 분리하고 농축한 결과, fraction III(Nos. 108-112)에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 3-7).

라) HPLC

상기의 활성획분을 μ-Bondapack C_{18}(4.5 × 150 mm) column를 사용하여 TFA와 acetonitrile을 0.05% TFA-H_2O : acetonitrile = 100 : 0~60 : 40의 용매조건과 1 ml/min의 유속으로 용출시키고 활성획분을 농축였다. 활성이 높은 농축획분을 동일한 조건에서 HPLC를 실시한 결과 좌우 대칭의 단일 peak를 얻음으로써 비교적 정제도 높게 물질을 정제할 수 있었다(Fig. 3-8).

다. 정제물질의 구조해석

정제물질을 구조해석하기 위해 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, EI-MS 등을 이용하여 구조분석한 후 chemical library로 동정한 결과 활성물질이 procyanidin B3로 밝혀짐에 따라 시판 procyanidin B3를 authentic으로 동일한 방법에 따라 구조분석한 다음 비교검토함으로써 정제물질이 procyanidin B3임을 재확인하였다.

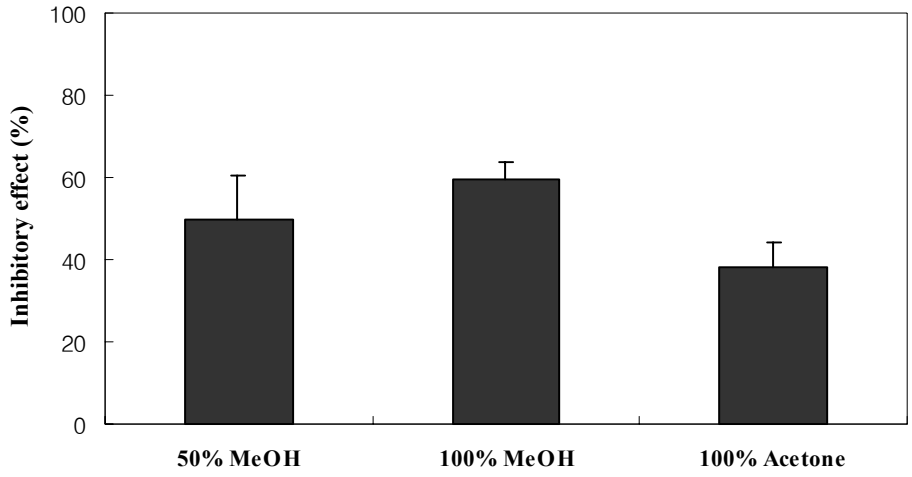
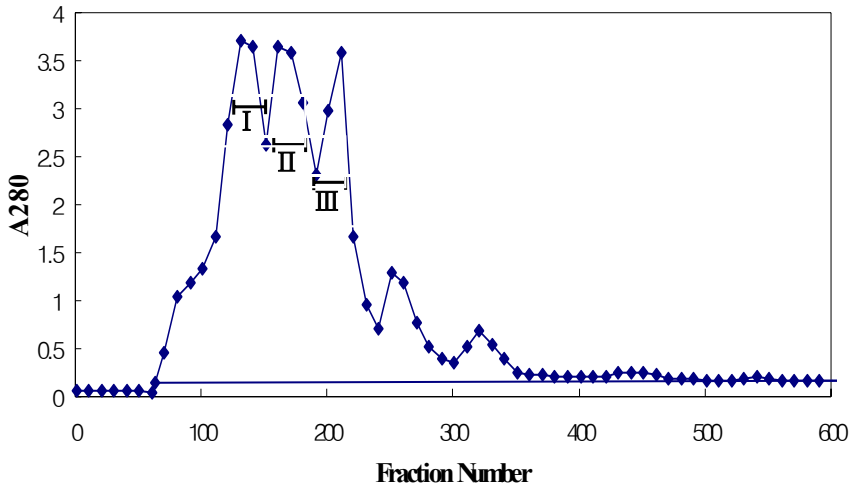


Fig. 3-5. Inhibitory activity of M-M subfractions eluted by diaion HP20 column chromatography on CYP2E1 in *E. coli* membrane.



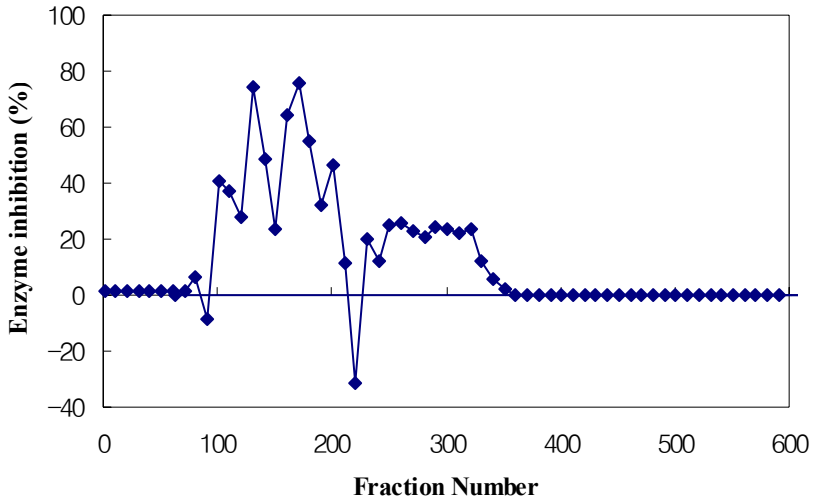


Fig. 3-6. Inhibitory activity of M-M subfractions eluted by Sephadex LH20 column chromatography on CYP2E1 in *E. coli* membrane.

Inhibitory effect on CYP2E1 was determined according to the methods previously described scheme 3-2. Eluants were mixtures of 50-100% methanol gradient (fraction I (Nos.125-135), fraction II (No.165-175), fraction III (No.195-205)).

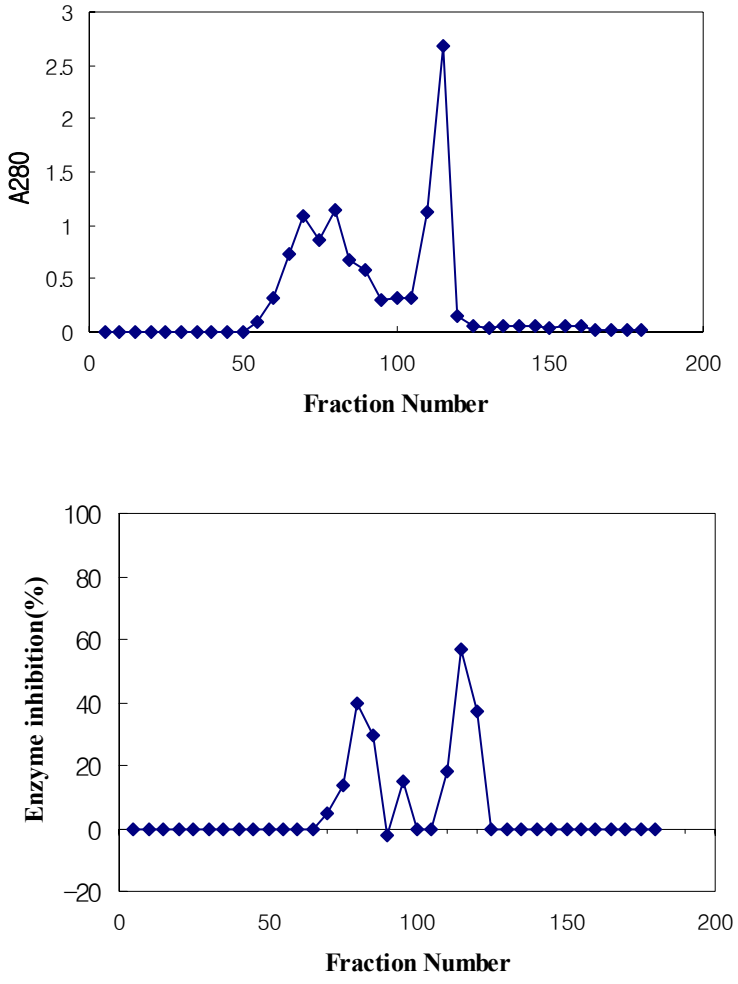


Fig. 3-7. Inhibitory activity of M-M subfractions eluted by Toyopearl HW40 column chromatography on CYP2E1 in *E. coli* membrane.

Inhibitory effect on CYP2E1 was determined according to the methods previously described scheme 3-2. Eluant was 100% methanol.

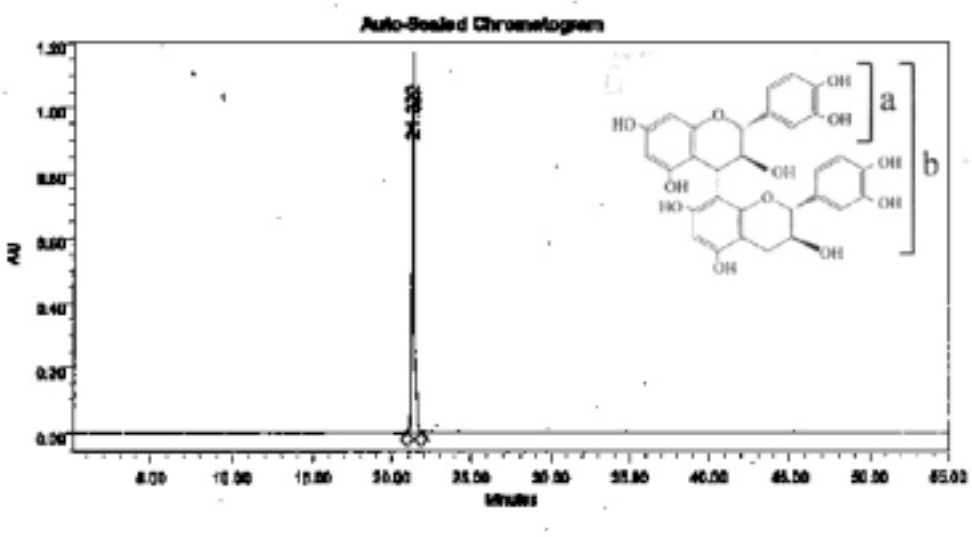


Fig. 3-8. HPLC analysis of the purified fraction from *Hordeum vulgare.* The HPLC analysis performed with a UV detector (at 280 nm). The column was eluted with the linear gradient of 0~40% acetonitrile and 0.05% TFA at flow rate of 1.0 ml/min. Injection volumn was 10 $\mu\ell$.

제4절 알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals의 소재화

1. 서 설

최근 통계청 발표에 따르면 간질환에 의한 40대 사망자는 10만명 당 41.4명으로 2위인 교통사고에 비해 38%나 높다. 여기에 알코올 소비량과 여성 음주인구의 급격한 증가 추세에 있는 우리나라는 알코올성 지방간질환자가 알코올성 간질환 환자의 45%를 차지하고 있다. 또한 지방간의 원인이 되는 비만, 지속적 음주, 습관성 약물 복용 등이 교정되지 않는다면 지방간염(steatsohepatitis), 간섬유화를 거쳐 간경변증으로 진행될 수 있다. 알코올의 장기 섭취는 지방산의 산화를 억제하고 에스테르화를 증가시켜 지방간을 유도하고 간 조직내의 콜레스테롤 대사, 단백질 합성 및 분비 등에 영향을 미침으로써 간의 기능 저하를 초래한다. 현재까지 지방간을 유발시키는 단일 인자(factor)는 밝혀져 있지 않으며 다양한 요인에 의하여 발병되는 것으로 알려져 있다. 알코올에 의한 간손상 관계를 규명하기 위한 다수의 연구들은 흡수된 알코올의 90%를 분해하는 ADH(alcohol dehydrogenase) 및 MEOS(microsomal ethanol-oxidizing system)에 관한 것이 대부분이다.

장기간 알코올 섭취에 의해 분해 대사물로 생성되는 acetealdehyde, acetate에 의한 지방대사의 이상 및 중성지방의 축적으로 발생되는 지방간과 이때 관여하는 L-FABP(liver fatty acid binding protein)와의 상호 연관은 중요하다. 알코올은 폐와 신장을 통하여 10% 정도가 체외로 배출되고 나머지는 체내에 흡수된 후 약 90%가 간에서 산화되므로 알코올 섭취에 의해 여러 조직의 FABP 중에서 특히 간세포의 L-FABP의 변화가 가장 클 것으로 예상되기 때문이다. 또한 지방산 합성은 간의 cytosol에서 일어나지만 지방산의 분해는 미토콘드리아(mitochondria)와 퍼옥시좀(peroxisome)에서 일어난다. 알코올에 의해 L-FABP의 양과 활성이 감소될 경우 이들 소기관으로의 지방산 이동에 변화가 생길 것이며 이로 인한 지방산 분해율이 감소됨으로써 간에서의 중성지방의 합성 및 혈중 중성지방이 증가된다.

L-FABP는 간(liver)을 비롯한 장기에 분포하며 Ockner에 의해 1970년대 초부터 연구가 시작되었다. 보통 간세포질에서는 전체 단백질 중의 3~5% 정도를 차지하며, 크기는 14.3 kDa이고 장쇄 지방산(long chain fatty acid)과의 높은 친화력을 갖고 있고 외부로부터 유입되는 지방산을 세포내 소기관으로 운반하는 운반단백질(carrier protein)로 알려져 있다. 간의 FABP는 다른 조직에 분포하고 있는 일반적인 FABP계열과 다르게 여러 종류의 ligand와 결합할 수 있으며 한 번

에 2 개의 ligand와 결합하는 특성을 갖고 있다. 고지방식이나 고농도의 당을 함유한 식이를 장기간 투여하였을 경우 간, 심장, 소장, 지방조직 등의 FABP가 증가하였고, fibrate계열의 약품같은 혈청 지질 강하제는 간 세포내에서 유리지방산의 흡수속도와 FABP의 양을 증가시킨다는 보고가 있다. 또한 *in vitro* 실험에서 L-FABP는 지방대사 관여 효소의 활성에 영향을 미치며 유리 지방산(free fatty acid)의 이용과 대사에 변화가 생겼을 경우, 조직에 존재하는 FABP의 양이 변화한다. 이 보고들은 FABP 단백질이 세포내의 지방 이용에 중요한 역할을 한다는 것을 간접적으로 제시해주고 있다. 현재 알려진 바로는 L-FABP의 발현은 성호르몬, 알코올, peroxisome proliferators, 지방산 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 생체내 증가된 유리 지방산에 대한 효소 및 세포막 운반 과정(enzymatic and membrane transport process)에 있어 역작용(adverse effect)에 대한 방어기작으로 L-FABP의 증가가 보고되고 있으며, 이로 인하여 증가된 지방산이 미토콘드리아, 퍼옥시솜, 소포체(endoplasmic reticulum) 등으로 보내짐으로써 이들 소기관에서 산화(β-oxidation)되거나 중성지방(triglyceride)의 형태로 저장된다.

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 한국, 중국 동북부, 일본에 자생하며 햇빛이 잘 쪼이는 산야의 초원에서 자라는 다년초이다. 또한 초롱꽃과에 속하는 다년생초로 뿌리는 굵고 줄기는 단생 또는 족생(簇生)하여 높이 40~100 cm이다. 잎은 호생 또는 윤생하며 거의 잎자루 없이 긴 계란형 또는 타원형이다. 꽃은 6~8월에 피며 꽃색은 청자색으로 종모양이며 줄기의 끝이나 가지 끝에 하나씩 정생하여 핀다. 흰꽃이 피는 계통을 백도라지라고 하며 뿌리는 각혈성환자의 약제 또는 식용으로 쓰인다. 도라지의 뿌리는 식용채소 또는 약용으로 이용되어 왔으며, 뿌리를 물로 씻어 말리거나 껍질을 벗겨서 말리고 건조시킨 것을 길경근이라고 하며 약용한다. 뿌리에는 2%의 트리터페노이드 사포닌(triterpenoid saponin) 및 0.03%의 스테롤(sterol)이 함유되어 있다. 그 외 당류로서는 이누린(inulin), 프라티코디닌(platycodinin : 과당 10 분자로 구성되는 다당류)이 함유되어 있다. 한방에서 도라지의 주요 효능은 기침, 가래 등과 폐의 장해와 밀접한 인후통, 실음(失音), 배뇨곤란, 설사, 후중(後重) 등의 증상에 좋은 것으로 알려져 있다. 생쥐에서 acetaminophen에 대한 간보호 효과 및 랫트에서 고지방식이로 유도된 hyperlipidemia에 대한 효과 등이 입증되었으나 알코올로 인한 지방간 예방을 위한 L-FABP 증가활성이 보고되어진 바는 없다.

본 연구에서는 알코올성 지방간을 예방함에 있어 간에서 L-FABP 증강제로 사용할 수 있는 미량성분을 200 여종의 식용식물을 대상으로 검색한 결과 도라지를 선정하였으며 도라지 함유 유효물질을 분리, 정제한 후 활성본체의 구조와 특성을 규명함으로써 실용화 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

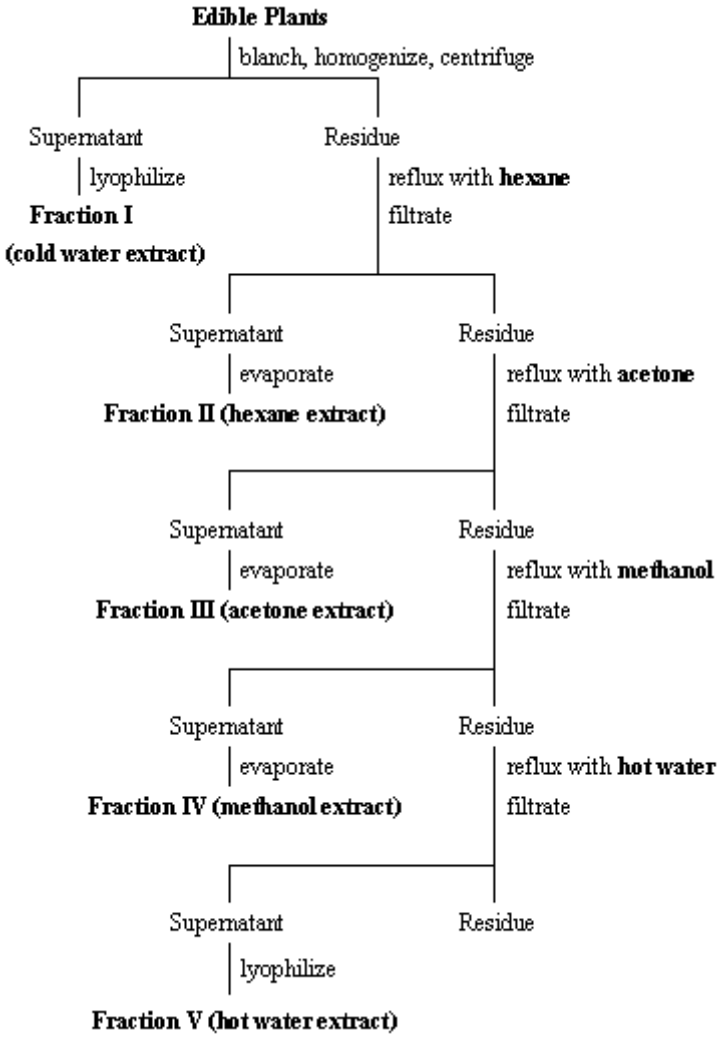
가. 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 국내산 식용식물 200 여종은 서울 시내 백화점, 경동시장, 수협 등지에서 산지가 표시된 것만을 구입 또는 공급받아 사용하였다. 최종 선별된 도라지는 경동시장에서 구입하여 다단계의 대량추출 과정을 거쳐 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 HepG2/2E1 cell line은 ATCC(American Type Culture Collection)으로부터 HepG2 cell line을 분양받아 transfection시켜 사용하였으며, IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium), FBS(fetal bovine serum), antibiotics 등은 Gibco-BRL사(Grand Island, USA), sodium bicarbonate, anti-mouse IgG, TMB(3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine), DMSO(dimethyl sulfoxide) 등은 Sigma사(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. L-FABP antibody (monoclonal)는 HyCult biotechnology b.v.(Netherlands) 제품을 사용하였고, silica gel 60, silica coated aluminium sheet와 silica coated glass sheet는 Merk사(Damstadt, Germany)로부터 구입하였다. 중성지방과 콜레스테롤 및 GOT, GPT 측정용 kit는 영동제약에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에서 사용된 동물은 4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐로 (주)샘타코에서 구입하여 사용하였으며, 실험동물은 온도 22 ± 2℃, 습도 55~60%에서 1일 12시간씩 점등 하에, 물과 사료를 자유로이 급식시키면서 사육하였다.

나. 실험방법

1) 알코올성 지방간 억제활성물질 검색 시료의 조제

각각의 시료는 Scheme 4-1의 방법에 따라 100℃에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고 동결건조한 다음 5,000 rpm에서 5분, 6,000 rpm에서 5분, 7,000 rpm에서 20분간 homogenizer(IKA Labotechnik Co. Ultra-turrex T50, Germany)로 파쇄한 후 5,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 냉수추출획분(Fr. Ⅰ)으로 하였다. 침전물은 동결건조 후 극성도에 따라 hexane, acetone, methanol, hot water 순으로 2시간 동안 환류 추출한 후 각각을 농축, 동결건조하여 Fr. Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ,Ⅴ의 용매별 추출획분을 조제하였다.



Scheme 4-1. Systematic extraction procedure for various edible plants.

2) 알코올성 지방간 억제활성 *in vitro* assay계

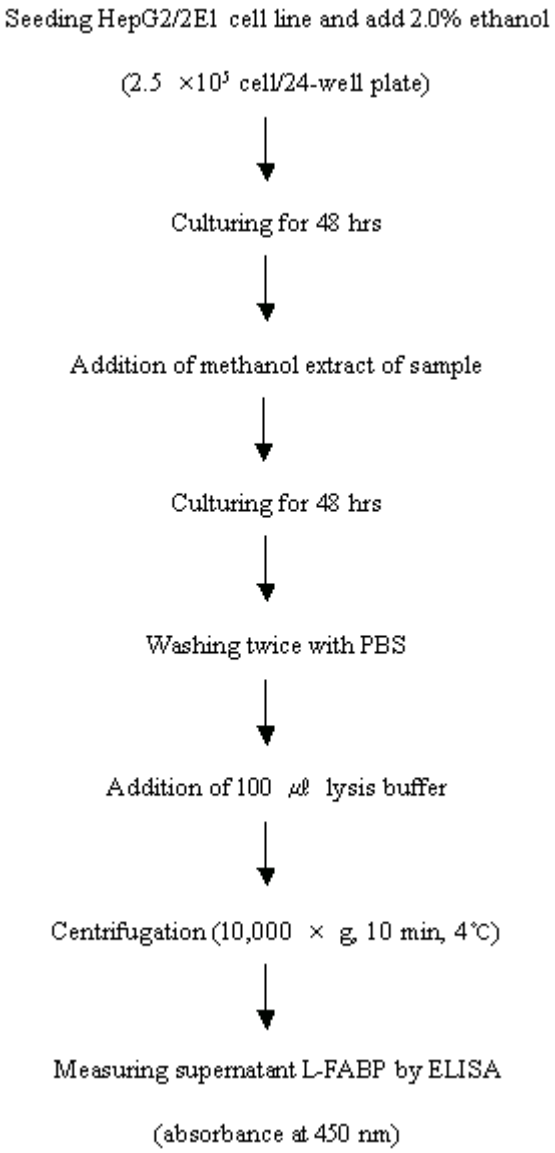
알코올성 지방간 억제활성물질을 검색하기 위해 L-FABP 증가활성을 ELISA 방법에 의거 조건을 검토한 후 Scheme 4-2와 4-3과 같은 assay계를 확립하였다. HepG2/2E1 cell line을 24 well-plate에 2.5×10^5 cells/well의 농도로 48시간 동안 2% 알코올(334 mM)을 첨가하여 배양한 다음 lysis buffer로 처리한 후 얻은 cell cytosol을 취하여 ELISA 방법으로 아래와 같이 측정하였다. Immuno-well plate에 glutaraldehyde를 100 ㎕(10 ㎕/ml D.W)씩 well에 분주하여 37℃, 1시간 반응시킨 후 증류수로 well plate를 세척하고 물기를 제거하였다. 상기의 cytosol 상등액을 100 ㎕ 분주하고 37℃, 1시간 반응시킨 후 L-FABP antibody(mouse)를 1 : 4,000으로 blocking solution(0.5% BSA)에 희석하여 100 ㎕ 씩 분주하고 37℃, 1시간 반응시켰다. Anti-mouse IgG conjugated peroxidase를 1 : 4,000으로 blocking solution에 희석하여 37℃, 1시간 반응시킨 후 기질[TMB 10 mg/mL DMSO, 3% H_2O_2, 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.1)]을 well당 200 ㎕ 씩 첨가하고 15분간 빛을 차단한 채 반응시켰다. 1 M H_2SO_4 50 ㎕를 가하여 반응을 완전히 중지시킨 다음 microplate reader(Model 550, BIO-RAD Laboratories, USA)을 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 의한 L-FABP양의 증가활성은 아래 식에 따라 환산하였다.

$$\text{L-FABP 증가활성(\%)} = [1 - (As - Ab / Ac - Ab)] \times 100$$

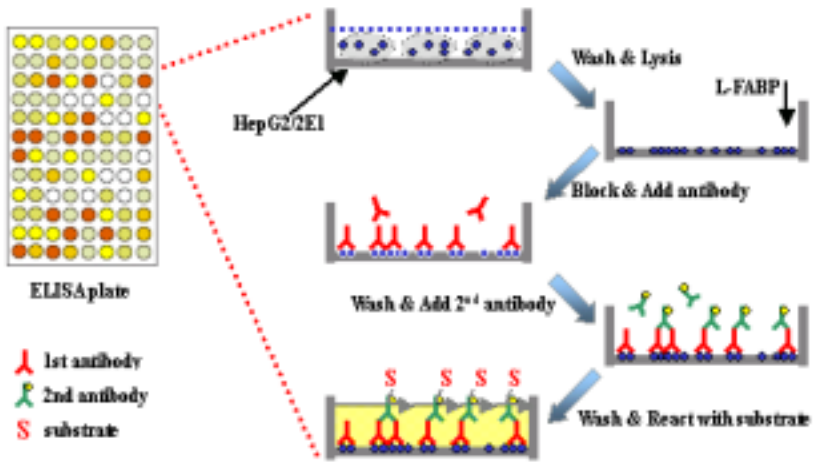
Ac : 2% 알코올을 처리한 control cell lysate의 흡광도
Ab : ELISA 측정시 증류수만을 처리한 well의 흡광도
As : 2% 알코올 및 시료를 처리한 cell lysate의 흡광도

3) 알코올성 지방간 억제활성물질의 *in vivo* 안전성 실험

선정된 알코올성 지방간 억제활성물질의 급성독성 여부를 확인하기 위하여 마늘, 산수유, 목단피, 도라지 methanol 추출물을 0, 1,500, 3,000 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 흰쥐(male, 4 weeks old)에 음용수 형태로 5주 동안 공급하였다. 5주 동안의 체중변화를 관찰하고 최종일까지 생존한 마리 수를 측정 후 백분율로 표시하였다.



Scheme 4-2. L-FABP assay in HepG2/2E1 cell.



Scheme 4-3. ELISA assay system for determining L-FABP increase.

4) *In vivo*에서의 알코올성 지방간 억제활성 측정

실험에 사용한 90~100 g의 4 주령 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐는 ㈜샘타코에서 80 마리를 구입하였으며, 고형사료로 2 일간 적응시킨 후 대조군과 액상식이에 전체 열량의 35%를 알코올로 대체시킨 알코올 급여군으로 나누었다. 알코올 급여군은 다시 알코올 대조군, methanol로 추출한 시료를 0.15% 급여한 군과 시료를 0.30% 급여한 군으로 Table 4-1과 같이 나누어 5 주간 사육하였다. 실험식이(Table 4-2)는 Lieber-DeCarli 액체식이를 변형하여 사용하였고 매일 식이 공급 직전에 조제하였으며, 대조군은 이에 해당하는 열량만큼 maltodextrin으로 대체함으로써 당질 65%, 단백질 20%, 지방 15%로 구성하였다. 각 실험군은 8 마리씩 사육하였으며 환경은 항온, 항습 조건(온도 22 ± 0.5℃, 상대 습도 55 ± 5%)을 유지하고 명암을 인공조명에서 1일 12시간씩 교대하였다. 모든 실험군은 5 주 후에 단두로 희생시켜 간과 혈액을 얻었다.

가) 체중 및 식이 섭취량 측정

체중은 1주일에 한번씩 일정한 시간에 동일한 방법으로 측정하였고, 식이섭취량은 1일에 한번씩 급여량과 잔여량의 차이로 측정하였다. 식이효율(food effficiency ratio, FER)은 체중 증가량(g)을 같은 기간에 섭취한 열량(kcal)으로 나눈 값으로 계산하였다.

$$FER = \frac{\text{Body weight gain (g)}}{\text{Diet intake (kcal)}}$$

Table 4-1. Group composition of *in vivo* experiment

NC : Normal control rat
EC : Ethanol control rat
A1 : Ethanol rat supplied with methanol extract(0.15%) of *Allium sativum*
A2 : Ethanol rat supplied with methanol extract(0.30%) of *Allium sativum*
B1 : Ethanol rat supplied with methanol extract(0.15%) of *Cornus officinalis*
B2 : Ethanol rat supplied with methanol extract(0.30%) of *Cornus officinalis*
C1 : Ethanol rat supplied with methanol extract(0.15%) of *Paeonia suffruticosa*
C2 : Ethanol rat supplied with methanol extract(0.30%) of *Paeonia suffruticosa*
D1 : Ethanol rat supplied with methanol extract(0.15%) of *Platycodon grandiflorum*
D2 : Ethanol rat supplied with methanol extract(0.30%) of *Platycodon grandiflorum*

나) 혈액 및 간의 전처리

혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 분석 시까지 -70℃에서 냉동보관하면서 사용하였으며, 간은 potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 Teflon glass homogenizer(Glas-Col)로 균질화한 후 일부는 -70℃에 보관하고, 나머지는 효소측정을 위해 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 다음 상등액을 취하여 108,000 ×g에서 60분간 초원심분리하여 cytosol과 microsome으로 분리, 실험 전까지 -70℃에 보관하였다.

다) 혈청 및 간내 중성지방, 콜레스테롤 측정

알코올로 지방간을 유도한 흰쥐의 혈청과 간의 triglyceride의 함량은 Glycerol kinase(GK)-Glycerol phospho-oxidase(GOP)법을 이용하여 측정하였다. 즉 혈청과 기준액(300 ㎎/㎗)을 각각 20 ㎕와 효소시약 3 ㎖을 37℃에서 5분간 반응시킨 후 546 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 콜레스테롤의 함량은 cholesterolester hydrolase, cholesterol oxidase 및 hydrogen peroixdase를 이용한 효소법으로, 혈청과 기준액(300 ㎎/㎗)을 20 ㎕씩 넣고 효소시약 3 ㎖을 혼합한 후 37℃의 수조에서 15 분간 반응시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청 중 HDL 콜레스

테롤은 dextran sulfate와 magnesium sulfate를 이용하여 LDL과 VLDL의 lipoprotein을 침전시킨 후 상층액에서 측정하였다. 즉 혈청 0.5 ㎖에 침전 시약 50 ㎕를 첨가, 혼합한 후 실온에서 5분간 방치하고 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 상등액과 표준액 각각 20 ㎕와 효소 시약 3 ㎖을 37℃의 수조에서 15 분간 반응시킨 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청 중 VLDL과 LDL-콜레스테롤은 Friedewald 계산식에 준하여 계산하였다.

Table 4-2. Composition of liquid diet

Component (g/liter)	Control	Alcohol	0.15% sample	0.30% sample
Casein	42	42	42	42
DL-met	0.6	0.6	0.6	0.6
Salt-mixture [1)]	7.0	7.0	7.0	7.0
Vitamin-mixture [2)]	2.0	2.0	2.0	2.0
Choline bitrate	0.4	0.4	0.4	0.4
Cellulose	1.0	1.0	1.0	1.0
Xanthan gum	3.0	3.0	3.0	3.0
Corn oil	15	15	15	15
Sodium saccharin	0.254	0.254	0.254	0.254
Sucrose	20	20	20	20
Maltodextrin	120	40	40	40
Ethanol		45.5	45.5	45.5
Sample [3)]			1.5	3.0

1) AIN salt mixture
2) AIN vitamin mixture
3) Methanol extract of *Allium sativum*
Methanol extract of *Cornus officinalis*
Methanol extract of *Paeonia suffruticosa*
Methanol extract of *Platycodon grandiflorum*

나) GOT(glutamic oxaloacetate transaminase) 및 GPT(glutamate pyruvate transaminase) 활성도

알코올 및 도라지 methanol 추출물의 간 독성 여부를 확인하기 위하여 혈청에서 GOT 및 GPT의 활성을 측정하였다. GOT 또는 GPT 기질을 1 ㎖씩 시험관에 넣고 37℃ 수조에서 2~3분간 가온한 뒤 증류수로 5 배 희석된 혈청을 0.2 ㎖씩 첨가하고 37℃ 수조에서 GOT의 경우 60 분, GPT의 경우 30분간 각각 반응시킨 다음 발색액 2,4-dinitrophenyl-hydrazine을 1.0 ㎖씩 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 후 0.4 N-NaOH을 10 ㎖씩 첨가 반응을 중지시켰다. 반응 중지 30분 후 505 nm에서 증류수를 blank로 하여 표준액, 검체 및 대조군의 흡광도를 측정하고 작성한 검량곡선을 이용하여 효소의 활성 단위를 환산하였다.

다) 간내 L-FABP 측정

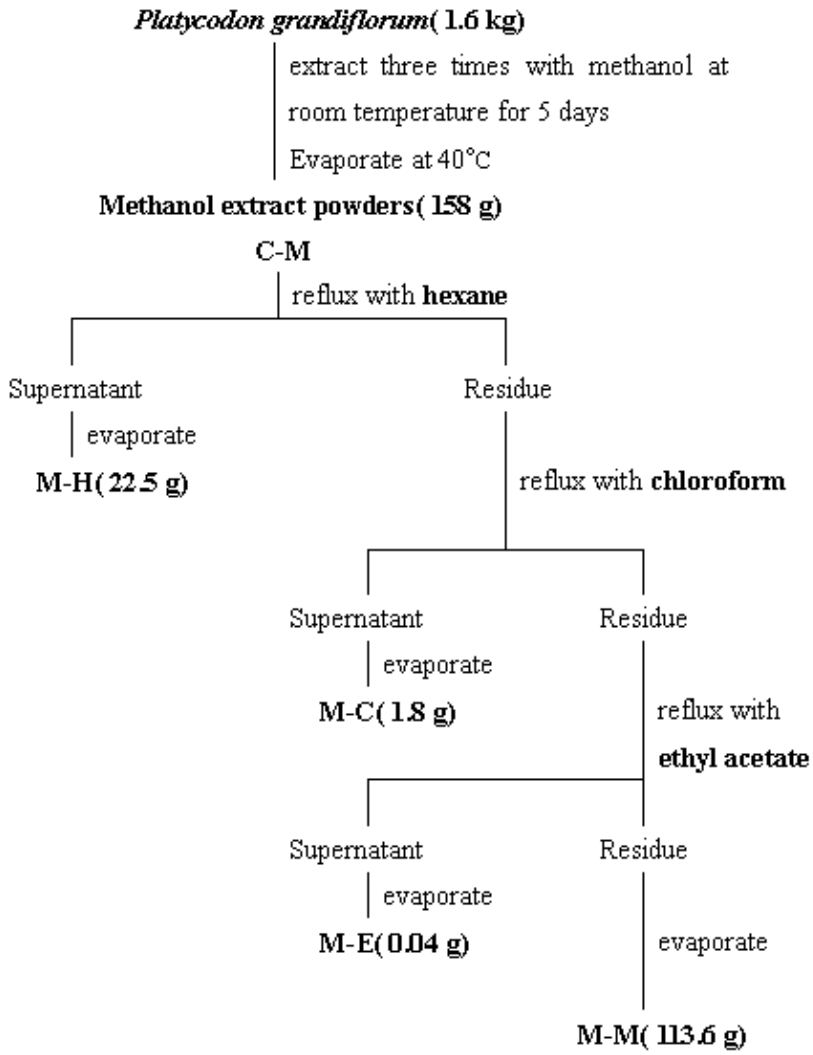
균질화한 시료를 대상으로 *in vitro*상에서 수행한 것과 동일하게 ELISA assay system을 사용하여 L-FABP의 양을 측정하였다.

라) 간내 CYP2E1 활성 측정

CYP2E1활성은 *p*-nitrophenol(PNP) hydroxylation에 의하여 형성된 *p*-nitrocatechol(또는 4-nitrocatechol)을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소반응은 50 pmol CYP2E1, 5 mM PNP가 함유되어 있는 100 mM KP용액(pH 7.4)에 NADPH generating system(1 mM glucose 6-phosphate, 0.5 mM $NADP^+$ and 1 U glucose-6-phosphatedehydrogenase)를 첨가하여 개시하였으며 100 ㎕ trichloroacetic aicd(TCA, 20% v/v)에 의하여 중지시켰다. 10,000 × g에서 5분간 원심분리에 의해 얻은 상등액 0.5 ml에 2 M NaOH를 가하여 혼합한 후 각 시료를 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 선정시료 도라지 methanol 추출 및 유기용매 분획

대량으로 구입한 도라지를 100℃에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성화시키고, hand mixer로 곱게 마쇄한 1.6 kg의 도라지 조말을 methanol 10배 부피로 4℃에서 2주 동안 정치시키면서 2회 추출한 후 감압농축하여 도라지 methanol 추출물을 조제하였다. 추출물로부터 methanol을 완전히 제거한 후 hexane, chloroform, ethylacetate를 각각 5배 부피로 환류 추출함으로써 각 유기용매별 가용획분을 조제하였다(Scheme 4-4).



Scheme 4-4. Flow sheet for fractionation of active component from *Platycodon grandiflorum*.

6) 도라지로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 분리 및 정제

Chloroform으로 활성화된 silica gel 60 column에 유기용매 분획을 통해 예비 분리되어진 M-M을 chloroform과 methanol을 사용하여 1, 2차 silica gel open column chromatography를 실시하여 활성물질을 분리하였다. 예비실험을 통하여 활성 획분의 최적 분리되는 조건이었던 MeOH : water = 7 : 3의 전개용매를 사용, ODS gel plate로 Prep-TLC(Thin Layer chromatography)를 실시하여 5개의 획분으로 분리하였다. HPLC C_{18} column(Analytical HPLC, 3.9 × 150 mm)에 활성획분을 주입하고 MeOH : water = 95 : 5의 전개용매를 사용하여 1 ml/min의 유속으로 용출, 활성획분만을 농축한 후 2차 HPLC를 동일조건에서 실시함으로써 활성물질을 정제하였다.

7) 도라지 함유 알코올성 지방간 억제활성물질의 구조 분석

HPLC로 정제된 물질의 ^{1}H-NMR은 600 MHz, ^{13}C-NMR은 500 MHz에서 시료의 이화학적 이동(ppm)을 측정하였으며, EI-MS와 FAB-MS spectrum을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 식용식물로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 검색

1) 식용식물로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 1차 검색

국내산 식용식물로부터 지방간 억제용 L-FABP 조절 미량소재를 실용화시키기 위해 1차적으로 앞서 기술한 방법에 따라 조제한 추출물 200 여점을 대상으로 L-FABP 증가활성물질을 검색한 결과 마늘, 산수유, 목단피, 도라지, 참깨, 살구, 탱자, 냉이 등의 메탄올 추출물(Fr. Ⅳ)이 30% 이상의 높은 증가활성을 나타내었다(Table 4-3).

2) 알코올성 지방간 억제활성 시료의 2차 검색

시료의 산지별, 계절별, 품종별 활성변화에 따른 시료선정의 정확성을 기할 목적으로 1차 검색시 활성이 높았던 마늘, 산수유, 목단피, 도라지, 참깨, 살구, 탱자, 냉이 등을 대량 구입한 후 이들을 대상으로 ELISA assay system을 사용하여 2차 활성검색을 실시한 결과 마늘, 산수유, 목단피, 도라지 methanol 추출물이 각각 15.2, 34.4, 18.0, 46.8%의 L-FABP 증가활성을 나타내었다(Fig. 4-1). 이에 상기의 시료들을 *in vivo* 실험의 최종시료로 선정하였다.

Table 4-3. First screening of increase of L-FABP of plant extracts

Sample name		Increasing effect (%)[c]
Common name	Scientific name	Fr. IV[b]
차조기죽	*Penilla sikokiana*	8.8
오수유죽	*Evodia officinalis*	34.9
연근죽	*Nelumbo nucifera*	7.9
호박죽	*Cucurbita moschata*	5.4
동과죽	*Benincasa cerifiera Savi*	10.2
죽즙죽	*Sasamorpha purpurasceus*	8.7
황정죽	*Polygonatum sibiricum Red*	27.1
토사자죽	*Cuscuta japonica*	-4.5
땅콩죽	*Arachis hypogea*	22.2
살구죽	*Prunus armeniaca var. ansu*	31.5
금앵자죽	*Rosa laevigata Michx*	32.5
곶감죽	*Disopyrus kaki*	32.5
부추죽	*Allium tuberosum*	15.7
가시연 밥죽	*Euryale ferox*	12.4
시금치죽	*Spinacia oleracea*	16.8
고구마죽	*Ipomoea batatas.*	13.9
목단피죽	*Paeonia suffruticosa Andrews*	40.2
흰파죽	*Allium fistulosum*	22.0
잣죽	*Pinus koraiensis*	6.4
우뭇가사리	*Gelidium amansii*	19.4

(to be continued)

Sample name		Increasing effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. IV
참깨죽	*Sesamum indicum*	34.5
알파파	*Medicago sativa*	3.7
톳	*Hizikia fusiforme*	10.6
어린백경채	*Brassica campestris var. chinensis*	6.5
원추리	*Hemerocallis fulva*	3.4
치커리	*Cichorium intybus L. var. foliosum*	0.5
고나	-	17.9
청경채	*Brassica campestris var. chinensis*	-11.2
브러커리	*Brassica oleracea*	-13.1
어린참나물	*Pimpinella brachycarpa*	-7.2
그린비타민	-	-12.0
겨자채	*Brassica nigra*	-7.1
왕궁야채	-	9.1
앤다이브	*Cichorium endivia*	-1.9
비닐하우스갓	*Brassica juncea*	1.9
콘샐러드	*Valerianella locusta*	14.8
당근잎	*Meloidogyne hapia Chitwood*	-15.9
참나물	*Pimpinella brachycarpa*	-18.7
파슬리(잎)	*Petroselinum crispum*	-8.0
고추잎	*Capsicum anuum*	-8.1
접시꽃	*Althaea rosea*	-5.4

(to be continued)

Sample name		Increasing effect (%)
Common name	**Scientific name**	**Fr. Ⅳ**
치커리(잎)	*Cichorium intybus L. var. folisum*	3.3
곰피	*Entermorpha intestinalis*	-0.5
근대	*Beta vulgaris*	-1.1
오갈피	*Acanthopanax sessiliflorus*	3.7
다시다	*Kjellmaniella crassifolia*	-25.3
감초차	*Glycyrrhiza glabra*	-19.4
정향	*Eugenia caryophyllate*	7.2
서양 고추냉이	*Armoracia rusticana*	-14.7
모자반	*Sargassum fulbellum*	-14.4
다시마	*Laminaria japonica*	0.8
파래	*Euteromorpha intenstinalis*	-13.0
우뭇가사리	*Gelidium amansii*	-11.0
진도바리	-	-15.5
지름몸	-	-21.0
게발	*Amphyra dilate*	-14.3
넙천각	*Codium latum*	-14.4
말청각	*Codium divaricatum*	-15.7
진두발	*Chondrus cocellatus*	-15.2
타이브	-	16.3
비닐하우스갓	*Brassica juncea*	13.9
박하차	*Menta arvensis var. japonia*	8.1

(to be continued)

Sample name		Increasing effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
계피차	*Cinnamomum loureirii*	4.6
둥글레차잎	*Polygoatum japonicum*	9.1
솔잎차	*Pinus densiflora*	3.5
유자차	*Citrus junos*	-0.3
결명자차	*Cassia tora*	-12.1
석류차	*Punica gratum*	7.2
인삼차	*Panax ginseng*	-10.8
삽주차(창출)	*Atractylodes japoncia*	-4.6
보리차	*Hordeum vulgare var. hexastichon*	-2.5
잇꽃차(홍화)	*Carthamus tinctorius*	1.7
치자차	*Gardenia jasminoides*	7.4
오미자차	*Schizandra chinensis*	5.1
쑥차	*Artemisia asiatica*	11.3
오갈피차	*Acathopanax sessiliflorum*	1.8
옥수수차	*Zea mays*	9.8
치커리차	*Cichorium intybus.*	3.0
으름덩굴차	*Akebia quinata*	-9.4
쌍화차	-	-7.9
칡차	*Pueraria thunbergiana*	4.5
잔대차	*Adeophora tryphilla var. japonica*	6.4
탱자차	*Poncirus trifoliate*	22.0
호도차	*Juglas sinensis*	4.0

(to be continued)

Sample name		Increasing effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
해바라기차	*Helianthus annus*	-12.4
하늘타리차	*Trihesanthes kirilawii*	3.2
율무차	*Coix lacryma-jobi var. ma-yuen*	-0.1
녹차	*Cinnamomum campora*	16.2
다시마차	*Laminaria japonica*	6.3
질경이차	*Plantago asiatica*	4.4
모과차	*Pseudocydonia sinensis*	5.2
더덕차	*Condonosis lanceolata*	5.2
도라지차	*Platycodon grandiflorum*	33.7
귤피차	*Citrus unshiu*	4.2
들국화차	*Chrysanthemum morifolium*	18.2
대추차	*Zizyphus jujuba var. inermis*	12.7
둥글레차줄기	*Polygoatum japonicum*	17.0
두충차	*Eucommia ulmoides*	15.9
산딸기차	*Rubus coreanus*	25.6
민들레차	*Taraxacum platycarpum*	21.5
계피차	*Cinnamomum koreanum*	4.2
박하차	*Menta arvensis var. japonia*	12.0
백년초차	*Opuntia ficus-indica Mill*	13.2
둥글레차잎	*Polygoatum japonicum*	7.8

(to be continued)

Sample name		Increasing effect (%)
Common name	**Scientific name**	**Fr. Ⅳ**
삼지구엽차 (음양곽)	*Epimedium koreanum*	12.7
감잎차	*Diospyros kaki*	13.1
구기자차	*Lycium chinense*	-2.3
산수유차	*Comus officinalis*	25.4
비파잎차	*Eribotrya japonia*	22.8
감초차	*Glycyrrhiza glabra*	-0.4
유자차	*Citrus junos*	-13.1
질경이차	*Plantago asiatica*	2.9
냉이차	*Capsella bursa-Pastoris*	24.4
뽕잎차	*Morus alba*	-5.9
단더섭차	*Astragalus membranaceus*	18.3
당귀차	*Angelica gigas*	20.8
해당화차	*Rosa rugosa*	15.0
검정콩차	*Glycine max*	-2.2
귤피차	*Citrus unshiu*	0.2
현미차	*Oryzae sativa*	21.5
오향	*Illicium verum Hooker*	-2.8
고수	*Coriandrum sativum*	-8.0
무순	*Papharus acanthiformis*	1.4
스파이스	-	-12.1

(to be continued)

Sample name		Increasing effect (%)
Common name	Scientific name	Fr. Ⅳ
젠트	-	-17.0
성숙방아잎 (배초향)	*Lophanthus rugosus*	-19.2
시금치죽	*Spinacia oleracea*	-16.2
세이지	*Salvia officinalis*	-12.5
카르티몬	-	-19.9
토란죽	*Lecocasia esculenta Schott*	27.7
장노희	-	-9.1
페넬	*Foeniculum vulgare*	-3.3
백리향	*Thymus vularis*	5.1
흑후추	*Pipper nigrum.*	15.6
래디쉬	*Raphanus sativus*	-2.0
마늘	*Allium sativum*	27.8
청들깨잎	-	4.2
냉이	*Capsella bursapastoris*	26.3
갓	*Brassica juncea*	8.9
피망	*Capsicum annuum*	4.0
팥죽	*Phaseolus angularis*	7.1
육두구	*Myristica fragranas Houtt*	16.7
사보리	*Satureja hortensis*	-2.9
케일뿌리	*Brassica oleracea*	5.1

(to be continued)

Sample name		Increasing effect (%)
Common name	**Scientific name**	**Fr. Ⅳ**
하수오죽	*Polygonum multiflorum*	0.4
낙동김	*Porohyra tenera*	-1.4
바실	*Ocimm basilicum*	10.8
카라웨이	*Carum carvi*	-20.6
겨자	*Brassica alba*	-17.0
메이스	-	10.0
아니스	*Pimpinella aisum*	-8.9
어린들깨잎	*Perilla frutescr*	-2.5
양귀비종자	*Papaver somniferum*	8.8
자연산갓	*Brassica juncea*	5.0
울금,심황	*Curcuma longa*	-0.3
잔금	-	15.5
키디움	-	3.0
붉은뼈까막살	*Carpopeltis angusta*	-1.4
파래	*Enteromorpha intenstinalis*	-11.8
미역줄거리	*Undrania pinnatifida*	-0.2
서실	-	-6.1
땅콩죽	*Arachis hypogaea*	4.7
진저리	*Sargassum thunbergii*	-8.6
플로카미움	*Plocamium telfairae*	-3.9
백복령죽	*Poria cocos Wolf*	-7.9

(to be continued)

Sample name		Increasing effect (%)
Common name	**Scientific name**	**Fr. Ⅳ**
이의인	*Coix lacryna-jobi*	2.6
민트	*Mentha spp.*	9.2
큰잎모자반	*Sargassum fulbellum*	-3.4
청각	*Codium fragile*	-0.1
아가위	*Crataegus pinnatifida Bunge*	2.1
매실	*Prunus mume*	9.7
참도박	*Pachymeniopsis elliptica*	-7.3
Catechin	-	6.4
마	*Dioscorea batatas Decaisae*	11.9
쿠민	*Cumium cyminum*	5.9
아욱	*Malva verticillate*	-4.4
재래김	*Porohyra tenera*	-11.9
월계수잎	*Laurus nobilis*	-14.3
칼래잎	-	-14.7
개몽	-	20.0
커러플라워	*Brassica oleracea*	8.7
이태리조대	-	-14.2
참김	*Porohyra tenera*	21.9

[a] Increasing effect (%) : The percentage of increasing effect for each sample was calculated as compared with the control.

[b] Fr. Ⅳ : Extracted with methanol

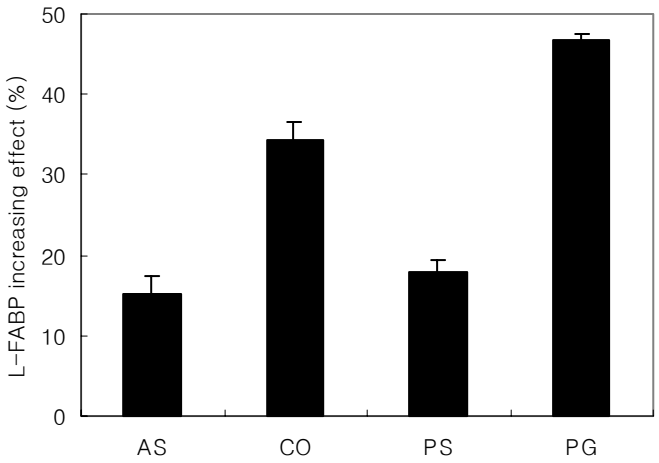


Fig. 4-1. Increase effect of several plants extract on L-FABP.

AS : Methanol extract of *Allium sativum*
CO : Methanol extract of *Cornus officinalis*
PS : Methanol extract of *Paeonia suffruticosa*
PG : Methaol extract of *Platycodon grandiflorum*

3) 알코올성 지방간 억제활성물질의 *in vivo* 안전성

시료로 선정된 마늘, 산수유, 목단피, 도라지 methanol 추출물의 급성독성을 알아보기 위해 추출물을 0, 1,500, 3,000 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 흰쥐를 사용하여 음용수 형태로 공급한 결과 Table 4-4에 나타난 바와 같이 모든 실험군에서 100% 생존율을 보임으로써 시료의 methanol 추출물에 의한 독성은 나타나지 않았다.

Table 4-4. Survival rate of experimental rats

	Dose (㎎/kg)	No. of rats	No. of survival	Survival rate (%)
NC	-	8	8	100
EC	-	8	7	87.5
A1	1,500	8	8	100
A2	3,000	9	9	100
B1	1,500	8	8	100
B2	3,000	9	9	100
C1	1,500	8	8	100
C2	3,000	9	9	100
D1	1,500	8	8	100
D2	3,000	9	9	100

Extracts of *Allium sativum, Cornus officinalis, Paeonia suffruticosa* and *Platycodon grandiflorum* were supplied in liquid diet(0.15%, 0.30%) for 5 weeks.

NC : Normal control rats
EC : Ethanol control rats
A1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Allium sativum*
A2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Allium sativum*
B1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Cornus officinalis*
B2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Cornus officinalis*
C1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Paeonia suffruticosa*
C2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Paeonia suffruticosa*
D1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Platycodon grandiflorum*
D2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Platycodon grandiflorum*

4) *In vivo*에서의 알코올성 지방간 억제활성

알코올성 지방간 억제활성물질을 검색하기 위해 상기의 2차 *in vitro* L-FABP 증가활성 검토와 동시에 4점의 시료를 대상으로 L-FABP 관련 *in vivo* 실험을 실시함으로써 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 높은 증가활성을 갖는 시료를 최종시료로 선정하고자 하였다.

가) 식이효율 및 체중증가

지방간이 유도된 흰쥐는 5주간의 실험기간에서 식이효율 및 체중증가 등은 알코올 급여군과 시료를 급여한 군이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았으나, 도라지(D1) 급여군의 경우는 마늘, 산수유, 목단피를 급여한 군에 비하여 높게 나타났다(Table 4-5, 4-6).

Table 4-5. Effects of several plants extracts on FER of rats fed experimental diets for 5 weeks

	weeks				
	1	2	3	4	5
NC	0.062 ± 0.016	0.104 ± 0.007	0.113 ± 0.005	0.110 ± 0.005	0.098 ± 0.005
EC	0.060 ± 0.008	0.089 ± 0.006	0.093 ± 0.005	0.093 ± 0.005	0.082 ± 0.008
A1	0.016 ± 0.013	0.078 ± 0.005	0.090 ± 0.004	0.089 ± 0.003	0.082 ± 0.003
A2	-0.044 ± 0.006	0.063 ± 0.006	0.076 ± 0.005	0.076 ± 0.005	0.070 ± 0.006
B1	0.058 ± 0.011	0.099 ± 0.006	0.098 ± 0.005	0.089 ± 0.004	0.084 ± 0.004
B2	0.013 ± 0.015	0.073 ± 0.006	0.085 ± 0.005	0.075 ± 0.003	0.070 ± 0.004
C1	0.024 ± 0.020	0.086 ± 0.008	0.094 ± 0.005	0.089 ± 0.004	0.082 ± 0.003
C2	-0.108 ± 0.022	0.056 ± 0.008	0.077 ± 0.005	0.076 ± 0.004	0.072 ± 0.005
D1	0.065 ± 0.019	0.093 ± 0.005	0.095 ± 0.010	0.092 ± 0.009	0.089 ± 0.006
D2	-0.019 ± 0.018	0.069 ± 0.008	0.079 ± 0.007	0.075 ± 0.005	0.068 ± 0.006

Extracts of *Allium sativum, Cornus officinalis, Paeonia suffruticosa* and *Platycodon grandiflorum*were supplied in liquid diet(0.15%, 0.30%) for 5 weeks. FER was calculated per week. Each value represents the mean ± S.E..

나) 혈중 지질 조성 및 생화학적 특성

혈청 HDL-콜레스테롤의 경우 시료를 급여한 대부분의 군에서 대조군에 비하여 유의적인 증가를 보였고, VLDL-콜레스테롤의 경우에는 도라지(D1)와 목단피(C1)를 급여한 군에서 대조군과 알코올군에 비하여 현저히 낮아졌다(Table 4-7). 혈청 중성지방 함량은 시료들에 의하여 크게 영향을 받은 것으로 나타났다. 특히 마늘(A2), 산수유(B1, B2) 및 도라지(D2) 급여군에서 알코올군 및 대조군에 비하여 현저한 차이를 보였다. 콜레스테롤 함량은 알코올군과 비슷한 수준을 나타내었다(Table 4-8). 알코올에 의한 간 손상을 간접적으로 나타내는 GPT 값의 경우 대조군에 비해 알코올군 및 각 시료 급여군에서 증가했지만 GOT 값은 알코올군에 비해 도라지(D1) 투여군에서 현저히 낮게 나타났다(Table 4-9).

Table 4-6. Effect of several plants extracts on weight gain in rats

	Initial body Weight(g)	Final body Weight(g)	Weight gain (g/5 weeks)
NC	101.1 ± 3.4	256.6 ± 15.3	155.5 ± 11.4
EC	99.7 ± 1.9	227.0 ± 10.9	127.3 ± 8.7
A1	99.8 ± 2.7	213.3 ± 10.6	113.5 ± 7.5
A2	101.0 ± 2.0	206.3 ± 13.8	105.3 ± 11.4
B1	103.4 ± 3.4	219.9 ± 11.9	116.5 ± 8.8
B2	100.9 ± 3.2	206.8 ± 6.4	105.8 ± 3.3
C1	101.0 ± 2.8	213.5 ± 11.7	112.5 ± 8.7
C2	102.1 ± 3.4	206.3 ± 10.7	104.2 ± 7.4
D1	101.2 ± 2.8	229.4 ± 14.8	128.2 ± 11.5
D2	102.6 ± 3.6	211.6 ± 12.0	109.0 ± 8.2

Extracts of *Allium sativum*, *Cornus officinalis*, *Paeonia suffruticosa* and *Platycodon grandiflorum* were supplied in liquid diet(0.15%, 0.30%) for 5 weeks. Body weight was measured by weekly. Value were mean ± S.D. of 8~9 rats in each group.

NC : Normal control rats
EC : Ethanol control rats
A1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Allium sativum*
A2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Allium sativum*
B1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Cornus officinalis*
B2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Cornus officinalis*
C1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Paeonia suffruticosa*
C2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Paeonia suffruticosa*
D1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Platycodon grandiflorum*
D2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Platycodon grandiflorum*

다) 간의 지질조성 및 L-FABP 변화

간의 중성지방 및 단백질 함량은 각 군별로 유의적인 차이를 보이지 않았지만 콜레스테롤 함량은 도라지 methanol 추출물 급여군에서 유의적으로 낮은 값(Table 4-10)을 보였으며, L-FABP 증가활성 측정결과 도라지 methanol 추출물 급여군은 알코올 급여군과 기타군보다 높은 값을 나타내었다(Table 4-11).

라) CYP2E1 활성

알코올에 의한 간 손상을 검색하기 위해 손상을 받은 간에서 발현이 증가되는 CYP2E1효소를 측정한 결과 대조군과 기타군보다 도라지 methanol 추출 급여군에서 낮은 CYP2E1 활성을 나타내었다(Fig. 4-2).

Table 4-7. Effects of several plants extracts on HDL-C, LDL-C and VLDL-C in serum of rats

	HDL-C (㎎/㎗)	LDL-C (㎎/㎗)	VLDL-C (㎎/㎗)
NC	54.7 ±1.1	12.2 ±1.0	10.2 ±0.50
EC	69.0 ±2.6	12.2 ±1.2	10.3 ±0.16
A1	67.3 ±1.7	9.2 ±0.8	9.1 ±0.32
A2	68.7 ±2.8	9.0 ±0.4	10.3 ±0.50
B1	66.7 ±1.8	13.8 ±1.6	8.8 ±0.28
B2	70.3 ±1.3	13.5 ±1.2	9.7 ±0.53
C1	74.7 ±1.5	12.2 ±0.6	7.8 ±0.38
C2	74.3 ±2.8	12.2 ±0.7	8.7 ±0.25
D1	66.9 ±2.7	12.4 ±1.1	8.1 ±0.12
D2	66.5 ±2.3	12.1 ±1.0	8.8 ±0.56

Extracts of *Allium sativum, Cornus officinalis, Paeonia suffruticosa* and *Platycodon grandiflorum* were supplied in liquid diet(0.15%, 0.30%) for 5 weeks HDL-C, LDL-C and VLDL-C were measured at 5 weeks. Each value represents the mean ± S.E..

NC : Normal control rats

EC : Ethanol control rats

A1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Allium sativum*

A2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Allium sativum*

B1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Cornus officinalis*

B2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Cornus officinalis*

C1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Paeonia suffruticosa*

C2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Paeonia suffruticosa*

D1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Platycodon grandiflorum*

D2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Platycodon grandiflorum*

Table 4-8. Effects of several plants extracts on triglyceride, cholesterol in serum of rats

	Triglyceride (㎎/㎗)	Cholesterol (㎎/㎗)
NC	119.5 ± 7.4	75.4 ± 1.7
EC	157.3 ± 10.7	86.7 ± 5.0
A1	85.0 ± 3.4	88.0 ± 2.3
A2	69.5 ± 4.8	82.8 ± 3.8
B1	59.2 ± 3.2	93.0 ± 4.9
B2	69.8 ± 4.4	95.2 ± 1.7
C1	119.3 ± 7.3	96.6 ± 2.0
C2	72.5 ± 2.0	87.0 ± 2.9
D1	92.3 ± 10.2	88.6 ± 3.0
D2	63.8 ± 5.3	90.8 ± 2.7

Extracts of *Allium sativum, Cornus officinalis, Paeonia suffruticosa* and *Platycodon grandiflorum* were supplied in liquid diet(0.15%, 0.30%) for 5 weeks. Triglyceride and cholesterol were measured at 5 weeks. Each value represents the mean ± S.E..

NC : Normal control rats

EC : Ethanol control rats

A1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Allium sativum*

A2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Allium sativum*

B1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Cornus officinalis*

B2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Cornus officinalis*

C1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Paeonia suffruticosa*

C2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Paeonia suffruticosa*

D1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Platycodon grandiflorum*

D2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Platycodon grandiflorum*

Table 4-9. Effects of several plants extracts on GPT, GOT and total protein in serum of rats

	GPT (IU/L)	GOT (IU/L)	Total protein (g/dℓ)
NC	50.5 ± 2.7	145.5 ± 8.2	6.3 ± 0.05
EC	86.8 ± 7.6	162.8 ± 12.2	6.1 ± 0.10
A1	109.7 ± 5.3	153.3 ± 6.5	6.0 ± 0.07
A2	133.7 ± 12.5	174.3 ± 10.5	6.1 ± 0.08
B1	95.5 ± 3.6	160.3 ± 7.4	6.1 ± 0.08
B2	90.5 ± 4.1	153.7 ± 4.9	6.1 ± 0.08
C1	94.7 ± 6.2	131.0 ± 2.5	6.1 ± 0.08
C2	87.6 ± 4.6	142.4 ± 9.2	5.9 ± 0.08
D1	97.7 ± 7.4	135.7 ± 6.8	5.9 ± 0.09
D2	84.3 ± 3.9	176.4 ± 6.8	6.0 ± 0.12

Extracts of *Allium sativum, Cornus officinalis, Paeonia suffruticosa* and *Platycodon grandiflorum* were supplied in liquid diet(0.15%, 0.30%) for 5 weeks. GPT, GOT and total protein were measured at 5 weeks. Each value represents the mean ± S.E..

NC : Normal control rats

EC : Ethanol control rats

A1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Allium sativum*

A2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Allium sativum*

B1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Cornus officinalis*

B2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Cornus officinalis*

C1 : Ethanol rat supplied with methanol extract(0.15%) of *Paeonia suffruticosa*

C2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Paeonia suffruticosa*

D1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Platycodon grandiflorum*

D2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Platycodon grandiflorum*

Table 4-10. Effects of several plants extracts on triglyceride, cholesterol and protein in liver of rats

	Triglyceride (㎎/㎗)	Cholesterol (㎎/㎗)
NC	119.5 ±7.4	75.4 ±1.7
EC	157.3 ± 10.7	86.7 ±5.0
A1	85.0 ±3.4	88.0 ±2.3
A2	69.5 ±4.8	82.8 ±3.8
B1	59.2 ±3.2	93.0 ±4.9
B2	69.8 ±4.4	95.2 ±1.7
C1	119.3 ±7.3	96.6 ±2.0
C2	72.5 ±2.0	87.0 ±2.9
D1	92.3 ± 10.2	88.6 ±3.0
D2	63.8 ±5.3	90.8 ±2.7

Extracts of *Allium sativum, Cornus officinalis, Paeonia suffruticosa* and *Platycodon grandiflorum* were supplied in liquid diet(0.15%, 0.30%) for 5 weeks. GPT, GOT and total protein were measured at 5 weeks. Each value represents the mean ± S.E..

NC : Normal control rats

EC : Ethanol control rats

A1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Allium sativum*

A2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Allium sativum*

B1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Cornus officinalis*

B2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Cornus officinalis*

C1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Paeonia suffruticosa*

C2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Paeonia suffruticosa*

D1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Platycodon grandiflorum*

D2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Platycodon grandiflorum*

Table 4-11. Effects of several plants extracts on L-FABP in liver of rats and liver index

	L-FABP (㎍/㎖)	Liver index
NC	0.363 ± 0.020	2.6 ± 0.02
EC	0.307 ± 0.010	3.1 ± 0.07
A1	0.309 ± 0.020	3.2 ± 0.06
A2	0.321 ± 0.008	3.3 ± 0.09
B1	0.300 ± 0.012	3.1 ± 0.05
B2	0.319 ± 0.019	2.9 ± 0.07
C1	0.328 ± 0.010	3.0 ± 0.09
C2	0.343 ± 0.016	2.9 ± 0.07
D1	0.367 ± 0.017	3.0 ± 0.05
D2	0.324 ± 0.015	3.0 ± 0.04

Extracts of *Allium sativum, Cornus officinalis, Paeonia suffruticosa* and *Platycodon grandiflorum* were supplied in liquid diet(0.15%, 0.30%) for 5 weeks. Triglyceride and cholesterol were measured at 5 weeks. Each value represents the mean ± S.E..

NC : Normal control rats

EC : Ethanol control rats

A1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Allium sativum*

A2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Allium sativum*

B1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Cornus officinalis*

B2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Cornus officinalis*

C1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Paeonia suffruticosa*

C2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Paeonia suffruticosa*

D1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Platycodon grandiflorum*

D2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Platycodon grandiflorum*

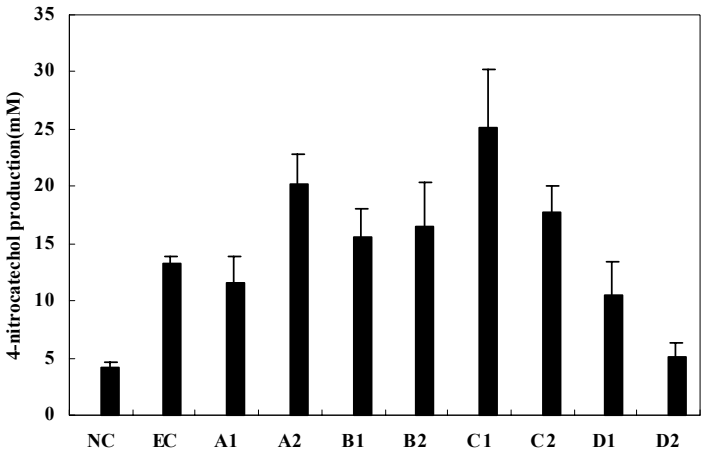


Fig. 4-2. Effect of ethanol on catalytic activity of CYP2E1.

Toxic effect in liver was determined according to PNP assay. Data represents the mean ± S.E..

NC : Normal control rats
EC : Ethanol control rats
A1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Allium sativum*
A2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Allium sativum*
B1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Cornus officinalis*
B2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Cornus officinalis*
C1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Paeonia suffruticosa*
C2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Paeonia suffruticosa*
D1 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.15%) of *Platycodon grandiflorum*
D2 : Ethanol rats supplied with methanol extract(0.30%) of *Platycodon grandiflorum*

나. 도라지 함유 알코올성 지방간 억제활성물질의 정제

1) 도라지의 methanol 추출 및 유기용매 분획

L-FABP 증가활성물질을 정제하기 위해 시료로 선정된 도라지를 Scheme 4-3에 기술된 방법에 따라 대량추출을 실시하였다. 도라지 1.6 kg을 methanol로 추출한 후, hexane, chloroform, ethylacetate로 분획하여 남는 잔사를 methanol 분획으로 하였다. 각 분획별로 L-FABP 증가활성을 측정한 결과 Fig. 4-3에서와 같이 methanol 분획물, methanol 추출물 순으로 높은 증가활성을 나타내었다.

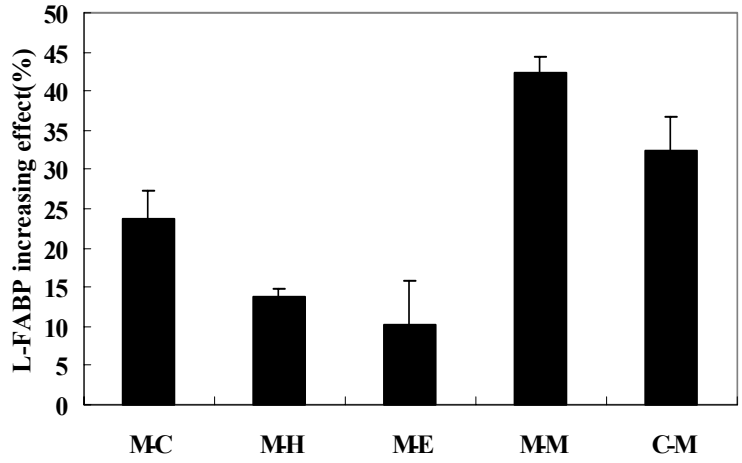


Fig. 4-3. Increase effect of organic solvent extracts from *Platycodon grandiflorum* on L-FABP.

Increasing effect on L-FABP was determined according to the methods previously described in scheme 3. Final concentration of sample was 0.1 ㎎/㎖. Data represent the mean(n=3) ± S.D..

M-C : Chloroform extract of *Platycodon grandiflorum*

M-H : Hexane extract of *Platycodon grandiflorum*

M-E : Ethylacetate extract of *Platycodon grandiflorum*

M-M : Methanol extract of *Platycodon grandiflor*

2) 1차 silica gel 60 open column chromatography

상기의 methanol 분획물을 chloroform과 methanol을 100 : 0부터 0 : 100으로 극성도를 10%씩 변화시키면서 각각 5 bed volume씩 stepwise로 용출시킨 후, 각 획분의 L-FABP 증가활성 효과를 검토한 결과 chloroform : methanol = 60 : 40에서 가장 높은 L-FABP 증가활성을 갖는 획분을 분리하였다(Fig. 4-4).

3) 2차 silica gel 60 open column chromatography

분리된 활성획분을 chloroform과 methanol을 100 : 0, 85 : 15, 80 : 20, 78 : 22, 76 : 24, 74 : 26, 72 : 28, 70 : 30, 68 : 32, 66 : 34 순으로 용출하여 증가활성을 측정한 결과 chloroform : methanol = 76 : 24에서 가장 높은 L-FABP 증가활성을 갖는 용출획분을 분리하였다(Fig. 4-5).

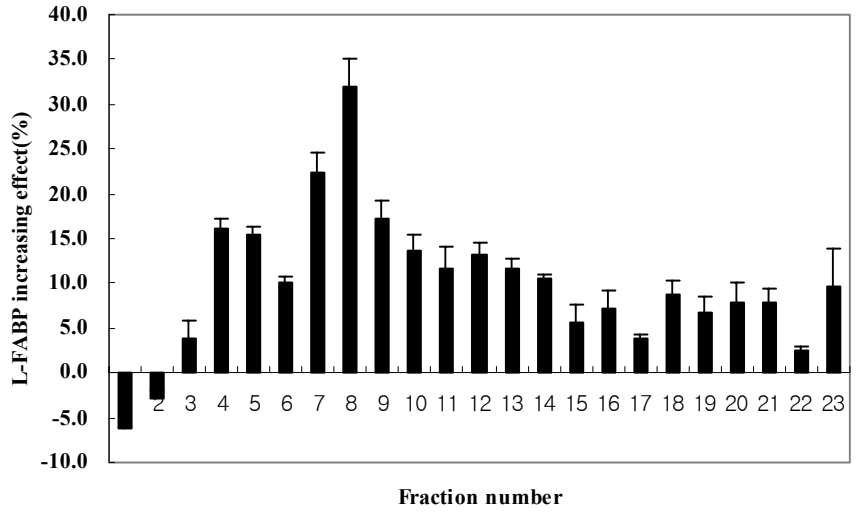


Fig. 4-4. Increase effect of M-M subfraction separated by the first silica gel open column chromatography on L-FABP.

Increasing effect on L-FABP was determined according to the methods previously described in scheme 4-3. Sample concentration was 0.1 ㎎/㎖. Eluants were mixture of $CHCl_3$ and MeOH (100:0 (No. 1), 80:20 (Nos. 2~4), 70:30 (Nos. 5~7), 60:40 (Nos. 8~10), 50:50 (Nos. 11~13), 40:60 (Nos. 14~16), 30:70 (Nos. 17~19), 20:80 (Nos. 20~22), 0:100 (No. 23); v/v). Data represent the mean (n=3) ± S.D..

4) Prep-Thin layer chromatography

고활성 상기 획분을 ODS gel plate(20 × 10 cm)에서 methanol : water = 7 : 3의 전개용매로 Prep-TLC(thin layer chromatograpy)를 실시하여 5개의 획분으로 분리한 후 L-FABP 증가활성을 측정한 결과 Fig. 4-6과 같이 R_f값이 0.74인 2번째 획분(PG-2)에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

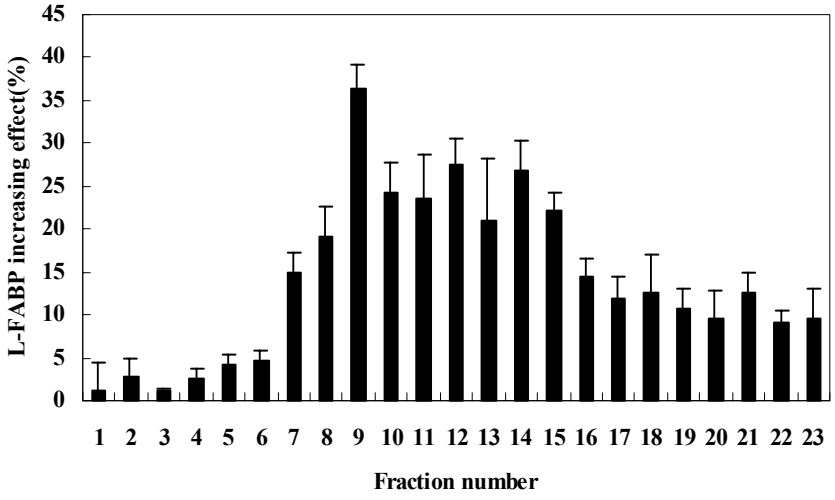


Fig. 4-5. Increase effect of M-Ma subfraction separated by the second silica gel open column chromatography on L-FABP.

Increasing effect on L-FABP was determined according to the methods previously described in scheme 4-3. Sample concentration was 0.1 ㎎/㎖. Eluants were mixture of $CHCl_3$ and MeOH (85:15 (No. 1), 80:20 (No. 2), 78:22 (Nos. 3～5), 76:24 (Nos. 6～9), 74:26 (Nos. 10～14), 72:28 (Nos. 15～17), 70:30 (Nos. 18～19), 68:32 (Nos. 20～21), 66:34 (Nos. 22～23); v/v). Data represent the mean (n=3) ± S.D..

5) HPLC

분리된 활성획분을 C_{18} column(Analytical HPLC, 3.9 × 150 mm)에 주입하고 MeOH : water = 95 : 5의 전개용매를 사용하여 1 ml/min의 유속으로 용출하여 활성획분만을 모아 농축한 후 2차 HPLC를 동일조건에서 실시한 결과 Fig. 4-7과 같이 비교적 순도가 높은 L-FABP 증가활성물질을 정제할 수 있었다. 도라지 methanol 분획물로부터 정제 PG-2a 물질까지의 정제단계에 따른 수율은 Table 4-12에 나타내었다.

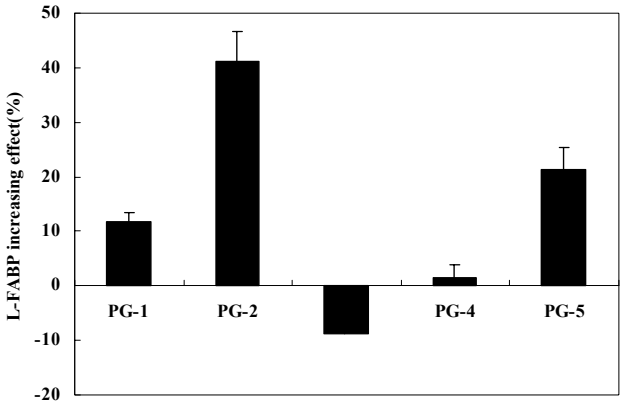


Fig. 4-6. Increasing effect of fractions isolated by the TLC on L-FABP.

TLC was carried out on ODS gel plate with methanol and water (3 : 7) solvent system and detected with UV lamp (256 nm). The concentration of sample was 0.1 ㎎/㎖. Data represent the mean(n=3) ± S.D..
PG-1~PG-5 : Fractions of preparative by the thin layer chromatography

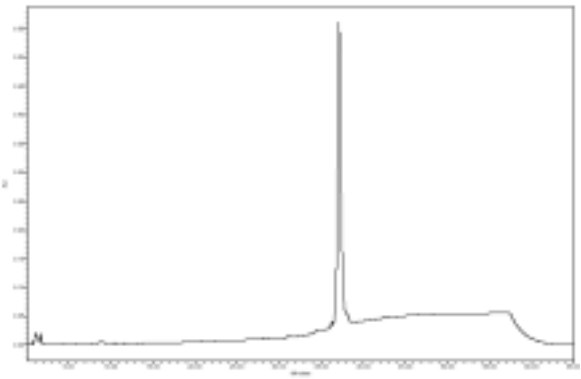


Fig. 4-7. HPLC analysis of the purified fraction, PG-2a, on Bondapak C_{18} reverse column.

The HPLC analysis was performed with Waters 2690 system equipped with a UV detector (at 228 nm). The column (3.9 × 150 mm) was eluted with the linear gradient of 95~100% methanol in distilled water at a flow rate of 1.0 ㎖/min. Injection volume was 10 ㎕.

Table 4-12. Yield of L-FABP activator, PG-2, isolated from *Platycodon grandiflorum*

	Yield(%)
Methanol extract (CM)	9.9
Fractionated methanol extract (M-M)	7.1
First silica gel (M-Ma)	0.48
Second silica gel (M-Mb)	0.032
Prep. TLC (PG-2)	0.018

다. 정제물질의 구조 해석

정제물질 PG-2a 물질을 구조해석하기 위해 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FAB-MS, EI-MS 등을 실시하였다. ^{1}H-NMR spectrum(Fig. 4-8)은 7.7과 7.6 ppm의 aromatic proton과 0.8 ~ 1.7 ppm에서 치환된 alipatic proton signal들을 보였으며, ^{13}C-NMR spectrum(Fig. 4-9)은 169.4 ppm의 ester carbonyl 탄소와 67.3 및 67.0 ppm에서 hydroxylated aliphatic 탄소 signal을 나타내었다. EI-MS와 FAB-MS spectrum은 $[H+H]^{+}$ 419 m/z와 $[H+Na]^{+}$ 441 m/z의 두 peak가 일치하였으며 EI-MS의 base peak(149 m/z)는 phthalic acid 잔기의 존재를 시사하면서 분자량 418의 물질임을 나타내었다(Fig. 4-10). 또한 $FeCl_3$, ninhydrin, bromocresol green 등에 의한 TLC 정색반응은 나타나지 않음으로써 정제 PG-2a의 구조를 phthalic acid의 diisononlyester 또는 hydroxyl alkyl ester로 추정할 수 있었다.

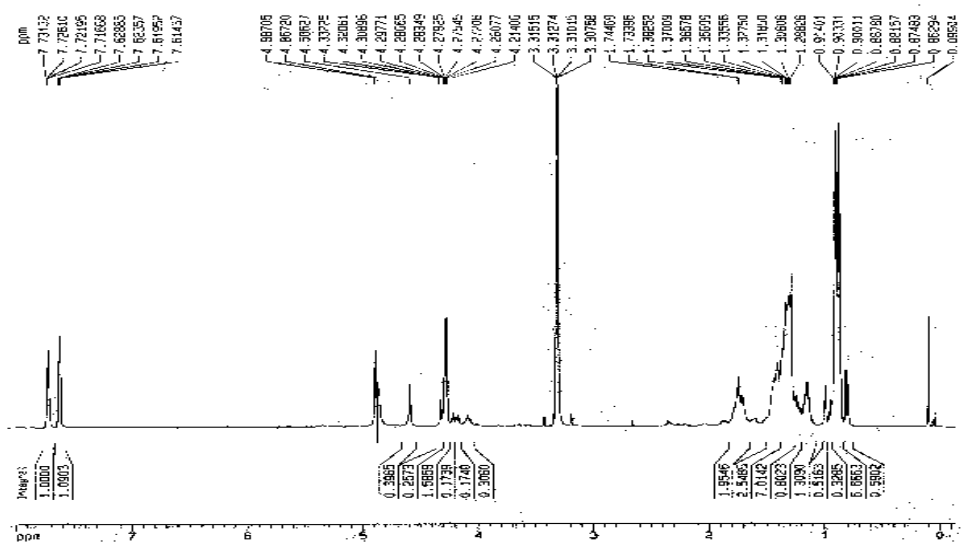


Fig. 4-8. ^{1}H-NMR spectrum of PG-2a isolated from *Platycodon grandiflor*.

PG-2a was dissolved in MeOD (methyl-d3 alcohol-dl) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-500, Bruker, German) operating at 600 MHz and 25℃.

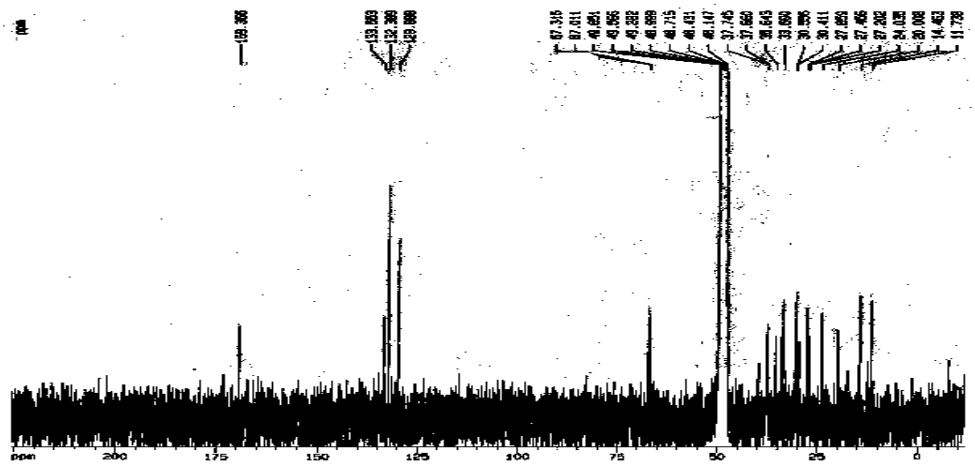


Fig. 4-9. ^{13}C-NMR spectrum of PG-2a isolated from *Platycodon grandiflor*.

PG-2a was dissolved in MeOD (methyl-d3 alcohol-dl) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-500, Bruker, German) operating at 500 MHz and 25℃.

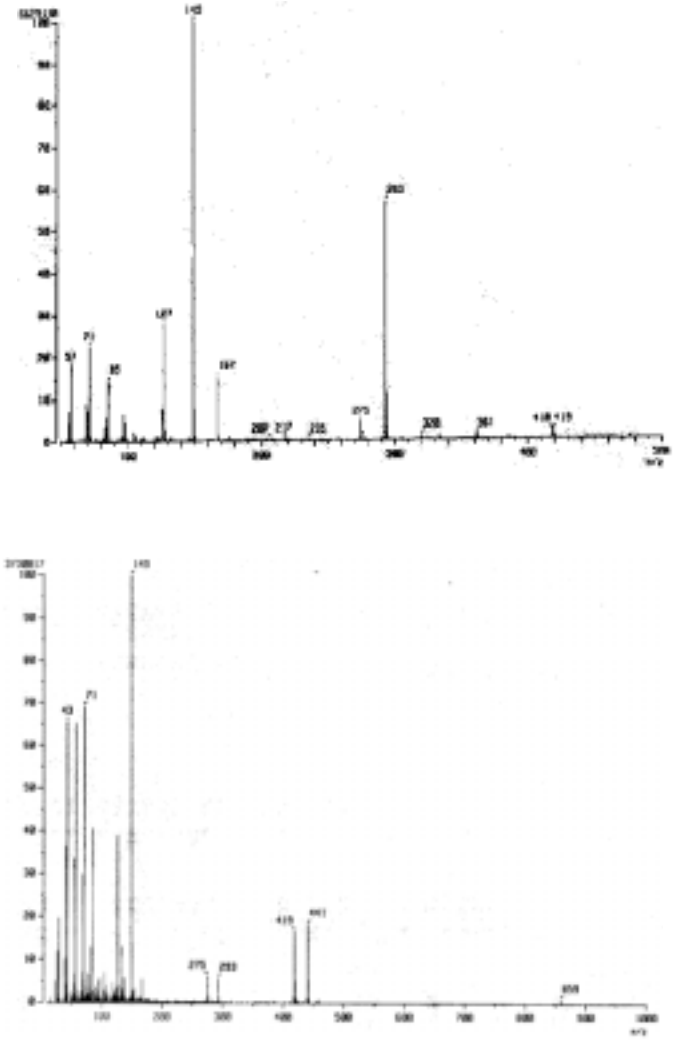


Fig. 4-10. EI-MS spectrum (A) and FAB-MS spectrum (B) of PG-2a isolated from *Platycodon grandiflor*.

The spectrum was recorded on positive ion EI mass spectrometer and on positive ion FAB mass spectrometer (JMS-AX505WA, JEOL, Japan).

제5절 알코올성 간질환용 phytochemicals의 소재화

1. 서 설

최근 식품성분에 대해 새로운 관점에서 계통적, 조직적인 연구가 발전함에 따라 식품기원의 특정 성분들이 인체의 신경계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등 각종 생리기능조절계에 작용하여 직·간접으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 이들 특정성분들에 의한 생체조절계 및 생체방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 전인류적 규모의 지속적이고도 가장 자연스러운 건강유지를 위한 강력한 수단이 될 수 있음을 의미한다. 식품에 도입되고 있는 생체조절성 3차기능은 질병을 발병의 전단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고령화 사회에서 기능성식품 및 의약식품의 수요가 합성의약품을 상회할 것으로 예측되고 있기도 하다.

기능성식품에 대한 정의는 후생성 생활위생국과 일본건강식품간담회가 제시한 바 있다. 후생성은 기능성식품이란 식품의 품질변환조작에 의해 얻어진 기능성 성분을 활용하여 생체에 대해 기대되는 효과를 충분히 발현할 수 있도록 설계된 일상적으로 섭취하는 식품으로 특히 신장병, 심장병, 고지혈증, 당뇨병 등의 성인병과 노인병의 병태에 대응하는 기능을 가지는 식품을 지칭하고 있으며 건식간담회는 기능성식품이란 사람의 건강에 직접 관여하는 생체 제계통의 특정한 조절에 유효하게 작용하도록 설계 가공되어 건강의 유지, 증진, 질병의 방지 등을 목적으로 하고 식품으로서 일상적으로 섭취되는 형태를 가지며 영양기능과 감각기능을 함께 가지는 식품으로 정의하고 있다. 후자가 보다 타당한 정의를 짓고 있지만 양자 모두 생체조절기능과 식품이라는 공통분모를 가지고 있다.

기능성식품의 효용과 의약품과의 차별에 있어 도입한 반건강상태 용어는 기능성식품의 역할을 잘 설명해 주고 있다. 반건강상태란 병원에 가서 진찰을 받아도 발병 판정이 되지 않는 상태 또는 발병의 징후가 보이는 상태로 약을 먹기에는 아직 빠른 시기이다. 병에 대한 자각 증상을 전혀 느끼지 않는 사람의 건강도를 100으로 할 때 몸의 어디엔가 자각 증상을 가지고 있으면서 건강도가 50~60% 선인 경우에 해당된다. 기능성식품은 이러한 반건강의 상태에서 유효성과 실용성을 갖게 되며 이 점에서 질병의 치료가 주기능인 의약품과 질병의 예방이 주기능인 기능성식품이 구분된다 할 수 있다. 또한 질병 A의 염려가 되는 반건강상태에는 기능성식품 A를 먹음으로써 건강상태로 돌아갈 수 있다는 개념으로 특정한 질병의 예방을 강조하고 있는 점에서 건강보조식품과 구분된다. 일본은 기능성식품을 21세기의 식품산업계를 주도할 품목으로 미국은 Designer Foods가

New Industry로 위치를 확보하게 될 가능성을 점치고 있다.

1993년 미국은 'Nutrition Labeling and Education Act' 를 작성, 공포하였다. 또한 7개 항목(지방식품과 심장혈관질환, 저지방식품과 암, 칼슘 고함유 식품과 골다공증, 저염식품과 고혈압, 식이섬유를 함유한 곡류제품, 과일, 야채와 암, 식이섬유 특히 수용성 식이 섬유를 함유한 곡물 및, 과일, 야채, 곡류제품과 심장관상동맥질환)에 대해 식품의 건강 강조 표시를 인가한 후 13개 항목으로 확대하였다. EU의 소비자들은 기능성 식품에 대해 식사의 일부로 천연 물질에서 유래하는 식품을 섭취함으로써 질병의 예방과 치료, 기타 의학상, 건강상에 이익을 가져온다는 개념으로 정제, 캡슐제의 사용보다는 식품이나 음료 등의 형태로 된 제품을 선호하고 있다. Pro-biotic 음료와 어유가 함유된 빵, 영양 드링크 정신활성 드링크, 섬유분이 풍부한 빵, 우유, 칼슘강화 오렌지 쥬스, 우유, 요구르트 등이 대표적이다.

현재 우리나라는 고령화 지수면에서 선진국에 비해 아직 낮은 수준에 있지만 평균수명은 76세에 이르렀으며 사망원인 또한 감염형 질환의 비율이 감소하면서 대표적인 성인병인 순환기계 질환과 암에 의한 사망비율이 전체의 절반에 가까워지고 있다. 이에 따라 국민들도 고령화 사회를 인식하게 되었고, 건강하게 장수하고자 하는 욕구가 커지면서 "성인병 고령화병은 현대의 의료기술로 완치할 수 없다"는 불안감을 갖게 됨과 동시에 일상생활을 통한 예방에 관심이 높아질 것으로 예견되고 있다.

본 연구과제의 최종목표는 사회적으로 문제시되고 있는 알콜성 간질환의 치료 또는 예방용 소재의 개발과 이를 주성분으로 한 기능성식품화에 있다.

2. 활성 phytochemicals의 bench-scale 수준적 추출방법 확립

가. 녹차(*Camellia sinensis*)로부터 간섬유화 억제물질의 bench-scale 수준적 추출방법

녹차로부터 간섬유화억제물질의 bench-scale 수준적 추출조건을 최적화하기 위해 100% methanol과 5 L용 bench-scale의 추출기 및 0.5 L용 Lab-scale의 환류추출기를 사용하여 추출온도별, 추출시간별, 추출회수별 조건에 따른 억제활성 및 추출고형물량을 Lab-scale과 비교 검토함으로써 bench-scale 수준적 추출조건을 확립하고자 하였다. Table 5-1에 나타난 바와 같이 Lab-scale과 bench-scale 모두 70℃에서 추출물 중량당 간섬유화 억제활성이 가장 높았으며 추출수율은 온도증가에 따라 증가하는 경향을 보였다(Table 5-2). 추출온도 70℃에서 추출시간별 저해활성을 측정한 결과 bench-scale은 60분 이상에서

Lab-scale은 80분 이상에서 억제활성 증가는 나타나지 않았으며 Lab-scale보다 bench-scale 경우가 간섬유화 억제활성이 다소 우수함을 보였다(Table 5-3, 5-4). 추출온도와 추출시간을 각각 70℃와 80분으로 고정시키고 추출회수별 잔여 억제활성을 측정한 결과 Fig. 5-1에서와 같이 첫회 추출이 가장 높았으며 2회는 1회의 50%, 3회는 30%, 4회 이후에는 20% 이하를 나타냄으로써 최적 추출회수는 3회임을 알 수 있었다. 이상의 결과들로부터 bench-scale의 최적 추출조건으로 추출온도 70℃, 추출시간 80분 추출회수 2회 또는 3회 등을 확립할 수 있었다.

Table 5-1. Effects of extraction temperature on liver anti-fibrosis activities for 60 min

Anti-fibrosis activity(%)[1)]	40℃	50℃	60℃	70℃
Lab-scale	11.1	15.4	19.1	23.8
Bench-scale	12.8	19.6	22.6	25.0

[1)] Assay concentration : 100 ug/ml

Table 5-2. Effects of extraction temperature on extracted solid amount for 60 min

Solid (kg)	40℃	50℃	60℃	70℃
Lab-scale[1)]	0.07	0.08	0.09	0.12
Bench-scale[2)]	0.78	0.85	1.02	1.31

[1)] Dry sample weight : 0.3 kg, [2)] Dry sample weight : 3 kg

Table 5-3. Effects of extraction time on liver anti-fibrosis activities at 70℃

Anti-fibrosis activity(%)[1)]	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Lab-scale	20.4	22.6	23.6	23.4	23.0
Bench-scale	22.8	25.3	25.1	25.8	25.2

[1)] Assay concentration : 100 ug/ml

Table 5-4. Effects of extraction time on extracted solid amount at 70℃

Solid (kg)	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Lab-scale [1)]	0.08	0.11	0.14	0.16	0.17
Bench-scale [2)]	1.26	1.30	1.45	1.57	1.60

[1)] Dry sample weight : 0.3 kg, [2)] Dry sample weight : 3 kg

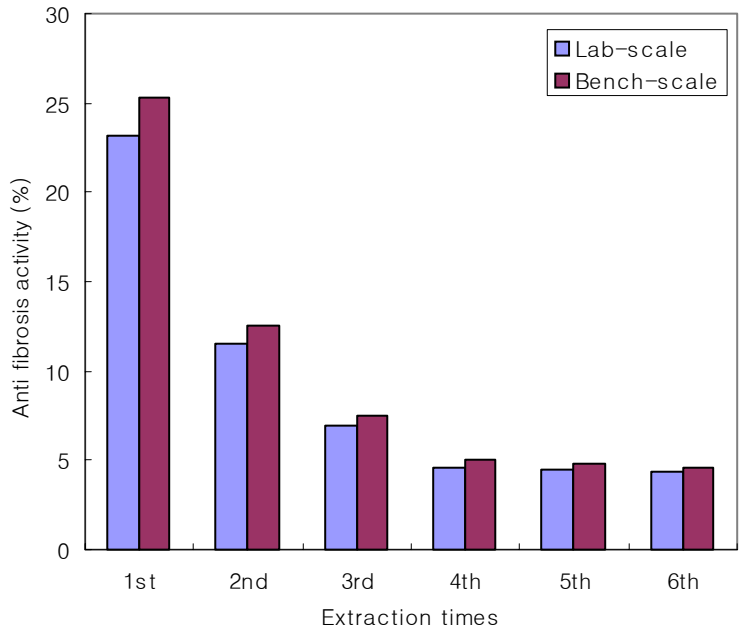


Fig. 5-1. Effects of serial extraction on liver anti-fibrosis activities under condition of every 80 min per a serial extraction at 70℃.

나. 녹차(*Camellia sinensis*)로부터 간세포 보호활성 성분의 bench-scale 수준적 추출방법

녹차로부터 간세포 보호활성물질의 bench-scale 수준적 추출조건을 최적화하기 위해 5 L용 bench-scale의 추출기와 0.5 L용 Lab-scale의 환류추출기를 사용하여 100% methanol로 온도별, 시간별, 회수별 추출조건에 따른 활성을 비교 검토함으로써 bench-scale 수준적 추출조건을 확립하고자 하였다.

Table 5-5와 Table 5-6에 나타난 바와 같이 Lab-scale과 bench-scale 모두 70℃에서 추출물 중량당 알코올성 지방간 억제활성이 가장 높았으며 추출 수율은 온도증가에 따라 증가하는 경향을 보였다. 추출온도 70℃에서 추출시간별 저해활성을 측정한 결과 bench-scale은 60분 이상에서 Lab-scale은 80분 이상에서 저해활성 증가는 나타나지 않았으며 교반장치가 부착된 bench-scale 경우가 우수함을 보였다(Fig. 5-2). 추출온도와 추출시간을 각각 70℃와 80분으로 고정시키고 추출회수별 잔여저해활성을 측정한 결과 Fig. 5-3에서와 같이 2회와 3회는 각각 1회의 55%와 35%를, 4회 이후에는 20% 이하를 나타냄으로써 최적 추출회수는 3회임을 알 수 있었다. 이상의 bench-scale의 추출조건들은 Lab-scale에 비해 큰 차이를 보이지 않았고 최적 추출조건으로 추출온도 70℃, 추출시간 80분 추출회수 3회 등을 확립하였다.

Table 5-5. Effects of extraction temperature on liver protective activities for 60 min

Liver protective activity(%)[1)]	40℃	50℃	60℃	70℃
Lab-scale	60.4	68.9	70.1	72.1
Bench-scale	59.9	69.3	72.6	75.8

1) Assay concentration : 100 ug/ml

Table 5-6. Effects of extraction temperature on extracted solid amount for 60 min

Solid (kg)	40℃	50℃	60℃	70℃
Lab-scale[1)]	0.07	0.08	0.08	0.14
Bench-scale[2)]	0.78	0.91	1.16	1.40

1) Dry sample weight : 0.3 kg, 2) Dry sample weight : 3 kg

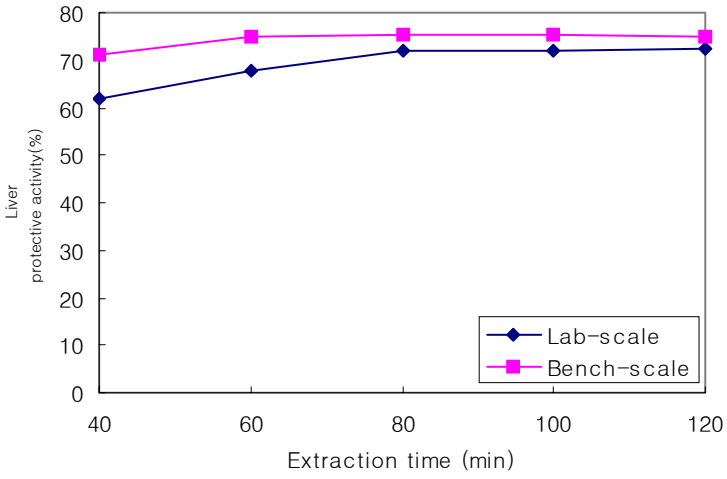


Fig. 5-2. Effects of methanol extraction time on liver protective activities at 70℃.

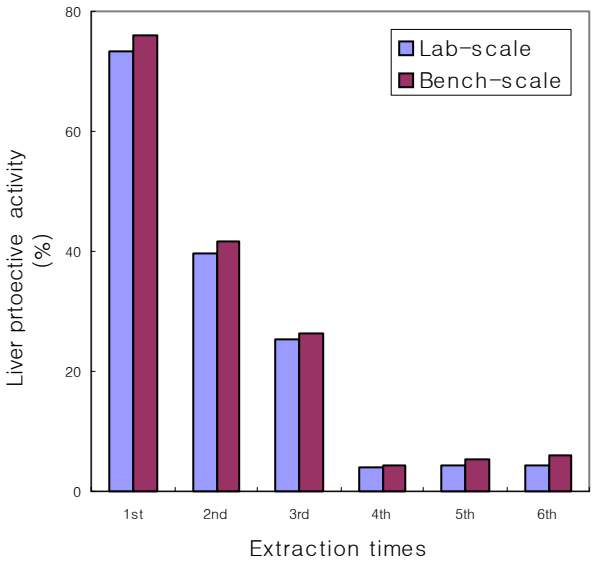


Fig. 5-3. Effects of serial methanol extraction on liver protective activities under condition of every 60 min per a serial extraction at 70℃.

다. 보리(*Horedeum vulgare*)로부터 CYP2E1 저해활성 성분의 bench-scale 수준적 추출방법

보리로부터 CYP2E1 저해활성물질의 bench-scale 수준적 추출조건을 최적화하기 위해 100% methanol과 5 L용 bench-scale의 추출기 및 0.5 L용 Lab-scale의 환류추출기를 사용하여 추출온도, 시간 및 회수에 따른 저해활성 및 추출고형물량을 Lab-scale과 비교 검토함으로써 bench-scale 수준적 추출조건을 확립하고자 하였다. Lab-scale과 bench-scale 모두 60℃에서 추출물 중량당 CYP2E1 저해활성이 가장 높았으며 추출수율은 온도증가에 따라 증가하는 경향을 보였다(Table 5-7, 5-8). 추출온도 60℃에서 추출시간별 저해활성을 측정한 결과 Lab-scale과 bench-scale 모두 60분 이상에서 저해활성 증가는 나타나지 않았으며 Lab-scale보다 bench-scale 경우가 추출고형물량 및 저해활성이 다소 높음을 보였다(Table 5-9). 한편 추출시간에 따른 고형물량의 증가는 Lab-scale에서는 미미하였으나 bench-scale에서는 80분까지 증가폭이 큰 값을 나타내었다(Table 5-10). 추출온도와 추출시간을 각각 60℃와 80분으로 고정시키고 추출회수별 잔여저해활성을 측정한 결과 Fig. 5-4에서와 같이 첫회 추출이 가장 높았으며 제1, 2세부의 녹차와는 달리 추출회수에 따른 잔여활성이 높아 2회는 1회의 60%, 3회는 50%, 4회 이후에는 30% 이하를 나타내었다. 이상의 bench-scale의 추출조건들은 Lab-scale에 비해 큰 차이를 보이지 않음으로써 bench-scale의 최적 추출조건으로 추출온도 60℃, 추출시간 80분 추출회수 3회 등으로 확립하였다.

Table 5-7. Effects of extraction temperature on CYP2E1 inhibitory activities for 60 min

Inhibitory activity (%)[1)]	40℃	50℃	60℃	70℃
Lab-scale	15.7	16.1	22.5	17.9
Bench-scale	16.1	18.2	24.2	21.1

[1)] Assay concentration : 100 ug/ml

Table 5-8. Effects of extraction temperature on extracted solid amount for 60 min

Solid (kg)	40℃	50℃	60℃	70℃
Lab-scale [1)]	0.02	0.02	0.03	0.03
Bench-scale [2)]	0.22	0.23	0.30	0.33

[1)] Dry sample weight : 0.3 kg, [2)] Dry sample weight : 3 kg

Table 5-9. Effects of extraction time on CYP2E1 inhibitory activities at 60℃

Inhibitory activity (%)[1)]	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Lab-scale	20.8	23.0	22.8	23.4	23.1
Bench-scale	22.1	25.6	26.5	25.9	25.3

[1)] Assay concentration : 100 ug/ml

Table 5-10. Effects of extraction time on extracted solid amount at 60℃

Solid (kg)	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Lab-scale [1)]	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05
Bench-scale [2)]	0.22	0.31	0.42	0.47	0.50

[1)] Dry sample weight : 0.3 kg, [2)] Dry sample weight : 3 kg

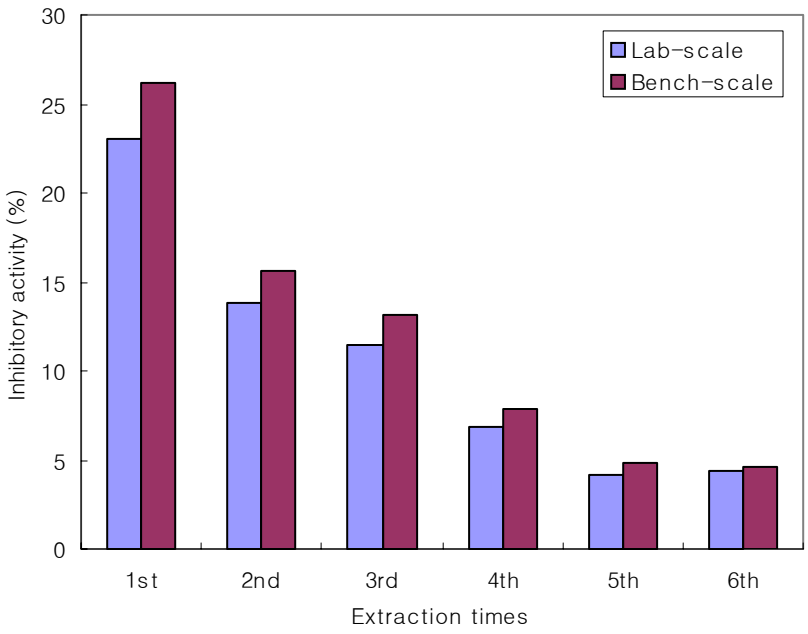


Fig. 5-4. Effects of serial extraction on CYP2E1 inhibitory activities under condition of every 80 min per a serial extraction at 60℃.

라. 도라지(*Platycodon grandiflorum*)로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 bench-scale 수준적 추출방법

도라지로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 bench-scale 수준적 최적추출조건을 확립할 목적으로 앞서와 동일한 추출기들을 사용하여 70% methanol로 온도별, 시간별, 회수별 추출조건에 따른 활성을 비교 검토하고자 하였다.

Table 5-11에 나타난 바와 같이 Lab-scale과 bench-scale 모두 70℃에서 추출물 중량당 알코올성 지방간 억제활성이 가장 높았으며 추출수율은 온도증가에 따라 증가하는 경향을 보였다(Table 5-12). 추출온도 70℃에서 추출시간별 억제활성을 측정한 결과 bench-scale은 60분 이상에서 Lab-scale은 80분 이상에서 억제활성 증가는 나타나지 않았으며 추출고형물량은 추출시간에 따라 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5-5, 5-6). 추출온도와 추출시간을 각각 70℃와 80분으로 고정시키고 추출회수별 잔여억제활성을 측정한 결과 Fig. 5-7에서와 같이 첫회 추출에 비해 2회는 70%, 3회는 40%, 4회 이후에는 20% 이하를 나타냄으로써 최적 추출회수는 2회임을 알 수 있었다. 이상의 bench-scale의 추출조건들은 Lab-scale에 비해 큰 차이를 보이지 않았고 최적 추출조건으로 추출온도 70℃, 추출시간 80분 추출회수 2회 등을 확립하였다.

Table 5-11. Effects of extraction temperature on alcoholic fatty liver inhibitory activities for 60 min

Inhibitory activity (%)[1)]	40℃	50℃	60℃	70℃
Lab-scale	27.4	35.9	39.1	43.3
Bench-scale	27.7	37.1	42.8	45.2

[1)] Assay concentration : 100 ug/ml

Table 5-12. Effects of extraction temperature on extracted solid amount for 60 min

Solid (kg)	40℃	50℃	60℃	70℃
Lab-scale[1)]	0.02	0.05	0.08	0.12
Bench-scale[2)]	0.97	1.04	1.15	1.31

[1)] Dry sample weight : 0.3 kg, [2)] Dry sample weight : 3 kg

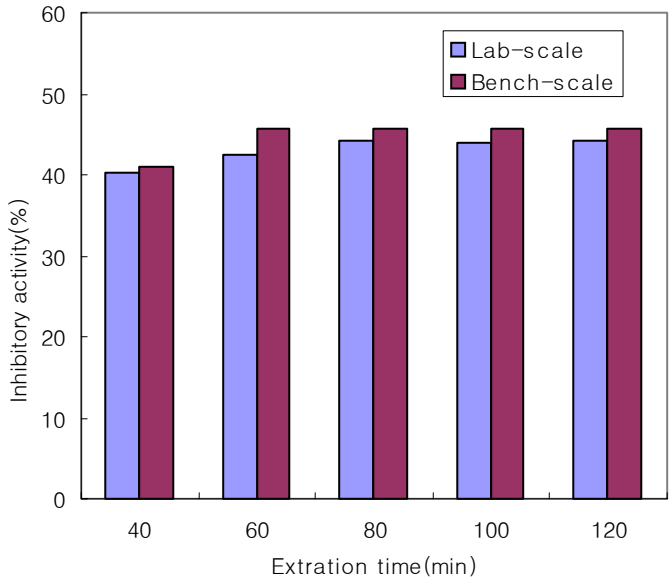


Fig. 5-5. Effects of methanol extraction time on alcoholic fatty liver inhibitory activities at 70℃.

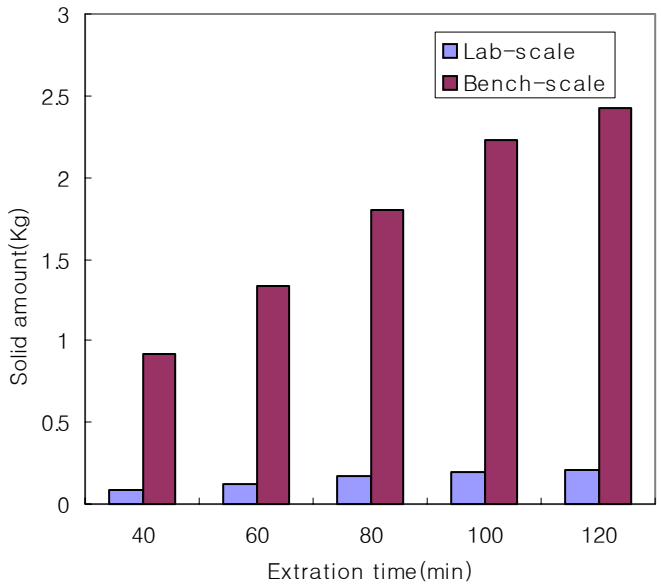


Fig. 5-6. Effects of methanol extraction time on solid amounts at 70℃.

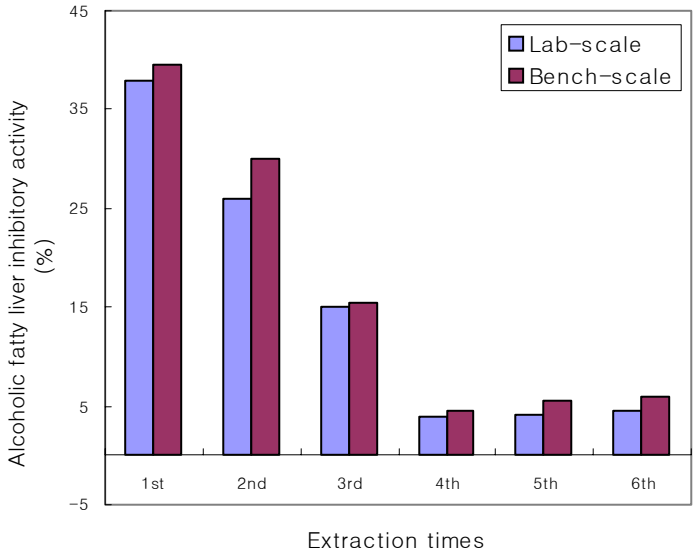


Fig. 5-7. Effects of serial methanol extraction on alcoholic fatty liver inhibitory activities under condition of every 80 min per a serial extraction at 70℃.

3. 활성 phytochemicals의 bench-scale 수준적 부분정제방법 확립

가. 녹차(*Camellia sinensis*)로부터 간섬유화 억제물질의 bench-scale 수준적 부분정제방법

1) 녹차 methanol 추출물의 유기용매 분획

부분정제의 첫 번째 단계로 녹차 100% methanol 추출물 중에 함유되어 있는 hexane과 chloroform 가용성 불순물을 제거하고자 유기용매 분획을 실시하였다. 그 결과 Fig. 5-8에서와 같이 대부분의 활성성분이 methanol로 분획됨을 알 수 있었으며 hexane 및 chloroform 분획내 함유된 간섬유화 억제활성물질은 미미하였다.

2) Methanol 분획물의 탈색

내구성이 강하고 저가인 탈색용 resin으로 Diaion HP-20, HP-21 및 활성탄을 사용하여 batch type과 column type에서 상기 methanol 분획물의 탈색효과를 검토한 결과 Diaion HP-21이 가장 우수하였으며 column type이 batch보다 약 7% 이상 탈색효과를 나타내었다(Table 5-13, 5-14).

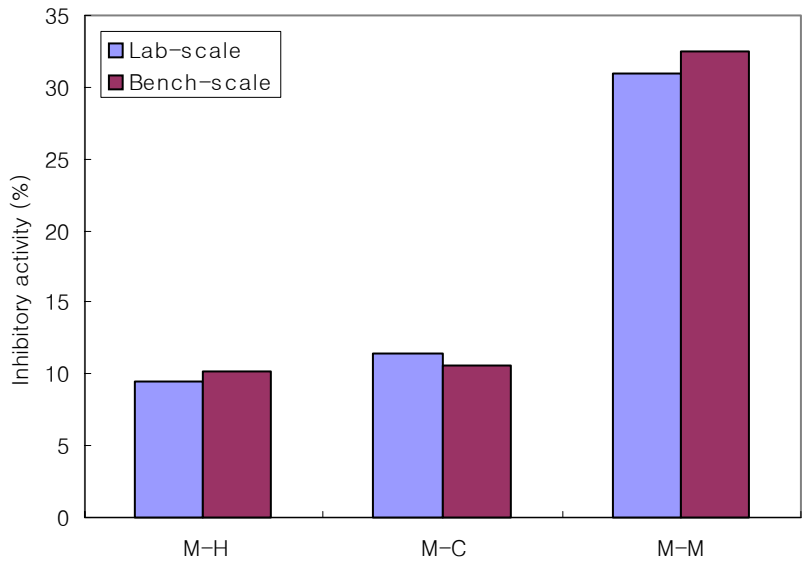


Fig. 5-8. Liver anti-fibrosis activities of organic solvent fractions from methanol extract.

M-H : Hexane soluble fraction　　M-C : Chloroform soluble fraction

M-M : Methanol soluble fraction

Table 5-13. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in batch type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Camellia sinensis	57.42	63.11	47.30

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

Table 5-14. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in open column type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Camellia sinensis	62.33	68.15	52.28

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

3) Ultrafiltration

분자량별 여과막 column과 Millipore masterflex를 사용하여 ultrafiltration을 실시함으로써 신속, 간편한 부분 정제공정을 개발하고자 하였다. 그 결과 분자량 1,000 MW-cut off 여과막을 통과한 여액이 전체 저해활성의 96% 이상 함유하였고 고형물 또한 93%를 나타냄으로써 이전 단계들에 의해 주로 저분자 물질들이 추출 또는 분획되었음을 알 수 있었고 이에 따라 ultrafiltration에 의한 부분 정제도는 크게 높지 않을 것으로 사료되었다(Data 제시하지 않음).

4) Diaion HP-20 open column chromatography

부분정제의 최종단계로 Diain HP-20을 이용하여 column chromatography를 실시함으로써 정제와 2차 탈색을 동시에 도모하고자 하였다. 물에 녹인 상기의 활성획분을 물로 평형화시킨 column에 주입하고 물로 세척한 후 stepwise로 20%, 60%, 100%의 methanol로 용출한 결과, Fig. 5-9와 같이 100% methanol 용출획분이 100 ug/ml의 assay계 농도에서 약 35% 내외의 높은 알코올성 간섬유화 억제활성을 나타내었다. 한편 각 용출획분의 고형물량을 측정한 결과 전체 고형물량 중 약 40%가 60% methanol 용출획분에, 30% 내외가 20% methanol 용출획분에, 약 20%가 100% methanol 용출획분에 존재함으로써, 고형물 중량당 억제활성을 비교 검토할 때 매우 높은 부분 정제도를 나타내었다.

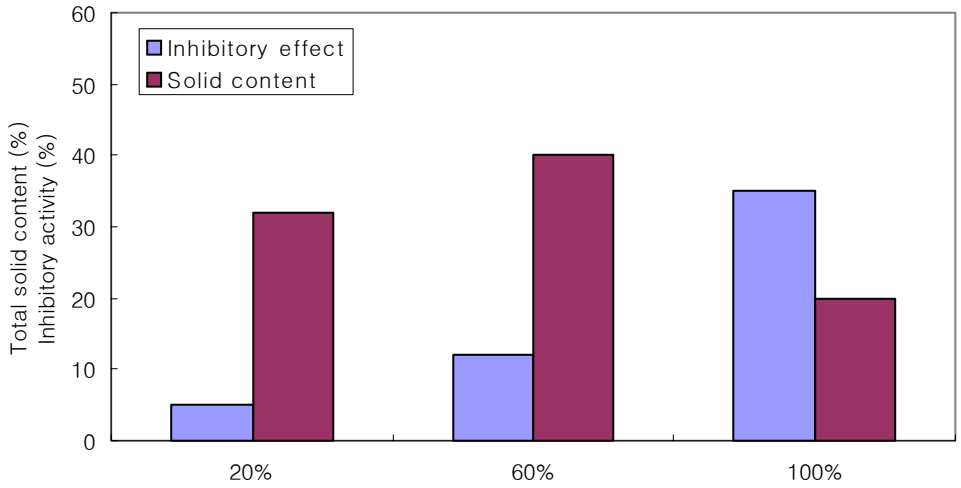


Fig. 5-9. Liver anti-fibrosis effects of methanol fractions eluted from silica gel 60 column.

이상의 부분정제공정을 요약하면 Fig. 5-10과 같다.

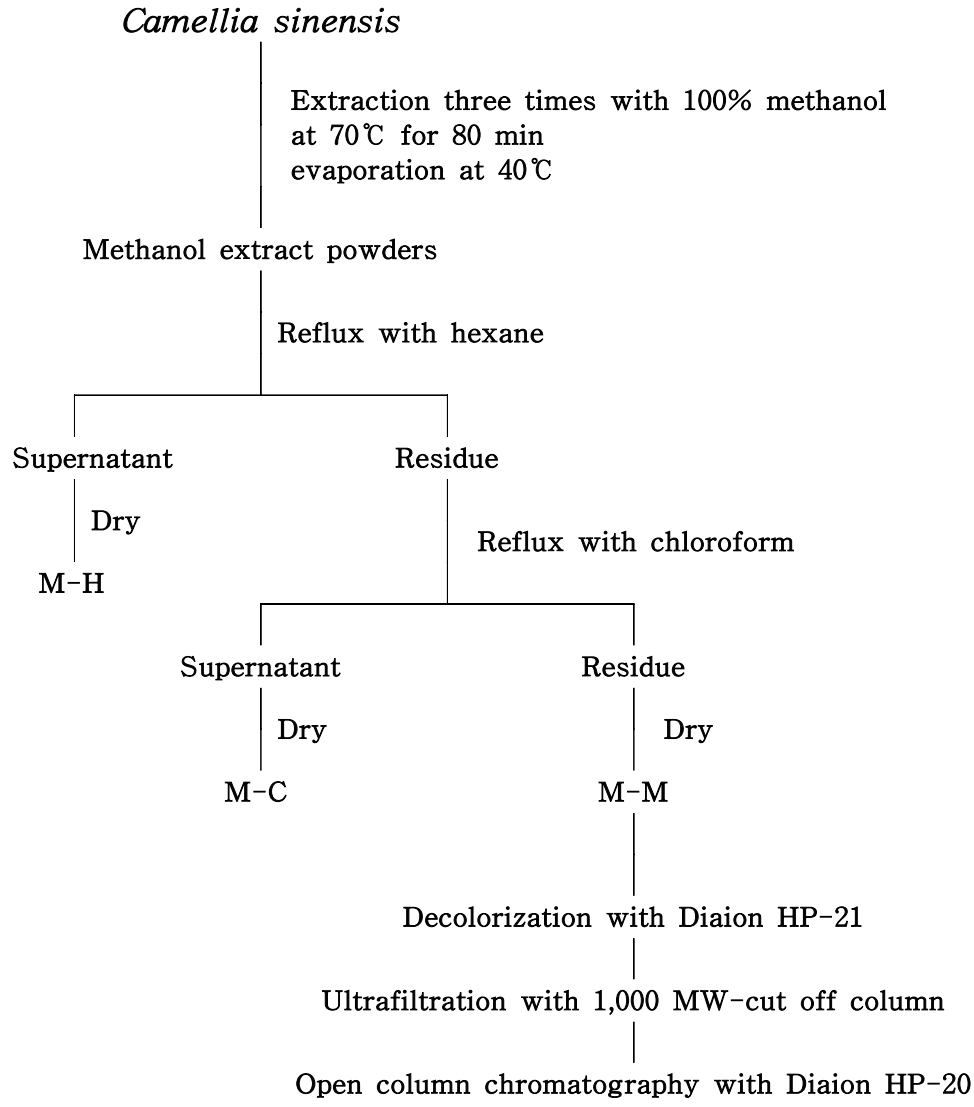


Fig. 5-10. Flow sheet for partial purification of liver anti-fibrosis component from *Camellia sinensis*.

나. 녹차(*Camellia sinensis*)로부터 간세포 보호활성 성분의 bench-scale 수준적 정제방법

1) Methanol 추출물의 hexane 및 chloroform

녹차 100% methanol 추출물 중에 함유되어 있는 hexane과 chloroform 가용성 불순물을 제거함으로써 부분정제의 정제도를 높이고 정제를 용이하게 하기 위해 유기용매 분획을 실시하였다. 그 결과 Fig. 5-11에서와 같이 대부분의 활성성분이 methanol로 분획됨을 알 수 있었으며 hexane 및 chloroform 분획내 함유된 저해활성물질은 미미하였다.

2) Methanol 분획물의 탈색

비교적 저가이면서 내구성이 강한 탈색용 resin인 Diaion HP-20, HP-21 및 활성탄을 사용하여 batch와 column에서 methanol 분획물의 탈색효과를 검토한 결과 Diaion HP-21이 가장 우수하였으며 column type이 batch보다 약 10% 이상 높은 탈색효과를 나타내었다(Table 5-15, 5-16).

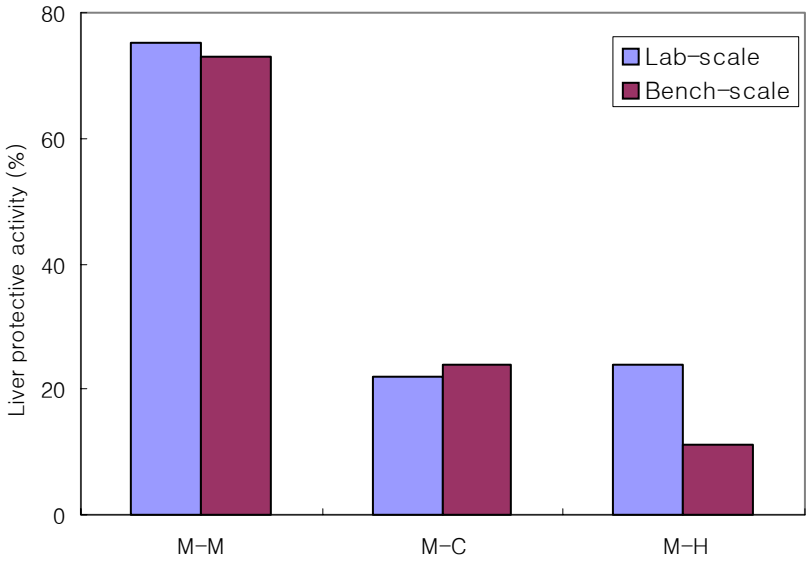


Fig. 5-11. Liver protective activities of organic solvent fractions from methanol extract.

M-M : Methanol soluble fraction　　M-C : Chloroform soluble fraction
M-H : Hexane soluble fraction

Table 5-15. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in batch type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Camellia sinensis	58.12	64.33	48.42

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

Table 5-16. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in open column type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Camellia sinensis	64.15	70.49	54.36

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

3) Ultrafiltration

Millipore masterflex와 분자량별 여과막 column을 사용하여 ultrafiltration을 실시함으로써 신속하고 간편한 부분 정제공정을 개발하고자 하였다. 그 결과 분자량 1,000 MW-cut off 여과막을 통과한 여액이 전체 저해활성의 94% 이상 함유하였고 고형물 또한 92%를 나타냄으로써 이전 단계들에 의해 주로 저분자 물질들이 추출 또는 분획되었음을 알 수 있었다(Data 제시하지 않음).

4) Diaion HP-20 open column chromatography

부분정제의 최종단계로 탈색처리에서 사용한 바 있는 Diaion HP-20과 Diaion HP-21 중 HP-21 resin의 반복사용을 피하기 위해 HP-20을 이용하여 column chromatography를 실시함으로써 정제와 탈색을 동시에 도모하고자 하였다. 물에 녹인 상기의 활성획분을 물로 평형화시킨 column에 주입하고 물로 세척한 후 stepwise로 20%, 60%, 100%의 methanol로 용출한 결과 Fig. 5-12와 같이 100% methanol 용출획분이 0.1 mg/ml의 assay계 농도에서 약 90% 내외의 높은 저해활성을 나타내었다. 이상의 부분정제 공정을 종합하면 Fig. 5-13과 같다.

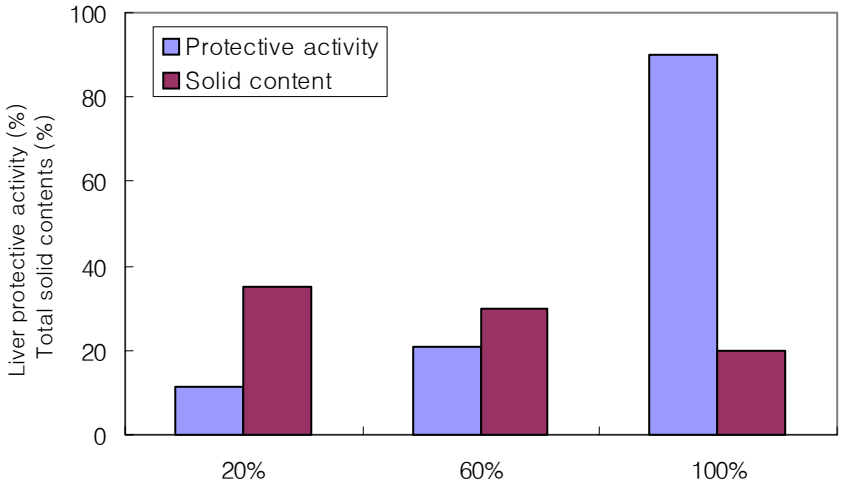


Fig. 5-12. Liver protective activities of methanol fractions eluted from Diaion HP-20.

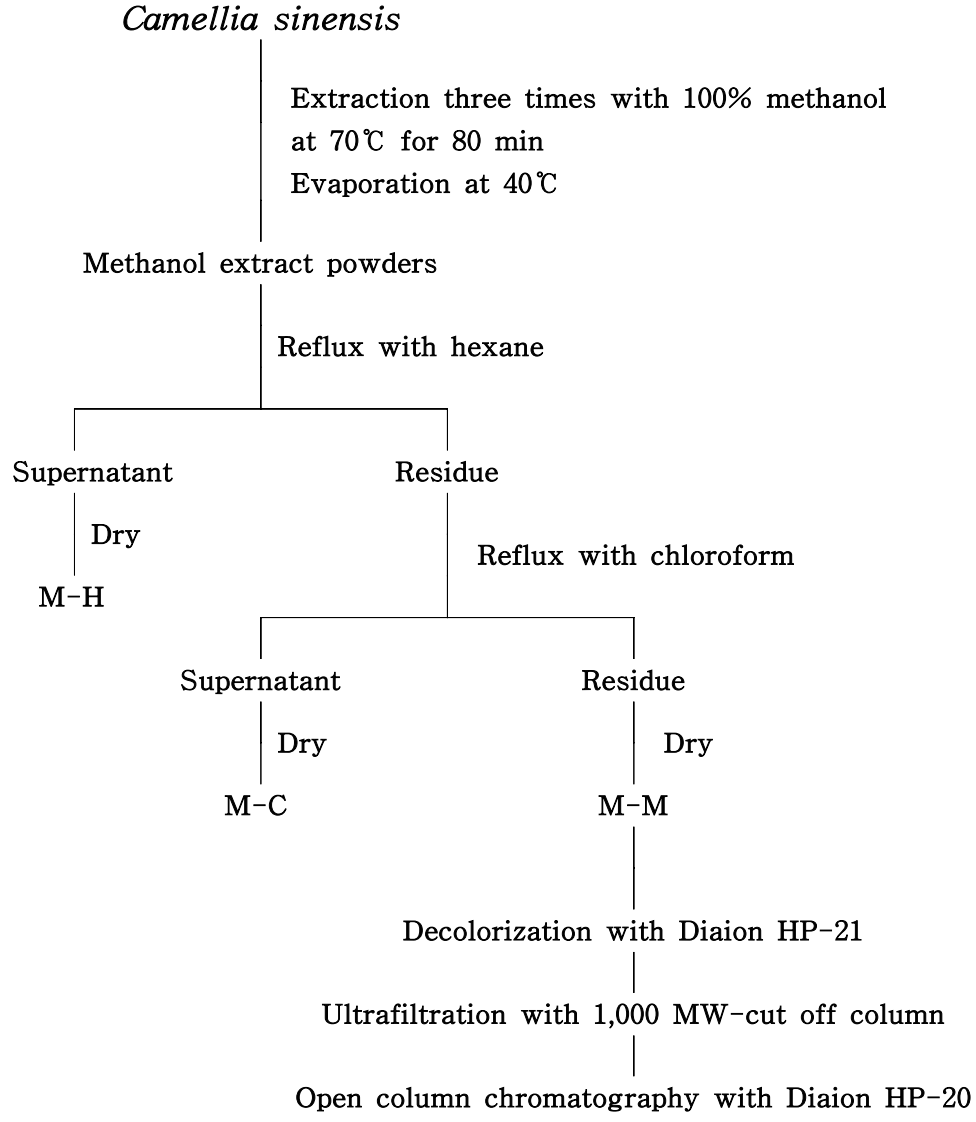


Fig. 5-13. Flow sheet for partial purification of liver protective active component from *Camellia sinensis*.

다. 보리(*Hordeum vulgare*)로부터 CYP2E1 저해활성 성분의 bench-scale 수준적 정제방법

1) 보리 methanol 추출물의 유기용매 분획

Bench-scale 수준적 부분정제 공정을 개발할 목적으로 보리 100% methanol 추출물 중에 함유되어 있는 hexane과 ethylacetate 가용성 불순물을 제거하고자 유기용매 분획을 실시하였다. 그 결과 Fig. 5-14에서와 같이 대부분의 활성성분이 methanol로 분획됨을 알 수 있었으며 hexane 분획물에도 상당량의 활성을 보였으나 ehylacetate 분획내 함유된 저해활성물질은 미미하였다.

2) Methanol 분획물의 탈색

제 1,2세부과제와 동일한 방법으로 내구성이 강하고 저가인 탈색용 resin인 Diaion HP-20, HP-21 및 활성탄을 사용하여 batch type과 column type에서 상기 유기용매 분획물의 탈색효과를 검토하였다. 그 결과 Diaion HP-20과 HP-21은 유사한 값을 나타내었으며 column type이 batch보다 약 8% 이상 우수한 탈색효과를 나타내었다(Table 5-17, 5-18).

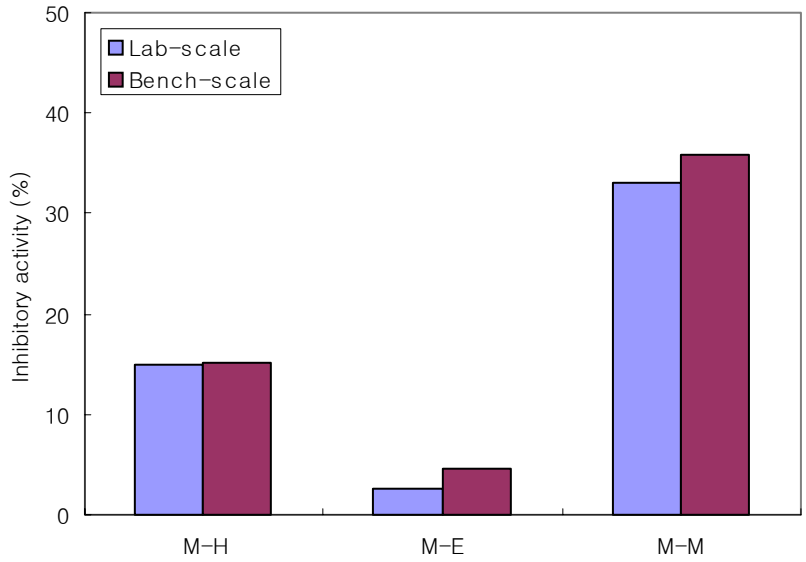


Fig. 5-14. CYP2E1 inhibitory activities of organic solvent fractions from methanol extract.

M-H : Hexane soluble fraction

M-E : Ethylacetate soluble fraction

M-M : Methanol soluble fraction

Table 5-17. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in batch type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Hordeum vulgare	59.32	60.27	49.39

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

Table 5-18. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in open column type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Hordeum vulgare	64.15	63.62	53.21

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

3) Diaion HP-20 column chromatography

공업적으로 광범위하게 사용되고 있는 Diain HP-20을 이용하여 1차 column chromatography를 실시하였다. 물에 녹인 상기의 활성획분을 물로 평형화시킨 column에 주입하고 물로 세척한 후 stepwise로 50%, 100%의 methanol과100% acetone으로 용출한 결과 Fig. 5-15와 같이 100% methanol 용출획분이 0.1 mg/ml의 assay계 농도에서 약 60% 내외의 높은 CYP2E1 저해활성을 나타내었다. 한편 각 용출분획의 고형물량을 측정한 결과 전체 고형물량 중 약 60%가 100% methanol 용출분획에, 20% 내외가 50% methanol 용출분획에, 약 10%가 100% acetone 용출분획에 존재함으로써, 고형물 중량당 저해활성과 비교 검토할 때 매우 높은 부분정제도를 나타내었다. 이상의 부분정제 공정을 종합하면 Fig. 5-16과 같다.

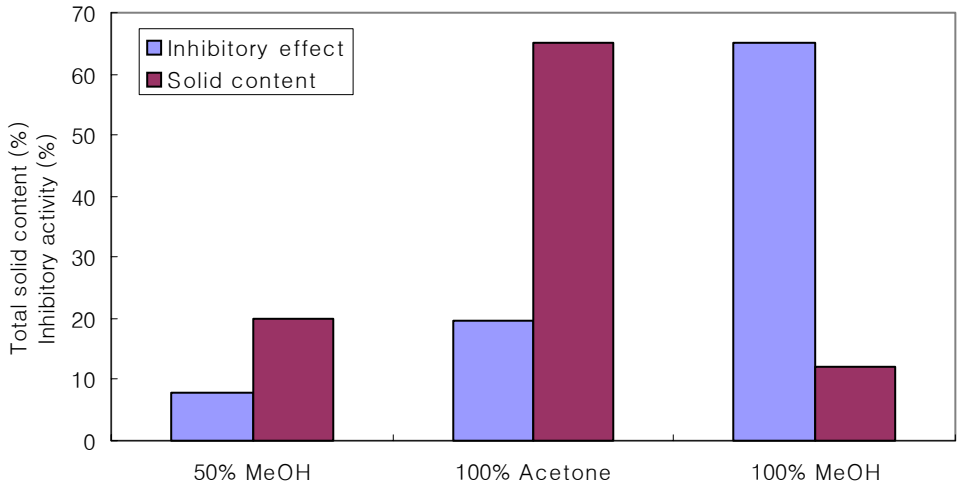


Fig. 5-15. CYP2E1 inhibitory effects of methanol and acetone fractions eluted from Diaion HP-20.

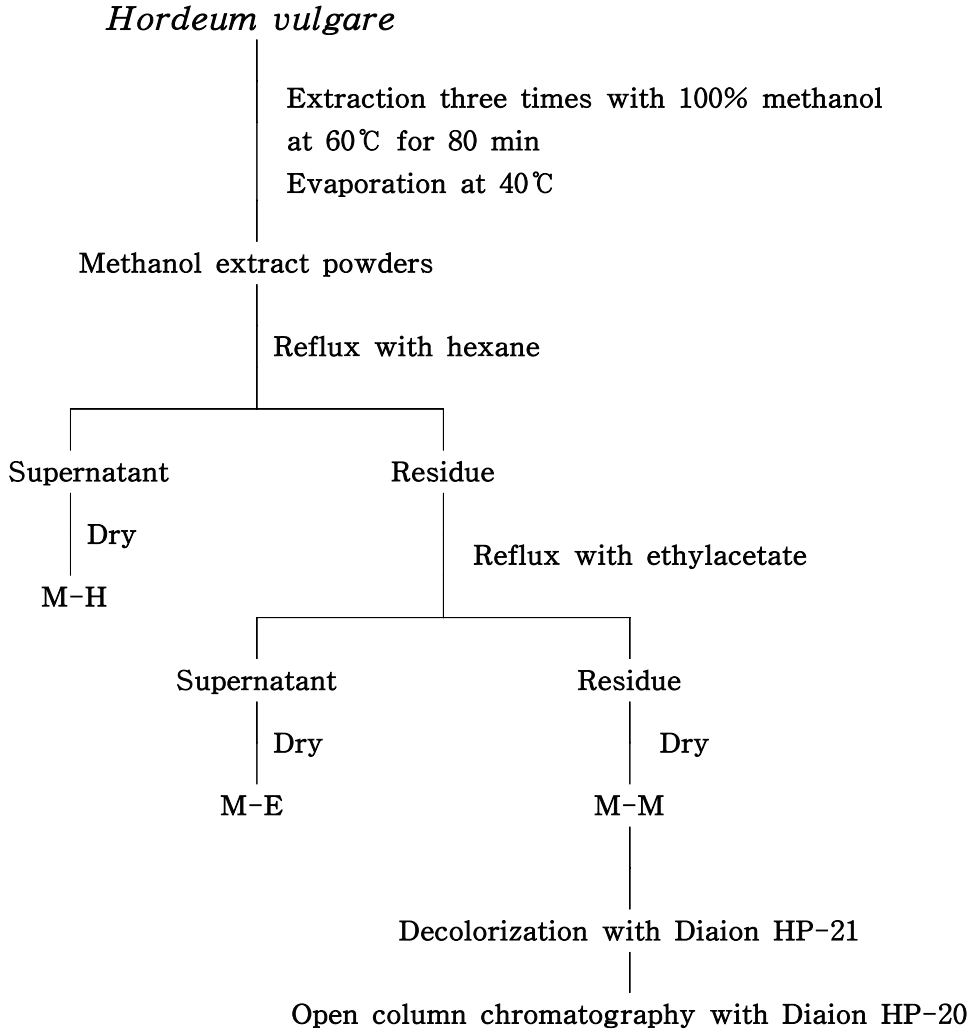


Fig. 5-16. Flow sheet for partial purification of CYP2E1 inhibitory component from *Hordeum vulgare.*

라. 도라지(*Platycodon grandiflorum*)로부터 알코올성 지방간 억제활성물질의 bench-scale 수준적 정제방법

1) Methanol 추출물의 hexane 및 acetone 분획

도라지 70% methanol 추출물 중에 함유되어 있는 hexane과 acetone 가용성 불순물을 제거함으로써 부분정제의 정제도를 높이고 정제를 용이하게 하기 위해 유기용매 분획을 실시하였다. 그 결과 Fig. 5-17에서와 같이 대부분의 활성성분이 methanol로 분획됨을 알 수 있었으며 hexane 및 acetone 분획내 함유된 저해활성물질은 미미하였다.

2) Methanol 분획물의 탈색

내구성이 강하고 공업적으로 사용빈도가 높은 탈색용 resin인 Diaion HP-20, HP-21 및 활성탄을 사용하여 batch와 column에서 methanol 분획물의 탈색효과를 검토한 결과 Diaion HP-21이 가장 우수하였으며 column type이 batch보다 약 14% 이상 높은 탈색효과를 나타내었다(Table 5-19, 5-20).

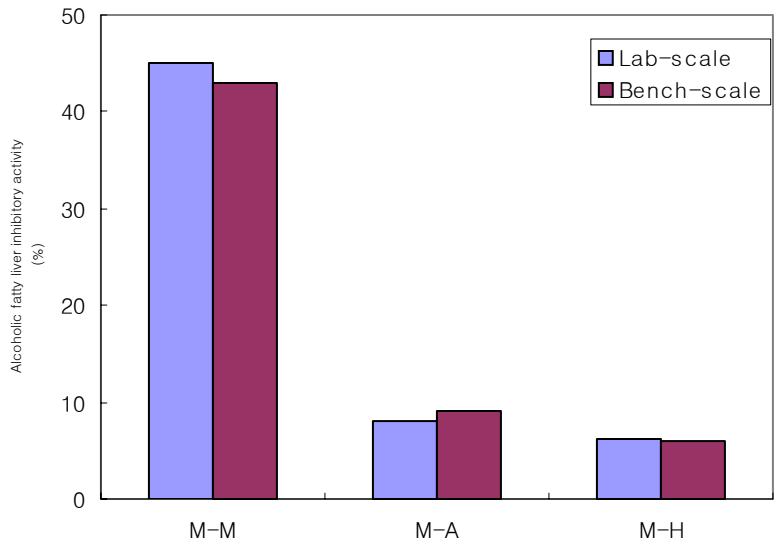


Fig. 5-17. Alcoholic fatty liver inhibitory activities of organic solvent fractions from methanol extract.

M-M : Methanol soluble fraction

M-A : Acetone soluble fraction

M-H : Hexane soluble fraction

Table 5-19. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in batch type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Platycodon grandiflorum	54.24	61.23	44.52

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

Table 5-20. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in open column type treatment

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
Platycodon grandiflorum	62.18	70.24	53.39

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

3) Silica gel 60 open column chromatography

부분정제의 최종단계로 탈색처리에서 검토한 바 있는 Diain HP-20과 HP-21의 반복사용을 피하기 위해 silica gel 60 column chromatography를 실시함으로써 정제효율을 높이고자 하였다. Chloroform에 녹인 상기의 활성획분을 chloroform으로 평형화시킨 column에 주입하고 chloroform으로 세척한 후 stepwise로 chloroform : methanol을 80:20, 60:40, 40:60 순으로 용출한 결과 Fig. 5-18과 같이 80:20 용출획분이 0.1 mg/ml의 assay계 농도에서 약 45% 내외의 높은 저해활성을 나타내었다. 이상의 부분정제 공정을 종합하면 Fig. 5-19와 같다.

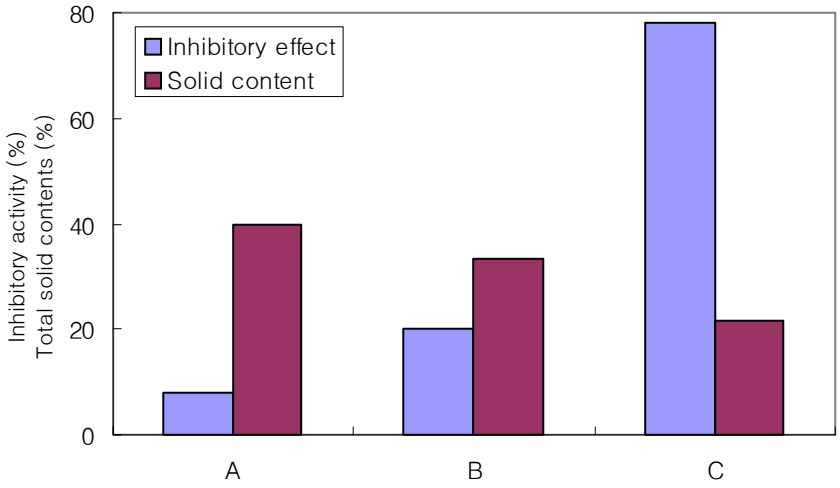


Fig. 5-18. Alcoholic fatty liver inhibitory activities of methanol fractions eluted from Silica gel 60 column.

A : Chloroform : Methanol = 20 : 80
B : Chloroform : Methanol = 40 : 60
C : Chloroform : Methanol = 80 : 20

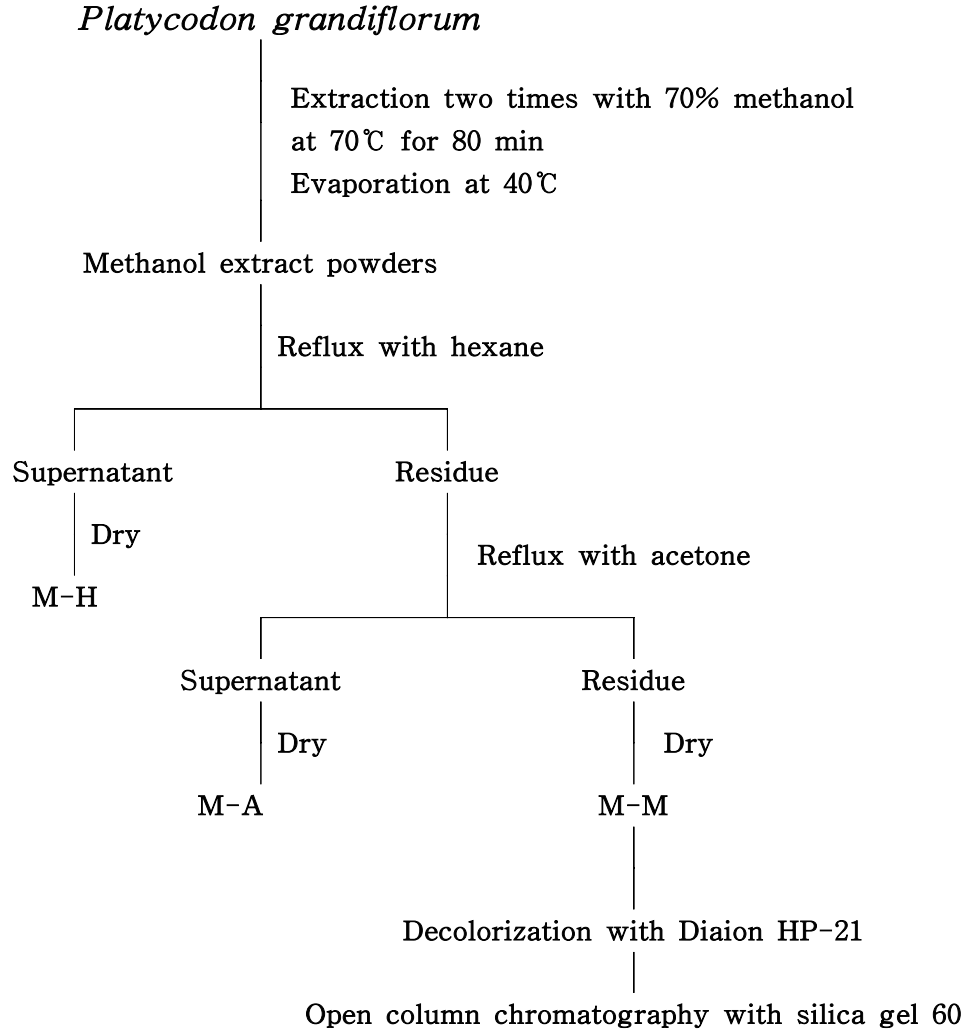


Fig. 5-19. Flow sheet for partial purification of active component from *Platycodon grandiflorum*.

제6절 알코올성 간질환용 phytochemicals의 기능성식품화

1. 재료 및 방법

가. 드링크제제 제작

각 세부과제별로 선정한 녹차, 보리, 도라지들로부터 제 5절에서 검토한 소재화공정에 따라 공업적 수준의 부분정제물을 조제한 후 100 mL용 내용액제제를 제작하였다. 제품의 향, 맛 안정성 등을 고려하여 3가지 정도의 배합 예를 이용하여 실시하였다. 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상과당, 올리고당, 벌꿀 등을 이용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨을 산미제 및 pH 조절제로 구연산을 사용하였다. 항산화제로 비타민 C를 방부제로 에탄올, 안식향산나트륨을 첨가하였고 그외 사과과즙, 배과즙, 대추즙 등도 혼합하여 제품의 식미를 향상시켰다. 주성분의 배합은 100-300 mg 내에서 조제하였다.

나. 연질캅셀 제작

녹차, 보리, 도라지 추출분말 100 mg에 소맥배아유를 50%~30%, 미강추출물 10~20%, 베타카로틴 1~3%, 레시틴 1~2%, 토코페롤 1% 등을 부형제로 이용하였으며 생강추출물, 계피분 등도 관능효과를 위하여 미량 첨가하였다.

다. 과립제 제작

주성분인 녹차, 보리, 도라지 추출분말 50 mg에 부형제로서 유당 670 mg, 옥수수 전분 196.35 mg, 감미제로서 백당 100 mg, 산미제로서 구연산 1.5 mg을 혼합하고 spray dry 후 제과하였으며 함습도를 시험 후 정립하고 최종 혼합하였다.

2. 결 과

가. 드링크제제

동물실험을 통하여 독성을 나타내지 않았던 녹차, 보리, 도라지 조시료들을 이용하여 100 mL 용 내용액제제를 제작하였다. 제품의 향, 맛, 안정성 등을 고려하여 3가지 정도의 배합예를 이용하여 실시하였다. 재료 및 방법에서와 같이 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상과당, 올리고당, 벌꿀 등을 이용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨을 산미제 및 pH 조절제로 구연산을 사용하였다. 항산화제로 비타민 C와 방부제로 에탄올, 안식향산나트륨을 첨가하였고 그외 사과과즙, 배과즙, 대추즙 등도 혼합하여 제품의 식미를 향상시켰다. 주성분의 배합은 100~300 mg내에서 조제하였다(Table 6-1).

Table 6-1. 녹차, 보리 및 도라지 함유 기능성 드링크 제제의 배합예

배합예 1.	배합예 2.	배합예 3.
용량: 100 mL 제품유형: 희석과즙 음료 성분: 녹차 추출 조시료 100 mg 사과과즙 10% 대추즙 1% 배과즙 3% 벌꿀 0.5% 구연산 0.05% 비타민 C 0.05% 비타민 B6 염산염 0.01% L-글루타민산나트륨 0.01% 니코틴산아미드 0.01% 액상과당 0.01%	용량: 100 mL 제품유형: 착향탄산음료 성분: 보리 추출 조시료 100 mg 계피분 10 mg 서양배농축과즙 3% 구연산 50 mg 비타민 C 50 mg 젖산칼슘 50 mg 액상과당 10 mg 리보플라빈 10 mg 나트륨 10 mg 올리고당 5 mg 이산화탄소	용량: 100 mL 제품유형: 내용액제제 성분: 도라지 추출 조시료 100 mg 백당 8.8% 포도당 5.8% 식염 0.05% 호박산이나트륨 0.05% 구연산 0.08% CH-20 0.5% 안식향산나트륨 0.01% 에탄올 0.001% 니코틴산아미드 0.01%

* 효능표시

- 만성 알코올 섭취자의 간질환 예방 및 간보호에 유효할 수도 있음.

* 보존 및 유통기준

- 본 제품은 공기접촉, 온도, 물리적 충격 등에 안정한 화합물로서 물질변화에 대한 위험이 전혀 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통상 바람직함.

나. 연질캅셀 제제

녹차, 보리, 도라지 추출분말 100 mg을 이용하여 연질캅셀을 제작하였으며 제품의 향, 맛 등을 고려하여 2가지 정도의 배합예를 이용하였다. 부형제로서 소맥배아유를 50%~30%, 미강추출물 10~20%, 베타카로틴 1~3%, 레시틴 1~2%, 토코페롤 1% 등을 이용하였으며 생강추출물, 계피분 등도 관능효과를 위하여 미량 첨가하였다(Table 6-2).

Table 6-2. 녹차, 보리 및 도라지 함유 기능성 연질캅셀 제제의 배합예

배합예 1.	배합예 3.	배합예 2.
단위: 1 Cap 제품유형: 건강보조식품 (연질캅셀) 성분 ・녹차 추출 조시료 100 mg ・소맥배아유 50% ・미강추출물 10% ・베타카로틴 3% ・레시틴 2% ・비타민 C 1% ・생강추출물, 계피분 기타. 권장섭취량 및 섭취방법 ・1일 3회, 1회 1-2 캅셀씩 식전 또는 식후에 섭취 ・필요에 따라 증감 가능	단위: 1 Cap 제품유형: 건강보조식품 (연질캅셀) 성 분 ・보리 추출 조시료 100 mg ・소맥배아유 50% ・미강추출물 10% ・베타카로틴 3% ・레시틴 2% ・비타민 C 1% ・생강추출물, 계피분 기타. 권장섭취량 및 섭취방법 ・1일 3회, 1회 1-2 캅셀씩 식전 또는 식후에 섭취 ・필요에 따라 증감 가능	단위: 1 Cap 제품유형: 건강보조식품 (연질캅셀) 성 분 ・도라지 추출 조시료 100 mg ・소맥배아유 30% ・미강유 20% ・대두박 추출물 3% ・D-□-토코페롤 1% ・베타카로틴 3% ・레시틴 1% ・마늘, 생강추출물 기타. 권장섭취량 및 섭취방법 ・1일 3회, 1회 1-2 캅셀씩 식전 또는 식후에 섭취 ・필요에 따라 증감 가능

* 효능표시

- 만성 알코올 섭취자의 간질환 예방 및 간보호에 유효할 수도 있음.

* 보존 및 유통기준

- 본 제품은 공기접촉, 온도, 물리적 충격 등에 안정한 화합물로서 물질변화에 대한 위험이 전혀 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통상 바람직함.

다. 과립제 제작

주성분인 녹차, 보리 도라지 추출분말 50 mg에 배합예(Table 6-3)와 같이 부형제로서 유당 670 mg, 옥수수 전분 196.35 mg, 감미제로서 백당 100 mg, 산미제로서 구연산 1.5 mg을 혼합하고 spray dry 후 제과하였으며 함습도를 시험 후 정립하고 최종 혼합하였다.

Table 6-3. 녹차, 보리 및 도라지 함유 기능성 과립제제의 배합예

단위: 1포(5 g)
제품유형: 건강보조식품(과립제제)
성 분
・녹차, 보리, 도라지 추출 조시료(TV-3) 300 mg
・옥수수 전분(부형제) : 3.5 g
・유당(부형제) : 0.65 g
・백당(감미제) : 0.5 g
・구연산(산미제) : 5 mg
권장섭취량 및 섭취방법
・1일 3회, 1회 1-2 캅셀씩 식전 또는 식후에 섭취
・필요에 따라 증감 가능

* 효능표시

- 만성 알코올 섭취자의 간질환 예방 및 간보호에 유효할 수도 있음.

* 보존 및 유통기준

- 본 제품은 공기접촉, 온도, 물리적 충격 등에 안정한 화합물로서 물질변화에 대한 위험이 전혀 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통상 바람직함.

라. 제품의 외관, 미생물 검사

본 제품들의 유통성과 저장성을 검토하기 위해 37℃와 55℃에서 각각 1개월과 1주일 위치시키면서 제품의 미생물 검사를 실시하였으며 제품의 안정성 검사는 간이적으로 동일조건에서 드링크제품에 한하여 침전물, 이미, 이취 등의 항목에 국한시켜 실시하였다. 그 결과 Table 6-4, 6-5, 6-6과 같이 식품위생 및 제품 품질 상의 문제는 발견할 수 없었다.

Table 6-4. 제품의 미생물검사

드링크제품 저장조건 : 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
녹차 제품	1×10^3 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출
보리 제품	1×10^3 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출
도라지 제품	1×10^3 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출

과립제품 저장조건 : 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
녹차 제품	1×10^2 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출
보리 제품	1×10^2 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출
도라지 제품	1×10^2 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출

연질캡슐제품 저장조건 : 37℃, 1개월

	세 균	진 균	대 장 균	황색포도상구균
녹차 제품	1×10^2 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출
보리 제품	1×10^2 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출
도라지 제품	1×10^2 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출

Table 6-5. 제품들의 미생물검사

드링크제품 저장조건 : 50℃, 1주일

	세 균	진 균	대 장 균	황색포도상구균
녹차 제품	1×10^3 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출
보리 제품	1×10^3 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출
도라지 제품	1×10^3 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출

과립제품 저장조건 : 50℃, 1주일

	세 균	진 균	대 장 균	황색포도상구균
녹차 제품	1×10^2 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출
보리 제품	1×10^2 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출
도라지 제품	1×10^2 개 이하	1×10^2 개 이하	불검출	불검출

연질캡슐제품 저장조건 : 50℃, 1주일

	세 균	진 균	대 장 균	황색포도상구균
녹차 제품	1×10^2 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출
보리 제품	1×10^2 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출
도라지 제품	1×10^2 개 이하	1×10 개 이하	불검출	불검출

Table 6-6. 드링크제품들의 외관검사

드링크제품 저장조건 : 37℃, 1개월

	침 전 물	이 취	이 미
녹차 제품	없음	없음	없음
보리 제품	없음	없음	없음
도라지 제품	없음	없음	없음

드링크제품 저장조건 : 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미
녹차 제품	없음	없음	없음
보리 제품	없음	없음	없음
도라지 제품	없음	없음	없음

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표달성도

1. 1차년도 연구개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
○ 제 1 세부과제 : 알코올성 간섬유화 억제활성 phytochemicals의 소재화	- Hepatic stellate cell(HSC) line의 알코올에 의한 collagen type I 의 활성화 정도를 immunoassay kit를 사용하여 측정하는 assay계를 확립함으로써 간섬유화에 미치는 알코올의 영향을 정량화함. - Wister rat에 알코올을 급성과 만성으로 섭취시킨 후 실험동물 HSC의 활성화도를 collagen type I 및 MMP을 지표로 정량화하는 assay계를 확립함. - 식용생물자원 세포 전 성분의 온건하고 완전한 추출을 목적으로 세포벽이 파괴되는 파쇄방법을 도입함. - 식용생물자원 세포 전 성분을 가용화시키기 위해 계통적 추출법을 사용함. - 상기에서 확립한 신속 정밀 *in vitro* assay계를 사용하여 보관중인 400 여점의 extracts library와 본 연구에서 추가되는 extracts library를 대상으로 5종 내외의 후보시료를 선정함.	100
○ 제 2 세부과제 : 알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phytochemicals의 소재화	- 급성 알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호물질 assay계를 transfected HepG2 cell line을 이용하여 cell death를 지표로 확립함. - 급성 알코올의 경우 ICR mouse에 알코올을 3회 경구 투여한 후 간 및 혈액의 산화적 손상에 관련된 생화학적 지표를 측정함. - 식용생물자원 세포 전 성분의 온건하고 완전한 추출을 목적으로 세포벽이 파괴되는 파쇄방법을 도입함. - 식용생물자원 세포 전 성분을 가용화시키기 위해 계통적 추출법을 사용함. - 상기에서 확립한 신속 정밀 *in vitro* assay계를 사용하여 보관중인 400 여점의 extracts library와 본 연구에서 추가되는 extracts library를 대상으로 5종 내외의 후보시료를 선정함.	

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
○ 제 3 세부과제 : 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals의 소재화	- CYP2E1, reductase, b_5를 발현시킨 *E. coli* membrane fraction을 조제한 후 CYP2E1 합성저해물질을 검색하는 assay계를 구축함. - ICR mouse에 알코올을 식이로 급여한 후 microsome에서 유도된 CYP2E1의 활성을 PNP oxidation법으로 정량함. - 식용생물자원 세포 전 성분의 온건하고 완전한 추출을 목적으로 세포벽이 파괴되는 파쇄방법을 도입함. - 식용생물자원 세포 전 성분을 가용화시키기 위해 계통적 추출법을 사용함. - 상기에서 확립한 신속 정밀 *in vitro* assay계를 사용하여 보관중인 400 여점의 extracts library와 본 연구에서 추가되는 extracts library를 대상으로 5종 내외의 후보시료를 선정함.	100
○ 제 4 세부과제 (협동과제) : 알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals의 소재화	- HepG2 cell line의 알코올 투여량에 따른 농도 의존적 L-FABP 생합성량을 Western blot 또는 ELISA방법에 의해 측정하는 assay계를 확립함. - CYP2E1 함유 membrane fraction을 이용하여 alcohol 유도 CYP2E1의 활성을 PNP oxidation법으로 정량함. - SD rat에 알코올을 급·만성으로 경구투여한 후 희생시킨 실험동물의 간에 존재하는 L-FABP의 활성을 측정함. - 상기 실험동물의 간과 혈액 내에 존재하는 AST, ALT, ALP, 중성지방, cholesterol 등의 생화학적 지표를 측정함. - 식용생물자원 세포 전 성분의 온건하고 완전한 추출을 목적으로 세포벽이 파괴되는 파쇄방법을 도입함. - 식용생물자원 세포 전 성분을 가용화시키기 위해 계통적 추출법을 사용함. - 상기에서 확립한 신속 정밀 *in vitro* assay계를 사용하여 보관중인 400 여점의 extracts library와 본 연구에서 추가되는 extracts library를 대상으로 5종 내외의 후보시료를 선정함.	

2. 2차년도 연구개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
○제 1 세부과제 : 알코올성 간섬유화 억제활성 phytochemicals의 소재화	- 1차년도에서 확립한 신뢰도 높은 *in vivo* assay계를 사용하여 1차 선정시료의 효능과 안전성을 검정함. - 최종선정된 시료를 산지별, 부위별 활성을 측정함. - 알코올성 간섬유화 억제물질을 정제함. - 선정한 시료로부터 유효성분의 공업적인 최적 추출조건을 참여기업과 함께 확립함. - 추출한 유효성분의 공업적 수준의 대량 신속 정제방법을 참여기업과 함께 확립함.	100
○제 2 세부과제 : 알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phyochemicals의 소재화	- 1차년도에서 확립한 *in vivo* assay계를 사용하여 선정시료의 효능과 안전성을 검정함. - 최종선정된 시료를 산지별, 부위별 활성을 측정함. - 알코올의 산화적 손상에 대한 세포보호물질을 정제함. - 선정한 시료로부터 유효성분의 공업적인 최적 추출조건을 참여기업과 함께 확립함. - 추출한 유효성분의 공업적 수준의 대량 신속 정제방법을 참여기업과 함께 확립함.	
○제 3 세부과제 : 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals의 소재화	- 1차 년도에서 확립한 *in vivo* assay계를 사용하여 1차 년도 선정시료의 효능과 안전성을 검정함. - 최종선정된 시료를 산지별, 부위별 활성을 측정함. - 알코올 유도 CYP2E1 저해활성물질을 정제함. - 선정한 시료로부터 유효성분의 공업적인 최적 추출조건을 참여기업과 함께 확립함. - 추출한 유효성분의 공업적 수준의 대량 신속 정제방법을 참여기업과 함께 확립함.	
○제 4 세부과제 (협동과제) : 알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals의 소재화	- 1차년도에서 확립한 *in vivo* assay계를 사용하여 선정시료의 효능과 안전성을 검정함. - 최종선정된 시료를 산지별, 부위별 활성을 측정함. - 알코올에서 지방간 억제물질을 정제함. - 선정한 시료로부터 유효성분의 공업적인 최적 추출조건을 참여기업과 함께 확립함. - 추출한 유효성분의 공업적 수준의 대량 신속 정제방법을 참여기업과 함께 확립함.	

3. 3차년도 연구개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
○제 1 세부과제 : 알코올성 간섬유화 억제활성 phytochemicals의 소재화	- 정제 간섬유화 억제물질의 구조를 해석함. - 상기 정제물질의 구조로부터 활성 관련 reactive site의 구조를 규명함. - 추출, 농축, 건조 및 살균 공정에서의 활성물질의 안정성을 참여기업과 함께 검토함. - 소재를 extract, granule, tablet, capsule, tea bag 형태로의 제품화를 참여기업과 함께 검토함.	100
○제 2 세부과제 : 알코올의 산화적 손상에 대한 간세포 보호활성 phyochemicals의 소재화	- 정제 간세포 보호물질의 구조를 해석함. - 상기 정제물질의 구조로부터 활성 관련 core region의 구조를 규명함. - 추출, 농축, 건조 및 살균 공정에서의 활성물질의 안정성을 참여기업과 함께 검토함. - 소재를 extract, granule, tablet, capsule, tea bag 형태로의 제품화를 참여기업과 함께 검토함.	
○제 3 세부과제 : 알코올 유도 CYP2E1 활성조절 phytochemicals의 소재화	- 정제 CYP2E1 저해활성물질의 구조를 해석함. - 상기 정제물질의 구조로부터 활성 관련 구조를 규명함. - 추출, 농축, 건조 및 살균 공정에서의 활성물질의 안정성을 참여기업과 함께 검토함. - 소재를 extract, granule, tablet, capsule, tea bag 형태로의 제품화를 참여기업과 함께 검토함.	
○제 4 세부과제 (협동과제) : 알코올성 지방간 억제활성 phytochemicals의 소재화	- 정제 지방간 억제물질의 구조를 해석함. - 상기 정제물질의 구조로부터 활성 관련 reactive site의 구조를 규명함. - 추출, 농축, 건조 및 살균 공정에서의 활성물질의 안정성을 참여기업과 함께 검토함. - 소재를 extract, granule, tablet, capsule, tea bag 형태로의 제품화를 참여기업과 함께 검토함.	

4. 평가 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	달성도 (%)
1차년도(2001)	○ 검색시 활성측정법의 적합성 ○ 검색방법의 효율성 및 창의성 ○ 선정 식용생물자원의 고활성 여부	30 30 40	100
2차년도(2002)	○ 추출 조건 및 방법의 확립여부 ○ 간질환용 phytochemicals의 정제결과와 정제물질 순도 검정법의 명확성 ○ 공업적 순도 수준의 대량정제법 및 확립 여부	30 40 30	100
3차년도(2003)	○ 물질의 구조규명 결과 ○ 소재화와 소재화 적성 검토의 타당성 ○ 공업적 소재화 공정의 확립여부 ○ 제품화 적성 검토의 타당성	40 20 30 10	100
최 종 평 가	○ 약리·생리활성 물질의 구조해석 여부 ○ 물질의 소재화 여부	30 70	100

제2절 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면

- 알코올성 간질환 예방 및 치료용 phytochemicals의 *in vitro, in vivo* assay계를 각 세부과제별로 2개 이상 확립하였음.
- 알코올성 간질환 예방 및 치료용 phytochemicals을 각 세부과제별로 1개 이상 정제하였음.
- 정제 phytochemicals의 구조를 규명하였음.
- 추출 폐기박의 감량화를 이룰 수 있는 추출방법을 확립하였음.
- 고형물 중량당 추출율을 향상시킬 수 있는 추출방법을 확립하였음.
- 생리활성 미량성분의 막농축 기술을 확립하였음.
- 공업적 순도 수준의 대량 정제법을 확립하였음
- 생리활성 미량소재의 소재화 기술을 도입하였음.

2. 경제 · 산업적 측면

- 알코올성 간질환용 진단 kit의 개발 가능성을 제시하였음.
- 도라지, 보리, 녹차 재배농가의 안정적 수입원 확보를 위한 하나의 방법을 제시하였음.
- 생리활성 물질의 소재화로 소량 다품종의 벤처기업 활성화에 기여하였음.
- 기술의존도가 높은 무공해 산업종으로 향후 국내산업 개편의 모델을 제시하였음.
- 알코올성 간질환 예방 및 치료용 phytochemicals의 개발로 현재 문제시 되어 있는 알코올 대응 드링크제에 대한 소비자의 불신감을 불식시킬 수 있음.

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 추가 연구의 필요성

본 연구를 통하여 식용생물자원으로부터 알코올성 간질환 예방, 개선 및 치료용 phytochemicals를 세부과제별로 소재화하고 이들 소재의 가공, 유통적성을 검토함으로써 이들을 주제로 한 제품의 실용화 기초를 마련하였다. 그러나 각각의 소재가 어떠한 기전으로 작용하는지에 대한 연구와 이들 phytochemicals가 다른 생리약리활성을 갖는지에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

제2절 타 연구에의 응용

본 연구과제 수행 중에 구축한 알코올성 간질환 예방 및 치료용 phytochemicals의 *in vitro, in vivo* assay계는 알코올 이외의 독성물질에 의한 간질환 예방 및 치료용 미량소재를 개발하는데 응용이 가능하고, 식물세포내 전 성분의 온건하고 완전한 추출법은 국내 고유의 식용생물자원으로부터 약리·생리활성 신규후보물질을 개발하는데 핵심일 뿐만 아니라 생리활성물질의 신속 간편한 정제법 및 미량성분의 막농축 기술 등은 천연물로부터 의약품 및 기능성식품의 소재화에 있어 중요한 기법을 제시한 것으로 사료된다.

제3절 기업화 추진 방안

본 연구개발과제는 삼조셀텍(주)가 참여기업으로 공동연구를 수행하였음. 특히 물질의 공업적 추출, 농축, 건조 등의 단위공정과 이 소재들을 주제로 하여 제조한 드링크, 캡슐, 과립의 기호성, 가공 및 유통적성을 검토한 바가 있음. 따라서 향후 본 연구개발과제에서 선정한 시료들의 높은 활성과 원료들의 안정적 품질유지 및 물량확보 여하에 따라 기업화 추진 가능성이 매우 높음. 기업화 추진에 따른 이들 소재의 제품화 유형 및 마케팅 전략을 아래와 같이 요약할 수 있을 것으로 사료된다.

1) 음주자용 기능성 음료를 개발함으로써 여성음주자를 비롯한 음주인구를 위한 건강관리용 드링크제의 제품화가 가능하다.
2) 현재 시판 중인 숙취해소 음료와 조합 조제함으로써 품질이 고급화된 숙취해소음료로의 개발이 가능하다.
3) 특히 녹차와 겉보리 함유 phytochemicals를 소재화함으로써 일반인이 상음할 수 있는 간 보호용 음료 또는 tea bag 형태로 제품화가 가능하다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Acetaldehyde에 의한 collagen type I 생성 측정

간성상세포주에서 간섬유화 발현을 위하여 acetaldehyde 및 β-aminopropionitrile fumarate와 L-ascorbic acid 첨가 후 생성되는 collagen type I을 ELISA 방법을 통해 측정하는 기술

- *Hepatology*. 1999:29: 719-727.
- *J Gastroenterology*. 2001:16:1267-1273.

2. DMN에 의한 흰쥐에서의 간섬유화 유발

흰쥐에서 간섬유화를 유발하기 위하여 DMN을 복강 주사하고, 3주뒤 간을 적출하여 간경화 정도를 측정하는 기술.

- *Hepatology*. 1999:29: 719-727.
- *Clinical and Experimental phamacology and physiology*.2001:28:522-527.

3. Human CYP2E1의 간세포에서의 발현과 활성측정

CYP2E1이 실활된 간세포주에 Human CYP2E1을 virus infection에 의하여 transfection시키고 그 발현 정도를 측정한 뒤, CYP2E1의 substrate인 알코올 등의 약물을 대상으로 세포주의 viability, ROS production 등의 변화를 측정하는 기술

- *World J Gastroenterol.* 2003;9(12): 2732-2736.
- *Biochemistry.* 1993:32: 6928-6937.
- *Free Radical Biology & Medicine*. 2004:3: 359-370.

4. Human CYP2E1의 대장균에서의 발현과 활성측정

Human CYP2E1을 대장균에 과다발현시킨 후 membrane fraction을 수집하여 CYP2E1에 관련된 pNP hydroxylation assay를 비롯한 활성정도를 측정하는 기술

- *Acta Biochimica Polonica*. 2002:49(4): 917-925.
- *FEBS Letters.* 1996:397: 210-214.
- *Biochemistry*. 1997:36:14741-14750.
- *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1996:327(2):254-259.

5. Mouse에서 알코올 유도 CYP2E1의 발현과 microsome에서의 활성측정

Mouse 또는 흰쥐에 liquid diet를 이용한 알코올 식이를 이용하여 CYP2E1을 과다 유도시키고, 희생 후 간을 적출하여 발현과 활성정도를 측정하는 기술

- *Life Sciences*. 2003:73: 933-946.
- *Exp Biol Med.* 2004:299: 351-360.

6. 간세포의 cytosol부분에서의 L-FABP의 측정

간세포에서 cytosol부분을 수집하여 L-FABP 발현의 증감을 측정하는 기술

- *J Lipid Res*. 1999:40: 708-714.
- *J Biol Chem.*, 1982:257:7872-7878.

7. 알코올 유도 지방간의 생성 및 해석방법

흰쥐에서 액체식이를 이용한 알코올 장기 급여로 지방간을 생성시키고 희생 후 간을 적출하여 cholesterol, TG, L-FABP 등의 변화를 측정하는 기술

- *Hepatology*. 1987:7(5):865-871.
- *J Clin Invest.* 1999:102:313-320.
- *European Journal of Clinical Investigation*. 1997:27:719-722.

제7장 참고문헌

1. Carol A. Casey, Amin Nanji, and T.Takahashi: Alcoholic Liver Disease and Apoptosis, Alcoholism : *Clinical and Experimental Research,* 25(5):49s-53s, 2001.

2. Laurie F. Prescott: Paracetamol, alcohol and the liver, J *Clin Pharmacol,* 49:291-301, 2000.

3. Charles S. Lieber: Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism, *Clinica Chimica Acta*, 257:59-84, 1997.

4. Minoru Tahara, Kunio Matsumoto, Toshihiro Nukiwa, and Toshikazu Nakamura: Hepatocytes growth factor leads to recovery from alcohol-induced fatty liver in rats, *J Clin Investigation*, 103:313-320, 1999.

5. S. Eaton, C. O. Record, K. Bartlett: Multiple biochemical effects in the pathogenesis of alcoholic fatty liver, *European J Clin Investigation,* 27:719-722, 1997.

6. Abraham P, Wilfred G, Ramakrishna B.: Oxidative damage to the hepatocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. *Clin Chim Acta*, 325(1-2):117-25, 2002.

7. Sugimoto T, Yamashita S, Ishigami M, Sakai N, Hirano K, Tahara M, Matsumoto K, Nakamura T, Matsuzawa Y.: Decreased microsomal triglyceride transfer protein activity contributes to initiation of alcoholic liver steatosis in rats, *J Hepatol*., 36(2):157-62, 2002.

8. Donohue TM Jr, Clemens DL, Galli A, Crabb D, Nieto N, Kato J, Barve SS.: Use of cultured cells in assessing ethanol toxicity and ethanol-related metabolism, *Alcohol Clin Exp Res*, 25(5 Suppl ISBRA):87S-93S, 2001.

9. Deaciuc IV, D'Souza NB, de Villiers WJ, Burikhanov R, Sarphie TG, Hill DB, McClain CJ.:Inhibition of caspases *in vivo* protects the rat liver against alcohol-induced sensitization to bacterial lipopolysaccharide, *Alcohol*

Clin Exp Res, 25(6):935-43, 2001.

10. De la M Hall P, Lieber CS, DeCarli LM, French SW, Lindros KO, Jarvelainen H, Bode C, Parlesak A, Bode JC.:Models of alcoholic liver disease in rodents: a critical evaluation, *Alcohol Clin Exp Res*, 25(5 Suppl ISBRA):254S-261S, 2001.

11. Robert K. Ockner and Joan A. Manning: Fatty Acid-Binding Protein in Small Intestine, *The Journal of Clinical Investigation*, 54:326-338, 1974.

12. Robert K. Ockner, Joan A. Manning, Ruth B. Poppenhausen, and William K. L. Ho: A Binding Protein for Fatty Acids in Cytosol of Intestinal Mucosa, Liver, Myocardium, and Other Tissues, *Science*, 177:56-58, 1972.

13. Robert K. Ockner, Nina Lysenko, and Joan A. Manning: Sex Differneces in Long Chain Fatty Acid Utilization and Fatty Acid Binding Protein Concentration in Rat Liver, *J. Clin. Invest.*, 64:172-181, 1979.

14. Robert K. Ockner, Nina Lysenko, Joan A. Manning, Scott E. Monroe, and David A. Burnett: Sex Steroid Modulation of Fatty Acid Utilization and Fatty Acid Binding Protein Concentration in Rat Liver, *J. Clin. Invest.*, 65:1013-1023, 1980.

15. Mohinder P. Bansal, Richard G Cook, Keith G. Danielson, and Daniel Medina: A 14-Kilodalton Selenium-binding Protein in Mouse Liver Is Fatty Acid-binding Protein, *J.B.C.*, 264(3):13780-13784, 1989.

16. Judith K. Woodford, William D. Behnke, and Friedhelm Schroeder: Liver fatty acid binding protein enhances sterol transfer by membrane interaction, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 152:51-62, 1995.

17. Asim K. Dutta-Roy: Fatty acid transport and metabolism in the feto-placental unit and the role of fatty acid-binding proteins, *Nutritional Biochemistry*, 8:548-557, 1997.

18. 김혜경: 지방산 결합단백질과 인지질막 사이의 지방산이동기전, 한국영양학회지, 30(8):930-935, 1997.

19. 김혜경: 세포내 소수성 물질 이동에서 막과 세포내 결합단백질의 역할: 지방산 결합 단백질과 장쇄 지방산, 한국영양학회지, 30(6):658-668, 1997.

20. 김혜경, 권영아, 노숙령, 함영태: 알코올 및 고콜레스테롤 식이로 유도된 흰쥐의 지방간에서 지방산 결합단백질의 역할 및 특성, 한국영양학회지, 32(6):628-636, 1999.

21. Judith K. Woodford, John R. Jefferson, W. Gibson Wood, Timothy Hubbell, and Friedhelm Schroeder: Expression of liver fatty acid binding protein alters plasma membrane lipid composition and structure in transfected L-cell fibroblasts, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1145:257-265, 1993.

22. Alfred E. A. Thumser and David C. Wilton: Characterization of binding and structural properties of rat liver fatty acid binding protein using tryptophan mutants, *Biochem. J.*, 300:827-833, 1994.

23. Thompson, J., Winter, N., Terwey, D., Bratt, J., Banaszak, L.: The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. A complex with two bound oleates, *J.B.C.*, 272:7140, 1997.

24. Ngoc Vu-Dac, Sandrine Chopin-Delannoy, Philippe Gervois, and bart Staels: The Nuclear Receptors Peroxisome Proliferator-activated Receptor and Rev-erb Mediate the species-specific Regulation of Apolipoprotein A-I Expression by Fibrates, *J.B.C.*, 273(40):25713-25720, 1998.

25. H. Poirier, I. Niot, M. Monnot, and P. Besnard: Differential involvement of peroxisome-proliferator-activated receptor and in fibrate and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine, *Biochem,* 355:481-488, 2001.

26. Cameron GL and Karunratne WAE: Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration, J Path Bact, 42:1, 1936.(cited by Adam SEI. A review of drug hepatotoxicity in animals, *Vet Bull*, 42:683-692, 1972.)

27. Lieber C.: Alcohol-induced hepatotoxicity. In: Hepatotoxicology, Meeks RG, Harrison SD, Bull RJ, 481-488, 1991.

28. Elko EE, Wooles WR, Di Luzio NR: Alterations and moblization of lipids in acute ethanol-treated rats, *Am J Physiol*, 201:923-933, 1961.

29. de la M Hall P, Lieber CS, DeCarli LM, French SW, Lindros KO, Jarvelainen H, Bode C, Parlesak A, Bode JC.:Models of alcoholic liver disease in rodents: a critical evaluation, *Alcohol Clin Exp Res*, 25(5 Suppl ISBRA):254S-261S, 2001.

30. Kerai MD, Waterfield CJ, Kenyon SH, Timbrell JA.: The effect of taurine depletion by beta-alanine treatment on the susceptibility to ethanol-induced hepatic dysfunction in rats, *Alcohol Alcohol*, 36(1):29-38, 2001.

31. Shiota A, Yamashita Y, Fujise N, Masunaga H, Higashio K.: A deleted form of human hepatocyte growth factor stimulates hepatic lipogenesis and lipoprotein synthesis in rats, *Pharmacol Res*, 42(5):443-52, 2000.

32. Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Enomoto A, Nishiura T, Nishimura T, Brenner DA, Schemmer P, Bradford BU, Rivera CA, Zhong Z, Thurman RG.:Kupffer cell-derived prostaglandin E(2) is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279(1):G100-6, 2000.

33. Philip Burton and Konrad Bloch: Studies on the Mode of Action of Sterol Carrier Protein in the Dehydrogenation of 5-cholest-7-en-3β-ol, *J.B.C.*, 25:7289-7294, 1985.

34. Moncada, C., Torres, V., Varghese, G., Albano, E. and Israel, Y: Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms, *Molecular Pharmacology*, 46:786-791, 1994.

35. Knecht, K. T., Thurman, R. G., and Mason, R. P: Role of superoxide and trace tradition metals in the production of α-hydroxyethyl radical from ethanol by microsomes from alcohol dehydrogenase-deficient deermice. *Arch. Biochem. Biophys*. 303:339-348, 1993.

36. Eliasson, E., Kenna, J. G.: Cytochrome P450 2E1 is a cell surface autoantigen in halothhanes hepatits. *Mol. Pharmacol*. 50:573-582, 1996.

37. Clot, P., Parola, M., Bellomo, G., Dianzani, U., Carini, R., Tabone, M., Arico, S., Ingelman-Sundberg, M., and Albano, E.: Plasma membrane hydroxyethyl radical adducts cause antibody-dependent cytotoxicity in rat hepatocytes exposed to alcohol. *Gastroenterology*. 113:265-276, 1997.

38. Alcolado, R., Arthur, M., and Iredale, J. 1997 Pathogenesis of liver disease. *Clinical Science*. 92:103-112.

39. Nieto, N, Greenwel, P., Friedman, S., Zhang, F., and Dannenberg, A: Ethanol and arachidonic acid increase □2(I) collagen expression in rat hepatic stellate cells overexpressing cytochrome P450 2E1. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 26;20136-20145, 2000.

40. Sato, M., Kojima, N., and Senoo, H.: Induction of cellular processes containing collagenase and retinoid by integrin-binding to interstitial collagen in hepatic stellate cell culture. *Cell Biology International*. 22, 2:115-125, 1998.

41. Okazaki, I., Watanabe, T., and Maruyama, K.: Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis:With special reference to the role of matrix metalloproteinases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(Suppl.):D26-D32, 2000.

42. Arthur, M.: Fibrogenesis II Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol*. 279:G245-G249, 2000.

43. Odani, S., Namba, Y., and Fugii, H.: Disulfide bonds in rat cutaneous fatty acid-binding protein. *J. Biochem(Tokyo)*. 128(3): 355-61, 2000.

부록 I

학회발표 및 논문발표

2001년도
춘계연합학술대회초록

생활양식의 변화에 따른
식생활과 건강

- 일 시 : 2001년 5월 26일 (토) 09 : 00
- 장 소 : 고려대학교 과학도서관 강당(5층)

주최 한국영양학회(사)
한국식품영양과학회(사)
한국식생활문화학회
한국운동영양학회
후원 한국학술진흥재단
한국과학기술단체 총연합회

PB-35

만성 알코올 섭취로 인한 간손상 억제물질 검색을 *in vitro* assay계의 확립

이윤현*, 김혜경[1], 신동훈, 홍범석, 조홍연. 고려대학교 생명공학원, [1]한서대학교

최근 우리나라 남성의 음주율은 이미 83.3%를 넘어섰고 여성 음주 인구 또한 54.9%로 점차 증가하는 추세에 있을 뿐만 아니라 음주 관련 사망자 중 간질환 관련 사망자가 1위를 차지함으로써 알코올성 간질환에 대한 연구에 관심이 높아지고 있다. 체내 알코올 산화는 대부분 간에서 이루어지는데 만성적 또는 과다한 알코올 섭취시 알코올의 산화는 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)의 ethanol-induced cytochrome P450 2E1(CYP 2E1)에 의해 수행되며, 이 과정에서 hydroxyethyl radical 등 매우 반응성이 높은 활성산소종이 생성되어 간에 손상을 입히게 된다. 본 연구는 만성적, 과다 알코올 섭취로 인한 간손상 억제물질의 검색을 위한 *in vitro* assay계를 확립하기 위해 CYP 2E1의 발현을 조절하는 enhancer 부위를 HepG2 cell line에 transient transfection시킨 후 알코올 농도에 따른 발현 정도를 정량적으로 추적함으로써 ethanol-induced CYP 2E1의 조절에 의한 간손상 억제물질 검색계를 확립하고자 하였다. Sprague-Dawly rat에서 얻어진 chromosomal DNA로부터 CYP 2E1의 enhancer 부위를 포함한다고 알려진 5'-flanking region에서 126 bp, 484 bp, 678 bp의 region을 각각 증폭하여 luc+ gene을 포함한 PGL-3 basic vector에 ligation한 후 HepG2 cell에 transfection시킨 다음 reporter system (dual-luciferase assay)으로 다양한 ethanol 농도에 따른 발현 정도를 검토하였다. 이중 678 bp의 enhancer부위를 포함한 transient transfected HepG2 cell에서의 발현이 ethanol 농도에 따라 농도 의존적으로 증가함을 보임으로써 물질 검색을 위한 *in vitro* assay계를 확립할 수 있었다.

PB-36

미나리와 산채(참나물 · 신선초 · 방풍)의 영양성분 및 아질산염 소거능

노광석*, 양미옥, 조은자. 성신여자대학교 식품영양학과

미나리와 산채인 참나물, 신선초, 방풍의 영양 성분과 아질산염 소거능 분석 결과는 다음과 같다. 조단백은 21.11~28.83%, 조지방은 3.32~4.64%였다. β-carotene은 신선초에서 18.18mg%, 비타민 C는 방풍에서 0.25mg%를 함유하여 다른 산채보다 높았다. Selenium(Se)은 모든 시료에서 검출되지 않았다. 지방산 조성은 linoleic acid와 linolenic acid가 66.46~77.44%였다. 불포화지방산의 비율은 75.76~80.43%를 나타내었다. 총 페놀 함량은 방풍이 804.2mg%로 가장 높았다. 아질산염 소거능은 메탄올 가용성 획분이 수용성 획분에 비하여 높은 소거능을 보였고, pH 1.2> 4.2> 6.0 순으로 소거능이 높았다. 방풍의 메탄올 가용성 획분의 아질산염 소거능이 pH 1.2에서 95.3%로 가장 높았으며, 다음이 참나물, 신선초 순이었다. 총 페놀과 아질산염 소거능은 수용성 획분, pH 6에서 가장 높은 상관관계를 나타내었다.

International Symposium on
Food, Nutrition and Health for 21st Century

30th Anniversary of the Korean Society of Food Science and Nutrition

Proceedings and Abstracts

December 7-8, 2001
Graduate School of Biotechnology Building, Korea University, Seoul, Korea

Sponsors : Ministry of Health and Welfare
Korea Research Foundation
The Korean Federation of Science and Technology Societies
CHEIL JEDANG Corporation

KFN The Korean Society of Food Science and Nutrition

100㎕이상이 필요할것으로 보인다. *E. coli*, *E. aerogens*는 추출물 첨가가 오히려 균증식이 강화된 것으로 나타났다. 또한 *S. aureus* 균액(초기균수는 1.8×10^5/ml)에 500㎕/10ml의 인삼산, 물기 methanol 추출물의 첨가로 초기 균수를 90% 살균하는데 약 47분이 소요될 것으로 예측된다.

P11-77

Immuno-modulating Activity of the Exo-polymer Produced from Submerged Mycelial Culture of *Auricularia auricula-judae*

Sung-Pill Cho*, Byung-Keun Yang, Sang-Chul Jeong, Jun-Bo Park, Hyun-Ji Lee, Surajit Das, Kyung-Su Ra[1] and Chi-Hyun Song
Department of Biotechnology, Taegu University,
[1]Department of Food & Nutrition, Taegu Technical College

The water soluble exo-polymer (AJ-0) from *Auricularia auricula-judae* showed the highest anti-complementary activity (70.7 %). The activating pathway of complement system was identified by crossed immunoelectrophoresis and found to be occurred through both in classical and alternative pathway. The exo-polymer of *Auricularia auricula-judae* fractionated three major fraction (AJ-Fr-Ⅰ, -Fr-Ⅱ and -Fr-Ⅲ) by Sepharose CL-6B gel chromatograpy column. The exo-polymer of *Auricularia auricula-judae* also showed the ability to activate macrophage and to proliferate splenocyte. Total sugar and protein content of AJ-0 were 88.4 and 11.6 %, respectively. Water soluble polymers were mainly composed of arabinose, mannose and galactose. These polymers also contained amino acid which consisted of aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, alanine, glycine, valine, leucine, phenylalanine, lysine and arginine. The molecular weights were determined by HPLC. MW of *Auricularia auricula-judae* was 4 kDa (AJ-Fr-Ⅲ), 44 kDa (AJ-Fr-Ⅱ) and over 160 kDa (AJ-Fr-Ⅰ).

P11-78

Hypolipidemic Effect of the Exo-polymer Produced from Submerged Mycelial Culture of *Hericium erinaceus* and Its Production

Jun-bo Park*, Byung-Keun Yang, Sang-Chul Jeong, Sung-Pill Cho, Hyun-Ji Lee, Surajit Das, Kyung-Su Ra[1] and Chi-Hyun Song
Department of Biotechnology, Taegu University,
[1]Department of Food & Nutrition, Taegu Technical College

The hypolipidemic effect of the exo-polymer produced from the submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus* were investigated in hyperlipidemic rats at the dose of 50, 100, 150 and 200mg/kg body weight. Hypolipidemic effect was achieved in all the experimental groups. In particular, these effects were proportionally increased with the increasing concentration of exo-polymer for oral administration. The exo-polymer, at the dose of 200mg/kg body weight, substantially reduced the plasma triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, phospholipid concentration and hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase activity and increased the plasma HDL-cholesterol concentration as compared to the saline administered group. The optimum pH and temperature for both biomass and exo-polymer yield of *H. erinaceus* were recorded 4 and 25℃, respectively. Maximum yields of exo-polymer (2.02g/l) and mycelia (7.91g/l) were appeared in 5-l jar fermenter without pH control after 15 and 9 days, respectively.

P11-79

만성 알코올 섭취로 인한 간손상 억제물질 검색용 *in vitro* assay계 확립 및 식용 생물자원 함유 간손상 억제물질의 검색

이유현*, 동미숙, 김혜경[1], 신동훈, 홍범식, 조홍연

고려대학교 생명공학원, [1]한서대학교

2020년 통계보고에 의하면 우리나라 국민의 음주 경험률은 80%이상으로 음주 관련 사망자 중 간질환 관련 사망자가 여전히 1위를 차지함으로써 알코올성 간질환에 대한 연구에 관심이 높아지고 있다. 만성적 또는 과다한 알코올 섭취시 미대해진 cytochrome P450 2E1(CYP 2E1)에 의해서 알코올은 산화되며, 이 과정에서 생성된 활성산소종은 간세포를 손상시킨다. 본 연구는 human liver cDNA로부터 얻어진 CYP 2E1을 *Escherichia coli*에 overexpression시켜 얻어진 membrane fraction과 CYP 2E1의 substrate인 *p*-nitrophenol을 사용하여 CYP 2E1의 활성을 측정하는 *in vitro* assay계를 확립하였다. 확립된 assay계를 이용하여 400여종의 식용생물자원으로부터 추출한 1,200여점의 extract library를 대상으로 CYP 2E1의 활성을 inhibition과 stimulation 시키는 추출물을 검색중에 있으며 향후 선정된 시료를 대상으로 활성산소종의 소거능을 검토함으로써 간손상 억제물질을 소재화할 계획이다.

P11-80

해조류로부터 Glucose uptake/transport 저해활성 물질의 검색

김지산*, 김혜경[1], 신동훈, 홍범식, 조홍연
고려대학교 생명공학원, [1]한서대학교 식품생물공학과

최근 식생활의 서구화로 인한 비만증 환자의 급증과 이에 따른 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등 성인병의 증가로 비만 예방 및 치료제의 개발이 주목받고 있다. 특히 과도한 glucose의 흡수는 비만의 주원인으로 소장에서의 glucose uptake/transport inhibition은 비만의 예방은 물론 당뇨 환자의 식후 급격한 혈당상승을 막을 수 있다. 본 연구는 *in vitro* assay계에서 Caco-2 cell line을 사용하여 기존의 radioisotope과는 다른 fluorescent glucose analog인 2-NBDG를 이용함으로써 glucose uptake/transport inhibition system을 확립하였다. 확립한 *in vitro* assay계를 사용하여 극성도에 따라 추출한 60여종의 해조류를 산지별, 종류별로 분류하여 glucose uptake 저해활성을 나타내는 물질을 검색하였다. 검색결과 갈조류군, 홍조류군, 녹조류군 중 갈조류군이 glucose uptake 저해작용에 효능이 있는 것으로 나타났으며 특히 갈조류군 중에서는 주문진 다시마, 완도 미역귀, 완도 톳의 메탄올 추출물이 각각 20 % 이상의 저해활성을 보였다. 선별된 3종의 시료를 대상으로 Caco-2 cell line을 이용한 transport 저해효과와 마우스의 소장에서 분리한 BBMV에서의 glucose uptake/transport 저해효과를 검토하였다.

P11-81

Effects of Soy Protein and Isoflavones on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content in Growing Female Rats

Mi-Ja Choi
Department of Food and Nutrition, Keimyung University

The purpose of this study was to examine the effects of soy protein and isoflavones on bone mineral density and bone mineral content of growing female rats. Thirty female Sprague-Dawley rats were obtained from KLEC(Korea Life Engineering Corporation, Seoul, Korea). Animals were assigned randomly to one of three groups. Animals were fed either a 20 % casein diet, 20% soy isolate diet(rich Isoflavones), or 20% soy concentrate diet(trace isoflavones). Spine and femoral bone mineral density(BMD) and bone mineral content (BMC) were measured by using dual energy X-ray absorption (FIXImus, GE Medical Systems Lunar , Madison, WI). The results of this study spine and femur bone mineral density and spine and femur bone mineral content were found to be significantly greater in the soy isolate group compared to casein- and soy concentrate-fed groups. Overall, it can be concluded that soy protein with rich isoflavones is beneficial for acquisition of spine and femur bone mineral density in young growing female rats.

P11-82

콩단백질과 isoflavones가 성장기 암컷 흰쥐에서 혈중 지질 농도에 미치는 영향

2002년도 한국식품과학회

임시총회 및 제68차 학술발표회

〈클로렐라의 기능성 심포지엄〉

〈Chromium picolinate의 기능성 심포지엄〉

2002년 5월 25일 (토)

서울산업대학교 응용화학공학관

사단법인 한국식품과학회

P8-53

만성 알코올 섭취로 인한 간손상 억제물질 검색용 Transfected HepG2 Cell Line의 확립

이유현*, 동미숙, 박정환[1], 김혜경[2], 신동훈, 홍범식, 조홍연
고려대학교 생명공학원, 한양대학교 의과대학[1], 한서대학교 식품생물공학과[2]

2000년 통계에 의하면 우리나라는 음주 경험 인구와 알코올 소비량에 있어 상위권 국가일 뿐만 아니라, 음주 관련 사망자 중 간질환 관련 사망자가 1위를 차지함으로써 알코올성 간질환에 대한 관심이 높아지고 있다. 만성음주자의 경우 비대해진 cytochromeP450 2E1(CYP2E1)에 의해 알코올이 산화되며 이 과정에서 발생하는 활성산소종이 간세포를 손상시킨다. CYP 2E1은 NADPH-CYP reductase(CYPR)와 상호작용시에만 효소 활성을 보이는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 CYP 2E1과 CYPR을 human hepatocyte인 HepG2 cell line에서 동시발현시킴으로써 알코올 및 기타 약물 독성 대사 검색용 *in vitro* assay system을 확립하였다. CYP 2E1과 CYPR의 동시발현 세포주의 경우 알코올 1% 농도에서 control에 비하여 cell viability가 40%, 2% 농도에서는 60% 감소를 보임에 따라, 알코올성 활성산소에 의한 간손상 억제물질의 검색이 가능함을 알 수 있었다.

P8-54

해조류로부터 Glucose Uptake/Transport 저해활성 물질의 *in vitro* 및 *in vivo* 검색

김지선[1]*, 김혜경[2], 신동훈[1], 홍범식[1], 조홍연[1]
[1]고려대학교 생명공학원, [2]한서대학교 식품생물공학과

최근 식생활의 서구화로 인한 비만 인구의 급증과 이에 따른 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등 성인병의 증가로 비만 예방 및 치료제의 개발이 주목받고 있다. 특히 과도한 glucose의 흡수는 비만의 주원인으로 소장에서의 glucose uptake/transport를 조절함으로써 비만의 예방은 물론 당뇨 환자의 식후 급격한 혈당상승을 막을 수 있다. 본 연구는 Caco-2 cell line과 fluorescent glucose analog인 2-NBDG를 사용하여 glucose uptake/transport를 정량하는 *in vitro* assay system을 확립한 후 극성도에 따라 추출한 60여종의 해조류를 대상으로 glucose uptake 저해활성을 나타내는 물질을 검색하였다. 그 결과 갈조류군, 홍조류군, 녹조류군 중 갈조류군이, 갈조류군 중에서는 주문진 다시마, 완도 미역귀, 완도 톳의 메탄올 추출물이 각각 20% 이상의 저해활성을 나타내었다. 선정된 3종의 시료를 대상으로 Caco-2 cell line을 이용한 transport 저해활성과 마우스 소장에서 분리한 BBMVs에서의 glucose uptake/transport 저해활성 경향은 유사하였다. ICR 마우스를 이용한 *in vivo* assay 결과 상기의 시료들 중 다시마 0.2% 식이군이 체중감소 및 혈당상승 완화 효과를 나타냄으로써 소재화 가능성을 시사하였다.

P8-55

Alcohol성 간섬유화 억제활성물질 *in vitro* assay계의 확립 및 검색

양태훈*, 김혜경[1], 신동훈, 홍범식, 조홍연
고려대학교 생명공학원, [1]한서대학교 식품생물공학과

간질환은 대표적인 성인병의 하나로 우리나라 40대 성인남자의 사망원인 2위이고, 이 중 간섬유증과 간경화에 의한 사망자는 해마다 증가하고 있다. 간경화는 간세포암종의 기저질환으로 간섬유증이 발전한 형태이며 만성적인 알코올 섭취가 주요 병인이다. 간섬유증(liver fibrosis)은 간섬상세포(hepatic stellate cell)의 활성화로 인해 세포외기질인 collagen type I의 비정상적 증가 현상으로 간경화의 직접적인 원인이 된다. Collagen type I은 알코올이 간에서 alcohol dehydrogenase (ADH)와 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의해 산화되어 생성된 acetaldehyde에 농도의존적으로 발현량이 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 쥐에서 분리한 간섬상세포인 HSC-T6 cell line을 사용하여 acetaldehyde, BAPN, ascorbic acid 처리시 배지에 분비되는 collagen type I을 ELISA법으로 정량하는 *in vitro* assay계를 확립한 후 알코올성 간섬유화 억제물질 탐색계에 적용하였다. 본 연구실이 확보하고 있는 식용생물자원 extracts library 600점을 대상으로 검색을 실시한 결과 상황버섯을 비롯한 일부 추출물에서 높은 간섬유화 억제활성을 나타내었다.

P8-56

두충(*Eucommia ulmoides*)으로부터 광노화 억제활성물질의 분리

호진녕*, 김혜경[1], 신동훈, 홍범식, 조홍연
고려대학교 생명공학원, [1]한서대학교 식품생물공학과

피부노화는 연령에 따른 연대기 노화(chronological aging)와 장기간 자외선 노출에 의한 광노화(photoaging)로 구분된다. 특히 자외선은 피부내 진피세포와 표피세포의 MMP(Matrix Metalloproteinase) 분비를 증가시킴으로써 MMP와 TIMP(Tissue Inhibitors of Metalloproteinase)의 균형을 깨뜨려 진피층이 붕괴되고 결국 피부 노화를 일으키게 된다. 광노화는 굵고 깊은 주름, 피부 면역기능 저하, 불균일한 색소침착 등을 나타내며, 피부암을 유발할 수 있다. 본 연구는 식용생물자원 유래 피부 광노화 억제활성물질을 분리하기 위해 검색용 *in vitro* assay계로 human foreskin fibroblast HS-68 cell line을 사용한 ELISA assay계를 확립한 후 UVB 조사에 의해 분비되는 핵심 MMP인 MMP-1을 정량하였다. 400여종의 식용생물자원으로부터 추출한 1,200여점의 extracts library를 대상으로 MMP-1 저해활성을 검색한 결과 높은 억제 활성을 보인 두충 메탄올 추출물을 최종 시료로 선정하였다. 이 추출물로부터 silica gel 60 open column chromatography, Prep. TLC, HPLC 순으로 광노화 억제활성물질을 분리, 일부 물리화학적 성질을 검토하였다.

2002년도 한국식품영양과학회
제52차 학술발표회 및 정기총회

전통식품의 가공기술과 영양

- 일 시 : 2002년 11월 9일 (토) 09:00~17:30
- 장 소 : 원광대학교 숭산기념관 (전북 익산)
- 주 최 : 사단법인 한국식품영양과학회
- 후 원 : 한국학술진흥재단, 한국과학기술단체총연합회
- 협 찬 : 미국대두협회, (주)건보, 순창문옥례식품, 일양약품(주), 진성식품, (주)대두식품, (주)코메드, (유)한풍제약, 코끼리식품, (주)유니콘, (주)하림, 보해양조(주)

KFN 사단법인 한국식품영양과학회
KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION

P -69

Transfected HepG2 Cell line에서 L-FABP의 함량을 변화시키는 Phytochemical 소재화

김동섭*, 김혜경[1], 신동훈, 홍범식, 조홍연
고려대학교 생명공학원, [1]한서대학교 식품생물공학과

알코올 소비량과 여성 음주인구의 급격한 증가 추세에 있는 우리나라는 알코올성 간질환이 더욱 심각해질 것으로 전망된다. 특히 알코올성 간 질환 중 가장 많은 비율을 차지하는 지방간은 우리나라 간질환 환자의 45%를 차지하고 있으며 환자들이 대부분 이를 잘 인식하지 못하며 치료가 늦어질 경우 간 기능 악화로 인하여 간경변, 간암으로 발전될 수 있다. 알코올의 장기 섭취는 지방산의 산화를 억제하고 에스테르화를 증가시켜 지방간을 유도하여 간 조직내의 콜레스테롤 대사, 단백질 합성 및 분비 등에 영향을 미쳐 간 기능 저하를 초래한다. 특히, 알코올은 체내에 흡수된 후 약 80%가 간에서 산화되므로 알코올 섭취에 의하여 여러 조직의 FABP 중에서 특히 간세포의 L-FABP(Liver Fatty Acid Binding Protein)의 변화가 가장 클 것으로 예상된다. 본 연구는 L-FABP의 증가 또는 감소를 유도하여 지방간의 억제 및 치료의 기능을 가질 수 있는 phytochemicals 소재화를 목적으로 ELISA 법, RT-PCR 및 immunoblotting을 기초로 transfected Hep G2 cell line과 L-FABP antibody를 이용한 *in vitro* assay계를 확립하였다. 이를 이용하여 극성도에 따라 추출한 200여 종의 전통양념채소류, 서양향신료, 건강채소, 전통차 및 생약재를 대상으로 screening을 수행하였다.

P11-70

Inhibitory Effect of Edible Plant on Alcohol Related Liver Fibrosis *in vitro* Assay System

Taik-Hoon Yang*, Hye-Kyung Kim[1], Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong and Hong-Yon Cho
Graduated School of Biotechnology, Korea University,
[1]Department of Food and Biotecnology, Hanseo University

Ethanol is metabolized in the liver by two major pathway: (1) the alcohol dehydrogenase(ADH) pathway and (2) the microsomal ethanol oxidizing(MEOS) system. Each of this pathway produces specific metabolic and toxic disturbances, and both result in the production of acetaldehyde, a highly reactive compound. Acetaldehyde stimulates type I collagen synthesis and gene transcription in cultured rat HSC(hepatic stellate cell). Secreted excess amount of type I collagen lay down in the space of Disse and induce liver fibrosis. By using rat HSC-T6, we screened the inhibitory activity on collagen type I in six hundred edible plant extracts. In the first screening, methanol extracts of *Cornus officinalis* (28%), *Pinus densiflora* (23.8%), *Cinamomum camphora* (26.8%) showed high inhibitory effect, followed screening, second screening methanol extracts of *Cinamomum camphora* has the most highest inhibitory effect on HSC-T6 cell collagen content and cell proliferation.

건강기능식품의 발전 및 연구 방향

● 일 시 / 2003년 5월 24일 (토) 09:00

● 장 소 / 이화여대 이화삼성교육문화관 및 SK-Telecom관 컨벤션홀

주 최 / 한국운동영양학회
한국영양학회
한국식품영양과학회

후 원 / 한국학술진흥재단
한국과학기술단체총연합회

협찬단체 / 미국대두협회(ASA)

협 찬 사 /

단일SMC	동아오츠카(주)	바디플래너
(주)이뮨라이프	(주)이에스그룹	(주)정 · 식품
(주)한국에보트	썬스위트 코리아 텍스	(주)풀무원
(주)태찬들	(주)한성식품	(주)농심
(주)동양제과	혜성과학	

P8-77

Protective Effect of Edible Plants on Alcoholic Li... Disease *in Vitro* System

Yoo-Hyun Lee*, Mi-Sook Dong, Chang-Hwan Park[1], Hye-Kyung Kim[2], Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong and Hong-Yon Cho
Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, [1]Department of Medical Science, Hanyang University, [2]Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Chronic ethanol consumption is associated with an increased incidence of various liver diseases including alcoholic fatty liver, cirrhosis, and cancer. Several mechanisms have been suggested to play important roles in pathway of ethanol toxicity to the liver. The microsomal ethanol oxidizing system(MEOS) is strikingly inducible by chronic ethanol consumption with the key enzyme cytochrome P450 2E1(CYP2E1), increased 4 to 10 fold in liver. Induction of CYP 2E1 and formation of reactive oxygen metabolite by chronic ethanol consumption is one of the factor in hepatotoxicity. We established four kinds of HepG2 cell lines constitutively expressed human CYP2E1 and NADPH-cytochrome P450 reductase(CYPR) and characterized those cell lines with immunoblotting for CYP 2E1 and CYPR expression, *p*-nitrophenol hydroxylation for CYP 2E1 activity in whole cells and *in situ*, enzyme activity of NADPH cytochrome c reductase for CYPR, and MTT test for cytotoxicity to several chemicals including ethanol. CYP 2E1 activity was significantly higher and the toxical response to ethanol was 30-40% sensitive than those of control HepG2 cell line. Then we selected one cell line showing highest cytotoxicity to ethanol and screened the protective effect to ethanol toxicity in a hundred of plant extracts prepared by solvent extraction based on polarity with this selected HepG2 cell line.

P8-78

Anti-Photoaging Effect of *Eucommia ulmoides* in Human Skin Fibroblasts

Jin-Nyoung Ho*, Hye-Kyung Kim[1], Dong-Hoon Shin, Bum-Shic Hong and Hong-Yon Cho
Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,
[1]Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

The aging process of skin can be attributed to intrinsic aging and photoaging. Clinically, naturally aged skin was smooth, pale, and finely wrinkled. In contrast, photoaged skin was coarsely wrinkled and associated with dyspigmentation, and telangiectasia. Photoaging is influenced by several factors, including genetics, environmental exposure (ultraviolet irradiation, mechanical stress), hormonal changes, and metabolic processes (generation of reactive chemical compounds such as activated oxygen species). The influence of the environment, especially solar UVB irradiations have been demonstrated to produce reactive oxygen species (ROS) and induce the synthesis of matrix metalloproteinases (MMP) which degrade extracellular matrix. We investigated expression of MMP-1 in human foreskin fibroblast HS-68 cell line under UVB irradiation using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for selection and characterization of photoaging inhibitor, and A isolated from *Eucommia ulmoides*. Cytotoxic effect was not shown in HS-68 cell line when we treated with A isolated from *Eucommia ulmoides* according to concentration. Furthermore cell viability according to varying degrees of UV exposure times were increased in A compared with control values. Up until now, the most intensively studied dietary antioxidants for prevention of skin photodamage have been vitamin C, vitamin E, and β-carotene. Compared with vitamin C and vitamin E, A isolated from *Eucommia ulmoides* showed similar or higher inhibitory activity of MMP-1 expression.

PB-83

도라지(*Platycodon grandiflorum*)로부터 L-FABP 증강물질의 분리 및 특성

김동일*, 김혜경¹, 신동훈, 홍범식, 조홍연
고려대학교 생명공학원, ¹한서대학교 생물공학과

최근 통계청 발표에 따르면 간질환에 의한 40대 사망자는 10만명 당 41.4명으로 2위인 교통사고에 비해 38%나 높다. 여기에 알코올 소비량과 여성 음주인구의 급격한 증가 추세에 있는 우리나라의 알코올성 간질환 중 가장 많은 비율을 차지하는 지방간은 간질환 환자의 45%를 차지하고 있으며, 환자들은 대부분 이를 잘 인식하지 못하고 있다. 알코올의 장기 섭취는 지방산의 산화를 억제하고 에스테르화를 증가시켜 지방간을 유도하여 간 조직내의 콜레스테롤 대사, 단백질 합성 및 분비 등에 영향을 미쳐 간의 기능저해를 초래한다. 지방간의 원인이 되는 비만, 지속적 음주 및 약물 복용, 당뇨 등이 교정되지 않는다면 지방간염, 간섬유화를 거쳐 간경변증으로 진행될 수 있다. 현재까지 정확히 지방간을 유발시키는 단일 인자는 밝혀져 있지 않으며 다양한 요인에 의하여 발병되는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 장기간 알코올 섭취 후에 분해 대사물로 생성되는 acetaldehyde 및 acetate에 의한 지방대사의 이상 및 중성지방의 축적으로 발생되는 지방간과 이에 변화되는 L-FABP(liver fatty acid binding protein)와의 상호 연관 관계를 규명하는 것에 있다. 또한 지방간 예방 및 치료용 phytochemicals의 소재화 연구의 일환으로 200여 종의 향신채소, 서양향신료, 건강채소, 차 및 곡류 등의 재료를 대상으로 극성도에 따라 계통추출한 후 L-FABP 증강물질을 검색하였다. 검색용 in vitro assay계는 human liver cell line의 일종인 HepG2 2E1 LNCX2를 사용하였으며 L-FABP의 양을 ELISA방법으로 정량함으로써 알코올에 의해 감소된 L-FABP를 증가시키는 물질을 검색하였다. 총 200여 종의 extract library를 대상으로 1차 및 2차 검색 및 5주간의 in vivo 실험 결과, 독성이 없고 높은 L-FABP 증가를 보인 도라지 methanol 추출물을 최종 시료로 선정하였다. 도라지의 methanol 추출물을 silica gel 60 open column chromatography, Prep. TLC 및 analytical HPLC 순으로 L-FABP 증강물질을 정제하였다.

PB-84

***Helicobacter pylori* Arginase의 Cloning, 고발현, 정제 및 저해물질 탐색**

박준태*, 신동훈, 홍범식, 조홍연
고려대학교 생명공학원

*H. pylori*는 그람음성, 미호기성이며, 강한 운동성을 부여하는 편모를 가지고 있는 나선형의 박테리아로 사람의 위 상피세포 표면과 점액층 사이에서 colony를 형성함으로써 만성 및 급성 위염, 위·십이지장 궤양, 위암을 유발한다. 강산성인 위내에서 urease를 분비하여 urea로부터 암모니아를 생성하고 위산을 중화시킴으로써 증식하며, 감염경로는 사람의 배설물에서 입을 통해 옮겨지는 것으로 추정되고 있다. 우리나라의 경우 성인에서 약 80%의 감염률을 보이고 있는 이 균은 세계보건기구에서 1급 발암물질로 규정하고 있다. 본 연구는 *H. pylori*가 생산하는 arginase의 저해물질을 개발함으로써 *H. pylori* 질소대사 중간물질의 하나이면서 생육에 있어 필수적인 물질로 알려진 urea의 생합성을 감소시키고, 동시에 nitric oxide에 의한 균의 생육을 저해시킬 목적으로, *H. pylori* arginase 유전자를 cloning하고 고발현시킨 후 정제하였으며, 정제한 효소를 사용하여 저해물질을 해조류를 대상으로 검색하였다. *H. pylori* genomic DNA로부터 *H. pylori* arginase(rocF) gene을 PCR로 증폭시켜 얻은 products를 pET-16b vector에 cloning하였고, *E. coli* BL21-DE3에 형질전환하였다. 재조합된 *H. pylori* arginase는 표준assay계에서 매우 높은 활성을 나타내었고, host로부터 얻은 6xHis-tagged 조효소를 Ni-NTA affinity chromatography를 사용하여 1단계로 90%이상 정제하였다. 이 정제효소를 이용하여 극성도에 따라 추출한 60여종의 해조류를 대상으로 arginase 저해활성을 나타내는 물질을 검색하였다. 그 결과 갈조류군 중에서 완도 미역귀, 제주 개몰, 속초 꼼부기의 메탄올 추출물에서, 홍조류군 중에서는 부산 진분홍잎의 메탄올 추출물에서, 녹조류군 중에서는 통영 파래의 메탄올 추출물에서 약 50% 이상의 저해활성을 나타내었다.

PB-79

녹차(*Camellia sinensis*)로부터 *Porphyromonas gingivalis* Collagenase Inhibitor의 분리 및 특성

박찬국*, 신동훈, 홍범식, 조홍연.
고려대학교 생명공학원

*Porphyromonas gingivalis*는 Gram 음성, 혐기성 간균으로 진행중인 치주질환 부위에서 다른 미생물보다 현저히 많이 발견되고 있으며 성숙도 빠르게 증식하는 것으로 알려져 있다. *Porphyromonas*종은 collagenolytic activity, trypsin-like activity, specific IgA-cleaving protease activity, endotoxin, 상피세포에 의한 collagen-breakdown을 촉진하는 인자들, cytotoxic factors 등의 많은 잠재적 독성인자들을 가지고 있다. 특히 *P. gingivalis*가 생산하는 collagenase는 직접적으로 치주교원섬유(periodontal collagen fiber)를 분해할 뿐만 아니라 구강 내로 많은 분해 저분자들(molecules)을 용출시킴으로써 타 구강미생물들의 서식처를 제공하여 치주염의 본질적인 원인을 제공하는 것으로 밝혀져 있다. 본 연구는 식용생물자원 활용 치주염 예방물질 소재화 연구의 일환으로 200여종의 향신채소, 식용 한약재, 산야채소, 차 및 곡류 등을 극성도에 따라 계통추출한 후 치주염 예방물질을 검색하였다. 검색용 *in vitro* assay계는 *P. gingivalis* 2561 collagenase와 Type I collagen을 사용한 ninhydrin-hydrindantin assay계를 사용하였다. 총 200여종의 식용생물자원 extract library를 대상으로 1차 검색한 결과, 녹차(MeOH Fr.: 36%), 계피(MeOH Fr.: 28%), 월계수잎(MeOH Fr.: 26%), 민트(MeOH Fr.: 25%) 등의 추출물에서 각각 높은 저해활성을 나타내었다. 선정된 4종의 추출물을 대상으로 동일 assay계를 이용한 2차 검색을 수행한 결과, 1차 검색과 일치하는 경향을 보였고, 총 4종의 시료 중 독성이 없고 높은 저해활성을 보인 녹차(*Camellia sinensis*) methanol추출물을 최종시료로 선정하였다. 이 추출물로부터 ethylacetate partition, silica gel 60 open column chromatography, Prep. TLC 및 Prep. HPLC 순으로 치주염 예방물질을 정제하였고, 정제된 물질의 일부 이화학적 성질을 규명하였다.

PB-80

In Vitro and *In Vivo* Inhibitory Effect of *Camellia sinensis* on Alcoholic Liver Fibrosis in Rats

Taik-Hoon Yang*, Hye-Kyung Kim[1], Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong and Hong-Yon Cho
Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,
[1]Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Ethanol is metabolized in the liver by two major pathways : the alcohol dehydrogenase (ADH) pathway and the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS). Each of these pathways produce specific metabolic and toxic disturbances, and both pathways result in the production of acetaldehyde, a highly reactive compound. Acetaldehyde can stimulate the deposit of extracellular matrix proteins especially collagen type I through several interrelated mechanisms by HSC (hepatic stellate cell). Inhibitory effect of collagen type I and liver protective activity from various plant materials were studied *in vitro* and *in vivo*. Plant extracts prepared by solvent extraction based on polarity from two hundred kinds of edible plats. *In vitro* system, collagen type I in the HSC-T6 culture medium or in the cell was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELASA), hydroxyproline assay, and immunoblotting. Methanol extracts of *Camellia sinensis* (26.8%), *Cornus officinalis* (28%) and *Pinus koraiensis* (23.8%) showed particulary high inhibitory effect *in vitro* assay system. By the result of *in vitro* assay, *Camellia sinensis*, *Cornus officinalis* and *Pinus koraiensis* were selected for the *in vivo* study. We induced acute fibrosis of rats by dimethylnitrosamine (DMN) and determined collagen type I deposition in the liver. Especially, the methanol extract of *Camellia sinensis* showed significantly high inhibitory effect on hepatic fibrosis.

2003년도 한국식품영양과학회
정기총회 및 제54차 학술발표회

건강기능식품의 유효성 평가

일 시 / 2003년 11월 29일 (토) 09:00

장 소 / 충북대학교 개신문화관

주 최 / 한국식품영양과학회

후 원 / 한국과학기술단체총연합회
충북대 RRC

후원사 / 서울우유협동조합

협찬사 / 동서약품 식품사업부, 이오무역,
(주)이롬라이프, WBG Korea,
Bio & 21, (주)빅솔, 체리부로,
풀무원건강생활(주), (주)해찬들

P11-69

Antioxidative Effects of Aucubin in Human Skin Fibroblasts

Jin-Nyoung Ho*, Hye-Kyung Kim[1], Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong and Hong-Yon Cho. Graduated School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, [1]Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Cumulative oxidative stress by reactive oxygen species(ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, ultraviolet(UV) irradiation, and lipid peroxide causes oxidative damage to lipids, proteins, and nucleic acids. This oxidative damage could be an initiator in the pathogenesis of skin cancer and photoaging. Aucubin is a common iridoid glucoside isolated from *Aucuba japonica*, *Eucommia ulmoides* and *Plantago asiatica*. Aucubin has been known to have diverse biological activities such as protective activity against liver damage, anti-inflammatory effect, and antimicrobial activity. Using human foreskin fibroblast HS-68 cell line, we investigated cell survival and membrane lipid peroxidation as markers of oxidative damages by hydrogen peroxide, SNAP, and UVB. Evaluation of living cells was carried out by MTT assay. The damage was associated with lipid peroxidation of the cell membrane, as shown by the accumulation of malondialdehyde(MDA). By pre-incubation with aucubin, a significant preventive effect was noted on the increase in the absolute number of surviving cells, and the levels of MDA were markedly decreased.

P11-70

Protective Effect of *Hordeum vulgare var. hexastichon* on Alcoholic Liver Disease *in vitro* System

Yoo-Hyun Lee*, Mi-Sook Dong, Hye-Kyung Kim[1], Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong and Hong-Yon Cho. Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea Univ., [1]Department of Food and Biotechnology, Hanseo Univ.

Chronic ethanol consumption is associated with an increased incidence of various liver diseases including alcoholic fatty liver, cirrhosis, and cancer. Several mechanisms have been suggested to play important roles in pathway of ethanol toxicity to the liver. The microsomal ethanol oxidizing system(MEOS) is strikingly inducible by chronic ethanol consumption with the key enzyme cytochrome P450 2E1(CYP2E1), increased 4 to 10 fold in liver. Induction of CYP2E1 by ethanol consumption appears to be one of the major mechanisms by which ethanol is believed to generate such a state of oxidation stress. To investigate the inhibitory effect of CYP2E1 using *E.coli* membrane fraction coexpressed human CYP2E1, NADPH cytochrome P450 reductase, and cytochrome b_5, we screened a hundred of plant extracts prepared by solvent extraction based on polarity with assay system using *p*-nitrophenol as CYP2E1 substrate. *Hordeum vulgare var. hexastichon* shows a relatively significant inhibitory effect. A potential inhibitory compound, HV-M2a, is purified by ion exchange chromatography, gel filtration chromatography, and HPLC. Further study on identification and characterization of HV-M2a is now in progress.

2004년 한국식품과학회
제71차 학술대회

FUSION TECHNOLOGY in FOOD SCIENCE

기간 : 2004년 6월 23일(수)~25일(금)
장소 : 강원도 용평리조트

사단법인 한국식품과학회

후원 : 강원도청, 한국학술진흥재단
한국과학기술단체총연합회

P7-199

Anti-stress and Anti-fatigue Effects of Enzyme-containing Food and Activated Charcoal in SD Rats and ICR Mice

[illegible]
[illegible]

Animals of the normal group were not exposed to any stress and the control group was exposed to stress. The rats were given water containing 100 mg of Sun-ginseng (SG) extract, 200 mg of enzyme-containing food, 100 mg of activated charcoal, 150 mg of enzyme-containing food mixed with 50 mg of activated charcoal/100 mL of potable water. The mice were given water containing 35 mg of Sun-ginseng extract, 70 mg of enzyme-containing food, 35 mg of activated charcoal, 75 mg of enzyme-containing food mixed with 25 mg of activated charcoal/ 100 mL of potable water. The groups with enzyme-containing food were supplemented enzyme pellets while the rest of the groups were supplemented with ordinary pellets. Animals were given supplements for 7 days with restrained and electroshock stress. After loading final stress, we recorded stress-related behavioral changes of experimental animals by stressing them and measured the levels of blood corticosterone and interleukin 2 (IL-2). Anti-fatigue effect was evaluated by RotaRod and Beam Balance or Walking for 7 days in mice. Enzyme-containing food and activated charcoal supplementation partially blocked the stress and fatigue effect on locomotion and elevated plus-maze test in rats and mice. It also partially blocked stress induced behavioral changes such as freezing, burrowing, smelling, face-washing, and rearing behavior in rats and mice. Enzyme-containing food and activated charcoal supplementation decreased the levels of blood corticosterone, which is increased by stress in rats and mice.

P7-200

Protective Effect of Green Tea Polyphenols on Alcohol-induced Liver Damage *in vitro*

Yoo-Hyun Lee[*], Mi-Sook Dong, Hye-Kyung Kim[1], Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong, and Hong-Yon Cho
Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University,
[1]Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of alcoholic liver injury and induction of cytochrome P4502E1 by ethanol appears to be one of the main mechanisms through that ethanol is believed to generate such oxidative stress. Natural polyphenols from green tea exhibit antioxidant activities in several studies and protect diverse oxidative stress-related disorder like hepatic injury. HepG2 cells overexpressing human CYP2E1 appears to be useful *in vitro* model to investigate the mechanism how various polyphenols from green tea protects liver cell by ethanol-induced oxidative stress. Eight kinds of polyphenols from green tea including epigallocatechin-3-gallate (EGCG) were screened to attenuate the toxicity of alcohol in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. EGCG, catechin gallate, epicatechin gallate and epicatechin among them showed significant protective effects against ethanol toxicity, preventing cell death by 84 %, 36 %, 88 % and 88% at 25 mM concentration, respectively. The effects of four kinds of catechins on CYP2E1 catalytic activity were determined by *p*-nitrophenol hydroxylation in *E. coli* membrane fraction coexpressed CYP2E1 and NADPH cytochrome P450 reductase. Prevention of ethanol toxicity was associated with a reduction of oxidative damage and a decrease of lipid peroxidation.

P7-201

An Aqueous Extract of Perilla Leaf Protects Primary Rat Hepatocytes against *tert*-Butylhydroperoxide Induced Oxidative Stress

Min-Kyung Kim[*] and Kwang-Won Lee
Department of Food Science, College of Life and Environmental Sciences, Korea University

Perilla (*Perilla frutescens* var. *crispa*, *Labiatae*) is one of the most common herbs in Korea. These leaves are also used as medicinal plants in east Asian countries and for protection against food microbial poisoning. In this study, we describe its *in vitro* antioxidant activity. The aqueous extract of perilla leaf possessed antioxidant activity, free radical scavenging properties assayed using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and reducing activity using ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The cytoprotective effects of perilla leaf were demonstrated in aqueous extracts of freshly isolated primary rat hepatocyte system. *tert*-Butylhydroperoxide (*t*-BHP) is a well known inducer of oxidative stress in biological systems. The cells cytotoxicity studies by diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) leakage and malondialdehyde (MDA). The cytochrome P450s and other enzymes were investigated following the administration of oxidative stress. The aqueous extract of perilla leaf exhibited radical scavenging activity with an EC_{50} of 400.5±3.5 μg/mL. The antioxidative activity of perilla extract (62.5-1000 μg/mL) against *t*-BHP (0.5 mM for 2 hr) showed a 5-fold decrease compared with *t*-BHP alone in LDH leakage. Furthermore, malondialdehyde formation was significantly decreased.

P7-202

Glycation Inhibition Activity of Traditional Herb Extracts by Using ^{14}C-N-Formyl-Lysine Crosslingking Assay

Soo-Youn Choi[*] and Kwang-Won Lee
Department of Food Science, College of Life and Environmental Sciences, Korea University

Advanced glycation end products (AGEs) formed during the last stage of the Maillard reactions between reducing sugars and protein *in vivo*. Aminoguanidine (AG) has been shown to be an effective artificial inhibitor for AGE formation. The purpose of this study was to investigate AGE inhibitors from medicinal plant extracts. The inhibitory activities of protein glycation by aqueous and methanol extracts from 16 plant tissues were evaluated *in vitro* using a ^{14}C-N-formyl-lysine crosslinking assay. Protein crosslink measurement of reaction mixture was incubated with bovine serum albumin (BSA, 5 mg/mL), ribose (25 mM), 1 mM DTPA, ^{14}C-N-formyl-lysine (2.5 μCi/mL) and AG or different levels of medicinal plants extracts (15.625-1000 μg/mL) in potassium phosphate buffer (pH 7.4). The mixture was incubated at 37℃ in 5% CO_2 in air for 7 days. The potent and significant inhibitory activity were found from medicinal plants tissues which are *Portulaca oleracea* (whole), *Taraxacum platycarpum* (whole), *Plantago asiatica* (leaf, bark), *Houttuynia cordata* (leaf, bulb), *Commelina*

- 217 -

부록 II

특 허 출 원

특 허 출 원 서

出願人參照番號 :　　　　　　　　　　代理人參照番號 : PN056700KR

出願番號	04-65039	심사청구
出願日字	2004-08-18	유
발명의 명칭	알코올성 간섬유화 예방 및 치료용 식물 유래 추출물	

독립항	3
종속항	2
명세서	16
도면수	2
도 수	4

出願人	고려대학교 산학협력단
發明者	조홍연, 홍범식, 신동훈, 김혜경, 양덕춘, 이유형, 홍진범, 김은수, 김순화

리 & 목 특허법률사무소

TEL [illegible]

특 허 출 원 서

出願人參照番號 : 代理人參照番號 : P0356/1786

出願番號	04-64128	심사청구
出願日字	2004-06-14	유
발명의 명칭	도라지 추출물을 함유하는 L-FABP 증강제 및 그 정제방법	

독립항	4
종속항	4
명세서	20
도면수	4
도 수	4

出願人	고려대학교 산학협력단
發明者	조홍연, 홍범식, 신동훈, 기혜경, 김동섭, 이유현, 최진영, 김은주, 김순희

리&목 특허법률사무소

[illegible]

특 허 출 원 서

出願人參照番號 :　　　　　　　　　　代理人參照番號 : [illegible]

出願番號	04-125040	심사청구
出願日字	2004-08-18	유
발명의 명칭	알코올 유도 CYP2E1이 생성한 활성산소종으로부터 간세포 보호활성을 갖는 [illegible] 화합물	

독립항	3
종속항	4
명세서	18
도면수	4
[illegible]	6

出願人	고려대학교 산학협력단
發明者	조홍연,홍변식,신동호,김혜경,이유현,홍진봉,김은수,김준희

리 & 목 특허법률사무소

[illegible]

특 허 출 원 서

出願人參照番號 :　　代理人參照番號 : PN056/06KR

出願番號	04-64127	심사청구
出願日字	2004-08-14	12
발명의 명칭	북리 추출물을 함유하는 인코올성 간세포 보호용 CYP2F1 지해제 및 그 정제방법	

독립항	4
종속항	4
명세서	18
도면수	6
도 수	8

出願人	고려대학교 산학협력단
發明者	조홍연,홍범식,신동훈,김혜경,이유현,호진영,김은주,김춘희

리&목 특허법률사무소

TEL:(代)588-8585 FAX:588-8547-8