

제주조릿대의 대장건강 개선 기능성 규명 및 효능 평가

Function and efficacy evaluation of Sasa quelpaertensis Nakai in colonic health

주관연구기관	이화여자대학교 산학협력단
연구책임자	김유리
발행년월	2016-02
주관부처	농촌진흥청
사업관리기관	농촌진흥청
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201600003261
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/02 17:04:14

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

완결 과제 최종 보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ009777)

주관과제명(한글)

제주조릿대의 대장건강 개선 기능성 규명 및 효능 평가

(주관과제명(영문))

Function and efficacy evaluation of *Sasa quepaertensis* Nakai in colonic health

주관연구기관명

이화여자대학교산학협력단

연구수행기간

2013.04.01 ~ 2015.12.31

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청 장 귀하

본 보고서를 “제주조릿대의 대장건강 개선 기능성 규명 및 효능 평가에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 제주조릿대의 대장건강 개선 기능성 규명 및 효능 평가

2016. 02 . 15

주관연구기관명 : 이화여자대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 김유리

참 여 연 구 원 : 김경미, 김유선, 임지예, 민수진, 이지수, 염이슬, 서유나

주관연구책임자 : 김 유 리

주관연구기관장 : 오 익 수



* 반드시 기관장 직인을 받아서 스캔 첨부

요 약 문

I. 제 목

제주조릿대의 대장건강 개선 기능성 규명 및 효능 평가

II. 연구개발의 목적 및 필요성

제주 조릿대를 이용해 아직 규명되지 않은 염증성 장 질환 개선 효과를 규명하여 복합 추출물이 가지는 건강 기능성을 확인함. 현재 연구진이 수행하고자 하는 제주 조릿대가 대장암 줄기세포에 미치는 영향과 그 기전에 대한 연구는 국내외에서 밝혀진 바 없는 최초의 기초연구로 연구를 통한 과학적인 자료의 제시가 필요함. 또한, 염증성 장 질환 발병과정에 영향을 줄 것이라고 추정되는 장내 균총의 군집을 분석하고, 제주 조릿대가 가지는 기능성이 장내 미생물의 군집에 미치는 변화를 국내에서 첨단 신기술로 알려진 barcoded pyrosequencing을 통해 확인함.

위의 연구를 통한 결과를 간결하게 분석하고 해석하여 제주 조릿대가 장 건강 전반에 미치는 효과를 종합적으로 규명함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

제주 조릿대를 이용해 아직 규명되지 않은 염증성 장 질환 개선 효과를 In vitro, In vivo 실험을 통해 규명하여 복합 추출물이 가지는 건강 기능성을 확인함. 제주 조릿대가 대장암 줄기세포에 미치는 영향과 그 기전을 In vitro, In vivo 실험을 통해 규명하고 분석함. 또한 염증성 장 질환 발병과정에 영향을 줄 것이라고 추정되는 장내 균총의 군집을 분석하고, 제주 조릿대가 가지는 기능성이 장내 미생물의 군집에 미치는 변화를 국내에서 첨단 신기술로 알려진 barcoded pyrosequencing을 통해 확인함.

IV. 연구개발결과

제주 조릿대 잎 추출물과 p-coumaric acid, tricin의 항염증 효능을 규명함. In vitro 실험으로 장환경과 비슷한 환경을 만들기 위해 epithelial 세포인 CaCo2 세포와 대식세포인 Raw 264.7 세포를 co-culture 하여, 제주 조릿대 잎 추출물과 활성성분의 염증성 매개인자 분비, 단백질, mRNA 발현을 측정하였음. LPS에 의해 유도된 염증매개 인자들인 NO, PGE2, IL-1 β , IL-6 분비, iNOS, COX-2의 단백질 발현, TNF- α , IL-6 mRNA 발현이 조릿대잎 추출물과 p-coumaric acid, tricin에 의해 유의적으로 억제되었음. 이 실험들에서 제주조릿대 추출물의 효과가 개별 활성물질인 p-coumaric acid, tricin 효과보다 우수했음이 확인되었음. 항염효과와 마찬가지로 항암줄기세포 효과에서도 조릿대 추출물의 효과가 활성물질인 p-coumaric acid, tricin 개별효과보다 우수하였음. In vivo 실험을 통해서 제주 조릿대 잎 추출물을 경구투여 했을 때 DSS유도로 짧아진 대장 길이를 회복하고 임상적 염증 지표인 DAI

score, histopathology score가 개선됨을 확인하였고, 제주 조릿대 잎 추출물의 투여에 따른 동물모델의 세포분열마커의 변화 분석 결과 조릿대를 경구투여한 군에서 PCNA의 발현이 억제되었음. 또한 제주 조릿대 잎 추출물 투여에 따른 동물모델의 혈장에서의 염증성 매개인자인 TNF- α 와 IL-6 분비, 대장조직에서의 iNOS, COX-2, PPAR- γ 의 단백질 발현, MAPK인 ERK, JNK, p38의 인산화, TNF- α mRNA 발현이 억제되었음.

또한, 제주 조릿대 잎 추출물과 p-coumaric acid, triclin의 항암줄기세포효능을 규명하였음. In vitro 실험으로 HT-29와 HCT-116 대장암세포에서 CD133⁺CD44⁺ 대장암줄기세포를 분리하여, 제주 조릿대 잎 추출물과 p-coumaric acid, triclin의 대장암 줄기세포 분화유도 효과를 cytokeratin 20 단백질 발현 증가를 통해 확인하였음. 더불어, 대장암줄기세포에서 제주 조릿대 잎 추출물과 p-coumaric acid, triclin에 의해 암줄기세포의 중요한 특징인 자가복제가 억제됨을 clonogenic assay 및 sphere formation assay를 통해 규명하였음. 이러한 조릿대의 암줄기세포 억제 효능의 분자적 기전 규명을 위해 조릿대 잎 추출물과 조릿대의 활성물질 처리 시 변하는 여러 암줄기세포 마커 및 암줄기세포 관련 마커와 신호전달 마커인 DLK1, Sox-2, Notch1, HIF-1 α , VEGF, β -catenin 등의 단백질 발현 또는 mRNA 발현이 억제됨을 확인함으로써 조릿대의 항대장암 기능성을 세포실험 수준에서 증명하였음. 이러한 조릿대 잎 추출물의 항암줄기세포 효과는 in vivo xenograft 모델을 이용하여 다시 확인 한 결과, 제주 조릿대 잎 추출물의 투여에 따라 조릿대를 경구투여한 군에서 DLK1의 발현이 억제되었고, 동물모델의 대장암 억제 기전 마커인 HIF-1 α , VEGF, p-ERK의 단백질 발현이 억제됨을 확인함으로써, 조릿대의 항대장암 효능을 in vivo 수준으로 확대하여 규명하였음.

마지막으로, 제주 조릿대 잎 추출물의 in vivo 만성 대장염 동물 모델에서 항산화 효과 및 DNA damage 억제 효과, 장내 미생물 군집에 미치는 영향을 확인하였음. 제주 조릿대 잎 추출물 투여에 따른 동물 모델의 항산화효소 활성변화 분석 결과 조릿대를 경구 투여한 군에서 항산화효소 SOD, catalase, Gpx1의 발현이 조절되었고, 동물 모델의 DNA damage 마커인 8-oxo-dG의 발현이 억제되었음. 또한, 만성 대장염을 유도한 동물의 변에서 추출한 genomic DNA를 sequencing을 통해 분석한 결과, 대조군과 만성염증성 장 질환군 간의 장내 미생물 군집의 유의미한 변화가 관찰되었고 조릿대 잎 추출물 투여한 동물 군에서 만성염증성 장 질환군과 비교하여 유의미하게 미생물 군집의 다양성 변화(α -diversity, β -diversity)와 미생물의 구성이 phylum level, class level, species level 등에서 대조군 수준으로 회복되었음.

이로써, 제주 조릿대 잎 추출물의 만성대장염, 대장암줄기세포 억제효과와 대장미생물의 균형에 미치는 영향을 규명함으로써 제주 조릿대 잎 추출물이 총체적인 장건강 보호와 치료에 긍정적인 효과가 있음을 규명하였음.

V. 연구개발결과의 활용계획

제주 조릿대 잎 추출물의 대장질환에 대한 기능성을 과학적으로 규명하여 객관적인 기초 자료를 제공하고 이를 통해 조릿대를 이용한 기능성 식품 개발가능성을 확고하게 함. 또한 제주 조릿대의 기능성 소재 개발로 농가의 안정된 수익이 확보되며, 해외 기능성 식품에 대응하는 경쟁력을 확보하게 하며 국내에서 생산되는 천연물질로 만성대장질환을 예방, 치료하는데 활용함으로써 약의 부작용을 줄이고, 건강 개선을 통한 국민의 삶의 질 향상 도모할 수 있음. 인체에 자연스러운 천연식품을 암의 예방 및 치료에 응용함으로써, 현재 대장암 환자들이 겪는 항암제 및 항암치료에 의한 부작용을

줄이고, 건강 개선을 통한 국민의 삶의 질 향상을 도모함으로써 국가적으로는 의료비를 절감하게 할 수 있음. 또한 만성대장질환에서 장내 미생물 군집의 긍정적인 변화를 유도하는 조릿대의 효과를 확인하여 만성 대장염 예방 및 치료의 새로운 방향을 제시할 수 있음. 제주 조릿대의 대장건강 효능에 미치는 영향을 규명한 연구결과 중, 경제성이 있다고 판단되는 사항은 특허출원 후 관련기업에 기술 이전하고, 조릿대의 항염, 항암, 항산화, 대장 미생물 군집 등에 미치는 영향을 규명한 결과를 국제 학술지 및 학술대회에 발표하고 이를 홍보함.

S U M M A R Y

Sasa quelpaertensis Nakai is native to Korea and is only grown on Mt. Halla in Jeju Island, Korea. Although its beneficial effects for several chronic diseases are well-known, the role of its effects on chronic intestinal inflammation, colon cancer stem cells (CSCs), and intestinal microbiome are limited. Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammatory disorders of gastrointestinal tract. It has been reported that IBD is associated with colon cancer which is one of the most common types of cancer diagnosed and a major cause of cancer-related mortality. The present study hypothesized that *Sasa quelpaertensis* leaf extract (SQE) would exert a protective effect on inflammation and oxidative stress in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mouse model and on colon CSCs. Effect of SQE on proinflammatory markers, mitogen-activated protein kinase signaling (MAPKs), activation of nuclear factor κ B (NF- κ B), and anti-oxidant enzyme activity, DNA damage in DSS-induced colitis mice model were investigated. In addition, chemopreventive effects of SQE on the characteristics of colon CSCs *in vitro* and *in vivo*. Pyrosequencing was used to analyze the effect of SQE on intestinal microbiota profiles in chronic inflammatory models. Results showed that SQE attenuated the severity of DSS-induced colitis, as assessed by disease activity index scores, shrinkage of colon length, and histopathologic changes. SQE suppressed DSS-induced proliferation in distal colon tissues, and levels of tumor necrosis factor- α in serum and colon tissues, nitric oxide synthase, cyclooxygenase, and levels of phosphorylated MAPK and I κ B α in colon tissues. Furthermore, SQE treatment significantly suppressed the self-renewal capacity of colon CSCs, and down-regulated β -catenin and phosphorylated GSK3 β , while it significantly enhanced cell differentiation. SQE also down-regulated the expression of several CSC markers, including DLK1, Notch1, and Sox-2 *in vitro* and *in vivo*. SQE suppressed 8-oxo-dG of oxidative DNA damage marker, SOD, and MDA activity in plasma. The antioxidant enzyme expression, SOD2, Gpx1, and catalase in colon tissues was higher and SOD1 expression was lower in SQE supplementation group compared to those of DSS group. Finally, administration of SQE helped to prevent intestinal dysbiosis associated with colitis through recovering changed microbial composition and diversity. Taken together, these results provide evidence that SQE inhibits inflammation and colon cancer by regulating inflammatory cytokines, characteristics of CSCs, antioxidant enzymes, and intestinal microbiome profiles which indicates its benefit for colon health.

목 차

제 1 장 서 론	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	17
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도.....	57
1절 목표대비 대외 달성도.....	57
2절 정량적 성과	59
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	60
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	61
제 7 장 기타 중요 변동사항.....	63
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구장비 현황.....	65
제 9 장 참고문헌.....	66

제 1 장 서 론

1절. 연구개발의 필요성

1. 연구 개발 대상 기술의 경제적 · 산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

가. 건강기능식품 시장의 성장급증과 더불어 우리나라 고유의 새로운 건강식품개발의 필요

건강기능식품 시장은 세계적으로 총 800억불의 시장을 형성하고 있으며, 연 평균 3~10 %의 시장 성장률을 나타내고 있다. 미국의 경우 300억 달러로 세계 최대 시장을 형성하고 있으며, 일본은 200억불, 한국은 8.4억불로 보고되고 있다. (2010년도 기준)

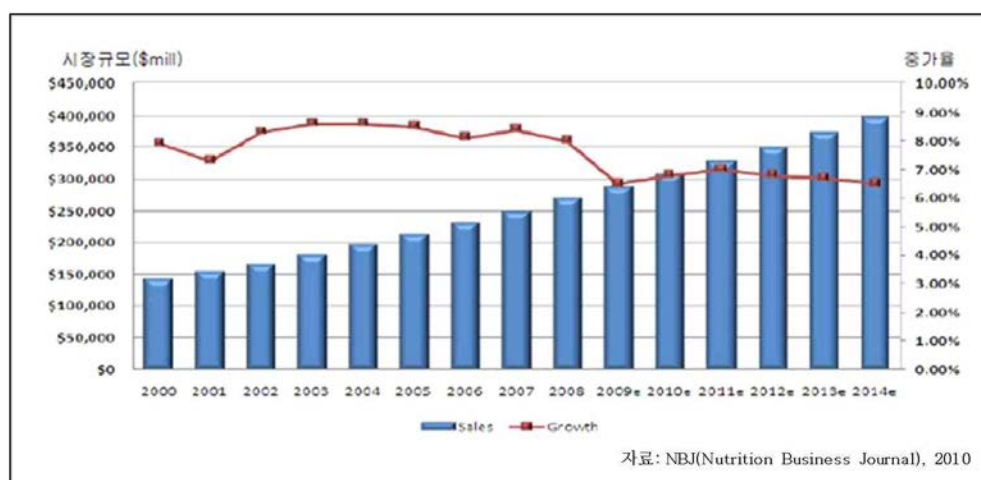


Figure 1) 연도별 세계 기능성식품 시장현황

국내의 경우, 건강기능식품에 대한 소비자의 수요증대가 지속되고 2002년 8월 26일자로 건강기능식품에 관한 법률이 제정 · 공포됨에 따라 건강기능식품에 대한 관심과 소비가 증가되고 있다. 국내 식품관련 시장은 2005년도 기준 GDP의 5% 정도를 차지하여 외식산업까지 포함하면 약 80조원을 차지하고 있다. 특히 국내 기능성 식품 시장은 2005년도 매출 기준 434백만 달러에서 2010년 585백만 달러로 6%의 성장률을 보이고 있으며, 2015년에는 696백만 달러가 될 것으로 예측된다. 국내 건강기능식품의 시장은 2000년도 이후 매년 20~30% 성장을 이루고 있으며 향후 세계시장의 10%에 육박할 것으로 추정되며, 따라서 우리 고유의 새로운 기능성소재의 발굴과 이를 기반으로 한 신소재 개발의 연구에 대한 필요성이 강하게 요구되고 있다.

천연물 유래의 건강기능식품 개발은 기존 화학적 약물 치료제의 독성이나 부작용을 보완할 수 있어 선호도가 증가하고 있으며, 질병의 약물치료로 정상 세포가 손상되고 비정상세포의 약물 자체에 대한 저항성 증가는 화학 합성 치료제의 한계점으로 지적되고 있다. 올바른 기능성 식품의 개발은 질병의 이환율을 낮추고, 진행속도를 늦추는 효과를 기대할 수 있다.

본 연구는 우리나라 고유의 제주 조릿대의 기능성을 이용해 장 건강 관련 지표와 장내 균총, 염증성 장질환 및 대장암과의 연관성을 연구해 장 건강의 총체적 개선을 도모함으로써 국민의 삶의 질을 향상시키고, 나아가 국가적 차원에서는 의료비를 절감하여 공적 부담금 감소 효과를 기대한다는 것에 본 연구의 의의가 있다.

나. 제주조릿대의 생태학적 분류와 생리적 효능

(1) 제주조릿대의 생태학적 분류 및 응용 현황

조릿대는 생태학적으로 대나무아과 (Bambusoideae)의 조릿대속(Sasa)에 속하는 식물군으로 분류된 키 작은 대나무 식물이며 산죽, 지죽, 죽엽 또는 임하죽, 토맥 이라고도 하며 우리나라 중부이남, 중국, 일본과 같은 아시아 일부 지역에서 서식하는 식물임. 특히 제주조릿대는 *Sasa quelpaertensis* Nakai 라는 학명으로 한라산에 특징적으로 분포하는 제주도 특산 삼림자원으로 여겨지고 있다.



Figure 2) 제주조릿대 (*Sasa quelpaertensis* Nakai)

대나무 잎을 이용한 민간요법의 기원은 동의보감, 본초강목, 신농본초경 등의 고서에서 찾을 수 있는데 대나무 잎은 해열, 거담, 청량 등의 목적으로 폐렴, 기관지염에 이용되었다고 기록되어 있다. 또한 대나무아과에 속하는 조릿대는 황달, 암, 고열, 위 및 십이지장염, 당뇨, 고혈압 해열 등의 증상을 완화시키는 효과가 있는 것으로 알려져 민간 약재로 전해짐. 현재까지 조릿대를 이용한 선행연구가 많이 진행 된 것은 아니나, 제주도 천연자원 물질로써 조릿대의 약리적 작용이 알려지고 있는 가운데 질병의 예방 및 회복, 노화억제 등의 건강 기능성 측면에 대한 관심이 급증하고 있고 더불어 식품 안전성을 위협받지 않고 부작용에 대한 우려가 적은 천연물에 대한 관심이 커지면서 조릿대의 효과가 더욱 주목받고 있다.

(2) 제주조릿대의 생리활성 물질 및 효능

조릿대 잎에 함유된 폴리페놀성 물질로는 triclin, triclin 7-o-β-D-glucopyranoside, syringaresinol, lutenolin 6-C-α-L-arabinopyranoside(isoorientin), isoorientin 2-O-α-L-rhamnoside 등이 확인되었으며 이 가운데 다양한 형태의 triclin 유도체가 조릿대의 생리활성을 갖는 유효성분 중 활성이 높은 것으로 보고되었다. 또한 *p*-coumaric acid는 메탈닌 세포 자극호르몬으로부터 유발된 멜라닌을 억제하는 미백 효과를 갖는다고도 보고되고 있다.

Table 1. 제주조릿대의 기능성에 대한 선행연구

제주 조릿대의 기능성	연구 내용	참고문헌
항염작용	LPS로 염증반응을 유도한 대식세포 (Raw264.7)에서 조릿대에 의한 염증성매개인자(NO, iNOS, COX-2, PGE ₂ 등)활성저해	Ko et al. 2010
항암작용	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 혈액 암세포(HP60,L1210)에서 조릿대에 의한 세포사멸 효과 ▪ 폐암세포(H1299,A549)에서 조릿대에 의한 암줄기세포적 성격 및 암전이 억제 효과 ‡ 	Choi et al.2006 ‡ Kim et al.2014
항균작용	식품 위생 관련 주요 세균에 대한 항균력 조사 결과 식품 오염 미생물인 E.coli, B.subtilis, S.aureus 등에 대한 광범위한 항균력 가짐	Kim et al. 2004
대사증후군 개선 효과	비만유도 동물모델에서 조릿대 섭취군이 혈당, 혈장 렙틴 농도 및 혈장 인슐린 농도가 유의적으로 낮게 나타남. 간의 지방침착 정도도 낮아 대사증후군 개선에 도움	Kim et al. 1984
항비만 작용	비만유도 동물 모델에서 조릿대를 섭취한 군이 체지방감소, 고인슐린 혈증개선 및 혈장렙틴농도 저하효과검증. 비만으로 인한비정상적 내분비 및 생리적 대사 작용개선 기대‡	‡ Kim et al. 2012

‡ 표시 논문은 본 신청연구과제 참여연구원에 의해 진행된 연구임

나. 장 건강을 위한 기능성 식품의 개발과 함께 총체적 연구시스템 확립과 과학적 근거의 확보의 필요

현재 식품의약품안전처에서 기능성 지표로 삼고 있는 장 건강에 관한 정의는 다음과 같다.

- 배변활동개선의 기능성은 대장운동 등이 개선되어 배변횟수, 배출시간이 촉진되고 변의 수분량이 개선된 경우
- 면역기능 조절을 통한 장 건강 개선은 면역학적 지표 cytokine 변화에 의한 염증유발 장염이 개선된 경우
- 장내 유익균 증식 및 유해균 억제에 도움이라는 기능성은 장내 유익균이 장내 균총에서 유익균이 증가되고 유해균수가 억제되어 장운동 및 배변활동이 개선 된 경우

이와 같은 장 건강의 기능성과 더불어 최근 급증하는 대장암관리에도 효과가 있는 기능성 식품의 개발을 위하여 총체적 연구확립과 과학적 근거의 확보가 필요한 실정이다.

(1) 염증성 장질환 (Inflammatory Bowel Disease ; IBD)

염증성 장질환은 크론병 (Crohn's Disease, CD) 와 궤양성 장질환 (ulcerative colitis, UC)으

로 구분하며, 두 질환 모두 복통과 더불어 심각한 만성 설사를 동반하며 완치가 힘든 특징을 가진다. 한국인의 염증성 장질환 유병률은 미국과 유럽에 비해 높은 수준은 아니나, 1990년대부터 최근까지 꾸준히 증가하고 있으며 이러한 추세가 계속될 경우 서양의 발병률과 비슷한 수준이 될 것으로 전망된다. IBD의 정확한 발병원인은 밝혀지지 않았지만 장 점막 면역 체계와 장내 세균 사이의 비정상적인 상호작용이 주된 원인이라는 것은 다수의 선행연구를 통해 밝혀진 바 있다.

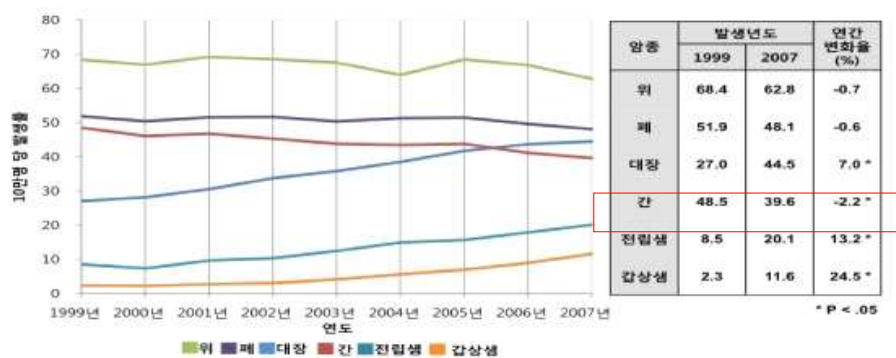
(2) 장건강과 장내미생물

장내미생물은 영양, 비소화성 물질 (non-digestible dietary components)의 대사, 면역체계의 항상성유지에 필수적이다. 특히, 소화관 내에 서식하는 미생물들은 장 면역계와 상호작용을 하고, 소화관 벽의 주요 구성성분을 위한 영양소를 제공하며 에너지 대사를 조절하는 것으로 알려져 있어 숙주와 microbiome과의 상호작용은 GI lymphoid 조직의 활성을 유도하고 소화관 벽 구조를 형성함으로써 장 건강에 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

반대로, 대장의 박테리아가 대장암을 유발시킬 수 있고, 동물성 단백질, 지방, sulfide가 높은 서구식 식사의 섭취가 대장암 발생과 상관관계가 있는 것으로 발표되고 있다. 대장 내 박테리아는 특정한 세포 표면의 수용체와 결합할 수 있고, 세포내 신호 전달에 영향을 미칠 수 있는 독성 또는 유전 독성적 대사산물을 생성 하며, 또한 박테리아는 1차 담즙산을 2차 담즙산으로 변화시킨다. 그 예로 서구식 식사를 많이 하는 대장암 환자의 경우 2차 담즙산 수준이 높음을 보여주는 등 박테리아가 대장암과 관련이 있다.

(3) 대장암

보건복지부 산하 한국중양암등록본부에서 2009년 발표한 자료에 따르면 대장암은 우리나라 발생 전체 암 가운데 12.7%를 차지하며 위암, 간암에 이어 세 번째로 높은 발병률을 보인다. 최근 10년간 대장암의 연령 표준화 발생 추이는 남성에서 연간 7.0%의 증가율을 보였고 여성에서는 연간 5.3%의 증가율을 나타내었으며 전체적으로는 6.4%의 증가율을 보였다.



자료 : 보건복지부 한국중양암등록본부 (2009). 국가암등록사업 연례보고서.

Figure 3) 국가암등록 현황

우리나라에서 대장암 발생 증가 원인에 대한 많은 연구에서 서구화된 식사와 생활방식이 주

된 원인으로 손꼽히며 (고성준과 김주성, 2010), 육식 위주의 식생활과 정제된 탄수화물이 식단에서 차지하는 비율이 커지고 신체활동의 감소로 인해 비만 유병율이 증가하고 대사 질환 및 대장암 발병 위험에 노출된 것으로 분석된다.

장건강의 위한 기능성식품의 개발로 염증성 장질환과 대장암 등의 환자의 면역/항염증 기능을 향상시킴으로써 삶의 질을 향상시키고, 특히 대장암의 경우, 생존기간 연장이 가능할 뿐 아니라 항암제 치료를 안전하고 지속적으로 유지시키는 면에서도 유용할 것으로 기대한다.

다. 장건강을 유지하기 위한 건강기능식품 개발을 위해 새로운 연구 방법적 접근필요

(1) barcoded pyrosequencing을 이용한 총체적 미생물군집 분석

IBD와 장내 미생물 군총 변화에 관한 임상연구에 따르면 IBD 환자에 경우 장내에 분포하는 미생물의 분포에 변화가 있고 특정한 병원균의 감염의 양상을 보인다고 알려져 있다. 현재까지 알려진 균주로는 *E.coli*, *Mycobacterium*, *Clostridium difficile*, *cytomegalovirus* 와 같은 병원체로 이들이 IBD의 발병과 연관성이 있을 것으로 추측된다. 일반적으로 병원체는 독성인자(virulent factor)를 가지고 있는데 이는 숙주세포의 정상적인 세포 신호(cell signaling)를 재구성하고 세포 신호전달체계를 변형시켜 숙주세포의 면역 반응을 무력화 하는 것으로 알려져 있다.

장내미생물이 영양, 비소화성 물질 (non-digestible dietary components)의 대사, 면역체계의 항상성유지 등 인간의 건강에 중요한 역할을 한다는 사실은 여러 연구에 의해 알려져 왔으나, 실제로 대부분 연구에서 1% 미만의 장내미생물만이 배양되어 왔고, 잘 갖추어진 실험실이나 연구에서도 인간 장내미생물은 최대 20-40%만이 배양될 수 있다. 또한 장내 건강상태 및 식이섭취에 장내 미생물 군총은 큰 변화를 보이는데, 국내 기존의 장내 군총의 분석은 주로 장내미생물을 배양하는 방법으로 이루어져왔기 때문에, 혐기성 미생물 등 배양을 통해서는 모든 미생물 군총을 밝혀내기 어렵다는 한계를 가진다.

본 연구에서 이용하게 될 차세대 염기서열분석 (Next Generation Sequencing, NGS) 법은 장내세균의 small subunit ribosomal RNA (16S rRNA) gene을 분석함으로써 배양이 불가능한 미생물을 포함하여 모든 미생물의 패턴 분석이 가능해 개체의 유전자 분석 및 식이섭취를 통한 맞춤 의료가 가능하도록 하도록 하였다 (권경훈과 정해원, 2012).

국외에서도 이러한 연구는 아직 초기단계이며, **국내 한국인 기능성식품 효과평가에서 한 미생물군집 enterotype의 분석연구도 거의 전무한 실정이다.** 따라서, IBD 등 질환에서 식품의 공급 전 후에 장내 미생물 군총의 변화를 평가함으로써 대장건강과 영양관리에 유용한 자료를 확보할 수 있다.

(2) 대장암 암줄기세포 타겟의 선별적 항암식품개발

기존의 암 예방이나 항암치료는 주로 거대한 종양 전체에 영향을 주는 것으로, 그러한 방법들은 항암치료나, 방사선 치료에 저항성을 증가시켜 제한된 효율을 보이고 (Gottesman. M. M., T. Fojo & S. E. Bates, 2002) 빠르게 성장하는 정상세포에까지 영향을 주어서 부작용을 일으킬 수 있다. 최근의 연구들에서 많은 암들이 줄기세포와 같은 성격을 지닌 적은 수의 암세포를 포함하고 있으며, 그 암줄기세포들은 항암치료나 방사선치료 이후 사멸되지 않고 다시 자

라나서 전이를 일으킨다고 보고되고 있다 (Reynertson, K. A, M. E. Charlson & L. J. Gudas, 2011). 영양소나 천연물이 선별적으로 암줄기세포 타겟 또는 암줄기세포 특성에 미치는 영향에 대한 연구가 적고, 그 기전연구 또한 부족하므로 부작용이 적은 영양소나 천연물의 체계적인 암줄기세포 특성과 기전에 대한 연구는 암 예방이나 치료에 많은 가능성을 가진 분야이다.

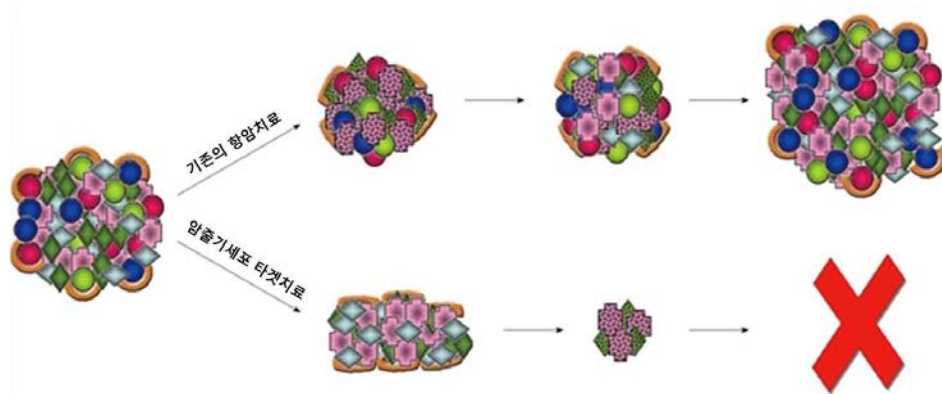


Figure 4) 암줄기세포타겟 항암관리

암줄기세포 (Cancer Stemcell, CSC)는 세포분화(differentiation), 자가복제(self-renewal), 종양생성(tumorigenicity)의 특징을 가진 세포로써, 암 예방 및 치료의 과정에서 암줄기세포를 targeting 한다면 효율적인 항암치료가 가능하다. 암줄기세포는 현재까지 우리나라에서 많이 연구되지 않은 분야로 대장암세포 가운데서도 줄기세포적 성격을 가진 세포의 발생과 성장을 억제시키는 천연물을 개발하는 시도는 중요하고 시급한 문제로 대두된다. 천연물의 기존의 항암예방, 치료법과 함께 암줄기세포를 타겟으로 하는 새로운 항암기전으로 이용되기 위해서는 *Drosophila delta-like 1 homologue* (DLK1)과 *Hypoxia inducible factor* (HIF) 와 같이 lycopene에 의해 비활성화 되는 신호전달체계 등 기전연구가 필요하고, 이러한 연구는 종양의 증식억제 등의 기존의 항암치료법과 함께 사용될 수 있는 유용한 방법이다. 이는 좀 더 효과적인 암 예방과 치료를 위하여 암줄기세포를 타겟으로 하는 새로운 모델로써, 암 전체나 암과 상관없이 빠르게 성장하는 다른 정상세포에도 영향을 적게 주는 안전하고, 높은 항암가능성을 가진 방법이다 (Frank, N. Y, T. Schatton & M. H. Frank, 2010).

제주 조릿대의 대장 건강기능성 연구는 기존의 일반 대장암세포의 사멸이나 종양생성에 대한 효과를 연구하는 방법과는 차별되는 암줄기세포타겟이라는 새로운 측면의 연구방법 개발이 필요한 실정이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절 : 국내외 연구 현황

1. 국내 연구 현황

제주조릿대는 제주 한라산에 자생하는 식물로 국내를 중심으로 연구가 진행되어 왔으며 조릿대를 포함한 대나무에 대한 기능성이 강조되면서 여러 연구에서 그 생리활성을 입증하고 있다. 죽순의 건강 효능 (Chuyen, N. V, T. Kurata, A. Kato & M. Fujimaki, 1982), 대나무 에탄올 추출물의 항산화 효과 및 아질산염 소거작용 (임진아와 나영순, 백승화, 2004), 추출방법에 따른 대나무 추출물의 화학분 및 생리활성, 대나무 잎의 생리활성 및 항균효과 (김미정과 변명우, 장명숙, 1996), 한국산 대나무의 항 돌연변이 효과 및 대나무 코팅 쌀의 간 독성 억제 효과 (Choi, S. Y., H. S. Cho & N. J. Sung, 2006) 등이 보고되었다.

최근에는 서구화된 식습관과 생활양식으로 비만이 건강 문제로 인식되고 이 인한 대사증후군이 큰 이슈로 대두되면서 조릿대의 효능이 비만, 대사증후군, 항염 및 항암에 대한 기능성에 특히 초점이 맞춰지기 시작하였다(Table 1).

천연 추출물을 이용한 염증성 장 질환에 관한 연구도 꾸준히 증가하는 추세로, 그 예로 염생 식물의 일종인 함초 열수 추출물을 이용해 염증을 유발시킨 흰 쥐에 함초 추출물을 2주, 4주간 투여한 결과 4주 동안 함초 추출물을 투여한 군에서 c-reactive protein, myeloperoxidase 활성이 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 핵염색을 통한 조직학적 변화 또한 함초 추출물 투여군에서 장 점막의 침윤, 염증, 용모의 손실이 감소하는 효과를 보였다 (최선헌, 2007).

최근 small subunit ribosomal RNA (16S rRNA) gene을 barcoded pyrosequencing으로 분석하여 장내 microbiome 전체를 분석하는 연구가 시작되면서, 이러한 방법으로 인간 장내의 미생물군집의 enterotype이 고지방, 저지방 등 식이패턴에 따라 다르고 (Wu, G. D., J. Chen, C. Hoffmann, K. Bittinger, Y. Y. Chen, S. A. Keilbaugh, M. Bewtra, D. Knights, W. A. Walters, R. Knight, R. Sinha, E. Gilroy, K. Gupta, R. Young, V. B., S. A. Kahn, T. M. Schmidt & E. B. Chang, 2011), 또한 사회의 발달 상태에 따라 다른 환경에 의한 식이섭취의 차이에 따라서도 다르다는 연구들이 발표되고 있다 (De Filippo, C., D. Cavalieri, M. Di Paola, M. Ramazzotti, J. B. Poullet, S. Massart, S. Collini, G. Pieraccini & P. Lionetti, 2010).

식이섭취와 대장암에 관한 연구는 여러 물질을 이용해 진행되어 왔으나 기능성 물질 섭취와 대장암 줄기세포 연관성에 관한 연구는 국내에서 전무한 실정이다. 최근 본 참여과제 연구원들을 통해 폐암세포에서 조릿대의 암줄기세포적 성격 억제를 규명하여 최초로 조릿대의 암줄기세포 억제 기능성을 보고한 바 있다 (Kim J1, Kim YS, Lee HA, Lim JY, Kim M, Kwon O, Ko HC, Kim SJ, Shin JH & Kim Y, 2014).

2012년 기준 우리나라 식품의약품안전처에 등재된 장 건강 도움 기능성 원료는 갈락토올리고당, 구아검가수분해물, 대두올리고당, 라피노스, 프락토올리고당, 난소화성말토덱스트린 등을 포함하여 22가지이며 이들은 단일 영양소인 경우가 대부분이다. 따라서 제주 조릿대 추출물을 이용해 총체적 장 건강을 도모하는 본 연구는 기능성 식품을 통한 질병의 예방 및 치료 분야에서 새로운 시도이다.

2. 국외 연구 현황

IBD와 대장암 등의 건강문제는 우리나라보다 훨씬 앞서 대두 되었고, 염증성 장 질환 및 대장암의 주된 원인으로 노화, 비만, 부족한 운동, 식습관 등이 지적되고 있다 (American Cancer Society, 2007-2008). 미국과 유럽 국가의 경우 과다한 육류와 가공식품의 섭취가 오랜 식습관으로 자리 잡은 만큼 천연 식품을 통해 IBD와 대장암을 예방하는 것이 중요하다는 인식이 앞서 활발한 연구가 진행되었다. Curcumin, green tea는 강력한 항염 기능으로 염증성 장 질환을 낮추는 효과가 있다는 연구들이 보고된 바 있고 (Bengmark S, 2007), 또한 대장암에 관한 연구도 활발하게 진행되고 있다 (Table 2).

Table 2. 천연물질 기능성에 관한 선행연구

천연물질 기능성	연구 내용	참고문헌
(Chemopreventive Potential of Natural Products)	대장암세포(HT-29)에서 Grape seed extract에 의한 세포증식억제 및 세포사멸 유도	Kaur et al. 2006
	대장암 세포 (CaCo2) 에서 Grape seed extract에 의한 PI3-K pathway 변화에 따른 대장암 억제효과	Engelbrecht et al. 2007
	대장암 세포 (Colo205) 에서 curcumin에 의한 세포사멸 증가와 전이 억제 효과	Su et al. 2006
	대장암 세포 (HT-29) 에서 Resveratrol에 의한 COX-2, PGE2 감소	Zykova et al. 2008
	AOM 장질환 유도 동물모델에서 Garlic and tomato에 의한 대장암 억제 효과	Sengupta et al. 2008
	HT-29 and LoVo xenografts 동물 모델에서 curcumin에 의한 대장암 억제 효과	Li et al. 2007

국외에서는 장내 균총(microbiome)과 염증성 장질환에 관한 연구가 최근 활발히 진행되기 시작하였으며, barcoded pyrosequencing을 이용하여 IBD와 microbiome의 연관성을 분석할 때에 고려해야 할 여러 변수들에 대한 깊이 있는 논의도 함께 진행 중이다 (Vincent B. Young, 2012). 또한 장 질환 치료 모델로 probiotics, prebiotics가 이용되기도 한다.

2절 : 국내외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야

본 연구의 필요 분야는 제주 조릿대를 이용해 아직 규명되지 않은 염증성 장 질환 개선 효과를 규명하여 복합 추출물이 가지는 건강 기능성을 확인한다. 또한 염증성 장 질환 발병과정에 영향을 줄 것이라고 추정되는 장내 균총의 군집을 분석하고, 제주 조릿대가 가지는 기능성

이 장내 미생물의 군집에 미치는 변화를 국내에서 첨단 신기술로 알려진 barcoded pyrosequencing을 통해 확인하도록 한다. 더불어 제주 조릿대가 대장암 줄기세포에 미치는 영향과 그 기전을 분석이 필요하며 이는 국내외에서 밝혀진 바 없는 최초의 기초연구이다.

위의 연구를 통한 결과를 긴밀하게 분석하고 보충 실험을 통해 제주 조릿대가 장 건강 전반에 미치는 효과를 종합적으로 규명하도록 한다.

Table 3 국내외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야

비교항목	국내	국 외
천연물질을 이용한 IBD개선 연구현황	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 예로부터 한의학에 기초한 민간요법으로 꾸준히 응용해 왔음 ▪ 현재도 활발히 연구 중이나 기능성물질이 단일영양소인 경우가 많음 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 염증성 장 질환이 대장암으로 이어지는 등의 건강문제로 대두되면서 일찍이 연구가 진행됨
천연물질을 이용한 IBD와 Microbiome간 상관성 규명현황	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IBD와 장내균총이 관련 있다는 가능성이 대두되지만 실질적인 연구는 시작단계 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 장내균총의 pyrosequencing이 활발히 진행 중이며 이를 이용한 IBD, 대장암 및 타 질환과 다각도 접근 ▪ 하지만 이들의 천연물질과의 연관성에 관한 연구는 많지 않음
천연물질을 이용한 대장암억제 연구현황 (암줄기세포규명)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 천연물질을 이용한 대장암 줄기세포에 관한 연구는 보고된 바 없음 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 천연물질을 이용한 대장암 줄기세포에 관한 연구는 보고된 바 없음
천연물질을 이용한 총체적 장 건강 연구현황	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 최근 서구화된 식문화로 건강이 위협받고 있는 만큼 총체적 장 건강을 위한 연구가 속히 추진되어야 하는 실정 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 여러 만성 질환에 노출될 가능성이 높은 식문화 국가들은 우리나라보다 앞서 총체적 장 건강에 대한 연구를 해왔으며 그 중요성을 인지함

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절: 조릿대의 만성염증 장 질환에서의 건강기능성 및 항염기능과 기전 규명

제주조릿대의 항염기능성 효과와 그 기전을 in vitro 실험을 통해 확인하여 조릿대의 건강기능성 효과와 기전을 규명한다. 또한, 조릿대의 만성염증 장 질환의 예방 및 개선효과를 DSS를 이용한 in vivo 마우스모델을 통하여 확인하여 실증적이고 과학적 자료를 제시한다.

1. 연구목표

- 가. 대식세포와 장의 epithelial cell을 co-culture 하는 in vitro 실험을 통해 조릿대의 항염기능성 효과와 그 분자적 기전을 규명한다.
- 나. DSS를 이용하여 만성장염 질환 마우스모델을 유도한다.
- 다. in vivo 모델을 통해 조릿대의 장상피세포의 세포분열정도에 미치는 영향을 분석한다.
- 라. in vivo 모델을 통해 조릿대의 항면역 효과와 그 기전을 분석한다.

2. 연구방법

가. in vitro 실험을 통한 조릿대잎 추출물과 그 기능성분의 항면역 효과와 그 분자적 기전 규명

- (1) 조릿대잎 추출물 제조: 조릿대 추출물은 제주대 제주조릿대 산학협력단에서 공급받아 사용하였다. 냉동건조한 물 추출물 또는 에탄올 추출물을 공급받으며, HPLC를 이용한 분획물들의 분석을 통해 지표물질 함유 분획물을 확인하고 함유성분 분리하였다.
- (2) 세포 실험: epithelial cell인 CaCo2와 대식세포 Raw 264.7 (or differentiation시킨 U937) co-culture하여 장의 환경과 비슷하게 만든 후, LPS를 처리하여 염증반응을 일으킨 후, 조릿대추출물 또는 기능성분을 처리하였다.
- (3) 염증마커측정: 조릿대의 항염효과를 nitric oxide (NO) 발생억제, TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE2 생성억제효과 등을 cell media에서 ELISA로 분석하고, NF-kB p65, COX-2, iNOS 발현 등을 cell lysate 또는 nuclear extraction에서 western blot을 이용하여 분석하였다. 또한 TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA 발현에 미치는 효과를 Real time PCR을 이용하여 분석하였다.

나. in vivo 마우스 모델을 이용하여 만성염증 장 질환 유도

- (1) 실험 대상 및 식이공급: 만성염증 장 질환의 대표적인 실험모델로 알려진 Dextran Sulphate Sodium (DSS) 모델을 사용하였다 (Copper, 1993). C57BL/6 mouse (5주령)을 구입하여 조릿대 추출물을 정상대조군, 만성염증성 장 질환 대조군, sulfasalazine (STZ, 대표적 장질환 약물), 장 질환 유도 후 조릿대 추출물 투여군 등으로 나누었다. 만성염증 장

질환은 3% DSS를 물에 섞어 7일 동안 먹인 후 21일 동안에는 다시 물을 먹임으로써 만성 염증 장 질환을 유도하였다.

- (2) 임상적 염증 정도 측정: 몸무게, 혈변, 변의 농도 측정하였다.
- (3) 기관, 조직의 길이, 무게측정: 대장의 길이, 무게를 측정하였다.
- (4) 대장의 조직형태학적 분석: 대장 샘플의 세 지역(proximal, middle, rectum)으로 각각 조직을 분리하여 4%포르말린에 고정시킨 후, 파라핀에 embedding 시킨 후 슬라이드를 만들고, 또 다른 절반의 조직은 액체질소에 넣어서 냉동시켰다. 대장 조직을 10% formaldehyde 용액에 24시간 고정한 후, 파라핀 블록 제작 후, 박절하여 hematoxylin-eosin (H&E)으로 염색하여 염증의 여부, 염증의 정도, crypt damage를 정도에 따라 점수를 매겨 염증의 정도를 측정하였다.(Surface epithelial loss, Crypt destruction, follicle aggregates정도, percentage of area affected by inflammation)
- (5) 세포분열마커 측정: 세포 분열과 염증 과정에 중요한 역할을 하는 nuclear protein인 Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)로 immunohistochemistry를 함으로써 세포 분열의 정도를 측정하였다. PCNA 염색은 streptavidin biotin peroxidase method를 이용하였다.
- (6) 염증마커 측정: 혈청에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 발생을 ELISA를 이용하여 분석하고, 대장 조직에서 점막에서의 면역세포의 부착과 침투시키는 데에 역할을 하는 Chemokine인 Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)과 염증성 cytokine인 Tumor necrosis factor(TNF- α)의 mRNA 발현을 real time PCR로 측정하고 COX-2, iNOS, p65 등을 western blot으로 측정하였다. 장 염증을 조절하는 superfamily of nuclear receptor의 일종인 PPAR γ 단백질 발현량도 western blot으로 측정하였다.
- (7) 신호전달체계 기전 분석: 염증 단계에 관여하는 MAPK 중 p38, p-ERK, p-JNK의 발현을 western blot으로 분석하였다.
- (8) 결과분석: 통계학적 분석은 SPSS ver 17.0통계 프로그램을 사용하여 대조군과 실험군들 사이의 통계적인 유의성을 검증하였다($p < 0.05$).

3. 연구결과

가. In vitro 조릿대잎 추출물과 활성물질(p-coumaric acid, tricin)의 dose별 독성실험

- (1) 세포 독성 측정 결과: Co-culture system의 대식세포에서 조릿대잎 추출물의 dose별, 조릿대잎의 활성 물질별 세포 독성 측정결과 LPS유도와 조릿대잎 추출물, 조릿대잎의 활성 물질 (tricin, p-coumaric acid) 처리가 대식세포의 세포독성에 영향을 주지 않는 것으로 측정되었다(Figure 5).

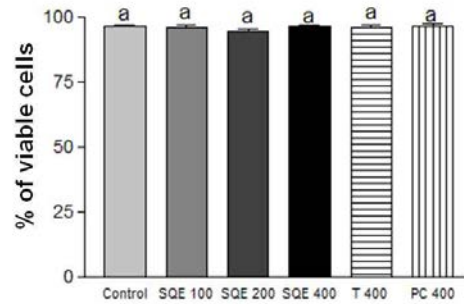


Figure 5. Effect of SQE on cell toxicity of Raw 264.7 cells in co-culture system.

RAW 264.7 cells were treated with various doses of SQE (100, 200 and 400 $\mu\text{g/ml}$) and bioactivecompound (tricin, p-coumaric acid). The cell numbers were counted with a hemocytometer after staining with trypan blue for enumerating viable cells. All data were repeated at least 3 times. One-way ANOVA was implemented using Turkey's post-hoc test ($\alpha = 0.05$).

나. In vitro 조릿대잎 추출물과 활성물질(p-coumaric acid와 triclin)의 염증마커 활성화에 미치는 효능

LPS로 염증을 유도한 co-culture system에서 조릿대의 다양한 농도 처리에 따른 Raw 264.7에서 발현되는 염증매개물질인 NO, PGE_2 , IL-1 β , IL-6, IL-6 (Figure 2)의 활성을 ELISA를 통해 측정하였다 (Figure 6).

- (2) NO측정 결과: Co-culture media에서 NO측정 결과 LPS로 염증을 유도한 군들에서는 NO의 활성의 모두 유의적으로 증가하였고, 조릿대잎 추출물을 처리한 모든 군에서 LPS control군에 비해 NO 활성이 감소하였다(Figure 6A). 특히 LPS control, 조릿대잎 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$, 조릿대잎 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 세 군은 dose dependent하게 감소하였다.
- (3) PGE_2 측정 결과: LPS로 염증을 유도한 군에서 증가한 PGE_2 활성은 조릿대잎 처리함으로써 감소하였으며, 조릿대잎 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 군은 조릿대잎 추출물을 처리하지 않은 그룹에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다(Figure 6B).
- (4) IL-1 β 측정 결과: LPS에 의해 증가된 IL-1 β 는 조릿대잎 추출물을 처리함에 따라 감소하였으며, 특히 조릿대잎 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 처리한 군은 LPS로 염증을 유도하지 않은 control수준 까지 유의적으로 IL-1 β 의 수준을 억제하는 것으로 측정되었다(Figure 6C).
- (5) IL-6측정 결과: 염증반응에서 pro-inflammatory 인자로 중요한 역할을 하는 IL-6의 분비는 조릿대잎 추출물의 처리에 따라 감소하였으며, 조릿대잎 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 군은 LPS 콘트롤군과 유의적 차이가 없었으나, 200 $\mu\text{g/ml}$ 와 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 조릿대잎 추출물을 처리한 군은 유의적 차이를 보여주었다(Figure 6D).

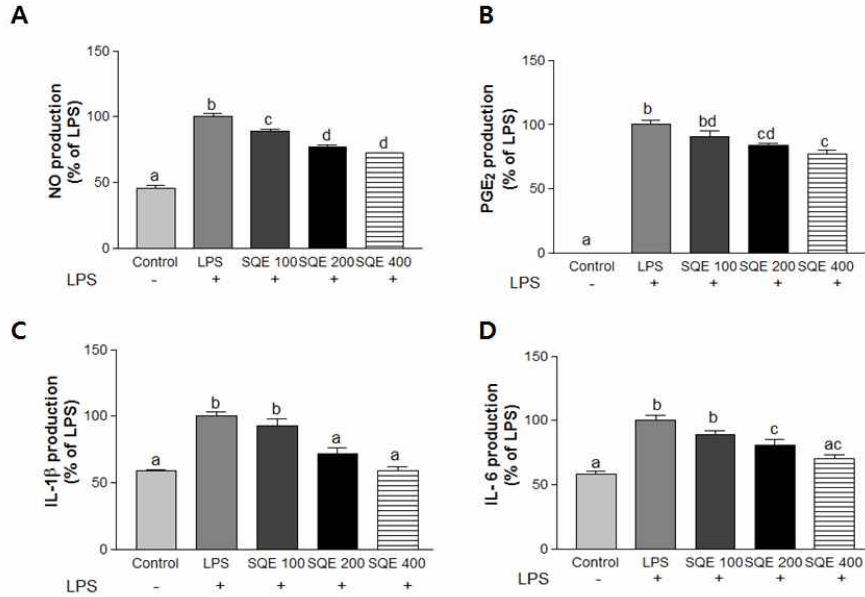


Figure 6. Effect of SQE on inflammatory cytokines in co-culture system.

(A) NO, (B) PGE2, (C) IL-1 β , (D) IL-6. Cells were treated with various doses of SQE. Co-culture media was collected and analyzed using commercial ELISA kits. Data was analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$).

다. In vitro 조릿대잎 추출물과 활성물질(p-coumaric acid와 tricin)의 염증마커 mRNA 발현에 미치는 효능

LPS로 염증을 유도한 co-culture system에서 조릿대의 다양한 농도 처리에 따른 Raw 264.7에서 발현되는 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해서 측정하였다(Figure 7A).

- (1) in vitro 조릿대 잎 추출물의 TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA 발현에 미치는 효과: LPS의 염증 유도로 증가된 TNF- α 는 RT-PCR을 통해 측정한 결과, 조릿대잎 추출물 100 μ g/ml 에서는 억제 효과가 거의 없었으나, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml 농도에서는 TNF- α 의 mRNA 감소가 더 많이 일어난 것으로 측정되었다(Figure 7A). IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현이 LPS 유도로 크게 증가하였으며 조릿대를 서로 다른 농도로 처리하였을 때 조릿대잎 추출물 200 μ g/ml, 400 μ g/ml에서 억제되는 경향을 보이기는 하였으나 그 효과가 크지 않은 것으로 나타났다.
- (2) in vitro 조릿대잎 추출물과 활성물질(p-coumaric acid와 tricin)의 TNF- α , IL-1 β , IL-6 발현, IL-6 mRNA 발현에 미치는 효과: LPS의 염증 유도로 증가된 TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA 발현을 p-coumaric acid, tricin 성분을 처리한 후 RT-PCR을 통해 측정한 결과, 억제 효과가 크지 않은 것을 알 수 있었다.

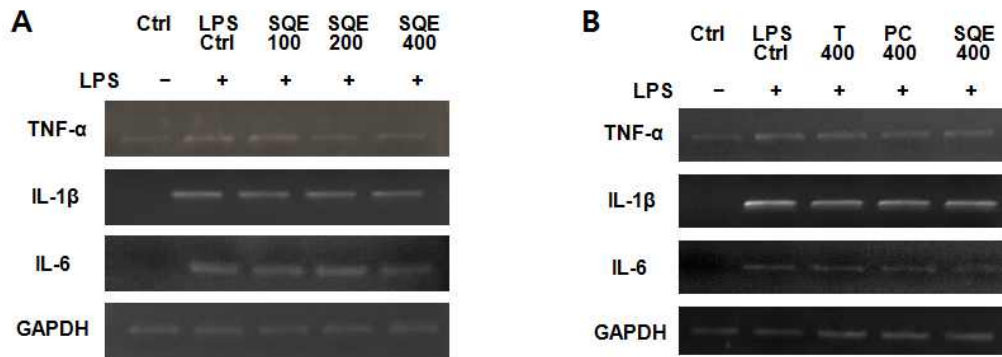


Figure 7. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on mRNA expression of inflammatory cytokines

TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA expression were analyzed using RT PCR. (A) SQE dose dependant group, (B) SQE, p-coumaric acid, tricin treatment. GAPDH was used as a loading control.

라. In vivo 동물모델의 임상적 측정 결과

- (1) 몸무게 변화: 총 4주의 실험기간 동안 동물 몸무게의 변화를 나타낸 추이 그래프는 **Figure 8A**와 같다. DSS를 이용해 대장염을 유도하지 않은 control에 비해서 DSS로 대장염을 유도한 나머지 군에서 몸무게가 감소되는 경향을 보였으며 이는 대장의 염증으로 인한 증상으로 판단된다. 특히 항생제를 처리한 SSZ군 이외의 DSS control, DSS 와 조릿대잎 추출물을 경구 투여한 군은 DSS유도하지 않은 control군과 비교했을 때 유의적으로 몸무게 감소가 일어난 것으로 측정되었다. 이는 조릿대잎 추출물이 비만억제효과가 있음을 보고한 선행연구들의 결과와 일치하는 결과로 보였다.
- (2) 대장 무게: DSS control군은 control 군에 비해 대장무게가 감소하는 경향을 보였고, 조릿대잎 추출물 군과 SSZ 군에서는 다시 대장무게를 회복하는 경향을 보였으나, 동물 희생 전 날 24시간 절식을 시켰음에도 불구하고, 대장에 잔변이 제거 되지 않아 정확한 대장 무게의 측정을 불가능하여 대장 무게는 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(**Figure 8B**).
- (3) 대장 길이: DSS로 대장 염증을 유발한 DSS군의 경우 염증을 유도하지 않은 군에 비해서 대장의 길이가 짧았고(**Figure 8C & D**), 장 출혈의 흔적도 육안으로 확인할 수 있었다. 조릿대잎 추출물을 경구투여한 군의 경우, 대장의 길이가 DSS만 먹인 군 보다는 장 길이를 회복한 것으로 측정 되었고, 특히 조릿대를 300 mg/kg b.w. 경구 투여시킨 군은 대장 염증을 유도하지 않은 수준까지 대장길이를 회복하였다.
- (4) 임상적 염증척도 (Disease Activity Index, DAI score): 실험기간 동안 주 3회에 걸쳐 대장 염증의 척도로 여겨지는 실험동물의 혈변 여부, 변의 농도와 몸무게 변화를 측정하여 이를 수치화한 DAI score를 통계적으로 분석한 결과 DSS로 대장염증을 유도하지 않은 control 군은 DAI score가 0점 이었고, DSS control군은 나머지 4개의 그룹과 비교했을 때 유의적

으로 DAI score가 높았다(Figure 9). 통계적 유의성 검증 결과 조릿대잎 추출물 100 mg/kg b.w., 300 mg/kg b.w.을 경구투여한 군에서는 항생제를 먹인 군과 비슷한 수준 까지 장의 염증 정도가 완화되는 결과를 얻을 수 있었다.

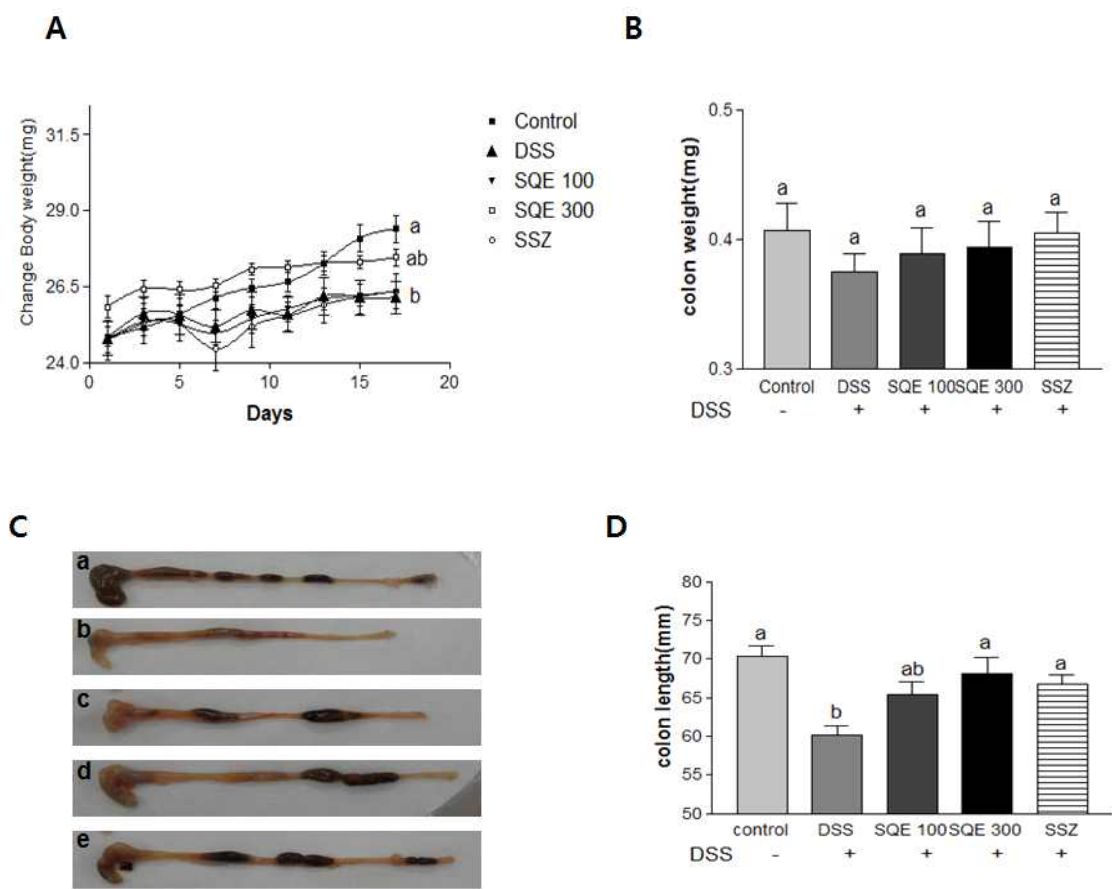


Figure 8. Effect of SQE supplementation on bodyweight and colon length in DSS-induced chronic colitis mice. (A) Body weight changed was recorded every 2 times per week. (B) The colon weight was measured and compared among five experimental groups. (C) Representative pictures of colon of each group of mouse. (D) The colon length was measured and compared among five experimental groups. Data was analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$)

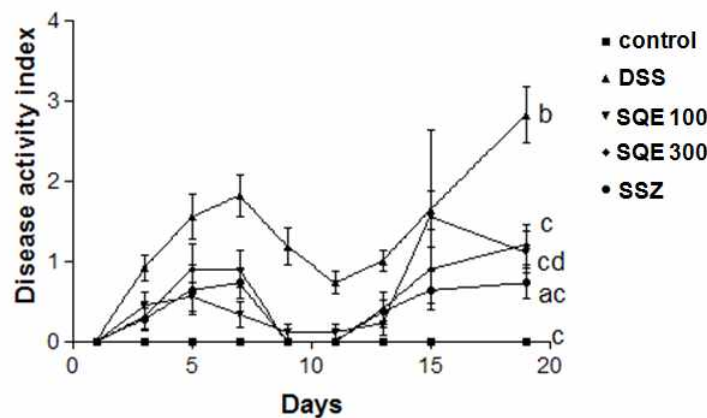
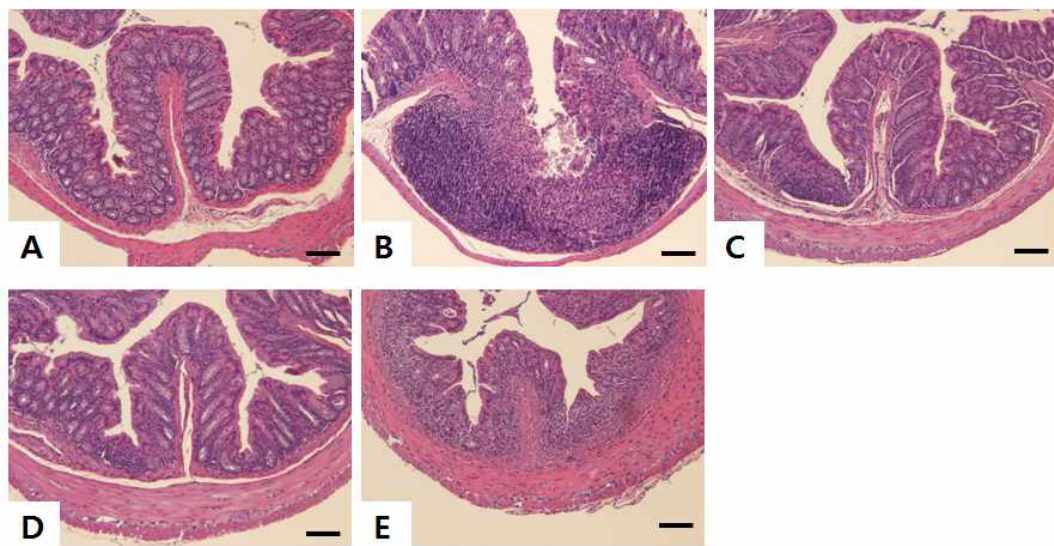


Figure 9. Effect of SQE supplementation on DAI score.

DAI was evaluated at average of score of clinical parameters as body weight changes, rectal bleeding and stool consistency or diarrhea. Data was analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$)

마. In vivo 동물모델 대장의 조직형태학적 분석

(1) H&E staining: 대장의 조직형태학적 분석을 위해 해부 당시 포르말린에 고정된 대장의 H&E staining을 시행하였다. 그 결과 DSS염증유도하지 않은 control 군은 정상적인 대장의 histological architecture와 cytology를 보였고(**Figure 10A**), DSS 유도한 군은 장의 epithelial layer가 무너지고 경계를 잃었으며 극심한 염증에 따른 inflammatory cells의 침투를 관찰할 수 있었다(**Figure 10B**). DSS군에서 보인 심각한 layer와 조직형태학적 파괴는 조릿대잎 추출물과 항생제의 처리로 인해 완화되고 감소된 것을 볼 수 있는데 (**Figure 10C, D, and E**) 이는 DSS군에 비해 조릿대와 항생제의 처리로 염증의 sign이 적어지고, 상피세포와 crypt의 regeneration이 관찰되었다. 또한 조직염색학적 분석에 근거하여 염증 정도를 점수화하여 비교한 그래프는 **Figure 10F**와 같다. 조릿대잎 추출물과 항생제를 처리한 군에서 염증정도와 crypt damage가 DSS 군에 비해 회복된 것을 볼 수 있으며 특히 조릿대잎 추출물을 투여한 경우가, SSZ만을 투여한 경우보다 전반적인 회복정도가 더 좋은 것으로 측정되었다.



F

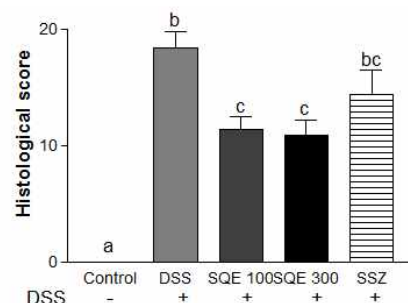


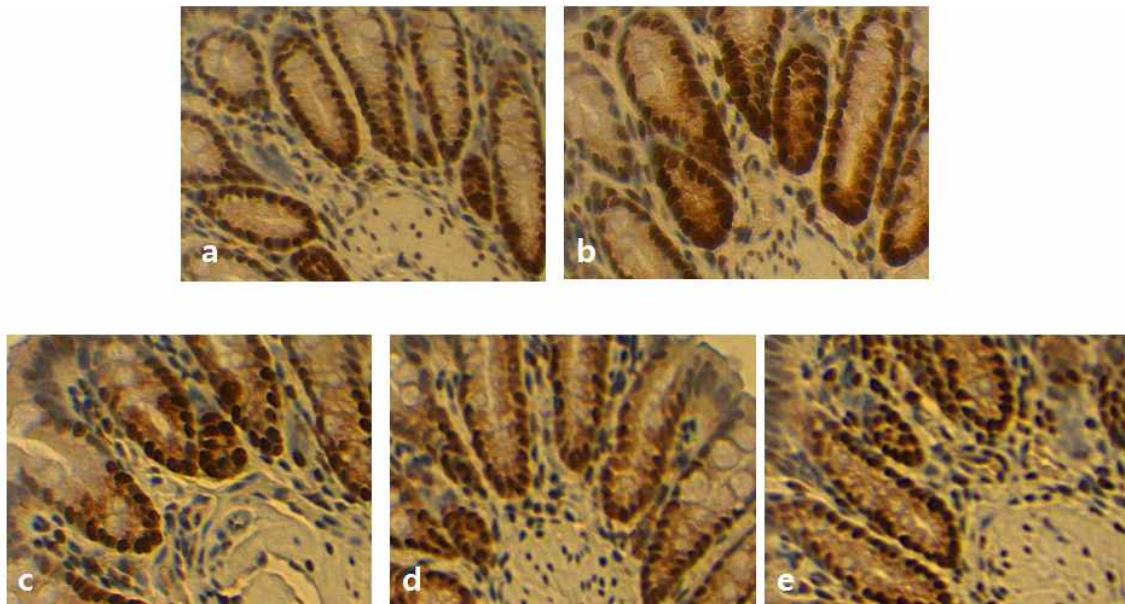
Figure 10. Histopathology sections of colonic lesions from mice fed SQE or SSZ.

(A) control, (B) DSS, (C) DSS + SQE 100 mg/kg b.w., (D) DSS + SQE 300 mg/kg b.w., (E) DSS + SSZ 100 mg/kg b.w.. HE stain, Bar; 50µm. (F) Histological score. Data was analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$)

마. 조릿대잎 추출물 투여에 따른 동물모델의 세포분열마커의 변화 분석 결과

- (1) 세포분열마커 측정: 세포의 분열과 염증과정에 중요한 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)의 발현이 조릿대잎 추출물의 처리 여부에 따라 변화하는지를 규명하기 위하여 쥐의 대장 조직을 면역염색 (Immunohistochemistry)한 결과는 **Figure 11A**와 같음. 사진에서 볼 수 있듯이 DSS로 염증을 유도한 군에서 PCNA의 발현이 control에 비해 크게 증가한 것을 볼 수 있고, 이는 조릿대잎 추출물 100 mg/kg b.w.를 경구투여한 군에서는 많은 차이가 없었으나, 조릿대잎 추출물 300 mg/kg b.w.를 경구투여 한 군과 항생제 군에서 PCNA의 발현이 통계적으로 유의한 것을 볼 수 있었다(**Figure 11B**).

A.



B

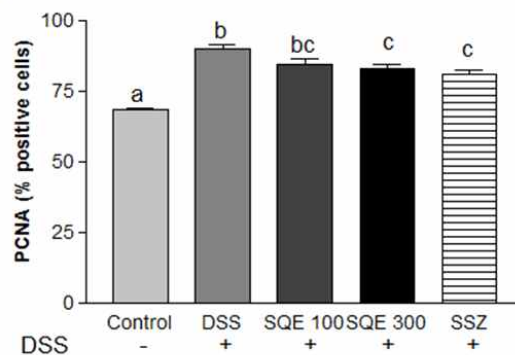


Figure 11. Effect of SQE on PCNA expression by immuno-histochemistry method in the animal model of DSS-induced colitis

A. (a) Control, (b) DSS, (c) DSS + SQE 100mg/kg b.w. (d) DSS + SQE 300mg/kg b.w. (e) DSS + SSZ 100mg/kg b.w. 400x magnification.
 B. Quantified by PCNA positive cell counting. Data was analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$)

사. 조릿대잎 추출물 투여에 따른 동물모델의 염증성 매개인자 혈중 분비 측정결과

- (1) TNF- α 측정결과: 동물의 희생당시 분리한 serum에서부터 측정한 TNF- α 의 결과는 **Figure 12A**와 같다. DSS로 염증을 유도한 군에서 혈액 내의 TNF- α 분비가 유의적으로 많았으며, 이는 조릿대잎 추출물 100 mg/kg b.w., 300 mg/kg b.w.와 항생제를 투여시킴으로써 염증을 유도하지 않은 군의 수준까지 낮아지는 것으로 나타났다.
- (2) IL-6 측정결과: 혈중 IL-6의 분비량을 측정 한 결과, DSS를 유도한 군에서 크게 증가한 IL-6의 분비가 조릿대잎 추출물과 항생제를 투여한 군에서 감소하였다. 조릿대잎 추출물 100 mg/kg b.w.을 투여한 군은 DSS를 유도하지 않은 control군과 비슷한 수준으로 감소하기는 하였으나 DSS군과 비교했을 때 통계적인 유의성은 없었고, 조릿대잎 추출물 300 mg/kg b.w.군을 투여한 군에서 통계적인 유의성을 보이며 감소한 것으로 나타났다 (**Figure 12B**).

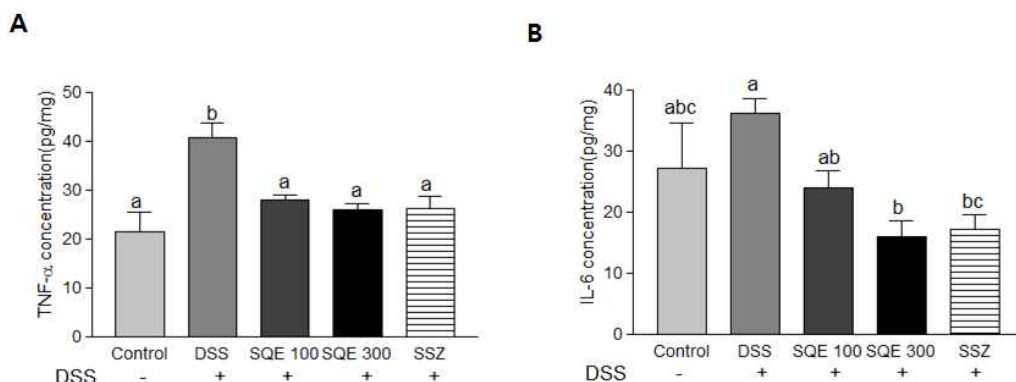


Figure 12. Effect of SQE supplementation on serum inflammatory cytokines

Effect of SQE on serum TNF- α (A) and IL-6 (B) were analyzed using commercial ELISA kit. Data was analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$).

아. 조릿대잎 추출물 투여에 따른 동물모델의 염증성 지표의 단백질 발현 측정결과

- (1) COX-2 단백질발현: 대장 조직에서 분리한 단백질로 염증성 지표의 단백질 수준을 측정하기 위하여 western blot 실험을 수행하였다. 그 결과, DSS로 염증을 유도한 군에서 COX-2가 발현되어 염증이 유도됨을 확인할 수 있었고, 이는 조릿대잎 추출물과 항생제를 투여한 군에서 유의적으로 감소한 것으로 확인되었다(**Figure 13**).

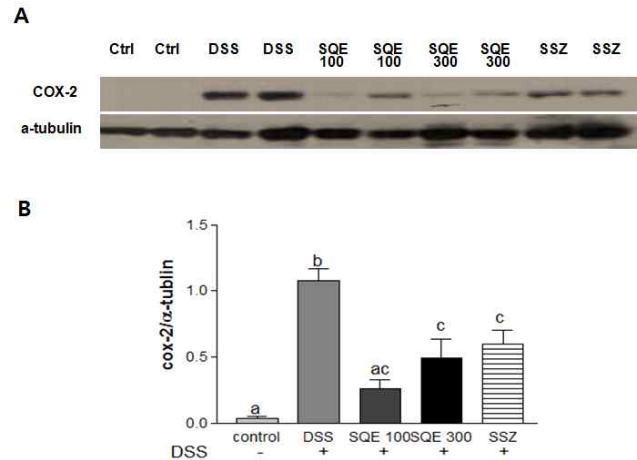


Figure 13. Effect of SQE supplementation on expression of COX-2

(A) Protein expression levels of COX-2 were assessed by western blot. α-tubulin was used as a loading control. (B) Results were quantified by densitometry and analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$).

(2) iNOS 단백질 발현: iNOS의 단백질 발현을 비교 한 결과 DSS로 염증을 유도한 군에서 iNOS 발현이 증가되어 염증이 유도됨을 확인할 수 있었고, 이는 조릿대잎 추출물과 항생제를 투여한 군에서 유의적으로 억제되었다(Figure 14).

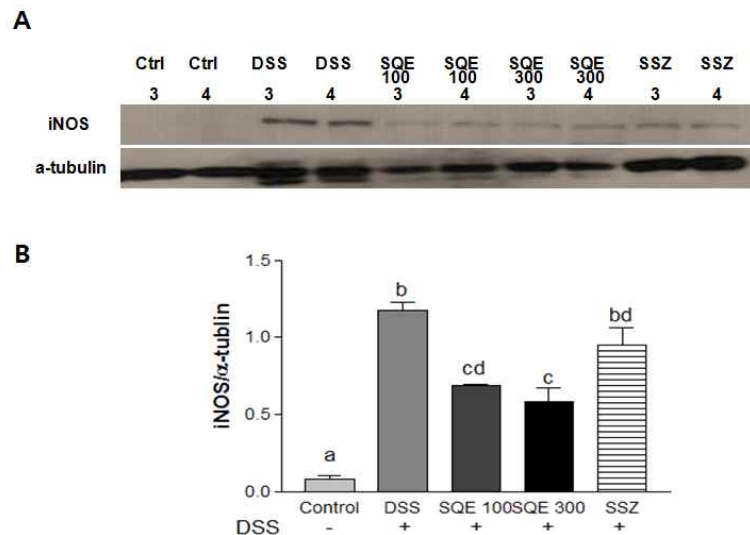


Figure 14. Effect of SQE supplementation on expression of iNOS

(A) Protein expression levels of iNOS were assessed by western blot. α-tubulin was used as a loading control. (B) Results were quantified by densitometry and analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$).

(3) PPAR-γ 단백질 발현: 대장 염증을 조절하는 주요한 인자인 PPAR-γ의 단백질 발현을 그룹간에 비교한 결과 DSS의 유도로 크게 증가한 PPAR-γ의 단백질 발현이 조릿대잎 추출물과 항생제군 모두에서 유의적으로 감소하였다. 특히, PPAR-γ를 억제한 수준이 DSS로 염증을 유도하지 않은 정도까지 억제되어 본 연구를 통해 조릿대의 효능을 확인하였다

(Figure 15).

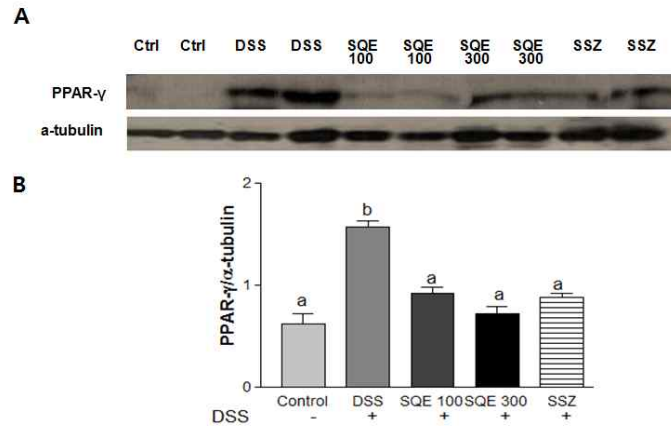


Figure 15. Effect of SQE supplementation on expression of PPAR-γ

(A) Protein expression levels of PPAR-γ were assessed by western blot. α-tubulin was used as a loading control. (B) Results were quantified by densitometry and analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$).

(4) p-ERK 단백질 발현: 염증이 일어나는 단계에 관련한다고 알려져 있는 signaling pathway를 규명하기 위해 ERK의 phosphorylation 정도를 western blot을 이용해 측정한 결과는 **Figure 16**와 같다. DSS로 염증을 유도한 군에서 ERK의 phosphorylation이 크게 증가하였고 이는 조릿대 잎 추출물과 항생제의 투여에 따라 감소하는 경향을 보였으나 DSS군과 통계적으로 유의한 반면, 항생제군은 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

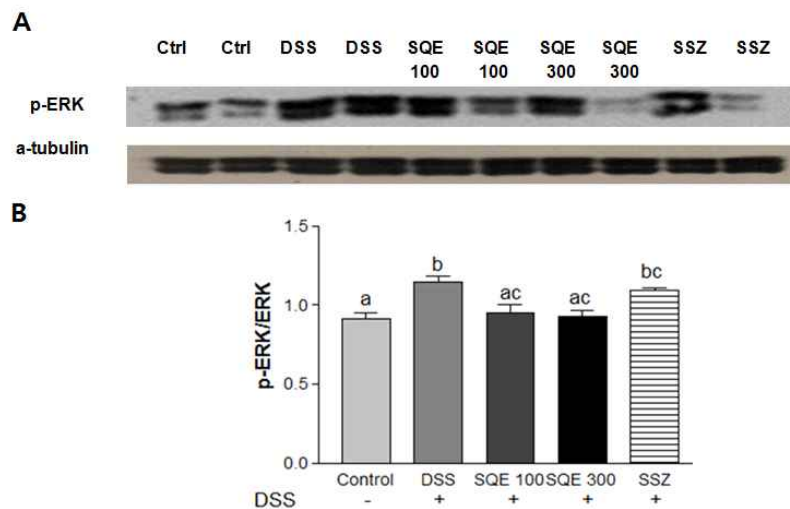


Figure 16. Effect of SQE supplementation on expression of p-ERK

(A) Protein expression levels of p-ERK were assessed by western blot. Total ERK was used as a loading control. (B) Results were quantified by densitometry and analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$).

(5) p-JNK 단백질 발현: 염증반응 단계에 ERK와 함께 관여하는 또 다른 유전자인 JNK의 phosphorylation 정도를 확인한 결과는 **Figure 17**과 같다. DSS로 염증을 유도한 군에서

p-JNK의 단백질 발현이 증가되어 염증이 유도됨을 확인할 수 있었고, 이는 조릿대잎 추출물과 항생제의 처리로 감소하는 경향을 나타내었다. 통계적인 유의성을 검증한 결과 조릿대 300 mg/kg b.w. 군과 항생제 군이 DSS군과 비교해서 유의성을 보였고, 항생제보다도 300 mg/kg b.w. 군에서 JNK의 phosphorylation 의 더 큰 감소를 보이는 것으로 확인되었다.

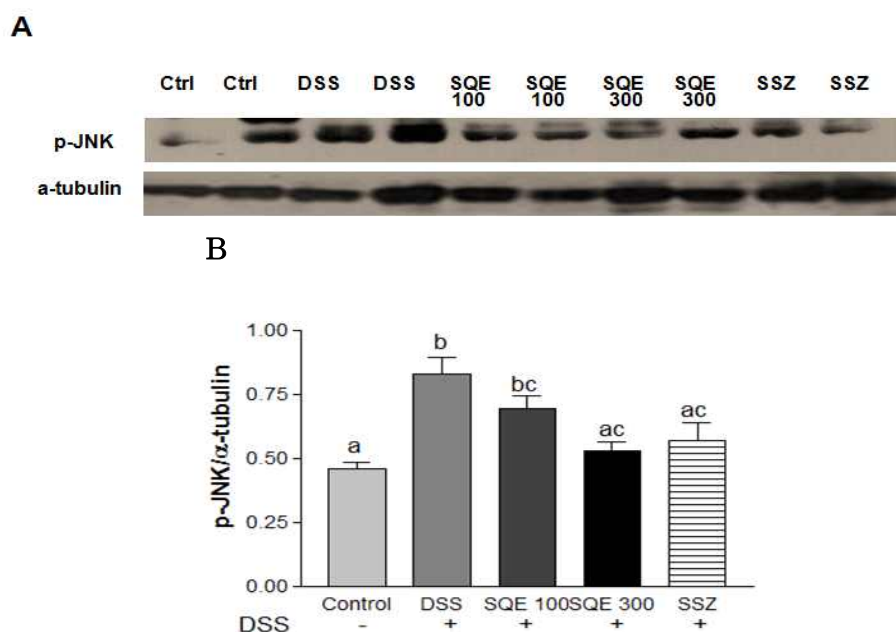


Figure 17. Effect of SQE supplementation on expression of p-JNK

(A) Protein expression levels of p-JNK were assessed by western blot. α-tubulin was used as a loading control. (B) Results were quantified by densitometry and analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$).

(6) p38 단백질 발현: 염증반응에 작용하는 signaling pathway에 대한 조릿대잎 추출물의 억제 효과를 규명하기 위해 p38의 단백질 발현을 측정한 결과는 **Figure 18**와 같다. DSS군에서 증가된 p38의 단백질 발현은 조릿대와 항생제의 처리로 감소하는 경향을 보였다.

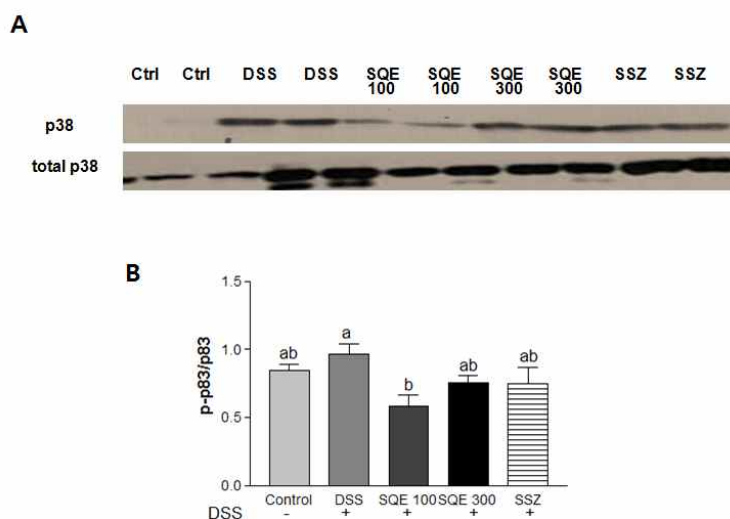


Figure 18. Effect of SQE supplementation on expression of p38.

(A) Protein expression levels of p38 were assessed by western blot. Total p38 was used as a loading control. (B) Results were quantified by densitometry and analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$).

자. 조릿대잎 추출물 투여에 따른 동물모델의 염증성 지표의 mRNA 발현 측정결과

DSS로 동물의 대장 염증을 유도한 모델에서 조릿대잎과 경구투여에 따른 동물의 대장세포에서 분리한 샘플로부터의 TNF- α 와 MCP-1 mRNA 측정 결과는 다음과 같다.

- (1) TNF- α mRNA 발현: DSS군에서 증가한 TNF- α mRNA 이 조릿대 추출물과 항생제의 경구투여로 감소한 것을 알 수 있었으며, 통계적 검증 결과, 조릿대잎 추출물 100 mg/kg b.w.와 300 mg/kg b.w. 군에서 DSS를 유도하지 않은 control 수준까지 억제된 결과를 도출하여, 조릿대의 효능을 확인하였다(Figure 19).

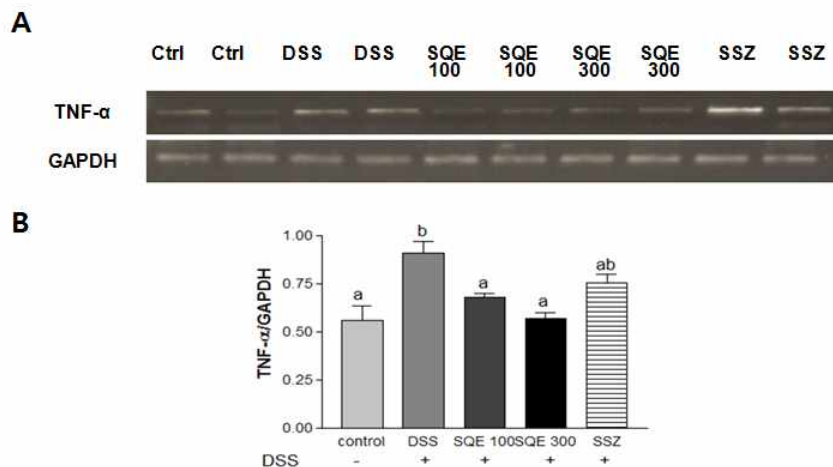


Figure 19. Effect of SQE supplementation on mRNA Expression of TNF- α in the colon tissue

TNF- α was assessed by RT-PCR and GAPDH was used as a internal control. (B) Results were quantified by densitometry and analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$).

- (2) MCP-1 mRNA 발현: 대장 점막조직에서 면역세포의 부착과 침투에 관여하는 인자인 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)에 대한 조릿대의 효능을 RT-PCR로 실험한 결과 DSS의 유도에 따른 MCP-1 mRNA 변화가 없었으며, 조릿대잎 추출물이나 항생제를 투여한 군에서 MCP-1 mRNA의 변화가 없는 것으로 나타나 본 연구에서는 모든 군에서 비슷한 정도로 MCP-1 mRNA가 발현되는 것으로 측정되었다(Figure 20).

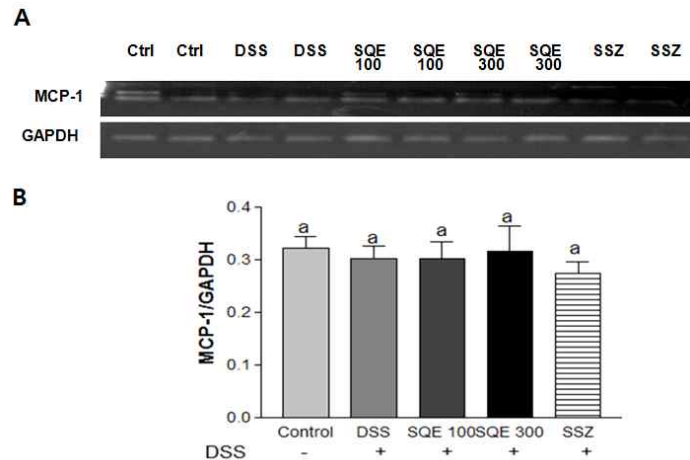


Figure 20. Effect of SQE supplementation on mRNA Expression of MCP-1 in the colon tissue

(A) MCP-1 was assessed by RT-PCR. GAPDH was used as a internal control. (B) Results were quantified by densitometry and analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison($P < 0.05$).

2절 : 조릿대의 암줄기세포 타겟의 항대장암 효과 규명

제주조릿대의 항 대장암 효과 중 암줄기세포를 타겟으로 하는 효과를 규명하기 위해 조릿대가 암줄기세포 성격 각각에 미치는 영향을 in vitro 세포실험과 in vivo xenograft 모델을 이용하여 과학적이고 실증적인 데이터를 제시하였다.

1. 연구목표

- in vitro 실험을 통해 조릿대의 대장암 줄기세포 분화에 미치는 영향 규명
- in vitro 실험을 통해 조릿대의 대장암 줄기세포의 자가복제에 미치는 영향 분석
- in vitro 실험을 통해 조릿대의 대장암 줄기세포 타겟의 항 대장암 효과 분자적 기전 분석
- in vivo xenograft 모델을 통해 조릿대의 대장암 줄기세포 타겟의 대장암 생성억제에 미치는 영향을 규명

2. 연구방법

가. in vitro 실험을 통해 조릿대의 대장암 줄기세포 분화에 미치는 영향과 기전 규명

- 대장암줄기세포 분리: 사람 대장암 세포인 HCT-116, HT-29에서 암 줄기세포에서 발현되는 마커인 CD133, CD44를 모두 발현하고 있는 암 줄기세포를 fluorescence-activated cell sorting(FACS) technology를 통해 분리하였다.
- 대장암 줄기세포분화분석: 다양한 농도의 조릿대를 처리한 세포의 분화의 정도를 측정하기 위해서 Cytokeratin 20 발현을 분석하였다.

- (3) 줄기세포마커분석: CD133, DLK1, wnt/ β -catenin 등의 줄기세포 마커를 western blot을 이용하여 분석하였다.

나. in vitro 실험을 통해 조릿대의 대장암 줄기세포의 자가복제에 미치는 영향 분석

- (1) Clonogenic assay: 암 줄기세포의 자가 복제하는 특징을 측정하기 위해 clonogenic assay를 실시하였다. 6-well plate에 다양한 농도의 조릿대를 treat한 후 colony를 0.9% NaCl로 고정시킨 뒤, 크리스탈 바이올렛으로 염색을 하여 염색된 colony를 측정하였다.
- (2) Sphere formation assay: 암 줄기세포의 자가복제 능력을 측정하는 assay로써, sphere media에 암세포를 배양한다. 형성된 sphere의 개수를 셀 뿐 아니라, 크기를 측정함으로써 조릿대의 자가복제에 미치는 영향을 분석하였다.

다. in vivo xenograft 모델을 통해 조릿대의 대장암 줄기세포 타겟의 대장암 생성에 미치는 영향 규명

- (1) 실험 대상 및 식이공급: nude mice (5주령)을 구입하여 적응시킨 후, 대장암줄기세포를 sorting 하여 등 아래쪽에 피하주사로 주입시켰으며, 정상대조군, 종양대조군, 조릿대식이군, SSZ 군으로 나누어 3주간의 실험 식이를 섭취시킨 후 희생시켰다.
- (2) 몸무게, 식이섭취, 종양크기 측정: 몸무게, 식이섭취와 종양크기를 일주일에 두 번 측정하였다.
- (3) 종양발생정도, 줄기세포마커, 분화마커 분석: 종양조직에서 암조직을 분리하여 반으로 잘라 절반은 4% 포르말린에 고정시킨 후, 파라핀에 embedding 시킨 후 슬라이드를 만들고, 또 다른 절반의 종양조직은 액체질소에 넣어서 냉동하였다. 줄기세포마커 (CD133, DLK1, wnt/ β -catenin), 단백질 (immunohistochemistry, western blot 이용), mRNA 발현 (Real-time PCR)을 이용하여 분석하였다.
- (4) 대장암억제 기전분석: HIF-1 α , VEGF, DLK1, pERK 발현분석: 단백질 (western blot, immunohistochemistry 이용)과 mRNA (real-time PCR 이용) 발현을 측정하여 기전 규명하였다.
- (5) 결과분석: 통계학적 분석은 SPSS ver 17.0통계 프로그램을 사용하여 대조군과 실험군들 사이의 통계적인 유의성을 검증하였다($p < 0.05$).

3. 연구결과

가. In vitro 실험을 통한 조릿대의 대장암 줄기세포 분화에 미치는 영향과 그 기전 규명

- (1) HT-29, HCT-116 대장암세포에서 암줄기세포 분리: Human 유래 대장암 세포인 HT-29,

HCT-116 두 세포주에서 FACS 시스템을 통해 줄기세포 마커인 CD133, CD44를 모두 발현하고 있는 암 줄기세포를 분리하였다. 그 결과 HT-29, HCT-116 두 세포 모두 80% 이상 CD133+/CD44+ double staining이 되는 결과를 확인하였고(Figure 21), 본 연구의 모든 in vitro, in vivo 실험에서는 상위 20% 이내의 double staining 이 된 대장암 세포를 선택 하여서 실험을 진행하였다.

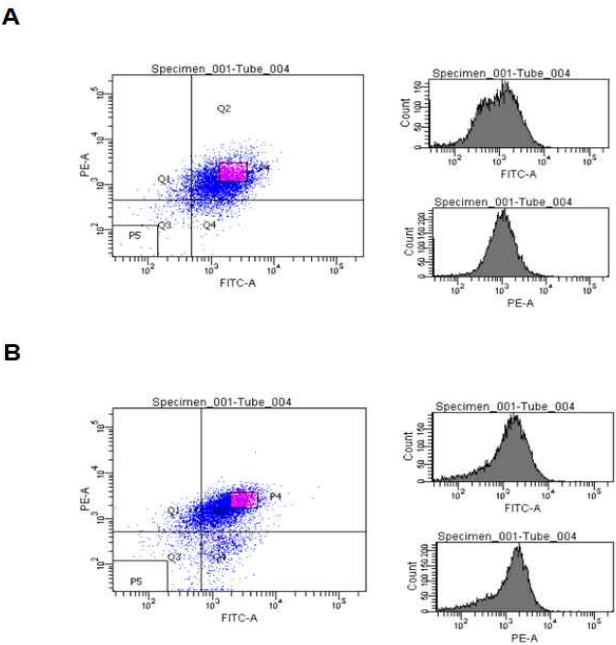
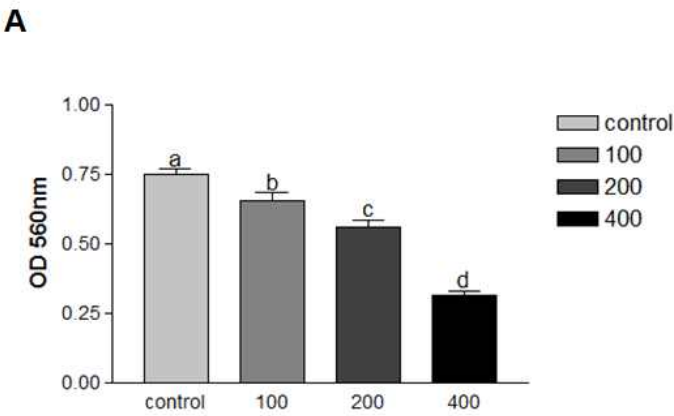


Figure 21. HT-29 and HCT-116 cells were double-stained and sorted by fluorecense-activated cell sorting (FACS) system. Representative diagrams of flow cytometry analysis of CD133+/CD44+ expression in (A) HT-29, and (B) HCT-116 human colon cancer cells.

(2) cell viability 측정결과: MTT assay를 이용해 조릿대잎 추출물의 대장암줄기세포 cell viability에 미치는 효과를 측정 한 결과, HT-29, HCT-116 두 세포주에서 모두 조릿대잎을 처리하지 않은 군에 비해 세포의 성장이 억제된 것으로 나타났으며, 조릿대의 처리 농도에 따라 cell viability 가 통계적으로 유의하게 감소되었다.(Figure 22).



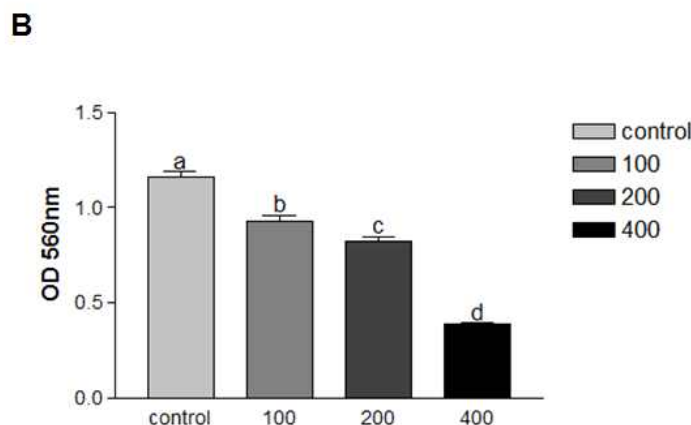


Figure 22. Cell viability of HT-29 and HCT-116 with treatment of SQE.

Cells were exposed to various concentrations of *Sasa quelpaertensis* extract (0, 100, 200, or 400 µg/ml) for 48 h. (A) HT-29 cells, (B) HCT-116 cells. Bars represented the means \pm SEM. Bars labeled with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

- (3) Cytokeratin 20 단백질 발현 : 암줄기세포의 분화를 유도는 암줄기세포적 성격을 잃는 것을 의미하며, Cytokeratin 20은 대장암 줄기세포 분화지표로 알려져있다. 따라서, 본 실험에서는 HT-29와 HCT-116의 세포에서 Cytokeratin 20 단백질의 수준을 측정하기 위하여 western blot 실험을 수행하였다. 그 결과, 조릿대잎 추출물 (SQE) 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml 농도와 p-coumaric acid, triclin을 추출물 300 ug/ml에 포함되어 있는 농도로 계산하여 처리하였을 때 control에 비해 Cytokeratin 20 발현이 up-regulate 되었으며, 활성 물질을 단독으로 처리했을 때 보다 조릿대잎 추출물을 처리하였을 때 Cytokeratin 20이 효과가 더 컸음을 확인할 수 있었다(Figure 23).

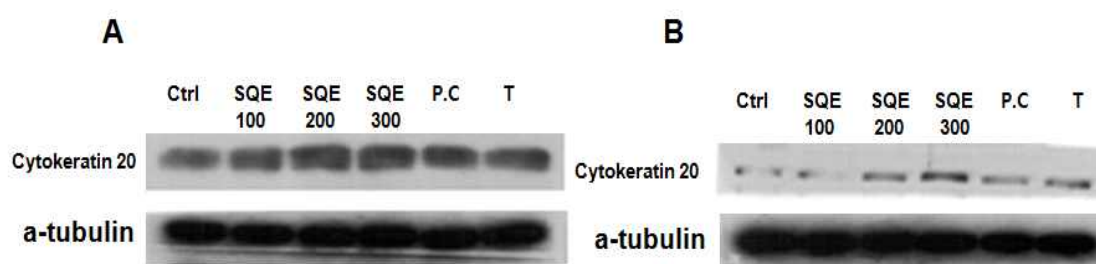


Figure 23. Effect of SQE, p-coumaric acid, and triclin on expression of Cytokeratin 20.

Protein expression levels of Cytokeratin 20 were assessed by western blot. Cells were exposed to various concentrations of SQE (0, 100, 200, or 300 µg/ml), PC, triclin for 8 d. Cell lysates were subjected to western blotting to detect protein expression of cytokeratin 20 and α -tubulin was used as a loading control. (A) HT-29 cells, (B) HCT-116 cells. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quelpaertensis* leaf extract; P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

나. 제주 조릿대잎 추출물과 활성물질의 대장암줄기세포마커의 단백질 발현 억제 효능

- (1) DLK1 발현 측정: HT-29와 HCT-116 대장암 세포에서 암 줄기세포 마커인 DLK1의 단백질 수준을 western blot을 이용하여 측정하였다. 그 결과, p-coumaric acid와 tricin 처리군에서는 control과 큰 차이를 보이지 않으나 조릿대잎 추출물을 처리했을 때 DLK1의 단백질 발현이 크게 감소하였다(Figure 24).

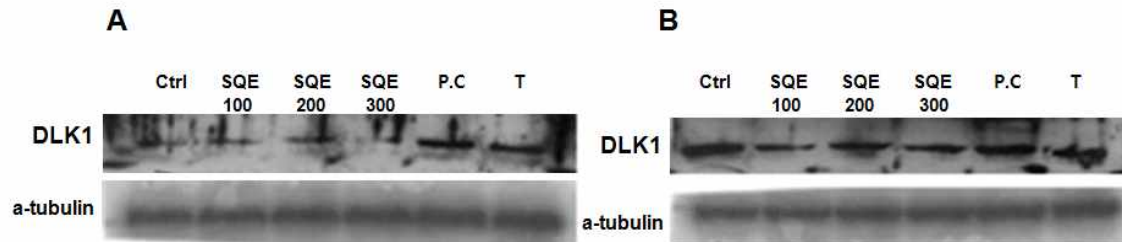


Figure 24. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on expression of DLK1.

Protein expression levels of DLK1 were assessed by western blot. α-tubulin was used as a loading control. (A) HT-29 cells, (B) HCT-116 cells. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quelpaertensis* leaf extract; P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

- (2) Notch1 발현 측정: HT-29와 HCT-116에서 대장암 줄기세포 마커인 Notch1의 단백질 수준을 western blot을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 조릿대잎 추출물을 처리했을 때 control에 비해 Notch1 발현이 dose-dependent하게 감소하였으며 조릿대의 활성물질인 p-coumaric acid와 tricin 처리 시에도 Notch1 발현이 감소됨을 확인하였다(Figure 25).

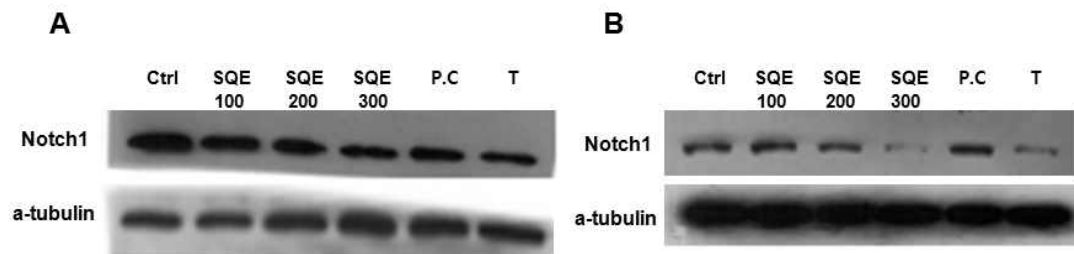


Figure 25. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on expression of Notch1.

Protein expression levels of Notch1 were assessed by western blot. α-tubulin was used as a loading control. (A) HT-29 cells, (B) HCT-116 cells. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quelpaertensis* leaf extract; PC, p-coumaric acid; T, Tricin.

- (3) Sox-2 발현 측정: HT-29와 HCT-116에서 대장암 줄기세포 마커인 Sox-2의 단백질 수준을 western blot을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 조릿대잎 추출물을 처리했을 때 control에 비해 Sox-2 수준이 처리 농도에 따라 감소하였고, p-coumaric acid와 tricin에서도 다소 감소한 것을 확인하였으나, 다른 마커들과 같이 추출물 보다는 효과가 적음을 확인하였다(Figure 26).

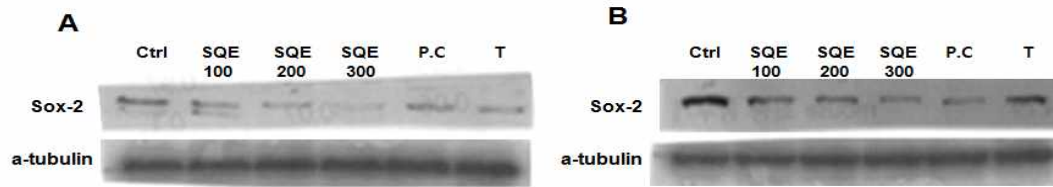


Figure 26. Effect of SQE, p-coumaric acid, and triclin on expression of Sox-2.

Protein expression levels of Sox-2 were assessed by western blot. α -tubulin was used as a loading control. (A) HT-29 cells, (B) HCT-116 cells. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quelpaertensis* leaf extract; P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

(4) CD133, CD44 발현 측정 : HT-29와 HCT-116에서 대장암 줄기세포 마커인 CD133과 CD44의 발현량을 FACS를 이용해 측정하였다. 그 결과, 대장암 세포의 종류에 따라 다른 양상이 나타났는데, HCT-116 세포의 경우 조릿대잎 추출물과 p-coumaric acid, triclin을 처리함에 따라 CD133과 CD44 마커의 발현이 처리 농도에 따라 감소하는 경향을 보였으나 HT-29의 경우 감소 정도가 미미한 것으로 측정되었다(Figure 27, 28).

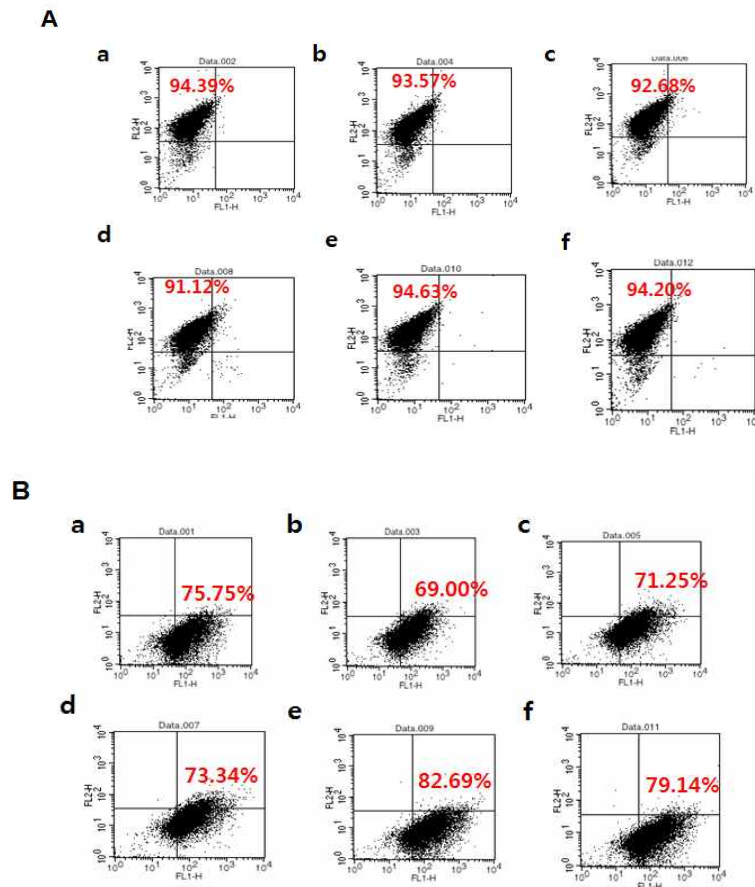


Figure 27. Effect of SQE, p-coumaric acid, and triclin on expression of HT-29 cells.

(A) CD133, (B) CD44 a, ctrl; b, SEQ 100 μ g/ml; c, 200 μ g/ml, d, 300 μ g/ml, e, PC; f, triclin. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quelpaertensis* leaf extract; P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

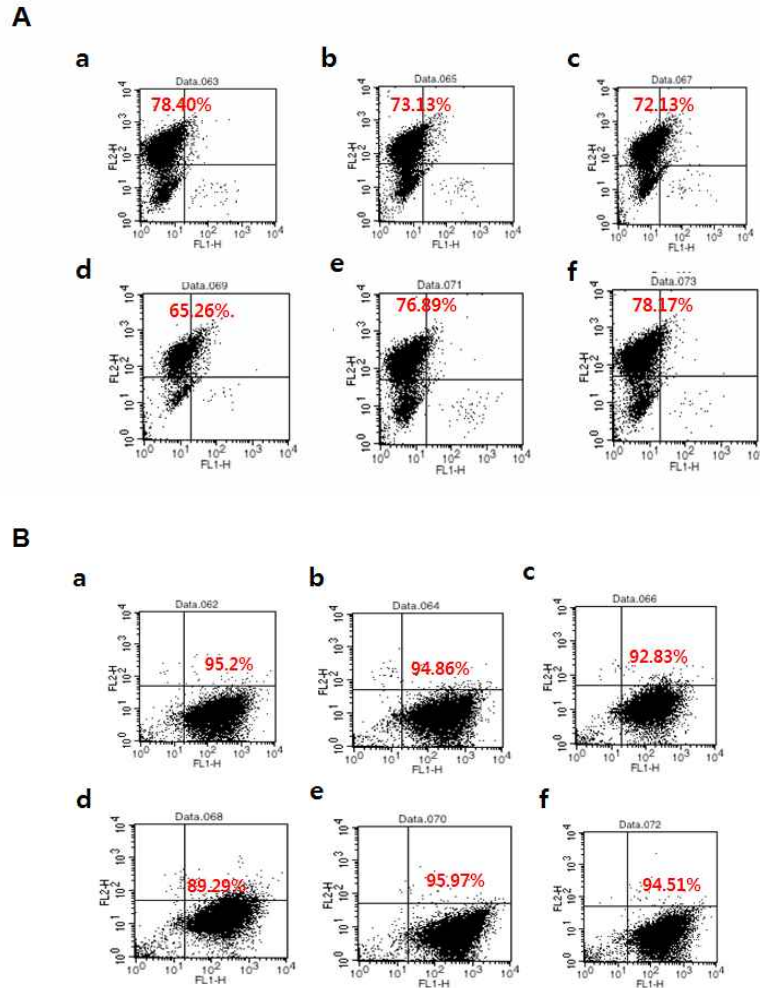


Figure 28. Effect of SQE, p-coumaric acid, and triclin on expression of HCT-116cells.

(A) CD133, (B) CD44 a, ctrl; b, SEQ 100 μ g/ml; c, 200 μ g/ml, d, 300 μ g/ml, e, PC; f, triclin. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quepaertensis* leaf extract; P.C, p-coumaric acid; T, Triclin.

(5) Wnt/ β -catenin 발현 측정 : HT-29와 HCT-116에서 대장암 줄기세포 마커의 감소에 관여하는 신호전달 기전규명을 위하여 wnt/ β -catenin의 단백질 수준을 western blot을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 두 세포주 모두에서 조릿대잎 추출물을 처리했을 때 control에 비하여 β -catenin의 단백질 발현 수준이 dose-dependent하게 감소하였고, p-coumaric acid와 triclin 처리군에서도 다소 β -catenin의 감소를 확인하였다(Figure 29).

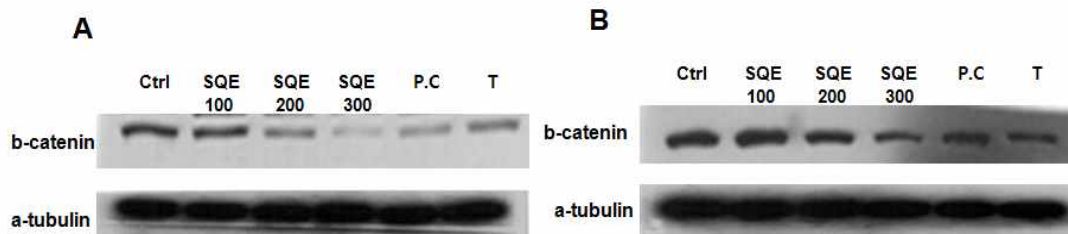


Figure 29. Effect of SQE, p-coumaric acid, and triclin on expression of β -catenin.

Protein expression levels of b-catenin were assessed by western blot. α -tubulin was used as a loading control. (A) HT-29 cells, (B) HCT-116 cells.

다. 제주 조릿대잎 추출물과 활성물질의 대장암줄기세포마커의 mRNA 발현 억제 효능

- (1) Notch1 mRNA 발현 측정: 조릿대잎 줄기세포 마커 발현을 조절하는지를 규명하기 위하여 HT29, HCT116 세포에서 분리한 mRNA로부터 조릿대 추출물과 p-coumaric acid, tricin의 처리 유무에 따른 mRNA 변화를 real-time PCR을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 암줄기세포마커인 Notch1 mRNA 이 조릿대 추출물 처리로 가장 낮은 조릿대잎 추출 농도인 100 μ g/ml부터 크게 감소하였고, 조릿대잎의 활성성분인 p-coumaric acid와 tricin에서도 통계적으로 유의미하게 Notch1 mRNA 발현이 억제됨을 확인하였다(**Figure 30**).

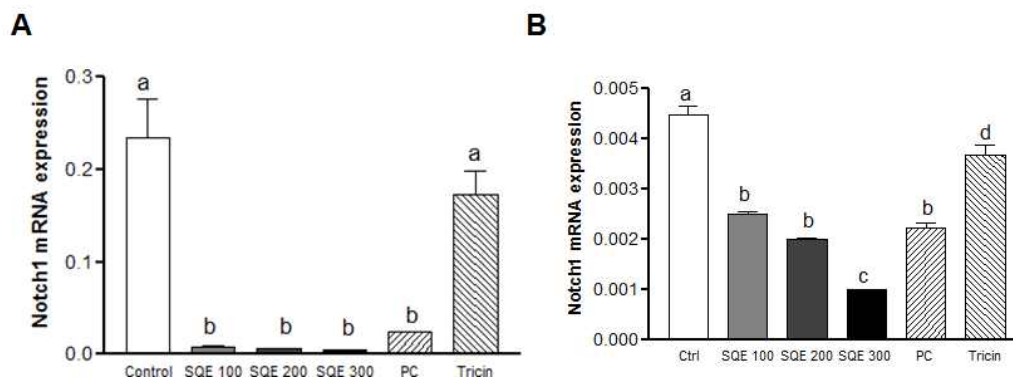


Figure 30. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on mRNA expression of Notch1 in HT-29 and HCT-116 cells.

mRNA level of Notch1 was analyzed using real-time PCR. (A) HT-29 cells, (B) HCT-116 cells. β -actin was used as an internal control. The statistically significant differences between treatments were analyzed by one-way ANOVA. Different letters in the bars indicated that those values are significantly different from each other ($p < 0.05$).

- (2) CD133 mRNA 발현 측정: 암줄기세포 마커인 CD133 mRNA 발현이 두 세포주에서 모두 조릿대잎 추출물과 p-coumaric acid에서 유의적으로 감소하였고 tricin에 의한 효능은 미미한 것으로 측정되었다(**Figure 31**).

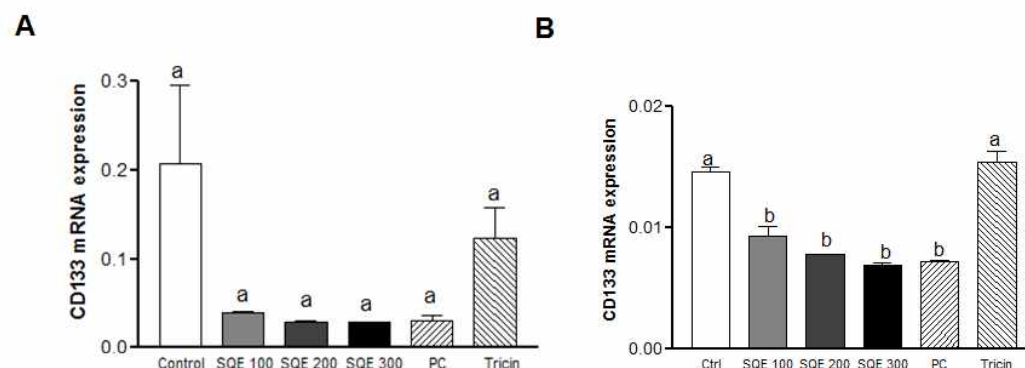


Figure 31. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on mRNA expression of CD133 in the HT-29 and HCT-116 cells.

mRNA level of CD133 was analyzed using real-time PCR. (A) HT-29 cells, (B) HCT-116 cells. β -actin was used as an internal control. The statistically significant differences between treatments were analyzed by one-way ANOVA. Different letters in the bars indicated that those values are significantly different from each other($p < 0.05$).

- (3) VEGF mRNA 발현 측정: 암줄기세포성격 유지에 중요한 인자로 알려진 HIF-1 α 의 down-stream target gene으로써 혈관신생에 관여하는 VEGF의 mRNA 발현을 측정하였다. 그 결과 VEGF mRNA 발현은 두 세포주에서 모두 조릿대잎 추출물과 p-coumaric acid에서 유의적으로 감소하였고, tricin에 의한 효능은 미미한 것으로 측정되었다(Figure 32).

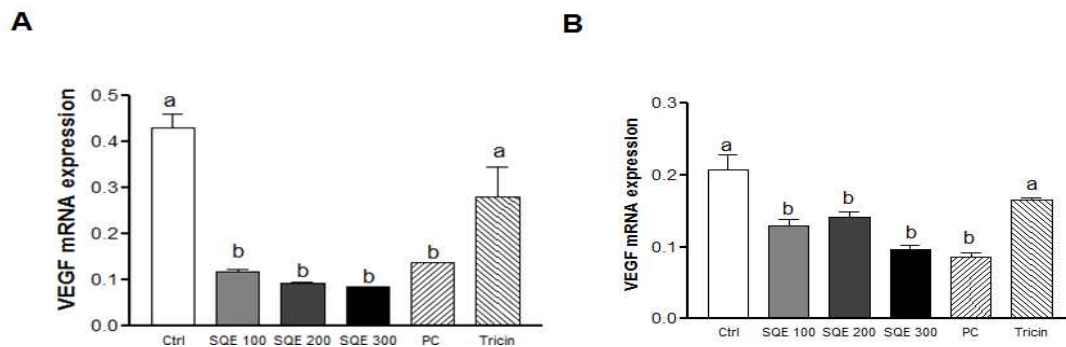


Figure 32. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on mRNA expression of VEGF in the HT-29 and HCT-116 cells.

mRNA level of VEGF was analyzed using real-time PCR. β -actin was used as an internal control. The statistically significant differences between treatments were analyzed by one-way ANOVA. Different letters in the bars indicated that those values are significantly different from each other ($p < 0.05$). (A) HT-29 cells, (B) HCT-116 cells.

라. In vitro 실험을 통한 조릿대의 대장암 줄기세포 자가복제에 미치는 효능

- (1) Colony formation 측정: 암 줄기세포가 가지는 중요한 특성인 자가복제 능력이 조릿대잎 추출물에 의해 조절되는지 측정하기 위해 clonogenic assay를 수행하였으며, 그 결과, HT-29, HCT-116 두 세포주 모두에서 조릿대잎 추출물, p-coumaric acid, tricin을 처리함에 따라 colony의 수가 유의적으로 감소함을 확인하였다(Figure 33). 특히, HT-29 세포에서 조릿대잎 추출물은 dose-dependent 하게 colony의 형성을 억제 시켰고, HCT-116 세포에서는 조릿대잎 추출물 100 μ g/ml처리군에서는 미미한 colony 감소 효능을 보였으나, 300 μ g/ml 처리군에서 colony 형성이 크게 억제되었다. 그러나 p-coumaric acid와 tricin 처리군에서는 HT-29에서는 조릿대 추출물보다는 약하지만 colony 형성을 억제하는 효과를 보였으나, HCT-116에서는 통계적으로 유의한 감소효과를 보이지 않았다.

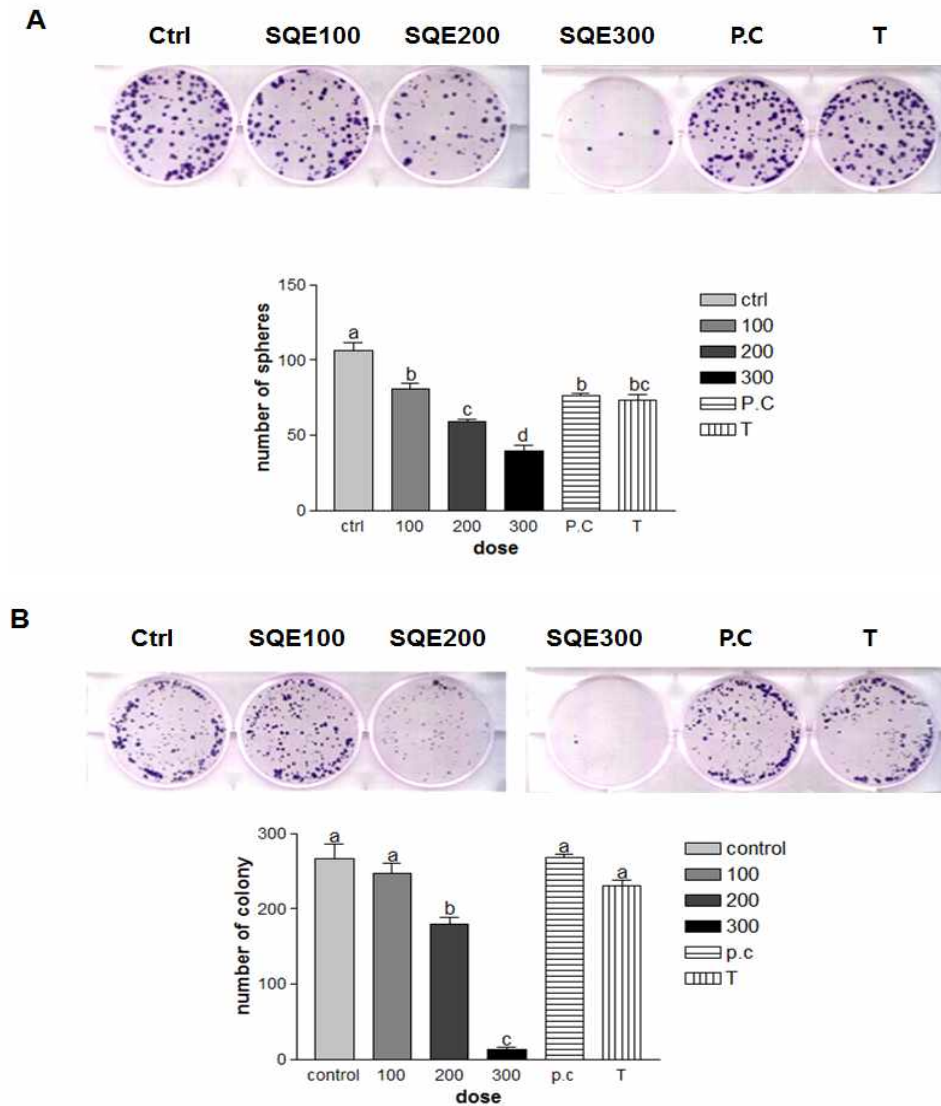


Figure 33. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on colony formation in HT-29 and HCT-116 cells.

Colony formation was analyzed in HT-29 (A), HCT-116 (B) using clonogenic assay. Cells were plated at 300 cells/well and treated with various doses of SQE, PC and tricin. After incubating 10 days, colonies were fixed and stained. Ctrl, Control; PC, p-coumaric acid; T, Tricin. Statistically significant differences between treatments were analyzed by one-way ANOVA. Different letters in the bars indicated that those values are significantly different from each other ($p < 0.05$).

(2) Sphere formation 측정: 암 줄기세포의 자가복제 특성을 suspension cell 상태에서 측정하는 실험법인 sphere formation assay를 수행하여 조릿대잎 추출물과 활성성분의 효능을 규명하였으며, 그 결과, HT-29 세포에서 조릿대잎 추출물은 200 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서, HCT-116 세포에서는 조릿대잎 추출물 300 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 통계적으로 유의하게 sphere 개수를 억제시켰다. 특히, clonogenic assay와는 달리 p-coumaric acid 와 tricin 처리군에서 sphere 형성이 조릿대잎 추출물 처리 수준까지 감소하였다(**Figure 34**).

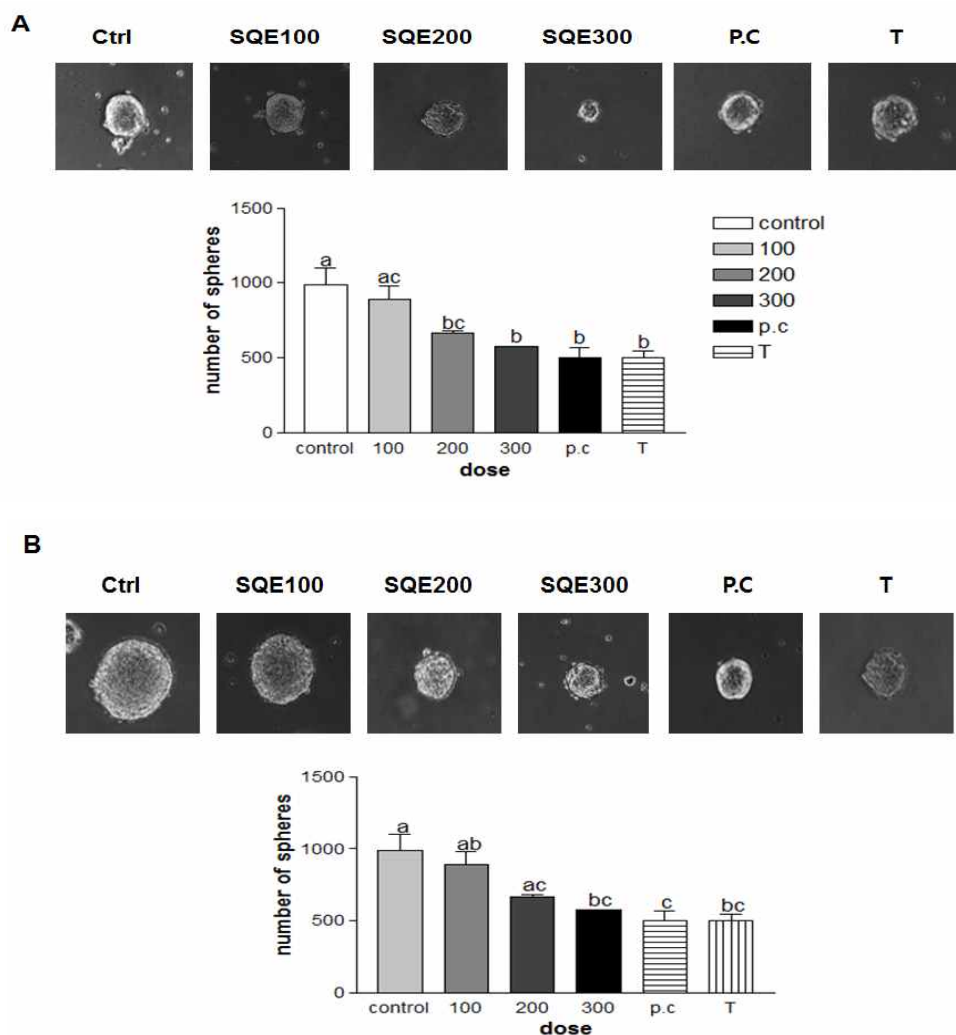


Figure 34. Effect of SQE, p-coumaric acid, and triclin on sphere formation in HT-29 and HCT-116 cells.

Cells were treated with various doses of SQE, PC, and triclin in sphere media to determine sphere formation. Images for sphere formation were taken using phase contrast microscopy (magnification, 100x) and sphere numbers were counted and quantified. Ctrl, Control; PC, p-coumaric acid; T, Triclin. Statistically significant differences between treatments were analyzed by one-way ANOVA. Different letters in the bars indicated that those values are significantly different from each other ($p < 0.05$).

마. In vivo xenograft 모델을 통해 조릿대의 대장암 줄기세포타겟의 대장암 생성에 미치는 영향 규명

- (1) Injection 세포 수 확립: 총 8주간의 실험기간동안 적절한 크기로 자랄 수 있는 HT-29 대장암줄기세포의 주입 개수를 확인하기 위하여 서로 다른 세포수를 예비실험 동물에 주입하였다. 그 결과 10,000개의 세포주입에서는 8일 후, 100,000 개의 세포주입에서는 5일 후 종양형성이 시작되었음을 확인하여 double-staining 한 세포들이 적은 수의 암세포로 종양을 형성할 수 있는 암줄기세포임을 확인하였다(**Figure 35**).

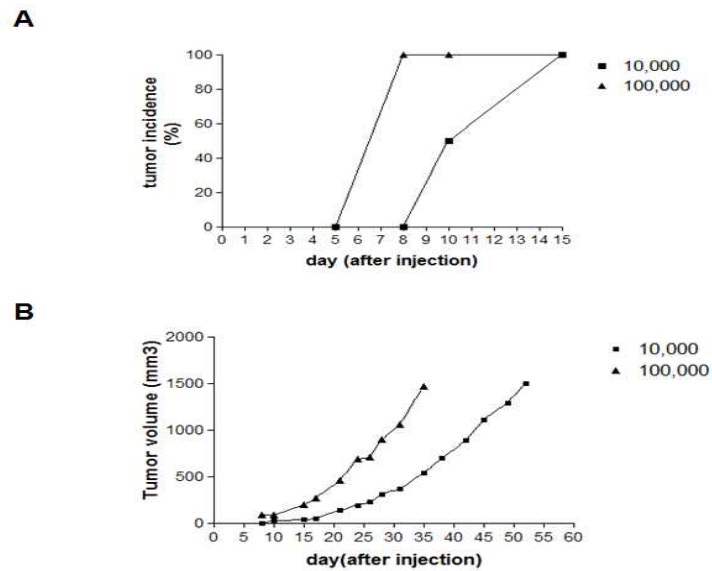


Figure 35. tumor incidence (A) and tumor vloume (B) in preliminary study.

라. 조릿대잎 추출물의 투여에 따른 동물모델의 몸무게, 식이섭취, 임상적 변화 분석

(1) 몸무게변화: 다섯 군 간의 최종 몸무게차이는 없음을 확인하였다(Figure 36).

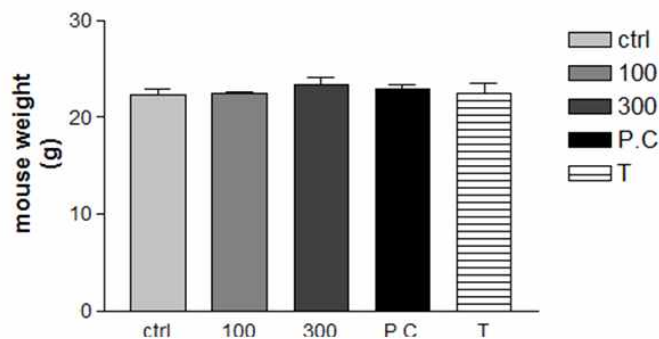


Figure 36. Difference of final body weight among groups.

Ctrl, Control; P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

(2) 식이섭취변화: 다섯 군간의 차이가 없었다(Figure 37).

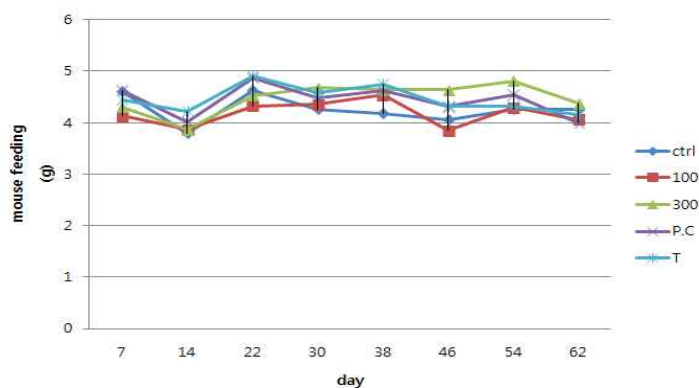
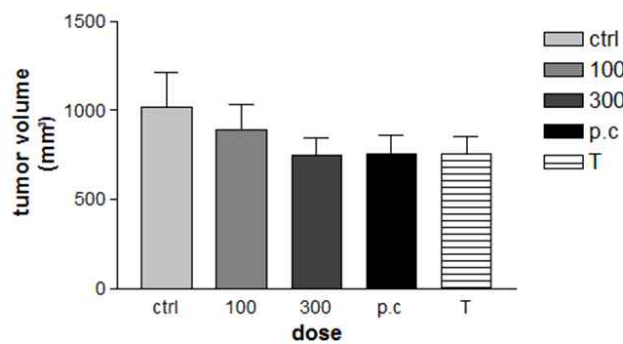


Figure 37. Food intake among five groups during experimental period.

Ctrl, Control; P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

- (3) 종양부피측정: HT-29 대장암줄기세포 피하지방에 주입 후 6주간 키운 뒤 희생시켜 각 군 별로 생성된 종양의 부피를 비교하였다. 종양 control 군에 비해서 조릿대잎 추출물 군과 p-coumaric acid 군, tricin 군에서 tumor volume이 감소되는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의적이지는 않았다(Figure 38A).
- (4) 종양무게측정: 조릿대잎 추출물을 투여한 군과 p-coumaric acid 또는 tricin 투여한 군은 control 군에 비해 tumor 무게가 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의성은 없는 것으로 확인되었다(Figure 38B).

A



B

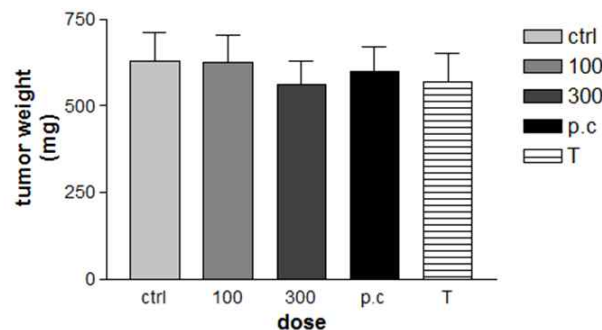


Figure 38. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on tumor volume and tumor weight.

(A) tumor volume (B) tumor weight were measured and compared among five experimental groups. Data was analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P < 0.05$). P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

마. 조릿대잎 추출물의 투여에 따른 in vivo 동물모델에서의 암줄기세포 억제 효능

- (1) DLK1 단백질 발현 측정: 서로 다른 실험물질을 처리한 각 군의 동물 종양으로부터 단백질을 추출하여 암줄기세포 마커인 DLK1 발현을 western blot을 이용하여 확인하였으며, 그 결과, DLK1의 단백질 발현 수준은 조릿대잎 추출물을 100 mg/kg b.w., 300 mg/kg b.w.

투여한 군에서 감소한 것을 확인하였다(**Figure 39**). p-coumaric acid와 tricin을 투여한 군에서는 DLK1 억제 효과가 미미한 것으로 분석되었다.

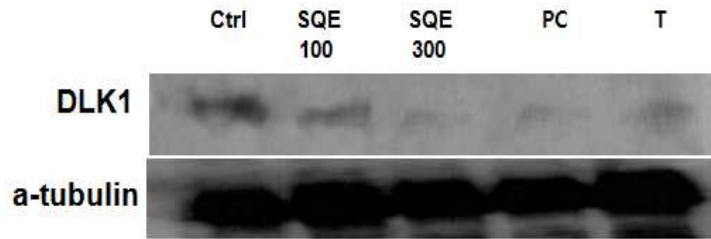


Figure 39. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on expression of DLK1.

Protein was extracted from frozen tumor tissue using Pro-PREP reagent according to the protocol provided by manufacturer. The protein level of DLK1 was detected by western blot. α -tubulin was used as a loading control. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quelpaertensis* leaf extract; P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

- (2) HIF-1 α 단백질 발현 측정: 동물 모델에서 조릿대의 항암줄기세포 효능을 규명하기 위하여 암의 줄기세포적 성격을 유지하는데 중요한 인자로 알려진 hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)의 단백질 발현을 western blot을 이용하여 비교하였다. 그 결과 조릿대잎 추출물 300 mg/kg b.w 을 투여한 군과 p-coumaric acid 또는 tricin 을 경구투여한 군에서 HIF- α 의 단백질 발현 수준이 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다(**Figure 40**).

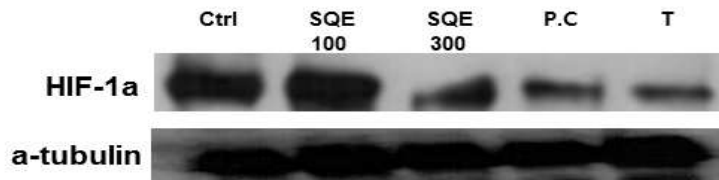


Figure 40. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on expression of HIF-1 α .

Protein was extracted from frozen tumor tissue using Pro-PREP reagent according to the protocol provided by manufacturer. The protein level of HIF-1 α was detected by western blot. α -tubulin was used as a loading control. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quelpaertensis* leaf extract; PC, p-coumaric acid; T, Tricin.

- (3) VEGF 단백질 발현 측정: HIF-1 α 의 down-stream target gene으로써, 암의 발달 과정 가운데 혈관신생(angiogenesis)에 결정적인 역할을 하는 VEGF의 단백질 발현 비교를 위해 동물의 종양조직에서 단백질을 추출하여 western blot을 수행하였으며, 그 결과, 조릿대잎 추출물을 100 mg/kg b.w., 300 mg/kg b.w. 투여한 군에서 VEGF 단백질 발현 수준이 감소한 것을 확인하였으며 조릿대 활성물질인 p-coumaric acid 과 tricin 을 투여한 군에서는 VEGF의 감소가 미미한 것으로 측정되었다(**Figure 41**).

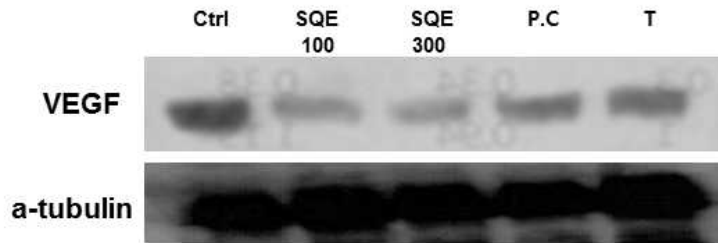


Figure 41. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on expression of VEGF.

Protein was extracted from frozen tumor tissue using Pro-PREP reagent according to the protocol provided by manufacturer. The protein level of VEGF was detected by western blot. α -tubulin was used as a loading control. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quelpaertensis* leaf extract; P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

- (4) p-ERK 발현 측정: 동물모델에서 조릿대에 의한 종양관련 신호전달체계영향을 측정하기 위하여 Wnt/ β -catenin signaling에 의해 영향을 주고받는 Mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway의 주요 인자인 Extracellular signal-regulated kinases (ERK)의 phosphorylation 정도를 western blot을 이용하여 측정하였으며, 그 결과, 조릿대잎 추출물을 투여한 군에서 p-ERK의 발현이 크게 감소하였으며, p-coumaric acid 에서도 다소 감소한 것으로 확인되었다(**Figure 42**).

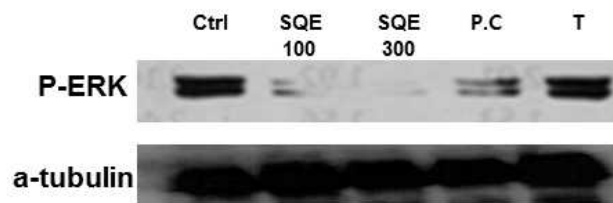


Figure 42. Effect of SQE, p-coumaric acid, and tricin on protein expression of p-ERK.

Protein was extracted from frozen tumor tissue using Pro-PREP reagent according to the protocol provided by manufacturer. The protein level of p-ERK was detected by western blot. α -tubulin was used as a loading control. Ctrl, Control; SQE, *Sasa quelpaertensis* leaf extract; P.C, p-coumaric acid; T, Tricin.

3절 : 염증성 장 질환 마우스에서의 조릿대의 항산화효과, 대장세포 DNA damage, 장관기능 에 미치는 영향 및 염증 시 장내 미생물 군집에 미치는 효과분석

제주조릿대의 만성염증 시 항산화 효과, 대장세포 DNA 손상, 장관기능, 장내 미생물 군집에 미치는 영향을 규명하여, 조릿대의 건강 기능성 효과와 그 기전을 다양한 방법으로 모색하고 과학적 자료를 제시하였다.

1. 연구목표

- 가. 만성염증성 장 질환 마우스 모델을 이용하여 조릿대의 항산화효과를 분석한다.
- 나. 만성염증성 장 질환 마우스 모델을 이용하여 조릿대의 대장세포 DNA damage에 미치는 영향을 규명한다.
- 다. 만성염증성 장 질환 마우스 모델을 이용하여 조릿대의 장관기능에 미치는 영향을 규명한다.
- 라. 만성염증성 장 질환 마우스 모델을 이용하여 조릿대의 장내 미생물 군집에 미치는 효과를 분석한다.

2. 연구방법

가. 실험 모델: 1차년도와 동일한 만성 염증성 장 질환 모델 이용

- (1) 실험 대상 및 식이공급: 1차년도와 동일

나. 조릿대의 항산화 효과 규명

- (1) 항산화마커 측정: 동물 희생 시 마우스 대장을 적출하여 myeloperoxidase activity, MDA, SOD activity를 kit를 사용하여 측정하고, SOD, Gpx, catalase 등 효소들의 발현을 western으로 측정하였다.

다. 조릿대의 DNA damage 억제 효과 규명

- (1) DNA damage 측정: 대장조직으로부터 대장세포를 분리하여 HBSS 제거 후 따뜻한 EDTA가 포함된 RPMI-1640에 넣은 후, cell viability를 측정함. anti-8-oxo-dG 분석을 통해 DNA damage 분석하였다.

라. 조릿대의 장관기능에 미치는 영향 분석

- (1) 장통과시간 측정: 섬유소가 풍부한 조릿대가 노폐물과 독성물질이 장 내에 머무르는 시간을 단축시키는 효과를 측정하기 위하여 장 통과시간 측정하였다. 시료투여 2주 후에 12시간 절식시키고 실험동물 1마리당 사료 2g에 10% Coomassie Brilliant blue dye 1ml을 첨가하여 섭취시켜 푸른 변이 나오는 처음 시간으로 하였다.
- (2) 장의 길이, 무게 측정, 장 통과시간 분석: 시료투여 4주 후 12 시간 절식시킨 후에 해부하여 소장, 대장의 길이와 무게를 측정. 속도는 장의 길이를 통과시간으로 나누어 계산하였다.

마. 조릿대의 장내 미생물 군집에 미치는 영향 분석

- (1) 장내 미생물 군집 분석: 마우스 변으로부터 Genomic DNA를 추출 (soil genomic DNA assay kit이용). 분리된 metagenomic DNA의 검증을 위한 PCR 시행하고 16S rRNA을 이용한 샘플별 barcoded pyrosequencing 실행하여 EzTaxon-e Database/Server를 사용한 미생물의 동정 및 미생물 분석을 시행하였다(species richness, diversity indices 등).

3. 연구결과

가. 조릿대잎 추출물(SQE) 제조

본 연구에 이용된 조릿대는 제주대 제주조릿대 산학협력단에서 공급받았으며 열수 또는 70% 에탄올로 조릿대를 추출하여 HPLC 분석을 통하여 함유된 지표물질을 확인하고 함유성분 분리 결과는 1차년도에 제시되었다.

나. In vivo 동물모델의 임상적 측정 결과

- (1) 몸무게 변화: 총 5주의 실험기간 동안 DSS를 이용해 대장염을 유도하지 않은 control에 비해서 DSS로 대장염을 유도한 나머지 군에서 몸무게가 감소되는 경향을 보였으며 이는 대장의 염증으로 인한 증상으로 판단된다. 또한 몸무게의 감소 경향은 1차년도의 결과와 유사하게 관찰되었다.
- (2) 대장 무게: 동물 희생 전 날 24시간 절식을 시켰음에도 불구하고, 대장에 잔변이 제거 되지 않아 정확한 대장 무게의 측정을 불가능하여 대장 무게는 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.
- (3) 임상적 염증척도 (Disease Activity Index, DAI score): 실험기간 동안 주 3회에 걸쳐 대장 염증의 척도로 여겨지는 실험동물의 혈변 여부, 변의 농도와 몸무게 변화를 측정하여 이를 수치화한 DAI score를 통계적으로 분석한 결과 DSS로 대장염증을 유도하지 않은 control 군은 DAI score가 0점 이었고, DSS control군은 나머지 4개의 그룹과 비교했을 때 유의적으로 DAI score가 높았다 (**Figure 43A**). 통계적 유의성 검증 결과 조릿대잎 추출물 100 mg/kg b.w., 300 mg/kg b.w.을 경구투여한 군에서는 항생제를 먹인 군과 비슷한 수준 까지 장의 염증 정도가 완화되는 결과를 얻을 수 있었다.
- (4) 대장 길이: DSS로 대장 염증을 유발한 DSS군의 경우 염증을 유도하지 않은 군에 비해서 대장의 길이가 짧게 나타났다(**Figure 43B**). 조릿대잎 추출물을 경구투여한 군의 경우, 대장의 길이가 DSS만 먹인 군 보다는 장 길이를 회복한 것으로 측정 되었고, 특히 조릿대를 300 mg/kg b.w. 경구 투여시킨 군은 대장 염증을 유도하지 않은 control군과 유사하게 회복이 되었다.

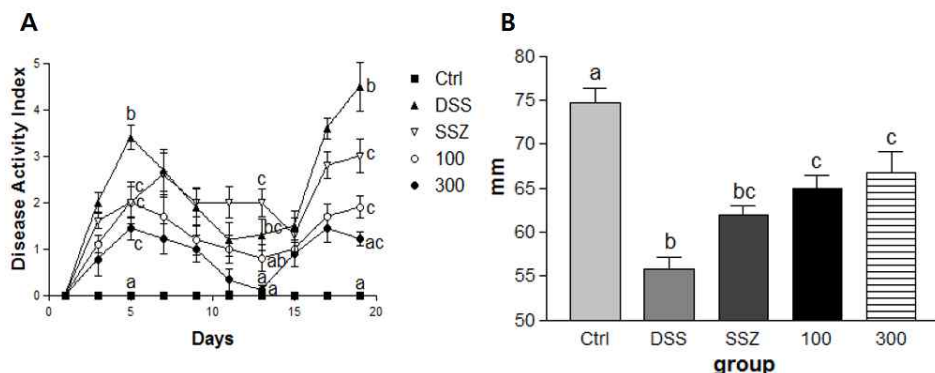


Figure 43. in vivo 동물모델의 DAI 및 대장 길이

(A) DAI was evaluated at average of score of clinical parameters as body weight changes, rectal bleeding and stool consistency or diarrhea. Data was analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P<0.05$) (B) The colon length was measured and compared among five experimental groups. Data was analyzed by one-way ANOVA for multiple comparison ($P<0.05$)

다. In vivo 동물모델에서 조릿대의 항산화 효과 규명

(1) 항산화 마커 측정: 동물 희생 시 얻은 plasma를 통해 MPO, MDA, SOD activity를 확인함. Plasma level에서 MPO 농도는 각 그룹들 간의 유의적인 차이가 없었으며(Figure 44A), lipid peroxidation 정도를 나타내는 MDA의 활성은 DSS control 군에 비해 조릿대 300mg/kg b.w 군에서 유의적으로 감소하였다(Figure 44B). 항산화 효소인 SOD의 활성은 DSS를 투여하지 않은 control군에 비해 DSS 군에서 유의적으로 감소하였고, 조릿대 군에서 유의적으로 증가하였다(Figure 44C). 또한 대장 조직에서 SOD1, SOD2, Gpx1 항산화 효소 발현을 western blot으로 확인하였다. SOD1은 대표적인 항산화 효소로 염증상황에서 유도 되는 높은 수준의 ROS에 의해 감소하게 되는데 DSS를 투여하지 않은 control 군에 비해 DSS control군에서 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었다(Figure 45A). 반면 조릿대군은 DSS control군에 비해 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. SOD1과 달리 SOD2는 염증상황에서 발현이 증가하게 되는데 DSS를 투여하지 않은 control 군에 비해 DSS control군에서 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었고 조릿대군은 DSS control군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 보였다(Figure 45B). Gpx1은 control군에 비해 DSS control군에서 유의적으로 증가하였고 조릿대 군에서 유의적으로 감소하여 control과 유사한 수준으로 회복되는 효과를 보였다(Figure 45C). 또한 Catalase activity를 대장조직에서 kit를 통해 확인한 결과, DSS를 투여하지 않은 control 군에 비해 DSS control군에서 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었고 조릿대군은 DSS control군에 비해 유의적으로 증가하는 경향을 보였다(Figure 46). 이를 통해 조릿대가 항산화 효소의 modulation에 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

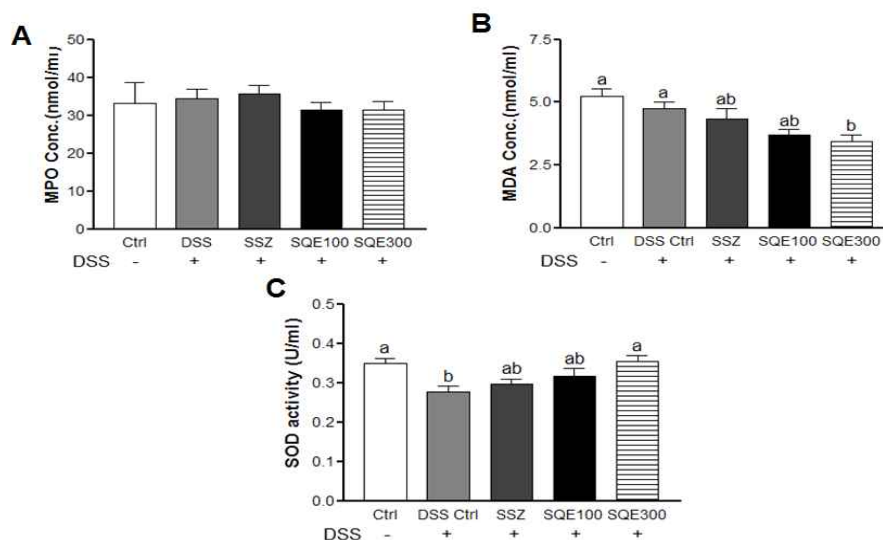


Figure 44. in vivo 동물 모델의 plasma 수준에서 본 MPO, MDA, SOD

(A-C) Levels of MPO (A) and MDA (B) and SOD (C) were examined by commercial kit in plasma for all groups.

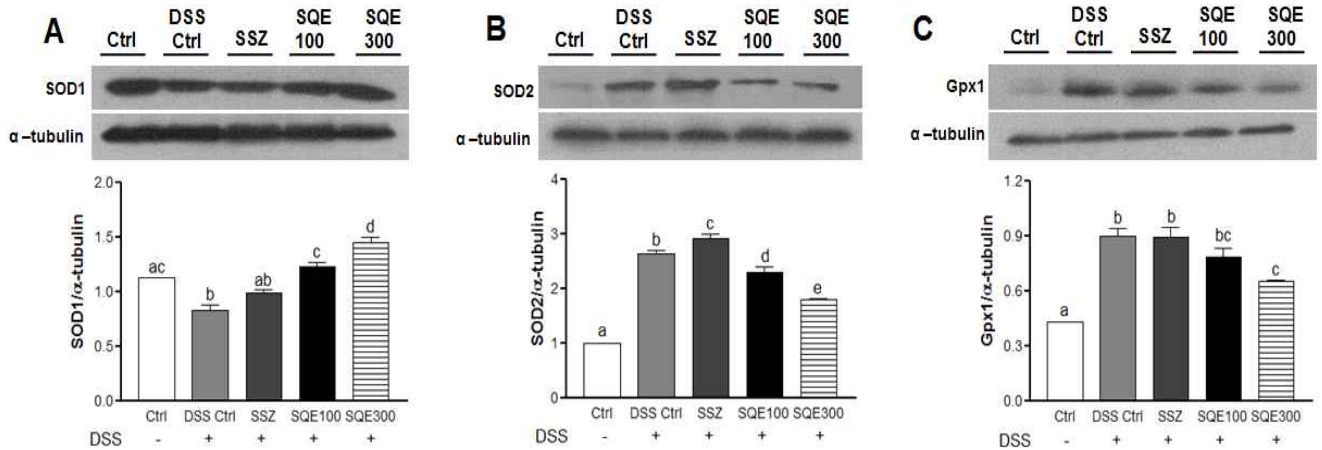


Figure 45. in vivo 동물 모델의 대장조직에서 본 SOD1, SOD2, Gpx1의 발현

(A-C), Expressions of SOD1 (A), SOD2 (B), and Gpx1 (C) were analyzed in colon tissues by using western blot. Level of α-tubulin was detected as a loading control. Band intensities were quantified by densitometry and data shown are the mean ± SEM and were used were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); $n = 10$ mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium; SSZ, sulfasalazine.

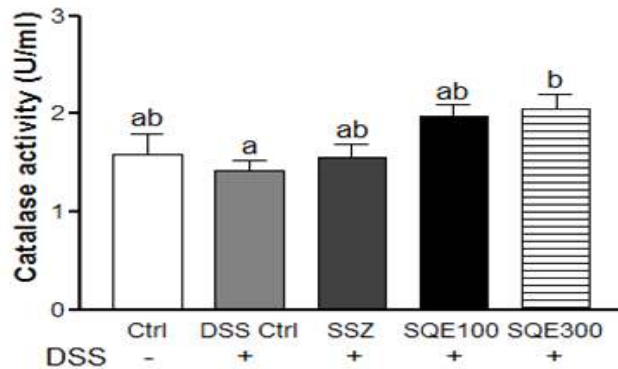


Figure 46. in vivo 동물 모델의 대장조직에서 본 Catalase 의 발현

Catalase activity was examined in colon tissues by using a commercial kit. Data are shown to as the mean ± SEM and were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); $n = 10$ mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium; SSZ, sulfasalazine.

라. In vivo 동물모델에서 조릿대의 DNA 손상 억제 효과 규명

(1) 조릿대의 DNA 손상 억제 효과 규명: 동물 희생 시 마우스의 대장을 적출하여 포르말린에 고정 시킨 후, Anti-8-oxo-dG를 통해 Immunohistochemistry로 DNA 손상 정도를 분석하

였다. DSS를 투여하지 않은 군에서 DNA 손상정도가 가장 낮았고, DSS control군에서 유의적으로 DNA 손상이 증가하였다 (Figure 47). 반면 조릿대 300mg/kg b.w 군에서는 DSS control군과 비교하여 DNA손상이 유의적으로 감소하였으며 control군과 유사한 수준으로 회복되는 것을 볼 수 있었다. 이 결과를 통해 조릿대가 만성염증으로 유발되는 장내 세포의 DNA 손상을 회복시키는 효과가 있다는 결과를 얻을 수 있었다.

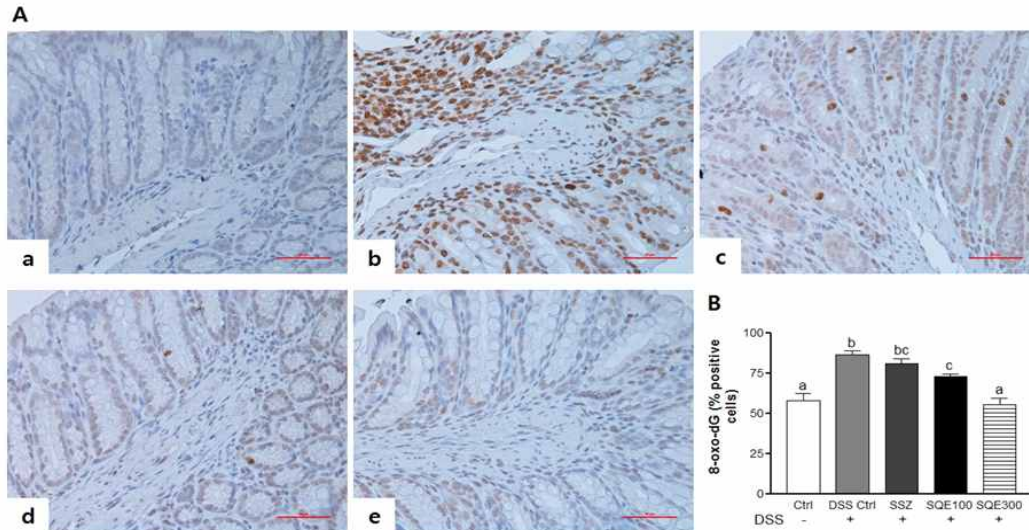


Figure 47. in vivo 동물모델의 대장 조직 DNA damage

(A) Production of 8-oxo-dG was detected using immunohistochemistry in sections of colorectal tissue obtained DSS-induced colitis mice for: (a) Ctrl, (b) DSS, (c) SSZ, (d) SQE 100, and (e) SQE 300. (magnification, 400 x) (B) The % of positive cells from 3 fields were counted and averaged. Scale bar: 50 μ m. Data are shown to as the mean \pm SEM and were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); $n = 10$ mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium; SSZ, sulfasalazine.

마. In vivo 동물모델에서 조릿대가 장관기능에 미치는 영향 분석

(1) 조릿대가 장관기능에 미치는 영향 분석: 조릿대가 장관기능에 미치는 영향을 분석하기 위해 장통과 시간과 장 운동성을 측정하였다. 장통과시간은 각 군간의 유의적인 차이가 없었으며(Figure 48A), 장통과시간과 대장 길이를 통해 구한 장운동성은 DSS를 투여하지 않은 control군에 비해 DSS control군에서 감소하는 경향을 보였으며 조릿대와 항생제군에서 DSS control군보다 증가하는 경향을 보였다(Figure 48B).

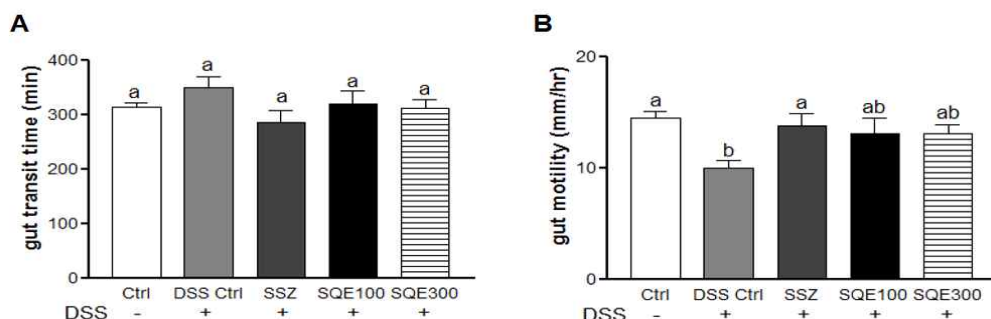


Figure 48. in vivo 동물모델에서 측정한 장통과시간 및 장운동성

(A) Gut transit time for all groups was analyzed by measuring the time of first development of red stools after carmine red administration. (B) Gut motility was estimated by the time and colon length for each group. Data are shown to as the mean \pm SEM and were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); $n = 10$ mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium; SSZ, sulfasalazine.

바. In vivo 동물모델에서 조릿대가 장내 미생물 군집에 미치는 영향 규명

(1) 장내 미생물 군집 다양성 변화: DSS로 만성 염증성 장질환을 유도한 마우스 모델에서 DSS처리 후 19일차의 마우스 변을 수집하여 genomic DNA를 뽑아낸 뒤, PCR을 통해 증폭시킨 후 pyrosequencing을 통해 만성 염증성 장질환이 발병하였을 때, 조릿대를 섭취 시 변화되는 전체 박테리아의 다양성과 상호관계에 대해 분석하였다.

(가) α -diversity: 대조군 (Control), 만성 염증성 장 질환군 (DSS), 조릿대 투여군 (SQE) 세 그룹의 microbial α -diversity를 분석한 결과 진화 계통 분류에서 가장 끝 분지가 되는 개체로 분류의 대상이 되는 생물체 수를 나타내는 Operational Taxonomic Units (OTUs)의 수가 Control군에 비해 DSS군에서 유의적으로 낮았고 SQE군에서 다시 증가하는 경향을 보였다(**Table 4**). 그 외에도 Evenness와 richness의 다양성을 나타내는 지표인 Chao-1, Shannon diversity index가 Control군에 비해 DSS군에서 유의적으로 감소하고 SQE에서 유의적으로 증가하였다. 샘플링을 통해 얼마나 많은 population을 나타내고 있는지를 보여주는 지표인 Goods Lib. coverage는 세 그룹에서 모두 차이를 보이지 않아 유사한 coverage 수에서 분석되었음을 알 수 있었다. 즉 Microbial diversity는 Host의 질환에 의해 감소하거나 영향을 받으며 이러한 감소가 조릿대 섭취에 의해 다시 증가할 수 있음을 보여주었다.

Table 4. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Microbial α - diversity

	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Number of OTUs	444.83 \pm 66.84 ^a	256.33 \pm 65.64 ^b	404.17 \pm 178.21 ^{ab}
Chao-1 estimators	657.94 \pm 91.98 ^a	366.26 \pm 109.76 ^b	594.05 \pm 259.98 ^a
Shannon's diversity index	4.75 \pm 0.19 ^a	3.96 \pm 0.31 ^b	4.52 \pm 0.69 ^a
Goods Lib. Coverage	0.97 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	0.97 \pm 0.01
Values are mean \pm SD			

Data were shown to as the mean \pm SEM and were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); $n = 6$ mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

(나) β -diversity: Community sample간의 차이를 통계를 통해 비교 분석하여 각각 그룹의 유사도, 거리를 파악할 수 있는 β -diversity를 분석하였다. PCO1, PCO2 2개의 축을 구성하였을 때 각각의 거리는 PCO1=18.478%, PCO2=42.369%로 나타났고 **Figure 49**에서 볼 수 있듯이 Control군안에서 sample간의 유사성을 확인 할 수 있었다. 또한 Control군과 DSS 군 간의 거리는 차이를 보이며 축의 반대방향으로 구성되어 있는 것을 볼 수 있었다. 반면 만성 염증성 장질환이 유도된 SQE군은 DSS군보다는 Control군과 가까운 거리를 가지고 있고 유사한 구성을 나타내고 있었다. 이는 만성 염증성 장질환이 유도된 동물 모델에서 조릿대의 투여가 장내 미생물 군집의 다양성을 변화시키면서 염증반응을 조절하고 Control군과 유사한 장내 미생물 다양성을 나타내는 것을 보여주었다.

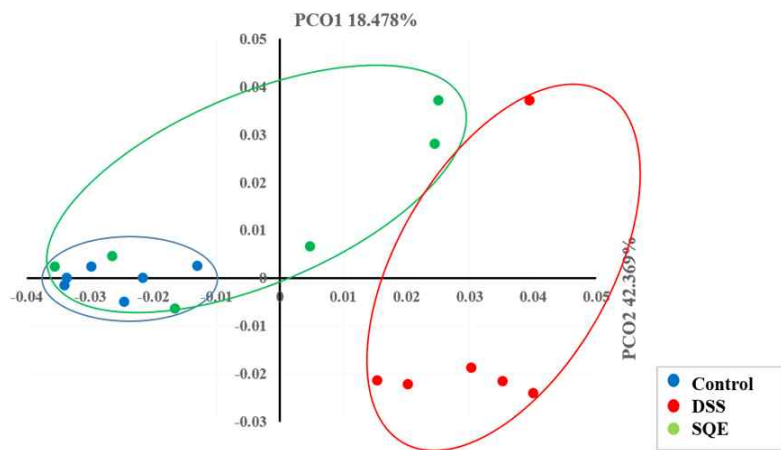


Figure 49. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 각 그룹 간의 Beta diversity

PCoA using unweighted UniFrac distances of gut microbial communities obtained from stool samples at 19 days after DSS treatment. n = 6 mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

(2) 장내 미생물 군집 구성 변화: DSS로 만성 염증성 장질환을 유도한 마우스 모델에서 DSS 처리 후 19일차의 마우스 변을 수집하여 genomic DNA를 뽑아낸 뒤, PCR을 통해 증폭시킨 후 pyrosequencing을 통해 만성 염증성 장질환이 발병하였을 때, 조릿대를 섭취 시 변화되는 전체 미생물 군집의 구성에 대해 분석하였다.

(가) Phylum level: 각 그룹에서 동물 Fecal 샘플이 나타내는 박테리아의 상대적인 abundance를 확인하였을 때, Bacterioidetes와 Firmicutes가 가장 많은 비율을 차지하고 있었으며, 대장 내에서 Short Chain Fatty Acid을 발효대사에 이용 하면서 대장건강에 영향을 미치는 Firmicutes의 비율이 Control군에 비해 DSS군에서 감소하고 SQE군에서 유의한 수준으로 그 비율이 증가하였다. 또한 비만이나 염증과 관련이 있는 Bacterioidetes의 비율이 Control군에 비해 증가하고 SQE군에서 유의적으로 감소하였다. 만성 염증성 장질환 모델의 대장에서 변화되는 Bacterioidetes/Firmicutes 비율 역시 Control군에 비해 DSS군에서 증가하고 SQE군에서 유의한 수준으로 그 비율이 감소하였다. 즉, DSS로 만성 염증성 장질환을 유도한 동물 모델에서 장내 미생물 군집의 Dysbiosis가 관찰되고 이를 조릿대의

투여가 유의미한 수준으로 개선한다는 사실을 보여 주었다(Figure 50, Table 5).

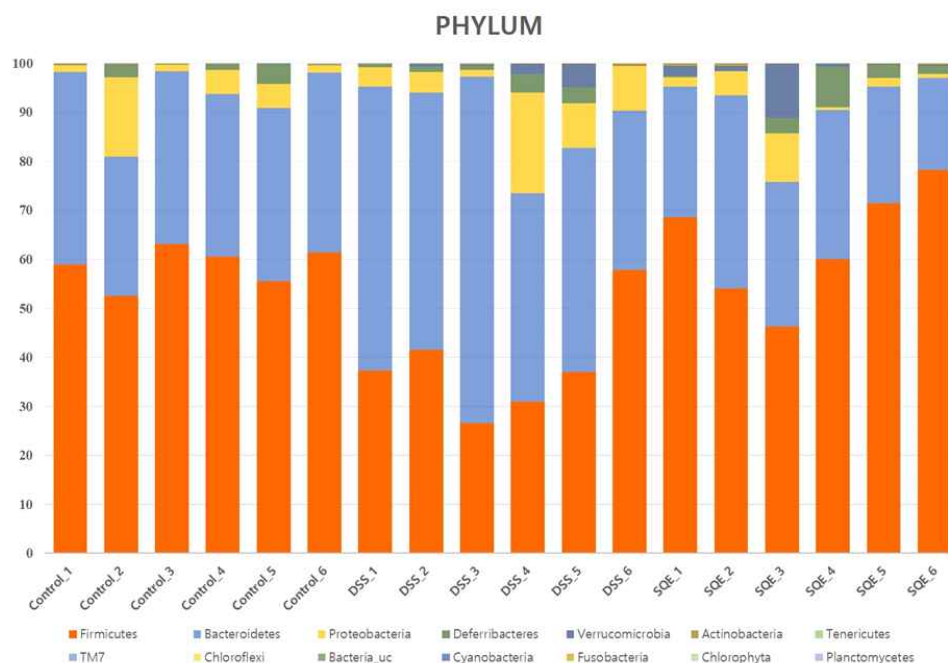


Figure 50. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Phylum level의 박테리아 구성

Phylum level classification of 16s rRNA gene sequences from stool samples collected 19days after DSS treatment. Bars represent relative abundances for each sample. n = 6 mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

Table 5. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Phylum level의 박테리아 비율

Bacteria	Group	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Firmicutes		58.67 ± 4.00 ^a	38.51 ± 10.82 ^b	63.08 ± 11.87 ^a
Bacteroidetes		34.75 ± 3.69 ^a	50.34 ± 13.27 ^b	28.14 ± 6.98 ^a
Proteobacteria		5.01 ± 5.77	8.04 ± 6.87	3.26 ± 3.58
Deferribacteres		1.39 ± 1.68	1.64 ± 1.56	2.72 ± 3.00
Verrucomicrobia		0 ± 0	1.25 ± 1.85	2.52 ± 4.25
Actinobacteria		0.14 ± 0.09	0.20 ± 0.16	0.26 ± 0.22
Bacteroidetes/ Firmicutes		0.59 ± 0.02 ^a	1.44 ± 0.28 ^b	0.47 ± 0.08 ^a

Phylum level classification of 16s rRNA gene sequences from stool samples collected 19 days after DSS treatment. Table is shown to as the mean ± SEM and were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); n = 6 mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

(나) Class level: Phylum level과 유사하게 박테리아 구성이 Control군에 비해 DSS군에서 변화되었으며, SQE군은 상대적으로 Control군과 유사한 구성을 보여주었다. 가장 큰 변화를

나타내고 있는 것은 Clostridia의 비율로 DSS군에서 감소하고 SQE군에서 유의적으로 증가하였다. 이는 대장에서 항염증 조절 작용과 T cell 생산에 관련되어 있는 Clostridia가 DSS로 유도된 만성 염증성 장질환의 발병 및 발전에 영향을 미칠 수 있음을 보여준다. 그와 반대로 Bacteroidia의 비율은 Control군에 비해 DSS군에서 유의적으로 증가하였고 SQE군에서 유의적으로 감소하였다. 또한, Phylum level에서 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 proteobacteria의 하위 level에 속하는 Gammaproteobacteria의 비율이 염증 환경에 의해 DSS군에서 유의적으로 증가하였고 SQE군에서는 Control군과 유사한 비율을 보였다(Figure 51, Table 6).

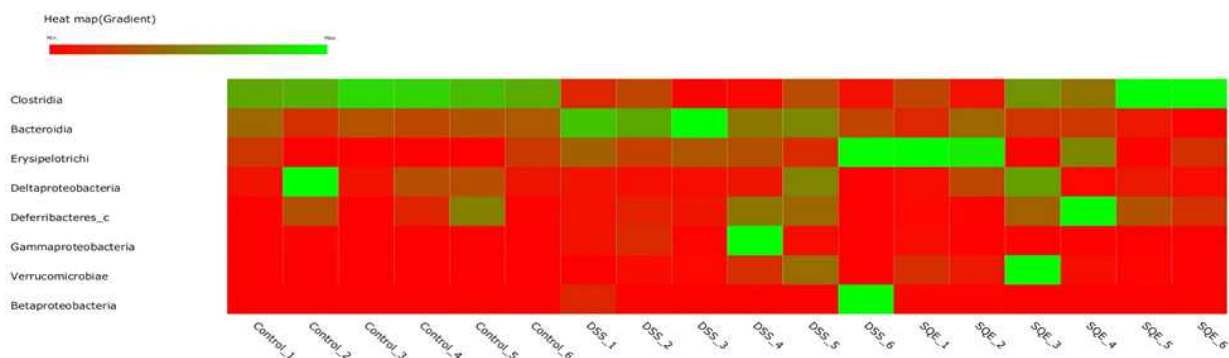


Figure 51. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Class level의 박테리아 구성

Class level classification of 16s rRNA gene sequences from stool samples collected 19 days after DSS treatment. The data contained in the matrix are represented by red and green colors. The cut off value was set to 5%. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

Table 6. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Class level의 박테리아 비율

Bacteria	Group	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Clostridia		54.7 ± 4.7 ^a	20.7 ± 7.3 ^b	45.0 ± 22.1 ^a
Bacteroidia		34.7 ± 3.7 ^a	50.3 ± 13.3 ^b	28.1 ± 7.0 ^a
Erysipelotrichi		3.1 ± 4.5 ^a	16.2 ± 12.0 ^{ab}	17.8 ± 17.9 ^b
Deltaproteobacteria		4.9 ± 5.7	2.1 ± 3.0	3.0 ± 3.7
Deferribacteres_c		1.4 ± 1.7	1.6 ± 1.6	2.7 ± 3.0
Gammaproteobacteria		0.1 ± 0.1 ^a	4.1 ± 7.4 ^b	0.2 ± 0.3 ^a
Verrucomicrobiae		0.0 ± 0.0	1.2 ± 1.8	2.5 ± 4.2
Bacilli		0.9 ± 0.0	1.6 ± 1.7	0.3 ± 0.1
Betaproteobacteria		0.0 ± 0.0	1.8 ± 3.6	0.1 ± 0.1

Class level classification of 16s rRNA gene sequences from stool samples collected 19days after DSS treatment. Table is shown to as the mean ± SEM and were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); n = 6 mice per group. SQE,

Sasa quelpaertensis extract; DSS, dextran sulfate sodium.

(다) Family level: 박테리아 구성이 Control군에 비해 DSS군에서 변화되었으며, SQE군은 상대적으로 Control군과 유사한 구성을 보여주었다. 그 중에서도 Short chain fatty acid의 발효와 대사와 탄수화물 대사에 관여하면서 acetyl-CoA의 pathway에 관여하는 박테리아인 Lachnospiraceae, Ruminococcaceae의 비율이 DSS군에서 유의적으로 감소하고 SQE군에서 유의적으로 증가하였다. 반면 염증 반응에 의해 발생하는 산물로 인해 호흡이 증가하는 Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae 등이 DSS군에서 유의적으로 증가하여 장내 미생물 군집의 Dysbiosis를 유도하였다. 또한 DSS군에서 유의적으로 증가한 Enterobacteriaceae는 Toll like receptor 4 (TLR4)와 연관되어 장염증과 밀접한 관련이 있음을 보여준다. SQE군에서는 해당 박테리아의 비율이 Control군과 유사하게 나타났다 (Figure 52, Table 7).

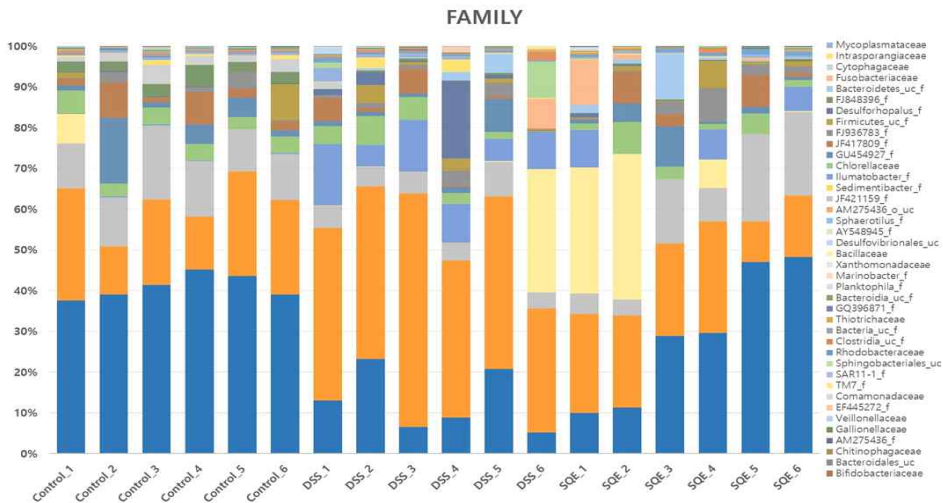


Figure 52. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Family level의 박테리아 구성

Family level classification of 16s rRNA gene sequences. Bars represent relative abundances for each sample. n = 6 mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

Table 7. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Family level의 박테리아 구성

Family	Group	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Lachnospiraceae		40.98 ± 2.97 ^a	12.95 ± 7.52 ^b	29.19 ± 16.54 ^a
Bacteroidaceae		20.33 ± 6.54 ^a	42.24 ± 8.75 ^b	20.29 ± 6.46 ^a
Ruminococcaceae		12.77 ± 2.87 ^a	5.39 ± 1.60 ^b	12.52 ± 7.76 ^a
Coprobacillus_f		0.17 ± 0.13 ^a	9.50 ± 3.86 ^b	3.75 ± 4.24 ^a
Prevotellaceae		4.08 ± 3.38	2.25 ± 2.84	3.23 ± 3.64
Enterobacteriaceae		0.07 ± 0.07 ^a	4.13 ± 7.36 ^b	0.18 ± 0.34 ^a
Streptococcaceae		0.57 ± 0.41	1.05 ± 1.39	0.17 ± 0.10
Lactobacillaceae		0.30 ± 0.17 ^a	0.14 ± 0.06 ^{ab}	0.05 ± 0.05 ^b

Family level classification of 16s rRNA gene sequences from stool samples collected 19days after DSS treatment. Table is shown to as the mean \pm SEM and were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); n = 6 mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

(라) Genus level: 박테리아 구성이 Control군에 비해 DSS군에서 변화되었으며, SQE군은 상대적으로 Control군과 유사한 구성을 보여준다. 특히 지질대사와 담즙산 recycling에 관여하고 염증에 의해 변화되는 박테리아인 Enterobacter, Bacteriodes, Clostridium의 비율이 DSS군에서 유의적으로 증가하였고 SQE군에서는 유의적으로 감소하였다. 염증성 장질환 발병 시 장내미생물군집의 대사가 변화하고 대사 변화에 의해 장내 환경이 변화할 수 있음을 나타내고 조릿대의 섭취가 장내 미생물 군집의 Dysbiosis를 억제함을 보여주었다 (Table 8).

Table 8. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Genus level의 박테리아 구성

Phylum	Genus	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
Firmicutes	Pseudoflavonifractor	4.83 \pm 0.82	2.71 \pm 1.32	6.19 \pm 3.93
	Clostridium_g6	0.17 \pm 0.13 ^a	9.49 \pm 3.85 ^b	3.75 \pm 4.23 ^a
	Acetatifactor	1.48 \pm 1.42	1.31 \pm 1.30	4.78 \pm 3.55
	Oscillibacter	1.68 \pm 0.75 ^a	1.12 \pm 0.76 ^a	4.44 \pm 2.68 ^b
	Hungatella	3.56 \pm 1.07 ^a	0.82 \pm 0.69 ^b	1.50 \pm 1.28 ^b
	Turicibacter	1.72 \pm 3.57	1.61 \pm 1.73	1.73 \pm 2.48
	Clostridium_g21	1.51 \pm 0.59	0.75 \pm 0.44	1.78 \pm 1.44
	Romboutsia	0 \pm 0	1.20 \pm 2.93	2.09 \pm 4.35
	Lachnospiraceae_uc	1.41 \pm 0.47	0.25 \pm 0.29	1.47 \pm 1.75
	Roseburia	0.17 \pm 0.08	0.11 \pm 0.07	0.24 \pm 0.17
Bacteroidetes	Bacteriodes	20.23 \pm 6.55 ^a	41.64 \pm 8.25 ^b	20.10 \pm 6.43 ^a
	Alloprevotella	4.07 \pm 3.37	2.20 \pm 2.76	3.19 \pm 3.61
	Alistipes	3.11 \pm 1.12 ^a	0.31 \pm 0.23 ^b	0.30 \pm 0.16 ^b
Proteobacteria	Enterobacter	0.02 \pm 0.03 ^a	3.94 \pm 7.40 ^b	0.04 \pm 0.05 ^a
	Parasutterella	0.01 0.01	1.78 \pm 3.55	0.04 \pm 0.06
Deferribacteres	Mucispirillum	1.38 \pm 1.66	1.64 \pm 1.56	2.72 \pm 3.00
Verrucomicrobia	Akkermansia	0 \pm 0	1.25 \pm 1.85	2.52 \pm 4.25

Genus level classification of 16s rRNA gene sequences from stool samples collected 19days after DSS treatment. Table is shown to as the mean \pm SEM and were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); n = 6 mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

(마) Species level: 박테리아 구성이 Control군에 비해 DSS군에서 변화되었으며, SQE군은 상대적으로 Control군과 유사한 구성을 보였다. 특히 Bacteriodes acidifaciens의 비율이 DSS군에서 유의적으로 증가하고 SQE군에서 유의적으로 감소하였다(Figure 53, Table 9).



Figure 53. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Class/Species level의 박테리아 구성
(A) Control, (B) DSS, (C) SQE, SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

Table 9. in vivo 동물모델의 변에서 Pyrosequencing을 통해 분석한 Species level의 박테리아 구성

Species	Group	Control (n=6)	DSS (n=6)	SQE (n=6)
<i>Bacteroides acidifaciens</i>		0.48 ± 0.41 ^a	18.54 ± 9.75 ^b	9.53 ± 6.55 ^a
<i>Bacteroides sartorii</i>		7.03 ± 10.51	6.22 ± 8.79	0.19 ± 0.19
<i>Clostridium cocleatum</i>		0.17 ± 0.13	9.43 ± 3.84	3.73 ± 4.21
<i>Mucispirillum schaedleri</i>		1.38 ± 1.66	1.64 ± 1.56	2.72 ± 2.98
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>		0.01 ± 0.02	3.38 ± 6.37	0.04 ± 0.05
<i>Akkermansia muciniphila</i>		0 ± 0	1.24 ± 1.84	2.51 ± 4.24
<i>Romboutsia ilealis</i>		0 ± 0	1.17 ± 2.87	2.08 ± 4.32
<i>Lachnospiraceae_uc_s</i>		1.41 ± 0.47 ^{ab}	0.25 ± 0.29 ^b	1.47 ± 1.75 ^a
<i>Bacteroides_uc</i>		0.30 ± 0.09	1.85 ± 1.18	0.73 ± 0.38
<i>Butyricimonas virosa</i>		0.45 ± 0.17	0.47 ± 0.30	0.38 ± 0.19
<i>Ruminococcaceae_uc_s</i>		0.54 ± 0.49	0.07 ± 0.06	0.27 ± 0.23
<i>Lactococcus lactis subsp</i>		0.41 ± 0.32	0.23 ± 0.19	0.15 ± 0.11

Species level classification of 16s rRNA gene sequences from stool samples collected 19days after DSS treatment. Table is shown to as the mean ± SEM and were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$); n = 6 mice per group. SQE, *Sasa quelpaertensis* extract; DSS, dextran sulfate sodium.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1절 : 목표대비 달성도

1. 세부과제별 정성적 연구목표대비 달성도

연구개발 목표	연구개발내용	달성도 (%)
<input type="checkbox"/> 1차년도: 조릿대 잎 추출물의 만성염증 장 질환에서의 건강기능성 및 항염 기능과 기전규명	제주조릿대 잎 추출물의 항염 기능성 효과와 그 기전을 in vitro, in vivo 마우스모델을 통하여 확인	100
○ in vitro 실험을 통한 조릿대 잎 추출물 및 조릿대 활성 물질의 항면역 효과와 그 기전 규명	- LPS로 염증을 유도한 co-culture system에서 조릿대의 처리에 따른 염증성 인자의 억제를 여러 molecular level에서 규명함	100
○ in vivo 마우스 모델을 이용하여 조릿대 잎 추출물의 만성염증 장 질환 유도 및 항면역 효과와 기전 규명	- 2.5%의 DSS를 식수로 공급함으로써 대장 염증을 유도하여 동물모델을 확립하고 임상적 정도 측정 - 동물 대장조직에서부터 PCNA 단백질의 면역염색을 수행하여 조릿대가 대장상피세포의 분열에 미치는 영향을 측정함 - 동물의 대장조직에서 분리한 단백질과 RNA, 혈액을 이용해 염증성 지표를 분석함으로써 조릿대의 효능을 여러 molecular 수준에서 규명함	100
<input type="checkbox"/> 2차년도: 조릿대 잎 추출물의 대장암 줄기세포 억제에 미치는 효과 규명	제주조릿대 잎 추출물의 대장암 줄기세포 억제에 미치는 효과와 그 기전을 in vitro, in vivo 마우스모델을 통하여 확인	100
○ in vitro 실험을 통한 조릿대 잎 추출물 및 조릿대 활성 물질의 대장암 줄기세포의 분화에 미치는 영향과 그 기전 분석	- in vitro 실험을 통한 조릿대의 대장암 줄기세포 분화에 미치는 영향과 그 기전을 ALP와 여러 줄기세포 발현을 통해 분석 - in vitro 실험을 통한 조릿대의 대장암 줄기세포 자가복제에 미치는 영향을 clonogenic assay와 sphere formation assay를 통해 분석하고, Hif-1α의 발현을 통해 규명	100

연구개발 목표	연구개발내용	달성도 (%)
○ in vivo Xenograft 모델을 통해 조릿대 잎 추출물이 대장암 생성에 미치는 영향 규명	- in vivo xenograft 모델을 통한 조릿대의 대장암 생성에 미치는 영향을 종양생성 정도, 종양크기 등으로 규명 - in vivo xenograft 모델을 통한 조릿대의 대장암 생성에 미치는 영향을 암줄기세포 마커, HIF-1α, VEGF 등 분자적 기전으로 규명	100
□ 3차년도: 조릿대 잎 추출물의 만성염증 장 질환에서의 항산화 효과 DNA damage 개선 효과, 장관기능에 미치는 영향 및 장내 미생물 군집에 미치는 영향 규명	제주조릿대 잎 추출물의 기능성 효과와 그 기전을 in vivo 마우스모델을 통하여 확인	100
○ in vivo 마우스 모델을 이용하여 조릿대 잎 추출물의 만성염증 장 질환 유도	- 2.5%의 DSS를 식수로 공급함으로써 대장 염증을 유도하여 동물모델을 확립하고 임상적 정도 측정	100
○ 만성 염증성 마우스 모델에서 항산화 효과와 그 기전 분석	- 동물 대장조직에서 분리한 단백질, 혈액을 이용해 항산화 지표를 분석함으로써 조릿대의 효능을 여러 molecular 수준에서 규명함	100
○ 항산화 효과와 DNA damage에 미치는 영향 규명	- 동물 대장조직에서부터 8-oxo-dG 단백질의 면역염색을 수행하여 조릿대 잎 추출물이 대장상피세포의 DNA damage에 미치는 영향을 측정함	100
○ in vivo 마우스 모델을 이용하여 조릿대 잎 추출물의 장관기능에 미치는 영향을 분석	- 장통과 시간과 장 운동성을 측정하여 조릿대 잎 추출물이 장관기능에 미치는 영향을 규명	100
○ in vivo 모델에서의 조릿대의 장내 미생물 군집(microbiome)에 미치는 효과 분석	- 동물의 변에서 뽑아낸 DNA를 pyrosequencing을 통해 분석하여 장내 미생물 군집의 변화를 분석함	100

2절 : 정량적 성과

1. 정량적 목표대비 달성도

구 분	논문 게재		산업재산권		학술발표		기술이전	정책건의	영농활용	홍보
	SCI	비SCI	출원	등록	국내	국제				
당초 목표 (전체)	3	1	1	0	3	2	0	0	2	0
1년차 (2013)	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
2년차 (2014)	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
3년차 (2015)	2	1	1	0	1	1	0	0	0	1
소계	3	1	2	0	3	2	0	0	1	1
달성도 (%)	100	100	초과 달성	100	100	100	100	100	50	초과 달성

영농활용 부분의 성과는 미흡하나 홍보부분과, 산업재산권 출원 부분에서 초과달성함.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1절 : 연구개발결과의 활용방안

1. 제주 조릿대에서 유래된 기능성 물질의 효과와 안전성을 규명하여 이를 소재화한 기능성 식품을 개발하여, 국내 수요뿐 아니라 수출에 힘써 조릿대 재배 농민의 안정된 수입보장 뿐 아니라 국가경제발전에 기여함.
2. 조릿대의 대장건강 효능에 미치는 영향을 규명한 연구결과 중, 경제성이 있다고 판단되는 사항은 특허출원 후 관련기업에 기술 이전함.
3. 조릿대의 항염, 항암, 항산화, 대장 미생물 군집 등에 미치는 영향을 규명한 결과를 국제 학술지 및 학술대회에 발표하고 이를 홍보함.
4. 제주조릿대는 예로부터 당뇨, 고혈압, 면역력 증강, 항암 등의 치료에 사용해오던 다기능성 자원으로 위와 같은 과학적 연구를 통해 항염증, 항암 효과가 입증 되었으므로, 인체에 자연스러운 천연식품으로서 암의 예방 및 치료에 응용할 수 있으며, 현재 대장암 환자들이 겪는 항암제 및 항암치료에 의한 부작용을 줄이는데 활용 될 수 있음.
5. 제주조릿대는 제주에서 가장 풍부한 임산물이면서 유네스코 제주도 생물권보전지역 인증 품목 산업적으로 가장 청정한 천연소재로, 유네스코 제주도 생물권보전지역 품목, 국제유기농(IFOAM) 등을 획득하여 청정자원 브랜드로 활용가치가 있음.
6. 최근 제주 조릿대의 다양한 기능성의 과학적 입증을 기반으로 2010년부터 신산업이 시작되고 있는데, 현재 연구를 기반으로 식품, 향장품, 주류, 생활용품, 건축자재 등으로 산업 인프라 확대에 기여 할 수 있음.

2절 : 현재 추진 중인 연구 개발 결과 활용 계획

1. 조릿대 잎 추출물의 장내 미생물 군집에 미치는 효과'에 대한 SCI 논문작성 중
2. '염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물'의 국내특허출원(10-2015-0162647) 심사 중.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1절 : 천연물질을 이용한 국외의 연구

1. 천연물질을 이용한 국외의 장내 염증과 면역에 대한 연구 및 과학 기술 정보

천연물질 소재를 활용하여 염증성 장 질환에 대한 항염증 치료제로써 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있음. 아시아, 유럽 등 다양한 국가의 천연 물질이 연구의 소재로 각광 받고 있음. 또한 천연물질의 효과를 입증하기 위해 다양한 실험모델과 실험방법에 연구에 사용되고 있음. in vivo 모델에서는 현 연구에서 사용된 DSS로 장내 염증을 유발하는 모델이 가장 많이 사용되고 있으나, 그 외에도 TNBS, acetic acid도 여러 dose로 활용하여 염증성 장질환을 유도함. in vitro 모델에서는 사람의 대장세포인 Caco-2 cell에 바로 염증을 자극하거나, Raw 264.7 cell에 LPS로 자극하는 방법, Coculture 방법 등이 연구 목적에 맞게 다양하게 사용되고 있음.

천연물질	연구방법	연구결과	참고문헌
<i>Inonotus obliquus</i> (IO) - 차가버섯	DSS-유도 염증성 장질환 마우스 모델 활용	대표적인 proinflammatory mediator인 TNF- α , Cox-2, IL-4, IFN- γ 감소, STAT1, STAT6 발현 감소	Debnath et al 2012
<i>Ginger</i> (Zingiber officinale) - 생강	TNBS-유도 염증성 장질환 마우스 모델 활용	대장에서의 NF- κ B 활성화 억제, IL-1 β 신호 전달 과정 억제	Hsiang et al 2013
Cocoa polyphenols extract - 코코아	TNF- α -stimulated Caco-2 cell 실험모델을 활용한 in vitro 실험	NF- κ B traslocation과 JNK 인산화를 억제함으로써 염증성 마커들의 수준을 down regulation 시킴	Ildefonso Rodríguez-Ramiro et al 2013
Schizonepeta tenuifolia - 형개	LPS-stimulated RAW 264.7 cell 실험모델을 활용한 in vitro 실험	iNOS 활성화 억제, DNA 산화 억제	Tae et al 2013

2. 천연물질을 이용한 국외의 대장암 줄기세포에 대한 연구 및 과학 기술 정보

암줄기세포는 현재까지 우리나라에서 많이 연구되지 않은 분야이지만, 해외에서는 다양한 방법으로 암줄기세포를 타겟하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있음. 특히, 최근에는 intestinal Wnt target genes에 대한 천연물질의 암줄기세포를 타겟 연구가 활발하며 이러한 연구는 종양의 증식억제와 항암제 대체요법과 개발에 큰 도움을 줌.

천연물질	연구방법	연구결과	참고문헌
<i>Auraptene</i> (7-geranyloxycoumarin, AUR), - 과일, 채소에서 추출하는 extract	HT-29과 HCT-116 wild-type과 FOLFOX-resistant cells을 이용한 in vitro 실험 모델 활용	FOLFOX-resistant colon cancer HT-29 cell에서 colonospheres 성장 및 형성 억제. phospho-epidermal growth factor receptor 감소	Francesco Epifano et al 2013
Anthocyanin-포함 purple-fleshed potatoes	대장암 줄기세포를 CD44, CD133, ALDH1b1 marker로 isolation한 in vitro 모델과 AOM - induced colon tumorigenesis in vivo 모델 활용	대장암 줄기세포의 p53-independent manner의 세포 사멸을 증가시키고, 세포 증식을 억제. Wnt pathway와 β -catenin 신호전달의 수준을 억제, Bax, cytochrome C 증가, proteins-mediating mitochondrial 세포사멸 증가. In vivo에서, nuclear β -catenin 감소.	Venkata Charepalli et al 2015

3. 천연물질을 이용한 국외의 장내 미생물 군집에 대한 연구 및 과학 기술 정보

장내 미생물 군집에 관한 연구는 현재 국외 뿐만 아니라 국내에서도 활발하게 진행되고 있으며, 차세대 염기 서열 분석 기술의 발전과 더불어 기존의 배양가능한 미생물을 넘어서 배양 불가능한 미생물의 구성에 초점이 맞춰지고 있음. 또한 비만, 식이습관 등과 미생물 군집사이의 관계에 대한 연구와 염증성 장 질환, 심혈관계 질환, 대사 증후군, 암, 뇌 등 다양한 질병의 새로운 치료 방법으로서 장내 미생물 군집에 대한 연구가 진행되고 있음. 하지만 천연물질을 활용하여 장내 미생물 군집을 변화시키려는 시도는 아직 미약함.

질병	연구결과	참고문헌
비만	장내 미생물 군집의 Short chain fatty acid (SCFA) 대사를 통하여 <i>Firmicutes</i> 를 증가, <i>Bacteroidetes</i> 를 감소 시키는 등 미생물 군집의 구성 변화	Kyu Yeon Hur et al 2014
천연물질	연구결과	참고문헌
Anthocyanins	박테리아의 transformation에 관여하여 <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 변화	B.Miladino vi' et al 2014

제 7 장 기타 중요 변동사항

1절 : 중요 변동 사항

연차	변동사항	근거
1년차 (2013)	<ul style="list-style-type: none"> - 협약시 농진청과 협의결과 조릿대 추출물 (crude extract)로 충분하며, 기능활성성분도 함께 이용하기로 함. - 산업재산권 등 실용화 목표 중 특허 출원 1건 추가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선정평가위원회 지적사항에 대한 변경 <ul style="list-style-type: none"> - 제주 조릿대를 이용한 대장 건강 개선 효능 평가 연구로서 다양한 추출물의 검토가 필요함 - 실용화목표 상향조절 요망
	<ul style="list-style-type: none"> - 2차년도와 3차년도의 연구내용을 바꿈. - 조릿대잎 추출물임을 명시 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 협약 시 지적사항에 대한 변경 <ul style="list-style-type: none"> - 2차년도 연구내용 (염증성 장 질환 마우스에서의 조릿대의 항산화효과, 대장세포 DNA damage, 장관기능에 미치는 영향 및 염증 시 장내 미생물 군집에 미치는 효과분석)과 3차년도 연구내용 (조릿대의 암줄기세포 타겟의 항대장암 효과 규명)을 바꿔서 연구수행 - 추출물이 조릿대의 어느 부위임을 명시
2년차 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> - 원료의 표준화 경우, 이미 원료를 제공받고 있는 제주대학교 산학단에서 원료를 표준화를 한 바 있음 - 조릿대를 기능성 소재로 활용하는 방안의 일환으로 특허 출원 1건을 하는 것으로 연구계획을 수정한 바 있으며, 1차년도에 영농활용 기관제출 1건 등도 추가된 바 있음 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1년차 연차평가위원회 지적사항에 대한 반영 <ul style="list-style-type: none"> - 조릿대를 기능성 소재로 활용 할 수 있도록 실용화를 고려한 연구를 요망. - 제주조릿대의 대장건강 개선 기능성 규명 및 효능평가에 대한 연구가 적절하게 이루어지고 있음, 연구 방법이 실험상의 문제점에 의해 다소 변경되긴 하였으나 주요 목표에 변화를 주지는 않음
3년차 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> - DNA damage 억제 효과 규명 연구 방법 변경 	<ul style="list-style-type: none"> DNA damage 억제 효과 규명을 위해 DNA damage 측정을 comet

		<p>assay를 이용해 분석하기로 연구계획을 하였으나, 8-hydroxy 2 deoxyguanosine을 이용한 DNA damage측정법이 더 효율적이라고 판단되어 연구방법을 수정하여 대체함.</p>
--	--	--

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구장비 현황

* 국가과학기술정보시스템에 등록된 연구 장비는 보유하고 있지 않음.

제 9 장 참고문헌

고성준 and 김주성 (2010). “특집 : 대장암의 조기 발견 및 치료에 대한 전략 ; 최근에 한국인에서 대장암이 증가하는 이유는?” 대한내과학회지 79(2): 97-103.

권경훈 and 정해원 (2012). “차세대 염기서열 분석 기법과 활용.” 人口醫學研究論集 25(-): 42-48.

김미정, 변명우, 장명숙 (1996), “대나무(이대)잎의 생리활성 및 항균성 효과”, 한국영양식량학회지 25(1):135-142.

임진아, 나영순, 백승화 (2004), “대나무 에탄올추출물의 항산화 효과 및 아질산염 소거작용”, 한국식품과학회지, 36(2):306-310

최선필 (2007). “유색미 겨 추출물의 만성염증질환 억제효과”. 국내박사학위논문, 아주대학교 일반대학원.

B. Miladinovi´ c, M. Kosti´ c, K. Savikin et al.. (2014) “Chemical profile and antioxidative and antimicrobial activity of juices and extracts of 4 black currants varieties (*Ribes nigrum*L.),” J Food Sci, 79:C301 - C309.

Baldassano, L. Nessel, H. Li, F. D. Bushman and J. D. Lewis (2011). “Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes.” Science 334(6052): 105-108.

Bengmark, S. (2007). “Bioecological control of inflammatory bowel disease.” Clin Nutr 26(2):169-181.

Bengmark S.(2007), “Diet of our time behind inflammation and disease development. Heating of food produces dysfunctional proteins which accumulates in the body”, Lakartidningen. Dec 19;104(51-52):3873-7

Cancer Facts & Figures - African Americans 2007-2008, American Cancer Society.

Choi, S. Y., H. S. Cho and N. J. Sung (2006). “The Antioxidative and Nitrite Scavenging Ability of Solvent Extracts from Wild Grape (*Vitis Coignetiea*) Skin” J Korean Soc Food Sci Nutr, 35(8):961-966.

Chuyen, N. V., T. Kurata, A. Kato and M. Fujimaki (1982). “Antimicrobial activity of Kumazasa (*Sasa albo-marginata*).” Agric Biol Chem 46(4):971-978.

De Filippo, C., D. Cavalieri, M. Di Paola, M. Ramazzotti, J. B. Poullet, S. Massart, S. Collini, G. Pieraccini and P. Lionetti (2010). “Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa.” Proc Natl Acad Sci U S A 107(33):14691-14696.

Debnath, T. Hasnat, M.A. Pervin, M. Lee, S.Y. Park, S.R. Kim, D.H. Kweon, H.J. Kim, J.M. Lim, B.O (2012). “Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) grown on germinated brown rice suppresses inflammation associated with colitis in mice.” Food Sci. Biotechnol, 21:1235 - 1241

Engelbrecht AM, Mattheyse M, Ellis B, Loos B, Thomas M, Smith R, Peters S, Smith C, Myburgh K (2007), “Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line”, Cancer Lett.

258(1):144-53.

Francesco Epifano, Salvatore Genovese, Rebecca Miller and Adhip P. N. Majumdar. (2013) "Auraptene and its Effects on the Re-emergence of Colon Cancer Stem Cells." *Phytother. Res.* 27:784 - 786

Frank, N. Y., T. Schatton and M. H. Frank (2010). "The therapeutic promise of the cancer stem cell concept." *J Clin Invest* 120(1):41-50.

Gottesman, M. M., T. Fojo and S. E. Bates (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." *Nat Rev Cancer* 2(1):48-58.

Hsiang, C.Y.; Lo, H.Y.; Huang, H.C.; Li, C.C.; Wu, S.L.; Ho, T.Y. (2013) "Ginger extract and zingerone ameliorated trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice via modulation of nuclear factor- κ B activity and interleukin-1 β signalling pathway." *Food Chem*, 136:170 - 177.

Ildefonso Rodríguez-Ramiro, Sonia Ramos, Elvira López-Oliva, Angel Agis-Torres, Laura Bravo, Luis Goya and Maria Angeles Martín. (2013) "Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF- α -stimulated Caco-2 cells" *Br J Nutr* 110:206 - 215

Kaur M, Singh RP, Gu M, Agarwal R, Agarwal C (2006), "Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells", *Clin Cancer Res.* 2(20 Pt 1):6194-202.

Kim JI, Kim YS, Lee HA, Lim JY, Kim M, Kwon O, Ko HC, Kim SJ, Shin JH, Kim Y (2014), "Sasa quelpaertensis Leaf Extract Improves High Fat Diet-Induced Lipid Abnormalities and Regulation of Lipid Metabolism Genes in Rats", *J Medl Food* 17(5):571-581.

Kyu Yeon Hur, Myung-Shik Lee. (2014) "Gut Microbiota and Metabolic Disorders." *Diabetes Metab J* 39:198-203

Reynertson, K. A., M. E. Charlson and L. J. Gudas (2011). "Induction of murine embryonic stem cell differentiation by medicinal plant extracts." *Exp Cell Res* 317(1): 82-93.

Su CC, Lin JG, Li TM, Chung JG, Yang JS, Ip SW, Lin WC, Chen GW (2006), "Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca²⁺ and the activation of caspase-3", *Anticancer Res.* Nov-Dec;26(6B):4379-89.

Tae, K.-S. Kim, S.-J. (2012) "Inhibition of iNOS and DNA oxidation by methanol extract of *Schizonepeta tenuifolia*." *Trop. J. Pharm. Res*, 11:397 - 404.

Venkata Charepalli, Lavanya Reddivari, Sridhar Radhakrishnan, Ramakrishna Vadde, Rajesh Agarwal, Jairam K.P. Vanamala. (2015) "Anthocyanin-containing purple-fleshed potatoes suppress colon tumorigenesis via elimination of colon cancer stem cells." *J Nutr Biochem* 26:1641 - 1649

Vincent B. Young (2012), *The Intestinal Microbiota in Health and Disease*, *Curr Opin Gastroenterol.* Jan; 28(1): 63 - 69.

Wu, G. D., J. Chen, C. Hoffmann, K. Bittinger, Y. Y. Chen, S. A. Keilbaugh, M. Bewtra, D. Knights, W. A. Walters, R. Knight, R. Sinha, E. Gilroy, K. Gupta, R. Young, V.

B., S. A. Kahn, T. M. Schmidt and E. B. Chang (2011). "Studying the Enteric Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Getting through the Growing Pains and Moving Forward." *Front Microbiol* 2:144..

Zykova TA, Zhu F, Zhai X, Ma WY, Ermakova SP, Lee KW, Bode AM, Dong (2008), "Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis", *Mol Carcinog.* 47(10):797-805.

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「(예산사업명) 국책기술개발사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서의 내용을 인용·발표할 때는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「(예산사업명) 국책기술개발사업」의 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.