

국내산 방향성식물을 이용한 허혈성 뇌졸중 예방소재 탐색 및 기능성식품 응용 연구

Screening of anti-stroke materials from
domestic herb plants and their application to
functional foods

연 구 기 관
한 국 식 품 연 구 원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 방향성식물을 이용한 허혈성 뇌졸중 예방소재 탐색 및 기능성식품 응용 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다

2005년 10월 15일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
총괄연구책임자 : 전 향 숙
세부연구책임자 : 이 창 호
위탁연구책임자 : 김 원 기(이화여자대학교)
위탁연구책임자 : 임 용 호(건국대학교)
연 구 원 : 김 현 정
연 구 원 : 김 지 명
연 구 원 : 장 현 주

요 약 문

I. 제목

국내산 방향성식물을 이용한 허혈성 뇌졸중 예방소재 탐색 및 기능성식품 응용 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 필요성

한국인의 사망원인은 1위 암, 2위 뇌혈관질환, 3위가 심장질환으로 혈액순환기 계통의 질환이 주요 사망원인의 2, 3위를 차지하고 있으며(2003년 통계청 자료), 혈액순환관련 환자는 80년대 초와 비교할 때 7배 정도로 급증하고 있는 상황이다. 혈액순환기 계통의 질환 가운데 허혈성 뇌졸중은 뇌로 혈액을 공급하는 혈관에 여러 가지 병리학적 이상이 발생되어 정상적 뇌혈류(50 ml/gram/minute)의 장애가 초래되면 일과성 뇌허혈증(transient cerebral ischemia)으로부터 완전 뇌졸중(complete stroke)으로 급속히 발전하게 되며, 2003년 우리 나라 인구 10만 명당 75명이 뇌졸중으로 사망한 것으로 보고되고 있다. 허혈성 뇌졸중은 갑자기 발생하고, 신경학적 이상을 동반하며 단시간내 급격하게 질병의 경과가 진행되어 응급 치료법인 색전용해술에 의해서도 완전 치유가 불가능하며 사망에 이르지 않더라도 부작용 및 후유증이 초래되어 직접·간접적으로 심각한 사회, 경제적인 손실까지 야기되고 있으므로 예방이 매우 중요하게 인식되고 있다. 허혈성 뇌졸중의 예방을 위해서는 여러 위험인자들을 제거하거나 감소시키는 노력이 요구된다. 한편, 방향성식물에는 허혈성 뇌졸중 예방 활성이 있을 것이라고 기대되는 활성물질의 존재 가능성이 높고 한방에서는 예로부터 수종 방향성 식물을 뇌졸중 예방에 사용해 오고 있어, 이를 건강기능식품 소재로 개발할 경우 국내산 방향성 식물의 부가가치가 증가될 것이다. 이를 위해서는 국내산 방향식물로부터 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 선도 소재를 체계적으로 발굴하고 기능성 식품화를 위한 기초 응용 기술을 개발하는 것이 필요하다.

2. 목적

본 연구의 최종목표는 국내산 방향식물로부터 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 선도 소재를 발굴하고 기능성 식품화를 위한 응용 기술을 개발하는 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구의 최종목표는 국내산 방향식물로부터 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 선도 소재를 발굴하고 기능성 식품화를 위한 응용 기술을 개발하는 것이다. 이를 위한 본 연구개발과제의 연차별 연구개발 목표 및 내용은 다음과 같다.

구분	연구개발목표	연구개발 과제의 범위
1차년도	허혈성 뇌졸중 예방 식품 선도 소재 발굴 및 생체내 효과 조사	<ul style="list-style-type: none"> ● 방향식물 추출물의 제조 및 표준화 연구 ● 시험관내 모델을 이용한 활성 물질의 탐색 및 발굴 ● 뇌허혈 동물모델을 이용한 효과 조사
2차년도	허혈성 뇌졸중 예방 활성물질의 조분리 및 작용기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> ● 뇌허혈 동물모델을 이용한 효과 조사 ● 세포모델에서 허혈성 뇌졸중 예방 작용기전 연구 ● 활성물질의 조분리 ● 선별된 추출물의 소재화를 위한 기초조사
3차년도	허혈성 뇌졸중 예방 기능성 식품화를 위한 응용기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 활성물질의 분리, 구조분석 및 동정 ● 뇌허혈 동물모델을 이용한 허혈성 뇌졸중 예방효과 확인 ● 허혈성 뇌졸중 예방 기능성 식품화를 위한 응용기술 연구 ● 기술적용 소재의 특성 평가

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 허혈성 뇌손상 예방 소재 탐색 및 발굴

국내산 방향성식물로부터 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 선도 소재를 발굴하기 위하여 기존 database 및 자료조사로부터 식물원료 22종을 선별하였다. 그런 다음 감압하의 증기증류와 액체-액체 연속 추출방법에 의해 추출물을 제조하고 각 추출물의 구성성분을 정성 및 정량분석 하였다. 이로부터 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 소재를 탐색하고 발굴하기 위하여 human brain neuroblastoma cell을 이용하여 산소와 포도당 결핍 상태(hypoxia 및 hypoglycaemia)와 회복시킨 조건(simulated reperfusion)을 결합시킨 시험관내 유사 허혈(*in vitro* simulated ischemia) 모델을 확립하고 활성을 조사하였다. 그 결과, 방향성 시료 추출물의 수율은 시료중량의 0.3~38.8 mg% 범위로 넓게 나타났으며, 조사한 시료중 *Acori graminei* Rhizoma(AGR), *Chrysanthemi Flos*(CF), *Pini Foilium*(PN), *Allium victoriallis* var. *platyphyllum*(WAD), *Acanthopanax Cortex*(ESR), *Vitis vinifera*(VV)과 WAD의 수용성 원료 성분인 (R)-allylthio-2-aminopropionic acid(SAC)이 비교적 높은 효과를 보였다. 또한 방향성 식물 추출물로부터 분리된 성분 가운데, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo(7.2.0)undec-4-ene(TMBU), 4,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol(TMBH), 4-allyl-1,2-dimethoxybenzen(ADB)의 허혈성 뇌손상 보호 효과가 비교적 높았다.

2. 허혈성 뇌손상 예방 활성물질의 작용기전 조사

세포모델에서 허혈성 뇌손상 예방 작용기전은 뇌허혈에 의한 뇌손상을 일으키는 기전(Blockade of NMDA receptor, Removal of oxidative stress, Blockade of glial cell activation, Blockade of cell cycle progression 등)에 의거하여 조사하였다. 먼저 NMDA receptor 차단 효과는 CCN(cerebral cortical neuron) 초대배양 세포를 이용하여 NMDA neurotoxicity에 대한 후보물질의 효과를 확인하였다. 그 결과, SAC은 NMDA receptor와 세포

주기 및 교세포 활성화에 미치는 영향은 비교적 적었으며, 여러 가지 실험 모델에서 산화적 스트레스를 차단하고 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달체인 MAPKs(mitogen activated protein kinases) 중에서 ERK(extracellular signal-regulated kinase)의 활성화를 저해하였다. PN 또한 NMDA receptor와 세포주기에 미치는 영향은 비교적 적었으나 산화적 스트레스를 차단하고 교세포 활성화에 관여하는 일부 염증 매개물질을 저해하는 것으로 나타났다.

3. 뇌허혈 동물모델을 이용한 효능 조사

임상학적 뇌허혈 손상과 유사한 특징을 가지는 동물모델로 전뇌허혈 모델과 국소 허혈 모델을 확립하였다. 전뇌허혈 모델의 경우, Mongolian gerbil의 양측 총경동맥을 5 분 동안 결찰하여 허혈을 유발한 다음 뇌손상을 살펴본 결과, 허혈 유발 후 4일부터 해마(hippocampus) CA1부위의 신경세포 손상이 관찰되었다. 또한 전뇌허혈 모델에서 Map-2(microtubule associated protein-2) 항체와 정상교세포의 marker인 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행한 결과, 정상군과 비교하여 뚜렷한 차이를 관찰할 수 있었다. 한편 국소허혈 모델에서 뇌손상을 일차적으로 평가하기 위하여 TTC 용액으로 염색하고 경색용적(total infarct volume)을 측정된 결과, 전체 경색용적은 허혈 24시간 군에서 $310 \pm 23 \text{ mm}^3$ 으로 측정되었고, 부종율은 $24 \pm 4\%$ 로 조사되었다.

전뇌 허혈 동물 모델을 이용하여 후보물질의 특성에 따라 경구 또는 복강을 통하여 후보 물질을 투여한 다음 후보물질 투여에 의한 효과를 조사하였다. 그 결과 시험관내 유사 허혈 모델(simulated *in vitro* ischemia model)을 이용하여 선발한 시료 가운데 PNW, SAC, VV의 유의적인 효과($P < 0.01$)가 전뇌 허혈 동물 모델에서 확인되었다. 국소 허혈 동물 모델에서의 효과를 조사한 결과, 전뇌 허혈 동물 모델에서 효과가 있었던 PNW, SAC, VV 시료 가운데 SAC과 PNW의 효과가 비교적 우수한 것으로 나타났다. 또한 방향성 식물 추출물로부터 분리된 성분 가운데, TMBH, TMBU

및 ADB이 전뇌 및 국소허혈 동물모델에서 효과가 있었다.

최종 활용도를 고려하여 고혈압 뇌졸중 동물모델인 뇌졸중 발증성향 SHR(SHRSP/Izm) rat에게 SAC과 TMBU 시료가 함유된 식이(diet)와 NaCl이 포함된 식수를 공급하였을 때 뇌졸중 발병 및 수종 관련 생체 지표를 살펴보았다. 그 결과 뇌졸중 유발 빈도의 경우 SAC 보충군이 대조군에 비해 22% 감소되었고, 시험기간 동안 대조군은 33%의 사망률을 보이는데 비해 SAC 보충군에서는 사망 예가 관찰되지 않았다. 또한 신경장애 행동지수도 대조군에 비해 SAC 보충군에서는 유의적으로 낮은 경향을 보였다. 한편, TMBU 또한, 0.1% 보충군에서는 뇌졸중이 발병하지 않았을 뿐만 아니라 대조군을 포함한 다른 군에 비해 신경장애행동지수도 유의적으로 낮은 경향을 보였다. 그러나 혈압, 혈액학적 지표, 혈청중 사이토카인 수준에서는 대조군과 비교할 때 차이가 없었다.

4. 활성소재의 구조분석 및 동정

5개의 물질(시료 A, B, C, D, E)을 단리한 후 구조분석을 위해 약 300mg의 시료를 확보하여 ¹H NMR, ¹³C NMR, distortionless enhancement by polarization transfer(DEPT), heteronuclear multiple quantum coherence(HMQC), correlated spectroscopy(COSY), heteronuclear multiple bonded connectivities(HMBC) 등의 실험을 수행하였다. 그 결과, 시료 A는 4,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol로 시료 C는 4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo(7.2.0)undec-4-ene로 확인되었으며, 그 외 단리 시료의 구조 동정을 위해서는 추가적인 정제가 요구되었다.

5. 기능성식품 응용기술 연구

식품소재 원료로서 활성물질의 특성을 살펴보기 위해 활성물질별로 HPLC 또는 GC 분석방법을 확립한 다음 열 및 저장안정성을 조사하였다. 그 결과 SAC은 조사된 pH 조건에서 안정하였고, 60°C에서 24시간 처리하였을 때 약 1%의 함량 감소를 나타낸 것을 제외하고는 조사된 조건에서

비교적 안정한 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 SAC을 약 12주 동안 저장한 결과에서도 안정한 것으로 관찰되었다. 방향성 식물 추출물로부터 확인된 활성성분인 TMBU와 TMBH를 100℃에서 1-60분 동안 가열하면서 열안정성을 살펴본 결과 TMBH는 비교적 높은 열안정성이 관찰되었으나, TMBU는 1시간 이상 가열에서는 열안정성이 감소되는 것으로 나타났다. 저장안정성의 경우, TMBH는 4주 저장후 관찰한 실험조건에서 20% 정도 손실되었으나 TMBU는 25℃에서 저장 4주째에는 약 53% 정도 손실되는 것으로 나타났다. 한편, 인체 섭취시 안전성을 고려하여 SAC과 PN의 경우 단위 급성독성을 살펴본 결과, 치사량은 암·수 각각 2,000 mg/kg 이상으로 비교적 독성이 적은 것으로 관찰되었다.

선별된 후보들의 효능, 추출수율과 이화학적 특성을 고려하여 배합조성과 디자인 선정을 시도해본 결과, SAC 또는 SAC-Ex은 원가면에서 유리한 경질 캡셀을 사용하고, 크기는 0호로 하는 것이 타당할 것으로 보였다. 방향성 식물 추출물인 PN이나 추출물로부터 분리된 활성물질인 TMBH, TMBU 및 ADB은 음료 형태의 건강기능식품으로 응용하는 것이 바람직할 것으로 보였다. 이들 추출물 또는 활성성분을 응용하여 음료 형태의 건강기능식품을 제조할 경우, 설탕 5 내지 10 중량%, 구연산 0.05 내지 0.3 중량, 카라멜 0.005 내지 0.02 중량%, 소르비탄 모노스테아레이트 0.1% 중량, 비타민 C 0.1 내지 1 중량%의 첨가물을 혼합하고 여기에 79 내지 94 중량%의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 약 90℃에서 약 100초간 살균하여 냉각수와 1:4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5 내지 0.82 중량%를 주입하는 것을 기본 배합비로 하여 여기에 TMBH, TMBU 및 ADB 10 - 20g을 탄산가스와 혼합된 시럽과 혼합하여 탄산음료를 제조하는 것을 prototype으로 선정하였다. 방향성 식물 추출물인 PN이나 활성물질인 TMBH, TMBU 및 ADB를 캡셀의 형태로 제조할 경우, 경질캡셀보다 부드러운 젤라틴막으로 성형한 연질 캡셀제가 더 적당할 것으로 판단되었다.

국내 방향성식물 자원으로부터 허혈성 뇌손상을 예방할 수 있는 건강기

능성 후보물질의 효과를 여러 실험 모델에서 조사하고 가능한 작용기전을 연구함으로써 산업적으로 활용할 수 있는 기초 기술이 축적될 수 있을 것으로 예상된다. 특히 노령화되는 사회에서 허혈성 뇌졸중 관련 건강기능식품 시장은 계속 성장할 것으로 예측되고 있어 효과에 대해 health-claim을 인정받을 수 있는 건강기능성식품의 개발을 유도하는 것은 국내 건강기능식품 시장을 활성화하고 건전성을 부여하는데 기여할 것으로 전망된다.

SUMMARY

I. Title of the Study

Screening of anti-stroke materials from domestic herb plants and their application to functional foods

II. Objectives and Significance of the Study

The objectives of this study is to screen anti-stroke materials from domestic herb plants and to investigate their application technology to functional foods.

III. Contents and Scope of the Study

Cerebral ischemia, the most commonly encountered type of stroke in humans, is an important cause of brain injury and permanent neurologic disability. At present, stroke is the first leading cause of death in the elderly population in Korea. Despite extensive research efforts to better understand the biological mechanisms of stroke-induced neuronal injury in experimental models, a promising therapeutic solution which protects neurons from various types of insult remains unavailable for clinical application. Recently, it is suggested that the prevention of cerebral ischemia by diet therapy or food supplements is being considered as a promising solution in reducing stroke-induced neuronal injury.

The present study was aimed 1) to screen anti-stroke materials from domestic herb plants and 2) to examine the effect of candidate materials on neuroprotection in animal models and its mechanism in cerebral ischemic insult, and 3) further to investigate their application technology as a functional materials or functional foods.

IV. Results and Recommendation

1. Screening of bioactive volatile plant extracts

We attempted to screen anti-stroke materials/extracts from domestic herb plants having protective potentials against ischemic stroke. Twenty two herbs selected from traditional Korean prescriptions or database were extracted by steam distillation under reduced pressure, followed by continuous liquid-liquid extraction. They were examined for protective potentials against ischemic brain injury using an *in vitro* simulated ischemia model. The human neuroblastoma cells were incubated with or without samples for 48 h and then exposed to simulated ischemia(hypoglycemia and hypoxia), followed by simulated reperfusion(reoxygenation). Among tested samples, *Acori graminei* Rhizoma(AGR), *Chrysanthemi Flos*(CF), *Pini Foilium*(PN), *Allium victorialis* var. *platyphyllum*(WAD), *Acanthopanax Cortex*(ESR), *Vitis vinifera*(VV) and (R)-allylthio-2-aminopropionic acid(SAC), a water-soluble component of WAD showed significantly high neuroprotective activities by the treatments of 10-100 µg/ml samples($p < 0.05$). Additionally, we found that 4,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol (TMBH), 4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo[7.2.0]undec-4-ene (TMBU), and 4-allyl-1,2-dimethoxybenzene (ADB) have neuroprotective activity among herbal constituents isolated.

2. Action mechanism on ischemic stroke in cell model

We further investigated the neuroprotective mechanism of SAC and PN using *in vitro* experimental models. SAC showed the negligible protective effect against NMDA-induced neurotoxicity in the cultured

cerebral cortical neuron. SAC reduced cell death up to about 20–37% from 100 μ M to 5mM in a dose dependent manner compared to control by 100 μ M H₂O₂. SAC also reduced cell death up to about 30% at 10 μ M as compared to control in glucose-deprived immunostimulated glial cells. On the other hand, SAC slightly block the oxidation of DCF-H to DCF induced by glucose-deprived immunostimulated glial cells. SAC and PN directly inhibited the oxidation of dihydrorhodamine-123 to rhodamine-123 by NO donor, S-nitroso-N-acetylpenicillamine in a dose-dependent manner. In glucose-deprived immuno-stimulated glial cells, SAC treatment reduced the immunoreactivity of nitrotyrosine, a marker for ONOO⁻. However, flow cytometry analysis showed the neuroprotective effects of SAC and PN were not attributed to their inhibition of cell cycle progression. The activity of extracellular signal-regulated kinase (ERK), one family of mitogen-activated protein kinases, was increased by oxygen-glucose deprivation in cultured cerebral cortex neurons as well as by transient middle cerebral artery occlusion in rats. We found that SAC significantly inhibited the activation of ERK, which was mimicked by the ERK inhibitors U0126. The results indicate that SAC may exert its neuroprotective effect on cerebral ischemic insults by scavenging ONOO⁻ as well as inhibiting the ERK signaling pathway. In contrast, PN may exert its neuroprotective effect on cerebral ischemic insults by scavenging oxidative stress as well as partly inhibiting the activation of glial cells.

3. Neuroprotective effect using *in vivo* ischemic model

To develop reliable *in vivo* global and focal cerebral ischemic models, histological evaluation methods were employed. Five-min occlusion of bilateral common carotid artery of Mongolian gerbils

induced neuronal cell damages in CA1 region of hippocampi 4 days after reperfusion. Cresyl staining showed loss and shrinkage of a number of pyramidal neurons. Immunohistochemical staining showed an increased number of GFAP (glial fibrillary acidic protein, an astrocyte marker)-positive cells and its immunoreactivity. As determined by 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride and cresyl violet staining, focal cerebral ischemia by occlusion of right middle cerebral artery for 2 hrs was found to induce most severe brain damages 24 hr after reperfusion.

The neuroprotective effect of the candidate extracts on the ischemic damage was examined using an *in vivo* focal and global ischemia models. Among tested samples, PNW, SAC and VV were found to increase the number of surviving cells/mm of the CA1 region ($P < 0.01$) in transient global ischemia model. In focal ischemia model, SAC and PN were effective on the reduction of infarction volume. Additionally, TMBH, TMBU and ADB isolated from herbal extracts were effective both in global and focal cerebral ischemic models.

To determine the effects of dietary SAC and TMBU on the development of stroke, salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) rats were fed a stroke-prone diet with or without SAC and TMBU for 4 weeks. No difference of blood pressure was observed after SAC and TMBU supplementation. In the SAC and TMBU administered groups, the onset of stroke was delayed in parallel with a decrease in the incidence and mortality. The SAC and TMBU administered groups scored better in the neurological examination than the control group. These results indicate that dietary SAC and TMBU attenuate the development of stroke in salt-loaded SHRSP rats.

4. Structural analysis of active compounds

The structure of five isolated compounds from herbal extracts were

elucidated by a combination of NMR techniques including ¹H NMR, ¹³C NMR, distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT), heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), correlated spectroscopy (COSY) and heteronuclear multiple bonded connectivities (HMBC). As a result, compound A and C were elucidated to be 4,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol and 4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo(7.2.0)undec-4-ene, respectively. However, for the complete structural assignment of compound B, D and E, further purification of them were required.

5. Study on application of functional food technology

Thermal, pH and storage stabilities of SAC, TMBH and TMBU were studied for the application as functional food and/or materials. The results of pH stability indicate that SAC did not decompose in buffer solutions with pH values ranging from 1 to 14. It was found that SAC was stable at 0~80°C range of temperature and stable for 12 weeks storage at 25°C. When TMBH and TMBU were heated at 100°C for 60 min, TMBH was heat-stable but TMBU was not. As well, TMBH exhibited storage stability but TMBU did not. It was also observed that toxicity of SAC and PN was relatively low in single oral dose toxicity study. The lethal oral dose for SAC and PN in rat is above 2,000 mg/kg body both in male and female, suggesting low toxicity.

For applying candidates to functional food and/or materials, dosage form of candidates was considered. Concerning physicochemical characteristics of SAC and SAC-Ex and comfortableness in swallowing, the capsule formulation with a diameter of 7.3-7.6 (capsule 0') showed to be robust. Particularly, a bad taste of SAC and SAC-Ex could be covered by capsule shell. In case of the liquid active compounds PN,

TMBH and TMBU, the soft capsule or liquid dosages (drink) forms was considered to be reasonable. The liquid dosages (drink) forms for PN, TMBH and TMBU consisted of 5-10% (w/w) of sugar, 0.05-0.3% (w/w) of citric acid, 0.005-0.02% (w/w) of caramel, 0.1% (w/w) of sorbitan monostearate, 0.1-1.0% (w/w) of vitamin C, 79-94% (w/w) of purified water and 10-20 g (w/w) of active ingredients. It is recommended to include PN, TMBH and TMBU as active ingredients and soybean oil as filler in a soft gelatine capsule.

Taken together, it is likely that candidate material, SAC, PN, TMBH, TMBU and ADB could be used as a diet supplement for protecting damages induced by ischemic insult and/or stroke.

CONTENTS

SUMMARY	11
Chapter 1. Resume of the Research	27
1. Objective and necessity of the research	27
1-1. Objective of the research	27
1-2. Necessity of the research	27
2. Scope of the research	28
3. Application and the future prospect	29
Chapter 2. State of the Art	31
1. Foreign	31
2. Domestic	36
Chapter 3. Results and Discussion	37
1. Materials and Methods	37
1-1. Preparation of volatile plant extracts and standardization	37
1-1-1. Screening of sample	37
1-1-2. Preparation of volatile plant extracts	38
1-1-3. Selection and analysis of indicative compound	38
1-2. Screening of bioactive extracts using in vitro cell model	39
1-2-1. Establishment of simulated in vitro ischemic model	39
1-2-2. Measurement of cell viability	40
1-3. Action mechanism on ischemic stroke in cell model	40
1-3-1. Culture of primary cell and neuroblastoma cell line	40
1-3-1-1. Glial cell culture	40

1-3-1-2. Cerebrocortical neuron culture	41
1-3-1-3. C6 glioma cell culture	41
1-3-2. Neuroprotective effect in <i>in vitro</i> ischemic damage	41
1-3-2-1. Immunosimulated glucose deprivation	41
1-3-2-2. Oxygen-glucose deprivation	42
1-3-2-3. Measurement of cytotoxicity	42
1-3-2-4. Western blot analysis	42
1-3-3. Measurement of antioxidant activities	43
1-3-3-1. MDA analysis	43
1-3-3-2. Measurement of total antioxidative activity and the scavenging activities of reactive oxygen intermediates (ROI) and reactive nitrogen intermediates (RNI)	43
1-3-3-2-1. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay	43
1-3-3-2-2. Superoxide radical scavenging assay	44
1-3-3-2-3. Hydroxyl radical scavenging assay	44
1-3-3-2-4. Hydrogen peroxide scavenging assay	45
1-3-3-2-5. Peroxynitrite scavenging assay	45
1-3-3-2-6. Nitric oxide scavenging assay	45
1-3-3-3. Immunocytochemical staining	46
1-3-3-4. Measurement of 2,7-dihydrochlorofluorescein (DCF) fluorescence	46
1-3-4. Measurement of mitochondrial dysfunction	46
1-3-5. Measurement of inflammatory mediator	47
1-3-6. Determination of cell cycle distribution	47
1-4. <i>In vivo</i> experimental model	48

1-4-1. <i>In vivo</i> experimental model	48
1-4-1-1. Experimental animal	48
1-4-1-2. Focal ischemia model	48
1-4-1-3. Global ischemia model	49
1-4-1-4. Western blot analysis	49
1-4-2. Examination of behavior test and learning ability	50
1-4-3. Feeding study	50
1-4-3-1. Animal treatment	50
1-4-3-2. Measurement of blood pressure and observation of stroke frequency	51
1-4-3-3. Measurement of infarct size and histopathological examination	51
1-4-3-4. Measurement of cytokines	52
1-4-3-5. Measurement of blood parameters	53
1-5. Structural analysis of active compounds	53
1-5-1. Crude separation of active compounds	53
1-5-2. Structural analysis of active compounds and observation of originality	54
1-6. Study on application of functional food technology	55
1-6-1. Elementary research of materials for functional food product	55
1-6-2. Study on application of functional food technology for product effective in prevention from ischemic stroke	55
1-7. Statistical analysis	55
2. Results and discussion	57
2-1. <i>In vitro</i> screening of bioactive volatile plant extracts	57
2-1-1. Preparation of volatile plant extracts	57

2-1-2. Standardization of volatile plant extracts	58
2-1-3. Screening of bioactive extracts using in vitro cell model	65
2-1-3-1. Establishment of simulated in vitro ischemia model	65
2-1-3-2. Screening of active compounds using simulated in vitro ischemia model	69
2-2. Action mechanism on ischemic stroke in cell model	70
2-2-1. Cytotoxicity	70
2-2-2. Antioxidative action	76
2-2-3. Anti-inflammatory action	92
2-3. Neuroprotective effect using in vivo ischemic model	93
2-3-1. Screening of bioactive extracts using in vivo ischemic model	95
2-3-1-1. Brain ischemic damage	95
2-3-1-2. Effect of candidate on brain ischemic candidate	99
2-3-2. Reexamination of activity on ischemic stroke	104
2-3-2-1. Activity in global and focal ischemic models	104
2-3-2-2. Examination of oxidative damage and inflammatory products	105
2-3-2-3. Behavior test and learning ability	105
2-3-3. Feeding study	116
2-4. Structural analysis of active compounds	126
2-4-1. Crude separation of active compounds	126
2-4-2. Structural analysis of active compounds and observation of originality	127
2-5. Study on application of functional food technology	143
2-5-1. Elementary research of materials for functional food product	143

2-5-2. Study on application of functional food technology for product effective in prevention from ischemic stroke	154
2-5-2-1. Examination of the unit production process	
2-5-2-2. Examination of flavor, seasoning, and reforming techniques	
2-5-2-3. Examination of shape and design	
Chapter 4. Achievement and Contribution to Related Fields	156
Chapter 5. Application Plan	158
Chapter 6. Foreign Scientific Information Acquired	159
Chapter 7. Reference	165

목 차

요 약 문	3
제 1 장 연구개발과제의 개요	27
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	27
1. 연구개발의 목적	27
2. 연구개발의 필요성	27
제 2 절 연구개발 과제의 범위	28
제 3 절 활용방안 및 전망	29
제 2 장 국내외 기술개발 현황	31
제 1 절 국외 기술개발 현황	31
제 2 절 국내 기술개발 현황	36
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	37
제 1 절 연구수행 방법	37
1. 방향식물 추출물의 제조 및 표준화 연구	37
가. 시료의 선발	37
나. 각종 방향식물 추출물의 제조	38
다. 유효지표물질의 선정과 분석	38
2. 시험관내 모델을 이용한 활성 물질의 탐색 및 발굴	39
가. 유사허혈모델의 확립	39
나. 세포생존율의 측정	40
3. 세포모델에서 허혈성 뇌졸중 예방 작용기전 연구	40
가. 초대세포 및 뇌신경세포주의 배양	40
1) 교세포 배양	40

2) 대뇌피질 신경세포 배양	41
3) C6 glioma 배양	41
나. 허혈 조건 유도시 신경세포에 대한 시료의 보호효과	41
1) 면역자극-포도당 결핍 조건에서의 신경보호 효과	41
2) 산소-포도당 결핍 조건에서의 신경보호 효과	42
3) 세포사 측정	42
4) Western blot analysis	42
다. 항산화체계 조사	43
1) MDA 함량	43
2) 총 항산화능, 반응성 산소종(ROI) 및 질소종(RNI) 소거능 측정	43
가) 총 항산화능(TEAC)	43
나) Superoxide 라디칼 소거능	44
다) Hydroxyl 라디칼 소거능	44
라) Hydrogen peroxide 소거능	45
마) Peroxynitrite 소거능	45
바) Nitric oxide(NO) 소거능	45
3) 면역세포화학적 염색	46
4) 교세포의 2,7-dihydrochlorofluorescein(DCF) 형광도 측정	46
라. 미토콘드리아 손상 조사	46
마. 염증매개 물질의 변화 조사	47
바. 세포주기 분포의 측정	47
4. 뇌허혈 동물모델을 이용한 효능 조사	48
가. 뇌허혈 유발 동물 모델에서의 효과 조사	48
1) 동물	48
2) 국소허혈모델	48
3) 전뇌허혈모델	49

4) Western blot analysis	49
나. 행동양식 및 학습능의 변화 조사	50
다. 시료의 식이 섭취에 의한 효과 조사	50
1) 실험동물의 사육 및 실험군의 분리	50
2) 혈압 측정 및 뇌졸중 발병빈도 관찰	51
3) 뇌경색 면적 측정 및 조직학적 검사	51
4) Cytokine 측정법	52
5) 혈액지표 측정	53
5. 활성소재의 구조분석 및 동정	53
가. 허혈성 뇌졸중 예방 활성물질의 조분리	53
나. 활성물질의 구조분석 및 신규성 조사	54
6. 기능성 식품 응용기술 연구	55
가. 선별된 추출물의 소재화를 위한 기초조사	55
나. 허혈성 뇌졸중 예방 기능성 식품화를 위한 응용기술 연구	55
7. 결과의 통계처리	55
제 2 절 결과 및 고찰	57
1. 허혈성 뇌졸중 예방 소재 탐색 및 발굴	57
가. 허혈성 뇌졸중 예방 식품 선도 소재 발굴	57
1) 방향식물 추출물의 제조	57
2) 방향식물 추출물의 표준화	58
3) 시험관내 모델을 이용한 활성 물질의 탐색 및 발굴	65
가) 유사 허혈 모델 (Simulated in vitro ischemia model)의	
확립	65
나) 유사 허혈 모델을 이용한 활성물질의 탐색 및 선별	69
나. 세포모델에서 허혈성 뇌졸중 예방 활성물질의 작용기전 조사	70
1) 세포의 독성 조사	70
2) 항산화체계조사	76

3) 염증매개 물질의 변화 조사	92
2. 뇌허혈 동물모델을 이용한 효능조사	95
가. 뇌허혈 동물모델을 이용한 식품 선도 소재 발굴 및 생체내 효과 조사	95
1) 뇌허혈 유발 및 유발에 따른 신경 및 혈관독성 조사	95
2) 후보 추출물 및 물질의 효과 조사	99
나. 뇌허혈 동물모델을 이용한 허혈성 뇌졸중 예방효과 확인	104
1) Global ischemic model 및 focal ischemic model을 이용한 효과 확인	104
2) 뇌의 산화적 손상 정도 및 염증매개물질의 변화 측정	105
3) 행동양식 및 학습능의 변화 조사	105
다. 시료의 식이섭취에 의한 효과 조사	116
3. 활성소재의 구조분석 및 동정	126
가. 허혈성 뇌졸중 예방 활성물질의 조분리	126
나. 활성물질의 구조분석 및 신규성 조사	127
4. 기능성식품 응용기술 요구	143
가. 허혈성 뇌졸중 예방 활성물질의 소재화를 위한 기초 조사	143
나. 허혈성 뇌졸중 예방 기능성 식품화를 위한 응용 기술 연구	154
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	156
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	158
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	159
제 7 장 참고문헌	165

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구의 최종목표는 국내산 방향식물로부터 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 선도 소재를 발굴하고 기능성 식품화를 위한 응용 기술을 개발코자 하였다.

2. 연구개발의 필요성

뇌졸중은 세계적으로 중요한 질환으로, 우리 나라에서 인구 10만명당 뇌졸중으로 사망하는 사람은 약 75명으로 교통사고, 심장질환, 위암으로 사망하는 사람보다 많으며 노인 인구중 사망원인 제 1 위를 차지하고 있다 (통계청, 2003). 허혈성 뇌졸중은 갑자기 발생하고, 신경학적 이상을 동반하며 단시간내 급격하게 질병의 경과가 진행되어 응급 치료법인 색전용해술에 의해서도 완전 치유가 불가능하며 사망에 이르지 않더라도 부작용 및 후유증이 초래된다. 따라서 뇌졸중에 의한 가족 및 국가의 경제적 손실이 매우 막대한 것으로 추산되고 있다. 뇌혈관계통의 질환에 의해 유발되는 허혈성 뇌졸중은 노령인구의 증가에 따라 매년 증가추세에 있어 현재 뇌졸중 발병의 50% 이상을 차지하고 있으며, 뇌를 관류하는 혈관이 폐쇄되고 뇌에 충분한 혈액공급이 차단되어 신경세포의 손상에 기인한다고 알려져 있다.

허혈성 뇌졸중의 최대과제는 혈관장애를 얼마나 예방하고 치료할 것인가와, 허혈 발생후 단기간에 뇌조직의 변화가 불가역적으로 발생하므로 허혈 진행정도의 확인과 신경학적 손상을 경감시키는 치료방법으로 나눌 수 있다. 국·내외적으로 허혈성 뇌졸중을 치료할 수 있는 신약 개발에 관한 많은 연구가 수행되었으나 대부분 성공하지 못한 것으로 알려져 있다. 예를 들어 lubeluzole, citicoline, aptiganel 등이 임상 3상 단계까지 이르렀으나

성공하지 못했고, GABA agonist인 clomethiazole과 K channel modulator인 BMS-204352에 대한 제3상 임상시험이 진행 중에 있다. 그러나 뇌허혈의 발생시 glutamate에 의한 칼슘이온 channel의 개방에 따른 과도한 Ca 이온의 유입으로 과흥분에 의한 흥분성세포독성(exitotoxicity)이 야기되거나, 재관류(reperfusion)시 유발되는 산소 라디칼에 의해 신경세포내 효소 군들이 파괴되는 등 뇌손상은 다중 경로(multi-pathway)에 의한 메카니즘에 발생된다. 또한 뇌졸중 발병후 약 2시간 이내에 치료가 이루어지지 않을 경우 비가역적인 뇌손상을 피할 수 없는 것으로 알려져 있다. 이에 최근에는 뇌졸중에 대해서는 예방적인 시도가 강조되고 있는 실정이다.

방향성 식물은 독특한 방향성 특성과 새로운 특용 작물 발굴 노력에 힘입어 그 생산량은 해마다 증가하고 있으나, 현재로서는 착유 공정 등 단순 가공처리만을 거쳐 일반 첨가 소재로 사용되고 있거나, 일부 한방 의약품에 추출물 형태로 첨가되고 있어 그 활용도가 낮은 실정이다. 그러나 방향성식물에는 허혈성 뇌졸중 예방 활성이 있을 것이라고 기대되는 활성물질의 존재 가능성이 높고 한방에서는 예로부터 수종 방향성 식물을 뇌졸중 예방에 사용해 오고 있어, 이를 건강기능식품 소재로 개발할 경우 방향성 식물의 부가가치가 증가될 것으로 사료된다. 따라서 국내산 방향식물로부터 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 식품선도소재를 탐색하고 동물실험에서 효과를 검증한 다음 기능성 식품으로 응용할 수 있는 기술을 개발함으로써 향후 효과에 대해 health-claim이 가능한 건강기능성식품을 개발할 수 있도록 과학적인 기초 자료를 마련하는 체계적인 연구의 수행이 필요하다.

제 2 절 연구개발 과제의 범위

본 연구의 최종목표는 국내산 방향식물로부터 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 선도 소재를 발굴하고 기능성 식품화를 위한 응용 기술을 개발하는 것이다. 연차별 목표는 1차 년도에 허혈성 뇌졸중 예방 식품선도 소재를

발굴하고 생체내 효과를 살펴보고, 2차 년도에 활성물질의 조분리 및 작용기전을 조사하며, 3차 년도에는 허혈성 뇌졸중 예방 기능성 식품화를 위한 응용기술을 연구하는 것이다. 이를 위한 본 연구개발과제의 연차별 연구개발 내용은 다음과 같다.

구분	연구개발목표	연구개발 과제의 범위
1차년도	허혈성 뇌졸중 예방 식품 선도 소재 발굴 및 생체내 효과 조사	<ul style="list-style-type: none"> ● 방향식물 추출물의 제조 및 표준화 연구 ● 시험관내 모델을 이용한 활성 물질의 탐색 및 발굴 ● 뇌허혈 동물모델을 이용한 효과 조사
2차년도	허혈성 뇌졸중 예방 활성물질의 조분리 및 작용기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> ● 뇌허혈 동물모델을 이용한 효과 조사 ● 세포모델에서 허혈성 뇌졸중 예방 작용기전 연구 ● 활성물질의 조분리 ● 선별된 추출물의 소재화를 위한 기초조사
3차년도	허혈성 뇌졸중 예방 기능성 식품화를 위한 응용기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 활성물질의 분리, 구조분석 및 동정 ● 뇌허혈 동물모델을 이용한 허혈성 뇌졸중 예방효과 확인 ● 허혈성 뇌졸중 예방 기능성 식품화를 위한 응용기술 연구 ● 기술적용 소재의 특성 평가

제 3 절 활용방안 및 전망

국내 방향성식물 자원으로부터 허혈성 뇌손상을 예방할 수 있는 건강기능성 후보물질의 효과를 여러 실험 모델에서 조사하고 가능한 작용기전

을 연구함으로써 산업적으로 활용할 수 있는 기초 기술이 축적될 수 있을 것으로 예상된다. 특히 노령화되는 사회에서 허혈성 뇌졸중 관련 건강기능식품 시장은 계속 성장할 것으로 예측되고 있어 효과에 대해 health-claim을 인정받을 수 있는 건강기능성식품을 개발하는 것은 국내 건강기능식품 시장을 활성화하고 건진성을 부여하는데 기여할 것으로 전망된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외기술개발 현황

뇌에 혈액을 공급하는 동맥에 장애가 생겨 정상적인 혈액공급이 이루어지지 못해 뇌허혈이 일어나면 성장인자, 싸이토카인, 글루타메이트, 자유라디칼 등 여러 인자들이 방출되면서 뇌신경세포를 포함한 뇌세포의 사멸로 치닫게 되는 일련의 현상들이 진행된다. 뇌허혈에 의한 세포사를 도식화한 것은 Fig. 1과 같다. 뇌허혈의 발생시 glutamate에 의한 칼슘이온 channel의 개방에 따른 과도한 Ca 이온의 유입으로 과흥분에 의한 흥분성 세포독성(excitotoxicity)이 야기되거나 산소 라디칼이 형성되어 신경세포내 효소군들이 파괴되는 등 손상이 유발된다. 허혈성 뇌손상시 나타나는 세포사에는 흥분성신경독성에 의한 세포괴사 뿐만 아니라 세포고사(apoptosis)도 관찰되는 것으로 알려져 있다. 신경세포나 교세포에 손상이 일어나면 이러한 세포들로부터 분비되던 여러 성장 인자들이 고갈되게 되고 신경세포의 neurotrophins에 대한 민감도가 감소하게 된다. 성장인자가 결핍되면 신경세포에서는 자유 라디칼 형성이 초기에 증가하여 세포고사를 유도하게 된다. 이때 항산화제를 처리하면 성장인자 결핍에 의해 유발되는 세포고사를 막을 수 있다고 보고되고 있다. 한편 뇌허혈시 미토콘드리아의 기능이 손상되게 되는데 이는 흥분성신경독성에 의한 손상을 더 악화시킬 뿐만 아니라 신경세포고사도 유도하게 된다. 뇌허혈 및 재관류 시에 미토콘드리아 기능 및 에너지 대사에서 지속적인 결함이 관찰되고 세포고사에 의한 신경성 퇴행이 일어나게 된다. 또한 뇌허혈 후 염증반응에 관여하는 싸이토카인이 신경세포와 교세포 뿐만 아니라 염증반응에 관여하는 세포 등에서 유도되어 뇌에서 그 농도가 증가되어 세포고사를 유도하게 된다. 그 외에도 세포주기 조절 및 유전자 발현 등 조절기전에 영향을 주어 뇌허혈에 의한 손상이 유도된다.

최근 녹차 및 홍차 폴리페놀, carnosine, 카로틴 유도체, S-cysteinyl 유

도체 등의 식품 성분들이 허혈성 뇌손상의 일차적 예방뿐 아니라 이차적 예방에도 효과가 있는 것으로 국외에서 보고되기 시작했다. 일례로, Levites 등(2002)은 인체 유래 neuroblastoma세포인 SH-SY5Y에서 녹차와 홍차가 6-hydroxydopamine으로 유도한 NF- κ B 활성화와 세포 사멸을 감소시킴을 관찰하였는데, 이는 녹차가 NF- κ B nuclear translocation과 NF- κ B의 결합 활성을 저해하기 때문이라고 보고하였다. 이러한 신경보호효과는 차 추출물의 폴리페놀 성분의 항산화 및 철분 킬레이팅 작용에 기인한다고 하였다. 또한 실험모델에서 뿐만 아니라 역학연구에서도 과일 채소중에는 항산화성 영양소와 비영양소 성분의 함유량이 높아 과일 채소의 섭취량이 높을 수록 뇌졸중의 발병율이 낮다는 증거가 보고되고 있다(Table 1). 최근 Aruoma 등(2003)은 약용 및 식용 식물 추출물의 생리활성물질에 의한 신경보호작용에 대한 연구 결과들을 고찰하여 보고하였다. 이 보고에서, 식이 항산화제/허브 추출물이 신경퇴행성 질병의 복잡한 기전을 조절하는데 크게 기여할 수 있다고 하였다. 또한 전통 약용 및 식용 식물 추출물이 면역계를 조절하는데 크게 기여한다는 사실을 고려할 때 이들이 신경 이상을 관리하는데도 효과를 나타낼 가능성이 높다고 하였다. 그러나 신경보호작용, 산화적 스트레스, 면역 기능의 분자적 기전이 확실하게 이해되어야 하고, 인체에서의 효과를 입증하는 과학적 증거가 미흡하여 향후 이에 관한 연구가 전략적으로 이루어져야 하다고 제안하였다(Fig. 2). 이상을 종합하면, 국외적으로 식품성분들이 뇌졸중을 예방할 수 있다는 간접적이고 단편적인 증거는 보고되고 있으나 신경세포의 손상기전과 관련한 target-specific한 연구가 미흡할 뿐 아니라 식품소재의 효과를 동물의 뇌에서 최종적으로 검증하고 제품개발로 성공한 사례가 거의 없다.

한편, 허혈성 뇌졸중을 치료할 수 있는 신약 개발에 관한 많은 연구가 수행되었으나 대부분 성공하지 못한 것으로 알려져 있다. 예를 들어 lubeluzole, citicoline, aptiganel 등이 임상 3상 단계까지 이르렀으나 대부분 성공하지 못했다. 또한, GABA agonist인 clomethiazole과 K channel modulator인 BMS-204352에 대한 제3상 임상시험이 진행 중에 있으나 성공 가능성이 높지 않을 것으로 예견되고 있다.

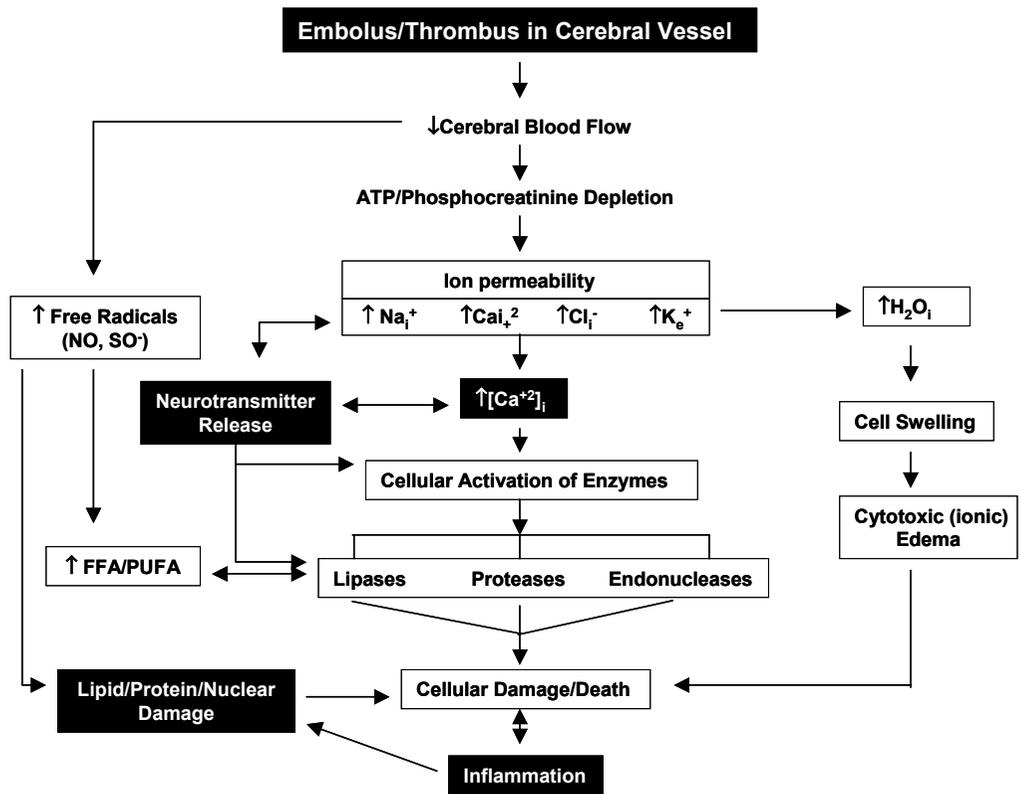


Fig. 1. Pathways of ischemic cell death(Wang, 2001).

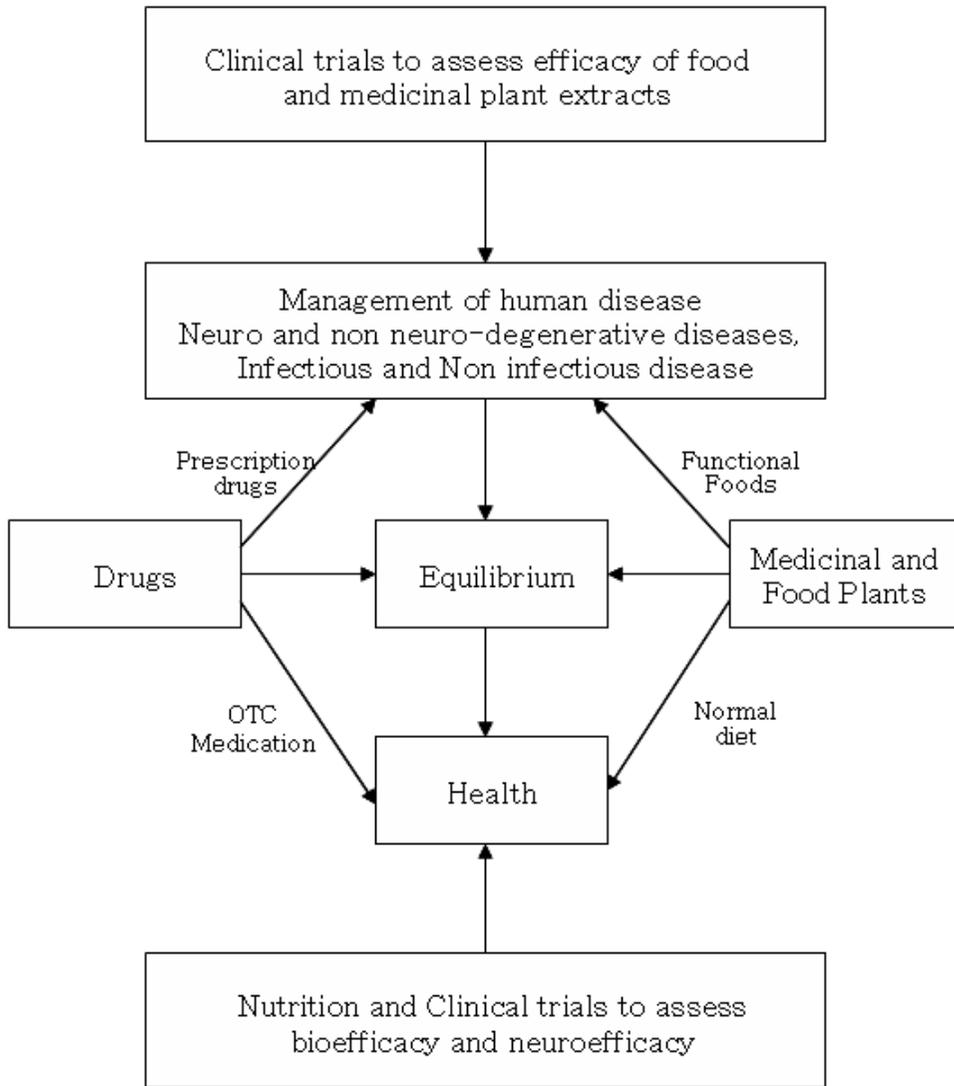


Fig. 2. A strategy to facilitate definition of the prophylactic potentials of diet, nutritional/food supplements and medicinal plants and herbal extracts(Aruoma et al).

Table 1. Epidemiological trials investigating the association between fruits and vegetables(antioxidants) intake and incidence of stroke

Authors and country	Subjects	Sample (n)	Age of subjects (years)	Length of follow-up (years)	Antioxidant studied	Endpoints	Comments
Gey et al. (1993), Switzerland	Men of the working population	2974	50 (SD 9)	12	Plasma carotene and Vitamin C	Thirty-one incident strokes	Increased incidence of stroke at low concentration of both vitamin C and plasma carotene (risk adjusted for age, smoking, blood pressure and cholesterol)
Manson et al. (1993), USA	Female nurses free of 552diagnosed IHD and cancer at baseline (1980)	87245	34-59	8	Dietary carotene and vitamins C and E	183 incident strokes	After adjustment for age, smoking and other cardiovascular risk factors, higher antioxidant vitamin consumption (all three) is associated with a reduced risk of ischaemic stroke
Gale et al. (1995), UK	Randomly selected elderly people (1973-4) free of history or symptoms of stroke or IHD living in the community	730	~65	20	Dietary and plasma vitamin C	643 died (124 because of stroke)	Mortality from stroke was highest in those who had the lowest vitamin C levels. Low vitamin C, whether measured by plasma concentration or dietary intake, was strongly related to subsequent risk of death from stroke but not from IHD
Gillman et al. (1995), USA	Framingham population-based longitudinal study. Men free of cardiovascular disease at baseline (1966-9)	832	45-65	>20	Estimated servings per d of fruits and vegetables from a single 24 h diet recall at baseline	Ninety-seven incident strokes (seventy-three completed strokes and twenty-four transient ischaemic attacks)	The risk of completed stroke or transient ischaemic attack was adjusted for BMI, cigarette smoking, glucose intolerance, physical activity, blood pressure, serum cholesterol, and energy, ethanol and fat intake. There was an inverse association between fruit and vegetable intake and the development of stroke so that the intake of fruit and vegetables may protect against development of stroke in men
Keli et al. (1996), The Netherlands	Randomly selected men free of stroke from the town of Zutphen (1960)	552	50-69	15	Dietary history taken in 1960, 1965 and 1970	Forty-two incident strokes	After adjusting for age, systolic blood pressure, serum cholesterol, smoking, energy intake and consumption of fish and alcohol, dietary flavonoids (quercetin) and β -carotene intake were inversely associated with stroke incidence. Intake of vitamins C and E was not associated with stroke risk
Khaw & Barrett-Connor (1987), USA	A sub-sample of 30% of a defined upper-middle class white community in Rancho Bernardo, CA, USA who participated in a survey of risk factors for heart disease	859	50-79	12	24 h dietary K intake at baseline	Twenty-four died of stroke	An inverse association If K intake, irrespective of hypertensive status, with stroke mortality so that high dietary intake of K may protect against stroke-associated death

제 2 절 국내 기술개발 현황

최근 식품 추출물이 뇌의 산화적 손상에 대해 효과가 있다는 것이 보고되었다. Lee 등(2002)은 마우스 뇌에서 N-methyl-D-aspartate로 인해 초래되는 산화적 스트레스에 대하여 채소 추출물, 즉 *Brassica oleracecea var. capitata* L., *Brassica japonica* L., *Sedum sarmentosum* L., *Aster scaber* L.의 보호효과를 평가하였다. 그 결과, *Aster scaber* L. *Sedum sarmentosum* L. 및 *Brassica oleracecea var. capitata* L.로부터 제조한 추출물은 NMDA에 의해 유도된 뇌의 glutathione의 감소를 조절함에 의해 신경보호효과를 나타내었다. 그러나 허혈성 뇌세포손상 또는 뇌졸중에 대해 효과를 나타내는 식품성분에 관한 연구는 타 기능성 분야에 비해 적다. 또한 활성소재를 활용하여 기능성식품으로 개발한 대한 사례도 거의 없다.

한편, 기능성과는 별개로 현재 국내 시판되고 있는 대부분의 기능성소재는 단순복합제 형태이며, 일부 기능성 식품들은 산소접촉에 의한 산화, 갈변 등에 의하여 유용성이 저해되고 식품소재로서의 외형적 가치도 저급한 수준이다. 따라서 필요한 경우 코팅에 의한 차단막 형성으로 저장안정성을 확보하고 유용성분의 활성을 유지시킬 수 있는 기술 등이 필요하다. 뿐만 아니라 활성 소재를 적정 동반 식품(food vehicle)에 적용하여 활용도를 증진시킬 수 있는 가공기술이 요구되나 이에 관한 시도는 미흡한 수준이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행방법

1. 방향식물 추출물의 제조 및 표준화 연구

가. 시료의 선별

기존 database 및 자료조사로부터 국내산 또는 국내 자생 방향성 식물의 활성물질을 조사함에 의해 가능성이 높은 식물 원료 21종을 선별하였다. 선별된 시료는 *Araliae continentalis Radix*(이하 ACR), *Allii fistulosi Bulbus*(이하 AFB), *Acori graminei Rhizoma*(이하 AGR), *Atractylodis Rhizoma alba*(이하 ARA), *Achyranthes Radix*(이하 ARR), *Angelica tenuissimae Radix*(이하 ATR), *Chrysanthemi Flos*(이하 CF), *Caryophylli Flos*(이하 CLV), *Carthami Flos*(이하 CTF), *Epimedii Herba*(이하 EH), *Gastrodiae Rhizoma*(이하 GR), *Glycine semen nigra*(이하 GSN), *Ledebouriellae Radix*(이하 LR), *Menthae Herba*(이하 MH), *Mori Ramulus*(이하 MR), *Nepetae Spica*(이하 NS), *Pini Foilium*(이하 PN), *Siegesbeckiae Herba*(이하 SH), *Xanthii Fructus*(이하 XF), *Allium victoriallis var. platyphyllum*(이하 WAD), *Acanthopanax Cortex*(이하 ESR)이다. 시료는 경동시장에서 구입하였으며, 식물의 종(species)은 전문가(경상대학교 농과대학, S 교수)에게 의뢰하여 확인하였다. 이 때 자료 조사는 PubMed, Medline, CARDS(Computer Access to Research on Dietary Supplements), and IBIDS(International Bibliographic Information on Dietary Supplements database) of the US National Institutes of Health, Medline, FSTA, Agricola, Science search, KREP(Korea R&D Bibliographic Information), DIMD(Dissertation Information of Master & Doctor), KSMA(Korean Scientific & Medical Abstracts) 등의 검색 엔진을 이용하였다.

나. 각종 방향식물 추출물의 제조

감압하의 증기 증류(DRP, distillation under reduced pressure)와 dichloromethane을 용매로 한 액체-액체 연속 추출(LLE, liquid-liquid continuous extraction)방법에 의해 음건된 방향식물의 추출물을 제조하였다(Fig. 3). 즉, 분쇄된 건조 시료와 증류수를 3 L round-bottom flask에 넣고, 감압(55~60℃, ca. 95 mmHg)하에서 5시간 증기 증류하였다. 증기 증류한 액은 액체-액체 연속 추출기를 사용하여 dichloromethane으로 6시간동안 추출하였고, 추출 후 sodium sulfate로 용매에 남아있는 수분을 제거한 후 냉각 순환기를 부착한 rotary flash evaporator(BUCHI, Switzerland)를 사용하여 약 1 mL로 농축하고 0.4 mL가 될 때까지 질소(N₂)로 농축하였다. 예외적으로, VV는 용매로 메탄올을 사용하여 10분간 초음파 처리함에 의해 추출물을 제조하였다.

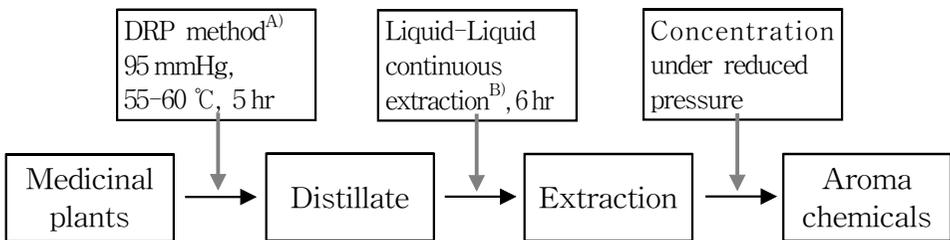


Fig. 3. Preparation scheme of volatile extracts by steam distillation under reduced pressure(DRP, A) and liquid-liquid continuous extraction(LLE, B).

다. 유효 지표물질의 선정과 분석

방향성 성분의 정성분석을 위해 DRP-LLE에서 얻어진 방향성 추출물 성분을 Kovats gas chromatographic retention index와 실제 화합물과 비교한 다음 각 성분의 mass spectrometry(MS) fragmentation pattern을 실

제 성분과 비교하였다. 방향성 성분의 정량 분석은 DRP-LLE에서 얻어진 추출물을 GC-FID를 사용하여 분석하였다. 각 실험은 독립적으로 2번 반복되었고, 용매의 detector 반응은 0.2~1 μ L를 주입하여 R^2 값이 0.99인 선형 범위에서 측정하였다. 방향성 성분의 정성 분석은 mass selective detector(HP 5973)와 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m DB-WAX bonded-phase fused-silica capillary column(J&W Scientific, Folsom, CA)이 장치된 Hewlett-Packard(HP) model 6890 gas chromatograph(GC)을 이용하여 분석하였다. 이때 MS ionization voltage는 70 eV, 헬륨(He)의 선형속도는 44 cm/s, injector와 detector 온도는 각각 250 $^{\circ}$ C, 280 $^{\circ}$ C이었고, 오븐 온도는 50 $^{\circ}$ C~200 $^{\circ}$ C로 3 $^{\circ}$ C/min의 rate를 주고 10분간 holding time을 주는 조건을 사용하였다. 방향성 성분의 정량 분석을 위해서는 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m DB-WAX bonded-phase fused-silica capillary column(J&W Scientific, Folsom, CA)와 flame ionization detector(FID)가 장치된 HP model 5890 GC를 이용하였다. 이때 injector와 detector 온도는 각각 200 $^{\circ}$ C, 250 $^{\circ}$ C이었고 헬륨(He)의 선형속도는 41.3 cm/s, split ratio는 0.741:1이었다.

2. 시험관내 모델을 이용한 활성 물질의 탐색 및 발굴

가. 유사 허혈 모델(Simulated *in vitro* ischemia model)의 확립

선발된 시료 중에서 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 활성물질의 탐색 및 발굴을 위해, 최근 비교적 동물모델과의 상관성이 높다고 알려진 모델인 시험관내 유사 허혈 모델(Simulated *in vitro* ischemia model)을 사용하였다. 이는 혈관이 폐쇄되어 뇌에 충분한 혈액공급이 차단됨으로써 나타나는 산소와 포도당 결핍(hypoxia 및 hypoglycemia) 상태와 회복시킨 조건(simulated reperfusion)을 결합시킨 모델이다. 즉, human brain neuroblastoma cell(SK-N-SH)을 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, RPMI 1640배지에서 배양한 다음, 24-well plate에 적정농도로 접종한 후 48시간 동안 배양함. 그런 다음 glucose-free 배지로 교환하고 N₂ : CO₂ : H₂ = 90 : 5 : 5로 유지

되는 ischemic chamber(Coy Laboratory Product, USA)에서 세포를 일정 시간 노출시킨 후 다시 37°C, 5% CO₂, RPMI 1640배지로 교환하여 일정 시간 배양하였다. 이때 chamber안의 산소량은 O₂ meter와 indicator를 이용하여 측정하였다.

나. 세포생존율의 측정

세포의 생존율은 MTT법으로 측정하였다. 즉, 0.5% MTT (w/v)를 세포에 넣고 4시간 동안 반응시킨 후, 용해제 (DMSO:에탄올, 1:1)를 첨가하여 반응침전물을 녹여낸 후, 흡광도를 측정하였다. 포마잔 산물과 비포마잔 산물은 각각 570 nm와 630 nm 파장에서 읽었으며, 이 때 얻어진 A570/A630 비율은 각 well에서 살아있는 세포수를 나타낸다. 허혈 (ischemic insult)에 대한 신경세포의 보호 활성은 대조군의 생존율에 대한 시료 첨가구의 백분율(%)로 나타내었으며, 모든 실험은 매 측정시 3반복 실험하면서 적어도 3~5번의 독립된 반복을 실시하였다. 활성 측정시 사용한 방향성 물질 추출물의 농도는 아래와 같이 산출하여 시험에 이용하였다.

Concentration(ppm)=

$$\frac{\text{weight of extract(without solvent)} \times \text{GC peak area \%}/100(\mu\text{g})}{\text{weight of dried samples(g)}}$$

3. 세포모델에서 허혈성 뇌졸중 예방 작용 기전 연구

가. 초대세포 및 뇌신경세포주의 배양

1) 교세포(astrocyte) 배양

교세포는 2-5일령 랫트(Sprague-Dawley종)의 전두엽 피질에서 분리하여 사용하였다(Choi and Kim, 1998). 즉, 트립신을 처리하여 단일세포로 분리한 후 PDL(20 μg/ml)을 코팅한 75-cm² 배양 플라스크를 이용하여 5% CO₂를 공급한 37°C의 습윤배양기에서 배양하였다. 먼저 10% FBS가

첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium/F-12 nutrient(DMEM/F-12)를 이용하여 1주일동안 배양한 후 다시 PDL을 코팅한 24-well plate에 옮겨 배양한 다음 실험에 사용하였다.

2) 대뇌피질 신경세포(cerebrocortical neuron) 배양

대뇌피질 신경세포는 임신 15-17일인 랫트(Sprague-Dawley종)의 태아에서 분리하여 사용하였다(Kim et al, 1999). 즉, 0.027% 트립신(w/v)을 처리하여 분리한 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 배지로 분산시키고, laminine과 PDL을 코팅한 24-well plate를 이용하여 5% CO₂를 공급한 37°C의 습윤한 배양기에서 배양하였다. 배양 후 5일째에 10 μM cytosine arabinoside를 24시간동안 처리하였다. 세포배양액은 주 3회 교환하였고, 배양 후 15일째에 실험에 이용하였다.

3) C6 glioma 배양

마우스 유래 glial 세포인 C6 glioma 세포주는 10% FBS, 항생제(100 U/ml 페니실린과 100 μg/ml 스트렙토마이신) 및 페놀 레드가 첨가된 DMEM을 이용하여 5% CO₂를 공급한 37°C의 습윤한 배양기에서 배양하였다. 세포배양액은 2-3일마다 교환하였고, 4-5일마다 트립신을 처리하여 회수한 세포를 1:8-1:10의 비율로 계대하였다.

나. 허혈 조건 유도시 신경세포에 대한 시료의 보호효과

1) 면역자극-포도당 결핍(immunostimulated glucose deprivation)조건에서의 신경보호효과

24-well plate에서 배양된 교세포를 IFN-γ(100 U/ml)와 LPS(1 μg/ml)로 48시간동안 처리하여 면역자극 시킨 후, 다양한 농도의 시료를 처리하고 포도당 결핍 상태로 8시간동안 37°C에서 배양하였다. 세포사멸 배지의 LDH 활성을 측정하여 정량하였다.

2) 산소-포도당 결핍(oxygen-glucose deprivation, OGD)조건에서의 신경 보호효과

15일 동안 24-well plate에서 배양된 대뇌피질세포를 포도당을 함유하지 않은 배지로 교환하고 혐기성 배양기(85% N₂/5% CO₂/10% H₂) (ThermoForma, Marietta, OH, USA)에서 1시간동안 배양하여 허혈을 유도하였다. 산소-포도당 결핍 유도 직후, 세포에 5.5 mM 포도당을 공급하고 5% CO₂를 공급한 37°C의 습윤한 배양기(정상 배양상태)에서 다시 2시간동안 배양하였다. 세포사는 배지의 LDH 활성을 측정하여 정량하였고, 총 LDH 활성 또는 총 LDH의 비율로 표현하였다

3) 세포사 측정

세포사는 키트를 이용하여 LDH 활성을 측정함에 의해 측정하였다. 즉, 시료를 처리한 배지 20 μ l에 20 μ l의 1 mg/ml NADH/0.45 mM pyruvate을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 20 μ l의 발색시약(2,4-dinitrophenylhydrazine/1 N HCl)을 첨가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 그런 다음 반응을 종결시키기 위해 100 μ l의 0.4 M NaOH 용액을 첨가하고 흡광광도계를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포사는 총 LDH 활성 또는 총 LDH의 비율로 표현하였다.

4) Western blot analysis

세포는 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide(w/v), 0.1% SDS(v/v), 100 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml aprotinin, 1% NP-40(v/v), 0.5% sodium deoxycholate (w/v))에 세포를 용해시킨 후, 14,000 \times g, 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 단백질을 SDS를 이용하여 변성시킨 후 Bio-Rad Miniprotein II apparatus를 이용하여 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 실행하였다. Stacking gel 과 separating gel의 농도는 각각 4%와 10% 이었으며 전개된 단백질은 100V에서 90분 동안

nitrocellulose membrane(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)에 전기적으로 transfer 하였다. Nitrocellulose membrane은 0.05% Tween-20(v/v), 5% skim milk(w/v)를 섞은 Tris-buffered saline(TBS)을 이용하여 1시간 동안 blocking 하고, p-ERK(1:2000), ERK(1:1000), p-JNK(1:500), JNK(1:1000), p-p38(1:500), p38(1:1000), b-actin(1:10,000)의 primary antibody와 overnight동안 반응시킨 후 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 1시간 동안 반응시켰다. 결합된 antibody는 ECL Plus Western blotting detection system(Amersham Pharmacia Biotech Inc.)에 의하여 측정하였다. 검출 용액은 solution A와 B(40:1)를 사용직전에 섞어 사용하며, membrane 1장당 1ml을 사용하였다. Membrane은 실온에서 1분 동안 ECL plus detection solution과 반응시켰다. 그후 X-ray film(Kodak, Rochester, NY, USA)에 노출하여 현상하였다. 정량을 위해, 인산화된 ERK, JNK, p38의 농도를 비인산화된 ERK, JNK, p38에 대한 비로 보정하였다.

다. 항산화 체계조사

1) MDA 함량

과산화생성물 지표인 malondialdehyde(MDA) 측정은 세포를 lysis시킨 후 33 mM FeSO₄/33 mM ascorbic acid로 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 2배 용량의 10% trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하여 원심분리 하였다. 얻어진 상층액에 동량의 thiobarbituric acid(TBA)를 넣고 100°C에서 10분간 반응시키고 냉각시킨 다음 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 총 항산화능, 반응성 산소종(ROS) 및 질소종(RNS) 소거능 측정

가) 총 항산화능(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

총 항산화능은 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiozoline-6-sulfonic acid (ABTS+) 라디칼 소거능을 측정하는 TEAC assay를 이용하여 측정하였다. 먼저, 7 mM ABTS를 암소에서 16시간동안 2.45 mM potassium

persulfate와 반응시켜 ABTS+ 라디칼을 생성시켰다. 시험관에 10 μ l의 다양한 농도의 시료 또는 Trolox(수용성의 비타민 E 유도체), 990 μ l ABTS+ 용액을 첨가하고 실온에서 20분동안 반응시켰다. 흡광광도계를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하고 다음과 같이 TEAC값을 계산하였다. 즉, 1 mM Trolox의 값을 1로 할 때, 시료의 값을 산출하여 비교하였다.

나) Superoxide 라디칼 소거능

Phenazine methosulfate(PMS)/ β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) system에서 생성된 superoxide radical이 nitroblue tetrazolium chloride(NBT)를 환원시키는 정도를 microplate reader를 이용하여 측정하였다²⁾. 즉, microplate에 190 μ l의 NADH/NBT(각각 103 μ M, 50 μ M), 10 μ l의 다양한 농도의 시료 및 50 μ l의 50 μ M PMS를 순서대로 첨가하고, 실온에서 3분동안 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 용매의 흡광도에 대한 시료 처리후 흡광도의 차이를 소거능(%)으로 표현하였다.

다) Hydroxyl 라디칼 소거능

Fenton system(ascorbic acid/ FeSO_4 -EDTA/ H_2O_2)에 의해 생성된 hydroxyl radical이 deoxyribose를 분해시키는 정도를 deoxyribose법을 이용하여 측정하였다. 즉, 시험관에 1.5 ml의 3.74 mM deoxyribose, 100 μ l의 다양한 농도의 시료, 100 μ l의 28.4 mM H_2O_2 , 100 μ l의 2 mM EDTA, 100 μ l의 2 mM ascorbic acid 및 100 μ l의 400 μ M FeSO_4 를 순서대로 첨가하고, 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 직후 1 ml의 1%(w/v) thiobarbituric acid와 1 ml의 2.8%(w/v) trichloroacetic acid를 첨가하고 100°C에서 12분 동안 끓인 후 곧바로 얼음에 넣어 10분 동안 냉각시켰다. 흡광광도계를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 용매의 흡광도에 대한 시료 처리후 흡광도의 차이를 소거능(%)으로 표현하였다.

라) Hydrogen peroxide 소거능

Hydrogen peroxide가 guaiacol 및 peroxidase와 반응하여 갈색을 띠는 정도를 Guaiacol method를 이용하여 측정하였다. 즉, 시험관에 880 μ l의 150 mM potassium phosphate buffer(1 mM EDTA 포함, pH 7.4), 10 μ l의 다양한 농도의 시료, 10 μ l의 14.5 U/ml horseradish peroxidase, 50 μ l의 0.2% guaiacol solution 및 50 μ l의 10 mM H₂O₂를 첨가한 후, 실온에서 30분동안 반응시켰다. 흡광광도계를 이용하여 436 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 용매의 흡광도에 대한 시료 처리후 흡광도의 차이를 소거능(%)으로 표현하였다.

마) Peroxynitrite 소거능

3-Morpholinocydnnonimine(SIN-1)의 산화반응으로 생성된 peroxynitrite(ONOO-)가 dihydrorhodamine-123(DHR)을 산화시켜 rhodamine-123(RH)으로 전환되는 정도를 형광분석법을 이용하여 측정하였다. 즉, microplate에 10 μ l의 130 U/ml catalase, 10 μ l의 200 μ M SIN-1, 10 μ l의 10 μ M의 DHR-123, 70 μ l의 다양한 농도의 시료를 첨가하고 실온에서 20분동안 반응시켰다. Fluorescence microplate reader(FL600, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 490 nm(exc.)/530 nm(emi.)에서 형광을 측정하였다. 용매의 형광도에 대한 시료 처리후 형광도의 차이를 소거능(%)으로 표현하였다.

바) Nitric oxide(NO) 소거능

4 mM cysteine과 200 μ M S-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP)과 반응하여 생성된 NO를 Clark-type electrode(ISO-NO, Mark II, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 측정하였다. 생성된 NO 양은 data acquisition system Duo18(World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)을 이용하여 정량하였다.

3) 면역세포화학적 염색(Immunocytochemical staining)

생후 2-5일된 랫 (Sprague-Dawley종)의 전두엽 피질에서 얻은 교세포를 4% paraformaldehyde/PBS(w/v) 용액으로 실온에서 10분간 고정한 후 차가운 70% 에탄올(v/v)을 넣어 보관하였다. 내인성 peroxidase를 불활성화시키기 위해, 3% H₂O₂/PBS(v/v)를 첨가하여 실온에서 5분동안 반응시킨 후, 비특이적 염색을 막기 위해 8% BSA/PBS(w/v)를 첨가하여 실온에서 30분동안 반응시켰다. Nitrotyrosine 면역반응을 검색하기 위해 10 µg/ml의 rabbit anti-nitrotyrosine antibody/1% BSA/PBS(w/v)를 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고, 1:200의 anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated secondary antibody를 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 세포를 0.05% diaminobenzidien(w/v)으로 발색시켜 현미경으로 관찰하였다.

4) 교세포의 2,7-dihydrodichlorofluorescein(DCF) 형광도 측정

교세포에 IFN- γ (100 U/ml)와 LPS(1 µg/ml)를 48시간동안 처리한 후 포도당을 함유하지 않은 DMEM 배지로 8시간동안 배양하였다. 그 다음 200 µM SIN-1을 첨가하여 3시간동안 포도당을 함유하지 않은 배지로 배양하였다. 다양한 농도의 시료는 SIN-1 처리와 동시에 처리하였다. 그 후 30 µM 2,7-dihydrodichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 처리하여 10분동안 반응시킨 다음 DCF의 형광도를 fluorescence microplate reader (FL600, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 485 nm(exc.)/530 nm(emi.)에서 측정하였다.

라. 미토콘드리아 손상조사

미토콘드리아의 손상 정도는 미토콘드리아 통과막전위(mitochondrial transmembrane potential, MTP)를 측정함에 의해 평가하였다. 즉, 24-well plate에서 배양한 교세포에 1.0 µg/ml 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine chloride(JC-1)을 첨가하고 37°C

에서 20분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 배지에 시료를 첨가하여 3시간동안 반응시킨 후 MTP의 소멸(depolarization)을 fluorescence microplate reader(FL600, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 530 nm(ext.)/590 nm(emi.)에서 측정하였다.

마. 염증매개 물질의 변화 조사

교세포를 9-12일동안 배양한 다음, 회수한 소교세포(microglia) (37°C, 3분, 200 rpm)를 48-well plate에 다시 배양하여 실험에 사용하였다. 소교세포를 LPS(10 ng/ml)로 처리하고, 24시간 후에 배지를 취하여 소교세포에서 생성된 NO 양을 Griess 방법을 이용하여 측정하였다. Griess 시약 I (0.1% naphthylethylenediamine(w/v)/5% phosphoric acid(v/v))과 Griess 시약 II (1% sulphanilamide(w/v)/5% phosphoric acid(v/v))를 사용직전에 1:1로 혼합하였다. 배지에 동량의 Griess 시약을 첨가하고 10분동안 실온에서 반응시킨 후 microtiter plate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0-100 μ M sodium nitrite로 표준곡선을 구하여 NO 농도를 산출하였다.

바. 세포주기 분포(cell cycle distribution)의 측정

세포주기 분포는 C6 glioma를 이용하여 측정하였다. 즉, 배양한 세포를 PBS로 세척한 후 트립신처리하여 회수한 세포를 citrate buffer(250 mM sucrose, 40 mM sodium acetate, pH 7.6)에 분산시켰다. 세포를 차가운 DNA staining/lysis buffer(10 μ g/ml RNase, 20 μ g/ml propidium iodide, 0.5% Nonidet P-40(v/v), 0.5 mM EDTA/Mg²⁺, Ca²⁺-free PBS, pH 7.2)로 30분간 염색하였다. Flow cytometric analysis는 FACS Caliber (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 567-609 nm(FL2)의 emission filter를 이용하여, 시료 하나당 최소 10,000개 세포를 측정하였다. 또한, 세가지 세포주기요소(G0/G1, S, G2/M기)로 나누어 CELLQuest 프로그램(Becton Dickinson)을 사용하여 그 비율을 정량하였다.

4. 뇌허혈 동물모델을 이용한 효능 조사

가. 뇌허혈 유발 동물 모델에서의 효과 조사

1) 동물

260-270 g의 수컷 Spargue-Dawley 랫트와 60-80 g의 Mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*)은 Chrles River Laboratories (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 12시간 낮/밤 주기로 사육하였고 식이 및 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험에 이용하기 전에 6일 동안 적응시킨 다음 사용하였다.

2) 국소허혈모델

랫트는 70% N₂O/ 30% O₂(v/v) 가스에 3% isoflurane을 혼합하여 마취시킨 후, 2% isoflurane으로 마취상태를 유지하였다. 직장으로 온도계를 삽입하여 수술기간동안 열판을 이용하여 체온을 37°C로 유지하였다. 국소 뇌허혈은 우측 내혈관의 중간 대뇌 동맥 폐쇄(MCAO)에 의해 일어나므로 다음의 절차에 따라 실시하였다(Belayev 등, 1996). 즉, 목 중양을 절개하고 미주신경에 손상을 주지 않도록 주의하면서 오른쪽 총경동맥, 내경동맥 및 외경동맥을 분리한 뒤 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 곧바로 외경동맥과 내경동맥의 분지점에 프로브 전체를 삽입한 뒤 삽입 부위 바로 위쪽을 결찰함으로써 동측 중대뇌 동맥을 폐쇄하였다. 뇌허혈 2시간 후, 프로브를 제거하여 혈액을 재관류 시켰다. 시료는 혈관계쇄 직후, 재관류 직후에 투여하였다.

수술 24시간 후에 랫트를 chloral hydrate로 마취하여 희생시켰다. 랫트의 뇌를 분리하여 2 mm 두께의 coronal brain slice를 얻은 후 뇌 절편을 2% triphenyl tetrazolium chloride(TTC, w/v) 용액에 넣어 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. TTC 반응 후, 뇌절편을 4% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer, pH 7.4로 하루동안 고정된 뒤, 30% sucrose/PBS(w/v)에서 2일동안 보관하였다. 뇌허혈 면적은 computer image analysis(OPTIMAS 5.1, BioScan Ins.)를 이용하여 계산하였고, 뇌

의 각 절편들을 각각 분석하여 평균값을 구하였다. 총 허혈 면적은 6개의 절편을 합하여 총 뇌 부위의 비율로 나타냈다. 조직은 동결시켜 cryostat에서 10 또는 30 μm 로 잘라(Leica 3050, Leica, Germany) 4°C에서 저장하였다.

3) 전뇌 허혈 모델

80-88 g의 수컷 Mongolian gerbil을 67% N_2O /33% O_2 (v/v) 가스에 2.5% isoflurane을 혼합하여 마취시킨 상태에서 양쪽 경동맥을 분리하여 신경섬유를 건드리지 않고 aneurysm clip을 이용하여 경동맥을 폐쇄시켰다. 혈액의 흐름이 완전히 차단된 것은 ophthalmoscope를 이용하여 눈의 주동맥을 관찰함으로써 확인하였다. 폐쇄 5분 후, aneurysm clip을 제거하여 혈액이 재관류 되도록 하였다. Sham-대조군(n=7)은 경동맥을 폐쇄하지 않고 동일한 수술을 실시하였다. 수술 동안, 수술이 끝나고 마취가 풀릴 때까지 체온을 $37\pm 0.3^\circ\text{C}$ 로 유지시켰다. 시료는 경동맥 폐쇄 30분전, 폐쇄 직후, 재관류 2시간 후에 주입하였다.

수술 7일 후, gerbil을 chloral hydrate로 마취하여 4% paraformaldehyde/PBS (w/v)를 심장으로 관류시켜 뇌를 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 동일한 고정액에서 4시간동안 처리하여 후고정하고, 4°C에서 30% sucrose(w/v)/PBS에 차례로 침전시켜 동결시 조직이 손상되지 않도록 처리했다. Sucrose 처리가 끝난 조직은 조직 동결처리기를 사용하여 신속히 얼리고 cryostat로 해마 부위를 30 μm 두께로 횡단으로 잘라 cresyl violet으로 염색하였다. 해마 CA1 부위의 신경손상정도를 광학현미경으로 평가하였으며, 1 mm^2 당 살아있는 신경세포의 수를 측정하였다.

4) Western blot analysis

조직은 lysis buffer[50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide(w/v), 0.1% SDS(v/v), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1% NP-40(v/v), 0.5% sodium deoxycholate(w/v)]로 용해시킨 후, 14,000 $\times g$, 4°C에서 10분간 원심분리

하여 단백질을 추출하였다. 그런 다음, 단백질은 SDS를 이용하여 변성시킨 후 Bio-Rad Miniprotein II apparatus를 이용하여 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 실행하였다. Stacking gel 과 separating gel의 농도는 각각 4%와 10%였으며 전개된 단백질은 100 V에서 90분동안 nitrocellulose membrane(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)로 전이시켰다. Nitrocellulose membrane은 0.05% Tween-20(v/v)과 5% skim milk(w/v)를 혼합한 Tris-buffered saline(TBS)을 이용하여 1시간동안 blocking하고, p-ERK(1:2000), ERK (1:1000), p-JNK(1:500), JNK(1:1000), p-p38(1:500), p38(1:1000), β -actin (1:10,000)의 primary antibody와 하룻밤동안 반응시킨 후 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 1시간동안 반응시켰다. 표적 단백질은 ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)을 사용하여 검출하였다. 정량을 위해, 인산화된 ERK, JNK, p38의 농도를 비인산화된 ERK, JNK, p38에 대한 비로 보정하였다.

나. 행동양식 및 학습능의 변화 조사

허혈을 유도한 총 36마리 쥐에 대해 행동양식 및 학습능의 변화를 조사하였다. 허혈 유도 동물 가운데 회복 도중에 5마리가 사망하여 치료처치군(n=11), vehicle 대조군(n=10), sham 대조군(n=10), 모두 31마리의 자료를 분석하였다. Rotarod-fixed version는 시술 다음날 한 번 검사되었으며, Rotarod-fixed version을 제외한 모든 검사는 21일 동안 측정되었다. 9일까지는 매일 측정하고 14, 18, 21일에 각각 측정하였다. 행동양식 및 학습능의 변화를 조사하기 위해서는 reflex test, motor coordination test, open field, watermaz 시험 등을 수행하였다.

다. 시료의 식이 섭취에 의한 효과 조사

1) 실험동물의 사육 및 실험군 분리

6주령의 수컷 랫트(Wistar-Kyoto, WKY/Izm)와 stroke-prone

spontaneously hypertensive rat(SHRSP/Izm)를 Japan SLC, In (Shizuoka prefecture, Japan)으로부터 구입하였다. 동물은 수령 후 2주 동안 적응시킨 다음 8주령을 시험에 이용하였다. 군은 SAC의 경우 4군으로 분리하였다: (1) SHRSP-무처리군(n=9); (2) SHRSP-SAC군(n=9); (3) WKY-무처리군(n=10); (4) WKY-SAC군(n=10). 모든 군은 stroke-prone 식이 및 1% NaCl(w/v) 음수를 4주동안 공급하였고, SAC 처리군은 0.5% SAC (w/w) 을 공급하였다. TMBU 시료의 경우, SHRSP rats에 0.5% NaCl 음수와 stroke-prone diet를 공급하여 4주간 사육하였으며 시료는 식이의 0.03%, 0.1%, 0.3% 수준으로 공급하였다. 동물은 온도 22±2℃, 습도 55±5%인 환경에서 12시간 낮밤 주기로 사육하였다.

2) 혈압 측정 및 뇌졸중 발병빈도 관찰

혈압은 pressure meter(Letica Scientific Instruments LE 5002, Barcelona, Spain)를 이용하여 마취하지 않은 상태에서 tail-cuff 방법으로 측정하였다. 혈압은 실험 시작부터 매주 1회 측정하였다.

뇌졸중의 발병은 급격한 체중감소, 식이섭취량의 감소, 음수섭취량의 증가로 판단하였다. 각 랫트는 이중맹검으로 신경성 손상 행동 지표를 처음에는 주 1회, 신경성 징후를 보이기 시작하면 매일 측정하였다. 신경성 손상의 총 합계 점수는 12점으로 0점에서 1 또는 3점 척도였다. 주요 신경 장애를 반영하는 항목으로 발작, 마비, 몸의 대칭감각 상실, 운동조정능력 상실, 보행 반응(gait response), 균형감각(Eliash 등, 2001) 등을 측정하였다. 모든 동물은 사후 조직학적 검사를 실시하여 사인이 뇌졸중으로 인한 것임을 확인하였다.

3) 뇌경색 면적 측정 및 조직학적 검사

실험동물의 뇌를 꺼내 2 mm 두께의 coronal brain slice를 얻은 후 뇌 절편을 2% TTC(w/v) 용액에 넣어 37℃에서 30분간 반응시켰다. TTC 반응 후, 뇌절편을 0.1M phosphate buffer로 맞춘 4% paraformaldehyde (pH

7.4)로 하루동안 고정 한 뒤, 30% sucrose (w/v)를 함유한 PB 용액에 2일 동안 보관하였다. 뇌허혈 면적은 computer image analysis(OPTIMAS 5.1, BioScan Ins.)를 이용하여 계산하였다. 뇌 절편들 중 각 절편들을 각각 분석하여 평균값을 구하였다. 총 허혈 면적은 6개의 절편을 합하여 총 뇌 부위의 비율로 표현하였다. 조직은 동결시켜 cryostat에서 10 또는 30 μm 로 잘라(Leica 3050, Leica, Germany), 20°C에서 저장하였다.

실험동물의 뇌를 고정 한 후, 동일한 고정액에서 4시간동안 처리하여 후고정하고, 4°C에서 30% sucrose(w/v)를 포함한 PBS 용액에 차례로 침전시켜 동결시 조직이 손상되지 않도록 처리했다. Sucrose 처리가 끝난 조직은 조직동결처리기를 사용하여 신속히 얼리고 cryostat로 해마 부위를 30 μm 두께로 횡단으로 잘라 cresyl violet으로 염색하였다. 해마 CA1 부위의 신경손상정도를 광학현미경으로 평가하였으며, 1 mm²당 살아있는 신경세포의 수를 세었다.

4) Cytokine 측정법

랫트에서 얻은 혈액의 혈청내 TNF- α , IL-6 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법을 이용하여 측정하였다. 즉, anti-rat TNF- α , IL-6 단일클론 항체가 코팅된 microtiter plate에 100 μl 의 표준 rat TNF- α , IL-6 또는 완충액과 1:1로 혼합한 100 μl 혈청을 주입하고 여기에 50 μl 의 biotin-labeled anti-rat TNF- α , IL-6를 첨가한 후 실온에서 90분동안 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 4회 세척한 다음, 100 μl streptavidin-conjugated peroxidase를 첨가하여 실온에서 30분동안 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 4회 세척한 다음, 여기에 100 μl 의 기질(tetramethylbenzidine)을 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 100 μl 의 반응정지액을 첨가한 후 microtiter plate reader(Molecular device, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 TNF- α , IL-6로부터 작성한 표준곡선으로부터 TNF- α , IL-6 함량을 계산하였다.

5) 혈액지표 측정

채취한 혈액내의 혈소판수, 적혈구수, 헤모글로빈, 백혈구수, 림프구, 단핵구, 과립구, 호산구, 호염구 등의 혈액 지표를 측정하였다. 혈액지표의 측정은 ADVIA 120 Hematology System(Bayer, USA)을 이용하여 수행하였다.

5. 활성소재의 구조분석 및 동정

가. 허혈성 뇌졸중 예방 활성물질의 조분리

허혈성 뇌졸중 예방 활성물질의 조분리는 전술한 방향성 추출물을 제조하는 방법과 동일하게 하였다. 즉, 감압하의 증기 증류(DRP, distillation under reduced pressure)와 dichloromethane을 용매로 한 액체-액체 연속 추출(LLE, liquid-liquid continuous extraction)방법에 의해 음건된 방향식물로부터 방향성 성분을 조분리 하였다. 그런 다음 mass selective detector(HP 5973)와 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm DB-WAX bonded-phase fused-silica capillary column(J&W Scientific, Folsom, CA)이 장치된 Hewlett-Packard(HP) model 6890 gas chromatograph(GC)을 이용하여 조분리물을 분석하였다. 분석은 Kovats gas chromatographic retention index와 실제 화합물을 비교함에 의해 정성분석을 실시하는 동시에 GC-FID를 사용하여 정량분석을 병행하였다. 방향성 성분의 정량 분석을 위해서는 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm DB-WAX bonded-phase fused-silica capillary column(J&W Scientific, Folsom, CA)와 flame ionization detector(FID)가 장치된 HP model 5890 GC를 이용하였다. 이때 injector와 detector 온도는 각각 200°C, 250°C이었고 헬륨(He)의 선형속도는 41.3 cm/s, split ratio는 0.741:1이었다. 정성 및 정량분석이 완료된 조분리물에 대하여 전술한 시험관내 유사허혈모델에 의하여 활성을 측정한 후, 활성이 인정되는 경우 alcohol류, ketone류, aldehyde류, terpene류, 기타 및 미지물질로 분류하였다. 그런 다음 각 분류군 내에서 농도가 높고 표준품

의 구입이 용이한 성분부터 개별적으로 활성을 조사함에 의해 활성을 추적하였다.

이와 동시에 조분리물을 다시 물, CH_2Cl_2 , *n*-BuOH, Ethyl acetate로 분획을 병행하였다. 그런 다음 각 분획물의 활성을 추적한 다음 활성이 인정된 분획은 넓은 범위의 gradient mobile phase(*n*-Hexane-EtOAc-MeOH)로 Silicagel column chromatography를 실시하였다. 단리된 물질은 냉동건조 또는 Speed/Vacuum으로 용매를 제거한 후, deuterated solvent에 시료를 녹여서 NMR tube에 옮긴 후 NMR 실험에 사용하고, 회수하여 Mass Spectrometry 및 IR 분석에 사용하였다.

나. 활성물질의 구조분석 및 신규성 조사

본 연구에서 활성을 보이는 단일 물질의 구조를 규명하기 위하여 사용한 기기분석 방법은 주로 NMR spectroscopy를 이용하였다. 모든 NMR 실험은 Bruker Avance 400 spectrometer (Karlsruhe, Germany) system을 사용하였고 온도는 298K로 하였다. ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, COSY, TOCSY, HMQC, HMBC spectra를 측정하였고, 용매는 deuterated로 치환된 용매를 사용하였다. ^1H -NMR의 경우 1 s 간격으로 32번 scan을 하였고 32K의 data point를 사용하였다. 90 pulse는 9.7 s로 하였고 spectral width를 4K Hz로 하여 기록을 하였다. ^{13}C -NMR과 DEPT spectrum의 경우는 64K의 data point를 사용하였고 90 pulse는 9.8 s로 하였으며 spectral width는 20K Hz로 하였다. 모든 two-dimensional spectra의 경우 f2 dimension의 경우 2K data points를 사용하였으며 f1 dimension의 경우는 256을 사용하였다. HMBC의 경우 long range coupling constant를 70 ms로 하였다. TOCSY와 NOESY의 경우 mixing time을 각각 60 ms와 1 s로 하였다. 상기 서술한 실험들을 수행하여 분자량 및 분자의 부분 구조를 찾은 후 영국 Chapman & Hall사의 Natural Products Data/Base 등을 이용하여 동일한 화합물의 존재 여부를 확인하였다. CD에 존재하지 않는 화합물은 완전한 구조를 찾은 다음 찾은 구조를 특허 및 STN에서 검색하여 신규성을 확인하는 절차로 신규성 여부를 판단하였다.

6. 기능성 식품 응용기술 연구

가. 선별된 추출물의 소재화를 위한 기초조사

선별된 추출물의 소재화를 위한 기초 정보를 파악하기 위해 활성 물질의 구조 및 분자적 특성을 다음의 항목들에 대하여 살펴보았다: 구조적 표현자(constitutional descriptors)로는 분자량(MW), 치환체; 화학적 표현자로는 octanol/water partition coefficient(Clog P), 수용해성(Aslog S); 위상적 표현자(topological descriptors)로는 극성표면적(PSA), 상대적 전기음성도인 Balaban index; 정전기적 표현자(electrostatic descriptors)로는 총 음전기량과 총 양전기량; 흡수 예측자로는 blood brain barrier(BBB), 인체 소장 흡수율(HIA)이었다. EILSTEINE, DIPPR, MRCK, HOPOC, HSDB, PhysProp, PreADME(version 1.0, Research Institute of Bioinformatics & Molecular Design), TRCTHERMO 등의 데이터베이스를 이용하여 산출하였다.

또한 식품소재 원료로서 활성물질의 특성을 살펴보기 위해 활성물질별로 HPLC 또는 GC 분석방법을 확립한 다음 pH stability, storage stability, heat stability 등을 조사하였다.

나. 허혈성 뇌졸중 예방 기능성 식품화를 위한 응용기술 연구

식물성 추출물을 허혈성 뇌졸중 예방 소재로 이용하기 위해서는 쓴맛이나 이취 등 기호도를 저해하는 요소들을 감소시켜 식품소재로서의 활용도를 높여야 한다. 따라서 선별된 후보추출물 또는 비교적 순도가 높은 활성물질의 효능, 추출수율과 이화학적 특성을 고려하여 배합조성과 디자인을 선정하였다.

7. 결과의 통계처리

결과들은 평균 \pm 표준오차(또는 표준편차)로 나타내었다. Student's t-test를 이용하여 유의성을 확인하였으며, 전뇌 허혈실험 결과에서는

Wilcoxon rank sum test를 실시하였다. 동물 종 및 처리 요인에 대해 2-way ANOVA를 실시하여, Duncan's multiple range test로 검증하였다. 두 그룹간의 차이는 Wilcoxon rank sum test로 분석하였다. 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. 허혈성 뇌졸중 예방 소재 탐색, 발굴 및 작용기전 조사

가. 허혈성 뇌졸중 예방 식품 선도 소재 발굴

1) 방향성 식물 추출물의 제조

PubMed, Medline, CARDS(Computer Access to Research on Dietary Supplements), and IBIDS(International Bibliographic Information on Dietary Supplements database) of the US National Institutes of Health, Medline, FSTA, Agricola, Science search, KREP(Korea R&D Bibliographic Information), DIMD(Dissertation Information of Master & Doctor), KSMA(Korean Scientific & Medical Abstracts) 등 기존 database와 자료조사로부터 국내산 또는 국내 자생 방향성 식물의 활성물질을 조사함에 의해 허혈성 뇌졸중 예방 가능성이 높은 식물 원료를 조사하였다. 또한 한의학 연구소로부터 국내·외 고대 의학서에 뇌졸중의 치료에 사용된 단방처방에 관한 정보를 제공받아 향후 기능성 식품으로 이용가능성, 원료의 구입 용이성 등을 고려하여 최종적으로 식물 원료 21종을 선별하였다. 수집한 식물의 종(species)은 전문가(경상대학교 농과대학, S 교수)에게 의뢰하여 확인하였다.

음건된 방향식물의 추출물은 감압하의 증기 증류(DRP, distillation under reduced pressure)와 dichloromethane을 용매로 한 액체-액체 연속 추출(LLE, liquid-liquid continuous extraction)방법에 의해 제조하였다. 제조한 추출물을 DB-WAX column에서 분석한 결과는 Table 2와 같다. 21종 방향식물 추출물에 있어서 전체 향기 성분의 총 수율은 각각 ACR(2.963 mg%, w/w), AFB(0.814 mg%, w/w), AGR(8.512 mg%, w/w), ARA(12.607 mg%, w/w), ARR(2.534 mg%, w/w), ATR(7.907 mg%, w/w), CF(6.925 mg%, w/w), CLV(38.617 mg%, w/w), CTF(2.879 mg%, w/w), EH(1.668 mg%, w/w), GR(0.969 mg%, w/w), GSN(0.293 mg%, w/w), LR(1.459 mg%, w/w), MH(7.310 mg%, w/w), MR(0.552

mg%, w/w), NS(6.733 mg%, w/w), PN(4.932 mg%, w/w), SH(2.636 mg%, w/w), XF(0.743 mg%, w/w), WAD(3.632 mg%, w/w), ESR(6.825 mg%, w/w)으로 나타났다. 한편 메탄올과 초음파에 의해 추출한 VV의 수율은 비교적 높아 15%(w/w)이었다.

Table 2. Total yields of aroma chemicals for medicinal plants

Sample	Total yield of aroma chemicals (mg%, w/w)	GC peak area % ¹⁾
ACR	2.963	51.8
AFB	0.814	7.3
AGR	8.512	78.2
ARA	12.607	91.9
ARR	2.534	42.8
ATR	7.907	70.0
CF	6.925	59.7
CLV	38.617	93.3
CTF	2.879	24.4
EH	1.668	24.1
GR	0.969	15.1
GSN	0.293	4.9
LR	1.459	13.0
MH	7.310	66.1
MR	0.552	9.6
NS	6.733	59.1
PN	4.932	45.2
SH	2.636	47.1
XF	0.743	12.2
WAD	3.632	50.3
ESR	6.875	59.9

¹⁾On DB-Wax

ACR: Araliae continentalis Radix, AFB: Allii fistulosi Bulbus, AGR: Acori graminei Rhizoma, ARA: Atractylodis Rhizoma alba, ARR: Achyranthes Radix, ATR: Angelica tenuissimae Radix, CF: Chrysanthemi Flos, CLV: Caryophylli Flos, CTF: Carthami Flos, EH: Epimedii Herba, GR: Gastrodiae Rhizoma, GSN: Glycine semen nigra, LR: Ledebouriellae Radix, MH: Menthae Herba, MR: Mori Ramulus, NS: Nepetae Spica, PN: Pini Foilium, SH: Siegesbeckiae Herba, XF: Xanthii Fructus, WLD: *Allium victorialis* var. *platyphyllum*, ESR: Acanthopanax Cortex

2) 방향성식물 추출물의 표준화

21종 방향성 추출물 성분의 정성분석을 위해 DRP-LLE에서 얻어진 방향성 추출물 성분을 Kovats gas chromatographic retention index와 실제

화합물과 비교한 다음 각 성분의 mass spectrometry(MS) fragmentation pattern을 실제 성분과 비교하였다. 그 결과 DB-WAX column에서의 Kovats index와 계산된 농도 그리고 정성 분석된 방향성 성분을 대표적으로 나타낸 것은 Table 3~6 및 Fig. 4~7과 같다(그외 데이터는 미제시). 각 추출물을 표준화하고자, 분석된 정성, 정량 결과를 활용하여 주요 방향성 성분이 유사할 경우 두 가지 물질의 비(ratio)로 파악하기 위해 유효 지표물질을 선정한 결과는 다음과 같다. ACR; berbenone, carveol, AFB; propenyl propyl trisulfide, 2-hexyl-5-methyl-(2H)-furan-3-one, AGR; asarone, methyl eugenol, ARA; germacrene B, β -selinene, ARR; eseroline, asarone, ATR; butyl phthalide, α -farnesene, CF; chrysanthenone, cineole, CLV; β -caryophyllene, eugenol, CTF; caproic acid, caryophyllene oxide, EH; α -cedrol, widdrol, GR; 4-methyl phenol, asarone, GSN; 1-octene-3-ol, maltol, LR; β -bisabolene, germacrene A, MH; mentol, piperitone, MR; anethole, caproic acid, NS; menthone, pulegone, PN; borneol, spathulenol, SH; geraniol, eugenol, XF; pulegone β -selinene, WAD; diallyl sulfide, diallyl disulfide, ESR; β -elemene, α -beramotene.

Table 3. Aroma compounds identified in the extract from XF

Peak No.	I ^a	Concn ^b (ppm) ^c	Possible compound	Peak No.	I ^a	Concn ^b (ppm) ^c	Possible compound
1	1161	2.23	Unknown	28	2095	3.34	Di(t-butyl)-methoxy-cyclohexadienone
2	1354	1.89	Unknown	29	2117	2.67	Trimethyl pentadecanone
3	1450	24.61	1-Methanone	30	2146	0.45	Eugenol
4	1454	1.56	Furfural	31	2160	3.23	Nonanoic acid
5	1476	1.78	μ -Menthone	32	2177	7.80	Unknown
6	1531	16.37	Unknown	33	2210	1.58	Unknown
7	1623	5.68	Phenyl acetaldehyde	34	2231	1.67	Acetovanillone
8	1627	24.39	Pulegone	35	2238	5.46	Eugenol acetate
9	1637	11.58	Menthol	36	2265	1.00	Unknown
10	1698	11.92	β -Selinene	37	2287	1.78	Dihydroactinidiolide
11	1702	23.16	Unknown	38	2319	1.45	Unknown
12	1713	1.34	Carvone	39	2329	0.78	Asarone
13	1807	1.56	Anethole	40	2332	11.03	Unknown
14	1858	1.89	Methyl propanoic acid	41	2344	2.00	Benzencarboxylic acid
15	1863	5.90	Benzyl alcohol	42	2374	5.12	Unknown
16	1865	9.02	Unknown	43	2379	5.23	Decanoic acid
17	1880	2.45	Unknown	44	2420	2.45	Unknown
18	1892	0.89	Piperitone	45	2455	2.45	Unknown
19	1895	6.79	Phenylethanol	46	2462	1.11	BHT-aldehyde
20	1912	2.12	Camphene	47	2474	0.89	Hydroxymethylfurfural
21	1953	5.79	Acetylpyrrole	48	2477	3.01	Dodecanoic acid
22	1970	1.23	Unknown	49	2485	4.34	Unknown
23	1993	1.78	Anisaldehyde	50	2524	10.36	Vanillin
24	2021	6.13	Unknown	51	2639	1.11	Unknown
25	2047	1.56	Unknown	52	2666	0.78	Benzencarboxylic acid, dibutyl ester
26	2054	3.90	Octanoic acid	53	2677	0.56	BHT-alcohol
27	2089	1.45	Cedrol	54	2687	1.67	Tridecanoic acid

^aI means Kovats retention index on DB-WAX.

^bConcentration; solvent peak excluded.

^cValues are on dried weight of XF in $\mu\text{g/g}$.

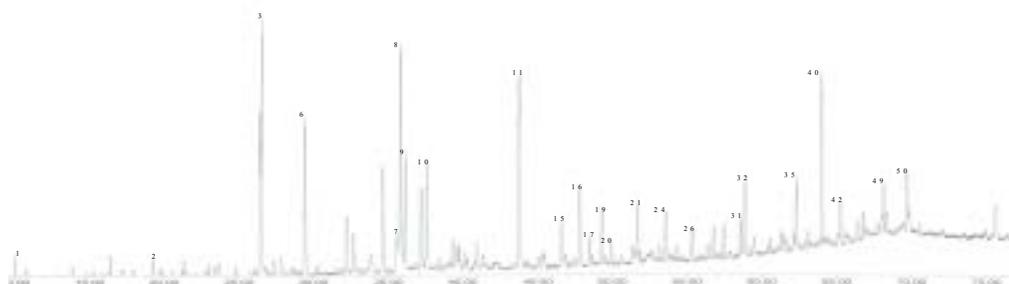


Fig. 4. Typical gas chromatogram of the aroma extract isolated from XF.

Table 4. Aroma compounds identified in the extract from AFB

Peak No.	I ^a	Concn ^b (ppm) ^c	Possible compound	Peak No.	I ^a	Concn ^b (ppm) ^c	Possible compound
1	1154	34.13	Unknown	22	2087	1.96	Dibutyl-hydroxy methyl cyclohexadien 1-one
2	1210	1.12	Methyl thiourea	23	2131	1.96	Unknown
3	1248	36.65	Dimethyl thiophene	24	2151	7.27	Nonanoic acid
4	1346	19.30	Unknown	25	2157	25.46	Unknown
5	1354	3.36	Hexanol	26	2164	5.04	4-vinyl-2-methoxy-phenol
6	1424	3.36	Propyl disulfide	27	2190	134.29	2-Octyl-5-methyl-(2H)-furan-3-one
7	1519	13.43	Unknown	28	2256	2.24	Decanoic acid
8	1647	3.36	Dipropyl trisulfide	29	2309	1.96	Unknown
9	1687	7.27	Unknown	30	2324	5.32	Unknown
10	1740	2.24	Unknown	31	2337	9.23	Diethyl sebacate
11	1746	1.68	Undec-2-enal	32	2368	3.08	Unknown
12	1762	16.23	Propenyl propyl trisulfide	33	2454	5.32	Unknown
13	1787	3.36	Undec-2,4-dienal	34	2481	54.55	Ethyl oleate
14	1832	13.15	Dimethyl pentanoic acid	35	2514	3.64	Unknown
15	1849	37.77	Unknown	36	2523	32.45	Methyl linoleate
16	1861	2.24	Methyl propanoic acid	37	2558	14.27	Unknown
17	1889	7.55	Phenylethyl alcohol	38	2580	11.19	Unknown
18	1930	9.23	Dimethyl-thiophene-2-one	39	2620	7.83	Unknown
19	1938	21.26	Hexanoic acid	40	2660	1.40	Diethyl phthalate
20	1973	132.33	2-Hexyl-5-methyl-(2H)-furan-3-one	41	2670	1.40	Butylated hydroxy benzyl alcohol
21	2043	4.76	Octanoic acid	42	2679	2.24	Tridecanoic acid

^aI means Kovats retention index on DB-WAX.

^bConcentration; solvent peak excluded.

^cValues are on dried weight of AFB in µg/g.

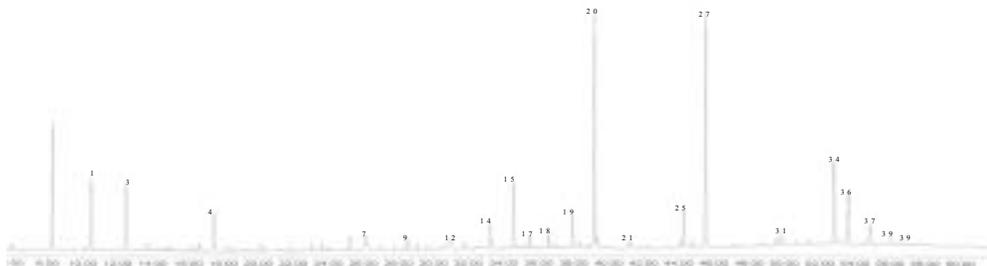


Fig. 5. Typical gas chromatogram of aroma extract isolated from AFB.

Table 5. Aroma compounds identified in the extract from NS

Peak No.	I ^a	Concn ^b (ppm) ^c	Possible compound	Peak No.	I ^a	Concn ^b (ppm) ^c	Possible compound
1	1312	14.23	Methylcyclohexan-3-one	27	1885	73.98	Unknown
2	1375	5.69	Unknown	28	1892	648.74	Piperitenone
3	1380	25.61	Unknown	29	1916	34.14	Jasmone
4	1455	5357.78	Menthone	30	1923	5.69	Unknown
5	1476	759.71	Isomenthone	31	1926	5.69	Unknown
6	1550	36.99	Menthyl acetate	32	1950	318.68	Caryophyllen oxide
7	1562	59.75	Isopulegone	33	1966	5.69	Unknown
8	1588	182.10	Neoisomenthol	34	1970	28.45	Unknown
9	1628	3121.34	Pulegone	35	1981	25.61	Methoxy-4(1-methylethyl) benzene
10	1634	469.48	Menthol	36	2060	39.83	Decyne
11	1663	150.80	μ -Mentha-2,8-dien-1-ol	37	2101	113.81	Spathulenol
12	1689	62.60	α -Terpineol	38	2130	42.68	Unknown
13	1698	702.80	Unknown	39	2137	34.14	Isocamphonone
14	1702	133.73	Piperitone	40	2144	22.76	Eugenol
15	1709	2.85	Carvone	41	2181	31.30	Unknown
16	1720	5.69	Unknown	42	2206	36.99	Unknown
17	1728	8.54	Unknown	43	2212	59.75	Tetramethylcyclooctan-3-ol
18	1736	1007.25	Hydroxy- μ -menthan-3-one	44	2256	628.82	Mint furanone
19	1742	85.36	Unknown	45	2262	71.13	Unknown
20	1785	156.49	Unknown	46	2269	147.96	Diethyl-2,6-dimethylenecyclo undecan-5-ol
21	1791	159.34	Unknown	47	2309	28.45	Unknown
22	1809	73.98	Unknown	48	2327	48.37	Asarone
23	1825	31.30	Carvenol	49	2349	62.60	Unknown
24	1830	42.68	Unknown	50	2519	34.14	3N Butyl phthalide
25	1861	59.75	Benzyl alcohol	51	2619	17.07	Unknown
26	1882	586.14	Hydroxy menthene-3-one				

^aI means Kovats retention index on DB-WAX.

^bConcentration; solvent peak excluded.

^cValues are on dried weight of NS in $\mu\text{g/g}$.

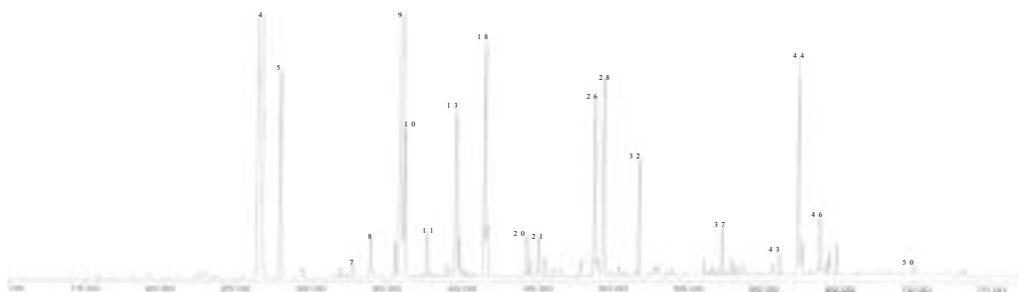


Fig. 6. Typical gas chromatogram of aroma extract isolated from NS.

Table 6. Aroma compounds identified in the extract from PN

Peak No.	I ^a	Concn ^b (ppm) ^c	Possible compound	Peak No.	I ^a	Concn ^b (ppm) ^c	Possible compound
1	1345	18.27	Unknown	32	1992	505.74	Methyl eugenol
2	1447	70.34	Menthone	33	2013	87.24	Unknown
3	1472	53.16	Campholene aldehyde	34	2029	106.60	Unknown
4	1517	15.81	Unknown	35	2037	64.34	Cadina-1,4-diene
5	1543	115.05	Pinocarvone	36	2043	73.07	Octanoic acid
6	1551	91.33	5-Methylfurfural	37	2076	115.60	<i>p</i> -Cymene-7-ol
7	1564	2069.57	Bornyl acetate	38	2086	103.60	2,6-Di(<i>t</i> -butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadiene-1-one
8	1575	617.24	Caryophyllene	39	2096	1158.69	Spathulenol
9	1579	186.48	1-Isopropyl-2-methoxy-4-methyl benzene	40	2145	158.67	α -Cadinol
10	1586	61.07	Terpinen-4-ol	41	2178	238.01	Unknown
11	1597	118.05	Myrtenal	42	2205	503.83	Muurolol
12	1615	64.89	β -terpineol	43	2261	400.50	Unknown
13	1629	76.88	Menthol	44	2276	153.77	Dihydroactinidiolide
14	1637	472.47	Pinocarveol	45	2282	103.87	Unknown
15	1645	193.84	α -Humulene	46	2319	221.38	Unknown
16	1665	692.22	trans-Vervanol	47	2329	583.44	5-mMethoxy-2,8,8-trimethyl-di pyran-4-one
17	1676	338.34	Verbenone	48	2353	309.44	Caryophylla-3,8-dien-5-ol
18	1685	428.31	Borneol	49	2358	138.23	4-Vinylphenol
19	1693	165.49	β -Selinene	50	2367	160.85	Decanoic acid
20	1706	58.62	α -Muurolene	51	2389	283.54	Unknown
21	1714	71.70	<i>p</i> -mentha-1,5-diene-8-ol	52	2419	85.06	Unknown
22	1739	585.07	α -Cadinene	53	2446	14.99	Dehydroabietan
23	1751	30.81	Cuminaldehyde	54	2465	238.55	Dodecanoic acid
24	1776	157.58	Myrtenol	55	2485	272.09	Unknown
25	1820	95.97	trans-Carvenol	56	2515	241.55	3 <i>N</i> Butyl phtalide
26	1832	670.13	<i>p</i> -Cymene-8-ol	57	2498	2129.00	Thunbergol
27	1869	41.17	Unknown	58	2556	42.26	Unknown
28	1886	139.59	Phenylethyl alcohol	59	2578	766.65	Unknown
29	1917	54.53	Unknown	60	2608	1559.19	Unknown
30	1949	2133.09	Caryophyllene oxide	61	2654	161.67	Methyl dehydroabietate
31	1964	126.23	Bicyclo(2.2.2)oct-2-ene-1,2,3,6-tetramethyl	62	2676	604.16	Tridecanoic acid

^aI means Kovats retention index on DB-WAX.

^bConcentration; solvent peak excluded.

^cValues are on dried weight of PN in $\mu\text{g/g}$.

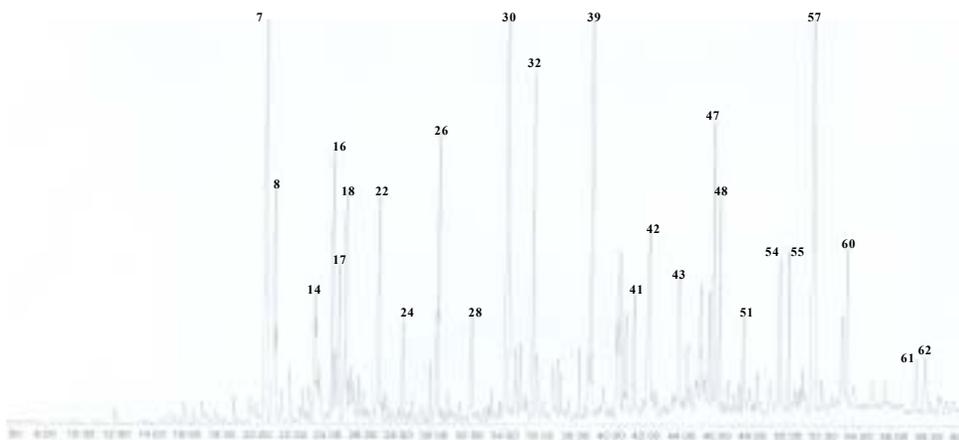


Fig. 7. Typical gas chromatogram of aroma extract isolated from PN.

3) 시험관내 모델을 이용한 활성물질의 탐색 및 발굴

가) 유사허혈모델(Simulated in vitro ischemia model)의 확립

뇌조직은 혈액순환에 의한 지속적인 산소공급을 필요로 하며, 혈액 중에서 포도당을 흡수해서 산화함으로써 에너지 대사를 영위하고 있다. 허혈성 뇌손상은 뇌로 혈액을 공급하는 혈관에 여러 가지 병리학적 이상이 발생되어 정상적 뇌혈류(50 ml/gram/minute)의 장애가 초래되면 신경세포가 손상됨으로써 발생된다고 알려져 있다. 이러한 허혈성 뇌손상을 예방할 수 있는 식품 선도물질의 발굴에 있어서 선행되어야 할 것은 우선 신속하고, 재현성이 있으면서 활성을 예측할 수 있는 시험관내 선별 모델을 확립하는 것이다. 또한 이러한 모델은 동물모델과 상관성이 높아야 하며, 또 동물모델은 사람의 뇌혈관 질환과 병리학적, 생리학적인 측면에서 유사하여야 하는 유기성을 요구한다. 따라서 본 연구에서는 허혈성 뇌손상을 예방할 수 있는 식품 선도물질을 발굴하기 위하여 수종 뇌질환의 발병 및 치료와 관련된 기전연구에 이용되고 있는 human brain neuroblastoma cell line을 이용하여 산소와 포도당 결핍 상태(hypoxia 및 hypoglycaemia)와 회복시킨 조건(simulated reperfusion)을 결합시킨 시험관내 유사 허혈(*in vitro* simulated ischemia) 모델을 확립하고자 하였다.

Fig. 8 및 9는 human brain neuroblastoma cell에서 산소와 포도당 결핍(hypoxia 및 hypoglycaemia) 시간과 적정 재관류(reperfusion)에 따른 세포 생존율을 살펴본 것이다. 4시간 동안 산소와 포도당 결핍 환경에 노출하였을 때 세포 사멸 정도는 약 30%이었으나 8시간 이상 세포를 노출시킬 경우 약 60% 정도 사멸되는 것으로 나타났다. 재관류 시간은 재관류를 전혀 하지 않은 세포와 비교할 때 재관류 18시간까지는 세포 사멸 정도가 크지 않았으나 24시간 동안 재관류를 실시한 세포의 사멸 정도는 급격하게 증가하는 것으로 나타났다. 이에 본 연구에서 세포를 이용한 시험관내 유사 허혈 모델에서의 산소와 포도당 결핍 환경에의 노출시간은 6시간으로, 재관류 시간은 18시간을 기본적으로 설정하였다.

한편, SD 랫드의 태아로부터 분리한 초대배양세포는 동일한 산소와

포도당 결핍 환경에의 노출시간과 재관류 시간에서 human brain neuroblastoma 세포보다 세포사멸 정도가 더 큰 것으로 조사되었다. 따라서 초대배양 세포를 이용한 시험관내 유사허혈 모델에서는 각 시료를 처리한 후 세포주를 이용한 유사허혈 모델 보다 마일드한 조건(1/2 노출 및 재관류)으로 허혈을 유발하였다. 이때 초대배양 세포의 형태학적인 특징은 Fig. 10과 같이 대조군은 핵을 가진 세포의 형태가 잘 유지되고 있는 것으로 관찰되나 산소와 포도당 결핍 환경에 노출된 세포는 세포가 위축되고 사멸된 것으로 보인다.

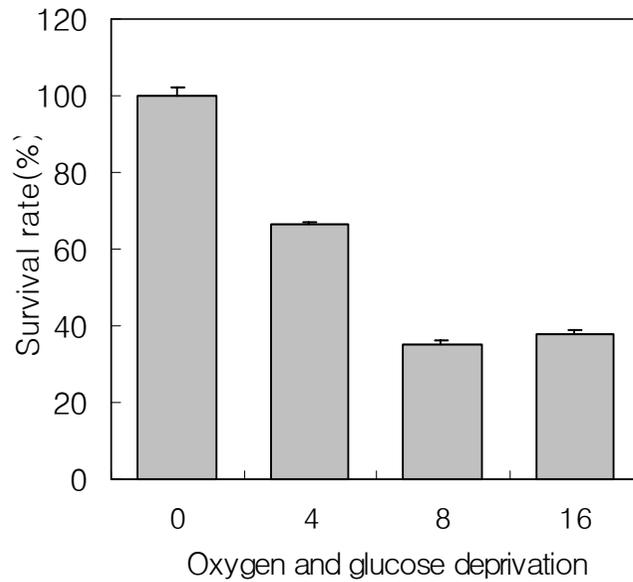


Fig. 8. Effects of simulated *in vitro* ischemia on the viability of brain neuroblastoma cells.

Confluent neuroblastoma cells(2×10^5) were exposed to the indicated period of oxygen and glucose deprivation. Cell viability was determined by the conversion capacity of the viable cells from MTT to its formazan, and then was expressed as survival ratio(%).

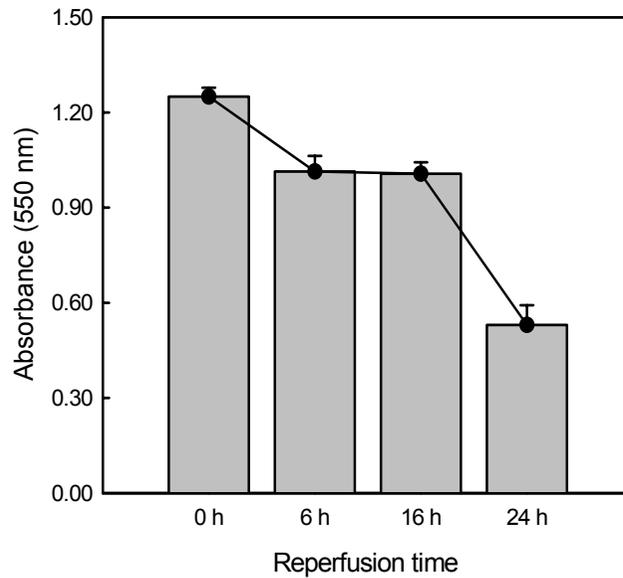


Fig. 9. Effects of reperfusion time on the viability of brain neuroblastoma cells. Confluent neuroblastoma cells (2×10^5) were exposed to the indicated period of reperfusion. Cell viability was determined by the conversion capacity of the viable cells from MTT to its formazan, and then was expressed as absorbance at 550 nm.



Fig. 10. Effects of oxygen and glucose deprivation on the morphology of primary rat cortical neuron culture. CONT : control, OD/GD : oxygen and glucose deprivation.

나) 유사 허혈 모델을 이용한 활성물질의 탐색 및 선별

전술한 방법에 의해 제조한 시료추출물과 활성성분에 대해 앞서 확립된 시험관내 유사 허혈 모델을 이용하여 신경세포 보호활성을 조사한 결과를 종합한 것은 Table 7과 같다. 신경세포 보호활성의 판단 기준은 매 활성 측정시 3반복 실험하면서 적어도 3~5번의 독립된 실험에서 대조군과 비교할 때 통계적으로 양성의 효과를 보이는 동시에 비교적 용량-반응관계가 성립하는 것을 효과가 있는 것으로 하였다. 그 결과, 조사한 시료 가운데, 방향성 추출물의 경우 AGR, CF, PN, WAD, ESR과 WAD의 원료식물 성분인 SAC이 비교적 효과가 높은 것으로 조사되었다. 메탄올 추출물인 VV 또한 효과가 관찰되었다. 이중 대표적으로 몇 가지 시료에 대한 신경세포보호 활성을 나타낸 것은 Fig. 11과 같다.

Table 7. Neuroprotective activities of aroma extracts

Sample	Neuroprotective activity	Sample	Neuroprotective activity
AGR	+++	GSN	-
CF	++	AFB	+
ARA	+	EH	-
ACR	+	ATR	+
LR	+	NS	-
XF	-	MH	-
GR	+	CTF	+
SH	-	ARR	+
PN	++	WAD	++
CLV	-	ESR	+++
MR	-	SAC	+++

-: inactive, ±: inactive or active in a much lesser extend,
+: slightly active, ++: active, +++: moderately active

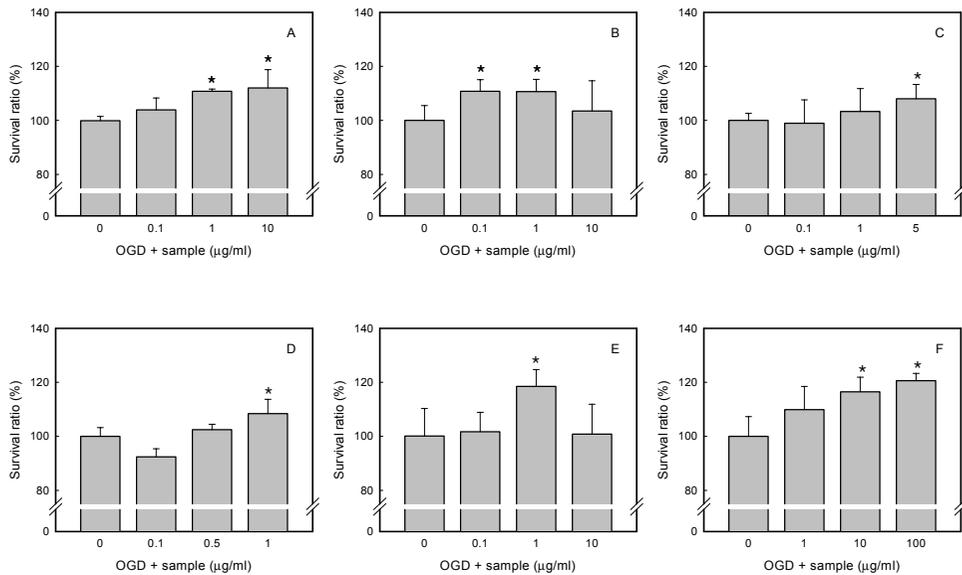


Fig. 11. Neuroprotective effect of AGR(A), ESR(B), PN(C), WAD(D), CF(E) and F(SAC) against simulated *in vitro* ischemic insult. * $p < 0.05$, This assay was done at least 3~5 independent experiments.

나. 세포모델에서 허혈성 뇌손상 예방 활성물질의 작용기전

1) 세포의 독성 조사

뇌허혈에 의한 뇌손상을 일으키는 주 기전(Blockade of NMDA receptor, Removal of oxidative stress, Blockade of glial cell activation, Blockade of cell cycle progression 등)들을 고려하여 세포의 독성 조사, 항산화 체계 조사, 염증매개 물질의 변화 조사 등으로 나누어 세포모델에서 허혈성 뇌졸중 예방 작용의 기전을 조사하였다. 먼저 NMDA receptor 차단 효과는 대내피질신경(cerebral cortical neuron) 초대배양 세포를 이용하여 NMDA neurotoxicity에 대한 후보물질의 효과를 살펴봄으로써 확인하였다. 그 결과, SAC은 저농도에서는 효과가 없었고, 1 mM의 고농도에서만 NMDA 독성을 일부 저해하였으나 NMDA receptor 차단제로 알려진 MK-801의 효과와 비교할 때 낮은 수준이었다(Fig. 12). PN 또한 NMDA

독성을 저해하는 효과는 보이지 않았다(Fig. 13). 이에 SAC과 PN이 NMDA receptor를 차단하는데 미치는 효과는 미미한 것으로 판단하였다. 또한 시료가 cell cycle progression에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 C6 glioma cell을 이용하여 flow cytometer로 분석한 결과 SAC과 PN의 처리가 G0+G1, S, G2+M기의 분포에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 조사되었다(Table 8 및 9). 또한 SAC과 PN의 처리가 cyclin D1(Fig. 14) 및 caspase 3 및 9 활성화에 미치는 영향(데이터 미제시)을 살펴보았으나 두 시료 모두 효과를 나타내지 않았다.

방향성 식물 추출물로부터 확인된 활성성분인 4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo(7.2.0)undec-4-ene(TMBU), 4,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol(TMBH), 4-allyl-1,2-dimethoxybenzen(ADB)이 흥분성 신경독성에 의한 대뇌 신경세포의 손상에 미치는 보호 효과를 살펴보았다. 그 결과 Fig. 15에 나타낸 바와 같이 NMDA 처리로 약 45%의 세포사가 관찰되었으며, TMBU, TMBH, ADB를 1-10 μ M 농도로 처리하였을 때 통계적으로 유의한 보호 효과가 나타나지 않았다. 이는 흥분성 신경독성에 의한 대뇌 신경세포의 손상에 미치는 활성성분들의 효과는 다른 효과에 비해 비교적 낮음을 시사한다.

반면, 산소 및 포도당의 결핍으로 인한 대뇌 신경세포의 손상에 대해 TMBU, TMBH 및 ADB의 처리가 미치는 영향을 살펴본 것은 Fig. 16과 같다. 즉, 산소와 포도당을 결핍시킴으로써 대뇌 신경세포의 손상을 유도하고 1시간, 3시간, 5시간이 경과한 후에 각각 세포 사멸율을 확인한 결과, 1-10 μ M의 농도의 TMBU, TMBH 및 ADB 처리는 대뇌신경세포 손상에 의한 세포사를 억제하였다.

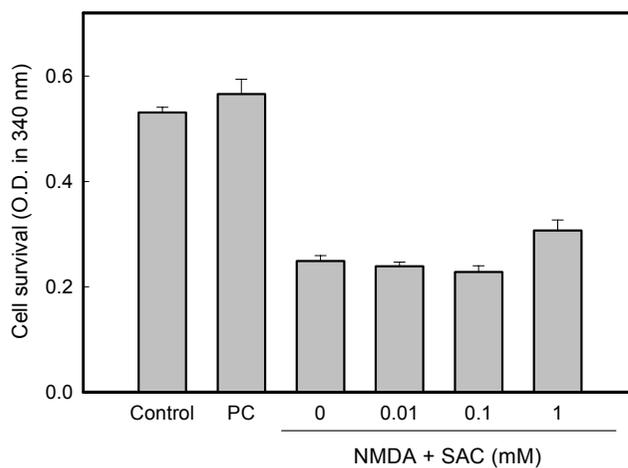


Fig. 12. Effect of SAC on the NMDA-induced cytotoxicity in the cultured cerebral cortical neuron. PC: MK-801

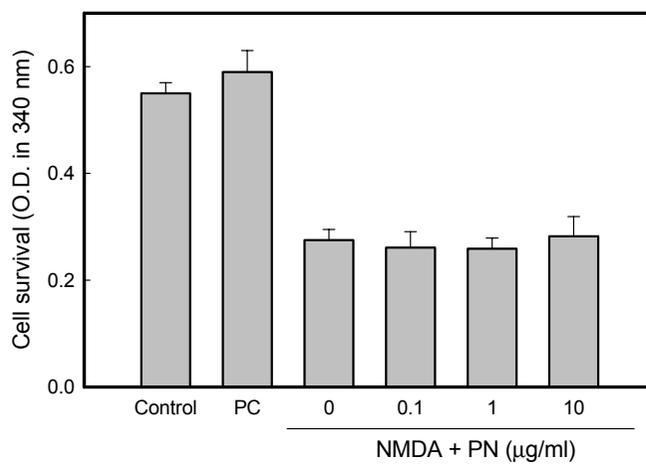


Fig. 13. Effect of PN on the NMDA-induced cytotoxicity in the cultured cerebral cortical neuron. PC: MK-801

Table 8. Changes of cell cycle distribution by SAC

Treatment	Cell cycle distribution (%)		
	G ₀ + G ₁	S	G ₂ + M
Control	60.4	21.8	18.0
SAC 1 mM	62.3	20.0	17.8
SAC 5 mM	76.4	10.1	12.1
Dwe31 3 μM	86.3	6.4	7.2

Table 9. Changes of cell cycle distribution by PN

Treatment	Cell cycle distribution (%)		
	G ₀ + G ₁	S	G ₂ + M
Control	60.4	21.8	18.0
PN 20 μg/ml	60.3	20.6	17.4
PN 50 μg/ml	66.4	16.6	15.2
Dwe31 3 μM	86.3	6.4	7.2

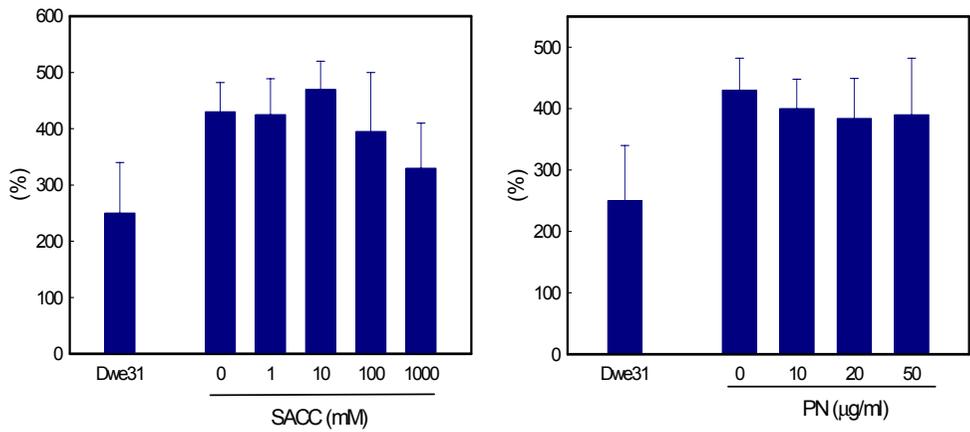


Fig. 14. Cyclin D1 promoter activity in C6 glioma cells.

C6 glioma cells were stably transfected with cyclin D1 reporter gene. Cyclin D1 promoter activity was determined using by luminometer. Data are a representative mean \pm SD of two experiments.

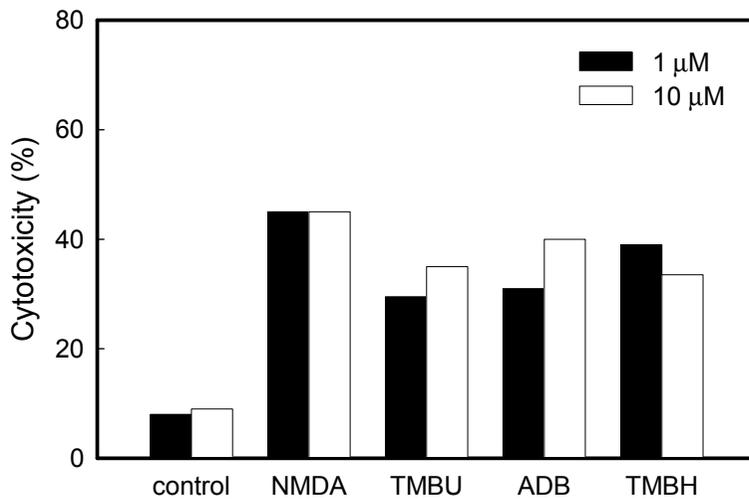


Fig. 15. Effect of TMBH, TMBU and ADB on the NMDA-induced cytotoxicity in the cultured cerebral cortical neuron.

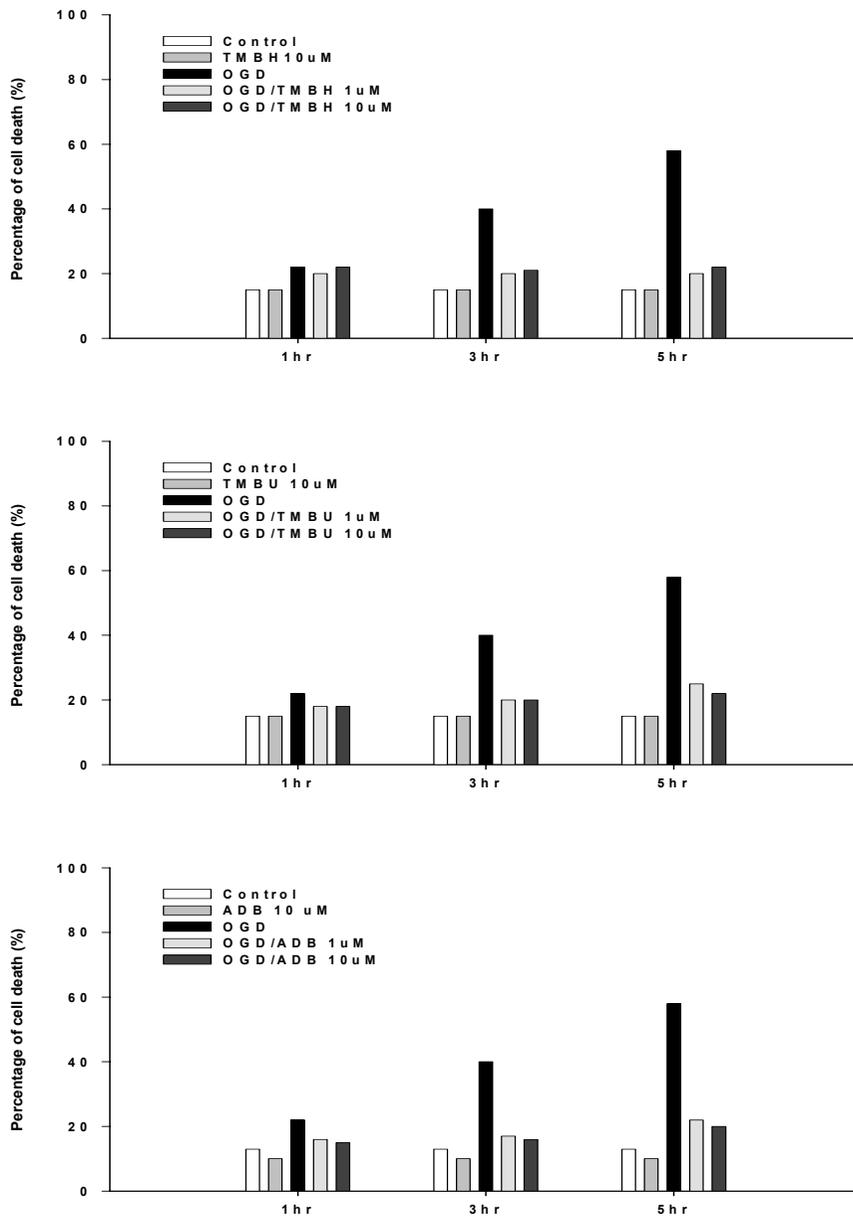


Fig. 16. Effect of TMBU, TMBH and ADB on neuroprotection against oxygen-glucose deprivation in cerebral cortex neurons.

2) 항산화 체계 조사

산화적 스트레스의 제거효과는 mixed glia 초대 배양 세포와 neuroblastoma cell을 이용하여 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대한 보호효과, 세포내 과산화물(TBARS)에 미치는 효과 등을 살펴보았다. 그 결과 mixed glia 초대배양 세포와 neuroblastoma cell에서 SAC과 PN은 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대한 보호효과와 세포내 과산화물 생성을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 17 및 18). 이러한 항산화 효과의 특성을 시험관내에서 살펴본 결과 SAC과 PN은 peroxyxynitrite를 소거하는 효과가 비교적 큰 것으로 조사되었으나(Table 10 및 11), superoxide anion을 소거하는 효과는 거의 없거나 미약하였다(Fig. 19).

한편, mixed glia 초대배양 세포에서 면역자극과 포도당을 제거한 모델(immunostimulated and glucose-deprived condition)을 이용하여 시료의 처리가 LDH법에 의한 cell death, DCF-DA의 산화 및 nitrotyrosine 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, SAC은 10 μ M 농도에서 면역자극과 포도당 제거에 의한 cell death, DCF-DA의 산화 및 nitrotyrosine의 생성 정도를 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 20, 21 및 22). PN 또한 H₂O₂-induced cytotoxicity, DCF-DA의 산화 및 nitrotyrosine의 생성을 유의적으로 감소시키는 것으로 관찰되었다(데이터 미제시).

또한 신경세포막으로부터 핵으로 산화적 스트레스와 같은 신호를 전달함으로써 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달계인 MAPKs에 미치는 시료의 영향을 Western blotting에 의해 살펴보았다. 먼저 대뇌피질 신경세포에서 허혈 유발이 대표적인 MAPKs인 c-Jun N-terminal kinase(JNK), p38 MAPK 및 ERK에 미치는 영향을 살펴본 결과, ERK 활성은 증가하였으나 JNK나 p38의 활성은 변화가 없었다(Fig. 23 및 24). 이에 대해 SAC의 처리는 ERK활성의 증가를 유의적으로 저해하였으며, ERK 저해제로 알려져 있는 U0126과 동시에 처리할 경우 미약하나마 상승작용이 관찰되었다(Fig. 25 및 26). 이와 같은 ERK활성의 저해는 포도당 및 산소의 결핍으로 유발된 대뇌피질신경세포의 사멸을 저해하는 것과 관

련됨을 관찰하였다(Fig. 27 및 28).

방향성 식물 추출물로부터 확인된 활성성분인 TMBU, TMBH 및 ADB의 총항산화능(TEAC)과 hydroxyl, superoxide, hydrogen peroxide, nitric oxide, peroxinitrite와 같은 라디칼 및 비라디칼의 소거효과를 살펴보았다. 그 결과 Table 12에 나타낸 바와 같이 TMBU, TMBH 및 ADB의 총항산화능(TEAC)과 hydroxyl, superoxide, hydrogen peroxide, nitric oxide 소거효과는 보이지 않았다. TMBU, TMBH 및 ADB는 peroxinitrite 만 소거하는 것으로 관찰되었으나 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid 에 비해 IC₅₀치는 매우 높았다. 이와 같은 결과는 TMBU, TMBH 및 ADB의 항산화활성은 거의 없거나 매우 낮음을 시사한다.

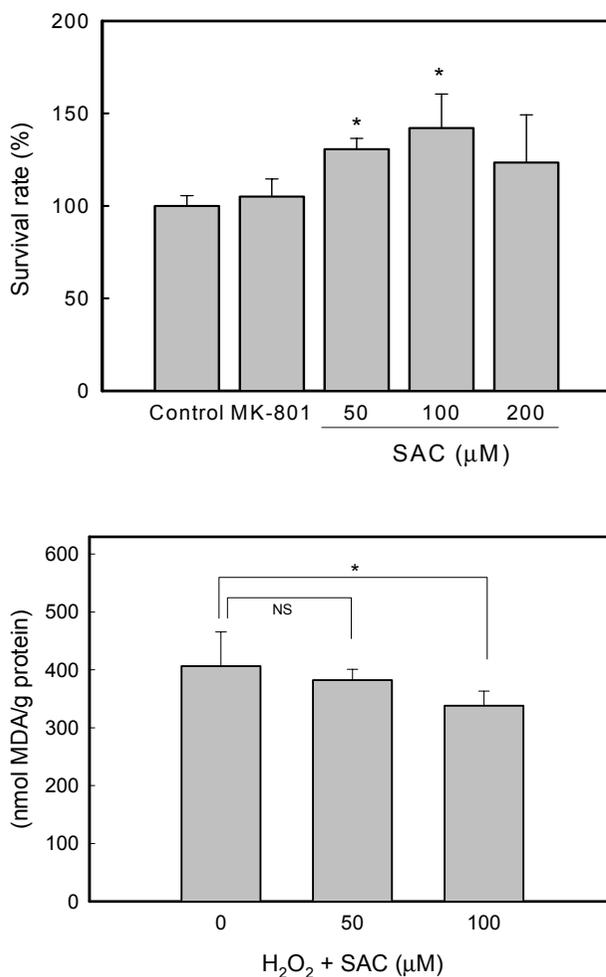


Fig. 17. Effect of SAC on the viability and thiobarbituric acid reactive substances(MDA) of SK-N-SH neuroblastoma cells exposed to H₂O₂.

SK-N-SH cells in 10 cm dishes were preincubated with different conc. of SAC for 48 h, and then incubated with 200 μM H₂O₂ for 24 h. The extent of lipid peroxidation was determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The value was calculated by comparing with standards prepared from 1,1,3,3-tetraethoxypropane. *p<0.05 compared with 200 μM H₂O₂alone.

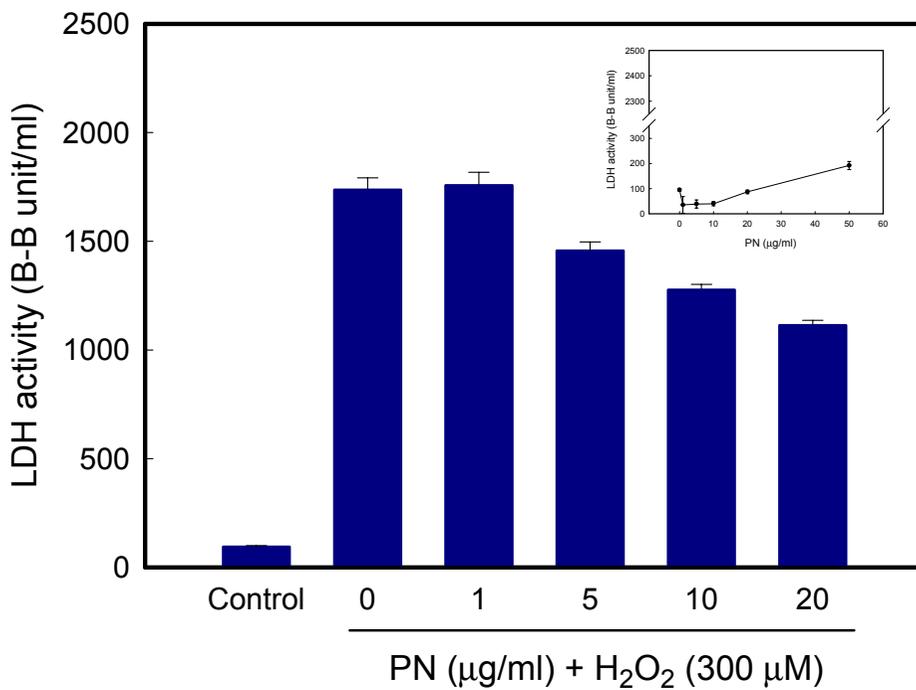


Fig. 18. Effect of PN on the LDH release in glial cells exposed to H₂O₂. Glial cells in 10 cm dishes were preincubated with different conc. of PN for 48 h, and then incubated with 300 µM H₂O₂ for 24 h.

Table 10. Inhibition by SAC of SIN-1 and SNAP-induced oxidation of DHR 123 to RH

Concentration (mM)	Oxidation of DHR 123 (%)	
	SIN-1	SNAP
0	100	100
0.001	94	54
0.01	86	38
0.05	81	40
0.1	80	29
1	57	30
5	29	24

Dihydrorhodamine (DHR 123) was incubated for 10 min with SIN-1 and SANP in both the absence and presence of various concentrations of SAC.

Table 11. Inhibition by PN of SIN-1 and SNAP-induced oxidation of DHR 123 to RH

Concentration (μg/ml)	Oxidation of DHR 123 (%)	
	SIN-1	SNAP
0	100	100
1	93	93
5	73	95
10	60	89
20	53	83
40	39	57
50	33	29

Dihydrorhodamine(DHR 123) was incubated for 10 min with SIN-1 and SANP in both the absence and presence of various concentrations of PN.

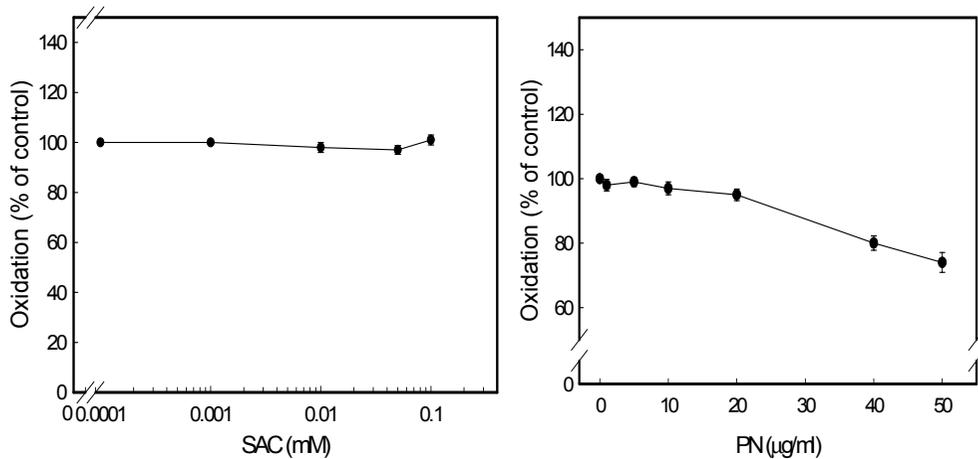


Fig. 19. Effect of SAC and PN on superoxide anion.

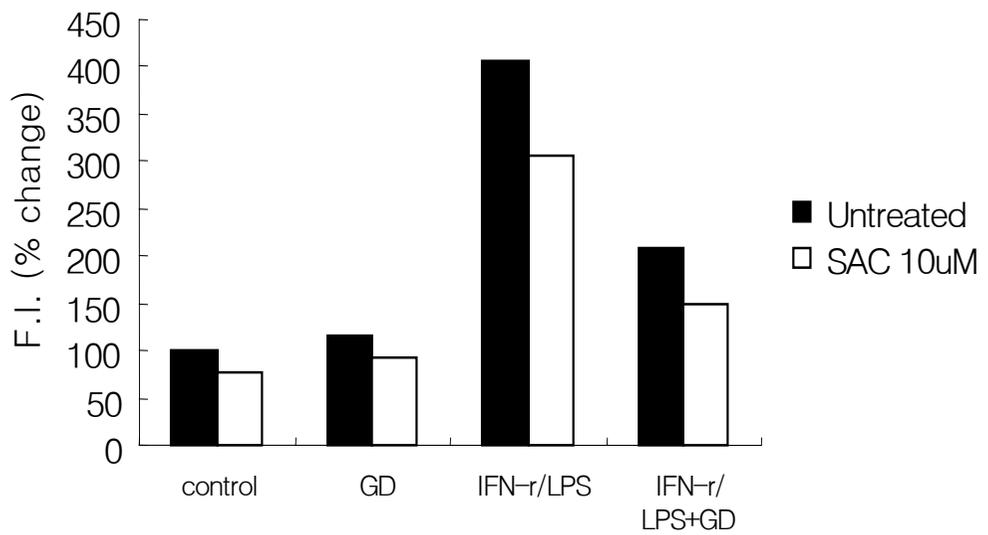


Fig. 20. Effect of SAC on the oxidation of DCF-H in glucose-deprived immunostimulated glial cells.

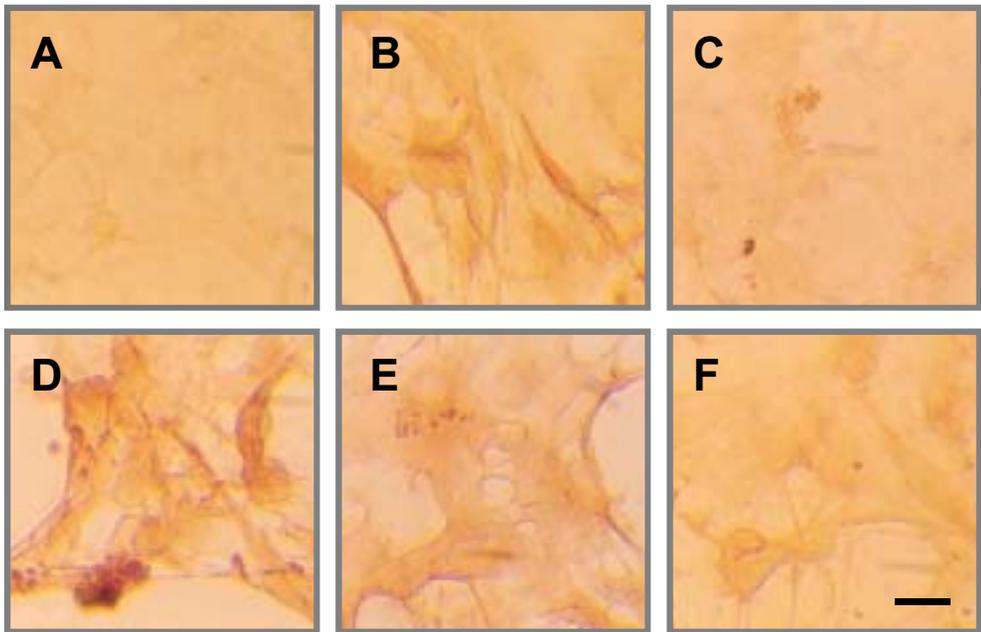


Fig. 21. Effects of SAC on the nitrotyrosine immunoreactivity in glucose-deprived immunostimulated glial cells. A-F): Glial cells were cultured for 2 days in the growth medium without or with IFN-g (100 U/ml) and LPS (1 g/ml). Immunostimulated glial cells were then deprived of glucose for 8 h in the absence and presence of SAC. A) Control; B) Glucose deprivation (GD); C) Immunostimulation; D) Immunostimulation +GD; E) Immunostimulation +GD+SAC (10 M) F) Immunostimulation+GD+SAC (100 M). Scale bar = 40 m.

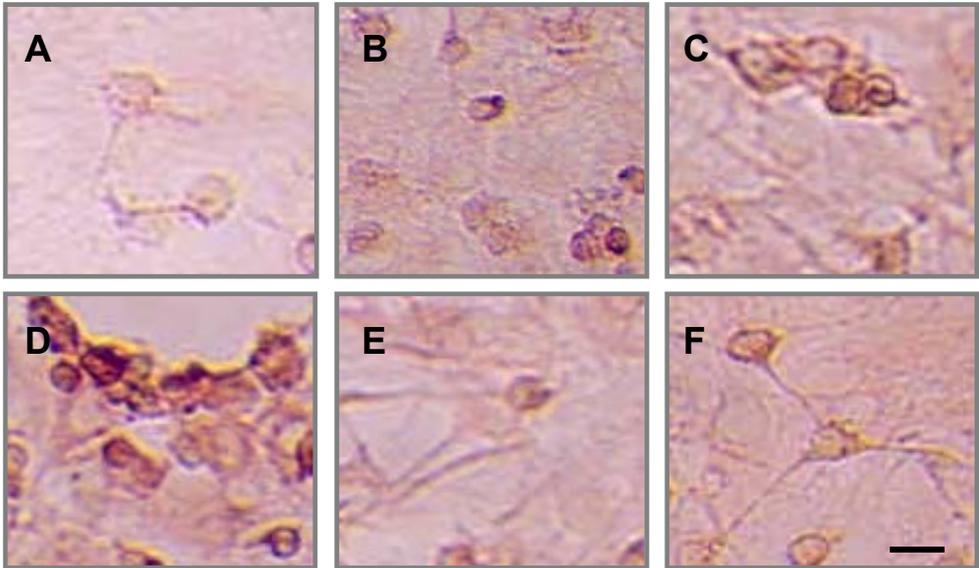


Fig. 22. Effects of SAC on the nitrotyrosine immunoreactivity in SIN-1-treated glial cells.

A-F: Glial cells were exposed to glucose deprivation and SIN-1(200 M) for 4h in the absence and presence of SAC. : A, control; B, glucose deprivation (GD); C, SIN-1; D, SIN-1+GD; E, SIN-1+GD+SAC (10 M); F, SIN-1+GD+SAC (100 M). Micrographs were taken 4 h (A-F) after starting glucose deprivation and are representative of 4-5 separate experiments.

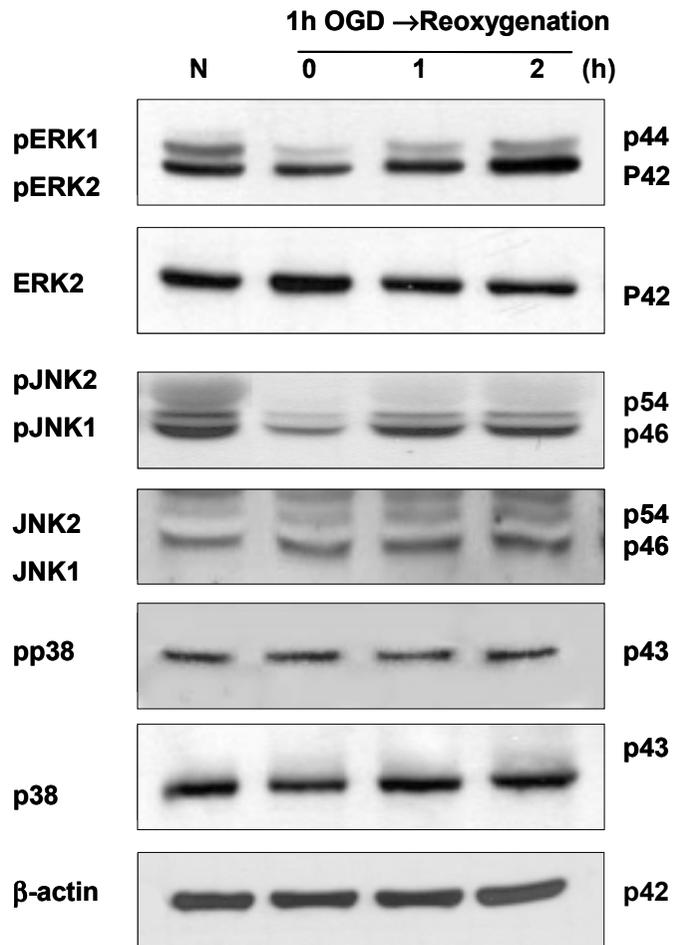


Fig. 23. Phosphorylation of MAPKs during oxygen-glucose deprivation in cerebral cortex neurons by immunoblot analysis. After the cells were harvested and lysed, samples of the extracts were electrophorized on 10% SDS-PAGE gels, followed by Western blotting using phospho-antibodies and pan-antibodies of each autoradiogram for the different MAPK isoforms.

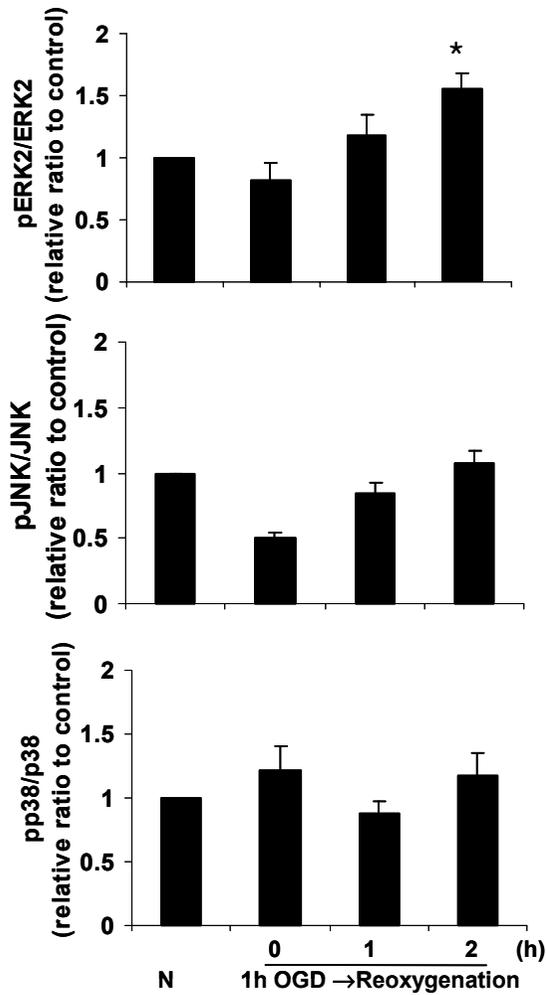


Fig. 24. Phosphorylation of MAPKs during oxygen-glucose deprivation in cerebral cortex neurons by densitometric quantification. Results were expressed as mean±SEM from three separate experiments. The fold of relative phosphorylation ratio to controls is shown in each panel. *P<0.05: significantly different from each corresponding control

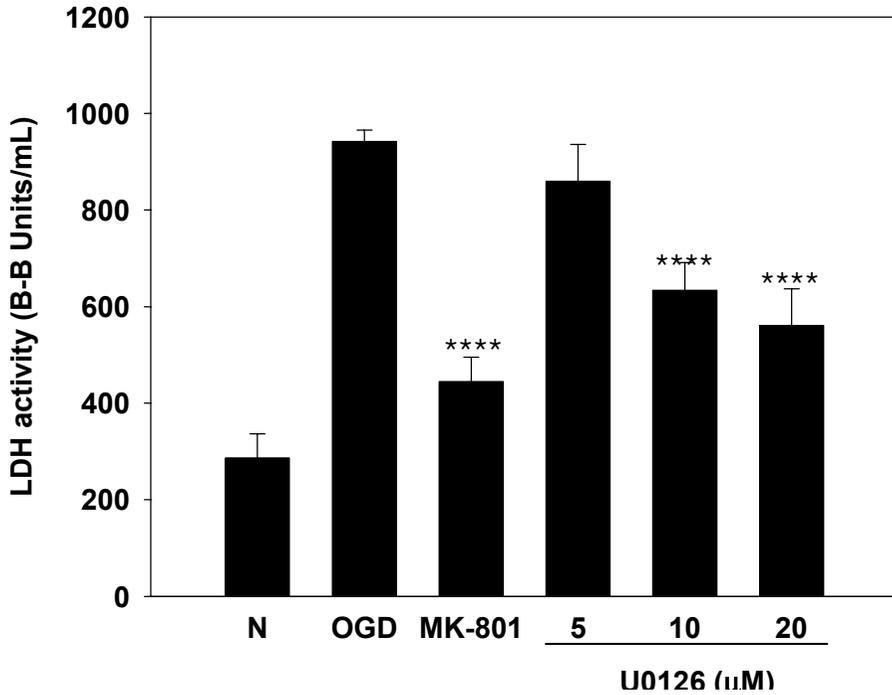


Fig. 25. Effect of U0126, a ERK inhibitor, on neuroprotection against oxygen-glucose deprivation in cerebral cortex neurons. Results were expressed as mean±SEM from four separate experiments. ****P<0.0001; significantly different from OGD control. MK-801 was used as a positive control.

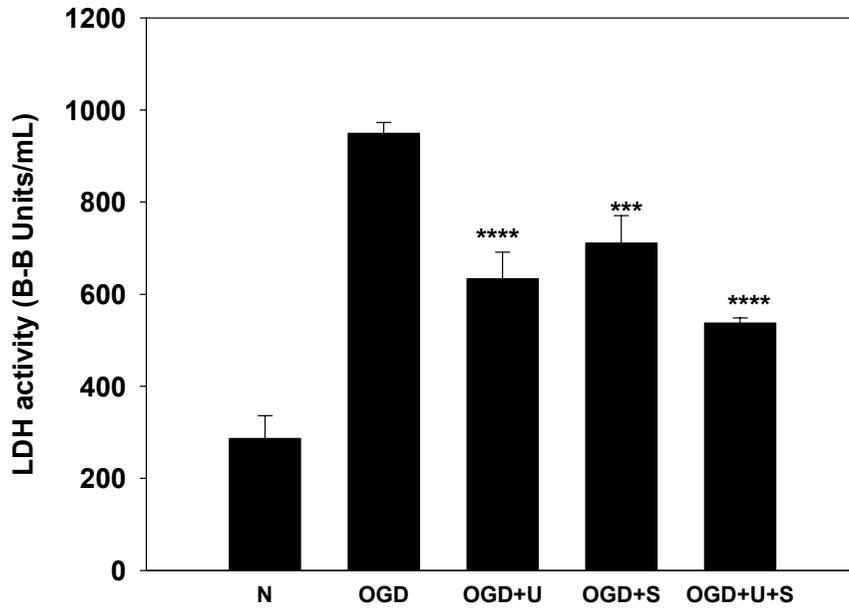


Fig. 26. Effects of SAC on ERK-dependent neuroprotection against oxygen-glucose deprivation in cerebral cortex neurons. U: U0126 (10 M), S: SAC (10 M). Results were expressed as mean±SEM from five separate experiments. *** $P < 0.002$, **** $P < 0.0001$; significantly different from OGD control

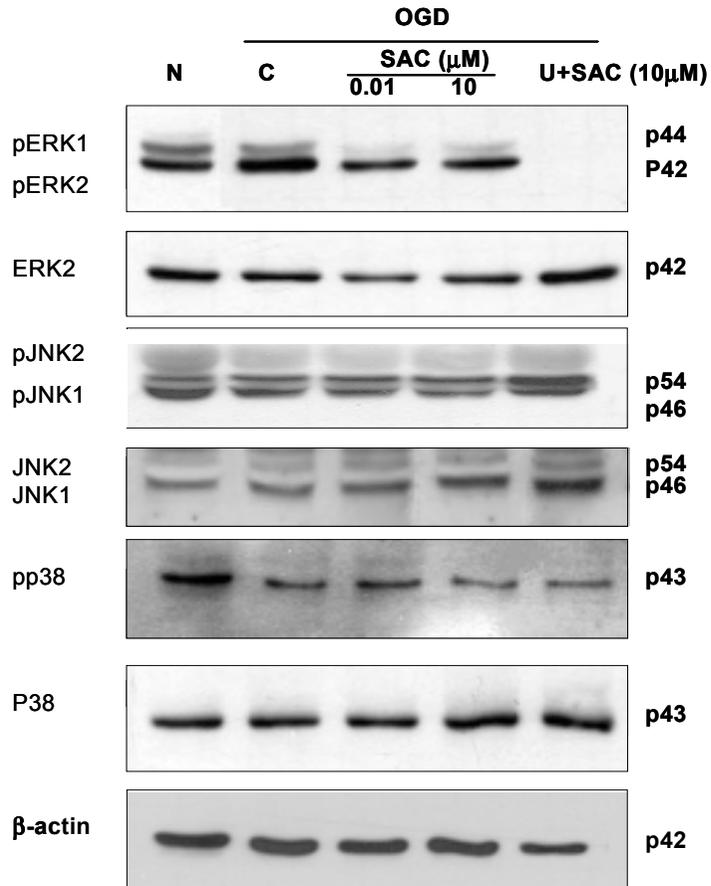


Fig. 27. Effects of SAC on OGD-induced activation of MAPK isoforms in cerebral cortex neurons by immunoblot analysis. Cerebral cortex neurons treated with SAC were exposed to OGD for 1 h. Western blotting using phospho-antibodies and pan-antibodies of each autoradiogram for the different MAPK isoform

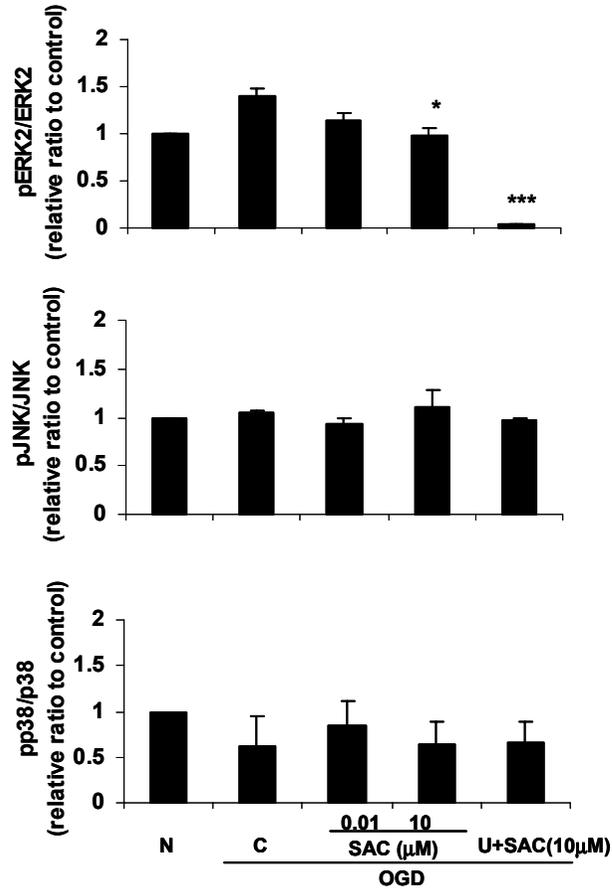


Fig. 28. Effects of SAC on OGD-induced activation of MAPK isoforms in cerebral cortex neurons by densitometric quantification. Cerebral cortex neurons treated with SAC were exposed to OGD for 1 h. The fold of relative phosphorylation ratio to controls is shown in each panel. U: U0126 10 M. Results were expressed as mean SEM from three separate experiments. *P<0.05, ***P<0.001; significantly different from each corresponding OGD control.

Table 12. Total antioxidative and free radical scavenging activities of ADB, TMBU and TMBH¹⁾

Compound	TEAC ²⁾	Hydroxyl	Superoxide	Hydrogen peroxide	Nitric acid	Peroxinitrite
ADB	NE ⁵⁾	NE	NE	NE	NE	1,820
TMBU	NE	NE	NE	NE	NE	760
TMBH	NE	NE	NE	NE	NE	2,970
Ascorbic acid ³⁾	1.00	NE	281.9	55.4	NE	50
Quercetin ⁴⁾	-	-	-	-	203.1	-

¹⁾ Free radical scavenging activities were expressed as IC₅₀ (μM).

²⁾ TEAC represents millimolar concentration of a trolox solution having the antioxidant capacity equivalent to 1.0 mM compounds.

^{3, 4)} Ascorbic acid and quercetin were used as positive controls.

⁵⁾NE: not effective

3) 염증매개 물질의 변화 조사

뇌허혈 후 염증반응에 관여하는 싸이토카인이 신경세포와 교세포 뿐만 아니라 염증반응에 관여하는 세포 등에서 유도되어 뇌에서 그 농도가 증가하는 것으로 알려져 있다. 이에 초대 배양 신경 교세포 및/또는 BV2 세포주를 24-well plate에 적정농도로 접종한 후 24시간 배양한 후 LPS 및 시료를 첨가하여 24시간 동안 추가로 배양한 후, 배지로 유리되어 나온 아질산염의 양을 측정함으로써 시료가 교세포 활성화에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 SAC은 BV2 세포에서는 mM 범위의 고농도에서만 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 저해시켰으나 교세포 또는 소교세포 강화 배양에서는 저해효과가 나타나지 않았다(Fig 29 및 30). PN의 경우 BV2세포, 교세포 또는 소교세포 강화 배양에서 비교적 저농도로 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 저해하는 것으로 보였으나 활성의 정도는 크지 않았다.

방향성 식물 추출물로부터 확인된 활성성분인 TMBU, TMBH 및 ADB이 LPS에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 Table 13과 같이 세 가지 활성성분 모두 10-100 μ M 농도에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 저해하는 것으로 나타났다. 또한 배지로 유리된 TNF- α 농도를 측정한 결과, TMBH 처리시 농도의존적으로 TNF- α 의 농도가 유의적으로 감소되는 것이 관찰되었다. ADB나 TMBU를 처리할 경우에도 TNF- α 의 농도가 감소되는 것이 관찰되었으나 통계적 유의성은 없었다. 배지로 유리된 IL-6 농도를 측정한 결과, TMBU와 TMBH를 처리했을 때 IL-6 농도가 감소되는 것이 관찰되었으나 양성대조군으로 사용한 항염증 플라보노이드계 물질인 wogonin을 10 μ M 처리한 경우를 제외하고는 활성성분을 처리한 모든 시험구에서는 유의성이 관찰되지 않았다.

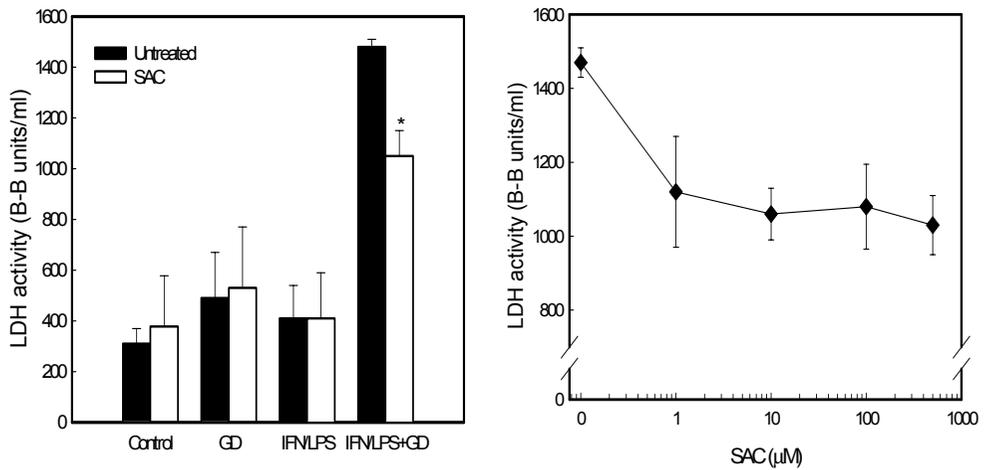


Fig. 29. Effect of SAC on LDH release in glucose-deprived immunostimulated glial cells. Left: Glial cells were exposed to 10 μM SAC, Right: Dose-dependent effect of SAC.

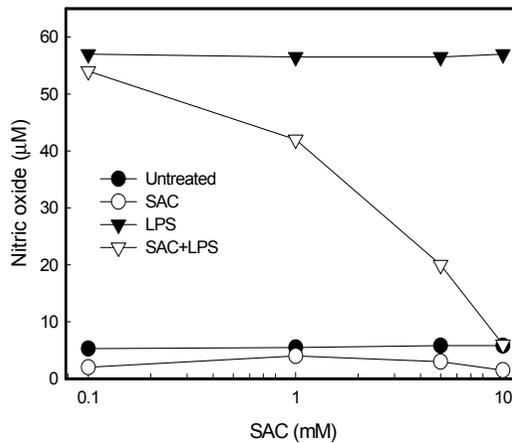


Fig. 30. Effect of SAC on the NO production in BV-2 microglial cells. Cells are incubated with various concentration of SAC in the absence or presence of LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After 24 h incubation, the level of NO_2 in the media was measured using Griess reagent. Data are a representative mean \pm SD of at least three experiments.

Table 13. Nitrite concentration in culture medium from BV-2 mouse microglial cell line treated with LPS in the absence or presence of active compounds and wogonin

Compounds	Concn (μM)	Nitrite concn (μM)
ADB	0	37.8 ± 0.6
	1	37.0 ± 0.4
	10	$35.5 \pm 0.6^*$
	100	$30.8 \pm 0.6^{**}$
TMBU	0	37.1 ± 1.2
	1	35.6 ± 0.3
	10	35.2 ± 0.6
	100	$34.1 \pm 0.1^*$
TMBH	0	34.6 ± 0.7
	1	34.2 ± 0.3
	10	33.7 ± 0.6
	100	32.8 ± 0.4
Wogonin	0	35.0 ± 0.5
	1	$27.9 \pm 0.2^{**}$
	10	$22.5 \pm 0.3^{**}$
	50	$16.9 \pm 0.2^{**}$

2. 뇌허혈 동물모델을 이용한 효능 조사

가. 뇌허혈 동물모델을 이용한 식품 선도 소재 발굴 및 생체내 효과 조사

1) 뇌허혈 유발 및 유발에 따른 신경 및 혈관 독성 조사

뇌허혈은 전뇌허혈(global ischemia)과 국소허혈(focal ischemia)로 나누어지므로 두 가지 뇌허혈 모델을 사용하였다.

뇌허혈 유발 후 약 30분 및 3시간 경과 했을 때 랫드의 꼬리를 완전히 들었을 때 반시계 방향으로의 circling이 일어나는지를 확인하였다. 95% 이상의 랫드에서 반시계 방향의 circling이 관찰되었고, 이들 랫드의 체온은 모두 38.5℃ 이상으로 확인되었다. 일시적인 허혈에 의한 뇌손상을 일차적으로 평가하기 위하여 TTC 용액으로 염색하고, 경색용적(total infarct volume)을 측정하였다. 각 실험군 뇌의 후각망울을 제외하고, 앞쪽으로부터 2mm 두께로 연속 절단한 6개 절편을 TTC 염색한 결과 2, 3 및 4번째 조직에서 뚜렷한 경색부위가 관찰되었다. 전체 경색용적은 허혈 24시간군에서 $310 \pm 23 \text{mm}^3$ 으로 측정되었다. 또한, 경색이 일어난 대뇌반구에서 부종(edema)이 관찰되었으며, 그 부종율은 $24 \pm 4\%$ 로 나타났다(Fig. 31).

전뇌허혈모델에서 해마(hippocampus) CA1부위의 신경세포 손상을 cresyl violet으로 염색하여 관찰한 결과, 허혈 유발 후 2일까지 손상받은 신경세포가 관찰되지 않았으나, 4일에서 신경세포의 위축(shrinkage) 및 핵 응축(pyknosis)이 보였고, 일부 세포는 소실되었다. 이러한 신경세포의 소실은 7일에 더욱 증가하여 정상군과 비교하여 약 25% 만이 존재하였다(Fig. 32). 또한, 2시간의 focal ischemia를 유발하고 시간경과에 따른 조직학적 변화를 관찰하고자 cresyl violet 염색을 수행한 결과, 정상군의 대뇌 피질은 표면쪽에서 안쪽으로 분자층(molecular layer), 외과립층(external granular layer), 외피라미드층(external pyramidal layer), 내과립층(internal granular layer), 내피라미드층(internal pyramidal layer) 및 다형층(multiform layer)으로 구분되었다. 선조체(striatum)는 미상핵(caudate nucleus)과 조가비핵(putamen)으로 구성되고, 이들 세포들은 밀집되어 있으며 가는 섬유질의 다발이 관찰되었다. 반면, 허혈 후 3시간에서 허혈이 유

발된 중심부위(ischemic core region)에서 신경세포가 감소하였다. 시간이 지남에 따라 세포 소실이 증가하여 24시간에서는 cresyl violet에 염색된 신경세포들이 관찰되지 않았으며, 일부 교세포만이 관찰되었다. 중심부위와 경계를 이루는 주변부위(ischemic penumbra region)의 신경세포에서는 세포질 위축 및 핵응축 소견이 관찰되었다. 한편, 선조체에서도 바깥쪽 허혈 중심부위의 신경세포들은 cresyl violet에 염색되지 않았으며 주변부위에 손상받은 세포들이 관찰되었다. 4일의 경우 허혈 중심부위를 중심으로 혈관이 확장되고 혈관 내에 염증세포가 관찰되었다. 7일군에서 이들 세포들이 조직내로 침윤하여 세포가 소실된 부위를 중심으로 넓게 분포하였고, 이러한 세포들의 침윤이 점차 주변부위로 확대되었다. 또한, 정상교세포들이 밀집되어 glial scar를 형성하여 정상조직과 손상조직의 경계를 이루고 있었다. 한편, 15일에서는 허혈 중심부위로부터 조직의 괴사가 일어나 공포가 관찰되고 주변부위에서만 일부 세포들이 염색되었다.

국소허혈모델에서 acid fuchsin 염색을 통하여 세포 변성을 확인하였다. 24시간에서 허혈 중심부위와 주변부위의 경계가 두드러지게 관찰되었으며, 중심부위에서 acid fuchsin에 염색된 신경세포들은 거의 소실되어 관찰되지 않았다. 주변부위에서는 신경세포와 교세포가 같이 분포하였는데 많은 수의 신경세포가 세포질 위축 및 핵응축의 소견을 보였으며, 이들 세포들에서 acid fuchsin에 뚜렷하게 염색됨이 관찰되었다.

국소허혈모델에서 Map-2(microtubule associated protein-2) 항체를 이용하여 시간 경과에 따른 해마의 CA1지역 신경세포의 변화를 알아보고자 면역조직화학염색을 수행한 결과 정상군은 피라밋 세포들이 면역염색되어 고르게 분포하였는데 주로 아래로 길게 뻗은 세포돌기들에서 관찰되었다. 4일에서 이들 세포체에서 면역반응이 증가하였고, 세포체는 위축되었다. 이들 세포의 세포돌기들은 불규칙하게 단절된 형태로 염색되었다. 이러한 경향은 7일에서 더욱 뚜렷하여 일부 위축된 세포체에서만 관찰되었다(Fig. 33). 또한, 전뇌 허혈에 따른 해마의 신경세포 손상에 대하여 정상교세포의 활성화 정도를 알아보고자 정상교세포의 marker인 GFAP(glial fibrillary

acidic protein) 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였다. 정상군의 해마에서는 면역염색된 세포가 관찰되지 않았다. 1일군에서는 hippocampal fissure 부위의 세포들에서 염색되었으나 다른 부위는 정상군과 비교하여 차이가 관찰되지 않았다. 한편, 2일에서 해마의 다형층(polymorphic layer) 및 분자층(molecular layer)에서 면역염색된 세포가 증가하기 시작하여 7일에서는 매우 높게 관찰되었다. 이들 염색된 세포들은 세포체 및 돌기의 비후가 뚜렷하였으며, 수적으로도 증가하였다(Fig. 33).

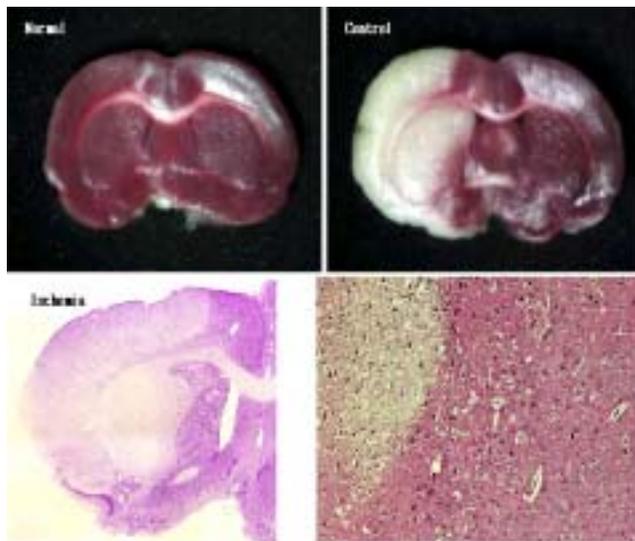


Fig. 31. Infarct size of normal and ischemic brain in the focal ischemia model. Infarct size was determined by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC). Representative pictures taken after TTC staining indicate larger infarct size in ischemic brain(upper right) as compared with that in normal brain(upper left). After ischemic insult, only a few normal cells are seen(C; cresyl violet staining and D; H-E staining).

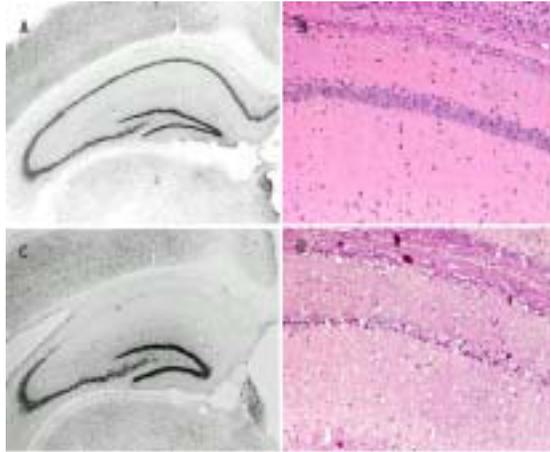


Fig. 32. Representative photomicrographs of normal and ischemic brain in global ischemia model(right panel). The neuronal layer of the hippocampus was clearly visible after cresyl violet staining in control(A, B). After global ischemic insult, neuronal loss was observed in regions CA1(A and C; cresyl violet staining $\times 100$, B and D; H-E staining $\times 100$).

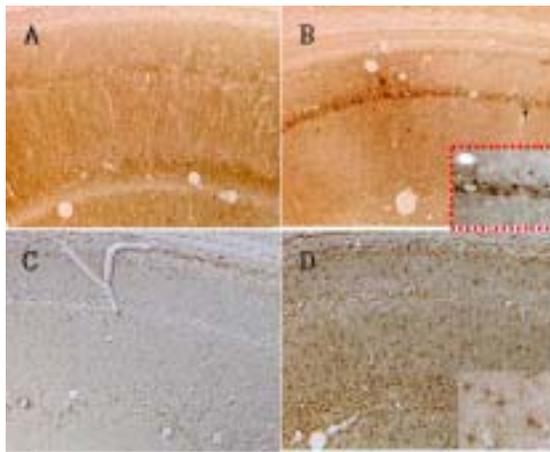


Fig. 33. Map-2 and GFAP immunohistochemistry in global ischemia model.
 A and B; Map-2(microtubule associated protein-2) immuno-staining
 C and D; GFAP(glial fibrillary acidic protein) immuno-staining

2) 후보 추출물 및 물질의 조사

전뇌 허혈 동물 모델을 이용하여 후보물질(추출물) 특성에 따라 경구 또는 복강을 통하여 후보 물질을 투여한 다음 후보물질 투여에 의한 효과를 조사하였다. 그 결과 21종 시료 중에서 시험관내 유사 허혈 모델(simulated *in vitro* ischemia model)을 이용하여 선발한 시료 가운데 PNW, SAC, VV의 유의적인 효과($P < 0.01$)가 전뇌 허혈 동물 모델에서 확인되었다(Fig. 34 및 Fig. 35).

시험관내 유사 허혈 모델(simulated *in vitro* ischemia model)을 이용하여 선발한 시료를 대상으로 국소 허혈 동물 모델에서의 효과를 조사한 결과, 전뇌 허혈 동물 모델에서 효과가 있었던 PNW, SAC, VV 시료 가운데 2개 시료(SAC, PN)의 효과가 우수한 것으로 나타났다(Fig. 36 및 37). 즉, SD계 랫드에 300 mg/kg의 용량으로 SAC를 복강 투여하였을 때 대조군과 비교하여 TTC 염색에 의한 뇌경색 면적을 약 40% 감소시켰다. PN은 TTC 염색에 의한 대조군의 뇌경색 면적 22.7%와 비교하여 100 mg/kg의 용량으로 투여할 경우 12.9%, 300 mg/kg의 경우 9.3%로 감소시켰다.

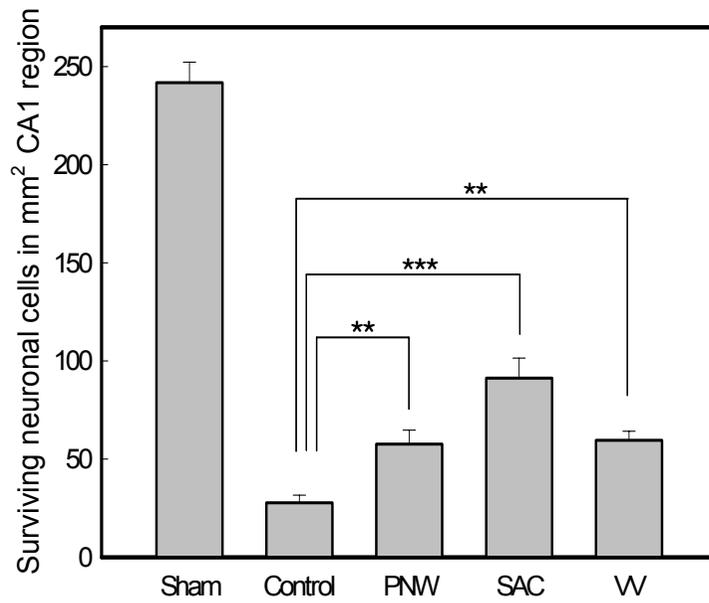


Fig. 34. Effect of selected samples on the number of surviving cells in the hippocampal CA1 region after global ischemic insult.

**P<0.01 compared with the control.

***P<0.001 compared with the control.

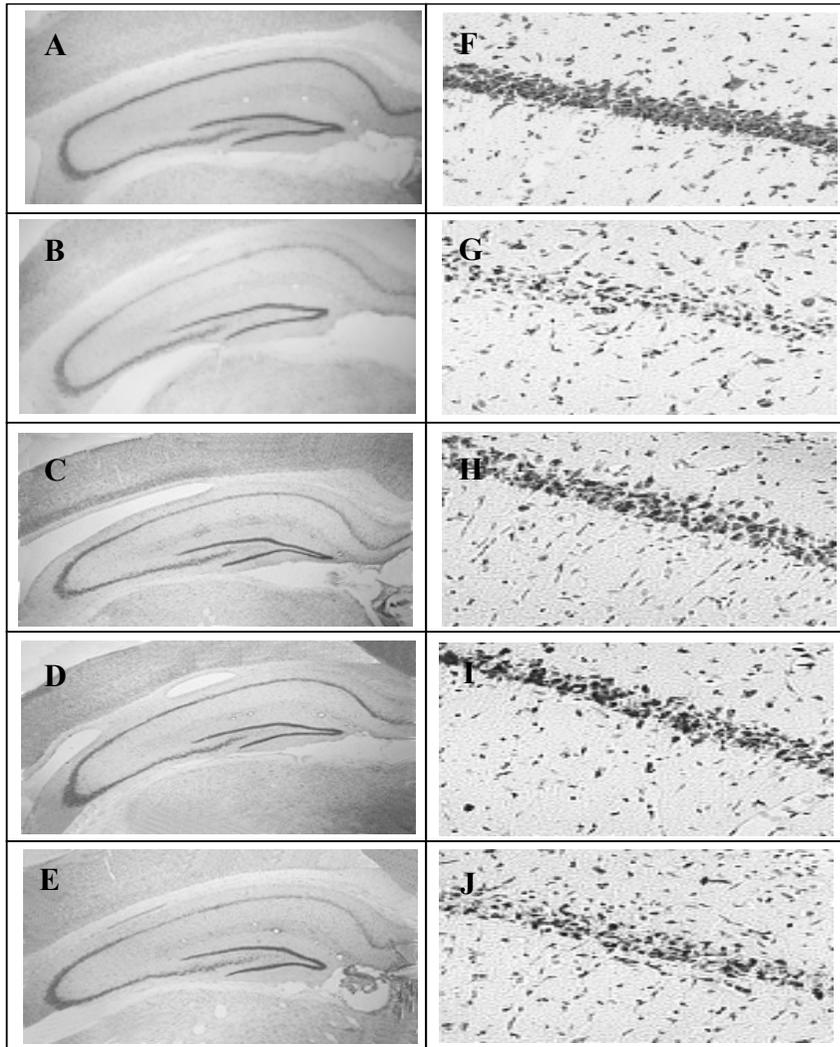


Fig. 35. Representative photomicrograph of the hippocampal CA1 region in the gerbil 7 days after global ischemia by cresyl violet staining. A, F: Sham, B, G: Control, C, H: PN, D, I: SAC, E, J: VV

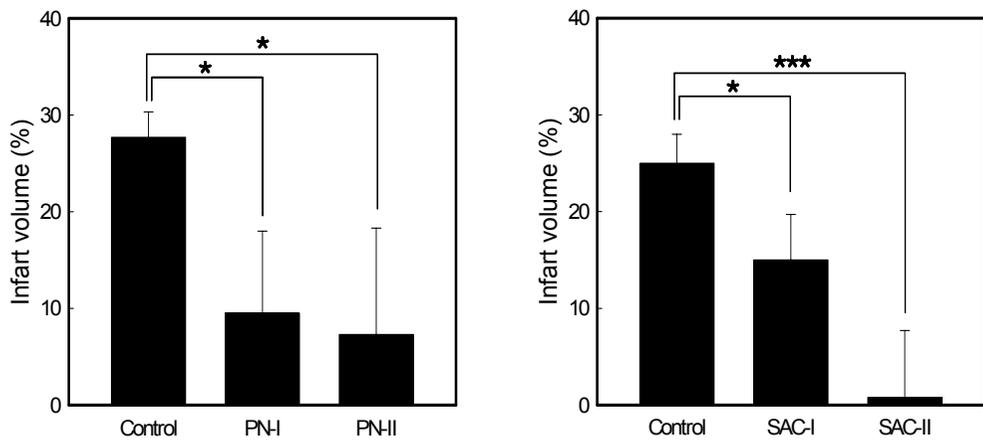


Fig. 36. Effect of PN and SAC on the infarct volume of the rat brain exposed to focal ischemia. Infarct area was determined by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. PN-I: 100 mg/kg, PN-II: 300 mg/kg, SAC-I: 300 mg/kg × 1, SAC-II: 300 mg/kg × 2, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ for the comparison between sample-treated and control groups.

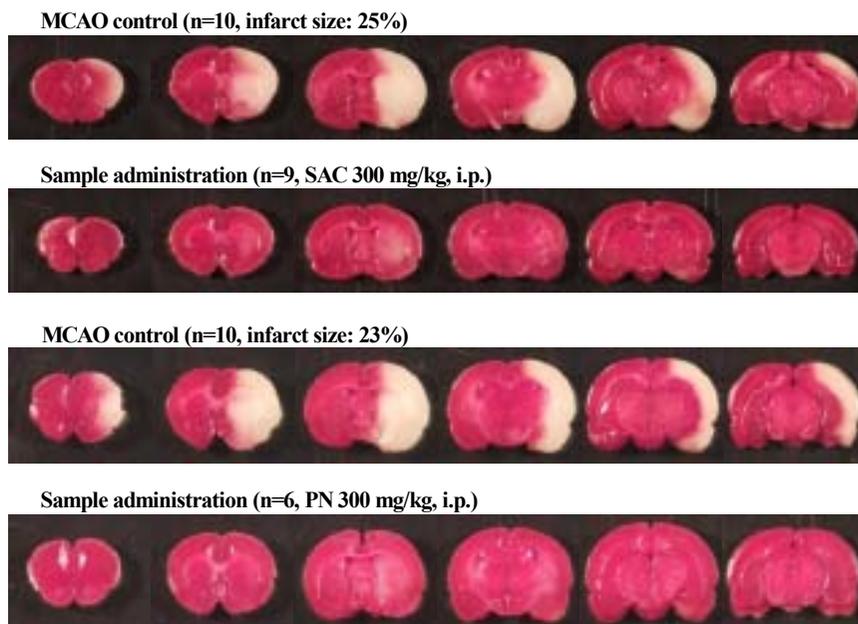


Fig. 37. Reduction of infarct volume in the focal ischemia model treated with PN and SAC. Representative pictures taken after TTC staining indicate smaller infarct volume in sample-treated rat as compared with those in control rat.

나. 뇌허혈동물 모델을 이용한 허혈성 뇌졸중 예방효과 확인

1) 전뇌허혈모델과 국소허혈모델을 이용한 효과 확인

전뇌허혈모델과 국소허혈모델에서 효과가 나타났던 SAC 및 PN 시료에 대해 동 모델을 이용한 조사를 1회 더 반복하여 효과를 재확인하였다. 그 결과, PN은 복강으로 100 - 300 mg/kg 투여시 유의적으로 뇌의 경색용적을 감소시켰고, SAC도 경구 또는 복강으로 300 mg/kg 투여시 유의적으로 뇌의 경색용적이 감소되어 전과 동일한 경향이였다(데이터 미제시).

다음으로 방향성 식물 추출물로부터 확인된 활성성분인 TMBH, TMBH, ADB, MM3CH 및 MM4CH가 허혈성 뇌졸중에 미치는 영향을 국소허혈모델을 이용하여 조사하였다. 즉, 국소허혈모델은 일시적인(transient) MCAO에 의한 뇌손상을 평가하는 것으로 TTC 용액으로 염색하면 정상조직은 미토콘드리아 효소들이 TTC를 환원시킴으로써 진한 적색으로 염색되나, 손상된 조직은 미토콘드리아 손상에 의해 환원력을 소실함으로써 정상조직과 구분되어 진다. 이에 각 실험군 뇌의 후각망울을 제외하고, 앞쪽으로부터 2 mm 두께로 연속 절단한 6개 절편을 TTC 염색한 결과 2, 3 및 4번째 조직에서 뚜렷한 경색부위가 관찰되었다. 전체 경색용적은 허혈 24시간군에서 $22.66 \pm 2.62\%$ 으로 측정되었다. 또한, 경색이 일어난 대뇌반구에서 부종(edema)이 관찰되었으며, 그 부종율은 $24 \pm 4\%$ 로 나타났다(Fig. 38 및 39).

두시간 중간대뇌동맥의 결찰 후 24 시간동안 재관류 후 TTC 염색에 의한 전체 경색용적이 일부 시료 투여군에서 유의성 있게 줄어들었다(Fig. 38). TMBU($6.27 \pm 4.56\%$), ADB($8.00 \pm 3.06\%$), 및 TMBH($7.34 \pm 5.89\%$)에서 60%이상 뇌경색 용적이 감소하였으며, MM3CH($17.66 \pm 6.85\%$) 및 MM4CH($19.10 \pm 7.61\%$)에서 미약한 효과를 관찰하였다(Fig. 38 및 39).

2) 뇌의산화적 손상정도 및 염증매개물질의 변화 측정

신경세포막으로부터 핵으로 산화적 스트레스와 같은 신호를 전달함으로써 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달계인 MAPKs에 미치는 영향을 살펴보기 위해 Western blotting을 실시한 결과는 Fig. 40과 41과 같다. 국소허혈모델에서도 대내피질신경세포에서 관찰한 바와 같이, 대표적인 MAPKs인 JNK, p38 ERK 가운데 허혈 유발에 의해서 ERK 활성화만이 증가하였다. SAC의 처리는 ERK활성의 증가를 유의적으로 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 42 및 43). 이와 같은 결과는 세포모델에서 관찰된 것과 같은 경향이였다.

3) 행동양식 및 학습능의 조사

뇌허혈 유발 후 약 30분 및 3시간 경과 했을 때 랫드의 꼬리를 완전히 들었을 때 반시계 방향으로의 circling이 일어나는지를 확인하였다. Fig. 44에 나타난 바와 같이, PN 투여군에서 용량의존적으로 반시계 방향으로의 circling이 감소되었다.

일시적인(transient) MCAO에 의한 뇌손상을 유도한 다음 water maze 시험을 실시하였다. Water maze 훈련시 동물이 도피대를 찾아갈 때까지 소요된 도피잠재기(escape latency)를 측정한 결과는 Fig. 45와 같다. 즉, 7일간 실시한 학습 회기에서 측정된 결과를 분석해 본 결과 PN 시료처리군과 vehicle집단(허혈유발 대조군) 모두 sham 집단과의 차이만 보였을 뿐 PN 시료처리군과 vehicle집단(허혈유발 대조군) 간의 차이는 관찰되지 않았다. Fig. 46에서는 명백하게 도피대를 보이게 한 visible platform version의 water maze에서 도피대를 찾아가는 데 걸린 시간을 측정하였다. 6회 실시한 훈련 시행에서 측정된 도피잠재기를 반복측정변량분석으로 분석해 본 결과 회기[F(5, 140)=10.739, p <.001]에서만 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

방향성 식물 추출물로부터 확인된 활성성분인 TMBH, TMBH, ADB 등이 뇌허혈 유발 후 약 30분 및 3시간 경과 했을 때 랫드의 꼬리를 완전

히 들었을 때 반시계 방향으로의 circling 발생에 미치는 영향을 살펴보았다. 뇌허혈 유발시 95% 이상의 랫드에서 반시계 방향의 circling이 관찰되었고, neurological score는 2.8 ± 0.28 로 나타났다. 이에 대해 방향성 식물 추출물로부터 확인된 활성성분 투여군에서 자발적인 circling이 감소하였다. 즉, neurological score는 TMBU(100 mg/kg) 투여군에서는 0.9 ± 0.41 , ADB 투여군에서는 1.2 ± 0.52 , 및 TMBH 투여군에서는 1.4 ± 0.37 로 신경행동학적 결손이 유의적으로 억제되었다(Fig. 47).

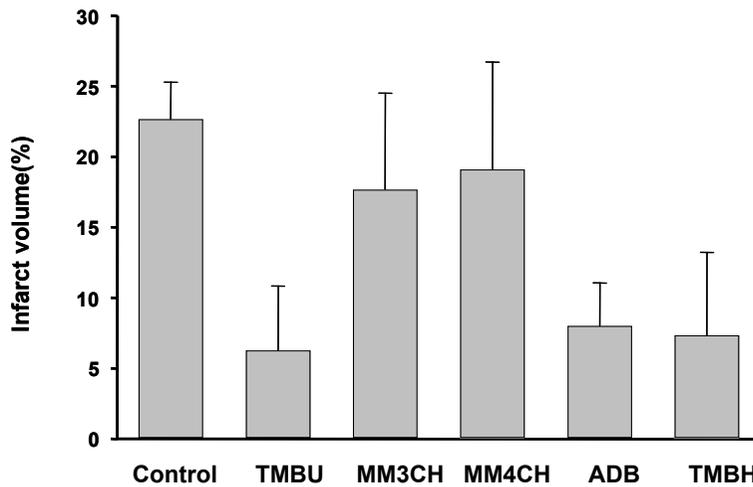


Fig. 38. Effects of pre-treatment with TMBU, MM3CH, MM4CH, ADB, TMBH on infarct volumes by MCAO. The percentage infarct volumes are measured with TTC-stained brain sections.

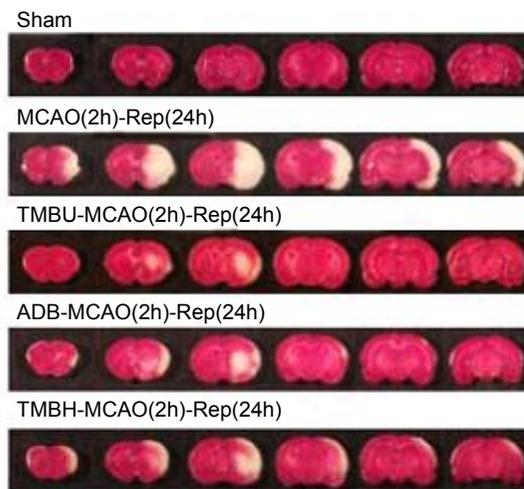


Fig. 39. Effects of pre-treatment with PN component on infarct volumes by MCAO.

Representative TTC-stained coronal brain sections with six slices (2mm-thick) each between 4 and 16 mm from the frontal pole in the each studies group.

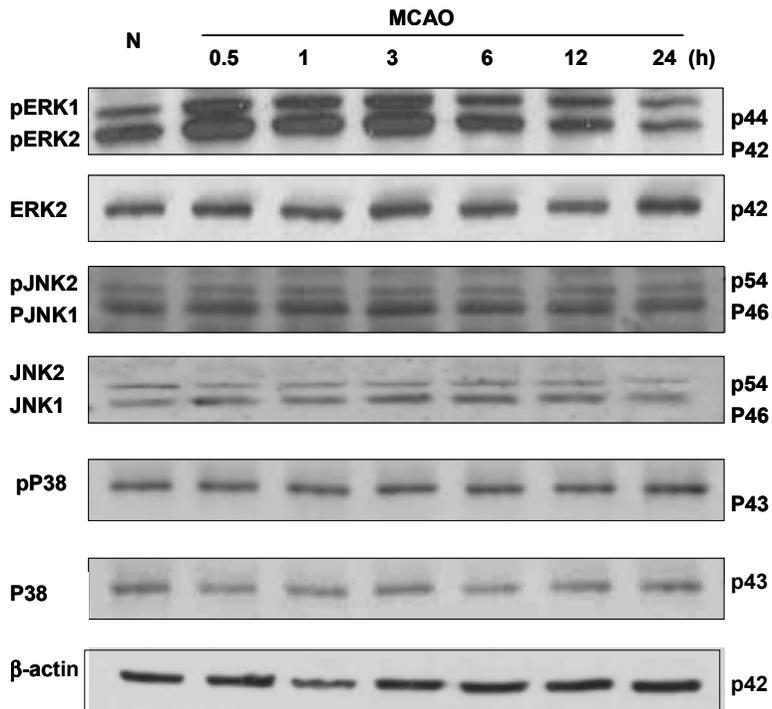


Fig. 40. Immunoblot analysis of MAPK isoforms activation using phospho-specific antibodies at following a middle cerebral artery occlusion. The immunoblot is a representative example of four experiments performed from two different sets of animals at each time point.

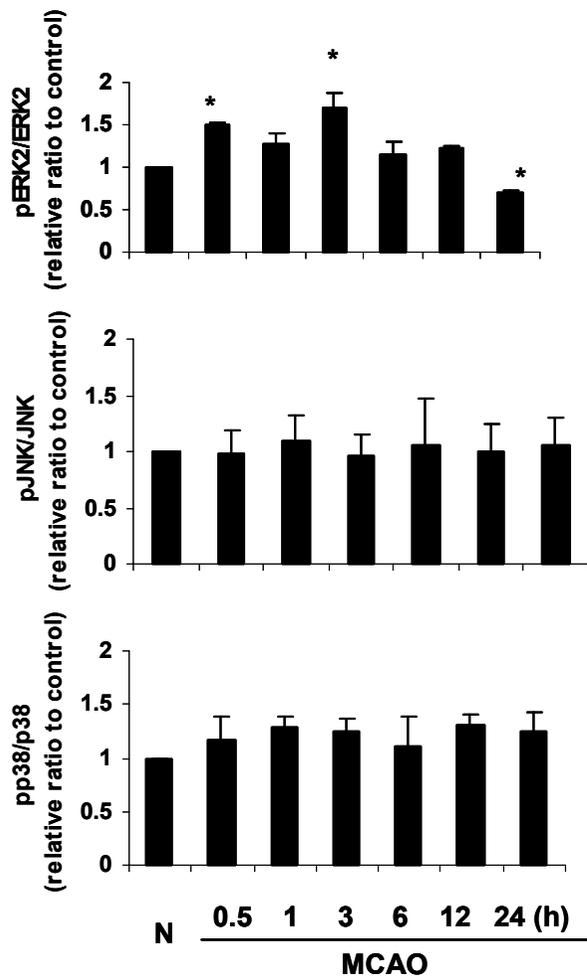


Fig. 41. Densitometric quantification of MAPK isoforms activation using phospho-specific antibodies following a middle cerebral artery occlusion. Data on densitometric quantitation, expressed as fold of relative phosphorylation ratio to controls, were mean±SEM. *P<0.05; significantly different from each corresponding control.

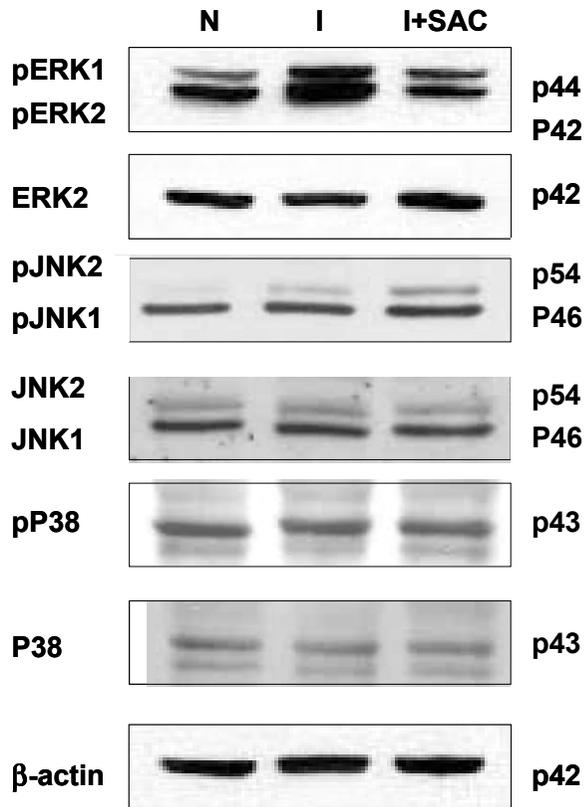


Fig. 42. Effects of SAC on MAPKs by cerebral ischemic injury at 3 h following a middle cerebral artery occlusion by immunoblot analysis. N: normal, I: ischemia, I+SAC: ischemia-treated SAC. The immunoblot is a representative example of three experiments performed from four different sets of animals.

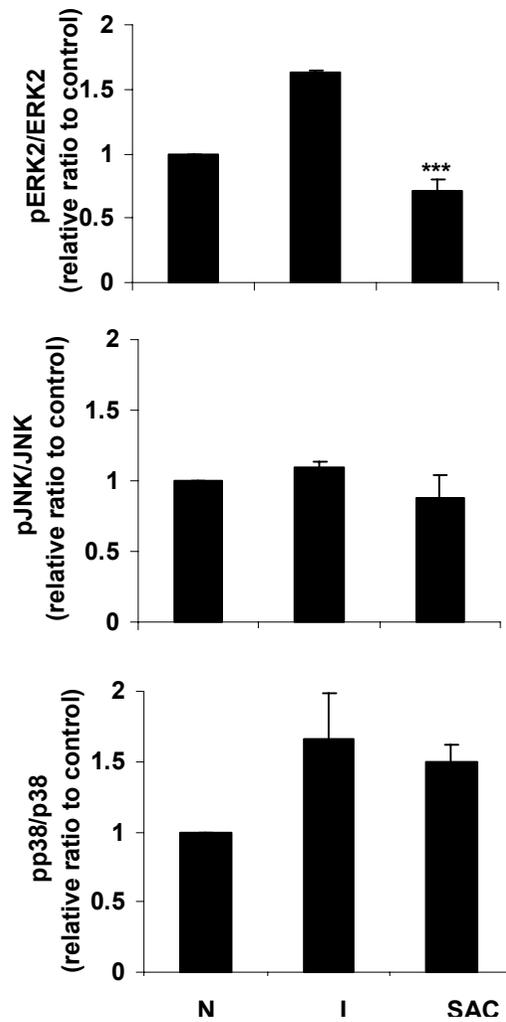


Fig. 43. Effects of SAC on MAPKs by cerebral ischemic injury at 3 h following a middle cerebral artery occlusion by densitometric quantification. N: normal, I: ischemia, I+SAC: ischemia-treated SAC. Data on densitometric quantitation, expressed as fold of relative phosphorylation ratio to controls, were mean±SEM. ***P<0.001; significantly different from the ischemic control.

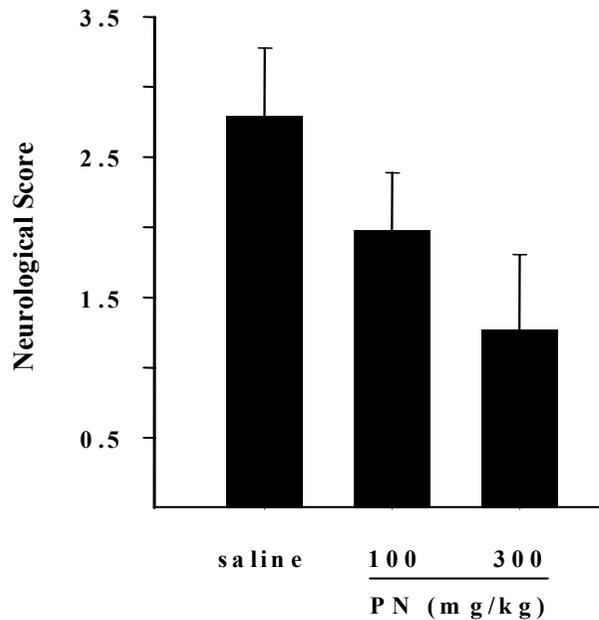


Fig. 44. Improvement in neurological score following PN treatment. Twenty-four hours after reperfusion following MCAO for 2 hrs, a neurological examination was performed as previously described (Huang et al., 1994). Briefly, the scores were 0 (no observable neurological deficit, normal), 1 (failure to extend left forepaw on lifting the whole body by tail, mild), 2 (circling to the contralateral side, moderate) and 3 (leaning to the contralateral side at rest or no spontaneous motor activity, severe). Animals that showed had the higher scores also showed all the features of the lower grades.

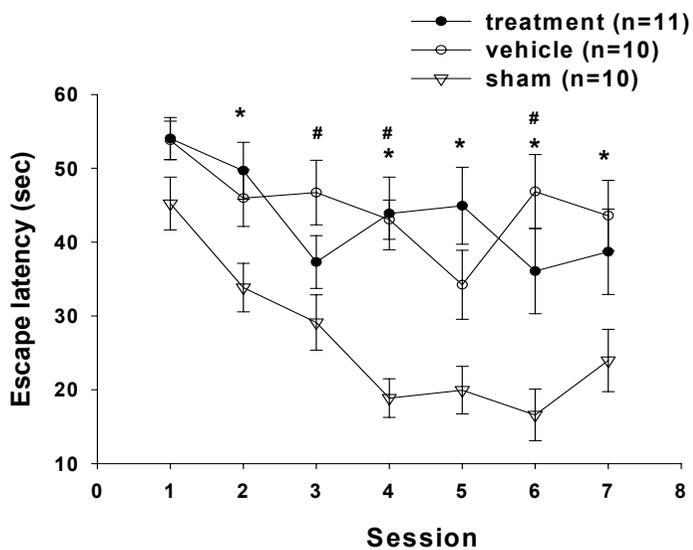


Fig. 45. Escape latency measured in Water maze training. *: $P < 0.05$, a comparison between sample treated group and sham control, #: $P < 0.05$, a comparison between vehicle treated control and sham control.

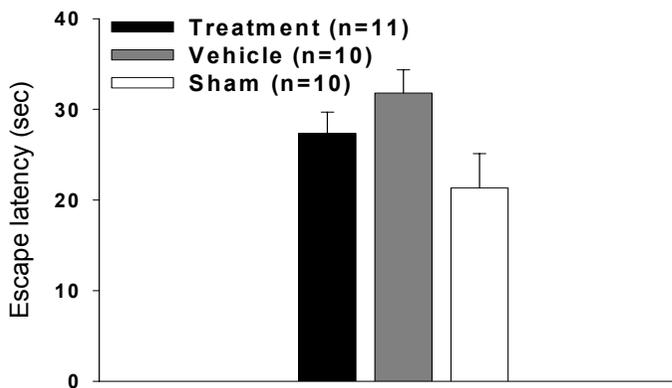
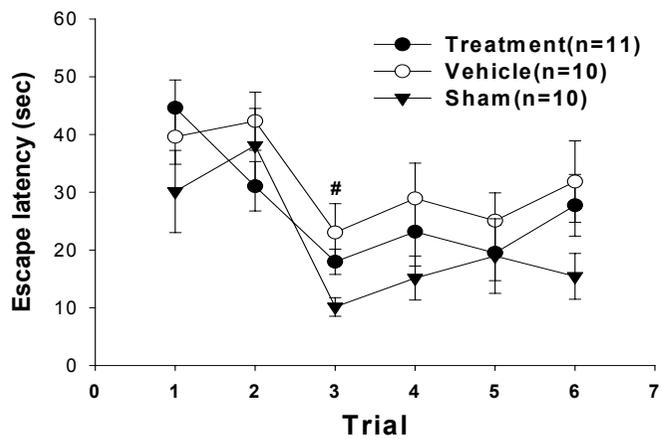


Fig. 46. Escape latency in visible platform version of water maze[all trial(upper) and mean escape latency(bottom)]. #: $P < 0.05$, significantly different between vehicle control and sham control.

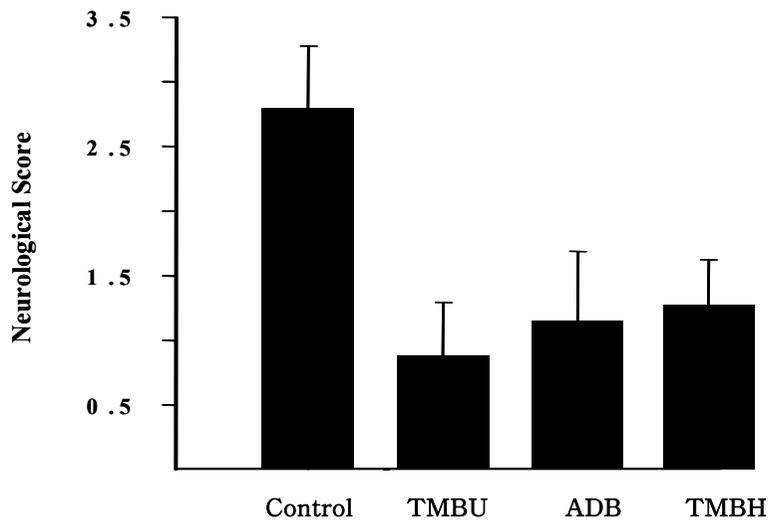


Fig. 47. Neurological examination.

Twenty-four hours after reperfusion following MCAO for 2 hrs, a neurological examination was performed as previously described (Huang et al., 1994).

Briefly, the scores were 0 (no observable neurological deficit, normal), 1 (failure to extend left forepaw on lifting the whole body by tail, mild), 2

(circling to the contralateral side, moderate) and 3 (leaning to the contralateral side at rest or no spontaneous motor activity, severe). Animals that showed had

two grades.

다. 활성물질의식이섭취를 통한 허혈성 뇌졸중 예방 효과

본 연구의 최종 목적이 허혈성 뇌손상을 예방할 수 있는 선도 소재를 발굴하고 기능성 식품화를 위한 응용 기술을 개발하는 것이기 때문에 최종 활용도를 고려하여 고혈압 뇌졸중 동물모델인 뇌졸중 발증성향 SHR(SHRSP/Izm) rat에게 SAC 시료가 함유된 식이(diet)와 1% NaCl이 포함된 식수를 공급하였을 때 뇌졸중 발병 및 수종 관련 생체 지표를 살펴 보았다. 뇌졸중의 발병은 체중의 현저한 감소, 식이섭취량의 감소 및 음수 섭취량의 증가를 지표로 관찰하였으며, 신경퇴행증상을 보이는지 또한 관찰하므로써 확인하였다. 실험기간동안 체중 및 식이와 음수섭취량의 변화를 관찰하여 시간이 경과함에 따라 뇌졸중의 발병시점을 확인한 결과는 Fig. 48-50과 같다. 즉, 대조군에 비해 SAC 섭취군에서는 뇌졸중 발병에 따라 체중 및 식이와 음수섭취량의 유의적인 변화가 관찰되었다. 뇌졸중 유발 빈도의 경우 시험물질 보충군 대조군에 비해 22% 감소되었고, 실험 기간 동안 대조군은 33%의 사망률을 보이는데 비해 시험물질 보충군에서는 사망 예가 관찰되지 않았다. 신경장애행동지수도 대조군에 비해 시험물질 보충군에서는 유의적으로 낮은 경향을 보였다(Fig. 51). 그러나 뇌졸중 발증성향 SHR(SHRSP/Izm) rat에서 대조군과 비교하여 시험물질의 식이 보충이 혈액생화학적 지표[RBC, WBC, hemoglobin, hematocrit, platelet, SGPT(ALT), SGOT(AST), glucose, cholesterol, triglyceride 등]와 혈청 호모시스테인에 미치는 유의적인 영향은 관찰되지 않았다(데이터 미제시).

방향성 식물 추출물로부터 확인된 활성성분인 TMBU를 식이로 섭취시켰을 때 나타나는 영향을 살펴보고자 하였다. Stroke prone spontaneously hypertensive rats에 0.5% NaCl 음수 및 Stroke-prone diet를 공급하여 4주간 사육하였으며 TMBU를 식이의 0.03%, 0.1%, 0.3% 수준으로 공급하였다. 먼저 실험군의 간, 비장, 신장의 무게를 측정된 결과, 비장 및 신장은 군간에 차이를 보이지 않았으나, TMBU 0.3 군에서 실험 대조군에 비해 간의 무게가 유의적으로 증가하였다(Table 14). 이는 식이의 0.3% 또는 그 이상의 수준으로 TMBU를 공급할 경우 간에 부작용이

발생될 수 있다는 것을 시사해 준다.

실험군의 맥박 및 수축기·이완기 혈압을 측정된 결과, 본 실험에 사용한 시료는 SHRSP 동물의 맥박 및 수축기·이완기 혈압에 영향을 미치지 않았다(Table 15). 초기의 맥박 및 수축기·이완기 혈압과 4주간 시료를 투여했을 때의 맥박 및 수축기·이완기 혈압이 차이가 없어 본 시료의 뇌졸중 예방효과가 혈압과는 상관이 없음을 알 수 있었다. 실험대조군의 경우 실험기간이 4주에 경과하였을 때 수축기·이완기 혈압이 초기에 비해 감소되었으며, 이는 뇌졸중 발병에 따라 증세의 강도가 심하여 사망이 임박한 동물에서 혈압이 크게 낮아진 영향인 것으로 보인다.

뇌졸중의 발병은 체중의 현저한 감소, 식이섭취량의 감소 및 음수 섭취량의 증가를 지표로 관찰하였으며, 신경퇴행증상을 보이는지 또한 관찰하므로써 확인하였다. 이 중 한가지 이상의 증상을 보일 경우 뇌졸중이 발병된 것으로 간주하였다. 실험기간동안 체중 및 식이와 음수섭취량의 변화를 관찰하여 시간이 경과함에 따라 뇌졸중의 발병시점을 확인하였다(Fig. 52-54). 실험군의 체중 증가량 및 식이와 음수섭취량을 살펴보면, 총 사육기간동안 체중의 증가량은 군간에 차이를 보이지 않았으나, 식이섭취량의 경우 TMBU 0.1군과 TMBU 0.3군에 비해 실험대조군의 섭취량이 유의적으로 감소하였고, 음수섭취량은 TMBU 0.03군과 TMBU 0.1군에 비해 실험대조군 및 TMBU 0.3군에서 유의적으로 증가하여, 실험대조군의 평균 식이섭취량 및 음수섭취량이 뇌졸중 발병시 나타나는 경향을 보여주고 있음을 확인하였다(Table 16).

뇌졸중의 발병을 살펴보면 실험대조군에서 20%의 발병이 나타났으며, 시료투여군 TMBU 0.03 및 TMBU 0.3 군에서 각각 40%와 20%의 발병을 보였다. 그러나 시료투여군 TMBU 0.1군에서는 뇌졸중이 발병하지 않았다 (Table 17).

또한 뇌졸중 발병에 따른 신경퇴행성 증상을 점수화하여 살펴보았다. 신경퇴행성 증상은 발작, 마비, 몸의 대칭감각 상실, 운동조정능력 상실, 보행 반응(gait response), 균형감각(Eliash 등, 2001)등을 평가하여 점수화하

였다. 신경퇴행성 점수가 실험대조군이 가장 높게 나타나 증세가 가장 심각하였으며, TMBU 0.1군이 가장 점수가 낮아 뇌졸중 예방에 효과가 있었다(Fig. 55). 그러나 실험군들의 혈청을 얻어 싸이토카인을 분석한 결과에서 실험동물의 혈중 TNF- α 수준은 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 56). 또한 실험동물의 혈중 IL-6 수준 역시 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 57). 이러한 결과는 TMBU의 섭취가 혈중 싸이토카인 수준에는 영향을 미치지 않은 것으로 판단되며, 향후 뇌조직중 싸이토카인 수준의 변화를 살펴보아야 할 것으로 사료된다.

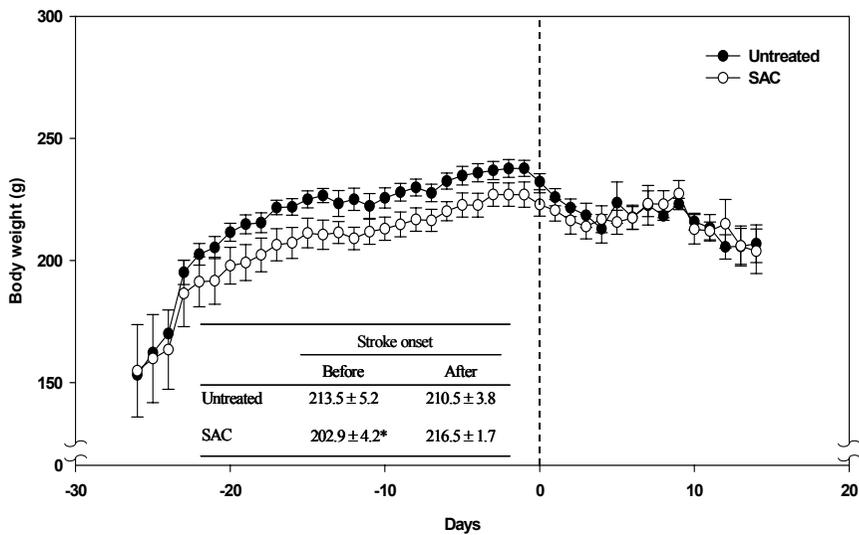


Fig. 48. Body weight before and after stroke onset in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Values are mean \pm SEM. *P<0.05; significantly different between untreated and SAC supplemented groups.

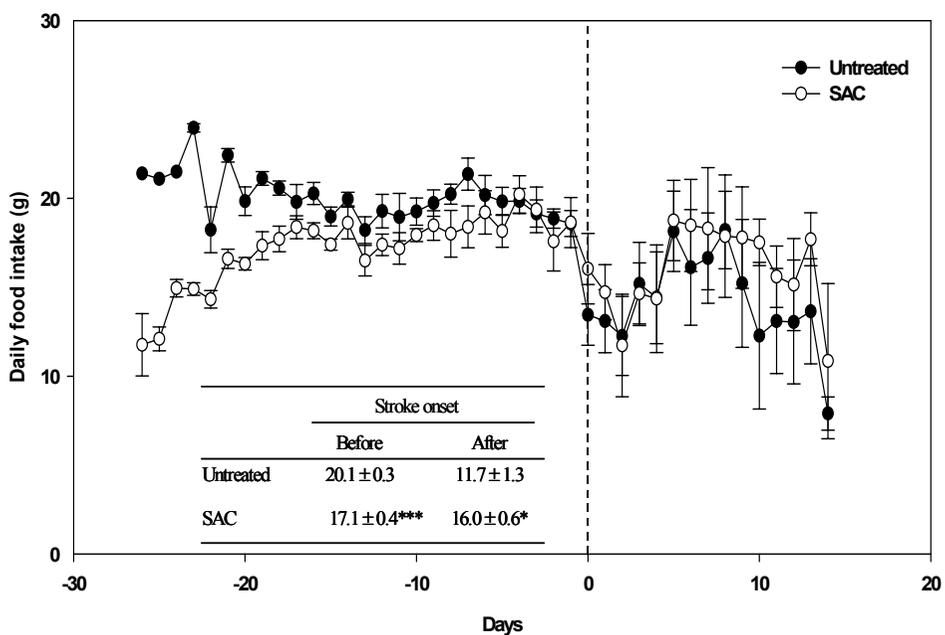


Fig. 49. Food intake before and after stroke onset in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Values are mean SEM. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$; significantly different between untreated and SAC supplemented groups.

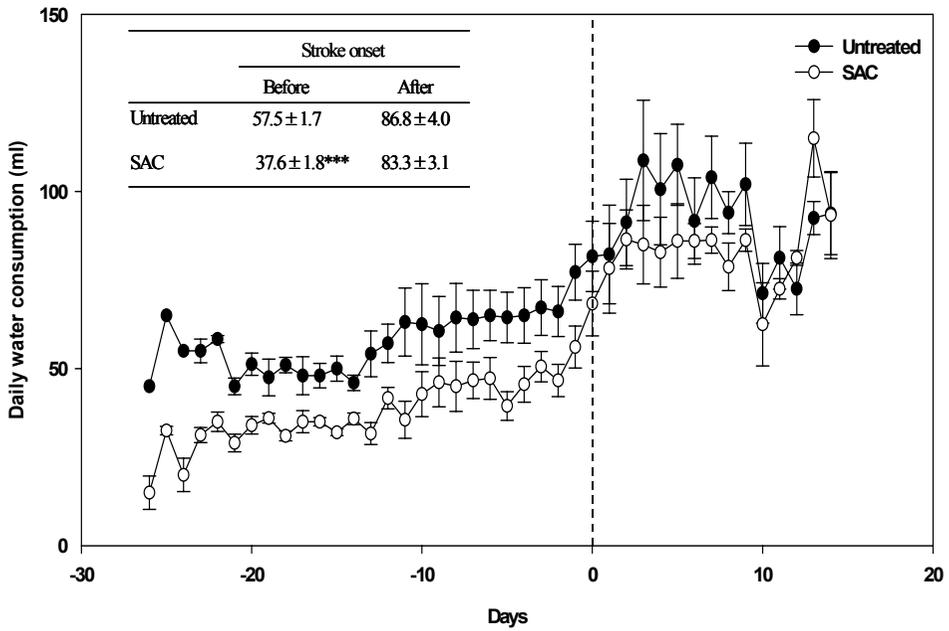


Fig. 50. Water consumption before and after stroke onset in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Values are mean SEM. ***P<0.001; significantly different between untreated and SAC supplemented groups.

Fig. 51. Stroke onset time, incidence, mortality and stroke-related behavioral scores in salt-loaded SHRSP and age-matched normotensive WKY rats: (A) Stroke onset time (mean SEM) was not significantly different between SHRSP control and SHRSP + SAC groups according to Wilcoxon rank sum test. (B, C) The number of stroke incidence and mortality was calculated as a percentage of the total number of group. Stroke incidence and mortality (%) was analyzed by Chi-square test, respectively ($C^2=26.96$, $P=0.0001$; $C^2=7.38$, $P=0.025$). (D) Neurological disability (mean SEM) was expressed as stroke related behavioral changes. *Mean value was significantly different from that for the SHRSP control rats according to Wilcoxon rank sum test ($P<0.05$).

Table 14. Tissue weight in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

	Liver (g)	Spleen (g)	Kidney (g)
Con	7.2 ± 0.14 ^b	0.51 ± 0.02	1.99 ± 0.02
TMBU 0.03	7.5 ± 0.21 ^b	0.56 ± 0.04	1.98 ± 0.03
TMBU 0.1	7.7 ± 0.14 ^b	0.49 ± 0.01	2.00 ± 0.03
TMBU 0.3	8.7 ± 0.45 ^a	0.51 ± 0.02	2.08 ± 0.05

Table 15. Heart rate, systolic and diastolic blood pressure in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

	week				
	0	1	2	3	4
Heart rate					
Con	366.1 ± 31.4	421.0 ± 22.8	411.2 ± 15.4 ^{ab}	401.8 ± 13.8	431.8 ± 24.7
TMBU 0.03	392.0 ± 23.4	417.4 ± 17.7	380.6 ± 24.0 ^{ab}	412.8 ± 19.3	419.5 ± 20.6
TMBU 0.1	364.7 ± 21.8	383.3 ± 23.6	396.9 ± 20.5 ^b	381.9 ± 20.7	418.6 ± 13.6
TMBU 0.3	404.0 ± 35.3	471.2 ± 14.5	427.3 ± 21.5 ^a	414.7 ± 14.9	401.0 ± 28.9
SBP					
Con	207.2 ± 19.5	189.9 ± 20.7	218.4 ± 7.8	190.1 ± 14.8	180.5 ± 10.9 ^b
TMBU 0.03	203.8 ± 15.6	178.0 ± 13.4	235.1 ± 7.9	200.0 ± 13.9	214.3 ± 14.0 ^a
TMBU 0.1	205.2 ± 19.5	211.6 ± 19.7	228.1 ± 10.9	185.3 ± 11.3	207.8 ± 10.7 ^{ab}
TMBU 0.3	183.3 ± 10.6	201.9 ± 19.8	208.9 ± 10.2	223.0 ± 11.5	198.3 ± 12.1 ^{ab}
DBP					
Con	180.5 ± 13.2 ^a	151.9 ± 23.0	162.0 ± 7.5	156.2 ± 14.5	144.7 ± 8.4 ^b
TMBU 0.03	154.1 ± 19.9 ^{ab}	134.7 ± 14.1	181.7 ± 10.3	156.6 ± 12.5	172.6 ± 14.5 ^a
TMBU 0.1	178.7 ± 18.3 ^a	185.2 ± 16.4	177.1 ± 11.7	139.2 ± 10.9	162.9 ± 7.3 ^{ab}
TMBU 0.3	143.9 ± 9.9 ^b	165.4 ± 16.6	168.4 ± 9.5	174.5 ± 10.1	151.2 ± 9.0 ^{ab}

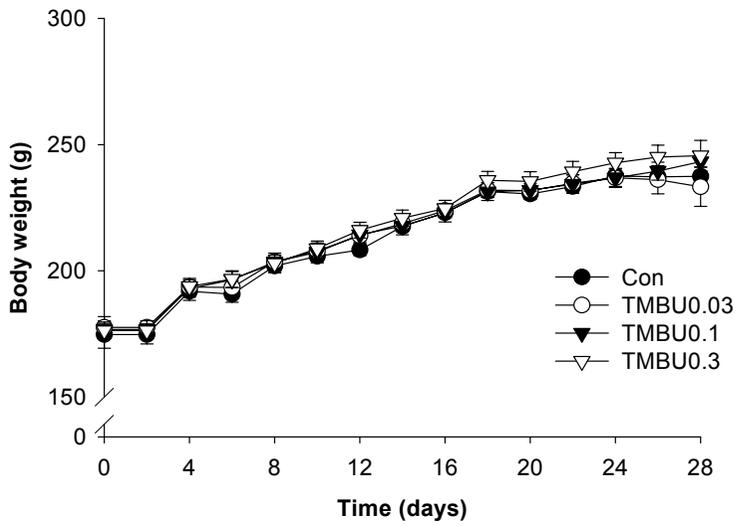


Fig. 52. Body weight in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

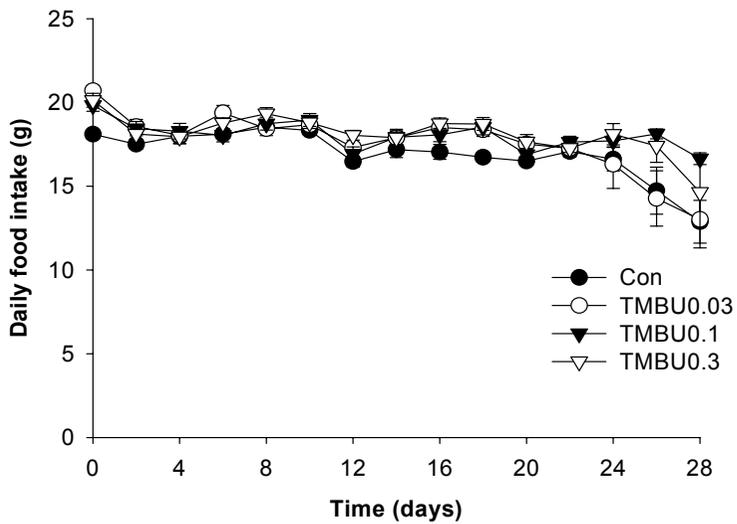


Fig. 53. Daily food intake in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

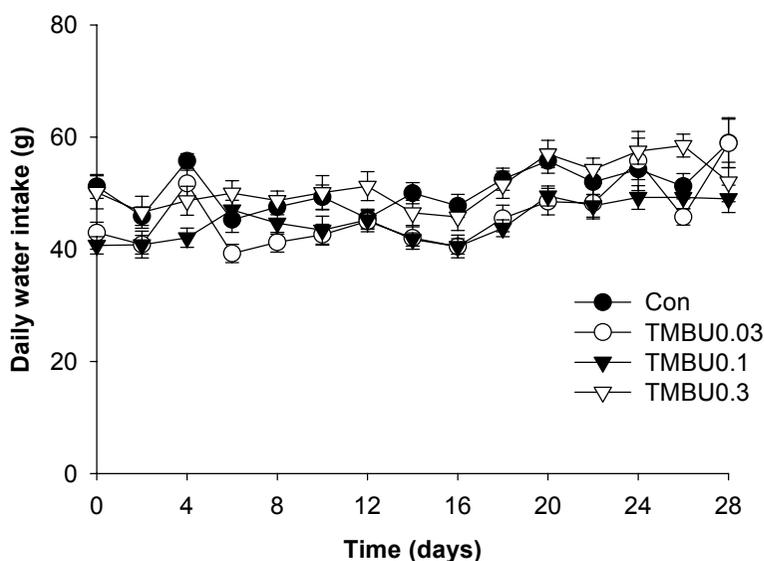


Fig. 54. Daily water intake in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

Table 16. Weight gain, daily food and water intake in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

	Wt gain	Daily food intake	Daily water intake
Con	87.4 ± 8.1	17.1 ± 0.2 ^b	50.6 ± 1.5 ^a
TMBU 0.03	79.3 ± 10.3	17.7 ± 0.4 ^{ab}	45.4 ± 1.6 ^b
TMBU 0.1	90.0 ± 3.2	18.1 ± 0.2 ^a	44.8 ± 1.3 ^b
TMBU 0.3	90.9 ± 6.8	18.2 ± 0.2 ^a	51.2 ± 1.8 ^a

Table 17. Stroke frequency and onset in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

	Con	TMBU 0.03	TMBU 0.1	TMBU 0.3
No. of animals	10	10	10	10
Survived animals	10	9	10	9
Stroke incidence	2	4	0	2
Stroke onset day	26	26	-	27

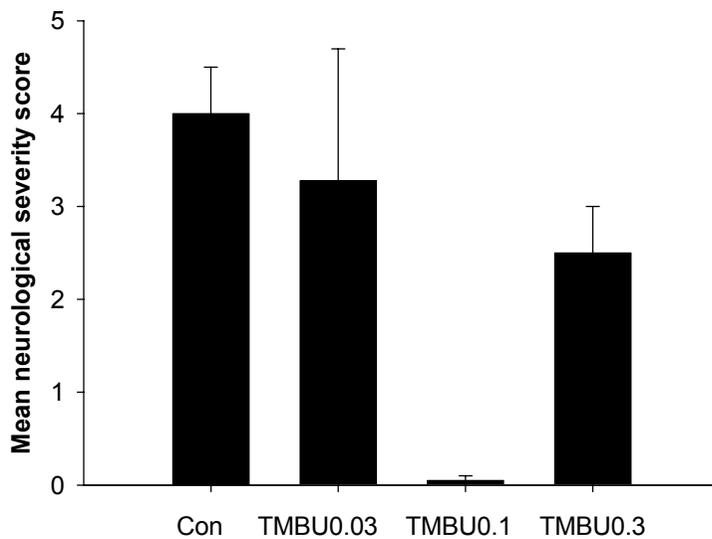


Fig. 55. Mean neurological severity score in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

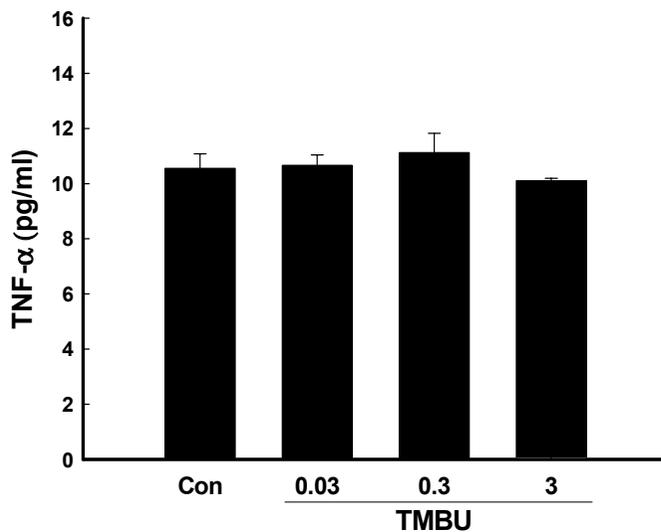


Fig. 56. TNF- α levels in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

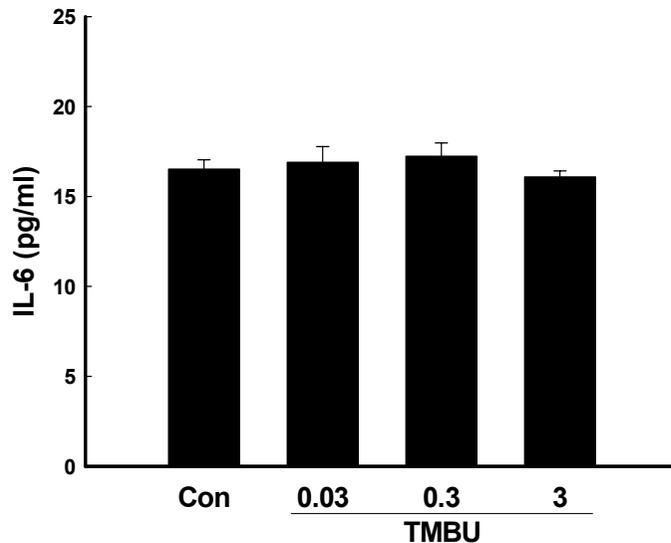


Fig. 57. IL-6 levels in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats

3. 활성소재의 구조분석 및 동정

가. 허혈성 뇌졸중 예방 활성물질의 조분리

감압하의 증기 증류(DRP, distillation under reduced pressure)와 dichloromethane을 용매로 한 액체-액체 연속 추출(LLE, liquid-liquid continuous extraction)방법에 의해 음건된 방향식물로부터 방향성 성분을 조분리 하였다. 그런 다음 GC/MS에 의해 조분리물을 정성 및 정량 분석한 다음 전술한 시험관내 유사 허혈 모델에 의하여 활성을 측정하였다. 활성이 인정되는 경우 분석 결과를 alcohol류, ketone류, aldehyde류, terpene류, 기타 및 미지 물질로 분류한 다음 정량분석을 실시하여 물질을 단리하기 위한 기초정보를 파악하였다. 이와 동시에 조분리물을 다시 물, CH₂Cl₂, n-butanol, ethyl acetate로 분획을 병행하였다. 그런 다음 각 분획물의 활성을 추적한 다음 활성이 인정된 분획은 넓은 범위의 gradient mobile phase(n-hexane-ethyl acetate-methanol)로 Silicagel column chromatography를 실시하였다. 그 결과 5개의 물질(시료 A, B, C, D, E)을 단리한 후 이를

냉동건조 또는 Speed/Vaccum으로 용매를 제거한 후, deuterated solvent에 시료를 녹여서 NMR tube에 옮긴 후 NMR 실험에 사용하고, 회수하여 Mass Spectrometry 및 IR 분석에 사용하였다.

나. 활성물질의 구조분석 및 신규성 조사

시료 A의 구조분석을 위해 약 300mg의 시료를 확보하여 0.5 ml MeOH-d₄에 녹여서 NMR 실험을 위한 시료를 준비하고 분석을 수행한 결과는 Fig. 58-63과 같다. ¹³C NMR spectrum에서 10개의 peak을 보였기 때문에 이 물질은 모두 10개의 carbon으로 구성된 화합물로 추정하고 distortionless enhancement by polarization transfer(DEPT) 실험을 수행하였다. 여기서 3개의 CH₃, 1개의 CH₂, 4개의 CH, 2개의 C가 결정되었다. DEPT에서 singlet으로 관찰된 40.0 ppm과 147.9 ppm의 두 peak을 제외한 8개의 ¹³C peak은 heteronuclear multiple quantum coherence(HMQC)에서 각각 1H peak이 연결되어 있음을 나타냈다. 73.9 ppm에서 관찰된 ¹³C peak은 4.45 ppm의 1H peak과 연결되어 있어서 hydroxyl group과 연결되어 있음을 보여주었다. 또한 120.6 ppm에서 관찰된 ¹³C peak은 5.32 ppm의 1H peak과 연결되고 있기 때문에 double bond를 이룬 carbon 중 하나임을 알 수 있었고 이와 연결된 다른 쪽 carbon은 147.9 ppm peak으로 밝혀졌다. 앞서 언급한 바와 같이 40.0 ppm에서 관찰된 ¹³C peak은 두개의 methyl group을 갖고 있음이 밝혀졌다. 이 화합물에 포함된 세 개의 methyl group 중 하나는 147.9 ppm ¹³C에 연결되어 있었다. correlated spectroscopy(COSY)의 해석으로부터 2.45 ppm 1H peak과 1.28 ppm 1H peak은 1.95 ppm 1H peak 및 2.22 ppm 1H peak에 동시에 연결되어 있음이 관찰되었기 때문에 이들과 각각 연결되어 있는 ¹³C peak인 36.2 ppm peak은 49.2 ppm peak과 49.4 ppm peak에 연결되어 있다고 판단되었다. 이는 bicyclic ring의 존재를 가질 때 가능한 구조로서 이 화합물에는 bicycle이 존재함을 나타냈다. heteronuclear multiple bonded connectivities(HMBC)의 해석에 근거하여서 이들 ¹³C peak들과 1H peak들의 연결을

결정하였고 그 결과 Fig 64와 같은 구조를 도출할 수 있었다. 그 화합물의 이름은 4,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept3-en-2-ol이다.

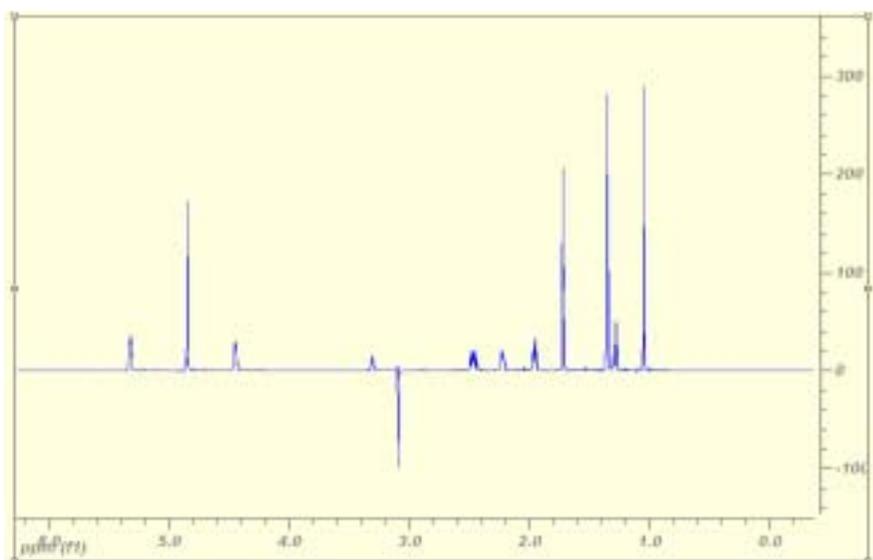


Fig. 58. ¹H spectrum of sample A.

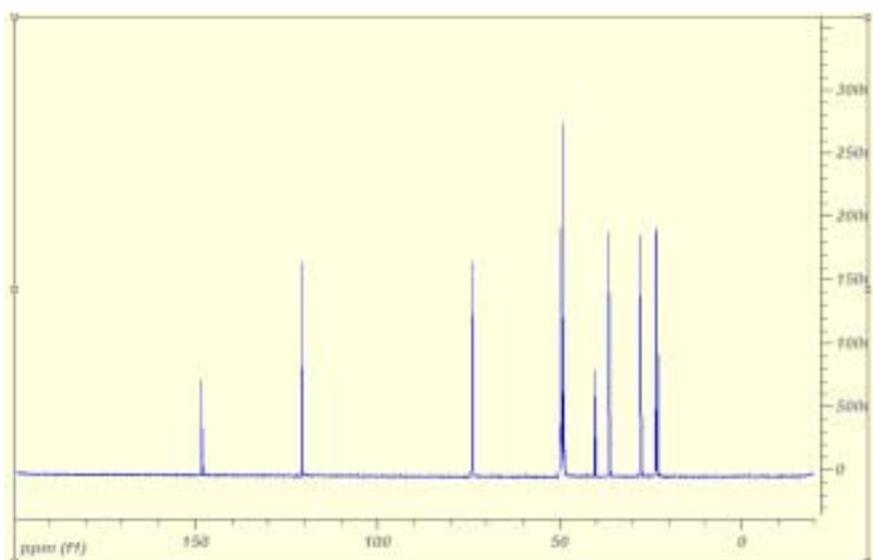


Fig. 59. ¹³C spectrum of sample.

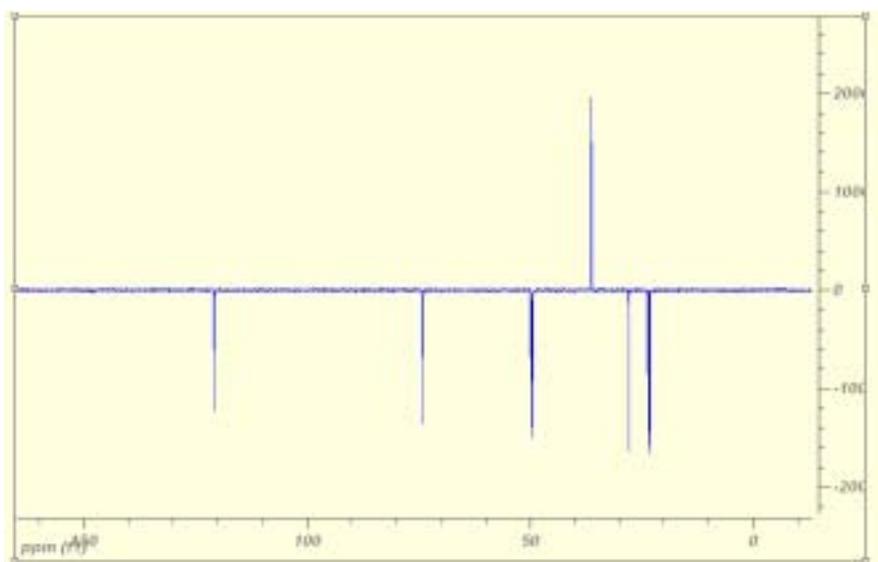


Fig. 60. DEPT spectrum of sample A.

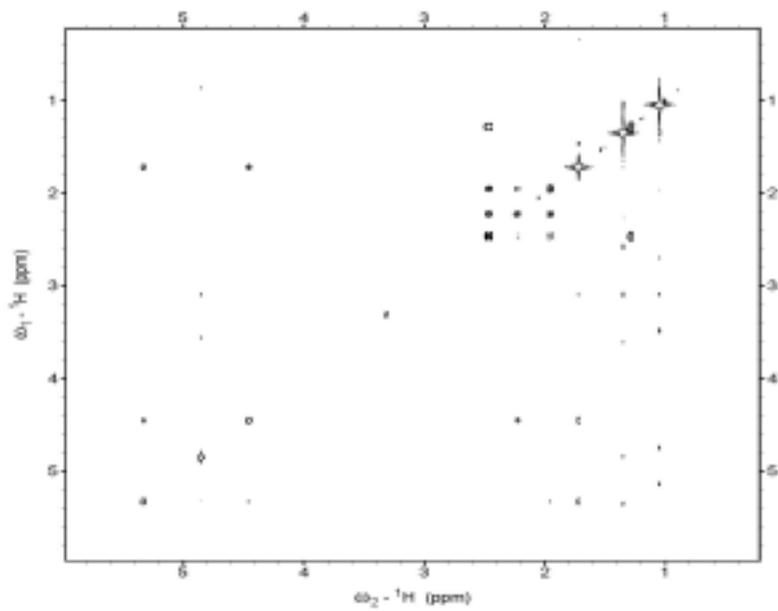


Fig. 61. COSY spectrum of sample A.

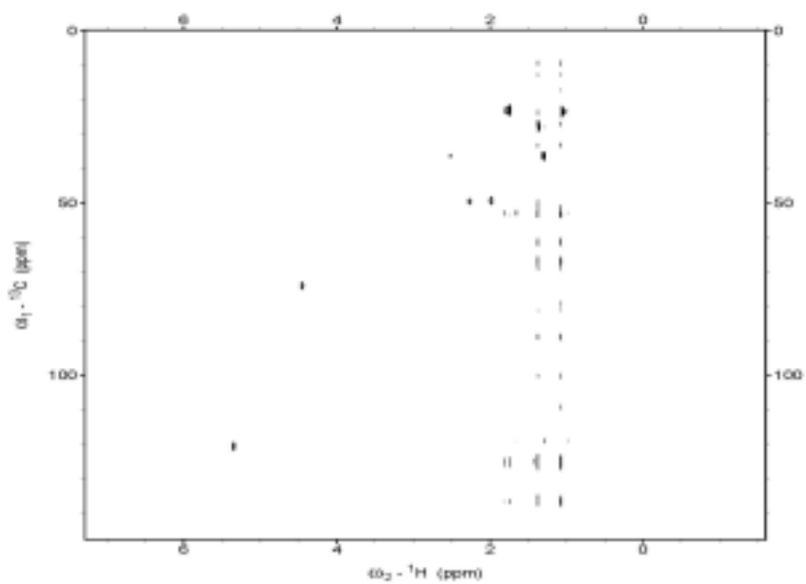


Fig. 62. HMQC spectrum of sample A.

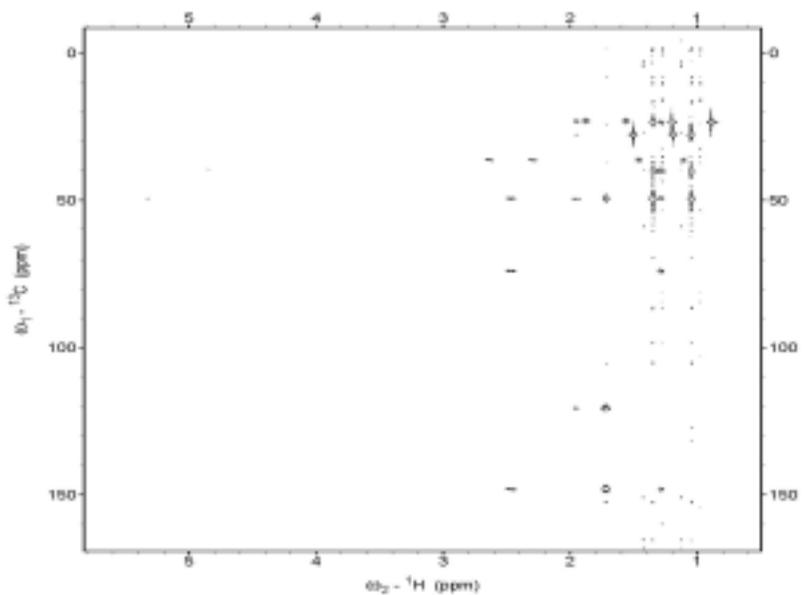


Fig. 63. HMBC spectrum of sample A.

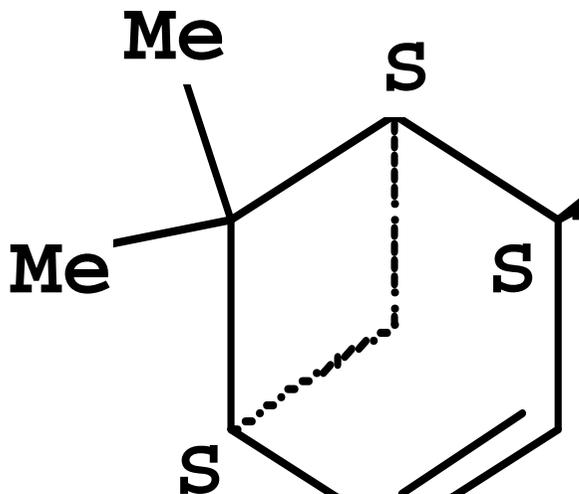


Fig. 64. Structure of sample A.

시료 B의 경우 완전한 단일물질로 분리되지 못하였으나 GC-MS 분석 결과로 볼 때 terpenoid계 화합물로 추정된다. 본 연구에서는 Fig. 65-71에 나타낸 바와 같이 ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, HMQC, HMBC, COSY, total correlated spectroscopy(TOCSY) 실험을 수행하였고 이의 해석을 진행 중에 있다. 그러나 좀 더 정확한 구조 규명을 위해서 이 화합물의 purity를 높이기 위한 실험도 병행 중에 있다.

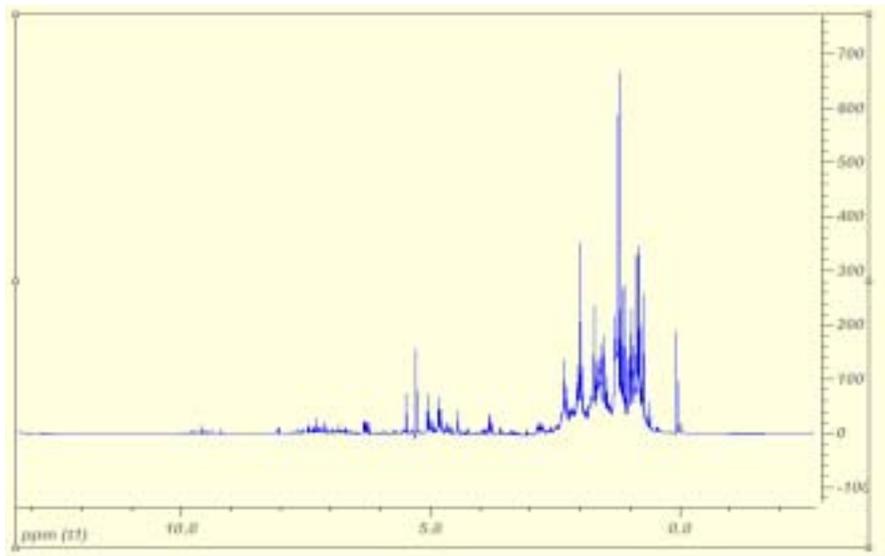


Fig. 65. 1H spectrum of Sample B.

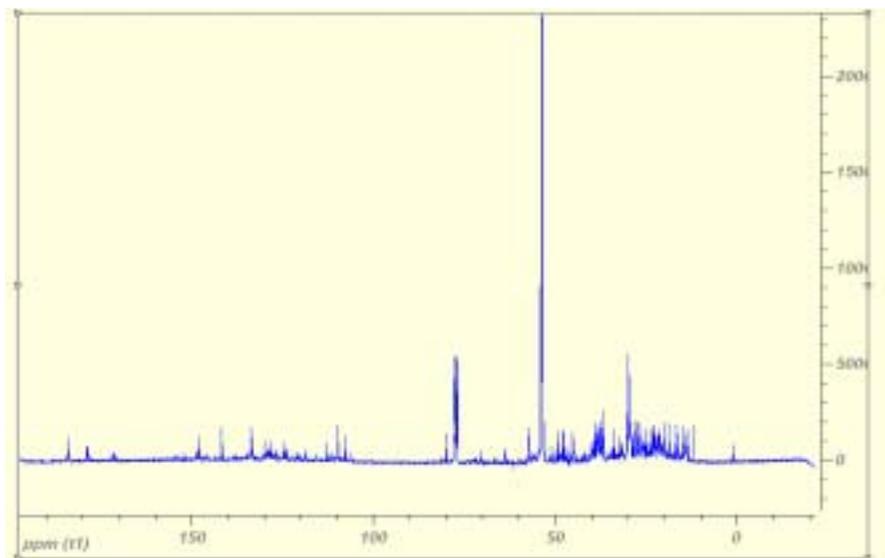


Fig. 66. 13C spectrum of Sample B.

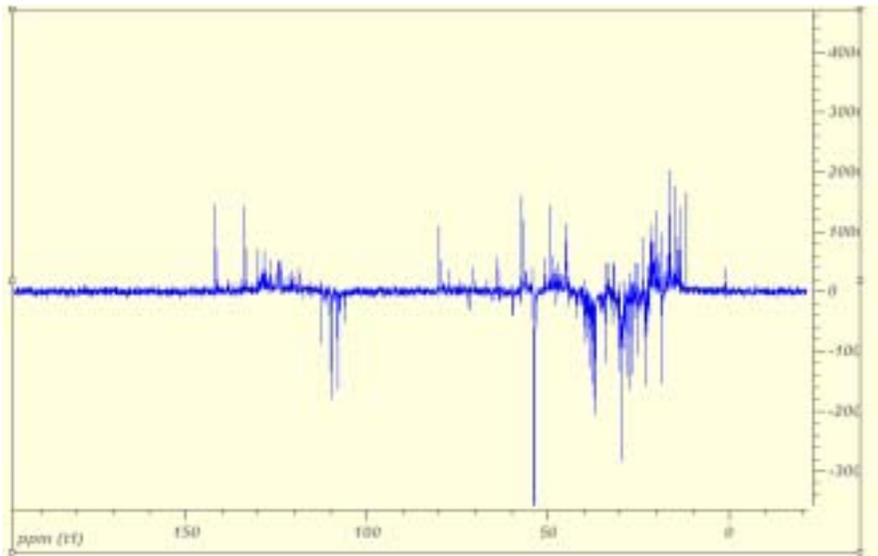


Fig. 67. DEPT spectrum of Sample B.

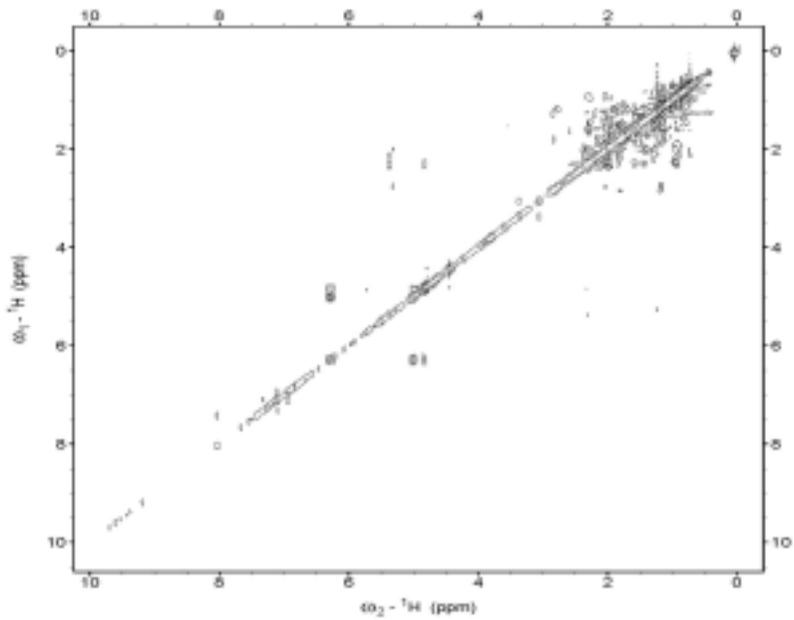


Fig. 68. COSY spectrum of Sample B.

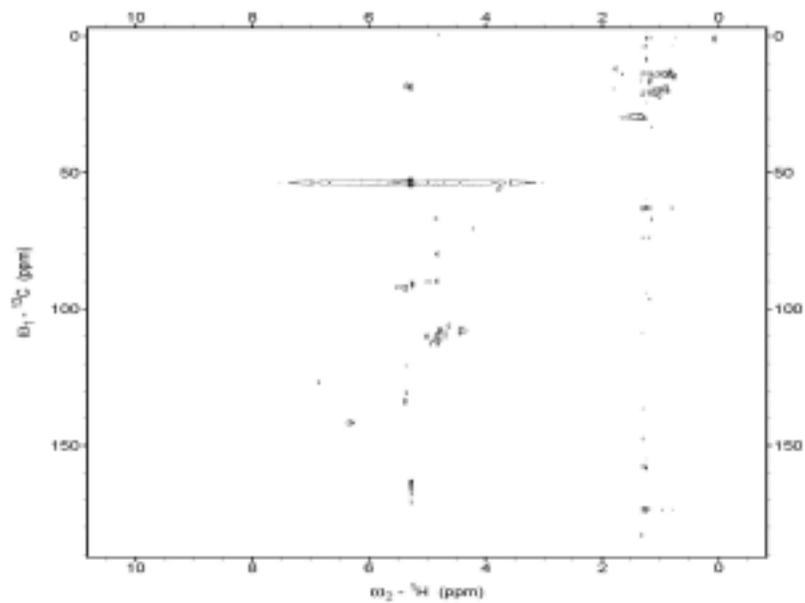


Fig. 69. HMQC spectrum of Sample B.

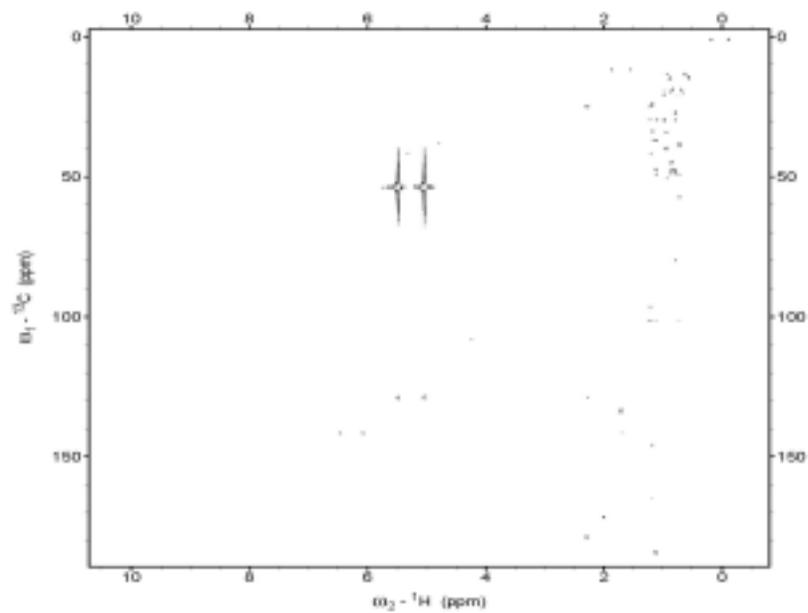


Fig. 70. HMBC spectrum of Sample B.

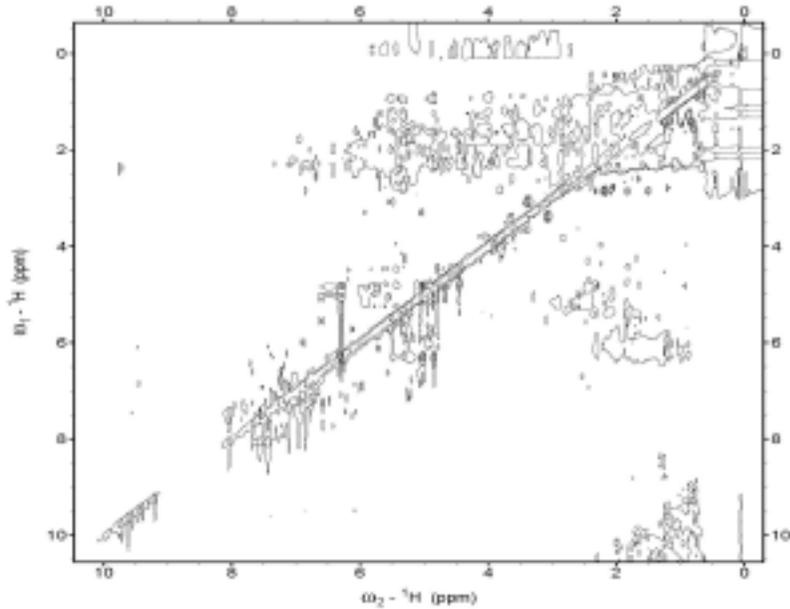


Fig. 71. TCOSY spectrum of Sample B.

시료 C의 구조분석을 수행하기 위해 약 500 mg의 시료를 MeOH-d₄ 0.5 ml에 녹여서 NMR 실험을 위한 시료를 준비하였다. ¹³C NMR spectrum에서 15개의 peak이 관찰되었다. 따라서 시료 4 화합물은 15개의 carbon을 갖고 있는 것으로 추정되었다. DEPT 실험을 통해서 carbon의 종류를 결정하였는데 3개의 CH₃, 6개의 CH₂, 3개의 CH, 3개의 C를 가지고 있는 것으로 판단하였다. 112.5 ppm ¹³C peak과 125.2 ppm ¹³C peak은 double bond에 포함된 carbon으로 보이나 이들 두 carbon이 서로 연결된 것은 아니었기 때문에(이들의 ¹H peak들이 서로 COSY에서 cross peak을 보이고 있지 않기 때문에) 이들 carbon과 double bond를 이루고 있는 다른 carbon을 HMBC spectrum의 해석을 통해 찾은 결과 112.5 ppm ¹³C는 154.9 ppm ¹³C와 서로 double bond를 이루고, 125.2 ppm ¹³C는 135.5 ppm ¹³C와 double bond를 이루고 있는 것으로 결정되었다. 그런데 135.5 ppm ¹³C와 154.9 ppm ¹³C는 둘 다 singlet carbon이므로 다른

carbon과 연결되어 있어야 하는데 135.5 ppm 13C는 methyl group 한 개와 40.7 ppm 13C와 연결되어 있음이 HMBC에서 관찰 되었다. 그리고 154.9 ppm 13C는 35.5 ppm 13C 및 49.3 ppm 13C와 연결되어 있음이 HMBC에서 밝혀졌다. 49.3 ppm 13C는 다시 41.1 ppm 13C와 연결되어 있고 이것은 다시 33.5 ppm 13C와 연결되어 있다. 33.5 ppm 13C는 54.2 ppm 13C와, 이는 29.2 ppm 13C와, 이는 앞서 언급했던 40.7 ppm 13C와 연결되기 때문에 이 화합물은 고리를 이루어 연결된 것으로 판단되었다. 그런데 HMQC에 의해 결정된 1H peak들 중 54.2 ppm 13C와 49.3 ppm 13C에 각각 연결된 1H peak들인 1.65와 2.28이 COSY에서 cross peak을 보이기 때문에 이들은 서로 bond를 형성하고 있다고 판단되었기 때문에 이 화합물은 bicyclic compound로 확인되었다. 지금까지 결정이 안 된 세 개의 13C peak 중 두 개의 methyl group은 33.5 ppm 13C에 연결되어 있는 것으로 HMBC에서 확인 되었고, 30.1 ppm 13C는 125.2 ppm 13C와 35.5 ppm 13C에 동시에 연결되어 있는 것으로 결정되었다(Fig. 72-77). 이와 같은 결과에 근거하여서 이 화합물의 구조는 Fig. 778 같고 그 이름은 4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo[7.2.0]undec4-ene이다.

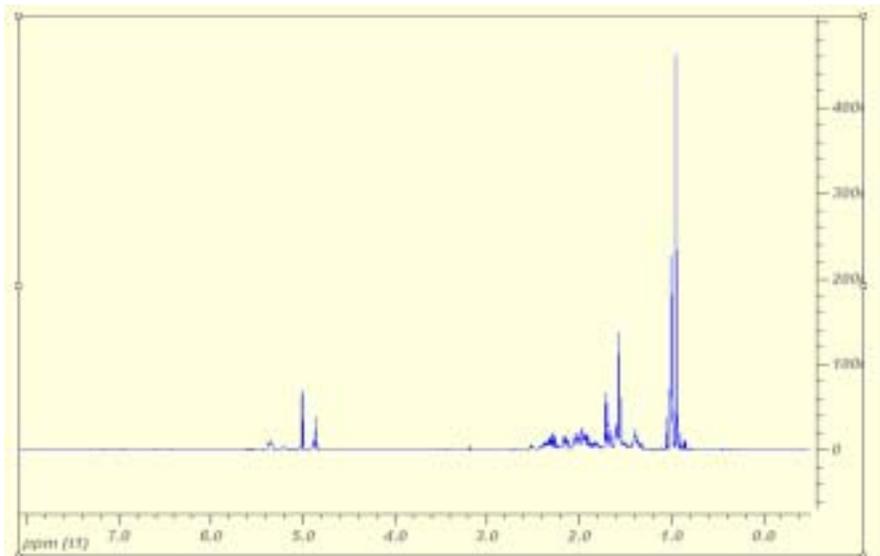


Fig. 72. 1H spectrum of sample C.

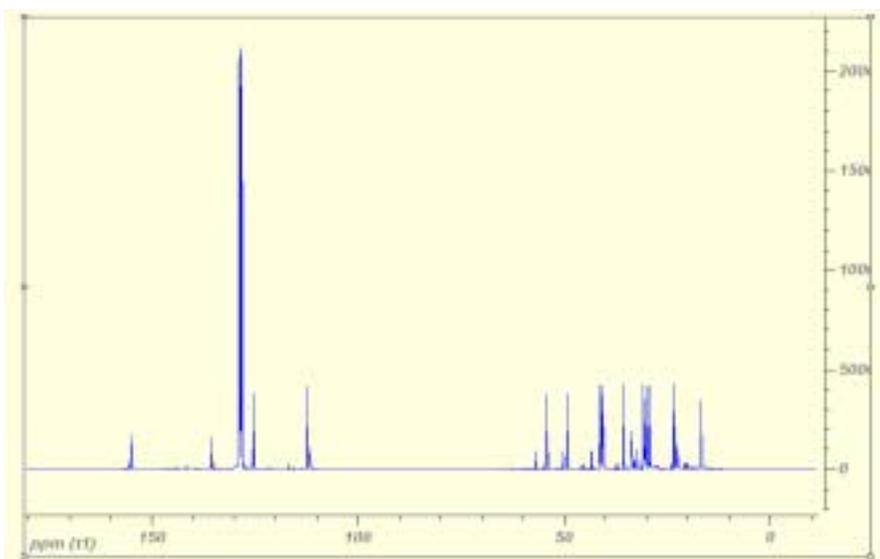


Fig. 73. 13C spectrum of sample C.

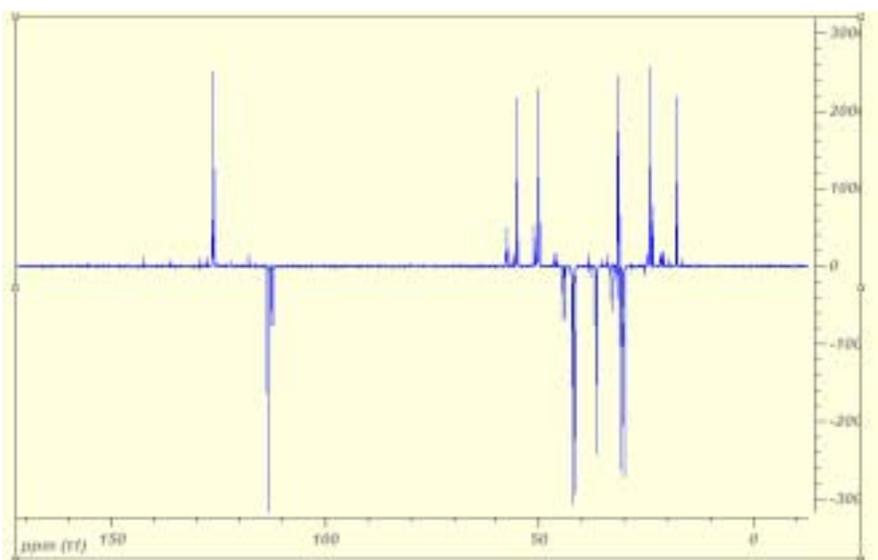


Fig. 74. DEPT spectrum of sample C.

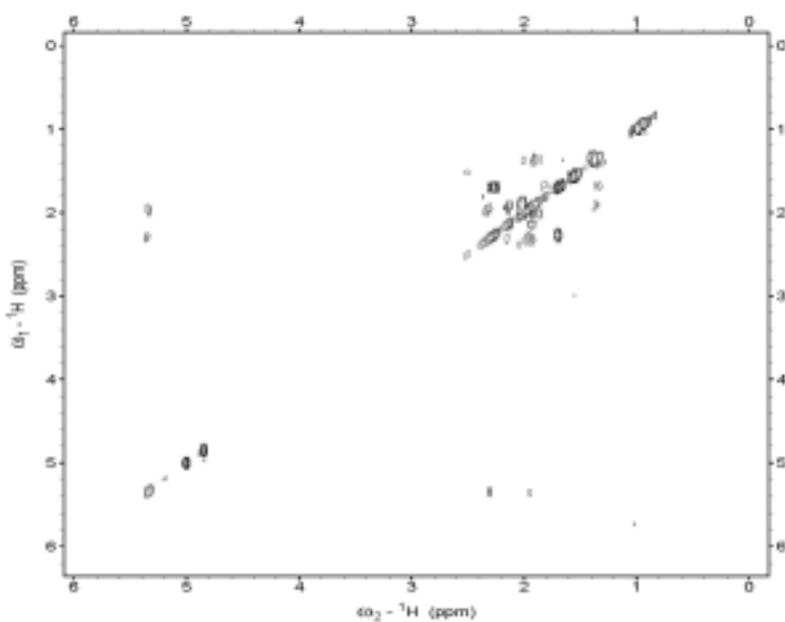


Fig. 75. COSY spectrum of sample C.

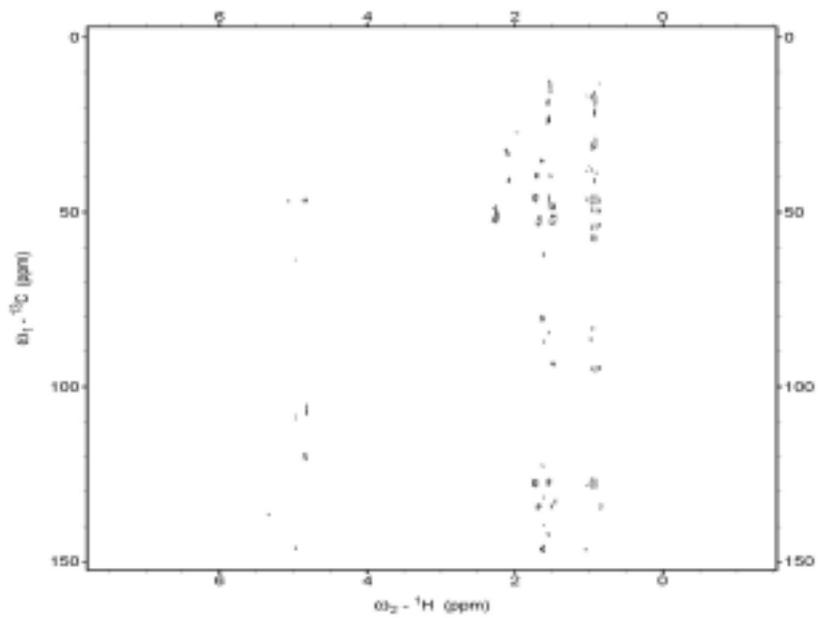


Fig. 76. HMQC spectrum of sample C.

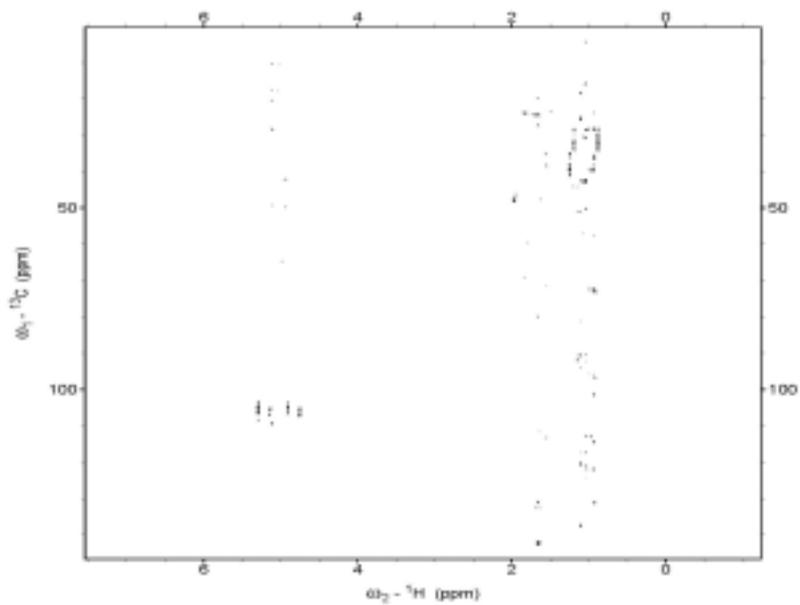


Fig. 77. HMBC spectrum of sample C.

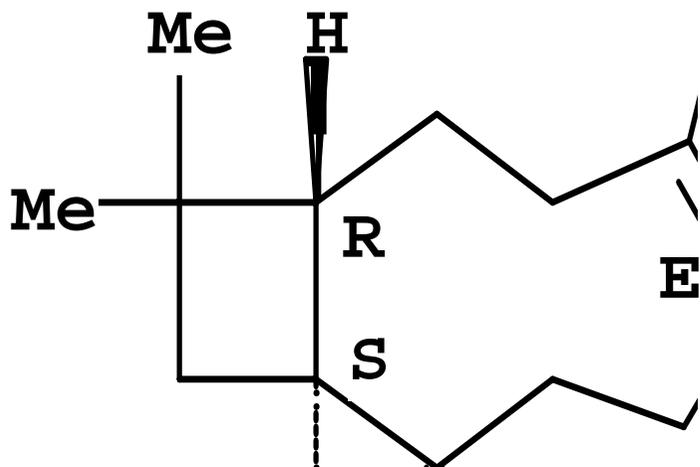


Fig. 78. Structure of sample C.

반면, 시료 D와 E의 경우, 활성물질을 분리하여 MeOH-d₄ 0.5 ml에 녹여서 ¹H NMR 실험을 수행하였으나 Fig. 79 및 80에서 보듯이 극소량의 시료가 분리된 이유로 화합물의 signal이 해석할 정도로 나타나질 않았다. 따라서 시료 D와 E는 좀 더 많은 양을 확보하기 위한 실험을 계속 진행 중에 있다.

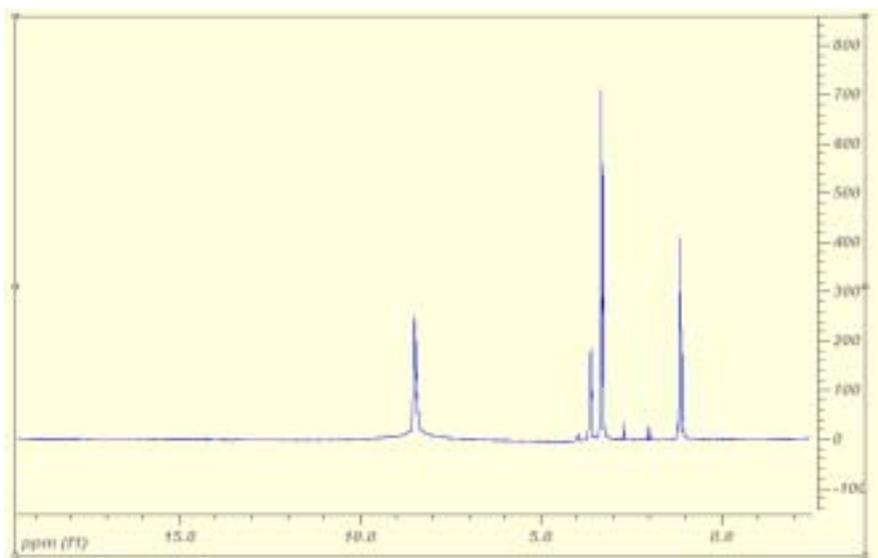


Fig. 79. 1H NMR spectrum of sample D.

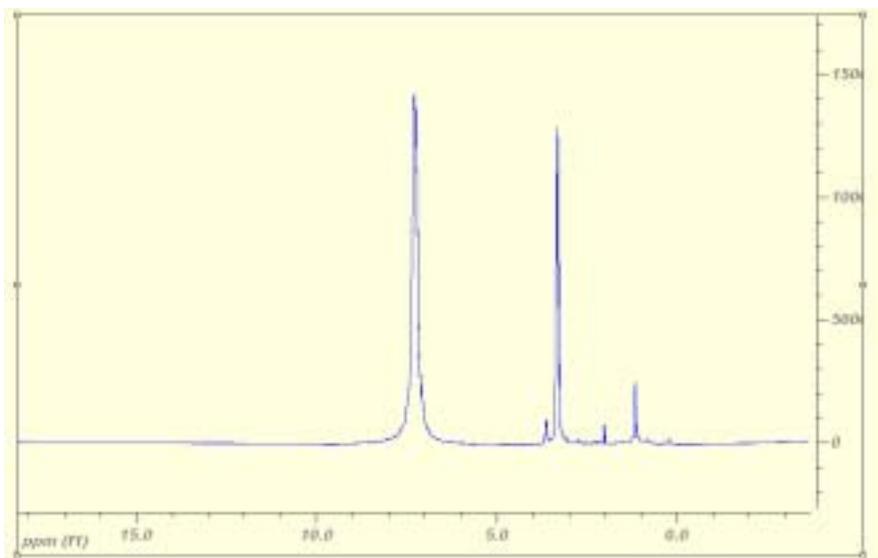


Fig. 80. 1H NMR spectrum of sample E.

4. 기능성식품 응용기술 연구

가. 허혈성 뇌졸중 예방 활성물질 소재화를 위한 기초조사

선별된 추출물의 소재화를 위한 기초 정보를 파악하기 위해 활성 물질의 구조 및 분자적 특성을 다음의 항목들에 대하여 살펴보았다. 즉, 구조적 표현자(constitutional descriptors)로는 분자량(MW)과 분자표면적(MSA); 화학적 표현자로는 옥탄올-물 분배 계수(octanol/water partition coefficient, Clog P); 위상적 표현자(topological descriptors)로는 상대적 전기음성도인 Balaban index; 양자화학적 표현자(quantum chemical descriptors)로는 HOMO와 LUMO이었다. 이와 같은 분자 특성치의 산출은 EILSTEINE, DIPPR, MRCK, HOPOC, HSDB, PhysProp, PreADME(version 1.0, Research Institute of Bioinformatics & Molecular Design), TRCTHERMO 등의 데이터베이스 또는 프로그램을 이용하였다. 그 결과, Table 18과 같이 SAC은 TMBH, TMBU, ADB에 비해 옥탄올-물 분배 계수는 작고 상대적 전기음성도인 Balaban index치가 비교적 높았다.

식물성 추출물을 허혈성 뇌졸중 예방 소재로 이용하기 위해서는 쓴맛이나 이취 등 기호도를 저해하는 요소들을 감소시켜 식품소재로서의 활용도를 높여야 한다. 따라서 선별된 추출물 및 활성성분 시료의 소재화를 위한 디자인 검토 자료로 외관, 색상, 맛, 냄새, pH, 용해도 등을 살펴보았다. 그 결과, Table 19와 같이 SAC 또는 SAC-Ex는 미색 수용성 분말로 다양한 형태의 소재로 제조할 수 있는 장점이 있었지만 불유쾌한 이취가 있는 것으로 조사되었다. 반면, PN, TBMH, TMBU, ADB 등은 향미는 우수하나 액상이며 용해도가 SAC 또는 SAC-EX에 비해 낮아 다양한 식품 matrix에 적용하기 위해서는 추가적인 가공이 필요하다고 판단되었다.

또한 식품소재 원료로서 활성물질의 특성을 살펴보기 위해 활성물질별로 HPLC 또는 GC 분석방법을 확립한 다음 pH stability, storage stability, heat stability 등을 조사하였다. SAC의 pH stability(pH 1-14), storage stability(3개월, 실온), heat stability(0-80°C, 1시간, 24시간)를 조

사한 결과는 Fig. 81-82와 같다. 즉, 조사된 pH 조건에서 SAC은 거의 안정하였고, 60℃에서 24시간 처리하였을 때 약 1%의 함량 감소를 나타낸 것을 제외하고는 조사된 조건에서 비교적 안정한 것으로 나타났다(Fig. 81). 뿐만 아니라 SAC을 약 12 동안 저장하면서 안정성을 살펴본 결과에서도 안정성이 높은 것으로 관찰되었다(Fig. 82).

방향성 식물 추출물로부터 확인된 활성성분인 TMBU와 TMBH를 100℃에서 1분, 5분, 10분, 20분, 30분, 60분 동안 가열한 다음 열안정성을 살펴본 것은 Fig. 83과 같다. 그 결과, TMBH는 1시간 가열한 후 시험용액의 93.3%로 유지되어 높은 열안정성이 보였다. 한편, TMBU는 30분까지는 81.2%로 유지되었으나 1시간 가열에서는 67%까지 감소하여 가공처리시 가열시간은 30분 이하로 설정하는 것이 바람직하다고 사료된다.

또한 TMBH와 TMBU를 vial에 분주하여 5℃, 25℃, 45℃에서 1주, 2주, 3주, 4주 동안 저장한 다음 저장안정성을 살펴본 것은 Fig. 84 및 85와 같다. 그 결과, TMBH는 3주까지 온도에 따라서 약간의 차이는 있으나 O time 시험용액(4.4mM)의 90%로 유지되었다. 그러나 4주에서는 80%로 다소 감소하였고 5℃에서의 안전성이 다른 저장온도에서 보다 안정성이 높았다. TMBU의 경우, 45℃에서는 4주 동안 85%이상의 수준으로 유지되고 있었으나 25℃에서는 1주부터 64.8%로 감소하였고 4주째에는 47%까지 감소하여 실온에서 1주 이상의 보관은 어려울 것으로 사료된다.

한편, 식물성 추출물 또는 그 활성물질을 허혈성 뇌졸중 예방 소재로 이용하기 위해서는 인체 섭취시 안전성이 우선되어야 한다. 따라서 SD랫드를 이용하여 시험물질을 경구로 단회 투여시 나타나는 독성을 평가하고 개략의 치사량을 구하기 위하여 SAC과 PN을 0(대조군) 및 2,000 mg/kg의 용량으로 암·수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 하였다. 그런 다음, 투여 후 14일 동안의 일반증상, 사망률 및 체중변화와 부검시 간, 뇌, 신장, 비장, 자궁, 폐, 췌장, 피부, 비장, 위 등의 육안적 소견을 관찰하였다. 그 결과, 관찰기간동안 암·수 대조군과 시험물질 투여군에서 투여에 기인한 체중변화 및 사망률은 관찰되지 않았다(Fig. 86 및 Table 20 및 21). 그러나 SAC

의 경우 PN과는 달리 투여 당일 4시간 및 8시간째 암·수 일부개체에서 점액변(mucous stool) 및 연변(soft feces)이 관찰된 후 투여 후 1일째 회복되었다. 투여 후 8시간째 암·수 시험물질 투여군에서 생기저하(inanimation)가 관찰되었고, 투여 후 3일째 체중증가 억제경향이 관찰되었으나, 7일째 회복되어 정상적인 증가가 관찰되었다(Table 22 및 23). 또한 부검한 결과에서 특기할만한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로, SAC과 PN의 치사량은 암·수 각각 2,000 mg/kg 이상으로 판단된다.

Table 18. Molecular descriptors generated for four volatile compounds

Compounds	Structural		Physicochemical	Topological	Quantum Chemical	
	MW	MSA ^a	Log P ^b	Balaban Index ^c	HOMO ^d	LUMO ^e
SAC	161.24	182.55	0.142	3.130	-8.834	0.363
ADB	178.25	217.58	2.586	2.135	-8.670	0.377
TMBU	204.39	222.97	4.319	1.769	-9.076	1.224
TMBH	152.26	180.84	1.954	2.052	-9.452	0.914

^a Molecular surface area

^b Octanol/water partition coefficient

^c The relative electronegativity

^d Energy of highest occupied molecular orbital in atomic units

^e Energy of lowest unoccupied molecular orbital in atomic units

Table 19. Basic parameters for materialization

Parameters	Sample					
	SAC-Ex	SAC	PN	TMBH	TMBU	ADB
Extraction yield(mg%)	100	2	50	3	10	7
Standardized component	allyl sulfide	-	borneol	-	-	-
Solubility	hydrophilic	hydrophilic	hydrophobic	hydrophobic	hydrophobic	hydrophobic
Organoleptic, appearance	yellowish powder	yellowish powder	yellowish liquid	yellowish liquid	yellowish liquid	yellowish liquid
aroma	+++	++	+++	++	++	+
flavor	+++	++	+++	+++	+++	+
pH	5.5-6.5	4.5-5.5	4.0-4.6	~6.5	~6.5	~6.5
Moisture content	0.1-1.0%	0.1-1.0%	0.1% 이하	0.5% 이하	0.5% 이하	0.5% 이하

+++ : Moderately high

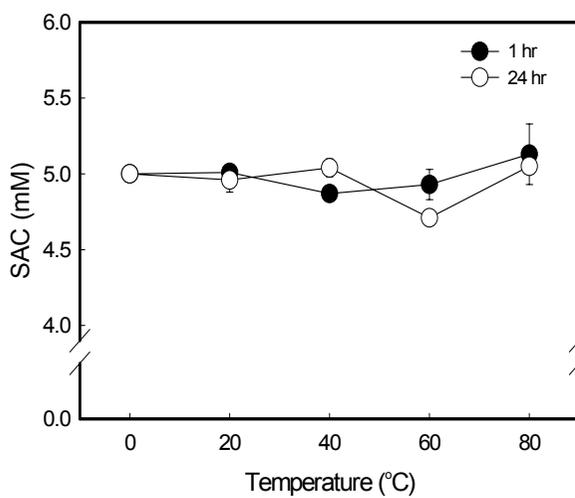
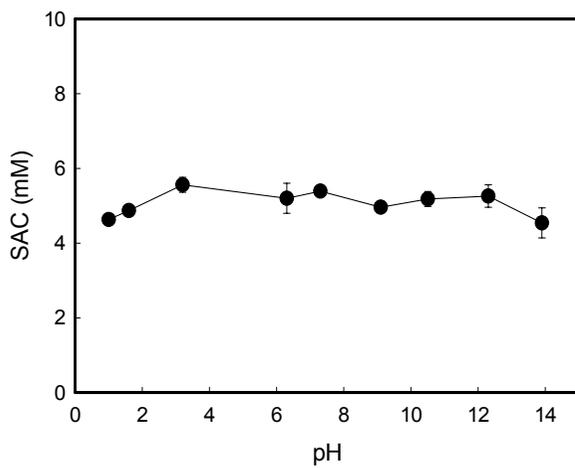


Fig. 81. Stability of SAC at different pHs(top) and temperatures(bottom).

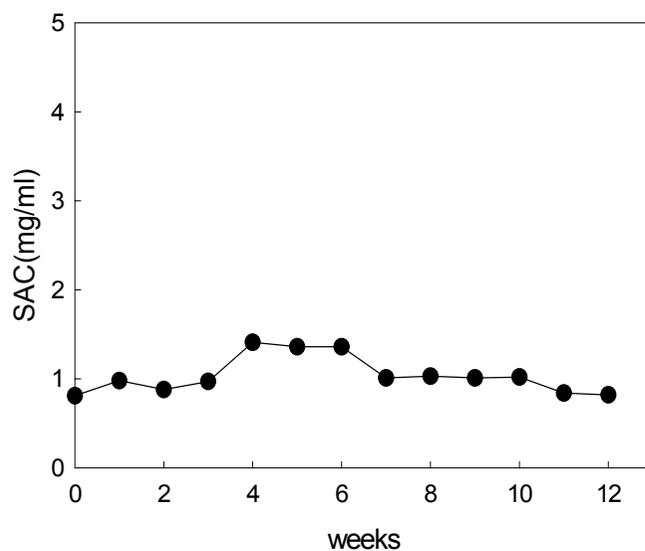


Fig. 82. Stability of SAC during storage at 25°C for 12 weeks.

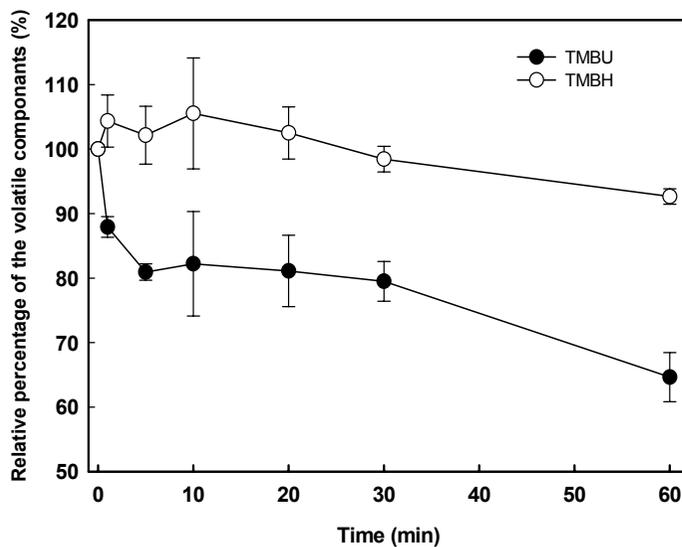


Fig. 83. Heat stability of TMBH and TMBU during heating at 100°C for 60 hours.

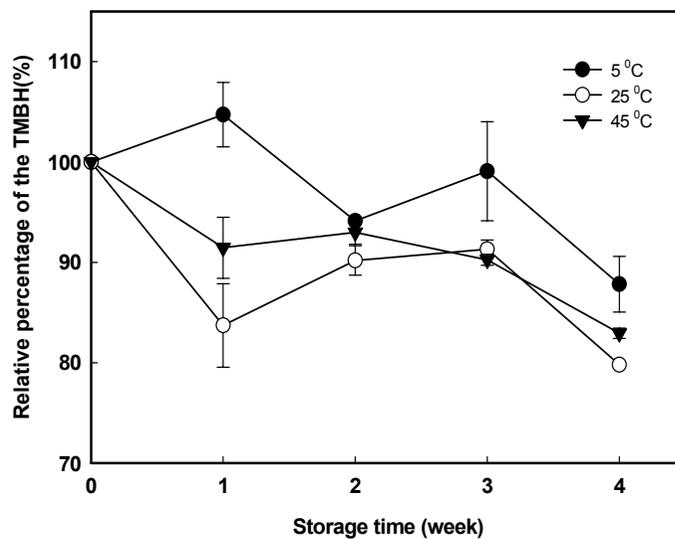


Fig. 84. Stability of TMBH during storage at 5, 25 and 45°C for 4 weeks.

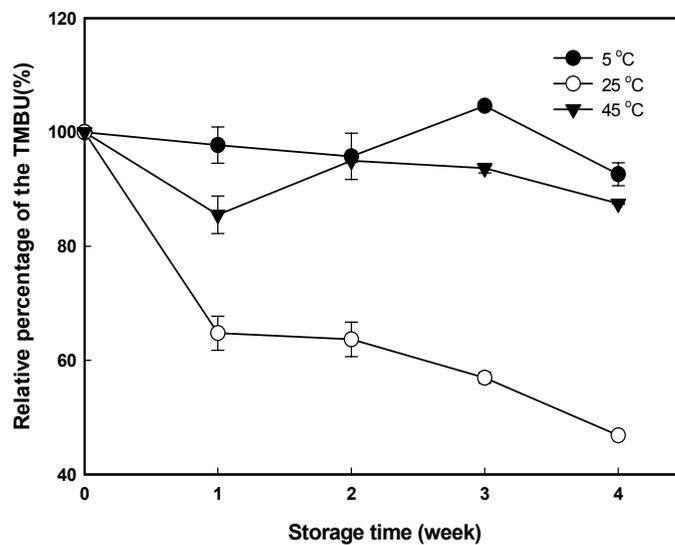


Fig. 85. Stability of TMBU during storage at 5, 25 and 45°C for 4 weeks.

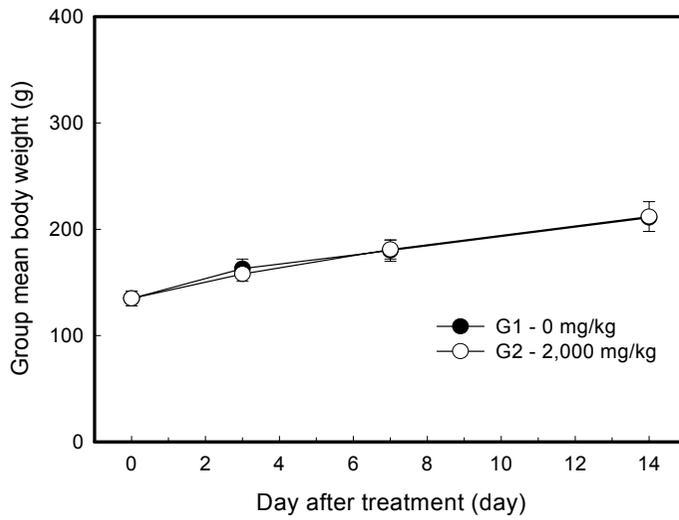
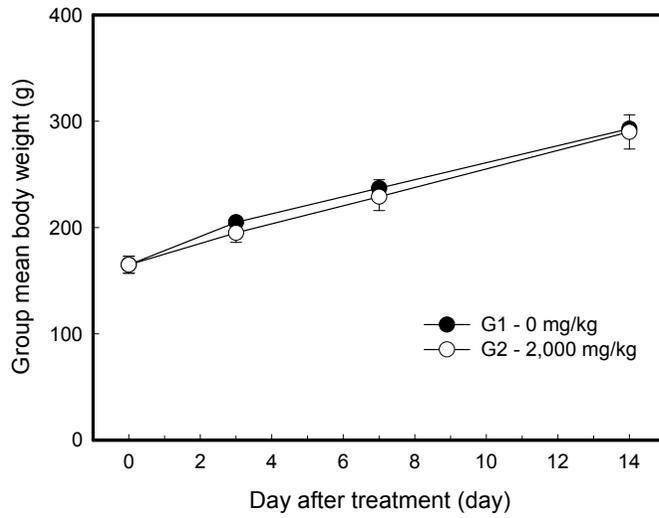


Fig. 86. Mean body weights of male(top) and female(bottom) SD rats during 14 days.

Table 20. Mortality in single oral dose of SAC toxicity study(group summary)

Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of examined animals	Day after treatment														Mortality (dead/total)			
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14		
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)

Table 21. Mortality in single oral dose of PN toxicity study(group summary)

Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of examined animals	Day after treatment														Mortality (dead/total)			
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14		
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)

Table 22. Clinical signs in single oral dose of SAC toxicity study(group summary)

Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of animals	Signs	Hour(Day 0) after treatment													
				0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Male	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	-	-	-	5	-	-	-	-	-
	G2 2,000	5	NAD Mucous stool Inanimation	5	5	5	5	4 1	-	-	-	0 2 5	-	-	-	-	-
Female	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	-	-	-	5	-	-	-	-	-
	G2 2,000	5	NAD Soft feces Inanimation	5	5	5	5	5	-	-	-	0 3 5	-	-	-	-	-
Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of animals	Signs	Day after treatment													
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Male	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	5	NAD Mucous stool Inanimation	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	5	NAD Soft feces Inanimation	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NAD : No Abnormalities Detected

Table 23. Clinical signs in single oral dose of PN toxicity study(group summary)

Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of animals	Signs	Hour(Day 0) after treatment													
				0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Male	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	-	-	-	5	-	-	-	-	-
	G2 2,000	5	NAD Shivering Abnormal gait	2 2 1	2 2 1	5	5	5	-	-	-	5	-	-	-	-	-
Female	G1 0	5	NAD Mucous stool	5	3 2	5	5	4 1	-	-	-	5	-	-	-	-	-
	G2 2,000	5	NAD	5	5	5	5	5	-	-	-	5	-	-	-	-	-
Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of animals	Signs	Day after treatment													
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Male	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NAD : No Abnormalities Detected

나. 허혈성 뇌졸중 예방 기능성 식품화를 위한 응용기술 연구

식물성 추출물을 허혈성 뇌졸중 예방 소재로 이용하기 위해서는 쓴맛이나 이취 등 기호도를 저해하는 요소들을 감소시켜 식품소재로서의 활용도를 높여야 한다. 따라서 선별된 후보추출물 또는 비교적 순도가 높은 활성물질의 효능, 추출수율과 이화학적 특성을 고려하여 배합조성과 디자인을 선정하고자 하였다.

선행 기초조사에서 SAC 또는 SAC-Ex는 미색 수용성 분말로 다양한 형태의 소재로 제조할 수 있는 장점이 있었지만 불유쾌한 이취가 있었기 때문에 액상의 음료나 타블렛의 형태로 응용하기는 어려울 것으로 판단되었다. 따라서 SAC 또는 SAC-Ex는 캡셀 형태의 건강기능식품으로 제조하는 것이 바람직 할 것으로 보였다. 캡셀의 역사는 프랑스인 Mothes와 Dublance)가 젤라틴 캡셀을 발명하여 현재까지 이용되고 있다. 우리나라에서 캡셀류의 정의는 『건강보조식품, 특수영양식품 및 인삼·홍삼제품을 장기 보존할 목적으로 충전하여 그대로 식용할 수 있도록 하는 것을 말한다』로 되어 있다. 캡셀제는 캡셀의 정도에 따라 부드러운 젤라틴막으로 성형한 연질 캡셀제가 있으며, SAC 또는 SAC-Ex의 경우 캡셀에 충전이 용이하며 원가면에서 유리한 경질 캡셀을 사용하는 것이 장점이 있을 것으로 보였다. 이때 캡셀 크기는 겉보기 밀도(bulk density)와 tap density, 충전물의 압축성, 점착성, 퍼짐성 및 Disc 유입성 등을 평가하여 결정하였다. 캡셀 크기는 4호, 3호, 2호, 1호, 0호, 00호가 있는데 SAC 또는 SAC-Ex의 경우 압축성과 Disc 유입성을 고려하고 최종 제품의, 삼킴성을 고려해 0호가 적당하였다(Fig. 87).

방향성 식물 추출물 PN 또는 추출물로부터 분리된 활성물질인 TMBH, TMBU 및 ADB은 선행 기초조사에서 향미가 우수하며, 액상의 형태를 띠고 있기 때문 음료 형태의 건강기능식품으로 응용하는 것이 바람직 할 것으로 보였다. 본 연구에서는 이들 추출물 또는 활성성분을 응용하여 음료 형태의 건강기능식품을 제조할 경우, 설탕 5 내지 10 중량%, 구연산 0.05 내지 0.3 중량, 카라멜 0.005 내지 0.02 중량%, 소르비탄 모노스테

아래이트 0.1% 중량, 비타민 C 0.1 내지 1 중량%의 첨가물을 혼합하고 여기에 79 내지 94 중량%의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 약 90℃에서 약 100초간 살균하여 냉각수와 1:4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5 내지 0.82 중량%를 주입하는배합비가 비교적 관능 품질면에서는 바람직한 것으로 조사되었다. 여기에 TMBH, TMBU 및 ADB 10 - 20g을 탄산가스와 혼합된 시럽과 혼합하여 탄산음료를 제조하는 것을 prototype으로 선정하였다.

또는 방향성 식물 추출물 PN 또는 추출물로부터 분리된 활성물질인 TMBH, TMBU 및 ADB의 경우, 캡셀제로도 응용이 가능한데 유동성이 있는 액상이기 때문에 경질캡셀보다 부드러운 젤라틴막으로 성형한 연질 캡셀제가 적당할 것으로 보였다. 활성성분과 함께 배합하는 부형제로는 활성에 영향을 주지 않고 원가면에서 유리하여 널리 사용되고 있는 대두유로 하는 것이 적당하다고 판단되었다.



Fig. 87. Tentative shape of SAC.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구의 최종목표는 국내산 방향식물로부터 허혈성 뇌졸중을 예방할 수 있는 선도 소재를 발굴하고 기능성 식품화를 위한 응용 기술을 개발하는 것이다. 이를 위하여 1차 년도에는 허혈성 뇌손상 예방을 위한 식품선도물질을 발굴하기 위해 기존의 보고에서 가능성이 높을 것이라고 예상되는 원료 21종을 수집한 다음 추출물을 제조하여, 산소와 포도당 결핍 상태(hypoxia 및 hypoglycaemia)와 회복시킨 조건(simulated reperfusion)을 결합시킨 시험관내 유사 허혈(*in vitro* simulated ischemia) 모델을 이용하여 뇌신경세포 보호효과를 측정하고 추출물을 선별하였다. 또한 선별된 추출물 및 성분에 대하여 뇌허혈 동물모델을 이용한 실험을 실시하여 허혈성 뇌손상 예방 가능성을 파악하였다. 2차 년도에는 1차 년도에 이어 전뇌 및 국소허혈모델을 이용하여 도출한 소재의 효과를 조사하였으며, 활성이 나타난 성분에 대해서 NMDA receptor 차단 효과, 산화적 스트레스의 제거 효과, glial cell 활성화에 대한 차단 효과, cell cycle progression의 차단 등을 포함한 작용 기전을 연구하였다. 3차 년도에는 활성물질을 분리하여 구조를 분석하고 동정하였으며, 전뇌 및 국소허혈동물 모델뿐만 아니라 뇌졸중 발증성향 동물모델을 이용하여 효과를 확인하는 동시에 식이보충 효과를 살펴보고 건강기능식품화를 위해 제품 디자인 및 독성의 검토, pH, heat, storage 안전성 등 응용기술을 조사하였다. 따라서 본 연구에서 계획한 목표는 100%를 달성하였다고 사료된다.

이상의 결과로부터 국내 방향성 식물자원으로부터 허혈성 뇌손상을 예방할 수 있는 건강기능성 선도물질 또는 후보 추출물이 적어도 2종 이상 도출되고, health-claim을 하기 위한 기초 자료가 확보된 것으로 보인다. 기술적으로는 허혈성 뇌손상 예방 관련 실험모델, 각종 assay법, 기능성 소재의 구명, 체내활성 발현 기작 등 기반기술이 축적되게 하는데 기여하였다. 특히 노령화되는 사회에서 허혈성 뇌졸중 관련 건강기능식품 시장은

계속 성장할 것으로 예측되고 있어 효과에 대해 health-claim을 인정받을 수 있는 건강기능성식품을 개발하는 것은 국내 건강기능식품 시장을 활성화하고 건전성을 부여하며 나아가 삶의 질 향상에 기여할 것으로 전망된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구개발결과의 활용계획은 다음과 같다.

1. 본 연구에서 얻어진 연구결과의 일부는 이미 SCI 등재 학회지에 논문게재 및 투고되었으며, 미발표 결과에 대해서 향후 계속적으로 발표함으로써 보다 강도 높은 health-claim을 할 수 있는 근거로 활용할 계획이다.
2. 활성이 인정된 시료 중에서 1개에 대해서는 특허 출원하였으며, 나머지 개발된 소재 및 기술에 대해서도 특허 출원하여 계속적으로 산업재산권을 확보해 나갈 예정이다.
3. 건강기능식품법률이 실시됨에 따라 본 연구에서 축적된 허혈성 뇌졸중 관련 기능성 평가방법은 향후 예상되는 기능성 평가 수요에 능동적으로 대응할 수 있는 기반기술로 활용할 것이다.
4. 본 연구에서 확보된 연구결과를 활용하여 추가적으로 요구되는 미분리 물질의 분리 및 동정, 분자수준의 작용 메카니즘 연구, 활성물질의 대사 및 생체이용성, 인체에서의 효과, 활성물질의 경제적 생산방법 등에 관한 후속 연구를 수행할 계획이다.
5. 본 연구결과, 실용화할 수 있는 소재 및 기술에 대해서는 산업계에 기술이전을 추진하여 실용화를 유도할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

1. 건강증진을 위한 기능성식품에 관한 정보

2003년 4월 11일(금)부터 15일(화)까지 미국 California주 San Diego시에서는 미국실험생물연합학회(Federation of American Societies for Experimental Biology, FASEB) 2003년도 연례 학술대회가 개최되었다. FASEB은 전 세계적으로 규모가 크고 전통이 깊은 학회로 미국 해부학회(AAA), 미국 생리학회(APS), 미국 생화학 및 분자생물학회(ASBMB), 미국 조사병리학회(ASIP), 미국 영양과학회(ASNS), 미국 약리 및 실험 치료학회(ASPET)가 공동으로 개최되며, 2003년에는 세계 약 50여 개국으로부터 수 만 명이 참석하여 학술정보를 교환하고 필요한 자료들을 수집하였다. 본 연구과제와 관련하여 FASEB meeting에 참석하여 1편의 논문을 발표하고 향후 연구에 필요한 자료들을 수집하였다.

대부분 발표에서 건강기능식품 또는 소재가 만성퇴행성질환 실험 모델이나 세포 수준에서 여러 가지 유익한 효과를 나타낸다는 증거들이 제시되었다. 새로운 소재 보다 기존 알려진 소재의 효능에 대해 좀더 잘 정립된 실험모델(transgenic 동물 및 세포 모델 등)을 이용한 결과나 신호전달계까지 고려한 작용 메카니즘을 연구한 결과들이 소개되었다. 이 중 기능성 지질 소재 및 플라보노이드에 대한 대표적인 몇 가지 결과를 소개하면 다음과 같다.

가. Effects of Conjugated Linoleic Acids in Decreasing the Production of Inflammatory Mediators by Human Osteoarthritic Chondrocytes(Shen, C.L. et. al. Pathology, Texas Tech Univ. Health Sciences Center)

노인들에게 가장 흔하게 발생하는 퇴행성 관절 질환인 골관절염 (osteoarthritis, OA)에 대한 CLA의 효과를 연구한 결과가 소개되었다. 특히 이 연구에서는 다양한 다중불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)이 인체 골관절 연골세포(human osteoarthritic chondrocytes, OC)의 형태, 지방산의 조성, prostaglandin E2(PGE2)와 반응성 질소종(NO)과 같은 염증성 매개물질의 생성에 미치는 영향에 대해 연구한 결과가 제시되었다. OC 세포에 PUFA 종류별로 6일동안 10 μ M 농도로 처리한 (conjugated linoleic acid(CLA). CLA/arachidonic acid(CLA/AA), CLA/eicosapentaenoic acid(EPA), linoleic acid(LA), LA/AA, LA/EPA) 결과, PUFA의 처리는 세포의 형태에는 아무런 변화를 주지 않았다. 그러나 지방산 조성 분석결과에서는 CLA를 처리한 세포(CLA, CLA/AA, CLA/EPA group)가 LA를 처리한 세포(LA, LA/AA, LA/EPA) 보다 OC 세포막의 CLA의 농도가 높았다. 또한 OC cell에 CLA 처리는 LA 처리와 비교할 때 염증성 매개물질의 생성이 감소되는 것으로 나타났는데, 이 중 LA/AA 처리군의 경우, PGE2 생성은 가장 높았으나 NO 생성은 가장 낮게 나타났다. 즉, 이 연구에서는 OC 세포에 CLA를 보충하면 세포막의 지방산 조성의 변화를 통해 반응성 매개물질의 생성이 변화될 수 있으며, 이러한 변화들로 인해 CLA가 골관절염에 효과를 나타낼 수 있다는 가능성이 제시되었다.

나. Dietary fish oil enhances targeted apoptosis response to dextran sodium sulfate(DSS)-induced DNA damage in the top part of the colonic crypt(Hong, M.Y. et. al. Faculty of Nutr., Texas A&M Univ.)

생선기름이 DNA가 손상된 대장세포에 대해 targeted apoptosis를 증가시킴으로써 DNA adducts의 alkylating을 감소시킨다는 결과가 Texas A&M 대학 연구팀에 의해 소개되었다. 특히 생선기름이 oxidative DNA 손상에서 apoptosis를 증가시킬 것인지에 대해 조사되었다. 실험방법은 60

마리의 SD rat을 두개의 식이그룹으로 나누어서 옥수수유와 생선기름을 제공하고 oxidative DNA damage를 유도하는 물질(DSS)을 처리한 다음 oxidative DNA damage(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG), proliferation (ki-67 kit), apoptosis(TUNEL assay)정도를 측정하였다. 그 결과, control과 비교하였을 때 DSS를 처리한 쥐 대장 crypt의 top 부위에서 8-OHdG(p=0.001) 함량과 apoptosis(P=0.046) 정도가 모두 유의적으로 높았고 cell수/crypt수의 비율도 유의적으로 증가하였다(p=0.006). 이에 대해 생선기름의 투여는 옥수수유에 비해 DSS 처리 후 crypt의 top 부위에서 8-OHdG(p=0.038) 함량과 proliferative zone(p=0.043) 크기를 감소시킨 반면, apoptosis(P=0.036)는 증가시켰다. 또한 생선기름 투여군에서는 DNA damage가 증가함에 따라 apoptosis 자극도 증가되는 것으로 나타났으나 옥수수유 투여군에서는 영향이 없는 것으로 보아, 생선 기름은 산화적 DNA 손상이 야기된 대장세포에 대해 apoptosis를 유도하는 것으로 추론하였다. 일반적으로 polyps와 종양은 DNA 손상으로부터 시작되어 생성 및 발달이 되기 때문에 대장암세포에서 관찰된 생선기름의 효과는 적어도 생선기름에 의한 대장암 예방 효과를 설명할 수 있는 작용기전의 한가지로 볼 수 있을 것으로 생각된다.

다. The Chemopreventive Action of Quercetin Decreases the Number of High Multiplicity Abberant Crypt Foci(ACF), Reduces Proliferation, and Increase apoptosis in Rat Colonocytes(Warren, C.A., et. al. Faculty of Nutr., Texas A&M Univ.)

본 발표는 과일과 야채에 매우 흔하게 함유되어 있는 플라보노이드인 quercetin의 대장암 발병 감소 메커니즘을 살펴본 연구결과를 소개한 것이다. 즉, 선행연구에서 암으로 인한 사망률 중 미국에서 두 번째를 차지하는 대장암에 대해 quercetin은 high multiplicity ACF를 감소시키는 (ACF>4, P=0.0246) 것으로 나타났는데, 이에 대한 메커니즘을 살펴보기

위한 연구로 Texas A&M 연구팀에 의해 수행되었다. 이를 위해 2×2 factorial design을 사용하여, 40마리의 수컷 SD rats에 0 또는 0.45% quercetin을 포함한 식이를 주고 saline 또는 AOM(대장암 발암물질)을 주입하였다. 쥐들에게 AOM 처리전 3주간 식이를 제공하고 AOM 처리후에도 4주간 식이를 제공한 다음, 대장을 떼어내고 길이를 반으로 잘라 나눈 후 앞부위와 끝부위의 1cm는 고정시켜 세포증식(PCNA)과 apoptosis (TUNEL)에 대한 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis)를 실시하였다. 그 결과, quercetin의 투여는 증식하는 세포의 수(proliferating cells)를 감소시켰고(p=0.0378) 세포증식 부위(proliferative zone)도 감소시켰다(p=0.0006). Apoptotic index 또한 quercetin+AOM 군에서 증가되었다(p=0.0142). 이러한 결과들로부터 quercetin을 섭취한 쥐들에서 high multiplicity의 감소는 세포증식과 세포자가소멸에 관여하는 signaling pathway에 대한 영향 때문인 것으로 결론을 내렸다.

라. Soy isoflavones reduce colon tumor incidence in wild-type and ER α KO mice(MacDonald, R.S., et. al. Food Science and Nutritional science, U of Missouri)

여성들이 호르몬 대체요법을 사용함으로써 대장암의 발병이 줄어들고 있다는 결과들이 보고되고 있으며, 호르몬 대체요법의 하나로 에스트로젠과 유사한 활성을 보이는 isoflavones을 함유하고 있는 대두를 많이 섭취하고 있다. 따라서 estrogen이 대장암에 대해서 보호작용을 하는지의 여부를 살펴보기 위하여 에스트로젠 수용체(ER- α)를 knock-out(KO)시킨 동물모델을 이용하여 살펴 본 결과가 소개되었다. 미조리 대학 연구팀은 발암물질로 대장암을 유발한 wild-type(WT)과 ER α KO mice에 genistein 또는 다른 isoflavones mixture(NovaSoy,NS)가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해, 대조군으로 casein, isoflavones을 제거한 대두 단백질(Soy-IF), 250mg genistein(Soy+Gen), 또는 NovaSoy(equivalent to 250 mg

genistein, Soy+NS)를 각각 포함하는 weaning AIN93G 식이를 준 다음, 7 주 후에 난소절제를 실시하고 6주동안 매주 AOM을 주입(ip)하여 대장암을 유발하였다. 그 결과, soy diet으로 대장의 tumor incidence나 multiplicity가 감소되었지만 대장암 유발에서는 ER α KO mice와 wild type mice 간 차이가 없었으므로 soy isoflavones의 대장암에 대한 보호효과는 ER α -independent mechanism일 것이라고 발표하였다.

2. Nutrigenetics 및 Nutrigenomics 분야

대부분의 발표에서 기능성 식품 또는 소재 관련 연구나 식품영양학 관련 연구가 기존 연구의 틀에서부터 Nutrigenetics 및 Nutrigenomics 분야로 전환되어야 한다는 것이 강조되었으며, 관련 연구 결과들이 소개되었다. 그러나 대부분의 연구들은 영양소 또는 기능성 성분과 유전자와의 관련성을 DNA array method를 이용하여 유전자 변화를 살펴보는데 그치고 있어, 향후에는 이러한 유전자들의 변화와 phenotype과의 관련성을 살펴보는 일련의 연구가 필요할 것으로 생각되었다. 특히 현재 대부분의 Nutrigenetics 및 Nutrigenomics 분야 연구는 식품영양학, 유전체학, 생화학 등 다학제간 연구의 형태로 이루어지고 있었으며, Gene trapping 기술, ES cell line 공급, 유전자 KO 동물 등을 상호 공급함으로써 연구의 효율성을 높이고 있었다. 캘리포니아 대학의 German 박사는 인간에게 있어서 약 30%의 loci는 polymorphic variant를 가지고 있을 뿐만 아니라 SNP를 나타내고 있어서 유전자 variation이 발생하는데, 유전적으로 결정되는 인간의 다양성(variability)은 혈중 콜레스테롤의 경우 50%, 혈압 30-60%, 피브리노젠 15-50%, 골강도는 75%라고 발표하였다. 이에 대해 식이 성분은 다양한 영향을 끼칠 수 있어 Nutrigenetics 연구와 더불어 Nutrimetabolomics 관련연구를 수행함으로써 식이성분과 질병과의 관계 나아가 새로운 식품을 설계하는 것이 가능하다고 하였다. Proteomics 관련 연구로 기 잘 알려진 플라보노이드인 Quercetin이 대장암 세포의 단백질 발현에 어떠한 영향을 주는지 발표한 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. Quercetin and Protein Expression in Human Colon Carcinoma SW480 Cells(Mouat, M. et. al. Foods and Nutrition, U of Georgia)

Quercetin은 양파, 사과, 차, 적포도주 등에 가장 풍부하게 들어있는 식물성 플라보노이드로서 항산화활성과 항세포증식(anti-proliferative) 활성을 나타낸다. 이 연구에서는 Proteomics 기술을 이용하여 인체 유래 대장암 SW480 세포배양계에서 quercetin이 어떠한 단백질의 발현에 영향을 주는지를 살펴봄으로써 quercetin의 cellular 효과와 생화학적 효과에 관여하는 target protein을 밝혀보고자 하였다. 20 μ M quercetin을 첨가하여 24시간동안 세포를 배양한 다음, 세포로부터 단백질을 추출하고 2-dimensional 전기영동을 실행한 결과 12개의 단백질이 대조군과 비교할 때 다르게 발현되었다. 이중 7개의 단백질 발현은 감소하였고 5개는 증가하였다. Quercetin 처리로 변화된 발현의 강도를 정량하고, apparent isoelectric point와 분자량에 근거하여 이러한 단백질들의 possible identity를 분석한 결과, GST와 같은 해독화 효소 단백질과 항산화 관련 단백질 발현이 증가하였다.

제 7 장 참고문헌

ABDULLAH, T.H., KIRKPATRICK, D.V., and CARTER, J. (1989) Enhancement of natural killer cell activity in AIDS with garlic. *J. Oncol.* 21, 52-53.

ABE, K., YUKI, S., and KOGURE, K. (1988) Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke* 19, 480-485.

ALESSANDRINI, A., NAMURA, S., MOSKOWITZ, M.A., and BONVENTRE, J.V. (1999) MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 96, 12866-12869.

ALI, M., AL-QATTAN, K.K., AL-ENEZI, F., KHANAFER, R.M., and MUSTAFA, T. (2000) Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 62, 253-259.

AMAGASE, H., and MILNER, J.A. (1993) Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-DMBA binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis* 14, 1627-1631.

AMAGASE, H., PETESCH, B.L., MATSUURA, H., KASUGA, S., and ITAKURA, Y. (2001) Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 131, 955S-962S.

ASAKAWA, Y., TAIRA, Z., TAKEMOTO, T., ISHIDA, T., KIDO, M., and ICHIKAWA, Y. (1981) X-ray crystal structure analysis of 14-hydroxycaryophyllene oxide, a new metabolite of (-)-caryophyllene, in rabbits. *J Pharm Sci.* 70, 710-1.

AUST, S.D. (1985) In: *CRC Handbook Methods for Oxygen Radical Research* (Packer, L., ed.), pp. 203. CRC Press, Boca Raton, Florida.

BECKMAN, J.S., and KOPPENOL, W.H. (1996) Nitric oxide superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad and ugly. *Am. J. Physiol.* 71, C1424-C1437.

BELAYEV, L., ALONSO, O.F., BUSTO, R., ZHAO, W., and

GINSBERG, M.D. (1996) Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 27, 1616-1622.

BLOCK, E. (1985) The chemistry of garlic and onion. *Sci. Am.* 252, 114-119.

BOREK, C. (2001) Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J. Nutr.* 131, 1010S-1015S.

BUDOFF, M.J., TAKASU, J., FLORES, F.R., NIIHARA, Y., LU, B., LAU, B.H., ROSEN, R.T., and AMAGASE, H. (2004) Inhibiting progression of coronary calcification using Aged Garlic Extract in patients receiving statin therapy: a preliminary study. *Prev. Med.* 39, 985-981.

CARNEY, J.M, and FLOYD, R.A. (1991) Protection against oxidative damage to CNS by α -phenyl-*tert*-butyl nitron (PBN) and other spin-trapping agents: a novel series of nonlipid free radical scavengers. *J. Mol. Neurosci.* 3, 47-57.

CHOI, D.W., and ROTHMAN, S.M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 171-182.

CHOI, I.Y., LEE, S.J., JU, C., NAM, W., KIM, H.C., KO, K.H., and KIM, W.K. (2000) Protection by a manganese porphyrin of endogenous peroxynitrite-induced death of glial cells via inhibition of mitochondrial transmembrane potential decrease. *Glia* 31, 155-164.

CHOI, J., and KIM, W.K. (1998a) Potentiated glucose-deprivation-induced death of astrocytes after induction of iNOS. *J. Neurosci. Res.* 54, 870-875.

CHOI, J., and KIM, W.K. (1998b) Proliferation-dependent vulnerability of glucose-deprived astrocytes to nitric oxide-induced cytotoxicity. *Neurosci. Lett.* 256, 109-112.

CHOI, J., OH, Y., KIM, H., KIM, H., KO, K., and KIM, W.K. (2002) Mimosine prevents the death of glucose-deprived immunostimulated astrocytes by scavenging peroxynitrite. *Glia* 39, 37-46 .

CUZZOCREA, S., and REITER, R.J. (2001) Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur. J.*

Pharmacol. 426,1-10.

DE WIT, R., BOONSTRA, J., VERKLEIJ, A.J., and POST, J.A. (1998) Large scale screening assay for the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in cells. *J. Biomol. Screen.* 3, 277-284.

D'EMILIA, D.M., and LIPTON, S.A. (1999) Ratio of S-nitrosohomocyst(e)ine to homocyst(e)ine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures. *Neurosci. Lett.* 265, 103-106.

DYKENS, J.A. (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : Implications for neurodegeneration. *J. Neurochem.* 63, 584-591.

ELIASH, S., SPEISER, Z., and COHEN, S. (2001) Rasagiline and its (S) enantiomer increase survival and prevent stroke in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Neural. Transm.* 108, 909-923.

ERIKSSON, K., and LEVIN, J.O. (1990) Identification of cis- and trans-verbenol in human urine after occupational exposure to terpenes. *Int Arch Occup Environ Health* 62, 379-83.

FLAMM, E.S., DEMOPOULOS, H.B., SELIGMAN, M.L., POSTER, G.R., and RANSOHOFF, J. (1978) Free radical in cerebral ischemia. *Stroke* 9, 445-447.

FLOYD, R.A., and GARNEY, J.M. (1992) Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.* 32, S22-S27.

FUKUYAMA, N., TAKIZAWA, S., ISHIDA, H., HOSHIAI, K., SHINOHARA, Y., and NAKAZAWA, H. (1998) Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 123-129.

GENG, Z., RONG, Y., and LAU, B.H.S. (1997) S-Allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 345-350.

GREEN, S.J., MELTZER, M.S., HIBBS, J.B. Jr., and NACY, C.A. (1990) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* 144, 278-283.

- GREENLUND, L.J., Deckwerth, T.L., and Johnson, E.M. (1995) Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14, 303-315
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M., and ARUOMA, O.I. (1987) The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165, 215-219.
- HARA, H., FRIEDLANDER, R.M., and GAGLIARDINI, V. (1997) Inhibition of interleukin 1 beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 2007-2012.
- HIGUCHI, O., TATESHITA, K., and NISHIMURA, H. (2003) Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in *Allium* species for human low-density lipoprotein (LDL) oxidation in vitro. *J Agric. Food Chem.* 51, 7208-7214.
- HORIE, T., AWAZU, S., ITAKURA, Y., and FUWA, T. (1992) Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation. *Planta Med.* 58, 468-469.
- HORIE, T., MURAYAMA, T., MISHIMA, T., ITOH, F., MINAMIDE, Y., FUWA, T., and AWAZU, S. (1989) Protection of liver microsomal membranes from lipid peroxidation by garlic extract. *Planta Med.* 55, 506-508.
- HSU, C.C., HUANG, C.N., HUNG, Y.C., and YIN, M.C. (2004) Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *J. Nutr.* 134, 149-152.
- HU, B.R., LIU, C.L., and PARK, D.J. (2000) Alteration of MAP kinase pathways after transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1089-1095.
- HUANG, C.N., HORNG, J.S., and YIN, M.C. (2004) Antioxidative and antiglycative effects of six organosulfur compounds in low-density lipoprotein and plasma. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3674-3678.
- IDE, N., and LAU, B.H. (1997) Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 908-911, 1997.

IDE, N., and LAU, B.H.S. (2001) Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *J. Nutr.* 131, 1020S–1026S.

IKEDA, Y., and LANGN, D.M. (1990) The molecular basis of brain injury and brain edema; The role of oxygen free radicals. *Neurosurg.* 27, 1–11.

IMA, J., IDE, N., NAGAE, S., MORIGUCHI, T., MATSUURA, H., and ITAKURA, Y. (1994) Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* 60, 417–420.

IRVING, E.A., and BAMFORD, M. (2002) Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 6, 631–647.

IRVING, E.A., BARONE, F.C., REITH, A.D., HADINGHAM, S.J., and PARSONS, A.A. (2000) Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurons and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. *Mol. Brain Res.* 77, 65–75.

IRVING, E.A., RAY, A.M., STATON, P.C. (2001) Neuroprotection with the MEK inhibitor U0126 following ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, S379.

ISCHIROPOULOS, H., AL-MEHDI, A.B., and FISHER, A.B. (1995) Reactive species in ischemic rat lung injury: contribution of peroxynitrite. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 269, L158–L164.

ITO, Y., ITO, M., TAKAGI, N., SAITO, H., and ISHIGE, K. (2003) Neurotoxicity induced by amyloid β -peptide and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: protection by S-allyl-L-cysteine, a garlic compound. *Brain Res.* 985, 98–107.

JOPE, R.S., ZHANG, L., and SONG, L. (2000) Peroxynitrite modulates the activation of p38 and extracellular regulated kinases in PC12 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 365–370.

JU, C., YOON, K.N., OH, Y.K., KIM, H.C., SHIN, C.Y., RHU, J.Y., KO, K.H., and KIM, W.K. (2000) Synergistic depletion of astrocytic glutathione by glucose deprivation and peroxynitrite: correlation with mitochondrial dysfunction and subsequent cell death. *J. Neurochem.* 74, 1989–1998.

KAGAWA, K., MATSUTAKA, H., YAMAGUCHI, Y., and FUKUHAMA, C. (1986) Garlic extract inhibits the enhanced peroxidation and production of lipids in carbon tetrachloride-induced liver injury. *Jpn. J. Pharmacol.* 42, 19-26.

KANDIL, O.M., ABDELLAH, T.H., and ELKADI, A. (1987) Garlic and the immune system in humans: its effects on natural killer cells. *Fed. Proc.* 46. 441.

KIM, H.J., and CHUN, H.S., and YANG, R. (2000) Inhibition of benzo[a]pyrene-induced cytotoxicity and cytochrome P450 1A activity by dietary flavonoids in human liver cell model: structure-activity relationship. *Biotechnol. Lett.* 22, 1941-1946.

KIM W.K., CHOI Y.B., RAYUDU, P.V., DAS, P., ASAAD, W., ARNELLE, D.R., STAMLER, J.S., and LIPTON, S.A. (1999) Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO⁻. *Neuron* 24, 461-469.

KIM, K.M., CHUN, S.B., KOO, M.S., CHIO, W.J., KIM, T.W., KWON, Y.G., CHUNG, H.T., BILLIAR, T.R., and KIM, Y.M. (2001) Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 747-756.

KNUCKEY, N.W., PALM, D., PRIMIANO, M., EPSTEIN, M.H., and JOHANSON, C.E. (1995) N-Acetylcysteine enhances hippocampal neuronal survival after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 26, 305-310.

KODERA, Y., SUZUKI, A., IMADA, O., KASUGA, S., SUMIOKA, I., KANEZAWA, A., TARU, N., FUJIKAWA, M., NAGAE, J., MASAMOTO, K., MAESHIGE, K., and ONO, K. (2002) Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *J. Agric. Food Chem* 50, 622-632.

KOKETSU, N., BERLOVE, D.J., MOSKOWITZ, M.A., KOWALL, N.W., CADAY, C.G., and FINKLESTEIN, S.P. (1994) Pretreatment with intraventricular basic fibroblast growth factor decreases infarct size following focal cerebral ischemia in rats. *Ann. Neurol.* 35, 451-457.

KONG, L.Y., LAI, C., WILSON, B.C., SIMPSON, J.N., and HONG,

J.S. (1997) Protein tyrosine kinase inhibitors decrease lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in mixed glia, microglia-enriched or astrocyte-enriched cultures. *Neurochem. Int.* 30, 491-497.

KOSUGE, Y., KOEN, Y., ISHIGE, K., MINAMI, K., URASAWA, H., SAITO, H., and ITO, Y. (2003) S-Allyl-L-cysteine selectively protects cultured rat hippocampal neurons from amyloid β -protein- and tunicamycin-induced neuronal death. *Neuroscience* 122, 885-895.

KURATA, M., OKUDA, M., MUNHEYUKI, M., and OHNISHI, S.T. (1991) ³¹P MRS study of the protective effects of prostaglandin oligomers on forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* 545, 315-318.

LANDER, J.M., JOCOVINA, A.T., DAVIS, R.J., and TAURAS, J.M. (1996) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J. Biol. Chem.* 271, 19705-19709.

LAU, B.H.S. (2001) Suppression of LDL oxidation by garlic. *J. Nutr.* 131, 985S-988S.

LAWSON, L.D., WANG, Z.J. (1993) Pre-hepatic fate of the organosulfur compound derived from garlic (*Allium sativum*), *Plant Med.* 59, A688-A689.

LEE, S.R., KIM, S.P., and KIM, J.E. (2000) Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in the gerbils. *Neurosci. Lett.* 281, 184-187.

LEWIN, G., and POPOV, I. (1994) Antioxidant effects of aqueous garlic extract. Second communication: inhibition of the Cu (2+)-initiated oxidation of low density lipoproteins. *Arzneim.-Forsch.* 44, 604-607.

LICINIO, J. (1997) Central nervous system cytokines and their relevance for neurotoxicity and apoptosis. *J. Neural Transm.* 49, 169-175.

MARK, K.S., and MILLER, D.W. (1999) Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF- α exposure. *Life Sci.* 64, 1941-1953.

MILLER, N.J., RICE-EVANS, C., DAVIS, M.J., GOPINATHAN, V., and MINER, A. (1990) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in

premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407412.

MOON, B.H., LEE, Y., AHN, J.H., and LIM, Y. (2005) Complete assignment of ¹H and ¹³C NMR data of some flavonol derivatives. *Magn Reson Chem.* 43, 858-60.

MORIGUCHI, T., MASUURA, H., KODERA, Y., ITAKURA, Y., KATSUKI, H., SAITO, H., and NISHIYAMA, N. (1997) Neurotrophic activity of organosulfur compounds having a thioallyl group on cultured rat hippocampal neurons. *Neurochem. Res.* 22, 1449-1452.

NAGAE, S., USHIJIMA, M., HATONO, S., IMAI, J., KASUGA, S., MATSUURA, H., ITAKURA, Y., HIGASHI, Y. (1994) Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med.* 60, 214-217.

NAGAOKA, A., IWATSUKA, H., SUZUOKI, Z., and OKAMOTO, K. (1976) Genetic predisposition to stroke in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 230, 1354-1359.

NAMURA, S., LIHARA, K., TAKAMI, S., NAGATA, I., KIKUCHI, H., MATSUSHITA, K., MOSKOWITZ, M.A., BONVENTRE, J.V., and ALESSANDRINI, A. (2001) Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 98, 11569-11574.

NEIL, H., and SIGALI, C. (1994) Garlic, its cardioprotective properties. *Curr. Top. Lipidol.* 5, 6-10.

NUMAGAMI, Y., and OHNISHI, S.T. (2001) S-Allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J. Nutr.* 131, 1100S-1105S.

NUMAGAMI, Y., SATO, S., and OHNISHI, S.T. (1996) Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem. Int.* 29, 135-143.

O'NEILL, M.J., KICKS, C., WARD, M., and PANETTA, J.A. (1997) Neuroprotective effects of the antioxidant LY231617 and NO synthase inhibitors in global cerebral ischaemia. *Brain Res.* 760, 170-178.

OH-HASHI, K., MARUYAMA, W., YI, H., TAKAHASHI, T., NAOI, M., and ISOBE, K. (1999) Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263,

504-509.

OHNISHI, S.T., TOMINAGA, T., and KATSUOKA, M. (1989) Inhibition of ischemic edema formation by post-ischemic administration of a prostaglandin oligomer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 37, 107-111.

OI, Y., IMAFUKU, M., SHISHIDO, C., KOMINATO, Y., NISHIMURA, S., and IWAI, K. (2001) Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. *J. Nutr.* 131, 2150-2156.

OISHI, R., ITOH, Y., NISHIBORI, M., WATANABE, T., NISHI, H., and SAEKI, K. (1989) Effect of MCI-186 on ischemia-induced changes in monoamine metabolism in rat brain. *Stroke* 20, 1557-1564.

OLMOS, E., PIQUERAS, A., MARTINEZ-SOLANO, J.R., and HELLIN, E. (1997) The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation shoots. *Plant Sci.* 130, 97-105

OU, C.C., TSAO, S.M., LIN, M.C., and YIN, M.C. (2003) Protective action on human LDL against oxidation and glycation by four organosulfur compounds derived from garlic. *Lipids.* 38, 219-224.

PENG, Q., BUZZARD, A.R., and LAU, B.H.S. (2002) Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-peptide-induced apoptosis in vitro. *Med. Sci. Monit.* 8, BR328-337.

PEREZ-SEVERIANO, F., SALVATIERRA-SANCHEZ, R., RODRIGUEZ-PEREZ, M., CUEVAS-MARTINEZ, E.Y., GUEVARA, J., LIMON, D., MALDONADO, P.D., MEDINA-CAMPOS, O.N., PEDRAZA-CHAVERRI, J., and SANTAMARIA, A. (2004) S-allylcysteine prevents amyloid-peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur. J. Pharmacol.* 489, 197-202.

RABINKOV, A., MIRON, T., KONSTANTINOVSKI, L., WILCHEK, M., MIRELMAN, D., and WEINER, L. (1998) The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1379, 233-244.

RENWICK, J.A., HUGHES, P.R., and KRULL, I.S. (1976) Selective

production of cis- and trans-verbenol from (-)-and (+)-alpha by a bark beetle. *Science* 191, 199-201.

ROBAK, J., and GRYGLEWSKI, R.J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37, 837-841.

ROBINSON, M.J., and COBB, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.

ROMSI, P. (2003) Adjuncts to improve neurological outcome following hypothermic circulatory arrest: An experimental study using a chronic porcine model. Chap. 2. Academic Dissertation in University of Oulu, Oulu Finland.

SAKAMOTO, A., OHNISHI, S.T., OHNISHI, T., and OGAWA, R. (1991) Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res.* 554, 186-192.

SAKAMOTO, K., LAWSON, L.D., and MILNER, J.A. (1997) Allyl sulfides from garlic suppress the in vitro proliferation of human A549 lung tumor cells. *Nutr Cancer.* 29, 152-156.

SATOH, T., NAKATSUKA, D., WATANABE, Y., NAGATA, I., KIKUCHI, K., and NAMURA, S. (2000) Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 288, 163-166.

SCHIEKE, S.M., BRIVIBA, K., KLOTZ, L.O., and SIES, H. (1999) Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett.* 448, 301-303.

SCHOCH, H.J., FISCHER, S., and MARTI, H.H. (2002) Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain* 125, 2549-2557.

SCHREIER, P., DRAWERT, F., and JUNKER, A. (1976) Sesquiterpene hydrocarbons from grapes (author's transl). *Z Lebensm Unters Forsch.* 160, 271-4.

SHIN, C., HONG, M., KIM, D., and LIM, Y. Structure determination of a sildenafil analogue contained in commercial herb drinks. *Magn*

Reson Chem. 42, 1060-2.

SIESJO, B.K. (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. *J. Neurosurg.* 77, 337-354.

SONG, K., MILNER, J.A. (1999) Heating garlic inhibits its ability to suppress 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced DNA adduct formation in rat mammary tissue. *J. Nutr.* 129, 657-661.

STANCIU, M., WANG, Y., KENTOR, R., BURKE, N., WATKINS, S., KRESS, G., REYNOLDS, I., KLANN, E., ANGIOLIERI, M.R., JOHNSON, J.W., and DEFRANCO, D.B. (2000) Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J. Biol. Chem.* 275, 12200-12206.

SUNDARAM, S.G., and MILNER, J.A. (1996) Diallyl disulfide induces apoptosis of human colon tumor cells. *Carcinogenesis* 17, 669-673.

VENDITTI, P., DE ROSA, R., CIGLIANO, L., AGNISOLA, C., and DI MEO, S. (2004) Role of nitric oxide in the functional response to ischemia-reperfusion of heart mitochondria from hyperthyroid rats. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 2244-2252.

WANG, K.W. (2001) In: *New concepts in cerebral ischemia* (Lin, R.C.S., ed.), pp. 204. CRC Press, Boca Raton, Florida.

WANG, Q., XU, J., ROTTINGHAUS, G.E., SIMONYI, A., LUBAHN, D., SUN, G.Y., and SUN, A.Y. (2002) Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res.* 958, 439-447.

WHITE, B.D., SULLIVAN, J.M., DEGRACIA, D.J., O'NEIL, B.J., NEUMAR, R.W., GROSSMAN, L.I., RAFOLS, J.A., and KRAUSE, G.S. (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179, 1-33

WU, D., YE, W., CHE, X., and YANG, G. (2000) Activation of mitogen activated protein kinase after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1320-1330.

YAMASAKI, T., KI, L., and LAU, B.H. (1994) Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother. Res.* 8, 408-412.

YAVUZ, O., TURKOZKAN, N., BILGIHAN, A., DOGULU, F., and

AYKOL, S. (1997) The effect of 2-chloro adenosine on lipid peroxide level during experimental cerebral ischemia-reperfusion in gerbils. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 337-341.

YEH, Y.Y., and YEH, S.M. (1994) Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. *Lipids* 29, 189-193.

YIN, M.C., HWANG, S.W., and CHAN, K.C. (2002) Nonenzymatic antioxidant activity of four organosulfur compounds derived from garlic. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6143-6147.

ZHANG, P., WANG, Y.Z., KAGAN, E., and BONNER, J.C. (2000) Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J. Biol. Chem.* 275, 22479-22486.