상추 및 식용식물로부터 항 동맥경화 물질의 분리, 기능 규명 및 건강 기능성 식품 개발

Isolation, functional identification of bioactive compounds from *Lactuca sativa* and edible plants, and development of functional food materials for prevention of atherosclerosis

경희대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “상추 및 식용식물로부터 항 동맥경화 물질의 분리, 기능 규명 및 건강 기능성 식품 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 14 일

주관연구기관명 : 경희대학교
총괄연구책임자 : 김 지 영
세부연구책임자 : 김 지 영
세부연구책임자 : 정 대 균
연 구 원 : 백 남 인
협동연구기관명 : 안양대학교
협동연구책임자 : 배 동 근

요 약 문

Ⅰ. 제 목

상추 및 식용식물로부터 항 동맥경화 물질의 분리 , 기능 규명 및 건강기능성 식품개발 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구과제는 동맥경화의 예방과 치료에 탁월한 기능성 식품의 개발이며, 이를 위해 인체에 부작용이 거의 없는 천연재료인 녹황색식물로부터 시료를 추출하여 이를 정제, 탐색함으로써 탁월한 항 동맥경화물질을 확보하고 이를 대량생산 할 수 있는 기술의 개발에 있다.

소득수준이 높아짐에 따라 식생활문화에 있어서 고칼로리 식품의 섭취가 늘고, 생활이 편의 위주로 치우침에 따라 운동부족으로 비만이 일반화되어 고혈압, 동맥경화, 심장병, 뇌질환 등의 순환기계 질환의 발병률이 점차 높아지고 있다. 국내의 경우 사망원인 중에서 순환기계 질환의 점유비가 가장 놓은 실정이다. 순환기계 질환의 예방 또는 치료에 소요되는 금액은 천문학적 수치에 이르고 있다.

콜레스테롤은 지방의 일종으로 인체의 기능을 정상적으로 유지시키는데 필수적인 구성성분이고, 특히 인체는 세포로 구성되어 있으며, 콜레스테롤은 세포를 만드는데 꼭 필요한 영양소이다. 그러나 혈액속의 콜레스테롤 농도가 높으면 동맥경화의 원인이 되어 협심증이나 심근경색증(허혈성 심장병이라고도 함) 등의 심장질환과 뇌졸중, 고혈압 등의 뇌혈관 질환이 생기게 된다.

또한, 만성 심장 질환의 주요 원인은 관상동맥의 동맥경화이다. 동맥경화를 유발하는 인자는 고콜레스테롤혈증, 흡연, 고혈압, 비만, 당뇨, 스트레스 등이 있으나, 혈중 콜레스테롤 함량의 상승으로 인한 고콜레스테롤혈증은 동맥경화증의 발생과 진전에 가장 중요한 원인이 된다.

동맥경화를 예방하기 위하여 치료제를 개발하는 것은 매우 중요하며 기능성 식품

이 최근 동맥경화 및 다른 여러 가지 질환을 예방하는 접근 방법으로 널리 추진되고 있다. 본 연구에서는 상추 및 식용 식물로부터 Acyl-CoA-Cholesterol Acyltransferase (ACAT) 활성을 저해하거나 혹은 동맥경화 관련 염증성 사이토카인, 예를 들면 IL-1β, Leukotactin-1, CKβ8 등의 생성을 저해하는 물질을 분리하고자 하였다. 본 연구의 궁극적인 목표는 동맥경화의 예방과 치료를 위한 혈액 내 LDL의 수치를 낮추는 것뿐만 아니라 LDL에 의해 유도되는 사이토카인의 분비와 활성을 저해하는 것이며, 상추에서 분리한 ACAT 저해 물질을 이용하여 기능성 식품을 개발하고자 하는 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 상추 및 식용식물로부터 항 동맥경화 물질의 분리, 기능 규명 및 건강기능성 식품 개발에 관한 연구에 있어서 다음과 같은 내용을 수행하였다.

1. 항동맥경화 분획의 추출방법 최적화 및 상추 품종 선정
2. 동맥경화유발 사이토카인 저해 물질 탐색 시스템 확립
3. 상추추출물 및 식물 추출물의 동맥경화유발 사이토카인 전사 저해 활성 물질 탐색 및 분석
4. 상추추출물 및 식물 추출물에서 동맥경화유발 사이토카인 저해 물질의 효능 분석
5. 식물 추출물에서 염증 및 동맥경화 유발 사이토카인 저해물질의 조절 기작분석
6. 상추 및 식용작물에서 ACAT 활성 저해 물질의 분리, 정제, 구조 분석
7. 추출물의 세포 증식 및 안정성 분석
8. 마우스에서 항동맥경화 활성 검증
9. 시제품 제작
10. 상추 및 식용작물의 항동맥경화 물질 규명 및 건강기능성 식품 개발
11. 상추유래 항동맥경화 물질의 가공적성 연구

12. 항동맥경화물질의 가공적성에 따른 식품 모델 연구

13. 항동맥경화 건강기능성 시제품 개발

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

동맥경화유발 사이토카인 저해물질 탐색시스템을 개발하기 위해, 먼저 Leucokactin-1, CKβ8 그리고 IL-1β 프로모터에 luciferase 유전자를 융합하여 Reporter 유전자를 제조하였다. 이 제조된 Reporter 유전자를 사람 U937 세포에 transfection 하여, 동맥경화 유발 사이토카인 유전자 저해물질을 탐색하기 위한 stable cell line을 확립하였다. 이후 상추 추출물 및 여러 식물 추출물로부터 얻은 시료를 stable cell line을 이용하여 동맥경화유발 사이토카인 저해 물질을 탐색 하였다. 그 결과 여러 식물 추출물에서 leucokactin-1의 저해활성을 보이는 물질 5개 이상과 CKβ8의 저해활성을 보이는 4개 이상의 후보물질을 물질을 탐색하였고, 후보 물질의 농도별 처리와 세포독성실험을 수행한 결과 붉나무 추출물이 CKβ8의 활성저해에 매우 중요한 것을 확인 하였다. 상추추출물인 경우는 동맥경화 및 염증유발 관련 사이토카인의 저해에 영향을 주지 않았으며, 세포독성 또한 별다른 영향을 주지 않았다. 삼백초 추출물인 manassantin의 경우 동맥경화 및 염증유발 관련 사이토카인의 저해에 아주 효과적인 활성을 보였으며, IL-1β 생성조절의 분석을 통해 manassantin은 기존에 알려진 전사인자 NF-κB 뿐만 아니라 전사인자 NF-IL6의 활성에 더욱 효과적으로 작용함을 확인하였다.

본 연구에서는 상추 추출물외에도 400 여종의 식물 추출물을 탐색한 결과 적어도 5종 정도의 동맥경화 관련 사이토카인을 저해하는 활성을 확인하였다. 이 추출물 은 앞으로 동맥경화, 관절염 등을 예방하는 기능성 식품으로 개발할 수 후보로서 이용될 수 있을 것이다.

상추를 MeOH로 추출한 후 극성에 따라 분배 추출하여 ACAT 억제활성을 확인하고 가장 높은 활성을 나타낸 화합물을 분리 정제한 뒤, ^{1}H-NMR(400㎒, $CDCl_3$), ^{13}C-NMR(100㎒, $CDCl_3$)에서 분석하여 이 화합물의 각종스펙트럼 데이터를 문헌 값과 비교한 결과 phytol로 구조결정 하였다. phytol을 함유한 항동맥경화 상추 분획물이

in vivo 마우스 실험을 통해 효과가 있음을 확인하였다. 상추추출물을 이용하여 기능성 식품을 개발하기 위해서 주정 추출 수율 최적화 및 가공 적성을 확인하였으며 그 결과 주정 65%에서 Phytol 과 β-sitosterol 등의 항동맥경화 물질의 수율이 가장 높음을 확인하였다. 이 추출물을 이용하여 10:1 상추추출물건조분말 그린콜-1000을 제작하였으며, 이 시제품을 이용하여 항동맥경화 효능을 *in vitro* ACAT 활성 저해 실험에서 약 65%의 저해 활성을 확인 하였으며, *in vivo* 쥐 임상실험을 통해 정제된 Phytol에 비해 약 60%의 항동맥경화 효과가 있음을 확인 하였다. 상추추출물의 가공적성을 고려하여 생식형태의 분말제품, 과립형태의 제품, tablet 형태의 제품 및 well-being bar 형태의 식품모델을 개발하고 시제품을 제작하였다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Isolation, functional identification of bioactive compounds from *Lactuca sativa* and edible plants, and development of functional food materials for prevention of atherosclerosis.

Ⅱ. Purpose and Importance of Research

The purpose of this research is to isolate, and identify bioactive compounds from *Lactuca sativa* and edible plants, and development of functional food materials for prevention of atherosclerosis. Atherosclerosis is the main cause of death in the western world. Atherosclerosis is increasing in Korea due to high fat diet, smoking, diabetes mellitus, hypertension and obesity and lack of exercies. In recent years, atherosclerosis and related coronary heart disease is the leading cause of death in Korea and tremendous amounts of costs are expended for the prevention and treatment of the coronary diseases.

Cholesterol, one of lipid components in the cells, is essential for maintenance of cellular funcions in vertebrates including humans. Over the past two decades, modifying low-density lipoprotein cholesterol has been the major target for preventing atherosclerotic cardiovascular disease because high cholestrol levels in blood is a major risk of atherosclerosis.

It is very important to develop therapeutic agents to prevent atheroclerosis. Functional food is a better alternative approach to prevent numerous diseases including atherosclerosis. Functional foods allows low costs of prevention and therapy of atheroscleosis and other diseases. In the present research, we attempted to isolate, characterize bioactive coumpounds from *Lactuca sativa* and edible plants which inhibit acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) and/or inhibits production of proinflammatory cytokines such as

IL-1β,. Leukotactin-1 and CKβ8. Ultimate goal is to develop functional food materisls for prevention of atherosclerosis and related diseases using the compounds from *Lactuca sativa* which inhibits acitivities of ACAT.

Ⅲ. Contents of Research

1. Establishment of system of screening for atherosclerosis related to cytokine inhibitors.
2. Screening and analysis of atherosclerosis related to cytokine inhibitor in Lettuce and other plant extracts.
3. Analysis of activity of atherosclerosis related to cytokine inhibitors in Lettuce and other plant extracts.
4. Analysis of mechanism of proinflammation and atherosclerosis related to cytokine inhibitors.
5. Extraction and purification of ACAT inhibitory substance, and determination of structure from lettuce and edible plants
6. Efficacy of anti-atherosclerosis in mouse model
7. Optimization of extraction and selection of species of lettuce
8. Pilot production
9. Food processing properties of ACAT inhibitory substance from lettuce and edible plants
10. Development of food model(s) according to the food processing properties of the ACAT inhibitory substance
11. Production of ACAT inhibitory health functional food in pilot product form

Ⅳ. Results and Application of Research

For development of system for screening of bioactive coumpounds which inhibit

production of proinflammatory cytokines involved in atherosclerosis, we first constructed reporter genes that were fused 5'-promoter region of human leucokactin-1, CKβ8 or IL-1β genes to the firefly luciferase gene. We transfected repoter plasmids to human U937 cells and established stable cell lines expressing reporter genes. We screened over 400 plant extracts. Five extracts inhibited expression of leukotactin-1 and four extracts inhibited expression of CKβ8. We analyzed effects of the candidate coumpounds on production of proinflammatory cytokines involved in atherosclerosis and confirmed that all of the comounds inhibited production of proinflammatory cytokines in dosage dependent manner. Analysis of cytotoxic tests revealed that one of extracts did not show cytotoxic effects under the conditions used in the study, which was identified as an extract from *Rhus chinensis Mill.* Methanol extract from *Lactuca sativa* did not exhibited any inhibitory effect on expression of proinflammatory cytokines involved in inflammation and atherosclerosis.. A lognoid compound, Manassantin which was obtained from the roots of *Saururus chinensis,* was analyzed in this study. We showed that mannasantin B inhibed NF-κB transactivation and also NF-IL6 transactivation. NF-κB and NF-IL6 are critical transcription factors which play important roles in expression of proinflammatory cytokines. . We demonstrated that Manassantin B uppresseed expression of IL-1β in promonocytic U937 cells by inhibiting not only NF-κB but also NF-IL6 activity.

Among over 400 plant extracts, we obtained at least five extracts including *Rhus chinensis Mill* which exhibited inhibition of proinflammatory cytokine expression. Further investigation is needed to utilize and develop novel functional foods and/or therapeutic agents from such plants for prevention of atherosclerosis and related diseases in future.

Lettuce was extracted with methanol and fractionated according to polarity. Then ACAT inhibitory activities of fractions were analyzed. The structure of fraction with the highest value was determined through 1H-NMR(400㎒, CDCl3) and 13C-NMR(100㎒, CDCl3). The spectrum compared to the value of literature reveal the identity as phytol. The fraction of lettuce containing phytol showed the activity of anti-atherosclerosis in the in vivo experiment of mouse model. A extract process was optimized and process aptitude

was inspected for the development of function food. The yield of phytol and β-sitosterol was obtained in ethanol of 65%. With this extract, lettuce extract powder of Greenchol-1000 was produced at the concentration of 10 fold to lettuce. This pilot product showed the ACAT inhibitory activity of 65% and anti-atherosclerosis of 60% when compared to purified phytol in mouse model. Considering the food processing properties, several food models were developed and pilot products were produced in the form of powder, granule, tablie and a well-being bar.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction---------- 20

Section 1. Purpose of research---------- 20
Section 2. The significance of research---------- 21
Section 3. Outcomes of research---------- 24

Chapter 2. Current research stutus (Domestic and foreign status)---------- 26

Chapter 3. Contents and Results of Research---------- 28

Section 1. Materials and methods---------- 28

Section 2. Contents and results---------- 37

1. Development of system of screening for atherosclerosis related to cytokine inhibitors and isoltion and test of inhibitors ---------- 37
2. Extraction and purification of ACAT inhibitory substance from lettuce and edible plants, and evaluation of efficacy---------- 91
3. Characterization of ACAT inhibitory substance from lettuce and edible plants---------- 135

Chapter. 4. Achievement and Contribution---------- 171

Section 1. Progress of the study---------- 171
Section 2. Contribution in the related fields---------- 174

Chapter 5. Application of the results---------- 175

Section 1. Summary of the results---------- 175

Section 2. Application ---------- 177

Chapter 6. Scientific and technological information on foreign biotechnology-------- 178

Chapter 7. References---------- 181

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요---------- 20

제 1 절 : 연구개발의 목적---------- 20
제 2 절 : 연구개발의 필요성---------- 21
제 3 절 : 연구개발의 기대효과---------- 24

제 2 장 국내외 기술개발 현황---------- 26

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과---------- 28

제 1 절 : 이론적 및 실험적 연구개발 방법---------- 28
1. 식물 재료의 확보 및 활성 물질의 분리---------- 28
2. 동맥경화 유발 사이토카인 저해물질 탐색용 세포주의 확립---------- 28
3. RT- PCR을 통한 chemokine 저해활성 측정---------- 31
4. ACAT 억제 활성 측정 (*in vitro* test)---------- 32
5. 항동맥경화 물질의 효능 및 안전성 검증을 위한 *in vivo* test--------- 32
6. 항동맥경화 물질의 구조 규명---------- 33
7. 항동맥경화 물질의 식품 가공 적성 실험---------- 33
8. 활성물질의 대량 제조 및 분리 방법 확립---------- 35
9. 식품 가공적성에 따른 식품 model 및 시제품 개발---------- 36

제 2 절 연구개발 내용 및 결과---------- 37
1. 동맥경화유발 사이토카인 저해 물질 탐색 시스템 개발, 저해물질 분리 및 효능 검증---------- 37
가. 동맥경화 관련 유전자의 전사 저해 관련 탐색용 리포터 유전자의 제조---------- 37

나. 동맥경화 관련 유전자의 전사 저해 관련 탐색용 stable cell line의 확립---------- 44
다. 식물 추출물의 동맥경화 관련 사이토카인 전사 저해 활성 물질 탐색 및 분석---------- 48
라. 상추 추출물의 동맥경화 관련 사이토카인의 저해 효능 분석------- 71
마. 상추 추출물 시제품의 염증 유발 및 동맥경화 관련 사이토카인의 저해 효능 분석---------- 75
바. 식물 추출물 manassantin의 염증유발 및 동맥경화 관련 사이토카인의 조절 및 기작 분석---------- 79

2. 상추 및 식용작물의 항동맥경화 물질 분리 정제 및 효능 검증------- 91
가. 상추 추출물의 분리 및 정제---------- 91
나. 상추 추출물의 ACAT의 저해 활성 측정(*in vitro.*)---------- 93
다. 마우스에서의 혈장지질 함량 측정---------- 93
라. 상추에서의 Phytol 분리 및 검량---------- 101
마. 상추(*Lactuca sativa* L.) 품종별 Phytol 함량 분석---------- 104
바. 항동맥 경화물질, phytol의 대량 제조 방법 확립---------- 110
사. 상추 품종 중 적토마에서 분리한 항동맥경화 후보물질(phytol)의 in vitro, in vivo activity test---------- 115
아. 상추 품종 적토마의 추출 조건에 따른 β-sitosterol 및 Phytol의 함량 분석---------- 121
자. 상추 적토마의 추출물을 이용한 시제품의 제작---------- 126
차. 상추 추출물시제품 그린콜-1000을 이용한 항동맥경화 in vitro, in vivo activity test---------- 128

3. 상추 및 식용작물의 항동맥경화 물질 규명 및 건강기능성 식품 개발-- 135
가. 상추의 항동맥경화 물질의 물리·화학적 특성 규명---------- 135
나. 상추유래 항 동맥경화물질의 구조규명---------- 135

다. 상추의 가공적성과 in vitro, in vivo 실험결과를 고려한 식품모델 연구---------- 140
라. 상추의 항동맥경화물질의 가공적성과 최적식품 model 연구에 의한 건강 증진 식품 시제품 개발---------- 151
마. 항동맥경화물질의 가공적성에 따른 식품모델 연구---------- 156

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도---------- 171

제 1절 : 목표 달성도---------- 171
제 2절 : 관련 분야의 기여도---------- 174

제 5 장 연구개발결과의 활용계획---------- 175

제 1 절 : 최종 연구개발 결과---------- 175
제 2 절 : 연구개발의 활용계획---------- 177

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보---------- 178

제 7 장 참고문헌---------- 181

표 목록

표 1. 식물추출물의 CK8 전사활성 저해율 (%)---------- 66
표 2. 1H-NMR(400MHz, CDCl3) 과 13C-NMR(100MHz, CDCl3) 결과---------- 92
표 3. 품종별 시료 및 EtOAC 추출량과 GC 전처리를 통한 분석값을 통한 phytol 함량---------- 108
표 4. 추출용매별 상추로부터 추출된 phytol의 함량 ---------- 111
표 5. 분배용매에 따른 phytol의 함량---------- 113
표 6. 추출 조건에 따른 상추 추출물 수율---------- 122
표 7. 추출 조건에 따른 항동맥경화 물질의 함량 분석---------- 122
표 8. ACAT inhibition activity of fractions obtained from the *Lactuca sativa* L.---------- 136
표 9. 각 시료에 대한 관능검사 및 소비자 기호도---------- 164
표 10. well-being bar의 관능검사에 사용된 설문지의 예---------- 165

그림 목록

그림 1. pGL3-Lkn-1 플라스미드의 제조---------- 38
그림 2. pGL3-CKβ8 플라스미드의 제조---------- 39
그림 3. pGL3-IL-1β 플라스미드의 제조---------- 40
그림 4. pREP8/Lkn-1 Luc 플라스미드의 제조---------- 41
그림 5. pREP8/CKβ8 Luc 플라스미드의 제조---------- 42
그림 6. pREP8/IL-1 Luc 플라스미드의 제조---------- 43
그림 7. U937/Lkn-1 Luc stable cell line 의 확립---------- 45
그림 8. U937/CKβ8 Luc stable cell line 의 확립---------- 46
그림 9. U937/IL-1 Luc stable cell line 의 확립---------- 47
그림 10. 식물추출물 1~15 시료의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는
영향분석---------- 49
그림 11. 식물추출물 16~30 시료의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는
영향분석---------- 50
그림 12. 식물추출물 31~45 시료의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는
영향분석---------- 51
그림 13. 식물추출물 46~60 시료의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는
영향분석---------- 52
그림 14. 식물추출물 #7 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사 활성에
미치는 영향분석---------- 54
그림 15. 식물추출물 #21 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사 활성에
미치는 영향분석---------- 55
그림 16. 식물추출물 #25 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사 활성에
미치는 영향분석---------- 56
그림 17. 식물추출물 #30 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사 활성에
미치는 영향분석---------- 57
그림 18. 식물추출물 #39 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사
활성에 미치는 영향분석---------- 58

그림 19. 식물추출물 #30 시료의 세포독성에 미치는영향 분석---------- 60
그림 20. 식물추출물 804~823 시료의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향 분석-- 62
그림 21. 식물추출물 825~836 시료의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향 분석-- 63
그림 22. 식물추출물 842~854 시료의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향 분석-- 64
그림 23. 식물추출물 855~864 시료의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향 분석-- 65
그림 24. 식물추출물 #829, 851, 852, 861 시료들의 농도에 따른 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향분석---------- 68
그림 25. 식물추출물 #829, 851, 852, 861 시료들의 세포독성에 미치는 영향 분석---------- 70
그림 26. 농도에 따른 상추추출물의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향분석---------- 72
그림 27. 농도에 따른 상추추출물의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향분석---- 73
그림 28. 농도에 따른 상추추출물의 세포독성에 미치는 영향 분석---------- 74
그림 29. 상추 추출물 시제품 그린콜 1000 이 사이토카인 유전자 TNF-α와 IL-1β의 생성에 미치는 영향 분석---------- 76
그림 30. 상추 추출물 시제품 그린콜 1000 이 사이토카인 유전자 i-NOS 와 cox-2의 생성에 미치는 영향 분석---------- 77
그림 31. 상추 추출물 시제품 그린콜 1000의 세포 독성에 미치는 영향 분석---------- 78
그림 32. 삼백초 추출물 manassantin의 동맥경화 및 염증유발 사이토카인의 생성에 미치는 영향 분석---------- 80
그림 33. 삼백초 추출물 manassantin의 IL-1β 단백질의 생성에 미치는 영향 분석---------- 82
그림 34. 삼백초 추출물 manassantin의 IL-1β 프로모터의 전사에 미치는 영향 분석---------- 83
그림 35. 전사인자 NF-κB (p65) 에 의해 유도된 IL-1β 유전자의 발현에 manassantin의 미치는 영향 분석---------- 85
그림 36. 전사인자 NF-IL6에 의해 유도된 IL-1β 유전자의 발현에 manassantin의 미치는 영향 분석 ---------- 86
그림 37. 삼백초 추출물 manassantin의 전사인자 NF-IL6의 전사 활성 능력에 미치는 향 분석---------- 88

그림 38. 삼백초 추출물 manassantin의 전사인자 NF-κB의 DNA 결합 능력에 미치는 영향 분석---------- 89
그림 39. 삼백초 추출물 manassantin의 전사인자 NF-IL6의 DNA 결합 능력에 미치는 영향 분석---------- 90
그림 40. 고지방식이 및 상추로부터 분리한 화합물의 총 콜레스테롤 함량에 미치는 영향---------- 95
그림 41. 고지방식이 및 상추로부터 분리한 화합물의 트리글리세라이드 함량에 미치는 영향---------- 97
그림 42. 식이 및 상추로부터 분리한 화합물의 HDL 함량에 미치는 영향--- 100
그림 43. Phytol standard의 농도별 GC spectrum과 비교---------- 102
그림 44. Standard curve of phytol in GC analysis---------- 103
그림 45. 각 품종별 SPE 전처리 후, TMS화된 EtOAc 분획의 GCs-------- 106
그림 46. 품종별 TMS화된 EtOAc 분획 GC spectrum들의 비교---------- 107
그림 47. 총 콜레스테롤 함량 측정---------- 117
그림 48. 트리글라세이드 함량 측정---------- 118
그림 49. 전체 지질 함량 측정---------- 120
그림 50. 추출조건에 따른 β-sitosterol의 함량---------- 124
그림 51. 추출조건에 따른 Phytol의 함량---------- 125
그림 52. 상추 추출물 시제품 <그린콜-1000>---------- 127
그림 53. 총 콜레스테롤 함량 측정---------- 130
그림 54. 트리글라세이드 함량 측정---------- 132
그림 55. 전체 지질 함량 측정---------- 134
그림 56. 화합물 1의 H_1-NMR의 스펙트럼---------- 137
그림 57. 상추로부터 분리한 화합물(화합물1)의 ^{13}C-NMR 스펙트럼-------- 138

그림 58. 상추로부터 분리한 phytol의 화학구조---------- 139
그림 59. 가공온도의 변화에 따른 상추 추출물 중의 phytol 함량 변화---------- 141
그림 60. 상추추출물에 20,000 lux의 빛을 조사한 후, 상추 추출물의 색 변화---------- 144
그림 61. 상추추출물에 20,000 lux의 빛을 조사한 후, 상추추출물 내의 phytol 함량변화---------- 145
그림 62. 빛 조사(20,000 lux)에 의한 phytol의 변화---------- 146
그림 63. 빛(20,000 Lux, 72시간)에 따른 phytol의 GC-MS spectrum 변화--- 147
그림 64. phytol의 EIMS spectrum---------- 148
그림 65. 광조사(20,000 Lux, 72시간) 후의 phytol의 EIMS spectrum------- 149
그림 66. 광조사(20,000 Lux, 72시간) 후의 phytol의 예상 구조변화-------- 150
그림 67. 상추추출물 및 상추추출물 분말---------- 152
그림 68. 상추추출물을 첨가한 생식(분말)형태의 가공식품---------- 153
그림 69. 상추추출물 및 수용성 또는 불용성 섬유소를 주 재료로 한 환형태의 가공식품---------- 154
그림. 70 tablet 형태로 제작한 상추추출물 함유 가공식품---------- 155
그림 71. 각 시료의 색에 대한 소비자 기호도---------- 158
그림 72. 각 시료의 외관에 대한 소비자 기호도---------- 159
그림 73. 각 시료의 향에 대한 소비자 기호도---------- 160
그림 74. 각 시료의 촉감에 대한 소비자 기호도---------- 161
그림 75. 각 시료의 끝맛에 대한 소비자 기호도---------- 162
그림 76. 각 시료의 맛에 대한 소비자 기호도---------- 163
그림 77. 상추를 이용한 상품화 제품---------- 179

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적

소득수준이 높아짐에 따라 식생활문화에 있어서 고칼로리 식품의 섭취가 늘고, 생활이 편의 위주로 치우침에 따라 운동부족으로 비만이 일반화되어 고혈압, **동맥경화**, 심장병, 뇌질환 등의 순환기계 질환의 발병률이 점차 높아지고 있다. 국내의 경우 사망원인 중에서 순환기계 질환의 점유비가 가장 놓은 실정이다. 순환기계 질환의 예방 또는 치료에 소요되는 금액은 천문학적 숫자에 이르고 있다.

콜레스테롤은 지방의 일종으로 인체의 기능을 정상적으로 유지시키는데 필수적인 구성성분이고, 특히 인체는 세포로 구성되어 있으며, 콜레스테롤은 세포를 만드는데 꼭 필요한 영양소이다. 그러나 혈액속의 콜레스테롤 농도가 높으면 동맥경화의 원인이 되어 협심증이나 심근경색증(허혈성 심장병이라고도 함) 등의 심장질환과 뇌졸중, 고혈압 등의 뇌혈관 질환이 생기게 된다.

또한, 만성 심장 질환의 주요 원인은 관상동맥의 동맥경화이다. 동맥경화를 유발하는 인자는 고콜레스테롤혈증, 흡연, 고혈압, 비만, 당뇨, 스트레스 등이 있으나, 혈중 콜레스테롤 함량의 상승으로 인한 고콜레스테롤혈증은 동맥경화증의 발생과 진전에 가장 중요한 원인이 된다.

따라서, **동맥경화의 예방과 치료를 위한 목표는 혈액내 LDL의 수치를 낮추는 것뿐만 아니라 LDL에 의해 유도되는 사이토카인의 분비와 활성을 저해하는 것이다.**

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

주로 간에서 생성된 콜레스테롤은 지질단백질이라는 작고 둥근 입자형태로 혈액중에 존재하며, 동맥경화에 주로 관여하는 지질단백질에는 **LDL(low density lipoprotein)과 HDL(High density lipoprotein)** 두 종류가 있다. HDL은 다른 조직에서 간으로 콜레스테롤을 운반하기 때문에 HDL이 많으면 혈관 등에서 콜레스테롤이 제거되나, LDL은 간에서 분비된 VLDL(very low density lipoprotein)이 인체의 다른 조직으로 지질을 운반하고 남은 형태로서 고농도의 cholesterol을 함유하고 있어 **LDL이 많으면 혈관에 콜레스테롤이 많이 쌓여서 동맥경화**가 촉진된다. 혈중 LDL이 축적돼 혈액 내 지방질이 높아지고 고지혈증이 되면 혈소판 응집 기능 항진, 혈소판 응고시간 단축등 혈액 응고에 변화를 일으켜 혈액점도가 상승하고 결국 혈액의 성질과 상태에 병적 변화가 나타나며 **혈관염에 의한 말초순화장애**를 일으키게 된다.

ACAT (LDL의 합성에 관여)를 저해하는 물질에 관한 연구는 주로 화학합성물질이 대상이었으며, urea, amide, phenol 계 화합물이 주종을 이루어 왔다. 전임상단계 시험중인 후보물질은 있으나, 아직 임상에 사용되지 않고 있다. 본 연구진은 인체에 유익한 **상추로부터 ACAT 활성 저해제를 추출하여 마우스의 콜레스테롤 축적에 미치는 영향에 대하여 종합적으로 고찰**하였다.

천연자원으로부터의 저해제 탐색연구는 일본에서 미생물을 대상으로 한 연구가 많이 보고되어있다. (Kitasato 연구소, Sankyo사, 일본농공대, Kyowa Hakko 사 등) 국내에서도 미생물대사산물로부터 sesquiterpene 계 및 bispheol 계의 저해제가 분리된다. **사. 식물에서는 마늘로부터 ajoene 등의 polyene-sulfide 화합물, 호박잎으로부터 magnolol 등의 lignan 화합물, 오미자의 lignan 화합물, 인삼의 protopanaxadiol 등의 triterpenoid 및 polyacetylene 화합물, 왕고들빼기로부터 triterpene acetate 화합물 등이 저해활성이 있다 는 연구결과가 보고되었으나, 실용화를 위해서는 더 많은 연구가 필요한 실정이다.**

현재 생산, 판매되고 있는 **기능성식품 및 의약품의 70% 이상이 천연물로부터**

제조되고 있거나, 적어도 천연물을 그 기원으로 하고 있다. 천연물의 경우 대부분 독성이 적고 안전성에 문제가 없어 기능성 식품 및 의약품 개발의 자원으로 유용성이 높아 예로부터 이에 관한 관심이 높았다. 18세기 이후 **버드나무의 수피**로부터 진통효과를 갖는 **aspirin 의 전구체를 분리**한 이래 각종 질병의 치료 및 예방 약품이 개발되었고 현재도 활발히 연구가 진행중이다. **타. 지금도 성인병, 난치병 등의 치료제를 천연자원으로부터 탐색하고자 하는 연구는 선진국에서 활발히 이루어지고 있으며, 근세에 들어서며 천연물화학의 눈부신 발전에 힘입어 독일, 일본, 미국 등을 중심으로 천연물로부터 의약용 활성물질의 개발에 관한 연구가 활발히 이루어져 많은 의약품이 개발되었다.**

신약 개발은 **일반적으로 오랜 시간과 비용이 들어간다.** 이러한 의약품의 개발은 아직 국내에서는 다소 무리가 있다. 그러나 기술과 물질의 축적을 소홀히 할 수 없다. 따라서 의약품으로써의 가치가 있는 물질을 분리하고 이들을 축적함으로써 향후 의약품개발의 발판으로 삼고, 또한 이들을 기능성 식품으로 개발함으로써 의약품개발에 드는 비용과 시간을 절감할 수 있다. 따라서 이러한 물질들을 **저비용으로 신속하고 대량으로 쉽게 탐색할 수 있는 시스템의 개발이 절실히 요구**되고 있다.

2. 경제・산업적 측면

WTO 체제에서 세계적으로 나타나는 현상 중의 하나는 **농산물 가격하락**에 의한 시장에 있어서 공급관리의 약화, 농산물 수요의 정체, 그리고 농산물시장구조의 변화 등에 의한 것이다. 공급관리기능이 약화된 것은 미국의 생산조정 폐지와 EU의 생산공정 완화에 의한 영향이 크며, 여기에 자연재해 빈발 등에 의한 생산변동이 추가된 결과이다. 이러한 세계적인 **농산물 가격의 하락에 대한 정부의 대책이 시급한 상태이다**. 미국과 일본의 경우 농업소득안정정책을 수립 농민의 소득안정을 적극적으로 도모하고 있다. 그러나 우리나라는 **신자유주의에 입각한 자유무역에 그대로 노출된 상태로 농민을 방치**하고 있다. 따라서 농가의 부채는 점점 증가 할 수밖에 없다. 이런 농가의 소득을 증가시키기 위해서는 무엇보다도 **농민이 고부가가치의 제품을 생산 할 수 있도록 해야 할 것이다.**

국내 바이오 시장규모는 97년에 4, 246억원에서 2000년에는 1조 1천억원으로 추정되고 있다. 각 연구기관의 전망은 고속성장을 예견하고 있음. 2003년까지 연평균 32.1% 씩 성장할 것으로 전망 되고 있다. 이러한 추세를 감안 할 때 **신약개발 및 식품첨가제를 위한 기초탐색 기술의 확보는 앞으로의 기업경쟁력과 농산물의 부가가치를 한층 높일 수 있을 것으로 사료된다**. 또한 보다 빠르게 많은 물질들을 탐색함으로써 **새로 발견되는 물질에 대한 특허권을 획득**할 수 있을 것이다.

우리나라를 비롯한 중국과 일본의 동양 3국에서는 천연소재를 강장, 강정 등 신체기능의 향상뿐만 아니라 병의 치료와 예방에 널리 이용하여 왔다. 특히 식약동원이라 하여 천연 식물자원 중에 기능성 활성물질이 함유되어 있다는 것을 기본 개념으로 하여 **천연자원으로부터 활성 신소재를 개발하기 위한 연구**가, 정부의 지원 하에 각 연구기관, 학교 및 기업체에 서 활발히 이루어지고 있다. 그러나 관련 분야의 기초적인 기술이 충분히 확립되지 않았고, 또한 제품 개발에 소요되는 기간이 길기 때문에, 아직 가시적인 개발의 예는 극히 적으나, **항암, 고혈압, 당뇨 등의 난치병의 예방 및 치료제, 기능성 식품 및 화장품의 개발**이 가까운 시일 내에 가능할 것으로 예견케 하는 **고무적인 연구결과가 속속 보고** 되고 있다.

3. 사회・문화적 측면

1987, 1988년 조사에 의하면 이때까지 우리나라의 소아에서는 볼 수 없었던 성인형 당뇨병이 **초・중・고생의 2만명 중에 1명의 빈도로 발견**되었으며, 1989년에 서울시내 초・중・고생중 고도 비만아 324명에서 어린이 성인병의 유병률을 조사한 결과 고지혈증 61.7%, 지방간38.6%, 고혈압7.4%, 당뇨병 0.3%로서 78.7%가 합병증을 가지고 있다고 발표하여 충격을 주었다. 그러므로, 전국 수만 명의 고도비만아를 방치하고 요즘과 같은 식생활 상태가 계속된다면, 20~30년 후의 우리나라의 **성인병 발생은 현저하게 증가**하여 성인병 예방사업에 열의를 쏟고 있는 미국이나 일본보다 많아질 가능성이 높다.

성인인구의 주된 두 가지 사망원인은 동백경화와 암이다. 70세까지는 암에 의한 사망률이 가장 높으나 70세 이후에는 동맥경화가 제1의 사망원인이 된다. 이미 서구

의 산업화된 국가들 에서는 동맥경화가 사망원인의 수위를 점하고 있으며 근래의 WHO 통계자료에 의하면 2020년에는 전 세계적으로 동맥경화가 제1의 사망원인이 될 것으로 사료된다.

우리사회가 빠른 속도로 산업화되어 식생활이 달라져 많은 칼로리와 기름기를 섭취하게 되고 생활양식이 서구됨에 따라 동맥경화로 인한 혈관병은 계속증가 추세에 있다. 그 중에 서도 가장 특기해야 할 사항은 근래에 들어 눈에 띄게 많아지고 있는 관상동맥 심장병이다. 70년대와 비교할 때 현재 관상동맥심장병의 환자는 10배 정도이며 80년대 초와 비교할 때는 7배 정도로 폭발적으로 증가하고 있다.

따라서, **항동맥경화 효과를 가지는 기능성 식품의 개발**이 요구되고 있다. 이에 본 연구진은 인체에 부작용이 거의 없는 천연재료인 녹황색식물로부터 항 동맥경화 물질을 추출하고 이를 식품첨가제로 개발하여 동맥경화로 인한 성인병의 예방 및 국내 농가의 수익을 증대시킬 수 있는 기술을 개발하고자 한다.

제 3 절 : 연구 개발의 기대효과

1.기술적 측면

식용작물로부터 **항동맥경화 물질의 대량 분리 공정 개발**은 **건강보조식품산업 뿐만 아니라, 식품산업에 이용**할 수 있다. **식물추출물을 이용한 연구**에 있어서 대량 분리공정의 개발은 **연구 개발의 효율성 및 가속화에 기여** 할 수 있다. 본 연구에서 **항 동맥경화물질의 탐색**을 위한 기초 탐색기술의 확보를 통해서 보다 **많은 물질을 신속하게 탐색**할 수 있으며, 이때 Reporter gene을 지속적으로 발현하는 세포의 확립은 부가적으로 얻어진 것으로 **고부가 가치의 생명공학제품으로 개발이 가능하다.**

혈관신생과 관련된 실험방법의 확립은 새로운 **혈관생성물질의 탐색을 가능**케 한다. 이는 암의 성장을 위해 새롭게 생성되는 혈관이 아닌 정상적인 조직의 영양공급

을 위한 혈관의 형성에도 많은 물질들의 탐색이 이루어지고 있는데 최근의 치료적인 면에서 볼 때 혈관의 막힘으로 허혈 조직의 괴사가 발생하는 환자의 치료에도 신 혈관 형성 유도물질의 역할이 차차 보고 되고 있으며 전 세계적인 추세이다.

마지막으로 항 동맥경화물질의 대량 생산 공정의 개발이 가능하다.

2. 경제 · 산업적 측면

식물 추출물은 녹황색식물을 원료로 하므로 농민들의 수입증대에도 기여하여 **국내농업의 새로운 활로를 모색하는 데에 기여할 것으로 사료된다. 식용작물로부터 항동맥경화 물질의 대량 분리 공정 개발**은 건강보조식품산업 뿐만아니라, **식품산업에 이용**되어, 기업의 **경제적 이익**뿐만 아니라, 소비자들의 가격부담이 줄어들어, 소비를 증진시키고, 따라서 **국내농가의 이익을 창출**하게 된다.

국내 시장규모가 1조 1천억원인 건강보조식품과 증가 추세에 있는 혈관계 질병에 비추어 볼 때 혈관계 질병에 관련된 **식물추출물을 이용한 기능성식품 첨가제**는 국내 건강보조식품 산업의 질적향상과 다양성을 부여할 것이다(한국식품정보원).

식물추출물로부터 얻어진 시료는 **항 동맥경화기능 뿐 아니라 혈관신생, 종약억제와 같은 여러 기능의 물질들이 포함**되어있으며 이런 물질들의 **특허권 신청은 부가소득을 얻을 수 있다.** 결과의 창출 시 빠른 시간에 **효과적인 고부가가치의 제품개발, 기술 수출** 등을 통하여 효율적인 **경제적 이익의 극대화**를 도모할 수 있으며, 인류사회에 공헌할 수 있을 것으로 기대되어진다.

제 2 장　국내·외 관련기술의 현황과 문제점

천연자원으로부터의 저해제 탐색연구는 일본에서 미생물을 대상으로 한 연구가 많이 보고됨. (Kitasato 연구소, Sankyo사, 일본농공대, Kyowa Hakko 사 등) 국내에서도 미생물대사산물로부터 sesquiterpene 계 및 bispheol 계의 저해제가 분리된다. 식물에서는 **마늘**로부터 ajoene 등의 polyene-sulfide 화합물, **호박잎**으로부터 magnolol 등의 lignan 화합물, **오미자**의 lignan 화합물, **인삼**의 protopanaxadiol 등의 triterpenoid 및 polyacetylene 화합물, **왕고들빼기**로부터 triterpene acetate 화합물 등이 저해활성이 있다 는 연구결과가 보고되었으나, **실용화를 위해서는 더 많은 연구가 필요한 실정이다**.

현재 생산, 판매되고 있는 의약품의 70% 이상이 천연물로부터 제조되고 있거나, 적어도 천연물을 그 기원으로 하고 있다. **천연물의 경우 대부분 독성이 적고 안전성에 문제가 없어** 의약품 개발의 자원으로 유용성이 높아 예로부터 이에 관한 관심이 높았다. 18세기 이후 **버드나무**의 수피로부터 진통효과를 갖는 aspirin 의 전구체를 분리한 이래 각종 질병의 치료 및 예방 약품이 개발되었고 현재도 활발히 연구가 진행중이다. 지금도 성인병, 난치병 등의 치료제를 천연자원으로부터 탐색하고자 하는 연구는 선진제국에서 활발히 이루어지고 있으며, 근세에 들어서며 천연물화학의 눈부신 발전에 힘입어 독일, 일본, 미국 등을 중심으로 **천연물로부터 의약용 활성물질의 개발에 관한 연구**가 활발히 이루어져 많은 의약품이 개발된다.

현재, 국내에는 동맥경화의 예방과 치료에 관한 연구가 진행 중에 있으며, 건강보조식품으로서 예로부터 **항동맥경화 작용을 하는 식용작물 및 야채 등을 혼합하여 제조한 건강보조식품등이 개발**되어 있다. 그러나, **항동맥경화 작용을 유도하는 물질에 대한 연구는 미비한 실정이다**. 따라서 동맥경화 치료 및 건강보조식품에 대한 근본적인 예방 및 치료가 이루어지지 않고, 운동요법, 식이요법을 이용한 동맥경화 예방을 하고 있다. 또한 약물요법의 경우 그 약효에 비해 부작용이 심해 그 사용이 제한적이다. 따라서 동맥경화를 예방하고, 치료할 수 있는 물질연구를 통한 **동맥경화 치료제 및 항동맥경화 건강보조식품을 개발**하여, 동맥경화 질환환자의 전문적인 치

료 및 효과적인 건강보조식품을 통한 예방 효과를 극대화하여 **국민건강 증진 및 농민의 소득 증대에 기여**할 수 있다.

본 연구진은 **상추 및 식용 식물로부터 동맥경화를 예방 및 치료를 할 수 있는 항 동맥경화물질을 순수 분리하여 이를 식품첨가제 및 의약품으로 개발**하고자 한다. **본 연구진에**서는 지난 **15년간 천연자원으로부터 생물활성 이차대사산물의 분리, 동정** 및 이용에 관한 연구를 수행하여 **항암, 항동맥경화, 항경련, 항고혈압, 강장** 등과 관련하여 많은 **연구결과**를 발표하였다(지난 **5년간** 국내외 학술지에 **60여편 게재되었다**). 따라서 본 과제와 관련하여 **필요한 설비, 인력 및 뛰어난 연구수행능력**을 갖추고 있다. 본 연구진은 수년간 식물 추출물을 이용한 항동맥경화 물질에 대한 연구를 수행하였다. 또한 본 연구진에서는 **상추**로부터 얻어진 추출물 및 **1차 분획물로부터 ACAT 저해활성** 나타내는 실험결과를 얻었다.

상기 식물들은 보통 **식용으로 섭취**할 수 있는 것들로, **독성, 안전성에 있어서도 문제가 없을 것**으로 생각된다. 활성을 나타낸 화합물들은 **식물체에서의 함량도 상당히 높으므로, 고지혈증 치료제 및 건강보조식품의 개발에 매우 유리할 것으로** 생각된다. 따라서 상기 식물로부터 **ACAT 저해활성물질을 분리, 정제 및 화학구조를 결정**하고, 또한 고지혈증 치료와 관련된 **그 외의 다양한 활성의 측정 및 기작규명**, 아울러 **안전성, 안정성, 독성 및 제제실험에 필요한 시료를 공급**하기 위하여 상기 **활성물질을 대량제조**하는 방법을 확립하게 된다면, 효과적인 고지혈증 치료제의 개발이 가능할 것이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 : 이론적 및 실험적 연구 개발 방법

1. 식물 재료의 확보 및 활성 물질의 분리

가. 식물재료의 확보

상추는 적치마, 청치마, 자주적축면 상추 등 다양한 품종이 있으며 이들 품종 중 구입이 가능한 경우에는 구입을 하고자 함. 구입이 안 되는 품종은 권농종묘에서 씨앗을 구매하여 재배하여 확보할 예정이다.

상추 외 다른 식용식물의 추출물은 일차 탐색용으로는 생명공학연구원 자생 식물단 에서 구축해 놓은 식물추출물을 확보하여 저해활성을 탐색하고자 한다.

나. 상추로부터 활성물질의 분리

선발된 식물시료 5kg을 동일하게 추출, 농축하여 MeOH extracts 제조한다. 이후 EtOAc, *n*-BuOH 및 물을 이용하여 분배, 추출하여 분획 제조한다. 각 분획에 대하여 활성 검정하여 활성분획 추적하고, 활성분획에 대하여 silica gel, Amberlite XAD-II 및 Sephadex 등을 담체로 하여 용출용매를 변경하여 column chromatography하고, TLC로 확인하여 유사분획끼리 합하여 소 분획 제조 한다

각 소 분획에 대하여 활성검정하고 동일한 과정을 반복하여 활성 물질 추적, 분리하고, 분리가 용이하지 않은 경우에는 acetylation, esterification 및 ether 유도체를 제조하여 물질 분리, 정제 한다.

2. 동맥경화 유발 사이토카인 저해물질 탐색용 세포주의 확립

가. 저해물질 탐색용 Reporter 융합 유전자 제조

녹황색 식물 추출물의 사이토카인 저해활성을 측정하기 위한 방법으로 Reporter

assay를 수행한다. reporter는 Luciferase vector가 삽입 되어있는 pGL3basic vector (Promega) 를 사용한다.

1) Luciferase assay

세포를 24 시간 동안 시료를 처리한 후 cell을 harvest 한다. PBS buffer로 2번 씻어준 다음 Reporter 1× lysis buffer(Promega) 첨가한다. 상온에서 5분간 vortexing 하고 12000 rpm에서 1분간 원심분리 한 후 상층액을 새로운 tube에 옮긴다. extract 20ul와 luciferase assay reagent(Promega) 100ul를 혼합한 후 luminometer (Turner Designs)로 luminescence를 혼합 후 10초에서 1분 사이에 측정함. 측정은 sample당 3회씩 두 번 반복하여 측정함.

나. 세포 독성 검사

세포 독성 검사에는 MTT, XTT, MTS, WST-1 등이 있다. 본연구에서는 WST-1 kit (TAKARA)를 사용하였다. 이것의 원리는 Tetrazolium salt가 mitochondria의 호흡사슬에 존재하여 생존세포에만 활성이 있는 succinate-tetrazolium-reductase에 의해 fomazan 색소로 분해 되는 원리이다. 생존세포수가 증가하면 시료중의 mitochnodria 탈수소효소 전체의 활성이 증가하므로, 이 효소 활성의 증가가 fomazan 색소의 생성증가를 유도하기 때문에 fomazan 색소와 배지 중의 대사활성이 있는 세포의 수와는 직선적인 상관을 나타내게 된다. ELISA reader로 색소용액의 흡광을 측정하여 대사활성이 있는 세포가 만들어내는 fomazan색소를 정량할 수 있으므로 세포증식 능력이나 세포생존능력을 관찰할 수 있다.

실험 방법은 다음과 같다. 800 rpm에서 5분정도 원침한 후 pellet을 resuspend하여 세포 부유액을 얻는다. WST-1의 권장 세포수는 $1X10^5$ - $5X10^5$ 개이다. 각 세포별로 이 범위 안에서 적정 접종 세포수를 결정해야 한다. 결정 방법은 먼저 첫 번째 칸에는 180 ㎕의 배지와 PBS 20 ㎕ 만을 넣어 blank로 사용하고 두 번째 칸부터는 먼저 배지만 90 ul을 넣는다. 90 ul의 세포 부유액을 접종하여 잘 혼합한 후 두 번째 칸에서 얻은 세포부유액 90 ㎕를 세 번째 칸으로 옮겨 넣음. 이와 같은 방법으로 1/2로 희석하면서 접종한 후 WST-1을 넣고 ELISA를 측정 한다 (측정 파장 420-480 nm,

대조파장 600 nm). 이로부터 얻어진 값을 세로축을 세포의 흡광도로 하고 가로축을 세포의 농도로 하여 그래프로 도시하면 지수적인 곡선을 얻게 됨. 이 지수곡선에서 세포농도가 세포의 농도에 정비례하여 감소 또는 증가하는 부분의 세포 수를 적정세포로 정한다. 결정된 적정농도를 기준으로 세포의 농도를 결정한 후 준비된 단일 세포 부유액을 넣은 cane에서 잘 혼합한 뒤 multichannel pipette을 이용하여 각 well에 50 ㎕의 세포 부유액을 접종한다. 측정하고자 하는 시료(녹황색식물 추출물)는 농도별로 50 ㎕씩 각 well에 첨가한다. 배양 후 plate의 각 well에 10 ㎕의 WST-1를 가해주고 다시 37℃, 5% CO_2 하에서 3시간 배양해준다. ELISA reader로 측정파장을 420-480 nm 사이에서, 대조파장을 600 nm 이상에서 측정한다.

시험군에서 각 well로부터 한 칼럼의 평균 OD450 값(대조파장 600 nm이상)을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD450 값에 대한 백분율 값을 산출하는데 그 평균치는 다음의 공식에 의해 계산된다.

$$\frac{\text{mean optical density in test well}}{\text{mean optical density in control well}} \times 100$$

이 백분율은 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율에 해당하는 값이다. 이로부터 pharmacological calculation program의 quantal prohibit analysis를 이용하여 각 검체의 IC_{50}값을 구한다.

다. Stable cell line 확립

시료의 신속한 탐색과 결과의 안정성을 위해서 지속적으로 reporter gene을 발현하는 cell line을 확립한다.

1) Reporter gene을 발현하는 cell line의 선별

Vector에 selection marker를 이용한 cell line의 선별한다. selection은 hisD gene에 의해서 이루어 짐. hisD gene의 product는 histidinol dehydrogenase이며, 이들은 histidinol을 histidine으로 catalyze한다.

$$L\text{-histidinol} + 2\ NAD^{+} \quad \text{-->} \quad L\text{-histidine} + 2NADH + 2H^{+}$$

histidinol은 cell membrane으로 들어가서 cytotoxic agent 로서 histidyl-tRNA synthetase의 inhibitor로 작용하게 된다. histidinol이 첨가된 배지 하에서 transfection 시킨 cell을 키운다. reporter gene이 삽입된 세포만이 생존한다.

3. RT- PCR을 통한 chemokine 저해활성 측정

U937 cell line을 6well plate에 well당 $1X10^{6}$ cell을 0.5%배지로 18 h를 starvation 시킨다. 그 후에 배지, 배지+PMA, 배지+PMA+약물을 처리한다. 약물을 처리하는 well의 약물 농도는 1 ㎍/ml, 5 ㎍/ml, 10 ㎍/ml, 20 ㎍/ml로 처리해 주었다. 그 후 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다.

가. Total RNA에서 cDNA의 합성

먼저 RNA용 microtube에 0.1-5 ㎍의 total RNA와 Oligo-dT를 넣은 다음 70℃에서 5분간 반응한 하였다. 5X reaction buffer 4 ㎕와 10mM NTP mix 2 ㎕(final 1.0 mM), Ribonuclease inhibitor를 넣고 DEPC-water로 19 ㎕를 맞춘다. (전체 부피가 20 ul일 때) 37℃에서 5분간 incubation시킨 후 40unit의 M-MuLv reverse transcriptase를 넣고 42℃에서 1시간 incubation하였다. 70℃에서 반응을 stop시킨 후 얼음에서 식혀 주었다.

나. PCR reaction

PCR tube에 10X reaction buffer(with Mg^{2+}) 5 ul와 2.5 mM dNTP mix 4 ul, upstream primer 1 ㎕(10pmol), down stream primer 1 ㎕(10pmol), template(합성한 cDNA), 4-5 ㎕, Taq Polymerase 2.5 unit을 넣고 water로 50 ㎕를 맞추었다.

94℃에서 5분, 50-60℃에서 2분, 72℃에서 3분의 조건으로 pre-PCR을 행한 후 94℃에서 30초에서 1분, 50-60℃에서 30초에서 1분, 72℃에서 40초에서 2분, 30-35cycle의 조건으로 PCR을 하고 72℃에서 7분으로 반응을 하여 stop시킨 후 4℃에서 보관하

였다.

4. ACAT 억제 활성 측정 (*in vitro* test)

시료액 10 ㎕, 쥐의 간조직 microsomal enzyme 4.0 ㎕. buffer 20 ㎕ (0.5 M KH2PO4, 10 nM DTT, pH 7.4), bovine serum albumin 15.0 ㎕ (40 mg/㎖. fatty acid free), cholesterol 2.0 ㎕ (20 mg/㎖), H20 41.0 ㎕을 섞은 후 37℃에서 20분간 예비 반응시킨다. 반응액에 [1-14C]oleoyl-CoA 8 ㎕ (0.05㎕ci, 최종농도 10 ㎛M)를 첨가하고 다시 37℃에서 25분간 본 반응시킨 후 반응액에 isopropanol-heptane (4:1. v/v) 1 ml를 가하여 반응을 정지시키고, heptane 0.6 ml와 5배로 희석한 buffer 0.4 ml를 첨가한 후 원심분리 한다. 상층액 100 ㎕를 취하고 거기에 Lipoluma 3 ml를 첨가한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 방사능을 측정한다.

- ACAT 저해활성은 다음과 같이 계산한다. .

$$\% \text{ 저해도} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{CPM (T)} - \text{CPM (C2)}}{\text{CPM (C1)} - \text{CPM (B)}}\right]$$

CPM (T) : 시료와 효소를 넣었을 때의 CPM (Count per minute)

CPM (C1) : 효소는 넣고 시료는 넣지 않았을 때의 CPM

CPM (C2) : 시료는 넣고 효소는 넣지 않았을 때의 CPM

CPM (B) : 시료와 효소를 넣지 않았을 때의 CPM

5. 항동맥경화 물질의 효능 및 안전성 검증을 위한 *in vivo* test

가. 실험 동물 사육 및 식이조성

C57BL/6 마우스 5주령, 수컷을 구입하여 일반 고형 사료로 1주일간 예비 사육한다. 적응 기간 후 무작위로 8마리씩 정상 식이군, 3% 상추로부터 추출한 항동맥경화 물질 첨가 식이군, 3% 제1 세부과제의 항동맥경화 후보물질 첨가 고지방 식이군, 3% 상추로부터 추출한 항동맥경화 물질 첨가 고지방 식이군의 다섯 군으로 분류한다. 실험 식이는 AIN-76 diet 조성을 참고로 하여 조성한다. 실험식이와 물은 자유로이 섭

취케 하여 4주간 사육한다.

나. 체중, 먹이 섭취량, 장기 중량 측정

각 군의 초기 체중을 측정한 다음, 일주일 마다 먹이 섭취량 및 체중을 측정 한다. 장기 중량은 실험기간 종류 후 마우스를 희생시켜 채혈 및 각 주요 장기를 적출한 후 생리 식염수로 세정 후 중량을 측정하여 체중에 대한 상대 중량비(%)를 구한다.

다. 시료채취

사육이 끝난 마우스를 12시간동안 절식시킨 뒤 di-ethyl ether로 마취시키고 심장으로부터 혈액을 채취한 후 간장, 신장, 심장, 비장을 적출한다. 사육 종료 후 마우스를 희생시켜 전혈을 채취하여 8,000rpm에서 15분간 원심 분리한 상층을 사용한다.

라. 혈장 지질 함량 측정

혈장중의 지질 함량 즉, total-cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol은 효소법에 의한 비색정도를 측정하는 kit로 각 지질 함량을 측정한다. 37℃에서 5분간 배양한 뒤, 96 well ELISA plate에 배양한 blank, 표준액, 마우스 혈청 sample를 200 ul씩 분주한 뒤, ELISA leader로 450 nm의 파장에서 측정한다.

6. 항동맥경화 물질의 구조 규명

제2세부과제에서 분리·정제된 상추 유래의 항동맥경화 물질의 물리·화학적 특성을 연구하고 GC-MSD, HPLC, NMR 등을 이용하여 물질의 구조를 밝힌다.

2세부과제에서 분리·정제된 식용작물 유래의 항동맥경화 물질의 물리·화학적 특성을 연구하고 GC-MSD, HPLC, NMR 등을 이용하여 물질의 구조를 밝힌다.

.

7. 항동맥경화 물질의 식품 가공 적성 실험

가. 상추 및 식용작물 유래의 항동맥경화 물질의 각 용매에 대한 용해성 또는 용매로서의 성질에 대해 연구한다.

나. 상추 및 식용작물 유래의 항동맥경화 물질의 함량 측정법 설정

항동맥경화 물질의 가시광선 또는 자외선 영역에서의 최대 흡광도를 조사하여 흡광도에 따른 동 물질의 함량 표준 곡선 작성 및 함량 측정법 설정한다. - 흡광도에 따른 함량 측정법이 용이치 않을 시, 구조 동정에 사용된 분석 방법을 응용하여 동 물질의 함량 측정 법 설정 (GC, GC-MSD, HPLC 등) 한다.

다. 열 안정성 실험

특정 pH 영역에서 (pH 3.0, pH 7.0, pH 9.0) 상추 및 식용작물 유래의 항동맥경화 물질의 열안정성 측정한다. 각각의 완충용액에서 최대 흡광도를 나타내는 광선의 영역에서 최종 흡광도가 1.0 정도가 되도록 상추 유래 항동맥경화 물질의 농도를 조절한 후, 50, 70, 90 ℃에서 각 용액의 흡광도를 일정기간 동안 측정하여 분해속도 또는 반감기 계산을 통한 상추 유래의 항동맥경화 물질의 열 안정성 측정

라. pH 안정성 실험

pH 2.0 ~ pH 9.0 사이의 완충용액을 이용하여 항동맥경화 물질의 pH 각 영역에서의 pH 안정성 실험 한다. phosphate buffer, citrate buffer, acetate buffer 등을 사용 한다. 각 pH의 완충용액에 최대 흡광도를 갖는 파장에서 흡광도가 1.0 정도 되도록 농도를 조절한 후, 일정 기간 동안 저장하며 흡광도의 변화, 또는 농도의 변화를 관찰하여 상추 및 식용작물 유래의 항동맥경화 물질의 pH 각 영역에서의 안정성 측정 한다.

마. 금속이온에 대한 안정성 시험

금속이온이 상추 및 식용작물 유래 항동맥경화 물질의 저장안정성에 끼치는 영향을 연구한다. 특정 pH 영역에서 (pH 3.0, pH 7.0, pH 9.0) 상추 유래의 항동맥경화 물질의 금속이온에 대한 안정성 측정 한다. 각각의 완충용액에서 최대 흡광도를 나타내

는 광선의 영역에서 최종 흡광도가 1.0 정도가 되도록 상추 유래 항동맥경화 물질의 농도를 조절한 후, Na, K, Mg, Cu, Mn, Ca, Zn, Mg, Ag, Al 등의 이온농도를 10~100 mM 정도로 일정하게 조절하여 각 시료의 최대 흡광도 변화를 일정기간 동안 측정하여 각 금속이온이 상추 유래 항동맥경화 물질의 안정성에 끼치는 영향을 연구한다.

바. 식품성분이 상추 및 식용작물 유래 항동맥경화 물질의 안정성에 끼치는 영향

식품 중에 함유된 당류, 유기산, 단백질 등이 상추 유래 항동맥경화 물질의 안정성에 끼치는 영향을 연구한다.

바. 상추 및 식용작물 유래 항동맥경화 물질의 유화성 시험

상추 및 식용작물 유래 항동맥경화 물질의 유화성과 유화안정성을 연구 한다. 상추 및 식용작물 유래 항동맥경화 물질 1.25g에 증류수 25ml를 넣고 25℃에서 15분 동안 교반한 후, 옥수수유 25 ml를 첨가하여 3분동안 Waring blender로 mixing한 후, 혼합액을 원심분리하여(1,600Xg, 5min), 유화된 층의 높이와 총 내용물의 높이와의 비를 이용하여 유화활성(%)을 계산하고, 유화액을 80℃ 물중탕에서 30min 간 방치하고, 15℃로 냉각한 다음 원심분리하여 유화활성과 동일한 방법으로 유화 안정성을 계산한다.

8. 활성물질의 대량 제조 및 분리 방법 확립

항동맥경화의 활성을 보인 물질에 대하여 고지혈증 치료와 관련된 다양한 활성을 확인하고 그 기작을 규명하기 위한 실험용 시료를 대량으로 제조해야 할 필요가 있음. 또한 그 외에도 안전성, 안정성, 독성 및 제제 실험을 위해서도 대량의 시료가 필요함. 따라서 화학적 방법을 이용하여 여러 가지 실험에 필요한 시료를 대량으로 제조하고자 한다.

상추로부터 항동맥경화 물질의 분리 방법을 토대로 EtOAc, *n*-BuOH 의 농도를 변화시켜 항동맥경화 물질을 분리 추출한다. 이러한 방법으로 분리수율 최적화를 통

한 경제성 있는 분리방법을 확립한다.

9. 식품 가공적성에 따른 식품 model 및 시제품 개발

항동맥경화 물질의 가공적성 및 제2세부과제의 *in vivo, in vitro* 실험 결과에 따른 최적식품응용분야를 설정하고 이에 다른 식품 model을 개발한다.

항동맥경화 물질을 이용하여 개발된 식품 model을 sensory evaluation, 저장성, 경제성, 시장성 등을 고려하여 최적의 건강증진 식품을 개발한다.

제 2 절 : 연구개발 내용 및 결과

1. 동맥경화유발 사이토카인 저해 물질 탐색 시스템 개발, 저해물질 분리 및 효능 검증

가. 동맥경화 관련 유전자의 전사 저해 관련 탐색용 리포터 유전자의 제조

동맥경화유발 사이토카인의 전사 저해 물질을 탐색하기 위하여, 3종류의 유전자 프로모터를 플라스미드에 클로닝 하였다. 먼저 클로닝을 수행하기 위해 사용한 플라스미드는 pGL3-basic 벡터 (Promega)이고 이 vector는 유전자의 전사활성을 측정하기 위해 Luciferase 유전자를 리포터 유전자로 포함하고 있다. 동맥경화 관련 사이토카인 유전자인 **Leukotactin-1(CCL15), CKβ8 (CCL23) 그리고 interleukin (IL)-1β**의 유전자는 human genomic DNA (Promega)로부터 PCR 방법을 이용하여 프로모터 부위를 확보하였다.

pGL3-basic 벡터에 Lkn-1, Ckβ-8, IL-1β promoter 부위를 cloning 하여 그림 1에서와 같은 리포터 플라스미드를 제조하였다 (그림 1 ~ 3). 이후 동물세포에서 **stable cell line**을 만들기 위하여 **pREP8** 벡터 (Clonetech)를 사용하였다. pREP8 벡터는 EBNA-1유전자를 가지고 있어 염색체처럼 세포내에 episome 상태로 존재가 가능하며, hisD 유전자를 가지고 있어 세포 배양 시 **histidinol**을 처리하여 벡터가 들어있는 세포만을 선별할 수 있다. Stable cell line을 만들 수 있는 pREP8 벡터에 그림 1에서 먼저 클로닝한 각각의 플라스미드에서 Lkn-1, Ckβ-8, IL-1β promoter 유전자와 reporter유전자인 Luciferase가 융합된 부위와 클로닝 하여 최종적으로 동맥경화 관련 유전자의 전사 저해 관련 탐색용 리포터 유전자를 제조하였다. 이 각각의 플라스미드를 **pREP/Lkn1-Luc, pREP/Ckβ8-Luc, pREP/IL1β-Luc**라 명명하였다 (그림 4 ~ 6).

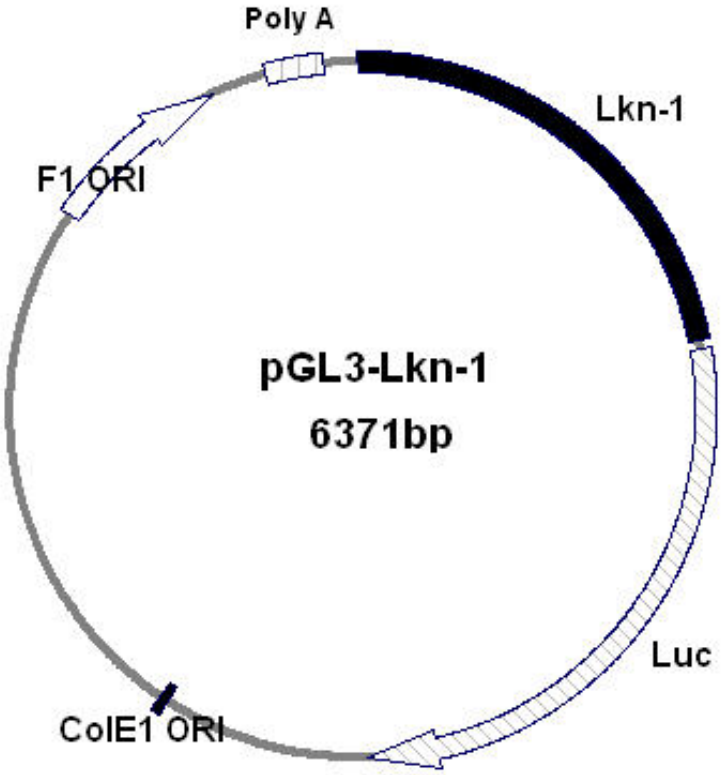


그림 1. pGL3-Lkn-1 플라스미드의 제조. 사람 genomic DNA에서 PCR 방법을 이용하여 leukotactin-1 의 5‘ 프로모터 부위를 클로닝 하였다. 이후 Luciferase 유전자를 가진 pGL3/ basic 벡터와 leukotactin-1 의 5‘ 프로모터 부위를 융합하여 pGL3-Lkn-1 플라스미드를 제조하였다.

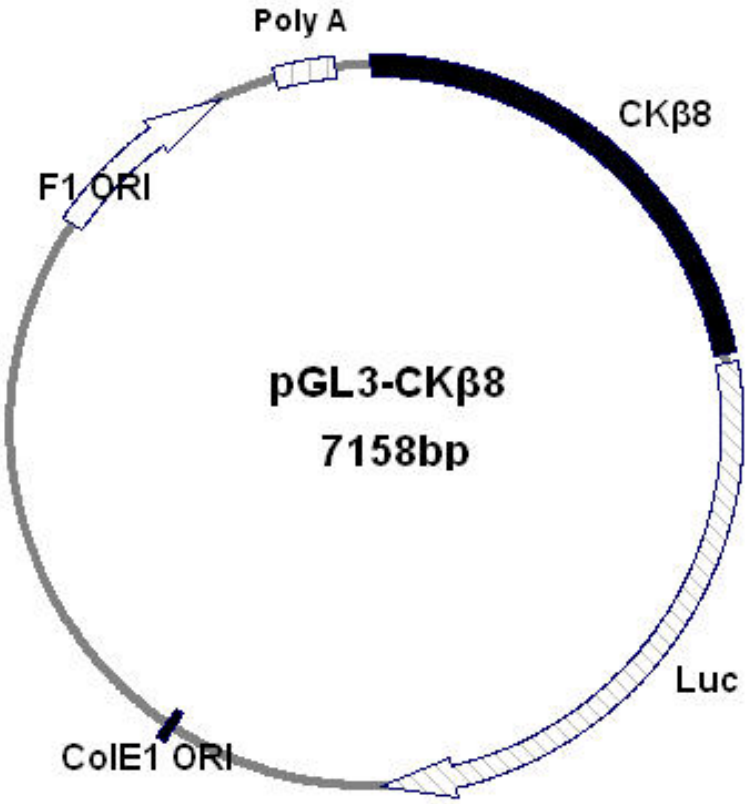


그림 2. pGL3-CKβ8 플라스미드의 제조. 사람 genomic DNA에서 PCR 방법을 이용하여 CKβ8 의 5‘ 프로모터 부위를 클로닝 하였다. 이후 Luciferase 유전자를 가진 pGL3/ basic 벡터와 CKβ8 의 5‘ 프로모터 부위를 융합하여 pGL3-CKβ8 플라스미드를 제조하였다.

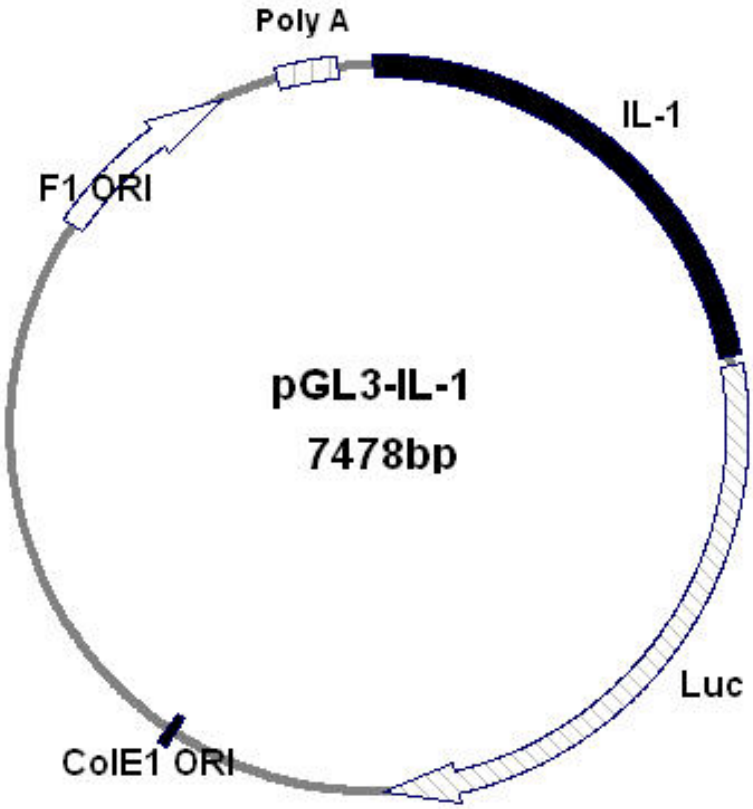


그림 3. pGL3-IL-1β 플라스미드의 제조. 사람 genomic DNA에서 PCR 방법을 이용하여 IL-1β 의 5' 프로모터 부위를 클로닝 하였다. 이후 Luciferase 유전자를 가진 pGL3/ basic 벡터와 IL-1β 의 5' 프로모터 부위를 융합하여 pGL3-IL-1β 플라스미드를 제조하였다.

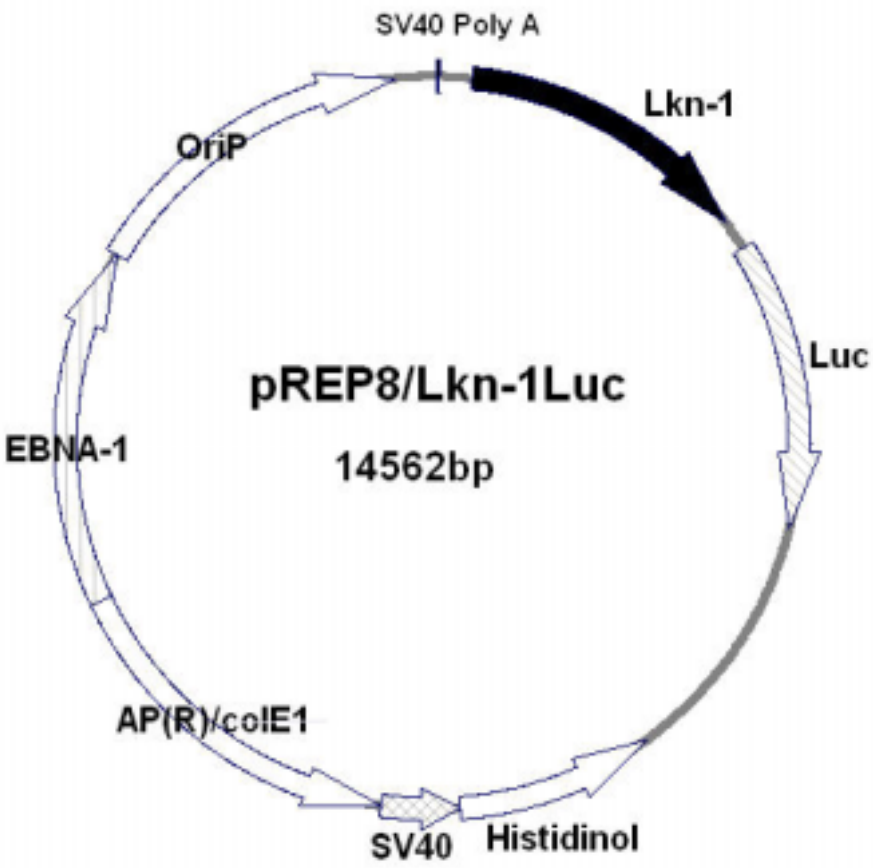


그림 4. pREP8/Lkn-1 Luc 플라스미드의 제조. Stable cell line을 만들기 위한 reporter 유전자를 만들기 위해, 포유세포에서 episome형태로 존재할 수 있는 pREP8 벡터를 이용하였다. pGL3-Lkn-1 플라스미드에서 leukotactin-1의 프로모터 부위와 luciferase 유전자가 융합된 부위를 pREP8 벡터에 클로닝하여 pREP8/Lkn-1 Luc 플라스미드를 제조하였다.

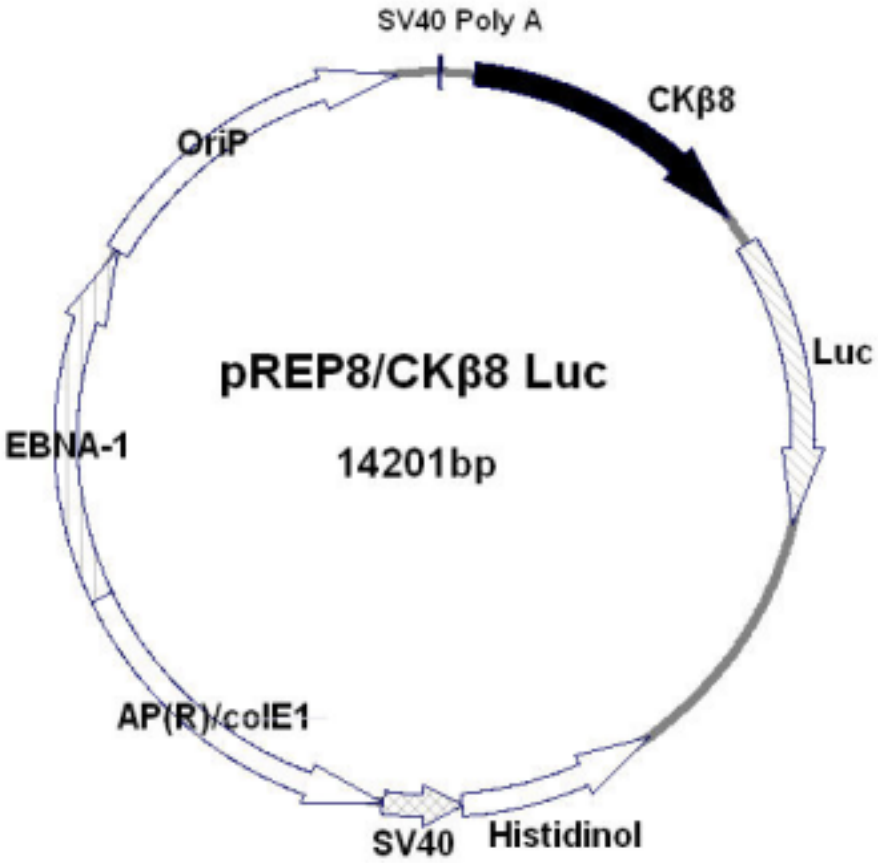


그림 5. pREP8/CKβ8 Luc 플라스미드의 제조. Stable cell line을 만들기 위한 reporter 유전자를 만들기 위해, 포유세포에서 episome형태로 존재할수 있는 pREP8 벡터를 이용하였다. pGL3-CKβ8 플라스미드에서 CKβ8의 프로모터 부위와 luciferase 유전자가 융합된 부위를 pREP8 벡터에 클로닝하여 pREP8/CKβ8 Luc 플라스미드를 제조하였다.

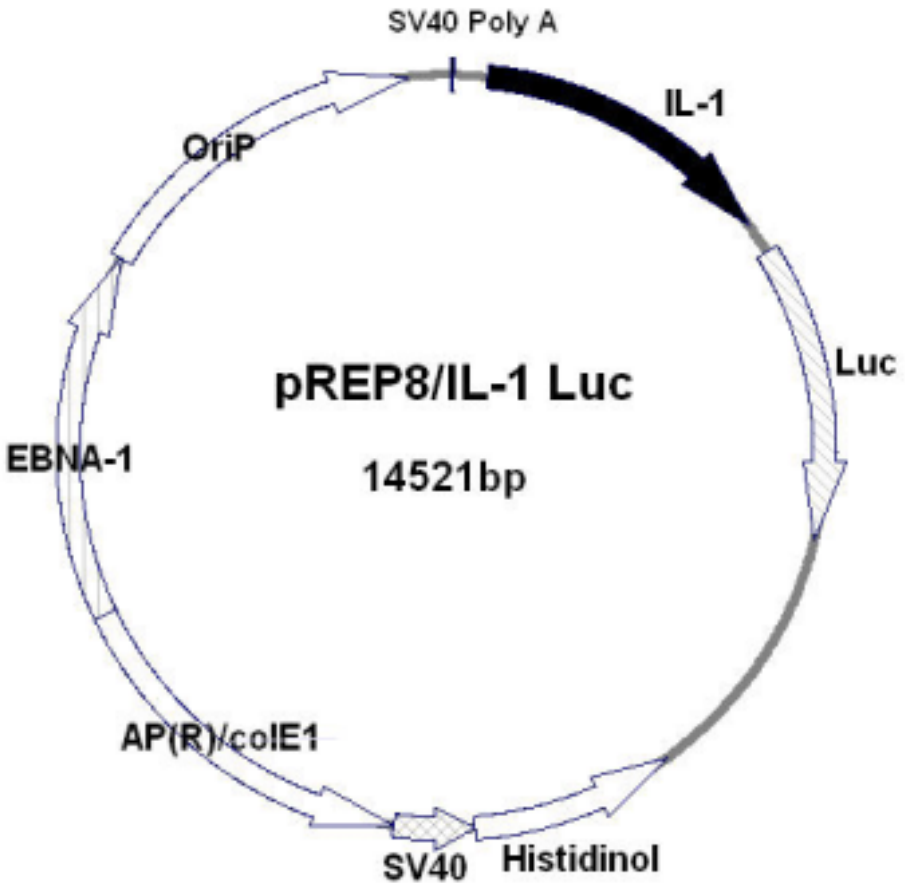


그림 6. pREP8/IL-1 Luc 플라스미드의 제조. Stable cell line을 만들기 위한 reporter 유전자를 만들기 위해, 포유세포에서 episome형태로 존재할수 있는 pREP8 벡터를 이용하였다. pGL3-IL-1 플라스미드에서 IL-1의 프로모터 부위와 luciferase 유전자가 융합된 부위를 pREP8 벡터에 클로닝하여 pREP8/IL-1 Luc 플라스미드를 제조하였다.

나.동맥경화 관련 유전자의 전사 저해 관련 탐색용 stable cell line의 확립

1) 세포배양

실험에 사용된 세포주는 U937 (human monocyte-like histocytic) 세포이며, Korean Cell Line Bank (한국세포주은행) 에서 구입하였다. U937 세포는 RPMI1640 (GibcoBRL) 배지에 Antibiotics (100 unit/ml의 penicillin과 100 g/ml의 streptomycin) 와 Fetal bovine serum (GibcoBRL)이 10% 첨가된 배지에서 배양하였다. 이후 동맥경화 관련 유전자의 전사 저해 관련 탐색용 stable cell line의 확립하기 위해 위에서 클로닝 한 플라스미드를 U937 세포에 transfection하였다.

2) Transfection

Transfection 은 DEAE-dextran 방법을 이용하였으며, 방법은 다음과 같다. 먼저 TS solution 1 ml에 플라스미드 0.5 nmol과 DEAE-dextran 10 mg/ml을 100 ㎕를 넣어 혼합한 후 U937 세포에 첨가하여 상온에서 15분 기다린다. 이후 chloroquine (100 mM)이 포함된 RPMI1640 배지를 10 ml 첨가한후 37 ℃에서 30분 반응 시켰다. 그 다음 RPMI1640 배지로 washing 후 FBS 10%가 포함된 RPMI1640 배지를 첨가하여 24 시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 다음 Stable 세포주를 선별하기 위해 histidinol 1mM이 점가된 배지를 첨가하여, 3-4일 마다 Passing을 약 4주간 수행하여 Stable 세포주를 확립하였다. 확립된 각각의 세포주는 U937/Lkn-1 Luc, U937/CKβ Luc, 그리고 U937/IL-1 Luc 라 명명하였다.

3) Stable cell line의 확립

각각의 확립된 세포주가 제대로 작동하는 지를 확인하기 위해 Luciferase assay를 수행하였다. 각각의 stable cell line에 PMA 10 ng/ml를 시간별로 처리한 후 세포를 회수하여 Luciferase assay를 수행하였다. 실험결과 각각의 확립된 세포주는 PMA에 의해 프로모터의 작동이 유도됨을 확인하였고, **24시간 처리**에서 가장 높은 활성을 보였다. 그림 7 ~ 9는 PMA에 의한 U937/Lkn-1 Luc, U937/CKβ Luc, U937/IL-1 Luc 세포에서 각각의 프로모터의 활성을 보여 주고 있다.

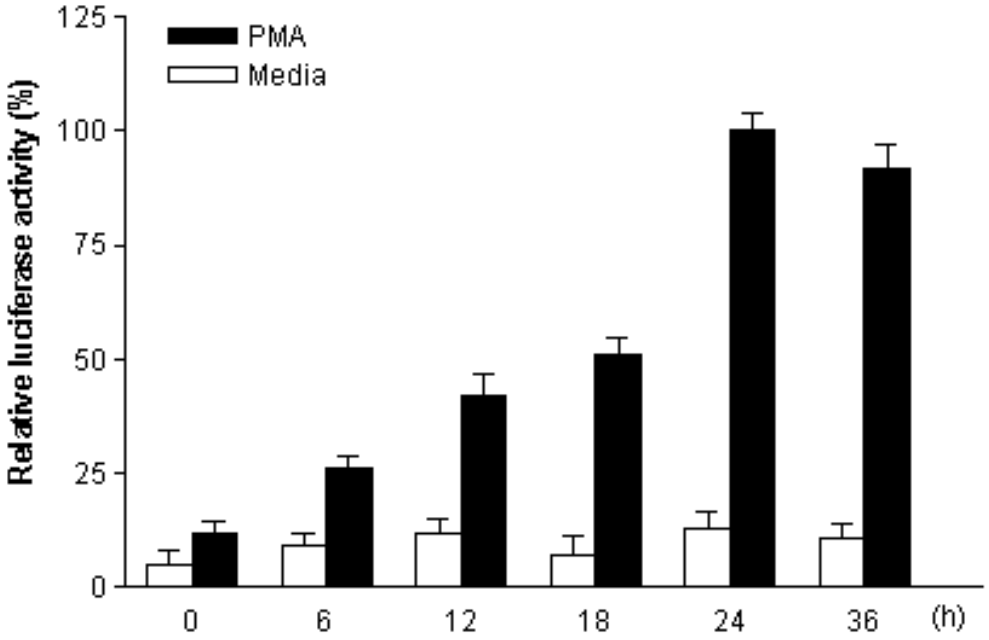


그림 7. U937/Lkn-1 Luc stable cell line 의 확립. 사람 U937 세포에 U937/Lkn-1 Luc 플라스미드를 DEAE-dextran 방법을 이용하여 transfection 하였다. Stable 세포주를 선별하기 위해 histidinol 1mM이 점가된 배지를 첨가하여, 3-4일 마다 Passing을 약 4주간 수행하여 Stable 세포주를 확립하였다. 이후 stable 세포주가 확립 되었는지를 확인하기 위해 U937/Lkn-1 Luc stable cell line에 PMA 10 ng/ml를 시간별로 처리한 후 세포를 회수하여 Luciferase assay를 수행하였다.

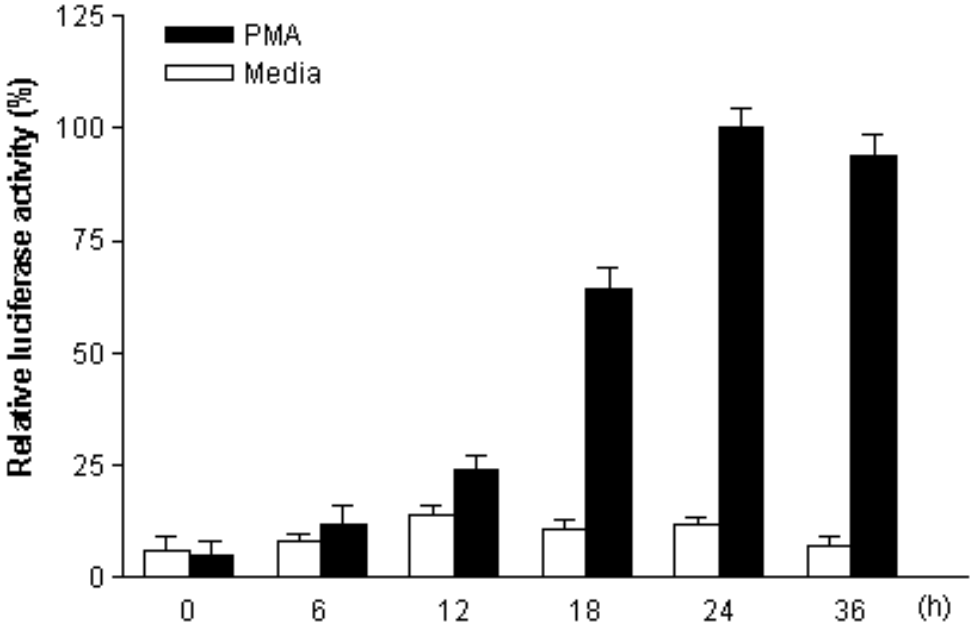


그림 8. U937/CKβ8 Luc stable cell line 의 확립. 사람 U937 세포에 U937/CKβ8 Luc 플라스미드를 DEAE-dextran 방법을 이용하여 transfection 하였다. Stable 세포주를 선별하기 위해 histidinol 1mM이 점가된 배지를 첨가하여, 3-4일 마다 Passing을 약 4주간 수행하여 Stable 세포주를 확립하였다. 이후 stable 세포주가 확립 되었는지를 확인하기 위해 U937/CKβ8 Luc stable cell line에 PMA 10 ng/ml를 시간별로 처리한 후 세포를 회수하여 Luciferase assay를 수행하였다.

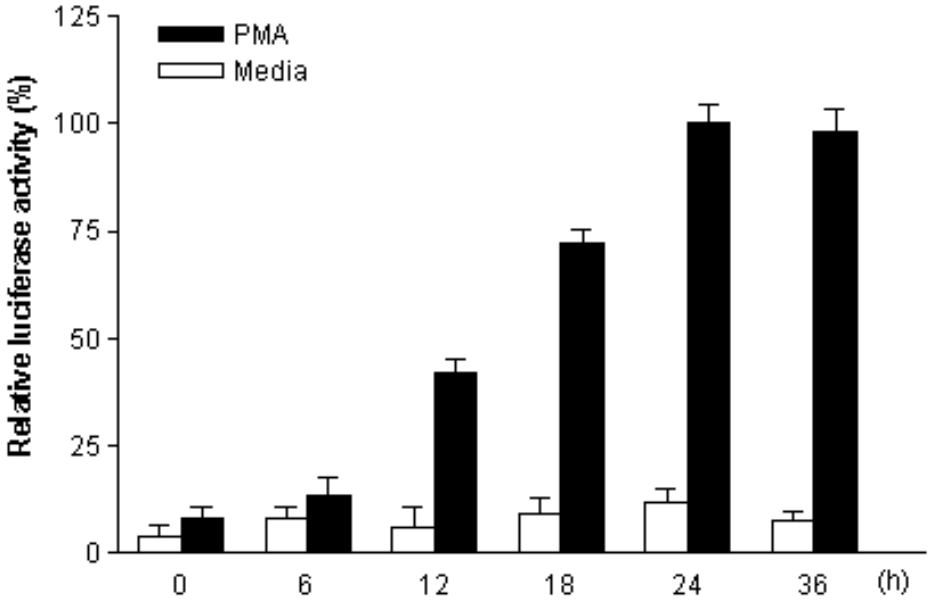


그림 9. U937/IL-1 Luc stable cell line 의 확립. 사람 U937 세포에 U937/IL-1 Luc 플라스미드를 DEAE-dextran 방법을 이용하여 transfection 하였다. Stable 세포주를 선별하기 위해 histidinol 1mM이 점가된 배지를 첨가하여, 3-4일 마다 Passing을 약 4주간 수행하여 Stable 세포주를 확립하였다. 이후 stable 세포주가 확립 되었는지를 확인하기 위해 U937/IL-1 Luc stable cell line에 PMA 10 ng/ml를 시간별로 처리한 후 세포를 회수하여 Luciferase assay를 수행하였다.

다. 식물 추출물의 동맥경화 관련 사이토카인 전사 저해 활성 물질 탐색 및 분석

본 연구 과제를 수행하기 위해 위에서 설명된 동맥경화 관련 사이토카인 유전자의 프로모터를 클로닝 하여 확립한 stable 세포주를 이용하여 전사 저해 물질 탐색을 수행하였다.

1) 식물추출물의 동맹경화 관련 유전자인 Leukotactin-1 전사 저해 활성 물질의 탐색

가) 식물추출물의 Leukotactin-1 전사 저해 활성 후보물질의 확립

본 연구에서 사용된 세포주는 Leukotactin-1 프로모터를 포함한 확립된 U937/Lkn-1 Luc stable transfectants를 이용하였다. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5×10^5개로 분주 후 12 시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 뱅크의 시료 중 먼저 60 여종의 추출물(crude extract) 을 최종 농도 100 ㎍/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 Lkn-1 생성을 저해하는 물질을 탐색하는 실험을 수행하였다.

Leukotactin-1의 생성 저해제를 탐색한 결과가 그림 10 ~ 13에 보이고 있다. PMA에 의해 유도된 leukotactin-1의 전사활성을 100%로 정해 놓고 식물 추출물을 함께 처리하여 나타난 활성을 비교 값으로 환산하여 저해제의 활성을 탐색하였다. 그림 4 에서 보는 바와 같이 **#7, 9, 10, 21, 25, 30, 39 번이 동맥관련 사이토카인인 leukotactin-1의 전사에 영향을 주었다.** 이 중 #9. #10인 경우는 leukotactin-1의 생성을 활성화 시켰다. 본 연구에서는 생성 저해제의 탐색에 초점을 맞추고 있으므로 #7, 21, 25, 30, 39 번을 중심으로 실험을 수행하였다.

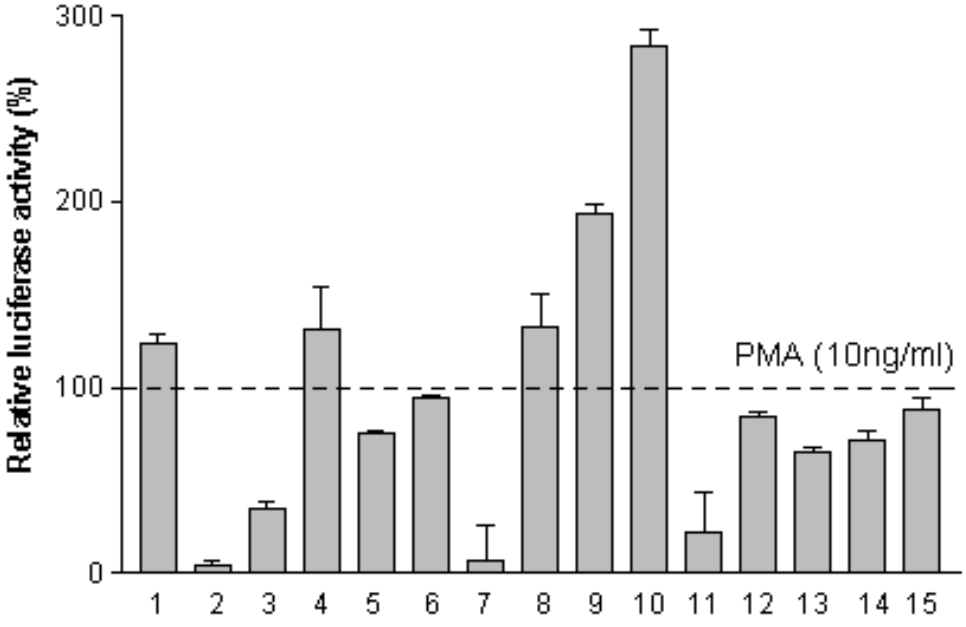


그림 10. 식물추출물 1~15 시료의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 뱅크의 시료 중 #1 - 15 sample을 최종 농도 100 ㎍/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 Lkn-1 생성을 저해하는 물질을 탐색하였다.

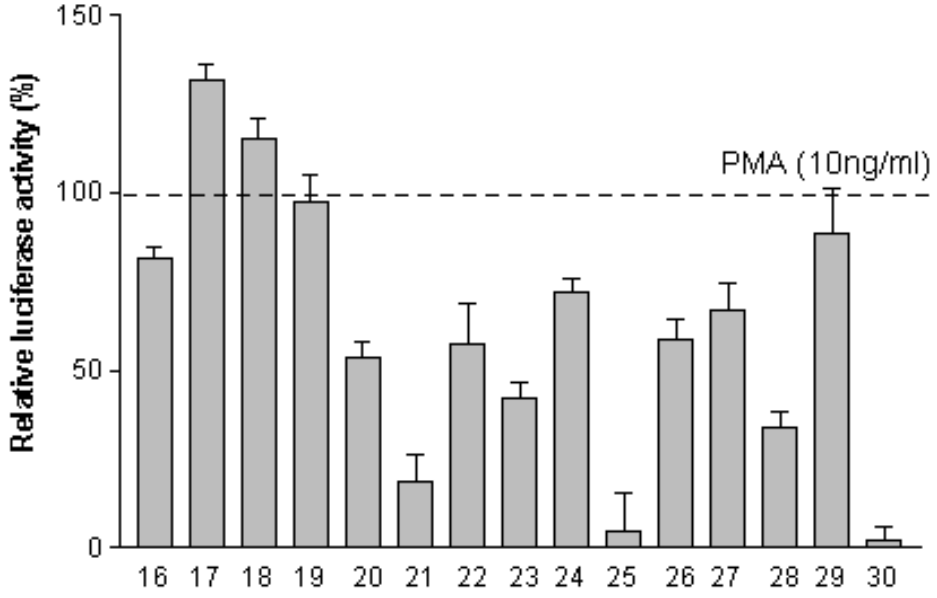


그림 11. 식물추출물 16~30 시료의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 뱅크의 시료 중 #16 - 30 sample을 최종 농도 100 ㎍/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 Lkn-1 생성을 저해하는 물질을 탐색하였다.

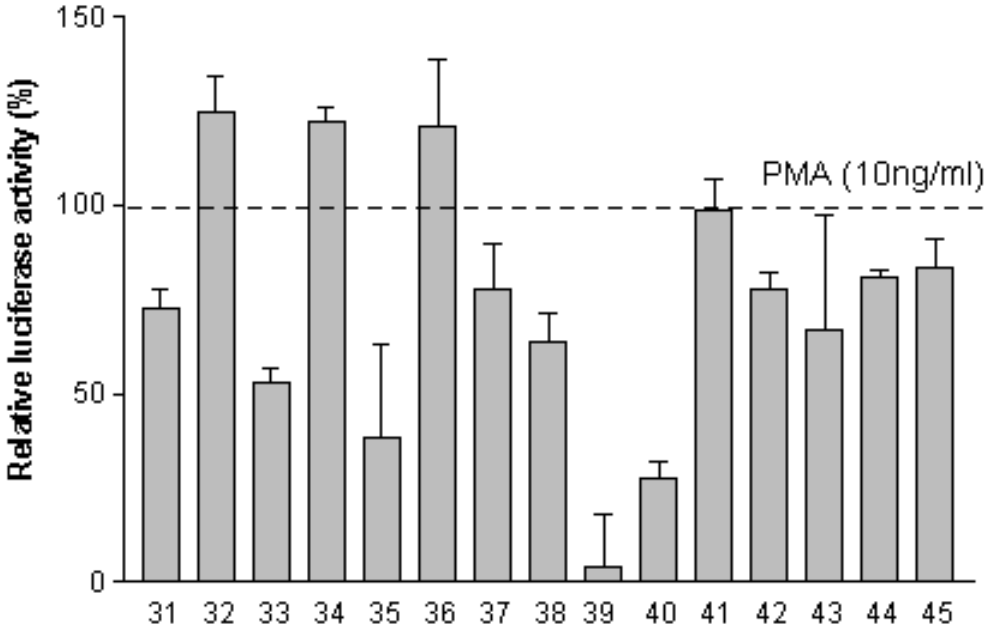


그림 12. 식물추출물 31~45 시료의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 뱅크의 시료 중 #31 - 45 sample을 최종 농도 100 ㎍/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 Lkn-1 생성을 저해하는 물질을 탐색하였다.

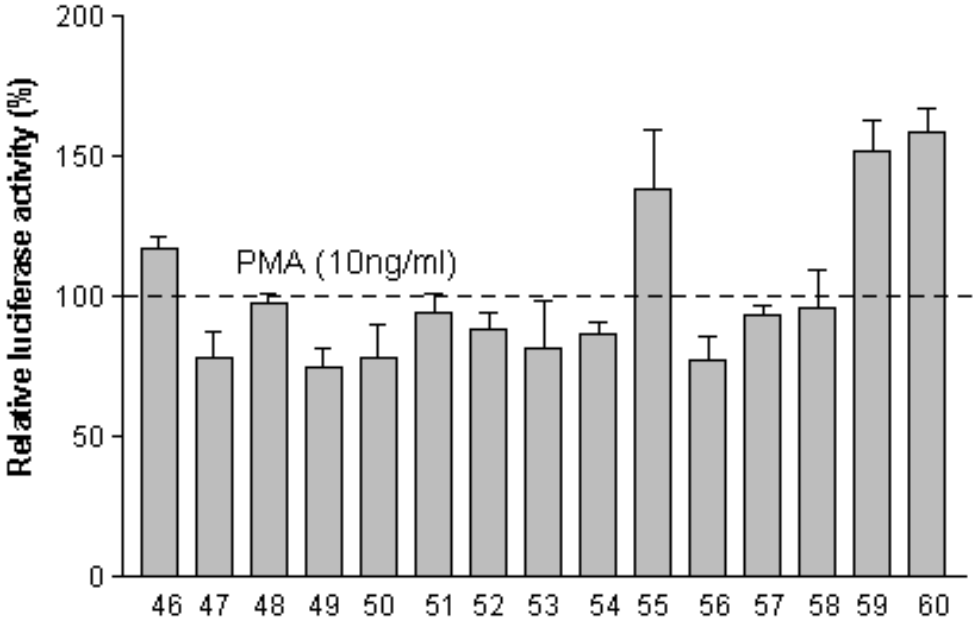


그림 13. 식물추출물 46~60 시료의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 뱅크의 시료 중 #46 - 60 sample을 최종 농도 100 ㎍/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 Lkn-1 생성을 저해하는 물질을 탐색하였다.

나) Leukotactin-1 저해물질의 dose-dependent 저해 활성 분석

Leukotactin-1의 전사 저해 활성을 보이는 후보 물질인 활성 #7, 21, 25, 30, 39번 식물 추출물을 희석하여 0, 10, 30, 50 ㎍/ml 농도에서 두 번째 탐색을 수행하였다 (그림 14 ~ 18). 그러나 결과에서 보여지 듯 두 번째 탐색과정에서 #7, 25, 39번 식물 추출물은 PMA에 의해 유도된 Leukotactin-1의 전사 저해 활성에 아무런 영향을 미치지 않았고, #21인 경우는 오히려 전사 활성을 증가시킴을 확인하였다. 이것은 첫 번째 탐색과정에서의 실험적 오류 이거나 세포의 독성에 의한 것으로 판단되었다. 그러나 **#30번의 추출물은 농도에 의존적으로 PMA에 유도된 Leukotactin-1의 전사활성을 저해함을 확인하였다** (그림 17). 이 물질은 동맥경화에 관여하는 사이토카인의 저해 물질의 후보 물질로 이후 실험을 수행하였다.

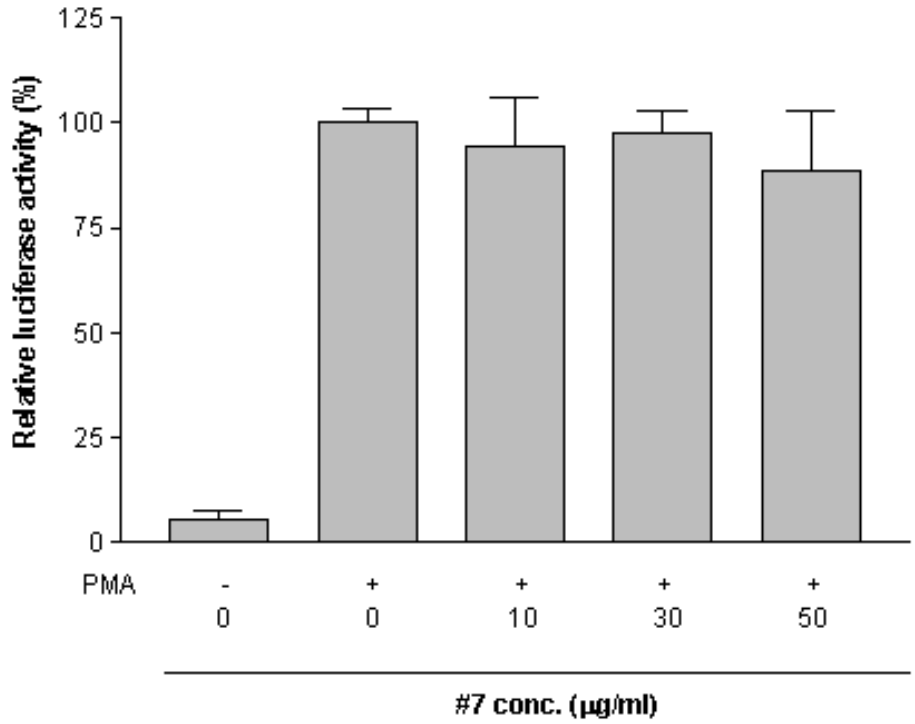


그림 14. 식물추출물 #7 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향 분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포에 Leukotactin-1의 전사 저해 활성을 보이는 후보 물질인 #7번 식물 추출물을 희석하여 10, 30, 50 μg/ml 농도로 처리 하였다. 24시간 후 세포를 회수하여, luciferase assay를 수행하였다.

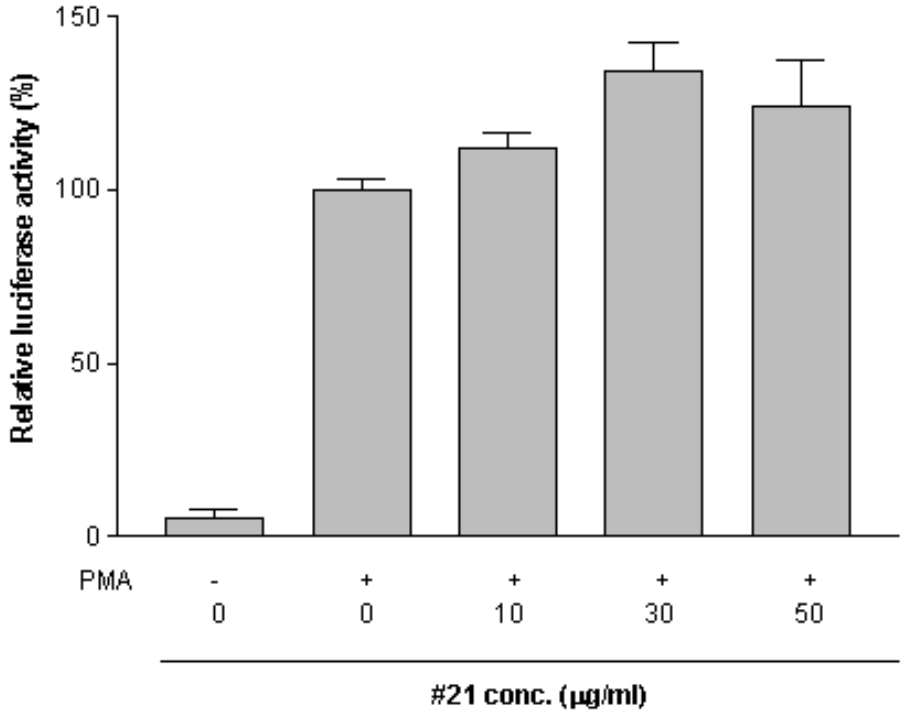


그림 15. 식물추출물 #21 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향 분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포에 Leukotactin-1의 전사 저해 활성을 보이는 후보 물질인 #15번 식물 추출물을 희석하여 10, 30, 50 μg/ml 농도로 처리 하였다. 24시간 후 세포를 회수하여, luciferase assay를 수행하였다.

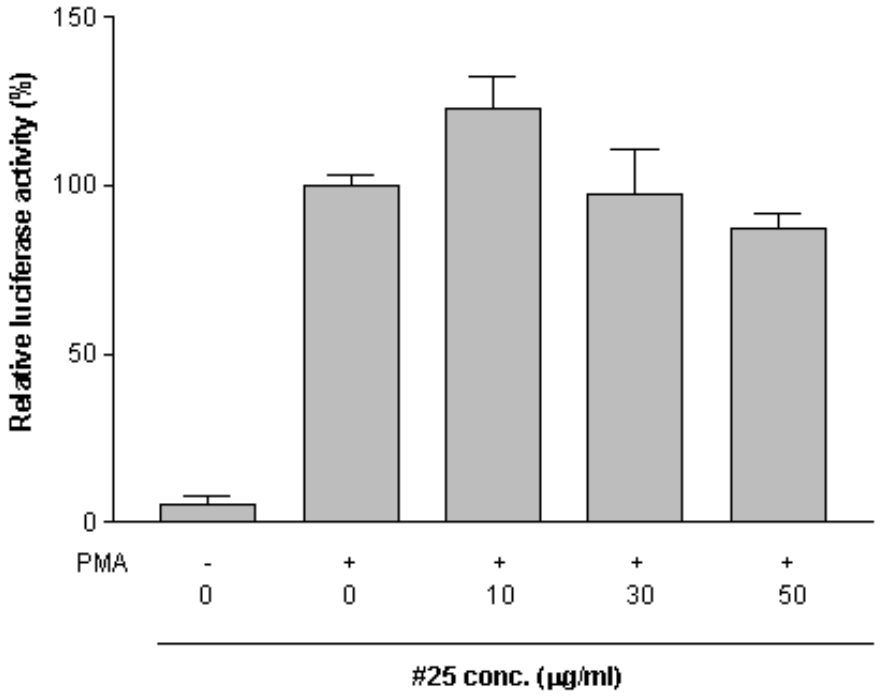


그림 16. 식물추출물 #25 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향 분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포에 Leukotactin-1의 전사 저해 활성을 보이는 후보 물질인 #25 식물 추출물을 희석하여 10, 30, 50 μg/ml 농도로 처리 하였다. 24시간 후 세포를 회수하여, luciferase assay를 수행하였다.

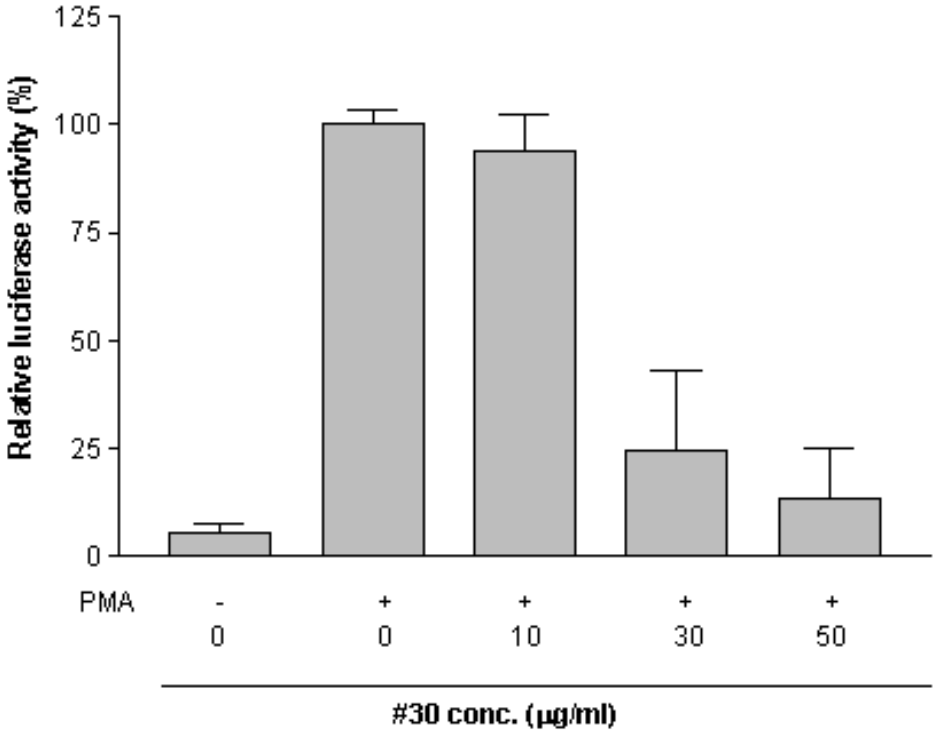


그림 17. 식물추출물 #30 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향 분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포에 Leukotactin-1의 전사 저해 활성을 보이는 후보 물질인 #30번 식물 추출물을 희석하여 10, 30, 50 μg/ml 농도로 처리 하였다. 24시간 후 세포를 회수하여, luciferase assay를 수행하였다.

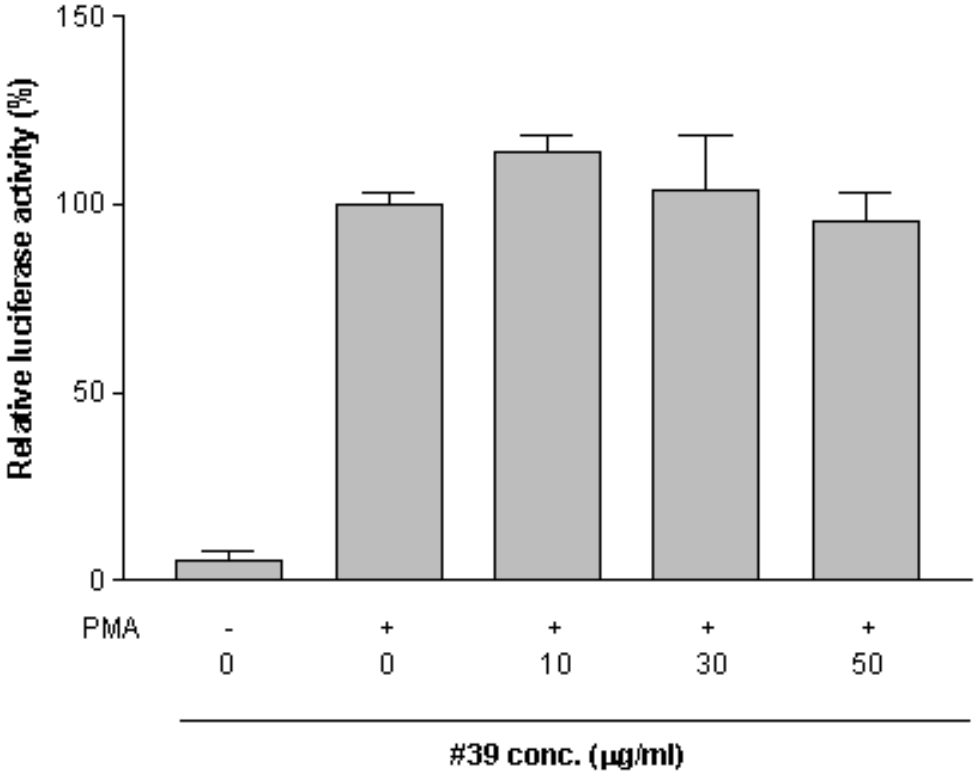


그림 18. 식물추출물 #39 시료의 농도에 따른 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향 분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포에 Leukotactin-1의 전사 저해 활성을 보이는 후보 물질인 #39번 식물 추출물을 희석하여 10, 30, 50 μg/ml 농도로 처리 하였다. 24시간 후 세포를 회수하여, luciferase assay를 수행하였다.

다) Leukotactin-1 전사 저해 활성 후보물질의 독성 효과 측정

위의 실험에서 Leukotactin-1 의 전사 저해를 시키는 후보 물질을 발굴해 내었다. 하지만 이것이 Leukotactin-1 의 전사를 저해하는 것인지 cell death를 일으킴으로써 luciferase activity값을 감소하는지를 알기 위해 세포 독성 시험을 수행하였다. 세포독성 실험은 WST-1 kit (Takara)를 이용하여 수행하였다. WST-1 kit는 tetrazolium salt가 mitochondria의 호흡사슬에 존재하여 생존세포에만 활성이 있는 succinate-tetrazolium-reductase에 의해 fomazan 색소로 분해 되는 원리를 이용하여 세포독성을 측정한다. 96 well plate의 각각의 well에 1 x 10^4의 U937 세포를 깔고 추출물의 농도를 Leukotactin-1 의 전사 저해를 측정한 농도인 5 ㎍/ml, 10 ㎍/ml, 20 ㎍/ml, 30 ㎍/ml, 50 ㎍/ml을 처리하였다. 이후 WST-1를 가해주고 다시 37 ℃, 5% CO_2 하에서 1 시간 배양해 주었다. 그 다음 흡광도 파장을 420-480 nm 사이에서, 대조파장을 600 nm 이상에서 ELISA reader로 세포의 viability를 측정하였다. # 30 추출물의 경우 모든 농도에서 50% 이상의 생존율을 확인할 수 있었으나 전사 저해활성이 있는 10 과 30 ㎍/ml의 농도에서 30% 이상의 세포 독성을 확인할 수 있었다 (그림 19). 이는 전사 저해 활성에 비해 세포독성이 너무 큼을 확인할 수 있다.

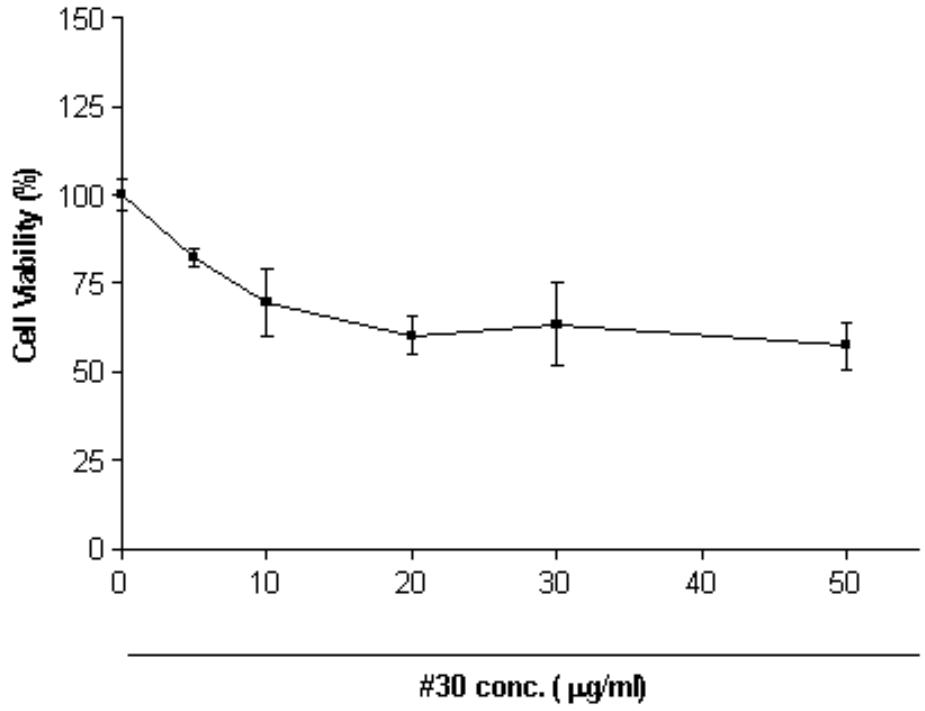


그림 19. 식물추출물 #30 시료의 세포독성에 미치는 영향 분석. 세포독성은 WST-1 kit를 이용하였다. 96 well plate의 각각의 well에 1 x 10^4의 U937 세포를 깔고 # 30 추출물의 농도를 5 μg/ml, 10 μg/ml, 20 μg/ml, 30 μg/ml, 50 μg/ml을 처리하였다. 이후 WST-1를 가해주고 다시 37 ℃, 5% CO_2 하에서 1 시간 배양해 주었다. 그 다음 흡광도 파장을 420-480 nm 사이에서, 대조파장을 600 nm 이상에서 ELISA reader로 세포의 viability를 측정하였다 .

2) 식물추출물의 CKβ8 전사활성 저해 물질의 탐색

가) 식물추출물의 CKβ8 전사 저해 활성 후보물질의 확립

본 연구에서 사용된 세포주는 CKβ8 프로모터를 포함한 확립된 U937/CKβ8 Luc stable transfectants를 이용하였다. 위 실험에서 와 같이 세포를 12-well plate의 각각에 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 18시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 뱅크의 시료 중 약 200여종의 추출물(crude extract) 을 최종 농도 10 μg/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 CKβ8 생성을 저해하는 물질을 탐색하는 실험을 수행하였다.

약 200 여 종류를 분석하였는데 **그중 일부의 결과를 아래 그림 20 ~ 23 에 나타내었다. 그리고 일부 식물 추출물의 전사 저해 활성을 표로 요약하였다**. (표 1)

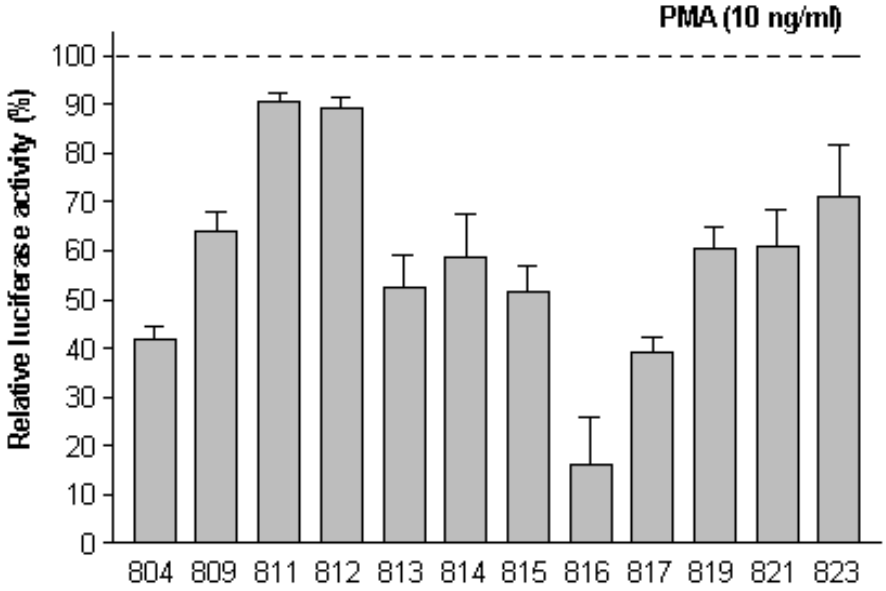


그림 20. 식물추출물 804~823 시료의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 중 #804 - 823 sample을 최종 농도 10 μg/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 CKβ8 생성을 저해하는 물질을 탐색하였다.

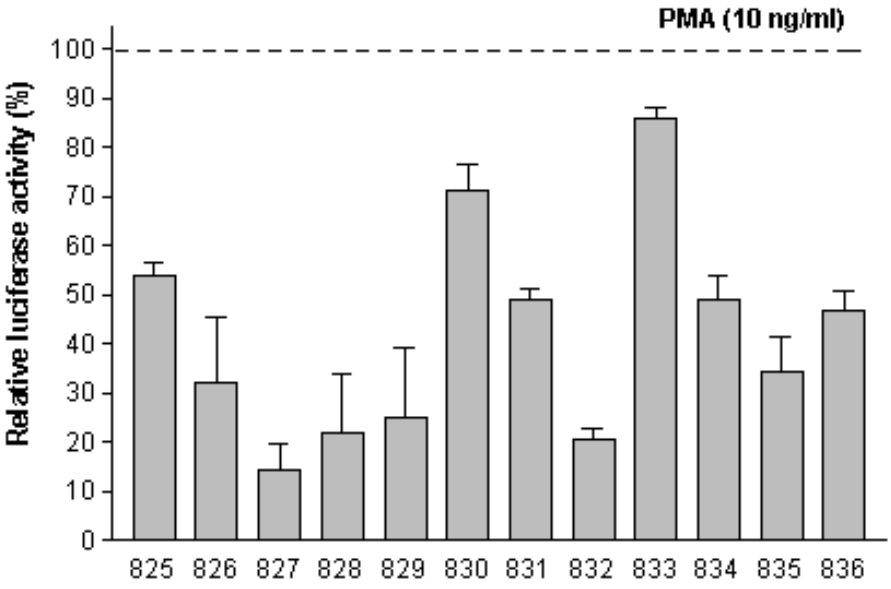


그림 21. 식물추출물 825~836 시료의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 중 #825 - 836 sample을 최종 농도 10 μg/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 CKβ8 생성을 저해하는 물질을 탐색하였다.

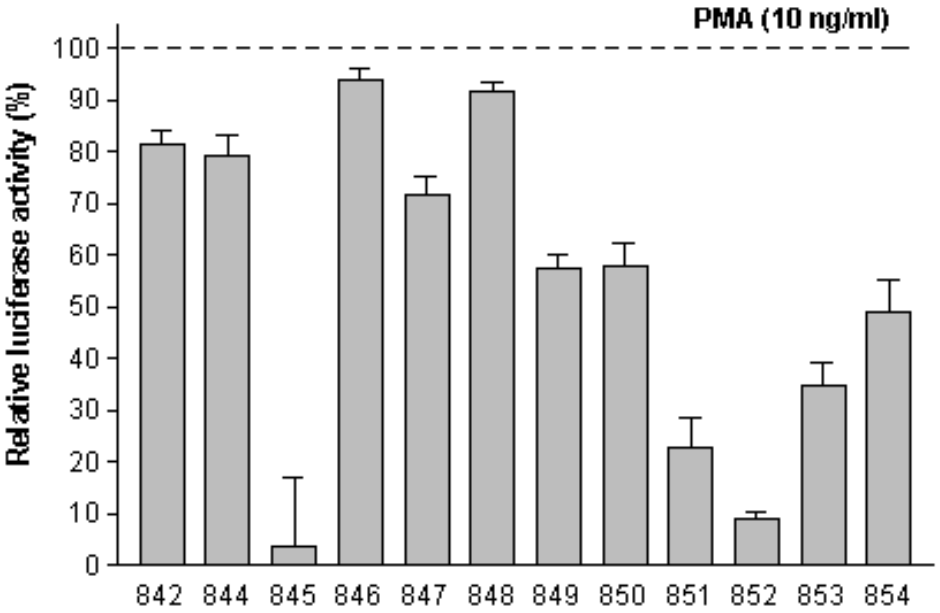


그림 22. 식물추출물 842~854 시료의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 중 #842 - 854 sample을 최종 농도 10 μg/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 CKβ8 생성을 저해하는 물질을 탐색하였다.

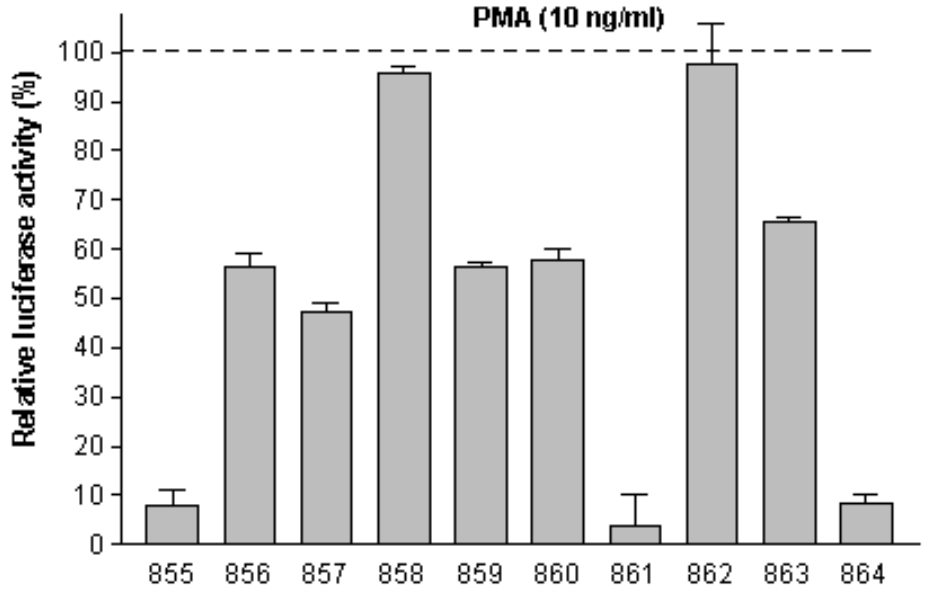


그림 23. 식물추출물 855~864 시료의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 식물 추출물 중 #855 - 864 sample을 최종 농도 10 μg/ml로 세포에 함께 처리하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 CKβ8 생성을 저해하는 물질을 탐색하였다.

표 1. 식물추출물의 CK18 전사활성 저해율 (%)

sample	저해률(%)	sample	저해률(%)	sample	저해률(%)
861	96.27	836	53.05	809	35.93
845	96.13	857	52.92	863	34.59
855	92.08	831	51.16	823	28.90
864	91.74	854	51.11	830	28.80
852	91.08	834	51.06	847	28.15
827	85.68	815	48.50	844	20.70
816	83.82	813	47.57	842	18.44
832	79.20	825	46.22	833	14.04
828	77.92	859	43.6	812	10.58
851	77	856	43.44	811	9.28
829	75.02	849	42.44	848	8.20
826	67.86	860	42.21	846	6.14
835	65.78	850	41.85	858	4.47
853	65.08	814	41.24	862	2.63
817	60.87	819	39.41		
804	58	821	39.20		

나) CKβ8 저해물질의 dose-dependent 저해 활성 분석

70% 이상 저해활성을 가지는 후보 물질 중에서 829, 851, 852, 861 추출물에 대해 농도에 따른 전사 저해활성을 측정하였다. 실험 방법은 동일하게 수행 하였으며 농도는 (0, 1, 10, 20 mg/ml)로 처리하였고 PMA 양은 10 ng/ml을 처리해 주었다. 먼저 829 추출물의 경우 추출물의 농도가 20 mg/ml 에서 70% 정도를 저해 하였고 5 와 10 mg/ml 에서는 40% 정도의 비슷한 저해율을 보였으며 1 mg/ml 에서는 거의 저해시키지 않음을 확인 할 수 있었다 (그림 24A). 다음으로 851추출물의 경우 농도 의존적 경향을 보였고 또한 5 와 10 mg/ml 에서도 차이가 남을 확인 할 수 있었다 (그림 24B). 852의 경우 20 mg/ml 에서 80%이상을 저해 하는 것을 확인 할 수 있었으며 가장 낮은 농도인 1 mg/ml 에서도 20% 가량 저해하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 24C). 다음으로 861 추출물의 경우에는 급격하게 저해하는 경향을 확인 했고, 10 mg/ml 에서도 basal level 까지 저해 하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 24D). 결과에서 보듯이 4가지 물질 모두 동일하게 농도 의존적으로 전사를 저해하였지만 물질에 따라 농도에 따른 미비한 차이를 확인 할 수 있었으며 위의 결과와 동일한 양상을 보임으로써 농도에 따른 저해활성은 검증이 된 것으로 보인다.

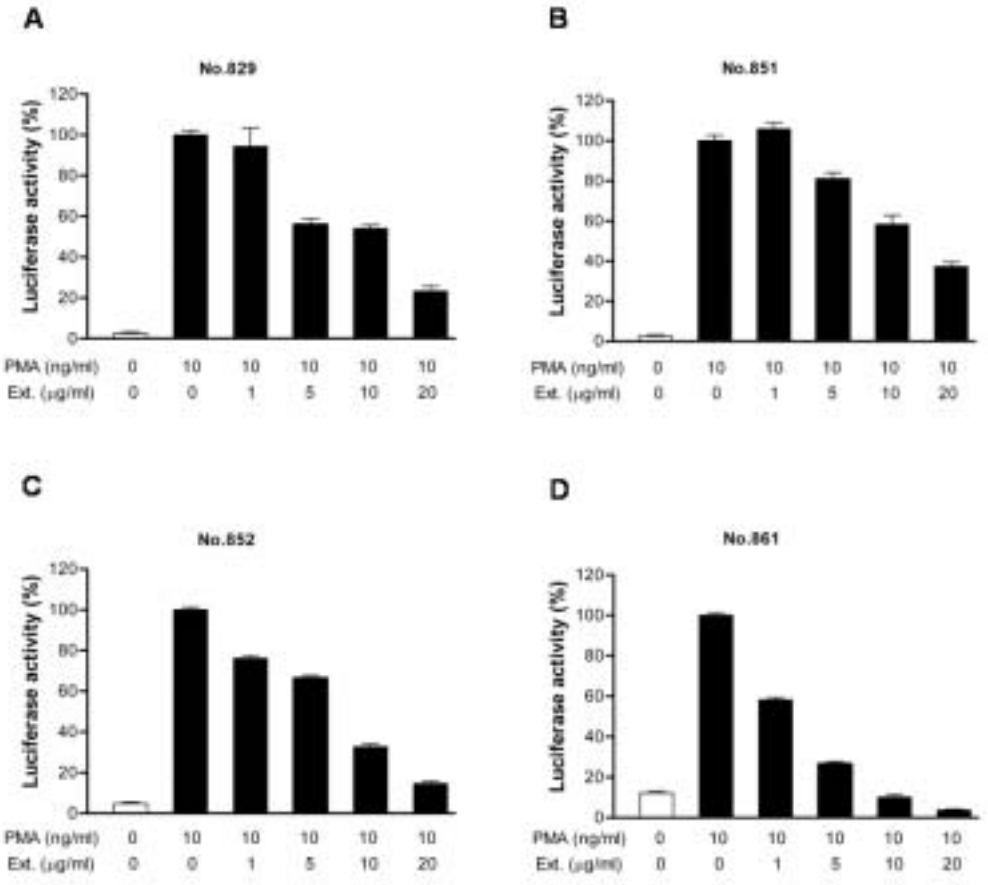


그림 24. 식물추출물 #829, 851, 852, 861 시료들의 농도에 따른 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향분석. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포에 의 CKβ8 전사 저해 활성을 보이는 후보 물질인 #829, 851,852, 861번 식물 추출물을 희석하여 0,1,5,10, 20 μg/ml 농도로 각각 처리 하였다. 24시간 후 세포를 회수하여, luciferase assay를 수행하였다.

다) CKβ8 전사 저해 활성 후보물질의 세포 독성 효과 측정

위의 실험에서 CKβ8의 전사 저해를 시키는 4가지 후보 물질을 발굴해 내었다. 하지만 이것이 CKβ8의 전사를 저해하는 것인지 아니면 cell death를 일으킴으로써 luciferase activity값을 감소하는 것인지를 알기 위해 세포독성실험을 수행하였다. 추출물의 농도는 CKβ8의 전사 저해를 측정한 농도인 1 μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml, 15 μg/ml, 20 μg/ml을 처리하였으며 위에서와 같이 WST-1 kit를 이용하여 세포독성을 분석하였다. (그림 25). 829 추출물의 경우 50% 이상의 생존율을 확인 할 수 있는 농도가 1 μg/ml 과 5 μg/ml 의 사이였고 나머지 높은 농도에서는 세포 독성이 심각한 것을 알 수가 있었다 (그림 25A). 다음으로 851와 861의 경우도 마찬가지로 거의 모든 농도에서 독성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 25B,D). 그러나 852 추출물의 경우 농도에 따른 세포 독성은 거의 없었으며 가장 높은 농도인 20 μg/ml 에서도 생존율이 80% 정도로 나타나는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 25C). 이와 같은 실험을 통해 알 수 있듯이 전사 저해 활성을 보이는 4가지 물질 중 829, 851 그리고 861은 세포 독성에 의한 결과라 미루어 짐작 할 수 있고, **852만이 독성이 아닌 물질의 전사 저해 활성을 지녔다고 생각할 수 있다.**

852물질은 붉나무 추출물이며 붉나무는 (*Rhus chinensis Mill.*) 오배자나무, 염부목, 굴나무, 뿔나무, 불나무라고도 한다 붉나무는 민간에서 흔히 이용되는 식물로써 그 기작에 대한 연구는 크게 이루어진 내용이 없다. 일단 붉나무 추출물이 면역 세포인 U937 세포에서 생리활성을 나타내는 농도에서는 독성이 없는 것을 확인 하였고 또한 CKβ8의 전사를 저해 시키는 것을 확인 하였다. **붉나무의 어떤 성분에 의한 효과인지는 아직 더 많은 실험을 통해 확인해야 할 과제이다.**

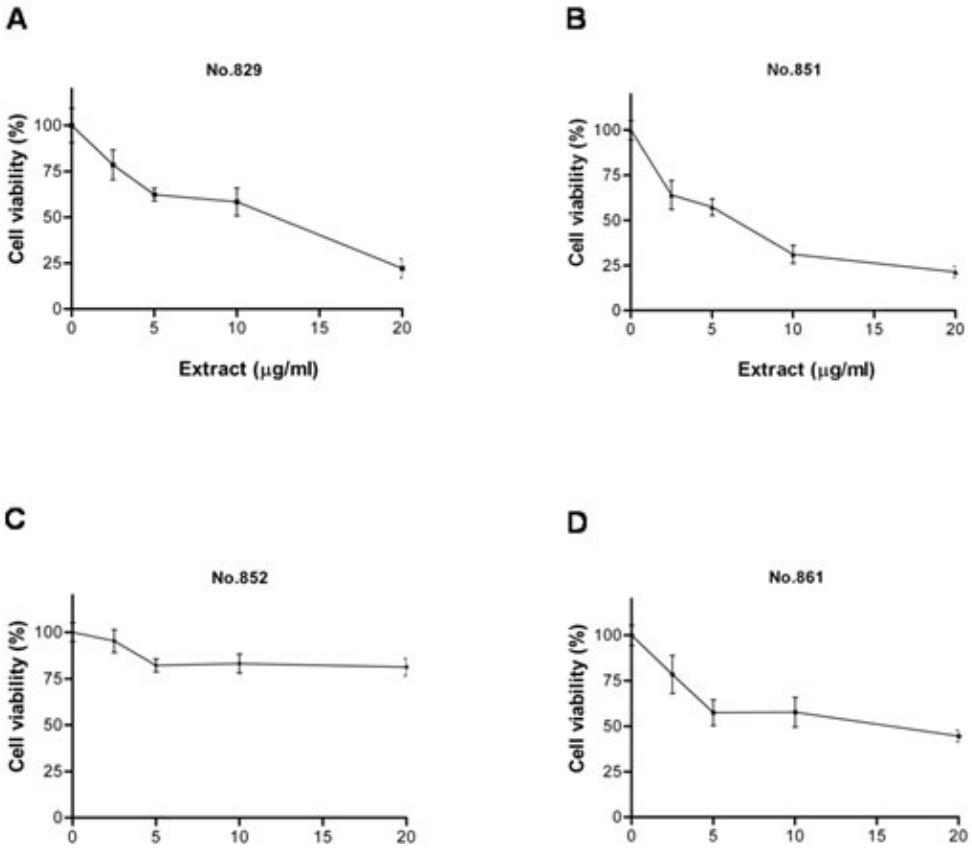


그림 25. 식물추출물 #829, 851, 852, 861 시료들의 세포독성에 미치는 영향 분석. 세포독성은 WST-1 kit를 이용하였다. 96 well plate의 각각의 well에 1 x 10^4의 U937 세포를 깔고 #829, 851,852, 861 추출물의 농도를 5 μg/ml, 10 μg/ml, 15 μg/ml, 20 μg/ml, 처리하였다. 이후 WST-1를 가해주고 다시 37 ℃, 5% CO_2 하에서 1 시간 배양해 주었다. 그 다음 흡광도 파장을 420-480 nm 사이에서, 대조파장을 600 nm 이상에서 ELISA reader로 세포의 viability를 측정하였다.

라.상추추출물의동맥경화 관련 사이토카인의 저해 효능 분석

본 연구진에서 제조한 **상추 추출물이 동맥경화와 관련된 사이토카인의 생성에 저해 활성**을 보이는지를 분석하기위해 위에서 확립한 Stable 세포주를 이용하여 사이토카인의 전사 저해 활성을 분석하였다.

1) 상추 추출물의 Leukotactin-1 유전자의 전사 저해 효능 분석

본 연구에서 사용된 세포주는 Leukotactin-1 프로모터를 포함한 확립된 U937/Lkn-1 Luc stable transfectants를 이용하였다. 세포를 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 18시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포를 10 ng/ml의 PMA와 상추 추출물의 농도별 (0.1, 1, 10, 50, 100, 200 ㎍/ml)로 함께 처리 하였다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase assay를 수행하여 PMA에 의해 유도된 Lkn-1 생성을 저해하는 물질을 탐색하는 실험을 수행하였다. 상추 추출물에 의한 Lkn-1유전자의 전사활성 저해는 그림. 26 에서 보여 지고 있다. 상추 추출물은 Lkn-1 전사 저해 활성에 별로 영향을 미치지 않았다.

2) 상추 추출물의 CK㉧8 유전자의 전사 저해 효능 분석

다음으로 상추 추출물이 CK㉧8 유전자의 전사 저해에 활성이 있는지를 분석하였다. U937/CK㉧8 Luc stable transfectants를 이용하여 위와 같이 실험한 결과, 상추 추출물은 Lkn-1과 마찬가지로 CK㉧8 유전자의 전사 저해에 별다른 영향을 미치지 않았다 (그림 27).

3). 상추 추출물의 세포독성 실험

본 연구진의 결과에서 상추 추출물은 많은 양의 ㉧-sitosterol 과 Phytol을 함유 하고 있다. 또한 상추에서 추출한 Phytol 성분은 혈장 중의 콜레스테롤 함량을 낮춤을 알 수 있었다. 상추 추출물이 세포의 독성에 영향을 주는지를 확인하기 위해 위 실험에서 사용한 WST-1 kit를 이용하여 세포독성을 확인 하였다. 상추 추출물을 U937 세포에 농도 별로 처리한 결과 세포 독성에 아무런 영향을 미치지 않았다 (그림 28).

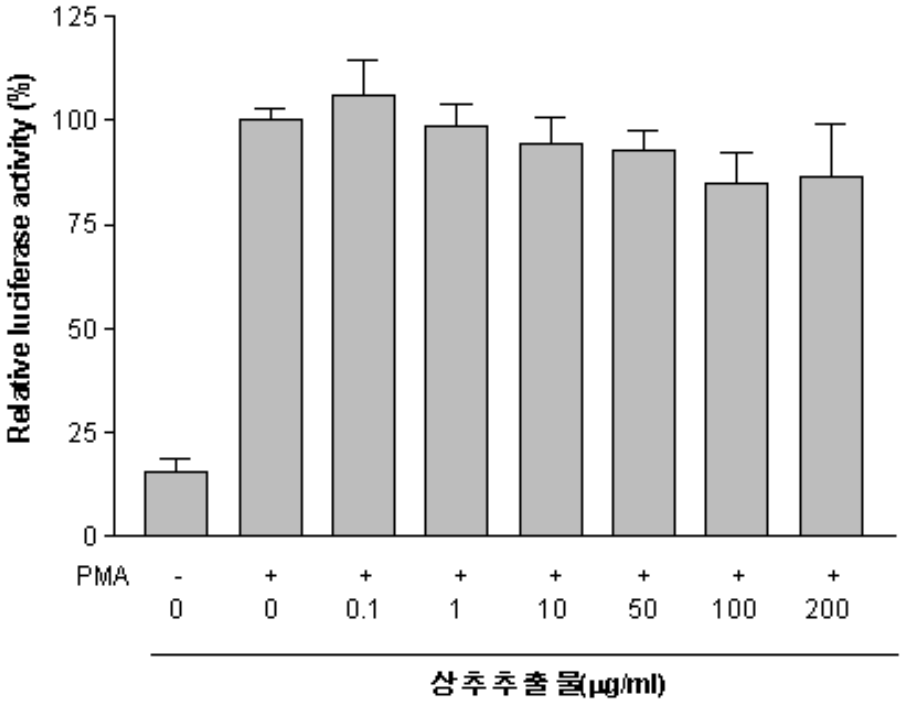


그림 26. 농도에 따른 상추추출물의 Leukotactin-1 전사 활성에 미치는 영향분석. U937/Lkn-1 Luc stable cell line을 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포에 상추추출물을 희석하여 0,1,10, 50 100, 200 μg/ml 농도로 각각 처리 하였다. 24시간 후 세포를 회수하여, luciferase assay를 수행하였다.

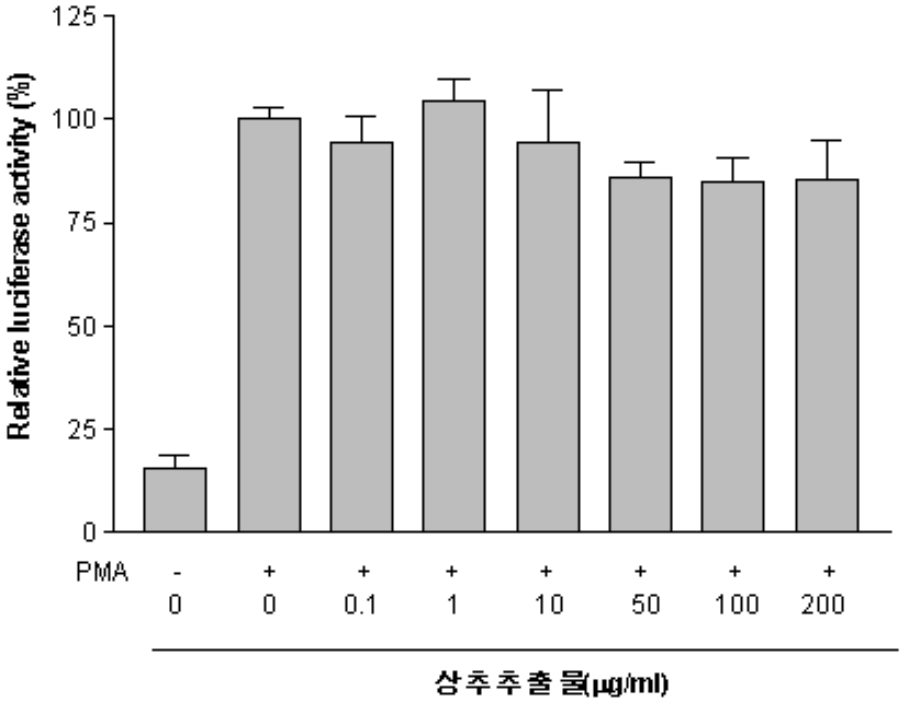


그림 27. 농도에 따른 상추추출물의 CKβ8 전사 활성에 미치는 영향분석. U937/CKβ8 Luc stable cell line을 12-well plate의 각각의 well 에 5 x 10^5개로 분주 후 12시간 serum이 없는 배지에서 starvation 시킨다. 이후 세포에 상추추출물을 희석하여 0,1,10, 50 100, 200 μg/ml 농도로 각각 처리 하였다. 24시간 후 세포를 회수하여, luciferase assay를 수행하였다.

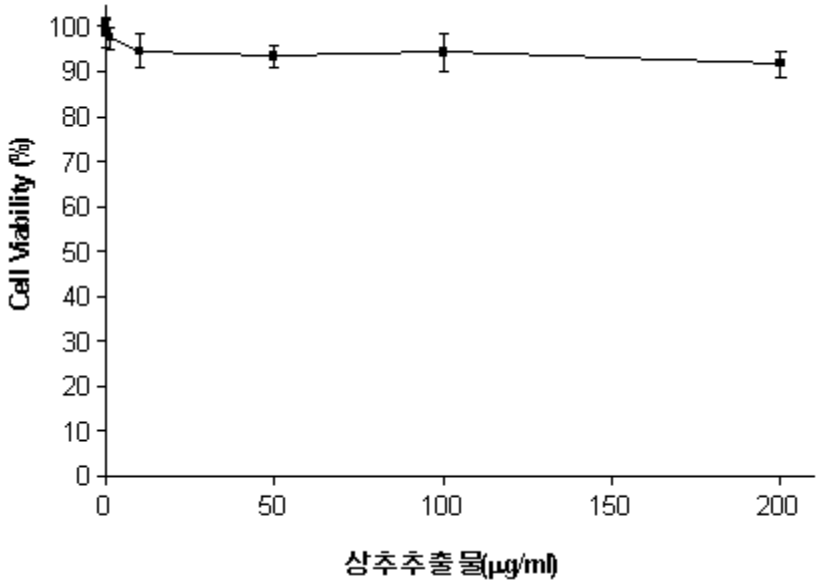


그림 28. 농도에 따른 상추추출물의 세포독성에 미치는 영향 분석. 세포독성은 WST-1 kit를 이용하였다. 96 well plate의 각각의 well에 1 x 10^4의 U937 세포를 깔고 상추추출물의 농도를 0 μg/ml, 1 μg/ml, 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 150 μg/ml, 200 μg/ml 처리하였다. 이후 WST-1를 가해주고 다시 37 ℃, 5% CO_2 하에서 1 시간 배양해 주었다. 그 다음 흡광도 파장을 420-480 nm 사이에서, 대조파장을 600 nm 이상에서 ELISA reader로 세포의 viability를 측정하였다 .

마. 상추 추출물 시제품의 염증 유발 및 동맥경화 관련 사이토카인의 저해 효능 분석

본 연구진은 상추 적토마의 추출물을 이용하여 시제품을 제작 하였다. 이 시제품의 설명은 제 2세부과제에서 설명되어 있다.

1) 상추 추출물시제품 그린콜-1000을 이용한 염증 유발 및 동맥경화 관련 사이토카인의 저해 효능 분석

상추 추출물인시제품인 그린콜-1000이 염증 유발 및 동맥경화 관련 사이토카인의 저해활성을 분석하기 위해 **RT-PCR**을 수행하였다. 5 x 10^6개의 U937 세포를 12시간 동안 serum이 없는 배지에서 Starvation시킨 후 PMA 10 ng/ml과 물로 희석한 그린콜-1000을 농도별로 함께 처리하였다. 12시간 후 세포를 회수하여, RNA-Bee isolation kit (Tel-Test, Inc)를 이용하여 total RNA를 회수 하였다. 회수한 RNA 2 μg을 M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas Life Science)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 각각의 primer를 이용하여 PCR를 수행 하였다.

그린콜-1000은 염증 유발에 중요한 사이토카인인 **TNF-α, 와 IL-1β** 의 생성에 아무런 영향을 미치지 않았다 (그림 29).

또한 그린콜-1000은 염증 유발 및 동맥경화에 매우 중요한 사이토카인 iNOS 나 cox-2의 생성에도 어떠한 영향을 주는지를 분석하였다. U937 세포를 LPS (1 μg/ml)과 그린콜-1000을 농도별로 처리하였다. LPS에 의해 유도된 **iNOS 나 cox-2의** 생성의 생성은 그린콜-1000에 의하여 아무런 영향을 미치지 않았다 (그림 30).

2) 상추 추출물시제품 그린콜-1000의 세포독성 분석

상추 추출물 시제품인 그린콜-1000 세포 독성을 분석하기 위해 위에서 사용한 WST-1 kit를 이용하였다. 5 x 10^6개의 U937 세포를 12시간 동안 serum이 없는 배지에서 Starvation시킨 후 물로 희석한 그린콜-1000을 0, 0.1, 1, 10, 50, 100, 200 μg/ml의 농도로 처리 하였다. 24시간 후 세포 독성을 측정하였다. **상추 추출물 시제품인 그린콜-1000은 세포 독성에 영향을 주지 않았다** (그림 31).

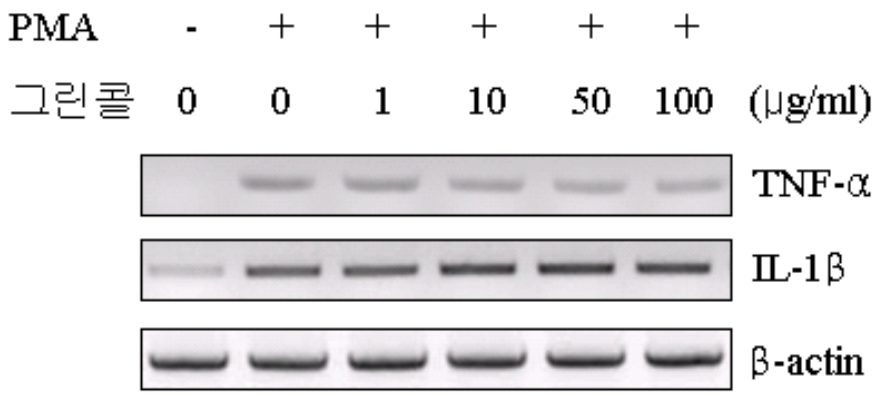


그림 29. 상추 추출물 시제품 그린콜 1000 이 사이토카인 유전자 TNF-α와 IL-1β의 생성에 미치는 영향 분석. 5 x 10^6개의 U937 세포를 12시간 동안 serum이 없는 배지에서 Starvation시킨 후 PMA 10 ng/ml과 물로 희석한 그린콜-1000을 농도별로 함께 처리하였다. 12 시간 후 세포를 회수하여, RNA-Bee isolation kit (Tel-Test, Inc)를 이용하여 total RNA를 회수 하였다. 회수한 RNA 2 μg을 M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas Life Science)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 TNF-α와 IL-1β 각각의 primer를 이용하여 PCR를 수행 하였다. β-actin 유전자는 internal control로 사용하였다.

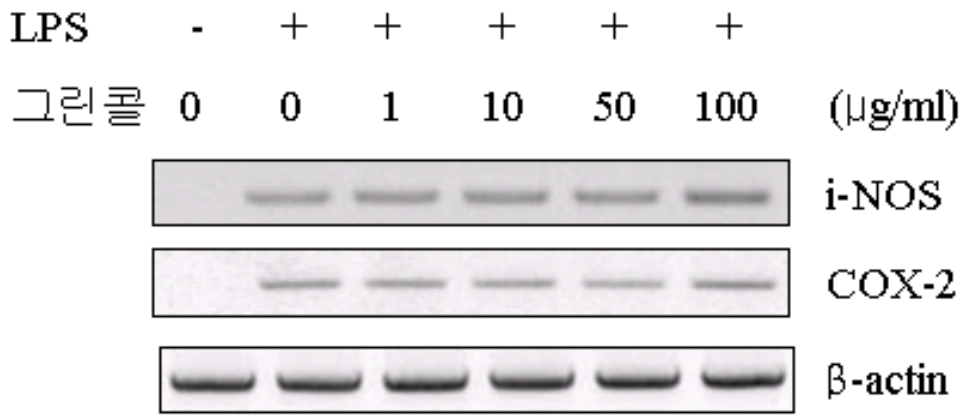


그림 30. 상추 추출물 시제품 그린콜 1000 이 사이토카인 유전자 i-NOS 와 cox-2의 생성에 미치는 영향 분석. 5 x 10^6개의 U937 세포를 12시간 동안 serum이 없는 배지에서 Starvation시킨 후 PMA 10 ng/ml과 물로 희석한 그린콜-1000을 농도별로 함께 처리하였다. 12 시간 후 세포를 회수하여, RNA-Bee isolation kit (Tel-Test, Inc)를 이용하여 total RNA를 회수 하였다. 회수한 RNA 2 μg을 M-MuLV reverse transcritase (Fermentas Life Science)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 i-NOS 와 cox-2 각각의 primer를 이용하여 PCR를 수행 하였다. β-actin 유전자는 internal control로 사용하였다.

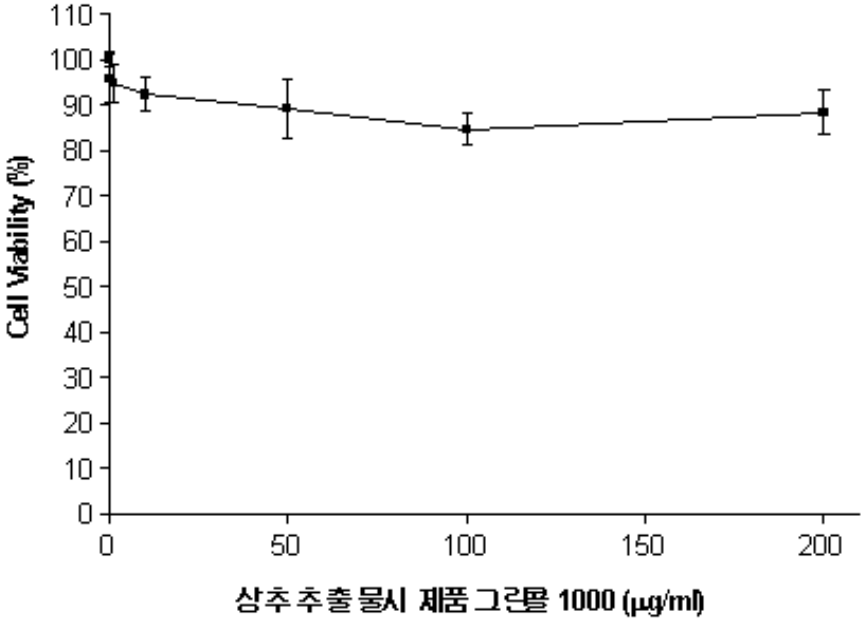


그림 31. 상추 추출물 시제품 그린콜 1000의 세포 독성에 미치는 영향 분석. 세포독성은 WST-1 kit를 이용하였다. 96 well plate에 각각의 well에 1 x 10^4의 U937 세포를 깔고 그린콜1000의 농도를 0 μg/ml, 1 μg/ml, 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 150 μg/ml, 200 μg/ml 처리하였다. 이후 WST-1를 가해주고 다시 37 ℃, 5% CO_2 하에서 1시간 배양해 주었다. 그 다음 흡광도 파장을 420-480 nm 사이에서, 대조파장을 600 nm 이상에서 ELISA reader로 세포의 viability를 측정하였다

바. 식물 추출물 manassantin의 염증유발 및 동맥경화 관련 사이토카인의 조절 및 기작 분석

Manassantin는 삼백초의 뿌리로부터 추출한 Lignoid성분 중의 하나 이다. 삼백초는 중국에서 오래 전부터 민간약으로 사용되어 온 약초이다. 중약 대사전에는 삼백초가 청리습열, 소종해독 작용이 있어 수종, 각기, 황달, 임탁, 대하, 옹종, 정독에 효과가 있다고 되어 있다. 당본초에는 삼백초가 수종, 각기에 좋고 대소변을 원활히 배출케하며, 소담파벽, 제적취의 기능이 있다고 한다. 원색천연약물대사전에는 삼백초가 소변 불리, 수종, 임탁, 각기, 간염, 황달, 옹종, 사교상에 효과가 있다고 하였으며, 그 외 본초습유, 식물명실도고, 영남채약록, 광서중약지, 본초추진 및 호남약물지 등에 삼백초를 약용으로 사용한 기록이 있다.

최근 연구에서 **이 삼백초의 추출물 중에 하나인 manassantin 이 여러 사이토카인의 전사활성에 중요한 전사인자 NF-κB의 활성을 저해함이 보고되어 있다**. 본 연구자는 이러한 manassantin이 염증유발이나 동맥경화와 관련된 유전자의 생성에 영향을 미칠 것으로 예상되어, 여러 사이토카인의 생성 및 조절기작에 대하여 분석 하였다. Manssantin은 생명공학원의 이정준 박사 실험실에서 받아 실험하였다.

1) Manassantin의 염증유발 및 동맥경화 관련 사이토카인의 발현에 미치는 영향 분석

NF-κB는 여러 사이토카인의 전사활성에 매우 중요한 전사 인자로 알려져 있다. 본 연구자는 manassantin이 염증유발 및 동맥경화에 매우 중요한 사이토카인으로 알려진 **IL-1β, TNF-α, GM-CSF, IL-6**의 전사활성을 RT-PCR를 이용하여, 발현에 미치는 영향을 분석 하였다. 실험방법은 위와 동일한 방법을 이용하였으며, manassantin의 농도는 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 μM 로 처리하였다. 그림 32 의 결과에서 Manassantin 은 PMA 10ng/ml로 유도된 IL-1β와 TNF-α의 전사활성을 dose-dependet하게 저해 하였다. 또한 manassantin은 **IC_{50} 값이 약 50 nM** 이라는 매우 낮은 농도에서 IL-1β의 생성의 저해 활성을 확인하였다. 다른 사이토카인인 GM-CSF, 또는 IL-6는 PMA에 의해 유도된 전사활성을 dose-dependet하게 저해 하였다 (그림 32).

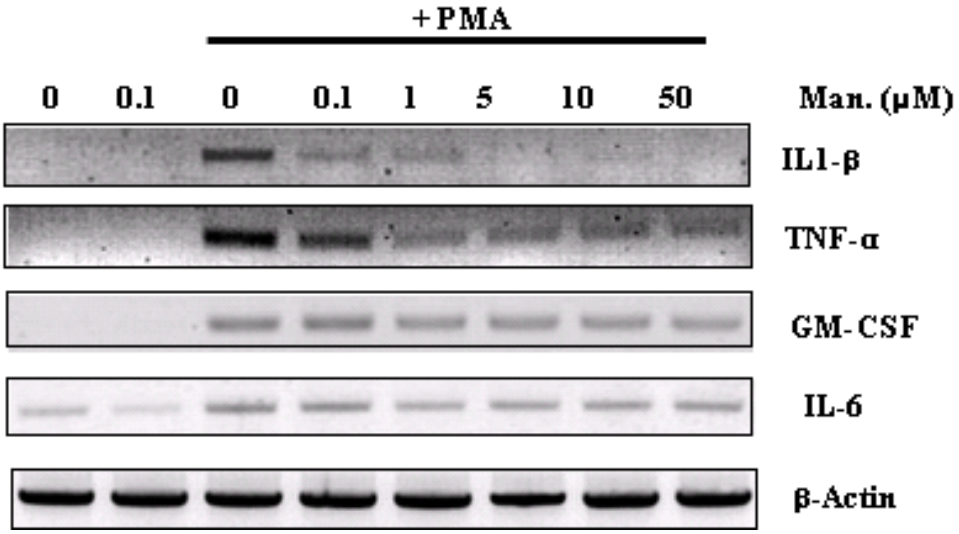


그림 32. 삼백초 추출물 manassantin의 동맥경화 및 염증유발 사이토카인의 생성에 미치는 영향 분석. 사람 U937 세포를 다양한 농도의 manassantin으로 30분 전처리 한다. 이후 PMA (10 ng/ml)를 처리하고 12시간 후 세포를 회수한다. RNA-Bee isolation kit (Tel-Test, Inc)를 이용하여 total RNA를 회수 하였다. 회수한 RNA 2 μg을 M-MuLV reverse transcritase (Fermentas Life Science)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 IL-1β, TNF-α, GM-CSF, IL-6, 각각의 primer를 이용하여 PCR를 수행 하였다. β-actin 유전자는 internal control로 사용하였다.

2). Manassantin의 IL-1β의 유전자 발현에 미치는 영향 분석

Manassantin의 사이토카인 생성 저해 활성을 더욱 분석하기위해 가장 효과가 많은 것으로 보이는 IL-1β 유전자를 이용하여 실험을 진행 하였다. 먼저 manassantin이 직접적으로 **IL-1β의 생성을 저해**하는지를 확인하기 위해 **ELISA** kit (Amersham Bioscience)를 이용하여 세포에서 만들어지는 IL-1β의 단백질 량을 측정하였다. Manassantin은 PMA에 의해 유도된 IL-1β의 단백질 량을 dose dependently 하게 저해 하였다 (그림 33). 이후 위에서 만든 U937/IL-1 Luc stable 세포주를 이용하여 manassantin의 IL-1β의 전사활성에 미치는 영향을 luciferase assay를 통하여 분석하였다. Manassantin은 PMA 10 ng/ml 로 유도된 IL-1β 유전자의 전사활성을 dose-dependently하게 저해 하였고, RT-PCR의 결과와 비슷한 약 **50 nM** 의 농도에서 IC_{50} 값을 보였다 (그림 34).

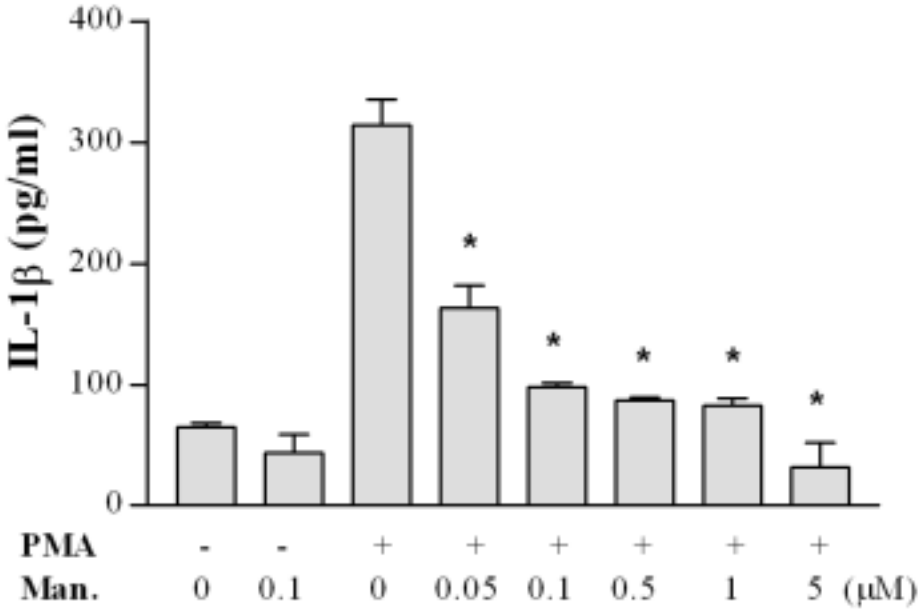


그림 33. 삼백초 추출물 manassantin의 IL-1β 단백질의 생성에 미치는 영향 분석. 다양한 농도의 manassantin을 30분 전처리 한 사람 U937 세포에 PMA (10 ng/ml)를 처리한다. 24 시간후 cell-free supernatants를 회수하여 IL-1β의 단백질량을 IL-1β ELISA kit를 이용하여 측정한다.

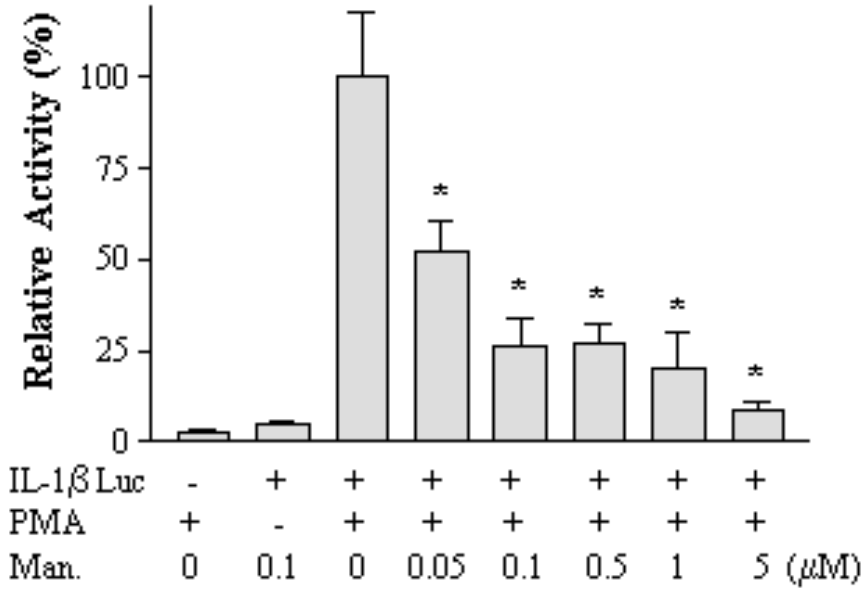


그림 34. 삼백초 추출물 manassantin의 IL-1β 프로모터의 전사에 미치는 영향 분석. U937/IL-1 Luc stable cell line 에 다양한 농도로 manassantin을 30분전 처리한다. PMA (10 ng/ml)를 처리한 후 24시간 후 에 세포를 회수 한다. luciferase assay kit를 이용하여 활성을 측정한다.

3) Manassantin의 IL-1β의 전사에 미치는 조절 기작 분석

최근 연구에 의하면 Manassantin은 사이토카인 전사활성에 매우 중요한 전사 인자인 NF-κB의 활성을 저해하는 것으로 보고 되어져 있다. 하지만 저해 활성은 수 μM 에서 저해 활성을 보였다. 위의 결과에서 Manassantin은 IL-1β 유전자의 저해 활성을 수십 nM 정도에서 보였다. Manassantin의 활성이 NF-κB 활성뿐 아니라 다른 전사인자에도 영향을 주는지를 분석하였다. IL-1β 유전자의 전사활성은 NF-κB와 더불어 NF-IL6가 전사활성에 매우 중요한 전사인자로 알려져 있다.

먼저 NF-IL6와 NF-κB 가 IL-1β의 유전자의 전사활성에 중요한지를 확인하기 위해 U937/IL-1 Luc stable 세포주에 NF-IL6와 NF-κB (p65)가 발현하는 플라스미드를 각각 transfection하여 luciferase assay늘 수행 하였다. **NF-IL6와 NF-κB (p65)는 IL-1β의 유전자의 전사활성을 직접적으로 증가 시켰다.** (그림. 35,36)

Manassantin이 NF-IL6와 NF-κB에 의해 유도된 IL-1β의 유전자의 전사활성을 저해하는지를 분석하기 위해, U937/IL-1 Luc stable 세포주에 NF-IL6와 NF-κB (p65)가 발현하는 플라스미드를 각각 transfection하고 이후 manassantin을 농도별로 처리 하였다. 그림 35. 에서 보듯이 manassantin은 NF-IL6에 의해 유도된 IL-1β 유전자의 활성을 IC_{50} 값이 약 78 nM 이라는 매우 낮은 농도에서 저해 하였다 (그림 35). 또한 manassantin은 NF-κB 에 의해 유도된 IL-1β 유전자의 활성을 IC_{50} 값이 약 1.6 μM에서 저해함을 확인하였다 (그림 36). 위 실험에서 보듯이 m**anassantin은 NF-κB 뿐만 아니라 NF-IL6의 전사활성을 저해하였으며, 또한 NF-IL6의 전사활성을 더욱 효과적으로 저해함을 보였다.**

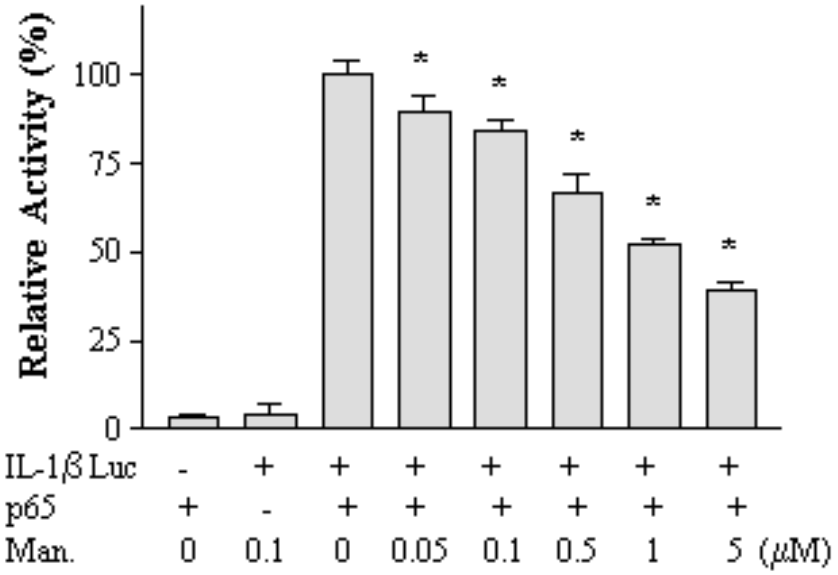


그림 35. 전사인자 NF-κB (p65) 에 의해 유도된 IL-1β 유전자의 발현에 manassantin 의 미치는 영향 분석. U937/IL-1 Luc stable cell line 에 전사인자 NF-κB (p65)를 발현하는 플라스미드를 transfection 한다. 이후 manassantin을 다양한 농도로 처리한다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase 활성을 측정한다.

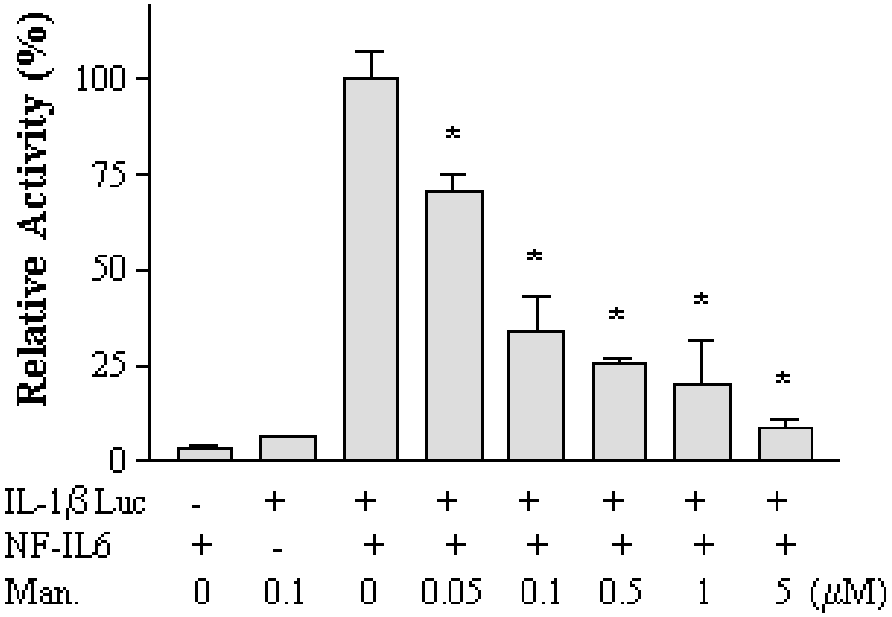


그림 36. 전사인자 NF-IL6에 의해 유도된 IL-1β 유전자의 발현에 manassantin의 미치는 영향 분석. U937/IL-1 Luc stable cell line 에 전사인자 NF-IL6를 발현하는 플라스미드를 transfection 한다. 이후 manassantin을 다양한 농도로 처리한다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase 활성을 측정한다.

4) Manassantin의 전사인자 NF-IL6와 NF-κB의 활성에 미치는 영향 분석

위 실험 결과에서 manassantin은 IL-1β 유전자의 전사 활성 및 IL-1β 단백질의 생성을 저해함을 확인하였으며, 이는 전사인자인 NF-κB 뿐만 아니라 NF-IL6에 의함을 확인 하였다. 전사인자의 활성은 전사인자의 전사활성 능력과 DNA 결합능력이 중요하다. Manassantin이 위 두 가지 능력의 어느 곳에 영향을 주는지를 보기위해 먼저 전사활성 능력을 분석하였다. Gal4 binding site를 포함하는 luciferase 융합 플라스미드를 Gal4 binding domain과 NF-IL6유전자가 융합된 플라스미드와 cotransfection 한 후 manassantin을 처리하여 luciferase로 전사활성능력을 분석하였다. **Manassantin은 dose dependently 하게 NF-IL6의 전사 활성능력 저해하였다** (그림 37).

다음으로 manassantin이 전사인자 NF-IL6와 NF-κB의 DNA 결합능력을 저해하는지를 확인하였다. Gel shift assay를 수행한 결과 manassantin은 NF-κB의 DNA 결합능력에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 NF-IL6의 DNA 결합능력을 저해하였다 (그림 38). 즉 **manassantin은 전사인자 NF-IL6의 전사활성 능력 및 DNA 결합능력에 함께 영향을 주어 IL-1β 생성을 저해함을 알 수 있다** (그림 39).

위 실험결과에서 manassantin은 동맥경화 및 염증성 사이토카인인 IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, GM-CSF의 생성을 저해함을 확인하였다. 또한 IL-1β의 유전자 전사활성 및 단백질의 생성을 저해함을 확인하였고, 이러한 활성은 전사인자인 NF-κB 와 NF-IL6에 의함을 확인 하였다. 이 연구를 통하여 **manassantin이 새로운 동맥경화 치료제의 후보물질이 될 것으로 생각된다.**

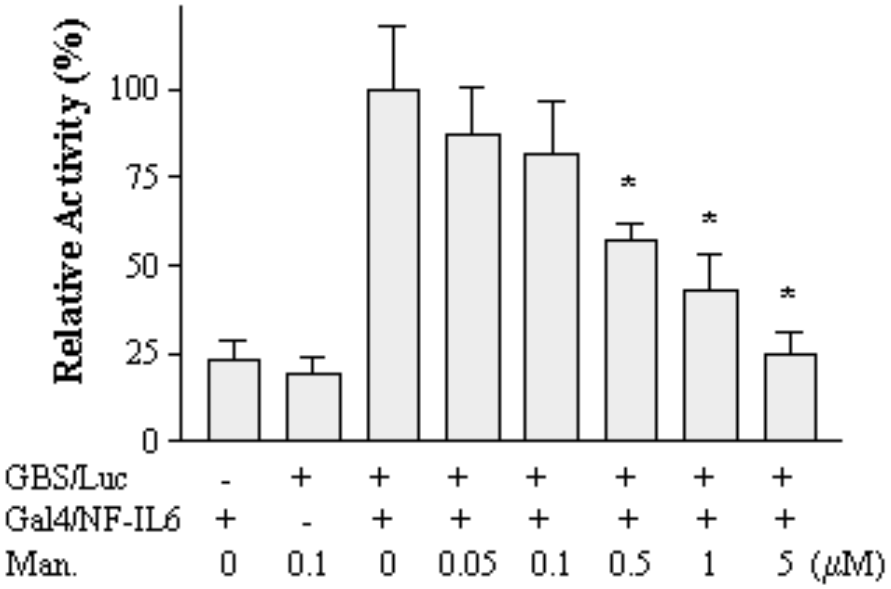


그림 37. 삼백초 추출물 manassantin의 전사인자 NF-IL6의 전사 활성 능력에 미치는 영향 분석. 사람 U937세포에 Gal4 binding site를 포함한 reporter유전자를 Gal4 binding domain과 전사인자 NF-IL6가 융합된 플라스미드를 cotransfection 한다. 이후 manassantin을 다양한 농도로 처리한다. 24 시간 후 세포를 회수하여 luciferase 활성을 측정한다.

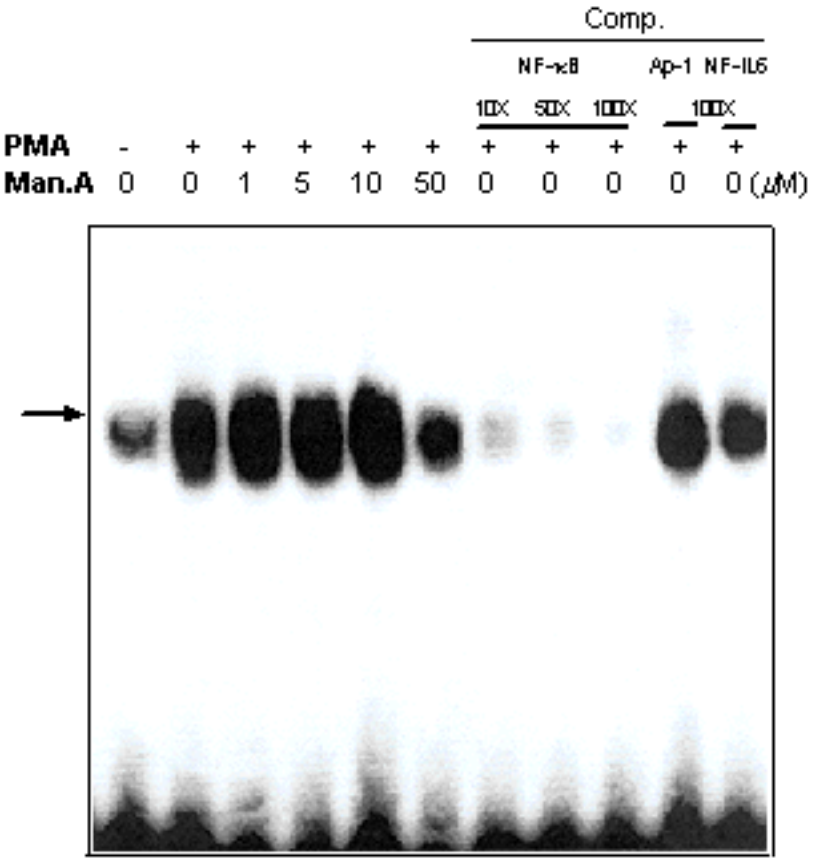


그림 38. 삼백초 추출물 manassantin의 전사인자 NF-κB의 DNA 결합 능력에 미치는 영향 분석. 사람 U937 세포에 manassantin을 다양한 농도로 전처리 하고, 다시 PMA (10ng/ml) 처리한다. NF-κB의 DNA binding assay를 하기 위해 세포에서 nuclear extracts를 회수한다. 10, 50, 100 배의 unlabeled NF-κB consensus oligonucleotide를 specific competition을 위해 사용하였다. Unlabeled AP-1과 NF-IL6 oligonucleotides 는 non-specific competitor로 사용하였다.

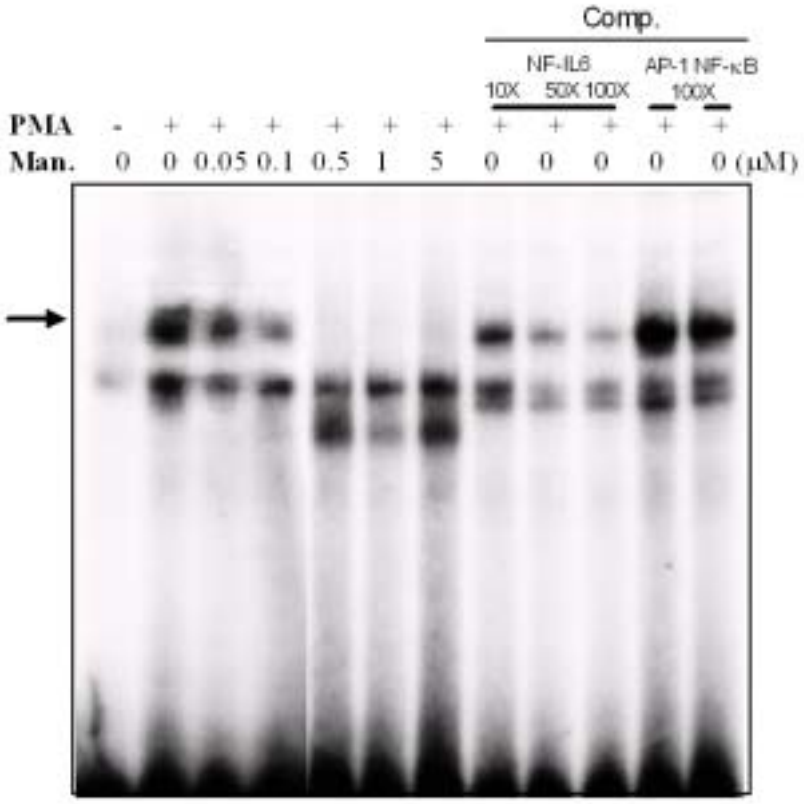


그림 39. 삼백초 추출물 manassantin의 전사인자 NF-IL6의 DNA 결합 능력에 미치는 영향 분석. 사람 U937 세포에 manassantin을 다양한 농도로 전처리 하고, 다시 PMA (10ng/ml) 처리한다. NF-IL6의 DNA binding assay를 하기 위해 세포에서 nuclear extracts를 회수한다. 10, 50, 100 배의 unlabeled NF-IL6 consensus oligonucleotide를 specific competition을 위해 사용하였다. Unlabeled AP-1과 NF-κB oligonucleotides는 non-specific competitor로 사용하였다.

2. 상추 및 식용작물의 항동맥경화 물질 분리 정제 및 효능 검증

가. 상추 추출물의 분리 및 정제

1). 상추 추출물의 제조

상추(Lactuca sativa) 20㎏을 100% 메탄올 72ℓ를 가하여 실온에서 24시간 추출하고, 80% 메탄올 22.5ℓ를 가하여 다시 한번 더 추출한 뒤, 여과한 후, 감압·농축하여 **상추 추출물 120g**을 얻었다.

2) 상추 추출물의 분리 및 정제

농축물을 물 2ℓ와 아세틸 에탄올 2ℓ로 분배·추출한 후, 아세틸 에탄올 분획에 대하여 n-헥산:아세틸 에탄올을 1:1의 비율로 혼합한 용매를 사용하여 TLC(Thin Layer Chromatography; Merck Co. Ltd., 25TLC aluminiun sheet silica gel 60 F_{254})를 실시하여 전개시키고, 건조하여, UV램프(Spectroline, ENF-240C/F, specronics corporation, USA)로 형광 또는 흡수가 있는 부분을 표시하였다. 그리고, 10% 황산 수용액에 담근 후, 건조시켜 알코올램프로 가열하여 발색되는 양상과 R_f값을 확인하였다.

아세틸 에탄올 분획 56g을 용매로 $CHCl_3$: MeOH를 7:1에서 5:1 및 3:1로 순차적으로 변화시키며 전개하여, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Merck Co. Ltd., silica gel 60(63~200㎛), 750g)를 실시하고, 70㎖씩 분취하였다. 이 분취액을 TLC로 확인하여 8개의 소분획을 얻고, 그중 2번째 분획에 대하여 용매로 n-헥산:아세틸 에탄올을 5:1에서 3:1로 변화시키고, $CHCl_3$:MeOH를 10:1로 하여, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여, 6개의 소분획을 얻었다. 이중 4번째 분획에서 100㎎을 취하여 용매로 아세톤:메탄올:물을 3:7:1에서 9:3:1로 변화시켜 OSD 컬럼 크로마토그래피(octadecyl silicagel, Merck Co. Ltd., LiChroprep RP-18(40~63㎛), 50g)를 실시하여 **첫 번째 분획 70㎎을 분리, 정제**하였다.

표 2. 1H-NMR(400MHz, CDCl3) 과 13C-NMR(100MHz, CDCl3) 결과

탄소의 수	δH	δC
1	4.14 (2H, d, J=6.9 Hz)	59.34
2	5.40 (1H, tq, J=6.9, 1.4 Hz)	123.11
3		140.14
4	1.99 (2H, t, J=7.0 Hz)	39.85
5		39.34
6		37.34
7		32.66
8		37.26
9		37.40
10		36.65
11		32.76
12		25.12
13		24.77
14		24.45
15		27.95
16	0.87 (3H, d, J=6.3 Hz)	19.68
17	0.87 (3H, d, J=6.3 Hz)	16.13
18	0.85 (3H, d, J=6.1 Hz)	19.72
19	0.84 (3H, d, J=6.6 Hz)	22.69
20	1.66 (3H, br, s)	22.59

녹는점 : 132 ℃ ; 흰색 가루 ($CHCl_3$)

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$)

^{13}C-NMR(100MHz, $CDCl_3$)

IR_V(KBr, $CHCl_3$) : 3334, 2954, 2923, 2868, 1669 cm^{-1}

EI/MS : m/z = 29 [M^+]

나. 상추 추출물의 ACAT의 저해 활성 측정(*in vitro.*)

마이크로좀 단백질(microsomal protein)용액(10mM HEPES 완충액 중 17.3 mg/ml, pH 7.4) 8㎕, 100mM DTT 0.8㎕, 400㎛M BSA 4㎕, 측정용 시료용액(물:디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)=9:1(v/v)) 4㎕, 1.5M 인산 완충액(pH 7.4) 8㎕, 100㎛M 14C-올레오일-CoA(11.1 MBq/mmol) 5㎕ 및 물 15.2㎕를 가하여 30℃에서 5분간 반응시킨 후, 메탄올 200㎕ 를 가하여 효소와 화합물의 반응을 정지시키고, 에테르:디에틸에테르:아세틸산=90:14:2(Rf=0.54)의 전개 용매를 이용하여 분취 TLC로 전개시킨 후, 요오드를 분무하여 콜레스테롤 에스테르 밴드(cholesterol ester band)를 분취하여 섬광 바이알(scintillation vial)에 넣은 후, EX-H 용액 4㎖을 첨가하여 방사능을 측정하였다. ACAT 활성은 측정된 방사선량으로부터 시간당 방사선량을 계산하여 피코몰/분/㎎ 단백질 단위로 하여, ACAT 활성 저해도를 대조군과 비교하였다,

그 결과 **ACAT 활성 저해도는 대조군 0%에 대하여 본 과제 실험의 상추로부터 분리한 화합물의 저해도는 91.6%임을 확인**하였다.

다. 마우스에서의 혈장지질 함량 측정

1) 마우스의 식이 조성 및 시료 채취

마우스(C57BL/6, 5주령, 수컷, 대한바이오링크)를 일반 고형 사료로 1주일간 예비 사육하여 적응 기간을 거친 후, 정상식이군, 고지방식이군, 상추로부터 추출한 물질을 3% 첨가한 고지방식이군으로 각 군당 8마리씩 분류하였다. 실험 식이는 AIN-76 식이 조성을 참고로 하여 표 2와 같이 조성하고, 물과 함께 자유롭게 섭취하도록 하여 4주간 사육하였다.

사육이 끝난 마우스를 12시간동안 절식시킨 뒤, 디에틸에테르로 마취시키고 심장으로부터 heparin 처리된 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액에서 8,000rpm, 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 측정 전까지 -20℃에서 보관하였고 총 콜레스테롤 함량, 트리글리세라이드 함량과 HDL 함량 측정에 사용하였다.

2) 총 콜레스테롤 함량 측정

혈장 중의 총 콜레스테롤 함량은 총콜레스테롤 측정용 시액 AM 202-K (아산제약주식회사, 대한민국)을 이용하여 효소적 방법 (Sale et al., Anal. Biochem., 142:347-350, 1984)에 의해 측정하였다. 혈장, 시약블랭크, 표준액 각 20㎕와 효소시액 3㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 5분간 방치한 후, 시약블랭크를 대조로 60분 이내에 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 콜레스테롤 함량은 표준액 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비에 표준액 농도(300㎎/㎗)를 곱하여 구했다. 그림 40. 에서 도시된 바와 같이 고지방 식이는 정상식이보다 **29.5%의 총 콜레스테롤 함량 증가를 유발**하였다. **고지방 식이로 증가된 총 콜레스테롤 함량은 상추 추출물이 첨가된 고지방식이군에서 정상 식이군과 유사한 수준으로 감소하였다.**

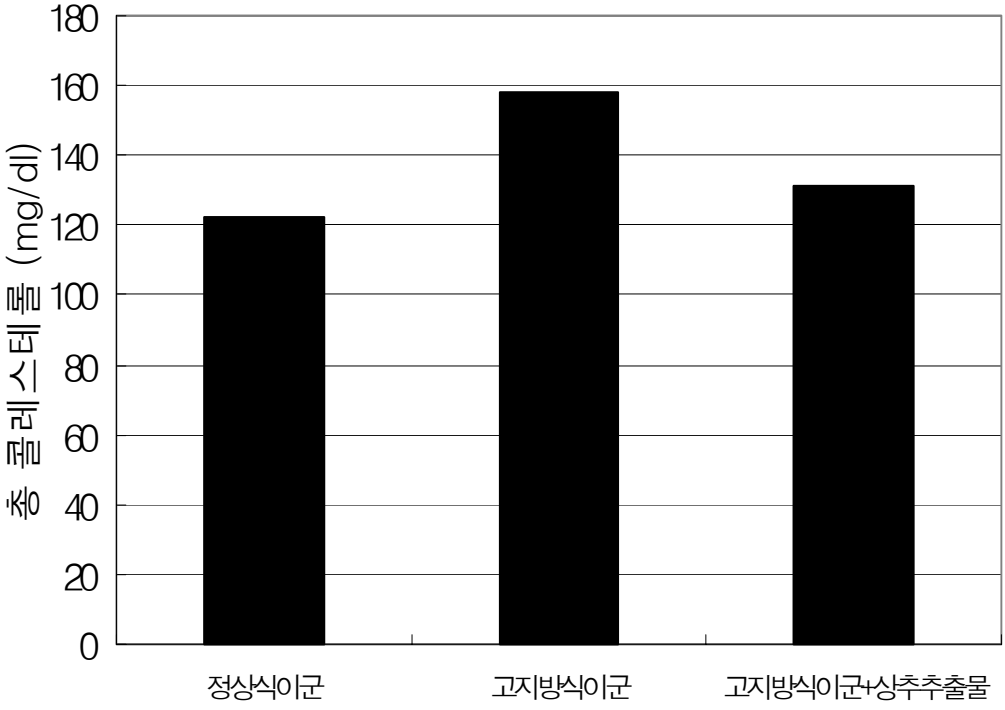


그림 40. 고지방식이 및 상추로부터 분리한 화합물의 총 콜레스테롤 함량에 미치는 영향

3) 트리글리세라이드 함량 측정

혈장 중의 트리글리세라이드 함량은 아산셋트 중성지방 측정용 시액 AM 157S-K (아산제약주식회사, 대한민국)을 이용하여 효소적 방법 (Biggs et al., Clin. Chem., 21: 437-441, 1975)에 의해 측정하였다. 혈장, 시약블랭크, 표준액 각 20㎕와 효소용액 3㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 10분간 방치한 후, 시약블랭크를 대조로 60분 이내에 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

트리글리세라이드 함량은 표준액 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비에 표준액 농도(300㎎/㎗)를 곱하여 구했다. 그림 41. 에서 도시된 바와 같이 고지방 식이는 정상식이보다 **31.9%의 트리글리세라이드 함량 증가를 유발**하였다. 고지방 식이로 증가된 총 콜레스테롤 함량은 **상추 추출물이 첨가된 고지방식이군에서 정상식이군과 유사한 수준으로 감소하였다.**

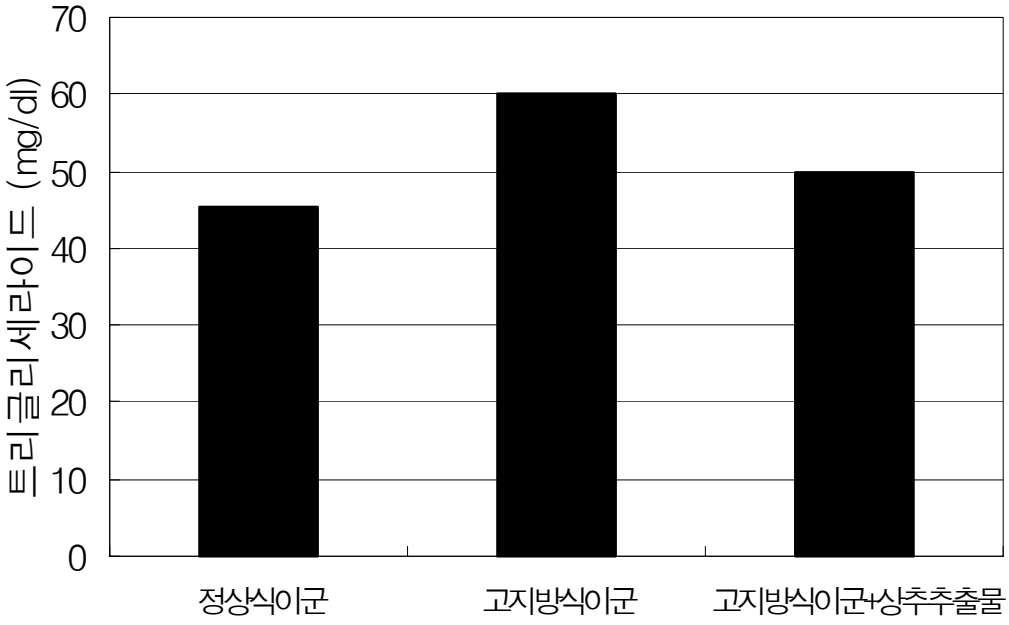


그림 41. 고지방식이 및 상추로부터 분리한 화합물의 트리글리세라이드 함량에 미치는 영향

4) HDL 함량 측정 및 LDL 함량 추정

혈장 중의 HDL 함량은 에취디엘 콜레스타제 AM 203-K (아산제약주식회사, 대한민국)을 이용하여 β-lipoprotein (LDL, VLDL)을 침전시킨 후, 상등액에 있는 HDL의 콜레스테롤을 상기와 같이 효소적 방법으로 구하였다. 혈장과 분리시액 0.2㎖을 잘 혼합하여 실온에 10분 방치 후, 3000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 상등액, 시약블랭크, 표준액 각 0.1㎖에 효소시액 3㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 5분간 방치하고 시약 블랭크를 대조로 하여 파장 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

HDL 함량은 표준액의 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비에 표준액 농도 (50㎎/dℓ)와 희석배수 2를 곱하여 구했다. LDL 함량은 다음 방정식에 의하여 구하였다 (Friedewald et al., Clin. Chem., 18:499-502).

그림 42. 에서 도시된 바와 같이, **고지방식이군이 정상식이군에 비해 혈중내 HDL 함량이 27.8% 유의적으로 감소**되었고, **고지방식이로 감소된 HDL 함량이 상추 추출물을 첨가한 고지방식이군에서는 오히려 정상식이군보다 12.4% 증**가하였다.

HDL은 혈중의 불필요한 콜레스테롤을 운반하여 제거하는 역할을 하므로, HDL의 함량이 증가하였다는 것은 상추 추출물이 혈중 콜레스테롤을 저하시킬 수 있다는 것을 의미한다.

그림 42. 에 도시된 바와 같이, 고지방식이군이 정상식이군에 비해 혈중 내 LDL 함량이 2배 가까이 유의적으로 증가하였고, 고지방식이로 증가된 LDL 함량이 상추추출물을 첨가한 고지방식이군에서 정상식이군과 유사한 수준으로 감소하였다.

LDL은 LDL 콜레스테롤이 변형된 형태로 혈관 벽에 쉽게 달라붙어 동맥경화를 유발하므로, LDL이 감소하였다는 것은 혈중 콜레스테롤의 침착이 줄어든다는 것을 의미한다.

상추로부터 분리한 화합물은 콜레스테롤을 에스테르화시키는 효소인 ACAT를 저해함으로써, 혈중 HDL 수치를 높이고 LDL 수치를 낮추어 혈중 콜레스테롤이 침착 및 증가하는 것을 막는다. 따라서, 고콜레스테롤혈증 뿐만 아니라, 혈중 콜레스테롤의 증가로 인한 고지혈증, 동맥경화증, 협심증, 심근경색증 또는 뇌경색증 등과 같은 심혈관계 질환의 예방 및 치료에 효과가

있다.

또한, 화학적으로 합성되어 판매되는 약물에 비하여 **중독성이 없으며, 각종 식품 조성물에 첨가되어 혈중 콜레스테롤 농도의 감소를 위한 각종 보조제로도 사용할 수 있다.**

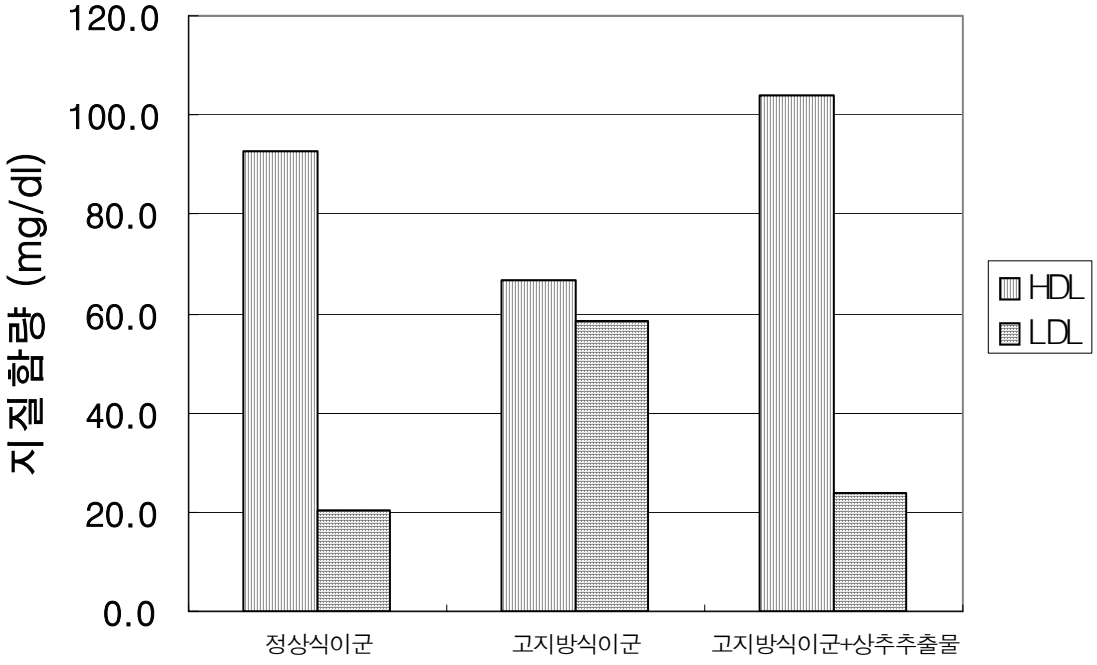


그림 42. 식이 및 상추로부터 분리한 화합물의 HDL 함량에 미치는 영향

라. 상추에서의 Phytol 분리 및 검량

1) Phytol의 검량.

각 시료 중의 phytol의 함량을 GC를 이용하여 정량분석하기 위하여, 동일한 분석 조건으로, phytol을 TMS화 한 후, 농도별로 GC를 측정한 결과는 그림 43. 와 같다.

phytol 유도체는 7′ 42″에서 관측되었으며, 검량선을 그림 44. 와 같이 작성하였다.

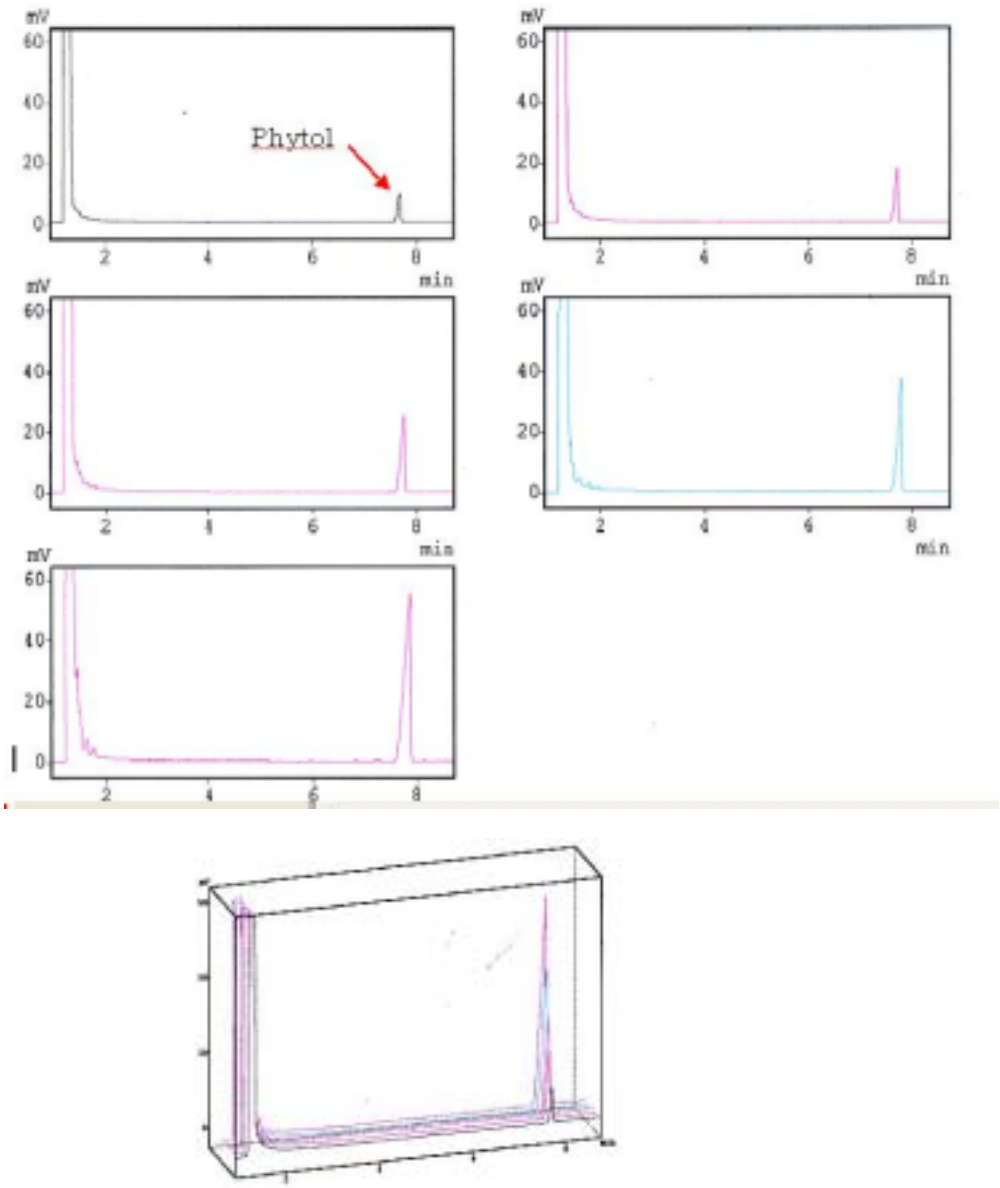


그림 43. Phytol standard의 농도별 GC spectrum과 비교

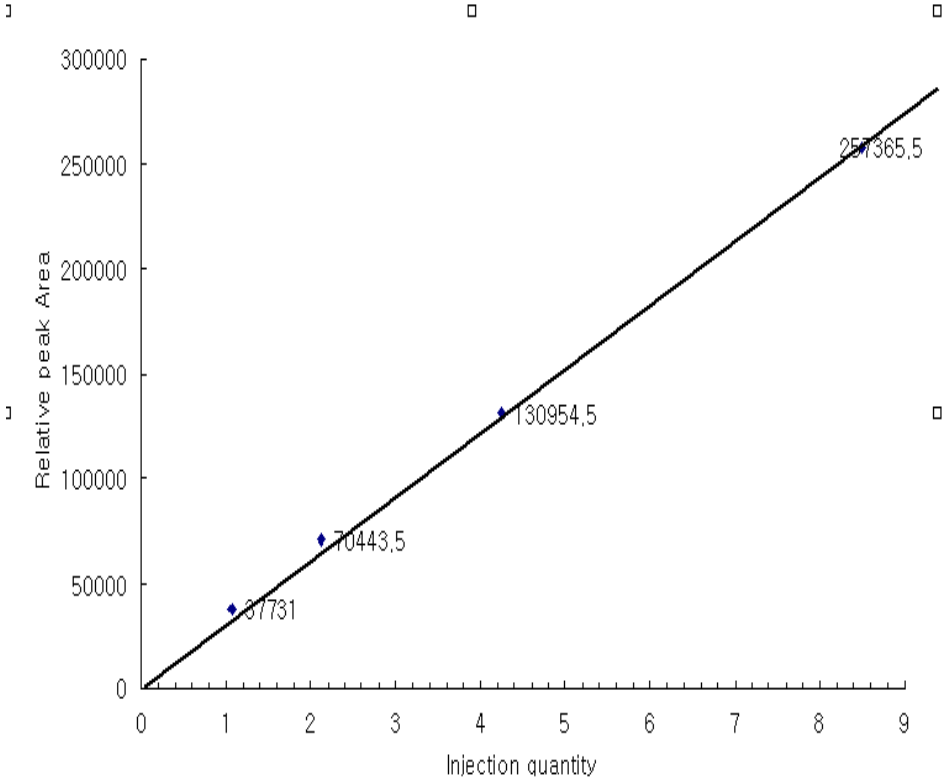


그림 44. Standard curve of phytol in GC analysis.

마. 상추(*Lactuca sativa* L.) 품종별 Phytol 함량 분석

1) 상추 품종별 Phytol 분획의 분리

청치마(100 g, Blue Smooth), 여름적치마(100 g, Red Smooth-1), 적토마(200 g, RS-2), 삼선적축면(200 g, Red Rough-1), 신불꽃축면(100 g, RR-2) 등 각 시료 생체를 80% MeOH 수용액(500 m*l* × 3)로 24시간, 3번 반복하여 추출하였다. 얻어진 각 추출물을 감압농축하고, 얻어진 농축액을 EtOAc(100 m*l* × 2)와 H_2O(100 m*l*)로 분배 추출하였다. 이중 phytol을 함유하는 EtOAc 분획을 감압 농축하여, 각 BSE(369 mg), RSE-1(255 mg), RSE-2(471 mg), RRE-1(531 mg), RRE-2(202 mg)을 얻었다.

각 분획으로부터 각각 BSE(34 mg), RSE-1(31 mg), RSE-2(24 mg), RRE-1(30 mg), RRE-2(27 mg)을 *n*-hexane-EtOAc=3:1(6 m*l*)의 용매극성으로 SPE (Supelclean LC-Si SPE 3 m*l* tube)로 전처리를 하였다. 그 결과, BSE(6.2 mg), RSE-1(4.1 mg), RSE-2(6.0 mg), RRE-1(12.3 mg), RRE-2(6.3 mg)을 얻었다. 이 중에서, GC를 측정하기 위하여, 각각 BSE(1.3 mg), RSE-1(1.2 mg), RSE-2(0.7 mg), RRE-1(3.2 mg), RRE-2(1.6 mg)을 취하였다. 각 분획을 비극성화시켜, 휘발성을 높이고자 TMS화 {N,O-Bis(tirmethylsilyl)acetamide, 95 %} 100 μ*l*를 가한 후, 60 ℃의 oven에서 50분 동안 반응시켰다. 여기에 CHCl 100 μ*l* (HPLC grade)를 첨가하여 희석하였다.

2) 상추 품종별 Phytol 분획의 GC 측정.

각 시료 BSE(1.3 mg/200 μl), RSE-1(1.2 mg/200 μl), RSE-2(0.7 mg/200 μl), RRE-1(3.2 mg/200 μl), RRE-2(1.6 mg/200 μl)로부터 각 3 μ*l*를 취하여, FID가 설치된 GC(GC-14B, Shimadzu, Japan)의 주입구에 넣고, 탈착시켜 분석하였다. 분리용 DB-5(30 m × 0.32 mm ID × 0.25 μm, J&W, Folsom, CA, USA)을 사용하였고, 초기 오븐 온도는 200℃에서 10분간 유지한 후에, 10℃/min씩 상승시켜 최종온도 320℃에서 5분간 유지하였다. 분리된 phytol의 동정을 위하여, GC(HP-6890)와 연결된 mass spectormeter (HP 5973, Hewlett-Packed Alto, CA, USA)를 사용하였고, 분리용으로 사용한 column(HP-5, 30 m × 0.53 mm ID × 1.5 μm, USA)이외의 모든 분석 조건은 GC 조건과 동일하였다. MS의 이온화는 70 eV 에서 수행하였다. GC로 분리된 각

peak 성분의 최종적인 확인은 GC-MS의 library (Wikey/NBS)의 분석을 바탕으로 확인하였다(그림 45. 46).

3) GC분석에 따른 상추 품종별 phytol 함량 분석.

식용 식물자원으로부터 활성물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로, 상추로부터 ACAT 억제활성이 높은 diterpene 화합물인, phytol을 분리 보고한 바 있다. 전 실험에서는, 상추로부터 phytol을 0.015 %의 수율로 분리/정제한 바 있다. 상추는 그 기호에 따라 색과 모양에 따른 수요가 달라진다. 따라서 각 상추의 색과 모양에 따른 phytol의 함량을 분석하여, 비교 분석하였다.

각 시료 BSE(1.3 mg/200 ㎕), RSE-1(1.2 mg/200 ㎕), RSE-2(0.7 mg/200 ㎕), RRE-1(3.2 mg/200 ㎕), RRE-2(1.6 mg/200 ㎕)에 대하여, 3반복 실험하여, 각 평균값을 얻었다. 각 평균값을 phytol의 검량선의 기울기로 계산하여 본 결과, 주입량 3 ㎕당 각 시료에 함유되어 있는 phytol의 양을 BSE(6.05 ㎍), RSE-1(4.87 ㎍), RSE-2(7.42 ㎍), RRE-1(23.85 ㎍), RRE-2(2.97 ㎍)와 같이 나타났다. 이를 각 시료 100 g 당 phytol 함량을 역산하여 본 결과, BSE(46.1 mg, 4.6×10^{-2} %), RSE-1(19.3 mg, 1.9×10^{-2}%), RSE-2(99.7 mg, 10.0×10^{-2} %), RRE-1(86.9 mg, 8.7×10^{-2} %), RRE-2(10.4 mg, 1.0×10^{-2}%)임을 알 수 있었다 (표 3).

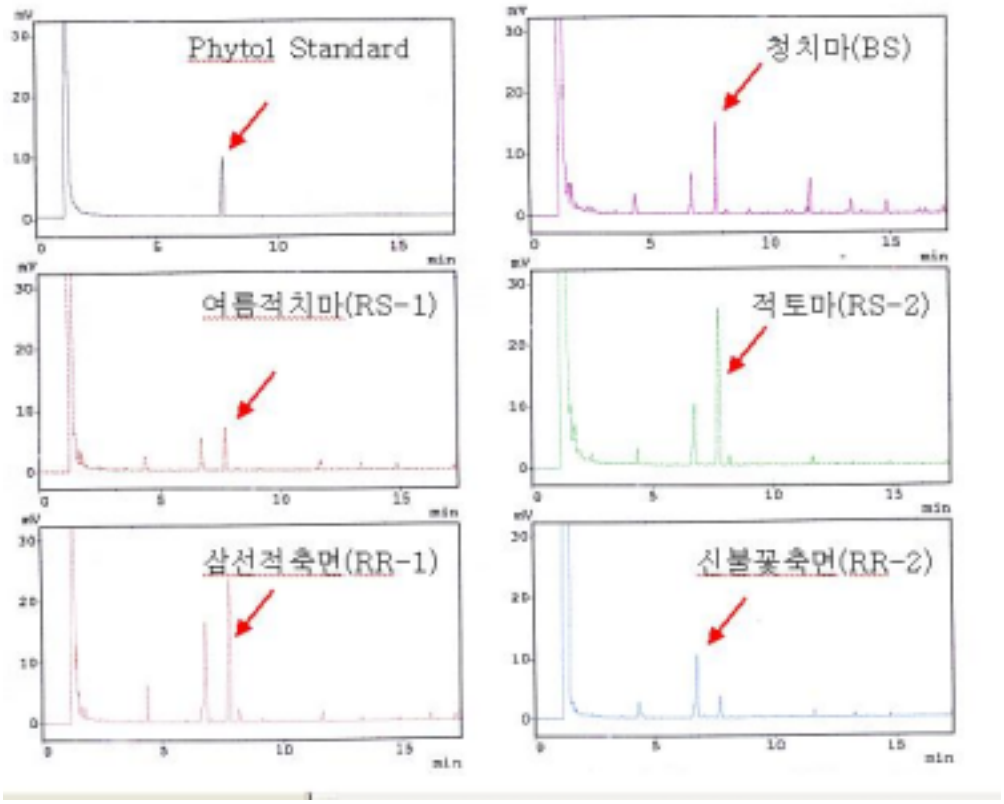


그림 45. 각 품종별 SPE 전처리 후, TMS화된 EtOAc 분획의 GC s

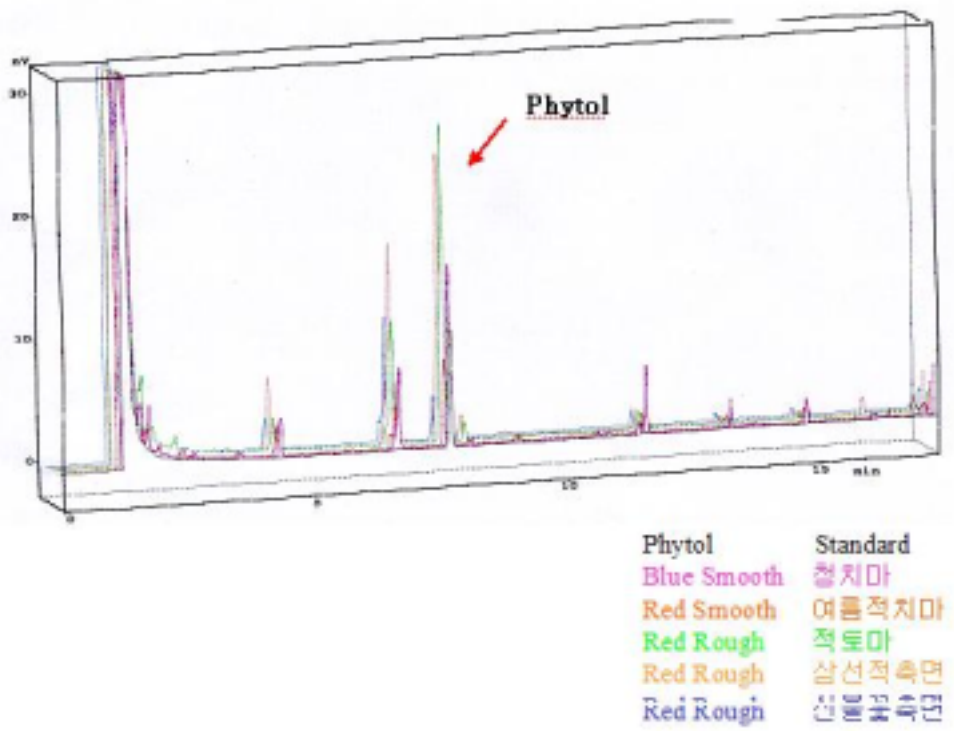


그림 46. 품종별 TMS화된 EtOAc 분획 GC spectrum들의 비교

표 3. 품종별 시료 및 EtOAC 추출량과 GC 전처리를 통한 분석값을 통한 phytol 함량

		시료	EtOAc fr. sample/total (mg/mg)	Supelclean LC-Si SPE (3 ml) samping / n-hexane-EtOAc (6 ml)	Phytol 함량 (phytol / 시료)
청치마	2.청치마	100 g	34 / 369	1.3 mg/ 6.2 mg	**46.2 mg/ 100 g**
적치마	12.여름적치마	100 g	31 / 255	1.2 mg/ 4.1 mg	**19.3 mg / 100 g**
	3.적토마 (만추대)	200 g	24 / 471	0.7 mg/ 6.0 mg	**99.7 mg /100 g**
적축면	13.삼선적축면	200 g	30 / 531	3.2 mg/ 12.3 mg	**78.9 mg /100 g**
	9.신불꽃축면 (만추대)	100 g	27 / 202	1.6 mg/ 6.3 mg	**10.4 mg / 100 g**

4) 상추 품종별 phytol 함량 분석.

색에 따른 차이 : 청색(청치마)과, 적색(적치마/적축면) 등 색에 따른 phytol의 함량에 있어서, **청치마는 46.2 mg/100 g이었지만, 적색이 들어간 적치마와 적축면에서, 색에 따른 phytol의 일정한 함량 패턴이 나타나지 않았다.**

잎 주름에 따른 차이 : 잎 끝이 둥그스런 청치마, 적치마와 잎 끝이 쭈글쭈글한 적축면의 **phytol 함량에 있어서도, 비교적 치마형의 상추가 높은 값으로 나타나기는 하지만, 그 값이 일정치 않고, 적축면에서도 청치마보다 2종에서 보다 높은 phytol 함량값을 보여 잎 주름의 유무에 따른 구분이 용이하지 않았다.**

추대시기에 따른 차이 : 적치마와 적축면에 대한 실험에서, 추대시기가 이른 품종과 추대시기가 늦은 만추대의 2가지씩 비교한 결과, 적치마의 경우, 만추대 품종에서, 약 4배정도의 높은 phytol 함량을 갖는 것으로 나타났고, 적축면의 경우, 이와는 반대로, 추대가 빠른 품종이 만추대 품종보다 약 7-8 배의 높은 phytol 함량을 갖는 것으로 나타났다. 따라서 **추대시기에 따른 phytol 함량을 구분하기는 용이하지 않은 것으로 나타났다.**

각 품종별 phytol의 함량 : 실험의 결과, 적치마의 만추대 품종인, **“적토마”가 99.7 mg/100g으로 가장 높은 phytol 함량**을 보였고, 그 다음으로는 적축면 품종인, “삼선적축면”이 78.9 mg/100 g으로 높은 phytol을 함량을, 그리고, 청치마 품종인 “청치마”가 46.2 mg/100 g으로 시료 중 중간치의 phytol 함량을 나타내었다. 또한, 적치마 품종인 “여름적치마”와 적축면 만추대 품종인, “신불꽃축면”이 각각 19.3 mg/100 g과 10.4 mg/100 g으로 위 실험에서 가장 낮은 phytol 함량을 보였다.

결과 분석 : 상기의 결과를 토대로 유추하여 본 결과, 일반적인 기호가 높은 적축면의 상추가 phytol을 많이 함유하고 있지는 않았다. 또한, 색과 잎 끝면의 모양에 따른 차이가 분명하지도 않았다. 따라서 상추에 포함된 phytol을 보다 많이 얻기 위한 품종의 선발 및 선별에 있어서, 일정한 기준을 제시할 수는 없다고 하겠다.

따라서, **phytol 함량이 높은 상추를 선발 및 선별을 위해서는, 각 품종에 대한 직접적인 phytol 검출방법을 - 본 실험과 같은 GC 분석 및 HPLC 정량 분석 방법 등 - 통해서만 가능할 것으로 여겨진다.**

바. 항동맥 경화물질, phytol의 대량 제조 방법 확립

1) 추출용매에 따른 phytol의 회수율 분석

상추 생체시료로부터 phytol을 효과적으로 추출하기 위하여 추출용매를 결정하고자 하였다. 추출용매는 80% MeOH, 100% MeOH, MeOH-CHCl3 (1:1), CHCl3 4종의 용매 사용하였다.

아래의 표 4. 에서 보는 바와 같이 최종적으로 얻어진 phytol의 함량은 74 mg/100 g에서 81 mg/100g으로 추출용매에 따라 크게 변화를 보이지 않았다. 하지만 80% MeOH 수용액으로 추출했을 때는 phytol 외에 당류 등의 추출량이 많아져서 후처리에 시간이 오래 걸렸고, 농축 시에도 물의 끓는점도 다른 용매에 비해 높아서 시간이 오래 걸렸다. 또한 CHCl3용매의 경우는 phytol 이외의 다른 성분 추출량이 많아지지도 않고, 농축 시간도 오래 걸리거나 하지 않기는 하였지만, 용매의 단가가 MeOH에 비해 2배 이상으로 높다는 단점을 가지고 있다. 따라서 **상추생체시료로부터 phytol을 추출하는데 가장 적절한 용매는 100% MeOH 로 결정되었다.**

표 4. 추출용매별 상추로부터 추출된 phytol의 함량

추출용매	80% MeOH	MeOH	MeOH-CHCl3 (1:1)	CHCl3
phytol함량 (mg phytol/100g 상추)	76	79	80	81

2) 분획용매에 따른 phytol의 회수율 분석

상추생체시료의 MeOH 추출물을 물과 유기용매로 분배 추출할 때, 유기용매에 따른 phytol 의 분배율을 확인하고자 하였다. 뿐만 아니라 유기용매 층에 클로로필이 다량 분배 전이될 경우, column chromatography 로 phytol을 분리정제 할 때 물질의 분리를 어렵게 하고 있으므로, 클로로필의 분배전이의 정도도 육안으로 확인하고자 하였다.

사용한 유기용매로는 n-hexane, n-hexane-EtOAc (3:1), n-hexane-EtOAc (1:1), n-hexane-EtOAc (1:3), EtOAc 5종을 사용하였다.

아래의 표 5. 에서 보는 바와 같이 n-hexane 만 사용했거나 n-hexane-EtOAc (3:1),을 사용했을 때는 다른 용매에 비해 phytol의 전이분배의 정도가 낮은 것으로 나타났고, 다른 3종의 용매의 경우에는 앞의 두 용매에 비해 분배전이의 효율이 높았으나, 서로 간에는 그다지 큰 차이가 없었다. 다만 n-hexane-EtOAc (1:3)와 EtOAc 의 경우에는 n-hexane-EtOAc (1:1)의 경우에 비해 **클로로필의 전이분배정도가 더 큰 것으로 확인**되었다. 따라서 **분배용 용매로는 n-hexane-EtOAc (1:1)를 사용하기로 하였다.**

표 5. 분배용매에 따른 phytol의 함량

분배용매	n-hexane	n-hexane-EtOAc (3:1)	n-hexane-EtOAc (1:1)	n-hexane-EtOAc(1:3)	EtOAc
phytol함량 (mg phytol/100g 상추)	47	62	77	78	83

3) 상추 phytol 분리시의 column chromatography의 용출용매조건 확립

상추생체시료를 용매 추출 및 용매 분획하여 얻어진 phytol 함유분획에 대하여 silica gel column chromatography를 실시하였을 때, 적절한 용출용매를 확립하고자 하였다. 이 때 1차 column chromatography 시에는 **CHCl3-MeOH (12:1)을 사용**하였을 때, 다량의 클로로필이 우선 용출되어 나온 후에 phytol 함유분획이 확실하게 분리되어 나왔으므로 클로로필과 **phytol을 1차 분리하는데 매우 적절한 용**매로 판단되었다.

2차 column chromatography시에는 **n-hexane-EtOAc (2:1)를 사용**하였을 때 **효과적으로 phytol이 분리, 정제**되는 것으로 판단되었다.

4) 최적화된 조건을 이용하여 상추로부터 phytol의 분리, 정제

상추생체시료 1kg을 100% MeOH 실온에서 추출하였고, 얻어진 농축물을 물 (700 ml)와 n-hexane-EtOAc (1:1) 로 분배 추출하였다. 얻어진 유기층의 감압농축물 (4.4 g) 을 silica gel column chromatography를 반복하였으며 이때 용출용매로 CHCl3-MeOH (12:1)와 n-hexane-EtOAc (2:1) 하였다.

최종적으로 분리 정제하여 얻어진 phytol은 250 mg으로 회수율이 65% 에 달할 정도로 매우 높았다. 뿐만 아니라 column chromatography도 단 2회만을 수행하였기 때문에 흡착 손실량도 매우 적었으며, 시간도 매우 단축되었고, 유기용매의 사용량도 매우 적었다.

따라서 **위에서 확립한 방법은 용매추출 분획 및 chromatography를 사용하여 상추 생체시료로부터 phytol을 분리하는데 매우 효율적인 방법으로 확인되었다.**

사. 상추 품종 중 적토마에서 분리한 항동맥경화 후보물질(phytol)의 in vitro, in vivo activity test

1) 상추 Phytol의 ACAT의 저해 활성 측정(*in vitro.*)

마이크로좀 단백질(microsomal protein)용액(10mM HEPES 완충액 중 17.3 mg/ml, pH 7.4) 8㎕, 100mM DTT 0.8㎕, 400㎛M BSA 4㎕, 측정용 시료용액(물:디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)=9:1(v/v)) 4㎕, 1.5M 인산 완충액(pH 7.4) 8㎕, 100㎛M 14C-올레오일-CoA(11.1 MBq/mmol) 5㎕ 및 물 15.2㎕를 가하여 30℃에서 5분간 반응시킨 후, 메탄올 200㎕ 를 가하여 효소와 화합물의 반응을 정지시키고, 에테르:디에틸에테르:아세틸산=90:14:2(Rf=0.54)의 전개 용매를 이용하여 분취 TLC로 전개시킨 후, 요오드를 분무하여 콜레스테롤 에스테르 밴드(cholesterol ester band)를 분취하여 섬광 바이알(scintillation vial)에 넣은 후, EX-H 용액 4㎖을 첨가하여 방사능을 측정하였다. ACAT 활성은 측정된 방사선량으로부터 시간당 방사선량을 계산하여 피코몰/분/㎎ 단백질 단위로 하여, ACAT 활성 저해도를 대조군과 비교하였다,

그 결과 **ACAT 활성 저해도는 대조군 0%에 대하여 본 과제 실험의 상추로부터 분리한 Phytol의 저해도는 92.7%임을 확인하였다.**

2) 마우스에서의 혈장지질 함량 측정 (*in vivo test*)

가) 마우스의 식이 조성 및 시료 채취

마우스(C57BL/6, 5주령, 수컷, 대한바이오링크)를 일반 고형 사료로 1주일간 예비 사육하여 적응 기간을 거친 후, 정상식이군, 고지방식이군, 상추로부터 추출한 Phytol을 3% 첨가한 고지방식이군으로 각 군당 8마리씩 분류하였다. 실험 식이는 AIN-76 식이 조성을 참고로 하여 물과 함께 자유롭게 섭취하도록 하여 4주간 사육하였다.

사육이 끝난 마우스를 12시간동안 절식시킨 뒤, 디에틸에테르로 마취시키고 심장으로부터 heparin 처리된 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액에서 8,000rpm, 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 측정 전까지 -20℃에서 보관하였고 총 콜레스테롤 함량, 트리글리세라이드 함량과 HDL 함량 측정에 사용하였다.

나). 총 콜레스테롤 함량 측정

혈장 중의 총 콜레스테롤 함량은 총콜레스테롤 측정용 시액 AM 202-K (아산제약주식회사, 대한민국)을 이용하여 효소적 방법 (Sale et al., Anal. Biochem., 142:347-350, 1984)에 의해 측정하였다. 혈장, 시약블랭크, 표준액 각 20㎕와 효소시액 3㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 5분간 방치한 후, 시약블랭크를 대조로 60분 이내에 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 콜레스테롤 함량은 표준액 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비에 표준액 농도(300㎎/ml)를 곱하여 구했다. 그림 47. 에서 도시된 바와 같이 **고지방 식이는 정상식이보다 36.5%의 총 콜레스테롤 함량 증가를 유발**하였다. 고지방 식이로 증가된 총 콜레스테롤 함량은 상**추에서 추출한 Phytol이 첨가된 고지방식이군에서 고지방식이군에 비해 10% 수준 감소하였다. 즉 상추에서 추출한 Phytol 성분이 콜레스테롤 함량을 낮춤을 알 수 있었다.**

다). 트리글리세라이드 함량 측정

혈장 중의 트리글리세라이드 함량은 아산셋트 중성지방 측정용 시액 AM 157S-K (아산제약주식회사, 대한민국)을 이용하여 효소적 방법 (Biggs et al., Clin. Chem., 21: 437-441, 1975)에 의해 측정하였다. 혈장, 시약블랭크, 표준액 각 20㎕와 효소용액 3㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 10분간 방치한 후, 시약블랭크를 대조로 60분 이내에 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

트리글리세라이드 함량은 표준액 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비에 표준액 농도(300㎎/ml)를 곱하여 구했다. 그림 48. 에서 도시된 바와 같이 **고지방 식이는 정상식이보다 31.9%의 트리글리세라이드 함량 증가를 유발**하였다. 고지방 식이로 증가된 총 콜레스테롤 함량은 **Phytol이 첨가된 고지방식이군에서 정상식이군과 유사한 수준으로 감소하였다.**

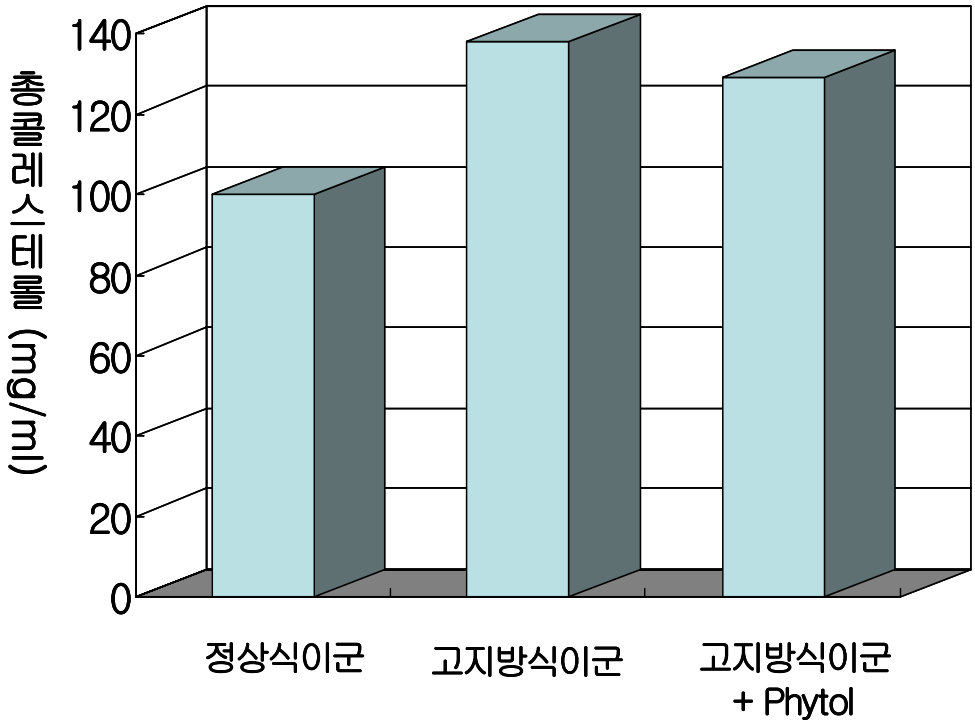


그림 47. 총 콜레스테롤 함량 측정

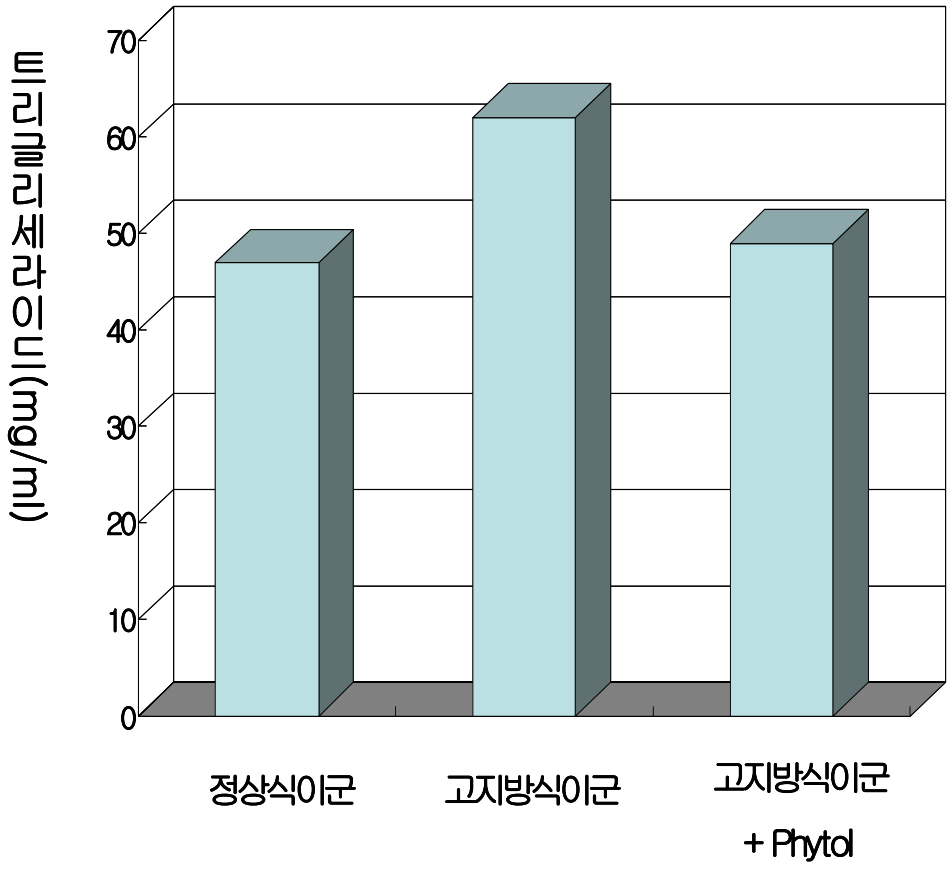


그림 48. 트리글라세이드 함량 측정

라). HDL 함량 측정 및 LDL 함량 추정

혈장 중의 HDL 함량은 에취디엘 콜레스타제 AM 203-K (아산제약주식회사, 대한민국)을 이용하여 β-lipoprotein (LDL, VLDL)을 침전시킨 후, 상층액에 있는 HDL의 콜레스테롤을 상기 실시예와 같이 효소적 방법으로 구하였다. 혈장과 분리시액 0.2㎖을 잘 혼합하여 실온에 10분 방치 후, 3000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 상층액, 시약블랭크, 표준액 각 0.1㎖에 효소시액 3㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 5분간 방치하고 시약 블랭크를 대조로 하여 파장 500nm에서 흡광도를 측정하였다. HDL 함량은 표준액의 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비에 표준액 농도 (50㎎/ml)와 희석배수 2를 곱하여 구했다. LDL 함량은 다음 방정식에 의하여 구하였다 (Friedewald et al., Clin. Chem., 18:499-502).

그림 49. 에서 도시된 바와 같이, **고지방식이군이 정상식이군에 비해 혈중내 HDL 함량이 31.2% 유의적으로 감소**되었고, **고지방식이로 감소된 HDL 함량이 상추에서 추출한 Phytol을 첨가한 고지방식이군에서는 오히려 정상식이군보다 6.4% 증가하였다**. HDL은 혈중의 불필요한 콜레스테롤을 운반하여 제거하는 역할을 하므로, HDL의 함량이 증가하였다는 것은 **상추에서 추출한 Phytol이 혈중 콜레스테롤을 저하시킬 수 있다는 것을 의미**한다. 그림 49. 에 도시된 바와 같이, **고지방 식이군이 정상식이군에 비해 혈중 내 LDL 함량이 2배 이상 유의적으로 증가**하였고, **고지방식이로 증가된 LDL 함량이 상추에서 추출한 Phytol을 첨가한 고지방식이군에서 정상식이군과 유사한 수준으로 감소**하였다. LDL은 LDL 콜레스테롤이 변형된 형태로 혈관 벽에 쉽게 달라붙어 동맥경화를 유발하므로, **LDL이 감소하였다는 것은 Phytol에 의해 혈중 콜레스테롤이 혈관 내벽 침착이 줄어든다는 것을 의미**한다.

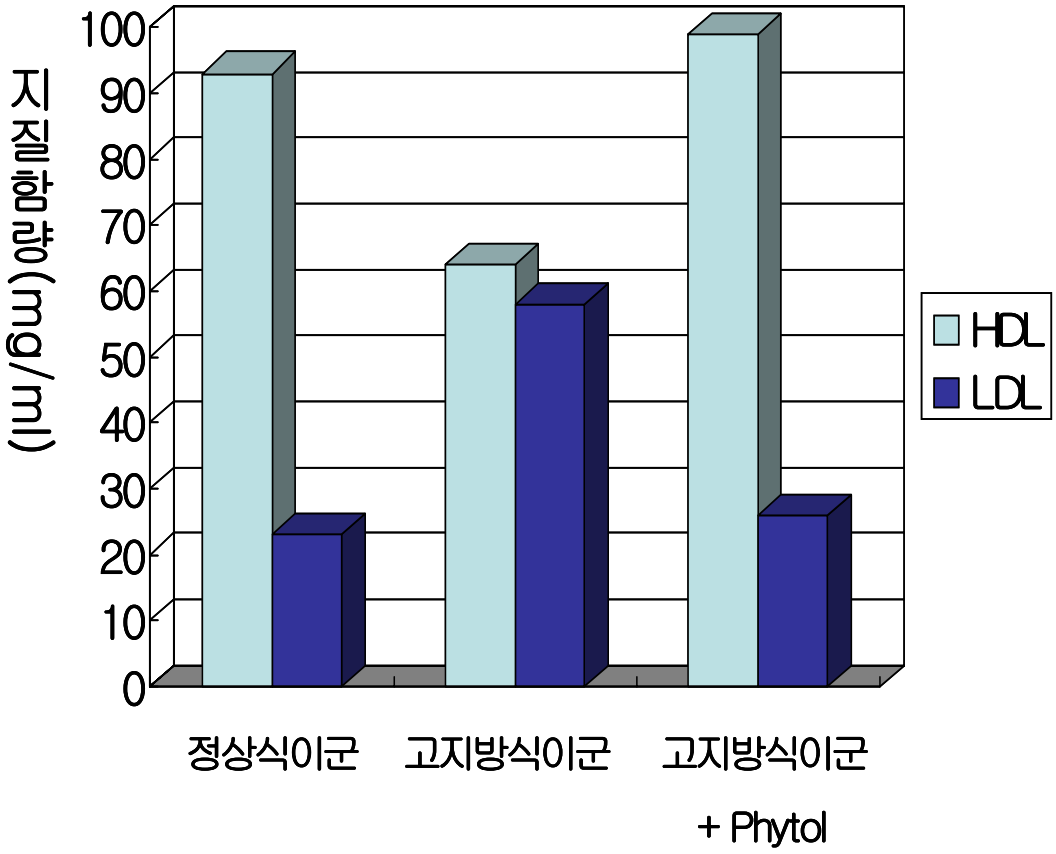


그림 49. 전체 지질 함량 측정

아. 상추 품종 적토마의 추출 조건에 따른 β-sitosterol 및 Phytol의 함량 분석

1) 상추 추출물 시제품 생산을 위한 주정 추출 최적화 방법

상추 시료 생체중 300g을 각각 주정용 EtOH 100%, 65%, 20%로 1000ml씩 두 번 진탕 추출 하였다. 얻어진 각 추출물을 감압 농축하고, 각 농축액을 EtOAc(100ml X 2)와 H2O(100ml)로 분배 추출하였으며, EtOAc 분획을 탈수 감압 농축하여 분석 시료를 제조하였다.

시료(각 EtOH 추출물 및 EtOAc 분획 농축물) 및 standard를 1mg씩 떼내어 *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamide(Aldrich Chemical Company) 100㎕ 가한 후, 60℃의 오븐에서 60분 동안 반응 시켰다. 여기에 $CHCl_3$(HPLC grade) 900㎕ 을 첨가하여 분석용 시료로 사용하였다.

β-Sitosterol을 정량하기 위해서는 각 EtOH 추출물을 TMS화하였고, phytol의 정량을 위해서는 EtOAc 분획의 농축물을 TMS화하여 정량하였다. (β-sitosterol의 경우, EtOAc로 분획을 나누면, 물 분획으로도 분배되기 때문에 정확한 함량을 측정하기 위해서 EtOH 추출물로부터 함량을 구하였다. 반면, phytol은 상추 내 함유량이 극미량이며, 분획을 통하여서 보다 함량을 측정하기 용이하므로, EtOAc 분획물을 농축하여 시료로 사용하였다.)

TMS화 시킨 각 시료 용액 3u*l*을 취하여 GC(GC-14B, Shimadzu, Japan)로 분석하였다. 검출기는 flame ionization detector(FID)를 사용하였고, column은 DB-5(30m(0.32mm ID(0.25um, J&W, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. 오븐 온도는 200℃에서 10분간 유지한 후에, 10?/min으로 상승시켜 최종 온도 320℃에서 5분간 유지 하였다. Injector와 detector의 온도는 모두 320℃로 유지 하였다.

2) 주정 추출 조건에 따른 상추 추출물의 수율

주정용 EtOH 100%, 65%, 20%의 용매로 상추를 추출하고 분획했을 때, 얻어진 농축물의 양은 다음의 표 6 와 7 과 같다. 추출용매의 극성에 따라서 초기 추출량은 물의 함량에 비례해서 증가하였으나, EtOAc 분획의 농축물은 극성이 상대적으로 낮은 100% EtOH 추출물의 EtOAc 분획물의 양이 가장 많았다.

표 6. 추출 조건에 따른 상추 추출물 수율

추출용매	EtOH 추출물의 양 (%)	EtOAc 분획물의 양 (%)
20% EtOH	5.58g *(1.86%)*	38.3mg *(0.013%)*
65% EtOH	4.83g *(1.61%)*	260.9mg *(0.087%)*
100% EtOH	3.52g *(1.17%)*	792.2mg *(0.264%)*

표 7. 추출 조건에 따른 항동맥경화 물질의 함량 분석

추출용매	β-sitosterol(%)	phytol(%)
20% EtOH	2.60mg/1g *(2.60mg%)*	Not Detected
65% EtOH	9.33mg/1g *(9.33mg%)*	0.03mg/1g *(0.029mg%)*
100% EtOH	4.21mg/1g *(4.21mg%)*	0.06mg/1g *(0.060mg%)*

3) 주정 추출 조건에 따른 항동맥경화 물질 β-sitosterol 및 Phytol 함량 분석

위에서 기술한 조건의 분석방법으로 GC를 측정했을 때, β-sitosterol의 retention time은 21.61분이었고, phytol의 retention time은 6.98분이었다. 시료를 injection하여 표준품과의 retention time을 비교하여 같은 화합물임을 확인하고, 정량곡선을 그렸다 (그림 50, 51).

β-Sitosterol의 정량곡선은 $y = 213.78x + 2137$였고, 회귀도는 R2 = 0.9995로 나타났으며, phytol의 경우에는 $y = 241.23x - 248.73$, R2 = 0.9997이었다. 이 곡선을 통하여서 상추 내 표준품의 함량을 계산하였다.

각 추출 조건에서 항동맥 경화물질의 함량을 비교해본 결과, 65% EtOH를 추출용매로 사용하였을 때, β -sitosterol의 추출량이 최대였으나, phytol의 추출양이 최대인 용매는 100% EtOH임을 알 수 있었다. 그러나 **시제품생산에따른항동맹경화물질의최대수율은65%주정을사용하였을때,추출물의수율및각β-sitosterol과phytol함량의비율이최적으로판단된다.**

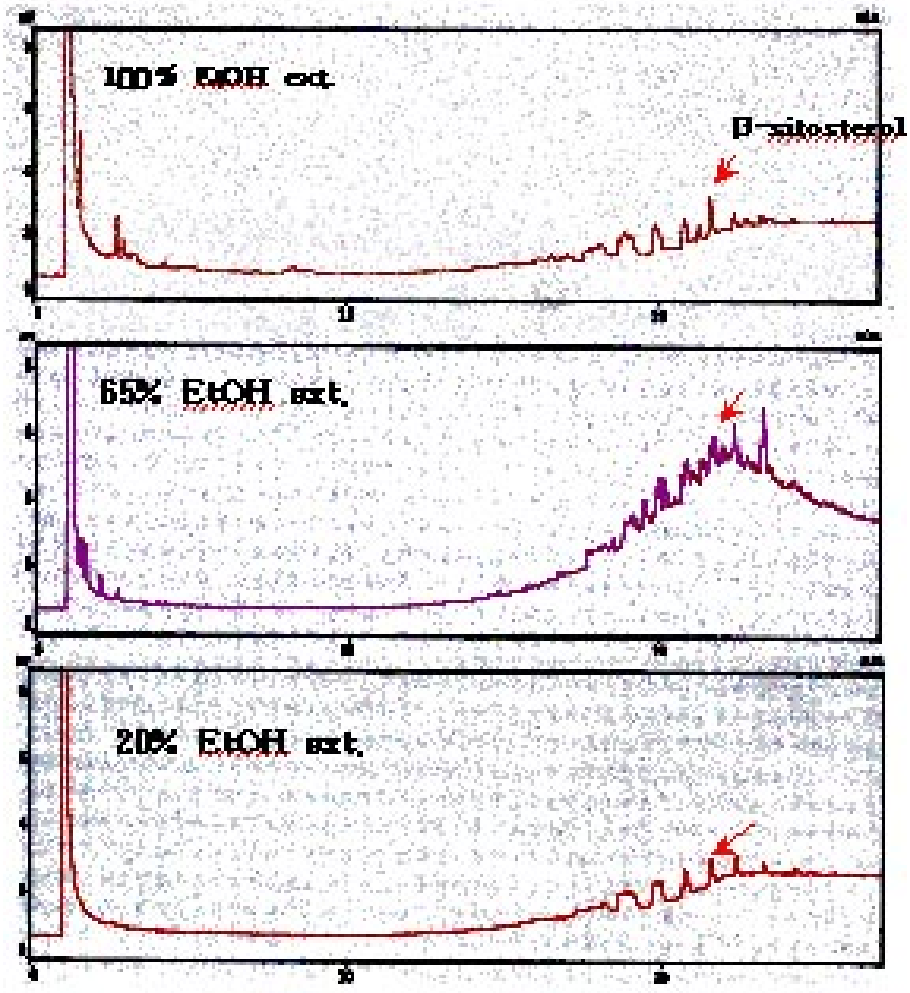


그림 50. 추출조건에 따른 β-sitosterol의 함량

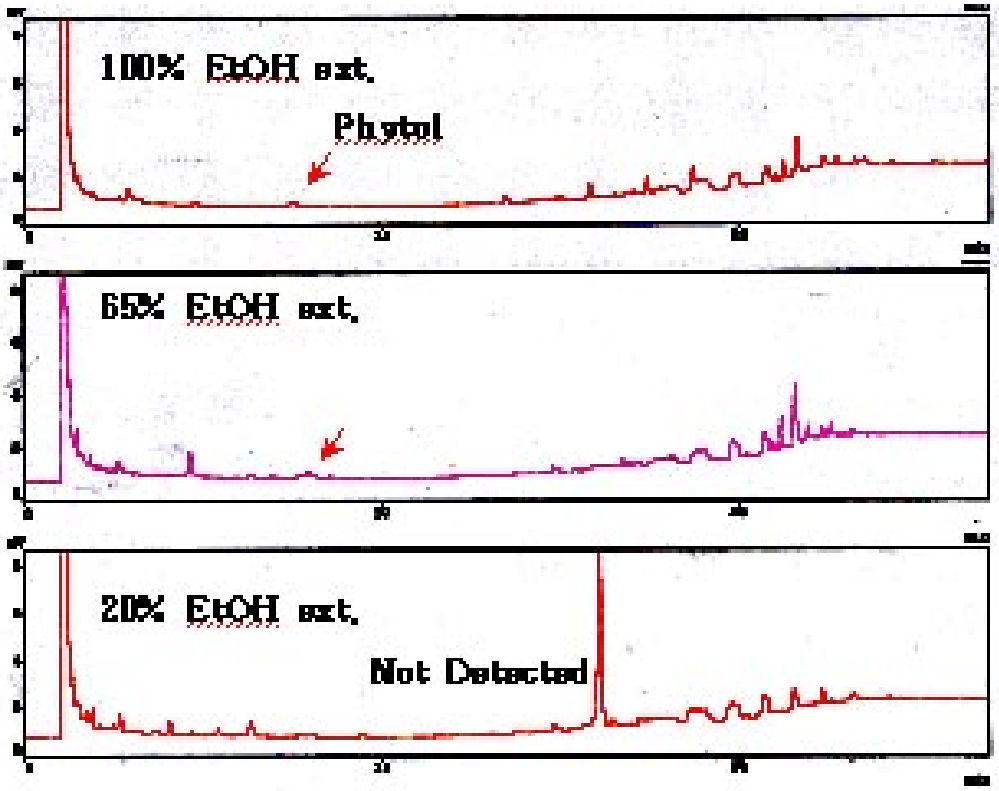


그림 51. 추출조건에 따른 Phytol의 함량

자. 상추 적토마의 추출물을 이용한 시제품의 제작

적토마 상추 10Kg을 구입하여 65% 주정을 이용하여 24hr씩 2차에 걸쳐 추출 하였다. 1차 추출엔 65%주정 52liter, 2차 추출엔 30liter가 사용 되었으며 각 추출후 여과지를 이용하여 슬러지를 제거 한 후 감압 농축기를 이용하여 10 Brix 이상 농축 하였다.

또한 농축 과정 중 Chlorophyll 성분의 결정화를 방지하기 위하여 10DE미만의 Dextrin을 이용하였으며 농축 후 spray dryer를 이용하여 **1Kg의 10:1 상추추출물 건조 분말을 제작** 하였다. 그림 52. 에서 시제품을 볼 수 있다..

그림 52. 상추 추출물 시제품 <그린콜-1000>

차. 상추 추출물시제품 그린콜-1000을 이용한 항동맥경화 in vitro, in vivo activity test

1) 상추 Phytol의 ACAT의 저해 활성 측정(*in vitro.*)

마이크로좀 단백질(microsomal protein)용액(10mM HEPES 완충액 중 17.3 mg/ml, pH 7.4) 8㎕, 100mM DTT 0.8㎕, 400μM BSA 4㎕, 측정용 시료용액(물:디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)=9:1(v/v)) 4㎕, 1.5M 인산 완충액(pH 7.4) 8㎕, 100μM 14C-올레오일-CoA(11.1 MBq/mmol) 5㎕ 및 물 15.2㎕를 가하여 30℃에서 5분간 반응시킨 후, 메탄올 200㎕ 를 가하여 효소와 화합물의 반응을 정지시키고, 에테르:디에틸에테르:아세틸산=90:14:2(Rf=0.54)의 전개 용매를 이용하여 분취 TLC로 전개시킨 후, 요오드를 분무하여 콜레스테롤 에스테르 밴드(cholesterol ester band)를 분취하여 섬광 바이알(scintillation vial)에 넣은 후, EX-H 용액 4㎖을 첨가하여 방사능을 측정하였다. ACAT 활성은 측정된 방사선량으로부터 시간당 방사선량을 계산하여 피코몰/분/㎎ 단백질 단위로 하여, ACAT 활성 저해도를 대조군과 비교하였다,

그 결과 **ACAT 활성 저해도는 대조군 0%에 대하여 본 과제 실험의 상추 추출물 시제품 그린콜-1000의 저해도는 64.9%임을 확인하였다.**

2) 마우스에서의 혈장지질 함량 측정 (*in vivo.*)

가) 마우스의 식이 조성 및 시료 채취

마우스(C57BL/6, 5주령, 수컷, 대한바이오링크)를 일반 고형 사료로 1주일간 예비 사육하여 적응 기간을 거친 후, 정상식이군, 고지방식이군, Greenchol-1000 3% 첨가한 고지방식이군으로 각 군당 5마리씩 분류하였다. 실험 식이는 AIN-76 식이 조성을 참고로 하여 물과 함께 자유롭게 섭취하도록 하여 4주간 사육하였다.

사육이 끝난 마우스를 12시간동안 절식시킨 뒤, 디에틸에테르로 마취시키고 심장으로부터 heparin 처리된 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액에서 8,000rpm, 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 측정 전까지 -20℃에서 보관하였고 총 콜레스테롤 함량, 트리글리세라이드 함량과 HDL 함량 측정에 사용하였다.

나) 총 콜레스테롤 함량 측정

혈장 중의 총 콜레스테롤 함량은 총콜레스테롤 측정용 시액 AM 202-K (아산제약주식회사, 대한민국)을 이용하여 효소적 방법 (Sale et al., Anal. Biochem., 142:347-350, 1984)에 의해 측정하였다. 혈장, 시약블랭크, 표준액 각 20㎕와 효소시액 3㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 5분간 방치한 후, 시약블랭크를 대조로 60분 이내에 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 콜레스테롤 함량은 표준액 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비에 표준액 농도(300㎎/ml)를 곱하여 구했다. 그림 53. 에서 도시된 바와 같이 **고지방 식이는 정상식이보다 36.5%의 총 콜레스테롤 함량 증가를 유발하였다. 고지방 식이로 증가된 총 콜레스테롤 함량은 Greenchol-1000이 첨가된 고지방식이군에서 고지방식이군에 비해 10% 수준 감소하였다.**

즉 **상추 추출물 시제품인 Greenchol-1000이 콜레스테롤 함량을 낮춤**을 알 수 있었다.

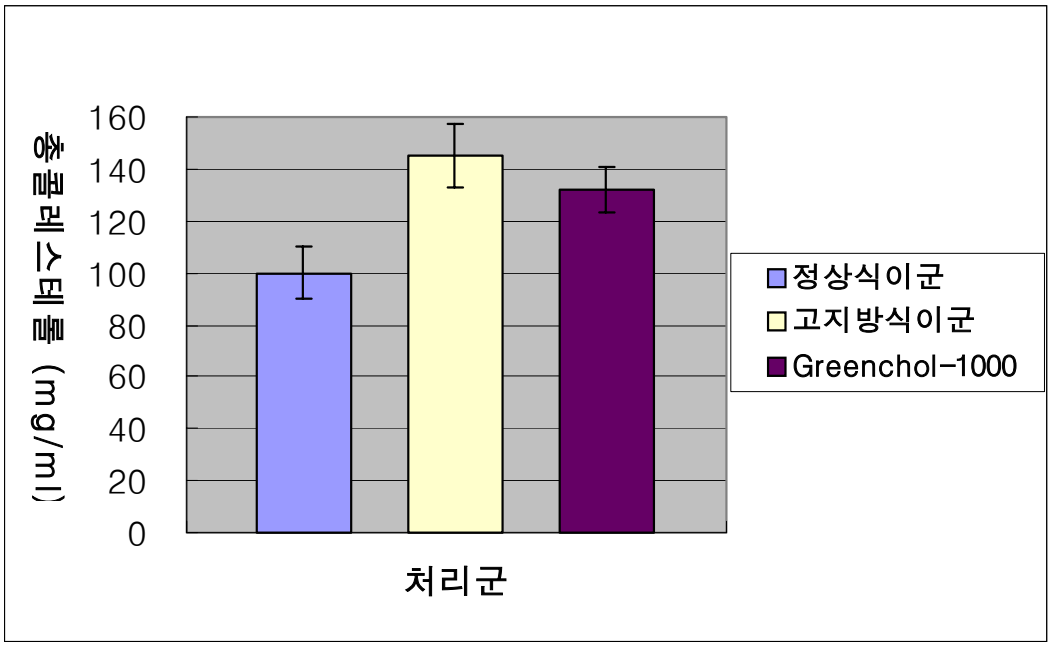


그림 53. 총 콜레스테롤 함량 측정

다) 트리글리세라이드 함량 측정

혈장 중의 트리글리세라이드 함량은 아산셋트 중성지방 측정용 시액 AM 157S-K (아산제약주식회사, 대한민국)을 이용하여 효소적 방법 (Biggs et al., Clin. Chem., 21: 437-441, 1975)에 의해 측정하였다. 혈장, 시약블랭크, 표준액 각 20㎕와 효소용액 3㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 10분간 방치한 후, 시약블랭크를 대조로 60분 이내에 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

트리글리세라이드 함량은 표준액 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비에 표준액 농도(300㎎/ml)를 곱하여 구했다. 그림 54. 에서 도시된 바와 같이 **고지방 식이는 정상식이보다 25.3%의 트리글리세라이드 함량 증가를 유발**하였다. 고지방 식이로 증가된 **총 콜레스테롤 함량은 Greenchol-1000 이 첨가된 고지방식이군에서 정상식이군과 유사한 수준으로 감소**하였다.

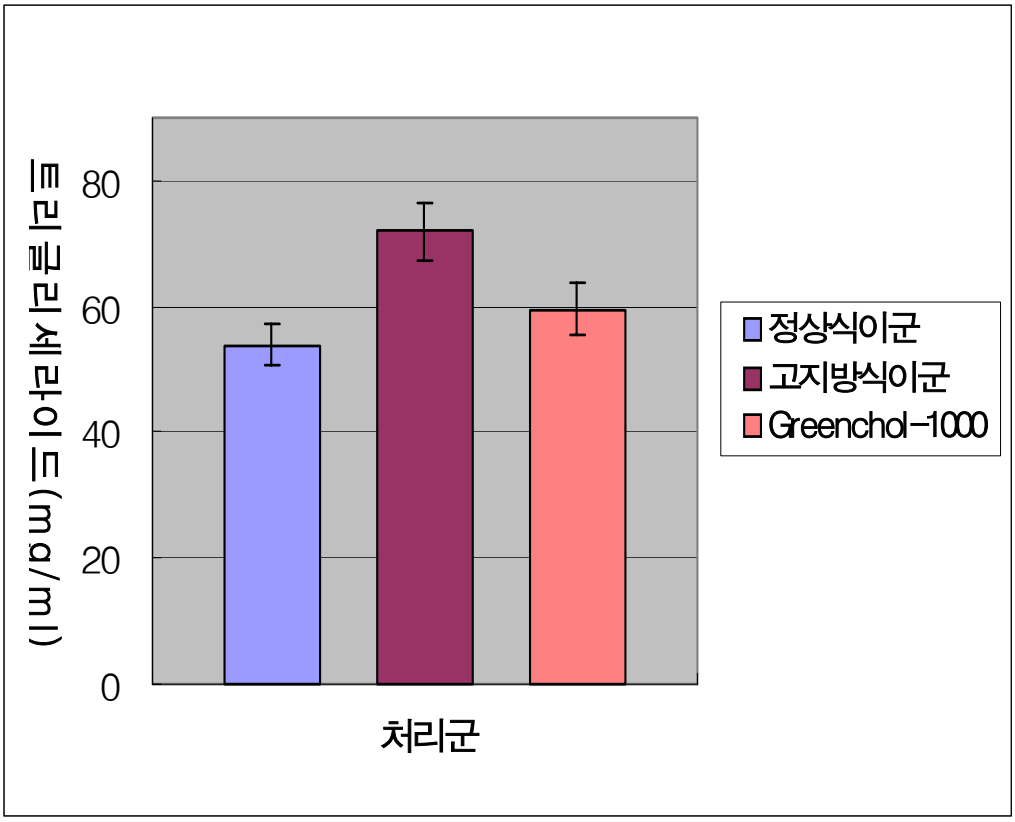


그림 54. 트리글라세이드 함량 측정

라) HDL 함량 측정 및 LDL 함량 추정

혈장 중의 HDL 함량은 에취디엘 콜레스타제 AM 203-K (아산제약주식회사, 대한민국)을 이용하여 β-lipoprotein (LDL, VLDL)을 침전시킨 후, 상층액에 있는 HDL의 콜레스테롤을 상기 실시예와 같이 효소적 방법으로 구하였다. 혈장과 분리시액 0.2㎖을 잘 혼합하여 실온에 10분 방치 후, 3000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 분리된 상층액, 시약블랭크, 표준액 각 0.1㎖에 효소시액 3㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 5분간 방치하고 시약 블랭크를 대조로 하여 파장 500nm에서 흡광도를 측정하였다. HDL 함량은 표준액의 흡광도에 대한 검체 흡광도의 비에 표준액 농도 (50㎎/ml)와 희석배수 2를 곱하여 구했다. LDL 함량은 다음 방정식에 의하여 구하였다 (Friedewald et al., Clin. Chem., 18:499-502).

그림 55. 에서 도시된 바와 같이, **고지방식이군이 정상식이군에 비해 혈중내 HDL 함량이 22.3% 유의적으로 감소**되었고, **고지방식이로 감소된 HDL 함량이 Greenchol-1000을 첨가한 고지방식이군에서는 오히려 정상식이군보다 5.8% 증가하였다.** HDL은 혈중의 불필요한 콜레스테롤을 운반하여 제거하는 역할을 하므로, HDL의 함량이 증가하였다는 것은 **Greenchol-1000이 혈중 콜레스테롤을 저하시킬 수 있다는 것을 의미**한다. 그림 55. 에 도시된 바와 같이, **고지방 식이군이 정상식이군에 비해 혈중 내 LDL 함량이 2배 이상 유의적으로 증가**하였고, **고지방식이로 증가된 LDL 함량이 Greenchol-1000을 첨가한 고지방식이군에서 정상식이군과 유사한 수준으로 감소**하였다. LDL은 LDL 콜레스테롤이 변형된 형태로 혈관 벽에 쉽게 달라붙어 동맥경화를 유발하므로, LDL이 감소하였다는 것은 혈중 콜레스테롤의 침착이 줄어든다는 것을 의미한다.

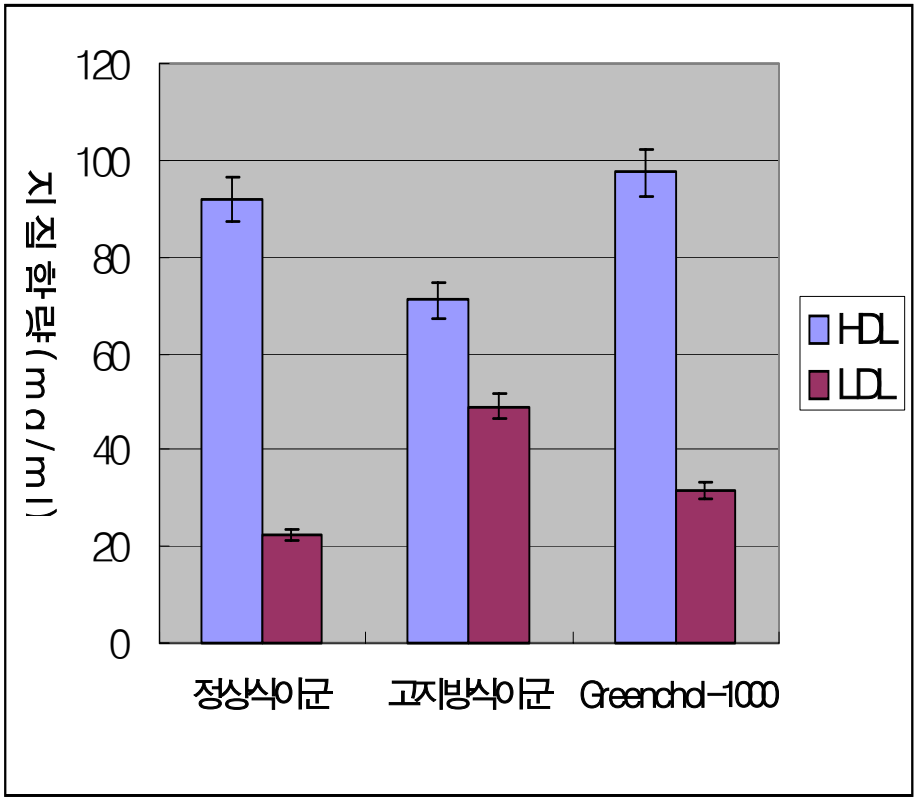


그림 55. 전체 지질 함량 측정

3. 상추 및 식용작물의 항동맥경화 물질 규명 및 건강기능성 식품 개발

가. 상추의 항동맥경화 물질의 물리·화학적 특성 규명

상추를 MeOH로 추출하여 이 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O로 분배 추출하였다. 3개의 분획 중 EtOAc분획에서 ACAT 억제활성이 확인되었고(표 8), EtOAc분획에 대하여 활성을 추적해가며 silica gel Column chromatography를 반복하여 가장 높은 활성을 나타낸 화합물 1을 0.015%의 수율로 분리, 정제하였다.

화합물 1은 흰색 오일상의 물질로, 밀도 0.85, 용융점 203℃ 등을 가진 것으로 확인 되었으며, 물에는 불용성이고 EtOH, MeOH에 잘 녹으며, 기타 다른 유기용매에도 잘 녹는 지용성 물질로 확인 되었다.

나. 상추유래 항 동맥경화물질의 구조규명

화합물1은 ^{1}H-NMR(400㎒, $CDCl_3$)에서 triplet-quartet의 olefine methine(δ5.40)과 doublet으로 관측된 oxygenated allyl methylene(δ4.14)그리고 triplet의 allyl methylene(δ1.99)과 singlet methyl(δ1.66) signal이 관측되었다. 또한 0.84~0.88ppm에서 4개의 doublet methyl signal이 관측되었다. 그밖에 고자장 영역에서 다수의 methine과 methylene signal이 관측된 점으로 볼 때 지방족 사슬구조를 갖는 화합물로 추정할 수 있었다(그림 56).

^{13}C-NMR(100㎒, $CDCl_3$)에서는 모두 20개의 signal이 관측되었으며, olefine quaternary(δ_c 59.34)과 고자장영역에서 5개의 methyl(δ_c 22.69, 22.59, 19.72, 19.68, 16.13), 9개의 methylene 및 3개의 methine 탄소signal이 관측되었다. 이를 종합해 보면 이 화합물은 탄소수20개의 의 비환상 diterpene 화합물로 판단되었다(그림 57).

이 화합물의 각종스펙트럼 데이터를 문헌 값과 비교한 결과 phytol로 구조결정하였다(그림 58).

표 8. ACAT inhibition activity of fractions obtained from the *Lactuca sativa* L.

Fractions*	EOAc fr.	*n*-BuOH fr.	H_2O fr.									
Inhibition rate(%)	72.4	32.1	12.4									
Fractions*	CCE-1	CCE-2	CCE-3	CCE-4	CCE-5	CCE-6	CCE-7	CCE-8				
Inhibition rate(%)	55.4	82.1	38.4	32.1	54.7	52.1	56.6					
Fractions*	CCE-2-1	CCE-2-2	CCE-2-3	CCE-2-4	CCE-2-5	CCE-2-6	CCE-2-7	CCE-2-8	CCE-2-9	CCE-2-10	CCE-2-11	
Inhibition rate(%)	70.8	56.1	56.5	91.6	57.2	46.8	39.4	38.6	35.4	34.9	31.5	
Fractions*	CCE-2-4-1	CCE-2-4-2	CCE-2-4-3	CCE-2-4-4	CCE-2-4-5	CCE-2-4-6	Ginsenoside Ro**					
Inhibition rate(%)	45.2	93.5	13.4	51.2	32.3	43.5	89.2					

*100μg of each fraction was treted.

**50μg was treted.

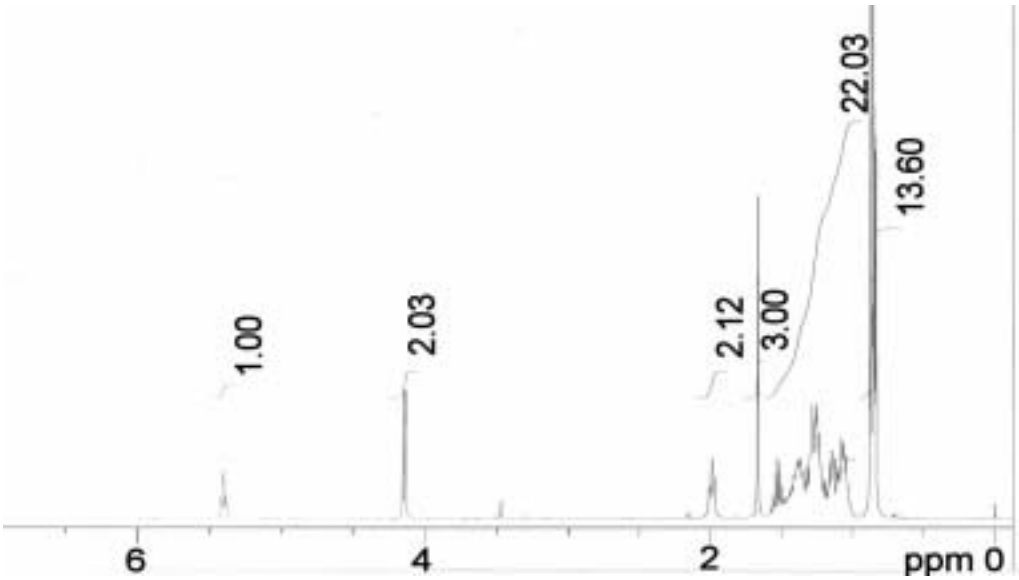


그림 56. 화합물 1의 H_1-NMR의 스펙트럼

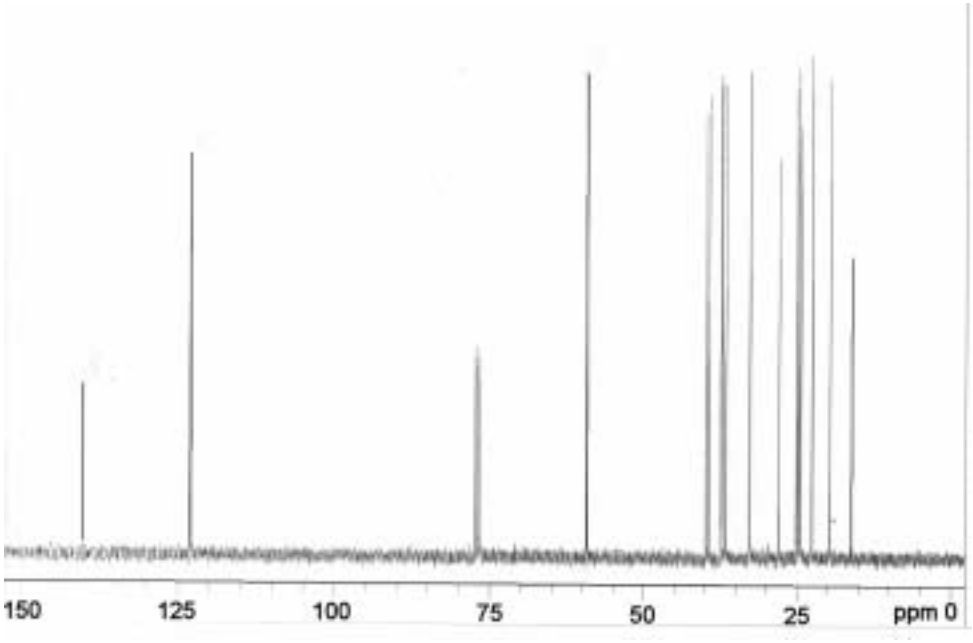


그림 57. 상추로부터 분리한 화합물(화합물1)의 ^{13}C-NMR 스펙트럼

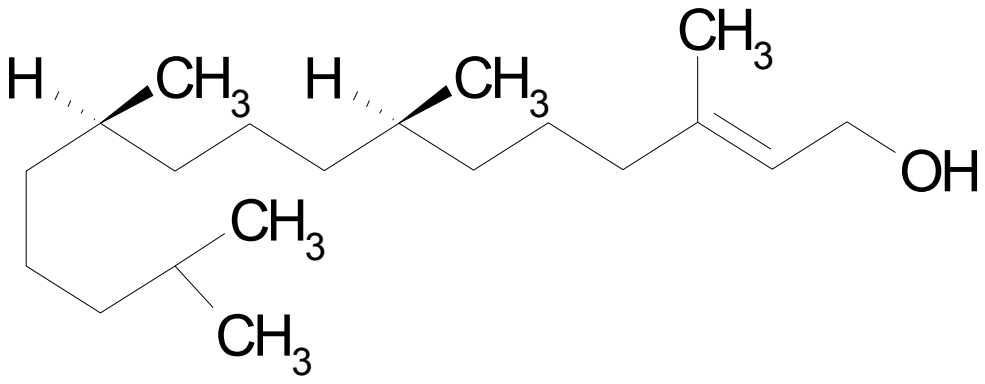


그림 58. 상추로부터 분리한 phytol의 화학구조

다. 상추의 가공적성과 in vitro, in vivo 실험결과를 고려한 식품모델연구

상추추출물의 열 안정성을 측정하기 위하여 최대 흡광도를 나타내는 광선의 영역에서 최종 흡광도가 1.0정도가 되도록 상추 추출물의 농도를 조절한 후, 20, 60, 100℃에서 각 용액의 흡광도를 일정기간 동안 측정하여 분해 속도 또는 반감기 계산을 통한 상추 유래의 항동맥경화 물질의 열 안정성에 관한 실험을 하였으나, 실험을 해 본 결과 항동맥경화 활성을 갖는 유효 생리활성물질(phytol)의 최대 흡광도가 212 nm부근에서 나타나며 이 영역에서는 용매에 의한 간섭이 매우 심해 UV-Visible 영역에서의 흡광도 측정이 불가능하여 다른 방법을 타진한 결과 gas chromatography법을 이용하여 phytol의 함량을 측정함이 가능하여 gas chromatography법을 이용하여 열 안정성 실험을 실행 하였다.

상추추출물을 각 실험온도에서 처리한 후, 각 시료를 *N,O*-bis(trimethylsilyl) acetamide 를 이용하여 trimethylation 한 후, Gaschromatography를 이용하여 phytol 함량을 측정하였다. phytol의 분리를 위한 gaschromatography 운용조건을 간략히 기술하면 칼럼온도 200℃에서 시작하여 5분 후, 분당 10 ℃씩 증가하여 320℃까지 올려 총 30분간 시료를 분리하였으며 이 때, injector 온도는 360℃, detector 온도는 360℃ 그리고 flow rate는 0.8 ml/min, split ratio는 76:1 이었다. gas chromatograph는 Shimadzu(Japan)의 GC-14B model이었고, detector는 flame ionization detector 였으며 사용된 column은 DB-5 fused silica capillary columnn (30 m * 0.25 mm I.D., 20 μm film; JMW Scientific, USA)였다. internal standard 로는 β-sitosterol(Sigma, USA)을 사용하였다.

각 온도에서 24시간 처리 후, 60℃이상의 온도처리 군에서 상추 추출물은 진한 녹색에서 연한 녹색으로 변한 것을 확인할 수 있었고, 이 변화는 온도가 높아짐에 따라 더욱 심화되는 것을 알 수 있었다. 이 변화는 시료 중의 phytol 변화와도 일치 하였으며 20℃에서는 거의 변화가 없었고, 60℃에서는 약 27% 그리고 100℃에서는 50%의 phytol 함량 감소를 확인하였다.(그림 59)

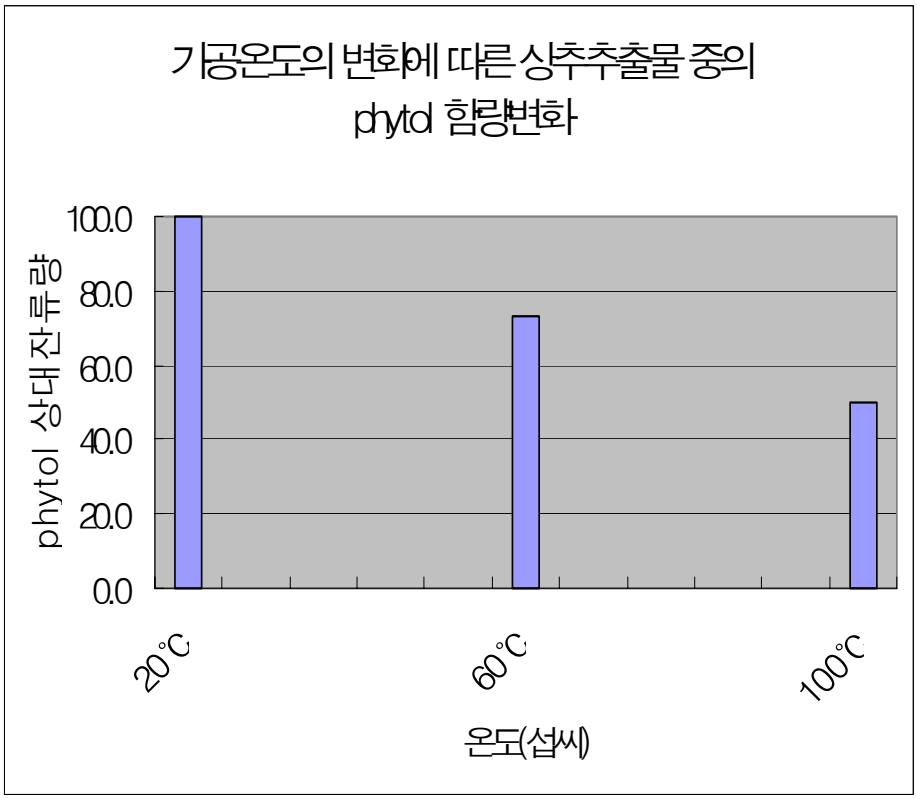


그림 59. 가공온도의 변화에 따른 상추 추출물 중의 phytol 함량 변화

상추추출물의 빛 안정성실험은 20,000 lux의 조도에서 상추추출물을 1, 6, 24, 48, 72시간 동안 처리한 후, 열안정성 실험과 마찬가지로 trimethylation 한 후, GC를 이용하여 phytol의 함량을 측정하여 실행하였다.

20,000 lux의 빛을 조사 한 후, 상추추출물의 색은 열 안정성 실험과 유사한 결과를 나타내어 약 24시간까지 특유의 녹색이 매우 옅어졌으며, 24시간 이후로는 phytol이 검출되지 않았다.(그림 60 ~61)

빛조사(20,000 lux)에 의한 상추추출물 중의 phytol의 함량변화는 예상치 못했던 결과이므로, 이 현상을 더 이해하기 위해 phytol 순품을 Sigma(USA)에서 구입하여 phytol의 빛 안정성에 대해 실험 하였다. (그림 62)

빛조사(20,000 Lux, 72시간)에 따른 phytol의 변화를 GC-MS detector를 사용하여 분석하였다. (그림 63) 광처리 전의 phytol은 2개의 분리된 peak로 관찰되었는 데, 광조사후, 새로운 peak 가 관찰 되었고 이에 대한 분석을 하였다.(그림 64,65,66) phytol을 72h 동안, 20,000 lux에 조사하였을 때에, phytol의 C1의 oxymethylene의 수산기에서 proton이 떨어지면서, 전자의 이동이 위 그림과 같이 보이면서, 산화를 보였을 것으로 여겨진다. 그럼과 동시에, C1~C4사이에 conjugated olefine을 형성하여 구조적으로 안정한 상태를 이루는 것으로 여겨진다.

정상적인 phytol의 분자량 $[M]^+$ 296에서 H_2O가 떨어진 $[M-H_2O]^+$ 278, $[M-H_2O-CH_3]^+$ 263등의 fragmentation을 보이지만, 산화된 phytol의 경우 분자량 $[M]^+$ 295에서 떨어진 $[M-H_2O]^+$ 278는 나타나지 않고, $[M-CH_3OH^-]^+$ 263등이 바로 나타났다. 또한, phytol에서 크게 나타났던, Base peak 71대신에 CH3가 붙은 base peak 85가 나타나는 것으로 관측되었다. 이는 활성산소의 분자내에서의 이동에 의해서 fragmentation의 변화를 가져온 것으로 여겨진다.

따라서, 빛에 의해서 시간대 별로 확인한 바와 같이 phytol과 phytol isomer의 경우, 조사 시간량에 비해서 상당히 크게 감소하는 반면, 새로이 생성되어지는 분자량 295로 나타나는 산화된 형태의 phytol은 비례적으로 증가하는 현상을 발견할 수 있다. 또한, 생리활성이 보고된 phytol이 빛에 의해 산화되어 활성산소를 갖는 골격으로 변화되는 것으로 여겨져, 도리어 유효한 생리활성의 억제효과로 나타날 것으로 여겨진다. 상추추출물의 열 및 온도에 대한 가공적성 등을 종합적으로 고려해 볼 때, 상추추

출물의 항동맥경화성을 최대한 활용하기 위해서는 가능한 한 열처리는 적게 하는 방향으로 가공이 되어야 할 것으로 보인다

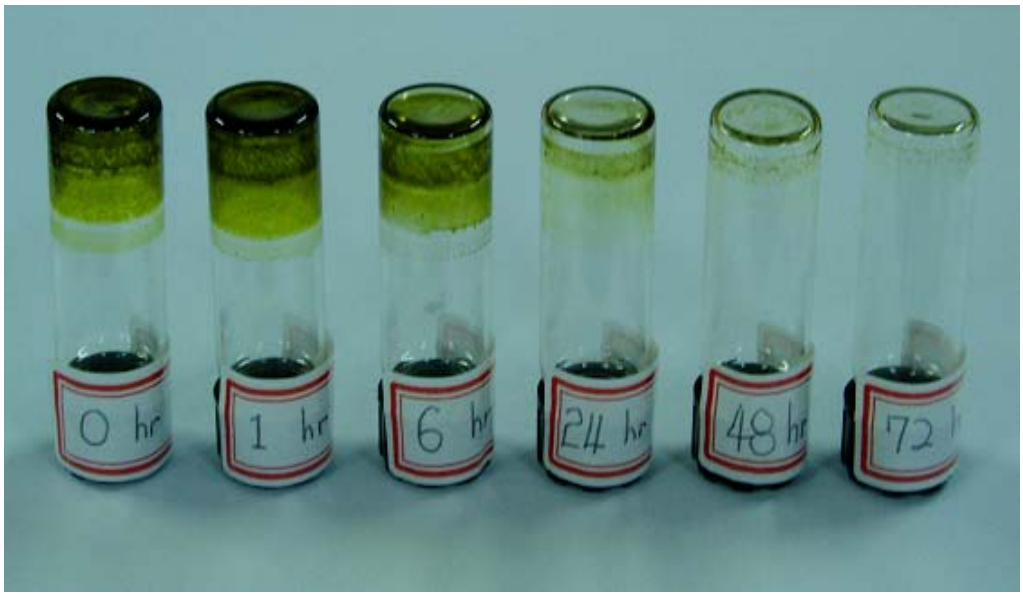


그림 60. 상추추출물에 20,000 lux의 빛을 조사한 후, 상추 추출물의 색 변화

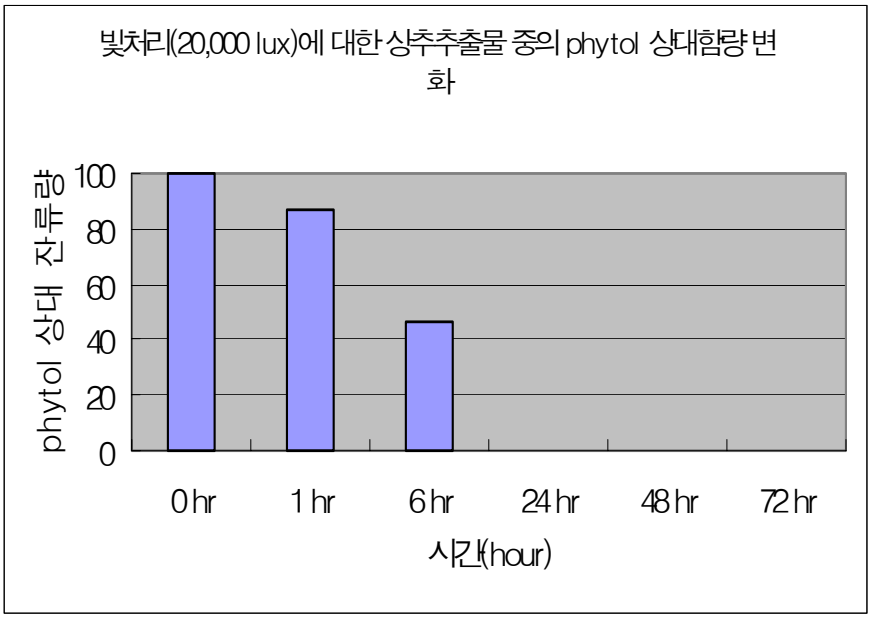


그림 61. 상추추출물에 20,000 lux의 빛을 조사한 후, 상추추출물 내의 phytol 함량 변화

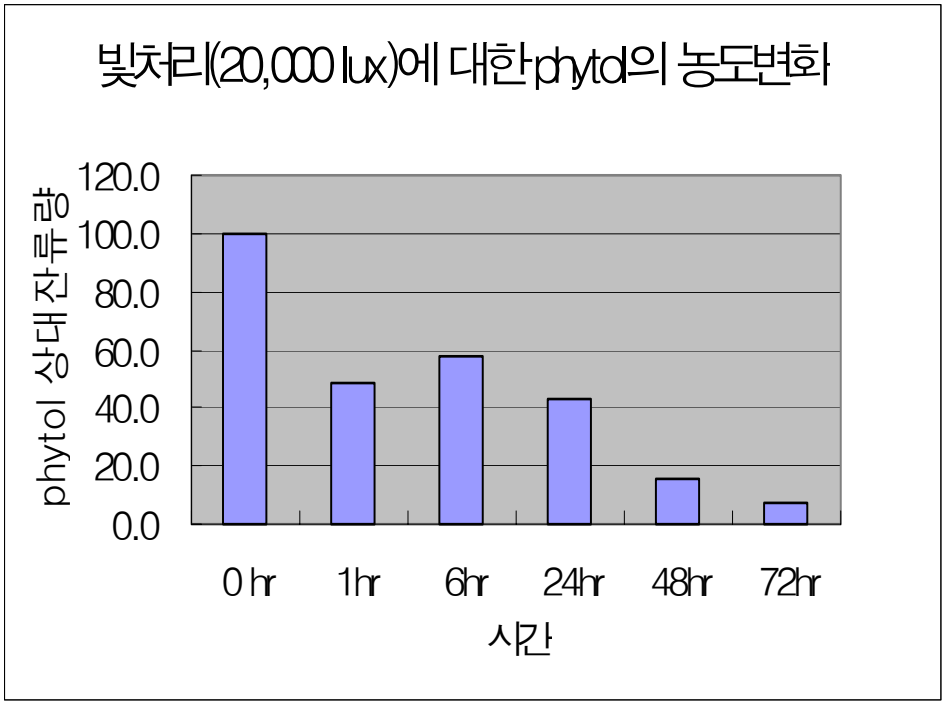


그림 62. 빛 조사(20,000 lux)에 의한 phytol의 변화

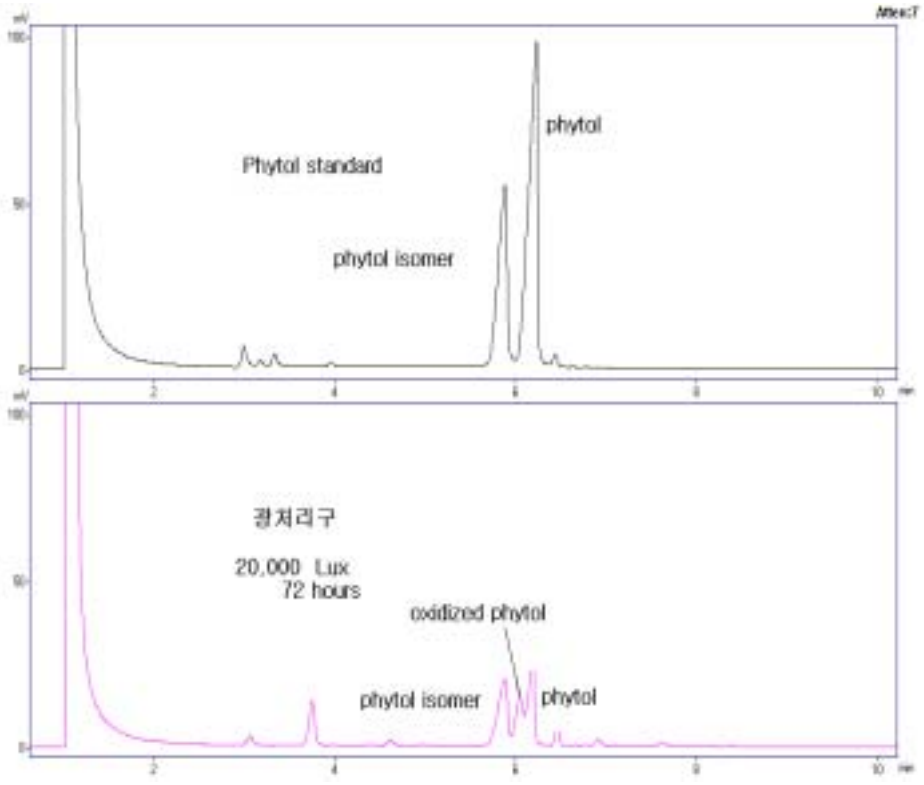


그림 63. 빛(20,000 Lux, 72시간)에 따른 phytol의 GC-MS spectrum 변화

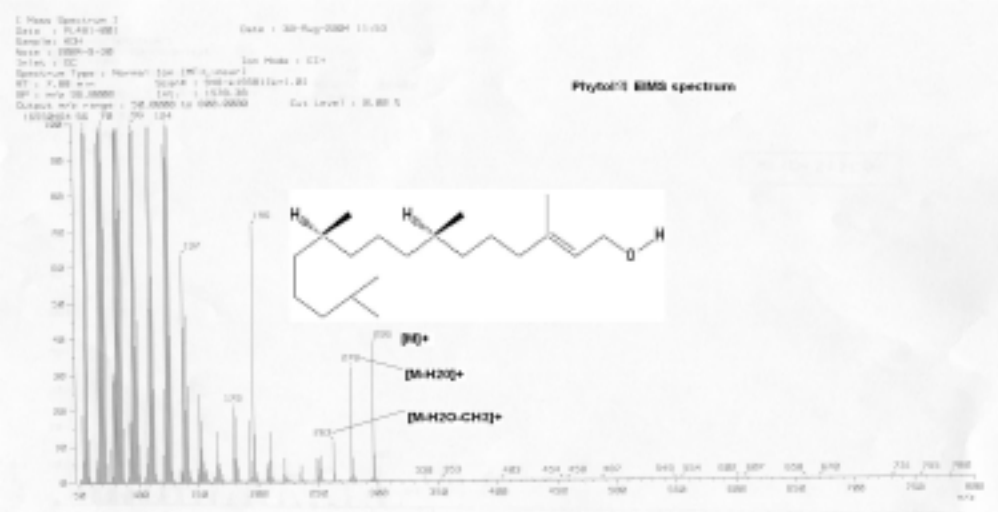


그림 64. phytol의 EIMS spectrum

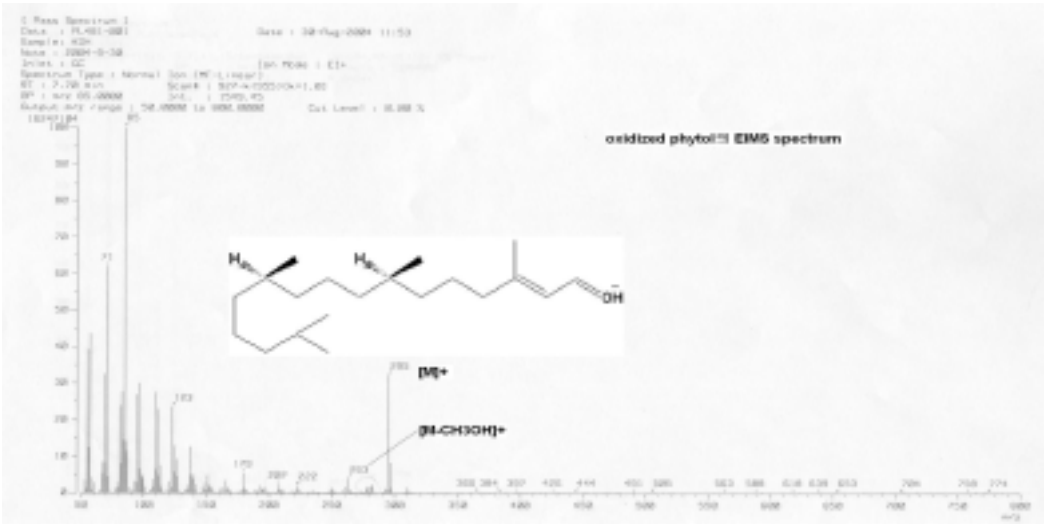
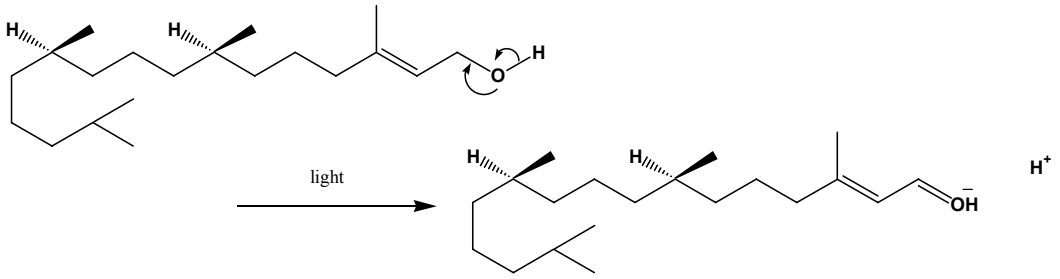


그림 65. 광조사(20,000 Lux, 72시간) 후의 phytol의 EIMS spectrum



Phytol에 20,000 Lux, 72 h 조사 후, 예상되는 oxidized phytol의 구조

그림 66. 광조사(20,000 Lux, 72시간) 후의 phytol의 예상 구조변화

라. 상추의 항동맥경화물질의 가공적성과 최적식품 model 연구에 의한 건강 증진 식품 시제품 개발

상추추출물은 암록색을 띤 무정형의 혼합물로서 그 자체로는 식품 재료로 첨가하여 가공하기에는 어려움이 따르므로, 증량제를 이용하여 분말형태로 만들었다. 먼저 spray drying 공법을 이용하여 분말제조를 시도하였는 데, 상추추출물과 증량제(malto dextrin, glucose, xylitol 등)의 용해도 차이로 인하여 균질의 용액을 만드는 데 어려움이 있었고, 이 이후에도 용액 중 높은 알콜함량으로 인하여 안전상 spray drying 공법을 이용하여 추출물 분말을 만드는 것은 불가능하여 다른 방법을 모색하게 되었다. 최종적으로 분쇄기(grinder)를 이용하여 상추추출물:malto dextrin(1:9)의 분말을 제조하게 되었다 (그림 67).

상추추출물 분말의 최소한의 가공을 통한 섭취를 위하여 30여종의 곡류, 두류, 야채, 과일 건조분말과 혼합하여 생식형태의 가공품을 만들어 보았다. 열처리 되지 않은 여러 재료의 특이한 향이 매우 강하여 상추추출물 분말의 독특한 향은 거의 감지할 수 없었고, 상추추출물 분말의 첨가로 인한 관능적 변화는 감지되지 않았다 (그림 68).

상추추출분말을 다시마, galactomannan 등 배변작용을 도와주며 장내 담즙산 및 콜레스테롤과 결합하여 궁극적으로 혈중 콜레스테롤 및 혈중 지질 농도를 낮출 수 있는 소재들과 혼합하여 작은 환(丸) 형태로 가공하여 보았다. 이 역시 상추추출물의 항 동맥경화성을 상승시킬 수 있는 다른 소재들의 추가 배합으로 생리기능성이 더욱 강화된 제품의 제작이 기대되는 바이다. (그림 69)

상추추출물을 생리기능성이 강하나 강한 향 및 매운 맛 등으로 인하여 식품형태로 바로 섭취할 수 없는 식품들과 혼합하여 tablet 형태로 가공하였다. 여러 농도의 lactose, glucose 등의 고형제와 Na-stearate를 코팅제로사용하여 타정하여 실험한 결과 tablet 형태로 가공하였다.(그림 70)

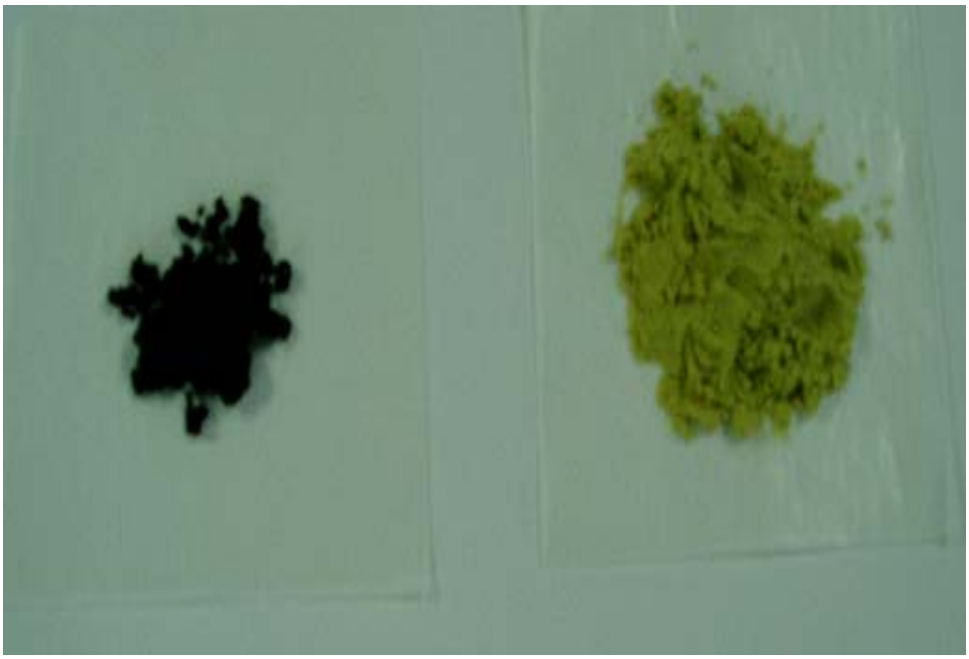


그림 67. 상추추출물 및 상추추출물 분말

그림 68. 상추추출물을 첨가한 생식(분말)형태의 가공식품

그림 69. 상추추출물 및 수용성 또는 불용성 섬유소를 주 재료로 한 환형태의 가공식품

그림. 70 tablet 형태로 제작한 상추추출물 함유 가공식품

마. 항동맥경화물질의 가공적성에 따른 식품모델 연구

상추추출물 첨가로 생리활성이 강화된 well-being bar의 제조

1) 재료

오트밀, 기초가공 보리, 버터, 땅콩버터, 소금, 달걀, 꿀, 흑설탕, 땅콩, 건포도, 상추추출액, 민트잎

2). well-being bar의 제조

토종 곡류를 주재료로 하며 곡류고유의 형태를 유지하는 well-being bar를 제조하기 위하여 현미, 현미찹쌀, 찹쌀, 율무, 보리 등을 사용하여 다양한 기초가공을 한 결과, 보리만이 곡류고유의 형태를 유지한 상태로 식감이 우수한 상태로 가공이 가능하여 well-being bar의 주 재료로 기초가공된 보리를 사용하여 well-being bar를 제조하였다.

기초가공된 보리로 Granola bar를 제조하기 위하여 오트밀을 이용한 Granola bar의 레시피를 응용하여 여러 번의 시행착오 끝에 가장 적합한 비율의 레시피를 실험을 통해 확보하였다. 이렇게 하여 얻어진 레시피를 이용하여 상추추출물을 첨가한 well-being bar를 제조하였다.

3) well-being bar의 기호도 검사

오트밀을 주원료로 하는 granola bar와 well-being bar, 그리고 상추추출물을 첨가하여 생리기능성을 강화한 well-being bar의 관능검사를 다음과 같이 실시하였다.

granola 또는 well-being bar에 대한 기호도를 검사하기 위하여 은박 접시에 각각의 시료(4㎝*5㎝)를 담아 제시하였다. 각 시료 용기는 난수표에서 선택한 세자리 숫자를 표기하였으며, 평가 사이에 입을 행굴 수 있도록 정수된 물과 뱉는 컵을 함께 제시하였다.

검사원은 식품영양학과 재학생24명과 영양교육학과 대학원생10명으로 구성하였다.

평가 항목은 각 시료의 색(color), 외관(appearance),향미(flavor), 질감(texture), 맛

(taste)에 대한 기호도였으며, 평가 척도는 9점 기호 척도(1=대단히 많이 싫다;9=대단히 많이 좋다)를 사용하였다.

4) 기호도 검사 결과

1은(시료417)은 주재료를 보리로 한 것으로 다른 부재료는 동일하게 하였다. 2(시료629)는 주재료를 보리로 한 것에 상추추출물을 0.1%첨가한 것으로 다른 부재료는 동일하게 하였다. 3(시료925)는 주재료를 오트밀로 한 것으로 다른 부재료는 동일하게 하였다.

외관, 향, 끝맛에 대한 소비자의 기호도를 보면 각 시료간 유의적인 차이를 보이지 않는 범위에서 좋지도 싫지도 않다 또는 약간 싫다의 선호도를 나타냈다. 이는 곡류를 주재료로 하고 건강 지향형의 well-being bar 개념으로 당분 및 강한 향을 가능한 한 억제한 결과로 사료된다. (그림 71 ~76)

촉감과 색에 있어서는 oatmeal을 주재료로 한 시료는 보통에서 약간 싫다의 선호도를 보리를 주 원료로 한 시료는 보통에서 약간 좋다의 경향을 보였으며, 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

전체적으로 보면 oatmeal을 주원료로 한 granola bar는 보통에서 약간 싫다의 선호도를, 그리고 보리를 주원료로 한 well-being bar는 보통에서 약간 좋다의 선호도를 나타내었는데. 그러나 통계적으로 유의하지는 않았다. 결론적으로 상추추출물을 첨가하여 보리를 주 원료로 제작된 well-being bar는 기존의 granola bar에 비해서 촉감과 색에 있어서 소비자에게 더 좋은 반응을 보였고 전체적으로도 더 선호되는 경향을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다.(표 9) 참고로 표 10에 관능검사에 이용된 설문지 내용을 표시하였다.

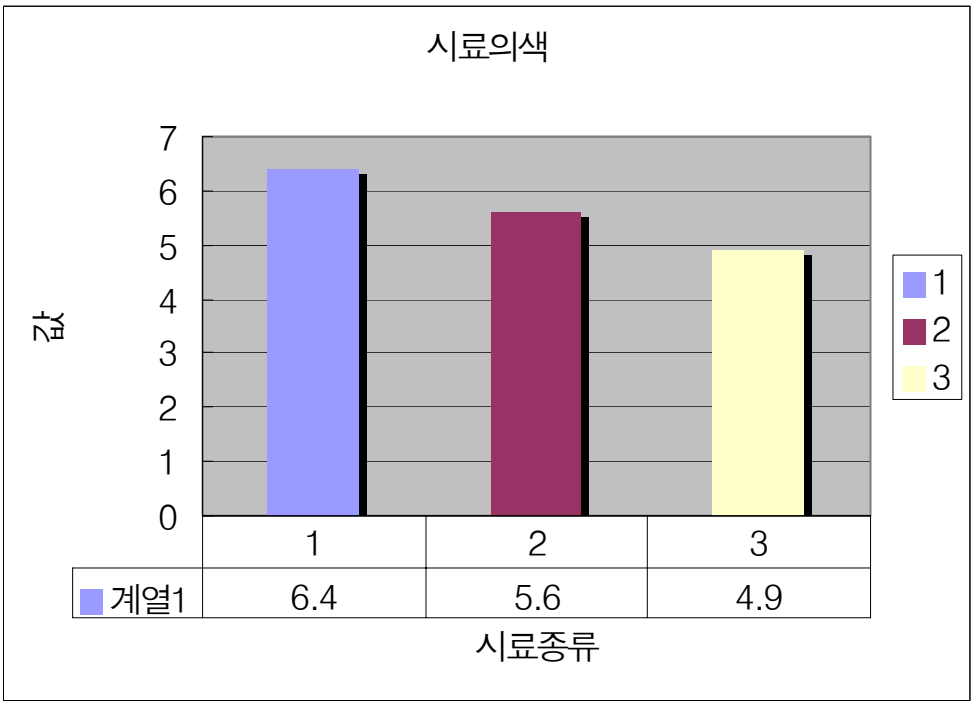


그림 71. 각 시료의 색에 대한 소비자 기호도

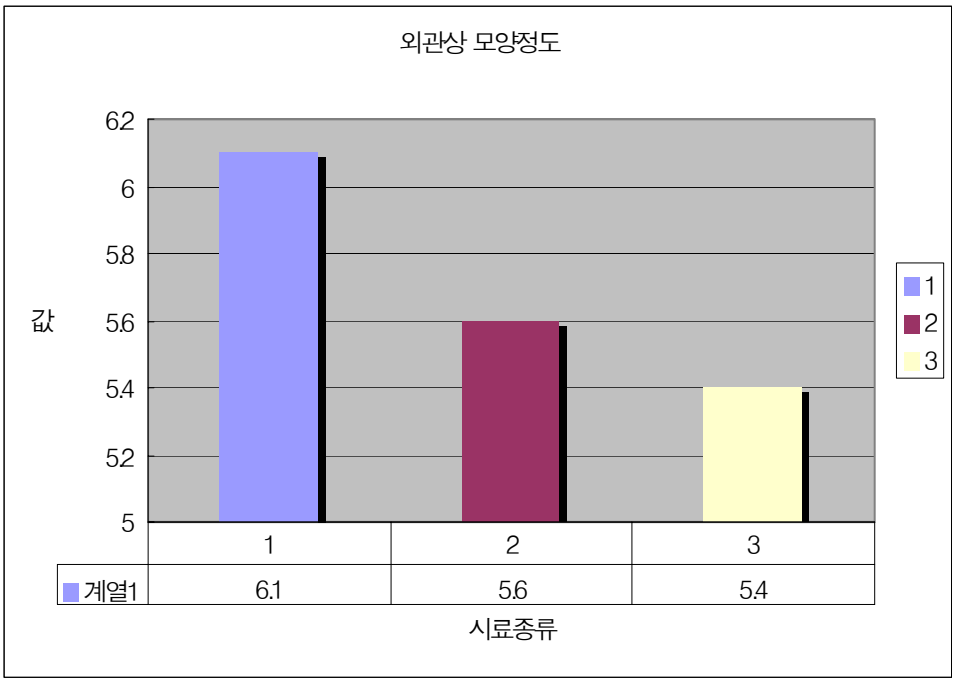


그림 72. 각 시료의 외관에 대한 소비자 기호도

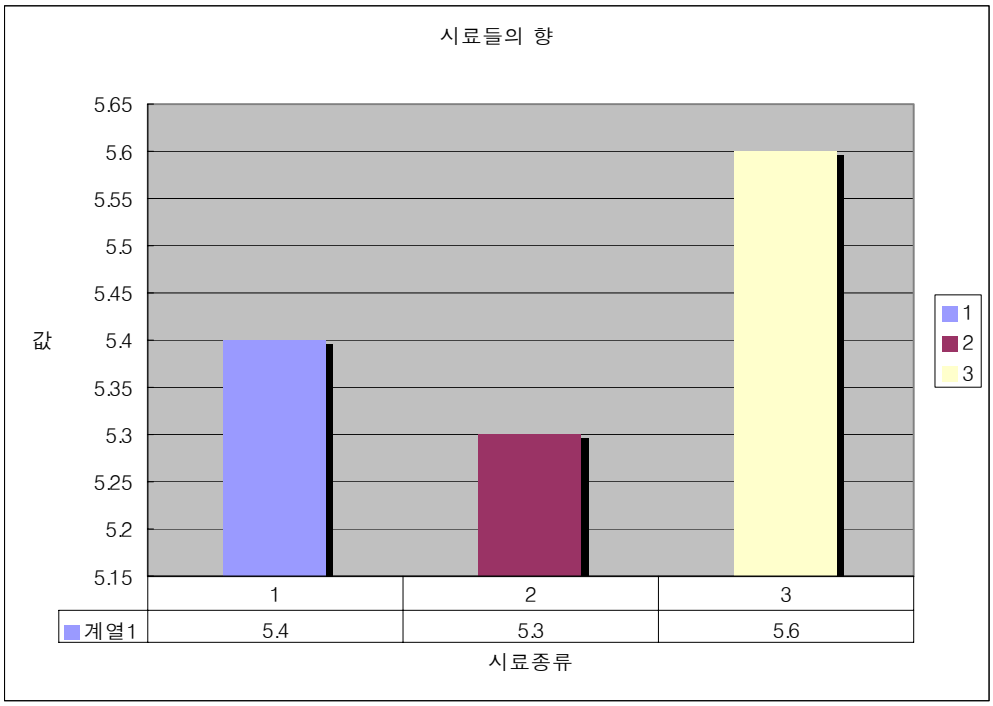


그림 73. 각 시료의 향에 대한 소비자 기호도

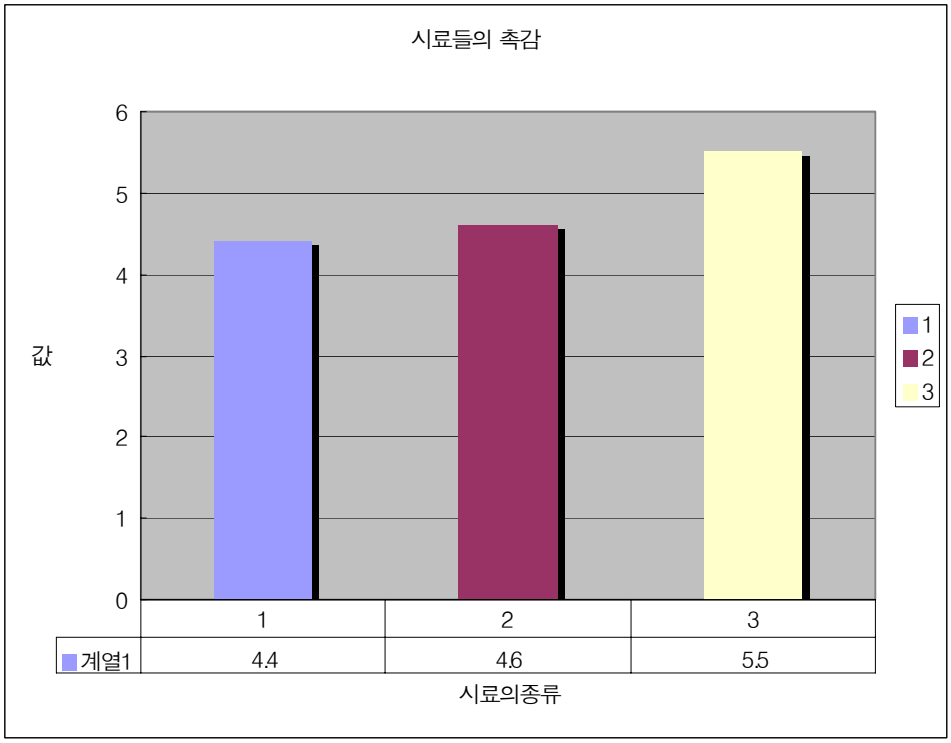


그림 74.. 각 시료의 촉감에 대한 소비자 기호도

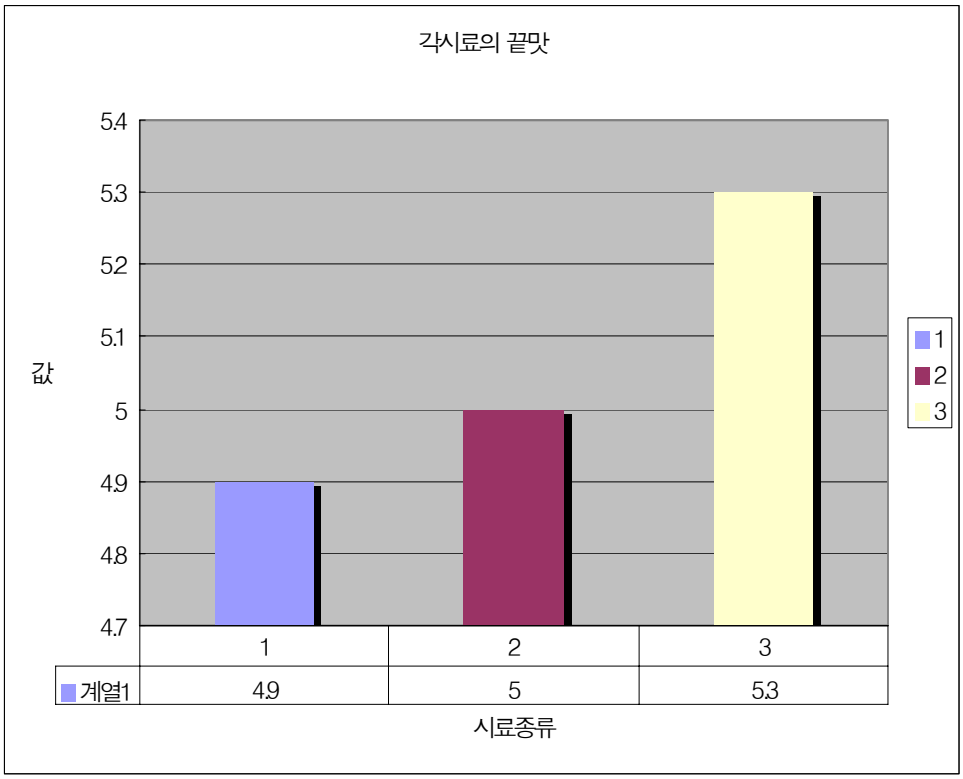


그림 75. 각 시료의 끝맛에 대한 소비자 기호도

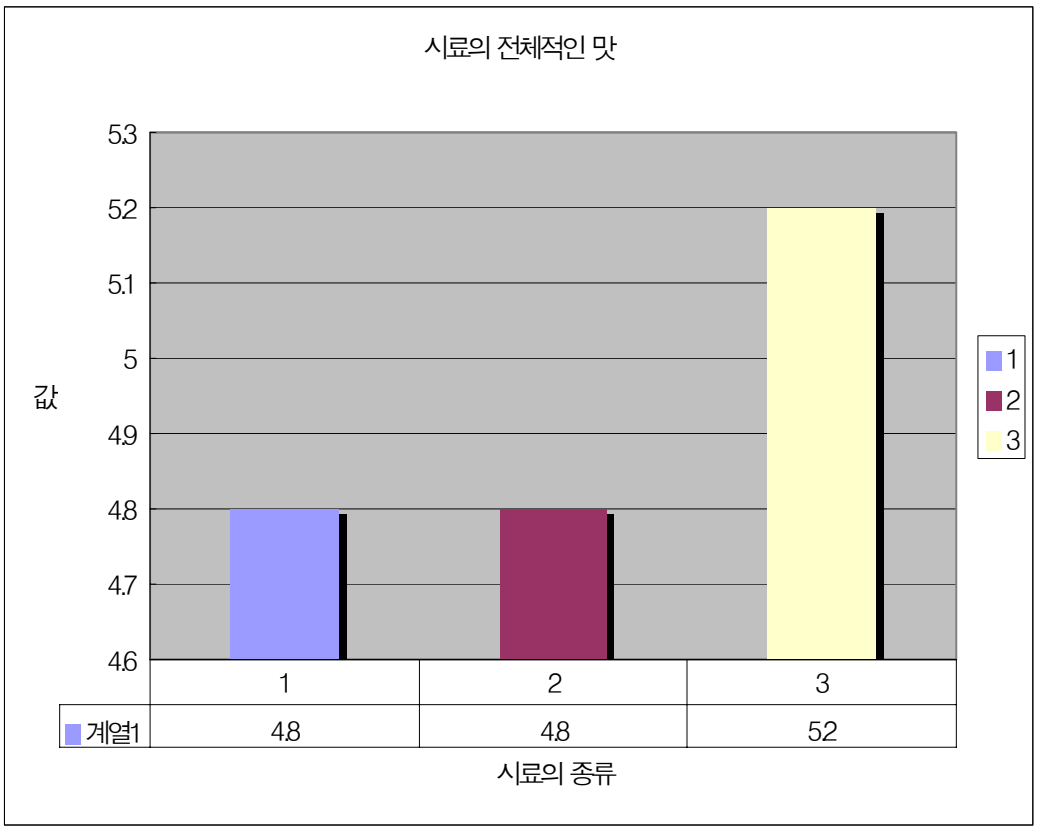


그림 76. 각 시료의 맛에 대한 소비자 기호도

표 9. 각 시료에 대한 관능검사 및 소비자 기호도

	시료 1 (417)	시료 2 (629)	시료 3 (925)
색	6.38±1.34[a]	5.58±1.63[a]	4.88±1.70[b]
외관	6.11±1.38[a]	5.58±1.45[a]	5.38±1.47[a]
향	5.35±1.41[a]	5.26±1.42[a]	5.55±1.61[a]
촉감	4.41±1.61[a]	4.58±1.63[a]	5.50±1.71[b]
끝맛	4.88±1.55[a]	4.97±1.52[a]	5.29±1.91[a]
전체적인맛	4.76±1.70[a]	4.76±1.81[a]	5.20±1.87[a]

표 10. well-being bar의 관능검사에 사용된 설문지의 예

이 기호도 평가는 학술적 목적 이외에는 사용되지 않습니다. 주의사항을 잘 듣고, 질문에 응답해주세요. -안양대학교 식품영양학과-

이름_____ 날짜_____

이 welbeing bar들을 왼쪽부터 차례로 맛보고, 당신이 좋아하고 싫어하는 정도를 나타낸 곳에 V표 하세요.

시료를 맛보기 전에는 반드시 입을 충분히 헹구어 주세요.

1. 각 시료들의 색은 어떻습니까?

417	629	925
____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다
____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다
____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다
____ 약간 싫다	____ 약간 싫다	____ 약간 싫다
____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다
____ 약간 좋다	____ 약간 좋다	____ 약간 좋다
____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다
____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다
____ 대단히 많이 좋다	____ 대단히 많이 좋다	___ 대단히 많이 좋다

의견:

2. 각 시료들의 외관상의 모양정도는 어떻습니까?

417	629	925
_____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다
_____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다
_____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다
_____ 약간 싫다	____ 약간 싫다	____ 약간 싫다
_____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다
_____ 약간 좋다	____ 약간 좋다	____ 약간 좋다
_____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다
_____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다
_____ 대단히 많이 좋다	____ 대단히 많이 좋다	___ 대단히 많이 좋다

의견:

3. 각 시료들의 향은 어떻습니까?

417	629	925
_____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다
_____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다
_____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다
_____ 약간 싫다	____ 약간 싫다	____ 약간 싫다
_____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다
_____ 약간 좋다	____ 약간 좋다	____ 약간 좋다
_____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다
_____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다
_____ 대단히 많이 좋다	____ 대단히 많이 좋다	___ 대단히 많이 좋다

의견:

4. 각 시료들을 씹을 때의 촉감은 어떻습니까?

417	629	925
____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다
____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다
____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다
____ 약간 싫다	____ 약간 싫다	____ 약간 싫다
____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다
____ 약간 좋다	____ 약간 좋다	____ 약간 좋다
____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다
____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다
____ 대단히 많이 좋다	____ 대단히 많이 좋다	___ 대단히 많이 좋다

의견:

5. 각 시료들을 먹고 난 끝 맛은 어떻습니까?

417	629	925
_____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다
_____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다
_____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다
_____ 약간 싫다	____ 약간 싫다	____ 약간 싫다
_____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다
_____ 약간 좋다	____ 약간 좋다	____ 약간 좋다
_____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다
_____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다
_____ 대단히 많이 좋다	____ 대단히 많이 좋다	___ 대단히 많이 좋다

의견:

6. 각 시료들의 전체적인 맛은 어떻습니까?

417	629	925
_____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다	____ 대단히 많이 싫다
_____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다	____ 대단히 싫다
_____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다	____ 보통으로 싫다
_____ 약간 싫다	____ 약간 싫다	____ 약간 싫다
_____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다	____ 좋지도 싫지도 않다
_____ 약간 좋다	____ 약간 좋다	____ 약간 좋다
_____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다	____ 보통으로 좋다
_____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다	____ 대단히 좋다
_____ 대단히 많이 좋다	____ 대단히 많이 좋다	___ 대단히 많이 좋다

의견:

-감사합니다..좋은 하루 되세요!!-

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제 1절 : 목표 달성도

1. 1차년도(2002) 평가

평가내용 및 척도		목표 달성도 (%)
평가내용	척도 (%)	
○상추로부터 항동맥경화 물질의 분리 정제	20	100
○상추유래 항동맥경화 물질의 특성 및 구조규명	10	100
○항동맥경화 물질의 가공적성 연구	20	100
○LKn-1/Luciferase융합 유전자 제조	10	100
○Stable cell line 확립	10	100
○상추추출물 및 식물추출물의 Lkn-1 저해 활성측정	20	100
○시료의 Cytotoxic Test	10	100
최종평가	100	100

2. 2차년도(2003) 평가

평가내용 및 척도		목표 달성도 (%)
평가내용	척도 (%)	
○시료의 케모카인 저해활성 측정	20	100
○식용작물 유래 항동맥경화 물질의 구조규명	10	100
○항동맥경화 물질의 가공적성 연구	10	100
○상추로부터 항 동맥경화 물질의 분리 수율 최적화	10	100
○항 동맥경화 후보물질의 분리 수율 최적화	10	100
○항 동맥경화 후보물질의 *in vivo* 실험	20	100
○RT-PCR을 통한 동맥경화유발 chemokine level 측정	10	100
○항동맥경화 물질의 가공 적성에 따른 식품 모델 연구	10	100
최종평가	100	100

3. 3차년도(2004) 평가

평가내용 및 척도		목표 달성도 (%)
평가내용	척도 (%)	
○항동맥경화 물질의 가공 적성에 따른 식품 모델 연구	15	100
○시제품제작	30	100
○시제품의 효능 검증	55	100
최종평가	100	100

4. 최종평가

평가내용 및 척도		목표 달성도 (%)
평가내용	척도 (%)	
○항동맥경화 물질의 분리정제	20	100
○항동맥경화 물질의 특성 및 구조규명	10	100
○항동맥경화 물질의 선별	10	100
○항동맥경화 물질의 가공적성 연구	10	100
○항동맥경화 물질의 *in vivo* 실험	10	100
○항동맥경화 물질의 대량 생산 공정 개발	20	100
○항동맥경화 물질의 가공 적성에 따른 식품 모델 연구 및 시제품 개발	20	100
최종평가	100	100

제 2절 : 관련 분야의 기여도

동맥경화와 같은 심혈관계 질병의 증가로 인해서 새로운 약물과 식품첨가제의 수요가 증가할 것이다. 이에 따른 시장의 확대가 예상되며 이를 위한 기술개발 및 제품개발은 **기업의 기술 경쟁력과 국가의 국가경쟁력에 이바지 할 것**으로 사료된다.

천연 식물자원으로부터 새로운 고부가가치를 갖는 항동맥경화 물질을 개발하는 일은 인류의 숙원인 **건강한 삶의 실현** 및 막대한 **경제적 이득**을 가져오게 될 뿐만 아니라 **국내농업의 새로운 활로를 모색**하는 데에 기여할 것이다. 또한 이런 물질의 원료가 되는 녹황색 식물의 수요 증가로 이를 공급하는 **농민의 수입증대에도 이바지 할 것으로 사료된다**.

기술적으로도 **천연자원으로부터 기능성 소재를 개발**하기 위하여 유용한 활성검색 방법을 확립하고, 활성물질을 천연자원으로부터 분리하며, 분리된 물질의 분자구조를 밝힘으로써, 의약품 및 식품산업등 다른 **여러 분야에서도 광범위하게 이용**될 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 : 최종 연구개발 결과

본연구진은 상기 과제의 수행으로 다음과 같은 결과를 얻었다. 먼저 동맥경화유발 사이토카인 저해 물질 탐색 시스템 개발, 저해물질 분리 및 효능 검증에 초점을 맞추어 동맥경화 유발에 중요한 것으로 보고 된 사이토카인 유전자 저해물질의 탐색하기 위한 stable cell line을 확립하였다. 이후 상추 추출물 및 여러 식물 추출물로부터 얻은 시료를 stable cell line 이용하여 동맥경화유발 사이토카인 저해 물질을 탐색 하였다. 그 결과 여러 식물 추출물에서 몇 가지의 후보 물질을 탐색하였고, 농도별 처리와 세포독성을 측정하여 하여 붉나무 추출물이 CKβ8의 활성저해에 매우 중요한 것을 확인 하였다. 상추추출물인 경우는 동맥경화 및 염증유발 관련 사이토카인의 저해에 영향을 주지 않았으며, 세포독성 또한 별다른 영향을 주지 않았다. 삼백초 추출물인 manassantin의 경우 동맥경화 및 염증유발 관련 사이토카인의 저해에 아주 효과적인 활성을 보였으며, IL-1β 생성조절 분석을 통해 manassantin은 기존에 알려진 전사인자 NF-κB 뿐만 아니라 전사인자 NF-IL6의 활성에 더욱 효과적으로 작용함을 확인하였다.

다음으로 상추의 추출물화를 시도 하였으며 그 상추 추출물이 *in vitro* ACAT 활성 저해 실험 및 *in vivo* 쥐 임상실험을 통해 항동맥경화 효과가 있음을 확인 하였다. 이후 상추 추출물 내 주요 성분 중 하나가 항동맥경화 효과를 보인다는 점에 착안하여 상추를 MeOH로 추출하여 극성에 따라 분배 추출하여 ACAT 억제활성을 확인하고 가장 높은 활성을 나타낸 화합물을 분리 정재하고, ^{1}H-NMR(400㎒, $CDCl_3$), ^{13}C-NMR(100㎒, $CDCl_3$)에서 분석하여 이 화합물의 각종스펙트럼 데이터를 문헌 값과 비교한 결과 phytol로 구조결정 하였다. 또한 상추 시료에서 용매추출 분획 및 chromatography를 사용하여 상추에서 Phytol의 분리 수율 최적화를 하였다. 상추추출물을 이용하여 기능성 식품을 개발하기 위해서 주정 추출 수율 최적화 및 가공 적을

확인 하였으며 그 결과 주정 65%에서 Phytol 과 β-sitosterol 등의 항동맥경화 물질의 수율이 가장 높음을 확이 하였으며 이 추출물을 이용하여 10:1 상추추출물건조분말 그린콜-1000을 제작하였으며. 이 시제품을 이용하여 항동맥경화 효능을 *in vitro* ACAT 활성 저해 실험에서 약 65%의 저해 활성을 확인 하였으며, *in vivo* 쥐 임상실험을 통해 정제된 Phytol에 비해 약 60%의 항동맥경화 효과가 있음을 확인 하였다.

한편으로 항동맥경화 물질의 특성에 따른 식품 모델 연구 및 건강증진 식품 개발 하였다. 상추추출물은 암록색을 띤 무정형의 혼합물로서 그 자체로는 식품 재료로 첨가하여 가공하기에는 어려움이 따르므로, 증량제를 이용하여 분말형태로 만들었다. 상추추출물 분말을 30여종의 곡류, 두류, 야채, 과일 건조분말과 혼합하여 생식형태의 가공품을 제조 하였다. 상추추출분말을 다시마, galactomannan 등 궁극적으로 혈중 콜레스테롤 및 혈중 지질 농도를 낮출 수 있는 소재들과 혼합하여 작은 환(丸) 형태로 가공하여 보았다. 또한, 상추추출물을 생리기능성이 강하나 강한 향 및 매운 맛 등으로 인하여 식품형태로 바로 섭취할 수 없는 식품들과 혼합하여 tablet 형태로 가공하였다. 토종 곡류를 주재료로 하며 곡류고유의 형태를 유지하는 well-being bar를 기초 가공된 보리를 사용하여 제조하였다. 상추추출물을 첨가하여 보리를 주 원료로 제작된 well-being bar는 기존의 granola bar에 비해서 촉감과 색에 있어서 통계적으로는 유의하지는 않았으나, 일반적으로 소비자에게 더 좋은 반응을 보였고 전체적으로도 더 선호되는 경향을 보였다.

이 연구에서 얻은 결과는 생리기능성을 갖는 다양한 소재의 작용기작을 이해하는데 기본이 되며, 또한 다른 생리기능성을 갖는 식품 신소재와 혼합하여 각 소재의 기능을 상승적으로 보강한 신 개념의 건강 기능성 식품의 제조에 활용될 수 있을 것으로 보인다. 이는 농가의 소득 향상에 기여하며, 과학적인 근거를 둔 영양정보를 통한 소비자의 식품에 대한 올바른 지식과 소비를 유도하여 국민건강의 향상에 이바지 할 것으로 사료된다.

제 2 절 : 연구개발의 활용계획

본 연구 개발의 결과는 다음과 같은 산업화를 촉진시킬 것으로 사료 된다.

먼저 항 동맥경화 물질은 식품첨가제 및 건강보조식품으로 이용이 가능하다. 그리고 혈관신생 유도 및 억제물질을 얻을 수 있으며, 이를 항암제 및 새로운 혈관형성 치료법을 위한 물질로의 개발이 가능하다. 추출물로부터 염증성 사이토카인의 저해물질을 탐색, 이를 의약품 및 식품첨가제로 이용 가능하다.

신속한 탐색기술을 이용하여 한방소재 추출물 및 여러 식물추출물 등 저분자 물질의 탐색을 위한 수단으로 이용할 수 있다. 대량 탐색 시스템을 이용하여 항 동맥경화 물질의 탐색뿐만 아니라 이 기술을 응용하면 류마티스 관절염 및 천식과 같은 염증성 질환의 치료 물질 탐색 기술 개발을 가능케 한다.

한편으로 작물의 계량을 통해서 특정물질의 생산량을 증가시킨 작물의 재배를 위한 기초자료로 응용이 가능하고 대량생산 시스템의 일환으로 이용 될 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재 상추 자체에 관한 연구는 상당히 진행되어있는 상태이다. 상추의 생육지와 특징, 상추의 자세한 구성성분, 독성, 그리고 효능에 관한 연구도 상당히 진행되어있다. 상추의 효능을 적용할 수 있는 분야 중에 체내에 직접 적용할 수 있는 분야로는 diuretic, digestive tract, circulatory system, sedative, respiratory tract, female genital apparatus - dysmenorrhoea 등이 있고, 외부용으로는 analgesic, ocular eyewash 등에 적용가능하다. 그리고 위와 같은 기본적인 분야 외에 다른 적용 가능한 분야로는 edible properties를 이용하는 것으로 다이어트에 효과가 있으며, 폐암, 전립선암, 대장암등 몇 종류 암의 예방에도 효과가 있다, 그리고 노화방지나 비듬치료에도 효과가 있다. 그중에서도 노화방지제나, 항암제로의 효과가 특징적이다. 또한 다른 병리적 현상에도 효과가 있음이 연구되고 있는데, 예를 들자면, anemia, headache, varicose veins 등의 증상에 상추의 즙이 유용하다는 보고가 있다.

상추의 이러한 적용 가능 분야에서 상품화가 된 것으로는 'BarleyGreen Fibre CleanseTM'이 있는데, 이 제품은 상추를 비롯한 다양한 채소, 야채, 허브의 혼합물로써 체내의 독성을 제거하고, 소화력을 증진 시킨다 (그림. 77). 그리고 다른 제품으로는 'Wild Lettuce Toner'가 있다. 이 제품은 피부정화와 수분을 유지시켜주는 기능을 한다(그림 77).

그리고 본연구과제인 항동맥경화와 관련된 연구로는 영국에서 발표된 연구결과로 상추, 오이 등의 채소류가 동맥경화 예방에 효과가 있다는 보고가 있다. 이 보고에서는 상추, 오이, 양배추 등 야채류에서 발견되는 색소 루테인이 심장병의 원인이 되는 동맥경화 및 혈관폐색을 예방하는데 도움이 될 수도 있다는 연구 결과가 나왔다.

그림 77. 상추를 이용한 상품화 제품

영국의 과학자들은 심장병이 없는 남성과 여성 수백명을 대상으로 신체의 전반적인 동맥경화를 측정하는 주요 지표가 되는 목 동맥의 혈액검사를 18개월 간격으로 두 차례 실시, 루테인치를 측정했다. 두 차례의 검사 동안 혈중 루테인 농도가 높은 사람은 목 동맥 내에 농축도가 가장 적게 심화된 것으로 나타났다. 반면 혈중 루테인 농도가 낮은 사람은 목 동맥의 농축도가 5배 이상 증가한 것으로 나타났다.

또 동맥절단 수술시 사전에 루테인 처치를 받은 환자가 동맥 혈관벽에서 동맥경화를 유발할 수도 있는 화학적 부작용을 훨씬 덜 경험하는 것으로 조사되었다. 그리고 과일과 야채를 많이 먹는 사람이 심장병에 덜 걸리는 이유 중 하나로 루테인이 포함될 수 있을 것이라고 보고했다. 루테인을 많이 함유한 채소 및 과일로는 브로콜리 상추 오이 콩 아보카도 물냉이 양배추 시금치 등을 꼽을 수 있다.

이 연구 외에 상추를 이용하여 동맥경화와 관련된 연구성과를 보이는 논문은 해외에서는 아직 실적이 없는 상태이다. 따라서 상품화된 제품도 현재 없는 상태이다. 그러므로 본 과제의 연구가 상추가 동맥경화의 예방에 중요하다는 결과를 보이는 선도적인 연구결과를 보여주는 좋은 시작이 될 것이며, 본 과제의 결과물인 시제품은 항동맥경화의 효과적인 제품이 될 것으로 기대한다.

제 7 장 참고문헌

1. A. Henderson, X. Zou and K. Calame. 1995 C/EBP proteins activate transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in macrophages/monocytes. J. Virol., 69, 5337-534

2. A. keys, J. T. Anderson and F. Grande. 1965 Serum cholesterol response to changes in the diet. IV. particular saturated fatty acids in the diet. Metabolism, 14;776-787

3. B. H. Lau, S. L. Li and P. Yoon. 1993 Thymic peptide protects vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. life Sciences, 52;1787-1796

4. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge. 1984 Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J, 219;1-4

5. B. Y. Hwang, J. H. Lee, H. S. Jung, K. S. Kim, J. B. Nam, Y. S. Hong, S. G. Paik and J. J. Lee. 2003 Sauchinone, a lignan from Saururus chinensis, suppresses iNOS expression through the inhibition of transactivation activity of RelA of NF-kappaB. Planta. Med., 69, 1096-1101.

6. C. A. Dinarello. 2004 Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. Curr. Opin. Pharm., 4, 378-385

7. C. Kunsch, R. K. Lang, C. A. Rosen and M. F. Shannon. 1994 Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. J. Immunol., 153, 153-164

8. D. Pratico, L. Iuliano, A. Mauriello, L. Spagnoli, J. A. Lawson, J. maclouf, F. violi and G. A. Fitzgerald. 1997 Localization of distinct F2-isoprostanes in human? atherosclerotic lesions. J. clin. Invest, 100;2028-2034

9. E. Brandt and H-D. Flad. 1992 Structure and function of platelet-derived cytokines of the

thromboglobulin/interleukin-8 family. platelets, 3;295-305

10. E. H. Farmer, G. F. Bloomfieid, A. Sundralingam and D. A. Sutton. 1942 The Course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. Trans. Faraday Soc., 38;348-356

11. F. Shirakawa, K. Saito, C. A. Bonagura, D. L. Galson, M. J. Fenton, A. C. Webb and P. E. Auron. 1993 The human prointerleukin 1gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. Mol. Cell. Biol., 13, 1332-1344

12. H. Kaizu, M. Sasaki, H. Nakajima and Y. Suzuki. 1993 Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet difficient in vitamin E. J. Dairy Sci., 76;2493-2499

13. J. H. Lee, B. Y. Hwang, K. S. Kim, J. B. Nam, Y. S. Hong and J. J. Lee. 2003 Suppression of RelA/p65 transactivation activity by a lignoid manassantin isolated from Saururus chinensis.Biochem. Pharmacol,. 66, 1925-1933

14. J. Tsukada, K. Saito, W. R. Waterman, A. C. Webb and P. E. Auron. 1994 Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 gene. Mol. Cell. Biol., 14, 7285-7297

15. J. W. Sandwrs, K. J. Leehouts, A. J. Haandrikmam, G. Venema and J. Kok. 1995 Stress response in Lactococcus lactis: clonig, expression analysis, and mutation of lactococcal superoxide dismutase gene. J. Bacteriol., 177;5254-5260

16. K. Arunachalam, H. S. Gill and R. K. Chandra. 2000 Enhancement of natural immune function by dietary consumption of Bifidobacterium lactis(HN019). European Journal? of Clinical Nutrition., 54;263-267

17. K. L. Berkner and K. W. Runge. 2004 The physiology of vitamin K nutriture and vitamin

K-dependent protein function in atherosclerosis. J. Thromb Haemost, 2(12):2118-32

18. K. M. Catron, J. R. Brickwood, C. Shang, Y. Li, M. F. Shannon and T. P. Parks. 1998 Cooperative binding and synergistic activation by RelA and C/EBPbeta on the intercellular adhesion molecule-1 promoter. Cell Growth Differ., 9,949-959
19. K. Yamamoto, T. Arakawa, N. Ueda and S. Yamamoto. 1995 Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. J. Biol. Chem., 270, 31315-31320
20. M. Braddock and A. Quinn.? 2004 Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. Natrue Reviews Drug Discorvery, 3, 330-340
21. M. C. Rho, O. E. Kwon, K. Kim, S. W. Lee, M. Y. Chung, Y. H. Kim, M. Hayashi, H. S. Lee and Y. K. 2003 Inhibitory effects of manassantin A and B isolated from the roots of Saururus chinensis on PMA-induced ICAM-1 expression. Planta. Med., 69, 1147-1149.
22. M. Goto, K. I. Katayama, F. Shirakawa and I. Tanaka. 1998 Involvement of NF-B p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1 gene at two subregions of the upstream enhancer element. Cytokine, 11, 16-28
23. M. Passeri and D. Provvedini. 1982 Vitamins: their relationship to atherosclerosis. Acta Vitaminol Enzymol., 4(1-2):169-77
24. M. V. Tejada-Simon, Z. Ustunol and J. J. Pestka. 1999 Ex vivo effects of Lactobacilli, Streptococci, and Bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in murin model. J. Food protect., 62;162-169
25. R. E. Gerszten, F. Mach, A. Sauty, A. Rosenzweig, A. D. Leuster. 2000 Chemokine, leukocytes, and atherosclerosis. J. Lab. Clin. Med., 136;87-92
26. S. Akira. 1997 IL-6-regulated transcription factors. Int. J. Biochem. Cell Biol., 29, 1401-1418.

27. S. M. Dunn, L. S. Coles, R. K. Lang, S. Gerondakis, M. A. Vadas and M. F. Shannon. 1994 Requirement for nuclear factor (NF)-kappa B p65 and NF-interleukin-6 binding elements in the tumor necrosis factor response region of the granulocyte colony-stimulating factor promoter. Blood, 83, 2469-2479

28. S. Natsuka, S. Akira, Y. Nishio, S. Hashimoto, T. Sugita, H. Isshiki and T. Kishimoto. Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. Blood, 79, 460-466.

29. T. J. Reape and P. H. Groot. 1999 Chemokine and artherosclerosis. Artherosclerosis, 147;213-225

30. T. Matsusaka, K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Kishimoto and S. Akira. 1993 Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 90, 10193-10197.

31. T. Y. Ha, S. H. Lee and H. Y. Lee 1997 The Effect of Various Rice Bran Extracts on the Lipid contents of serum and liver in rat fed with high fat diet. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., 29;178-182

32. W. A. Boisvert, L. K. Curtiss and R. A. Terkeltaub. 2000 Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in artherosclerosis. Immunol. Res., 21;129-137

33. W. H. Lee, S. H. Kim, E. M. Jeong, Y. H. Choi, D. I. Kim, B. B. Lee, Y. S. Cho, B.S. Kwon and J. E. Park. 2002 A novel chemokine, Leukotactin-1, induces chemotaxis, proatherogenic cytokines, and tissue factor expression in atherosclerosis. Atherosclerosis, 161(2):255-260

34. W. Ibrahim, U. Lee, C. Yeh, J. Szabo, G. Bruckner and C. K. Chow. 1997 Oxidative stress and oxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. Journal of Nutrition., 127;1401-1406

35. Y. Hwang, J. H. Lee, J. B. Nam, Y. S. Hong and J. J. Lee. 2003 Lignans from Saururus chinensis inhibiting the transcription factor NF-kappaB. Phytochemistry, 64, 765-771

36. Y. L. Ren, Y. W. Zhou and Y. H. Ye. 2004 Chemical components of Lactuca and their bioactivites. Yao Xue Xue Bao, 39(11):954-60

37. Y. Zhang and W. N. Rom. 1993 Regulation of the Interleukin-1 gene by Mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two Nuclear Factor-IL6 motifs. Mol. Cell. Biol., 13, 3831-3837

38. 신미경, 한성희, 한경조. 1997 녹차의 음용이 지방과 콜레스테롤을 투여한 흰쥐의 혈청 지질 및 간의 조직에 미치는 영향. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., 29;1255-1263

39. 이은, 최무영. 2000 솔잎분말이 고 콜레스테롤 급여 흰쥐의 체지질구성과 TBARS량에 미치는 영향. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., 32;1186-1190

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.