

T0009574

최 중
연구보고서

GOVP1200628264

느티나무 추출액의 생리활성 탐색 및 용도
개발에 관한 연구

Investigation on Biological Activities of *Zelkova*
serrata Extracts and Their Utilization

연구기관

국립산림과학원
서울대 수의과대학

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “느티나무 추출액의 생리활성 탐색 및 용도개발에 관한 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14

주관연구기관명 : 국립산림과학원
총괄연구책임자 : 최 돈 하
연구 원 : 이 성 숙
연구 원 : 최 준 원
연구 원 : 박 혜 량
연구 원 : 임 현 진
연구 원 : 장 지 혜
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 조 명 행
연구 원 : 김 현 우
연구 원 : 권 정 택
연구 원 : 김 원 주
연구 원 : 권 한 조
연구 원 : 문 학 식

요 약 문

I. 제 목

느티나무 추출액의 생리활성 탐색 및 용도개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라의 위암과 간암 환자는 점차 감소하는 반면 폐암 환자는 해마다 늘고 있으며, 그 사망률 또한 계속적으로 증가하고 있다. 따라서 이러한 암을 치료하거나 예방하기 위한 약물에 대한 수요 역시 증가 하고 있다. 그러나 암 치료나 예방용 약물의 대부분은 합성의약품으로써 그 독성이 높아 부작용에 관한 심각한 문제를 가지고 있다. 그러므로 상대적으로 독성이 낮은 천연물을 대상으로 한 암 예방이나 치료용 약물의 개발이 필요하다.

그래서 본 과제에서는 최근 급격히 증가하고 있는 폐암의 예방 및 치료를 목적으로 하는 새로운 천연물질을 느티나무 추출물로부터 개발하기 위해 먼저 폐암 예방물질의 효율적 탐색을 위한 적정 폐암 억제효능 탐색 model 을 확립하고 느티나무 추출성분의 폐암세포에 대한 다양한 *in vitro* 시험법으로 유효성을 검정하여 유효성이 확인된 최종 성분에 대한 *in vivo* 실험을 실시하여 효력을 입증함으로써 느티나무에서 분리 한 폐암예방 물질의 실용화를 위한 기초 자료를 확립하고, 다른 천연물질들의 폐암 예방 및 치료용 효능검색을 위한 최적 방안을 제시코자 실시하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

선행 연구에 의하면 느티나무가 함유하고 있는 천연물질인 카달렌(7-hydroxy-3-methoxycadalrene)은 폐암억제에 탁월한 효능을 나타낸다고 하였다. 그러나 현재 카달렌에 대한 화학적, 생물학적 자료는 매우 빈약한 상태

이므로 카달렌을 의약품으로 활용하기에는 많은 한계가 있다.

그래서 본 과제에서는 느티나무 부위별 카달렌의 분포도를 조사함과 동시에 카달렌의 대량생산 체계를 구축하고 단리한 카달렌의 화학적인 특성을 규명하였다.

그리고 생물, 의학적 측면에서 카달렌을 인간 폐암세포주인 A549 cell line에 적용하여 western blot 등의 proteomics를 이용하여 정확한 생육억제 작용기작을 규명하고, 폐암을 유도한 실험용 쥐에 유효성분을 경구 투여하는 *in vivo* 방법으로 폐암예방 및 치료기작을 확인함으로써 활성성분의 생체 내 작용기작을 규명하였다.

폐암 예방 효능 물질인 카달렌을 lead compound로 하여 약효의 증진이나 투여 시 카달렌의 독성을 완화시키기 위해 유도체를 합성하고 이들의 약효를 검증함으로써 느티나무의 폐암예방 물질의 실용화를 위한 기초자료를 확립하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

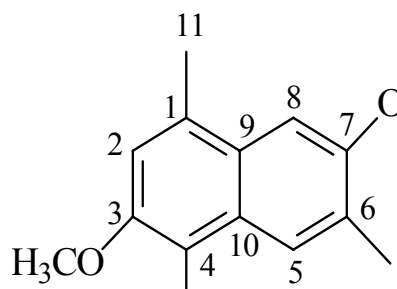
카달렌에 대한 항균 활성, hydroxy radical 및 superoxide radical 소거활성, 멜라닌 미백효과, MTT assay에 의한 카달렌의 세포생존율에 미치는 영향, esterase 저해능 등 항산화 효능과 화장품용 원료로서의 카달렌 효능을 측정하였으나 특이한 효능은 규명되지 않았다. 폐암세포 생육 억제에 대해서는 카달렌이 폐암세포의 자기사멸과정인 Apoptosis에 관여하며 폐암세포의 글루코오스 흡수를 억제 시켜 암세포의 증식이 억제된다는 사실을 확인 하였다.

그러나 카달렌의 동물실험을 통한 생체내 안전성 평가 결과 카달렌 자체에 대한 독성이 나타났으나 투여 경로를 변경 시 그 독성이 달리 나타났기에 투여경로의 다양화 및 카달렌 유도체에 대한 추가적인 실험을 실시하는 것이 본 연구의 완성도 제고를 위해 필요하다고 생각된다.

SUMMARY

1. Purification and identification of biologically active compounds from Zelkova tree (*Zelkova serrata* Makino.)

Cadalene was isolated from hexane fraction of ethanol extracts of Zelkova wood powder using successive silica gel column chromatography. The cadalene yield amounts to 0.3% based on dried wood powder. Instrumental analysis including EI/MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ revealed that its molecular weight was measured to 244 m/z and hydroxyl group was positioned at C7 and methoxyl group at C3. Cadalene (7-hydroxy-3-methoxycadalene) structure was similar with naphthalene form and was classified into sesquiterpene group, constructed with 15 carbons, in the field of natural product chemistry.

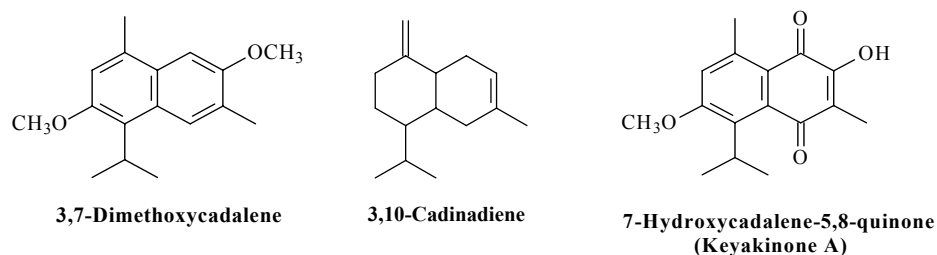


Chemical structure of 7-hydroxy-3-methoxycadalene(cadalene)

Topochemical study of Zelkova tree suggested that cadalene was found only xylem tissues in zelkova wood, not in leaves and bark. Furthermore,

cadalene was specifically embedded only in heartwood tissue, absolutely not in sapwood. This physiological feature of cadalene firmly indicates that cadalene could be one of typical substances related to heartwood formation and transported to pith direction after biochemically synthesized in parenchyma cell between sapwood and heartwood.

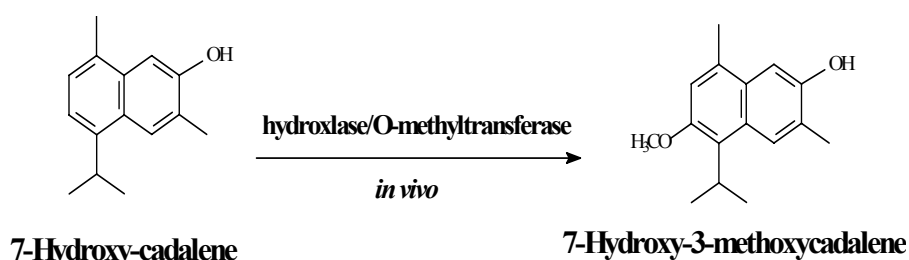
HPLC analysis of hexane fraction of Zelkova heartwood suggested that several compounds co-existed with cadalene. Each peak on the HPLC chromatogram worked with preparative HPLC technique and 9 compounds were purified from hexane fractions. Among them, three compounds were characterized to their chemical structures with the help of $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and EI-MS. As indicated below, their structures were similar to that of cadalene, thus these compounds could be also synthesized by the same biochemical routes as cadalene.



Chemical structures isolated from hexane fraction of Zelkova heartwood

We attempted to purify cadalene and its related compounds from the Ulmus species, such as Japanese Elm (*Ulmus davidiana*), Chinese Elm (*Ulmus parvifolia*), *Ulmus macrocarpa*, *Ulmus macrophylla*. No cadalene was found

in the *Ulmus* species except *Zelkova*. However, 7-hydroxycadalene, which is very similar structures with cadalene, was identified only in heartwood of all *Ulmus* species including *Zelkova* tree. Therefore, it is temporarily concluded that cadalene can be biochemically synthesized from 7-hydroxycadalene by the successive function of two enzymes in parenchyma cell such as hydroxylase and O-methyltransferase.

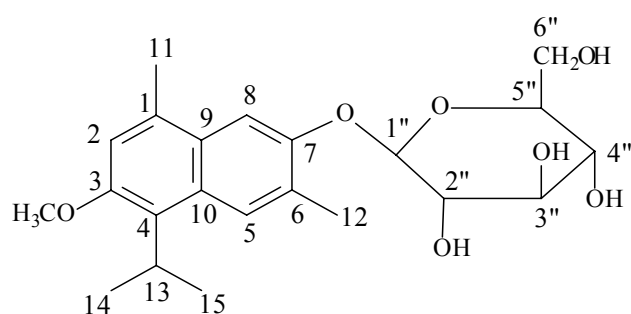


The chemical structure of 7-hydroxycadalene isolated from *Ulmus* species and its biochemical role in the cadalene synthesis

Cadalene has several excellent biological activities, like scavenging activity of hydroxyl and superoxide radicals. The scavenging activity of hydroxyl radical was intended to be increased in proportion to cadalene concentration. At 100 ppm concentration of cadalene, almost complete hydroxyl radicals was removed. However, MTT assay revealed that cadalene at high concentration showed critical toxicity to the cells. When 1 ppm of cadalene was treated to the cells, cell viability was reached up to 90 %, while it was reduced to 22 % after treatment of 9 ppm of cadalene.

To reduce the cell toxicity, cadalene was chemically modified to 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene (Mw 406 m/z) via substitution

reaction of hydroxyl group with glucose molecule. As a result, the cell toxicity, determined to IC₅₀ value, was lowered more 20 folds than that of cadalene itself. In addition, the solubility to water was much more improved.



Structure of 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene

2. The development of lung cancer drug by cell cycle control

For better understanding of the mechanisms of cadalene on lung cancer cell growth arrest, A549 cells were treated with different concentrations of cadalene, then effects of cadalene on apoptosis were examined by flow cytometry. Our results clearly demonstrated that cadalene suppressed the G1 and G2/M phase in a concentration-dependent manner, thus, increased the apoptotic phase. Our data suggest that cadalene may exert its anti-cancer effects through facilitating the apoptosis.

Cadalene also induced the suppression of the proteins associated with

G1, and G2/M checkpoint. Especially, the expression of cyclin A, B, D was significantly decreased by cadalene treatment. Moreover, protein expression of p21, p27, GADD45 and PCNA was also suppressed by cadalene. Our data suggest that cadalene may suppress lung cancer cell growth by controlling the cell cycle.

Cadalene increased the PTEN, strong tumor suppressor gene significantly while decreasing the other important proteins on protein translation pathways. Especially, cadalene suppressed the expression of total Akt as well as phosphorylation of Akt which is known to play a key role in lung tumorigenesis. Such decreased Akt and phospho-Akt protein expression was clearly re-confirmed by Akt and mTOR kinase assays. Immunohistochemistry of p-Mnk also supported our credit of data. Together, cadalene may suppress the lung cancer cell growth through controlling the protein translation.

Glucose is one of important energy source for cancer cell growth. Therefore, potential effects of glucose uptake by cadalene was examined. Our results clearly demonstrated that cadalene could disturb the glucose uptake efficiently suggesting that part of antitumor effects of cadalene may be closely associated with selective interruption of glucose uptake.

For the single dose toxicity test of cadalene, mice were treated with different concentrations of cadalene (100, 50, and 25 mg/kg dissolved in ethanol) intraperitoneally. Such single dose toxicity study provided the LD50s of 43.59 mg/kg (male) and 18.63 mg/kg (female).

For 28-day repeat dose toxicity test, 3 different doses were determined based on above LD50 values. Briefly, 1/10th of LD50 was chosen as highest dose. From there, 3 different doses were determined (for male mice;

4.4, 2.2, and 1.1 mg/kg: for female mice; 1.9, 0.95 and 0.48 mg/kg). During the 4 weeks toxicity test period, all mice treated with cadalene in all different doses were dead.

Our next question was how to decrease the toxicity. To minimize or decrease the toxicity of cadalene, cadalene was dissolved in DMSO instead of ethanol and gavage was selected as a route of administration instead of intraperitoneal administration. With changed status, independent 28-day repeat dose toxicity was performed again. In the study, 1 mouse in control and 1 mouse in middle dose group were dead, however, such death was not closely associated with cadalene itself because other mice in all groups were alive. Moreover, no female mice were dead during the study period. Significant decrease of body weight was observed in female mice only, especially in 4th week. Based on hematological, serum biochemical analysis and histopathological examination, no observed adverse effect level (NOAEL) was determined as 2.2 mg/kg for male mice and 0.48 mg/kg for female mice. Our results strongly suggest that there is a sex-dependent toxicity of cadalene. Extensive studies are under progress to elucidate such sex-dependent toxicity. Together, toxicity of cadalene may be increased by the use of ethanol and intraperitoneal administration. Therefore it is highly recommended that oral administration with DMSO for safe application of cadalene.

Our next question was how to decrease the potential toxicity of cadalene and maximize the potential efficacy of cadalene. For the purpose, hydroxyl group at 7 position of cadalene was replaced with glucose. Based on try and error, we synthesized 7-O- β -D-glucopyranosyl-3-methoxy-cadalene and such cadalene glucoside was easily soluble in water and IC₅₀ against human lung cancer cell line (A549) was 88.6 μ M. Next step, we were interested in IC₅₀ values of cadalene glucoside in normal lung cells.

However, IC₅₀ value on normal lung cells was much lower than that on lung cancer cell line; 298.2 μM on WI-38 cell line.

Taken together, cadalene, extracted from Zelkova tree, has strong antitumor activity. However, some degree of intrinsic toxicity may hinder the practical application. Additional study for decreasing the toxicity whereas increasing the efficacy is desperately needed.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	17
Section 1. Objectives for research	17
Section 2. Importance of the research	17
Chapter 2. Status of domestic and international researches	21
Section 1. Situation and difficulties	21
Section 2. Prospect for the researches	22
Section 3. Feasibility of the research	22
Chapter 3. Methods and results of the project	24
Section 1. Isolation and structural identification of functional compounds from <i>Zelkova serrata</i> Makino	24
Section 2. Development of lung cancer drug by cell cycle control	42
Section 3. Evaluation of Safety	46
(single and repeat toxicity study in mice)	
Section 4. Results and discussion	52
Section 5. Conclusion	127
Chapter 4. Achievement and Contribution	133
Section 1. Purpose and research fields	133
Section 2. Annual performance schedule	133
Section 3. Contents and plans	134
Section 4. Contribution to related research fields	135
Chapter 5. Application plans	137
Chapter 6. References	138

목 차

제 1 장 서 론	17
제 1 절 연구개발의 목적	17
제 2 절 연구개발의 필요성	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	21
제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	21
제 2 절 연구개발 전망	22
제 3 절 기술도입의 타당성	22
제 3 장 연구내용 및 결과	24
제 1 절 느티나무 추출성분 분리 및 유효물질 구조 동정	24
1. 카달렌 추출	24
가. 공시재료	24
나. 에탄올 추출	24
다. HPLC 분석	26
라. 카달렌 정량분석용 검량선 작성	26
마. 기기분석	27
2. 느티나무 에탄올 조추출액의 항균 활성 검정	28
가. 공시균주	28
나. 항균활성 검정	28
3. 카달렌의 생리활성 검정	29
가. Hydroxy radical(\cdot OH) 소거활성 측정	29
나. Superoxide radical 소거활성 측정	30
다. 멜라닌 미백효과 측정	30
라. MTT assay에 의한 카달렌의 세포생존율 평가	30
마. Esterase 저해능 측정	31
바. 카달렌에 의한 글루코오스 대사 억제 실험	31

4. 느티나무 연료별 카달렌의 분포	32
가. 시료 제조	32
나. 카달렌 추출	32
다. 느티나무 연료별 헥산 농축액의 HPLC 분석	32
5. 느릅나무과 수종에서 카달렌 및 카달렌 동족체 분리	33
가. 공시재료	33
나. 에탄올 추출	33
다. HPLC 분석	33
라. 기기분석	34
6. 카달렌의 유도체 합성 및 활성 조사	34
가. 시약	34
나. 7-O-β-glucopyranosyl-3-methoxycadalene 합성	34
다. 7-O-β-cellobiosyl-3-methoxycadalene 합성	37
라. HPLC 분석	40
마. 기기분석	41
바. 카달렌 유도체의 세포독성 평가	41
제 2 절 세포주기 조절억제에 의한 폐암예방 및 치료제 개발	42
1. 세포주기 검정	42
가. Flowcytometric analysis	42
나. G1, G2/M checkpoint 및 protein translation에 미치는 영향	42
1) 시료준비	42
2) 단백질 정량	42
3) Western blotting	43
2. 카달렌이 protein translation에 미치는 메커니즘	43
가. 시료 준비	43
나. 단백질 정량	43
다. Western blotting	44
라. Kinase assay	44
마. Immunocytochemistry	44

제 3 절 생체내 안정성 평가	46
1. 단회투여 독성 시험평가	46
가. 연구수행 방법	46
1) 실험동물 및 사육조건	46
2) 시험군의 구성 및 용량설정	46
3) 투여약액의 조제 및 투여방법	47
나. 관찰 및 검사항목	47
1) 일반증상 관찰	47
2) 체중 측정	47
3) 부검	47
4) 통계학적 분석	47
2. 반복투여 독성 시험평가	48
가. 연구수행 방법	48
1) 실험조건 및 사육조건	48
2) 시험군의 구성 및 용량설정	48
3) 투여약액의 조제 및 투여방법	49
나. 관찰 및 검사항목	49
1) 일반증상 관찰	49
2) 체중 측정	49
3) 부검	49
4) 병리학적 검사	50
제 4 절 결과 및 고찰	52
1. 느티나무 추출성분 분리 및 유효물질 구조 동정	52
가. 느티나무에서 카달렌의 생합성 과정	54
나. 카달렌 분리 및 구조동정	56
다. 느티나무 연륜별 카달렌의 분포조사	60
라. 느티나무 에탄올 조추출액의 항균활성 검정	64
마. 느티나무 에탄올 조추출액의 항산화활성	66
바. 카달렌의 생리활성 검정	67
1) Superoxide radical과 hydroxy radical 소거활성 측정	67

2) 세포독성 및 멜라닌 미백효과 측정	69
사. 느티나무 심재부에서 단리한 카달렌 동족체 구조동정	76
1) 화합물 3,7-Dimethoxycadalene 구조	77
2) 화합물 7-Hydroxycadalene-5,8-quinone 구조	80
3) 화합물 3,10-Cadinadiene 구조	82
4) 그 외 화합물	84
아. 느릅나무과 수종에서 카달렌 및 카달렌 동족체 분리	88
1) 느릅나무	91
2) 참느릅나무	92
3) 당느릅나무	93
4) 큰잎느릅나무	95
자. 카달렌-글루코사이드의 세포독성 측정	97
2. 세포조절주기 억제에 의한 폐암예방 및 치료제 개발	103
가. 카달렌의 적용용량 및 시간	103
나. 세포주기 검정	103
다. G1, G2/M checkpoint에 미치는 영향	105
라. Protein translation 및 세포 신호전달에 미치는 영향	109
3. 생체내 안전성 평가	113
가. 단회투여 독성 시험평가 연구	113
1) 사망동물 및 임상증상 관찰	113
2) 체중변화	113
3) 육안적 부검 소견	113
나. 반복투여 독성 시험평가 연구	116
1) 사망동물 및 임상증상 관찰	116
2) 체중변화	116
3) 혈액 및 혈액 생화학적 검사	118
4) 병리조직학적 검사	118
제 5 절 결론	127
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	133

제 1 절	연구개발의 목표와 내용	133
제 2 절	연차별 연구개발 목표와 내용	133
제 3 절	연구추진 내용 및 계획	134
제 4 절	연구결과의 관련분야 기여도	135
제 5 장	연구개발 결과의 활용계획	137
제 6 장	참고문헌	138

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

1. 폐암 예방물질 검색을 위한 효율적 model system 확립
2. 천연물을 대상을 *in vitro*에서 bioassay-directed fraction 방법에 의한 암예방 물질의 추적으로 활성성분 분리, 구조확인 및 작용기전 규명
3. 활성성분의 *in vivo* 방법에 의한 암예방 작용 확인 및 작용기전 규명
4. 암 예방물질의 lead compounds 개발 후 동물실험을 통하여 효과가 검증된 물질에 대하여 특허 창출을 위한 기초자료 확립

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

암은 인류가 해결해야 될 난치병 중의 하나로 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 치료제의 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이나, 그 유발원인이 다양하여 치료제의 개발이 어렵다. 현재 치료제로 사용되어 지고 있는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있기에 암의 치료보다 예방이 훨씬 효율적인 방법으로 인식되고 있다. 암 예방은 암 발생의 여러 기전을 효율적으로 차단함으로써 정상세포가 암세포로 전이되는 과정을 미연에 방지, 진행을 지연 또는 회복시킬 수 있는 물질을 사용한다. 이는 기존의 부작용이 심한 암 치료제 또는 외과수술에 의존한 임상학적으로 심각한 상태를 초래하거나 치명적인 질환이 동반되는 암 치료법에 비해 그 위험부담을 효과적으

로 줄일 수 있다. 현재 사용되고 있는 합성 항암치료제는 투여 시 자체독성에 의한 심각한 부작용을 야기하므로 이를 보완하기 위해 비교적 부작이 적은 천연물질을 대상으로 한 암 치료나 예방을 위한 약물 개발에 관한 연구가 활발히 진행 중에 있다.

천연 항암제의 경우 우리나라는 물론 전 세계적으로 사망률이 급증하고 있는 폐암과 50대 이후의 남성에게 특이적으로 발병되는 전립선암은 발병 대상이 넓고 발병 빈도가 높기 때문에 이들 암의 예방 및 치료를 위한 신약물질의 개발에 관한 다양한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있으며 특히 천연물에 대한 요구 역시 증가되고 있는 실정이다.

그러나 구미의 선진국을 위시한 세계 각국은 지적 소유권의 보호 정책으로 유용물질이나 이에 관련된 기술의 배타적 권리를 점차 엄격하게 보호하는 방향으로 가고 있어 개발된 기술의 이전을 기피하고 있는 현실에서 국내산 산림자원에서 유용물질을 탐색하고, 효율적인 추출법을 정립하여, 고부가가치의 기능성 소재를 개발함으로써 지적 소유권을 확보하는 동시에 국제 경쟁력 강화를 위한 연구 개발이 절실히 요청된다.

그러므로 국내산 자원의 보존·개발 및 외국산 자원과의 경쟁력 우위 확보 차원에서 국내산 임산자원의 생리활성 기능에 따른 계통체계를 확립하여 유효 산림자원의 체계적 관리 방안의 정립이 요구되며, 지금까지 알려진 천연 항암물질의 경우 약한 활성, 독성 및 용량의 한계로 인한 식·의약 활성물질로서의 문제점을 갖고 있어 이들로부터 보다 안전하고 강한 활성을 지닌 신규 천연 생리활성물질의 단리 및 구조 동정을 통하여 생리활성물질의 상업화를 위한 체계적인 자료 구축이 요구된다.

2. 경제·산업적 측면

암 발생 및 사망의 지속적인 증가는 사회·경제적으로도 큰 부담을 주고 있다. 지난 2002년 건강보험 대상자(4,670만명) 중 암으로 진료를 받은 사람은 총

291,820명으로, 이 가운데 남자가 148,266명으로 여자(143,554명)보다 많은 것으로 조사되었다.

암 환자 진료건수는 매년 증가하여 지난 2002년 1년간 2,015,545 건이 발생하여 전체 진료건수의 약 0.6%를 차지하였으며, 암으로 지출된 의료비는 2002년의 경우 총 9,272억 원이 발생하여 총 의료비의 6.3%를 차지하고 있으며, 암으로 인한 외래 진료건수는 총 외래 진료건수의 0.5%, 진료비는 총 외래 진료비의 2.4%를 차지하고 있다. 이는 진료건수에 비하여 상대적으로 고가의 의료비가 암 치료를 위해 소요되고 있음을 의미한다.

그러나 국민건강보험에 포함되어 있지 않은 의료비까지 포함할 경우 암으로 인하여 발생하는 의료비는 이보다 훨씬 더 많을 것으로 추정되며, 특히 암 환자 및 가족의 생산력 손실까지를 고려할 때 사회·경제적으로 큰 부담을 줄 것으로 판단된다. 따라서 암에 대한 포괄적인 관리를 통해 암을 예방하고 조기에 발견하고, 치료하며, 나아가 암 환자의 삶을 질을 높이기 위한 국가단위의 암 관리정책이 요구된다.

그리고 천연 의약품과 같은 고부가가치 창출분야에서 신의약품 개발에 관한 기술력과 경쟁력을 확보하지 못하고 신약 원료물질이나 제품을 전량 수입에 의존한다면 막대한 기술료를 지불해야 하므로 천연의약품의 시장 규모가 커질수록 국가적 손실은 더욱 커지게 되므로 이로 인해 국가 경쟁력 상실은 물론 국내 의약산업의 예측화가 우려되기 때문에 천연 의약품 개발 분야의 국가 경쟁력 우위를 확보하기 위해서도 독자적인 암 예방제의 개발이 시급히 요구된다.

3. 사회·문화적 측면

폐암은 기관지 및 폐에 발생하는 암을 말하며, 미국의 경우 매년 16만명의 환자가 발생하고 있다. 우리나라에서도 폐암의 발생빈도는 매년 증가하여 장기별 발생빈도가 위암에 이어 2위를 기록하고 있으며, 무엇보다 가장

사망률이 높은 암으로 알려져 있다. 특히 우리나라 성인 흡연율은 61.8%로 매우 높아 머지않아 서구와 마찬가지로 암 발생률 및 사망률 모두 1위를 차지할 것으로 예상된다.

최근 10년 동안 각종 암에 대한 사망률 변화를 보면 90년 인구 십만명 당 110.4명에서 99년 114.7명으로 3.0% 증가하였다. 지난 90년에 비해 사망률이 증가한 암은 폐암, 대장암, 췌장암, 여성유방암, 전립선암 등으로, 폐암은 인구의 노령화와 흡연인구의 증가 및 대기오염의 심화로 크게 증가하고 있으나 아직까지 폐암에 대한 검색자료가 부족한 상태이고 장기간의 잠복기를 가진다는 점에서 치료제 또는 치료방법의 개발보다는 예방제의 개발이 더 적합한 것으로 알려져 있다.

표 1. 최근 주요 사망원인 변동 추이(1990 - 2000년)

(단위 : 인구 십만명당)

	각종 암	위암	간암	폐암	대장암	췌장암	유방암	지궁암	전립선암
1990	110.4	31.5	24.1	14.4	4.5	3.3	3.5	7.8	1.6
1999	114.7	24.0	20.7	22.1	7.9	5.4	4.8	5.6	1.8
2000	122.1	24.3	21.3	24.4	8.9	5.7	4.9	5.6	2.3
증감율(%)	3.9	-23.8	-14.1	53.5	75.6	63.6	37.1	-28.2	12.5

1998년까지의 통계를 보면 현재 폐암의 발병율과 사망률은 흡연율과 밀접한 관련을 지니고 있으며, 일단 발병 후에는 그 치료가 매우 어렵다. 국내의 경우, 남성 폐암 환자의 90%이상이 흡연자인 것으로 조사되었으며, 그 숫자 또한 흡연율의 증가와 함께 급증하고 있어 적극적인 금연홍보와 폐암 예방 및 치료제 개발 등 제반 대처가 시급하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

우리나라는 다른 개도국에 비해 전통지식과 유전자원이 상대적으로 풍부하지는 않으며 이를 활용한 생명공학 및 천연물의약 등 관련 산업의 진흥을 도모해야 하는 입장이라고 할 수가 있다. 우리나라의 식물자원은 약 4000여종이고 이중 우리나라의 특산식물은 407종이나 약 20,000여종 이상을 보유하고 있는 것으로 알려진 중국에 비해서는 적은 편이다. 그러나 우리나라는 전통약물에 관한 know-how를 보유하고 있고, 천연물 의약 분야는 외국에 비해 상대적으로 우수한 과학기술 연구 기반 및 인력 인프라가 구축되어 있는 것으로 자체 평가되고 있다. 그러므로 국내 관련 산업의 발전에 도움이 될 수 있는 방안 마련을 위해서는 전통의약 관련 전통지식 DB 구축 등으로 우리나라 유전자원 및 전통지식에 관한 보호 장치를 마련하고 이를 천연물 의약 분야 연구기관에서 활용하게 함으로써 천연물 의약 R&D 지원을 강화하는 방안을 마련 중이다.

현재 국내에서 제품화를 위한 신약개발 연구는 화합물신약이 35%를 차지하고 있는 가운데, 천연물 신약개발 22%, 개량신약 개발 14%, 바이오신약 개발 29%로 신약개발 흐름이 합성화합물신약에서 바이오·천연물·개량신약 쪽으로 무게중심이 옮겨가고 있으며 약효 군별 신약개발 동향을 분석한 결과 역시 항암제 분야가 가장 활발한 연구 활동이 전개되고 있었으며, 대사성질환치료제 및 심혈관 질환 치료제가 각각 2·3위를 기록했다.

이러한 추세에 맞춰 임업계에서도 국내 임산 자원을 활용한 생리활성 물질 탐색은 1990년대 들어 지속적으로 수행하고 있으나, 아직은 체계적으로 이루어지고 있지 않으며 그 연구 역시 나열식 연구로써 연구결과의 상업화를 위한 심층적인 연구가 수행되지 못하고 있는데 그 한 예로 국립산림과학원에서는 침엽수 12 수종과 활엽수 17 수종 등을 대상으로 한 심재 추출물의 항균

및 항산화활성을 분석한 결과, 느티나무 수종의 경우, 항진균 활성, 항세균 활성, 항산화 활성이 다른 수종에 비해 상당히 우수하다는 것을 보고하였을 뿐 그 원인 및 작용기작에 대한 사항에 관해서는 전혀 언급을 하지 못하고 있다.

그러므로 천연물 의약의 시장성 증가와 전통지식 보호에 관한 국제적 관심고조에 따라 천연물신약 개발을 위한 R&D 투자비용 증대, 효율적이고 객관적인 R&D 계획 수립 및 연구결과를 종합적이고 일관적인 체계로 관리 하는 것이 필요한 것으로 사료된다.

제 2 절 연구개발 전망

폐암, 전립선암, 전립선 비대증 등은 당뇨, 비만, 고혈압 등의 각종 성인병과 함께 전 세계적으로 급증하고 있으며, 이러한 질병은 발병하면 완치가 거의 불가능한 것으로 알려져 있다. 다만, 합병증의 유발을 억제하기 위하여 막대한 의료비가 지출되고 있는 실정이다. 이러한 상황에서 유용 약리식물 자원에서 성인병의 예방과 치료에 쓰이는 기능성 식·의약품으로 이용될 수 있는 생리활성천연물질을 분리, 추출, 정제, 동정, 개발하여 예방제로 쓰일 수 있다면 질병의 예방 및 치료가 가능해지며, 부작용과 독성이 적으며, 효력이 우수한 천연물 특유의 특성을 이용한 기능성 식·의약품의 상업화로 경제적, 산업적 측면에서 고도의 부가가치가 있는 물질을 얻을 수 있게 된다. 이러한 활성화는 국내 임업의 경쟁력을 확보할 수 있게 되며, 국가적으로도 지적 재산권 확보 및 경쟁력을 제고 할 수 있게 될 것이다. 또한, 생체조절 기능의 기작에 대한 과학적인 해석을 통하여 이들의 기능을 적절히 조절·이용함으로써 질병의 예방 및 치료에도 큰 기여를 할 수 있을 것이다.

제 3 절 기술도입의 타당성

의약 신물질 개발품에 관한 첨단 기술은 막대한 양의 자본이 투자되고 있으며, 이에 대한 결과는 특히 화하여 개발한 나라 이외의 타국으로 유출되는

것을 막고 있다. 선진국과의 로열티 지불에 의한 기술이전의 경우에도 신약물질 개발 전반에 관한 핵심 기술에 대해서는 이전 받지 못하는 것이 현실이다. 그러므로 천연 신약물질 개발에 관해서는 국내 기술의 자립이 절실히 요구된다.

특히 암은 난치병으로써 폐암의 경우 발생 빈도가 증가하고 있으므로 이에 대한 대책 마련이 시급하며, 발생 빈도역시 우리의 식생활이 서구화되어 감에 따라 계속 증가할 것이 예상된다. 그러나 기존의 경우는 암 발병 시 치료를 위한 치료제 개발에 치중되어 있으므로 발병이전에 예방에 관한 연구는 현재 진행 중이므로, 이 분야의 기술 도입은 어려울 것으로 판단된다.

제 3 장 연구내용 및 결과

제 1 절 느티나무 추출성분 분리 및 유효물질 구조 동정

1. 카달렌 추출

가. 공시재료

본 연구에서는 향암활성 성분 물질을 단리, 동정할 목적으로 연령 20 - 30 년생 느티나무 수종을 채취한 후 길이 50cm 단위로 절삭하여 통풍이 잘되고 그늘진 곳에서 건조한 다음 심재, 변재, 수피와 잎으로 나누어 칩 상으로 만든 후에 볼밀(Zirconium planetary mono mill)을 이용하여 분말화하고 60 mesh 크기로 분쇄하여 실험재료로 사용하였다.

나. 에탄올 추출

기건 상태의 느티나무 분말 (12 kg)을 에탄올로 72시간씩 3회 추출하여 감압, 농축하였다. 에탄올 농축액은 헥산으로 추출한 후에 헥산분획물은 실리카젤로 충전된 칼럼크로마토그래피 (5.5 × 53 cm)로 카달렌의 단리를 시도하였다. 용출용매는 헥산과 에틸아세테이트를 100 : 0, 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20 과 50 : 50 (v/v) 비율로 혼합하여 사용하였으며, 칼럼크로마토그래피를 통과한 용매를 각각 50 ml 씩 받아 TLC (전개용매 : 헥산 : 에틸아세테이트 = 80 : 20, 헥산 : 벤젠 = 4 : 1)로 카달렌의 용출 여부를 추적하였다. 카달렌은 헥산과 에틸아세테이트의 혼합비율이 90 : 10 (v/v) 인 용매조건에서 나타나기 시작하였으며, 카달렌 성분을 포함한 분획들을 모두 합하여 감압, 농축하였다. 카달렌 농축액에 존재하는 미량의 불순물을 제거하기 위하여 이를 다시 실리카젤-칼럼크로마토그래피 (3 x 45 cm)를 실시하여 순수한 상태의 카달렌 분획을 획득하였다 (그림 1). 카달렌 분획들을 감압, 농축한 후에 -4℃ 이하에서 48시간 이상 방치하여 결정화 한 후에 카달렌 결정 (7-hydroxy-3-methoxy

cadalene)에 포함된 미량의 추출용매를 완전히 제거하기 위하여 24시간 동안 동결건조 하였다

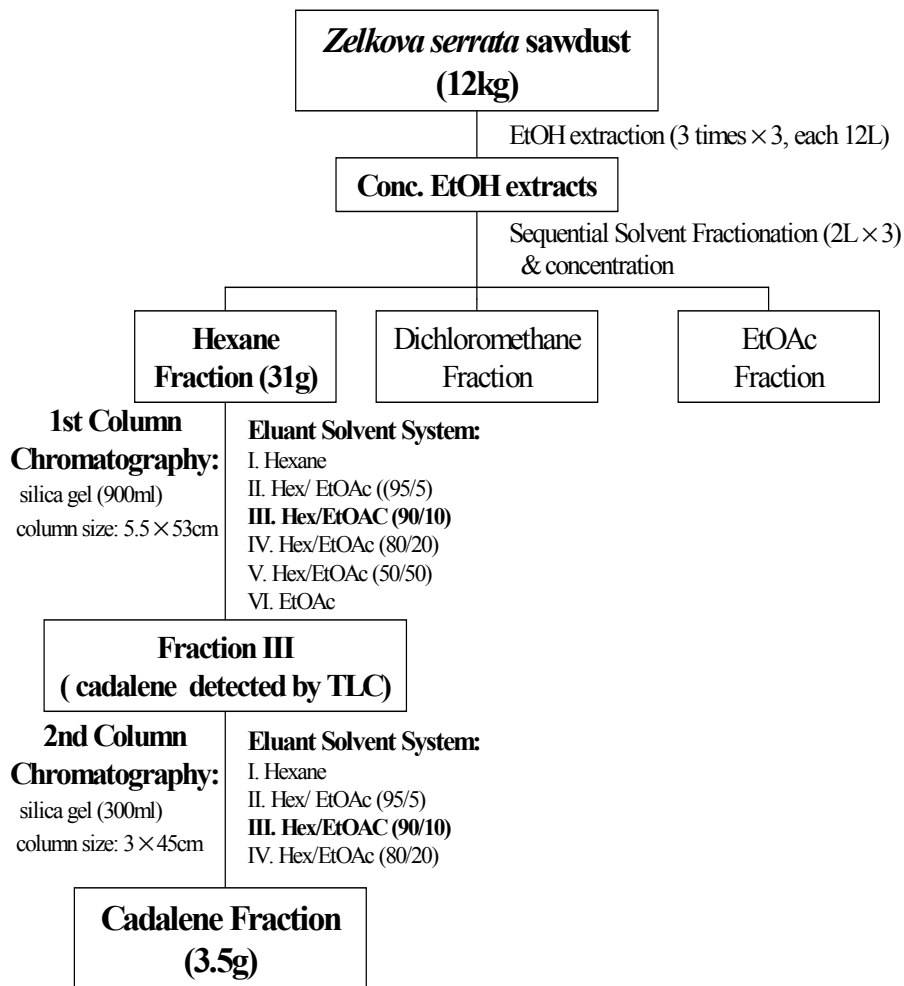


그림 1. 느티나무에서 카달렌의 단리 과정

다. HPLC 분석

단리한 카달렌은 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 정성적, 정량적 분석을 실시하였다. HPLC 기종은 Hewlett packard 1100이며 분석용 칼럼은 Waters symmetry reverse phase column (4.6 × 250 mm)을 이용하였다. HPLC용매는 처음 25분 동안은 아세토니트릴과 물을 50 : 50 (v/v)으로 혼합하여 흘려주었으며, 이후 아세토니트릴의 비율을 10분 동안 100 % 까지 높여서 사용하였다. 자세한 분석조건은 표 2에 제시하였다.

표 2. 느티나무에서 단리한 카달렌의 HPLC 분석조건

Instrument	• High-performance liquid chromatography (HP 1100series) equipped with autosampler
Column	• Waters symmetry reverse phase C18 (4.6 × 250 mm)
Detector	• UV detector at 280 nm
Mobile phase	• Starting with 50% water & 50% AcCN, maintaining for 25min, linear gradient to 100% AcCN for 10min, which was held for 5min
Flow rate	• 0.6 ml/min
Injection volume	• 20 µl

라. 카달렌 정량분석용 검량선 작성

느티나무에 존재하는 카달렌의 정량분석을 위하여 분리한 카달렌 결정을 이용하여 검량선을 작성하였다. 정량분석용 검량선 작성을 위하여 카달렌을 재차 실리카겔을 이용한 칼럼크로마토그래피 (3 × 45 cm)를 실시하여 카달렌에서 이물질을 최대한 제거하였다. 여기서 획득한 카달렌 (순도 약 95% 이상)을 표준 카달렌으로 간주하여 5가지 농도의 카달렌 표준용액을 제조하였다. 이렇

계 제조한 표준 카달렌 용액을 위의 HPLC 조건하에서 retention time으로 확인하였으며, 각 농도별 피크의 면적을 측정하여 카달렌의 정량분석용 검량식을 구하였으며, 이를 이용하여 느티나무에서 단리한 카달렌의 정량분석에 이용하였다. 그림 2.는 카달렌의 검량선을 제시하였다.

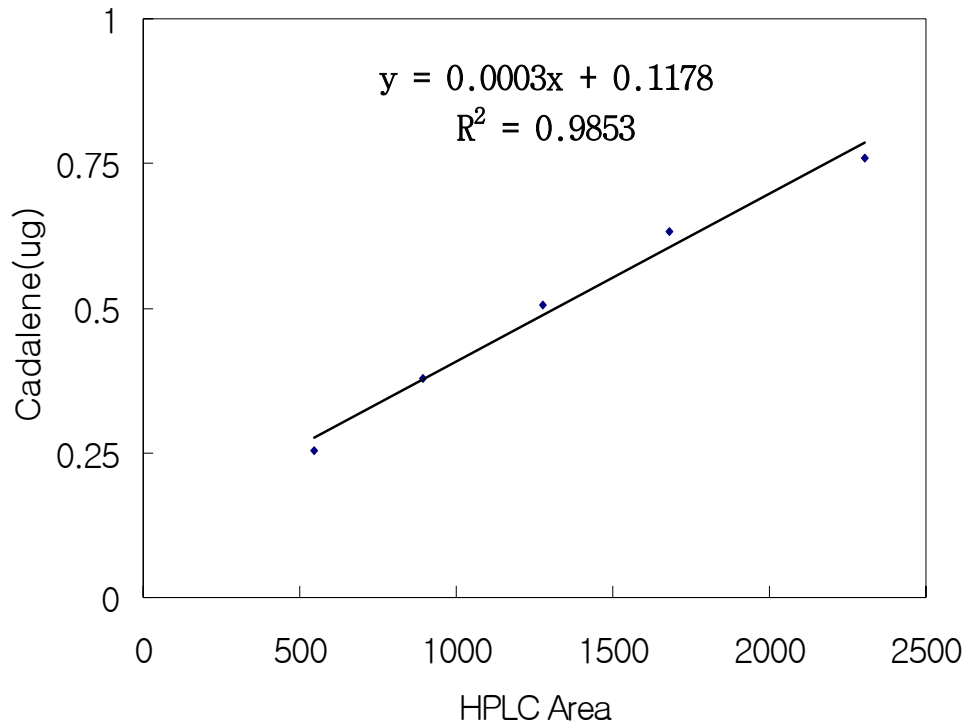


그림 2. 카달렌의 정량분석용 검량선

마. 기기분석

분리한 카달렌은 구조 동정을 위하여 CD₃OD에 녹여서 기초과학지원연구원 서울분소에서 ¹H- 및 ¹³C-NMR (Varian, 500 MHz)을 측정하였으며, 분자량은 EI 및 CI-MS (JMS-600W, JOEL)로 분석하였다.

2. 느티나무 에탄올 조추출액의 항균 활성 검정

가. 공시균주

항진균활성용 공시균으로는 식물병원균인 *Glomerella cingulata*(탄저병균), *Fusarium oxysporium*(채소류 시들음병균), *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*(후사리움 가지마름병균), *Cryphonectria parasitica*(밤나무 동고병균)를, 표고해균인 *Libertella betulina*(주홍꼬리버섯), *Trichoderma viride*(표면오염균), *Trichoderma harzianum*(표면오염균)을, 그리고 목재부후균인 *Trametes versicolor*(백색부후균), *Tyromyces palustris*(갈색부후균) 등을 사용하였다. 또한, 항세균활성용 공시균으로는 그람양성균인 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCTC 1621(황색포도상구균), *Listeria monocytogenes* KCTC 3710(식중독원인균), *Streptococcus faecalis* ATCC 29212(연쇄구균)과 그람음성균인 *Escherichia coli* KCTC 1039(대장균), *E. coli* 05157 NCTC 12079(대장균 0-157), *Salmonella typhimurium* KCTC 2515 및 ATCC 12027(식중독원인균), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853(식품부패균) 등을 사용하여 검정하였다.

나. 항균활성 검정

항진균활성 검정방법으로는 배지점적법을 이용하여 검정하였다. 즉, potato dextrose agar배지에 소정의 농도가 되도록 화합물을 혼합하여 만든 평판배지에 미리 배양해둔 각 공시균의 균사 선단부를 직경 8 mm의 cork borer로 떼어내어 접종하였다. 배양온도 27 °C에서 소정기간 배양한 후 자란 균사환의 직경

을 측정하여 균사생장억제율(hyphal growth inhibition ratio)로 항균활성을 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{균사생장억제율(\%)} = \left[\frac{-(Gc) - (Gt)}{(Gc)} \right] \times 100$$

Gc : 무첨가 배지상의 균사 직경

Gt : 첨가 배지상의 균사 직경

또한, 항세균활성은 한천배지확산법을 이용하였다. 한천배지확산법은 우선 agar 1.5 %가 함유되어 있는 배지를 petri dish에 분주하여 하층배지를 만들고, 그 위에 각 세균을 접종한 0.6 %의 agar 배지를 부어 2중의 평판배지를 만들었다. 이렇게 제조된 평판배지에 소정 농도의 화합물을 마운트한 페이퍼디스크 (직경 : 8 mm)를 올려놓고 37 °C에서 20시간 배양한 후 디스크 주변에 형성되는 생육저지환 (clear zone)의 직경을 측정하여 항세균활성을 검토하였다.

3. 카달렌의 생리활성 검정

가. Hydroxy radical (·OH) 소거활성 측정

안정한 프리라디칼을 생성하는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrohydrazyl)는 산화에 의하여 생성되는 hydroperoxide (ROOH)가 유리 시 발생하는 라디칼 (RO·, ·OH)을 DPPH 라디칼이 포착함에 따라 DPPH 라디칼 본래의 흑자색을 잃게 된다. 이러한 점을 이용하여 DPPH의 퇴색 정도를 흡광도로 측정하여 항산화활성을 검토하였다. 측정방법은 시험관에 소정 농도의 시료를 포함한 메탄올용액 4 ml 및 0.5 mM의 DPPH·메탄올 용액 1 ml를 가하여 총 5 ml가 되도록 하고, vortex mixer로 잘 섞어서 30분간 상온에서 반응시킨 다음, 반응액을 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 프리라디칼 소거능은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도를 사용하여 다음과 같이 백분

율로 나타내었다.

$$\text{프리라디칼소거능(\%)} = \left[\frac{-(\text{무첨가구의 흡광도}) - (\text{첨가구의 흡광도})}{(\text{무첨가구의 흡광도})} \right] \times 100$$

나. Superoxide radical 소거활성 측정

Superoxide radical 소거활성의 측정에 사용된 superoxide radical은 hypoxanthine을 기질로 xanthine oxidase를 사용하는 발생시스템 (HPX/XOD system)을 이용하여 생성시켰으며, 생성된 라디칼은 spin trap agent인 5,5-dimethylpyrroline-N-oxide (DMPO)와 반응시켰다. 적당량의 시료 (25 μ l)에 K2EDTA (15 mM, 20 μ l), hypoxanthine (3 mM, 60 μ l), NBT (0.6 mM, 50 μ l)와 xanthine oxidase (1 unit/10 ml buffer, 50 μ l)를 혼합하여 반응 시킨 후에 595 nm에서 흡광도를 측정하여 소거능을 측정하였다.

다. 멜라닌 미백효과 측정

Sodium phosphate buffer (67 mM, pH 6.8)를 사용하여 L-DOPA (8.3 mM)과 mushroom tyrosinase (50 unit/ml)를 제조하였으며, 96-well에 각각 120 μ l와 40 μ l를 첨가하였다. 여기에 카달렌 시료를 농도에 따라 40 μ l를 첨가하여 37 °C에서 30분간 효소반응을 진행시켰다. 반응생성물인 도파크롬의 흡수파장인 490 nm에서 흡광도를 측정하여 카달렌의 효소 저해 활성을 측정하였다.

라. MTT assay에 의한 카달렌의 세포생존을 평가

MTT assay는 세포독성이나 세포 생존율을 평가하는 방법으로 세포의 미토콘드리아에 있는 succinate dehydrogenase 가 MTT를 환원시켜 formazan

크리스탈을 형성한다. 살아있는 세포의 수가 많을수록 크리스탈의 생성도 많아 지므로 이러한 방법을 통해 세포의 성장을 쉽게 측정할 수 있다. 사람 각화형 성 세포주 (HaCaT cell)를 96-well에 적당한 양으로 깔아놓고 카달렌을 100 % DMSO에 녹여 MTT 용액 (20 μ l)과 함께 넣은 후 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 하에서 4일간 배양한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 크리스탈의 양을 측정하였다.

마. Esterase 저해능 측정

Elastin은 피부 진피에 2 % 존재하는 성분으로 피부에 탄력성을 부여하고 활성화된 elastase에 의해 분해되면 주름이 생성되는 원인이 된다. 이러한 elastase의 저해능을 측정하여 항주름 효과를 평가하는 방법이다. Elastase 저해 측정은 효소와 기질의 반응으로 일정농도의 기질에 elastase를 넣으면 기질이 분해되는데 이 반응물에 자화육각수를 첨가하여 elastase 저해여부를 실험하였다. 카달렌은 DMSO에 100,000 ppm으로 녹여 사용하였으며 희석하는 과정에서 용해성이 불안정하여 여러 가지 용매와 용매농도를 달리하여 사용하였다.

바. 카달렌에 의한 글루코즈 대사 억제 실험

6-well plate에 A549 cell을 1×10^6 seeding, over night 한 후 새 배지로 교환과 함께 카달렌을 처리한 후 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 시간별로 배지를 채취하여 배지 내 글루코오스 농도를 측정하였다. 8-well chamber slide에 A549 cell을 1×10^4 seeding하고 24시간 동안 방치하였다. 다음날 새 배지로 교환과 함께 카달렌을 처리한 후, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min 시간별로, 세포내 글루코오스를 확인할 수 있는 형광 R.I.T.C. (rhodamine isothiocyanate) antibody를 3 h, 4 h, 12 h, 24 h 별로 세포내 글루코오스를 확인할 수 있는 형광 F.I.T.C. (fluorescein isothiocyanate) antibody를 처리 후 C.L.S.M. 형광현미경으로 세포내 글루코오스 분포를 확인하였다.

4. 느티나무 연륜별 카달렌의 분포조사

가. 시료 제조

공시수종인 2령급(14년생)과 3령급(30년생) 느티나무는 진주 남부산림연구소 시험림에서 채취하였다. 채취한 후 길이 50cm 단위로 절삭하여 통풍이 잘 되고 그늘진 곳에서 기건 상태로 건조한 다음 심재, 변재, 수피와 앞으로 나누었다. 각 부분은 연륜 별로 각각 분리한 다음 칩으로 제조한 후에 볼밀(Zirconium planetary mono mill)을 이용하여 분말화하고 60 mesh 크기로 분쇄하여 실험재료로 사용하였다. 2령급 느티나무는 변재부 6부분, 심재부 3부분으로 분리하였고, 3령급 느티나무는 변재부 5부분, 전이부분 (transition zone) 3부분, 그리고 심재부 7부분으로 각각 분리하였다.

나. 카달렌 추출

연륜 별로 분리된 분말상의 시료 (5 - 10 g)를 에탄올로 24시간씩 2회 추출하였다. 에탄올 추출액은 농축기를 이용하여 감압농축 하였다. 획득한 에탄올 농축액은 헥산으로 용매분획한 후에 다시 농축하였다. 최종 헥산 농축액은 소량의 메탄올로 녹인 후에 HPLC 분석 전까지 -4°C 이하에서 보관하였다.

다. 느티나무 연륜별 헥산 농축액의 HPLC 분석

느티나무 연륜별로 획득한 헥산농축액을 메탄올로 녹인 후에 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 각 연륜별 카달렌의 함량을 정량적으로 분석하였다. HPLC 기종은 Hewlett packard 1100이며 분석용 칼럼은 Waters symmetry reverse phase column (4.6 × 250 mm)을 이용하였다. HPLC용매는 처음 25분 동안은 아세토니트릴과 물을 50 : 50 (v/v)으로 혼합하여 흘려주었으며, 이후 아세토니트릴 비율을 10분 동안 100 %까지 높여서 사용하였다. 자세한 분석조건은 앞에서 제시한 표 2.와 같다.

5. 느릅나무과 수종에서 카달렌 및 카달렌 동족체 분리

가. 공시재료

느릅나무과에 속하는 수종 중에서 느릅나무(*Ulmus davidiana*), 참느릅나무(*Ulmus parvifolia*), 큰잎느릅나무(*Ulmus crophylla*)와 당느릅나무(*Ulmus macrocarpa*)를 공시수종으로 선택하여 카달렌 분리 및 카달렌 동족체 분리 실험을 수행하였다. 느릅나무와 참느릅나무는 경상남도 함양읍 원산리 부근에서 채취하였으며, 당느릅나무와 큰잎느릅나무는 국립산림과학원 천장산 연습림에서 채취하였다. 각 공시수종은 채취 후 길이 50 cm 단위로 절삭하여 통풍이 잘되고 그늘진 곳에서 기건상태로 건조한 다음 심재, 변재, 수피와 잎으로 나누었다. 각 부분은 칩으로 제조한 후에 불밀 (*Zirconium planetary mono mill*)을 이용하여 분말화하고 60 mesh 크기로 분쇄하여 실험재료로 사용하였다.

나. 에탄올 추출

분말상의 느릅나무과 시료 (100 - 500 g)를 에탄올로 24시간씩 2회 추출하였다. 에탄올 추출액은 농축기를 이용하여 감압농축 하였다. 에탄올 농축액은 헥산으로 용매분획한 후에 다시 농축하였다. 최종 헥산 농축액은 소량의 메탄올로 녹인 후에 HPLC 분석 전까지 -4°C 이하에서 보관하였다.

다. HPLC 분석

느릅나무과 수종들의 헥산 농축액을 메탄올로 녹인 후에 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 각 수종별 카달렌과 카달렌 동족체들을 정성적으로 분석하였다. HPLC 기종은 Hewlett packard 1100이며 분석용 칼럼은 Waters symmetry reverse phase column (4.6×250 mm)을 이용하였다. HPLC용매는 처음 25분 동안 아세트니트릴과 물을 50 : 50 (v/v)으로 혼합하여 흘려주었으며, 이후 아세트니트릴 비율을 10분 동안 100 %까지 높여서 사용하였다.

라. 기기분석

분리한 카달렌은 구조 동정을 위하여 CD₃OD에 녹여서 기초과학지원연구원 서울분소에서 ¹H- 및 ¹³C-NMR (Varian, 500 MHz)을 측정하였으며, 분자량은 EI-MS(JMS-600W, JOEL)로 분석하였다.

6. 카달렌의 유도체 합성 및 활성 조사

가. 시약

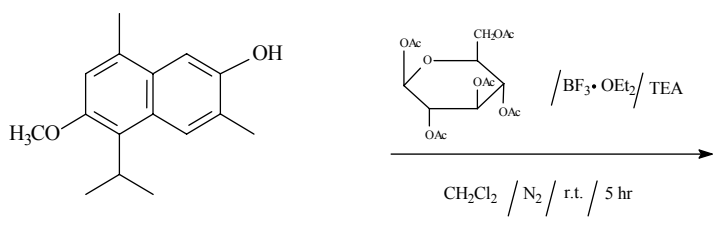
카달렌 유도체 합성에 이용한 카달렌 (7-hydroxy-3-methoxycadalene)은 3령급 느티나무 심재부에서 그림 1.과 같은 과정에 의해서 단리 하였다. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene 합성에는 penta-O-acetyl-β-D-glucopyranose (Aldrich 285943)을 사용하였고, 7-O-β-D-cellobiosyl-3-methoxycadalene 합성에는 octaacetate-D-cellobiose (Acros 146460)를 사용하였다. 그 외 합성반응에 필요한 triethylamine (Aldrich 471283), methylene chloride, boron trifluoride diethyl etherate (BF₃.OEt₂, Aldrich 216607), n-butylamine (Aldrich 471305), sodium bicarbonate, magnesium sulfate와 메탄올 등은 reagent 급 시약을 사용하였다.

나. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene 의 합성

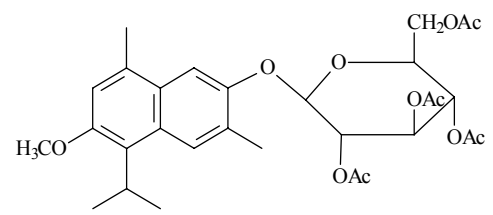
카달렌 (7-hydroxy-3-methoxycadalene)으로부터 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene을 합성하기 위해서는 전구물질의 7번 위치에 존재하는 수산기의 수소원자 위치를 acetyl화 된 glucose로 치환하는 단계와 이렇게 합성된 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene에서 acetyl기를 제거하여 최종 목표물질을 얻는 두 단계의 합성과정으로 구성되었다.

1) 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene 합성

첫 단계 반응은 7-hydroxy-3-methoxycadalene (1.22 g)과 penta-*O*-acetyl- β -D-glucopyranose (2.25 g)을 100 ml의 둥근 플라스크에 넣고, 0.23 ml의 TEA가 섞인 20 ml의 CH₂Cl₂를 첨가하여 용해시켰다. 질소 조건하에서 이 용액에 2 ml의 BF₃OEt₂가 용해된 CH₂Cl₂ 5 ml를 첨가하였다. 이 플라스크에 magnetic stirrer를 넣고 혼합액을 상온에서 5시간 동안 교반하였다. 교반이 끝난 다음 혼합액에 물에 용해시킨 포화 sodium bicarbonate를 첨가하고 20 ml의 CH₂Cl₂로 세 번 추출하였다. 용매 추출액을 모두 모아서 magnesium sulfate를 처리하여 용매 속에 존재하는 미량의 수분을 제거한 후, 진공 하에서 회전식 증발장치를 이용해 CH₂Cl₂를 증발시켰다. 결과물에 잔재하는 이물질들을 제거하고 순수한 물질을 얻기 위해서 용매 증발 후 남은 결과 물질을 포화 용액이 되도록 소량의 메탄올에 용해하고 12시간 동안 냉장 보관기에 넣어두어 결정을 유도하였다. 거름 장치를 이용하여 형성된 결정을 분리하고 피펫을 이용하여 냉각된 메탄올로 조심스럽게 씻어내어 이물질을 제거하였다. 이렇게 하여 얻어진 결정은 최종물질의 중간단계 합성물인 7-*O*-(tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene (그림 3)으로 분자량은 EI-MS로 확인하였다.



7-Hydroxy-3-methoxycadalene

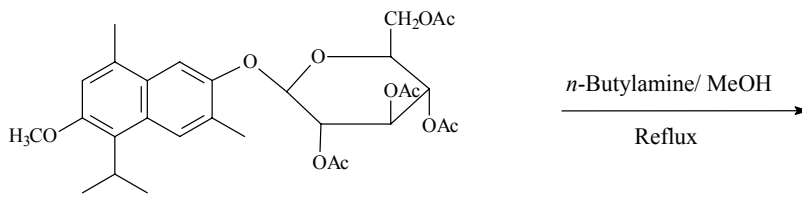


7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene

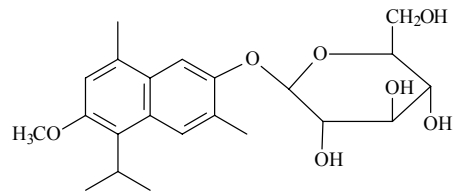
그림 3. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene에서 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene의 합성과정

2) 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene 합성

두 번째 반응단계는 획득한 결정체인 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene을 둥근 플라스크에 넣고 50 ml의 메탄올과 3.5 ml의 *n*-butylamine을 첨가하여 15시간 동안 환류조건 하에서 실시하였다. 반응이 끝난 후, 용액을 농축시키고 분취용 박층 chromatography plate로 이물질 제거하여 최종 결과물인 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene (그림 4)을 획득하였다. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene의 구조와 분자량은 EI-MS와 ¹H- 및 ¹³C-NMR 분석으로 확인하였다.



7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene



7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene

그림 4. 7-O-(tetra-O-Acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene에서 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene 합성과정

다. 7-O-β-D-Cellobiosyl-3-methoxycadalene 합성

카달렌(7-Hydroxy-3-methoxycadalene)으로부터 7-O-β-D-cellobiosyl-3-methoxycadalene을 합성하는 과정은 전구물질인 카달렌의 7번 위치에 존재하는 수산기의 수소원자 위치에 acetyl기가 부착된 cellobiose로 치환하는 단계와 이 화합물의 acetyl기를 다시 수산기로 전환시키는 두 단계의 합성과정으로 완성된다.

1) 7-*O*-(Hepta-*O*-acetyl-β-D-cellobiosyl)-3-methoxycadalene 합성

첫 단계로, 7-hydroxy-3-methoxycadalene (0.1708 g)과 octa-acetate-D-cellobiose (0.6786 g)을 50 ml의 둥근 플라스크에 넣고, 0.07 ml의 TEA가 섞인 4 ml의 CH₂Cl₂를 첨가하여 용해시켰다. 질소 가스 조건하에서 이 용액에 0.314 ml의 BF₃OEt₂가 용해된 CH₂Cl₂ 0.5 ml를 첨가하였다. 이 플라스크에 magnetic stirrer를 넣고 혼합액을 상온에서 9시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후 혼합액에 물에 용해시킨 포화 sodium bicarbonate를 첨가하고 5 ml의 CH₂Cl₂로 세 번 추출하였다. 용매 추출액을 함께 모아 magnesium sulfate를 처리하여 용매 속에 존재하는 미량의 수분을 제거한 후, 진공 하에서 회전식 증발장치를 이용해 CH₂Cl₂를 증발시켰다. 반응생성물에 존재하는 이물질들을 제거하고 순수한 물질을 얻기 위해서 용매 증발 후 남은 생성물질을 포화용액이 되도록 소량의 메탄올에 용해하고 12시간 동안 냉장 보관기에 넣어두어 결정체를 형성시켰다. 거름 장치를 이용하여 형성된 결정을 획득하고 피펫으로 냉각된 메탄올로 조심스럽게 씻어내어 이물질을 제거하였다. 이렇게 하여 얻어진 결정이 반응 중간물질인 7-*O*-(hepta-*O*-acetyl-β-D-cellobiosyl)-3-methoxy-cadalene (그림 5)이다. 생성된 7-*O*-(hepta-*O*-acetyl-β-D-cellobiosyl)-3-methoxycadalene의 분자량은 EI-MS로 확인했다.

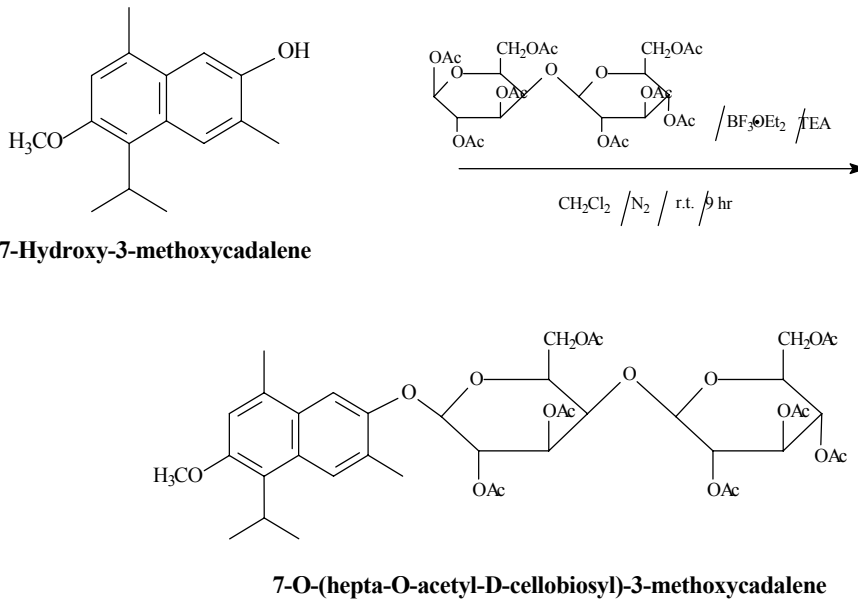
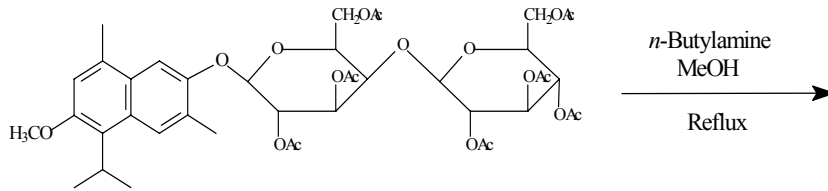


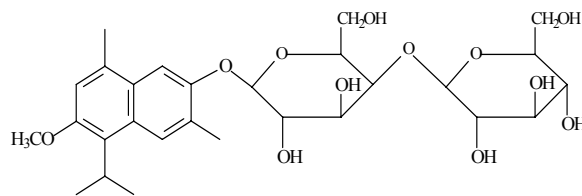
그림 5. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene에서 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene 합성과정.

1) 7-O-β-D-Cellobiosyl-3-methoxycadalene 합성

두 번째 반응은 결정체인 7-O-(hepta-O-acetyl-β-D-cellobiosyl)-3-methoxycadalene을 둥근 플라스크에 넣고 50 ml의 메탄올과 3.5 ml의 *n*-butylamine을 첨가하여 15시간 동안 환류조건 하에서 실시하였다. 반응이 끝난 후, 용액을 농축시키고 preparative thin layer chromatography plate로 이물질들을 제거하여 최종 결과물인 7-O-β-D-cellobiosyl-3-methoxy-cadalene (그림 6)을 획득하였다. 7-O-β-D-cellobiosyl-3-methoxycadalene의 구조와 분자량은 EI-MS와 ¹H- 및 ¹³C-NMR 분석으로 확인하였다.



7-O-(hepta-O-acetyl-D-cellobiosyl)-3-methoxycadalene



7-O-β-D-cellobiosyl-3-methoxycadalene

그림 6. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene에서 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene 합성과정

라. HPLC 분석

위에서 합성한 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene, 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene와 7-O-(tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-3-methoxycadalene, 7-O-β-D-cellobiosyl-3-methoxycadalene을 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 분석하였다. HPLC 기종은 Hewlett packard 1100이며 분석용 칼럼은 Waters symmetry reverse phase column (4.6 x 250 mm)을 이용하였다. HPLC용매는 처음 25분 동안은 아세트니트릴과 물을 50 : 50 (v/v)으로 혼합하여 흘려주었으며, 이후 아세트니트릴의 비율을 10분 동안 100 %까지 높여서 사용하였다. 자세한 분석조건은 표 2.에 제시하였다.

마. 기기분석

분리한 카달렌은 구조 동정을 위하여 CD₃OD에 녹여서 기초과학지원연구원 서울분소에서 ¹H- 및 ¹³C-NMR (Varian, 500 MHz)을 측정하였으며, 분자량은 EI 및 CI-MS (JMS-600W, JOEL)로 분석하였다.

바. 카달렌 유도체의 세포독성 평가

카달렌을 복강 내 반복 투여 시 나타나는 독성의 경감을 위하여 카달렌에 글루코오스 치환에 의한 수용성을 증가시켜 그에 대한 세포독성을 실험하였다. 실험에 사용한 카달렌 유도체는 카달렌에 글루코오스가 치환된 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene을 대상으로 하여 실시하였다. 우선 합성한 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene을 thin layer chromatography로 이물질을 제거한 후 세포독성 실험에 사용하였다.

1) Cell culture

Human non-small cell lung cancer cell 중 adenocarcinoma cell line인 A549를 본 실험에 사용하였다. A549는 10 % FBS가 함유된 RPMI 배지로 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2) MTT assay

세포독성을 확인하기 위하여 CCK-8 assay를 실시하였다. A549 cell을 96 well plate에 1 x 10⁴ cells/well의 density로 seeding 후 overnight 하여 안정화시킨 다음, 최고농도(500 μM)에서부터 공비를 2로 두어 처리 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 살아있는 세포의 mitochondria에만 침투하여 오렌지색의 formazan salt를 형성하는 water soluble tetrazolium salt-8 를 처리하여 75분 incubation 후 microplate reader를 사용하여 455 nm, 650 nm에서 OD값을 측정하여 IC₅₀을 산출 하였다.

제 2 절 세포주기 조절억제에 의한 폐암예방 및 치료제 개발

1. 세포주기 검정

가. Flowcytometric analysis

A549 cell을 2×10^5 씩 25 cm² tissue culture flask에 plating한 후 24시간 동안 배양하였다. 설정한 용량의 카달렌을 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 2회 세척한 세포를 70 % 에탄올로 고정하였다. 고정된 cell을 12,000 × g에서 10분간 원심분리하여 ethanol을 제거한 후 PBS로 다시 세척하여 RNase A (100 mg/ml)를 sample 당 50 μl씩 실온에서 30분간 처리하였다. RNase가 제거된 cell을 propidium iodide로 염색 후 flowcytometry를 이용하여 세포주기를 측정하였다.

나. G1, G2/M checkpoint 및 protein translation에 미치는 영향

1) 시료준비

A549 cell을 2×10^5 씩 25 cm² tissue culture flask에 plating한 후 24시간 동안 배양하였다. 설정한 용량의 카달렌을 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 1회 세척하고 scraper를 이용하여 flask 내의 cell을 모두 수거하였다. 12,000 × g에서 10분간 원심분리하여 cell pellet만을 수거하여 cell lysis buffer를 이용하여 lysis하였다. 다시 12,000 × g에서 10분 동안 원심분리하여 cell debris를 제외한 상층액만을 수거하여 실험에 사용하였다.

2) 단백질 정량

Bradford법을 사용하여 sample 내의 단백질 농도를 산출하였다.

3) Western blot

단백질의 크기에 따라 12 - 15 %의 separating gel과 8 %의 stacking gel 을 만들어 well 당 20 μ g의 단백질을 loading하여 100 V에서 2시간 동안 전기 영동을 실시하여 단백질을 크기별로 분리하였다. Gel 상에서 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer한 후 5 % skim milk / 0.1% BSA / T-TBS에서 1시간 동안 blocking을 실시하였다. Blocking 후 확인하고자 하는 단백질에 대한 항체를 1 : 1000의 비율로 3 % BSA / T-TBS에 희석하여 2시간에서 overnight까지 membrane과 binding하였다. 다시 horseradish peroxidase (HRP) conjugated 이차항체를 1 : 1000의 비율로 3 % BSA / T-TBS에 희석하여 1시간동안 반응시켰다. T-TBS로 membrane을 washing한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) kit을 사용하여 membrane을 반응시킨 후 LAS-3000 image analyzer로 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

2. 카달렌이 protein translation에 미치는 메커니즘

가. 시료 준비

A549 cell을 2×10^5 씩 25 cm² tissue culture flask에 plating한 후 24시간 동안 배양하였다. 설정한 용량의 카달렌을 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 1회 세척하고 scraper를 이용하여 flask 내의 cell을 모두 수거하였다. 12,000 \times g에서 10분 동안 원심분리하여 cell pellet만을 수거하여 cell lysis buffer를 이용하여 lysis하였다. 다시 12,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 cell debris를 제외한 상층액만을 수거하여 실험에 사용하였다.

나. 단백질 정량

Bradford법을 사용하여 sample 내의 단백질 농도를 산출하였다.

다. Western blot

단백질의 크기에 따라 12 - 15 %의 separating gel과 8 %의 stacking gel 을 만들어 well 당 20 μ g의 단백질을 loading하여 100 V에서 2시간 동안 전기 영동을 실시하여 단백질을 크기별로 분리하였다. Gel 상에서 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer한 후 5 % skim milk / 0.1 % BSA / T-TBS에서 1시간 동안 blocking을 실시하였다. Blocking 후 확인하고자 하는 단백질에 대한 항체를 1 : 1000의 비율로 3 % BSA / T-TBS에 희석하여 2시간에서 overnight까지 membrane과 binding하였다. 다시 horseradish peroxidase (HRP) conjugated 이차항체를 1 : 1000의 비율로 3 % BSA / T-TBS에 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. T-TBS로 membrane을 washing 한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) kit을 사용하여 membrane을 반응 시킨 후 LAS-3000 image analyzer로 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

라. Kinase assay

제조사에 지시에 따라 Seize primary mammalian immunoprecipitation kit 을 사용하여 실시하였다. mTOR kinase assay는 300 μ M의 ATP와 1 μ g의 PHAS을 사용하여 30분 동안 30 $^{\circ}$ C에서 실시하였다. 5X sample buffer를 추가 하여 끓임으로써 반응을 정지시켰다. 시료는 15 % SDS / PAGE로 분석하였다. Akt의 kinase activity는 제조사의 지시에 따라 Akt kinase assay kit으로 분석하였다.

마. Immunocytochemistry

A549 cell을 chamber slide에 배양한 후 카달렌을 처리하여 24시간 후에 slide를 PBS로 세척한 후, 4 % paraformaldehyde로 10분 동안 고정하였다. 다시 세척 후 메탄올 : 아세톤 (1 : 1, v/v)으로 후 고정하였다. 3 % BSA / T-TBS로 1시간 동안 bloking한 후 anti-phospho Mnk 항체를 1 : 50으로 희 석하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight으로 반응시켰다. 다시 상온에서 FITC-conjugated

이차항체를 1 : 500의 비율로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 세포핵은 DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole)를 사용하여 암실에서 30분 동안 염색하였다. 세척 후 poly-*L*-lysine으로 mount하여 형광현미경에서 관찰하였다.

제 3 절 생체내 안전성 평가

1. 단회투여 독성 시험평가

가. 연구수행 방법

1) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 SPF (특정병원체 부재) ICR계 마우스를 중앙실험동물로부터 분양받아 약 1주일간 본 대학의 사육실에 순화 적응시킨후 건강한 동물을 선택하여 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 배기 10~12회, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 실험동물용 케이지에 5마리씩 넣어 시험하였으며, 사육상자에는 시험번호, 동물번호 및 투여량을 적은 tag를 붙였다. 사료는 실험동물용 고품사료를 음수는 상수도수를 자유섭취 시켰다. 모든 실험동물의 사육은 미국 NIH 안내지침(NIH publication No. 86-23, revised 1985)에 따른 서울대학교의 실험동물 관리지침에 따라 실시하였다.

2) 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였으며 각 군의 평균체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 시험군으로는 대조군을 control로 하여 3개 농도의 실험군을 설정하였다. 각 군당 암·수 각 5 마리를 설정하였으며, 시험군으로는 저용량군 (25 mg/kg), 중용량군 (50 mg/kg) 및 고용량군 (100 mg/kg)을 설정하였다. 각각의 용량군에 복강 내 투여를 실시하여 카달렌의 안전성을 평가하였다.

3) 투여약액의 조제 및 투여방법

국립산림과학원에서 공급받은 시험물질인 느티나무 추출물 카달렌을 사용하였으며, 투여직전에 측정된 체중에 따라 시험물질의 투여량을 산출하여 에탄올을 용매로 복강 내 투여하였다.

나. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상관찰

모든 실험동물에 대한 임상증상은 투여당일에는 투여 후 6시간동안은 매 시간 관찰하였으며, 그 후에는 1일 1회 14일간, 운동성, 외관, 자율신경증상, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

2) 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여당일 (0일), 7일, 부검 시 (14일)에 체중을 측정하였다.

3) 부검

시험 중 폐사동물은 그때마다 부검을 실시하였고, 시험 종료 시 생존동물은 경추탈골로 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 육안적 이상 장기와 조직은 10 % 중성포르말린에 고정하였다.

4) 통계학적 분석

시험물질에 대한 LD₅₀는 Litchfield & Wilcoxon법으로 산출하며, 체중에 대한 유의성검정법으로 one-way ANOVA에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰

될 때 대조군과 시험군을 비교하기 위하여 Student's *t*-test를 이용하여 대조군과의 군간 유의성을 검정하였다.

2. 반복투여 독성 시험평가

가. 연구수행 방법

단회투여 독성 평가로 산출된 LD₅₀의 1/10을 암컷, 수컷 각각의 고용량 군으로 설정하여 복강 내 반복투여 시 실험동물에게 있어서 1주일 내, 전 개체 사망이 관찰되었다. 이러한 독성반응을 고려하여 반복투여 독성평가 시에는 복강 내 투여가 아닌 Corn-oil에 현탁하여 경구투여로 투여경로를 변경하였다.

1) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 SPF (특정병원체 부재) C57BL/6 마우스를 중앙실험동물로부터 분양받아 약 1주일간 본 대학의 사육실에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 배기 10~12회, 형광등 명암 12시간 주기, 조도 150~160 Lux로 전 시험기간 동안 실험동물용 케이지에 5마리씩 넣어 시험하였으며, 사육상자에는 시험번호, 동물번호 및 투여량을 적은 tag를 붙였다. 사료는 실험동물용 고품사료를 음수는 상수도수를 자유섭취시켰다. 모든 실험동물의 사육은 미국 NIH 안내지침(NIH publication No. 86-23, revised 1985)에 따른 서울대학교의 실험동물 관리지침에 따라 실시하였다.

2) 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군 분리를 실시하였으며 각 군의

평균체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 시험군으로는 대조군을 control로 하여 3개 농도의 실험군을 설정하였다. 각 군당 암·수 각 10 마리씩을 설정하였으며, 시험군으로는 단회투여 독성 평가 시 산출된 LD₅₀의 1/10을 암컷, 수컷 각각의 고용량군으로 설정하여 수컷 저용량군 (1.1 mg/kg), 중용량군 (2.2 mg/kg) 및 고용량군 (4.4 mg/kg)으로 암컷 저용량군 (0.475 mg/kg), 중용량군 (0.95 mg/kg) 및 고용량군 (1.9 mg/kg)으로 설정하였다. 각각의 용량군에 경구투여를 실시하여 카달렌의 안전성을 평가하였다.

3) 투여약액의 조제 및 투여방법

카달렌을 DMSO에 용해시켜 stock을 제조한 후 투여직전에 측정된 체중에 따라 시험물질의 투여량을 산출하여 corn-oil에 현탁하여 경구 투여하였다.

나. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상관찰

모든 실험동물에 대한 임상증상은 1일 1회 28일간, 운동성, 외관, 자율신경 증상, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

2) 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여 시작일, 7일, 14일 21일 부검 시 (28일)에 체중을 측정하였다.

3) 부검

시험 중 폐사동물은 그때마다 부검을 실시하였고, 시험종료시 생존동물은 경추탈골로 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 육안적 이상 장기와 조직은 10 % 중성포르말린에 고정하였다.

4) 병리학적 검사

가) 부검소견

투여 종료 후 대조군과 시험군의 모든 실험동물을 안와정맥으로 채혈하였으며 채혈이 끝나면 경추탈골로 안락사 시킨 후 부검을 진행 하였으며 육안적인 장기의 이상 유무를 관찰하였다.

나) 혈액 및 혈액 생화학적 검사

실험동물에 대해 시험물질 노출 종료 하루 전 절식 시켰으며, 부검 전 모든 실험동물을 안와정맥으로 채혈하였다. 혈액검체는 혈액 응고방지제 (EDTA)가 들어있는 채혈병에 채집하였으며, 자동혈구 계수기 (Hemacyte., Oxford Science Inc)를 이용하여 백혈구수 (white blood cell or leukocyte count, WBC), 적혈구수 (red blood cell or erythrocyte count, RBC), 혈색소 농도 (hemoglobin concentration, HGB), 적혈구용적 (hematocrit, HCT), 평균 적혈구 용적 (mean corpuscular volume, MCV), 평균 혈색소량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균 혈색소 농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC), 혈소판 수 (platelet or thrombocyte count 등의 항목에 관하여 측정하였다.

혈액생화학적 검사 또한 안와정맥으로 채혈한 후 혈액을 1,500 rpm으로 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으나, 다양한 혈액 생화학적 항목을 분석 하기에는 실험동물인 마우스 특성상 그 양이 적어 증류수에 2배 희석하여 혈액 생화학분석기 (Prime)를 이용하여 TP (total protein), ALB (albumin), TB (total bilirubin), AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), GLU (glucose), CREAT (creatinine), B.U.N. (blood urea

nitrogen), TG (triglycer), Ca (calcium), P (phosphor), LDH (lactate dehydrogenase), CHOL (cholesterol), ALP (alkaline phosphatase) 항목을 측정하였다.

다) 병리조직 검사

채혈 후 모든 동물을 부검하였으며 이때 육안적 관찰을 동시에 진행하였다. 뇌, 심장, 흉선, 폐장, 간장, 신장, 부신, 비장, 고환, 난소, 안구, 비강을 적출하고 그 중 뇌, 심장, 흉선, 폐장, 간장, 신장, 비장, 고환, 난소 중량을 측정 한 후 모든 장기는 10 % 중성 포르말린 용액에 고정하였다. 장기 조직은 파라핀에 포매하고 H&E (Hematoxylin and Eosin)염색을 하여 광학현미경에 의한 병리조직학적 검사를 하였다.

라) 통계학적 분석

시험물질에 대한 LD₅₀는 Litchfield & Wilcoxon법으로 산출하며, 체중에 대한 유의성검정법으로 one-way ANOVA에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰 될 때 대조군과 시험군을 비교하기 위하여 Student's *t*-test를 이용하여 대조군과의 군간 유의성을 검정하였다.

제 4 절 결과 및 고찰

1. 느티나무 추출성분 분리 및 유효물질 구조 동정

느티나무 (*Zelkova serrata* MAKINO)의 추출물에 대한 연구는 약 60년대 초반부터 70년대 후반에 이르기까지 활발한 연구가 진행된 바 있다. 느티나무의 여러 추출성분 중에서도 카달렌류는 다양한 생리활성과 함께 양적으로 특히 주목받는 천연물질로서 느티나무를 비롯한 느릅나무과 수종에서만 발견되는 특징을 지니고 있다. 이에 대한 구조적 특성은 많은 연구자들의 화학적 분석과 NMR분석을 통해서 보고된 바 있다.

Hayashi 등(1972)은 느티나무 (*Zelkova serrata* MAKINO)의 심재부에서 형성된 카달렌 타입의 두 가지 naphthalene 유도물질을 분리·동정하여 각각 4-isopropyl-3-methoxy-1,6-dimethyl-7,8-naphthoquinone (= mansonone G methyl ether)과 7-hydroxy-4-isopropyl-3-methoxy-1,6-dimethyl naphthalene (7-hydroxy-3-methoxycadalene)라고 규명하였으며 느티나무의 변색과 강력한 부후 저항성에 중요한 역할을 한다고 보고하였다(그림 7).

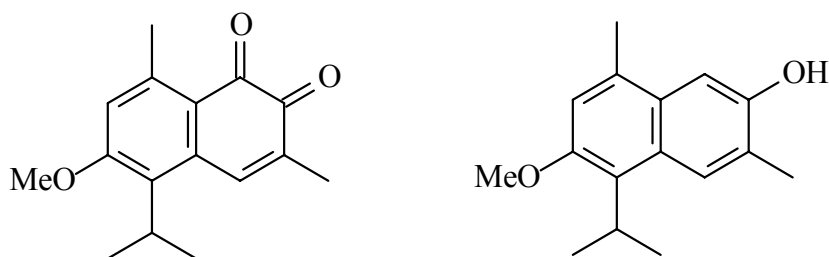


그림 7. Mansonone G methyl ether와 7-hydroxy-3-methoxy cadalene

또한 Hayashi 등(1976)은 7-hydroxy-3-methoxycadalene과 Mansonone G methyl ether 두 sesquiterpenoid의 중합체인 7-hydroxy-3,3'-dimethoxy-7',8-bicadalenyl ether ($C_{32}H_{38}O_4$, MW 486)를 느티나무 심재에서 *n*-hexane : benzene (1 : 1, v/v)의 용매조건을 이용하여 silica gel column chromatography 법으로 분리 하였으며 C-7 위치의 O와 C-8 위치의 탄소 두 개의 라디칼이 에테르결합으로 중합체를 형성한다고 밝혔다(그림 8).

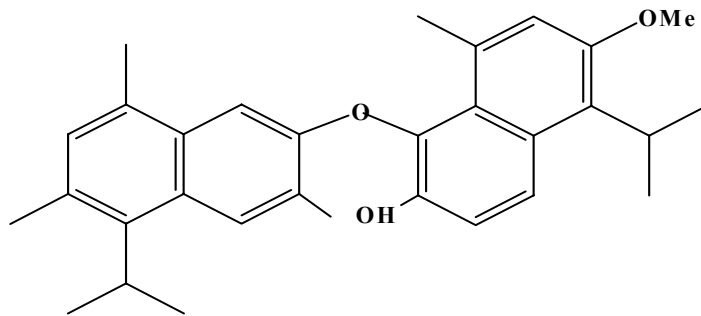


그림 8. 7-Hydroxy-3,3'-dimethoxy-7',8-bicadalenylether

Hayashi 와 Takahashi (1980)는 느티나무 심재부의 벤젠 추출물로부터 *n*-hexane : ethyl acetate (4 : 1, v/v)를 이용한 Silica gel column chromatography법으로 카달렌 타입의 새로운 sesquiterpenoid류에 속하는 두 물질 즉, zeloserratonone ($C_{15}H_{18}O_3$, Mw 246)과 동족체인 homozeloserratonone (cadinan-2,5,7,9-tetraene-4,7-diol-3-one, $C_{16}H_{20}O_3$, Mw 260)에 대한 분리 및 구조 동정에 성공하였다. Zeloserratonone이 탈수반응에 의해 7-hydroxycadalene으로 전환될 수 있으며 또 homozeloserratonone은 zeloserratonone으로 메틸화된다고 보고하였다.

가. 느티나무에서 카달렌의 생합성과정

느티나무는 느릅나무과에 속하는 낙엽활엽교목으로 한반도의 황해도 이남과 중국, 일본, 몽골, 시베리아와 유럽등지에 널리 서식하고 있다. 느티나무는 나뭇결이 아름답고 틀어지지 않아 건축 구조재나 가구재로 널리 이용되어 왔으며, 최근 산림청으로부터 밀레니엄 나무로 지정되면서 가로수나 공원수로 많이 식재되고 있다. 이러한 느티나무의 열매는 고전문헌에 의하면 시력을 향상시키며, 흰머리를 검게하는 효능을 지녔다고 기록되어 있다. 국립산림과학원에서는 느티나무의 부가가치가 높은 의학적, 산업적 이용을 위한 프로젝트의 일환으로 느티나무 추출액의 생물학적 활성실험을 실시한 바 있다. 실험결과, 느티나무 추출액 중에 폐암세포에 활성이 높은 성분이 함유되어 있다는 예비실험 결과를 얻었으며, 이러한 성분은 잠정적으로 카달렌 구조를 하고 있음을 보고하였다.

카달렌은 테펜노이드중 세스퀴테펜에 속하는 천연물로 탄소 5분자로 구성된 이소프레노이드 (isoprenoid) 법칙에 의해서 이들 3분자가 축합반응을 하여 합성된 탄소 15개로 구성된 천연화합물이다. 일반적으로 모노테펜 (C10)과 디테펜 (C20)은 세포내의 색소체 (plastids)에서 생합성 되지만, 세스퀴테펜은 세포질 (cytosol)과 소포체 (endoplasmic reticulum)에서 생합성 된다. 이들은 수목생장 중 병원균의 침입이나 외부상처에 대한 저항성을 향상시켜 주는 역할을 담당한다.

카달렌은 그림 9 에서 보듯이, farnesyl diphosphate 로부터 여러 단계의 화학반응, 즉 고리화 반응 (cyclization)과 여러 단계의 전위반응 (rearrangement)을 거쳐서 cadalane 이 형성되고, cadinene 형태를 거쳐서 방향족 구조를 이룬 카달렌 기본 골격이 완성되는 것으로 알려져 있다. 카달렌과 유사한 구조를 가진 세스퀴테펜은 여러 종류 식물의 수피나 잎에서 이미 발견된 바 있으며, 본 실험에서 사용한 느티나무에서는 카달렌의 기본 골격의 3번 탄소와 7번 탄소에 각각 메톡실기와 하이드록실기가 치환된 7-hydroxy-3-methoxycaldalene (이하 **카달렌**으로 명명)의 구조를 하고 있었다(그림 10).

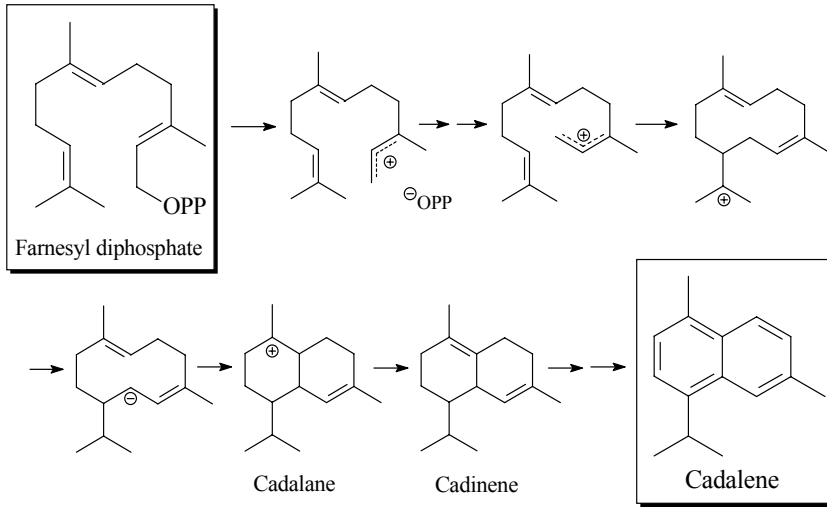


그림 9. Sesquiterpene의 전구물질인 farnesyl diphosphate로부터 카달렌의 생합성 과정

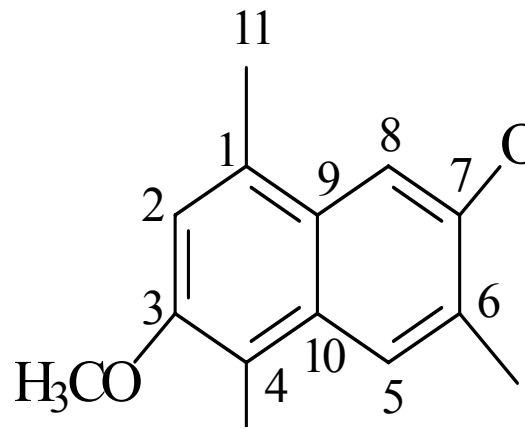


그림 10. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene
(카달렌)의 화학구조식

나. 카달렌 분리 및 구조동정

카달렌은 느티나무 에탄올 추출액으로부터 획득한 헥산분획을 실리카 겔 칼럼크로마토그래피에 의해서 분리 하였다. 용출용매로는 헥산과 에틸아세테이트를 다양한 비율로 혼합하여 사용하였으며, 카달렌은 두 용매의 9 : 1 (v/v) 비율에서 용출되기 시작하였다. 각 분획은 TLC를 이용하여 카달렌의 용출을 확인하였으며, 순수한 상태의 카달렌 분획을 얻기 위하여 카달렌이 확인된 분획만 모아서 다시 실리카 겔 칼럼크로마토그래피를 위와 동일하게 실시하였다. 분리한 카달렌의 수율은 대략 느티나무 1kg 당 2.9g 이었다.

분리한 카달렌의 분자량은 EI-MS 분석으로 측정하였는데, 분자량이 244 (m/z, base peak)로 측정되었다(그림 11). 그림 12에 분리한 카달렌의 HPLC chromatogram을 제시하였다. HPLC chromatogram 의 앞부분에 나타난 피크는 카달렌 분리에 사용한 용매(에틸아세테이트)피크이며, retention time 약 26분에 느티나무로부터 분리한 순수한 상태의 카달렌 피크가 나타났다. HPLC chromatogram으로 조사한 카달렌의 순도는 95 % 이상인 것으로 나타났다.

그림 13과 14에는 분리한 카달렌의 ^1H -, ^{13}C -NMR 스펙트럼과 mass spectrum을 나타내었다. 분리한 카달렌의 ^{13}C -NMR스펙트럼의 chemical shifts는 표 4와 같다. 위에서 언급했듯이, 카달렌은 다른 세스퀴테펜들과는 달리 aromatic hydrocarbon 구조를 이루고 있으므로 C1부터 C10까지의 탄소 피크는 100 - 155 ppm 영역에서 나타났다. 반면 C11부터 C15는 카달렌의 측쇄구조를 이루는 hydrocarbon으로서 30 ppm이하에서 발견되었으며, 메톡실기는 전형적으로 57 ppm에서 피크를 나타내었다.

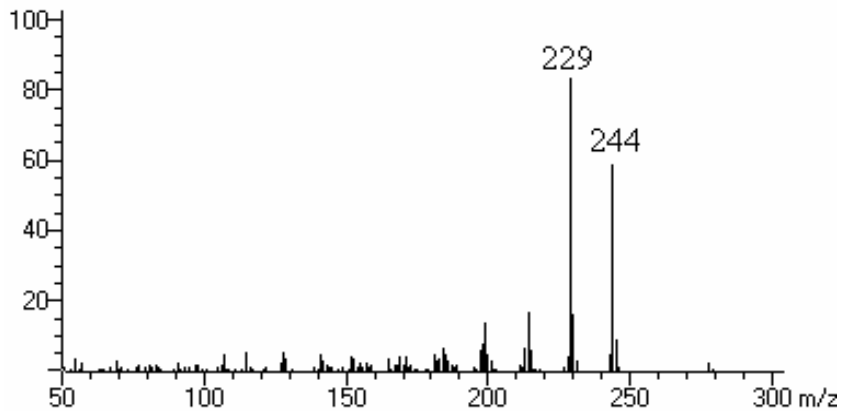


그림 11. EI-MS에 의한 카달렌의 분자량 측정

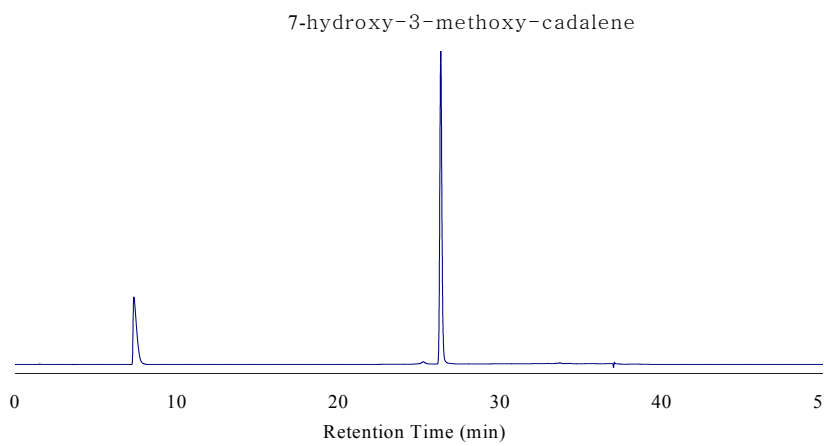


그림 12. 카달렌의 HPLC 분석 크로마토그램

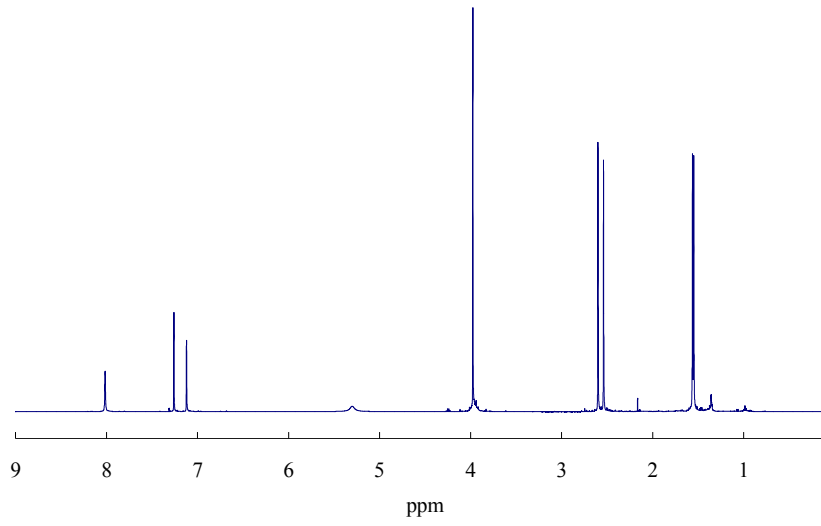


그림 13. 카달렌의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼

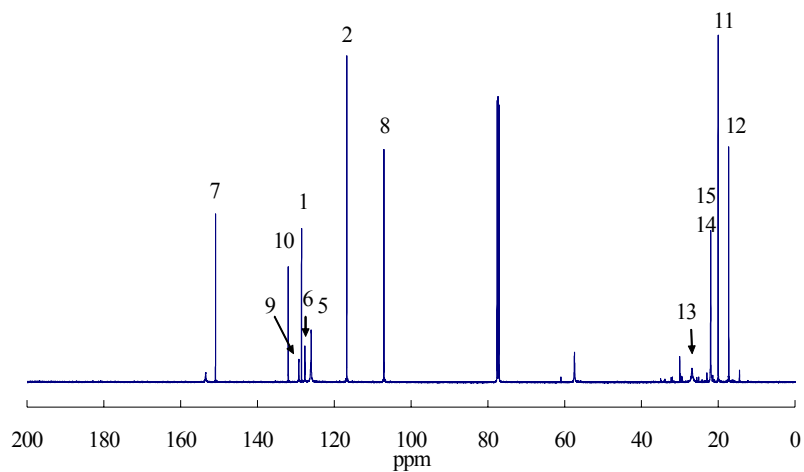


그림 14. 카달렌의 ^{13}C -NMR 스펙트럼

표 4. ^{13}C -NMR 에 의한 카달렌 구성 탄소원자들의 chemical shifts

Carbon No.	Chemical shift (ppm)	Carbon No.	Chemical shift (ppm)
C1	131.6	C9	128.8
C2	116.4	C10	131.6
C3	153.1	C11	19.7
C4	125.7	C12	16.9
C5	125.7	C13	21.6
C6	127.5	C14	26.4
C7	150.7	C15	26.4
C8	106.7	OMe	57.0

다. 느티나무 연륜별 카달렌의 분포

본 연구에서는 느티나무의 생장과정 중 카달렌 합성시기와 조직 내 카달렌의 분포에 관한 분석을 실시하였다. 실험을 위하여 2령급과 3령급 느티나무 단편을 각 연륜별로 분리하여 에탄올 추출을 실시하였으며, 에탄올 조추출액 내의 카달렌 함량은 HPLC를 이용하여 정량적 분석을 실시하였다.

그림 15에는 각 연륜별 에탄올 추출물 hexan 분획의 HPLC 크로마토그램을 중첩시켜 함께 나타내었다. 그림에서 보듯이, 카달렌 피크는 느티나무 내 심재부에서만 발견되었고, 변재부에서는 전혀 검출되지 않았다. 그림내의 (*) 표시한 피크는 190 nm부터 400 nm범위에서 카달렌과 매우 유사한 자외선 흡광스펙트럼을 나타내는데 이 결과로 미루어 볼 때 이들은 카달렌과 매우 유사한 구조를 지닌 이성질체라고 예측된다.

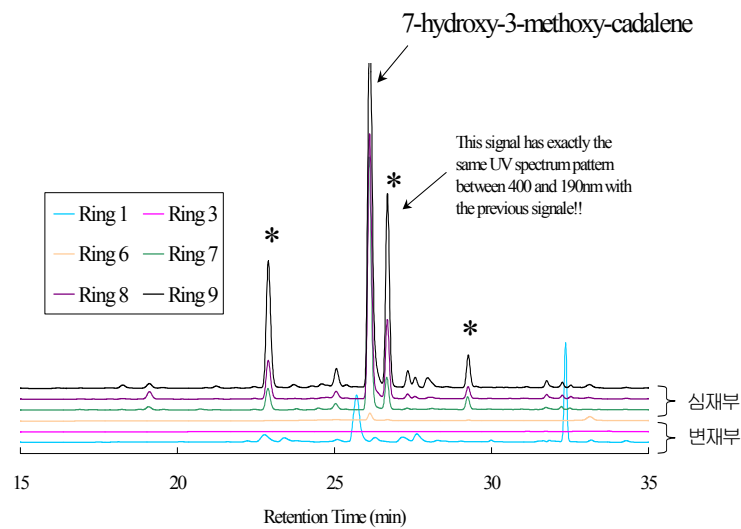


그림 15. 느티나무 연륜별 hexan 분획물의 HPLC 크로마토그램

느티나무의 에탄올 추출물 함량을 연륜별 분석 결과 2령급 느티나무의 경우 연륜 분포와 상관없이 대체로 변재부에서 약간 높게 나타났다 (그림 16). 카달렌은 변재부에서 심재부 (ring 7~9)로 전이되면서 발견되기 시작하였으며, 심재부에는 연륜에 관계없이 대체로 고르게 분포하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 수피와 잎의 에탄올 추출물에서는 카달렌은 전혀 발견되지 않았다.

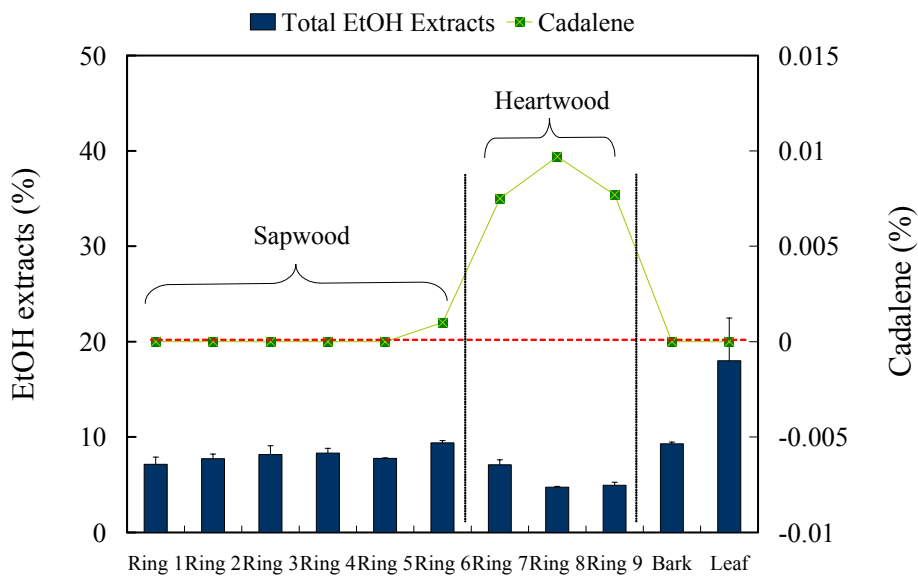


그림 16. 2령급 느티나무의 연륜별 에탄올 추출물과 카달렌의 함량 변화

3등급 느티나무의 경우에는 육안적으로 심재와 변재사이에 미백색의 전이 부분이 존재하였다. 카달렌은 2등급 느티나무와 마찬가지로 3등급 느티나무에서도 심재부에서만 발견되었으며, 수(pith)에 가까워질수록 그 함량은 완만하게 감소하는 경향을 보였다(그림 17).

카달렌은 심재와 변재사이에 존재하는 전이부분(ring 6, 7, 8)의 유세포 조직(ray parenchyma cell)에서 실질적으로 생합성되어 심재부로 이동할 것으로 예측되었지만, 분석결과 이 부분에서는 카달렌이 전혀 발견되지 않았다. 에탄올 추출액의 함량은 전이부분에서 심재와 변재부보다 상대적으로 높은 것으로 나타났다.

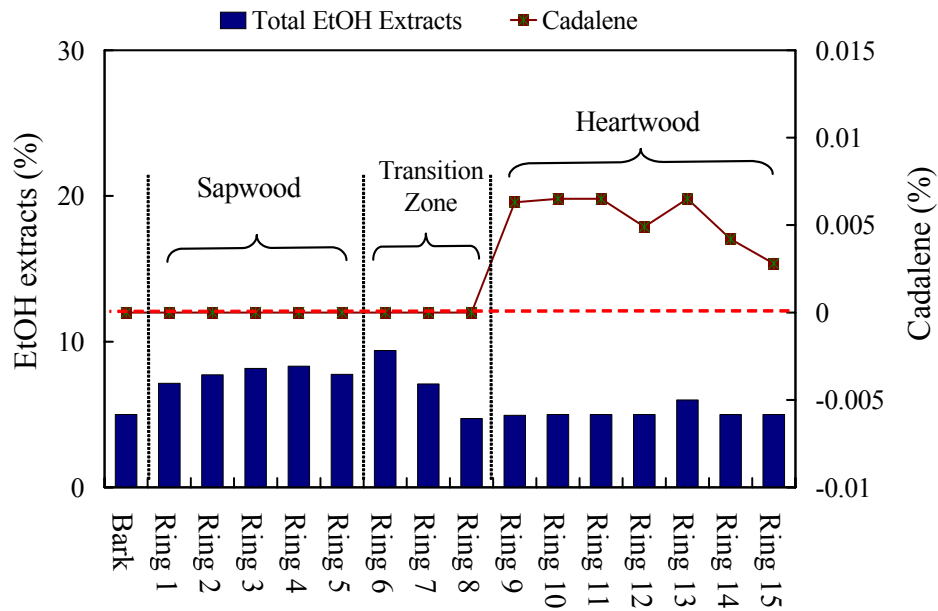


그림 17. 3등급 느티나무의 연륜별 에탄올 추출물과 카달렌의 함량 변화

결론적으로, 느티나무는 생리적인 성장 과정이나 또는 외부적인 영향에 의해서 심재부를 형성하기 시작하면 카달렌은 심재와 변재사이의 경계부에서 생합성되어 수(pith)부분으로 이동하는 전형적인 심재형성물질이라고 예측된다. 그림 15의 HPLC 분석 크로마토그램에서 보듯이, 느티나무 심재부에는 카달렌 이외에 다양한 천연물질이 존재하고 있으며, 이들은 양적으로 비록 소량 존재하지만 느티나무 심재부를 형성하는 주요 물질들로 예측된다. 이러한 성분들의 UV 스펙트럼 분석에 의하면 이들은 카달렌 생합성 과정에서 파생된 카달렌 동족체(그림 18)들로 예측된다.

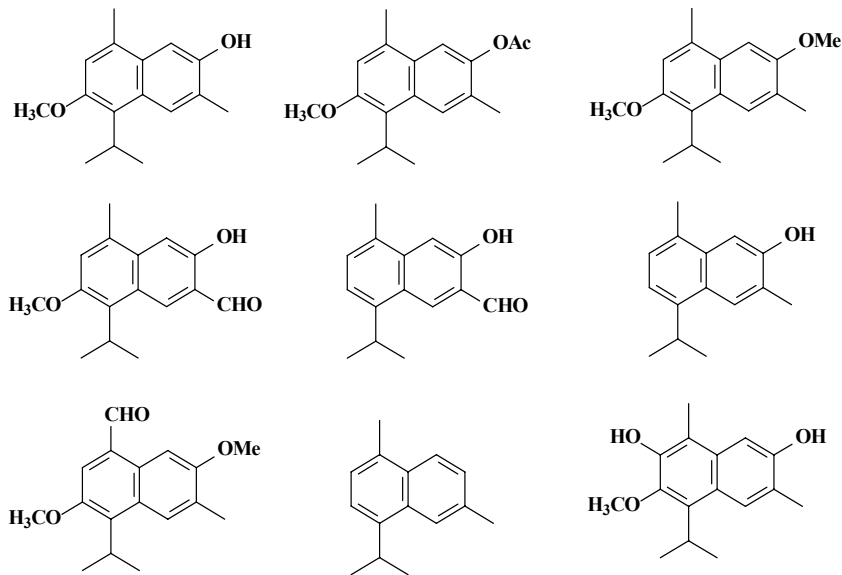


그림 18. 느릅나무과 수중에서 발견되는 주요 카달렌 동족체 구조

라. 느티나무 에탄올 조추출액의 항균활성 검정

느티나무로부터 활성물질을 분리하는 과정에서 우선 에탄올 조추출물의 항균활성을 검정하였다. 즉 9종의 공시균주에 대한 조추출물의 균사생장억제율을 조사하여 항진균활성을 검정한 결과 후사리움 가지마름병균인 *F. subglutinans* f. sp. *pini* 와 백색부후균인 *T. versicolor*를 제외한 공시균주에 대하여 50 %이상의 균사생장억제율을 나타내어 항진균활성이 우수한 것으로 나타났다 (그림 19). 특히 밤나무 동고병균인 *C. parasitica*와 목재 표면오염균인 *T. viride*에 대해서는 80 %이상의 억제율을 나타내었다.

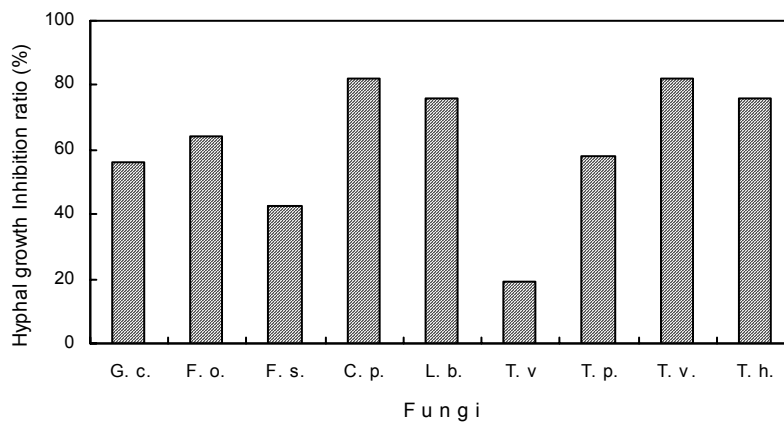


그림 19. 느티나무 에탄올 조추출물의 항진균 활성

G. c. : *Glomerella cingulata*, *F. o.* : *Fusarium oxysporium*, *F. s.* : *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, *C. p.* : *Cryphonectria parasitica*, *L. b.* : *Libertella betulina*, *T. v.* : *Trametes versicolor*, *T. p.* : *Tyromyces palustris*, *T. v.* : *Trichoderma viride*, *T. h.* : *Trichoderma harzianum*

또한, 한천배지확산법을 이용하여 항세균활성을 검정한 결과해서도 황색포도상구균인 *S. aureus* subsp. *aureus* KCTC 1621를 비롯한 공시균주 7종에 대하여 공히 생육저지환을 보임으로써 항세균활성이 높은 것으로 나타났다. 특히, 황색포도상구균에 대해서는 생육저지환의 직경이 15 mm로 가장 크게 나타나 황색포도상구균에 대한 항세균활성이 매우 우수한 것으로 판명되었다 (그림 20).

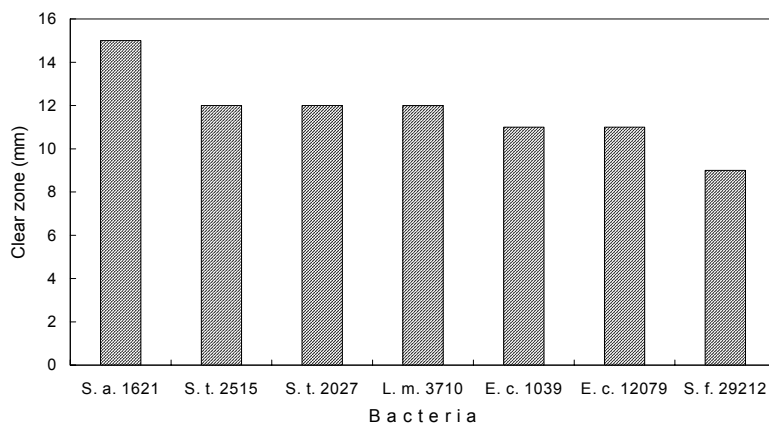


그림 20. 느티나무 에탄올 추출물의 항세균 활성

S. a. 1621 : *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCTC 1621, *S. t.* 2515 : *Samonella typhimurium* KCTC 2515, *S. t.* 12027 : *Samonella typhimurium* ATCC 12027, *L. m.* 3710 : *Listeria monocytogenes* KCTC 3710, *E. c.* 1039 : *Escherichia coli* KCTC 1039, *E. c.* 12079 : *E. coli* 05157 NCTC 12079, *S. f.* 29212 : *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, *P. a.* 27853 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

마. 느티나무 에탄올 조추출물의 항산화활성

본 연구에서는 느티나무 조추출물의 항산화활성을 천연항산화제인 α -tocopherol과 합성항산화제인 butylated hydroxyanisol (BHA)과 비교·검토하였다. 즉, 느티나무 에탄올 조추출물의 프리라디칼 소거에 의한 항산화활성을 검토하기 위하여 DPPH를 이용하여 각각 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 α -tocopherol, BHA 및 조추출물의 프리라디칼 소거능을 비교, 측정된 결과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 α -tocopherol, BHA, 조추출물 모두 90 %이상의 프리라디칼 소거능을 나타내었는데 (그림 21), 이는 시료의 농도가 너무 높아 DPPH에 의한 라디칼 소거능의 차이가 나타나지 않는 것으로 생각되었다. 이와 같은 가능성을 확인하기 위해 DPPH법의 최적 농도를 조사한 결과, 시료의 농도를 10~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하였을 때 각 처리별 유의성이 명확히 나타나, 시료를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 조제하여 검정하였다. 그 결과, 조추출물의 소거능이 44.3 %, BHA가 38.4 %, α -tocopherol이 46.4 %로 조추출물의 항산화활성은 천연항산화제인 α -tocopherol 및 합성항산화제인 BHA와 동등한 것으로 판명되었다.

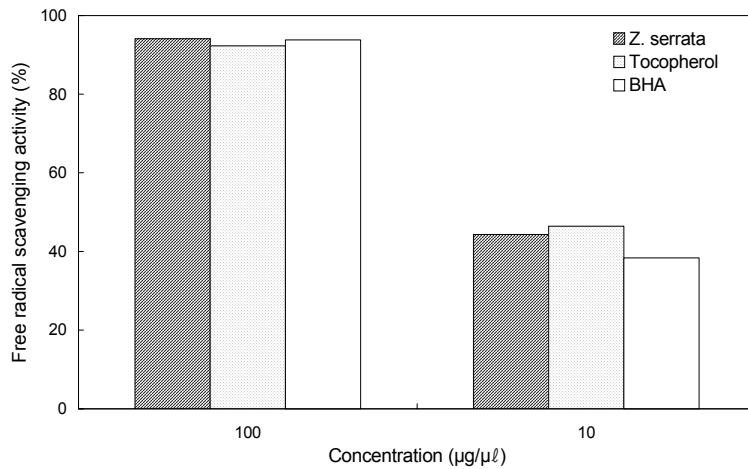


그림 21. 느티나무 에탄올 조추출물의 프리라디칼 소거능에 의한 항산화활성

바. 카달렌의 생리활성 검증

1) Superoxide radical과 Hydroxy radical 소거활성 측정

산소호흡과정에서 부산물로 발생하는 유해 활성산소종(ROS: reactive oxygen species)이 생체 고분자의 산화를 통하여 노화 및 암발생 등 만성질환의 원인된다는 사실은 널리 알려진 사실이다. 느티나무 심재부 에탄올 조추출물이 항산화 활성을 나타낸다는 기존의 실험결과를 근거로 카달렌이 이러한 활성을 나타내는 주요 성분인지를 판단하기 위하여 느티나무에서 단리한 순수한 카달렌의 항산화 활성을 두 가지 방법 (superoxide radical과 hydroxy radical)을 통하여 검증하였다.

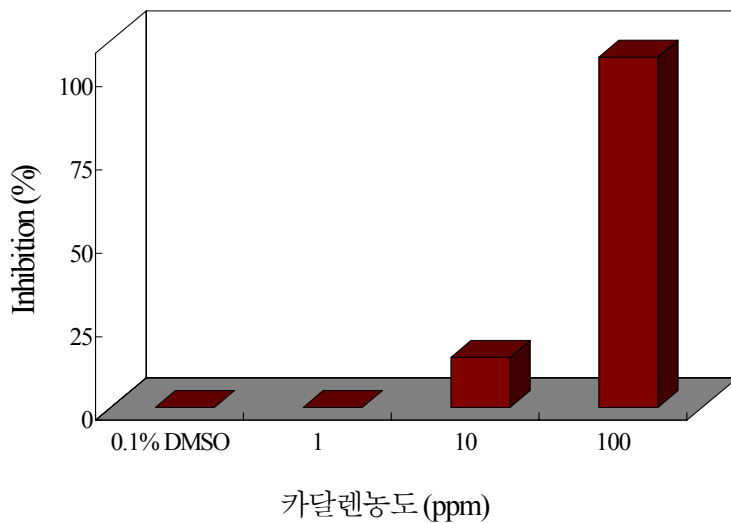


그림 22. 카달렌 농도별 hydroxy radical의 소거능 측정

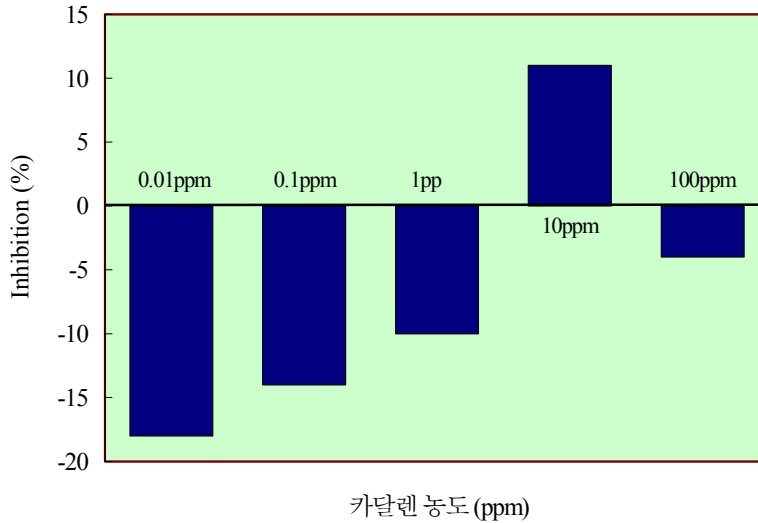


그림 23. 카달렌 농도별 superoxide radical의 소거능 측정

카달렌에 대한 hydroxy radical 소거능은 1 ppm에서 100 ppm까지 카달렌 농도를 달리하면서 측정하였다(그림 22). 실험 결과 카달렌의 라디칼 소거능은 농도에 매우 의존적인 것으로 판명되었으며, 100 ppm에서는 hydroxy 라디칼은 거의 100 % 이상 제거되는 것으로 보아 카달렌은 hydroxy 라디칼 소거활성이 매우 우수한 것으로 예측되었다. 반면, 그림 23에서 제시한 것처럼 카달렌은 superoxide 라디칼의 소거활성에는 거의 효과가 없는 것으로 보이나, 특이하게 카달렌 10 ppm 농도에서만 10 % 가량의 superoxide 소거능을 보여주었다.

2) 세포독성 및 멜라닌 미백효과 측정

카달렌의 세포독성은 사람 각질형성 세포주 (HaCaT cell)을 사용하여 MTT assay법으로 측정하였으며 (그림 24), 멜라닌 미백효과는 카달렌의 tyrosinase 효소 저해활성을 측정하여 판단하였다 (그림 25). 카달렌의 항주름 효과는 피부에 탄력성을 부여하는 elastase 효소에 대한 카달렌의 저해능을 측정하여 판단하였다.

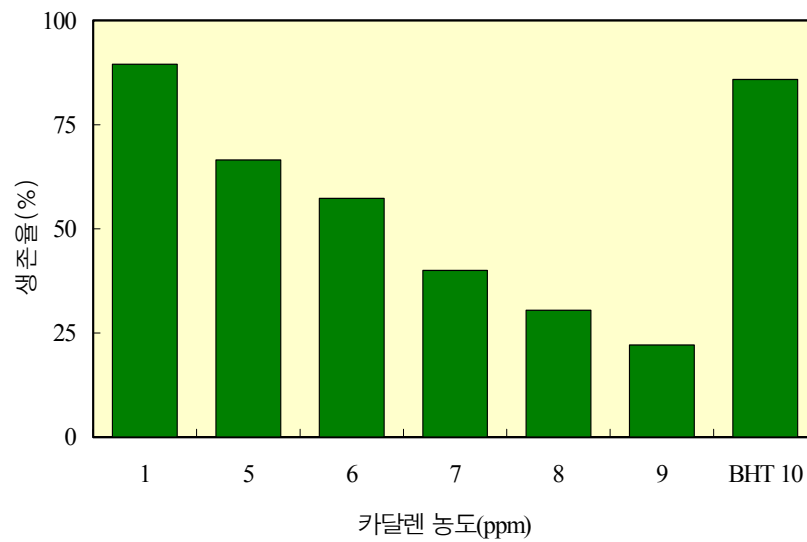


그림 24. 카달렌 농도별 세포독성 측정

MTT assay는 세포의 미토콘드리아에 있는 succinate dehydrogenase 가 MTT를 환원시켜 formazan이라는 크리스탈을 형성하는 반응으로서, 이를 정량화함으로써 세포독성 및 세포생존율을 판단할 수 있다. 본 실험에서는 카탈렌 농도를 1 ppm에서 10 ppm까지 달리하여 사람 각질세포에 투여한 후에 형성된 크리스탈의 양을 UV (540 nm)로 측정하여 카탈렌의 세포독성 여부를 합성항산화제인 BHT를 투여 하였을 경우와 비교하여 판단하였다.

카탈렌 농도 1 ppm에서는 세포 생존율이 약 90 % 가량으로 세포 독성은 거의 나타나지 않았지만 농도가 높아질수록 세포 생존율에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 실험 결과 카탈렌은 다소 낮은 농도인 6 - 7 ppm 정도에서 IC₅₀ 값이 측정되어 비교 물질인 BHT에 비해 세포 생존율에 영향이 있는 것으로 평가된다.

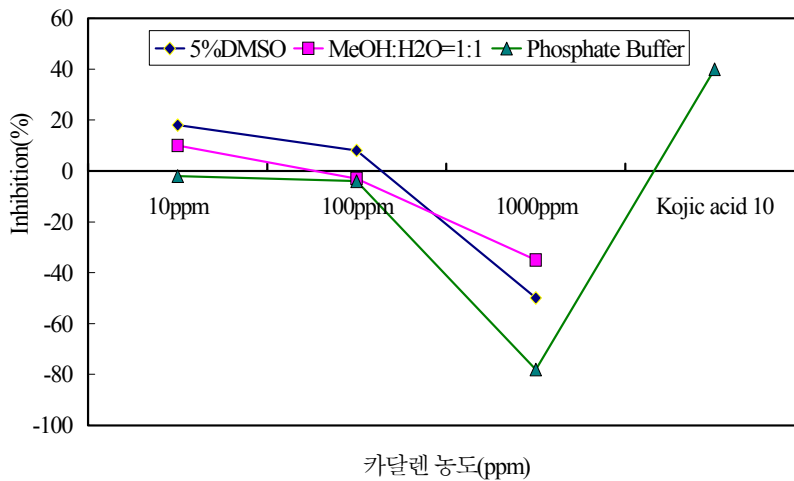


그림 25. 카탈렌의 tyrosinase 효소 저해활성을 측정

카달렌의 멜라닌 미백효과는 여러 종류의 용매 (DMSO, 50 % 메탄올 수용 용매와 phosphate buffer)를 사용하여 측정하였으며, 양성대조구인 kojic acid 10 ppm과 비교하였다. 실험 결과 카달렌의 미백효과는 용매 종류에 따라 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. DMSO와 50 % 메탄올을 용매로 사용하였을 경우 카달렌 농도 10 ppm에서는 어느 정도의 미백효과를 나타내는 것으로 나타났으나 카달렌 농도가 높아질수록 미백효과는 용매에 관계없이 현저하게 낮아지는 것으로 판명되었다.

카달렌에 의한 A549 세포의 글루코오스 대사 억제 실험은 세포내 시간별로 글루코오스 양과 그리고 배지 내 글루코오스 양을 측정함으로써 그 대사량을 측정할 수가 있다. 일반적으로 암세포는 정상세포에 비해서 그 분화속도가 빠르다 이는 그만큼 많은 양의 에너지가 필요하다는 말이 된다. 즉 생체 내 주요 에너지원의 하나인 글루코오스 양을 측정하면 그 대사량을 유추할 수가 있다.

다양한 시간조건별로 세포내 글루코오스 양을 측정결과 카달렌을 처리한 시험군이 처리하지 않은 대조군 대비 글루코오스-형광 발현도가 낮았다. 또한 배지 내 글루코오스 함유량 측정결과 카달렌 처리 시험군이 처리하지 않은 대조군 대비 농도가 높았다. 이를 종합해 보면 카달렌은 A549 세포에게 있어서 글루코오스 대사를 억제함으로써 암 세포에 대한 에너지를 차단하여 암세포의 증식을 억제한다는 것을 유추할 수가 있다. (그림 26, 27, 28, 29).

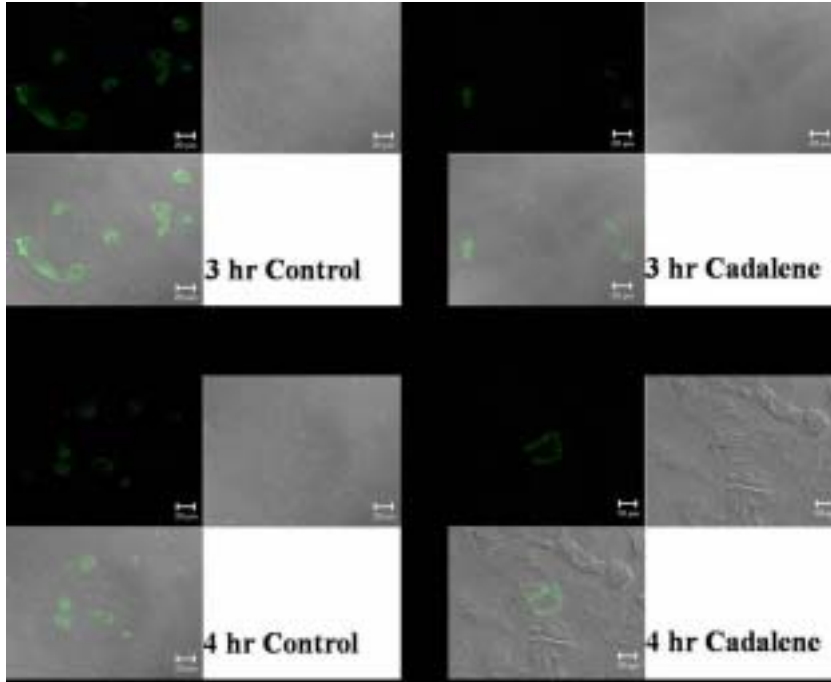


그림 26. 카달렌에 의한 세포내 글루코오스 대사 억제 scale bar = 20 μ m

A549세포 배지에 FITC가 label된 글루코오스를 가한 후 시간별로 형광 염료의 uptake를 경시적으로 관찰한 그림 [각 시간별로 왼쪽 위는 형광, 오른쪽 위는 differential interference contrast (DIC) image로 세포의 일반적 형태를 잘 나타냄, 왼쪽 아래는 형광과 DIC image를 겹쳐 놓은 그림으로 형광과 세포의 형태를 동시에 관찰하는 장점이 있음]

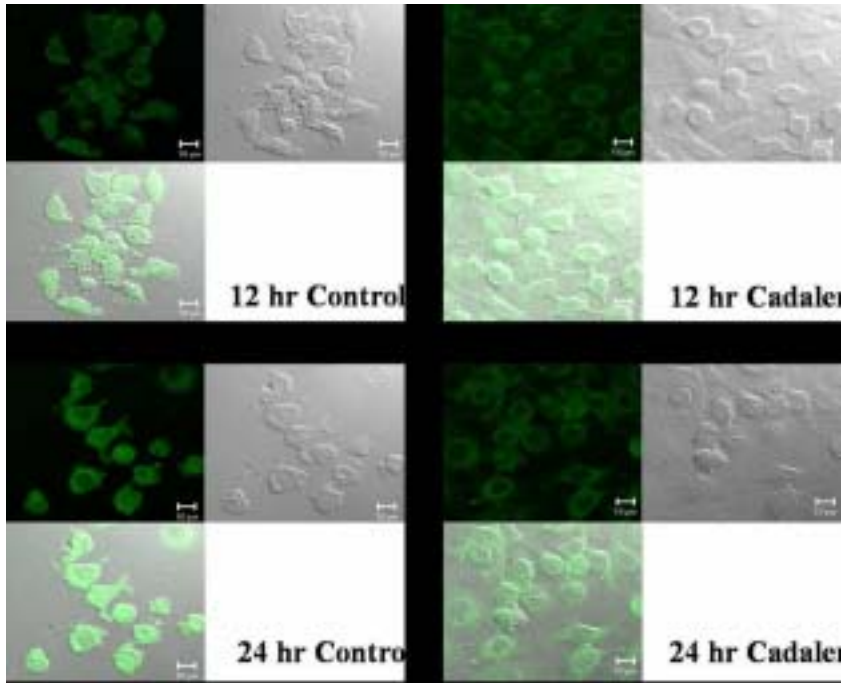


그림 27. 카달렌에 의한 세포내 글루코오스 대사 억제 scale bar = 20 μ m

A549세포 배지에 FITC가 label된 글루코오스를 가한 후 시간별로 형광 염료의 uptake를 경시적으로 관찰한 그림 [각 시간별로 왼쪽 위는 형광, 오른쪽 위는 differential interference contrast (DIC) image로 세포의 일반적 형태를 잘 나타냄, 왼쪽 아래는 형광과 DIC image를 겹쳐 놓은 그림으로 형광과 세포의 형태를 동시에 관찰하는 장점이 있음]

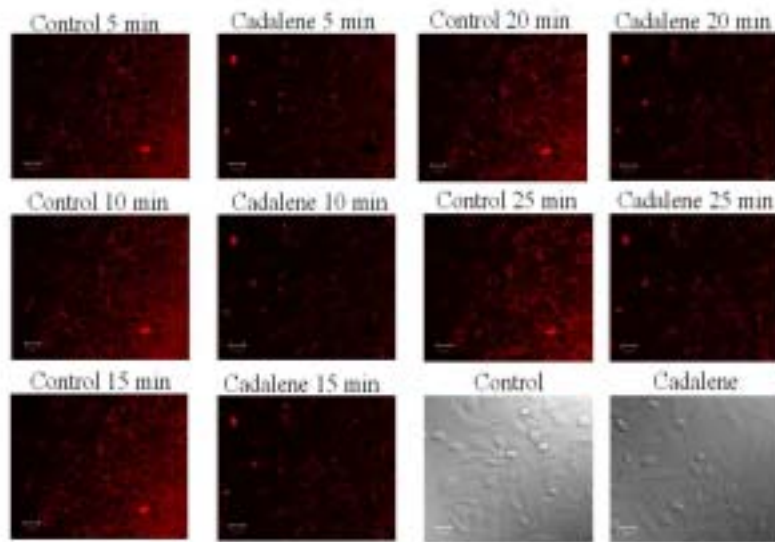


그림 28. 카달렌에 의한 세포내 글루코오스 대사 억제 scale bar = 20 μ m

A549세포 배지에 RITC가 label 된 글루코오스를 가한 후 시간별로 형광 염료의 uptake를 경시적으로 관찰한 그림 [각 시간별로 왼쪽과 오른쪽 컬럼의 비교를 나타낸 것. 맨 마지막 오른쪽 밑 하단에는 참고로 대조군과 카달렌 처리군의 세포모양을 비교한 것으로 암세포의 모양은 커다란 변화가 없으나 그 숫자가 눈에 띄게 감소한 것을 나타낸 differential interference contrast (DIC) image]

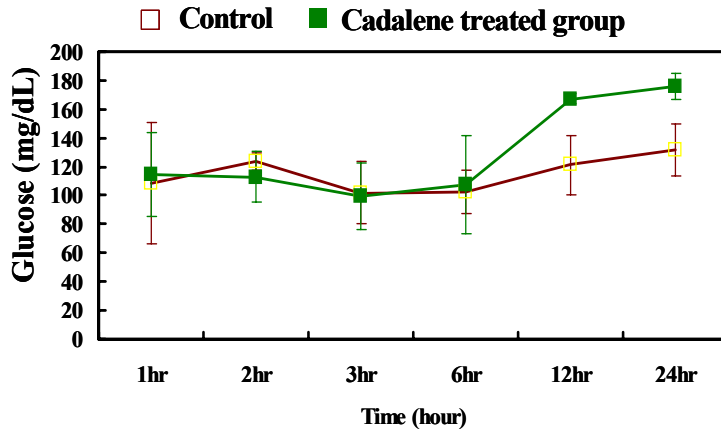


그림 29. 카달렌 처리 후 배지 내 글루코오스 농도

글루코오스 uptake 실험에 언급하였듯이 A549 세포에 카달렌을 처리한 후 시간별로 배지에 남아있는 글루코오스의 양을 분석한 결과로 녹색은 카달렌 처리군을 나타냄. 상기 그림에서 보듯이 카달렌 처리군의 배지에 더 많은 글루코오스가 남아있는 것으로 미루어 카달렌이 암세포 성장에 필수적인 에너지원인 글루코오스의 섭취를 억제한다는 사실을 확인할 수 있음.

사. 느티나무 심재부에서 단리한 카달렌 동족체 구조동정

느티나무의 에탄올 조추출액을 헥산으로 분획한 물질의 HPLC chromatogram은 그림 30에 제시하였다. 크로마토그램 상에는 카달렌 이외에 8종의 피크가 발견되었는데, 이들 각 피크들의 UV 스펙트럼은 카달렌과 매우 유사하여 이들 물질들은 카달렌 생합성과정에서 카달렌으로부터 유도되어진 것으로 사료되었다. 이는 느티나무 심재부에 카달렌 이외에도 여러 종류의 카달렌 동족체가 존재하고 있음을 암시하고 있다.

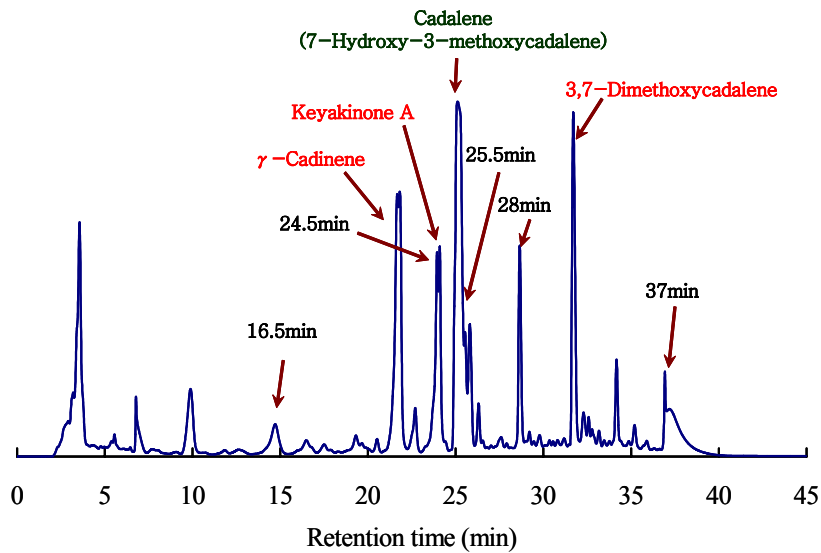


그림 30. 느티나무 헥산 추출액의 HPLC 분석 크로마토그램

각각의 피크에 해당하는 물질에 대하여 prep용 HPLC로 각 분획을 획득하여 EI-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등 기기분석을 시도하여 구조 동정을 실시하였으며 그 결과는 아래에 자세히 제시하였다. 본 연구에서는 느티나무 심재부에서 3종의 물질을 분리 하는데 성공하였고, 그림 31에서 보듯이 단리한 물질들은 모두 카달렌과 유사한 구조를 지니고 있었다.

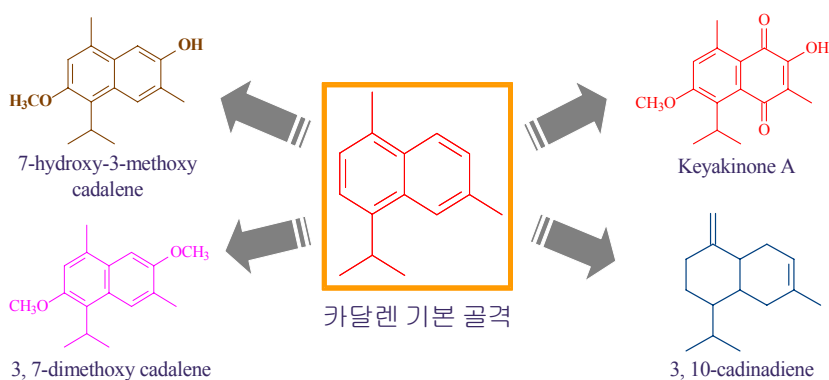


그림 31. 느티나무에서 단리한 주요 카달렌 동족체 구조

1) 화합물 3,7-Dimethoxycadalene 구조

3,7-Dimethoxycadalene은 HPLC 크로마토그램상에서 약 31.9 min에서 용출되었으며, 이 물질을 EI-MS spectrometry로 분석한 결과 분자량은 258, 분자식은 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 로 나타났다. silica gel TLC plate에서 3,7-dimethoxycadalene의 Rf 값은 hexane-EtOAc (9 : 1, v/v)에서 약 0.7로 나타났으며, 분취용 TLC (20 × 20 cm, Silica gel) 분리의 용매조건은 hexane-EtOAc (8 : 2, v/v)

로 하였다. 화합물 3,7-dimethoxycadalene의 결정은 무색으로 투명한 빛을 띠며, 이 물질에 대한 HPLC chromatogram, UV spectrum, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 과 EI-MS spectrum은 그림 33에, 화학 구조식은 그림 32와 같다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum (500 MHz, CDCl_3 , Methanol- d_4) : δ 1.42 (3H, s, CH_3), 1.44 (3H, s, CH_3), 2.36 (3H, d, 0.1Hz, H-12), 2.62 (3H, d, 0.1Hz, H-11), 3.88 (3H, s, OCH_3), 3.94 (3H, s, OCH_3), 7.10 (1H, s, H-8), 7.16 (1H, s, H-5), 7.88 (1H, s, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (125 MHz, CDCl_3 , Methanol- d_4) : δ 17.34 (s, CH_3), 19.93 (s, CH_3), 21.97 (m, C-14, 15), 24.20 (s, C-13), 55.55 (s, C-16), 57.20 (s, C-17), 102.75 (s, C-8), 116.74 (s, C-2), 129.16 (s, C-9), 156.03 (s, C-3).

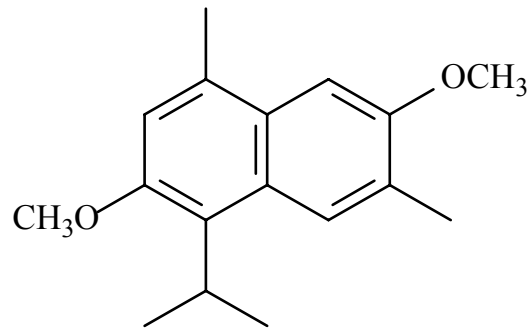


그림 32. 3,7-Dimethoxycadalene의 구조

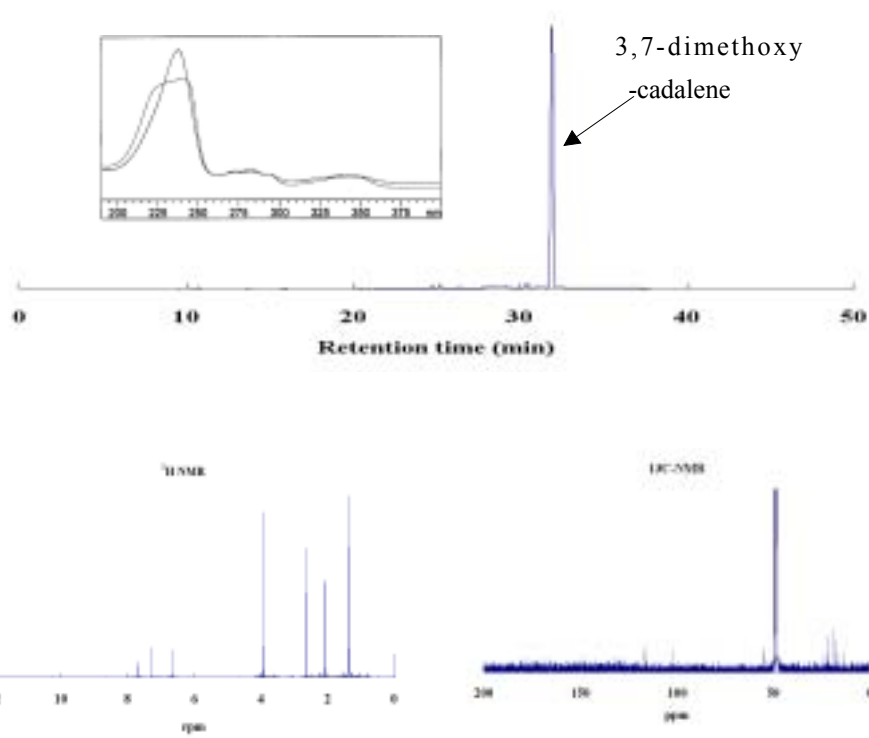


그림 33. 3,7-Dimethoxycadalene에 대한 HPLC 분석 크로마토그램, ^1H -, ^{13}C - NMR 스펙트럼 과 EI-MS 스펙트럼

2) 화합물 7-Hydroxycadalene-5,8-quinone 구조

HPLC spectrum상의 24.7 min 대에서 검출된 물질로서 진한 오렌지색 빛을 띠며 고운 결정을 지니고 특이한 향을 낸다. silica gel TLC plate에서 7-hydroxycadalene-5,8-quinone의 Rf 값은 hexane-propanol (8 : 1, v/v)에서 약 0.7로 나타났으며, 분취용 TLC (20 × 20 cm, Silica gel) 분리의 용매조건은 hexane-propanol (7 : 3, v/v)로 하였다. EI-MS로 분석한 결과 분자량은 274 (mp = 152 °C)이며 분자식은 C₁₆H₁₈O₄로 나타났다. Keyakinone A라고도 하며 7-hydroxycadalene-5,8-quinone의 구조를 지닌다. 이 물질에 대한 HPLC chromatogram, UV spectrum, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 과 EI-MS 스펙트럼은 그림 35에, 화학 구조식은 그림 34와 같다.

¹H-NMR spectrum (500 MHz, ²H, Methanol-d₄) : ²H 1.38 (6H, t, 3.0Hz, H-14, 15), 2.02 (3H, d, 3.5Hz, CH₃), 2.61 (3H, s, CH₃), 3.93 (3H, s, OCH₃), 6.82 (1H, s, C-13), 7.88 (1H, d, 1.5Hz, C-2).

¹³C-NMR spectrum (125 MHz, ²H, Methanol-d₄) : ²H 15.76 (s, CH₃), 21.56 (s, C-14, 15), 23.90 (s, CH₃), 56.12 (s, OCH₃), 116.38 (s, CH₃), 140.16 (s, CH₃), 181.59 (s, C=O), 183.47 (s, C=O).

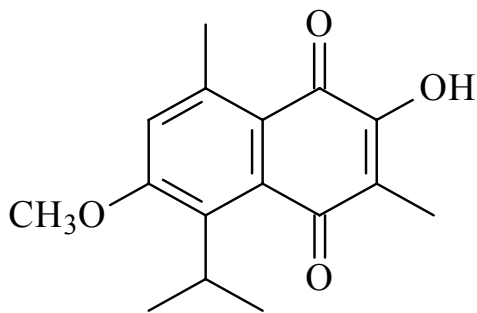


그림 34. 7-Hydroxycadalene-5,8-quinone 구조

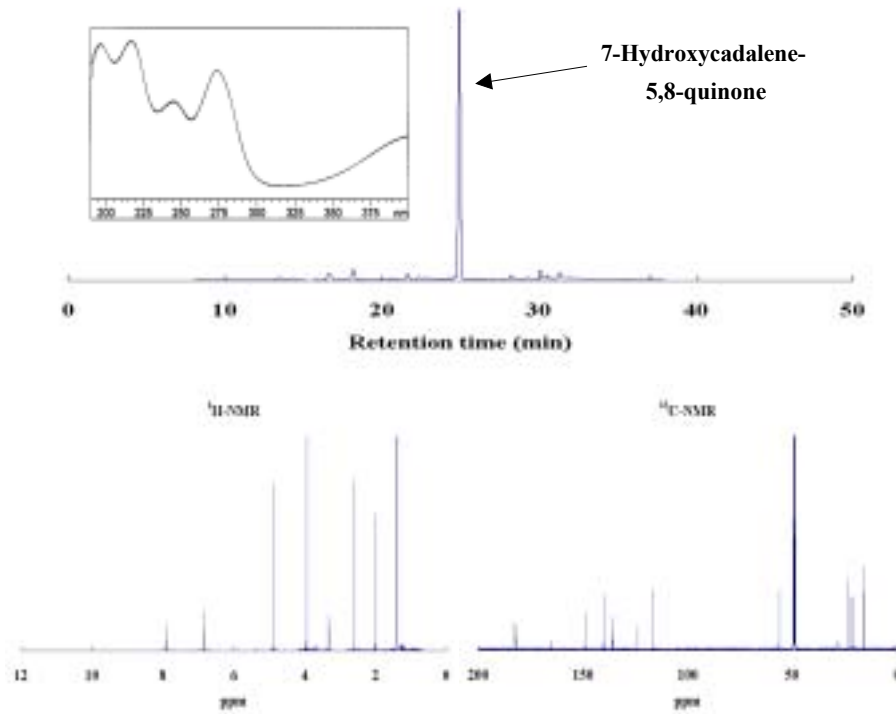


그림 35. 7-hydroxycadalene-5,8-quinone 화합물에 대한 HPLC 분석 크로마토그램, $^1\text{H-}$, $^{13}\text{C-}$ NMR 스펙트럼 과 EI-MS 스펙트럼

3) 화합물 3,10-Cadinadiene 구조

HPLC spectrum상에서 22.7 min 내에 검출된 물질로서 결정은 밝은 오렌지색을 띠고 있으며 용매에 용해된 상태에서는 노랑색을 띤다. silica gel TLC plate에서 3,10-cadinadiene의 가장 이상적인 Rf 값은 hexane-EtOAc (8 : 2, v/v)에서 나타났으며, 분취용 TLC (20 × 20 cm, Silica gel) 분리의 용매조건은 hexane-EtOAc (7 : 3, v/v)로 하였다. EI-MS로 분석한 결과 분자량은 204이며 분자식은 C₁₅H₂₄로 나타났다. Ψ_2 -Cadinene이라고도 하며 3,10-cadinadiene의 구조를 지닌다. 이 물질에 대한 HPLC chromatogram, UV spectrum, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 과 EI-MS 스펙트럼은 그림 37에, 화학 구조식은 그림 36과 같다.

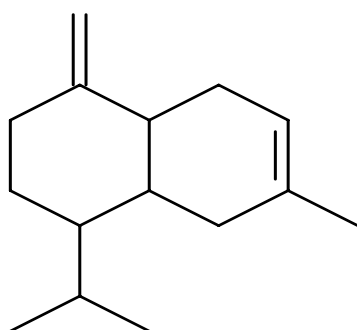


그림 36. 3,10-cadinadiene 구조

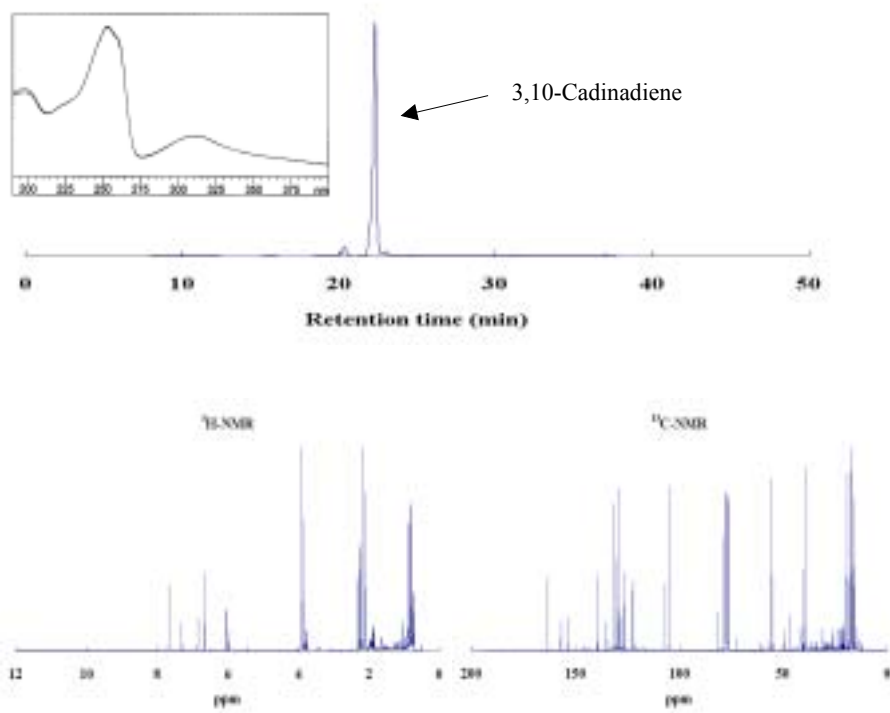


그림 37. 3,10-Cadinadiene 화합물에 대한 HPLC 분석 크로마토그램, ^1H - ^{13}C -NMR 스펙트럼 과 EI-MS 스펙트럼

4) 그 외 화합물

가) 화합물 A(RT 16.5 min)의 구조

이 물질의 결정은 흰색에 가까우며 용해상태일 경우에는 투명한 빛깔을 띤다. HPLC chromatogram 상에 나타난 피크의 모양은 아래에 나타낸 그림과 같이 뚜렷한 모양을 하고 있다. silica gel TLC plate에서 이 화합물의 R_f 값은 benzene-EtOAc (3 : 1, v/v)에서 약 0.7로 나타났으며, 분취용 TLC (20 × 20 cm, Silica gel) 분리의 용매조건은 benzene-EtOAc (7 : 3, v/v)로 하였다. 이 물질에 대한 HPLC chromatogram, UV spectrum, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR은 그림 38과 같다.

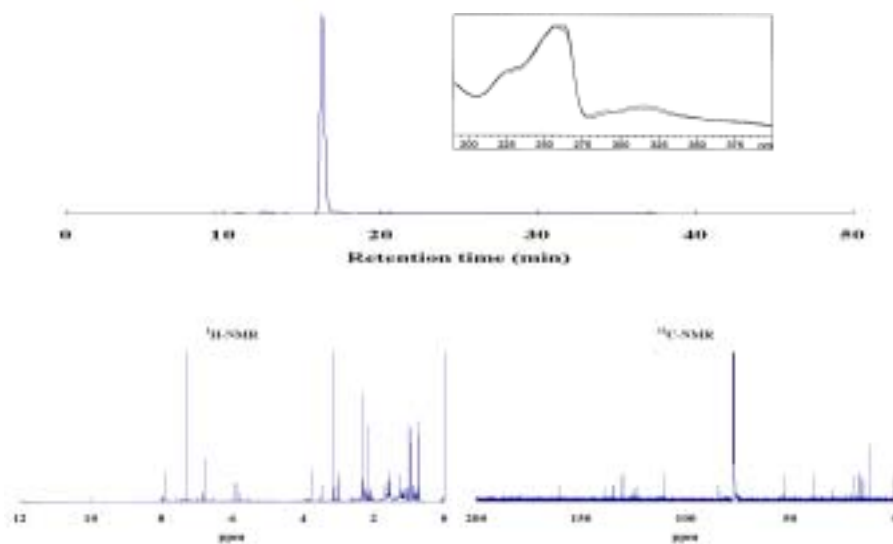


그림 38. 화합물 A (RT 16.5min)에 대한 HPLC 분석 크로마토그램, ¹H-, ¹³C-NMR 스펙트럼

나) 화합물 B (RT 25.5 min)의 구조

HPLC spectrum상에서 약 25 min 대에 카달렌과 같은 위치에서 검출되며 이 물질을 EI-MS로 분석한 결과 분자량은 244로 분자식이 $C_{17}H_{22}O_2$ 인 7-hydroxy-3-methoxycadalene (mp = 109 °C)과 매우 비슷하게 나타났으나 mp는 electrothermal meter (9200)로 측정한 결과 108 °C로 카달렌 보다 낮았다. 또한 피크도 카달렌의 스펙트럼의 모양과는 다른 양상을 나타냈으며 결정의 색과 향도 전혀 다른 특성을 지닌 물질로 밝혀졌다. silica gel TLC plate에서 이 화합물의 가장 이상적인 Rf 값은 hexane-EtOAc (9 : 1, v/v)에서 나타났으며, 분취용 TLC (20 × 20 cm, Silica gel) 분리의 용매조건은 hexane-EtOAc (8 : 2, v/v)로 하였다. 결정은 밝은 노랑색의 둥근 반점모양을 띤다. 이 물질에 대한 HPLC chromatogram, UV spectrum, 1H -NMR과 ^{13}C -NMR 과 EI-MS 스펙트럼은 그림 39와 같다.

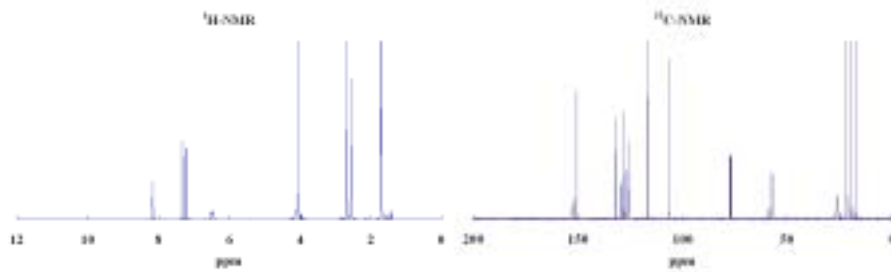
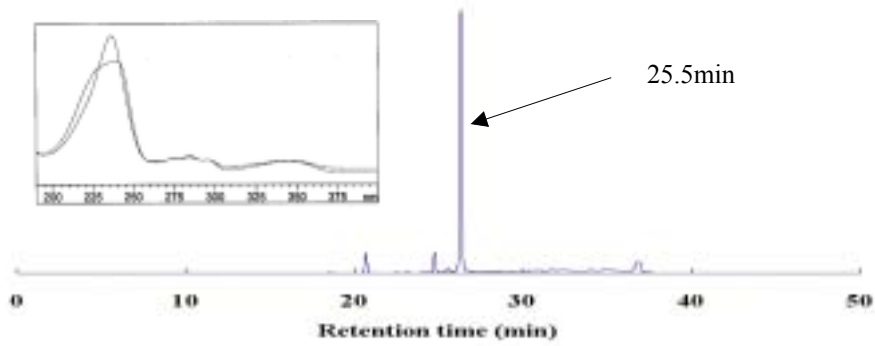


그림 39. 화합물 B (RT 25.5min)에 대한 HPLC 분석 크로마토그램, ^1H - ^{13}C -NMR 스펙트럼

다) 화합물 C (RT 37.0 min)의 구조

아래 그림 40에 나타난 바와 같이 HPLC 스펙트럼 상에서 37 min대에 매우 뚜렷하게 나타나는 이 물질은 극성이 낮으며 결정의 색은 진한 황색으로 나타났다. silica gel TLC plate에서 이 성분의 Rf 값은 hexane-EtOAc (100 : 5, v/v)의 조건에서 약 0.7로 나타났으며, 분취용 TLC(20 × 20 cm, Silica gel) 분리의 용매조건은 hexane-EtOAc (100 : 8, v/v)로 하였다.

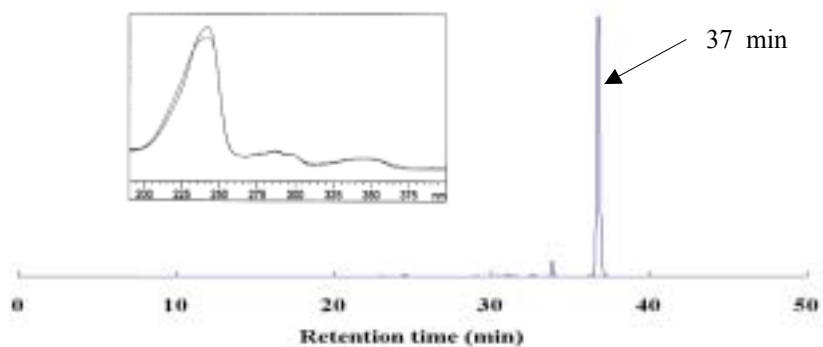


그림 40. 화합물 C (RT 37.0 min)에 대한 UV 스펙트럼과 HPLC 분석 크로마토그램

아. 느릅나무과 수종에서 카달렌 및 카달렌 동족체 분리

느티나무를 비롯한 느릅나무과 수종들은 카달렌과 이들의 동족체인 sesquiterpene 류와 리그난, 페놀물질 등 약리적인 효능이 높은 천연화합물질을 다량 함유하고 있는 것으로 알려져 있다 (B. O. Lindgren 1968, B. J. C. Overeem 1970, Fa-Ching Chen 1972).

느릅나무과 수종을 대상으로 한 카달렌 연구는 M. Fracheboud(1968)과 B. O. Lindgren(1968)등이 naphthalene 구조물질들에 대한 광범위한 연구를 수행하였다. Overeem과 Elgersma(1970)는 느릅나무과 수종에서 mansonone E와 mansonone F, 그리고 7-hydroxycadalene 등을 심재 추출물에서 분리하였으며, 이들 중에서 EtOAc 조추출물로부터 분리한 mansonone E와 mansonone F는 살균특성을 지닌다고 보고하였다.

H. Suzuki 등(1972)은 느릅나무과에 속하는 난티나무(*Ulmus laciniata* MAYR.) 심재의 *n*-hexane 추출물로부터 7-hydroxycadalene과 mansonone C와 E를 분리하였다. Nishikawa 등(1972)도 난티나무를 대상으로 심재와 변재간의 추출물 조성을 비교하여 변재와 심재물질들의 생합성에 관한 연구를 수행하였다. 이들은 변재추출물에서 7-hydroxycadalene, lacinilene A, scopoletin, vanillic acid 등을 분리하였다. 이들 중에서 7-hydroxycadalene과 lacinilene A는 심재부 hexane 추출액에서 발견되었으며, scopoletin, vanillic acid는 심재에서는 전혀 발견되지 않았다. 특히 mansonone C는 7-hydroxycadalene이 산화되어 합성되는 물질로서 심재에서만 나타난다고 하였다.

Krishnamoorthy(1971)에 의하면 7-hydroxycadalene은 *U. glabra*와 *U. rubra*라는 느릅나무과 수종에서 발견되며, 특히 mansonone C는 *U. glabra*의 심재에 다량으로 존재하며 7-hydroxycadalenal과 7-hydroxy-3-methoxycadalenal은 변재에서 발견된다고 하였다. Chen 등(1972)은 참느릅나무의 벤젠 추출물에서 7-hydroxycadalenal, 7-hydroxy-3-methoxycadalenal, mansonone C, sitosterol, mansonone G 등을 분리하는데 성공하였다.

본 장에서는 느티나무와 함께 느릅나무과에 속하는 느릅나무(*U. macrocarpa* Hance.) 참느릅나무(*U. parvifolia* Jacq.), 당느릅나무(*U. davidiana* Planch.)와 큰잎느릅나무(*U. macrophylla* Nak.)를 대상으로 심재부에 존재하는 naphthalene 계열의 물질이면서 생체 내에서 폐암세포분열 억제에 효과적인 물질인 카달렌의 유무에 연구의 초점을 맞추었다.

그림 41에 공시수종 심재부의 에탄올 추출액을 헥산으로 추출한 후에 HPLC로 분석한 크로마토그램들을 제시하였다. 그림의 상단부에는 느티나무 HPLC 크로마토그램이며, 아래로 느릅나무, 참느릅나무, 당느릅나무와 큰잎느릅나무 크로마토그램을 차례로 제시하였다. 그림에서 보듯, 카달렌은 단지 느티나무 추출액에서 약 25분대에 나타나며, 다른 수종들의 HPLC 분석 크로마토그램 상에서는 전혀 발견되지 않았다.

느릅나무과 수종들의 크로마토그램을 살펴보면 당느릅나무와 큰잎느릅나무가 매우 유사하다는 공통점을 발견할 수 있다. 그 외에 모든 수종에서 2개 물질에 대한 피크가 발견되었는데 이들 물질들도 카달렌과 같이 심재부분에서만 발견된 점으로 미루어 이들도 심재와 변재사이의 방사조직세포에서 생합성되어 심재부로 이동하는 심재형성물질로 추정된다. 이들 동족체 피크들은 prep-HPLC를 이용하여 각각 순수한 상태로 분리하여 EI-MS (JMS-600W, JOEL)로 분자량은 측정하였으나 매우 소량인 관계로 NMR 분석은 불가능하였다.

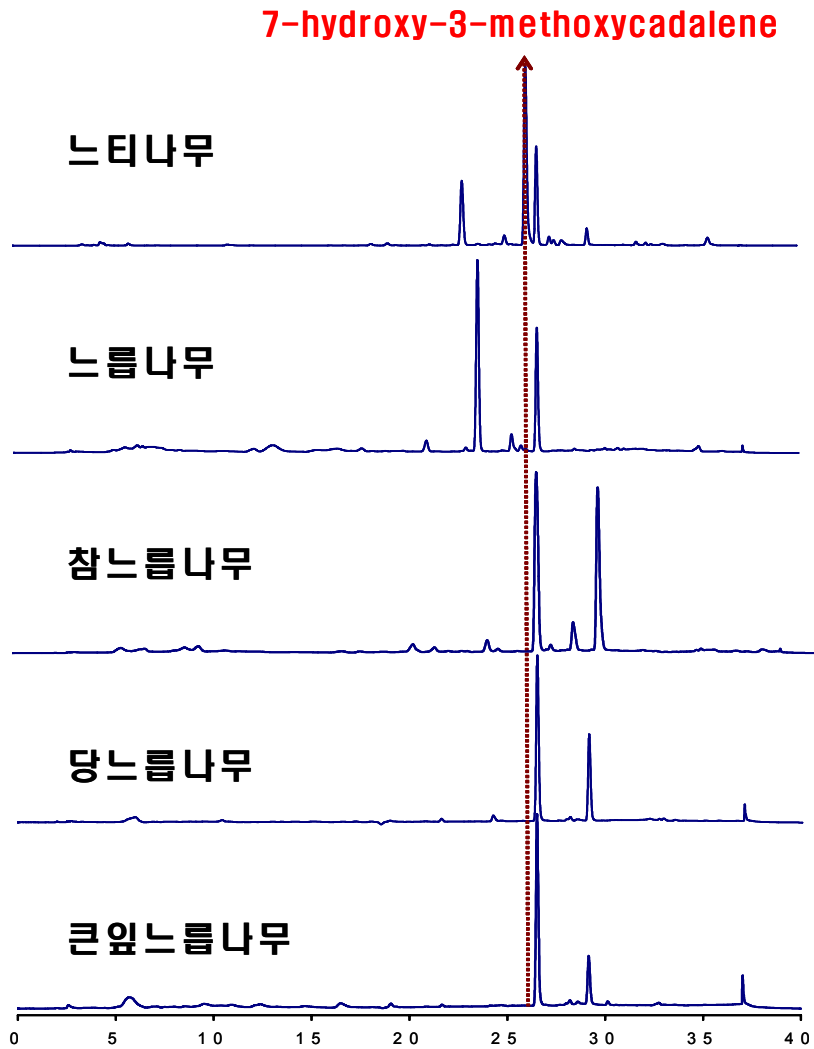


그림 41. 느릅나무과 수종에서 획득한 헥산 분획물의 HPLC 분석 크로마토그램

1) 느릅나무(*Ulmus davidiana* Planch.)

느릅나무 심재부 에탄올 추출액의 hexan 분획물에서는 두 개의 피크가 각각 24분과 26분대에서 발견되었다 (그림 41). 이들 피크들은 prep-HPLC를 이용하여 각각 순수한 상태로 분리한 후 EI-MS (JMS-600W, JOEL)로 분자량은 측정하였다 (그림 43). 26분대에 용출되는 피크의 분자량은 214 m/z 이었으며, 이는 카달렌의 3번 위치에 부착된 메톡실기가 존재하지 않을 경우와 일치하고 있다. 이러한 구조 (7-hydroxycadalene)는 당느릅나무와 큰잎느릅나무에서도 발견되었다. 카달렌이 생합성되는 과정 (그림 9)을 살펴보면 7-hydroxycadalene는 카달렌 생합성의 전구물질의 하나로 추정되어 수목 내에서 hydroxylase/O-methyl transferase의 작용에 의해서 카달렌의 생합성이 완성되는 것으로 추정된다 (그림 42).

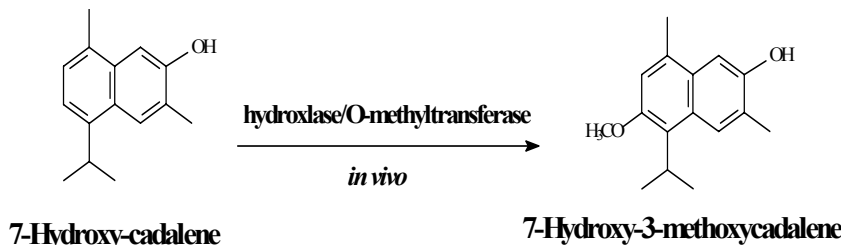


그림 42. 효소반응에 의한 7-hydroxycadalene에서 카달렌의 생합성

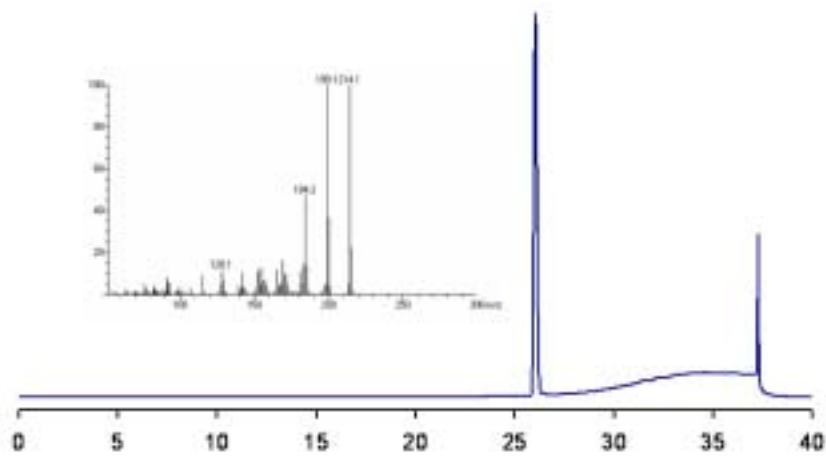


그림 43. 느릅나무 추출물에서 단리한 순수 화합물의 HPLC 분석 크로마토그램

2) 참느릅나무(*Ulmus parvifolia* Jacq.)

참느릅나무 심재부 에탄올 추출액의 hexan 분획물에는 두 개의 피크가 각각 26분과 29분대에서 발견되었다 (그림 41). 이들 피크들은 prep-HPLC를 이용하여 각각 순수한 상태로 분리한 후 EI-MS (JMS-600W, JOEL)로 분자량은 측정하였다. 26분대에 용출되는 피크의 분자량은 214 m/z 로 느릅나무에서 발견된 화합물과 동일한 것으로 추정된다. 29분 피크의 분자량은 574 m/z 로 측정되었는데, 이에 대한 정확한 구조는 아직 밝혀지지 않았다 (그림 44).

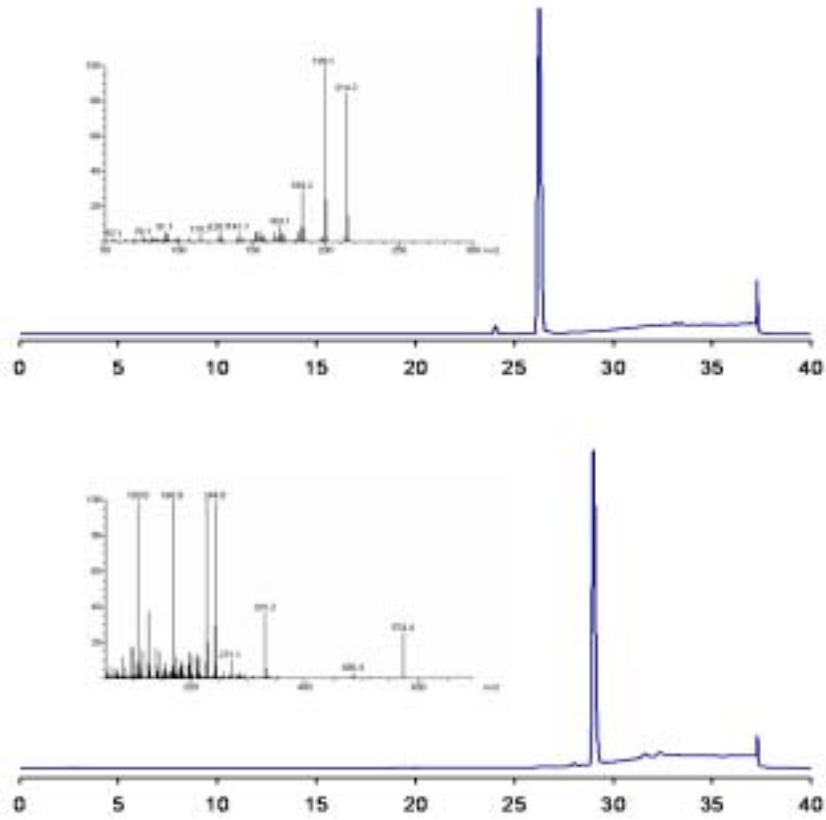


그림 44. 참느릅나무 추출물에서 단리한 순수 화합물의 HPLC 분석 크로마토그램

3) 당느릅나무(*Ulmus macrocarpa* Hance.)

당느릅나무 심재부 에탄올 추출액의 헥산 분획물에는 두 개의 피크가 각각 26분과 28분대에서 발견되었다 (그림 41). 이들 피크들은 prep-HPLC를 이

용하여 각각 순수한 상태로 분리한 후 EI-MS (JMS-600W, JOEL)로 분자량은 측정하였다. 26분대에 용출되는 피크의 분자량은 214 m/z 로 느릅나무와 참느릅나무에서 발견된 화합물과 동일한 것으로 추정된다. 29.5분 피크의 분자량은 218 m/z 로 측정되었는데, 이에 대한 정확한 구조는 아직 밝혀지지 않았다 (그림 45).

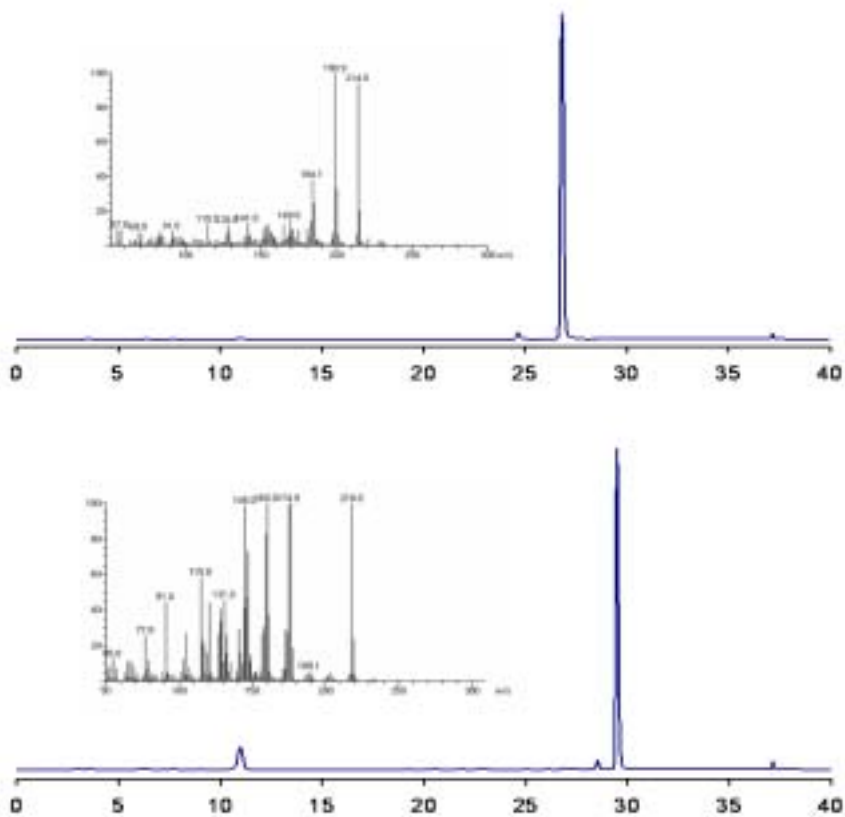


그림 45. 당느릅나무 추출물에서 분리한 순수 화합물의 HPLC 분석 크로마토그램

4) 큰잎느릅나무(*Ulmus macrophylla* Nak.)

큰잎느릅나무 심재부 에탄올 추출액의 헥산 분획물에는 두 개의 피크가 각각 26분과 28분대에서 발견되었다 (그림 41). 이들 피크들은 prep-HPLC를 이용하여 각각 순수한 상태로 분리한 후 EI-MS (JMS-600W, JOEL)로 분자량은 측정된 결과, 당느릅나무에서 발견된 화합물과 동일한 것으로 나타났다. 26분대에 용출되는 피크의 분자량은 214 m/z 로 모든 느릅나무과 수종에서 발견되었으며, 29분 피크의 분자량은 218 m/z 로 당느릅나무에서 발견된 것과 동일한 화합물이었으며, 이에 대한 정확한 구조는 아직 밝혀지지 않았다 (그림 46).

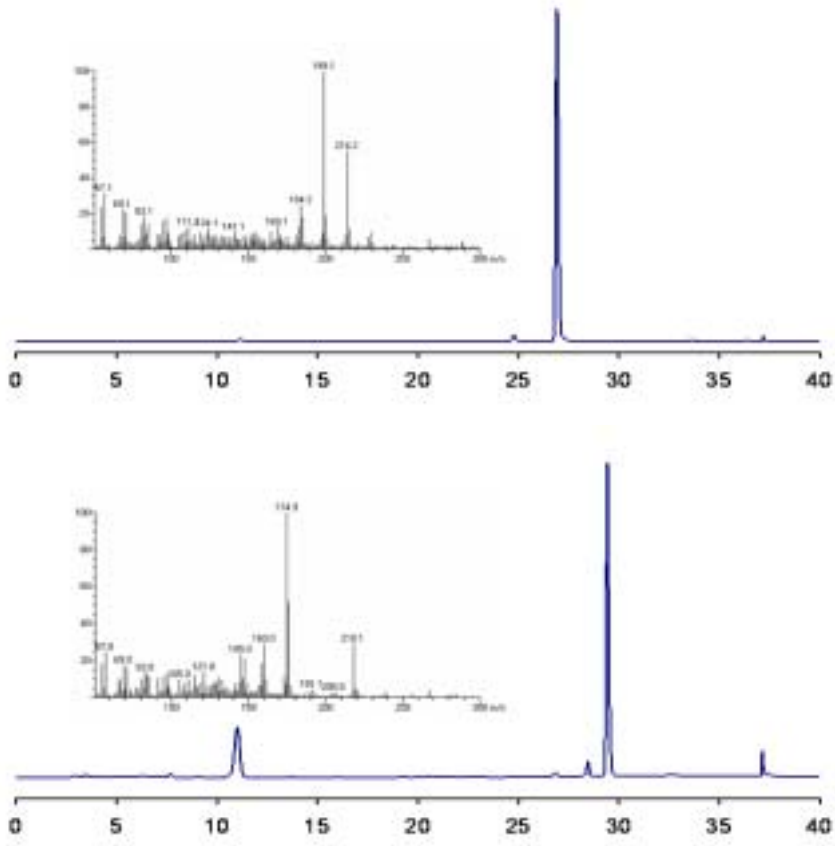


그림 46. 큰잎느릅나무 추출물에서 단리한 순수 화합물의 HPLC 분석 크로마토그램

자. 카달렌-글루코사이드의 유도체 합성 및 세포독성 측정

카달렌은 느티나무 심재부에서 추출한 천연물질로서 인간의 폐암세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내는 특징을 지니고 있다. 그러나 카달렌은 이러한 유용한 생리활성과 함께 세포독성을 띠고 있는 것으로 판명되었다. 아울러 카달렌은 화학 구조적으로 비극성을 띠므로 물에 대한 용해도가 극히 낮다. 이러한 카달렌의 화학적, 생물학적 특이성은 의약품이나 식품 첨가제로서의 활용도 면에서 상당한 취약점으로 지적되었다. 따라서 카달렌을 부가가치가 높은 의약품 등으로 활용을 위해서는 세포독성과 물에 대한 용해도를 높이는 연구의 수행이 필수적이다.

카달렌의 수용성을 증대시키기 위해서는 카달렌에 수용성 관능기를 부착시키는 방법을 들 수 있다. 카달렌은 화학구조적으로 7번 위치에 수산기가 존재하는데, 이 위치는 화학반응에 의해서 수용성 관능기를 부착시킬 수 있는 위치로 적절한 위치이다. 주요 수용성 관능기로는 -SH, Salt화, PEG와 글루코오스/셀로비오스 등을 들 수 있다.

본 실험에서는 위의 여러 수용성 관능기 중에서 글루코오스와 셀로비오스를 대상으로 카달렌 유도체화를 시도하여 카달렌의 7번 수산기에 글루코오스를 부착하여 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene를 합성하는데 성공하였으며, 그 수율은 약 45%에 이르렀다. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene에 대한 분석 데이터로서 HPLC 크로마토그램은 그림 48에, ¹H-NMR ¹³C-NMR 스펙트럼은 그림 49와 그림 50에 각각 제시하였다. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene의 화학구조식은 그림 47과 같으며, 분자량은 406 *m/z*으로 측정되었다. 카달렌에 글루코오스 분자 1개를 부착함으로써 물에 대한 용해도는 크게 증가하였다.

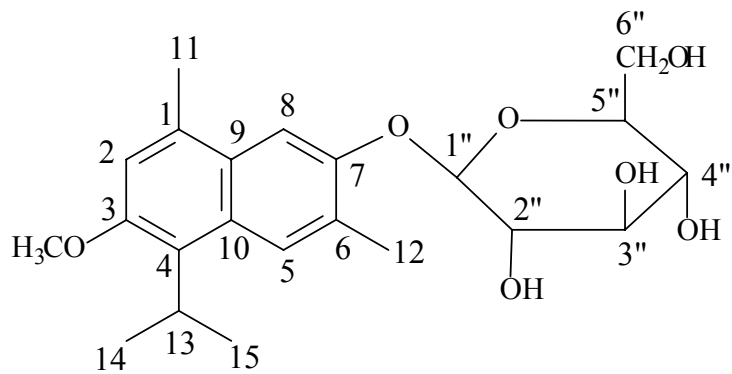


그림 47. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene 구조

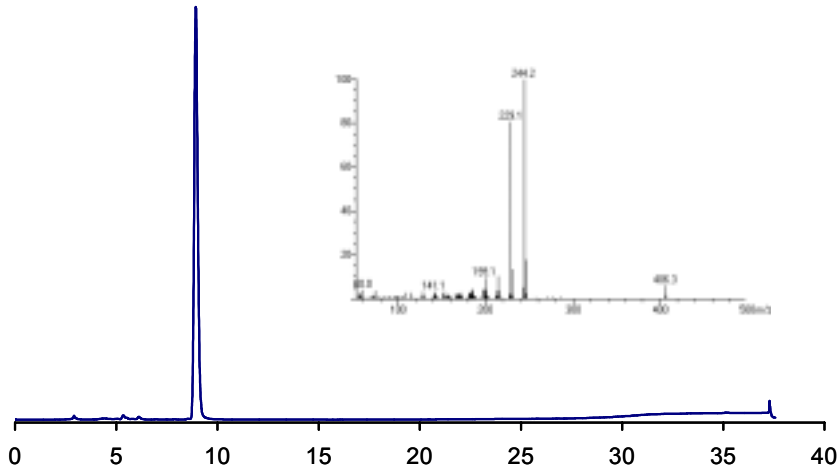


그림 48. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene의 HPLC 분석 크로마토그램과 EI-MS 스펙트럼

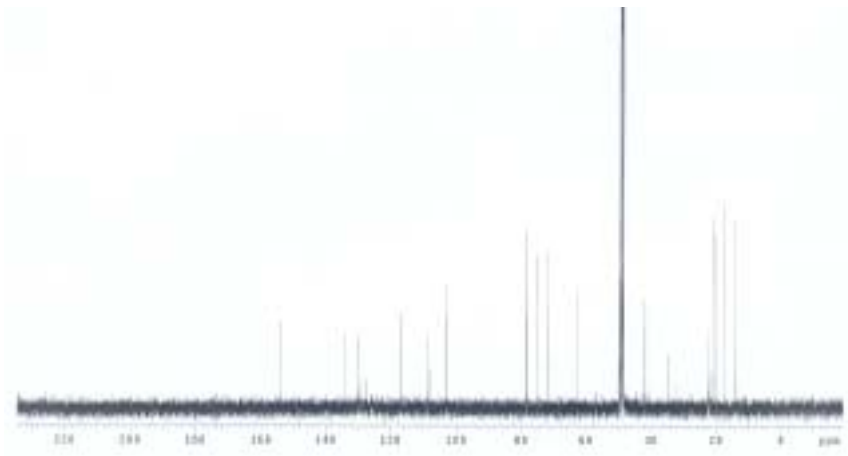


그림 49. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene의 ¹³C-NMR 스펙트럼

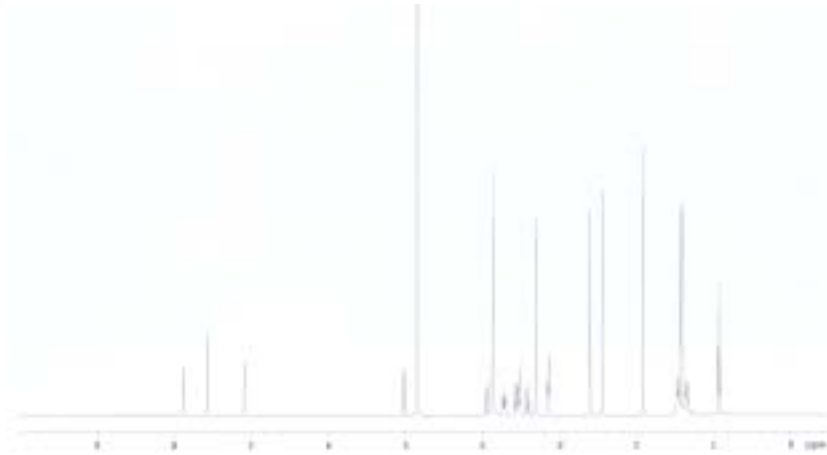


그림 50. 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene의 ¹H-NMR 스펙트럼

각 물질에 대한 세포독성은 물질의 반수치사율 (IC₅₀)을 측정함으로써 판단할 수 있다. 카달렌의 반수치사율은 사람 폐암 세포주에서 약 3.2 mM이었으나, 글루코오스 1분자를 부착한 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene의 반수치사율이 88.6 μM로 측정되어 세포독성은 유도체화에 의해서 약 20배 이상 낮아지는 것으로 측정되었다(그림 51).

폐암 세포주 대비 정상세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene을 대상으로 WI-38 cell line과 같은 normal lung cell line을 이용한 추가적인 실험결과 WI-38 cell에서 IC₅₀는 298.2 μM로 그 효능이 폐암세포인 A549에 비해 상대적으로 낮아짐이 관찰되어졌다 (그림 52).

이는 글루코오스 치환된 카달렌이 normal lung cell line인 WI-38 세포 보다 폐암세포인 A549 세포에 더 효과가 있음을 나타낸다. 이를 통해 글루코오

스 치환된 카달렌이 폐암세포 증식억제에 특이적인 효과를 나타 낼 수 있는 가능성을 제시 해주며 추가적인 실험을 통해 그 작용기전을 규명이 필요할 것으로 생각 된다.

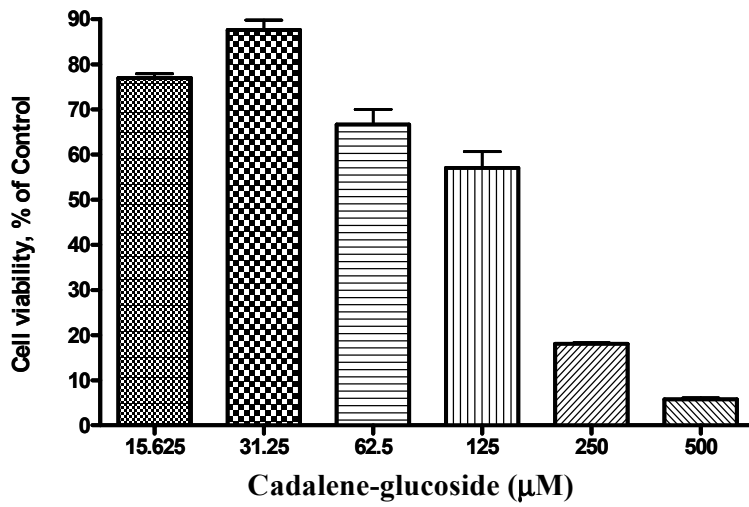


그림 51. 7-O- β -D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene의 세포독성 평가

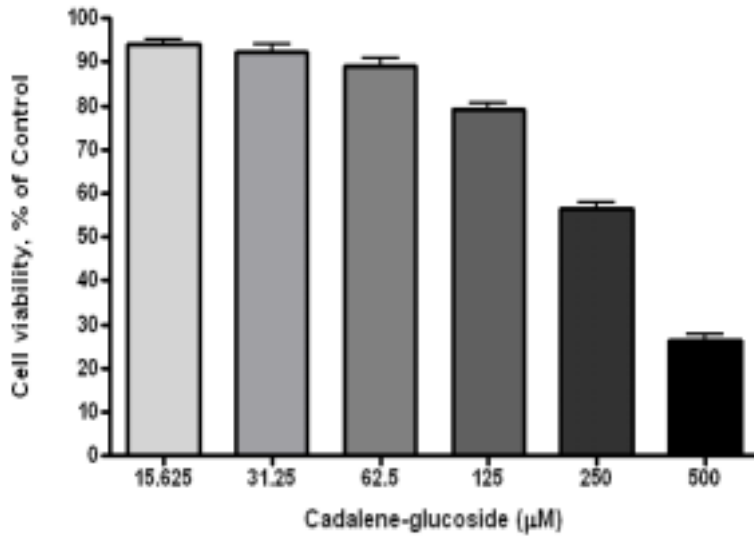


그림 52. Normal lung 세포인 WI-38 세포에서 7-O- β -D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene의 IC₅₀ 평가

2. 세포주기조절 억제에 의한 폐암예방 및 치료제 개발

가. 카달렌의 적용 용량 및 시간

세포독성 시험인 MTT assay 실시하여 A549 세포에 대한 IC₅₀ 산출한 결과 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 으로 결정되었다. 실제 실험에 사용된 용량은 IC₅₀의 1/10인 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 을 고농도로 선정하고, 공비를 2로 하여 저 농도와 중 농도를 결정하였고 노출시간은 24시간으로 결정하였다.

나. 세포주기 검정

카달렌에 의한 세포주기의 변화를 확인하기 위하여 flow cytometric analysis를 실시하였다. 세포주기에서 세포분열에 중요한 부분인 G1 phase와 G2/M phase가 농도 의존적으로 감소를 보였고, apoptotic phase라고도 불리는 subG1 phase는 농도 의존적으로 증가하였다 (그림 52의 위 오른쪽 그림). 이와 같은 결과에서 카달렌은 세포주기를 조절하여 폐암세포의 증식을 억제하고, 세포자살을 유도하여 폐암조직에서의 암세포를 효율적으로 제거할 수 있을 것으로 판단된다.

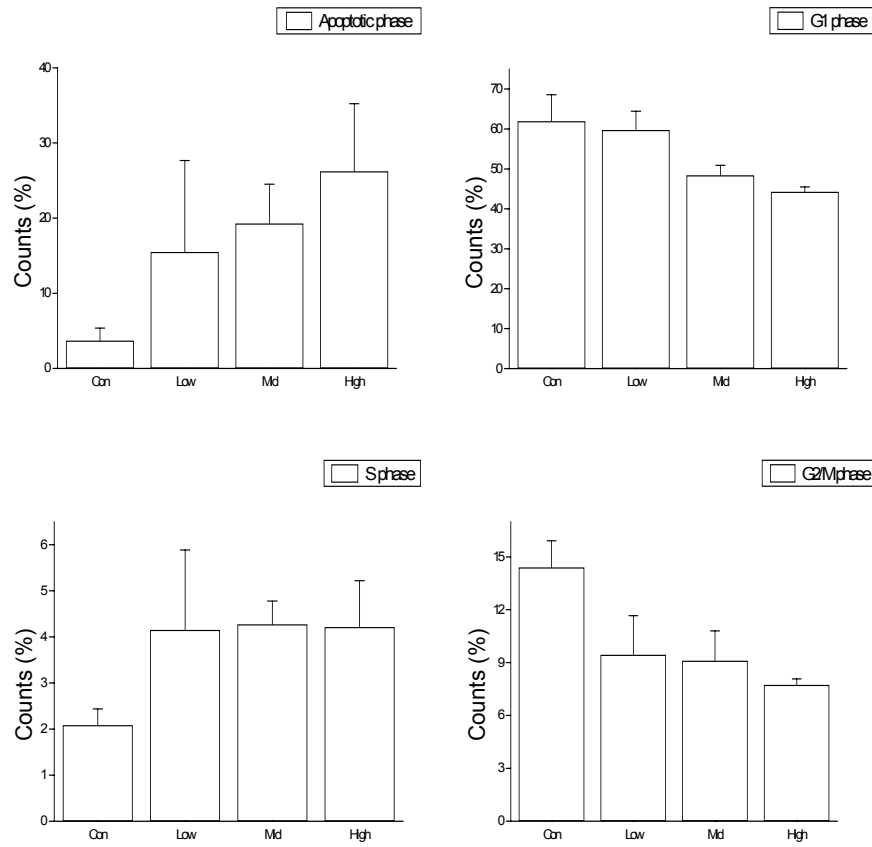


그림 53. 카달렌에 의한 세포주기 변화

Con, vehicle control ; Low, $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; Mid, $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$;
 High, $0.08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

실험방법에 적시한 바와 같이 용량을 결정한 뒤 카달렌에 대한 apoptosis 유발 유무를 flow cytometry로 연구한 바 카달렌의 폐암세포주에 대한 apoptosis 유발 능력이 농도 의존적으로 발생함을 알 수 있었다.

다. G1, G2/M checkpoint에 미치는 영향

Cell cycle에 관련된 전반적인 개요는 그림 54와 같다. 이중 G1, G2/M checkpoint에 관련된 단백질의 발현 수준을 확인하기 위하여 western blot을 실시하였다. 여러 checkpoint 중 직접적인 작용을 담당하는 cyclin A, B, D는 카달렌에 의해 효율적으로 감소하는 경향을 나타내었다 (그림 54). 이외에 또한 세포주기 조절에 심대한 영향을 미치는 것으로 밝혀진 다른 인자들 즉, p21, p27, GADD45 및 PCNA 역시 cyclin A, B, D와 유사한 경향으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 55). 이는 실질적으로 카달렌에 의해 세포의 분열이 효율적으로 억제되는 방향으로 조절된다는 사실을 제시하는 것이다.

Protein translation에 미치는 영향을 확인하기 위하여 관련 pathway에 작용하는 단백질들에 대한 western blot을 실시하였다. PI3K와 길항적으로 작용하는 PTEN을 제외한 전 cascade에서 카달렌에 의해 단백질 발현 수준이 감소하였다 (그림 56). 이와 같은 결과로 볼 때, 카달렌은 세포 증식에 필요한 단백질 합성을 억제함으로써 폐암세포의 증식을 감소시킬 수 있을 것이라고 생각되었다.

Schematic Representation of Cell Cycle Control

(modified from Pines, 1995).

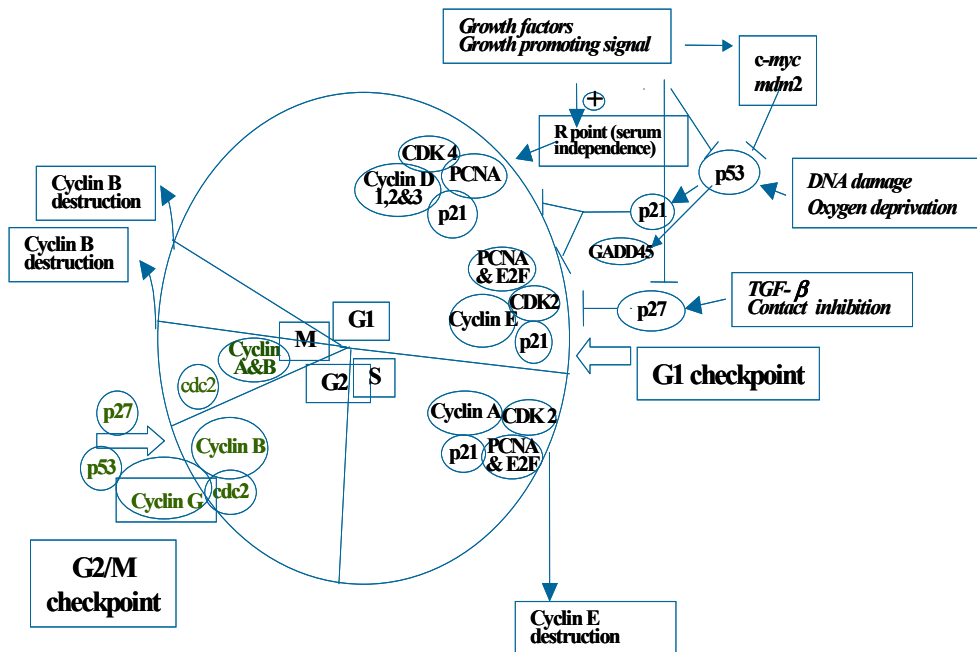


그림 54. Cell cycle의 주요 개요도

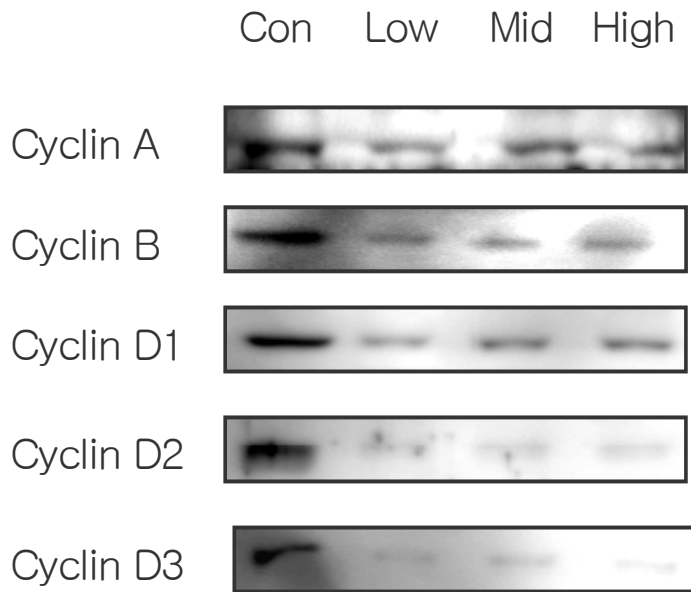


그림 55. 카달렌에 의한 cyclin A, B, D의 단백질 발현량 변화

실험방법에 명기한 시간별 농도별로 샘플을 채취한 후 western blot을 이용하여 각 단백질의 변화를 관찰한 그림.

Con, vehicle control ; Low, 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Mid, 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; High, 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

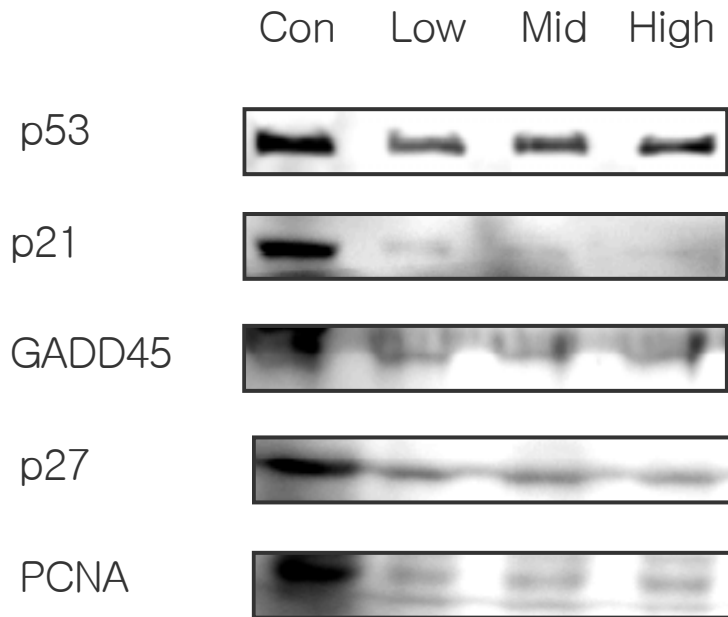


그림 56. 카달렌에 의한 p53, p21, GADD45, p27 및 PCNA의 단백질 발현량의 변화

실험방법에 명기한 시간별 농도별로 샘플을 채취한 후 western blot을 이용하여 각 단백질의 변화를 관찰한 그림.

Con, vehicle control ; Low, 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Mid, 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; High, 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

라. Protein translation 및 세포 신호전달에 미치는 영향

Protein translation에 미치는 영향을 확인하기 위하여 관련 pathway에 작용하는 단백질들에 대한 Western blot을 실시하였다. PI3K와 길항적으로 작용하는 PTEN을 제외한 전 cascade에서 카달렌에 의해 단백질 발현 수준이 감소하였다 (그림 57). 이와 같은 결과로 볼 때, 카달렌은 세포 증식에 필요한 단백질 합성을 억제함은 물론 항암유전자인 PTEN을 증가시키는 작용도 동시에 함으로서 폐암세포의 증식을 감소시킬 수 있을 것이라고 생각되었다.

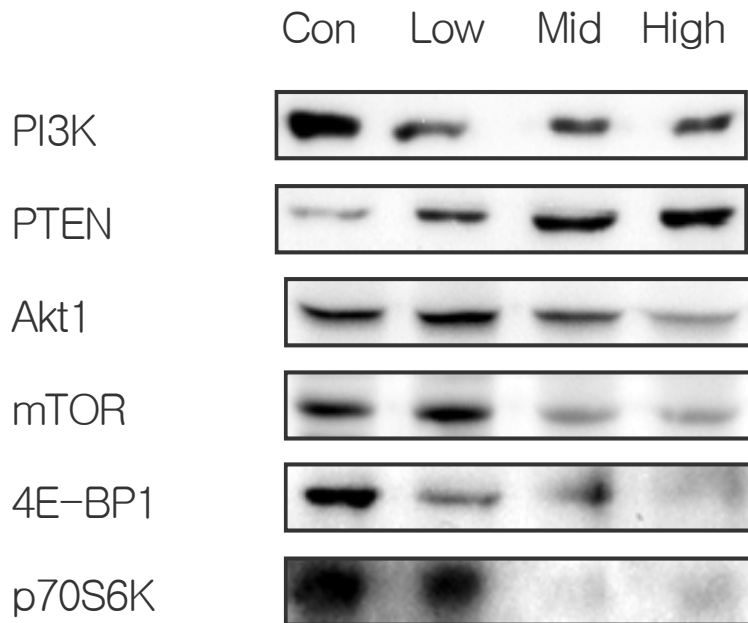


그림 57. 카달렌에 의한 protein translation pathway의 변화

실험방법에 명기한 시간별 농도별로 샘플을 채취한 후 western blot을 이용하여 각 단백질의 변화를 관찰한 그림.

Con, vehicle control ; Low, 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Mid, 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; High, 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

카달렌이 protein translation과 세포의 성장과 사멸에 있어서 중요한 기능을 가지고 있는 신호전달에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 실시한 결과, 카달렌에 의하여 protein translation pathway 관련 단백질들이 농도 의존적 또는 시간별로 감소함을 확인하였다 (그림 58). 특히 폐암의 발현에 매우 중요한 기능을 담당하는 Akt의 단백질 발현은 물론 이의 활성화 또한 현저히 감소시킨다는 사실을 증명할 수 있었다.

그림 58에서 보듯이 total Akt 단백질의 발현은 물론 phospho-Akt를 모두 억압시킴을 알 수 있었다. 이런 중요한 기능을 담당하는 Akt의 활성을 kinase assay로 다시 한번 확인 하였는데 Akt 활성화는 물론 mTOR 활성화 또한 현저히 감소시킴을 알 수 있었다 (그림 59). 이와 같은 결과로 보아 카달렌은 단백질 합성을 감소시키고 세포 증식에 관여하는 단백질의 발현도 감소시킴으로써 세포의 성장과 증식을 억제하는 것으로 생각된다.

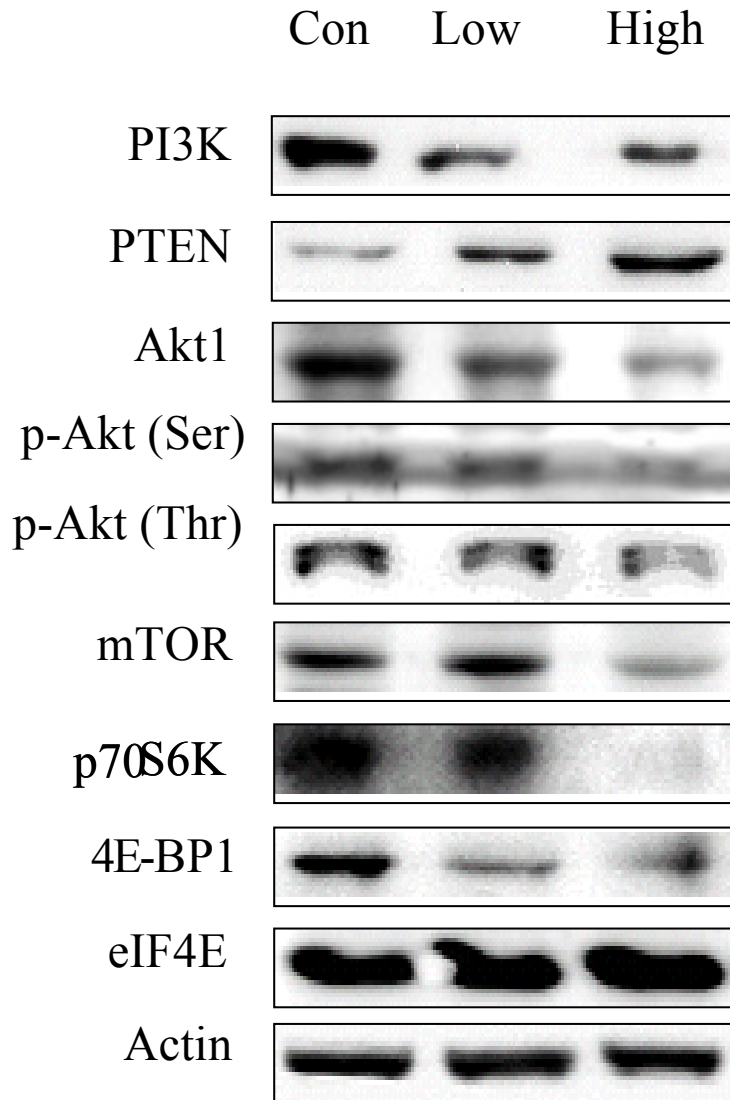


그림 58. 카달렌에 의한 protein translation 관련 단백질의 변화
 Con, vehicle control ; Low, 82 μ M ; High, 164 μ M

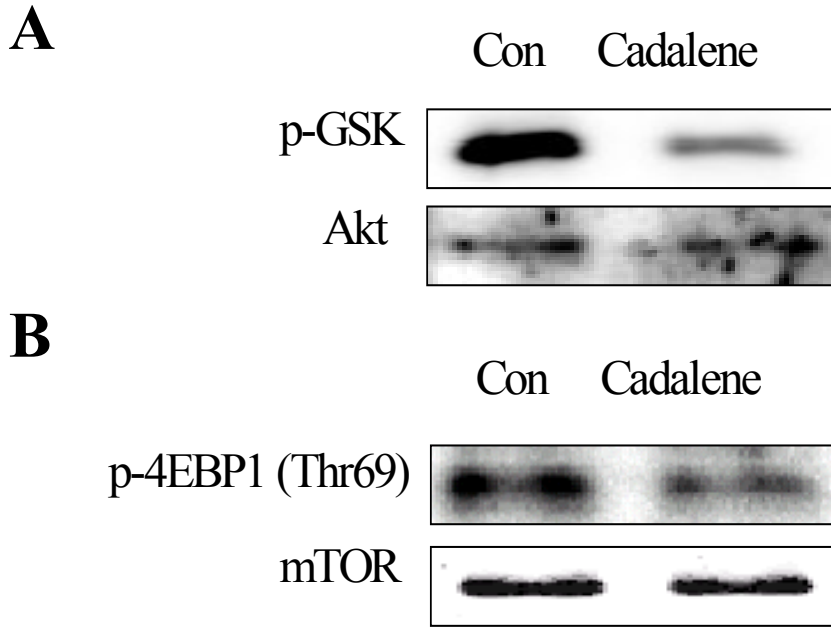


그림 59. 카달렌에 의한 Akt (A)와 mTOR (B)의 활성화도 변화

3. 생체내 안전성 평가

가. 단회투여 독성 시험평가 연구

1) 사망동물 및 임상증상 관찰

실험 기간동안 수컷에서는 고 농도군 (100 mg/kg)에서 투여 1일후 5마리 모두 폐사, 중 농도군 (50 mg/kg)에서도 투여 1일 후 3마리 폐사, 저 농도군(25 mg/kg)에서는 투여 1일후 1마리가 폐사하였다.

암컷 에서는 고 농도군 (100 mg/kg)에서 투여 1일후 5마리 모두 폐사하였으며 중 농도군 (50 mg/kg)에서는 투여 1일 후 4마리 폐사하였고 저 농도군인 (25 mg/kg)에서도 투여 1일후 3마리가 폐사하였다 (표 4).

2) 체중변화

전 투여군 모두에서 유의할 만한 체중변화를 관찰할 수 없었다 (표 5).

3) 육안적 부검소견

시험기간 중 폐사한 투여용량군의 부검결과 비장비대가 관찰되어졌고, 실험종료 후 부검한 개체 또한 투여군이 용매대조군에 비해 비장비대가 관찰되어졌다. 시험기간 중 고 농도군에서는 수컷이 5마리, 암컷이 5마리가 폐사하였다. 중 농도군에서는 수컷이 3마리, 암컷이 4마리가 폐사하였으며, 저 농도군에서는 수컷이 1마리, 암컷이 3마리가 폐사하였다. 체중변화 및 사료 섭취 변화량은 대조군과 비교하여 암·수 전 투여군에서 유의차가 관찰되지 않았다. 부검 시 육안관찰 결과 실험기간 중 폐사한 투여군에서 비장비대가 관찰되어졌고, 실험 종료 후 부검한 개체에서 또한 투여군이 용매대조군에 비해 비장비대가 관찰되어졌다. 폐사 개체 수에 대한 통계학적 분석결과 LD₅₀는 수컷에서 43.59 mg/kg, 암컷에서 18.63 mg/kg로 나타났다.

표 4. 카달렌의 복강 내 단회투여 후 마우스 생존율 변화

Sex	Dose (mg/kg)	No. of Animal	Hours after administration						Days after administration						Final mortality	
			1	2	3	4	5	6	1	2	4	7	10	14		
Male	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	100	5	5													5/5
	50	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/5
	25	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/5
Female	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	100	5	5													5/5
	50	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5
	25	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/5

표 5. 카달렌의 복강 내 단회투여 후 마우스 체중 변화

Sex	Dose (mg/kg)	Days after administration						
		0		7		14		
		Body weights	No. of Animal	Body weights	No. of Animal	Body weights	No. of Animal	
Male	Control	Mean	26.26	5	28.42	5	31.52	5
		S.D.	0.81		0.89		0.56	
	100	Mean	26.40	5		0		0
		S.D.	1.46					
	50	Mean	25.52	5	27.55	2	29.30	2
		S.D.	0.64		0.35		0.28	
	25	Mean	26.18	5	28.55	4	30.83	4
		S.D.	1.16		0.87		0.78	
Female	Control	Mean	21.88	5	22.78	5	24.00	5
		S.D.	1.05		0.79		0.50	
	100	Mean	22.22	5		0		0
		S.D.	0.98					
	50	Mean	22.08	5	22.80	1	22.60	1
		S.D.	1.10					
	25	Mean	22.48	5	23.20	2	23.00	2
		S.D.	1.19		0.42		0.28	

S.D. : Standard deviation

나. 반복투여 독성 시험평가 연구

LD₅₀의 1/10을 고 농도 (수컷 : 4.4mg/kg, 암컷 : 1.9mg/kg)로 정하여 중 농도 (수컷 : 2.2mg/kg, 암컷 0.95mg/kg), 저 농도 (수컷 : 1.1mg/kg, 암컷 0.475mg/kg) 4주간 복강 내 반복 투여 독성평가 결과 수컷, 암컷 모든 실험군에서 실험동물의 폐사가 나타났다.

이후 카달렌의 용매인 에탄올을 DMSO로, 투여경로를 복강이 아닌 경구로 전환하여 4주간 같은 농도로 반복투여독성평가 결과 시험기간 동안 수컷 대조군, 중 농도군에서 개체 간 각각 1마리씩의 사망개체가 발생 하였으나 암컷에서는 사망개체가 발생하지 않았다.

1) 사망동물 및 임상증상 관찰

시험기간 동안 수컷에서 대조군과 중 농도군에서 각각 1마리씩의 사망개체가 발생하였다. 육안적 부검 시 등 쪽 부분과 꼬리 부분에 집중적인 상처가 난 것으로 볼 때, 이는 개체 간 싸움으로 인한 상처로 사망한 것으로 생각되어진다. 그 외 수컷과 암컷 전 군에서는 특이적 임상증상이 관찰되어지지 않았다.

2) 체중변화

노출기간 중 암수 동물의 체중을 측정한 결과 그림 60, 61과 같이 암컷, 수컷에서 4주차 때 대조군, 시험군 모두 체중저하 현상이 나타났으며, 수컷에서 통계적 유의성이 관찰되어지지 않았으나 암컷에서 대조군 대비 통계적 유의성이 관찰되어 졌다.

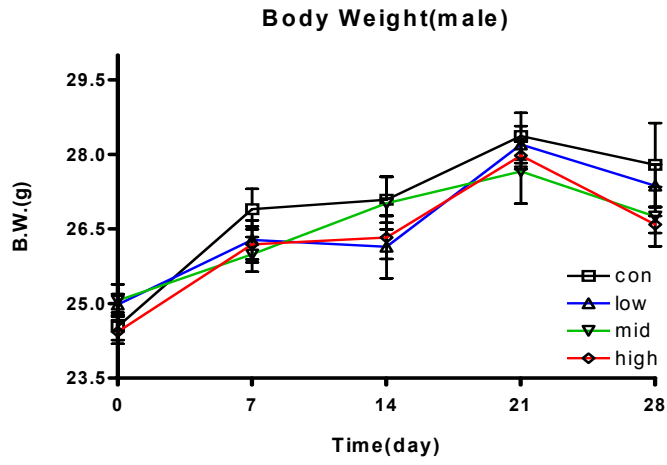


그림 60. 반복투여기간 중 실험동물의 체중변화 (수컷)

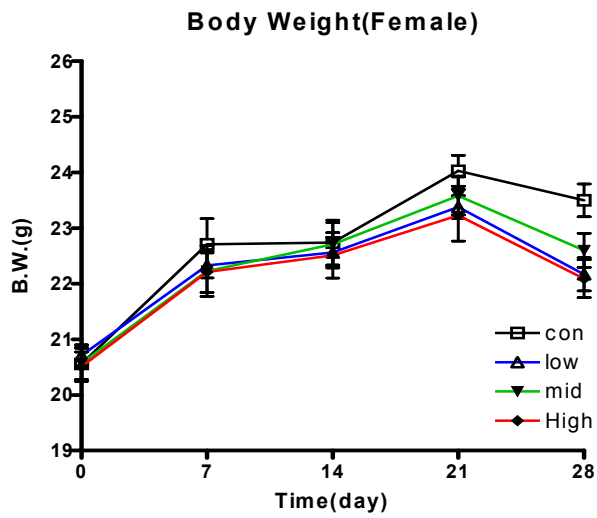


그림 61. 반복투여기간 중 실험동물의 체중변화 (암컷)

3) 혈액 및 혈액 생화학적 검사

혈액검사 결과 표 6, 표 7, 그리고 그림 65와 그림 66과 같이 수컷에서 대조군 대비 저 농도와 고 농도는 WBC가 증가 되었고 암컷에서는 대조군 대비 저 농도, 중 농도, 고 농도에서 WBC가 감소되는 것이 관찰되었다. 혈액 생화학적 검사 결과 표 8, 표 9와 같이 수컷에서 대조군 대비 AST, P는 감소하였으며 TP, BUN, P는 증가하였다. 암컷에서는 대조군 대비 TP, AST, TG, CHOL는 감소하였으며, TB, GLU, P는 증가하였다.

4) 병리조직학적 검사

C57BL/6 마우스를 이용한 4 주 반복 경구투여 독성시험에서 고환, 난소, 신장, 간장, 비장, 심장, 폐장 및 뇌 조직에 대한 병리 조직학적 검사결과 암수 모든 군의 폐장에서 사육구역의 세균 등 감염으로 추측되는 경미한 간질성 폐렴 (Interstitial pneumonia)이 관찰되었고 암컷 저 농도군의 심장에서 가령에 따라 흔히 관찰되는 국소성 심근염 (myocarditis)이 한 개체에서 관찰되었다 (그림 64, 65). 따라서 본 시험에서 표적 장기는 판단할 수 없었으며 조직 병리학적 측면에서 무독성량(No observed adverse effect level, NOAEL)은 수컷에서는 4.4 mg/kg과 암컷에서는 1.9 mg/kg인 것으로 추정되었다.

본 결과로 비추어 볼 때 카달렌은 수컷보다는 암컷마우스에 독성이 더 잘 나타나는 것으로 판단된다. 종합하면 무독성량(No observed adverse effect level, NOAEL)은 수컷에서는 2.2 mg/kg과 암컷에서는 0.48 mg/kg인 것으로 추정되었다. 현재 암컷과 수컷에 따른 독성의 차이를 밝히기 위한 연구가 진행 중에 있다.

표 6. 카달렌의 4주간 경구 반복투여 후 암컷 마우스의 혈액학적 지표 변화

Parameter	Female			
	Control	Low	Mid	High
Hematology				
n	10	10	10	10
WBC (K/ μ l)	5.19 \pm 1.66	4.08 \pm 1.52	3.42 \pm 0.77**	3.33 \pm 1.26*
NEU (%)	16.16 \pm 6.04	16.27 \pm 3.58	11.96 \pm 3.43	10.76 \pm 4.36
LYM (%)	78.48 \pm 6.41	75.49 \pm 4.23	82.28 \pm 4.78	83.28 \pm 6.18
MON (%)	4.45 \pm 1.03	5.91 \pm 1.87	4.79 \pm 1.36	4.59 \pm 1.47
EOS (%)	0.72 \pm 0.60	1.85 \pm 1.27	0.72 \pm 0.69	0.99 \pm 0.97
BAS (%)	0.19 \pm 0.18	0.40 \pm 0.39	0.26 \pm 0.14	0.38 \pm 0.52
RBC (M/ μ l)	9.24 \pm 0.90	9.20 \pm 0.99	10.69 \pm 1.34*	9.78 \pm 1.07
Hb (g/dl)	10.86 \pm 1.61	11.41 \pm 0.87	12.04 \pm 1.01	10.87 \pm 0.95
HCT (%)	60.40 \pm 11.45	60.01 \pm 7.13	65.04 \pm 7.09	60.17 \pm 4.92
MCV (fL)	65.25 \pm 9.68	65.43 \pm 6.46	61.20 \pm 2.14	61.83 \pm 3.74
MCH (pg)	11.76 \pm 1.54	12.49 \pm 1.26	11.39 \pm 0.76	11.22 \pm 1.30
MCHC (g/dl)	18.19 \pm 2.60	19.17 \pm 2.01	18.61 \pm 1.09	18.09 \pm 1.17
PLT (K/ μ l)	666.60 \pm 556.57	911.30 \pm 477.61	705.20 \pm 658.70	700.20 \pm 644.63

* P < 0.05, ** P < 0.01 : Significant differences as compared with control
Mean \pm standard deviation

표 7. 카달렌의 4주간 경구 반복투여 후 숫컷 마우스의 혈액학적 지표 변화

Parameter	Male			
	Control	Low	Mid	High
Hematology				
n	10	10	10	10
WBC (K/ μ l)	3.87 \pm 1.30	5.58 \pm 3.95	2.73 \pm 0.90	7.85 \pm 3.56**
NEU (%)	34.60 \pm 12.55	16.63 \pm 10.43	29.97 \pm 6.97	28.26 \pm 12.77
LYM (%)	57.17 \pm 12.91	74.27 \pm 11.21	61.99 \pm 6.81	63.44 \pm 11.09
MON (%)	7.18 \pm 1.94	5.93 \pm 3.16	6.28 \pm 2.37	7.92 \pm 3.21
EOS (%)	1.04 \pm 0.60	0.81 \pm 0.59	1.44 \pm 1.04	0.34 \pm 0.27
BAS (%)	0.23 \pm 0.15	0.24 \pm 0.28	0.32 \pm 0.22	0.04 \pm 0.03
RBC (M/ μ l)	7.82 \pm 3.27	8.39 \pm 2.80	9.52 \pm 1.61	11.15 \pm 0.88**
Hb (g/dl)	10.30 \pm 1.74	8.96 \pm 4.40	11.20 \pm 0.74	11.82 \pm 1.39
HCT (%)	55.94 \pm 11.57	55.13 \pm 15.74	63.34 \pm 7.36	67.69 \pm 5.60
MCV (fL)	63.72 \pm 2.58	67.81 \pm 8.07**	67.32 \pm 6.15	60.73 \pm 2.16
MCH (pg)	11.89 \pm 1.36	10.67 \pm 4.04	12.07 \pm 2.23	10.60 \pm 0.74
MCHC (g/dl)	18.66 \pm 2.05	16.22 \pm 6.42	17.82 \pm 1.67	17.44 \pm 1.24
PLT (K/ μ l)	682.10 \pm 569.52	1055.30 \pm 1052.01	1037.90 \pm 1050.73	449.60 \pm 404.76

* P < 0.05, ** P < 0.01 : Significant differences as compared with control, Mean \pm standard deviation

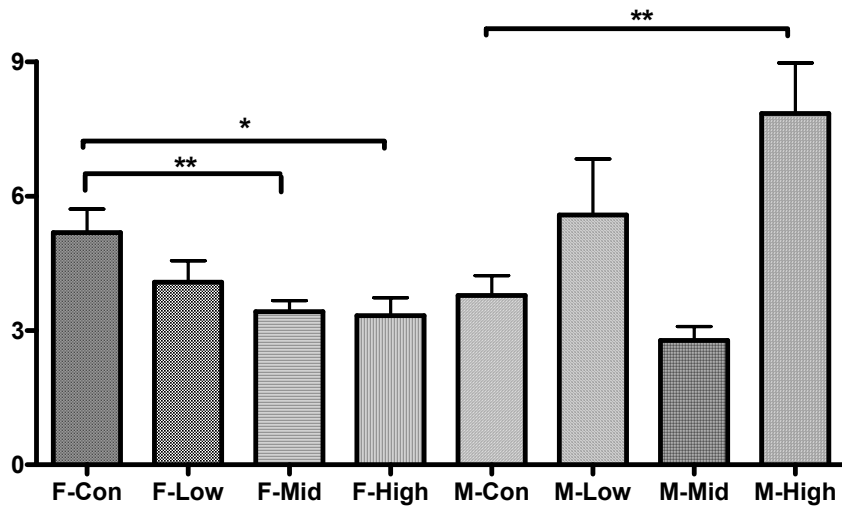


그림 62. 카달렌의 4주간 경구 반복투여 후 마우스의 혈중 백혈구 수치 변화

M : 숫컷, F : 암컷,

Con : 대조군, Low : 저농도, Mid : 중농도, High : 고농도

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significant differences

Mean \pm standard error

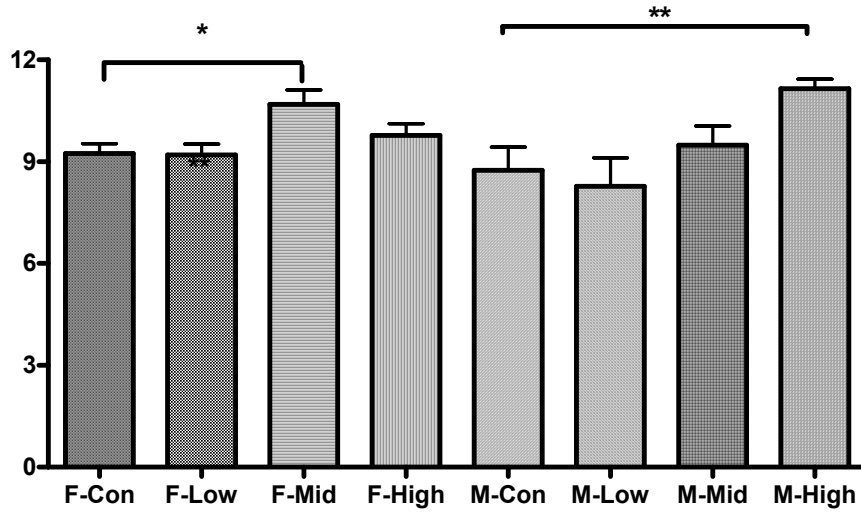


그림 63. 카달렌의 4주간 경구 반복투여 후 마우스의 혈중 적혈구 수치 변화

M : 숫컷, F : 암컷,

Con : 대조군, Low : 저농도, Mid : 중농도, High : 고농도

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significant differences

Mean \pm standard error

표 8. 카달렌의 4주간 경구 반복투여 후 암컷 마우스의 혈청학적 지표 변화

Parameter	Female			
	Control	Low	MIId	High
TP (GR/DL)	8.90±0.39	8.60±0.35	8.18±2.63	8.34±0.46**
ALB (U/L)	4.30±0.44	4.28±0.21	4.76±0.40*	4.42±0.42
TB (MG/DL)	0.06±0.02	0.09±0.07	0.12±0.07**	0.18±0.13**
AST (U/L)	18.20±3.05	14.80±3.29*	14.00±5.58	11.20±2.86**
ALT (U/L)	4.89±3.02	2.89±1.45	5.80±3.05	8.00±2.31*
GLU (MG/DL)	164.00±21.83	164.20±29.55	134.00±21.60*	139.00±26.10*
CREAT (MG/DL)	1.30±0.79	1.06±0.50	0.86±0.53	1.44±0.82
UA (MG/DL)	1.16±0.44	0.84±0.36	1.22±0.57	0.82±0.39
TG (MG/DL)	30.20±5.45	20.80±11.36*	9.00±3.68**	9.60±3.86**
Ca (MG/DL)	8.26±0.48	8.02±0.48	8.30±1.51	8.02±0.48
P (MG/DL)	2.57±0.19	2.60±0.41	2.81±0.38	2.85±0.28*
LDH (U/L)	178.00±47.54	156.00±49.77	191.00±122.16	155.60±40.13
CHOL (U/L)	118.60±12.29	97.60±17.17*	95.40±5.89*	96.00±24.57*

표 9. 카달렌의 4주간 경구 반복투여 후 숫컷 마우스의 혈청학적 지표 변화

Parameter	Male			
	Control	Low	MI _d	High
TP (GR/DL)	7.56±0.50	9.84±0.63**	8.71±1.10*	8.92±0.78**
ALB (U/L)	3.09±0.23	4.10±0.39**	3.78±0.32**	3.56±0.36**
TB (MG/DL)	0.13±0.10	0.38±0.35	0.08±0.06	0.11±0.09
AST (U/L)	16.00±3.16	13.40±3.41*	13.56±7.06*	13.40±5.97*
ALT (U/L)	4.67±3.01	5.20±2.53	6.50±4.29	7.20±2.35**
GLU (MG/DL)	176.22±30.02	163.20±15.47	144.22±16.17*	181.00±27.94
CREAT (MG/DL)	1.32±0.91	1.22±0.49	1.12±0.91	0.86±0.21
UA (MG/DL)	0.49±0.32	1.10±0.54*	0.89±0.47	0.72±2.35
TG (MG/DL)	38.00±11.83	34.40±4.30	29.11±7.69	41.40±7.72
Ca (MG/DL)	7.51±1.47	7.64±0.26	8.44±1.34	7.58±0.73
P (MG/DL)	3.59±0.51	3.16±0.58	2.86±0.63*	2.85±0.38*
LDH (U/L)	152.67±57.40	185.40±70.24	213.78±101.06	188.00±67.48
CHOL (U/L)	117.33±14.49	142.60±10.50**	139.33±23.79*	122.20±14.06

* P < 0.05, ** P < 0.01 : Significant differences as compared with control,
Mean ± standard deviation

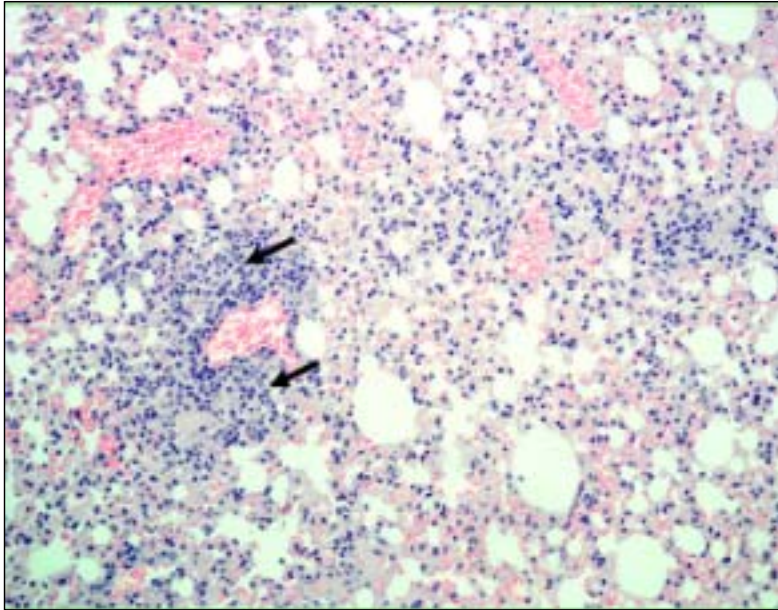


그림 64. 고 농도군 수컷 마우스에서 간질성 폐렴. H&E. x 200

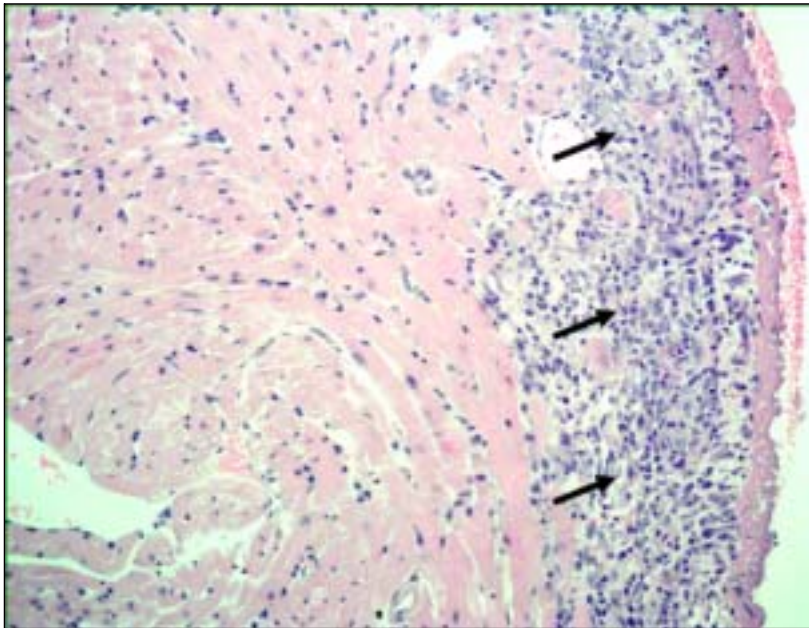


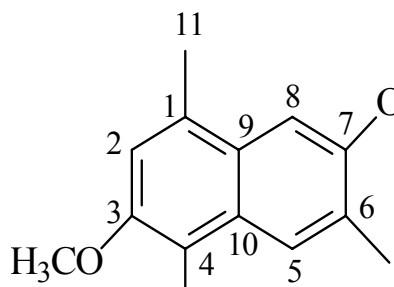
그림 65. 저 농도군 수컷 마우스에서 국소성 심근염. H&E x 200

제 5 절 결 론

1. 느티나무 추출성분 분리 및 유효물질 구조 동정

본 연구는 느티나무에서 단리한 카달렌의 폐암세포 증식억제 효과를 이용하여 효과적인 폐암치료제 개발 목적으로 카달렌의 화학적 특성 규명과 폐암 세포에 미치는 의학적, 생물학적 특이성 규명에 초점을 맞추어 수행하였다.

카달렌은 느티나무 분말을 에탄올로 추출한 후에 이를 헥산으로 분획하여 실리카 젤 칼럼으로 분리 하였다. 카달렌의 수율은 느티나무 전건무게의 약 0.3 % 정도를 차지하였다. 단리한 카달렌을 기기분석으로 그 구조를 동정한 결과, 분자량은 244 m/z 으로 측정되었으며, 7번 위에 수산기가, 3번 위치에 메톡실기가 치환된 7-hydroxy-3-methoxycadalene 구조로 나타났다. 이러한 나프탈렌 구조의 카달렌은 천연물화학 분야에서 탄소가 15개인 sesquiterpene류로 분류되고 있다.

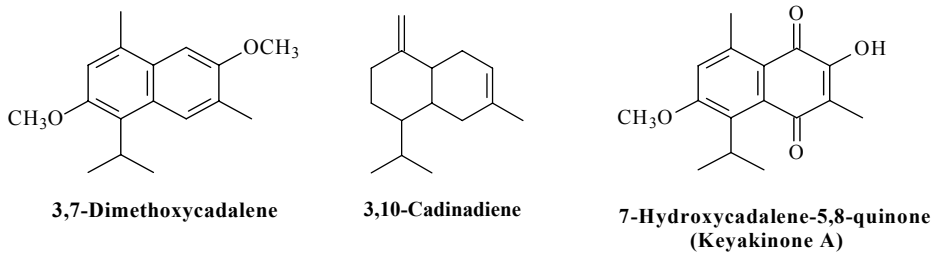


카달렌(7-hydroxy-3-methoxycadalene)의 화학구조

느티나무 부위별, 연륜별로 카달렌의 분포를 조사한 결과, 카달렌은 느티나무 수피나 잎에서는 전혀 발견되지 않았다. 또한 목부에서도 변재부에는 전

혀 존재하지 않고 심재부에서만 발견되는 특성을 발견하였다. 이러한 생화학적 특성으로 미루어 카달렌은 변재와 심재부 사이에 있는 유세포조직에서 합성되어 심재부로 이동하는 전형적인 심재형성물질로 추정된다.

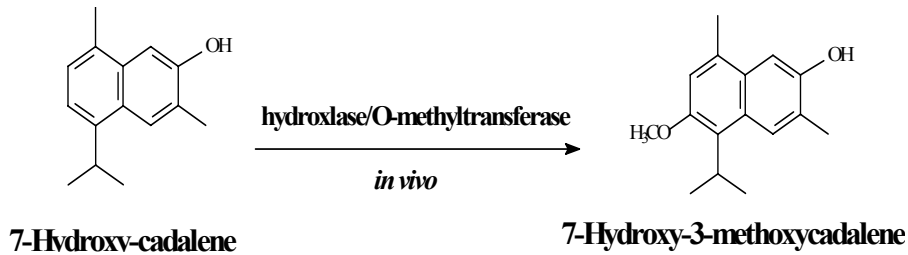
느티나무 심재부에서 획득한 헥산분획물의 HPLC분석결과에 의하면 카달렌을 제외하고도 여러 화합물들이 존재하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 헥산분획물의 HPLC 크로마토그램에서 나타나는 각 피크들을 prep-HPLC를 이용하여 분리한 결과 총 9종의 화합물을 단리 하였다. 이 중에서 3종의 화합물은 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 와 EI-MS 등 기기분석을 통하여 구조 동정에 성공하였다. 아래 그림에서 보듯 이들 화합물은 모두 카달렌의 기본 골격을 유지하고 있어서 느티나무에 존재하는 카달렌 동족체로 분류될 수 있다.



느티나무 심재부에서 단리한 카달렌 동족체의 화학구조

분류학적으로 느티나무가 속한 느릅나무과 수종 - 느릅나무, 참느릅나무, 당느릅나무와 큰잎느릅나무 - 을 대상으로 카달렌 분리를 시도하였다. 느릅나무과 수종에서는 카달렌과 동일한 구조의 카달렌은 발견되지 않았다. 그러나 느티나무와 유사하게 느릅나무과 수종 심재부에서 카달렌과 유사한 구조의 화합물인 7-hydroxycadalene이 검출되었는데, 이는 카달렌 생합성과정 중 카달렌의 전구물질의 하나로 예측되었으며, 생합성 과정에서 hydroxylase와

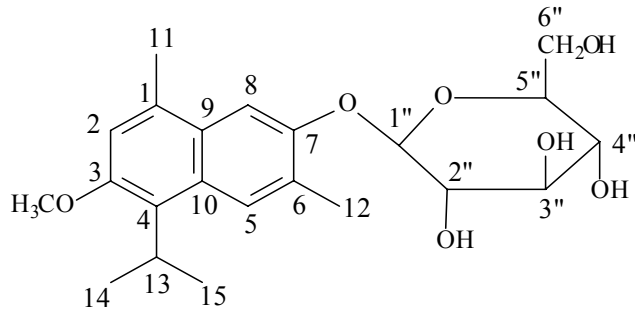
O-methyl transferase라는 효소의 작용으로 카달렌이 합성되는 것으로 사료된다. 이러한 결과로 미루어 카달렌은 느릅나무과 수종 중에서 단지 느티나무에서만 생합성되는 화합물로 잠정적으로 결론지을 수 있다.



느릅나무과 수종에서 단리한 7-hydroxycadalene의 구조와 카달렌 생합성에 관련된 경로

카달렌은 hydroxy radical ($\cdot\text{OH}$) 소거능력이 탁월한 것으로 나타났다. Hydroxy radical은 카달렌 농도에 비례하여 소거능력을 나타냈는데, 카달렌 농도 100 ppm에서 hydroxy radical이 거의 완전히 제거되었다. 그러나 카달렌의 MTT assay 측정결과에 의하면 카달렌은 세포독성을 띠고 있는 것으로 판명되었다. 카달렌 농도 1 ppm에서는 약 90 % 가량의 세포생존율을 보였으나, 9 ppm에서는 세포생존율이 22 %로 크게 낮아지는 점으로 미루어 카달렌 농도가 높아질수록 현저한 세포독성 효과를 보였다.

이러한 세포독성은 카달렌을 식품첨가제나 의약품으로 적용할 경우 부작용이 발생할 가능성이 있으므로 이를 최소화하기 위한 방편으로 카달렌 분자의 7번 위치에 존재하는 수산기에 글루코오스 분자 1개를 부착하여 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene(분자량 406 m/z)을 합성하였다(수율 45 %).



7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalenol의 화학구조

2. 세포주기 조절억제에 의한 폐암예방 및 치료제 개발

카달렌에 의한 세포주기의 변화를 확인한 결과 세포주기에서 세포분열에 중요한 부분인 G1 phase와 G2/M phase가 카달렌에 의하여 농도 의존적으로 감소를 보였고, apoptotic phase라고도 불리는 subG1 phase는 농도 의존적으로 증가하였다. 이와 같은 결과에서 카달렌은 세포 주기를 조절하여 폐암세포의 증식을 억제하고, 궁극적으로 세포자살을 유도하여 폐암조직에서의 암세포를 효율적으로 제거할 수 있을 것으로 판단된다.

Cell cycle에 관련된 주요 인자 중 G1, G2/M checkpoint에 관련된 단백질의 발현 수준 특히 cyclin A, B, D의 발현량이 카달렌 처리에 의하여 효율적으로 감소하였다. 이외에 또한 세포주기 조절에 심대한 영향을 미치는 것으로 밝혀진 다른 인자들 즉 p21, p27, GADD45 및 PCNA 또한 유사한 경향으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 실질적으로 카달렌에 의해 세포의 분열이 효율적으로 억제되는 방향으로 조절된다는 사실을 제시하는 것이다.

Protein translation에 미치는 영향을 확인하기 위하여 관련 pathway에 작용하는 단백질들에 대한 Western blot을 실시하였다. PI3K와 길항적으로 작용

하는 PTEN을 제외한 전 cascade에서 카달렌에 의해 단백질 발현 수준이 감소하였다. 이와 같은 결과로 볼 때, 카달렌은 세포 증식에 필요한 단백질 합성을 억제함은 물론 항암유전자인 PTEN을 증가시키는 작용도 동시에 함으로써 폐암세포의 증식을 감소시킬 수 있을 것이라고 생각되었다.

카달렌이 protein translation과 세포의 성장과 사멸에 있어서 중요한 기능을 가지고 있는 신호전달에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 실시한 결과, 카달렌에 의하여 protein translation pathway 관련 단백질들이 농도의존적 또는 시간별로 감소함을 확인하였다. 특히 폐암의 발현에 매우 중요한 기능을 담당하는 Akt의 단백질 발현은 물론 이의 활성화 또한 현저히 감소시킨다는 사실을 증명할 수 있었다. 특히 중요한 점은 total Akt 단백질의 발현은 물론 phospho-Akt를 모두 억압시킴을 알 수 있었다. 이런 중요한 기능을 담당하는 Akt의 활성을 kinase assay로 다시한번 확인 하였는데 Akt 활성은 물론 mTOR 활성화 또한 현저히 감소시킴을 알 수 있었다. 세포 성장을 촉진하는 단백질인 p-Mnk1의 immunocytochemistry를 실시한 결과, 카달렌을 처리한 경우에 세포 핵내로의 전이가 감소하여 기능이 억제됨을 확인하였다. 이와 같은 결과로 보아 카달렌은 단백질 합성을 감소시키고 세포 증식에 관여하는 단백질의 발현도 감소시킴으로써 폐암 세포의 성장과 증식을 억제하는 것으로 생각된다.

카달렌에 의한 A549 세포의 글루코오스 대사 억제 실험은 세포내 시간별로 글루코오스 양과 그리고 배지 내 글루코오스 양을 측정함으로써 그 대사량을 측정할 수가 있다. 일반적으로 암세포는 정상세포에 비해서 그 분화속도가 빠르고 따라서 그만큼 많은 양의 에너지가 필요하다. 즉 생체 내 주요 에너지원의 하나인 글루코오스 양을 측정하면 그 대사량을 유추할 수가 있다. 다양한 시간조건별로 세포내 글루코오스 양을 측정결과 카달렌을 처리한 시험군이 처리하지 않은 대조군 대비 글루코오스-형광 발현도가 낮았다. 또한 배지내 글루코오스 함유량 측정결과 카달렌 처리 시험군이 처리하지 않은 대조군 대비 농도가 높았다. 이를 종합해 보면 카달렌은 A549 세포에게 있어서 글루코오스 대사를 억제함으로써 세포내 에너지를 차단하는 항암제 및 예방제로의 기능

성을 나타낸다.

단회 및 28일 반복독성 시험 결과로 비추어 볼 때 카달렌은 수컷보다는 암컷마우스에 독성이 더 잘 나타나는 것으로 판단된다. 즉 종합하면 무독성량 (No observed adverse effect level, NOAEL)은 수컷에서는 2.2 mg/kg과 암컷에서는 0.48 mg/kg인 것으로 추정되었다. 현재 암컷과 수컷에 따른 독성의 차이를 밝히기 위한 연구가 필요하며 카달렌의 화학적 유도체를 개발하여 독성을 경감시키는 대책이 절실히 요구되고 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발의 목표와 내용

- (1) 폐암 예방물질 검색을 위한 효율적 model system 확립
- (2) 천연물을 대상으로 *in vitro*에서 bioassay-directed fractionation 방법에 의한 암예방물질의 추적으로 활성성분 분리, 구조확인 및 작용기전 규명
- (3) 활성성분의 *in vivo* 방법에 의한 암예방작용 확인 및 작용기전 규명
- (4) 암예방물질의 lead compounds 개발 후 동물실험을 통하여 효과가 검증된 물질에 대하여 특허 창출을 위한 기초자료 확립

제 2 절 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> · 느티나무 추출성분 분리 및 유효물질 탐색 · 세포배양 조건 및 예비실험/ FACS를 이용한 세포주기 검색 	<ul style="list-style-type: none"> - 느티나무의 부위별, 입지별 활성성분 탐색 · 부위별 분리; 심·변재, 수피 · 지역별 분리; 동부, 서부, 남부지방 - 협동연구 책임자에게 활성 검정 시료분양 - 부위별, 지역별 채취시료의 bioassay-directed fractionation 실시 - 항산화활성 측정 - 느티나무추출물의 용량 및 노출 시간 결정 - G0, G1, S, G2, M기를 검정하여 인체암세포 주기중 특정 주기에 미치는 영향 검정

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> · 느티나무 유효 추출 성분 구조 동정 및 DB 구축 · G1/S 및 G2/M checkpoint 검색 	<ul style="list-style-type: none"> - 느티나무 수종의 부위별 생리 활성 물질의 수율 증대 방안 확립 - 각 생리 활성 물질 구조 동정 EI-MS, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, FT-IR - 공시 수종 생리활성 물질의 Database화 - p53, p21, GADD45, p27, PCNA 발현에 미치는 영향 - cyclin A, B, G 및 p27과 p53과의 상관성 규명 - HMG CoA reductase 활성과의 상관관계 - Telomerase 활성과 telomere 길이에 미치는 영향 연구
3차년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> · 느티나무 유용 생리 활성천연물질의 산업적 이용 확립 · 폐암 예방 및 치료 효과에 대한 <i>in vivo</i> 효력검정 	<ul style="list-style-type: none"> - 각 생리 활성 물질 구조 동정 EI-MS, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, FT-IR - 생물공학적인 방법에 의한 대량생산 체계 확립 - 국내 임업환경을 고려한 산업화 이용 기술 개발 - 마우스에서의 NNK 유발 폐암모델 설정 - 1,2차년도에서 획득한 유효성분의 폐암 예방 및 치료효과 검색

제 3 절 연구 추진 내용 및 계획

대기오염 증가에 따른 폐암의 발생빈도가 높아지고 천연의약품에 대한 수요가 증대됨에 따라 항균 및 항산화활성이 높은 것으로 알려진 느티나무의 추

출물로부터 폐암을 치료하거나 예방하기 위한 의약품용 신 물질을 분리하기 위해 본 실험을 실시하였다. 본 실험에서는 느티나무 추출물로부터 폐암 예방 물질의 효율적 탐색을 위한 적정 model을 확립하기 위해 먼저 폐암세포에 대한 느티나무 추출액 및 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 가용성 분획 등 다양한 시료에 대한 폐암세포 생육억제 활성을 *in vitro* 상태에서 실험을 실시하여 bioassay-directed fraction 방법으로 활성분획을 선정한 후 이 활성 분획 으로부터 가장 효과가 좋은 폐암 예방물질을 분리하고 화학적 구조를 확인하였다.

그 후 이 활성 성분을 폐암세포에 적용하여 western blot 등의 proteomics 를 이용하여 정확한 생육억제 작용기작을 규명하고, 폐암을 유도한 실험용 쥐 에 유효성분을 경구 투여하는 *in vivo* 방법으로 폐암예방 및 치료기작을 확인 함으로써 활성성분의 생체 내 작용기작을 구명하고 분리된 물질을 폐암 예방 물질의 lead compound로 하여 약효의 증진이나 투여 시 유효성분의 독성을 완화시키기 위해 유도체를 합성하고 이들의 약효를 검증하였다.

제 4 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

본 연구는 아직 국내에서 시작 단계인 천연물에서의 기능성 천연물질의 탐색 및 개발, 특히 산림자원의 유용 물질 탐색 및 개발에 관한 연구 분야에서 기초 자료로 제공하는 자료가 될 수 있으며 산림자원의 고부가가치화를 위한 데이터베이스 구축과 관련분야 연구 활성화에 큰 도움이 될 것이다.

식·의약품의 생체조절 기능인자는 일반적으로 미량으로서 생리활성을 발현함으로 이러한 생리활성천연물질을 발견, 개발하여 특이적 생체조절기능을 부여한 기능성 식·의약품의 제조기술을 개발하면 각종 질병에 대한 치료 작용 연구 및 예방제를 개발하여 국민보건 증진에 기여할 수가 있다.

국내산 자원의 보존 개발 및 외국산 자원과의 경쟁력 우위 확보 차원에서 국내산 느티나무로부터 생리활성천연물질을 개발하여 생리활성 기능에 따른 계통체계를 확립하여 유효 산림자원의 체계적 관리 방안의 체계를 정립할 수 있을 것이다.

현재 미·이용 임산자원의 고부가가치화로 임업 및 임산물이용의 활성화에 기여할 수 있을 것이다.

첨단 기술을 사용하여 제조된 천연의 기능성 식·의약품은 공업화를 통한 대량생산에 있어서 어려움이 많으므로, 천연물이 지니고 있는 지역적 특성과 연구결과의 지적 재산권으로서의 역할은 높은 소득 증대 및 파급되는 관련 산업체의 국내·외 국제수지 향상을 도모함으로써 산업, 경제, 기술발전에 이바지하게 될 것이다.

국제적으로 고부가가치 식·의약품의 경쟁력을 확보하고, 기능성 신소재 제품을 국산화함으로써 아직까지 수입으로 지출되는 막대한 기술료를 절감할 수 있을 것이다.

느티나무에서 향산화, 항암 활성천연물질을 추출, 단리, 구조 동정하여 지적재산권 소유할 수 있으며, 생리활성천연물질을 이용한 항암 예방제로서의 발현기작 구명을 통한 학문적 기초자료를 제공할 수 있을 것이다.

생리활성천연물질의 체계적인 추출법과 신속, 정확한 검정기술법 향상에 기여하고 생리활성에 근거한 database 구축으로 기능에 따른 산림자원 활용체계 확립할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

암은 인류가 해결해야 될 난치병 중의 하나로 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 치료제의 개발에 막대한 자본이 투자되고 있다. 그러나 암은 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려우며, 현재 치료제로 사용되는 물질들은 모두 상당한 독성을 지니고 있으므로, 치료보다 암 예방이 훨씬 효율적인 방법으로 인식되고 있다.

그래서 본 연구는 최근 들어 발생율 및 사망율이 급격히 증가하고 있는 폐암에 대한 저독성의 천연 폐암 치료 및 예방제를 개발하고자 느티나무의 추출액에서 이에 대한 연구를 실시하였다. 그 결과 느티나무의 폐암 치료물질인 카달렌을 분리하여 그 효능을 다양한 방법으로 조사하여 작용기전을 구명하였다.

그러나 본 연구에서 규명된 폐암 예방물질인 카달렌은 폐암세포의 생육억제 효능은 있지만 자체 독성 갖고 있다는 것이 밝혀졌다. 그래서 카달렌의 자체 독성을 저감시키고 카달렌의 수용성 용매에 대한 용해도를 증가시키기 위해 7-O-β-D-glucopyranosyl-3-methoxycadalene을 합성하여 이에 대한 폐암 세포 생육억제에 관한 효능을 조사 중에 있는데 이 실험의 결과가 도출되면 이에 관한 특허를 출원할 계획이다.

그리고 기존 카달렌의 폐암 예방효능에 관해 취득한 특허와 본 연구에서 얻어진 연구결과를 종합적으로 정리하여 기술장터에 공개하고 본 결과를 상업화 할 기업체를 발굴한 후 폐암 예방약품으로써의 카달렌 상품화를 위한 산업화 연구를 산업자원부 “Bio-Star”과제와 연계하여 실질적으로 산업화가 가능하도록 연구를 진척시켜 나갈 예정이다.

제 6 장 참고문헌

1. A. O. C. S. 1989. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist Society. 4th ed. Method Cd 8-53. Champaign, Illinois.
2. Andersson, S., and Russell, D. W. 1990. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87. 3640-3644.
3. Bestilny, L. J., Brown, C. B., Miura, Y., Robertson, L. D. and Riabowol, K. T. 1996. Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. Cancer Res. 56. 3796-3802.
4. Burden, R. S. and Kemp, M. S. 1984. Sesquiterpene phytoalexins from *Ulmus Glabra*. *Phytochemistry* 23(2). 383-385.
5. Chen, F. A., Lin, Y. M. and Chen, A. H. 1972. Sesquiterpenes from the heartwood of chinese elm. *Phytochemistry* 11. 1990-1991.
6. Chen, I. T., Smith, M. L., O'Connor, D. M., and Fornace, A. J. 1995. Direct Interaction of GADD45 with PCNA and Evidence for Competitive Interaction of GADD45 and p21^{WAF1/CIP1} with PCNA, *Oncogene* 11(10). 1931-1937.
7. Cohen, S. M. and Ellwein, L. B., 1990. Cell Proliferation in Carcinogenesis, *Science* 249, 1007-1011.

8. Fracheboud, M., Rowe, J. W., Scott, R. W., Fanega, S. W., Buhl A. J. and Toda, J. K. 1968. New sesquiterpenes from yellow wood of slippery elm. *Forest Products Journal*. 18(2). 37-40.
9. Gartel, A. L., Serfas, M. S., Gartel, M., Goufman, E., Wu, G. S., El-Deiry, W. S., and Tyner, A. L. 1996. p21(WAF1/CIP1) Expression Is Induced by Newly Nondividing Cells in Diverse Epithelia and during Differentiation of the Caco-2 Intestinal Cell Line, *Exp. Cell. Res.* 227(1). 171-181.
10. Hartwell, L. H. and Weinert, T. A. 1989. Checkpoint: Controls the Order of Cell Cycle Events, *Science* 246(4930). 629-634.
11. Hartwell, L. H., and Kastan, M. B. 1994. Cell Cycle Control and Cancer, *Science* 266. 1821-1828.
12. Hayashi, Y. and Takahashi, T. 1980. Zelkoserratone and Homozelkoserratone, new cadalenic sesquiterpenes from the heartwood of *Zelkova serrata*. *Mokuzai Gakkaishi* 26(1). 54-55.
13. Hayashi, Y., Sakurai, K., and Takahashi, T. 1976. Isolation of a Dimer of 7-Hydroxy-3-methoxycadalenone from the heartwood of *Zelkova serrata* MAKINO. *Mokuzai Gakkaishi* 22(3). 202-203.
14. Hayashi, Y., Yasue, M., and Takahashi, T. 1972. Two new naphthalene derivatives from the heartwood of *Zelkova serrata* MAKINO. *Mokuzai Gakkaishi* 18(1). 41-42.
15. Homma, Y., Kaneko, M., Kondo, Y., Kawave, K., and Kakizoe, T., 1997. Inhibition of rat prostate carcinogenesis by a 5 α -reductase

- inhibitor, FK143, J. Natl. Cancer Inst. 89. 803-807.
16. Jiang, Y., Ahn, E., Ryu, S., Kim, D., Park, J., Yoon, H., You, S., Lee, B., Lee, D., and Jung, J. 2004. Cytotoxicity of psammoplin A from a two-sponge association may correlate with the inhibition of DNA replication, BMC Cancer 4. 70.
 17. Kim, J. H., Lee, H. J., Kim, G. S., Choi, D. H., Lee, S. S., Kang J. K., Chae, C., Paik, N. W., and Cho, M. H. 2004. Inhibitory effects of 7-hydroxy-3-methoxy-cadalene on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK)-induced lung tumorigenesis in A/J mice. Cancer Lett. 213(2). 139-145.
 18. Kim, J. H., Lee, H. J., Yeon, S. C., Choi, D. H., Lee, S. S., Kang, J. K., Chae, C. H., Paik, N. W., Lee, K. H., and Cho, M. H. 2004. Antioxidative effects of 7-hydroxy-3-methoxy-cadalene extracted from *Zelkova serrata* on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced oxidative stress in A/J mice. Phytother Res. (5). 425-427.
 19. Kim, W. G., Kim, J. P., and Yoo, I. D. 1996. Benzastatin A, B, C and D: New free radical scavengers from *Streptomyces nitrosoreus* 30643. (II) Structure determination. J. Antibiotics 49. 26-30.
 20. Krishnamoorthy, V. and Thomson, R. H. 1971. Mansonone C in elm wood. *Phytochemistry* 10. 1669-1670.
 21. Lamb, J. C. Levy, M. A., Johnson, R. K., and Isaacs, J. T. 1992. Response of rat and human prostatic cancers to the novel 5 α -reductase inhibitor, SK&F 105657. Prostate 21. 15-34.

22. Lee S. S., Lee H. J., Kang H. Y., and Choi, D. H. 1999. Studies on biological activity of wood extractives (I): antimicrobial and antioxidative activity of heartwood extractives. *FRI J Forest Sci* 61. 82-89.
23. Lee, I. K., Kim, C. J., Song, K. S., Kim, H. M., and Yoo, I. D. 1995. Two more benzylated dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *J. Natural Products* 58. 1614-1617.
24. Lee, S. S. Lee, H. J. Kang, H. Y. and Choi, D. H. 2000. Studies on biological activity of wood extractives (II): antimicrobial and antioxidative activity of heart wood extractives, *Wood Sci. Technol.* 28. 32-41.
25. Levy, M. ., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W., and Harley, C.B. 1992. Telomere End-replication Problem and Cell Aging, *J. Mol. Biol.* 225(4). 951-960.
26. Lindgren, B. O. and Svahn, C. M. 1968. Extractives of elm wood. *Phytochemistry.* 7(8). 1407.
27. Marnett, L. J. 1987. Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis* 8. 1365-1373.
28. McCord, J. M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244. 6049-6055.
29. Mori, M., Mimori, K., Shiraishi, T., Tanaka, S., Ueo, H., Sugimachi, K., and Akiyoshi, T. 1997. p27 expression and gastric carcinoma. *Nat.*

Med. 3. 593.

30. Morse, M. A., Eklind, K. I., Toussaint, M., Amin, S. G., and Chung, F. 1990. Characterization of a glucuronide metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and its dose-dependent excretion on the urine of mice and rats Carcinogenesis 11. 1819-1823.
31. Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65. 55 - 63.
32. Nakagaki, I., Sasaki, S., Hori, S., and Kondo, H. 2000. $2+Ca$ and electrolyte mobilization following agonist application to the pancreatic β cell line HIT Pflugers Arch. Eur J Physiol. 440. 828-834.
33. Nakanishi, Y., Kawasaki, M., Bai, F., Takayama, K., Pei, X. H., and Takano, K. 1999. Expression of p53 and glutathione s-transferase-pi relates to clinical drug resistance in non-small cell lung cancer. *Oncology* 57. 318-323.
34. Nguyen, V. N., Mirejovsky, P., Mirejovsky, T., Melinova, L., and Mandys, V. 2000. Expression of cyclin D1, Ki-67 and PCNA in non-small cell lung cancer: prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2, *Acta Histochem.* 102. 323-338.
35. Nishikawa, K., Yasuda, S., and Hanzawa, M. 1972. The extractives of Ohyonire, *Ulmus laciniata* MAYR. II. The isolation of 7-Hydroxycadalene, Lacinilene A, Scopoletin and Vanillic acid from the Sapwood. *Mokuzai Gakkaishi* 18(9). 471-474.

36. Okudela, K., Hayashi, H., Ito, T., Yazawa, T., Suzuki, T., and Nakane, Y. 2004. K-ras gene mutation enhances motility of immortalized airway cells and lung adenocarcinoma cells via Akt activation: possible contribution to non-invasive expansion of lung adenocarcinoma, *Am. J. Pathol.* 164 (1). 91-100.
37. Overeem, J. C., and Elgersma, D. M. 1970. Accumulation of mansonones E and F in *Ulmus hollandica* infected with *Ceratosistis Ulmi*. *Phytochemistry* 9. 1949-1952.
38. Packer, L., (ed.). 1994. *Meth. Enzymol.* Vol. 234, Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, San Diego.
39. Poli, G., Albano, E., and Dianzani, M. U. (ed.) 1993. *Free radicals: From basic science to medicine*, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
40. Qiao, L. Shiff, S. J. and Rigas, B. 1997. Sulindac sulfide inhibits the proliferation of colon cancer cells: Diminished expression of the proliferation markers PCNA and Ki-67, *Cancer Lett.* 115. 229-234.
41. Reisman, D. and Loging, W. T. 1998. Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene, *Semin. Cancer Biol.* 8. 317-324.
42. Renwick, L. C., Donladson, K., and Coulter, A. 2001. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicological and Applied Pharmacology* 172. 119-127.
43. Sawyer, D. T. and Valentine, J. S. 1981. How super is superoxide? *Acc. Chem. Res.* 14. 393.

44. Shimokawa, T., Kawabe, Y., Honda, M., Yazaki, Y., Matsumoto, A., Itakura, H., and Kodama, T. 1995. Determination of mRNA Levels of Cholesterol Biosynthesis Enzymes and LDL Receptor Using Ribonuclease Protection Assay, *J. Lipid Res.* 36. 1919-1924.
45. So, J. B., Samarasinge, K., Raju, G. C., Mochhala, S. M., and Ti, T. K. 2000. Expression of cell-cycle regulators p27 and Cyclin E correlates with survival in gastric carcinoma patients, *J. Surgic. Res.* 94. 56-60.
46. Stipanovic, R. D., Greenblatt, G. A., Beier, R. C., and Bell, A. A. 1981. 2-Hydroxy-7-methoxycadalene. The precursor of lacinilene C 7-methyl ether in *Gossypium*. *Phytochemistry* 20(4). 7298-730.
47. Suzuki, H., Yasuda, S. and Hanzawa, M. 1972. The extractives of Ohyonire, *Ulmus laciniata* MAYR. I. The isolation of 7-hydroxy-cadalene, Mansonone C and E, and Lacinilene A and B from the heartwood. *Mokuzai Gakkaishi.* 18(1). 37-40.
48. Takami, H., Kishibayashi, N., Ishii, A., and Kumazawa, T. 1998. Indole and benzimidazole derivatives as steroid 5- α reductase inhibitors in the rat prostate. *Bioorg. Med. Chem.* 6(12). 2441-80.
49. Thomas, G. V., Szigeti, K., Murphy, M., Draetta, G., Pagano, M., and Loda, M. 1998. Down regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases, *Am. J. Pathol.* 153. 681-687.
50. Tolmasoff, J. M., Ono, T., and Culter, R. G. 1980. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77. 2777-2781.

51. Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. V., Barclay, L. R. C, and Locke, S. J. 1987. The relative contribution of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochem. Biophys. Acta* 924. 408-419.
52. Wu, A. H., Whittemore, A. S., Kolonel, L. N., John, E. M. Gallagher, R. P., and West, D. W. 1995. Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4. 735-41.
53. Zaccheo, T., Giudici, D., and di Salle, E. 1998. Effect of the dual 5- α reductase inhibitor PNU157706 on the growth of dunning R3327 prostatic carcinoma in the rat. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 64. 193-198.
54. Zeringue, H. J. 2001. Effects of methyl jasmonate on phytoalexin production and aflatoxin control in the developing cotton boll, *Biochem. Syst. Ecol.* 1-7.
55. Ziegel, R. Shallop, A. Jones, R., and Tretyakova, N. 2003. K-ras, gene sequence effects on the formation of 4-(methyl nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-DNA adducts, *Chem. Res. Toxicol.* 16 (4). 541-550.
56. 近藤元治. 1995. Free radical. メジカルビュー社, 東38. 吉川敏. (1996) フリーラジカル入門. 先端医学社, 東京.
57. 大柳善彦. 1989. SODと活性酸素調節剤. 日本医学館, 東京.
58. 二木鋭雄. 1988. ビタミンEの抗酸化作用. *ビタミン*. 62. 601-619.

59. 이성숙, 이학주, 강하영, 최돈하. 1999. 수목추출물의 생리활성에 관한 연구 (I). 산림과학논문집 61. 82-89.