

최        종  
연구보고서

산뽕나무로부터 혈압강하와 간보호 물질  
탐색 및 기능성소재 개발

Development of Novel matters for  
Anti-hypertension and Hepatoprotective activity  
from *Morus bombycis* Koidzumi

연구기관

강원대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “산뽕나무로부터 혈압강하와 간보호 물질 탐색 및 기능성소재 개발”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 07월 15일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 왕 명 현

세부연구책임자 : 왕 명 현

연 구 원 : 김 영 선

연 구 원 : 곡 관 정

연 구 원 : 허 성 일

연 구 원 : 한 용

협동연구기관명 : 한국화학연구원

협동연구책임자 : 이 병 호

# 요 약 문

## I. 제 목

산뽕나무로부터 혈압강하와 간보호 물질 탐색 및 기능성소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

산업의 발달, 식생활의 변화 및 환경오염원들은 인간에게 다양한 질병을 일으키는 원인으로 알려져 있다. 생체 내에 존재하는 활성산소와 관련된 free radical은 노화, 염증, 동맥경화, 혈관질환 및 암 등과 같은 여러 가지 질병들의 병인인이 밝혀지고 있다. 따라서 여러 연구자들이 자연계에 존재하는 많은 natural products로부터 활성산소 장애를 방해하는 항산화 물질 등과 같은 생리활성 물질이 이러한 질병에 대한 치료제로서의 가능성과 관련되어 많은 주목을 받고 있다.

심혈관계와 관련된 고혈압 예방식품은 향후 식생활 패턴변화, 운동부족 및 스트레스 가중으로 특징지어지는 일상생활 패턴에 변화에 따라 향후 가장 수요가 클 것으로 전망되고, 이러한 상황에서 고혈압 등 순환기계 질환을 예방 할 수 있는 기능성 식품 및 한방제제용 선도물질을 개발, 발굴하는 것은 시장성이 매우 좋을 뿐 아니라 기하급수적으로 늘어가는 의료비 부담을 감소시킬 수 있는 한 가지 해결책이 될 것이다. 이에 근거하여 고혈압 등 순환기계 질환에 대한 예방 활성이 있는 소재를 탐색 발굴하고, 이를 이용하여 건강 기능 식품의 개발 및 나아가 의약품용 선도물질을 개발할 경우, 출발 물질의 독창성의 측면에서 선진 외국과 비교할 때 경쟁력이 있을 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 산뽕나무를 대상으로 간보호 활성 및 혈압강하활성 등의 다각적인 생리활성을 탐색하고, 나아가서 유효성분의 분리 및 구조규명을 통하여 농업 신소재로 개발하고, 천연자원이 부족한 우리나라의 경우 체계적인 다양성 연구를 바탕으로, 고부가가치 기능성 물질을 생산을 한국 고유의 산뽕나무 자원을 활용한 생리활성물질로부터 고부가가치 신약의 개발은 새로운 국제 경쟁에서 국가의 기술적 우위를 얻는 중요한 핵심 기술이 될 것이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

산뽕나무(*Morus bombycis* Koidzumi)는 뽕나무 과에 속하는 낙엽교목으로 동아시아에 주로 분포하고 있는데 우리나라에서는 전국 각지에서 자생하고 있다. 지금까지 뽕나무 혹은 꾸지뽕나무 등에서 약리작용으로 항염증작용 및 항균작용, 항산화작용, 항당뇨 작용, 고지혈증 억제작용 등이 일부 보고되어 있으나, 아직 생리활성에 대한 체계적인 연구는 극히 미비한 실정이다. 그리하여 본 연구에서는 산뽕나무를 대상으로 영양학적 분석, 항산화활성, 간보호 활성 및 항당뇨 작용 등의 다각적인 생리활성을 탐색하였다. 이러한 일련의 연구를 통하여 여러 질병의 치료제로서의 가능성을 타진하고 국내 유용식물자원인 산뽕나무의 자원화 및 농업 신소재로 적극 개발하고자 한다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

산뽕나무의 생리활성 기능을 탐색하기 위하여 메탄올, 에탄올, 클로로포름, 80% 메탄올, 80% 에탄올 및 물 추출물을 조제하였고, 산뽕나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물로부터 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물을 제조하였다. 얻어진 추출물과 분획물에 대하여 DPPH 자유라디칼 소거법에 의한 항산화성 효과와 UVB 및 UVA 영역에서의 자외선 흡수 효과를 검토하였다. 산뽕나무 추출물의 수소전자공여능(IC<sub>50</sub>)을 측정한 결과, 추출물에서는 80% 메탄올 줄기 추출물, 80% 메탄올 열매 추출물, 80% 에탄올 줄기 추출물, 80% 에탄올 열매 추출물에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. 자외선 차단효과에서는 80% 에탄올 뿌리 추출물 및 80% 메탄올 뿌리 추출물에서 매우 높은 자외선 흡수력이 높게 측정되었다. 항산화 효과 및 자외선 차단효능이 탁월한 산뽕나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물을 대상으로 용매 분획물을 제조하였다. 에틸아세테이트 분획물(IC<sub>50</sub>: 15.0 µg/mL)이 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었으며, 자외선 차단효과에서도 에틸아세테이트 분획물의 자외선 B영역에서 매우 높은 흡수력을 나타내었다.

ESR spectrometer 로 superoxide radical과 hydroxide radical의 소거 활성을 측정하고 소거 활성이 제일 높은 물 추출물로 간보호 기능을 연구하였다. 100 mg/kg의 물 추출물을 투여한 군은 사염화탄소군보다 유의적인 간보호 활성을 나타내었다. 조직학적 관찰에서도 100 mg/kg 투여군 에서 사염화탄소군보다 간조

직이 많이 회복된 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 산뽕나무의 물 추출물은  $\text{FeCl}_2$ -ascorbic acid에 의해 유도된 쥐 간의 과산화지질에 대한 억제작용을 나타내었다. 이로부터 산뽕나무 물 추출물의 간보호 활성은 그의 항산화활성과 연관된 것이라고 생각된다.

산뽕나무 뿌리에서 2,5-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene(DGTS)를 분리 동정하였고 이 물질로 사염화탄소에 의한 간보호 활성을 연구하였다. ESR에 의한 superoxide radical의 소거활성은  $\text{IC}_{50}$ 값이  $430.2 \mu\text{g/mL}$ 이었다. Sample 투여군이 사염화탄소군보다 AST, ALT량이 유의적인 감소를 나타내었다. 그리고  $400\sim 600 \text{ mg/kg}$  투여하였을 때 silymarin과 비슷한 효과를 나타내었다. 이런 간보호 기능은 조직학적 관찰에서도 관찰 할 수 있었다. 이로부터 DGTS는 사염화탄소에 의한 간손상에 보호기능이 있는 것으로 판단되었다.

산뽕나무 뿌리에서 분리 동정된 DGTS로 STZ에 의해 유도된 당뇨쥐 에서 항당뇨 작용을 알아본 결과는 다음과 같다. DGTS 투여군의 혈당량이 STZ군보다 유의적인 감소를 나타내었고 DGTS 투여군의 혈청 AST, ALT, BUN의 함량이 STZ군보다 유의적인 감소를 나타내었고 insulin함량은 유의적인 증가를 나타내었다. 그리고 혈중 과산화지질 함량을 측정된 결과 DGTS투여군의 함량이 STZ군보다 유의적인 감소를 나타내었다. 췌장의 조직학적 관찰에서 보면 STZ군에서 췌장  $\beta$ -cell이 많이 손상된 것을 알 수 있는 반면에 DGTS 투여군 에서는  $\beta$ -cell이 많이 회복된 것을 관찰할 수 있었다. RT-PCR로 CYP2E1과 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 알아본 결과 STZ군에서 제일 강하게 발현되는 반면에 DGTS투여군 에서는 STZ군보다 약하게 발현 되었다. Albumin의 발현량은 정상군과 sample 투여군에서 강하게 나타났고 기타 STZ+DGTS군에서는 약하게 발현되었다. 이로부터 STZ에 의해 유도된 당뇨 쥐에서 DGTS의 항당뇨 작용을 확인하였다.

산뽕나무 뿌리 에탄올추출물은 용량 의존적으로 흰쥐 적출혈관을 이완( $\text{ED}_{50}$ :  $6.7 \text{ mg/kg}$ )시켰으며, 산뽕나무 뿌리 에탄올추출물 (10, 30, 100  $\text{mg/kg}$ )을 6주 일간 선천성 고혈압쥐 (SHR) 에 장기 투여하였을 때, 용량 의존적으로 혈압상승을 억제하였다.

본 연구는 우리나라에서 많이 자생하고 있는 작물 중 하나인 산뽕나무로부터 다양한 활성검사를 통해 산뽕나무의 고부가가치를 창출함과 동시에 산뽕나무의 상품성을 높여 농가 소득 증대를 증대 할 것으로 기대 된다. 기술적인 측면에서는 산뽕나무 뿌리로부터 항산화활성, 간 보호활성 및 NO 생성 저해활성이 뛰어난

난 물질의 분리 및 구조 규명이 이루어 졌으며, 이로 인해 풍부한 유용 식물자원인 산뽕나무로부터 천연 항산화제의 개발, 간장질환 치료제 및 항염증 치료제의 개발도 가능할 것으로 판단된다. 경제·산업적 측면에서는 이러한 일련의 연구결과들을 활용하여 여러 가공식품의 첨가제, 의약품 및 의약부외품의 원료, 기능성 화장품 첨가물, 음료 첨가물, 기능성 건강보조식품 등으로 개발될 수 있기 때문에 유용식물인 산뽕나무의 자원화 및 상품화에 크게 기여할 것으로 기대된다. 또한, 날로 높아가는 기술 특허장벽에 능동적으로 대처함으로써 기술료를 획득하는 기술선진국으로의 발전에 크게 기여할 것이다. 향토지적소유권의 확보 및 유용 식물유전자원의 확보를 통하여 생물 산업 활성화에도 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

## SUMMARY

This study was carried out to investigate the antioxidative activity for the purpose of developing antioxidant from *Morus bombycis* Koidzumi. Antioxidant activities were examined by measuring the radical scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical. The 80% methanol extract from the stem of *M. bombycis* Koidzumi showed strong antioxidative activity. The 80% ethanol extracts from the root, stem, and fruit had high antioxidative activity. The 80% ethanol extract has strong absorbency at UVA region (350nm). Because of these highest antioxidative and photoprotective effect among 24 samples, UVA/B absorption properties and radical scavenging effects of 5 different extract compartments (Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH and H<sub>2</sub>O fraction) from the 80% ethanol extract of root of *M. bombycis* Koidzumi were further examined. The ethyl acetate(EtOAc) fraction exhibited antioxidative activity with IC<sub>50</sub> of 15.0 µg/mL similar to those of synthetic antioxidant, BHT. The EtOAc fraction has a good absorbency property as synthetic filter. In the absorbance of various extracts, the 80% ethanol and ethyl acetate extracts from the root of *M. bombycis* Koidzumi showed higher absorbency at 285 nm. The ethyl acetate fraction from the root of *M. bombycis* Koidzumi contained total phenolic compounds at the level of 654.8 mg/100g. These results seem that the phenolic compound is the major biological component in the root of *M. bombycis* Koidzumi extracts. Considering these biological activities, the extracts of *M. bombycis* Koidzumi showed a possibility to be used as a new material for natural antioxidant and substitutes for synthetic UV sunscreen agents.

The antioxidant activity and liver protective effect of *M. bombycis* Koidzumi were investigated. Aqueous extracts of *M. bombycis* Koidzumi had higher superoxide radical scavenging activity than other types of extracts. The aqueous extract at a dose of 100 mg/kg showed significant hepatoprotective activity when compared with that of a standard agent. The

biochemical results were confirmed by histological observations indicating that *M. bombycis* Koidzumi extract together with CCl<sub>4</sub> treatment decreased ballooning degeneration. The water extract recovered the CCl<sub>4</sub>-induced liver injury and showed antioxidant effects in assays of FeCl<sub>2</sub>-ascorbic acid-induced lipid peroxidation in rats. Based on these results, we suggest that the hepatoprotective effect of the *M. bombycis* Koidzumi extract is related to its antioxidative activity.

We have identified 2,5-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene(DGTS) as the active factor and investigated the protective effect of the purified compound from *Morus bombycis* Koidzumi against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats and the mechanism underlying the protective effects. Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is a toxic material known to induce lipid peroxidation and liver damage. The purified compound from *M. bombycis* Koidzumi displayed dose-dependent superoxide radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>=430.2  $\mu$ g/mL), as assayed by the electron spin resonance (ESR) spin-trapping technique. The increase in aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities in serum associated with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver injury was also inhibited by purified compound from *M. bombycis* Koidzumi. The purified compound from *M. bombycis* Koidzumi at a dose of 400~600 mg/kg had hepatoprotective activity comparable to the standard agent, silymarin. The biochemical assays were confirmed by histological observations showing that the purified compound from *M. bombycis* Koidzumi decreased cell ballooning in response to CCl<sub>4</sub> treatment. These results demonstrate that the purified compound from *M. bombycis* Koidzumi is a potent antioxidant with a protective action against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity.

We investigated 2,5-dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene(DGTS) effects on STZ-induced diabetes in rats. DGTS inhibited the increases in aspartate aminotransferase (AST), alanine amino-transferase (ALT) and blood urea nitrogen (BUN) in the serum associated with STZ-induced diabetes. At doses of 200~800 mg/kg, DGTS had antidiabetic



activity comparable to the standard agent, tolbutamide. The biochemical assays were confirmed by histological observations showing that DGTS prevented atrophy of  $\beta$ -cells and vascular degenerative changes in the islets. DGTS reversed STZ-induced diabetes and had an antioxidant action in assays of lipid peroxidation in serum. Levels of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) mRNA, as measured by RT-PCR, were lower in the livers of DGTS-treated rats than those of the control group. These results demonstrate that DGTS is a potent antidiabetic with a protective action against STZ-induced diabetes.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	13
Section 1. Necessity of research .....	13
Section 2. Prospects for research .....	17
Section 3. Validity for research .....	19
Section 4. purpose of research .....	21
Chapter 2. Current research status (Domestic and foreign status) .....	22
Chapter 3. Contents and products of the development of research .....	25
Section 1. Photoprotective effect and antioxidative activity from different organs of <i>Morus bombycis</i> Koidzumi .....	25
1. Introduction .....	25
2. Materials and Methods .....	26
3. Results and Discussion .....	28
4. Conclusion .....	43
Section 2. Hepatoprotective activity from <i>Morus bombycis</i> Koidzumi water extracts .....	43
1. Introduction .....	43
2. Materials and Methods .....	45
3. Results and Discussion .....	48
4. Conclusion .....	60
Section 3. Hepatoprotective activity and isolation of single matter from <i>Morus bombycis</i> Koidzumi .....	61
1. Introduction .....	61
2. Materials and Methods .....	63
3. Results and Discussion .....	67
4. Conclusion .....	94
Section 4. Isolation of single matter from <i>Morus bombycis</i> Koidzumi for diabetes effects .....	95

1. Introduction .....	95
2. Materials and Methods .....	98
3. Results and Discussion .....	104
4. Conclusion .....	128
Section 5. Evaluation of antihypertensive effect of extracts of <i>Morus bombycis</i> Koidzumi Cortex Radicis .....	128
1. Introduction .....	128
2. Materials and Methods .....	130
3. Results and Discussion .....	134
4. Conclusion .....	153
Chapter 4. Achievements and contribution of the studies to the related fields .....	154
Section 1. Objectives of the research .....	154
Section 2. Standpoints of evaluation and accomplishment of the research .....	154
Chapter 5. Plans for the application of the research .....	157
Section 1. Summary of the results .....	157
Section 2. Applications to other studies .....	160
Chapter 6. Scientific and technological information on foreign biotechnology .....	163
Chapter 7. Reference .....	164

# 목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요 .....	13
제 1 절. 연구개발의 필요성 .....	13
제 2 절. 앞으로의 전망 .....	17
제 3 절. 기술도입의 타당성 .....	19
제 4 절. 연구개발 과제의 목적 .....	21
제 2 장. 국내·외 기술개발 현황 .....	22
제 3 장. 연구 개발 수행 내용 및 결과 .....	25
제 1 절. 부위별 산뽕나무 추출물의 항산화 활성 및 광보호 효과 .....	25
1. 서론 .....	25
2. 재료 및 방법 .....	26
3. 결과 및 고찰 .....	28
4. 결론 .....	43
제 2 절. 산뽕나무 뿌리 물 추출물의 간보호 작용 .....	43
1. 서론 .....	43
2. 재료 및 방법 .....	45
3. 결과 및 고찰 .....	48
4. 결론 .....	60
제 3 절. 산뽕나무 뿌리에서 단일물질의 분리 및 간보호 작용에 미치는 영향 .....	61
1. 서론 .....	61
2. 재료 및 방법 .....	63
3. 결과 및 고찰 .....	70
4. 결론 .....	94
제 4 절. 산뽕나무 뿌리에서 분리된 DGTS의 항당뇨 작용에 미치는 영향 .....	95
1. 서론 .....	95
2. 재료 및 방법 .....	98
3. 결과 및 고찰 .....	104

4. 결론 .....	128
제 5 절. 산뽕나무 뿌리에서 추출한 물질의 항고혈압작용 평가 .....	128
1. 서론 .....	128
2. 재료 및 방법 .....	130
3. 결과 및 고찰 .....	134
4. 결론 .....	153
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	154
제 1 절. 연구개발 목표의 달성도 .....	154
제 2 절. 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 연구실적 .....	154
제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획 .....	157
제 1 절. 최종 연구개발 결과 .....	157
제 2 절. 연구 개발 활용계획 .....	160
제 6 장. 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	163
제 7 장. 참고문헌 .....	164

# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발의 필요성

- 산업의 발달, 식생활의 변화 및 환경오염원들은 인간에게 다양한 질병을 일으키는 원인으로 알려져 있으며, 생체 내에 존재하는 활성산소와 관련된 free radical은 노화, 염증, 동맥경화, 혈관질환 및 암 등과 같은 여러 가지 질병들의 병인임이 밝혀지고 있음.
- 여러 연구자들이 자연계에 존재하는 많은 천연물로부터 활성산소 장해를 방해하는 항산화 물질 등과 같은 생리활성 물질이 이러한 질병에 대한 치료제로서의 가능성과 관련되어 많은 주목을 받고 있음.
- 생약자원을 이용한 한방을 전통적으로 사용해온 배경에 풍부한 생명과학 분야의 연구와 개발전략 그리고 기술인력 및 업계의 창의성을 접목한다면 생물산업 발전뿐만 아니라 국민건강에도 기여할 수 있을 것임.
- 21세기의 정밀화학 산업은 식물자원 소재에서 유용 천연물을 탐색하여 고부가가치의 천연색소, 천연향료, 천연농약, 천연 기능성 식품 등과 나아가서 천연약물 등을 창출하는 시대이며, 특히, 최근의 보완-대체의학에 대한 세계 각국의 정책적인 연구개발과 지원이 확대되면서, 생약자원에 대한 관심과 중요성이 더욱 높아지고 있음.
- 인구의 고령화와 의료비 증가, 생약자원에 대한 관련업계(약품, 식품, 화장품, 농약 등) 참여 가속화, 의사, 약사 등의 전문가의 이해폭 확대, 학계의 연구가속화, 의약분업, 식품에서의 생약 인정 범위가 확대되고 있음.

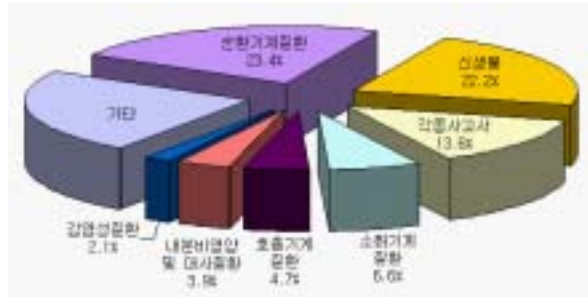
- 현대 의학의 눈부신 발달에도 불구하고 free radical을 억제 혹은 제거하는 방법이 아직 규명되지 않고 있고, 많은 과학자들이 자유라디칼을 제거할 수 있는 각종 항산화제의 탐색 및 개발에 주력하고 있으며, Butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), Troxal-C등의 합성 항산화제가 개발되어 식품의 가공 또는 저장에 사용되고 있으나 이들 합성 항산화제는 항산화 효과는 뛰어나지만 그의 변이원성 및 독성이 지적되면서 보다 안전하고 효력이 우수한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있음.
- 실용화되고 있는 천연 항산화제로는 tocopherol, 향신료 추출물, sesamol, flavonoid, phenol 유도체, gallic acid 등이 있으며 이들의 항산화 효과는 tocopherol만큼 항산화력이 높고 실용적인 것은 없는 것으로 알려져 있음.
- 산뽕나무(Morus bombycisKoidzumi)는 뽕나무 과에 속하는 낙엽교목으로 동아시아에 주로 분포하고 있는데 우리나라에서는 전국 각지에서 자생하고 있으며 잎은 난형 또는 난상 원형이며 밑은 일(一)자 모양 또는 심장형이고 끝은 뾰족하며 날카로운 톱니가 있고 엽병은 길이 5~25 mm로서 잔털이 있고 꽃은 4~5월에 피고 과실은 장질로 구형 또는 타원형이며 5~6월에 자흑색으로 익는다. 뽕나무(Morus alba)에 비해 주두(柱頭)가 씨방보다 길으며. 근피(根皮)를 상백피(桑白皮) 또는 Mori Cortex라 하고 열매를 상심자(桑椹子), 상실(桑實)이라 함.
- 민간에서는 치열(治熱), 천식(喘息), 청폐(淸肺), 소염, 이뇨, 진해, 해수, 거담 등에 쓰였다고 하며, 지금까지 뽕나무 혹은 꾸지뽕나무 등에서 약리작용으로 항염증작용 및 항균작용, 항산화작용, 항당뇨 작용, 고지혈증 억제작용 등이 일부 보고되어 있으나, 아직 생리활성에 대한 체계적인 연구는 극히 미비한 실정 임.
- 울산의대·서울의대·고려의대 예방의학 교실 연구팀이 한국인 120만969명을 무작위 추출하여 140여개 질병에 대해 1998년부터 2002년까지 5년간 추적 조사한 ‘한국인의 질병 부담 2005년 보고서’의 결과에 의하면 우리나라에서 질병의 후유증이나 장애로 한국인의 일상생활에 지장을 초래하는 질병 1위는 당뇨병

이고 매년 많은 수가 걸리고 그로 인한 장애도 심각하다는 의미이며 당뇨병은 국내에서 매년 50만 명의 새 환자가 생기고 전 국민의 8.4%가 치료 받고 있으며 40대 이후부터 꾸준히 우리의 건강을 위협하고 20·30대에는 사고사나 자살을 제외하고 일상생활에 지장을 초래하는 질병은 우울증·위궤양·간염 등이 두드러짐.

- 혈압이란 혈관 속을 흐르는 혈류의 압력, 즉 동맥압을 말하는 것으로, 어떤 원인에 의해 수축기 혈압이 120 mm Hg (최대혈압) 이상이고 확장기 혈압이 80 mm Hg (최저혈압) 이상인 경우를 고혈압이라고 함.
- 고혈압은 본태성 고혈압과 이차성 고혈압으로 크게 나뉘는데, 본태성 고혈압은 가족력을 비롯한 생활습관에 의해 발병되는 질환으로 아직까지 정확한 원인이 알려져 있지 않음. 반면, 이차성 고혈압은 다른 질환에 의해 일시적으로 발병하는 질환으로서, 그 원인 질환이 치유되면 자연적으로 치유됨.
- 고혈압의 분류는 원인은 달라도 기본적으로는 교감신경계의 이상 활성화, 세포막의 기능이상, 신장에서의 물 및 Na 배설장애, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, ANP, EDRF 등과 같은 혈압강하제(hypotensive agent)들의 분비저하 또는 카테콜아민(catecholamine), 레닌-안지오텐신(renin-angiotensin)계 등 고혈압 조절기능의 이상 등이 원인이 됨.
- 이러한 신경계, 내분비계, 세포계의 이상은 말초 저항혈관의 압력증가를 가져오고 고혈압을 유발함. 또한, 고혈압은 그 자체보다는 신부전증, 동맥경화, 뇌출혈, 뇌졸중, 실명, 심부전증 및 심장마비 등과 같은 합병증으로 인해서 사망에 이르게 되는 경우가 많음.
- 고혈압의 90% 이상을 차지하는 본태성 고혈압의 경우 특별한 완치방법이 없을 뿐 아니라, 대부분 장기간 혈압 강하를 위한 치료를 받아야 함.



[1997년 국내 사망원인]



- 고혈압 환자는 현재 세계적으로 6억명을 넘어선 것으로 추산되고 있는데, 미국에만 6,000 만 명 이상의 환자 수를 보유하고 있으며, 치료에 소요되는 경비도 세계적으로 연간 약 400 억달러를 넘는 것으로 평가되고 있음. 국내의 경우도 예외가 아니어서, 연 6,000 억원대의 고혈압 치료제 시장이 형성되어 있으며 매년 평균 15~20%의 고성장을 구가하고 있는 것으로 파악되고 있음 (Med. Ad. News. 2002).
- 혈액순환기계 질환과 관련한 기능성 식품의 경우, herb 제품 중 은행잎 제품이 판매고 3위를 기록할 정도로 수요가 많음(미국, 1999년, 6.11%).
- 심혈관계와 관련된 고혈압, 뇌졸중 예방식품은 향후 식생활 패턴변화, 운동부족 및 스트레스 가중으로 특징지어지는 일상생활 패턴에 변화에 따라 향후 가장 수요가 클 것으로 전망됨.
- 이러한 상황에서 뇌졸중, 고혈압, 혈전 등 순환기계 질환을 예방 할 수 있는 기능성 식품 및 한방제제용 선도물질을 개발, 발굴하는 것은 시장성이 매우 좋을 뿐 아니라 기하급수적으로 늘어가는 의료비 부담을 감소시킬 수 있는 한 가지 해결책이 될 것임.
- 본 연구에서는 산뽕나무를 대상으로 영양학적 분석, 항산화활성, 간보호 활성 및 항당뇨 작용 등의 다각적인 생리활성을 탐색하여, 산뽕나무의 천연 항산화제로의 개발, 간장 질환 치료제, 혈관 평활근 이완작용을 조사하고, 또한 선천

성 고혈압쥐에서의 혈압강하 작용을 측정하고, 혈당 강하제의 기능을 가진 신약 개발로서의 이용에 이론적 근거를 제공하려고 함.

## 제 2 절. 앞으로의 전망

- 우리나라의 4명의 성인 중 1명 정도가 고혈압 환자지만, 심혈관계 약물에 대한 개발 실적이 부진하여 대부분을 외국에 의존하고 있는 실정이며, 효율성이 우수하며, 부작용이 적은 경쟁력 있는 혈압강하제의 개발은 중요하며 시장성이 매우 밝음.
- 우리나라의 산야에 자생하는 산뽕나무를 대상으로 다각적인 효능을 평가하고, 그 효능에 대한 물질을 추적하여 신약 개발을 한다면 농업신소재 개발 측면에서 농가 소득을 향상시킬 수 있을 뿐 아니라 아울러 국민들의 건강증진에도 기여할 수 있을 것으로 기대되고 신약개발에 있어 외국의 고가자원에 의존하지 않고 우리나라의 식물자원을 활용한다는 측면에서 국가 의료 경쟁력을 향상시킬 것으로 기대됨.
- 뽕나무과는 *Artocarpus*, *Morus*, *Ficus* 등의 6개 속을 포함하는 1400여종으로 이루어진 거대한 과로 뽕나무속(*Morus*)은 중국, 한반도, 일본 등 북반구의 아열대지역의 산지에 널리 분포하고 있는 낙엽교목이며, 고대의 원시적 양잠에서는 산과 들에 자생하고 있는 뽕나무에서 뽕잎을 직접 수확하여 오다가 점차 양잠규모가 커짐에 따라 우수한 자생뽕을 주변에 옮겨 심고, 오랜 기간의 재배를 통하여 발견된 우수한 그루를 증식하여 재배뽕이 형성된 것으로 보고 있으며 한국재배 뽕나무 품종의 기원이 되는 원종은 산뽕나무(*Morus bombycis* Koidzumi.), 몽고뽕나무와 백상(*Morus alba* L.) 및 노상(*Morus lhou* Koidzumi.)으로서 현재 재배되고 있는 뽕나무 품종은 그 수가 상당히 많지만 3원종 중 어느 하나에 속하고 있음.

- 뽕나무 근피는 상백피라 하여 소염, 이뇨제로서 주로 한방에서 응용되고 있으며, 근피 추출물은 혈압강화작용이 있는 것으로 보고되고 있으며, 근피의 성분으로는 morusin, kuwanon C와 E, cyclomorusin, neocyclomorusin, mulverrofurane A, mulberroside A와 C, moracin M), kuwanon G, moralbanone, kuwanon S, mulberroside C, eudraflavone B hydroperoxide, oxydihydromorusin, leachinanone G,  $\alpha$ -acetyl-amyrin 등이 알려져 있으며, 상백피의 주요 생리활성 성분으로서 morusin, cyclomorusin, sanggenon A-E, Kuwanone A, B, C, G, H, mulberrofurane Q, G, J,  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin, 지방산 등이 알려져 있음.
- 뽕잎 추출물의 투여는 간장조직의 산소 라디칼의 생성을 억제하여 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 Mn-SOD 및 Cu, Zn-SOD 등 활성산소의 제거효소의 활성을 효과적으로 증가시킴.
- 뽕나무 및 꾸지뽕나무 줄기껍질 수용성 추출물에는 혈청 중성지방 저하 작용 뿐만 아니라 신장 및 간장 microsome의 지질 과산화물 농도 저하작용이 인정되었음.
- 뽕잎 추출물의 투여는 뇌조직의  $\cdot\text{OH}$  및  $\cdot\text{O}_2^-$  등 산소 라디칼의 생성을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 Mn-SOD 및 Cu/Zn-SOD 등 활성산소의 제거효소의 활성을 효과적으로 증가시키고, 꾸지뽕나무 각 부위별 수용성 추출물 중에는 in vitro 항산화 실험계에서 항산화 활성을 나타내는 생리활성 성분을 지니고 있는 것으로 나타났음.
- 꾸지뽕나무 열매의 추출 온도 및 용매를 달리한 실험에서 각각 30℃ 추출과 acetone 분획에서 linoleic acid 및 microsome 세포막 지질 과산화 억제효과가 강하게 나타났고, 잎, 열매, 줄기 및 뿌리의 분획물과 플라보노이드 화합물이 흰쥐의 과산화지질 함량에 영향을 줌.

### 제 3 절. 기술도입의 타당성

- 고혈압에 쓰이는 약은 주로 크게 다음과 같다.
  - 이뇨제 (diuretics)
  - 교감신경차단제 (adrenergic inhibitor, alpha and beta blocker)
  - 칼슘길항제 (calcium antagonist)
  - 안지오텐신 전환효소 억제제 (ACE inhibitor)
- 이들은 각기 특징과 장단점이 있으며 환자마다 적합한 약이 다를 수 있으며, 일반적으로 이뇨제는 매우 저렴하다는 점이 장점임.
- 교감신경차단제는 심혈관질환에 대하여 강한 심장보호 효과가 있으며, 비교적 새로운 약인 칼슘 길항제와 안지오텐신 전환효소 억제제는 혈압강하효과도 뛰어나고 심장보호 효과도 있으나 가격이 높은 편임.
- 세계적으로도 고혈압과 같은 심혈관 질환이 심각한 문제로 대두되고 있어 심혈관계 약물의 수요가 폭발적으로 증가하고 있으며, 이에 인체에 독성이 적고 효과가 우수하며 장기 복용이 가능한 약물의 개발이 절실히 요구되고 있지만, 우리나라의 심혈관계 약물 연구 성과가 전무한 실정 임.
- 의약품 시장이 개방되면 국내 의약품 산업계는 외국 기업에 종속될 가능성이 크며, 부작용이 적으며, 장기복용이 가능한 고부가가치를 창출하는 혈압관련 신약 개발이 절실히 요구 됨.
- 뽕나무과 식물중 약용식물이 75%를 나타내고 있는바 그 중 잎류와 근류 약용식물이 가장 많았으며 전국에 고루 분포되어 있고, 독성약물도 거의 없기 때문에 임상에 용의하게 사용될 수 있을 것이라고 생각 됨
- 산뽕나무(*Morus bombycis* Koidzumi)는 쌍떡잎식물 켄피폴목 뽕나무 과에 속하는 낙엽교목으로 표고 1,400 m 이하에서 자라고 중국이 원산지이며 한국

각지에 널리 가꾸어지고 있음.

- 내한성과 내조성은 강하나 내음성과 내동성, 내건성이 약하며, 줄기가 곧고 굵으며 높이 자라고, 높이 7-10 m, 직경 0.5-1 m 로 나무껍질은 회갈색을 띠며 작은 가지는 잔털이 있는 것도 있고 없는 것도 있으며, 점차 흑갈색으로 변하고, 잎은 길이 2-22 cm, 넓이 1.5-14.0 cm로서 어긋나게 자리하며 계란꼴 또는 계란꼴에 가까운 둥근꼴로서, 3-5개로 얇거나 깊게 갈라 짐.
- 잎 끝은 뾰족하고 날카로운 톱니가 있고, 밑둥은 심장형으로 얇게 패이고 길이는 10 cm안팎으로 가장자리에는 무딘 톱니가 규칙적으로 배열되고 있으며 잎 뒷면에 있는 잎맥 위에는 잔털이 나 있고 엽병은 길이 5-25 cm로서 잔털이 있고 턱잎은 일찍 떨어지고, 잎자루에는 잔털이 나 있으며 꽃은 새로 자라난 가지 밑부분의 잎겨드랑이에서 4-6월에 피어나는데, 암꽃과 수꽃이 각각 다른 나무에 달림.
- 근피를 상백피 또는 Mori Cortex라 하고 열매를 상심자, 상실이라 하며, 잎은 누에의 사료로 쓰이고 뿌리껍질에는 베타아미린, 알파핵세놀, 크리산세민, 쿠드라린, 이소퀘르시트린, 모린 등의 성분이 함유되어 있음
- 이 성분은 해열, 진해, 이뇨, 소종 등의 효능을 가지며, 한방에서는 폐질환으로 인한 기침, 기관지염, 각기, 수종, 소변이 잘 나오지 않는 증세 등의 치료약으로 쓰이며, 잎을 차 대신 달여서 마시면 고혈압과 동맥 경화에 효과가 있으며, 간장 효과도 볼 수 있음.
- 국내산 수목 추출물의 항균 및 항산화활성을 검정한 결과 산뽕나무가 활성이 우수한 것으로 나타났으므로 심재 에탄올 추출물에서 에틸아세테이트 가용부로부터 4개의 페놀성 화합물을 단리 하였고 그 중 resveratrol와 oxyresveratrol의 항균 및 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있음.

## 제 4 절. 연구개발 과제의 목적

- 지금까지 뽕나무 혹은 꾸지뽕나무 등에서 약리작용으로 항염증작용 및 항균 작용, 항산화작용, 항당뇨 작용, 고지혈증 억제작용 등이 일부 보고되어 있으나, 아직 생리활성에 대한 체계적인 연구는 극히 미비한 실정 이므로 본 연구에서는 산뽕나무를 대상으로 영양학적 분석, 항산화활성, 간보호 활성 및 항당뇨 작용 등의 다각적인 생리활성을 탐색하고 이러한 일련의 연구를 통하여 여러 질병의 치료제로서의 가능성을 타진하고 국내 유용식물자원인 산뽕나무의 자원화 및 농업 신소재로 적극 개발하고자 함
- 주요 생리활성 물질 탐색 방법은 다음과 같다.
  - 뽕나무의 일반성분 분석, 미량영양원소의 함량분석, 구성당의 조성, 지방산의 조성, 아미노산의 조성, 기타 미량영양성분의 함량분석
  - 유기용매에 의한 대량추출, 극성에 따른 용매분획, silica gel column chromatography등을 이용한 생리활성물질 분리
  - 선천성 고혈압쥐 및 신성 고혈압쥐에서의 항고혈압효과 평가
  - Gas chromatography 및 NMR을 이용한 구조규명
  - 저밀도 지방 단백질 산화에 대한 억제효과 측정
  - 일차 간 배양세포 혹은 간세포주(Hep G2)를 이용한 간 보호활성 탐색
  - 선천성 고혈압쥐에서의 항고혈압효과 측정
  - S.D.계 흰쥐 적출혈관을 이용한 생리활성물질의 혈관이완 작용 측정
  - S.D.계 흰쥐 적출심장을 이용한 생리활성물질의 심장순환계 작용 평가
  - 각종 동물모델을 이용한 생리활성 성분의 약리기전 연구
  - 생리학, 생화학 및 의학 관련 실험

## 제 2 장. 국내 · 외 기술개발 현황

- 1980년대에 들어선 후 우리나라 사람의 사망원인이 되는 질병은 선진국과 비슷한 양상으로 급속히 변했으며 지난 20년 동안 순환기질환으로 인한 사망이 약 10배가 증가하여 순환기 질환 사망률이 제 1위로 전체 사망자의 약 30%를 차지하게 되었음.
- 순환기 질환에 의한 사망률의 증가는 당분간 계속될 것이므로 가까운 장래에는 우리나라 사람의 40% 또는 그 이상이 순환기 질환으로 사망하게 될 것이며, 특히 우리나라 순환기 질환의 대다수가 고혈압과 이에 관련된 질환임은 잘 알려진 사실 임.
- 각종 통계에 의하면 우리나라 성인의 약 25% 정도가 혈압이 높고 이중 20% 정도는 중증 고혈압이고 나머지 80%가 중등도 고혈압이며 우리나라에서도 이제 고혈압을 적절히 치료하여 고혈압의 합병증으로 고통 받는 사람을 구제할 필요성이 절실.
- 식품성분 및 생약재 등 천연물을 이용한 순환기계 질환관련 연구로는, 최근 carnosine, ellagic acid 유도체, 카로틴 유도체, S-cysteinyll 유도체등의 식품성분들이 허혈성 뇌손상의 일차적 예방뿐 아니라 이차적 예방에도 효과가 있는 것으로 국외에서 보고되고 있으며, 미국 고혈압학회지에 발표한 내용에 따르면, 고혈압을 비롯한 심장 질환을 앓고 있는 미국 국민의 30%에서 50%에 해당하는 인구가, 건강기능 소재를 함께 병용하고 있는 것으로 나타나 그냥 간과하기에는 커져버린 시장을 어떠한 시각으로 볼지 관심이 집중되고 있음

표. 유럽과 미국에서 시장을 주도하고 있는 제품군

소재	유효 성분	업체
Isoflavone	Genistein, Daidzein	ADM, Royal Schouten, TSI
Grape Extract	Activin, Resveratrol	Biolandes, TSI, Cyvex
Dansheng	Mg Lithospermate	TSI, Draco
Lycopene	cis-Lycopene	Lycored, DSM, BASF
Aloe	Aloeemodin, Aloin A	Aloe Corp...
Policosanol		AHD Intl.
Horse Chestnut	Venostasin	Euromed USA

- 혈압강화제는 여러 가지가 있지만 크게 세 가지로 원리를 요약 할 수 있음.
- 첫째는 이노를 시킴으로써 혈압을 떨어뜨리는 방법이며 이노를 시키면 일단은 혈액을 구성하고 있는 수분이 소변을 통해 빠져나가기 때문에 혈액의 전체 용적이 감소하게 되고 따라서 혈관에 미치는 압력이 줄어 혈압이 떨어지게 되는 원리를 이용한 것
- 이 방법은 초기에는 상당히 빠른 효과를 주는 장점이 있지만 오랜 기간 동안 사용하면 과도하게 혈액의 수분이 감소돼 혈액의 농도가 높아지고, 걸쭉해진 혈액은 순환장애를 쉽게 일으키므로 오히려 혈압을 상승시키는 결과를 초래할 수 있음.
- 둘째, 혈관 확장제를 사용 해 혈관의 용적을 늘림으로써 일시적이거나 혈액의 흐름을 원활하게 하는 방법이 있으며 이 방법 또한 일시적으로는 혈압을 떨어뜨릴 수 있겠지만, 장기적으로 볼 때는 혈관을 강제로 늘리기 때문에 오히려 혈관의 탄력성을 떨어뜨려 쉽게 혈관 벽의 강화, 즉 동맥경화를 일으키는 요인으로 작용할 수 있음.
- 끝으로 심장의 혈액 방출력을 감소시킴으로써 혈압의 강하를 유도하는 방법이 있다. 이 방법도 한시적으로는 혈압을 떨어뜨릴 수 있지만 자칫 잘못하면 심



장 기능의 약화를 초래해 전반적인 혈액 순환 장애를 유발할 수 있는 문제점이 있음.

- 특히, 일본에서는 cineol, geraniol, camphor, morin, scopoletin, ecdystreone, inokosterone, morocetin, kuwanone C. 거담, 진해, 해소, 이뇨, 소염, 두통 등에 효능이 있다는 것을 알고 뽕나무의 효능을 증명하기 위한 여러 가지 실험들을 실시 해왔음.
- 그들의 실험에서 고혈압의 대부분을 차지하는 본태성 고혈압의 기작에서 renin-angiotensin system이 혈압 조절에 매우 중요한 역할을 한다고 밝혀지고 여기에 관여하는 효소인 ACE는 renin에 의해 생성된 생체 중에 존재하고 있는 불활성형의 decapeptide인 angiotensin I의 C말단 decapeptide을 절단하여 강력한 혈관 수축 작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효소가 ACE의 작용을 저해함으로써 고혈압 치료가 가능하다는 것을 알게 되었음.
- 본 연구의 총괄 책임자인 왕명현 교수는 2003년도에 일본 현지를 방문하여 일본의 기술을 견문하였으며, 전문적인 지식을 축적하기 위해서 일본의 연구소를 방문하여 그들의 기술을 확인함과 동시에 본 연구에 직접 응용할 수 있는 연구기법을 전수 받았음.

## 제 3 장. 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 부위별 산뽕나무 추출물의 항산화 활성 및 광보호 효과

#### 1. 서론

생체 내에서 산화제 공격과 항산화제 방어는 밀접하게 조화를 이루고 있다. 그러나 방어는 필연적으로 완벽하지 못하다. 따라서 생체 구성분자들인 지질, 단백질, 핵산 등의 생체분자들은 산화제인 free radicals에 의해 계속적인 산화적 손상을 받으며 이들 산화반응 산물들은 나이와 더불어 축적된다. 산화제에 유리한 이러한 불균형이 노화 그 자체의 원인이 된다는 학설이 free radical 설이다. 나이, 자외선 등 내외적인 여러 가지 스트레스에 의해 일어나는 피부노화현상은 피부두께의 변화와 함께 세포 수 감소 및 피부 신진대사 저하, 생체결합수 손실을 비롯하여 콜라겐, 엘라스틴 등의 세포간물질 감소로 인해 피부속이 바람 빠진 공처럼 함몰되고 골이 생겨 결국 주름지고 거친 피부표면의 형태로 나타난다. 피부노화는 특히 태양광선에 매일 노출되는 신체 부분에서 자외선에 의해 야기된다. 피부에 도달하는 태양광 스펙트럼은 UVB(280-320 nm), UVA(320-400 nm), 가시광선 그리고 적외선으로 이루어진 복사선 복합체이다. UVA는 UVB보다 피부 흥반 생성에 있어서는 1000배 정도 약하다. 그러나 태양광선은 UVA를 UVB보다 100배나 더 많이 함유하고 있다. UVB의 작용은 주로 표피에 제한되어 있으나 UVA보다 더 깊이 침투하여 단구 및 다형핵 세포의 침윤을 야기 시킬 뿐만 아니라 진피의 미세 혈관에서 내피 세포 손상도 야기 시킨다. Bryce가 조사한 바와 같이, 자외선의 피부 속까지의 침투 깊이는 활성산소가 생성되는 자리를 결정하며, 이는 확실히 자외선의 파장과 세기에 의존한다. UVA 및 UVB 조사 후 생체 내에서 활성 산소종은 높은 농도로 생성되며 이들 활성 산소종은 세포 및 세포간질 성분인 결합조직을 손상시킨다는 간접적인 증거들이 많이 축적되고 있다(76-79). 자외선에 노출되면 피부에는 과잉의 활성산소가 생성되며, 항산화효소와 글루타

치온, 비타민 E, 비타민 C 및 유비퀴놀과 같은 저 분자량의 항산화제가 감소한다. 이와 같이 자외선으로 생성된 활성 산소종은 실질적으로 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어를 위태롭게 만든다. 결과적으로 산화적 스트레스는 세포 성분들에 대한 손상을 야기 시키고 광노화를 촉진시킨다. 광노화 과정에서 활성 산소종은 멜라닌 생성을 촉진시키고 주름을 생성시키는 원인물질로 받아들여지고 있다.

최근 산화적 스트레스에 기인한 많은 종류의 질병이 발생되고 있으며, 이와 관련하여 우수한 항산화 활성을 갖는 물질에 대한 탐색연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 널리 사용되고 있는 항산화제는 BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxy anisole), TBHQ(2-tert-butyl hydroxyquinone) 같은 합성품인데, 이들을 50 mg/kg/day 이상의 고용량으로 장기간 복용 시 지질대사의 불균형과 암을 유발 시킬 수 있기 때문에 이들의 사용을 제한하고 있는 실정이다. 그러므로 이러한 합성항산화제를 대체할 수 있는 우수한 항산화제의 개발이 매우 중요하다. 따라서 최근에는 각종 생약이나 식용식물 추출물 등에서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 연구에서는 부위별 산뽕나무를 대상으로 새로운 기능성 탐색의 일환으로 부위별 산뽕나무의 각종 추출물과 분획물을 이용하여 항산화활성과 광보호 효과에 대하여 연구하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 재료

본 연구에 사용된 산뽕나무는 강원도 내에서 자생하는 것을 부위별로 열매, 잎, 줄기 및 뿌리를 직접 채취하여 감별한 후, 잘 세척하고 잘게 세절한 다음, 음건시켜 냉장실에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

### 2) 용매 추출 및 분획

부위별로 산뽕나무를 음건 세절하여 분말로 분쇄 후, 약 100 g 정도를 추출용기에 넣고, 에탄올(ethanol, EtOH), 메탄올(methanol, MeOH), 클로로포름(chloroform, CHCl<sub>3</sub>), 물(water, H<sub>2</sub>O), 80% 에탄올, 80% 메탄올 등의 용매 2 L

를 가하여 상온에서 3일간 교반 추출하였다. 추출하여 얻어진 용액을 여과(Watman Paper No. 2)한 후, 감압 농축하여 추출물을 얻은 다음 각각의 추출수율(%)을 계산하였다.

생리활성 부분을 보다 더 정제하기 위하여, 산뽕나무 뿌리를 대량으로 채취하여, 음건 세절 후, 분말화한 1 kg을 10 L의 80% 에탄올로 상온에서 3일간 2회 반복 추출하여 80% 에탄올 엑스(106.47 g)를 얻었다. 이 추출물을 물 10 L에 현탁 한 후, 용매의 극성차에 따라서 헥산(n-hexane), 클로로포름( $\text{CHCl}_3$ ), 에틸아세테이트(ethyl acetate, EtOAc), 부탄올(n-butanol, BuOH)등으로 분획하였다. 분획된 각각의 용매혼합액을 감압 농축하여 hexane분획(3.85 g),  $\text{CHCl}_3$ 분획(2.52 g), EtOAc분획(2.89 g), BuOH분획(12.54 g), 및  $\text{H}_2\text{O}$ 분획(64.13 g)을 얻은 후 분획물을 대상으로 생리활성을 탐색하였다.

### 3)추출물 및 분획물에 대한 흡광도 측정

부위별 산뽕나무 추출물 및 뿌리 분획물에 대하여 항산화성 물질로 알려진 화합물들(protein, aromatic amine, 및 phenol 등)의 용출정도를 Hewlett Packerd사(Palo Alto, CA, USA)의HP 8452A diode array spectrophotometer를 사용하여 285 nm에서 흡광도로 측정하였다. 이때 시료는 0.1 mg/mL이 되게 추출물을 메탄올에 녹인 후, 흡광도를 측정하였다. Carotenoids함량은 추출물을 0.01%가 되도록 메탄올에 녹인 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 그 함량을 측정하였다. 부위별 산뽕나무 추출물 및 뿌리 분획물의 갈색화 반응 생성물질의 농도를 나타내는 갈색도는 490 nm에서의 흡광도를 자외선/가시광선 분광광도계(Hewlett Packerd사의 HP 8452A diode array spectrophotometer)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

### 4)총 페놀성 화합물 함량

총 페놀성 물질 함량은 Folin-Denis방법에 따라 분석하였다. 즉, 추출물 혹은 분획물을 1.0 mg/mL가 되게 조제한 후, 75 mL의 증류수가 함유된 100 mL의 메스 플라스크에 1 mL씩 넣고 잘 혼합하여 Folin-Denis시액 5 mL와 탄산나트륨 포화용액 10 mL를 차례로 넣은 다음 증류수로 100 mL 용량으로 채운다. 이것을 잘 혼합하여 실온에서 30분 방치한 후, UV/VIS 분광광도계로 760 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질은 tannic acid를 이용하였다.

### 5) 자외선 차단효과 측정

부위별 산뽕나무 추출물 혹은 분획물 들의 농도를 0.1 mg/mL 이 되도록 제조한 뒤, 자외선 중파장대(UVB 280~320 nm, UV 308 nm) 및 장파장대(UVA 320~400 nm, 350 nm)에서 자외선/가시광선 분광광도계(Hewlett Packard사의 HP 8452A diode array spectrophotometer)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 자외선 차단력(E%cm)은 추출물 1% 농도 시, 직경 1 cm의 UV cell에서의 흡광도로 정하였다. 산뽕나무 뿌리 80% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 농도별(0~100 $\mu$ g/mL)로 제조하여 중파장대(UV 308 nm) 및 장파장대(UV 350 nm)에서의 흡광도를 측정하였다. UV spectrum은 추출물의 농도를 0.01%로 제조한 뒤, 파장 200~400 nm에서 측정하였다.

$$A=ebC$$

A: 흡광도 e: 흡광계수 b: cell의 크기 C: sample의 농도

### 6) DPPH 자유라디칼(free radical) 소거법에 의한 항산화 효과

추출물이나 분획물 등의 검체를 적당한 농도로 에탄올 혹은 메탄올에 희석한 용액 4 mL와 0.2 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 1 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음, 실온에서 30분간 방치한 후, 514 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 효과는 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였다. 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하였다. 이 효능검정을 통하여 항산화력을 확인하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 1) 산뽕나무 추출물의 흡광도

산뽕나무를 부위별로 각각 100 g을 용매 2 L로 상온에서 3일간 추출한 후, 여과하여 감압 농축 후 추출수율을 구하였다. 열매 물 추출물이 29.0%로 추출수율이 가장 높았으며 그 다음이 잎 물 추출물과 열매 80% 메탄올 추출물로 각각 21.4%, 19.2%로 나타났다. 용매별로는 물 > 80% 에탄올 > 80% 메탄올 > 메탄올 > 에탄올 > 클로로포름 순으로 주로 극성용매일수록 추출수율이 높게 측정되었다. 항산화성 물질로 알려진 화합물들(protein, aromatic amine 및 phenol 등)의

용출정도를 HP사의 HP 8452A diode array spectrophotometer를 사용하여 285 nm에서 측정하여 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 산뽕나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물이 1.687로 가장 높게 측정되었고 그 다음이 뿌리 80% 메탄올 추출물, 메탄올, 및 에탄올 순으로 나타났다. 부위별로는 뿌리 > 줄기 > 열매 > 잎 순으로 자외선 흡광도가 높게 측정되는 것으로 보아서 주로 뿌리에 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있을 것으로 추정된다.

대부분의 카로티노이드(carotenoids)는 450 nm 파장에서 높은 흡광계수(extinction coefficient)로 흡수하므로, 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 그 함량을 추정할 수 있다. 부위별 산뽕나무 추출물의 카로티노이드계 화합물의 함량을 Figure 1에 나타내었다. 잎 클로로포름 추출물이 0.424로 가장 높게 측정되었고, 그 다음이 열매 80% 에탄올 추출물, 잎 80% 에탄올 추출물이 0.231 및 0.198로 갈색도가 높게 측정되었다. 그 외의 추출물들은 흡광도가 높지 않은 것으로 미루어 보아서 산뽕나무 추출물중 카로티노이드계 화합물은 소량 함유되어 있는 것으로 추정되었다.

산뽕나무 부위별 추출물들의 갈색도를 Figure 1에 나타내었다. 산뽕나무 열매 80% 에탄올 추출물이 0.189로 다소 높게 측정되었고 그 다음이 잎 클로로포름 추출물과 줄기 물 추출물로 각각 0.185 및 0.141로 측정되었다. 그 외의 추출물들은 대부분 흡광도가 0.1 이하로 매우 낮게 측정되는 것으로 보아서 산뽕나무 추출물에는 갈변물질을 거의 함유하지 않은 것으로 보여 진다.

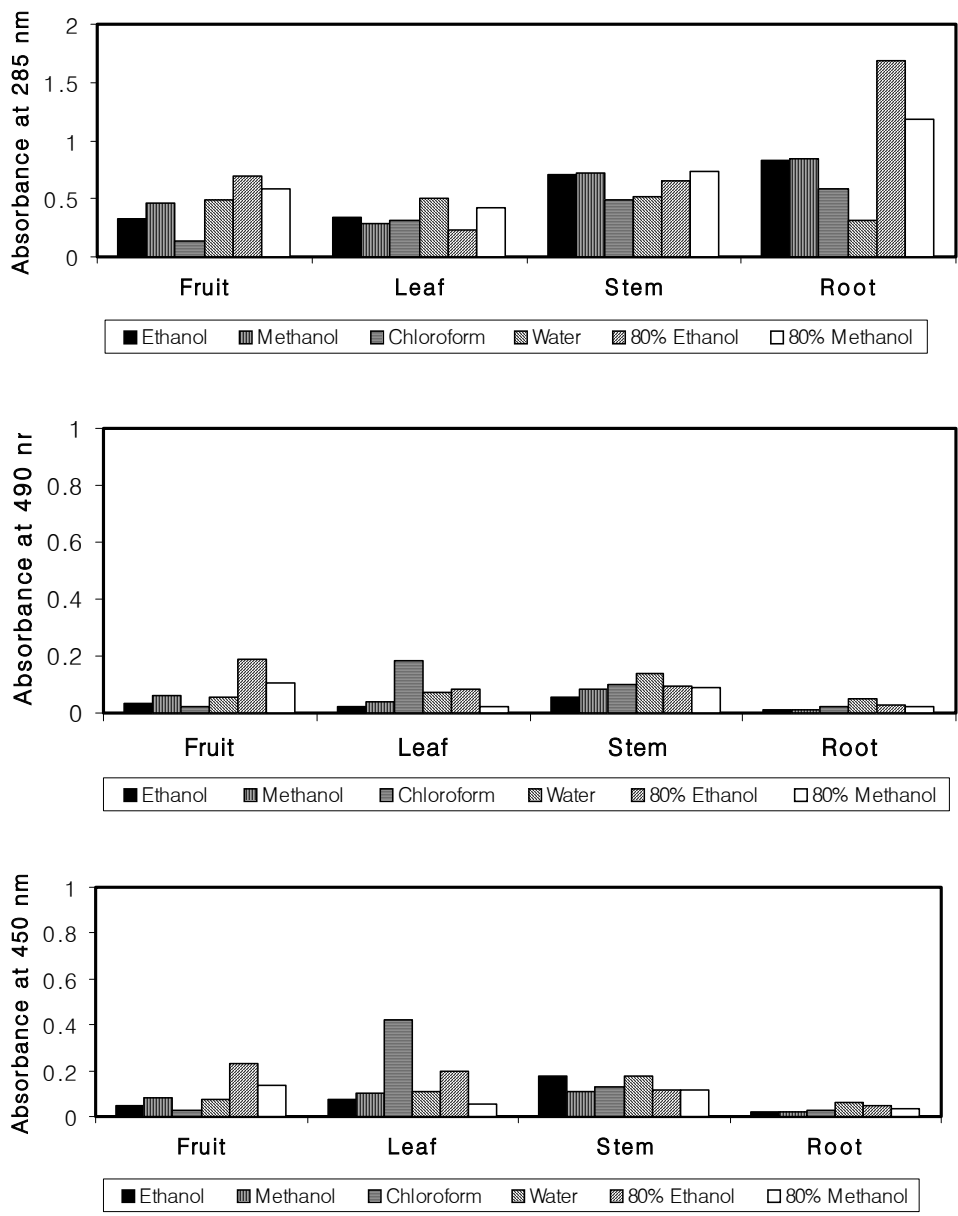


Figure 1. Absorbance of extracts obtained from *Morus bombycis* Koidzumi by using various solvents at 285, 450, and 490 nm. The absorbance is measured with a 0.01% solution in methanol over an optic path of 1cm.

## 2) 산뽕나무 추출물의 총 페놀성 화합물 함량

산뽕나무 부위별 추출물 내에 들어 있는 추출 고형분 100 g당 들어있는 총 페놀성 화합물(Total phenolic compounds) 함량을 Folin-Denis법에 따라 분석하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 줄기 80% 메탄올 추출물이 추출 고형분 100 g당 819.4 mg으로 가장 높은 함량을 함유하고 있었으며 그 다음이 줄기 80% 에탄올 추출물(537.6 mg/100g), 열매 80% 에탄올 추출물(503.7 mg/100g) 순으로 총 페놀성 화합물을 함유하고 있는 것으로 분석되었다.

## 3) 산뽕나무 추출물의 자외선 차단효과

태양광선은 자외선 6%, 가시광선 49%, 적외선 45%의 구성으로 광선을 방사하고 있으며, 이들 광선 중 특히 피부에 영향을 끼치는 것은 자외선이다. 자외선은 특성상 장파장대(UVA 320~400 nm), 중파장대(UVB 280~320 nm) 및 단파장대(UVC 280 nm 이하)로 구분하고 있다. 장파장(UVA 320~400 nm)은 피부표피의 환원 멜라닌을 산화하여 태워주고, 중파장대(UVB 280~320 nm)는 피부질환, 피부암 등을 유발하고, 단파장(UVC 280 nm 이하)은 대기와 오존층에 흡수되어 피부에 영향을 미치지 못하는 것으로 알려져 있다.

산뽕나무 추출물들의 자외선 차단효과를 Table 2에 나타내었다. 자외선 중파장대(UVB 280~320 nm)에서는 뿌리의 80% 에탄올 추출물의 흡광계수가 150.5로 강력한 자외선 차단효과를 지니고 있었다. 그 다음으로 뿌리 80% 메탄올 추출물(108.5), 뿌리 메탄올 추출물(81.6), 뿌리 에탄올 추출물(80.1) 순으로 자외선 차단효과가 높게 측정되었다. 자외선 장파장대(UVA 320~400 nm)에서는 뿌리 80% 에탄올 추출물이 64.1로 가장 높게 측정되었으며 그 다음으로 뿌리 80% 메탄올 추출물(52.3), 열매 80% 에탄올 추출물(43.2), 뿌리 에탄올 추출물(40.9) 순으로 자외선 차단효과가 높게 측정되었다. 부위별로는 뿌리 > 줄기 > 열매 > 잎 순으로 자외선 차단효과가 높게 나타났다. 산뽕나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물은 매우 강력한 자외선 차단효과를 지니고 있기 때문에 자외선 차단효과를 지닌 기능성 화장품 원료로 개발할 가능성을 충분히 지닌 것으로 사료된다. 산뽕나무의 줄기 및 뿌리는 현재 식용이 가능하지 않기 때문에 기능성 화장품 원료로 사용한다면 잎이나 열매에 비하여 잘 활용되지 않는 산뽕나무 줄기 및 뿌리의 활용에 큰 도움을 줄 것으로 보인다.



Table 1. Contents of total phenolics in extracts obtained from *Morus bombycis* Koidzumi by using various solvents.

Extracts	Total phenolics (mg/100g)			
	Fruit	Leaf	Stem	Root
Ethanol	196.8	115.0	327.7	334.6
Methanol	164.0	56.1	331.4	270.6
Chloroform	32.1	59.9	106.2	109.3
Water	254.9	451.6	414.4	198.5
80% Ethanol	503.7	236.2	537.6	388.9
80% Methanol	385.6	298.5	819.4	360.6

Table 2. UVA/UVB absorption properties of extracts obtained from *Morus bombycis* Koidzumi by using various solvents.

Extracts	E%cm <sup>1)</sup> at absorption 308nm	E%cm <sup>1)</sup> at absorption 350nm
<b><u>Synthetic filter</u></b>		
Octyl methoxy cinnamate	924.4	16.9
Dioxybenzone	412.6	208.5
Oxybenzone	423.8	216.1
<b><u>Fruit</u></b>		
Ethanol	21.6	12.0
Methanol	37.1	19.6
Chloroform	10.8	6.4
Water	40.1	23.3
80% Ethanol	60.2	43.2
80% Methanol	48.3	31.4
<b><u>Leaf</u></b>		
Ethanol	25.6	16.1
Methanol	21.4	13.9
Chloroform	26.5	27.1
Water	40.5	27.4
80% Ethanol	18.8	16.8
80% Methanol	32.6	18.3
<b><u>Stem</u></b>		
Ethanol	65.4	34.3
Methanol	65.8	35.0
Chloroform	44.3	32.4
Water	43.3	32.6
80% Ethanol	60.7	31.7
80% Methanol	68.0	36.7
<b><u>Root</u></b>		
Ethanol	80.1	40.9
Methanol	81.6	39.2
Chloroform	44.2	19.6
Water	28.6	18.9
80% Ethanol	150.5	64.1
80% Methanol	108.5	52.3

1) The coefficient of extinction, E%cm, is the theoretical absorbance of a 1% solution over an optic path of 1cm.

#### 4) 산뽕나무 추출물의 항산화효과

DPPH 라디칼 소거법에 의한 산뽕나무 추출물들의 항산화 효과를 Table 3에 나타내었다. 산뽕나무 줄기 80% 메탄올 추출물의 항산화효과(IC<sub>50</sub>: 23.8 µg/mL)가 가장 높게 측정되었다. 줄기 80% 에탄올 추출물(IC<sub>50</sub>: 26.2 µg/mL) 및 열매 80% 메탄올 추출물(IC<sub>50</sub>: 26.2 µg/mL)이 그 다음으로 항산화 효과가 높게 측정되었으며 열매 물 및 80% 에탄올 추출물(IC<sub>50</sub>: 28.6 µg/mL)도 매우 높은 항산화력을 나타내었다. 용매별로는 80% 메탄올 > 80% 에탄올 > 메탄올 > 물 > 에탄올 > 클로로포름 순으로 항산화 효과가 높게 측정되었으며 주로 극성 용매에서 항산화 활성이 높게 측정되었다. 모든 부위에서 유사한 항산화 활성을 나타내었으며, 열매 추출물에서도 높은 항산화 활성을 나타내었다. 항산화 활성이 높은 추출물들의 경우, 대부분 페놀성 화합물의 함량이 높게 측정된 것으로 미루어 보아서, 이들 추출물들의 항산화효과는 페놀성 화합물에 의한 영향 일 것으로 추정된다. 앞선 보고에서 뽕나무 혹은 꾸지뽕나무 등에서도 항산화 작용이 있는 것으로 보고된바 있는데, 본 연구에서도 산뽕나무의 추출물에서 항산화 작용이 강력하게 나타남을 확인하였다.

#### 5) 산뽕나무 뿌리 용매 분획물 들의 흡광도

산뽕나무 부위별 추출물들의 생리활성 탐색결과, 뿌리 추출물이 자외선 차단효과 및 항산화효과가 가장 탁월한 부위였기 때문에 산뽕나무 뿌리 추출물을 대상으로 용매 분획물을 제조하여 활성물질을 보다 더 정제한 후 다각적인 생리활성을 탐색하였다. 제조된 분획물의 추출수율을 분석한 결과, 물 분획물이 60.2%로 가장 많은 부분을 차지하였고, 클로로포름 분획물이 2.4%로 가장 적게 분획되었다. 이로 미루어 보아서 산뽕나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물은 주로 물에 잘 녹는 성질을 지닌 극성 계통의 물질이 다량 함유되어 있을 것으로 추정된다.

산뽕나무 뿌리 용매 분획물 들의 285 nm, 450 nm, 490 nm에서의 흡광도를 Figure 2에 나타내었다. 주로 285 nm에서 흡광도가 높게 측정되었는데, 특히 에틸아세테이트 분획물이 2.269로 매우 높게 측정되었고, 그 다음이 부탄올 분획물로 1.461로 측정되었다. 주로 카로티노이드계 화합물이 용출되는 450 nm에서의 흡광도는 모든 분획물 에서 낮게 측정되었고, 또한 갈변물질이 주로 용출되는 490 nm에서의 흡광도도 매우 낮게 측정되었다. 이로 미루어 보아서 산뽕나무 뿌리 용매 분획물 에는 주로 285 nm에서 강한 흡광을 나타내는 페놀계 계통의 화

합물이 많이 함유되어 있을 것으로 추정되며, 285nm에서 흡광을 나타내는 페놀계 화합물들이 생리활성을 나타내는 주된 물질일 것으로 판단되어 진다.

6) 산뽕나무 뿌리 분획물의 총 페놀성 화합물 함량

산뽕나무 뿌리 분획물중 총 페놀성 화합물의 함량을 Table 4에 나타내었다. Table 4에 나타낸바와 같이 에틸아세테이트 분획물이 100 g당 654.8 mg으로 다량의 총 페놀성 화합물을 함유하고 있었으며 그 다음이 부탄올 분획물로 100 g당 409.2 mg의 총 페놀성 화합물을 지니고 있는 것으로 확인되었다. 그 외의 분획물 들은 다소 소량의 총 페놀성 화합물을 함유하고 있었다.

Table 3. Antioxidant activity of extracts obtained from *Morus bombycis* Koidzumi on DPPH radical scavenging method.

Extracts	Antioxidant activity, (IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> ): µg/mL			
	Fruit	Leaf	Stem	Root
Ethanol	114.3	90.5	50.0	61.4
Methanol	45.2	97.6	31.0	65.3
Chloroform	231.0	104.8	228.6	70.3
Water	28.6	42.9	57.1	108.2
80% Ethanol	28.6	109.5	26.2	35.9
80% Methanol	26.2	38.1	23.8	42.3
<b>Control antioxidants</b>				
BHT	5.4			
Vitamin-C	4.2			
α-Tocopherol	3.3			

1) Amount required for 50% reduction of DPPH (0.04 mM) after 30 min.

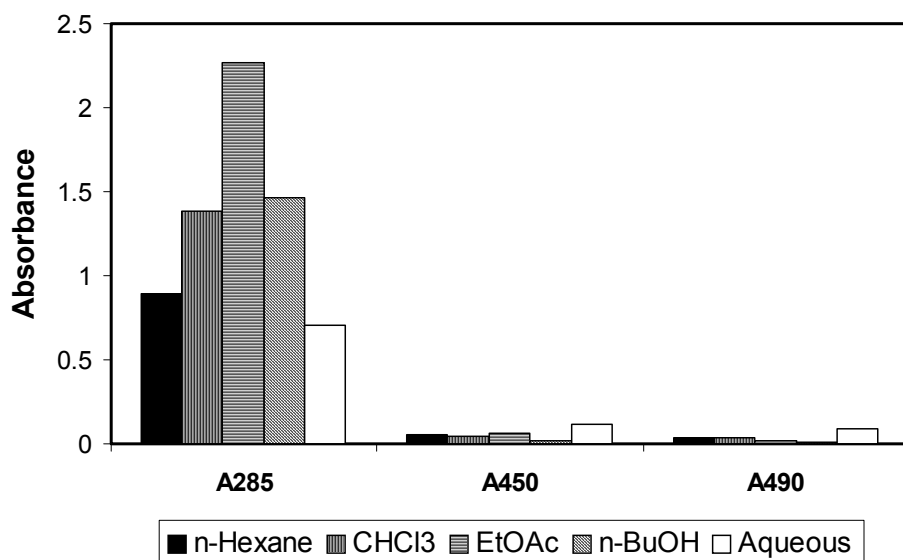


Figure 2. Absorbance of solvent fractionations from the root of *Morus bombycis* Koidzumi at 285, 450, and 490 nm. The absorbance is measured with a 0.01% solution in methanol over an optic path of 1cm.

Table 4. Contents of total phenolics in solvent fractionations from the root of *Morus bombycis* Koidzumi.

(Unit: mg/100g)

<b>Fractions</b>	<b>Total phenolics</b>
n-Hexane	167.2
CHCl <sub>3</sub>	98.6
EtOAc	654.8
n-BuOH	409.2
Aqueous	295.9

#### 7) 산뽕나무 뿌리 용매 분획물의 자외선 차단효과

산뽕나무 뿌리 용매 분획물의 자외선 차단효과를 Table 5에 나타내었다. 에틸아세테이트 분획물의 경우 중파장대(308 nm)에서의 흡광계수가 223.4로 매우 높게 측정되었고 장파장대(350 nm)에서 94.2로 높게 측정되었다. 산뽕나무 뿌리 80% 에탄올 추출물보다 매우 높게 측정되는 것으로 보아서 자외선 차단효과를 나타내는 물질이 에틸아세테이트 분획물에서 주로 용출됨을 확인하였다. 그 다음이 부탄올 분획물로 중파장대에서의 흡광도는 151.0으로 높게 측정되었고 장파장대에서는 84.1로 측정되었다. 클로로포름 분획물에서도 자외선 차단효과가 각각 116.3 및 46.8로 매우 높게 측정되었다.

산뽕나무 뿌리 80% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 농도에 따른 자외선 차단효과를 Figure 3에 나타내었다. 산뽕나무 80% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 농도에 의존하여 UVB 및 UVA 영역에서의 흡광도가 증가하였다. UVA 영역의 자외선보다 UVB 영역의 자외선 차단효과가 더 높게 나타났다. 산뽕나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물은 UVB 영역에서 높은 흡광도를 보이는 것으로 보아서 자외선 B 영역의 차단효과가 우수한 물질이 다량 함유되어 있음을 알 수 있었다. 이 결과로 미루어 보아서 산뽕나무 뿌리의 분획물에는 약간의 극성을 띤 천연의 자외선 차단제가 다량 함유되어 있음을 확인하였다.

#### 8) 산뽕나무 뿌리 용매분획물의 항산화효과

DPPH 자유 라디칼 소거활성에 의한 항산화 활성을 Table 6에 나타내었다. 에틸아세테이트 분획물의 항산화 활성( $IC_{50}$ : 15.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )이 가장 높게 나타내었으며 그 다음이 클로로포름 분획물( $IC_{50}$ : 25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )이 높게 측정되었다. 모든 분획물에서 항산화 효과가 나타났으며, 이로 미루어 보아서 극성 및 비극성 계통의 다양한 항산화제가 함유되어 있을 것으로 사료된다. 특히 에틸아세테이트 분획물의 경우 항산화 활성뿐 만 아니라 강력한 자외선 차단효과를 지니고 있기 때문에 자외선 차단 및 피부보호 활성을 지닌 천연 기능성 화장품 원료로 매우 적합한 추출물로 사료된다.



Table 5. UVA/UVB absorption properties of solvent fractionations from the root of *Morus bombycis* Koidzumi.

Fractions	E%cm <sup>1)</sup> at 308 nm	E%cm <sup>1)</sup> at 350 nm
<b>Synthetic filter</b>		
Dioxybenzone	412.6	208.5
Octyl methoxy cinnamate	924.4	16.9
Oxybenzone	423.8	216.1
n-Hexane fr.	73.8	33.8
CHCl <sub>3</sub> fr	116.3	46.8
EtOAc fr.	223.4	94.2
BuOH fr	151.0	84.1
Water fr	64.5	35.9

1) The coefficient of extinction, E%cm, is the theoretical absorbance of a 1% solution over an optic path of 1cm.

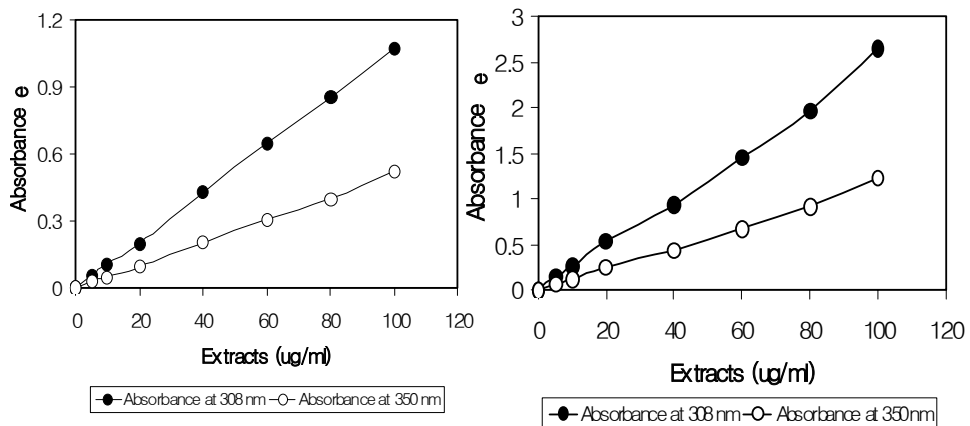


Figure 3. Concentration dependent UV B and UV A absorption properties of 80% ethanol extract and ethyl acetate fraction from the root of *Morus bombycis* Koidzumi.

Table 6. Antioxidant activity of solvent fractionations from the root of *Morus bombycis* Koidzumi on DPPH radical scavenging method.

Fractions	Antioxidant activity, (IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> : µg/mL)
n-Hexane fr.	45.0
CHCl <sub>3</sub> fr	25.0
EtOAc fr.	15.0
n-BuOH fr.	57.5
Aqueous fr.	37.5
<b>Control antioxidants</b>	
BHT	5.4
Vitamin-C	4.2
α-Tocopherol	3.3

1) Amount required for 50% reduction of DPPH (0.04 mM) after 30 min.

#### 4. 결론

산뽕나무의 생리활성 기능을 탐색하기 위하여 부위별로 메탄올, 에탄올, 클로로포름, 80% 메탄올, 80% 에탄올 및 물 추출물을 조제하였고, 산뽕나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물로부터 n-Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH 및 water 분획물을 제조하였다. 얻어진 추출물과 분획물에 대하여 DPPH 자유라디칼 소거법에 의한 항산화성 효과와 UVB 및 UVA 영역에서의 자외선 흡수 효과를 검토하였다. 산뽕나무 추출물의 수소전자공여능(IC<sub>50</sub>)을 측정된 결과, 추출물에서는 80% 메탄올 줄기 추출물, 열매 추출물, 뿌리 추출물에서, 80% 메탄올 잎 추출물에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. 자외선 차단효과에서는 80% 에탄올 뿌리 추출물 및 80% 메탄올 뿌리 추출물에서 매우 높은 자외선 흡수력이 높게 측정되었다. 항산화 효과 및 자외선 차단능이 탁월한 산뽕나무 뿌리 80% 에탄올 추출물을 대상으로 용매 분획물을 제조하였다. 에틸아세테이트 분획물(E%cm: 223.4)이 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었으며, 자외선 B영역에서 매우 높은 흡수력을 나타내었다.

## 제 2 절. 산뽕나무 뿌리 물 추출물의 간보호 작용

### 1. 서론

간 질환은 우리나라 국민들의 사망원인 중 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 교통사고에 이어 5위를 기록하고 있을 정도로 높은 비중을 차지하고 있다. 간질환은 우리나라에서 특히 빈발하는 질환으로 이를 치유 혹은 예방하기 위한 방법의 하나로 천연물을 이용한 간 기능 보호제 또는 간질환의 치료제 개발의 연구가 활발히 이루어지고 있다. 현재까지의 연구 결과로는 차전자(*Plantago asiatica*)의 acubin의 간 기능 보호 작용, 마리아 엉겅퀴(*Sylubum marianum*)로부터 분리된 silybin의 간보호 작용 및 이의 이성체인 silymarin의 제품화가 있고 최근에 와서는 천련자성분의 간 보호 작용 등이 보고되고 있으나 아직도 뚜렷한 효과를 나타내는 간

기능 보호 약제의 개발은 활발히 이루어지지 않고 있다.

근래에 산화성 스트레스가 여러 가지 질환의 병인에 중요한 역할을 하고 특히 알코올성 간질환, 중금속에 의한 간손상 및 허혈 후 재관류 손상 등의 간질환에도 관여하는 것으로 알려져 있으며, 만성 B형 및 C형 간질환에서도 산화성 스트레스가 간조직의 괴사성 염증반응과 관계가 있다는 것을 이미 보고된 바 있다. 이렇듯 간손상에 관여하는 산화성 스트레스는 간손상에 의해 유발되는 간섬유화 과정에도 관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 즉 산화성 스트레스에 의한 지질과산화(lipid peroxidation)에 의해 간정상 세포에서 교원질 유전자의 전사율이 증가된다는 보고가 있다.

사염화탄소는 화학용매, 방화제, 가구 및 의류 세척제, 기타 약제 등으로 사용되고 있어 일상생활에서 사람들과의 접촉 가능성이 많으며 위장관 계통과 호흡기를 통한 흡입에 의해 간에 심한 괴사성 변화를 초래하는 것으로 보고 되어있다. 사염화탄소는 간에서 mixed function oxidase (MFO) enzyme system인 microsomal ferrous cytochrom P-450에 의해 trichloromethyl free radical (CCl<sub>3</sub>)을 형성한다. 이때 산소 분압이 높으면 CCl<sub>3</sub>에서 CCl<sub>3</sub>COO· 형성이 촉진되는데 이것이 간 독성 유발의 전제 조건으로 널리 받아들여지고 있다. Free radical의 종류에는 superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-·</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical(·OH), peroxyradical (ROO-)및 singlet oxygen(1O<sub>2</sub>)등이 있다. 이러한 free radical에 의해 일어나는 생체 내 반응에는 세포 또는 세포 소기관의 막 지질 과산화에 의한 microsome, mitochondria 등의 소기관 손상, 효소 단백질 중의 아미노산 잔기의 산화를 통한 비가역적 불활성화, 핵산염기의 변형 및 산화적 분해 절단을 통한 손상, 생체 내로 침입한 병원체에 대한 macrophage의 방어과정에서 생겨나는 주위 조직의 손상, 그리고 DNA 손상에 의한 세포의 암화 등이 있다. 이와 같이 free radical의 생성과 antioxidant의 방어력 사이에 장애가 생겨 세포손상을 일으키는 것을 oxidative stress 상태라고 하며, oxidative stress는 antioxidant의 결핍이나 free radical의 양이 antioxidant의 방어력 이상으로 많이 생성되었을 때 일어날 수 있다. 사염화탄소에 의해 생성 유도된 free radical (·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH, 1O<sub>2</sub>)은 지질 막을 공격하여 지질의 과산화를 일으키거나, free radical이 세포 내 단백질이나 지질 등의 macromolecules와 결합하여 간의 괴사, 지방 침착, microsomal enzyme 활성 저하 등의 간 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 최근에는 사염화탄소 또는 그 대사물이 endoplasmic reticulum

의 Ca<sup>2+</sup> pump를 억제하여 세포 내 calcium homeostasis를 저해하는 것이 간 조직 괴사의 기전으로 제시되고 있다. 특히 최근의 ESR(electron spin resonance) spectroscopy 연구에서 사염화탄소의 최종 대사물이 CO<sub>2</sub>와 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>· 임이 보고되었다. 사염화탄소는 cytochrome P-450에 의해 독성이 강한 대사물로 되고 결국 간세포의 지질과산화물을 일으키고 중심정맥부위에서 지방변성 및 괴사를 일으킨다. 이 대사물이 간 microsome의 막 단백질과 강하게 결합하여 막의 지질 과산화반응을 촉진하여 장애를 일으켜서 간에서의 단백 합성 억제, 혈중에서 AST/ALT 등의 이탈을 일으키는 것으로 알려져 있다. Flavonoid 화합물은 식물에 폭 넓게 존재하며 고혈압과 동맥경화 억제작용, 호흡기능촉진, 진경 작용, 심박동 감소작용, 항염증작용, 혈관순환 개선작용과 간장보호 작용 등 여러 가지 생리활성을 갖고 있음이 보고되었다.

본 연구에서는 산뽕나무 추출물의 자유라디칼 소거활성을 ESR spectrometer로 측정하고 자유라디칼 소거활성이 제일 강한 산뽕나무 물 추출물로 간암 세포주인 HepG2의 성장억제작용과 사염화탄소에 의한 간독성 쥐에서 간 보호 작용을 알아보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) ESR(electron spin resonance) 법으로 활성산소 소거능 측정

ESR법으로 superoxide anion과 hydroxyl radical 소거능을 측정하였다. Superoxide anion은 다음 반응으로 측정하였다. 0.1 M potassium dihydrogen phosphate(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) buffer (pH 7.4) + 50 uM DETAPAC(diethylenetriamine-pentaacetic acid) + 180 mM DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline-oxide) + 1 mM Xanthine + 1 uM catalase + 25 unit XOD (Xanthine oxidase). 위 반응산물인 DMPO-OOH는 ESE spectrometer(JEOL-JES-TM200, JEOL, Tokyo)에 의해 측정된다. Hydroxyl radical은 다음 반응으로 측정하였다. 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4) + 200 uM EDTA + 90 mM DMPO + 200 uM FeSO<sub>4</sub> + 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 위 반응산물인 DMPO-OH는 ESR spectrometry에 의해 측정된다. 실험조건은 다음과 같다. 37°C에서 field set 335.4±5.0 mT, frequency 100 KHz, amplitude 0.79×0.1 mT, response time 0.1 s, sweep time 2 min, microwave power 8.0 mW(9.423 GHz), receiver gains 2×100이고, 시료는 30 mM NaOH로 용해하였다.

## 2) 간암 세포주 실험에서 사용되는 시료 준비

추출된 물질은 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축시킨 후 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 농도별로 녹이고 0.2 um sterile syringe filter에 여과, 살균시켜 냉동 보관하면서 사용한다.

## 3) 암세포주 배양

간암 세포주 (HepG2)는 서울대학교 의과대학 소재 한국 세포주 은행에서 분양받아 -196℃ 액체 질소탱크에 보관하면서 사용한다. Cell은 DMEM배지에 1%의 penicillin-streptomycin과 10% FBS(Fetal bovine serum)를 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2-3회 배지를 교환하면서 flask바닥에 세포가 90%이상 자라면PBS(Phosphate buffered saline)로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 flask 바닥에서 떼 낸 후 계대 배양한다.

## 4) Cytotoxicity test

Trypsin-EDTA 처리한 cell를 washing한 후 세포를  $2 \times 10^5$  cells/mL 농도로 하고 4시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양시키고 추출물을 0, 250, 500, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 각각 첨가하여 24, 48, 72시간 배양하면서 살아있는 세포수를 계수한다. 배양된 세포를 50 uL를 취하여 동일한 양의 0.4% trypan blue dye와 잘 섞어 실온에 1분간 방치시킨 후 hematometer를 이용하여 염색되지 않은 세포, 즉 살아 있는 세포의 수를 계수한다.

## 5) Flow cytometric analysis

T-25 mL flask 에 처리별로 배양된 세포에 Trypsin-EDTA를 넣어 37℃에서 5분간 처리하여 바닥에 붙은 cell를 떼어 wash한 후 counter하여  $2 \times 10^6$  cells/mL 되게 취한다. 차가운 70% 에탄올로 4℃에서 1시간 고정하고 PBS로 wash한 후 1 mL 의 염색액(980 uL PBS+1 mg/mL의 PI 10 uL+10 mg/mL 의 RNase A 10 uL)으로 37℃, 30분 둔 후 FACS를 찍는다.

## 6) FeCl<sub>2</sub>-ascorbic acid 에 의해 유도된 간 조직 microsome의 지질 과산화물 함량을 정량

2 g 의 간 조직을 10mL의 KCl-Tris-HCl (pH 7.2) buffer로 균질화 하였다. 0.35 mL의 간 균질물 + 0.1 mL Tris-HCl buffer(pH7.2) + 0.05 mL의 4 mM FeCl<sub>2</sub> +0.05 mL의 0.1 mM ascorbic acid+0.05 mL의 추출물을 넣어 37°C에서 1 시간 반응시킨 후 0.5 mL의 0.1 M의 HCl, 0.2 mL 의 9.8% SDS, 0.7 mL 무균수를 넣고 0.6% TBA를 2 mL 넣고 끓는 물에 30분 둔다. 실온에서 식힌 후 5 mL n-BuOH 를 넣고 3,000 rpm에서 15분 원심분리 하여 그 상층액을 532 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 단백질량은 Lowry법으로 측정하였다. 표준물질은 1,1,3,3-tetraethoxypropan 을 사용하였다.

#### 7) 사염화탄소에 의한 간손상

간 보호 효과는 사염화탄소에 의한 모델로 190-220 g 의 Male Wistar albino rats 36마리를 (주) 바이오제노믹스사로부터 공급받아 강원대학교 동물자원과학대학 동물 사육실에서 7일간 고형사료(pellet)로 사육하면서 환경에 적응시켰다. 1주일간 안정시킨 후 실험동물을 체중에 따라 난괴법에 의해 각 군당 6마리씩 제1군의 정상군과 제2군의 사염화탄소군은 생리식염수를 투여하고 기타 4군의 실험군은 사염화탄소를 피하주사 한 후 30분, 24시간, 48시간에 각각 추출물 100 mg/kg, 300 mg/kg, 500 mg/kg과 silymarin 100 mg/kg을 경구투여 하였다. 사염화탄소의 조제는 사염화탄소를 olive oil에 1:1(v/v)로 녹여서 2 mL/kg 용량으로 피하 주사하였다. 정상 대조군은 동일한 용량의 olive oil만을 피하주사 하였다.

#### 8) 혈청 AST(aspartate aminotransferase)및 ALT(alanine aminotransferase) 함량 측정

사염화탄소를 투여 후 72시간 만에 동물을 ethyl ether로 흡입 마취한 후 복강을 절개하여 복대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 4°C에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 얻은 후 냉동 보관하면서 분석에 사용하였다. 혈청 AST, ALT 활성은 자동생화학검사기(FUJI DRI-CHEM CLINICAL CHEMISTRY ANALYZER DRI-CHEM 3500, FUJIFILM, Japan)를 이용하여 측정하였다.

#### 9) 간 조직의 조직학적 관찰

간 조직을 10% formalin에 고정시킨 후 50-100% 의 ethanol로 탈수시키고 파



라핀으로 고정하였다. 4~5 um 두께로 잘라 Hematoxylin-Eosin 염색을 하여 관찰하였다.

#### 10) Statistical analysis

본 실험에서의 모든 실험결과는 mean±S.D.로 나타내었고, 각 군 간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one way analysis of variance(ANOVA)검정을 하였으며, 다군 간의 차이는 Statistival Analysis Software(SAS institute)를 이용하여 Duncan's new multiple t-test에 의하여 P<0.05 의 수준에서 유의성 검정을 진행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) ESR spin trapping법으로 활성산소 소거능 측정

ESR spin trapping법은 수명이 짧고 불안정하나 반응성이 높은 free radical( $\cdot R$ )을 DMPO나 PBN 같은 free radical trapping제와 반응시켜, 보다 안정한 free radical(spin adduct, SA $\cdot$ )을 생성시켜 이를 ESR로 측정하는 방법이다. ESR 법은 superoxide anion, hydroxyl radical량을 가장 정확하게 측정할 수 있는 방법으로 알려져 있다. 자유라디칼 소거 활성이 있는 천연물이 사업화탄소에 의한 간독성에서 간보호 작용을 한다는 보고가 있다. 그리하여 먼저 용매별 superoxide radical 소거 활성을 ESR spectrometer로 알아 본 결과 다음과 같다 (Table 7, Figure 3). 물 추출물에서 IC<sub>50</sub>값이 331.2 ug/mL로 제일 높았고 다음은 80% 에탄올, 메탄올, 80% 메탄올, 에탄올 의 순으로 나타났다. ESR signal 측정에서 보면 DMPO-OOH signal 이 농도 의존적으로 낮아지는 것을 알 수 있다(Figure 4). 다음은 용매별 hydroxide radical 소거 활성을 ESR spectrometer로 알아 본 결과는 Fig. 5과 같다. 각 추출물의 농도를 1500 ug/mL로 하였을 때에도 hydroxide radical의 소거 활성은 거의 나타나지 않았다. 이것으로부터 산뽕나무 뿌리 추출물은 superoxide radical 소거 활성은 있는 반면에 hydroxide radical 소거 활성은 거의 없는 것으로 사료된다.

Table 7. Superoxide radical scavenger activity assay

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibition rate (%)	SOD-like activity* ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Water	500	65.0	0.750	331.2
80% EtOH	500	55.2	0.570	399.9
MeOH	500	47.2	0.429	507.4
80% MeOH	500	46.6	0.419	641.7
EtOH	500	41.2	0.321	681.5
Chloroform	500	12.1	-	1652.2

\* Calibration curve:  $y = 55.2X + 23.495$ , where  $y$  = inhibition rate (%),  $X$  = SOD ( $\mu\text{g/mL}$ ).

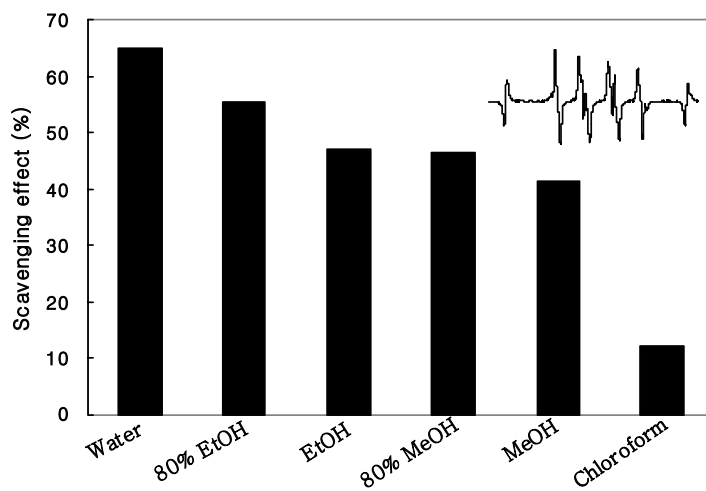


Figure 3. ESR spectrum of superoxide radical obtained in various extracts of 500 ug/mL samples. Inset shows ESR spectrum of superoxide radical. (1) water; (2) 80% EtOH; (3) EtOH; (4) 80% MeOH; (5) MeOH; (6) Chloroform.

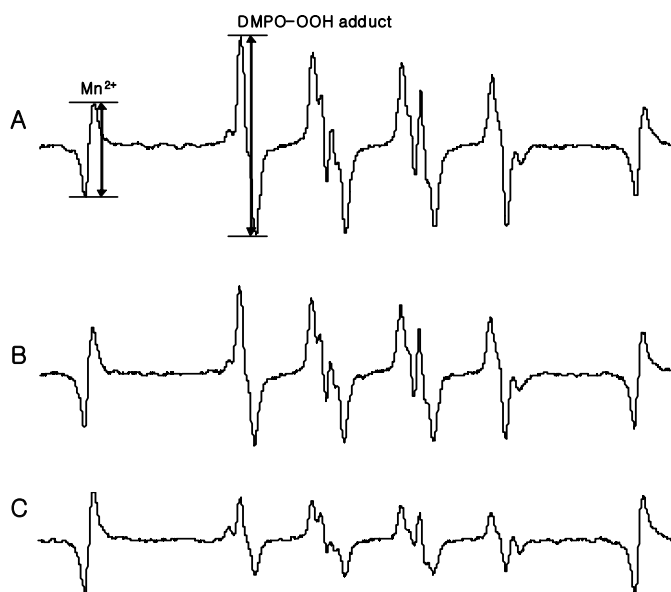


Figure 4. ESR signal of the standard manganese oxide ( $Mn^{2+}$ ) and superoxide radical (DMPO-OOH) peak without SOD and the inhibitory effect of the water extracts of different concentration on ESR signals of the superoxide radical. (A) Control; (B) 100  $\mu g/mL$  (C) 500  $\mu g/mL$ .



Figure 5. ESR signal of the standard manganese oxide ( $Mn^{2+}$ ) and hydroxide radical (DMPO-OH) peak and the inhibitory effect of the water extracts of different concentration on ESR signals of the hydroxide radical. (A) Control; (B) 1000 ug/mL (C) 1500 ug/mL.

2) 흰쥐 간 균질물 에서  $\text{FeCl}_2$ -ascorbic acid 에 의해 유도된 지질 과산화에 미치는 영향

지질 과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 또는 당뇨병 등에 의한 병태 생리학적 현상이나 조직의 손상정도를 나타내는 가장 중요한 기전으로 인정되고 있다. 일반적으로 아스코르빈산은 전자공여자 (electron donor)로서  $\text{Fe}^{3+}$ 을  $\text{Fe}^{2+}$ 로 환원시키고,  $\text{Fe}^{2+}$ 는  $\text{O}_2$ 와 반응 후 산소유리 잔기 (oxygen free radical)를 형성하여 산화성 스트레스가 발생하며 이는 세포막의 지질과산화를 유발한다. 본 연구에서는 superoxide radical 소거활성이 제일 강한 산뽕나무 뿌리 물 추출물로 흰쥐 간 균질물 에서  $\text{FeCl}_2$ -ascorbic acid 에 의해 유도된 지질 과산화에 미치는 영향을 malondialdehyde(MDA) 함량으로 측정한 결과는 Table 8와 같다. 산뽕나무 물 추출물을 1 mg/mL와 5 mg/mL 되게 첨가하였을 때 MDA함량이 유의적인 감소를 나타내었고 그 억제율은 각각 18.4%와 25.3%였다.

3) 간암세포 HepG2에 대한 산뽕나무 뿌리 물 추출물의 억제작용

산뽕나무 뿌리 물 추출물이 간암 세포주 사멸에 미치는 영향을 측정하기 위하여 농도별(0, 250, 500, 1000 ug/mL)로 각각 첨가하고 24, 48, 72h 배양하면서 살아있는 세포수를 계수하였다. Figure 6에서 알 수 있는 바와 같이 1 mg/mL의 농도에서 48시간 배양하였을 때 산뽕나무 뿌리 물 추출물이 세포성장을 대조군에 비하여 유의적인 억제를 나타내었고 72시간 배양하였을 때 500 ug/mL이상부터 대조군에 비하여 유의적인 억제활성을 나타내었다.

Table 8. Effects of water extract from *Morus bombycis* Koidzumi (MK) roots on FeCl<sub>2</sub>-ascorbic acid induced lipid peroxidation in a rat liver homogenate in vitro\*.

Groups	Concentration (mg/mL)	MDA (nM/mg protein)	Inhibition (%)
Normal	-	0.123±0.010 <sup>a</sup>	-
FeCl <sub>2</sub> -AA	-	0.288±0.019 <sup>d</sup>	-
FeCl <sub>2</sub> -AA+MK	1	0.235±0.013 <sup>bc</sup>	18.4
FeCl <sub>2</sub> -AA+MK	5	0.215±0.028 <sup>b</sup>	25.3
FeCl <sub>2</sub> -AA+MK	10	0.258±0.007 <sup>cd</sup>	10.4
FeCl <sub>2</sub> -AA+Vit E	1	0.153±0.027 <sup>a</sup>	46.9

\* Values are expressed as mean ±S.D. (n=5).

Among the group, values with different letters are significantly different at P < 0.05 by Duncan's multiple range test.

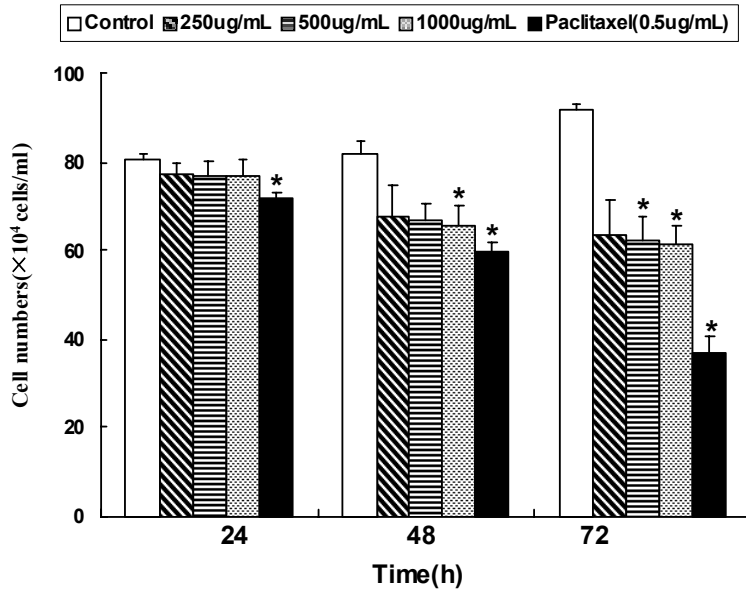


Figure 6. Effect of water extract of *Morus bombycis* Koidzumi (MK) in HepG2 cell. Values with different letters are significantly different at \*  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test.



#### 4) Flow cytometry 분석

PI 염색으로 산뽕나무 물 추출물이 간암 세포에 대한 Apoptosis를 감지하기 위하여 산뽕나무 뿌리 물 추출물을 일정시간동안 처리한 결과, 염색된 세포를 다수 확인할 수 있었는데 24시간 동안 배양한 경우에는 1.06%로 나타났고 48시간 동안 배양하였을 때 1.52%로 나타났으며 72시간 동안 배양하였을 때는 3.95%로 나타나는 것을 알 수 있었다 (Figure 7).

#### 5) 사염화탄소에 의해 유발된 간독성에서의 간 보호 작용

간독성을 유발하는 산업장 유해물질의 일종으로 간장 독작용을 유발하는 사염화탄소의 간장 독작용의 작용기전은 확연히 규명되어 있지 않으나 사염화탄소 (Carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)는 cytochrome P-450 enzyme system에 의해 free radical trichloromethyl radical로 전환되어 free radical이 간 중심부 괴사, 단백합성 억제, 지방변성 등 지질막을 변화시켜 cytochrome P-450을 비롯한 여러 microsomal enzyme들의 활성을 변화시킨다고 한다. Silymarin은 국화과 식물인 마리아 엉겅퀴 종자에서 분리, 추출된 flavonolignan으로서 동물간의 미토콘드리아 및 마이크로솜에서의 과산화지질의 생성을 억제하는 효과와 사염화탄소에 의한 독성에 대한 보호 작용도 갖고 있다고 알려져 있다. 간세포막의 변화를 안정시킴으로서 간세포에 대한 직접적인 보호효과도 있다고 하는 silymarin을 positive control로 선택하여 산뽕나무 물 추출물의 간 보호 효과를 알아보았다.

사염화탄소에 의해 유발된 간손상에 대한 영향을 알아 본 결과(Table 9) 사염화탄소를 투여하고 산뽕나무 물 추출물을 처리한 결과 ALT, AST 함량이 사염화탄소에 의해 유의적인 증가를 보였고 또 산뽕나무 뿌리 물 추출물의 투여에 의해 유의적인 감소를 관찰할 수 있었다. 그리고 100 mg/kg 양으로 투여 하였을 때 silymarin과 비슷한 간 보호 작용을 나타내는 것을 알 수 있었다. 한편 간 조직을 H&E 염색을 하여 관찰하였다 (Figure 8). 결과 정상군보다 사염화탄소군에서 간 조직이 많이 손상된 것을 관찰할 수 있었고 산뽕나무 물 추출물을 투여하였을 때 손상되었던 간 조직이 많이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다.

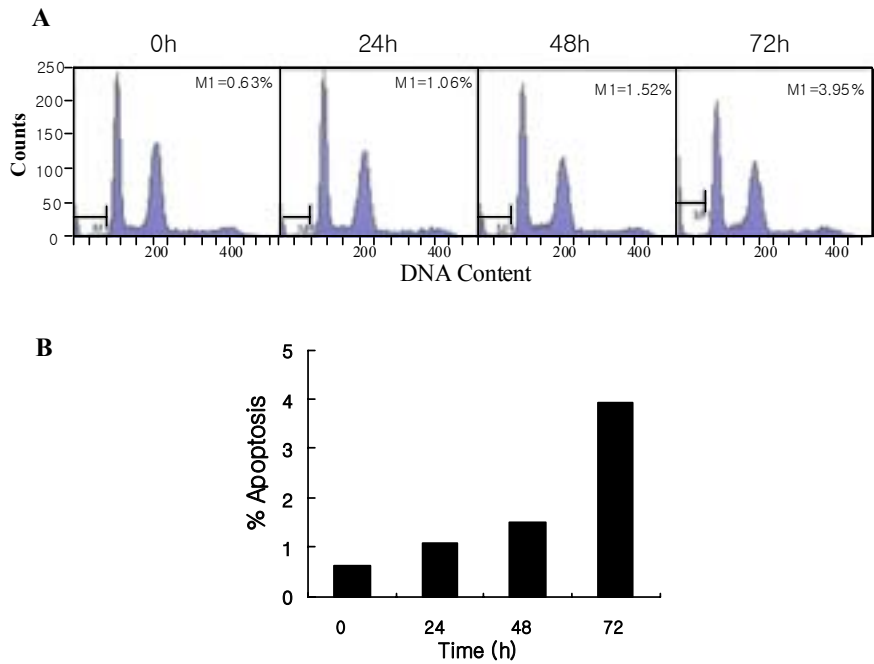


Figure 7. The cells were incubated with water extract of *Morus bombycis* Koidzumi (MK) (1 mg/mL) for each designated time. The number of apoptotic cells was measured by flow cytometry as described in text. The region to the left of the M1 place was defined as cells undergoing apoptosis-associated DNA degradation. By PI (propidium iodide) staining.

Table 9. Effect of the water extracts from *Morus bombycis* Koidzumi (MK) roots on CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis in rats

Groups	Dose(mg/kg)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
Control	-	84.0±4.95 <sup>d</sup>	32.8±1.93 <sup>c</sup>
CCl <sub>4</sub> /olive oil	2ml/kg	215.4±20.37 <sup>a</sup>	77.6±4.97 <sup>a</sup>
CCl <sub>4</sub> +MK	100	109.4±7.39 <sup>cd</sup>	35.0±3.03 <sup>bc</sup>
CCl <sub>4</sub> +MK	300	137.0±11.03 <sup>c</sup>	44.8±5.86 <sup>bc</sup>
CCl <sub>4</sub> +MK	500	174.2±15.89 <sup>b</sup>	47.8±5.32 <sup>b</sup>
CCl <sub>4</sub> +Silymarin	100	88.4±5.25 <sup>d</sup>	40.6±1.33 <sup>bc</sup>

Values are expressed as mean ± S.D. of six animals in each group.

Among the group, values with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

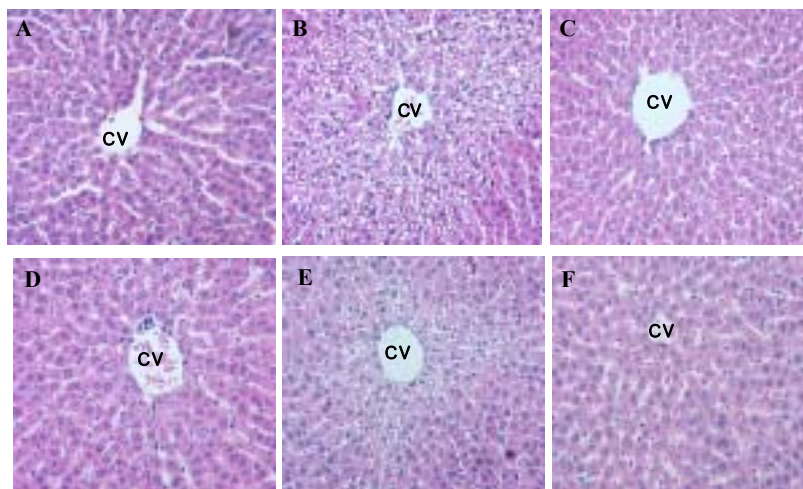


Figure 8. The photomicrography of liver section taken from rats. (A) control group; (B) CCl<sub>4</sub>/olive oil (1:1, 2 mL/kg, s.c.); (C) CCl<sub>4</sub>+MK(100 mg/kg, p.o.); (D) CCl<sub>4</sub>+MK(300 mg/kg, p.o.) (E) CCl<sub>4</sub>+MK(500 mg/kg, p.o.); (F) CCl<sub>4</sub>+silymarin (50 mg/kg, p.o.)

#### 4. 결론

근래에 산화성 스트레스가 여러 가지 질환의 병인에 중요한 역할을 하고 특히 알코올성 간질환, 중금속에 의한 간손상 및 허혈 후 재관류 손상 등의 간질환에도 관여하는 것으로 알려져 있으며, 만성 B형 및 C형 간질환에서도 산화성 스트레스가 간조직의 괴사성 염증반응과 관계가 있다는 것을 이미 보고된 바 있다. 이렇듯 간손상에 관여하는 산화성 스트레스는 간손상에 의해 유발되는 간섬유화 과정에도 관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 즉 산화성 스트레스에 의한 지질과산화(lipid peroxidation)에 의해 간 정상세포에서 교원질 유전자의 전사율이 증가된다는 보고가 있다. 그리하여 여러 가지 용매로 산뽕나무 뿌리에서 추출물을 얻었고 그 추출물을 ESR spectrometer 로 superoxide radical과 hydroxide radical의 소거 활성을 측정하였다. 결과 물 추출물에서 제일 높은 superoxide radical의 소거 활성을 나타내었고 모든 추출물에서 hydroxide radical의 소거활성은 거의 없는 것으로 나타났다. Superoxide radical의 소거활성이 제일 높은 물 추출물로 간 보호 작용에 대하여 in vitro에서와 in vivo에서 알아보았다. In vitro에서 간 암세포인 HepG2 에 산뽕나무 뿌리 물 추출물을 500 ug/mL 이상 첨가하였을 때 48시간 후부터 대조군보다 유의적인 성장 억제를 나타내었다. In vivo에서 산뽕나무 뿌리 물 추출물을 100 mg/kg으로 쥐에 투여 하였을 때 사염화탄소 대조군에 비하여 유의적인 간 보호 활성을 나타내었다. 그리고 산뽕나무 뿌리 물 추출물로 FeCl<sub>2</sub> - ascorbic acid에 의해 유도된 lipid peroxidation 의 억제 작용을 알아본 결과 산뽕나무 뿌리 물 추출물을 5 mg/mL 첨가 하였을 때 대조군보다 25% 이상의 억제활성을 나타내었다. 이로부터 산뽕나무 뿌리 물추출물은 높은 항산화 활성을 갖고 있고 산화적 스트레스로 인한 간손상에 대한 간 보호 작용을 갖고 있는 것으로 사료된다.

### 제 3 절. 산뽕나무 뿌리에서 단일물질의 분리 및 간보호 작용에 미치는 영향

#### 1. 서론

활성산소란 짝을 이루지 못한 전자(free radical)를 가진 불안정한 산소 화합물 혹은 반응성이 큰 산소화합물로서 생체조직을 공격하여 세포를 산화 손상시키는 주된 성분들이다. 활성산소는 Figure 9에서 보는 바와 같이 인체를 구성하고 있는 각종 세포의 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되고 있다. 우리는 공기 중의 산소를 호흡해서 산화에 의해 얻어진 에너지를 이용하여 생명을 유지해 가는데 이때 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되고 있는  $\cdot O_2^-$ 는 먼저 SOD(superoxide dismutase)에 의해  $H_2O_2$ 로 되고  $H_2O_2$ 는 catalase와 GSH peroxidase에 의해  $H_2O$ 로 무독화 되는 것이 일련의 활성산소 대사과정이다. 이들 항산화 효소 이외에도 비타민 E, C, 요산, 빌리루빈, GSH, 카로틴 등이 활성산소의 독작용을 제거하여 생체를 보호할 수 있으며 이들 물질들을 항산화물질이라고 한다. 생체 내에서 끊임없이 생성되고 있는 활성산소들을 항산화물질들이 제거하지 못할 경우 축적되는 활성산소에 의해 여러 가지 질병이나 노화가 초래된다고 한다. 현재 우리가 앓고 있는 질환 중 약 90%정도가 활성산소와 관련이 있다고 하며, 그 질환에는 주로 암, 동맥경화, 당뇨병, 뇌졸중, 심근경색, 간염, 신경염, 교원병, 아토피성 피부염, 파킨슨병, 자외선과 방사선에 의한 질병 등이 있다

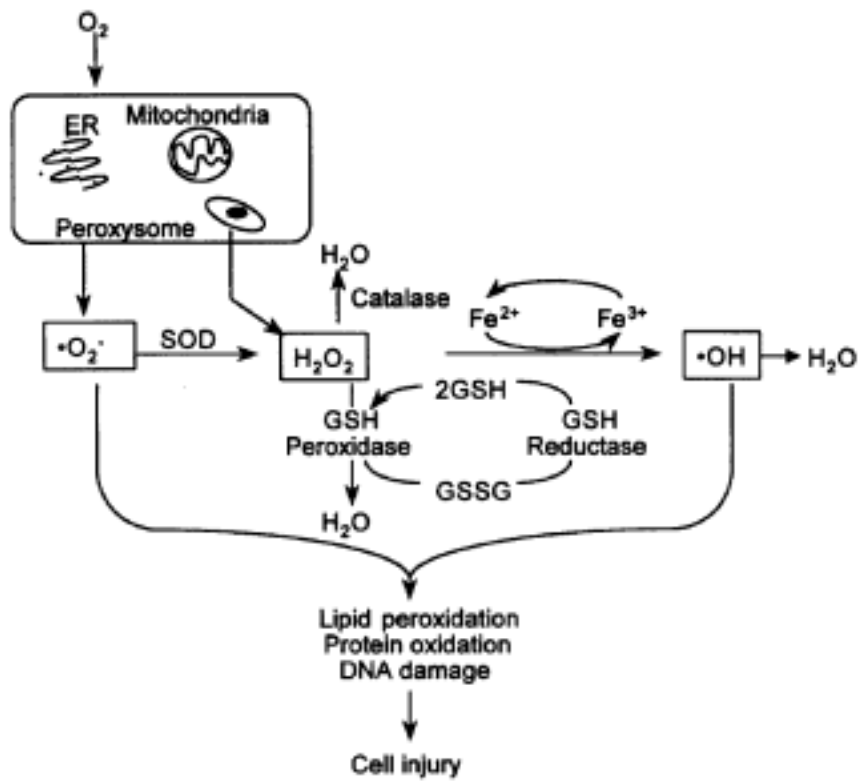


Figure 9. A process of oxygen free radical generation

간장은 활성산소를 제거하는 SOD와 똑 같은 고분자 항산화제인 글루타치온 퍼옥시다제(GSH-Px)가 대량으로 존재하는 장기인데 이 글루타치온 퍼옥시다제가 유일하게 과산화지질을 간장에서 분해한다. 간장은 과잉 활성산소와 과산화지질이 모이는 장소인 동시에 이들을 없애려고 고분자와 저분자의 항산화제가 활약하는 장소이기도 하다(Figure 9).

최근 간질환에 대한 관심과 더불어 천연자원으로부터 간보호 및 간손상 치료제에 관한 연구 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 현재 서양의학에서 간질환 치료제로 임상에서 널리 사용되고 있는 약물인 ursodeoxycholic acid (UDCA)는 웅담에서, silymarin은 국화과 식물인 *Silybum marianum*의 열매에서 각각 추출되었으며, biphenyldimethyldicarboxylate (DDB)은 오미자로부터 추출된 schizandrin과 유사한 물질을 합성하여 만들어진 것이다. 이와 같이 최근 한의학에서 간질환 치료에 사용되는 뽕나무에서도 새로운 간 기능 개선 및 간질환 치료제의 개발 가능성이 있을 것으로 생각한다. 그리하여 저자는 산뽕나무로부터 분리된 단일물질로 간 보호활성을 알아보았다. 먼저 간암세포주인 HepG2 세포의 성장억제 작용을 알아보았고 In vivo에서 간보호, 항염유화 효과를 검색하기 위하여 CCl<sub>4</sub>로 흰쥐의 간손상을 유발한 후 혈청에서 AST, ALT, LDH의 함량을 측정하고 H&E 염색으로 간 조직을 관찰하였으며, FeCl<sub>2</sub>-ascorbic acid법에 의한 과산화지질의 측정으로 간조직에서 hydroxyproline, malondialdehyde (MDA)를 측정하였고, RT-PCR 방법으로 CYP2E1, TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현량을 알아보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 산뽕나무 뿌리에서 단일 물질 분리 및 구조분석

산뽕나무 뿌리를 음건 세절하여 분말로 분쇄 후, 약 100 g 정도를 추출용기에 넣고, 80% 메탄올 용매 2 L를 가하여 상온에서 1시간 추출하였다. 추출하여 얻어진 용액을 여과한 후, 감압 농축하여 추출물을 500 mL 물에 용해시킨 후 MCI gel(CHP20P: 2.5×40 cm) column을 통과시켰다. 다음 차례로 0, 10, 20, 30, 40, 100% methanol를 통과시켜 20~30% methanol용액을 받아 농축한 후 10 mL의 70% methanol 용해시켰다. 이 용액을 filtration column (Sephadex LH-20: 2.5×40 cm)을 통과시키는데 용매는 70% methanol를 사용하여 흘리고 polyphenol detected 흡광과장인 326 nm에서 흡광도를 측정하여 용액을 모은 후 HPLC를 찍



었다. Polyphenol fraction을 모은 후 동결건조 하였다(Figure 10). 순수 분리 된 물질을 HPLC (M600E, M7725i, M996./Waters), UV(HP-8453),  $^1\text{H}$  NMR (Bruker DPX 400 MHz (9.4T)),  $^{13}\text{C}$  NMR (in CD3OD and DMSO-d6), 2D-NMR [DEPT-135, HETCOR, HMBC], IR spectrum 과 FAB-MS techniques 을 통하여 구조 및 질량 분석을 하였다.

## 2) ESR 법으로 활성산소 소거능 측정

ESR법으로 superoxide anion과 hydroxyl radical 소거능을 측정하였다. Superoxide anion은 다음 반응으로 측정하였다. 0.1 M KPi buffer (pH 7.4) + 50  $\mu\text{M}$  DETAPAC + 180 mM DMPO + 1 mM Xanthine + 1  $\mu\text{M}$  catalase + 25 unit Xanthine oxidase. 위 반응산물인 DMPO-OOH는 ESE spectrometry(JEOL-JES-TM200, JEOL, Tokyo) 에 의해 측정하였다. Hydroxyl radical 은 다음 반응으로 측정하였다. 0.1 M KPi buffer (pH 7.4) + 200  $\mu\text{M}$  EDTA + 90 mM DMPO + 200  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  + 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 위 반응산물인 DMPO-OH 는 ESR spectrometry에 의해 측정된다. 실험조건은 다음과 같다. 37°C에서 field set 335.4 $\pm$ 5.0 mT, frequency 100 KHz, amplitude 0.79 $\times$ 0.1 mT, response time 0.1 s, sweep time 2min, microwave power 8.0 mW(9.423 GHz), receiver gains 2 $\times$ 100.

## 3) $\text{FeCl}_2$ -ascorbic acid법에 의한 과산화지질의 측정

2 g 의 간 조직을 10 mL의 KCl-Tris-HCl (pH 7.2) buffer로 균질화 하였다. 0.35 mL의 간 균질물 + 0.1 mL Tris-HCl buffer(pH7.2) + 0.05 mL의 4 mM  $\text{FeCl}_2$  + 0.05 mL의 0.1 mM ascorbic acid + 0.05 mL의 sample를 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5 mL의 0.1 M의 HCl, 0.2 mL 의 9.8% SDS, 0.7 mL 무균수를 넣고 0.6% TBA를 2 mL 넣고 끓는 물에 30분 둔다. 실온에서 식힌 후 5 mL n-BuOH 를 넣고 3,000 rpm에서 15분 원심분리 하여 그 상층액을 532 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

## 4) 간암 세포주인HepG2 세포에대한 영향

### (1) 시료 준비

Sample를DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 농도별로 녹이고 0.2  $\mu\text{m}$  sterile syringe filter에 여과, 살균시켜 냉동 보관하면서 사용한다.

## (2) 암세포주 배양

간암 세포주 (HepG2)는 서울대학교 의과대학 소재 한국 세포주 은행에서 분양 받아  $-196^{\circ}\text{C}$  액체 질소탱크에 보관하면서 사용하였다. Cell은 DMEM배지에 1%의 penicillin-streptomycin과 10% FBS(Fetal bovine serum)를 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양한다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2-3회 배지를 교환하면서 flask바닥에 세포가 90%이상 자라면 PBS(Phosphate buffered saline)로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 flask 바닥에서 떼 낸 후 계대 배양한다.

## (3) Cytotoxicity test

Trypsin-EDTA 처리한 cell을  $2 \times 10^5$  cells/mL 농도로 600 mm Petri dish에 분주한 후 4시간 동안  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에 배양시키고 Sample을 0, 250, 500, 1000 ug/mL농도로 각각 첨가하여 24, 48, 72시간 배양하면서 살아있는 세포수를 계수한다. 배양된 세포를 50 uL를 취하여 동일한 양의 0.4% trypan blue dye와 잘 섞어 실온에 1분간 방치시킨 후 hematometer를 이용하여 염색되지 않은 세포, 즉 살아 있는 세포의 수를 계수한다.

## (4) DNA fragmentation analysis

HepG2 cells 를  $2 \times 10^5$  cells/mL 되게 10 cm culture dishes에 배양한 후 Sample로 일정 시간동안 처리 한 후 genomic DNA를 추출한다. Genomic DNA를 ethidium bromide가 들어있는 1.5% agarose gel 에 로딩 하여 확인한다.

## (5) Flow cytometric analysis

초기 apoptosis를 조사하기 위하여 MBL(Japan Co)사의 Annexin V-FITC Kit를 이용하였다. Apoptosis가 시작되면 세포막에 있는 Phospholipid phosphatidyl-serine(PS)이 원형질막 내부 표면에서 세포 외 표면으로 뒤집어진다. 이 PS는 Annexin V와 강한 친화력이 있기 때문에 쉽게 부착하여 살아있는 상태에서 Apoptosis여부를 알 수 있다. PI는 손상을 입은 세포나 죽은 세포의 핵이 적색으로 염색된다. 그 과정을 간단히 살펴보면 Chamber slide에 배양한 세포를 PBS로 세척한 후 Annexin V-FITC/PI 혼합액을 넣어 10분간 염색 반응시켜 Binding

buffer로 세척한 후 FACScalibur flow cytometer 로 분석한다.

#### 5) 사염화탄소에 의한 간손상에서 DGTS의 간보호 작용

##### (1) 사염화탄소에 의한 간 손상 유발

간 보호 효과는 사염화탄소에 의한 모델을 이용하여 실행하였다. 190-220 g 의 rats 수컷 36마리를 (주) 바이오제노믹스사로부터 공급받아 강원대학교 동물자원과 학대학 동물 사육실에서 7일간 고형사료(pellet)로 사육하면서 환경에 적응시켰다. 1주일간 안정시킨 후 실험동물을 체중에 따라 난괴법에 의해 각 군당 6마리씩 1군의 정상군과 2군의 사염화탄소군은 생리식염수를 투여하고 기타 4군의 실험군은 각각 Sample 100 mg/kg, 400 mg/kg, 600 mg/kg과 silymarin 50 mg/kg 을 투여 30분 후에 사염화탄소를 피하주사하고 24시간, 4일에 각각 sacrifice하였다. 사염화탄소의 조제는 사염화탄소를 olive oil에 1:1(v/v)로 녹여서 2 mL/kg 용량으로 피하 주사하였다. 정상 대조군은 동일한 용량의 olive oil만을 피하주사 하였다.

##### (2) 혈청 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), LDH(lactate dehydrogenase)함량 측정

사염화탄소를 투여 후 24시간, 4일만에 동물을 ethyl ether로 흡입 마취한 후 복강을 절개하여 복부대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 4℃에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 얻은 후 냉동 보관하면서 분석에 사용하였다. 혈청 AST, ALT, LDH 활성은 자동생화학검사기 (FUJI DRI-CHEM CLINICAL CHEMISTRY ANALYZER DRI-CHEM 3500, FUJIFILM, Japan)를 이용하여 측정하였다.

##### (3) 간 조직의 조직학적 관찰

간 조직을 10% formalin에 고정시킨 후 50-100% 의 ethanol로 탈수시키고 파라핀으로 고정하였다. 4~5 um 두께로 잘라 Hematoxylin-Eosin 염색을 하여 관찰하였다.

#### (4) CYP2E1과 TNF- $\alpha$ 의 RT-PCR 분석

쥐 간조직에서 RNA 추출은 Trizol RNA isolation kit (Invitrogen)를 사용하였다. cDNA 합성은 RNA를 이용하여 AMV RNA PCR kit (Takara, Japan)를 사용하였다. 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 x PCR buffer, RNase free dH<sub>2</sub>O, 10 mM dNTP, 0.25 unit AMV reverse transcriptase, 2.5 pmol/uL oligo dT 를 넣어 30°C에서 10분, 50°C 에서 30분, 2 min at 95°C에서 2분을 각각 반응시켜 cDNA를 합성하였다. PCR은 위에서 합성한 cDNA 를 1/10희석한 후 2 uL 취하여 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 x PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 0.05 uM primers, 2.5 unit Taq DNA polymerase (Takara, Japan)와 혼합하여 전체 혼합물이 50 uL 되게 하였고 94°C에서 2분 변성시킨 후 증폭하였다. PCR cycle 조건은 94°C에서 30 s, 60°C 에서 30 s, 72°C 에서 1 min, 30 cycles 증폭시킨 후 마지막 cycle은 72°C에서 7분간 반응시켰다. CYP2E1 gene primer은 Table 10과 같다.

#### 6) Statistical analysis

본 실험에서의 모든 실험결과는 mean $\pm$ S.D.로 나타내었고, 각 군 간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one way analysis of variance(ANOVA)검정을 하였으며, 다군 간의 차이는 Statistival Analysis Software(SAS institute)를 이용하여 Duncan's new multiple t-test에 의하여 P<0.05 의 수준에서 유의성 검정을 진행하였다.

Table 10. Oligonucleotide primers and sizes of expected PCR products

cDNA	Primers sequence	base pair
CYP2E1	Sense: 5'-ACCACCAGCACAACTCTGAGATATGG-3' antisense: 5'-CAATTCCATGCGGGCCAGGCCTTCTCC-3'	436
TNF- $\alpha$	Sense: 5'-CGAGTGACAAGCCCGTAGCC-3' antisense: 5'-GGATGAACACGCCAGTCGCC-3'	735
$\beta$ -actin	sense: 5'-CATCCCCAAAGTTCTAC-3' antisense: 5'-CCAAAGCCTTCATACATC-3'	347

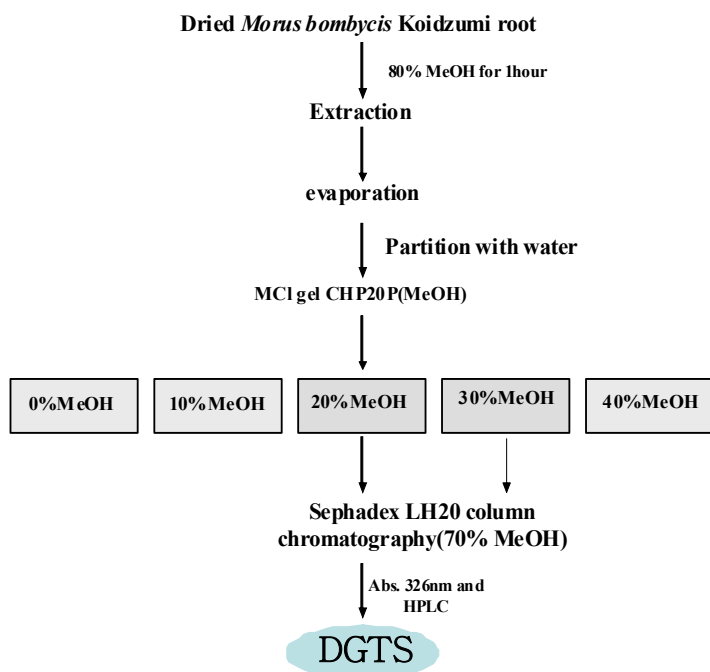


Figure 10. Diagram of purification from *Morus bombycis* Koidzumi root.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 산뽕나무 뿌리로부터 단일 물질의 분리 정제 및 구조 분석

산뽕나무 뿌리로부터 단일 물질을 분리 정제 한 후 HPLC를 이용하여 순도를 검증하고 34.5 min인 단일 peak가 확인 되었다(Figure 14). 옅은 노란색의 compound를 DMSO로 용해하여  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  를 찍어 본 결과는 다음과 같다.  $^1\text{H-NMR}$  data (J values)[H attached to numbered C atom] (Hz in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) were as follows:  $\delta$ : 9.85(s, 1H), 9.44(s, 1H), 7.46(d, 1H), 7.23(d, 1H), 6.95(d, 1H), 6.65(s, 1H), 6.56(m, 3H), 6.35(s, 1H), 5.31(m, 2H), 5.08(s, 2H), 5.00(s, 2H), 4.80(s, 2H), 4.56(d, 2H), 3.70(m, 2H), 3.50(m, 2H), 3.33(m, 2H), 3.30(m, 2H), 3.25(m, 2H), 3.20(m, 2H)(Figure 12).  $^{13}\text{C-NMR}$  data  $\delta$ : 158.794(13), 158.274(1), 157.837(11), 155.734(3), 139.658(9), 127.175(5), 125.874(7), 123.340(8), 117.713(4), 107.329(6), 106.385(10), 105.212(14), 103.706(2), 102.504(12), 100.606(1'), 100.238(1''), 76.909(3'), 76.878(3''), 76.472(5''), 73.161(2'), 73.067(2''), 69.485(4'), 69.413(4''), 60.476(6'), 60.439(6'')(Figure 13). 이로부터 이 화합물의 골격을 monosaccharides를 갖고 있는 stilbene으로 추정하였다. 계속하여 DEPT spectrum(Figure 14)를 찍어 탄소의 종류를 확정하고 IR spectrum(Figure 15)를 찍어 벤젠고리를 확인하였다. Maldi mass(Figure 16)를 찍어 분자량(568)을 체크하고  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY spectrum(Figure 17)와 HMBS spectrum(Figure 18) 찍어 위치 확인하였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 이 화합물의 구조가 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene (DGTS)임을 확인할 수 있었다 (Fig. 19).

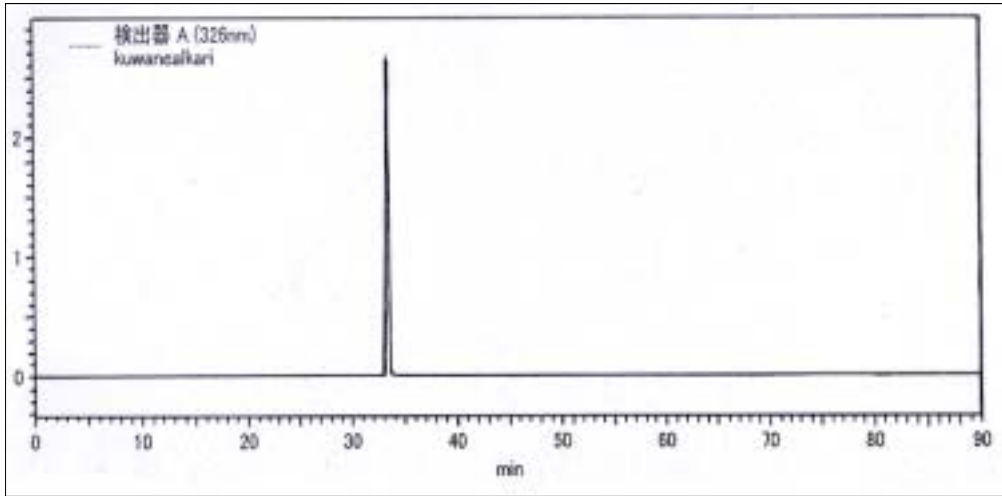
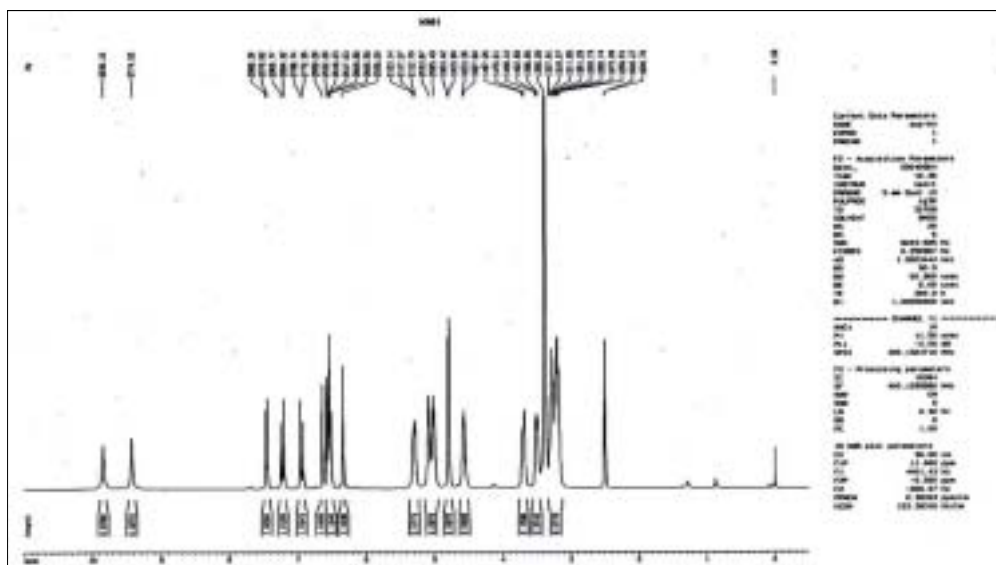


Figure 11. HPLC chromatogram of DGTS from roots of *Morus bombycis* Koidzumi.





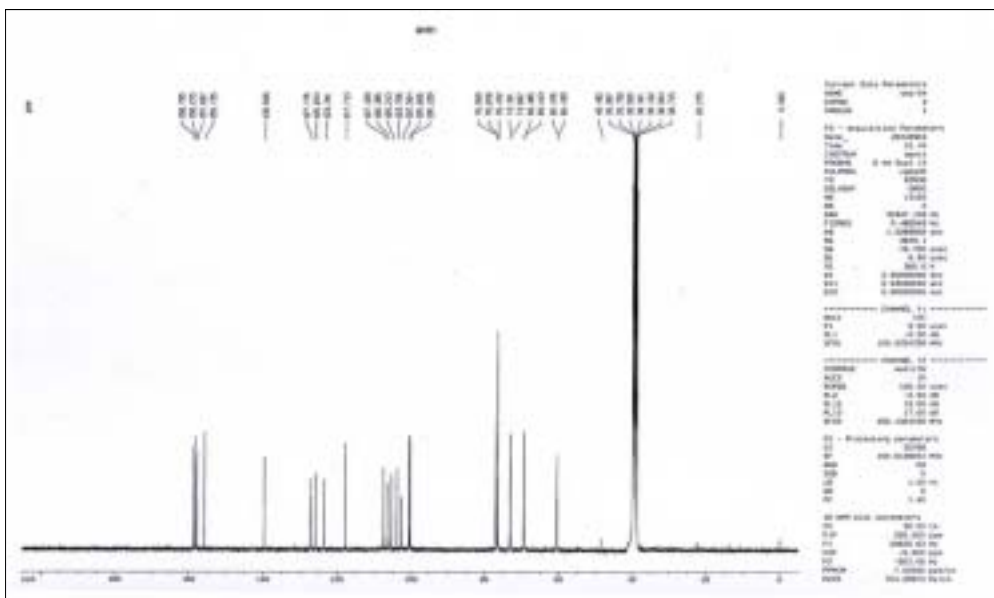


Figure 13.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyl-oxy)-trans-stilbene (DGTS).

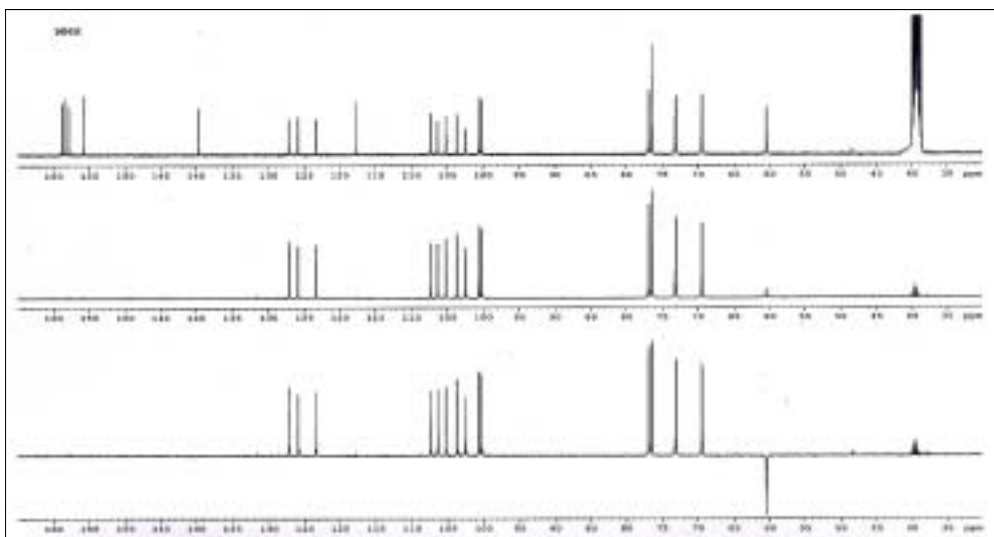


Figure 14. DEPT spectrum of 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene (DGTS).

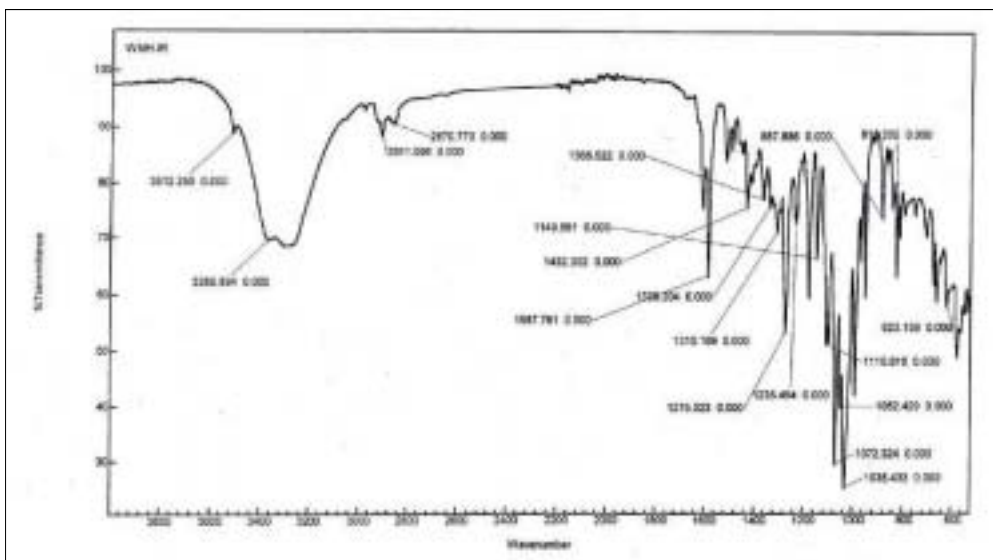


Figure 15. IR spectrum of 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di(β-D-glucopyranosyl-oxy)-trans-stilbene (DGTS).

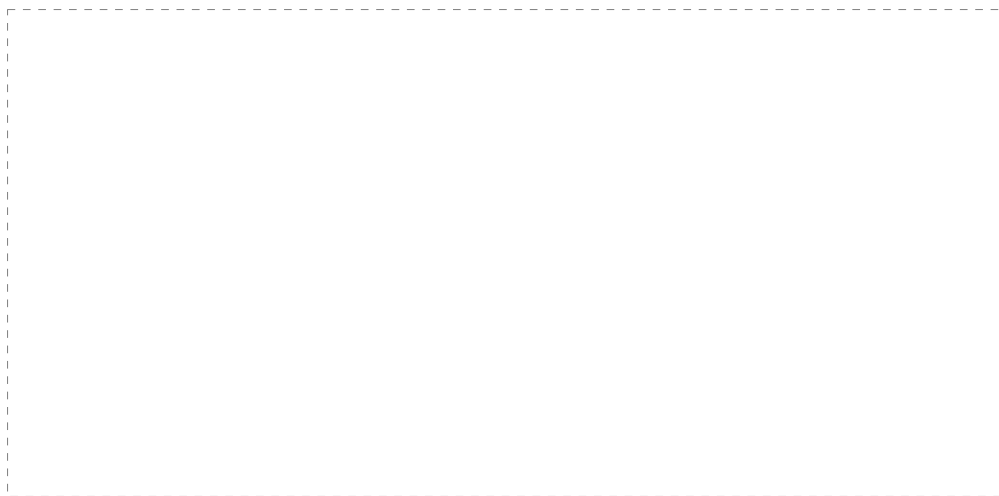


Figure 16. Maldi-Tof mass spectrum of 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene (DGTS).

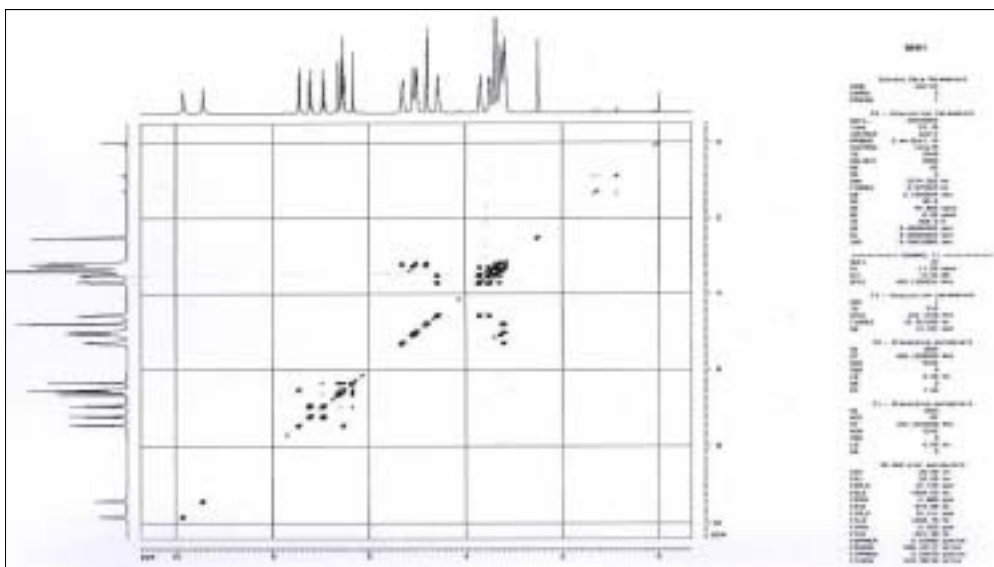


Figure 17.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene (DGTS).

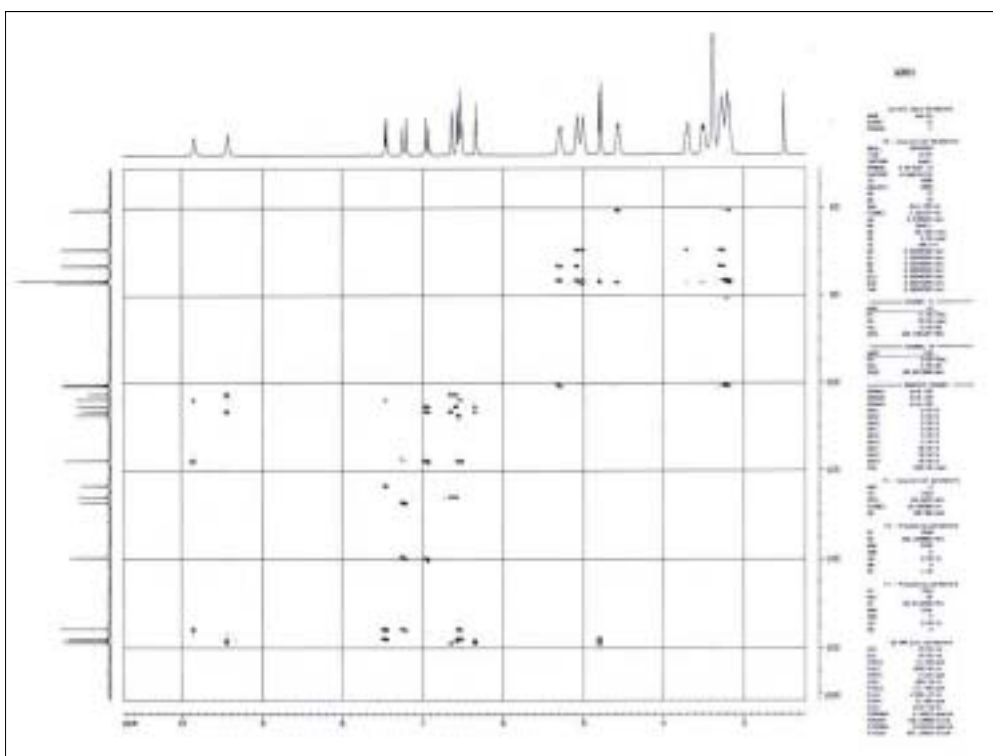
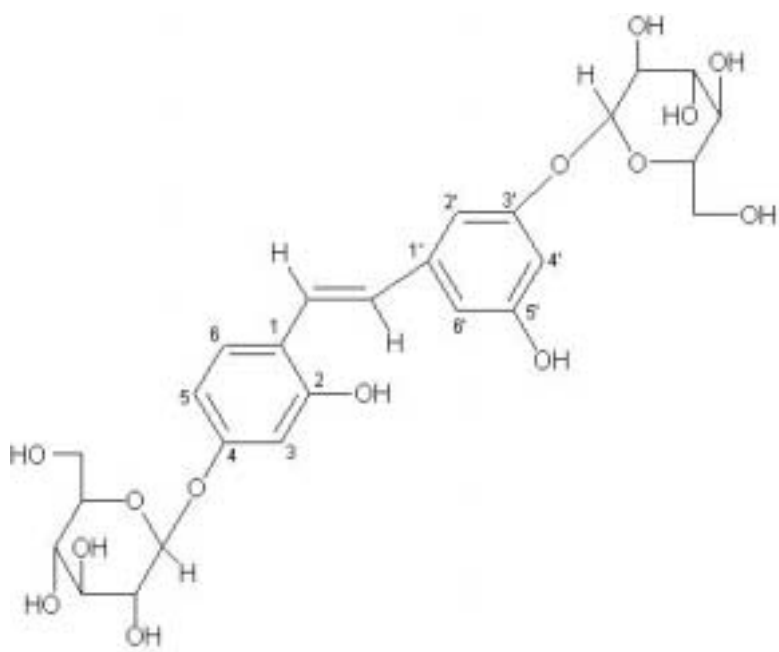


Figure 18. HMBC spectrum of 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di(β-D-glucopyranosyl-oxy)-trans-stilbene (DGTS).



2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene

$C_{26}H_{32}O_{14}$  (MW 568)

Figure 19. Structure of the purified compound from *Morus bombycis* Koidzumi



## 2) ESR 로 DGTS의 항산화 활성 측정

DGTS의 항산화활성을 ESR로 측정하였다. superoxide radical 소거 활성을 ESR spectrometer로 알아 본 결과는 다음과 같다(Figure 20). superoxide radical 소거 IC<sub>50</sub>값이 430.2 ug/mL로 나타났다. ESR signal 측정에서 보면 DMPO-OOH signal 이농도 의존적으로 낮아지는 것을 알 수 있었다(Figure 21). 용매별 hydroxide radical 소거 활성을 ESR spectrometer로 알아 본 결과, 농도를 1500 ug/mL로 하였을 때에도 소거 활성이 거의 나타나지 않았다. 이것으로부터 DGTS는 superoxide radical 소거 활성은 있는 반면에 hydroxide radical 소거 활성은 거의 없는 것을 알 수 있었다.

## 3) FeCl<sub>2</sub>-ascorbic acid법에 의한 과산화지질의 억제작용

지질 과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 또는 당뇨병 등에 의한 병태 생리학적 현상이나 조직의 손상정도를 나타내는 가장 중요한 기전으로 인정되고 있다. 동물 체내에서 생체막 지질의 과산화물 생성 정도의 지표로 알려져 있는 TBARS 함량을 측정한 결과는 Figure 21과 같다. DGTS를 첨가한 처리에서 대조군보다 MDA량이 감소하는 것을 알 수 있었고 300 ug/mL 되게 첨가하였을 때에는 MDA함량이 대조군보다 유의적인 감소를 보였고 그 함량은 비타민 E와 거의 비슷한 수준에 달하였다.

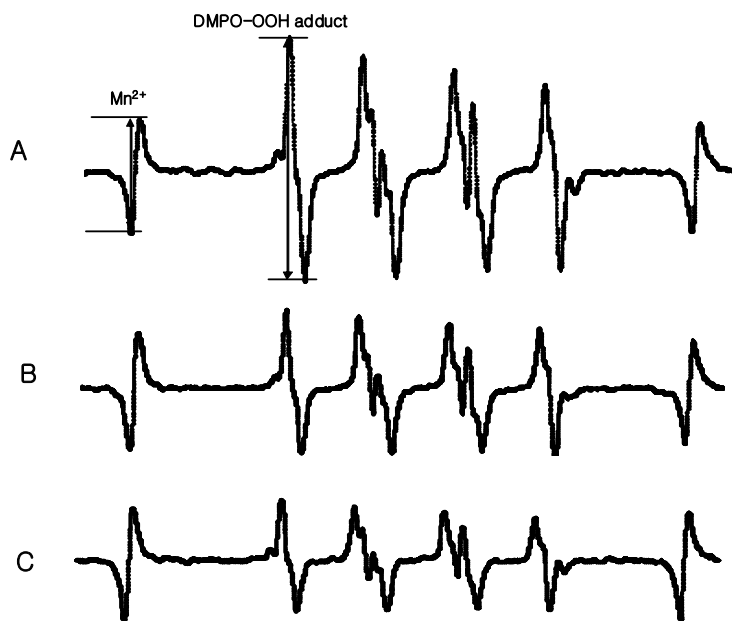


Figure 20. ESR signal of the standard manganese oxide ( $Mn^{2+}$ ) and superoxide radical (DMPO-OOH) peak without SOD and the inhibitory effect of the fraction of different concentration on ESR signals of the superoxide radical. (A) Control; (B) 300 ug/mL (C) 500 ug/mL.

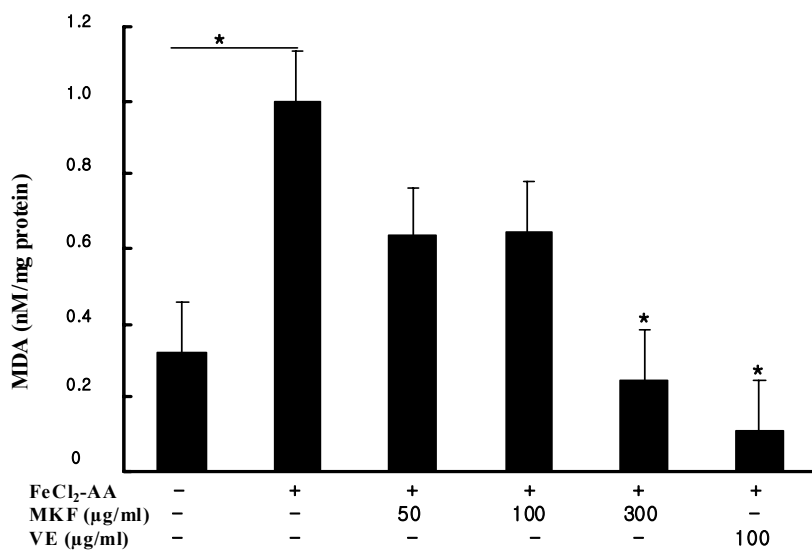


Figure 21. Inhibitory effects of the purified compound from *Morus bombycis* Koidzumi on FeCl<sub>2</sub>-ascorbic acid induced lipid peroxidation in rat liver homogenates. Data are expressed as means  $\pm$  S.D., N=5. \* significantly different from the control rats at P < 0.05 .

#### 4) HepG2 cell 에 대한 DGTS의 억제작용

##### (1) HepG2 cell 성장 억제활성

DGTS의 간암 세포주 사멸에 미치는 영향을 측정하기 위하여 농도별(0, 5, 20, 80 ug/mL)로 각각 첨가하고 24, 48, 72h 배양하면서 살아있는 세포수를 계수하였다. Figure 22에서와 같이 24시간, 48시간 배양시에는 유의적인 차이는 없었지만 72시간 배양하면 DGTS를 첨가한 군에서 대조군보다 유의하게 세포성장이 억제 되는 것을 알 수 있었다.

##### (2) DNA fragmentation

세포들이 생존과 사멸의 균형을 통해 개체의 항상성(homeostasis)을 효과적으로 유지하게 되는데 세포사(cell death)의 조절기전에는 apoptosis와 necrosis 두 가지 기전이 있다. Apoptosis는 핵 및 세포질에서 보여 지는 형태학적, 생화학적 기준으로 necrosis와 구별된다. 세포자연사에서 보여 지는 전형적인 세포핵의 특징은 염색질(chromatin)이 응축해 핵막의 주위에 밀집하게 되며, 세포자연사가 진행됨에 따라 핵막이 파괴되어 핵이 여러 개의 pyknotic nuclei 조각으로 나뉘게 된다(129). 이와 더불어 세포자연사에 대한 적절한 신호에 반응해 세포내의 칼슘과 마그네슘에 의존적인 endonuclease가 활성화 되어 이 효소가 DNA를 분절화 시켜 결과적으로 185-200 base pairs(bp)의 DNA 절편을 형성하게 된다. 그 결과 세포의 DNA를 추출해 전기영동을 실시하면 뉴클레오솜(nucleosome)단위(185 bp)로 잘려진 DNA ladder 형태로 관찰되며, 이러한 현상은 세포자연사의 특이적인 생화학적 지표로서 이용되고 있다. 암세포의 Apoptosis에 대한 생화학적 변화로 DNA가 Fragmentation되는지 여부를 확인하기 위해 agarose gel로 전기영동을 시행하였다. DGTS를 72시간 처리한 HepG2 세포의 경우 처리농도에 의존적으로 DNA의 분절화 현상이 증가됨을 관찰하였다(Figure 23).

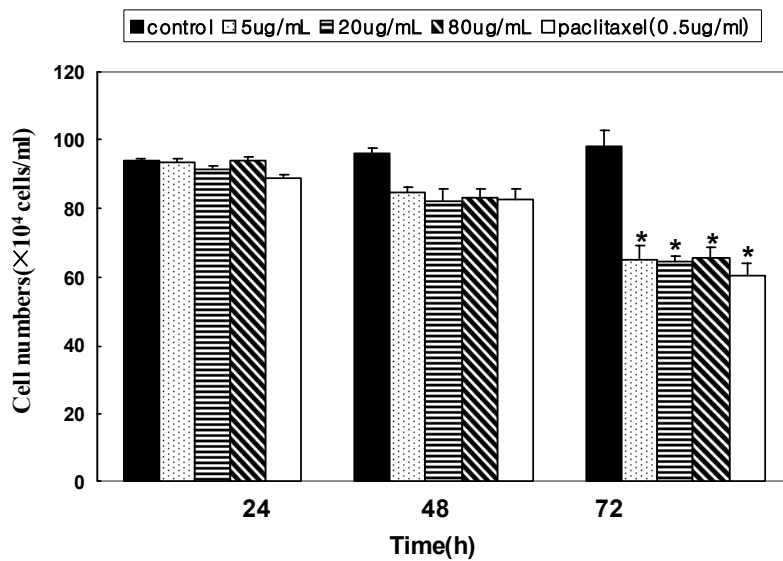


Figure 22. Inhibitory effect of fraction from *Morus bombycis* Koidzumion the growth of HepG2 cell for 24, 48 and 72 hr incubation time in cytotoxicity test.

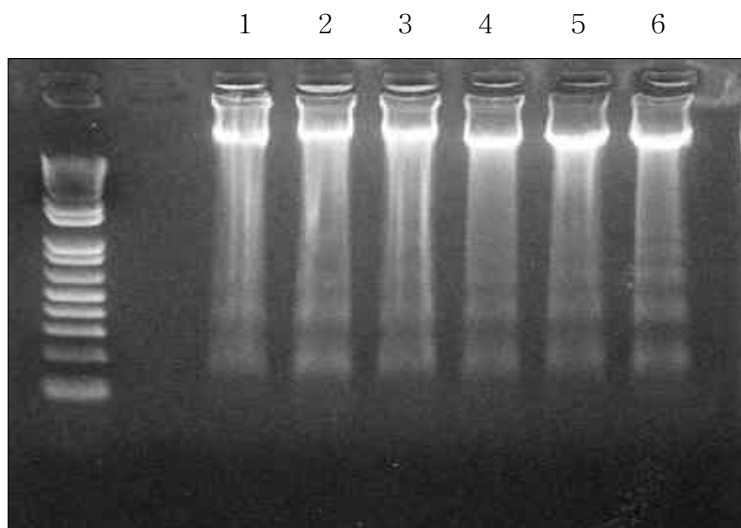


Figure 23. Agarose gel electrophoresis of DNA following treatment of HepG2 cells with DGTS. 1: 5 ug/ml; 2: 10 ug/ml; 3: 20 ug/ml; 4: 40 ug/ml; 5: 80 ug/ml; 6: 200 ug/ml.

### (3) Annexin V-FITC/PI

간암세포의 성장억제가 세포자멸사에 의한 것인지 괴사과정에 의한 것인지를 평가하기 위하여 Annexin V-FITC/PI로 이중 염색하여 flow cytometry assay를 수행하였다. DGTS로 1-3일 동안 처리한 결과, Annexin V-FITC/PI에 반응하여 염색된 세포를 다수 확인할 수 있었다. 24시간 동안 배양한 경우에는 Apoptosis가 0.96%로 나타났고 48시간 동안 배양하였을 때 1.07%로 나타났으며 72시간 동안 배양하였을 때는 3.29%로 나타나는 것을 알 수 있었다 (Figure 24).

### 5) 사염화탄소에 의해 유발된 간독성에서의 간 보호 작용

#### (1) 사염화탄소에 의해 유발된 간손상에서 AST, ALT 및 LDH 측정 및 조직학적 관찰

간독성을 유발하는 산업장 유해물질의 일종으로 간장 독작용을 유발하는 사염화탄소의 간장 독작용의 작용기전은 확연히 규명되어 있지 않으나 생체 세포막내의 smooth endoplasmic reticulum의 복합 산화기구에 의하여 reactive metabolite인 trichloromethyl free radical ( $\cdot\text{CCl}_3$ )로 대사되거나 혹은  $\cdot\text{CCl}_3$ 가 산소와 반응하여 생성된  $\text{Cl}_3\text{C-O-O}\cdot$ 로 산화되어 세포막의 polyunsaturated fatty acid를 과산화시킴으로써 막의 구조와 기능을 파괴한다고 보고되어 있다. 사염화탄소에 의해 유발된 간손상에 대한 영향을 알아 본 바 DGTS를 처리한 후 사염화탄소를 투여하여 하루 후에 ALT 함량이 사염화탄소에 의해 현저히 증가되었던 효소의 활성이 400 mg/kg, 600 mg/kg 투여 시 silymarin과 비슷한 양으로 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다(Figure 25). AST 함량은 사염화탄소군이 정상군보다 유의하게 증가하였으나 DGTS를 투여하고 사염화탄소를 투여시 모두 거의 정상으로 되어 있는 것을 알 수 있었다(Figure 26). 사염화탄소 투여 4일째에는 ALT, AST 함량이 정상치로 모두 회복되는 것을 알 수 있다(Figure 25, 26). LDH 함량은 사염화탄소 투여 시 증가하나 유의적인 차이는 없었고 DGTS투여 시에는 LDH 함량이 사염화탄소군보다 감소하는 것을 알 수 있었다(Figure 27). 한편 간 조직을 H&E 염색을 하여 관찰하였다(Figure 28). 정상군보다 사염화탄소군에서 중심정맥 주위의 간 조직이 배열이 규칙적이지 못하고 주변에 많은 공변세포가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. DGTS를 투여하였을 때 손상되었던 간 조직이 많이 회복되고 공변세포도 현저하게 적어진 것을 관찰할 수 있었다.

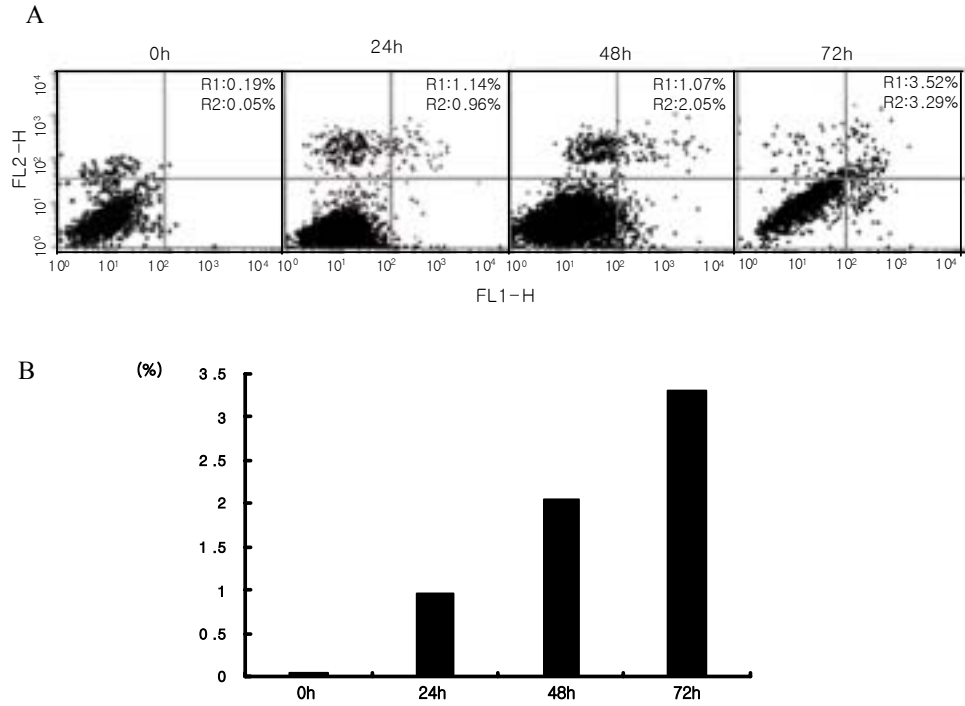


Figure 24. The cells were incubated with DGTS (1 mg/ml) for each designated time. The number of apoptosis cells was measured by flow cytometry as described in text. The region to the left of the R2 place was defined as cells undergoing apoptosis-associated DNA degradation. By AnnexinV-FITC double staining.



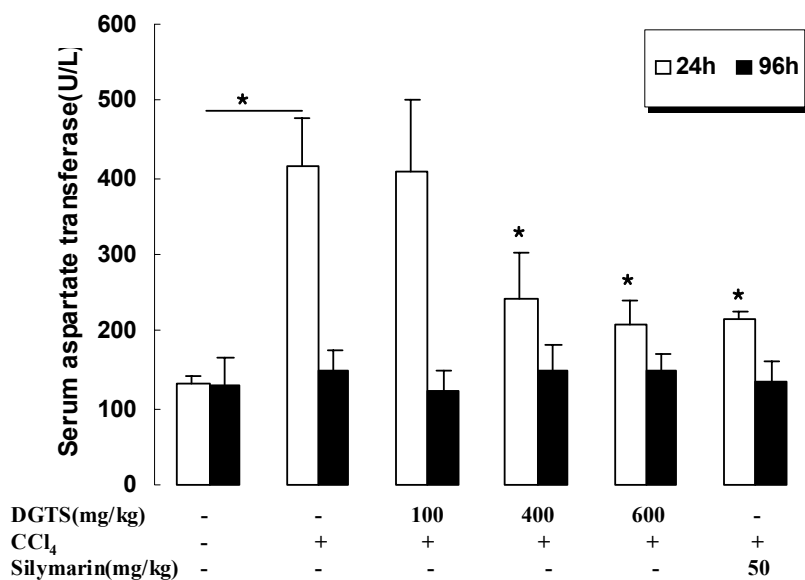


Figure 25. Serum aspartate transaminase level in various groups of rats treated with DGTS followed by induction of necrosis by carbon tetrachloride. Rats were sacrificed 24h after and 4day after the administration of each groups. Data are expressed as means  $\pm$  S.D., N=6.

\* significantly different from the control rats at  $P < 0.05$  .

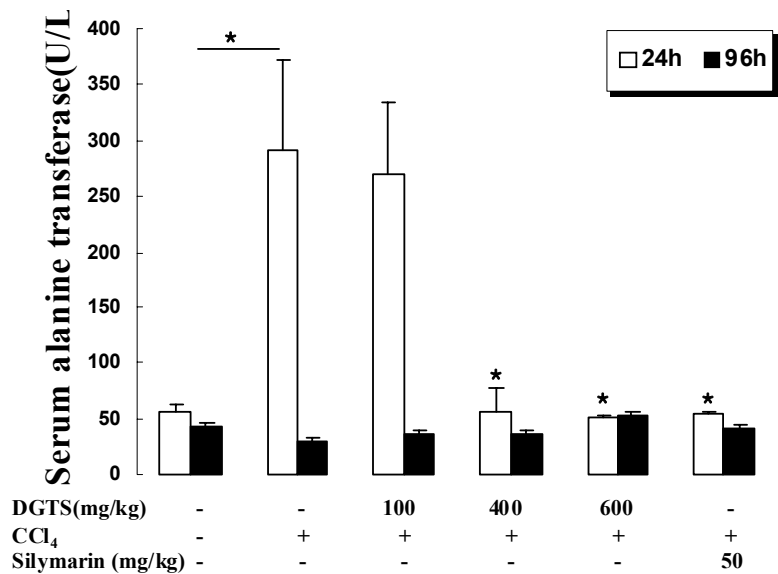


Figure 26. Activity of serum alanine transaminase level in various groups of rats treated with DGTS followed by induction of necrosis by carbon tetrachloride. Rats were sacrificed 24h after and 4day after the administration of each groups. Data are expressed as means  $\pm$  S.D., N=6.

\* significantly different from the control rats at  $P < 0.05$  .

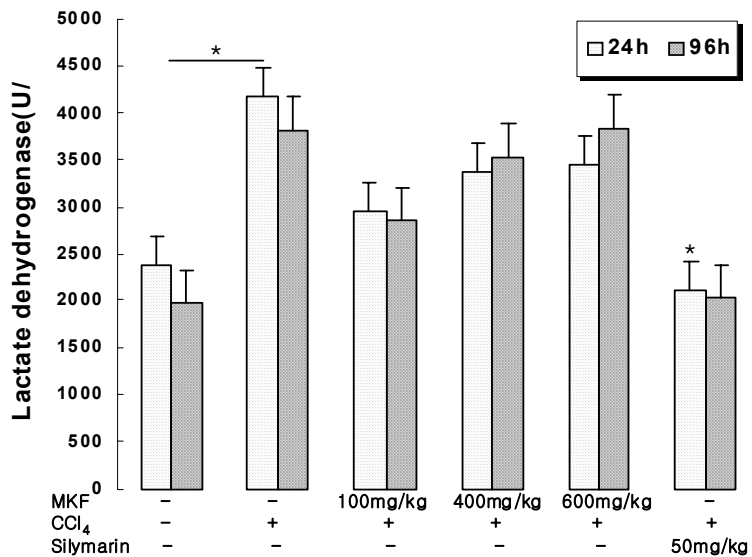


Figure 27. Activity of serum lactate dehydrogenase level in various groups of rats treated with DGTS followed by induction of necrosis by carbon tetrachloride. Rats were sacrificed 24h after and 4day after the administration of each groups. Data are expressed as means  $\pm$  S.D., N=6.

\* significantly different from the control rats at  $P < 0.05$  .

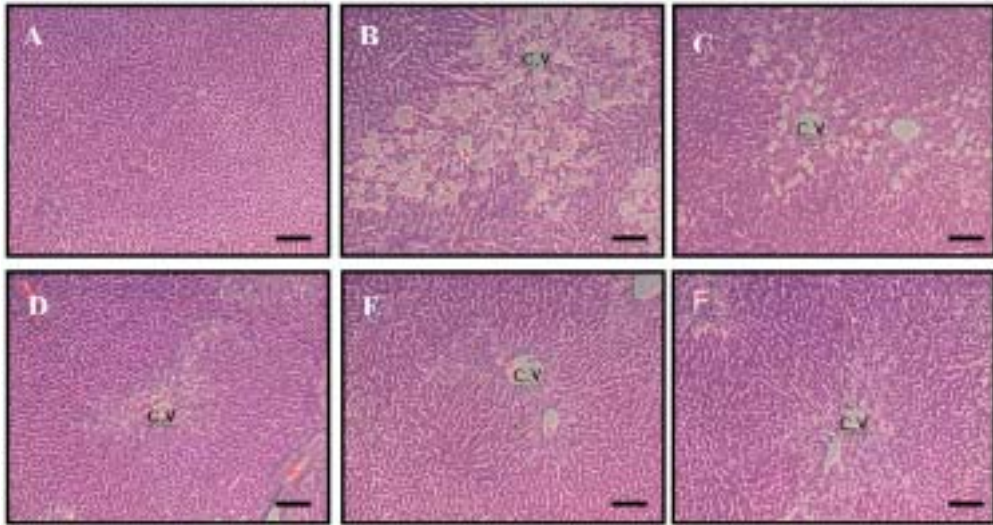


Figure 28. Section of liver of a  $\text{CCl}_4$ -treated rat showing ventral vein (C.V.) and hepatic cells (hematoxylin-eosin stain, original magnification, 100x). Rats were sacrificed 24 hr after the administration of  $\text{CCl}_4$ . A, control group; B,  $\text{CCl}_4$ /olive oil (1:1, 2 ml/kg); C, DGTS (100 mg/kg) +  $\text{CCl}_4$  D, DGTS (400 mg/kg) +  $\text{CCl}_4$  E, DGTS (600 mg/kg) +  $\text{CCl}_4$  F, Silymarin (50 mg/kg)+  $\text{CCl}_4$ .

## (2) CYP2E1와 TNF- $\alpha$ 의 RT-PCR 분석

P450 약물대사 효소계는 생체 내 물질뿐 만 아니라 체외에서 유입된 약물, 환경에서 유래하는 각종 유해 물질, 발암이나 돌연변이 등을 유발시키는 여러 화학물질(Xenobiotics)의 체내 활성화를 유도하며 이들 중 일부는 암의 initiation, promotion 과 tumor progression을 유발시키는 것으로 알려져 있어 이 분야에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다(130-133). 외부에서 유입된 화학물질의 독성화에 가장 많이 관여하는 Cyp isozymes으로는 Cyp 1A1/2, 2B1/2 및 2E1이 있다. 그중 Cyp2E1 은 ethanol에 의해서 유도되는 효소로서 acetaminophen, aliphatic alcohols, acetone, carbon tetrachloride, N-nitrosodimethylamine 과 같은 작은 유기분자들의 대사 및 독성에 관여한다. 사염화탄소를 투여하여 간 손상을 유도하였을 때 CYP2E1의 발현량을 RT-PCR로 알아보았다(Figure 32). 결과 사염화탄소군에서는 정상군보다 CYP2E1이 강하게 발현되는 것을 알 수 있었고 DGTS를 투여한 군에서는 사염화탄소군보다 연하게 발현되는 것을 알 수 있었다. 사염화탄소 투여 4일째에는 처리군마다 모두 비슷하게 발현되는 것으로 나타났다.

Rich & Lewis가 생물학적 활성도를 지닌 cytokines의 존재 가능성을 처음 기술한 이래 많은 종류의 cytokines이 발견되었고 이 물질들은 신체 내에서 조절기능의 조절과 면역 염증기전을 통한 신체 방어기전 및 조직의 복구과정에도 관여하는 것으로 알려져서 수술이나 외상 후 혹은 패혈증상태에서 cytokines의 신체내의 변화와 역할이 연구되고 있다. 이들 중 IL-6, TNF- $\alpha$ 는 수술이나 패혈증시 신체의 대사 작용의 주요 조절물질로서 간손상 후 간의 Kupffer 세포에서 많은 양이 생산되며 간에서 급성기 단백질의 생산을 포함한 단백질, 탄수화물, 지방대사에도 관여함이 알려져 있다. 사염화탄소로 의한 간 급성 손상에 있어서 IL-6는 24시간 때 강한 발현량을 나타내었고 TNF- $\alpha$ 는 6시간부터 발현되기 시작하여 시간의 증가에 따라 발현량이 증가되는 것으로 알려져 있다. Figure 29에서는 사염화탄소 투여 후 24시간에서의 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 RT-PCR로 나타낸 것으로 정상군에서는 거의 발현이 되지 않은 반면에 사염화탄소군에서는 강하게 발현되는 것을 알 수 있었고 DGTS를 농도별로 투여한 군과 silymarin군에서는 약하게 혹은 거의 발현되지 않는 것을 알 수 있었다.

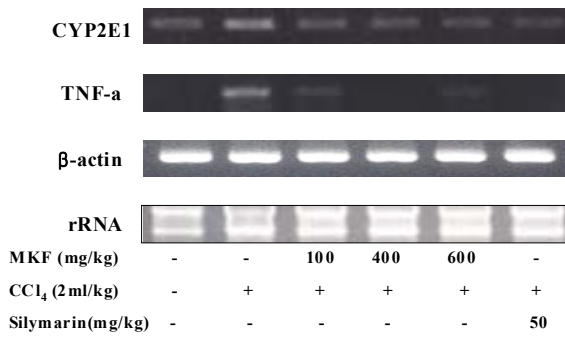


Figure 29. Inhibitory effect of the purified compound from *Morus bombycis* Koidzumi on the level of cytochrome P450 2E1 mRNA. CYP2E1 mRNA was detected by RT-PCR using total RNA from the livers of rats that had been exposed to (1) control, (2) CCl<sub>4</sub> /olive oil (1:1, 2 mL/kg), and (3-5) DGTS (100, 400, 600 mg/kg) after administration of CCl<sub>4</sub> and (6) silymarin (50 mg/kg) after administration of CCl<sub>4</sub>. All data were obtained from at least 3 rats.

#### 4. 결론

산뽕나무 뿌리로부터 단일 물질을 분리 정제 한 후 HPLC를 이용하여 순도를 검증하였다. 이 물질의 구조식을 규명하기 위하여  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT spectrum, IR spectrum, Maldi mass,  $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$  spectrum와 HMBS spectrum 를 이용하여 이 화합물이 분자량이 568이고 구조가 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene(DGTS)임을 확인하였다.

이 화합물의 항산화활성을 ESR spectrometry 로 측정한 결과 superoxide radical에 대한 소거활성이 농도의 증가에 따라 증가하였고 hydroxyl radical의 소거활성은 거의 없는 것으로 나타났다. 흰쥐 간균질물로  $\text{FeCl}_2$ -ascorbic acid법으로 과산화지질에 관한 억제활성을 측정한 결과 300 ug/mL 일때 100 ug/mL의 비타민 E의 과산화지질 억제활성과 비슷한 효과를 나타내었다. In vitro에서 간암세포주인 HepG2 세포에 DGTS 를 농도별로 첨가한 결과 농도가 증가함에 따라 시간의 흐름에 따라 대조군보다 암세포 성장이 억제되는 것으로 나타났고 DNA fragmentation 으로도 암세포의 apoptosis가 확인되었다. In vivo에서 사염화탄소에 의한 간 손상에서 DGTS 의 간 보호효과를 알아보기 위하여 DGTS 를 농도별로 투여한 후 사염화탄소를 투여하여 24시간과 4일후에 각각 부검을 진행하여 확인하였다. 결과 24시간일 때 DGTS 를 투여한 군의 AST, ALT의 양이 사염화탄소군보다 유의적인 감소를 나타내었고 조직학적 관찰을 한 결과 DGTS 군의 간손상 정도가 사염화탄소군보다 많이 회복된 것을 알 수 있었다. 그리고 간조직 에서 total RNA를 추출하여 CYP2E1과 TNF-a의 발현량을 RT-PCR로 알아본 결과 DGTS 군의 발현량이 사염화탄소군보다 약하게 발현되는 것을 알 수 있었다. 이런 결과들로부터 알 수 있는바 DGTS는 superoxide radical의 소거활성이 있고 간암세포인 HepG2 세포에 대하여 일정한 성장억제작용이 있으며 사염화탄소에 의한 간보호 작용이 있는 것으로 나타났다. 그리고 CYP2E1과 TNF-a의 발현량도 조절하는 것으로 나타났다.

## 제 4 절. 산뽕나무 뿌리에서 분리된 DGTS의 항당뇨 작용에 미치는 영향

### 1. 서론

당뇨병은 고혈당과 이에 수반되는 대사 장애가 장기간 지속되는 상태로 특징지어지는 만성 대사 질환으로서, 췌장 세포의 기능 이상에 의한 인슐린의 절대적 또는 상대적으로 부족하여 나타나는 제1형의 인슐린 의존형 당뇨병과 인슐린의 생물학적 효과의 감소로 나타나는 제2형의 인슐린 비의존형 당뇨병의 두 가지로 분류 된다. 당뇨병은 만성대사성 질환으로써 병이 오랜 기간 경과함에 따라 혈관 장애와 신경, 신장 그리고 망막 등의 기능 이상을 초래하는 치명적인 성인병중의 하나이다. 국내외적으로 당뇨병은 사회 환경의 변화에 따라 그 발생 빈도가 증가 추세에 있고 전 세계적으로 약 1억 4천만명 정도가 이 병으로 고생하고 있다. 특히 미국과 같은 선진국의 경우 전 국민의 6-7%가 당뇨 환자로 추정되고 있으며 해마다 치료경비로 100억 달러 이상 지출되는 것으로 알려져 있다. 그리고 이웃 나라 일본의 경우는 전체 인구의 약 5%인 약 690만 명 정도가 이병을 앓고 있으며 국내에서도 전 국민의 3-5%가 당뇨병 환자로 추정된다.

당뇨병은 췌장의 베타세포가 면역학적으로 파괴되어 인슐린 결핍에 의해 혈당이 증가하는 인슐린 의존형 당뇨병과 유전적 요인뿐 아니라 과식, 운동부족에 의한 비만, 감염, 외상 수술 등의 여러 가지 스트레스, 임신, 항인슐린 호르몬 분비 항진 등의 내분비이상, 스테로이드제 등의 약제, 노화물 등의 환경요인에 의해 발병되는 인슐린 비의존형 당뇨병으로 분류되는데 성인 환자의 대부분은 인슐린 비의존형 당뇨병이며 환자들은 이러한 질병의 치료와 합병증 예방을 위하여 약물복용과 함께 식이 운동요법 등을 병행하고 있다.

현재 인슐린 비의존형 당뇨병 치료를 위하여 가장 많이 사용되고 있는 경구용 혈당강하제로는 sulfonylurea계와 biguanide계 약물들인데 이 약물들은 그 효과와 안전성에 문제가 있고 특히 간기능 장애는 물론 저혈당과 유산혈증 등의 심각한 부작용을 수반하기도 한다. 따라서 이와 같은 문제점과 부작용을 줄이고 대사이상 증세를 개선시키며, 장기 복용에 있어서도 안전성이 높은 당뇨병 치료제 개발이 절실히 요구된다.



인슐린 비의존형 당뇨병에 대한 이상적인 치료제를 개발하기 위하여 이 질환의 발병원인을 명백히 규명하는 것이 필수적이나 발병원인이 확실히 밝혀질 때까지는 단순히 혈당치를 저하시키는 효과가 있다는 사실만으로도 치료제로 개발이 되어 질수밖에 없는 실정이다.

천연물로부터 당뇨병치료제로 개발된 사례를 살펴보면 biguanide계의 대표적 약물인 Metformin은 Galega officinalis로부터 분리된 guanidine type alkaloid인 galegine의 유도체인데 이 약물은 인슐린의 작용을 증강시키고 간에 의한 당의 생산을 효과적으로 억제함으로써 혈당을 조절하는 것으로 알려져 있고,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor의 대표적 약물인 Acarbose는 Actinoplanes로부터 분리된 pseudotetrasaccharide구조를 가지는 polyhydroxyl 화합물인데 이 약물은 소장내에서 다당류가 단당류로 분해되는 것을 저해함으로써 당의 흡수를 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 *Morus spp.* 로부터 분리된 1-deoxynijirimycin의 hydroxyethyl 유도체인 Miglitol등도 천연자원으로부터 개발된 대표적인 당뇨병 치료자라 할 수 있다(Figure 30). Tolbutamide는 1세대 sulfonylurea 계통의 경구용 혈당강하제로 인슐린내 당 기능 장애와 인슐린 비의존성 당뇨병 치료에 사용하며, 췌장 외 조직에서 당 섭취와 췌장에서 인슐린 분비를 촉진하여 혈당을 저하하는 효과를 가진다.

본 연구에서는 산뽕나무로부터 분리, 단리된 fraction(DGTS)의 항당뇨 효과를 알아보기 위하여 in vitro에서  $\alpha$ -glucosidase 와  $\alpha$ -amylase 억제작용을 알아보고 STZ로 처리한 췌장  $\beta$ 세포인 HIT-T15 cell에서 DGTS의 항당뇨 작용을 알아보았다. 그리고 in vivo에서 STZ로 유발된 당뇨 쥐에서의 항당뇨 연구를 하였다. Tolbutamide는 인슐린 비의존성 당뇨병환자에서 오랫동안 사용했던 경구용 혈당강하제로서 단백질합력이 강한 약물이며 간에서 산화반응으로 대사되어 소실되므로 positive control 약물로 선정하였다. STZ로 유발된 당뇨 쥐에서 Tolbutamide를 positive control로 하여 DGTS의 항당뇨 효과를 알아보기 위하여 insulin 측정, 혈중 효소활성 측정, 조직학적 검사 및 RT-PCR로 유관인자들의 발현량을 확인하였다.

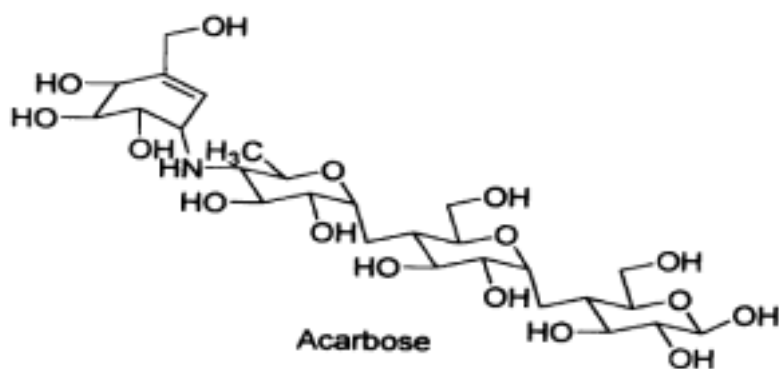
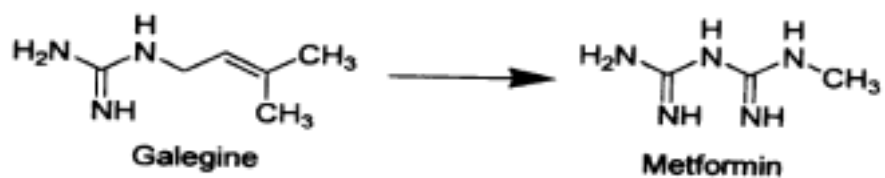


Figure 30. Structures of anti-diabetes drugs from natural resources.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 효소활성 측정( $\alpha$ -amylase와 $\alpha$ -glucosidase)

산뽕나무 fraction(DGTS)의 pancreatic  $\alpha$ -amylase 에 대한 저해활성을 측정하기 위해 starch를 기질로 사용하였다. 1.2 U/mL 효소액(porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase) 250  $\mu$ l와 산뽕나무 DGTS (50  $\mu$ L)를 PBS buffer(pH 6.8) 250  $\mu$ L 넣고, 37°C에서 10분간 preincubation 한 후 0.5% starch를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 DNS(48 mM 3,5-dinitrosalicylic acid 30% sodium potassium tartrate in 0.5 M NaOH) 500  $\mu$ l 발색시약을 넣어 반응을 정지 시켰다. 이를 100°C에서 15분 끓여 발색을 시키고 충분히 냉각시킨 후 반응액에 3배의 물을 가하였으며, 잘 교반한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 얻은 결과를 반응액에 DGTS 대신에 동량의 증류수를 넣은 값과의 차이로부터 저해율을 계산하였다. 이때 starch가 들어가지 않은 반응액을 blank로 하였다.

$\alpha$ -glucosidase(*Bacillus stearothermophilus*)에 대한 저해 활성은 pNPG(p-nitro-phenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)를 기질로 하여 측정하였다. 2.5 mU/ $\mu$ l  $\alpha$ -glucosidase 3  $\mu$ l와 DGTS 25  $\mu$ l을 pH 7.0, 37°C에서 15분간 pre-incubation 한 후 1.8 mg/mL pNPG를 250  $\mu$ l가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 21.2 mg/mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 500  $\mu$ l 가하여 반응을 정지 시켰다. 필요에 따라  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 로 희석한 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. DGTS 대신에 증류수를 대신하여 buffer를 넣어준 반응액과의 흡광도 차이로부터 저해율을 계산하였다. 이때 기질인 pNPG가 들어있지 않는 반응액을 blank로 하여 흡광도를 측정하였다.

### 2) STZ에 의해 손상된 $\beta$ -cell인 HIT-T15 cell line에서의 DGTS 의 항당뇨 작용

#### (1)시료 준비

시료를 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 농도별로 녹이고 0.2  $\mu$ m sterile syringe filter에 여과, 살균시켜 냉동 보관하면서 사용하였다.

#### (2) $\beta$ -cell 인 HIT-T15 cell 배양

Hamster  $\beta$ -cell(HIT-T15)는 서울대학교 의과대학 소재 한국 세포주 은행에서 분양받아 -196°C 액체 질소탱크에 보관하면서 사용하였다. Cell은 RPMI-1640배지에 1%의 penicillin-streptomycin과 10% FBS(Fetal bovine serum)를 첨가하여

37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2-3회 배지를 교환하면서 flask바닥에 세포가 90%이상 자라면 PBS(Phosphate buffered saline) 로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 flask 바닥에서 떼 낸 후 계대 배양하였다.

### (3) Cytotoxicity test

T-25ml flask 에  $2 \times 10^5$  cells/mL를 일주일 배양하였다. 0.01 M citrate buffer 에 녹인 1 mM STZ 2 mL로 세포를 1시간 처리한 후 농도별로 DGTS (0, STZ, 250, 500, 1000 ug/mL)를 첨가하고 37°C에서 24, 48, 72시간씩 배양하면서 살아있는 세포수를 계수하였다. 배양된 세포를 50 ul를 취하여 동일한 양의 0.4% trypan blue dye와 잘 섞어 실온에 1분간 방치시킨 후 hematometer를 이용하여 염색되지 않은 세포, 즉 살아 있는 세포의 수를 계수하였다.

### (4) Flow cytometric analysis

T- 25ml flask 에 처리별로 배양된 세포를 Trypsin-EDTA를 넣어 37°C에서 5분간 처리하여 바닥에 붙은 cell를 떼어wash한 후 counter하여 $2 \times 10^6$  cells/mL되게 취하였다. 차가운 70% 에탄올로 4°C에서 1시간 고정하고 PBS로 wash한 후 1 mL 의 염색액(980 uL PBS+1 mg/mL의 PI 10 uL+10 mg/mL 의 RNase A 10 uL)으로 37°C, 30분 둔 후 FACS를 찍었다.

## 3) In vivo에서 항당뇨 효과

### (1) 실험동물의 사육 및 식이 조성

실험동물은 약 8주령이 된 SDIGS계 흰쥐 수컷 50마리를 (주)오리엔트바이오로부터 분양 받아 강원대학교 동물자원과학대학 동물 사육실에서 7일간 고형사료(pellet)로 사육하면서 환경에 적응시켰다. 1주일간 안정시킨 후 실험동물을 난괴법(randomized complete block design)에 따라 개체별 체중이 295-305 g 되는 흰쥐를 선별하여 6마리씩 1군의 정상군, sample군과 4군의 당뇨 유발군 으로 분리하였다. 즉 당뇨를 유발하지 않고 기본식이를 급여한 normal군, 당뇨를 유발하지 않고 기본식이에 sample를 투여한 군, streptozotocin(STZ) 으로 당뇨를 유발한 STZ-control군, STZ-당뇨 유발 흰쥐에 sample를 매일 각 200 mg/kg, 800 mg/kg, tolbutamide를 400 mg/kg 체중단위로 경구투여 한 군으로 구분하여 사육

하였다. 기본적인 실험 식이는 RAT&MOUSE 18%-5L79(U.S.A.)를 사용하였다. 실험동물은 한 마리씩 분리 사육하였으며 사육실의 조건은 온도  $20\pm 25^{\circ}\text{C}$  습도는 약 60~70%를 유지시켰으며, 광주기는 매일 12시간 간격으로 조절하였다. 체중은 1주일에 한번 씩 일정한 시간에 동물용 체중계(animal balance)로 측정하였다.

## (2) STZ로 당뇨 유발

당뇨를 유발하기 위하여 16시간 실험동물을 절식시킨 후, 췌장의 베타세포에만 특이적으로 작용하여 다른 기관에 영향을 미치지 않는다고 알려진 STZ를 pH 4.5의 0.01 M citric acid buffer에 녹여 40 mg/kg 체중단위로 복강투여 하였다. 정상군은 동량의 citric acid buffer 용액을 투여하였다.

STZ를 주사한 후 약 7시간이 지나면 혈당량이 급격히 감소하고 인슐린 농도가 상승하다가 서서히 혈당이 상승되고  $\beta$ 세포의 파괴로 인하여 인슐린 농도가 감소되며 24시간이 경과된 후에는 고혈당 상태가 지속되므로, 주사 후 24시간 후에 미정맥 에서 혈액을 채취하여 ACCU-CHEK®Active Blood Glucose Monitoring System(Roche Diagnostics GmbH, Germany)으로 혈당농도를 측정하여 혈당농도가 300 mg/dL 이상인 쥐를 당뇨 유발쥐로 확인하여 실험에 공시 하였다.

## (3) 분석시료의 채취

5주간 실험 사육한 흰쥐를 12시간 절식시킨 후 에틸에테르로 가볍게 마취한 다음 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 방치한 후 3000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리하여 냉동 보관하면서 분석에 사용하였다.

장기는 채혈 후 즉시 간장, 신장, 췌장, 비장을 적출하였으며, 생리식염수로 씻어내고 여과지로 수분을 제거한 후 중량을 측정하여 체중 100 g당의 장기 중량으로 환산하였으며, 일부는 필요한 부분을 절단하여 10% NBF (neutral buffered formalin)에 고정하고 병리조직학적 관찰을 위하여 H&E (Hematoxylin&Eosin) 염색을 진행하였다. 간조직의 일부는 조직 지질정량과 RNA 추출용으로 적출 후 즉시  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동보관 하였다.

## (4) 혈중 지질 및 효소 활성 분석

- 혈 중 포도당 측정

혈 중 포도당 농도는 ACCU-CHEK® Active Blood Glucose Monitoring System(Roche Diagnostics GmbH, Germany)을 이용하여 매주 일정한 시간에 미정맥으로부터 채혈하여 측정하였다.

- 혈청 중 insulin 농도 측정

혈 중 insulin 농도는 rat insulin enzyme immunoassay(EIA) system (Amersham Pharmacia Biotech Inc. USA)을 이용하여 spectrophotometric plate reader로 450 nm에서 OD 값을 구하여 정량분석을 진행하였다.

- 혈청 중 AST, ALT, LDH, BUN의 농도 측정

혈청 중 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), LDH(lactate dehydrogenase), BUN(blood urea nitrogen)는 자동생화학검사기 (FUJI DRI-CHEM CLINICAL CHEMISTRY ANALYZER DRI-CHEM 3500, FUJIFILM, Japan)를 이용하여 측정하였다.

- 혈 중 과산화지질(malondialdehyde, MDA) 수준

혈 중 과산화지질의 함량은 malondialdehyde를 thiobarbituric acid(TBA)로 비색 정량하는 Ohakawa 등의 방법에 준하여 측정하였으며, 측정된 값은 정상군의 평균값에 대한 백분율로 표시하였다.

(5) 췌장, 신장 및 간장의 조직학적 검사

조직학적 검사는 조직을 절취하여 10% 중성 포르말린으로 고정한 후에 수세, 탈수, 투명, 침투 과정을 거쳐 파라핀으로 포맷하여 microtome을 이용하여 3 um 두께로 박절하였다. 60℃의 slide warmer에 30분간 방치하여 탈파라핀 과정인 xylene 3단계를 각각 3분씩 거친 다음 합수과정인 고농도 alcohol에서 저농도로 옮긴 후 흐르는 물에 3분간 수세를 하였다. 그리고 hematoxylin으로 핵을 5분간 염색한 후 흐르는 물에 수세하고 핵 이외에 염색된 부분을 제거하기 위하여 1% HCl-alcohol로 3회 dripping을 하고 흐르는 물에 수세를 한 다음 다시 0.5% ammonia water에 8회 dripping을 하고 수세를 하였다. Eosin에 30초 동안 대조 염색을 시행한 다음 탈수과정인 저농도 alcohol에서 고농도 alcohol 로 거친 후

xylylene으로 3회 3분간씩 투명과정을 거쳐 비수용성 봉입제인 malinol로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

#### (6) CYP2E1, TNF- $\alpha$ 과 Albumin 의 RT-PCR분석

쥐 간조직 에서 RNA 추출은 Trizol RNA isolation kit (Invitrogen)를 사용하였다. cDNA 합성은 RNA를 이용하여 AMV RNA PCR kit (Takara, Japan)를 사용하였다. 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 x PCR buffer, RNase free dH<sub>2</sub>O, 10 mM dNTP, 0.25 unit AMV reverse transcriptase, 2.5 pmol/ul oligo dT 를 넣어 30°C에서 10분, 50°C 에서 30분, 2 min at 95°C에서 2분을 각각 반응시켜 cDNA를 합성하였다. PCR은 위에서합성한 cDNA 를 1/10희석한 후 2 uL 취하여 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 x PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 0.05 uM primers, 2.5 unit Taq DNA polymerase (Takara, Japan)와 혼합하여 전체 혼합물이 50 ul 되게 하였고 94°C에서 2분 변성시킨 후 증폭하였다. PCR cycle 조건은 94°C에서 30 s, 60°C 에서 30 s, 72°C 에서 1 min, 30 cycles 증폭시킨 후 마지막 cycle은 72°C에서 7분간 반응시켰다. gene primer 조성은 다음 Table 11과 같다.

Table 11. Oligonucleotide primers and sizes of expected PCR products

cDNA	Primers sequence	Base pair
CYP2E1	Sense: 5'-ACCACCAGCACAACCTCTGAGATATGG-3' antisense: 5'-CAATTCCATGCGGGCCAGGCCTTCTCC-3'	436
TNF- $\alpha$	Sense: 5'-CGAGTGACAAGCCCGTAGCC-3' antisense: 5'-GGATGAACACGCCAGTCGCC-3'	735
<i>Albumin</i>	sense: 5'-GCCCTACCCACAAAGCCTCAG-3' antisense: 5'-GAGTGGCTTTCTGTTGCTGTTCA -3'	540
$\beta$ -actin	sense: 5'-CATCCCCCAAAGTTCTAC-3' antisense: 5'-CCAAAGCCTTCATACATC-3'	347



#### (7) SDS-PAGE와 Western blot

냉동 간조직을 액체질소로 곱게 균질화 시킨 후 증류수를 넣어 12,000 rpm 에서 15분 동안 원심분리 하여 상층액을 얻은 후 이를 이용하여 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 겔에서 나뉜 단백질들을 nitrocellulose membrane 에 옮기고 (250 mA, 4h), 다시 5% 탈지분유/Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl)로 냉장고에서 over night 하였다. 그 후 1차 항체 rabbit polyclonal anti-rat CYP2E1 antibody (Chemicon 사)와 mouse monoclonal anti-rat anti-rat  $\beta$ -actin antibody (Sigma사)를 각각 2차 항체 horseradish peroxidase-linked anti-rabbit, anti-mouse IgG (Santa Cruz 사)와 반응시켰다. 각각 항체 반응 후 TBST(TBS+0.05% Tween 20)로 수세하였다. 수세된 membrane 은 Enhanced Chemiluminescent (ECL, PicoEPDTM, Korea) 를 이용하여 발현량을 측정하였다.

#### 4) Statistical analysis

본 실험에서의 모든 실험결과는 mean $\pm$ S.D.로 나타내었고, 각 군 간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one way analysis of variance(ANOVA)검정을 하였으며, 다군 간의 차이는 Statistival Analysis Software(SAS institute)를 이용하여 Duncan's new multiple t-test에 의하여 P<0.05 의 수준에서 유의성 검정을 진행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) $\alpha$ -amylase에 대한 저해 활성

사람이 섭취하는 음식물에 포함되어 있는 탄수화물의 80%는 glucose 형태로 분해된다. 섭취된 탄수화물은 소화기관내에서 우선 타액 및 췌장의  $\alpha$ -amylase의 작용을 받은 후 소장으로 이동하는데 타액과 췌장의  $\alpha$ -amylase는 전분의  $\alpha$ -1,4 linkages를 분해하여 전분의 최종분해산물은 주로  $\alpha$ -1,4 결합의 이당류와 삼당류이다.

$\alpha$ -Amylase 저해제는cereals, legumes, tuber 그리고 많은 다른 생물종에서 보고되고 있다.  $\alpha$ -Amylase 저해제에 대한 연구는 췌장 등 hyperamylasemia증의

진단에서부터 당뇨병, 비만 그리고 hyperlipaemia 등의 조절에 이르기까지 다양한 인간 건강분야에서 이루어지고 있다. 산뽕나무에서 분리 정제된 단일 물질로  $\alpha$ -amylase에 대한 저해활성을  $\alpha$ -amylase 저해제인 Acarbose와 비교하여 조사하였다. 그 결과 25 ug 이상의 DGTS 의  $\alpha$ -Amylase의 저해 활성이 50 ug의 acarbose 와 유의적인 증가를 보였다(Figure 31). 높은  $\alpha$ -Amylase의 저해 활성으로부터 DGTS 의 항당뇨 작용을 기대하게 되었다.

## 2) $\alpha$ -Glucosidase에 대한 저해 활성

소장의 oligosaccharidases는 lactose를 glucose와 galactose로 분해하는 lactase와  $\alpha$ -glucosidases의 두 가지 종류가 있다. Glucosidase 저해제는  $\alpha$ -amylase 저해제와는 달리 효과적으로 소장으로부터의 탄수화물의 소화 흡수를 저해함으로써 혈당 상승을 억제하는 것으로 보고되었다. 이러한  $\alpha$ -glucosidase (maltase, sucrase, isomaltase, glucoamylase) 저해제의 혈당 상승 억제효과는 소장 점막에서 섭취된 이당류와 탄수화물로부터 생산된 이당류 및 과당류의 분해속도를 늦추어 줄으로써 이루어지며, 이러한 이유에서  $\alpha$ -amylase 저해제보다는 보다 더 특이적으로 혈당 상승의 조절이 가능하다. 이미 시판되고 있는 대표적인 혈당 강하용  $\alpha$ -glucosidase 저해제로는 Bayer사의 Actinoplanes 균주가 발효하여 생산하는 이차 대사산물인 Pseudo-oligosaccharide의 1972년에 발견된 물질인 Acarbose를 주성분으로 하는 Glucobay을 들 수 있다. 본 실험에서는 DGTS 의  $\alpha$ -glucosidase의 저해 활성을 알아본 결과 Figure 32와 같다. DGTS 의 농도 의존적으로  $\alpha$ -glucosidase의 저해 활성이 높아지는 것으로 나타났고 250 ug 일때 60% 넘는 저해 활성을 나타냈다.

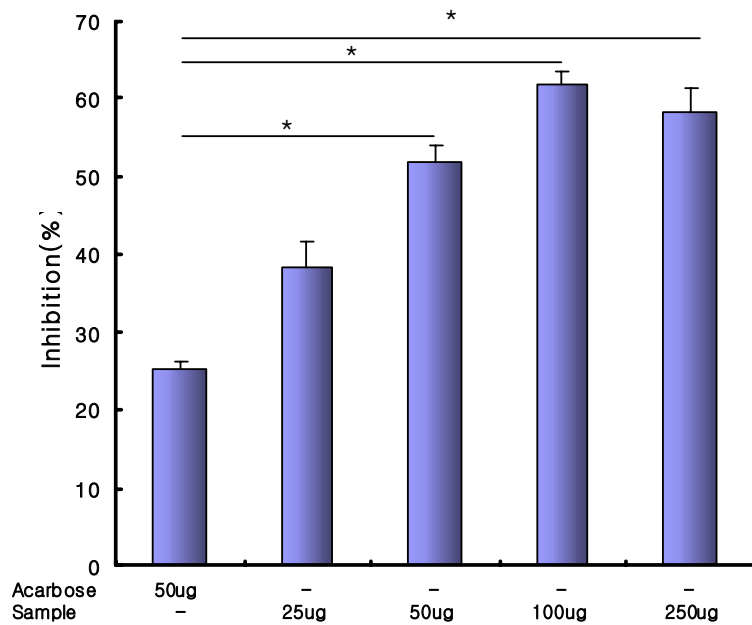


Figure 31. Inhibitory activities of *Morus bombycis* Koidzumi fraction against *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase inhibition. Results are expressed as mean $\pm$ S.D.(n=5).

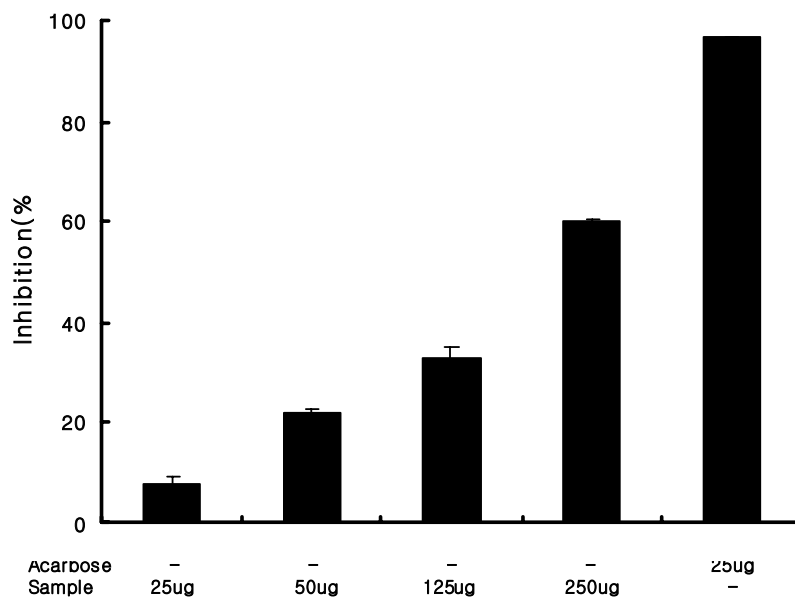


Figure 32. Inhibitory activities of *Morus bombycis* Koidzumi fraction against pancreatic  $\alpha$ -glucosidase inhibition. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D.(n=5).

### 3) STZ로 처리한 $\beta$ -세포인 HIT-T15 에서 DGTS의 작용

STZ로 처리한 베타 세포주인 HIT-T15 cell에 대한 DGTS의 영향을 알아보기 위하여 1 mM STZ로 1시간 처리한 후 DGTS를 농도별로 투여하여 24, 48, 72h 배양하면서 살아있는 세포수를 계수하였다. Figure 33에서와 같이 72시간 배양하면 DGTS를 첨가한 군에서 농도 의존적으로 대조군보다 유의하게 세포성장이 증가되는 것을 알 수 있었다. 이것으로부터 DGTS 는 STZ로 처리한 베타세포의 손상을 회복하는 것으로 사료된다. 그 반면에 tolbutamide를 첨가한 군은 24시간에서 STZ군보다도 세포가 더 손상을 받는 것으로 나타났고 48시간, 72시간 배양한 후에도 DGTS 군보다 세포수가 적은 것을 알 수 있었다. 이것은 tolbutamide가 베타 세포에 대해 독성을 갖고 있다는 것으로 생각된다.

### 4) Flow cytometry 분석

STZ로 처리한 베타세포에 DGTS를 처리하였을 때 세포의 회복능력을 알아보기 위하여 PI염색을 하여 Flow cytometry 로 확인하였다. 그 결과(Figure 34) STZ군(60.75%)에서 세포가 정상군(22.98%)보다 많이 손상되었다가 DGTS를 250 ug/ml 투여하였을 때 36.04%로 감소되는 것을 알 수 있었다. 이것으로부터 DGTS의 베타세포에 대한 보호 작용을 갖고 있는 것으로 생각된다.

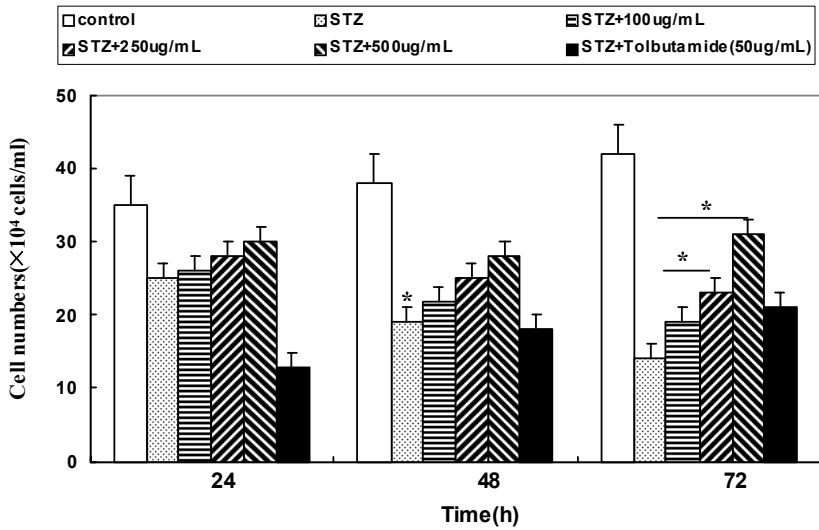


Figure 33. Effect of *Morus bombycis* Koidzumi fraction(DGTS) on STZ induced viability in HIT-T15 cell. 1, control; 2, STZ group; 3, STZ + DGTS 100ug/ml; 4, STZ + DGTS 250ug/ml; 5, STZ + DGTS 500ug/ml; 6, STZ + Tolbutamide 50ug/ml. Values with different letters are significantly different at \*  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

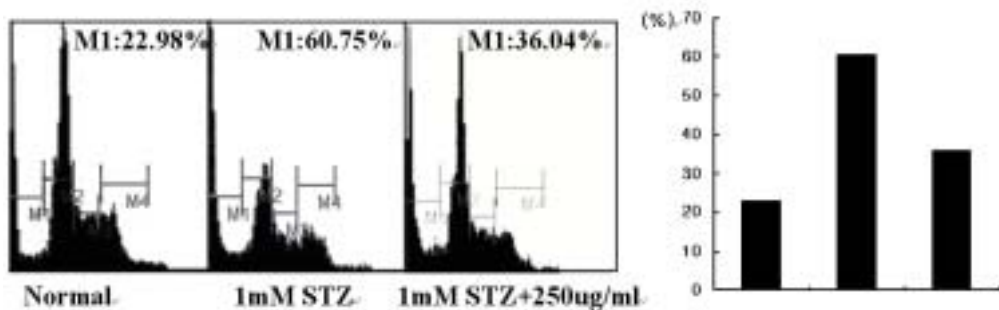


Figure 34. The cells were incubated with DGTS (1mg/ml) for each designated time. The number of apoptosis cells was measured by flow cytometry as described in text. The region to the left of the R2 place was defined as cells undergoing apoptosis-associated DNA degradation. By PI (propidium iodide) staining.

## 5) Streptozotocin 당뇨 유발 흰쥐에서의 DGTS의 항당뇨 효과

### (1) 체중변화

각 군의 체중 변화를 살펴보면(Table 12), 정상군에서는 실험 전기간 동안 지속적인 체중 증가를 나타낸 반면 STZ-control군에서는 체중 감소를 나타내어 당뇨 시 급격한 성장의 감소와 체중의 감소를 알 수 있었으며, STZ+sample군과 STZ+Tolbutamide군에서는 완만한 체중 감소를 나타내었다가 점차 체중이 증가하는 것을 알 수 있었다. STZ-control군에 비하여 유의적인 체중 증가 경향을 나타내었다.

### (2) 장기의 무게

체중 100 g 당 무게로 환산한 장기의 중량을 비교한 실험에서(Table 13) 신장과 간 조직의 체중에 대한 상대적 중량은 모든 당뇨 유발군에서 정상군에 비하여 유의적인 증가를 나타내었으며, 비장의 무게는 모든 실험군 사이에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 특히 신장의 경우 다른 장기에 비해 현저한 비대화 경향을 보였는데 이는 Gallaher 등의 연구 결과와 유사하였다. 하지만 STZ+DGTS 군들과 STZ+Tolbutamide군은 STZ군과 큰 차이는 없었다.

### (3) 혈중 포도당 수준에 미치는 영향

사용된 STZ는 베타세포에서 절대적인 인슐린 부족을 유발하기보다는 초기 단계에서 포도당에 대한 신속한 인슐린 분비 반응을 손상시켜 고혈당증을 유발한다. 당뇨쥐의 경우, 인슐린 기능 부진으로 인하여 혈액에서 각 조직으로 유입되는 당이 감소하고, 간에서 당 신생작용에 의하여 혈액내로 배출되는 당이 증가하여 고혈당을 초래한다. 본 실험에서 STZ 당뇨 유발 흰쥐에 5주 동안 DGTS를 투여한 후 7일 간격으로 혈 중 포도당 수준을 조사한 결과를 Table 14에 나타내었다. 모든 당뇨 유발군에서 정상군에 비하여 유의적인 혈당증가를 나타내었으며, 실험 2주째 주부터 시작하여 DGTS를 투여한 군에서 STZ군에 비하여 유의적인 혈당감소를 보이기 시작하여 실험 5주 후에도 STZ군에 비하여 유의적인 혈당감소를 나타내었다. DGTS는 800 mg/kg 높은 농도에서 혈당농도에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.



Table 12. Changes of body weight in diabetic rats fed on the experimental diets for 5 weeks

Weeks	Groups					
	Normal	STZ-control	STZ+ 200mg/kg	STZ+ 800mg/kg	STZ+ Tolbutamide 400mg/kg	800mg/kg
0 day	303.8±5.8 <sup>a</sup>	303.3±6.9 <sup>a</sup>	304±5.4 <sup>a</sup>	299.5±3.5 <sup>a</sup>	300.0±2.7 <sup>a</sup>	298.8±5.4 <sup>a</sup>
1st week	321.2±4.4 <sup>a</sup>	262.1±3.6 <sup>b</sup>	278.5±4.6 <sup>b</sup>	276.4±3.9 <sup>b</sup>	281.3±3.5 <sup>b</sup>	328.2±5.2 <sup>a</sup>
2nd week	356.1±6.8 <sup>a</sup>	258.2±5.8 <sup>b</sup>	287.2±6.3 <sup>b</sup>	283.1±4.6 <sup>b</sup>	288.6±6.3 <sup>b</sup>	350.3±5.9 <sup>a</sup>
3rd week	393.5±7.6 <sup>a</sup>	265.3±6.9 <sup>b</sup>	301.8±8.2 <sup>c</sup>	289.5±6.8 <sup>c</sup>	292.8±8.7 <sup>c</sup>	371.2±9.1 <sup>a</sup>
4th week	410.5±5.6 <sup>a</sup>	271.3±5.9 <sup>b</sup>	305.8±5.2 <sup>c</sup>	309.5±5.8 <sup>c</sup>	298.8±5.7 <sup>c</sup>	389.2±5.1 <sup>a</sup>
5th week	423.2±9.8 <sup>a</sup>	277.2±6.9 <sup>b</sup>	310.2±8.9 <sup>c</sup>	311.7±7.5 <sup>c</sup>	304.2±9.3 <sup>c</sup>	403.7±8.9 <sup>a</sup>

\* Values are mean ± S.D., N=6

\* Values with different superscript within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

Table 13. change of organ weights of diabetic rats fed on the experimental diets for 5 weeks

Organs	Groups					
	Normal	STZ-Control	STZ+ 200mg/kg	STZ+ 800mg/kg	STZ+ Tubutamide40 0mg/kg	800mg/kg
Liver	2.56±0.45 <sup>a</sup>	3.87±0.25 <sup>b</sup>	3.78±0.1 <sup>b</sup>	3.62±0.14 <sup>b</sup>	3.93±0.07 <sup>b</sup>	2.87±0.15 <sup>a</sup>
Kidney	0.58±0.02 <sup>a</sup>	1.05±0.07 <sup>b</sup>	1.00±0.04 <sup>b</sup>	1.01±0.05 <sup>b</sup>	1.04±0.02 <sup>b</sup>	0.59±0.02 <sup>a</sup>
Splen	0.16±0.008 <sup>NS</sup>	0.20±0.017	0.18±0.012	0.17±0.016	0.17±0.007	0.18±0.009

Values are mean ± S.D., N=6

Values with different superscript within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

NS : Not Significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

**Table 14. Blood glucose levels in diabetic rats fed on the experimental diets for 5 weeks.**

Blood glucose levels (mg/dl)	Groups					
	Normal	STZ-control	STZ+ 200mg/kg	STZ+ 800mg/kg	STZ+Tolbutamide 400mg/kg	800mg/kg
0 day	116±4.2 <sup>a</sup>	115±2.6 <sup>a</sup>	117±3.6 <sup>a</sup>	115±2.9 <sup>a</sup>	116±4.5 <sup>a</sup>	116±3.5 <sup>a</sup>
1 <sup>st</sup> week	126±4.5 <sup>a</sup>	410±15.1 <sup>b</sup>	375±14.3 <sup>b</sup>	387±16.9 <sup>b</sup>	400±22.6 <sup>b</sup>	110±5.15 <sup>a</sup>
2 <sup>nd</sup> week	109±2.1 <sup>a</sup>	494±42.6 <sup>d</sup>	366±19.9 <sup>b</sup>	367±12.1 <sup>b</sup>	429±34.4 <sup>c</sup>	115±2.7 <sup>a</sup>
3 <sup>rd</sup> week	113±4.9 <sup>a</sup>	546±17.3 <sup>d</sup>	360±28.9 <sup>b</sup>	357±22.0 <sup>b</sup>	410±20.1 <sup>b</sup>	110±2.3 <sup>a</sup>
4 <sup>th</sup> week	118±2.2 <sup>a</sup>	556±11.3 <sup>d</sup>	351±9.4 <sup>b</sup>	340±35.3 <sup>b</sup>	408±24.6 <sup>b</sup>	120±3.3 <sup>a</sup>
5 <sup>th</sup> week	116±2.8 <sup>a</sup>	540±31.8 <sup>d</sup>	345±40.5 <sup>b</sup>	335±31.5 <sup>b</sup>	406±7.5 <sup>b</sup>	125±6.6 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D., N=6. Values with different superscript within the row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. NS: not significant at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

#### (4) 혈 중 Insulin 농도에 미치는 영향

혈 중 인슐린은 췌장의 베타세포에서 분비되는 호르몬으로, 혈액속의 당분을 몸속의 여러 장기에서 이용할 수 있도록 하여 혈당을 일정하게 유지하는 역할을 할 뿐만 아니라 우리가 섭취하는 주요 영양소인 지질과 단백질대사에도 중요한 역할을 수행한다. 본 실험에서 혈 중 인슐린 함량(Figure 35)은 모든 당뇨 유발군에서 정상군에 비해 유의적인 감소를 나타내었으며, DGTS를 투여한 군에서는 STZ군에 비하여 유의적인 증가를 나타내었다. STZ + DGTS 800 mg/kg 군은 positive control인 tolbutamide 400 mg/kg 보다도 좀 더 높은 함량의 insulin 농도를 나타내었다. DGTS만 투여한 군에서는 정상군과 비슷한 인슐린 함량을 나타내었다.

#### (5) 혈 중 과산화지질(malondialdehyde, MDA) 억제 효과

당뇨병에서 산화적 스트레스에 대한 감수성이 높아져서 지질과산화가 쉽게 일어나며, 이러한 산화적 스트레스의 증가에 의해 조직 손상이 당뇨병에서 만성합병증을 유발시키는 주된 원인으로 여겨진다. 지질과산화물은 유리산소, 금속이온이 생체막의 불포화지방산에 작용하며 일어나는 반응 생성물로서 생체 내 지질 대사 이상을 초래하며 세포의 구성성분인 단백질, RNA 그리고 DNA와 작용하며 항산화효소가 존재하는 미토콘드리아 등의 기능 이상과 생화학적 변화를 일으키며 이로 인해 동맥경화를 비롯한 퇴행성 질환을 촉진하는 물질로 주목받고 있다. 본 실험에서 혈 중 과산화지질 수준은 (Figure 36) STZ 당뇨 유발군에서 정상군에 비하여유의적인 증가를 나타내었으며 DGTS 투여군에서 모두 정상군의 수준으로 회복되는 것을 알 수 있었다. 당뇨쥐에 DGTS 800 mg/kg 투여하였을 때는 positive control 인 tolbutamide 투여군보다도 과산화지질 함량이 정상군에 더 가까운 것을 알 수 있다. 이는 DGTS의 투여가 자유라디칼에 의해 발생하는 oxidative stress상태로의 진행을방어하여 상대적으로 과산화지질 함량이 낮아지는 것으로 사료된다.

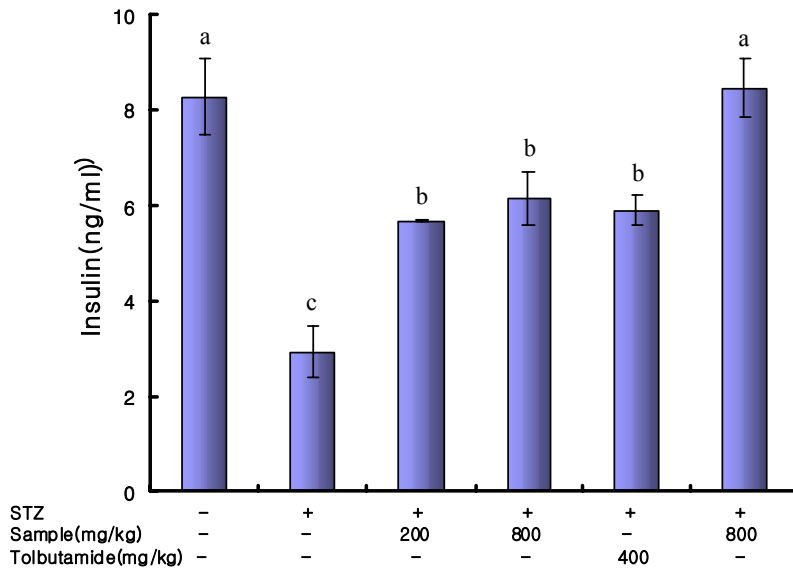


Figure 35. Insulin levels of diabetic rats fed on the experimental diets for 5weeks.

Values with different superscript within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Values are mean  $\pm$  S.D., N=6.

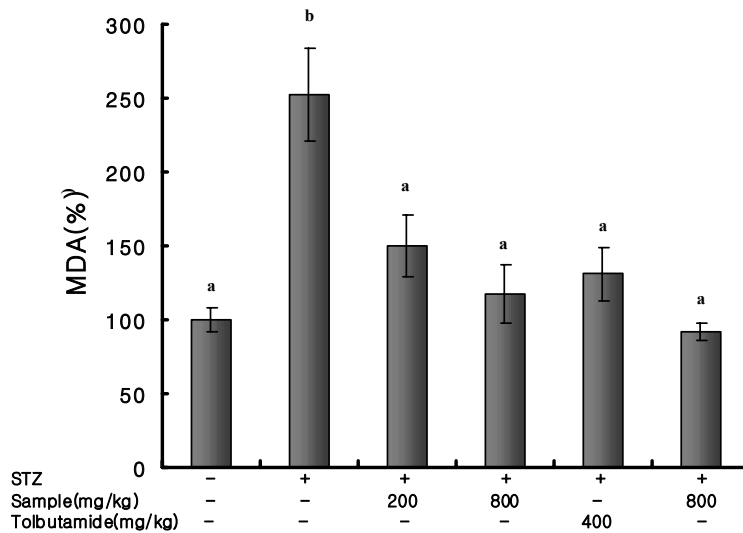


Figure 36. Serum MDA concentration in rats fed on the experimental diets for 5weeks.

Values with different superscript within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Values are mean  $\pm$  S.D., N=6. MDA concentration (%) are compared with Normal group mean in serum (Normal group mean=100%).

#### (6) 혈 중 AST, ALT, BUN의 활성

혈 중 AST, ALT는 간세포에 다량 존재하는 효소로서 지방간이 유발되거나 간 유해물질이 존재할 때 간세포가 손상되어 혈액 속으로 AST 및 ALT의 유리가 증가되어 효소 활성도가 높아짐으로서 간 손상의 지표로 이용된다. 혈 중 AST 활성도는 모든 당뇨 유발군 에서 정상군에 비하여 유의적인 증가를 나타내었으며 STZ+800 mg/kg 군에서 당뇨 유발군보다 유의적인 감소를 나타내었다(Table 15). 혈 중 ALT 활성도는 모든 당뇨 유발군에서 정상군에 비하여 유의적인 증가를 나타내었고 DGTS 투여 군에서 감소하는 경향은 있었으나 유의적인 차이는 없었다.

BUN(Blood urea nitrogen)은 단백질 대사과정에서 생산되는 물질인데 비뇨계 통질환에 걸리게 되면 혈중 함량이 높아진다고 알려져 있다. 혈 중 BUN 활성도는 모든 당뇨 유발군 에서 정상군에 비하여 유의적인 증가를 나타내었고 STZ 투여 후 DGTS를 투여(200 mg/kg, 800 mg/kg)하였을 때 STZ 당뇨유발군보다 모두 유의적인 감소를 나타내었다(Table 15). DGTS (800 mg/kg)만 투여한 군에서는 모두 정상치를 나타내어 독성이 없음을 나타내었다.

#### (7) 혈 중 LDH 활성도 측정

혈 중 LDH 활성도는 모든 당뇨 유발군 에서 정상군에 비하여 유의적인 증가를 나타내었으며 STZ+800 mg/kg 군에서 당뇨 유발군보다 유의적인 감소를 나타내었고 positive control인 tolbutamide(400 mg/kg) 투여군과 유사한 값을 나타내었다(Figure 37).

Table 15. Serum AST, ALT and BUN levels of diabetic rats fed on the experimental diets for 5 weeks.

Items	Groups					
	Normal	STZ-control	STZ+200mg/kg	STZ+800mg/kg	STZ+400mg/kg Tolbutamide	800mg/kg
AST(U/L)	107.5±20.04 <sup>a</sup>	358.3±47.44 <sup>b</sup>	249.3±27.69 <sup>b</sup>	224.8±16.40 <sup>c</sup>	145.5±13.30 <sup>c</sup>	114.5±73.5 <sup>c</sup>
ALT(U/L)	31.0±3.16 <sup>a</sup>	172.2±58.72 <sup>b</sup>	163.5±91.20 <sup>b</sup>	160.2±91.93 <sup>b</sup>	89.0±30.42 <sup>c</sup>	27.83±19.4 <sup>c</sup>
BUN(mg/dl)	15.5±0.83 <sup>a</sup>	39.6±8.95 <sup>b</sup>	28.1±6.61 <sup>c</sup>	31.6±4.71 <sup>c</sup>	29.1±5.45 <sup>c</sup>	15.4±1.88 <sup>c</sup>

Values are mean ± S.D., N=6.

Values with different superscript within the row are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.



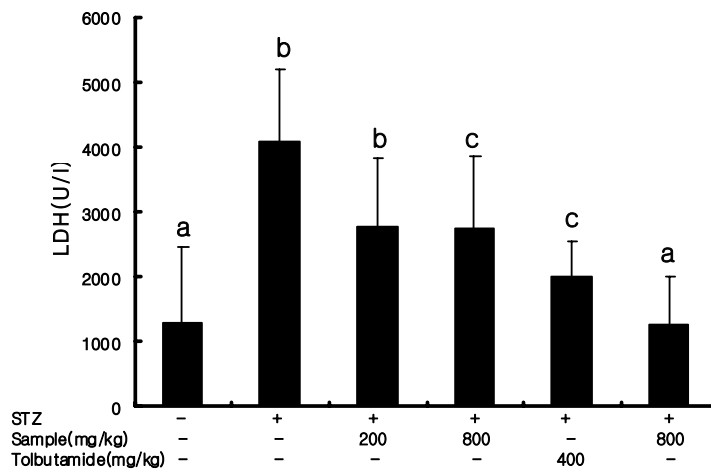


Figure 37. Effect of oral administration of DGTS at doses of 200 and 800 mg/kg body wt. on serum LDH levels in normal and diabetic rats. Tolbutamide (400 mg/kg) was treated only diabetic rats. Each represents mean  $\pm$  S.D. for six rats. Control group administrated with water as a vehicle. Values with different letters are significantly different \*at  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

(8) CYP2E1, TNF-a와 Albumin 의 RT-PCR분석

STZ로 당뇨 유발한 쥐의 간 조직에서 CYP2E1의 발현량을 RT-PCR로 알아본 결과는 Figure 38과 같다. 여러 실험에 의하면 STZ에 의해 유발된 당뇨 동물, 당뇨병환자, 비만환자, 알코올중독자들의 CYP2E1의 함량이 증가한다고 알려져 있다. 그리고 CYP2E1의 양이 인슐린 처리에 의하여 회복되는 것을 알 수 있었다. CYP2E1의 발현량을 알아보기 위하여 간 조직에서 total RNA 를 추출하여 RT-PCR 하였다. STZ군에서 다른 처리군보다 CYP2E1의 발현량이 증가하는 것을 알 수 있었고 STZ + DGTS군과 STZ + tolbutamide군에서는 정상군과 비슷한 발현량을 나타내는 것을 알 수 있었다(Figure 38). 이 결과로부터 DGTS가 STZ 투여로 하여 증가된 CYP2E1의 발현량을 조절하는 거라고 사료된다.

TNF(tumor necrosis factor)-a는 종양세포를 죽이기 위하여 여러 거대식세포들이 분비하는 물질로서 염증반응과 면역반응에 중요한 역할을 하고 있다. STZ로 유발된 당뇨쥐에서 TNF-a의 발현량을 알아보기 위하여 RT-PCR 하였다. 결과 STZ군에서는 강하게 발현되었고 STZ+ DGTS 군은 정상군과 거의 비슷하게 약하게 발현되는 것을 알 수 있었다(Figure 38). 그 반면에 이전에 당뇨시약으로 사용되었던 tolbutamide를 투여한 군은 DGTS 군보다 더 강하게 발현되는 것을 알 수 있었다. Tolbutamide는 급, 만성 당뇨병환자에서는 간대사 장애를 일으킬 수 있다는 보고가 있는데 이것은 가능하게 tolbutamide의 부작용일거라고 생각된다.

알부민 합성은 간에서만 진행된다. 간 회복 정도를 알아보기 위하여 간 조직에서 알부민의 발현량을 RT-PCR 로 알아보았다(Figure 38). 정상군과 DGTS 만 투여한 군에서 다른 군보다 강하게 발현되는 것을 알 수 있었다. 그러나 당뇨쥐에 DGTS 를 투여 하였을 때 알부민의 발현량은 당뇨쥐와 거의 비슷하게 발현되는 것으로 나타났다. 단시일 내에 albumin의 양의 증가를 할 수 없는 것으로 사료된다.

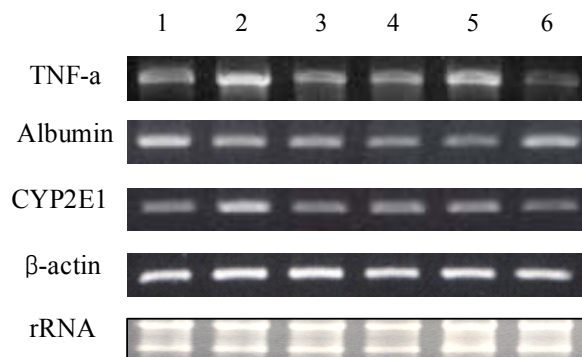


Figure 38. Inhibitory effect of DGTS on the level of cytochrome P450 2E1 and albumin mRNA. CYP2E1, TNF-a and albumin mRNA was detected by RT-PCR using total RNA from the livers of rats that had been exposed to (1) Normal control, (2) STZ (40 mg/kg), and (3-4) STZ+ DGTS (200, 800 mg/kg), (5) STZ+tolbutamide (400 mg/kg) and (6) DGTS (800 mg/kg). All data were obtained from at least 3 rats.

(9) 장기 조직의 병리조직학적 소견

① H&E 염색에 의한 췌장 조직의 광학현미경적 소견

랑게르한스섬이란 췌장 안에 섬[島(도)] 모양으로 산재하는 내분비성 세포군인데, 19세기 독일의 병리학자 P. 랑게르한스가 췌장에서 발견하여 <섬>이라 명명했는데, 그의 이름을 붙여 랑게르한스섬이라 하게 되었다. 랑게르한스섬의 지름은 50~200  $\mu\text{m}$ 이고 그 수는 이자 하나에 20만~200만 개나 흩어져 있으며, 그 부피 전체는 이자의 2%를 차지한다고 한다. 랑게르한스섬의 조직에는 3종류의 세포가 있는데, 그중  $\beta$ 세포는 세포 수가 가장 많으며, <인슐린>이라는 호르몬을 분비한다. 인슐린은 혈당농도를 낮추는 작용이 있으며, 혈당농도가 높아지면 인슐린의 분비촉진이 조절된다. 따라서  $\beta$ 세포의 분비가 장애를 받으면 당뇨병에 걸린다. 실제로  $\beta$ 세포를 알록산 등으로 선택적으로 파괴하면 당뇨병을 일으킬 수 있다.

정상군의 췌장 소도에서는 아무런 이상 현상이 관찰되지 않았으며(Figure 39A), 당뇨 유발군 에서는 전체적으로 췌장 소도가 위축된 소견을 보였으며 췌장 외분비부와외의 구분이 뚜렷하지 않았으며 췌장 소도 모양 자체가 구형이나 타원형이 아닌 불규칙한 형태를 나타내었으며 췌장 내 결체조직 세포의 증식이 많이 관찰되었다(Figure 39B). STZ+ DGTS군에서는 STZ군에 비해 췌장 소도의 위축이 경하게 관찰되었고 췌장 소도와 외분비부와외의 구분이 비교적 뚜렷하며 췌장 소도에서의 공포변성이나 췌도 내 결체조직 세포의 증식이 미약하게 관찰되었다(Figure 39C, Figure 39D). DGTS만 투여한 군에서는 아무런 이상 현상이 관찰되지 않았다(Figure 39F).

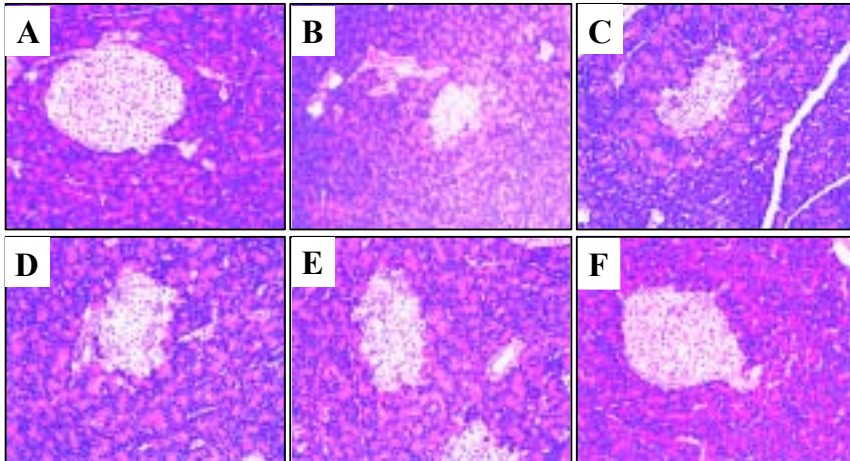


Figure 39. Histopathological observations made on the pancreatic tissue of control and experimental groups of rats and the photomicrograph presented are the representatives of the six rats used in each group (hematoxylin-eosin stain, original magnification, 100x). A, Normal control; B, STZ (40 mg/kg); C, STZ+ DGTS (200 mg/kg); D, STZ+ DGTS (800 mg/kg); E, STZ+Tolbutamide (400 mg/kg); F, DGTS (800 mg/kg).

## ② 신장 조직의 광학현미경의 소견

신장은 제 11, 12흉추와 제 1, 2 요추 사이에 위치하며 강낭콩 모양으로 좌우한 쌍의 후 복막 장기이다. 신장조직은 크게 두 부분으로, 즉 피질과 수질로 나누어지는데 신장피막 바로 아래에 있는 바깥층을 피질(cortex)이라고 하고 안쪽은 수질(medulla)이라 한다. 피질에는 한쪽 신장에 약 100-125만개의 네프론으로 구성되어 있으며 네프론(nephron)은 신장의 기능적, 구조적 단위를 이루고 있다. 네프론은 신소체(renal corpuscle)와 신 세뇨관(renal tubule)으로 구성되어 있다. 신소체(renal corpuscle)는 사구체(glomerulus)와 이를 둘러싸고 있는 보우만 주머니(Bowman's capsule)로 형성된다. 수입소동맥이 보우만주머니 내에서 20-40개의 고리를 만들어 형성된 모세혈관 총이 사구체이며 근위세뇨관의 상피세포가 구형으로 팽대되어 사구체를 둘러싸고 있는 주머니가 보우만주머니이다.

H&E 염색에 의한 신장 조직의 광학현미경적 소견을 관찰한 결과, 정상군에서는 신소체에서 뚜렷한 Bowman's space를 관찰할 수 있었으며(Figure 40A), STZ군에서는 사구체의 비대화(glomerulo-hypertrophy)가 관찰되었으며 이로 인한 신소체 내의 Bowman's space가 감소된 것을 관찰할 수 있었다(Figure 40B). STZ+ DGTS (200, 800 mg/kg)군에서는 STZ군에 비해 사구체의 비대가 뚜렷하게 나타나지 않았고 Bowman's space도 STZ군에 비해 비교적 뚜렷하게 관찰되었고(Figure 40C, D), tolbutamide 투여군 과도 비슷한 소견을 나타내었다(Figure 40E).

## ③ 간 조직의 광학현미경적 소견

간 조직의 H&E 염색에 의한 광학현미경 관찰 결과, 정상군에서는 아무런 이상 현상이 관찰되지 않았으며(Figure 41A), STZ군은 중심정맥 주변부 간세포대의 배열이 불규칙하고 간 세포질 내 공포가 관찰되는 세포들과 핵 농축 현상이 일어난 세포들이 일부 관찰되었다(Figure 41B). STZ+ DGTS (800 mg/kg)군에서는 STZ군에 비해 간세포대의 배열이 비교적 균일하게 배열되었고 세포질 내 공포도 현저하게 감소되어 있음이 관찰되었고(Figure 41C, D), tolbutamide 투여 군과 거의 비슷한 소견을 보였다(Figure 41E). DGTS 만 투여한 간 조직에서는 아무런 이상 현상이 관찰되지 않아(Figure 41F) 높은 농도에서도 간 조직에 손상을 주지 않는다는 것을 알 수 있다.

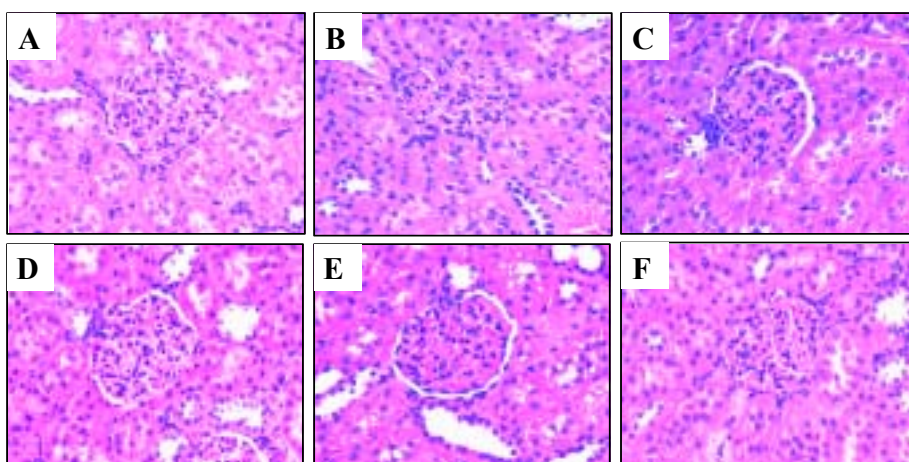


Figure 40. Histopathological observations made on the kidney tissue of control and experimental groups of rats and the photomicrograph presented are the representatives of the six rats used in each group (hematoxylin-eosin stain, original magnification, 100x). A, Normal control; B, STZ (40 mg/kg); C, STZ+ DGTS (200 mg/kg); D, STZ+ DGTS (800 mg/kg); E, STZ+Tolbutamide (400 mg/kg); F, DGTS (800 mg/kg).

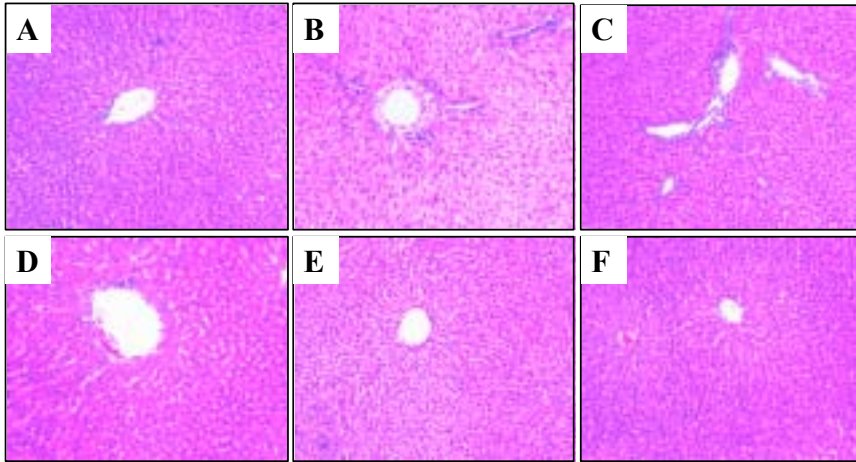


Figure 41. Histopathological observations made on the liver tissue of control and experimental groups of rats and the photomicrograph presented are the representatives of the six rats used in each group (hematoxylin-eosin stain, original magnification, 40x). A, Normal control; B, STZ (40 mg/kg); C, STZ+ DGTS (200 mg/kg); D, STZ+ DGTS (800 mg/kg); E, STZ+Tolbutamide (400 mg/kg); F, DGTS (800 mg/kg).



#### 4. 결론

산뽕나무 뿌리로부터 분리 정제된 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyl-oxy)-trans-stilbene(DGTS) 의 항당뇨 작용을 in vitro와 in vivo에서 알아보았다.  $\alpha$ -glucosidase와  $\alpha$ -amylase에 대한 저해 작용을 알아본 결과 높은 저해활성을 나타내었다. 또한  $\beta$  세포인 HIT-T15 cell에서 STZ로 처리하고 DGTS를 첨가하였을 때 48시간 후부터 STZ군에 비하여 유의적인 성장증가를 보였다. 그리고 in vivo에서 STZ로 유도된 당뇨 쥐에서 항당뇨 효과를 알아본 결과 DGTS를 투여한 군은 STZ군보다 유의적인 혈당억제를 나타내었고 insulin 농도는 증가하였고 BUN, AST, ALT, LDH 등 효소의 양은 STZ군보다 유의적인 감소를 나타내었다. 조직학적면에서 볼 때 췌장, 신장, 간장 등이 STZ 군에서 많이 손상되고 DGTS 첨가 후 많이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 분자생물학적방면에서 RT-PCR로 CYP2E1과 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 알아본 결과 DGTS 첨가 시 발현량이 감소하는 것을 알 수 있었다. 그 외에도 혈청에서의 과산화지질의 함량도 DGTS 첨가 시 대조군보다 유의적인 감소를 나타내었다. 그리고 DGTS 만 800 mg/kg 투여 시 아무런 이상 현상도 발견 할 수 없었다. 이상의 결과로부터 볼 때 DGTS 는 거의 독성이 없고 항당뇨 작용을 갖고 있는 것으로 판단된다.

### 제 5 절. 산뽕나무 뿌리에서 추출한 물질의 항고혈압작용 평가

#### 1. 서론

혈압이란 혈관 속을 흐르는 혈류의 압력, 즉 동맥압을 말하는 것으로, 어떤 원인에 의해 수축기 혈압이 120 mm Hg (최대혈압) 이상이고 확장기 혈압이 80 mm Hg (최저혈압) 이상인 경우를 고혈압이라고 하며, 고혈압은 본태성 고혈압과 이차성 고혈압으로 크게 나뉘는데, 본태성 고혈압은 가족력을 비롯한 생활습관에 의해 발병되는 질환으로 아직까지 정확한 원인이 알려져 있지 않음. 반면, 이차성

고혈압은 다른 질환에 의해 일시적으로 발병하는 질환으로서, 그 원인 질환이 치유되면 자연적으로 치유되는 것으로 알려져 있다. 고혈압의 분류는 원인은 달라도 기본적으로는 교감신경계의 이상 활성화, 세포막의 기능이상, 신장에서 물 및 Na 배설장애, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, ANP, EDRF 등과 같은 혈압강하제(hypotensive agent)들의 분비저하 또는 카테콜아민(catecholamine), 레닌-안지오텐신(renin-angiotensin)계 등 고혈압 조절기능의 이상 등이 원인이 되고, 이러한 신경계, 내분비계, 세포계의 이상은 말초 저항혈관의 압력증가를 가져오고 고혈압을 유발함. 또한, 고혈압은 그 자체보다는 신부전증, 동맥경화, 뇌출혈, 뇌졸중, 실명, 심부전증 및 심장마비 등과 같은 합병증으로 인해서 사망에 이르게 되는 경우가 많다. 고혈압의 90% 이상을 차지하는 본태성 고혈압의 경우 특별한 완치방법이 없을 뿐 아니라, 대부분 장기간 혈압 강하를 위한 치료를 받아야 한다. 고혈압 환자는 현재 세계적으로 6억명을 넘어선 것으로 추산되고 있는데, 미국에만 6,000만 명 이상의 환자 수를 보유하고 있으며, 치료에 소요되는 경비도 세계적으로 연간 약 400 억달러를 넘는 것으로 평가되고 있음. 국내의 경우도 예외가 아니어서, 연 6,000 억원대의 고혈압 치료제 시장이 형성되어 있으며 매년 평균 15~20%의 고성장을 구가하고 있는 것으로 파악되고 있다.

혈액순환기계 질환과 관련한 기능성 식품의 경우, herb 제품 중 은행잎 제품이 판매고 3위를 기록할 정도로 수요가 많으며(미국, 1999년, 6.11%), 심혈관계와 관련된 고혈압, 뇌졸중 예방식품은 향후 식생활 패턴변화, 운동부족 및 스트레스 가중으로 특징지어지는 일상생활 패턴에 변화에 따라 향후 가장 수요가 클 것으로 전망된다. 이러한 상황에서 뇌졸중, 고혈압, 혈전 등 순환기계 질환을 예방 할 수 있는 기능성 식품 및 한방제제용 선도물질을 개발, 발굴하는 것은 시장성이 매우 좋을 뿐 아니라 기하급수적으로 늘어가는 의료비 부담을 감소시킬 수 있는 한 가지 해결책이 될 것이다. 고혈압 저하제로는 1950년대 후반에는 이뇨제(diuretics)가, 1970년대에는 베타 차단제(beta blocker)가 개발되어 사용되어 왔으며, 1980년대에는 칼슘 길항제 (calcium antagonist), 안지오텐신 전환효소 억제제 (ACE inhibitor)가 개발되어 사용되고 있다. 1990년대 중반에는 Angiotensin II 수용체 길항제 (AT1 receptor antagonist)가 개발되어 시장이 빠르게 성장하고 있으나, 고혈압은 아직까지도 치료에 의한 완치보다는 고혈압을 조절하는 조절제로서 개발되어 왔기 때문에 고혈압 치료를 시작하는 동시에 평생 동안 약물을 복용해야 하는 단점을 가지고 있다. 이에 조직특이성이나 내성에 따른 부작용을 경감시킬

수 있는 새로운 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 전통적으로 한의학에서는 순환기계 질환에 대해 병증과 치료방안을 제시하고 있고 이러한 한약재와 국내에 자생하고 있는 동식물 자원 등 우리나라 고유의 물질 라이브러리를 확보하고 있으며. 이에 근거하여 허혈성 뇌졸중, 혈전, 고혈압 등 순환기계 질환에 대한 예방 활성이 있는 소재를 탐색 발굴하고, 이를 이용하여 건강 기능 식품의 개발 및 나아가 의약품용 선도물질을 개발할 경우, 출발 물질의 독창성의 측면에서 선진 외국과 비교할 때 경쟁력이 있을 것으로 여겨진다. 따라서, 본 연구자들은 산뽕나무 뿌리 추출물들의 혈관 평활근 이완작용을 조사하고, 또한 선천성 고혈압 쥐에서의 혈압강하 작용을 측정하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1). 실험 동물

(주) 오리엔트사 (한국) 로부터 구입한 Sprague-Dawley (S.D.)계 랫드 (♂, 380-420g) Chales River (미국) 에서 구입한 선천성 고혈압쥐 (SHR, 8주령) 를 한국화학연구원 내 동물사육실내에서 적응시킨 후에 사용하고, 동물실내 (온도  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50 \pm 10\%$ )의 명암은 12 시간을 주기로 자동조절 하며, 사료는 실험 동물용 고형사료 (제일사료주식회사)를 방사선 (2.0 Mrad)으로 멸균하여 섭취시키고, 물은 상수도수를 자외선 멸균기로 살균 후 자유로이 섭취시켰다.

### 2). 흰쥐 적출 혈관에 대한 산뽕나무 뿌리 에탄올 추출물의 혈관이완작용 평가

S.D.계 흰쥐의 후두부를 강타하여 기절시킨 후 경동맥을 잘라 혈액을 유실시켰다. 흉곽을 절개한 후 하행성 대동맥을 신속하게 적출하고 내피가 손상되지 않도록 조심스럽게 지방조직 및 주위조직을 제거하였다. 이로부터 혈관을 2 내지 3 mm 길이로 잘라 크랩스-헨셀레이트 생리용액 (Krebs-Henseleit 또는 Krebs' bicarbonate buffer: NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 mM 및 글루코스 11.0 mM, 준세(Junsei)사, 일본, 이하 "K-H 생리용액"이라 함)이 담긴 조직 챔버(tissue chamber) 내에 현수하였다. 이때, 챔버 내의 온도는 37°C를 유지하였으며, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 혼합 기체 (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>=95:5)로 포화시켜 pH를 7.4로 유지하였다. 2 g의 초기장력으로 1시간 동안 평형화시켰으며, 15분 간격으로 신선한 K-H 생리용액으로 교환하였다. 혈

관의 수축/이완성은 힘 변위 변환기(force displacement transducer, 제품명: 그라스(Grass) FT03, 그라스(Grass)사, 미국)를 통해 차트 기록기(chart recorder, 제품명: 멀티코더(Multicorder) MC 6625, 휴고 삭스(Hugo Sachs)사, 독일)로 기록하였다.

적출혈관을 조직 챔버 내에서 적응시키기 위하여, 0.3  $\mu\text{M}$ 의 페닐에프린(phenylephrine, 시그마-알드리치사(Sigma-Aldrich Co.), 미국)으로 수축시킨 후, K-H 생리용액으로 45분에 걸쳐 3회 세척하였다. 상기 적출혈관을 다시 페닐에프린으로 수축시켜 안정 상태에 도달한 후, 1  $\mu\text{M}$  아세틸콜린 클로라이드(acetylcholine chloride, 시그마 알드리치사, 미국)를 가해 혈관이 완전히 이완되는 것으로 혈관내피가 손상되지 않았음을 확인하였다. 본 실험에 사용된 검체시료는 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해시킨 후 K-H 생리용액으로 희석하여 사용하였으며, 최고농도에서의 DMSO 농도는 0.03%였다. 실험에 사용된 모든 약물 및 시약들은 실험 개시 직전에 조제하였다.

혈관 이완측정은 페닐에프린에 의해 수축된 혈관에 농도 누적법(1, 3, 10 및 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 시료를 가해 혈관의 이완정도를 측정하였다. 이때, 실험결과는 페닐에프린에 의해 수축된 상태를 기준으로 하여 이완되는 정도를 퍼센트(%)로 나타냈으며, 선형회귀분석을 통해  $\text{EC}_{50}$  수치(50% 이완시키는 농도)를 구하였다.

### 3). 흰쥐 적출 심장에 대한 산뽕나무 뿌리 추출물의 심장순환계 작용 평가

웅성 S.D. rat를 sodium pentobarbital (60mg/kg i.p.)로 마취시킨 후 rat에 heparin (1000U/kg i.v.)을 투여하고 Grover 등의 방법에 따라 심장을 적출 하였다. 즉, 기관에 trachea cannula를 삽입하고 rodent ventilator를 이용해 인공 호흡시키며, *in situ* 상태에서 대동맥 cannula를 통한 역행성 관류하에 Langendorff Apparatus (Modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer in mM : 112 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 11.5 mM Glucose, 2.0 Pyruvate) 에 재빨리 매달고 심장에 붙어 있는 불필요한 조직을 제거하였다. 에탄올과 증류수 혼합액 (1:1 vol/vol)으로 채운 고무 풍선 (latex balloon)을 매달은 금속 cannula를 폐정맥을 통해 좌심실에 삽입시키고 풍선에 전달되는 좌심실압을 isovolumetric하게 측정하기 위해 pressure transducer에 연결하였다. EDP (end diastole pressure)는 10mmHg로 주고 Gottlieb valve를 이용해 정압 관류 (80mmHg)를 하여 10-15분 이내 안정화되며

LVDP (left ventricular developing pressure)가 80-120mmHg 범위 안에서 유지되는 심장만을 사용하였다. 심장 기능을 평가하는 parameter로 수축기말 좌심실압 (LVP, left ventricular peak systolic pressure), 이완기말 좌심실압 (LVEDP, left ventricular enddiastolic pressure), LVDP,  $+dp/dt_{max}$ , 관상 혈관 기능을 평가하는 parameter로 관상 혈류량 (CF, coronary flow)과 그밖에 심박동수 (HR, heart rate)등을 측정하였다.

#### 4). 선천성 고혈압쥐 (spontaneously hypertensive rat: SHR)에 대한 산뽕나무 뿌리 추출물의 혈압억제 작용평가

8주령의 웅성 SHR을 미국 Charles River 사로부터 구입하여, 4주일간 환경 적응 기간을 둔 후, 12 주령부터 시험물질을 투여하기 시작하였다. 시험물질을 투여하기 앞서 2주일 동안 혈압측정을 위한 적응 훈련을 시켰다. 혈압 및 심박동수의 측정은 실험동물의 꼬리로부터 혈압을 측정하는 방법인 tail-cuff method를 이용하여, 미국의 IITC 사의 혈압측정기로 측정하였다. 혈압을 원활하게 측정하기 위하여, 실험동물을 32 °C의 항온 box에서 약 5분간 안정화 시켰다. 시험물질 10, 30 및 100 mg/kg 용량을 arabia gum 1% 에 현탁시켜 경구투여 (2 ml/kg) 하였다. 대조물질인 captopril 은 30 mg/kg 용량을 증류수에 용해시켜 투여하였다. 실험동물은 1군당 8마리로 하였으며, 시험물질은 42일 (6주일) 동안 매일 하루에 한번씩 (오전 10시) 투여하였고, 혈압 및 심박동수의 측정은 시험물질 투여 후 2.5 시간 후에 이루어졌다. 또한, 매주 한번 씩 체중변화를 측정하였다. 또한, SHR의 대조동물로서 Wistar-Kyoto rat (WKY) 를 사용하였다.

#### 5). 산뽕나무 뿌리 추출물에 의한 SHR의 혈액내 이온변화

시험물질 및 대조물질인 captopril 을 SHR 에 6주일 동안 투여한 후, ether 마취하에서 회복한 다음 혈액을 채취하여, 즉시 헤파린 2 IU/ml로 응고를 막은 후, 전해질/혈액가스분석기 (Rapidpoint 400, Bayer AG, 독일) 로 혈액내 전해질의 변화를 측정하였다.

#### 6). 산뽕나무 뿌리 추출물에 의한 SHR의 혈관이완작용

시험물질 및 대조물질인 captopril 을 SHR 에 6주일 동안 투여한 후, ether 마취하에서 회복한 다음 SHR의 흉곽 대동맥을 적출하여, 상기의 방법에 따라

acetylcholine 및 sodium nitroprusside 에 의한 혈관의 이완변화를 측정하였다.

#### 7. 산뽕나무 뿌리 추출물에 의한 혈장내 생화학적 변화

시험물질 및 대조물질인 captopril 을 SHR 에 6주일 동안 투여한 후, ether 마취하에서 개복한 다음 혈액을 채취하여, 즉시 헤파린 2 IU/ml로 응고를 막은 후,  $12,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리한 후 혈장을 얻어 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) 활성 측정용 시료로 사용하기 위하여 액화질소에 보관하였다.

Aspartate aminotransferase 활성도 측정은, L-Asparic acid와  $\alpha$ -ketoglutaric acid를 기질로 하여 효소 시료와 함께 37°C에서 30분간 반응 시킨 후, 생성된 oxaloacetic acid를 NADH와 반응 시켜서 NADH의 흡광도 감소율에 따른 AST 활성치를 구하는 UV 방법을 사용하였다. 측정 기기는 ADVIA 1650 (Bayer, USA)를 이용하였다. ALT 경우에는 기질로 L-alanine 과  $\alpha$ -ketoglutaric acid를 사용하였으며, 효소 반응 후 생성된 pyruvic acid를 AST 활성도 측정과 동일한 기기와 조건으로 측정하였다. 활성도 단위는 L당 IU단위로 표시하였다.

Lactate dehydrogenase 활성도 측정은 NADH에서 NAD로의 산화시에 pyruvate가 L-lactate로 전환되는 촉매작용을 340 nm에서 흡광도 감소량 측정을 통해 분석하였다. 이때 산화율과 LDH의 활성도는 비례적으로 나타난다. 측정기기는 ADVIA 1650 (Bayer, USA)를 이용하였으며, 활성도 단위는 ml당 U단위로 표시하였다.

#### 8). 산뽕나무 뿌리 추출물에 의한 심장 및 간에서의 항산화 작용

시험물질 및 대조물질인 captopril 을 SHR 에 6주일 동안 투여한 후, 혈액을 채취하여 시험물질 및 대조물질인 captopril 을 SHR 에 6주일 동안 투여한 후, ether 마취하에서 개복한 다음 심장과 간을 적출하였다. 적출한 심장과 간을 즉시 헤파린 35 IU/ml을 섞은 생리식염수로 세척을 하여 조직 내에 남아있는 혈액과 혈전을 제거한 다음, 생리식염수로 다시 세척하였다. 세척된 조직은 MDA와 total glutathion 측정용 시료로 사용하기 위하여 액화질소에 보관하였다.

결빙된 조직을 PBS로 세척을 한 후 여지로 압박하여 조직내 남아 있는 PBS를 가능한 모두 제거한 다음, 조직 일정량을 칭량하였다. 4 배량(심장)과 3 배량(간)의 차가운 Tris buffer (20 mM, pH7.4) 용액을 시료에 가한 후, Ultra Turrax

homogenizer로 마쇄균질액을 만들었다. 이 균질액을  $4,000 \times g$ 에서 10분간 원심 분리하여 침전된 핵 및 미마쇄부분을 제거한 후, 상층액을 다시  $4,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 취하여 MDA 함량 측정에 사용하였다. Total glutathion 함량 측정을 위한 시료 경우, trichloroacetic acid (TCA) 용액을 4 배량(심장)과 3 배량(간)을 가하여 시료내의 모든 단백질을 침전 시킨 후, MDA 시료와 동일한 조건으로 준비하였다.

심장과 간 조직 내의 malondialdehyde 함량은 BIOXYTECH MDA-586 Assay Kit에서 제공하는 방법에 준하였다. 분석원리는 시료속의 MDA를 강한 산성조건 하에서 N-methyl-2-phenylindol과 가열 반응시켜 생성된 물질을 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 조직 1 g 당  $\mu\text{mole}$ 로 표시하였다.

심장과 간 조직 내의 total glutathione 함량은 BIOXYTECH GSH-420 Assay kit에서 제공하는 방법에 준하였다. 분석원리는 tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP)를 시료에 가하여 산화된 glutathione을 모두 환원된 상태의 GSH로 전환 시킨 후, 4-chloro-1-methyl-7-trifluoromethylguinolinium methylsulfate를 가하여 환원된 모든 시료에 현존하는 thiol과 thioethers 형태를 형성시킨다. 증가된 pH에 따라 생성된 GSH-thioether물질을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total Glutathione 함량은 조직 1 g 당  $\mu\text{mole}$ 로 표시하였다.

마쇄균질액내의 단백질 정량은 Bradford 방법에 준해 bovine serum albumin (BSA)을 표준 품으로 하여 측정하였다.

## 9). 통계

모든 실험결과는  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$  으로 표시하였고, 실험결과의 통계분석은 미국 Jandel Co.사의 Sigma Stat 프로그램을 이용하여, unpaired t-test 및 one-way analysis of variance (ANOVA)로 처리하였고, 2차검정은 Dunnett multiple comparisons test로 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 1). 흰쥐 적출 혈관에 대한 산뽕나무 뿌리 추출물의 혈관이완작용

Table 16은 흰쥐 (rat) 로부터 적출한 흉부 대동맥 평활근에, 혈관수축제인 페닐에프린 (PE) 을 처리하여 수축시킨 후, 산뽕나무 뿌리껍질 추출물을 투여하여

혈관 평활근 이완효과를 측정된 결과이다. 산뽕나무 뿌리껍질을 에탄올 80% (KWU-1), 에탄올 100% (KWU-2), 메탄올 80% (KWU-3), 메탄올 100% (KWU-4) 및 물 (KWU-5) 로 침출한 추출액 중에서, 물 추출액을 제외하고는 모두 혈관이완작용을 나타내었다. 특히, 에탄올 100% 추출액의 혈관이완효과가 가장 우수하였기 때문에 ( $EC_{50}$  값 : 2.9  $\mu\text{g/ml}$ ), 이 추출액을 다시 methylene chloride (KWU-21), ethylacetate (KWU-22) 및 water (KWU-23) 층으로 분획을 얻었다. 물층에서는 혈관이완 효과가 전혀 나타나지 않았고, methylene chloride 및 ethylacetate 분획에서는 비슷한 정도로 혈관을 이완시켰다 ( $EC_{50}$  값 : 2.3 및 2.3  $\mu\text{g/ml}$ ). KWU-21을 에탄올로 다시 분획을 얻은 에탄올층 ((KWU-212)과 물층(KWU-211)은 모두 다 효과가 없게 나타났다. 따라서, KWU-22 분획을 가지고 activity-guided fractionation 을 한 결과, 단일물질로 보여지는 KWU-222-W171 및 KWU-222-W174 를 얻었으며, 이에 대한 구조분석 및 물질 확인 작업이 진행 중에 있다.



Table 16. Vasorelaxant effects of total extract and subfractions of *Morus bombycis* Koidzumi on thoracic aorta isolated from S.D. rat.

Code number	Vasorelaxation % ( $\mu\text{g/ml}$ )				EC <sub>50</sub> values
	1	3	10	30	
KWU-1	-2.6	6.7	80.8	95.8	6.4
KWU-2	8.8	64.4	94.8	97.2	2.9
KWU-3	4.3	20.2	85.1	99.5	5.1
KWU-4	-3.1	6.9	73.5	92.8	7.0
KWU-5	-4.5	-5.6	-10.2	-9.1	-
KWU-21	21.1	63.0	93.0	83.9	2.3
KWU-22	7.0	64.3	97.5	89.9	2.3
KWU-23	-0.7	-1.6	0.4	11.9	-
KWU-211	-9.0	-12.2	-10.5	-3.9	-
KWU-212	-7.6	-8.6	8.9	41.5	40.2
KWU-221	-3.5	-12.2	-5.2	49.0	30.8
KWU-222	8.6	74.6	96.8	98.5	2.0
KWU-223	-2.2	-4.4	-3.9	-0.5	-
KWU-224	-3.0	-3.3	-2.1	1.5	-
KWU-225	-4.4	-5.6	-4.7	-1.6	-
-KWU-226	-3.1	-5.1	-3.7	2.1	-
KWU-222-W1	13.3	60.8	91.9	95.6	2.7
KWU-222-W2	0.4	5.9	59.4	86.5	9.5
KWU-222-W3	1.4	0.0	13.9	51.0	34.8
KWU-222-W11	20.9	63.1	90.7	98.6	2.4
KWU-222-W12	0.4	0.8	11.6	64.9	22.2
KWU-222-W13	0.4	1.3	47.5	89.0	10.8
KWU-222-W14	0.0	4.0	48.8	80.7	11.4
KWU-222-W15	0.0	5.6	71.5	92.2	6.8
KWU-222-W16	3.0	53.8	93.3	98.8	3.1
KWU-222-W17	15.0	71.3	92.2	92.7	2.0
KWU-222-W18	0.9	13.2	93.0	100.0	5.2
KWU-222-W19	0.0	21.1	88.7	97.5	5.0
KWU-222-W110	0.8	4.9	69.5	94.6	8.2
KWU-222-W113	0.0	-0.4	38.7	86.8	12.1
KWU-222-W171	18.8	80.4	96.9	99.1	1.8
KWU-222-W172	-2.3	-2.9	38.8	65.9	16.1
KWU-222-W173	2.1	12.8	63.1	87.5	8.7
KWU-222-W174	9.1	56.2	93.3	95.9	2.9

## 2). 흰쥐 적출 심장에 대한 산뽕나무 뿌리 추출물의 심장순환계 작용

Table 17는 흰쥐 (rat) 로부터 적출한 심장에 산뽕나무 뿌리껍질 (상백피) 추출물을 투여하여 심장에 미치는 영향을 측정된 결과이다. 심장의 이완기말 압력 (LVEDP)를 제외하고 모든 parameter 들에서, 1 및 3  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 변화가 없다가, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 급격히 감소하였다. 한편, LVEDP는 낮은 농도에서는 심장에 보호효과를 보여주다가 10  $\mu\text{g/ml}$  이상의 고농도에서는 cardiac contracture를 나타내었다. 이상의 결과들은 산뽕나무 뿌리껍질 (상백피) 추출물이 심장에 대해 negative inotropic effect를 나타냄을 의미한다고 사료된다.

## 3). SHR 에 대한 산뽕나무 뿌리 추출물의 혈압억제 효과

미국 Charles River 사로부터 구입한 SHR을 10주령부터 혈압측정에 대한 훈련을 수행하였고, 12 주령부터 하루에 한번씩 6주일 동안 시험물질을 계속 투여하였다. 이때, 시험물질을 투여하기전의 수축기 혈압은 vehicle 투여군, captopril 투여군, 산뽕나무 추출물 10 mg/kg 투여군, 산뽕나무 추출물 30 mg/kg 투여군 및 산뽕나무 추출물 100 mg/kg 투여군에서 각각  $190 \pm 5.7$ ,  $189 \pm 3.6$ ,  $198 \pm 5.7$ ,  $191 \pm 11.0$  및  $191 \pm 5.0$  mm Hg 으로서, 각 실험군 간에 통계학적인 유의한 차이는 없었다. 한편, 대조동물로 사용한 WKY rat 의 혈압은  $142 \pm 3.6$  mm Hg 으로 나타났다.

6주일 동안 vehicle 을 투여한 군의 SHR 혈압은 시간이 지남에 따라 서서히 증가하는 것으로 나타났으며 (Figure 42), 이는 SHR 의 혈압은 14-16주령 후에 plateau에 도달한다고 알려진 실험결과들과 일치하고 있다. 다만, 이때 혈압이 plateau 에 도달한 후에 시험물질을 투여하지 않고, 12주령부터 투여한 이유는 시험물질이 고혈압 상태에서 혈압을 강하시키는지에 대한 것보다, 혈압이 증가되는 것을 예방해줄 수 있는지에 중점을 두고 실험 프로토콜을 작성하였기 때문이다.

산뽕나무 뿌리 추출물 (10, 30, 100 mg/kg) 은 용량 의존적으로 혈압상승을 억제하였으나, vehicle 투여군과 비교할 때 통계학적인 유의성은 없었다. 그러나, 30 및 100 mg/kg 투여군에서는 vehicle 투여군과 비교할 때 약 20 mm Hg (약 10%) 정도 혈압상승이 억제되었다. 반면, 고혈압치료제로 사용되고 있는 captopril 투여군은 약 30-40 mmHg 정도 억제되었다. 한편, WKY rat은 시간이 지남에 따라 혈압이 조금씩 내려가는 경향을 보였다.

시험물질을 투여하기전의 심박동수는 vehicle 투여군, captopril 투여군, 산뽕나

무 추출물 10 mg/kg 투여군, 산뽕나무 추출물 30 mg/kg 투여군 및 산뽕나무 추출물 100 mg/kg 투여군에서 각각  $424 \pm 10.0$ ,  $406 \pm 7.8$ ,  $435 \pm 16.6$ ,  $430 \pm 11.8$  및  $421 \pm 11.1$  beats/min 으로서, 각 실험군 간에 통계학적인 유의한 차이는 없었다. 한편, 대조 동물로 사용한 WKY rat 의 심박동수는  $352 \pm 8.7$  beats/min 으로 나타났다.

심박동수는 모든 투여군에서 서로 통계학적인 유의한 차이를 보이지 않았으나, 혈압강하 효과가 가장 강하였던 captopril 투여군에서 심박동수가 증가되는 경향을 나타내었다 (Figure 43).

시험물질을 투여하기전의 체중은 vehicle 투여군, captopril 투여군, 산뽕나무 추출물 10 mg/kg 투여군, 산뽕나무 추출물 30 mg/kg 투여군 및 산뽕나무 추출물 100 mg/kg 투여군에서 각각  $276 \pm 5.1$ ,  $267 \pm 6.6$ ,  $278 \pm 7.1$ ,  $265 \pm 4.0$  및  $269 \pm 8.0$  g 으로서, 각 실험군 간에 통계학적인 유의한 차이는 없었다. 한편, 대조 동물로 사용한 WKY rat 의 심박동수는  $265 \pm 4.2$  g 으로 나타났다.

체중의 증가는 모든 군에서 비슷한 정도로 증가하는 경향을 나타내 각 군간에 유의한 차이는 보이지 않았다 (Figure 44).

Table 17. Cardiovascular actions of total extract and subfractions of *Morus bombycis* Koidzumi. in isolated heart from S.D. rat.

Parameter	Baseline	<i>Morus bombycis</i> Koidzumi ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		1	3	10	30
LVDP (mm Hg)	116 $\pm$ 9.5	116 $\pm$ 7.1	114 $\pm$ 3.6	30 $\pm$ 8.7	6 $\pm$ 0.6
HR (beats/min)	283 $\pm$ 10.9	278 $\pm$ 13.9	276 $\pm$ 14.1	251 $\pm$ 4.4	207 $\pm$ 12.1
LVDPxHR/1000	32.4 $\pm$ 1.8	32.0 $\pm$ 0.8	31.2 $\pm$ 1.1	7.3 $\pm$ 2.1	1.3 $\pm$ 0.2
LVEDP (mm Hg)	11.0 $\pm$ 2.9	6.8 $\pm$ 1.8	5.0 $\pm$ 1.9	27.0 $\pm$ 6.5	40.3 $\pm$ 3.1
CFR (ml/min)	20.3 $\pm$ 1.0	24.5 $\pm$ 0.9	20.5 $\pm$ 0.2	13.0 $\pm$ 2.2	4.5 $\pm$ 0.9

Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n=4). LVDP, left ventricular developing pressure (mmHg); HR, heart rate (beats/min); LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure (mmHg); CFR, coronary flow rate (ml/min)

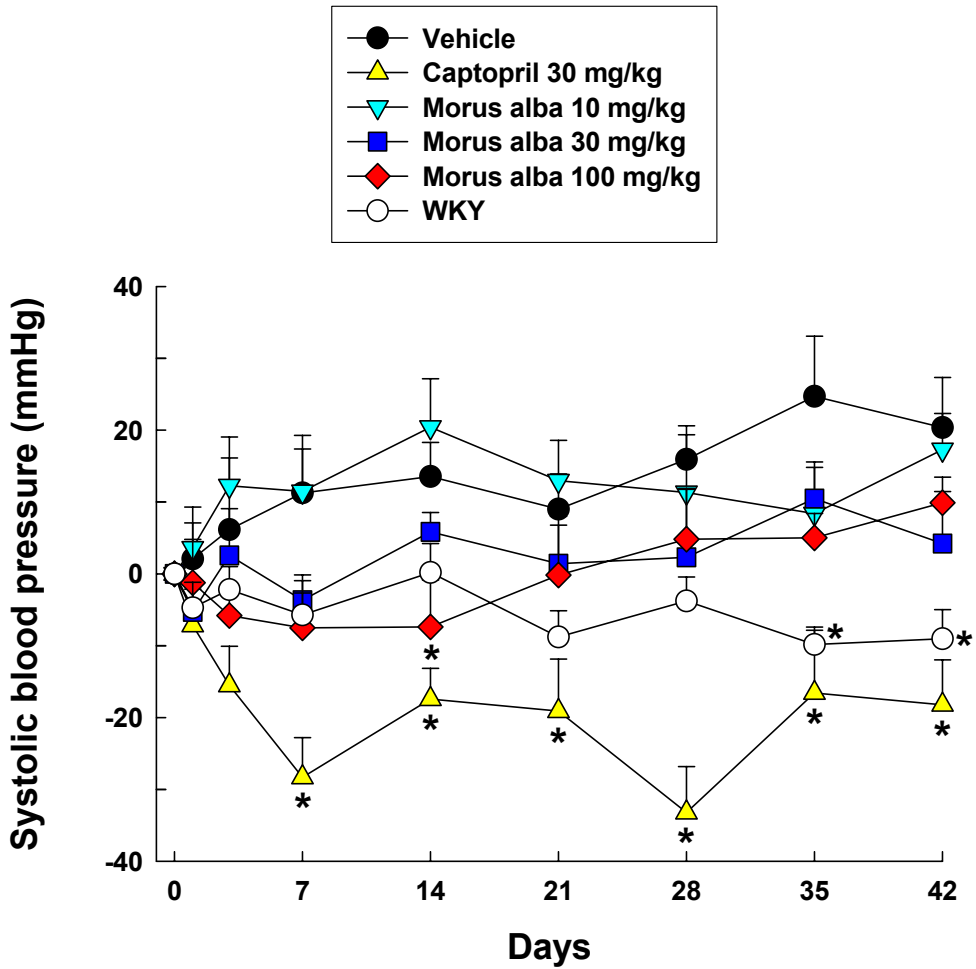


Figure 42. Effects of long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days) on systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rat (SHR). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat).  $P < 0.05$ , significantly different from the vehicle group.

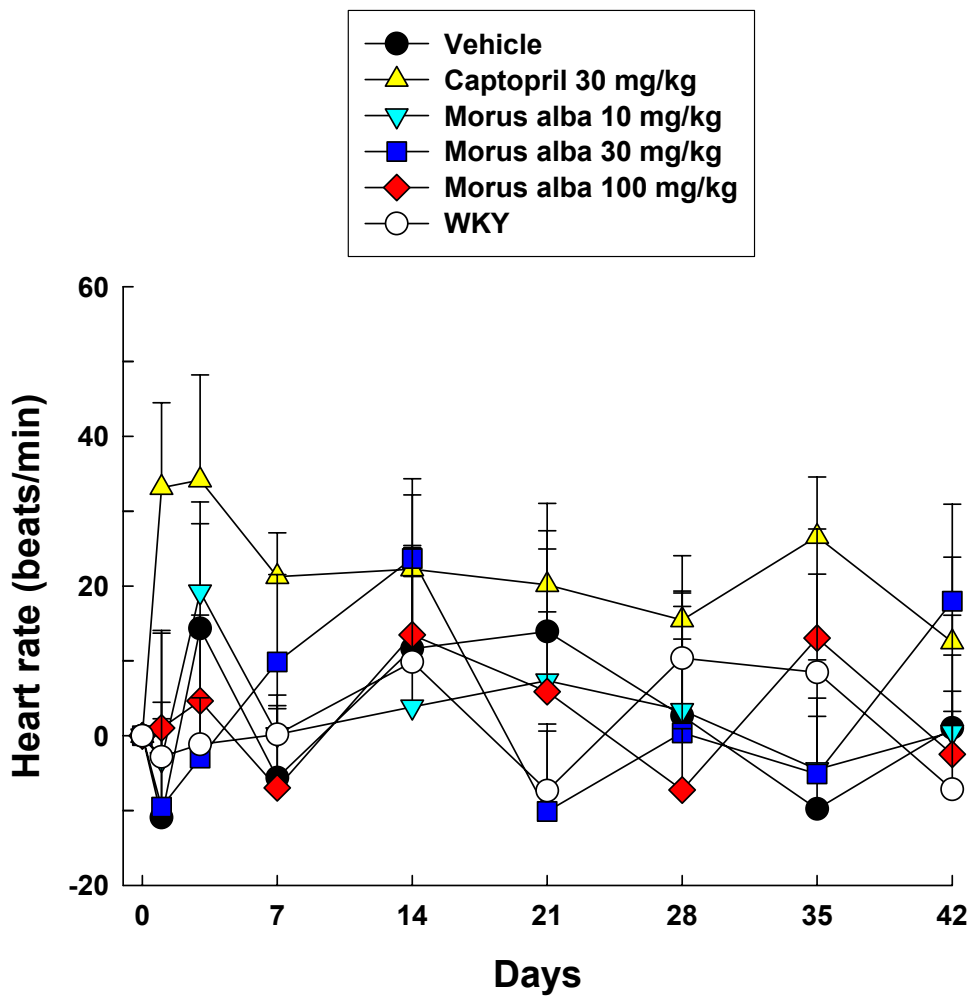


Figure 43. Effects of long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days) on heart rate in spontaneously hypertensive rat (SHR). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat).

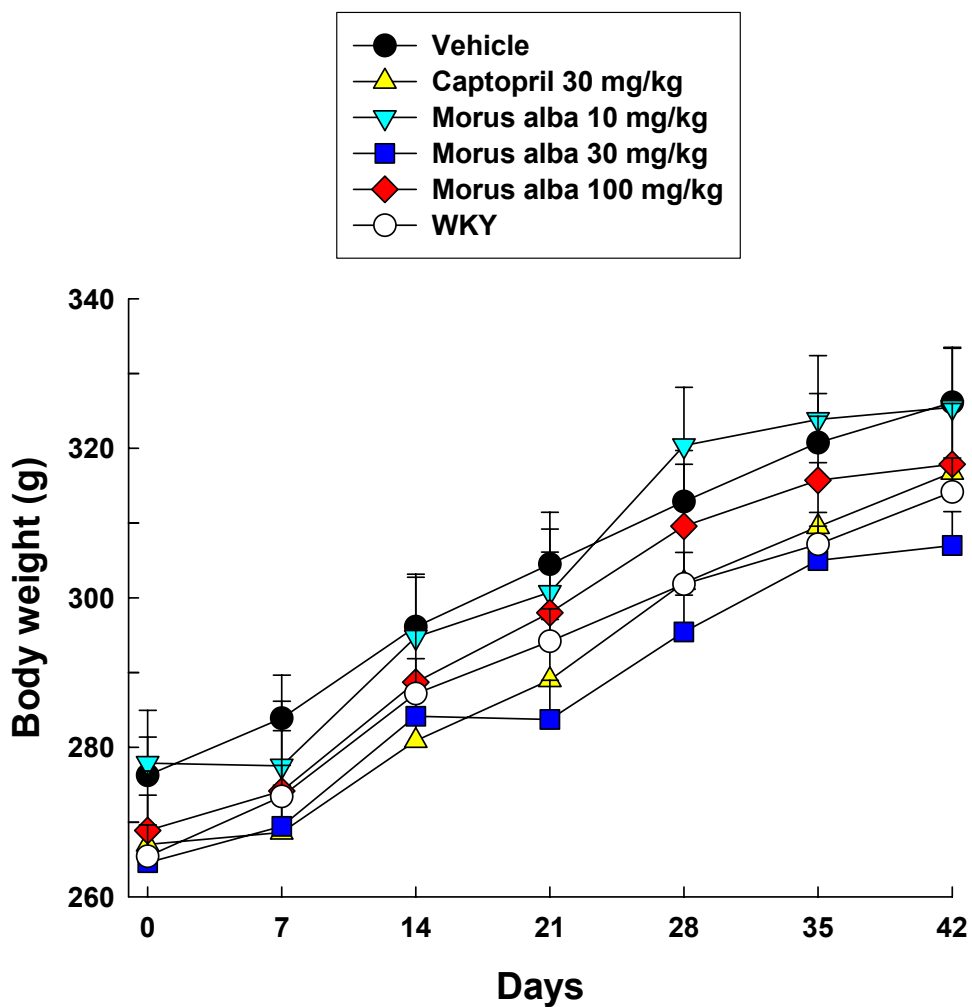


Figure 44. Effects of long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days) on body weight in spontaneously hypertensive rat (SHR). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat).

#### 4). 산뽕나무 뿌리 추출물에 의한 SHR의 혈액내 이온변화

SHR 에 시험물질 또는 captopril 을 6주일 동안 경구 투여한 후, 혈액을 채취하여 혈액 내 전해질의 변화를 측정하였다. 비록 통계학적인 유의성은 없었으나, WKY rat에 비해 SHR (vehicle 투여군) 에서  $\text{Na}^+$  이온은 증가하였고,  $\text{K}^+$  및  $\text{Ca}^{2+}$  이온은 감소하는 경향을 보였으며, 이는 앞선 여러 보고들과 비슷한 결과를 나타내었다 (Table 18). 특히, 이들 이온들의 변화 중  $\text{K}^+$  및  $\text{Ca}^{2+}$  이온은 산뽕나무 뿌리 추출물을 투여하였을 때, 다시 증가함으로써 WKY rat에서의 수치와 비슷해지는 경향성을 보여주었다.

#### 5). 산뽕나무 뿌리 추출물에 의한 SHR의 혈관이완작용

고혈압이 발생될 때 혈관 내피의 구조적인 또는 기능적인 변화들이 일어나기 때문에, 내피의존성 혈관이완 작용이 손상되는 것으로 이미 많은 보고자들에 의해 알려져 있다. 이러한 내피의 변화는 혈압을 조절하거나, 고혈압을 치료할 때 중요한 타깃이 되는 등 중요한 역할을 하고 있다. 따라서, SHR 에 시험물질 또는 captopril 을 6주일 동안 장기 투여한 후, 흉곽 대동맥을 적출하여 organ bath 상에서 acetylcholine 및 sodium nitroprusside 에 의한 혈관 이완성을 측정하였다. 본 실험에서, WKY rat 에 비해 SHR 에서의 ACh 유발성 이완작용은 유의성 있게 감소하였는데 (Figure 45), 이것은 oxygen free radical 등에 의해 nitric oxide의 합성이 감소하였기 때문으로 사료된다. 이렇게 감소된 ACh 유발성 혈관이완 작용은 산뽕나무 뿌리 추출물 또는 captopril 투여시에 다시 증가하는 것으로 나타나 고혈압으로 인한 혈관손상을 막아주는 것으로 보인다.

한편, nitric oxide donor 로서 작용하는 sodium nitroprusside에 의한 혈관이완 반응도 WKY rat 과 비교할 때 SHR에서 유의하게 감소하였다 (Figure 46). 이 감소된 혈관이완 반응은 산뽕나무 뿌리 추출물을 투여함으로써 다시 유의하게 회복됨을 보여 줌으로서 고혈압시에 나타나는 내피기능의 손상을 차단해 줄 것으로 사료된다.



Table 18. Effects of long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days) on ions in spontaneously hypertensive rat (SHR). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat).

Ion conc. in blood	Vehicle	Morus alba (mg/kg)			Captopril (mg/kg)	WKY
		10	30	100	30	
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	147.0 $\pm$ 1.1	145.7 $\pm$ 0.2	145.1 $\pm$ 0.1	145.9 $\pm$ 0.8	145.1 $\pm$ 0.3	145.0 $\pm$ 0.3
K <sup>+</sup> (mmol/L)	3.69 $\pm$ 0.03	3.60 $\pm$ 0.04	3.60 $\pm$ 0.06	3.84 $\pm$ 0.04	3.66 $\pm$ 0.06	3.96 $\pm$ 0.04
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	1.25 $\pm$ 0.01	1.23 $\pm$ 0.01	1.25 $\pm$ 0.01	1.27 $\pm$ 0.01	1.28 $\pm$ 0.01	1.27 $\pm$ 0.01
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	103.4 $\pm$ 0.3	104.3 $\pm$ 0.3	102.9 $\pm$ 0.1	103.4 $\pm$ 0.2	103.0 $\pm$ 0.4	103.3 $\pm$ 0.2

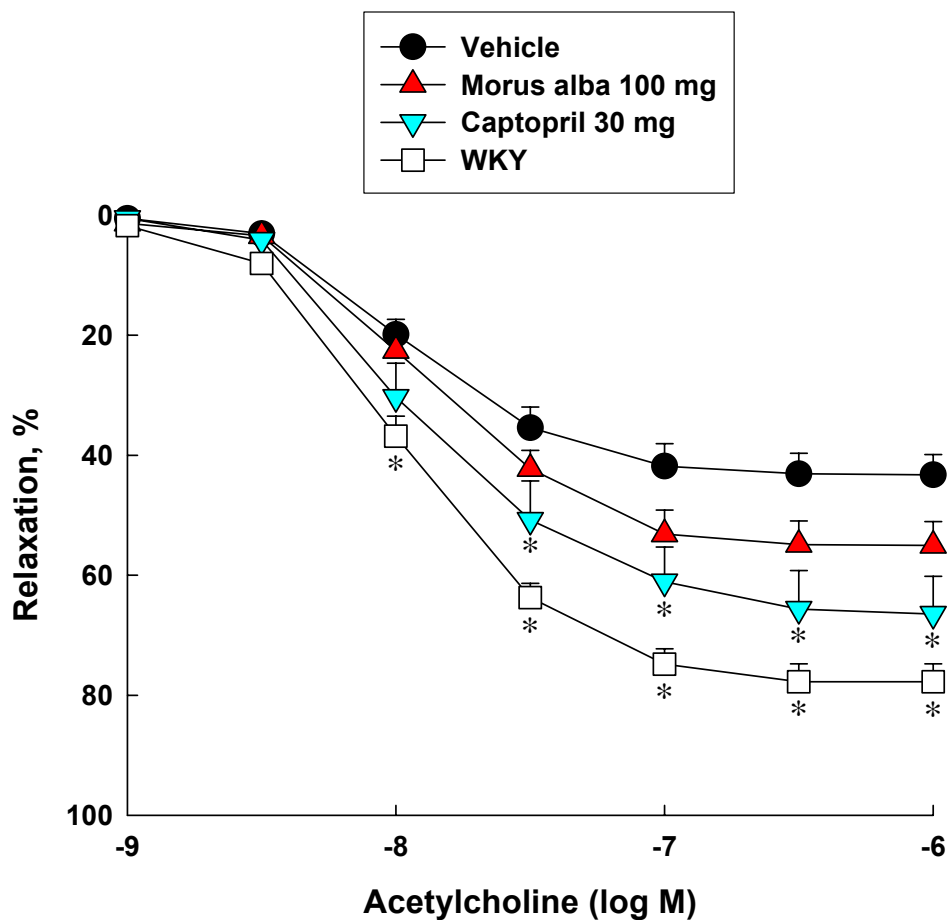


Figure 45. Acetylcholine-induced relaxation in thoracic aorta from spontaneously hypertensive rat (SHR) with long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat).  $P < 0.05$ , significantly different from the vehicle group.

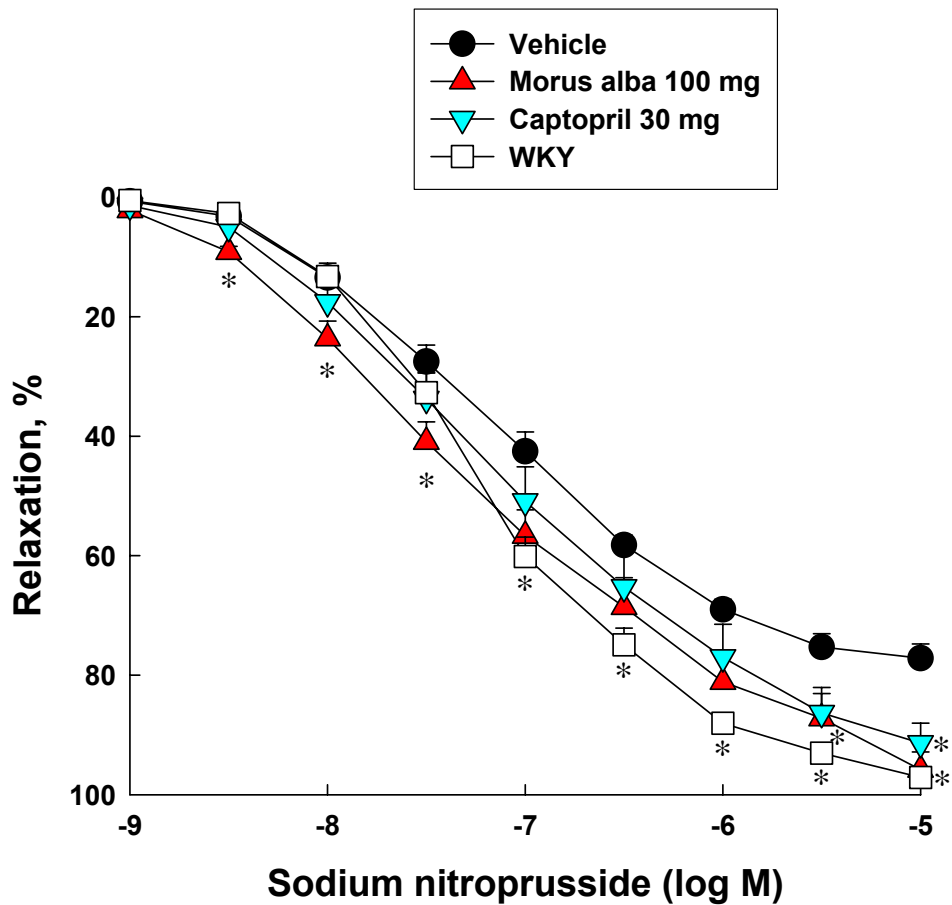


Figure 46. Sodium nitroprusside-induced relaxation in thoracic aorta from spontaneously hypertensive rat (SHR) with long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat).  $P < 0.05$ , significantly different from the vehicle group.

#### 6). 산뽕나무 뿌리 추출물에 의한 혈장내 생화학적 변화

산뽕나무 뿌리 추출물의 경구투여가 혈장의 간기능 지표 효소인 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Fig. 47와 같다. 혈장중의 AST, ALT 활성은 SHR에서 가장 높게 나타났고, captopril과 산뽕나무 뿌리 추출물 투여군은 SHR에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 그러나 100 mg/kg의 산뽕나무 뿌리 추출물 투여에 의해서는, SHR에서와 같은 AST 와 ALT 활성을 보여 다량의 섭취는 toxicity를 나타내는 것을 알 수 있었다. 본 실험결과, 산뽕나무 뿌리 추출물은 SHR에서 나타난 증가된 AST와 ALT의 활성을 낮춰줌으로써, 간기능의 회복에 도움을 주고 있다고 사료된다. 그러나 다른 약물과 마찬가지로 다량의 섭취는 간을 더욱 피로하게 만들어, 급성 간 손상을 유도하는 역할을 하는 것으로 나타났다.

한편, 조직손상 초기에 증가하게 되는, lactate dehydrogenase (LDH)의 활성은 SHR에 비해 유의적인 차이를 보이지는 않았지만, 산뽕나무 뿌리 추출물의 섭취에 의해 LDH 활성이 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 48). 그러나 10, 30 mg/kg 투여 시에는 LDH 활성이 감소하였으며, 100 mg/kg의 투여 군에서는 오히려 LDH 활성이 증가하였다.

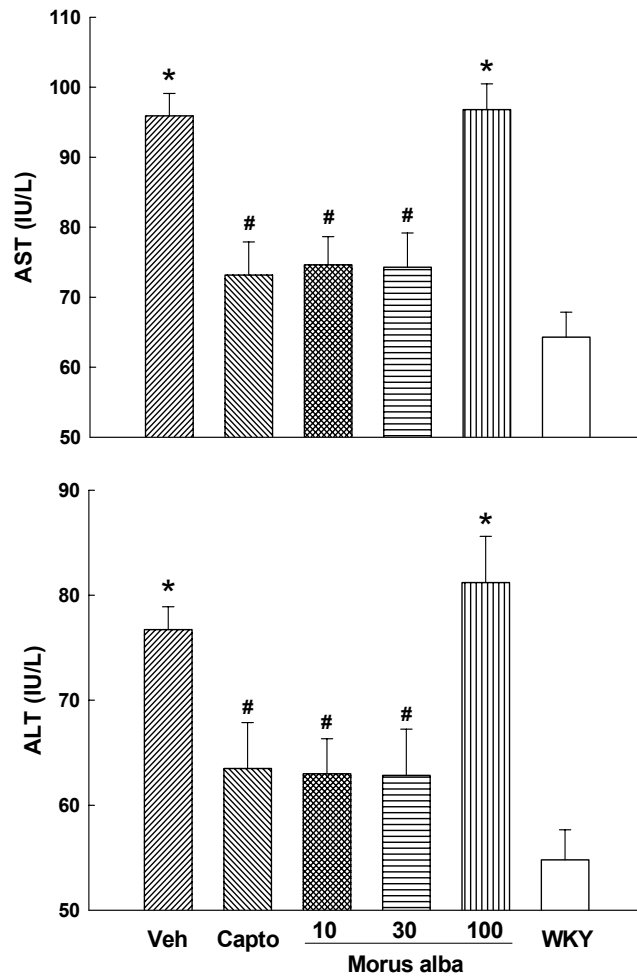


Figure 47. Effects of long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days) in aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) contents of spontaneously hypertensive rat (SHR). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat). \* $P < 0.05$ , significantly different from the WKY group. # $P < 0.05$ , significantly different from the vehicle group.

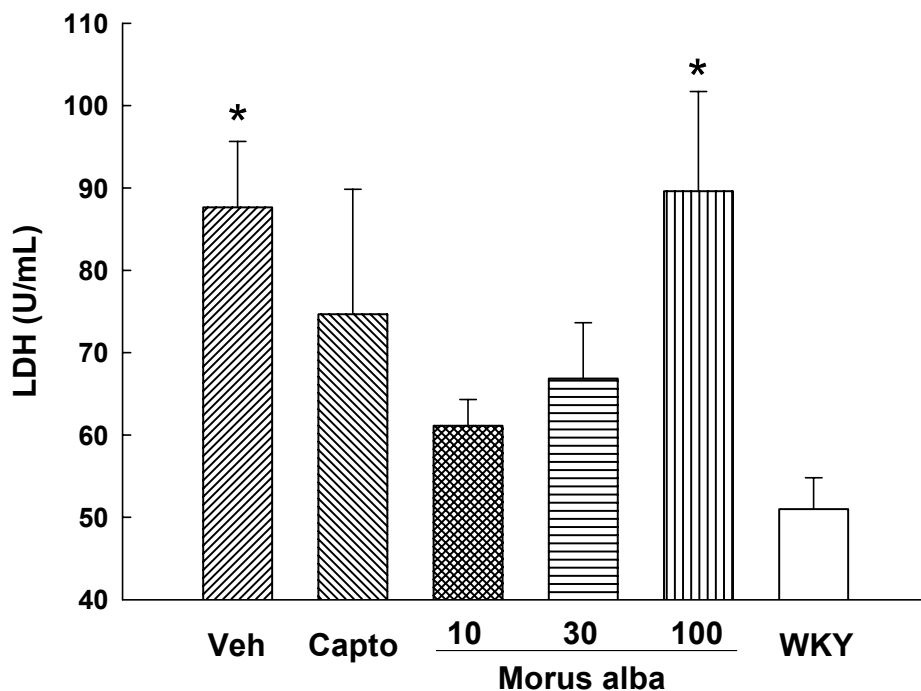


Figure 48. Effects of long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days) in lactate dehydrogenase (LDH) contents of spontaneously hypertensive rat (SHR). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat). \* $P < 0.05$ , significantly different from the WKY group.

#### 7). 산뽕나무 뿌리 추출물에 의한 심장 및 간에서의 항산화 작용

지질과산화 대사산물인 MDA는 불포화지방산이 free radical에 의해 쉽게 파괴되어 발생하는 반응의 산물로서, 감도가 높을 뿐 아니라 검정도 쉽기 때문에 지질 과산화의 정도를 분석하는데 많이 이용된다. 본 연구에서 lipid peroxidation의 정도를 나타내는 MDA 함량을 보면 100 mg/kg 산뽕나무 뿌리 추출물을 투여하였을 때, MDA의 함량이 심장조직에서는 통계적으로 유의성이 없으나 감소경향이 보였으며, 간 조직에서는 MDA의 함량이 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig. 49). 이처럼 산뽕나무 뿌리 추출물 투여로 지질 과산화물이 감소되는 것은 생체 내에서 지질 과산화물 생성반응이 free radical 제거능을 가진 산뽕나무 뿌리 추출물의 항산화적 방어계의 작용에 의해 억제된 것으로 사료된다.

한편, total glutathione의 함량 증가는 GPX-GSH redox system의 활성을 증가시켜 해독작용을 상승시키는 역할을 한다. 그러나 본 연구에서는 모든 군의 total glutathione 함량이 정상군 WKY보다 유의적으로 증가하였으며, 산뽕나무 뿌리 추출물의 투여에 의한 차이를 보이지는 않았다 (Fig. 50).

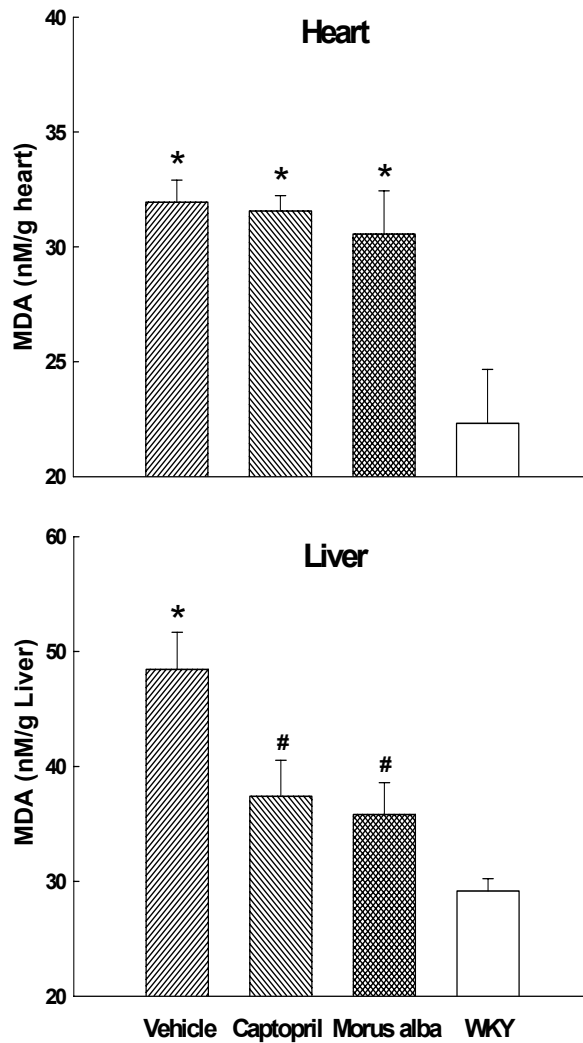


Figure 49. Effects of long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days) in malondialdehyde (MDA) contents of spontaneously hypertensive rat (SHR). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat). \* $P < 0.05$ , significantly different from the WKY group. # $P < 0.05$ , significantly different from the vehicle group.



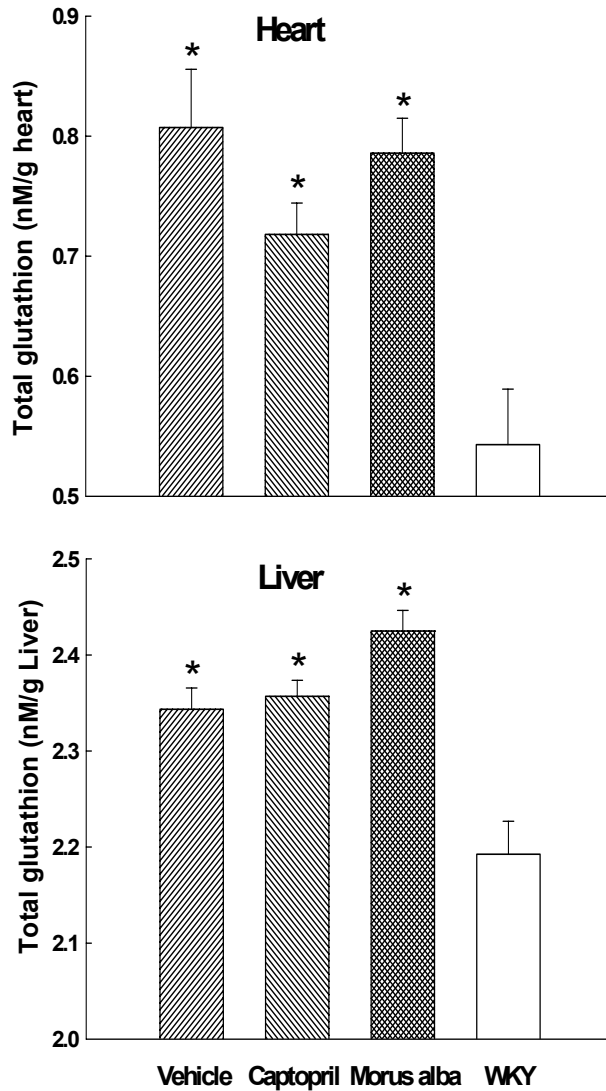


Figure 50. Effects of long-term administration of *Morus bombycis* Koidzumi extracts (once a day for 42 days) in total glutathione contents of spontaneously hypertensive rat (SHR). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M (n=8). WKY : Wistar-Kyoto rat, normotensive rat). \* $P < 0.05$ , significantly different from the WKY group.

#### 4. 결론

심혈관계와 관련된 고혈압 예방식품은 향후 식생활 패턴변화, 운동부족 및 스트레스 가중으로 특징지어지는 일상생활 패턴에 변화에 따라 향후 가장 수요가 클 것으로 전망되고, 이러한 상황에서 고혈압 등 순환기계 질환을 예방 할 수 있는 기능성 식품 및 한방제제용 선도물질을 개발, 발굴하는 것은 시장성이 매우 좋을 뿐 아니라 기하급수적으로 늘어가는 의료비 부담을 감소시킬 수 있는 한 가지 해결책이 될 것이다. 이에 근거하여 고혈압 등 순환기계 질환에 대한 예방 활성이 있는 소재를 탐색 발굴하고, 이를 이용하여 건강 기능 식품의 개발 및 나아가 의약품용 선도물질을 개발할 경우, 출발 물질의 독창성의 측면에서 선진 외국과 비교할 때 경쟁력이 있을 것으로 여겨진다.

산뽕나무 추출물 및 생리활성물질의 혈압강하효과 측정하기 위해 *In vitro* 항고혈압작용 평가 및 *In vivo* 항고혈압작용 평가를 수행 한 결과 산뽕나무 뿌리 추출물은 용량 의존적으로 흰쥐 적출혈관을 이완시켰으며( $ED_{50}$ : 6.7 mg/kg), 산뽕나무 뿌리 추출물 (10, 30, 100 mg/kg)을 6주일간 선천성 고혈압쥐 (SHR)에 장기 투여하였을 때, 용량 의존적으로 혈압상승을 억제하였다. 하지만 심박동수와 체중변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 산뽕나무 추출물은 고혈압으로 인한 혈관내피의 손상을 억제하였으며, 세포사를 의미하는 여러 생화학적 지표들을 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과들은, 산뽕나무 추출물이 여러 가공식품의 첨가제, 의약품 및 의약부외품의 원료, 기능성 화장품 첨가물, 음료 첨가물, 기능성 건강보조식품 등으로 개발될 수 있기 때문에, 유용식물인 산뽕나무의 자원화 및 상품화에 크게 기여할 것으로 기대된다.

## 제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절. 연구개발 목표의 달성도

#### 1. 연구개발 목표 및 달성도

계획	달성도(%)
산뽕나무의 영양성분 분석	100
산뽕나무의 생리활성 물질 탐색	100
생리활성 물질 분리	100
In vivo 항고혈압작용 평가	100
주 생리활성 물질의 구조규명	100
간보호 물질 및 작용 탐색	100
항고혈압 작용효과 측정	100
선천성 고혈압쥐에서의 항고혈압효과 측정	100
In vitro 및 in vivo 심장순환계 작용평가	100
약리기전 연구	100
계획 외	
항당뇨 작용 효과 탐색	100

### 제 2 절. 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 연구실적

- 최근의 생물 산업은 식물자원 소재에서 유용 천연물을 탐색하여 고부가가치의 천연약물, 천연색소, 다양한 기능성 식품 등을 창출시키고 있음.

가. 기술적 측면: 뽕나무 뿌리로부터 항산화활성, 간 보호활성 및 NO 생성 저

해활성 탐색에 관한 연구와 생리활성 물질의 분리 및 구조 규명에 관한 연구가 성공적으로 이루어져서, 풍부한 유용 식물자원인 뽕나무로부터 천연 항산화제의 개발, 간장 질환 치료제 및 항염증 치료제의 개발도 가능할 것으로 판단된다.

나. 경제·산업적 측면: 이러한 일련의 연구결과들을 활용하여 여러 가공식품의 첨가제, 의약품 및 의약부외품의 원료, 기능성 화장품 첨가물, 음료 첨가물, 기능성 건강보조식품 등으로 개발될 수 있기 때문에 유용식물인 산뽕나무의 자원화 및 상품화에 크게 기여할 것으로 기대된다. 또한, 날로 높아가는 기술 특허장벽에 능동적으로 대처함으로써 기술료를 획득하는 기술선진국으로의 발전에 크게 기여할 것이다.

- 향토지적소유권의 확보 및 유용 식물유전자원의 확보를 통하여 생물 산업 활성화에도 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되고, 특히 간보호 작용에 효과를 보이고 있는 물질의 신약 개발은 국민 보건 향상 및 국가 의료 경제에 이바지 할 것으로 보임.

#### - 연구 실적

##### (1) SCI 급

Ying-Shan Jin, Jae-Hoon Sa, Tae-Heum Shim, Hae-Ik Rhee, Myeong-Hyeon Wang. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Morus bombycis* Koidzumi on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 329 (2005) 991-995.

Ying-Shan Jin, Min-Jae Lee, Woong Han, Seong-II Heo, Myeong-Hyeon Wang. Antioxidant effects and hepatoprotective activity of 2,5-dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene from *Morus bombycis* Koidzumi roots on CCl<sub>4</sub> - induced liver damage. *Free*

radical research. (2006) accepted

(2) 국내논문

Jae-Hoon Sa, Ying-Shan Jin, In-Cheol Shin, Tae-Heum Shim, Myeong-Hyeon Wang. Photoprotective effect and antioxidative activity from different organs of *Morus bombycis* Koidzumi. Kor. J. Pharmacogn. 35(3) (2004) 207-214.

(3) 학회발표

김영선, 심태흠, 사재훈, 허성일, 곡관정, 왕명현, 산뽕나무 추출물의 광보호 효과 및 항산화 활성. 한국영양학회 추계학술대회(2004)

Min-Jae Lee, Ying-Shan Jin, Dong-Seok Sin, Hyun Im, Seong-Il Heo, Woong Han, Ji-Yae Song, Myeong-Hyeon Wang. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of acorn extract against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. 한국실험동물학회 춘계학술대회(2005)

Ying-Shan Jin, Seong-Il Heo, Woong Han, Myeong-Hyeon Wang. 2,5-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilben compound isolated from *Morus bombycis* Koidzumi is related to the antidiabetic. 한국식물생명공학회 추계학술대회 (2005)

(4) 특허출원

왕명현, 이민재, 김영선, 한웅, 간보호 활성을 가지는 스틸벤계 화합물 및 그 제조방법. 10-2005-0120285

## 제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

### 제 1 절. 최종연구 개발 결과

최근 산화적 스트레스에 기인한 많은 종류의 질병이 발생되고 있으며, 이와 관련하여 우수한 항산화 활성을 갖는 물질에 대한 탐색연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 널리 사용되고 있는 항산화제로는 BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxy anisole), TBHQ(2-tert-butyl hydroxyquinone) 같은 합성품인데, 이들을 50 mg/kg/day 이상의 고용량으로 장기간 복용 시 지질대사의 불균형과 암을 유발 시킬 수 있기 때문에 이들의 사용을 제한하고 있는 실정이다. 그러므로 이러한 합성항산화제를 대체할 수 있는 우수한 항산화제의 개발이 매우 중요하다. 따라서 최근에는 각종 생약이나 식용식물 추출물 등에서 보다 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

산뽕나무(*Morus bombycis* Koidzumi)는 뽕나무과에 속하는 식물로 낙엽활엽교목으로 잎은 난형 또는 난상 원형이며 밑은 일(一)자 모양 또는 심장형이고 끝은 뾰족하며 날카로운 톱니가 있고 엽병은 길이 5~25 mm로서 잔털이 있다. 꽃은 4~5월에 피고 과실은 장질로 구형 또는 타원형이며 7~8월에 자흑색으로 익는다. 뽕나무에 비해 주두가 씨방보다 길다. 근피를 상백피(桑白皮, Mori Cortex)라 하고 열매를 상심자(桑椹子) 혹은 상실(桑實)이라 한다. 뽕나무 잎에는 flavones, steroids, triterpenes, amino acids, vitamin 및 다량의 미네랄 성분이 존재하고 있으며, 또한 전통 생약으로 당뇨병을 예방, 치료하며 갈증을 해소시키는 것으로 알려져 있다. 뽕잎은 칼슘, 칼륨 등의 전해질과 pectin, cellulose 등의 식이섬유나 아미노산, protein 등이 풍부하고 봄부터 가을에 걸쳐 채취 가능하다는 재배적인 이점을 가지고 있으므로, 앞으로 식품소재로서 널리 이용될 가능성을 가지고 있다. 지금까지 이 식물의 약리작용으로는 항염증작용 및 항균작용, 항산화작용, 항당뇨 작용, 고지혈증 억제작용 등이 보고되어 있다. 그러나 아직까지 산뽕나무에 관한 체계적인 연구는 미비한 실정이다.

그러하여 본 연구에서는 부위별 산뽕나무를 대상으로 생리활성 기능을 탐색하기 위하여 메탄올, 에탄올, 클로로포름, 80% 메탄올, 80% 에탄올 및 물 추출물을

조제하였고, 산뽕나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물로부터 n-Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH 및 water 분획물을 제조하였다. 얻어진 추출물과 분획물에 대하여 DPPH 자유라디칼 소거법에 의한 항산화성 효과와 UVB 및 UVA 영역에서의 자외선 흡수 효과를 검토하였다. 산뽕나무 추출물의 수소전자공여능(IC<sub>50</sub>)을 측정된 결과, 추출물에서는 80% 메탄올 줄기 추출물, 열매 추출물, 뿌리 추출물에서, 80% 메탄올 잎 추출물에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. 자외선 차단효과에서는 80% 에탄올 뿌리 추출물 및 80% 메탄올 추출물에서 매우 높은 자외선 흡수력이 높게 측정되었다. 항산화 효과 및 자외선 차단효능이 탁월한 산뽕나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물을 대상으로 용매 분획물을 제조하였다. 에틸아세테이트 분획물(E%cm: 223.4) 이 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었으며, 자외선 B 영역에서 매우 높은 흡수력을 나타내었다.

근래에 산화성 스트레스가 여러 가지 질환의 병인에 중요한 역할을 하고 특히 알코올성 간질환, 중금속에 의한 간손상 및 허혈후 재관류 손상 등의 간질환에도 관여하는 것으로 알려져 있으며, 만성 B형 및 C형 간질환에서도 산화성 스트레스가 간조직의 괴사성 염증반응과 관계가 있다는 것을 이미 보고된 바 있다. 이렇듯 간손상에 관여하는 산화성 스트레스는 간손상에 의해 유발되는 간섬유화 과정에도 관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 즉 산화성 스트레스에 의한 지질과산화(lipid peroxidation)에 의해 간 정상세포에서 교원질 유전자의 전사율이 증가된다는 보고가 있다. 그리하여 여러 가지 용매로 산뽕나무 뿌리에서 추출물을 얻었고 그 추출물을 ESR spectrometer 로 superoxide radical과 hydroxide radical의 소거 활성을 측정하였다. 결과 물 추출물에서 제일 높은 superoxide radical의 소거 활성을 나타내었고 모든 추출물에서 hydroxide radical의 소거활성은 거의 없는 것으로 나타났다. Superoxide radical의 소거활성이 제일 높은 물 추출물로 간 보호작용에 대하여 in vitro에서와 in vivo에서 알아보았다. In vitro에서 간암세포인 HepG2 에 산뽕나무 뿌리 물 추출물을 500 ug/mL 이상 첨가하였을 때 48시간 후부터 대조군보다 유의적인 성장 억제을 나타내었다. In vivo에서 산뽕나무 뿌리 물 추출물을 100 mg/kg으로 쥐에 투여 하였을 때 사염화탄소 대조군에 비하여 유의적인 간 보호 활성을 나타내었다. 그리고 산뽕나무 뿌리 물 추출물로 FeCl<sub>2</sub>-ascorbic acid에 의해 유도된lipid peroxidation 의 억제 작용을 알아본 결과 산뽕나무 뿌리 물 추출물을5 mg/mL 첨가 하였을 때 대조군보다 25%이상의 억제활성을 나타내었다. 이로부터 산뽕나무 뿌리 물 추출물은 높은 항산화 활성

을 갖고 있고 산화적 스트레스로 인한 간손상에 대한 간 보호 작용을 갖고 있는 것으로 사료된다.

산뽕나무 뿌리로부터 단일 물질을 분리 정제 한 후 HPLC를 이용하여 순도를 검증하였다. 이 물질의 구조식을 규명하기 위하여  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT spectrum, FT-IR(fourier transform infrared) spectrum, Maldi mass,  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY spectrum와 HMBS spectrum 를 이용하여 이 화합물의 분자량은 568이고 구조가 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene(DGTS)임을 확인하였다.

ESR spectrometry 로 이 화합물의 항산화활성을 측정한 결과 superoxide radical에 대한 소거활성이 농도의 증가에 따라 증가하였고 hydroxyl radical의 소거활성은 거의 없는 것으로 나타났다. 흰쥐 간균질물로  $\text{FeCl}_2$ -ascorbic acid법으로 과산화지질에 관한 억제활성을 측정한 결과 300 ug/mL 일 때 100 ug/mL의 비타민 E의 과산화지질 억제활성과 비슷한 효과를 나타내었다. 이 화합물의 간 보호 활성을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험들을 하였다. In vitro에서 간암세포주인 HepG2 세포에 DGTS 를 농도별로 첨가한 결과 농도가 증가함에 따라 시간의 흐름에 따라 대조군보다 암세포 성장이 억제되는 것으로 나타났고 DNA fragmentation 으로도 세포의 apoptosis가 확인되었다. In vivo에서 사염화탄소에 의한 간 손상에서 DGTS 의 간 보호효과를 알아보기 위하여 DGTS 를 농도별로 투여한 후 사염화탄소를 투여하여 24시간과 4일후에 각각 부검을 진행하여 확인하였다. 결과 24시간일 때 DGTS 를 투여한 군의 AST, ALT의 양이 사염화탄소군보다 유의적인 감소를 나타내었고 조직학적 관찰을 한 결과 DGTS 군의 간손상 정도가 사염화탄소군보다 많이 회복된 것을 알 수 있었다. 그리고 간 조직에서 total RNA를 추출하여 CYP2E1과 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 RT-PCR로 알아본 결과 DGTS 군의 발현량이 사염화탄소군보다 약하게 발현되는 것을 알 수 있었다. 이런 결과들로부터 알 수 있는바 DGTS 는 superoxide radical의 소거활성을 갖고 있고 간암세포인 HepG2 세포에 대하여 일정한 억제작용을 갖고 있으며 사염화탄소에 의한 간보호 작용이 있는 것으로 나타났다.

산뽕나무 뿌리로부터 분리 정제된 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyl-oxy)-trans-stilbene(DGTS)의 항당뇨 작용을 in vitro와 in vivo에서 알아보았다.  $\alpha$ -glucosidase와  $\alpha$ -amylase에 대한 저해 작용을 알아본 결과 높은 저해활성을 나타내었다. 또한  $\beta$  세포인 HIT-T15 cell에서 STZ로 처리하고 DGTS를 첨



가하였을 때 48시간 후부터 STZ군에 비하여 유의적인 증가를 보였다. 그리고 *in vivo*에서 STZ로 유도된 당뇨 쥐에서 항당뇨 효과를 알아본 결과 DGTS 를 투여한 군은 STZ군보다 유의적인 혈당억제를 나타내었고 혈중 insulin농도는 증가하였고, 혈중 BUN, AST, ALT, LDH 등 효소의 양은 STZ군보다 유의적인 감소를 나타내었다. 조직학적면에서 볼 때 췌장, 신장, 간장 등이 STZ 군에서 많이 손상되었고 DGTS 첨가 후 많이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 분자생물학적면에서 RT-PCR로 CYP2E1과 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 알아본 결과 DGTS 첨가 시 발현량이 감소하는 것을 알 수 있었다. 그 외에도 혈청에서의 과산화지질의 함량도 DGTS 첨가 시 STZ군보다 유의적인 감소를 나타내었다. 그리고 DGTS 만 800 mg/kg 투여 시 아무런 이상도 발견 할 수 없었다. 이상의 결과로 볼 때 DGTS 는 거의 독성이 없고 항당뇨 작용을 갖고 있는 것으로 판단되었다.

산뽕나무 추출물 및 생리활성물질의 혈압강하효과 측정하기 위해 *In vitro* 항고혈압작용 평가 및 *In vivo* 항고혈압작용 평가를 수행 한 결과 산뽕나무 뿌리 추출물은 용량 의존적으로 흰쥐 적출혈관을 이완시켰으며( $ED_{50}$ : 6.7 mg/kg), 산뽕나무 뿌리 추출물 (10, 30, 100 mg/kg)을 6주일간 선천성 고혈압쥐 (SHR) 에 장기 투여하였을 때, 용량 의존적으로 혈압상승을 억제하였다. 하지만 심박동수와 체중변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 산뽕나무 추출물은 고혈압으로 인한 혈관내피의 손상을 억제하였으며, 세포사를 의미하는 여러 생화학적 지표들을 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과들은, 산뽕나무 추출물이 여러 가공식품의 첨가제, 의약품 및 의약부외품의 원료, 기능성 화장품 첨가물, 음료 첨가물, 기능성 건강보조식품 등으로 개발될 수 있기 때문에, 유용식물인 산뽕나무의 자원화 및 상품화에 크게 기여할 것으로 기대된다.

## 제 2 절. 연구 개발 활용계획

- 본 과제에서 도출한 주요 연구 결과는 농가에 부수적인 수입원이 될 수 있는 산뽕나무의 기능성과 생리활성물질을 밝혀냄과 동시에 상품가치를 높임으로서 고부가가치 작물로 전환 하는 역할을 하였음.
- 기존에 알려진 간보호 물질인 sylimarin과 비슷한 효과를 나타내는 물질을 분

리, 단리 하였으며, in vivo 연구에서도 뛰어난 효과를 입증하였음.

- 본 과제에서 도출된 연구 결과는 생산업체, 연구기관, 등 다양한 분야에 바로 이용되거나 응용될 수 있음.
- 대량 생산 기술을 확보 하여 생산과정을 표준화 한다면 산업적 응용에 가속화 될 수 있을 것으로 판단되며, 직접적으로 농가에서 수집하여 기능성 식품으로 응용 한다면 시장가능성이 매우 높음.
- 새로운 연구모델 확립응용.
- 지금까지 개발된 많은 간보호 물질의 대한 부작용에 대한 부담감을 감소.
- 산뽕나무로부터 생리활성물질의 분리 및 분석에 의해 산뽕나무의 고부가가치 화기술의 확립 및 이로 인한 농가 소득 증대 기여.
- 자생 생물 특히 뽕나무 작물의 자원화 산업에 시너지효과를 가져옴.
- 농민들의 소득증대는 물론 FTA에 의한 국제시장개방에 효과적인 대응을 할 수 있을 것으로 판단.
- 한국산 산뽕나무의 기능성식의약품으로 개발 가능성 타진.
- 산뽕나무를 고부가가치 경제작물로서 생물 자원화 함.
- 물질특허와 더불어 생물 산업화에 기술이전.
- 벤처기업 또는 대기업에 기술 이전을 통한 상업화 가능.
- 여러 가공식품의 첨가제, 의약품 및 의약부외품의 원료, 기능성 화장품 첨가물, 음료 첨가물, 기능성 건강보조식품 등으로 개발될 수 있기 때문에 유용식

물인 산뽕나무의 자원화 및 상품화에 크게 기여할 것으로 기대됨.

- 건강기능성 식품을 개발하고 있는 산업체 뿐 만아니라, 신약 및 식품개발과 관련된 기초연구를 하고 있는 대학들과의 공동연구 뒷받침.

## 제 6 장. 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보

- 일본 방문기간 동안 습득한 분리정제 기술을 응용하여 이번 연구의 핵심 물질이라고 할 수 있는 DGTS를 분리할 수 있었다. DGTS는 분자량은 568이고 구조가 2,5'-Dihydroxy-4,3'-di( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene임을 확인 할 수 있었음.
- 2003년도 5월에 발표된 미국의 루트거 대학과 퓨어월드 보태니컬사의 공동연구 발표 내용에 따르면 DPPH 자유 라디칼 분석에 의해 항산화 활성을 측정하였을 때 아티초크의 잎사귀에서 활성이 가장 높게 나온다는 사실을 밝혀내고 이를 일반적인 비타민제와 비교했을 때에도 유의적인 결과를 얻었다고 밝힌 바 있으며 이를 통해 클로로제닌산을 중심으로 시나린을 비롯한 카페오일 퀸산 등이 분리 되었다고 보고 하였으며 이러한 물질들은 강력한 항산화 활성에 따라 간세포에 대한 보호 기능이 매우 뛰어난 것을 알려졌음.
- 이탈리아 볼로냐대학의 스페로니 교수팀과 파르마대학의 귀자르디 교수팀이 발표한 2003년도 논문에서도 아티초크 추출물의 페놀릭 성분이 많은 부분일수록 담즙산 형성 촉진능 및 간세포 보호 효과가 뛰어난 것으로 나타났으나 클로로제닌산만을 투여한 대조구의 경우 아무런 효과가 나타나지 않는 것으로 나타났으며 이를 통해 카페오일 유도체들과 다양한 복합작용에 의해 기능성이 발현 된다는 것을 입증하였음.
- 일본의 교토약대의 니노미야 교수팀이 생유기의약과학회지에 2003년도에 발표한 내용을 보면 쥐를 대상으로 125mg/kg 및 250mg/kg 농도로 복강 투여한 뒤 올리브오일을 다량 투여하자 투여 2시간 경과 후부터 혈청 중성지방인 트리글리세라이드의 수치 상승이 현저히 억제 된다는 연구 결과를 발표하였음.

## 제 7 장. 참고문헌

1. Sies H., ed. (1985) Oxidative stress. Academic Press, London.
2. Miquel J., Quintanilha A. T., Weber H. (1989) CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine, Vol. I-III, CRC Press, Florida.
3. Stocker R., Glazer A. N., Ames B. V. (1987) Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. Proc Natl Acad Sci USA 84: 5918-5922.
4. Halliwell B. (1990) How to characterize a biological antioxidant. Free Radic Res Commun 9: 1-32.
5. Hathway D. E. (1966) Metabolic fat in animals of hindered phenolic antioxidants in relation to their safety evaluation and antioxidant function in food research. Academic Press, New York, Vol. 15, p. 1.
6. 吉永晴雄, 稻永文利. (1982) 抗酸化劑としての没食子酸の食品への利用. New Food Industry 24: 65.
7. Kim H. J., Cha J. Y., Choi M. L., Cho Y. S. (2000) Antioxidative activities by water soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 43: 148-152.
8. Bobin M. F., Raymond M., Martini M. C. (1994) UVA and UVB absorption properties of natural products. Cosmet Toiletr Vol. 109: 63-70.
9. Park K. J. (2000) 한국 잠사기술 발달 100년사. 제1장 재상. 제1절 뽕나무 품종. 한국잠사학회. 농업과학기술원 잠사곤충부 pp 3-35.
10. Nomura Taro. (2001) Chemistry and Biosynthesis of prenylflavonoids. Yakugaku Zasshi 121(7): 535-556.
11. Singab A. N., El-Beshbishy H. A., Yonekawa M., Nomura T., Fukai T. (2005) Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: Effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 14; 100(3): 333-338.
12. Park K. M., You J. S., Lee H. Y., Baek N. I., Hwang J. K. (2003) Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. Journal of Ethnopharmacology 84: 181-185.

13. Du J., He Z. D., Jiang R. W., Ye W. C., Xu H. X., But P. P. (2003) Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry* 62: 1235-1238.
14. 약학연구회 (1988) 현대상약학, 학원사, 서울, p 248.
15. Dai S. J., Ma Z. B., Wu Y., Chen R. Y., Yu D. Q. (2004) Guangsangons F-J, anti-oxidant and anti-inflammatory Diels-Alder type adducts, from *Morus macroura* Miq. *Phytochemistry* 65: 3135-3141.
16. Fridovich I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875.
17. Choi J. H., Kim D. I., Park S. H., Kim J. M., Baek Y. H., Lee H. S., Ryu K. S. (2000) Effects of Mulberry (*Morus alba* L.) Leaf Extract on Oxygen Radicals and Their Scavenger Enzymes in Liver of SD Rats. *Korean Journal of Life Science* 10(5): 504-510.
18. Cha J. Y., Cho Y. S. (2001) Effect of Stem Bark Extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the Concentrations of Lipid and Tissue Lipid Peroxidation in the Cholesterol-Fed Rats. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33(1): 128-134.
19. Choi J. H., Kim D. I., Park S. H., Kim J. M., Baek Y. H., Lee H. S., Ryu K. S. (2000) Effects of Mulberry (*Morus alba* L.) Leaf Extract on Oxygen Radicals and Their Scavenger Enzymes in Brain of SD Rats. *Korean Journal of Life Science* 10(6): 570-576.
20. Kim Y. Y., Choue R. W., Chung S. H., Koo S. J. (1999) Anti-hyperglycemic Effect of Cortex *Mori radidis* in db/db Mice. *Korean J Food Sci. Technol* 31(4): 1057-1064
21. Yoo S. K., Kim M. J., Kim J. W., Rhee S. J. (2002) Effects of YK-209 Mulberry Leaves on Disaccharidase Activites of Small Intestine and Blood Glucose-Lowering in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(6): 1071-1077.
22. Yoon S. H., Jung S. Y., Ha H. (2001) Hypoglycemic and Enzyme Effects of the Water Extract of *Mori Radicis Cortex* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Korean Soc Hygienic Sciences* 7(2): 119-123.
23. Park W. Y., Ro J. S., Lee K. S.(2001) Hypoglycemic Effect of *Cudrania*

- tricuspidata Root Bark. Kor J Pharmacogn 32(3): 248-252.
24. Kim S. Y., Park K. J., Lee W. C. (1998) Antiinflammatory and Antioxidative Effects of Morus spp. Fruit Extract. Korean J Medicinal Crop Sci 6(3): 204-209.
  25. Kim S. K., Kim S. Y., Kim H. J., Kim A. J. (2001) The Effect of Mulberry-Leaf Extract on the Body Fat Accumulation in Obese fa/fa Male Zucker Rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 30(3): 516-520.
  26. Lee S. H., Choi S. Y., Kim H. C., Hwang J. S., Lee B. G., Gao J. J., Kim S. Y. (2002) Mulberroside F Isolated from the Leaves of Morus alba Inhibits Melanin Biosynthesis. Biol Pharm Bull 25(8): 1045-1048.
  27. Lee H. S., Moon J. Y. (2000) Hairgrowth Effect of Mori Cortex Radicis extract on Cytarabine-induced alopecia. Korean. Yokhak Hoeji 44(1): 66-70.
  28. Chen C. C., Liu L. K., Hsu J. D., Huang H. P., Yang M. Y., Wang C. J. (2005) Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Food Chemistry 91: 601-607.
  29. Choi J. H., Kim D. I., Park S. H., Kim J. M., Baek Y. H., Lee H. S., Ryu K. S. (2000) Effects of Mulberry (Morus alba L.) Leaf Extract on Oxidative Stress and Membrane Fluidity in Brain of SD Rats. Korean Journal of Life Science 10(4): 354-361.
  30. Hwang S. Y., Kwon W., Chai H. Y., Cho Y. M., Lee N. J., Ryu J. M., Sin J. S., Kim T. M., Cho J. H., Kim E. J., Park J. H., Kang J. K., Kim Y. B. (2004) Four-Week Repeated-Dose Toxicity Study on Mori radicis Cortex. The Korean Journal of Laboratory Animal Science 20(3): 283-290.
  31. Richter C., Park J. W. and Ames B. N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc Natl Acad Sci USA 85: 6465-6467.
  32. Bryce G. F. (1993) The effects of UV radiation on skin connective tissue, In oxidative stress in Dermatology, (J. Fuchs and L. Packer, eds), pp. 105-125, Marcel Dekker, Inc., N. Y.
  33. Cha J. Y., Cho Y. S. (1999) Effect of potato polyphenolics on lipid peroxidation in rats. J Kor Soc Food Nutr 28: 1131-1136.

34. Kim M. H., Kim M. C., Park J. S., Park E. J., Lee J. O. (1999) Determination of antioxidants contents in various plants used as tea materials. *Kor J Food Sci Technol* 31: 273-279.
35. Ottersen T., Vance B., Doorenbos N. J., Chang B. L., EI-Feraly F. S. (1977) The crystal structure of cudranone, 2,6,3/-trihydroxyl-4-methoxy-2/-(3-methyl-2-butenyl)-I, a new antimicrobial agent from *Cudrania chochinensis*. *Acta Chem Scand* 31: 434-436.
36. 육창수 (1989) 원색한국약용식물도감, pp. 140-141, 아카데미서적, 서울
37. Cheigh H. S., Lee J. S., Lee C. Y. (1993) Antioxidative Characteristics of Melanoidin Related Products Fractionated from Fermented Soybean Sauce. *Korean J Food Sci Nutr* 22: 565-569.
38. Ji C. I., Byun H. S., Kang J. H., Lee T. G., Kim S. B., Park Y. H. (1992) The Antioxidative Activities of Spices Extracts on Edible Soybean Oil. *Korean J Food Sci Nutr* 21: 551-556.
39. Yeo S. G., Ahn C. W., Kim I. S., Park Y. B., Park Y. H., Kim S. B. (1995) Antimicrobial Effect of Tea Extracts from Green Tea, Oolong Tea and Black Tea. *Korean J Food Sci Nutr* 24: 299-304.
40. Diaz Gil J., Munoz J., Albillos A., Rua C., Machin C., Garcia Canero R., Rosa M., Cereceda R., Mari C., Guijarro G., Trilla C., Escartin P. (1999) Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl4-cirrhotic rats after injection of the liver growth favior. *Journal of hepatology* 30(6): 1065-1072.
41. 김영균, 김영신 (1997) III 슈퍼옥사이드의 역할과 독성. *프리라디칼*, 도서출판 경문각 81-108.
42. Disilvestro R. A., Carlson G. P.(1992) Inflammation, an inducer of metallothionein, inhibits carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol Lett* 60(2): 175-181.
43. Sanzgiri U. Y., Srivatsan V., Muralidhara S., Dallas C. E., Bruckner J. V.(1997) Uptake, distribution and elimination of carbon tetrachloride in rat tissues following inhalation and ingestion exposures. *Toxicol Appl Pharm*



- 143(1): 120-129.
44. Connor H. D., Thurman R. G., Galizi M. D., Mason R. P. (1999) The formation of a novel free radical metabolite from CCl<sub>4</sub> in the perfused rat liver in vivo. *Journal Biol Chem* 26(10): 442-454.
  45. Shewita S. A., El-Gabar A., Bastawy M. (2001) Carbon tetrachloride changes the activity of cytochrome P 450 system in the liver of male rats; role of antioxidants. *Toxicology* 169(2): 83-92.
  46. Paul B. M., Edward K. L., Poyer L. J. (1984) Oxygen and carbon centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J Biological Chem* 259: 2135-2143.
  47. Kolankaya D., Selmanoglu G., Sorkun K., Salih B. (2002) Protective effects of Turkish prop[ols on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry* 78(2): 213-217.
  48. 정해영, 김정원, 성도유, 노래경. (1998) 노화특집 VI: 노화의 이해: 활성산소와 노화조절. *대한화학회지*. 38(8): 51-55.
  49. Koop D. R., Laethem C. L., Schnier, G. G. (1989) Identification of ethanol-inducible P450 isozyme 3a (P450E1) as a benzene and phenol hydroxylase. *Toxicol Appl Pharmacol* 98: 278-288.
  50. Kadowaki T., Hara K., Yamauchi T., Terauchi Y., Tobe K., Nagai R. (2003) Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med* 228: 1111-1117.
  51. 김선우: (1987) 경구용혈당강하제의 부작용 실태. *당뇨병* 11(2): p. 208.
  52. 日経バイオテック: (1998) 日経バイオ年鑑 99, 日経BP社, 東京, p. 91.
  53. 이종길: (1995) 당뇨병의 치료, 신일상사, 서울 p. 77.
  54. Lemus I., Garcia R., Delvillar E., Knop G. (1999) Hypoglycemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. *Phytotherapy Research* 13: 91-94.
  55. Schmidt D. D., Frommer W., Junge B., Miller L., Wingender W., Truscheit E. (1977)  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor: *Naturwissenschaften* 64: 535-536.
  56. Junge B., Heikor F. R., Kurz J., Muller L., Schmidt D. D., Wunsche C. (1977) Untersuchungen zur struktur des  $\alpha$ -D-Glucosidase inhibitors

- acarbose. *Carbohydrate Research* 128: 235-268.
57. Turcotte G. E., Nadeau L., Forest J. C., Douville P., Leclerc P., Bergeron J., Lacos B. F. (1994) A new rapid immunoinhibition pancreatic amylase assay: diagnostic value for pancreatitis. *Clin Biochem* 27: 133-139.
58. Layer P., Carlson G. L., DiMagno E. P. (1985) Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion in vitro and inactivates intraduodenal amylase in humans. *Gastroenterology* 88: 1895-1902.
59. Bischoff H., Ahr H. J., Schmidt D., Stoltefuss J. (1994) Acarbose-ein neues Wirkprinzip in der Diabetes-Therapie. *Nachr Chem Tech Lab* 42: 1119-1128.
60. Scheen A. J. (2003) Is there a role for alpha-glucosidase inhibitors in the prevention of type 2 diabetes mellitus?. *Drugs* 63: 933-951.
61. Krause H. P., Keup U., Puls. W. (1982) Inhibition of disaccharide digestion in rat intestine by the -glucosidase inhibitor Acarbose (Bay g 5421). *Digestion* 23: 232-238.
62. Cauderay M., Tappy L., Temier E., Jequier E., Hillebrand I. and Felber J. P. (1985) Effect of alpha-glycohydrolase inhibitors (Bay m1099 and Bay o1248) on sucrose metabolism in normal men. *Metabolism* 35: 472-477.
63. Robinson K. M., Rhinehart B. L., Begovic M. E., King C. R., Liu P. S. (1989) Castanospermine-glucosides are potent, selective, long-lasting sucrase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 224-229.
64. Rury R. H., Robert C. T., Carole A. C. (1999) A randomized double-blind trial of Acarbose in type 2 diabetes shows improved glycaemic control over 3 years (U.K. Prospective Diabetes Study 44). *Diabetes Care* 22: 960-964.
65. Gallaher D. D., Csallany A. S., Shoeman D. W., Olson J. M. (1993) Diabetes increase excretion of urinary malondialdehyde conjugates in rats. *Lipids* 28: 663-666.
66. Gold G., Manning M., Heldt A., Nowlain R., Pettit J. P., Grodsky G. M. (1981) Diabetes induced with multiple subdiabetogenic doses of streptozotocin: lack of protection by exogenous superoxide dismutase.

- Diabetes Care 21: 160-178.
67. Baynes J. W. (1991) Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-421.
  68. Haffner S. M. (1998) Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *Diabetes Care* 21: 160-178.
  69. Morel D. W., Hessler J. R., Chisolm G. M. (1983) Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipids. *J Lipid Res* 24: 1070.
  70. Cunningham J. J. (1998) Micronutrients as nutraceutical interventions in diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 17: 7-10.
  71. Lim S. S., Kim M. H., Lee J. H. (1997) Effect of *Artemisia princeps* var *orientalis* and *Cirsium japonicum* var *ussuriense* on liver function, body lipid, and bile acid of hyperlipidemic rat. *Korean J Nutr* 30: 797-802.
  72. Reinke L. A., Stohs S. J., Rosenberg H. (1978) Altered activity of hepatic mixed-function mono-oxygenase enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Xenobiotica* 8(10): 611-619.
  73. Ioannides C., Bass S. L., Ayrton A. D., Trinick J., Walker R., Flatt P. R. (1988) Streptozotocin-induced diabetes modulates the metabolic activation of chemical carcinogens. *Chem Biol Interact* 68(34): 189-202.
  74. Hannon-Fletcher M. P. A., O'Kane M. J., Moles K. W., Barnett Y. A., Barnett C. R. (2001) Lymphocyte cytochrome P450- CYP2E1 expression in human IDDM subjects. *Food Chem Toxicol* 39(2): 125-132.
  75. Raza H., Prabu S. K., Robin M. A., Avadhani N. G. (2004) Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 53: 185-194.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.