

느릅나무 유효성분의 생리활성 평가 및
건강기능식품 개발연구

Development of functional food and evaluation of bioactive activity of
Ulmus deviadiana var, *japonica*

연 구 기 관
한국식품연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “느릅나무 유효성분의 생리활성 평가 및 건강기능식품 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 하 태 열

세부연구책임자 : 김 성 란

연 구 원 : 안 지 윤

연 구 원 : 한 찬 규

연 구 원 : 김 현 구

연 구 원 : 최 원 희

위탁연구기관명 : 충북대학교

위탁연구책임자 : 김 대 중

요 약 문

I. 제 목

느릅나무 유효성분의 생리활성 평가 및 건강기능식품 개발연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

오늘날 고령화 사회에서 혈관계 질환(심혈관, 뇌혈관)과 암은 3대 주요 사망 원인으로서 국민의 건강을 위협하고 있고 막대한 의료비 지출로 경제적 손실을 초래하고 있다. 특히 이러한 만성 퇴행성 질환은 일단 발병하면 치료가 어려운 만큼 어떠한 질병보다도 예방이 중요하며 이중 매일 섭취하는 식품의 선택은 매우 중요하다고 인식하고 있다.

한편, 느릅나무는 전통적으로 민간의 약재로서 다양한 형태로 섭취하여 왔으며 항산화 작용을 비롯한 암 예방 효과, 뇌신경 보호 효능 등에 있어서 높은 가능성을 나타내고 있어 이에 대한 체계적 연구로 그 효능이 입증된 건강기능 식품으로의 개발가능성이 매우 높을 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 느릅 추출물의 *in vitro*에서의 생리활성을 평가하고 *in vivo*에서의 효능을 평가하였으며 느릅의 유효성분을 추출, 분리, 구조를 동정하였고 이들 소재를 활용한 식품소재 및 제품을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 느릅나무 추출물의 *in vitro* 생리활성평가
2. 느릅나무 추출물의 지질대사 및 기억력 손상예방에 미치는 영향
(*in vivo*)

3. 느릅나무의 암 예방효과
4. 느릅나무 추출물의 지표물질 설정
5. 느릅나무 추출물의 식품소재화 및 제품개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 느릅나무 추출물의 *in vitro*에서의 생리활성평가

느릅나무 에탄올 추출물의 각 용매 분획물에 대한 항산화활성과 L-glutamate에 의하여 유도된 PC 12 세포에 대한 세포 독성 및 세포 내 활성산소종 (ROS)을 측정하였다. 느릅나무 수피의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획과 근피의 에틸아세테이트 분획층은 흰쥐 뇌조직에서 $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 로 유도한 산화적 스트레스를 유의하게 억제하였으며 강한 free radical 소거능을 나타내었다. 또한 glutamate에 의하여 PC 12 세포의 생존율이 억제되었고 세포내 ROS가 증가하였으며 이러한 ROS의 증가는 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올획분에 의하여 억제되었다.

2. 느릅나무 추출물의 지질대사 및 기억력 손상예방에 미치는 영향 (*in vivo*)

느릅나무의 식이섭유가 지질대사에 미치는 영향을 조사한 결과 식이섭유추출물을 첨가함에 따라 고콜레스테롤 식이에 의하여 상승된 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 중성지방 함량이 유의하게 감소하였고 동맥경화지수도 감소하였다. 또한 느릅식이섭유를 첨가함에 따라 간장중 총지방함량, 콜레스테롤 및 중성지방 함량이 감소하였다. 느릅나무 에탄올 추출물이 기억력 손상 예방 및 개선에 미치는 영향을 검토하고자 scopolamine으로 건망증을 유도하여 passive avoidance test 및 water maze test 로 기억력을 측정한 결과 느릅나무 에탄올 추출물은 기억력 손상예방에 효과적인 것으로 나타났다. 또한 염증반응과 관련하여 LPS로 유도된 기억력 손상 모델에서도 느릅나무 추출물은 기억력 손상 예방에 효과적인 것으로 나타났다.

3. 느릅나무의 항암활성 평가

느릅나무 추출물이 SW48 세포의 세포증식억제능 및 apoptosis에 미치는 영향을 검토한 결과, SW48 세포의 세포증식능을 억제하였으며 암세포의 apoptotic body를 증가시키고 apoptosis에 관련된 bcl-2/bax의 발현비율을 현저히 낮추고, 농도 의존적으로 procaspase-3의 발현을 감소시키는 것으로 나타나 암세포의 apoptosis를 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 느릅추출물의 대장암 예방 효과를 검토하기 위하여 DMH로 대장암을 유도한 흰쥐에게 느릅나무추출물을 섭취시킨 결과 느릅추출물군은 대조군에 비하여 ACF 및 AC의 형성을 유의하게 감소시켰으며, BrdU 표지에 의한 세포증식능을 측정한 결과에서도 느릅나무 추출물을 투여한 군에서 세포증식능이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 느릅의 폐암예방효과를 검토하기 위하여 A/J마우스를 사용하여 폐암 유발 물질로서 다환족방향성탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)의 일종인 벤조피렌 (benzo[a]pyrene)을 투여하고 느릅나무추출물을 사료에 혼합하여 자유로이 섭취한 뒤 폐샘종 발생의 변화를 분석하였다. 그 결과 벤조피렌을 투여한 모든 동물에서 폐샘종이 발생하였으며, 느릅추출물군은 숫컷에서 전체 폐샘종의 발생개수가 약 40%정도 유의적으로 감소하였고, 암컷 실험군에서는 약 30%정도의 감소를 보였다. 즉, 느릅추출물이 대장암모델에서 전암병변인 ACF의 생성을 유의적으로 감소시키고 폐암모델에서 폐샘종의 생성을 유의적으로 감소시키는 것으로 보아 대장암과 폐암의 암예방효과에 있어 탁월한 효능을 지니고 있는 것으로 사료된다

4. 느릅나무 추출물의 지표물질 설정

느릅나무 에탄올 추출물을 극성이 다른 용매로 순차 분획, 활성을 평가한 뒤 고활성 획분인 부탄을 획분을 얻었다. 부탄을 획분은 다시 silicagel을 충전한 open column에 적용하여 각 용매 조성을 달리하여 다시 분획하였고 각 분획을 TLC로 확인하여 TLC 패턴에 따라 같은 패턴을 모아서 활성을 분석하였다. 2차 분리를 하여 얻어진 frc.4-1은 HPLC 분석결과 단일 peak를 분리하였고 NMR,

Mass, IR을 이용하여 구조 분석을 한 결과 10개의 단일결합 탄소를 갖는 구조로 추정되었으며 이는 현재까지 밝혀진 느릅나무 이외의 새로운 phenolic compound로 판단되었다.

5. 느릅나무 추출물을 이용한 제품 개발

느릅나무 부위별 시료의 일반성분을 분석하였고, 에탄올 추출물의 환원당, 유리당, 플라보노이드 및 폴리페놀 함량을 분석하였으며 수용성 식이섬유 의 유동 특성을 분석하였다. 느릅 식이섬유 소재의 제빵적성을 검토하기 위하여 느릅나무 식이섬유추출물을 첨가한 결과 대조군에 비하여 색깔에 대한 기호도는 오히려 높았고 향과 조직감 및 전반적 기호도에서는 대조군과 차이가 없었다. 또한 느릅 수용성 식이섬유 소재를 비타민 C, 결정함수 포도당등과 혼합하여 과립제품을 제조하였다. 느릅나무 뿌리 에탄올 추출물 소재를 활용하여 음료를 개발하였으며, 느릅나무 추출물의 짠 맛을 줄이고 기호도를 높이기 위하여 구기자, 대추, 사과 및 감초추출물을 부재료로 선정하여 최적 배합비를 설정하였다.

SUMMARY

I. Title

Development of functional food and evaluation of bioactive activity from *Ulmus davidiana* var, *japonica*

II. Objective and Significance

Vascular disease and cancer have been increased in modern society with increasing of the elderly people. It has been focused on daily food intake and healthy functional food for the prevention of a degenerative disease. *Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai is a deciduous tree which is widely distributed in Korea. The barks of the stem and the root of this plant have been used in oriental traditional medicine for the treatment of edema, mastitis, gastric cancer and inflammation. Objectives of this study were to evaluate bioactive activity of *Ulmus davidiana* var, *japonica* *in vitro* and *in vivo*, and to establish indicator compound for the development of healthy function food.

III. Scope of Research

1. Evaluation of bioactive activity of *Ulmus davidiana* var, *japonica* *in vitro*
2. Effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on lipid metabolism and the prevention of memory deficit (*in vivo*)
3. Chemopreventive effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on colon cancer and lung cancer
4. Establishment of indicator compound from *Ulmus davidiana* var, *japonica*
5. Development of functional food materials and functional food using extract of *Ulmus davidiana* var, *japonica*

IV. Results and Recommendation

1. Evaluation of bioactive activity of *Ulmus davidiana* var, *japonica* *in vitro*

Antioxidative and protective effects of *Ulmus davidiana* var, *japonica* against oxidative damages induced by glutamate in PC 12 cells were investigated. Inhibitory activity against $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative stress and DPPH radical-scavenging activity were detected in ethyl acetate and butanol fractions of ethanol extracts from stems and roots. Ethyl acetate and butanol fractions of ethanol extracts from roots significantly inhibited glutamate-induced cytotoxicity and reactive oxygen species in PC 12 cells.

2. Effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on lipid metabolism and prevention of memory deficit (*in vivo*)

To determine the effects of soluble dietary fiber isolated from *Ulmus davidiana* var, *japonica* (U-SF) on lipid metabolism in cholesterol-fed rats. Forty male Sprague-Dawley rats were assigned to 4 groups; normal diet group, HCC-1% cholesterol fed group, HCLF-2.5% U-SF with 1% cholesterol fed group and HCHF-5% U-SF with 1% cholesterol fed group and fed each experimental diet for 4 weeks. The results obtained were as follows: The liver weights of U-SF groups were significantly decreased compared with those of HCC group. The supplementation of U-SF recovered the levels of serum total cholesterol(TC), triglyceride(TG) and LDL cholesterol (LDL-C), which were elevated by high cholesterol diet. Although HDL-C concentration was not affected by U-SF, AI index was significantly reduced. U-SF group showed the decreased hepatic TC, TG and total lipid contents compared with HCC group. The water contents and weights of fecal were increased by the supplementation of U-SF in dose dependent manner. In addition, TG, TC and total lipid contents of fecal were significantly increased in HCHF group

compare with HCC group.

To determine the effect of ethanol extract from *Ulmus davidiana* var, *japonica* (EUD) on the scopolamine induced cognitive deficit in mice, ICR mice were divided into 4 group(normal, scopolamine control, 0.5% EUD, 1% EUD) and fed each experimental diet for 4 weeks. Intraperitoneal(i.p) injections of scopolamine or saline were given 60 min. before behavioral test. Supplementation of EUD significantly in brain ameliorated scopolamine-induced cognitive deficit as measured in both the passive avoidance test and Morris water maze test in a dose dependent manner. It was also investigated that the effect of EUD on LPS induced cognitive deficit, Step through latency of Morris water maze markedly increased by injection of LPS. But, the supplementation of EUD attenuated impairment of learning and memory induced by LPS.

3. Chemopreventive effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on colon cancer and lung cancer

It was investigated that the effect of root and stem extract fraction(H₂O, hexane, chloroform, ethylacetate, butanol) of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on the cancer cell proliferation and preventive effect with human colon cancer cell line(SW 480, HCT 116). Treatment of *Ulmus davidiana* var, *japonica* to SW 480, HCT 116 cells resulted in the growth inhibition, morphological change and induction of apoptotic cell death as measured by hemocytometer counts, MTT assay, DAPI staining and western blot analysis. In SW 480 cancer cell, the expression of caspase-3 protein and bax increased with treatment of chloroform fraction of root in dose dependant manner. For the assessment of chemopreventive efficacy *in vivo*, male F344 rats were fed with EUD (0.5 or 1%) in diet for 8 weeks, and the animals were subcutaneously injected with 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 30 mg/kg) 5 times at 3-day

intervals to induce colonic aberrant crypt foci (ACF). The supplementation of EUD decreased both the numbers of AC (1191.1/colon) and ACF (529.3/colon) induced significantly by DMH. In addition, EUD triggered expression of caspase-3, a key factor of an apoptotic cascade on the colonic mucosa. These results suggest that EUD lead to apoptosis of cancer cells, and thereby suppress colorectal carcinogenesis during initiation stage. EUD also had the inhibitory effect against B[a]P-induced lung tumorigenesis in A/J mice.

4. Establishment of indicator compound from *Ulmus davidiana* var, *japonica*
Ulmus davidiana var, *japonica* were extracted with ethanol, and further fractionated with various solvents. Butanol fraction selected from the result of bioactive activity assay and yield was further fractionated with various solvent system by using open column filled silicagel. Flavonoid pattern of 5 fractions obtained was analyzed by HPLC, and the bioactive activity was assayed. Active fraction(frc. 4) was further isolated by fraction collector and applied to TLC. The chemical structure of active fraction(frc. 4-1) was identified by using HPLC, NMR, Mass and IR

5. Development of functional food materials and functional food from extract of *Ulmus davidiana* var, *japonica*
To develop functional food using ethanol extract(EUD) and soluble dietary fiber(U-SF) of *Ulmus davidiana* var, *japonica*, the physicochemical property was determined. It was examined the effect of U-SF on the quality characteristics of the bread. As a result of sensory evaluation, color scores of bread with U-SF were increased compared to control. But there was no differences in the scores of flavor, texture and overall acceptance. Also granule product using U-SF and sub ingredients was developed. To develop beverage using EUD and sub ingredients, recipe formulation and sensory evaluation were examined.

CONTENTS

SUMMARY	
Chapter 1. Objective and Scope	
Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology	
1. Current Status on Domestic Technology	
2. Current Status on Foreign Technology	
Chapter 3. Experimental Methods and Results	
1. Evaluation of bioactive activity of <i>Ulmus davidiana</i> var, <i>japonica</i> <i>in vitro</i>	
A. Materials and methods	
1. Extraction of sample	
2. Assay of inhibitory activity against oxidative stress	
3. Assay of protective activity against cytotoxicity of PC 12 cell	
B. Results	
1. Inhibitory activity against oxidative stress	
2. Protective activity against cytotoxicity of PC 12 cell	
2. Effect of <i>Ulmus davidiana</i> var, <i>japonica</i> on lipid metabolism and prevention of memory deficit (<i>in vivo</i>)	
A. Effect of <i>Ulmus davidiana</i> var, <i>japonica</i> on lipid metabolism	
1) Effect of water soluble fiber from <i>Ulmus davidiana</i> var, <i>japonica</i> on lipid metabolism and antioxidant activity	
a. Materials and methods	
b. Results	
2) Anti-hyperlipidemia of ethanol extract from <i>Ulmus davidiana</i> var, <i>japonica</i>	
a. Materials and methods	
b. Results	
B. Effect of <i>Ulmus davidiana</i> var, <i>japonica</i> on prevention of memory deficit	
1) Preventive activity of ethanol extract of <i>Ulmus davidiana</i> var, <i>japonica</i> on scopolamine induced memory deficit in mice	

- a. Materials and methods
 - b. Results
- 2) Preventive activity of active fraction of *Ulmus davidiana* var, *japonica* ethanol extracts on LPS induced memory deficit in mice
 - a. Materials and methods
 - b. Results
- 3. Chemopreventive effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica*
 - A. Inhibitory activity of colon cancer cell growth *in vitro*
 - 1) Materials and methods
 - 2) Results
 - a. Cell growth
 - b. Apoptosis
 - c. Apoptosis related protein (bcl, bax, caspase)
 - B. Preventive effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on colorectal carcinogenesis (*in vivo*)
 - 1) Materials and methods
 - 2) Results
 - a. Changes in body weight and organ weight
 - b. ACF and AC
 - c. Cell proliferation expressed as BrdU labelling index.
 - d. Serum biomarker
 - C. Preventive effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on lung carcinogenesis (*in vivo*)
 - 1) Materials and methods
 - 2) Results
 - a. Changes in body weight, food intake and organ weight
 - b. Number and size of lung tumor
- 4. Establishment of indicator compound from *Ulmus davidiana* var, *japonica*
 - A. Fractionation and assay of bioactive activity for establishment of indicator compound
 - 1) Materials and methods
 - 2) Results
 - B. Identification of chemical structure

- 1) Materials and methods
 - 2) Results
5. Development of functional food materials and functional food using extract of *Ulmus davidiana* var, *japonica*
- A. Physicochemical property of extract of *Ulmus davidiana* var, *japonica*
 - 1) Materials and methods
 - 2) Results
 - a. Preparation of extracts and solvent fraction
 - b. Proximate composition
 - c. Contents of reducing sugar and free sugar
 - d. Contents of flavonoid and polyphenol
 - B. Flower behavior of water soluble fiber from *Ulmus davidiana* var, *japonica*
 - 1) Materials and method
 - 2) Results
 - C. Development of functional food functional food from extract of *Ulmus davidiana* var, *japonica*
 - 1) Baking properties
 - a. Materials
 - b. Baking of bread
 - c. Physical properties of bread
 - d. Sensory evaluation
 - 2) Granule
 - 3) Beverage
 - 4) Tablet

Chapter 4. Attainment of objectives and contribution

Chapter 5 Applications of the results

Chapter 6 references

목 차

요 약

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내관련기술의 현황

제 2절 국외관련기술의 현황

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 느릅나무 추출물의 *in vitro* 생리활성 평가

제 1 항 재료 및 방법

1. 시료의 추출
2. 산화적 스트레스 억제활성 측정
3. 신경세포독성 보호효과 측정

제 2 항 실험결과

1. 산화적 스트레스 억제활성
2. 신경세포독성 보호효과

제 2 절 느릅나무 추출물의 지질대사 및 기억력 손상예방에 미치는 영향
(*in vivo*)

제 1 항 느릅나무 추출물이 지질대사에 미치는 영향

1. 느릅나무 식이섬유가 지질대사 및 항산화체계에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

나. 실험결과

2. 느릅나무 에탄올 추출물의 항 고지혈증효과

가. 재료 및 방법

나. 실험결과

제 2 항 느릅나무 추출물의 기억력손상예방 효과

1. 건망증 모델에서 느릅나무에탄올 추출물의 기억력손상예방효과

가. 재료 및 방법

- 나. 실험결과
- 2. 고효성 획득의 LPS 유도 기억력 손상예방효과
 - 가. 재료 및 방법
 - 나. 실험결과

제 3 절 느릅나무의 암 예방효과

제 1 항 느릅나무의 대장암 세포 성장 억제능 (*in vitro*)

- 1. 실험재료 및 방법
- 2. 실험결과
 - 가. Cell growth
 - 나. DAPI staining을 이용한 apoptosis 확인
 - 다. Western blot을 이용한 apoptosis 관련 단백질의 변화

제 2 항 느릅나무의 대장암전이억제능 (*in vivo*)

- 1. 실험재료 및 방법
- 2. 실험결과
 - 가. 체중변화 및 장기무게
 - 나. 대장이상선화소 및 이상선화
 - 다. BrdU 표지에 의한 세포증식능
 - 라. 혈액생화학적 biomarker

제 3 항 느릅나무의 폐암예방효능 (*in vivo*)

- 1. 실험재료 및 방법
- 2. 실험결과
 - 가. 체중변화, 식이섭취량 및 장기무게
 - 나. 폐샘종의 발생개수 및 크기

제 4 절 느릅나무의 지표물질선정

제 1 항 지표물질 선정을 위한 분획 및 활성측정

- 1. 실험재료 및 방법
- 2. 실험결과

제 2 항 지표물질 선정을 위한 유효물질의 구조동정

- 1. 실험재료
- 2. 실험결과

제 5 절 느릅나무의 식품소재 및 제품개발

제 1 항 느릅나무 추출물의 이화학적 성분 분석

1. 실험방법
2. 실험결과
 - 가. 느릅나무 추출물 및 분획물 제조
 - 나. 일반성분
 - 다. 환원당 및 유리당의 함량
 - 라. 플라보노이드 및 폴리페놀 함량

제 2 항 느릅나무 수용성 식이섬유 추출물의 유동 특성

1. 실험방법
2. 결과 및 고찰

제 3 항 느릅나무 추출물을 이용한 제품개발

1. 제빵적성
 - 가. 실험재료
 - 나. 식빵의 제조
 - 다. 식빵의 물리적 특성
 - 라. 관능검사
2. 과립제품
3. 음료제품
4. 타블렛 제품

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참 고 문 헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

인류의 수명연장에 따라 노인 인구의 비율이 급격히 증가하고 각종 만성질환의 유병율도 증가하고 있다. 특히, 혈관계 질환(심혈관, 뇌혈관)과 암은 매우 높은 발병율을 보이고 있으며 3대 주요 사망원인으로서 국민의 건강을 위협하고 있을 뿐만 아니라 이에 대한 의료비 지출로 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다. 특히 만성 퇴행성 질환은 한번 발병하면 치료가 어려운 만큼 어떠한 질병보다도 예방이 중요하며 이중 매일 섭취하는 식품의 선택은 매우 중요하다고 인식하고 있다. 이러한 사회적 현상과 더불어 식품이 지닌 건강유지, 질병예방 기능뿐 아니라 질병개선 기능을 강조한 건강기능식품에 대한 소비자들의 관심이 고조되고 있다. 오늘날 질병의 진행과 노화과정에 가장 많은 영향을 미치고 있는 것이 산화적 스트레스라는 결론이 도출되고 있다. 인체가 생명을 유지하고 살아가는 과정 자체가 산소라디칼의 영향을 받고 있어 산소라디칼의 생성이 생명체를 유지하는데 필수불가결한 과정이기는 하나 이러한 산화스트레스의 조절이 적절히 이루어지지 않을 경우 조직이나 세포에 손상을 가져온다. 즉, DNA 손상 복구 기능, 정확한 DNA 복제 및 단백질 합성 기능, 종양형성 억제능, 우수한 항산화 체계 등에 의해 조절되며 산화스트레스의 감소는 노화의 지연은 물론 만성퇴행성 질환의 발생과 진행도 효과적으로 억제할 수 있게 된다. 이러한 산화적 스트레스에 의한 세포손상은 고지혈증, 동맥경화등과 같은 혈관계 질환과 암의 질병상태를 초래하는 주요 원인이 될 수 있다고 밝혀지면서 이들 질환의 예방 개선을 위한 신약개발 등이 활발히 연구되고 있으나 화학적 합성의약품은 그 효능여부와 부작용, 간독성 등으로 천연물로부터 이들 질환의 예방용 소재 개발에 관심이 집중되고 있다.

한편, 느릅나무는 옛 부터 민간의 약재로 다양하게 사용되어 왔다. 줄기껍질을 유백피, 뿌리껍질을 유근피, 열매를 유전이라고도 부르며 이노제, 위, 소장, 대장, 십이지장등 소화기계의 궤양치료에도 널리 사용되어 오고 있다. 또한 위암이나 직장암 치료에도 쓰며 오래 먹어도 부작용이 없는 특징을 갖고 있는 것으로 알

려져 있다. 또한 느릅나무는 옛 부터 다양한 형태로 섭취하여 왔는데, 열매로 술이나 장을 담그기도 하고 껍질과 잎을 찌서 먹기도 하였다고 한다. 현재에는 일반 가정에서 암환자나 소화기계 케양 관련 환자의 재발 방지용으로서 또는 일반 건강음료로서 일반 보리차의 형태로 끓여서 복용하고 있다. 민간에서 다양하게 이용되고 있는 느릅나무에 관한 과학적 근거로서는 최근, 주요 활성성분으로서 lignan, neolignan 배당체, terpenoid류, tannin류 등이 보고되어 있고 효능에 관해서는 neuroprotective effect, antioxidant effect, nitric oxide 생성억제능, antimicrobial activity 등이 일부 산발적으로 보고되어 있을 뿐이다. 이상과 같이 느릅나무는 강한 항산화 작용 등으로 암 예방 효과, 뇌신경 보호능의 높은 가능성을 나타내고 있고, 별 부작용 없이 전통적으로 섭취해오고 있는 만큼 건강기능식품개발을 위한 매우 좋은 소재로 사료된다. 특히, 우리나라에서도 건강기능식품법에 의하여 기능성의 표시가 가능해졌고 현재, 고시형과 개별인정형으로 일부 소재들이 인정되어 있는 점 등으로 미루어 볼 때 민간에서 전통적으로 안전하게 섭취해 온 느릅으로부터 그 효능이 체계적으로 입증된 건강기능 식품으로의 개발가능성이 매우 높을 것으로 판단된다. 그러나 느릅을 이용한 식품소재화 및 제품화에 관해서는 느릅나무 뿌리자체를 말리거나 분말화 하여 그대로 이용하는 수준이며 느릅나무의 효능을 이용한 제품개발은 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 느릅 추출물의 *in vitro*에서의 생리활성을 평가하고 *in vivo*에서의 효능을 평가하였으며 느릅의 지표성분을 추출, 분리, 구조를 동정하였고 이들 소재를 활용한 식품소재 및 제품화 연구를 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 관련기술의 현황

느릅나무(*Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai)는 우리나라를 비롯한 일본 및 중국 등에 주로 분포하는 관엽 교목으로서 한방에서는 예로부터 참느릅나무 등의 껍질을 유백피라 하여 대소변 불통, 이수, 수종, 임질, 유선염, 위궤양 등에 널리 사용되어 왔다.

느릅나무의 성분에 관한 연구로는, Son 등과 문등은 당느릅나무 근피에서 (+)-catechin류와 β -sitosterol 유도체를 분리하였고, Kim 등은 당느릅나무 근피에서 davidianone 류와 mansonone 류를 분리하였다. Lee등은 느릅나무 줄기 및 뿌리의 껍질로부터 4종류의 lignan xylosides, 2종류의 neolignan glycosides와 5종류의 triterpene esters, sesquiterpenoid quinone을 분리하였다고 보고되어 있다.

느릅나무의 항산화 및 혈관계질환 개선 관련 연구로서, Kim 과 Lee는 느릅나무 메탄올 추출물이 SD rat 의 cortical cell을 이용하여 100 uM glutamate로 1시간 처리한 다음 24시간 후 유리된 LDH를 측정한 결과 강한 neuroprotective effect가 확인되었다고 보고하였다. 박 등은 국내산 약용식물로부터 항산화 물질을 탐색한 결과 유근피를 비롯한 몇몇 후보소재에서 항산화 활성이 나타났다고 보고하고 있으며 천등은 melanoma cell line을 이용하여 느릅나무의 용매분획별로 tyrosinase 활성을 측정한 결과 에틸아세테이트 획분에서 유의하게 효소활성이 증가하였으며 melanin 생성효과가 있음을 보고하고 있다. Chung 등은 유근피 메탄올 추출물의 부탄올 획분에서 macrophages에서의 nitric oxide 생성을 억제하였다고 보고하고 있고, 오등은 느릅나무 껍질로부터 메탄올추출물을 얻고 이를 다시 순차용매 분획하여 항균활성을 분석한 결과 부탄올 획분에서 강한 항산화 활성이 있었다고 보고하고 있다. 이상과 같이 느릅나무 추출물에 대한 생리활성이 대부분 *in vitro* 효능이며 *in vivo* 연구는 거의 없는 실정이다.

느릅나무의 면역 및 항암활성 관련 연구에서도 주로 배양세포계를 이용한 연

구가 주를 이루고 있다. 예를 들면, 느릅나무 뿌리껍질로부터 분리한 단백다당체와 느릅나무로부터 분리된 면역 활성 균주가 생산하는 당화합물에 대한 항암 면역 활성을 연구한 바 있으며 마우스 embryonic cell에서 느릅나무로부터 분리한 당단백이 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA)로 유도된 세포사멸을 억제시키는 작용이 있다고 알려져 있다. 마우스 embryonic hepatocyte에서 glucose/glucose oxidase(G/GO)로부터 유도된 apoptosis를 억제시키며, nitric oxide(NO)의 생성을 촉진한다고 보고되었다. 느릅나무 수피 메탄올 추출물의 위미란(gastric erosion) 및 위궤양(ulcer)에 대한 효과가 보고되어 있고, 느릅나무 뿌리껍질의 부탄올 분획이 간암 세포인 Hep G2에서 증식 억제 작용이 뛰어나고 항암제와 병용 처리시 항암제의 작용을 증가시킨다고 보고되었으며 느릅나무 메탄올 추출물의 부탄올 분획에서 macrophages 내 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 저하에 따른 NO 합성을 억제함으로써 큰포식세포의 세포사멸을 억제한다고 보고하였다. 또한 느릅나무 뿌리껍질의 메탄올 추출물이 간접돌연변이원에 대한 항돌연변이 효과가 높고, 마우스 embryonic cell에서 발암성을 억제하는 데 효과가 있으며, 위암 세포주에 대해 세포 독성 억제 효과가 있는 것으로 보고하였다. 은 등은 유근피의 부탄올 분획의 HepG2 세포에 대한 증식억제효과 및 기존 항암제와 병용했을때의 항암 상승작용 등을 보고하였다.

<특허>

느릅나무에 관한 국내 특허를 조사한 결과 느릅가루를 1차적인 가공에 이용한 예가 전부이며 구체적인 예를 보면 다음과 같다.

- 느릅나무 엑기스 제조방법; 느릅나무 껍질에 물을 넣어 항아리에 담아 맥반석, 원적외선으로 엑기스 추출하는 법
- 느릅 침출차의 제조방법: 느릅나무껍질을 가압증숙, 건조, 분쇄하여 티백포장
- 느릅을 이용한 채소 또는 곡물의 재배방법: 느릅혼합물 이용 곡류, 채서 발아, 느릅분말 혼합퇴비 이용 곡물, 채소 재배 방법
- 느릅함유기능성 주류제조방법: 느릅미세분말, 백미, 누룩첨가 술 제조

- 느릅콩나물재배 방법/ 느릅두부제조방법| 느릅 이용 가축사료 첨가제
- 느릅뿌리를 이용한 냉면제조방법 ; 느릅나무 뿌리가루를 2-5% 첨가 상법에 의한 냉면제조
- 느릅나무 추출액과 한약재에 황토�분말을 이용한 천연황토 미용팩 제조 방법
- 느릅빵: 느릅가루를 0.5-5% 첨가하여 상법에 의한 빵 제조

제 2장 국외 관련기술의 현황

느릅나무 추출물의 국외 기술현황을 보면, Wang 등이 느릅나무 80% 에탄올 추출물이 MCF-7 및 A375-S2의 암세포에 대해 세포증식억제효과를 보이며 암세포의 apoptosis를 유도한다고 보고가 거의 유일한 수준이며 특허도 주로, 국내연구자에 의하여 출원된 특허의 조성원료로서 이용되고 있다. 즉, 치주질환 예방 조성물의 한 원료로서 느릅나무 알콜추출물이 혼합되어 있으며(LG chemical LTD., USA patent), 신규항암제 조성물 생약원료의 하나로서 포함되어 있다(김 송배, 일본특허).

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 느릅나무 추출물의 *in vitro* 생리활성 평가

본 절에서는 느릅나무의 추출물과 추출물을 분획한 분획물의 산화적 스트레스 억제 활성을 DPPH, radical scavenging activity, TBARS 생성억제능으로 평가하였으며, 뇌신경세포를 이용하여 β -amyloid protein 유도 세포독성에 대한 보호능을 MTT assay로 평가하였고 apoptosis 관련 단백질의 발현을 western blot analysis로 분석하였다. 또한 acetylcholinesterase 억제활성을 평가하였고, 뇌신경세포에서 glutamate induced ROS 생성 억제능을 DCF-DA를 이용하여 평가하였다.

제 1 항 재료 및 방법

1. 시료의 추출

본 실험에서 사용한 느릅나무는 얼음골 토종식물 영농조합(경북)에서 구입하여 근피와 수피로 각각 분리하여 세척한 후 건조시켜 사용하였다. 건조된 느릅나무의 근피 및 수피를 40mesh의 크기로 분쇄하여 시료의 15배에 해당하는 80% 에탄올을 첨가한 다음 상온에서 18시간 동안 추출하여 여과하였다. 그 후에 rotary evaporator로 감압농축하여 이를 에탄올 추출물로 하였다. 얻어진 에탄올 추출물은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올의 순서로 극성을 달리하여 분획하였으며 순차용매분획으로부터 얻어진 분획물은 감압상태에서 용매를 제거하여 시료로 사용하였다.

2. 산화적 스트레스 억제활성 측정

가. Brain에서의 산화적 스트레스 억제활성

산화적 스트레스 억제활성은 rat (Sprague-Dawley, 웅성, 6주령)의 whole

brain을 적출하여 균질화 시킨 후 산화 스트레스 유발물질로서는 $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 를 사용하여 생성하는 TBARS 함량을 Ohkawa 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 뇌조직에 $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 와 각 시료를 농도별로 첨가하여 37°C에서 20분 동안 incubation하여 20% acetic acid 1.5 ml, 8.1% SDS 0.2 ml과 0.8% TBA 1.5 ml을 첨가한 후 100°C에서 40분간 가열하였다. 이후에 원심분리를 통하여 얻은 상층액을 분광광도계 (UV/VIS spectrophotometer, V-530, Jasco, Japan)를 이용하여 532 nm에서 측정하였다. 산화적 스트레스 저해활성은 시료 첨가군 흡광도와 증류수를 대조군으로 한 흡광도로부터 계산하여 활성을 비교하였다.

나. DPPH Free radical 소거능 측정

DPPH free radical 소거능은 Blois(18)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 적절한 농도로 희석된 각 시료 0.2 ml과 4×10^{-4} M의 DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)용액 0.8 ml을 첨가한 후 실온에서 15분간 방치한 뒤, 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 신경세포독성 보호효과 측정

가. 세포배양

본 실험에서 사용한 세포주는 rat pheochromocytoma PC 12로써 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양받아 10% inactivated horse serum (GIBCO, USA)과 5% fetal bovine serum (GIBCO, USA)이 첨가된 RPMI 1640 (GIBCO, USA, 25 unit/ml penicillin, 25 unit/ml streptomycin)배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하였다. 배지는 2일에 한번씩 교체하였으며, 4-5일에 한번씩 계대배양 하였다.

나. β -amyloid protein 및 L-glutamate 유도 세포독성에 대한 생존율 측정

세포 독성은 MTT 환원 방법을 이용하여 측정하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 측정은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 함유된 dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로

전환되는 양을 측정하는 방법으로 먼저 적절히 배양된 세포를 2.5×10^4 cell/well 수준으로 96 well plate에 접종한 다음, 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 β -amyloid 및 L-glutamate를 각각 30 μ M 및 20 mM의 농도로 처리하여 세포독성을 유발시켰으며 동시에 실험시료를 농도별로 첨가하여 48시간 더 배양을 시킨 후 MTT 시약 (50 μ g/well)을 첨가하고 4시간이 지난 다음 ELISA microplate reader (Molecular devices, THERBO Emax, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 측정된 대조구의 흡광도를 100으로 하여 percent(%)로 나타내었다.

다. Cellular Reactive Oxygen Species (ROS) 측정

적절히 배양된 PC 12 세포를 2×10^6 cells 수준으로 60 mm dish에 접종한 다음, 24시간 동안 배양하였다. 배양시킨 후, 20 mM의 glutamate로 산화적 스트레스를 유발시켰으며 동시에 실험시료를 일정농도로 첨가하여 4시간을 배양하였다. 생성된 ROS의 양을 측정하기 위하여 DCF-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate)를 10 μ M 되도록 첨가하여 30분간 37 $^{\circ}$ C에서 추가로 배양한 다음 fluorescence plate reader(Ex 485nm, Em 538, Labsystem, USA)을 이용하여 측정하였다. 결과는 측정된 대조구의 흡광도를 100으로 하여 percent (%)로 나타내었다.

제 2 항 실험결과

1. 산화적 스트레스 억제활성

가. Brain에서의 산화적 스트레스 억제활성

Rat brain 조직을 $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 로 산화스트레스를 유발시킨 후 과산화 지질 생성정도를 TBARS로 측정하였으며 느릅 각 부위별 에탄올 추출물과 각 분획물의 활성을 측정하였다. 느릅 잎의 에탄올 추출물과 각 분획물에 대한 과산화 지질 생성억제능을 조사한 결과 부탄올과 물 획분을 제외한 나머지 분획물은 에탄올 추출물에 비하여 높은 활성을 나타내었다. 각 분획물 중에서는 에틸아세테이트 획분에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 다음은 클로로포름, 헥산 획분이었으며 각 획분 모두 첨가농도가 높을 수록 높은 활성을 나타내어 용량의존적 반응을 나타내었다. 줄기에서도 역시 에틸아세테이트 획분에서 가장 높은 활성을 나타내었고 다음은 부탄올 획분이 매우 높은 활성을 나타내었으며 용량의존적 반응을 보였다. 뿌리에서도 에틸아세테이트, 부탄올 획분, 물 획분의 순으로 높은 활성을 보였다. 느릅나무 잎, 줄기, 뿌리 분획물을 전반적으로 비교해보면 부위별로는 줄기와 뿌리부분이 전반적으로 높은 억제활성을 나타내었고 분획물중에서는 에틸아세테이트 분획과 부탄올 분획물에서 높은 과산화지질의 생성 억제율을 보여 주고 있다 (Figure 1-1.)

나. DPPH Free radical 소거능 측정

느릅 부위별 추출물과 각 분획물의 DPPH radical scavenging activity를 나타내었다 (Fig. 1-2). 전반적으로 보아 부위별로는 잎 보다는 줄기와 뿌리에서 비교적 높은 활성을 나타내었으며 분획물중에서는 잎, 줄기, 뿌리 모두 에틸아세테이트 획분에서 활성이 가장 높았으며 각 부위 모두 헥산 획분에서는 활성이 가장 낮은 것으로 나타났다. 또한 대부분의 시료에서 첨가 농도가 높을수록 높은 활성을 나타내어 용량 의존적 반응을 나타내었다.

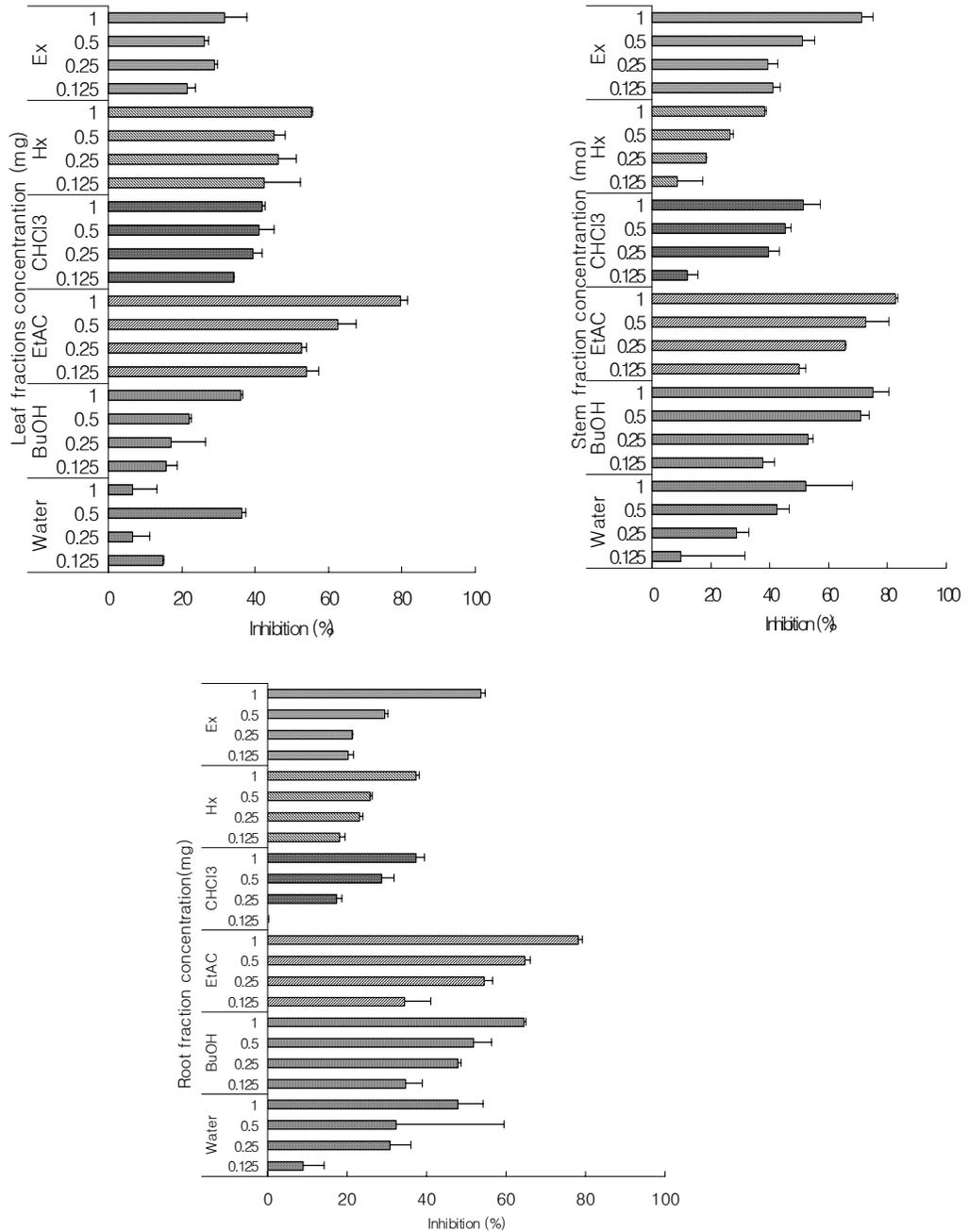


Fig. 1-1. Effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on TBARS formation.

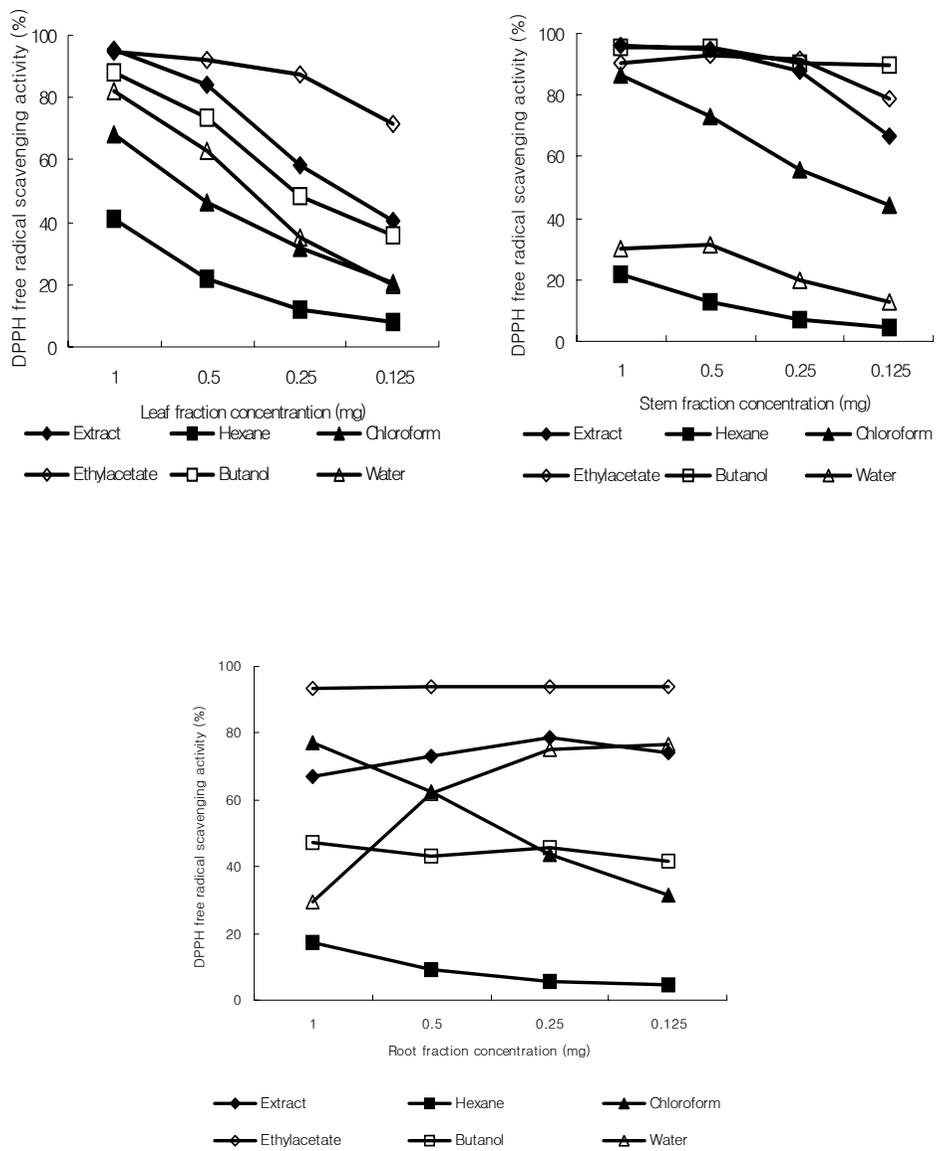


Fig. 1-2. Effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on DPPH radical scavenging activity.

2. 신경세포독성 보호효과

가. β -amyloid protein 및 L-glutamate 유도 세포독성 보호효과

β -amyloid protein fragment 25-35를 30uM의 농도로 첨가하여 세포사멸을 유도하였으며, 느릅나무 잎, 줄기, 뿌리의 추출물과 분획물을 첨가하여 세포사멸억제 능력을 MTT assay를 통하여 알아보았다(Fig. 1-3). 잎의 경우 에틸아세테이트 분획층에서 80%의 세포생존율을 보여 주고 있으나, 헥산과 클로로포름층에서는 7%의 세포생존율을 나타내고 있다. 줄기에서는 헥산과 클로로포름층을 제외한 추출물과 분획층에서 고른 세포생존율을 나타내고 있다. 추출물은 79%, 에틸아세테이트층은 91%로 가장 높고 다음은 부탄올층이 83%를 나타내었고 물층은 76%의 세포생존율을 나타내고 있다. 줄기 역시 헥산과 클로로포름층은 6%, 7%의 낮은 세포생존율을 보여주었다. 뿌리에서는 잎, 줄기를 모두 에틸아세테이트 층에서 97%의 세포생존율을 나타내었고 헥산층은 5%의 낮은 세포생존율을 나타내었다.

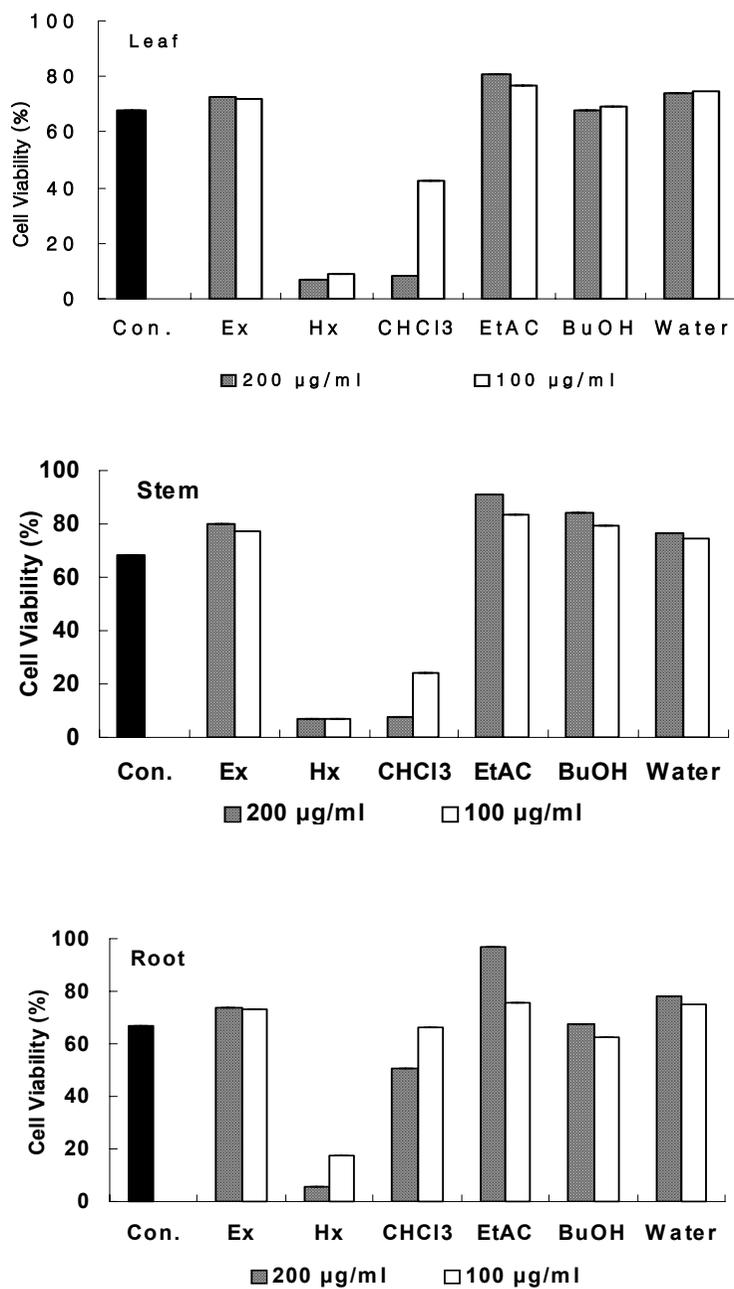


Fig. 1-3. Effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on β -amyloid induced cytotoxicity in PC 12 cells.

Fig. 1-4에서는 PC 12 cell에 있어서 느릅나무 에탄올 추출물의 각 분획물이 glutamate로 유도된 세포독성에 미치는 영향을 나타내었다. L-glutamate를 20 mM의 농도로 첨가하였을 때 46%의 세포사멸을 유도하여 약 54%의 세포생존율을 나타내었다. 그러나 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 획분을 첨가함으로써 생존율이 증가하여 에틸아세테이트 획분은 normal에 대하여 76.98%, 부탄올 획분은 67.52%의 생존율을 나타내어 glutamate에 의한 세포독성을 억제하였다. 그러나 이러한 세포독성의 억제능은 수피의 분획에서는 나타나지 않았으며 오히려 핵산 및 클로로포름 분획에서는 control 보다 더 낮은 생존율을 나타내어 세포독성이 오히려 촉진되는 경향을 나타내었다. 뇌 속에 과다하게 축적된 glutamate는 활성산소종을 축적시키고 뇌신경 세포벽의 지방산화를 촉진함으로써 뇌신경세포의 사멸을 촉진하고 알츠하이머와 같은 질환을 야기시키는 것으로 알려져 있으며 Choi 및 Murphy 등은 뇌 속의 glutamate 과다 축적은 세포내에 Ca^{2+} 이온의 항상성의 불균형에 의한다고 보고하였다. 또한 Bondy 등은 kinate와 같은 glutamate receptor agonist에 의하여 뇌세포의 free radical 형성이 증가하였다고 보고하였으며, Seyfreid 등은 glutamate에 의하여 유도된 PC 12 cell의 세포사멸은 flupirtine과 같은 NMDA receptor antagonist에 의하여 감소될 수 있다고 제안하였다. 이러한 점으로 미루어 볼 때 느릅 근피 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 및 부탄올 획분은 신경세포의 보호능이 있는 것으로 판단되었다

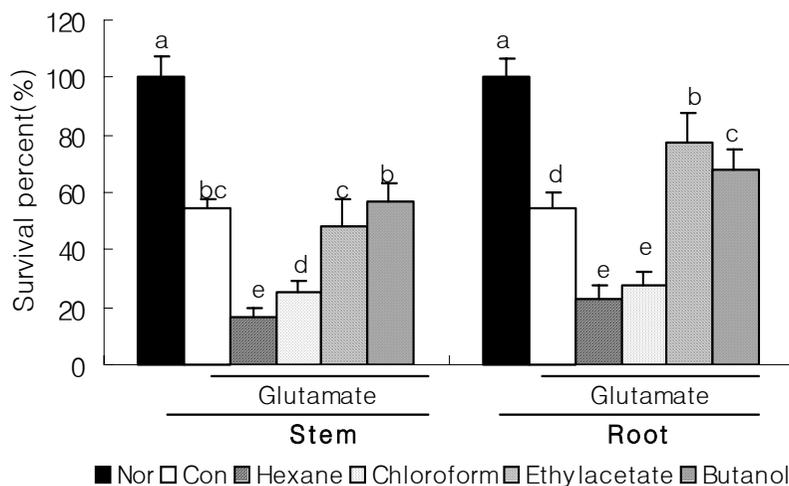


Fig. 1-4. Effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on L-glutamate induced cytotoxicity in PC 12 cells. Different alphabet letters mean significant difference ($p < 0.05$)

다. Cellular Reactive Oxygen Species (ROS) 측정

H_2O_2 와 같은 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 단순히 호흡과정에서 생성되는 부산물로 여겨져 왔으나 최근에 이르러 활성산소종은 외부자극에 의하여 세포막에 존재하는 수용체를 통하여 일시적으로 생성되며, 세포내 활성산소의 증가는 세포의 사멸과 관계가 있으며 특히, glutamate는 세포내 ROS를 형성함으로써 신경세포사멸을 초래하는 것으로 보고되어 있다. 세포내 생성된 ROS는 비형광을 나타내는 DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 산화시켜 형광물질인 DCF로 전환시키는데 이렇게 전환된 형광물질의 양을 세포내 생성된 ROS로 간주하였다. 본 실험에서는 glutamate에 의한 ROS 형성의 증가를 억제하는 느릅나무의 효과를 PC 12 cell을 이용하여 검토하였다. Fig. 1-5는 glutamate가 세포내 ROS 형성에 미치는 영향을 나타내었다. Glutamate는 PC 12 세포내의 DCF fluorescence intensity를 유의적으로 증가시켜 10 mM의 농도에서는 무처리구에 비하여 약 1.67배가 증가하였으며, 20 mM 및 30 mM에서는 각각 3.49배, 3.88배로 농도 의존적으로 증가하여 glutamate가 세포내 ROS를 증가시킴을 확인하였다. Fig. 1-6에서는 느릅나무의 수피 및 근피의 각 분획물이 glutamate에 의한 세포내 ROS 형성을 억제하는 효과에 대하여 나타내었다. 20 mM의 glutamate를 첨가함으로써 약 3.65배 증가한 DCF fluorescence intensity는 수피의 부탄올 획분 및 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 획분에서 형광정도가 유의적으로 감소하여 세포내 ROS의 형성이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 느릅나무 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 및 부탄올 획분에서의 세포내 ROS의 생성 억제능은 glutamate에 유도되는 세포사멸을 억제하는 한 요인으로 생각할 수 있다. 그러나 헥산 및 클로로포름 획분에서는 glutamate만을 첨가했을 경우보다 더욱 강한 fluorescence intensity를 나타내어 세포내 ROS의 형성을 억제하지 못하는 것으로 나타났다. Fig. 1-4에서 보여진 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 획분에서의 glutamate에 의한 세포사멸의 억제효과는 세포 내 ROS의 형성이 효과적으로 억제된 선행된 결과에서 일부분 설명될 수 있을 것이다. 즉, glutamate에 의한 세포사멸은 세포내 생성된 ROS에 의하며, 이러한 ROS의 형성은 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 획분에 의하여 억제되어 궁극적으로 신

경세포의 사멸을 억제하는 것으로 사료되었다.

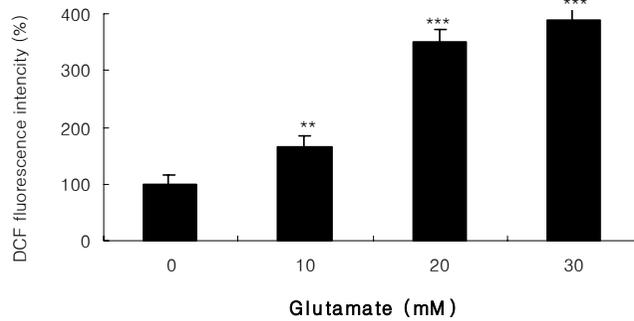


Fig. 1-5. Effect of L-glutamate on the intracellular ROS formation. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with glutamate negative group)

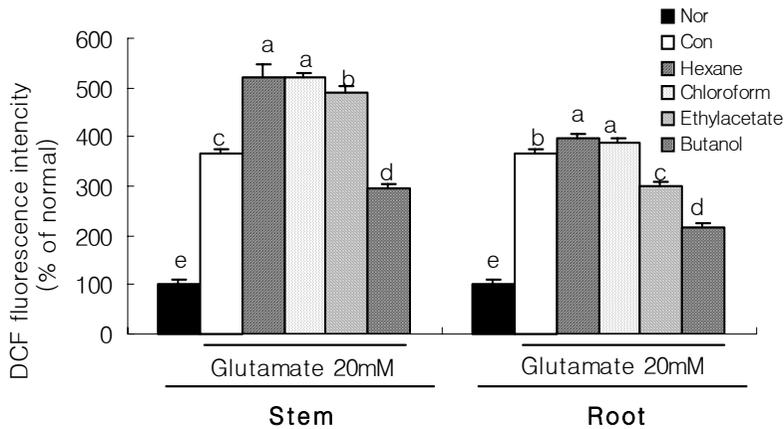


Fig. 1-6. Effect of *Ulmus davidiana* var, *japonica* on the cellular ROS formation in L-glutamate-induced PC12 cells. Different alphabet letters mean significant difference ($p < 0.05$)

제 2 절 느릅나무 추출물의 지질대사 및 기억력 손상 예방에 미치는 영향 (*in vivo*)

제 1 항 느릅나무 추출물이 지질대사 및 항산화체계에 미치는 영향

1. 느릅나무식이섬유가 지질대사 및 항산화 체계에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

1) 시료의 추출 및 조제

강원도에서 구입한 느릅나무의 뿌리를 정선, 수세하여 건조시킨 후 분쇄기로 4-5절 정도가 되도록 분쇄하였다. 여기에 10배의 증류수를 가하여 65-70℃의 수조에서 24시간 동안 가열추출하였다. 수용성 성분을 충분히 추출한 다음 추출액을 여과포에 걸러 4배의 95% 에탄올을 가하여 하룻밤 방치하여 식이섬유를 침전하였다. 이와같이 얻어진 수용성 식이섬유를 40℃ 열풍건조기에서 24시간 건조시킨 후 ball mill을 이용하여 입자를 분쇄한 후 시료로 사용하였다.

2) 실험동물의 사육 및 식이조성

느릅나무로부터 추출한 식이섬유가 고콜레스테롤 식이를 섭취한 흰쥐의 체내 지질수준 및 항산화체계에 미치는 영향을 검토하기 위하여 사용한 실험동물은 SD rat (4주령, male) 으로 실험 시작 전 1주일간 고형배합사료를 급여하면서 변화된 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 적응 기간 후 쥐들을 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 10마리씩 4군으로 정상군(normal), 고콜레스테롤 대조군(control), 느릅나무 식이섬유군(2.5% 및 5%)으로 분류하여 4주간 사육하였다. 실험에 사용한 식이의 구성은 Table 2-1과 같으며, 모든 식이는 AIN-76 diet 조성에 준하여 조제되었다. 고콜레스테롤 대조군의 식이에는 표준식이에 1%의 콜레스테롤을 첨가하였고, 느릅나무 식이섬유군에는 1%의 콜레스테롤과 기본식이에 포함된 5%의 cellulose를 느릅나무 수용성 식이섬유로 각각 50% 및 100% 대체하여 느릅나무 식이섬유가 2.5% 및 5%가 되도록 구성하였다. 사육실은

실내온도 23±2°C, 습도 60±5%로 유지되었으며 12시간 주기로 조명을 조절하였다. 체중 및 식이섭취량은 주 1회 일정한 시간에 측정하였다.

Table 2-1. General composition and contents of high cholesterol diet

(g/kg diet)

Ingredients	Normal	1% Cholesterol		
		HCCon ⁴⁾	HCLF ⁵⁾	HCHF ⁶⁾
Corn starch	150	137.5	137.5	137.5
Casein	200	200	200	200
Sucrose	500	500	500	500
Cellulose	50	50	25	
U-SF ¹⁾			25	50
Corn Oil	50	50	50	50
Cholesterol		10	10	10
Cholate		2.5	2.5	2.5
Mineral Mixture ²⁾	35	35	35	35
Vitamin Mixture ³⁾	10	10	10	10
Clolin bitartate	2	2	2	2
Methionine	3	3	3	3

1) Soluble fiber from Ulmus roots bark, 2)AIN-76 mineral mixture, 3)AIN-76 vitamin mixture, 4) 1% cholesterol diet group with 5% cellulose, 5) 1% cholesterol diet group with 2.5% cellulose and 2.5% U-SF, 6) 1% cholesterol diet group with 5% U-SF

3) Biomarker 분석

가) 혈액과 장기 및 분변의 채취

실험 동물을 희생하기 4일 전부터 대사장 (metabolic cage)에서 12시간씩 2회에 걸쳐 24시간 동안의 변을 채취하였는데, 이때 식이에 의해 변의 성분이 오염되는 것을 막기 위하여 식이 그릇을 넣어주지 않았다. 첫째 날에는 오후 9시부터 다음날 오전 9시까지 변을 채취하였고, 그 날 오전 9시부터 다음날 오전 9시까지는

본래의 사육장에서 식이를 섭취하도록 한 후 변 채취 3일째에는 오전 9시부터 오후 9시까지 12시간 동안 대사장에서 변을 채취하였다. 이와 같이 12시간씩 두 번 채취한 변을 합쳐 1일간의 변으로 간주하였다. 이 기간 중 물은 제한 없이 공급하였으며 채취한 변은 무게를 측정 후 -20°C 에서 냉동 보관하였다.

실험기간이 종료된 실험동물은 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 10 ml 주사기를 이용하여 복부대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리관에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 2,800 rpm, 4°C 에서 30분간 원심분리 (Refrigerated multi-purpose centrifuge union 55R, Hanil, Korea)하여 적혈구와 혈청을 분리하고, 분리된 혈청은 -70°C deep freezer에 보관하였다.

혈액을 채취한 후 간은 ice bath에서 즉시 떼어 ice cold saline에 세척한 다음 여지로 물기를 제거하여 무게를 측정하고 바로 -70°C deep freezer에 보관하여 지질의 양을 측정하는데 사용하였다. 그 외 신장, 비장, 부고환지방의 무게를 측정하였다.

나) 혈청 중 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤

혈청의 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도는 (주) 신양화학의 혈액분석용 kit를 이용하여 효소법으로 분석하였다. 총 콜레스테롤은 Cholestezyme-V, 중성지방은 Triglyzyme-V 및 HDL-콜레스테롤은 HDL-C555를 이용하여 분석하였으며 LDL-콜레스테롤의 함량은 측정된 콜레스테롤의 함량으로부터 계산하여 산출하였다.

다) 간 중 총 지방, 중성 지방 및 총 콜레스테롤

간의 총 지질함량의 측정을 위하여 Folch으로 지질을 추출하여 총 지질농도를 측정하였고 간의 중성 지방과 콜레스테롤 농도는 추출한 총 지방을 클로로포름 methanol로 녹여 혈청에서와 같은 방법으로 kit를 이용하여 측정하였다.

라) 변 중 총 지방, 중성 지방 및 총 콜레스테롤

변의 총 지방 배설량 측정을 위하여 냉동 보관되었던 변을 105°C 의 drying

oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 desiccator에서 식힌 후 무게를 측정하고 지방분석을 하였다. 변의 경우 0.2~0.3 g씩 취하여 간과 같은 방법으로 총 지방을 측정한 후, 이를 1일 총 지방 배설량으로 환산하였다. 분변의 중성 지방과 콜레스테롤 배설량은 변에서 추출한 총 지방을 클로로포름으로 녹여 혈장과 같은 방법으로 kit를 이용하여 측정하였다.

마) 간 중 과산화지질의 함량 측정

간 중 지질 과산화물 함량은 조직의 일정량을 Teflon Potter-Elvehjem homogenizer로 마쇄하여 얻은 균질액을 과산화지질 분석을 위한 시료로 사용하였다. 지질 과산화물 분석은 Ohkawa 등의 방법에 따라 분석하였으며, 표준물질로서는 1,1,3,3,-tetraethoxypropane을 사용하였다.

바) 간 중 항산화효소의 활성 측정

항산화계 효소 중 catalase, superoxide dismutase (SOD) 및 glutathione peroxidase (GPx) 활성을 간에서 측정하였다. 간 조직 무게 10배 volume의 0.25 M sucrose/0.5 M EDTA buffer를 가하여 빙냉하에 homogenizer로 분쇄하였으며, 이때 얻은 균질액을 1000×g에서 5분간 원심분리 (Rotary vacuum evaporator R-114, Swiss)하여 상층액을 catalase 효소원으로 사용하였다. 이 상층액을 다시 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 SOD와 GPx 활성 측정에 사용하였으며, 조제된 시료는 분석 시까지 -70℃에서 냉동 보관하였다. Catalase는 hydroperoxide가 분해 되는 정도를 측정하는 Aebi의 방법에 준하였으며, SOD 활성은 Marklund의 방법, GPx는 Lawrence와 Burk의 방법을 사용하였다.

사) 혈청 중 vitamin E의 함량 측정

Chen 등의 방법을 변형하여 혈청 100 µL에 900 µL methanol을 첨가하여 강하게 vortex mixing하여 825 g에서 5분간 원심분리하였고 상정액만을 0.45 µm filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. Nova-Pak C18 (3.9 × 150 mm) column을 사용하여 0.8 mL/min의 유동속도로 용매를 흘려주었으며, 용매로는 acetonitrile,

methanol, isopropanol, 1% acetic acid를 이용하여 time course gradient 조건하에서 fluorescence detector (Jasco FP-2020, Japan)를 사용하여 excitation 298 nm, emission 328 nm에서 측정하였다.

아) 단백질 정량

각 효소원의 단백질량은 Lowry법에 의하여 정량하였고 표준검량선 작성을 위해서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

자) 통계처리

실험결과는 SAS는 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 나타내었으며 각 군의 유의차 검정은 분산분석을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 duncan's multiple range test를 실시하였다.

나. 실험결과

1) 지질대사에 미치는 영향

가) 체중, 식이섭취량 및 장기무게

Cellulose가 첨가된 고콜레스테롤 식이(HCCon)와, 느릅나무 추출물로부터 추출한 수용성 식이섬유(U-SF)로 cellulose를 50%(HCLF) 및 100%(HCHF)로 각각 대체하여 제조한 식이를 섭취한 실험동물의 체중, 식이섭취량 등을 Table 2-2에 나타내었다. 실험 개시시의 체중은 약 147g 였으나 4주간 실험식이를 섭취시킨 후의 체중 및 체중증가량은 콜레스테롤을 급여하지 않은 정상군에 비하여 고콜레스테롤 대조군에서 대체로 높게 나타났다. 이러한 증가는 cellulose를 U-SF로 대체함으로써 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 식이 섭취량 역시 처리군들 간에 유의차가 나타나지 않았다. 실험동물의 장기무게를 (Table 2-3)를 보면, 우선 정상군의 간 무게는 3.56g이었으나 고콜레스테롤 식이를 섭취한 대조군에서 5.86g으로 크게 증가하였고 U-SF로 cellulose를 대한 처리군 (HCLF, HCHF)에서는 유의하게 감소하였다. 신장 및 비장의 무게는 큰 변화를 나

타내지 않았으나 신장주변 지방 및 부고환 지방의 경우는 대조군에 비하여 HCHF 군에서 유의하게 감소하였다.

Table 2-2. Body weight gain and food intake of the fed experimental for 4 weeks.

	Normal	1% Cholesterol		
		HCCon ⁴⁾	HCLF ⁵⁾	HCHF ⁶⁾
IBW (g) ¹⁾	147.72±1.57 ^{NS3)}	147.85±1.60	147.18±1.85	147.22±1.75
FBW (g) ²⁾	355.76±4.78 ^{NS}	366.53±5.46	357.37±7.08	351.84±6.50
Weight gain (g/4weeks)	208.04±5.69 ^{NS}	218.68±6.18	210.19±6.77	204.61±6.18
Food intake (g/day)	20.44±0.12 ^{ab4)}	20.82±0.11 ^a	20.79±0.07 ^a	20.33±0.02 ^b

1) Initial body weight, 2) Final body weight 3)NS: not significant 4) Values are means±SE (n=10) and those in the some row not sharing common superscript letter are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. 3)NS: not significant

Table 2-3. Organ tissue weights of the fed experimental for 4 weeks.

	Normal	1% Cholesterol		
		HCCon ⁴⁾	HCLF ⁵⁾	HCHF ⁶⁾
Liver (g/100g b.w)	3.56±0.08 ^c	5.86±0.15 ^a	5.38±0.13 ^b	5.18±0.14 ^b
Kidney (g/100g b.w)	0.72±0.05 ^{NS}	0.78±0.01	0.79±0.01	0.75±0.01
Spleen (g/100g b.w)	0.25±0.01 ^{NS}	0.28±0.02	0.27±0.01	0.26±0.01
Retroperipheral kidney adipose tissue (g/100g b.w)	1.84±0.11 ^a	1.72±0.07 ^a	1.39±0.01 ^b	1.21±0.07 ^b
EFP (g/100g b.w)	1.35±0.09 ^a	1.15±0.09 ^a	1.16±0.11 ^a	0.90±0.03 ^b

나) 분변 중 지질함량

실험쥐의 배변량은 정상군에 비하여 고콜레스테롤 대조군에서 유의하게 감소하였고 cellulose를 U-SF로 대체한 느릅식이섬유군에서는 대조군에 비하여 유의하게 증가하여 정상군과 유사한 수준을 나타내었다. 또한 변의 수분 함량은 정상군에 비하여 콜레스테롤 대조군에서 유의적으로 감소하였으나 U-SF의 함량이 높아짐에 따라 유의적으로 증가하였다(Table 2-4). 본 실험에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 U-SF를 급여한 실험쥐의 체중이 대조군보다 낮아진 것은 일반적으로식이섬유가 장내에서 영양소 흡수를 감소시키는 효과와 함께 배변량을 유의적으로 증가시킨 요인으로 설명할 수 있을 것이다. 식이섬유 첨가 식이 실험쥐의 변 배설량이 많고 상대적으로 높은 수분함량을 보인 것은 선행된 연구자들의 보고한 바와 일치하였으며 아울러 본 실험에서 사용한 느릅나무 뿌리로부터 추출한 수용성 식이섬유가 정상군 및 대조군에서 사용한 식이섬유인 cellulose보다 보습효과가 높고 분자량이 매우 큰 섬유상을 형성할 것으로 추측되었다. 또한 분변중으로 배설되는 총지방함량은 정상군에 비하여 고콜레스테롤 대조군에서 약 1.8로 유의하게 증가하였고 느릅식이섬유 추출물군은 고콜레스테롤 대조군에 비하여 증가하였고 첨가량에 비례하였다. 총 콜레스테롤 배설량에 있어서도 총 지질함량과 유사한 경향을 나타내어 느릅나무식이섬유가 체내 지질의 배설을 촉진하는 것으로 나타났다.

Table 2-4. Effect of U-SF on the fecal weight and fecal lipids profile.

	Normal	High cholesterol diet		
		HCCon	HCLF	HCHF
Fecal weight (g/day)	3.26±0.56 ^a	2.72±0.29 ^b	3.15±0.42 ^a	3.18±0.22 ^a
Fecal moisture (%)	34.57±3.99 ^b	23.56±2.94 ^c	33.91±2.39 ^b	48.73±2.91 ^a
Total lipid (mg/g)	48.85±4.21 ^c	86.4±2.28 ^b	92.63±4.50 ^{ab}	99.86±0.84 ^a
Total cholesterol	2.49±0.45 ^c	40.14±0.92 ^b	41.44±2.04 ^b	52.17±1.92 ^a
Triglycerides	0.39±0.03 ^b	1.00±0.13 ^a	0.88±0.07 ^a	0.86±0.12 ^a

다) 혈청 중 지질함량

느릅나무 뿌리로부터 추출한 수용성 식이섬유(U-SF)를 급여한 실험쥐 혈청의 콜레스테롤, 중성지방 및 HDL-콜레스테롤 함량을 측정하여 Table 2-5에 나타내었다. 고콜레스테롤 대조군의 경우, 식이에 1% 콜레스테롤을 첨가함으로써 total cholesterol이 유의하게 증가하였다. 그러나 이러한 혈 중 콜레스테롤의 증가는 cellulose를 U-SF로 대체함으로써 유의하게 감소하는 경향을 나타내었으며 이러한 경향은 농도의존적으로 나타났다. 또한 중성지방의 경우 고콜레스테롤 대조군과 정상군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 cellulose를 U-SF로 대체함으로써 정상군보다도 더 낮은 중성지방을 나타내어 고콜레스테롤증 뿐만 아니라 고지혈증에도 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료되었다. HDL cholesterol은 고콜레스테롤 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 낮아졌으며 이러한 감소는 U-SF의 첨가에 의해 영향을 받지 않은 것으로 나타났으나 HDL:Total cholesterol ratio는 cellulose를 100% 대체한 HCHF 군에서 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. LDL cholesterol 역시 고콜레스테롤 대조군에서 증가하였으나 HCHF 군에서 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과로 느릅나무로부터 추출한 수용성 식이섬유는 실험쥐의 혈중 콜레스테롤 및 지질대사에 유의적인 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

Table 2-5. Effect of U-SF on the serum lipids profile. (unit:mg/dl)

	Normal	High cholesterol diet		
		HCCon	HCLF	HCHF
Total cholesterol	98.24±3.26 ^c	177.81±11.47 ^a	159.43±8.60 ^{ab}	149.58±4.63 ^b
Triglycerides	140.8±7.32 ^a	144.09±5.52 ^a	107.11±3.13 ^b	101.82±5.26 ^b
HDL cholesterol	72.66±3.11 ^a	46.25±1.25 ^b	46.35±2.14 ^b	47.39±1.31 ^b
LDL cholesterol	70.94±3.29 ^c	152.52±4.19 ^a	142.64±4.28 ^a	123.03±4.21 ^b
HDL:Total cholesterol ratio	0.74±0.02 ^a	0.27±0.02 ^c	0.27±0.13 ^c	0.36±0.04 ^b

라) 간 중 지질함량

간장 중의 콜레스테롤, 중성지방 및 총 지질함량등을 측정한 결과는 Table 2-6 과 같다. 총 지질의 함량은 정상군에 비해 고콜레스테롤 대조군에서 유의적으로 높았으나 느릅나무 뿌리로부터 추출한 수용성 식이섬유(U-SF)를 급여함으로써 유의적으로 감소하였다. 그러나 HCLF와 HCHF간의 유의차는 인정되지 않았다. 간장중의 콜레스테롤 및 중성지방의 함량 역시 정상군에 비해 고콜레스테롤 대조군에서 유의적으로 증가하였으나 U-SF를 급여함으로써 유의적으로 감소하였다. 본 실험의 정상군 및 고콜레스테롤 대조군에서 식이성 섬유소로 사용한 cellulose는 불용성 식이섬유로, 혈장과 조직중의 중성지방 및 콜레스테롤의 농도에 영향을 미치지 않거나 오히려 증가시킨다는 보고가 있다. 그러나 본 실험에서 사용한 느릅나무수용성 식이섬유는 간의 중성지방 및 콜레스테롤, 총 지방함량의 농도를 현저히 저하시켜 간중 지방 profile의 개선에 효과적임을 나타내었다.

Table 2-6. Effect of U-SF on the contents of liver lipids profile.

	Normal	High cholesterol diet		
		HCCon	HCLF	HCHF
Total lipid (mg/g)	71.74±4.04 ^c	206.84±6.57 ^a	168.34±4.55 ^b	155.96±4.15 ^b
Total cholesterol (mg/g)	4.44±0.32 ^c	43.95±3.14 ^a	39.15±1.97 ^{ab}	32.30±1.26 ^b
Triglycerides(mg/g)	19.80±2.43 ^d	52.89±1.33 ^a	42.47±2.43 ^b	32.30±1.26 ^c

2) 항산화체계에 미치는 영향

가) 간 중 과산화지질의 함량

고콜레스테롤 식이의 급여는 간 중 과산화지질의 함량을 근소하게 상승시키

는 것으로 나타났다. cellulose를 U-SF로 100% 대체한 HCHF에서 다소 낮아지는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 인정되지 않았다(Table 2-7).

Table 2-7. Contents of TBARS in liver of rat

	Normal	High cholesterol diet		
		HCCon	HCLF	HCHF
TBARS (nmole / g liver)	165.26±3.23 ^{NS}	169.33±5.57	164.43±3.21	159.65±2.83

나) 간 중 항산화효소의 활성

전체적으로 고콜레스테롤 식이는 catalase 및 GPx의 활성의 유의적인 증가를 초래하였으며 이와 같이 증가된 활성은 cellulose를 U-SF로 대체하였을때 다소 낮아지는 경향을 나타내었다(Table 2-8). 항산화효소의 활성은 생성된 과산화지질의 농도와 비례한다는 연구보고에 미루어 고콜레스테롤 대조군에서 근소하게나마 상승한 지질과산화물에 의하여 catalase 및 GPx의 활성이 증가하였으며, HCLF 및 HCHF에서의 항산화효소의 활성의 감소는 위의 처리군에서 감소한 지질과산화물에 기인하는 것으로 사료되었다.

Table 2-8. Antioxidant enzyme activities in liver

	Normal	High cholesterol diet		
		HCCon	HCLF	HCHF
Catalase (unit/min/mg pro.)	51.99±1.09 ^{ab}	55.95±1.71 ^a	49.33±1.76 ^{bc}	46.42±1.31 ^c
SOD (unit/min/mg pro.)	4.58±0.08 ^{NS}	4.52±0.16	4.57±0.12	4.25±0.10
GPx (nmole/min/mg pro.)	285.82±8.82 ^b	340.48±20.62 ^a	343.71±12.99 ^a	320.21±11.79 ^{ab}

다) 혈청 중 vitamin E의 함량

혈청 중 vitamin E의 함량을 HPLC로 분석한 결과(Table 2-9), α , β , γ -tocopherol이 확인되었으며 δ -tocopherol은 관찰되지 않았다. 또한 β 와 γ -tocopherol은 분리되지 않았고, (β + γ)-tocopherol의 양은 각 군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 혈청 중 tocopherol의 대부분이 α 형이었고, 대조군에 비해 HCLF 및 HCHF에서의 tocopherol의 함량이 높은 것으로 확인되었으며, 특히 HCLF의 경우 10.90 μ g/ml로 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 2-9. Contents of vitamin E in serum

	Normal	High cholesterol diet		
		HCCon	HCLF	HCHF
α -tocopherol (μ g/ml)	7.56 \pm 0.34 ^b	7.19 \pm 0.99 ^b	10.90 \pm 0.29 ^a	8.74 \pm 0.38 ^b
(β + γ)-tocopherol (μ g/ml)	0.0362 \pm 0.0013 ^{ns}	0.033 \pm 0.0015 ^{ns}	0.038 \pm 0.0043 ^{ns}	0.034 \pm 0.0015 ^{ns}

2. 느릅나무 에탄올 추출물의 항 고지혈증 효과

가. 재료 및 방법

1) 시료의 추출 및 조제

본 실험에서 사용한 느릅나무는 경동시장에서 구입하여 뿌리부분을 분리하여 세척한 후 건조시켜 사용하였다. 건조된 느릅나무의 뿌리를 40mesh의 크기로 분쇄하여 시료의 15배에 해당하는 80% 에탄올을 첨가하여 상온에서 18시간 동안 추출하여 여과한 후 rotary evaporator로 감압농축하여 시료로 사용하였다.

2) 실험동물의 사육 및 식이조성

실험에 사용된 동물은 생후 4주령된 수컷 ICR mouse 로써, 중앙실험동물(주)로부터 구입하였으며, 고형배합사료로 1주일간 환경에 적응시켰다. 이 후 각 실험군의 평균체중이 같도록 10마리씩 7군으로 나누고, 실험식이를 공급하여 7주간 사육하였으며, 물과 실험식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험식이는 AIN-76 diet 조성에 의거하여 조제하였으며, 20% 지방과 1% 콜레스테롤을 실험식이내 첨가하여 공급함으로써 고지혈증을 유발시켰다(Table 2-10). 실험군은 정상군, 고지방 식이 대조군, 추출물 0.5%, 1% 첨가군으로 나누어 실험하였다.

Table 2-10. Composition of experimental diet

(unit : g/kg diet)

	Normal	High fat Control	0.5%	1.0%
Casein	200	200	200	200
Corn oil	50	50	50	50
Cocoa butter	-	50	50	50
Coconut oil	-	30	30	30
Cholesterol	-	10	10	10
Corn starch	450	340	340	340
Sucrose	200	200	200	200
Cellulose	50	50	50	50
Mineral MIX ¹⁾	35	35	35	35
Vitamin MIX ²⁾	10	10	10	10
Methionine	3	3	3	3
Choline bitartrate	2	2	2	2
80% EtOH ext.	-	-	5	10

1)AIN-76 mineral mixture, 2)AIN-76 vitamin mixture,

3) Biomarker 분석

가) 혈액과 장기의 채취

실험이 종료된 실험동물은 12시간 절식시킨 후, 안정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리관에 담아 1시간 방치한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리 (Centrifuge, VS-500, Vision Scientific Co. Korea)하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 분석시까지 -70℃에서 보관하였다. 채혈이 끝난 후 개복하여 간 및 다른 장기를 적출하여 무게를 잰 후 -70℃에서 보관하였다.

다) 혈청 중 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤

혈청의 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도는 (주) 신양화학의 혈액분석용 kit를 이용하여 효소법으로 분석하였다. 총 콜레스테롤은

Cholestezyme-V, 중성지방은 Triglyzyme-V 및 HDL-콜레스테롤은 HDL-C555를 이용하여 분석하였으며 LDL-콜레스테롤의 함량은 측정된 콜레스테롤의 함량으로부터 계산하여 산출하였다.

다) 간 중 총 지방, 중성 지방 및 총 콜레스테롤

간의 총 지질함량의 측정을 위하여 Folch으로 지질을 추출하여 총 지질농도를 측정하였고 간의 중성 지방과 콜레스테롤 농도는 추출한 총 지방을 클로로포름 methanol로 녹여 혈청에서와 같은 방법으로 kit를 이용하여 측정하였다.

라) 간 및 지방조직의 형태학적 분석

▶ Hematoxylin-Eosin staining

간조직 및 지방조직 세포의 형태학적 관찰을 위해 동물희생시 적출한 간과 부과환조직의 일부를 적출하여 10% formaldehyde용액에 24시간 고정한 다음 같은 용액으로 2회 교환하였다. 흐르는 물로 충분히 수세한 다음, 78% 80%, 90% 및 100% 에탄올을 이용하여 단계적으로 탈수시킨 다음 paraffin 투과과정을 거쳐 포매하였다. 포매된 조직은 박절편기로 약 4 μ m 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin으로 염색하고, xylene으로 투명화 시켜 봉입한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

▶ Oil Red-O staining

간 및 동맥 조직의 냉동 절편을 PBS로 세척하고, 여기에 차가운 4% formaldehyde 용액을 가하여 실온에서 1시간 고정시켰다. 이 후, 다시 PBS로 세척하고, 2-propanol에 녹인 0.5% Oil Red O 로 실온에서 4시간 동안 염색하였다. 다시 1회 세척한 후, 현미경용 마운팅 용액을 가하고 간 조직의 염색형태를 광학현미경으로 관찰하였다.

나. 실험결과

1) 체중, 식이섭취량 및 장기무게

느릅나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물이 고지방 식이(HCCon)를 섭취한 실험동물의 체중, 식이섭취량 등을 Fig. 2-1 및 Table 2-11에 나타내었다. 실험식이 섭취 4주후 고지방식이대조군의 체중증가량은 정상군에 비하여 높게 나타났고 이러한 체중증가는 추출물을 급여함으로써 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 식이 섭취량은 처리군들 간에 유의차가 나타나지 않았다. Table 2-12에 나타난 장기무게를 비교해 보면, 정상군의 간 무게는 3.81g이었으나 고지방식이를 섭취한 대조군에서 5.55g으로 크게 증가하였고 느릅나무 추출물 첨가군은 대조군에 비하여 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의차는 없었다.. 아울러 신장주변 지방 및 부고환 지방 무게 역시 정상군에 비하여 대조군에서 크게 증가하였으나 추출물의 급여는 이들 장기의 무게에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

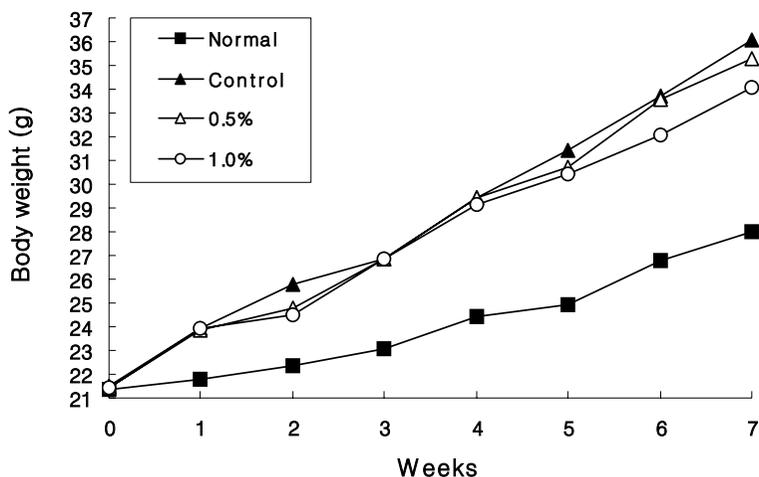


Fig. 2-1. Body weight change of experimental mice for 7 weeks

Table 2-11. Body weight gain and food intake of mice fed experimental diet for 7 weeks.

Ingredients	Normal	High fat diet		
		Control ⁴⁾	0.5%	1%
IBW (g) ¹⁾	21.37±1.14 ^{NS3)}	21.48±1.28	21.45±1.65	21.44±0.90
FBW (g) ²⁾	28.03±3.15 ^b	36.06±2.89 ^a	35.26±4.53 ^a	34.09±5.02 ^a
Weight gain (g/7weeks)	6.66±3.46 ^b	14.58±2.34 ^a	13.81±4.34 ^a	12.501±4.56 ^a
Food intake (g/day)	3.48±0.12 ^{NS}	3.47±0.11	3.58±0.07	3.67±0.02

1) Initial body weight, 2) Final body weight 3)NS: not significant 4) Values are means±SE (n=10) and those in the some row not sharing common superscript letter are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. 3)NS: not significant

Table 2-12. Organ tissue weights of the experimental mice.

Ingredients	Normal	High fat diet		
		Control ⁴⁾	0.5% ⁵⁾	1.0% ⁶⁾
Liver (g/100g b.w)	3.81±0.71 ^b	5.55±0.45 ^a	5.38±1.15 ^a	5.29±1.16 ^a
Kidney (g/100g b.w)	1.29±0.16 ^a	0.99±0.13 ^b	1.02±0.26 ^b	1.04±0.17 ^b
Spleen (g/100g b.w)	0.29±0.08 ^{NS}	0.27±0.09	0.30±0.15	0.22±0.07
Retroperipheral kidney adipose tissue (g/100g b.w)	0.88±0.60 ^b	1.67±0.31 ^a	1.71±0.67 ^a	2.01±0.39 ^a
EFP (g/100g b.w)	1.91±1.03 ^b	4.61±0.53 ^a	4.61±0.17 ^a	4.74±1.09 ^a

나. 혈청 중 지질함량

느릅나무 뿌리의 에탄올 추출물을 급여한 실험쥐 혈청의 지방성분 함량을 측정하여 Fig. 2-2, 3, 4에 나타내었다. 고지방 대조군의 경우, 식이에 1% 콜레스테롤 및 20%의 지방을 첨가함으로써 중성지방 및 total cholesterol이 유의하게 증가하였다. 그러나 이러한 혈중 중성지방 및 콜레스테롤의 증가는 느릅나무 에탄올 추출물을 급여함으로써 유의하게 감소하였다. HDL cholesterol 역시 정상군에 비하여 고지방 대조군에서 상승하는 경향을 나타내었으며 추출물 급여에 의하여 더욱 상승하는 경향을 나타내었다. HDL:Total cholesterol ratio는 정상군에 비하여 대조군에서의 유의한 감소를 나타내었으나 대조군의 이러한 감소는 느릅나무 추출물을 첨가함으로써 유의하게 상승하였다. 또한 동맥경화 위험지수를 나타내는 AI index도 대조군에서 크게 상승하였으나 느릅나무 추출물을 첨가함으로써 정상군 수준으로 감소하였다. 이러한 결과로부터 느릅나무 80% 에탄올 추출물은 실험쥐의 혈중 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시키는 데에 유의적인 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

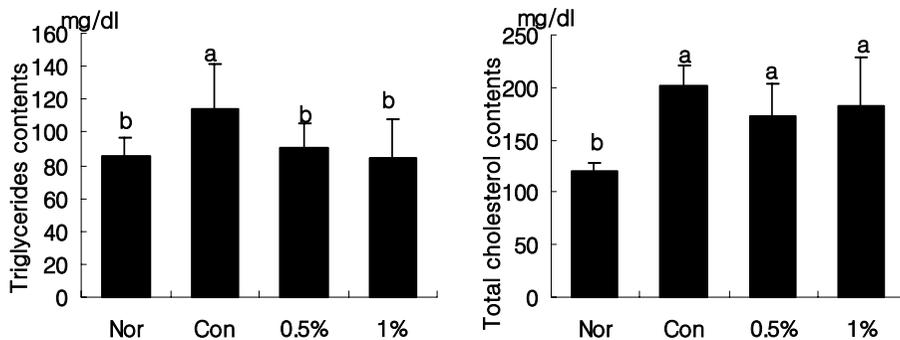


Fig. 2-2. Contents of triglycerides and total cholesterol in serum of the mice fed experimental diet for 7 weeks.

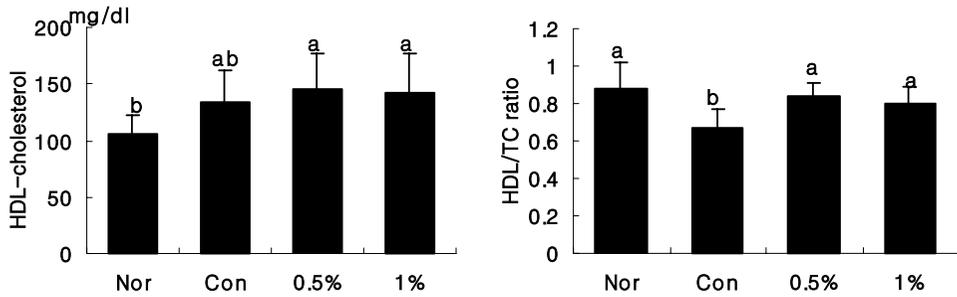


Fig. 2-3. HDL cholesterol contents and HDL/total cholesterol ratio in serum of the mice fed experimental diet for 7 weeks.

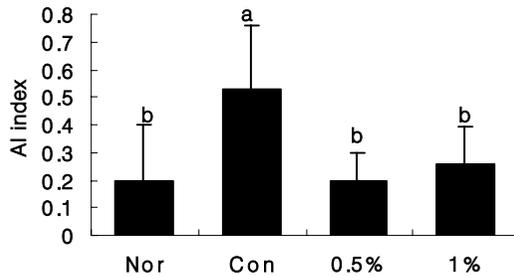


Fig. 2-4. AI index in serum of the mice fed experimental diet for 7 weeks.

다. 간 및 지방조직의 조직형태 변화

Oil Red O 및 Hematoxylne-Eosine (HE)으로 간조직을 염색한 결과는 Fig. 2-5, 6과 같다. 정상군의 조직에는 지방의 침착이 거의 관찰되지 않았으나 고지방 대조군의 간조직에는 지방 축적이 뚜렷하게 관찰되었다. 이러한 지방 축적은 느릅나무 에탄올 추출물을 첨가함에 따라 감소하는 경향을 보였다.

또한 지방조직의 형태를 관찰한 결과 (Fig. 2-5), 정상군의 지방조직에 비하여

고지방 대조군에서는 지방세포의 크기가 상당히 커짐을 관찰 할 수 있었으며 이러한 지방세포 크기의 증가는 느릅나무 추출물을 첨가함에 따라 감소하였다.

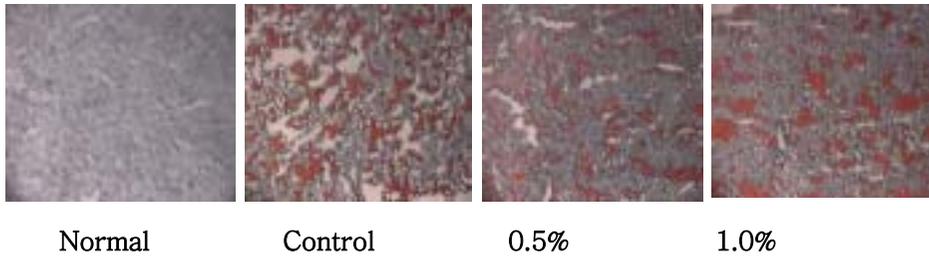


Fig. 2-5. Representative ORO staining of liver tissue

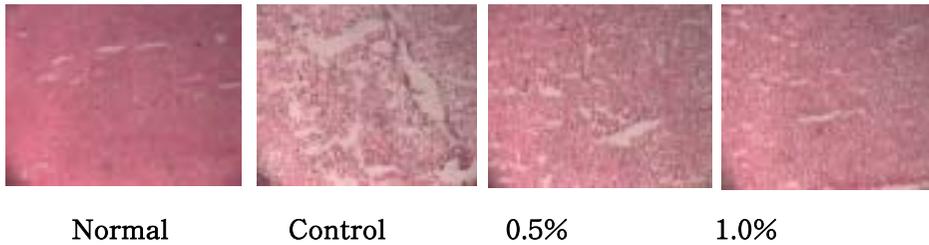


Fig. 2-6. Representative HE staining of liver tissue

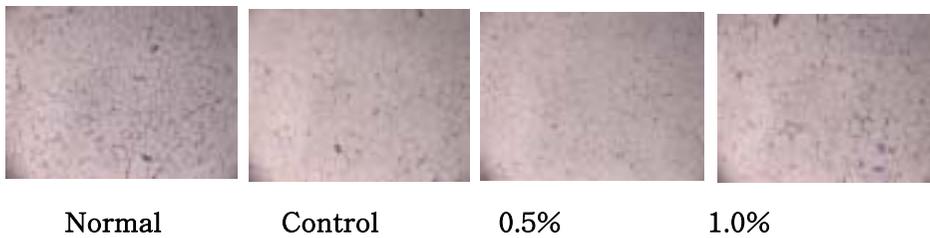


Fig. 2-7. Representative HE staining of epididymal fat pad

제 2 항 느릅나무 추출물의 기억력손상예방 효과

1. 건망증 모델에서 느릅나무 에탄올 추출물의 기억력손상예방효과

가. 재료 및 방법

1) 시료의 추출 및 조제

본 실험에서 사용한 느릅나무는 경동시장에서 구입하여 뿌리부분을 분리하여 세척한 후 건조시켜 사용하였다. 건조된 느릅나무의 뿌리를 40mesh의 크기로 분쇄하여 시료의 15배에 해당하는 80% 에탄올을 첨가하여 상온에서 18시간 동안 추출하여 여과한 후 rotary evaporator로 감압농축하여 시료로 사용하였다.

2) 실험동물 및 식이조성

본 실험을 위하여 사용된 ICR mouse는 Bio genomics, Inc에서 분양받아 일반 교형사료로 자유급여하였다. 1주일간 환경에 적응시킨 후 체중에 따라 난피법에 의하여 정상군(normal), scopolamine 주사 대조군(control), 에탄올 추출물 0.5% 첨가군 및 1% 첨가군으로 나누어 4주간 실험식이를 공급하였다. 실험식이는 AIN-76 diet 조성을 기본으로 제조하였으며 실험기간 동안 물과 식이는 자유롭게 공급하였다. 본 연구에서 사용한 식이 구성 성분은 Table 2-13에 제시하였다. 식이 섭취량은 1주일에 3회 일정한 시각에 측정하였으며, 체중은 매주 측정하였다. 실험동물은 식이 기간이 종료되는 시점에서 passive avoidance test 및 Morris water maze를 통하여 scopolamine으로 유도된 건망증의 기억력 회복능력을 측정하였다.

다. Scopolamine에 의한 건망증의 유발

추출물을 첨가한 식이로 4주간 사육한 ICR mouse를 scopolamine(HBr, 1mg/kg, i.p., Sigma, U.S.A)을 복강주사하여 건망증을 유발시키고 60분 후에 각각 passive avoidance test 및 water maze test 실험을 실시하여 scopolamine에 의한 건망증의 유발 및 추출물의 기억력 회복효과를 관찰하였다.

Table 2-13. General composition of diet

	(g/kg diet)			
	Normal	Scopolamine inj.(1mg/kg, i.p)		
		Control	LT ⁴⁾	HT ⁵⁾
Corn starch	529.5	529.5	524.5	529.5
Casein	200	200	200	200
Sucrose	100	100	100	100
Cellulose	50	50	50	50
80% Ethanol extr. ¹⁾			5	10
Corn Oil	70	70	70	70
Mineral Mixture ²⁾	35	35	35	35
Vitamin Mixture ³⁾	10	10	10	10
Clolin bitartate	2.5	2.5	2.5	2.5
Methionine	3	3	3	3

1)80% Ethanol extracts from Ulmus roots bark, 2)AIN-76 mineral mixture, 3)AIN-76 vitamin mixture, 4)Normal diet group with 0.5% extracts, 5)Normal diet group with 1% extracts,

라. Passive avoidance test

Passive avoidance (256000-series, TSE-System, German)는 마우스의 어둠을 좋아하는 습성을 이용하여 설계된 장치로서 암실과 명실로 구분되어 있으며, 그 사이에 작은 문으로 연결되어있다. 실험동물을 명실에 넣고 빛을 주면 곧 암실로 들어가는데, 이때 문을 닫고 0.3 mA의 전류를 3초간 주어 이를 기억하게 하였다. 이와 같은 방법으로 test 하루 전날 2회 연습시킨 다음 날 test시 scopolamine을 주사(1mg/kg body weight, i.p)하고 한 시간이 지난 후에 다시 명실에 실험동물을 두어, 빛을 회피하여 암실로 들어가는 데 까지 걸리는 시간 (step through latency)을 측정하였다.

마. Morris water maze test

ICR mouse를 Morris water maze에서 1일 2회 반복 학습을 실시한 후 2일 연속으로 측정하였다. Morris water maze는 직경이 110cm, 높이가 90cm 인 수조로써, 수온이 26~28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm 인 원통형 platform을 설치하고 적당량의 탈지분유를 부유시켜서 설치한 플랫폼이 육안으로 보이지 않도록 제조하였다. 1일 2회 연습 시 ICR mouse가 180초 이내에 pool에서 platform으로 찾아서 올라갈 수 있도록 하였으며, 180초 이내에 찾지 못하면 생쥐를 platform으로 인도하여 이를 인지하게 하였다. 연습 후 다음날 trial 시 60분 전에 scopolamine을 주사(1mg/kg body weight, i.p)하고 위와 같은 방법으로 water maze를 실시하여 platform으로 찾아 올라가는데 까지 소요되는 시간을 측정하였으며 이와 같은 trial을 연속 2일간 실시하였다.

바. 혈액 및 장기의 채취

Scopolamine을 주사하여 passive avoidance test 및 water maze를 실시한 실험 쥐들은 scopolamine을 주사한지 180분 이후에 안구채혈 방법으로 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리관에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 2,800 rpm, 4℃에서 30분간 원심분리 (Refrigerated multi-purpose centrifuge union 55R, Hanil, Korea)하여 적혈구와 혈청을 분리하고, 분리된 혈청은 -70℃ deep freezer에 보관하였다.

혈액을 채취한 후 각종 장기들은 ice bath에서 즉시 떼어 ice cold saline에 세척한 다음 여지로 물기를 제거하여 무게를 측정하고 바로 -70℃ deep freezer에 보관하여 분석시 시료로 사용하였다.

사. 혈청 및 뇌 중 Acetylcholinesterase의 활성 측정

혈청 및 뇌중의 AChE 활성도는 Elman 법에 근거하여 측정하였다. 즉, 3.0 mL phosphate buffer (pH 8.0)와 3-carboxy-4-nitrophenyl disulfide (DTNB), acetylcholine iodide 및 혈청 또는 phosphate buffer로 균질화한 뇌조직 일정량을

넣어 반응시켜 412 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였으며 단위 단백질 당, 1분 당의 활성도로 산출하였다.

아. 뇌 중 지질과산화물의 함량 측정

뇌조직의 지질 과산화물 함량은 조직의 일정량을 Teflon Potter-Elvehjem homogenizer로 마쇄하여 얻은 균질액을 과산화지질 분석을 위한 시료로 사용하였다. 지질 과산화물 분석은 Ohakawa 등의 방법에 따라 분석하였으며, 표준물질로서는 1,1,3,3,-tetraethoxypropane을 사용하였다.

2. 실험결과

가. 체중, 식이섭취량 및 장기무게

Scopolamine의 주사 및 느릅나무 에탄올 추출물의 급여는 4주간의 실험기간동안 체중의 변화에 영향을 미치지 않았으며, 각 처리군들 간의 식이 섭취량에도 변화를 나타내지 않았다(Table 2-14). 장기무게 역시 각 처리군들 간에 차이를 나타내지 않았다(Table 2-15)

Table 2-14. Body weight gain and food intake of the fed experimental for 4 weeks.

	Normal	Scopolamine (1mg/kg, i.p)		
		Control	LT ⁴⁾	HT ⁵⁾
IBW (g) ¹⁾	28.65±0.47 ^{NS3)}	28.62±0.48	28.95±0.59	28.85±0.55
FBW (g) ²⁾	35.85±0.52 ^{NS}	35.73±0.76	36.15±0.87	35.86±0.55
Weight gain (g/4 wks)	7.19±0.54 ^{NS}	7.10±1.07	7.20±0.59	7.00±0.29
Food intake (g/day)	5.77±0.59 ^{NS}	5.90±0.59	5.69±0.13	5.60±0.24

1)Initial body weight, 2)Final body weight 3)NS: not significant, 4)0.5% extracts fed group with scopolamine inj. 5)1% extracts fed group with scopolamine inj..

Table 2-15. Organ tissue weights of the fed experimental for 4 weeks.

	Normal	Scopolamine (1mg/kg, i.p)		
		Control	LT ⁴⁾	HT ⁵⁾
Liver(g/mouse)	0.45±0.01 ^{NS}	0.44±0.01	0.45±0.01	0.44±0.01
Kidney(g/mouse)	0.57±0.03 ^{NS}	0.58±0.02	0.56±0.02	0.56±0.02
Brain(g/mouse)	1.61±0.03 ^{NS}	1.56±0.04	1.50±0.05	1.52±0.03

NS: not significant

나. Passive avoidance test를 통한 기억력손상 예방효과

느릅나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물의 급여가 scopolamine으로 유도한 건망증을 완화시켜 기억력의 개선능이 있는지를 passive avoidance test를 통하여 관찰하였다(Fig. 2-8). Test 전날 행해진 training의 결과에 나타난 대로 mouse 들은 암실로 들어가는데 걸리는 시간이 정상군(normal), 대조군(control), 0.5% 첨가군(LT) 및 1% 첨가군(HT) 각각 13.8, 14.78, 9.82 및 12.78초로 처리군들간에 비슷한 latency를 나타내었다. 그러나 24시간 이후, scopolamine을 주사하여 기억력 손상을 유도한 후에 측정한 latency는 각각 265.87, 52.07, 178.14 및 213.75초로 scopolamine 대조군인 control의 경우 scopolamine을 주사하지 않은 normal군에 비하여 유의적으로 낮아져서 확실히 기억력 손상이 유도됨을 확인할 수 있었다. 그러나 사육기간 4주 동안 느릅나무 에탄올 추출물을 섭취한 LT 및 HT의 경우 유의적으로 latency가 증가하였으며 그 효과는 농도 의존적으로 나타나 scopolamine에 의하여 유도되는 기억력 손상이 예방됨을 관찰하였다.

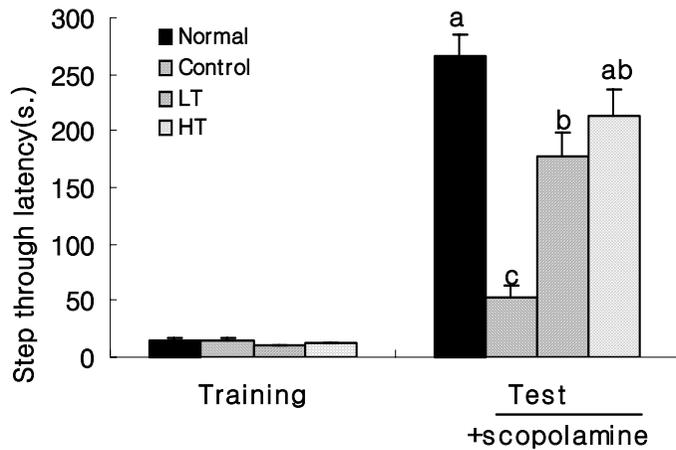


Fig. 2-8. Anti-amnesic effects of ethanol extracts from *Ulmus deviadiana* var, *japonica* on scopolamine-induced memory impairment in mice in passive avoidance test. All mice were given one day training. Twenty-four hours after the training trial, amnesia was induced in mice scopolamine (1 mg/kg body weight, i.p). After 60 min, all mice were again placed in the light compartment. The latency time to enter the dark compartment was measured.

다. Morris water maze를 통한 기억력손상 예방 효능의 평가

느릅나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물의 급여가 scopolamine으로 유도되는 기억력의 손상을 예방하는지를 Morris water maze 통하여 관찰하였다(Fig. 2-9). Scopolamine을 주사하지 않고 플랫폼까지 찾아가는데 소요되는 시간을 측정한 결과, 정상군(normal), 대조군(control), 0.5% 첨가군(LT) 및 1% 첨가군(HT) 각각 99.47, 91.60, 107.74 및 87.28초로 처리군들간에 비슷한 latency를 나타내었다. 그러나 24시간 이후, scopolamine을 주사하여 기억력 손상을 유도한 후에 측정한 latency는 각각 21.63, 78.91, 58.28 및 17.16초로 scopolamine 대조군인 control의 경우 scopolamine을 주사하지 않은 normal군에 비하여 유의적으로 높아져서 기억력 손상이 유도됨을 확인할 수 있었다. 또한 2일째 다시 측정한 결과, 각 처리군 각각의 latency는 9.01, 44.58, 19.22, 7.63초로, scopolamine 대조군의 latency가 다른 처

리군에 비하여 유의적으로 증가함을 확인하였으며, 정상군과 추출물 급여군의 경우 실험이 반복됨에 따라 플랫폼으로 찾아가는데 걸리는 시간이 급격하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

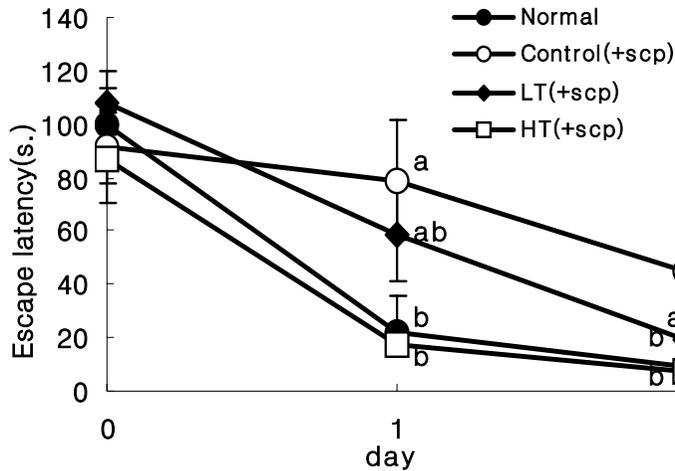


Fig. 2-9. Annti-amnestic effects of ethanol extracts from *Ulmus deviadiana var, japonica* on scopolamine-induced memory impairment in mice in Morris water maze. The swimming time required for the mouse to escape was recorded. Each day, the mice was injected with scopolamine(1 mg/kg body weight, i.p). All mice were tested for spatial memory 60 min after the injection of scopolamine.

라. 혈청 및 뇌 중 acetylcholinesterase(AChE)의 활성

Mouse에 있어서 scopolamine의 투여로 AChE가 증가하고 acetylcholine의 양이 급격히 감소하여 기억과 인식의 장애를 유발하는 건망증 생쥐가 되는 것으로 알려져 있다. Fig. 2-10에는 mouse에 있어서 scopolamine으로 기억력 손상을 유발하여 생쥐의 혈청과 뇌 중 AChE의 활성도를 측정된 결과로, scopolamine의 주사는 혈청 중 AChE의 활성을 유의적으로 증가시켰으나 추출물의 급여는 증가된 AChE의 활성을 억제하지 못하는 것으로 나타났다. 또한 scopolamine의 주사는 뇌중 AChE의 활성을 비교적 증가시키는 경향을 나타냈으나, 통계적인 유의차는 나타나

지 않았으며, 5%의 느릅나무 추출물을 섭취한 mouse의 뇌중 AChE의 활성은 scopolamine을 주사하지 않은 normal군보다도 낮게 나타남으로써, 느릅나무 추출물은 AChE의 활성을 감소시킴으로써 기억력개선에 효과가 있을 것으로 사료되었다.

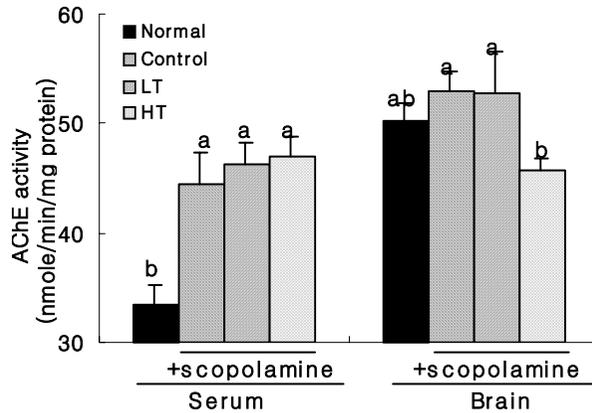


Fig. 2-10. Effect of ethanol extracts from *Ulmus deviadiana var, japonica* on AChE activity in scopolamine-induced amnesia mice. Each serum and brain was acquired 180 min after the injection of scopolamine.

마. 뇌 중 지질과산화물의 함량 측정

Scopolamine의 주사 및 느릅나무 추출물의 급여가 뇌 중 지질과산화물의 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과(Table 2-16), 통계적 유의차는 나타나지 않았지만 scopolamine의 주사는 뇌 중 지질과산화물의 함량을 다소 증가시키는 경향이 있으며, 5%의 느릅나무 추출물의 급여는 scopolamine 만을 주사한 control과 비교하여 유의적으로 산화를 억제시키는 것으로 나타났다.

Table 2-16. Contents of TBARS in liver

	Normal	Scopolamine(1mg/kg, i.p)		
		Control	LT ⁽⁴⁾	HT ⁽⁵⁾
TBARS (nmole / g liver)	68.15±2.44 ^{ab}	76.72±7.57 ^a	75.13±5.97 ^{ab}	56.38±2.68 ^b

2. 고탄성 획분의 LPS 유도 기억력 손상예방 효과

가. 재료 및 방법

1) 시료의 추출 및 조제

본 항에서는 활성이 높고 추출수율이 높은 80% 에탄올 추출물의 부탄올 획분을 분획하여 염증유발로 인한 기억력 손상모델에서의 효능을 평가하고자 하였다.

2) 실험동물 및 식이조성

실험에 이용한 ICR mouse는 Bio genomics. Inc에서 분양받아 일반 고형사료로 1주일간 자유 급여하여 환경에 적응시켰다. 실험군은 난괴법에 의하여 정상군(normal), LPS (Lipopolysaccharides) 염증 유발 대조군(control), 부탄올 획분 0.25 및 0.5% 첨가군 또한 에탄올 추출물 1% 첨가군의 5군으로 나누고 각 군은 10마리씩 배치하였으며 4주간 실험식이를 공급하였다. 실험식이는 AIN-76 diet 조성을 기본으로 제조하였으며 실험기간 동안 물과 식이는 자유롭게 공급하였다. 실험식이 조성은 Table 2-17에 제시하였다. 식이 섭취량은 1주일에 3회 일정한 시각에 측정하였으며, 체중은 매주 측정하였다. 실험동물은 식이 기간이 종료되는 시점에서 passive avoidance test 및 Morris water maze를 통하여 LPS로 유도된 기억력 상실에 대한 기억력 회복능력을 측정하였다.

3) LPS에 의한 기억력 상실 유발

각 실험식으로 4주간 사육한 ICR mouse에게 LPS(Lipopolysaccharides from *Salmonella typhimurium*, Sigma, St. Louis, Mo., USA)를 복강주사(50ug/35-40g, mouse, i.p)하여 염증에 의한 기억력을 상실시키고 24시간 이후에 각각 passive avoidance test 및 water maze test 실험을 실시하여 LPS에 의한 기억력 상실 및 추출물에 의한 기억력 회복효과를 관찰하였다.

Table 2-17. General composition of diet

	(g/kg diet)				
	Normal	LPS injection (50ug/mouse)			
		Control	0.25%	0.5%	1%
Corn starch	529.5	529.5	527	524.5	519.5
Casein	200	200	200	200	200
Sucrose	100	100	100	100	100
Cellulose	50	50	50	50	50
80% Ethanol extr.					10
Buthanol fraction			2.5	5	
Corn Oil	70	70	70	70	70
Mineral Mixture ¹⁾	35	35	35	35	35
Vitamin Mixture ²⁾	10	10	10	10	10
Clolin bitartate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Methionine	3	3	3	3	3

1) AIN-76 mineral mixture

2) AIN-76 vitamin mixture

4) Passive avoidance test

Passive avoidance (256000-series, TSE-System, German)는 마우스의 어둠을 좋아하는 습성을 이용하여 설계된 장치로서 암실과 명실로 구분되어 있으며, 그 사이에 작은 문으로 연결되어있다. 실험동물을 명실에 넣고 빛을 주면 곧 암실로 들어가는데, 이때 문을 닫고 0.3 mA의 전류를 3초간 주어 이를 기억하게 하였다. 이와 같은 방법으로 test 하루 전날 2회 연습시킨 후 LPS를 주사(50ug/mouse, i.p) 하고 24시간 후에 test하여 암실로 들어가는데 까지 걸리는 시간 (step through latency)을 측정하였다.

5) Morris water maze test

ICR mouse를 Morris water maze에서 1일 2회 반복 학습을 실시한 후 2일 연속으로 측정하였다. Morris water maze는 직경이 110cm, 높이가 90cm 인 수조로써, 수온이 26~28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm 인 원통형 platform을 설치하고 적당량의 탈지분유를 부유시켜서 설치한 플랫폼이 육안으로 보이지 않도록 제조하였다. 1일 2회 연습 시 ICR mouse가 180초 이내에 pool에서 platform으로 찾아서 올라갈 수 있도록 하였으며, 180초 이내에 찾지 못하면 생쥐를 platform으로 인도하여 이를 인지하게 하였다. 2일 간 연습 후 LPS를 주사(50ug/mouse, i.p)하고 24시간 후에 test하여 platform으로 찾아 올라가는데 까지 소요되는 시간을 측정하였다.

나. 실험결과

1) 체중, 식이섭취량 및 장기무게

LPS로 염증을 유도한 마우스의 체중, 식이섭취량 및 장기무게를 측정한 결과 느릅나무 에탄올 추출물 및 부탄올 분획물의 급여는 4주간의 실험기간동안 체중의 변화에 영향을 미치지 않았으며, 식이 섭취량에도 변화가 없었으며 (Table 2-18) 장기무게에도 영향이 없는 것으로 나타났다.(Table 2-19)

Table 2-18. Body weight gain and food intake of mice fed experimental diet for 4 weeks.

	Normal	LPS (50ug/mouse)			
		Control	0.25%	0.5%	1%
IBW (g)	28.96±1.24 ^{NS}	29.47±1.56	28.87±1.24	29.33±1.34	29.35±1.33
FBW (g)	37.62±1.82 ^{NS}	39.27±3.92	35.69±2.78	37.57±4.43	39.20±2.81
Weight gain (g/4weeks)	8.67±3.14 ^{NS}	9.79±2.15	6.82±3.87	8.24±1.14	9.85±2.46
Food intake (g/day)	4.42±0.37 ^{NS}	4.52±0.24	4.05±0.25	4.55±0.37	4.64±0.26

Table 2-19.. Organ tissue weights of the experimental mice.

	Normal	LPS(50ug/mouse)			
		Control	0.25%	0.5%	1.0%
Liver (g/100g b.w)	4.73±0.38 ^{NS}	4.60±0.56	4.54±0.19	4.82±0.36	4.63±0.40
Kidney (g/100g b.w)	1.56±0.15 ^{NS}	1.50±0.23	1.49±0.14	1.46±0.20	1.45±0.14
Spleen (g/100g b.w)	0.34±0.12 ^{NS}	0.34±0.12	0.38±0.09	0.38±0.08	0.38±0.04
Brain (g/100g b.w)	1.25±0.08 ^{NS}	1.21±0.11	1.15±0.17	1.20±0.22	1.16±0.12

나. 기억력 손상예방 효과

느릅나무 뿌리의 80% 에탄올 추출물과 그 부탄올 획분이 LPS로 유도한 기억력에 어떠한 영향을 미치는지를 passive avoidance test 및 Morris water maze를 통하여 측정하였다(Fig. 2-11, 12). LPS 주사 전 passive avoidance test에 의한 training의 결과, 모든 쥐들의 암실로 들어가는 데 걸리는 시간은 처리군과 상관없이 비슷한 latency를 나타내었다. 그러나 LPS를 주사하고 24시간 이후에 측정된 latency는 정상군, 대조군, 0.25%, 0.5% 및 1% 각각 137.33, 4.65, 64.23, 86.43 및 104.75초로 LPS 대조군은 LPS를 주사하지 않은 정상군에 비하여 유의적으로 낮아져서 확실히 기억력이 감소되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 사육기간인 4주 동안 느릅나무 에탄올 추출물 및 부탄올 획분을 농도별로 급여한 처리군의 경우 유의적으로 latency가 증가하였으며 농도의존적 경향을 보였다. Morris water maze test에서도 LPS주사 전 플랫폼을 찾아가는 데 걸리는 시간은 처리군과 상관없이 비슷한 latency를 나타내었으나 LPS를 주사하고 24시간 이후에 측정된 latency는 정상군, 대조군, 0.25%, 0.5% 및 1% 각각 21.72, 51.86, 34.92, 34.35 및 30.87로 LPS 대조군은 LPS를 주사하지 않은 정상군에 비하여 유의적으로 증가하여 확실히 기억력이 상실되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 사육기간인 4주동안 느릅나무 에탄올 추출물 및 부탄올 획분을 농도별로 급여한 처리군의 경우 유의적으로 latency가 짧아졌으나 농도간의 유의차는 인정되지 않았다. 80% 에탄올 추출물의 성분함량을 비교해 볼 때 에탄올 추출물 1%에는 부탄올 획분 0.25%가 함유되어있다. Passive avoidance test 및 water maze test 결과, 80% 에탄올 추출물 1% 첨가구의 효과가 가장 높은 것으로 나타났는데, 이러한 에탄올 추출물의 뛰어난 효과는 에탄올 추출물에는 부탄올 획분에 포함되어 있는 성분 뿐만 아니라 다른 유의한 성분들이 상호 상승작용을 나타낸 것으로 사료되며 아울러 에탄올 추출물에 포함되어 있는 부탄올 획분의 성분도 LPS에 의한 기억력의 상실을 회복시키기에 효과적인 것으로 사료되었다. 또한 관련 biomarker들은 현재 분석중에 있다.

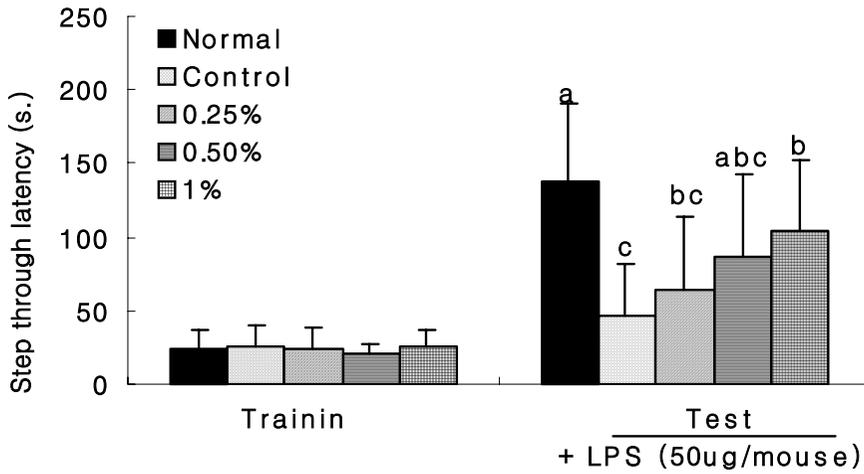


Fig. 2-11. Effect of buthanol fraction (0.5% and 0.5%) and ethanol extracts (1%) from *Ulmus deviadiana var, japonica* on LPS-induced memory impairment in mice in passive avoidance test. All mice were given one day training. Twenty-four hours after the trainig trial, LPS(50ug/mouse, i.p) was injected in mice. The next day, all mice were again placed in the light compartment. The latency time to enter the dark compartment was measured.

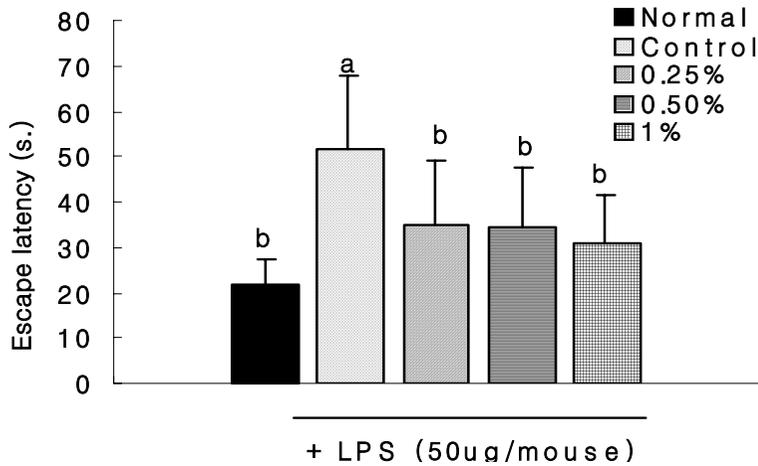


Fig. 2-12. Effect of buthanol fraction (0.5% and 0.5%) and ethanol extracts (1%) from *Ulmus deviadiana var, japonica* on LPS-induced memory impairment in mice in Morris water maze test. The swimming time required for the mouse to find platform. All mice were given two days training. Twenty-four hours after the 2nd day trainig, LPS(50ug/mouse, i.p) was injected in mice. The next day, all mice were tested for spatial memory.

제 3 절 느릅나무의 암 예방효과

우리나라의 5대 사망원인인 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병, 자살로 인한 사망자수가 14만 명으로 전체 사망자의 절반이상(총사망자의 57.1%)을 차지하고 있다. 최근 우리나라는 암으로 사망하는 사람이 늘고 있으며, 국립암센터의 통계에 따르면 2004년 암으로 사망한 사람은 전체 사망자의 26.3%(64,731명)에 이르고 있다. 암에 대한 사망률 중 폐암(lung cancer)은 20.6%로 1위, 대장암(colorectal cancer)은 9.1%에 해당하며 4위를 차지하고 있는 실정이다 (<http://www.ncc.re.kr>). 또한 국립암센터에서 발표한 2002년 통계자료에 따르면, 발생률이 높은 10대 암 중에서 폐암은 남자 2위(17.0%), 여자 5위(8.0%)이고, 대장암은 남자 4위(11.2%), 여자 3위(10.7%)를 차지하고 있다(Shin *et al.*, 2004). 대장암은 서구에서 많이 발생되어 왔으며, 대장암이 많이 발생한 사회에서는 고지방식이와 특히 육류의 소비가 많은 것으로 나타났다(Potter *et al.*, 1993; Duthie *et al.*, 1999). 국립암센터의 보고에 의하면 1995년부터 2002년까지, 최근 8년간 대장암의 발생증가율이 남자에서 184%, 여자에 있어서는 164%로 굉장히 높은 증가율을 나타내고 있다. 또한 역학 조사를 통하여, 대장암 발생에 육류와 지방의 소비가 상관성이 있다고 알려져 있다(Witte *et al.*, 1996). 우리나라에서도 경제 발전으로 인한 생활수준 향상과 그에 따른 서구화된 식생활 문화로 인해 고지방 섭취가 증가하고 동물성 식품의 소비가 증가하여 대장암 발생이 높은 증가 추세를 보이고 있는 것으로 추정된다. 현재 식품중의 항암물질에 관한 관심과 연구가 증가하고 있다. 이번 연구의 재료로 선정된 느릅나무는 예전부터 많이 사용되어져 오고 있는 물질이다. 느릅나무의 근피는 예로부터 항부종, 항염증, 항암, 해독, 거담 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 민간약재로 사용되어 오고 있다.

다단계 과정으로 일어나는 암 발생 단계는 처음에 하나의 세포내에서 일어나며, 개시(initiation), 촉진(promotion), 진행(progression)의 과정으로 구분할 수 있다. 암 개시단계는 발암물질이 DNA와 반응하여 유전자 변이를 초래하는 비가역적 과정으로 계속적으로 종양 촉진제에 노출이 되지 않는 한 암세포로 전환될

수 있는 잠재력만을 가지고 있다. 암 촉진단계(promotion)는 상대적으로 오랜 시간을 두고 서서히 진행되는 과정으로 암 개시화된 세포의 증식을 유도하여 전암 병변(prenoplastic lesions) 상태의 세포군집을 형성시킨다. 암 개시단계와는 달리 암 촉진단계는 원인이 제거되면 이전 단계로 되돌아 갈수 있는 가역적인 단계이다. 암 진행단계(progression)는 비교적 양성이던 병소가 악성으로 되어, 침입성(invasiveness), 전이능(metastatic potential)이 증가한 악성종양 신생물(neoplasm)로 전환되는 단계이다. 암의 발생은 한순간에 이루어지지 않고 오랜 시간에 걸쳐 일어난다. 화학발암물질인 1,2-dimethylhydrazine (DMH)은 간에서 azoxymethane (AOM)으로 대사되고 계속해서 methylazoxy methanol (MAM, $\text{CH}_3\text{-[O]NH-NH-CH}_2\text{OH}$)로 대사되어 methylcarbonium ion (CH_3^+)이 형성이 되고, DNA와 반응하는 최종적인 발암원으로 작용한다(Corpet *et al.*, 2002). DMH 나 AOM과 같은 화학발암물질을 설치류에 투여하면 대장점막에 변이가 일어나게 되는데 이때 정상 창자염(crypt)보다 2~3배 이상 크고 넓은 음 주변지역(pericryptal zone)을 가지며 핵은 크고 중첩되어 있는 변형된 창자염(이상선와, aberrant crypt colonic mucosa in rodents, AC)을 나타내고, 이와 같이 변형된 창자염과 그들이 집합적으로 모여 형성된 이상선와소(aberrant crypt foci of colonic mucosa in rodents, ACF)라는 전암병변이 생성되고, 이들 전암병변의 계속적인 증식이 이루어지면 종양으로의 발전이 될 가능성이 매우 높다(McLellan *et al.*, 1989; Bird, 1995).

폐종양 유발물질로 사용한 benzo[a]pyrene(B[a]P)은 돌연변이 및 암을 일으키는 PAHs의 하나로서 환경공해 물질 중에 광범위하게 분포되어 있기 때문에 그 화학적인 성질, 대사, 그리고 생물학적인 효과 등이 광범위하게 연구되어 왔다(Gelboin, 1972). B[a]P의 분자량은 252.3이며 녹는점은 179.0°C인 탄소와 수소로 이루어진 물질이고 결정은 노란색이며, 화학식은 $\text{C}_{20}\text{H}_{12}$ 이다. B[a]P는 화학적으로 불활성이나 세포내의 마이크로솜 효소에 의해 대사적으로 전환되는 동안 친전자성 유도체들로 활성화 되어 세포내 거대분자들(macromolecule)에 공유결합한다(Miller, 1970; Heidelberger, 1975; Weisburger, 1978). B[a]P 대사물질의 하나인 diol epoxide인 r-7, t-8-dihydroxy-t-9, 10-oxy-7,8,9,10-tetrahydro

benzo[a]pyrene (BPDE)이 B[a]P의 궁극적인 발암형태로 밝혀져 있다(Sims *et al.*, 1974; Huberman *et al.*, 1976; Newbold and Brookes, 1976; Wood *et al.*, 1976; Yang *et al.*, 1976; Kapifuliak *et al.*, 1978). 따라서 이러한 궁극적인 발암성 대사물질의 확인과 종양(tumor)의 형성정도와 서로 다른 세포조직, 또는 종(species)간의 암유발의 선택성을 설명해주는 DNA modification 정도의 특징이 평가되어 왔다.

본 연구는 느릅나무의 줄기와 뿌리를 에탄올 추출하여 얻어진 추출액이 DMH에 의해 유발된 랫드 대장암 모델과 B[a]P에 의해 유발된 폐종양 모델에서 암예방 효과를 알아보았다.

제 1 항 느릅나무의 대장암 세포 성장 억제능 (*in vitro*)

1. 실험재료 및 방법

가. Cell growth 및 cell count 측정

세포의 confluence가 70~80% 이상이 되면 96well plate에 2×10^5 의 세포를 200 μ l씩 파종하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 담겨있는 배지를 버리고 시료를 배지에 희석하여 각 well에 넣어주었다. 뿌리와 줄기 chloroform층은 5×10^5 으로 세포를 파종하였다. 이를 12, 24, 48시간 동안 배양한 뒤 각 농도별 시간별 세포의 형태를 광학현미경(OLYMPUS)으로 관찰하여 $\times 100 \sim \times 200$ 에서 사진 촬영하였다. 또 같은 방법으로 배양하여 각 시간대별로 세포를 모아서 trypan blue용액에 1:1로 희석하여 염색이 되지 않은 살아있는 세포만을 세어 direct cell count를 하였다.

나. MTT assay

세포의 생존율을 측정하는 방법으로, 96 well plate에 1×10^5 cells/ml의 세포를 100 μ l씩 파종하여, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well당 새로운 배지 200 μ l씩 넣어준 후 MTT (thiazolyl blue, SIGMA Co.)를 2

mg/ml의 농도로 준비하여 50 μ l씩 첨가하여 3시간에서 4시간동안 반응을 시켰다. 각 well당 시험물질 220 μ l를 제거하고, 보라색물질 30 μ l만 남긴 후 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 150 μ l 첨가하여 microplate mixer상에서 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 ELISA plate reader에서 540nm 흡광도로 OD(optical density)값을 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정한 값을 산출하였다.

다. DAPI staining for detection of apoptotic cell

8 well chamber slide 에 5×10^5 cell/ml의 세포를 각 400 μ l씩 넣고 24시간동안 배양한 후 시료를 처리후 24시간동안 반응시킨 뒤 반응이 끝나면 배지를 버리고 75 mM KCl을 500 μ l정도 넣고 5분간 반응을 하였다. 이는 세포를 부풀려서 핵의 관찰을 용이하게 하기 위함이다. 그 다음 acetic acid와 methanol을 1:3으로 섞어 cold-ice 상태를 만든 뒤 이를 500 μ l정도 넣어서 5분간 반응시켜 세포를 고정시켰다. 두 번 반복을 시행하였다. 고정이 끝나면 공기중에서 완전히 말린 뒤 DAPI staining 용액을 100 μ l정도 떨어뜨려 10분간 염색한 뒤 PBS로 세척하였다. Glycerol로 cover glass를 덮고 형광현미경으로($\times 100$ 또는 $\times 200$)으로 관찰하였다. 300개의 세포를 세어 이중 핵의 단편화와 염색질의 응축을 보이는 세포를 apoptosis의 형태적 판정기준에 따라 판독하여 관찰하였다.

라. Western blot analysis

원하는 물질의 처리가 끝나면 scraper로 세포를 모으고 모은 세포를 담겨있던 배지와 함께 1000 rpm에서 원심분리 하여 상층액을 버린 뒤 2ml의 cold PBS로 두 번 세척하였다. 여기에 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% Sodium Azide, 0.2% SDS, PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) 100 μ g/ml, Aprotinin 50 μ l/ml, Igapel 630 (또는 NP-40) 1%, NaF 100 mM, Sodium Deoxychoate 0.5%, EDTA (Ethylendiamineetraacetic acid--Sigma E-4884) 0.5 mM, EGTA (Ethylene glycol-bis(β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid--sigma

E-4378) 0.1 mM로 조성된 Lysis Buffer를 50~100 μ l를 가해 잘 vortex한 뒤 2 시간 동안 4°C에서 용해하였다. 반응이 끝나면 시료를 1.5 ml tube에 담아 30 초 동안 vortex 하고 4°C 23,000 g에서 1시간동안 원심분리하였다. 원심분리 한 상층액만 취한다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정한다. 정량이 된 단백질에 Lysis Buffer와 5X sample buffer를 섞어 protein 양을 같게 한 후 100°C heat block에서 5분 동안 boiling 한 후, 잠깐동안 원심 분리 하여 시료를 모은다. Separating gel(12%)과 Stacking gel(5%)을 만든 다음, 전기영동을 하고 transfer하였다. transfer가 끝난 gel은 staining solution(Coomassie Blue staining soln.) 용액에 10분 담가둔 후 탈 염색 용액으로 넘겨 남은 protein을 확인하였고, transfer된 membrane은 TBS-T용액으로 washing한 후 약간 물기를 제거하고 TBS-T 용액으로 희석한 약 5% skim milk로 약 2시간정도 blocking한 후 TBS-T 용액으로 여러 번 세척한다. 1차 항체 및 2차 항체와 반응시킨 후 ECL 용액에 1분 정도 반응시킨 후 필름을 카세트에 올려놓고 찍은 다음 현상하여 관찰하였다.

2. 실험결과

가. Cell growth

느릅나무 추출물 처리 12, 24시간 후 대장암 세포 SW 480에 대한 성장 억제 효과를 trypan blue 염색으로 확인한 결과, 잎 추출물의 전체 분획, 뿌리와 줄기의 핵산 분획과 물 분획, 줄기 부탄올 분획(data not shown)에 비해 뿌리의 부탄올 분획과 뿌리와 줄기의 에틸아세테이트 분획, 클로로포름 분획에서 농도와 시간에 따라 대장암 세포의 성장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3.-1). 뿌리 에틸아세테이트 분획의 경우 느릅나무 분획 처리 24 시간 후, 농도별로 대조군에 비해 30.3~26.1%의 생존율을 보였으며, 뿌리 부탄올 분획의 경우 41.7~37.9%, 줄기 에틸아세테이트 분획의 경우 37.4~24.2%의 생존율을 보였다. 다른

분획에 비해 24시간 이전에 현저히 세포의 생존율을 낮춘 줄기와 뿌리 클로로포름 분획(data not shown)을 가지고 처리 6, 12시간 후 생존율을 측정해 보았다. 줄기 클로로포름 분획의 경우 처리 12시간 후 농도에 따라 대조군 대비 75.1, 64.3, 35.1, 15.9%의 생존율을 보여 농도 의존적으로 세포 생존이 억제되는 것을 알 수 있었다. 뿌리 클로로포름 분획의 경우 7.0, 1.2, 0.1, 0.1%의 매우 낮은 생존율을 보였다(Fig. 3-1.). 세포 생존율 측정을 통한 결과를 바탕으로 가장 효과가 좋은 줄기와 뿌리 클로로포름 분획을 가지고 MTT assay를 실시하였다. 생존율 시험에서와 마찬가지로 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 줄기와 뿌리 각각 56.7%와 53.3%의 생존율을 보였고, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 줄기와 뿌리 각각 18.3%와 21.0%의 생존율을 보여 81.7%와 79.0%의 높은 세포 증식 억제능을 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig. 3-2). Kim의 연구에서도, 다른 대장암 세포인 HT-29를 가지고 SRB assay를 통해 느릅나무 근피의 세포 증식 억제능을 확인한 바 있는데, 클로로포름 분획 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 37%의 세포 증식 억제능을 가진 것으로 나타나 본 실험과 일치한다. 또한, 위암 세포인 AGS에도 같은 처리를 하여 확인하였는데, 클로로포름 분획의 같은 농도에서 14%의 억제능을 보인 것으로 나타나, 대장암 세포에 대한 느릅나무 추출물 클로로포름 분획의 세포 증식 억제능이 뛰어난 것으로 보인다. 또한, 느릅나무로부터 분리한 당단백(G-120)의 세포 증식 억제능을 살펴 본 연구에서도 농도 의존적으로 세포 증식 억제능이 높아진 바 있다. 이러한 결과로 볼 때, 느릅나무 추출물은 탁월한 세포 증식 억제능을 가지고 있는 것으로 사료된다. 한편, trypan blue를 통한 세포 생존율 측정에서 줄기와 뿌리 클로로포름 분획 24시간 처리시에는 줄기가 45.0, 41.2, 10.9, 8.1%(50, 100, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, data not shown), 뿌리가 1.4, 0.0, 0.5, 0.0%(50, 100, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, data not shown)의 생존율을 나타내었다. 그러나 이와는 다르게 MTT assay에서는 같은 농도에서 줄기가 71.7, 77.2, 78.0, 56.8%의 생존율을 보였고, 뿌리가 93.8, 81.8, 69.5, 53.3%의 생존율을 보여 차이가 발생하였는데, 이와 같은 결과는 서로 다른 방법의 두 가지 실험이 산출하는 세포 독성의 value가 다른데서 비롯된 것으로 보고 된 바 있다. 시료를 대장암 세포에 처리한 결과 줄기와 HCT-116, SW-480 두 가지 세포에서 뿌리의 chloroform층과 줄기의 chloroform층 분획물에서 암세포의 성장율

억제하는 효과를 볼 수 있었으며, 줄기의 hexane층 분획물은 SW-480세포에서 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 대장암 세포에 성장을 억제하는 것으로 나타났다, 대부분 높은 농도에서 암세포에 대한 생장억제를 나타남을 관찰할 수 있었다.

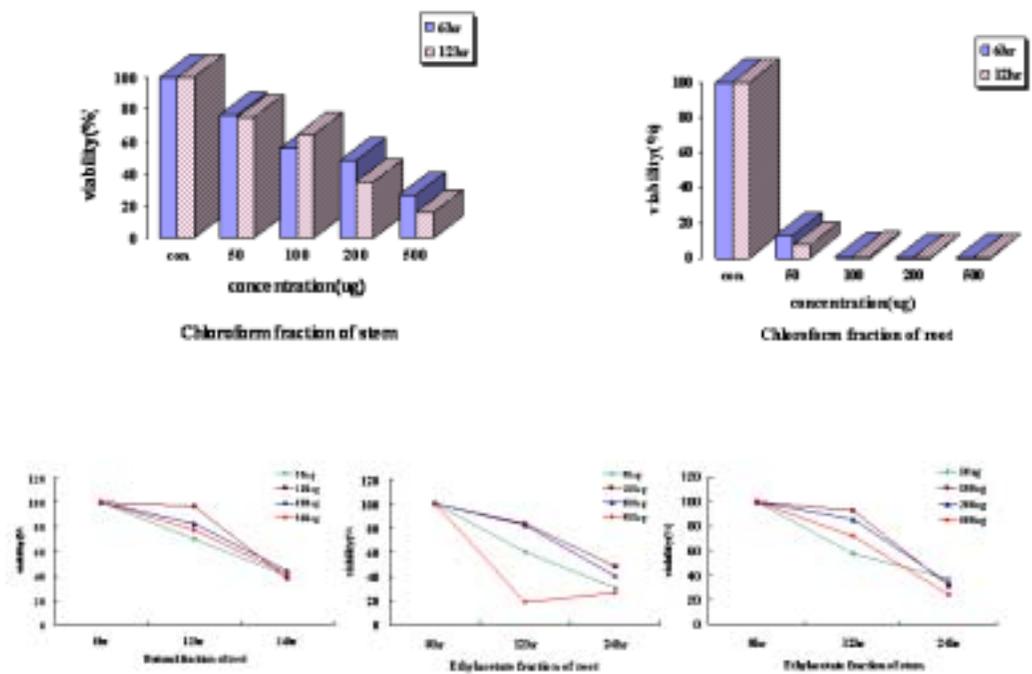


Fig. 3-1. Growth inhibition of SW 480 by ethylacetate fraction of root, butanol fraction of root ethylacetate fraction of stem, chloroform fraction of stem and root, exponentially dividing cultures were exposed to the indicated concentration of each drug.

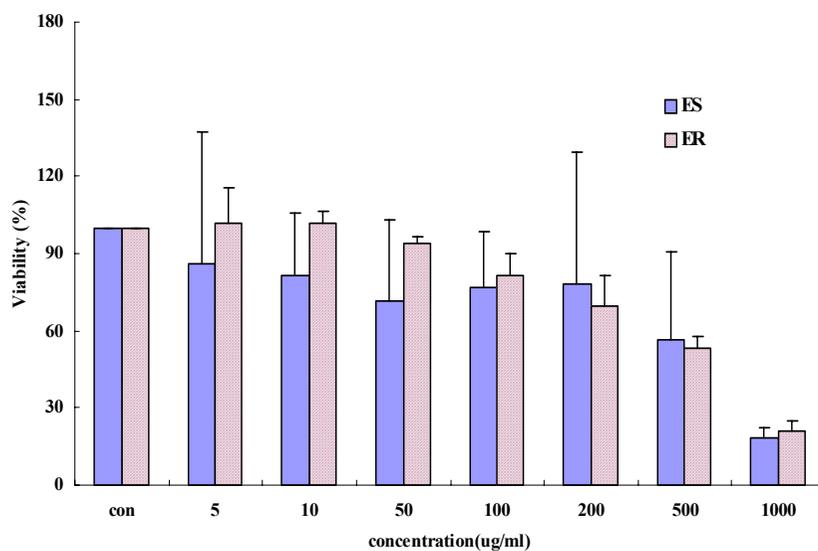


Fig. 3-2. Inhibitory effects of chloroform fraction of stem and root on the growth of SW 480 human colon cancer cells. Cells were treated with medium containing 0, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and inhibitory effects were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SD.

나. DAPI 형광염색을 이용한 apoptosis 확인

Apoptosis는 예정 세포 사멸 (programmed cell death)로서 세포의 위축 (shrinkage), 염색질 응축, DNA 분절, 미토콘드리아의 기능 장애, caspase protease 활성화 등의 특징을 수반하는 것으로 보고 된 바 있다. DAPI는 청색의 형광 염료로서, DNA의 AT cluster가 있는 minor groove에 결합하여 형광이 증가하는 물질인데, 이러한 특성에 따라, 분절되고 응축된 apoptotic body를 현미경을 통해서 간단히 확인 하여 DNA fragmentation 정도를 육안으로 관찰할 수 있다. 뿌리 클로로포름 분획의 처리를 한 SW 480세포에 DAPI stain을 실시하였는데, 대조군과 대비했을 때, 줄기와 뿌리 분획 모두 핵의 분절과 염색질의 응축을 관찰 할 수 있었으며, 고농도로 갈수록 많은 apoptotic body를 관찰 할 수 있었다(Fig. 3-3.(A)). 직접 세포의 수를 세어 정상적인 세포 200개당 나타나는 apoptotic body의 수를 세어본 결과, 줄기와 뿌리 클로로포름 분획 모두에서 농도 의존적으로 apoptotic body가 늘어나는 것으로 나타났고, 특히 뿌리 클로로포름 분획에서는 줄기에 비해 같은 농도에서 두 배 이상의 apoptotic body를 관찰 할 수 있었다(Fig. 3-3. (B)). 이와 같은 결과로 미루어 보아, 느릅나무 추출물의 클로로포름 분획은 대장암 세포인 SW 480에 apoptosis 유도를 하는 것으로 생각되어지며, 특히 뿌리 분획에서 그 효과가 더 큰 것으로 사료된다.

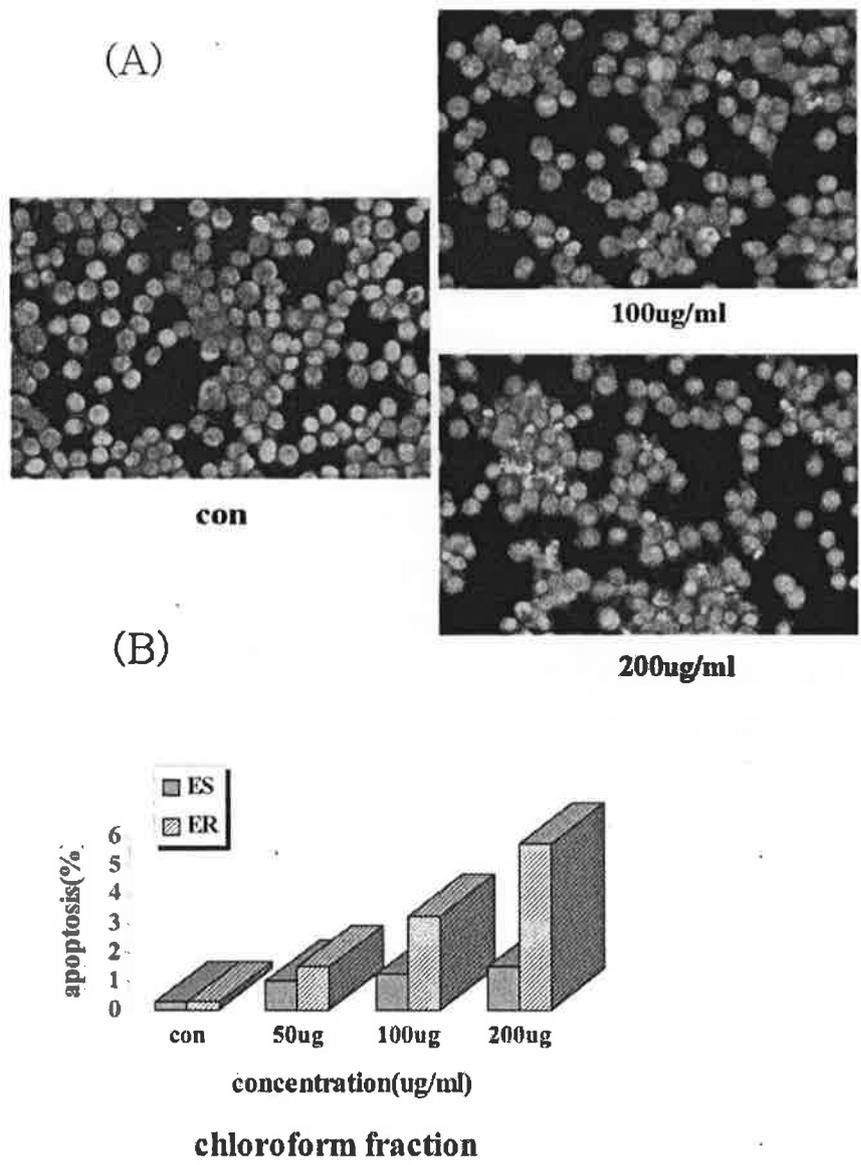


Fig. 3-3. Morphological aspect of control and treated cells with chloroform fraction of root(100, 200 μ g/ml) by DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) stain(A) and apoptotic body expressions(B) in SW 480 cells treated with chloroform fraction of root and stem. Cells were stained with DAPI and showed condensed and fragmented nuclei, which are hallmarks of the apoptotic nuclei.

다. Western Blot을 이용한 apoptosis 관련 단백질 발현 확인

(Bcl-2, Bax, Caspase-3)

Apoptosis는 예정 세포 사멸 (programmed cell death)로서 세포의 위축, 염색질 응축, DNA 분절, 미토콘드리아의 기능 장애, caspase protease 활성화 등의 특징을 수반하는 것으로 보고 된 바 있다. DAPI는 청색의 형광 염료로서, DNA의 AT cluster가 있는 minor groove에 결합하여 형광이 증가하는 물질인데 이러한 특성에 따라, 분절되고 응축된 apoptotic body를 현미경을 통해서 간단히 확인 하여 DNA fragmentation 정도를 육안으로 관찰할 수 있다. 뿌리 클로로포름 분획의 처리를 한 SW 480세포에 DAPI stain을 실시하였는데, 대조군과 대비했을 때, 줄기와 뿌리 분획 모두 핵의 분절과 염색질의 응축을 관찰 할 수 있었으며, 고농도로 갈수록 많은 apoptotic body를 관찰 할 수 있었다(Fig. 3-3.(A)). 직접 세포의 수를 세어 정상적인 세포 200개당 나타나는 apoptotic body의 수를 세어본 결과, 줄기와 뿌리 클로로포름 분획 모두에서 농도 의존적으로 apoptotic body가 늘어나는 것으로 나타났고, 특히 뿌리 클로로포름 분획에서는 줄기에 비해 같은 농도에서 두 배 이상의 apoptotic body를 관찰 할 수 있었다(Fig. 3-3.(B)). 이와 같은 결과로 미루어 보아, 느릅나무 추출물의 클로로포름 분획은 대장암 세포인 SW 480에 apoptosis 유도를 하는 것으로 생각되어지며, 특히 뿌리 분획에서 그 효과가 더 큰 것으로 사료된다. DAPI염색을 통해 apoptotic body가 많이 일어난 줄기와 뿌리 클로로포름 분획을 SW 480 cell에 처리하여 apoptosis 관련 단백질인 bcl-2, bax, caspase-3의 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다. bcl-2 family는 세포 밖이나 세포내의 상황을 전달받는 중요한 신호 전달 체계로서 작용을 하며, bcl-2 단백질은 미토콘드리아 세포막의 안정성을 조절하는 것으로 알려져 있다. Bax는 cytosol에서 미토콘드리아로 이동하면서 미토콘드리아로부터 cytochrome C의 분비를 촉진하여 결국은 세포 사멸을 유도하는 기능을 가지고 있는 반면에 bcl-2는 미토콘드리아로의 bax의 이동을 억제함으로써 세포사멸을 억제시키는 작용을 한다. 따라서, bcl-2 수준의 감소는 bax의 이동을 촉진시킴으로써 cytochrome C의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있으며,

이 둘간의 균형이 세포사멸을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서는 줄기 클로로포름 분획에서는 bax가 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 미약하게 발현되다가 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약간 증가하였고, bcl-2는 전 농도에서 비슷한 정도의 발현을 보였다. 뿌리 분획에서는 bax가 줄기보다 많은 양이 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서에서 발현되었고, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 발현양이 감소하였고, bcl-2는 미약하나 농도 의존적으로 감소하였다(Fig.3-4).따라서 결과적으로, bcl-2의 발현은 감소하고, bax의 발현은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 감소하긴 하였으나 줄기 분획보다 발현양이 많고, 나머지 농도에서 거의 변화가 없는 뿌리 분획이 bcl-2/bax의 비율이 현저하게 감소하여 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있다.

caspase라 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family는 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로 작용할 수 있는 것으로 보고되어져 오고 있다. 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 미토콘드리아의 외막에 존재하며 이들의 활성화는 bcl-2/bax family 발현의 정도에 의존적인 경우도 있다. caspase는 잠재적인 전구체며 procaspase로써 합성되고, 세포사멸 동안 caspase의 aspartic acid기에서 일어나는 단백 용해과정을 통해 활성 단백 분해 효소로 전환된다. caspase는 주로 연쇄적(cascade)으로 작용하며, 상류 caspase가 caspase adoptor와의 상호작용으로 활성화되는 과정이 세포사멸에 있어서 중요한 조절단계로서 세포사멸 촉진 혹은 항 세포사멸 단백 모두에 의하여 조절된다. 활성화된 초기의 caspase 2, 8 혹은 9는 caspase 3, 6 혹은 7에 작용하여 이들을 활성화시키고, 활성화된 이들 caspase들이 다양한 세포단백의 분열을 통해 세포사멸에 이르게 한다. caspase-3는 apoptosis로 이르게 하는 중요한 upstream 인자로서 정상적으로 그것은 불활성화된 proenzyme(procaspase-3)의 형태로 존재하다가 가수분해 되어 두 개의 조각으로 분해되면서 활성화 형태를 갖게 된다. 또한 세포사멸의 초기 단계에 작용하며, 32kDa 효소전구체(proenzyme)의 분리에 의해 유도된 17 및 19 kDa 이종이합체(heterodimer)가 활성화된 형태로 caspase-8과 caspase-9의 초기 신호를 증폭시킨다. 한편, 세포사멸은 외인적 및 내인적 경로로 나뉘어 지며, 두 경우 모두 caspase-3의 활성화를 통해 세포사멸을 유발하고, 따라서 caspase-3는 세포사멸에 가장 직접적으로 관련된 caspase이

다. caspase-3가 활성화된 형태로 관찰되려면 불활성 형태인 32kDa의 procaspase-3가 상대적으로 발현이 줄어들거나 그들의 활성화형인 17kDa과 19kDa 분자량의 단백질이 검출되어야 한다. 본 실험 결과, 줄기 클로로포름 분획에서는 농도 의존적으로 32kDa의 procaspase-3가 증가한 반면에, 뿌리 분획을 처리한 군에서 대조군에 대비했을 때 농도가 증가할수록 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3-4).

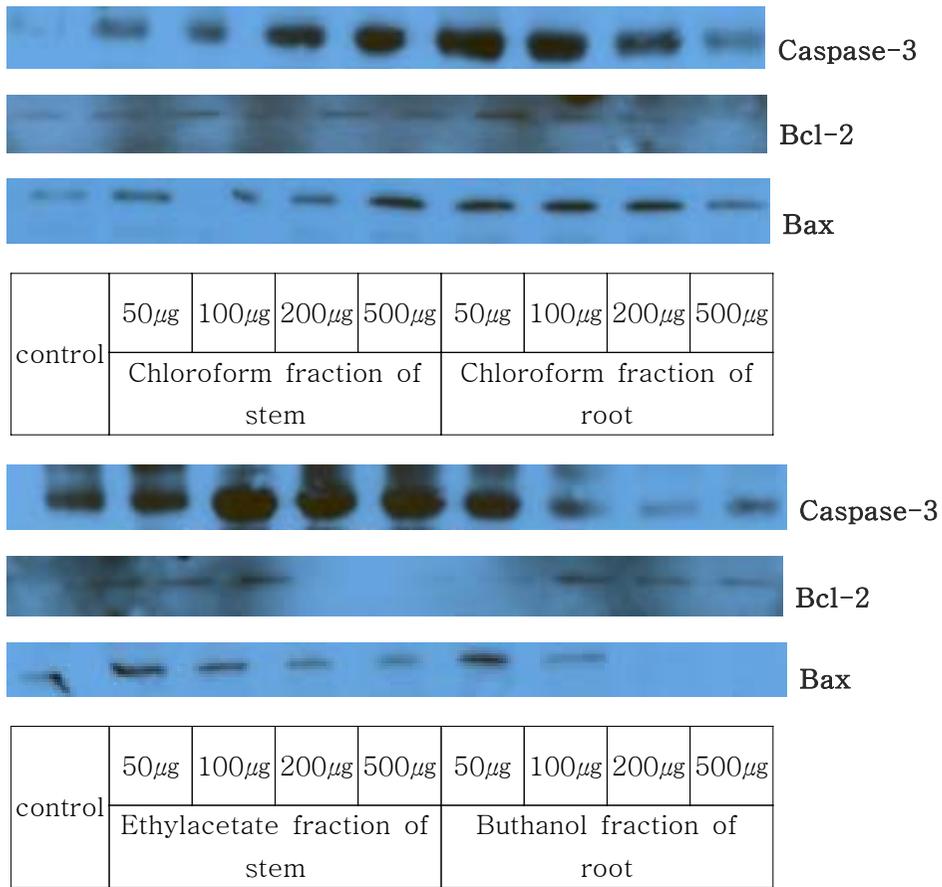


Fig. 3-4. Effects of chloroform fraction on Caspase-3, Bcl-2, and Bax in SW 480 cells. SW 480 cells were treated with chloroform fraction of stem and root(0, 50, 100, 200, 500 μ g/ml) for 24hr. Cell lysates were subjected to western blotting with an antibody against caspase-3, bcl-2, and bax.

제 2 항 느릅나무의 대장암전이억제 효능 (*in vivo*)

1. 실험재료 및 방법

가. 실험동물 및 사육환경

실험동물은 특정병원체부재(SPF) F344계 6주령 수컷 랫드(SLC Inc., Shizuoka, Japan) 89마리를 사용하였다. 이들 랫드는 사육상자(polycarbonate cage)에 3마리씩 넣고 사육하였다. 실험기간 동안의 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 55±10%, 환기횟수 10~15회(hr), 인공조명(12시간 점등, 12시간 소등), 조도 150~300 Lux의 조건을 유지하였다. 시험기간중 실험동물용 표준사료 (Teklad Global 18% protein rodent diet) 분말 또는 고형 사료)를 자유로이 급이 하였고, 필터를 이용하여 여과한 정제수를 자유로이 섭취하도록 하였다. 사육기간 동안 주 1회씩 체중과 사료섭취량을 측정·기록하였으며, 임상증상관찰을 통하여 이상 유무를 확인하였다.

나. 실험 방법 및 내용

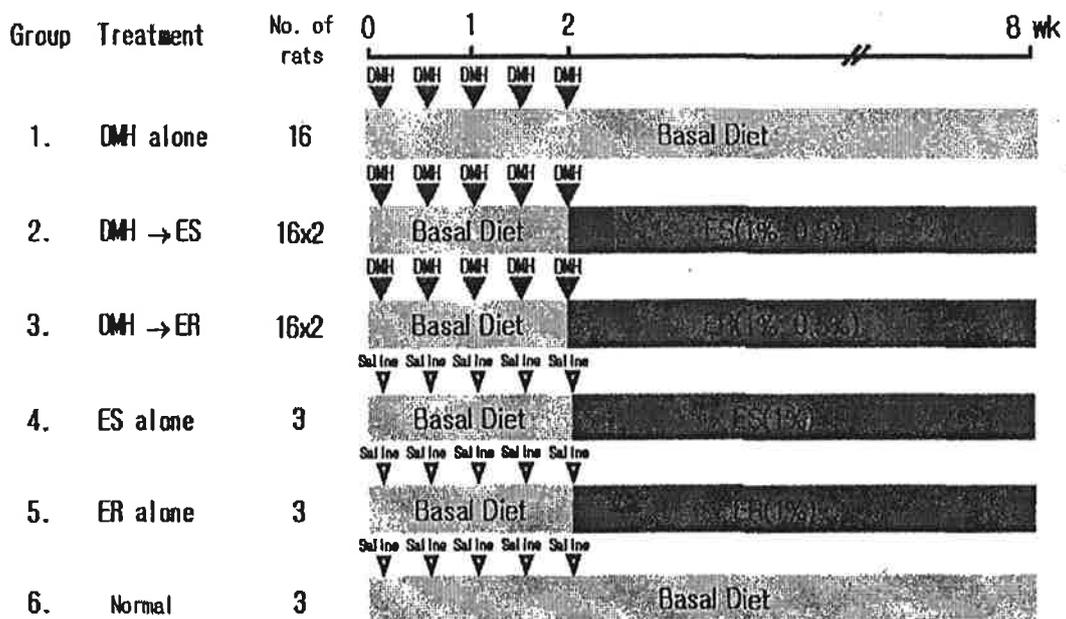
1) 시험물질의 추출과 투여

시험물질인 느릅나무(*Ulmus davidiana var. japonica*)는 느릅나무 줄기추출물(ES) 느릅나무 뿌리추출물(ER)시험군에서의 추출물 투여는 적용 예상 투여경로인 경구로서 에탄올추출물을 사료에 0.5, 1%혼합하여 펠렛을 만들어 자유섭취하게 하였다.

2) 대장발암물질의 투여

대장발암물질로는 DMH(1,2-dimethylhydrazine, Sigma, USA)를 사용하였으며, 체중 kg당 30mg용량으로 Citrate buffer solution에 용해하여 두경부 피하로 2주간 총 5회 투여하였다. 실험동물은 Fig. 5-7에서와 같이 8군으로 분류하였다. 실험군에서 DMH 투여군은 각 군당 16마리, DMH 투여가 없는 시험물질군과 정상대조군은 3마리씩을 사용하였다. 시험물질은 사료무게에 1.0, 0.5%로 혼합하여 펠렛(pellet)형태로 급여하였다.

1. DMH alone군 : DMH 투여 후 기초사료만 급여.
- 2~3. DMH + ES : DMH 투여 후 느릅나무줄기 추출물(ES) High & Low 투여.
- 4~5. DMH + ER : DMH 투여 후 느릅나무뿌리 추출물(ER) High & Low 투여.
- 6~7. ES&ER alone : 느릅나무줄기 및 뿌리 추출물만 High투여 (-DMH)
8. Normal : 정상대조군



Animals : n = 89, 6 weeks old, male F344 rats (SLC Inc., Shizuoka, Japan)
 ACM : 1,2-Dimethylhydrazine(30 mg/kg body weight, sc Inj., 5 times for 2 weeks)
 ES : Extract of Elm tree stem ER : Extract of Elm tree root

Fig. 3-5. Protocol for rat colon cacinogenesis (promotion stage).

3) 부검 및 대장암 전암병변의 검사

마지막 시험물질투여 후 24시간을 절식시킨 후 대장의 ACF(aberrant crypt foci)검색법을 위하여 부검을 실시하였다. 부검시 채증과 적출한 모든 장기의 무

3) 부검 및 대장암 전암병변의 검사

마지막 시험물질투여 후 24시간을 절식시킨 후 대장의 ACF(aberrant crypt foci)검색법을 위하여 부검을 실시하였다. 부검시 체중과 적출한 모든 장기의 무게를 측정하여 기록하였으며, 적출한 모든 장기는 10% 중성완충 포르말린으로 고정하였다. 적출한 대장(직장과 결장을 포함하여)은 고정이 끝난 후 펼쳐 0.3~0.5% 메틸렌블루로 염색을 하여 **대장이상선와소 (Total numbers of aberrant crypt foci; ACF)** 및 **대장이상선와 (Total numbers of aberrant crypts; AC)**의 총수를 현미경 시야($\times 40$, $\times 100$)에서 측정한다. 대장암 전암병변으로 생각되는 마리당 대장 이상선와소(aberrant crypt foci of colonic mucosa/colon:ACF) 및 대장 이상선와(aberrant crypts of colonic mucosa/colon: AC)의 마리당 총수를 측정하였고, 실험군간에 비교하여 대장발암의 수식효과 유무를 확인하였다.

Total ACF/colon

Total ACs/colon: No. of 1-3 AC/ACF

No. of >4 AC/ACF

4) 세포증식능 측정

세포증식능(cell proliferation) 검사를 위하여서 군당 1마리씩에 BrdU(Sigma사)를 체중 kg당 100mg을 부검 한시간 전에 복강으로 투여하였다. 그리고 위와 동일한 방법으로 파라핀블록을 만든 후 조직을 삭정하여 BrdU항체 (BD Biosciences, USA)와 ABC kit(Vector Lab., USA)로 **면역조직화학 염색**을 실시하였다. 장용모를 따라서 위, 중간, 아래부분의 세부분으로 나누어 **세포증식능지표(BrdU L. I.)**를 계산하였다.

5) 혈청생화학적 검사

혈액은 부검시 에테르 흡입마취 하에 배대동맥을 통하여 채혈하였으며, 이를 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 취하였다. 전혈을 채혈해서 얻은 혈액을 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 다음, 원심분리 (1,500rpm \times 10min)해서 얻은 혈청을 혈액자동분석기 (Roche, INTEGRA 400, Germany)를 이용하여 분석

하였다. 혈청을 통하여 혈액내의 Glucose, Creatinine, Total protein, Uric acid, BUN, Albumin, Glutamic oxaloacetic transaminase, Glutamic pyruvic transaminase, Alkaline phosphatase, Total cholesterol, Lactate dehydrogenase, Triglyceride를 측정 비교하였다.

6) 병리조직학적 검사

대장(직장과 결장을 포함하여)은 ACF 검사가 끝난 다음, 조직을 삭정하여 조직처리를 거쳐 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매한 조직은 4 μ m 두께로 얇게 잘라서 HE염색을 실시하여 광학현미경으로 검사하였다.

간과 신장도 위와 동일한 방법으로 조직슬라이드를 제작하여 광학현미경으로 검사하였다.

7) 자료의 통계학적 처리

각각의 실험결과에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하고, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Dunnett's t-test를 실시하였다.

2. 실험결과

가. 체중변화 및 장기무게

8주간의 실험에서 각 군간 체중의 변화와 사료섭취량의 변화에 있어서 DMH 투여기간인 1~2주에서 느릅나무 추출물 투여군에서 체중과 사료의 섭취량이 감소하였으나, 그 뒤 시험기간 동안 정상으로 회복되었다(Fig. 3-6). DMH투여 후 느릅나무 추출물을 사료에 혼합하여 투여한 모든 군에서 체중이 감소하는 경향이 나타났다. 장기무게의 비교에 있어서도 커다란 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 3-2, 3), 느릅나무 추출물이 특이할 만한 독성을 가지고 있지 않은

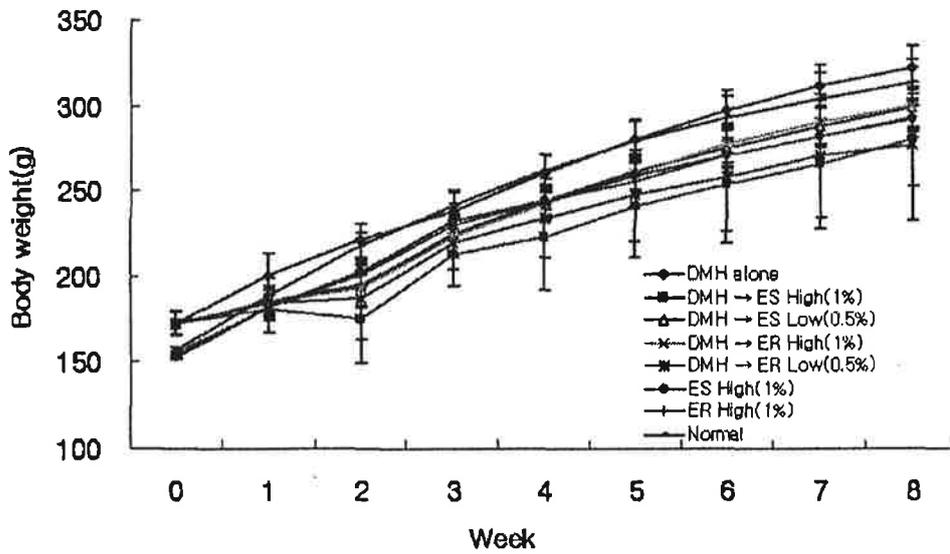


Fig. 3-6. Changes of body weight.

Table 3-1. Change of food consumption ratio (g/day/rat)

Group	Weeks								(g)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
DMH alone	15.99±0.8	15.96±0.8	17.10±1.2	19.12±0.5	19.73±0.7	19.68±0.8	18.89±0.8	18.61±0.8	
DMH→ES High(1%)	4.75±4.1	12.99±7.1	20.10±2.0	14.87±7.6	17.66±6.6	17.12±6.1	16.36±5.9	18.03±1.9	
DMH→ES Low(0.5%)	7.19±1.5	14.68±1.3	19.88±1.4	17.68±0.9	18.23±0.8	17.91±0.8	17.81±0.8	18.03±0.9	
DMH→ER High(1%)	7.39±2.1	15.41±3.2	19.37±0.7	17.94±1.2	18.98±0.9	19.62±1.8	17.98±1.3	17.88±1.4	
DMH→ER Low(0.5%)	8.09±4.0	14.21±5.0	19.73±1.9	16.77±5.8	17.41±6.4	17.40±6.2	16.92±6.2	16.03±6.2	

Table 3-2. The organ weights of F344 rats with treated DMH and *Ulmus deviadiana* var, *japonica* extracts

Group	Final Body Weight(g)	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Thymus	Heart	Lung
DMH alone	304.8±12.2	8.64±0.5	0.67±0.04	0.94±0.06	0.03±0.01	0.32±0.05	0.88±0.06	1.36±0.16
DMH→ES High(1%)	266.5±26.9	7.77±0.7	0.62±0.16	0.88±0.08	0.03±0.01	0.27±0.03	0.81±0.05	1.27±0.21
DMH→ES Low(0.5%)	283.4±12.5	7.86±0.5	0.64±0.05	0.91±0.06	0.02±0.01	0.29±0.03	0.83±0.04	1.30±0.14
DMH→ER High(1%)	284.2±14.9	8.08±0.6	0.66±0.04	0.92±0.05	0.03±0.01	0.27±0.04	0.85±0.05	0.31±0.12
DMH→ER Low(0.5%)	263.7±41.5	7.42±1.3	0.59±0.17	0.88±0.10	0.03±0.00	0.26±0.07	0.79±0.13	1.29±0.08
ES High(1%)	277.4±11.4	7.90±0.3	0.56±0.05	0.89±0.03	0.03±0.01	0.27±0.05	0.82±0.02	1.41±0.10
ER High(1%)	274.1±7.8	8.25±0.9	0.62±0.06	0.91±0.05	0.03±0.01	0.26±0.02	0.85±0.06	1.20±0.12
Normal	294.5±13.2	8.79±0.5	0.64±0.03	0.95±0.06	0.03±0.01	0.29±0.04	0.85±0.05	1.32±0.10

Kidney and Adrenal grand are mean of right and left.

DMH: 1,2-dimethylhydrazine, ES: stem extract, ER: root extract

Table 3-3. The Relative organ weights (%) of F344 rats with treated DMH and *Ulmus davidiana var. japonica* extracts

Group	Final Body Weight (g)	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Thymus	Heart	Lung
DMH alone	304.8±12.2	2.8±0.11	0.22±0.01	0.31±0.01	0.01±0.0	0.11±0.01	0.29±0.02	0.45±0.04
DMH→ES High(1%)	266.5±26.9	2.9±0.20	0.23±0.07	0.33±0.02	0.01±0.0	0.10±0.01	0.31±0.02	0.48±0.05
DMH→ES Low(0.5%)	283.4±12.5	2.7±0.12	0.23±0.01	0.32±0.02	0.01±0.0	0.10±0.01	0.29±0.01	0.46±0.04
DMH→ER High(1%)	284.2±14.9	2.8±0.14	0.23±0.01	0.32±0.02	0.01±0.0	0.10±0.01	0.30±0.01	0.46±0.04
DMH→ER Low(0.5%)	263.7±41.5	2.8±0.12	0.23±0.06	0.34±0.02	0.01±0.0	0.10±0.02	0.30±0.01	0.50±0.09
ES High(1%)	277.4±11.4	2.8±0.02	0.20±0.02	0.32±0.01	0.01±0.0	0.10±0.02	0.30±0.01	0.51±0.05
ER High(1%)	274.1±7.8	3.0±0.25	0.23±0.02	0.33±0.01	0.01±0.0	0.10±0.01	0.31±0.01	0.44±0.03
Normal	294.5±13.2	2.9±0.06	0.22±0.02	0.32±0.01	0.01±0.0	0.10±0.01	0.29±0.01	0.45±0.03

Relative organ weight(%) : Absolute organ weight / body weight × 100

DMH: 1,2-dimethylhydrazine, ES: stem extract, ER: root extract

나. 대장 이상선와소 및 이상선와

대장암의 전암병변 검사는 1984년 Dr. B.S. Reddy 박사가 고안한 방법으로, 설치류 대장점막의 이상선와소 (ACF, aberrant crypt foci colonic mucosa in rodents)와 이상선와 (AC, aberrant crypt colonic mucosa in rodents)를 전암병변 (preneoplastic lesions)의 생체지표 가능성을 제시한 이래로 많은 연구자들이 생약, 또는 그 추출물 등의 대장암 예방효과를 검색하는데 이용하였다. 화학발암물질인 DMH나 AOM을 이용하여 인위적으로 랫드나 마우스와 같은 설치류에서 대장암을 유발할 수 있다. DMH나 AOM을 설치류에 투여하면 대장점막에 이상선와와 이상선와소가 형성되며, 설치류의 ACF는 사람의 대장암 초기병변과 유사하여 인체의 대장암 예방에 중요한 지표로 사용되고 있다. AC는 정상 선와보다 크고 넓은 움 주변지역(pericryptal zone)을 가지고 있으며, 핵은 크고 중첩되어 있는 변형이 된 선와인데, 이들 AC의 집합체가 ACF이다. ACF가 생성되는 시기는 다단계 발암 과정 중 발암개시 세포가 증식이 일어나는 발암촉진단계 (promotion stage)라고 말할 수 있다. 이러한 비정상적인 증식을 거쳐 폴립 (polyp)이나 샘종(adenoma)으로 진행될 수 있으며 종양에는 악성종양으로 발전할 가능성이 매우 높다. 종양으로 발전되기 전에 더 이상의 이상증식을 억제하는 것이 암예방 중의 한 가지 방법이라 할 수 있다. 느릅나무 추출물의 대장암 예방효과를 대장암 전암병변 생체지표인 대장이상선와소(ACF)와 대장이상선와(AC)를 비교분석하였다(Table 3-4, Fig. 3-7, 8). DMH와 느릅나무 추출물을 사료에 혼합하여 투여한, 느릅나무 줄기 0.5%, 느릅나무 뿌리 0.5, 1% 군에서 ACF를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 총 ACF의 수에 있어서 DMH alone군은 529.3개가 생성된데 반해 느릅나무 줄기 0.5% 투여 군에서 323.9개로 39% 감소하였으며, 느릅나무 뿌리 0.5, 1% 투여 군에서는 253.1, 237.2개로 52.2%, 54.2% 감소하였다(Table 3-4). 또한 AC의 수에 있어서도 느릅나무 줄기 0.5% 투여군, 뿌리 0.5%, 1% 투여군에서 현저하게 감소하였다. 특히 느릅나무 뿌리가 줄기에 비하여 탁월한 효과를 보이는 것으로 나타났다.

Table 3-4. Changes of aberrant crypt and aberrant crypt foci in rats treated with DMH and *Ulmus davidiana var. japonica* extracts

Treatments	No. of rats	No. of Total ACF	
		$\Sigma \leq 3AC$	$\Sigma \geq 4AC$
DMH alone	16	464.2± 121.3	65.1± 19.6
DMH → ES High(1%)	16	397.2± 172.9	62.3± 30.2
DMH → ES Low(0.5%)	16	287.1± 60.1**	36.8± 14.0**
DMH → ER High(1%)	16	214.0± 49.3**	23.2± 9.1**
DMH → ER Low(0.5%)	16	233.9± 87.8**	19.2± 11.1**

Treatments	No. of rats	Total ACF/colon (%)	Total AC/colon (%)
DMH alone	16	529.3± 138.5 9 (100)	1191.1± 310.0 (100)
DMH → ES High(1%)	16	459.5± 199.5 (86.8)	1032.2± 443.1 (86.7)
DMH → ES Low(0.5%)	16	323.9± 70.1 (61.2)**	692.5± 162.3 (58.1)**
DMH → ER High(1%)	16	237.2± 55.0 (44.8)**	507.8± 122.9 (42.6)**
DMH → ER Low(0.5%)	16	253.1± 97.0 (47.8)**	525.8± 214.7 (44.1)**

** : Significant different from those of DMH alone (p<0.01)

DMH: 1,2-dimethylhydrazine, ES: Elm stem extract, ER: Elm root extract

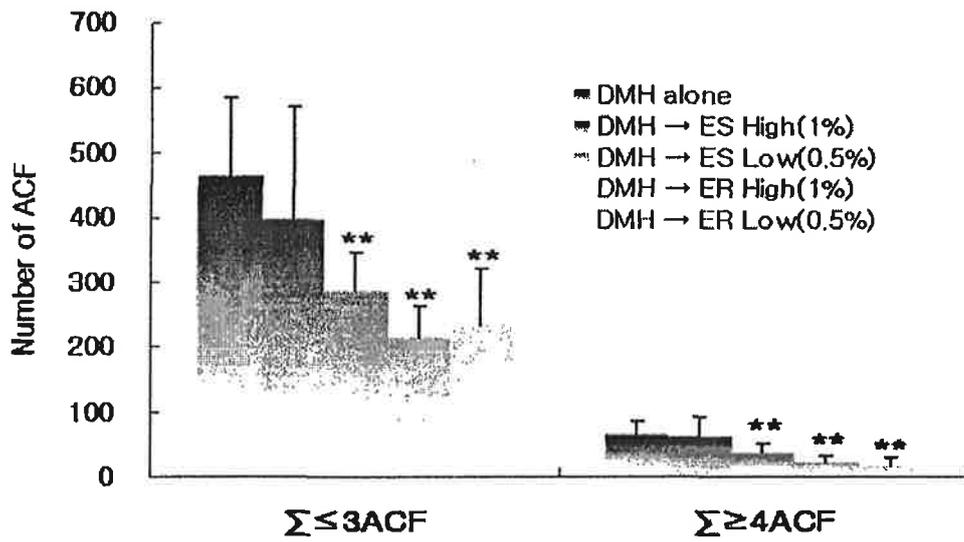


Fig. 3-7. Effect of *Ulmus davidiana var. japonica* extracts on colonic ACF formation in F344

rats. ** : Significant different from those of DMH alone (p < 0.01).

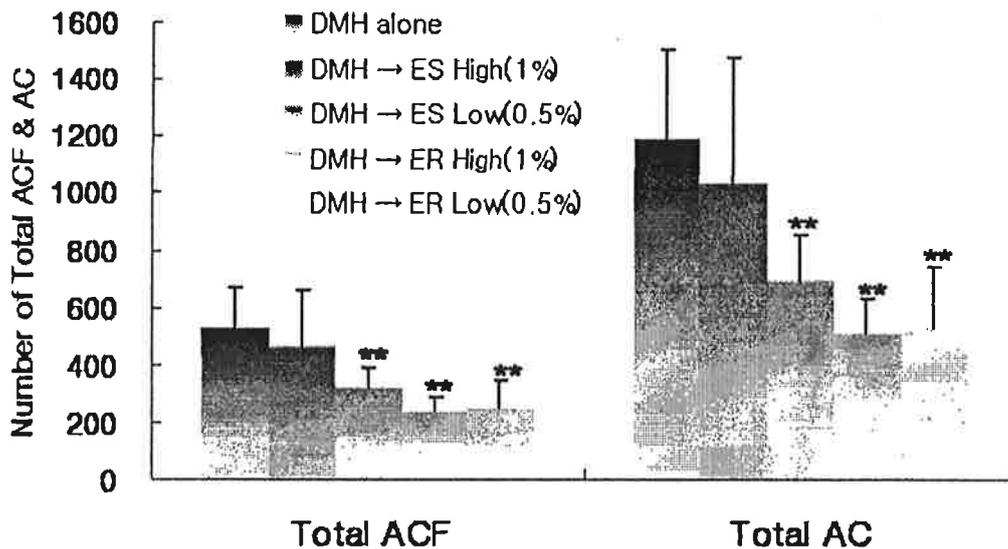
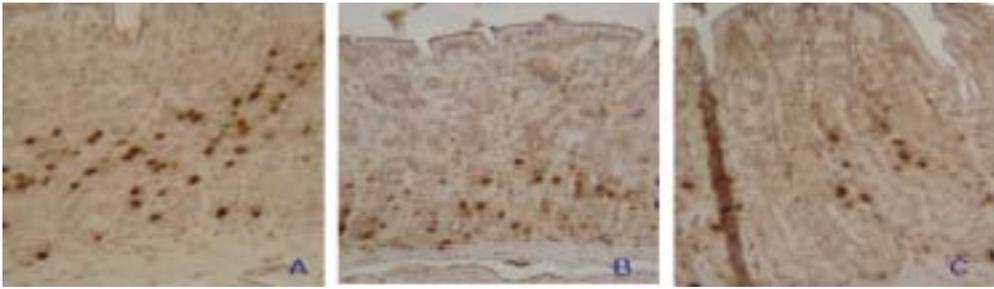


Fig. 3-8. Effect of *Ulmus davidiana var. japonica* extracts on colonic ACF & AC formation in F344 rats. ** : Significant different from those of DMH alone ($p < 0.01$).

다. BrdU 표지에 의한 세포증식능

세포증식에 관한 검색은 생물학이나 의학에 있어서 매우 중요한 연구과제이며, 암 세포의 증식, 조직의 재생등의 연구에 필수 불가결한 것이다. BrdU는 Grazter에 의해 개발된 이후, 기존에 사용되어져 오던 방사성동위원소인 ^3H -thymidine를 대신하여 계속적으로 이용되어지고 있다. BrdU 표지에 의한 세포증식능의 측정 결과 DMH에 의해 증가된 세포증식이 일어난 세포의 수가 느릅나무 줄기, 뿌리 추출물 투여에 의해 감소한 것으로 나타났다(Fig 3-9, 10).



A: DMH alone, B: DMH+UD stem, C: DMH +UD root

Fig. 3-9. Immunohistochemical staining of BrdU.

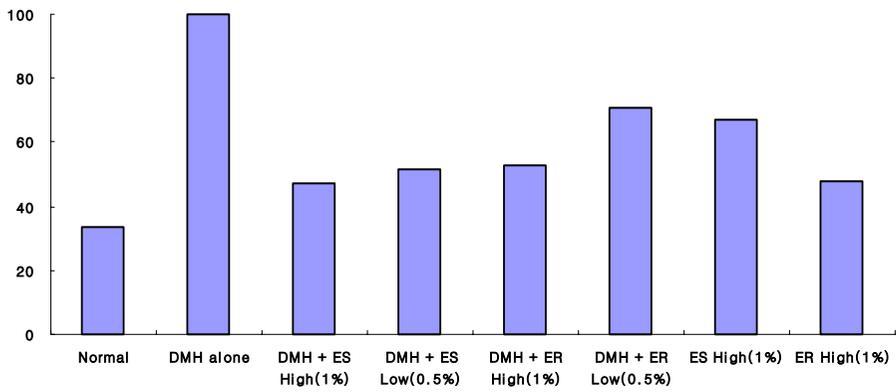


Fig. 3-10. Cell proliferation is expressed as BrdU labelling index.

라. 혈액생화학적 biomarker

느릅나무 추출물을 투여한 랫드의 혈청생화학적 검사결과는 Table 5-5에
 서와 같다. DMH 단독투여군과 비교하여 Lactate dehydrogenase(LDH)의 수치
 가 느릅나무 추출물 투여군(줄기 0.5%, 뿌리 0.5, 1%)에서 감소하였고, 느릅나무
 줄기 추출물 1%만이 증가하였다. 다른 지표의 수치에 있어서는 생리적 변화의
 범위에 있는 것으로 관찰되었다.

Table 3-5. Biochemical analysis in rats treated with DMH and UD extracts

Treatments	GLU	CRE	TP	UA	BUN	ALB
DMH alone	116.1±18.61	0.5±0.07	7.2±0.28	1.7±1.04	24.2±3.00	4.9±0.26
DMH→ES High(1%)	101.0±17.25	0.5±0.10	7.3±0.40	1.7±0.98	21.3±2.91	4.6±0.32
DMH→ES Low(0.5%)	100.9±29.10	0.6±0.23	7.0±0.45	1.7±0.88	21.1±2.53	4.9±0.23
DMH→ER High(1%)	100.6±20.70	0.7±0.49	6.9±0.28	1.5±0.80	20.8±2.21	4.8±0.43
DMH→ER Low(0.5%)	112.5±27.71	0.6±0.33	6.6±0.70	1.5±0.68	22.2±3.98	4.7±0.47
ES High(1%)	115.0±32.53	0.5±0.00	6.9±0.07	1.1±0.35	21.5±2.62	4.7±0.00
ER High(1%)	127.0±13.89	0.9±0.64	6.8±0.50	0.9±0.15	19.4±2.29	4.7±0.75
Normal	141.0±26.87	1.8±0.64	6.6±0.21	0.8±0.07	20.7±1.91	4.7±0.00

(Continued)

Treatments	GOT	GPT	ALP	T-CHO	LDH	TG
DMH alone	117.3±28.43	58.3±8.83	331.1±34.25	70.0±6.94	3337.5±1435.87	110.2±36.61
DMH→ES High(1%)	148.8±91.45	62.9±17.37	342.0±57.06	80.4±12.12	4217.8±1588.71	77.7±7.82
DMH→ES Low(0.5%)	105.7±19.33	56.1±9.46	311.3±35.82	75.7±10.38	2646.7±757.15	70.3±18.78
DMH→ER High(1%)	112.0±25.17	57.9±11.90	330.0±30.69	82.6±9.73	2822.5±1115.44	81.0±25.31
DMH→ER Low(0.5%)	103.6±18.22	54.7±6.84	294.1±35.03	79.3±12.35	2376.0±964.61	51.4±20.24
ES High(1%)	89.0±5.66	51.5±0.71	330.5±41.72	84.0±2.83	2485.0±1393.00	51.0±14.14
ER High(1%)	106.0±15.62	56.7±14.19	287.0±6.56	85.3±15.63	1740.0±122.88	38.0±12.49
Normal	71.5±16.26	32.5±13.44	265.5±3.54	79.0±14.14	840.0±905.10	57.5±9.19

Glucose(GLU), Creatinine(CRE), Total protein(TP), Uric acid(UA), BUN, Albumin(ALB), Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), Glutamic pyruvic transaminase(GPT), Alkaline phosphatase(ALP), Total cholesterol(T-CHO), Lactate dehydrogenase(LDH), Triglyceride(TG)

또한 육안소견상이 장기의 변화는 없었으며, 특히 간이외의 장기에서의 특이한 병리조직학적 변화는 관찰되지 않았다.

제 3 항 느릅나무의 폐암예방 효능 (*in vivo*)

1. 실험재료 및 방법

가. 실험동물 및 사육환경

생후 3일령의 A/J마우스에 폐암 유발 물질인 벤조피렌 (Benzo[a]pyrene)을 투여하여 폐암이 유발되게 후 느릅나무 뿌리 추출물을 사료에 혼합하여 제조한 뒤, 모유수유를 중지하고 사료를 섭취하기 시작하는 3주령부터 13주령까지 자유섭취하도록 하였다. 13주령이 되는 시기에 부검을 실시하여 간, 신장, 비장, 폐를 적출하여 육안관찰을 실시하였고, 폐는 아세톤으로 고정한 후 실체현미경을 이용하여 육안으로 폐샘종(Lung adenoma)의 발생개수와 크기(직경)를 측정하였다.

태어나서 사료를 직접 섭취하기 전의 모유수유를 하는 마우스에 벤조피렌을 투여하여 폐암을 유발한 후에 느릅나무뿌리에서 추출한 시료를 혼합하여 사료를 만들어서 사료를 섭취하기 시작하는 시점부터 공급하여 마우스에 자유섭취하게 하였다. 실험이 종료되는 시점에서 부검을 실시하여 폐, 간, 비장, 신장을 적출하여 검사한다. 신생 A/J마우스에 벤조피렌을 1회 투여하여 폐암을 유발시켰다.

1) 실험물질

- 느릅나무 추출물: 느릅나무를 분쇄하여 에탄올 추출한 다음 추출물의 농도가 0.5%~ 2%가 되도록 사료에 혼합하여 펠렛(고체)형태로 만들어서 자유섭취하게 하였다.

2) 실험동물

임신 AJ마우스로부터 태어난 신생마우스를 사육 상자에 모유수유를 하는 동안은 모체마우스와 같이 수용하고, 모유수유가 끝나는 3주부터는 모체와 격리하여 암·수를 구분하여 수용하였다. 동물실내 환경은 온도 23 ± 2 °C, 상대습도 60 ± 10 %, 환기횟수 10~15 회/시간, 조명주기 12 시간 점등/12 시간 소등, 조도 150~300 Lux를 유지하여 사육하였다.

3) 발암물질 투여 및 실험물질 투여

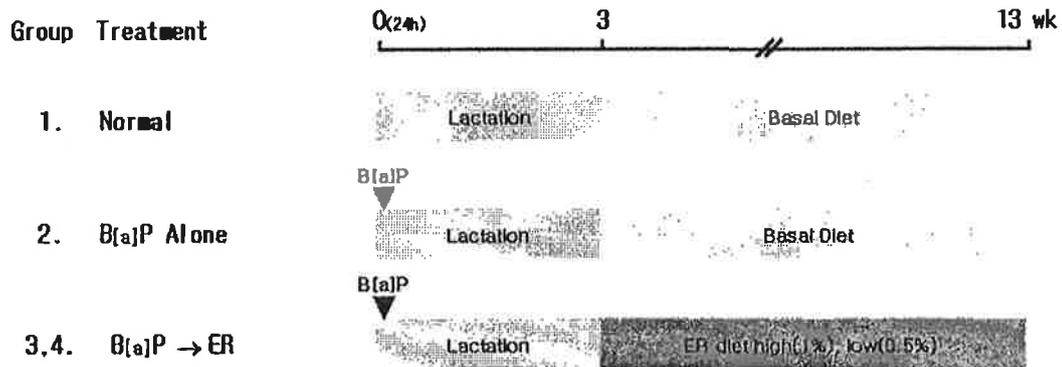
임신 AJ마우스에서 태어난 3일령의 신생 마우스의 등쪽 어깨부위 피부밑조직 내로 벤조피렌(Benzo[a]pyrene)을 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 올리브 오일에 부유시켜 $20\mu\text{l}$ 씩을 피하투여하여 폐암이 유발되도록 한 후 모유수유를 마치고 사료를 섭취하게 되는 3주부터 군분리 및 암·수 분리를 실시하였다. 3주부터 13주까지 10주간을 느릅나무 추출물 혼합사료를 자유섭취하게 하여 마지막 사료 급여이후 1일을 절식시켜 부검을 실시하였다.

가) 조사내용

- 매주 체중과 사료섭취량을 측정하였다.
- 부검시에 장기별 무게를 측정하여 기록하였다.
- 부검시 폐를 적출하여하여 폐표면의 폐샘종의 발생개수를 세고, 폐샘종 각각의 직경을 측정한다.

나) 조사방법

- 주 1회 체중과 사료섭취량을 측정하였다.
- 실험 종료후 부검을 하여 폐, 간장, 비장, 신장(좌,우)의 무게를 측정하여 각 실험군 별로 비교 분석하였다.
- 부검시 폐는 아세톤에 고정하여서 폐표면과 폐샘종이 뚜렷이 구분이 되도록 한 뒤에 실체현미경을 이용하여 폐샘종의 발생개수를 세고, 버니어캘리퍼스를 이용하여 폐샘종 각각의 직경을 측정하였다.



Animals : New born mice (A/J, Korea)

B[a]P : Benzo[a]pyrene (0.5 mg/head in 0.02 ml olive oil , single inj. SC. In 24 hours)

ER : Extract of Elm tree root

Fig. 3-11 Protocol for rat lung carcinogenesis.

4) 부검 및 폐샘종 (lung adenoma)의 관찰

부검시 간, 비장, 신장을 적출하여 육안적 이상유무를 확인하고, 폐는 폐샘종 확인을 위하여 아세톤에 고정하였으며, 나머지 장기는 10% 중성완충포르말린에 고정하였다.

폐샘종은 실체현미경을 통하여 관찰하고, 폐의 부위별 발생위치 및 개수를 측정하였다.

5) 통계분석

각각의 실험결과에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하고, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Dunnett's t-test를 실시하였다.

나. 실험결과

1) 체중변화, 사료섭취량 및 장기무게

수컷과 암컷 모두 3주에서부터 13주까지 발암대조군에 비하여 느릅추출물 혼합사료급여군에서 체중이 낮게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. 발암대조군인 벤조피렌 단독투여군과 비교하여 다른 군들에서 사료섭취량이 적게 나타나는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

2) 폐샘종의 발생개수 및 크기

수컷에서 폐샘종의 발생개수는 직경이 0.5mm 이상 것(직경 1mm 이상인 것 포함), 직경이 1mm 이상인 것, 전체 발생한 폐샘종의 총합 모두에서 유의적으로 감소($p < 0.05$)하였다. 폐샘종의 총합의 개수는 벤조피렌 단독투여군의 평균발생개수 58.118 ± 45.288 에 비하여 느릅나무 추출물 1% 혼합사료 급여군의 평균발생개수는 35.667 ± 27.126 로 약 40% 정도로 유의적 수준으로 감소효과가 있었다. 직경이 1mm 이상인 것도 마찬가지로 벤조피렌 단독투여군의 발생개수 5.7 ± 4.93 에 비하여 느릅나무 추출물 1% 혼합사료 급여군의 발생개수는 2.6 ± 3.15 로 54% 정도로 감소하였다(Fig. 3-14). 암컷에서는 폐샘종의 총합에서는 벤조피렌 단독투여군의 발생개수 50.62 ± 35.12 에 비하여 느릅나무 추출물 1% 혼합사료 급여군의 발생개수는 35.08 ± 21.80 으로 감소하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 직경이 1mm 이상인 것에서는 벤조피렌 단독투여군의 발생개수 4.54 ± 6.46 에 비하여 느릅나무 추출물 1% 혼합사료 급여군의 발생개수는 0.69 ± 0.95 로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3-15). 각 군별 폐표면의 폐샘종 유발사진을 Fig. 3-16 ~ 21까지 비교하였다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때, 느릅나무 추출물은 폐암모델에서 폐샘종의 생성을 유의적으로 감소시키는 것으로 보아 폐암의 암예방효과에 있어 탁월한 효능을 지니고 있는 것으로 사료된다.

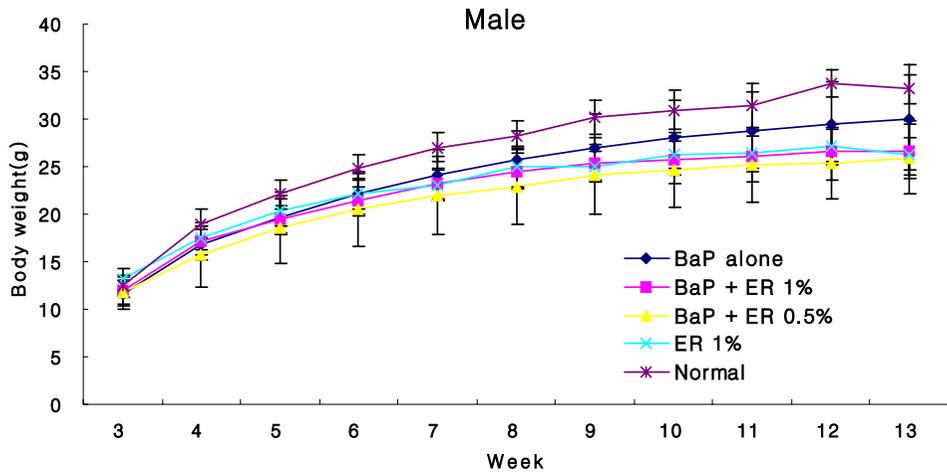


Fig. 3-12. Changes of body weight.

DMH: 1,2-dimethylhydrazine, ES: stem extract, ER: root extract

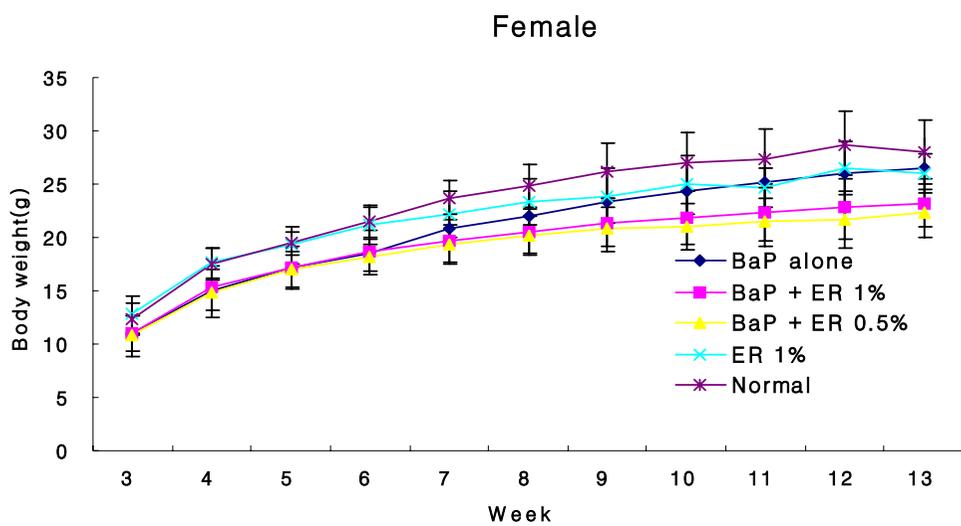


Fig. 3-13. Changes of body weight.

DMH: 1,2-dimethylhydrazine, ES: stem extract, ER: root extract

Table 3-6. The feed consumption (g) of A/J mice treated with DMH and *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts

Male

Week \ Group	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
BaP alone	2.85±0.33	3.33±0.14	3.46±0.18	3.65±0.24	3.56±0.16	3.58±0.27	3.57±0.27	3.63±0.21	3.57±0.06	3.48±0.29
BaP + ER 1%	3.32±0.41	3.23±0.31	3.26±0.11	3.52±0.34	3.35±0.34	3.31±0.09	3.32±0.38	3.28±0.14	4.04±1.76	3.13±0.09
BaP + ER 0.5%	3.15±0.50	3.50±0.35	3.38±0.33	3.46±0.28	3.32±0.28	3.39±0.21	3.39±0.28	3.26±0.14	3.39±0.45	3.27±0.04
ER 1%	3.26	3.56	3.65	2.95	3.34	3.37	3.33	3.39	3.66	3.65
Normal	3.40	3.75	4.00	3.81	3.80	4.13	3.94	3.84	4.21	3.67

Female

Week \ Group	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
BaP alone	3.16±1.01	2.92±0.33	3.30±0.43	3.61±0.29	3.36±0.26	3.51±0.32	3.57±0.31	3.50±0.16	4.12±1.35	3.45±0.36
BaP + ER 1%	3.02±0.46	3.12±0.18	3.14±0.22	3.22±0.22	3.19±0.30	3.22±0.29	3.21±0.34	3.06±0.18	3.50±0.38	3.35±0.65
BaP + ER 0.5%	2.95±0.57	3.11±0.30	3.20±0.31	3.13±0.21	3.22±0.45	3.27±0.44	3.17±0.36	3.17±0.33	3.23±0.37	3.32±0.21
ER 1%	3.63	3.70	3.69	3.13	3.38	3.30	3.44	3.12	4.11	3.32

DMH: 1,2-dimethylhydrazine, ES: stem extract, ER: root extract

Table 3-7. The relative organ weights (%) of A/J mice treated with DMH and *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts

* Male						
Treatments	Final body weight	Liver	Spleen	Lungs	Kidneys	
					left	right
BaP alone	28.11±4.90	3.44±0.24	0.27±0.07	0.64±0.12	0.51±0.07	0.51±0.08
BaP + ER 1%	24.18±2.96	3.49±0.42	0.31±0.17	0.66±0.08	0.57±0.07	0.57±0.05
BaP + ER 0.5%	23.90±1.65	3.47±0.16	0.26±0.05	0.66±0.07	0.57±0.07	0.58±0.06
ER 1%	21.93±1.79	3.41±0.17	0.23±0.04	0.75±0.03	0.69±0.06	0.68±0.04
Normal	31.31±1.43	3.40±0.24	0.26±0.02	0.58±0.02	0.59±0.05	0.56±0.03

Female						
Treatments	Final body weight	Liver	Spleen	Lungs	Kidneys	
					left	right
BaP alone	24.55±2.58	3.36±0.24	0.30±0.09	0.66±0.10	0.45±0.04	0.46±0.03
BaP + ER 1%	24.12±2.84	3.21±0.44	0.28±0.11	0.60±0.09	0.50±0.09	0.51±0.10
BaP + ER 0.5%	19.98±2.24	3.54±0.79	0.28±0.04	0.71±0.08	0.56±0.07	0.57±0.10
ER 1%	22.14±1.88	4.76±2.18	0.54±0.54	0.76±0.08	0.60±0.05	0.63±0.06
Normal	26.00±2.74	3.56±0.13	0.40±0.24	0.64±0.04	0.53±0.03	0.52±0.01

DMH: 1,2-dimethylhydrazine, ES: stem extract, ER: root extract

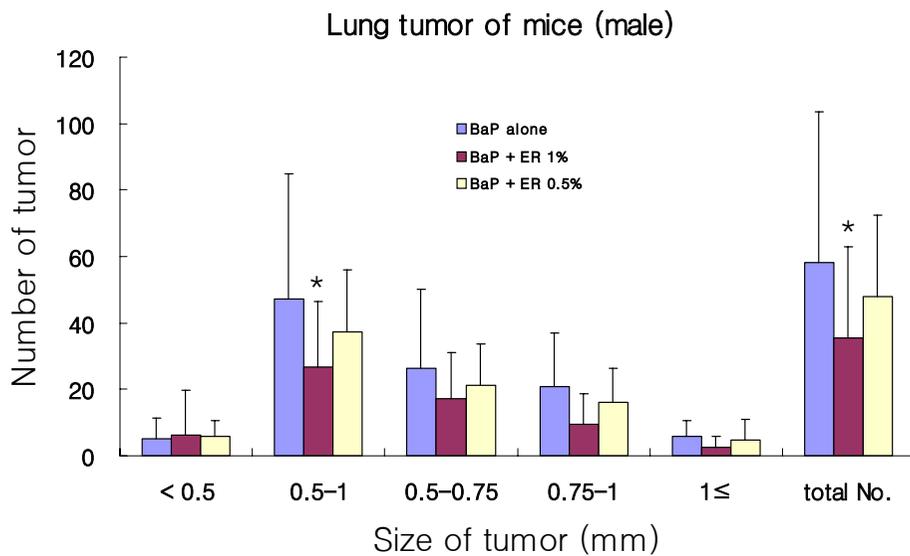


Fig. 3-14. Effects of *Ulmus davidiana var. japonica* extracts on lung tumor induced by B(a)P in A/J Mice.

* : Significant different from those of B(a)P alone (p<0.05)

DMH: 1,2-dimethylhydrazine, ES: stem extract, ER: root extract

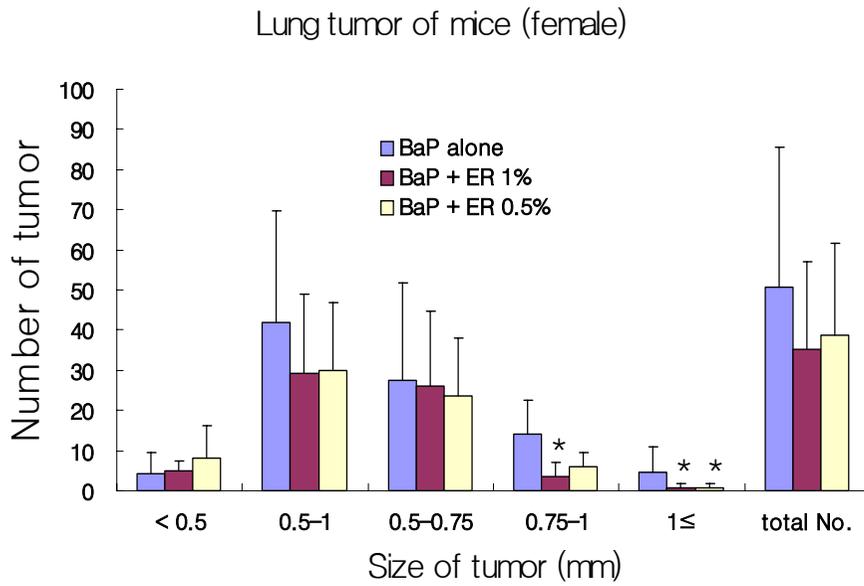


Fig. 3-15. Effects of *Ulmus davidiana var. japonica* extracts on lung tumor induced by B(a)P in A/J Mice.

* : Significant different from those of B(a)P alone (p<0.05)

DMH: 1,2-dimethylhydrazine, ES: stem extract, ER: root extract

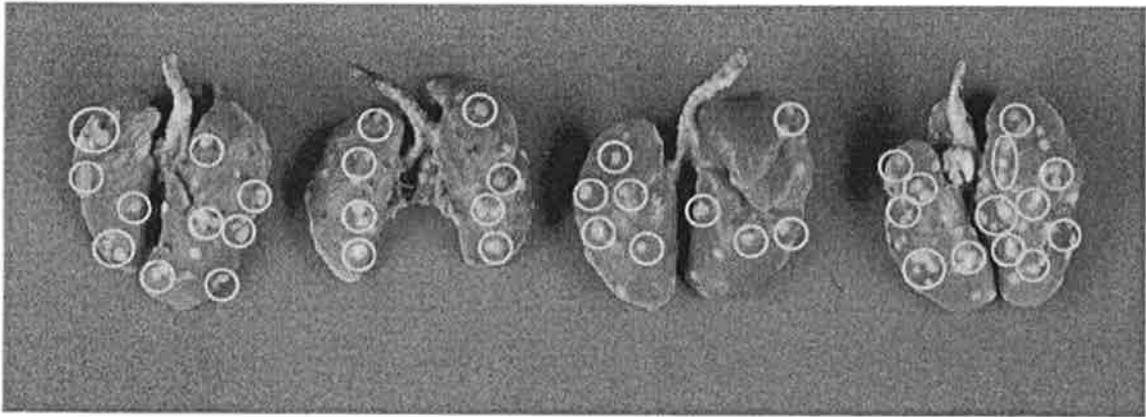


Fig. 3-16. B(a)P alone (male)

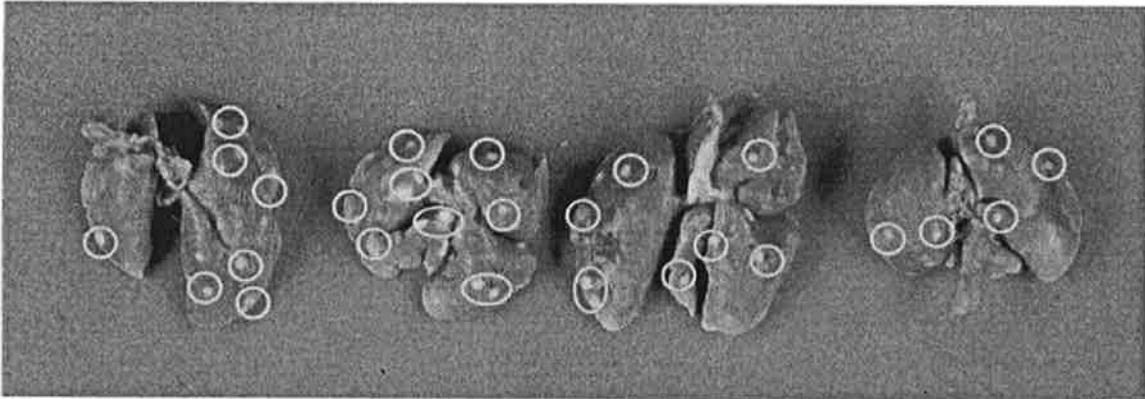


Fig. 3-17. B(a)P + root extract 0.5% (male)

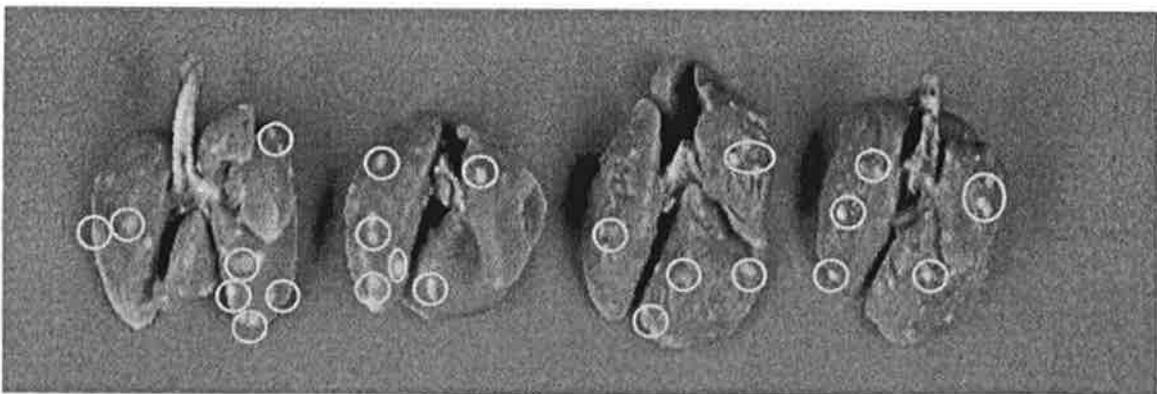


Fig. 3-18. B(a)P + root extract 1% (male)

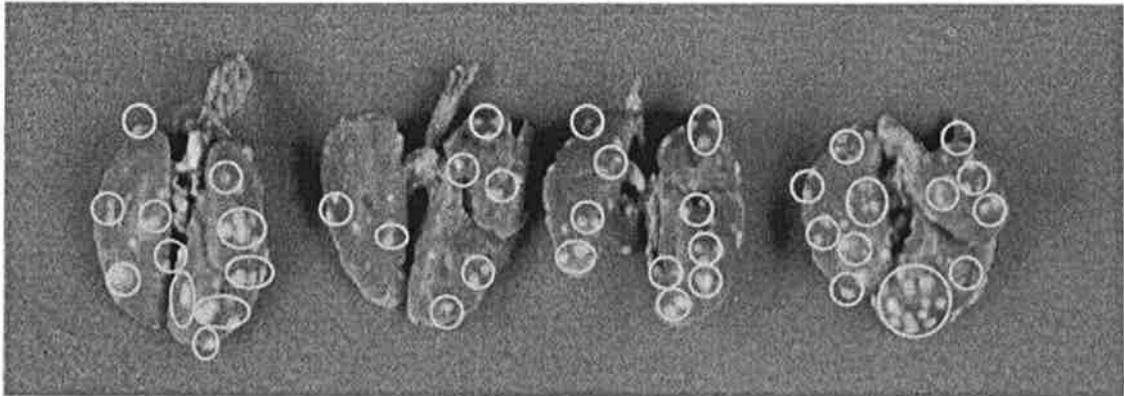


Fig. 3-19. B(a)P alone (female)

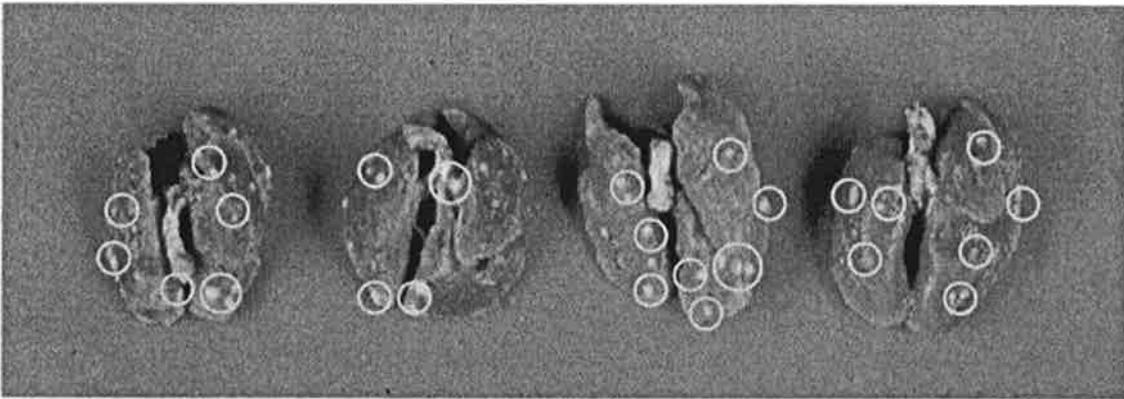


Fig. 3-20. B(a)P + root extract 0.5% (female)

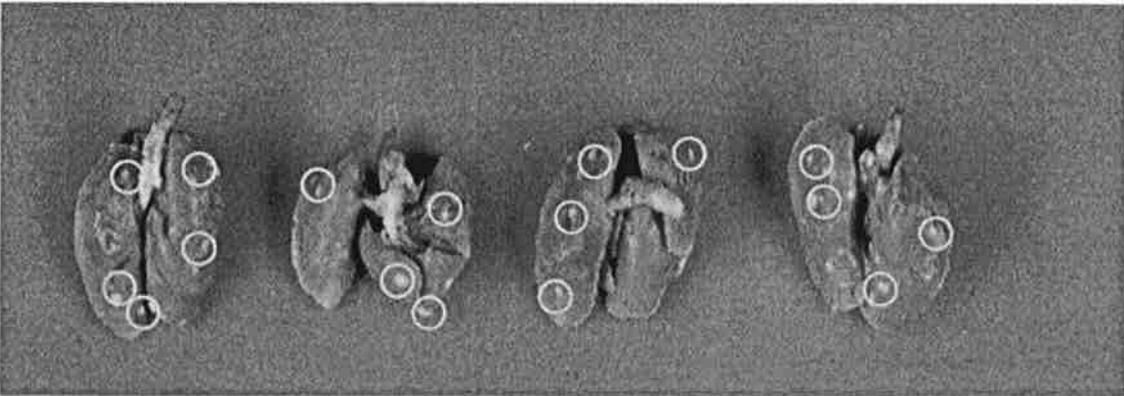


Fig. 3-21. B(a)P + root extract 1% (female)

제 4 절 느릅나무의 지표물질 설정

제 1 항 지표물질 설정을 위한 분획 및 활성측정

1. 실험재료 및 방법

가. 추출 및 분획

수세, 정선한 느릅나무 뿌리를 80% 에탄올로 하룻밤 동안 교반 추출하여 에탄올 추출물을 조제하고, 선행된 방법으로 순차분획한 획분 중 부탄을 획분을 시료로 이용하였다.

나. 생리활성 물질의 분리

1) 1차 분리

일차로 활성 획분을 분리하고자 실리카겔 (Merk 60, 70-230 mesh, 0.063-0.2mm)을 고정상으로 하였으며, 이동상은 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하여 stepwise gradient 방법으로 elution 시켰다. 유출되는 각 분획을 TLC로 확인하면서 이동상의 극성을 9/1/1, 8/2/1, 7/3/1, 6/4/1, 5/5/1의 비율로 증가시켰으며 마지막 메탄올로 washing하였다. Chromatography가 완결된 후 TLC pattern에 따라 같은 분획끼리 모으고 용매를 제거하였다. chromatography에서 얻은 분획 중 생리활성 실험에 의하여 활성을 확인하고 확인된 분획은 2차 column을 통해 분리하였다.

2) 2차 분리

1차 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 를 이동상으로 하여 분획된 생리활성획분의 2차 분리, 정제를 위하여 ethylacetate/hexane=1:2를 이동상으로 하여 1차 분리와 마찬가지로 stepwise gradient 방법으로 elution 시켰으며, 유출되는 각 분획을 TLC로 확인하고, 같은 분획끼리 모아 용매제거한 뒤 얻어진 분획에 대하여 활성을 확인하였다.

다. 분획별 활성 측정

1) DPPH Free radical 소거능 측정

DPPH free radical 소거능은 Blois(18)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 적절한 농도로 희석된 각 시료 0.2 ml과 4×10^{-4} M의 DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)용액 0.8 ml을 첨가한 후 실온에서 15분간 방치한 뒤, 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Acetylcholinesterase 억제활성

Acetylcholinesterase(Achase) 저해활성은 Geroge L. Ellman법을 응용하여 측정하였다. 기질로서는 acetylthiocholine iodide를 사용하였고 dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB)에 의한 발색을 412 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 측정하여 효소활성도를 산출하였다. 이러한 효소활성도는 control에 대한 효소활성 억제활성을 백분율(%)로 나타내었다.

2. 실험결과

가. 분리획분의 활성 및 Flavonoid pattern

1) 1차 분리

가) 항산화활성 및 Acetylcholinesterase 억제활성

느릅나무 뿌리 80% 에탄올 추출물로부터 순차분획에 의하여 얻어진 부탄올 획분 5g을 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=9/1/1, 8/2/1, 7/3/1, 6/4/1, 5/5/1$ 의 비율로 추출하였다. 부탄올 층의 5가지 분획물에 대한 항산화 효능을 관찰하기 위해 DPPH radical 소거활성을 관찰한 결과는 Table 4-1과 같다. 각 분획별 radical 소거활성은 대체로 극성이 증가될수록 높아져서 비교적 6/4/1, 5/5/1의 획분(Frc. 4, 5)에서 활성이 높아짐을 관찰할 수 있었다. 또한 부탄올 층의 5가지 분획물에 대한 acetylcholinesterase 억제활성을 관찰한 결과(Table 4-2), DPPH radical 소거능과 마찬가지로 극성이 증가될수록 높아져서 비교적 6/4/1, 5/5/1의 획분(Frc. 4, 5)에서 활성이 높아짐을 관찰할 수 있었다.

Table 4-1. Effects of 5 fraction of n-butanol fractions from *Ulmus daviadiana* var, *japonica* on DPPH radical scavenging activities

Frac.	Inhibition activity (%)				
	1 ug	5 ug	10 ug	50 ug	100 ug
BuOH	2.5	28.8	30.1	58.5	85.9
1 (9/1/1)	7.8	7.2	5.6	8.6	13.3
2 (8/2/1)	-2.2	-1.4	0.3	9.9	19.6
3 (7/3/1)	-2.2	-0.7	0.9	12.8	26.0
4 (6/4/1)	0.0	11.5	24.7	79.6	87.8
5 (5/5/1)	-0.8	8.8	20.3	63.6	89.6
MeOH washing	-1.8	-2.8	-2.6	-0.3	-0.7

Table 4-2. Effects of 5 pools of n-butanol fractions from *Ulmus daviadiana* var, *japonica* on acetylcholinesterase inhibitory activities.

Frac.	AChE inhibition (%)
BuOH	53.2
1 (9/1/1)	5.6
2 (8/2/1)	11.0
3 (7/3/1)	21.1
4 (6/4/1)	30.8
5 (5/5/1)	37.9
MeOH washing	18.6

나) Flavonoids profile

1차 분리에 의하여 얻어진 분획물에 함유되어있는 flavonoid pattern을 관찰한 결과(Fig. 4-1, 2) 느릅나무 부탄을 획분에는 카테킨 등과 같은 simple flavonoids 등이 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 부탄을 층으로부터 획득한 5가지 획분들의 profile을 분석 한 결과, 많은 종류의 simple flavonoids 들이 Frc. 4에 집중되어 있음을 알 수 있었다. 종합적으로 1차 CHCl₃/MeOH/H₂O 에 의하여 추출된 느릅나무 뿌리의 부탄을 획분 들 중 6/4/1의 비율로 추출된 Frc. 4에 많은 항산화 성분 및 유효성분들이 이행되는 것으로 판단되었다.

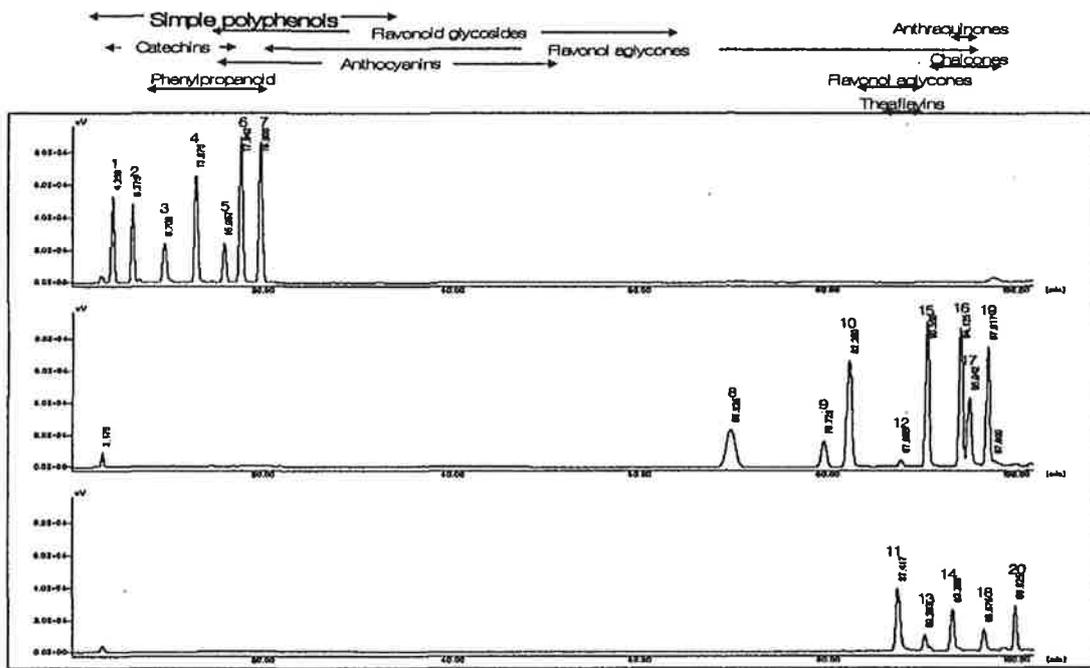


Fig. 4-1-1. Typical HPLC profile for polyphenols. Number show the following standard chemicals: 1, gallic acid; 2, protocatechuic acid; 3, chlorogenic acid; 4, caffeic acid; 5, catechin 6, p-coumaric acid; 7, puerarin 8, daidzein 9, equol 10, naringenin 11, formononetin 12, quercetin 13, kaempferol 14, glycirrhizin 15, apigenin 16, isoliquiritigenin 17, flavone 18, chrysin 19, biochanin A; 20, glabridin

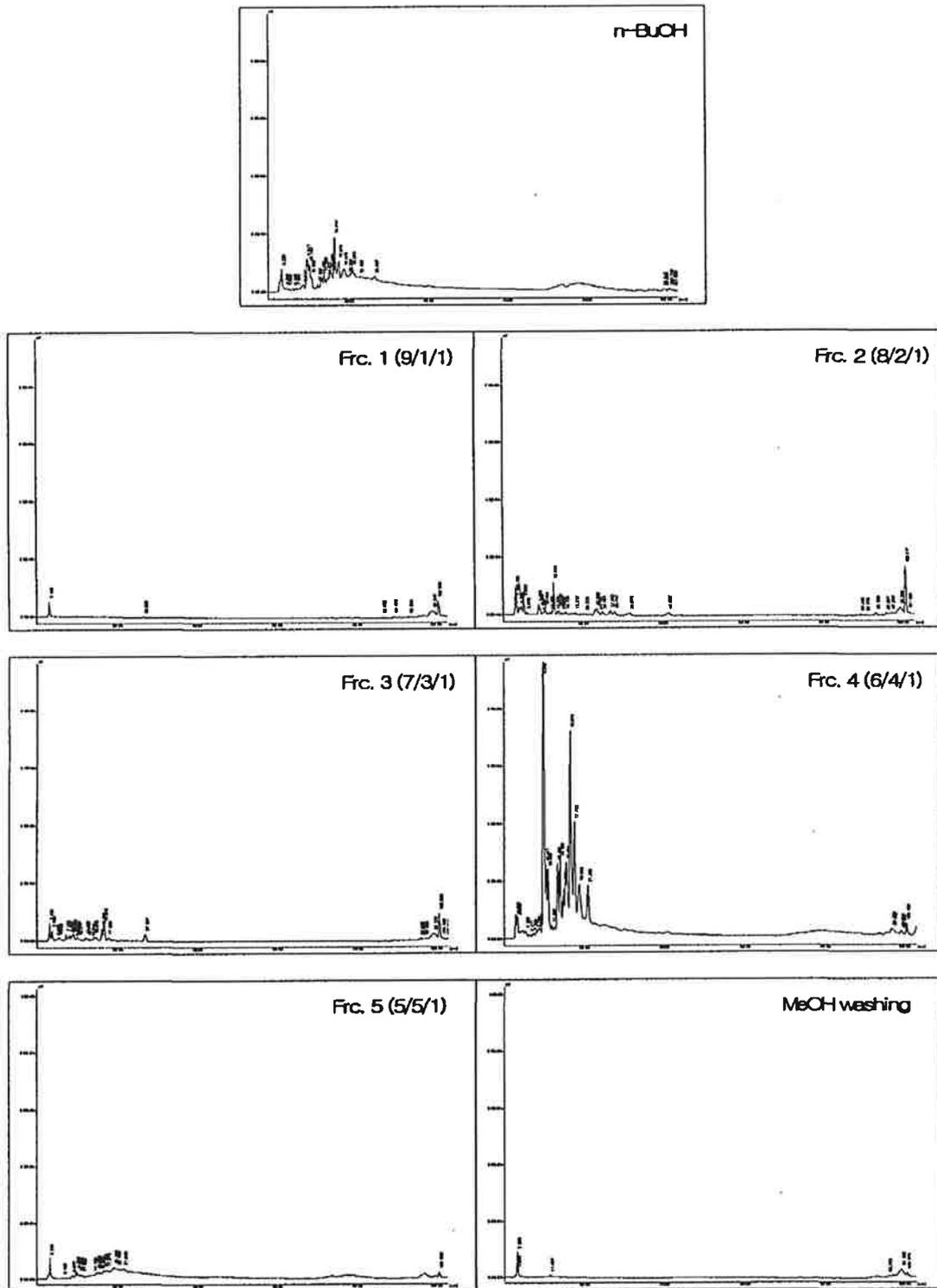


Fig. 4-1-2. Flavonoids profile in 5 fraction n-butanol fractions from *Ulmus davidiana* var, *japonica*

2) 2차 분리

가) 물질의 분리

1차 분리로부터 유효성분들의 이행이 확인된 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=6/4/1$ 의 비율로 추출된 Frc. 4에 대하여 ethylacetate/hexane=1:2를 이동상으로 하여 2차 추출을 실시하였다. 추출 조건은 fraction collector를 이용하여 분당 60방울씩 취하여 총 130개의 fraction을 얻었으며, 얻어진 fraction에 대해서 이동상과 같은 전개용매를 사용하여 TLC(Merk, 60_{F254})로 유효성분의 유무를 확인하고 같은 pattern끼리 묶어 fractionation하였다. 즉, fractionation 결과, 총 130개(No. 1~130)의 fraction을 취하여 다음과 같이 총 7개의 sub-fraction (Frc. 4-1~7)을 얻었다. 즉 No.4~12(frc. 4-1 51.5mg), 31~33(frc. 4-2, 2.9mg), 34~38(frc. 4-3, 5.4gm), 39~46(frc. 4-4, 11.9mg), 47~63(frc. 4-5, 16.8mg), 64~68(frc. 4-6, 5.3mg), 69~130(frc. 4-7, 33.0mg)와 같은 sub fraction을 얻었는데, 이들 중 31~33(frc. 4-2, 2.9mg), 34~38(frc. 4-3, 5.4gm), 39~46(frc. 4-4, 11.9mg)의 3개의 fraction 들을 하나의 fraction으로 하여 frc. 4-4로 명칭하였고(Fig. 4-2). 획득된 부탄을 획득의 sub-fraction에 대해서 TLC로 확인 한 결과는 Fig. 4-3-2 과 같다.

나) 항산화활성 측정

1차 분리로부터 유효성분들의 이행이 확인된 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=6/4/1$ 의 비율로 추출된 Frc. 4에 대하여 ethylacetate/hexane=1:2를 이동상으로 하여 2차 추출을 실시한 후 획득된 sub-fraction에 대하여 DPPH 및 ABTS radical scavenging activity를 확인하였다(Fig. 4-4, 5). 확인한 결과, Frc. 4-1 획득에서 radical scavenging activity가 가장 높아 항산화 활성이 비교적 가장 우수한 것으로 나타났다.

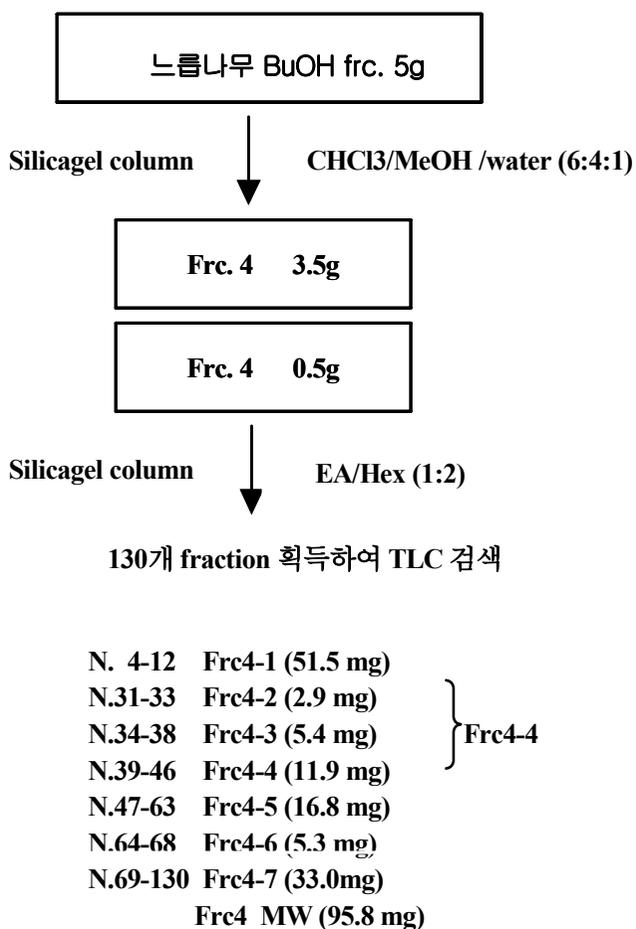


Fig. 4-2. Flow sheet for fractionation of *Ulmus davidiana* var, *japonica*

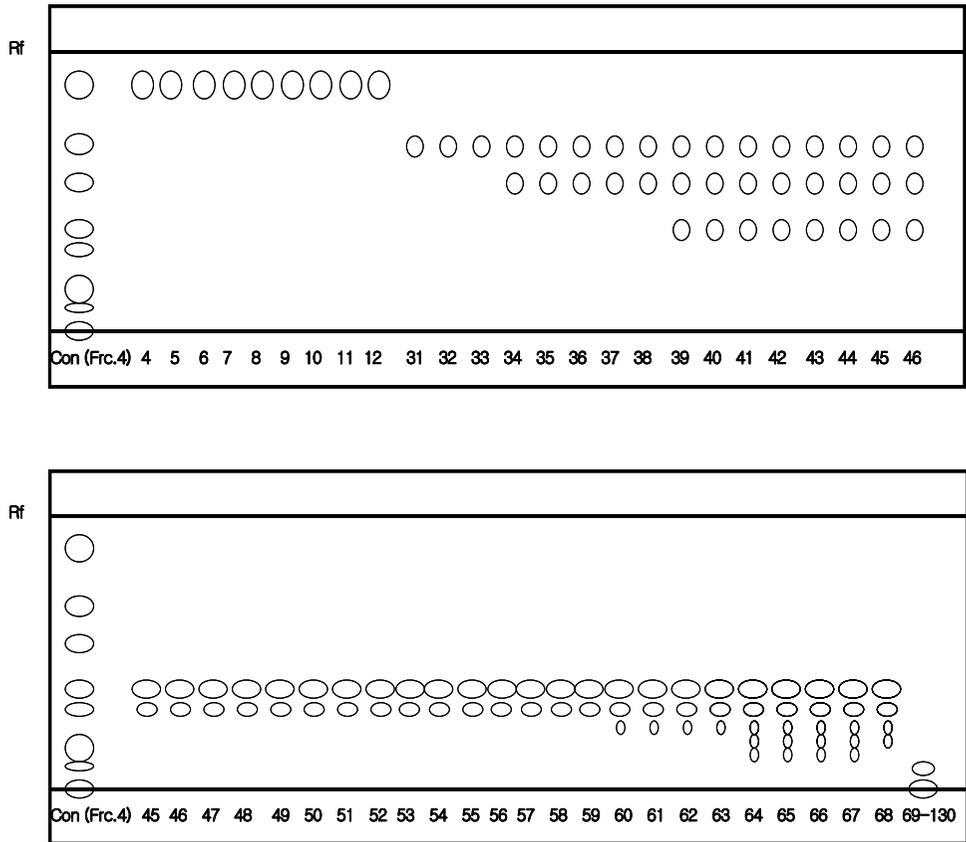


Fig. 4-3-1. Thin-layer chromatogram on silica gel of n-butanol fraction from *Ulmus davidiana* var. *japonica* 80% ethanol extracts.

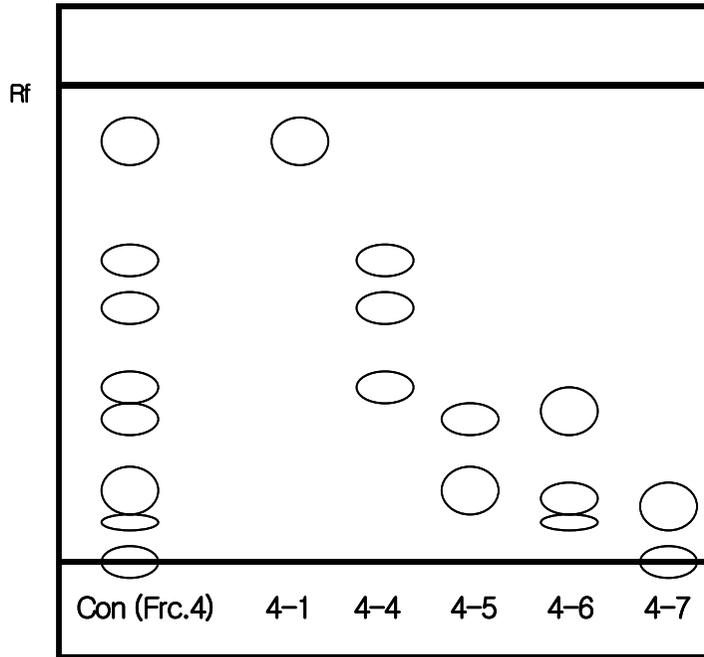


Fig. 4-3-2. Thin-layer chromatogram on silica gel of n-buthanol fraction from *Ulmus davidiana* var, *japonica* 80% ethanol extracts.

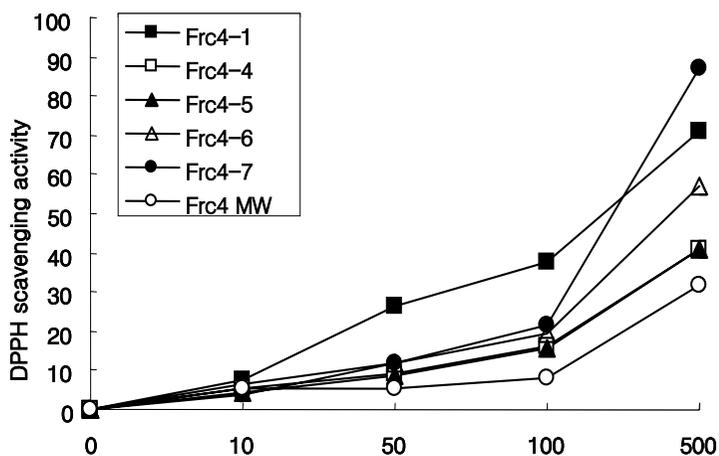


Fig. 4-4. Effects of sub-fractions of n-butanol fractions from *Ulmus davidiana* var, *japonica* on DPPH radical scavenging activities

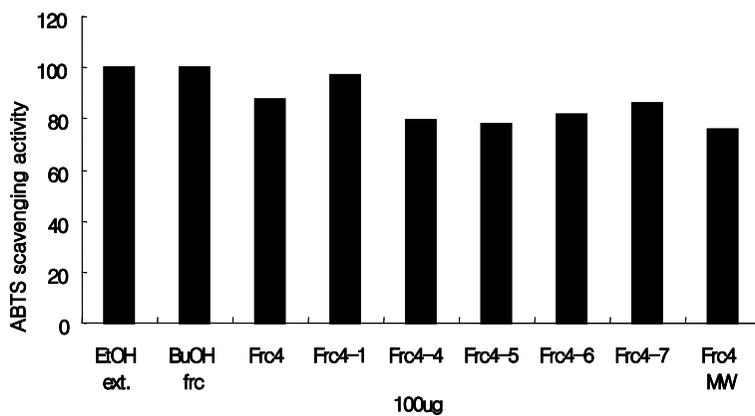


Fig. 4-5. Effects of sub-fractions of n-butanol fractions from *Ulmus davidiana* var, *japonica* on ABTS radical scavenging activities

제 2 항 지표물질 설정을 위한 유효물질의 구조동정

1. 실험재료

느릅나무 뿌리를 80% 에탄올로 추출한 후 순차분획으로부터 부탄올 획분을 얻었으며, 부탄올 획분로부터 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 및 ethylacetate/hexane 등의 용매를 이용하여 Frc. 4-1을 분리하였다. 분리된 Frc. 4-1의 성분을 확인하기 위하여 HPLC, NMR, Mass, IR을 이용하여 구조를 동정하였다. 사용한 NMR은 MHz FT-NMR Spectrometer (Varian co.), ^1H -NMR spectra는 Bruker의 AM-300을 사용하였고, IR spectra는 FT-IR (Shimatsu, Japan)을 이용하여 측정하였다.

2. 실험결과

우선 HPLC로 phenolic compound pattern을 분석한 결과 카테킨과 유사한 retention time에서 단일 peak가 분리되었다. 카테킨을 spike 실험한 결과 카테킨은 아닌 것으로 확인되었다(Fig.4-6).

분리된 frc. F4-1의 구조동정을 위하여 NMR, Mass, IR을 측정하였다. NMR은 CD_3OD 에 녹인 시료를 500 MHz FT-NMR Spectrometer (Varian co.)로 측정하였으며 ^1H -NMR의 6.7-7.2 ppm 사이에서 페닐환에 위치한 4개의 수소를 확인하였고 5.8-6.2 ppm에서 탄소-탄소 이중결합에 위치한 수소와 5 ppm 근처의 hydroxy 수소, 2 ppm 이하의 탄소-탄소 단일결합에 위치한 수소 등을 확인하였다(Fig. 4-7). ^{13}C -NMR에서 역시 157.9 ppm의 1번 탄소와 112-147 ppm사이의 2-8번 탄소, 17-49 ppm에서 나머지 10개의 단일결합으로 추정되는 탄소를 확인하였다(Fig. 4-8). Mass는 EI+ mode로 측정하여 256의 추정분자량을 얻었으며 원소분석은 $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}$ 으로 나타났다(Fig. 4-9). Compound Frc.4-1의 IR 측정결과는 Fig.4-10과 같으며 3300 cm^{-1} 부근의 O-H stretch와 2900 cm^{-1} 부근의 C-H stretch, 1500 cm^{-1} 부근의 CH_2 bend 등을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼때 compound Frc. 4-1은 R에 10개의 단일결합 탄소를 갖는 Fig. 4-11의 구조로 추정되며 이는 현재까지 밝혀진 느릅나무 성분 이외의 새로운 phenolic compound로 판단된다.

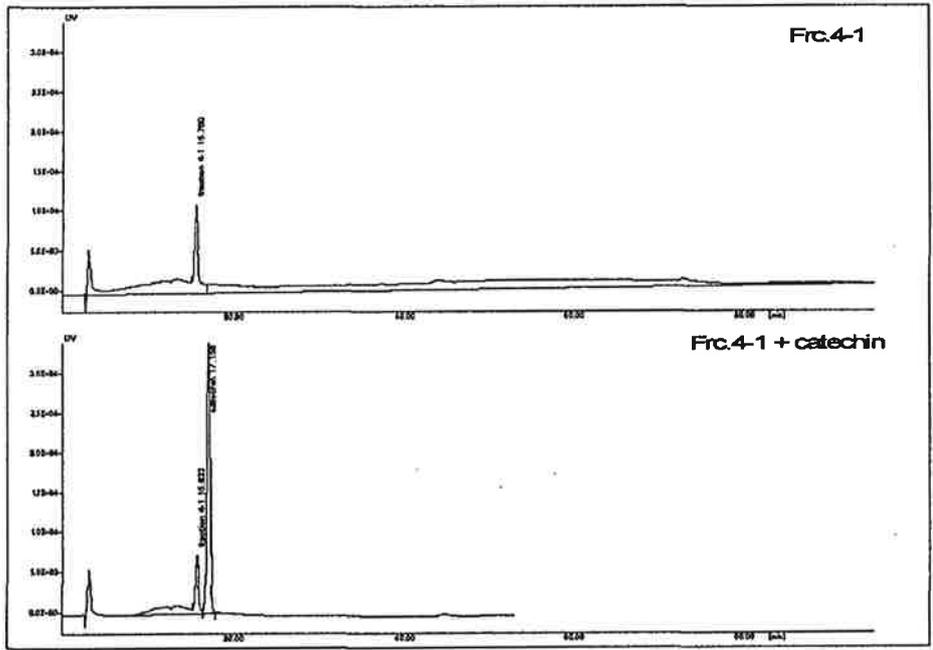


Fig4-6. Chromatogram of HPLC of Frc.4-1

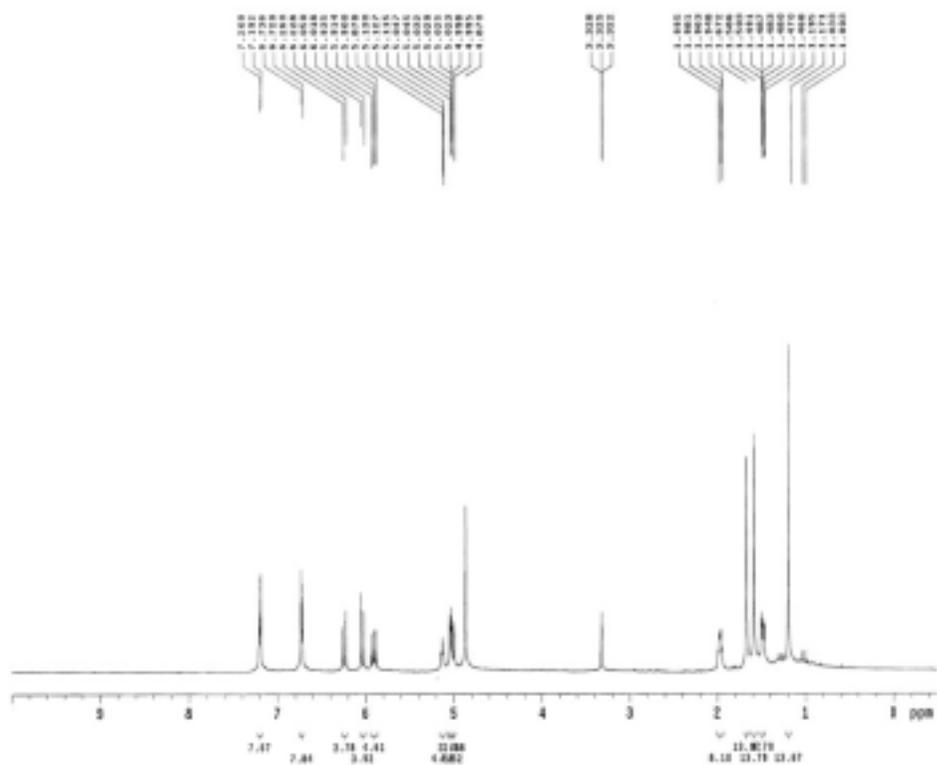


Fig4-7. $^1\text{H-NMR}$ spectra of compound Frc.4-1

(Mass Spectrum)
 Data : 060502-F-4-1-022 Date : 08-Jun-2020 09:11
 Sample : F-4-1
 Note : 2025-26-22
 Inlet : Direct Ion Mode : E1
 Spectrum Type : Normal Ion (M+L:rear)
 RT : 0.59 min Scans : 36
 BP : m/z 173.2222 Int. : 1599.94
 Output m/z range : 100.0000 to 499.9916 Cut Level : 0.00 X
 18218558

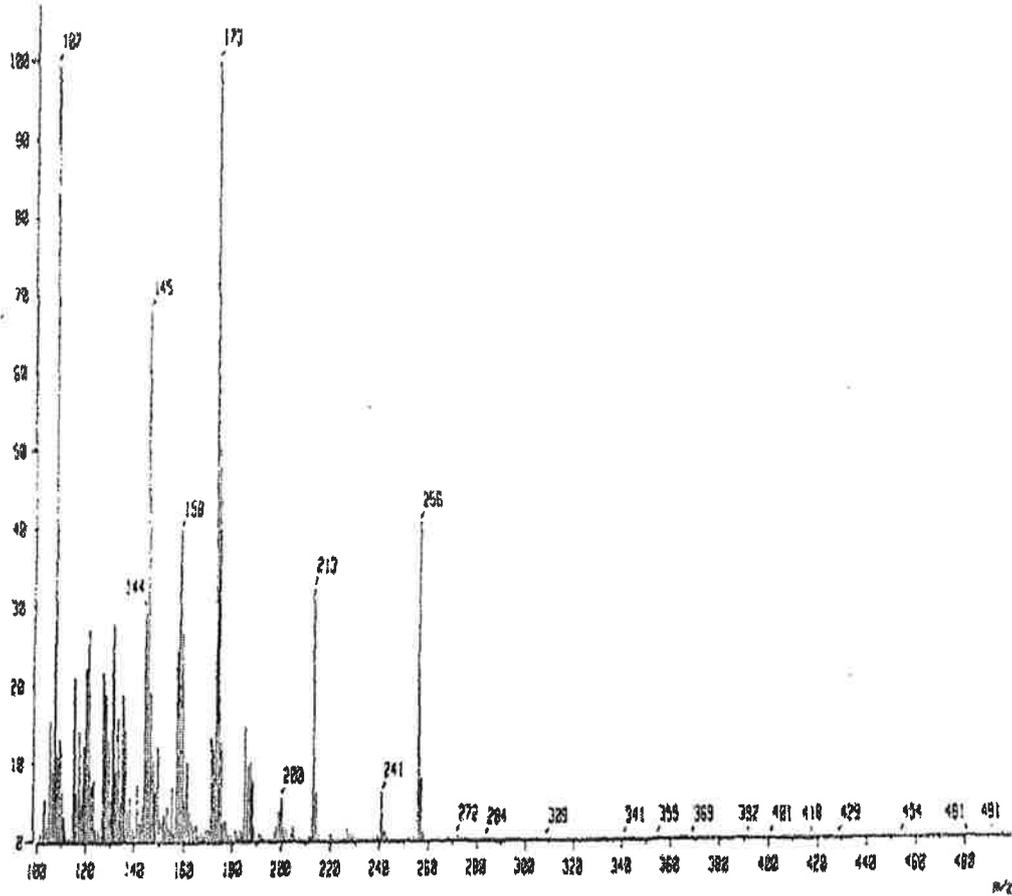
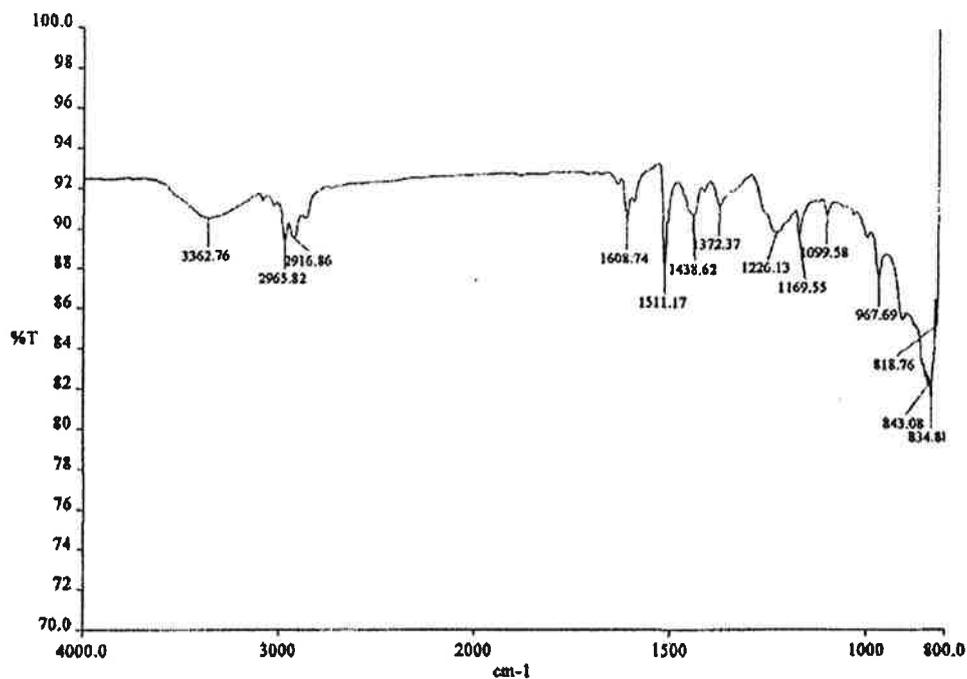


Fig4-9. Mass analysis of compound Frc.4-1



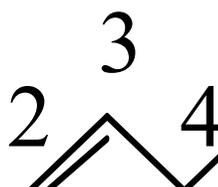
F4-1() .pk

F4-1(~1.SP 3201 4000.00 800.00 81.57 141.88 4.00 %T 16 0.50

REF 4000 92.48 2000 92.68 600

3362.76 90.52 2965.82 89.40 2916.86 89.53 1608.74 90.45 1511.17 88.24
 1438.62 90.71 1372.37 91.16 1226.13 89.84 1169.55 89.63 1099.58 90.74
 967.69 87.61 843.08 82.16 834.88 81.57 818.76 85.17 805.10 127.52

Fig4-10. IR spectra of compound Frc. 4-1



R: single bond carbon chain (n=10)

Fig. 4-11. Chemical structure of compound Frc. 4-1

제 5 절 느릅나무추출물의 식품소재화 및 제품개발

제 1 항 느릅나무 추출물의 이화학적 성분 분석

1. 실험방법

가. 시료의 추출 및 조제

실험재료로 이용한 느릅나무의 잎, 줄기, 뿌리는 강원도에서 구입하여 정선 후 세절하여 저온 건조하여 사용하였다. 느릅나무의 잎, 줄기, 뿌리를 미세하게 분쇄하여 느릅나무 원 시료로 사용하였으며, 분쇄한 각 시료의 40g에 80% 에탄올 600ml (시료의 15배)을 넣어 25℃에서 150 rpm으로 overnight 추출한 뒤, 재추출은 80% 에탄올 250ml (시료의 5배)의 하였다. Whatman filter paper #2를 이용하여 여과하고 여과된 에탄올 추출물은 rotary vacuum evaporator로 40-50℃에서 감압, 농축하여 80% 에탄올 추출물로 사용하였다.

나. 시료의 부위별 추출물로부터의 용매별 분획물 조제

느릅나무 잎, 줄기, 뿌리의 80% 에탄올 추출물에 에탄올 (0.1): 증류수 (0.9) : 유기 용매300ml(1)가 되도록 하여 각각의 분별깔때기를 이용하여 순차용매분획을 하였다 (Fig. 3-1). 순차용매분획의 순서는 Hexane > Chloroform > Ethylacetate > Butanol의 순서로 하였다. 순차용매분획으로부터 얻어진 분획물들은 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압상태에서 유기용매를 제거하였다.

다. 일반성분 분석

느릅나무의 잎, 줄기, 뿌리 등의 일반성분 분석은 AOAC법에 의하여 분석하였다. 즉 수분은 105℃ dry oven법, 회분은 회화법, 지방은 soxhlet법으로, 단백질은 Auto Kjeltex Unit를 이용한 Kehlidal 법을 이용하여 분석하였다.

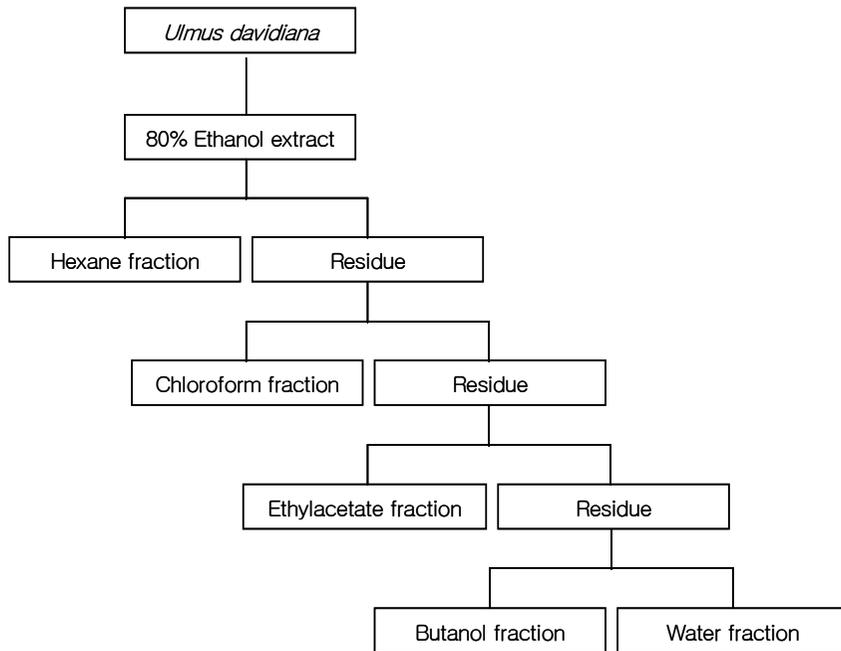


Fig. 5-1. Preparation of 80% Ethanol extract and fractions from leaf, stem and root of *Ulmus davidiana*.

라. 환원당 분석

환원당 분석은 Somogyi-Nelson법을 변형하여 측정하였다. 즉, A용액은 anhydrous sodium carbonate 25 g, sodium tartrate 25 g, sodium hydrogen carbonate 20 g, anhydrous sodium sulfate 200 g을 넣어 1 L로 정용하였고, B용액은 cupric sulfate 30g을 4방울의 conc-H₂SO₄를 첨가하여 증류수 200 ml에 용해하였다. C용액은 ammonium molybdate 25 g을 conc-H₂SO₄ 21 ml을 포함하는 증류수 450 ml에 용해한 후, 여기에 sodium bisenate 3 g을 증류수 25 ml에 용해시킨 것을 가하고 전량을 500 ml로 정용하여 37°C에서 16시간 방치하여 사용하였다. D용액은 A용액 25 ml과 B용액 1 ml을 당일 혼합하여 사용하였다.

시료 1 g 또는 추출물 1ml에 증류수를 넣어 200 ml로 정용하여 200 rpm에서 2시간 교반한 후, 이 중 50 ml만을 취하였다. 단백질을 제거하기 위하여 10% lead

acetate 5ml와 3.2% sodium oxalate 5 ml를 넣어 filter paper No. 2 (Whatman, England)로 여과하였다. 여과액 1 ml에 D액 1 ml을 가하여 100℃에서 20분간 방치한 후, C액을 1 ml 첨가하고 10 ml로 정용하여 20분간 방치 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. 유리당 분석

시료는 milipore filter (0.45 μ m)로 여과한 후 분석시료로 사용하였다. Carbohydrate column (Waters, U.S.A)을 이용하여 RI detector로 분석하였고, 이동상으로 acetonitrile : water (83 :17)를 1 ml/min으로 흘려주었다. 유리당 정량을 위한 표준물질로 glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose (Sigma, GR)을 혼합하여 사용하였다.

바. 플라보노이드 및 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법으로 분석하였고, 표준물질로 (+)-catechin을 사용하였다. 총 플라보노이드 분석은 시료 100 μ l에 diethylene glycol 1 ml을 첨가하여 균질화한 후, 1N NaOH 100 μ l를 첨가하여 37℃에서 1 시간 방치하고 420 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하고, 표준물질은 naringin으로 하여 환산하였다.

2. 실험결과

가. 느릅나무 추출물 및 용매 분획물 제조

정선, 수세, 건조, 세절, 분쇄한 느릅나무의 잎, 줄기, 뿌리를 80%에탄올로 추출하여 추출물을 조제하였다. 시료의 추출방법에 따라 추출한 다음 수율을 측정한 결과는 Table 5-1과 같다. 에탄올 추출물의 수율은 잎이 가장 높았고 다음은 줄기였으며 뿌리가 가장 낮은 수율을 보냈다. 에탄올 추출물의 각 용매 획분의 수율을 보면, 각 부위별 모두 에틸아세테이트 획분이 가장 낮은 수율을 나타내었고 부탄올 획분이 가장 많았다. 각 획분의 수율은 부위에 따라 다소 다르

게 나타났으며 잎에서는 hexan 회분이 23.7%로 높은 반면 줄기에서는 hexan 회분이 가장 낮았고 뿌리에서는 클로르 포름 회분이 매우 높은 수율을 보여 부탄올 회분과 유사하였다.

나. 느릅나무 부위별 일반성분

Table 5-2 에는 느릅나무 부위별 시료의 색도를 나타내었다. L값은 줄기부위가 가장 높았고 잎과 뿌리는 유사하였다. a값과 b값은 잎이 가장 낮았고 줄기와 뿌리는 유사하였다. 또한 각 부위별 일반성분을 분석한 결과(Table 5-3) 수분은 8-9% 범위였고, 단백질, 지방, 회분 모두 줄기와 뿌리에 비하여 잎에서 매우 높은 함량을 나타내었다. 뿌리와 줄기를 비교하여 지방은 동일하였으나 회분과 단백질은 뿌리에서 더 높은 값을 나타내었다.

Table 5-1. The Yields of solvent factions from 80% ethanol extract's leaf, stem and root of *Ulmus davidiana*.

Fractions	leaf	stem	root
Etanol ex.	11.8	16.5	27.3
Hexane	23.7	2.6	15.7
Chloroform	11.8	16.5	27.3
Ethylacetate	6.8	7.4	7.2
Butanol	29.0	38.9	29.6
Water	28.7	34.6	20.2

Table 5-2 Color of leaf, stem and root of *Ulmus davidiana*.

	L	a	b
Leaf	54.20	-2.97	23.36
Stem	58.78	6.98	23.76
Root	53.32	6.69	14.81

Table 5-3. The proximate compositionl in leaf, stem and roots from *Ulmus davidiana*

	leaf	stem	root
Moisture (%)	8.74 ± 0.11	8.32 ± 0.24	8.38 ± 0.19
Ash (%)	13.87 ± 0.05	6.41 ± 0.01	7.12 ± 0.03
Fat (%)	4.58 ± 0.07	0.38 ± 0.00	0.38 ± 0.02
Protein %	13.15 ± 0.13	2.97 ± 0.00	5.20 ± 0.10

다. 환원당 및 유리당의 함량

느릅나무 원 시료와 에탄올 추출물에 포함된 환원당과 유리당의 함량을 측정하였다. 환원당은 특히 잎 부분에 많이 함유되어 있으며, 80% 에탄올 추출물의 경우에서 환원당의 함량이 증가하였고 줄기에 비하여 잎과 뿌리 부분에 다량의 환원당이 함유된 것으로 나타났다(Table 5-4). 유리당의 구성성분을 비교. 분석한 결과(Table 5-5) 느릅나무를 구성하고 있는 유리당은 주로 glucose, fructose와 sucrose 등으로 구성되어 있으며 특히 느릅나무 원시료의 경우 뿌리부분에 glucose와 fructose가 가장 많이 함유되어 있었으며, 잎과 줄기에는 sucrose가 검출되지 않았다. 또한 80% 에탄올 추출물에는 느릅나무 원 시료에 비해 유리당의 함량이 크게 증가하였으며, 역시 뿌리부분에 가장 많은 glucose와 fructose가 함유된 것으로 나타났다.

Table 5-4. Content of reducing sugars

	mg/ sample g			mg/ 80% ethanol extracts g		
	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root
환원당	33.2	7.7	3.8	271.0	38.8	261.1

Table 5-5. Content of free sugars.

	mg/ sample g			mg/ 80% ethanol extracts g		
	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root
glucose	4.88	1.68	12.4	161	66	201
fructose	3.6	1.22	8.34	115	65	146
sucrose	-	-	2.58	-	43	41

라. 플라보노이드 및 폴리페놀 함량

느릅나무 원 시료와 에탄올 추출물의 플라보노이드와 폴리페놀 함량을 측정하였다(Table 5-6). 총 폴리페놀의 함량을 측정한 결과, 느릅나무 원 시료의 경우 잎, 줄기 및 뿌리에 함유된 총 폴리페놀의 함량은 각각 7.59, 8.58 및 5.28 mg/g 이었으나 80% 에탄올 추출물에 함유된 총 폴리페놀은 각각 82.27, 460.21 및 370.63 mg/g 으로 느릅나무시료를 80% 에탄올로 추출하였을 때 다량의 폴리페놀 성분이 추출되어짐을 확인할 수 있었으며, 특히 느릅나무의 잎부분에 비해 줄기 및 뿌리에 월등히 많은 폴리페놀 성분이 함유되어있음을 관찰하였다.

또한 총 플라보노이드 성분을 분석한 결과, 느릅나무 원 시료의 경우 잎, 줄기 및 뿌리에 함유된 총 플라보노이드의 함량은 각각 3.37, 1.25 및 0.71 mg/g 이었으나 80% 에탄올 추출물에 함유된 총 폴리페놀은 각각 14.26, 9.30 및 16.20 mg/g 으로 느릅나무시료를 80% 에탄올로 추출하였을 때 다량의 플라보노이드 성분이 추출되어짐을 확인할 수 있었으며, 특히 뿌리의 80% 에탄올 추출물에 가장 많은 플라보노이드가 함유되어 있음을 관찰하였다.

Table 5-6. Contents of total flavonoid and polyphenol

	mg/ sample g			mg/ 80% ethanol extracts g		
	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root
총 폴리페놀	7.59	8.58	5.28	82.27	460.21	370.63
총 플라보노이드	3.37	1.25	0.71	14.26	9.30	16.20

제 2 항 느릅나무 수용성 식이섬유 추출물의 유동 특성

1. 실험방법

가. 정상유동특성 측정

느릅나무 수용성 식이섬유를 분쇄기를 이용하여 마쇄 하여 150 μm 체를 이용하여 균질화 하였다. 0.5~2.5%의 느릅 수용성 식이섬유의 정상유동특성은 회전점도계(Hakke viscometer VT 550)의 원추평판형(cone and plate geometry)인 PK 5-1(각도 1°, 직경 5 cm, zero gap : 0 μm)을 이용하여 측정하였다. 측정조건으로는 전단속도($\dot{\gamma}$)는 0~1000 s^{-1} , 측정온도는 10, 20 그리고 30°C이었다. 그리고 4종의 점성을 가지고 있는 물질(Sigma Co., USA)인 Pectin(P8471), Gum guar(G4129), Gum xanthan(G1253), 그리고 Carrageenan(C1013)을 이용하여 20°C에서 전단속도($\dot{\gamma}$) 0~1000 s^{-1} 의 범위로 측정하였다.

느릅 수용성 식이섬유의 정상유동특성은 Power-law model(1)과 Herschel-Bulkley model(2)을 이용하여 점조도지수와 유동지수를 해석하였으며 Herschel-Bulkley model로 항복력을 구하였다.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

$$\tau = C + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (2)$$

τ : 전단응력 (shear stress, Pa)

$\dot{\gamma}$: 전단속도 (shear rate, s^{-1})

K : 점조도 지수 (consistency coefficient, $\text{Pa} \cdot \text{S}^n$)

n : 유동지수 (flow behaviour index, dimensionless)

C : 항복력 (Yield stress, Pa)

나. 농도 및 온도의 영향

느릅 수용성 식이섬유의 겔보기점도에 미치는 농도 및 온도의 영향은 각각 Arrhenius 함수(식 2, 3)로 분석하였다

$$\eta_{app} = \eta_{\infty} \cdot \exp(E_a/RT) \quad (3)$$

$$\eta_{app} = \eta_{\infty} \cdot \exp(B \cdot A) \quad (4)$$

η_{app} : 겔보기점도 (apparent viscosity, Pa · s)

η_{∞} : 무한겔보기점도 (infinite apparent viscosity, Pa · s)

E_a : 유동 활성화에너지 (activation energy of flow, J/kg · mol)

R : 기체상수 (gas constant, J/kg · mol · K)

T : 절대온도 (absolute temperature, K)

A : 추출물의 농도(%)

B : 농도의존성 상수 (concentration dependency constant, dimensionless)

2. 실험결과

가. 겔보기 점도의 변화

느릅 수용성 식이섬유의 농도에 따른 겔보기점도의 변화를 측정한 결과는 Fig. 5-1과 같다. 느릅 수용성 식이섬유와 다른 검물질의 농도가 증가할수록 겔보기 점도도 증가하였다. 다른 검물질 중에서는 guar gum이 모든 농도에서 겔보기 점도가 가장 높았으며 carageena이 가장 낮았다. xanthan은 농도 0~1.5%까지는 pectin보다 높았으나 2.0과 2.5%는 pectin이 높은 겔보기 점도가 높았다. gum guar가 xanthan보다 점도가 높았다는 Casas 등과 Kaycier과 Dogan의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 본 연구에서 느릅 수용성 식이섬유는 점성이 높은 물질

이라는 것을 확인하였다.

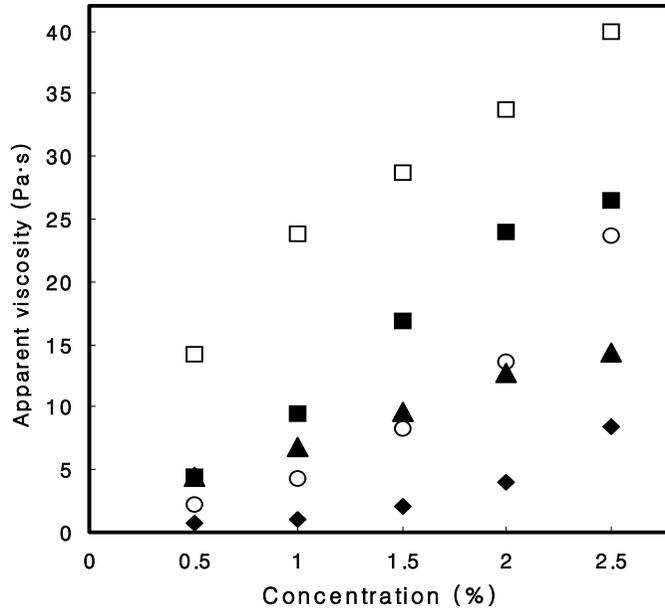


Fig. 5-1. Changes in apparent viscosity on concentration of standard gums and U-SF from *U. davidiana var.* at 800 s^{-1} and 20°C

□ : U-SF from *U. davidiana var.*, ■ : gum guar, ▲ : gum xanthan, ○ : pectin, ◆ : carageenan

나. 정상유동특성

20°C 에서 0.5~2.5%의 느릅 수용성 식이섬유에 대하여 전단속도를 $0\sim 1000 \text{ s}^{-1}$ 까지 변화시키면서 전단응력을 측정된 결과는 Fig. 5-2와 같다. 전형적인 의가소성 유체의 흐름 특성($n < 1$)을 나타내었으며 전단속도와 농도가 증가할수록 전단응력은 증가하였고 10°C 와 30°C 에서도 같은 경향 이었다. 김 등은 수용성 사과박에서 추출한 galacturonic acid의 함량이 높을수록 전단응력의 값이 증가하였다고 하였으며 Burkus와 Temelli는 β -glucan의 분자량이 클수록 intrinsic viscosity의

점도가 증가하였다고 하였다. 따라서 느릅 수용성 식이섬유의 정상유동특성은 수용성 polysaccharides의 영향으로 생각된다.

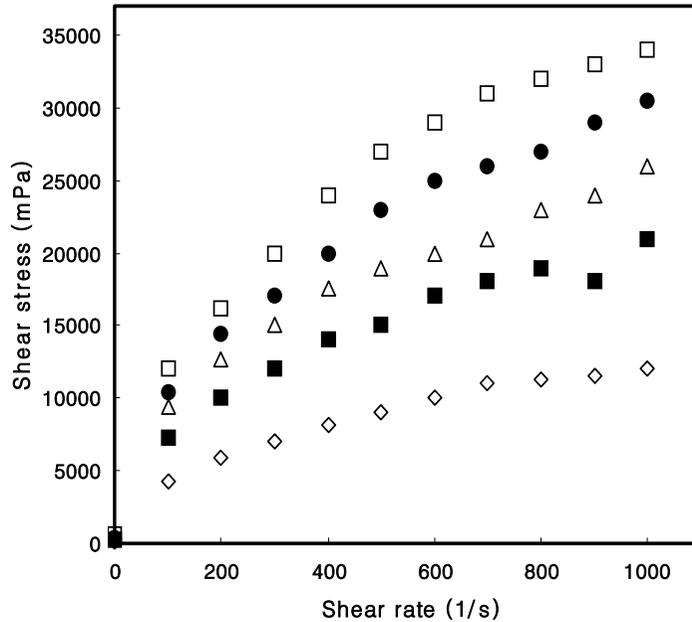


Fig. 5-2. Effect of concentration on flow behavior of U-SF from *U. davidiana* var. at 20°C. □ : 2.5%, ● : 2.0%, △ : 1.5%, ■ : 1.0%, ◇ : 0.5%

Power law와 Herschel-Bulkley model에 적용시켜 유동특성을 조사한 결과는 Table 5-7과 같다. 농도와 온도범위에서 높은 상관관계를 나타내어 위의 model에 잘 적용되어졌다. Power law model로 구한 농도가 증가할수록 n 은 감소하여 의가소성이 증가하였다. 온도의 변화에 대해서는 온도가 증가할수록 의가소성은 감소하는 것으로 나타났다. K 는 $3.23 \sim 49.39 (\times 10^2 \text{mPa} \cdot \text{s}^n)$ 로 농도가 증가할수록 증가하고 온도가 증가할수록 감소하였다. Herschel-Bulkley model에 의한 C 는 $2.01 \sim 92.62 (\times 10^3 \text{mPa})$ 로 농도가 증가할수록 증가하고 온도가 증가할수록 감소하였다. 2.5% 느릅 수용성 식이섬유는 높은 C 의 값을 가져 Bingham pseudoplastic

유통특성으로도 정상유동특성의 해석이 가능하다. 농도가 높아질수록 n 의 값이 감소하는 이유는 응집구조의 전단속도 의존성이 커서 응집구조의 강도가 약해지기 때문이고 K 의 값이 증가하는 이유는 수용액내에서 고분자들이 엉킴에 의한 그물구조가 형성하는 하기 때문이다. 또한 C 의 값이 증가하는 이유는 입자간 결합력 등 구조형성의 정도가 커지기 때문으로 알려져 있다. Grigelmo 등은 복숭아 식이섬유 부유물이 의가소성을 보였으며 n 은 농도가 증가할수록 감소하고 온도가 증가할수록 감소하는 정상유동특성을 보였다고 보고하여 본 연구와 유사한 경향을 나타내었다.

Table 5-7. Rheological parameters of U-SF from *U. davidiana* var.

Conc. Temp.		Power law			Herschel-Bulkley			
(%)	(°C)	n	$K(\times 10^2 \text{mPa}\cdot\text{s}^n)$	r^2 ¹⁾	n	$K(\times 10^2 \text{mPa}\cdot\text{s}^n)$	r^2	$C(\times 10^3 \text{mPa})$
0.5	10	0.42	7.62	0.99	0.64	1.21	0.99	3.57
	20	0.46	5.26	0.98	0.67	0.95	0.97	2.88
	30	0.52	3.23	0.98	0.68	0.88	0.99	2.01
1.0	10	0.36	7.97	0.99	0.62	2.20	0.99	7.20
	20	0.43	10.67	0.98	0.65	1.71	0.95	5.31
	30	0.52	5.39	0.98	0.69	1.35	0.98	3.43
1.5	10	0.34	25.53	0.99	0.61	2.63	0.99	9.66
	20	0.42	13.19	0.99	0.64	2.32	0.99	6.40
	30	0.49	7.76	0.98	0.81	5.88	0.99	6.55
2.0	10	0.34	30.84	0.98	0.62	2.92	0.98	11.63
	20	0.48	12.17	0.99	0.67	2.34	0.99	6.83
	30	0.55	6.63	0.99	0.69	2.05	0.99	4.34
2.5	10	0.32	49.39	0.98	0.62	3.20	0.96	14.82
	20	0.43	17.92	0.99	0.67	2.60	0.95	92.62
	30	0.51	9.72	0.99	0.68	2.42	0.97	59.60

¹⁾ correlation coefficient

다. 전단응력의 온도의존성

온도를 변화시키면서 느릅 수용성 식이섬유에 대하여 전단속도를 $0 \sim 1000 \text{ s}^{-1}$ 까지 변화시키면서 전단응력을 측정된 결과는 Fig. 5-3과 같다. 온도가 높아짐에 따라 전단응력이 낮아졌는데 이는 온도가 높아지면서 열운동에 의한 교란에 의해 결합하는데 방해작용이 일어나서 전단응력이 감소되었기 때문이다. 느릅 알콜 불용성 물질의 온도 의존성을 arrhenius 식을 이용하여 살펴보았다. η_{app} 에 대한 온도의 영향을 보기 위하여 전단속도 800 s^{-1} 에서 $\ln \eta_{app}$ 와 $1/T$ 로 나타낸 결과는 Fig. 5-4. Arrhenius 식을 이용하여 E_a 와 η_{∞} 을 구한 결과는 Table 5-8과 같다. 느릅 알콜불용성물질의 농도가 증가할수록 E_a 는 $3.76 \sim 7.39 (\times 10^3 \text{ J/mol} \cdot \text{kg})$ 로 증가하였다. 이는 농도가 높은 상태에서는 E_a 와 분자간 화학등을 절단하는데 활성화 에너지 이외에 구조 활성화 에너지가 필요하기 때문이다. 위의 결과를 살펴보면 낮은 농도보다는 온도에 의한 겔보기점도의 감소는 높은 농도에서 더욱 크다는 것을 알 수 있었다. η_{∞} 는 $1.54 \sim 3.03 (\text{mPa} \cdot \text{s})$ 이었다. 온과 임은 온도의 증가할수록 느릅나무뿌리의 점액질의 relative viscosity가 감소하였으며, Furuta와 Maeda는 20% SSPS(soluble soybean polysaccharides solution)을 $5 \sim 80^\circ\text{C}$ 로 온도를 변화시키면서 129 s^{-1} 의 전단속도에서 viscosity를 측정된 결과 5°C 에서 최대 점도($212 \text{ mPa} \cdot \text{s}$), 80°C 에서 최소 점도($2.2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$)를 보였다고 하였다. Pagán과 Ibarz은 복숭아박에서 추출한 pectin이 25°C 에서 6.66, 5.55, 4.44%에서 96.0, 80.5, 76.0($\text{mPa} \cdot \text{s}$)를 가진다고 하여 등 본 연구와 유사한 경향을 나타내었다.

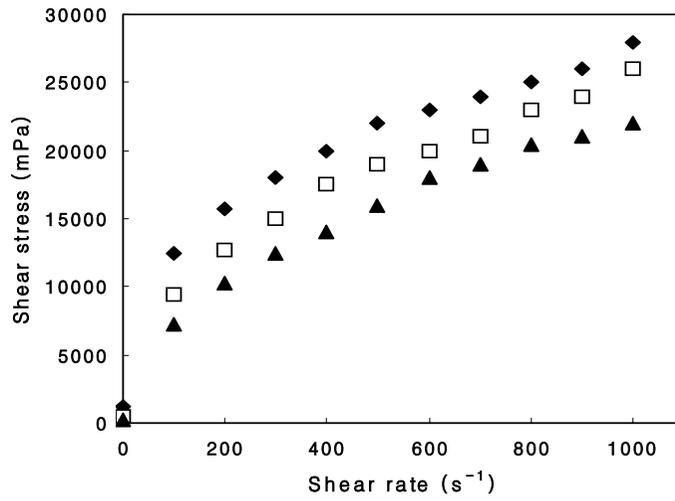


Fig. 5-3. Effect of temperature on flow behavior of U-SF from *U. davidiana* var. at 1.5 %. ◆ : 10°C, □ : 20°C, ▲ : 30°C

Table 5-8. Effect of temperature on apparent viscosity of U-SF from
U. davidiana var. at 800 s⁻¹

Conc. (%)	Temp. (°C)	η_{app} (mPa·s)	Ea($\times 10^3$ J/mol·kg)	η_{∞} (mPa·s)	r^2
0.5	10	15.10	3.76	3.03	0.99
	20	14.13			
	30	13.51			
1.0	10	25.01	5.77	2.18	0.95
	20	23.75			
	30	21.25			
1.5	10	33.03	7.06	1.54	0.96
	20	28.75			
	30	27.04			
2.0	10	38.00	7.27	1.72	0.93
	20	33.74			
	30	31.02			
2.5	10	44.61	7.39	1.92	0.92
	20	40.03			
	30	36.25			

¹⁾ correlation coefficient

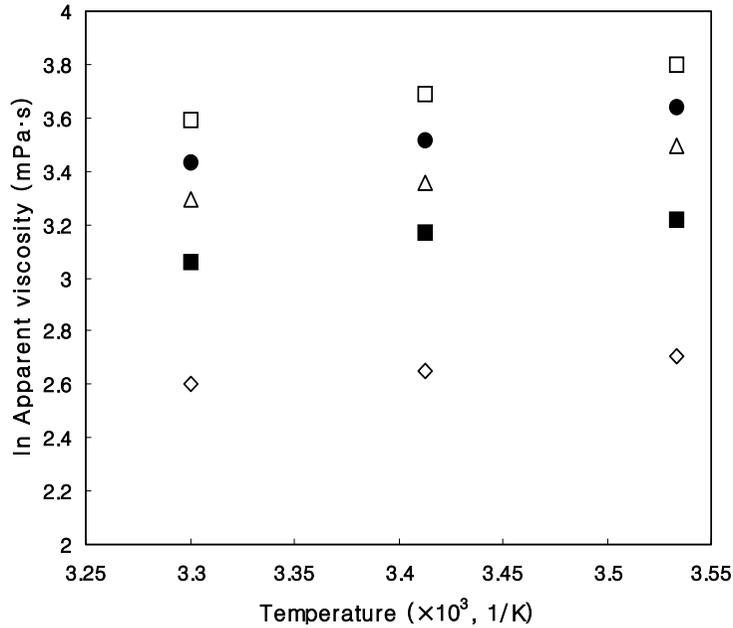


Fig. 5-4. Effect of temperature on apparent viscosity of U-SF from *U. davidiana var.* at 800 s^{-1} .

◇ : 0.5%, ■ : 1.0%, △ : 1.5%, ● : 2.0%, □ : 2.5%

라. 겔보기 점도의 농도의존성

느릅 수용성 식이섬유의 온도 의존성을 arrhenius 식을 이용하여 살펴보았다. η_{app} 에 대한 농도의 영향을 보기 위하여 전단속도 800 s^{-1} 에서 $\ln \eta_{app}$ 와 농도로 나타낸 결과는 Fig. 5-5, Arrhenius 식을 이용하여 B와 η_{∞} 을 구한 결과는 Table 5-9와 같다. 느릅 수용성 식이섬유의 B는 $0.47 \sim 0.52$, η_{∞} 는 $11.94 \sim 13.22(\text{mPa} \cdot \text{s})$ 로 온도가 증가할수록 감소하였다. 온도가 낮을수록 느릅 수용성 식이섬유의 농도의존성은 증가하여 낮은 농도에서 온도가 겔보기 점도에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다. 이 등은 열수 추출한 천마 농축액의 B가 온도가 증가할수록 B

가 감소한다고 하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

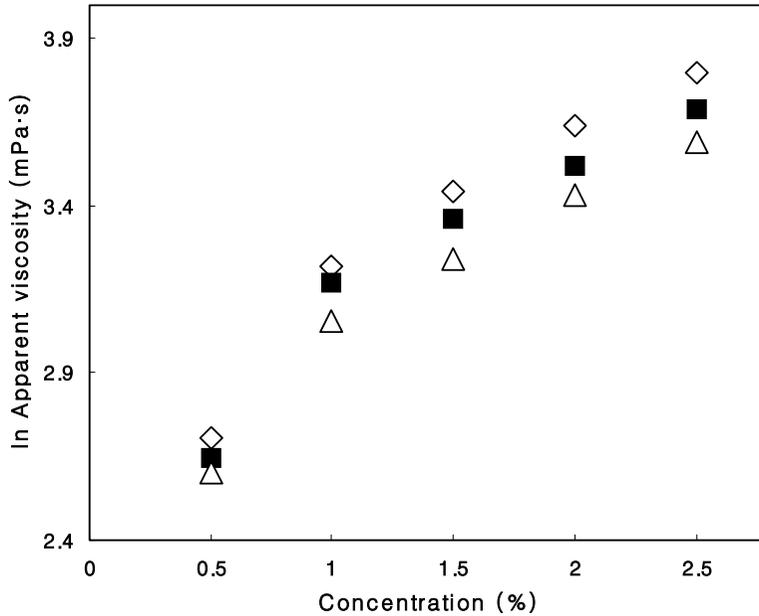


Fig. 5-5. Effect of concentration on apparent viscosity of U-SF from *U. davidiana var.* at 800 s^{-1} . ◇ : 10°C , ■ : 20°C , △ : 30°C ,

Table 5-9. Effect of concentration on apparent viscosity of U-SF from *U. davidiana var.* at 800 s^{-1}

Temp. ($^\circ\text{C}$)	Conc. (%)	B	$\eta_{\infty}(\text{mPa} \cdot \text{s})$	r^2
10	0.5~2.5	0.52	13.22	0.94
20	0.5~2.5	0.49	12.99	0.92
30	0.5~2.5	0.47	11.94	0.95

¹⁾ correlation coefficient

제 3 항 느릅나무 추출물을 이용한 제품개발

느릅나무로부터 추출한 식이섬유 추출물과 에탄올 추출물을 활용하여 제빵적성을 검토하였고 음료 및 과립제품을 개발하였으며 현재 타블렛 제조를 위하여 원료의 대량 추출을 완료 한 상태이다.

1. 제빵 적성

가. 실험재료

제빵용 밀가루는 시판되는 1등급 무표백 강력분(대한제분)을 구입하여 사용하였고 기타 원 부재료도 한주소금, 정백당(제일제당), saf-instant yeast(S.I.Lesaffre, France)를 시중에서 구입하여 식빵을 제조하였으며 또한 기능성을 위하여 느릅나무뿌리 식이섬유(고형분 15%)를 첨가하여 식빵을 제조하여 대조군과 비교하였다.

나. 식빵의 제조

제빵 제조의 배합비는 다음과 같다. 밀가루의 중량대비 소금 2%, 설탕 7.5%, 이스트 3.0%를 첨가하였으며, 실험에 사용한 오일은 해표 정제 대두유를 시중에서 구입하여 사용하였다, 식빵제조시 첨가한 느릅나무 추출물은 10% 첨가하였다.

밀가루 및 부재료를 Kitchen Aid Mixer (Kitchen Aid Inc. Model K5ss, St, Joseph, Michigan, USA)에서 약 30분간 충분히 mix하여 dough를 얻었다. 얻어진 반죽은 온도 40℃로 고정된 오븐에서 약 2시간 발효시켰으며, 처음 55분간의 1차 발효 후에 1차 punching을 한 다음 40분간 2차 발효를 하였다. 2차 발효가 끝난 반죽은 sheeting과 moulding을 한 후 식빵틀에 넣고 55분간 3차 발효(proofing)을 거친다음 오븐에 넣고 아랫불 170℃, 윗불 190℃에서 40분간 baking 하였다.

다. 식빵의 물리적 특성

식빵의 특성 및 외형을 Table 5-10과 Fig. 5-6에 나타내었다.

1차 발효 후 느릅나무 수용성식이섬유를 첨가한 식빵 반죽의 부피는 대조군보다 약간 줄었으나 식빵 제조에 큰 문제를 야기하지는 않았다. 또한 제품의 중량 대비 부피비 및 다른 모든 항목들을 대조군과 비교했을 때, 큰 차이를 보이지 않았으며, 반죽의 점성 등이 식빵 제조에 적합한 것으로 사료되었다.

Table 5-10. The character of bread with soluble dietary fiber(U-SF) of *Ulmus deviadiana var, japonica*.

	control	U-SF
Expansion ratio of dough (%)	185	168
Loaf wt. (g)	558.4	561.9
Baking loss ratio (%)	15.5	14.8
Loaf vol.(cm ³)	1540	1492
Specific vol. (cm ³ /g)	2.34	2.31



대조군



느릅뿌리 추출물 함유

Fig. 5-6. Bread with U-SF of *Ulmus deviadiana var, japonica*.

Table 5-11에 식빵의 crust와 crumb에 대한 색도 측정결과를 나타내었다. 식이 섬유 첨가에 따른 색도의 차이가 있었으며, crust의 경우 식이섬유를 첨가함에 따라 L값이 낮아졌으며, 반면에 a 값이 높아지는 것으로 나타나 식이섬유 추출물의 첨가가 식빵의 색상을 어둡게 하는 경향이 있음을 알 수 있었다. 또, crumb의 색도 측정결과 역시 L값은 낮아지고 a 값이 높아져서 crust와 같은 경향을 나타내었다. 즉, 본 실험에서 나타난 대로 느릅나무 식이섬유 추출물을 첨가하여 식빵을 제조할 경우 색상이 어두워짐을 알 수 있었다,

Table 5-11. Color value of baked bread with U-SF of *Ulmus deviadiana* var, *japonica*.

	control	U-SF
Crust		
L	58.91±2.11	47.82±3.17
a	11.5±1.58	15.66±0.63
b	30.72±1.50	25.75±1.88
Crumb		
L	75.67±0.15	67.28±1.27
a	-1.69±0.09	-0.54±0.08
b	14.77±0.44	14.54±0.81

느릅나무 수용성 식이섬유 첨가에 따른 식빵의 조직감 측정결과를 Table 5-12에 나타내었다. Hardness의 경우 수용성 식이섬유 함유 식빵에서 대조군과 비교하여 약간 증가하는 것으로 나타났으나 처리군 간 유의차는 나타나지 않았으며 다른 모든 항목은 대조군과 차이를 나타내지 않는 것으로 측정되었다.

Table 5-12. Texture profile analysis of baked bread with U-SF of *Ulmus deviadiana* var, *japonica*.

	control	U-SF
Springness	0.88 ^{ns}	0.84
Gumminess	396.68 ^{ns}	401.51
Cohesiveness	0.47 ^{ns}	0.47
Hardness	836.7 ^{ns}	852.1
Chewiness	354.16 ^{ns}	352.62

라. 관능검사

Table 5-13에는 느릅나무 수용성 식이섬유 첨가 식빵에 대한 관능검사 결과를 나타내었다. 외관의 경우 대조군에 비하여 수용성 식이섬유 첨가군에서 낮은 점수를 나타내었으나 색깔의 경우는 수용성 식이섬유를 함유한 식빵이 약한 갈색을 나타내는 점이 대조군에 비해서 더욱 기호도가 증가한 것으로 나타났으며, 이외의 향, 조직감, 및 전체적 평가에 대해서는 대조군에 비해 유의차가 없는 것으로 나타나 느릅나무 수용성 식이섬유의 첨가는 제품의 기능성 강화 측면을 위하여 유효한 것으로 판단되었다.

Table 5-13. Sensory evaluation score of baked bread with U-SF of *Ulmus deviadiana* var, *japonica*.

	control	U-SF
Appearance	6.28 ^a	5.75 ^b
Color	6.25 ^b	6.78 ^a
Flavor	5.63	5.55
Taste	6.13	6.25
Texture	5.63	5.50
Overall acceptability	6.75	6.25

2. 과립 제품

느릅나무로부터 식이섬유를 추출하여 과립화 제품을 개발하였으며 과립의 조성은 식이섬유, 합수결정포도당, 비타민 C 알콜 등을 주 재료로 사용하였다. 즉, 느릅나무 식이섬유 분말에 합수결정포도당 및 비타민 C 및 부재료를 정량만큼 계량하여 혼합한 후, 물과 알콜을 비율대로 첨가하고 본 재료와 혼합하여 혼합된 시료를 과립제조기를 통과시켜 길이 2mm의 과립상태로 만든 후 35℃의 열풍건조기에서 2시간 건조시킨 후 과립화 제품을 제조하였다. 최종과립화 제품에 포함된 식이섬유는 10%로 조정하였으며, 완성된 과립은 Fig. 5-7과 같다.



Fig. 5-7. Granule with U-SF of *Ulmus deviadiana var. japonica*.

3. 음료 제품

가. 재료

느릅나무뿌리 80% 에탄올 추출물을 주재료로 하여 음료를 제조하였으며 고형분 함량은 15%이었다.

본 실험에서 사용한 부재료의 특징은 다음과 같다.

구기자 추출물 : 23.0 Brix

대추 추출물 : 9.0 Brix

사과 농축액 : 25.5 Brix

감초 추출액 : 29.0 Brix

나. 추출물의 적정 농도 검토

추출물을 적정음용농도로 희석하여 관능요원들에게 관능특성에 대하여 묘사하도록 하여 추출물에 대한 관능적 특성을 조사해 본 결과, 떫은 맛이 매우 강해 이를 완화시키기 위한 적정 농도의 결정이 필요하였다. 결과, 추출물의 농도는 3-5%가 적정한 것으로 나타났다.

표 5-14. 느릅나무 추출물의 적정 음용농도 결정을 위한 배합비

구 분	느릅나무 추출물의 함량				
	1%	3%	5%	7%	10%
추출액	1.0	3.0	5.0	7.0	10.0
설탕	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
구연산	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
증류수	90	89	88	87	86
합(구연산제외)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

라. 부재료의 선정 및 배합비 검토

1) 1차 배합

떫은맛을 제거하고, 추출물과의 어울림을 평가하기 위한 예비실험으로 추출물의 농도를 3%로 고정시키고 부재료로 감초추출액, 대추추출액, 구기자추출액, 복분자 배즙 및 사과 농축액을 각각 첨가하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사를 실시한 결과, 음료의 색깔은 구기자 추출물의 첨가가 가장 좋았으며, 복분자의 경우 신 맛이 강하기 때문에 다른 첨가물의 첨가 농도에 대해 낮은 농도인 1%만을 첨가하였지만 본 느릅나무 추출물과는 어울리지 않는 것으로 판단되었다. 감초추출물의 첨가는 떫은맛을 가장 효과적으로 완화시키는 것으로 나타났으며 배즙 농축액의 경우 단맛을 내는 것 이외에는 다른 영향을 주지 못하는 것으로 나타나, 부재료의 배합비를 위한 2차 실험을 위하여 구기자, 대추, 사과, 및 감초추출액을 선정하였다.

2) 2차 배합

3%로 첨가된 추출물의 떫은 맛을 줄이고 부재료들 간의 어울림을 평가하기 위하여 선정된 부재료 : 구기자, 대추, 사과 농축액을 각 농도별로 첨가하여 표 3-19와 같이 제조하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사결과, A와 B는 떫은 맛이 가장 강하고, E와 F는 부재료의 맛이 너무 강한 것으로 평가되었다. 즉, 전체적으로 떫은맛을 완화시키면서 부재료들 간의 맛이 적절한 배합비는 2%의 구기자 농축액, 3-5%의 대추추출액 그리고 5%의 사과농축액을 첨가한 C,D의 배합비가 가장 우수한 것으로 나타났다. 그러나 아직 남아있는 떫은 맛을 완화하기 위하여 감초의 적정 첨가농도를 결정해야 할 것으로 사료되었다.

표 5-15. 2차 배합비

구분	A	B	C	D	E	F
추출액	3	3	3	3	3	3
구기자농축액	1.0	1.0	2.0	2.0	3.0	3.0
대추농축액	3.0	5.0	3.0	5.0	3.0	5.0
사과농축액	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
설탕	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
구연산	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
증류수	79	77	78	79	77	75
합(구연산제외)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

3) 3차 배합

2차 배합에서 관능적 평가가 가장 우수한 C와 D의 배합비를 기본으로 하여, 추출액의 농도를 높이면서 짙은맛의 완화를 위해 감초를 첨가하는 배합비를 표 3-20과 같이 달리하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 관능검사 결과, 감초농축액을 0.3% 첨가하였을 때, 추출물의 농도를 5%로 증가하여 첨가하여도 그다지 짙은 맛이 감지되지 못하였다. 즉, 0.2%의 감초농축액의 첨가로 추출물의 농도를 5%로 증가시켜도 관능적인 차이가 없었으므로 D의 배합비로 결정하였다.

표 5-16. 감초추출액 농도 결정을 위한 배합비

구분	A	B	C	D
추출액	3	3	5	5
감초추출액	0.2	0.3	0.2	0.3
구기자농축액	2.0	2.0	2.0	2.0
대추농축액	5.0	5.0	5.0	5.0
사과농축액	5.0	5.0	5.0	5.0
설탕	9.0	9.0	9.0	9.0
구연산	0.07	0.07	0.07	0.07
증류수	75.8	75.7	75.8	75.7
합(구연산제외)	100.0	100.0	100.0	100.0

4) 4차 배합(당함량의 결정)

3차 배합까지에서 결정된 배합비를 기준으로 당의 함량을 결정하기 위하여 표 5-17과 같이 당함량을 달리하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 사용한 당은 가장 관능적 특성이 좋았던 당의 비율 즉, 설탕과 고과당을 1 : 1의 비율로 혼합한 당을 사용하였다. 또한 건강음료인 측면을 관찰할 때에 설탕대신 꿀을 사용하여 배합하였다. 관능검사 결과, 단맛의 정도는 A의 배합비가 적당하였으며 B는 단맛이 너무 강한 것으로 평가되었다, 꿀을 사용한 배합비중 C와 D는 비슷한 것으로 평가되어 D의 배합비중 꿀의 함량을 1.5%로 조정하였다.

표 5-17. 당함량 결정을 위한 배합비

구분	A	B	C	D
추출액	5	5	5	5
감초추출액	0.3	0.3	0.3	0.3
구기자농축액	2.0	2.0	2.0	2.0
대추농축액	5.0	5.0	5.0	5.0
사과농축액	5.0	5.0	5.0	5.0
설탕:고과당(1:1)	10	15		
고과당			5	5
꿀			1	2
구연산	0.07	0.07	0.07	0.07
증류수	72.7	67.7	76.7	75.7
합(구연산제외)	100.0	100.0	100.0	100.0

5) 5차 배합(구연산 함량의 결정)

4차 배합에서 결정된 배합비를 기준으로 구연산 및 비타민 C의 첨가량을 달리하여 표 5-18과 같이 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. pH의 조절하여 저장성을 증가시킬 목적으로 구연산 및 비타민 C를 첨가하였다. 구연산과 비타민 C를 첨가할수록 pH가 낮아짐을 알 수 있었으며 신맛이 점점 강하게 느껴졌다. 관능검사를 실시한 결과 비타민 C를 0.2%로 고정하고 구연산을 농도별로 첨가한 결과 구연산의 함량이 0.3% 이상 첨가할 경우 신맛이 너무 강하여 바

탐색하지 못하였으며 대체로 0.2%를 첨가한 경우가 관능적 평가가 높게 나타나 구연산 함량을 0.2%로 결정하였다. 이상의 배합비로 음료를 제조하였을 경우 pH 3.2으로 음료제조시 95℃에서 15분 열수살균과정을 거쳐서 제품을 완성하였다.(Fig. 5-8)

표 5-18. 당함향 농도 결정을 위한 배합비

구분	A	B	C	D
추출액	5	5	5	5
감초추출액	0.3	0.3	0.3	0.3
구기자농축액	2.0	2.0	2.0	2.0
대추농축액	5.0	5.0	5.0	5.0
사과농축액	5.0	5.0	5.0	5.0
고과당 꿀	5 1.5	5 1.5	5 1.5	5 1.5
비타민 C	0.2	0.2	0.2	0.2
구연산	0.1	0.2	0.3	0.4
증류수	75.7	75.7	75.7	75.7
합(구연산제외) pH	100.0 4.28	100.0 3.21	100.0 2.52	100.0 2.14

마. 음료의 최적 배합비 설정

단위 : %

재 료	함량(고형분)
추출액	5.0 (0.75g)
감초추출액	0.3
구기자농축액	2.0
대추농축액	5.0
사과농축액	5.0
고과당	5
꿀	1.5
비타민 C	0.2
구연산	0.2
구연산 나트륨	0.1
L-아스코르브산 나트륨	0.05
니코틴산 아마이드	0.05
복합과일향	0.003
증류수	75.7
pH	3.21
당도(Brix)	17.0

마. 느릅나무 추출물 음료의 제조공정

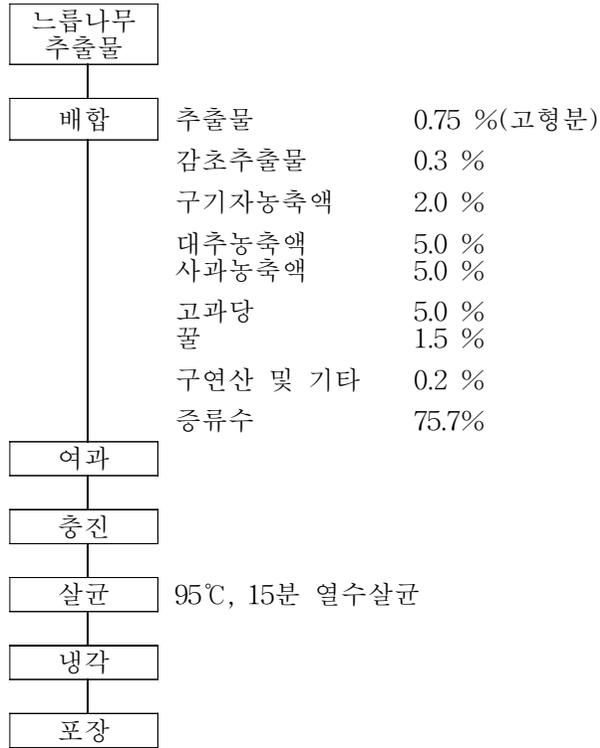




그림 5-8. 느릅 에탄올 추출물 함유 음료

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	평가의 착안점 및 달성도		관련분야에의 기여도
	착안사항	달성도 (전체에 대한 %)	
1차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 이화학적 특성, 유효성분 분석 여부 ○ <i>in vitro</i> 활성평가 여부 ○ 암세포주의 세포증식능 검토 여부 	25점 45점 30점	느릅의 식품학적 기초자료가 확보 됨.
2차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효획분의 추출조건 확립여부 ○ 식품소재화 검토 여부 ○ 추출물의 <i>in vivo</i> 효능검토 여부 ○ 대장암 예방효능 검토여부 	15점 20점 40점 25점	기억력 손상 및 대장암예방용 모델은 관련연구에 활용가능.
3차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성성분의 분리, 구조 확인 여부 ○ 건강기능식품 개발 여부 ○ 활성소재이용 가공제품화 여부 ○ 고활성 획분의 <i>in vivo</i> 효능검정 ○ 폐암예방효능 검토 여부 	25점 20점 15점 20점 20점	유효성분의 분리구조 동정 연구에 기여. <i>in vivo</i> 폐암모델은 관련연구에 활용가능
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식품소재의 특성 확인 여부 ○ 효능평가 여부 ○ 제품개발 여부 ○ 논문 발표 	25점 40점 25점 10점	소재발굴, 효능평가, 지표물질 설정을 비롯한 건강기능식품 개발에 관한 일련의 기술이 개발됨.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

1. 연구개발결과

본 연구과제를 통한 주요성과물로서는 6편의 학술발표와 3편의 논문을 투고, 게재하였고 1편의 특허를 출원하여 국내 기술력을 확보하였으며 2종의 기능 식품을 개발하였다. 그 자세한 내용은 다음과 같다.

가. 학술발표

- 1) *Ulmus davidiana var, japonica* ameliorate the Scopolamine -Induced Amnesia in Mice International symposium and Annual meeting of the Korean society of food science and nutrition. p495. 2005
- 2) Effects of Soluble Dietary Fiber isolated from *Ulmus davidiana var, japonica* on Lipid metabolism in Cholesterol-Fed Rats. KoSFoST Annual meeting. p203. 2005
- 3) Protective effect of *Ulmus davidiana var, japonica ethylacetate fractions* on oxidative PC 12 cell death. The korean society of food science and nutrition. Annual Meeting and International Symposium p460. 2004
- 4) 느릅나무(*Ulmus davidiana*)의 항산화 효과. 한국식품과학회 제 71차 학술대회 p270. 2004
- 5) Cell proliferation and cancer chemopreventive effect by *Ulmus davidiana var. japonica* Nakai Extracts in human colon cancer cells", ORGANIZING COMMITTEE OF 2ND APOCP, 2ND APOCP GENERAL ASSEMBLY CONCERENCE, 2004

6) Chemopreventive effect of extract of *Ulmus davidiana* var. *japonica* on rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine”, 대한수의학회, 제49차 대한수의학회 추계학술대회, 2005

나. 논문게재 및 투고

1) 느릅나무 추출물의 항산화 효과 및 L-glutamyl 유래 PC 12 세포독성 보호 효과, 한국식품과학회지 37(3) 479-483 (2005)

2) *Ulmus davidiana* var. *japonica* ameliorate the scopolamine induced amnesia in mice. Biogerontology, 투고중

3) Chemopreventive effects of extracts of elm tree root on colonic aberrant crypt foci induced by 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats, *Cancer Letters* 투고중

다. 특허출원

○ 느릅나무 추출물을 함유한 신경세포보호 및 기억력 개선용 조성물

- 출원일자: 2005년 7월 13일

- 출원번호: 10-2005-0063387

2. 활용계획

○ 본 연구결과 축적된 기억력 손상예방 또는 개선 효능을 평가하는 기술은 향후 관련 연구의 도출 및 연구수행에 크게 활용 될 것이다.

○ 느릅의 지질대사 개선 및 기억력 손상예방 효능을 확인함으로써 건강기능식품개발에 활용될 것이고 본결과를 논문화하여 허가용 기능성 자료로도 활용가능

○ 또한 본 연구 결과 얻어진 느릅 유효성분의 분리, 동정 및 구조확인 기술은 향후 관련연구에 활용될 것이며, 건강기능식품 개발기술은 관련업체에 기술이전을 통하여 제품의 생산 및 산업화에 적극 활용할 계획이다.

제 6 장 참고문헌

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381): 1322-1326 (1998).

Ahn CB, Im CW, Kim CH, Youn HM, Jang KJ, Song CH, Choi YH. Apoptotic cell death by melittin through induction of bax and activation of caspase protease in human lung carcinoma cells. *J Kor Acupuncture Moxibustion Soc* 21(2): 41-55 (2004).

Bae YS, Kim JK. Extractives of the bark of ash and elm as medical hardwood tree species. *Mokjae Konghak* 28: 62-69. (2000).

Brenan M, Parish CR. Automated fluorimetric assay for T cell cytotoxicity. *J Immunol Methods* 112: 121-131 (1988).

Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulations of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 821-846 (2000).

Cho SK, Lee SG, Kim CJ. Anti-inflammatory and analgesic activities of water extract of root bark of *Ulmus parvifolia*. *Kor J Pharmacogn* 27(3): 274-281 (1996).

Choi JK. Long life with Korean herbal medicine. *Taeil Publications* p 414-417 (1997).

Choi OS, Kim WY. Effects of curcumin on apoptosis in SW 480 human colon cancer cell line. *Korean J Nutr* 37(1): 31-37 (2004).

Choi WH, Oh YS, Ahn JW, Kim SR, Ha TY. Antioxidative and Protective Effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* Extracts on Glutamate-Induced Cytotoxicity in PC 12 Cells. *Korean J Food Sci Technol* 37(3): 479-483 (2005).

Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack *in vitro*. *Eur J Nutr* 38: 28-34 (1999).

Eun JS, Song WY. The combined effects of n-BuOH fraction of Ulmi cortex and anticancer drugs on cancer cell lines. *Kor J Pharmacogn* 25(2): 144-152 (1994).

- Evans VG. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int* 17: 461-476 (1993).
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 269: 30761-30764 (1994).
- Gelboin HV. Studies on the mechanism of microsomal hydroxylase induction and its role in carcinogen action. *Rev. Can. Biol.* 31(1): 39-60 (1972).
- Grüter MG. Caspases: Key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10: 649-655 (2000).
- Heidelberger C. Chemical carcinogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 79-121 (1975).
- Hong ND, Rho YS, Kim NJ, Kim JS. A study on efficacy of ulmi cortex. *Korean J Pharmacogn* 21: 217-222 (1990).
- Huberman E, Sachs L, Yang SK, Gelboin V. Identification of mutagenic metabolites of benzo[a]pyrene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb;73(2): 607-11 (1976).
- Jun CD, Pae HO, Kim YC, Jeong SJ, Yoo JC, Lee EJ, Choi BM, Chae SW, Park RK, Chung HT. Inhibition of nitric oxide synthesis by butanol fraction of the methanol extract of *Ulmus davidiana* in murine macrophages. *J Ethnopharmacol* 62(2): 129-35 (1998).
- Kang YK, Park DI, Lee JH, Choi YH. The effects of Yunpyesan on cell proliferation, apoptosis and cell cycle progression of human lung cancer A549 cells. *Kor J Oriental & Pathology* 16(4): 745-755 (2002).
- Kapitulnik J, Wislocki PG, Levin W, Yagi H, Jerina DM, Conney AH. Tumorigenicity studies with diol-epoxides of benzo[a]pyrene which indicate that (+/-)-trans-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetra hydro benzo[a]pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice. *Cancer Res.* 38(2): 354-8 (1978).
- Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 70(5): 220-233. (1995).
- Kim JP, Kim WG, Koshino H, Jung J, Yoo ID. Sesquiterpene O-naphthoquinones from the root bark of *Ulmus davidiana*. *Phytochemistry* 43(2): 425-430 (1996).

Kim KY. Studies on the antimutagenic and anticancer activities of the root bark of *Ulmus parvifolia*. 부산대학교 석사학위논문 (1997).

Kim SH, Hwang KT, Park JC. Isolation of flavonoids and determination of rutin from the leaves of *Ulmus parviflora*. *Kor J Pharmacogn* 23(4): 229-234 (1992).

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136 (1997).

Ko JH, Lee SJ, Lim KT. 116 kDa glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai (UDN) inhibits glucose/glucose oxidase (G/GO)-induced apoptosis in BNL CL.2 cells. *J Ethnopharmacol* 100(3): 339-46. (2005).

Lee EB, Kim OK, Jung CS, Jung KH. The influence of methanol extract of *Ulmus davidiana* var. *japonica* cortex of gastric erosion and ulcer and paw edema in rats. *Kor J Pharmacol* 39: 671-675 (1995).

Lee GY, Kim MH, Choi HY, Myung KB. Preliminary study of expression of caspase mRNA and apoptosis in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Kor J Dermatol* 41(1): 7-14 (2003).

Lee JC, Lee KY, Son YO, Choi KC, Kim J, Truong TT, Jang YS. Plant-originated glycoprotein, G-120, inhibits the growth of MCF-7 cells and induces their apoptosis. *Food Chem Toxicol* 43(6): 961-8 (2005).

Lee MK, Sung SH, Lee HS, Cho JH, Kim YC. Lignan and neolignan glycosides from *Ulmus davidiana* var. *Japonica*. *Arch Pharm* 24: 198-201 (2001).

Lee SE, Kim YS, Kim JE, Bang JK, Sung NS. Antioxidant Activity of *Ulmus davidiana* var. *japonica* N. and *Hemipteleae davidii* P. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12(4): 321-327 (2004).

Lee SJ, Heo KS, OH PS, Lim K, Lim KT. Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai inhibits TPA-induced apoptosis through nuclear factor-kappa B in NIH/3T3 cells. *Toxicol Lett* 146(2): 159-74 (2004).

Miller JA. Carcinogenesis by chemicals: an overview - G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 30: 559-576 (1970).

Moon YH, Rim GR. Studies of on the constituents of *Ulmus parvifolia*. *Kor J Pharmacogn* 26(1): 1-7 (1995).

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63 (1983).

Murphy KM, Ranganathan V, Fransworth ML, Kavallaris M, Look RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* 7(1): 102-111 (2000).

Nagata S. Apoptosis by death factor *cell* 88: 355-365 (1997).

Newbold RF, Brookes P. Exceptional mutagenicity of a benzo[a]pyrene diol epoxide in cultured mammalian cells. *Nature*. 261(5555): 52-54 (1976).

Nomura M, Shimizu S, Ito T, Narita M, Matsuda H, Tsujimoto Y. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res* 59(21): 5542-5548 (1999).

Potter JD, Slattey ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* 15: 499-545 (1993).

Quillardet P, Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins. *Mutat Res* 147: 65-69 (1985).

Rashmi. Santhosh Kumar TR. Karunagaran D. Human colon cancer cells differ in their sensitivity to curcumin-induced apoptosis and heat shock protects them by inhibiting the release of apoptosis-including factor and caspases. *FEBS Lett* 538(1-3): 19-24 (2003).

Reed JC. Apoptosis and cancer: Strategies for intergrating programmed cell death. *Semin Hematol* 37: 9-16 (2000).

Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-3236 (1998).

Shin HR, Jung KW, Won YJ, Park JG, 139 KCCR-affiliated Hospital. 2002

Annual Report of The Korea Central Cancer Registry: based on registered data from 139 hospitals. *Cancer Res Treat* 36(2): 103-114 (2004).

Sims P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, Hewer A. Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature*. 252(5481): 326-8 (1974).

Sims P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, Hewer A. Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature*. 252(5481): 326-8 (1974).

Son BH, Park JH, Zee OP. Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*. *Arch Pharm Res* 12: 219-222 (1989).

Son YO, Lee KY, Choi KC, Chung Y, Kim JG, Jeon YM, Jang YS, Lee JC. Inhibitory effects of glycoprotein-120 (G-120) from *Ulmus davidiana* Nakai on cell growth and activation of matrix metalloproteinases. *Mol Cells* 18(2): 163-70 (2004).

Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family protein in apoptosis apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3: 697-707 (1998).

Virag L, Kerekgyarto C, Facht J. A simple, rapid and sensitive fluorimetric assay for the measurement of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 185: 199-208 (1995).

Weisburger EK. Mechanism of chemical carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 395-415 (1978).

Witte JS, Longnecker MP, Bird CL, Lee ER, Frankl HD, Haile RW. Relation of vegetable, fruit and grain consumption to colorectal adenomatous polyps. *Am J Epidemiol* 144: 1015-1027 (1996).

Wood AW, Wislocki PG, Chang RL, Levin W, Lu AY, Yagi J, Hernandez O, Herina DM, Conney AH. Mutagenicity and cytotoxicity of benzo[a]pyrene benzo-ring epoxides. *Cancer Res.* 36(9 pt. 1): 3358-66 (1976).

Yang SK, McCourt DW, Roller PP, Gelboin HV. Enzymatic conversion of benzo[a]pyrene leading predominantly to the diol-epoxide-7, t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-7,8,9,10 -tetrahydrobenzo[a]pyrene through a single enantiomer of r-7,t-8-dihydroxy-7, 8-dihydro benzo[a]pyrene. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(8): 2594-8 (1976).

Yang YL, Kim YJ. Immunostimulating exopolysaccharide with anticancer activity from *enterobacter* sp. SSY(KCTC 0687BP) screened from *Ulmus parvifolia*. *Kor J Biotechnol Bioeng* 16(6): 554-561 (2001).

Yang YL, Kim YJ, Kim KH, Oh YJ. Separation of glycoprotein and its anticancer immunostimulating activity from dried bark of slippery elm (*Ulmus parvifolia*). *Kor J Biotechnol Bioeng* 16(6): 547-553 (2001).

Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, Guyton RA, Vinten JJ. Adenosine attenuated reperfusion induced apoptotic cell death by modulation expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol* 33:

57-68 (2001).

Wang D., Xia M.Y., Cui Z., Tashiro S., Onodera S. and Ikejima T. (2004)
Cytotoxic effects of mansonone E and F isolated from *Ulmus pumila*. Bio.
Pharm. Bull. 27(7) 1025-1030