

국내 차·죽류 식물의 신물질을 이용한 노인성 뇌장애
개선 및 간암억제용 건강기능식품 개발

(Development of ameliorating geriatric brain ailment
and anti-hepatic cancer health aid functional food from
native plant resources)

뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의
건강기능 식품화

(Development of functional foods inhibiting acetylcholinesterase
in neuronal cells)

뇌신경세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는
유효성분의 건강기능 식품화

(Development of functional foods protecting neuronal cells
against amyloid beta-induced neurotoxicity)

간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제
유효성분의 건강기능 식품화

(Development of functional foods inhibiting the expression
of matrix metalloproteinase-2, -9 in liver)

고려대학교

농림수산식품자료실



0017087

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내 차죽류 식물의 신물질을 이용한 노인성 뇌장애 개선 및 간암억제용 건강 기능식품 개발” 과제(세부과제 “뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의 건강 기능 식품화”, “신경세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 건강기능 식품화”, “간 세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 유효성분의 건강기능 식품화”)의 보고서 로 제출합니다.

2009 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 신 동 훈

세부연구책임자 : 홍 범 식

세부연구책임자 : 김 영 준

연 구 원 : 최 수 정

연 구 원 : 김 재 겹

연 구 원 : 백 승 석

연 구 원 : 이 강 옥

연 구 원 : 김 초 룡

연 구 원 : 김 준 호

연 구 원 : 김 재 훈

연 구 원 : 조 성 도

연 구 원 : 정 인 혜

연 구 원 : 김 기 룡

연 구 원 : 조 남 희

연 구 원 : 오 제 훈

연 구 원 : 강 미 경

연 구 원 : 임 성 훈

요 약 문

I. 제 목

국내 차·죽류 식물의 신물질을 이용한 노인성 뇌장애 개선 및 간암억제용 건강기능식품 개발

II. 연구개발의 목적

뇌라는 기관은 신체의 중심 부위로 매우 과거부터 신성시되어 왔고 매우 복잡한 구조를 갖고 있으며, 타 기관에 비해 접근이 쉽지 않고 다루기가 쉽지 않아 그에 대한 생리학적 이해나 병리가 잘 알려져 있지 않고 있다. 이러한 배경을 살펴 볼 때, 최근 주요선진국가의 연구방향은 생명공학을 중심으로 이루어져 있고, 특히 뇌 질환 중심으로 이루어지고 있음을 알 수 있다. 또한 생활수준의 향상과 의학기술의 발달에 따라 노령 인구가 증가되어 인구의 고령화 현상이 두드러지고 있으며 현대사회의 치열한 경쟁에 따른 극심한 스트레스로 인한 성인병의 발병률 또한 급격한 증가 추세를 보인다. 사망원인의 경우 과거 주원인이었던 감염형 질환에서 대표적인 성인병인 순환기계 질환, 암등에 의한 사망이 전체의 절반을 넘기기에 이르렀다. 이에 건강한 삶을 누리하고자 하는 LOHAS가 하나의 큰 관심사로 대두하게 되었고 장수에 대한 욕구 증가로 일상생활을 통한 성인병 및 노인성 질환에 대한 예방에 관심이 고조되고 있다.

식품성분에 대해 새로운 관점에서의 체계적인 연구가 발전함에 따라 식품기원의 특정 성분들이 인체의 신경계, 생체 방어계, 세포분화 등 각종 생리기능 조절계에 작용하여 직·간접으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 이들 특정성분들에 의한 생체 조절계 및 생체 방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 가장 자연스러운 건강유지를 위한 최적의 수단이 될 수 있음을 의미한다. 식품에 도입되고 있는 생체 조절성 3차 기능은 질병을 발병 전 단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로서, 향후 고령화 사회에서 건강기능식품 및 식품의약의 수요가 합성의약품을 상회할 것으로 예측되고 있기도 하다.

본 연구그룹은 고령화 질환 및 성인병의 예방 및 치료용 phytochemicals를 국내자생 식용생물자원으로부터 탐색하고 이들을 원료로 하여 의약, 식품의약 및 건강기능식품으로의 제품화함에 있어, 최종물질의 안전성을 확보, 의약품 및 건강기능식품 소재로 실용화될 확률을 높이고자 하며, 뿐만 아니라 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안으로 식용생물자원으로부터 신물질을 탐색하고 개발하고자 한다. 따라서 본 연구는 국내산 식용생물자원을 대상으로 고령화 질환인 뇌장애와 간암 등 항상성 불균형에 의한 질환들의 예방 및 치료 가능한 미량성분을 실용화함과 동시에 이를 주제로 한 건강기능식품을 제품화함으로써 국내 농림산업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 자연 식물자원들로부터 약리·생리활성 성분을 의약 및 식품용 중간원료의 소재로 실용화하고 이를 주제로 한 기능성 식품을 개발하고자 하였다. 최종 목표달성을 위해서 대표적인 고령화 질환에 따라 제 1, 2, 3 세부과제로 구분하였으며 이를 통하여 수행한 연구 개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

(1) 제 1세부과제; 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의 건강기능 식품화

탱자 (*Poncirus trifoliata*) 에서 acetylcholinesterase (AChE) 억제 활성 성분을 추출 정제, 구조 해석 및 소재화를 연구 개발 내용으로 하며 *in vitro* assay계를 확립하고 ICR-mouse를 이용한 *in vivo* assay계를 도입하여 인지능력과 독성검사 등을 시행한다. 또한 선정된 시료 및 구조가 밝혀진 활성화 성분 물질의 실용화 및 제품화를 검토하는 것을 연구 범위로 한다.

(2) 제 2세부과제; 뇌신경세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 건강기능 식품화

석류 (*Punica granatum L.*) 로부터 amyloid β peptide (A β)에 의한 뇌신경 독성 저해 미량소재를 추출 정제, 구조해석 및 소재화를 연구개발 내용으로 하며 *in vitro* assay계를 확립하고 ICR-mouse를 이용한 *in vivo* assay계를 도입하여 인지능력과 독성 등을 검사하고 저해활성 물질의 실용화를 검토하는 것을 연구 범위로 한다.

(3) 제 3세부과제; 간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 유효성분의 건강기능 식품화

깎 결합을 통한 세포 간 신호전달의 회복 및 matrix metalloproteinase의 활성억제 성분의 검색과 선정하고 *in vivo* 항암 test를 통한 간암 발생률 억제 효과 검색한다. 간암억제 유효성분을 이용한 건강기능식품의 공업적 실용화 및 제품화를 검토하는 것을 연구 범위로 한다.

Ⅳ. 연구개발결과

국내 고유 식물자원으로부터 약리·생리활성 성분을 의약 및 식품용 중간원료의 소재화 및 실용화를 최종 목적으로 수행한 본 연구 개발 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 국내 차·죽류 식물을 극성별 계통으로 용매 추출 후 각각의 획분에 대하여 AChE 억제 및 A β 에 의한 뇌신경 독성 저해 활성을 검색한 결과, 각각 탱자와 석류가 선정되었다. 또한 깎

결합을 통한 세포 간 신호전달의 회복 및 matrix metalloproteinase의 활성억제 시료로는 유근피 추출물이 가장 높은 효과를 나타내었다.

(1) 국내 고유농림자원을 대상으로 AChE 억제 효과를 같은 시료를 선정된 결과, 탕자 추출물이 가장 높은 억제활성을 보였다. 추출물을 용매 극성에 다른 상분리 및 open column chromatography, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography를 통해 활성물질을 분리하여 8-methoxsalen을 활성물질로 밝혀냈다. *in vitro* 및 *in vivo* 활성시험을 통해 탕자 추출물 및 8-methoxsalen이 유의할만한 독성 없이 높은 항치매 활성 및 기억력증진에 도움이 됨을 밝혀냈으며 공업적 활용을 위한 시험에서도 특이한 문제점이 발견되지 않았다.

(2) 국내 고유농림자원을 대상으로 A β 에 의한 뇌신경 독성 저해 활성효과를 가지는 시료를 검색하였다. 석류의 에탄올 추출물을 용매 극성에 다른 상분리 및 open column chromatography, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography를 통해 활성물질을 분리하여 2,4-Di-*tert*-butylphenol을 활성물질로 밝혀냈으며 석류 추출물과 2,4-Di-*tert*-butylphenol을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 항치매 활성 및 뇌신경세포 보호효과를 확인하였다. 또한 공업적 실용화를 위한 실험에서도 특별한 문제점은 발견되지 않았다.

(3) 국내 고유농림자원을 대상으로 간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 시료를 검색하였다. 유근피의 에탄올 추출물의 경우 MMP-2와 MMP-9 모두 발현을 억제하였고, 저농도에서도 암전이 초기단계에서 예방 효과가 나타날 것으로 확인되었다. HPLC를 통한 활성성분 확인결과, 적어도 4가지 이상의 10,000 MW이하의 저분자 폴리페놀류가 관련되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 공업적 실용화를 위한 실험에서도 특별한 문제점은 발견되지 않았다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

(1) 기대효과

본 연구개발 내용은 원료의 전 처리에서 제품화 단계까지 다양한 연구기법과 공정기술이 사용되고 있을 뿐만 아니라 시장 경쟁성이 없는 1차 농림자원으로부터 고부가가치성 기능성 제품화를 주 내용으로 하고 있기 때문에 연구가 성공적으로 수행되었을 경우 기술적, 경제·산업적 측면에서 아래와 같은 성과를 관련 관·산·학·연계에 제공할 것으로 기대된다.

(2) 기술적 측면

- 치매 및 간암의 예방 및 치료용 phytochemicals의 *in vitro, in vivo* assay계 확립
- 정제 phytochemicals의 전 구조 (저분자) 또는 core region(고분자)을 규명
- 추출 폐기물의 감량화를 이룰 수 있는 추출방법의 확립
- 생리활성 물질의 신속 간편한 정제법의 도입 및 미량성분 농축기술 확립
- 국내 고유의 식용농림자원으로부터 약리·생리활성 신규후보 물질의 개발모델 제시

(3) 경제 · 산업적 측면

- 간단한 분리공정을 통하여 성인성 뇌질환 및 간암에 대한 효과적인 예방, 치료제의 생산
- 외국의 기존 물질특허와 마찰을 일으키지 않는 신규물질이 창출될 가능성이 높고 신규 물질에 따라서는 거대 수출품목이 될 수 있음.
- 현재 수입되고 있는 유사소재의 수입대체 효과 및 1차 산물의 고부가 가치화
- 고기능성 식품제조 기술의 발전을 촉진시켜 식품 및 관련 산업들의 신장을 촉진
- 제약 및 식품산업의 영역을 넓힘으로써 관련 산업들의 경쟁력 제고

(4) 활용방안

본 연구과제의 수행과정이나 성공적인 수행 후에 얻어지는 성과에 대한 예상되는 활용방안은 다음과 같다.

- 의약품제제와 건강기능식품의 원료 및 중간원료로서의 소재화
- 특히 노인성 치매 및 간암 치료 및 치료보조용 또는 예방용 의약품 및 건강기능식품의 제품화
- 고기능성 건강기능식품들에 대한 국민적 관심과 지식을 높임

SUMMARY

Development of ameliorating geriatric brain ailment and anti-hepatic cancer health aid functional food from native plant resources

Alzheimer's disease (AD) was discovered by Dr. Alois Alzheimer in 1907, and is described as a degenerative disease of the central nervous system with many cognitive and neuropsychiatric manifestations that result in progressive disability and eventual incapacitation. AD is not just among the leading causes of senile dementia, but it is also the most prevalent neurodegenerative disease affecting populations worldwide, and thus is an increasingly threatening international health problem. According to the report from the Alzheimer's Association, one in eight Americans over the age of 65 and about half of Americans over the age 85 currently suffer from this disease. Moreover, the annual economic cost of AD health care expenses and lost wages for both patients and caregivers are estimated to be approximately 80–100 billion dollars. With the present rate of growth among the elderly population, it is predicted that around 16 million seniors will be affected by 2050. AD patients present with a progressive loss of cholinergic synapses in brain regions associated with higher mental functions, mainly the hippocampus and neocortex. In the AD patients a decrease in acetylcholine (ACh), a neurotransmitter, appears to be a critical element in the development of dementia; this finding has led to research on ways to enhance diminished levels of cholinergic neurotransmitter. Hence, AD and other forms of dementia could be treated by the use of agents that restore the level of acetylcholine through inhibition of both two major forms of cholinesterase: acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). Moreover, the inhibition of AChE plays a key role not only in enhancing cholinergic transmission in the brain, but also in reducing the aggregation of amyloid beta peptide (Ab) and the formation of the neurotoxic fibrils in AD. Thus far, AChE inhibitors approved by the U.S. Food and Drug Administration for the treatment of symptomatic patients with mild to moderate AD are tacrine, donepezil, and rivastigmine.

Despite intensive advancement in research, effective therapeutic options against AD are limited, and have thus increased demand for new drugs. Polyphenolic compounds from fruits and vegetables are currently gaining interest for their beneficial effects, including antioxidative, antiviral, anticancer, and anti-inflammatory effects, as well as the prevention of cardiovascular diseases. However, previous interest in these phytochemicals, with respect to their health-promoting effects, has primarily been focused on examining their roles in

protection against cancers and ischemic heart disease. Few studies have investigated their effects on brain functions and neurodegenerative diseases.

In this research project, various Korean plants were screened in a search for effective AChE inhibitors. Among these plants, the ethanol extract of *Poncirus trifoliata* was selected for the isolation and purification of an AChE inhibitor because it showed the highest inhibitory activity. To separate the active compound from the extract of *Poncirus trifoliata*, solvent partition, open column chromatography, thin layer chromatography (TLC), and high performance liquid chromatography (HPLC) were also utilized. The isolated compound was then analyzed by EI-MS and $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -NMR to elucidate the putative chemical structure. To confirm the attenuating effect of the extract of *Poncirus trifoliata* against trimethyltin (TMT)-induced learning and memory impairment, *in vivo* behavior tests, *i.e.* Y-maze test and passive avoidance test, were performed.

On the other hand, the amyloid β peptide ($\text{A}\beta$) accumulates in the AD brain. And many researchers believe this peptide plays central role to the pathogenesis of this disorder. In addition, AD brains are characterized by extensive oxidative stress. That is manifested by lipid peroxidation, free radical formation, protein oxidation and DNA/RNA oxidation. Overproduction of $\text{A}\beta$ by genetic [*i.e.* mutations in APP or in presenilins or the presence of apolipoprotein *E4* allele (ApoE4)] or other mechanisms (*i.e.* oxidative stress) leads to $\text{A}\beta$ -associated free-radical oxidative stress. This oxidative stress is manifested by reactive oxygen species (ROS) formation, lipid peroxidation and subsequent modification of proteins by the reactive lipid peroxidation products such as 4-hydroxy-2-trans-nonenal (HNE) and acrolein. Other consequences of $\text{A}\beta$ -associated oxidative stress are free fatty-acid (FFA) release, protein oxidation, Ca^{2+} dyshomeostasis (with subsequent alterations in mitochondrial function, oxidative stress, activation of phospholipase A2, cytoskeletal proteins, and induction of apoptosis pathways), mitochondrial impairment, peroxynitrite formation, inflammatory response, apoptosis and other cellular responses. Ultimately, the neuron dies. Antioxidants are able to interfere with most, if not all, of these processes, including the neurotoxicity. This is consistent with the concept of $\text{A}\beta$ -associated oxidative stress and neurodegeneration in AD brain.

To search for a protector against $\text{A}\beta$ -induced oxidative stress, we screened various plant material extracts. The ethanol extract of *Punica granatum* L. was selected by screening. The ethanol extract of *Punica granatum* L. was partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate, respectively. The fraction of ethyl acetate showed the highest protective effect against oxidative stress. The fraction was subjected to silica-gel open column chromatography. The eighth fraction (second fraction of chloroform and ethanol = 80:20,

v/v) of thirty three fractions was selected. The fraction was separated by TLC. The fifth band (R_f value 0.47) represented the highest activity. Then the obtained sample was dissolved in ethanol and separated on HPLC using C_{18} μ -BondapakTM column. The peak appeared at 236.8 nm. A significant single peak was measured at 41 min. The isolated sample was analyzed by EI-MS and $^{13}C/^1H$ -NMR to predict chemical structures. The protector was identified as the 2,4-Di-*tert*-butylphenol. *In vivo* experiment, treatment with the ethanol extract of *Punica granatum* L. ameliorated the $A\beta_{1-42}$ -induced learning and memory impariment in both Y-maze and passive avoidance test.

We also evaluate the anti-metastatic effect and hepatoprotective activity of *Ulmus Davidiana plancn. japonica Nakai* (UDN) which has been used widely as Korean traditional medicine for edema and inflammation. It was shown that UDN ethanol extract (UDNe) was most active in the induction of hepatocarcinoma apoptosis and inhibited the expression of MMP-2 and -9. UDNe showed the highest activity among all the various fractions in a cell viability study. In *in vitro* and *in vivo* studies to test the hepatoprotective activities, UDNe increased the activity of alcohol dehydrogenase (ADH; 105%). Whereas the levels of total cholesterol, TG, LDL cholesterol, AST and ALT of serum of rats were decreased by feeding UDNe, HDL cholesterol level was significantly increased (20 mg/dl). In addition, the levels of hepatic total cholesterol, LDL cholesterol and TG of UDNe group were lower than that of ethanol treated group. The amount of liver injuries were measured by histopathological studies. UDNe group showed a decline in liver tissue damages and TG contents (40%) as compared with the ethanol group. These results suggest that UDNe has strong protective activity against the liver disease induced by ethanol. These findings could provide the therapeutic potential of ethanol extracts of UDN on the metastasis and alcohol-induced disease, and it should be meaningful to develop new effective functional foods on diseases related with fatty liver, cardiovascular diseases, cirrhosis, hypertension, obesity and liver cancer.

The bio-reactive compounds of selected samples, *Poncirus trifoliata*, *Punica granatum* L. and *Ulmus Davidiana plancn. japonica Nakai* were isolated and purified with industrial-level procedure. Extracts of each samples were decolorized with low cost absorbents and purified by ultrafiltration using Milipore masterflex system. Finally, each purified bio-reactive compounds was formulated as the types of beverage, capsule and granule.

CONTENTS

Summary (Korean)	2
Summary (English)	6
Contents (English)	9
Contents (Korean)	15
Part 1. The outline of research and development	22
Chapter 1. The objective of research and development	22
Chapter 2. Significance of research and development	24
1. Technical aspects	24
2. Economical and industrial aspects	26
3. Social and cultural aspects	26
Part 2. The present condition of technical development	28
Chapter 1. The present condition of research and development	28
1. Technical condition and level of foreign countries	28
2. Technical condition and level of nation	28
Part 3. Research development and results	31
Chapter 1. Development of functional foods inhibiting acetylcholinesterase in neuronal cells	31
1. Introduction	31
2. Material	31
3. Methods	32
A. Establishment of <i>in vitro</i> assay measurement for AChE activity	32
(1) Extraction conditions and methods	32
(2) Establishment of <i>in vitro</i> assay measurement	32
B. Sample screening and selection having the most potency of AChE inhibitory activity	33
C. <i>In vitro</i> toxicity test	33
D. Establishment of <i>in vivo</i> assay measurement, evaluation and toxicity tests of selected sample	34
(1) Establishment of <i>in vivo</i> assay measurement	34
(2) <i>In vivo</i> toxicity test	35
(3) Y-maze	35
(4) Passive avoidance test	36
E. Establishment of extraction and preliminary purification methods	37
(1) Establishment of extraction method	37
(2) Establishment of preliminary purification method	37
(3) Open column chromatography	39
(4) Preparative thin layer chromatography (PLC)	39
(5) High performance liquid chromatography (HPLC)	40
F. Characterization of AChE inhibitor	40
G. Secondary <i>in vivo</i> test for the measurement of active compound	40

(1) Establishment of <i>in vivo</i> assay measurement and evaluation of AChE inhibitory activity	40
(2) Y-maze test	41
(3) Passive avoidance test	41
(4) Measurement of AChE activity and lipid peroxidation from the dissected brain tissues	41
(5) <i>In vivo</i> toxicity test	41
H. Industrialization of AChE inhibitor	42
(1) Establishment of extraction and purification procedures for industrial use	42
(2) Production of capsule	42
(3) Production of beverage	43
(4) Production of granule	43
I. Tests of appearance and contamination of end-product	43
4. Results	43
A. Screening of AChE inhibitor and sample selection	43
B. <i>In vitro</i> toxicity test	47
C. Establishment of <i>in vivo</i> assay measurement, evaluation and toxicity tests of selected sample	48
(1) <i>In vivo</i> toxicity test	48
(2) Y-maze	51
(3) Passive avoidance test	53
D. Searching for AChE inhibitor from <i>Poncirus trifoliata</i> extract	55
(1) Solvent partition	55
(2) Open column chromatography	56
(3) Preparative thin layer chromatography (PLC)	57
(4) High performance liquid chromatography (HPLC)	58
E. Characterization of AChE inhibitor	59
F. Secondary <i>in vivo</i> test for the measurement of active compound	62
(1) Establishment of <i>in vivo</i> assay measurement and evaluation of inhibitory activity of methoxsalen	62
(2) Y-maze test	62
(3) Passive avoidance test	64
(4) Measurement of AChE activity and lipid peroxidation from the dissected brain tissues	65
(5) Acute toxicity test	67
G. Industrialization of AChE inhibitor	69
(1) Establishment of extraction and purification procedures for industrial use	69
(2) Industrialization of sample extracts	71
(3) Tests of appearance and contamination of end-product	72
Chapter 2. Development of functional foods protecting neuronal cells against amyloid beta (A β)-induced neurotoxicity	75
1. Introduction	75
2. Material and Methods	76
A. Material	76
B. Methods	76
(1) Establishment of <i>in vitro</i> assay and primary screening	77

(A) Cell culture	77
(B) Extraction conditions and methods	77
(C) DCF-DA assay	77
(D) MTT reduction assay	79
(E) Extraction and sample preparation	80
(2) Purification and isolation of phytochemicals	81
(A) Solvent partition	81
(B) Open column chromatography	83
(C) Preparative thin layer chromatography (PLC)	83
(D) High performance liquid chromatography (HPLC)	83
(3) Characterization of the protector of neuronal cells	84
(A) Structure analysis using NMR	84
(B) Measurement of molecular weight using EI-MS	84
(4) Establishment of <i>in vivo</i> assay measurement, evaluation and toxicity tests of selected sample	84
(A) Establishment of <i>in vivo</i> assay measurement	84
(B) <i>In vivo</i> toxicity test	84
(C) Y-maze test	84
(D) Passive avoidance test	85
3. Results	85
A. Establishment of <i>in vitro</i> assay measurement and sample selection	85
(1) Primary sample screening	85
(2) Sample selection and cytotoxicity test	91
B. Purification and isolation of phytochemicals	93
(1) Solvent partition	93
(2) Results of solvent partition	94
(A) DCF-DA assay	94
(B) MTT reduction assay	95
(3) Open column chromatography	97
(4) Results of Open column chromatography	97
(A) DCF-DA assay	97
(B) MTT reduction assay	99
(5) PLC	102
(A) DCF-DA assay	102
(B) MTT reduction assay	103
(6) HPLC	104
C. Characterization of the protector of neuronal cells	105
(1) Structure analysis using NMR	105
(2) Measurement of molecular weight using EI-MS	107
D. Evaluation of sample extracts using <i>in vivo</i> test	108
(1) <i>In vivo</i> toxicity test	108
(2) Results of primary <i>in vivo</i> test	111
(A) Y-maze test	111
(B) Passive avoidance test	112
(3) Secondary <i>in vivo</i> toxicity test	113
(4) Secondary <i>in vivo</i> behavior test	118
(A) Y-maze test	118
(B) Passive avoidance test	119

E. Industrialization of active compound	120
(1) Test of industrial processes	120
(2) Production of trial products	121
(A) Production of capsule	121
(B) Production of baverage	122
(C) Production of granule	123
(3) Tests of appearance and contamination of end-product	124
Chapter 3. Development of functional foods inhibiting the expression of matrix metalloproteinase-2, -9 in liver	126
1. Introduction	126
2. Material and Methods	127
A. Searching anti-liver cancer effects from natural resources	127
(1) Establishment of extraction methods	127
(2) Evaluation of anti-oxidative activity	128
(3) Quantitative analysis of active compound	128
(4) <i>In vitro</i> toxicity test	128
(5) Establishment of <i>in vitro</i> measurement	129
(A) Measurement of intracellular communication	129
(B) FOX assay	129
(C) Measurement of anti-metastatic effect by inhibiting MMP	129
B. Establishment of the conditions of pretreatment prior to extraction	130
(1) Anti-cancer and anti-metastatic effects of <i>Ulmus Davidiana</i> <i>planchn. japonica Nakai</i>	130
(A) Extraction conditions	130
(B) MTT assay	130
(2) Search of anti-metastatic effects	131
(A) Gelatin zymography	131
(3) Search of gap junction intracellular communication activity	131
(4) Search of bioavailability and anti-angiogenesis activity of active compound	131
(A) Caco-2 human intestinal model	132
(B) Chorioallantoic membrane (CAM) assay	132
(5) Measurement of anti-oxidative activity and quantitative analysis	133
(A) DPPH assay	133
(B) Quantitative analysis	133
(6) Elucidation of active compound from extracts	133
(A) MTT assay	133
(B) Measurement of the activity of solvent fractions	134
(C) Isolation of active compound using HPLC	134
(7) Evaluation of protective activity against alcohol-induced liver damage	134
(A) Evaluation of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activity	134
(B) Evaluation of liver protective activity using <i>in vivo</i> model	134
C. Evaluation of anti-liver cancer activity	135
(1) CAA (Cellular Antioxidant Activity) assay	135
(2) Annexin V-PI staining	136
(3) Quantitative analysis of MMP-2, -9 using ELISA	136
D. Anti-cancer effects of <i>Enteromorpha intestinalis</i>	136
(1) MTT assay	136

(2) Anti-thrombus effects of <i>Enteromorpha intestinalis</i>	136
(A) Evaluation of anti-coagulative activity with various solvents	137
(B) Evaluation of anti-coagulative activity with concentrations of alkali extraction	137
(C) Evaluation of anti-coagulative activity by Activated partial thromboplastin time (APTT)	137
E. Industrialization of active compound from <i>Ulmus Davidiana plancn. japonica Nakai</i>	137
(1) Production of capsule	137
(2) Production of beverage	138
(3) Production of granule	138
F. Tests of appearance and contamination of end-product	138
3. Results	138
A. Establishment of extraction methods	138
B. Establishment of anti-oxidative activity measurement	139
C. <i>In vitro</i> toxicity test	141
D. Establishment of <i>in vitro</i> measurement	142
(1) Measurement of intracellular communication	142
(2) Measurement of anti-metastatic effect	144
E. Establishment of the conditions of pretreatment prior to extraction	144
(1) Anti-proliferative effects against liver cancer cell	145
(2) Searching of anti-metastatic effects	146
(3) Measurement of gap junction intracellular communication	147
(4) Measurement of anti-oxidative activity and quantitative analysis	149
(5) Measurement of the activity of solvent fractions	150
F. Evaluation of protective activity against alcohol-induced liver damage	151
(1) Evaluation of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activity	151
(2) Evaluation of liver protective activity using <i>in vivo</i> model	152
(A) Establishment of <i>in vivo</i> assay measurement and evaluation of anti-liver cancer activity of <i>Ulmus Davidiana plancn. japonica Nakai</i>	152
(B) Measurement of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), serum triglyceride(STG), total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol from the blood serum	152
(C) Measurement of hepatic triglyceride (STG), total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol from tissues	155
(D) Measurement of cell damage and the level of triglyceride from the sliced tissues	156
G. Evaluation of anti-liver cancer activity	158
(1) CAA(Cellular Antioxidant Activity) assay	158
(2) Annexin V-PI staining	159
(3) Quantitative analysis of MMP-2, -9 using ELISA	160
H. Elucidation of active compound from extracts	160

(1) MTT assay	160
(2) Measurement of the activity of solvent fractions	161
(3) Isolation of active compound using HPLC	162
I. Anti-cancer and anti-thrombus effects of <i>Enteromorpha intenstinalis</i>	163
(1) Effects of <i>Enteromorpha intenstinalis</i> on HepG2	163
(2) Effects of <i>Enteromorpha intenstinalis</i> on B16/F10	164
(3) Effects of <i>Enteromorpha intenstinalis</i> on HT1080	164
(4) Effects of <i>Enteromorpha intenstinalis</i> on MCF7	166
(5) Anti-thrombus effects of <i>Enteromorpha intenstinalis</i>	167
(A) Evaluation of anti-coagulative activity with various solvents	167
(B) Evaluation of anti-coagulative activity with concentrations of alkali extraction	169
J. Industrialization of active compound from <i>Ulmus Davidiana plancn. japonica Nakai</i>	170
(1) Production of capsule	170
(2) Production of beverage	171
(3) Production of granule	172
K. Tests of appearance and contamination of end-product	172
Part 4. Achievements of purpose and rest of relative field	175
Chapter 1. Purpose of research and development and achievement	175
1. Achievements of annual research and development	175
(1) Achievements of first year	176
(2) Achievements of second year	177
(3) Achievements of third year	178
2. Evaluation points	179
Chapter 2. The rest of relative field	180
1. Academic and technical aspects	180
2. Economical and industrial aspects	180
Part 5. Results of research and development and applicative plan	181
Chapter 1. Needs of further research	181
Chapter 2. Application to another fields	181
Chapter 3. Strategy for industrialization	181
Part 6. Collection of foreign informations	183
1. Measurement of oxidative stress (DCF-DA method)	183
2. Assessment of cell viability (MTT reduction assay)	183
3. Assessment of AChE activity (Ellman's methods)	183
4. Evaluation of learning and memory capacity using <i>in vivo</i> model	184
A. Y-maze test	184
B. Passive avoidance test	184
Part 7. Reference	185
Appendix	

목 차

요약문 (한글)	2
요약문 (영어)	6
목차 (영어)	9
목차 (한글)	15
제 1 장 연구개발과제의 개요	22
제 1절 연구개발의 목적	22
제 2절 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성	24
1. 기술적 측면	24
가. 제 1세부과제: 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의 건강기능 식품화	24
나. 제 2세부과제: 뇌신경 세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 건강기능 식품화	24
다. 제 3세부과제: 간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 유효성분의 건강기능 식품화	25
2. 경제·산업적 측면	26
3. 사회·문화적 측면	26
제 2 장 국내외 기술개발 현황	28
제 1절 연구개발 대상 기술의 국내외 현황	28
1. 해외 기술개발 현황 및 수준	28
2. 국내 기술개발 현황 및 수준	28
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	31
제 1절 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의 건강기능 식품화	31
1. 서설	31
2. 재료	32
3. 실험방법	32
가. AChE 저해활성 물질 측정을 위한 <i>in vitro</i> assay계 확립	32
(1) 1차 검색용 시료 추출조건과 방법	32
(2) <i>In vitro</i> assay계의 확립	32
나. AChE 저해활성을 갖는 시료의 검색 및 선정	33
다. <i>In vitro</i> 세포독성 실험	33
라. AChE 저해활성 측정을 위한 <i>in vivo</i> assay계 확립, 선정 시료의 활성 검사 및 독성검사	34
(1) <i>In vivo</i> assay계 확립	34
(2) 최종 선정된 AChE 억제 시료의 <i>in vivo</i> 독성실험	35

(3) Y-maze	35
(4) Passive avoidance test	36
마. 추출법 확립 및 예비정제	37
(1) 추출법 확립	37
(2) 예비정제법의 확립	37
(3) Open column chromatography	39
(4) Preparative thin layer chromatography (PLC)	39
(5) High performance liquid chromatography (HPLC)	40
바. 정제된 AChE 저해 활성물질 구조분석	40
사. 선정된 시료로부터 분리한 신경전달물질 분해효소 억제물질의 2차 <i>in vivo</i> test	40
(1) <i>In vivo assay</i> 계 확립 및 구조가 밝혀진 활성물질의 활성측정	40
(2) Y-maze test	41
(3) Passive avoidance test	41
(4) 적출된 뇌 조직을 이용한 AChE activity 측정 및 지질과산화도 측정	41
(5) 활성물질의 <i>in vivo</i> 상의 독성실험	41
아. 신경전달물질 분해효소 억제물질의 공업적 실용화	42
(1) 최종적으로 선정된 시료들로부터 추출조건의 최적화 및 공업적 수준의 정제방법 확립	42
(2) 연질 캡슐 제작	42
(3) 드링크제 제작	43
(4) 과립제 제제	43
자. 제품의 외관 및 안정성 검사	43
4. 실험결과	43
가. AChE 저해활성을 갖는 시료의 검색 및 선정	43
나. <i>In vitro</i> 세포독성 실험	47
다. AChE 저해활성 측정을 위한 <i>in vivo</i> assay계 확립 과 선정 시료의 활성 및 독성검사	48
(1) 최종 선정된 AChE 억제 활성물질의 <i>in vivo</i> 독성실험	48
(2) Y-maze	51
(3) Passive avoidance test	53
라. <i>Poncirus trifoliata</i> 추출물로부터 AChE 저해 활성물질 탐색	55
(1) Solvent partition	55
(2) Open column chromatography	56
(3) Preparative thin layer chromatography (PLC)	57
(4) High performance liquid chromatography (HPLC)	58
마. 정제된 AChE 저해 활성물질 구조분석	59
바. 선정된 시료로부터 분리한 신경전달물질 분해효소 억제물질의 2차 <i>in vivo</i> test	62
(1) <i>In vivo assay</i> 계 확립 및 methoxsalen의 활성측정	62
(2) Y-maze test	62
(3) Passive avoidance test	64
(4) 적출된 뇌 조직을 이용한 AChE activity 측정 및 지질과산화도 측정	65
(5) 활성물질의 acute toxicity 측정을 위한 간독성 실험	67
사. 신경전달물질 분해효소 억제물질의 공업적 실용화	69
(1) 대량 추출 및 대량정제법 확립	69
(2) 추출물의 공업적 식품화 시험	71

(3) 제품의 외관 및 안정성 검사	72
제 2절 뇌신경세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 건강기능 식품화	75
1. 서설	75
2. 재료 및 실험 방법	76
가. 재료	76
나. 실험방법	77
(1) <i>In vitro</i> assay계의 확립 및 후보식용식물의 1차 선정	77
(가) 세포배양	77
(나) 1차 검색용 시료 추출조건과 방법	77
(다) DCF-DA assay	77
(라) MTT reduction assay	79
(마) 선정된 식용식물자원 대량추출 및 시료조제	80
(2) 활성 phytochemicals의 분리 및 정제	81
(가) Solvent partition	81
(나) Open column chromatography	83
(다) Preparative thin layer chromatography (PLC)	83
(라) High performance liquid chromatography (HPLC)	83
(3) 정제된 시료로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 구조분석	84
(가) NMR을 통한 구조 분석	84
(나) EI-MS를 통한 분자량 측정	84
(4) 뇌신경세포 손상 저해활성 측정을 위한 <i>in vivo</i> assay계 확립 과 선정	84
시료의 활성 및 독성검사	
(가) <i>In vivo</i> assay계 확립	84
(나) <i>Punica granatum</i> extract의 <i>in vivo</i> 독성실험	84
(다) Y-maze test	84
(라) Passive avoidance test	85
3. 결과	85
가. <i>In vitro</i> assay계의 확립 및 후보식용식물의 선정	85
(1) 1차 선정 결과	85
(2) 시료 최종 선정 및 세포독성 실험	91
나. 활성 phytochemicals의 분리 및 정제	93
(1) Solvent partition	93
(2) 용매분획별 <i>in vitro</i> assay 결과	94
(가) DCF-DA assay	94
(나) MTT reduction assay	95
(3) Open column chromatography	97
(4) Open column chromatography 분획의 <i>in vitro</i> assay 결과	97
(가) DCF-DA assay	97
(나) MTT reduction assay	99
(5) PLC	102
(가) DCF-DA assay	102
(나) MTT reduction assay	103
(6) HPLC	104
다. 정제된 시료로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 구조분석	105
(1) NMR을 통한 구조 분석	105
(2) EI-MS를 통한 분자량 측정	107

라. <i>In vivo</i> test를 통한 석류 추출물의 효과확인	108
(1) 석류 추출물의 <i>in vivo</i> 독성실험	108
(2) 공간인지능 및 기억학습능력의 1차 <i>in vivo</i> test결과	111
(가) Y-maze test	111
(나) Passive avoidance test	112
(3) 석류 추출물로부터 분리된 활성물질의 2차 <i>in vivo</i> 독성실험	113
(4) 석류 추출물로부터 분리된 활성물질의 2차 <i>in vivo</i> 행동실험	118
(가) Y-maze test	118
(나) Passive avoidance test	119
마. 활성 물질의 공업적 실용화	120
(1) 가공 적성 시험	120
(2) 시작용 제작	121
(가) 연질 캡슐 제작	121
(나) 농축액 및 드링크제 제작	122
(다) 과립제 제작	123
(3) 제품의 외관 및 안정성 검사	124
제 3절 간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 유효성분의 건강기능 식품화	126
1. 서설	126
2. 재료 및 실험방법	127
가. 천연소재의 간암억제활성 검색	127
(1) 용매추출에 의한 간암 억제 효능을 갖는 추출물 제조법 확립	127
(2) 항산화 활성 조사법	128
(3) 활성성분 정량	128
(4) <i>In vitro</i> 세포독성 조사	128
(5) 활성검색방법 확립	129
(가) 세포간 정보전달 회복효과 측정	129
(나) FOX assay	129
(다) MMP 억제능을 통한 암전이 억제효과 측정	129
나. 선정된 활성 추출물로부터 유효성분의 확보를 위한 특성 검토 및 추출물 전 처리 조건 확립	130
(1) 유근피의 항암 및 항암전이 효과	130
(가) 천연물 추출 조건	130
(나) MTT assay	130
(2) 암전이 억제효과 검색	131
(가) Gelatin zymography	131
(3) 세포간 갭결합 신호전달 회복효과 검색	131
(4) 활성물질의 생물학적유용성 및 혈관 신생성 억제효과 검토	131
(가) Caco-2 human intestinal model	132
(나) Chorioallantoic membrane (CAM) assay	132
(5) 항산화 효과 입증 및 부분정제 유효성분 함량 분석	133
(가) 항산화 효과 검토 (DPPH assay)	133
(나) 활성성분 분석	133
(6) 추출물의 활성 물질의 규명	133
(가) MTT assay를 이용한 용매별 분획의 활성 입증	133
(나) 용매 Fraction의 Molecular Weight에 의한 분획물질의 활성 입증	134
(다) HPLC를 통한 최종 활성 분획 물질의 분리	134

(7) 알코올에 의한 간 손상에 대한 보호 능력 입증	134
(가) 알코올 분해효소인 alcohol dehydrogenase와 aldehyde dehydrogenase 의 활성 측정	134
(나) 동물실험을 통한 간 보호 능력 측정	134
다. 추출물의 간암 활성 입증	135
(1) CAA (Cellular Antioxidant Activity) assay를 통한 유근피 추출물 의 활성 측정	135
(2) Annexin V-PI staining을 통한 apoptosis 유도 현상 관찰	136
(3) ELISA법을 이용한 간암전이 지표 효소인 MMP-2와 MMP-9 정량	136
라. 파래의 항암 효과	136
(1) MTT assay	136
(2) 파래의 항혈전 효과	136
(가) 추출 용매에 따른 항응고 활성 검토	137
(나) 알칼리 추출 농도에 따른 항응고 활성 검토	137
(다) Activated partial thromboplastin time (APTT)에 의한 항응고 활성 측정	137
마. 유근피 추출물로부터 간암억제 유효성분의 공업적 실용화	137
(1) 유근피 추출물을 이용한 연질 캡슐 제작	137
(2) 유근피 추출물을 이용한 드링크제 제작	138
(3) 유근피 추출물을 이용한 과립제 제제	138
바. 제품의 외관 및 안정성 검사	138
3. 결과	138
가. 용매추출에 의한 간암 억제 효능을 갖는 추출물 최적조건 확립	138
나. 복합물질에 대한 항산화 활성 비교법 확립	139
다. <i>In vitro</i> 세포독성 조사	141
라. 활성검색방법 확립	142
(1) 세포간 정보전달 회복효과 측정	142
(2) 암전이 억제효과 측정	144
마. 선정된 활성 추출물로부터 유효성분의 확보를 위한 특성 검토 및 추출물 전 처리 조건 확립	144
(1) 간암세포 증식 억제효과	145
(2) 암전이 억제효과 검색	146
(3) 세포간 갭결합 신호전달 회복효과 검색	147
(4) 항산화 효과 입증 및 부분정제 유효성분 함량 분석	149
(5) 부분정제획분의 활성유지 확인	150
바. 알코올에 의한 간 손상에 대한 보호 능력 입증	151
(1) 알코올 분해효소인 alcohol dehydrogenase와 aldehyde dehydrogenase 의 활성 측정	151
(2) 동물실험을 통한 간 보호 능력 측정	152
(가) <i>In vivo assay</i> 계 확립 및 유근피 추출물의 활성 측정	152
(나) 혈청 분석에 따른 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), serum triglyceride(STG), total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol의 활성 측정	152
(다) 조직 분석에 따른 hepatic triglyceride (STG), total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol의 활성 측정	155
(라) 조직 절편 분석을 통한 세포 손상도 측정 및 triglyceride 측정	156

사. 추출물의 간암 활성 입증	158
(1) CAA(Cellular Antioxidant Activity) assay를 통한 유근피 추출물 의 활성 측정	158
(2) Annexin V-PI staining을 통한 Apoptosis 유도 현상 관찰	159
(3) ELISA법을 이용한 간암전이 지표 효소인 MMP-2와 MMP-9 정량	160
아. 추출물의 활성 물질의 규명	160
(1) MTT assay를 이용한 용매별 분획의 활성 입증	160
(2) 용매 fraction의 molecular weight에 의한 분획물질의 활성 입증	161
(3) HPLC를 통한 최종 활성 분획 물질의 분리	162
자. 과래의 항암, 항혈전 효과	163
(1) 과래 추출물의 HepG2의 생존율에 미치는 영향	163
(2) 과래 추출물의 B16/F10의 생존율에 미치는 영향	164
(3) 과래 추출물의 HT1080의 생존율에 미치는 영향	164
(4) 과래 추출물의 MCF7의 생존율에 미치는 영향	166
(5) 과래의 항혈전 효과	167
(가) 추출 용매에 따른 항응고 활성 검토	167
(나) 농도에 따른 항응고 활성의 검토	169
차. 유근피 추출물로부터 간암억제 유효성분의 공업적 실용화	170
(1) 유근피 추출물을 이용한 연질 캡슐 제작	170
(2) 유근피 추출물을 이용한 드링크제 및 농축액 제작	171
(3) 유근피 추출물을 이용한 과립제 및 캡슐 제제	172
카. 제품의 외관 및 안정성 검사	172
제 4장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	175
제 1절 연구 개발 목표의 달성도	175
1. 연차별 연구 개발 목표 달성도	175
(1) 1차년도 연구 개발 목표 달성도	176
(2) 2차년도 연구 개발 목표 달성도	177
(3) 3차년도 연구 개발 목표 달성도	178
2. 평가 착안점	179
제 2절 관련 분야에의 기여도	180
1. 학문·기술적 측면	180
2. 경제·산업적 측면	180
제 5장 연구개발결과의 활용계획	181
제 1절 추가연구의 필요성	181
제 2절 타 연구에의 응용	181
제 3절 기업화 추진방안	181
제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보	183
1. Measurement of oxidative stress (DCF-DA method)	183

2. Assessment of cell viability (MTT reduction assay)	183
3. Assessment of AChE activity (Ellman's methods)	183
4. Evaluation of learning and memory capacity using <i>in vivo</i> model	184
가. Y-maze test	184
나. Passive avoidance test	184
제 7장 참고문헌	185
부 록		

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

최근 생활수준의 향상과 의학기술의 발달에 따라 노령 인구가 증가되어 인구의 고령화 현상이 두드러지고 있으며 조직사회의 치열한 경쟁화에 따른 극심한 스트레스로 인한 성인병의 발병률 또한 급격한 증가 추세를 보이고 있다. 사망원인의 경우, 과거 주원인이었던 감염형 질환에서 대표적인 성인병인 순환기계 질환, 암등에 의한 사망이 전체의 절반을 넘기기에 이르렀다. 이에 건강한 삶을 누리하고자 하는 LOHAS가 하나의 큰 관심사로 대두하게 되고 장수에 대한 욕구 증가로 일상생활을 통한 성인병 및 노인성 질환에 대한 예방에 관심이 고조되고 있다.

차세대 21세기 질환으로 불리는 치매는 주로 다양한 원인으로 뇌신경의 일시적 혹은 지속적인 손상이 발생한 것으로 정신기능의 전반적인 장애가 나타나는 것을 특징으로 하는 진행성 퇴행성 질환으로 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 치매는 노인인구가 증가하고 있는 현대 사회에서 가장 영향력 있는 노화 질환일 뿐 아니라 앞으로 인류가 당면할 심각한 문제가 될 것으로 예상 된다. 실제로 최근 고령화 사회로 진입한 국가들의 경우 치매가 사회적 문제로 대두되고 있는 추세이다. 우리나라의 경우 평균수명의 연장과 출산율 감소로 인하여 65세 이상 노령인구가 2000년 기준 전체인구의 7.2%로 고령화 사회에 이미 진입을 하였고, 이러한 추세라면 2019년에는 14.4%로 고령사회에, 2026년에는 20.0%로 초고령 사회에 도달할 것으로 전망되고 있다. 미국의 경우 알츠하이머병은 전체 인구의 사망 원인 중 심혈관질환, 악성종양, 뇌졸중에 이어 4위를 차지하며, 치료경비 면에서도 암, 심장병에 이어 3위를 점유하고 있어 사회, 경제적으로 미치는 영향도 상당한 것으로 보여 진다. 구체적으로 살펴보면 알츠하이머병 환자 한명 당 약 4만 달러의 의료비 지출 및 사회적 경비가 소모되는 것으로 추산되며 질병으로 인한 수입의 감소와 환자 자신의 사회적 기능 상실을 고려한다면 이러한 비용은 약 17만 달러에 이를 만큼 큰 손실이 예상된다. 이는 환자 자신의 고통 뿐 만 아니라 부양가족은 물론 국가적으로도 큰 경제적 부담을 안겨줄 것으로 예상된다.¹⁻²⁾

현재 이루어지고 있는 치매 치료 방법은 몇 가지로 구분할 수 있는데 인지기능 장애 개선(기억력 회복), 행동장애 또는 이상행동의 치료, 치매 진행의 억제, 치매 발생 시기의 지연, 치매 발생의 예방 등이다. 현재 전 세계적으로 이루어지고 있는 연구는 대부분 증상의 완화를 일차적인 목표로 이루어지고 있다.³⁻⁷⁾

한편, 간암(hepatoma)은 전 세계적으로 가장 흔한 암 중의 하나이며 특히 남자에게서 많이 발생한다. 간암의 주요 원인은 B형 간염 바이러스에 의한 만성간염과 C형 간염 바이러스에 의한 만성간염이며, 이들 바이러스에 의한 만성 간염의 결과 간경화가 발생하고 장기간 염증이 진행하면서 간암이 발생하는 것으로 보인다. 또한 알콜성 간질환이나 아플라톡신과 같은 독소에 의한 간손상 등의 만성 간질환이 모두 간암의 원인이 될 수 있다. 간암은 진행 속도가 매우 빠르

므로 조기 검진이 무엇보다 중요하다. 간암의 치료를 위하여는 수술로 암조직을 제거하는 방법, 경동맥 화학 색전술(transarterial chemoembolization)을 이용하는 방법, 경피적 에탄올 주입술(percutaneous ethanol injection), 고주파 응고 치료(radiofrequency thermal ablation)를 이용하여 암세포를 사멸시키는 방법 등이 있으나, 이들 방법은 간암의 크기가 너무 크거나, 큰 혈관이 침범되어 있거나 다른 장기에 암이 전이되어 있는 경우 효과적이지 못하거나 값이 비싼 단점이 있다.

간암을 치료하기 위해서는 항암제를 단독 또는 복합으로 주사하여 치료하는 것이 가장 효과적인 방법이다. 그러나 기존에 쓰이고 있는 알킬화제나 항대사제, 항암 항생제, 알칼로이드 등 항암제들은 대부분 간암에 대해서는 작용효과를 나타내지 못하며 심지어 이들 중 일부는 다른 암세포에는 효과적이거나 간기능에는 오히려 장애를 가져오는 경우도 있다. 따라서 간기능에 장애를 주지 않으면서 특별히 간암에 효과적인 항암제를 개발하는 것이 시급하다.

이에 본 연구에서는 고령화 질환 및 성인병의 예방 및 치료용 phytochemicals를 국내자생 식용생물자원으로부터 탐색하고 이들을 원료로 하여 의약, 식품의약 및 건강기능식품으로의 제품화함에 있어, 최종물질의 안전성을 확보, 의약품 및 건강기능식품 소재로 실용화될 확률을 높이고자 하며, 뿐만 아니라 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안으로 식용생물자원을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하고자 한다. 따라서 본 연구는 국내산 식용생물자원을 대상으로 고령화 질환인 뇌장애와 간암 등 항상성 불균형에 의한 질환들의 예방 및 치료 가능한 미량성분을 실용화함과 동시에 이를 주제로 한 건강기능식품을 제품화함으로써 국내 농림산업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 한다.

제 2절 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성

1. 기술적 측면

가. 제 1세부과제: 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의 건강기능 식품화

국내고유의 식용식물로부터 뇌신경 신호전달 물질 분해효소를 억제시키는 미량성분을 검색하고 이를 제품화시키고자 한다. Alzheimer's disease (AD)는 신경전달물질을 통한 신경세포 간의 정보 교환과정이 파괴됨에 따라 신경세포의 기능이 정지되고 신경세포간의 연결이 끊어짐으로써 비가역적 행동과 인성의 변화, 사고능력의 저하로 나타나며 결과적으로 신경세포가 죽게 되며 그 원인은 아직까지 불분명하다. AD는 중추신경, 특히 전뇌(fore brain), 소뇌편도(amygdala), 해마(hippocampus) 및 대뇌피질 같은 피질과 변연계(limbic system)의 신경을 파괴하는데 이들은 뇌에서 학습, 기억, 사고, 행동, 감정조절 등과 관련된 부위이다. 특히 AD에서 아세틸콜린과 같은 신경전달물질의 부족이 가장 중요한 지표이며 이것을 회복시키는 것이 AD 치료목표의 하나가 되고 있다. 부교감신경성 약물은 muscarinic 또는 nicotinic agonist, cholinesterase inhibitors (ChEIs), 간접적으로 아세틸콜린 유리를 조절하는 약물들로 나눌 수 있다. ChEIs는 많은 약물들이 개발되어 사용되어지고 있는데 제 1세대 ChEIs (tacrine, physostigmine, physostigmine)와 제 2세대 ChEIs (donepezil, ENA 713, metrifonate, galanthamine, eptastigmine, rivastigmin)로 나누어지며 최근 들어 사용되고 있는 memantin이 있다. 제 2세대 ChEIs는 제 1세대 ChEIs에 비해 작용시간이 길고 약동학적으로 안정되어 있으며 뇌혈관 관문 통과율이 높아서 중추신경 내 농도가 높은 경향이 있다. 제 1세대 ChEIs는 acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, 다른 말초 cholinesterase를 비 선택적으로 억제하는 반면, 몇몇 새로운 ChEIs는 acetylcholinesterase에 대한 선택성이 높아 말초부작용의 발생이 감소한다고 한다. ChEIs의 작용기전은 아세틸콜린의 분해를 억제함으로써 synapse 내의 아세틸콜린 농도를 증가시키는 것에 기인하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 대부분의 치료제는 그 효과가 탁월하나 장기간 사용으로 인한 부작용 또한 간과할 수 없으므로 기존의 효과와 유사 하거나 더 좋으면서 그 부작용은 적은 물질의 개발이 필요하다고 여겨진다.

나. 제 2세부과제: 뇌신경 세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 건강기능 식품화

국내고유의 식용식물자원으로부터 amyloid β protein (A β) induced 뇌신경 독성 억제 미량성분을 검색하고 이를 제품화 시키고자 한다. A β 는 amyloid precursor protein

(APP)의 abnormal cleavage로부터 생성된 40-42개의 peptide 물질이고 AD에서 중요한 pathogenetic material로 생각되어지고 있다. AD에서의 뇌신경세포 괴사의 원인은 아직 불분명하지만 oxygen free radical의 생성, reactive oxygen species (ROS)와 같은 oxidative injury가 뇌신경세포 파괴 및 pathogenesis와 관련되어 있을 것으로 추정된다. AD 환자의 brain에서 이들 oxidative stress (ROS, lipid peroxidation, protein modification, mitochondrial DNA oxidation)의 증가는 증명되고 있으며 이러한 생리적 대사 이상은 amyloid plaques와 neurofibrillary tangles (NFT)와 같은 AD 뇌 고유의 임상적 결과를 초래한다. 또한 A β 는 intra-cellular free radical status를 유발시키고 궁극적으로 세포괴사를 유도하여 A β 와 뇌신경세포 파괴는 상관성이 있는 것으로 보인다. 또한 현재까지 개발된 AD치료제는 병인을 제거하는 방법이 아닌 발병 이후의 증상을 완화하는 치료법을 대안적으로 적용하고 있으므로, A β 에 의한 ROS, free radical의 생성 및 A β -induced free radical-mediated neurotoxicity에 대한 연구는 필수적이라 할 수 있다.

다. 제 3세부과제: 간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 유효성분의 건강기능 식품화

국내고유의 식용식물자원으로부터 검색, 획득한 미량성분이, 다양한 세포독성실험 모델에서 독성을 나타내지 않는 농도를 확립하고, 간암의 진행, 이동 및 전이에 관여하는 주요한 현상인 갭 결합을 통한 세포 간 신호전달(gap junctional inter-cellular communication)을 회복시키고, 매트릭스 메탈로프로티나아제(matrix metalloproteinase: MMP)의 활성을 저해하여 간암 등에 대한 억제 효능을 나타내는지의 여부를 확인하고 이를 제품화 하고자 한다. 간암의 진행 단계에서 갭 결합 채널에 의한 세포 간 신호전달이 억제되는 현상은 중요한 생화학적 지표로 인정되고 있으며, 특히 간암에 있어서 특히 connexin 32와 26이 결핍이 중요한 원인으로 이러한 현상이 나타나는 것으로 잘 알려져 있다. 반면, 이러한 억제를 회복시키는 물질은 간암의 진행 단계를 저해함으로써 간암의 억제 효과를 갖는 것으로 인정되고 있다. 또한, MMP는 암의 이동과 전이에 중요하게 관여하는 효소로서, 세포외 기질을 녹이는 대표적인 효소이다. 최근 암의 전이뿐만 아니라 암의 진행의 여러 단계를 촉진시키는 것으로 알려졌으며, 현재까지 다양한 암 중에서 발현이 증가되어 있고, 암의 전이에 가장 직접적인 관련이 있는 것으로는 gellatinase A (MMP-2, 72 kD)와 gellatinase B (MMP-9, 92 kD)가 잘 알려져 있다. 간암 세포에서도 역시 이러한 MMP-2와 MMP-9이 중요한 역할을 하고 있으며, MMPs를 억제시키는 물질은 최근 새로운 암 억제제로서 주목받고 있다.

상기의 지표들은 기존의 식품 분야에서는 널리 사용되어지지 않았던 검색기술에 주요한 marker로서 본 연구를 통하여 천연물에서 획득한 유효성분을 항암물질로 사용할 경우 기존의 간암 억제제 혹은 치료제에서 개선되어야 할 점인 정상적인 세포에서도 독성을 나타내는 문제점을 효과적으로 극복할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 nitroso-pyrrolidine계, quinoline

계, phthalate계 화합물들에 의해 특이적으로 유도되는 간암모델을 이용한 *in vivo* 시스템을 통하여 glutathione 수준, glutathione S-transferase 등 간 조직에서 특이적으로 유도되는 효소의 역가를 측정하여 임상적으로 응용할 수 있는 수준의 자료를 확보할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에 따른 새로운 검색방법에 의한 식물 추출 미량성분들 또는 이들의 혼합물을 유효 성분으로 소재화를 통한 간암 억제제 개발로 항암제에서 흔히 볼 수 있는 독성 없이 암 억제 효과를 얻을 수 있으며 간단한 분리 공정만으로도 높은 간암 억제 효능을 나타내는 물질의 분리 및 제제화가 가능할 것으로 판단된다.

2. 경제·산업적 측면

국내 식용식물자원은 가격의 등락이 심한 1차 산물로 이들의 생산과 관련된 농·임업과 가공제조업을 연계시킴으로써, 생산농가의 소득 및 영농의지를 향상시킴과 동시에 식용식물자원 가격의 안정화를 기할 수 있기 때문에 전체적인 소비자물가의 안정에 기여도가 클 것으로 예상할 수 있다. 한편 약리·생리활성 물질의 탐색과 건강기능식품의 제품화는 기술의존도가 높은 무공해산업종으로 향후 국내 산업에서 중추적인 역할을 담당하게 될 것으로 예상된다. 우리 고유의 자원으로부터 탐색된 물질은 우선 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 먹어 온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 합성에 의한 물질들보다 안전성의 확보가 용이하다. 따라서 의약과 식품용 leading compound의 연구개발과 실용화에 있어 기술선진국보다 비교우위에 있다고 볼 수 있다. 물질에 따라서는 현재 수입되고 있는 유사소재를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 의약 및 건강기능식품의 원료로서 거대 수출품목이 될 것으로 예측된다. 평균 수명의 연장과 출산율의 저하에 따른 사회 고령화 및 잘못된 식생활과 스트레스에 의해 늘어가는 노인성 질환 및 암 등 성인병의 예방 및 치료용 소재를 개발하고 이를 이용한 식품의약, 건강기능식품 등의 상품화는 개인 및 국가적인 측면에서도 절실히 요구되는 연구개발 분야라 할 수 있다. 현재까지 국내에서 학술적, 산업적으로 노인성 뇌장애 개선 및 간암 억제에 대한 천연 신제품 개발 연구가 활발하지 못했던 점을 고려할 때 본 연구를 통하여 선도연구와 개발로 해당 분야의 연구를 활성화하고 관련 관·산·학·연계의 관심과 연구를 활성화시키는 계기를 마련할 수 있을 것이며 수급안정화에 따른 농가수익 구조개선 등의 파급효과도 기대된다.

3. 사회·문화적 측면

국내 사망 원인 중 성인병 및 노인성 질환에 의한 사망률이 1983년에는 62%였던 것이 2004년에는 65%로 그 비율이 증가하고 있다. 특히 대표적 노인성 질환인 Alzheimer's disease (AD)는 국내 경우 8만여 명 정도 이었으나 2004년 이후에는 40만 명에 이를 것으로 추측되고 있으며, 미국의 경우, 4백만 명이 AD로 고통을 받고 있으며, 오는 2050년

에는 환자수가 1,400만 명에 달할 것으로 추산되고 있다. 전 세계적으로 AD 환자수가 급증하는 주된 이유로 사회의 고령화를 꼽고 있다. 평균 수명이 늘어나면서 노인 인구가 증가함에 따라 자연적으로 AD 환자수가 증가한다는 것이다. 고령화와 AD 발병률은 상관관계가 극히 높다. 한국의 경우 75-79세 노인인구의 15%가 AD를 앓고 있으며 80세 이상의 노인인구 39%가 AD 환자이다. 미국의 시장조사기관 프로스트 & 설리번 (F & S)의 보고서에 따르면 미국의 AD 치료제 시장이 연평균 32.3%의 성장을 거듭, 오는 2006년에 이르면 순수한 AD 치료제 시장만도 그 규모가 24억 달러에 도달할 것이라고 전망하고 있다. 전 세계 AD 관련 시장 규모는 대략 2,000억 달러 규모, 원화로는 260조원에 이를 것으로 추산된다.

또한, 최근 우리나라의 경제 수준이 높아짐에 따라 생활환경, 특히 식생활의 풍요로 서구적인 식생활이 보편화되고 있으며 그 결과로 과다한 영양의 섭취나 불균형적인 식생활 등이 원인되어 암 등의 만성적인 성인병 질환이 크게 늘고 있는 추세이다. 지금까지 암은 한국인 사망원인 1위를 차지하고 있으며 이를 치료하기 위해 약물요법, 수술요법, 방사선 요법 등 많은 방법들이 시도되어 왔다. 하지만 효과적인 암 억제물질을 식품성분으로부터 얻어냄으로써 개선된 식생활을 통해 약 85% 정도의 암이 억제되고 예방될 수 있다는 차원에서 최근 들어 각종 천연물유래 항암물질들에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다. 그 중 특히 간암은 위암 등과 함께 식이에 의해 극복될 수 있는 암으로 본 연구를 통한 천연물을 이용한 간암억제제의 제품화로 국민의 건강에 기여할 수 있는 치료보조용 식품, 의약대체식품 및 건강기능식품으로의 제품화 등 고부가가치성 응용분야에 적용할 수 있으리라 판단된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 연구개발 대상 기술의 국내·외 현황

1. 해외 기술개발 현황 및 수준

현재까지 보고된 항 AD 활성화 성분은 주로 식물 기원성 저분자로 특히 AD 환자들에게 인지적 증상을 호전시키는 약물로서 ChEIs를 많이 사용되고 있다. 제 1세대 ChEIs로서 최초로 항 AD 작용에 있어 적용 승인을 받은 tacrine은 작용지속 기간이 짧아 하루 4번 투여해야 하며, 간 독성이 있어 monitoring의 번거로움이 있다. 요즘 주목받고 있는 제 2세대 ChEIs들로는 일본 에자이사에서 개발되어 96년 말 미국 FDA 승인을 받고 97년부터 세계 30여국에서 판매되고 있는 donepezil로 하루 한번 복용할 수 있고, 선택적인 저해로 말초 부작용을 줄였다. Rivastigmine은 미국 노바티스사에서 개발한 약물로, 스위스에서 1997년 12월에 승인 받아 EU와 남아메리카 국가들에서 사용되고 있고, 미국, 캐나다에서도 승인 준비 중이며, 우리나라에는 97년 9월 도입되었다. Rivastigmine은 하루 2회 복용이 가능하고 중추 신경계에 특이성이 높아 말초 부작용을 크게 감소시켰고 신장에서 대사되므로 간 독성이 거의 없는 것으로 보고되고 있다. Mefenoxate가 AD 환자에 3상 임상실험이 진행 중이며, 비가역적인 ChEIs로서 작용기간이 길다. 현재 AD 환자를 치료하는 데 사용되고 있는 대증요법을 종합해보면 아세틸콜린 보충요법이 가장 대중적으로 쓰이고 있으나, 앞으로 더욱 효율적인 방법을 개발하려면 뇌 신호전달성분 분해효소 억제물질 외에도 brain nerve cell protector와 같이 다양한 부분에서 여러 천연재료를 적용하여 신경전달물질의 뇌 안에서의 증가를 가져오는 약제를 개발할 필요가 있다.

2. 국내 기술개발 현황 및 수준

최근의 AD 연구는 A β 에 의한 뇌세포 파괴, 그리고 이들 단백질의 구조, 생리작용, 뇌 안에서의 축적에 의한 acetylcholine (ACh: neuro-transmitter)의 level 감소 등이 중심이 되고 있다. AD의 치료는 주로 환자의 증세를 가볍게 하고, 병의 진행속도를 지연시키는데 주안을 두고 있다. AD 환자에서 보는 주 증세는 기억력, 인지능력, 학습능력의 감퇴에 있고, 이어서 감정 장애와 이상행동을 가져온다. 이 중에서 가장 보편적인 증세인 기억력과 인지능력 장애에 대한 증세를 가볍게 해주는 간접 치료가 유일한 치료법이 되었다.

차별 치료제의 특허 출원을 살펴보면 전체 2,039건 중 미국이 40.8%를 차지하고 있으며 유럽이 29.0%, 일본이 17.3%로 그 뒤를 잇고 있다. 이를 보면 미국과 유럽의 선도적인 기술을 짐작

할 수 있다. 또한 특히 출원이 본격적으로 시작된 시점을 보아도 미국이 가장 앞서고 있으며 유럽, 일본이 그 뒤를 따르고 있다. 이는 고령화 사회로 먼저 진입한 구미 선진국이 치매에 대한 연구 및 치료제 개발을 활발히 하고 있다는 사실을 미루어 짐작할 수 있게 한다. 이러한 점은 외국 제품들이 국내 치매 치료제 시장을 장악하고 있고 특히 출원 역시 외국에 편중되어 있다는 상황을 보여준다. 하지만 천연물을 활용하는 치료약물 개발에 있어서는 외국 선진기술에 비해 국내 연구진이 충분한 우수성을 가진 분야로 판단됨에 따라 이 분야에 대한 기술 개발에 관심과 활발한 연구가 필요하다고 생각된다.⁸⁻¹⁰⁾

또한, A β 의 생성과 A β -induced cytotoxicity를 inhibition 또는 blocking 시켜주는 연구는 genetic approach에 한해서 국내 연구진에서도 비교적 활발히 이루어지고 있지만 개발된 신소재나 drug은 현재 전무한 실정이다.

최근 항암연구에 있어서는 비가역적이고 짧은 시간에 발생하는 암의 개시 단계에서 저해하는 전략보다는 현실적이고 실질적인 암 예방제로서 비교적 장기간에 걸쳐 일어나고 가역적인 암의 진행 단계의 저해 효과를 갖는 물질이나 식품성분들을 찾는 연구가 집중되고 있다. 간암 등의 난치성질환의 경우 약물 치료 시 항암제를 경구 또는 정맥 투여 할 경우 약물이 일단 혈류를 통해 전신에 퍼졌다가 병소에 도달하게 되므로 병소에는 미량만이 집적된다. 따라서 병소에 적정량을 집적시키기 위해서는 많은 양의 약물을 투여해야 하고 이로 인한 부작용이 심각한 문제로 대두되고 있다. 또한, 대체로 효과가 좋은 암 억제제가 통증이나 발열 등의 부작용이 더 크다는 문제점이 있으며 방사선 요법의 경우 그 부작용이 특히 문제가 되고 있다.

Table. 1. 국내 연구진 연구현황

연구수행기관	연구개발의 내용	활용현황
서울대	치매의 원인인 C단 단백질의 세포 내 작용 과정	
한림대	천연물로부터 알츠하이머성 치매예방 및 치료물질 탐색과 기전연구	Ferulic acid에 의한 효과
충남대	식물자원으로부터 항치매 식의약품 선도물질 개발연구	한국산 독활로부터 활성 물질 분리
경희대	치매치료를 위한 한약제제 개발	석창포 추출물의 효과
충남대	식물자원으로부터 항치매 식의약품 선도물질 개발연구	녹차 추출물의 효과
덕성여대	천연 및 합성 flavonoid와 allicin 유도체의 항암 및 간 보호 작용기전 연구	
한국식품연구원	인삼을 이용한 간 기능개선음료 및 비만억제 기능성 식품소재개발	
조선대	국내특산 다년생 도라지를 이용한 간섬유화 억제 기능성 소재	
서울대	실험적 간 섬유화증 및 콜레스타시스에 대한 구기자 성분 비테인의 치료효과 및 기전	
성신여대	DHA가 간암세포 (HepG2 cell)에서 CYP2E1 발현에 따른 세포사멸 조절에 관한 연구	
한국생명공학연구원	자생 오가피를 이용한 성기능장애 및 간질 환용 식품의약 개발	

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의 건강기능 식품화

1. 서설

고도의 경제성장과 함께 현대 사회는 복지수준 및 의료 기술의 향상으로 인해 사람들의 평균수명이 점차 늘어가고 있으며 이에 따라 노인성 질환에 대한 관심, 특히 치매에 대한 관심이 증가되고 있다. 실제로 치매의 발병률은 60세 이상에서 증가되는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서 뿐만 아니라 미국, 일본, 중국 등지에서도 그 발병율과 그에 따른 사망률은 해마다 증가되어 그에 따른 크나 큰 사회적 문제를 일으키고 있다. 치매의 형태는 다양한데 50%는 알츠하이머병 치매, 20~30%는 혈관성 치매, 그리고 나머지는 알코올성 치매와 파킨슨병 치매 등이 있으며 그 중 15~20%는 알츠하이머와 혈관성 치매를 동시에 앓고 있는 것으로 알려져 있다. AD는 대부분 치매의 일반적 형태이며 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 노령화가 되고 있는 현대사회에서 최대의 질환일 뿐만 아니라 21세기에 당면할 심각한 문제가 될 것으로 예상된다. 치매는 초기에 건망증으로 시작해서 기억력, 추상적 사고력, 창의력의 상실, 판단력의 저하 등이 점차적으로 일어나며 시간 감각과 방향감각의 상실까지 일어나 결국엔 일상적인 생활을 할 수 없게 되고 결국엔 죽음에 이르게 된다. 알츠하이머병의 원인은 여러 연구의 진행이 있었음에도 불구하고 아직까지 정확하게 밝혀진 바가 없으며 단지 신경전달물질인 acetylcholine의 수준을 높이는 것으로 대부분 치료의 목적을 두고 있다. ACh의 분해하는 효소로는 AChE로 알려져 있는데 이것은 뇌의 전두엽의 cholinergic neuron에 존재한다. 뇌의 전두엽 (basal forebrain)은 cholinergic neuron을 상당수 포함하고 있고, 이 부위에 있는 cholinergic neuron이 인지능력을 관장하고 있는 것으로 보인다. 노인성 치매환자에 있어서 시냅스간극의 신경전달물질의 농도는 비정상적으로 낮으므로 이 효소의 활성을 억제함으로써 신경전달물질의 농도를 높임과 동시에 인지능 및 학습능의 향상의 효과를 확인할 수 있다. ¹¹⁻¹⁶⁾

본 연구에서는 자연식용식물자원이 추출물에 대하여 AChE 활성 억제물질의 검색과정에서 가장 높은 활성을 보인 탕자(*Poncirus trifoliata*)의 ethanol 추출물로부터 활성물질을 분리하여 그것의 AChE 활성 억제와 기억력 및 인지학습능력 향상 효과를 확인하고 아울러 그 구조적 특징을 조사하여 실용화 하고자 하였다.

2. 재료

본 연구에서 사용한 식용식물 자원들은 서울 경동시장에서 직접 구입하였다. 실험에 사용된 trimethyltin chloride (TMT), tacrine (9-amino-1,2,3,4 tetra-hydroacridine), acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithio-bis(2-nitro) benzoic acid (DTNB), dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 C18-Bondapak column은 Waters Co. (Milford, MA, USA)에서 구입하였다. 또한 인지능력 향상 실험을 위한 ICR mouse는 대한바이오링크에서 분양받아 사용하였다. 그 밖에 분석에 사용한 시약은 모두 특급 수준의 시약을 사용하였다.

PC12 cell line (rat pheochromocytoma cell)는 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1721)에서 분양받아 사용하였다. Cell culture에 사용된 RPMI 1640 medium, horse serum donor herd, fetal bovine serum and antibiotic-antimycotics는 Gibco-BRLTM (Gaithersburg, MD, USA), sodium bicarbonate는 Sigma Co, filter membrane (pore size: 0.22 μ m)는 Millipore Co. (Bedford, MA, USA)에서 구입하였다.

3. 실험방법

가. AChE 저해활성 물질 측정을 위한 *in vitro* assay계 확립

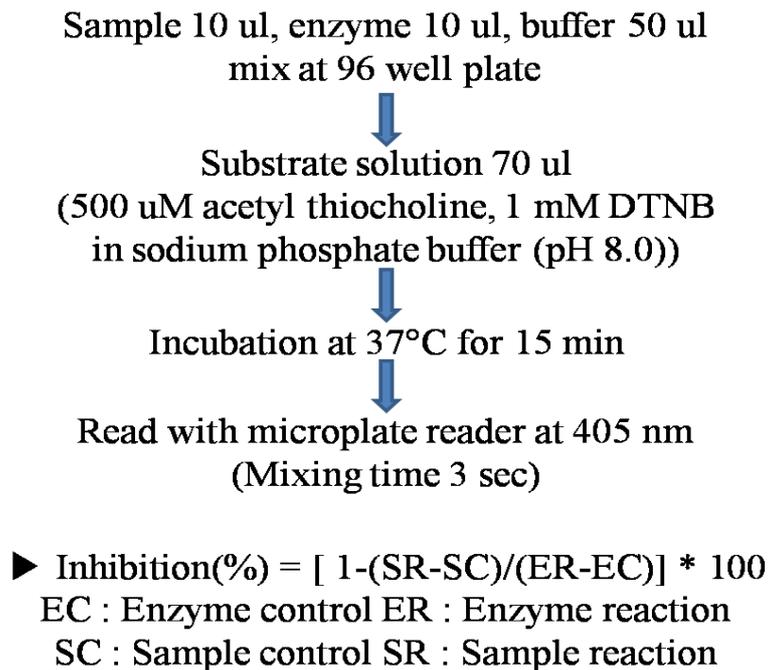
(1) 1차 검색용 시료 추출조건과 방법

시료의 선정을 위해 몇 가지 식용식물자원을 선정하여 추출을 하였다. 추출방법은 식용식물자원의 5배수에 해당하는 에탄올, 메탄올, 클로로포름, 헥산, 에틸아세테이트, 및 냉수를 넣고 하루 동안 shaking하였다. 하루가 지난 후 추출된 용매를 회수하고 다시 5배수에 해당하는 에탄올을 넣었다. 이 과정을 5회 반복하였다. 열수를 이용한 추출의 경우 시료의 10배수에 해당하는 증류수를 넣고 30분 boiling 후 30분 방냉하고 다시 30분 boiling 후 방랭한 후 상등액을 감압 농축하여 사용하였다. 추출되어진 용매를 감압농축기를 이용하여 추출물을 건조하였다. 건조된 식용식물자원 시료들을 이용하여 1차 선정 실험을 실시하였다.

(2) *In vitro* assay계의 확립

식용식물자원을 대상으로 추출조건과 방법에 따라 시료를 추출한 후 AChE에 의한 뇌신경 전달물질의 분해를 억제 또는 저해하는 물질의 assay계를 PC12 cell line을 이용하여 Scheme 1-1과 같이 *in vitro* assay를 확립하였다.

PC12 cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 세포수가 10^4-10^6 cell/ml가 되었을 때 cell lysis buffer를 이용하여 cell로부터 AChE 를 조제하여 $10,000 \times g$ 에서 원심분리 하여 얻은 crude enzyme 10 μ l와 추출한 sample 10 μ l를 buffer 50 μ l가 분주되어 있는 96 well plate에 첨가하고 substrate solution 70 μ l를 마지막으로 첨가하여 37°C에서 15분간 incubation시킨다. 반응이 끝나면 microplate reader를 이용하여 405 nm 파장에서 측정한다. Enzyme의 protein 농도는 Bradford법을 이용하여 측정한다.



Scheme 1-1. Measurement of AChE activity

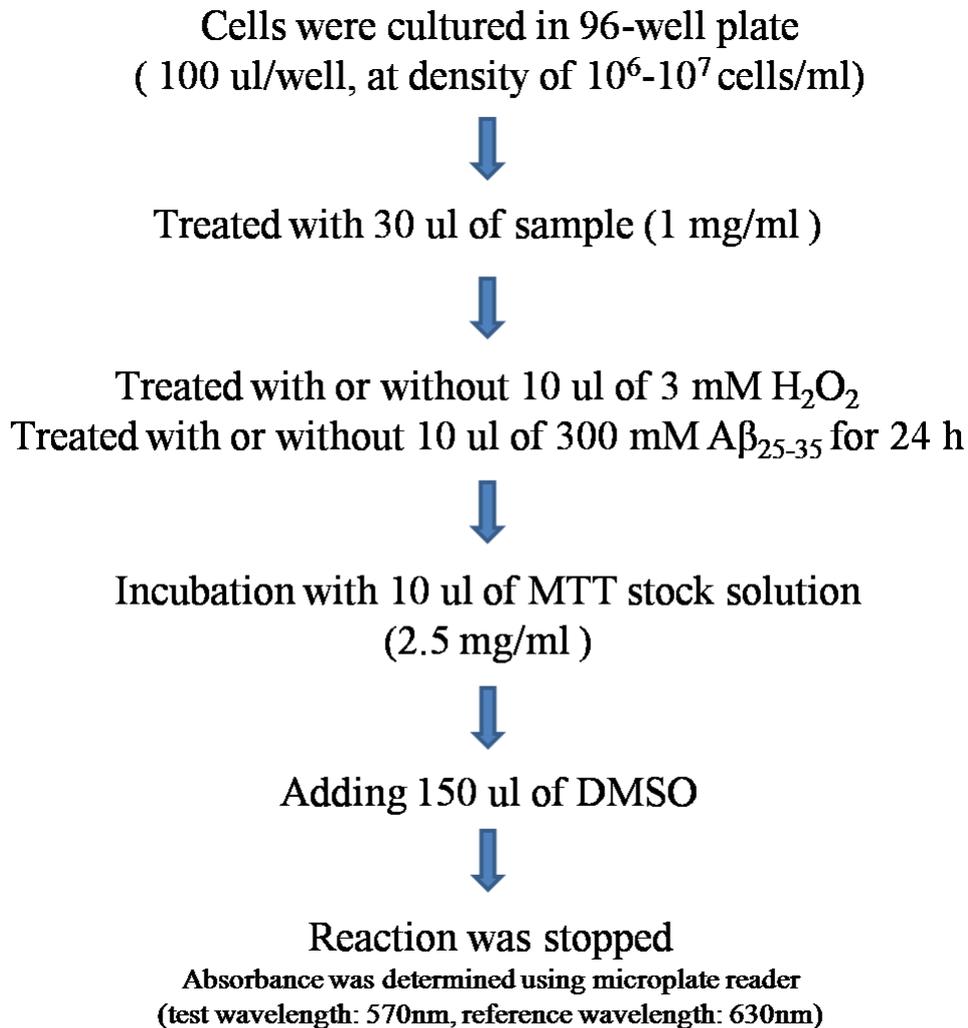
나. AChE 저해활성을 갖는 시료의 검색 및 선정

국내 고유 차·죽류 식물자원으로 부터의 AChE 저해활성을 본 assay계에 적용 ethanol 추출 물을 대상으로 검색하였다. 추출물의 활성을 확인하기 위해 기준에 그 효과가 입증된 tacrine으로 농도별 활성비교를 시행하였다.

다. *In vitro* 세포독성 실험

위의 *in vitro* assay계에 의해 가장 높은 AChE 억제효과를 보이는 시료를 선정하고,

MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay를 이용하여 cytotoxicity 여부를 검사하였다(Scheme 1-2).



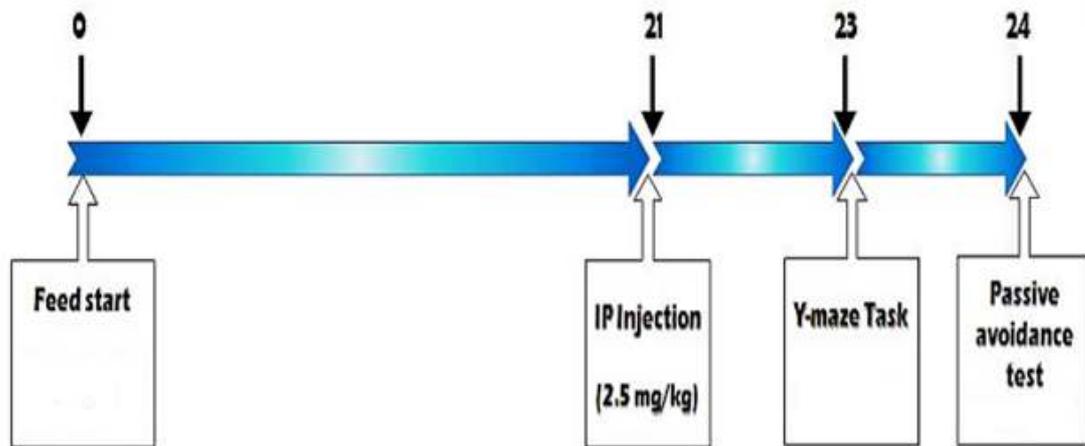
Scheme 1-2. Assessment of cytotoxicity by MTT reduction assay.

라. AChE 저해활성 측정을 위한 *in vivo* assay계 확립, 선정 시료의 활성검사 및 독성검사

(1) *In vivo* assay계 확립

In vivo behavioral test를 위해 ICR-male mice를 대한 바이오템크로부터 구입하고 최종선정 시료의 추출물을 control과 negative control을 제외한 각 group당 400, 800, 1200 mg/kg 제공한

다. ICR-male mouse는 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photoperiod chamber에서 사육한다(Scheme 1-3).



Scheme 1-3. *In vivo* experimental design.

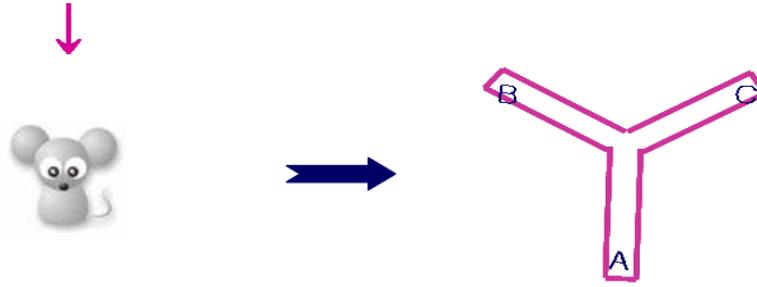
(2) 최종 선정된 AChE 억제 시료의 *in vivo* 독성실험

시료의 간 독성을 확인하기 위해 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) kit를 이용하여 혈청에서 검사하였다. 각각의 기질을 1 ml 씩 시험관에 넣고 37°C 수조에서 가운한 후 혈청 0.2 ml 씩 넣은 후 AST의 경우 60 분, ALT의 경우 30 분간 반응시킨 다음 발색액 2,4-dinitrophenyl hydrazine을 1.0 ml 씩 넣고 실온에서 20 분간 반응시킨 후 0.4 N-NaOH을 10.0 ml 씩 넣어 반응을 중지 시켰다. 반응 중지 30분 후에 505 nm에서 측정하고 여기서 얻은 검량 곡선을 이용하여 효소의 활성단위로 환산하였다.

(3) Y-maze

ICR-male mice는 sample을 섞은 물을 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로 trimethyltin (TMT)을 injection하여 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시한다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록했다. Mouse를 maze에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다(Scheme 1-4).

Mice were allowed free access to normal water or water mixed with extracted materials for 3 weeks.



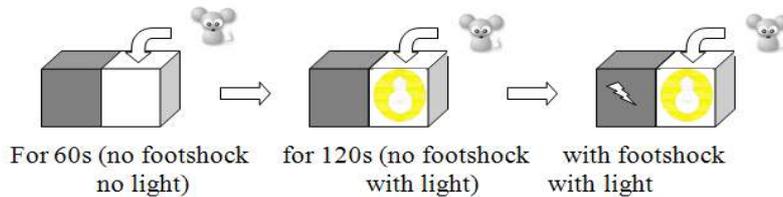
Placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during an 8-min session.

Scheme 1-4. Y-maze test

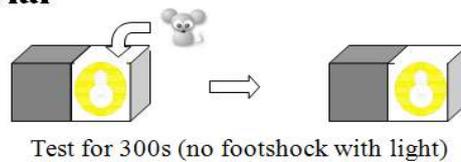
(4) Passive avoidance test

ICR-male mice는 sample을 섞은 물을 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로 TMT을 injection하며 이 실험은 실제 실험에 들어가기 하루 전, 기억상자와 같은 장소에서 training을 시킨 다음 행동실험을 실시한다. 모든 mice를 실험 상자에서 적응 훈련 (명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 후에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험한다(Scheme 1-5).

In the acquisition trial



In the retention trial



Scheme 1-5. Passive avoidance test.

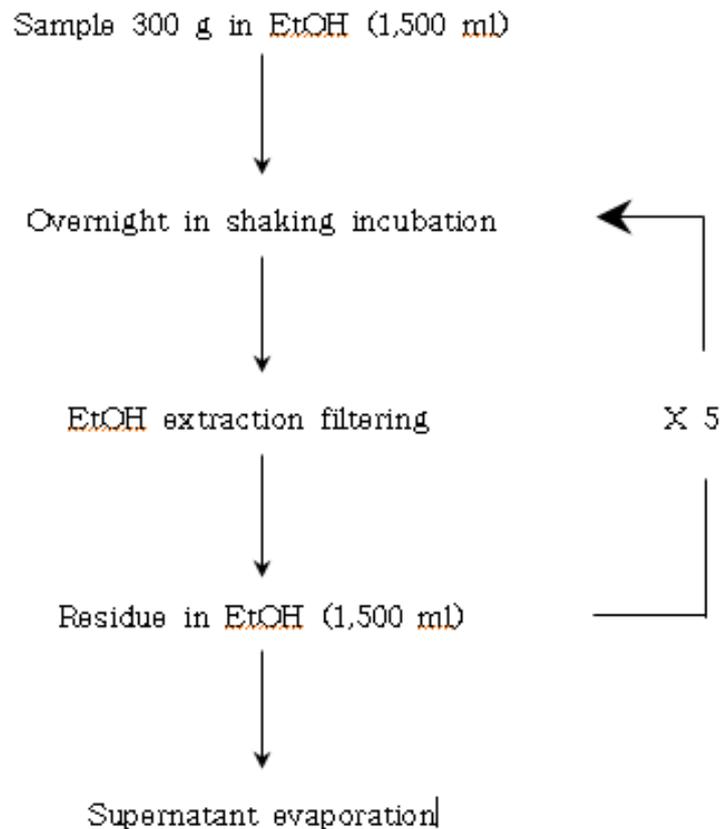
마. 추출법 확립 및 예비정제

(1) 추출법 확립

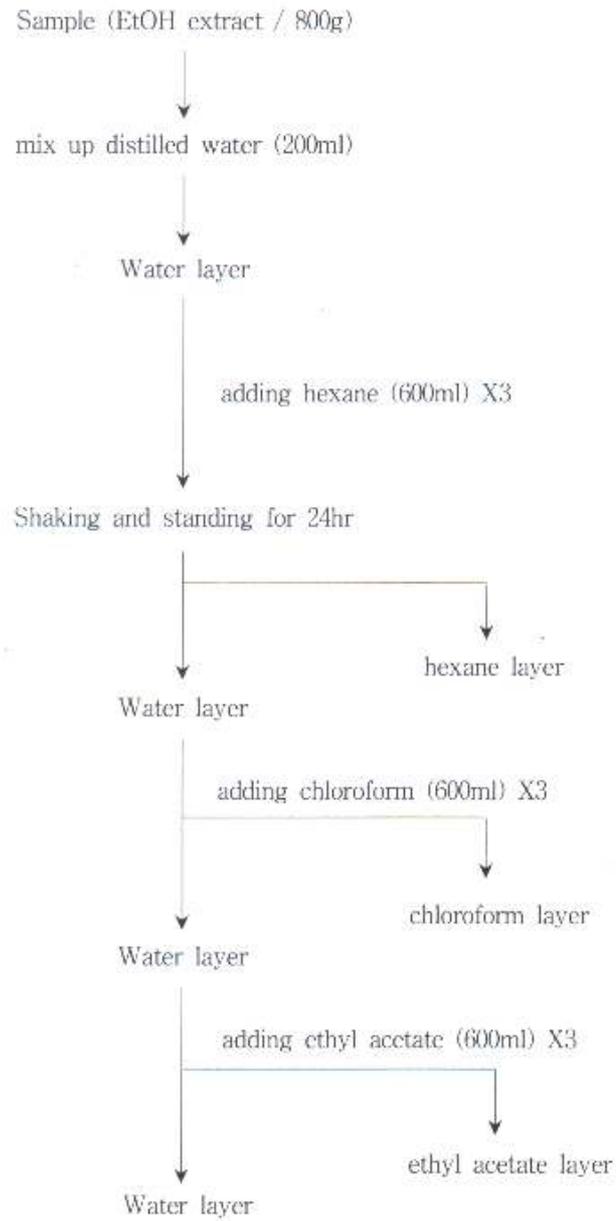
선정된 시료를 Scheme 1-6 에서 표시한 방법으로 추출 하였다. 경동 시장에서 직접 구입한 시료를 위의 추출 방법에 따라 시료의 5배에 해당하는 양의 ethanol을 이용해 5회 추출한 후 감압 농축하여 시료를 ethanol 추출물을 조제하였다.

(2) 예비정제법의 확립

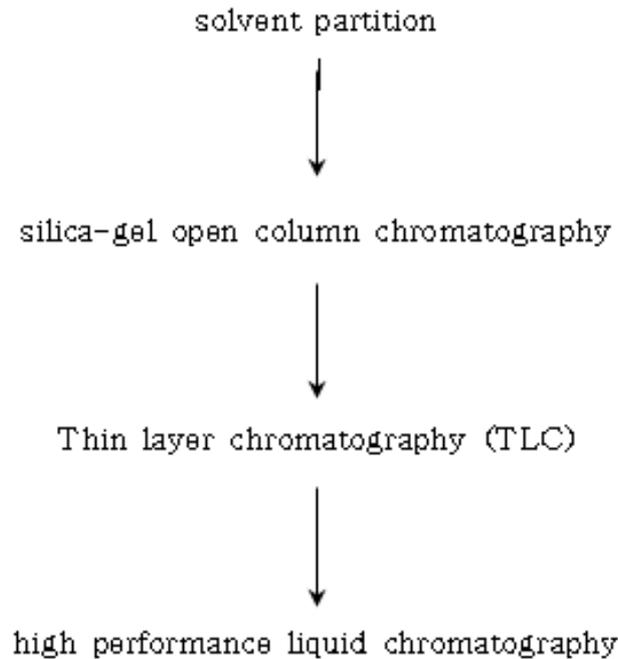
In vitro assay계를 통해 선정된 시료를 ethanol로 추출하고 추출된 crude ethanolic extract는 물에 녹여 hexane을 넣어 24시간 후에 용매층을 분리하는 과정을 3번 반복하고 chloroform, ethyl acetate 순으로 같은 방법을 이용하여 각각 3일 동안 분획과정을 거친다(Scheme 1-7). Solvent partition을 통해 얻은 시료의 활성을 확인한 후, Scheme 1-8과 같이 예비정제단계를 확립하였다.



Scheme 1-6. Preparation of ethanolic extracts from *Poncirus trifoliata*.



Scheme 1-7. Solvent partition of ethanolic extract from *Poncirus trifoliata*.



Scheme 1-8. 예비 정제단계

(3) Open column chromatography

Solvent partition 후, 선정된 분획을 대상으로 silica gel open column chromatography를 실시한다. 선정된 분획을 감압 농축하여 sample을 준비해놓고 silica를 가열하여 활성화 시킨 후, 이 silica를 chloroform으로 현탁하여 column에 충전시킨다. 충전된 column에 선정된 분획의 sample을 loading하고, 에탄올과 chloroform의 농도 기울기를 이용하여 정제를 실시한다. 각각 분리된 분획 (총 33개의 분획)을 일정량 (1 mg/ml) 취하여 AChE 저해 활성을 측정하고 그 중 가장 높은 저해활성을 보이는 분획을 선정한다.

(4) Preparative thin layer chromatography (PLC)

Open column chromatography를 통해 얻은 시료의 활성을 확인한 후, 선정된 획분을 preparative silica-gel plate (glass, 200 × 200 mm)를 사용하여 preparative thin layer chromatography (PLC)를 실시하였다. 선정 획분을 2 × 0.1 mg/ml 농도로 methanol에 녹이고 0.5 µl씩 8회 spotting하여 건조시킨다. Chloroform과 ethanol (99.5:0.5, v/v)으로 전개시킨 후 band를 분리하여 AChE 저해 활성을 측정하였다.

(5) High performance liquid chromatography (HPLC)

PLC로부터 분리한 밴드의 활성을 확인 한 후 μ -BondapakTM C₁₈ column을 이용한 HPLC를 통하여 활성 물질을 분리 하였다. 0-100%의 ethanol과 물의 직선농도 구배로 변화를 주어 90 분간 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는 분당 0.5 ml로 하였으며 한 번에 10 μ l씩 시료 주입을 하였다. 사용 용매는 특급 ethanol과 3차 증류수를 사용하였다.

Instrument	Waters 2690
Detector	Waters 996 (PDA: photodiode array detector)
Column	μ - Bondapak C ₁₈ (reverse phase, 3.9 \times 300 mm)
Flow rate	0.5 ml/min
Mobile phase	0 % ~ 100 % ethanol (gradient elution)
Injection volume	10 ml

바. 정제된 AChE 저해 활성물질 구조분석

선정된 시료에서 정제된 물질을 ¹H-NMR (Fig. 1-2A) 과 ¹³C-NMR (Fig. 1-2B) 를 이용하여 측정하였으며, Electronic ionization (EI) mass (Fig. 1-3) 를 이용하여 그 구조와 mass size를 확인하였다.

사. 선정된 시료로부터 분리한 신경전달물질 분해효소 억제물질의 2차 *in vivo* test.

(1) *In vivo* assay계 확립 및 구조가 밝혀진 활성물질의 활성측정

활성물질로 밝혀진 시료의 *in vivo* 활성측정을 위해서, ICR-male mice를 준비하고 최종선정 시료를 각 group당 각각 0.0003, 0.0006, 0.0012, 및 0.0024%의 농도로 일반사료에 섞어서 제공한다. ICR-male mice는 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12 hr-photoperiod chamber에서 사육한다. 신경독성 물질인 TMT를 injection (2.5 mg/kg body weight of mice, single dose) 한 후 *in vivo* 활성을 시험한다.

(2) Y-maze test

위의 조건처럼 ICR-male mice에 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로는 TMT를 복강투여하고 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시한다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록했다. Mouse를 arm에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.

(3) Passive avoidance test

Y-maze test와 같은 조건으로 ICR-male mice에 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로는 TMT를 복강투여하여 기억력 실험을 실시한다. 이 실험은 실제 실험에 들어가기 전날에 기억상자와 같은 장소에서 training을 시킨 다음 행동실험을 실시한다. 모든 mice를 실험 전날, 실험 상자에서 적응 훈련 (명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후, 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험한다.

(4) 적출된 뇌 조직을 이용한 AChE activity 측정 및 지질과산화도 측정

행동실험 완료 후, mice의 뇌조직을 적출하여 균질화 하고 AChE 활성도 및 지질과산화도를 측정하였다. TMT는 AChE의 활성도를 높여 신경전달물질의 분해를 유발하며 산화적인 스트레스로 신경세포의 괴사 및 사멸을 초래하므로 본 연구에서 밝혀진 활성물질의 섭취가 실제 쥐의 뇌 조직에서 어떠한 영향을 미치는지 확인해보았다.

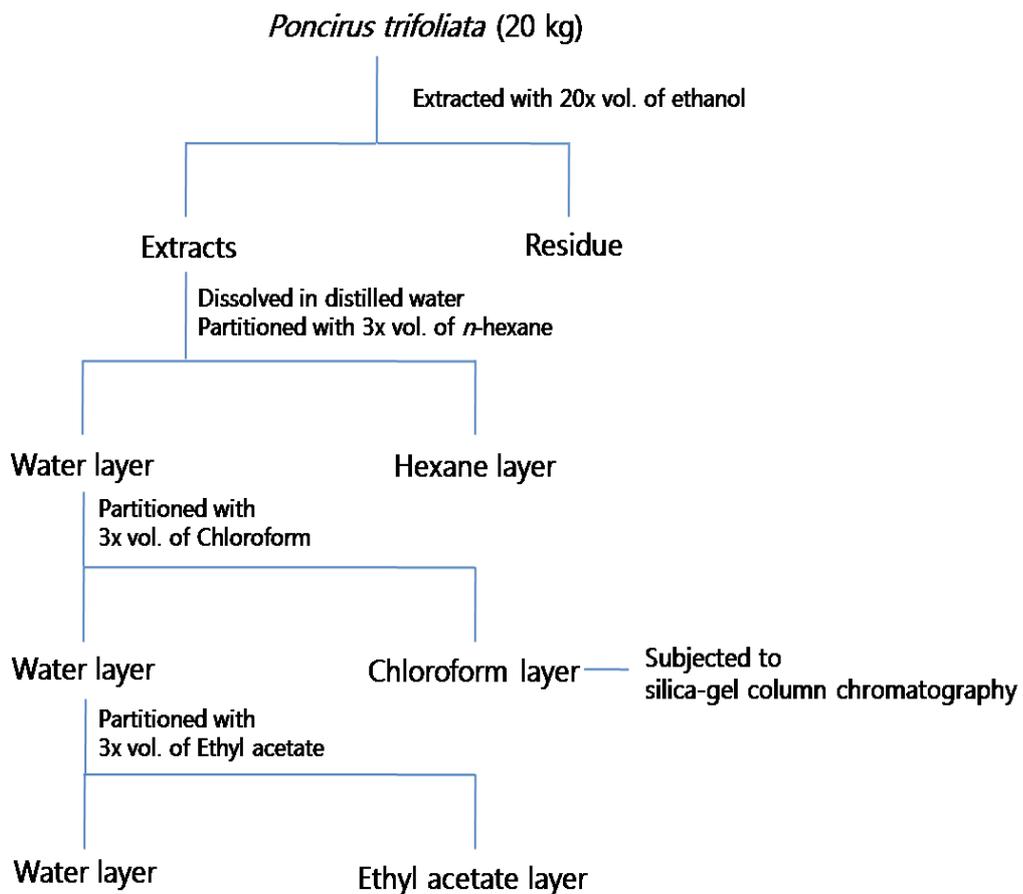
(5) 활성물질의 *in vivo*상의 독성실험

간 독성을 보기위해 AST, ALT kit를 이용하여 혈청에서 검사하였다. 각각의 기질을 1 ml 씩 시험관에 넣고 37°C 수조에서 가온한 후 혈청 0.2 ml씩 넣은 후 AST의 경우 60 분, ALT의 경우 30 분간 반응시킨 다음 발색시약 2,4-dinitrophenyl hydrazine을 1.0 ml 씩 넣고 실온에서 20 분간 반응시킨 후 0.4 N-NaOH을 10.0 ml 씩 넣어 반응을 중지 시켰다. 반응 중지 30분 후에 505 nm에서 측정하고 여기서 얻은 검량 곡선을 이용하여 효소의 활성단위로 환산하였다.

아. 신경전달물질 분해효소 억제물질의 공업적 실용화

(1) 최종적으로 선정된 시료들로부터 추출조건의 최적화 및 공업적 수준의 정제방법 확립

활성 물질의 공업적 실용화를 위해 추출 온도, 시간 및 가공조건 시험을 해보았다. 시료 20 kg 으로부터 향치매 활성 성분을 공업적으로 대량 추출하기 위해 10 L용 steam jacket이 부착된 추출기를 사용하였다(Scheme 1-9).



Scheme 1-9. 향치매 활성물질의 공업적 실용화

(2) 연질 캡슐 제작

시료의 추출 분말 100 mg에 소맥 배아유를 30-50%, 미강 추출물 10-20%, 베타카로틴 1-3%, 레시틴 1-2%, 토코페롤 1% 등을 부형제로 사용하고, 맛을 고려하여 생강추출물, 인삼분 등의 각종 추출물을 미량 첨가하였다.

(3) 드링크제 제작

시료의 추출 분말의 이용하여 내용액 제제를 만들었다 제제의 맛, 향, 안정성 등을 고려하여 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상 과당, 올리고당, 벌꿀 등을 사용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨을, 산미제 및 pH 조절제로 구연산을 사용하였다. 향산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였다. 그 외에 식미 향상을 위해 사과과즙 같은 과일과즙을 혼합해 준다. 주성분의 배합은 100 mg으로 하여 조제 하였다.

(4) 과립제 제제

시료의 추출 분말 300 mg에 부형제로 유당 700 mg, 옥수수 전분 3.5 mg, 산미제로 구연산 5 mg 을 혼합하고 spray dry 한 후 제과 하였으며 함습도를 시험한 후 정립하고 최종 혼합하였다.

자. 제품의 외관 및 안정성 검사

본 연구에서 개발된 제품들은 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속하므로 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가속시험 (고온, 고압) 을 실시하여 제품의 외관과 미생물 검사를 실시하였다.

4. 실험결과

가. AChE 저해활성을 갖는 시료의 검색 및 선정

국내 고유 차·죽류 생물자원의 추출물을 대상으로 AChE 저해활성을 검색한 결과, Table 1-1과 Fig. 1-1 에서 나타난 것처럼 탱자 추출물이 가장 높은 52%의 활성을 보였다. 탱자 추출물의 활성을 확인하기 위해 기존에 그 효과가 입증된 tacrine을 농도별로 처리하고 활성비교를 수행하였다(Fig. 1-2).

Table 1-1. Inhibitory effect of the Korean edible plants extract against AChE

Korean name	Common name	Scientific name	Inhibition(%)
부자	Aconiti Tuber	<i>Aconitum carmichaeli</i> <i>Debeaux</i>	18.3
잔대	Adenophorae Radix	<i>Adenophora tryphilla</i> var. <i>Japonica</i>	36.1
차소엽	Beefsteak plant	<i>Perilla frutescens</i>	27.0
산약	Chinese yam shan yao	<i>Dioscorea opposita</i>	21.4
계피	Cinnamon	<i>Cinnamomum loureirii</i>	23.0
유자	Citron	<i>Citrus junos</i>	22.6
미나리	Dropwort	<i>Oenanthe siolonifera</i>	24.6
가시오가피	Eleutherococcus senticosus MAXIM	<i>Acanthopanax senticosus</i>	17.6
생강	Ginger	<i>Zingiber officinale</i>	25.2
고추	Hot pepper	<i>Capsicum annuum</i>	23.6
유근피	Japanese Elm	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	22.5
목단피	Moutan cortex radiceis	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.	28.2
질경이	Plantaginis semen	<i>Plantago asiatica</i>	29.3
깨잎	Sesame	<i>Perilla frutescens</i> (leaf)	28.1
돈나물	Stonecrop	<i>Sedum sarmentosum</i>	20.9
탱자	Trifoliate orange	<i>Poncirus trifoliata</i>	52.0
동과	Wax gourd	<i>Benincasa cerifera</i> Savi.	19.6
취나물	Wild Aster	<i>Ligularia fischeri</i>	27.0
들국화	Wild chrysanthemum	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	20.9
달래	Wild rocambole	<i>Allium monanthum</i>	28.3

Korean Name	Common name	Scientific name	Inhibition(%)
택사	Channelled waterplantain	<i>Alisma canaliculatum</i>	51.3
대파	Spring onion	<i>Allium fistulosum</i>	17.6
양파	Onion	<i>Allium cepa</i>	16.6
쪽파	Stone-leek	<i>Allium fistuosum</i>	36.4
당귀	Angelicae gigantis radix	<i>Angelica gigas</i>	43.0
냉이	Shepherd's purse	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	21.7
홍화씨	Safflower seed	<i>Carthamus tinctorius (seed)</i>	39.5
모과	Chaenomeles fructus	<i>Chaenomeles sinensis</i>	22.5
치커리	Cichory	<i>Cichorium intybus</i>	4.9
유자	Citron	<i>Citrus junos</i>	22.6
산수유	Cornus fruit	<i>Cornus officinalis</i>	19.3
음양곽	Epimedium koreanum NAKAI	<i>Epimedium koreanum</i>	45.6
얼레지	Dog's-tooth violet	<i>Erythronium japonicum</i> <i>Descaisne</i>	12.0
검실	Gordon euryale	<i>Euryale ferox</i>	17.1
들깨	Perilla	<i>Perilla frutescens</i>	20.1
질경이씨	Plantaginis semen (seed)	<i>Plantaginis Semen</i>	23.3
석류	Pomegranate	<i>Punica granatum</i>	27.6

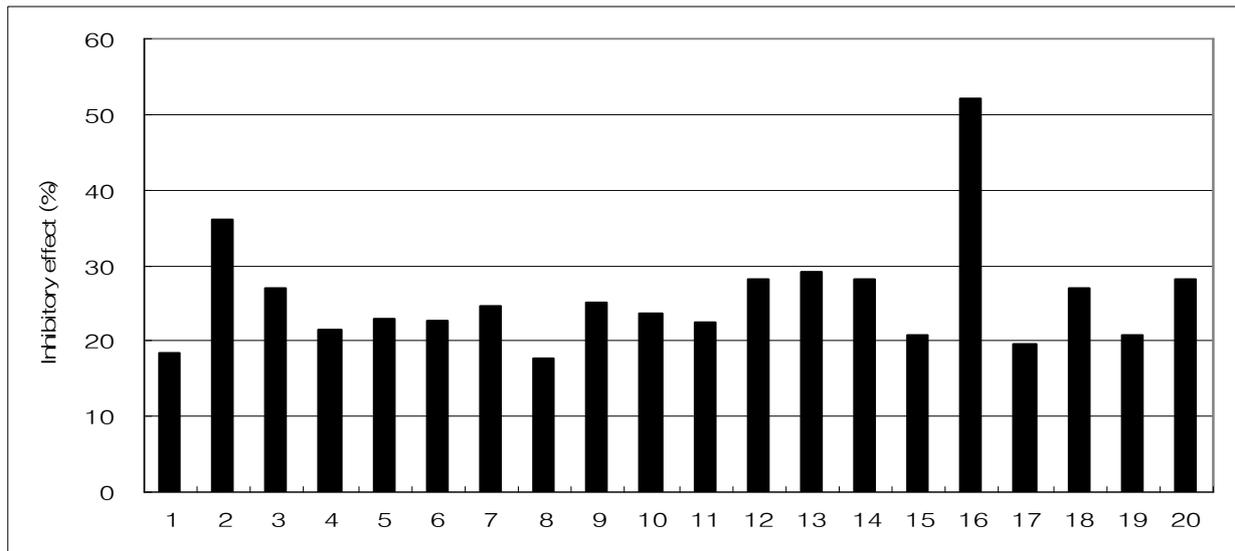


Fig. 1-1. Inhibitory effect of ethanolic extracts obtained from Korean edible plants against AChE.

1: *Aconitum carmichaeli* Debeaux, 2: *Adenophora tryphilla* var. *Japonica*, 3: *Perilla frutescens*, 4: *Dioscorea opposita*, 5: *Cinnamomum loureirii*, 6: *Citrus junos*, 7: *Oenanthe siolonifera*, 8: *Acanthopanax senticosus*, 9: *Zingiber officinale*, 10: *Capsicum annuum*, 11: *Julmus davidiana* var. *japonica*, 12: *Paeonia suffruticosa* Andr., 13: *Plantago asiatica*, 14: *Perilla frutescens* (leaf), 15: *Sedum sarmentosum*, 16: ***Poncirus trifoliata***, 17: *Benincasa cerifera* Savi., 18: *Ligularia fischeri* 19: *Chrysanthemum morifolium*, 20: *Allium monanthum*

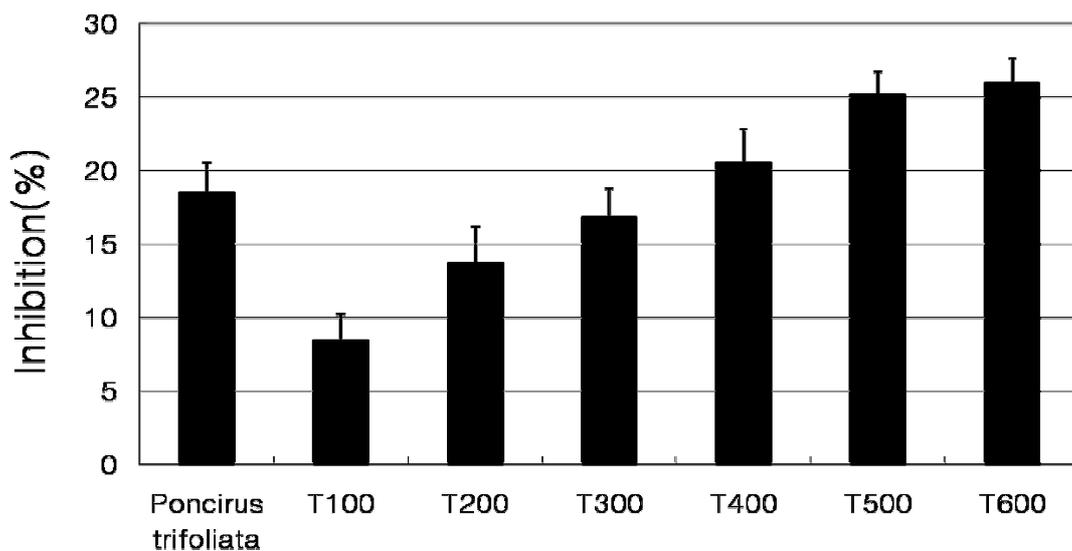


Fig. 1-2. Inhibitory effect of tacrine against acetylcholinesterase (AChE). Group T is treated with various concentrations of tacrine (nM).

나. *In vitro* 세포독성 실험

위의 *in vitro* assay 계에서 가장 높은 AChE 저해 활성을 보이는 탱자를 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay를 이용하여 cytotoxicity 여부를 검사하였다. 선정된 탱자 추출물에서 유의적인 독성은 관찰되지 않았다 (Fig. 1-3).

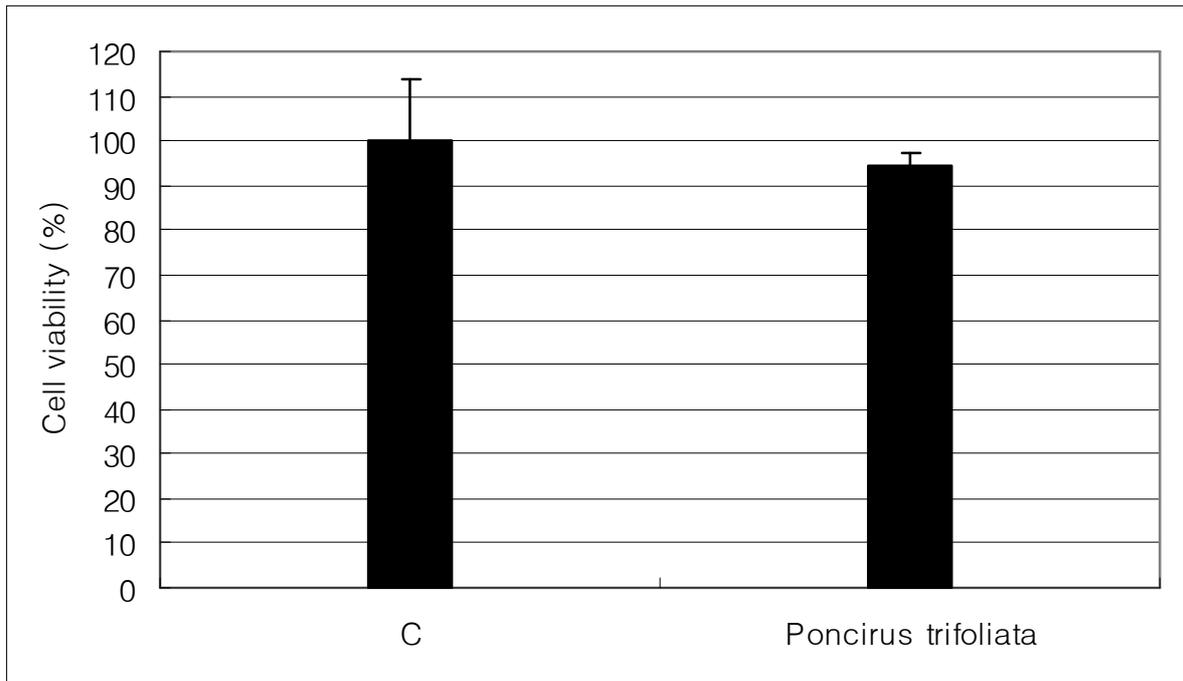


Fig. 1-3. Effect of the *Poncirus trifoliata* on cytotoxicity.

Group C was untreated control culture.

다. AChE 저해활성 측정을 위한 *in vivo* assay계 확립 과 선정 시료의 활성 및 독성검사

(1) 최종 선정된 AChE 억제 활성물질의 *in vivo* 독성실험

Poncirus trifoliata extract 식이 전·후의 body weight에서 비정상적인 변화는 발견되지 않았다(Fig. 1-4). 특히 농도에 관계없이 각 group의 모든 mice의 생존율이 100% 였으며, serum의 AST, ALT 변화도 SAS analysis 결과 유의성을 보이지 않음으로서 선정된 시료의 독성은 없는 것으로 확인되었다(Figs. 1-5, 6).

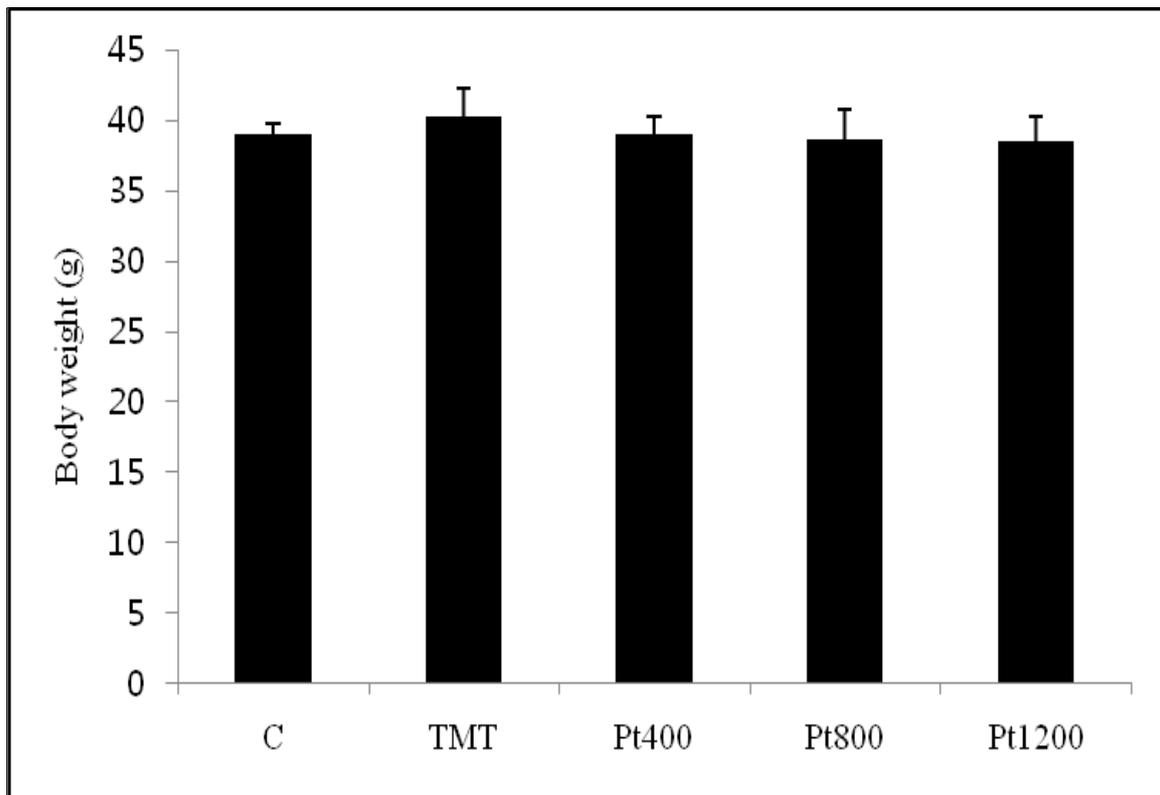


Fig. 1-4. Body weight of mice.

Duncan's multiple range test of SAS (statistical analysis system) showed no significant differences ($P < 0.05$). Data represent the mean ($n=8$) \pm S.D.

Control: Normal diet and untreated TMT group

TMT: Treated with TMT and diet group

Pt 400: Treated with TMT and diet group (400 mg/kg)

Pt 800: Treated with TMT and diet group (800 mg/kg)

Pt 1200: Treated with TMT and diet group (1,200 mg/kg)

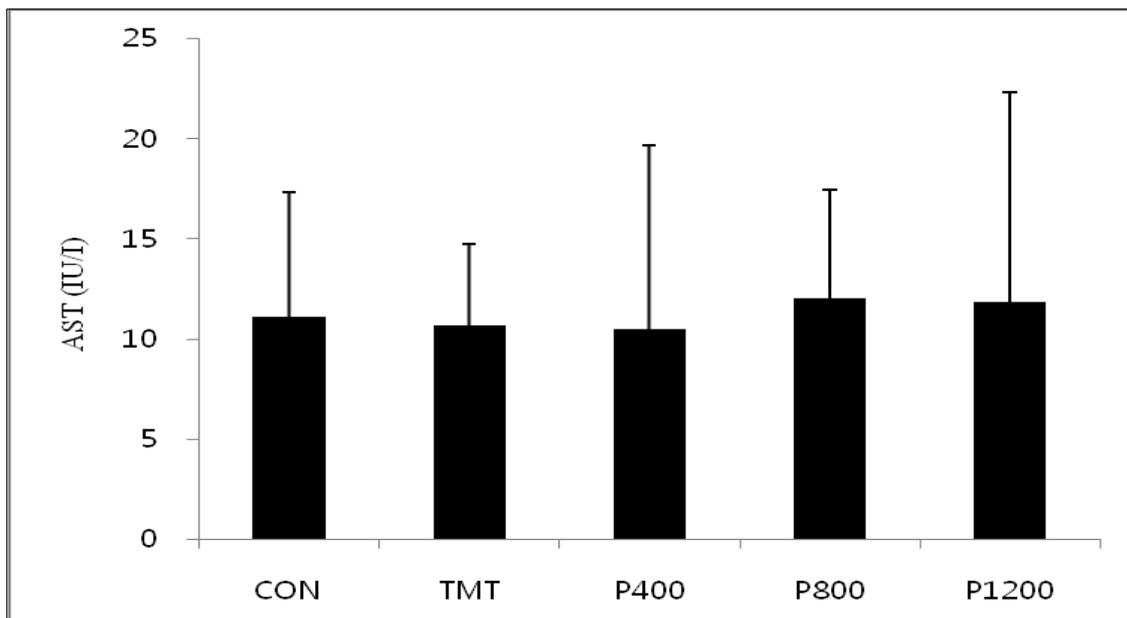


Fig. 1–5. AST (aspartate aminotransferase) activity in serum of *Poncirus trifoliata* extract diet mice.

Poncirus trifoliata was added in water for 24 day. Mice were injected (2 mg/kg body weight of mice) with TMT or equal volume of saline (control) for test. Duncan's multiple range test of SAS (statistical analysis system) showed no significant differences ($P < 0.05$). Data represent the mean ($n=8$) \pm S.D.

Pt 400: Treated with TMT and diet group (400 mg/kg)

Pt 800: Treated with TMT and diet group (800 mg/kg)

Pt 1200: Treated with TMT and diet group (1,200 mg/kg)

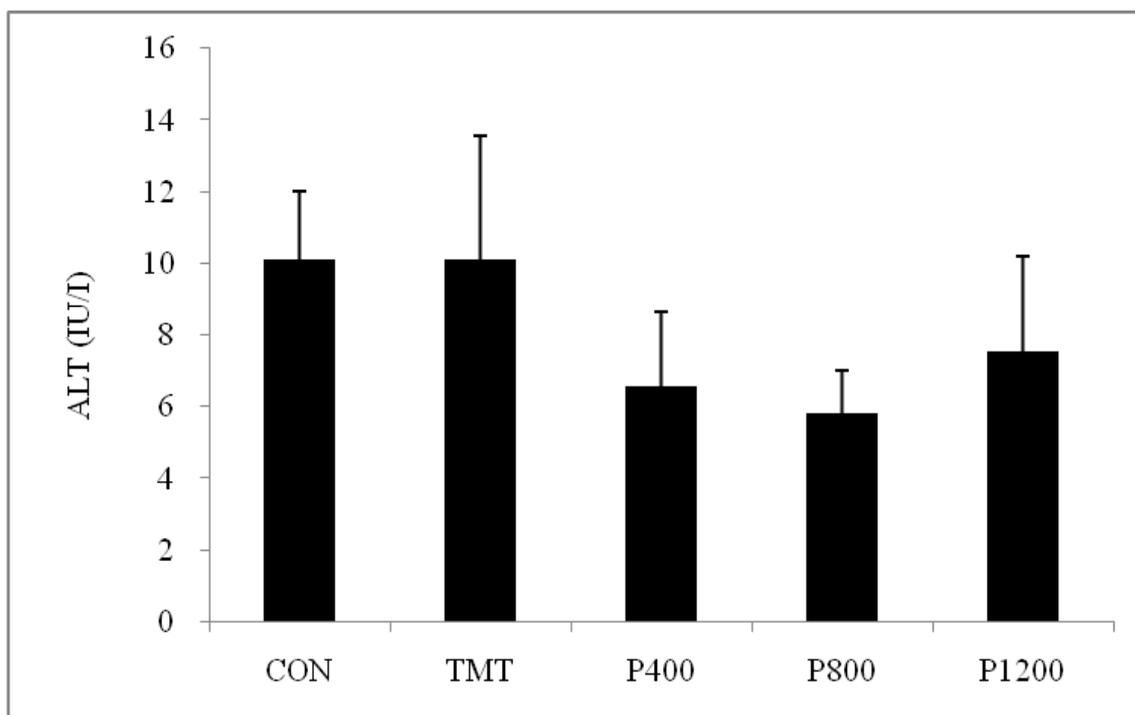


Fig. 1–6. ALT (alanine aminotransferase) activity in serum of *Poncirus trifoliata* extract diet mice.

Poncirus trifoliata was added in water for 24 day. Mice were injected (2 mg/kg body weight of mice) with TMT or equal volume of saline (control) for test. Duncan's multiple range test of SAS (statistical analysis system) showed no significant differences ($P < 0.05$). Data represent the mean ($n=8$) \pm S.D.

Pt 400: Treated with TMT and diet group (400 mg/kg)

Pt 800: Treated with TMT and diet group (800 mg/kg)

Pt 1200: Treated with TMT and diet group (1,200 mg/kg)

(2) Y-maze

ICR-male mice는 sample을 섞은 물을 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로 TMT를 injection하여 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시한다. TMT 및 sample이 mouse의 운동능력에는 영향을 주지 않았으며(Fig. 1-7), sample이 공급된 group에서 기억력이 향상되었음을 알 수 있다(Fig. 1-8).

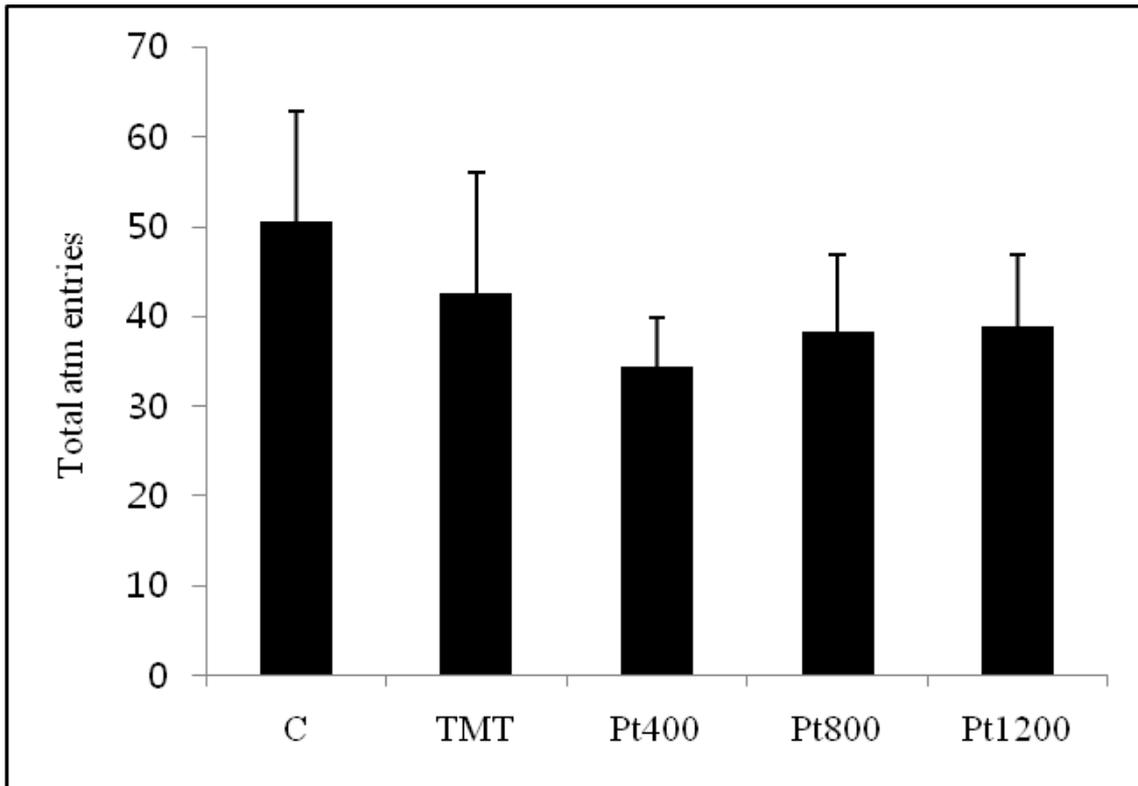


Fig. 1-7. The number of arm entries in Y-maze test.

Duncan's multiple range test of SAS (statistical analysis system) showed no significant differences ($P < 0.05$). Data represent the mean ($n=8$) \pm S.D.

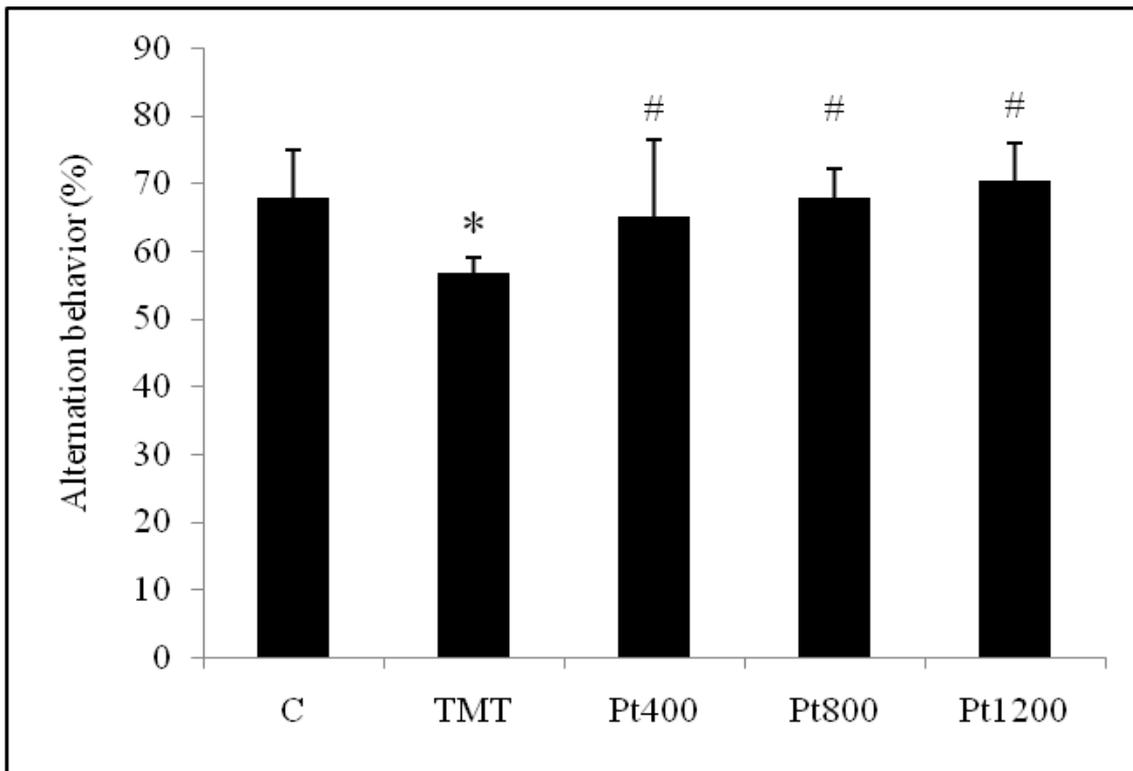


Fig. 1–8. TMT–induced learning and memory impairments in mice.

Protective effect of *Poncirus trifoliata* extract against the TMT induced memory impairment in Y–maze test. Spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min. Data represent the mean (n=8) \pm S.D. (*P < 0.05 vs. Control group, #P < 0.05 vs. TMT group).

(3) Passive avoidance test

ICR-male mice는 sample을 섞은 물을 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로 TMT를 injection하며 이 실험은 실제 실험에 들어가기 하루 전, 기억상자와 같은 장소에서 training을 시킨 다음 행동실험을 실시한다. 모든 mice를 실험 상자에서 적응 훈련 (명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 후에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험한다. 본 실험에서 sample과의 효과를 비교했을 때, TMT투여한 군에서 현격히 학습능력이 떨어짐을 보였으나 시료투여로 인한 학습능력 보호 및 증진 효과가 나타났다(Figs. 1-9, 10).

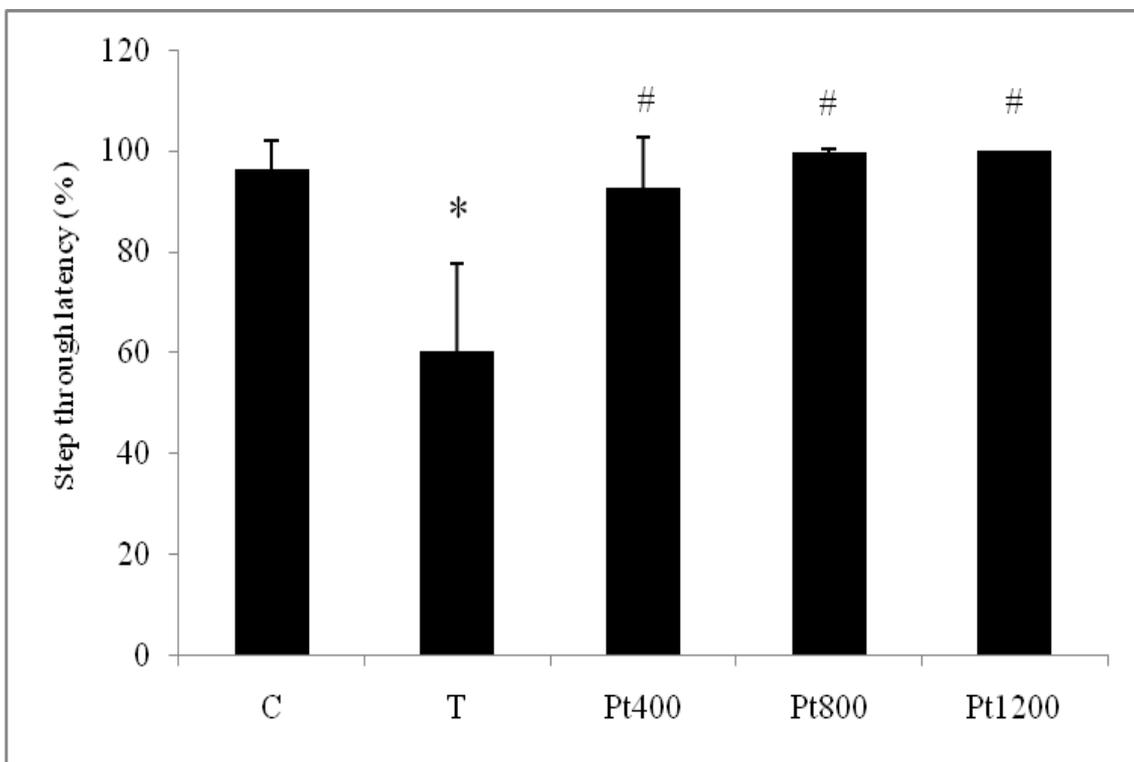


Fig. 1-9. Effect of *Poncirus trifoliata* extract on step-through latency in the passive avoidance test.

Protective effect of *Poncirus trifoliata* extract against the TMT induced memory impairment in passive avoidance test. The testing trial was given 1 day after the training trial. Data represent the mean (n=8) \pm S.D. (*P < 0.05 vs. Control group, #P < 0.05 vs. TMT group).

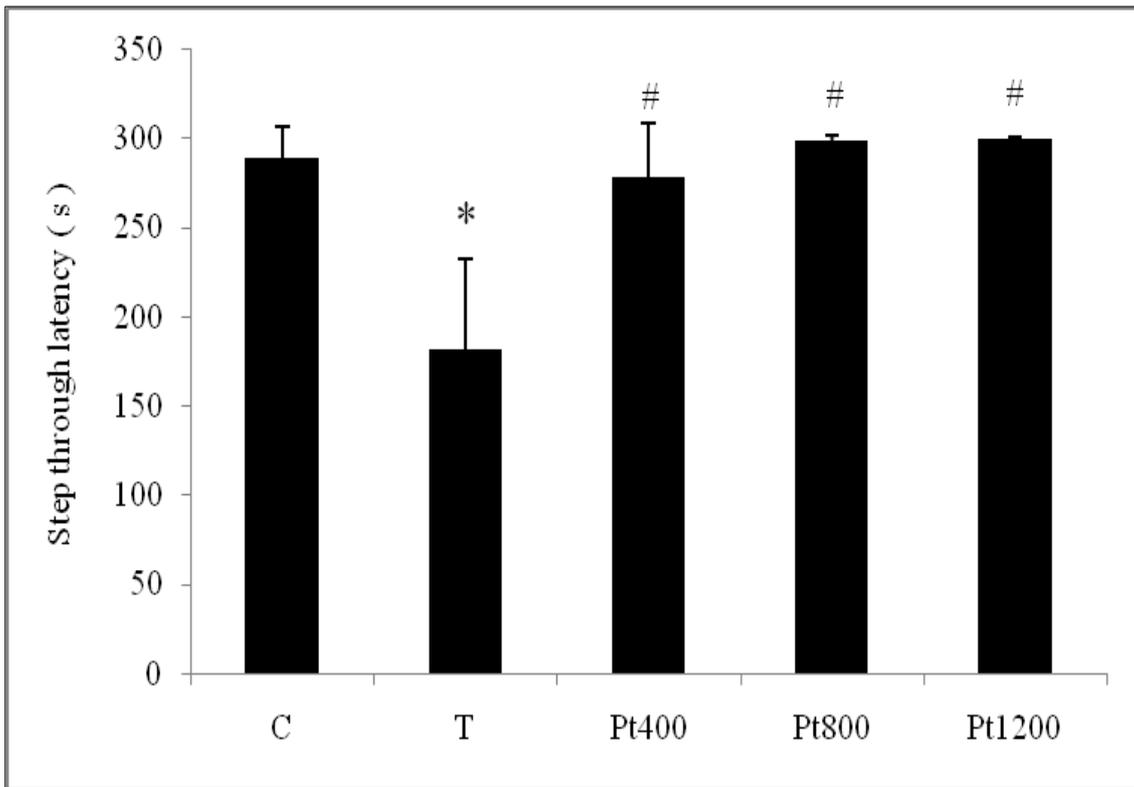


Fig. 1–10. Effect of *Poncirus trifoliata* extract on step-through latency in the passive avoidance test.

Data represent the mean (n=8) \pm S.D. (*P < 0.05 vs. Control group, #P < 0.05 vs. TMT group).

라. *Poncirus trifoliata* 추출물로부터 AChE 저해 활성물질 탐색

(1) Solvent partition

최종 선정된 *Poncirus trifoliata*의 crude ethanolic extract를 극성도에 따라 분획한 다음 각 분획의 AChE에 대한 효소 활성을 검색하였다. Hexane, chloroform, ethyl acetate의 순으로 분획한 결과 chloroform layer에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 1-11).

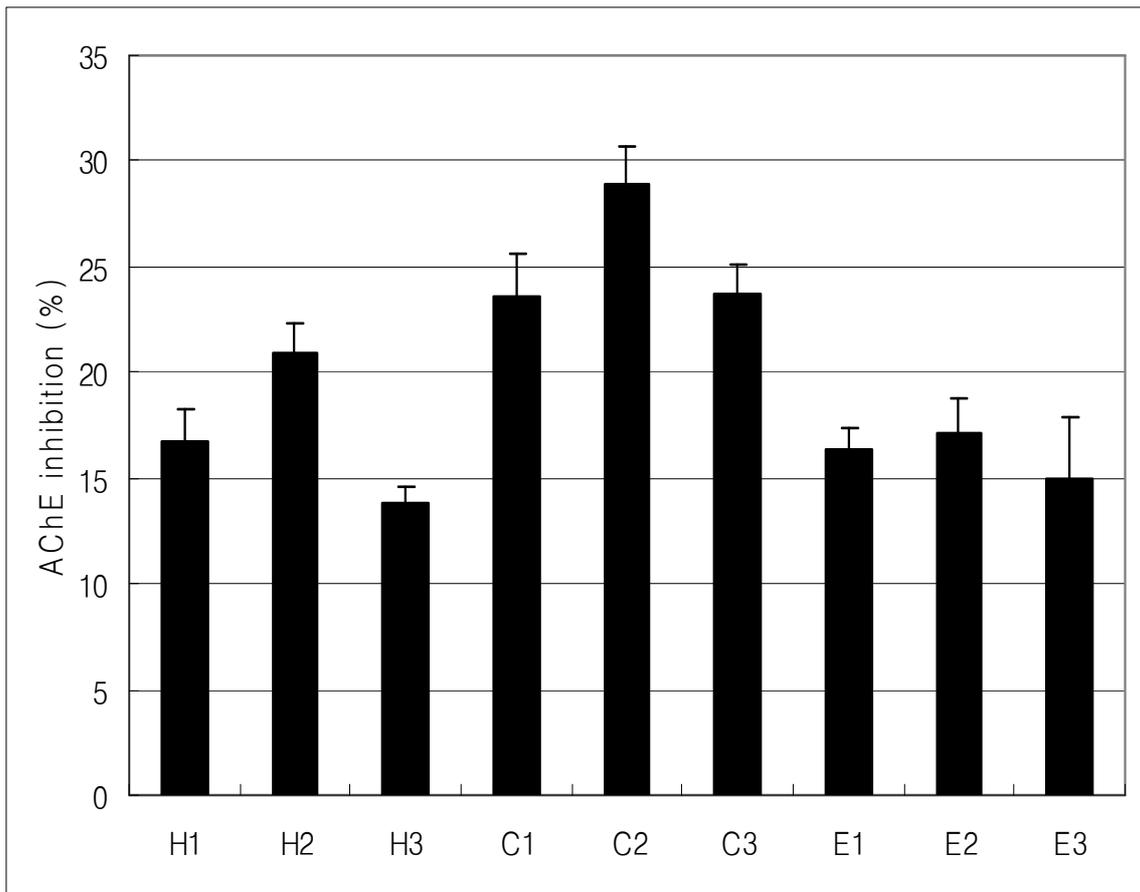


Fig. 1-11. Inhibitory effect of each solvent partition against AChE from *Poncirus trifoliata* extract.

H : Hexane

C : Chloroform

E : Ethyl acetate

(2) Open column chromatography

Solvent partition 후, 선정된 분획을 대상으로 silica gel open column chromatography를 실시한다. 선정된 분획을 감압 농축하여 sample을 준비해놓고 silica를 가열하여 활성화 시킨 후, 이 silica를 chloroform으로 현탁하여 column에 충전시킨다. 충전된 column에 선정된 분획의 sample을 loading하고, 에탄올과 chloroform의 농도 기울기를 이용하여 정제를 실시한다. 각각 분리된 분획 (총 33개의 분획)을 일정량 (1 mg/ml) 취하여 AChE 저해 활성을 측정하고 그 중 가장 높은 저해활성을 보이는 분획을 선정한다. Fig. 1-12에 보이는 바와 같이 두 번째 분획에서 54%의 가장 높은 AChE 저해 활성도가 나타났다.

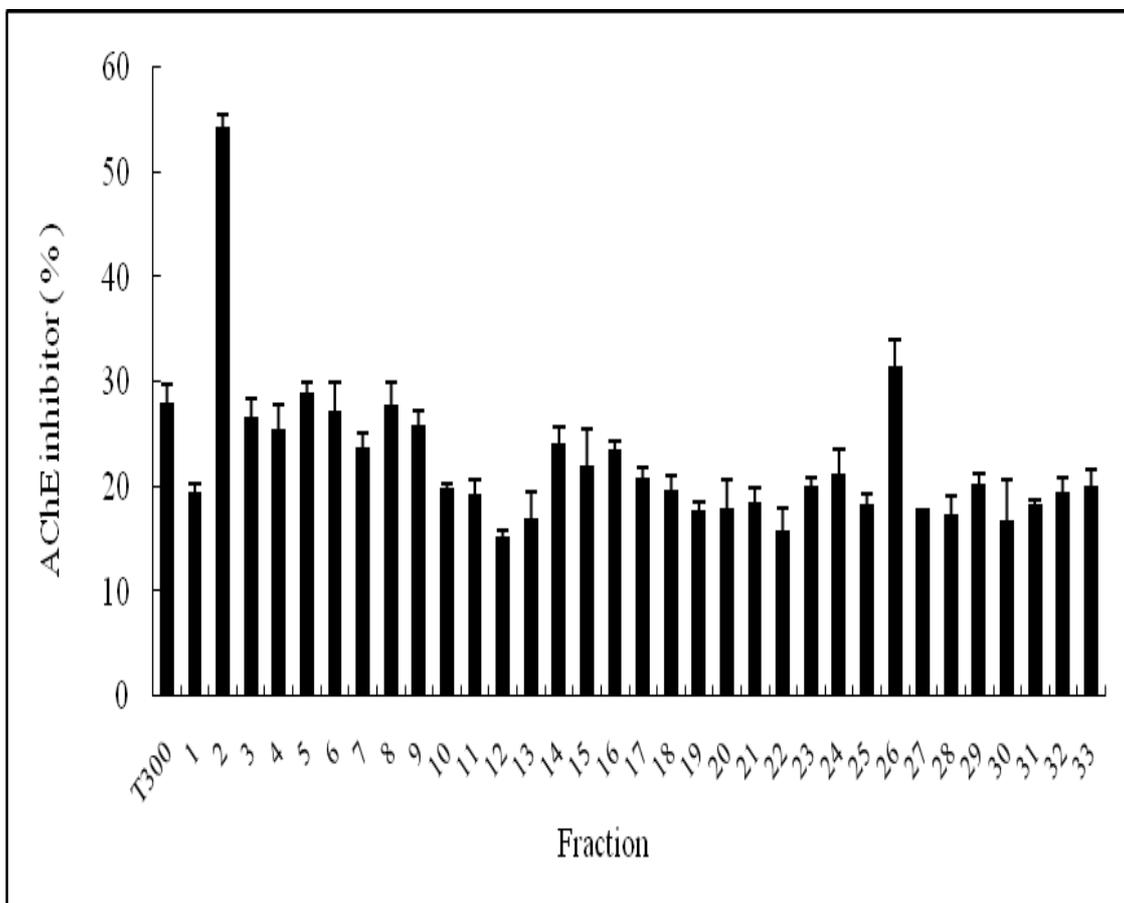


Fig. 1-12. Inhibitory effect of *Poncirus trifoliata* extract fractions by the silica-gel open column chromatography.

The eluants were the mixture of chloroform and ethanol. The highest inhibitory activity of AChE was 54% of the second fraction. The sample concentration was 1 mg/ml. Data represent the mean (n=4) \pm S.D.

(3) Preparative thin layer chromatography (PLC)

Open column chromatography를 통해 얻은 시료의 활성을 확인한 후, 선정된 획분을 preparative silica-gel plate (glass, 200 × 200 mm)를 사용하여 preparative thin layer chromatography (PLC)를 실시하였다. 선정 획분을 2 × 0.1 mg/ml 농도로 ethanol에 녹이고 0.5 µl씩 8회 spotting하여 건조시킨다. Chloroform과 ethanol (99.5:0.5, v/v)으로 전개시킨 후 band를 분리하여 AChE 저해 활성을 측정하였다. 분리된 밴드의 순서대로 AChE 저해활성을 확인한 결과 8번째 밴드에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 1-13).

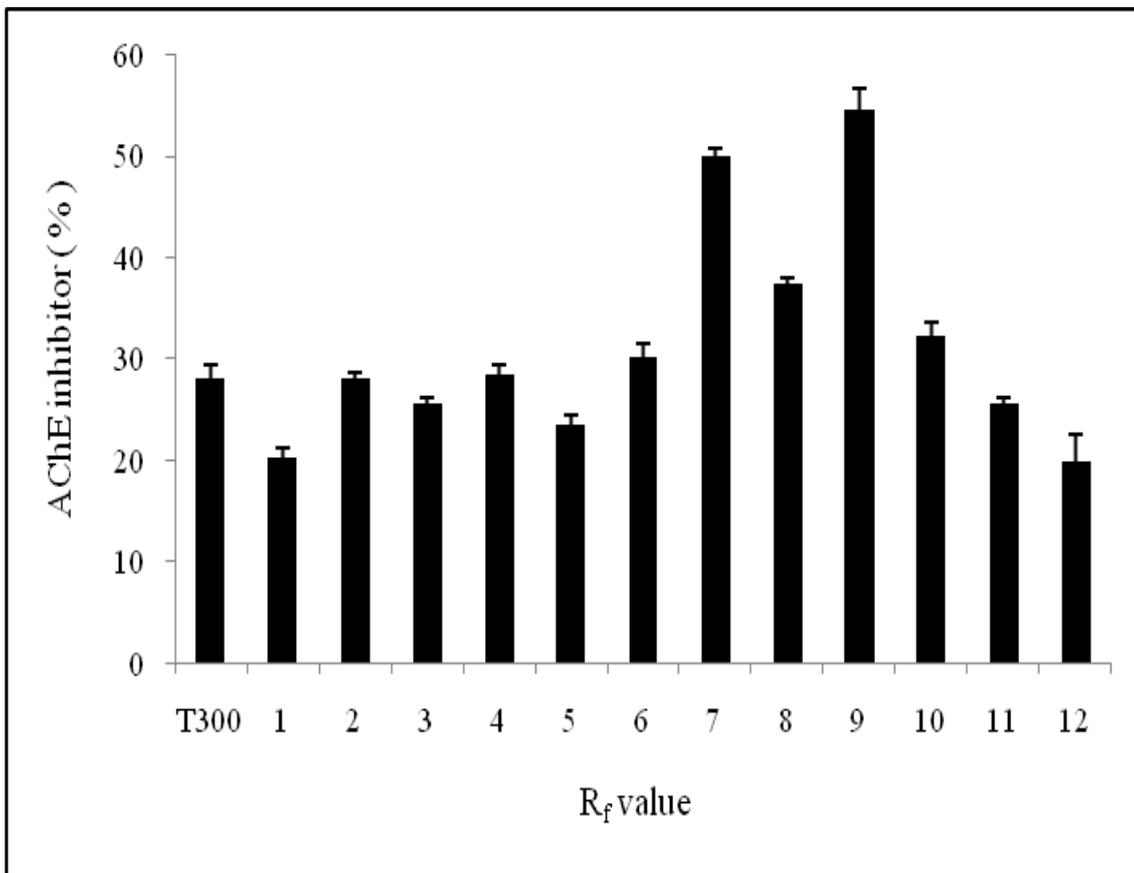


Fig. 1-13. Inhibitory effect of separated bands of *Poncirus trifoliata* extract by the preparation TLC.

(4) High performance liquid chromatography (HPLC)

PLC로부터 분리한 밴드의 활성을 확인 한 후, μ -BondapakTM C₁₈ column을 이용한 HPLC를 통해 활성 물질을 분리 하였다(Fig. 1-14). 0-100%의 ethanol과 3차 증류수의 직선농도 구배로 변화를 주어 90분간 분리를 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는 분당 0.5 ml로 하였으며 한번에 10 μ l씩 시료 주입을 하였다. 사용 용매는 특급 ethanol을 사용하였다.

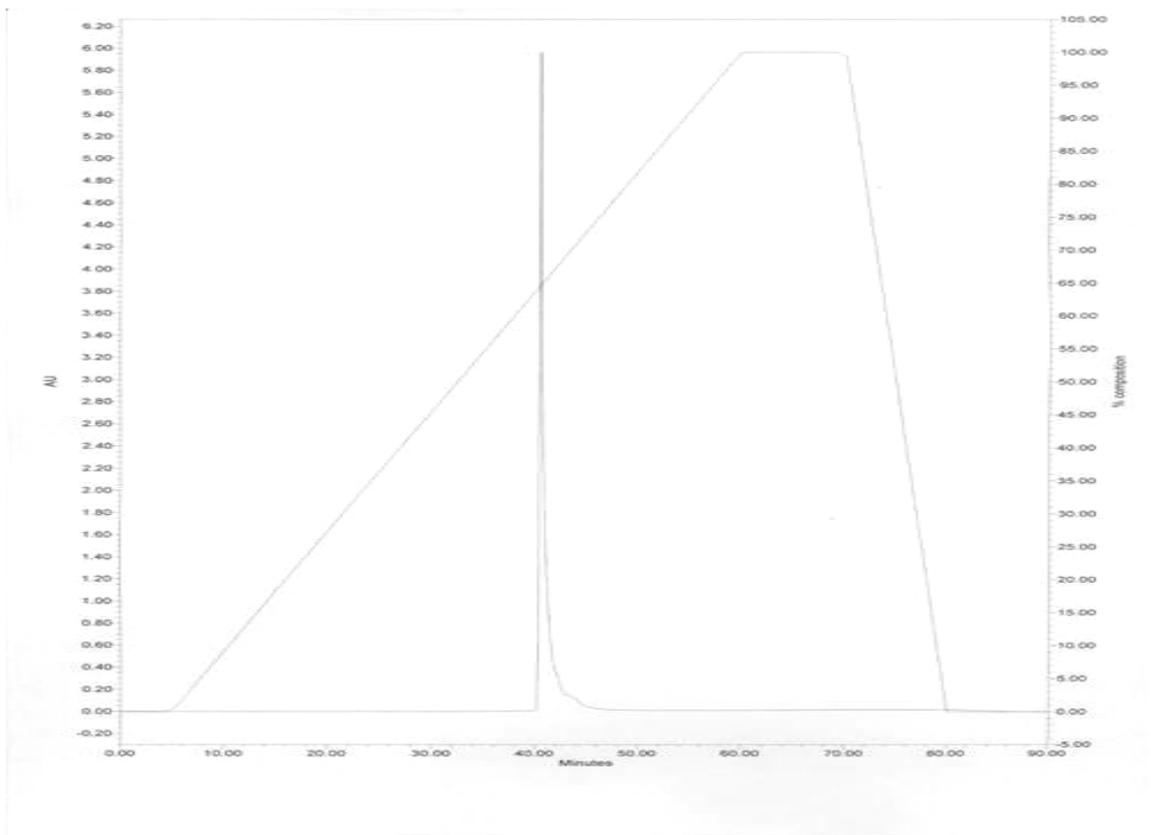


Fig. 1-14. Isolation of active compounds from *Poncirus trifoliata* extract by HPLC.

Column: μ -BondapakTM C₁₈ column (3.9 mm \times 300 mm),

Flow rate: 0.5 ml/min, Injection volume: 10 μ l

Mobile phase: 90 min, Detector: PDA

마. 정제된 AChE 저해 활성물질 구조분석

Poncirus trifoliata extract로부터 정제된 물질을 ^1H -NMR (Fig. 1-15A) 과 ^{13}C -NMR (Fig. 1-15B) 를 이용하여 측정하였으며, Electronic ionization (EI) mass (Fig. 1-16) 를 이용하여 그 구조와 mass size를 확인하였다. 그 결과, 활성물질은 분자량 216 m/z의 methoxsalen으로 확인되었다(Fig. 1-17).

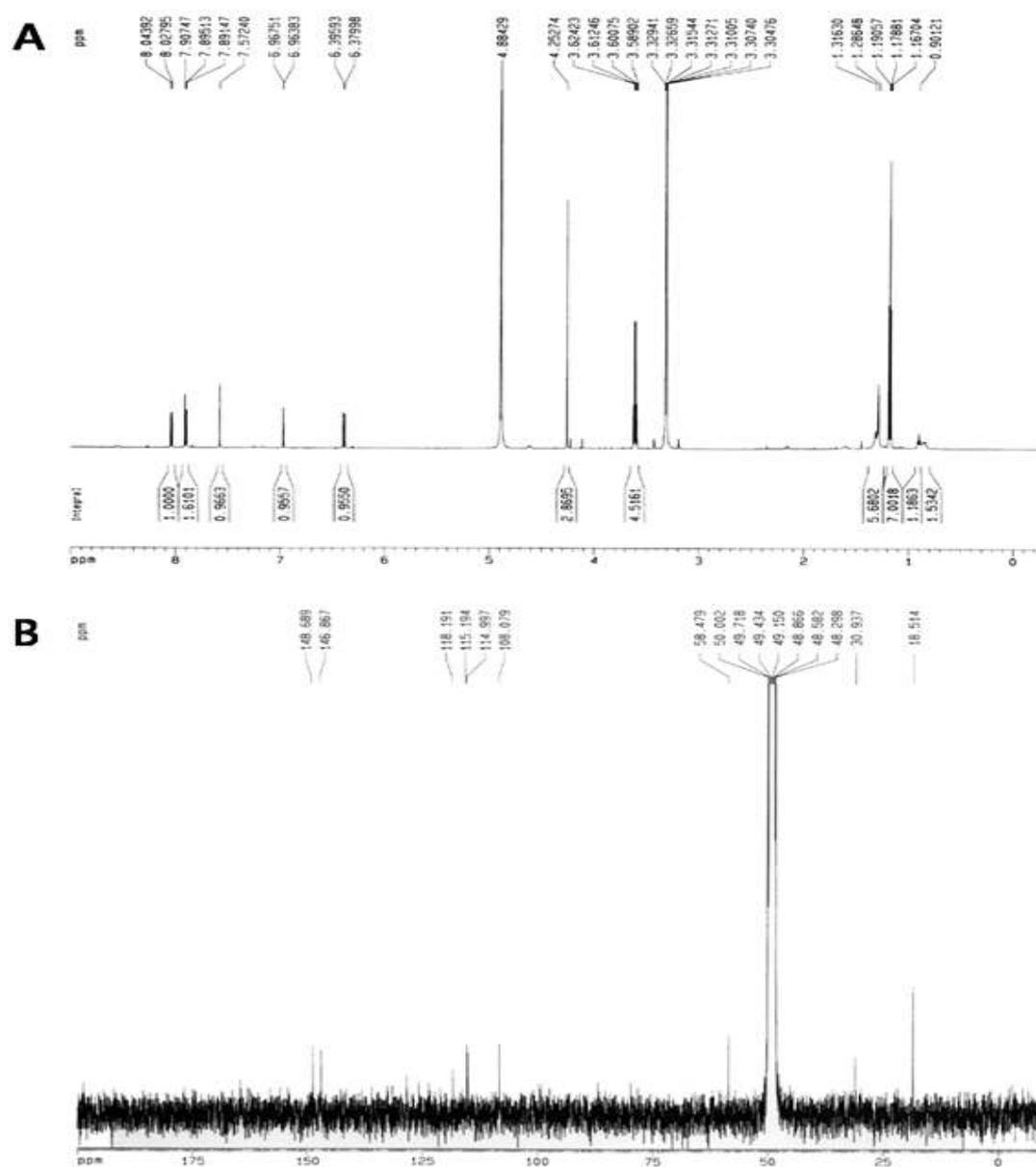


Fig. 1-15. $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -NMR spectrum of AChE inhibitor isolated from *Poncirus trifoliata* extract.

$^{13}\text{C}/^1\text{H}$ NMR was operated at 600 MHz and 25°C (Avance-600, Bruker, Karlsruhe, Germany; ^1H -NMR spectrum (A), ^{13}C -NMR spectrum (B)). Sample (1.5 mg) was dissolved in methyl- d_3 alcohol- d_1 (MeOD).

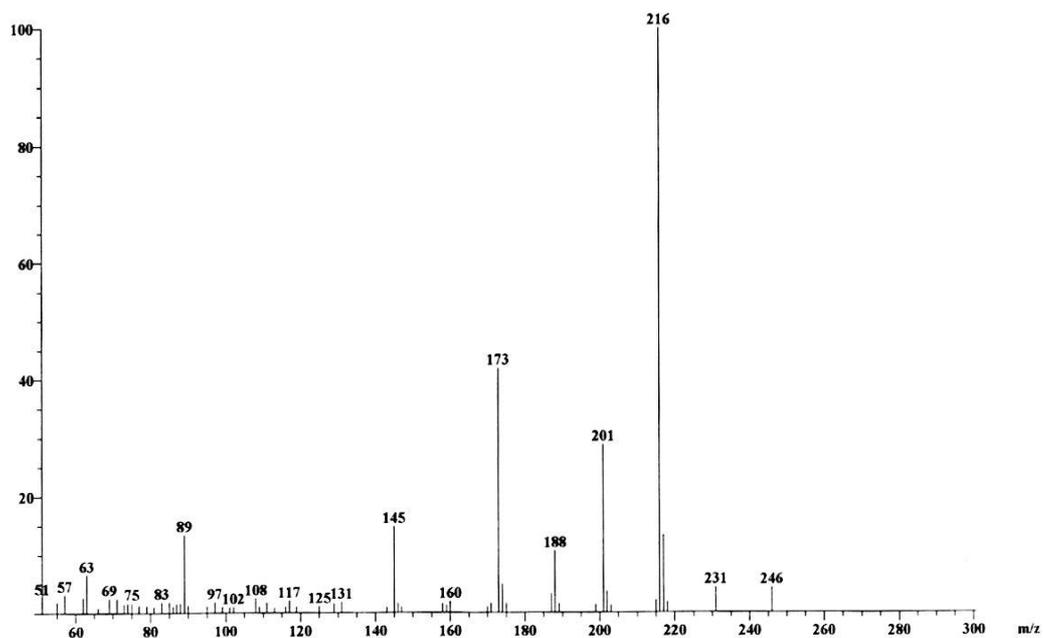


Fig. 1-16. EI-MS spectrum of AChE inhibitor isolated from *Poncirus trifoliata*.
The spectrum was recorded on positive ion EI mass spectrometer (JMS 600, JEOL, Japan).

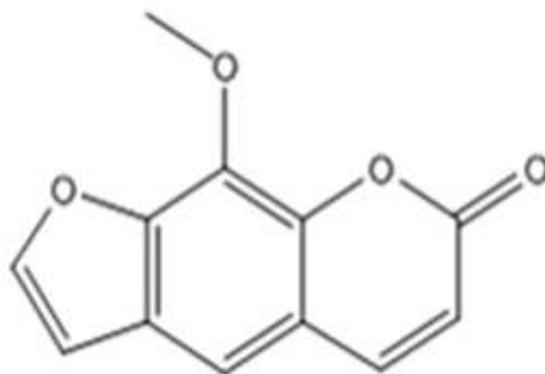


Fig. 1-17. Chemical structure of methoxsalen.
Molecular formula: $C_{12}H_8O_4$, Molecular weight: 216.18.

바. 선정된 시료로부터 분리한 신경전달물질 분해효소 억제물질의 2차 *in vivo* test

(1) *In vivo* assay계 확립 및 methoxsalen의 활성측정

활성물질로 밝혀진 methoxsalen의 *in vivo* 활성측정을 위해서, ICR-male mice를 준비하고 최종선정 시료를 각 group당 각각 0.0003, 0.0006, 0.0012, 및 0.0024%의 농도로 일반사료에 섞어서 제공한다. ICR-male mice는 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12 hr-photoperiod chamber에서 사육한다. 신경독성 물질인 TMT를 injection (2.5 mg/kg body weight of mice, single dose) 한 후 *in vivo* 활성을 시험한다.

(2) Y-maze test

위의 조건처럼 ICR-male mice에 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로는 TMT를 복강투여하고 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시한다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록했다. Mouse를 arm에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다. TMT의 투여가 mice의 운동능력에는 영향을 미치지 않았지만(Fig. 1-18B), 인지능에서 유의적인 감소를 나타냈다. 반면, 본 연구에서 활성물질로 밝혀진 methoxsalen을 식이한 실험군에서는 인지능이 유의적으로 향상되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1-18A).

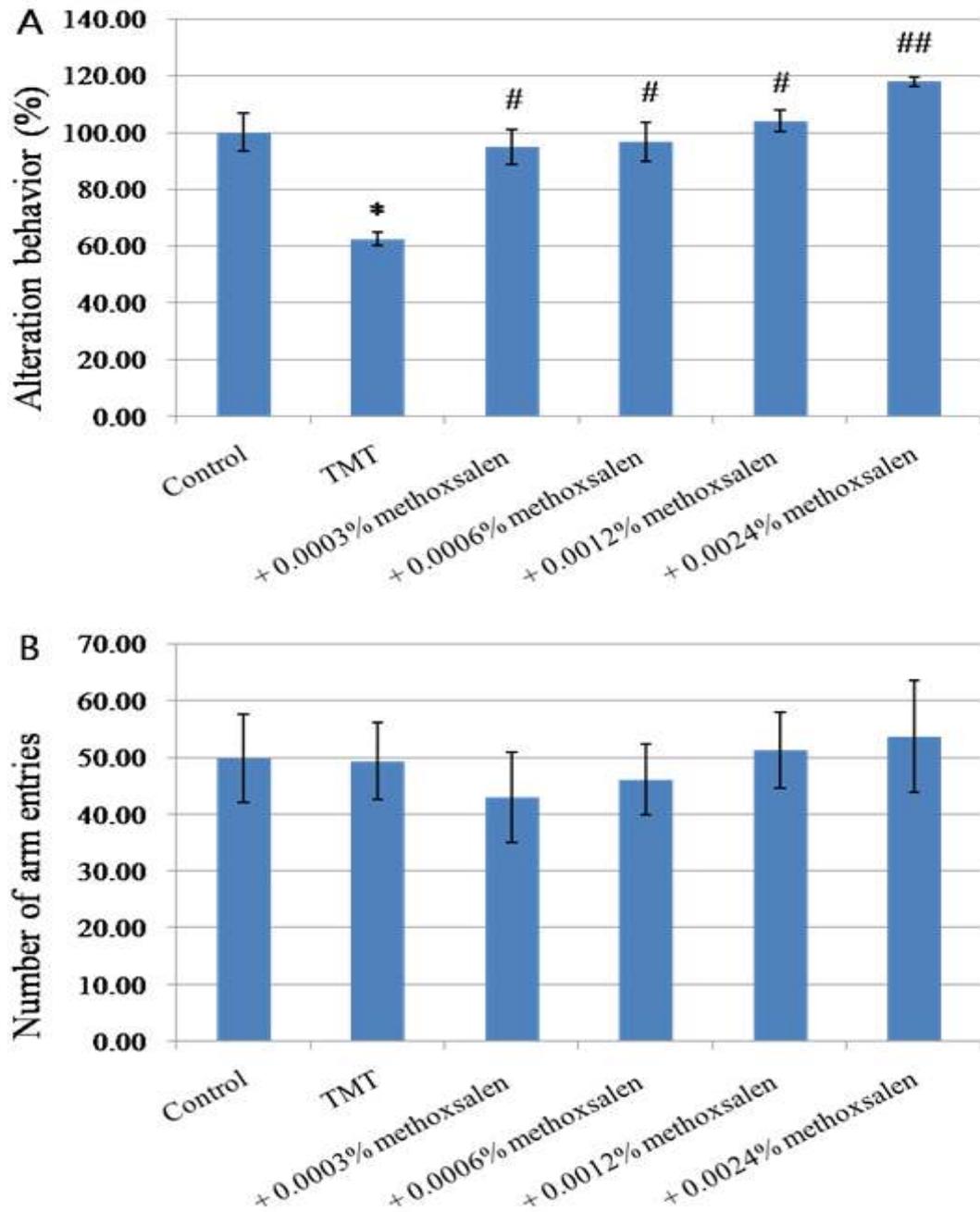


Fig. 1–18. Protective effect of methoxsalen against spontaneous alteration behavior in TMT-induced amnesic mice.

The Y-maze test was performed 2 days after the TMT injection (0.0025 mg/g body weight). Spontaneous alteration behavior (A) and the number of arm entries (B) were measured over 8 min. Data represent the means (n=9) ± S.D. Control animals were injected with saline (0.85%, w/v, 100 µl). TMT group was injected with a single dose of TMT (0.0025 mg/g body weight of mice). Duncan's multiple range test of SAS indicates a significant difference (*p < 0.01 vs. control group, #p < 0.01 vs. TMT group).

(3) Passive avoidance test

Y-maze test와 같은 조건으로 ICR-male mice에 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로는 TMT를 복강투여하여 기억력 실험을 실시한다.

TMT group은 TMT를 주사하지 않은 control group에 비해서 유의적으로 저하된 기억학습 능력을 나타내었고, methoxsalen를 식이한 group들에서는 control group의 학습능력 활성과 비교할 때 거의 같거나 상회하는 인지능력의 회복을 확인하였다. Y-maze test에서와 마찬가지로 활성물질로 규명된 methoxsalen이 TMT로 유발된 기억학습능력 저해를 효과적으로 보호/회복 시켜준 것을 알 수 있다(Fig. 1-19).

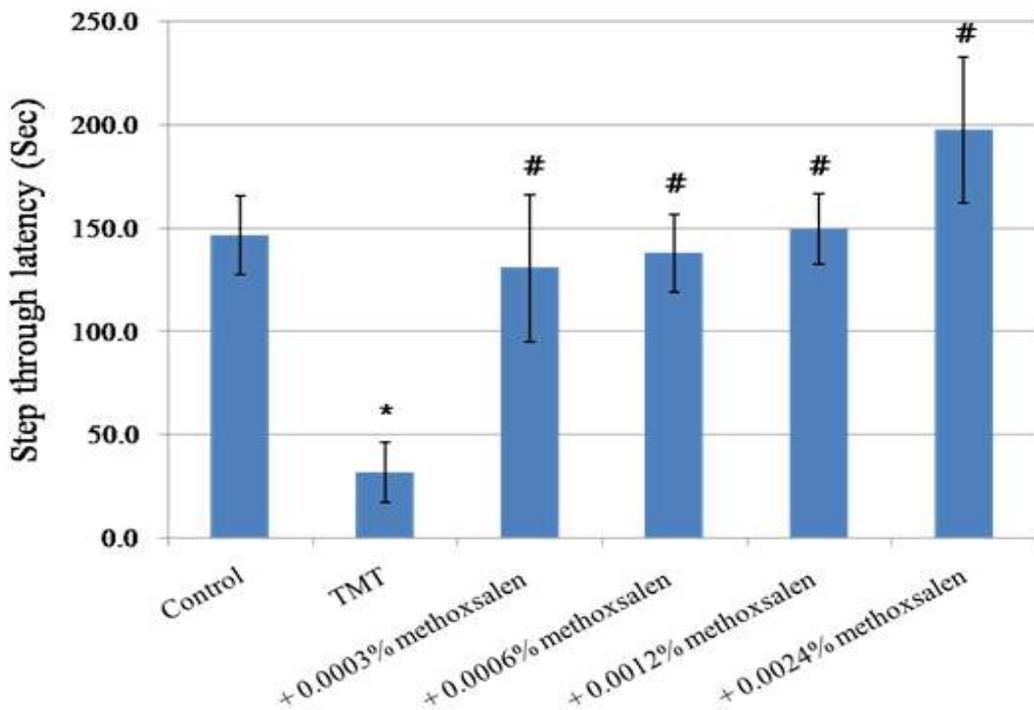


Fig. 1-19. Protective effects of methoxsalen against TMT-induced step through latency impairments of ICR mice.

The passive avoidance test was performed 2 days after the TMT injection (0.0025 mg/g body weight of mice). Control animals were injected with saline (0.85%, w/v, 100 μ l). TMT group was injected with a single dose of TMT (0.0025 mg/g body weight). Data represent the mean latency (n=9) \pm S.D. Duncan's multiple range test of SAS indicates a significant difference (*p < 0.01 vs. control group, #p < 0.01 vs. TMT group).

(4) 적출된 뇌 조직을 이용한 AChE activity 측정 및 지질과산화도 측정

행동실험 완료 후, mice의 뇌조직을 적출하여 균질화 하고 AChE 활성도 및 지질과산화도를 측정하였다. TMT는 AChE의 활성도를 높여 신경전달물질의 분해를 유발하며 산화적인 스트레스로 신경세포의 괴사 및 사멸을 초래하므로 본 연구에서 밝혀진 활성물질인, methoxsalen이 실제 쥐의 뇌조직에서 어떠한 영향을 미치는지 확인해보았다. 그 결과, AChE activity와 뇌조직의 지질과산화도 모두 methoxsalen의 식이가 TMT로 인한 손상에 유의적인 보호효과를 나타내었다. (Table 1-2, Fig. 1-20).

Table 1-2. Inhibitory effects of methoxsalen against AChE in the brains of ICR mice.

Experimental treatment	AChE inhibition (%)
Control ^a	100.00 ± 2.70
TMT ^b	72.70 ± 1.87*
TMT + <i>Methoxsalen</i>	
+ 0.0003% <i>methoxsalen</i>	87.68 ± 0.81 [#]
+ 0.0006% <i>methoxsalen</i>	84.67 ± 3.11 [#]
+ 0.0012% <i>methoxsalen</i>	86.91 ± 2.46 [#]
+ 0.0024% <i>methoxsalen</i>	86.54 ± 0.67 [#]

Brain tissues were dissected from the mice immediately after behavior tests to evaluate the activity of AChE. Data represent the mean latency (n=9) ± S.D. Control^a = Saline injected (0.85%, w/v, 100 µl). TMT^b = TMT injected only (0.0025 mg/g body weight of mice). Duncan's multiple range test of SAS indicates a significant difference (*p < 0.01 vs. control group, [#]p < 0.01 vs. TMT group).

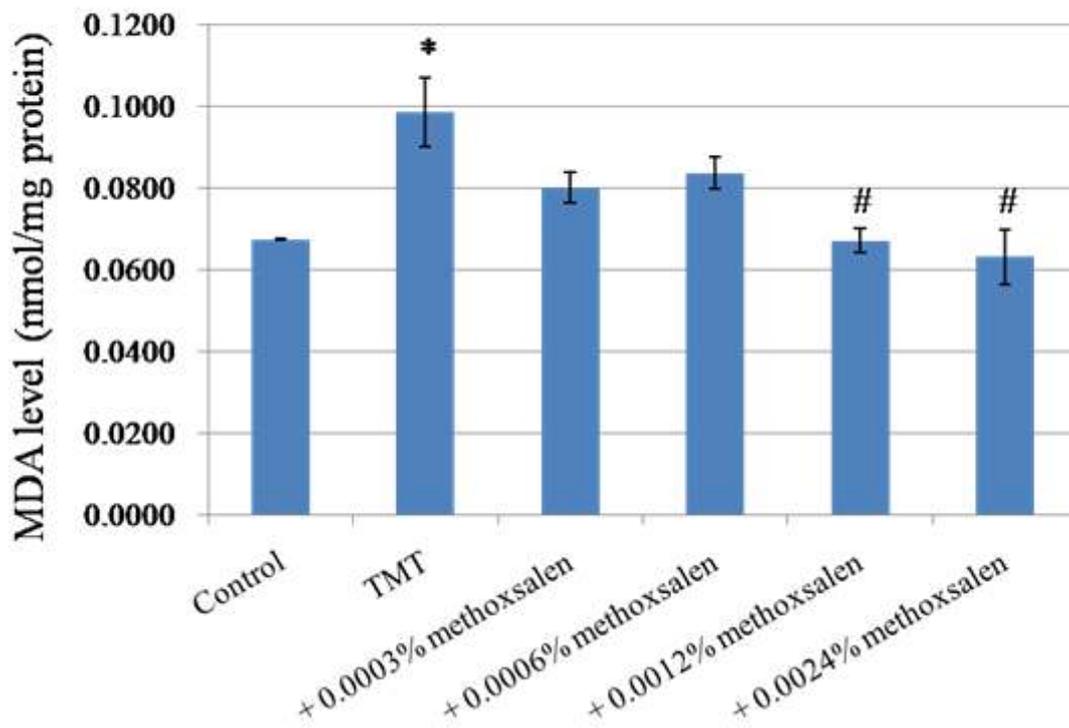


Fig. 1–20. Inhibitory effect of methoxsalen against TMT–induced lipid peroxidation in the brains of ICR mice.

Control animals were injected with saline (0.85%, w/v, 100 μ l). TMT group was injected with a single dose of TMT (0.0025 mg/g body weight of mice). Brain tissues were dissected from the mice immediately after behavior tests to assess the level of MDA. Levels of MDA were evaluated spectrophotometrically using 1,1,3,3–tetramethoxypropane as a standard. Data represent the means ($n = 9$) \pm S.D. Duncan’s multiple range test of SAS indicates a significant difference (* $p < 0.01$ vs. control group, # $p < 0.01$ vs. TMT group).

(5) 활성물질의 acute toxicity 측정을 위한 간독성 실험

활성물질로 확인된 methoxsalen의 농도에 관계없이 각 group의 모든 mice의 생존율이 100%였고, serum의 AST, ALT 변화도 SAS analysis 결과 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Figs. 1-21, 22).

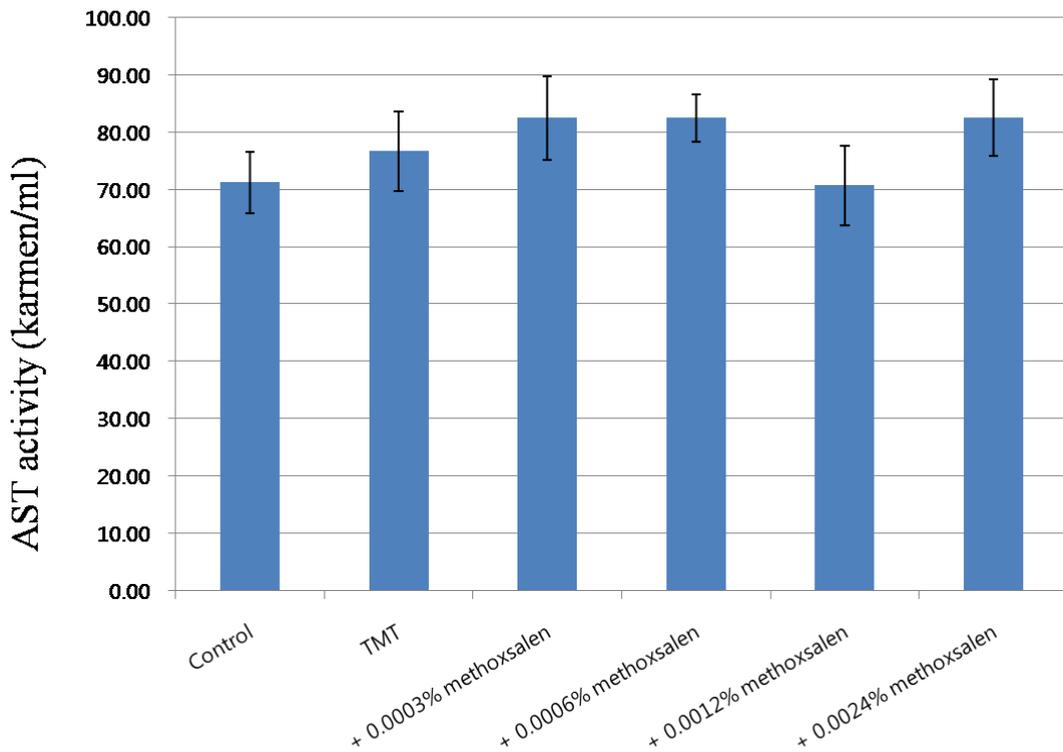


Fig. 1-21. AST activity in the serum of methoxsalen mixed diet mice.

Control animals were injected with saline (0.85%, w/v, 100 μ l). TMT group was injected with a single dose of TMT (0.0025 mg/g body weight of mice). Blood serum was collected from the mice immediately after behavior tests to assess the activity of AST. Data represent the means (n = 6) \pm S.D. The statistical significance of differences among groups was calculated by one-way ANOVA. (*p < 0.01 vs. control group, #p < 0.01 vs. TMT group).

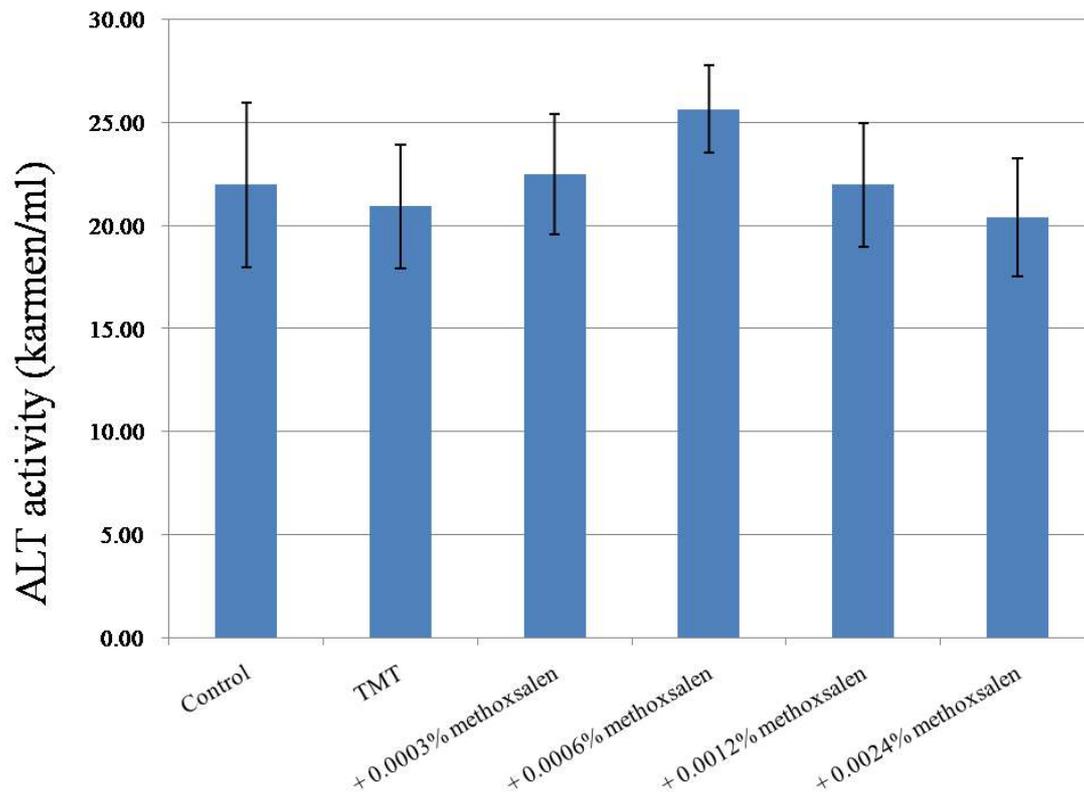


Fig. 1–22. ALT activity in the serum of methoxsalen mixed diet mice.

Control animals were injected with saline (0.85%, w/v, 100 μ l). TMT group was injected with a single dose of TMT (0.0025 mg/g body weight of mice). Blood serum was collected from the mice immediately after behavior tests to assess the activity of ALT. Data represent the means ($n = 6$) \pm S.D. The statistical significance of differences among groups was calculated by one-way ANOVA. (* $p < 0.01$ vs. control group, # $p < 0.01$ vs. TMT group).

사. 신경전달물질 분해효소 억제물질의 공업적 실용화

(1) 대량 추출 및 대량정제법 확립

활성 물질의 공업적 실용화를 위해 추출 조건과 가공조건 시험을 해보았으며, 대량생산에 별다른 문제가 발견되지 않았다(Figs. 1-23, 24, 25).

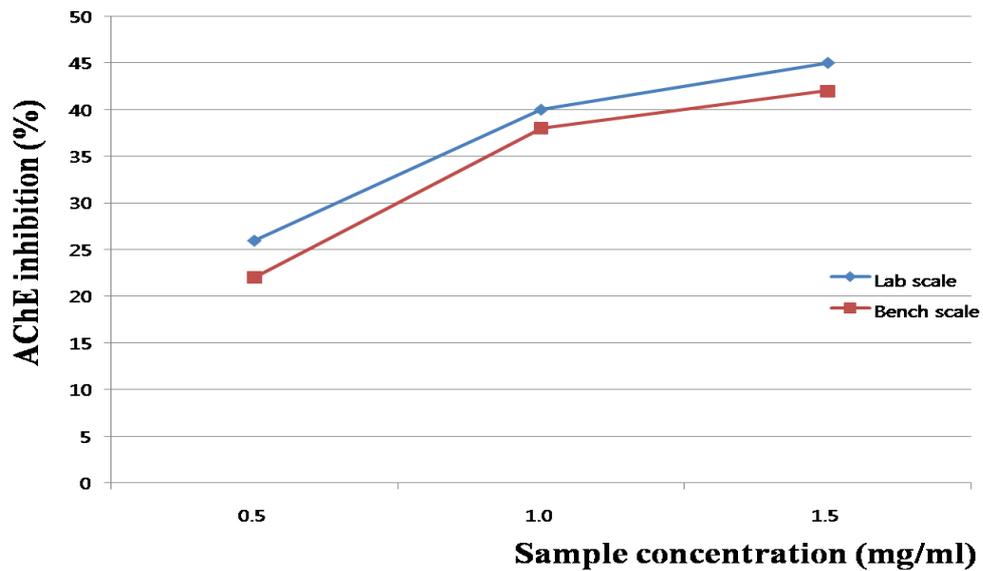


Fig. 1-23. Inhibitory effect of *Poncirus trifoliata* extract against AChE.

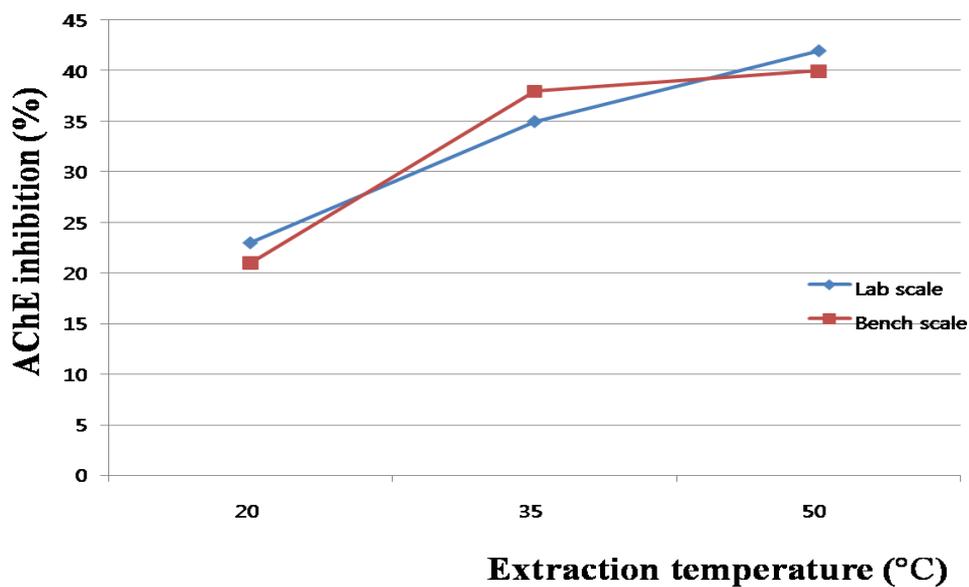


Fig. 1-24. Effect of extraction temperature of *Poncirus trifoliata* on AChE activity. Sample concentration was 1 mg/ml.

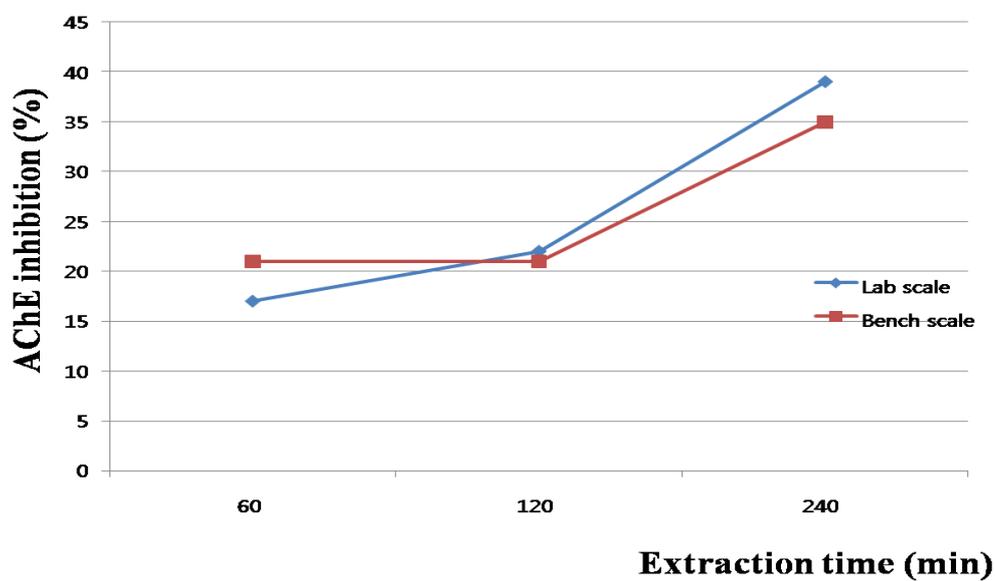


Fig. 1-25. Effect of extraction time of *Poncirus trifoliata* on AChE activity. Sample concentration was 1 mg/ml.

(2) 추출물의 공업적 식품화 시험

- 드링크제 및 농축액 제작 시험



배합 예

용량: 25 mL
제품유형: 내용액제제

성분: 분말소재 100 mg
백당 8.8%
포도당 5.8%
식염 0.05%
호박산이나트륨 0.05%
구연산 0.08%
안식향산나트륨 0.01%
에탄올 0.001%
니코틴산아미드 0.01%

- 연질 캡슐제작 시험

배합 예

단위: 1 Capule
제품유형: 건강기능식품(연질캡셀)

성분: Extract 소재 100 mg
소맥배아유 30%
대두박 추출물 3%
D- α -토코페롤 1%
베타카로틴 3%
레시틴 1%
계피분, 생강추출물 기타

권장섭취량 및 섭취방법: 1일 3회, 1회 1-2
캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 필요에 따라
증감 가능



- 과립제제 제작 시험

배합 예

단위: 1포 (5 g)

제품유형: 건강기능식품(과립제제)

성분: 분말소재 300 mg
옥수수 전분(부형제) 3.5 g
유당(부형제) 0.65 g
백당(감미제) 0.5 g
구연산(산미제) 5 mg
인삼추출물 2 mg

권장섭취량 및 섭취방법: 1일 3회, 1회 1-2 포씩 식전 또는 식후에 섭취 필요에 따라 증감 가능



(3) 제품의 외관 및 안정성 검사

상기 제품들은 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속하므로 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가혹실험 (고온, 고압)을 실시하여 제품의 외관과 미생물 검사를 실시하였다(Tables 1-3, 4).

Table 1-3. 제품의 미생물검사

- 연질 캡슐 제제의 저장 조건: 37°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
탱자	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 드링크제제의 저장조건: 37°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
탱자	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 과립 제품 저장 조건: 37°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
탱자	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 연질 캡슐제제 저장 조건: 50°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
탱자	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 드링크제제의 저장조건: 50°C, 1주일

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
탱자	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 과립 제품 저장 조건: 50°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
탱자	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

Table 1-4. 제품의 외관검사

-연질 캡슐제제의 저장조건: 37°C, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
탱자	없음	없음	없음	없음

-드링크제제의 저장 조건: 37°C, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
탱자	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 37°C, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
탱자	없음	없음	없음	없음

-연질 캡슐제제의 저장 조건: 50°C, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
탱자	없음	없음	없음	없음

-드링크제제의 저장 조건: 50°C, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
탱자	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 50°C, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
탱자	없음	없음	없음	없음

제 2절 뇌신경세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 건강기능 식품화

1. 서설

고유의 식용식물 자원으로부터 A β 유발 뇌신경 독성 저해 미량소재를 검색하고 이를 소재화 시키고자 한다. A β 는 40-42개의 아미노산이 모여 형성되는 peptide 물질이고 그 구성 단백질이 1987년에 이르러서 규명 되었다. 또한, A β 를 이루는 유전자는 염색체 21번에 존재하며, A β 의 전구단백질 (APP)로부터 β -secretase와 γ -secretase라고 불리는 단백질 분해효소에 의해 생성된다(Fig. 2-1). AD에서 중요한 pathogenetic material로 생각되어지고 있다. AD에서의 뇌신경세포 괴사의 원인은 아직 명확하게 밝혀지진 않았지만 oxygen free radical의 생성, ROS와 같은 oxidative injury가 뇌신경세포 파괴 및 pathogenesis와 관련되어 있을 것으로 추정된다. AD 환자의 brain에서 이들 oxidative stress (ROS, lipid peroxidation, protein modification, mitochondrial DNA oxidation)의 증가는 증명되고 있으며 이러한 생리적 대사 이상은 amyloid plaques와 NFT와 같은 AD brain 고유의 임상적 결과를 초래한다. 또한 A β 는 intracellular free radical status를 유발시키고 궁극적으로 cell death를 유도하여 A β 와 뇌신경세포 파괴는 상관성이 있는 것으로 보인다. A β 에 의한 ROS, free radical 등의 생성은 A β -induced free radical-mediated neurotoxicity의 추정을 가능하게 하기 때문에 이들에 대한 연구는 매우 중요하다. ¹⁷⁻²²⁾

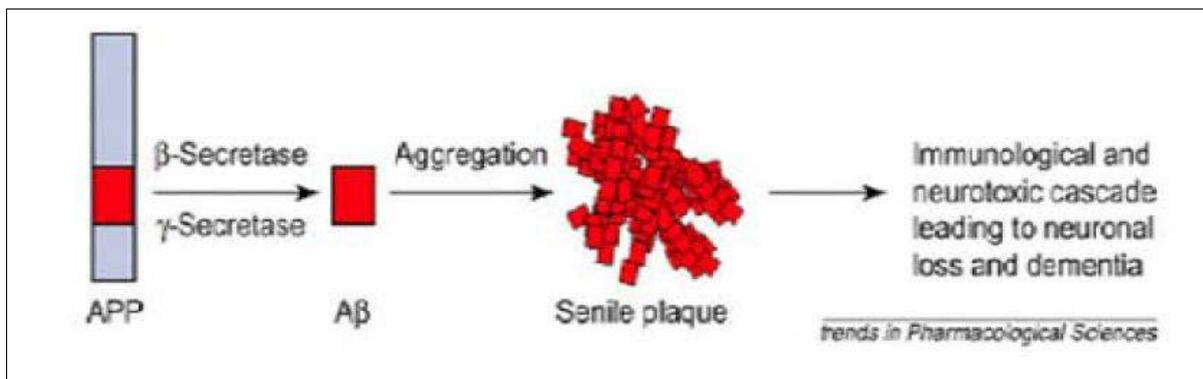


Fig. 2-1. 노인성 치매의 원인물질인 A β peptide의 형성과 응집과정

본 연구에서 선정된 석류[石榴, *Punica granatum*]는 지름 6~8 cm에 둥근 모양을 하고 있으며, 단단하고 노르스름한 껍질이 감싸고 있고 과육 속에는 많은 종자가 있다. 먹을 수 있는 부분이 약 20%인데, 과육은 새콤달콤한 맛이 나고 껍질은 약으로 쓴다. 종류는 단맛이 강한 감과와 신맛이 강한 산과로 나뉜다. 원산지는 서아시아와 인도 서북부 지역이며 한국에는 고려

초기에 중국에서 들어온 것으로 추정된다. 현재 중부와 남부지방에서 정원수와 과수로 재배한다. 주요 성분은 당질 (포도당·과당)이 약 40%를 차지하며 유기산으로는 새콤한 맛을 내는 시트르산이 약 1.5% 들어 있다. 수용성 비타민(B1·B2·나이아신)도 들어 있으나 양은 적다. 껍질에는 타닌, 종자에는 갱년기 장애에 좋은 천연식물성 에스트로겐이 들어 있다. 열매와 껍질 모두 고혈압·동맥경화 예방에 좋으며, 부인병·부스럼에 효과가 있다. 특히 이질이 걸렸을 때 약효가 뛰어나고, 휘발성 알칼로이드가 들어 있어 기생충, 특히 촌충 구제약으로 쓴다. 과즙은 빛깔이 고와 과일주를 담그거나 농축과즙을 만들어 음료나 과자를 만드는 데 쓴다. 올리브유와 섞어 변비에 좋은 오일을 만들기도 한다.

본 연구에서는 고유의 식용 식물자원으로부터 A β 유발 뇌신경 독성 저해 미량소재를 검색하였고 검색결과 가장 높은 신경독성 저해율을 보인 석류(*Punica granatum*)를 선정하여 ethanol 추출을 한 뒤, 저해물질을 분리·정제하여 활성물질의 뇌신경 독성 저해 효과와 인지력 향상 효과를 확인했다. 또한 분리한 활성물질의 구조적 특징과 안정성을 조사하여 산업적 제품화 방안을 제시하였다.

2. 재료 및 실험 방법

가. 재료

본 연구에서 사용한 식용식물 자원들은 모두 서울 경동시장에서 직접 구입하였다. 실험에 사용된 A β ₂₅₋₃₅, A β ₁₋₄₂, hydrogen peroxide (H₂O₂), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), trypan blue, ascorbic acid 는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, A β ₄₂₋₁ 는 BACHEM (Bubendorf, Switzerland), Silica-gel and TLC plate 는 Merck Co. (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. C₁₈-Bondapak column은 Waters Co. (Milford, MA, USA)에서 구입하였다. 또한 인지능력 향상 실험을 위한 ICR mouse는 대한 바이오링크에서 분양받아 사용하였다. 그 밖에 분석에 사용한 시약은 모두 특급 수준의 시약을 사용하였다.

PC12 cell line (rat pheochromocytoma cell)는 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1721)에서 분양받아 사용하였다. Cell culture에 사용된 RPMI 1640 medium, horse serum donor herd, fetal bovine serum and antibiotic-antimycotics는 Gibco-BRLTM (Gaithersburg, MD, USA), sodium bicarbonate는 Sigma Co, filter membrane (pore size 0.22 μ m)는 Millipore Co. (Bedford, MA, USA)에서 구입하였다.

나. 실험방법

(1) *In vitro* assay계의 확립 및 후보식용식물의 1차 선정

(가) 세포배양

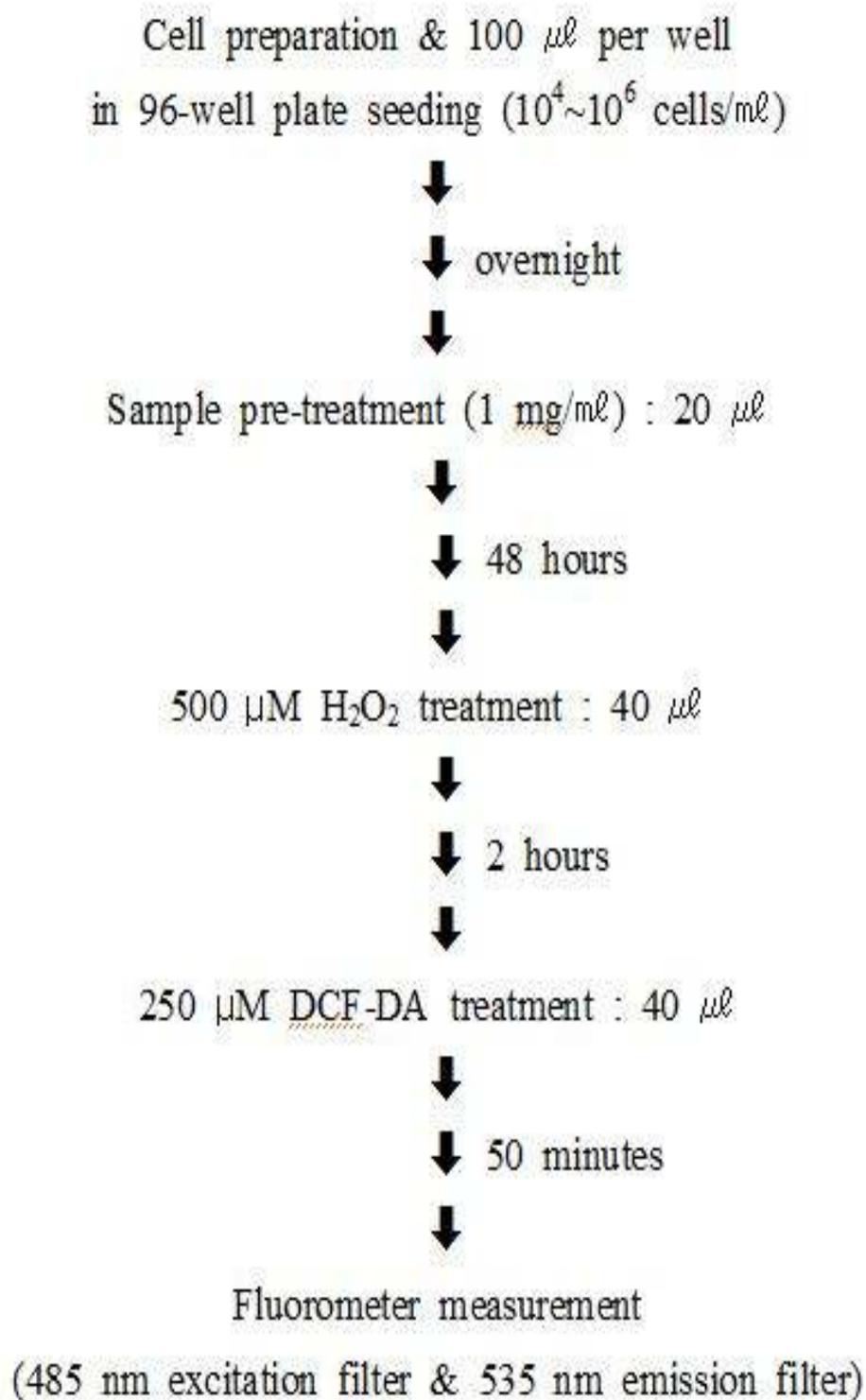
ATCC에서 구입한 PC12 cell은 rat의 adrenal gland에서 유래하는 pheochromocytoma cell로서 RPMI-1640 배지에서 배양한다. RPMI-1640 배지는 10%의 horse serum과 5%의 fetal bovine serum (FBS), 그리고 1%의 antibiotics/antimycotics의 조성을 맞춰 사용하고, cell은 37°C의 온도와 5%의 CO₂ 농도 조건 하에서 배양한다. 일주일에 두 번에서 세 번 배지를 갈아주고, cell이 dish에 가득 찰 경우 subculture를 하여 배양한다.

(나) 1차 검색용 시료 추출조건과 방법

시료의 선정을 위해 몇 가지 식용식물자원을 선정하여 추출을 한다. 추출방법은 식용식물자원의 5배수에 해당하는 에탄올, 메탄올, 클로로포름, 헥산, 에틸아세테이트, 및 냉수를 넣고 하루 동안 shaking하고. 하루가 지난 후 추출된 용매를 회수한다. 다시 5배수에 해당하는 에탄올을 넣고, 이 과정을 5회 반복한다. 열수를 이용한 추출의 경우 시료의 10배수에 해당하는 증류수를 넣고 30분 boiling 후 30분 방냉하고 다시 30분 boiling 후 방랭한 후 상등액을 감압 농축하여 사용한다.

(다) DCF-DA assay

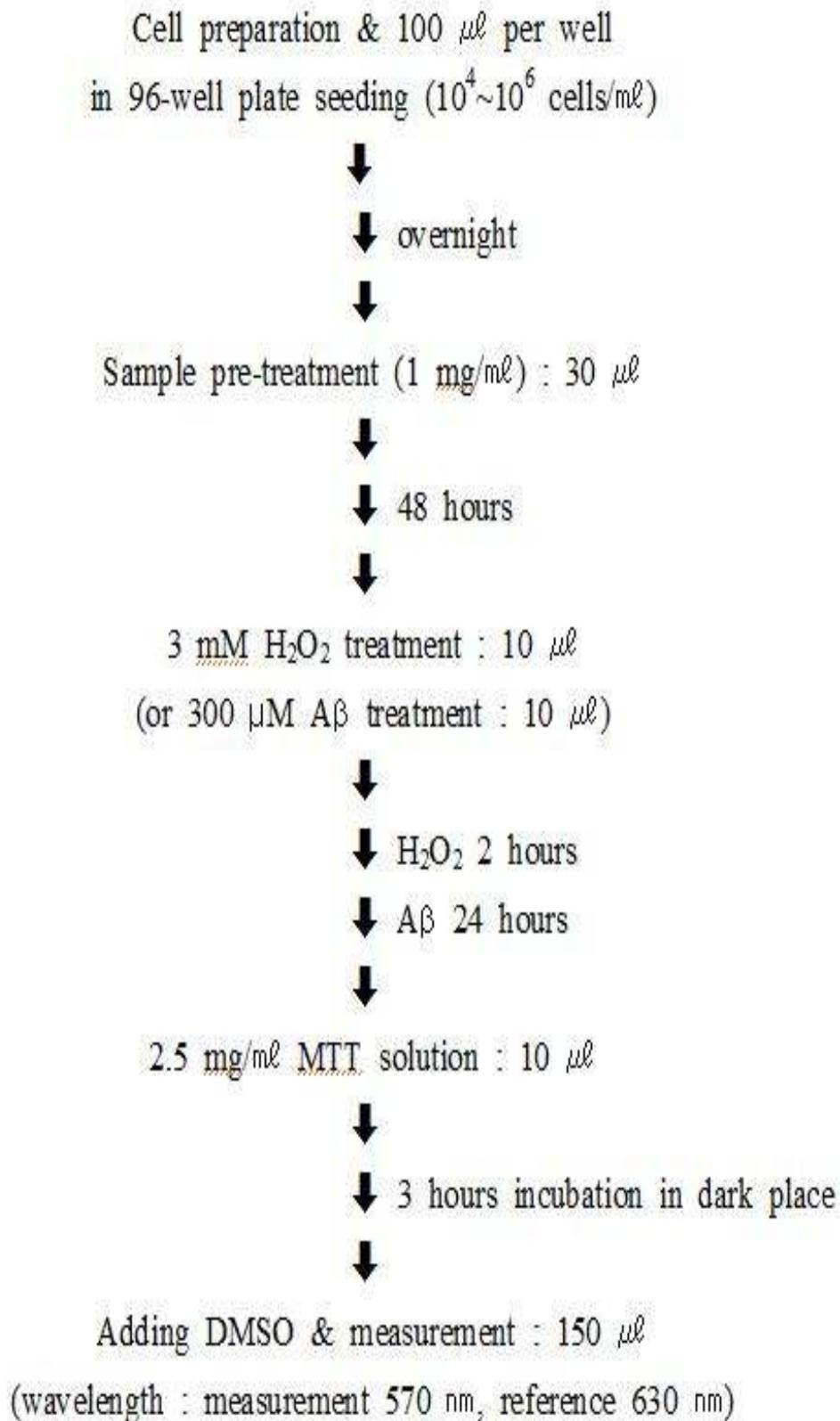
PC12 cell을 이용하여 cell 수가 10^4 - 10^6 cells/ml일 때 96 well에 100 μ l 씩 seeding 한 후 overnight 후에 식용식물자원 추출물을 distilled water (DW)로 녹여 1 mg/ml로 20 μ l씩 전처리한다. 이를 (48시간) 후 세포에 상해를 줄 수 있는 H₂O₂, (최종 농도: 100 μ M)를 처리하고 2시간 후 DCF-DA용액을 제조하여 cell에 처리해주어 어두운 조건 하에 incubator에서 50분 배양하고 spectrofluorometer (과장: excitation 485 nm, emission 535 nm)를 이용하여 측정한다. A β 또는 H₂O₂의 독성을 견뎌낸 cell이 있다면 DCF-DA는 세포 내로 들어가게 되고 세포 내부의 superoxide와 반응하여 diacetate (DA)가 떨어져 나가면서 형광을 나타내게 된다. DCF-DA assay는 이 형광의 정도로 cell cytotoxicity를 측정한다(Scheme 2-1).



Scheme 2-1. DCF-DA assay.

(라) MTT reduction assay

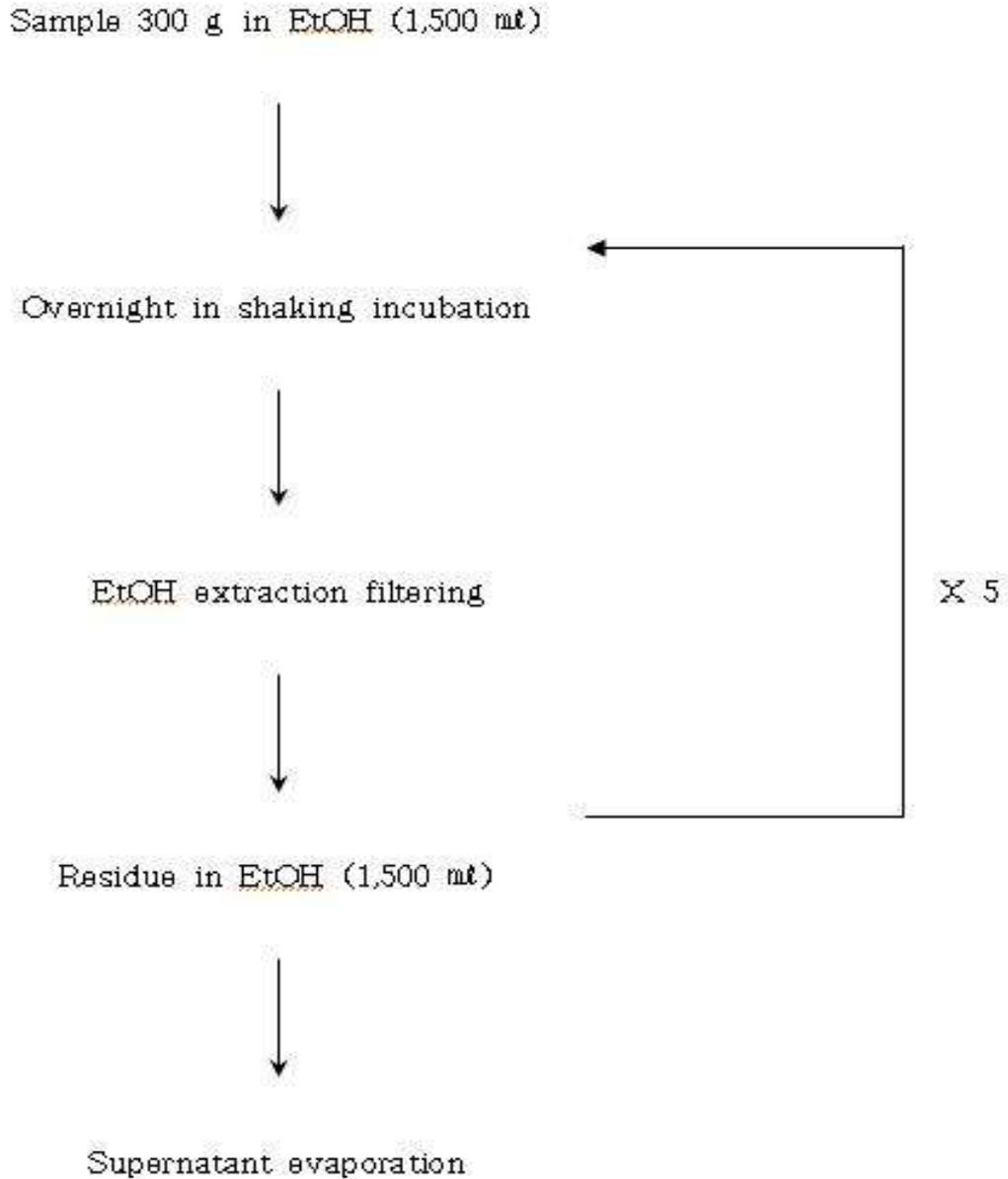
PC12 cell을 이용하여 cell 수가 10^4-10^6 일 때 96 well에 100 μ l 씩 seeding 한 후 overnight 후에 식용식물자원 추출물을 증류수로 녹여 1 mg/ml로 30 μ l씩 전처리한다. 이틀 (48시간) 후 세포에 상해를 줄 수 있는 A β peptide 또는 H₂O₂를 처리하고 2시간 후 (A β 는 24시간) MTT 용액을 2.5 mg/ml로 제조하여 cell에 처리해주어 어두운 조건하에 incubator에서 3시간 배양한 후에 DMSO를 처리한 후 microplate reader (파장: measurement 570 nm, reference 630 nm) 를 이용하여 흡광도를 측정한다. 살아있는 cell들은 호흡을 통하여 NADH를 생성하게 되고 이 NADH는 MTT와 반응하여 보라색의 formazan crystal을 형성한다. MTT reduction assay는 이 보라색의 formazan crystal의 흡광도를 측정한다(Scheme 2-2).



Scheme 2-2. MTT reduction assay.

(마) 선정된 식용식물자원 대량추출 및 시료조제

선정된 시료를 경동시장에서 3 kg 구입하여 마쇄한 후, 5배수에 해당하는 15 L의 에탄올 을 넣고 24시간 shaking 한다. 24시간이 지나면 추출된 용매를 filtering하여 추출한 용매는 수거 하고 나머지 시료에 다시 15 L의 용매를 넣어 shaking 한다. 이 과정을 총 5회 반복하고, 추 출된 용매는 rotary evaporator를 이용하여 잔류 용매가 없도록 농축한다(Scheme 2-3).

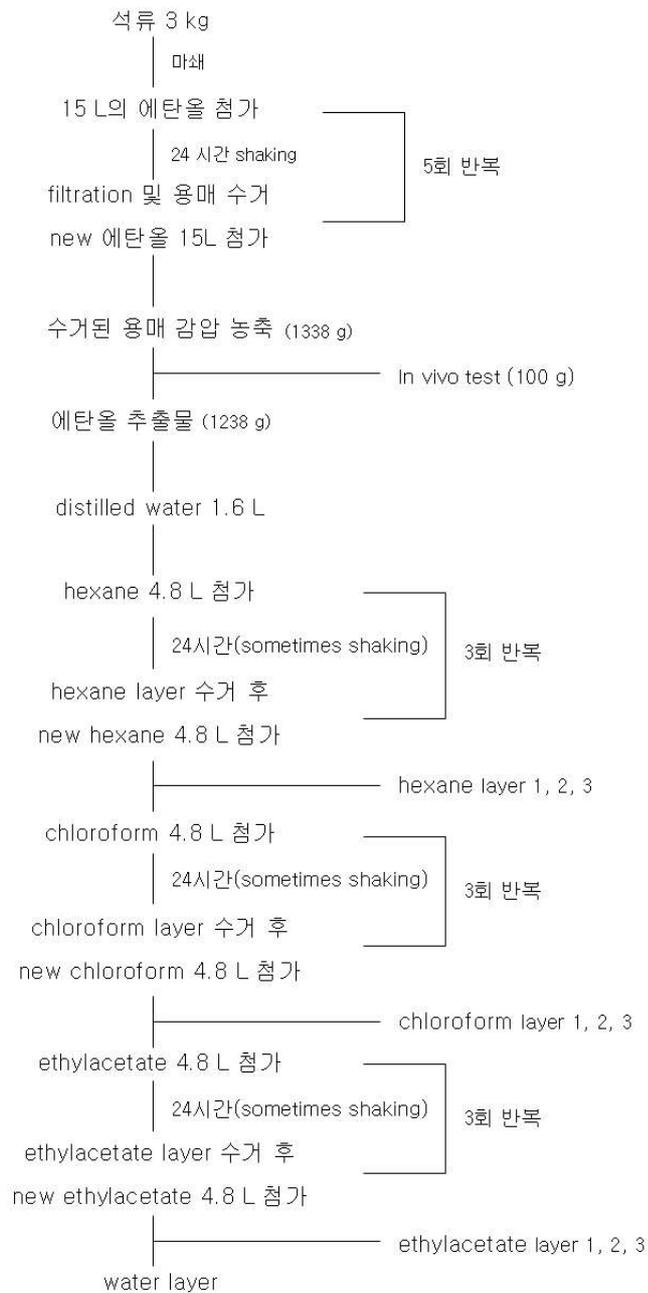


Scheme 2-3. Preparation of extracts from *Punica granatum*.

(2) 활성 phytochemicals의 분리 및 정제

(가) Solvent partition

선정된 시료를 funnel을 이용하여 solvent partition을 실시한다(Scheme 2-4). 최대한 건조시킨 추출물에 적당량의 증류수를 이용하여 녹인 후 사용된 물의 양의 3배에 해당하는 용매를 hexane (C₆H₁₄), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtAOc)의 순서대로 3회씩 실시하고 나누어진 분획을 각각 일정량 취하여 농축시킨 후 *in vitro* assay를 실시한다.



Scheme 2-4. Solvent partitioning of *Punica granatum*

(나) Open column chromatography

Solvent partition 후, 뇌신경세포 독성 보호 효과가 높게 나온 fraction을 대상으로 open silica gel column chromatography를 시행하여 33개의 소분획 ($\text{CHCl}_3 : \text{EtOH} = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100$)으로 분획 한다. 각각 분리된 분획 (총 33개의 분획)을 일정량(1 mg/ml) 취하여 DCF-DA 및 MTT reduction assay를 시행하고, 그 중 가장 높은 세포 보호효과를 보이는 분획을 선정한다. 1차적으로 높은 세포 보호효과를 보이는 fraction을 대상으로 2차 DCF-DA 및 MTT reduction assay를 수행한다.

(다) Preparative thin layer chromatography (PLC)

Open column chromatography를 통해 얻은 시료의 활성을 확인한 후, 선정된 획분을 preparative silica-gel plate를 사용하여 PLC를 실시한다. 선정된 획분을 감압 농축하여 얻은 1 g의 시료를 1 ml의 EtOH에 녹인 후, 0.5 μl 씩 5회 spotting하여 건조시킨다. Chloroform과 ethanol (80:20, v/v)으로 전개시킨 후 band를 분리한다. 분리된 밴드를 대상으로 DCF-DA 및 MTT reduction assay를 수행한다.

(라) High performance liquid chromatography (HPLC)

PLC로부터 분리한 밴드의 활성을 확인 한 후 μ -BondapakTM C₁₈ column을 이용한 HPLC를 통하여 활성 물질을 분리 한다. 0-100%의 ethanol과 물의 직선농도 구배로 변화를 주어 90분 간 실행한다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는 분당 0.5 ml로 하였으며 한번에 10 μl 씩 시료 주입을 한다. 사용 용매는 특급 ethanol과 3차 증류수를 사용한다(Table 2-1).

Table. 2-1. Conditions of the analytical HPLC.

Instrument	Waters 2690
Detector	Waters 996 (PDA: photodiode array detector)
Column	μ - Bondapak C ₁₈ (reverse phase, 3.9 \times 300 mm)
Flow rate	0.5 ml/min
Mobile phase	0 %~100 % ethanol (gradient elution)
Injection volume	10 ml

(3) 정제된 시료로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 구조분석

(가) NMR을 통한 구조 분석

정제된 물질을 HPLC를 이용하여 활성물질을 확인하고 유의적인 peak를 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 를 이용하여 각각 측정한다.

(나) Electronic ionization mass (EI-MS)를 통한 분자량 측정

Punica granatum extract로부터 정제된 물질을 EI-MS를 이용하여 그 구조와 mass size를 측정한다.

(4) 뇌신경세포 손상 저해활성 측정을 위한 *in vivo* assay계 확립 과 선정 시료의 활성 및 독성검사

(가) *In vivo* assay계 확립

In vivo behavioral test를 위해 ICR-male mouse를 대한 바이오링크로부터 구입하고 최종선정 시료의 추출물을 control과 negative control을 제외한 각 group을 농도별로 나눈다. ICR-male mouse는 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photoperiod chamber에서 사육한다.

(나) *Punica granatum* extract의 *in vivo* 독성실험

시료의 식이 전·후의 body weight 및 brain weight을 측정하여 시료가 미치는 영향을 살펴 보고, 생존률을 살펴봄으로써 독성의 유·무를 살펴한다. serum의 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) 변화도 측정함으로써 안정성 및 독성을 평가한다.

(다) Y-maze test

ICR-male mice는 sample을 섞은 사료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로 A β 를 ICV (intracerebroventricular) injection하여 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시한다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록한다. Mouse를 maze에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간

것을 측정하여 그 수치를 계산한다.

(라) Passive avoidance test

위의 조건처럼 ICR-male mice는 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질로는 A β 를 각각 test 전에 ICV injection 하여 기억력 실험을 실시한다. 이 실험은 실제 실험에 들어가기 전날에 기억상자와 같은 장소에서 training을 시킨 다음 행동실험을 실시한다. 모든 mice를 실험 전날 실험 상자에서 적응 훈련 (명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험한다.

3. 결과

가. *In vitro* assay계의 확립 및 후보식용식물의 선정

(1) 1차 선정 결과

MTT reduction assay의 결과에서 과산화수소를 처리한 그룹의 수치를 100%로 하고 세포의 viability를 토대로 시료의 보호효과를 측정하였다. 수치가 100% 보다 높은 시료가 PC12 cell을 oxidative stress로부터 보호해 준다는 것을 알 수 있다. 시료 중 석류 EtOH 추출물이 가장 높은 보호 활성을 보였다(Table 2-2). MTT reduction 결과를 토대로 높은 보호효과를 갖은 시료들의 oxidative stress에 대한 보호효과를 시험하였다(Table 2-3).

Table 2-2. MTT reduction assay에 의한 cell viability 측정.

Common name	Scientific name	추출용매	보호 효과 (%)
계피	<i>Cinnamomum loureirii</i>	methanol	132.5
계피	<i>Cinnamomum loureirii</i>	chloroform	58.6
계피	<i>Cinnamomum loureirii</i>	hexane	31.4
계피	<i>Cinnamomum loureirii</i>	hot water	115.8
계피	<i>Cinnamomum loureirii</i>	cold water	95.7
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>	methanol	95.6
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>	chloroform	107.0
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>	hexane	88.2
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i>	ethyl acetate	95.0
감로차	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunb.) Ser.	hot water	103.3
고추	<i>Capsicum annuum</i> L.	methanol	101.2
깻잎	<i>Sesamum indicum</i>	methanol	110.5
냉이	<i>Capsella burapastoris</i> (L.) L.W.Medicus	methanol	122.9
달래	<i>Allium monanthum</i> Maxim.	methanol	85.2
당귀	<i>Angelica grosseserrata</i> Maxim.	methanol	31.1
당귀	<i>Angelica grosseserrata</i> Maxim.	chloroform	29.1
당귀	<i>Angelica grosseserrata</i> Maxim.	hexane	29.5
당귀	<i>Angelica grosseserrata</i> Maxim.	cold water	95.6

Common name	Scientific name	추출용매	보호 효과 (%)
대파	<i>Allium fistulosum</i> L.	methanol	78.7
돈나물	<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge	methanol	90.9
들깨	<i>Perilla frutescens</i> Britton var.	methanol	83.3
마늘	<i>Allium sativum</i>	methanol	91.4
모과	<i>Chaomeles sinensis</i> KOE BHNE	ethanol	114.2
모과	<i>Chaomeles sinensis</i> KOE BHNE	methanol	103.3
모과	<i>Chaomeles sinensis</i> KOE BHNE	chloroform	103.8
모과	<i>Chaomeles sinensis</i> KOE BHNE	hexane	85.7
모과	<i>Chaomeles sinensis</i> KOE BHNE	ethyl acetate	102.6
미나리	<i>Oenanthe javanica</i> (BLUME) Dc.	methanol	108.6
미나리	<i>Oenanthe javanica</i> (BLUME) Dc.	ethyl acetate	104.3
부자	<i>Aconitum carmichaelli</i> Debeaux.	ethanol	91.8
부자	<i>Aconitum carmichaelli</i> Debeaux.	methanol	96.9
부자	<i>Aconitum carmichaelli</i> Debeaux.	chloroform	95.9
부자	<i>Aconitum carmichaelli</i> Debeaux.	ethylacetate	96.7
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	ethanol	109.6
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	methanol	102.8

Common name	Scientific name	추출용매	보호 효과 (%)
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	chloroform	90.1
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	hexane	93.1
산약	<i>Dioscorea opposita</i>	ethanol	90.0
산약	<i>Dioscorea opposita</i>	methanol	68.5
산약	<i>Dioscorea opposita</i>	chloroform	76.6
산약	<i>Dioscorea opposita</i>	ethyl acetate	85.7
생강	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	methanol	43.8
석류	<i>Punica granatum</i> L.	ethanol	137.8
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	ethanol	114.0
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	methanol	87.1
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	chloroform	89.4
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	hexane	96.1
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	ethyl acetate	107.7
양파	<i>Allium cepa</i>	methanol	98.7
얼레지	<i>Erythronium japonicum</i> Descaisne	methanol	99.2

Common name	Scientific name	추출용매	보호 효과 (%)
유근피	<i>Ulmus pumila</i> Linne	methanol	109.2
유근피	<i>Ulmus pumila</i> Linne	chloroform	89.9
유근피	<i>Ulmus pumila</i> Linne	cold water	86.3
유자	<i>Citrus junos</i>	methanol	91.2
자소엽	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i>	methanol	107.7
자소엽	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i>	chloroform	93.8
자소엽	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i>	hexane	91.3
자소엽	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i>	ethyl acetate	89.2
택사	<i>Alisma canaliculatum</i>	ethanol	109.0
택사	<i>Alisma canaliculatum</i>	methanol	121.1
택사	<i>Alisma canaliculatum</i>	chloroform	110.6
택사	<i>Alisma canaliculatum</i>	hexane	112.7
택사	<i>Alisma canaliculatum</i>	ethyl acetate	94.7
합환피	<i>Albiziaj ulibrissin</i> Durazz	methanol	84.5
합환피	<i>Albiziaj ulibrissin</i> Durazz	chloroform	88.0
합환피	<i>Albiziaj ulibrissin</i> Durazz	hexane	78.9
합환피	<i>Albiziaj ulibrissin</i> Durazz	ethyl acetate	69.1

Table 2-3. DCF-DA assay에 의한 cell 보호효과의 측정.

Common name	Scientific name	추출 용매	보호 효과 (%)
검실	<i>Euryale ferox</i>	ethanol	49.60
들국화	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	ethanol	41.64
석류	<i>Punica granatum</i> L.	ethanol	68.73
잔대	<i>Adenophora tryphilla</i> var. Japonica	ethanol	27.51
해당화열매	<i>Rosa rugosa</i> Thunb. var. rugosa	ethanol	59.10
산약	<i>Dioscorea opposita</i>	ethanol	48.62
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	ethanol	30.19
토사자	<i>Cuscuta chinensis</i> Lamark	ethanol	10.73
모과	<i>Chaomeles sinensis</i> KOEHBNE	ethanol	52.39
산수유	<i>Cornus officinalis</i>	ethanol	42.49
홍화씨	<i>Carthamus tinctorius</i>	ethanol	62.32
해당화뿌리	<i>Rosa rugosa</i> Thunb. var. rugosa	ethanol	42.76

(2) 시료 최종 선정 및 세포독성 실험

1차 선정에서 DCF-DA assay에 의해 검실, 석류, 잔대가 선정되었고(Fig. 2-2), MTT assay에 의해 검실, 석류, 토사자 및 하수오가 선정되었다(Fig. 2-3). DCF-DA assay 결과 우수한 보호효과를 보이는 검실, 석류, 토사자를 대상으로 2차 시료 선정 실험 (DCF-DA assay)을 실시하였다(Fig. 2-4). 1, 2차 선정 실험을 토대로 뇌신경세포에 가장 안정적인 보호효과를 보인 석류를 최종 선정하였다.

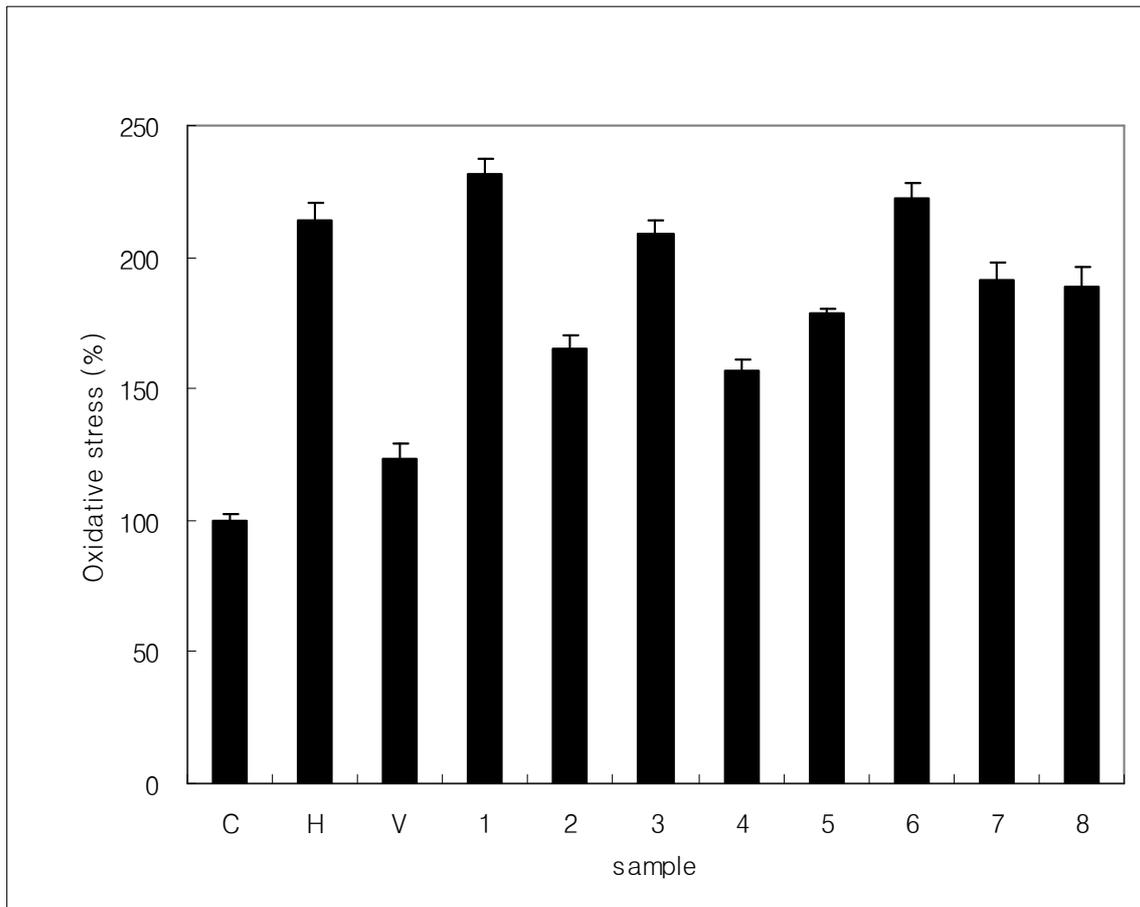


Fig. 2-2. H₂O₂로부터 생성된 oxidative stress에 대한 식용식물자원의 보호효과.

C: control group, H: H₂O₂ 처리 후, 시료 대신 DW를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전, vitamin C (100 μM)를 전처리

1: *Cinnamomum loureirii* (계피), 2: *Euryale ferox* (검실), 3: *Chrysanthemum morifolium* (들국화), 4: *Punica granatum* (석류), 5: *Adenophora tryphilla* var. *Japonica* (잔대), 6: *Cuscuta chinensis* Lamark (토사자), 7: *Polygonum multiflorum* (하수오), 8: *Rosa rugosa* Thunb. var. *rugosa* (fruit-해당화열매)

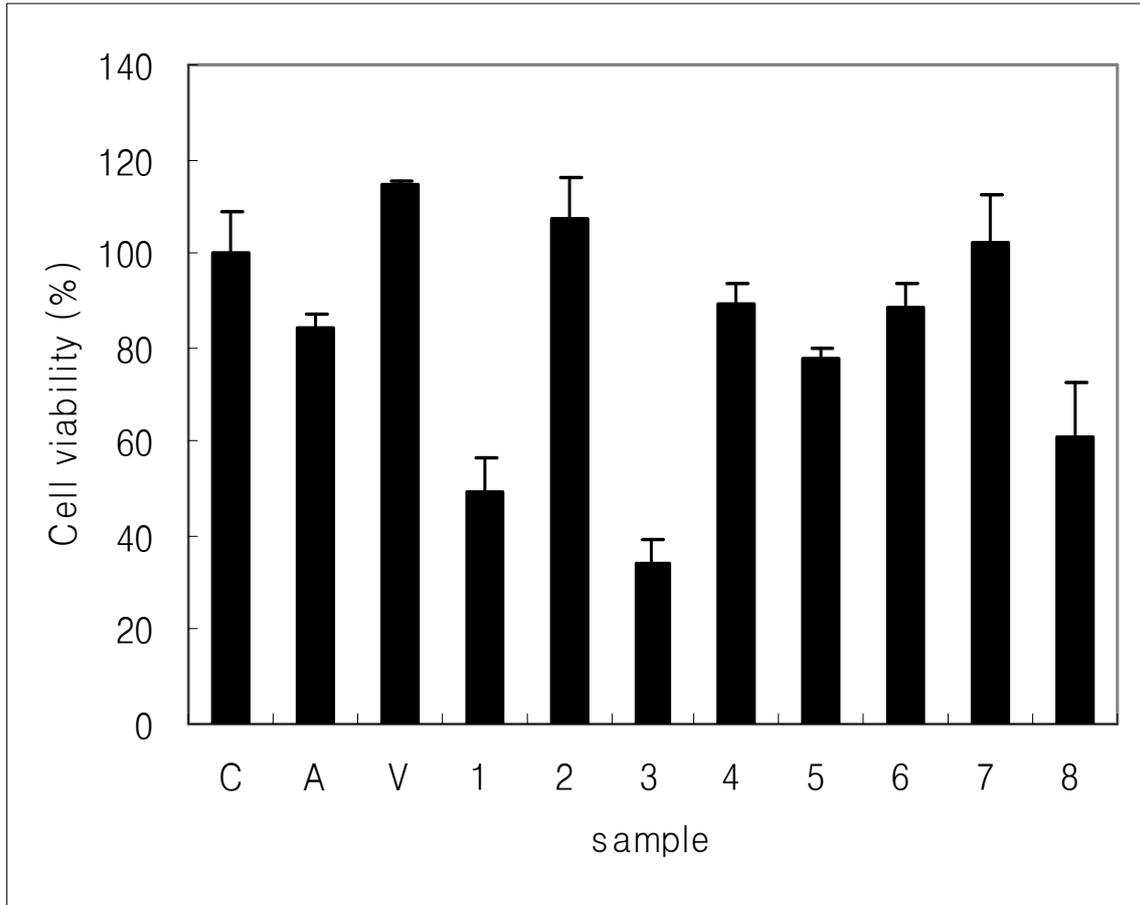


Fig. 2-3. A β 에 의해 생성된 신경독성에 대한 시료의 보호효과.

C: control group, A: A β 를 처리하고 보호물질 대신 DW를 처리

V: A β 를 처리하기 48시간 전에 항산화효과가 있는 vitamin C (100 μ M)를 전처리

1: *Cinnamomum loureirii* (계피), 2: *Euryale ferox* (검실), 3: *Chrysanthemum morifolium* (들국화), 4: *Punica granatum* (석류), 5: *Adenophora tryphilla* var. Japonica (잔대), 6: *Cuscuta chinensis* Lamark (토사자), 7: *Polygonum multiflorum* (하수오), 8: *Rosa rugosa* Thunb. var. rugosa (fruit-해당화열매)

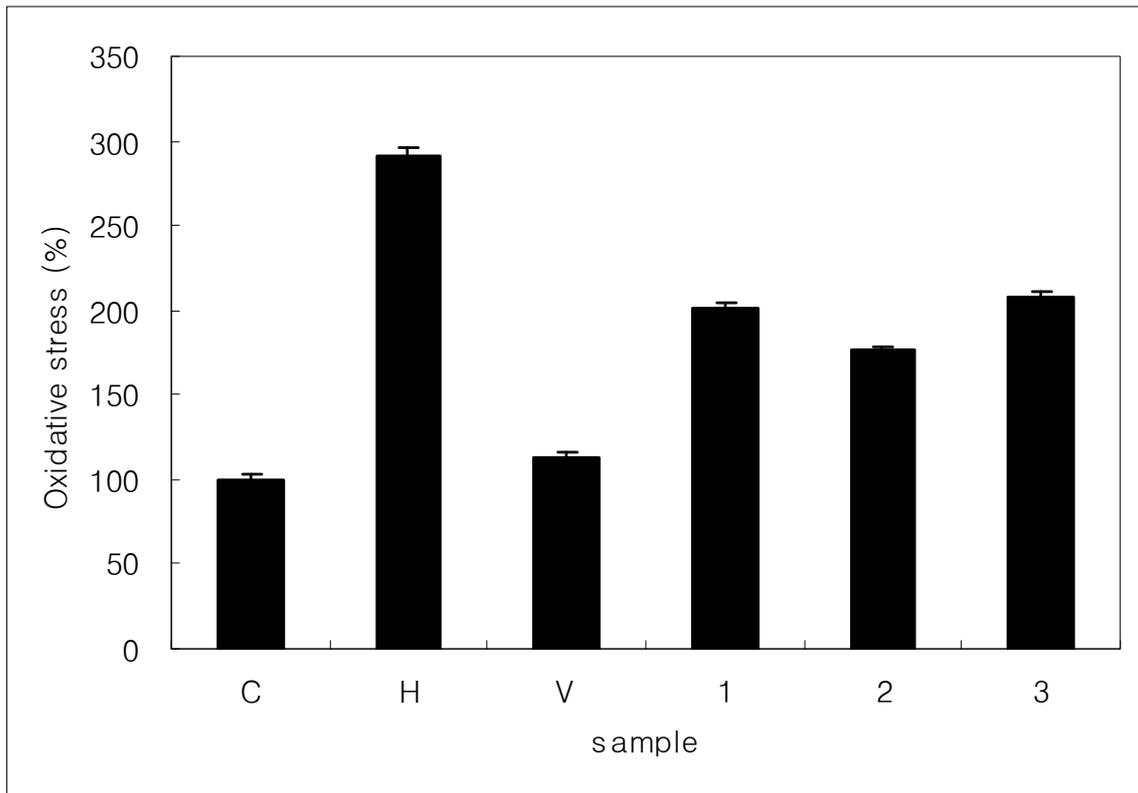


Fig. 2-4. H₂O₂로부터 생성된 oxidative stress에 대한 식용식물자원의 보호효과.

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 보호물질 대신 DW를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 항산화효과가 있는 vitamin C (100 μM)를 전처리

1: *Euryale ferox*(검실), 2: *Punica granatum*(석류), 3: *Cuscuta chinensis* Lamark(토사자)

나. 활성 phytochemicals의 분리 및 정제

(1) Solvent partition

건조시킨 석류 추출물 1,228 g에 적당량의 물 (1,600 ml)을 이용하여 녹인 후 사용된 물의 양의 3배 (4,800 ml)에 해당하는 용매 hexane (C₆H₁₄), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtAOc)의 순서대로 3회씩 실시하였고 나누어진 분획을 각각 일정량 취하여 농축시킨 후 세포 독성 실험과 세포 viability 실험을 실시하였다.

(2) 용매분획별 *in vitro* assay 결과

(가) DCF-DA assay

아래의 Fig. 2-5에서 보는 바와 같이 ethyl acetate fraction에서 가장 높은 저해활성을 보였다.

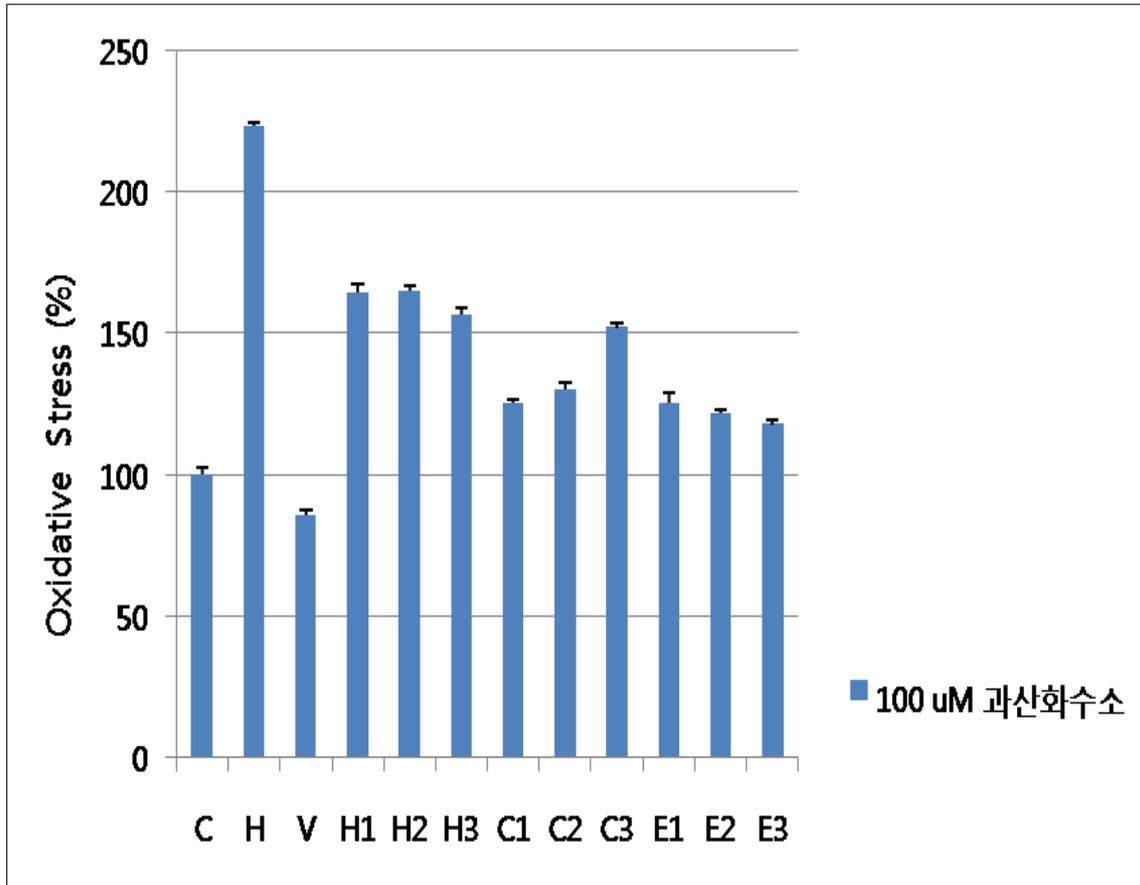


Fig. 2-5. H₂O₂로부터 생성된 oxidative stress에 대한 solvent partition된 석류 추출물의 보호 효과

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리

H1-E3: H₂O₂를 처리하기 48시간 전, solvent partition 용매별 분획을 각각 1 mg/ml로 전처리

H1-3: hexane 분획

C1-3: chloroform 분획

E1-3: ethyl acetate 분획

(나) MTT reduction assay

아래 그림과 같이 ethyl acetate fraction에서 과산화수소 및 A β 에 의한 산화적인 스트레스에 대한 세포보호 효과가 가장 높게 나타났으며 이는 DCF-DA assay에서의 결과와 일치했다(Figs. 2-6, 7).

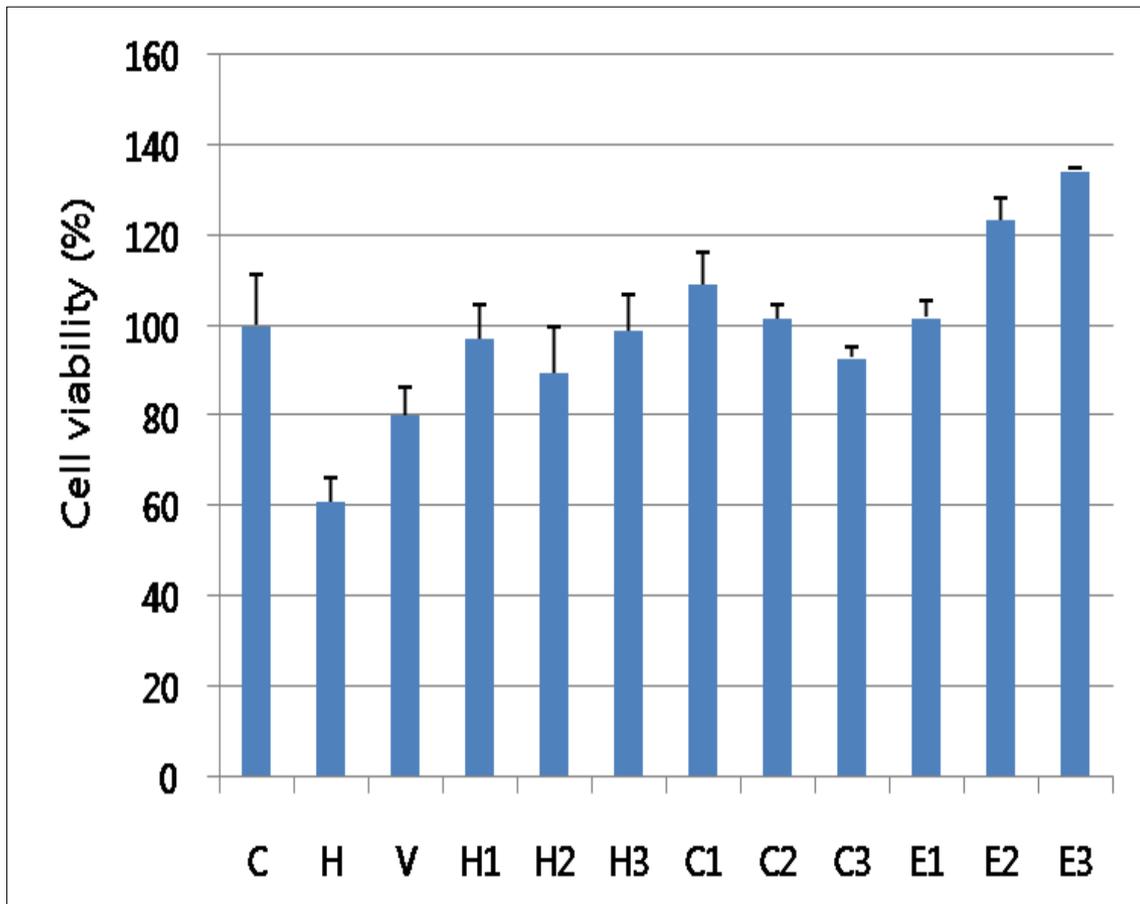


Fig. 2-6. H₂O₂에 유도된 세포독성에 대한 solvent partition된 석류 추출물의 보호효과

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μ M)를 전처리

H1-E3: H₂O₂를 처리하기 48시간 전, solvent partition 용매별 분획을 각각 1 mg/ml로 전처리

H1-3: hexane 분획

C1-3: chloroform 분획

E1-3: ethyl acetate 분획

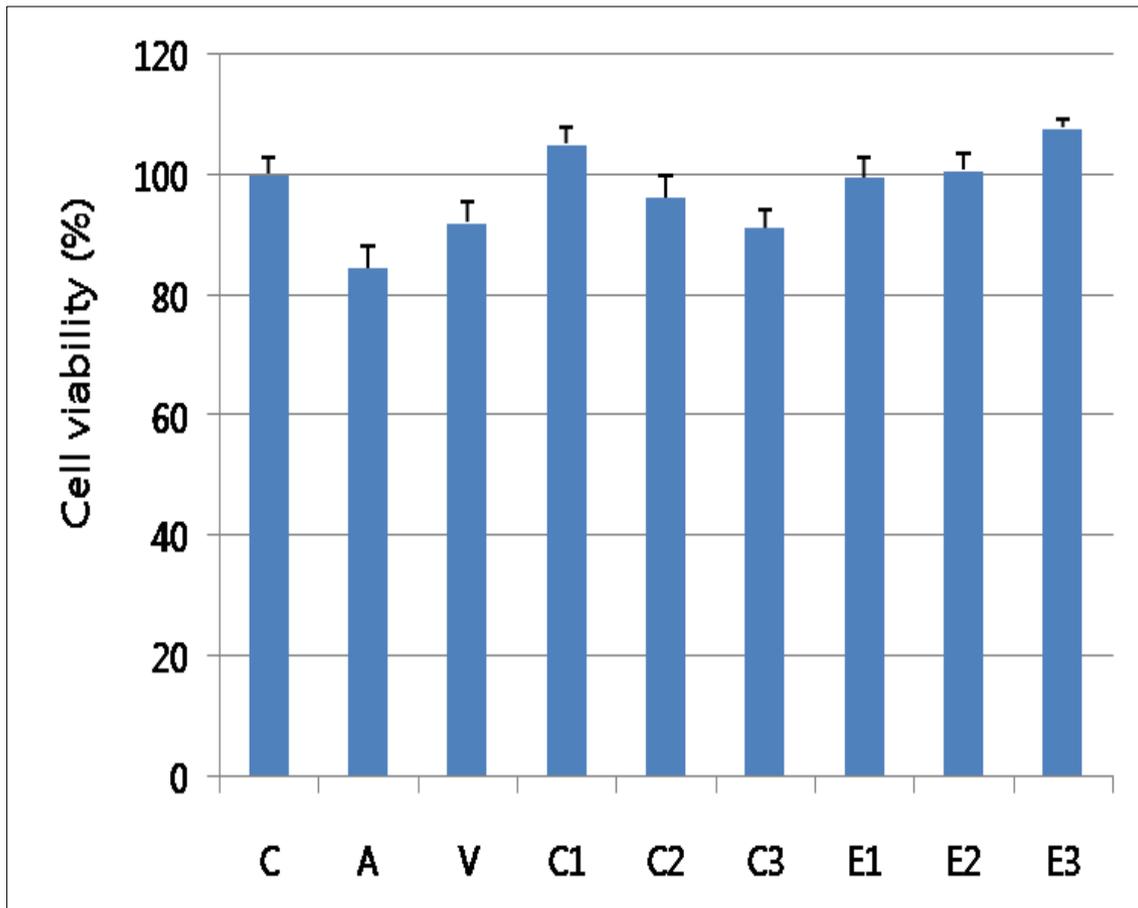


Fig. 2-7. A β_{25-35} 에 유도된 세포독성에 대한 solvent partition된 석류 추출물의 보호효과

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μ M)를 전처리

H1-E3: H₂O₂를 처리하기 48시간 전, solvent partition 용매별 분획을 각각 1 mg/ml로 전처리

H1-3: hexane 분획

C1-3: chloroform 분획

E1-3: ethyl acetate 분획

(3) Open column chromatography

Solvent partition 후, 가장 활성이 좋게 나온 ethyl acetate fraction을 감압 농축하여 open silica gel column chromatography를 시행하여 33개의 소분획 (CHCl_3 : EtOH = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)으로 분획 하였다. 각각 분리된 분획 (총 33개의 분획)을 일정량 (1 mg/ml) 취하여 DCF-DA 및 MTT reduction assay를 시행하고, 그 중 가장 높은 세포 보호효과를 보이는 분획을 선정한다. 1차적으로 높은 뇌신경세포 보호효과를 보이는 fraction을 대상으로 2차 DCF-DA 및 MTT reduction assay를 수행하였다.

(4) Open column chromatography 분획의 *in vitro* assay 결과

(가) DCF-DA assay

Open column chromatography 후 33개의 분획에 대하여 1차 DCF-DA assay를 측정한 결과 CHCl_3 : EtOH의 비율이 90:10인 5번 fraction과 80:20인 7, 8, 9번 fractions, 70:30인 10번 fraction, 40:60인 19, 20번 fractions, 마지막으로 0:100인 31, 32, 33번 fractions가 활성이 좋게 나왔으며(Fig. 2-8), 선정된 10개의 분획을 대상으로 2차 assay를 실시한 결과 8, 9, 10, 31, 32번 fractions이 활성이 좋게 나왔다(Fig. 2-9).

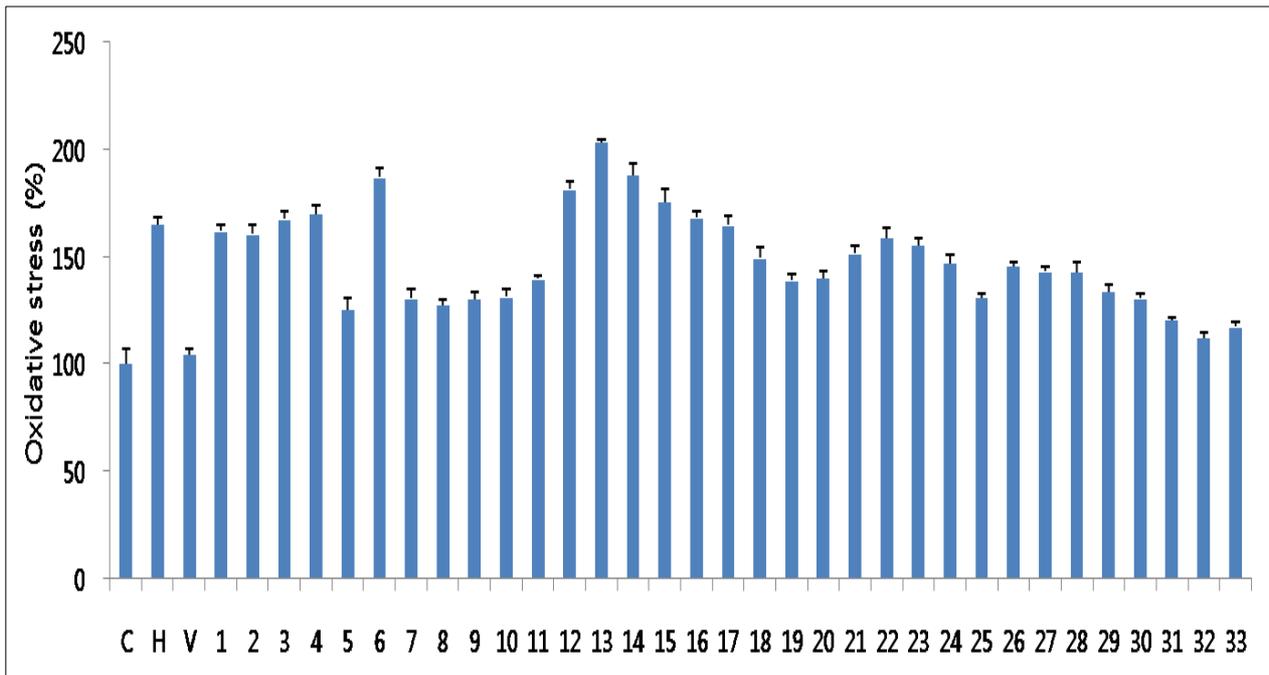


Fig. 2-8. Silica-gel open column chromatography fraction의 oxidative stress에 대한 억제효과.
 C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리
 V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리
 1~33 : Sample groups. H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml의 농도로 20 μl를 처리
 각각의 fractions은 CHCl₃과 EtOH을 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70,
 20:80, 10:90, 0:100의 비율을 각각 3번씩 반복 (33개 fractions)

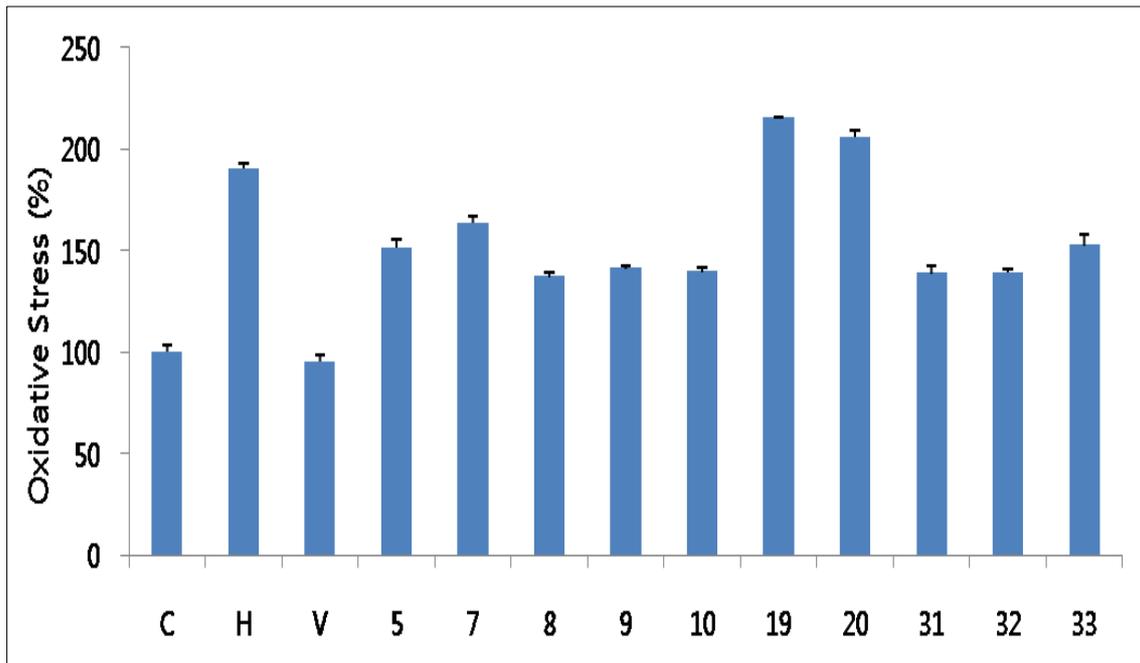


Fig. 2-9. Silica-gel open column chromatography fraction의 oxidative stress에 대한 억제효과
 C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리
 V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리
 5, 7, 8, 9, 10, 19, 20, 31, 32, 33 : 1차 선별된 fractions. H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml
 의 농도로 20 μl를 처리

(나) MTT reduction assay

Open column chromatography후 33개의 분획에 대하여 1차 MTT reduction assay를 측정하여 활성이 좋은 5개의 fractions를 선정한 결과 CHCl₃ : EtOH의 비율이 90:10인 5번 fraction과 80:20인 8, 9번 fractions, 70:30인 10번 fraction, 마지막으로 0:100인 32번 fraction이 활성이 높게 나왔으며(Fig. 2-10), 선정된 5개의 분획을 대상으로 2차 assay를 실시한 결과 8번 fraction이 활성이 가장 높게 나왔다(Fig. 2-11).

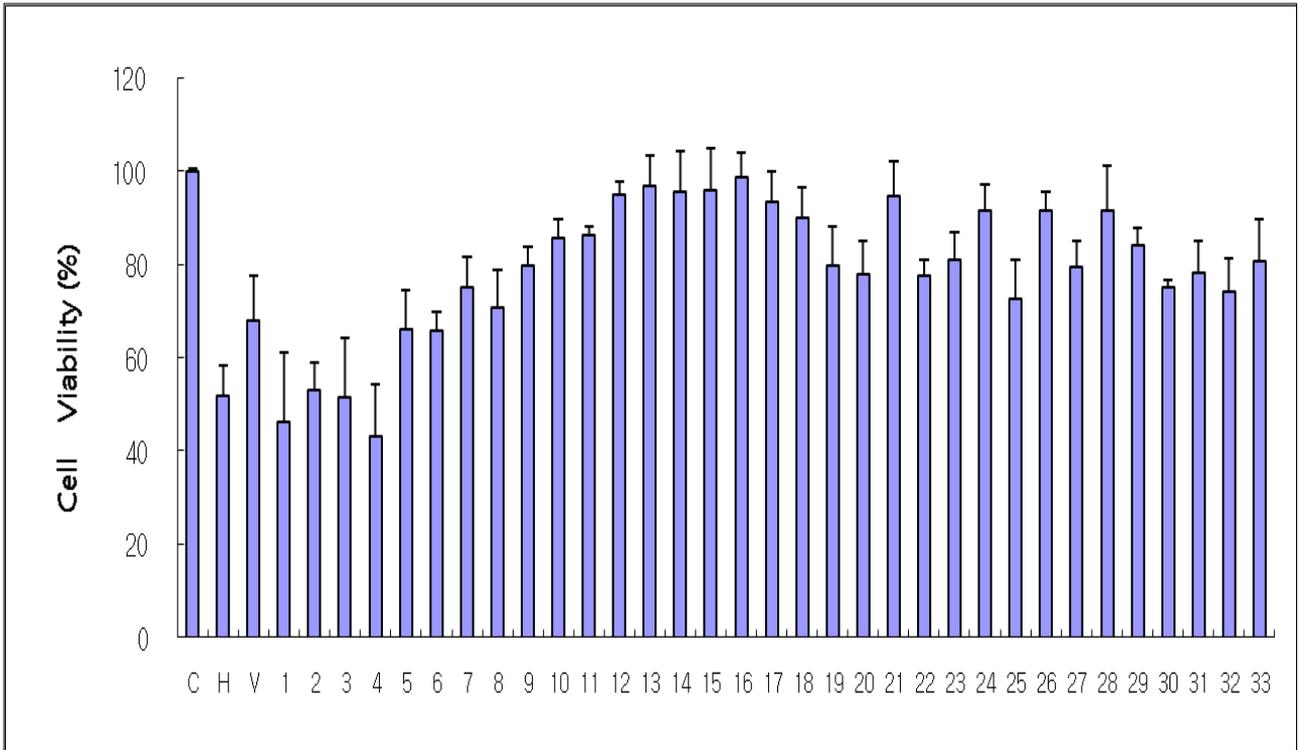


Fig. 2-10. Silica-gel open column chromatography fraction의 H₂O₂에 의한 세포독성의 억제효과.

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리

1~33 : Sample groups. H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml의 농도로 20 μl를 처리

각각의 fractions은 CHCl₃과 EtOH을 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100의 비율을 각각 3번씩 반복 (33개 fractions)

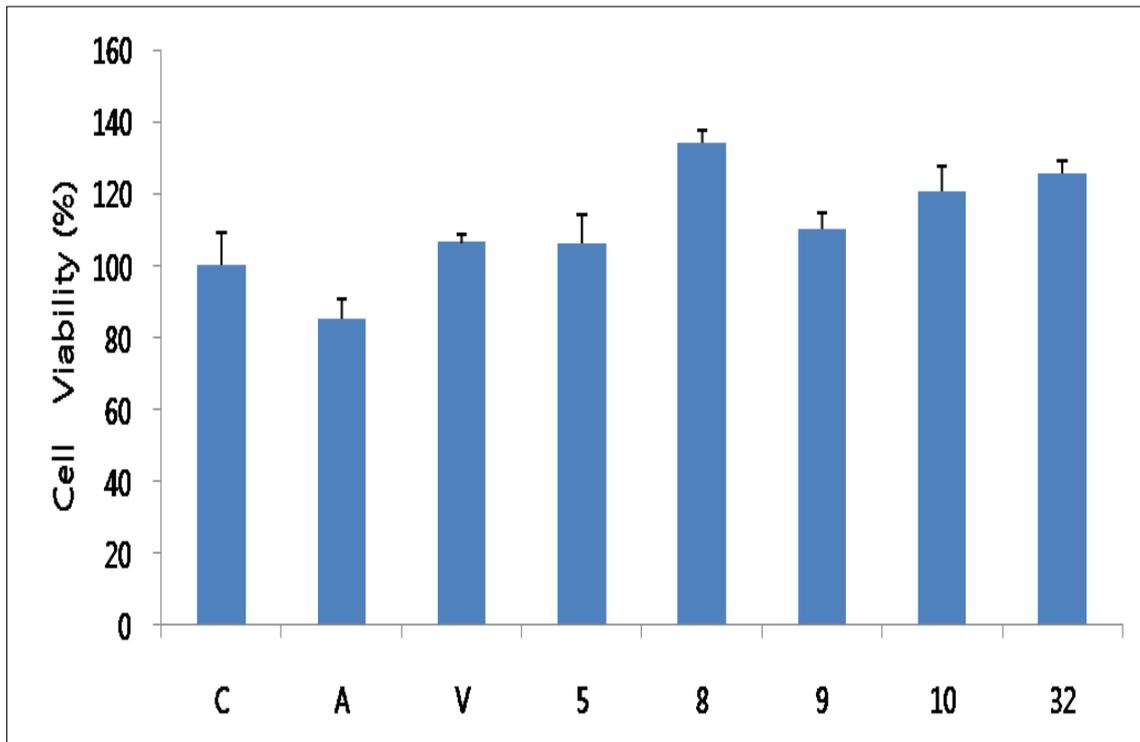


Fig. 2-11. Silica-gel open column chromatography fraction의 $A\beta_{25-35}$ 에 의한 세포독성의 억제 효과.

C: control group, H: H_2O_2 만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H_2O_2 를 처리하기 48시간 전에 vitamin C ($100 \mu M$)를 전처리

5, 8, 9, 10, 32 : 1차 선별된 fractions. H_2O_2 를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml 의 농도로 $20 \mu l$ 를 처리

(5) PLC

Open column chromatography를 통해 얻은 시료의 활성을 확인한 후, 선정된 획분 (fraction 8)을 preparative silica-gel plate (glass, 200 × 200 mm)를 이용하여 PLC를 실시하였다. 선정된 획분을 감압 농축하여 얻은 1 g의 시료를 1 ml의 EtOH에 녹인 후, 0.5 μ l씩 5회 spotting하여 건조시킨다. Chloroform과 ethanol (80:20, v/v)으로 전개시킨 후 band를 분리하였다. 분리된 밴드를 대상으로 DCF-DA (Fig. 2-12) 및 MTT reduction assay를 수행하였다(Figs. 2-13, 14).

(가) DCF-DA assay

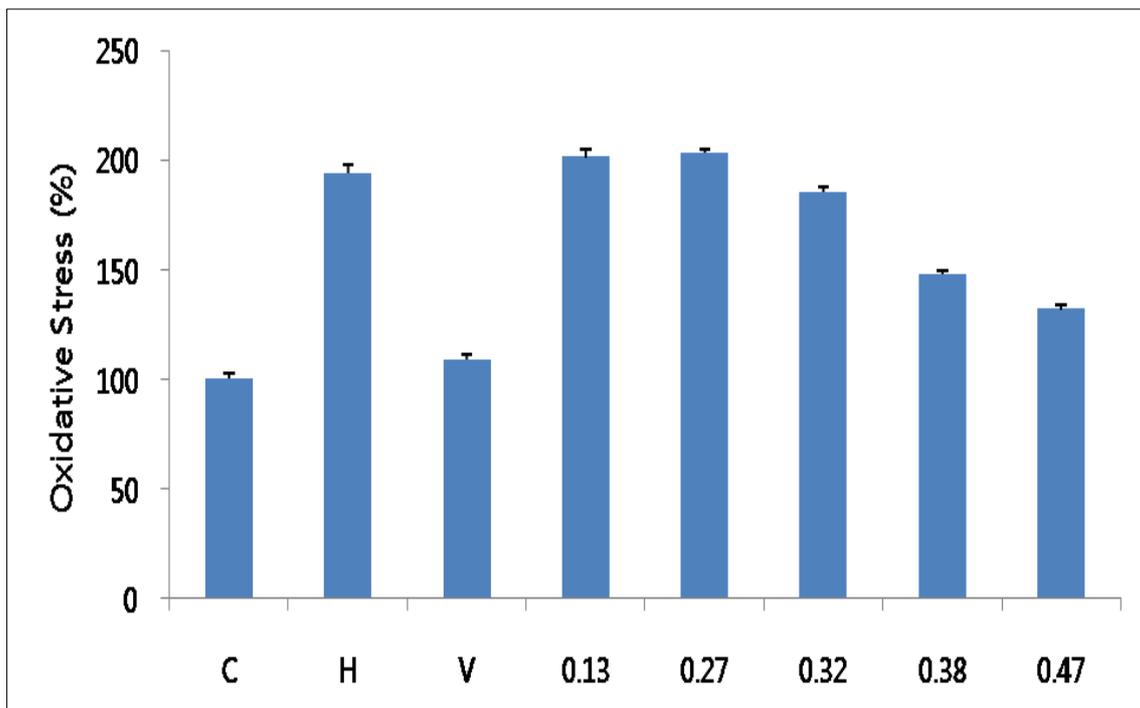


Fig. 2-12. H₂O₂로부터 생성된 oxidative stress에 대한 PLC된 석류 추출물의 보호효과

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μ M)를 전처리

0.13, 0.27, 0.32, 0.38, 0.47 : Sample groups. 과산화수소를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml의 농도로 20 μ l를 처리

(나) MTT reduction assay

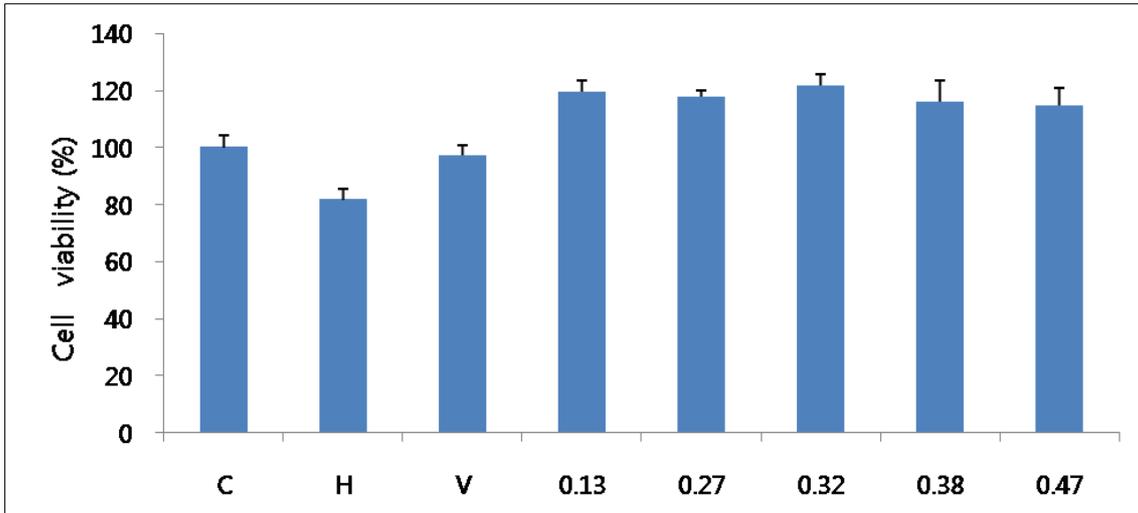


Fig. 2-13. H₂O₂에 유도된 세포독성에 대한 PLC된 석류 추출물의 보호효과.

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리

0.13, 0.27, 0.32, 0.38, 0.47 : Sample groups. 과산화수소를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml의 농도로 20 μl를 처리

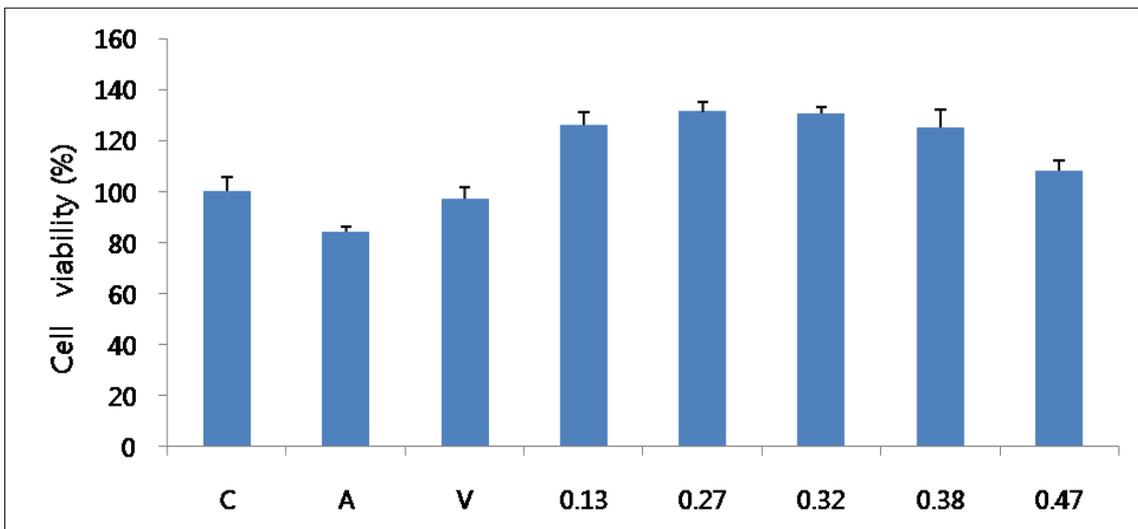


Fig. 2-14. Aβ₂₅₋₃₅에 유도된 세포독성에 대한 PLC된 석류 추출물의 보호효과

C: control group, A : 30 μM의 Aβ₂₅₋₃₅ 처리하고 보호물질 대신 DW를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 항산화효과가 있는 vitamin C (100 μM)를 전처리

0.13, 0.27, 0.32, 0.38, 0.47 : Sample groups. 과산화수소를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml의 농도로 20 μl를 처리

(6) HPLC

PLC로부터 분리한 밴드의 활성을 확인 한 후 μ -BondapakTM C₁₈ column을 이용한 HPLC를 통하여 활성 물질을 분리 하였다. 0-100%의 ethanol과 물의 직선농도 구배로 변화를 주어 90 분간 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는 분당 0.5 ml로 하였으며 한 번에 10 μ l씩 시료 주입을 하였다. 251.2 nm파장에서 38분경에 유의적인 peak이 관찰되었다 (Fig. 2-15).

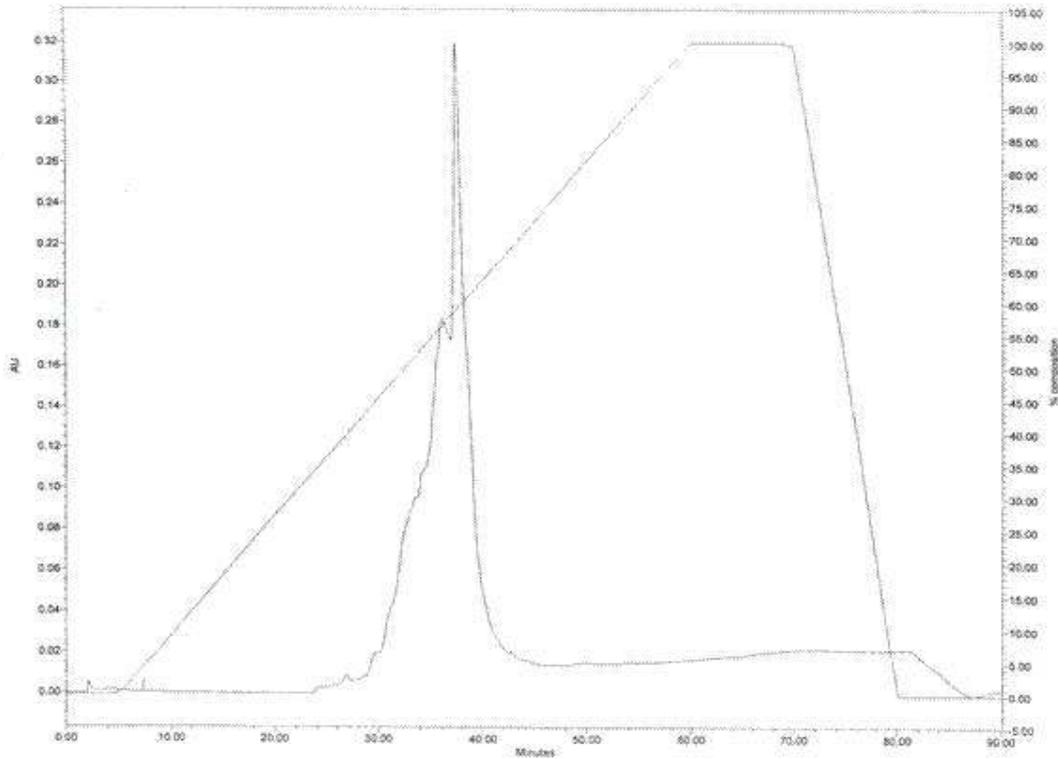


Fig. 2-15. HPLC를 이용한 활성물질의 분리.

Column: μ -BondapakTM C₁₈ column (3.9 mm \times 300 mm),

Flow rate: 0.5 ml/min, Injection volume: 10 μ l

Mobile phase: 90 min, Detector: PDA

다. 정제된 시료로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 구조분석

(1) NMR을 통한 구조 분석

HPLC를 이용해 분리한 활성물질을 취하여 ^1H -NMR (Fig. 2-16)과 ^{13}C -NMR (Fig.2-17)를 이용하여 각각 측정하였다.

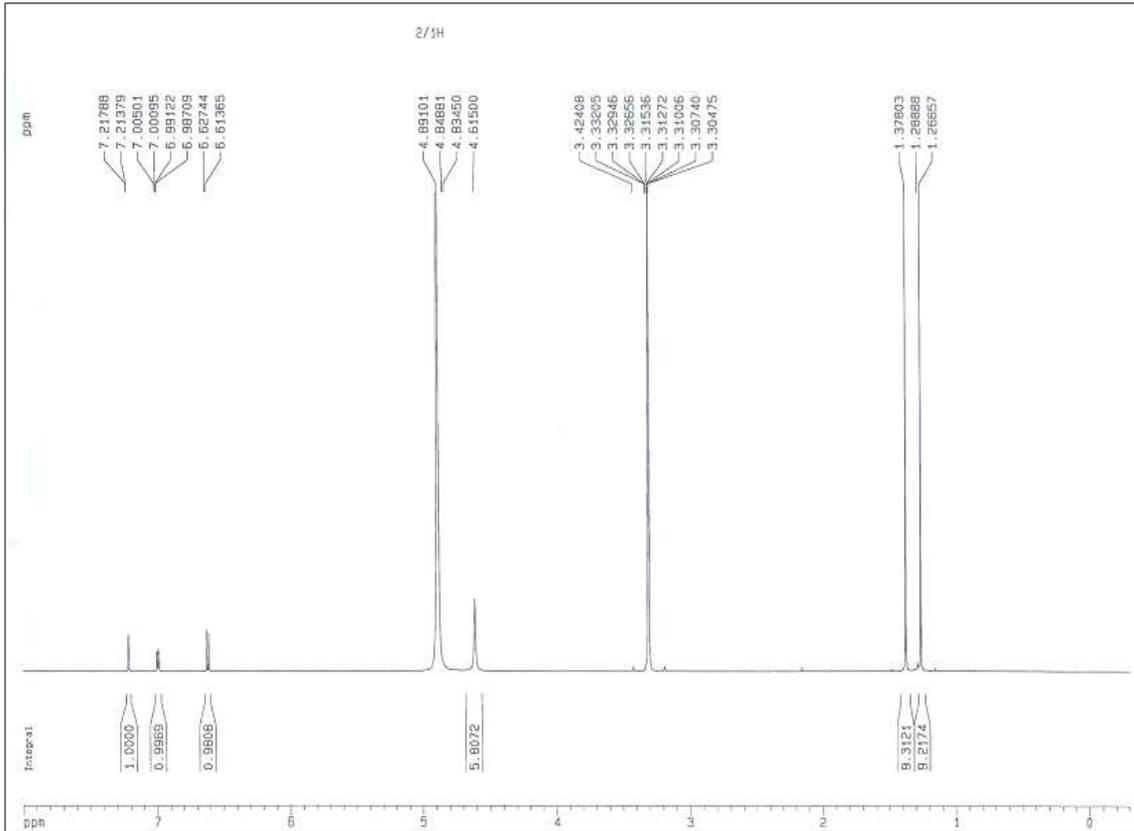


Fig. 2-16. ^1H -NMR spectrum을 이용한 석류 추출물의 활성물질 구조분석.

선정된 시료를 MeOD (methyl- d_3 alcohol- d_1)로 녹인 후 600 MHz, 25°C에서 NMR spectrometer (Avance-600, Bruker, German)을 이용하여 측정

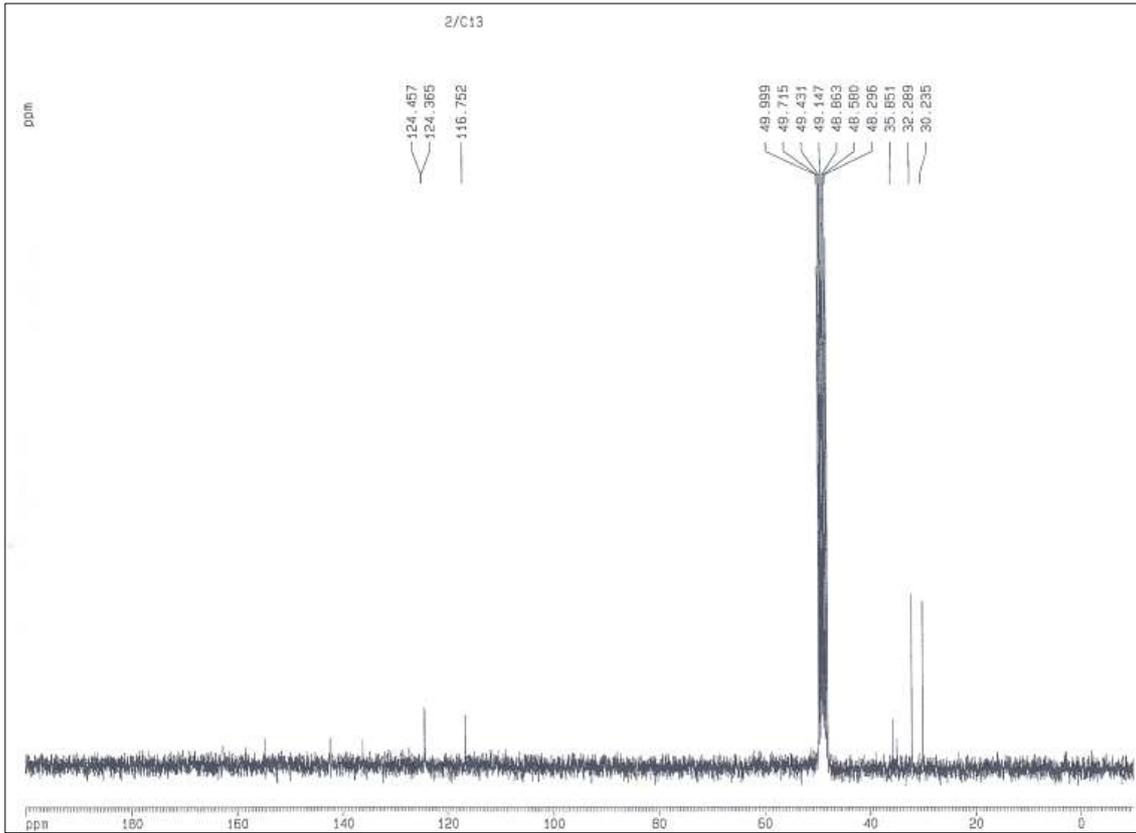


Fig. 2-17. ^{13}C -NMR spectrum을 이용한 석류 추출물의 활성물질 구조분석.
 선정된 시료를 MeOD (methyl- d_3 alcohol- d_1)로 녹인 후 600 MHz, 25°C 에서 NMR spectrometer (Avance-600, Bruker, German)을 이용하여 측정

(2) EI-MS를 통한 분자량 측정

Punica granatum extract로부터 정제된 물질을 EI-MS (Fig. 2-18)를 이용하여 mass size 측정을 실시한 결과, 분자량 206 m/z의 2,4-Di-*tert*-butylphenol인 것을 확인하였다(Fig. 2-19).

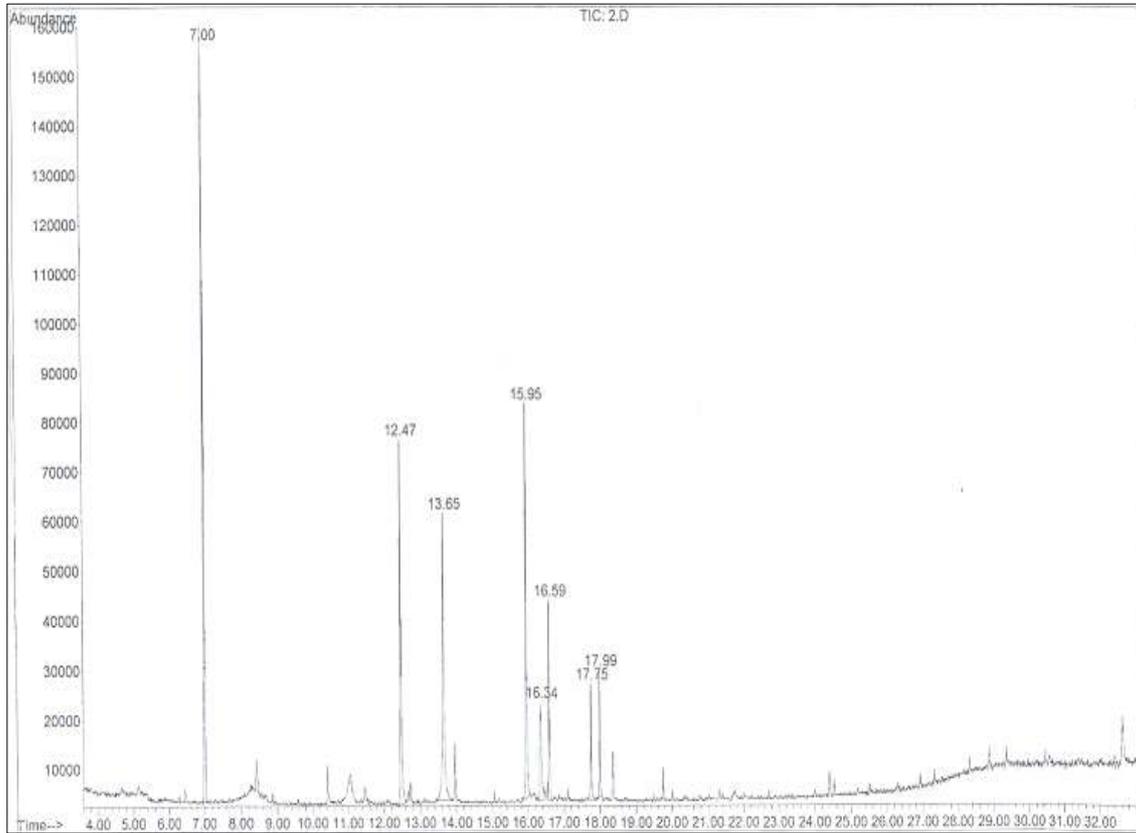


Fig. 2-18. EI-MS spectrum을 이용한 석류 추출물의 활성물질 구조분석.

The spectrum was recorded on positive ion EI mass spectrometer (JMS AX505WA, JEOL, Japan).

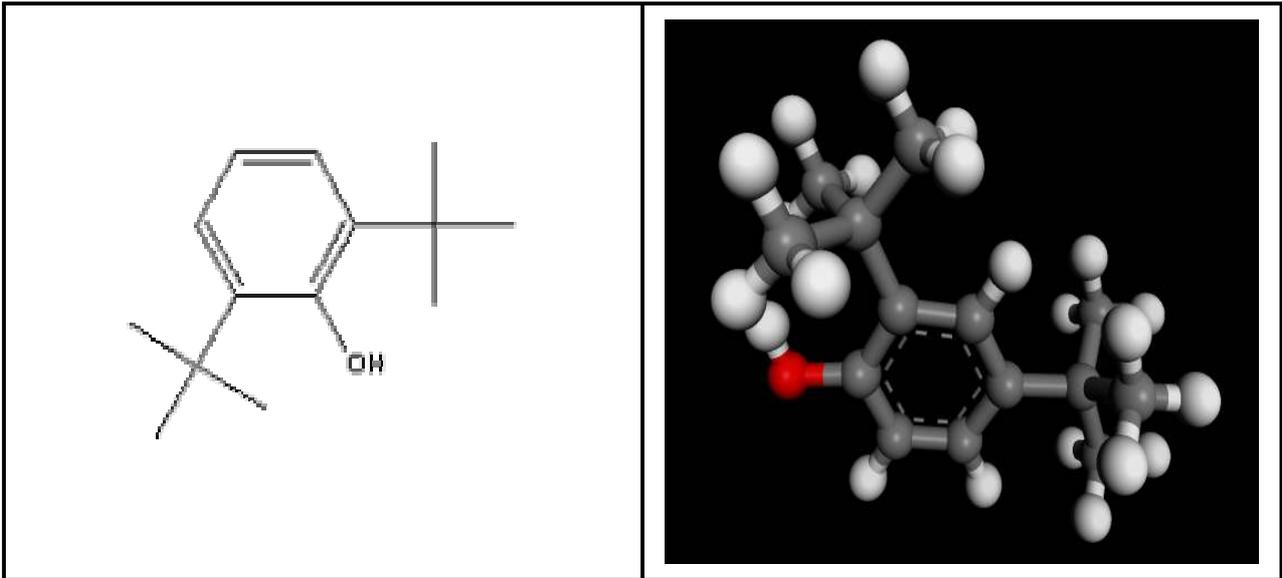


Fig. 2-19. A β 에 의한 신경독성에 보호효과를 가지는 활성물질, 2,4-Di-*tert*-butylphenol.

라. *In vivo* test를 통한 석류 추출물의 효과확인

(1) 석류 추출물의 *in vivo* 독성실험

시료의 식이 전·후의 body weight 및 brain weight에서 비정상적인 변화는 발견되지 않았다 (Figs. 2-20, 21). 특히 농도에 관계없이 각 group의 모든 mouse의 생존율이 100%였고, serum의 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) 변화도 유의적인 차이를 보이지 않음으로서 선정된 sample의 독성은 없는 것으로 확인되었다(Figs. 2-22, 23).

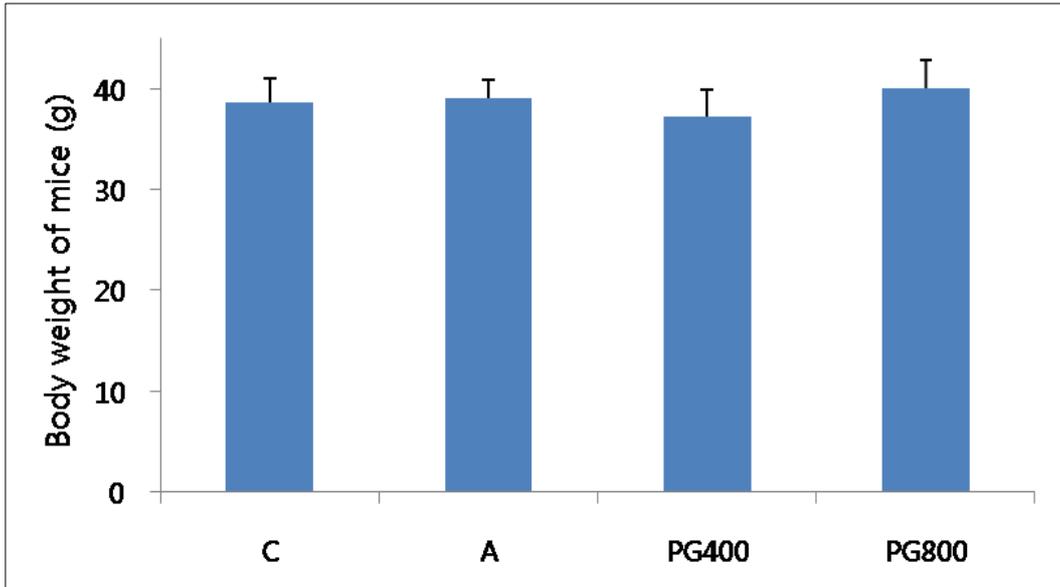


Fig. 2-20. Body weight of mice.

C (Control): Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

A ($A\beta$ group): Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

PG 400: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (400 mg/kg)

PG 800: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (800 mg/kg)

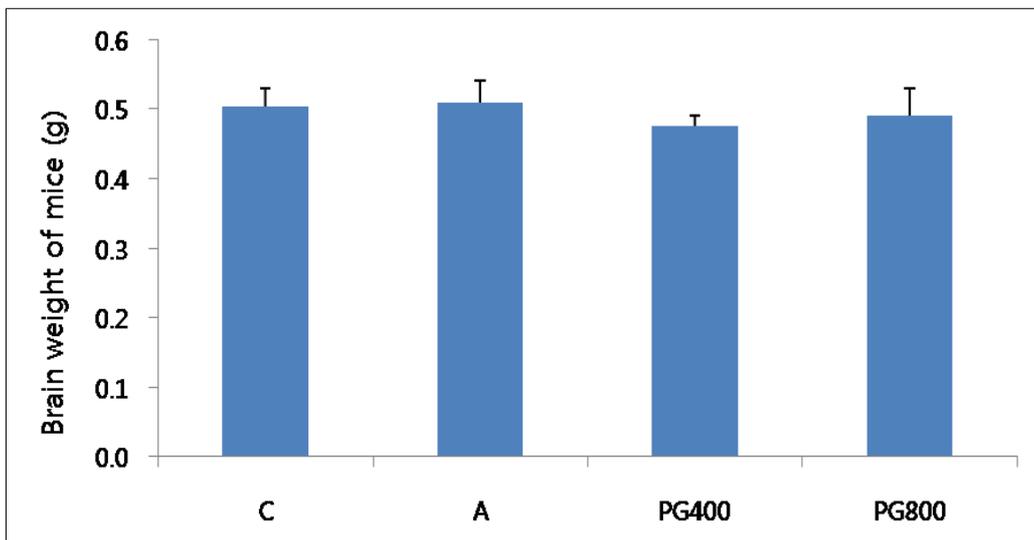


Fig. 2-21. Brain weight of mice.

C (Control): Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

A ($A\beta$ group): Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

PG 400: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (400 mg/kg)

PG 800: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (800 mg/kg)

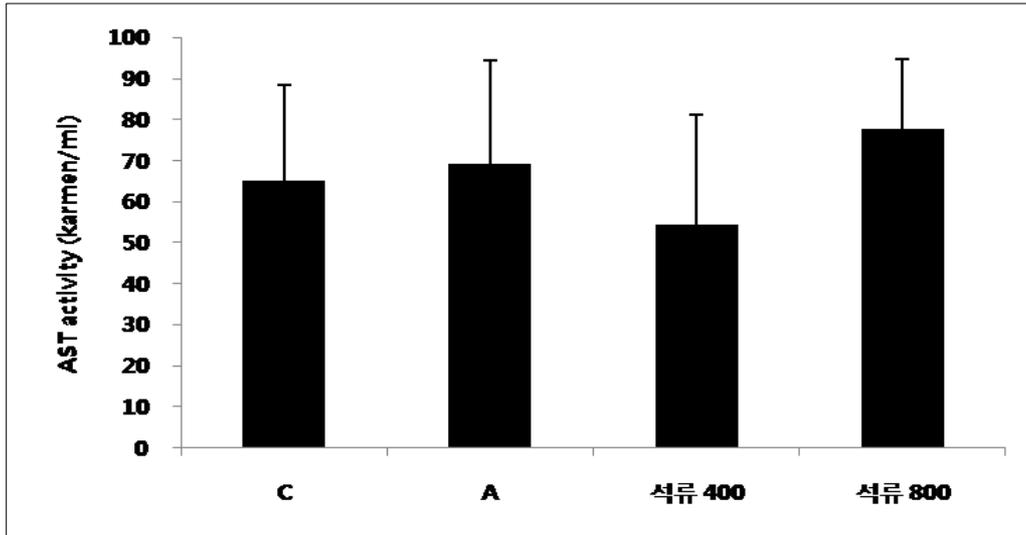


Fig. 2-22. AST activity in the serum of *Punica granatum* extract diet mice.

Group C was injected with $A\beta_{42-1}$.

Group A was injected with 410 pmol of $A\beta_{1-42}$ per mouse.

Sample groups (석류400, 석류800) were injected with $A\beta_{1-42}$ after supplied with ethanol extract of *Punica granatum* (400 mg/kg, 800 mg/kg per day).

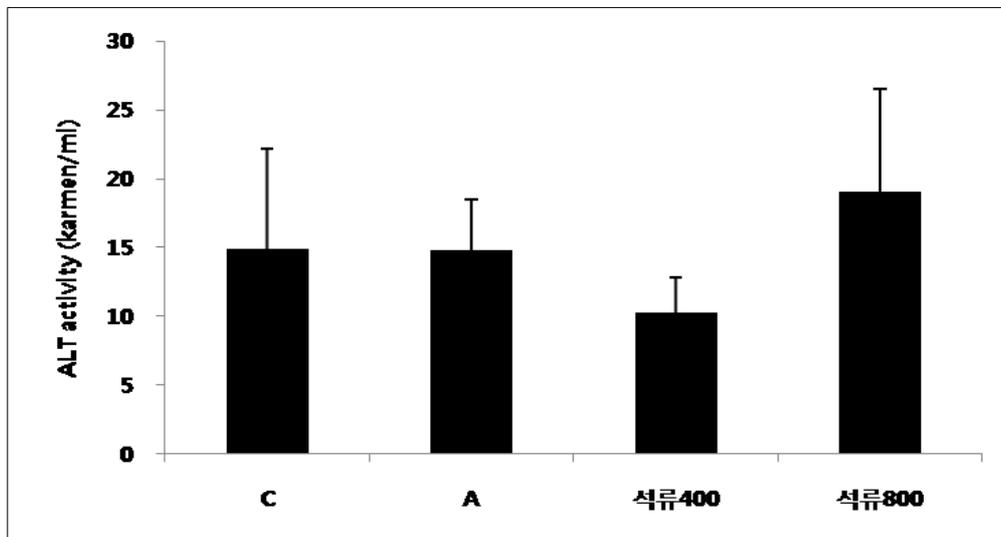


Fig. 2-23. ALT (alanine aminotransferase) activity levels in serum of *Punica granatum* extract diet mice.

Group C was injected with $A\beta_{42-1}$.

Group A was injected with 410 pmol of $A\beta_{1-42}$ per mouse.

Sample groups (석류400, 석류800) were injected with $A\beta_{1-42}$ after supplied with ethanol extract of *Punica granatum* (400 mg/kg, 800 mg/kg per day).

(2) 공간인지능 및 기억학습능력의 1차 *in vivo* test결과

(가) Y-maze test

A β 및 sample이 mouse의 운동능력에는 영향을 주지 않았으며(Fig. 2-24), sample이 공급된 group에서 기억력이 향상되었음을 알 수 있다(Fig. 2-25).

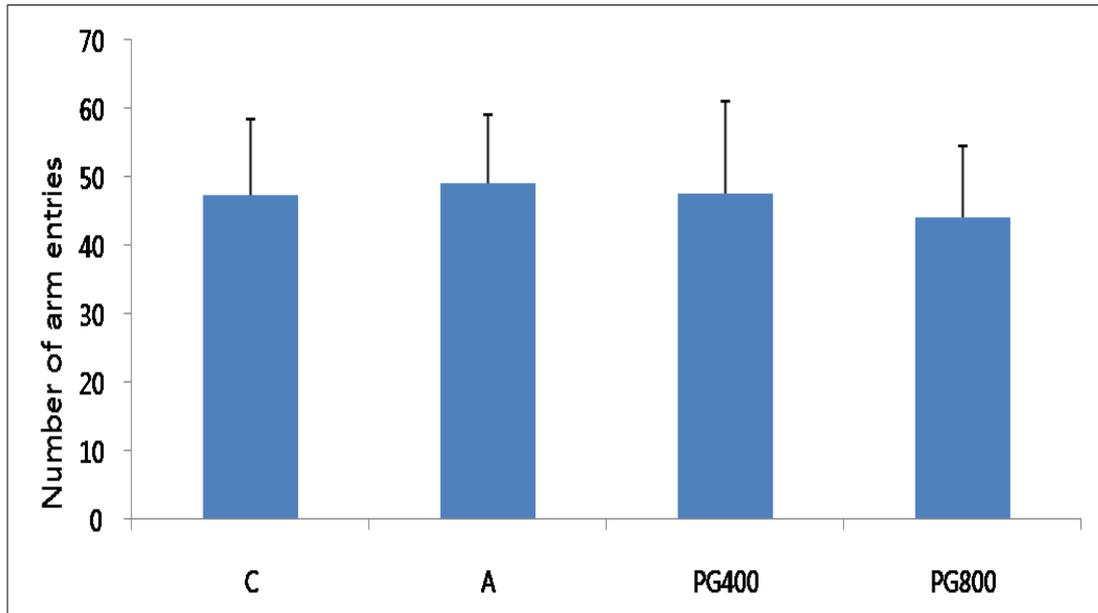


Fig. 2-24. The number of arm entries in Y-maze test.

C (Control): Treated A β_{42-1} group and normal diet

A (A β group): Treated with A β_{1-42} and normal diet

PG 400: Treated with A β_{1-42} and diet group (400 mg/kg)

PG 800: Treated with A β_{1-42} and diet group (800 mg/kg)

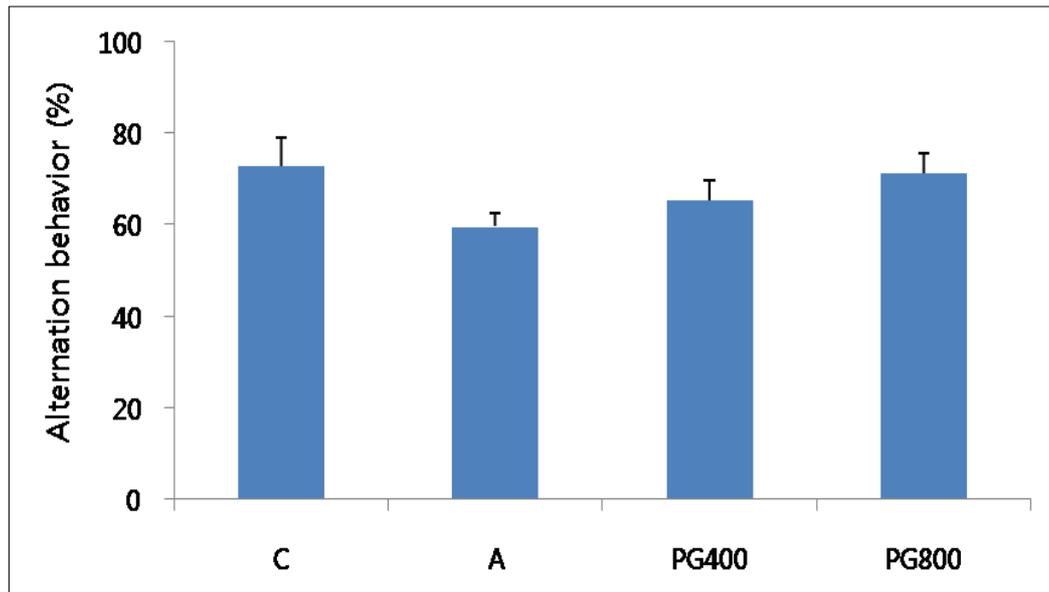


Fig. 2-25. Effects of *Punica granatum* extract on spontaneous alternation behavior. Protective effect of *Punica granatum* extract against the $A\beta_{1-42}$ -induced memory impairment in Y-maze test. Spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min.

C (Control): Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

A ($A\beta$ group): Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

PG 400: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (400 mg/kg)

PG 800: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (800 mg/kg)

(나) Passive avoidance test

$A\beta$ 를 주사하지 않은 control group은 $A\beta$ group에 비해서 안정된 기억학습능력을 나타내었고, 400, 800 mg/kg groups에서는 control group의 학습능력 활성과 비교할 때 거의 같거나 상회하는 인지능력의 회복을 확인하였다. 이는 석류 추출물이 $A\beta$ 의 기억학습능력 저해 효과 (인지능력과 학습능력의 상실유도)를 blocking하여 control group이 보여주는 인지 능력을 나타내어줌으로써 뇌세포 신호전달을 정상적으로 보호/회복시켜줌을 확인하였다(Fig. 2-26).

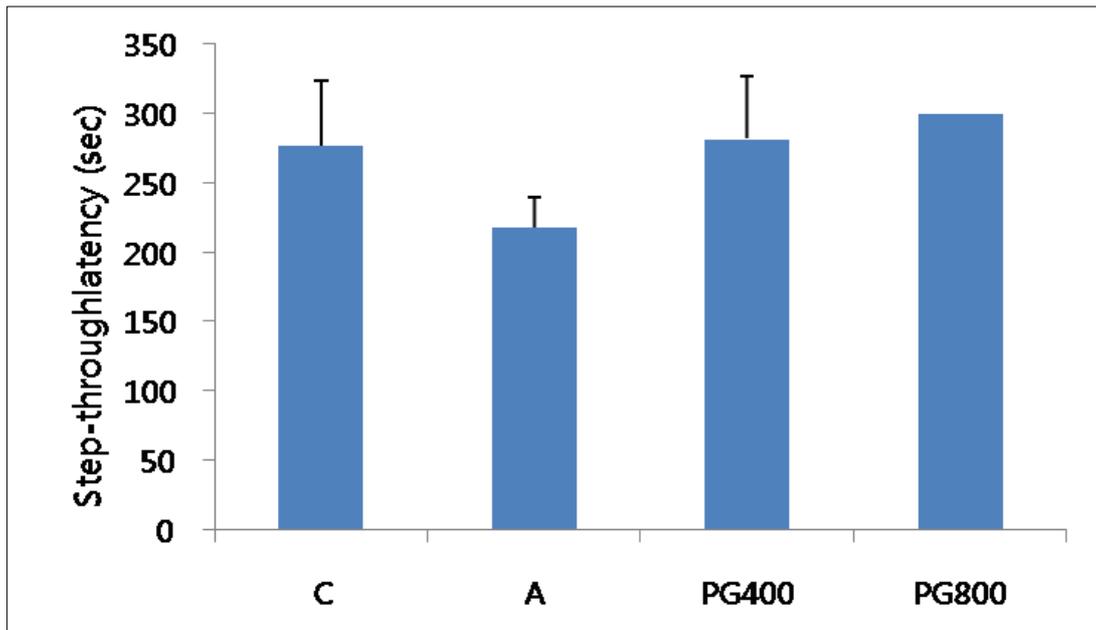


Fig. 2-26. Effect of *Punica granatum* extract on step-through latency in the passive avoidance test.

Protective effect of *Punica granatum* extract against the $A\beta_{1-42}$ -induced memory impairment in passive avoidance test. The testing trial was given 1 day after the training trial.

C (Control): Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

A ($A\beta$ group): Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

PG 400: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (400 mg/kg)

PG 800: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (800 mg/kg)

(3) 석류 추출물로부터 분리된 활성물질의 2차 *in vivo* 독성실험

2,4-Di-*tert*-butylphenol을 식이한 group과 일반사료를 식이한 group의 body weight 및 brain weight에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Figs. 2-27, 28). 특히 농도에 관계없이 각 group의 모든 mouse의 생존율이 100%였고, serum의 AST, ALT변화도 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다(Figs. 2-29, 30).

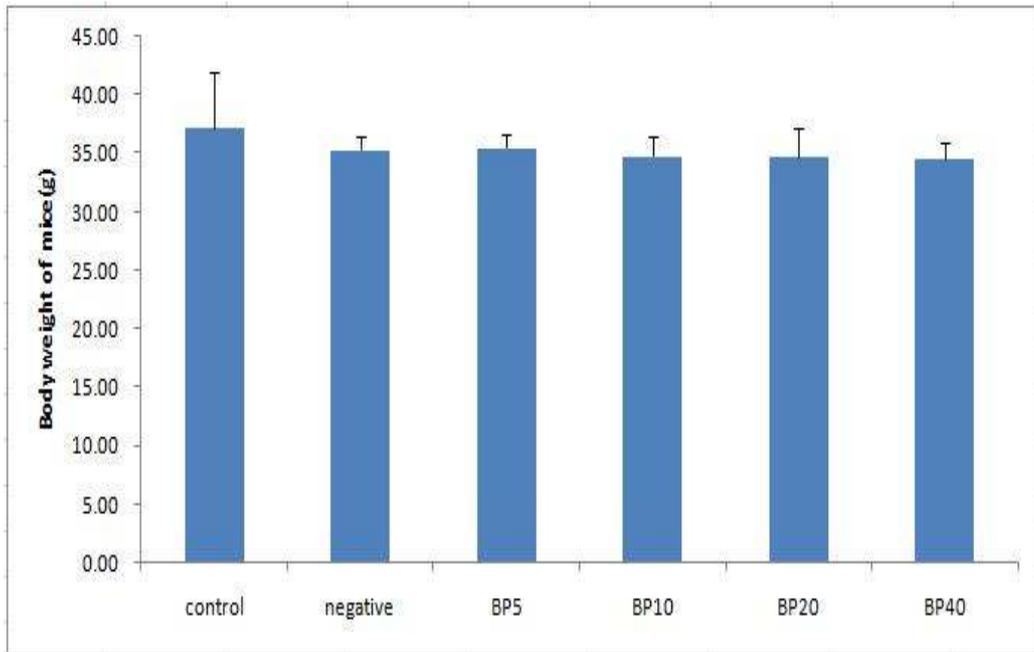


Fig. 2-27. Body weight of mice.

Control : Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

Negative ($A\beta$ group) : Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

BP 5 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (5 mg/kg)

BP 10 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (10 mg/kg)

BP 20 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (20 mg/kg)

BP 40 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (40 mg/kg)

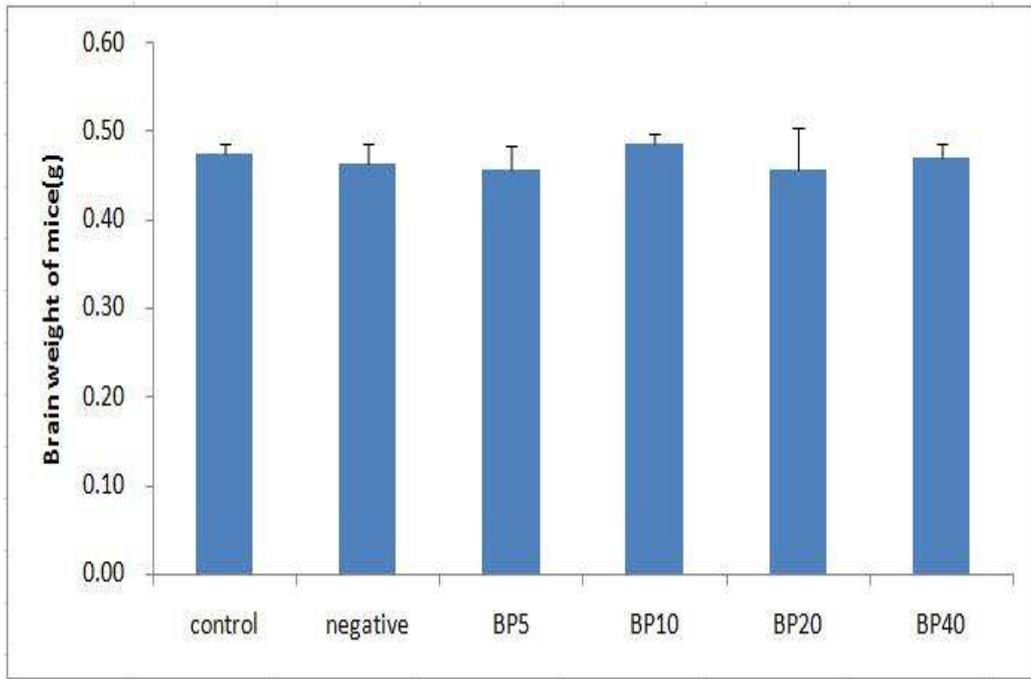


Fig. 2-28. Brain weight of mice.

Control : Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

Negative ($A\beta$ group) : Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

BP 5 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (5 mg/kg)

BP 10 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (10 mg/kg)

BP 20 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (20 mg/kg)

BP 40 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (40 mg/kg)

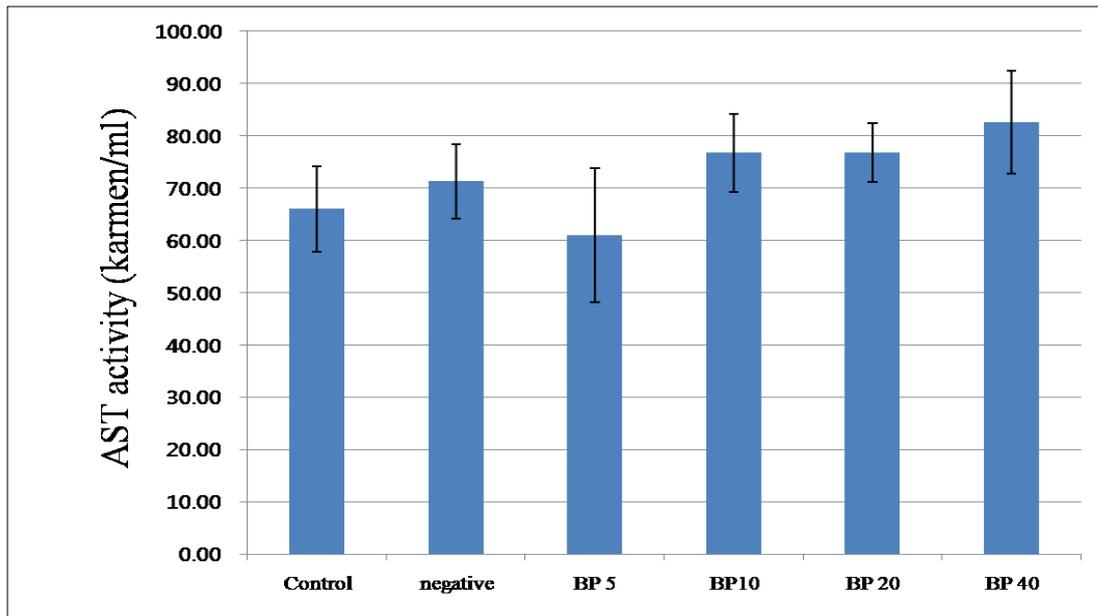


Fig. 2–29. AST activity in the serum of 2,4-Di-*tert*-butylphenol diet mice.

Blood serum was collected from the mice immediately after behavior tests to assess the activity of AST. Data represent the means ($n = 6$) \pm S.D. The statistical significance of differences among groups was calculated by one-way ANOVA. (* $p < 0.01$ vs. control group, # $p < 0.01$ vs. TMT group).

Control : Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

Negative ($A\beta$ group) : Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

BP 5 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (5 mg/kg)

BP 10 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (10 mg/kg)

BP 20 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (20 mg/kg)

BP 40 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (40 mg/kg)

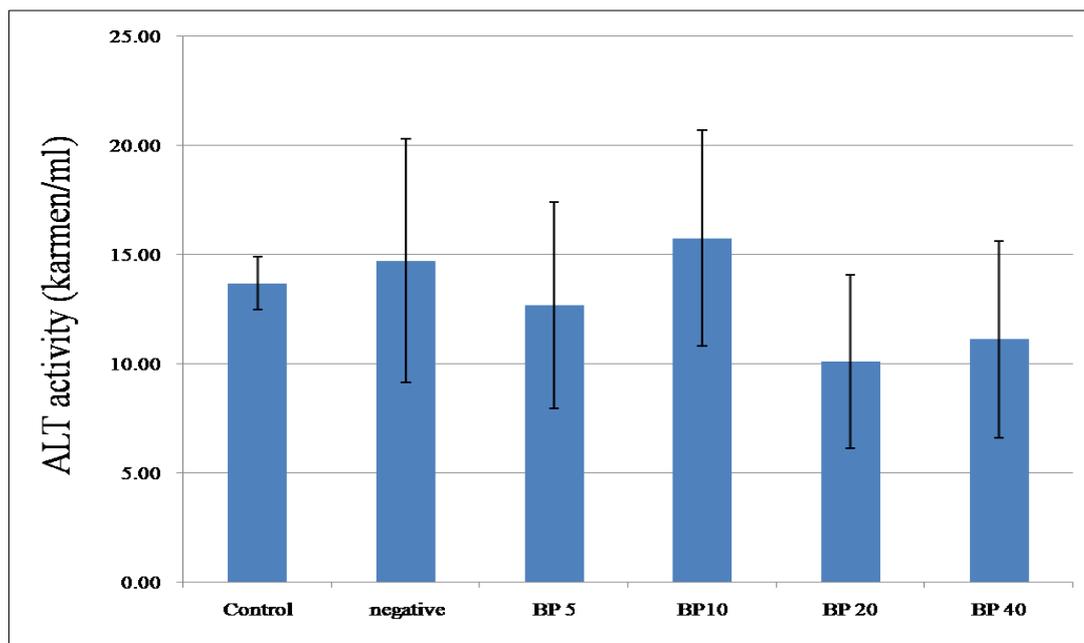


Fig. 2–30. ALT activity in the serum of 2,4–Di–*tert*–butylphenol diet mice.

Blood serum was collected from the mice immediately after behavior tests to assess the activity of ALT. Data represent the means ($n = 6$) \pm S.D. The statistical significance of differences among groups was calculated by one–way ANOVA. (* $p < 0.01$ vs. control group, # $p < 0.01$ vs. TMT group).

Control : Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

Negative ($A\beta$ group) : Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

BP 5 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (5 mg/kg)

BP 10 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (10 mg/kg)

BP 20 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (20 mg/kg)

BP 40 : Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (40 mg/kg)

(4) 석류 추출물로부터 분리된 활성물질의 2차 *in vivo* 행동실험

(가) Y-maze test

A β 를 injection하지 않은 control group은 A β 를 투여한 negative group에 비해서 약 10% 높은 인지능을 나타내었고, 활성물질을 식이한 group (BP5, BP10, BP20, BP40)은 control group과 비교할 때 거의 비슷한 수준의 인지능을 보였다. 이는 2,4-Di-*tert*-butylphenol이 A β 의 신경독성으로부터 보호효과를 나타내어 control 수준으로 인지능을 회복시켰음을 의미한다(Fig. 2-31).

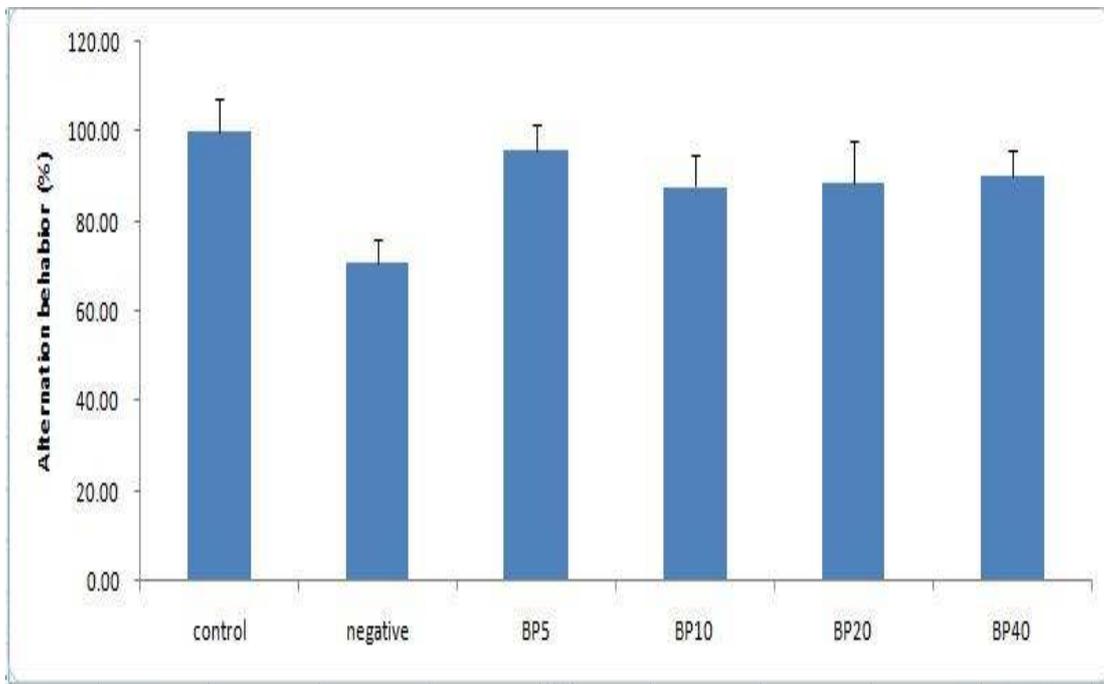


Fig. 2-31. Effects of 2,4-Di-*tert*-butylphenol on spontaneous alternation behavior. Protective effect of 2,4-Di-*tert*-butylphenol against the A β_{1-42} -induced memory impairment in Y-maze test. Spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min.

Control : Treated A β_{42-1} group and normal diet

Negative (A β group) : Treated with A β_{1-42} and normal diet

BP 5 : Treated with A β_{1-42} and diet group (5 mg/kg)

BP 10 : Treated with A β_{1-42} and diet group (10 mg/kg)

BP 20 : Treated with A β_{1-42} and diet group (20 mg/kg)

BP 40 : Treated with A β_{1-42} and diet group (40 mg/kg)

(나) Passive avoidance test

A β 를 주사하지 않은 control group은 A β 를 투여한 negative group에 비해서 안정된 기억학습능력을 나타내었고 활성물질을 투여한 group (BP5, BP10, BP20, BP40)은 활성물질의 농도가 높아질수록 기억학습능력이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 이는 석류에서 정제된 활성물질이 A β 의 기억학습능력 저해 효과 (학습능력의 상실유도)를 blocking하여 손상된 뇌기능을 회복하는 것을 확인시켜주는 결과이다(Fig. 2-32).

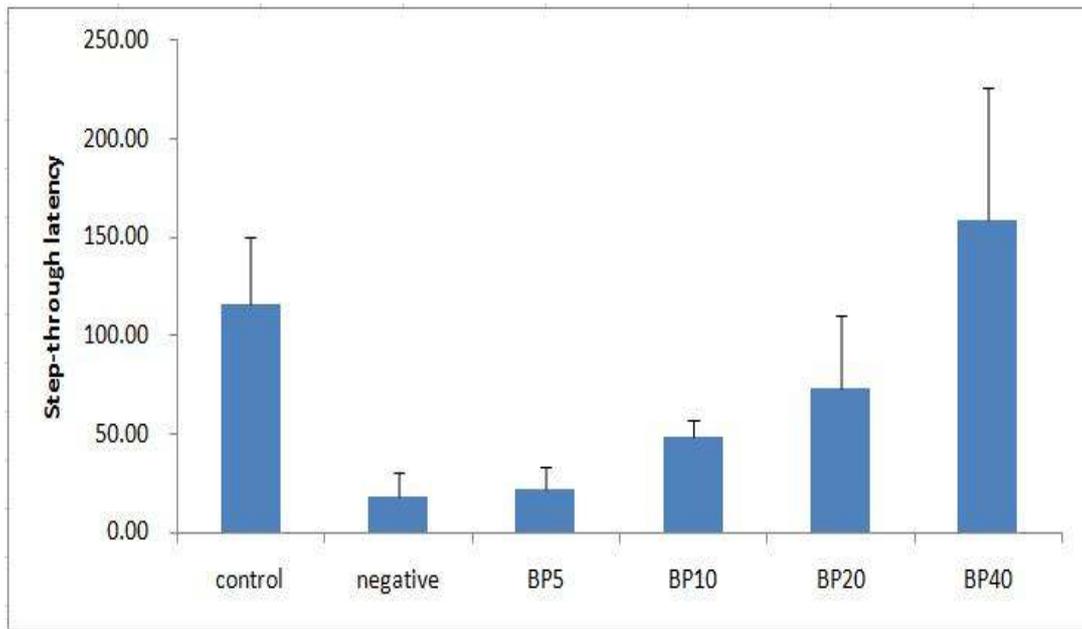


Fig. 2-32. Effect of 2,4-Di-tert-butylphenol on step-through latency in the passive avoidance test.

Protective effect of 2,4-Di-tert-butylphenol against the A β ₁₋₄₂-induced memory impairment in passive avoidance test. The testing trial was given 1 day after the training trial.

Control : Treated A β ₄₂₋₁ group and normal diet

Negative (A β group) : Treated with A β ₁₋₄₂ and normal diet

BP 5 : Treated with A β ₁₋₄₂ and diet group (5 mg/kg)

BP 10 : Treated with A β ₁₋₄₂ and diet group (10 mg/kg)

BP 20 : Treated with A β ₁₋₄₂ and diet group (20 mg/kg)

BP 40 : Treated with A β ₁₋₄₂ and diet group (40 mg/kg)

마. 활성 물질의 공업적 실용화

(1) 가공 적성 시험

공업적 실용화를 위해 가공 적성 및 제작 시험을 한 결과 특별한 문제점은 발견되지 않았다 (Figs. 2-33, 34).

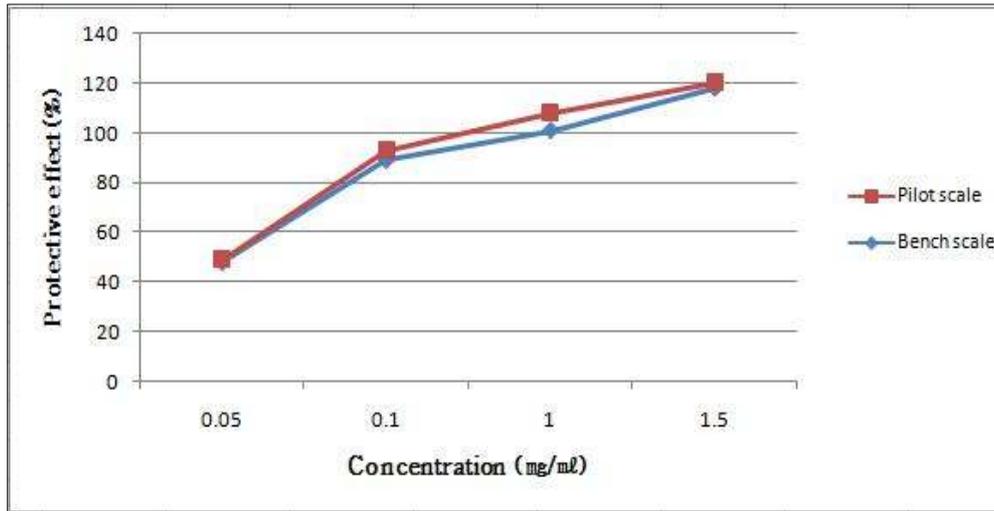


Fig. 2-33. Effect of extract concentrations on protective activity.

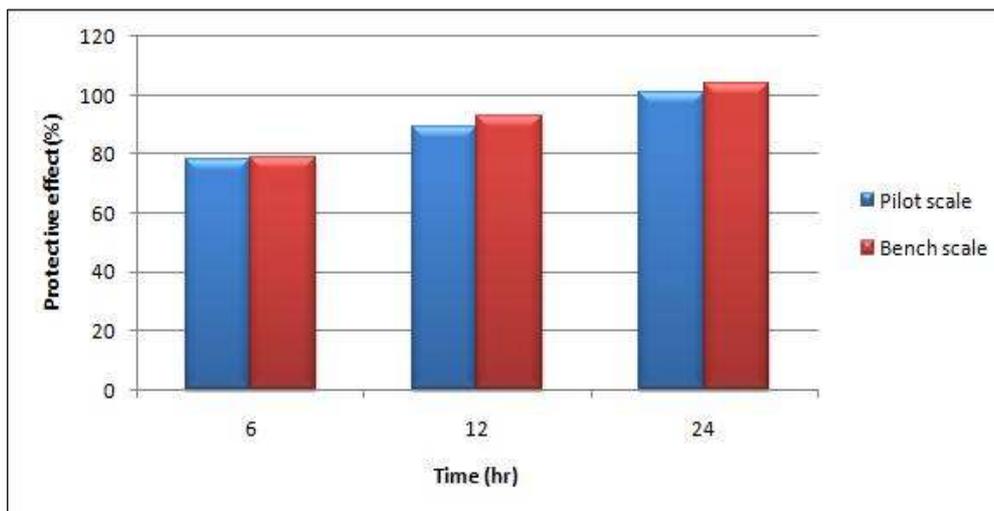


Fig. 2-34. Effect of extraction time on protective activity.

(2) 시작품 제작

(가) 연질 캡슐 제작

석류 (*Punica granatum*)의 추출분말 100 mg을 이용하여 제품의 향, 맛 등을 고려한 연질캡슐을 제작하였다(Fig 2-35). 부형제로서 소맥 배아유를 30-50%, 미강 추출물 10-20%, 베타카로틴 1-3%, 레시틴 1-2%, 토크페롤 1% 등을 사용하였고, 향미를 위해 생강추출물, 계피분 등을 미량 첨가하였다.

배합 예	
단위 : 1 Capsule	
제품유형 : 건강기능식품(연질캡슐)	
성분 : 분말소재 100mg	
소맥 배아유 50%	
미강추출물 10%	
베타카로틴 3%	
레시틴 2%	
비타민 C 1%	
권장섭취량 및 섭취방법 : 1일 3회, 1-2캡 술식 식전 또는 식후에 섭취 필요에 따라 증감가능	

Fig. 2-35. 연질 캡슐

* 보존 및 유통기준

본 제품의 효능 성분은 공기접촉, 온도, 물리적 충격에 안정한 천연화합물로서 물질 변화에 대한 위험은 없으나 가능한 직사광선을 피하고 저온에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통 상 바람직함.

(나) 농축액 및 드링크제 제조

석류 (*Punica granatum*) 의 추출 분말을 이용하여 25 ml 용 액상 제제를 제조하였다. 제품의 향, 맛, 안정성 등을 고려하여 3가지 정도의 배합을 만들었다. 성분에 표기되어있는 바와 같이 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상 과당, 올리고당, 벌꿀 등을 사용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨 또는 L-글루타민산 나트륨을, 산미제 및 pH 조절제로 구연산을 사용하였다. 향산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였다. 그 외에 식미의 향상을 위해 사과즙, 배즙 등을 혼합 하였다. 주성분의 배합은 100 mg으로 조제하였다(Fig. 2-36).

배합 예	
용량 : 25 ml	
제품유형 : 과즙희석음료	
성분 : 분말소재 100mg	
사과과즙 10%	
대추즙 1%	
배과즙 3%	
벌꿀 0.5%	
구연산 0.05%	
비타민 C 0.05%	
비타민 B6 염산염 0.01%	
L-글루타민산나트륨 0.01%	
니코틴산아미드 0.01%	
액상과당 0.01%	
안식향산나트륨 0.01%	

Fig. 2-36 농축액 및 드링크제

(다) 과립제 제작

석류 (*Punica granatum*)의 추출분말 50 mg에 배합 예와 같이 부형제로 유당, 옥수수 전분, 산미제로 구연산을 혼합하여 제작하였다(Fig. 2-37).

배합 예	
단위 : 1포(5g) 제품유형 : 건강기능식품(과립제제)	
성분 : 분말소재 50mg 옥수수 전분 (부형제) 3.5g 유당 (부형제) 0.65g 백당 (감미제) 0.5g 구연산 (산미제) 5mg 인삼추출물 1mg	
권장섭취량 및 섭취방법 : 1일 3회, 1회 1-2캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 필요에 따라 증감 가능	

Fig. 2-37. 과립제

(3) 제품의 외관 및 안정성 검사

위의 제작한 시작품들은 일종의 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속하므로 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년에 맞추어 이에 준하는 가혹실험 (고온, 고압)을 실시하여 제품의 외관과 미생물 검사를 실시하였다(Tables 2-4, 5).

Table 2-4. 제품의 미생물검사

- 연질 캡슐 제제의 저장 조건: 37°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
석류	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 드링크제제의 저장조건: 37°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
석류	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

s

- 과립 제품 저장 조건: 37°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
석류	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 연질 캡슐제제 저장 조건: 50°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
석류	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 드링크제제의 저장조건: 50°C, 1주일

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
석류	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 과립 제품 저장 조건: 50°C, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
석류	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

Table 2-5. 제품의 외관검사

-연질 캡슐제제의 저장조건: 37°C, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
석류	없음	없음	없음	없음

-드링크제제의 저장 조건: 37°C, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
석류	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 37°C, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
석류	없음	없음	없음	없음

-연질 캡슐제제의 저장 조건: 50°C, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
석류	없음	없음	없음	없음

-드링크제제의 저장 조건: 50°C, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
석류	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 50°C, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
석류	없음	없음	없음	없음

제 3절 간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 유효성분의 건강기능 식품화

1. 서설

간암은 아프리카, 대만, 중국, 한국, 동남아, 일본 등에서 흔하여 그 사망률은 인구 10만 명당 남자 32명, 여자 10.6명이다. 모든 암 중에서 간암이 차지하는 상대적 빈도는 남자는 15.5%로 위암에 이어 2위이고 여자는 4.5%를 차지한다. 우리나라 간암의 조발생률(粗發生率)은 인구 10만 명당 남자 20.7명, 여자 6.2명이고, 세계 인구에 보정한 발생률은 남자 30.5명, 여자 7.6명으로 세계에서 가장 높은 발생률을 보인다. 간암은 나이가 많을수록 발병이 증가하는 경향을 보인다.

간암의 가장 중요한 위험요인은 B형간염 바이러스 (HBV)와 간경변이며, 최근 C형간염 바이러스 (HCV)도 주목되고 있다. 인구집단에서의 연관성 조사와 분석적 역학연구에서 B형간염 바이러스와 간암 사이에 강하고 특이한 연관성을 볼 수 있는데, B형간염 항원의 만성보유자는 그렇지 않은 사람에 비해 간암 발생위험이 94~200배가량 높다고 알려져 있으며, 우리나라 간암 환자의 약 78.5%에서 현재 B형간염 바이러스의 감염이 진행 중인 것으로 나타났다. 그밖의 위험요인으로 아플라톡신(곰팡이에서 생기는 독소), 장기간의 피임약 복용, 단백동화 스테로이드, 혈중 α -1 항트립신결핍증, 티로신혈증(tyrosinemia) 등에 동반된 간경변 등이 거론되고 있다.

최근 항암연구에 있어서는 비가역적이고 짧은 시간에 발생하는 암의 개시 단계에서 저해하는 전략보다는 현실적이고 실질적인 암 예방제로서 비교적 장기간에 걸쳐 일어나고 가역적인 암의 진행 단계의 저해 효과를 갖는 물질이나 식품성분들을 찾는 연구가 집중되고 있다. 간암 등의 난치성질환의 경우 약물 치료 시 항암제를 경구 또는 정맥 투여 할 경우 약물이 일단 혈류를 통해 전신에 퍼졌다가 병소에 도달하게 되므로 병소에는 미량만이 집적된다. 따라서 병소에 적정량을 집적시키기 위해서는 많은 양의 약물을 투여해야 하고 이로 인한 부작용이 심각한 문제로 대두되고 있다. 또한, 대체로 효과가 좋은 암 억제제가 통증이나 발열 등의 부작용이 더 크다는 문제점이 있으며 방사선 요법의 경우 그 부작용이 특히 문제가 되고 있다.

이에 본 연구에서는 국내고유의 식용식물자원으로부터 검색, 획득한 미량성분이, 다양한 세포독성 실험 모델에서 독성을 나타내지 않는 농도를 확립하고, 간암의 진행, 이동 및 전이에 관여하는 주요한 현상인 갭 결합을 통한 세포 간 신호전달(gap junctional inter-cellular communication)을 회복시키고, 매트릭스 메탈로프로티나아제(matrix metalloproteinase: MMP)의 활성을 저해하여 간암 등에 대한 억제 효능을 나타내는지의 여부를 확인하고 이를 제품화 하고자 한다. 본 연구에서 적용된 지표들은 기존의 식품 분야에서는 널리 사용되어지지 않았던 marker로서 본 연구를 통하여 천연물에서 획득한 유효성분을 항암물질로 사용할 경우 기존의 간암 억제제 혹은 치료제에서 개선되어야 할 점인 정상적인 세포에서도 독성을 나타내는 문제점을 효과적으로 극복할 수 있을 것으로 판단되며 또한, nitroso-pyrrolidine계, quinoline계, phthalate계 화합물들에 의해 특이적으로 유도되

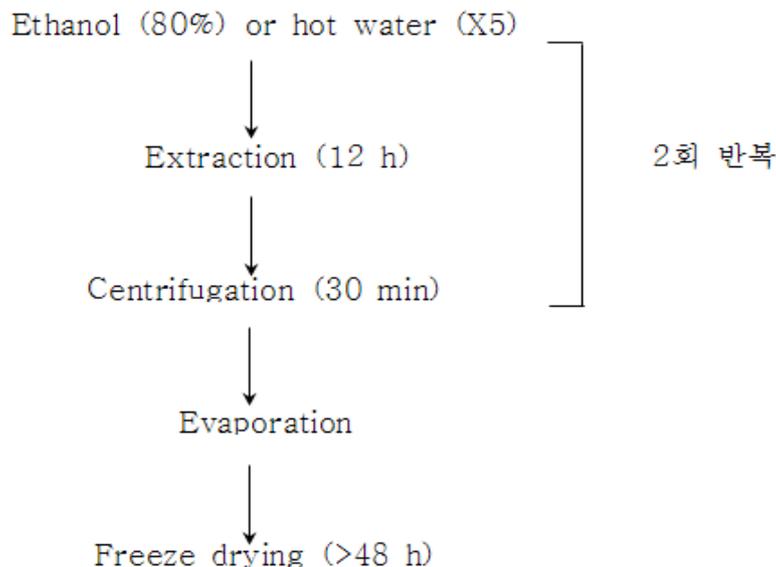
는 간암모델을 이용한 *in vivo* 시스템을 통하여 glutathione 수준, glutathione S-transferase 등 간 조직에서 특이적으로 유도되는 효소의 역할을 측정하여 임상적으로 응용할 수 있는 수준의 자료를 확보할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 재료 및 실험방법

가. 천연소재의 간암억제활성 검색

(1) 용매추출에 의한 간암 억제 효능을 갖는 추출물 제조법 확립

선행연구와 혼합물의 항산화활성을 근거로 간암 억제효능을 나타낼 수 있는 식용식물자원을 1차 선정하여 활성물질의 추출을 실시하였다. 추출방법은 식용식물자원의 5배수에 해당하는 에탄올 및 열수에서 12시간 동안 추출한 30분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 회수하고 동일한 방법으로 1회 반복 추출하였다. 추출되어진 용매를 감압농축기를 이용하여 추출물을 건조하였다. 건조된 식용식물자원 시료들을 이용하여 1차 선정 실험을 실시하였다. 대상 지표재료로는 항산화효과에 대한 지표물질로서 vitamin C와 사과 그리고 세포간 신호전달억제 회복효과에 대하여는 썩, 유근 피가 이용되었으며 죽엽차, 감잎차, 유기농녹차, 비유기농녹차 등 차 류에 대하여 활성을 비교하였다(Scheme 3-1).



Scheme 3-1. The preparation of extracts.

(2) 항산화 활성 조사법

1차 선별된 추출물 중에서 간암진행에 대한 항암효과의 메커니즘 및 원인물질 규명을 위하여 항산화 역가를 측정하였다. ABTS에 대한 전자 공여능을 측정하는 것으로 ABTS 20 mg을 PBS에 녹여 만든 ABTS 용액에 여러 농도의 시료용액 1 ml을 넣고 5초간 진탕시킨 후 30분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 활성을 비교하고 유효농도범위를 확보하였다. 복합물질의 시료 간 variation을 최소화하기 위하여 각 시료의 시간당 농도변화에 따른 추이곡선을 적분하여 total radical scavenging capacity (TRSC)값으로 나타내어 비교한 후 EC₅₀ 값을 계산하여 비교하였다.

(3) 활성성분 정량

1차 선별된 추출물 중에서 대표적 암 예방 식물성화합물인 페놀성 성분들의 함량을 분석하기 위해 Folin & Ciocalteu's phenol reagent를 이용하여 분광광도계로 측정 한다. 9 ml 시험관에 2.6 ml의 이차증류수를 첨가하고, 희석된 시료 또는 표준용액(ex. gallic acid 10, 30, 60, 100 mg/L) 200 μ l을 더해서 vortex 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 200 μ l을 시험관에 첨가하고 vortex한다. 6분간 실온에서 방치 후에, 7% Na₂CO₃ 용액 2 ml를 첨가하고 vortex한다. 시험관을 90분간 실온 (약 23°C)에 방치한 후에 750 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 총 phenol 함량은 mg gallic acid equiv. (GAE)/100 g fresh weight로 나타내었다. 녹차의 카테킨 함량은 HPLC로 분석하였다.

(4) *In vitro* 세포독성 조사

추출물의 세포 독성을 측정하기 위해 SK-Hep-1 세포를 사용하였다. DMEM 배지에 FBS를 10%로 첨가하고, 페니실린(penicillin) 100 IU/ml, 스트렙토마이신(streptomycin) 100 μ g/ml을 첨가한 배지를 이용하여, 5% CO₂, 37°C 배양기에서 상피세포를 배양하였다. 추출물의 첨가에 의한 암세포주의 성장 억제 효과를 조사하기 위하여, 상피 배양한 간암세포인 SK-Hep-1을 96 well plate에 1 x 10⁴개 세포를 분주하고, 추출물을 여러 농도로 첨가하여 72시간 동안 배양하였다. 72시간이 되기 4시간 전에 웰 당 MTT시약을 20 μ l 첨가하여 배양하였다. 배양 후 상층액을 모두 제거하고 남아있는 세포만을 남겨두고. 남아있는 염색된 세포를 DMSO (dimethyl sulfuroxide) 200 μ l로 녹인 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 독성검사 실시 후 최종시료의 *in vitro* 최대 활성 및 유효농도를 검증하였다.

(5) 활성검색방법 확립

(가) 세포간 정보전달 회복효과 측정

간암 억제능은 단순히 세포에 대한 독성으로만 판별하기 어렵기 때문에 이에 착안하여 억제기작을 규명함과 동시에 보다 정확한 활성판별을 할 수 있는 활성 검색법을 확립하고자 하였다. 간암 세포의 갭 결합을 통한 세포간 정보전달을 측정(gap junctional intercellular communication assay; GJIC)하여 간암 진행 과정의 저해 활성을 측정하기 위하여 scrape loding/dye transfer (SL/DT) assay 법으로 검색실험을 하였다. 간암 세포의 갭 결합을 통한 세포간 신호전달을 측정하기 위해 간암 세포로 SK-Hep-1 세포를 사용하였다. DMEM에 FBS를 10%로 첨가하고, 페니실린(penicillin) 100 IU/ml, 스트렙토마이신(streptomycin) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 배지를 이용하여, 5% CO_2 , 37°C 배양기에서 상기세포를 배양하였다. 이렇게 배양된 간암 세포는 2 ml plastic dish에 ml 당 1×10^5 개로 분주되어 24시간 동안 배양된 후 각 dish에 배양된 세포에 여러 농도의 추출물과 함께 배양하여 세포가 dish의 바닥의 90%이상 자라면 Lucifer yellow 염색액을 이용하여 GJIC의 회복여부를 공초점 현미경(BioRad, Hercules, CA, USA)로 측정한다.

(나) FOX assay

추출물의 간암 억제능을 나타내는 기전을 규명하기 위하여 간암억제 활성이 갭 결합을 통한 세포 간 정보전달의 억제를 회복시키는 효과로부터 유래하는지 또는 항산화효과로부터 유래하는지 의 여부를 판별하고자 하였다. H_2O_2 변화량을 측정하는 공지된 방법인 FOX2 assay법을 실시하여 판별하였다. Xylenol orange와 ammonium ferrous sulfate를 250 mM H_2SO_4 에 각각 1 mM과 2.5 mM이 되게 가하여 제조된 시약을 4.4 mM BHT (butyrate hydroxyl toluene)를 함유한 HPLC-grade 메탄올과 부피비가 1:9가 되도록 섞어서 working reagent를 제조하였다. 상기 세포실험과 동일한 조건에서 96 well microplate에 500 μM 의 H_2O_2 를 포함한 시료와 작업 시약을 1:9 부피비로 섞어 넣고 37°C 배양기에서 1시간 동안 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 유기농축차 80% 에탄올 추출물 군에서는 500 μM 의 H_2O_2 와 함께 시료로서 80% 에탄올 추출물을 각각 0~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였고, 대조군은 500 μM 의 H_2O_2 를 포함한 배양액만을 시료 대신에 사용하였다.

(다) MMP 억제능을 통한 암전이 억제효과 측정

상기 세포를 24시간 배양한 후, PBS로 씻어내고 serum-free media로 48시간 동안 배양한 후 상층액을 모아서 원심분리하여 정량(Beckman, DU650)한 후 동량의 total protein을 0.1% gelatin이

포함된 10% SDS-PAGE gel에 전기영동을 실시하였다. gel은 2.5% triton X-100으로 세 번 세척하고, 40 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 용액을 넣고 37°C에서 18시간 동안 배양한 후, 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색하여 gelatin이 분해된 부분을 표준시료와 비교하여 흰색밴드로 나타난 부분의 강도를 비교하였다.

나. 선정된 활성 추출물로부터 유효성분의 확보를 위한 특성 검토 및 추출물 전 처리 조건 확립

검색한 천연물 중 가장 활성이 좋고 상품화 가능성이 높은 유근피를 선정하여 추출방법을 선정하고 유효성분을 분석하였다. 추출물은 에탄올 희분에서 좋은 활성을 나타내었으며 저분자 중 활성 희분인 폴리페놀을 대상으로 정량분석을 실시하였다. 추출전 열수, 산, 세포벽 분해효소로 처리한 결과 미처리군과 비교하여 뚜렷한 차이를 보이지 않아 활성물질 분획을 위한 전처리는 생략하였다.

(1) 유근피의 항암 및 항암전이 효과

암이 발생되고 나서 생성된 암세포의 성장 억제 정도를 측정한다. 또한 암전이의 초기 단계에 깊이 관여하는 효소의 발현량을 효과적으로 억제하는지 측정하여 암 전이를 예방할 수 있는지 알아본다. 또한 갭 결합을 통한 세포간 정보전달을 측정함으로써 갭 결합의 항상성 불균형으로 일어나는 암 등의 질병에서의 회복 정도를 알아본다. 암전이 말기 단계에 발생하는 신생혈관 합성을 효과적으로 억제하는지를 살펴봄으로써 전이 과정을 효과적으로 억제할 수 있는지 알아본다.

(가) 천연물 추출 조건

Sample과 용매의 무게 비는 1:20으로 한다. 열수추출의 경우 중탕하여 추출하며, 유기 용매 추출의 경우 magnetic bar로 저어주면서 추출한다. 추출이 끝나면 비커에 거즈를 씌운 후 추출 혼합물을 붓는다. 추출물을 3000 rpm에서 15분간 centrifuge 한 후, filter paper로 여과(Whatman No. 41) 한다. Evaporator에서 농축시킨 후, deep freezer에서 동결 건조하여 분말 형태의 추출물을 획득한다.

(나) MTT assay

세포는 사람의 간암세포주인 HepG2를 사용하여 96 well plate에 2.0×10^4 의 세포를 분주한다. 24시간 배양 후, 여러 농도의 시료를 처리한 후 24시간 뒤에 MTT 시약으로 생세포를 염

색한다. 4시간 뒤에 540 nm에서 microplate reader를 이용해 흡광도를 측정해 세포 독성을 알아본다.

(2) 암전이 억제효과 검색

암세포에서 과발현되는 MMP-2와 MMP-9은 암전이의 초기 단계에 extracellular matrix (ECM)의 침윤에 높은 관여를 하는 것으로 알려져 있으며, MMP-2의 경우 종양세포와 혈소판의 상호 작용을 촉진해 암전이를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 간암활성이 있는 천연물들이 효과적으로 이 효소들을 억제하는지 알아봄으로써 암전이 초기단계에서 예방할 수 있는지의 여부를 검토해 본다.

(가) Gelatin zymography

The 96 well plate에 1.3×10^6 의 세포를 분주 한 후, 세포의 성장이 90%정도까지 이루어져있을 때 여러 농도의 시료를 처리한다. 72시간 후 배지를 수거한 후 농축하여 gelatin을 함유한 SDS-PAGE를 전기 영동하여 MMP-2와 MMP-9의 발현을 측정한다.

(3) 세포간 갭결합 신호전달 회복효과 검색

갭 결합은 조직에서의 항상성과 인접한 세포로의 빠른 2차 전달 물질의 수송으로 세포반응 조절을 촉진한다. 암을 비롯한 수많은 질병들이 갭 결합을 통한 세포 간 정보전달의 이상으로 생기는 항상성 불균형에 기인한다는 사실이 각종 문헌에 이미 보고된 바 있다. 본 연구에서는 유근피 추출물이 과산화수소 (H_2O_2)에 의해 발생하는 갭 결합을 통한 세포 간 정보전달의 억제를 회복하는 효능을 측정한다.

WB-F344 세포를 배양한 후, 배양된 세포를 2 ml 플라스틱 디쉬에 ml 당 1×10^5 개로 분주하여 약 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포가 90% 정도 dish에 가득 차면 각 dish에 배양된 세포를 10~1,000 $\mu g/ml$ 의 유근피 추출물 및 100 μM 의 H_2O_2 로 처리하였다. 대조군은 배양액으로만 처리한 그룹과 배양액 및 100 μM H_2O_2 로 처리한 그룹의 두 그룹으로 나누었다. 한 시간 후 lucifer yellow 염색액을 이용하여 갭 결합을 통한 세포 간 정보전달 정도를 공초점 현미경 (BioRad, Hercules, CA, USA)으로 측정하였다.

(4) 활성물질의 생물학적유효성 및 혈관 신생성 억제효과 검토

건강기능식품은 기능성 물질의 활성과 독성에 따라 그 가치를 평가받을 수 있다. 하지만, 체내로의 흡수가 저해, 대사과정에서의 pre-elimination은 기능성 물질의 이용률을 떨어뜨리는 요

소가 될 수 있다. Bioavailability는 물질의 체내 이용성을 나타내는 지표로서 기능성이 뛰어난 식품 또는 약물일지라도 낮은 bioavailability는 그 가치를 떨어뜨리기에 충분하다. Caco-2 cell line은 사람의 대장암 세포이지만 여러 번의 cloning과정을 거쳐 일반 소장세포와 유사한 성질을 지니게 된 세포로서 물질의 흡수율, 체내 이용률 등에 대한 실험에 많이 이용되고 있다. 본 실험은 Caco-2 cell line을 이용하여 추출물 내의 물질의 소장 내 흡수율을 알아봄으로서 체내 이용률을 간접적으로 시험하는데 그 목적이 있다.

또한 새로운 혈관을 형성하는 과정인 신생혈관형성(angiogenesis) 과정은 정상적인 조건에서는 거의 일어나지 않는 엄격히 조절되는 현상이나, 종양의 성장과 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 MMP-2는 혈관벽 세포들이 extracellular matrix를 분해하며 혈관을 형성할 위치로 이동할 수 있도록 해주는 신생혈관형성 촉진인자이며, 신생혈관형성이 일어나기 위해서는 MMP-2가 integrin v3에 결합해야 하는 것으로 알려져 있다. 암의 경우에 종양의 성장을 위해서는 새로운 혈관의 형성이 필수적이기 때문에 이를 적절히 억제한다면 종양의 성장을 억제하거나 더 나아가서는 제거할 수도 있을 것으로 사료된다. 실제로 여러 연구에서 단백질이나 펩티드 등으로 이루어진 여러 가지 억제인자들이 발견되었으며 이들은 종양의 성장을 억제하는데 상당한 효과를 보여주었다.

(가) Caco-2 human intestinal model

Permeability가 있는 6-well trans well plate에 cell이 잘 붙어 자랄 수 있도록 collagen 처리를 한 후 Caco-2 cell을 6.4×10^4 으로 seeding한다. 약 20일간 배지 (DMEM)를 교환해주며 cell을 confluence시킨 후, 추출물을 배지와 일정 비율로 섞어서 cell apical에 처리한다. 네 시간 후 basal media를 회수하여 HPLC를 이용해 목표 물질을 분석하고, cell에 처리한 양의 추출물과 비교해 Caco-2 cell내 흡수율을 알아본다. Cell integrity의 측정은 lucifer yellow assay를 이용한다.

(나) Chorioallantoic membrane (CAM) assay:

수정란을 90% 습도가 유지되는 37°C 배양기에 넣어 배양 후, 4일 배가 되면 계란의 끝부분에 구멍을 내어 알부민 3 ml을 뽑아낸 뒤, 계란의 공기 주머니 아래쪽을 소독 후, 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형 창문을 만들고, 막을 제거한 후 유리 테잎으로 구멍을 막는다. 5일 배가 되면 살균 처리된 thermanox 12 mm의 coverslip 위에 시료를 점적하여 용매를 완전히 말린 후, CAM 위에 올려놓고 밀봉하여 배양한다. 대조군으로 retinoic acid (10 μ g/egg)를 사용한다. 2일간 배양시킨 후 10% fat emulsion (Intralipid, 녹십자)을 CAM에 주입 후 해부 현미경으로 혈관신생효과를 관찰하고, 사진을 찍는다. 실험은 각 군당 20개씩 총 3회 실시하며, 수정란 20개 이상의 결과가 70% 이상 억제효과가 있을 경우에 한해 혈관신생억제효과가 있는

것으로 인정한다.

(5) 항산화 효과 입증 및 부분정제 유효성분 함량 분석

암의 발생 단계에서 영향을 주는 여러 요인들 중 하나인 free radical의 소거 능력을 통해 항산화 효과를 입증하고, 이를 통해 암 발생의 위험성을 낮추거나 예방할 수 있음을 확인한다. 또한 추출단계에서 높은 활성을 나타낸 획분에서 고농도로 농축된 저분자의 폴리페놀 함량 분석을 통해 발암성 억제 및 항산화효과 등을 낮추는 물질 중 하나인 총 폴리페놀의 함량을 알아보았으며 활성획분에 대한 HPLC 분석을 수행하였다.

(가) 항산화 효과 검토 (DPPH assay)

Sample과 standard (Vit-C)의 stock solution을 준비한다. DPPH solution (OD값이 0.7이 되도록 희석)을 만든다. Standard 0.1 ml과 DPPH solution 2.9 ml을 섞는다. 어두운 곳에서 30분간 반응시킨다. 517 nm에서 흡광도를 측정한다. Standard의 흡광도에 대한 농도의 standard curve를 구한다. Control은 DPPH 2.9 ml에 EtOH 0.1 ml blank는 EtOH만 담아서 측정한다. Sample의 OD 값으로 항산화 능력을 구한다.

(나) 활성성분 분석

유근피 추출물 중 에탄올 추출물에서 높은 활성을 보이는 것으로 미루어 저분자물질 그 중에서도 여러 문헌을 통하여 항산화 능력이 뛰어난 것으로 알려진 폴리페놀의 함량을 분석함으로써, 유근피 내의 저분자인 폴리페놀의 수준을 측정한다. 항산화 능력 뿐 아니라 체내 흡수에도 용이하며, 저분자이므로 체내 분해과정에서의 변화가 적고 발암의 각 단계에서 억제효과가 있는 물질인 폴리페놀의 함량을 측정함으로써 열수 추출물과 에탄올 추출물의 폴리페놀 수준을 비교하고, 총 폴리페놀의 함량을 측정한다. Standard stock sol. (gallic acid)을 희석한 뒤, 빈 falcon tube에 DW를 2.6 ml 씩 넣는다. blank와 standard solution을 0.2 ml씩 넣는다. Folin-ciocaltue's phenol sol.을 0.2 ml 씩 넣는다. Vortexing 후 7분간 반응 시킨다. 7% Na₂CO₃을 2 ml 씩 넣고, 90분간 어두운 곳에서 반응 시킨다. 750 nm에서 흡광도를 측정한다. Standard curve를 그린 후 미지의 sample 농도를 알아낸다.

(6) 추출물의 활성 물질의 규명

(가) MTT assay를 이용한 용매별 분획의 활성 입증

유근피 에탄올 추출물의 solvent partition을 통해 fraction을 나누었다. Funnel을 이용하여 24시간 동안 용매를 흘려줌을 반복하였다. 3배의 용매를 흘려주며, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol의 순서로 진행하였다. 이렇게 얻어진 용매는 동결 건조를 통해 sampling하였으며, cell viability 측정을 위해 MTT assay를 실시하였다.

정상 간 세포주인 Chang liver과 간암 세포주인 HepG2를 각각 96 well에 seeding하여 24시간 뒤에 10 µl의 sample, 90 µl의 DMEM (-) 배지를 처리한다. 24시간 후에 MTT 시약을 처리하고, 4시간 뒤 DMSO로 dissolve 후 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

(나) 용매 Fraction의 Molecular Weight에 의한 분획물질의 활성 입증

위 실험에서 결과가 가장 좋은 ethyl acetate fraction을 molecular weight에 따라 나누어 같은 방법으로 실험하였다. 분획은 Centricon-10 (Millipore, USA)을 사용하여 10,000 MW이상과 10,000 MW이하의 fraction으로 나누어 진행하였다.

(다) HPLC를 통한 최종 활성 분획 물질의 분리

분자량으로 10,000 MW으로 나누어진 분획 중 10,000 MW이하의 유근피 에탄올 추출물 1000 ppm을 이용하여 실험하였다. Waters HPLC system을 사용하였으며, two solvent-delivery system (Waters 515, USA), autosampler (Waters 717, USA), photodiode detector (Waters 2996, USA)로 구성되어있다. Mobile phase A는 0.1% acetic acid, B는 acetonitrile을 이용하여 gradient를 주어 UV 280 nm에서 측정하였다.

(7) 알코올에 의한 간 손상에 대한 보호 능력 입증

(가) 알코올 분해효소인 alcohol dehydrogenase와 aldehyde dehydrogenase의 활성 측정

대표적인 알코올 분해 효소인 alcohol dehydrogenase (ADH)와 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)의 활성 능력을 측정한다. Reaction mixture와 enzyme solution을 섞은 후, 5분간의 반응 시간 후에 알코올을 주입하여 그 분해능을 340nm에서 흡광도를 측정한다.

(나) 동물실험을 통한 간 보호 능력 측정

- *In vivo assay*계 확립 및 유근피 추출물의 활성 측정

활성이 검증된 유근피의 *in vivo* 활성측정을 위해서, Wistar-male rat를 준비하고 각 group

당 동일량의 일반사료를 제공한다. Control group을 제외한 그룹에서 30% ethanol를 5g/kg body weight의 농도로 oral administration하며, 30% ethanol 섭취 15분전 미리 sample group은 500mg/kg body weight 농도의 sample을 oral administration 시킨다. 사육은 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12 hr-photoperiod chamber 조건에서 4주간 이루어진다. 4주간의 사육이 끝난 후, rat의 무게를 측정하고 마취 상태에서 신속한 dissection이 이루어진다.

- 혈청 분석에 따른 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), serum triglyceride (STG), total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol의 활성 측정

마취된 쥐의 혈관을 통해 whole blood을 뽑아낸 뒤, 1000rpm에서 centrifuge하여 혈청만 분리해낸다. 분리해낸 혈청으로 혈청 분석기인 Cobas c111 (Roche applied science, USA)을 이용하여 분석하였다.

- 조직 분석에 따른 hepatic triglyceride (STG), total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol의 활성 측정

간 조직을 0.5 g씩 분리한 뒤, homogenize 한다. Homogenize된 조직을 ethylation하여 fat만을 분리하여 1% Triton용액에 녹여 분석한다. 분석은 혈청 분석기인 Cobas c111 (Roche applied science, USA)을 이용하여 분석하였다.

- 조직 절편 분석을 통한 세포 손상도 측정 및 triglyceride 측정

간 조직을 절편하여 histopathological examination을 실시한다. 혈액을 제거 한 후, 같은 크기로 조직을 절편하여 포르말린으로 고정한다. *Haematoxylin-Eosin* (H&E) 법으로 staining하여 조직을 현미경에서 관찰한다. 절편한 조직에서 파라핀을 제거한 후, Oil red O법을 실시하여, 조직에서의 triglyceride를 측정한다.

다. 추출물의 간암 활성 입증

(1) CAA (Cellular Antioxidant Activity) assay를 통한 유근피 추출물의 활성 측정

Hep G2 (Hepato-carcinoma) cell을 96 well dish에 6.0×10^4 cells/well/100 μ l의 농도로 seeding 한다. 24시간 후 PBS로 washing해 준 뒤, 100 μ g/ml의 농도의 sample과 25 μ M DCFH-DA를 100 μ l의 (-)medium에 첨가하여 처리한다. 한 시간 뒤 600 μ M ABAP/100 μ l

HBSS의 oxidant를 첨가 해 준 뒤 fluoremeter (485/538 nm)로 한 시간 동안 5분 간격으로 측정한다.

(2) Annexin V-PI staining을 통한 apoptosis 유도 현상 관찰

간암세포인 HepG2 세포를 6 well dish에 1.0×10^6 cells/well/2000 μ l의 농도로 seeding 한다. 24시간 후 PBS로 washing해 준 뒤, 100 μ g/ml의 농도의 sample을 2000 μ l의 (-)medium에 첨가하여 처리한다. 각각의 6시간, 24시간의 cell을 collect하여 flow cytometry assays를 이용하여 측정한다. Cell에 1 ml의 propidium iodide (PI) staining mixture을 처리한다. Cytomics FC 500 (Beckman coulter, USA)을 이용하여 cell apoptosis를 측정한다.

(3) ELISA법을 이용한 간암전이 지표 효소인 MMP-2와 MMP-9 정량

간암세포인 HepG2 세포를 6 well dish에 1.0×10^6 cells/well/2000 μ l의 농도로 seeding 한다. 24시간 후 PBS로 washing해 준 뒤, 10, 50, 100 μ g/ml의 농도의 sample을 2000 μ l의 (-)medium에 첨가하여 처리한다. 24시간 뒤, medium을 모아서 centricon으로 농축하여 실험에 사용한다. Assay는 Quantikine MMP-2와 MMP-9 kit (R&D system)의 instruction manual을 이용하여 진행하였다. MMP-2와 MMP-9의 standard curve를 측정하여 그 양을 정량하였다.

라. 파래의 항암 효과

Screening을 통해 높은 활성이 확인 된 파래가 특이적으로 간암 세포 등 다양한 암세포주에 대한 억제효과를 나타내어 효과를 극대화 할 수 있는 추출 조건을 검색하고 상품화에 적용할 수 있는 방안을 모색하고자 하였다.

(1) MTT assay:

세포는 HT1080 (fibrosarcoma cell, 섬유 육종 세포), MCF7 (breast cancer cell, 유방암세포), B16/F10 (melanoma cell, 피부 흑색종 세포), HepG2을 사용하여 96 well plate에 1.0×10^5 의 세포를 분주한다. 24시간 배양 후, 여러 농도의 시료를 처리한 후 48시간 뒤에 MTT 시약으로 생세포를 염색한다. 3시간 뒤에 570 nm에서 microplate reader를 이용해 흡광도를 측정해 세포 독성을 알아본다.

(2) 파래의 항혈전 효과

해조류의 경우 육상식물에 비해 비타민 및 미네랄, 특히 마그네슘, 칼슘, 요오드, 철 등의 함량이 높고 해조류를 구성하고 있는 다당류의 독특한 구조적인 특성으로 생리활성이 강한 물질로 알려지고 있어 최근 건강식품으로 많이 이용되고 있다. 이러한 점을 고려하여 본 연구에서는 수종의 해조류를 대상으로 항응고 활성을 검색한 후 높은 활성을 나타낸 파래를 선정하여 파래에서 얻은 각각의 추출물들에 대한 혈액 항응고 활성을 검토하였다.

(가) 추출 용매에 따른 항응고 활성 검토

본 실험의 재료 중 파래는 완도산으로 완도군 수산업협동조합에서 건조된 것을 구입하여 blender로 분쇄한 후 사용하였다. 파래 5 g에 각각 메탄올, 증류수, 1 N NaOH, 1 N HCl을 100 ml씩 가해 2시간 환류 추출하여 산 또는 알칼리추출물의 경우 중화시켜 원심분리(5,000 rpm, 20분)한 후 유기 용매 추출물의 상등액은 감압 건조하고 그 외 추출물의 상등액은 증류수에 투석, 동결 건조하여 얻은 추출물을 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 제조하여 APTT법으로 항응고 활성을 측정하였다.

(나) 알칼리 추출 농도에 따른 항응고 활성 검토

측정 결과 가장 높은 항응고 활성을 나타낸 알칼리 추출 조건을 0.1 N NaOH, 1 N NaOH, 2.5 N NaOH로 농도를 달리하여 추출한 후 얻어진 추출물을 상기의 방법으로 시료를 제조하고 항응고 활성을 측정하였다.

(다) Activated partial thromboplastin time (APTT)에 의한 항응고 활성 측정

내인성 혈액응고 및 전반적인 항응고 활성은 APTT으로 측정하였다. 시료를 함유한 100 μl 의 건강한 성인의 혈장을 APTT 진단시약 100 μl 과 혼합한 후 37°C에서 정확히 3분간 예열한 다음 37°C에서 미리 예열된 20 mM CaCl_2 100 μl 를 가한 후 blood coagulation analyzer (BC2210, (주)京都第一科學, Japan)를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 기록하였으며 대조구는 시료를 첨가하지 않은 순수한 혈장 100 μl 를 이용하여 응고 시간을 측정하였다.

마. 유근피 추출물로부터 간암억제 유효성분의 공업적 실용화

(1) 유근피 추출물을 이용한 연질 캡슐 제작

유근피의 추출 분말 100 mg에 소맥 배아유를 30-50%, 미강 추출물 10-20%, 베타카로틴 1-3%, 레시틴 1-2%, 토코페롤 1% 등을 부형제로 사용하고, 맛을 고려하여 생강추출물, 인삼분 등의

각종 추출물을 미량 첨가하였다.

(2) 유근피 추출물을 이용한 드링크제 제작

유근피의 추출 분말의 이용하여 내용액 제제를 만들었다 제제의 맛, 향, 안정성 등을 고려하여 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상 과당, 올리고당, 벌꿀 등을 사용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨을, 산미제 및 pH 조절제로 구연산을 사용하였다. 항산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였다. 그 외에 식미 향상을 위해 사과과즙 같은 과일과즙을 혼합해 준다. 주성분의 배합은 100 mg으로 하여 조제 하였다.

(3) 유근피 추출물을 이용한 과립제 제제

유근피의 추출 분말 300 mg에 부형제로 유당 700 mg, 옥수수 전분 3.5 mg, 산미제로 구연산 5 mg을 혼합하고 spray dry 한 후 제과 하였으며 함습도를 시험한 후 정립하고 최종 혼합하였다.

바. 제품의 외관 및 안정성 검사

본 연구에서 개발된 제품들은 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속하므로 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가혹시험 (고온, 고압) 을 실시하여 제품의 외관과 미생물 검사를 실시하였다.

3. 결과

가. 용매추출에 의한 간암 억제 효능을 갖는 추출물 최적조건 확립

추출조건은 추출물의 제품화 가능성을 고려하여 열수와 80% EtOH로 추출하여 수율을 비교하였다. 비교적 열수추출물에서 80% 에탄올 추출물보다 2배 가까이 높은 수율을 나타내었으나 항산화도는 에탄올 추출물에서 비교적 높은 값을 나타내었다(Table 3-1). 이 중 유기농 녹차는 가장 높은 항산화 활성을 보였으며 전반적으로 동결건조시료는 고열건조시료에 비하여 비교적 높은 수율과 활성을 나타내었다(Table 3-2). 1차 검색결과 가장 활성이 좋았던 유기농 녹차시료를 대상으로 각 추출조건에서의 수율과 활성을 고려하여 최적조건을 확립하였다.

Table 3-1. Yields of extracts from hot water and 80% EtOH.

		Extracts					
		사과	쑥	감잎차	죽엽차	녹차 (비유기농)	녹차 (유기농)
Yields (% dry wt.)	Hot water extracts	15.1	20.0	17.3	14.9	13.6	12.8
	80% EtOH extracts	8.9	7.2	8.2	6.4	6.3	6.8

Table 3-2. The antioxidant activity of extracts from hot water and 80% EtOH.

		Extracts (100 mg)					
		사과	쑥	감잎차	죽엽차	녹차 (중국산)	녹차 (유기농)
Antioxidant activity (μg) (VCEAC)	Hot water extracts	190 \pm 24	131 \pm 15	123 \pm 21	104 \pm 31	340 \pm 23	371 \pm 54
	80% EtOH extracts	215 \pm 38	175 \pm 12	138 \pm 20	127 \pm 19	324 \pm 21	355 \pm 32

나. 복합물질에 대한 항산화 활성 비교법 확립

간암 억제능 검색의 1차지표로 사용된 항산화 활성을 나타내는 대표적인 물질인 vitamin C를 지표물질로 하여 g당 vitamin C equivalent (VCEAC)를 계산하여 비교하기 위하여 ABTS radical assay법을 이용하여 vitamin C의 시간대별 농도별 항산화 활성을 조사하였다. Vitamin C의 ABTS radical 소거능은 농도에 의존적이었으나 반응시간에 따라 차이를 보이는 것으로 나타났다. 극성용매에서 용출되는 항산화활성에 대하여 민감도를 나타내는 ABTS radical의 소거능에 대하여 민감도가 가장 좋은 시간대를 반응시간에 baseline을 조정 한 후 kinetic parameter를 고려하여 최적 조건에서 활성을 조사하여 추출물의 항산화 활성과 비교하였으며, 비교값은 VCEAC값으로 나타내었다(Fig. 3-1).

Fig. 3-2에서 볼 수 있듯이 라디칼 소거능은 vitamin C의 농도와 반응시간에 대하여 의존적으로 나타났으나 농도에 따라 활성도가 포화되는 시간대가 다르게 나타나 각 데이터 값이 나타내는 곡선을 적분한 값을 비교하는 것이 variation이 큰 복합물질의 활성을 비교하여 나타내는데 효과적인 것으로 사료되었다. 추출물에서도 마찬가지로 각 시간대별, 농도별 항산화능을 나타낸 곡선면적의 적분값을 비교하여 항산화 활성을 비교하였다. 이때 각 농도에서 농도에 대한 반응성의 R^2 값이 비교적 높은 사과추출물과 비교하여 활성을 나타내었다. 전반적으로 유기농녹차에서 비유기농녹차보다 높은 항산화 활성을 나타내었다(Fig 3-3). 본 연구를 통한 total radical scavenging

capacity (TRSC) 방법의 개발로 variation이 큰 추출물상태의 항산화활성에 대한 데이터 제공과 상대비교가 가능할 것으로 사료된다.

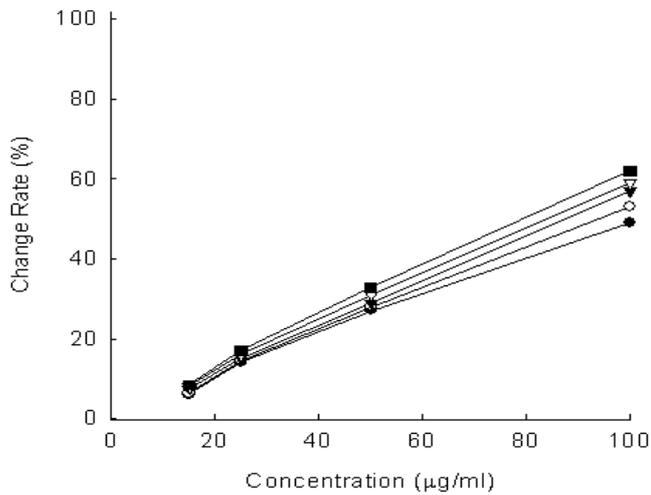


Fig. 3-1. Changes of antioxidant activities of vitamin C at different reaction time. Filled circle: 3 min, open circle: 10 min, filled triangle 20 min, open triangle: 40 min, rectangle: 60 min. Average values of three experimental data are expressed without error bars.

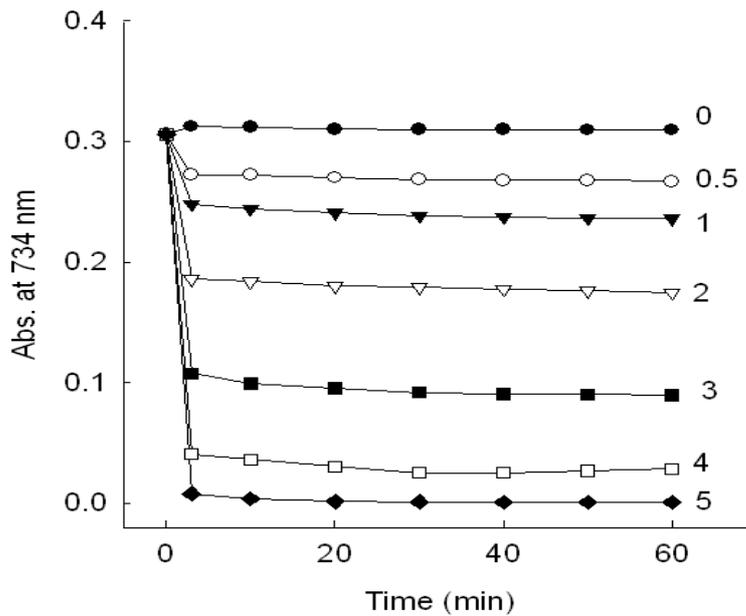


Fig. 3-2. Kinetics of reaction of ABTS radicals with antioxidants. Vitamin C at the concentration of 0 to 5 µg/ml was reacted with 100 µM ABTS radicals. Average values of three experimental data are expressed without error bars.

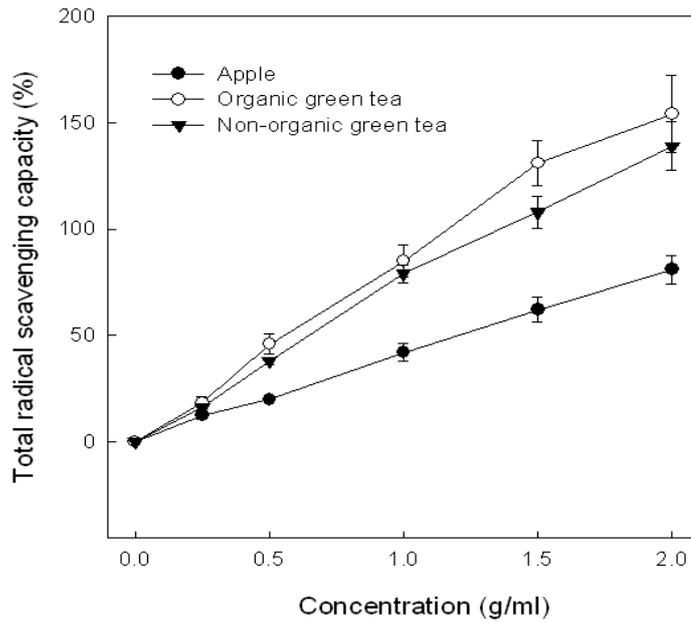


Fig 3-3. TRSC of extracts.

Values are expressed as % increase in the integrated area compared with the control without antioxidants. Average values of three experimental data are expressed without error bars.

다. *In vitro* 세포독성 조사

Table 3-3에서 나타나듯이 유기농 녹차는 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포 독성을 거의 보이지 않았던 반면 비유기농 녹차는 약간의 세포독성을 보였다. 유기농 녹차는 비유기농 녹차에 비하여 항산화 활성이 높았으며 세포독성을 나타내는데 유효범위를 고려하여 유기농 녹차를 대상으로 간암 억제 활성능을 조사하였다.

Table 3-3. Comparison of the cytotoxicity of extracts of organic green tea and non-organic green tea.

Concentration of extracts ($\mu\text{g/ml}$)	Cytotoxicity of green tea extract (%)	
	organic	non-organic
0	0	0
10	-2.6 ± 0.6	-0.4 ± 0.2
20	-5.3 ± 2.3	1.5 ± 0.4
40	4.6 ± 4.0	12.5 ± 5.2
80	15.4 ± 4.5	34.0 ± 11.6

라. 활성검색방법 확립

(1) 세포간 정보전달 회복효과 측정

간암의 진행 단계에서 갭 결합 채널에 의한 세포간 신호전달이 억제되는 현상은 중요한 생화학적 지표로 인정되고 있으며, 특히 간암에 있어서 특히 커넥신 32와 26이 결핍이 중요한 원인으로 이러한 현상이 나타나는 것으로 잘 알려져 있다. 반면, 이러한 억제를 회복시키는 물질은 간암의 진행단계를 저해함으로써 간암의 억제 효과를 갖는 것으로 인정되고 있어 본 연구에서 간암 억제능을 나타낼 수 있는 활성지표로서 선정되었다.

Table 3-4에서 나타난 바와 같이 갭결합을 통한 세포 간 정보전달 억제는 추출물의 농도가 증가함에 따라 증가하였으며 80% ethanol 추출물에서 열수추출물보다 높은 활성을 나타내었다.

Table 3-4. Rate of increase in GJIC (%) by organic green tea extracts.

		Concentration of organic green tea extract ($\mu\text{g/ml}$)				
		0	5	10	20	40
Extracts	Hot water extract	-	-	10	25	35
	80% Ethanol extract	-	5	15	40	50

과산화수소에 의해 유도되는 세포간 정보전달 억제회복능이 어느 정도 항산화효과에 의존하는지의 여부를 판별하기 위하여 유기농녹차 추출물을 대상으로 FOX assay를 실시한 결과 500 μM 의 과산화수소를 첨가한 대조군의 경우는 양의 변화가 없었으나 과산화수소를 제거하는 catalase의 경우 과산화수소를 농도 의존적으로 제거하는 것을 확인할 수 있었다. 유기농 녹차의 경우 과산화수소를 줄이기는 하였으나 그 정도가 미약한 것으로 보아 추출물의 과산화수소에 의하여 유도되는 GJIC의 회복능은 항산화효과에 의존한다기보다는 세포 간 신호전달에 의한 것임을 알 수 있었다(Fig. 3-4).

Fox assay에 의하여 추출물의 GJIC 회복능을 나타내는 기작을 비교하기 위하여 선행실험을 통하여 항산화활성에 의존하지 않고 GJIC 회복능을 나타내는 유근피를 동일한 조건 (열수, 80% EtOH)에서 추출하여 비교실험을 한 결과를 Fig. 3-5에 나타내었다. 유기농 녹차의 경우와 비교하여 같은 농도에서 과산화수소 값이 오히려 약간 증가하는 결과를 나타내어 항산화활성은 GJIC 회복능과 관련이 없는 것으로 나타났다.

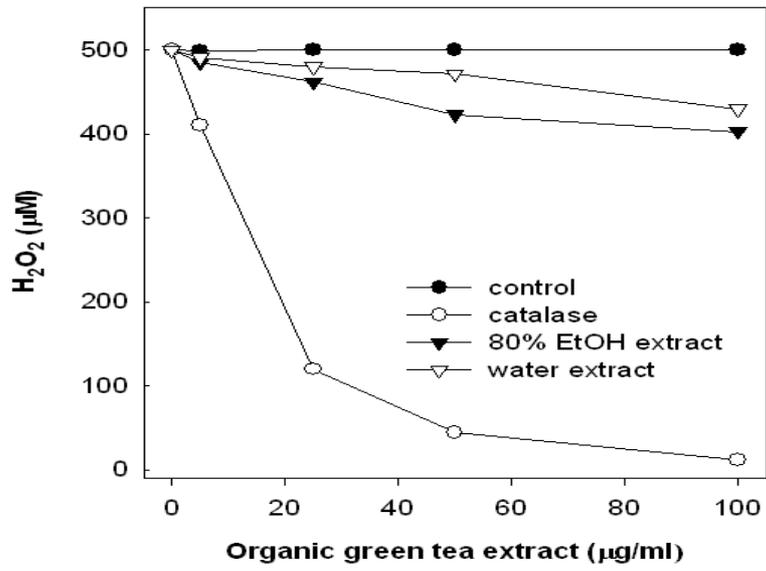


Fig. 3-4. Change of peroxide by organic green tea extract.

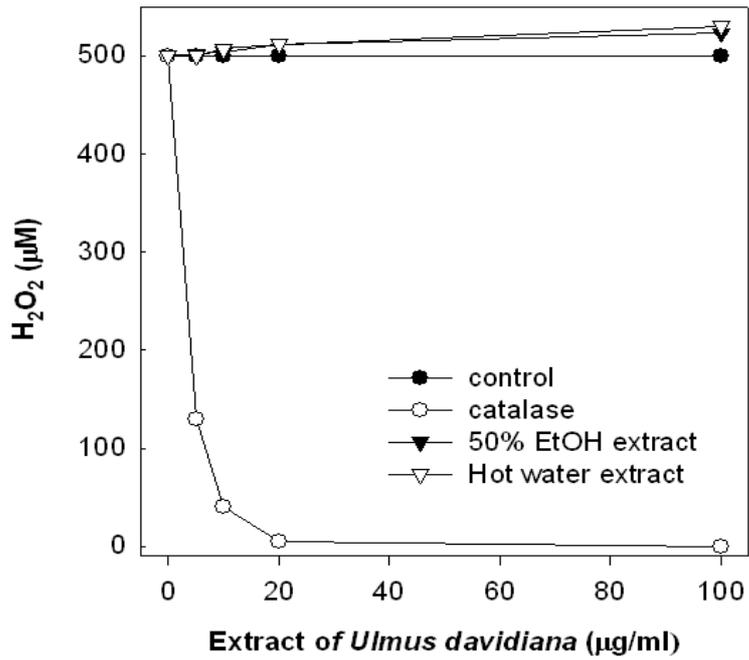


Fig. 3-5. Change of peroxide by *Ulmus davidiana* extract

(2) 암전이 억제효과 측정

MMP는 암의 이동과 전이에 중요하게 관여하는 효소로, 세포외 기질을 녹이는 대표적인 효소로서 암의 전이뿐만 아니라 암의 진행의 여러 단계를 촉진시키는 것으로 알려졌으며, 많은 종류의 암종에서 발현이 증가되어 있고, 암의 전이에 가장 직접적인 관련이 있는 gelatinase로서 간암의 진행에 있어서도 역시 중요한 역할을 하고 있어 본 연구의 항암지표로 설정되었다. MMP활성을 억제시키는 물질은 최근 새로운 암 억제제로서 주목받고 있다.

유기농녹차 80% EtOH 추출물의 경우 40 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 MMP-9에 대한 억제효과를 나타내었으며 같은 농도에서 미약한 정도의 세포독성을 나타내었으며 50% 이상의 갭 결합을 통한 세포간 신호전달 회복능을 나타내었다(Fig. 3-6). 따라서, 유기농녹차 추출물은 세포 독성을 나타내지 않는 농도범위에서 산화적 스트레스에 의한 갭 결합을 통한 세포간 신호전달의 억제를 다시 회복시키고, MMP의 활성을 억제함으로써 간암 억제에 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

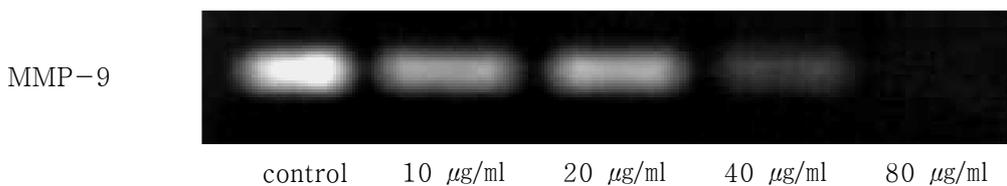


Fig. 3-6. Inhibition of MMP expression of organic green tea extract.

마. 선정된 활성 추출물로부터 유효성분의 확보를 위한 특성 검토 및 추출물 전처리 조건 확립

검색한 천연물 중 가장 활성이 좋고 상품화 가능성이 높은 유근피를 선정하여 추출방법을 선정하고 유효성분을 분석하였다. 추출물은 에탄올 희분에서 좋은 활성을 나타내었으며 저분자 중 활성획분인 폴리페놀을 대상으로 정량분석을 실시하였다. 추출전 열수, 산, 세포벽 분해 효소로 처리한 결과 미처리군과 비교하여 뚜렷한 차이를 보이지 않아 활성물질 분획을 위한 전처리는 생략하였다(Fig. 3-7).

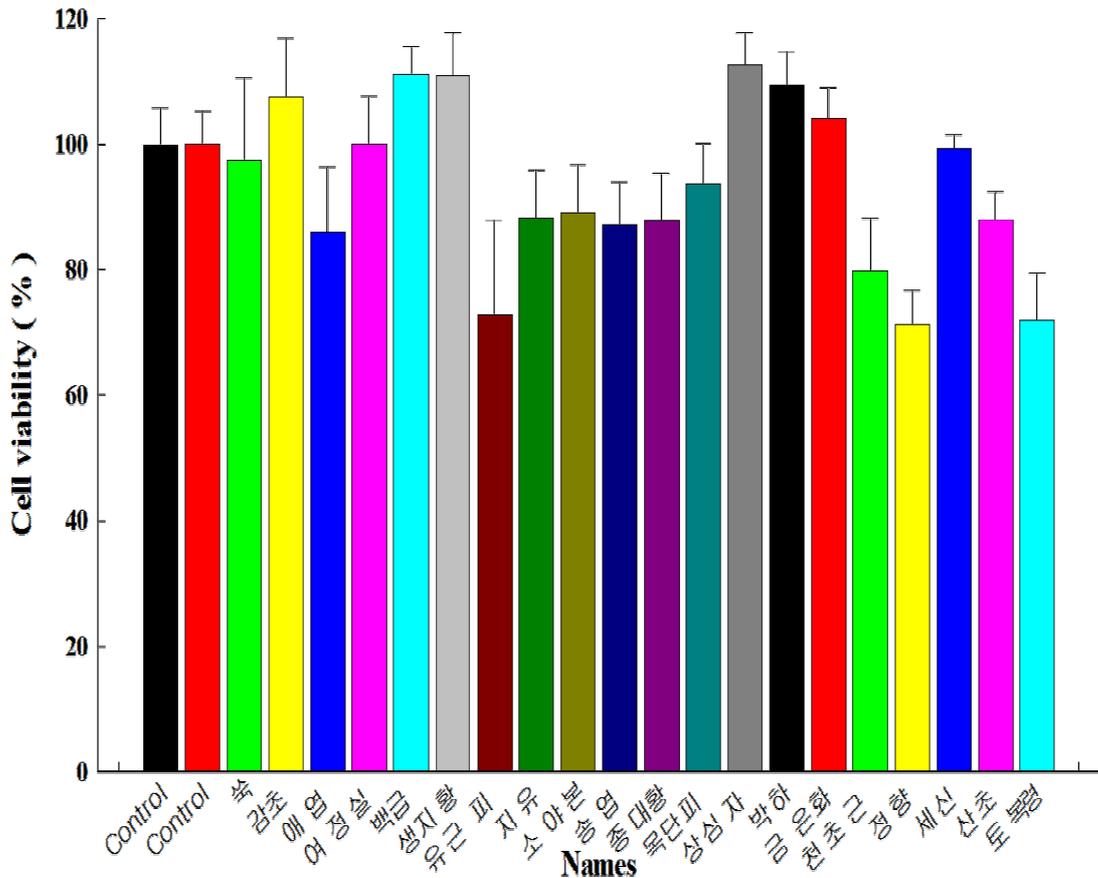


Fig. 3-7. 천연물 screening(1 mg/ml)

(1) 간암세포 증식 억제효과

선정된 유근피를 열수 추출물과 에탄올 추출물로 나누어 실험을 진행 하였다. 유근피 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두에서 간암세포의 성장을 효과적으로 억제하였다. 열수 추출물의 경우 400 $\mu\text{g/ml}$ 까지 60% 이하로 암세포의 성장을 억제하였으나, 300 $\mu\text{g/ml}$ 부터는 억제 활성이 낮아졌다. 특히 에탄올 추출물에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도까지 점차적으로 세포의 성장을 억제해 40%정도의 수준 정도의 간암세포의 성장을 억제하였다(Fig 3-8). 결과적으로 유근피 에탄올 추출물의 경우 낮은 농도 (100 $\mu\text{g/ml}$)에서 가장 효과적으로 암세포의 성장을 억제하여 소량의 섭취로도 좋은 효과를 기대할 수 있음을 시사했다.

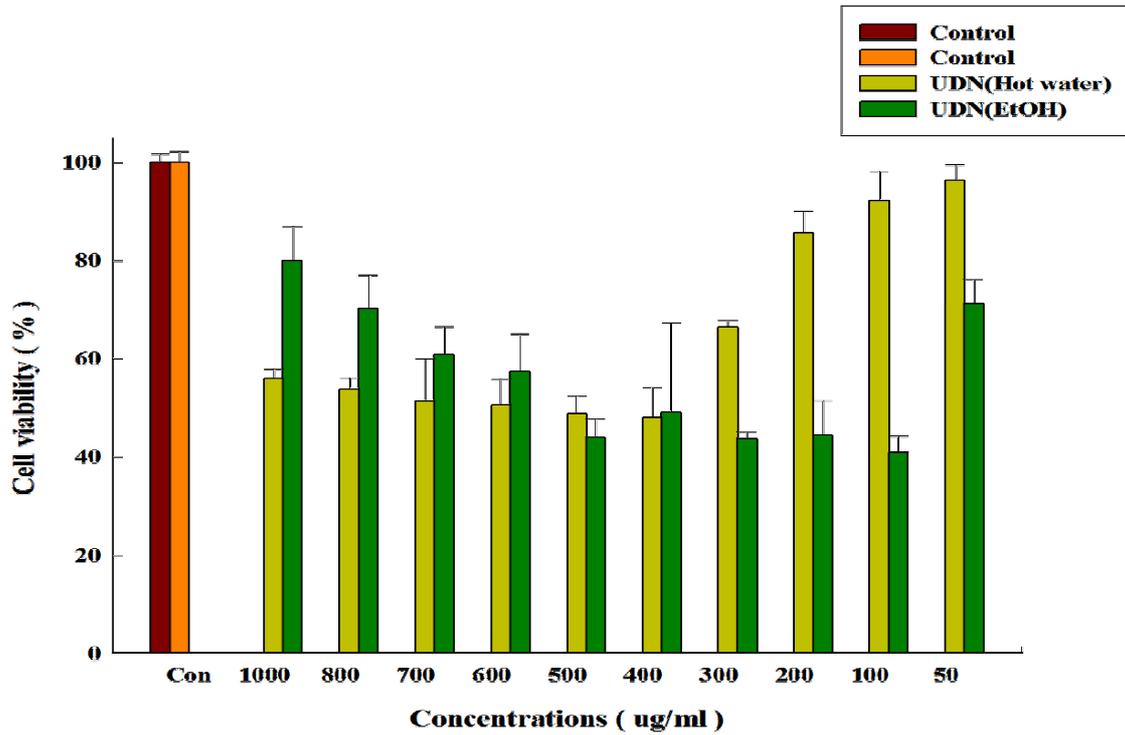


Fig. 3-8. 유근피 열수 추출물과 에탄올 추출물의 cell viability.

(2) 암전이 억제효과 검색

유근피 에탄올 추출물의 경우 0.2 mg/ml에서부터 MMP-2와 MMP-9 모두 40% 이하로 발현을 억제하였고, 열수 추출물의 경우 total MMP-2와 MMP-9 (Pro-MMP와 Active MMP의 합)의 발현을 1.0 mg/ml에서 유의적으로 낮추었다(Fig. 3-9). 에탄올 추출물에서 열수 추출물보다 저농도에서도 MMP-2와 MMP-9의 활성을 저해함을 알 수 있었다. 유근피 에탄올 추출물은 저농도로도 암전이 초기단계에 과발현되는 MMP-2와 MMP-9의 activation을 조절함으로써 암전이를 예방 효과가 나타날 것으로 기대한다.

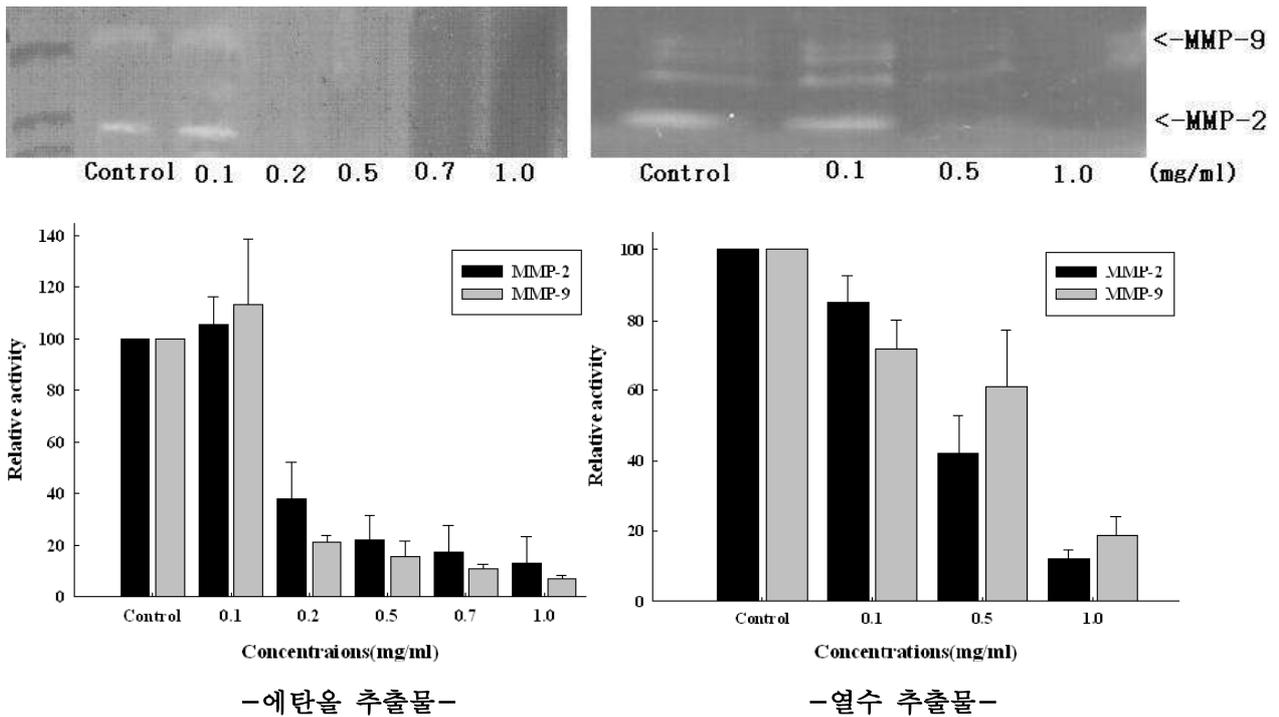


Fig. 3-9. 농도에 따른 각 추출물의 MMP 억제 정도

(3) 세포간 갭결합 신호전달 회복효과 검색

공초점 현미경에 의해 측정된 (Fig. 3-10) 결과에서 control과 비교 하였을 때, 100 μ M H₂O₂ 처리를 한 경우 갭 결합이 현저히 억제됨을 확인 할 수 있다. 유근피 열수 추출물과 에탄올 추출물의 경우 모두 갭 결합 억제를 회복하는 결과를 나타내었다. 이를 control을 100%로 두고 수치화 한 결과 (Fig. 3-11), 100 μ g/ml의 유근피 에탄올 추출물을 제외한 나머지 그룹에서 80% 이상으로 회복하는 양상을 띠었다. 1 mg/ml의 유근피 열수 추출물의 경우는 100% 가까이 달하는 수준으로 갭 결합 억제를 회복시켰다. 이는 유근피 열수 및 에탄올 추출물이 모두 갭 결합의 회복 능력이 있음을 뜻하며, 갭 결합의 항상성 불균형으로 인해 암에 영향을 주는 것을 예방 및 치료할 수 있음을 시사한다.

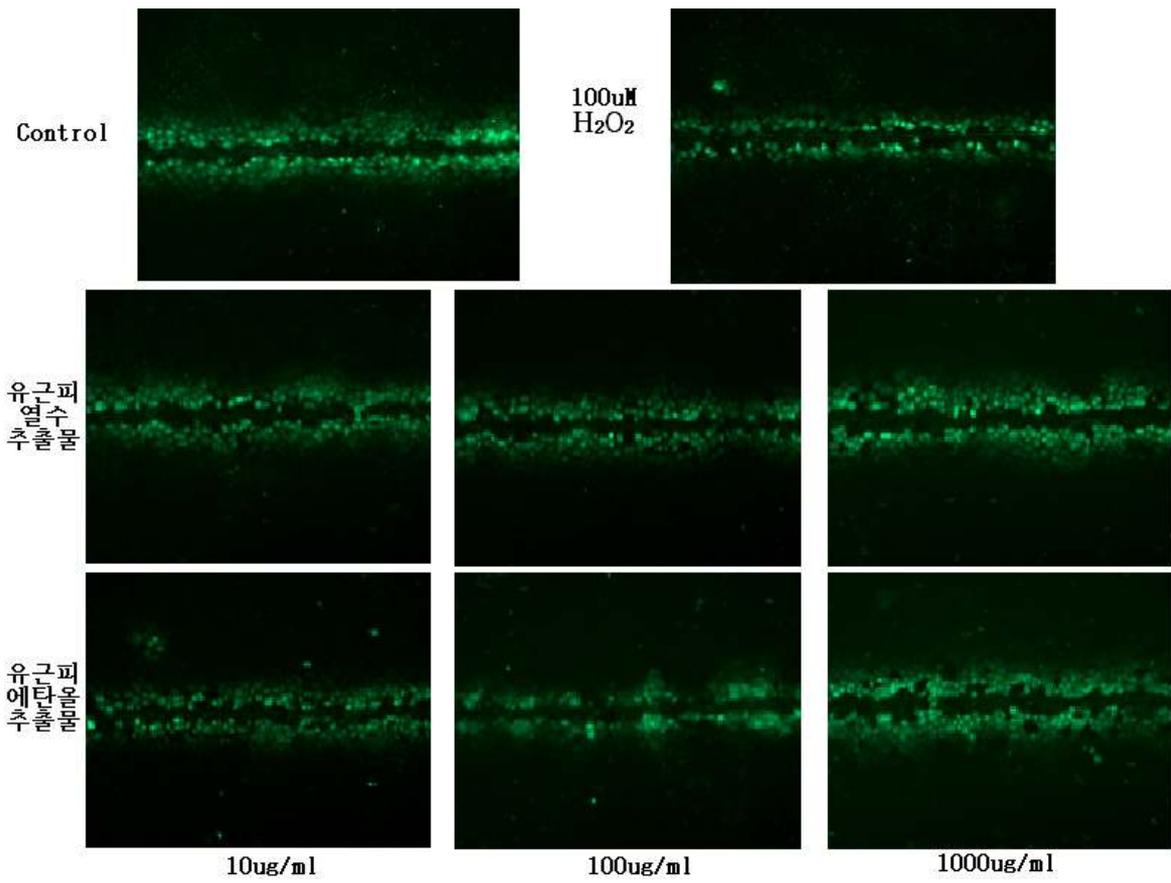


Fig. 3-10. 각 추출물의 농도에 따른 갯 결함을 통한 세포 간 정보전달 억제의 회복능

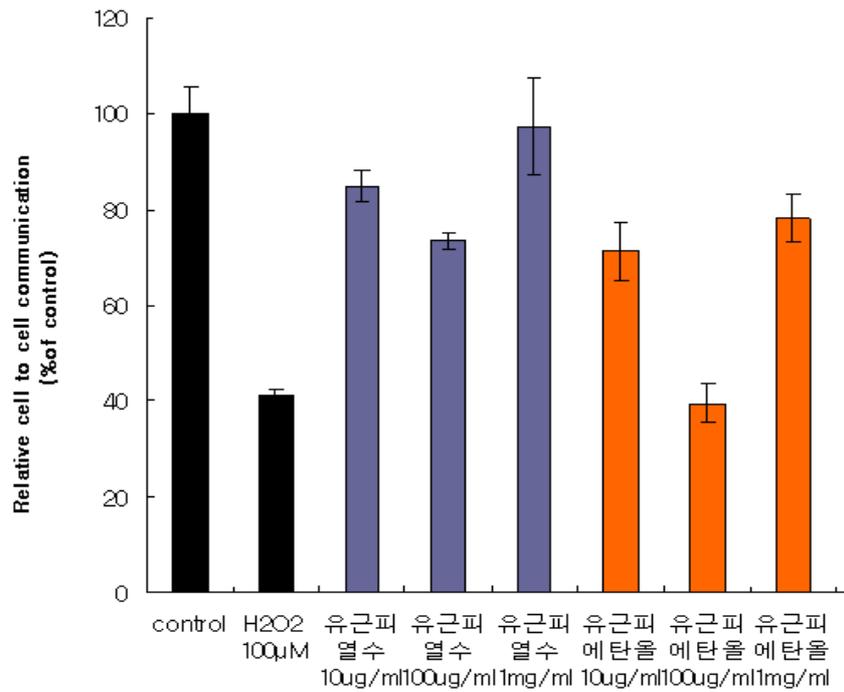


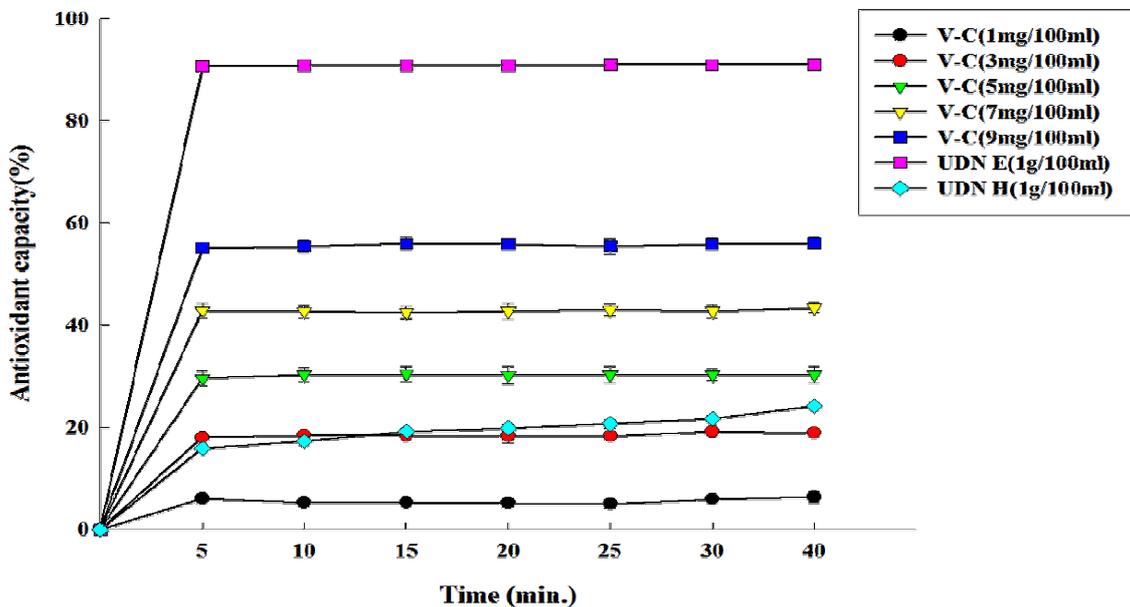
Fig. 3-11. 유근피 추출물의 세포 간 정보전달 억제회복효과

(4) 항산화 효과 입증 및 부분정제 유효성분 함량 분석

분석결과 1 g/100 ml의 동일 농도에서 유근피 열수 추출물과 에탄올 추출물 중 에탄올 추출물에서 항산화능력이 훨씬 더 뛰어났다(Fig. 3-12). 이에 에탄올 추출물로 농도별 분석을 실시하였다(Fig. 3-13). 유근피의 항산화능력은 5 mg/100 ml까지 항산화제로 널리 알려진 비타민 C와 비슷한 수준을 유지하다가 이후 10 mg/100 ml에서 급격하게 높은 항산화능을 띄었다. 이에 유근피 에탄올 추출물에서 높은 항산화 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

또한, 항산화 능력 뿐 아니라 체내 흡수에도 용이하며, 저분자이므로 체내 분해과정에서의 변화가 적을 뿐만 아니라 발암의 각 단계에서 억제효과가 있는 물질인 폴리페놀의 함량을 측정함으로써 열수 추출물과 에탄올 추출물의 폴리페놀 수준을 비교하고, 총 폴리페놀의 함량이 어느 정도인지 측정하였다.

실험 결과 유근피 열수 추출물의 경우 $96.1 \pm 1.6 (\mu\text{g})$ 으로 100 μg 의 gallic acid와 비슷한 수준을 나타내었으나, 유근피 에탄올 추출물의 경우 $181.5 \pm 3.5 (\mu\text{g})$ 로 gallic acid 보다도 약 1.8 배의 총 폴리페놀 함량을 나타내었다(Table 3-5). 이에 항산화능력이 더 높았던 유근피 에탄올 추출물이 유근피 열수 추출물 보다 높은 폴리페놀 함량을 띄는 것을 확인할 수 있었다.



$$\text{Antioxidant Capacity (\%)} = 100 - 100 \times \frac{(\text{Sample의 O.D} - \text{Blank의 O.D})}{(\text{Control의 O.D} - \text{Blank의 O.D})}$$

Fig. 3-12. 유근피 열수 추출물과 에탄올 추출물의 시간대별 항산화능력 측정

UDN E: 유근피 에탄올 추출물, UDN H: 유근피 열수 추출물

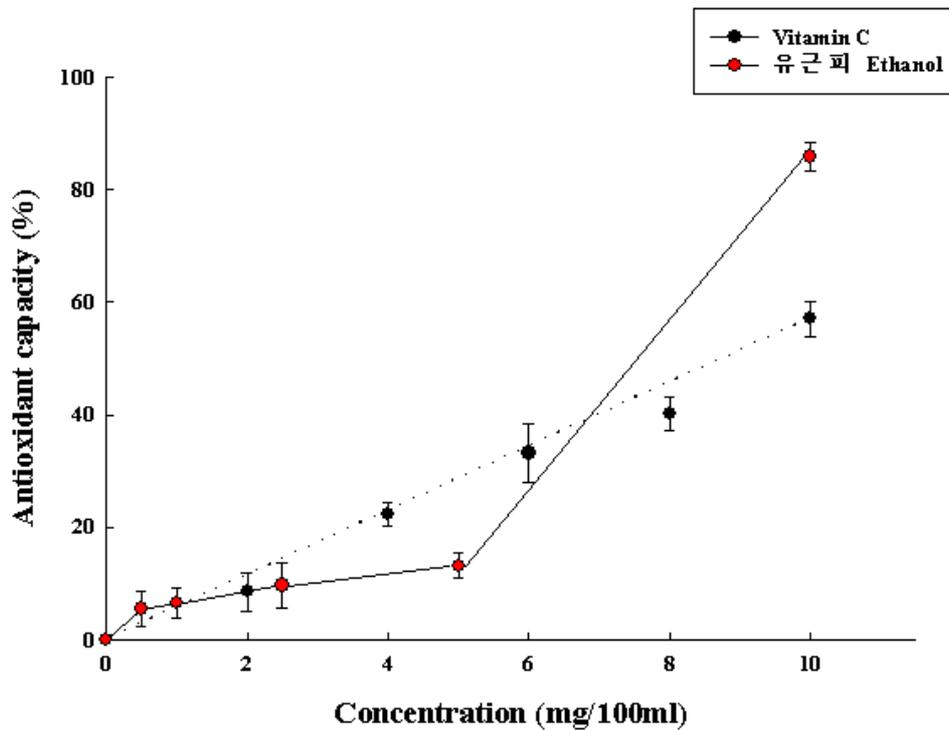


Fig. 3-13. 유근피 에탄올 추출물의 농도별 항산화능 측정

Table 3-5. 총 폴리페놀 함량 측정

Cultivars	total phenolics^a
UDN hot water extract	96.1±1.6^b
UDN ethanol extract	181.5±3.5

(5) 부분정제 획분의 활성유지 확인

높은 활성을 나타낸 에탄올 활성 획분을 유기용매의 극성을 낮추어가며 계통추출에 의하여 분획하여 역가를 확인한 결과 기존의 활성 획분과 유사한 정도의 재결합 회복효과를 나타내었다(Fig. 3-14).

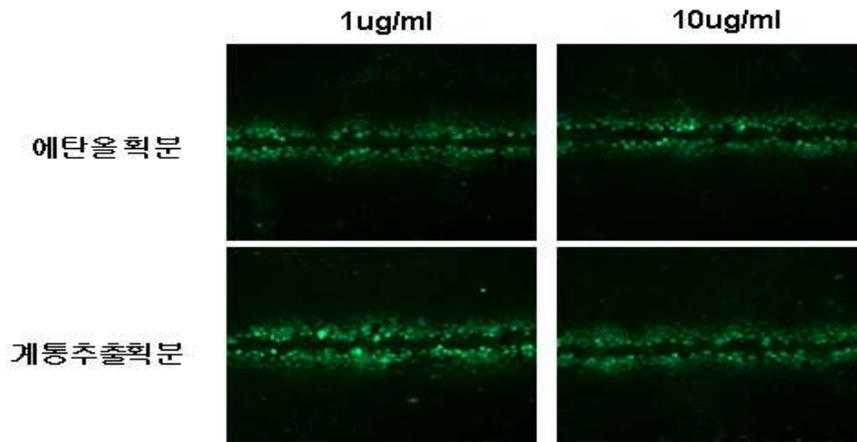


Fig. 3-14. 유근피 에탄올 추출물의 갱결합 회복효과

바. 알코올에 의한 간 손상에 대한 보호 능력 입증

(1) 알코올 분해효소인 alcohol dehydrogenase와 aldehyde dehydrogenase의 활성 측정

대표적인 알코올 분해 효소인 ADH와 ALDH의 활성 능력을 측정한다. Reaction mixture와 enzyme solution을 섞은 후, 5분간의 반응 시간 후에 알코올을 주입하여 그 분해능을 340 nm에서 흡광도를 측정한다.

실험 결과 ALDH의 효소 활성은 80%까지 저해되었으나, ADH의 활성은 Control 보다 다소 높게 나타났다(Fig. 3-15).

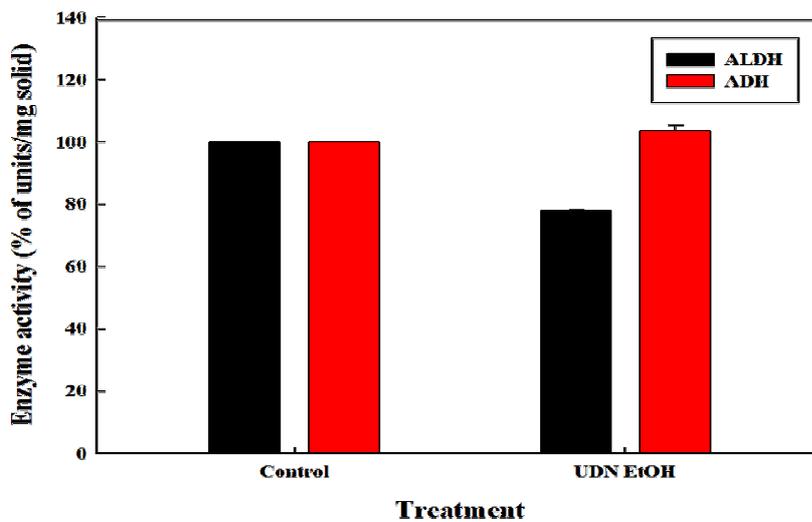


Fig. 3-15. ADH and ALDH enzyme activity ethanol extract of *Ulmus Davidiana* var. *japonica* Nakai

(2) 동물실험을 통한 간 보호 능력 측정

(가) *In vivo assay*계 확립 및 유근피 추출물의 활성 측정

활성이 검증된 유근피의 *in vivo* 활성측정을 위해서, Wistar-male rat를 준비하고 각 group 당 동일량의 일반사료를 제공한다. Control group을 제외한 그룹에서 30% Ethanol를 5 g/kg body weight of mice 의 농도로 oral administration하며, 30% Ethanol 섭취 15분전 미리 sample group은 500 mg/kg body weight of mice 농도의 sample을 oral administration 시킨다. 사육은 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12 hr-photoperiod chamber 조건에서 4주간 이루어진다. 4주간의 사육이 끝난 후, rat의 무게를 측정하고 마취 상태에서 신속한 dissection이 이루어진다.

Fig. 3-16, 에서와 같이 control 그룹을 제외한 나머지 그룹에서 모두 무게의 변화가 감소하였으며 유근피 추출물을 투여한 그룹에서는 변화량이 급감하였다. 세 그룹 모두에서 무게에 비례한 간의 무게는 거의 비슷한 수준으로 나타내어 간독성은 나타내지 않았다.

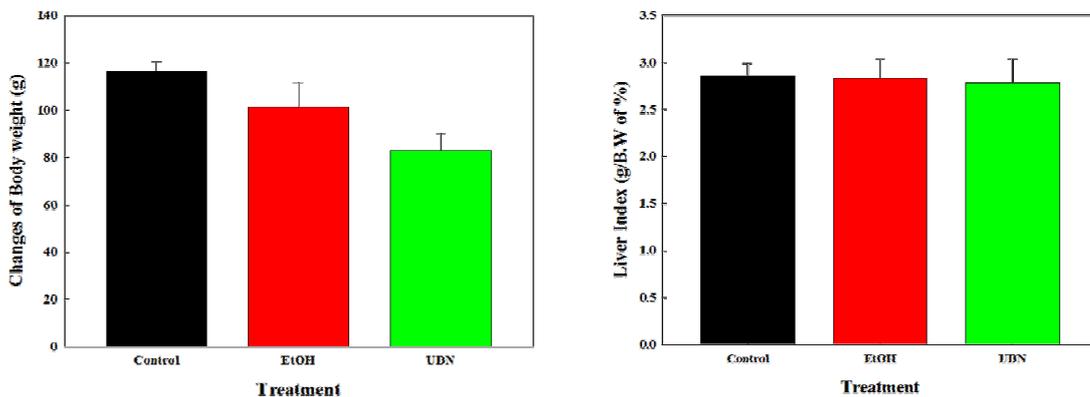


Fig. 3-16. Changes of body weight and liver index of Wistar rat.

(나) 혈청 분석에 따른 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), serum triglyceride(STG), total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol의 활성 측정

마취된 쥐의 혈관을 통해 whole blood을 뽑아낸 뒤, 1000rpm에서 centrifuge하여 혈청만 분리해낸다. 분리해낸 혈청으로 혈청 분석기인 Cobas c111 (Roche applied science, USA)을 이용하여 분석하였다.

Total cholesterol의 경우 (Fig. 3-17, A), 에탄올 그룹에서만 유의적으로 높게나왔으며, 유근

피 에탄올 그룹의 경우 그 수준이 에탄올 그룹보다 낮았다. 혈청 triglyceride의 경우에는 에탄올 그룹에 비해 유의적으로 그 수준이 낮았다. 유근피 그룹에서 LDL의 양은 에탄올 그룹에 비해 유의적인 차이는 보이지 않았지만 HDL의 양을 유의적으로 높임으로서 유근피 추출물은 HDL과 LDL의 비율의 조절을 통하여 고지질관련 질병을 예방할 수도 있음을 나타내었다. 또한 간이 손상되었을 때 가장 많이 혈액으로 내보내지는 효소인 AST의 경우 에탄올 그룹에서 유의적으로 높게 나온 것에 비해 에탄올 그룹에 유의적으로 낮추는 경향을 나타내었다. ALT의 경우 모든 그룹에서 높게 나타나지는 않았지만 ALT의 경우 간 이외의 다른 장기의 손상에도 많이 발생하므로 AST가 혈액으로의 유출이 많지 않은 것만으로도 급성 알콜 노출에 대한 보호 효과를 알 수 있다.

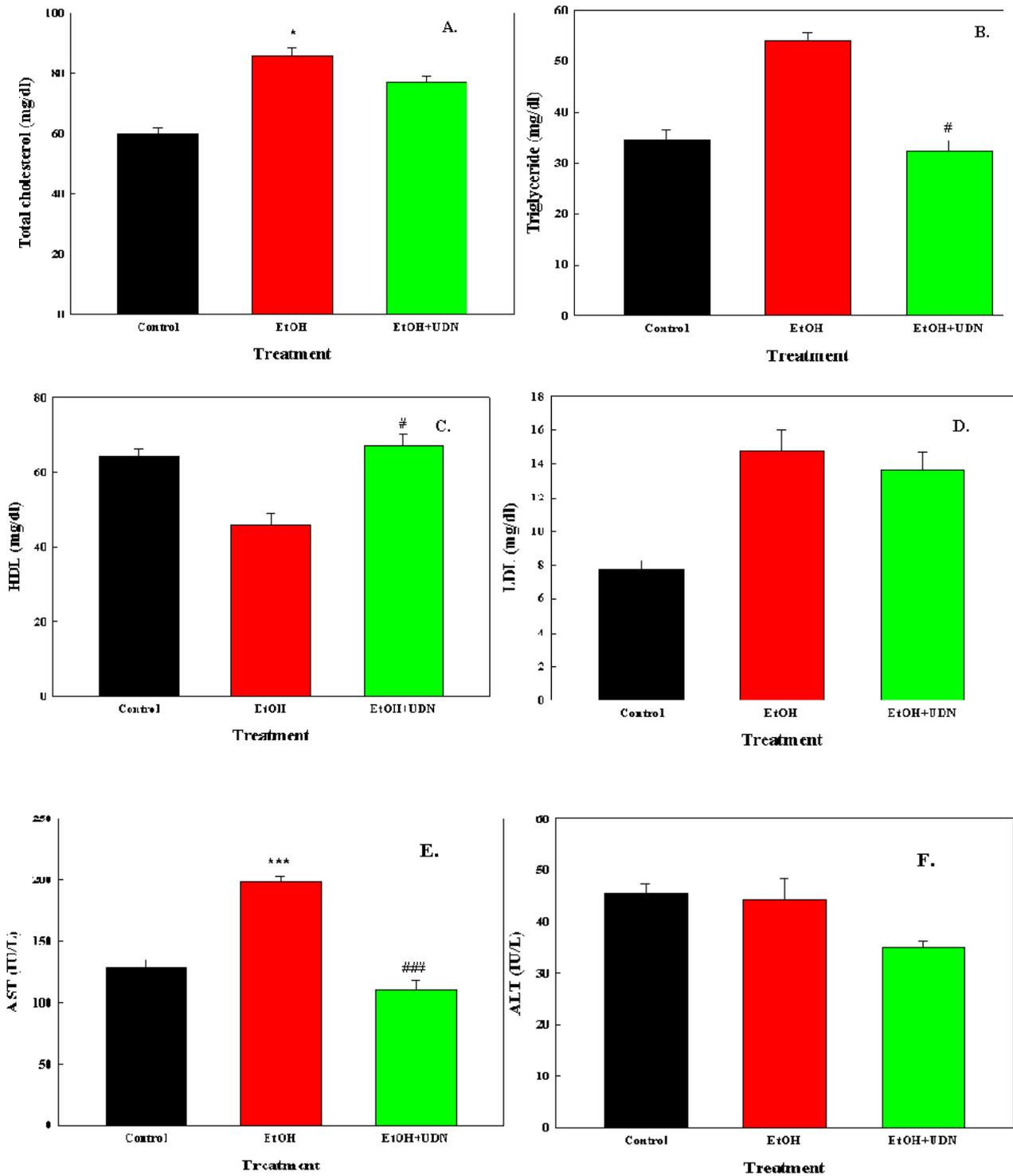


Fig. 3-17. Levels of A: Total cholesterol, B: Serum triglyceride, C: HDL, D: LDL, E: AST and F: ALT by serum analysis. * $p < 0.05$; significantly different from control; ** $p < 0.001$: significantly different from control; *** $p < 0.0001$: significantly different from control; # $p < 0.05$: significantly different from the ethanol group; ## $p < 0.001$: significantly different from the ethanol group; ### $p < 0.0001$: significantly different from the ethanol group (two-way analysis of variance).

(다) 조직 분석에 따른 hepatic triglyceride (STG), total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol의 활성 측정

간 조직을 0.5g씩 분리한 뒤, homogenize 한다. Homogenize된 조직을 ethylation하여 fat만을 분리하여 1% Triton용액에 녹여 분석한다. 분석은 혈청 분석기인 Cobas c111 (Roche applied science, USA)을 이용하여 분석하였다.

Total cholesterol은 에탄올 그룹에서 유의적으로 높게 나타났으며, Hepatic triglyceride는 control보다는 높았지만 에탄올 그룹보다는 유의적으로 낮추었다. 또한, 유근피 에탄올 추출물 그룹에서 HDL은 에탄올 그룹보다 높이고 LDL은 에탄올 그룹보다 낮춰주어 콜레스테롤 항상성을 유지하며 에탄올 섭취에 의해 일어날 수 있는 동맥경화 및 혈관 질환에서 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 3-18).

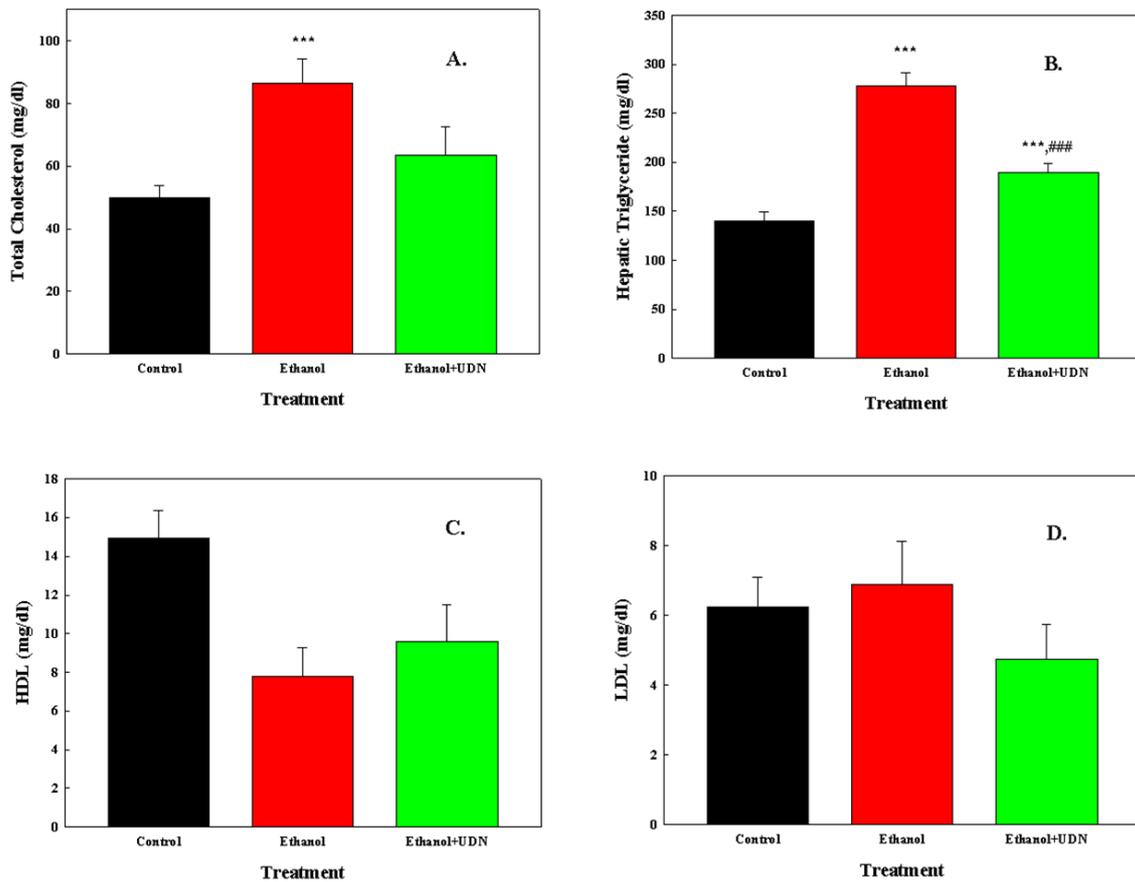


Fig. 3-18. Levels of A: Total cholesterol, B: Hepatic triglyceride, C: HDL and D: LDL by liver organ analysis. * $p < 0.05$; significantly different from control; ** $p < 0.001$: significantly different from control; *** $p < 0.0001$: significantly different from control; # $p < 0.05$: significantly different from the ethanol group; ## $p < 0.001$: significantly different from the ethanol group; ### $p < 0.0001$: significantly different from the ethanol group (two-way analysis of variance).

(라) 조직 절편 분석을 통한 세포 손상도 측정 및 Triglyceride 측정

간 조직을 절편하여 histopathological examination을 실시한다. 혈액을 제거 한 후, 같은 크기로 조직을 절편하여 포르말린으로 고정한다. *Haematoxylin-Eosin* (H&E) 법으로 staining하여 조직을 현미경에서 관찰한다. 절편한 조직에서 파라핀을 제거한 후, Oil red O법을 실시하여, 조직에서의 triglyceride를 측정한다.

Fig. 3-19에서처럼, control 그룹에서는 핵이 많고 주변부의 간세포들이 잘 자리하였지만, 에탄올 그룹의 경우 세포의 파손정도가 크며 세포내에 지방질이 많이 자리하였다(Fig. 3-19 A, B). 유근피 에탄올 그룹의 경우에는 핵의 분포도가 높고 약간의 지방질이 있지만 주변 세포들이 조밀하게 자리잡아 간세포가 많이 손상되지 않았다(Fig. 3-19 C). 이로부터 유근피 에탄올 추출물이 알코올에 의하여 간세포가 파괴되는 것을 보호하는 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

또한, Oil red O법에 의한 간조직의 triglyceride 양은 에탄올에서 높게 나타났으며, 유근피 그룹에서 control 그룹보다 낮추는 경향을 나타내었다(Fig. 3-20). 이는 유근피 추출물의 알코올성 지방간 등의 질환으로부터 예방효과가 있음을 보여주며, 전체적으로 체내에 손상을 최소화시키며 동시에 알코올성 비만 등으로부터도 예방효과가 있을 수 있음을 나타내어준다.

앞선 결과들에서 비추어볼 때, 유근피 에탄올 추출물은 인체에 해를 주지 않으면서 간암전이 및 간 보호에 탁월한 효과가 있음을 입증하였다.

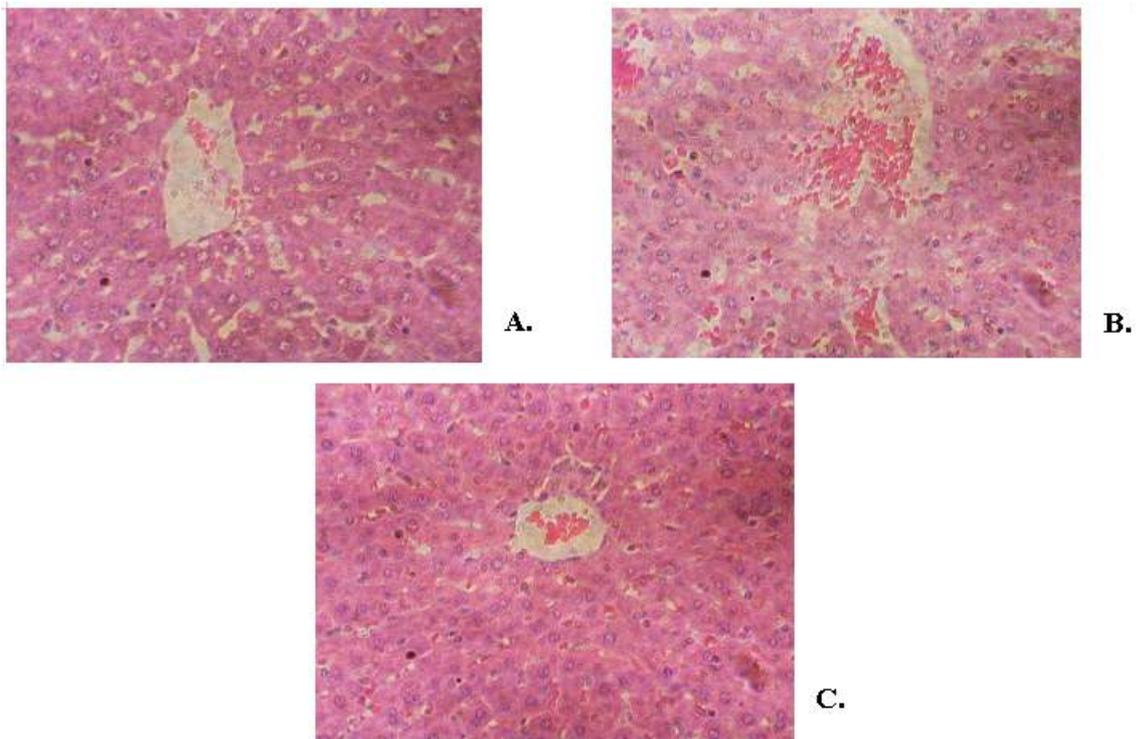


Fig 3-19. Light micrographs of H&E staining. A: Control, B: Ethanol, C: Ethanol+UDN ethanol extract.

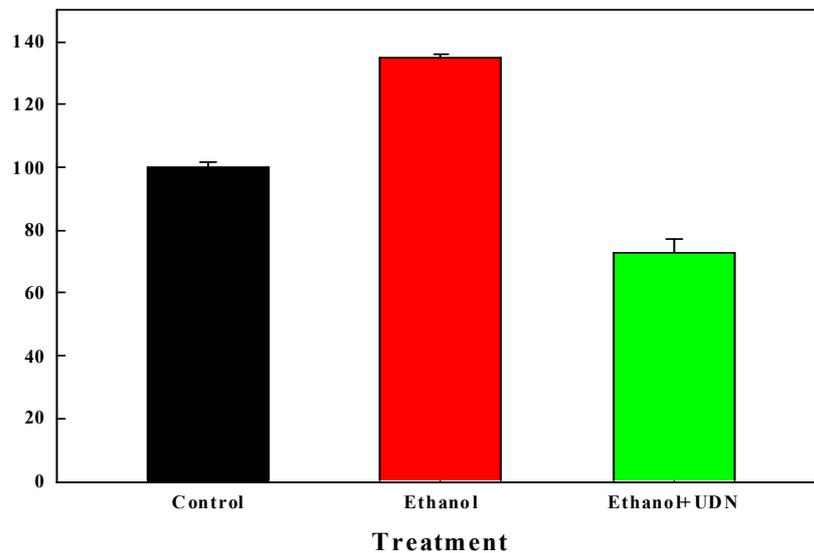


Fig. 3-20. Hepatic triglyceride amount by Oil red O.

사. 추출물의 간암 활성 입증

(1) CAA (Cellular Antioxidant Activity) assay를 통한 유근피 추출물의 활성 측정

Hep G2 cell을 96 well dish에 6.0×10^4 cells/well/100 μ l의 농도로 seeding 한다. 24시간 후 PBS로 washing해 준 뒤, 100 μ g/ml의 농도의 sample과 25 μ M DCFH-DA를 100 μ l의 (-)medium에 첨가하여 처리한다. 한 시간 뒤 600 μ M ABAP/100 μ l HBSS의 oxidant를 첨가해 준 뒤 fluoremeter (485/538 nm)로 한 시간 동안 5분 간격으로 측정한다(Fig. 3-21).

각 데이터의 시간대별 편차를 최소화 하기위하여 시간대별 값의 적분값 (AUC: area under curve)을 계산하여 표준물질인 quercetin과 비교해 보면 유근피 열수 추출물 100 μ g은 13.00 μ M of Quercetin equivalent를 나타내며, 에탄올 추출물 100 μ g은 24.28 μ M of Quercetin equivalent를 나타내었다. 이는 cell내에서의 상대적 항산화도가 에탄올 추출물의 경우 열수의 경우보다 우수한 것을 나타내며 이로부터 세포내에 흡수되는 항산화성분의 활성이 주로 저분자에 기인하는 것을 알 수 있다.

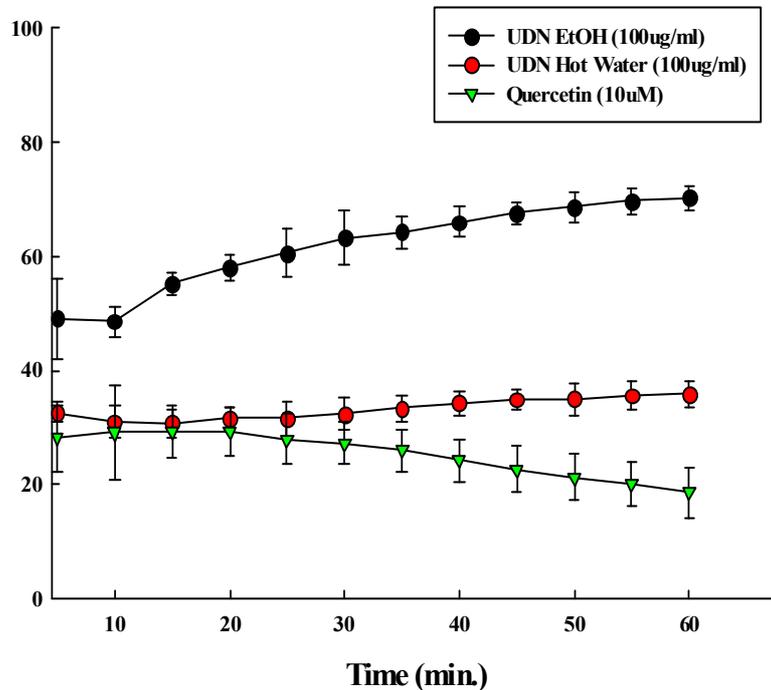


Fig. 3-21. CAA units during 60 min.

(2) Annexin V-PI staining을 통한 Apoptosis 유도 현상 관찰

간암세포인 HepG2 세포를 6 well dish에 1.0×10^6 cells/well/2000 μ l의 농도로 seeding 한다. 24시간 후 PBS로 washing해 준 뒤, 100 μ g/ml의 농도의 sample을 2000 μ l의 (-)medium에 첨가하여 처리한다. 각각의 6시간, 24시간의 Cell을 collect하여 flow cytometry assays를 이용하여 측정한다. Cell에 1 ml의 propidium iodide (PI) staining mixture을 처리한다. Cytomics FC 500 (Beckman coulter, USA)을 이용하여 Cell apoptosis를 측정한다.

Control의 세포사멸율은 4.07%이며, 6시간 동안 유근피 열수 추출물을 처리한 그룹은 16.94%에서 12시간 처리그룹에서 47.58%로 증가하였다. 에탄올 추출물을 6시간동안 처리한 그룹에서는 61.11%, 12시간 처리 그룹에서 80.43%로 증가하였다(Fig. 3-22). Control 그룹과 비교하여 모든 추출물 그룹에서 세포 사멸을 유도하였으며, 시간이 지남에 따라 그 사멸 유도율이 높아짐을 관찰할 수 있었다. 특히, 에탄올 추출물에서는 80% 이상의 높은 세포 사멸 유도율을 나타내었다. 본 실험에 의해 추출물에 의해 일어난 세포의 사멸이 세포괴사(necrosis)에 의해 일어난 것이 아니고, apoptosis의 유도를 통한 것임을 알 수 있다.

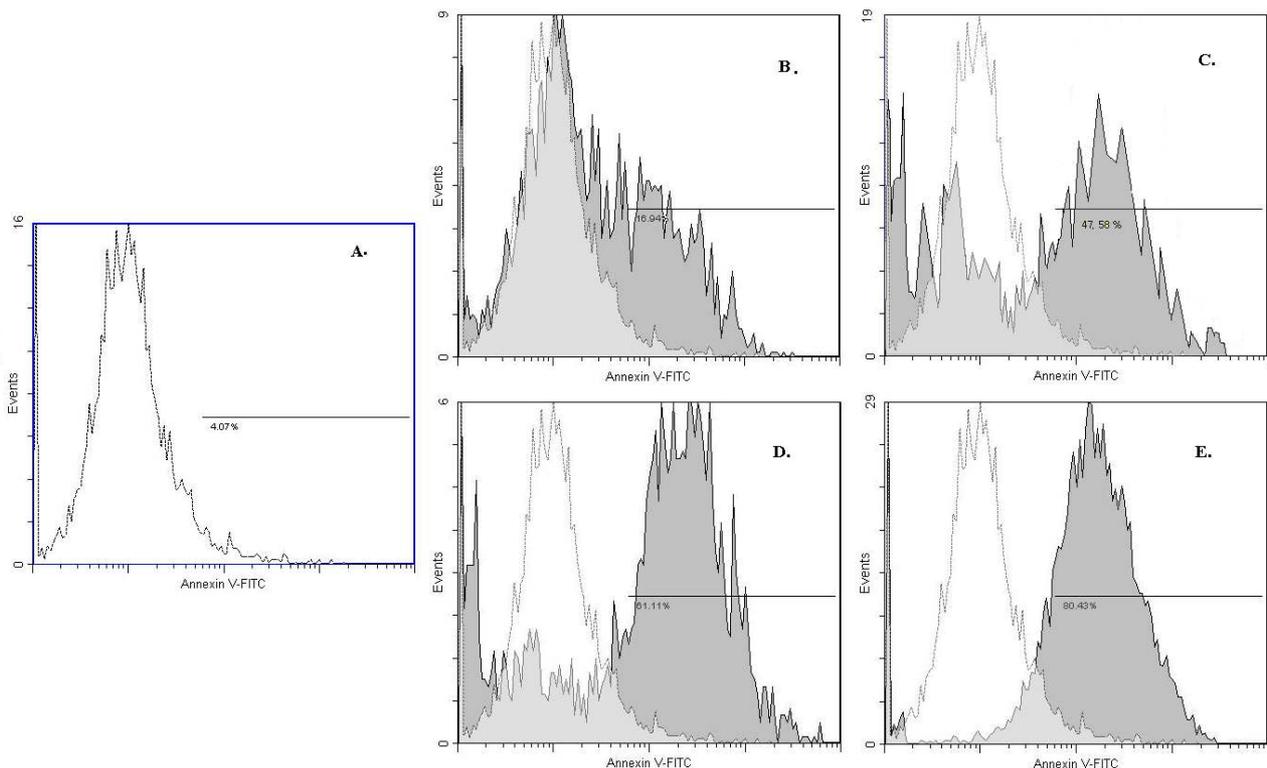


Fig. 3-22. Flow cytometry graph verse Control group by CXP cytometer 2.2 (Beckman coulter, USA). A: Control, B: 100 μ g/ml of UDN Hot water extract at 6 hrs, C: 100 μ g/ml of UDN Hot water extract at 12 hrs, D: 100 μ g/ml of UDN Ethanol extract at 6hrs, E: 100 μ g/ml of UDN Ethanol extract at 12 hrs.

(3) ELISA법을 이용한 간암전이 지표 효소인 MMP-2와 MMP-9 정량

Standard curve의 R²값은 MMP-2와 MMP-9 각각 0.9877과 0.9912를 나타내었다. Table 3-6과 같이, Control에 비해 모든 그룹에서 MMP-2와 -9의 발현량을 감소시켰으며, 특히, 유근피 에탄올 추출물에서 MMP-2와 -9 모두 높은 수준으로 억제하였으며 열수추출물에서는 유의적인 감소치를 나타내지 않았다. 암 전이에 있어 가장 중요한 지표 효소로 이용되는 이러한 효소들의 억제는 간암전이를 효과적으로 억제 할 수 있음을 시사하는 결과라고 할 수 있다.

Table 3-6. MMP-2 and MMP-9 expreeion of HepG2.

	MMP-2 발현량 (ng/ml)	변환율(%)	MMP-9 발현량 (ng/ml)	변환율(%)
Control	6.24±0.14	100.00±2.25	2.28±0.03	100.00±1.50
UDN 열수추출 (10ug/ml)	5.69±0.17	91.24±2.65	2.23±0.02	97.82±1.09
UDN 열수추출 (50ug/ml)	5.63±0.18	90.15±2.93	2.08±0.04	91.04±1.94
UDN 열수추출 (100ug/ml)	5.53±0.18	88.64±2.83	2.02±0.04	88.37±1.78
UDN 에탄올추출 (10ug/ml)	3.74±0.35	59.92±5.57	1.45±0.08	63.43±3.67
UDN 에탄올추출 (50ug/ml)	3.46±0.32	55.40±5.14	1.22±0.05	53.49±2.21
UDN 에탄올추출 (100ug/ml)	3.40±0.34	54.45±5.41	1.16±0.09	50.84±4.10

아. 추출물의 활성 물질의 규명

(1) MTT assay를 이용한 용매별 분획의 활성 입증

여러 실험을 통해 간 암전이에 효과적으로 억제를 나타낸 유근피 에탄올 추출물의 Solvent partition을 통해 fraction을 나누었다. Funnel을 이용하여 24시간 동안 용매를 흘려줌을 반복하였다. 3배의 용매를 흘려주며, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol의 순서로 진행하였다. 이렇게 얻어진 용매는 동결 건조를 통해 sampling하였으며, cell viability 측정을 위해 MTT assay를 실시하였다.

Fig. 3-23에서와 같이, butanol과 chloroform fraction에서는 암세포와 정상세포 모두의 성장을 억제하였으며, hexane fraction에서는 반대로 정상세포의 성장을 억제하였고 간암세포에는 영향을 미치지 않았다. Ethyl acetate fraction에서는 간암세포를 억제 하였으며, 정상세포주의 성장에는 크게 영향을 미치지 않았다.

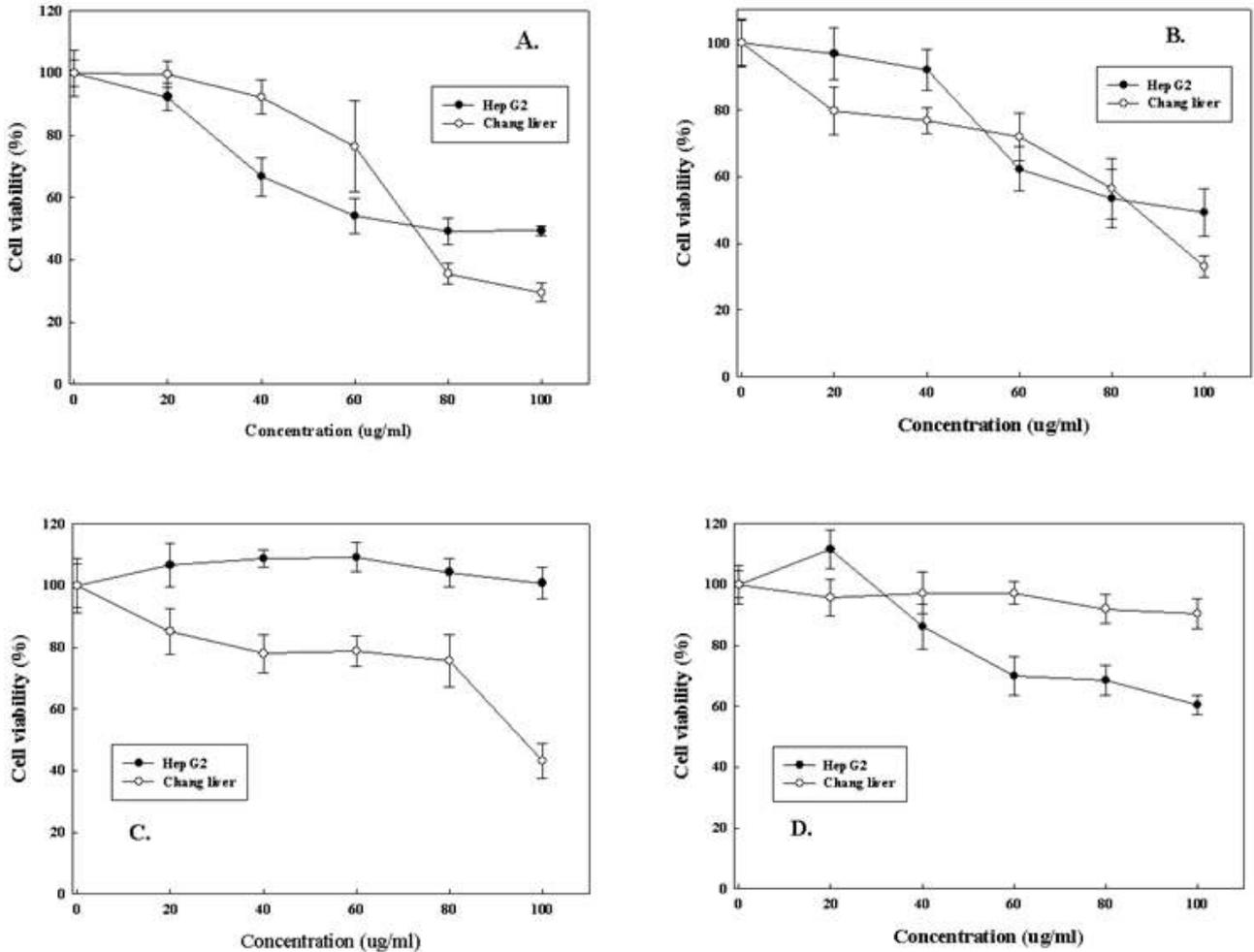


Fig. 3-23. Cell viability of different fraction by solvent partition. A: Butanol fraction, B: Chloroform fraction, C: Hexane fraction, D: Ethyl acetate fraction.

(2) 용매 Fraction의 Molecular Weight에 의한 분획물질의 활성 입증

위 실험에서 결과가 가장 좋은 ethyl acetate fraction을 molecular weight에 따라 나누어 같은 방법으로 실험하였다. 분획은 Centricon-10 (Millipore, USA)을 사용하여 10,000 MW이상과 10,000 MW이하의 fraction으로 나누어 진행하였다.

실험 결과로는 10,000 MW이상의 fraction은 간암세포의 성장을 올리고, 정상 간세포에는 영향을 미치지 않았다. 반면 10,000 MW이하에서는 간암세포의 성장을 억제하고 정상세포의 성장을 약간 올려주는 경향을 나타내어 주로 저분자에서 활성을 타내며 이는 항산화 활성과 항암전이활성에 있어 에탄올 추출물에서 높은 효과를 나타낸 결과를 고려하였을 때 활성물질이 phytochemical 류의 저분자라는 점에서 일관된 결과를 나타내었다(Fig. 3-24).

또한 fraction을 나누어 단일 물질에 가까이 갈수록 암세포의 억제도가 낮아지고 정상세포의 성장을 높이는 것도 미미하였다. 이는 단일 물질로서의 유근피 추출물보다는 그 속에서 물질들

의 시너지를 일으켜 효과를 더 극대화 시킬 수 있음을 나타내었다. 이에 알코올에 의한 간 손상으로부터의 보호도를 유근피 에탄올 추출물을 이용하여 측정하였다.

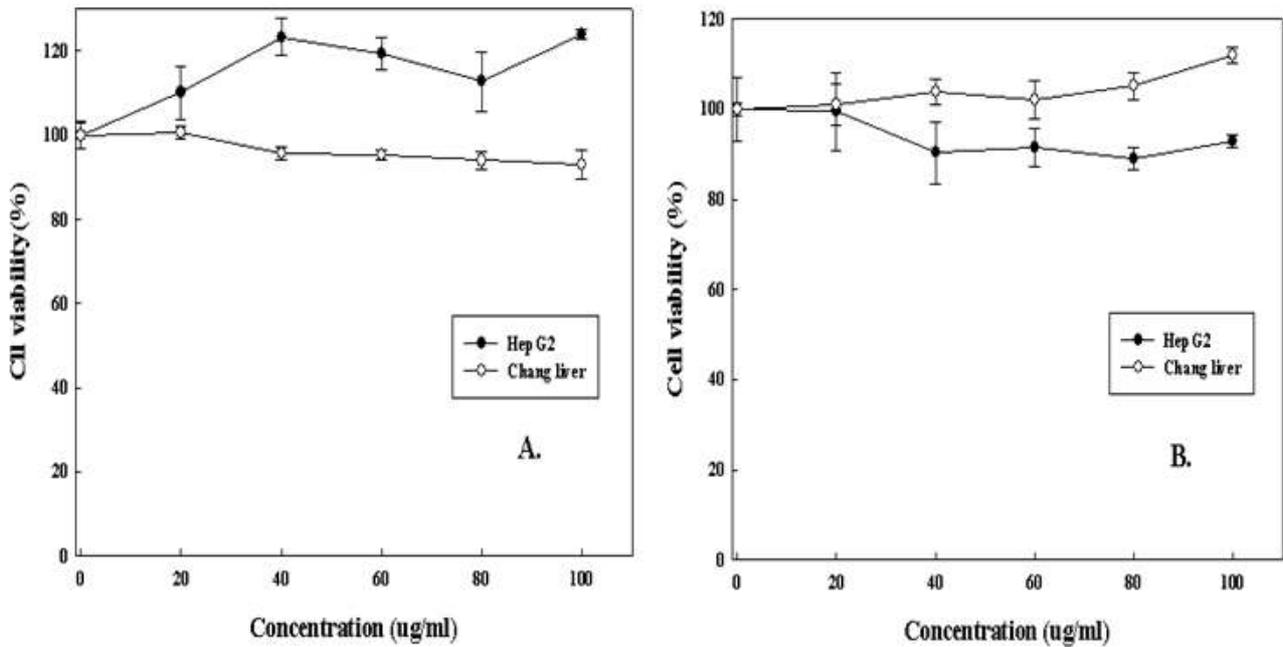


Fig. 3-24. Cell viability of different molecular weight by Centicon. A: >10,000 MW, B: <10,000 MW

(3) HPLC를 통한 최종 활성 분획 물질의 분리

분자량으로 10,000 MW으로 나누어진 분획 중 10,000 MW이하의 유근피 에탄올 추출물 1000 ppm을 이용하여 실험하였다. Waters HPLC system을 사용하였으며, two solvent-delivery system (Waters 515, USA), autosampler (Waters 717, USA), photodiode detector (Waters 2996, USA)로 구성되어있다. Mobile phase A는 0.1% acetic acid, B는 acetonitrile을 이용하여 gradient를 주어 UV 280 nm에서 측정하였다.

결과는 Fig. 3-25와 같이 main peak이 약 4 peak이상 나왔으며, 성분 확인을 위해서는 부가 실험이 필요하다. 적어도 4가지 이상의 10,000 MW이하의 저분자 폴리페놀류가 관련되어 있음을 확인 할 수 있었다.

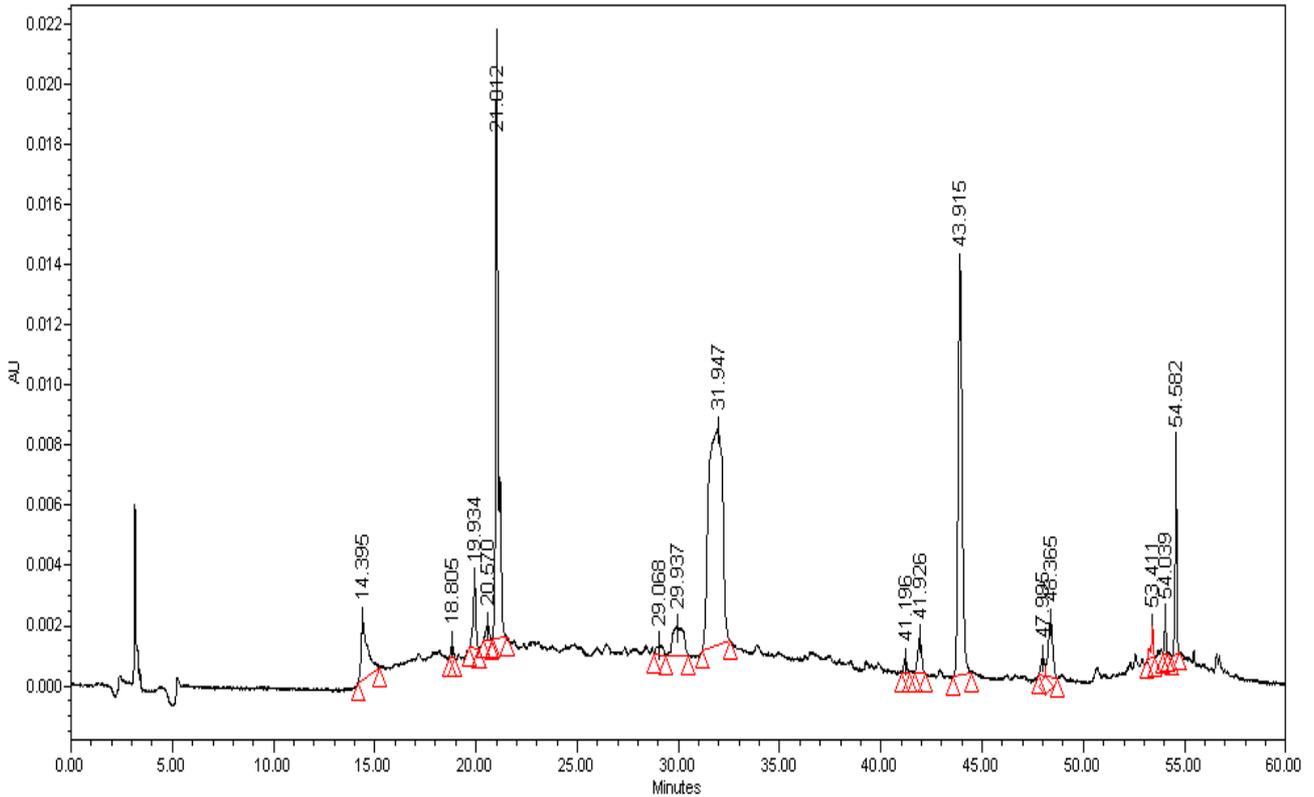


Fig. 3-25. Isolation of active compounds from *Ulmus Davidiana var. japonica Nakai* extract by HPLC.

Column: I.D CAPCELL PAK C18 column (4.6 mm × 460 mm),
 Flow rate: 1.0 ml/min, Injection volume: 20 µl
 Mobile phase: 90 min, Detector: PDA

자. 파래의 항암, 항혈전 효과

(1) 파래 추출물의 HepG2의 생존율에 미치는 영향

HepG2 세포에서는, 50 µg/ml에서 107.9%의 세포 생존율을 보였으며, 250 µg/ml에서 세포 생존율은 7.6%를 나타냈으며, 500 µg/ml의 농도에서 3.9%의 유의성 있는 항암 효과를 보여주었다. 0.1 N NaOH 추출물에서의 HepG2 cell에 대해 세포 생존율은 50 µg/ml에서 60.7%였고, 250 µg/ml에서 세포 생존율은 70.4%로 낮은 세포 생존율을 보여 HepG2 cell에 대해 항암 효과를 나타냈으며, 500 µg/ml의 농도에서는 80.7%의 세포 생존율을 보여 HepG2 cell에 대한 항암 활성을 확인할 수 있었다. 파래 1 N NaOH 추출물에서의 HepG2 cell에 대해 세포 생존율은 50 µg/ml에서 51.0%였고, 250 µg/ml에서 세포 생존율은 67.9%로 강한 세포 독성이 있음을 보고 하였으며, 500 µg/ml의 농도에서는 72.9%의 낮은 생존율로 대조구에 비

해 매우 강한 항암 활성이 있는 것으로 보였다(Fig. 3-26). 이는 기존의 HepG2 cell에 대한 식품 유래 곰팡이 배양액의 에틸아세테이트 추출물의 암세포 증식 억제 효과에 관한 연구와 비교해 보아 그 효과가 매우 우수함을 알 수 있다.

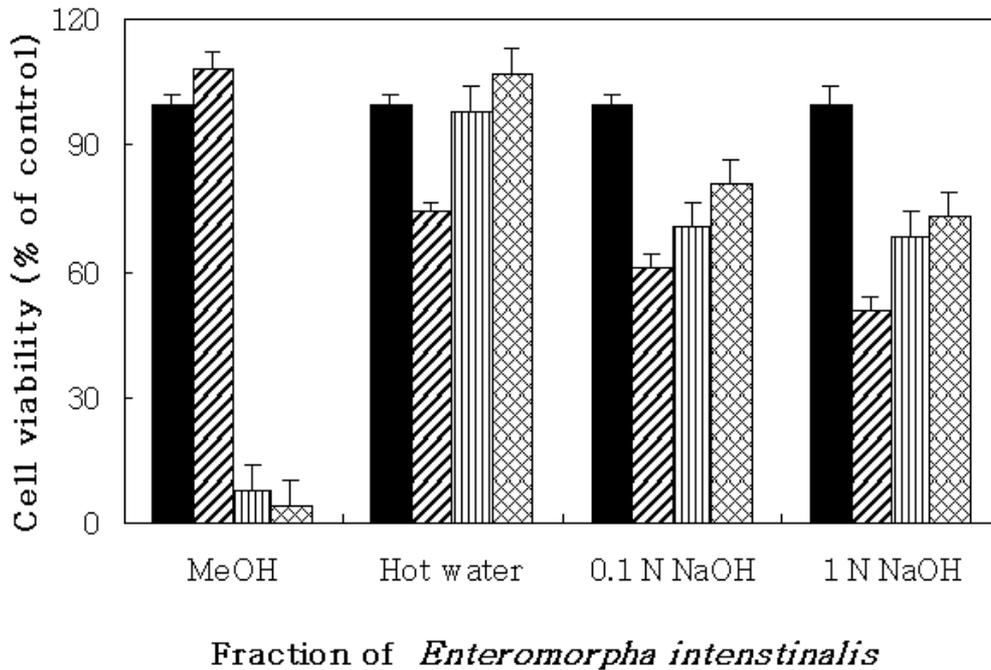


Fig. 3-26. 간암 세포에서의 파래의 추출 조건에 따른 cell viability
파래 농도에 따라 0 (■), 0.05 (▨), 0.25 (▧), 0.5 (▩) mg/ml 의 추출물을 48시간 동안 처리하였다. 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 3반복 실시하였다.

(2) 파래 추출물의 B16/F10의 생존율에 미치는 영향

B16/F10 (melanoma cell, 피부 흑색종 세포)를 대상으로 하여 1 N NaOH 추출물들에 대한 MTT assay에 의한 세포 생존율은 50 μ g/ml에서 36.38%였고, 250 μ g/ml에서 세포 생존율은 3.62%로 강한 항암 활성을 나타냈으며, 500 μ g/ml의 농도에서 3.29%의 낮은 생존율을 보여 B16/F10에 대한 매우 강한 항암 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 파래 0.1N NaOH 추출물에서의 B16/F10 cell에 대해 세포 생존율은 50 μ g/ml에서 99.07%였고, 250 μ g/ml에서 세포 생존율은 37.82%였으며, 500 μ g/ml의 농도에서는 4.58%의 매우 낮은 세포 생존율을 보여 B16/F10에 대한 강한 항암 활성을 확인할 수 있었다(Fig. 3-27).

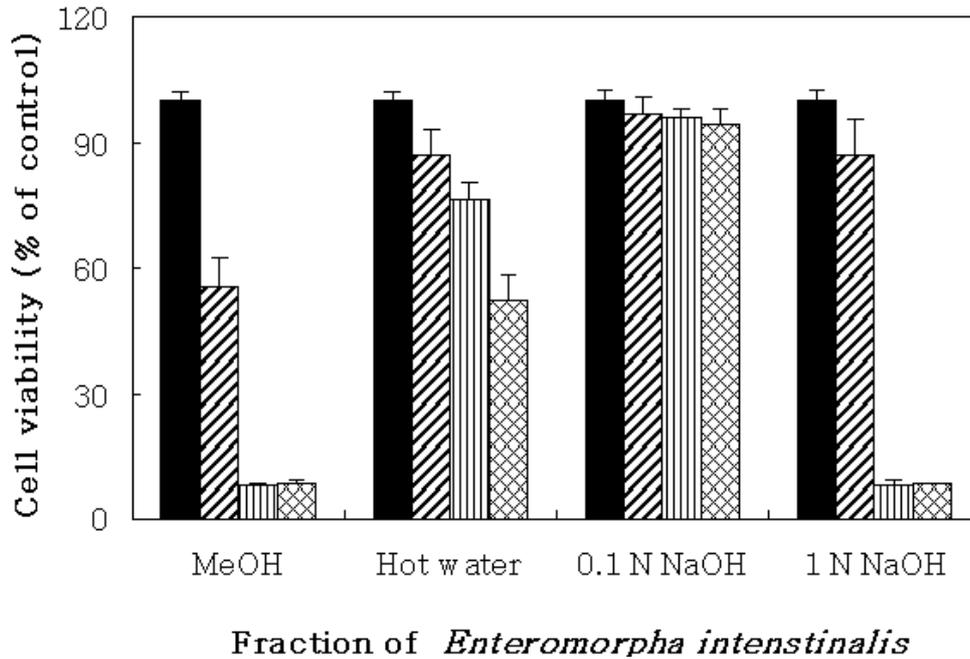


Fig. 3-27. 피부 흑색종 세포에서의 파래의 추출 조건에 따른 cell viability
 파래 농도에 따라 0 (■), 0.05 (▨), 0.25 (▧), 0.5 (▩) mg/ml 의 추출물을 48시간 동안
 처리하였다. 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 3반복 실시하였다.

(3) 파래 추출물의 HT1080의 생존율에 미치는 영향

HT1080 (fibrosarcoma cell, 섬유 육아종)세포의 항암 활성의 결과는 Fig. 3-28과 같다. 파래 메탄올추출물에서의 세포 생존율은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 55.44%였고, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포 생존율은 8.06%로 강한 항암 활성을 나타냈으며, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 8.72%의 낮은 생존율을 보여 HT1080에 대한 매우 강한 항암 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 열수추출물에서의 세포 생존율은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 86.90%였고, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포 생존율은 76.30%를 나타냈으며, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 52.61%로 항암 활성을 확인 할 수 있었다. 파래 1 N NaOH 추출물에서의 HT1080 cell에 대해 세포 생존율은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 87.07%였고, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포 생존율은 8.27%로 매우 낮은 세포 생존율을 보였으며, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 8.50%의 생존율로 대조구에 비해 매우 강한 항암 활성을 나타내었다. 기존의 연구에서 파래는 수명 연장 효과 실험에서 높은 수명 연장율을 보고하였고, 고형암 성장 저기 효과가 높아 우수한 항암 효과를 보고한 바 있는데 이번 실험 또한 우수한 항암 활성을 확인할 수 있었다.

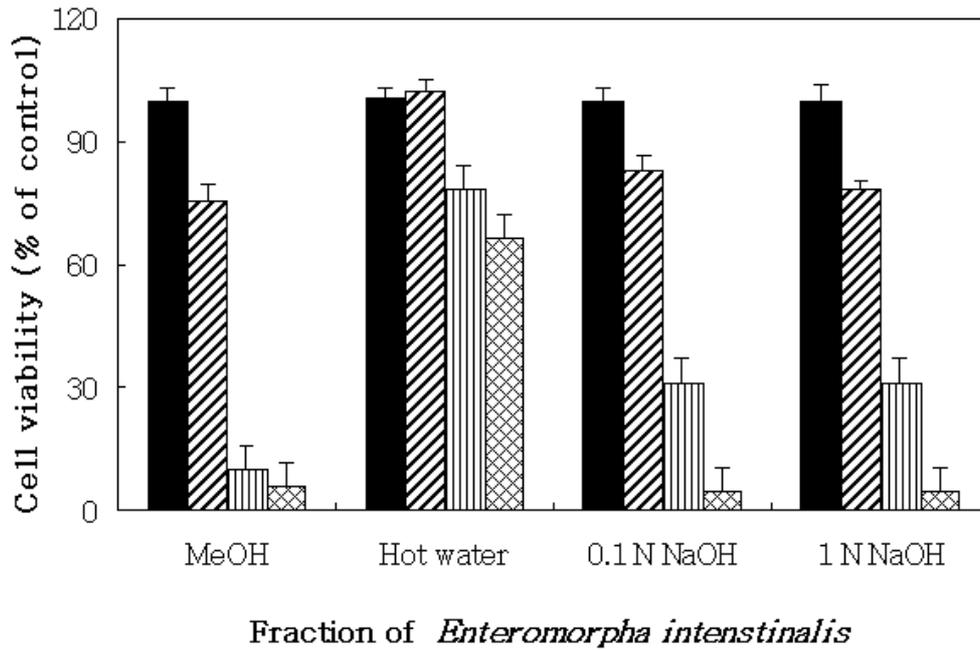


Fig. 3-28. 섬유 육아종 세포에서의 파래의 추출 조건에 따른 cell viability
 파래 농도에 따라 0(■), 0.05(▨), 0.25(▧), 0.5(▩) mg/ml의 추출물을 48시간 동안
 처리하였다. 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 3반복 실시하였다.

(4) 파래 추출물의 MCF7의 생존율에 미치는 영향

MCF7 (breast cancer cell, 유방암)세포의 항암 활성의 결과는 (Fig. 3-29) 파래 메탄올추출물
 에서의 세포 생존율은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 75.2%였고, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포 생존율은 10.1%로 강한
 항암 활성을 나타냈으며, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 8.7%의 낮은 생존율을 보여 MCF7 cell에 대한
 매우 강한 항암 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 0.1 N NaOH 추출물에서의 MCF7에 대해 세
 포 생존율은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 82.8%였고, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포 생존율은 31.0%로 낮은 세포 생존
 율을 보여 MCF7 cell에 대해 항암 활성을 나타냈으며, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 4.6%의 매우
 낮은 세포 생존율을 보였다. 파래 1 N NaOH 추출물에서는 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 77.4%의 생존율을
 나타내었고, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포 생존율은 31.0%로 강한 항암 활성이 있음을 보고 하였으며,
 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 4.6%의 매우 낮은 생존율로 대조구에 비해 매우 강한 항암 활성이 있
 는 것으로 보였다. 이는 기존의 연구에서 MCF7 cell에 대한 해조류의 성장 억제 효과에 관한
 연구나 대두와 현미 메탄올, 에탄올 추출물의 효과에 대한 보고와 비교해 볼 때 그 효과가 매
 우 우수한 것으로 사료된다.

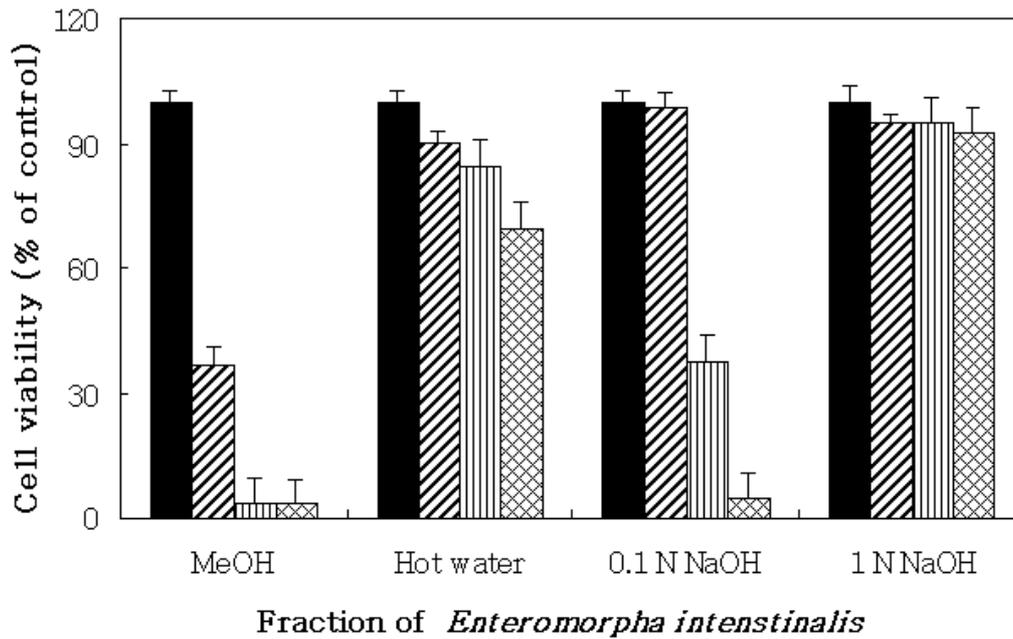


Fig. 3-29. 유방암 세포에서의 파래의 추출 조건에 따른 cell viability
 파래 농도에 따라 0(■), 0.05(▨), 0.25(▤), 0.5(▩) mg/ml의 추출물을 48시간 동안 처리하였다. 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 3반복 실시하였다.

위 결과들에서 알 수 있듯이 파래 추출 분획들은 간암세포 뿐 만 아니라 섬유 육종 세포, 유방암세포, 피부 흑색종 세포에서 높은 항암 활성을 나타내었다. 특히 저분자 획분인 메탄올추출물과 고분자 획분인 알칼리 용액 추출물 (0.1 N NaOH)은 실험한 모든 종양세포에 대한 강한 항암 활성을 확인할 수 있었다. 이상의 실험 결과에서 파래의 항암 활성을 검토를 통해 그 우수한 생리적 활성을 확인할 수 있었으며 이에 따라 새로운 기능성 식품의 소재로서 활용 가능성이 높을 것으로 검토되었다.

(5) 파래의 항혈전 효과

(가) 추출 용매에 따른 항응고 활성 검토

파래의 냉수 추출물, 메탄올 추출물과 1 N HCl 추출물에서는 항응고 활성을 나타내지 않았으나 열수 추출물에서는 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 시료를 포함하지 않는 순수 혈장으로 측정된 대조구가 36초인데 비해 469초로 13배의 높은 활성을 보였고, 1 N NaOH 추출물에서는 388초로 대조구에 비해 10.8배의 높은 활성을 보였다(Table 3-7). 실험 결과 열수추출물의 수용성 획분과 알칼리 추출물이 매우 높은 항응고 활성을 나타내었는데 이러한 수용성 획분에는 단백질이나 다당 등의 고분자류의 함량이 높아 이는 기존의 연구에서 해조류 유래 항응고 활성 물질의 경우 고분자류가 활성에 중요하게 관여

한다는 보고와 일치하는 것으로 보인다. 이에 따라 활성이 높았던 알칼리 추출물의 추출 용액의 농도에 따른 활성 비교를 위해서 0.1 N NaOH, 1 N NaOH, 2.5 N NaOH 용액으로 농도에 따른 항응고 활성을 비교 검토해 보았다. 그 결과(Table 3-8), 0.1 N NaOH 용액 추출물의 항응고 활성은 600초로 대조구에 비해 17배 높은 강한 항응고 활성을 보였고, 1 N NaOH 용액 추출물은 388초로 대조구에 비해 10.8배의 높은 항응고 활성을 보였다. 마지막으로 2.5 N NaOH 용액 추출물의 항응고 활성은 58.1초로 대조구에 비해 1.6배였다. 추출 용매의 알칼리 농도에 따른 항응고 활성 검토 결과 0.1 N NaOH에서 최고를 보였으며 농도가 높아짐에 따라 활성이 감소하였다. 이는 알칼리 추출 시 저농도에서는 파래로부터 항응고 활성 물질의 분리가 용이해져 항응고 물질의 활성이 높았으나 농도가 높아질 경우 이미 분리된 활성 물질이 알칼리에 의해 분해되면서 활성이 감소된 것으로 사료된다.

Table 3-7. 파래 추출물¹⁾의 항응고 활성

Scientific name	Anti-coagulant activity (sec) ²⁾				
	Fr. I ³⁾	Fr. II ⁴⁾	Fr. III ⁵⁾	Fr. IV ⁶⁾	Fr. V ⁷⁾
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	55.9	41.4	469.0	44.5	388.0

1) 1,000 µg/ml의 각 추출물의 농도 동일하게 설정.

2) Activated partial thromboplastin time (APTT)의 응고 시간 (control의 응고시간은 36 sec).

3) Fr. I : 냉수 추출 분획.

4) Fr. II : 메탄올 추출 분획.

5) Fr. III : 열수 추출 분획.

6) Fr. IV : 1 N HCl 추출 분획.

7) Fr. V : 1 N NaOH 추출 분획.

Table 3-8. 과래 알칼리 추출물의 농도에 따른 항응고 활성

Scientific name	Anti-coagulant activity (sec) ²⁾		
	Fr. I ³⁾	Fr. II ⁴⁾	Fr. III ⁵⁾
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	600.0	388.0	158.1

¹⁾ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 각 추출물의 농도 동일하게 설정.

²⁾ Activated partial thromboplastin time (APTT)의 응고 시간(control의 응고시간은 36 sec).

³⁾ Fr. I : 0.1 N NaOH 추출 분획.

⁴⁾ Fr. II : 1 N NaOH 추출 분획.

⁵⁾ Fr. III : 2.5 N NaOH 추출 분획.

(나) 농도에 따른 항응고 활성의 검토

실험 결과 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 600초로 높은 항응고 활성을 나타낸 과래 0.1 N NaOH 용액 추출물의 항응고 활성을 농도 변화에 따라 검토해 본 결과 (Table 3-9), 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 287초로 대조구에 비해 8배의 높은 항응고 활성을 나타냈으며 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서도 58.1초로 대조구에 비해 1.6배의 높은 항응고 활성을 확인 할 수 있었다.

Table 3-9. 농도에 따른 항응고 활성 측정

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Anti-coagulant activity (sec) ¹⁾
1000	600
500	287
100	58.1

¹⁾ Activated partial thromboplastin time (APTT)의 응고 시간(control의 응고시간은 36 sec).

차. 유근피 추출물로부터 간암억제 유효성분의 공업적 실용화

(1) 유근피 추출물을 이용한 연질 캡슐 제작

배합 예

단위: 1 Capule

제품유형: 건강기능식품 (연질캡슐)

성분: Extract 소재 100 mg

소맥배아유 30%

대두박 추출물 3%

D- α -토코페롤 1%

베타카로틴 3%

레시틴 1%

계피분, 생강추출물 기타

권장섭취량 및 섭취방법: 1일 3회, 1회 1-2
캡슐씩 식전 또는 식후에 섭취 필요에 따라
증감 가능



(2) 유근피 추출물을 이용한 드링크제 및 농축액 제작



배합 예

용량: 25 mL
제품유형: 내용액제제

성분: 분말소재 100 mg
백당 8.8%
포도당 5.8%
식염 0.05%
호박산이나트륨 0.05%
구연산 0.08%
안식향산나트륨 0.01%
에탄올 0.001%
니코틴산아미드 0.01%



(3) 유근피 추출물을 이용한 과립제 및 캡슐 제제



배합에

단위: 1포 (5 g)

제품유형: 건강기능식품 (과립제제)

성분: 분말소재 300 mg
옥수수 전분(부형제) 3.5 g
유당(부형제) 0.65 g
백당(감미제) 0.5 g
구연산(산미제) 5 mg
인삼추출물 2 mg

권장섭취량 및 섭취방법: 1일 3회, 1회 1-2 포씩 식전 또는 식후에 섭취 필요에 따라 증감 가능

카. 제품의 외관 및 안정성 검사

본 연구에서 개발된 제품들은 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속하므로 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가혹실험 (고온, 고압) 을 실시하여 제품의 외관과 미생물 검사를 실시하였다(Tables 3-10, 11).

Table 3-10. 제품의 미생물검사

- 연질 캡슐 제제의 저장 조건: 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유근피	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 드링크제제의 저장조건: 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유근피	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 과립 제품 저장 조건: 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유근피	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 연질 캡슐제제 저장 조건: 50℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유근피	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 드링크제제의 저장조건: 50℃, 1주일

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유근피	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

- 과립 제품 저장 조건: 50℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유근피	1×10^2 이하	1×10^2 이하	불검출	불검출

Table 3-11. 제품의 외관검사

-연질 캡슐제제의 저장조건: 37℃, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
유근피	없음	없음	없음	없음

-드링크제제의 저장 조건: 37℃, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
유근피	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 37℃, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
유근피	없음	없음	없음	없음

-연질 캡슐제제의 저장 조건: 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
유근피	없음	없음	없음	없음

-드링크제제의 저장 조건: 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
유근피	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
유근피	없음	없음	없음	없음

제 4장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구 개발 목표의 달성도

1. 연차별 연구 개발 목표 달성도

(1) 1차년도 연구 개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
제 1세부과제 : 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의 건강기능 식품화	<ul style="list-style-type: none"> - PC-12 cell에서 얻은 crude 상태의 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 이용하여 억제 활성물질 측정을 위한 <i>in vitro</i> assay계 확립 및 1, 2차 검색을 통한 시료들의 선정 - <i>In vitro</i> 세포독성 실험 - 식용 식물로부터 뇌세포 신호전달성분 분해효소 억제 최대 활성을 갖는 물질의 선정 및 추출법 확립 - 예비정제 	100
제 2세부과제 : 뇌신경세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 건강기능 식품화	<ul style="list-style-type: none"> - PC12 cell (rat pheochromocytoma cell)에 산화적인 세포상해를 유도할 수 있는 Aβ peptide를 인위적으로 가한 상태에서 이를 억제 또는 개선시킬 수 있는 시료를 검색 - Vitamin C 등과 같은 positive control과 Aβ-induced oxidative stress 저해 activity 비교 검토 - 뇌신경세포 보호성분으로서 최대 활성을 갖는 식용식물의 선정, 추출법 확립 - 예비정제 	100
제 3세부과제 : 간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 유효성분의 건강기능 식품화	<ul style="list-style-type: none"> - 활성이 있는 소재의 screening 및 추출법 확립 - SK-Hep-1 세포주를 대상으로 MTT assay를 통하여 추출물의 세포 독성을 측정 - Scrape loading/dye transfer (SL/DT) assay를 통하여 갭 결합을 통한 신호전달회복효과 검색 - 세포로부터 얻은 상등액을 SDS-PAGE를 이용 matrix metalloproteinase의 저해수준을 판별 - FOX assay를 통한 세포신호전달의 회복작용기전 확인 - 상기의 결과로 얻은 시료의 최대 활성 및 무독성의 대상 시료를 최종적으로 선정하여 유효범위 확정 	100

(2) 2차년도 연구 개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
<p>제 1세부과제 : 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의 건강기능 식품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 선정된 식물로부터 신호전달성분 분해효소 (acetylcholinesterase) 억제활성물질의 추출 - 선정된 식용식물을 대상으로 ICR male mouse를 이용한 <i>in vivo</i> 행동실험으로 활성 효과 확인 - Solvent partition, open column thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC)를 통한 활성물질의 분리, 정제 	100
<p>제 2세부과제 : 뇌신경세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 건강기능 식품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 선정된 식물로부터 Aβ peptide로 인한 산화적인 세포 상해를 억제 또는 개선시킬 수 있는 활성물질의 추출 - Vitamin C 등과 같은 positive control과 Aβ-induced oxidative stress 저해 activity 비교 검토 - 선정된 식용식물을 대상으로 ICR male mouse를 이용한 <i>in vivo</i> 행동실험으로 활성 효과 확인 - Solvent partition, open column thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC)를 통한 활성물질의 분리, 정제 	100
<p>제 3세부과제 : 간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 유효성분의 건강기능 식품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 선정된 활성 추출물로부터 유효성분의 확보를 위한 특성 검토 및 추출물 전 처리 조건 확립 - 활성이 증가된 분획물을 HPLC 등을 이용하여 정제 - 정제된 물질을 이용하여 <i>in vitro</i> test를 통한 역가유지 확인 - 유효순도 수준의 분획 및 정제방법 확립 - 정제물질의 특성 검토 	100

(3) 3차년도 연구 개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
<p>제 1세부과제 : 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 억제하는 유효성분의 건강기능 식품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 선정된 식물로부터 신호전달성분 분해효소 (acetylcholinesterase) 억제활성물질의 구조규명 - 정제된 활성물질을 이용한 2차 <i>in vivo</i> 행동실험으로 활성 효과 확인 - 활성물질의 공업적 수준의 대량정제법 확립 - 시작품 제조 	100
<p>제 2세부과제 : 뇌신경세포 상해로부터 뇌세포를 보호하는 유효성분의 건강기능 식품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 정제된 물질을 $^1\text{H-NMR}$과 $^{13}\text{C-NMR}$를 이용하여 구조해석 - 정제된 물질을 Electronic ionization (EI) mass를 이용하여 그 구조와 mass size를 측정하여 활성물질 확인 - 활성물질을 이용하여 가공적성 및 제작 시험 실시 	100
<p>제 3세부과제 : 간세포 내의 정보전달 억제를 회복시키는 간암억제 유효성분의 건강기능 식품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 정제물질의 특성 검토 및 구조분석 - 우수한 공업적 순도 수준의 정제방법 확립 - Bench 및 pilot 상에서 공업적 추출조건 확립 - 공업적 순도수준의 신속 대량 정제법 확립 - Extract, 기호음료, tablet, capsule 형태로의 시작품 제작 - 시작품의 가공, 품질, 유통 및 저장적성 검토 	100

2. 평가 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척도(점수)	달성도(%)
1차년도	시료선정의 효율성과 창의성에 맞는 assay계의 적합성	30	100
	생리활성 식용식물의 선정결과	35	
	추출 조건 및 방법, 예비정제법의 확립여부	35	
2차년도	<i>In vivo</i> 상에서의 독성검사 및 효능검정	35	100
	선정시료로부터 활성물질 추출시 소재화의 적성 검토	30	
	생리활성 물질의 정제결과와 정제물질 순도검정법의 명확성	35	
3차년도	물질의 구조규명 결과의 정확성	35	100
	공업적 순도수준의 대량정제법 및 확립 여부	30	
	시작품 제조	35	
최종보고	활성 물질의 구조해석 여부	35	100
	활성물질의 건강기능식품 제품화 여부	30	
	공업적 실용화 가능성	35	

제 2절 관련 분야에의 기여도

1. 학문·기술적 측면

- 천연물, 생리활성물질의 라이브러리 구축
- *In vitro, in vivo* 활성측정계의 도입
- 정제 phytochemical의 분자구조 규명
- 항암, 항치매 활성물질의 제품화 체계 확립
- 생리활성 물질의 신속 간편한 정제법의 도입 및 미량성분 농축기술 확립
- 1차 산물로부터 생리활성물질 추출 및 정제를 위한 최적의 조건 확립
- 약리·생리활성 신규후보 물질의 개발모델 제시

2. 경제·산업적 측면

- 1차 산물의 고부가가치화로 시장 경쟁성 확보
- 1차 산물의 생산의욕 고취로 농가의 소득증대에 기여
- 약리·생리활성 물질의 탐색과 소재화에 의한 국내 산업 창출 가능성 제시
- 간단한 분리·정제 공정으로 뇌질환에 대한 예방 및 치료제 생산
- 농업과 제조업 연계로 지역경제의 활성화에 기여
- 기능성 식품제조 기술의 발전을 촉진시켜 식품 및 관련 산업들의 신장을 촉진

제 5장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 추가연구의 필요성

본 연구에서는 국내 고유 차·죽류 식물로부터 신물질을 이용하여, 대표적인 성인질환인 치매 및 간암의 예방과 치료에 활용될 수 있는 미량성분을 개발하고 이를 원료로 건강기능식품을 개발하기위한 기초를 마련하였다. 선정된 최종 시료들의 효과를 다양한 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통해 병인을 막아주거나 질환에 의해 감소되는 인자를 증가시켜주는 것으로 확인하였으나, molecular level에서 어떠한 기전으로 작용하는지에 대한 연구는 추후 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

또한, 본 연구에서 밝혀진 향암, 항치매 활성물질은 기존의 연구에서 그 생리활성효과가 보고된 바가 거의 없으므로, 다른 질병이나, 실험모델에 적용시켜 추가적인 생리활성 효과에 대해 연구해볼 필요가 있다. 해당 연구과제로부터 얻어진 향암, 항치매 기능성 물질은 특허 출원 및 등록을 진행 중에 있으며, 이후 기능성 소재로의 기술이전과 홍보를 위해서는 전임상 및 임상 실험을 통한 식품의약품안전청으로부터 건강기능식품 기능성 원료 개별인정 획득이 필요할 것으로 보인다.

제 2절 타 연구에의 응용

국내 고유 차·죽류 식물로부터 얻은 향암, 항치매 활성소재를 이용한 노인성 질환의 예방과 치료는 비단 본 연구에서 적용한 간암 및 치매에 국한되지 않고 다른 질병이나, 실험모델에 적용이 가능할 것으로 여겨진다. 또한 미량소재를 개발하기 위해 사용한 천연 생리활성소재의 분리기술은 의약품 및 건강기능식품 소재의 개발에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

제 3절 기업화 추진방안

본 연구에서 진행된 약리·생리활성 물질의 탐색과 소재화는 기술의존도가 높은 무공해 산업으로 향후 국내산업의 재편과정에서 중추적인 역할을 담당하게 될 것으로 예상된다. 특히 제조공정상 하나의 시설로 다양한 제품의 생산이 가능하고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종 생산의 특성을 가지는 중·소기업 형 산업으로 분류할 수 있다.

- 1) 건강관리가 필요한 중·장년층을 대상으로 기능성 차의 개발로 기호 식품화
- 2) 식용식물자원에서 추출한 조추출물을 이용하여 드링크 음료화 하여 기능성 음료로의 개발

- 3) 연질 캡슐 및 과립화를 이용하여 섭취방법을 쉽게 함으로써 기존의 동물성 원료를 이용한 건강기능식품을 선호하지 않거나 또는 섭취할 수 없는 사람들을 대상으로 하여 건강기능식품으로써 개발
- 4) 자연식물자원으로부터 기능성 미량소재를 얻는 방법이 체계화 되고 용이해짐으로써 더 나아가 미량소재와 병의 작용기작을 연구하여 이를 통한 의약품 소재로서의 개발

제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Measurement of oxidative stress (DCF-DA method)

PC12 cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 A β peptide를 처리하여 oxidative stress를 유도한다. A β -induced oxidative injury는 DCF-DA (2',7'-dichlorofluoresine diacetate)를 이용하여 생성된 oxidative stress 정도를 spectrofluorometer를 통해서 측정한다.

- *Free Radical Biology and Medicine*, 2001; 30: 447-450
- *Mutation Research*, 2001; 496: 181-190
- *Molecular Brain Research*, 2002; 104: 55-65
- *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000; 164: 305-311

2. Assessment of cell viability (MTT reduction assay)

PC12 cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 A β protein을 처리하여 A β -induced cytotoxicity를 유도한 후 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)]를 이용하여 spectrophotometer를 통해서 측정한다.

- *J. of Neurochem.*, 1997; 69: 2285-2293
- *Life Sci.*, 2002; 70: 833-841
- *Pharmacol. Res.*, 2001; 43: 173-178
- *Neurosci. Letters*, 1998; 251: 105-108

3. Assessment of AChE activity (Ellman's methods)

PC12 cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 세포수가 10^4 - 10^6 cell/ml가 되었을 때 cell lysis buffer를 이용하여 cell로부터 AChE 를 조제하여 추출한 sample 10 μ l를 buffer 50 μ l가 분주되어 있는 96 well plate에 첨가하고 substrate solution 70 μ l를 마지막으로 첨가하여 37°C에서 15분간 incubation시킨다. 반응이 끝나면 microplate reader를 이용하여 405 nm 파장에서 효소의 활성을 측정한다. Enzyme의 protein 농도는 Bradford법을 이용하여 측정한다

- *Biochem. Pharmacol.*, 1961; 7: 88-95
- *Dement. Geriatr. Cogn. Disorder.*, 2004; 17: 151-157
- *J. Ethnopharmacol.* 2006; 108: 31-37
- *Mol. Cells*, 2001; 11: 137-143

4. Evaluation of learning and memory capacity using *in vivo* model

가. Y-maze test

ICR-male mice는 sample을 섞은 사료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질을 injection하여 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시한다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록한다. Mouse를 maze에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산한다.

- *Mole. Medicine*, 2001; 7: 548-554.
- *Cancer Res.*, 1991; 51: 2515-2520.
- *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 18210-18217.

나. Passive avoidance test

위의 조건처럼 ICR-male mice는 food와 선정시료를 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 치매 유발성 물질을 injection 하여 기억력 실험을 실시한다. 이 실험은 실제 실험에 들어가기 전날에 기억상자와 같은 장소에서 training을 시킨 다음 행동실험을 실시한다. 모든 mice를 실험 전날 실험 상자에서 적응 훈련 (명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험한다.

- *Behav. Brain Res.*, 1997; 83: 39-44
- *Amyloid.*, 2001; 8: 194-201
- *Amyloid.*, 2006; 13: 6-12
- *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52: 1520-1525

제 7 장 참고문헌

- 1) Prasad, K.N., Hovland, A.R., Cole, W.C., Prasad, K.C., Nahreini, P., Edwards-Prasad, J., and Andreatta, C.P., Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Alzheimer's disease: analysis of biologic rationale. *Clin. Neuropharmacol.*, 23, 2-13 (2000)
- 2) Heo, H.J., Cho, H.Y., Hong, B.S., Kim, H.K., Kim, E.K., Kim, B.G., and Shin, D.H., Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A β -induced oxidative stress in PC12 cells. *Amyloid.*, 8, 194-201 (2001)
- 3) Choi, S.J., Kim, M.J., Heo, H.J., Kim, H.K., Hong, B.S., Kim, C.J., Kim, B.G., and Shin, D.H., Protective effect of *Rosa laevigata* against amyloid beta peptide-induced oxidative stress. *Amyloid.*, 13, 6-12 (2006)
- 4) Heo, H.J., Kim, D.O., Shin, S.C., Kim, M.J., Kim, B.G., and Shin, D.H., Effect of antioxidant flavanone, naringenin, from *Citrus junos* on neuroprotection. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1520-1525 (2004)
- 5) Markesbery, W.R., and Carney, J.M., Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.*, 9, 133-146 (1999)
- 6) Behl, C., Davis, J., Cole, G.M., and Schubert, D., Vitamin E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186, 944-950 (1992)
- 7) Markesbery, W.R., and Lovell, M.A., DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Antioxid. Redox. Signal.*, 8, 2039-2045 (2006)
- 8) Shin, E.J., Suh, S.K., Lim, Y.K., Jhoo, W.K., Hjelle, O.P., Ottersen, O.P., Shin, C.Y., Ko, K.H., Kim, W.K., Kim, D.S., Chun, W., Ali, S., and Kim, H.C., Ascorbate attenuates trimethyltin-induced oxidative burden and neuronal degeneration in the rat hippocampus by maintaining glutathione homeostasis. *Neuroscience*, 133, 715-727 (2005)
- 9) Behl, C., Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 69, 213-219 (1999)

- 10) Alzheimer's Association, 2008 Alzheimer's disease facts and figures, 1–38 (2008)
- 11) Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., and Etherton, T.D., Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, 113, 71S–88S (2002)
- 12) Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., and Feather-Stone, R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88–95 (1961)
- 13) Jhoo, J.H., Kim, H.C., Nabeshima, T., Yamada, K., Shin, E.J., Jhoo, W.K., Kim, W., Kang, K.S., Jo, S.A., and Woo, J.I., Beta-amyloid (1–42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav. Brain Res.*, 155, 185–196 (2004)
- 14) Ahn, J., Um, M., Choi, W., Kim, S., and Ha, T., Protective effects of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. on the cognitive deficits caused by beta-amyloid peptide (25–35) in young mice. *Biogerontology.*, 7, 239–247 (2006)
- 15) Kim, M.J., Choi, S.J., Lim, S.T., Kim, H.K., Heo, H.J., Kim, E.K., Jun, W.J., Cho, H.Y., Kim, Y.J., and Shin, D.H., Ferulic acid supplementation prevents trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1063–1068 (2007)
- 16) Conte, V., Uryu, K., Fujimoto, S., Yao, Y., Rokach, J., Longhi, L., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., McIntosh, T.K., and Praticò, D., Vitamin E reduces amyloidosis and improves cognitive function in Tg2576 mice following repetitive concussive brain injury. *J. Neurochem.*, 90, 758–764 (2004)
- 17) Ishige, K., Schubert, D., and Sagara, Y., Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol.*, 30, 433–446 (2001)
- 18) Rabah, I.O., Hou, D.X., Komine, S., and Fujii, M., Potential chemopreventive properties of extract from baked sweet potato. *J Agric Food Chem.*, 52, 7152–7157 (2004)
- 19) Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Makino, K., and Ishikawa, F., Antioxidative activity

of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoera batatas cultivar Ayamurasaki*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 979–988 (2005)

- 20) Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C., and Thomas, M., Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.*, 130, 1910–1917 (1983)
- 21) Wolfe, K.L., and Liu, R.H., Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 8896–8907 (2007)
- 22) Kim, D.O., Heo, H.J., Kim, Y.J., Yang, H.S., and Lee, C.Y., Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9921–9927 (2005)

부 록

**2006 International Symposium and Annual Meeting of
the Korean Society of Food Science and Nutrition**

Nutraceuticals and Functional Food for Healthy Aging

October 18 ~ 20, 2006

Gyeongju TEMF Hotel, Gyeongju, Korea

Sponsored by

Korea Research Foundation
The Korean Federation of Science and Technology Societies
California Walnut Commission
American Soybean Association-International Marketing/Korea
Korea Nokjup Association
Newtree Industry Co., Ltd.
CJ Corp.
Nongshim Co., Ltd.
WiniaMando Co., Ltd.
Changnyeong-gun
RIS of Changnyeong Onion & Soy Products Industry

Hosted by

KFSN The Korean Society of Food Science and Nutrition
KFDA Korea Food & Drug Administration

purified β -secretase inhibitor was estimated to be 576 daltons with a sequence of Gly-Trp-Trp-Glu.

P10-03

Protective Effects of 3-Methoxy-4-Hydroxybenzoic Acid from *Allium tuberosum* Rottl. against TMT-induced Oxidative Stress in Neuronal Cell

Mi Jeong Kim^{1*}, Soo Jung Choi¹, Bumshik Hong², Hong Yon Cho², Hye Kyung Kim³, Dong Hoon Shin²

¹Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Korea, ²Department of Food and Biotechnology, Korea University, Korea, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Korea

In the previous study, we performed isolation and purification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid from *A. tuberosum* Rottl. as choline acetyltransferase (ChAT) activator. We investigated the protective effects of ferulic acid from *A. tuberosum* Rottl. against TMT-induced oxidative stress in neuronal cell line through measurement of lipid peroxidation, GSH content, assessment of cell viability. The organotin compound trimethyltin (TMT) is a potent neuro-toxicant which is capable of producing rapid and widespread damage to the central nervous system. Also, TMT increased generation of cellular reactive oxygen species ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2), and both NO, and NOS were formed on TMT exposure. The 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid (ferulic acid) manifests a profound anti-toxicant activity and exerts improvement or protective effects against neuronal cell damage. In this study, oxidative damage by TMT was demonstrated by detection of elevated malondialdehyde level, depressed content of GSH, and cell death. The 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid efficiently suppressed cytotoxicity and loss of GSH caused by peroxides. Also, lipid peroxidation which increased in response to TMT was counteracted by the 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid.

P10-04

Effects of *Chaenomeles sinensis* Extract on Trimethyltin (TMT)-Induced Amnesia in Mice

Yoon Kyung Kwon^{1*}, Mi Jeong Kim², Soo Jung Choi², Hong Yon Cho, Bum Shik Hong, Hye Kyung Kim³ and Dong-Hoon Shin. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

This study was performed to search the choline acetyltransferase (ChAT) activator from Korean traditional plants. ChAT activators increase cholinergic transmission by improving the enzymatic synthesis of acetylcholine. As a result of screening, the ethanol extract from *Chaenomeles sinensis* represented the highest activity effect on ChAT *in vitro*. The assay system for the measurement of ChAT activity was

assembled by the cell (human neuroblastoma cell) and a radioisotope, as [¹⁴C] Acetyl-CoA. To determine the effects from *Chaenomeles sinensis* extract on TMT-induced impairments of learning and memory, we carried out an *in vivo* experiment. *Chaenomeles sinensis* extract improved the TMT-induced deficits of memory registration in passive avoidance test and Y-maze behavior test in mice. It appeared that *Chaenomeles sinensis* extract might attenuate the brain disorder. This study suggests that *Chaenomeles sinensis* would be useful in the treatment of Alzheimer's disease.

P10-05

Protective Extracts from *Gardenia jasminoides* against Amyloid Beta Peptide-induced Oxidative Stress

Soo Jung Choi^{1*}, Mi Jeong Kim¹, Hong Yon Cho², Bum Shik Hong², Young Jun Kim², Hye Kyung Kim³ and Dong Hoon Shin². ¹Department of Food Technology, Korea University, ²Department of Food and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in aged population. The brains of AD were characterized by extensive oxidative stress. Additionally, large depositions of amyloid beta peptide (A β) were observed, and many researchers opined that A β is central to the pathogenesis of AD. The A β is known to increase free radical production in nerve cells, leading to cell death. The ethanol extract of *Gardenia jasminoides* was selected by screening. *In vitro* experiment, the extract of *Gardenia jasminoides* attenuated the A β -induced oxidative stress on PC12 cells. *In vivo* experiment, treatment with the extract of *Gardenia jasminoides* increased spontaneous alternation behavior of the A β ₁₋₄₂ injected mice. To find the active component, the ethanol extract of *Gardenia jasminoides* was solvent partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate, respectively. Then, the active component was sequentially purified by silica gel column chromatography and HPLC. The protector of A β -induced oxidative stress is determined as the palmitic acid. Therefore, *Gardenia jasminoides* extract should be useful to slow or reverse the pathology and course of AD.

P10-06

Exploring the Preventive Material of Alzheimer's Disease (AD) among Korean Edible Plants

Young-won Kim^{1*}, Mi Jeong Kim², Soo Jung Choi², Hong Yon Cho¹, Bum Shik Hong¹, Hye Kyung Kim³ and Dong-Hoon Shin¹. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Several studies about brains of Alzheimer's disease (AD)

patients have shown expression of senile plaques and neurofibrillary tangles, oxidative and inflammatory processes, and neurotransmitter disturbances including changes in the release of acetylcholine (ACh) and modulation of ACh receptors. One of the strategies to remedy AD is inhibiting ACh hydrolysis by acetylcholinesterase (AChE) on the basis of cholinergic hypothesis and another is using antioxidants that prevent initiation of cell injury as a consequence of oxidative damages. Thus, we tested diverse Korean edible plants to determine reputable effects relating to AChE and antioxidants. These plants were extracted from various solvents. We investigated the antioxidative effect by scavenging of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Besides, in order to find AChE inhibitors, we modified Ellman's method for assembling AChE and the measurement of its activity. Then, several ethyl alcohol (EtOH) extracts of Korean edible plants were selected as AChE inhibitors and/or antioxidants. In results, some extracts are expected to be used as both AChE inhibitor and antioxidant.

P10-07

Amelioration of Amyloid Beta Peptide (A β)-Induced Oxidative Stress

Ju Hyun Lee^{1*}, Soo Jung Choi², Mi Jeong Kim², Hong Yon Cho¹, Bum Shik Hong¹, Hye Kyung Kim³ and Dong-Hoon Shin¹. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is one of the senile dementia. Among the senile dementia, AD demonstrated the best outbreak rate. AD patients have aggressive inclination and changes in behavior and personality. These symptoms are originated from amyloid beta peptide (A β)-induced oxidative stress. A β is a 40-42 amino acids peptide derived from amyloid precursor protein (APP) and a major constituent of extracellular senile plaque. The cleavage of APP occurs due to β - and γ -secretase on either side of the A β sequence of APP molecule. A β and senile plaque are both causes for neuronal damage and cognitive failure via the generation of free radicals. Formation of free radicals may influence in mitochondrial oxidative damage, inflammatory processes, DNA/RNA oxidation, protein oxidation, lipid peroxidation, neurodegenerative disorders, and synaptic failure. Eventually neuronal cells die. For the protection of neuronal cell, we performed MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide] reduction assay. The MTT assay is a widely used for measuring cell viability against oxidative stress. According to MTT sequel, some plants represented excellent protective effect.

P10-08

Screening of Antioxidant and AChE Inhibitor from Korean

Plants in PC12 Cells

Hye Ri Bae^{1*}, Mi Jeong Kim², Soo Jung Choi², Hye Kyung Kim³, Hong Yon Cho¹, Bum Shik Hong¹ and Dong-Hoon Shin¹. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

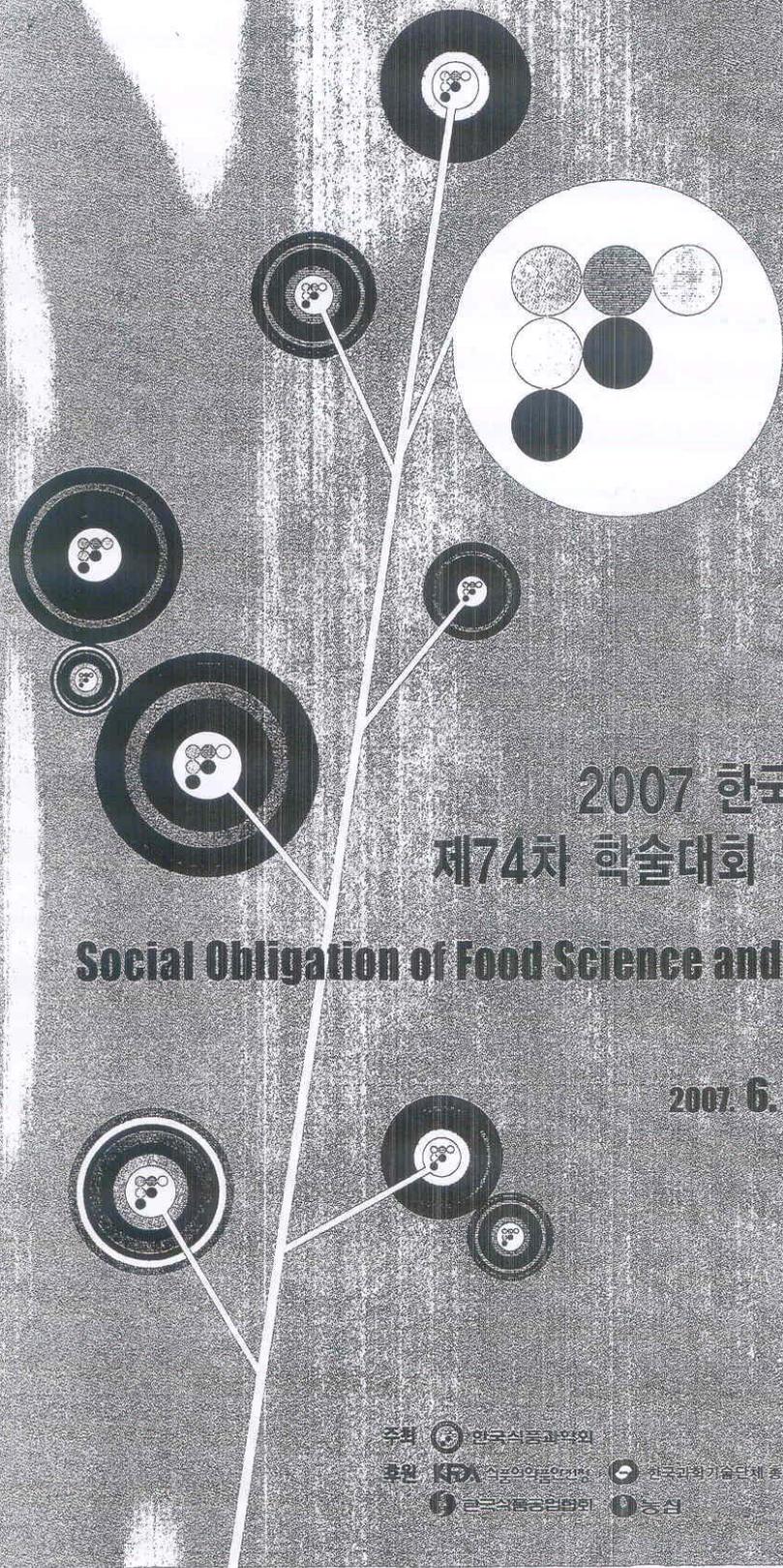
Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative disorder of the central nervous system. AD has been linked to a deficiency in the brain neurotransmitter acetylcholine (ACh). Acetylcholinesterase (AChE) is the principle enzyme involved in the hydrolysis of ACh to end its action in neural synapses. Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) were introduced for the symptomatic treatment of AD. The prevailing view has been that the efficacy of AChEIs is attained through their augmentation of acetylcholine-mediated neuron to neuron transmission. Inhibition of AChE increases extracellular levels of ACh and thereby amplifies its action. We screened Korean edible plants to determine the inhibitive effect of AChE. Korean edible plants were extracted with methanol, ethanol respectively. And then we measured radical scavenging activities via DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay and also with Ellman's method. Consequently, several extracts with high radical scavenging activity were selected. In addition, among extracts of Korean edible plants, we determined some plant extracts exhibiting AChE inhibition effects. In result, we found that *Poncirus trifoliata* would represent both the inhibition effect of AChE and/or radical scavenging activity.

P10-09

Physiological Activities of Fluid and Solid Chungkookjang

Bo-Mi Lee*, Seon-Bin Park, Young-Bae Kim, Hyun-Ku Kim. Korea Food Research Institute, Sungnam-Si, 463-746, Korea

Chungkookjang is a traditional Korean soybean-based fermented food. It is produced by fermenting whole steamed soybeans with *Bacillus subtilis*, the dominant species. This product is rich in proteins and carbohydrates, which suggests its potential as both a nutritional and healthy food. Actually, *Chungkookjang* is also known to have various physiological properties, such as fibrinolytic activity, anti-cancer activity, antihypertensive activity, hypocholesterolemic effects, hypoglycemic effects, and hypolipidemic effects. We examined physiological activities comparing solid *Chungkookjang* (SCK) with fluid *Chungkookjang* (FCK) extracts. FCK is an extract of whole steamed soybeans for making convenience foods using *Chungkookjang*. These two types of *Chungkookjang* were extracted with water, 50 and 100% ethanol changing sample concentration and power in microwave system. And then, we investigated electron-donating ability (EDA), nitrite-scavenging activity (NSA) and tyrosinase inhibition effects of extracts. EDA



2007 한국식품과학회
제74차 학술대회 및 정기총회

Social Obligation of Food Science and Technology

2007. 6. 20 수 - 22 금
부산 BEXCO



2007 Gold Sponsor

주최  한국식품과학회

후원  KFDA 식품안전관리청

 한국식품공업협회

 한국과학기술단체총연합회

 농림부

 한국식품진흥재단

P11-072**Screening of the Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitors from Plants**

Seung S. Oh* *Department of Food and Biotechnology, Korea University, Soo J. Choi and Mi J. Kim Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Hye K. Kim Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Hong Y. Cho, Bum S. Hong, Young J. Kim and Dong H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea Univ.*

Alzheimer's disease (AD) is a type of disease occurs in the central nervous system. It causes symptom of memory failure and retrogression of one's intelligence and cognitive faculty. AD is related to decrease of formation speed of acetylcholine (ACh) and it has been proven that restraint of hydrolysis of acetylcholine is effective for recovering the function of this synapsis. Currently, curing of AD can be achieved through usage of the effective inhibitors which impede the faculty of AChE and consequently preserve damaged ACh by restraining decomposition of ACh. Thus, various plants were tested to determine the inhibitive effect of AChE and antioxidant. These plants were extracted using 80% ethanol. The antioxidative effect was measured by scavenging activity via DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay. In addition, AChE inhibitory assay was performed in 96-well plate using microplate reader. Modified Ellman's method was used. Consequently, the effects of some extracts as AChE inhibitor and antioxidant were revealed.

P11-074**Protective Effect of Phytochemicals against Neurodegeneration in Mice**

Hye R. Bae* *Department of Food and Biotechnology, Korea University, Mi J. Kim and Soo J. Choi Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Hye K. Kim Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Hong Y. Cho, Bum S. Hong, Young J. Kim and Dong-H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea Univ.*

Alzheimer's disease is characterized neurochemically by a consistent deficit in cholinergic neurotransmission, particularly affecting cholinergic neurons in the basal forebrain, a neurochemical deficit that led to the use of AChE inhibitors for the symptomatic therapy of the disease. Various Korean edible plants were screened to determine the inhibitive effect of AChE. Consequently, among extracts of Korean edible plants, some plant extracts exhibited AChE inhibition effect. Unidentified phytochemicals which represent the inhibition effect of AChE were purified and these active extracts were evaluated by MTT assay to investigate cell viability. *In vivo*, ICR mice were used to ascertain TMT-induced cytotoxicity. Behavioral changes in the mice were evaluated using Y-maze test *in vivo*. Y-maze task was carried out on days 2 and 3 after TMT administration. Group with sample intake represented relevantly higher protective effect against neuronal disorder and relevantly higher AChE inhibition effect than that of control. [Korea (code # 106013-03-1-CG000)]

P11-076**Ameliorating Effect of *Gardenia jasminoides* against Amyloid β Peptide-induced Memory Impairment**

Soo J. Choi* and Mi J. Kim *Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea Univ., Hye K. Kim Department of Food and Biotechnology, Hanseo Univ., Bum S. Hong, Hong Y. Cho, Young J. Kim and Dong H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea Univ.*

Many natural plant extracts represent antioxidative activities. To find the protectant against $A\beta$ -induced oxidative stress, various natural plant extracts were screened. The fruit of *Gardenia jasminoides* is an oriental herbal medicine. It has been used for the treatment of inflammation, edema, fever, and hypertension for years, and its pigment is used as food colorant in oriental countries. Its pharmacological actions such as protective activity against oxidative damage, cytotoxic effect, antiinflammatory activity and fibrolytic activity have already been elucidated. In this study, to examine the possible prospective effect of *Gardenia jasminoides* extract against $A\beta$ -induced learning and memory impairment in mice, behavioral tests were performed *in vivo*. The animal model was used as an experiment for $A\beta$ -induced memory impairment. The intracerebroventricular (ICV) injection of $A\beta_{1-42}$ induced memory deficit. However, the *Gardenia jasminoides* extract revealed anti-amnesic activity *in vivo* through blocking of $A\beta$ -induced neuronal cell death. [Supported by a grant (Code # 20050401034615) from BioGreen 21 Program, Rural Development Administration]

P11-073**Study of Alleviating Hydrogen Peroxide (H_2O_2)-induced Neurotoxicity**

Ju H. Lee* *Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, Soo J. Choi and Mi J. Kim Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Hye K. Kim Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University, Hong Y. Cho, Bum S. Hong, Young J. Kim and Dong H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea Univ.*

Alzheimer's disease (AD) is a progressive, incurable disease that always ends in death. One of the classic neuropathological diagnostic markers for AD is senile plaque. It generates hydrogen peroxide (H_2O_2) and free radicals that causes for neurotoxicity and cognitive failure. Samples were extracted with ethanol. Then, MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide] reduction assay and DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) assay were carried out. The selected high protective sample against H_2O_2 -induced neurotoxicity was confirmed and then performed solvent partition. Solvent partition is executed with hexane, chloroform, ethyl acetate sequentially three times. Each partition was evaporated and performed as above mentioned assay. In DCF-DA assay, the first of chloroform (C1) and the third of ethyl acetate (E3) fractions demonstrated high protective effect against H_2O_2 -induced oxidative stress. In MTT reduction assay, E3 fraction exhibited the brilliant cell viability. [Korea (code # 106013-03-1-CG000)]

P11-075**Protective Effect of Plant Extracts against Amyloid β Peptide ($A\beta$)-induced Neurotoxicity**

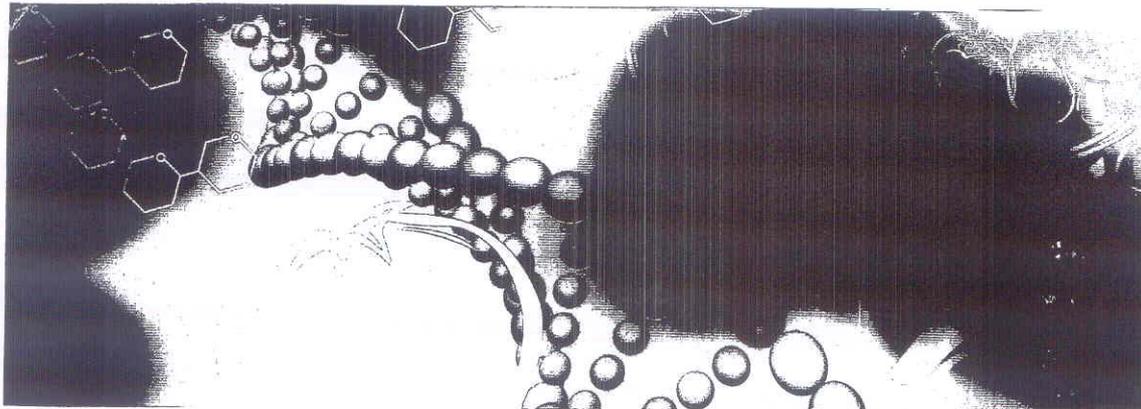
Jae K. Kim* *Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, Soo J. Choi and Mi J. Kim Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Hye K. Kim Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University, Hong Y. Cho, Bum S. Hong, Young J. Kim, and Dong H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea Univ.*

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder of central nervous system correlated with cognitive malfunction, loss of memory, unusual behavior and declined perception ability. AD is accompanied three main pathological changes in the brain: diffuse loss of neurons, intra- and extracellular proteins such as senile plaques. The most abundant constituent of senile plaques which can be observed in AD is A, cleaved form of amyloid precursor protein (APP) by γ -secretase. To investigate protective effect against oxidative damage in neural cells, various plants extracts were screened and evaluated by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. According to above assays, some plant extracts represented relevantly high protective effect against the neural cell disorder. Hence, these results may indicate that A-induced cytotoxicity can be reduced. It is suggested that some plant extracts may be potential preventive agent against AD. [Supported by a grant (Code # 20050401034615) from BioGreen 21 Program, Rural Development Administration]

P11-077**Mitigating Effect of Plant Extract against Cell Cytotoxicity in Mice**

Young W. Kim* *Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, Mi J. Kim and Soo J. Choi Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Hye K. Kim Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University, Hong Y. Cho, Bum S. Hong, Young J. Kim and Dong H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea Univ.*

Until recently, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid colorimetric assay for the sake of cell viability and cytotoxicity *in vitro*. Trimethyltin (TMT) chloride has been regarded as a potential tool for the behavior test in animal models judging from the fact that it is known to selectively inflict injury on specific regions of the brain. The protective effect of plant extract against encephalopathy was confirmed by behavioral test in TMT-induced ICR mice. Then, the ethyl alcohol (EtOH) extract of the plant was corroborated by MTT assay to detect cytotoxicity. *In vivo*, Y-maze test was performed with ICR mice which had free access to different concentration of sample in feed or water. In this test, the result demonstrates that administering plant extract to mice protected against TMT-induced memory dysfunction and behavioral alteration which are typical symptoms of encephalopathy. The outcome of both tests suggested the plant EtOH extract might mitigate encephalopathy. [Korea (Code # 106013-03-1-CG000)]



2007 International Symposium and Annual Meeting
**Metabolic Syndrome and
Functional Foods**

October 17-19, 2007
Carnival Hall, Muju Resort, Korea

Gold Sponsor
The Youlchon Foundation
 栗村財團 (Nongshim Group)

Sponsored by
The Korean Federation of Science and Technology Societies
Korea Food & Drug Administration
Korea Research Foundation
CJ Cheiljedang Co.
US Potato Board
Sejeon Co., Ltd.
Sempio Foods Co.
Amway Korea Ltd.
Korea Ginseng Corp.
American Soybean Association-IM
Jeju Seaweed Industry Development Agency
RIS of Changnyeong Onion & Soy Products Industry
Clinical Trial Center for Functional Foods, Chonbuk Natl Univ Hospital

KFN The Korean Society of Food Science and Nutrition

extract of *Gardenia jasminoides* was selected by screening. In this study, *Gardenia jasminoides* used to find the protector against A β -induced oxidative stress. And the active component was sequentially purified by silica-gel column chromatography and HPLC. The isolated component was established by EI-MS and ¹³C/H-NMR to predict chemical structures. The active component was ultimately shown to be palmitic acid. The component demonstrated cell protective effects against oxidative stress-induced cytotoxicity in DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) assay, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) reduction assay, and trypan blue assay. To study the effect of palmitic acid on A β -induced learning and memory impairment *in vivo*, regarded as a measure of step-through latency, the passive avoidance test was used. In conclusion, palmitic acid attenuated the A β ₁₋₄₂-induced impairment of passive avoidance performance in a dose-dependent manner. This work was supported by a grant (Code # 20050401034615) from BioGreen 21 Program, Rural Development Administration, Republic of Korea.

P8-18

Radioprotective Property of the Active Fraction of *Nelumbo nucifera* Ethanolic Extracts in Mice

정일윤*, 이효정, 박용대, 이영만, 이슬, 진창현, 변명우. 한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소

The present work is aimed at evaluating the radioprotective effect of the active fraction of *Nelumbo nucifera* Gaertn. 70% ethanolic extracts (AFN) against an oxidative stress and tissue injury induced by a gamma radiation. The search for ideal radioprotectors is one of the current topics of research in radiation biology and medicinal chemistry. Radioprotectors can protect a normal tissue intimately associated with a tumor and in the path of a treatment beam. Therefore, any protector that can improve the tolerance of a normal tissue to radiation is of considerable interest. In the course of searching for a radioprotector from natural product, we found that *N. nucifera* is used as a nontraditional or alternative medicine for various diseases such as anti-diabetic and anti-inflammatory effects. It is a well-known Korean folk medicine containing several kinds of polyphenols and it has the advantage of being relatively nontoxic. Polyphenols that have been identified from *N. nucifera* include isoquercetin (1). In this study, Mice were subjected to a dose of 4 Gy from a cesium-137 source. Four days prior to an irradiation, the mice received AFN daily (10 mg/kg body weight I.p.). In the irradiated animals, the oxidative stress markers, lipid degradation products, were significantly increased in the urine. To detect the free MDA, the samples were reacted under mild conditions (25 °C, PH 4.0, 30 min) with phenylhydrazine (PH) to afford phenylhydrazone derivatives. Treatment with AFN for 4 days before an acute irradiation significantly abolished radiation-induced elevation in their lipid degradation products.

P8-19

Ameliorating effects of traditional plants extract against oxidative stress on neural cell

Jae K. Kim*, Soo J. Choi¹, Mi J. Kim¹, Hye K. Kim², Hong Y. Cho, Young J. Kim, and Dong H. Shin. Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, ¹Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, ²Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder of central nervous system and characterized by several pathological changes: loss of neurons, intracellular proteins such as senile plaques, neurofibrillary tangles. The major component of senile plaques is the amyloid

beta peptide (A β) which is 40-42 amino acids sequence cleaved form of amyloid precursor protein (APP) by β -, γ -secretase. The A β has been identified as a possible source of oxidative stress then these may increase neural cell injury, apoptosis and finally leads to cell death in the AD brain. To investigate the most effective component against oxidative damage in neural cells, various traditional plants extracts were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. In conclusion, the sample (A) showing the highest protective effect against oxidative stress was selected. For the comparison of peel and body of sample, each part of sample was examined by above assays. As a result, the peel of sample represented higher protection than the body part. It is suggested that extracts of sample, especially the peel part, should reduce the cytotoxicity of A β and may be a useful chemo-preventive agent against AD. This work was supported by a grant (Code # 20050401034615) from BioGreen 21 Program, Rural Development Administration, Republic of Korea.

P8-20

Purification of Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitor from Korean Edible Plants

Hye R Bae^{1*}, Mi J Kim², Soo J Choi², Hye K Kim³, Hong Y Cho¹, Young J Kim¹, and Dong-H Shin¹. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and is clinically characterized by progressive cognitive decline associated with impairment in activities of daily living and progressive behavioral disturbances throughout the disease course. Acetylcholine, neurotransmitter on the end of synapses, is resolved into acetyl-CoA and choline by AChE. In AD patients, the quantity and ability of acetylcholine are reduced. Accordingly, AChE inhibition demonstrates beneficial effects on cognitive, functional, and behavioral symptoms of AD. Korean edible plants were extracted with ethanol. Consequently, among extracts of Korean edible plants, the plant extract Pt showing AChE inhibition effect was selected. Then, solvent partition was performed with hexane, chloroform and ethyl acetate, respectively, three times. The second chloroform fraction demonstrated the highest inhibitory effect. In result, the Korean edible plant Pt should represent the inhibition effect of AChE. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (code # 106013-03-1-CG000)>

P8-21

Separation of Acetylcholinesterase Inhibitor from Plant Extract

Young W. Kim^{1*}, Soo J. Choi², Mi J. Kim², Hye K. Kim³, Hong Y. Cho¹, young J. Kim¹ and Dong H. Shin¹. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

It has long been recognized that therapy currently available for Alzheimer's disease (AD) patients is limited to drugs which improve central cholinergic neurotransmission such as acetylcholinesterase inhibitor (AChEI). The purpose of this study was to test the reputable effect of AChEI from plant extract. The crude plant extract (A), prepared by maceration with ethyl alcohol (EtOH), was carried out solvent partition. It was fractionated by the solvent of different polarity; n-hexane, chloroform, ethyl acetate, respectively, 3 times. Chloroform partitions represent-

ing the highest AChE inhibition were subject to open column chromatography on a silica gel column eluting with the gradient mixtures of CHCl₃ and EtOH (0 to 100% EtOH, 3 bed volume). In order to find AChEI, modified Ellman's method for the measurement of AChE activity was performed in each separation step. Then, the 20% EtOH fraction was selected as AChEI. In results, the successive separation procedure was expected to discover bioactive substance from the crude plant EtOH extract (A). <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (Code # 106013-03-1-CG000)>

P8-22

Screening of Korean Plants for Alzheimer's Disease Prevention

Seung S. Oh^{1*}, Soo J. Choi², Mi J. Kim², Hye K. Kim³, Hong Y. Cho¹, Young J. Kim¹, and Dong H. Shin¹. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative disease. It leads to a progressive impairment in memory and cognitive abilities, and eventually to death. It is considered as serious disease of our society. AD is related to decrease of formation speed of acetylcholine (ACh) and it has been proven that restraint of hydrolysis of ACh is effective for recovering the function of this synopsis. Currently, curing of AD can be achieved through usage of the effective inhibits which impede the faculty of acetylcholinesterase (AChE) and consequently preserve damaged ACh by restraining decomposition of ACh. The antioxidant usage is another approach for treating AD. It is believed that antioxidants act by lowering free radical production and oxidative injury to the brain. Thus, various plants were tested to determine the inhibitive effect of AChE and antioxidant. These plants were extracted using ethanol. After extraction, various plants were examined for AChE inhibitory activity based on Ellman's method in 96-well microplates using AChE obtained from PC12-cell *in vitro*. In addition, the anti-oxidative effect was measured by scavenging activity via DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay. Consequently, the effects of some extracts as AChE inhibitor and antioxidant were revealed. <This work was supported by a grant (Code # 20050401034615) from BioGreen 21 Program, Rural Development Administration, and Republic of Korea>

P8-23

Isolation of Mitigating Component against Hydrogen Peroxide (H₂O₂)-induced Oxidative Stress

Ju H. Lee^{1*}, Soo J. Choi², Mi J. Kim², Hye K. Kim³, Hong Y. Cho¹, Young J. Kim¹, and Dong-H. Shin¹. ¹Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, ³Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of progressive cognitive dysfunction. One of the principal pathologic characteristics of AD is an extracellular deposition of amyloid beta peptide (A β) as senile plaques. Generally, A β has been shown to exert direct toxic effects on neurons and inhibit the neurite outgrowth *in vitro* in a dose-dependent manner. Also A β generates free radicals that cause neurotoxicity and cognitive failure. To review the protection from H₂O₂, DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) assay and MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide] reduction assay were performed. Samples were extracted with ethanol. Screening was established as above mentioned assays. The

sample (E) demonstrated the highest protective effect against H₂O₂-induced oxidative stress. As a result of solvent partition, the third ethyl acetate fraction (E3) represented excellent mitigating effect. Then E3 was isolated by silica-gel open column chromatography. In result, the eighth fraction (chloroform : ethanol = 80 : 20) exhibited the highest protective effect against H₂O₂-induced oxidative stress. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (code # 106013-03-1-CG000)>

P8-24

Ameliorating Effect of Herbal Ethanol Extract on Choline Acetyltransferase from MC-IXC Cell

Yoon K. Kwon^{1*}, Soo J. Choi², Mi J. Kim², Hye K. Kim³, Hong Y. Cho¹, Young J. Kim¹, and Dong H. Shin¹. ¹Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, ³Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University

This study was performed to search the choline acetyltransferase (ChAT) activator from Korean traditional plants. ChAT activator, which enhances cholinergic transmission by increasing the enzymatic production of acetylcholine, is the main source for the Alzheimer's disease treatment. The assay system for the measurement of ChAT activity was assembled by the MC-IXC cell (human neuroblastoma cell) and a radioisotope, as [¹⁴C] acetyl-CoA. As a result of screening, the special herbal ethanol extract represented the highest activating effect on ChAT *in vitro*. The special herbal ethanol extract was separated into *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, respectively, and then the chloroform fraction of 172% activating effect was selected by ChAT assay. Then, the fraction was separated by silica-gel open chromatography. The 21st fraction (the third fraction of CHCl₃ : EtOH = 40 : 60, v/v) showed the highest activating activity (628%). <This work was supported by a grant (Code # 20050401034615) from BioGreen 21 Program, Rural Development Administration, Republic of Korea.>

P8-25

Effect of Korean *Phellinus linteus* Extract to Ovariectomized Rat on Serum Factor and Bone Strength

Inho Kim^{1*}, Jiyoung Shin¹, Daeseok Han¹, Youngeon Kim¹, and Yongju Choi². ¹Korea Food Research Institute, ²Mush Guy

Effect of Korean *Phellinus linteus* extract to ovariectomized rat was investigated on the serum, urine and tissue factor. Alkaline phosphate(ALP) of serum factor was activated about 30% by treatment of extract and osteocalcin was higher in the treated samples. Value of sample extract was not significant to that of control at creatinine, deoxyypyridinoline(DPD) of urine factor but DPD was reduced in 12 week than 6 week, indicating inhibition of bone absorption. Bone mineral density(BMD) of right femur bone after 12 week administration since ovariectomy surgery was lowest in control. Trabeculae in epiphysis and metaphysis of control group was reduced but frequency of osteoclast was increased than sham and sample group. And fatty acid accumulation of sham was normal, sample treatments reduced, but control was considerably increased. Isolation and identification of mineralization effect materials of Korean *Phellinus linteus* extract will be conducted from the sample extract.

P8-26

크리핑로즈마리(*Rosemarinus officinalis* L.)의 생리활성 조영제¹, 주인식¹, 천성숙², 김정환³, 안봉전⁴, 김명옥⁵. ¹상주대학

2008 | Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology

2008

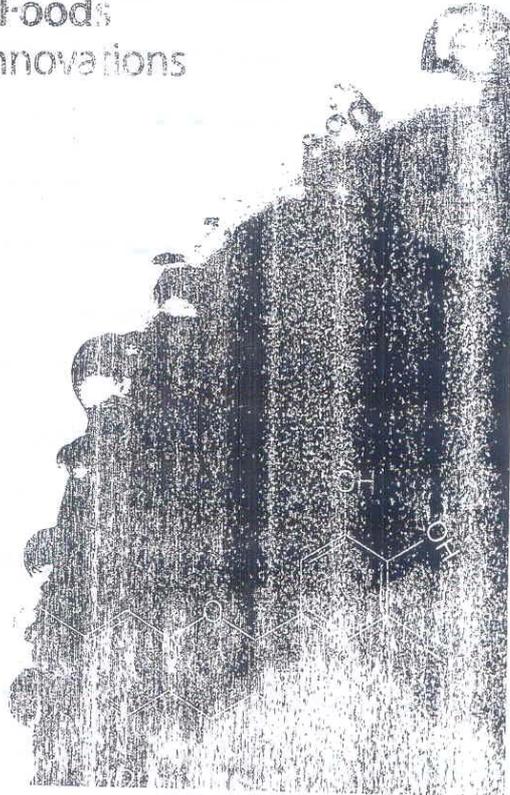
한국식품과학회

학술대회 및 정기총회

Kimdaejeung Convention Center, Gwangju, Korea
2008. 6. 18 (Wed.) ~ 20 (Fri.)

Wellness Foods
Science and Innovations


KOSFOST
Korean Society of Food Science and Technology



PI-019 열추출물의 in vitro 산화활성 측정

이정석*, 황상우, 이현영, 엄우식, 이기영 호서대학교 식품생명공학과

Nelumbo Nucifera GAERT)은 연못에서 자라는 다년초로서 오랫동안 식용으로 이용되어 왔고, 최근 들어서는 잎 부분이 차나 식품첨가료로서 각광받고 있다. 본 연구에서는 열의 추출물 당산화, 항산화 활성과 ADH(alcohol dehydrogenase)활성을 측정, 비교해 보았다. 각 시료에 10배의 70% ethanol 용액에 heating mantle에서 3시간 추출한 후 여과하여 얻은 액을 1차 추출액으로 하고, 상기방법에 따라 2,3차 추출액을 얻어 모두 혼합한 후 rotary vacuum evaporator로 농축한 뒤 동결건조하여 시료로 사용하였다. 당산화 효과의 지표라 할 수 있는 당 색변화 및 플라보노이드의 함량을 비교한 결과 총 페놀은 연잎에서 0.537 mg/mL로 연근 0.070 mg/mL, 연자육 0.283 mg/mL 보다 월등히 높은 함량을 보여 주었으며 총 플라보노이드 함량도 연잎이 0.385 mg/mL로 연근 0.017 mg/mL과 연자육 0.008 mg/mL 보다 월등히 높은 함량을 보였다. Paper disc법을 이용한 항균효과 측정결과 연잎추출물은 *B. subtilis*와 *E. coli*에 대한 항균효과를 보였으나 연근과 연자육추출물에서는 항균효과를 나타내지 않았다. 일초를 섭취 후 알코올을 분해하고 관련된 ADH(alcohol dehydrogenase)활성을 측정하기 위해 각 추출물들을 농도별로 추출해 본 결과 연잎추출물의 농도가 길어짐에 따라 ADH활성도 높아지는 것을 볼 수 있었으며 연근과 연자육 추출물은 알코올을 분해능력이 거의 없는 것으로 나타났다.

PI-020

연잎추출물의 항비만 및 심혈관계 질환 개선 효과

이정석*, 지현, 허경순, 김용준, 이기영 호서대학교 식품생명공학과

본 연구에서는 연잎 추출물을 rat에게 섭취시킨 후 항비만효과와 심혈관계 질환 개선효과를 알아보았다. 연잎 추출물은 10% ethanol로 추출하였으며 실험동물은 6주령의 수컷 rat을 사용하였다. Rat은 임박식이군(Cont), 고지방식이 섭취군(HFG), 고지방식이 섭취 및 연잎추출물 투여군으로 나누었으며 고지방식이 섭취 및 연잎추출물 투여군은 12g의 체중(kg)대비 고지방분 40 mg(HL40), 80 mg(HL80), 120 mg(HL120) 투여군으로 세분화 하여 4주간 실험을 진행하였다. 4주 후 각 군별 시료 섭취량 대비 체중증가량을 비교해 본 결과 연잎추출물을 투여한 군에서 HFG에 대비하여 20-40% 가량 체중증가가 억제됨을 볼 수 있었다. 간, 신장, 부고환 지방의 무게를 측정 한 결과 역시 HFG에 대비하여 연잎추출물 투여군에서 간과 신장 지방의 증가가 억제됨을 볼 수 있었다. 혈청학적 분석을 위한 혈액은 rat의 건강상태에서 채취하여 실험을 진행하였다. 총지질, 공지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, VLDL-콜레스테롤 등을 측정 한 결과 HDL-콜레스테롤 수치를 제외한 대부분수치에서 HFG보다 연잎추출물 투여군의 수치가 낮게 측정되었다. 이상의 실험결과를 종합하면 연잎추출물을 rat에게 끊이 시 체중증가를 억제하고 심혈관계 질환에 상당한 개선효과를 볼 수 있음을 알 수 있었다.

PI-021

연잎추출물에서 생리활성 물질의 분리 동정

이정석*, 지현, 허경순, 김용준, 이기영 호서대학교 식품생명공학과

연잎은 오래전부터 민간에서 약재로 쓰여져 왔을 만큼 경험적으로 그 기능성이 인정은 되고 있지만 이에 대한 과학적 연구는 거의 이루어지고 있지 않은 현실이다. 본 실험에서는 연잎의 성분 중 항산화제 성분을 밝혀내기 위해 진행되었다. 항산화활성은 용매추출시 극성을 조절해가면서 순차적 용매추출을 통한 분리과정에서 DPPH에 의한 free radical 소거능을 측정하여 비교하였다. 연잎은 70% ethanol로 추출하였으며 이를 hexan, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 순으로 분별 추출을 이용해 분리하였다. 이중 항산화활성이 가장 우수하게 나온 ethyl acetate 분획을 사용하여 silica gel column chromatography를 이용하여 분리하였다. 이 때 용매는 chloroform - methanol을 사용하였으며 용출시에는 methanol농도를 1/10, 1/9, 1/8, 1/7로 증가시키며 분리하였다. 이들 분획한 용출물에서 free radical 소거능이 인정되는 분획을 위한 후 HPLC를 사용하여 각 peak별로 물질을 정제하였다. HPLC로 정제한 물질은 GC-MS를 사용하여 성분을 표준물질과 비교하여 검증하였고 보다 확실한 검증을 위해 H-NMR, O-NMR로 분석한 결과 pyrocatechol로 판별되었다.

PI-022

사염화탄소로 유발된 췌장의 간독성이 대장 제형 가수분해물의 보호효과

심재민* 강동과학산업진흥원, 지경원 LG화학, 임영선 조순원, 최영진 강릉대학교 식품과학과, 정일탁 강릉대학교 해양생명공학부

동해안에서 원료확보가 쉬운 제철을 이용하여 간 기능 손상 및 간질환을 부작용이나 재발없이 효과적으로 예방하는 식품소재를 개발하고자 사염화탄소로 유발된 췌장의 간독성에 대한 제형 가수분해물의 보호효과를 조사하였다. 만성 간독성 유발 동물실험에서 한천 제형 Flavourzyme 가수분해물의 125 mg 투여군은 사염화탄소 단독 처리군에 비하여 ALT 및 AST의 효소활성을 각각 43.6 및 75.8%로 낮추었다. ALP, LDH 효소활성과 T-bili 함량은 사염화탄소 단독 처리군보다 제형 Flavourzyme 가수분해물의 용량별(125, 250, 500 mg) 투여군에서 모두 낮았으며, 혈청 TG 함량은 사염화탄소 단독 처리군보다 높게 나타났다. 간 조직내 glutathion 및 MDA 함량을 투여군에서 유의적으로 낮게 나타났다. 간 조직의 병리학적 관찰에서 사염화탄소 단독 처리군은 간의 중심정맥을 중심으로 심한 간세포 괴사와 전 체적인 세포 주변에 울혈을 보였으나, 제형 Flavourzyme 가수분해물 투여군에서는 부분적인 울혈은 보이지 않던 그 외의 부분에서는 정상적인 간세포 형태를 유지하였다.

PI-023

고추의 품종에 따른 고추씨 추출물의 생리활성

최은경*, 구정형, 박재복, 김영진 한국식품연구원

본 연구는 국내산 고추 20여종과 미국 뉴멕시코 지역에서 생산되는 고추품종 4종을 수집하여 고추씨만을 분리하여 품종별로 물과 에탄올로 추출한 후 생리활성 특성을 조사하였다. 그 결과 추출 수율과 총 폴리페놀 함량은 시료간 차이가 있어서 20-40%의 수율을 보였고 총 폴리페놀 함량의 경우 추출물은 51.6-81.93 ug/mg이었고, 에탄올 추출물은 46.37-73.15 ug/mg으로 시료간 차이가 있었다. 고추씨에는 아질산염 소거 작용에서 총 추출물 72.85-97.35%, 에탄올 추출물은 21.23-46.68%를 나타내었으므로, 아질산염 소거 작용 물질이 다량 포함되어 있는 가능성을 확인하였다. 그리고 전자공여능은 시료의 flavonoids 및 폴리페놀 물질 등에 대한 환산화 작용의 지표로 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력에 있어 항산화 활성 및 항산화에 대한 소거활성을 기대할 수 있다고 보고되는 아질산염 에탄올 추출물에서 32.34-57.74%로 나타나 물 추출물의 4.06-10.05%보다 효과가 있음을 나타내었다.

PI-024

Ameliorating Effect of 1,2-Benzenedicarboxylic Acid Diethyl Ester against Oxidative Stress-induced Neurotoxicity

Soo J. Choi* Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea Univ., Hye K. Kim Department of Food and Biotechnology, Hansoo Univ., Hong Y. Cho and Dong H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea Univ.

Amyloid beta peptide (Aβ), the central constituent of senile plaques in brain of Alzheimer's disease (AD), has been shown to be a source of free radical that may lead to neurodegenerative disorders. phytochemicals have been reported to prevent hydroxyl radical induced apoptosis in cultured neurons and also reduce the oxidative stress associated with AD. In this study, the protective effect of *Rosa laevigata* extract against oxidative stress was investigated in PC12 cells. And the effect of isolated 1,2-benzenedicarboxylic acid diethyl ester on memory and learning abilities was confirmed with *in vivo* model. Administration of 1,2-benzenedicarboxylic acid diethyl ester to mice significantly reversed learning and memory impairment *in vivo*. After the sacrifice of mice, brains were collected for the examination of lipid peroxidation and catalase activity. These results suggest that 1,2-benzenedicarboxylic acid diethyl ester should be able to reduce Aβ-induced neurotoxicity, possibly by the reduction of oxidative stress. This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (code # 106013-03-1).

Isolation of Anti-dementia Material from Native Plants for Remedying Alzheimer's Disease

Jaek K. Kim* Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, Soo J. Choi Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Hye K. Kim Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University, Hong Y. Cho and Dong H. Shin Dept. of Food and Biotechnology, Korea University

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder of central nervous system correlated with cognitive malfunction, loss of memory, unusual behavior and declined perception ability. In previous study, various plant extracts were screened and evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. To find the active compound, the ethanol extract of sample A which exhibited the highest protective effect against oxidative stress was partitioned with *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate, respectively, and then separated by preparative thin layer chromatography (TLC). In accordance with evaluation of above assays, the first fraction of chloroform partition (C1) was selected for further purification. The fifth band (Rf value: 0.28) of preparative TLC showed the highest protective effect against H₂O₂-induced cytotoxicity in neuronal cell. In result, it is suggested that the extract of sample A should be useful mitigating agent against AD. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (Code # 106013-03-1-CG000)>

Mitigating Effect of Plant Extracts against Amyloid β Peptide-induced Neurotoxicity

Seung S. Paek* Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, Soo J. Choi School Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Han J. Hwang, Young J. Kim and Dong H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea University

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. Pathologically, AD patients show loss of neurons in temporal lobes, insoluble aggregates consisting of amyloid β peptide (A β) and cytoskeletal proteins, and neurofilament tangles. A β is a component of amyloid plaques and a hydrophobic peptide with 40-43 amino acid residues. A β is produced from amyloid precursor protein (APP) encoded in chromosome by several cleavage enzymes such as β -secretase. Genetic, neuro-pathological, and biochemical evidence indicates that A β plays an important role in the early pathogenesis in AD. Thus, in order to examine protective effect against oxidative damage in neural cells by A β , various plant extracts were screened and measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. These results suggested that A β -induced cytotoxicity might be reduced. It is proved that some plant extracts might represent protective effect against A β -induced neurotoxicity. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (code # 106013-03-1)>

Isolation of Acetylcholinesterase Inhibitor from Traditional Plants

Seung S. Oh* Department of Food and Biotechnology, Korea University, Soo J. Choi Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Hye K. Kim Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Hong Y. Cho and Dong H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea University

Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative disease. Currently, curing of AD can be achieved through usage of the effective inhibitors which impede the faculty of acetylcholinesterase (AChE) and consequently preserve damaged ACh by restraining decomposition of ACh. Thus, various plants were tested to determine the inhibitory effect of AChE. These plants were extracted using ethanol. According to the screening results, sample A exhibited the highest inhibition. As a trial of searching of AChE inhibitor, sample A was partitioned with *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, respectively, then carried out silica gel column chromatography for further purification. The second fraction of chloroform partition showing 25% inhibition effect was selected. Then, the fraction was applied to silica gel column chromatography. Consequently, the fourth fraction (solvent ratio CHCl₃:EtOH = 90:10) represented the highest inhibition effect. As a result, it is suggested that the extract of sample A should be useful for ameliorating AD.

Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors from Edible Plants

Kang W. Lee* Department of Food and Biotechnology, Korea University, Soo J. Choi Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Han J. Hwang, Young J. Kim and Dong H. Shin Department of Food and Biotechnology, Korea University

Alzheimer disease (AD) is the most common age-related neurodegenerative disease with many cognitive and neuropsychiatric manifestations that result in progressive disability and eventual incapacitation. A decrease in acetylcholine (ACh) in the brain of patients with AD appears to be a critical element in producing dementia. Generally, curing of AD can be performed through appropriation of the effective inhibitors which hinder the ability of AChE and consequently preserve damaged ACh by restraining decomposition of ACh. In order to find a new active constituent that has potent inhibitory effect against AChE and anti-amnesic activity from natural resources, many kinds edible plants and spices were screened. AChE assay was performed according to the colorimetric method of Ellman *et al.* using ACh iodide as a substrate in 96-well plate with microplate reader. For the enzyme source, PC12 cell cultures were homogenized. Consequently, the effect of some plant extracts as AChE inhibitor was revealed. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (code # 106013-03-1)>

녹차추출물의 식품변색미생물에 대한 항균활력

조성환*, 허호철 경상대학교 식품공학과, 최형일 경상대학교 식품안전학과, 이승철 경남대학교 식품생명학과

녹차추출물(Green tea extract (GTE))의 항균활성을 구명하기 위하여, 견딜 하동균 약양면에서 채취한 녹차를 원료소재로 하여 항균성 실험을 결과는 다음과 같다. 먼저, 추출조건을 확인하기 위한 예비실험에서 생인공과 분말 녹차의 경우 추출수율이 각각 19.98% 및 3.7%이었으며, 추출온도가 높을수록 추출수율이 높았고, 녹차의 유마별 추출수율은 물의 경우가 가장 높았다. 녹차 물추출물의 paper disk method에 의한 농도별 항균력을 실험한 결과, Gram 양성균, Gram 음성균, 곰팡이, 합균 등의 광범위한 변색미생물에 대하여 농도에 비례하여 상당한 항균효과를 보였으며, 또한 생육저해곡선에서는 500 µg/mL 이상에서 미생물의 생육이 완전히 억제되는 것을 볼 수 있었다. 아울러, GTE는 일반적인 식품가용물질로 열처리된 온도(121°C) 범위에서 뚜렷한 항균력을 보임으로써 열과 pH가 안정한 것으로 나타났다. 또한 항균력에 의한 미생물의 생체변화에 대한 전자현미경적 분석(SEM)에서도 GTE이 미생물의 생리활성소자의 기능을 약화시켜 세포벽 또는 세포막을 파손하여 삼투기압이 상실됨으로 해서, 일부의 생체가 붕괴되고 생이 억제되는 것을 볼 수 있었으며, 균체내부에 변색 미생물에서 유래할 수 있는 효소를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 미루어, GTE는 항균성 조미료 개발을 수 있을 것을 확인할 수 있었다.

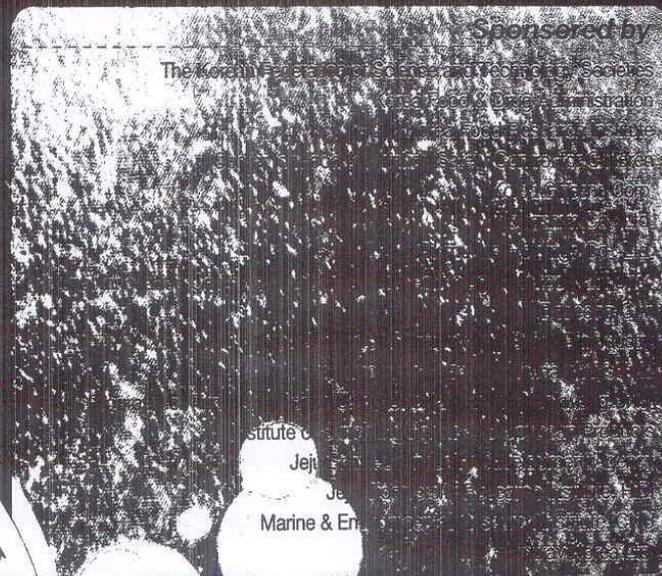
Antiatherosclerosis Animal Study and the Key Functional Compound Identification of the Original Extracted Residue of Sea Tangle

Gwang W. Kim* Department of Food Science (Graduate School) Kangnung National University, Mi J. Yoo Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hokodate 041-8611, Japan, Young J. Choi Gangneung Marine Bio Foundation, Myung H Ueo, Ok S Kim and Seon Y Cho East Coast Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University

For the purpose of high value added use of the original extracted residue of sea tangle, animal study for functionalities and key compound identification were carried out. Specially the key compounds were extracted by supercritical carbon dioxide. Sea tangle itself and the alginate extracted residue had good antihyperlipidemia and antiarteriosclerosis abilities while no antidiabetic ability in the animal study. The functional compounds in the alginate extracted residue of sea tangle were effectively extracted by supercritical carbon dioxide fluid. In respect of the extraction ability extraction conditions of 40°C and 650 psi were better than that of abilities of 70°C and 4500 psi in a similar ethanol extraction rate. freeze drying was effective for extraction of the functional compounds from the alginate extracted residue of sea tangle. The key compound in an hyperlipidemia and antiarteriosclerosisabilities in the alginate extracted residue of sea tangle was presumed to be fucosolol by several instrumental analysis. From the above results, the alginate extracted residue of sea tangle was supposed to be a good feed functional food for hyperlipidemia and arteriosclerosis.

2008 International Symposium and Annual Meeting
Chronic Disease and LOHAS Foods

October 13 - 15, 2008
Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju Island, Korea



KFN The Korean Society of Food Science and Nutrition

uate whether the effects of pycnogenol on glucose uptake were due to their action on insulin-sensitive tissues, we used the insulin-sensitive cell line 3T3-L1 adipocytes. And then we used the nonradioisotope enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake. We performed wortmannin treatment to elucidate whether action of pycnogenol using to insulin signaling pathway or not. The pycnogenol significantly increased glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes at the concentration of 300ug/mL. The results suggest that pycnogenol is similar to insulin effects in insulin-sensitive cells that could help to explain their antidiabetic effect in vivo. However, unlike insulin action, the effect of pycnogenol on 2-deoxyglucose uptake was not sensitive to wortmannin. And so we realized that pycnogenol did not induce tyrosine phosphorylation of the insulin receptor, but significantly induced both Thr-308 and Ser-473 phosphorylation of Akt.

OP-22

Attenuating Effect of Native Plant Extracts against Amyloid β peptide induced - Learning and Memory Impairment

Jae K. Kim¹, Soo J. Choi², Hye K. Kim³, Hong Y. Cho¹, Han J. Hwang¹, Young J. Kim¹, Dong H. Shin¹. ¹Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, ³Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder of central nervous system correlated with cognitive malfunction, loss of memory, unusual behavior and declined perception ability. AD is accompanied with three main pathological changes in the brain: loss of neurons, accumulation of intra- and extracellular proteins such as senile plaques. The most abundant constituent of senile plaques which can be observed in AD is amyloid beta peptide ($A\beta$), cleaved form of amyloid precursor protein (APP) by β -, and/or γ -secretases. The $A\beta$ -induced cytotoxicity has been proven to be caused by the intracellular reactive oxygen species (ROS) increment, consequently resulting in the peroxidation of cell membrane, modification of protein, damage of DNA/RNA, and cell death. In previous study, various plant extracts were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. The ethanol extract of sample A which exerted the highest protective activity against oxidative stress was applied to ICR male mice to test the effect on $A\beta$ -induced neurotoxicity. In conclusion, administration of ethanolic extract of sample A significantly lowered $A\beta$ -induced learning and memory impairment in both Y-maze and passive avoidance tests. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (Code # 106013-03-1-CG000)>

OP-23

Evaluation of Functional Properties of Histidine-Containing Low Molecular Weight Peptides Extracted from *Thunnus albacares* and *Thunnus obesus*

Hong-Kil Kim^{*}, Keun-Tae Lee, Sung-Min Park, Ho-Su Song, Hye-Ok Min. Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

To development of extracting process and evaluation of functional properties of histidine-containing low molecular weight

(LMW) peptides, such as carnosine, anserine, histidine containing extracts from yellowfin (*Thunnus albacares*) and bigeye (*Thunnus obesus*) tuna waste muscle. Several methods were tested such as heat treatment (80°C, 10min), DOWEX ion exchange (IEC), ultrafiltration (UFP), and CM-Cellulose column chromatography (IEC-2). Decreased pro-oxidants (total iron, protein) and increased functional properties of their undried and freeze dried extracts. For the evaluation of antioxidant activities of histidine containing LMW peptides and free amino acids (histidine, 1-methyl histidine, β -alanine, taurine) and antioxidants (ascorbic acid, BHT), which is scavenging effect on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl free radical, reducing power, superoxide dismutase (SOD) like activity, inhibition of linoleic acid autoxidation, nitrate-scavenging effects were evaluated. And effects on oxidative processes such as pH, meat color (a^* value), met-myoglobin reducing activity and psychrotrophic microbial populations of Hanwoo (Korean cattle) patties storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ for 2 weeks. Finally the role of these LMW peptides in the prevention of protein denaturation which attributed to bovin serum albumin (BSA) react with hypochlorite and inhibition to producing advanced glycation end-of products (AGE) through the protein glycation with carbonyl group were researched.

OP-24

Ellagic acid가 자외선 조사에 의한 세포 및 동물 모델의 피부노화에 미치는 영향 배지영*, 강영희. 한림대학교 식품영양학과

정상적인 피부결합조직은 collagen의 합성과 세포외기질의 분해 효소인 matrix metalloproteinases (MMP) 분비의 균형으로 collagen 양이 유지되나, 자외선 조사로 인해 발생하는 이들의 불균형은 주름을 생성하는 주요 원인이 된다. 세포를 이용한 *in vitro* 연구에서는 포도, 딸기, 석류, 전파류에 존재하는 식물성 페놀성분인 ellagic acid가 자외선에 노출된 피부 섬유아세포에서 MMP의 분비와 collagen의 분해에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. MTT 실험으로 세포생존율을 수행한 결과 자외선을 조사하였을 때 세포생존율이 약 20% 감소하였고, 여기에 ellagic acid를 처리하였을 때 섬유아세포의 생존을 감소를 억제하였다. 또한, 자외선 조사에 의해 생성된 피부노화에서 관찰되는 피부주름의 원인인 MMP-1, MMP-8 그리고 MMP-13의 분비와 collagen의 분해가 ellagic acid에 의하여 억제되었고, 이는 웨스턴 블롯 분석 및 세포면역학적 방법으로 확인하였다. 이 결과가 실제로 실험동물에 이용한 *in vivo* 연구에서도 주름 개선 효과와 연결되는지 확인하기 위하여 무모쥐 (hairless mice)를 8주간 자외선에 노출시켜 피부주름을 유발하고 동시에 ellagic acid를 도포하여 피부주름상태의 변화를 관찰하였다. 그 결과 hematoxylin-eosin 염색법과 Masson-Trichrome 염색법으로 무모쥐 피부조직의 상태를 확인한 결과 ellagic acid의 피부주름 개선능력을 확인할 수 있었다. 결론적으로 식물성 페놀성분인 ellagic acid는 자외선 조사에 의해 분비되는 MMP의 활성화와 collagen의 분해를 억제하는 것이 규명되어 자외선에 의해 나타나는 피부손상과 광노화를 억제하는 소재로서의 활용가능성을 제시한다. 한국학술진흥재단(F00072)과 BK21지원

OP-25

Antiobesity Effects of Panduratin A through Induction of Apoptosis in Adipose Tissue and Regulation of PPAR α/γ Ling-Ai Shen* and Jae-Kwan Hwang. Department of Biotechnology, Yonsei University, Seoul, Korea

Obesity is characterized at the cellular level by an increase in

of all extracts was not effect. The results will be useful for understanding the functional properties of *Dioscorea batatas* extracts. And the data suggest that the methanol extracts (YNCP) from yam can be used as a material in functional food to improve of blood circulation.

P8-47

Inhibitory Effect of Ginsenoside Rb₁, Rg₃, and *Panax ginseng* Head Butanol Fraction on Inflammatory Mediators from LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells
이재혁¹, 정준식², 김진희¹. ¹덕성여자대학교, ²덕성여자대학교 약학대학

Panax ginseng C.A. Mayer (Araliaceae, *P. ginseng*) has been used for the enhancement of vascular and immune functions in Korea and Japan for a long time. Ginsenoside Rb₁ and Rg₃ isolated from *P. ginseng* head-part butanolic extract (PGHB) were investigated for anti-inflammatory activity. Ginsenosides and PGHB did not affect the cell viability within 0 - 100 µg/ml concentration to RAW 264.7 murine macrophage cells. Ginsenosides and PGHB inhibited partly lipopolysaccharide (LPS)-induced nitrite production in a dose-dependent manner. The ginsenosides and PGHB showed partially chemical nitric oxide (NO) quenching (maximum 40%) in the cell-free system. Also, ginsenoside Rb₁ and Rg₃ inhibited markedly approximately 74 and 54% of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA transcription from LPS-induced RAW 264.7 cells. Taken together, the inhibitory effect of ginsenosides and PGHB on NO production did not occur as a result of cell viability, but was caused by both the chemical NO quenching and the regulation of iNOS. Additionally, the ginsenoside Rb₁ and PGHB inhibited prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesis in a concentration-dependent manner, showed approximately 70-98% inhibition at 100 µg/ml concentration. And the treatment with ginsenosides and PGHB attenuated partially LPS-upregulated cyclooxygenase-2 (COX-2) gene transcription. Ginsenoside Rg₃ suppressed LPS-stimulated interleukin-6 (IL-6) level to the basal in RAW 264.7 cells.

P8-48

Physicochemical and Functional properties of solvent fraction from *Dioscorea batatas* extracts
Byoung-Mok Kim^{*}, Jun-Bong Jee, Dong-Soo Kim, Myung-Ki Lee. Korea Food Research Institute

High serum cholesterol level and blood clot is one of cause of adult diseases such as hypertension, arteriosclerosis. Yam (*Dioscorea batatas*) have been used as substitution of medicinal herbs, because it has been known a serum cholesterol lowering effect, blood circulation improvement effect and blood pressure normalization effect. we investigated the physicochemical properties (total sugar, reducing sugar, total protein, total polyphenolic compounds content) and functional properties (DPPH radical scavenging effect, ACE inhibition activity, HMG-CoA reductase inhibition activity, Fibrinolytic activity) of solvent fraction partitioned with hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol from *Dioscorea batatas* extracts. The yield of methanol layer was the highest, as 15.7%, and ethyl acetate layer was the lowest, 0.3%. The total sugar content, reducing sugar content, total protein content, total polyphenolic content of ethyl acetate layer was the highest among partitioned layer, as 178.7 µg/mL, 158.8 µg/mL, 166.5 µg/mL, 145.9 µg/mL respectively. DPPH radical scavenging effect of all partitioned layer was good effect, and was not significant difference. Fibrinolytic activity of most partitioned layer was not effect. HMG-CoA reductase inhibition activity and ACE inhibition activity of ethyl acetate layer was the highest among partitioned layer, as 50.0%, 95.7%

respectively. The results will be useful for understanding the functional properties of *Dioscorea batatas* extracts.

P8-49

Antioxidative and Neuronal Protective Effects of Phytochemical against Amyloid Beta Peptide-induced Toxicity
Soo Jung Choi¹, Hong Yon Cho², Hye Kyung Kim³, Dong-Hoon Shin^{*}. ¹Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea Univ., ²Department of Food and Biotechnology, Korea Univ., ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo Univ.,

Alzheimer's disease is a progressive degenerative brain disorder characterized by neuronal loss, neurofibrillary tangles and abnormal deposition of senile plaque and amyloid beta peptide (A β). Many researchers believe that A β is central to the pathogenesis of this disorder. The A β is known to increase free radical production in nerve cells, leading to cell death. That is manifested by lipid peroxidation, free radical formation, protein oxidation and DNA/RNA oxidation. Many plant extracts represent antioxidative, anticarcinogenic, antimicrobial, antiinflammatory activities. The antioxidative and neuronal protective effects of *Eu* extract were investigated against A β -induced cytotoxicity in PC12 cells. In this study, the antioxidant effect of plant *Eu* extract was compared with gallic acid, catechin and ascorbic acid. Protective effect of *Eu* extract against oxidative stress was tested by DCF-DA assay. The cell viability test using MTT reduction assay elucidated that phytochemical of *Eu* reduced A β -induced cytotoxicity. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (Code # 106013-03-1-CG000)>

P8-50

Mitigative Effects of Plant Extract against Amyloid Beta Peptide-induced Learning and Memory Impairment
Jae K. Kim^{*}, Soo J. Choi¹, Hye K. Kim³, Hong Y. Cho¹, Han J. Hwang¹, Young J. Kim¹, Dong H. Shin¹. ¹Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, ³Dept. of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder of central nervous system correlated with cognitive malfunction, loss of memory, unusual behavior and declined perception ability. AD is accompanied with three main pathological changes in the brain: loss of neurons, accumulation of intra- and extracellular proteins such as senile plaques. The most abundant constituent of senile plaques which can be observed in AD is amyloid beta peptide (A β), cleaved form of amyloid precursor protein (APP) by β -, and/or γ -secretases. The A β -induced cytotoxicity has been proven to be caused by the intracellular reactive oxygen species (ROS) increment, consequently resulting in the peroxidation of cell membrane, modification of protein, damage of DNA/RNA, and cell death. In previous study, various plant extracts were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. The ethanol extract of sample A which exerted the highest protective activity against oxidative stress was applied to ICR male mice to test the effect on A β -induced neurotoxicity. In conclusion, administration of ethanolic extract of sample A significantly lowered A β -induced learning and memory impairment in both Y-maze and passive avoidance tests. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (Code # 106013-03-1-CG000)>

P8-51

Purification of Acetylcholinesterase Inhibitor from Korean Traditional Plants

Cho R. Kim^{1*}, Seung S. Oh¹, Soo J. Choi², Hye K. Kim³, Hong Y. Cho¹, Dong H. Shin¹. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University, ³Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that destroys patient memory and cognition, communication ability with the social environment and the ability to carry out daily activities. Based on the cholinergic hypothesis that memory impairments in patients suffering from AD result from a defect in the cholinergic system, an important approach to treat this disease is to enhance the acetylcholine level in the brain by inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Thus, various plants extracts were tested to determine the inhibitory effect of AChE. According to the screening results, sample A exhibited the highest inhibition. As a trial of searching of AChE inhibitor, sample A was partitioned with n-hexane, chloroform, ethyl acetate, respectively, and then carried out silica gel column chromatography for further purification. Finally, Sample A was separated by preparative thin layer chromatography (TLC). Then, the fraction was applied to silica gel column chromatography. The fourth fraction (solvent ratio CHCl₃ : EtOH = 90:10) was selected for further fractionation. The third band (Rf value: 0.22) of preparative TLC represented the highest AChE inhibition. As a result, it is suggested that the extract of sample A should be useful for ameliorating AD. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (Code # 106013-03-1-CG000)>

P8-52

Selection of Acetylcholinesterase Inhibitor from Korean Traditional Edible Plants

Kang W. Lee^{1*}, Seung S. Oh¹, Soq J. Choi², Han J. Hwang¹, Young J. Kim¹, Dong H. Shin¹. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University

Alzheimer's disease (AD) is the most common degenerative disease of the brain, characterized by a gradual intellectual deterioration. Clinical manifestations include cognitive impairment, psychiatric symptoms, behavioral disturbances, and difficulties with activities of daily living. A decrease in acetylcholine (ACh) in the brain of patients with AD appears to be a critical element in producing dementia. Generally, curing of AD can be achieved through appropriation of the effective inhibitions which disturb the ability of acetylcholinesterase (AChE) and consequently preserve damaged ACh by restraining decomposition of ACh. In order to search for new AChE inhibitor, many kinds of edible plants were screened. AChE assay was executed according to the colorimetric determination method of Ellman *et al.* for AChE activity using Ach iodide as a substrate in 96-well plate with microplate reader. As the enzyme source, PC12 cell cultures were homogenized. Moreover, the effect of some plant extracts as AChE inhibitor was revealed. Then, it is found that ethanol extract of the sample D which exhibited the highest activity for inhibition of AChE among such samples represented AChE inhibition activity in portion to concentration.

P8-53

Fermented goat milk reduce blood glucose level in type II diabetic rats

Jun-Sang Ham^{1*}, Seok-Geun Jeong¹, Seung-Gyu Lee¹, Aera

Jang¹, Dong-Hun Kim¹, Hyun-Uk Kim², Su-Yeon Kang³, Hye-Joong Hwang³, Wan-Kyu Lee³. ¹National Institute of Animal Science, MGEN, ²Chungbuk National University

The purpose of this study was to observe the effect of fermented goat milk with citrus concentrate on lowering blood glucose levels of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Streptozotocin-nicotinamide induced type II diabetic rats were divided into 5 groups for the test of diabetic control, metformin, goat milk, fermented goat milk, and fermented goat milk with citrus concentrate. During the experiment, blood glucose, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol levels, and body weight were measured weekly. On the 24th day of the experiment, oral glucose tolerance test (OGTT) has been carried. The administration of fermented goat milk significantly decreased the blood glucose levels and triglyceride levels while 33.3 mg/kg body weight of metformin administration didn't make significant decrease in blood glucose levels. The fermented goat milk with citrus concentrate showed significant decrease in OGTT on 30 min. These results suggest that the supplementation of fermented goat milk with citrus concentrate may be useful for controlling blood glucose levels of type II diabetes.

P8-54

Ameliorative Effect of Plant Extracts against Oxidative Damage in Neural Cells by Amyloid Beta Peptide

Seung S. Paek^{1*}, Soo J. Choi², Hong Y. Cho¹, Young J. Kim¹, Dong H. Shin¹. ¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, ²Graduate School Life Sciences and Biotechnology, Korea University

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dementia among people aged 65 and older. AD is characterized by a slow progressive loss of cognition, behavioral changes and loss of independence that ends in the complete destruction of the personality. Excessive accumulation of amyloid β peptide (A β) in the brain is a possible cause of AD, although the precise mechanism by which A β induces neuronal death remains unknown. A β -induced cytotoxicity is caused by the intracellular accumulation of H₂O₂, leading to the peroxidation of membrane lipids and finally to cell death. Indeed, several studies have suggested that oxidative stress is involved in apoptotic mechanisms where excessive reactive oxygen species (ROS) production can lead to neuronal apoptosis, as in neurodegenerative disorders such as AD. Therefore, therapeutic intervention with antioxidants may help in preventing neurodegeneration and clinical decline in AD patients. In order to examine protective effect against oxidative damage in neural cells by A β , various plant extracts were screened and measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. It is proved that some plant extracts might represent protective effect against A β -induced neurotoxicity. <This study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (code # 106013-03-1)>

P8-55

Effect of Saury Meat on Serum and Hepatic Lipids in Rats Fed a Hyperlipidemic Diet

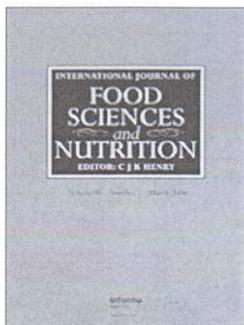
Soon-Yeong Cho^{1*}, Hyun-Jung Jin¹, Gwang-Woo Kim¹, Gil-Won Hu¹, Eun-Jung Cho², Yong-Seok Choi¹, Myung-Hee Ueo³, Ok-Seon Kim¹. ¹Department of Food Science, Graduate School, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea, ²Gangneung Marine Bio Foundation, Gangneung 210-340, Korea, ³East Coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University, Gangneung 210-702,

This article was downloaded by: [2007-2008-2009 Korea University - Seoul Campus]
On: 14 April 2009

Access details: Access Details: [subscription number 907466670]

Publisher Informa Healthcare

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House,
37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



International Journal of Food Sciences and Nutrition

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title-content=t713425816>

Improved assay for determining the total radical-scavenging capacity of antioxidants and foods

Ki Won Lee ^a; Young Jun Kim ^c; Nam Joo Kang ^a; Jong Hun Kim ^b; Sang Jun Lee ^a; Dae-Ok Kim ^c; Chang Yong Lee ^a; Hyong Joo Lee ^a

^a Department of Agricultural Biotechnology and Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea ^b Department of Bioscience and Biotechnology and IBST, Konkuk University, Seoul, Republic of Korea ^c Department of Food and Biotechnology, Korea University, Chochiwon, Chungnam, Republic of Korea ^d Department of Food Science and Technology, Cornell University, Geneva, NY, USA

First Published on: 10 June 2008

To cite this Article Lee, Ki Won, Kim, Young Jun, Kang, Nam Joo, Kim, Jong Hun, Lee, Sang Jun, Kim, Dae-Ok, Lee, Chang Yong and Lee, Hyong Joo(2008)'Improved assay for determining the total radical-scavenging capacity of antioxidants and foods',International Journal of Food Sciences and Nutrition,60:1,12 — 20

To link to this Article: DOI: 10.1080/10284150701567991

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10284150701567991>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Rural Development Administration in 2007 and by the Technology Development Program (No. 1016013-03-1) of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

References

- Adom KK, Sorrells ME, Liu RH. 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *J Agric Food Chem* 51:7825–7834.
- Arnao MB. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Technol* 11:419–421.
- Arts IC, Hollman PC, Kromhout D. 1999. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet* 354:488.
- Berg Rvd, Haenen GRMM, Berg Hvd, Bast A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 66:511–517.
- Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405:903–904.
- Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. 2002. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 287:3223–3229.
- Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A. 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic Biol Med* 18:29–36.
- Higdon JV, Frei B. 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43:89–143.
- Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* 50:3713–3717.
- Lee KW, Lee HJ. 2006. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors* 26:105–121.
- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. 2003a. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem* 51:7292–7295.
- Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY. 2003b. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 51:6516–6520.
- Lee KW, Lee HJ, Surh Y-J, Lee CY. 2003c. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *Am J Clin Nutr* 78:1074–1078.
- Lee KW, Lee SJ, Kang NJ, Lee CY, Lee HJ. 2004a. Effects of phenolics in Empire apples on hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication. *BioFactors* 21:361–365.
- Lee KW, Lee HJ, Lee CY. 2004b. Vitamins, phytochemicals, diets and their implementation in cancer chemoprevention. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:437–452.
- Meyers KJ, Watkins CB, Pritts MP, Liu RH. 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric Food Chem* 51:6887–6892.
- Pellegrini N, Rio DD, Colombi B, Bianchi M, Brighenti F. 2003. Application of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *J Agric Food Chem* 51:260–264.
- Sanchez-Moreno C, Cao G, Ou B, Prior RL. 2003. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *J Agric Food Chem* 51:4889–4896.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:287–306.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 500:299–313.
- Winston GW, Regoli F, Dugas AJ, Fong JH, Blanchard KA. 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med* 24:480–493.
- Xu J, Hu Q. 2004. Effect of foliar application of selenium on the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of selenium-enriched rice. *J Agric Food Chem* 52:1759–1763.
- Zhou K, Laux JJ, Yu L. 2004. Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *J Agric Food Chem* 52:1118–1123.

This paper was first published online on iFirst on 10 June 2008.

Effect of an Oil Byproduct from Conjugated Linoleic Acid (CLA) Purification on CLA Accumulation and Lipogenic Gene Expression in Broilers

JUN HO KIM,[†] WAN SIK JEONG,[†] IN HO KIM,[‡] HYO-JIN KIM,[‡] SANG HO KIM,[§]
 GEUN HO KANG,[#] HONG-GU LEE,[‡] HO GEUN YOON,^{||} HEE-JIN HAM,[†] AND
 YOUNG JUN KIM^{*:†}

Department of Food and Biotechnology, Korea University, Chungnam 339-700, Korea; Department of Animal Resource and Science, Dankook University, Chungnam 330-714, Korea; Nutrition Physiology Division, National Institute of Animal Science, Gyeonggi 441-701, Korea; Poultry Science Division, National Institute of Animal Science, Chungnam 330-801, Korea; College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Gyeongnam 627-706, Korea; and College of Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752, Korea

A previous study showed that supplementing broilers with an oil byproduct obtained during the purification process of conjugated linoleic acid (CLA) from safflower oil could result in CLA-enriched egg yolks more efficiently than feeding purified CLA (free fatty acid form). On this basis, this study evaluated whether dietary CLA byproduct (CBP) supplementation would enhance CLA accumulation in broiler muscle and its lipogenic mRNA expression in the liver. A total of 456 1-day-old male broiler chicks were randomly assigned to four groups, each of which was given one of the following 2% dietary supplements for 4 weeks: soybean oil (control), safflower oil (SAF), purified CLA, and CBP. During the feeding trial, little alteration in broiler performance was observed among the test groups. CLA accumulation efficiency in the breast muscle did not differ significantly between the CLA- and CBP-fed groups after feeding of the test diet for 3 weeks. CLA supplementation also induced lipogenesis in the livers of the broilers, and it significantly increased the relative mRNA levels of sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1), as well as its target genes: fatty acid synthase (FAS) and acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) ($p < 0.05$). However, in the CBP-fed group, SREBP1 and ACC mRNA levels were not significantly different from the controls ($p > 0.05$). These results suggest that CBP could be an efficient dietary source that promotes CLA accumulation in broiler muscle without inducing lipogenesis in the liver or compromising performance and meat quality in the birds.

KEYWORDS: Conjugated linoleic acid; byproduct; meat quality; lipogenesis; broiler

INTRODUCTION

Conjugated linoleic acid (CLA) refers to a group of positional and geometric linoleic acid isomers with various conjugated double-bond arrangements. CLA plays a variety of preventive roles against degenerative diseases such as cancer (1, 2) and atherosclerosis (3). CLA also reduces the catabolic effect associated with immune stimulation (4), and it improves the

protein to fat ratio (5) in several animal models. In addition, many studies of CLA-associated metabolic effects in various animals and adipocyte cultures suggest that CLA directly affects lipogenesis at the levels of gene expression and major enzyme activities (6–8). For this reason, considerable efforts have focused on producing CLA-enriched animal products by manipulating feeding regimens (9, 10). However, applying CLA as a feed additive is limited due to its high purification cost, which necessitates acquiring an economic alternative in order to elevate CLA in food products to a physiologically effective level.

Generally, the purification process for the production of high-purity CLA is performed using urea-inclusion crystallization with crude CLA (11). During this process, the crude CLA, which is not contained in crystallized urea, is converted to esterified forms, yielding a CLA byproduct (CBP) that still contains high

* Address correspondence to this author at the Department of Food and Biotechnology, College of Science and Technology, Korea University, Jochiwon, Chungnam 339-700, Korea (telephone +82-41-860-1435; fax +82-41-865-0220; e-mail yk46@korea.ac.kr).

[†] Korea University.

[‡] Dankook University.

[§] Nutrition Physiology Division, National Institute of Animal Science.

[#] Poultry Science Division, National Institute of Animal Science.

[‡] Pusan National University.

^{||} Yonsei University.

- (16) Bolukbasi, S. C. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on broiler performance, serum lipoprotein content, muscle fatty acid composition and meat quality during refrigerated storage. *Br. Poultry Sci.* **2006**, *47*, 470–476.
- (17) Bolukbasi, S. C.; Erhan, M. K. Effect of semi replacement of dietary olive oil and corn oil with conjugated linoleic acid on broiler performance, serum lipoprotein levels, fatty acid composition in muscles and meat quality during refrigerated storage. *J. Anim. Vet. Adv.* **2007**, *6*, 262–266.
- (18) Du, M.; Ahn, D. U. Effect of dietary conjugated linoleic acid on the growth rate of live birds and on the abdominal fat content and quality of broiler meat. *Poult. Sci.* **2002**, *81*, 428–433.
- (19) Lai, C. H.; Yin, J. D.; Li, D.; Liu, M. X. Effects of dietary conjugated linoleic acid supplementation on performance and immune function of early weaned pigs. *Chin. J. Anim. Sci.* **2004**, *40*, 9–12.
- (20) Romanoff, A. L. *The Avian Embryo*; New York: MacMillan Publishing, 1960.
- (21) Latour, M. A.; Devitt, A. A.; Meunier, R. A.; Stewart, J. J.; Watkins, B. A. Effect of conjugated linoleic acid. 1. Fatty acid modification of yolks and neonatal fatty acid metabolism. *Poult. Sci.* **2000**, *79*, 817–821.
- (22) Yang, L.; Huang, Y.; Wang, H. Q.; Chen, Z.-Y. Isomeric distribution of conjugated linoleic acids (CLA) in the tissues of layer hens fed a CLA diet. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5654–5660.
- (23) Lin, X.; Looor, J. J.; Herbein, J. H. *Trans*10,*cis*12–18:2 is a more potent inhibitor of de novo fatty acid synthesis and desaturation than *cis*9,*trans*11–18:2 in the mammary gland of lactating mice. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 1362–1368.
- (24) Sessler, A. M.; Ntambi, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr.* **1999**, *128*, 923–926.
- (25) Lefevre, P.; Tripon, E.; Plumelet, C.; Douaire, M.; Diot, C. Effects of polyunsaturated fatty acids and clofibrate on chicken stearoyl-coA desaturase 1 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 25–31.
- (26) Xu, J.; Nakamura, M. T.; Cho, H. P.; Clarke, S. D. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23577–23583.
- (27) Piperova, L. S.; Teter, B. B.; Bruckental, I.; Sampugna, J.; Mills, S. E.; Yurawecz, M. P.; Fritsche, J.; Ku, K.; Erdman, R. A. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2568–2574.
- (28) Corl, B. A.; Oliver, S. A. M.; Lin, X.; Oliver, W. T.; Ma, Y.; Harrell, R. J.; Odle, J. Conjugated linoleic acid reduces body fat accretion and lipogenic gene expression in neonatal pigs fed low- or high-fat formulas. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 449–454.
- (29) Takahashi, Y.; Kushiro, M.; Shinohara, K.; Ide, T. Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1631*, 265–273.
- (30) Ferramosca, A.; Savy, V.; Conte, L.; Colombo, S.; Einerhand, A. W. C.; Zara, V. Conjugated linoleic acid and hepatic lipogenesis in mouse: role of the mitochondrial citrate carrier. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 1994–2003.
- (31) Eder, K.; Kirchgessner, M. The effect of dietary vitamin E supply and a moderately oxidized oil on activities of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Lipids* **1998**, *33*, 277–283.
- (32) Porsgaard, T.; Xuebing, X.; Huiling, M. The form of dietary conjugated linoleic acid does not influence plasma and liver triacylglycerol concentrations in Syrian golden hamsters. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2201–2206.
- (33) Terpstra, A. H. M.; Javadi, M.; Beynen, A. C.; Kocsis, S.; Lankhorst, A. E.; Lemmens, A. G.; Mohede, I. C. M. Dietary conjugated linoleic acids as free fatty acids and triacylglycerols similarly affect body composition and energy balance in mice. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3181–3186.

Received for review November 6, 2008. Revised manuscript received January 16, 2009. Accepted January 16, 2009. This study was supported by the Technology Development Program for Agriculture and Forestry (106013-03-1-CG000), Ministry for Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

JF803470D

----- Original Message -----

Date:
From: <>
To: jio000@korea.ac.kr
Subject: [BBB] Manuscript Accepted, Manuscript Number: 80859

Dear Jae Kyeom Kim,

Thank you for submitting your manuscript to Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. We are pleased to tell you that your manuscript:

Manuscript Number: 80859

was accepted for this journal. You will be asked to submit a final manuscript for publication shortly.

Please login below for further information about the decision.

[Login at:]
<http://ess.jstage.jst.go.jp/contributor/BBB/contribLogin/~char/en>

Use the Manuscript Number (or the Temporary Receipt Number) and a password which you entered during the manuscript submission process. Please contact the Editorial Office if you forget your password.

[Manuscript Detail]

Kind of Paper : Regular Paper
Title : Inhibitory Effect of Poncirus Trifoliata on Acetylcholinesterase and Attenuating Activity against Trimethyltin-induced Learning and Memory Impairment
First Name : Jae Kyeom
Last Name : Kim
Subject Categories : Food & Nutrition Science
Research Fields Class : V. Foods
Manuscript Number : 80859
Initial Manuscript Process Date : 2008/12/04
Date : 2009/01/20
Comment to Author :

Please contact below if you have any questions.

Best regards.

Hitoshi ASHIDA
Editor-in-Charge
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
Email: ashida@kobe-u.ac.jp

<http://mail.nate.com/NateMailBodyMgr.php?act=view&uid=1429&box=INBOX&page=3&order=DE...> 2009-03-12

Anti-dementia Effect of *Poncirus Trifoliata*

1 **Running title;** Anti-dementia Effect of *Poncirus Trifoliata*

2

3 Inhibitory Effect of *Poncirus Trifoliata* on Acetylcholinesterase and
4 Attenuating Activity against Trimethyltin-induced Learning and Memory
5 Impairment

6

7 Jae Kyeom KIM,¹ Heyri BAE,¹ Mi-Jeong Kim,² Soo Jung CHOI,³ Hong Yon
8 CHO,¹ Han-Joon HWANG,¹ Young Jun KIM,¹ Seung Taik LIM,² Eun Ki KIM,⁴
9 Hye Kyung KIM,⁵ Bok Yong KIM,⁶ and Dong Hoon SHIN^{1,†}

10

11 ¹*Department of Food and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Republic of*
12 *Korea*

13 ²*Brain Korea 21 Project for Medicine, Yonsei University, Seoul 120-752, Republic of*
14 *Korea*

15 ³*Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701,*
16 *Republic of Korea*

17 ⁴*Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Republic of*
18 *Korea*

19 ⁵*Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Seosan 356-706, Republic*
20 *of Korea*

21 ⁶*Han-il Ginseng Industry Company, Chuncheon 200-170, Republic of Korea*

22

23 † To whom correspondence should be addressed. Fax: +82-2-3290-3429; E-mail:
24 dhshin@korea.ac.kr

25

26 **Complete list of abbreviations;**

27 acetylcholine, ACh; acetylcholinesterase, AChE; Alzheimer's disease, AD; amyloid beta

1 **Acknowledgements**

2
3 This study was supported by the Technology Development Program of the
4 Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (Code # 106013-03-1-CG000).

5
6 **References**

- 7
8 1) Alzheimer's Association, 2008 Alzheimer's disease facts and figures, 1-38 (2008).
9
10 2) Heo, H.J., Kim, M.J., Lee, J.M., Choi, S.J., Cho, H.Y., Hong, B.S., Kim H.K., Kim
11 E.K., and Shin, D.H., Naringenin from *Citrus junos* has an Inhibitory effect on
12 acetylcholinesterase and a mitigating effect on amnesia. *Dement. Geriatr. Cogn.*
13 *Disorder.*, **17**, 151-157 (2004).
14
15 3) Prasad, K.N., Hovland, A.R., Cole, W.C., Prasad, K.C., Nahreini, P., Edwards-Prasad,
16 J., and Andreatta, C.P., Multiple antioxidants in the prevention and treatment of
17 Alzheimer's disease: analysis of biologic rationale. *Clin. Neuropharmacol.*, **23**, 2-13
18 (2000).
19
20 4) Terry, R.D., and Masliah, E., Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's
21 disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.*,
22 **30**, 572-580 (1991).
23
24 5) Candy, J.W., Perry, R.H., Perry, E.K., Irving, D., Blessed, G., and Fairbairn, A.F.,
25 Pathological changes in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's and
26 Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.*, **59**, 277-289 (1983).
27
28 6) Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., and Menichini, F., Natural products and their

파래 추출물의 항응고 활성과 항암 활성에 관한 연구

임은정 · 조경련 · 김지영 · 이유현 · 효진녕 · 김영준 · 조홍연*

한양여자대학 식품영양과, *수원대학교 식품영양학과, **한국원자력의학원 방사선종양연구부
***고려대학교 식품생명공학과

The Anticoagulant and Anticancer Activities of *Enteromorpha intestinalis* Extracts

Eun-Jeong Lim, Kyung-Ryun Cho, Ji-Young Kim, Yoo-Hyun Lee*, Jin-Nyoung Ho**
Young-Jun Kim*** and Hong-Yon Cho***

Dept. of Food and Nutrition, Hanyang Women's College, Seoul 133-793, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Suwon University, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-743, Korea

**Laboratory of Radiation Tumor Physiology, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul 139-706, Korea

***Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, Jochiwon, Chungnam 339-700, Korea

Abstract

The study was performed to investigate the biological activity of *Enteromorpha intestinalis*. In order to examine its blood anti-coagulant effects, *Enteromorpha intestinalis* was extracted with cold water, methanol, hot water, HCl and NaOH. In general, the alkali extract of *Enteromorpha intestinalis* was approximately 17 times stronger than the control. The anti-cancer effects of select extracts(methanol, hot water, 0.1 N NaOH, 1 N NaOH) were determined in human melanoma cells(B16/F10), fibrosarcoma cells(HT1080) and breast cancer cells(MCF7) by MTT assay. With the treatment of 250 µg/ml of methanol extracts, HT1080, B16/F10 and MCF7 cell viabilities significantly decreased to 8.06%, 3.62% and 10.10%, respectively. Thus these results strongly support the possible use of *Enteromorpha intestinalis* as a functional materials.

Key words: anticoagulant, anticancer, *Enteromorpha intestinalis*, MTT assay.

서론

의학의 진보에 따라 평균 수명이 현저히 향상되었으나, 서구화된 요즘의 식생활 패턴은 영양적인 측면보다 기호성이 강조되면서 각종 성인병과 암 발생을 증가가 사회문제로 대두되고 있다. 국내 사망자 사망 원인의 절반 이상이 심장·순환기계 질환인 심근경색, 동맥경화증, 심장마비, 뇌출혈로 인한 것이고, 이 비율은 점차 증가 추세에 있다¹⁾. 혈전은 혈류 부전, 혈관 상해, 혈관 내피 세포 및 지질 침착 등의 원인에 의해 생성되어 혈액 순환을 방해하고, 조직으로의 영양 공급 및 산소 공급을 차단하여 뇌출혈, 뇌혈전, 심근경색, 동맥경화 등의 중대한 성인병의 원인이 된다²⁾. 이들 질환들에 대한

예방의학적 측면에서의 혈전의 형성을 방지하고 생성된 혈전을 용해하는 제제는 혈전에 의한 성인병의 중요한 치료제로 그동안 이에 대한 활발한 연구가 진행되어 왔다. 현재까지 알려진 항응고제로는 소의 심장이나 돼지의 소장에서 추출한 heparin^{3,4)}, 거머리 등에서 분리한 hirudin⁵⁾, 유기 합성제인 coumarin과 warfarin⁶⁾, 해조류 등에서 분리한 황황성 다당류인 fucoidan⁷⁾, 미생물 대사에서 분리된 수종의 peptide 성분^{8,9)} 등이 있다. 또한, 기존의 연구에서 갈조류인 fucoidan¹⁰⁾, alginate¹¹⁾, 홍조류인 agar 다당¹²⁾, carrageenan¹³⁾ 및 porphyran¹⁴⁾ 등과 같이 해조류 유래 황산기를 함유한 산성다당들의 항응고 활성 물질이 많다. 그리고 해조류는 육상식물에 비해 비타민 및 미네랄, 특히 마그네슘, 칼슘, 요오드, 철 등의 함량이 높고¹⁵⁾ 해조

*Corresponding author: Hong-Yon Cho, Dept. of Food and Biotechnology, Korea University, Jochiwon, Chungnam 339-700, South Korea.

Tel: 82-2-2290-2180, Fax: 82-2-2290-2199, E-mail: myann70@hanmail.net

접착용 돌연변이원에 대한 항돌연변이 효과가 우수한 것으로, 암세포에 대한 항암 효과는 각 시료마다 정도의 차이는 있으나, 5종의 해조류 모두 암세포 증식을 억제하는 것으로 보고도 있다²⁹⁾.

이번 연구 결과는 파래가 중요한 천연자원이 될 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었으며, 항암 효과를 좀 더 확실하게 이해하기 위하여 세포상의 메카니즘 규명 확인 등의 연구가 더 활발히 이루어져야겠다.

요약 및 결론

우리나라 대표적인 해조류로서 우리의 식탁에 자주 오르는데 파래의 생리활성을 규명할 수 있다면 식품도 새로운 측면에서의 가치 부여와 동시에 기능성 식품의 소재로서 응용될 수 있기에 파래를 열수, 메탄올, 알칼리로 추출하여 혈액 항응고 활성과 항암 활성의 생리적 활성을 검토해 보았다.

파래의 추출 용매별 활성 검토 결과 시료를 포함하지 않은 순수 혈장만으로 측정된 대조구의 응고 시간이 36초인 것에 비해 0.1 N NaOH 용액 추출물의 항응고 활성은 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 600초로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 농도에 따른 활성 검토 결과 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서도 287초와 58.1초로 높은 항응고 활성을 확인할 수 있었다. 이처럼 유기용매나 순수한 물보다는 알칼리 용액에 의한 추출물이 높은 항응고 활성을 나타낸 것은 지금까지 항응고 활성이 보고된 바 있는 갈조류인 다시마에서 추출된 fucoidan 이나³⁷⁾, 매우 높은 항응고 활성을 보고된 붓³⁸⁾과 홍조류인 잠도박으로부터 분리된 다당류³⁹⁾ 등과 같이 해조류 유래 항응고 활성 물질들이 구조적으로 함황성 다당류²⁷⁾이라는 독특한 구조적인 특성을 갖는 고분자인 다당류에서 기인한다는 보고와 같은 경향을 나타내는 것으로 보인다.

우수한 항응고 활성을 나타낸 파래의 메탄올 추출물, 열수 추출물, 0.1 N NaOH 추출물, 1 N NaOH 추출물에 대해 B16/F10(melanoma cell, 피부흑색종세포), HT1080(fibrosarcoma cell, 섬유육아종세포), MCF7(breast cancer cell, 유방암세포), HepG2 (hepatoblastoma cell, 간암세포) cell에 대하여 MTT법으로 항암 활성을 측정하였다. 실험 결과 파래는 실험한 4종의 종양 세포 모두에 항암 활성을 나타냈으며, 특히 저분자 획분인 메탄올 추출물과 고분자 획분인 알칼리 용액 추출물은 실험한 모든 종양세포에 대한 강한 항암 활성을 확인할 수 있었다. 또한, 낮은 농도에서도 매우 높은 항응고 활성을 나타냈던 파래 0.1 N NaOH 추출물의 경우 이들 실험 종양 세포에 대한 항암 활성 또한 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

이상의 실험 결과에서 파래의 항응고 활성과 항암 활성을 검토를 통해 그 우수한 생리적 활성을 확인할 수 있었으며,

이에 따라 새로운 기능성 식품의 소재로서 활용 가능성이 높을 것으로 검토되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(106013-03-2-CG000)의 지원에 의해 수행한 연구결과물의 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Korea National Statistical Office. 2006. Annual Report on the Cause of Death Statistics. Seoul, Korea
2. Kim, YT. Identification of the fibrinolytic bacterial strain from Chungkook-jang. PhD. Thesis, Sejong Uni., Seoul, Korea. 1994
3. Richard, L and Mueller, MD. History of drugs for thrombotic disease. *Circulation*. 89:432-450. 1994
4. Hahn, BS, Wu, S, Kim, SW and Kim, YS. Evaluation of anticoagulant and fibrinolytic activities from crude extracts of insects. *Kor. J. Pharmacogn.* 30:409-412. 1999
5. Lee, SK, Sohn, JH, Choi, ES and Rhee, SK. Screening and purification of anticoagulant proteins from Korean leeches. *Kor. Biochem. J.* 26:227-233. 1993
6. Lurence, AH. Antiplatelet and anticoagulant therapy, blood: Principles and practice of hematology, pp.226-248, Lippincott JB Company, Philadelphia. USA. 1995
7. Collic, S, Fisher, AM, Tapon-Brethaudiere, J, Boisson, C, Durant, P and Jozenfonvics, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb. Res.* 64:143-154. 1991
8. Lee, SS and Kim, SM. Studies on proteolytic and fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34:283-289. 2002
9. Dougson, KS and Price, RG. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* 84:106-110. 1992
10. Vidal, CB, Chaubet, F, Chevolut, L, Sinquin, C, Theveniaux, J, Millet, J, Stembreg, C, Mulloy, B and Fischer, AM. Relationship between antithrombotic activities of fucans and their structure. *Drug Devel. Res.* 51:216-224. 2000
11. Kim, DS and Park, YH. Uronic acid composition, block structure and some related properties of alginic acid. *J. Kor. Fish. Soc.* 18:29-36. 1985
12. Do, JR. Extraction and purification of agar from *Gelidium*

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2008.11.28
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0001)
출원번호 10-2008-0120169 (접수번호 1-1-2008-0825121-78)
출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)
대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
발명자성명 신동훈 최수정 이주현 김영준 조훈연 김혜경 허호진
발명의명칭 석류 추출물을 포함하는 신경계 질환 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(온라인전자출원)" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 동 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.(단 홈페이지 회원에 한하여 통지서비스 신청 가능)
2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 유별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
5. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2008.09.08
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2008-0088370 (접수번호 1-1-2008-0636790-14)
출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)
대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
발명자성명 신동훈 최수정 배해리 조홍연 김영준 황한준 김혜경 허호진 김명옥

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 - 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(온라인전자출원)" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 동 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.(단 홈페이지 회원에 한하여 통지서비스 신청 가능)
 - 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 유별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
 - 2-라. 1차 심사결과통지시(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
- 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
- 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
- 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
- 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
- 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
- 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
- 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454



특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 고려대학교 산학협력단

【출원인코드】 2-2004-017068-0

【대리인】

【성명】 손민

【대리인코드】 9-1999-000420-6

【포괄위임등록번호】 2005-033227-4

【발명의 국문명칭】 탱자로부터 분리한 8-메톡시소랄렌을 포함하는 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 화합물의 분리방법

【발명의 영문명칭】 Composition comprising 8-methoxypsoralen isolated from *Poncirus trifoliata* for prevention or treatment of Alzheimer's disease, and isolation method of the compound

【발명자】

【성명의 국문표기】 신동훈

【성명의 영문표기】 Shin, Dong-Hoon

【주민등록번호】

【우편번호】 135-280

【주소】 서울시

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최수정

【성명의 영문표기】 Choi, Soo Jung

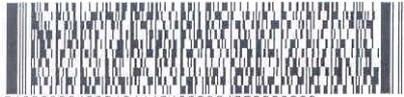


관인생략
출원번호통지서

출원일자 2008.06.30
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2008-0062877 (접수번호 1-1-2008-0472391-08)
출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)
대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
발명자성명 신동훈 최수정 이주현 조홍연 김혜경 김영준 허호진 김은기 김복용

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호 통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 - 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(온라인전자출원)" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 동 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.(단 홈페이지 회원에 한하여 통지서비스 신청 가능)
 - 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 유별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
 - 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
- 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
- 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
- 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2 서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
- 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원 상대임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
- 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
- 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
- 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454



9199900042061011101000024950000000

특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 고려대학교 산학협력단

【출원인코드】 2-2004-017068-0

【대리인】

【성명】 손민

【대리인코드】 9-1999-000420-6

【포괄위임등록번호】 2005-033227-4

【발명의 국문명칭】 뇌 신경 세포 보호물질을 포함하는 질경이 추출물을 포함하는 조성물

【발명의 영문명칭】 Composition comprising *Plantago asiatica* extract which contains inhibitor against amyloid β peptide-induced oxidative stress

【발명자】

【성명의 국문표기】 신동훈

【성명의 영문표기】 SHIN, Dong Hoon

【주민등록번호】

【우편번호】 135-280

【주소】 서울시

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최수정

【성명의 영문표기】 CHOI, Soo Jung

【주민등록번호】



[부 표]

인 쇄 내 용

I. 인쇄규격

1. 크기 : A4 신판(가로 210mm * 세로297mm)
2. 제본 : 좌철
3. 용 지
 - 가. 표지 200g/m² 양면 아트지
 - 나. 내용 80g/m² 모조지
4. 인쇄방법
 - 가. 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색
 - 나. 내용 : 흑색 지정활자
 - 다. 양면인쇄

II. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 보고서 요약서
4. 요약문
5. 영문 요약서(Summary)
6. 영문 목차(Contents)
7. 목 차
8. 본 문
9. 뒷면지

III. 참고사항

전자조판 인쇄시에는 이에 준한다.