

해양수산 연구개발과제 제4차년도 결과보고서

**2002 해조류 및 해면으로부터
노화억제제 개발**

기능성태양품

2003년 3월

부산대학교



[별지 제4호 서식]

최종연구보고서

2002년도 해양수산연구개발사업에 의하여 개발 중인 “해조류 및 해면으로부터 항노화 억제제 개발“에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨 부 : 1. 최종 보고서 3부.
2. 자체평가의견서 1부.
3. 최종보고 전산입력서 1부.

2003년 3월 일

주관 연구 기관 : 부산대학교

주관연구책임자 : 최 원 철

주관연구기관장 : 부산대학교 총장 박 재 윤



해양수산부장관 귀하

제 출 문

해양수산부장관 귀하

본 보고서를 “해조류 및 해면으로부터 항노화 억제제 개발 -해양 신기능성 활성 물질의 선도성 검증 및 개발- ” 과제에 대한 최종보고서를 제출합니다.

주관연구기관명 : 부산대학교

주관연구책임자 : 최 원 철

연 구 원 : 서홍석, 박장수
안원근, 김대덕
김영숙, 송영욱

요 약 문

I. 제 목 : 해조류 및 해면으로부터 항노화 억제제 개발
- 해양 신기능성 활성 물질의 선도성 검증 및 개발-

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 목적

- 국내 연안에 서식하는 각종 해양생물로부터 항노화, 항발암의 생리활성을 갖는 물질을 분리하고 이들의 대량생산을 가능케 하며 또한 이들의 다양한 유도체들을 합성하여 기능성 화장품 및 노화억제제로 개발.
- 해양생물 유래의 신 기능성 활성물질의 구조 해석을 통한 구조와 활성연구.
- 각종 합성물질의 세포내의 활성 기작 연구.
- 신 기능성 물질의 합성으로 통한 대량생산을 위한 기술 확립.

나. 연구개발의 필요성

- 해조류 및 해면으로부터 노화억제제 개발(1단계) 연구의 결과로 생긴 해양신기능성 천연물질의 순수 분리 및 정제로 말미암아 항산화 활성이 가장 높은 물질의 분자구조식을 찾아내었고 그 물질의 유도체를 합성하는 기술을 개발하게 되었음으로 신기능성 합성 유도체를 많이 합성하여야 함.
- 이러한 합성유도체물질을 통하여 미백효과를 가진 신기능성 물질을 찾아내어 다량 합성하여 화장품 개발을 할 필요성이 있음.
- 2단계에서는 제 1 단계에서 개발한 기술을 이용하여 “해양 신기능성 활성물질의 선도성 검증”연구에 들어가서 신기능성 합성 유도체를 많이 합성해야함
- 또한 해양 신기능성 물질로부터 합성유도체의 신기능성 건강식품의 첨가제 및 미백 화장품뿐만 아니라 의약품 개발을 위한 선도성 검증이 필요함.
- 제1단계에 쌓인 기술로 통하여 제2단계연구에서는 실제 활용하여 산업체와 협동으로 연구 개발이 필요함.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

- 가. 해양 신기능성 활성물질의 선도성 검증 및 개발을 하기 위하여 유도체합성
 - 제1단계에서 추출 분리 구조결정한 천연물로부터 우수 유도체 합성
- 나. 합성유도체의 활성연구 및 노화억제제로서의 가능성 연구
 - 항산화, 항암 및 콜레스테롤 억제능력 실험 (in vitro 및 in vivo 실험)
- 다. 합성유도체의 신기능성 화장품 개발 연구
 - 미백효과 실험 (in vitro 및 in vivo 실험)
- 라. 활성 단백질의 정제 및 물성 연구
 - 신기능성 물질중 주로 단백질 및 peptide 계통의 물질에 대한 연구 및 유도체합성

Ⅳ. 연구개발결과

- 가. 기술적 측면
 - 천연물의 신 기능성 활성물질 추출을 근거로 유도체 합성 기술 개발
 - 해조류로부터 화장품 기술개발
 - 해양생물자원을 이용하는 학문적 수준을 높임
- 나. 경제, 산업적 측면
 - 해양생물자원을 응용하여 신 기능성 물질을 추출 내지는 합성 할 때에 이를 통하여 산업화를 유도함.
 - 관련 기업이나 제약회사의 연구투자를 유도하여 국가 경제에 기여함.
 - 해양생물자원에 대한 국민적인 인식을 이해 증진시키며 미래 해양자원에 대한 고갈을 미리 예방할 수 있는 의식을 고취 시킴.

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

- 신기능성식품, 식품첨가제, 화장품개발로 국민 보건향상과 부가가치가 있는 수출전략상품 개발에 기여할 것임
- 생물제제 산업으로 발전하는데 있어서 해양생물의 응용분야에 초석으로 활용되어 질 것임

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

1. Project Title:

2002 Development of Antiaging Agents from the Marine Algae and Sponges - Development of new functional marine active substances and verification of their lead identified properties.

II. Purpose and Necessity of the project

1. Purpose of research and development

● To separate anti-aging and anticancer active substances from marine lives living in Korean waters; to enable their mass production; and to develop functional cosmetics and anti-aging agents by synthesizing the derivatives of the substances.

● To study structures and activities through the structural interpretation of new functional active substances originated from marine lives

● To study the activity mechanism of the cells of synthetic substances

● To develop mass production technology by synthesizing new functional substances

2. Necessity for research and development

● The research on the development of anti-aging agents from seaweeds and natural sponges (the first stage research) has resulted in the finding of new functional marine substances; the separation and refinement of the new functional marine substances has resulted in the finding of molecular structure

formulas of the substances with the highest anti-oxidation activities and a substance derivative synthesizing technology has been developed; and therefore it is necessary to synthesize as many new functional synthetic derivatives as possible.

● It is necessary to find out new functional substances having whitening effects from synthetic derivative substances and to develop cosmetics by synthesizing the substances.

● In the second stage, it is necessary to start research on the "verification of lead identified properties of new functional marine active substances" using the technology developed in the first stage and to synthesize as many new functional synthetic derivatives as possible.

● It is required to verify the lead identified properties of new functional marine substances in order to develop medicines, whitening cosmetics and health food additives using synthetic derivatives originated from the marine substances.

● It is also necessary to apply the technology developed in the first stage for to further research and development under a close cooperation with companies involved in the field.

III. Details and scope of research and development

1. Synthesizing derivatives to develop new functional marine active substances and verify their lead identified properties: to synthesize superb derivatives from the marine substances extracted, separated and structure-determined in the first stage.

2. Studying the activities of synthesized derivatives and their possibilities of being used as anti-aging agents: to test their

anti-oxidant, anticancer and cholesterol-detering abilities (in vitro and in vivo experiments)

3. Research and development of new functional cosmetics from synthetic derivatives - to conduct experiments to find out whitening effects (in vitro and in vivo experiments)

4. Examination of the purification and physical properties of active proteins: to focus efforts on the study of protein and peptide substances and to synthesize their derivatives.

IV. Research and development results

1. Technological aspects

● A derivative synthesizing technology has been developed on the basis of new functional marine active substances

● A technology to develop cosmetics from seaweeds has been developed.

● Scientific abilities to use marine life resources have been enhanced.

2. Economic and industrial aspects

● By extracting or synthesizing new functional substances from marine life resources, their industrial applications can be promoted.

● Contributions can be made to the national economy by encouraging relevant enterprises and pharmaceutical companies to conduct research and development on the substances.

● People's recognition and understanding of marine life resources can be enhanced while helping people increase their awareness of the need to preserve marine resources so that the resources may not be depleted in the future.

V. Research and development results use plan

1. The results will be used in bettering people's health and developing highly value-added strategic exports by developing new functional foodstuffs, food additives and cosmetics.
2. The results will also serve as a foundation for the enhancement of marine life applications in the bioindustry.

C O N T E N T S
(영 문 목 차)

Summary -----	1
Chapter 1. Introduction -----	9
Chapter 2. Scope of project-----	15
Chapter 3. Results and Discussions -----	16
Chapter 4. Achievement of project aim -----	133
Chapter 5. Utilization plan of research result -----	134
Chapter 6. References -----	135
Chapter 7. Others -----	144

목 차

요약문	1
제1장 서론	9
제2장 국내외 기술개발 현황	15
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과	16
제4장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	133
제5장 연구개발결과의 활용계획	134
제6장 참고문헌	135
제7장 기타	144

제1장 서론

제 1절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

가. 연구개발의 목적 및 필요성

삼면이 바다로 둘러싸여 있는 우리나라의 지형적인 특성에 의하면 수산물의 이용 및 가공이 다른 나라보다 훨씬 발달되어야 함에도 불구하고 인접 국가들이 우리나라 연안에서의 수산자원을 남획함과 우리나라 어민들의 무차별한 어획으로 수산자원이 고갈하게 이르렀다.

그래서 다행히 최근, 미래의 수산업을 위하여 기르는 어업 육성법 제정으로 그나마 우리나라 수산업의 양적인 발전과 어업인의 안정적 경제생활의 터전확보, 나아가 국민 식량원의 안전성의 확보등과 같은 질적인 발전에 기여하기 시작하는 것이라고 본다.

더 나아가 우리는 수산자원으로부터 새로운 신 기능성 물질을 추출하여 산업화 시키는 것이 시급한 문제라고 생각하여 1999년부터 해양수산부 해양개발과에서 연구비를 지원하여 이 분야를 발전시키고자 하였다. 그래서 1999년 처음으로 해양개발과의 연구 지원금으로 본 연구진들이 우리나라에서는 처음으로 이 분야에 연구를 시도하였다.

먼저 연구 분야를 설정하였는데 해양생물 중 해조류 및 해면을 대상으로 하여 노화 억제제를 개발하기로 하였다. 그 이유로는 오늘 날 산업이 발달하고 삶의 질이 나아짐에 따라 사회 구성원의 고령화되고, 국민적 건강에 대한 관심을 많이 가지게 되었기 때문이다. 특히 인간이 수명을 다하는 동안 노화를 억제하려는 노력은 부단하게 지속되었으나 아직까지 뚜렷한 항노화 물질을 발견하지 못하였다. 이에 따라 21세기 BT 산업분야의 핵심이 되는 신약개발 산업은 절대고부가 가치를 창출하는 산업으로 부존자원이 부족한 우리나라에서 절실히 필요한 연구 분야 중 하나이라고 생각하였다.

이러한 사고를 가지고 신약개발 산업을 위한 기초 자료로서 본 연구진들은 1999년부터 제1단계에서 해조류 및 해면으로부터 항노화에 대한 천연물질을 추출하게 되었으며 나아가서 그 물질의 분자구조식까지 밝히게 되었다. 그 다음, 천연물질의 구조식을 이용하여 항노화에 유효히 뛰어난 유도체를 만들었다. 뿐만 아니라 미백효과가 큰

유도체를 역시 합성하였는데 독성이 전혀 없는 질 높은 유도체를 생산하게 되었다. 이렇게 제1단계의 기초연구를 마치고 제2단계로서 화장품을 개발하기에 이르르게 되었다.

그런데 항노화에 관련된 유도체합성물은 여러 가지 실험결과에 의하면 의약품개발을 위한 선도물질로 개발할 수 있는 성향이 커지고 있다. 최근 해양생물 유래의 천연의 생리활성물질들이 신약 선도 물질로서 부각되어 많은 연구가 진행 중이지만, 경제적인 투자에 비하여 성과가 거의 희소한 상태이다. 예를 들면 우리나라 10여 년 동안 G-7 사업으로 적지 않는 경제적인 지원을 정부에서 하였으나 그 결과는 예상을 빗나가고 큰 효과가 없었다. 이러한 결과는 주로 육상의 동식물을 그 재료로 한 것이 대부분을 차지하고 있다. 육상생물로부터 신약개발은 수백 년 동안 집중적으로 연구되어 왔기 때문에 그 자원의 고갈 및 이미 거의 다 밝혀진 성분들뿐이다. 그러므로 본 연구진들은 해양생물을 자원으로 하여 연구를 한 결과 매우 좋은 결과를 가지게 되었다.

해양생물 중 해조류 및 해면으로부터 항노화를 유도하는 기능성 물질을 연구함에 있어서 특히 해조류로부터 항노화에 관련된 유해한 자유라디칼의 소거를 일으키는 항산화 물질의 개발을 하게 되었다. 또한 안정하고 반응성이 낮은 라디칼 $ArO\cdot$ 로 전환시킬 수 있는 해조류에서 찾은 페놀류 ($ArOH$) 분자를 개발 하여 해양신기능성 물질의 유도체 합성을 이끌어 내었다. 해조류의 천연물로부터 유도체합성을 하기 위하여 유기전 합성 개발 및 고지혈증 저하 기능을 찾는 데 그 목적으로 하였다. 이렇게 해양 신기능성 물질을 응용하여 산업화시켜 우리나라가 지향하는 신 해양국가를 이루기 위한 해양생물 산업의 발전의 초석을 이루려 함이다.

본 연구가 가지는 특별한 연구 개발의 목적은 우리나라 연안에서 서식하고 있는 해양생물로부터 신 기능성활성물질의 구조해석을 통해서 그들의 구조에 따른 활성을 연구하여 해양신기능성 물질의 유도체 합성을 위한 무기전 합성 방법을 개발하고자하며, 각종 합성유도체의 세포내의 활성 기작을 연구하여 해양 신기능성 합성물질로부터 의약품개발의 선도물질을 검증하고, 각종 해양생물로부터 항노화, 항암의 생리활성을 갖는 물질을 조사 및 분리하고 미백효과가 있는 생리활성 물질을 대량생산을 가능케 하여, 천연물에서 뿐만 아니라 천연물을 기초로 하여 효력이 강한 유도체들을 합성하여 이 물질들을 다시 신 기능성 화장품 및 노화억제제로 개발하고자한다.

이러한 목적을 가지고 연구할 때에 연구개발의 필요성은 해조류 및 해면으로부터 노화억제제 개발연구 중 제1단계 연구의 결과로 생긴 해

양신기능성 천연물질의 순수 분리 및 정제로 인하여 항산화 활성이 가장 높은 물질의 분자구조식을 합성하게 되었고 또한 그 물질의 유도체를 합성하는 기술이 개발하게 되어 산업화 연구를 위해 신기능성 합성 유도체를 많이 합성해야 할 필요성이 있다. 그리고 또한 합성유도체물질 중 3가지 그룹으로 대별할 수 있는 성질을 발견하였는데 첫째는 항노화 의약품개발로 이용할 수 있는 유도체, 둘째는 콜레스테롤 강하제로, 셋째는 미백효과를 가지는 신기능성 합성물질로 나누어 졌다. 이들의 유도체를 다량 합성하여 화장품 및 건강보조식품과 의약품개발에 활용 할 수 있는 합성유도체들이다. 그러므로 제1단계연구로부터 누적된 기술을 통하여 제2단계 연구에서는 산업체와 협동으로 생산품에 대한 연구개발이 필요한 상황이다.

그러면 연구개발을 함에 있어서 그 내용과 범위는 첫째로 해양 신기능성 활성물질의 선도성 검증 및 개발을 하기 위하여 유도체합성을 하고자한다. 이 유도체들을 합성하기 위하여 제1단계에서 추출 분리하여 구조를 결정한 천연물로부터 우수 유도체합성을 해야 하겠고, 둘째로는 합성유도체의 활성연구 및 노화억제제로서의 가능성 연구를 함에 있어서 항산화, 항암 및 콜레스테롤 억제능력 실험 (in vitro 및 in vivo 실험)이 정상적으로 이루어 져야 한다. 그리고 세 번째로는 합성유도체의 신기능성 화장품 개발 연구를 해야 하는데 그 연구는 먼저 미백효과 실험 (in vitro 및 in vivo 실험)이 이루어져야 한다.

나. 연구개발의 범위

(1) 유도체 합성

최근 고혈압 심장병 및 각종 암으로 인한 사망률이 수위를 차지하고 있으며 현대 과학문명의 발달 환경오염 식생활의 변화 등에 따라 더욱 증가되는 추세에 있다. 현대인의 성인병은 신체세포의 신진대사 또는 각종 공해 흡연 등에 의해 체내서 생성된 활성 물질인 자유라디칼(free radical)의 산화작용으로 세포막 및 DNA가 손상되고 이로 인해 생화학물질의 변형 및 조직세포의 파괴 등에 기인된 것으로 알려져 있다. 자유라디칼은 체내에서 식 작용과 화학반응에 의해 끊임없이 만들어지고 있으며 이는 효소반응 및 항산화 계에 의해 소거된다. 그러나 이 자유라디칼을 소거 할 수 있는 항산화 효소의 부족으로 자유라디칼의 소거를 위한 항산화 물질의 개발이 중요하다.

공기에 노출되는 거의 모든 유기물질들은 산화과정을 통하여 파괴된다. 항산화 물질의 낮은 농도를 사용하여 이 산화과정을 통한 파괴를 방지하는 것은 모든 생물체와 상업화되어있는 유기물질들의 보호

를 위하여 중요하다. 페놀류의 분자들은 이와 같은 항산화 물질에서 가장 중요한 부분을 차지한다. 아래의 식 (1)에서 보는 바와 같이 보통 이와 같은 항산화 효과는 페놀류 (ArOH) 분자가 수소원자를 peroxyradical (ROO·) 등의 유해한 자유라디칼에 빠르게 공급함으로써 이루어진다.

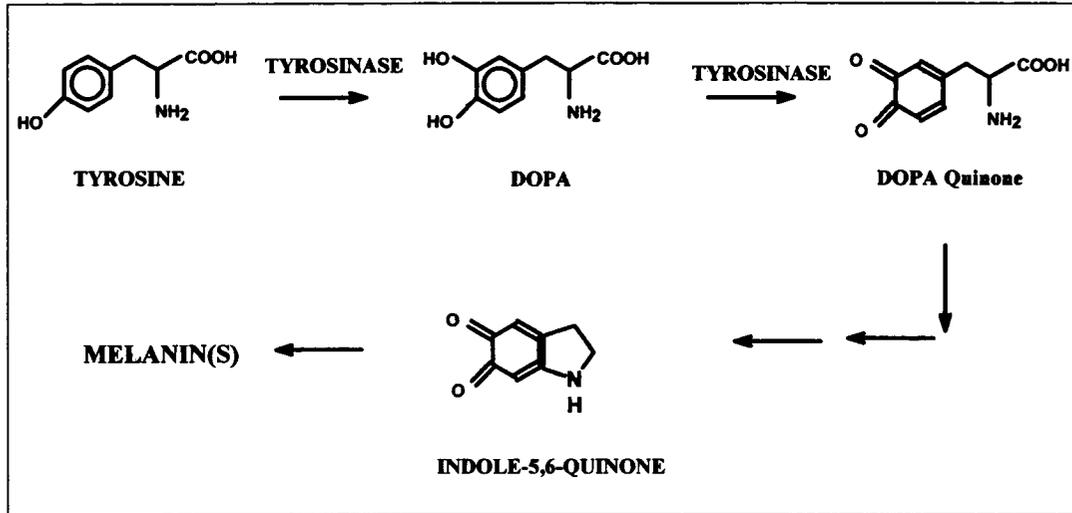
Peroxyradical (ROO·)은 식 (2)에서 보는 바와 같이 수소원자가 붙어 있는 수많은 생체내의 유기분자내의 작용기(RH)와 반응하여 유해하며 반응성이 높은 자유라디칼 (R·)을 생성한다. 형성된 자유라디칼 (R·)은 식 (3)에서 보는 바와 같이 다시 생체내에 공급되는 산소 분자와 빠르게 반응하여 peroxyradical (ROO·)을 빠르게 연속적으로 생성한다. 형성된 peroxyradical (ROO·)은 다시 식 (2)에서 보는 바와 같이 유기분자내의 작용기(RH)와 반응하여 유해하며 반응성이 높은 자유라디칼 (R·)을 생성한다. 즉 식 (2)와 식 (3)이 산소 분자만 공급되면 연속적으로 빠르게 일어나며 이것이 방지되지 않는 한 수많은 유기분자내의 작용기(RH)들은 파괴된다. 이와 같은 다양한 작용기들의 파괴는 노화 및 고혈압 등의 헤아릴 수 없는 문제점을 야기 시킨다. 이와 같이 유해한 식 (2)와 식 (3)의 반응의 차단은 peroxyradical (ROO·)이 형성될 시에 이것을 빠르게 제거하여 아주 반응성이 느리며 안정한 다른 라디칼로 전환을 하면 가능할 것이다. 많은 페놀류의 항산화제들은 아래의 식 (1)에서 보는 바와 같이 peroxyradical (ROO·)에 페놀류 (ArOH) 분자에서의 수소원자를 빠르게 공급함으로써 안정하고 반응성이 낮은 라디칼 ArO·을 생성한다.

본 과제에서는 이와 같이 유해한 자유라디칼의 소거를 위한 항산화 물질의 개발을 그 목적으로 하며 유해한 자유라디칼을 안정하고 반응성이 낮은 라디칼 ArO·로 전환시킬 수 있는 해양물에서 찾을 수 있는 페놀류 (ArOH) 분자를 즉 항산화제를 개발함을 목적으로 한다.



(2) 화장품개발을 위한 미백효과

사람의 피부는 자연적으로 발생하는 활성산소(active oxygen)나 유리기(free radical) 등을 소거하기 위하여 또는 자외선의 부과를 막기 위해 melanin을 생성한다. Melanin을 만드는 출발물질은 인체에 정상적으로 존재하는 아미노산의 일종인 tyrosine이다. Tyrosine은 melanocyte 내에서 tyrosinase에 의해 산화되어 DOPA로 변하고, DOPA는 더욱 산화되어 DOPA quinone으로 바뀐다. 그 후 DOPA quinone은 자동 산화반응이 일어나 5,6-dihydroxyindole을 거치면서 indole-5,6-quinone이 형성되고 최종적으로 흑갈색의 melanin을 만들어 낸다.¹⁾



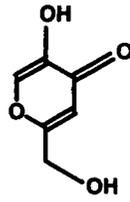
피부에 있어서 melanin의 과도한 침착을 방지하기 위한 방법으로는 melanin의 생합성 경로 중 각 단계를 차단하는 방법들이 있으며 크게 다음과 같이 나눌 수 있다:

- ① 피부의 자외선으로부터의 노출 방지
- ② tyrosinase 저해제의 사용
- ③ melanocyte에 특이적으로 독성을 나타내는 물질 부여
- ④ 생성된 melanin의 피부외부로의 배출 촉진

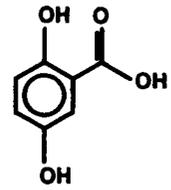
피부에 과색소 침착을 방지하기 위한 물질들을 작용기전 별로 분류해 보면 피부에 조사되는 자외선을 차단하기 위한 자외선 흡수제와 무기안료 등의 자외선 산란제가 있으며, vitamin C나 kojic acid 등의 tyrosinase 억제제, hydroquinone 등의 melanocyte에 독성을 나타내는 물질, tocopherol 같이 melanin 생성을 촉진시키는 active oxygen이나 free radical을 소거하는 물질 및 각질 박리를 촉진하여 생성된 melanin을 제거하는 AHA (alpha-hydroxyl acid) 등이 있다. 이중 특히 melanocyte에 독성을 일으키는 것으로 알려진 hydroquinone에 당을 결합시킨 arbutin은 kojic acid 등과 함께 tyrosinase inhibitor로 잘 알려져 있으며 피부의 미백 및 노화를 억제시킬 목적으로 기능성화장품 등의 형태로 많이 사용되고 있다. 그 외, 피부노화를 억제하는 것으로 알려진 retinol이나 ascorbic acid 등도 국내외적으로 많은 관심을 모으고 있으며 다수의 제품이 시판되고 있다. 이들의 작용 기전은 아직 명확하게 알려지지는 않았으나 tyrosinase효소의 억제 작용이 미백효과, 더 나아가 항노화효과와 관련이 있다는 연구들이 보고되고 있다.^{2,3)}



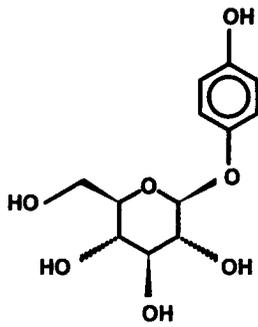
Hydroquinone



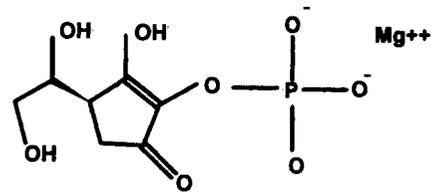
Kojic acid



Gentisic acid



Arbutin



Magnesium L-ascorbyl-2-phosphate

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내의 경우, 해양 생물자원으로부터 신 기능성 생리활성물질을 분리하여 새로운 건강식품 첨가제, 생체재료 및 의약품개발은 아직 초기 단계이다. 본 연구진은 국내에서 처음으로 해양생물로부터 신 기능성 활성물질을 연구 개발하고 있다. “해조류 및 해면으로부터 노화 억제제 개발” 사업의 제 1차 단계에서 갈조류(곰피, 우무가사리)에서 추출·분리·구조결정한 천연해양 신 기능성 활성물질을 세계 최초로 개발하였고 이를 모델로하여 수종의 유도체를 합성하여 합성분자들의 항산화, 항노화, 항발암 효과를 측정하였다. 그리하여 많은 활성 신기능성 활성물질 중 가장 우수한 항산화효과를 나타내는 분자들을 알아냈고 그 중 HS-1580은 L-ascorbic acid에 비해서도 약 60배정도의 항산화 능력을 보여주는 우수한 결과를 얻었다.

국외의 경우, 해양생물자원에 대한 관심의 고조에 해양천연물로부터 생리활성 펩타이드에 대한 생리활성 측정 방법, 분리·정제 기술, 구조결정방법 및 안정성 검사 등의 체계적인 확립이 이루어져 있으며, 개발에 대한 상당한 투자가 이루어지고 있다. 미국의 경우 National Sea Grant 사업을 통하여 대학들과 Scripps 해양 연구소를 비롯한 타기관의 연구소 및 제약회사에서 면역, 순환기 계통의 약물과 신경계약물 개발을 목표로 해양생물로부터 그리고 combinatorial library 접근방법으로 구조-활성에 관한 연구를 활발히 수행하고 있다.

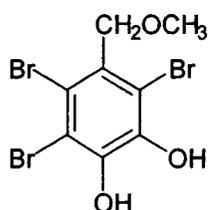
α -Tocopherol¹⁻²과 같은 여러 페놀류(ArOH)의 분자들이 항산화제로 알려져 있다. 현재 시판되고 있는 심장질환 치료제는 콜레스테롤의 흡수를 억제하는 phytosterol인 β -sitosterol, 혈 중 콜레스테롤을 떨어뜨리는 cholestyramine, LDL 산화를 억제시킴으로 심장질환을 개선하려는 항산화제인 Vt. C, Vt. E 외에 합성 항산화제인 Probucol, BO-653, bezafibrate 등이 사용되고 있고 HMG-CoA reductase inhibitor인 simvastatin, paravastatin 또는 lovastatin 등이 광범위한 심질환 치료제로 사용되고 있다. 노화의 일종인 심혈관계 질환의 대표적인 발병원인인 동맥경화는 LDL 산화에 의해 일어나며 이를 근본적으로 억제할 수 있을 때 질환의 예방 및 치료를 기대할 수 있다는 것이 정설로 되어있으므로 많은 연구진들이 LDL 산화를 억제시키면서 혈중 지질 농도 및 LDL-C 콜레스테롤을 낮추어 동맥경화 진행을 억제시키고, 피브린 분해활성도 높은 효과가 탁월한 물질의 개발에 힘쓰고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

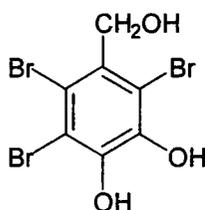
제 1 절 해양신기능성 물질의 유도체 합성을 위한 유기전합성방법 개발

1. 실험방법 및 결과

해양신기능성본 과제에서는 전년도에 해조류(곰피, 우무가시리)에서 추출, 분리, 구조결정한 천연해양 활성물질인 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzylether (TDB) 및 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol (TDB-OH)분자의 신규 유도체들을 합성하였으며 이들이 콜레스테롤 조절에 관여하는 LDL산화를 방지하는 효과를 확인할 수 있었다. 또한 미백효과를 면에서는 B16 melanoma cell line으로부터의 melanin 분비를 강력하게 억제하는 결과를 얻을 수 있었다.



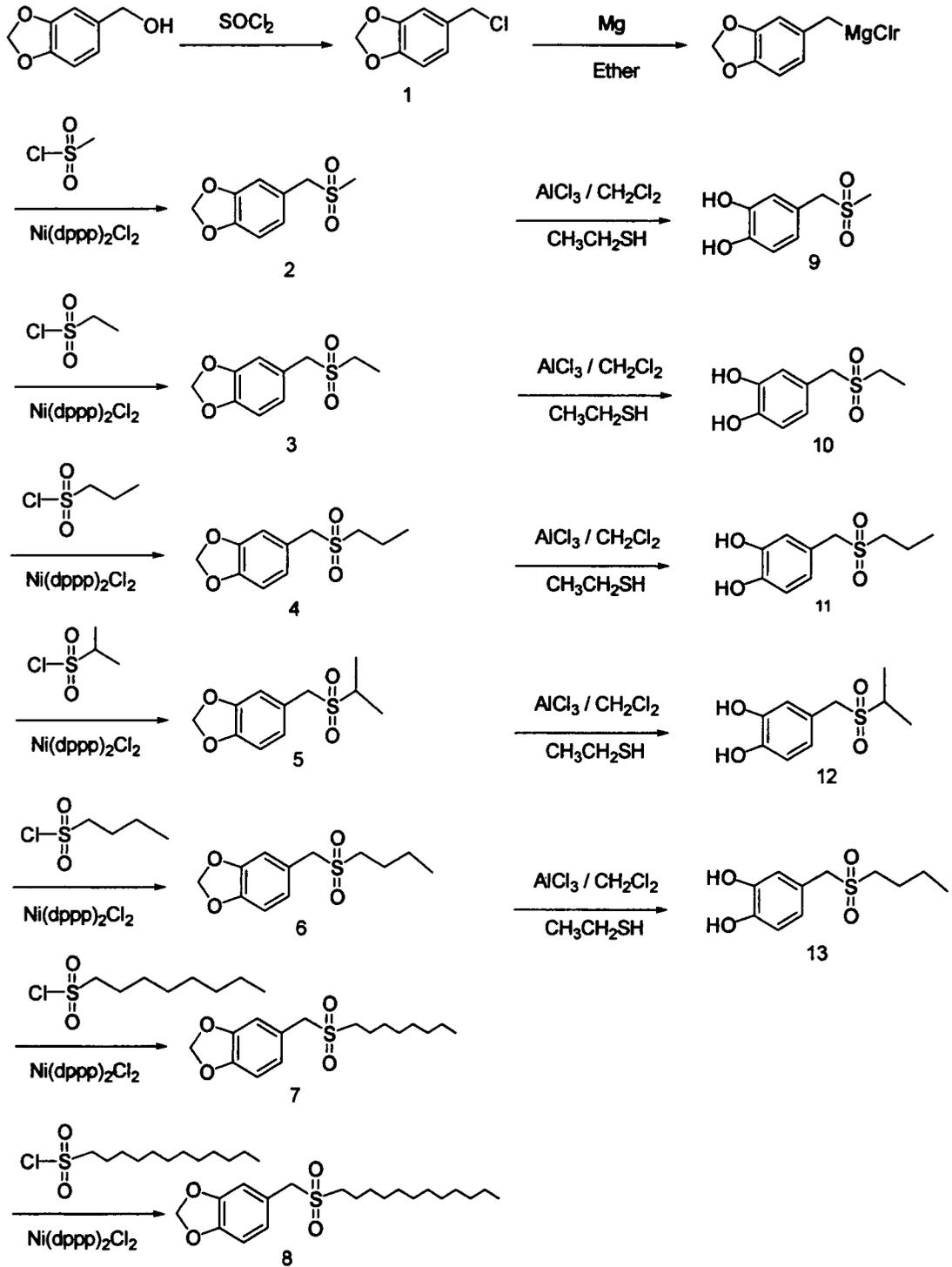
2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxy
benzyl methyl ether
(TDB)



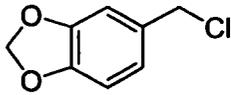
2,3,6-tribrom-4,5-dihydroxy
benzyl alcohol
(TDB-OH)

새로이 합성한 분자들의 합성법은 아래와 같다.

【반응식 1】

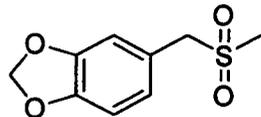


【화합물1】



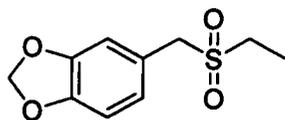
20g의 Piperonyl alcohol을 0℃에서 thionyl chloride 30ml에 녹인 후 10분간 교반시킨 후 천천히 가열하여 30℃에서 3시간동안 교반시킨다. 반응 종결 후에는 thionyl chloride을 모두 제거한 후 얼음물을 첨가하고 탄산 나트륨으로 pH 7정도까지 가한 다음 에틸아세테이트로 추출한 다음 메칠 알콜 : 디클로로메탄(2 : 98)을 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 화합물(1) 24.5g을 얻었다.

【화합물2 (HS1622)】



1.3g의 완전 건조한 마그네슘에 에테르를 넣고 9.7g의 화합물 1을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 천천히 첨가한다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. Ni(dppp)₂Cl₂(0.08g)와 methane sulfonylchloride (5g)을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 마그네슘 화합물을 천천히 첨가시킨다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. 반응이 종결된 후에는 얼음물을 첨가하여 희석시킨 후 염산을 사용하여 pH 7정도까지 중화시킨다. 에테르와 물로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 에틸아세테이트 : 헥산 (1 : 20)으로 컬럼크로마토그래피하여 화합물(2) 0.75g을 얻었다.

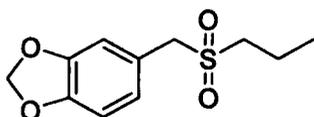
【화합물3 (HS1623)】



1.14g의 완전 건조한 마그네슘에 에테르를 넣고 8.6g의 화합물 1을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 천천히 첨가한다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. Ni(dppp)₂Cl₂(0.13g)와 ethane sulfonylchloride (5g)을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 마그네슘 화합물을 천천히 첨가시킨다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. 반응이 종결된 후에는 얼음물을 첨가하여 희석시킨 후 염산을 사용하여 pH 7정도까지

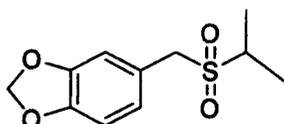
지 중화시킨다. 에테르와 물로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 에틸아세테이트 : 헥산 (1 : 20)으로 컬럼크로마도그래피하여 화합물(3) 1.07g을 얻었다.

【화합물4 (HS1624)】



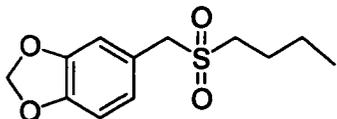
0.65g의 완전 건조한 마그네슘에 에테르를 넣고 5g의 화합물 1을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 천천히 첨가한다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. Ni(dppp)₂Cl₂(0.08g)와 propane sulfonylchloride (3.5g)을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 마그네슘 화합물을 천천히 첨가시킨다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. 반응이 종결된 후에는 얼음물을 첨가하여 희석시킨 후 염산을 사용하여 pH 7정도까지 중화시킨다. 에테르와 물로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 에틸아세테이트 : 헥산 (1 : 20)으로 컬럼크로마도그래피하여 화합물(4) 2.2g을 얻었다.

【화합물5 (HS1625)】



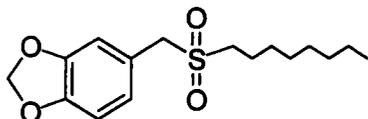
1.02g의 완전 건조한 마그네슘에 에테르를 넣고 7.78g의 화합물 1을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 천천히 첨가한다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. Ni(dppp)₂Cl₂(0.1g)와 isopropyl sulfonylchloride (5g)을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 마그네슘 화합물을 천천히 첨가시킨다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. 반응이 종결된 후에는 얼음물을 첨가하여 희석시킨 후 염산을 사용하여 pH 7정도까지 중화시킨다. 에테르와 물로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 에틸아세테이트 : 헥산 (1 : 20)으로 컬럼크로마도그래피하여 화합물(5) 2.3g을 얻었다.

【화합물6 (HS1626)】



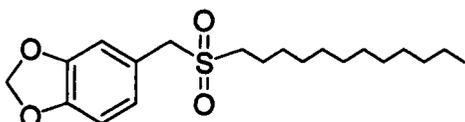
0.93g의 완전 건조한 마그네슘에 에테르를 넣고 7.1g의 화합물 1을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 천천히 첨가한다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. Ni(dppp)₂Cl₂ (0.1g)와 butane sulfonylchloride (5g)을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 마그네슘 화합물을 천천히 첨가시킨다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. 반응이 종결된 후에는 얼음물을 첨가하여 희석시킨 후 염산을 사용하여 pH 7정도까지 중화시킨다. 에테르와 물로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 에틸아세테이트 : 헥산 (1 : 20)으로 컬럼크로마토그래피하여 화합물(6) 0.45g을 얻었다.

【화합물7 (HS1627)】



0.69g의 완전 건조한 마그네슘에 에테르를 넣고 5.2g의 화합물 1을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 천천히 첨가한다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. Ni(dppp)₂Cl₂ (0.075g)와 octane sulfonylchloride (5g)을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 마그네슘 화합물을 천천히 첨가시킨다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. 반응이 종결된 후에는 얼음물을 첨가하여 희석시킨 후 염산을 사용하여 pH 7정도까지 중화시킨다. 에테르와 물로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 에틸아세테이트 : 헥산 (1 : 20)으로 컬럼크로마토그래피하여 화합물(7) 0.5g을 얻었다.

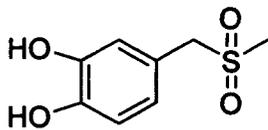
【화합물8 (HS1628)】



0.54g의 완전 건조한 마그네슘에 에테르를 넣고 4.1g의 화합물 1을 에테르에 녹

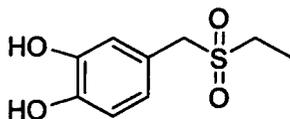
인 다음 0℃에서 천천히 첨가한다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. Ni(dppp)₂Cl₂ (0.054g)와 dodecane sulfonylchloride (5g)을 에테르에 녹인 다음 0℃에서 마그네슘 화합물을 천천히 첨가시킨다. 60℃까지 가열한 후 1시간정도 교반시킨다. 반응이 종결된 후에는 얼음물을 첨가하여 희석시킨 후 염산을 사용하여 pH 7정도까지 중화시킨다. 에테르와 물로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 에틸아세테이트 : 헥산 (1 : 20)으로 컬럼크로마토그래피하여 화합물(8) 0.5g을 얻었다.

【화합물9 (HS1630)】



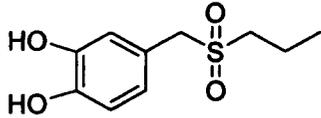
2.2g의 알루미늄 클로라이드를 정제된 메틸렌 클로라이드에 녹인다. 0℃에서 ethane thiol(10.2g)을 첨가한 후 화합물 2(1g)를 메틸렌 클로라이드에 녹여서 첨가한다. 다음 천천히 온도를 상승시켜 10℃를 유지시킨다. 반응이 종결된 후 디클로로 메탄 150ml로 묽히고 염화암모늄 용액으로 pH 2가 될 때까지 가한 다음 디클로로메탄고 물로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 메칠알코올 : 디클로로 메탄 (2: 98)을 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 화합물(9)을 60mg 얻었다.

【화합물10 (HS1631)】



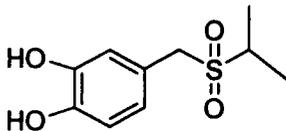
1g의 알루미늄 클로라이드를 정제된 메틸렌 클로라이드에 녹인다. 0℃에서 ethane thiol(13.6g)을 첨가한 후 화합물 3 (1g)을 메틸렌 클로라이드에 녹여서 첨가한다. 다음 천천히 온도를 상승시켜 10℃를 유지시킨다. 반응이 종결된 후 디클로로 메탄 150ml로 묽히고 염화암모늄 용액으로 pH 2가 될 때까지 가한 다음 디클로로메탄고 물로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 메칠알코올 : 디클로로 메탄 (2: 98)을 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 화합물(10)을 50mg 얻었다.

【화합물11 (HS1632)】



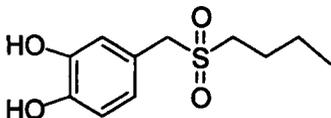
2.7g의 알루미늄 클로라이드를 정제된 메틸렌 클로라이드에 녹인다. 0℃에서 ethane thiol(12.7g)을 첨가한 후 화합물 4 (1g)을 메틸렌 클로라이드에 녹여서 첨가한다. 다음 천천히 온도를 상승시켜 10℃를 유지시킨다. 반응이 종결된 후 디클로로 메탄 150ml로 묽히고 염화암모늄 용액으로 pH 2가 될 때까지 가한 다음 디클로로메탄고 물로 추출하여 무수 황사마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 요리제로 메칠알코올 : 디클로로 메탄 (2: 98)을 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 화합물(11)을 45mg 얻었다.

【화합물12 (HS1633)】



6.3g의 알루미늄 클로라이드를 정제된 메틸렌 클로라이드에 녹인다. 0℃에서 ethane thiol(29.5g)을 첨가한 후 화합물 5 (2.3g)를 메틸렌 클로라이드에 녹여서 첨가한다. 다음 천천히 온도를 상승시켜 10℃를 유지시킨다. 반응이 종결된 후 디클로로 메탄 150ml로 묽히고 염화암모늄 용액으로 pH 2가 될 때까지 가한 다음 디클로로메탄고 물로 추출하여 무수 황사마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 요리제로 메칠알코올 : 디클로로 메탄 (2: 98)을 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 화합물(12)을 70mg 얻었다.

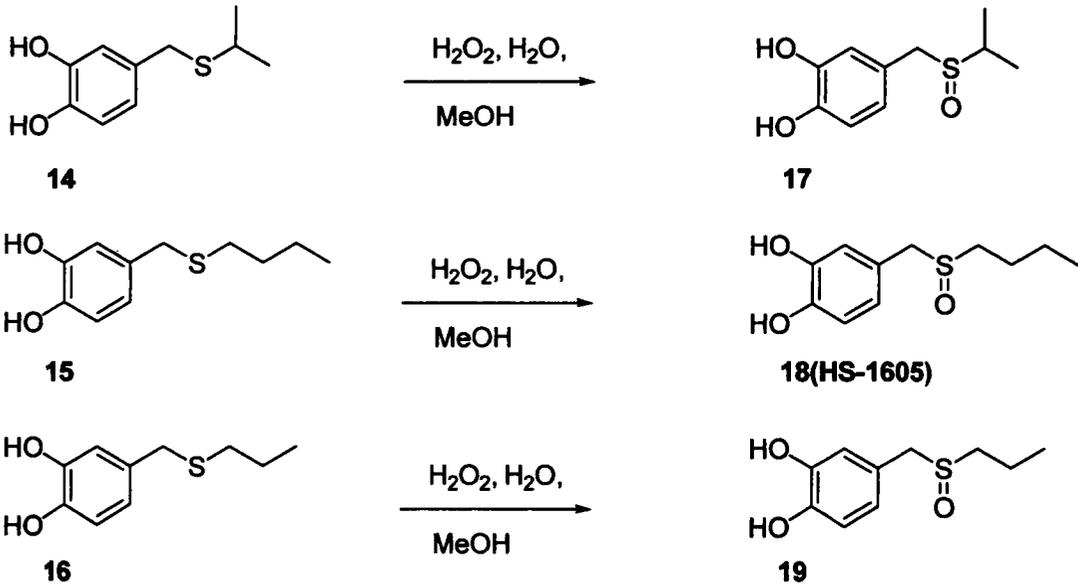
【화합물13 (HS1634)】



1.2g의 알루미늄 클로라이드를 정제된 메틸렌 클로라이드에 녹인다. 0℃에서 ethane thiol(5.5g)을 첨가한 후 화합물 6 (2.3g)을 메틸렌 클로라이드에 녹여서

첨가한다. 다음 천천히 온도를 상승시켜 10℃를 유지시킨다. 반응이 종결된 후 디클로로 메탄 150ml로 묽히고 염화암모늄 용액으로 pH 2가 될 때까지 가한 다음 디클로로메탄고 물로 추출하여 무수 황사마그네슘으로 건조시키고 용매를 제거한 다음 용리제로 메칠알코올 : 디클로로 메탄 (2: 98)을 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 화합물(13)을 30mg 얻었다.

【반응식 2】



【화합물17 (HS1604)】

본 과제에서 작년에 얻어진 화합물 (14) 198 mg을 5 ml의 메탄올에 녹인 후 과산화수소 1 mmol 수용액을 상온에서 가한후 40℃에서 12시간동안 교반하였다. 감압하에서 용매를 제거한 후, 용리제로 메칠알코올 : 디클로로메탄 (5:95)을 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 화합물(17) 212 mg을 얻었다. 이때 Rf는 0.32이었고 수율은 99%이었다.

【화합물18 (HS1605)】

본 과제에서 작년에 얻어진 화합물 (15) 210 mg을 5 ml의 메탄올에 녹인 후 과산화수소 1 mmol 수용액을 상온에서 가한 후 40℃에서 12시간동안 교반하였다. 감압하에서 용매를 제거한 후, 용리제로 메칠알코올 : 디클로로메탄 (5:95)을 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 화합물(18) 224 mg을 얻었다. 이때 Rf는 0.32이었고 수율은 99%이었다.

은 99%이었다.

【화합물19 (HS1603)】

본 과제에서 작년에 얻어진 화합물 (16) 198 mg을 5 mL의 메탄올에 녹인 후 과산화수소 1 mmol 수용액을 상온에서 가한후 40℃에서 12시간동안 교반하였다. 감압하에서 용매를 제거한 후, 용리제로 메칠알코올 : 디클로로메탄 (5:95)을 사용하여 컬럼크로마토그래피하여 화합물(19) 211 mg을 얻었다. 이때 Rf는 0.32이었고 수율은 99%이었다.

제 2 절 합성유도체의 고지혈증치료제로서의 기능성 연구

1. 실험방법

가. HS-1605 유도체의 in vitro 에서의 LDL 산화억제 효과 확인

(1) 시료 준비

Positive control인 Vit. C는 PBS buffer에 녹이며, 유도체는 EtOH에 녹여서 사용한다. Vit. C, 그리고 유도체는 1, 5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 희석하였다.

(2) LDL 준비

LDL(Sigma No. L-5402)을 구입하여 PBS buffer로 24시간 투석한 후, 0.45m syringe-mountable filter에 통과시켜 살균하여 사용하였다. LDL의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준으로 사용하여 Lowry법으로 정량하였다.

(3) TBARS 측정

0.1mg protein/ml의 LDL과 농도별로 만들어진 HS-Compounds가 함유된 LDL 산화 반응액에 Cu^{2+} 의 최종농도가 $5\mu\text{M}$ 가 되도록 첨가하고 alcohol 0.5%를 첨가하여 4시간 동안 40℃에서 산화시킨다. 산화된 LDL 반응액 1ml와 농도별로 제조된 malondialdehyde(MDA) 표준품 반응액에 0.4% TBA, 15% TCA, 2.5% HCl이 함유된 TBARS solution을 1ml 섞은 다음 그 반응 혼합액을 95~100℃ 수욕상에서 20분간 반응시켰다. 뜨거운 시료를 vortex해서 기포를 제거하고 찬물에서 식힌 후 2000rpm에서 10분간 원심분리 한 다음 상등액을 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료중의 TBARS의 농도는 malondialdehyde (MDA)로 만들어진 MDA의 표준곡선으로부터 구하여

MDA의 nmole로서 나타내었다.

(4) DPPH free radical 소거능 측정

각 시료의 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 소거 효과 측정방법은 다음과 같다. 각 농도별 시료 (1.25-120 μ g/mL)를 메탄올에 녹인 뒤 4mL씩 취하여 1.5 \times 10⁻⁴M 농도로 메탄올에 용해시킨 DPPH 용액 1mL과 잘 혼합하고 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후, 520nm에서 흡광도를 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내며, 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타낸다.

나. 동물사육

(1) C57BL/6J를 이용한 고콜레스테롤 혈증 치료효과에 관한 동물실험

저농도에서 LDL 억제 효과가 높고 대량유기 합성이 가능한 HS-1605의 지질저하 효과를 살펴보기 위해 고지혈증 치료제로 광범위하게 사용되고 있는 심바스타틴을 사용해서 비교 실험하였다.

(가) 고콜레스테롤 혈증유발

동맥경화 유발이 잘 되는 C57BL/6J mouse를 사용하여 1.25% 콜레스테롤을 함유한 paigen diet를 11주 동안 섭취시키면서 고 콜레스테롤 혈증을 유발하였다. 체중 20g의 수컷 C57BL/6J mouse를 5 마리씩 한 케이지에 넣어 사육하였다. 실험군은 콜레스테롤을 함유하지 않은 합성 사료를 섭취시키는 정상 대조군(N=10), paigen diet를 섭취시키는 실험 대조군(N=10), paigen diet를 공급하면서 HS-1605를 주사하는 HS-1605군(N=10) 그리고 paigen diet를 공급하면서 심바스타틴을 주사한 심바스타틴군(N=10) 으로 총 4개군 40 마리를 사육하였다. 사육실의 온도는 20 $^{\circ}$ C, 상대 습도는 55%을 유지하고, 12시간 간격으로 조명을 조절하였다. 식수는 병에 넣어 제한 없이 섭취하도록 하였다.

(나) 고콜레스테롤 혈증 치료효과

마우스를 군당 10마리씩 4군으로 나누어 정상군, 대조군, 심바스타틴군, HS-1605군으로 나누어 실험하였다. 고지혈증 환자인 성인을 60kg으로 볼 때 고지혈증 치료제 20mg을 투여하는 것을 기준으로 평균 20g인 마우스에는 0.0067mg의 HS-1605와 심바스타틴을 투여하도록 했다. 0.0013% 알코올에 녹인 HS-1605와 심바스타틴을 0.0067mg/20g/day로 34일간 복강투여하였고, 대조군은 0.0013% 알코올을 함유한 PBS를 동량 투여하였다. 실험기간 11주동안은 paigen diet로 사육하였다. 11주 사육후 마우스를 해부하여 장기를 적출하였다.

표 2-1. 실험 영양의 구성(Composition of experimental diet)

Ingredients	Normal group	Experimental group
Casein	20	20
Sucrose	10	40
Corn starch	13.25	13.25
Cocoa butter	7.5	7.5
Corn oil	7.5	7.5
Cholesterol	-	1.25
DL-Metionine	0.3	0.3
Vitamin	1	1
Mineral	3.5	3.5
Cellulose	5	5
Sodium cholate	0.5	0.5
Choline bitartrate	0.2	0.2

paigen diet 조성 (100g) -428 Kcal

* 정상군 (paigen diet에서 cholesterol을 뺀 것)

* 실험대조군 (paigen diet)

(다) 동물의 희생

11주 사육 후, 12시간 절식한 다음 에테르로 마취하였다. 헤파린 처리한 모세관으로 안구에서 채혈한 후, 심장, 신장, 비장, 간 등의 조직을 적출하여 0.9% 생리 식염수에서 씻은 다음 여과지로 수분을 완전히 제거하고 중량을 측정한 다음 -70℃ 냉동고에서 보관하였다.

간 독성 검사를 위해서 그리고 동맥은 동맥경화 정도를 주사전자 현미경으로 관찰하기 위하여 간은 외좌엽의 일부분을 10% NBF에 고정하고, 동맥은 Bouin액에 고정하였다.

(라) 혈중 콜레스테롤 분석

혈장 및 지단백증의 총 콜레스테롤 함량은 채취한 혈액으로부터 혈장을 구한 다음 cholesterol kit(Cholesterol E Kit BC 108-E, 아산제약)로 효소법에 의해 분석한다. 시료 0.02ml에 조제한 반응시약 3ml을 첨가하여 vortex mixer로 혼합하고 37℃ water bath에서 5분간 반응시켜 500nm에서 흡광도를 측정하고 콜레스테롤 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도 값을 다음 식에서 대입하여 혈장 및 각 지단백분획의 콜레스테롤 함량을 구한다.

$$\text{Cholesterol(mg/100ml)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{시료의 흡광도}} \times 300$$

(마) 혈중 중성지방 분석

혈장 및 지단백증의 중성지방 함량은 채취한 혈액으로부터 혈장을 구한 다음 triglyceride kit(Triglyceride kit, BC 118, 아산제약)로 효소법에 의해 분석한다.

실험방법은 총 콜레스테롤 측정시와 동일하고, 중성지방 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 550nm에서 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도 값을 다음 식에 대입하여 혈장 및 각 지단백 분획의 중성지방 함량을 계산하였다.

$$\text{Triglyceride(mg/100ml)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{시료의 흡광도}} \times 300$$

(바) 간의 지방 정량

Mouse의 간을 2g 씩 취하여 Folch 등의 방법을 수정하여 지방을 추출하고, chloroform으로 25ml이 되도록 정용하여 시료로 사용하였다.

간지방 추출액의 총 콜레스테롤 함량은 효소법에 의한 정량용 cholesterol kit(Cholesterol E Kit BC 108-E, 아산제약)로 측정하였다. 먼저 간지방 추출액을 0.1ml씩 취하여 water bath에서 용매를 모두 휘발시킨 뒤 0.2ml의 ethanol에 용해하였다. 반응액과의 혼탁을 방지하기 위하여 0.5% Triton X-100 0.5ml을 넣고 반응 시약 3ml을 첨가하여 교반하였다.

이것을 37℃ 수조에서 5분간 반응시켜 발색시킨 후, 500nm에서 흡광도를 측정하고 콜레스테롤 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정 한 후, 시료의 흡광도 값을 대입하여 혈장에서 함량과 동일한 방법으로 총 콜레스테롤 함량을 구하였다.

간 지방 추출액중의 중성지방 함량은 효소법에 의한 정량용 triglyceride kit(Triglyceride kit, BC 118, 아산제약)로 측정하였다. 실험 방법은 간의 총 콜레스테롤 측정시와 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도값을 대입하여 중성지방 함량을 구하였다.

(사) 간조직 손상 측정

간조직을 10% neutral buffered formalin(NBF)로 고정, 탈수시킨 후 paraffin으로 포매하고 이를 3~4 μ m 두께로 자른 다음 Hematoxylin-Eosin으로 염색하여 섬유 질화 정도를 광학 현미경으로 관찰하였다.

(아) 대동맥 지질침착도 측정

대동맥의 지질 침착정도를 측정해 보기 위하여 마우스의 동맥전체를 Bouin 용액으로 고정한 다음 automated image analysis (analySIS Image Processing; SIS, Germany)로 동맥의 두께를 측정하였다.

(자) 통계처리

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 고콜레스테롤 혈증 유발정도를 알아보기 위해서 정상 대조군과 실험 대조군 사이의 혈장 콜레스테롤 및 HDL-C, 그리고 LDL-C은 Student t-test로 0.05 유의수준에서 검증하였고 HS-1605와 심바스타틴의 고지혈증 치료효과를 확인하기 위하여 실험 대조군, HS-1605군 그리고 심바스타틴군의 유의성은 one-way ANOVA로 검증한 후 실험군간에 유의성이 발견되면 유의수준 0.05 에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

2. 실험결과

가. HS-1580계 화합물이 LDL 산화 억제 효과

HS-1580계 화합물의 LDL 산화에 대한 억제 효과를 살펴보면 Table 2에서 보는 바와 같이 HS-1580계 화합물은 LDL 산화에 대해 강력한 항산화능을 보여주고 있다. HS-1580계 화합물의 항산화 효과는 화합물 5 μ g을 첨가하였을 때 비타민 C가 약 40% 가량의 LDL 산화 억제 효과를 보인 것에 비해 HS-1580계 화합물을 약 50%에서 90% 저해 효과를 보여 항산화 효과가 비타민 C에 비해 높음을 알 수 있었다.

HS-1580계 화합물 중 저 농도에서 LDL 산화 억제가 효과가 높은 것은 HS-1579, HS-1581 그리고 HS-1605 이었으며, 이중 대량 합성이 가능한 HS-1605를 동물 실험용 물질로 선정하였다.

나. DPPH radical 소거능

HS-1580계의 유리기 소거능을 측정하고자 유도체의 농도를 0.1 μ g/ml 첨가하였을 때 도 2-3과 같이 비타민 C 보다 현저히 높은 0.84에서 0.91% 정도의 DPPH radical 소거능을 나타냈다.

다. 체중과 식이효율의 변화

Table 4는 11주 동안 정상 대조군 식이와 Paigen diet를 섭취한 실험 대조군과 Simvastatin군, HS-1605군의 체중과 식이효율을 살펴본 것이다.

4군 모두 처음 체중에서 최종적으로는 증가하는 현상이 있는 것을 볼 수 있고, 식이 섭취량은 2.34~2.74g/day 로 유의적인 차이가 없었다. 식이효율도 유의적인 차이가 없는 것을 볼 수 있다.

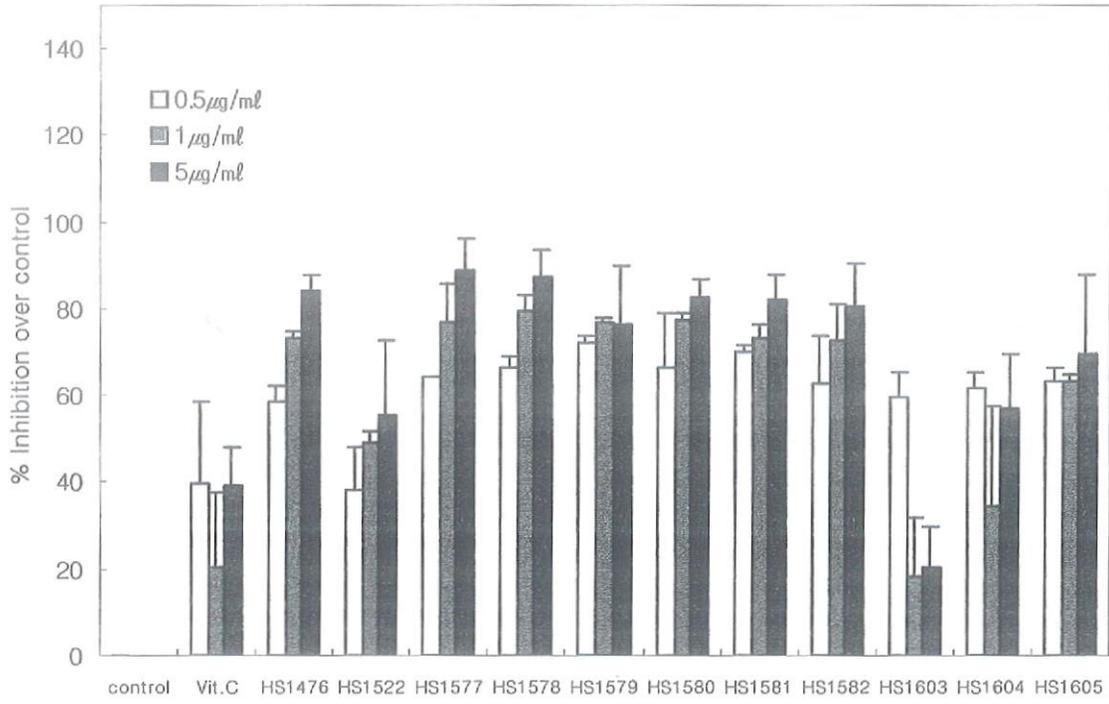
라. 장기무게

마우스의 장기무게는 표 2-5에 나타내었다. 간 무게는 정상 대조군군이 1.16g, 실험 대조군 2.06g, 심바스타틴군 1.82g, HS-1605군은 1.88g으로 정상 대조군은 모든 실험군에 비해 가벼웠고 이는 통계적으로 유의하였다. ($p < 0.05$)

심장무게는 4군모두 0.10g으로 각 군간에 차이가 없었고, 다른 장기인 폐, 신장, 비장, 뇌, 고환도 각 군간에 차이가 없는 것을 볼 수 있다.

표2-2. LDL 산화에 대한 HS-1580계의 항산화 효과(The antioxidant effect of HS-1580 derivatives against LDL oxidation)

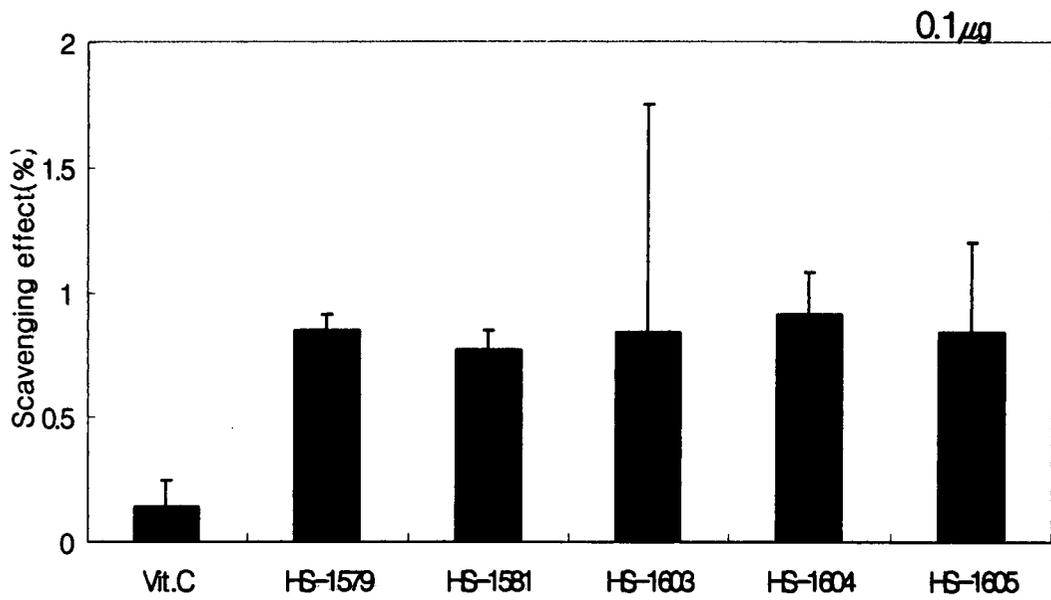
Sample	% Inhibition over Control		
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$
Control		0	
Vit. C	36.67 \pm 19.02	20.56 \pm 17.13	38.99 \pm 9.07
HS1476	58.62 \pm 3.76	73.39 \pm 1.39	84.1 \pm 3.49
HS1522	38.02 \pm 10.19	48.92 \pm 2.58	55.28 \pm 17.4
HS1577	64.37 \pm 0.02	76.85 \pm 9.01	88.74 \pm 7.43
HS1578	66.36 \pm 2.56	79.39 \pm 3.55	87.09 \pm 6.48
HS1579	72.05 \pm 1.67	76.65 \pm 1.47	76.15 \pm 13.67
HS1580	66.59 \pm 12.33	77.54 \pm 1.46	82.72 \pm 3.83
HS1581	70.23 \pm 1.53	73.27 \pm 3.28	81.96 \pm 6.04
HS1582	62.72 \pm 10.86	72.41 \pm 8.34	80.51 \pm 9.75
HS1603	59.82 \pm 5.65	18.36 \pm 13.54	20.58 \pm 9.15
HS1604	61.87 \pm 3.34	34.65 \pm 22.76	57.18 \pm 12.39
HS1605	63.06 \pm 3.13	62.98 \pm 1.61	69.71 \pm 17.85



도2-1. LDL 산화에 대한 HS-1580계의 항산화 효과(The antioxidant effect of HS-1580 derivatives against LDL oxidation)

표 2-3. HS-1580계 유도체의 DPPH 유리기 소거능 (DPPH radical scavenging activity of HS-1580 derivatives)

Group	DPPH scavenging effect(%)
	0.1 μ g/ml
Control	0
Vit. C	0.14 \pm 0.11
HS-1579	0.85 \pm 0.06
HS-1581	0.77 \pm 0.08
HS-1603	0.84 \pm 0.91
HS-1604	0.91 \pm 0.17
HS-1605	0.84 \pm 0.36



도 2-2. HS-1580계 유도체의 DPPH 유리기 소거능 (DPPH radical scavenging activity of HS-1580 derivatives)

표 2-4. 11주 동안 paigen diet 섭취 후의 체중, 식이 섭취, 식이효율의 변화
(Change in Body weight, food intake and food efficiency ratio(FER)of
mouse fed paigen diets for 11 weeks)

	Normal	Control	Simvastatin	HS-1605
Body weight				
Initial weight(g)	20.24±1.68 ^{NS}	20.72±0.30 ^{NS}	17.91±1.94 ^{NS}	20.97±0.47 ^{NS}
Final weight(g)	22.32±0.66	21.35±1.22	21.90±0.78	21.68±0.39
weight gain(g/day)	0.03±0.01	0.01±0.01	0.05±0.04	0.01±0.01
Food intake(g/day) & FER				
Food intake(g/day)	2.74±0.79 ^{NS}	2.34±0.82 ^{NS}	2.41±0.77 ^{NS}	2.55±0.78 ^{NS}
Food efficiency ratio(FER)	0.81±5.39	0.89±4.61	1.82±6.36	0.12±2.04

NS : not significance

Food efficiency ratio (%) = (weight gain(g) / food intake(g)) × 100

표 2-5. 11주 동안 paigen diet 섭취 후의 장기의 무게
(Liver, Heart, Lung, Kidney, Spleen, Brain, Testis weight of mouse fed paigen
diet for 11 weeks)

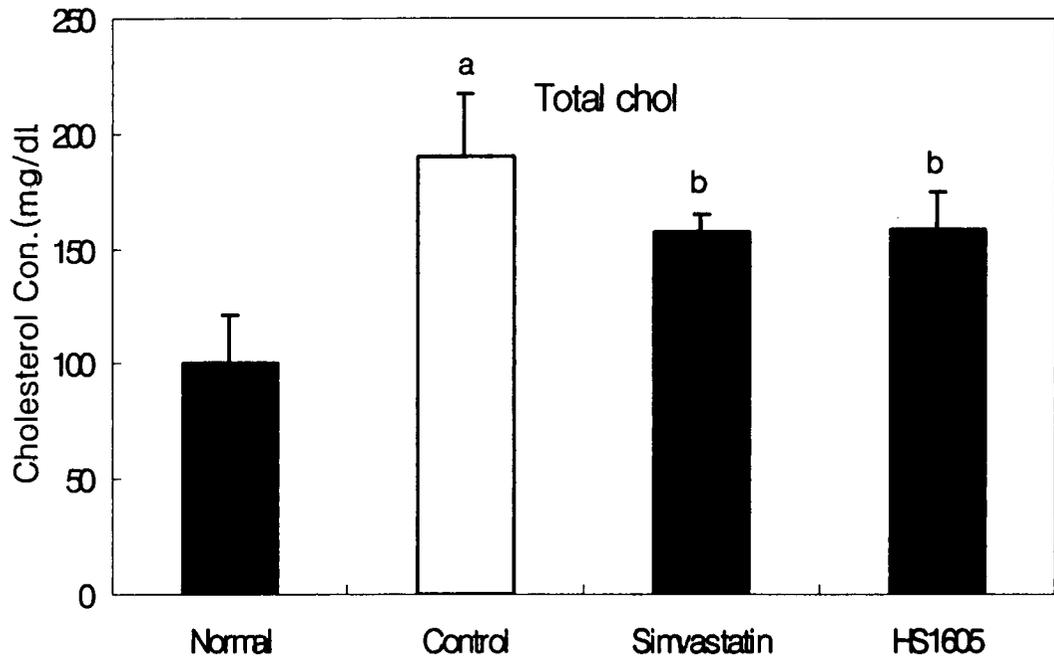
Group	Weight, g						
	Liver	Heart	Lung	Kidney	Spleen	Brain	Testis
Normal	1.16±0.20	0.10±0.02	0.16±0.05	0.29±0.05	0.07±0.01	0.40±0.07	0.15±0.02
Control	2.06±0.20	0.10±0.01	0.19±0.05	0.26±0.04	0.07±0.02	0.43±0.04	0.14±0.02
Simvastatin	1.92±0.24	0.10±0.02	0.20±0.08	0.25±0.04	0.09±0.02	0.43±0.03	0.15±0.02
HS-1605	1.98±0.23	0.10±0.02	0.15±0.06	0.26±0.02	0.08±0.03	0.42±0.03	0.15±0.02

표 2-6. 동맥경화 유발식이(pagien diet)를 11주 동안 섭취한 마우스의 혈장 지질 농도(Plasma lipids concentrations of mouse fed pagien diet for 11 weeks)

Group	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	HDL cholesterol (mg/dl)	LDL cholesterol (mg/dl)
Normal	100.17±21.20	161.41±3.82	60.44±5.37	7.45±17.89 ^b
Control	190.27±27.45 ^a	157.42±5.57 ^{NS}	51.00±4.2 ^{NS}	107.78±28.46 ^{Aa}
Simvastatin	156.74±8.14 ^b	154.26±6.12	54.64±6.08	71.25±2.81 ^b
HS-1605	158.65±15.80 ^b	156.42±1.99	58.04±8.03	69.33±19.25 ^b

a-cDate were significantly different analyzed by one-way Anova followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

NS : not significance



도 2-3. HS-1605의 혈장 콜레스테롤 저하효과
 (The effect of HS-1605 on decreasing plasma cholesterol)

마. 혈장 지질 농도 변화

(1) 혈장 콜레스테롤 농도

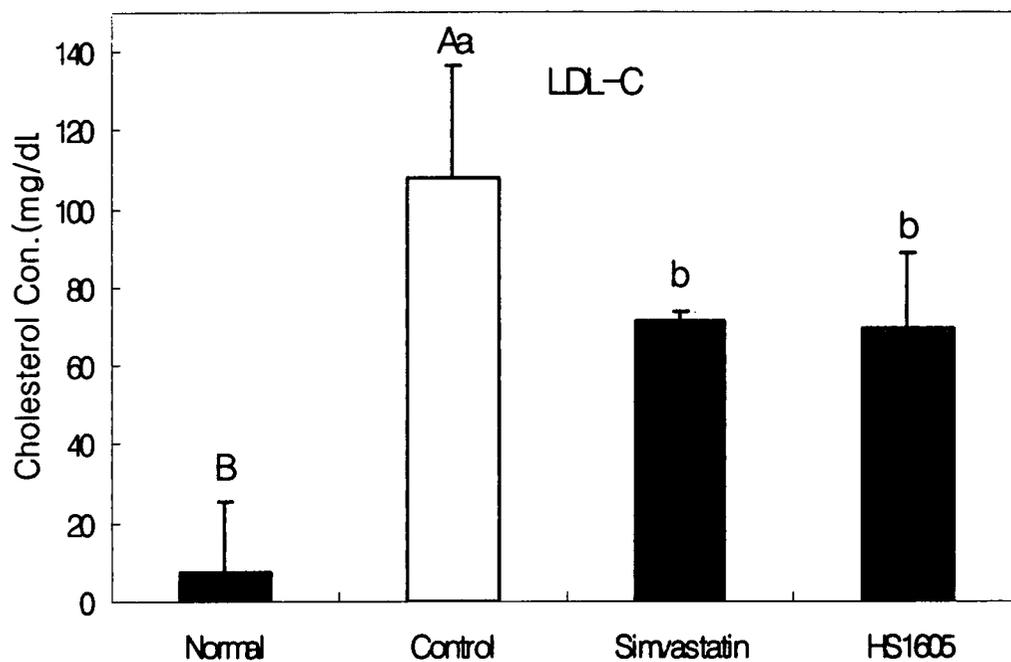
콜레스테롤이 1.25% 첨가된 paigen diet를 섭취한 마우스의 혈장 지질 농도는 190.27mg/dl로 콜레스테롤을 섭취하지 않은 정상 대조군의 100.17mg/dl에 비해 약 200% 증가하여 고지혈증이 유발된 것으로 생각된다(표2-6). HS-1605의 고지혈증 치료효과를 살펴보았을 때 HS-1605군은 158.65mg/dl로 실험 대조군에 비해 약 17% 정도 유의적으로 감소하였고(도2-3, $p < 0.05$) 이는 고지혈증 치료제로 광범위하게 사용되는 심바스타틴의 지질저하효과(18% 감소)와 유사하였다.

(2) LDL 콜레스테롤 농도

11주 사육 후의 LDL 콜레스테롤 농도는 정상 대조군이 7.45, 실험 대조군이 107.78 Simvastatin군은 71.25, HS-1605 군은 69.33 mg으로, 정상 대조군에 비해 실험 대조군이 10배 이상 높아($p < 0.05$) 콜레스테롤 식이를 장기간 공급하면 고콜레스테롤 혈증이 유발될 수 있음을 확인하였다(도2-4). HS-1605 투여시 LDL-C의 저하 효과를 살펴보았을 때, 실험 대조군에 비해 HS-1605 군은 36% 정도 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$) 이는 심바스타틴 투여시 LDL-C이 33% 감소한 결과와 유사하여 혈장 총콜레스테롤 결과와 동일한 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 HS-1605가 고콜레스테롤 혈증 치료제로 개발 가능성이 있음을 나타낸다고 생각한다.

식이와 조직에서 공급된 콜레스테롤은 간과 장에서 분비되는 지단백질의 구성성분에 포함되어 free cholesterol(FC) 또는 cholesteryl ester(CE)의 형태로 혈장내로 분비되거나, 또는 다른 조직의 세포막에서 분비되어 혈장 지단백질입자내로 이동한다. Chylomicron과 VLDL은 체내로 흡수되는 외인성 TG와 체내에서 합성되는 내인성 TG를 조직으로 운반하는 역할을 한다. 그리고 혈장내에서 VLDL로부터 전환되는 LDL은 혈장 콜레스테롤을 steroidogenic tissue로 수용하는 운반체 역할을 하며 심장순환기 계통의 질병에 대한 위험인자로 알려져 있다. 따라서 LDL은 동맥경화 인자로 분류되고 LDL 산화는 동맥경화를 일으키는 직접적인 원인이 되고 있다. 혈중 콜레스테롤은 거대한 지단백질분자의 형태로 움직이며 이중 약 3/4은 LDL을 형성하며 혈중 LDL 농도와 동맥경화증 발병빈도의 비례관계는 지금까지 잘 알려져 있다. 식생활 환경의 향상에 따른 육류섭취의 증가로 인한 과다한 콜레스테롤의 섭취는 결국 세포의 요구를 충족시키고도 남게 되어 이는 곧 혈액내, 주로 LDL 입자에 포함되어 떠돌다가 monocyte, macrophage 등과 함께 혈관내막에 흡착되어 거품세포로 전환하는데 기여하게 되며, 이와 같은 콜레스테롤 침착에 의해 두터워진 동맥내벽은 혈액순환 장애를 일으키게 된다.

도2-4. HS-1605의 LDL-C 저하효과
(The Decreasing effect of HS-1605 on LDL cholesterol)



a-cData were significantly different by one-way Anova followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

A, BData were significantly different.

(3) HDL 콜레스테롤 농도

11주 사육 후의 HDL 콜레스테롤 농도는 정상 대조군이 60.44, 실험 대조군은 51.00 mg/dl로 콜레스테롤 식이에 의한 HDL-C의 저하 현상은 살펴볼 수 없었다. 뿐만 아니라 HS-1605군의 HDL-C 농도는 58.04 mg/dl으로 실험 대조군의 HDL-C 농도에 비해 유의적인 차이가 없었고, 이는 심바스타틴 투여군에서도 유사하게 나타나, HS-1605나 심바스타틴은 고콜레스테롤 혈증은 치료할 수 있으나, HDL-C을 증가시키는 효과는 살펴볼 수 없었다(도2-5). HDL 콜레스테롤은 조직 중의 콜레스테롤을 받아들여 간으로 운반함으로써 혈장 콜레스테롤 농도를 떨어뜨려 동맥경화를 예방하는 지단백이다.

(4) 혈장 중성지질 농도

11주 사육 후의 혈장 중성지질 농도는 정상군이 161.41, 실험 대조군이 157.72mg/dl로 고콜레스테롤 식이에 의한 중성지방농도의 유의적인 변화는 살펴볼 수 없었다. 그리고, HS-1605 군의 중성지방 농도는 156.42 mg/dL로 실험대조군과 유의적인 차이가 없었고, 심바스타틴군 역시 중성지방 농도 저하 현상을 보이지 않았다(도2-6).

바. 간의 지질 농도

동맥경화 식이를 투여한 마우스의 간지질 농도를 표2-7에 나타내었다.

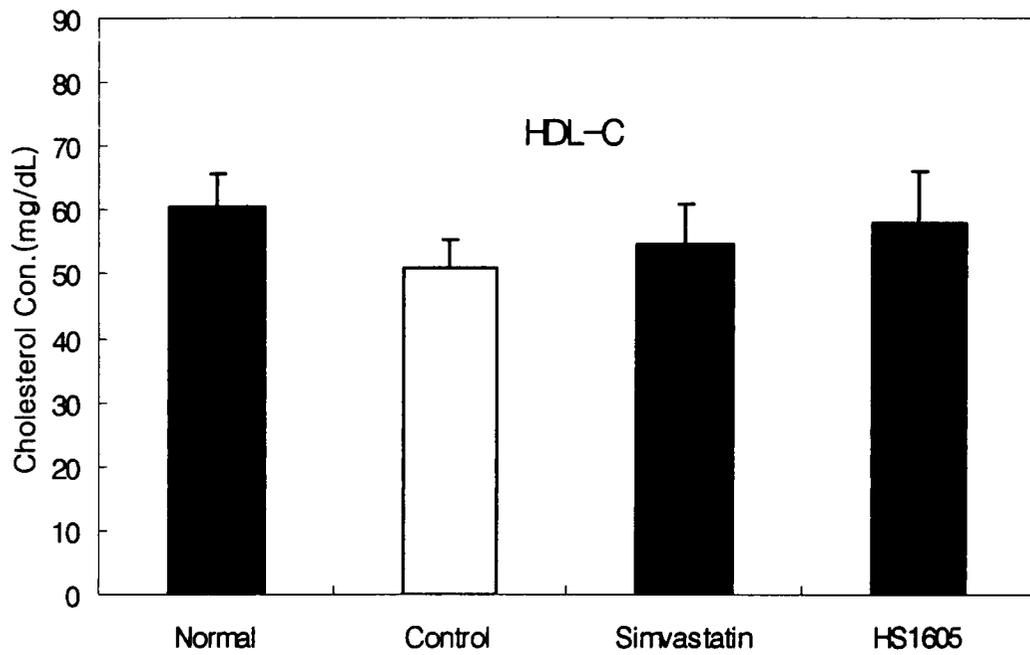
(1) 간의 콜레스테롤 농도

콜레스테롤 1.25% 첨가된 paigen diet를 섭취한 마우스의 간의 지질 농도 변화는 Table 6에서 보는 것과 같이 나타났고, 간의 콜레스테롤 농도는 11주 사육 후 정상 대조군은 23.78, 실험 대조군은 63.59, Simvastatin 군은 51.15이며, HS-1605 군은 52.85mg/g 이었다. 실험 대조군의 간 콜레스테롤 농도는 정상 대조군에 비해 약 2.5배 정도 높아 혈장에서와 마찬가지로 고콜레스테롤 식이를 섭취시켰을 때 간의 콜레스테롤 농도가 유의적으로 상승함을 알 수 있었다. 그리고 HS-1605을 투여하였을 때 간의 콜레스테롤 농도는 17% 유의적으로 감소하여 심바스타틴(20% 감소)과 유사한 결과를 나타내었다(도2-7, $p < 0.05$).

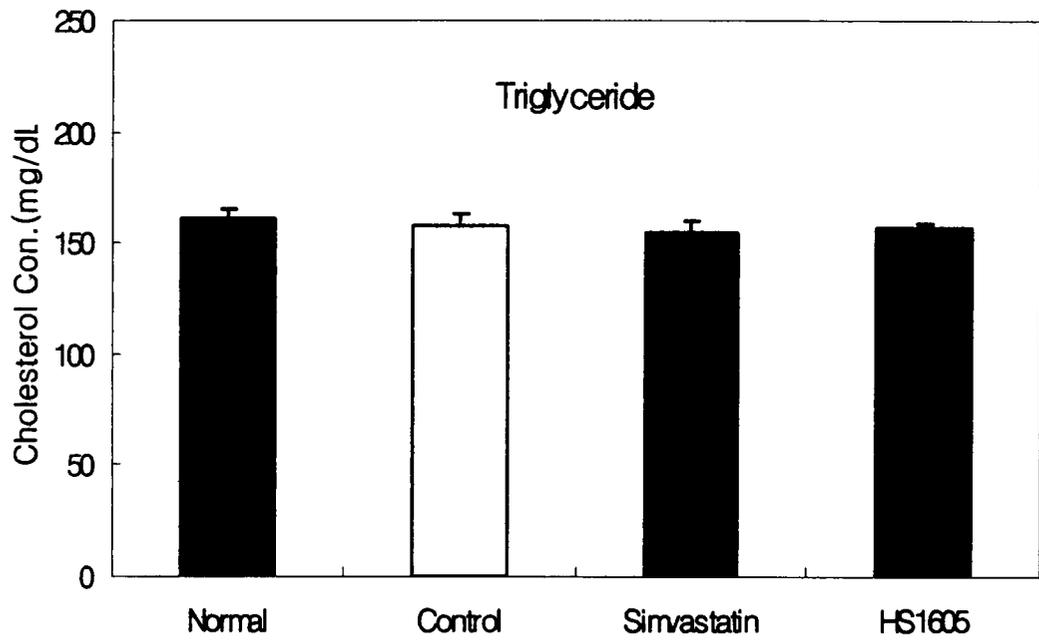
(2) 간의 중성지방 농도

콜레스테롤 1.25% 첨가된 paigen diet를 섭취한 마우스의 간의 중성지방 농도는 정상 대조군은 47.80, 실험 대조군은 40.53, Simvastatin 군은 49.14 그리고, HS-1605는 47.60 mg/g으로 군간 유의성이 없는 것으로 나타났다.

도2-5. HS-1605의 HDL-C 증가효과
(The increasing effect of HS-1605 on HDL-Cholesterol)



a-cDate were significantly different by one-way Anova followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.



도2-6. HS-1605가 11주 동안 동맥경화 유발식이를 섭취한
 마우스의 혈장중성지방농도에 미치는 영향

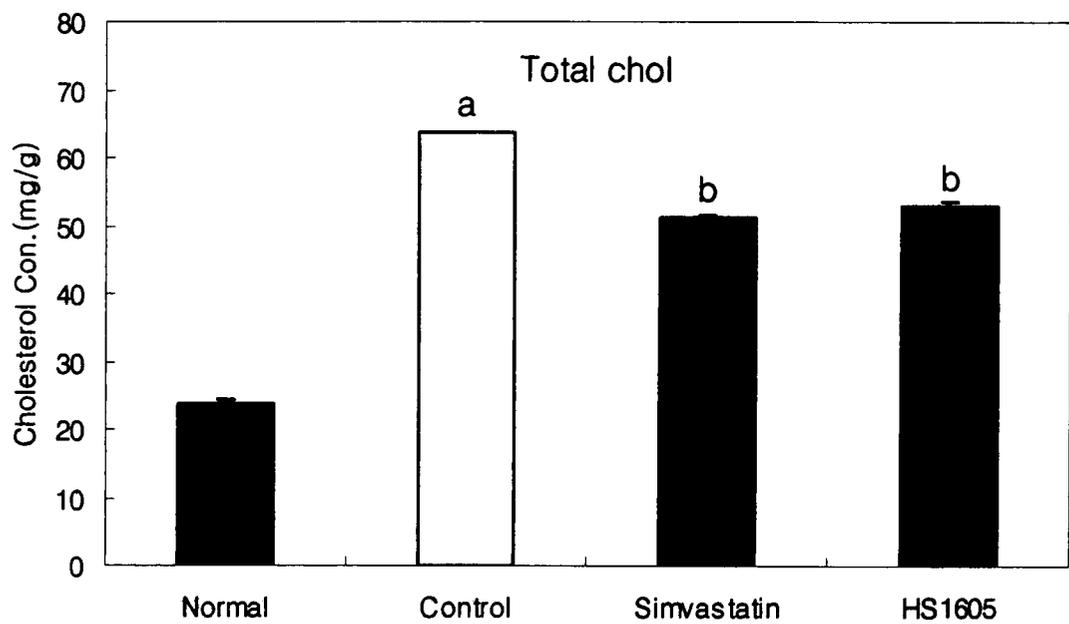
(The effect of HS-1605 on plasma triglyceride concentration of mouse fed
 paigen diet for 11 weeks)

표2-7. 동맥경화식이를 11주간 투여한 마우스의 지질농도
(Hapatic lipids concentrations of mouse fed paigen diet for 11 weeks)

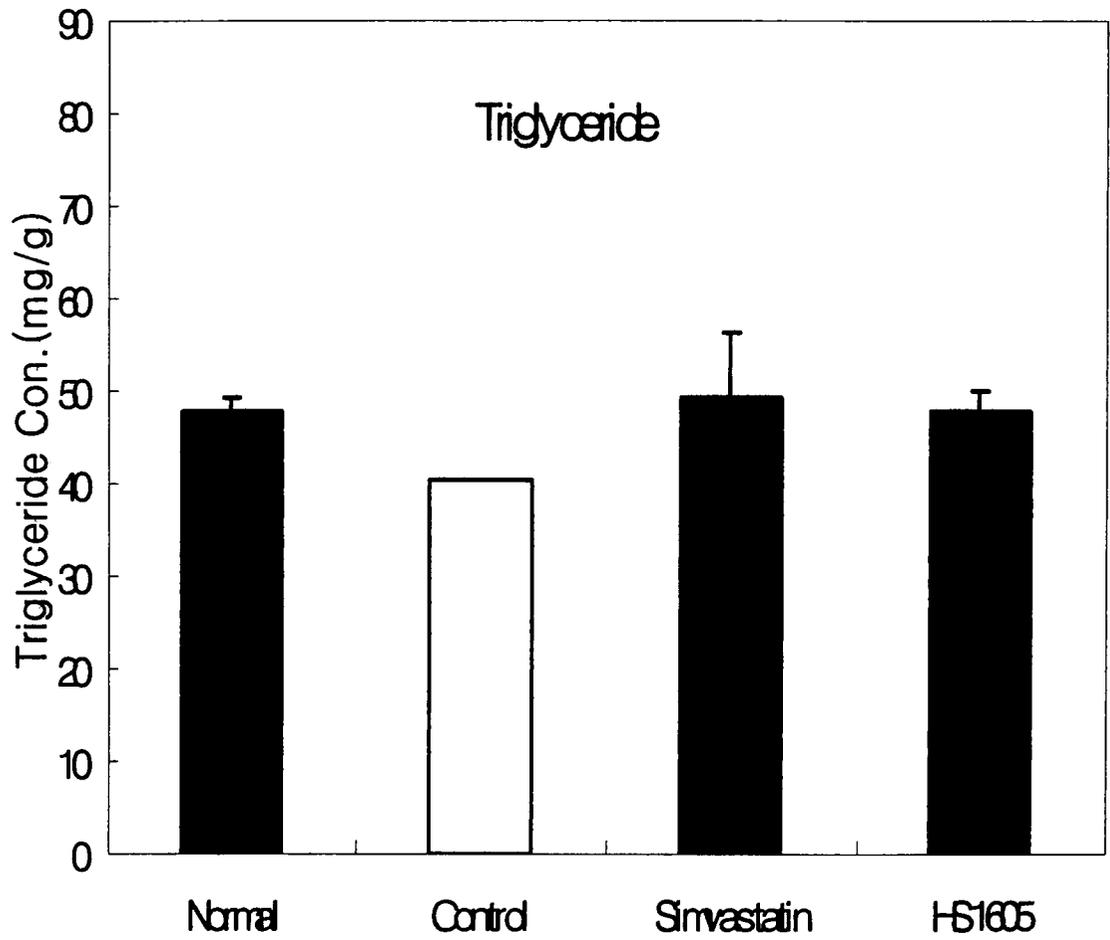
Group	Lipids(mg/g)	
	Total cholesterol	Triglyceride
Normal	23.78±0.54	47.80±1.35
Control	63.59±0.00 ^a	40.53±0.00 ^{NS}
Simvastatin	51.15±0.45 ^b	49.14±7.16
HS-1605	52.82±0.73 ^b	47.60±2.37

a,bDate were significantly different by one-way Anova followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

NS : not significance



도2-7. 11주 동안 piagen diet를 먹인 쥐의 hepatic cholesterol 농도
 (Hapatic cholesterol concentration of mouse fed paigen diet for 11 weeks)



도2-8. 11주 동안 paigen diet를 먹인 쥐의 hepatic triglyceride 농도
 (Hepatic triglyceride concentration of mouse fed paigen diet for 11 weeks)

사. 간독성 억제효과

고콜레스테롤 식이를 섭취시킨 실험대조군의 간 독성 현상을 살펴보았을 때(표 2-8) 지질 침착정도 (도2-9)와 간의 섬유질화 (도2-10)현상이 현저하게 진행되었음을 알 수 있었다. HS-1605를 투여하였을 때 간의 지방침착 정도는 실험대조군에 비해 그 정도가 약화되었으나 유의적이지 않았으며, 심바스타틴과 유사한 결과를 나타내었다. 그리고 간의 섬유질화 현상도 HS-1605 투여에 의해 다소 억제되었으나 심바스타틴 보다 좋은 효과를 나타내지는 않았다. 현재 고콜레스테롤혈증 치료제로 사용되는 심바스타틴계 물질은 콜레스테롤을 저하시킬 수 있으나 간에 독성이 나타나는 것이 지적되고 있다.

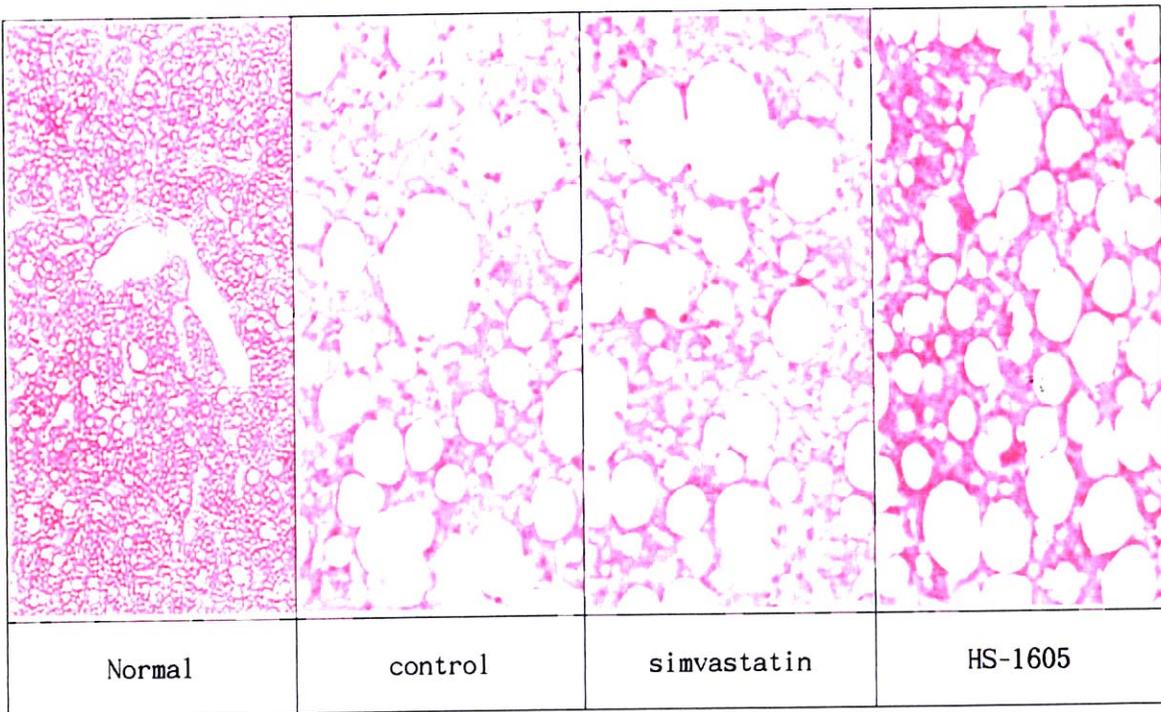
아. 동맥경화 억제효과

HS-1605의 동맥경화 억제 효과를 살펴보기 위하여 동맥 내벽의 두께를 측정하였다(도2-9). 1.25% 콜레스테롤을 함유한 식이를 11주간 섭취시켰음에도 불구하고, 실험대조군에서 충분한 동맥경화가 유발되지 않아 HS-1605의 동맥경화 억제 효과를 살펴볼 수 없었다. 일반적으로 paigen diet로 4개월 이상 사육하였을 때 C57BL/6J mouse에 동맥경화가 유발된다고 알려져 있어, 본 연구에서는 HS-1605의 효과를 살펴보기 위해서 장기간의 실험이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

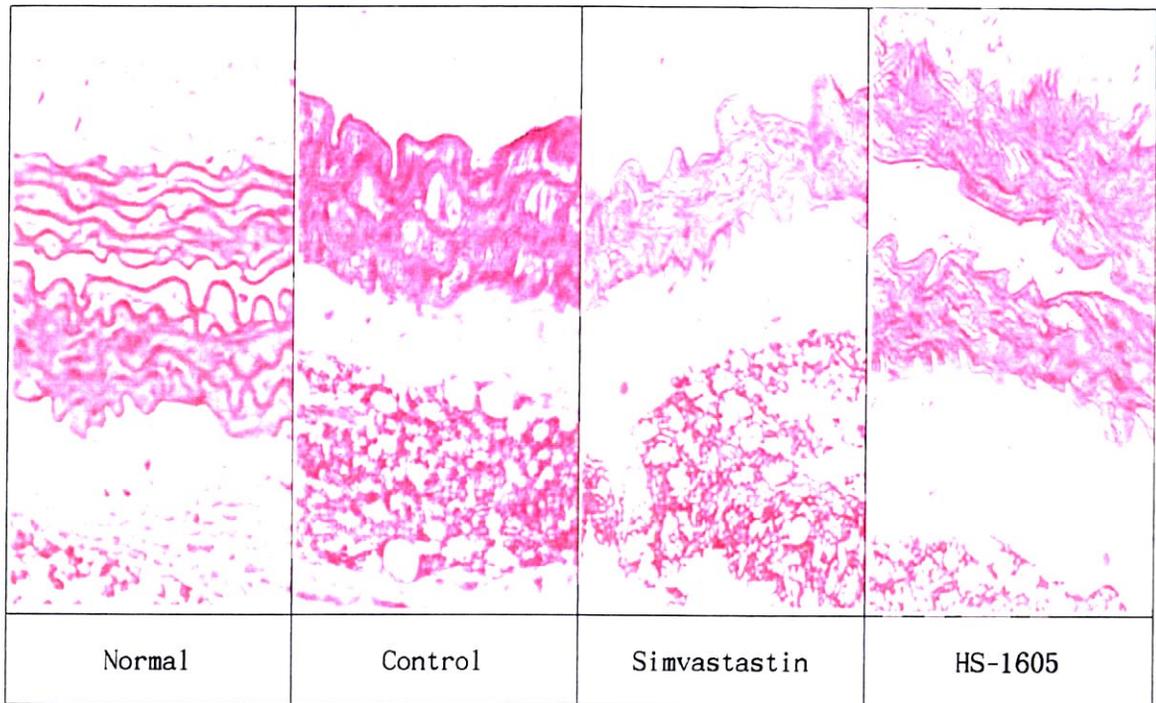
표2-8. 간의 비정상 수치 (The degree of abnormalities of liver)

	Degeneration of hepatocytes(lipidosis)			Hyperplasia of connective tissue (Fibrosis)
	Central	Peripheral	Portal triad	
Normal	+++	+	±	±
Control	++++	+++	+	+
Simvastatin	++++	+++	+	++
HS-1605	++++	+++	±	+

Degrees, not detected(-), very slight(±), slight(+), moderate(++), severe(+++) and very server(++++)



도2-9. 간 (The Liver)



도2-10. 간 (The Liver)

표2-9. 동맥벽의 두께 (Thickness of wall of the Aorta)

	Total thickness
Normal	68.80±9.61
Control	71.15±19.90
Simvastatin	68.95±13.32
HS-1605	76.20±14.44

제 3 절 TDB 유도체 (HS-1580, -1581, -1582)가 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 미치는 영향

1. 실험방법

가. 실험재료

Lipopolysaccharide (LPS), actinomycin D (ACD), cycloheximide (CHX) 및 bovine serum albumin (BSA)는 Sigma사 (St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. Phosphate-buffered saline (PBS), fetalbovine serum (FBS) 및 RPMI 1640 medium은 GIBCO사 (Grand Island, USA)에서 구입하였다. Anti-mouse iNOS monoclonal antibody 와 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 는 Transduction Laboratories (Lexington, USA)에서 구입하였으며 NG-Monomethyl-L-arginine (NMMA)는 Tocris사 (Bristol, UK) 제품을 사용하였다. 그 이외의 시약은 특급시약을 사용하였다.

나. 세포배양 및 시료처리

Raw 264.7 macrophages는 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 RPMI 배지를 사용해서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. TDB 유도체 시료는 100% 에탄올에 용해 후 배지에서 0.5% 에탄올이 되도록 하였으며 LPS 처리 1시간 전에 먼저 처리하였다.

다. 세포 생존율 측정

Raw 264,7 세포 (1 x 10⁵/well/100 ul)를 96 well plate에서 1일간 배양한 뒤 LPS 및 시료를 처리하고 24시간후에 sulforhodamine B (SRB) 방법으로 측정하였다.

라. NO 정량

Raw 264,7 세포 (1 x 10⁵/well)를 96 well plate에서 24 시간 배양후, phenol red가 첨가되지 않은 RPMI 배지로 교체하였다. 시료처리 1시간후에 ,LPS를 가하였고 24시간 후에 50 ul의 배양 상등액에 동량의 Griess 시약을 가한후 10분뒤에 550 nm에서 흡광도를 측정하여 NO를 직접 nitrite로서 정량하였다. 표준물질로서는 sodium nitrite를 사용하였다.

마. Western blot analysis

5 x 10⁶ 개의 세포를 PBS (pH 7.2)로 세척후 300 ul의 lysis buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Nonidet P-40, 1 mM

phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 ug/ml leupeptin, 20 ug/ml aprotinin)를 가하고 sonication한 후 10,000 g 에서 10분간 원심부리한 후 상등액을 취하였다. Cell lysate (40 ug protein)를 8% polyacrylamide gel로 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 이행시켰다. Blot을 5% non-fat milk으로 blocking 한 후 anti-mouse monoclonal iNOS antibody와 2,500 희석비율로 상온에서 1시간 반응시켰다. 세척후 1000배 희석비율로 horsersdish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG와 상온에서 1시간 반응시켰고 ECL detection system을 사용하여 전개하였다.

2. 실험결과 및 고찰

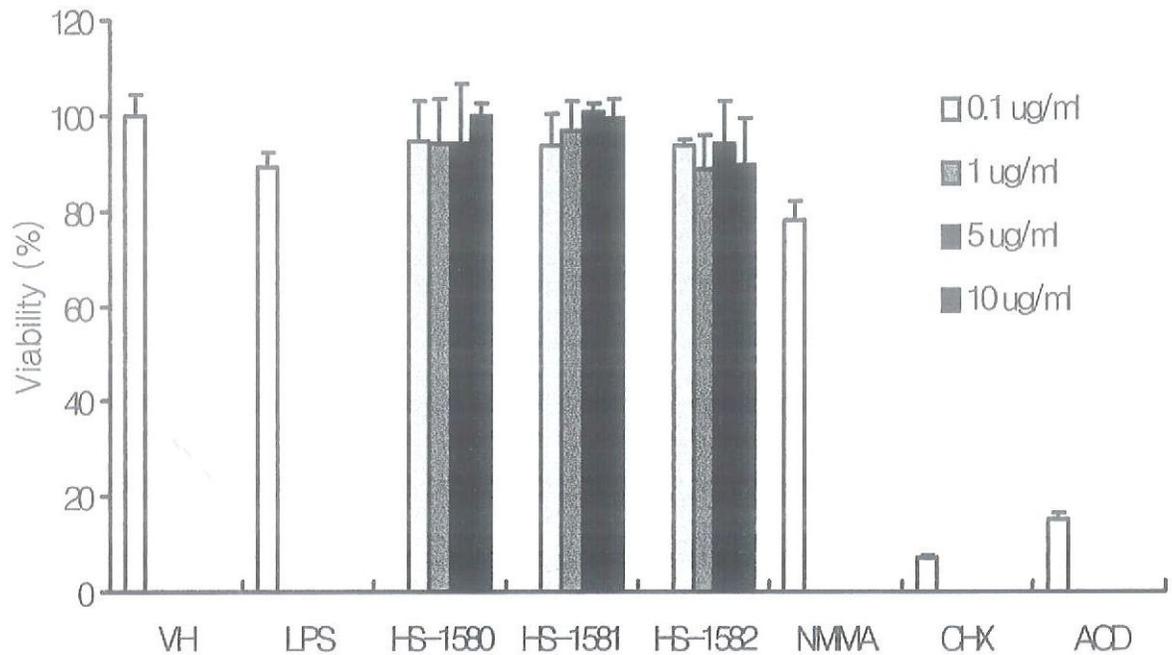
가. TDB 유도체의 세포생존에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에 각 화합물을 0.1, 1, 5, 10 ug/ml 처리하고 세포 생존을 SRB 방법으로 관찰하였다. 그 결과 이들 화합물은 10 ug/ml 농도까지 세포 생존에 큰 영향을 미치지 않았다 (도3-1). LPS (lypopolysaccharide) 1ug/ml 처리시 세포생존율은 약 90 %이였으며 NOS의 저해제인 NMMA (NG-monomethyl-L-arginine) 1 mM 처리시 세포생존율은 78 %였고 transcription inhibitor인 ACD (actinomycin D)와 translation inhibitor인 CHX (cycloheximide)는 현저하게 세포생존을 억제하였다.

나. LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향

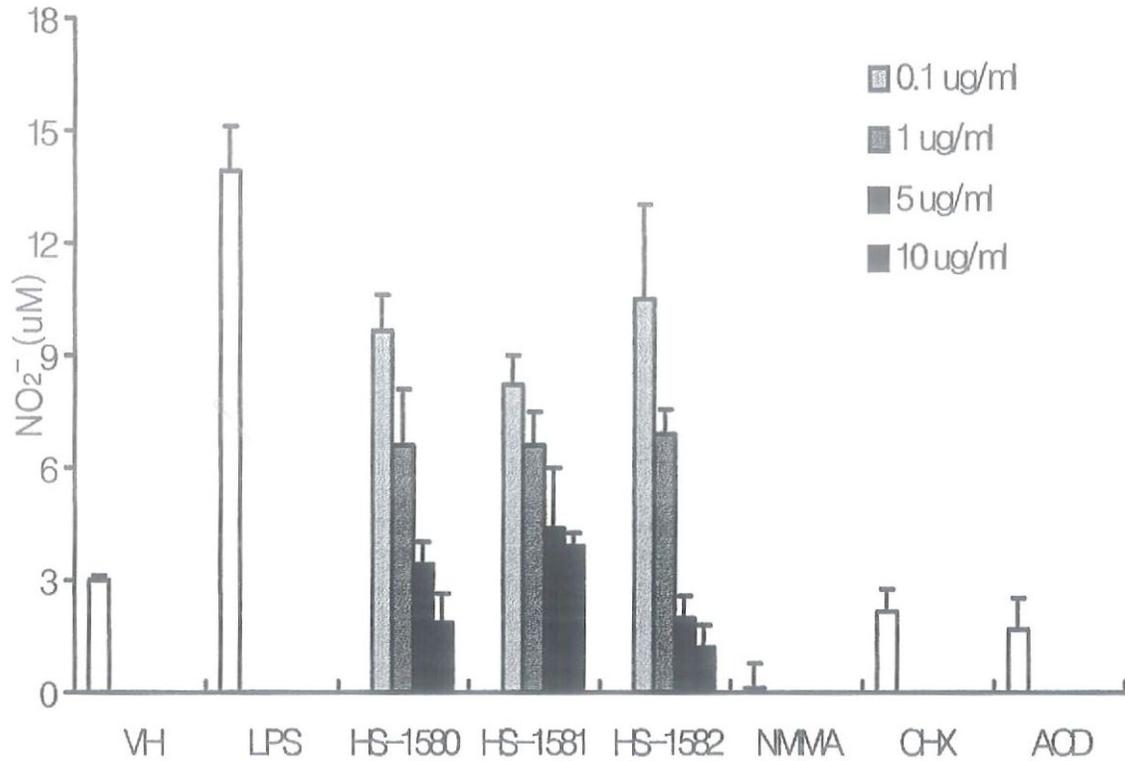
LPS (lypopolysaccharide)는 gram negative bacteria의 바깥 막을 구성하는 성분으로서 면역계에 여러가지 생리적 효과를 나타내는데 그 효과 중 마크로파지를 강력하게 활성화시키는 cofactor로 작용한다. 특히 TNF- α , IL-1 및 NO와 같은 염증을 유도하는 물질을 분비시키는데 이들 염증 유발 매개물질은 septic sock, bone resorption, periodontal disease의 병태에 관련한다고 간주되고 있다. TDB 유도체들이 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 LPS 1 ug/ml을 처리 1 시간 전에 각 유도체를 0.1, 1, 5, 10 ug/ml 농도로 처리후 24시간 뒤에 배지중의 NO를 정량하였다. 용해제 (0.5% 에탄올) 처리시 NO 농도는 3 μ M이었으나 LPS 단독 처리시 13.9 μ M로 NO 생성이 증가되었으며 HS-1580, HS-1581, HS-1582는 LPS에 의한 NO 축적을 농도 의존적으로 억제하였다. HS-1580와 HS-1582는 5, 10 ug/ml에서 HS-1581 보다 큰 억제 효과를 나타냈다. 또한 NOS 저해제인 NMMA 1 mM를 처리시 NO함량이 감소되었고 ACD (actinomycin D)와 CHX (cycloheximide) 처리시 LPS에 의한 NO 생성이 억제되었다 (도3-2).

이상과 같은 결과에서 이들 유도체가 LPS에 의한 NO 생성 자체를 억제함으로써 NO 함량이 감소되었는지, LPS에 의해 생성된 NO를 제거함으로써 그 축적이 감소되었는지 확실하지 않다. 그러므로 western blotting에 의해 iNOS 유도에 미치는 영향을 다음과 같이 조사하였다.



도3-1. 세포생존율에 미치는 TDB의 영향 (Effects of TDB derivatives on cell viability).

Raw 264.7 macrophages (1×10^5) were plated on 96 well plate for 24 h and treated with various concentration of TDB derivatives, or agents for 24 h. The cell viability was determined with SRB method. LPS, lipopolysaccharide (1 ug/ml); VH, vehicle (0.5% ethanol); NMMA, NG-monomethyl-L-arginine(1mM); CHX, cycloheximide(2 ug/ml) ; ACD, actinomycin D (1 ug/ml).



도3-2. LPS에 의해 유도된 NO 축적에 미치는 TDB 영향

(Effects of TDB derivatives on LPS-induced NO accumulation)

Nitrite was determined in the culture supernatant of Raw 264.7 macrophages. The cells were stimulated with LPS (1 ug/ml) for 24 h and HS-1580, HS-1581, HS-1582 (0.1, 1, 5, 10 ug/ml), NMMA (1 mM), CHX (2 ug/ml) or ACD (1 ug/ml) was added 1h before the stimulus of LPS. VH, vehicle (0.5% ethanol); NMMA, NG-monomethyl-L-arginine; CHX, cycloheximide ; ACD, actinomycin D.

다. iNOS 유도에 미치는 영향

LPS 1 ug/ml 처리시 iNOS (130 kDa)가 유도되었으나, 각 유도제 10 ug/ml를 처리시 LPS에 의한 iNOS 유도가 거의 억제되었다 (도3-3). 또한 NMMA는 iNOS 유도에는 영향을 미치지 않았으며, 이는 NMMA는 iNOS 활성을 억제하여 NO 생성을 억제하지 iNOS 유도에는 영향을 미치지 않음을 나타낸다. CHX 와 ACD는 LPS에 의한 iNOS의 유도를 억제하였다. 이상의 결과는 HS-1580, HS-1581, HS-1582 화합물들은 LPS에 의한 iNOS 유도를 억제함으로써 배지중의 NO 축적이 감소됨을 나타내었다.



도3-3. Raw 264.7 macrophages에서 iNOS 유도에 있어 TDB의 영향

(Effects of TDB derivatives on iNOS induction in Raw 264.7 macrophages). The cells were treated with and HS-1580, HS-1581, HS-1582 (10 ug/ml), NMMA (NG-monomethyl-L-arginin, 1mM), cycloheximide (2 ug/ml) or tinomycin D (1 ug/ml) was added 1h before the stimulus of LPS (1 ug/ml) for 24 h. 1, vehicle (0.5% ethanol); 2, LPS; 3, HS-1580; 4, HS-1581; 5, HS-1582; 6, NMMA; 7, cycloheximide; 8, actinomycin D.

제 4 절 합성 유도체의 항노화 효과

1. 실험 방법

가. 세포배양

유방암 세포주인 MCF-7 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO BRL)에 10 % fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL)과 10 ml/l의 antibiotic-antimycotic (GibcoBRL)을 첨가하여 3×10^6 세포의 밀도를 유지하면서 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.

나. 세포에 oxidative stresses 및 antioxidant 처리

Oxidative stresses를 야기하기 위해서 mimic hypoxia 상태로 세포 내에 ROS를 생성하는 CoCl₂를 300 µM의 농도로 처리하였고, NO donor로는 SNP (Sigma, St. Louis, Mo, USA)를 2 mM의 농도로 처리한 후 배양하였다. 항산화제인 HS-1354는 100 % EtOH에 희석하여 다양한 농도로 처리 후 같은 조건으로 반응시켰다.

다. NO concentration 측정

NO의 생성은 microplate assay method (Green et al., 1984) 방법에 의해 측정하였다. 6-well plate에 1×10^6 세포의 밀도로 분배하여 안정화시킨 다음 oxidative stresses와 HS-1354를 처리, 16 시간 후 96-well plate에 100 µl씩의 배양액을 따내고 동량의 Griess reagent (1 % sulfanilamide / 0.1 % N-(1-naphthyl)-thylendiamine dihydrochloride / 2.5 % H₃PO₄)를 첨가하여 상온에서 10 분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. DCF-DA assay

DCF-DA (2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate : H₂DCFDA, Molecular Probe, Eugene, Oregon, USA)를 DMSO에 녹이고 최종농도가 20 µM이 되게 PBS로 희석하여 처리하였다. 세포는 6-well plate에 4×10^4 세포의 밀도로 분배하여 배양하였다. DCF-DA를 처리하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 30 분간 반응시킨 후 새 배지로 갈아주고 안정화시킨 뒤 stresses를 처리하였다. 16 시간 뒤 배지를 제거하고 PBS로 세 번 수세하였다. 형광측정은 confocal microscopy를 이용하여 발광파장 485 nm, 흡광파장 530 nm에서 관찰하였다. 촬영 후 형광정도를 나타내는 수치는 임의의 5 구획에서 각 구획의 총 세포 수에 대한 형광을 나타내는 세포 수의 비율을 총 5 개 값 중 최고치와 최저치를 제외한 평균값으로 나타내었다.

마. Western blot 분석

세포를 ice-cold PBS로 세 번 수세한 다음 lysis buffer (protease inhibitor

cocktail tablets (Roche, Germany) 1 tablet/50 ml TNES buf. (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1 % NP-40, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl))를 100 μ l씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)로 정량한 후 동일량의 단백질 (50 μ g)을 sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel eletrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC)에 transfer하였다. 이 NC를 5 % non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween (TBS-T : 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1 % Tween 20)으로 30 분간 반응시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단한 후 p53, p21Waf1/Cip1, HIF-1, VEGF, NF- κ B에 대한 항체와 반응시키고, 각 항체들에 대한 2 차 항체인 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG 항체로 각각 1 시간씩 반응시켰다. 각 반응사이에 TBS-T로 10 번씩 3 회, 30 분 동안 수세하였다. 이어서 각 항체에 대한 대응 단백질 band는 enhanced chemiluminescence (ECL: Amersham/Pharmacia Biotech, USA) detection 방법으로 확인하였다.

바. SA β -gal activity 분석

세포를 6-well plate에 2×10^5 세포의 밀도로 분배하여 50 % 정도 자랐을 때 stresses를 처리하여 반응시켰다. 16 시간 뒤 세포를 ice-cold PBS로 3 번 수세하고 1 ml의 3 % formaldehyde 로 5 분간 고정시킨 후 PBS로 2 번 수세하여 고정액을 제거하였다. β -gal stain solution (X-gal (Sigma), 20 mg/mL in dimethylformaldehyde, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, citrate - phosphate buffer pH 6.0)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 12~16 시간 반응시켰다. Ice-cold PBS로 수세하고 반응을 정지시킨 후 고배율 현미경하에서 사진을 촬영하였다. 활성정도를 나타내는 수치는 임의의 5 구획에서 각 구획의 총 세포 수에 대한 형광을 나타내는 세포 수의 비율을 총 5 개 값 중 최고치와 최저치를 제외한 평균값으로 나타내었다.

사. Fluorescence-activated cell sorter (FACS)

1×10^6 세포의 밀도로 분배하고 안정화시킨 후, oxidative stresses를 처리하였다. 16 시간 뒤 PBS로 수세하고 75 % ice-cold EtOH에서 24 시간 고정된 세포를 2,000 rpm에서 3 분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고, RNase A (100 μ g/ml)를 함유한 propidium iodide (PI : 50 μ g/ml of 0.1 % NP-40)용액 1 ml에 현탁한 후, 4 $^{\circ}$ C의 암소에서 30 분간 반응시켰다. 염색한 각 세포의 DNA 함량은 flow cytometry (Becton Dickinson, FACS Calibur, France)로 분석하였다 (PI detect : 발광파장 488 nm, 흡광파장 585 nm).

아. Measurement of cell viability

(1) 세포수 산정

35mm dish에 5×10^5 세포의 밀도로 분배하여 8 시간 안정화시킨 후 stresses를 처리하였다. 16 시간 뒤에 PBS로 수세하고 배지를 제거하여 Trypsin EDTA를 가한 5 분 후, 배지 1 ml를 첨가하여 피펫으로 균일화하여 100 μ l를 취해서 0.4 % trypan blue 용액 100 μ l를 가하여 hemacytometer 로 세포의 수를 세었다. Dish별로 3 회 이상씩 반복하여 시행하였다.

(2) MTT assay

96-well plate에 2×10^4 세포의 밀도로 100 μ l씩 분배하여 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator에서 12 시간 이상 안정화시켰다. stresses를 처리하고 16 시간 동안 배양한 후 CellTiter 96® Non Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)의 dye solution을 15 μ l/well씩 첨가하여 4 시간 더 반응시켰다. Stop solution 100 μ l/well을 넣고 1 시간 뒤 570 nm 파장에서 흡광도를 측정했다.

2. 실험결과

MCF-7 세포에서 NO donor인 SNP에 의한 NO 생성을 확인하기 위해 Griess reagent를 이용하여 분석한 결과 SNP를 처리하지 않았을 때 NO가 낮는데 비해 SNP를 처리하였을 때 NO가 현저히 증가함을 확인하였다. 대조군의 경우 NO가 0.35 μ M로 낮는데 비해 SNP 1 mM 처리 시에 4.6 μ M, SNP 2 mM 처리의 경우에 6.3 μ M로 SNP의 농도에 따라 NO가 급증하는 것을 확인하였다(도4-1A). 그러나 SNP와 HS-1354를 동시에 처리하면 NO는 SNP만을 처리하였을 때와 비슷하거나 오히려 더 증가한 결과를 보였다. HS-1354의 농도를 100 μ M에서 300 μ M까지 크게 변화시켜 보았으나 NO의 변화에는 차이가 없었다 (도4-1B).

SNP에 의해 생성된 NO와의 반응으로 ROS가 유도되었을 가능성을 확인하기 위하여 DCF-DA 분석을 실시하였다 (도4-2). H₂O₂나 OH $^{\cdot}$ 와 같은 ROS 분자는 DCF fluorescence method에 의해 확인이 가능하다. DCFH는 비형광성 분자로서 안정하여 세포막의 소수성 지방에 잘 들어가고 세포에 들어간 후에 비형광성인 DCFH는 다양한 ROS에 의해 급격히 산화되어 fluorescent 2',7-dichlorofluorescein (DCF)로 바뀐다. 이 때 초록색 형광을 나타낸다. CoCl₂ 같은 금속 물질들은 ROS를 증가시키는 것으로 보고되었기 때문에 CoCl₂를 이용하여 ROS생성을 유도하였다.

SNP 나 CoCl₂를 단독으로 처리하였을 때는 처리하지 않았을 때에 비해 형광이 급증하는 것으로 ROS 생성을 확인하였다. 그런데, HS-1354와 동시에 처리하면 HS-1354의 농도 의존적으로 형광의 세기가 감소하였다.

Growth arrest를 야기하는 분자로 알려진 p21Waf1/Cip1 의 발현 양상에 초점을

맞추고 p21Waf1/Cip1의 up-stream에 존재하는 p53의 발현 양상을 Western blot으로 분석하였다. p21Waf1/Cip1의 발현이 현저하게 증가하였으며, p21Waf1/Cip1의 발현을 유도하는 p53의 발현 또한 증가하였다.

HIF-1은 정상적인 상태에서는 단백질 합성 후 빠르게 분해되기 때문에 세포 내에 매우 적은 양으로 존재하나, hypoxia 상태에서는 증가된다. ROS는 HIF-1 전사인자를 활성화 시키는 신호 전달 경로를 자극하여 세포 내에 HIF-1 단백질을 증가시켰다.

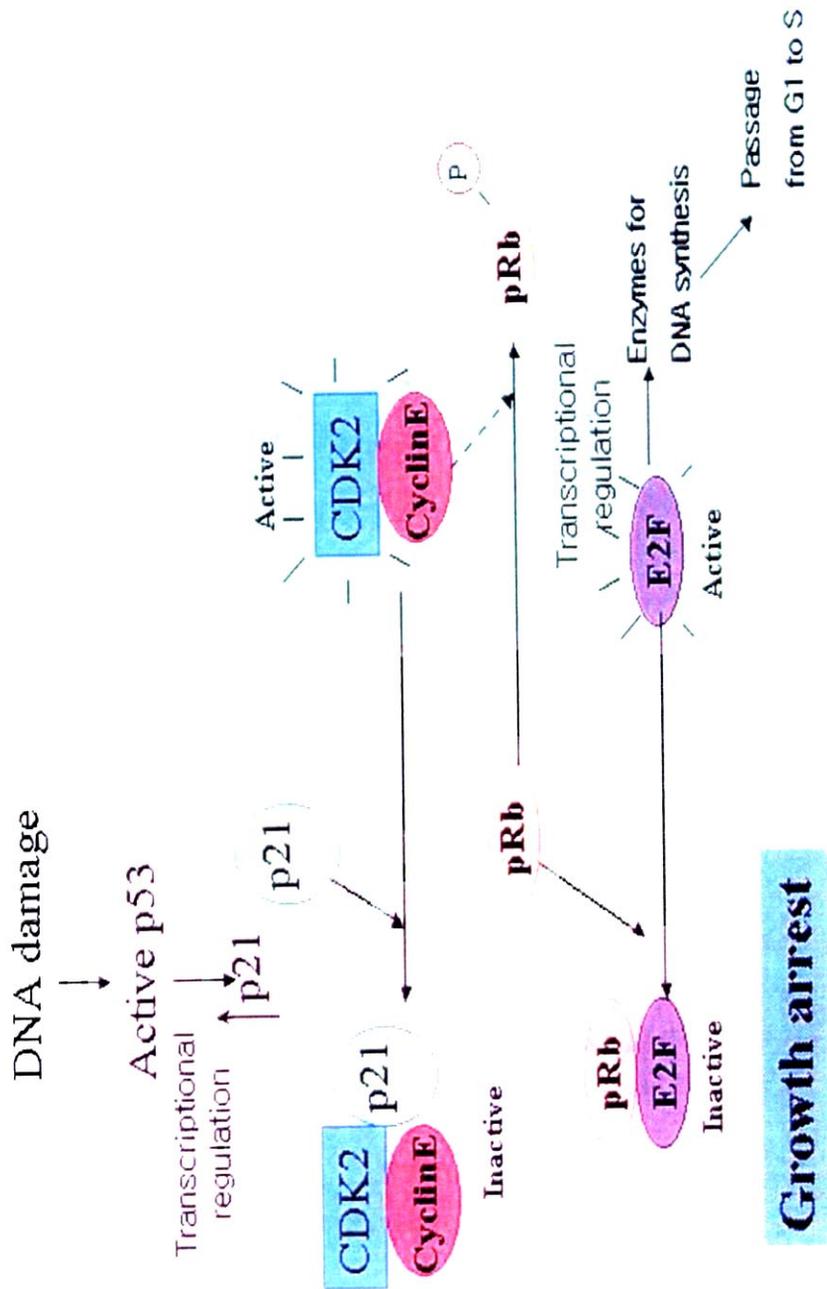
Hypoxia 감수성에 반응하는 HIF-1에 의해 활성화된다는 VEGF와 NF- κ B의 발현 또한 증가하였으나 HS-1354를 동시에 처리하면 그 발현 양상들이 감소하였다 (도4-3 A, B). 이 결과에서 CoCl₂나 SNP를 처리한 세포에서 p53 단백질의 안정화가 저해될 경우 노화관련 유전자로 알려진 p21Waf1/Cip1의 발현 또한 저해됨을 확인했다.

Stress-induced premature senescence (SIPS)에 의해 나타나는 현상 중의 하나인 senescence associated β -galactosidase-activity (SA β -gal activity)를 조사하였다. 노화가 진행될수록 세포의 SA β -gal activity가 커져 β -galactosidase가 푸른색을 나타내게 된다. CoCl₂나 SNP를 처리하였을 때 푸른색이 세포 전반에서 관찰되나 HS-1354를 동시에 처리하면 농도 의존적으로 푸른색이 감소하였다 (도4-4). X-gal staining법으로 분석한 결과, CoCl₂나 SNP를 처리하면 세포의 SA β -gal activity가 증가하나 HS-1354의 농도 의존적으로 SA β -gal activity가 억제되었다.

한편, CoCl₂나 SNP를 각각 단독으로 처리한 FACS 분석 결과에서는 세포가 G1기에서 growth arrest 되었지만, HS-1354를 동시에 처리했을 경우에는 G1기의 growth arrest 가 HS-1354 농도 의존적으로 감소하였다 (도4-5).

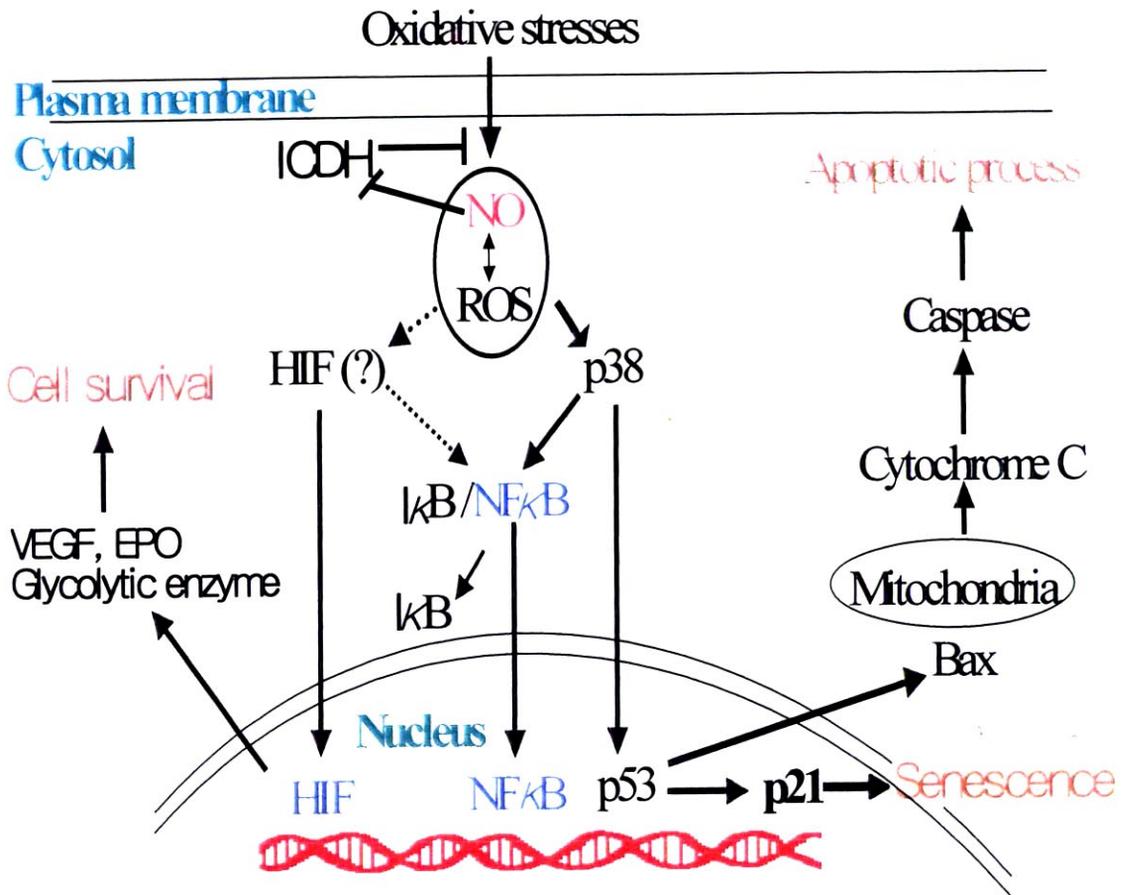
CoCl₂나 SNP는 MCF-7 세포에 cytotoxic effect를 야기 시켜 세포의 생존률을 감소시키는데 반해, HS-1354를 동시에 처리하면 세포의 생존률이 증가하였다 (도 4-6).

종양 억제 유전자의 하나인 p53 발현의 증가는 permanent growth arrest/senescence를 유도한다. 그러나 p21waf1/cip1 knockout 세포에서는 DNA 손상 후에도 p53이 growth arrest를 유도하지 않았다. 이는 p53에 의해 유도되는 단백질인 p21waf1/cip1은 cell cycle arrest에 필수적이다.



모식도 1. DNA 손상후 p21^{Waf1/Cip1}에 의한 growth arrest 조절 가설

(A hypothesis of how p21^{Waf1/Cip1} regulates growth arrest after DNA damage.)

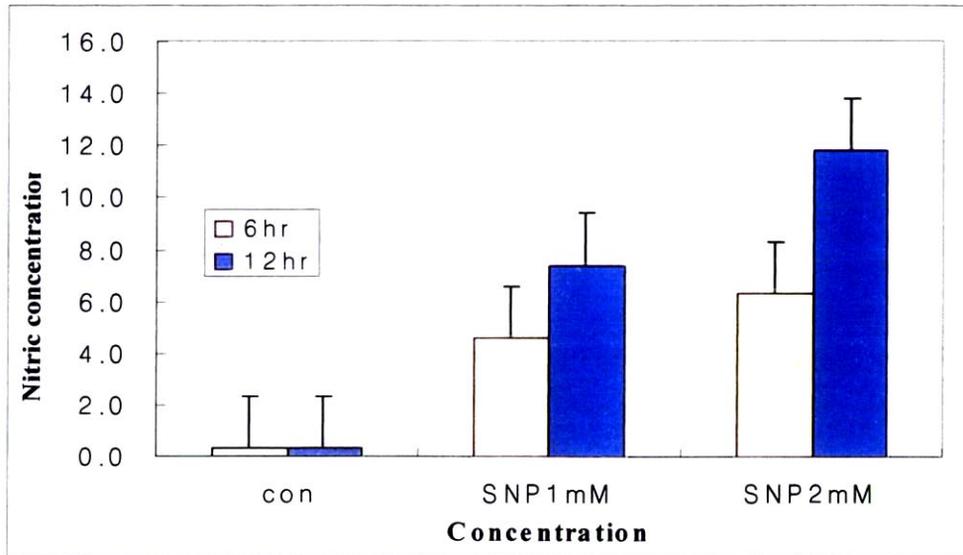


Schematic summary of NFκB regulated the apoptosis and senescence

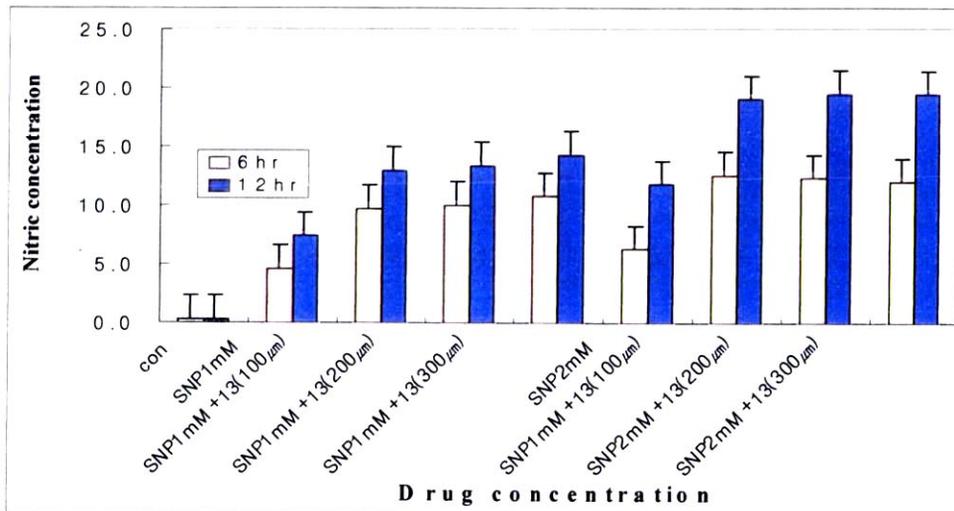
모식도 2. NFκB의 apoptosis와 노화조절 양상

(Schematic NFκB regulated the apoptosis and senescence.)

(A)



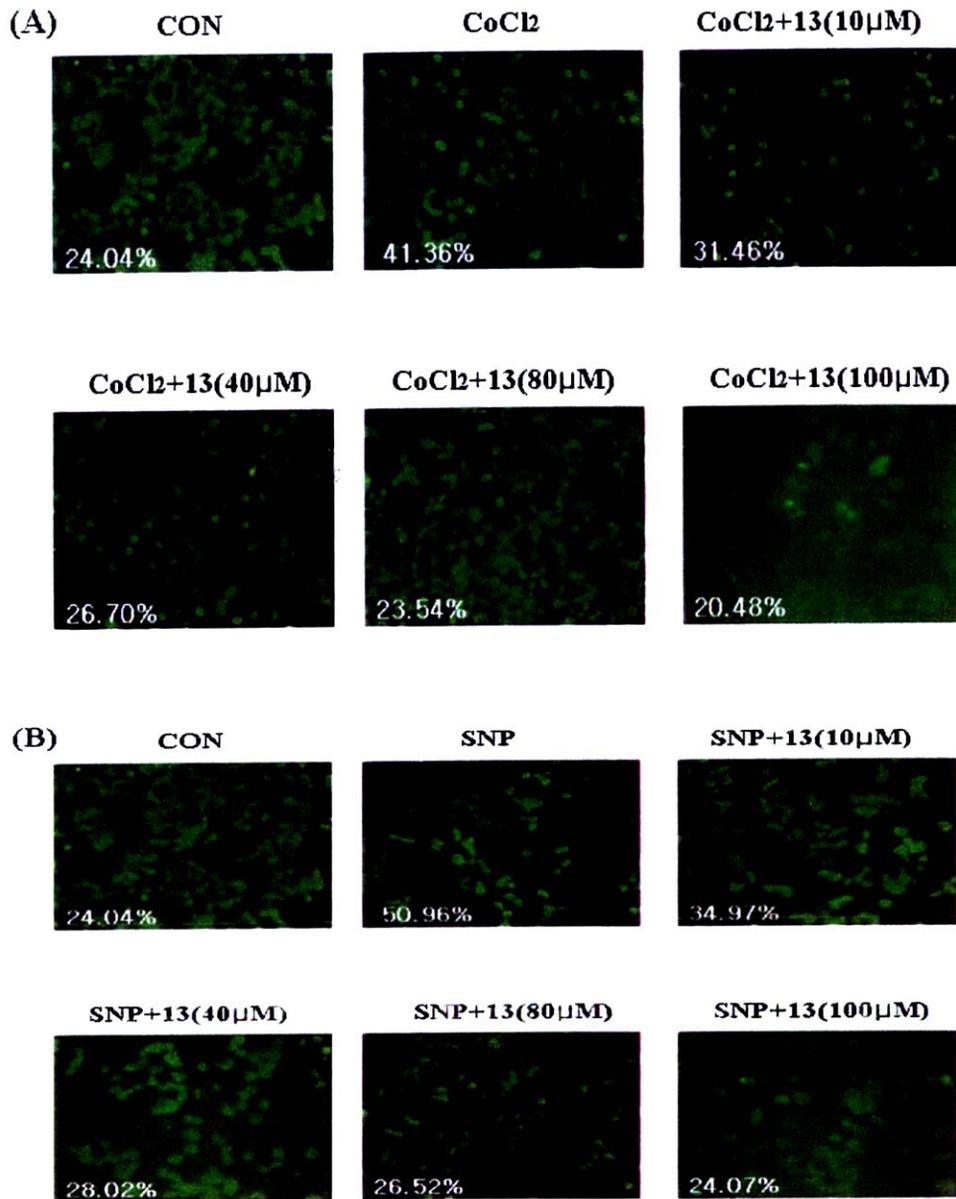
(B)



도4-1. SNP and/or SNP+HS-1354 처리한 MCF-7 cells에서의 nitric oxide 측정 (Measurement of nitric oxide in SNP and/or SNP+HS-1354 treated MCF-7 cells.)

(A) Does- and time- dependent effect of SNP in MCF-7 cells.

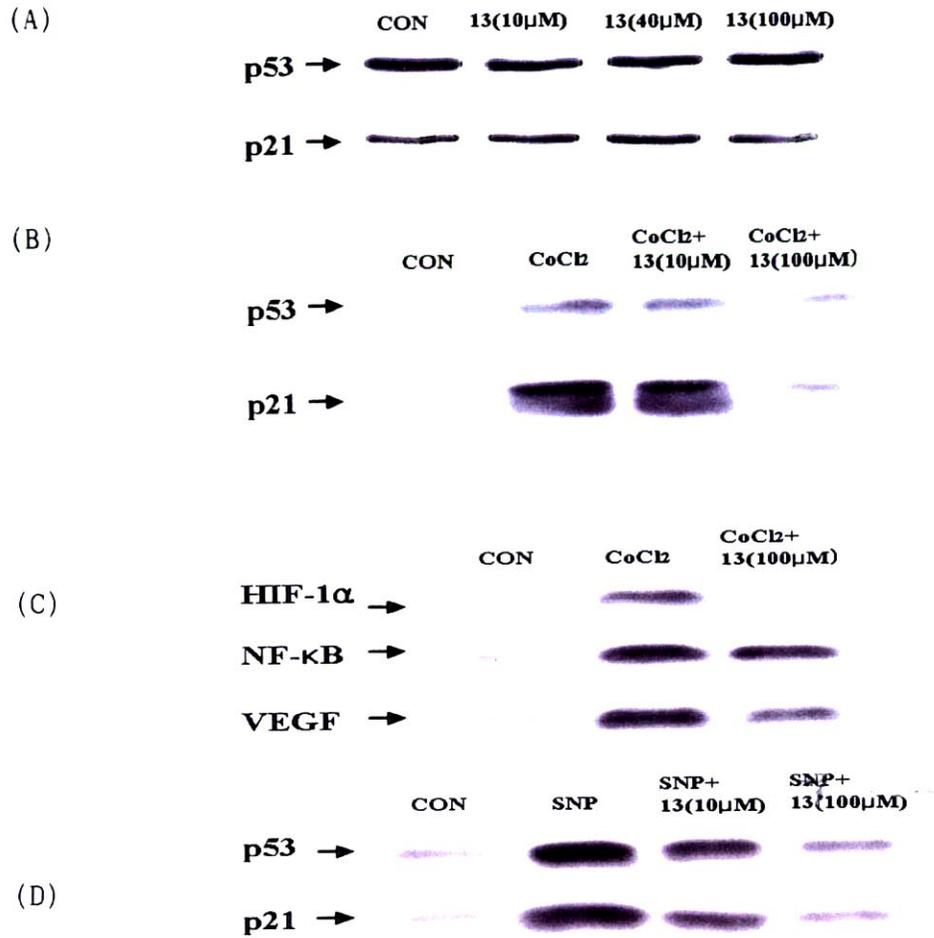
(B) Does- and time- dependent effect of HS - 1354 in SNP - treated MCF-7 cells.



도4-2. CoCl₂ or SNP에 16시간 노출시킨 후 세포안 ROS에 대한 HS-1354의 효과 (Effect of HS-1354 on intracellular ROS generation after 16h exposure to CoCl₂ or SNP (×20)).

(A) DCF-fluorescence assay in control, CoCl₂ and CoCl₂ + HS-1354 treated cells.

(B) DCF-fluorescence assay in control, SNP and SNP + HS - 1354 treated cells.



도4-3. MCF-7 cells에서의 p53, p21^{Waf1/Cip1}, HIF-1, NF-κB의 발현

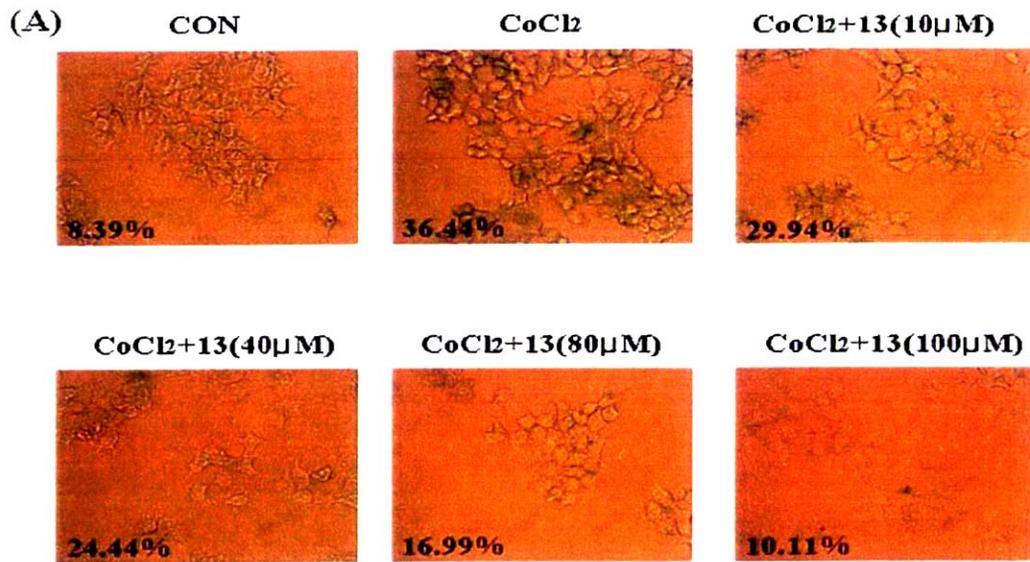
(Expression of p53, p21^{Waf1/Cip1}, HIF-1, NF-κB and VEGF in MCF-7 cells).

(A) Expression of p21^{Waf1/Cip1} and p53 by HS-1354.

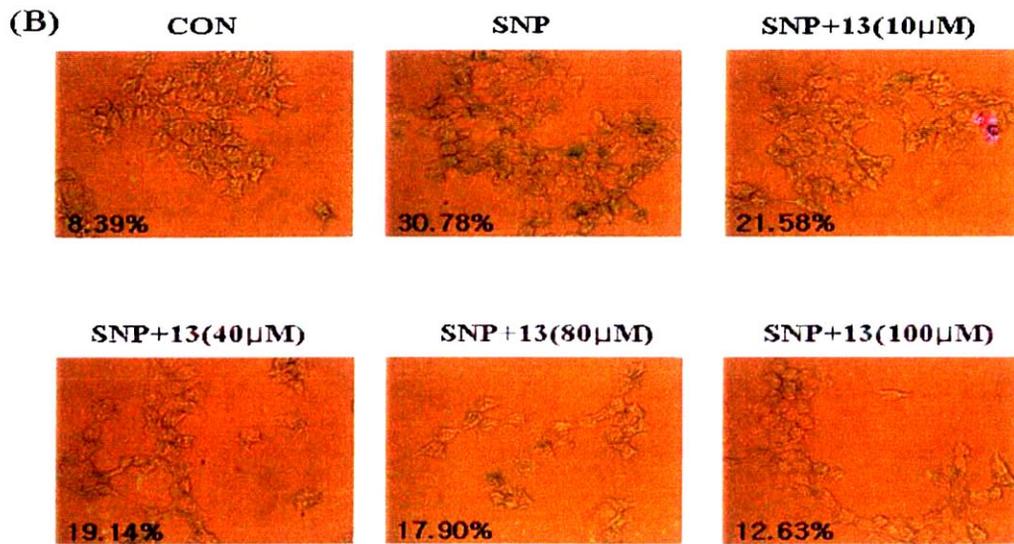
(B) Change of expression of p53 and p21^{Waf1/Cip1} after treatment with CoCl₂ and/or HS-1354 for 16h.

(C) Change of expression of HIF-1, NF-κB and VEGF after treatment with CoCl₂ and/or HS-1354 for 16h.

(D) Change of expression of p53 and p21^{Waf1/Cip1} after treatment with SNP and/or HS-1354 for 16h.

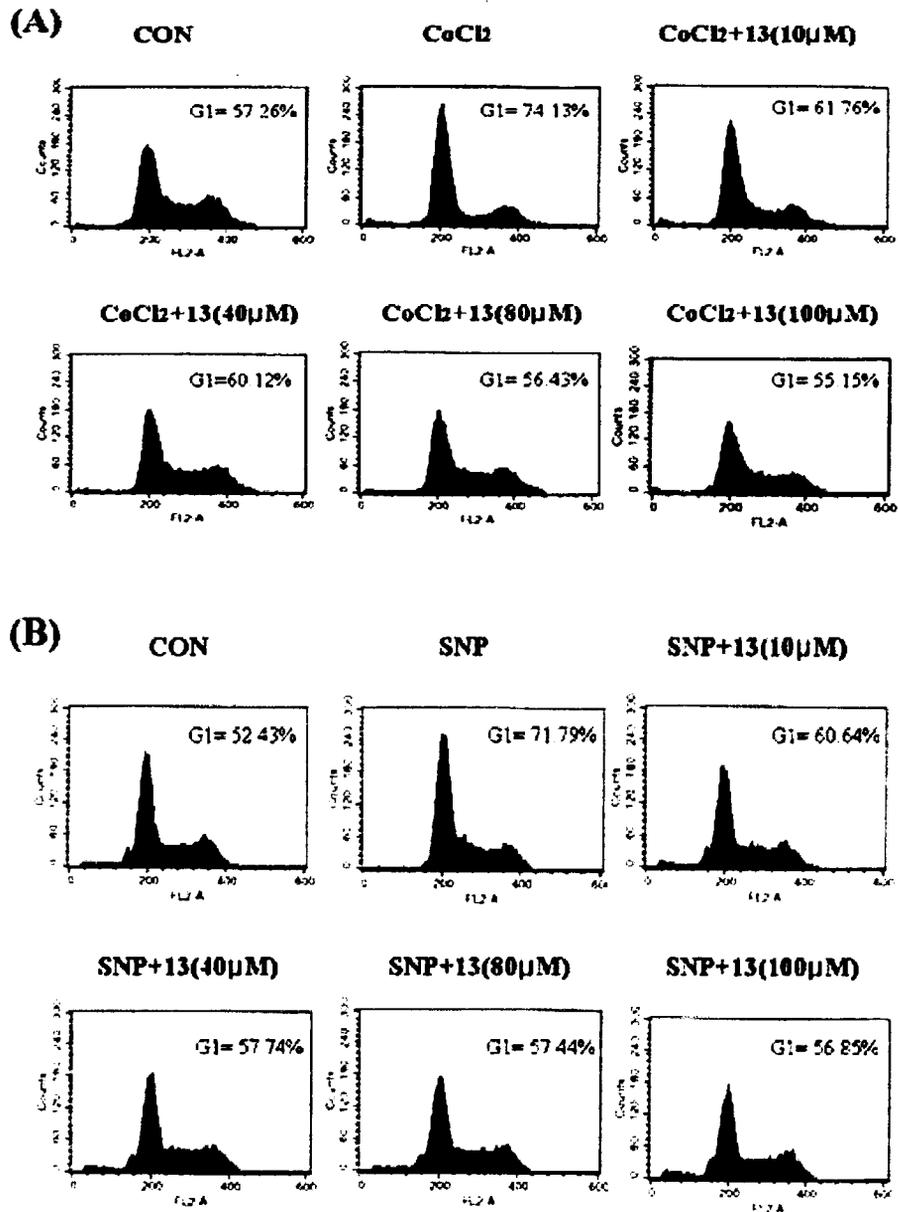


도4-4. SNP, CoCl₂ and/or HS-1354 처리된 MCF-7 cells에서의 SA β-gal의 활성



변화 (Change of SA β-gal activity in SNP, CoCl₂ and/or HS-1354 -treated MCF-7 cells).

To detect senescence associated SA β-gal activity, MCF-7 cells (5×10^4) were treated with SNP (2 mM) and/or HS-1354 10μM, 40μM, 80μM and 100μM for 16h. The cell were then fixed, washed, and incubated X-gal for 16 h detect SA β-gal activity.

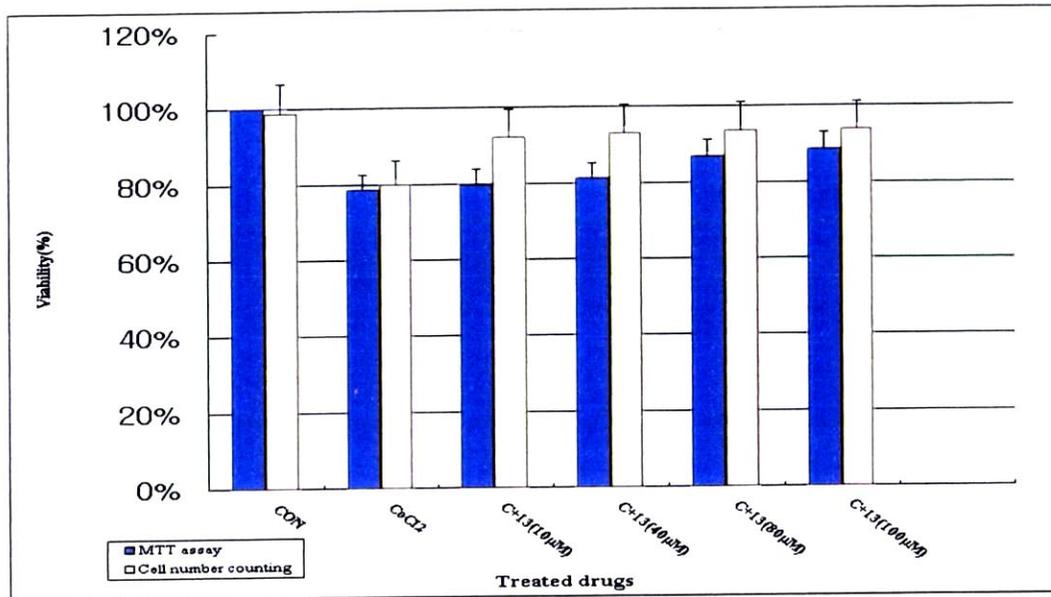


도4-5. MCF-7 cell의 세포주기에 대한 HS-1354의 효과

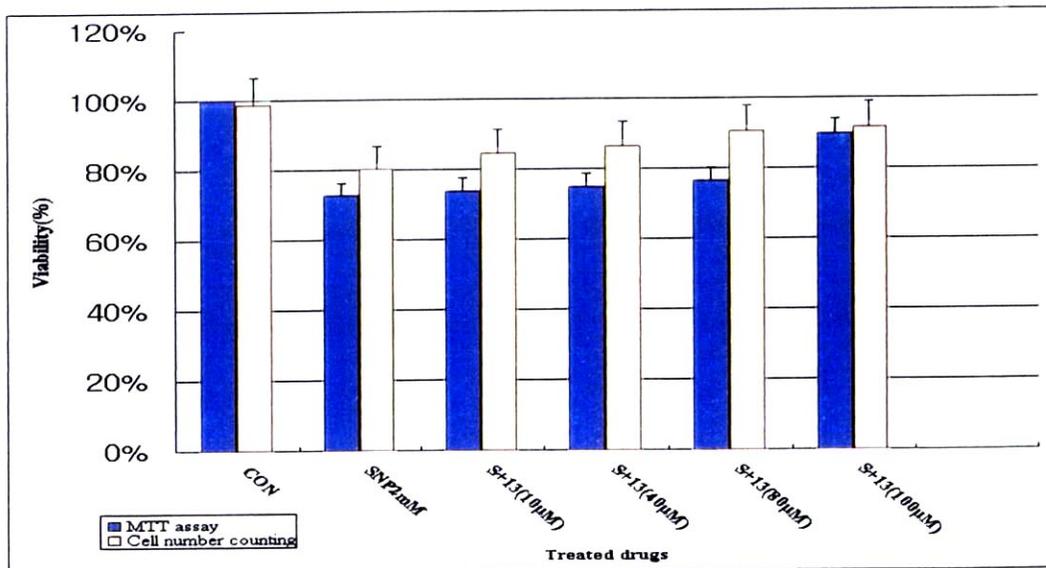
(Effect of HS-1354 on cell cycle in MCF-7 cells).

After cells (1×10^6 cell/dish) were cultured with CoCl₂ (300 μ M) or SNP (2 mM) with/without HS-1354 10 μ M, 40 μ M, 80 μ M and 100 μ M for 16h. FACS analysis of cells stained with PI. Percentages indicate the number of cells arrested in the G₁ phase of the cell cycle.

(A)



(B)



도4-6. 세포 생존률 측정 (Measurement of Cell viability)

(A) Under these conditions, CoCl₂ inhibited cellular growth. CoCl₂ co-treated with HS-1354 100 µM increased rates of cell proliferation.

(B) SNP or SNP with HS-1354.

제 5 절 합성 유도체에 대한 세포생존을 조사

1. HL-60 cell line의 cell growth assays

가. 실험 방법 및 결과

(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하여 HL-60세포에서 합성물질을 대사활성의 효과를 측정하였다. MTT assays 를 아래와 같이 수행하였다. HL-60 cells ($3 \times 10^5/ml$)을 96-microwell plates에 넣고 합성물질의 농도를 다양하게 해서 4일간 처리하였다. 배양후에 MTT를 0.1 mg(50 ul of a 2 mg/ml solution) 각 세포가 있는 well에 가하고 37°C에서 4시간동안 배양시켰다.

Plates를 실온에서 5분간 1000rpm에서 원심분리시키고 배양액을 well 밑에 있는 formazan crystals이 나오지 않게 주의 깊게 뽑아내었다. 그리고 formazan crystals을 용해시키기 위해서 150ul of dimethylsulfoxide를 각 well에 가했다. plates를 즉시 microplate reader로 540 nm에서 측정하였다. 모든 실험은 세 번 씩 측정한 후에 흡광치의 중앙값을 계산하였다.

결과는 합성유도체를 처리하지 않는 control과 합성유도체를 처리한 세포에 있어서 흡광도의 환원되는 억제상태를 퍼센트로써 나타내었다.

표 5-1. RAW264.7 cell에서 TNF- α 에 대한 샘플의 억제 효과
 (The inhibitory effect of samples on TNF- α production in RAW264.7 cells)

Samples	TNF- α inhibition(%)	
	1 μ M	10 μ M
positive control		97.05
HS-1580	ND	ND
HS-1581	ND	ND
HS-1582	ND	ND

ND: not detected

RAW cells(106cells/ml) were stimulated by 1 μ g/ml of LPS with samples.

Supernatants were collected after 6 hr and determined TNF- α amount by ELISA.

Data represent mean of 2 observations.

Stimulated level of TNF- α was about 250 ng/ml.

표 5-2. MTT 측정 (MTT assay)

sample : HS1580 series

cell line : HL60

cell수 : 3.5×10^5 cells/ml

			$2.5 \times 10^{-4} M$			$2.5 \times 10^{-5} M$			$2.5 \times 10^{-6} M$		
	Blank	con- trol	BS 1580	BS 1581	BS 1582	BS 1580	BS 1581	BS 1582	BS 1580	BS 1581	BS 1582
1	2.586	2.671	0.706	0.454	0.621	2.619	2.573	2.499	2.656	2.598	2.621
2	0.683	2.491	0.564	0.508	0.650	2.498	2.599	2.485	2.522	2.065	2.547
3	2.654	2.567	0.583	0.423	0.546	2.591	2.539	2.543	2.592	2.323	2.563
4	2.682	2.414	0.594	0.421	0.532	2.515	2.581	2.598	2.468	2.168	2.483
5	2.690	2.616	0.619	0.431	0.510	2.642	2.640	2.659	2.564	2.481	2.606
6	2.671	2.577	0.551	0.420	0.519	2.457	2.588	2.395	2.417	2.359	2.368
7	2.681	2.419	0.585	0.432	0.519	2.551	2.309	2.504	2.353	2.001	2.295
8	2.577	2.533	0.612	0.429	0.500	2.589	2.525	2.567	2.601	2.512	2.563
평균	2.653	2.536	0.602	0.440	0.550	2.558	2.544	2.531	2.522	2.313	2.506
inhibit-ion			76.27	82.66	78.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

제 6 절 TDB 유도체의 sarcoma 180에 대한
항암활성

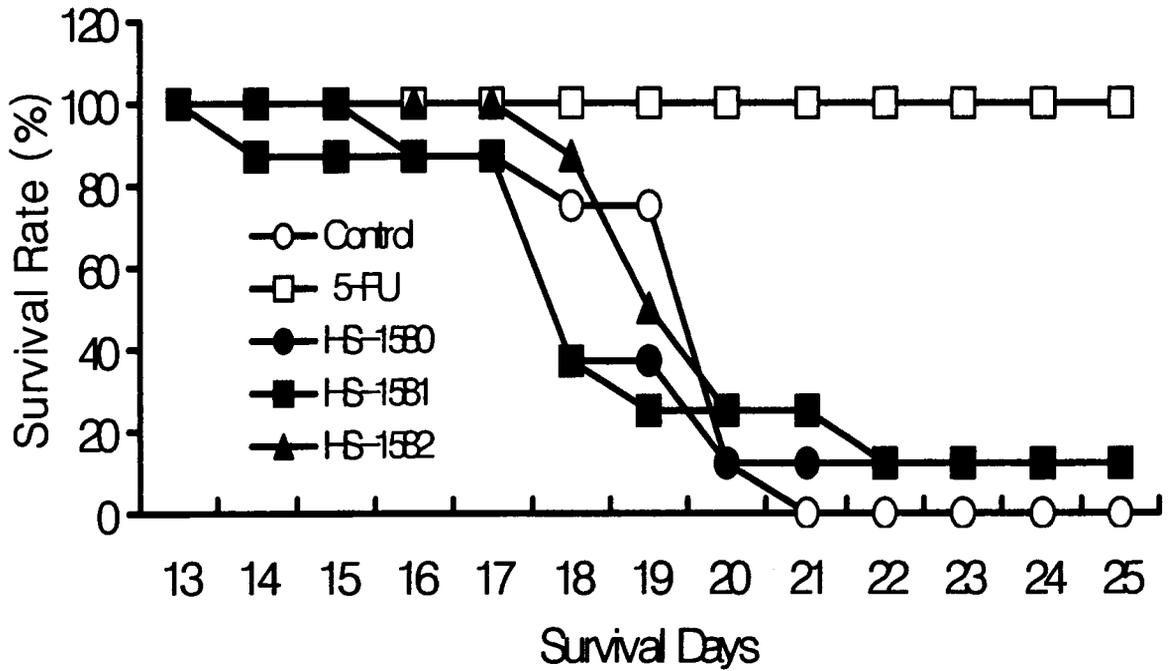
1. 실험방법

Sarcoma 180세포는 ICR 마우스의 복강에서 계대배양하여 유지하였으며 1×10^6 개의 세포를 복강에 이식하고 24시간 후부터 시료를 1일 1회 7일간 복강 투여한 후 25일간 수명을 관찰하였다.

시료는 100% 에탄올에 용해후 주사시 최종 0.5% 에탄올이 되도록 주사용 멸균수로 희석하여 0.2 ml 씩 복강주사 하였으며 대조군은 0.5% 에탄올 투여하였다.

2. 실험결과

각 시료는 20 mg/kg 용량으로 투여시 모든 시료는 sarcoma 180 이식 마우스의 수명연장에 영향을 미치지 않았다 (도5-1). 반면, 항암제인 5-fluorouracil 5 mg/kg 투여시 25일 동안 사망한 마우스가 없었다. 이 결과는 TDB 유도체는 in vivo 항암작용이 없음을 제시하였다.



도5-1. sarcoma 180 종양을 가진 ICR 쥐의 RGAP 항종양 활성

(Antitumor activity of RGAP in sarcoma 180 tumor-bearing ICR mice.)

The mice were administered intraperitoneally with HS-1580, HS-1581 and HS-1582 (20 mg/kg) or 5-fluorouracil (5 mg/kg) for consecutive 7 days after the intraperitoneal inoculation of 1×10^6 sarcoma 180 cells. Life span was observed for the next 25 days.

제 7 절 HS-1580의 항산화 효과

1. 쥐의 뇌의 균질액에 있어서 FeCl₂-유도 지질과산화에 대한 HS-1580의 효과

가. 실험 방법 : Lipid peroxidation assays

지질과산화와 thiobabituric acid reactive substances(TBARS)를 측정하기 위해서 Barrier *et al.* (1998)를 변형시킨 Stocks *et al.* (1974)의 방법을 따랐다. , 요약하면, Sprague-Dawley의 수컷(약 10주된 쥐)로부터 뇌조직을 ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer (pH. 7.4)에서 Teflon-glass homogenizer로 균질화 시켰다. 이 균질화된 것을 1,000 x g에서 10분동안 초원심분리 시켰으며, 그 상등액을 실험에 이용하였다. 지질과산화는 0.02 mM FeCl₂ and 0.25 mM ascorbic acid에서 균질화시킨 250 l rat brain homogenate를 함유하고 있는 어세이에서 자극되었고 그 혼합물은 37 C에서 30분간 반응시켰다. 그반응은 35% perchloric acid 0.05 ml를 첨가하여 반응을 중지시켰으며, 1,000 x g에서 10분동안 초원심분리 시킨 후 200 l 상등액에 0.5% TBA를 함유하고 있는 100 l 용액을 첨가하고 80 C에서 1시간동안 반응시켰다. 그다음에, 반응혼합물을 실내온도에서 냉각시켜서 흡광도 532 nm에서 측정하였다. 뇌 균질액에서는 특히 TBARS 형성은 1,1,3,3-tetraethoxypropane를 이용하여 흡광도 532 nm에서 측정하였다. Isotherms은 the program PRISM (Graphpad Software Inc., San Diego, CA) 로 IC₅₀ values를 nonlinear regression 로 분석하였다. , using to yield .

나. 실험 결과

Compounds	IC ₅₀ (uM)
HS-1580	0.825 ± 0.165
BHT (Sigma)	1.18 ± 0.45
U-83836E (Sigma)	0.10 ± 0.04
Trolox (Sigma)	7.18 ± 1.25

Data were expressed as mean ± SEM

Each point represents the mean value from 3 measurements.

2. 쥐의 cortical cell의 제1차 배양에서 H₂O₂, X/XO or Fe²⁺/AA에 의한 산화적 신경세포의 손상에 대한 HS-1580의 억제효과

가. 실험방법

(1) 흰쥐 대뇌피질 신경세포의 배양

임신 16-18일 된 Sprague-Dawley로부터 얻은 태자의 대뇌피질 부분을 분리한 후 해부현미경을 이용하여 뇌막을 제거한 다음 25 mM 포도당, 5% FBS, 5% HS, 2 mM L-glutamine을 함유한 MEM에서 알코올램프로 구멍의 크기를 조절한 파스테르 피펫을 이용하여 단일세포로 분리한 후, poly-L-lysine과 laminin으로 피막을 입힌 24-well 세포배양 용기에 well당 5×10^5 의 밀도로 이식하여 37°C 배양기에서 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 배양하였다. 주당 2회 배양액의 일부를 교환하였으며, 이식 후 7일에 10 μ M cytosine arabinoside로 48-72시간 동안 처리하여 신경세포 이외의 세포 성장을 억제시켰다. 배양세포는 이식 후 13-14일에 실험에 사용하였다.

(2) 배양한 신경세포에서 산화적 손상 유발 및 세포손상 측정

배양한 대뇌피질 신경세포를 HEPES-buffered salt solution(HBSS)으로 2회 세척한 후 시험하고자 하는 농도의 HS1580 존재 하에서 100 μ M H₂O₂로 5분간 처리하거나 xanthine/xanthine oxidase (X/XO, 0.5 mM/10 mU/ml)로 10분간 또는 Fe²⁺/ascorbic acid (Fe²⁺/AA, 100 μ M/25 μ M)로 2시간동안 처리한 다음, 다시 HBSS로 2회 세척하고 배양액을 포도당과 L-glutamine을 가한 MEM으로 교환하여 20-24시간동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 유발된 손상정도는 위상차 현미경을 이용하여 형태학적으로 관찰하거나, 배양액 상층으로 유리되는 lactate dehydrogenase의 활성을 측정하여 평가하였다. 실험결과는 시험약물을 가하지 않고 손상만을 유발했을 때의 세포 생존율을 0으로 하고 대조군의 세포생존율을 100으로 하여 이에 대한 백분율로 계산하였다. HS1580은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 최종 필요 농도의 100배로 용해시킨 다음 적정농도로 희석하여 사용하였다. 배양세포에 처리할 때의 최종 DMSO 농도는 0.5% 이하로서 배양세포에 영향을 미치지 않는 농도임을 확인하였다.

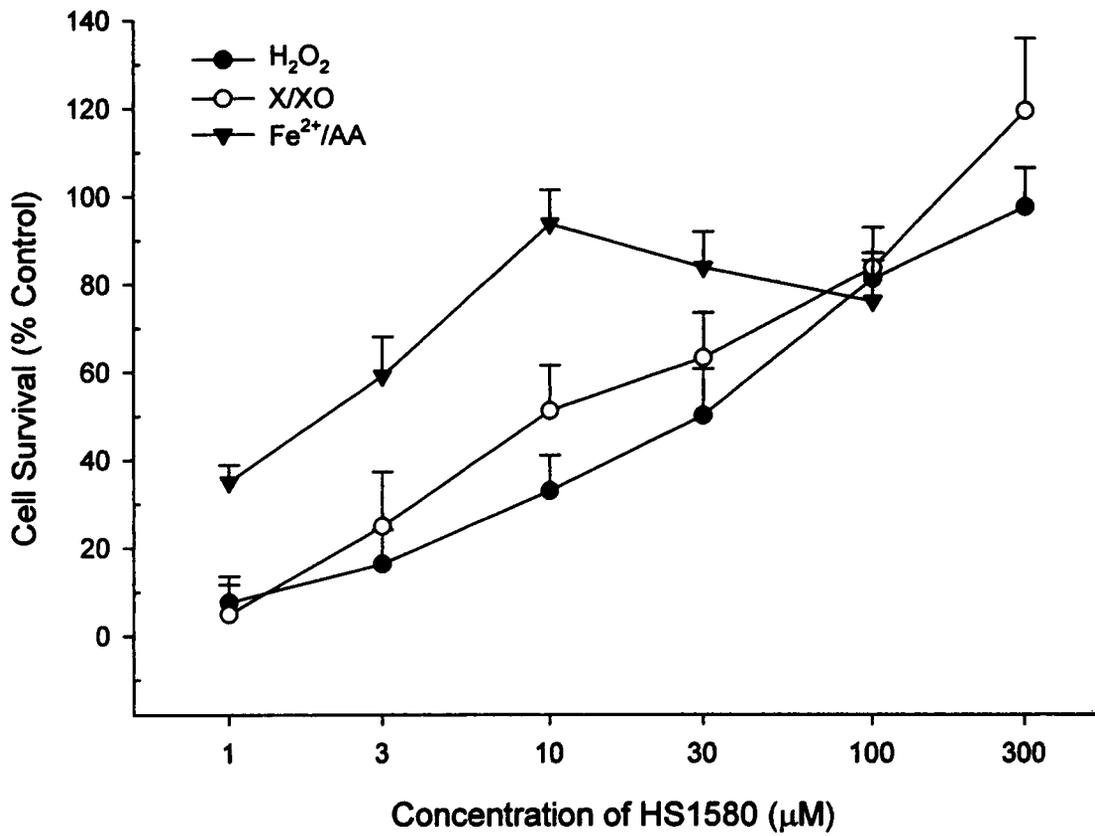
대조물질로는 항산화작용이 잘 알려져 있는 trolox를 사용하였다. 실험은 1회 2군씩 3회 이상 반복하여 실시하였고, 결과는 평균값 \pm SEM으로 나타내었다.

나. 실험결과

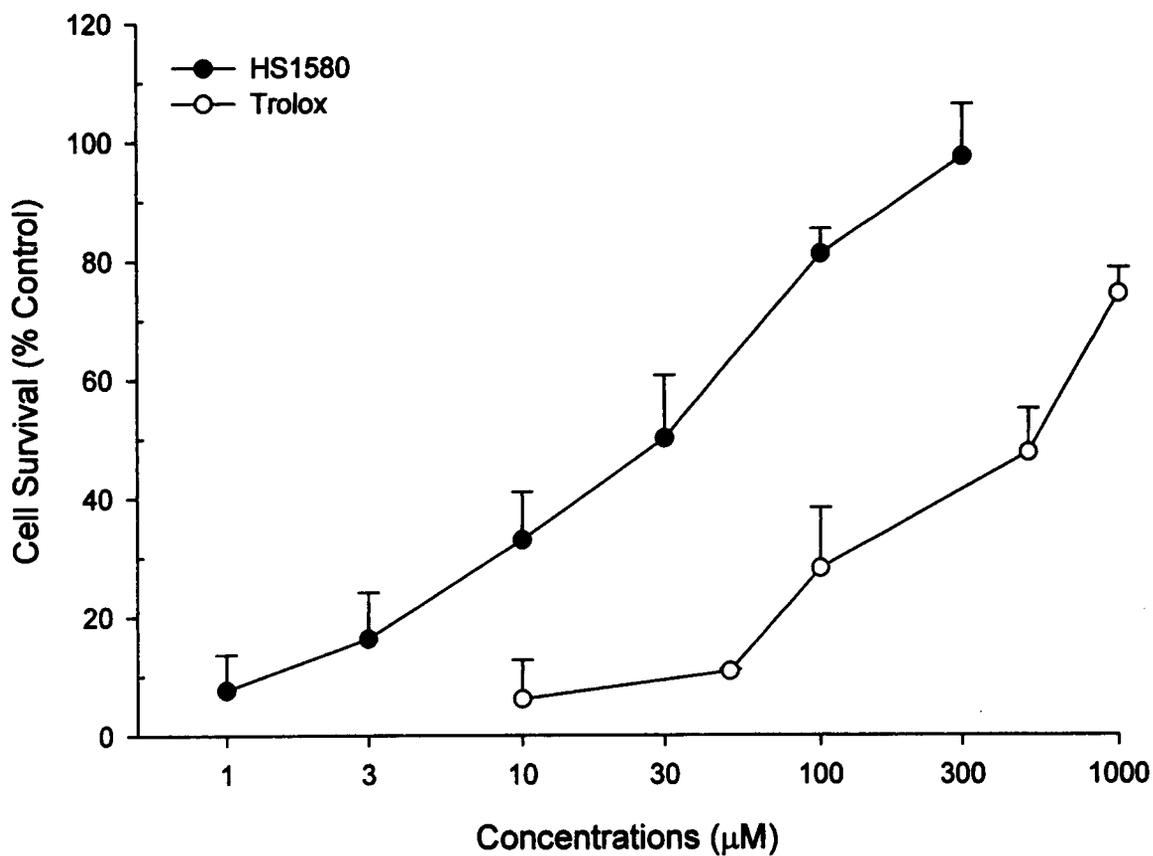
배양한 신경세포를 H₂O₂ 또는 X/XO, Fe²⁺/AA로 일정시간 동안 처리하여 유발한 산화적 손상에 대한 HS1580의 영향은 Fig. 21에 제시한 바와 같다. 즉, HS1580은 H₂O₂로부터 생성되는 hydroxyl radical에 의한 손상과 X/XO로부터 생성되는 superoxide radical에 의한 손상을 1-300 μ M의 농도범위에서 농도 의존적으로 억제함으로써 세포생존율을 증가시키는 것으로 나타났다. 이 결과를 Graph Pad (Prism)로 분석한 결과 H₂O₂ 의해 유발된 손상은 23.3 μ M에서, X/XO에 의해 유발된 손상은 11.5 μ M에서 대조군 세포의 50%가 생존하는 것으로 나타났다. 또한, HS1580은 Fig.

22에서 알 수 있는 바와 같이 항산화작용이 잘 알려진 Trolox에 비해 H₂O₂-유발 손상을 훨씬 강력하게 억제하였다 (Trolox의 50% 세포생존농도=400.2 μM).

한편, 배양한 신경세포를 Fe²⁺/AA로 처리하여 유발되는 손상은 H₂O₂나 X/XO에 의해 유발되는 손상보다 더 낮은 농도에서 억제되어(도7-1), 약 2 μM 정도에서 50%의 세포생존율을 나타내었다. 그러나, HS1580의 농도를 증가시킴에 따라 세포생존율은 약간씩 감소하였으며, 이는 Fe²⁺/AA로 처리하는 경우 신경세포가 시험약물에 노출되는 시간이 H₂O₂나 X/XO로 처리하는 경우에 비해 길기 때문인 것으로 생각된다.



도7-1. 배양한 대뇌피질 신경세포에서 H₂O₂ 또는 X/XO, Fe²⁺/AA로 유발한 세포손상에 대한 HS1580의 작용



도7-2. 배양한 대뇌피질 신경세포에서 H₂O₂로 유발한 세포손상에 대한 HS1580 및 Trolox의 작용

제 8 절 산업적 개발연구

1. 곰피로부터 화장품(Mud pack) 개발

가. Mud pack의 조성

* Mud를 해변에 있는 흙으로 사용하지 않고 광석으로 대체 사용함에 있어서 그 광석이 화장품으로 적당한가를 조사 연구하였다.

자색이질암 (Grayish purple Argillite)

시험항목	단위	결과치	시험항목	단위	결과치
정량분석: Al_2O_3	wt%	15.6	정량분석: V_2O_5	wt%	0.01
정량분석: BaO	wt%	0.06	정량분석: ZnO	wt%	0.03
정량분석: CaO	wt%	0.36	정량분석: V_2O_3	wt%	0.12
정량분석: Fe_2O_3	wt%	4.74	정량분석: P_2O_5	wt%	0.07
정량분석: K_2O	wt%	3.55	정량분석: Ge	wt%	1.0
정량분석: MgO	wt%	1.24	정량분석: Cd	wt%	2.9
정량분석: MuO	wt%	0.01	정량분석: 강열감량	wt%	2.93
정량분석: Na_2O	wt%	1.66	정량분석: SiO_2	wt%	68.9
정량분석: Ti_2O	wt%	0.62			

* Si, Al, Ba, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ti, V, Zn, B, P, Ge, Cd 등 16원소가 확인됨

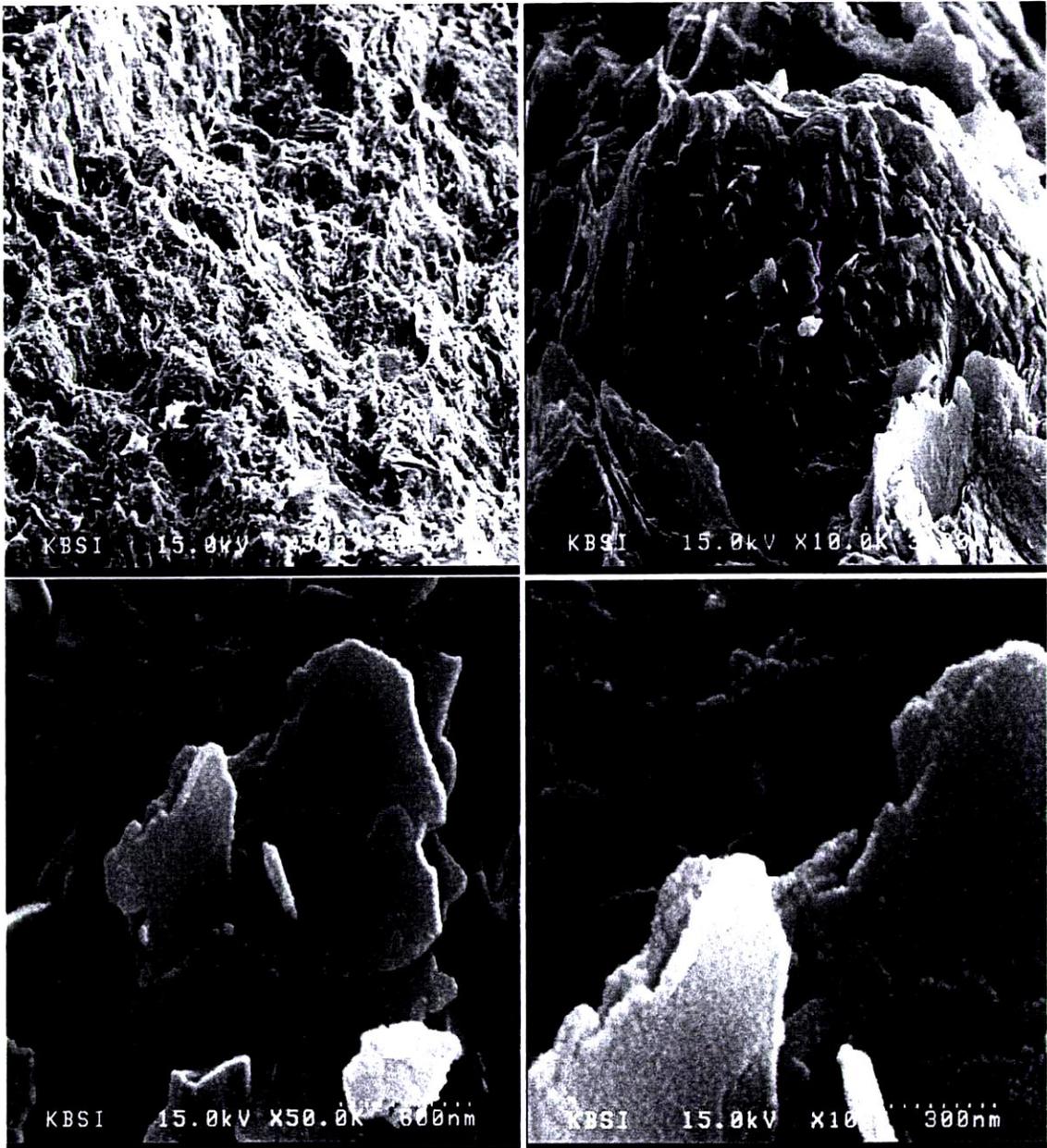
나. 자색이질암의 적합성여부 조사

자색이질암을 325mesh되게 분말을 만든 것과 광석 그 자체의 표면을 주사현미경

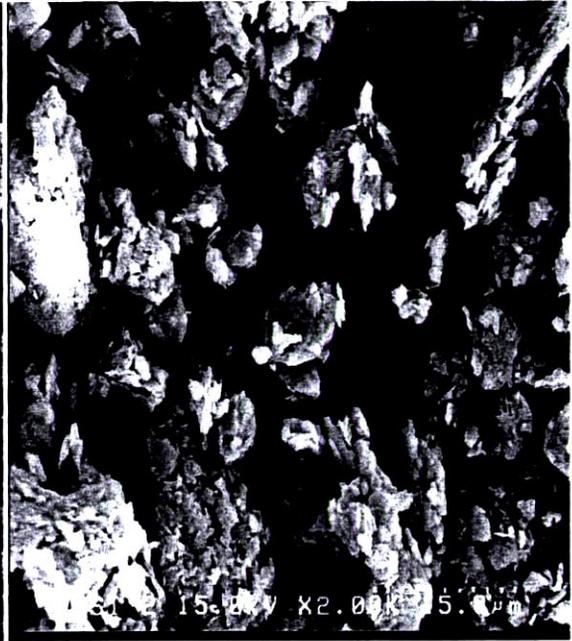
으로 관찰하였다.

먼저 자색이질암을 분말로 만들지 않고 원석 그대로의 표면을 주사전자현미경으로 살펴보면, 도 8-1에서 보는 바와 같이 500배로 확대해서 보면 표면이 산계곡과 같이 보이는데 10,000배에서 보면 그 표면에 돌의 두많은 작은 파편들이 얽혀 있는 것을 볼 수 있다. 이 작은 파편과 같이 생긴 것을 50,000배로 확대해 보면 이 광석의 구성이 치밀하게 조성된 것이 아니고 작은 판 형식으로 구성되어서 비늘같이 붙어 있는 것을 볼 수 있다. 이것은 광석 자체가 조밀하게 구성되어 있지 않는 것을 말해 주고 있다. 그래서 다시 100,000배로 확대하니 판같이 생긴 파편 자체의 구성이 작은 입자로 되어 있으며 이들은 공기가 쉽게 통할 수 있는 형태로 구성되어 있다. 이러한 현상은 빈 공간이 돌에 있는 것은 화장품을 만들 때 다른 영양물질이나 물 같은 것을 많이 함유할 수 있기 때문에 매우 좋은 양질의 mud로 개발할 수 있는 조건이 된다고 말할 수 있다. 그러므로 다시 이들을 325mesh의 분말로 만들어 관찰하였다.

도 8-2에서 보는 바와 같이 500배로 확대해서 보면 모든 분말들이 똑 같이 둥글게 쪼개지는 것이 아니라 원석에서 부서져서 찢겨지는 것을 알 수 있다. 분말로 만드는 과정이 물리적인 힘으로 미세하게 부수기 때문에 모든 분말은 이러한 모양으로 되는 것을 말해 준다. 다시 10,000배에서 확대해 보면 분말 그 자체가 역시 부정형의 얇은 파편들로 뭉쳐있는 것을 볼 수 있다. 이 형태를 미세한 부분까지 관찰하기 위해서 90,000배로 확대해서 분말 한 개의 입자를 확대해서 관찰한 결과 아주 얇은 비늘처럼 만들어진 파편들로 이루어져 있었다. 이러한 현상은 앞에서 언급하였듯이 물이나 공기, 그리고 화장품을 이루고 있는 구성물질들을 잘 함유할 수 있는, 즉 다른데서는 찾아보기 힘든 매우 훌륭한 mud pack으로 사용할 수 있는 형태를 유지하고 있었다.



도 8-1. 자색이질암 표면의 전자현미경 사진
 (Surface of Grayish purple Argillite by electron microscopy)



Grayish Purple Argillite

Left Upper: 500X

Right Upper: 20,000X

Left Down: 90,000X

도 8-2. 자색이질암 325mesh 분말가루의 전자현미경 사진
(325mesh powder of Grayish purple Argillite by electron microscopy)

다. 석영안산반암(맥반석)의 적합성여부 조사

석영안산반암(맥반석)은 일반적으로 널리 잘 알려진 광석으로서 물의 정화 및 여러 건축 자재로 쓰이기도 한다. 그래서 자색이질암과 석영안산반암(맥반석)의 차이를 조사하기 위하여 주사 전자현미경으로 관찰을 하였다. 이 석영안산반암은 군데 군데 작은 부분이기는 하지만 흰 부분이 점처럼 박혀 있고, 또한 회색부분과 아주 검은 부분의 색깔을 가지는 부분이 혼합되어 이루어져 있다.

먼저 이 광석의 대부분을 차지하고 있는 구성을 살펴보면, 도 8-3과 같이 일반적으로 석영안산반암(맥반석)의 구성이 대부분 많은 공간을 가지고 있는 해면조직의 내부와 비슷한 모양을 가지고 있다. 그러나 여기에서 특이한 것은 10,000배로 확대해서 구성 조직을 보면 광석의 뼈대는 견고하게 서로 연결되어 돌출되어 있는 점이다. 그래서 50,000배로 확대해서 볼 때 그 구조가 종으로 겹겹이 층판처럼 뭉쳐 있다. 이것을 100,000배로 확대해 봐도 그 구성 입자가 느슨하게 이루어져 있지 않고 치밀하게 되어있다. 그렇지만 이러한 모양으로 구성되어 있지만 광석의 모양은 앞에서 언급하였듯이 해면조직과 같이 생겨서 많은 수분과 물질을 함유할 수 있게 된 구조이다.

그리고 325mesh의 분말로 만들어 관찰해 본 결과 도 8-4와 같이 500배에서는 그 입자가 고르지 못하게 분말이 만들어 졌고 10,000배로 확대해 보면 역시 그 조성은 여물게 이루어져 있다 그러나 50,000배에서나 100,000배로 확대해 볼 때 많은 공간을 지닌 것을 볼 수 있다. 이러한 모양은 앞에서 이미 언급하였듯이 화장품의 mud pack을 만드는데 이용될 수 있다고 생각하기 쉬우나 그 입자 자체가 더 이상 분리되지 않고 견고하게 유지된다는 것은 좋은 재료가 되지 못함을 나타낸다. 이렇게 되면 피부나 세포를 상하게 할 가능성이 매우 짙게 나타나기 때문이다.

그 다음 회색부분의 조성을 살펴보면, 도 8-5에서 보는 바와 같이 원석 자체의 표면을 500배로 확대했을 때 그 표면은 매우 견고하게 되어 있고 가끔 cracking되어 있으며 표면의 구성이 몇 가지 구별되어 보인다. 이러한 모양은 눈으로 보았을 때 흰 부분과 검은 부분과 회색부분으로 구성되어 있는 것을 볼 수 있다. 이러한 현상은 다른 광물질들과 혼합되어 있음을 말해주는 것이다. 10,000배로 석영안산반암(맥반석)의 표면은 아주 치밀하게 구성되어 있지만 표면이 울퉁불퉁 하더라도 전부 치밀하게 연결되어 지상에서 산들이 생겨난 것처럼 어떤 구성 파편들이 없거나 떨어져 있지 않는 것을 볼 수 있다. 다시 50,000배로 확대해서 보면 광석의 구성이 빈틈없이 치밀하게 이루어져 있으며 이것을 100,000배 확대해서 관찰하면 입자사이에 치밀하게 둥근 입자로 구성되어 있음을 볼 수 있다. 이런 구성적인 모양은 보수력이라든지 다른 물질들을 함유할 수 없는 형태임을 말해준다.

석영안산반암(맥반석)의 아주 검게 보이는 부분은 육안으로도 매우 치밀하고 강한 입자의 구성으로 된 것 같이 보인다.

도 8-6 의 10,000배로 확대한 모양은 그 구성이 공기나 물, 그 외 다른 물질이 도저히 함유될 수 없을 정도로 치밀하게 구성되어 있으며 50,000배로 볼 때 그 구성물이 일정한 크기의 입자들로 만들어진 것을 볼 수 있다. 그리고 100,000배로 관찰을 해도 전혀 다른 물질이 섞이지 못하게 구성입자로 딱 짜여 있다.



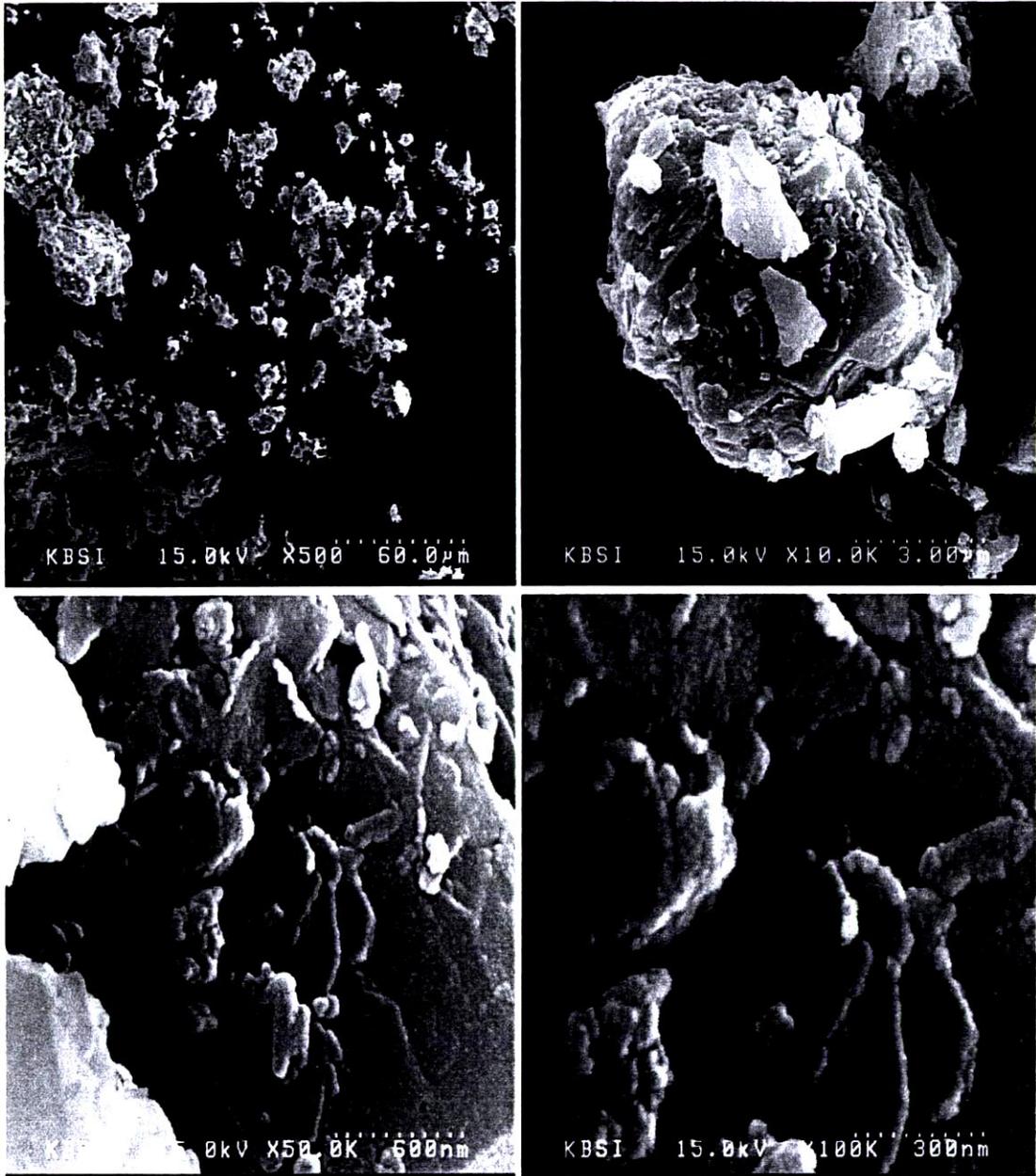
맥반석표면 정상 대부분 영역 (회색부분)

왼쪽 위: 맥반석표면 정상부분 (대부분영역: 10,000배)

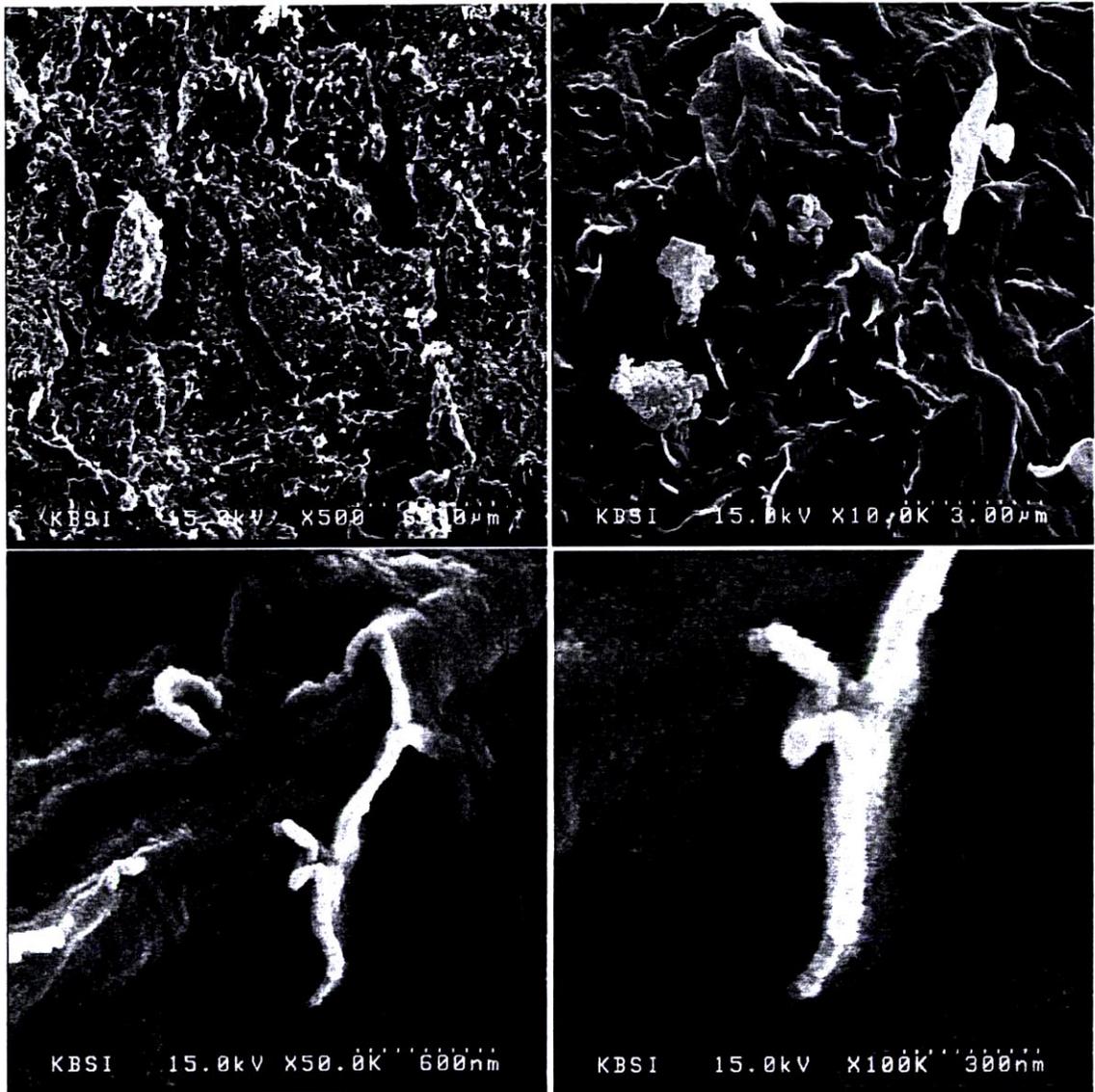
오른쪽 위: 맥반석표면 정상부분 (대부분영역: 50,000배)

왼쪽 아래: 맥반석표면 정상부분 (대부분영역: 100,000배)

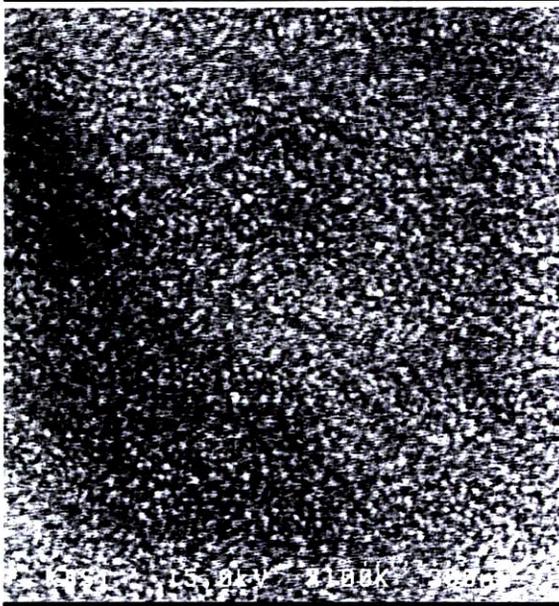
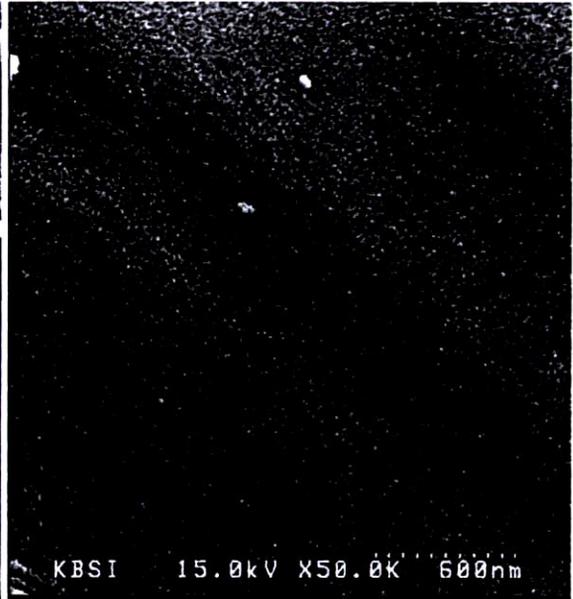
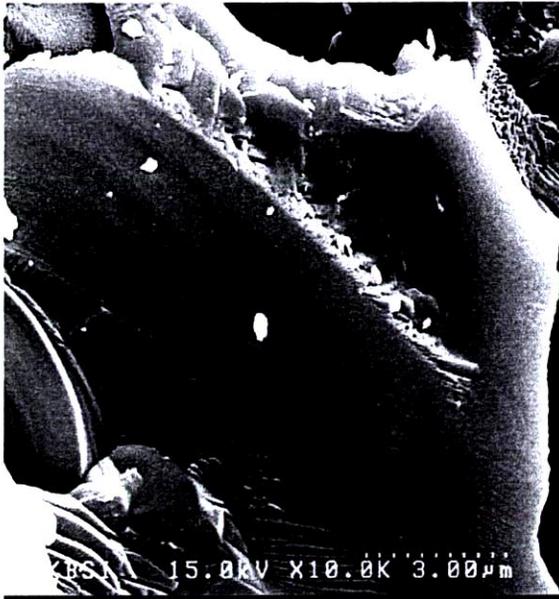
도 8-3. 석영안산반암 표면의 전자현미경 사진
 (Surface of Dacite porphyry by electron microscopy)
 대부분의 영역을 차지하고 있는 회색을 띤 부분임



도 8-4. 석영아산반암중 대부분의 영역을 차지하고 있는 부분의 325mesh 분말관찰.
 (325mesh powder of major part in Dacite porphyry by electron
 microscopy)



도 8-5. 석영아산반암의 회색부분의 주사현미경사진
(Glau part of Dacite porphyry by electron microscopy)



맥반석의 표면 (검은 부분)

왼쪽 위: 맥반석의 표면 (10,000배)

오른쪽 위: 맥반석의 표면 (50,000배)

왼쪽 아래: 맥반석의 표면 (100,000배)

도 8-6. 석영아산반암의 짙은 검은 부분의 주사현미경사진
 (The Black part of Dacite porphyry by electron microscopy)

라. 자색이질암의 금붕어에 대한 실험

포유류의 실험을 하기 전에 자색이질암의 분말을 300mesh로 분말을 만든 것을 5개월 키운 금붕어를 상대로 실험을 실시하였다. 사람이나 다른 육상동물의 피부보다 더 민감한 금붕어의 아가미에는 호흡을 하기 위해 많은 미세혈관이 집중되어 있고 뿐만 아니라 가장 민감한 반응을 나타내는 조직이기 때문에 일차적으로 본 재료가 어떤 독성을 나타내는지 보기 위해서 금붕어를 택하게 되었다.

(1) 실험재료

자색이질암은 강원도 횡성에 소재하고 있는 포조란 광산에서 채취하였고, 6개월 동안 키운 금붕어를 가로x세로x높이(40x25x30cm)의 어항에서 산소공급을 하면서 사육하였다.

(2) 시료처리

실험군을 크게 2그룹으로 나누었는데 제1군은 먹이를 전혀 주지 않는 control군과 먹이를 주지 않고 시료인 자색이질암(포조란) 분말을 10g/L를 넣고 키운군, 다른 하나는 먹이를 주지 않고 자색이질암(포조란) 돌을 그대로 어항 밑바닥에 깔고 사육하였다. 그리고 제2군은 위와 같이 구별하였으나 정상적으로 먹이를 하루에 아침, 저녁으로 주면서 사육하였다.

(3) 금붕어 생존율 측정

실험 금붕어를 한 개의 어항에 10마리씩 넣어 키웠으며 그 기간은 5주간 동안 실시하였고 실험 기간동안 죽어나오는 금붕어의 수를 조사하였다.



도 8-7. 5주간 금붕어 사육. (Feeding of Golden fish for 5 weeks)
각 어항에 6마리씩 사육함

(4) 결과

먹이를 주지 않고 사육한 control 그룹의 금붕어는 1주에 1마리가 죽었고 2주에는 7마리가 죽었는데, 3주 중반이 되면서 control 그룹의 금붕어는 모두 죽었다.

먹이를 준 control 그룹의 금붕어는 1주에서 2주까지 한 마리도 죽지 않았고 3주에서 4주째에 다 죽었다. 이것은 아마도 먹이를 주고 물을 갈아주지 않아서 물속의 먹이가 부패한 결과로 사망한 것이라고 판단된다.

그다음 325mesh의 분말을 만든 자색이질암을 넣고 앞의 경우와 같이 키운 금붕어에 있어서는 먹이를 주지 않는 군에서는 3-4주에 다 죽었는데 이것은 역시 자색이질암 분말의 정화능력이 상실될 때 먹이의 부패로 사망한 것으로 본다.

또한 먹이를 주면서 분말에서 키운 금붕어도 먹이를 주지 않는 것과 비슷한 결과를 나타내었다.

마지막으로 어항속에 광석 그 자체를 넣은 군에서는 먹이를 주지 않는 그룹에서는 5주 동안 금붕어가 한 마리도 죽지 않았으며 먹이를 준 금붕어는 4주말에 한꺼번에 다 사망하였다. 이러한 결과를 봄으로써 자색이질암 자체의 물의 정화능력을 알 수 있는 동시에 이 자색이질암은 민감하고 부드러운 피부일지라도 독성이 전혀 없고 오히려 물의 정화능력이 뛰어난 것을 알 수 있었다. 그리고 먹이를 주는 그룹에서는 자색이질암의 정화능력이 포화상태가 되고 난후 먹이자체에서 부패되어 나오는 독성 때문에 사망하는 것으로 확인할 수 있었다.

표 8-1. 금붕어 수 조사 (Count of dead Golden fish)

Week	Date	Control		Powder		Stone	
		N	F	N	F	N	F
1week (9.23)	2002. 9. 16						
	9. 17	1					
	9. 19				1		
2week (9.30)	9. 24	1					
	9. 26	1					
3(none) 4week (10.8)	10. 8	2					
	10. 9		1	1	1		
	10. 10	2	2		3		
	10. 11	2	1	2	2		
	10. 12	1	2	5	2		
	10. 13			1	2		
	10. 14		4	1			6
5week (10.21)	10. 15						4
	10. 22						
		10	10	10	10	10	10

마. 토끼 실험

(1) 실험재료

연암축산원에대학에서 공급하는 토끼인 New Zealand White Rabbit를 이용하였다. 그리고 실험 토끼는 3-4개월이 된 수컷 토끼 6마리를 사용하였는데 각 토끼의 체중 범위는 2.5-2.7 Kg이며 이들을 약 1주일간 동물 사육실에서 순화시켰다.

(2) 사육환경

(가) 환경조건

본 시험은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대 습도 $55\pm 10\%$, 환기회수 10~12회/hr, 조명 12시간, 조도 150~300Lux로 설정된 본 연구원 동물실험실에서 실시하였다.

(나) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

순화기간 및 시험기간 중에 토끼는 3단 사육상자(420×500×310mm, 대종기계 제작)에 개체별로 사육하였다.

(다) 사료 및 음수의 급여법

사료는 토끼용 고품사료(퓨리나코리아(주))를 자유 급식시켰고, 음수는 상수도수를 자유 섭취시켰다.

(3) 투여량 및 시험군의 구성

(가) 투여량 설정

토끼 한 마리당 시험물질 분말을 적용부위에 0.5g씩 투여하였다.

(나) 군 분리 및 동물식별

토끼는 모두 순화기간 중에 건강하다고 판단된 동물을 골라 체중을 측정하였으며, 동물개체식별은 사육케이지에 시험번호, 동물번호 등을 기입한 tag를 붙였다.

(다) 시험물질의 투여방법

① 시험물질의 조제

시험의뢰가 제공한 분말을 사용하였다.

② 투여경로 및 투여방법

시험물질의 적용 24시간 전에 제모를 실시하여 도 8-8과 이 처치부위 및 대조부위로 구분하였고, 각 부위에 찰과구역과 비찰과구역을 두었다.

시험물질의 투여방법은 시험동물당 각 찰과구역과 비찰과구역에 처치부위에는 시험물질을 대조부위에는 멸균생리식염수를 각 0.5ml씩 투여하는데, 일부를 피부에 도포하고 나머지를 가아제에 적용한 후 피부에 부착하였다.

부착 후 시험물질의 분산을 막기위해 침투성이 없고 반응성이 없는 고형 재질의 박지를 덮고 테이프를 사용하여 고정한 후 24시간 노출시켰다. 노출 종료 후 생리식염수를 이용해 도포부를 가볍게 세정해 주었다.

(4) 관찰 및 검사항목

(가) 임상증상 및 검사항목

시험물질 투여 후 일주일간 매일 외관, 사료 및 음수 소비상태와 임상증상 등을 관찰하였다.

(나) 부검

적용 후 7일째에 국소마취제(리도카인, 광명약품)를 귀정맥을 통해 주입하여 안락사 시킨 후 부검하여 육안적으로 이상유무를 관찰하였다.

(5) 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

피부반응의 평가는 “의약품 등의 독성시험기준”을 이용하여 24시간과 72시간에 대하여 판정하였다. 또한 피부에 대한 자극성의 정도 판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 P.I.I. (Primary Irritation Index)의 산출방법에 따랐다.

표 8-2 피부반응의 판정표 (Check list of skin response)

1. 홍반과 가피형성	
· 홍반이 전혀 없음-----	0
· 아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)-----	1
· 분명한 홍반 -----	2
· 약간 심한 홍반 -----	3
· 심한 홍반(홍당무색의 발적)과 가벼운 정도의 가피 ---	4
* 총 가능한 홍반 점수 -----	4
2. 부종형성	
· 부종이 전혀 없음 -----	0
· 아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도) -----	1
· 가벼운 부종(뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구분 될 경우) -----	2
· 보통의 부종(약 1mm정도 부어 올랐을 경우) -----	3
· 심한 부종(1mm이상 부어오르고 노출부위 밖에 까지 확장된 상태) -----	4
* 총 가능한 부종 점수 -----	4

표 8-3. P.I.I.에 의한 자극 판정 (Irriating decision by P.I.I.)

정도 (P.I.I)	자극부분
0.0 ~ 0.5 0.6 ~ 2.0 2.1 ~ 5.0 5.1 ~ 8.0	비자극성 (None irritating) 약한 자극성 (Mildly irritating) 중등도 자극성 (Moderately irritating) 강한 자극성 (Severely irritating)

* P.I.I. : 일차자극지수 (Primary Irritation Index, Sum of mean/4)

표 8-4. 피부자극 판정 (Decision of skin irratating)

증 상	처 처 부 위							
	홍반과 가피				부종			
	정상피부(b)		상처부위(a)		정상피부(b)		상처부위(a)	
관찰시간	24	72	24	72	24	72	24	72
동물번호1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
합계	0	0	0	0	0	0	0	0
평균	0	0	0	0	0	0	0	0
평균의 합계	0							
자극도(P. I. I. *)	0							

표 8-4. 피부자극 판정 (Decision of skin irratating)

부 위	대 조 부 위							
	홍반과 가피				부종			
	정상피부(c)		상처부위(d)		정상피부(c)		상처부위(d)	
관찰시간	24	72	24	72	24	72	24	72
동물번호1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
합계	0	0	0	0	0	0	0	0
평균	0	0	0	0	0	0	0	0
평균의 합계	0							
자극도(P. I. I. *)	0							

* P.I.I. : 일차자극지수(Primary Irritation Index, Sum of mean/4)

(4) 종합 및 고찰

(가) 종합결과 (Results)

시험 항목	단 위	시험 결과
피부자극시험(P. I. I. *)	-	0(비자극성)

* P. I. I.: 일차자극지수(Primary Irritation Index, Sum of mean/4)

(나) 고찰

본 시험은 (주)렉스바이오사이언스에서 제공한 '포조란 파우더 (325mesh)'의 토끼에 대한 피부자극 정도를 확인하기 위해 실시되었다. 시험동물의 등쪽 부위를 제모한 후 24시간에 제모한 부위중 처치부위 및 비처리부위를 정한 후 각 부위는 다시 찰과구역과 비찰과 구역으로 나누었다. 처치부위의 찰과구역과 비찰과구역에 각각 의뢰자가 제공한 시험물질을 그대로 24시간 동안 적용하였고, 대조부 위에는 같은 방법으로 멸균생리식염수 0.5ml를 적용하였다. 시험물질 적용 개시 후 24, 48, 72시간에 각 적용부위를 자세히 관찰하였다. 처치부위에서 시험기간 동안 부종, 홍반, 가피가 관찰되지 않았다. 멸균생리식염수를 적용한 대조부위에는 어떠한 피부자극도 관찰되지 않았다.

따라서, 본 시험물질 '포조란 파우더(325mesh)'의 적용부위와 대조부위에는 어떠한 피부자극도 관찰되지 않았다. Draize의 P. I. I.(Primary Irritation Index)의 산출에 의한 피부 1차 자극율은 "0"으로 평가되었다.

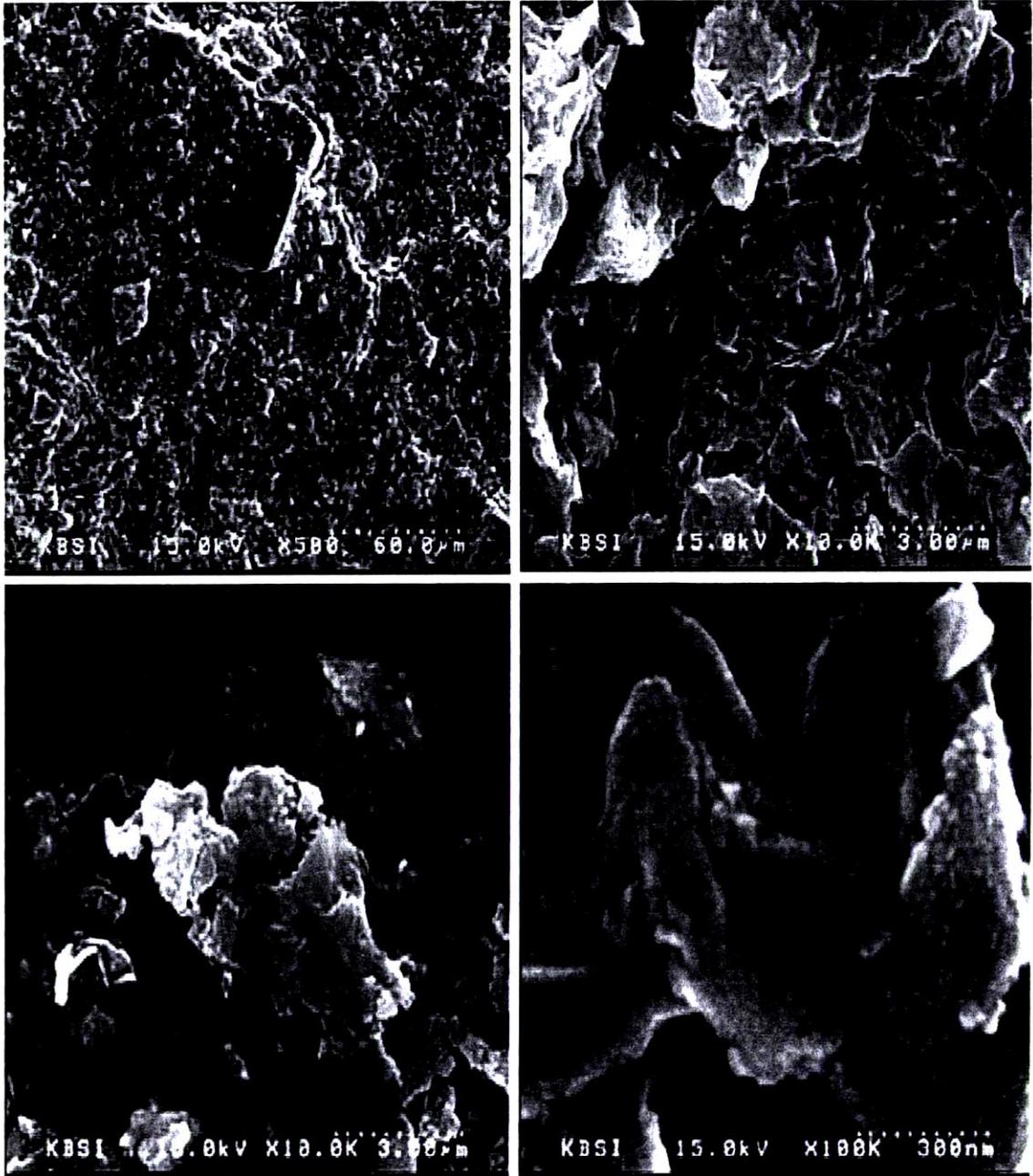
(5) 결론

시험물질 '포조란 파우더(325mesh)'에 대한 피부자극시험 결과 P. I. I. 값이 "0"으로 비자극성 물질로 판단되었다.

2. Mud Pack의 상품화 개발

표 8-5. 머드 팩의 조성 (Receipt of mud pack)

No	ingredient	ratio	No	ingredient	ratio
1	Allintion	0.1	11	Cellosize	0.2
2	EDTA-2Na	0.05	12	Carbopol	0.2
3	Germall 115M	0.1	13	Ge Water(2)	35.0
4	M-P	0.25	14	Bentonite	18.0
5	Tween 80	0.8	15	Ge. power	11.0
6	P.G.	5.0	16	Ocher	3.0
7	PEG 6000	3.95	17	Ginseng power	0.5
8	Cornstarch	1.3	18	Ethanol	2.0
9	TEA	1.0	19	Pf. Ginseng	0.2
10	Glycerin	2.0	20	Ecklonia stonifera and others	5.2, 10.4



도 8-9. 혼합이 끝난 mud pack의 전자현미경사진
 (Mud pack after mixing by electron microscopy)

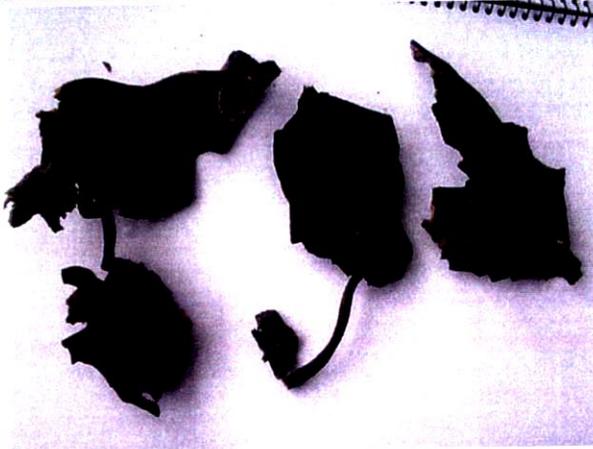


도 8-10. 곰피의 성분을 함유한 mud pack의 완제품 (Products of mud pack)

에꼴로니아 리바이탈라이징 파설 마스크 팩 생산

Scientific Name: *Ecklonia stolonifera*

(곰피)



에클로니아 리바이탈라이징 파셜 마스크 팩

Product Name: 곰피추출물

Analytical Tests	Specifications
Origin/Nature	<i>Ecklonia stolonifera</i>
Description	Brown Liquid
Odour	Typical
확인실험 1)	Dark green, ppt.
RefractiveIndex (nD20)	1.360 ~ 1.400
pH (1~10)	5.0 ~ 7.0
Specific Gravity (d20/20)	1.000 ~ 1.040
Heavy Metals	< 10ppm
Arsenic	≤ 2ppm
Dry Residue(1g, 105oC, 3hrs	0.2 ~ 1.0%
Microbes	≤100cfu/mL

에끌로니아 리바이탈라이징 파셜 마스크 팩

NO	Ingredient		Percent(%)
1	Purified Water	정제수	43.430
2	Allantoin	피부수회결과제	0.100
3	Methyl Paraben	방부제	0.200
4	Disodium EDTA	Chelating agent/금속이온 봉쇄제	0.020
5	Dipotassium Glycyrrhizinate	꿀추출물	0.500
6	Sea Water	해당성황수염분, 조우제염	0.500
7	Glycerin	보습제	15.000
8	Butylene glycol	보습제	5.000
9	Kaolin	Clay powder	20.000
10	Bentonite	Mud clay 파우더/미드/탈착제	10.000
11	Xanthan Gum	겔중제	0.600
12	Imidazolidinyl Urea	방부제	0.200
13	Fragrance	향	0.100
14	Bisabolol	결과제	0.300
15	Malaleuca Alternifolia(Tea Tree) Leaf Oil	살균 Oil	0.050
16	Ecklonia stolonifera Extract	끈뚝추출물	3.000
17	Portulaca Oleracea Extract	마치리 추출물/살균제	1.000
	Sum		100

물질 안전 보건 자료

1) 제품과 제조회사에 관한 정보

물질명 : 곰피 추출물

제조회사명 : Bioland Ltd.

2) 성분에 대한 정성 및 관련정보

Name	CAS number	EINECS Number
1,3-butylene glycol	107-88-0	203-529-7
Water	7732-18-5	231-791-2
<i>Eclonia stolonifera</i> *	-----	-----

3) 유해, 위험성: 없음

4) 응급조치:

흡 입: 토해낸 후 신선한 공기가 있는 곳으로 옮기고 의사의
처방을 받는다.

눈 접 촉: 다량의 물이나 생리식염수로 완전히 제거 될 때까지
충분히 씻는다.

피부 접촉: 위험하지 않음

5) 폭발 발: 화재시 대처방법

폭 발: 화재의 위험 없음

6) 누출사고시 대처방법

물로 씻거나 마른천으로 닦는다

7) 취급 및 저장방법

Packing 되어진 채로 사용, 보관(10oC ~25oC)

8) 노출 방지 및 보호구 관련 정보

안전을 위한 개인 보호 장비 : 특별한 장비 필요 없음

9) 물리, 화학적 특성

외 관: 갈색의 수용액

냄새: 특유의 냄새

pH : 5.0~7.0 (1-10)

비 중: 1.000 ~ 1.040 (20oC)

굴절율: 1.360~ 1.400(nD20)

10) 안정성 및 반응성

반응성: 상온 상압에서 안정함

피해야할 물질: 강산과 강염기

유해한 분해산물: 발생하지 않음

11) 독성에 관한 정보: 없음

12) 환경에 미치는 영향: 없음

13) 폐기시 주의 사항: 없음

14) 운송에 필요한 정보: 분류등급이 부여되어 있지 않음

15) 법적 규제현황

1,3-부탄디올(1,3-butanediol: 1,3-butylene glycol) :

한국규정

- 사업안전보건법: 미규정

- 유해화학물질관리법: 미규정

- 소방법: 미규정

물(water):

한국규정

- 산업안전보건법 : 미규정

- 유해화학물질 관리법: 미규정

- 소방법: 미규정

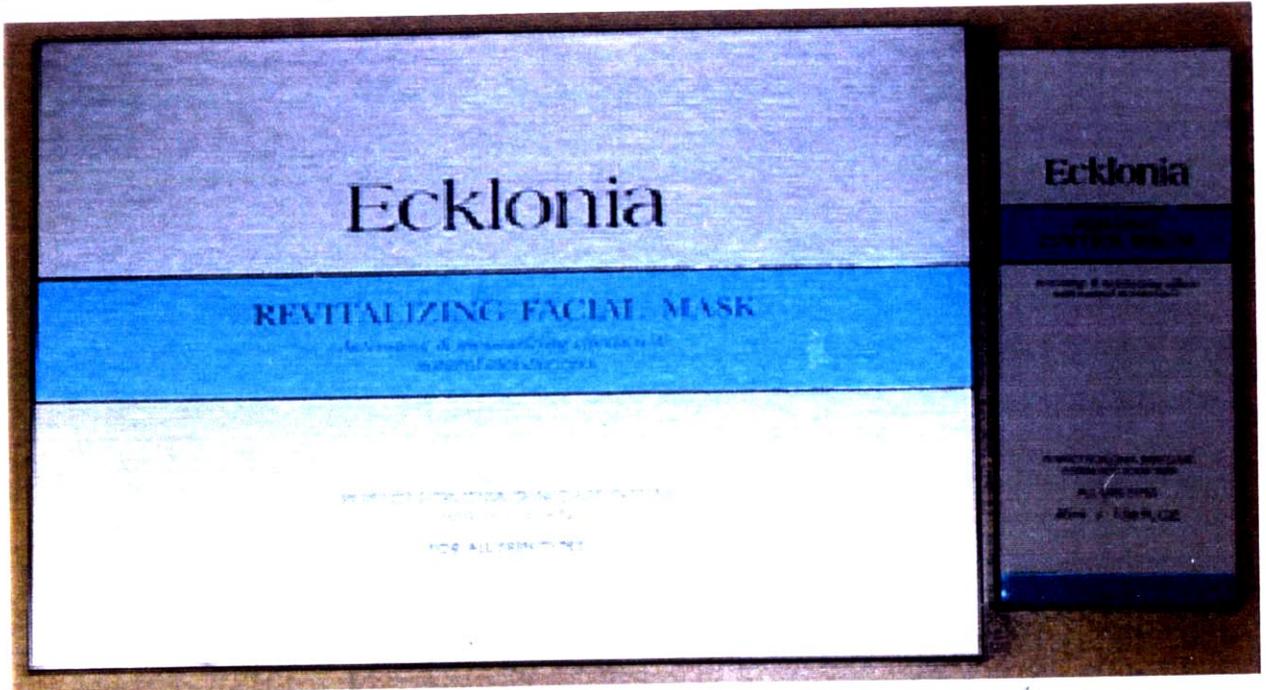
16) 기타참고사항

적용분야: 화장품

최대사용량: 제한 없음

최종 화장품생산: 에클로니아 리바이탈라이징 파셀 마스크 팩 화장품

Ecklonia Revitalizing Facial Mask



Ecklonia Refining Control Serum



제 9 절 TDB 합성 유도체로부터 미백효과에 대한 실험

1. 실험방법

가. MIT assay (세포독성실험)

Tyrosinase 억제물질의 세포독성을 알아보기 위해 MIT test (Mosmann⁴)의 방법을 기준으로 실시하여 melanocyte에 대한 독성을 시험하였다(도 9-1,2). 약물들의 세포독성 효과는 3,4,5-dimethyl thiazole-3, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MIT) assay로 조사하는데 이 방법은 살아있는 세포는 tetrazolium salt 분해할 수 있어 MIT의 세포내 축적을 막는 데 근거한다(도9-2).

MIT stock solution (5 mg/ml)은 PBS에 녹인 다음 0.22 μ m filter에 여과하여 formazan crystals을 없애고 상온의 암실에 보관하였다. 실험을 위해 B16 melanoma cell을 3,000cells/well의 농도로 96-well plate에 옮긴 뒤 여러 약물을 처리하였다.

일정 배양기간 후 10배 희석한 MIT를 각 well에 첨가하고 4시간 경과한 뒤 plate 를 275 x g에서 5 분간 원심분리시켜고 상층액 100 μ l을 채취하였다.

Formazan crystals을 제거하기 위하여 dimethyl sulphoxide를 첨가하고 microplate shaker에서 DMSO가 완전히 용해될 때까지 진탕시킨 뒤 microplate ELISA reader (E1 312e, Bio-Tek)를 이용하여 560 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 약물 처리군에서 세포 생존율은 대조군과 비교하여 % control로 나타내었다.

나. B16 melanoma cell line을 이용한 melanin 분비 억제효과 시험

약물들의 미백 효과는 백화된 B16 mouse melanoma 세포를 사용하여 조사하였다. B16 세포는 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 mg/ml streptomycin 및 100 U/ml penicillin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)으로 배양하였다. 실험을 위해 배양된 B16 세포는 trypsin을 처리하여 떼어낸 뒤 1 X 10⁵ cells/ml의 농도로 24 well tissue culture flask에 분주하였다.

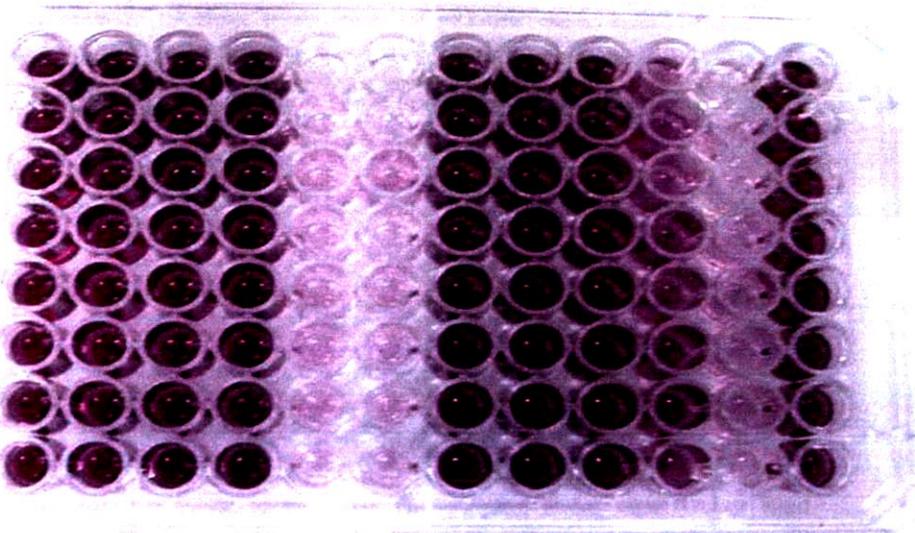
하루 경과 후 세포 배양액을 2 μ M α -melanocyte stimulating hormone (MSH)와 2 mM theophylline이 함유된 phenol red가 없는 DMEM으로 교체한 뒤 조사하고자 하는 약물을 다양한 농도로 첨가하고 7일 동안 배양한다.

첨가한 약물들의 미백 효과는 B16 세포에서 분비한 melanin 색소의 양으로 판별하는데 약물 처리 7일 후 각 well의 세포 배양액을 채취하여 원심분리로 세포를 제거하고 490 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 분비된 melanin 양을 측정하였다.

MTT assay



도 9-1. ELISA reader



도 9-2. MTT assay

다. tyrosinase활성억제 효과 시험

각 화합물의 tyrosinase활성억제효과는 L-tyrosine과 L-dopa를 기질로 하여 분광광도계로 측정하였다.

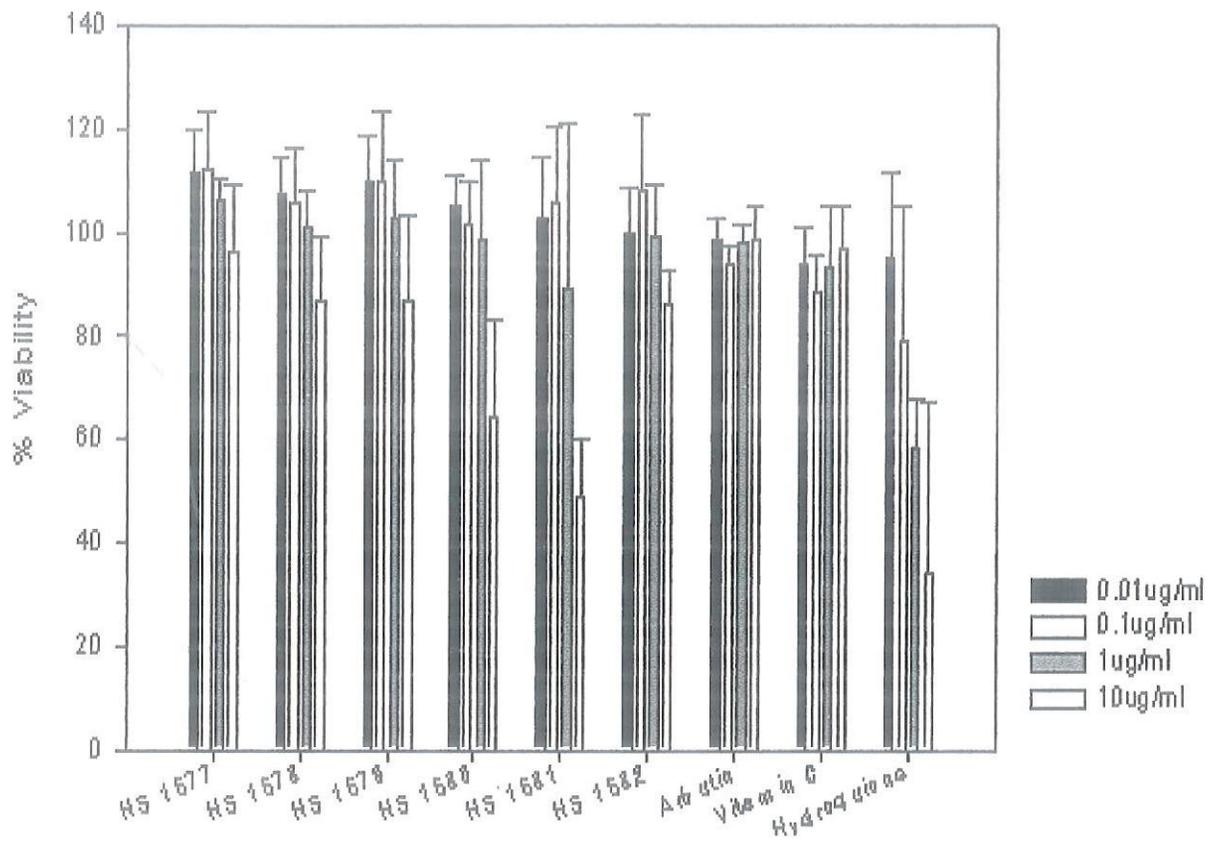
배양된 human melanocyte를 1.0 % Triton X-100, 0.5% deoxycholic acid와 1.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride로 용해시킨 후, 4℃에서 4시간동안 파쇄하였다. 투석시킨 후 상등액을 polysulfone membrane(52,000Mw exclusion)에 의해 농축시켰다

농축물을 1,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 tyrosinase의 조추출물로 사용하였다. Tyrosinase반응은 tyrosinase 조추출물 10 μ g/ml, 1 \times 10⁻³M L-tyrosine, 1 \times 10⁻⁴M L-dopa 추정 화학물질을 함유하는 phosphate buffer(PH7.4)로 진행시켰다. 37℃에서 4시간동안 배양 후 3550 microplate reader(Bio-Rad)에서 475nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 실험결과

가. MTT assay (세포독성실험)

제조된 화합물의 세포독성을 알아보기 위해 3,4,5-디메틸 티아졸 -3,5-디페닐 테트라졸륨 브롬 (3,4,5-dimethyl thiazole-3,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 테스트를 Mosmann [Mosmann, T.: J. Immunol. Methods 65, 55-63, (1983)]의 방법을 기준으로 실시하여 멜라닌세포에 대한 독성을 시험하였다. 약물들의 세포독성 효과는 MTT assay법으로 조사하는데 이 방법은 살아있는 세포는 테트라졸륨 염(tetrazolium salt)를 분해할 수 있어 MTT의 세포내 축적을 막는데 근거한다. MTT 용액 (5 mg/ml)은 인산완충용액 (phosphate buffer saline, PBS)에 녹인 다음 0.2 μ m 필터에 여과하여 상온의 암실에 보관하였다. 실험을 위해 B16 melanoma 세포를 1 \times 10⁴ cells/well의 농도로 96-웰 플레이트 (well plate)에 옮긴 뒤 제조된 화합물을 다양한 농도로 처리하였다. 일정 배양기간 후 10배 희석한 MTT를 각 웰에 첨가하고 4 시간 경과한 뒤 플레이트를 275 \times g에서 5 분간 원심분리 시키고 상층액 100 μ l을 제거하였다. 생성된 포마잔 결정을 용해하기 위하여 DMSO를 첨가하고, microplate shaker에서 완전히 용해 될 때까지 진탕시킨 뒤 마이크로플레이트 효소 결합면역흡착검사 판독기 (microplate ELISA reader; Emax, Molecular Devices)를 이용하여 560 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 약물 처리군에서의 세포 생존율을 대조군과 비교하여 % control로 나타내었다. (도 9-5,6)



도 9-3. 여러 농도에서의 세포 독성

(Result of cell viability in several concentration)

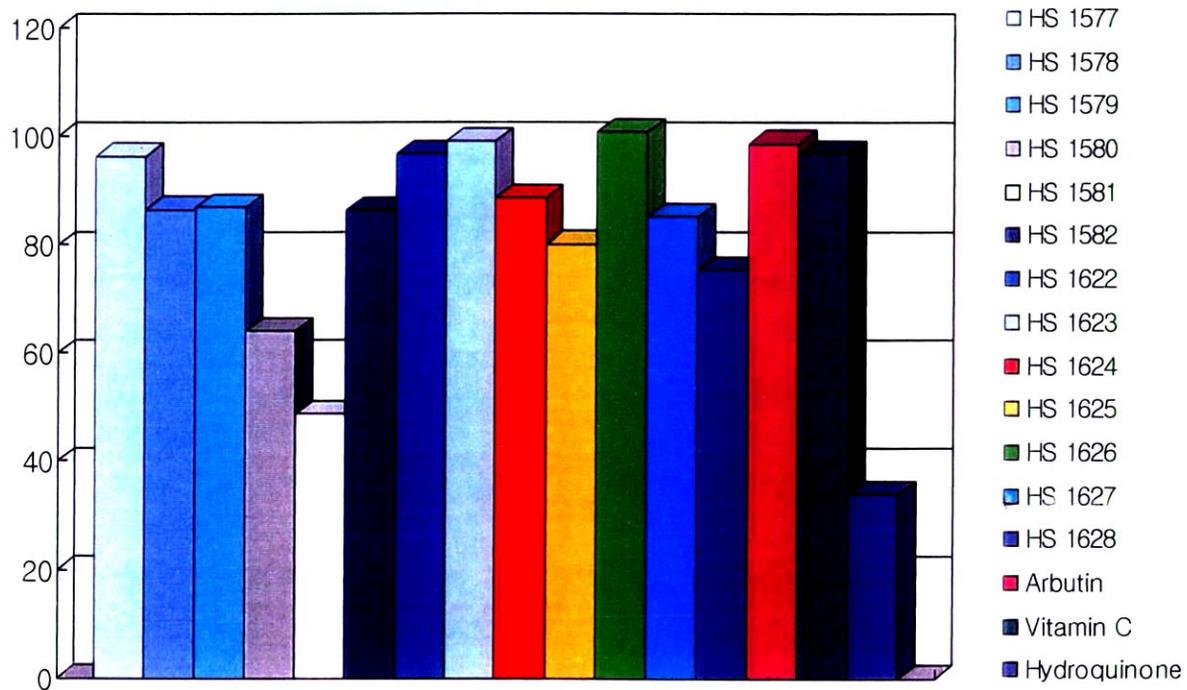
도 9-3 에 의하면 미백효과가 알려진 알부틴과 비타민 C는 10 μ g/ml의 농도까지 거의 100% 세포생존률을 나타내었으나 히드로퀴논은 알려진 바와 같이 세포독성이 매우 높게 나타났다. 1차적으로 제조된 화합물인 HS 1577-1582은 대체로 세포독성이 낮은 편이었으나 10 μ g/ml의 농도에서는 약간의 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다. 그러나 1 μ g/ml의 농도에서는 모두 100%에 가까운 세포생존률을 나타내었다. 이에 비하여 2차적으로 제조된 HS 1622-1628의 화합물들은 10 μ g/ml의 농도에서도 모두 80% 이상의 높은 세포생존률을 나타내어 세포에 대해 매우 안정한 약물임을 알 수 있었다(도 9-4).

나. B16 멜라노마 세포주를 이용한 멜라닌 분비 억제효과 시험

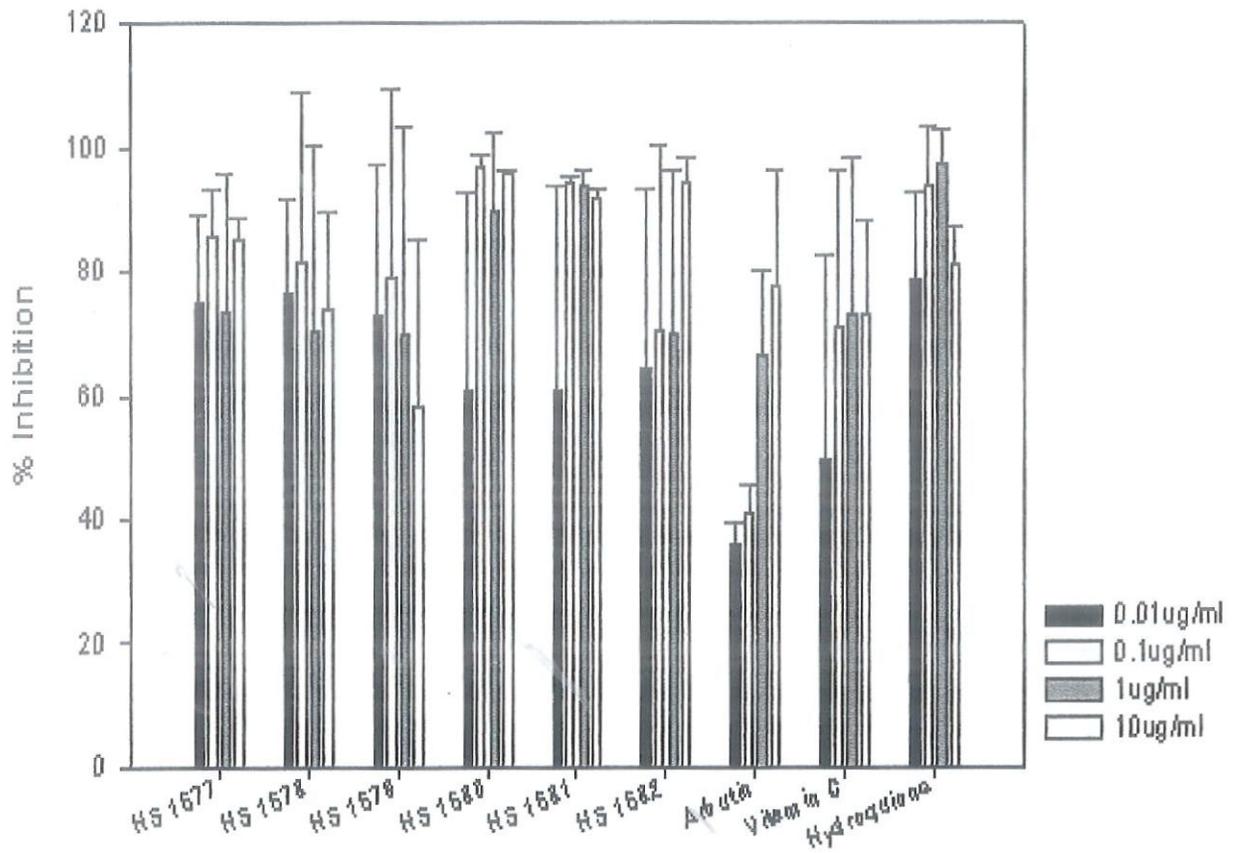
약물들의 미백 효과는 백화된 B16 마우스 (mouse) 멜라노마 세포를 사용하여 조사하였다. B16 세포는 10% 열 불활성화된 우태혈청(heat-inactivated fetal bovine serum, FBS), 100 mg/ml 스트렙토마이신 및 100 U/ml 페니실린을 함유한 변형된 이글스 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)로 배양하였다. 실험을 위해 배양된 B16 세포는 trypsin을 처리하여 떼어낸 뒤 1 \times 10⁴ cells/well의 농도로 96 well tissue culture plate에 분주하였다. 하루 경과 후 세포 배양액을 2 μ M α -멜라닌세포 자극 호르몬 (melanocyte stimulating hormone)과 2mM 테오필린 (theophylline)이 함유된 페놀 레드 (phenol red)가 없는 DMEM으로 교체한 뒤 조사하고자 하는 약물을 다양한 농도로 첨가하고 7일 동안 배양하였다. 첨가한 약물의 미백효과는 B16 세포에서 분비한 멜라닌 색소의 양으로 판별하는데 약물 처리 6일 후 각 웰의 상층액을 100 μ l 취하여 다른 96 웰 플레이트에 옮긴 후, 405 nm에서 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하여 분비된 멜라닌 양을 측정하였다. 각 물질의 억제효과는 하기식을 이용하여 계산하였다(도 9-5,6 참조).

$$\% \text{ 억제율} = \left(1 - \frac{\text{약물처리 후의 OD}}{\text{대조군의 OD}} \right) \times 100$$

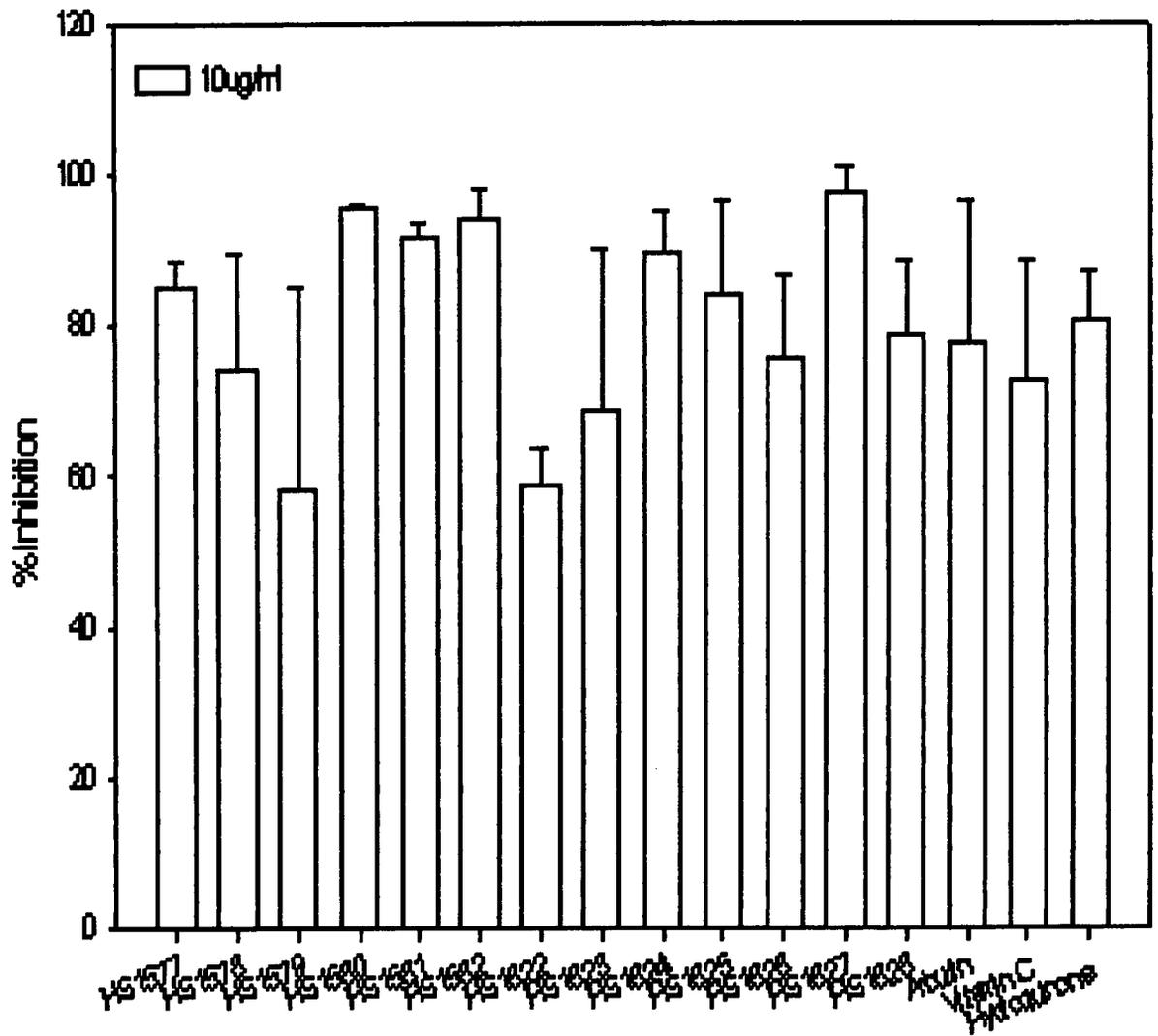
미백효과 면에서 알부틴, 비타민 C, 및 히드로퀴논은 농도 의존적으로 B16 멜라노마 세포주로부터의 멜라닌의 분비를 억제하는 경향을 보였다. 제조된 화합물은 대체로 알부틴과 비슷하거나 높은 멜라닌 분비억제효과를 나타내었고, 특히 HS 1580, HS 1581과 HS 1582은 매우 강력한 미백활성을 지니는 것으로 보인다. 그러나 앞의 MTT 분석에 의한 세포독성 결과와 종합해 볼 때, 이들 화합물들은 10 μ g/ml의 농도에서는 세포 독성이 강하여 시제품에 응용하기에 무리가 있으며 0.1~1.0 μ g/ml의 낮은 농도범위에서 세포독성이 없이 멜라닌의 분비를 거의 100% 억제함을 알 수 있었다 (도 9-5,6 참조)



도 9-4. 10ug/ml 농도에서의 세포독성실험
(Cell viability in 10ug/ml concentration)



도 9-5. 1차 화합물들의 농도별 미백활성실험
(Whitening test of primary mixture by concentration)



도 9-6. 10ug/ml에서의미백활성실험
 (Whitening test in 10ug/ml concentration)

다. 티로시나아제 활성 억제효과 실험

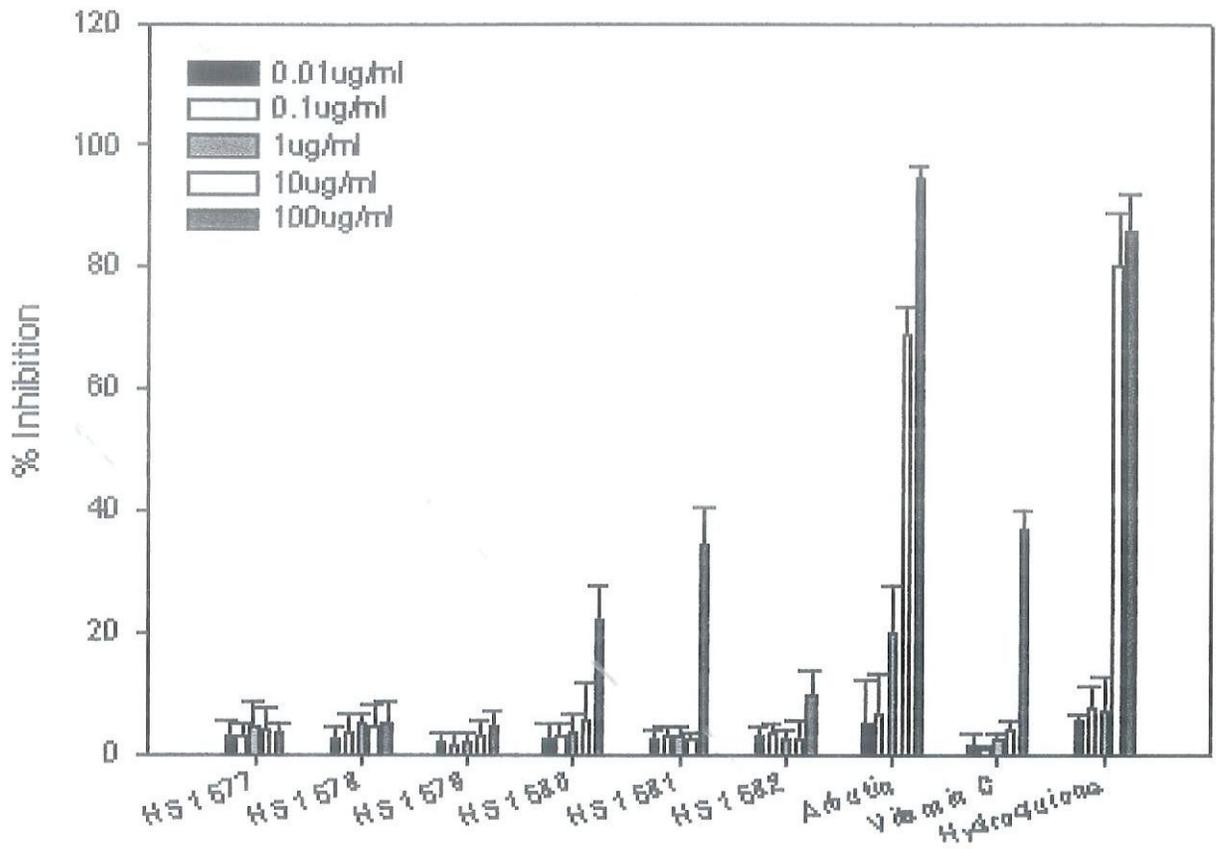
이러한 화합물들의 melanin 분비억제효과가 티로시나아제 활성의 억제에 기인하는지를 확인하기 위해 mushroom tyrosinase를 이용하여 티로시나아제 활성 억제 효과를 관찰하였다. Noh, J.K. [Noh, J.K.: Life Sciences, 65(21), 241-246, (1999)]의 방법을 기준으로 조금 변형하여 실시하였다. 조사하고자 하는 약물을 96 well microplate에 20ul 씩 첨가한다. 기질로서는 L-tyrosine을 최종농도 1×10^{-3} M 이 되도록 녹인 뒤 이를 50ul씩 첨가한다. mushroom tyrosinase는 최종적으로 100units/ml 이 되도록 녹인 후 50ul씩 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응을 시킨 후, microplate reader를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정한다. Buffer는 phosphate buffer(pH 7.4)를 이용한다. 실험계의 조성은 표 9-1과 같으며 효소의 억제율은 아래의 식을 이용하여 결정하였다.

알부틴과 히드로퀴논은 티로시나아제 억제제로서 알려있으며, 실험 결과로서 사실을 확인할 수 있었다. 1차적으로 제조된 화합물인 HS 1577에서 HS 1582 까지의 화합물들은 티로시나아제 활성 효과가 거의 없어 티로시나아제 저해제가 아니며, 특히 강력한 미백활성을 나타내었던 HS 1580, HS 1581과 HS 1582의 화합물들은 티로시나아제 저해제로서 작용하는 것이 아니라 다른 메카니즘에 의해 미백활성을 나타내는 것임을 알 수 있었다. 이해 비하여 2차적으로 제조된 화합물인 HS-1622에서 HS 1628을 살펴보면 HS 1627을 제외한 모든 화합물이 알부틴이나 히드로퀴논보다 강력한 티로시나아제 활성의 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이들은 티로시나아제 활성저해제로서 작용하여 강력한 미백활성을 나타내는 것이며 세포독성도 거의 없는 것으로 보아 매우 유용한 미백제로서 활용할 수 있으리라 생각된다(도 9-5 ~8 참고).

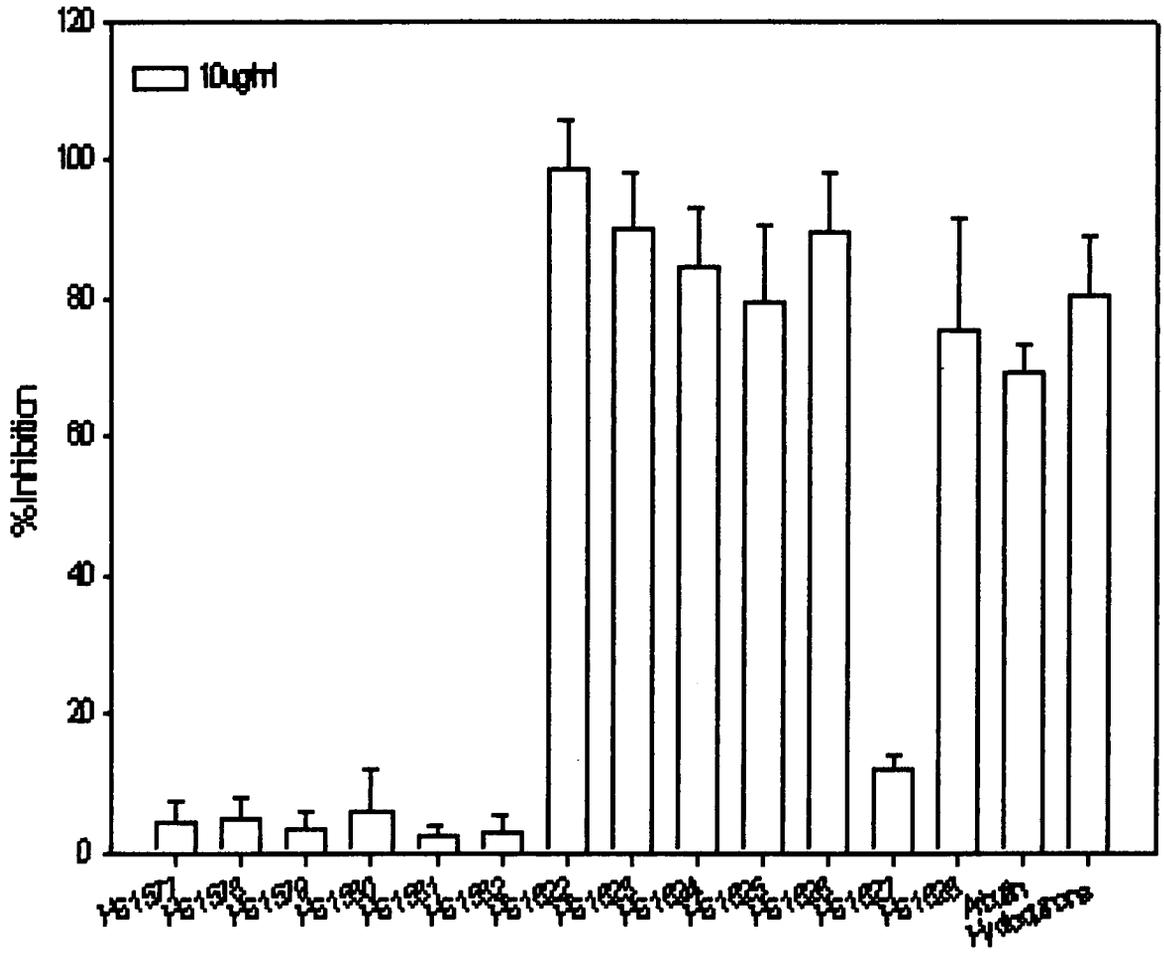
$$\% \text{억제율} = \left(1 - \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{control1}} - OD_{\text{control2}}} \right) \times 100$$

표 9-1. 실험계의 조성 (Composition of experiment)

Sample	sample	buffer	L-Tyrosine	Tyrosinase
Blank	sample	buffer	L-Tyrosine	buffer
Control 1	buffer	buffer	L-Tyrosine	Tyrosinase
Control 2	buffer	buffer	L-Tyrosine	buffer



도 9-7. 1차 화합물들의 농도별 티로시나아제 활성 억제 효과
(Effects of tyrosinase inhibition of primary mixture by concentration)



도 9-8. 티로시나아제 활성 억제 효과
 (Effects of activity of tiroxinase inhibition)

제 10 절 다시마 sample의 미백효과에 관한 연구

1. MTT assay (세포독성실험)

가. 원리

MTT의 tetrazolium salts(노란색)가 alive mitochondria에 의해 cleavage되어 water-insoluble formazan salt(보라색)를 형성한다.

→ quantitative colormetric assay

나. 결과

Arbutin에 sample을 첨가한 경우에도 세포독성은 거의 없음을 보아 세포에 대해 매우 안정하다. (도 10-1)

2. Melanin Release Inhibitory Assay (미백효과 실험)

가. 원리

B16 melanocyte에서 약물이 melanin release를 억제하는 정도를 비교한다.

나. % inhibition의 계산식

$$\% = \left(1 - \frac{\text{약물처리후의 OD}}{\text{control의 OD}}\right) \times 100$$

다. 결과

concentration-dependent하게 증가하는 미백활성 가지는데, Arbutin만의 경우보다 sample을 첨가한 경우에 미백활성이 더욱 증가하였다. (도 10-2)

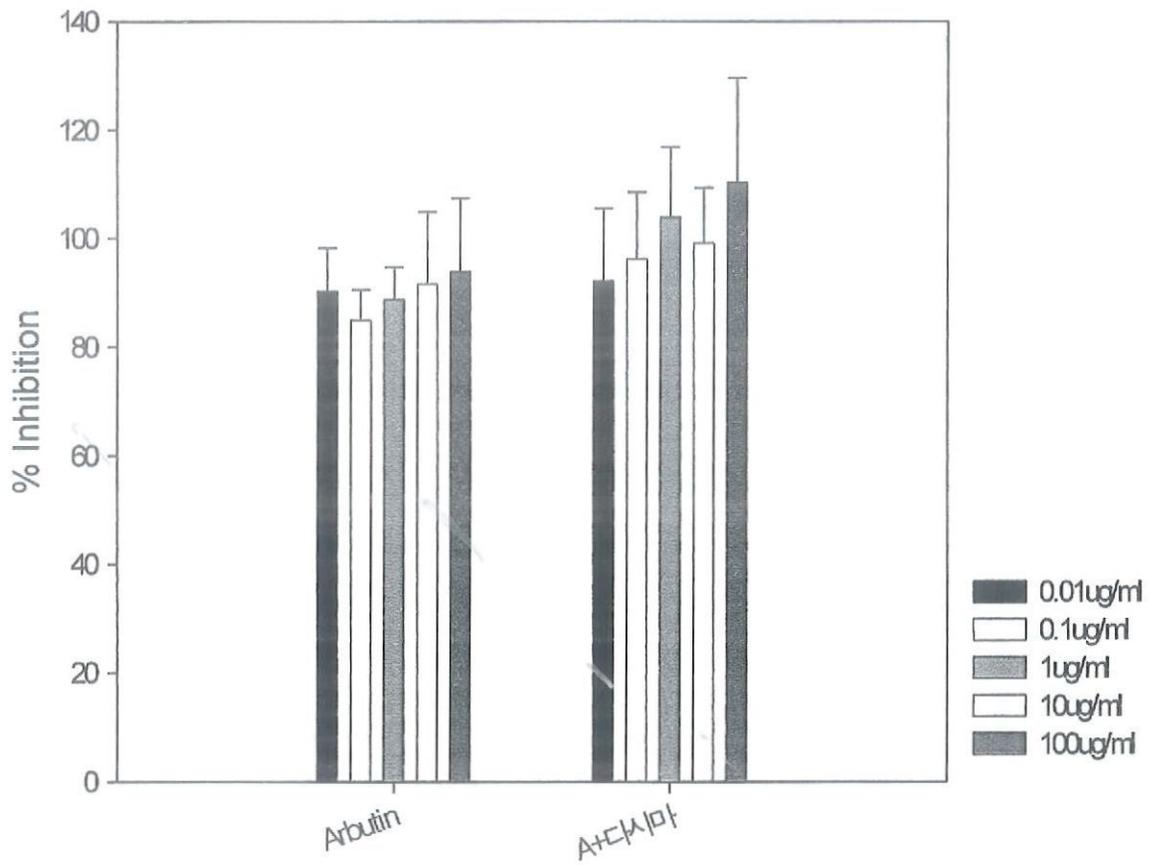
3. Mushroom Tyrosinase assay

가. 원리

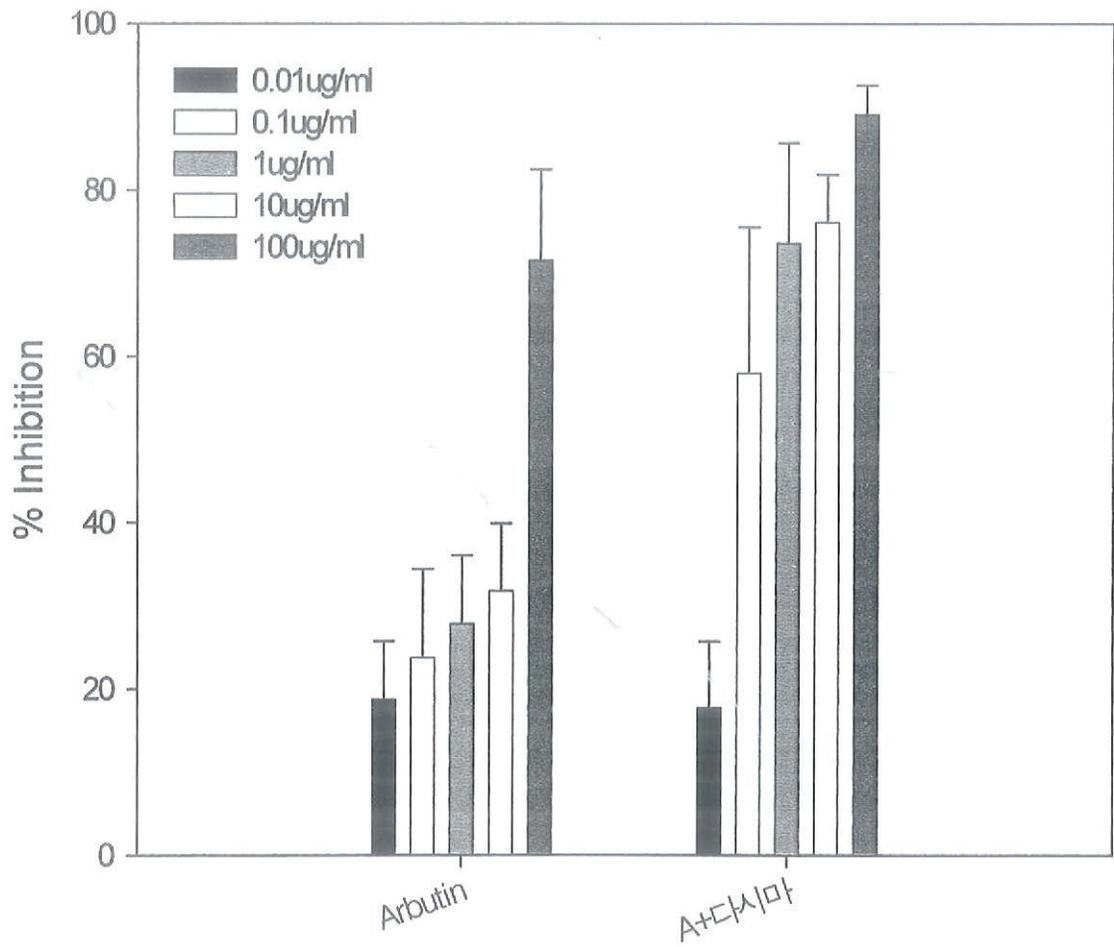
세포내의 Tyr이나 DOPA는 tyrosinase에 의해 산화되어 몇 단계를 거쳐 melanin이 되므로, 시판용 Tyr이나 DOPA를 기질로 하고 시판용 tyrosinase를 이용하여 약물이 tyrosinase의 활성을 억제하는 효능정도를 알아본다.

나. 결과

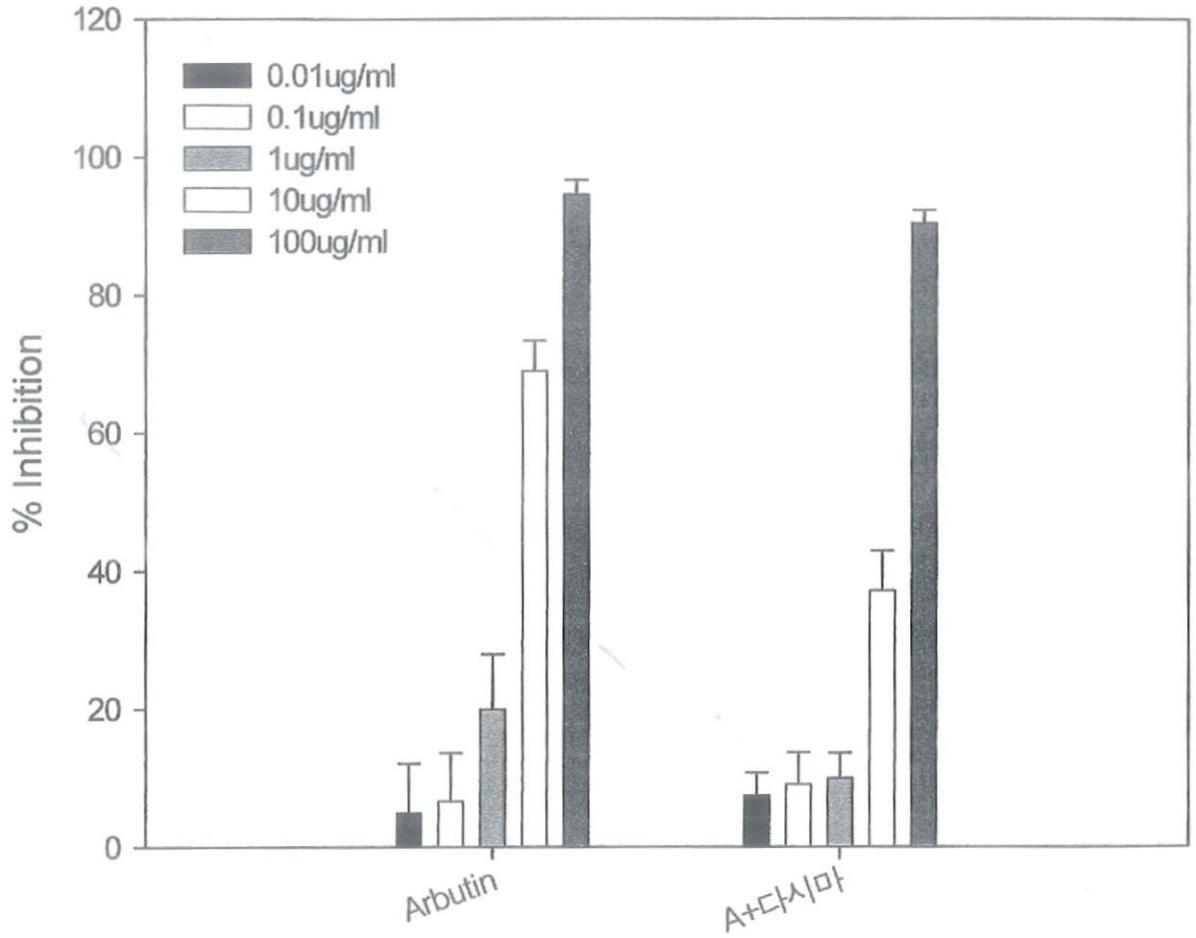
농도에 따라 저해활성이 증가하였는데 sample을 단독으로 실험한 경우는 tyrosinase inhibitor가 아니었고, sample을 첨가한 경우에도 arbutin의 tyrosinase inhibition에 거의 영향을 미치지 않았다. (도 10-3)



도 10-1. sample의 세포 독성 조사 (Result of MTT assay)



도 10-2. 미백효과 실험 (Melanin release inhibition)



도 10-3. Tyrosinase의 활성을 억제 효과 (Mushroom Tyrosinase assay)

제 11 절 활성 단백질의 정제 및 물성 연구

1. 붕장어로부터 평활근 수축물질의 정제 및 생화학적 특성

가. 실험방법

(1) 붕장어 피부로부터 crude sample의 추출

부산 부전시장에서 붕장어(*Coger myester*)를 해부하여 피부를 즉시 액체질소로 동결시켜 실험 시작 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다.

동결된 붕장어 피부 7kg을 끓는 물 12000ml에 넣고 10분간 끓여 식힌 후 Heavy duty laboratory blender (Waring Model 38BL52, LBC 10)로 조직을 파쇄하였다. 이후 acetic acid 600ml을 첨가하여 5% acetic acid solution이 되도록 만든 후 4°C 에서 24시간동안 추출하였으며, 초산 추출물은 원심분리(10,000xg, 20min, 20°C) 후 상층액만 모아서 ratory evaporator로 농축하였다. 농축된 시료는 ethanol을 20000ml(sample:ethanol = 1:4, v/v)을 첨가하여 다시 원심분리(10,000xg, 20min, 4°C)를 행한 후 상층액을 농축하였다.

농축된 시료에 다시 ethanol을 첨가(sample:ethanol = 1:7, v/v)한 뒤 원심분리(22,000xg, 20min, 4°C)분리를 하였고, 상층액을 농축하여 최종적으로 1N HCl을 첨가하여 최종농도가 0.1 NHCl 추출액이 되도록하여 -30°C 냉동고에서 3시간 보관후 원심분리를 하였다.

(2) 붕장어 피부로부터 추출된 시료의 정제

HPLC정제에 들어가기 전에 정제되지 않은 sample을 분리하기 위한 예비단계로서 Sep-pak C18 cartridge(20ml, Waters)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 먼저 Sep-pak C18 cartridge를 100% MeOH (in 0.1% TFA)로 활성화시키고 난 뒤 D.W.로 충분히 세척하였다. 그 후 sample을 apply하고 다시 한 번 cartridge를 D.W.를 주입하여 물질을 용출시킨 뒤 (flow throw: FT) 차례로 10% MeOH (in 0.1% TFA)로 용출시키고 (retained materials: RM10), 다음은 60% MeOH로 용출하였다 (RM60). 마지막으로 100% MeOH로 남아 있는 물질을 용출시킨 뒤 (RM100) 동결건조하였다. (도 11-1) 용출된 D.W., RM 10, RM 60과 RM 100의 평활근에 대한 수축활성은 Rat (Wister계, 230-250g)의 십이지장 (duodenum)과 떡장어 (*Epatatretua burgeri*)의 장관(intestine)을 이용하여 측정하였다. (도 11-3) 활성측정 결과 떡장어 장관에 대한 유의적인 반응을 나타낸 RM 60을 Sepadex G-25 column (2.6 x 110 cm, Pharmacia, Sweden)에 size exclusion (flow rate 1.0ml/min)을 행한 후 다시 떡장어 장관에 대해 수축활성을 측정하였다(도 11-4).

(3) 평활근 수축활성측정

(가) Rat 십이지장(duodenum)에 대한 수축활성

Rat (Wister계, 230-250g)의 웅성 rat (Sprague-Dawley)를 단두하여 복부를 절개한 뒤 위장(stomach)아래 유문 괄약근으로부터 십이지장을 절취한다. 절취된 십이지장은 Krebs's 완충액 (mM: NaCl 118.7, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.8, Glucose 10.1, CaCl₂ 1.8)이 담긴 상태에서 결체조직을 제거 후 면실로 10 mm 정도의 길이 정도로 아래와 위를 묶고, 아래는 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 isometric transducer에 연결하여 1.0 g의 장력을 주었다.

수축활성측정은 37°C에서 반응조내에 공기를 주입시켜 주면서 분리된 분획들을 반응조에 주입하였다. 분획들의 주입후 Ringer 용액으로 씻어주고 계속해서 분획들을 주입하면서 수축활성을 측정하여 physiograph상에 기록하였다. (도 11-2)

(나) 먹장어 장관수축활성

먹장어 (*Epatatretua burgeri*) 장관 표본을 만들기 위해 배측부를 항문쪽으로부터 절개한 후, 항문쪽으로부터 0.5 cm 떨어진 부위로부터 위쪽으로 장관을 3-4 cm 길이로 재빨리 적출한다. 적출된 장관의 결체조직을 제거하고, 면실로 10-15 mm 정도의 길이로 양끝을 묶어 아래쪽은 반응조에 고정시키고 위쪽은 isometric transducer에 연결하여 1.5 g의 장력을 주었다. 실온에서 15분 간격으로 인공해수 (mM: NaCl 445, KCl 10, CaCl₂·2H₂O 10, MgCl₂·6H₂O 55, Glucose 10, 0.5 M Tris-HCl 완충액 (pH 7.8) 20 ml)를 갈아주면서 평형화하였다. (도 11-2)

(4) 정제(Purification)

Size exclusion을 통해 용출된 활성분획은 순수한 단일물질 얻기 위해 성질이 다른 이온교환 및 역상 HPLC column을 이용하여 물질을 분리하였다. 각각의 HPLC 정제를 통해 얻어진 분획들은 먹장어 장관에 대해 수축활성을 측정하였고, 얻어진 활성분획들은 농축 후 다시 다음단계의 HPLC 정제를 위하여 사용하였다. 정제단계는 다음과 같다.

(가) 첫 번째 단계 :

첫 번째 정제에서는 size exclusion을 통해 얻어진 농축된 활성분획들을 cation-exchange column인 TSK-gel SP-5PW (7.5 x 75 mm, Tosho, Japan)를 사용하여 A용매로서 10 mM phosphate 완충액 (pH 6.0)과 B용매로서 10 mM phosphate 완충액 (pH 6.0) 포함하는 1.0 M NaCl 용액을 사용하여 0-1.0 M의 B 용매 linear gradient를 걸었고 유속은 1.0 ml/min으로 200분간 분리를 행하였다. (도 11-5)

(나) 두 번째 단계 :

두 번째 단계로 reversed-phase HPLC (Vydac C18, 218TP510) column에 적용하여 A 용매로 0.1 % TFA 수용액 (pH2.2)과 B 용매로서 0.1 % TFA를 포함하는 100 % acetonitrile (pH2.2)을 사용하여 0-60 %의 B용매 linear gradient를 걸었고 유속은 2.0 ml/min으로 120분간 분리를 행하였다. (도 11-6)

나. 실험결과

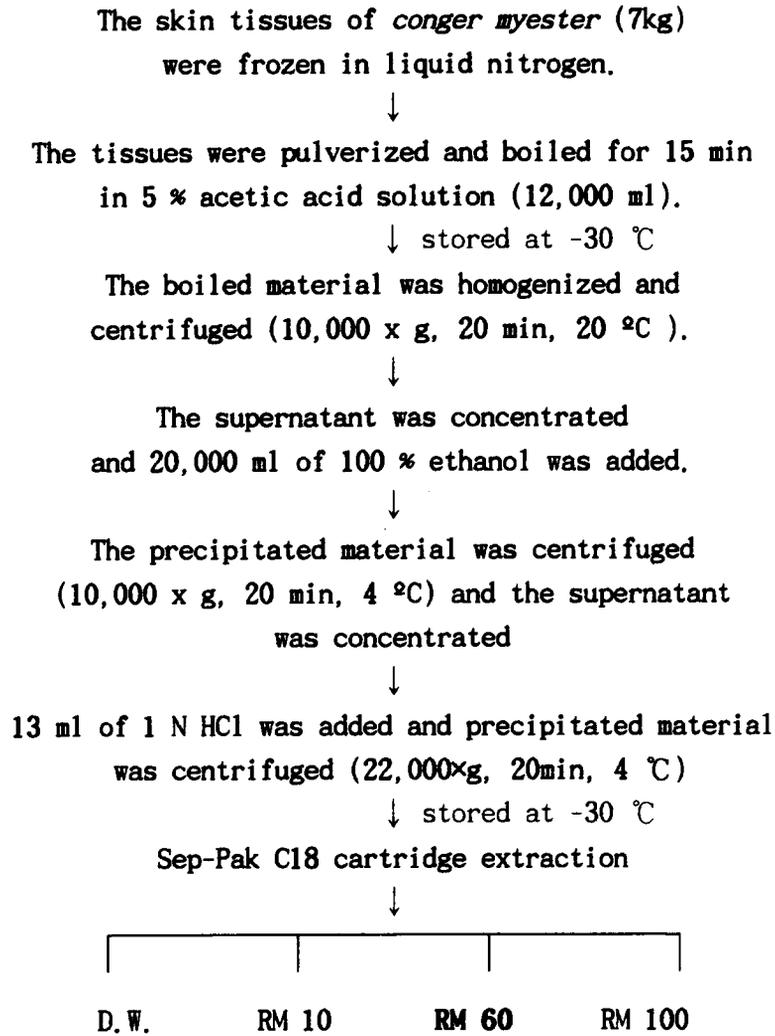
(1) 붕장어 피부로부터 추출한 crude extract의 생리활성

Rat의 duodenum과 떡장어 intestine에 대한 수축반응을 알아보기 위해 붕장어 피부로부터 추출한 FT, RM 10, RM 100을 이용하여 측정하였다. Rat duodenum에 대해 FT는 장관에 적용 후 급격한 수축반응 후 자율운동이 소실되었다. RM 60의 경우 큰 수축반응은 관찰되지 않았으나 약간의 이완반응을 보였다. 한편, RM 10과 Rm 100은 아무런 활성을 나타내지 않았다. 떡장어 장관에 대해서는 FT, RM 10 그리고 RM 60이 수축활성을 보였고, 그 중 RM 60이 가장 큰 활성을 나타냈다. 그러나 RM 100은 활성을 나타내지 않았다. (도 11-3)

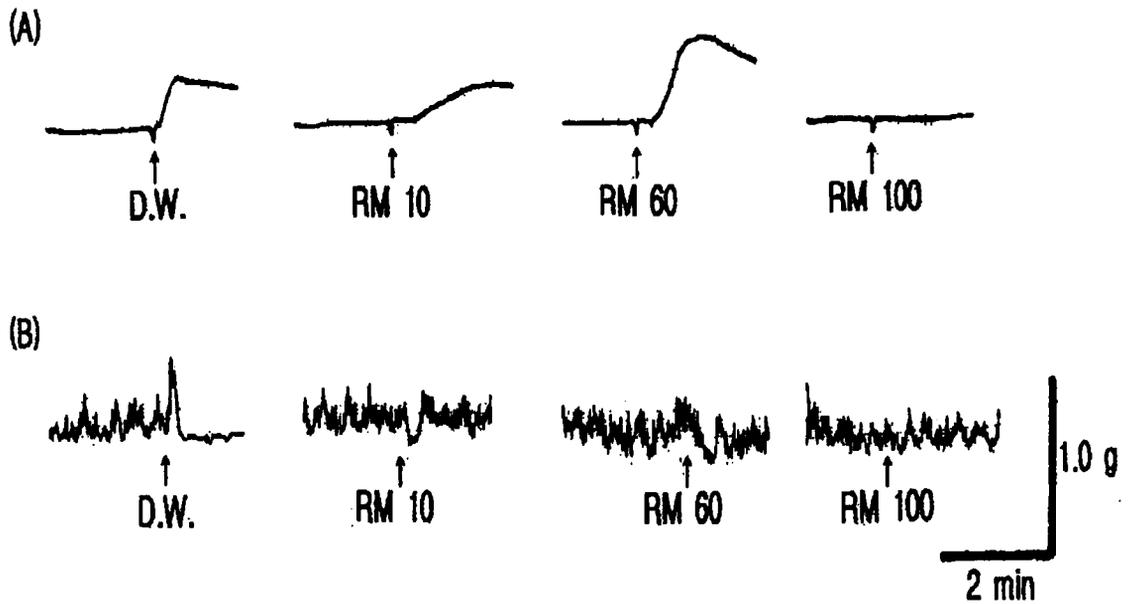
(2) 정제

(가) 붕장어 피부 추출물 RM 60으로부터 생리활성물질 정제

떡장어 장관에 대해 수축활성을 보인 RM 60로부터 생리활성물질을 정제하기 위해 첫 번째로 Sephadex G-25 (2.6 x 110 cm, Pharmacia, Sweden) column에 주입하여 size exclusion을 행한 결과, 14-35번 분획에서 수축활성을 나타내었다 (도 11-4). 반응을 나타낸 활성분획들을 양이온 교환 column인 SP-5PW (7.5 x 75 mm)를 사용하여 정제하였고, 각 분획들에 대해 수축활성을 측정한 결과, 약 0-0.03 M NaCl (Fractions # 0-5)에서 용출된 분획에서 수축활성이 나타났다 (도 11-5). 계속해서 활성분획들을 역상 column인 Vydac C18 (218TP510)을 사용하여 정제하였으며, 그 결과 13-27% CH₃CN 범위 (Fractions 3 16-30)의 분획에서 수축활성을 나타내었다. (도 11-6)



도 11-1. 떡장어의 피부로부터 novel bioactive peptide를 추출하는 과정
(Procedures for extraction of an novel bioactive peptide from skin of the
conger eel (*conger myester*)).

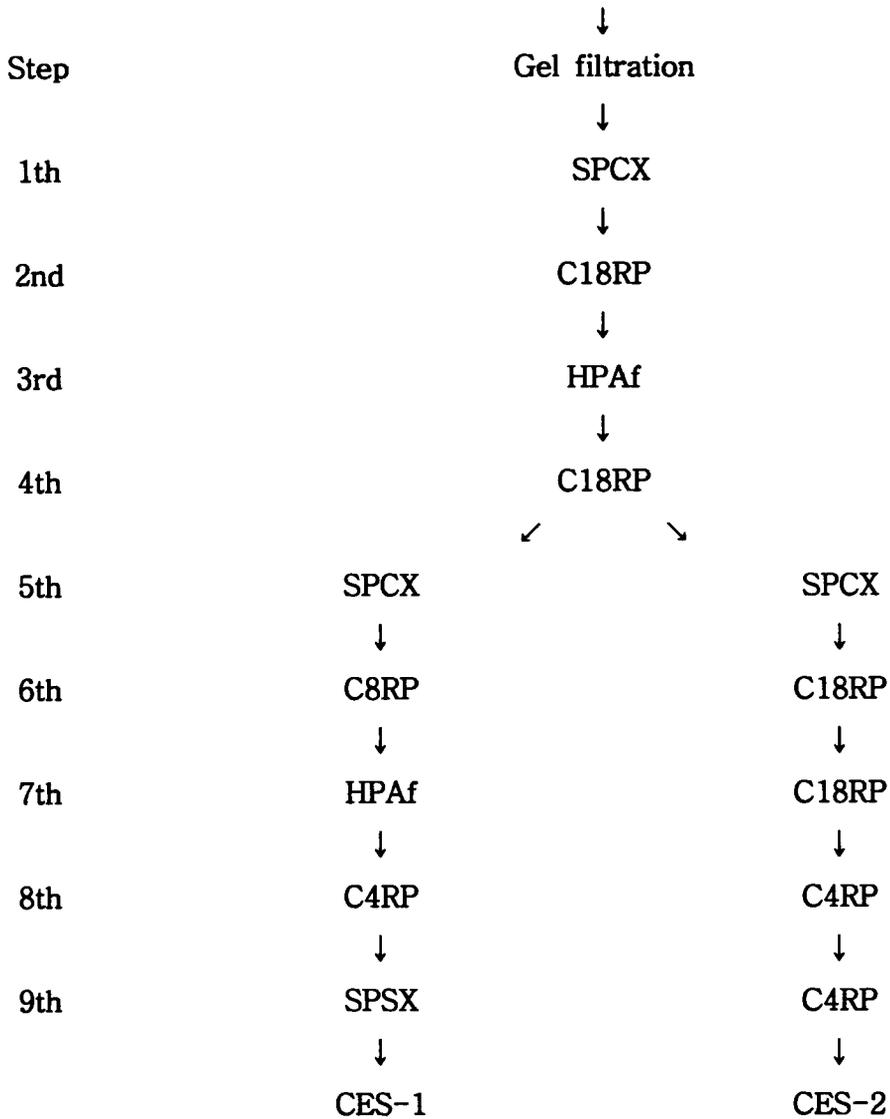


도 11-2. Rat 십이지장(duodenum)에 대한 수축활성

(The contractile activity of conger eel(*conger myester*) extracts on the rat duodenum)

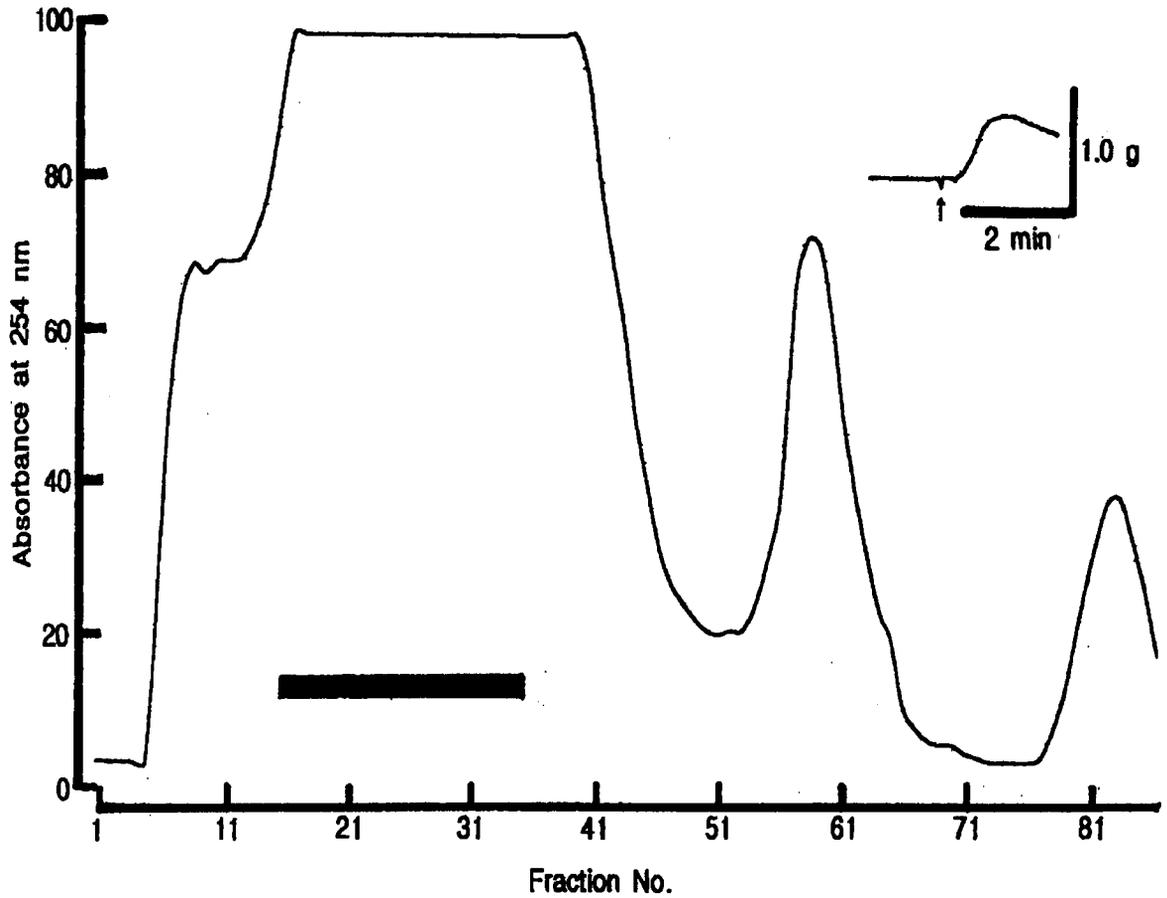
(A) and hagfish intestine (B). RM10; the eluate of 10 % methanol in 0.1 % TFA, RM60 ; the eluate of 60 % methanol in 0.1 % TFA, RM100: the eluate of 100 % methanol in 0.1 % TFA. An aliquot (1/1000) of each extract was applied at the time indicated by an arrow

Retained material 60 (RM 60)



도 11-3. 멍장어 피부로부터 추출한 peptide의 HPLC 정제 과정

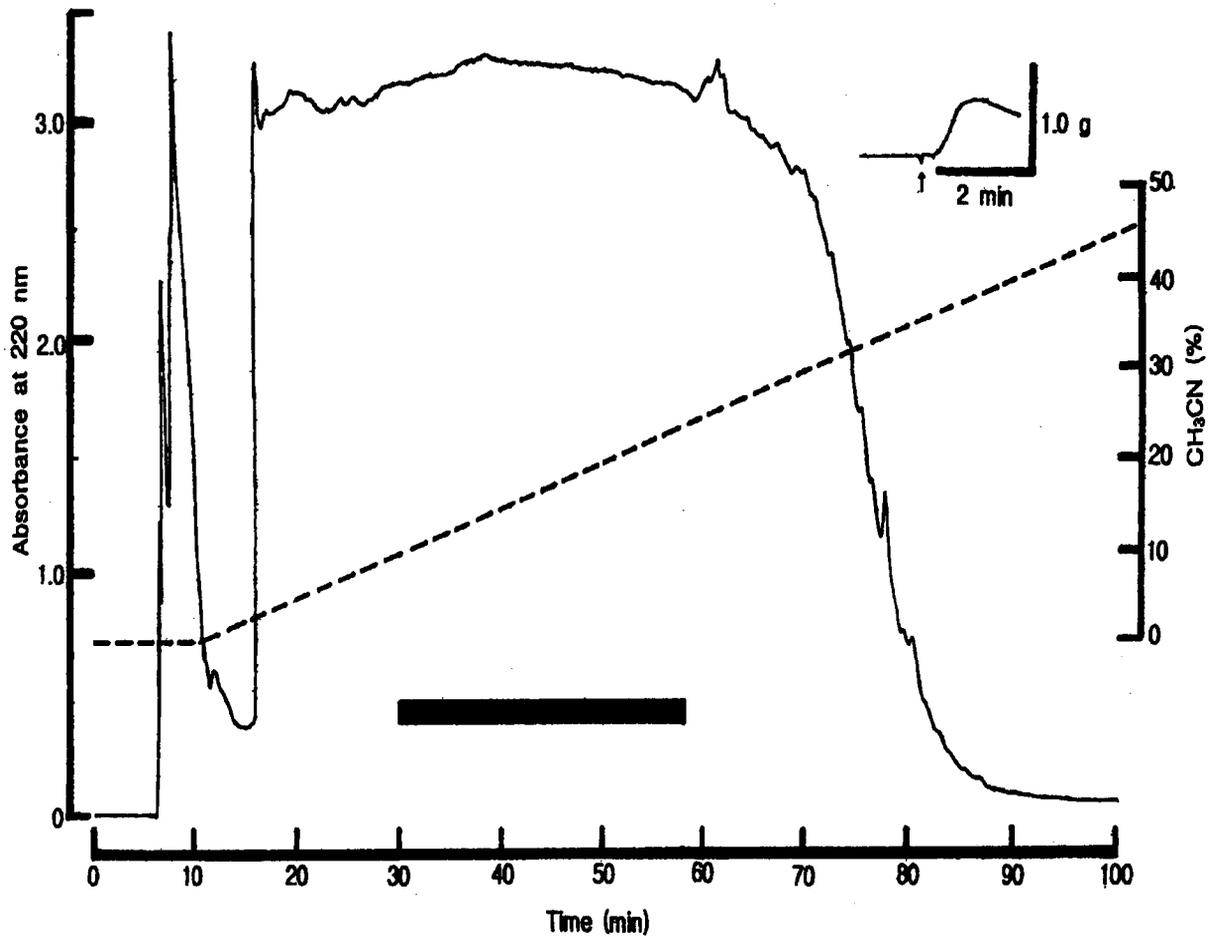
(Summarized procedures for HPLC purification of the peptides (CES-1, CES-2) in the extracts of the skin of conger eel (conger myester)).
 C18RP: C18 reversed-phase column, Vydac C18, Capcell-pak C18. SPCX: cation-exchange column, TSKgel SP-5PW. HPAf: affinity column, TSKgel Heparin-5PW. C8RP: reversed-phase column, Nova-pak C8. C4RP: reversed-phase column, Vydac C4. SPSX: size exclusion column, Superdex peptide HR 10/30.



도 11-4. 붕장어 피부 추출물 RM 60으로부터 생리활성물질 정제

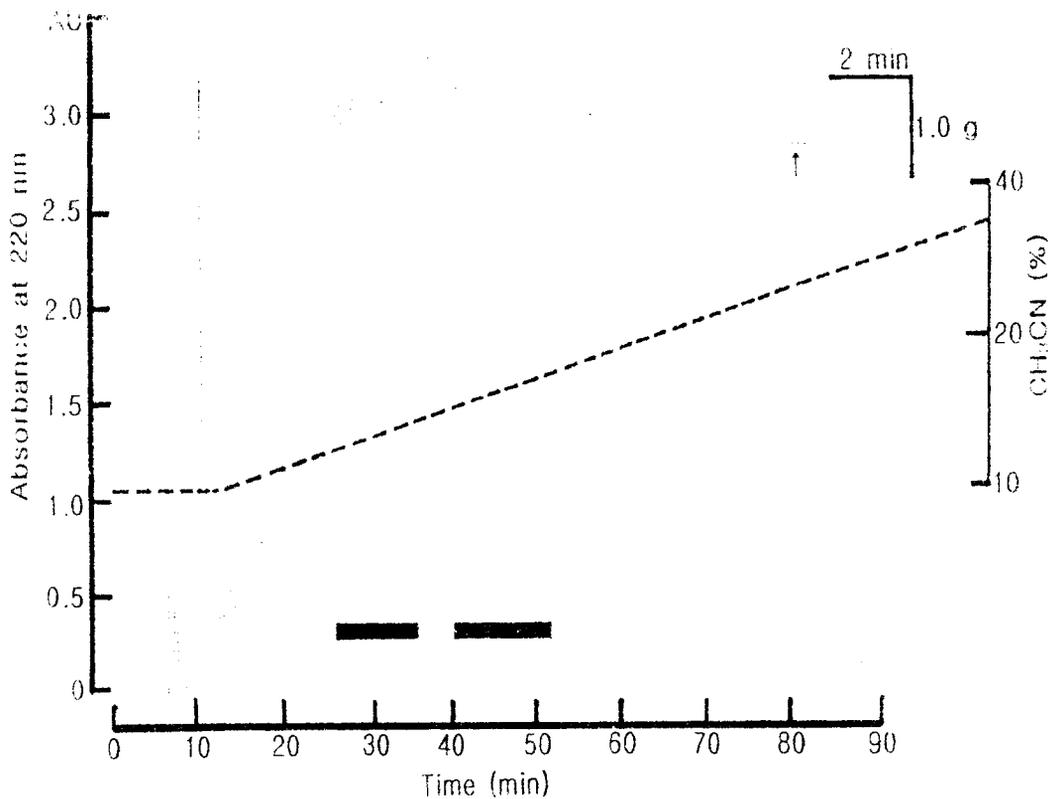
(Gel-filtration profile of the RM 60 from the Sep-Pak C18 cartridge on sephadex G-25 column(2.6 x 110 cm, Pharmacia) using 5 % acetic acid as eluent).

Fraction (15 ml) were collected and contractile activity was assayed with 15 μ l of each fraction.



도 11-5. 2차 정제 과정 (The 2nd Reversed-phase HPLC purification profiles of active fraction from cation-exchange column).

The active fraction were pooled and loaded onto a Vydac C18 column and eluted with a linear gradient of CH₃CN(dotted line) in 0.1 % TFA(120 min) at flow rate of 2.0 ml/min, contractile substance from conger eel skin. Fraction indicated by the bar showed an contractile activity on the hagfish intestine.



도 11-6. HPLC 정제의 chromatogram 의 4단계 (The chromatogram of the 4th step of reversed-phase HPLC (Capcell-pak C18, 10×250mm)).
The dashed line shows the concentration of acetonitrile in elution solvent. The fractions indicated by the black bars, denominated CES-1 and CES-2, caused contraction on the intestine of hagfish, respectively.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

본 과제는 해양 신기능성 활성 물질의 선도성 검증 및 개발을 목표로 한다. 이에 따른 연구로 천연물의 신 기능성 활성물질 추출을 근거로 유도체 합성과 해양생물 자원을 이용한 항균, 항암, 항노화제의 개발, 그리고 미백효과를 보였다. 해조류 (곰피, 우무가시리)에서 추출, 분리, 구조결정한 천연해양 활성물질인 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzylether (TDB) 및 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol (TDB-OH) 분자의 유도체 15종을 합성하였으며 이들이 콜레스테롤 조절에 관여하는 LDL 산화를 방지하는 효과를 확인할 수 있었다. 유도체 중 HS-1605 및 심바스타틴군의 동맥경화 억제효과와 간독성을 비교 완료하였으며, 콜레스테롤 조절능력 *in vivo* 실험 후보로 선별완료하였다. 이러한 효과를 지닌 HS-1650을 사용하여 고지혈증 치료제 개발시 간독성이 낮으므로 의약분야에 밝은 전망이 보일 것으로 기대된다.

또 유도체의 항노화 기전 연구로 세포에 oxidative stresses가 야기되었을 때에 유도체가 이를 억제하는 것을 볼 수 있었다. 또한 미백효과 면에서는 B16 melanoma cell line으로부터 melanin 분비를 강력하게 억제하는 결과를 얻을 수 있었다.

이에 더하여 해양생물인 붕장어의 분산물인 피부로부터 새로운 신경성 펩타이드를 분리 정제하여 그 활성메카니즘을 규명함으로써 유용 생리활성물질의 개발에도 충분한 정도의 연구진척도를 나타내고 있으며, 앞으로 몇몇 단계의 HPLC 정제과정을 행한 후 구조분석을 통해 하나의 새로운 생리활성물질을 개발할 수 있으리라 사료된다.

본 연구의 성공적인 수행은 해양생물자원을 이용하는 학문적 수준을 높이고 해양 생물자원의 보호 및 해양환경 보존에 크게 기여할 것이다. 해양생물자원의 이용 및 기초연구에 대한 요구의 잠재력의 극대화를 초래하고 해양생물자원의 활용을 위한 다양한 기술들의 개발 욕구를 높일 수 있을 뿐만 아니라 국가가 지향하는 기초과학 기술의 향상 및 기초과학기술자의 연구의욕 고취는 물론 연구투자 효율성을 극대화 하여 연구 인력투자 부문 및 재원의 효율적 활용면에서의 선진국과의 격차를 현격히 줄일 수 있다고 생각된다.

나아가 해양생물자원에 대대한 국민적인 인식을 이해 증진시킬 수 있으며 미래 해양자원에 대한 고갈을 미리 예방할 수 있는 의식을 고취시킬 수 있다.

본 과제에서는 특히 1건을 출원 준비 중에 있으며 2건의 논문도 투고 준비 중이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

수명의 연장으로 인한 고령화 사회에 대한 각종 문제들이 국내에서도 본격적으로 제기되고 있다. 특히 노화의 진행과 더불어 암, 동맥경화, 당뇨, 폐기종, 파킨슨씨 병 등 퇴행성질환 발생이 증대되고 있으며 이에 따른 의료문제 등으로 커다란 사회·경제적 비용을 요구하고 있다. 따라서 상기 문제의 근본적인 대책을 위해서는 노화의 진행을 억제하거나 지연시켜 이들 퇴행성질환의 발생을 억제하는 것이다. 특히 노화 및 노화와 더불어 발생하는 퇴행성 질환들의 발생 원인으로 최근 가장 주목을 받고 있는 것이 활성산소종((reactive oxygen species: ROS)이다. 본 과제에서 개발한 유도체들은 우수한 항산화제로서 미백제 및 콜레스테롤 조절제 등으로 응용되어질 수 있다. HS-1650은 현재 가장 많이 시판되고 있는 고지혈증 치료제인 simvastatin에 비하여 동등한 정도로 고지혈증의 치료를 가져오나 간독성이 낮으므로 추가적인 개발의 연구가 필요하다.

따라서 활성산소종에 의한 신호전달계와 세포사멸의 유도에 대한 기작 규명 및 해양생물들로부터 항산화물질의 개발을 통한 효율적인 조절은 노화와 관련된 여러 가지 질환의 발생을 억제하여 국민 보건과 사회, 경제적 비용 문제의 해결에 크게 기여할 것이다.

나아가 기능성 활성물질이 해양생물로부터 생산됨으로 가공으로 인한 폐기물을 재활용하여 고부가가치가 있는 생산물로 생산할 수 있을 뿐만 아니라 환경오염을 방지 하는데 기여할 것이다.

뿐만 아니라 신기능성 식품, 식품첨가제, 화장품개발로 국민 보건향상과 고부가가치가 있는 수출전략상품 개발에 기여하고 생물제제 산업으로 발전하는데 있어서 해양생물의 응용분야에 초석으로 활용되어 질 것이다.

제 6 장 참고문헌

- 1) Albrecht, E. W., C. A. Stegeman, A. T. Tiebosch, A. M. Tegzess and H. van Goor (2002) Expression of inducible and endothelial nitricoxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. *Am J. Transplant.* 2:448-453.
- 2) Aviram, M.; Hussein, O.; Rosenblat, M.; Schlezinger, S.; Hayek, T.; Keidar, S., Interaction of Platelets, Macrophages, and Lipoproteins in Hypercholesterolemia: Antiatherogenic Effects of HMG-CoA reductase Inhibitor Therapy, *J. Cardiovascular Pharmacology*, 1998, 31, 39-45
- 3) Bass, D. A.; Parce, J. W.; Dechatelet, L. R.; Szejda, P.; Seeds, M. C.; Thomas, M., Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation, *J. Immun.* 1983, 130, 1910-1917.
- 4) Blois, M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 1958, 26, 1199-1200.
- 5) Brugarolas, J., C. Chandrasekaran, J. I. Gordon, D. Beach, T. Jacks and G. J. Hannon, (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377 :522-557.
- 6) Buccolo, G.; David, H., Quantitative Determination of Serum triglycerides by the use of enzymes, *Clin. Chem.*, 1973, 19, 476.
- 7) Buege, J. A.; Aust, S. D., Microsomal lipid peroxidation, *Methods in enzymology*, 1978, 52, 302-310.
- 8) Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Terras, F. R., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S. B., Vanderleyelen, J. and Broekaert, W. F. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 2228-2233
- 9) Chen, Q. M., J. C. Bartholomew, J. Campisi, M. Acosta, J. D. Reagan and B. N. Ames (1998) Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb

- control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* 332:43-50.
- 10) Chung NS, Basile S., Livett BG (1993) *Neuropeptides*, 24, 91-97
 - 11) Conlon, J. M., Katsonlis, S., Schmidt, W. E. & Thim, L. (1988) *Regul. Pept.*, 20, 111-116
 - 12) Converse, C. A.; Skinner, R. E., *Lipoprotein Analysis. A practical Approach*, Oxford University Press, 1992, p205
 - 13) Crow, J. P., Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are Sensitive indicators of peroxynitrite in vivo: Implications for intracellular Measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide, Biology and Chemistry* 1997, 1(2), 145-151.
 - 14) Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Hua, J. and Lacroix, C. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3450-3455
 - 15) Deng, C., P. Zhang, J. W. Harper, S. J. Elledge and P. Leder (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82:675-684.
 - 16) Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubeli, O. Pereira-Smith, M. Peacocke and J. Campisi (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:9363-9367.
 - 17) El-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
 - 18) Erspamer, V. (1981) *Trends Neurosci.*, 4, 267-269
 - 19) Fang, L., M. Igarashi, J. Leung, M. M. Sugrue, S. W. Lee and S. A. Aaronson (1999) p21waf1/cip1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. *Oncogene* 18:2789-2797.

- 20) Gabay, J. E. (1994) *Science* 264, 373-374
- 21) Gasparo, M. (2002) Angiotensin II and Nitric Oxide Interaction. *Heart Fail Rev.* 7:347-358.
- 22) Gebhardt, R., Inhibition of Cholesterol Biosynthesis by a Water-soluble Garlic Extract in Primary Cultures of Rat Hepatocytes, *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, 1991, 41, 800-804.
- 23) Gibson, B. W., Tang, d., Maandrell, R., Kelly, M. and Spindel, E.R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 23103-23111
- 24) Harsch, M.; Braesen, H. J; Niendorf, A., Effects of Low-Dose Pravastatin Sodium on Plasma Cholesterol Levels and Aortic atherosclerosis of Heterozygous WHHL Rabbits Fed a Low Cholesterol(0.03%) Enriched Diet for One Year, *Atherosclerosis*, 1997, 128, 139-147
- 25) Haskew, R. E., A. A. Mongin and H. K. Kimelberg (2002) Peroxynitrite enhances astrocytic volume-sensitive excitatory amino acid release via a src tyrosine kinase-dependent mechanism. *J. Neurochem.* 82:903-912.
- 26) Heller, F. R.; Descamps, O.; Hondekihin, J. C., LDL Oxidation-Therapeutic Perspectives, *Atherosclerosis*, 1998, 137, S25-S31.
- 27) Ho, C-L. and Hwang, L-L. (1991) *Biochem. J.*, 274, 453-456
- 28) Hoshida, S.; Yamashita, N.; Igarashi, J.; Aoki, K.; Kuzuya, T.; Hori, M., Long-Term Probucol Treatment Reverses the Severity of myocardial Injury in Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1997, 17, 2801-2807
- 29) Hung, L. E., J. Gu, M. Shau and H. F. Bunn (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by and O₂-dependent degradation in domain via the ubiquitin - proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:7987-7992.
- 30) Hwang, J. W.; Song, Y. O., The effect of solvent fractions of Kimchi on

- plasma lipid concentration of rabbit fed high cholesterol diet, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2000, 29,(in printing).
- 31) Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S.; Crow, J. P.; Ye, Y. Z.; Royall, J. A.; Kooy, N. W.; Royall, J. A.; Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhocamine 123, *Free Radical & Medicine* 1994, 16(2), 149-156.
 - 32) Jeong, Y. K.; Yang, W. S.; Kang, J. O.; Kong, I. S.; Kim, J. O., Fibrinolysis of fermented Kimchi, *Korean J. Life Sci.*, 1995, 5, 203-210.
 - 33) Jo, S. H., S. H. Lee, H. S. Chun, S. M. Lee H. J. Koh, S. E. Lee, J. S. Chun, J. W. Park and T. L. Huh (2002) Cellular defense against UV-induced phototoxicity by cytosol NADP+-dependent Isocitrate dehydrogenase, *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 292 : 542-549.
 - 34) Kasprzak, K. (1991) The role of oxidative damage in metal carcinogen city. *Chem. Res. Toxicol.* 4:604-615.
 - 35) Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein and R. W. Craig (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51:6304-6311.
 - 36) Kim, M. J.; Song, Y. S.; Song, Y.O., The fibrinolytic activity of Kimchi and its ingredients in vivo and in vitro, *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, 1998, 27, 633-638
 - 37) Kim, H. J., Antiatherogenic effect of solvent fraction of cabbage Kimchi in rabbit, Master Thesis, 2000, Pusan National University.
 - 38) Kini, R. M. and Evans, H. J. (1989) *Int. J. Peptide Protein Res.*, 34, 277-286
 - 39) Kozawa, H., Hino, J., Minamino, N., Kangawa, K. & Matsuo, H. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177. 588-595
 - 40) Kwon, M.J.; Song, Y. O.; Song, Y.S., Effects of Kimchi on Tissue and

- Fecal lipid composition and apolipoprotein and tyroxine levels in rats, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 1997, 26, 507-513
- 41) Kwon, M.J.; Song, Y. S.; Song, Y.O., Antioxidative effect of Kimchi ingredients on rabbits fed cholesterol diet, J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr., 1998, 27, 1189-1196
- 42) Kwon, M.J., Antiatherogenic effect of Baechu Kimchi, Ph. D.Dissertation, 1998, Pusan National University
- 43) Kwon, M. J.; Song, Y. O.; Song, Y.S., Effects of Kimchi on Tissue and Fecal lipid composition and Apolipoprotein and tyroxine levels in rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 1997, 26, 507-513.
- 44) Kwon, M. J.; Song, Y. S.; Song, Y.O., Antioxidative effect of Kimchi ingredients on rabbits fed cholesterol diet, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 1998, 27, 1189-1196.
- 45) Kwon, M. J., Antiatherogenic effect of Baechu Kimchi, Ph. D.Dissertation , 1998, Pusan National University.
- 46) Lebel, C. P.; Bondy, S. C., Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosome, Neurochem. Int., 1990, 17(3), 435-440.
- 47) Lee, Y. M., Identification of active principle responsible for antiatherogenesis in methanol extract of Baechu Kimchi, Master Thesis, 2000, Pusan National University.
- 48) Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K. and Ganz, T. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11, 105-128
- 49) Leonard, S., P. M. Gannett, Y. Rojansakul, D. Schwegler-Berry, V. Castranova and X. Shi (1998) Cobalt-mediated generation of reactive oxygen species and its possible mechanism. J. Inorg. Biochem., 70:239-244.

- 50) Lowe, S. W., E. M. Schmitt, S. W. Smith, B. A. Osborne and T. Jacks (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362:847-849.
- 51) Macip, S., M. Igarashi, L. Fang, A. Chen, Z. Q. Pan, S. W. Lee and S. A. Aaronson (2002) Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* 31:2180-2188.
- 52) Martin, G. M., S. N. Austad and T. E. Johnson (1996) Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Genet.* 13:25-34.
- 53) Minchenko, A. I. Leshchinsky, I. Opentanova, N. Sang, V. Srinivas, V. Armstead and J. Caro (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene: its possible role in the Warburg effect. *J. Biol. Chem.* 277:6183-6187.
- 54) Misuda, H.; Yasumoto, K.; Iwami, K., Antioxidative Action of Indole compounds during the Autoxidation of linoleic acid, *Eiyo to Shakuryo* 1966, 19, 210-214.
- 55) Nakai, A.; Nishikata, M.; Matsuyama, K.; Ichikawa, M., Drug Interaction Between Simvastatin and Cholestyramine in vitro and in vivo, *Biol. Pharm. Bull.*, 1996, 19, 1231-1233.
- 56) Noguchi, N.; Okimoto, Y.; Tsuchiya, J.; Cynshi, O.; Kodama, T.; Niki, E., Inhibition of Oxidation of Low-Density-lipoprotein by a Novel Antioxidant, BO-653, Prepared by Theoretical Design, *Archiv. Biochem. Biophys.*, 1997, 3347, 141-147.
- 57) Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979, 95, 351-358.
- 58) Park, Y. B.; Jeoung, N. H.; Kim, H. S.; Choi, M. S., Reaction of HDL-Bound Cholesteryl Ester Transfer Protein and a New Method for

its activity measurement, Korean Biochem., J., 1992, 25, 409-417.

- 59) Parthasarathy, S.; Santanam, N.; Ramachandran, S.; Meilhac, O., Oxidants and Antioxidants in atherogenesis : an Appraisal, J. Lipid Research, 1999, 40, 2143-2157.
- 60) Phelps, S.; Harris, W. S., Garlic Supplementation and Lipoprotein Oxidation Susceptibility, Lipids, 1993, 28, 475-477.
- 61) Polyak, K., T. Waldman, T. C. He, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1996) Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. Genes Dev. 10:1945-1952.
- 62) Salnikow, K., M. Gao, V. Voitkun, X. Huang and M. Costa (1994) Altered oxidative stress responses in nickel-resistant mammalian cells. Cancer Res. 54:6408-6412.
- 63) Salnikow, K., W. Su, M. V. Blagosklonny and M. Costa (2000) carcinogenic Metals Induce hypoxia-inducible factor -stimulated transcription by reactive oxygen species -independent mechanism. Cancer Res. 60:3375-3378.
- 64) Schreck, R., P. Rieber and P. A. Baeuerle (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. EMBO J. 10:2247-2258.
- 65) Scott, B.; Lew, J., Effect of Chronic hydrogen peroxide exposure on neuronal electric membrane potential, Neurotoxicology 1988, 9, 189-196.
- 66) Seagroves, T. N. (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 21:3436-3444.
- 67) Semenza, G. L. (1998) Hypoxia-inducible factor 1 : master regulator of O₂ homeostasis. Curr. Opin. Genet. Dev. 8:588-594.
- 68) Semenza, G. L. (2001) Hypoxia-inducible factor1 : oxygen homeostasis and disease pathophysiology. Trend Mol. Med. 7:345-350.

- 69) Shih, S. C. and K. P. Claffey (1998) Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells. *Int. J. Exp. Pathol.*, 79:347-357.
- 70) Sionov, R. V. and Y. Haupt (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18:6145-6157.
- 71) Staal, F. J., M. Roederer, L. A. Herzenberg and L. A. Herzenberg (1990) Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:9943-9947.
- 72) Steiner, H., Hiltmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. and Boman, H.G. (1991) *Nature* 292,246-248
- 73) Stokes, K., D. Cooper, A. Taylor and D. Granger (2002) Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction : role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 33:1026-1036.
- 74) Sugrue, M. M., D. Y. Shin, S. W. Lee and S. A. Aaronson (1997) lacking functional p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:9648-9653.
- 75) Takeda, Y., M. Tashima, A. Takahashi, T. Uchiyama and T. Okazaki (1999) Ceramide generation in nitric oxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:10654-10660
- 76) Tarladgis, B. G.; Watts, B. M.; Yunathan, M. T., A Distillation method for the Quantitative determination of malonaldehyde in ranced Foods, *JAACS* 1960, 37, 44-49.
- 77) Vanderhoek, J. Y.; Bailey, J. M., Inhibition of Fatty Acid Oxygenases by Onion and Garlic Oils-Evidence for the mechanism by Which these Oils Inhibit Platelet Aggregation, *Biochemical Pharmacology*, 1980, 29, 3169-3173.
- 78) Waldman, T., K. W. Kinzler and N. Vogelstein (1995) p21 is necessary

- for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 55:5187-5190.
- 79) Waldman, T., C. Lengauer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1996) Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 381:713-716.
- 80) Wang, X., I. Yokoi, J. Liu, and A. Mori (1993) Cobalt(II) and nickel(II) ions as promoters of free radicals in vivo: detected directly using electron spin resonance spectrometry in circulating blood in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 306:402-406.
- 81) Wang, Y. and Conlon, J. M. (1993) *Peptides*, 14, 573-579
- 82) WHO, 세계보건 통계 연감, 1995
- 83) Yamasaki, K.; Hashimoto, A.; Kokusenya, Y.; Miyamoto, T.; Sato, T., Electrochemical method for estimating the autoxidative effects of method extracts of crude drugs, *Chem. Pharm. Bull.* 1994, 42(8), 1663-1665.
- 84) Yao, T.; Sato, M.; Kobayashi, Y.; Wasa, T., Amperometric Assay of total and free cholesterol in serum by the combined use of immobilized cholesterol esterases and cholesterol oxidant reactors and peroxidase electrode in a flow injection system, *Anal. Biochem.*, 1985, 149, 387-392.
- 85) Yen, G. C.; Chung, D. Y., Antioxidant effects of extracts from *Cassia tora* L. Prepared under different degrees of roasting on the oxidative damage to biomolecules. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1326-1332.
- 86) Yoshida, T.; Mori, K.; Hatano, T.; Okumura, T.; Uehara, I.; Komagoe, K.; Fujita, Y.; Okuda, T., Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids, V. Radical -Scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl radical, *Chem. Pharm. Bull.* 1989, 37(7), 1919-1921.
- 87) Zasloff, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 5449-5453

제 7 장 기타

1. 2002년 10월 동물학회발표 :

Yeoun Hee Kim, Won Chul Choi, Shin Sung Kang, and Won Gun An
Regulation of senescence-like changes induced by oxidative
stress in MCF-7 cells.

2. 국내 특허

출원번호: 특허출원 제2002-49788 호

출원원인: 서홍석, 최원철, 최재수, 김대덕, 송영욱, 김재곤,
텍스바이오사이언스

출원일자: 2002년 8월 22일

발명의 명칭: 4-[(알킬설펜일) 메틸]-1,2-벤젠 디올 유도체, 이의
제조방법 및 이를 포함하는 항산화제

3. 국제특허

발명의 명칭:

4-[(ALKYLSULFANYL)METHYL]-1,2-BENZENEDIOL, PREPARATION METHOD
THEREOF AND ANTIOXIDANT CONTAINING THE SAME

우선권 : KR 2002-49788(2002.08.22)

지정국 : 전세계 (KR제외)

출원인 : 서홍석 외 6명

출원번호: PCT/KR02/01595

출원일 : 2002년 8월 24일

4. 논문발표

Kim, J.-K., J.H. Noh, S. Lee, J.S. Choi, H.Suh, H.Y. Chung,
Y.-O. Song, and W.C. Choi, The first total synthesis of
2,3,6,-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its
antioxidant activity. Bull. Kor. Chem. Soc 23(5): 661-662 (2002)

Son, J.Y., S.-H. Chung, W.G. An, and W.C. Choi. Apoptosis of
MCF-7 cells treated with PKC inhibitors and daunorubicin.

Nutraceuticals & Food 7:128-132 (2002)

Park, J.-S., A. Kim, E.-H. Kim, H.-S. Suh, and W.C. Choi.
Increased Anticancer Activity by the Sulfated Fucoïdan from
Korean Brown Seaweeds. J. Kor. Chem. Society. 46(2): 151-156
(2002)

Son, B.H, Y.J. Choi, J.S. Choi, W.K. Lee, D.-S. Kim, H.D. Choi,
J.S. Choi, J.H. Jung, K.W. Im. and W.C. Choi. New galactolipids
from the marine bacillariophycean microalga *Nitzschia* sp. Nat.
Produc. Lett. 15(5): 299-306 (2001)

Alam, N., J. Hong, C.O. Lee, K.S. Im, B.W. Son, J.S. Choi, W.C.
Choi, and J.H. Jung. Montipyridine, a New Pyridinium Alkaloid
from the Stony Coral *Montipora* Species. J. Nat. Products.
64, 956-957 (2001)

Chung, H.Y., H.R. Choi, H.J. Park, J.S. Choi, and W.C. Choi.
Peroxynitrite Scavenging and Cytoprotective Activity of
2,3,6-Tribromo-4,5-dihydroxybenzyl Methyl Ether from the Marine
Alga *Symphocladia latiuscula* J. Agric. Food Chem. 49: 3614-3621
(2001)

Bae, B.H., K.S. Im, W.C. Choi, J.K. Hong, C.-O. Lee, J.S. Choi,
B.W. Son, J.-I., Y.O. Song, and J.H. Jung. New Acetylenic
Compounds from the Stony Coral *Montipora* sp. J. Nat. Prod. 63:
1511-1514 (2000)

Choi, J.S., W.K. Lee, Y.J. Cho, D.-S. Kim, A.R. Kim, H.Y. Chung,
J.H. Jung, K.S. Im, W.C. Choi, H.D. Choi, and B.W. Son,
Bioactive Carotenoid, Fucoxanthin as Chemotaxonomic Marker and
Antioxidative Agent from the Marine bacillariophycean Microalga
Hantzschia marina. Nat. Prod. Sci. 6(3): 122-125 (2000)

Chung, H.Y., H.R. Choi, H.J. Park, J.S. Choi and W.C. Choi,
Peroxynitrite scavenging activity of phloroglucinol of *Ecklonia*
stolorifera, J. of Korean Association of cancer prevention,

5(1): 1-6 (2000)

Choi, J.S., W.K. Lee, B.W. Son, D.-S. Kim, H.D. Choi, J.S. Choi, J.H. Jung, K.S. Im, W.C. Choi, Screening on Radical Scavenging Activity of Marine Microalgae. *Kor. J. Pharmacogn.* ; 31(2): 252~255 (2000)

Choi, J.S., H.J. Park, H.A. Jung, H.Y. Chung, J.H. Jung, and W.C. Choi, A new cyclohexanonyl bromophenol from the red alga, *Symphycladia lattiusscula*. *J. Nat. Prod.*, 63(12): 1705-1706(2000)

Kim, J.J., H.S. Sim, K.Y. Kim, S.H. Kim, Y.S. Chong, W.C. Choi, S. Choi and S.J. Moon, A study for the enhancement of Korean married woman's quality of life. *J. of Kor. Home Econ. Asso.* 38(1): 99-122 (2000)

5. 매스컴 발표

2002년 5월 15일: 매일 경제 17면 기사
기사제목: 우뚝가사리에 노화방지 물질

2002년 5월 8일: 매일경제
기사제목: 신약개발 전략 세미나

2003년 1월 15일 KBS 1 TV, 저녁 9시 뉴스
방영제목: 곰피(우뚝가사리 등)서 노화방지 물질 첫 추출

6. 생산품

Ecklonia(Revitalizing Mask + Refining Control Serum)
(에클로니아 화장품 (리바이탈라이징 마스크 + 리파이닝 컨트롤세럼))

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 해양수산연구개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 해양수산연구개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개해서는 아니됩니다.