

GOVP1200205309

(19th)

615.32

L 2936

최 중
연구보고서

웃나무 Urushiol과 Flavonoids의 간독성 및 면역증진과
암세포증식 및 혈관신생억제제 개발

The development of the treatment for liver detoxification,
immune stimulation, anti-cancer and anti-angiogenesis of
Urushiol and Flavonoids from Lac tree
(*Rhus verniciflua* STOKES)

산림청 임업연구원

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “옻나무 Urushiol과 Flavonoids의 간독성 및 면역증진과 암세포증식 및 혈관신생억제제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월 일

주관연구기관명 : 임업연구원

총괄연구책임자 : 김 선 창

세부연구책임자 : 김 세 현

연 구 원 : 나 천 수

연 구 원 : 백 을 선

연 구 원 : 김 만 조

연 구 원 : 정 남 철

연 구 원 : 김 선 주

연 구 원 : 안 영 상

협동연구기관명 : 부산대학교

협동연구책임자 : 김 남 득

협동연구기관명 : 한국과학기술원

협동연구책임자 : 조 철 오

협동연구기관명 : 기초과학지원연구소

협동연구책임자 : 정 재 준

요 약 문

I. 제 목

옷나무 Urushiol과 Flavonoids의 간독성 및 면역증진과 암세포증식 및 혈관신생억제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

옷나무는 중앙아시아 고원지대인 티벳 및 히말라야 지방이 원산지로서 알려져 있으며 옷나무과에 속하는 낙엽활엽교목으로 수고가 20m, 직경이 50cm에 이른다. 중국에서 약 4000년 전부터 재배하여 왔다고 알려져 있고, 우리나라에서는 약 2000년전인 낙랑고분과 광주 신창동 발굴지에서 칠기가 발굴된 바 있어 선사시대부터 우리나라 전역에서 목기에 옷칠을 하여 사용하는 것이 보편화된 것으로 추측할 수 있다. 그후 대체할 만한 합성도료가 생산되기 전인 1950년까지 생활용기, 판, 제기, 병기, 가구, 건축재 등 치수안정화, 내구성과 보존성을 요구하는 목제품 및 목구조물에 광범위하게 사용하여 왔기 때문에 우리나라를 비롯한 동양권에서는 옷나무 屬 수목이 천연도료를 생산하는 매우 중요한 자원이었다. 그러나 오늘날에는 인력에 의존하는 생산방식과 정제칠 생산기술의 부족, 알러지 반응 등에 대한 거부감과 값싼 카슈칠이나 화학도료에 밀려 옷칠의 우수성에도 불구하고 옷나무는 점차 사라져 강원도 원주, 전북 장수 전남 장흥, 경남 함양 등 지역에서 일부 재배되고 있고, 주로 원주지역에서 연간 약 1.5 ton 내외의 옷칠이 생산되고 있다.

옷나무 2차대사 산물의 각 부위별 분포를 보면 수피부위에서는 urushiol과 flavonoids 성분이 주성분인 抽出物이 함께 존재하였고 목재부에는 抽出物만이 존재하는 것으로 밝혀졌다. 전통적인 漆液채취법에서는 발견되지 않았던 flavonoids 성분들이 주성분인 抽出物로 발견되는 것은 매우 특징적이라 할 수 있다.

약용, 식용으로 이용되는 건조수피에서는 urushiol과 抽出物이 각각 17.6g과 5.3g 이 추출되어 약효를 나타내는 성분이 urushiol인지 抽出物중의 또 다른 성분인지를 규명하는 매우 중요한 과제이다. 그러나 약용, 식용으로 이용되는 건조목부에서는 抽出物만 발견되었다. 즉, 옻나무의 수피에서는 urushiol과 抽出物이 같이 발견되었고, 목재부에는 urushiol은 발견되지 않고 抽出物만이 발견되어 이들에 대한 약리활성을 규명해야 할 것이다.

2000년도 보건통계에 의하면 암이 순환계 질환을 제치고 한국인 사망원인 1위에 올랐다. 전체 사망인 100명 중 약 23.7명이 암으로 인해 사망하고 있으며, 인체에 치명적인 암의 발생은 매우 복잡한 기전에 의해 발생하기 때문에 발암 과정을 간단히 정의하기가 쉽지 않지만 간단히 정의하면 인체내 세포의 항상성에 교란이 생긴 상태라고 말할 수 있다. 인체에서 항상성은 세포들의 증식과 세포사이의 균형에 의해 유지된다.

세포 증식은 세포주기의 활동과 밀접한 관련을 가진다. 세포는 세포 분열의 능력에 따라 세 종류로 구성되어 있는데, 태생기 이후 세포 분열을 하지 않는 안정세포, 외부의 자극이 있을 경우 분열하는 불안정세포, 태생기 이후에도 분열 활동을 보이지 않는 영구세포 등이 그것이다. 이와 같은 세포는 수많은 세포 주기 조절 인자들에 의해 매우 정교하게 조절되며 각 세포 주기마다 checkpoint가 있고 이 checkpoint를 조절하는 또 다른 조절 인자들이 존재한다.

그러나 화학물질, 방사선, 바이러스, 물리적 인자 등 자연에 존재하는 돌연변이원 혹은 발암원이 세포 주기 조절 인자들의 작용을 변하게 하거나 아니면 세포 주기 내의 checkpoint 유전자들의 변이를 유발시킬 때 정상적인 세포 분열에서 지속적인 세포 분열, 즉 암세포화 되는 것이다. 그리고 암세포는 무제한적 증식을 통해 일정한 크기로 자라게 되는데 이러한 증식을 가능하게 하는 것이 산소와 영양분을 공급하는 혈관신생 작용이다.

암세포의 증식 속도에 맞춰 적절한 혈관신생 작용이 동반될 때 종양괴는 커지게 되나 혈관신생 작용이 수반되지 않을 때 암세포들은 괴사(necrosis) 상태에 빠지게 된다. 따라서 암세포의 증식을 조절하거나 종양내 혈관신생 억제작용을 가지는 선택적 신물질 개발은 매우 중요한 의미가 있다.

인체기관 중에서 간 같이 중요한 일을 하는 기관도 흔치 않다. 간은 체내에 흡수된 영양소를 대사시키고 혈당이 모자랄 때는 저장되어 있는 글리코젠이나 근육 등에서 혈당을 보충시키고 혈당이 높을 때는 다시 저장하는 역할을 하는데 간질환이 생기면 질환 정도에 따라 당뇨 또는 저혈당이 발생하기도 한다. 간은 지질대사에도 관련하여 음식물이나 체내 지방으로부터 계속적으로 공급되는 지방산을 대사시켜 지방단백질 및 인지질 등을 만들고, 소화기에 필요한 담즙산 및 인체에 꼭 필요한 콜레스테롤 등을 생산해낸다. 그밖에 단백질 대사 때 생기는 암모니아를 우레아라는 물질로 대사시켜 암모니아로 인한 해독을 막는데, 간경변시에는 암모니아 대사가 잘 이뤄지지 않고 체내에 축적되어 간성혼수가 일어나기도 한다.

체내에서 생산되는 각종 호르몬, 즉 인슐린, 갑상선호르몬, 부신피질호르몬 및 성호르몬 등을 대사시켜 균형을 이루게 하는 것도 간의 역할이다. 간경변이 생기면 호르몬 균형이 잘 맞지 않고 특히 여성호르몬이 체내에 축적되어 남성도 가슴이 나오거나, 성기능이 저하되고 혈관이 확장되어 가슴에 반점 등이 생기는 현상이 나타난다.

또한 간은 인체에서 유일하게 알부민을 만들어 내는 기관이다. 간경변이 생기면 알부민이 부족하게 되어 복수가 차거나 몸이 붓는 증상이 나타난다. 그리고 간은 혈액응고에 관여하는 응고인자를 만드는데 이 기능이 저하되면 출혈성 경향을 보이게 된다.

간은 외부에서 들어온 물질, 즉 각종 약물이나 독성 물질을 대사하는 역할도 한다. 이러한 물질들이 대사되지 않고 체내에 축적된다면 심각한 문제가 생길 것이다. 대표적인 것이 알코올로 어느 정도까지는 모두 대사되지만 간의 능력을 벗어날 정도로 지속적으로 많이 흡수되면 간경변으로 진행될 수 있다.

이렇듯 간은 인간이 생존하는데 반드시 필요한 중요한 역할을 하므로 손상되지 않도록 잘 보호해야 한다.

세계 각국의 민간요법, 식이요법, 한의학적 방법과 같은 대체의학에 의한 항암치료의 효능이 밝혀지면서 대체요법이 크게 대두되고 있다. 율나무는 우리나라의 민속의학 분야에서 암치료 약재로서 효능이 매우 우수한 것으로 알려져 있다. 민간에서 율순을 식용하고 율순주를 담아 먹기도 한다. 또한 율껍질이나 漆液을 위장병, 숙취해소에 특효가 있다하여 약용으로 복용하여 왔다. 따라서 국내의 율나무에서 약리효능이 우수한 물질이 개발될 경우 산림 자원 육성 뿐 아니라 농가의 소득 증대, 중소기업 육성 및 국내 제약산업 발전에 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

율나무 葉의 HPLC 분석 결과 원주산 漆液은 C₁₈ sep-pak을 통과시킨 후 0.2 μ m syringe filter로 filtering한 다음 HPLC분석용 칼럼으로 분석한 결과 50분 후에 용출되어 나오는 성분이 많았으나 silica gel adsorption column chromatography에서 hexane:acetone(90:10)용매계로 용출시킨 50분 이후의 peak들이 사라졌다.

HPLC에 의해 율나무 조추출물을 분석한 결과 5가지의 peak들이 나타났다. 이는 다른 천연물들의 성분들에 비해 매우 단순한 형태였다.

수피의 2차 대사산물 양상은 urushiol과 flavonoids, gummy material이 함께 분포하고 있었으며 생수피가 건조수피에 비하여 urushiol과 flavonoids함량이 높게 추출되었다.

율나무 목부 acetone추출물을 추출한 결과 F1, F2, F3로 분획되었으며 F3을 다시 2.5cm \times 30cm칼럼으로 전환하여 분리하였을 때 다시 3개로 분리되어 F1, F2, F3, F4, F5로 분취할 수 있었다.

RAE 53.5g과 RBE 23g을 MeOH에 녹인 후 methylenechloride, ethylacetate water를 사용하여 순차연속추출하였을 때 RAE 분획의 용매분획물은 methylene-

chloride 가용부(RAE 1) 23g, ethylacetate 가용부(RAE 2) 29g 및 water 가용부(RAE 3) 1.5g을 얻었으며 RBE 분획의 용매분획물은 methylenechloride 가용부 7g(RBE 1), ethylacetate 가용부(RBE 2) 15g 및 water 가용부(RBE 3) 0.6g을 얻었다.

욱나무 추출액을 대상으로 항암활성을 검색한 결과 urushiol의 경우 탁월한 유암 및 위암세포 성장 억제 및 apoptosis 유도 효과를 보였다. 특히 apoptosis 유도 효과, DNA fragmentation 유도 효과, apoptosis 관련 단백질의 발현을 조절하는 작용 기전이 확인되었다. 따라서 윅나무에는 단일 혹은 수종 이상의 항암 활성, 특히 유암 및 위암에 대한 세포성장 억제효과 물질이 있음을 알 수 있었고 윅나무 추출물 중 urushiol의 위암, 유암에 대한 항암 활성 기전 연구가 필요하다고 사료된다. 그리고 apoptosis 유도와 관련하여 apoptosis 발생과정에 수종의 세포질내 혹은 핵내 단백질들이 분해되는데, 이들 단백질의 발현 유무를 확인할 경우 윅나무 추출물들에 의한 apoptosis 유도 여부를 더욱더 명확히 검색할 수 있다. 그리고 urushiol의 경우 p53의 발현 증가, p53 의존성 p21의 발현 증가로 세포주기를 G1 phase에 arrest시키고, 이후 암세포의 apoptosis 유도, Bcl-2의 발현 감소, Bax의 발현 증가 등으로 이루어질 때 전형적인 형태의 암세포 apoptosis 유도물질로 사료된다. 특히 wild type p53를 가지는 인체 위암에 선택적인 apoptosis 유도 작용이 있음이 관찰되어 이에 대한 지속적인 연구를 통해 새로운 항암제로의 lead compound 개발이 필요하며, 항혈관신생억제 효과를 가지는 것으로 보아 이에 대한 체계적인 연구도 더 필요하다고 사료된다.

욱나무 추출물을 투여하면 간의 alcohol dehydrogenase 효소활성이 증가하며, 혈중알콜농도가 0.162%에서 0.014%로 떨어져 약 1/10 가량으로 혈중알콜농도를 감소시키는 것으로 확인되었다. 그리고 과산화지질을 유도하여 지방간을 유도하는 간독성물질인 사염화탄소(CCl₄)를 처리한 랫드에 윅나무 추출물을 처리하였을 때 ALT와 AST 모두 대조군의 수준으로 감소시켜 윅나무 추출물이 간보호작용을 하는 것으로 나타났다.

욱나무의 추출물에 대하여 마우스 비장세포를 이용하여 mitogen assay를 수행하였다. 율나무 추출물만을 사용한 경우 cell viability의 변화 없이 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 경우부터 proliferation activity가 감소되는 결과를 보였다.

그러나 율나무와 함께 concanavalin A(ConA, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리한 경우에는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 cell viability의 큰 변화 없이 DPM이 약 70% 정도 감소하여 T lymphocyte proliferation activity에 영향을 주었다. Lipopolysaccharide(LPS, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 이용한 B lymphocyte proliferation assay에서도 cell viability의 변화 없이 율나무의 농도 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 DPM이 감소하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

율나무 및 관련 수종의 추출물에서 다양한 형태의 항암 활성 및 혈관신생억제 효과가 있음이 검색되었다. 특히 율나무 추출물 중 urushiol의 경우 유암 및 위암 세포에서 세포독성 효과, apoptosis 유도 결과 생성된 DNA fragmentation, apoptosis 관련 단백질인 Bcl-2의 감소, 암세포주기 중 G1 세포주기 조절 인자인 p53 단백질의 증가 및 G1 phase arrest 인자인 p21의 증가가 관찰되었다. 특히 p53 wild type을 가진 MKN-45 위암세포에 대해서 매우 선택적인 apoptosis 유도 작용을 보인 반면 p53 mutant type을 가진 MKN-28 위암세포에서는 비특이적인 necrosis에 의한 세포사멸을 관찰할 수 있었다.

그리고 율나무 추출물 중 urushiol이 위암 및 유암세포에 대한 세포독성 효과가 크게 나타나 있는 것으로 보아 이들 물질에 대한 체계적인 활성 검색, 순수 물질 분리 정제, 그리고 대규모의 동물 실험을 통한 항암활성 검색을 통해 율나무로부터 유래한 leading compound의 확보가 필요하다고 사료된다.

또한 옷나무 추출액 중 Hwa-Chil I, Hwa-Chil S, KW 분획의 혈관신생억제 효과를 검색한 결과 Hwa-Chil I는 CAM assay 결과 높은 혈관신생억제 효과가 있었으며, Hwa-Chil S는 농도 의존적인 혈관신생 억제 효과를 보여 농도 100 μ g에서 100%의 혈관신생 억제 효과를 보였다. 따라서 Hwa-Chil I와 Hwa-Chil S에 대한 보다 체계적인 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

옷나무의 목부 추출물 분획에서 간독성을 억제하는 효과가 우수함을 알 수 있었고 숙취해소 능력도 매우 뛰어남을 알 수 있었다. 특히 숙취해소 능력에서는 대조군에 비해 혈중 알코올 농도를 크게 떨어뜨리는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 옷나무의 목부추출물 분획에서 어떠한 약리 효능을 가지고 있음을 의미하며, 옷나무에서 간질환 치료 및 숙취해소 물질을 창출할 경우 옷나무를 신임산 소득작목으로 개발이 가능할 것으로 생각된다.

SUMMARY

The sap of lacquer tree (*Rhus vernicifera* Stokes), planted in Wonju city Kangwon province, have much compounds eluted after 50 minutes. But The peaks after 50 minutes disappeared on eluent solvent system same as Hexane:Acetone (90:10) by silica gel adsorption column chromatography.

The analysis results of lacquer tree crude extract by HPLC appeared five main peaks simply as be compared to other extracts. Secondary metabolites of lacquer tree bark were urushiol, flavonoids and gummy material. The contents of urushiol and flavonoids were extracted higher at the dried bark than green bark. By preparative HPLC lacquer tree crude extract was isolated to F1, F2, F3, F4 and F5 fractions.

The demand for lacquer tree must be increase continually because the variety methods for the use of lacquer tree are tried.

Urushiol and several crude mixture compounds were isolated from the sap of Korean lacquer tree (*Rhus vernicifera* Stokes). The plant family *Anacardiaceae*, the family of Korean lacquer tree, contains skin sensitizing agents in their resins. These allergenic agents, commonly referred to as urushiols, are mixtures of olefinic catechols with a n-C15 or n-C17 alkyl side chain. Although urushiol has been extensively studied on its allergic contact dermatitis, the cytotoxic activity was not studied until now. In this point of view, it is important to screen the anti-cancer activities of urushiol. The main purpose of this study was to determine cytotoxic activities of urushiol on human gastric adenocarcinoma cell lines, MKN-45 and MKN-28. The statuses of p53 tumor suppressor gene in the two cell lines are different. MKN-45 expresses heterozygous (wt/mt) but MKN-28 expresses mutant type of p53 (mt/mt).

The cytotoxicity of urushiol measured by MTT assay. The IC₅₀ values were about 15 and 20 $\mu\text{g/ml}$ on MKN-45 and MKN-28 cells, respectively. Urushiol mediated cell death on these two cancer cell lines through different pathway. Urushiol induced apoptosis on MKN-45 cell lines. The expression levels of Fas and Fas-ligand proteins were increased after treatment of urushiol. The bcl-2 protein level was not changed but the bax protein level was slightly upregulated by urushiol. In addition, caspase-3 was activated and PARP protein was cleaved by urushiol treatment. Morphological study showed nuclear condensation on urushiol-treated MKN-45 cells. The DNA ladder was also detectable on urushiol-treated MKN-45 cell lines. On the contrary, no apoptotic features could be induced by treatment of urushiol on MKN-28 cell line. The DNA ladder was not detectable on urushiol-treated MKN-28 cell line. The p53, bcl-2, and bax protein level were not changed by urushiol treatment. Nevertheless, the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27 proteins were upregulated by urushiol on MKN-28 cell. And cyclin-dependent kinase 2 and 4 proteins were decreased. The cyclin-dependent kinase inhibitor protein, a key regulatory protein of the cell cycle, may have contributed to cell cycle arrest in urushiol treated in MKN-28 cells. Moreover, urushiol showed growth inhibition effect on the transplanted MKN-45 human gastric cancer cells in vivo nude mice experiment. These data suggest that urushiol show possibility as a chemotherapeutic drug in human gastric cancer cells.

Moreover, urushiol and several other crude mixtures also showed anti-proliferative effects against MCF-7 and MDA-MB-231 human breast carcinoma cells and MKN-45 and MKN-28 human gastric cancer cells. These compounds also showed some anti-angiogenic activities by using the chick embryo chorioallantoic membrane(CAM) assay.

The presence of these compounds inhibited angiogenesis in a dose-dependent manner. Based on these results, we speculated that the inhibitory and cytotoxic effects of lacquer tree extracts might be important for anti-cancer and/or anti-angiogenesis.

When it dose the 2ml of the flavonoids of crude extracts(500mg/ml), the blood alcohol concentration of rat dosing 40% ethanol was lowed to 0.014% from 0.162% and the enzyme activity of alcohol dehydrogenase increased.

When it dose to Rat Carbon tetrachloride(CCl₄), hepatoxin which induce fatty liver as inducing lipid peroxidation, At dose group of the flavonoids of crude extracts ALT and AST could be deceased to control level. Therefore, the flavonoids of crude extracts was revealed as having hepatoprotective effect.

Mitogen assay using Spleen cell of mouse was conducted for the flavonoids of crude extracts. In case of using alone the flavonoids of crude extracts proliferation activity decreased from 2.5µg/ml treatment group without the change of cell viability. But in case of using the flavonoids of crude extracts with concanavalin A(ConA, 5µg/ml), At 25µg/ml without change of cell viability DPM was deceased to about 70% as a results give effect to T lymphocyte proliferation activity.

At B lymphocyte proliferation assay using Lipopolysaccharide(LPS, 10µg/ml), DPM was decreased at 25µg/ml without change of cell viability.

The flavonoids isolated by HPLC consists of the five main peak which were compound 2(fustin), compound 3(fisetin), compound 4(sulfuretin) and compound 5(butein). These compounds are the flavonoids of flavonol and chalcone class.

CONTENTS

Chapter 1. Isolation and purification of bioactivity compounds from lac tree	
Introduction	19
Chapter 2. Isolation and purification of bioactive compounds	
Section 1. Introduction	27
Section 2. Materials and Methods	36
Section 3. Results and Discussion	47
Section 4. Conclusion	65
Chapter 3. Anti-cancer and anti-angiogenesis activity of urushiol and flavonoids	
Section 1. Introduction	69
Section 2. Materials and Methods	76
Section 3. Results and Discussion	82
Section 4. Conclusion	119
Chapter 4. Liver detoxification, immune stimulation and safty assessment flavonoids	
Section 1. Introduction	123
Section 2. Materials and Methods	126
Section 3. Results and Discussion	130
Section 4. Conclusion	142
Chapter 5. Structure analysis of bioactive compounds	
Section 1. Introduction	145
Section 2. Materials and Methods	146
Section 3. Results and Discussion	148
Section 4. Conclusion	166
Reference	167

목 차

제 1 장 서 론	19
제 2 장 옷나무 유용물질 분리 및 정제	25
제 1 절 서 설	27
1. 옷나무 유용물질	27
2. Urushiol의 화학적 구조	28
3. Urushiol의 피부염증 유발 및 면역학적 연구	30
4. Flavonoids의 生理活性	30
가. 각종 flavonoids의 종류와 生理活性	30
나. 옷나무 抽出物 中 flavonoids	34
제 2 절 材 料 및 方 法	36
1. 공시재료	36
가. 공시 임목과 시료조제	36
나. 공시 靑漆液	36
2. 실험방법	36
가. Urushiol의 분리정제	36
1) Silica gel adsorption column chromatography	37
2) 분리정제	37
나. Flavonoids의 분리정제와 분석	40
1) Flavonoids의 분리정제	40
가) 조추출물 제조	40
나) 실리카겔 흡착 크로마토그래피	41
다) Solid Phase Extractor(SPE)	43

다. Flavonoids의 분리	43
1) HPLC	43
라. Prep-HPLC에 의한 분리정제	45
마. 옷나무 수피로부터 urushiol과 flavonoids의 분리	46
바. 용매분획	46
1) RAE분획과 RBE분획의 용매분획	46
2) 각 분획물질 확인	46
제 3 절 결과 및 고찰	47
1. Urushiol과 flavonoids의 분리정제	47
가. Urushiol의 분리와 정제	47
나. Flavonoids의 분리정제	48
1) 옷나무 목재부로부터 flavonoids의 제조	48
2) HPLC에 의한 분리정제	49
3) SPE(Solid Phase Extractor)에 의한 분리정제	50
2. 옷나무 수피로부터 urushiol과 flavonoids의 분리	52
3. Prep-HPLC에 의한 분리정제	52
4. Flavonoids의 용매분획	54
가. RAE 분획의 용매분획	54
나. RAE 분획별 물질에 대한 Rf치	54
다. RBE 분획의 용매분획	54
라. RBE 분획별 물질에 대한 Rf치	55
5. GPDC의 합성	55
6. 옷나무의 경제성분석	56
가. 조림면적 및 생산실태	56
나. 옷칠의 유통경로	60

다. 옷나무 재배의 투자효과	61
1) 경제성 계산 기준	62
2) 옷나무 경제성 분석	63
제 4 절 결 론	65
제 3 장 암세포 증식 및 혈관신생 억제 작용	67
제 1 절 서 설	69
제 2 절 재 료 및 방 법	76
1. 재료 및 시약	76
가. 암세포	76
나. CAM assay용 계배	76
다. 시 약	76
2. 실험방법	77
가. 암세포 증식 억제 연구	77
1) 세포배양	77
2) MTT assay 에 의한 세포 독성 조사	77
3) Agarose gel analysis of DNA fragmentation	78
4) PI staining과 핵 구조 관찰	79
5) Western immunoblot analysis	79
6) 전자현미경에 의한 관찰	79
나. Urushiol의 생체 내 항암활성 연구	80
다. 혈관신생억제 연구: CAM assay	80
제 3 절 결 과 및 고 찰	82
1. Urushiol에 의한 암세포 증식 억제 연구	82
가. 유암세포의 증식 억제	82

나. Urushiol에 의한 위암세포 증식 억제 연구	88
다. Urushiol의 생체 내 항암활성 연구	100
2. 옷나무 수피 추출물들에 대한 세포독성 효과 검색	101
3. KW, Hwa-Chil I, Hwa-Chil S의 항암활성 검색	104
4. 수종의 옷나무 추출액에 대한 항암활성 검색(I)	106
5. 수종의 옷나무 추출액에 대한 항암활성 검색(II)	108
6. 항혈관생성 억제 실험 결과	113
제 4 절 결 론	119
제 4 장 간독성, 면역증진 및 안전성 평가	121
제 1 절 서 설	123
제 2 절 재료 및 방법	126
1. 실험동물	126
2. 숙취해소 및 예방에 대한 효과	126
가. 혈중 alcohol 농도의 측정	126
나. Alcohol dehydrogenase 활성도 측정	126
3. 간독성 치료 및 예방에 대한 연구	127
가. <i>In vitro</i> 간독성 실험모델 정립	127
나. 간독성 시험방법	127
4. 면역기능 증강효과 시험	128
가. Polyclonal 항체반응	128
나. T-dependent 항체반응	128
다. B-cell proliferation assay	129
라. T-cell proliferation assay	129
5. 단회 경구투여독성 시험에 의한 안전성 평가	129

제 3 절 결과 및 고찰	130
1. 혈중알콜농도 저하효과	130
2. Alcohol dehydrogenase 활성도 측정	132
3. 간독성 해소효과	133
4. 면역증진효과	135
가. Mitogen Assay	135
5. 단회 경구투여독성 시험에 의한 안전성 평가	141
제 4 절 결 론	142
제 5 장 욱나무 유용물질의 구조분석	143
제 1 절 서 설	145
제 2 절 재 료 및 방 법	146
1. 분자량 측정 및 조성식 분석	146
가. 질량분석	146
나. 분자구조 분석(NMR)	146
1) 조성식 확인	146
2) 공명선 귀속	146
3) 분자구조분석	147
제 3 절 결과 및 고찰	148
1. 분자량 측정 및 조성식 분석	148
가. 욱나무 목부 Ra분획의 분석	148
나. UV Spectrum 분석	148
다. 욱나무 Ra분획의 FTIR에 의한 화학 작용기 분석	149
2. Urushiol의 분자구조	149
가. 분자량	149

나. NMR 분석	150
3. Flavonoids의 분자구조	152
가. 분자량	152
나. NMR 분석	152
제 4 절 결 론	166
참고문헌	167

제 1 장 서 론

東洋에서는 수천년 전부터 여러가지 옷나무에서 漆液을 채취하여 왔는데 한국, 일본, 중국은 옷나무(*Rhus verniciflua* Stokes), 베트남과 대만에서는 검양옷나무(*Rhus succedanea*), 미얀마 등지에서는 버마옷나무(*Melanorrhoea usitata*)에서 漆液을 얻어 도료로 사용하여 왔다. 그 중에서 한국, 일본, 중국에 있는 옷나무는 중국, 한국, 일본 순으로 전래되었던 것으로 여겨지며 漆液의 주성분은 urushiol이다(松井, 1963; 鄭均, 1985).

옷나무와 같이 수목으로부터 유용 2차 대사산물인 수지를 생산하는 대표적인 나무로는 황칠나무, 고무나무, 슬래쉬소나무, 카슈나무 등이 있다. 황칠나무는 우리나라 남부 도서와 제주도에 분포하는 상록활엽교목으로 상처부위에서 분비되는 황금색 수액이 금속에 고온경화나 태양광 경화를 시킬 경우 황금색의 도막을 형성하여 금속공예에 유용한 도료로 사용되고 있다(김, 1998).

신발이나 일상제품에 많이 이용되는 생고무를 채취하기 위해 동남아시아 열대지방에서 대단위로 재배되고 있는 고무나무(*Hevea brasiliensis*)는 남미 아마존강 지역이 원산지였으나 18세기초 유럽에 알려져 20세기초 천연고무의 유용성이 인식되고 산업적인 수요가 증가되자 영국인들에 의해 그들의 식민지가 있는 동남아시아에 집약재배되어 전세계에 공급되어 왔으며 합성고무가 대량생산되는 오늘날까지도 유용 천연자원이다(Gomez, 1972). 이밖에도 송지생산의 주요 수종인 슬래쉬소나무(*Pinus elliottii*)(Bolland *et al.*, 1946)는 열대지방에서 재배되고, 옷칠의 대용으로 사용되는 카슈칠은 카슈나무의 미숙열매에서 분비되는 수지성분으로서 옷칠과 비슷한 도막형성 효과와 옷칠과 혼합했을 때 잘 혼합되는 특성 때문에 고가의 옷칠의 증량제로 사용되거나 정제칠 제조에 이용되고 있다.

수목으로부터 생산되는 수지들은 산업적으로 매우 유용하지만 아직까지 합성물질에 의해서 대체되지 않고 천연물로 계속 생산되는 것은 합성물질이 천연물질에 비하

여 품질면에서 차이가 있을 뿐만 아니라 고분자물질 특성상 합성하는데 많은 공정을 거쳐서 합성해야 하므로 공업적인 생산은 고가의 합성비용 때문에 어려운 점이 있다. 그러므로 계속적으로 요구되는 수요를 충족시키기 위해서는 수지액 생산량이 우수한 신품종 육성 및 재배방법 개선이나 생물공학적 기술에 의존할 수 밖에 없다.

식물생체 중에 함유된 성분은 조직물질(cellulose, lignin 등), 저장물질(전분, 지방 유 등), 생리물질(단백질, 엽록소 등), 신진대사산물(생활현상의 부산물, 약용, 향료 등으로 이용되는 다양한 종류의 물질)로 나누어 왔으나, 생체에 있어서의 물질변화를 1차 대사산물과 2차 대사산물로 나누는 방향으로 나아가고 있다. 즉, 1차 대사산물(일반대사 물질)은 식물, 동물, 미생물에 보편적으로 분포되어 있는 각종 amino acids, 당질, 지질, 핵산 등 생체유지에 기본적인 역할을 하고 있는 것을 말한다. 2차 대사산물(특수대사산물)은 개개의 屬, 種 또는 계통에 특이하게 존재하는 물질로서 주로 식물, 미생물에 나타나는 alkaloids, terpenes, flavonoids, 항생물질 등의 다양한 화합물로 약용, 향료 등 인간생활에 유용한 다수의 물질이 여기에 속한다.

각각의 종마다 다른 유전자를 가지고 있듯이 이들 유전자에 의해서 생합성되는 2차 대사산물의 종류나 함량 또한 각각 다르게 나타나게 된다. 식물체에 함유되어 있는 2차 대사산물인 약리활성물질은 phenolics, flavonoids, alkaloids, terpenoids, carotenoids, steroids 등으로 특정한 식물체 부위에서 생합성되며 식물체의 부위에 따라 물질분포나 그 함량이 다르고 특이하게 한 종에서 한 물질이 발견되는 경우도 있고, 유전적으로 근연에 있는 속내 종간이나 과내 속간에도 같은 물질이 존재하는 경우도 있어 지의류나 버섯류와 같은 하등식물의 분류에도 많이 이용되고 있다. 식물체로부터 약리효능을 지닌 유용물질 생산증대를 위해서는 자연변이체 중 유용성분의 함량이 높은 개체를 선발하여야 하는데 자연상태에서 우수한 변이체를 선발한다는 것은 시간적, 비용적으로 많은 어려움이 있다. 그래서 최근에는 인위적으로 변이체를 유발시켜 유용성분의 함량이 높은 품종을 육성하려는 추세에 있다.

인체에 치명적인 암의 발생은 매우 복잡한 기전에 의해 발생한다. 그렇기 때문에 발암 과정을 간단히 정의하기가 쉽지 않지만 간단히 정의를 해보자면 인체내 세포의 항상성에 교란이 생긴 상태라고 말할 수 있다. 인체에서 항상성은 세포들의 증식과 세포사 사이의 균형에 의해 유지된다. 특히 위암은 극동, 특히 한국과 일본에서 매우 높은 빈도로 발생한다. 위암은 확장되는데 분화가 된 장형, 침윤성과 분화가 덜된 형태로 나눈다. 분화가 잘된 것은 성장이 잘되고 간 전이가 잘되며 분화가 덜된 것은 침윤성으로 성장한다.

세포 증식은 세포주기의 활동과 밀접한 관련을 가진다. 세포는 세포 분열의 능력에 따라 세 종류로 구성되어 있는데, 태생기 이후 세포 분열을 하지 않는 안정세포, 외부의 자극이 있을 경우 분열하는 불안정세포, 태생기 이후 분열 활동을 보이지 않는 영구세포 등이 있다. 이들은 수많은 세포 주기 조절 인자들에 의해 매우 정교하게 조절되며 각 세포 주기마다 checkpoint가 있고 이들 checkpoint를 조절하는 또 다른 조절 인자들이 존재한다. 그러나 화학물질, 방사선, 바이러스, 물리적 인자 등 자연에 존재하는 돌연변이원 혹은 발암원이 세포 주기 조절 인자들의 작용을 변하게 하거나 아니면 세포 주기 내의 checkpoint 유전자들의 변이를 유발시킬 때 정상적인 세포 분열에서 지속적인 세포 분열, 즉 암세포화 되는 것이다.

그리고 암세포는 무제한적 증식을 통해 일정한 크기로 자라게 되는데 이러한 증식을 가능하게 하는 것이 산소와 영양분을 공급하는 혈관신생 작용이다. 암세포의 증식 속도에 맞춰 적절한 혈관신생 작용이 동반될 때 종양괴는 커지게 되나 혈관신생 작용이 수반되지 않을 때 암세포들은 괴사(necrosis) 상태에 빠지게 된다. 따라서 암세포의 증식을 조절하거나 종양내 혈관신생 억제작용을 가지는 선택적 약물 개발은 매우 중요한 의미가 있다.

특히 국내의 율나무에서 이러한 신물질이 개발이 될 경우 산림 자원 육성 뿐 아니라 농가의 소득 증대, 중소기업 육성 및 국내 제약산업 발전에 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

Urushiol은 n-C₁₅ 혹은 n-C₁₇ alkyl side chain을 가진 olefinic catechol의 혼합물로서 한국형 옷나무에서 추출된다. 옷나무는 *Anacardiaceae* family에 속하며 이들 진액에 의해 피부에 과민성 염증을 일으키며, 특히 urushiol은 CD8+T 세포를 자극하여 접촉성 피부염을 일으킨다.

또한 urushiol은 전통적으로 동양에서 부종, 염증, 종양 치료 등에 이용되어 왔으며, 종양의 치료를 위해 다양한 방법이 시도되어 암세포를 직접 죽이는 기전으로 apoptosis와 관련된 많은 연구들이 진행중이다(Sellers and Fisher, 1999). Apoptosis는 무척추 및 척추동물에 흔히 나타나는 생리적인 현상이다(Ellis *et al.*, 1991). 이것은 태생기 발생 시기부터 필요없는 세포들을 죽이는데 사용되어져 왔으며 특히 면역계와 신경계 발달에 유용하게 이용되어진다. 그 외 조직내 항상성 유지, 불필요한 세포 및 세포파괴, 감염물질에 대한 저항성에 중요한 기전이다(Vaux, 1993). 그리고 AIDS나 퇴행성 뇌질환에서도 중요한 역할을 한다(Williams, 1991). 이러한 apoptosis는 매우 정교한 기전에 의해 유발된다.

특히 p53, APO-1/Fas 항원, Bcl-2 family 등이 중요한 역할을 한다. Apoptosis 진행은 핵의 변화(염색체 농축, DNA 절단), 미세구조물 변경(세포골격 교란, 세포 크기 축소, 세포막 물집), 생화학적 변화(수종의 단백질 분해 효소 활성화) 등을 들 수 있다. 이러한 과정 후 세포는 죽게 되고 대식세포에 의해 제거된다.

세계보건기구(WHO)가 발표한 간염 바이러스(HBV) 감염자는 B형 3억 5,000만명, C형 1억 7,000만명 등 전세계적으로 5억 2000만명에 달하고 있으며, 국내 사정도 심각하다. 의학계에 따르면 10명중 1명이 바이러스 보균자로 국내의 경우 450만명이 감염된 것으로 추정되고 있다.

인체기관 중에서 간 같이 중요한 일을 하는 기관도 흔치 않다. 간은 체내에 흡수된 영양소를 대사시키고 혈당이 부족할 때는 저장돼 있는 글리코겐이나 근육 등에서 혈당을 보충시키고 혈당이 높을 때는 다시 저장하는 역할을 한다. 따라서 간경변이 생기면 질환 정도에 따라 당뇨 또는 저혈당이 발생하기도 한다.

간은 지질대사에도 관련하여 음식물이나 체내 지방으로부터 계속적으로 공급되는 지방산을 대사시켜 지방, 단백질 및 인지질 등을 만들고, 소화기에 필요한 담즙산 및 인체에 꼭 필요한 콜레스테롤 등을 생산해 낸다. 이밖에 단백질 대사 때 생기는 암모니아를 우레아라는 물질로 대사시켜 암모니아로 인한 해독을 막는데, 간경변시에는 암모니아 대사가 잘 이뤄지지 않고 체내에 축적돼 간성혼수가 일어나기도 한다.

체내에서 생산되는 각종 호르몬, 즉 인슐린 갑상선호르몬, 부신피질호르몬 및 성호르몬 등을 대사시켜 균형을 이루게 하는 것도 간의 역할이며, 간경변이 생기면 호르몬 균형이 잘 맞지 않고 특히 여성호르몬이 체내에 축적돼 남성도 가슴이 나오거나, 성기능이 저하되고 혈관이 확장되어 가슴에 반점 등이 생기는 현상이 나타나게 된다. 간은 또한 인체에서 유일하게 알부민을 만들어낸다. 간경변이 생기면 알부민이 부족해 복수가 차거나 몸이 붓는 증상이 나타난다. 또 간은 혈액응고에 관여하는 응고인자를 만드는데 이 기능이 저하되면 출혈성 경향이 나타난다. 간은 외부에서 들어온 물질, 즉 각종 약물이나 독성 물질을 대사하는 역할도 한다.

이러한 물질들이 대사되지 않고 체내에 축적된다면 심각한 문제가 생길 것이다. 그 중 가장 대표적인 것은 알코올로 어느 정도까지는 모두 대사되지만 간의 능력을 벗어날 정도로 지속적으로 많이 흡수되면 간경변으로 진행될 수 있다. 이렇듯 간은 인간이 생존하는데 반드시 필요한 중요한 역할을 하므로 손상되지 않도록 잘 보호해야 한다.

간염은 어떤 원인에 의해서든 간에 염증이 생겨 간세포가 파괴되고 있는 상태를 말한다. 대개는 간염균(바이러스), 술, 약물과 독소 등에 의해 야기되고 그밖의 자가면역반응에 의해서 생기기도 하는데 간염이 생긴 경우는 황달, 복통이 일어나고 간이 커지며 열이 나기도 한다. 대부분의 경우 이러한 증상은 가볍게 지나가지만, 어떤 경우 전격적으로 감염이 되어 생명이 위협해 지기도 하며, 바이러스 혹은 알코올성 간염은 만성으로 진행하여 간경화를 일으키기도 하고 간암으로 진행되기도 한다.

간암의 원인이 되는 간염 바이러스는 A형(이전에는 감염성 간염이라 불리움), B형(혈청 간염), C형(이전엔 non-A, non-B 간염이라 불리움), D형(델타 간염), E형(감염된 환자의 분변을 통해 전염되는 바이러스), F형, G형, 특발성(아직 밝혀지지 않은 바이러스) 등이 있으며, 현재 더 많은 바이러스들이 발견되고 있으나 매우 드물게 발생하고 있다. 이밖에도 황색열(Yellow fever), 엡스타인 바 바이러스(Epstein barr virus, EBV) 그리고 싸이토메갈로 바이러스(Cytomegalovirus, CMV), 기생충, 박테리아가 2차성으로 간염을 일으키기도 한다. 또한 약물을 포함한 화학물질들이 간염을 일으키기도 한다. 가장 대표적인 것이 해열제로 널리 쓰이는 아세트아미노펜(Acetaminophen)이다. 다른 형태의 간염으로서는 자가면역질환에 의한 간염, 윌슨병(Wilson's disease), 그리고 알코올성 간염을 들 수 있다.

지방간은 간세포 내에 지방이 축적되어 기능 장애를 유발하는 질환으로 자각증상이 거의 없으므로 신체 검사 등에서 우연히 발견되는 경우가 대부분이다. 원인에 따라 알코올성 지방간과 비만, 당뇨 등에 의한 비알코올성 지방간으로 나뉜다.

알코올성 지방간인 사람이 술을 절제하지 않으면 알코올성 간염 및 간경변으로 진행될 수 있다. 비알코올성 지방간은 대개 간경변으로 진행되지는 않으나 원인을 제거하는데 소홀한 일부 환자에서 심한 지방간염이나 간경변으로 진행할 수 있다.

지방간은 원인만 제거하면 정상으로 회복될 수 있다. 그러나 근본적인 해결은 하지 않고 간장약만 복용하는 경우가 적지 않은데, 이 경우 평생 지방간에서 벗어나기 어렵다.

따라서 본 연구는 옻나무의 지금까지 알려진 약효를 규명하기 위해서 옻나무 urushiol과 flavonoids의 간독성 및 면역증진과 암세포증식 및 혈관신생억제 활성검정을 통하여 옻나무의 이용성을 극대화하여 재배농가의 소득증대에 이바지 하고자 실시되었다.

제 2 장 옷나무 유용물질 분리 및 정제
Isolation and purification of bioactivity
compounds from Lac tree

연구기관명 : 임업연구원

연구책임자 : 김 세 현

연구 원 : 나 천 수

연구 원 : 백 을 선

연구 원 : 김 만 조

연구 원 : 정 남 철

연구 원 : 김 선 주

연구 원 : 안 영 상

여 백

제 1 절 서 설

1. 옷나무 유용물질

옷나무의 칠액구내에 존재하는 漆液을 채취하기 위해 전통적으로 행하여 왔던 채취방법으로는 수피에 상처를 점진적으로 가하면서 상처낸 순간 흘러나오는 漆液을 6월에서 9월까지 계속해서 채취하고난 후에 나무를 잘라내고 다시 맹아갱신한 다음 다시 채취하는 살소법(殺搔法)과 상처를 내고 漆液을 채취하는 것은 살소법과 동일하나 漆液 채취기간을 짧게 하고 채취후에 1년이나 2년 정도 그대로 방치한 다음 다시 채취하는 것을 3회 정도 한 다음에 나무를 잘라내는 방법인 양생법(養生法), 잘라낸 나무에 10cm간격으로 환상의 칠흙을 낸 후에 열을 가하여 漆液을 삼출시키는 화칠법(火漆法) 등이 있다.

옷나무에서 바로 채취한 漆液(生漆)은 회백색의 유상액으로 urushiol이 약 70%이고 그밖에 고무질(4~8%), 합질소물질(2~3%), 효소(laccase)와 수분(10~20%)을 함유하고 있다(伊藤清三, 1949). 화칠에 의해 채취된 漆液(火漆)은 회백색의 유상액으로 urushiol이 약 55%이고 그밖에 고무질(4~8%), 합질소물질(2~3%), 효소(laccase)와 수분(10~40%) 그리고 flavonoids(1~2%)가 함유되어 있다.

옷나무 생수피, 건조수피, 생목부, 건조목부를 acetone으로 추출했을 때 생수피는 urushiol이 31.2g이 추출된 반면 건조수피에서는 urushiol이 17.6g이 추출되어 수피를 건조시켜도 urushiol은 완전경화되지 않고 칠액구 내에 존재하는 것으로 밝혀졌다.

옷나무 2차 대사산물의 각 부위별 분포는 수피부위에서는 urushiol과 flavonoids 성분이 주성분인 抽出物이 함께 존재하며, 목재부에는 抽出物만이 존재하는 것으로 밝혀졌다. 전통적인 漆液채취법에서는 발견되지 않았던 flavonoids성분들이 주성분인 抽出物이 발견되었던 것은 특징적이라 할 수 있다.

약용, 식용으로 이용되는 건조수피에서는 urushiol이 17.6g, 抽出物이 5.3g이 추출되어 약리효과를 나타내는 성분이 urushiol인가 抽出物 중의 성분인가를 규명하는 것

은 매우 중요하다. 또한 약용, 식용으로 이용되는 건조목부에서는 抽出物만 발견되었다. 이와 같이 옷나무의 수피에서는 urushiol과 抽出物이 같이 발견되었고 목재부에는 urushiol은 발견되지 않고 抽出物만이 발견되어 이들에 대한 약리활성을 규명해야 할 것이다.

세계 각국의 민간요법, 식이요법, 한의학적 방법과 같은 대체의학에 의한 항암치료의 효능이 밝혀지면서 대체요법이 크게 대두되고 있다. 옷나무는 우리나라의 민속의학 분야에서 암치료 약재로서 효능이 매우 우수한 것으로 알려져 있어 민간에서 옷순을 식용하고 옷순주를 담아 먹기도 한다. 또한 옷겍질이나 漆液을 위장병, 숙취해소에 특효가 있다하여 약용으로 복용하여 왔다.

2. Urushiol의 화학적 구조

漆液中 도막을 형성하는 화학적 기작 및 주성분의 화학적 구조를 밝히기 위해서 옷나무(*Rhus verniciflua* Stokes) 수액을 대상으로 漆液의 구성성분들이 밝혀졌으며, 미국 등지에서 poison ivy, poison oak 등 *Rhus* 屬·種들에 대하여 피부염을 일으키는 물질을 분리, 동정하려는 시도과정에서 옷나무에서 발견되는 urushiol 성분이 한가지 성분이 아니라 여러가지 analogues(유사체)로 이루어져 있다고 알려졌다(Ma *et al.*, 1980; Corbertt *et al.*, 1975; Symes and Awson, 1954; Markiewitz and Dawson, 1965).

Majima는 옷나무 수액을 알콜로 추출하여 얻은 독성이 강하고 비휘발성의 기름이 3번 탄소에 15개의 불포화탄소사슬을 지닌 O-dihydroxybenzene의 혼합물이며, 환원시키면 1-n-pentadecyl-2,3-dihydroxybenzene(hydrourushiol)이 되는 것을 밝히고 이를 urushiol이라 명명하였다(Hill *et al.*, 1934). 그후 漆液의 천연혼합물을 urushiol이라 총칭하며, 3번 탄소측쇄의 불포화도에 따라 포화된 측쇄를 가진 3-pentadecylcatechol을 hydrourushiol 측쇄에 이중결합이 1개인 것을 urushenol, 2개인 것을 urushadienol, 3개인 것을 urushatrienol이라 명명하였다(Sunthanker *et al.*, 1954; Love and Dawson, 1956).

3. Urushiol의 피부염증 유발 및 면역학적 연구

Urushiol은 서양의 poison ivy(*Toxicodendron radicans*)의 주성분으로서 피부가 민감한 서양인들에게는 심한 옷오름 때문에 옷나무를 도료나 약용자원으로 연구하지 않고 면역학적 연구나 피부염에 대한 연구를 위해 urushiol을 연구하여 왔다 (Markiewitz and Dawson, 1960; Corbertt and Billets, 1975).

Poison ivy에 의해서 일으키는 피부염증은 부착소인 urushiol의 특이기질 T-임파구에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있다(Kalish, 1991; Kalish and Johnson, 1990; Kalish *et al.*, 1975, 1994). 즉, 부착소인 urushiol이 피부에 있는 항원세포(langerhans 세포)에 결합하여 국부임파구로 이동 T-임파세포에 항원을 전달한다. 반응을 일으킨 T-임파세포는 피부의 환부로 이동하여 계속적인 순환과정을 통하여 피부염증을 나타내게 된다(Kalish, 1990). 또한 urushiol의 기본구조인 catechol 골격을 가지고 있는 화합물들이 단백질과 결합하는 부착소로서 역할을 하며 이 화합물이 면역체계에 외래항체로 작용하여 피부에 민감성 반응을 일으키는 것으로 알려져 있어 피부염증을 일으키는 주원인으로 알려져 있다(Griffiths and Nickoloff, 1989).

Organoclay를 국소처치할 경우 poison ivy(*Toxicodendron radicans*)의 urushiol에 의해서 일으키는 피부염증이 95%의 보호효과가 있는 것으로 밝혀졌고, betolite, kaolin, silicone은 각각 30%, 38%, 33% 보호효과가 있는 것으로 보고되었다(Epstein, 1989).

4. Flavonoids의 生理活性

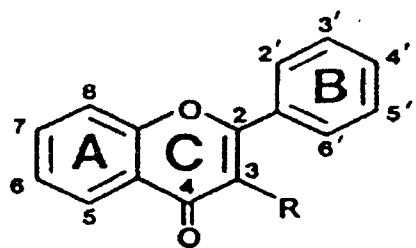
가. 각종 flavonoids의 종류와 生理活性

플라보노이드(flavonoids)는 식물계에 널리 분포되어 있는 폴리페놀계 화합물로서 약 4,000여 종이 있으며 이들은 Fig. 1. 2와 Table 1. 1과 같이 화학구조의 차이에 따라 flavonol, flavone, flavanone, flavanol, chalcone, anthocyanin, isoflavone, dihydroflavonol류로 나뉜다(Herrmann, 1976; Kuhnau, 1976).

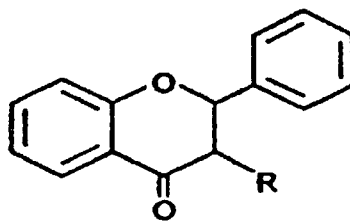
플라보노이드는 식물성 성분으로 다양한 구조적 특성을 가지고 있으며 벤젠환의 탄소에 -OH기와 탄소의 2와 3위치에 2중결합, 탄소 4번 위치에 카보닐기와 A와 B환에 결합되어 있는 -OH기에 의하여 항산화 활성을 갖는 것으로 보고되어 있다(Ratty *et al.*, 1988; Hackett, 1986; Cody, 1988). 플라보노이드의 흡수 및 대사에 대해 쥐를 이용한 실험에서 소화관을 통하여 흡수된다는 사실이 일부 규명되었고 한편으로는 지질대사의 산화를 억제한다는 사실도 밝혀졌다(Blavo *et al.*, 1994; Das, 1971).

Gugler 등(1997)은 플라보노이드를 21~22세의 건강한 사람에게 4g을 경구투여한 후 폴리페놀 화합물 및 유도체를 조사한 결과 플라보노이드가 혈장과 뇨에서 검출되지 않았고 투여량의 50%는 그대로 분변으로 배설되었다고 보고하였다.

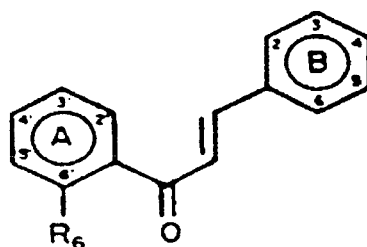
Flavonol계 quercetin, fisetin과 같은 것은 과실의 껍질, 식물이나 야채에 함유되어 있어 인간에게는 음식물에 의해 항상 섭취되어지고 있다(Singleton, 1981). Fisetin, fustin과 같은 flavonoids는 혈관이나 모세혈관을 보호하는 작용이 있으며(Beretz *et al.*, 1988) 과산화 지질을 억제하고(Kappus *et al.*, 1977; Yoshimoto *et al.*, 1983) 알러지나 피부 질환을 억제한다(Loggia *et al.*, 1986). 플라보노이드는 사과와 β -galactosidase의 활성을 억제하는데 있어 -OH기의 다소와 배당체화의 정도에 따라 효과가 증가하였다(Dick, 1987). 더욱이 quercetin은 7,12-dimethylbenz(a)anthracene과 *N*-nitrosomethylurea로 유도된 rat의 유방암(Verma *et al.*, 1988)이나 azoxymethanol로 유도된 결장 종양(Deschner *et al.*, 1991)이나 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate로 발생된 쥐의 피부 종양의 진행(Kato *et al.*, 1985)을 억제한다.



R = H : flavone
 R = OH : flavonol



R = H : flavanone
 R = OH : flavanonol



Chalcone

Fig. 1. 2. General structure of flavonoids.

Table 1. 1. General structures of some flavonoids

Flavonoids	Class	Hydroxylation pattern	Substitution
Flavone	Flavone		
Luteolin	Flavone	5, 7, 3', 4'	
Apigenin	Flavone	5, 7, 4'	
Scutellarein	Flavone	5, 6, 7, 4'	
Rhamnetin	Flavone	3', 4'	R ₇ =OCH ₃
Diosmetin	Flavone	5, 7, 3'	R ₄ =OCH ₃
Chrysin	Flavone	5, 7	
Luteolin-7-glucoside	Flavone	5, 3', 4'	R ₇ =glucose
Diosmin	Flavone	5, 3'	R ₇ =rutinose R ₄ =OCH ₃
Fisetin	Flavonol	3, 7, 3', 4'	
Quercetin	Flavonol	3, 5, 7, 3', 4'	
Kaempferol	Flavonol	3, 5, 7, 4'	
Myricetin	Flavonol	3, 5, 7, 3', 4', 5'	
Myricitrin	Flavonol	5, 7, 3', 4', 5'	R ₃ =rhamnosied
Morin	Flavonol	3, 5, 7, 2', 4'	
Rutin	Flavonol	5, 7, 3', 4'	R ₃ =rutinose
Catechin*	Flavan-3-ol	3, 5, 7, 3', 4'	
Epicatechin*	Flavan-3-ol	3, 5, 7, 3', 4'	
Daidzein	Isoflavone	7, 4'	Ring B attached to C ₃
Genistein	Isoflavone	5, 7, 4'	
Flavanone†	Flavone		
Hesperetin†	Flavone	5, 7, 3'	R ₄ =OCH ₃
Hesperidin†	Flavone	5, 3'	R ₄ =OCH ₃ R ₇ =rhamno -glucose
Naringenin†	Flavone	5, 7, 4'	
Naringin†	Flavone	7, 4'	R ₅ =rhamno -glucose
Taxifolin†	Flavonol	3, 5, 7, 3', 4'	
Fustin†	Flavonol	3, 7, 3', 4'	
Chalcone	Chalcone		
Butein	Chalcone	3, 4, 4', 6'	
Phloretin†	Chalcone	4, 2', 4', 6'	
Phloridzin†	Chalcone	4, 2', 4'	R ₆ =-D-glucose

* Flavonoids without carbonyl group at C₄ and double bond between C_{2,3}

† Flavonoids without double bond between C_{2,3}

나. 옷나무 抽出物 中 flavonoids

지금까지 옷나무 屬에서 발견된 화합물(Table 1. 2)로는 agathisflavone, butein, corilagin, 3'4'-dihydroxy-flavone, eicosanedioic acid, europetin, fisetin, fustin, lantabetulic acid, myricetin, palasitrin, sulfuretin, 3-pentadecyl-1,2-benzenediol, demethoxykanugin, ovalitenone, syringtin, semialatic acid, semimoronic acid, 2-(3,4-dihydroxybenzyl)-2,6-dihydroxy-3(2h)-benzofuranone, fisetin; 7-O- β -d-glucopyranoside, mesuaferone A, resokaempferol, rhoifolin, rhusflavanone, succedanea flavanone, bhilawanol, cynarine, tannin, hydrolaccol, stellacyanin, quercetin이 밝혀져 있다(Buckkingham, 1994). 이들 대부분은 flavonoids로서 옷나무 변재와 수피에서 발견되었으며, 옷나무 심재에서는 지금까지 fisetin과 fustin만이 발견되었다.

Table 1. 2. Compounds discovered in Genus *Rhus*

Compounds	Molecular weight	Molecular fomular
Agathisflavone	538.466	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀
Butein	272.257	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀
Corilagin	634.460	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈
3'4'-dihydroxyflavone	254.242	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
Eicosanedioic acid	342.518	C ₂₀ H ₃₈ O ₄
Europetin	332.266	C ₁₆ H ₁₂ O ₈
Fisetin	286.240	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Fustin	288.256	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
Lantabetulic acid	470.691	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
Myricetin	318.239	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
Palasitrin	594.525	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
Sulfuretin	270.241	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
3-pentadecyl-1,2-benzenediol	320.514	C ₁₂ H ₃₆ O ₂
Demethoxykanugin	326.305	C ₁₈ H ₁₄ O ₆
Ovalitenone	338.316	C ₁₉ H ₁₄ O ₆
Syringtin	346.293	C ₁₇ H ₁₄ O ₈
Semialatic acid	470.691	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
Semimoronic acid	470.691	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
2-(3,4-dihydroxybenzyl)-2,6-dihydroxy-3(2h)-benzofuranone	288.256	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
Fisetin;7-o-β-d-glucopyranoside	448.382	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
Mesuaferone A	542.498	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀
Resokaempferol	270.241	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
Rhoifolin	578.526	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄
Rhusflavanone	542.498	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀
Succedaneaflavanone	542.498	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀
Bhilawanol	318.498	C ₂₁ H ₃₄ O ₂
Cynarine	516.457	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂
Hydrolaccol	348.568	C ₂₃ H ₄₀ O ₂
Quercetin	302.240	C ₁₅ H ₁₀ O ₇

제 2 절 材 料 및 方 法

1. 공시재료

가. 공시 임목과 시료조제

강원도 원주시 금대리 일대에서 재배하고 있는 10년생 옷나무를 벌채하여 원구부 위에서 원목을 채취하여 약 1개월 가량 음건한 후 chipper에 의하여 나무조각으로 만들어 抽出物 분석과 生理活性 검정용 시료로 사용하였다.

나. 공시 옷漆液

공시목을 재배하고 있는 지역에서 재배자가 1999년 6월에서 9월까지 채취한 옷漆液을 구입하여 urushiol 분석과 세포독성 및 급성독성 검정용 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

가. Urushiol의 분리정제

옷나무 漆液성분 중 urushiol을 분리하기 위해서 Fig.1.3과 같이 1999년도에 채취된 원주산 漆液을 사용하여 漆液의 3배 가량(kg/l)의 acetone을 첨가한 후 1시간 정도 방치하면 urushiol 성분과 다른 漆液성분(고무질, 합질소물질, laccase)이 분리가 되며 이를 4,000rpm으로 15분간 원심분리하여 whatman no. 2 여과지로 여과하였다. 여과된 acetone 抽出物은 감압하의 rotary vacuum evaporator(Laborota 300, Resona Co. Swiss)를 수행하여 crude urushiol을 준비하였다.

Urushiol은 漆液성분 중 laccase라는 산화효소에 의해서 자연상태에서 중합이 이루어지기 때문에 상당량의 urushiol이 고분자성 polymeric urushiol로 변하여 HPLC reversed-phase column의 오손을 가져오므로 monomeric urushiol로 정제하기 위해서 Fig.1.3에서와 같이 urushiol을 분리 정제하여 crude urushiol에 hexane을 첨가하면 hexane soluble층과 insoluble층으로 분리되며 상층액을 4,000rpm 15분간 원심분리하

여 whatman no. 2 여과지로 여과한 다음 감압하의 rotary vacuum evaporator에 의해서 농축시킨다. 이 농축액에 다시 acetonitrile을 첨가하면 acetonitrile soluble층과 insoluble층으로 분리되며 상층액을 4,000rpm 15분간 원심분리하여 whatman no. 2 여과지로 여과한 다음 감압하의 rotary vacuum evaporator에 의해서 농축시킨 후 silica gel adsorption column chromatography에 의한 용출분획을 위해서 사용하였다.

1) Silica gel adsorption column chromatography

130℃에서 3시간 동안 활성화시킨 silica gel(230-400mesh, chromatography용, Merck Co.) 40g을 n-hexane으로 slurry를 만들어 open column(2.9×45cm)에 충전시킨 후 silica gel의 1/5에 해당하는 시료(8g)를 loading하고 Fig. 1. 4와 같이 hexane-acetone 용매계에서 acetone의 농도를 10%, 50%, 100% 단계적으로 증가시킨 step-wise 용출방법으로 용출분획하여 암세포주별 항암활성을 검정하였다.

2) 분리정제

시료는 sep-pak(C₁₈ type)으로 전처리하고 syringe filter(0.2μm, Satorius)로 여과한 후 Table 1. 3과 같은 조건으로 분리 및 urushiol 주성분을 분취하였다.

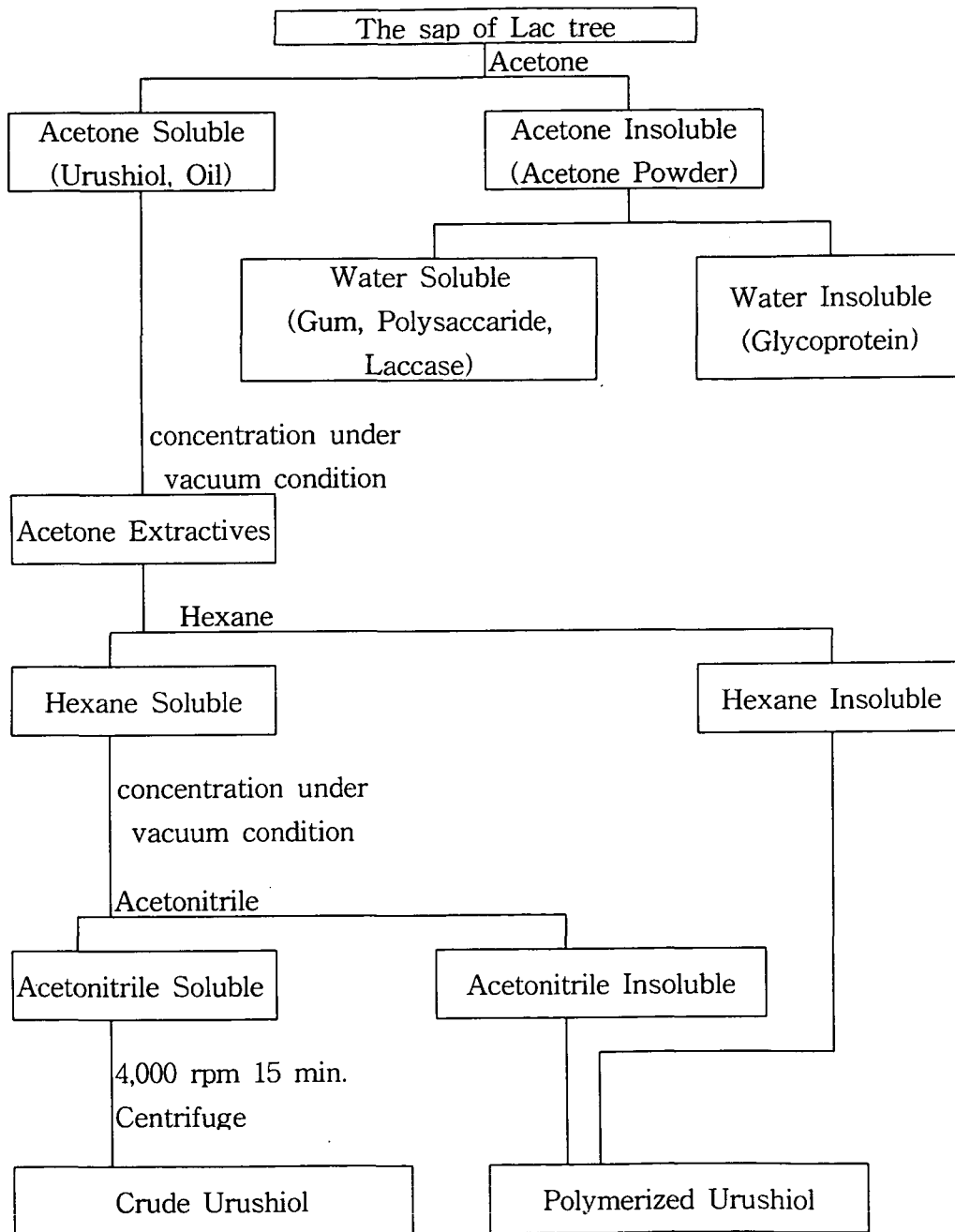


Fig. 1. 3. Schematic diagram for the purification of urushiol in lac tree sap.

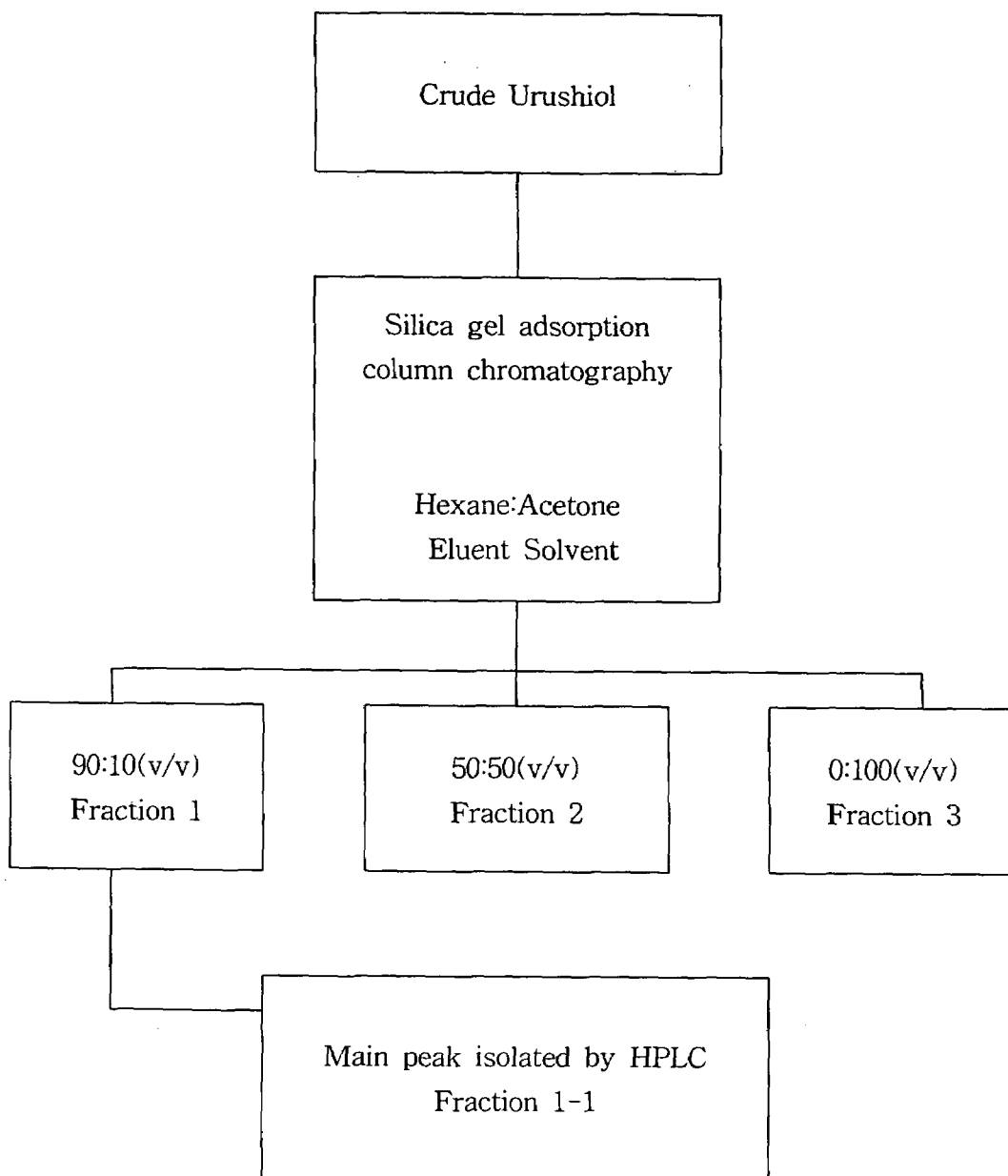


Fig. 1. 4. Schematic diagram for the fractionization of crude urushiol.

Table 1. 3. Operating conditions of HPLC

Instrument	Analysis conditions
Column	Waters' Nova-Pak C ₁₈ 3.9×300mm analytical column Waters' Delta Pak C ₁₈ -300Å (7.8×300mm, 15μ, spherical) semi-prep. column
Detector	Waters associates Model 441 HPLC, 441UV detector
Wave length	254nm
Flow rate	1.0ml/min(analytical) 1.6ml/min(semi-prep.)
Mobile phase	Acetonitrile:0.002% acetic acid(80:20)

나. Flavonoids의 분리정제와 분석

1) Flavonoids의 분리정제

가) 조추출물 제조

옷나무를 자른 다음 내피가 포함된 수피를 벗겨내지 않고 그늘에서 1개월 정도 말려 목재 칩제조기로 목재칩을 만들어 300g/1ℓ 정도 비율로 99.9% acetone을 침윤시켜 40℃ 수조에서 5일 정도 방치하면 노란색을 띤 물질이 추출되어진다.

이 조추출액을 whatman no. 2로 여과하여 여과된 용매抽出物은 rotary vacuum evaporator로 용매를 증발시킨 다음 이것을 원심진공건조기(센트라백 비전사, 한국)로 완전 건조시켜 분말로 제조하였다. 이를 조추출물이라 하였다. 조추출물은 Fig. 1. 5와 같은 순서로 분리하여 生理活性을 검정하였다.

나) 실리카겔 흡착 크로마토그래피

조추출물을 정제하기 위하여 silica gel adsorption column chromatography를 실시하였다. 130℃에서 3시간 동안 활성화시킨 silica gel(230-400mesh)을 n-hexane으로 slurry를 만들어 column(2.9×45cm)에 40g을 충전시킨 후 용매나 조추출물내의 수분을 제거하고 충전된 silica gel의 안정화를 위해 calcium sulfate나 sodium sulfate 6~8g을 그 위에 충전시킨다. Silica gel 중량의 1/10에 해당되는 조추출물 4g을 methanol 4ml에 녹여 loading 하고 chloroform:methanol(90:10(v/v)), chloroform:methanol(80:20(v/v)), chloroform: methanol(50:50(v/v)), chloroform: methanol(0:100(v/v)) 용매로 용출하여 감압하에서 rotary vacuum evaporator로 농축하여 이것을 원심진공건조기로 건조하였다.

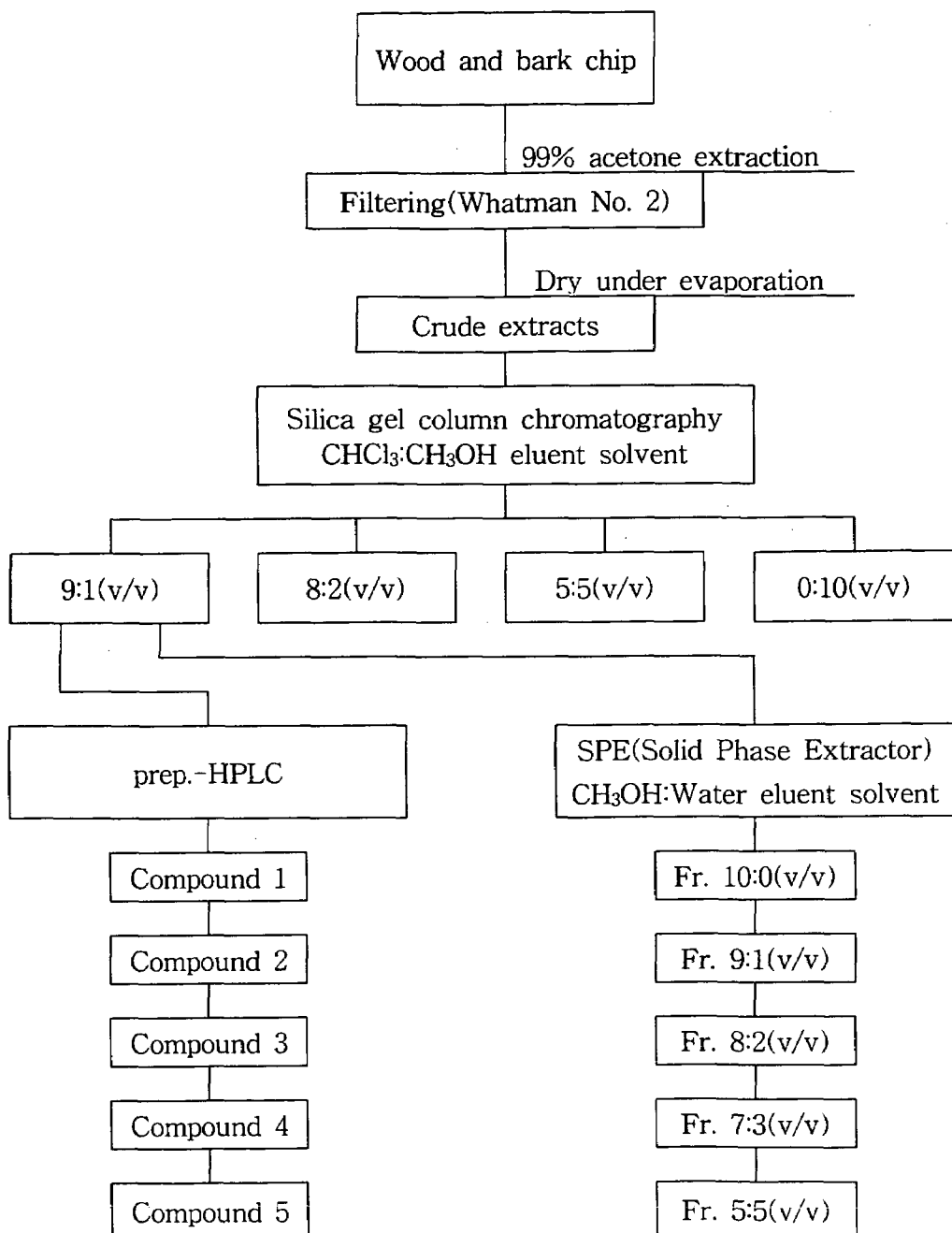


Fig. 1. 5. Schematic diagram for the fractionization of crude extracts.

다) Solid Phase Extractor(SPE)

Solid Phase Extractor(SPE)(Supelco Co.)에 LC-18(C₁₈ type 6ml) column을 이용하여 옷나무 抽出物의 성분들을 분리하여 生理活性검정(항산화효과)에 이용하였다.

LC-18 column은 2ml의 methanol(HPLC grade)로 먼저 washing한 후에 2ml의 water(HPLC grade)로 washing하는 방법으로 활성화시켰다. 상기의 silica gel adsorption column chromatography의 chloroform:methanol (90:10(v/v)) fraction 건조품 0.1g에 2ml의 methanol(HPLC grade)에 녹여 활성화시킨 LC-18 column에 1ml을 loading한 다음 실온에서 column를 건조시켰다. 완전히 건조된 column을 24 port solid phase extractor에 장착하고 100% water, water:methanol(90:10), water:methanol(80:20), water:methanol(70:30) 1st, water:methanol(70:30) 2nd, water:methanol(70:30) 3rd, water:methanol(50:50) 순서의 용매계로 용출시켜 각 10ml씩의 fraction을 얻었다. 각 fraction은 건조시켜 HPLC로 분석하여 peak가 분리된 fraction을 항산화효과 검정에 이용하였다.

다. Flavonoids의 분리

1) HPLC

옷나무 수용성 抽出物에 대한 분석 및 물질구조 분석을 위한 순수 단일물질을 얻기 위하여 상기 얻은 chloroform:methanol(90:10(v/v))분획을 메탄올과 1:1(v/v)로 혼합한 후 sep-pak(C₁₈ type)으로 전처리하고 주사여과기(syringe filter, 0.2 μ m)로 여과한 후 Dionex사의 DX-300 그래디언트 HPLC로 Table 1. 4와 같은 분석조건으로 옷나무 추출성분의 분석 및 단일물질을 분취하였다.

Table 1. 4. Operation conditions of analytical bio-HPLC

Column	Waters RCM 8×10, Nova-Pak C ₁₈ 8×10 Cartridge			
Flow rate	1.5ml/min			
Detector	DX-300 UV detector			
Wave length	254nm			
Mobile phase	Solvent 1: Water solvent 2: Methanol			
Time(min)	Flow(ml/min)	Solvent 1(%)	Solvent 2(%)	Curve
0.0	1.5	80	20	linear
0.5	1.5	80	20	linear
3.0	1.5	50	50	linear
12.8	1.5	20	80	linear
14.9	1.5	0	100	linear
16.7	1.5	0	100	linear
18.6	1.5	80	20	linear
20.0	1.5	80	20	linear

또한 단일물질별 항암효과 검증 및 물질구조 규명을 위한 다량의 단일물질을 분취하기 위해서 상기 얻은 chloroform:methanol(90:10(v/v)) 분획을 메탄올과 1:1(v/v)로 혼합하여 sep-pak(C₁₈ type)으로 전처리하고 주사여과기(syringe filter, 0.2 μ m)로 여과한 후 Waters prep. LC 4000 HPLC에 의해 Table 1. 5과 같은 분석조건으로 실시하였다.

위에서 얻은 단일물질 용출액은 rotary vacuum evaporator로 농축하여 이것을 원심진공건조기로 건조하였고 그래디언트 HPLC(DX-300, Dionex)로 상기와 같은 조건에서 순수 단일물질 여부를 확인하였다.

라. Prep-HPLC에 의한 분리정제

단일물질별 항암효과 검정 및 물질구조 규명을 위한 다량의 단일물질을 분취하기 위해서 상기 얻은 chloroform:methanol(90:10(v/v)) 분획을 메탄올과 1:1(v/v)로 혼합하여 sep-pak(C₁₈ type)으로 전처리하고 주사여과기(syringe filter, 0.2 μ m)로 여과한 후 Merck NOVA-prep 2000 HPLC에 의해 Table 1. 5과 같은 조건으로 옷나무 목부 acetone추출, Methanol추출, 열수추출, 수피 flavonoids의 분취를 실시하였으며, 얻어진 단일물질 용출액은 rotary vacuum evaporator로 농축하여 동결건조기로 건조하였다.

Table 1. 5 Operation conditions of preparative HPLC

Column	Merck NOVA prep 2000, RP-select B			
Flow rate	100ml/min			
Detector	HITACHI UV Detector			
Wave length	254nm			
Mobile phase	Solvent 1: Water, Solvent 2: Acetonitrile			
Time(min)	Flow(ml/min)	Solvent 1(%)	Solvent 2(%)	Curve
0.0	7.5	80	20	linear
0.5	7.5	80	20	linear
2.5	7.5	0	100	linear
27.5	7.5	0	100	linear
30.0	7.5	80	20	linear

마. 옷나무 수피로부터 urushiol과 flavonoids의 분리

옷나무 수피부로부터 옷나무 칠액에서 분리되는 urushiol과 수피내의 flavonoids를 분리 정제하기 위해서 벗겨낸 수피를 잘게 잘라 공업용 Acetone(95%)에 침윤시켜 실온에서 약 한달가량 방치하여 추출하였다.

이 추출액을 whatman no. 2로 여과하여 여과된 용매抽出物은 rotary vacuum evaporator로 용매를 증발시킨 다음 추출물을 분획여두에 넣고 hexane과 water를 넣어 방치하면 urushiol은 hexane층에 flavonoids와 gum질은 water층으로 분리가 된다. 각각 분리된 urushiol과 flavonoids는 whatman no. 2로 여과하여 rotary vacuum evaporator로 용매를 증발시킨 다음 flavonoids는 동결건조기로 완전 건조시켜 분말로 제조하였다.

바. 용매분획

1) RAE분획과 RBE분획의 용매분획

RAE 53.5g과 RBE 23g을 MeOH에 녹인 후 methylenechloride, ethylacetate, water를 사용하여 순차 연속추출하였다.

2) 각 분획물질 확인

각 분획물은 전개용매(Toluene:Ethylformate:Formica=5:4:1)를 이용하여 TLC (Thin Layer Chromatography)를 실시하였다. 용매 전개 후 TLC판에 나타난 여러 spot은 UV lamp(F₂₅₄, 365, Viber Loumate) 및 50% H₂SO₄ 발색반응을 통하여 물질을 확인하였다. 또한 각 물질에 대한 각각의 화학적 이동거리를 계산하였다.

$$R_f = \frac{\text{원점에서 spot까지의 거리}}{\text{원점에서 전개된 용매거리}}$$

제 3 절 결과 및 고찰

1. Urushiol과 flavonoids의 분리정제

가. Urushiol의 분리정제

원주산 漆液을 C₁₈ sep-pak을 통과시킨후 0.2 μ m syringe filter로 filtering한 다음 HPLC분석용 칼럼으로 분석한 결과 Fig. 1. 6과 같이 50분 후에 용출되어 나오는 성분이 많았으나 silica gel adsorption column chromatography에서 hexane:acetone (90:10)용매계로 용출시킨 fraction 1은 50분 이후의 peak들이 사라졌다.

이것은 Du(1984)의 분리정제를 거친 후 HPLC 분석 결과 95% 이상이 monomer라는 결과와 fraction 1의 HPLC chromatogram과 일치하였다. 그러므로 원액 urushiol 중 50분 이후에 용출되어 나오는 성분은 urushiol monomer가 아니라 중합된 dimer나 oligomer 또는 urushiol 이외의 성분일 것으로 사료된다.

Silica gel adsorption column chromatography에서 hexane:acetone 용매계로 acetone 10, 50, 100%의 step-wise용출법으로 용출한 용출 fraction 1, 2, 3의 chromatogram은 Fig. 1. 6과 같이 fraction 1은 urushiol monomer들만의 조합이었고 fraction 2는 urushiol 주성분인 3-(8'Z, 11'E, 13'Z-pentadecatrienyl) catechol의 앞시간대에 용출되어 나오는 성분들로 검양옻나무 漆液에서 발견되었고 옻나무 漆液에서는 Du(1984)에 의해서 발견된 thitsiol 성분들이므로 생각되었다. 그러나 fraction 3은 urushiol 주성분인 3-(8'Z,11'E,13'Z- pentadecatrienyl)catechol과 같은 retention time에서 용출되어 나오나 세포독성효과도 없을 뿐만 아니라 어떤 성분인지 알 수 없었다. Urushiol 주성분인 3-(8'Z, 11'E, 13'Z-pentadecatrienyl)catechol은 urushiol 유사체 중 약 60%를 차지하기 때문에 단일물질만의 세포독성효과와 Du(1984)의 결과의 성분들과 비교 확인을 위해 fraction 1을 HPLC에 의해 semi-prep용 칼럼으로 fraction 1-1만을 분취하여 항암효과 구명 및 분자량 NMR 분석용으로 사용하였다.

나. Flavonoids의 분리정제

1) 옷나무 목재부로부터 flavonoids의 제조

옷나무를 자른 다음 내피가 포함된 수피를 벗겨내고 그늘에서 1개월 정도 말려 목재 칩제조기로 목재칩을 만들어 500g/1ℓ 정도 비율로 95% Acetone, 95% Methanol, 95% Ethanol을 넣고 한달정도 방치하였고, 열수추출은 120℃ 고압에서 3시간 동안 2회에 걸쳐 옷나무 목재부를 추출하였다.

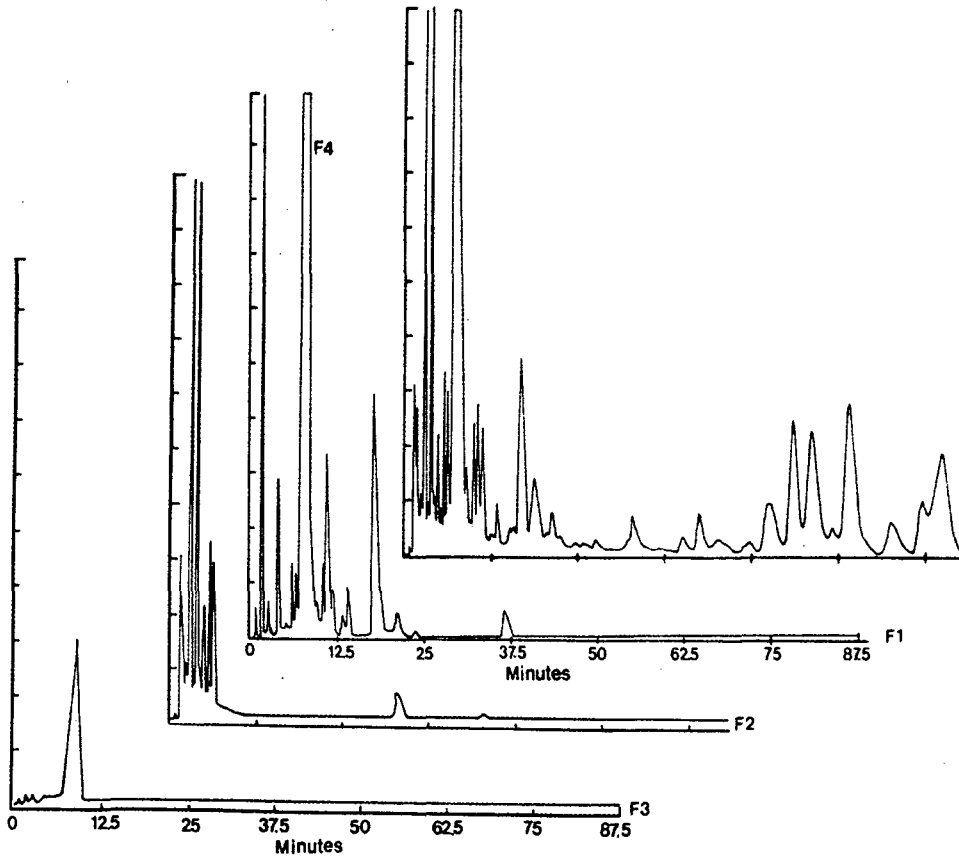


Fig. 1. 6. HPLC chromatogram of silica gel adsorption column chromatography eluent fraction 1, 2, 3, 1-1 of urushiol in lac tree sap.

이 추출액을 whatman no. 2로 여과하여 여과된 용매抽出物과 열수추출물은 rotary vacuum evaporator로 용매를 증발시킨 다음 이것을 동결건조기로 완전 건조시켜 분말로 제조하였다.

목재부의 2차 대사산물의 추출효율을 규명하고자 95% Acetone, 80% Methanol, 80% Ethanol로 추출했을 때를 비교하면 Table 1. 6에서와 같이 80% Ethanol추출이 가장 추출량이 많았다.

Table 1. 6. Secondary metabolites for the wood part of *Rhus verniciflua*

Secondary metabolites The parts	Urushiol (g)	Extractives(g)		Moisture content (%)
		(Gummy material)	(Flavonoids)	
Green wood(1kg) (Acetone Extraction)	-	-	13.5	50.3
Dry wood(500g) (Acetone Extraction)	-	-	10.7	5.01
Dry wood(500g) (80% MeOH extraction)	-	1.62	8.3	5.01
Dry wood(500g) (80% EtOH extraction)	-	-	20.4	5.01
Dry wood(500g) (Hot water extraction)	-	-	13	5.01

2) HPLC에 의한 분리정제

HPLC에 의한 옷나무 조추출물을 분석한 결과 Fig. 1. 7과 같이 5가지의 peak들이 나타났다. 이는 다른 천연물들의 성분들에 비해 매우 단순한 형태였다. 조추출물을 silica gel adsorption column chromatography의 chloroform:methanol(90:10(v/v)), chloroform:methanol(80:20(v/v)), chloroform:methanol(50:50(v/v)), chloroform:methanol(0:100(v/v)) 용출용매로 용출한 결과 Fig. 1. 8과 같이 chloroform:methanol(90:10(v/v))분획은 base line이 안정된 5가지 물질들이었다.

그러나 다른 분획들은 base line이 불안정하고 peak가 불명확하였다. 따라서 chloroform:methanol(90:10(v/v))분획을 분취용(preparative) HPLC로 분취하여 生理活性검정, 분자량, 물질구조 분석에 이용하였다.

3) SPE(Solid Phase Extractor)에 의한 분리정제

Solid phase extractor(SPE)에 LC-18(C₁₈ type 6ml) column을 이용한 water 100% eluent fraction, water:methanol(90:10) eluent fraction, water:methanol(70:30) 1st eluent fraction, water:methanol(70:30) 3rd eluent fraction, water:methanol(50:50) eluent fraction들에 대한 HPLC 분석결과 Fig. 1. 9와 같이 나타났다. 이것을 chloroform:methanol(90:10(v/v))분획의 HPLC분석 결과(Fig. 1. 8)와 비교한 결과 water 100% eluent fraction은 compound 1, water:methanol(90:10) eluent fraction은 compound 2, water:methanol(70:30) 1st eluent fraction은 compound 3, water:methanol(70:30) 3rd eluent fraction은 compound 4, 그리고 water:methanol (50:50) eluent fraction은 compound 4, 5가 주성분인 것으로 나타났다.

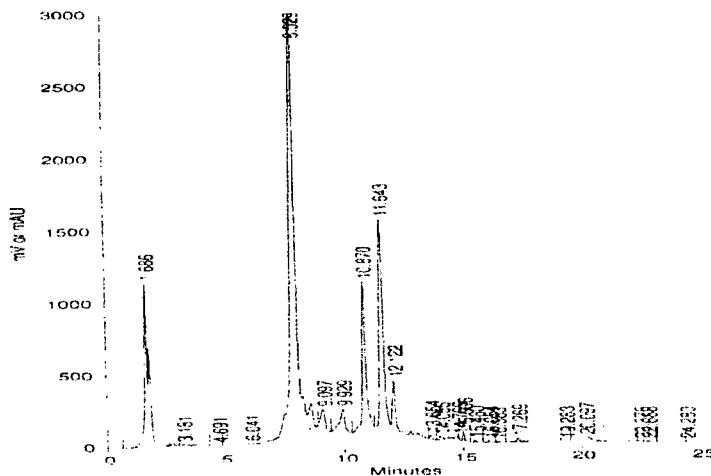


Fig. 1. 7. HPLC chromatogram of crude extracts.

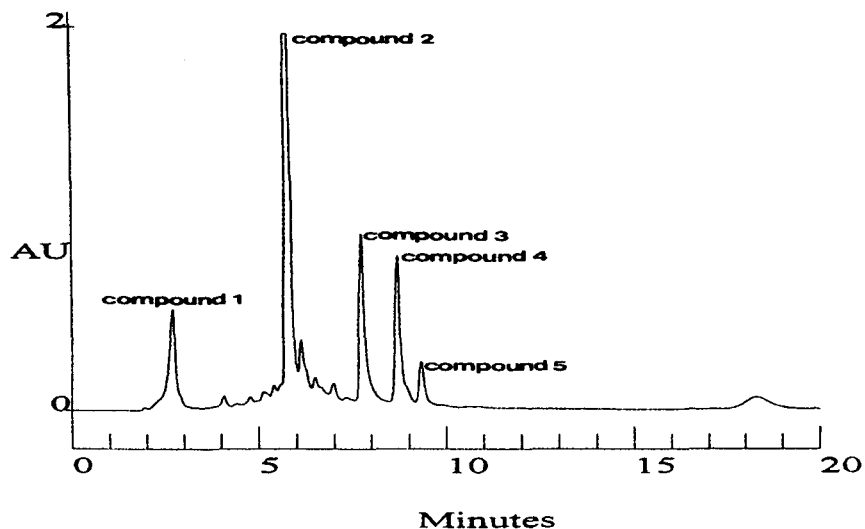


Fig. 1. 8. HPLC chromatogram of Chloroform:Methanol(90:10(v/v)) fraction on silica gel adsorption chromatography.

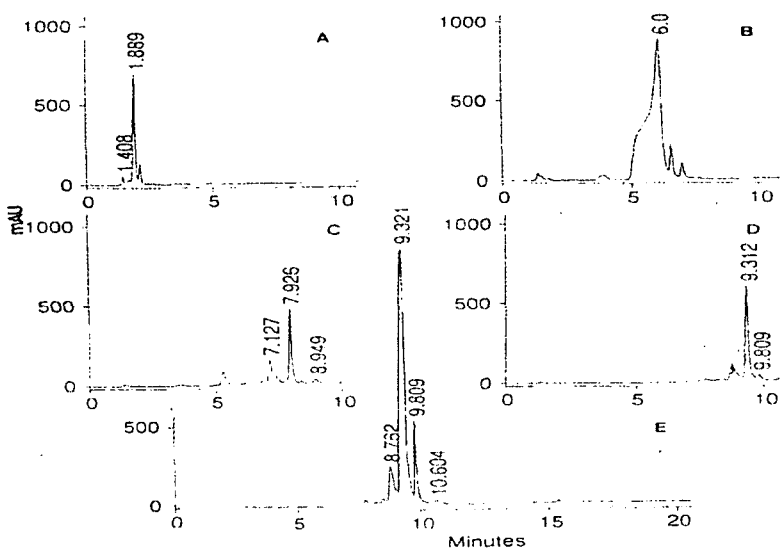


Fig. 1. 9. HPLC chromatogram of SPE(Solid Phase Extractor) fractions. A: Water 100 fraction, B: Water:Methanol(9:1) fraction, C: Water: Methanol(7:3) 1st fraction, D: Water:Methanol(7:3) 3rd, fraction, E: Water:Methanol(5:5) fraction.

2. 옷나무 수피로부터 urushiol과 flavonoids의 분리

옷나무 수피부로부터 옷나무 칠액에서 분리되는 urushiol과 수피내의 flavonoids를 분리, 정제하기 위해서 벗겨낸 수피를 잘게 잘라 공업용 acetone(95%)에서 침윤시킨 후 추출용기를 실온에서 약 한달가량 방치하여 추출한 결과 수피부의 2차 대사산물 양상은 urushiol과 flavonoids, gummy material이 함께 분포하고 있었으며 생수피가 건조수피에 비하여 urushiol과 flavonoids함량이 높게 추출되었다(Table 1. 7).

Table 1. 7. Secondary metabolites for the bark part of *Rhus verniciflua*

Secondary metabolites The parts	Urushiol (g)	Gummy material (g)	Flavonoids (g)	Moisture content (%)
Green bark(1kg) (Acetone Extraction)	31.2	0.58	11.2	54.68
Dry bark(500g) (Acetone Extraction)	17.6	4.0	5.3	8.7

3. Prep-HPLC에 의한 분리정제

단일물질별 항암효과 검정 및 물질구조 규명을 위한 다량의 단일물질을 분취하기 위해서 상기 얻은 chloroform:methanol(90:10(v/v)) 분획을 메탄올과 1:1(v/v)로 혼합하여 sep-pak(C₁₈ type)으로 전처리하고 주사여과기(syringe filter, 0.2 μ m)로 여과한 후 Merck NOVA-prep 2000 HPLC에 의해 옷나무 목부 acetone추출물을 추출한 결과 F1, F2 및 F3로 분획되었으며 F3를 다시 2.5cm \times 30cm컬럼으로 전환하여 분리하였을 때 다시 3개로 분리되어 F1, F2, F3, F4 및 F5로 분취할 수 있었다(Fig. 1. 10).

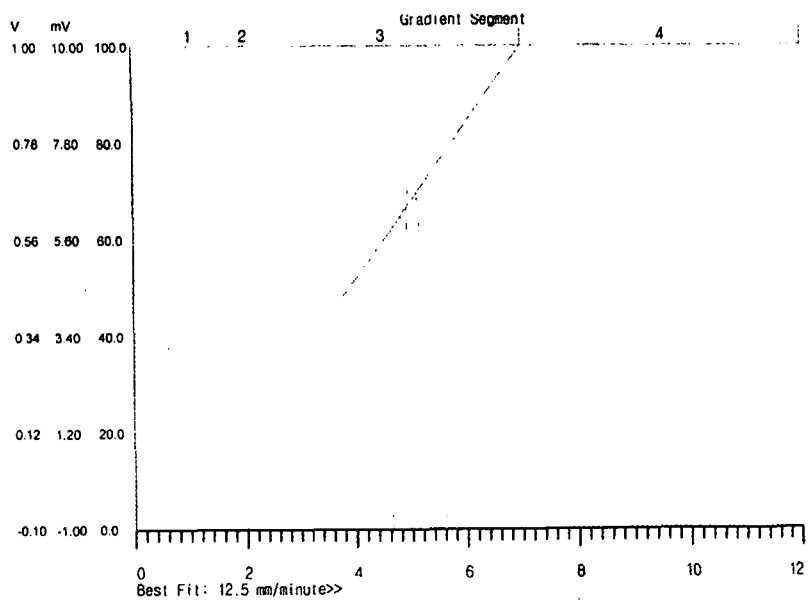
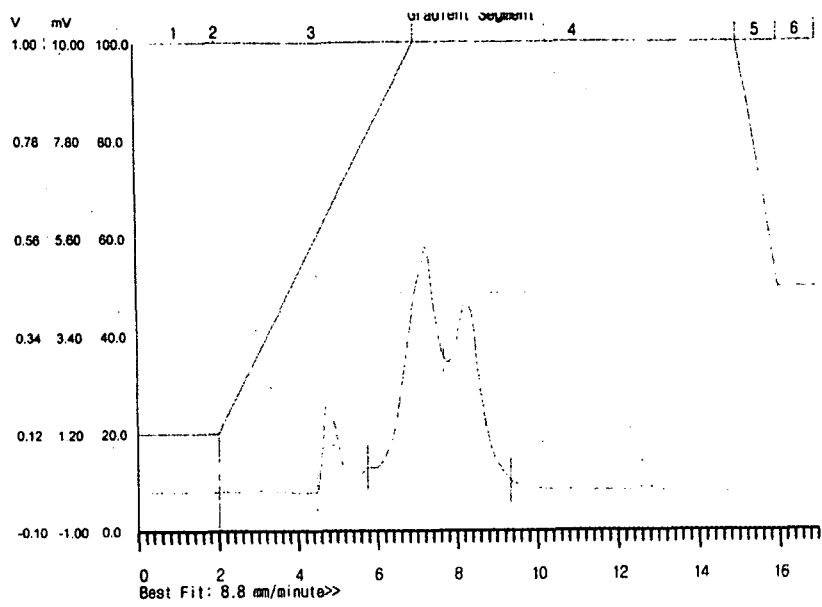


Fig. 1. 10. Preparative collection of Ra F1, F2, F3, F4 and F5 fractions.

4. Flavonoids의 용매분획

가. RAE 분획의 용매분획

각 분획물은 methylenechloride 가용부(RAE 1) 23g, ethylacetate 가용부(RAE 2) 29g 및 water 가용부(RAE 3) 1.5g을 얻을 수 있었다.

나. RAE 분획별 물질에 대한 Rf치

RAE 1	RAE 2	RAE 3
0.50	0.50	
0.46	0.46	
0.41		
0.39	0.39	
		0.34
0.33	0.33	
	0.18	0.18
		0.06
		0.00

(T:EF:FA=5:4:1)

다. RBE 분획의 용매분획

각 분획물은 methylenechloride 가용부 (RBE 1) 7g, ethylacetate 가용부(RBE 2) 15g 및 water 가용부(RBE 3) 0.6g을 얻을 수 있었다.

라. RBE 분획별 물질에 대한 Rf치

RBE 1	RBE2	RBE 3
0.54		
0.49		
f	0.45	
f	0.33	
3.2		원점

5. GPDC의 합성

GPDC(O-D-glucopyranosyl-3-pentadecylcatechol)의 합성은 2,3,4,6-pentaacetyl-D-glucopyranose(390mg, 1.0m mol), PDC (417mg, 1.3m mol) tetrabutylammonium perchlorate(171mg, 0.5m mol) 용액과 molecular sieve 500mg이 함유된 1,2-dichloroethane 1ml에 stannous chloride (57mg, 0.3m mol)를 첨가하여 수행하였다. 이 혼합액을 상온에서 24시간 동안 교반하였으며, sodium hydrogen carbonate로 포화시키고 1,2-dichloroethane으로 추출하였다. Organic layer는 건조시키고 용매는 압력을 가하여 제거하였다. Tetraacetyl GPDC (287mg, 44.2% yield, $1\alpha+1\beta:2\alpha+2\beta=63:37$, $1\alpha+1\beta=1:1$, $2\alpha:2\beta=1:9$)를 얻기 위해 hexane-ethyl acetate(7:3)의 용매로 silica gel chromatography과정을 수행하여 정제를 하였다.

1α -GPDC는 1α -tetraacetyl GPDC(380mg)에 deacetylation 처리하여 합성하였으며, silica gel chromatography($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=9:1$)를 이용하여 정제하여 89.7% 회수율을 가지고 1α -GPDC(253mg)을 얻었다(colorless crystals; mp 72-73°C, Rf0.17 ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=9:1$), $[\alpha]_{20}^{+104.5}$ (C 1.05, MeOH) $^1\text{H NMR}$ (270MHz, CD_3OD) δ =1.0 (3H, t, J=7Hz, CH_3), 1.4-1.5 (24H, br.s, CH_2), 1.6 (2H, m, CH_2), 2.69(2H, t, J=7Hz, ArCH_2), 3.4-4.0 (6H, m, CH-O), 4.93(5H, br. s, OH), 5.31 (1H, s, glu-1-CH), 6.78(1H, t, Ar-5-CH). $^{13}\text{C NMR}$ (65.4MHz, CD_3OD) δ =102.13 (Glu-1), 117.04(Ar-6-C), 119.91(Ar-5-C), 125.69(Ar-4-C), 131.18(Ar-3-C), 146.43(Ar-1-C) 146.79(Ar-2-C).

6. 옷나무의 경제성분석

가. 조림면적 및 생산실태

국내에서 옷나무는 원주지역, 전북 남원군, 경남 함양군 등지에서 주로 식재하여 채취되고 있다. 현재 우리나라 옷나무 재배는 대부분 농가부업적 형태로 이루어지고 있으며, 군집재배보다는 휴경지, 밭두렁과 산록부위에서 재배되고 있다. 최근 들어서 원주와 남원지역에서 소규모로 식재되고 있는 실정이나, 2000년도의 옷나무 조림면적은 10ha, 조림본수는 30천본으로 예전에 비하여 지속적으로 감소하는 경향이다(Table 1. 8).

Table 1. 8. 옷나무 조림본수 및 조림면적

년 도	1962-1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
본수(천본)	4,821	NA	NA	150	126	NA	-	102	30
면적(ha)	3,116	NA	NA	50	43	NA	-	34	10

자료 : 산림청, 조림사업실적(각년도), 93년, 94년, 97년은 자료 없음.

옷 채취작업은 옷채취를 전문으로 하는 채취전문기능인들에 의해 보통 6월에서 9월 사이에 이루어지고 있다. 원주시의 자료에 따르면 1998년 현재 채취인력은 14명에 불과한 실정이며, 채취작업은 인력에 의존하는 재래식 채취방법이 답습되고 있어 인건비가 과다하게 소요돼 생산성 저하의 원인이 되고 있다. 또한 청장년층의 채취기능 습득 기피현상으로 말미암아 채취인력의 노령화가 가속화되고 있다(Table 1. 9). 따라서 채취노동의 직업적 안정화를 도모하면서 채취인력을 적정수준에서 유지·확보하는 방안과 더불어 채취노동의 생산성을 획기적으로 개선하기 위한 노력이 병행되어 나가야 할 것이다.

Table 1. 9. 원주시내 옷칠채취 전문인력 연령분포

구 분	30-40세	41-50세	51-60세	61-70세	계	평균연령(세)
채취자수(명)	3	1	5	5	14	54
분포(%)	21	7	36	36	100	-

자료 : 원주시, 원주 옷의 지역특화산업화방안 연구(1999)

또한 옷나무는 철저한 비배관리를 요하는 수종으로서 옷나무의 생장에 따라 칠액 생산량이 크게 차이가 나타나고 있다(Table 1. 10). 흉고직경이 5cm인 경우 본당 채칠량은 80.5g인 반면에, 흉고직경이 10cm인 경우 본당 채칠량은 235.1g으로 약 3배 정도가 생산되고 있어 철저한 시비가 필요한 것으로 보인다.

Table 1. 10. 흉고직경별 1본당 평균 채칠량

흉고직경(cm)	채칠량(g)	흉고직경(cm)	채칠량(g)
4.0	64.9	7.5	128.0
4.5	75.4	8.0	155.0
5.0	80.5	8.5	174.5
5.5	91.3	9.0	210.9
6.0	97.7	9.5	239.2
6.5	111.5	10.0	235.1
7.0	113.4	-	-

자료 : 임업시험장 연구보고서(1939)

따라서 옷나무 수령별 시비량을 살펴보면 본당 년차별 시비량은 1년차 3-4월에 20g, 5-7월에 10g을 시비한다. 이는 채칠하기전 봄에 시비를 함으로서 생장이 왕성해 지고 직경생장이 좋아져 채칠기간동안 칠액분비가 잘되며, 채칠중인 7월경에 실시하는 추가시비는 채칠로 인한 스트레스로 약화된 수세회복에 도움을 주어 채칠량을 증가시키기 위해 시비를 하는 것으로 보고되고 있다(Table 1. 11). 옷나무의 년차별 시비량은 1년차에 1,500본당 45kg에서 10년차에는 600kg으로 계속 증가시키는 것이 바람직하다.

Table 1. 11. 옷나무 시비량 시범

구 분	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3-4월(g/본)	20	30	40	50	50	100	150	200	250	250
5-7월(g/본)	10	10	10	20	20	50	50	50	150	150
1,500본(kg)	45	60	75	112.5	150	225	300	375	600	600

자료 : 漆の木, 高野徳明(1982), 우리나라의 옷생산실태분석(1989)에서 재인용

우리나라의 칠액생산량은 연간 2,000kg 내외를 생산하고 있으나 해를 거듭할수록 생산량은 감소하고 있다. 2000년도의 칠액생산량은 1,793kg으로 전년도에 비해 10.7% 감소하고 있다(Table 1. 12). 지역별로 주생산지역은 강원도와 경남지역인데, 이 두 지역의 1993년도 생산량은 2,003kg으로 전체의 97% 이상을 차지하였으나, 2000년에 들어와서 이 두지역의 생산량은 1,140kg으로 전체의 64%로 감소하였다. 이는 값싼 중국산 칠액과 저렴한 화학도료의 수입으로 인하여 값비싼 국산생칠의 수요가 감소하여 생산자들이 옷나무 재배에 소극적이기 때문으로 사료된다.

Table 1. 12. 년도별 · 지역별 칠액생산량

(단위 : kg, %)

년도	강원		전남		경북		경남		기타		계	
	량	비율	량	비율	량	비율	량	비율	량	비율	량	비율
1993	1,422	69.1	-	-	-	-	581	28.2	54	2.7	2,057	100.0
1994	1,745	69.0	-	-	-	-	750	29.6	35	1.4	2,530	100.0
1995	903	70.6	76	5.9	-	-	301	23.5	-	-	1,280	100.0
1996	394	5.9	5,006	75.5	950	14.3	282	4.3	-	-	6,632	100.0
1997	356	4.9	5,006	69.3	-	-	1,860	25.8	-	-	7,222	100.0
1998	808	34.8	135	5.8	900	38.8	457	19.7	20	0.9	2,320	100.0
1999	705	35.1	125	6.2	800	39.8	358	17.8	20	1.0	2,008	100.0
2000	765	42.7	130	7.3	500	27.9	375	20.9	23	1.3	1,793	100.0

자료 : 산림청, 임업통계요람(각 년도)

생칠 수출입량 및 금액을 보면, 수출량은 1991년도에 407kg, 수출금액은 109천 \$로 최고조에 달했다가 1993년도에는 30kg, 34천\$로 급격하게 감소한 이후로 수출은 전혀 되지 않고 있는 것으로 나타났다. 이에 반하여 수입량은 해마다 큰 차이를 보이고 있으나, 최근에는 계속적으로 증가하고 있는 추세를 보이고 있다. 2000년 현재 생칠 수입량은 우리나라 생산량의 약 2배 정도인 3,287kg이 수입되었으며, 수입금액으로는 69천\$로 나타나 전년도에 비해 생산량은 32.1%, 수입금액은 115.6% 증가하였다. 이렇게 수입량이 크게 증가하는 이유는 국산 생칠가격이 수입산에 비해 약 10배나 높아 국산 생칠을 선호하지 않기 때문으로 사료된다(Table 1. 13).

Table 1. 13. 생칠 수출입량 및 금액

년도	수 출		수 입	
	물량(kg)	금액(천\$)	물량(kg)	금액(천\$)
1988	300	45	3,232	41
1989	200	36	1,520	20
1990	141	33	5,838	102
1991	407	109	102	5
1992	120	34	2,187	41
1993	30	9	4,531	46
1994	-	-	6,635	64
1995	-	-	516	16
1996	-	-	1,028	23
1997	-	-	1,103	23
1998	-	-	1,832	24
1999	-	-	2,506	32
2000	-	-	3,287	69

자료 : 무역정보서비스(KOTIS), 한국무역통계

나. 옷칠의 유통경로

채질자들 대부분이 자가생산한 옷나무에서 채칠하거나 옷나무 재배자로부터 옷나무를 구입하여 채칠하였는데 옷나무의 구입가격은 옷나무의 크기, 분포상황 등을 보아 소유자와 채칠자가 협의하여 결정하고 있다. 따라서 옷칠의 유통은 채칠자가 직접 옷나무를 재배하거나 생산자로부터 옷나무를 구입하여 생칠을 생산하여 가구업자, 수출 등으로 판매하고 있다. 생칠을 생산하고 남은 자목은 다시 화칠업자에게 화칠용 자목으로 판매하는 유통구조를 가지고 있다(Fig. 1. 11).

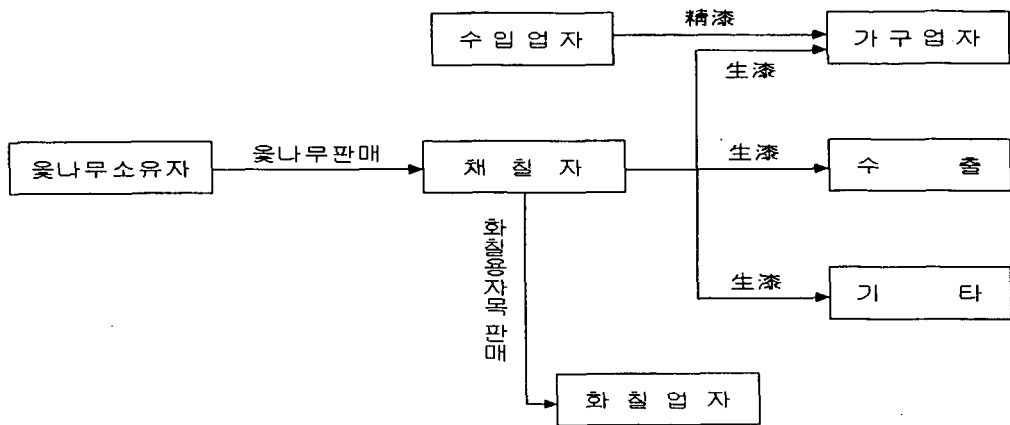


Fig. 1. 11. 옷칠 유통경로.

자료 : 우리나라의 옷생산실태분석(1989)

2000년도 옷나무의 구입가격을 보면, 집단적으로 재배되어 있는 옷나무 지역은 본당 평균 8,000원 선이며, 논두렁 등과 같이 작업조건이 좋지 못한 지역에서는 본당 평균 6,000원 정도였다. 그리고 채칠을 하고난 옷나무의 가치는 다시 화칠용 자목으로 판매되는데 주로 경남 함양지역으로 판매되고 있으며 판매가격은 주당 2,500~3,000원, 생칠가격은 kg당 280,000원에 유통되고 있었다.

다. 옷나무 재배의 투자효과

옷나무 재배업은 일반영농과는 달리 장기간에 걸쳐 수확되므로 비용요소 뿐만 아니라 시간요소가 고려되지 않으면 안된다. 그래서 이러한 시간요소를 감안하여 장래에 있을 수익 및 비용 모두를 현재가치로 환원하여 비교 분석한다. 그러므로 경제성 분석은 입목가격, 조림비용이 불변이라면 상관없이 없겠지만 수시로 변동하기 때문에 가능하면 매년 분석하여 현실에 맞출 필요가 있다. 임업내부 투자수익율은 조림비를 포함한 모든 비용의 원리합계와 입목수입이 같아지는 이자율을 말하는 것인데 일반적으로 자본을 은행에 예치시킨 경우와 비교하여 판단하고 있다.

1) 경제성 계산 기준

웃나무 경제성 분석에 사용한 자료는 다음의 몇가지 기준을 적용하였다.

가) 산출기준년도는 2000년말을 기준으로 300평에 300본이 식재된 것으로 가정하였다. 조립묘목대는 1997년 양묘협회의 본당 판매가격인 500원으로 계산하였다.

나) 조수익은 입목을 판매할 경우와 직접 채칠할 경우로 구분하였다. 우선 입목을 판매할 경우 입목 가격은 8,000원/1주를 적용하였으며, 생산자가 직접 채칠을 할 경우 생산되는 채칠량은 30kg, 판매가격은 kg당 280,000원을 적용하였다.

다) 자재비(비료 등)는 '93년도 단기소득 입산물 특성과 재배법(산림청)의 작업공정에 따라 시비량을 적용하였으며, 시비는 1-5년차까지 실시하고 마지막 10년차에 하는 것으로 하였다. 그리고 복합비료 및 유기질비료 가격은 생산자들이 2000년도에 직접 구입한 단가를 적용하였다.

Table 1. 14. 수종별 본당 시비량 기준

년차별	복 합 비 료 (g)	유기질 비료(kg)
1	80	1.0
2 - 4	400	1.0
5 - 6	800	1.5
7 - 9	1,500	2.0
10 - 14	1,700	2.5
15 - 19	1,900	3.0
20 - 25	1,900	5.0

자료 : 산림청, 단기소득 입산물 특성과 재배법(1993)

라) 지대는 전체 수익의 10%를 적용하였으며, 웃나무는 농가부업의 형태로 이루어지고 있어 노동력은 모두 자가노동에 의해서 이루어지는 것으로 가정하였다.

농촌의 남·여 평균임금은 농협조사월보 자료를 이용하였다. 채취작업은 자가노동에 의해 이루어지고 있으며, 남·여가 45일을 작업하는 것으로 가정하였고 채취기구 가격은 75,000원으로 계산하였다. 그리고 풀베기(하예) 작업은 1~5년차까지 실시하고 마지막 10년차에 실시하고 있는 것으로 하였다.

2) 옷나무 경제성 분석

옷나무를 재배하여 전문 옷채취자나 수피채취자에게 입목으로 판매할 경우와 직접 생질을 뽑을 경우를 분석한 결과는 표 1.15와 같다. 옷나무를 입목으로 판매할 경우에 일반적인 투자효과는 300본을 식재를 기준으로 할 때 순수익(3% 할인율)은 454천원으로 나타났고, 자가채취할 경우 순수익(3% 할인율)은 입목을 판매할 경우보다 약 3.7배가 높은 1,661천원의 수익을 올리는 것으로 나타났다.

Table 1. 15. 옷나무 투자분석(300평)

(단위 : 원)

구 분	할인율(%)	조수익(A)	생산비(B)	순수익(A-B)
입목판매	0	2,400,000	1,492,579	907,421
	3	1,785,825	1,332,254	453,573
자가채취	0	8,400,000	5,782,519	2,617,481
	3	6,250,389	4,589,728	1,660,661

옷나무 재배는 농가부업적인 형태로 경영되고 있기 때문에 대부분의 작업이 자가노동에 의해서 이루어지고 있어 경영비가 많이 들어가지 않는 특징을 가지고 있다. 300평을 기준으로 할 때 입목판매할 경우(3% 할인율 적용) 조수익은 1,786천원, 경영비는 476천원, 소득은 1,310천원으로 계산되었다. 이에 반하여 자가채취에 의한 경우(3% 할인율 적용) 조수익은 6,250천원, 경영비는 532천원, 소득은 5,718천원으로 분석되었다(Table 1. 16).

Table 1.16. 옷나무 소득분석(300평)

(단위 : 원)

구 분	할인율(%)	조수익(A)	경영비(B)	소득(A-B)
입목판매	0	2,400,000	540,255	1,859,745
	3	1,785,825	476,234	1,309,591
자가채취	0	8,400,000	615,255	7,784,745
	3	6,250,389	532,041	5,718,348

옷나무의 내부투자수익율(IRR)과 재무투자수익율(FRR)을 계산한 결과는 Table 1. 17과 같다. 현재 입목으로 판매를 할 경우 내부투자수익율은 7.7%로 나타났으나, 조림묘목에 대해서 시·군에서 무상으로 보조해 주고 있는 점을 감안하여 계산하면 재무투자수익율은 12.8%로 나타났다. 그리고 자가채취에 의한 내부투자수익율은 입목 판매에 비해 약 2배에 가까운 14.0%이었으며, 재무투자수익율은 18.3%로 분석되었다.

Table 1.17. 옷나무 IRR 및 FRR분석(300평)

(단위 : 원)

구 분	IRR(%)	FRR(%)
입목판매	7.7	12.8
자가채취	14.0	18.3

현재 옷나무는 입목판매 등을 통한 채질용과 채질을 뽑아낸 다음에 다시 화질용, 수피용 등으로 매우 제한적으로 사용되고 있었다. 그러나 최근에는 옷나무를 이용한 다양한 방법들이 모색되고 수요도 증가하고 있는 실정이다. 특히 옷나무를 이용한 옷꿀재배, 식용음료수 개발 등의 노력들이 다각적으로 시도되고 있고, 소비되는 옷나무의 수요가 지속적으로 증가될 전망이어서 앞으로 옷나무 재배 수익성은 점차 높아질 것으로 예상된다.

제 4 절 결 론

원주산 漆液을 C₁₈ sep-pak을 통과시킨 후 0.2 μ m syringe filter로 filtering한 다음 HPLC분석용 칼럼으로 분석한 결과 50분 후에 용출되어 나오는 성분이 많았으나 silica gel adsorption column chromatography에서 hexane:acetone(90:10)용매계로 용출시킨 결과 50분 이후의 peak들이 사라졌다.

HPLC에 의한 옷나무 조추출물을 분석한 결과 5가지의 peak들이 나타났다. 이는 다른 천연물들의 성분들에 비해 매우 단순한 형태였다.

수피의 2차대사산물 양상은 urushiol과 flavonoids, gummy material이 함께 분포하고 있었으며 생수피가 건조수피에 비하여 urushiol과 flavonoids함량이 높게 추출되었다.

옷나무 목부 acetone추출물을 추출한 결과 F1, F2, F3로 분획되었으며 F3를 다시 2.5cm \times 30cm컬럼으로 전환하여 분리하였을 때 다시 3개로 분리되어 F1, F2, F3, F4, F5로 분취할 수 있었다.

RAE 53.5g과 RBE 23g을 MeOH에 녹인 후 methylenechloride, ethylacetate, water를 사용하여 순차연속추출하였을 때 RAE 분획의 용매분획물은 methylene chloride 가용부(RAE 1) 23g, ethylacetate 가용부(RAE 2) 29g 및 water 가용부(RAE 3) 1.5g을 얻었으며 RBE 분획의 용매분획물은 methylenechloride 가용부 7g(RBE 1), ethylacetate 가용부(RBE 2) 15g 및 water 가용부(RBE 3) 0.6g을 얻었다.

이와 같은 결과로 분획된 옷나무 추출물들은 간독성 및 면역증진과 암세포증식 및 혈관신생억제 활성검정, 동물실험 및 물질구조 구명을 위한 시료로 제공하였다.

여 백

제 3 장 암세포 증식 및 혈관신생 억제 작용
Anti-cancer and anti-angiogenesis of urushiol
and flavonoids

연구기관명 : 부산대학교

연구책임자 : 김 남 득

연 구 원 : 강 현 경

연 구 원 : 임 은 옥

연 구 원 : 김 시 호

연 구 원 : 장 을 영

연 구 원 : 손 대 권

여 백

제 1 절 서 설

인체에 치명적인 암은 매우 복잡한 기전에 의해 발생한다. 그렇기 때문에 발암 과정을 간단히 정의하기가 쉽지 않지만 간단히 정의를 해보자면 인체내 세포의 항상성에 교란이 생긴 상태라고 말할 수 있다. 인체에서 항상성은 세포들의 증식과 세포사 사이의 균형에 의해 유지된다. 위암의 경우 극동, 특히 한국과 일본에서 매우 높은 빈도로 발생한다. 위암은 확장되며 분화가 잘된 장형과 침윤성이며 분화가 덜된 형태로 나눈다(Sugano *et al.*, 1982). 분화가 잘된 것은 성장이 잘되고 간 전이가 잘되며 분화가 덜된 것은 침윤성으로 잘 성장한다(Adachi *et al.*, 1992). MKN-45 및 MKN-28 세포는 인체 위암세포이다(Motoyama *et al.*, 1986).

세포 증식은 세포주기의 활동과 밀접한 관련을 가진다. 인체에는 세포 분열의 능력에 따라 세 종류의 세포로 구성되는데 태생기 이후 세포 분열을 하지 않는 안정세포, 외부의 자극이 있을 경우 분열하는 불안정세포, 태생기 이후 분열 활동을 보이지 않는 영구세포 등이 있다. 이들은 수많은 세포 주기 조절 인자들에 의해 매우 정교하게 조절되며 각 세포 주기마다 checkpoint가 있고 이들 checkpoint를 조절하는 또 다른 조절 인자들이 존재한다.

그러나 화학물질, 방사선, 바이러스, 물리적 인자 등 자연에 존재하는 돌연변이원 혹은 발암원이 세포 주기 조절 인자들의 작용을 변하게 하거나 아니면 세포 주기 내의 checkpoint 유전자들의 변이를 유발시킬 때 정상적인 세포 분열에서 지속적인 세포 분열, 즉 암세포화 되는 것이다.

그리고 암세포는 무제한적 증식을 통해 일정한 크기로 자라게 되는데 이러한 증식을 가능하게 하는 것이 산소와 영양분을 공급하는 혈관신생 작용이다. 암세포의 증식 속도에 맞춰 적절한 혈관신생 작용이 동반될 때 종양피는 커지게 되나 혈관신생 작용이 수반되지 않을 때 암세포들은 괴사(necrosis) 상태에 빠지게 된다.

따라서 암세포의 증식을 조절하거나 종양내 혈관신생 억제작용을 가지는 선택적 약물 개발은 매우 중요한 의미가 있다.

특히 국내의 옻나무에서 이러한 신물질의 개발이 이루어질 경우 산림자원 육성 뿐 아니라 농가의 소득 증대, 중소기업 육성 및 국내 제약산업 발전에 큰 기여를 할 것으로 기대된다. Urushiol은 n-C₁₅ 혹은 n-C₁₇ alkyl side chain을 가진 olefinic catechol의 혼합물로서 한국형 옻나무(lacquer tree, *Rhus vernicifera* Stokes)에서 추출된다. 옻나무는 *Anacardiaceae* family에 속하며 이들 진액에 의해 피부에 과민성 염증을 일으킨다(Watson *et al.*, 1981). Urushiol은 전통적으로 동양에서 부종, 염증, 종양 치료 등에 이용되었다. 특히 urushiol은 CD8+T 세포를 자극하여 접촉성 피부염을 일으킨다(Kalish and Johnson, 1990).

종양의 치료를 위해 다양한 방법이 시도되고 있으며 암세포를 직접 죽이는 기전으로 apoptosis와 관련된 연구들이 많이 진행중이다(Sellers and Fisher, 1999). Apoptosis는 무척추 및 척추동물에 흔히 나타나는 생리적인 현상이다(Ellis *et al.*, 1991). 이것은 태생기 발생 시기부터 필요없는 세포들을 죽이는데 사용되어져 왔으며 특히 면역계와 신경계 발달에 유용하게 이용되어진다(Jacobson *et al.*, 1997). 그 외 조직 내 항상성 유지, 불필요한 세포 및 세포파괴, 감염물질에 대한 저항성에 중요한 기전이며(Vaux, 1993), 그리고 AIDS나 퇴행성 뇌질환에서도 주요한 역할을 한다(Williams, 1991), 이러한 apoptosis는 매우 정교한 기전에 의해 유발된다(Wyllie, 1987; Williams, 1991). 특히 p53, APO-1/Fas 항원, Bcl-2 family 등이 주요한 역할을 한다(El-Deiry *et al.*, 1992; Nagata and Golstein, 1995).

Apoptosis 진행은 핵의 변화(염색체 농축, DNA 절단), 미세구조물변경(세포골격 교란, 세포 크기 축소, 세포막 물집), 생화학적 변화(수종의 단백질 분해 효소 활성화) 등을 들 수 있다(Alnemri *et al.*, 1996). 이러한 과정 후 세포는 죽게되고 이웃한 대식 세포에 의해 제거된다(Wyllie *et al.*, 1980).

p53 종양억제유전자는 돌연변이된 세포의 DNA를 수정하거나 아니면 apoptosis를 일으킨다(Vogelstein and Kinzler, 1992). 이러한 과정은 매우 복잡한 생화학, 생물학적 기능에 의해 가능하다(Arrowsmith and Morin, 1996). p21^{WAF1/CIP1} 단백질은 p53 단백질에 의해 활성화되며 세포주기 중 G1 phase에 arrest를 야기시키고 또 apoptosis와 관련된다(El-Deiry *et al.*, 1993). 이러한 과정 중 Bcl-2 (Korsmeyer, 1992)와 관련된 family, Bcl-X_L, Bcl-X_s, Bax 등도 주요한 역할을 한다(Boise *et al.*, 1993). 이때 Bcl-2는 세포의 생명 연장에 관여하게 되는데 Bcl-2가 강할 경우 살고, Bax가 강할 경우 세포사가 발생한다고 생각되며 세포사를 야기시키는 인자로는 세포 성장인자의 제거, glucocorticoids, 방사선조사, 항암제 등이 주된 인자이다(Vaux *et al.*, 1988; Miyashita and Reed, 1992). 특히 *bax* 유전자는 p53에 의해 transactivation된다(Miyashita and Reed, 1995).

Caspase는 cysteine proteases로서 세포내 단백질을 분해하는데(Thornberry and Lazebnik, 1998), 이 과정은 apoptosis의 초기과정에서 매우 중요한 역할을 하며(Saraste and Pulkki, 2000), Caspase의 활성화는 2종의 기전에 의해 야기된다(Li *et al.*, 1997; Nicholson and Thornberry, 1997). 첫째는 death receptor에 결합되면서 발생하는데 여기에는 Fas나 tumor necrosis factor(TNF) receptor가 있다(Ashkenazi and Dixit, 1998). 이중 caspase-8은 가장 apical caspase로서 알려져 있으며 수용체와 ligand와의 결합으로 활성화 된다(Ashkenazi and Dixit, 1998; Hirata *et al.*, 1998).

Caspase-3은 정상적인 상태에서는 inactive한 상태로 있다가 단백질 분해효소에 의해 절단되면서 17kD와 12kD로 나뉘어지고 활성화된다(Nicholson *et al.*, 1995). 이것은 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), retinoblastoma(Rb), 세포골격단백질(lamin, gelsolin) 등을 분해하기도 한다(Kaufmann *et al.*, 1993; Im *et al.*, 1999). 이로 인해 apoptosis의 특이적인 형태변화가 관찰된다(Cryns and Yuan, 1998; Choi *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2001). 단백질 분해와 관련된 것을 요약하면 다음과 같다(Table 2. 1).

Apoptosis의 marker 중 하나인 DNA ladder 생성은 이중나선구조의 DNA가 180-200 base pairs(bp)로 endogenous DNases들에 의해 잘려지면서 나타난다(Wyllie, 1980). 그리고 caspase들도 DNA 구조와 형태를 유지하는 단백질들을 자르기도 한다(Nicholson and Thornberry, 1997). DNase들은 DNA fragmentation factor(DFF40)(Liu *et al.*, 1998)과 caspase activated DNase(CAD)(Enari *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998)가 있다. 특히 핵산이 활성형 CAD와 DFF40 등에 노출되면 apoptosis에서 나타나는 형태변화가 나타난다(Enari *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998). 이러한 DNA 조각은 전기영동상에서 사다리꼴로 나타난다(Wyllie, 1980).

세포주기에서 G1 phase에서 S phase로 가는 것은 세포의 성장에 있어서 매우 중요하다(Hartwell and Kastan, 1994). 세포주기가 완전히 돌기 위해서는 세포내 거대 단백질의 합성, 조합, 이동 등이 매우 정교하게 일어나야 하는데 이러한 과정은 cyclin dependent kinase(CDK)들에 의해 조절된다(Murray and Hunt, 1993). CDK의 활성형은 kinase 기능과 cyclin 복합체로 이루어진다. Cyclin D와 cyclin E는 G1 phase에서 합성되는데 S phase로 들어갈 때 속도 조절단계이다(Hartwell and Kastan, 1994). D-형 cyclin의 촉매인자로는 CDK4와 CDK6이며 cyclin E의 촉매인자는 CDK2이다(Pike *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 1999)(Fig. 2. 1).

하지만 생체에는 세포주기 활동을 억제하는 인자도 잘 발달되어 있는데 p16^{INK4a}, p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} 등이며 이들은 CDK-cyclin 복합체와 결합하여 이것의 작용을 방해한다(Sherr and Roberts, 1995). 특히 p53은 돌연변이로 손상받은 세포의 G1 check point에서 p21^{WAF1/CIP1}의 발현 증가로 세포주기를 정지시키고 repair를 유도한다(Hartwell and Kastan, 1994). 이러한 p21^{WAF1/CIP1}은 p53과 무관한 형태로 발현되기도 한다(Michieli *et al.*, 1994; Zeng and El-Deiry, 1996; Im *et al.*, 2001).

Table 2. 1. Partial list of polypeptides cleaved during apoptosis

Repair-related nuclear enzymes

- poly(ADP-ribose) polymerase
- DNA-PK
- Topo I
- Topo II

Signal transduction-related and cell cycle-related polypeptide

- D4-GDP dissociation inhibitor (D4-GDI)
- Retinoblastoma gene product
- Steroid response element binding proteins-1 and -2
- PITSLRE protein kinase
- Adenomatous polyposis colon gene protein
- PKC δ

Structural proteins

- Lamin A,
- Lamin B
- Fodrin,
- β -Actin
- Numa
- GAS-2 microfilament-associated protein

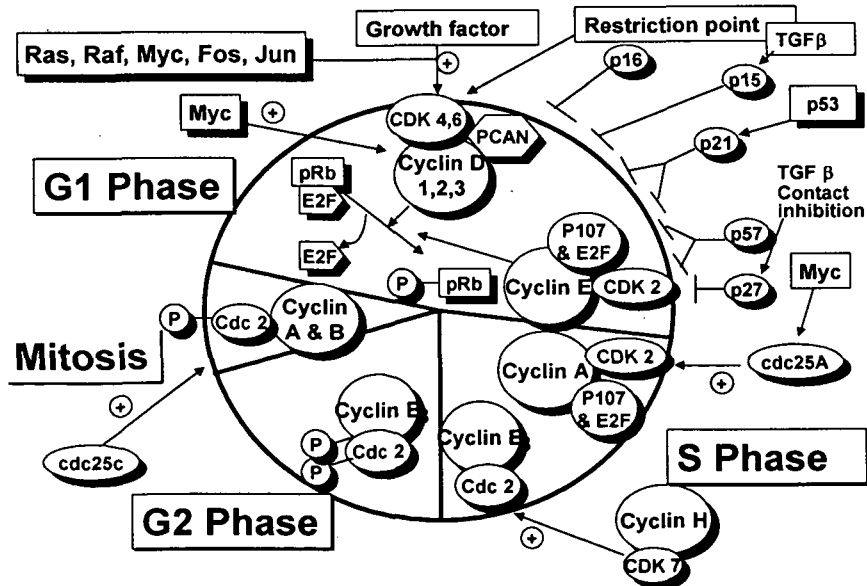


Fig. 2. 1. Cell cycle and cell cycle regulatory proteins.

혈관형성작용(angiogenesis)은 새로운 혈관을 만들어가는 과정을 말한다. 이것은 배 발생과정이나 상처조직의 회복부위, 난소의 황체(corpus luteum)를 제외하고 정상적인 생리상태에서는 거의 일어나지 않는다. 혈관형성은 고형암세포의 지속적인 성장을 위해 필수 불가결하고 또한 암세포가 처음 발생했던 곳에서 여러 부위로 전이되어 암세포가 퍼지게 하는 작용을 말한다. 암세포 전이는 혈관형성 작용에 의해 모세혈관 형성시 조직세포의 확산으로 촉진되며 종양을 둘러싸고 있는 조직 안쪽으로 이동하고 또 혈관 기본막을 파괴하는 소혈관이 있는 내복 조직 세포를 자극하므로써 혈관형성이 이루어진다. 그러므로 고형 암세포의 지속적인 성장에 혈관형성 작용은 대단히 중요한 일이다(Liotta *et al.*, 1974; Folkman and Klagsburn, 1987). 암세포 전이나 hemangiomas, diabetic retinopathy, psoriasis, neovascular glaucoma, 류마티스 관절염과 같은 심각한 이들 병들은 공통적으로 새로운 모세혈관의 병리적인 성장으로 특징지어진다(Moses *et al.*, 1990). 결론적으로 혈관형성 억제만이 암세포 증식을 억제하는데 있어서 새로운 항암제로서 종양의 제거 수술 후 혈관형성에 의해 전이될 수 있는 암세포의 전이를 막는데 이용될 수 있다.

암세포를 정상세포로 분화 유도하는 물질로 잘 알려진 retinoic acid와 vitamin D₃는 혈관형성 억제 작용을 하는 것으로 알려져 있으나(Oikawa *et al.*, 1989; Oikawa *et al.*, 1991), 이들 혈관형성 억제제는 한정된 효과와 독성 때문에 임상에 사용하는데는 문제가 있는 것으로 알려져 있다(Meeks *et al.*, 1981). 그래서 이와 같은 독성이 있는 합성 의약품 대신에 독성이 없으면서 혈관형성 억제효과가 있는 혈관형성억제제를 식물에서 찾자 한 결과 비파나무에서 ursolic acid나 oleanolic acid가 chick embryo chorioallantoic membrane(CAM) 검정법에 의해서 혈관형성 억제 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Sohn *et al.*, 1995).

제1협동연구과제에서는 제1세부과제팀에서 제공한 시료를 이용하여 인체 유암 및 위암세포들에 대한 항암활성 및 혈관신생억제 작용을 검색하였으며, 본 실험에 사용된 시료는 다음과 같다(Table 2. 2).

Table 2. 2. Used materials for the study

시료명	시료명
1. Urushiol	7. KRW-2
2. 옷나무 추출물(Cascara of <i>Rhus verniciflua</i> Stokes) F1, F2, F3, F4, F5	8. KRM-1
3. KW	9. KRM-2
4. HWA-Chil I	10. RbE
5. HWA-Chil S	11. RbE-1
6. KRW-1	12. RbE-2
	13. RbE-3

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

가. 암세포

실험에 사용된 MCF-7(Human breast adenocarcinoma cells, estrogen receptor-positive, wild type p53), MDA-MB-231(Human breast adenocarcinoma cells line, estrogen receptor-negative, mutant p53)은 생명공학연구소(Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology)에서 제공받았다. MKN-28(Human stomach adenocarcinoma cell line; mutant p53), MKN-45(Human stomach adenocarcinoma cell line; wild type p53 protein)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하여 사용하였다.

나. CAM assay용 계배

CAM assay를 위한 계배는 아바에이카종의 수정란을 구입하여 사용하였다.

다. 시 약

Fetal bovine serum 등 세포 배양용 시약은 Gibco사에서 구입하였고 그의 시약들은 Sigma사로부터 구입하였다. 실험에 사용한 Bcl-2, Bax, p53, c-Myc, and c-Jun, Cyclin B1, PARP protein들에 대한 primary antibody들은 Santa Cruz Biothchnology, Inc.(CA, USA)에서, p21은 Transduction Lab.(Lexington, KY, USA), peroxidase-labeled donkey anti-rabbit Ig와 peroxidase-labeled sheep anti-mouse Ig secondary antibody들은 Amersham Life Science(Arlington Heights, IL, USA) 구입하였으며 internal control로 사용된 β -actin에 대한 antibody는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. ECL Western blotting detection reagent는 Amersham Pharmacia Biotech에서 구입하였다. 기타 시약들은 특급 혹은 일급 이상의 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

가. 암세포 증식 억제 연구

1) 세포배양

MCF-7 cell은 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 50mg/ml gentamicin, 135mg/ml glutamine을 포함한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium)으로, 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다. MDA-MB-231, MKN-45, MKN-28 cell line은 10% FBS, 50mg/ml gentamicin, 135mg/ml glutamine을 포함한 RPMI 1640, 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다. 이들의 특징을 정리하여 Table 2. 3에 표기하였다.

2) MTT assay 에 의한 세포 독성 조사

암세포의 증식 억제 효과와 세포 사멸 효과를 MTT assay 방법으로 조사하였다. 이 방법은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]가 mitochondrial enzyme에 의해서 formazan으로 변화되는 원리를 이용하였다(Tada *et al.*, 1986). 세포를 24-multiwell plates에 1ml의 배지와 함께 넣고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 동안 배양했다. 세포들을 urushiol의 농도별로 처리한 후 48시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 배양한 후 배지를 제거하고 각각의 well에 MTT용액(5mg/ml PBS)을 0.25mg/ml이 되게 넣어주었다. 이것을 37°C에서 4시간 동안 incubation 한 후 배지와 MTT 용액의 혼합액을 formazan이 팔려오지 않게 조심스럽게 제거한 후 1ml의 EtOH-DMSO(1:1)을 결정화된 formazan을 녹이기 위해 넣어준다. 이것은 Spectrophotometer의 570nm에서 흡광도를 읽고 그래프를 그렸으며 측정은 3반복으로 하였다.

3) Agarose gel analysis of DNA fragmentation

세포 배양 후에 세포들을 모아서 PBS로 한 번 씻어 낸 후에 lysis buffer(5mM Tri-Cl, pH 7.4, 20mM EDTA, 0.5% Triton X-100)로 4°C에서 30분간 lysis시켰다. 4°C, 14,000rpm에서 15분간 원심분리 시킨 후 상등액을 모아서 protease K(300 μ g/ml)를 처리해서 50°C 항온수조에서 24시간 동안 incubation 시켰다. 이것을 다시 phenol-chloroform으로 처리한 후 상온, 14,000rpm, 15분 동안 원심분리 한 후 상등액을 취하였다. 이 상등액 0.1 부피의 5M NaCl 과 0.5부피의 Isopropanol로 처리해서 -20°C에서 1시간 동안 DNA를 침전시켰다. 14,000rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리 한 후 상등액을 제거하고 건조된 pellet을 300 μ g/ml 농도의 RNase가 포함된 증류수에 녹였다. DNA의 전기영동은 TAE buffer(0.04M tris-acetated, 0.01M EDTA) 속에 담긴 1.5% agarose gel에서 하였다. Agarose gel속의 DNA는 ethidium bromide로 염색 하였으며 DNA는 UV transilluminator에서 관찰하였다. DNA는 size marker로 사용한 1kb DNA ladder와 비교하여 size를 추정하였다.

Table 2. 3. Cell lines used for this experiment

Cell line	Cell line name	Characteristics
MCF-7	Human breast carcinoma cell	wild type p53 Estrogen receptor positive
MDA-MB-231	Human breast carcinoma cell	mutant type p53 Estrogen receptor negative
MKN-45	Human gastric adenocarcinoma cell	wild type p53 poorly differentiated
MKN-28	Human gastric adenocarcinoma cell	mutant type p53 well differentiated

4) PI staining과 핵 구조 관찰

암세포에 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ urushiol을 48시간 처리하고 이들을 PBS-B로 세척한 뒤 70% 에탄올, 0.5% Tween 20 혼합액으로 고정했다. 고정세포를 PI 용액(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS)으로 핵을 염색하고 형광현미경으로 핵의 구조를 관찰하였다.

5) Western immunoblot analysis

배양된 세포들을 모아서 PBS로 두 번 씻어 낸 후에 TNN lysis buffer[40mM Tris-HCl(pH 8.0), 120mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.1mM sodium orthovanadate, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF]로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 간격으로 진탕하면서 30분간 incubation하였다. Lysate를 4 $^{\circ}\text{C}$, 14,000rpm에서 15분간 원심분리해서 Cell debris를 제거했다.

BCA Protein Assay Reagent Kit(Pierce, USA)를 이용해서 protein assay 한 후 동일한 양의 protein을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 한 후에 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell, NH, USA)에 transfer시켰다. Blots은 5% skim milk(non-fat dried milk)를 함유한 TBE buffer[10mM Tris-HCl(pH 7.5), 50mM NaCl, 2.5mM EDTA]에서 1시간 동안 blocking 시킨 후 동일한 buffer속에 antibody를 넣고 blot를 담귀 1시간 동안 처리했다. Blot을 TBE buffer로 씻어준 후 peroxidase-labeled secondary antibody를 1시간 동안 처리한 후에 ECL western blotting analysis kit을 이용해서 protein band를 확인했다.

6) 전자현미경에 의한 관찰

MKN-45와 MKN-28 세포에 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ urushiol을 48시간 처리하고 이들을 PBS로 세척하였다. 원심분리기로 pellet을 만든 뒤 2.5% gluteraldehyde 용액에서 고정하였다. 그리고 이들을 epoxy resin과 섞은 뒤 이들을 전자현미경용 시료로 제작한 뒤 Hitachi 전자현미경을 이용하여 세포와 핵의 형태를 관찰하였다.

나. Urushiol의 생체 내 항암활성 연구

Urushiol의 동물에 대한 생체 실험은 1998년 Chung(Chung, 1998)에 의해 급성독성 실험이 시행되었는데 이들은 Sprague Dawley(SD)계 흰쥐를 이용하여 최대용량인 5g/kg, 3.3g/kg, 2.2g/kg, 1.5g/kg, 1.0g/kg의 용량으로 urushiol을 0.5% carboxymethyl cellulose sodium salt 용액에 현탁시켜 경구 투여 후 급성독성 실험을 시도한 적이 있었다. 이 실험 결과 3.3g/kg, 5.0g/kg의 농도로 1회 투여한 경우 투여받은 흰쥐 5마리 중 5마리 모두 사망하였으나 2.2g/kg이나 그 이하의 양으로 투여받은 흰쥐는 2주간 생존하였다는 결과를 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 상기 급성독성 시험에 사용한 용량보다는 적은 50mg/kg의 양으로 주 3회 경구 투여하면서 urushiol이 nude mouse에 이식시킨 위암세포들의 증식을 억제하고 또 nude mouse의 생존에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다.

Urushiol 100mg/kg, 50mg/kg, 25mg/kg의 농도로 carboxymethyl cellulose sodium salt와 현탁액을 만들고 항종양실험에 이용하였다. 앞선 실험에서 MKN-45 세포들이 선택적 apoptosis 유도과정에 의해 세포사하는 것이 관찰되었기에 본 생체 실험은 MKN-45 세포만을 대상으로 시행하였다. 위암세포 이식을 위해 한 마리의 nude mouse에 1×10^7 cells/ml의 농도로 mouse 당 0.3ml씩 양쪽 겨드랑이 피하로 이식하였다. 종양을 이식한 후 14일째 종양의 크기가 대략 150mm³(평균 ≥ 5 mm의 크기)에 도달한 nude mouse를 각 실험군당 5마리 선발하여 urushiol을 투여하기 시작하였다.

약물 투여는 urushiol 현탁액(carboxymethyl cellulose sodium salt)을 주 3회 경구 투여하였으며 약물 투여를 시작한 날부터 크기 및 체중을 개체별로 측정하고 약물 투여 후 15일째에 nude mouse를 희생시켜 종양을 분리하고 무게를 측정하였다.

다. 혈관신생억제 연구: CAM assay

CAM assay방법은 수정란을 구입하여 45시간 동안 18℃에 놓아둔 다음 90% 습도가 유지되는 37℃ 배양기에 넣어 이를 1일배로 하여 배양했다.

3일배가 되면 계란의 끝 부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 2ml 뽑아 내고 계란의 공기 주머니가 있는 쪽을 멸균된 메스를 이용하여 지름 3cm 크기의 원형 창문을 만들었다. 공기 주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리 테이프로 구멍을 막았다.

4.5일배가 되면 thermanox coverslip에 제1세부과제팀에서 제공한 시료들 각각 2 μ l를 도포한 후 말렸다. 완전히 마른 것을 확인하고 4.5일배 수정란의 유리 테이프를 떼어 낸 후, 이 coverslip을 발생 중의 embryo CAM 표면에 놓고 다시 유리 테이프로 창문을 막았다.

이를 배양기에서 2일 동안 배양시킨 후 10% fat emulsion(Intralipid, 녹십자)를 CAM 막 안쪽에 주입하여 해부 현미경(magnification x 8)로 혈관 형성이 억제되었는지 관찰하고 CAM의 사진을 촬영하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Urushiol에 의한 암세포 증식 억제 연구

가. 유암세포의 증식 억제

옻나무(Fig. 2. 2)에서 추출된 urushiol의 화학적 조성은 수종의 다른 물질이 혼합된 형태로 구성되어 있다(Fig. 2. 3). 이들 혼합물인 urushiol을 유암세포를 대상으로 세포독성 검사법인 MTT assay를 실시하였다. MTT assay는 종양세포의 증식 여부에 따른 미토콘드리아의 효소 활성을 검색한 것으로 가장 흔히 활용되는 암세포 증식억제 연구이다. 본 실험을 위해 옻나무에서 분리 정제된 urushiol을 시료로 유암세포(MCF-7)를 대상으로 검색하였다. Urushiol의 세포독성 작용 기전을 연구하기 위해서는 여러 종류의 암세포를 모두 연구하기 보다는 세포독성 효과가 가장 잘 나타나는 estrogen receptor positive cell line 중 가장 대표적인 MCF-7 세포를 대상으로 실험하였다.

전반적으로 유암세포에 현저한 세포독성 효과를 보였으며, 특히 MCF-7 암세포에 대한 세포 독성 효과가 탁월하였으며 농도 의존적인 세포독성 효과를 보였다(Fig. 2. 4; Fig. 2. 5). 그리고 이들 암세포들의 MTT 실험 결과 암세포 성장 억제 농도인 IC_{50} 값은 약 $6\sim 7\mu\text{l/ml}$ 이었다. MCF-7 암세포에 urushiol을 다양한 농도로 첨가하고 배양된 세포들의 수와 형태를 관찰한 결과 수와 형태가 control에 비해 현저하게 차이가 났다. 즉 urushiol 존재 하에는 많은 세포들이 성장을 하지 않았거나 세포독성의 결과 수가 감소하였다. 그리고 일부 암세포들에서는 apoptosis의 결과라고 생각되는 apoptotic body 등을 동반한 구조물이 관찰되기도 하였다(Fig. 2. 5).

MCF-7 암세포의 배양 결과 urushiol의 존재하에 세포들의 형태가 control에 비해 매우 다양하게 변화하였으며 apoptosis의 과정에 나타나는 cell의 크기 변화, dead cell의 증가 등이 관찰되었다. 따라서 본 연구에서는 apoptosis의 전형적인 시험법 중 하나인 DNA fragmentation assay를 시도하였다. 그 결과 약 $8\mu\text{l/ml}$ 농도에서 전형적인 형태의 DNA ladder가 관찰되었다(Fig. 2. 6).

Apoptosis 과정에 관여하는 단백질 중 Bax와 Bcl-2의 발현 양상을 검토한 결과 pro-apoptotic protein인 Bax는 urushiol의 농도 증가에 따라 약간 증가하는 경향을 보였으나 anti-apoptotic protein인 Bcl-2가 urushiol의 농도 증가에 따라 현저히 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2. 7).



Fig. 2. 2. *Rhus verniciflua* Stokes.

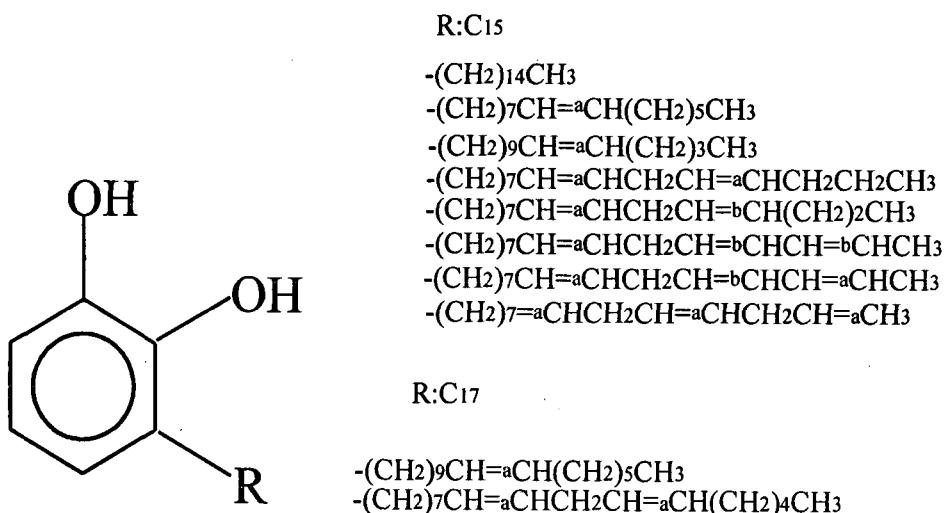


Fig. 2. 3. Structure of urushiol analogues of *Rhus verniciflua* Stokes.

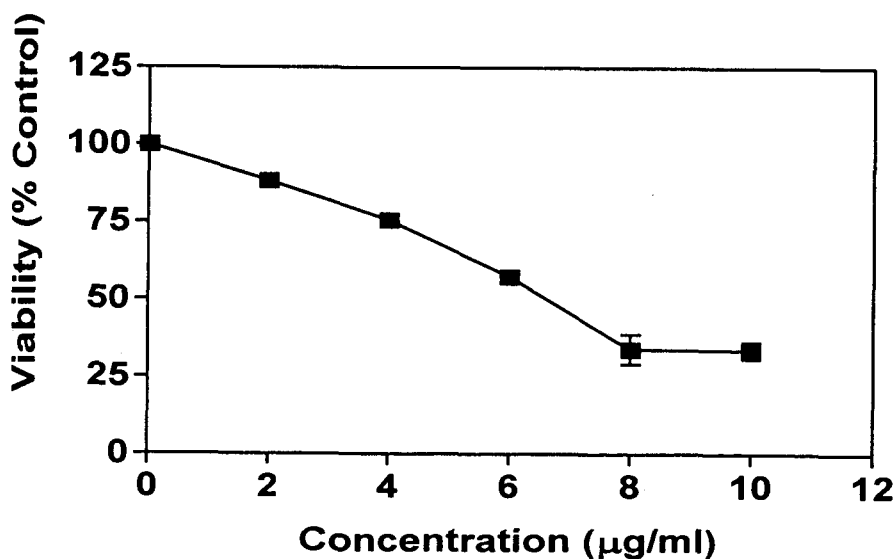


Fig. 2. 4. Cytotoxic effect of urushiol on MCF-7 cells. Cells were incubated with different concentration of urushiol for 48hrs and the effect of urushiol on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

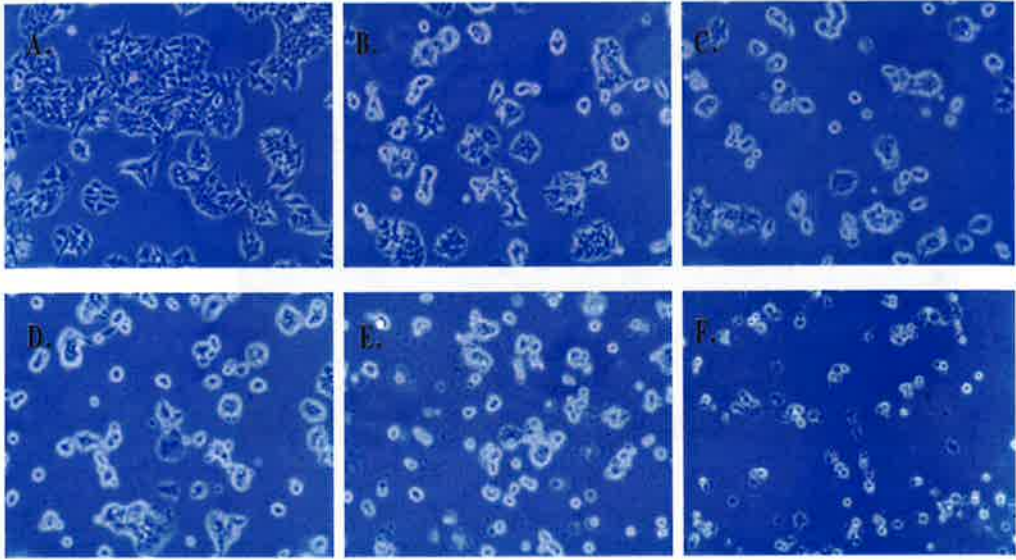


Fig. 2. 5. Microphotographs of urushiol treated MCF-7 cells were determined by light microscopy. MCF-7 cells were treated with urushiol for 48hrs. (A: control, B: $2\mu\text{g/ml}$, C: $4\mu\text{g/ml}$, D: $6\mu\text{g/ml}$, E: $8\mu\text{g/ml}$, F: $10\mu\text{g/ml}$).

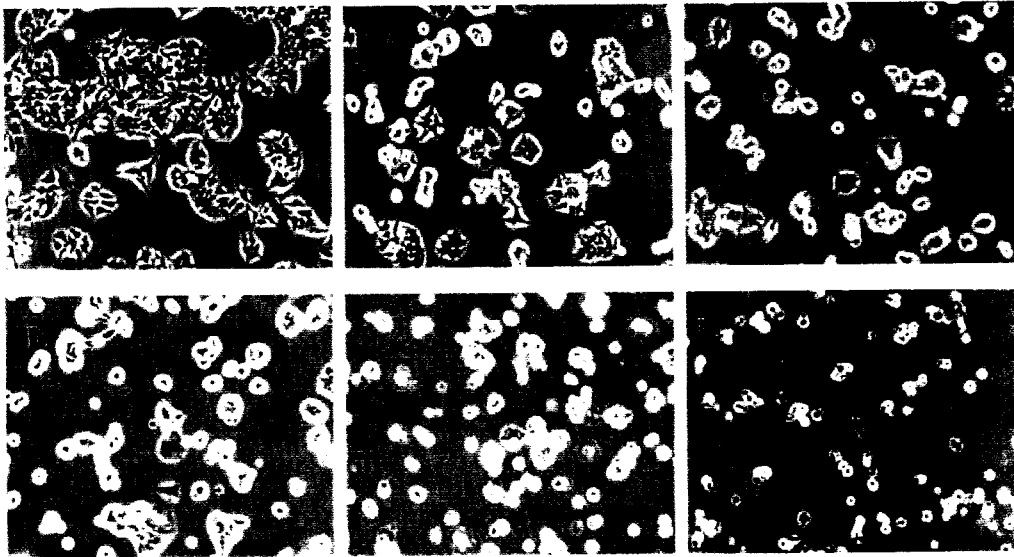


Fig. 2. 5. Microphotographs of urushiol treated MCF-7 cells were determined by light microscopy. MCF-7 cells were treated with urushiol for 48hrs. (A: control, B: 2µg/ml, C: 4µg/ml, D: 6µg/ml, E: 8µg/ml, F: 10µg/ml).

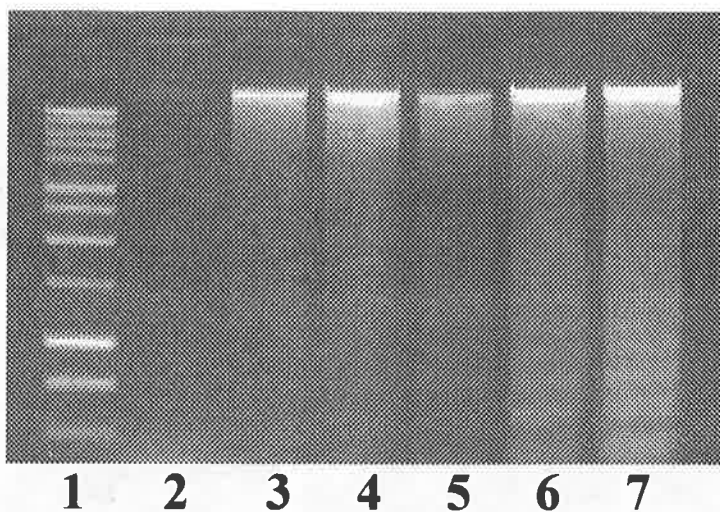


Fig. 2. 6. DNA fragmentation induced by urushiol. MCF-7 cells were treated with urushiol for 48hrs. DNA fragmentation appeared from Lane 2.(Lane 1: Marker, Lane 2: Control, Lane 3: 2µg/ml, Lane 4: 4µg/ml, Lane 5: 6µg/ml, Lane 6: 8µg/ml, Lane 7: 10µg/ml).

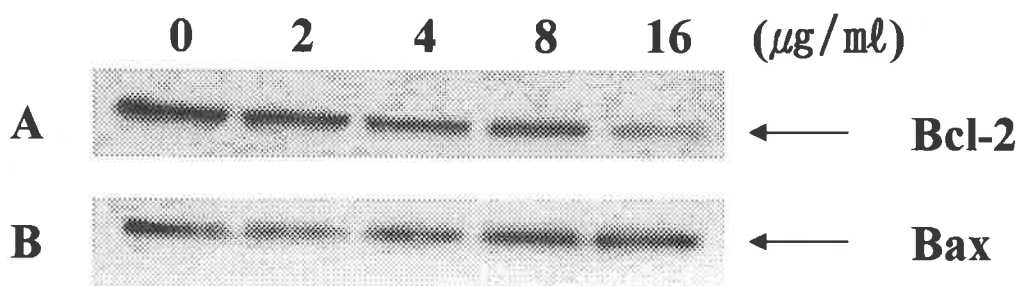


Fig. 2. 7. The effect of urushiol on the expressions of Bcl-2 and Bax after treatment of urushiol on MCF-7 cells for 48hrs. Down-regulation of Bcl-2 (A) and slightly up-regulation of Bax (B).

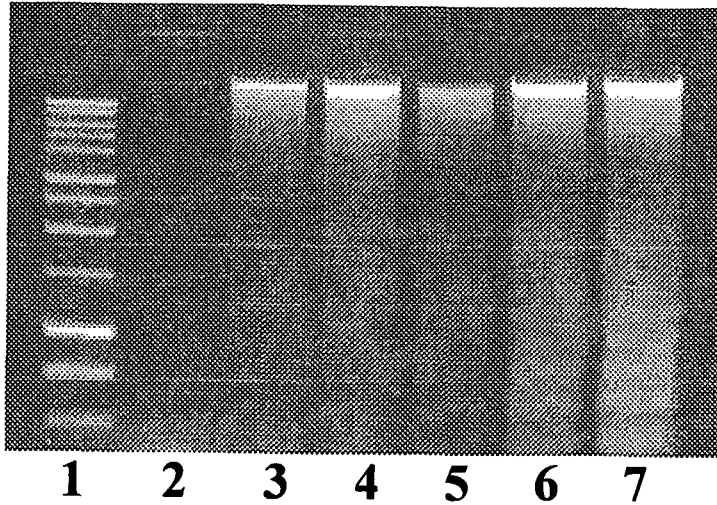


Fig. 2. 6. DNA fragmentation induced by urushiol. MCF-7 cells were treated with urushiol for 48hrs. DNA fragmentation appeared from Lane 2.(Lane 1: Marker, Lane 2: Control, Lane 3: 2µg/ml, Lane 4: 4µg/ml, Lane 5: 6µg/ml, Lane 6: 8µg/ml, Lane 7: 10µg/ml).

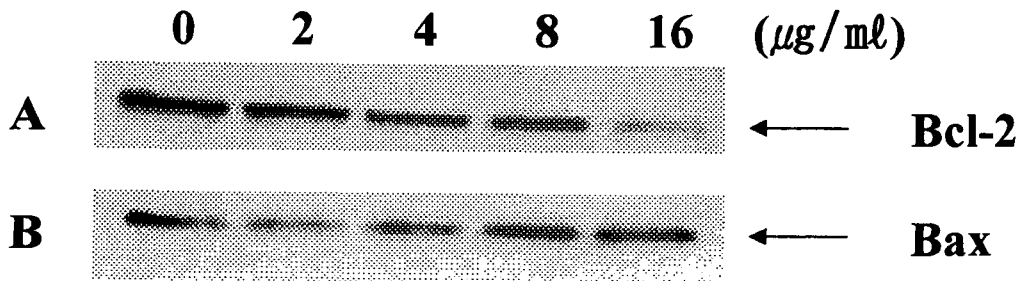


Fig. 2. 7. The effect of urushiol on the expressions of Bcl-2 and Bax after treatment of urushiol on MCF-7 cells for 48hrs. Down-regulation of Bcl-2 (A) and slightly up-regulation of Bax (B).

이러한 결과는 여러 apoptosis 유도 작용을 가진 약물에서 나타나는 현상과 매우 유사한 경향을 보이며 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 감소가 MCF-7 암세포의 apoptosis 유도에 결정적인 영향을 미친 것으로 사료된다. 또 apoptosis의 특이한 단백질 분해 산물인 PARP(116 KDa)의 변화를 관찰한 결과 8 μ g/ml와 16 μ g/ml에서 다소 PARP의 단백질 양이 감소하는 것과 fragment(89 KDa)를 관찰할 수 있었다(Fig. 2. 8).

그리고 cell cycle 조절 인자 중 apoptosis 및 세포주기 G1 arrest에 관여하는 단백질의 경우 p53과 p21의 발현을 조사한 결과 p53은 농도 의존적으로 증가하였으며, p21의 경우 8 μ g/ml에서 가장 현저한 p21 단백질 증가를 보인 후 다소 감소하는 경향을 보였다(Fig.2. 9). 그리고 urushiol의 농도를 8 μ g/ml로 고정하고 72시간 동안 시간 의존성을 조사한 결과 p53과 p21 모두 시간 의존적인 발현 증가를 확인할 수 있었다(Fig.2. 10). 이러한 결과는 urushiol이 apoptosis를 유도하여 G1 phase에 특이한 형태의 arrest 유도하는 결과로 생각된다. 이에 따라 urushiol에 의한 암세포들의 세포주기 조절 변화 가능성을 제시하는바 이에 대한 추가 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

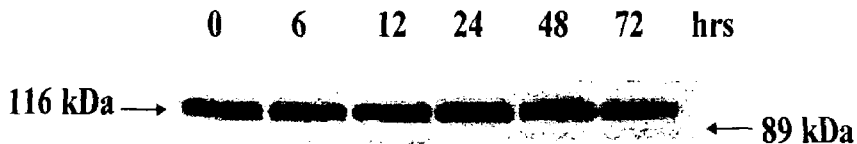


Fig. 2. 8. Specific cleavage of PARP protein was induced in urushiol treated MCF-7 cells. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP, 116 KDa) was cleaved into 89 KDa fragment after 48hrs on MCF-7 cells with treatment of 8 μ g/ml urushiol.

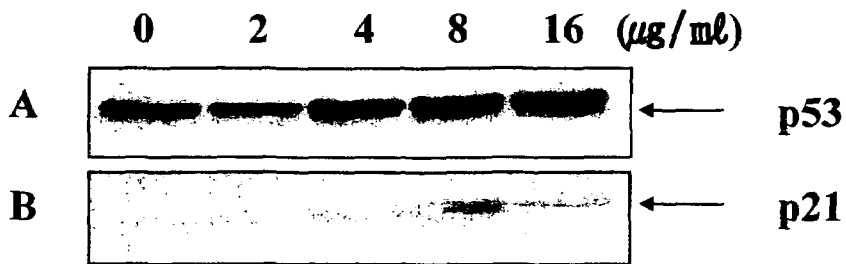


Fig. 2. 9. Dose-dependent effects of urushiol on the expressions of p53 and p21. After treatment of urushiol on MCF-7 cells for 48 hrs, the expressions of p53 (A) and p21 (B) were both up-regulated.

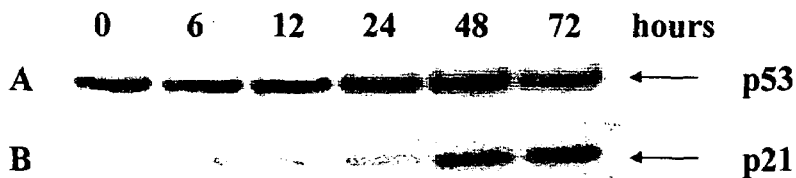


Fig. 2. 10. Time-dependent effects of urushiol on the expressions of p53 and p21. After treatment of 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ urushiol on MCF-7 cells for 72hrs, the protein levels of p53 and p21 were both up-regulated.

나. Urushiol에 의한 위암세포 증식 억제 연구

위암세포의 인체 위암세포들에 대한 세포독성 검색결과 urushiol은 MKN-28과 MKN-45 위암세포에 대해 조사하였다.

Urushiol은 이들 2종류의 위암세포에 대해 유의성 있는 농도 의존적 세포독성을 보였으나 p53 wild type protein을 가진 MKN-45 암세포에 더욱 더 높은 세포독성을 보였다. 시험한 암세포의 50%를 사멸할 수 있는 값(IC₅₀)은 MKN-28 암세포의 경우 약 18 μ g/ml, MKN-45 암세포의 경우 12 μ g/ml였다(Fig. 2. 11). 그리고 urushiol을 처리하고 배양하면서 세포의 형태를 비교한 결과 MKN-45세포의 경우 control 세포일 경우 세포배양기 표면에 monolayer로 붙어 자라기 보다 약간 뜬 상태에서 둥근 모양을 유지하였다. 이에 비해 MKN-28 세포는 전형적인 monolayer의 형태로 성장하였다. Urushiol 처리 결과 이들 두 종류의 위암세포들의 성장이 억제되고 또 세포독성에 의해 죽어 가는 모습을 보였다(Fig. 2. 12).

PI 염색법으로 염색체 모양을 관찰한 결과 MKN-45 세포의 경우 염색체가 농축되고 엉켜있는 모습을 관찰하였다. 그러나 MKN-28 세포에서는 이러한 현상이 보이지 않았다(Fig. 2. 13). 이러한 결과는 MKN-45 세포의 경우 urushiol이 선택적으로 apoptosis 유도 효과를 보이는 것으로 사료되어 apoptosis marker 중의 하나로 알려진 DNA fragmentation 유무를 확인하였다.

실험결과 urushiol의 농도를 3, 6, 12, 24 μ g/ml로 증가시킬수록 DNA fragmentation이 MKN-45 세포에서 현저히 나타났다. 그러나 MKN-28 세포에서는 DNA ladder 현상이 관찰되지 않았고 necrosis 현상으로 알려진 DNA smearing 현상이 관찰되었다(Fig. 2. 14). 이러한 결과는 MKN-45 세포에서 선택적인 apoptosis 유도 작용이 있다는 것을 시사하였기 때문에 다음 단계로 cell cycle arrest 유도와 관련된 단백질인 p53 및 p21^{WIP/CIP1}(이하 p21으로 표기)단백질의 발현을 Western blot으로 확인하였다. 동일 농도 범위(3, 6, 12, 24 μ g/ml)에서 p53 단백질의 경우 MKN-45와 MKN-28 세포의 경우 뚜렷한 변동은 관찰되지 않았으나 cell cycle 중 G1 arrest에 관여한다고 알려진 p21 단백질의 발현 유도가 MKN-48 세포에서 현저하게 관찰되었다(Fig. 2. 15).

이것은 p21 단백질의 경우 p53-dependent or p53-independent pathway에 의해 up-regulation됨이 여러 논문에서 보고되고 있는데 본 실험에서는 MKN-45 세포의 경우 p53-dependent pathway가 현저히 작동하는 것으로 보여지며 MKN-28 세포의 경우 urushiol 고농도에서 약간의 p21 up-regulation이 관찰되었을 뿐 농도 의존적인 변화를 볼 수 없었다.

그리고 late G1 phase에서 cyclin E/CDK2의 작용을 억제하는 것으로 알려진 p27 단백질의 경우에서도 MKN-45 세포의 경우 urushiol 처리 후 up-regulation 된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 MKN-28 세포의 경우 현저한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2. 16).

Cytotoxicity of urushiol on stomach cancer cells

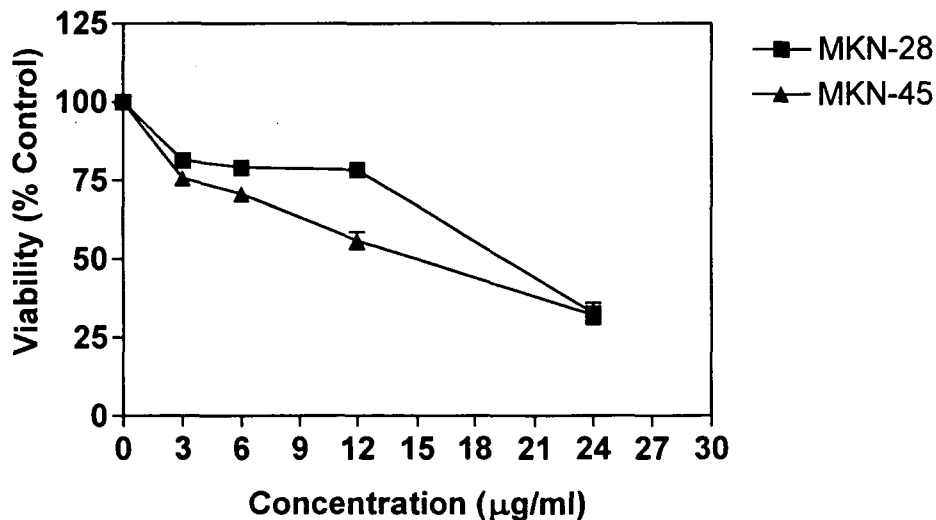


Fig. 2. 11. Cytotoxic effect of urushiol on MKN-45 and MKN-28 cells. Cells were treated with different concentration of urushiol for 48 hrs and the effects of urushiol on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

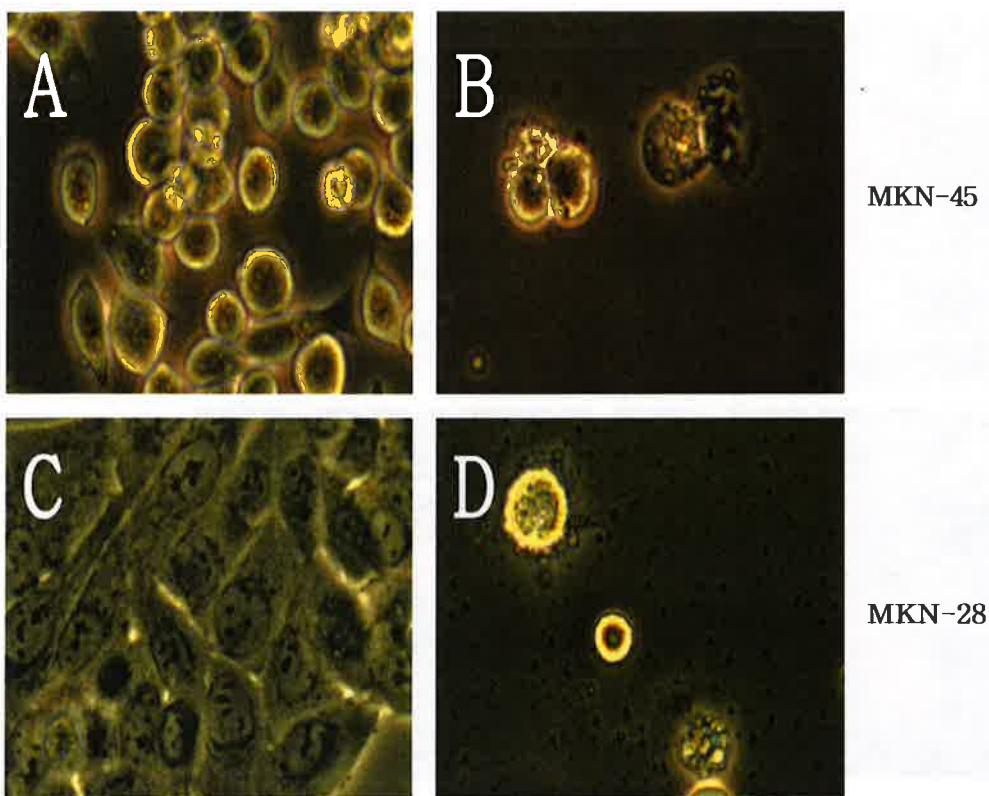


Fig. 2. 12. Microphotographs of human gastric cancer cells treated with urushiol. Morphological changes were observed by light microscopy after treatment with urushiol for 48hrs. Untreated control of MKN-45 cells (A); 24 μ g/ml urushiol-treated MKN-45 cells (B); untreated control of MKN-28 cells (C); 24 μ g/ml urushiol-treated MKN-28 cells (D).

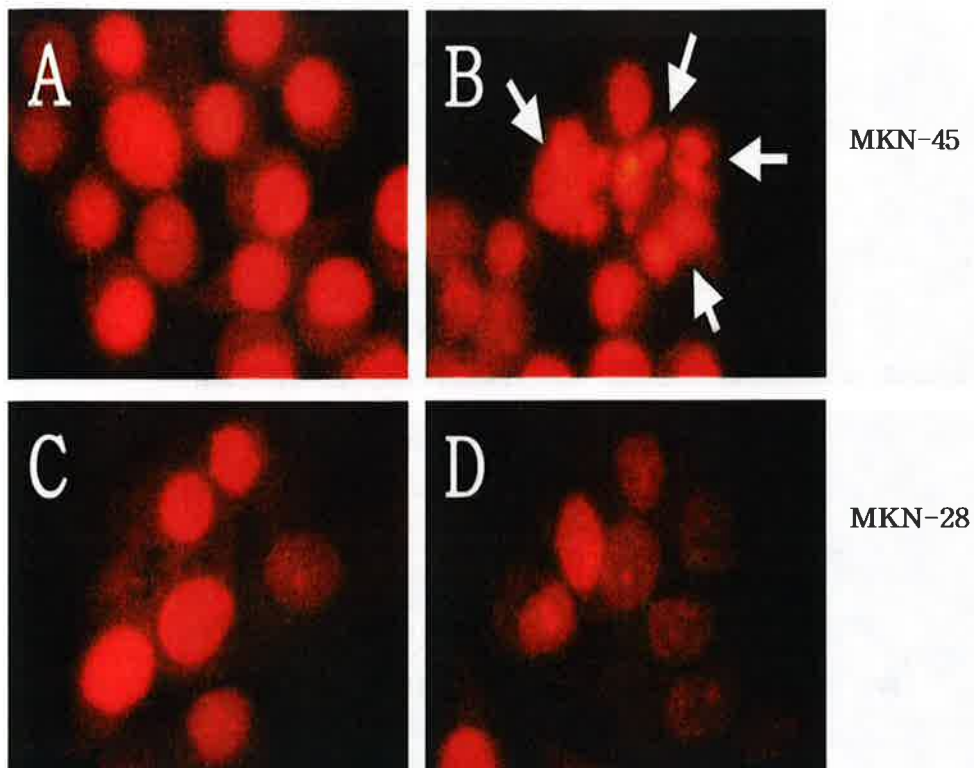


Fig. 2. 13. Morphological change of nuclear structure on MKN-45 cells after treatment with urushiol. Detection of apoptotic morphology by staining with fluorescent DNA-binding dye, PI. Cells have been stained with PI after treatment with urushiol. Untreated control of MKN-45 cells (A); 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ urushiol-treated MKN-45 cells (B); untreated control of MKN-28 cells (C); 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ urushiol-treated MKN-28 cells (D). Apoptotic cells with small, solid spheres of condensed DNA were shown in the panel B (arrows).

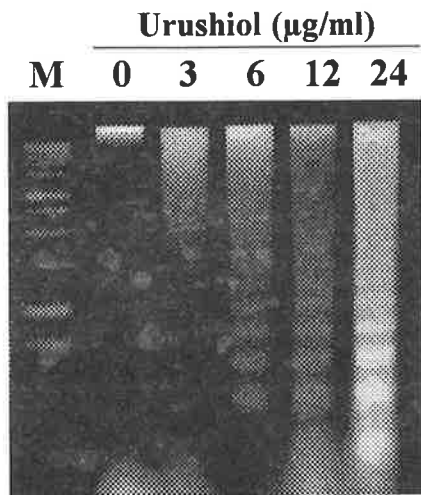
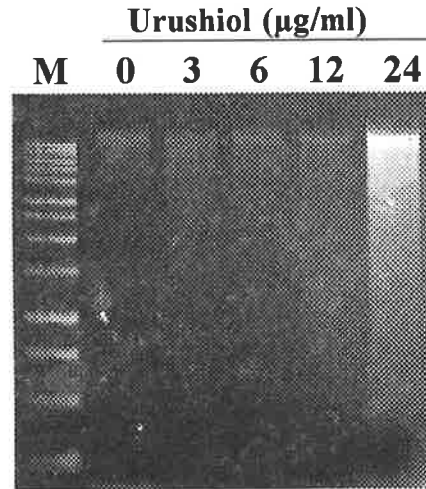
A**MKN-45****B****MKN-28**

Fig. 2. 14. DNA fragmentation induced by urushiol on MKN-45 cell lines. Effect of urushiol on induction of DNA fragmentation in MKN-45 and MKN-28 cells was observed. Cells were incubated with indicated concentration of urushiol for 48hrs. Urushiol induced DNA fragmentation in MKN-45 cells in the dose-dependent manner (A). However, urushiol did not induced DNA fragmentation in MKN-28 cells (B).

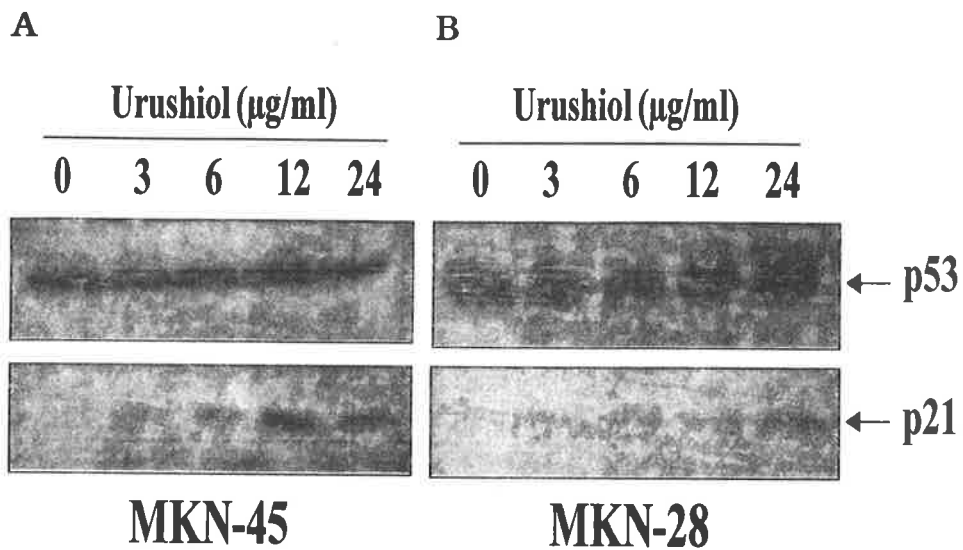


Fig. 2. 15. Expression of p53 and p21^{WIF/CIP1} proteins after treatment with urushiol on MKN-45 and MKN-28 cells. The protein levels were determined by Western blotting. In MKN-45 cells, the expression levels of p53 and p21^{WIF/CIP1} proteins were up-regulated (A). In MKN-28 cells, p53 protein was not regulated, but p21^{WIF/CIP1} protein expression was slightly increased (B).

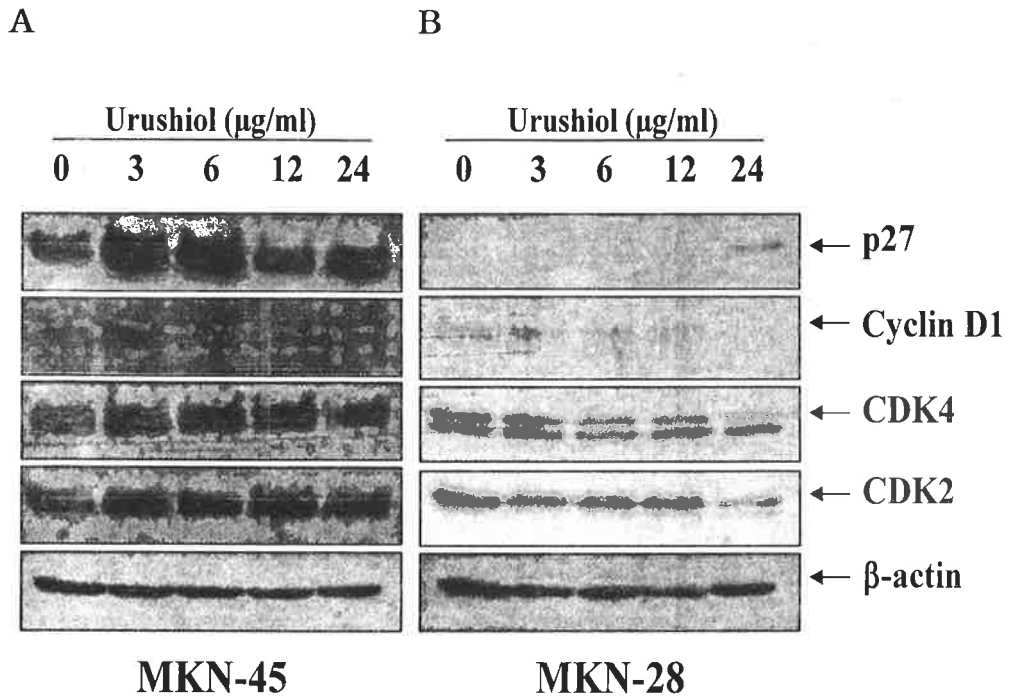


Fig. 2. 16. Expressions of p27^{WIF/CIP1} CDK inhibitor, cyclin D1, CDK4, CDK2, and β -actin after treatment with urushiol on MKN-45 and MKN-28 cells. The protein levels were determined by Western blotting. p27^{WIF/CIP1} CDK inhibitor was increased on urushiol-treated MKN-45 cells (A). However, the rest of the proteins were remained unchanged. Moreover, the cell cycle regulator proteins in MKN-28 cells were also unchanged through the treatment (B).

Apoptosis 과정에 관련된 Bcl-2/Bax 단백질의 발현을 조사한 결과 이들 단백질의 발현에 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2. 17). 그런데 특이한 것은 MKN-45 세포에서는 Bcl-2 단백질의 발현이 확인되지 않았으며 MKN-28 세포에서는 Bax 단백질이 검색되지 않았다. 따라서 이들의 family protein들에 대한 추가적인 Western blot의 실험이 요구되어졌다.

또 다른 apoptosis marker 중 하나인 caspase-3 활성화형 검색에서 proform인 32kD와 활성화형 19kD가 urushiol 처리군인 MKN-45 세포에서 확인되었다. 그리고 caspase-3에 의한 단백질 분해 과정을 통해 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP, 116kD)의 분해 산물인 89kD의 분획이 확인되었다(Fig. 2. 18).

그러나 또 다른 apoptosis pathway 중 하나인 Fas, Fas-L 관련 단백질들의 up-regulation도 urushiol의 농도가 증가될수록 발현 양이 증가됨이 관찰되었다(Fig. 2.19). 그리고 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 urushiol을 처리한 뒤 전자현미경으로 관찰한 결과 MKN-45 세포에서 전형적인 apoptotic body들을 MKN-45 세포에서 관찰할 수 있었으나 MKN-28 세포에서는 이러한 특이 구조물이 관찰되지 않았고 necrosis와 관련된 형태적 변화를 보였다(Fig. 2. 20).

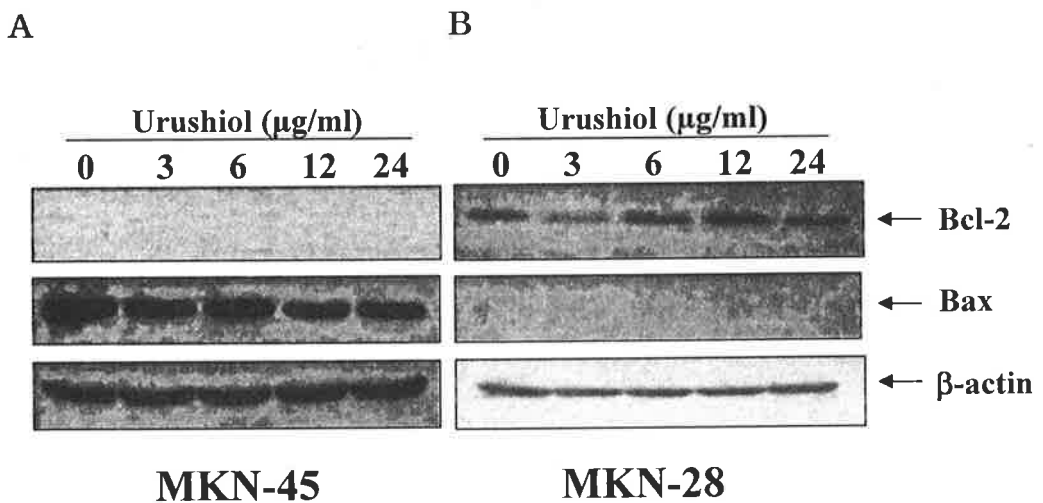
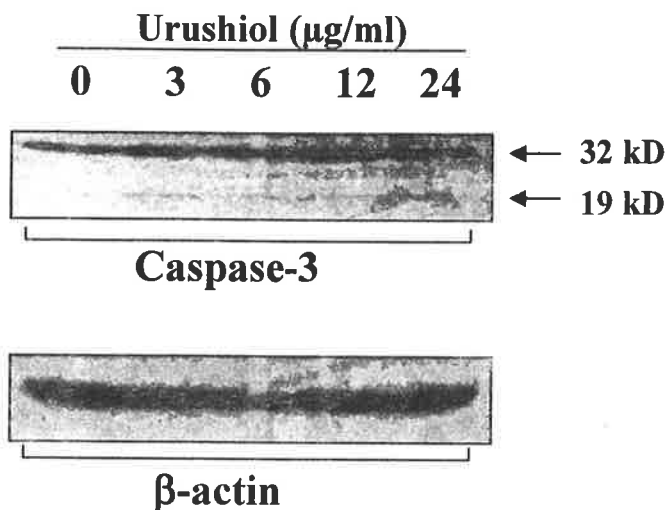


Fig. 2. 17. Expression of Bcl-2 and Bax proteins after treatment with urushiol on MKN-45 and MKN-28 cells. The protein levels were determined by Western blotting. In MKN-45 cells, the expression level of Bcl-2 was not detectable. However, the Bax protein expression was up-regulated (A). In MKN-28 cells, Bcl-2 protein was not regulated, but Bax protein expression was not detectable (B).

A



B

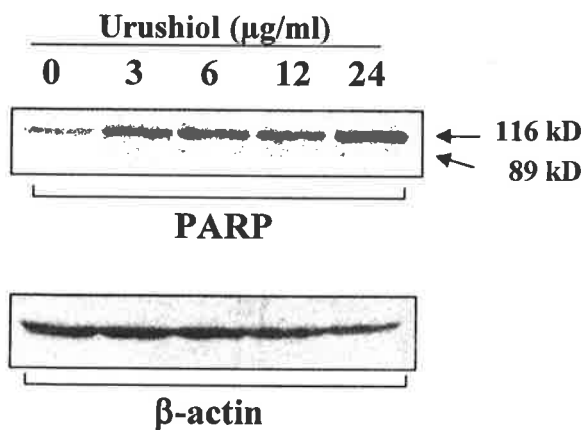
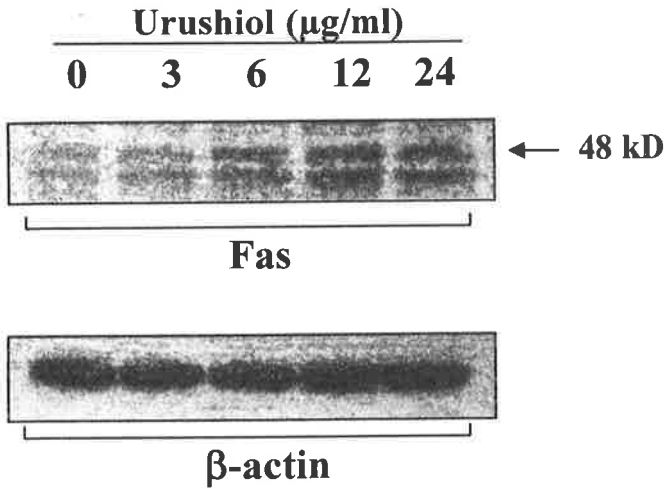


Fig. 2. 18. Activation of caspase-3 and specific cleavage of PARP on urushiol-treated MKN-45 cells. The protein levels were determined by Western blotting. After treatment with urushiol proenzyme (32 kD) of caspase-3 was activated (19 kD) on MKN-45 cells (A). PARP (116 kD) was cleaved into 89 kD fragment on MKN-45 cells after treatment with urushiol (B).

A



B

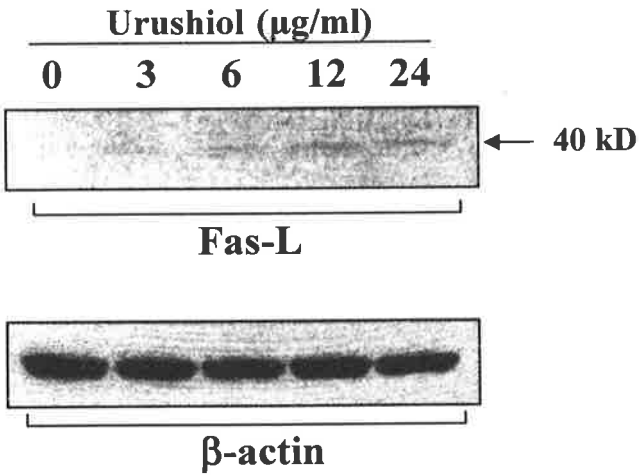


Fig. 2. 19. Up-regulation of Fas and Fas-L on urushiol-treated MKN-45 cells. The protein levels were determined by Western blotting. The expression levels of Fas (A) and Fas-L (B) were increased on MKN-45 cells after treatment with urushiol.

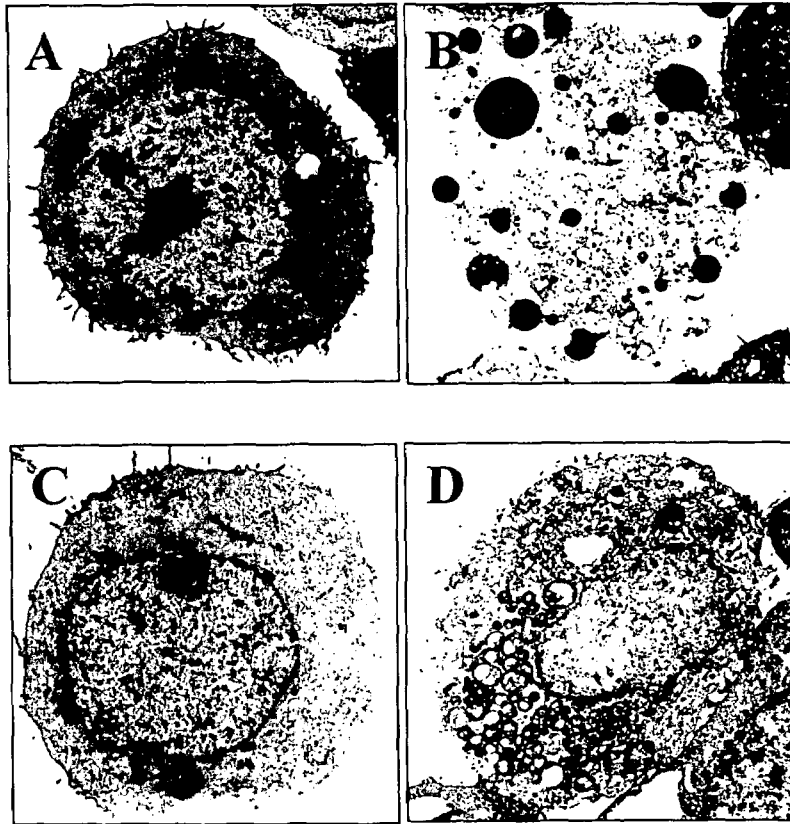


Fig. 2. 20. Electron microphotographs of MKN-45 and MKN-28 cells after treatment with urushiol. After treatment with urushiol morphological changes of MKN-45 and MKN-28 cells were observed by electron microscopy. Untreated control of MKN-45 cells (A); $15\mu\text{g/ml}$ urushiol-treated MKN-45 cells (B); untreated control of MKN-28 cells (C); $20\mu\text{g/ml}$ urushiol-treated MKN-28 cells (D). Multiple nuclear fragments were observed on urushiol-treated MKN-45 cells (B).

다. Urushiol의 생체 내 항암활성 연구

Nude mouse에 이식한 위암세포들의 항종양증식 실험 결과 urushiol을 0, 25, 50, 100mg/kg의 농도로 투여한 실험에서 urushiol을 투여하지 않은 control 군에서는 spontaneous regression(자연적인 감소)을 보이지 않았으며 2주간에 걸쳐 처음 약 5mm의 크기이던 종양이 약 ≥ 10 mm 크기로 자랐다. 투여한 urushiol의 농도가 증가 될수록 이식한 부위의 종양은 regression을 보였으며 특히 complete regression을 보이는 것이 dose-dependent한 패턴을 보였다(Table 2. 4). partial regression은 original diameter(≥ 5 mm) 보다 적어지는 것을 기준으로 했었는데 이것의 경우에도 urushiol의 농도가 증가될수록 partial regression을 보이는 것을 관찰할 수 있었다.

Table 2. 4. Regression of the transplanted MKN-45 tumors by urushiol - dose-response study

Concentration of urushiol (mg/kg)	Complete regression of tumors (%) ^a	Partial regression of tumors(%) ^b
0	0/10 (0)	0/10 (0)
25	1/10 (10)	1/10 (10)
50	2/10 (20)	3/10 (30)
100	3/10 (30)	3/10 (30)

^a Number of nude mouse per group = 5, both sides of nude mouse.

Total transplanted sites = 10 per group

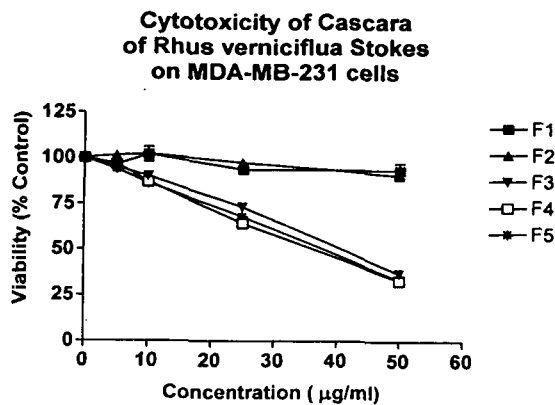
^b Partial regression defined as regression to half or less of the original diameter

2. 옷나무 수피 추출물들에 대한 세포독성 효과 검색

본 실험은 옷나무 수피 추출물들에 대한 세포독성 효과를 검색하기 위해 유암세포주 (MCF-7, MDA-MB-231)에 대한 MTT 세포독성실험과 apoptosis 유도 실험 결과이다. 이를 위해 적정량의 추출물을 대상 암세포에 72시간 처리하고 MTT에 의한 세포독성과 DNA fragmentation 측정을 실시한 결과 이들 유암세포들에 있어서도 동일한 항암활성을 보였다. 사용한 시료들은 제1세부과제에서 제공한 추출물 F1, F2, F3, F4, F5 등 총 5종으로 이들을 DMSO에 용해시킨 뒤 적정량을 암세포에 처리하고 세포독성을 검색하였다. 그 결과 wild type p53, estrogen receptor 양성인 MCF-7 암세포에 대하여 F3, F4, F5 등 3종의 추출물이 강한 활성을 보였다(Fig. 2. 21A and 2. 21B). 그리고 mutant p53 및 estrogen receptor 음성인 MDA-MB-231 암세포에 대해서도 F3, F4, F5 등 3종이 강한 활성을 보인 것으로 보아 이들은 p53이나 estrogen receptor와 무관한 다른 활성 기전에 의해 세포독성을 보이는 것으로 사료된다.

비교적 활성이 강한 F4 분획을 대상으로 MCF-7 암세포와 MDA-MB-231 암세포에서의 apoptosis 유도 여부를 확인할 수 있는 DNA fragmentation assay를 실시한 결과 MCF-7 암세포에서는 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서(Fig. 2. 22), MDA-MB-231 암세포에서는 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 DNA fragmentation을 유도함을 확인하였다(Fig. 2. 23).

A



B

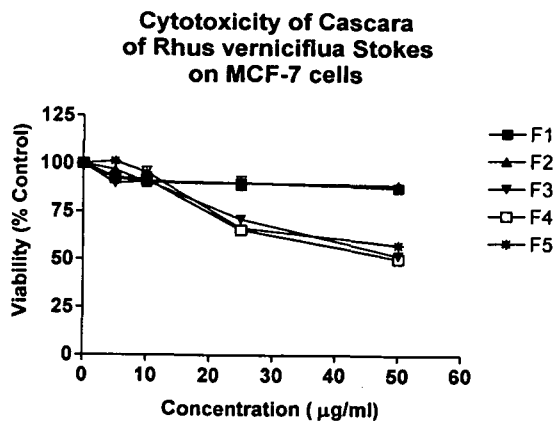


Fig. 2. 21. Cytotoxic effect of the fractions of cascara of *Rhus verniciflua* Stokes on MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Cells were incubated with different concentration of urushiol for 48hrs and the effect of urushiol on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

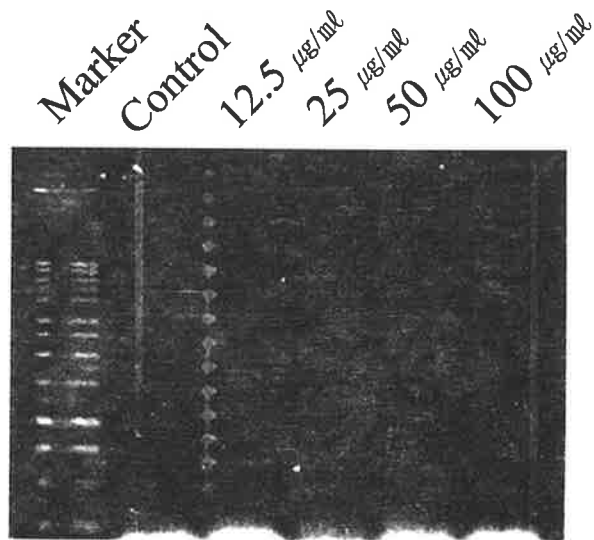


Fig. 2. 22. DNA fragmentation induced by the F4 of cascara of *Rhus verniciflua* Stokes. MCF-7 cells were treated with F4 for 48hrs. DNA fragmentation appeared on a cells treated with $50\mu\text{g/ml}$.

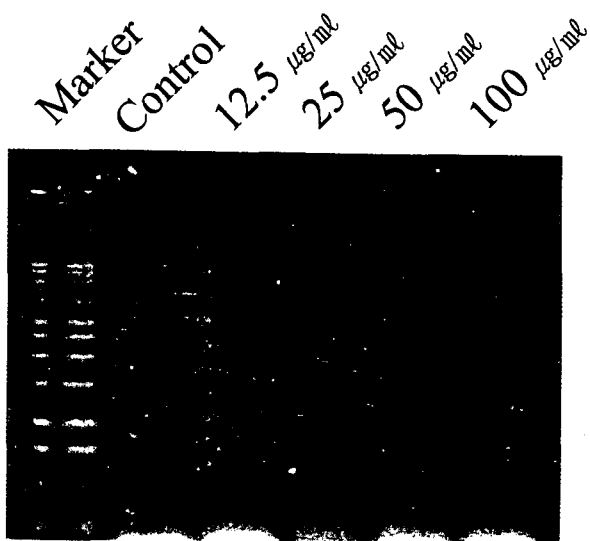


Fig. 2. 22. DNA fragmentation induced by the F4 of cascara of *Rhus verniciflua* Stokes. MCF-7 cells were treated with F4 for 48hrs. DNA fragmentation appeared on a cells treated with 50µg/ml.

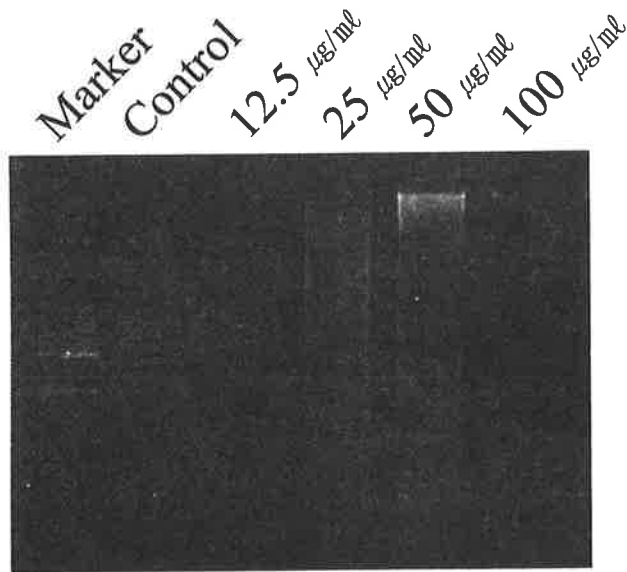


Fig. 2. 23. DNA fragmentation induced by the F4 of cascara of *Rhus verniciflua* Stokes. MDA-MB-231 cells were treated with F4 for 48hrs. DNA fragmentation appeared on a cells treated with 50µg/ml.

3. KW, Hwa-Chil I, Hwa-Chil S의 항암활성 검색

이들 3개의 시료에 대한 항암활성을 검색하기 위해 이들 시료를 48시간 동안 MCF-7 및 MDA-MB-231 암세포에 처리하고 MTT assay를 실시한 결과 Hwa-Chil I 및 Hwa-Chil S의 시료가 두종의 암세포에 높은 활성을 보였으며 또 MCF-7 암세포에 비해 MDA-MB-231 암세포에 대해서 강한 세포독성 효과를 보였다(Fig. 2. 24). 이러한 결과는 이들 시료가 p53-independent한 apoptosis 유도 가능성을 제시하는 것이기에 이에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

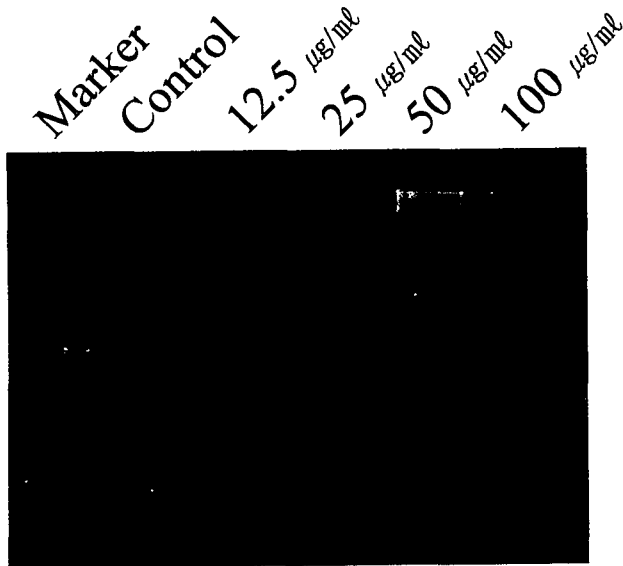
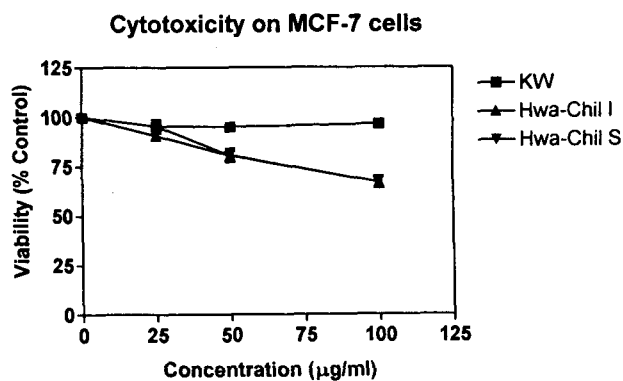


Fig. 2. 23. DNA fragmentation induced by the F4 of cascara of *Rhus verniciflua* Stokes. MDA-MB-231 cells were treated with F4 for 48hrs. DNA fragmentation appeared on a cells treated with 50 μ g/ml.

3. KW, Hwa-Chil I, Hwa-Chil S의 항암활성 검색

이들 3개의 시료에 대한 항암활성을 검색하기 위해 이들 시료를 48시간 동안 MCF-7 및 MDA-MB-231 암세포에 처리하고 MTT assay를 실시한 결과 Hwa-Chil I 및 Hwa-Chil S의 시료가 두종의 암세포에 높은 활성을 보였으며 또 MCF-7 암세포에 비해 MDA-MB-231 암세포에 대해서 강한 세포독성 효과를 보였다(Fig. 2. 24). 이러한 결과는 이들 시료가 p53-independent한 apoptosis 유도 가능성을 제시하는 것이기에 이에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

A



B

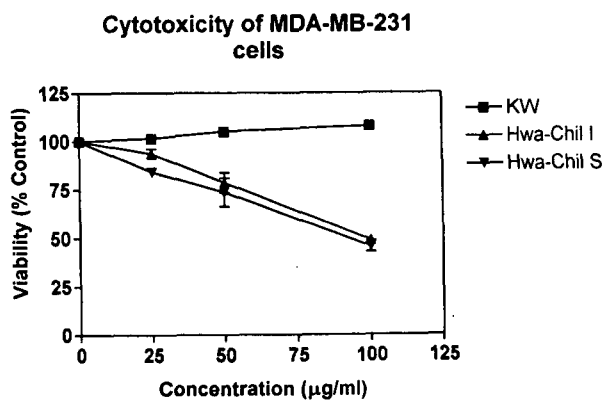


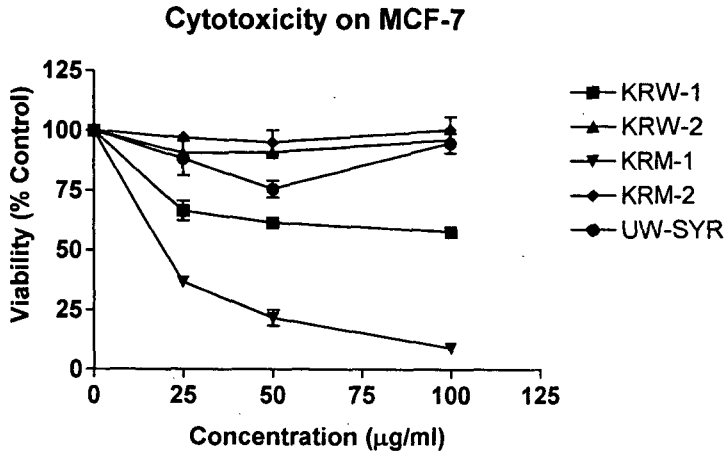
Fig. 2. 24. Cytotoxic effect of the fractions of KW, Hwa-Chil I, and Hwa-Chil S on MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Cells were incubated with different concentration of each fraction for 48hrs and the effect of the fraction on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

4. 수종의 옷나무 추출액에 대한 항암활성 검색(I)

KRW-1, KRW-2, KRM-1, KRM-2, UW-SRR, UW-SRT, UW-SYR, UW-iRR, UW-iRT, UW-iYR, 1, 2, 3, 4, 4-1, 5, 6 등 총 17종의 옷나무 추출액에 대한 항암활성을 검색하기 위해 제공된 시료를 DMSO에 용해시키고 이들을 MCF-7과 MDA-MB-231 암세포에 대한 세포독성을 검색하였다. 그러나 시료 중 KRW-1, UW-iRR, UW-iRT, UW-iYR 등은 DMSO에서의 용해도가 좋지 못해 검색을 시도하지 못하였다.

MCF-7 암세포에 대한 검색 결과 KRM-1의 활성이 농도의존적인 세포독성 효과를 보였으며 F-3의 경우에도 우수하였다(Fig. 2. 25A, B). KRM-1의 시료의 경우 IC₅₀ 값이 약 20 μ g/ml였으며 F-3의 경우 약 80 μ g/ml였다. 따라서 MDA-MB-231 암세포에 대한 세포독성 검색은 KRW-1, KRW-2, KRM-1, KRM-2 등을 대상으로 실시하였다. MDA-MB-231 암세포에 대한 세포독성 검색 결과 KRM-1이 가장 우수하게 검색되었고(Fig. 2. 26), 이에 대한 IC₅₀ 값은 약 25 μ g/ml였다.

A



B

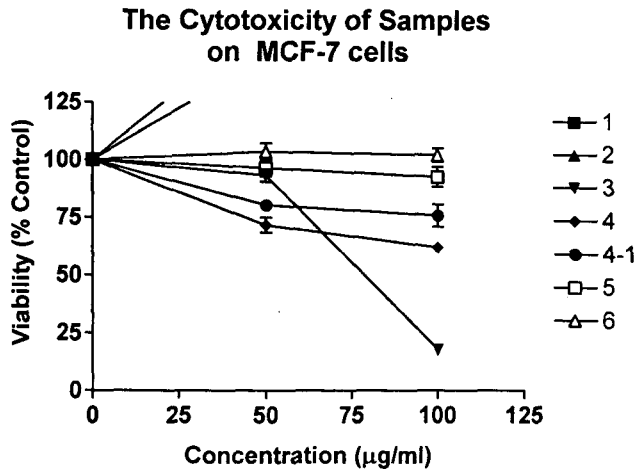


Fig. 2. 25. Cytotoxic effects of the fraction KRW-1, KRW-2, KRM-1, KRM-2, UW-SRR, UW-SRT, UW-SYR, UW-iRR, UW-iRT, UW-iYR, 1, 2, 3, 4, 4-1, 5, and 6 on MCF-7 cells. Cells were incubated with different concentration of each fraction for 48 hrs and the effect of the fraction on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

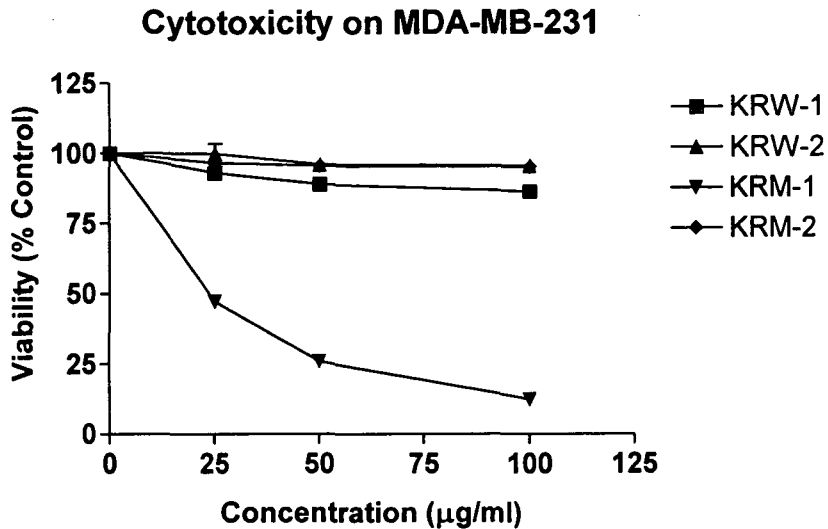


Fig. 2. 26. Cytotoxic effects of the fraction KRW-1, KRW-2, KRM-1, and KRM-2 on MDA-MB-231 cells. Cells were incubated with different concentration of each fraction for 48 hrs and the effect of the fraction on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

5. 수종의 옷나무 추출액에 대한 항암활성 검색(II)

Rb-B, Rb-E, Rb-W, MU2(CM-91) 등 4종의 옷나무 추출액에 대한 항암활성을 검색하기 위해 제공된 시료를 DMSO에 용해시키고 이들을 MKN-45와 MKN-28 위암세포에 대한 세포독성을 검색하였다. 그리고 Rb-E fractions의 세포독성효과를 MTT assay 방법으로 측정하였다. 시료들의 처리 농도는 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 세 가지 농도를 택했고, 처리 시간은 48시간 동안 하였다.

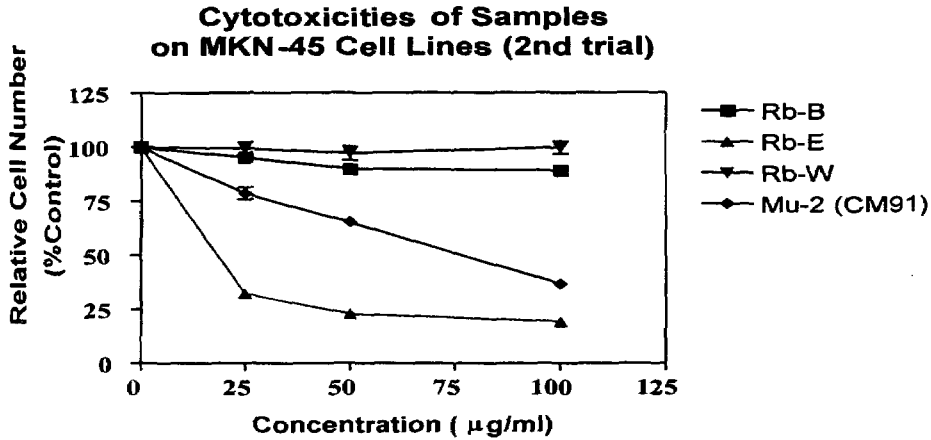
실험에 사용된 세포주는 인체기원 위암세포주인 MKN-45와 MKN-28이다. MKN-45 세포는 wild type의 p53(종양억제유전자)를 가지고 있으며, 반면에 MKN-28 세포는 mutant type의 p53만을 가지고 있다.

Rb-E와 그 분획물인 Rb-E F1, F2, F3 의 활성을 비교해 본 결과, MKN-45 cell 에서는 그 활성차이가 보이지 않고, 세가지 분획물 사이의 차이도 거의 없었다(Fig. 2. 27A). 또한 MKN-28 cell 에서도 Rb-E와 Rb-E fractions들 사이의 활성차이는 크게 보이지 않으며 fraction들 사이에서는 F1이 다른 것들에 비해 조금 높게 나타났다 (Fig. 2. 28A).

Water soluble urushiol의 경우에는 MKN-45와 MKN-28 두 세포주 모두에서 세포 독성 효과가 거의 없었다(Fig. 2, 27B; Fig. 2. 28B). Urushiol 자체의 IC50 가 15~20g/ml 정도이었던 것과 비교해 보면 water soluble urushiol의 세포독성효과는 크게 떨어진 것이다.

그리고 Rb-E(RbE) 분획을 더욱 세분화한 분획 RbE1, RbE2, RbE3에 의한 위암세포 세포독성을 검색한 결과 원 시료인 RbE에 비해 RbE2 분획이 더욱 세포독성이 더 많은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2. 29). 특히 p53 wild type을 가진 MKN-45 위암세포에서 MKN-28 위암세포에 비해 현저한 세포독성 효과를 보였음을 시사해 준다.

A



B

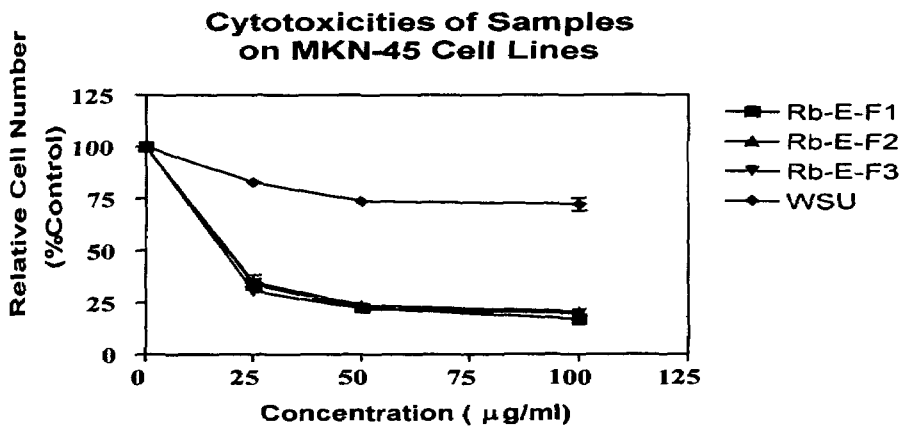
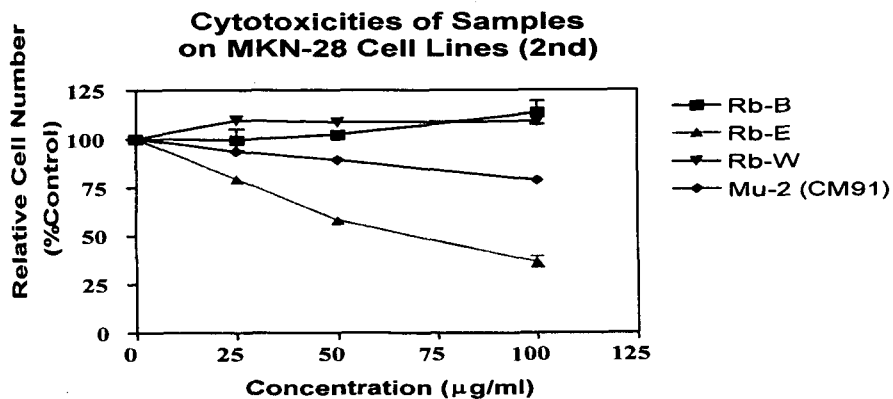


Fig. 2. 27. Cytotoxic effects of the fraction Rb-B, Rb-E, Rb-W, Mu-2 (CM-91) on MKN-45 cells (A), and Rb-E-F1, Rb-E-F2, Rb-E-F3, and WSU (water soluble urushiol) (B). Cells were incubated with different concentration of each fraction for 48hrs and the effect of the fraction on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

A



B

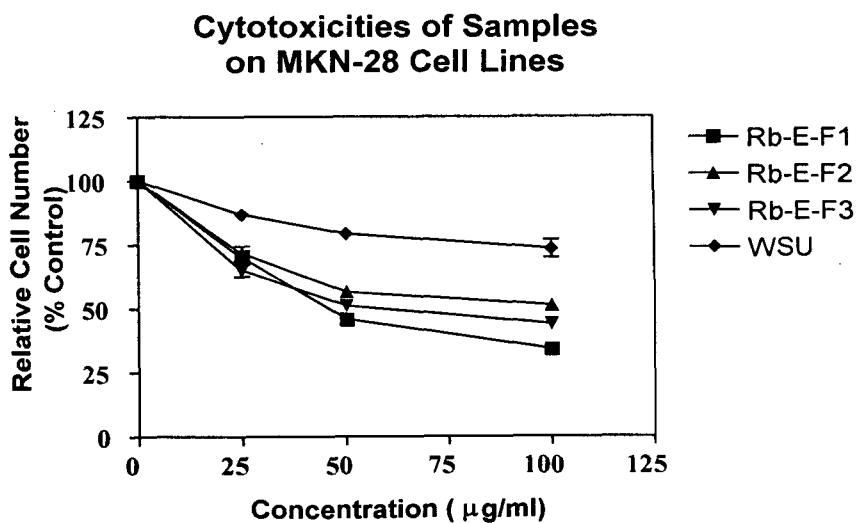
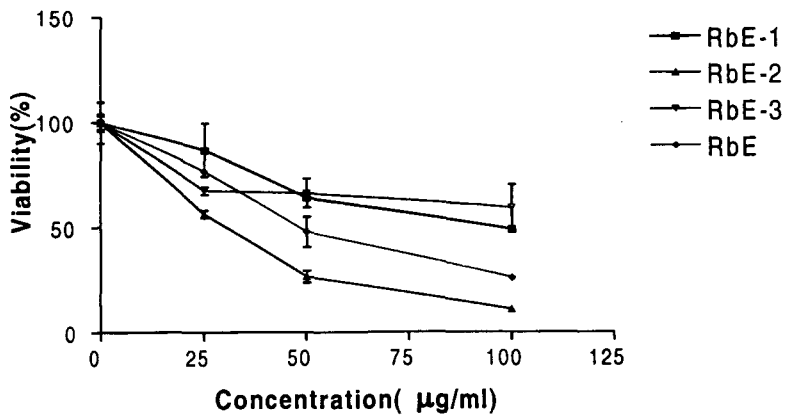


Fig. 2. 28. Cytotoxic effects of the fraction Rb-B, Rb-E, Rb-W, Mu-2 (CM-91) on MKN-28 cells (A), and Rb-E-F1, Rb-E-F2, Rb-E-F3, and WSU (water soluble urushiol) (B). Cells were incubated with different concentration of each fraction for 48hrs and the effect of the fraction on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

A



B

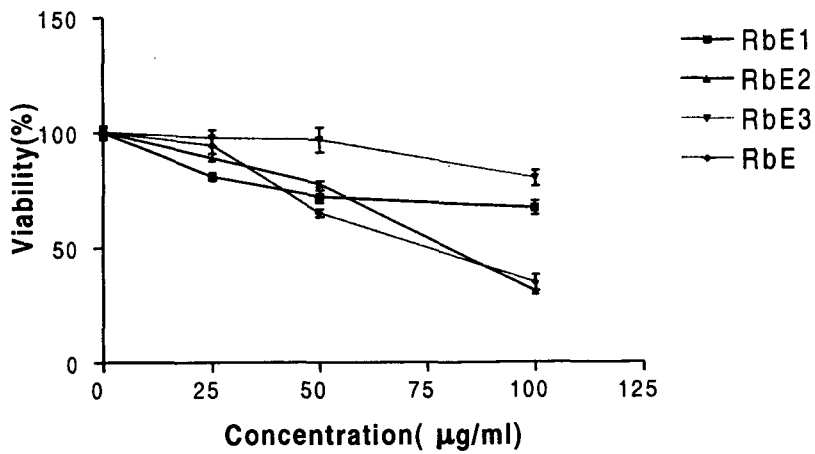


Fig. 2. 29. Cytotoxic effects of the fraction RbE, RbE1, RbE2, RbE3 on MKN-45 cells (A) and MKN-28 cells (B). Cells were incubated with different concentration of each fraction for 48hrs and the effect of the fraction on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

6. 항혈관생성 억제 실험 결과

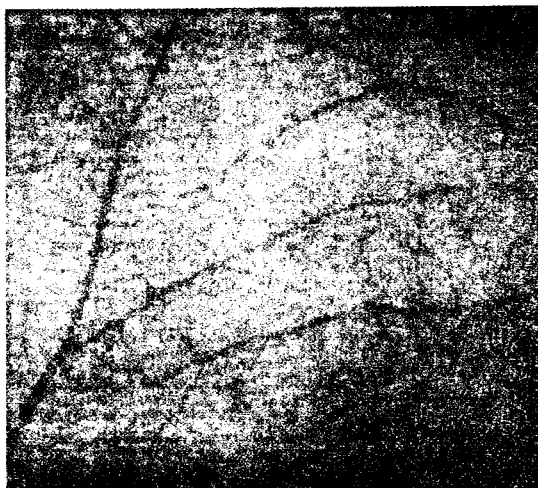
옻나무 추출물인 Hwa-Chil I, Hwa-Chil S, KW 등의 항혈관 생성 억제 실험을 위해 CAM assay를 실시하였으며 대조군으로 시료를 처리하지 않은 control, 혈관신생 억제 활성을 가진 retinoic acid를 처리한 양성 대조군을 사용하였다. 실험한 결과를 Table 2. 5에 나타내었다. 이 실험에서 Retinoic acid는 positive control로 사용하였다.

Table 2. 5. CAM assay analysis

Sample	Concentration ($\mu\text{g}/\text{CAM}$)	Tested total No.	Positive No.	%
Control	0	6	0	0
Retinoic acid	1	10	3	30.0
Hwa-Chil I	25	8	2	25.0
Hwa-Chil I	50	9	6	66.7
Hwa-Chil I	100	7	4	57.1
Hwa-Chil S	25	7	1	14.3
Hwa-Chil S	50	12	7	58.3
Hwa-Chil S	100	7	7	100
KW	25	9	1	11.1
KW	50	8	3	37.5
KW	100	5	3	60

Hwa-Chil I는 CAM assay 결과 높은 혈관생성억제 작용을 나타내었다. Hwa-Chil S는 농도 의존적인 혈관생성 억제 효과를 나타내었으며 농도 100 μg 에서는 100%의 혈관생성 억제 효과를 보였다. 그러나 KW는 비교적 낮은 혈관생성 억제 작용과 더불어 높은 치사율을 나타내어 CAM assay에 대하여 비교적 유독함을 알 수 있었다.

Control



Retinoic acid 1ug/CAM



Fig. 2. 30. CAM assay of control and retinoic acid treated group.

A

Hwa-Chil I 25ug/CAM



B

Hwa-Chil I 50ug/CAM



C

Hwa-Chil I 100ug/CAM

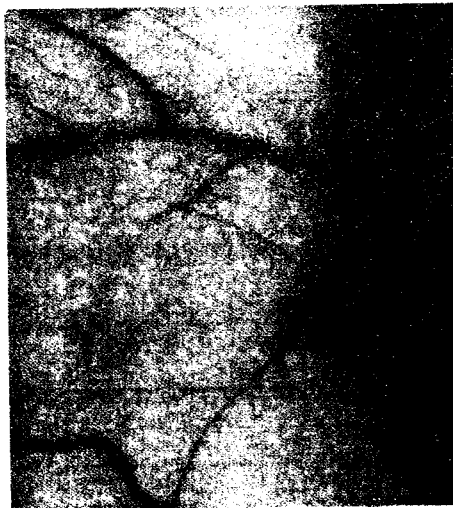
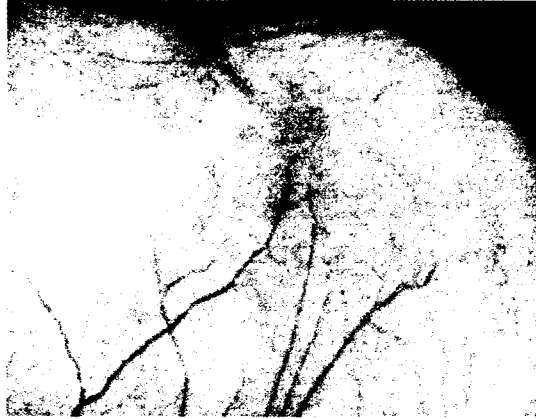


Fig. 2. 31. CAM assay of Hwa-Chil I(25, 50 and 100 μ g m $^{-1}$) treated group.

A

Hwa-Chil S 50ug/CAM



B

Hwa-Chil S 100ug/CAM



Fig. 2. 32. CAM assay of Hwa-Chil S(50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated group.

A

KW 25 ug/CAM



B

KW 50 ug/CAM



C

KW 100 ug/CAM



Fig. 2. 33. CAM assay of KW(25, 50, and 100 μ g/ml) treated group.

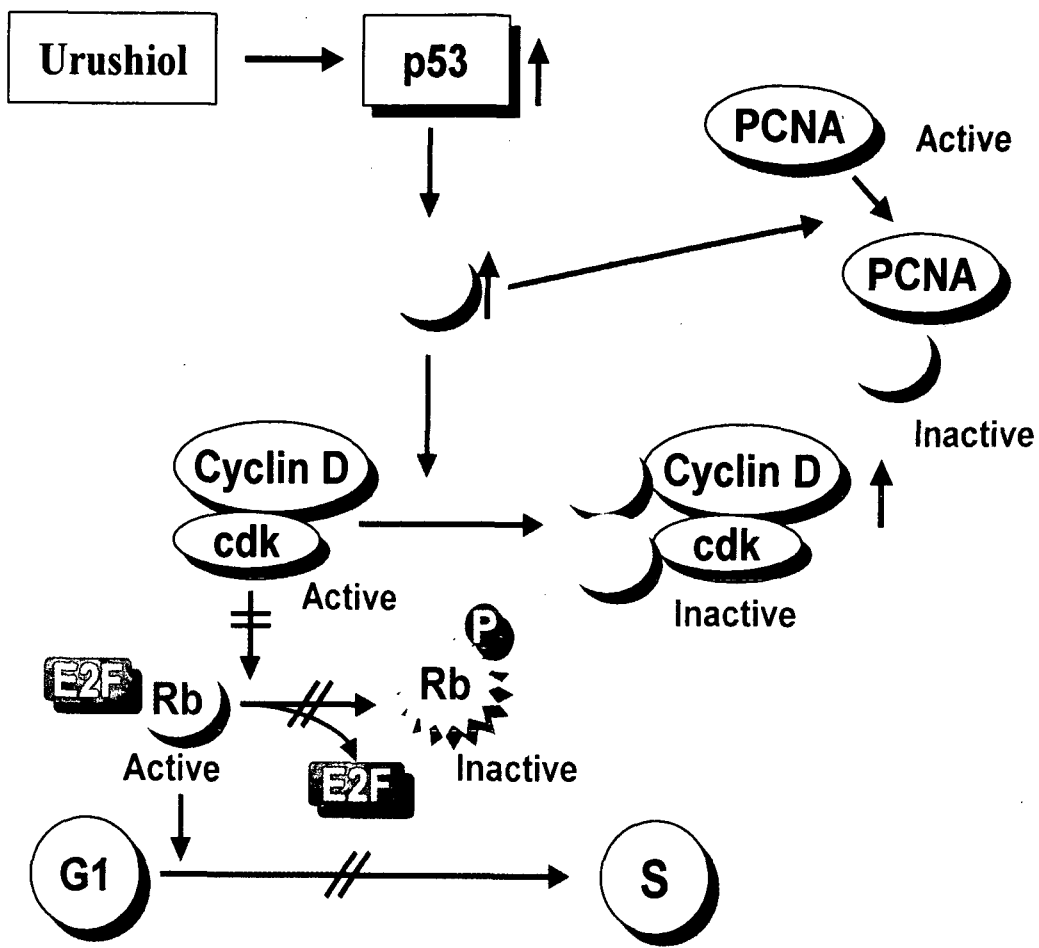


Fig. 2. 34. The mechanism of p53 dependent pathway of G1 arrest by urushiol. Urushiol induced up-regulation of p53. Therefore, p53-dependent p21 protein induction inactivated the activation of cyclin D1-cdk complex. Therefore, Rb protein could not help the progress of G1 phase of cell cycle to the S phase in cancer cells.

제 4 절 결 론

웃나무 및 수종의 육상식물 추출액을 대상으로 항암활성을 검색한 결과 urushiol의 경우 탁월한 유암 및 위암세포 성장 억제 및 apoptosis 유도 효과를 보였다. 특히 apoptosis 유도 효과, DNA fragmentation 유도 효과, apoptosis 관련 단백질의 발현을 조절하는 작용 기전이 확인되었다. 따라서 이러한 면에서 볼 때 웃나무에는 단일 혹은 수종 이상의 항암 활성, 특히 유암 및 위암에 대한 세포성장 억제 효과 물질이 있음을 알 수 있다.

그러나 웃나무 추출물 중 urushiol의 대표적인 안전성 검정과 위암, 유암에 대한 항암 활성 기전 연구가 필요하다고 사료된다. apoptosis 유도와 관련하여 apoptosis 발생과정에 수종의 세포질 내 혹은 핵내 단백질들이 분해된다. 따라서 이들 단백질의 발현 유무를 확인할 경우 웃나무 추출물들에 의한 apoptosis 유도 여부를 더욱 명확히 검색할 수 있다.

Urushiol의 경우 p53의 발현 증가, p53 의존성 p21의 발현 증가로 세포주기를 G1 phase에 arrest 시키고, 이후 암세포의 apoptosis 유도, Bcl-2의 발현 감소, Bax의 발현 증가 등을 미루어 볼 때 전형적인 형태의 암세포 apoptosis 유도물질로 사료된다. 특히 wild type p53를 가지는 인체 위암에 선택적인 apoptosis 유도 작용이 있음을 보아 이에 대한 지속적인 연구를 통해 새로운 항암제로의 lead compound 개발이 필요하며, 이러한 물질들이 항혈관신생억제 효과를 가지는 것으로 보아 이에 대한 체계적인 연구도 더 필요하다고 사료된다.

여 백

제 4 장 간독성, 면역증진 및 안전성 평가
Liver detoxification, immune stimulation and
safty assessment of flavonoids

연구기관명 : 한국과학기술원

연구책임자 : 조 철 오

연 구 원 : 예 성 수

연 구 원 : 서 재 홍

연 구 원 : 강 중 순

연 구 원 : 나 용 주

여 백

제 1 절 서 설

인체기관 중에서 간 같이 중요한 일을 하는 기관도 흔치 않다. 간은 체내에 흡수된 영양소를 대사시킨다. 혈당이 모자랄 때는 저장돼 있는 글리코겐이나 근육 등에서 혈당을 보충시키고 혈당이 높을 때는 다시 저장하는 역할을 한다. 따라서 간질환이 생기면 질환 정도에 따라 당뇨 또는 저혈당이 발생하기도 한다. 간은 지질대사에도 관련하여 음식물이나 체내 지방으로부터 계속적으로 공급되는 지방산을 대사시켜 지방, 단백질 및 인지질 등을 만들고, 소화기에 필요한 담즙산 및 인체에 꼭 필요한 콜레스테롤 등을 생산해낸다. 이밖에 단백질 대사 때 생기는 암모니아를 우레아라는 물질로 대사시켜 암모니아로 인한 해독을 막는데, 간경변시에는 암모니아가 잘 대사되지 않고 체내에 축적돼 간성혼수가 일어나기도 한다.

체내에서 생산되는 각종 호르몬, 즉 인슐린 갑상선호르몬, 부신피질호르몬 및 성호르몬 등을 대사시켜 균형을 이루게 하는 것도 간의 역할이다. 간경변이 생기면 호르몬 균형이 잘 맞지 않고 특히 여성호르몬이 체내에 축적돼 남성도 가슴이 나오거나, 성기능이 저하되고 혈관이 확장되어 가슴에 반점 등이 생기는 현상이 나타나게 된다.

간은 또한 인체에서 유일하게 알부민을 만들어 낸다. 간경변이 생기면 알부민이 부족해 복수가 차거나 몸이 붓는 증상이 나타난다. 또 간은 혈액응고에 관여하는 응고인자를 만드는데 이 기능이 저하되면 출혈성 경향을 보이게 된다.

간은 외부에서 들어온 물질, 즉 각종 약물이나 독성 물질을 대사하는 역할도 한다. 이러한 물질들이 대사되지 않고 체내에 축적된다면 심각한 문제가 생길 것이다. 대표적인 것이 알코올로 어느 정도까지는 모두 대사되지만 간장의 능력을 벗어날 정도로 지속적으로 많이 흡수되면 간경변으로 진행될 수 있다. 이렇듯 간은 인간이 생존하는데 반드시 필요한 중요한 역할을 하므로 손상되지 않도록 잘 보호해야 한다.

Ethanol은 술의 주성분으로서 신체적, 정신적으로 인체에 미치는 효과가 매우 다양하고 광범위하여 그 대사 과정과 독성 발현 특성에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 섭취된 ethanol은 소화관을 통해 흡수되어 섭취 후 20~120분 사이에 최고 혈중농도에 도달한다. 흡수된 ethanol은 간을 비롯한 모든 장기들에서 대사되는데 일부(약 10%)는 호흡을 통하여 또는 소변 및 땀으로 배설된다.

정상적인 상태에서 소량의 알코올을 섭취할 경우 간장내로 들어온 에탄올은 cytosol 내의 알콜탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH)와 알데히드탈수소효소(aldehyde dehydrogenase, ALDH)의 작용에 의해 acetate로 되어 순환계를 통해 간세포 밖으로 배설된다. 급성 알콜투여는 일시적으로 간에서 중성지방 축적을 일으킨다. 이 중 특히 에탄올의 최초 대사산물인 아세트알데히드는 에탄올에 비해 월등히 반응성이 높고 독성이 강하여 알콜성 간장해의 주원인 물질로 알려져 있다. 아세트알데히드는 미토콘드리아 호흡을 방해하고 산화적 인산화 반응을 억제하며, 막단백질 및 콜라겐 단백질과도 결합하여 항체를 생성하고, 면역학적으로 세포독성을 나타내며 간세포 분비 단백질의 방출기구를 저해하는 것으로 알려져 있다. 또한 아세트알데히드는 myofibroblast의 콜라겐 합성을 촉진하여 간 섬유화와 간세포의 변성 증대를 일으키며, 생체내 macromolecule과 반응하여 adduct를 형성하여 알콜에 의해서 간내에 중성지방이 축적된다. 알콜에 의한 간 중성지방 축적은 간에서 지방산 합성증가 보다는 지방산 산화 억제가 중성지방축적의 중요인자라고 여겨진다. 동물실험에 따르면 알콜투여로 인한 혈청중성지방의 증가는 간에서 VLDL(very low density lipoprotein) 생성증가가 원인인 것으로 여겨진다. 인체에 알콜을 경구 또는 정맥주사로 투여하면 혈청에서 중성지방을 함유한 VLDL이 급속히 증가된다. 또한 인체에 만성적으로 알콜을 투여해도 알콜투여량과 투여기간에 따라 혈청중성지방수준은 증가된다. 간에서의 중성지방 축적은 간의 대사장애를 반영해 주며, 지속적인 중성지방축적은 결국 섬유조직의 증식 및 간세포의 손상을 초래한다.

간독성을 일으키는 carbon tetrachloride(CCl_4)는 간독성 보호작용을 검정하기 위해서 배양 간세포, 간 slice 배양 그리고 마우스나 랫드에 직접 투여하여 인위적으로 간독성을 일으키는 물질이다. CCl_4 의 간독성기작은 간세포의 과산화지질 반응을 일으켜 간독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 복합적인 기능을 하는 cytochrome P450 과 같은 대사효소에 의해 소포체내에서 매우 반응성이 강한 자유 라디칼인 CCl_3 의 분자구조로 전환되면서 강한 간독성 효과를 나타낸다. 자유 라디칼인 CCl_3 은 알콜에 의해 축적된 간중성지방이나 막 인지질에 있는 지방산의 산화를 유발시켜 지질의 산패가 시작되고 산소와 결합한 후에 지질과산화 작용을 통하여 유기 과산화물을 형성한다. 지질과산화작용을 통하여 간에 지방이 축적되고, 단백질 합성능력은 감소하고 glycogen이 분해되며 혈관내의 세포질 효소들이 파괴되며 간조직의 괴사를 일으킨다. 그래서 CCl_4 실험모델은 알콜에 의해서 축적되어 간중성지방이나 막 인지질의 지방산 산화에 의한 과산화지질에 의해 야기되는 간독성해소효과를 검정하는 모델로 이용된다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험동물

동물은 BALB/c 마우스와 SD 랫드를 사용하며, 사료 (Purina Korea)와 물을 자유롭게 먹게 하고, 사육실의 온도는 21~24°C, 상대습도는 40~60%를 유지한다. 또한 12시간마다 낮과 밤이 반복되도록 사육장내 빛을 조절한다.

2. 숙취해소 및 예방에 대한 효과

가. 혈중 alcohol 농도의 측정

40%(w/v) alcohol을 10 mg/kg가 되도록 랫드에 경구 투여하고, 옷나무 시료 추출물을 alcohol 처리 1시간 후에 경구 투여한다. Alcohol 투여 4시간 후, 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈중알콜농도 측정 키트(Sigma Co.)를 이용하여 혈중 알콜농도를 측정한다.

나. Alcohol dehydrogenase 활성도 측정

시료의 일정기간 투여 후, 랫드를 CO₂로 질식사 시킨 후, 간을 적출한다. 적출한 간을 생리식염수로 잘 세척한 다음 무게를 재고, 약 10배의 0.154M KCl을 함유한 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 넣고 Teflon-glass homogenizer를 이용하여 균질화 시킨다. 균질화된 간을 4°C에서 9,000 x g로 30분 동안 원심분리한 다음, 상층액을 취하여 다시 110,000 x g로 1시간 동안 4°C에서 초원심분리하여 상층액을 cytosol 분획으로 사용한다. Alcohol dehydrogenase 활성도는 과량의 alcohol의 존재 하에서 환원되는 NAD의 양을 일정시간 동안 흡광도의 변화를 기록하여 측정하며 반응 혼합액은 55mM sodium pyrophosphate buffer(pH 7.4), 20mM ethanol, 0.2mM NAD 으로 구성되며 약 2-3mg의 cytosolic protein을 가한다. NAD의 농도는 실험에 따라서 0.025 - 2mM의 범위에서 사용한다. 340nm에서 3분간 흡광도의 변화를 기록하여 기울기로 부터 활성도를 계산한다.

3. 간독성 치료 및 예방에 대한 연구

가. *In vitro* 간독성 실험모델 정립

기존에 널리 사용되던 collagenase liver perfusion technique에 의한 간세포 단층 배양 기술은 다량의 세포를 얻을 수 있고 균일한 세포로 그룹간 개체차를 줄일 수 있는 장점이 있지만, 배양함에 따라 대사효소 활성이 급격히 감소하고 세포간의 유기적 상호작용이 파괴되어 실제 간조직이 갖는 특성을 제대로 보존하지 못한다는 단점이 있어 왔다. 이런 단일세포배양기술이 가진 단점을 보완하면서 장점을 살려 간조직 그 대로의 구조형태에서 실험하기 위해 랫드로부터 간을 떼어낸 후, Brendel/Vitron tissue slicer를 사용해 직경 8mm, 두께 200 μ m(18~22mg wet weight)를 가진 disk 형태의 slice 를 만든다. Slice는 10% fetal bovine serum을 포함한 Waymouth 배지를 사용하고 O₂/CO₂(95%/5%)를 유지하면서 dynamic organ culture incubator를 사용해 surface culture를 한다.

나. 간독성 시험방법

웃나무 추출물 및 분획시료와 대조군으로 증류수를 liver slice 에 처리하고 동시에 Bromobenzene 간 손상물질을 처리하여 인위적으로 간손상을 유발시킨상태에서 LDH(lactate dehydrogenase) release를 이용하여 웃나무 추출물의 간독성 해소효능을 검증한다. LDH release 측정은 간손상 정도를 재는 가장 널리 사용되는 방법으로, 손상된 세포에서 세포밖으로 배출되는 LDH의 양을 측정하여 세포손상정도의 지표로 사용한다. 측정은 아산제약의 표준 LDH 측정키트를 사용하여 570nm 에서의 흡광도를 이용한다.

사염화탄소(CCl₄)는 간에 독성을 주는 표본물질로서 간에 대한 독성을 연구하는데 널리 사용되고 있다. 사염화탄소의 간독성 기작은 사염화탄소가 간에서 대사되어 CCl₃ 와 Cl free radical을 형성하여 이 free radical이 세포막의 불포화 지방산에 작용하여 lipid peroxidation을 일으켜 간대사에 독성을 일으킨다.

실험에 사용된 동물은 체중 230~250g의 웅성(male) Sprague Dawley(SD) 랫드(rat)를 사용하였고, 사료(Purina Korea사, 한국)와 물을 자유롭게 먹게 하고, 사육실의 온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $55\pm 10\%$, 사육장내 빛(주야)은 12시간 주기로 하였다. 대조군(control group)의 랫드에는 PEG(polyethyleneglycol:Saline=1:2)을 4일 연속 복강 주사로 투여하였고, 간독성물질인 사염화탄소(CCl_4)처리군은 CCl_4 를 0.3ml/kg 농도로 1회 복강주사 하였고, 간독성에 대한 율나무 추출물의 간보호 효과를 알아보기 위해서 CCl_4 를 0.3ml/kg 농도로 1회 복강주사한 랫드에 율나무 추출물을 20mg/kg 농도로 4일간 연속으로 복강주사 하였다.

간독성 지표는 간독성이 유발될 경우 혈액내에 증가하는 AST(Serum aspartate transaminase)와 ALT(Alanine transaminase)의 농도는 Refletron S system(Boeringer Mannheim Co., Ltd., Osaka, Japan)을 이용하여 측정하였다.

4. 면역기능 증강효과 시험

가. Polyclonal 항체반응

Balb/c 마우스를 경추탈골하여 비장세포를 떼어낸 다음 single cells 상태로 RPMI1640 complete media 에서 suspension culture 한다. LPS와 율나무 추출물을 처리하고 48시간 배양한 후, DNP-haptenized sRBC를 indicator로 사용하여 항체 생성 세포수를 측정한다.

나. T-dependent 항체반응

Balb/c 마우스에 율나무 추출물을 2주간 경구 투여한 후, sRBC를 복강주사하여 immunize 시킨 후 5일 후에 비장세포를 적출한다. sRBC를 indicator로 사용하여 항체 생성세포수를 측정한다

다. B-cell proliferation assay

Balb/c 마우스를 경추탈골하여 비장세포를 떼어낸 다음 single cells 상태로 RPMI1640 complete media 에서 suspension culture 한다. B-cell specific stimulator 인 LPS 와 옷나무 추출물을 처리하고 48시간 배양한 후, [³H]-thymidine을 처리하여 16시간 동안 더 배양한 다음, 세포가 uptake한 방사능 양을 측정한다.

라. T-cell proliferation assay

Balb/c 마우스를 경추탈골하여 비장세포를 떼어낸 다음 single cells 상태로 RPMI1640 complete media에서 suspension culture한다. T-cell specific stimulator 인 ConA 와 옷나무 추출물을 처리하고 48시간 배양한 후, [³H]-thymidine을 처리하여 16 시간동안 더 배양한 다음, 세포가 uptake한 방사능 양을 측정한다.

5. 단회 경구투여독성 시험에 의한 안전성 평가

시험동물은 설치류인 랫드로 하되 1군에 암·수 각각 5마리 이상으로 하고 투여경로는 경구로 하였다. 용량단계는 시험물질의 개략의 치사량을 구하기에 적절한 단계인 5000mg/kg, 3300mg/kg, 2200mg/kg, 1500mg/kg 용량으로 투여하고 관찰기간은 2주간으로 하였으며, 명확한 증상이 지속되거나 사망이 지연될 때는 그 이상으로 하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 혈중알콜농도 저하효과

웃나무의 다양한 추출물들을 랫드에 oral feeding 방법을 이용하여 먹인 후, 혈중 알코올 농도를 측정하였다. 실험 12시간 전부터 랫드를 굶긴 후 40% EtOH(v/v)을 각각의 랫드에 10ml/kg로 oral feeding 시킨 뒤 1시간 후에 웃나무 추출물을 250mg/kg로 oral feeding 하였다. 웃나무 추출물 처리 4시간 후에 꼬리에서 blood sample을 얻어서 혈중 알코올 농도를 측정하였다. RW-2에서는 효과가 없었으며, RE, RW-1에서는 대조군에 비해 혈중 알코올 농도가 현저히 감소하였다(Fig. 3. 1).

40% 알코올을 투여한 후 1시간 후에 웃나무 조추출물을 랫드에 투여하고 4시간 후에 심장에서 채혈한 혈액의 혈중알콜농도를 측정한 결과 대조구의 경우 혈중알콜농도가 0.162%이었으나 조추출물 투여시 혈중알콜농도가 0.014%로 떨어져 약 1/10 가량으로 혈중알콜농도를 떨어뜨리는 것으로 확인되었다(Fig. 3. 2).

시간경과별 혈중알콜농도의 변화는 Fig. 3. 3과 같이 웃나무 추출물을 투여하지 않을 경우 알콜 투여후 10시간 후에 최고 혈중알콜농도에 이르나 웃나무 추출물을 투여할 경우 5 시간후 부터는 혈중알콜농도가 현저하게 저하되는 것으로 나타났다.

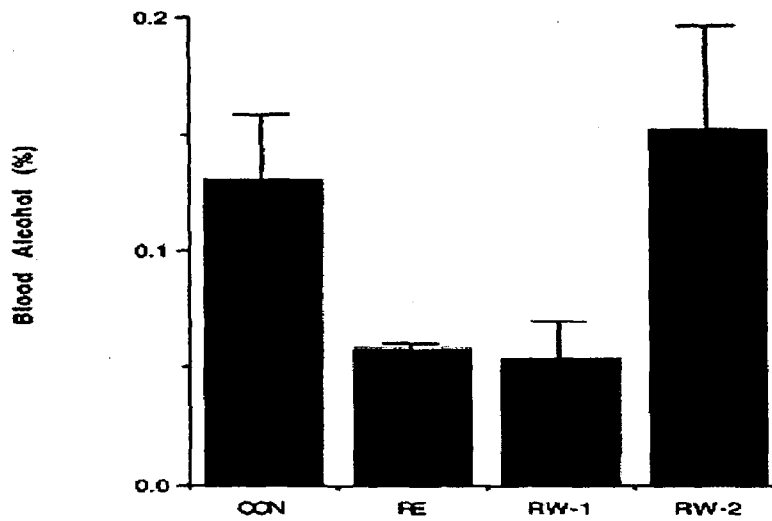
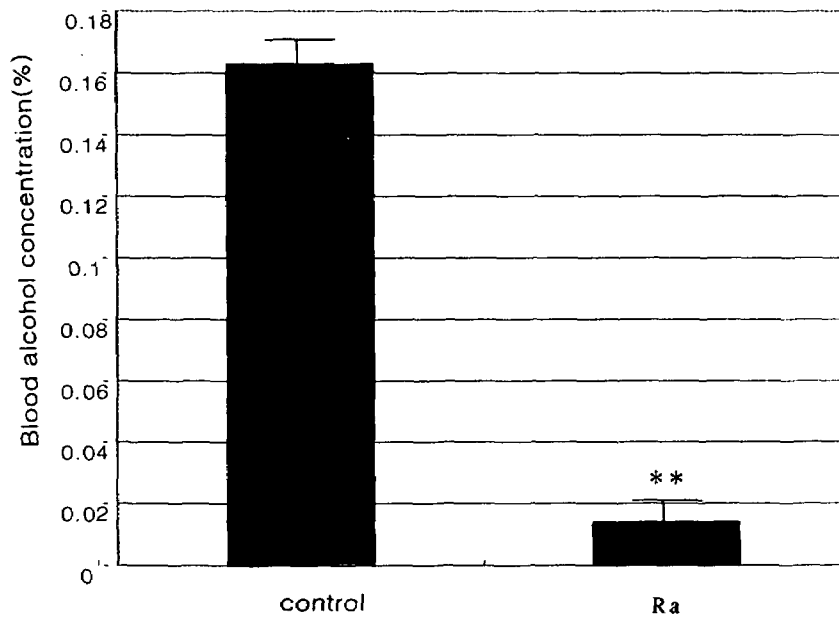


Fig. 3. 1. Alcohol detoxification effect of RE, RW-1, RW-2 fraction.



**P<0.0001 compared with control group

Fig. 3. 2. Alcohol detoxification effect of RA fraction.

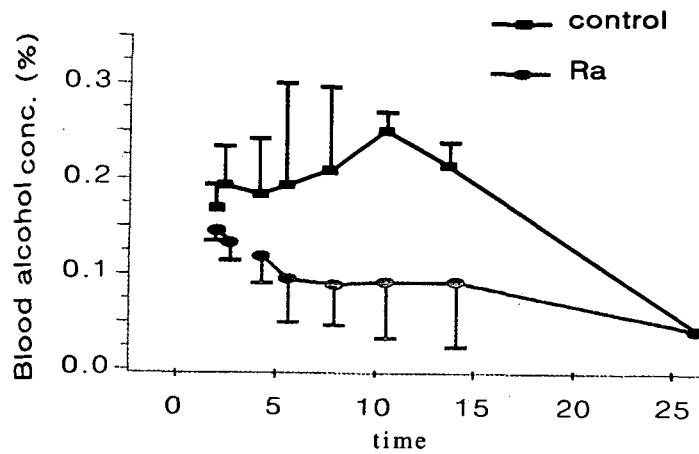


Fig. 3. 3. *In vivo* the effect of Ra fraction on lowering blood alcohol concentration of rat by time course.

2. Alcohol dehydrogenase 활성도 측정

웃나무 추출물의 숙취해소 효과에 대한 작용기작을 규명하고자 랫드에 40% 알콜 투여 후 1시간 후에 분획들을 투여하고 4시간 후에 간의 alcohol dehydrogenase 효소 활성을 측정한 결과 간의 alcohol dehydrogenase 효소활성이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3. 4).

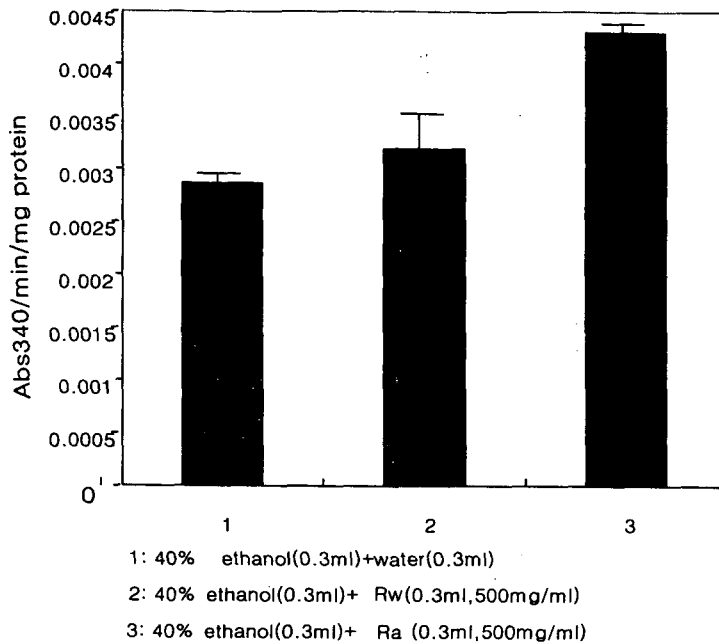
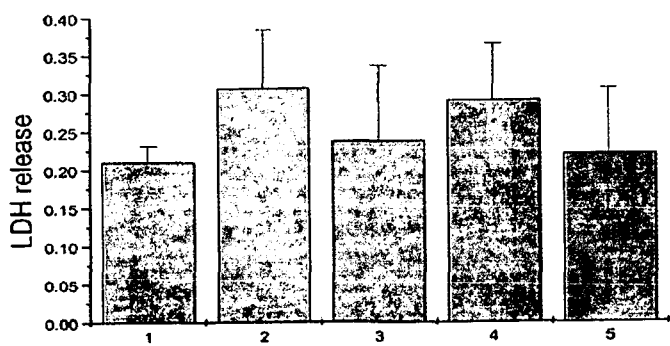


Fig. 3. 4. *In vivo* Alcohol dehydrogenase activity of Ra fraction lowering blood alcohol concentration of mouse.

3. 간독성 해소효과

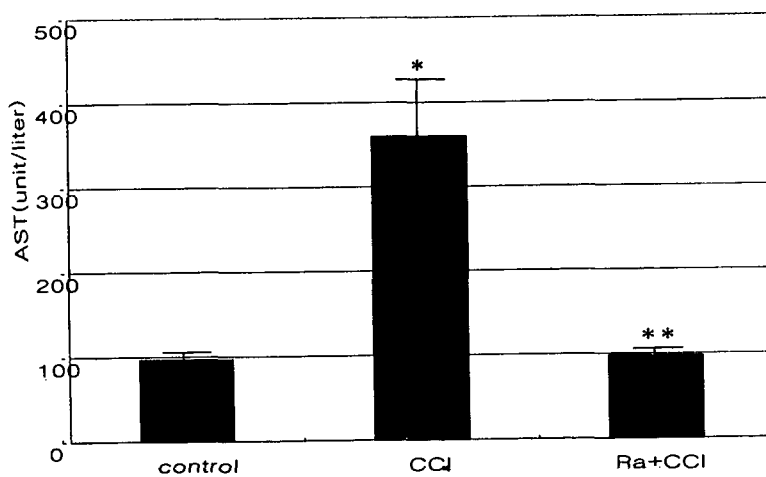
Dynamic liver slice culture 방법을 이용하여 RW-1, RW-2 그리고 RE의 간독성에 대한 영향을 알아보았다. Liver slice에 bromobenzene 1mM을 처리한 것에 대하여 각각의 추출물 100 μ g/ml을 동시에 가한 후 LDH release를 측정하여, RW-1과 RE는 간독성 보호작용이 관찰되었다(Fig. 3. 5).

간독성물질인 사염화탄소(CCl_4)처리군은 ALT와 AST의 수준이 증가하는 것으로 나타났지만(Fig. 3. 6), 간독성에 대한 옷나무 추출물의 간보호 효과를 알아보기 위해서 CCl_4 를 1회 처리한 랫드에 옷나무 추출물을 처리하였을 경우 ALT와 AST 모두 대조군의 수준으로 떨어뜨려 옷나무 추출물이 간보호작용을 하는 것으로 나타났다(Fig. 3. 7).



- 1: NA
- 2: Bromobenzene 1mM
- 3: Bromobenzene 1mM + RW-1 100 µg/ml
- 4: Bromobenzene 1mM + RW-2 100 µg/ml
- 5: Bromobenzene 1mM + RE 100 µg/ml

Fig. 3. 5. Hepatoprotective effects of RW-1, RW-2, and RE on liver injury induced by hepatotoxin Bromobenzene.



* :P<0.001 compared with control group
 ** :P<0.0001 compared with control group

Fig. 3. 6. Effects of Ra on CCl₄-induced serum AST(GOT) level.

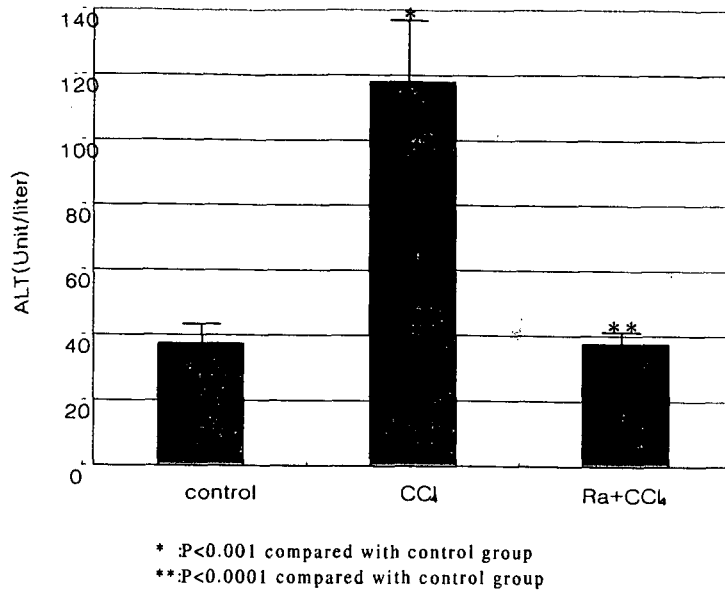


Fig. 3. 7. Effects of Ra on CCl₄-induced serum ALT(GPT) level.

4. 면역증진효과

가. Mitogen Assay

욱나무의 추출물에 대하여 마우스 비장세포를 이용하여 mitogen assay를 수행하였다. 율나무 추출물만을 사용한 경우 cell viability의 변화없이 2.5 μg/ml로 처리한 경우부터 proliferation activity가 떨어지는 결과를 보였다(Fig 3. 8, 3. 9). 그러나 율나무와 함께 concanavalin A(ConA, 5 μg/ml)를 처리한 경우에는 25 μg/ml에서 cell viability의 큰 변화 없이 DPM이 약 70% 정도 감소하여 T lymphocyte proliferation activity에 영향을 주었다(Fig 3. 10, 3. 11). Lipopolysaccharide(LPS, 10 μg/ml)를 이용한 B lymphocyte proliferation assay에서도 cell viability의 변화 없이 율나무의 농도 25 μg/ml에서 DPM이 감소하였다(Fig 3. 12, 3. 13). 다른 추출물 E80, MU2(CM)에 대해서도 각각 같은 방법으로 mitogen assay를 수행하였다. E80의 경우 B, T lymphocyte proliferation activity가 모두 추출물 25 μg/ml에서부터 감소하였고 (Fig. 3. 9, 3. 10), CM의 경우엔 250 μg/ml부터 감소하였다(Fig 3. 14, 3. 15).

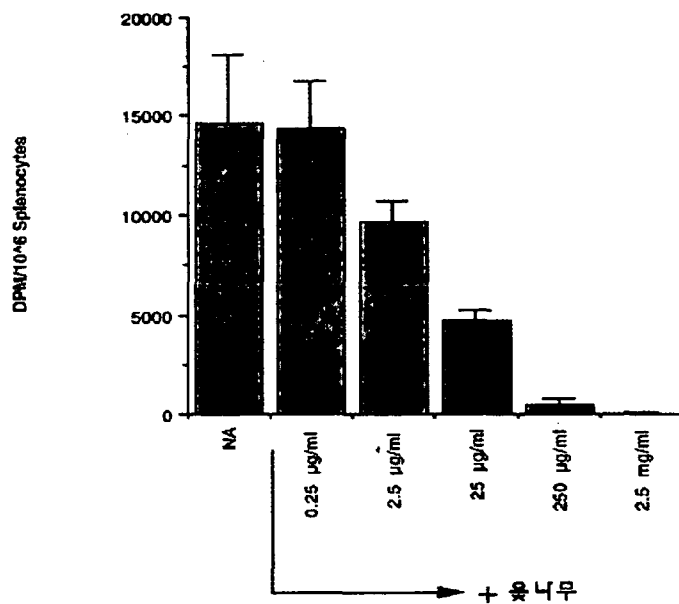


Fig. 3. 8. The changes of lymphoproliferation by Ra.

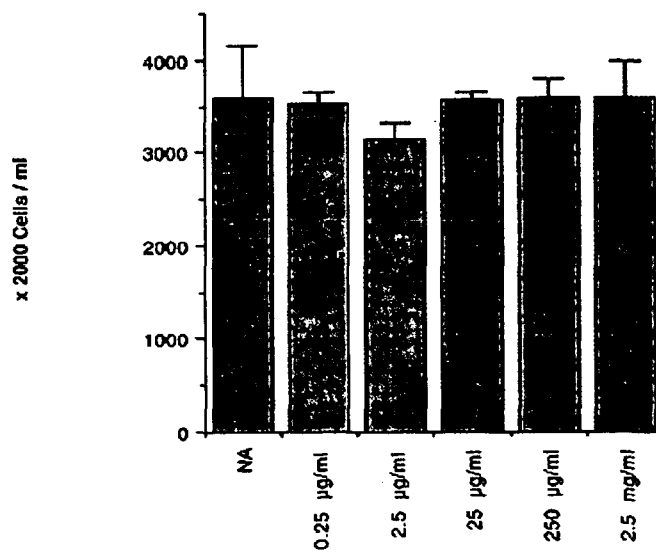


Fig. 3. 9. The changes of cell viability by Ra.

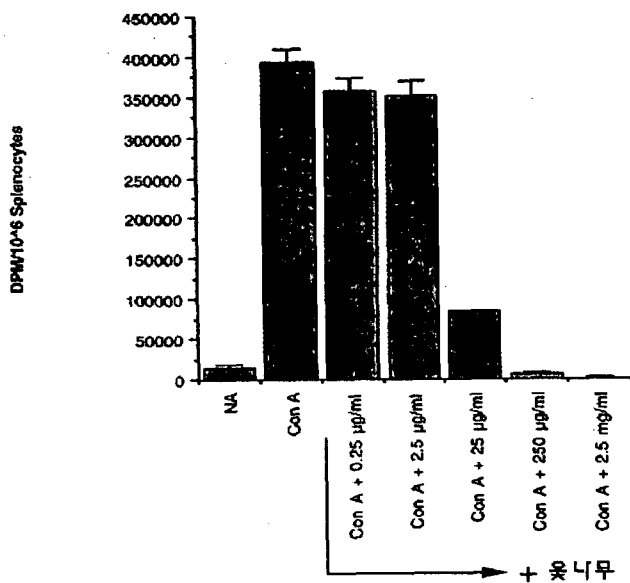


Fig. 3. 10. The changes of T-lymphocyte proliferation activity by Ra

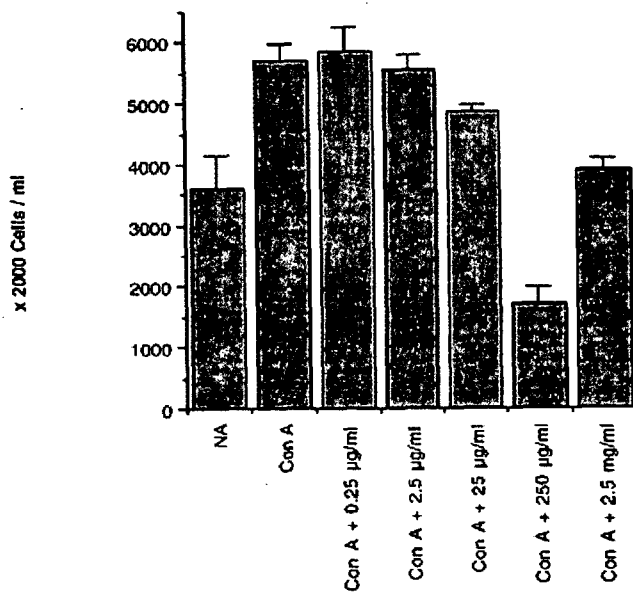


Fig. 3. 11. The changes of T-lymphocyte viability by Ra.

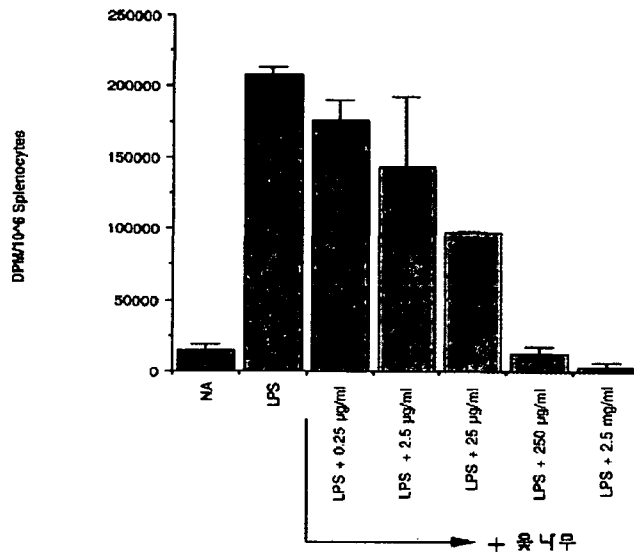


Fig. 3. 12. The changes of B-lymphocyte proliferation activity by Ra

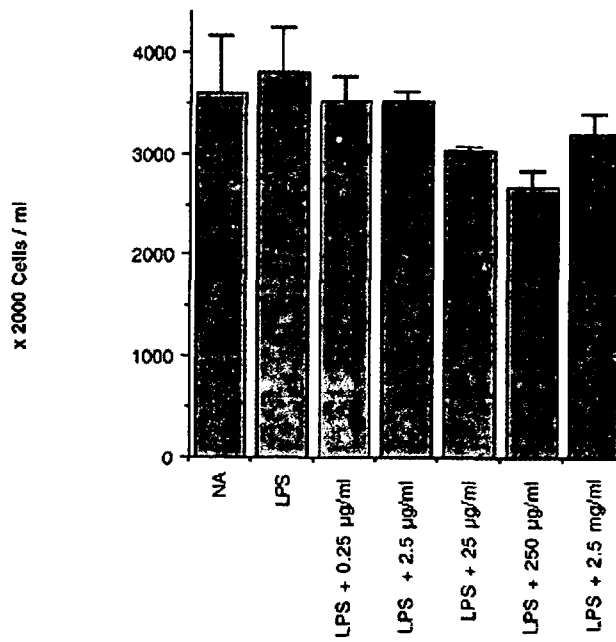


Fig. 3. 13. The changes of B-lymphocyte viability by Ra.

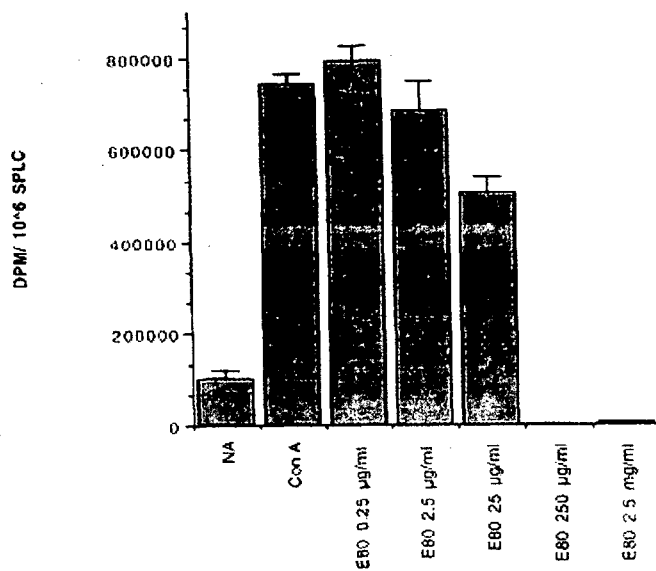


Fig. 3. 14. The changes of T-lymphocyte proliferation activity by E80 fraction.

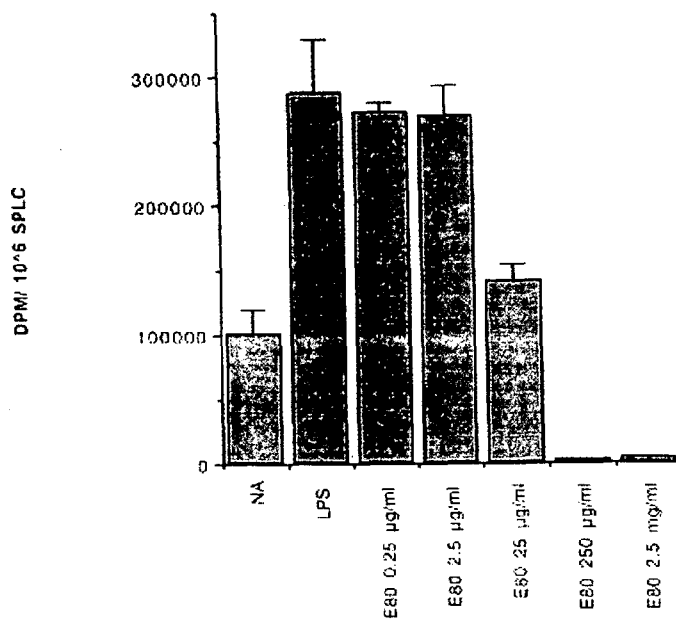


Fig. 3. 15. The changes of B-lymphocyte proliferation activity by E80 fraction

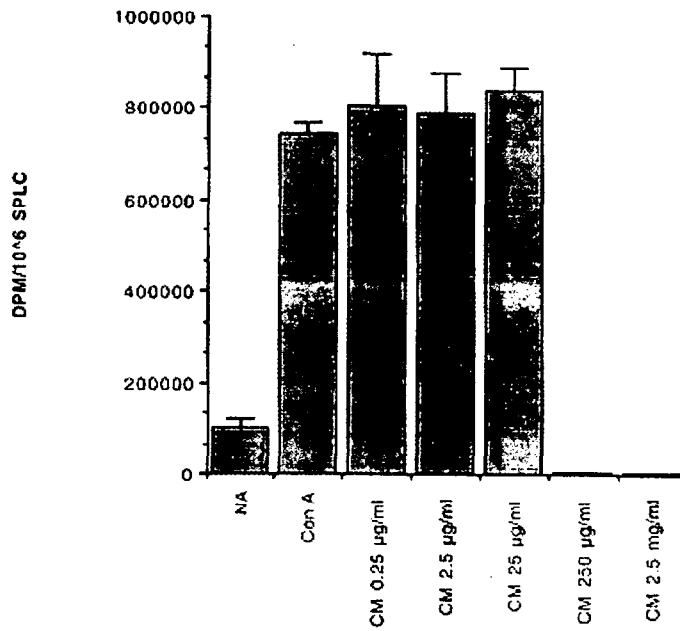


Fig. 3. 16. The changes of T-lymphocyte proliferation activity by MU2(CM)

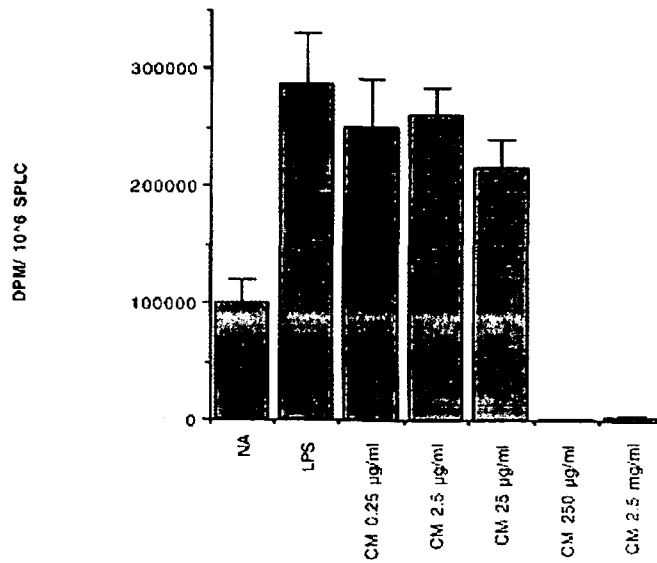


Fig. 3. 17. The changes of B-lymphocyte proliferation activity by MU2(CM).

5. 단회 경구투여독성 시험에 의한 안전성 평가

시험동물은 설치류인 랫드로 하되 1군에 암·수 각각 5마리 이상으로 하고 투여경로는 경구로 하였다. 용량단계는 시험물질의 개략의 치사량을 구하기에 적절한 단계인 5000mg/kg, 3300mg/kg, 2200mg/kg, 1500mg/kg 용량으로 투여하고 2주간 관찰한 결과 치사한 랫드나 이상 증상을 보이는 랫드는 관찰되지 않았다.

제 4 절 결 론

옻나무 추출물 처리 후 혈중 알코올 농도의 변화를 측정한 결과 RW-2에서는 효과가 없었으며, RE, RW-1에서는 대조군에 비해 혈중 알코올 농도가 현저히 감소하였다. 옻나무 조추출물은 대조군의 경우 혈중알코올농도가 0.162%이었으나 조추출물 투여시 혈중알코올농도가 0.014%로 떨어져 약 1/10 가량으로 혈중알코올농도를 떨어뜨리고 간의 alcohol dehydrogenase 효소활성이 증가하는 것으로 나타났다.

옻나무 추출물의 간보호 효과를 알아보기 위해서 CCl₄를 1회 처리한 랫드에 옻나무 추출물을 처리하였을 때 ALT와 AST 모두 대조군의 수준으로 떨어뜨려 옻나무 추출물이 간보호작용을 하는 것으로 나타났다.

옻나무 추출물만을 사용한 경우 cell viability의 변화없이 2.5 μ g/ml로 처리한 경우부터 proliferation activity가 떨어지는 결과를 보였다. 옻나무와 함께 concanavalin A(ConA, 5 μ g/ml)를 처리한 경우에는 25 μ g/ml에서 cell viability의 큰 변화 없이 DPM이 약 70% 정도 감소하여 T lymphocyte proliferation activity에 영향을 주었다. Lipopolysaccharide(LPS, 10 μ g/ml)를 이용한 B lymphocyte proliferation assay에서도 cell viability의 변화 없이 옻나무의 농도 25 μ g/ml에서 DPM이 감소하였다. 다른 추출물 E80, MU2(CM)에 대해서도 각각 같은 방법으로 mitogen assay를 수행하였다. E80의 경우 B, T lymphocyte proliferation activity가 모두 추출물 25 μ g/ml에서부터 감소하였고 CM의 경우엔 250 μ g/ml부터 감소하였다.

단회 경구투여독성 시험에 의한 안전성평가를 위해 5000mg/kg, 3300mg/kg, 2200mg/kg, 1500mg/kg용량으로 투여하고 2주간 관찰한 결과 치사한 랫드나 이상 증상을 보이는 랫드는 관찰되지 않았다.

제 5 장 옷나무 유용물질의 구조분석
Structure analysis of bioactive compounds

연구기관명 : 기초과학지원연구소

연구책임자 : 정 재 준

연 구 원 : 정 해 갑

연 구 원 : 이 철 현

여 백

제 1 절 서 설

일반적으로 정제된 물질은 질량분석기를 이용하여 분자량을 측정한다. 분자량이 400~500 정도로 작고 휘발이 용이할 경우 EI(Electron Ionization)의 MS(Mass Spectrometry)를 이용하고 분자량이 클 경우에는 CI(chemical Ionization), ESI(Electrospray Ionization), MALDI(Matrix Adsorption Laser Ionization)등의 이온화법을 사용하여 MS data를 얻는다. 분자량을 High resolution MS법으로 정확하게 측정한다면 동위원소 분석을 통하여 조성식을 파악할 수 있다.

순수하게 정제된 물질은 적합한 용매에 용해시킨 후 NMR(Nuclear Magnetic Resonance) Spectroscopy를 통하여 구조결정을 하게된다. 여기서도 수소핵, 탄소핵, 질소핵의 NMR기법으로 분자의 원소구성비를 파악할 수 있어서 MS에서 얻는 결과를 검증할 수 있다. 특히, DEPT 기법으로 각 탄소원자에 결합되어 있는 수소의 개수를 알 수 있으므로 많은 도움이 된다.

1차원 NMR 실험에서 얻은 각 스펙트럼의 공명선들은 각 대응하는 핵에 귀속시켜야 하는데, 이를 위하여서는 보통 2차원 NMR 기법인 COSY, HMQC, HMBC 실험들을 실시하게 되며, 필요한 경우에는 NOESY, TOCSY, HSQC 실험들도 실시하게 되는데, 특히 NOESY는 3차원 구조를 결정하는데 필수적인 기법이며, TOCSY 기법은 당과 같은 연속하여 이웃한 수소핵이 있는 경우에 특히 도움이 되는 실험기법이다.

NMR 기법을 통하여 Chemical Shifts, Coupling Constants, Internuclear Distance와 같은 정보를 얻을 수 있어서 2차원 혹은 3차원 분자구조를 결정할 수 있다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 분자량 측정 및 조성식 분석

가. 질량분석

생리활성물질은 질량분석기를 이용하여 분자량을 측정하였다. 분자량이 400~500 정도로 작고 휘발이 용이할 경우 EI(Electron Ionization)의 MS(Mass Spectrometry)를 이용하고 분자량이 클 경우에는 CI(Chemical Ionization), ESI(Electrospray Ionization), MALDI(Matrix Adsorption Laser Ionization)의 MS를 이용한다. 경우에 따라서는 GC-MS 및 LC-MS를 활용하였다.

분자량이 정확히 규명되면 조성식 분석을 위해 원소분석을 이용할 수도 있으나, 최근에 개발된 고분해능 질량분석법을 이용할 경우 더욱 신속히 정확하게 조성식을 파악할 수 있었다. 고분해능 질량분석기는 원소의 동위원소 비율까지 분자량을 정확히 측정함으로써 분자를 구성하고 있는 원소의 조성을 규명하였다.

나. 분자구조 분석(NMR)

본격적인 분자구조분석은 핵자기공명분광기(NMR spectrometer)를 이용하며 고자장일수록 분해능이 높아 분석이 용이하다.

1) 조성식 확인

수소핵, 탄소핵, 질소핵 등의 NMR을 이용하여 분자내의 원소구성비율을 정확히 파악한다. DEPT NMR 실험을 통하여 각 탄소원자와 결합한 수소의 갯수를 파악한 후 이 결과를 근거로 질량분석법을 이용한 조성식을 확인하였다.

2) 공명선 귀속

NMR로부터 정보를 얻기 위하여서는 spectrum의 공명선을 분자내의 수소핵 및 탄소핵에 귀속시키는 작업이 선행되어야 한다.

이를 위하여 HMQC, HSQC, HMBC, COSY, NOESY, TOCSY 등의 2차원 NMR 실험을 실행한다. 시료의 농도가 충분할 경우 INADEQUATE 실험을 실행하였다.

3) 분자구조분석

HMQC, HMBC, COSY, NOESY 실험으로부터 분자의 구조를 일차적으로 규명할 수 있다. 분자의 configuration을 규명하기 위해서는 scalar coupling constant J 값과 NOE 값으로부터 분자의 stereo structure를 결정한다. 분자의 configuration을 결정하기 위해서는 mixing time이 다른 NOESY 실험을 여러번 수행하여 각 mixing time 별로 모든 crosspeak volume을 integration한다. 이 값들로부터 NOE build-up rate를 계산하고 수소핵간 거리를 얻는다. 수소핵간 거리의 정보는 distance geometry를 이용하여 분자의 입체구조 정보로 바꾼다. NOE crosspeak volume과 scalar coupling constant를 이용하여 constrained molecular dynamics와 energy minimization을 실시한다. 이렇게 얻은 구조로부터 NOE data를 역계산하여 비교하고 구조를 수정한다. 이러한 과정을 반복하여 여러개의 입체구조를 구한다. 이들 구조간의 superimpose되는 정도를 계산하여 모델링의 질을 평가하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 분자량 측정 및 조성식 분석

가. 옷나무 목부 Ra분획의 분석

옷나무 조추출물의 성상은 orange yellow의 결정체이며 원소분석기(Perkin-Elmer, 미국)에 의해 원소분석을 한 결과 Table 4. 1과 같이 C(Carbon) 45.82%, H (Hydrogen) 4.62%, N(Nitrogen) 0.76%, O(Oxygen) 48.32%, Mineral이 0.48%인 물질로 밝혀졌다. 이중 N(Nitrogen)은 0.76%로 그 수치가 낮아 N(Nitrogen)은 없는 것으로 판명되었다.

Table 4. 1. 옷나무 조추출물의 원소분석

구 분	Replica I	Replica II	Replica III	Mean
Carbon	45.68	45.90	45.89	45.82
Hydrogen	4.68	4.60	4.57	4.62
Nitrogen	0.79	0.73	0.75	0.76
Oxygen	48.37	48.29	48.31	48.32
Mineral	0.48	0.48	0.48	0.48

나. UV Spectrum 분석

옷나무 조추출물 메탄을 용액을 UV/visible Spectrophotometer(Shimadzu UV-1601, 일본)로 UV 250nm~500nm 파장에서 흡광분석을 하였던 결과 그림 4.1과 같은 Spectrum을 나타냈으며 278.2nm, 304nm, 374.4nm에서 최대흡광도를 나타냈다.

최대흡광도 278.2nm, 304nm, 374.4nm은 Flavonoids성분 중 Calcone류나 Flavonol류, Flavanonol류에서 나타나는 UV 최대흡광도와 유사한 최대흡광도를 나타내 옷나무 조추출물의 주성분이 Flavonoids성분인 것으로 추정할 수 있었다.

다. 옷나무 Ra분획의 FTIR에 의한 화학 작용기 분석

옷나무 조출물을 완전히 건조시킨 후 KBr pellet을 만들어 Resolution : 4, Sample gain : 2, Mirror Velocity : 0.6329, Aperture : 100.0의 조건으로 FTIR(Naet Co. MAGNA-IR 550 Spectrometer series II)에 의해 화학작용기를 분석하였던 결과 781.86, 806.73, 860.80, 994.4, 1008.23, 1026.63, 1084.20, 1108.18, 1140.39, 1164.30, 1271.08, 1327.30, 1354.13, 1448.79, 1468.04, 1532.65, 1581.77, 1616.13, 1678.89, 2719.06, 2851.92, 2925.38, 3386.95 cm^{-1} 의 Wavenumber에서 Peak를 나타냈다.

일반적으로 생체중의 유기화합물은 C/H/O를 골격으로 하므로 우선 OH기가 3387 cm^{-1} 와 1026 cm^{-1} 에 나타나 있고, 2925 cm^{-1} 와 1478 cm^{-1} 에 CH_3 가 나타나며, 994 cm^{-1} 에 서는 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 가 나타났다.

탄소골격으로는 860, 807, 782 cm^{-1} 등에서 벤젠핵이 존재하고 1008 cm^{-1} 에서는 벤젠핵이 아닌 Cyclic 화합물 구조가 존재함을 보여주고 있다.

대부분의 Flavonoids 성분이 벤젠핵과 Cyclic 화합물이 결합된 형태로 이루어진 화합물이기 때문에 IR분석 결과와 UV흡광분석 결과는 옷나무 조출물이 Flavonoids 계열의 성분이 혼합되어 있는 화합물로 추정된다.

2. Urushiol의 분자구조

가. 분자량

Fraction 1의 분자량은 Fig. 4. 1 Mass Spectrum의 결과와 같이 314로 나타나 Du와 Oshima(1984) 연구에서 중국 후페이산 옷漆液의 urushiol도 main peak(3-(8'Z, 11'E, 13'Z-pentadecatrienyl)catechol)의 분자량이 314인 것과 동일하였다. 우리나라 원주산 옷漆液중 urushiol의 주성분도 중국산이나 일본산 옷漆液의 urushiol의 주성분과 동일하다는 것을 뒷받침해 주고 있다. 다만 원주산 HPLC Chromatogram에서는 중국산 urushiol 유사체 peak들보다 많이 나타나 원주산 urushiol에는 아직도 밝혀지지 못한 구조가 있는 것으로 사료된다.

나. NMR 분석

Fig. 4. 2는 원주산 urushiol의 main peak의 $^1\text{H-NMR}$, Fig. 4. 3은 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum으로 Du와 Oshima(1984) 연구결과와 유사한 spectrum을 보여 주었다.

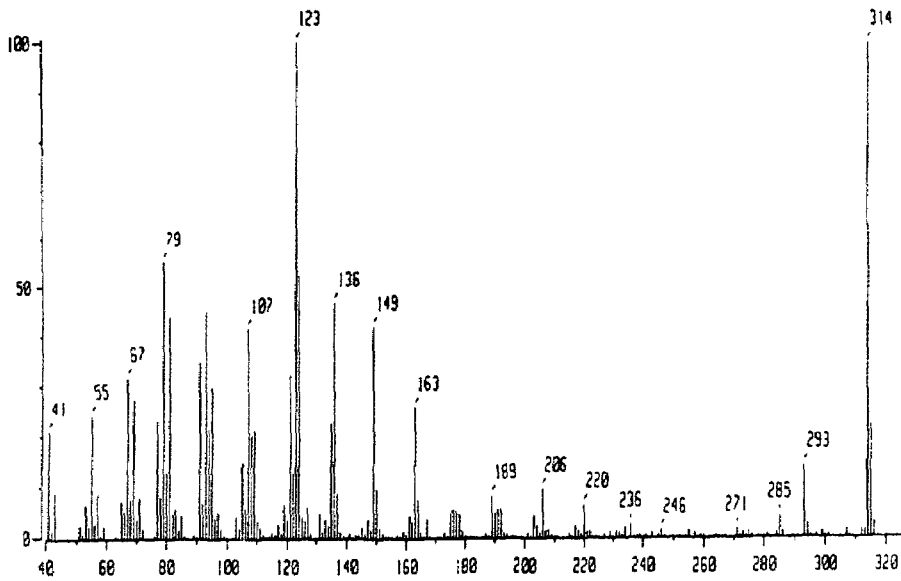


Fig. 4. 1. Mass spectrometry spectrum of urushiol main peak(3-(8'Z,11'E,13'Z-pentadecatrienyl)catechol).

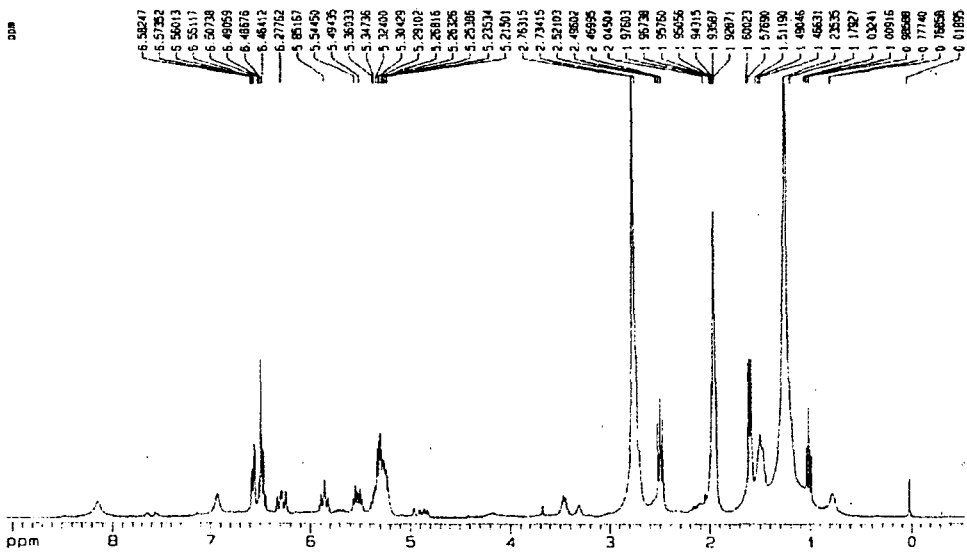


Fig. 4. 2. ^1H -NMR spectrum of urushiol main peak(3-(8'Z,11'E,13'Z-pentadatrienyl) catechol).

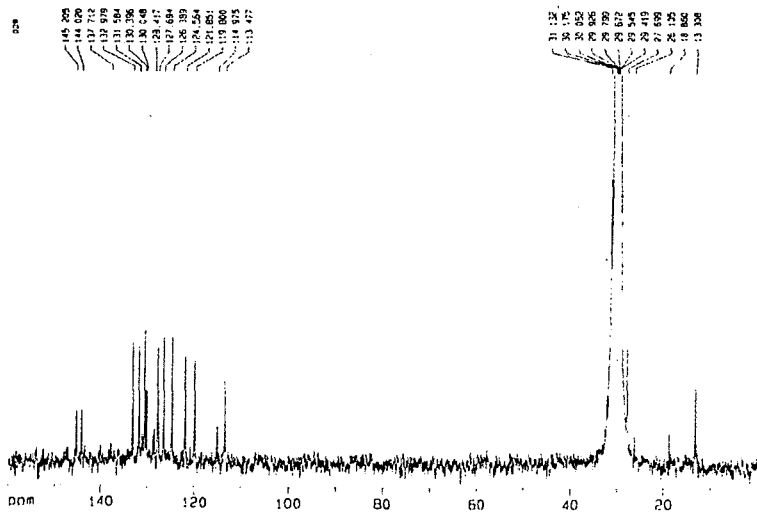


Fig. 4. 3. ^{13}C -NMR spectrum of urushiol main peak(3-(8'Z,11'E,13'Z-pentadatrienyl) catechol).

3. Flavonoids의 분자구조

가. 분자량

옻나무 acetone 추출물 중 compound 1의 분자량은 Fig. 4. 4와 같이 162, compound 2의 분자량은 Fig. 4. 5와 같이 288, compound 3의 분자량은 Fig. 4. 6과 같이 286, compound 4의 분자량은 Fig. 4. 7과 같이 270, compound 5의 분자량은 Fig. 4. 8과 같이 272로 밝혀졌다.

나. NMR 분석

Compound 2은 ^1H -NMR spectrum, ^{13}C -NMR spectrum, HETCOR spectrum, ^1H - ^1H COSY spectrum 결과 fustin인 것으로 확인되었다.

Compound 3은 ^1H -NMR spectrum, ^{13}C -NMR spectrum, HETCOR spectrum, ^1H - ^1H COSY NMR spectrum 결과 fisetin인 것으로 확인되었다.

Compound 4은 ^1H -NMR spectrum, ^{13}C -NMR spectrum, HETCOR spectrum, ^1H - ^1H COSY NMR spectrum 결과 sulfuretin인 것으로 확인되었다..

Compound 5은 ^1H -NMR spectrum, ^{13}C -NMR spectrum, HETCOR spectrum, ^1H - ^1H COSY NMR spectrum 결과 butein인 것으로 확인되었다.

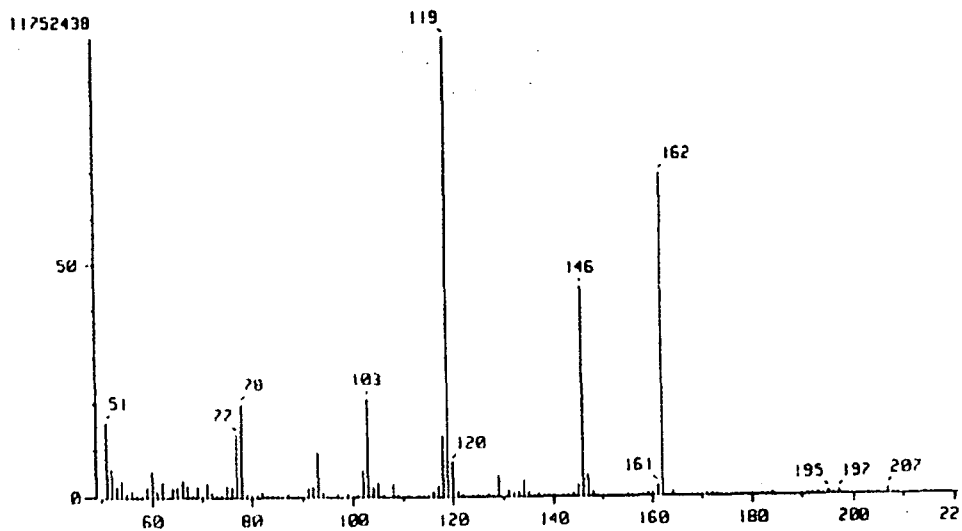


Fig. 4. 4. MS spectrum of compound 1.

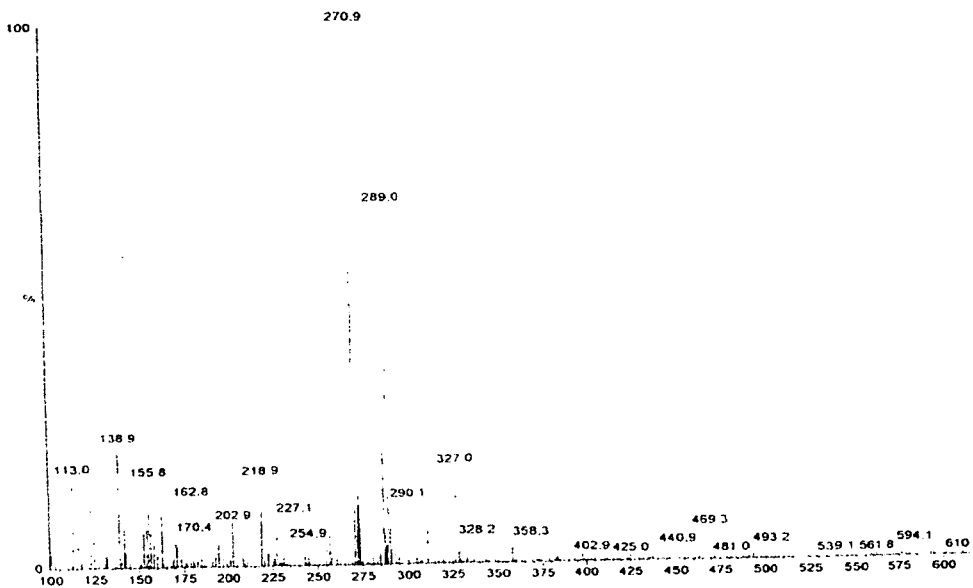


Fig. 4. 5. MS spectrum of Fustin.

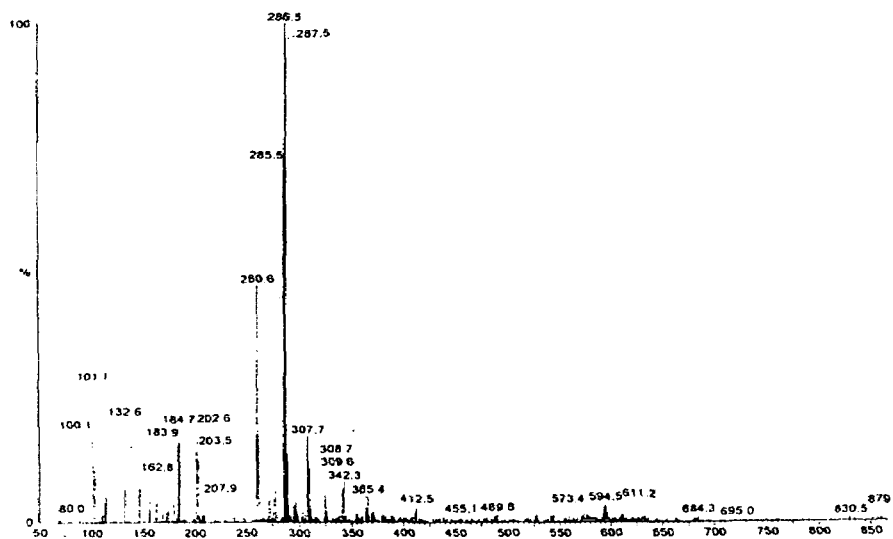


Fig. 4. 6. MS spectrum of Fisetin.

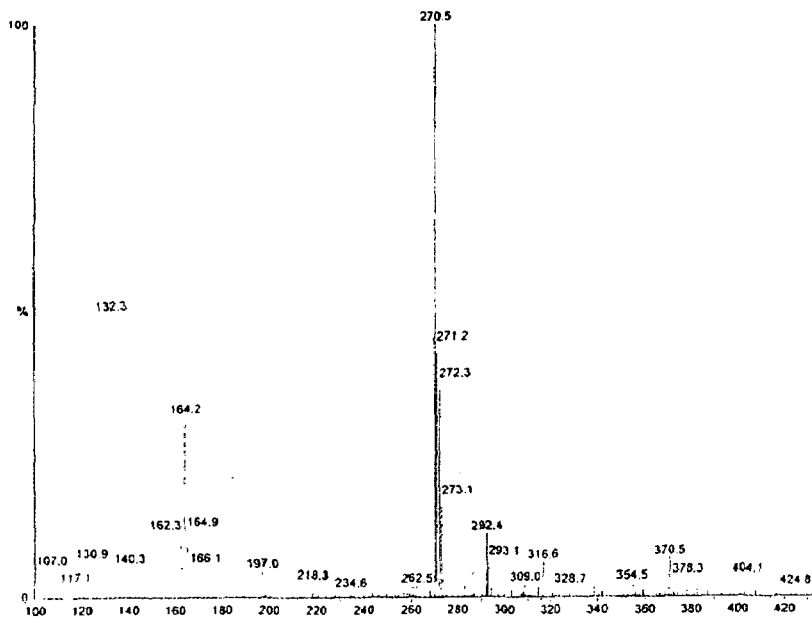


Fig. 4. 7. MS spectrum of sulfuretin.

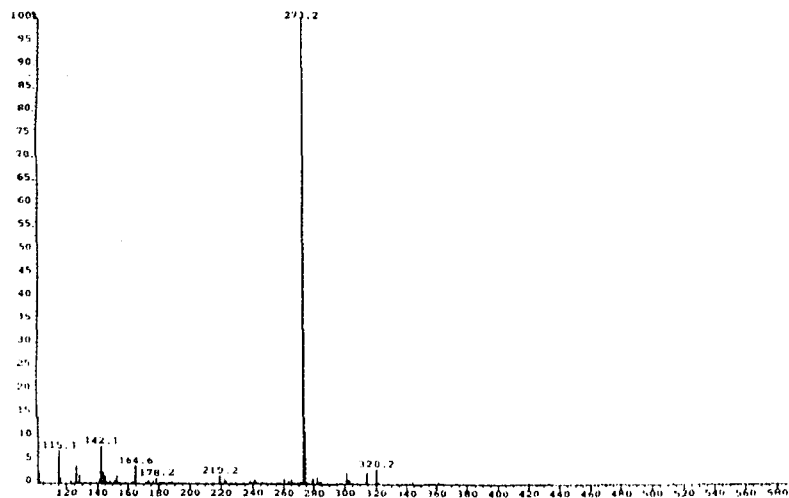
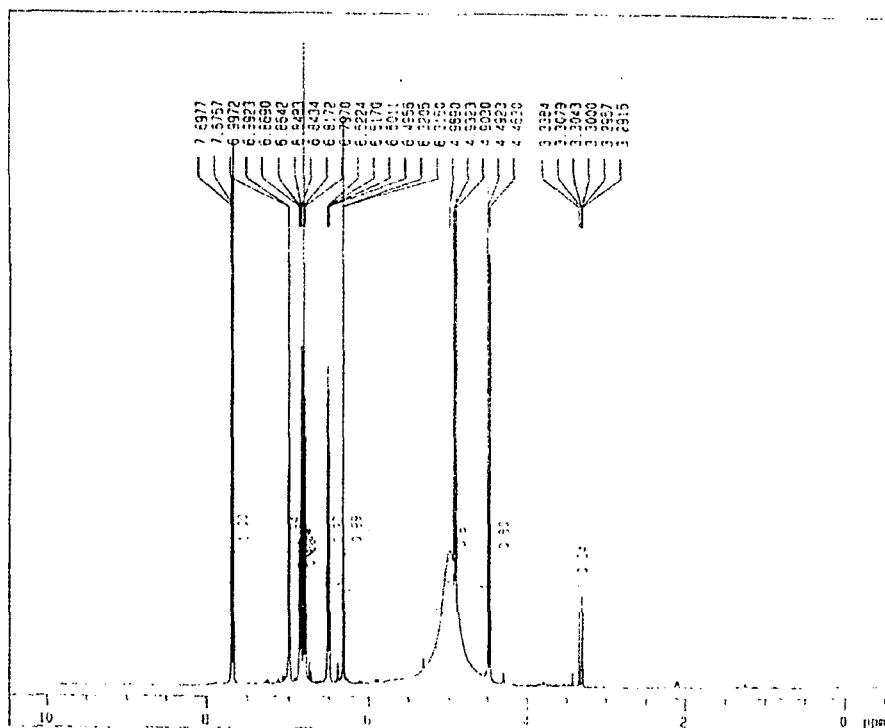


Fig. 4. 8. MS spectrum of Butein.



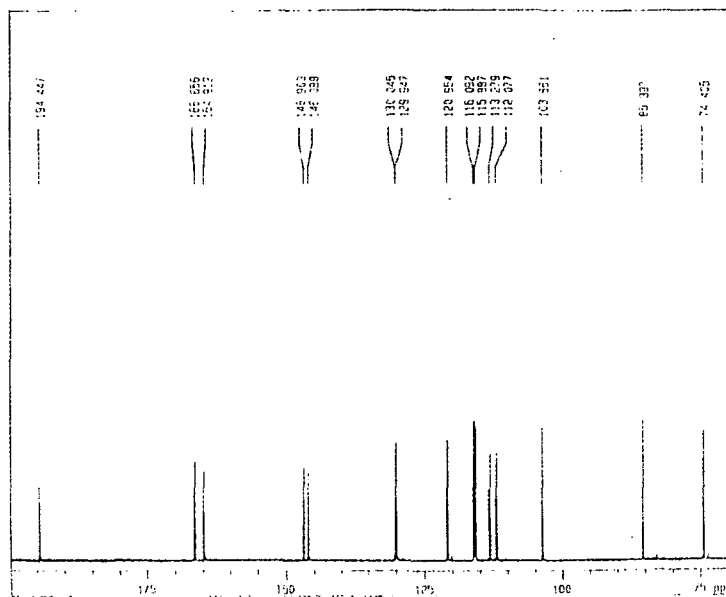


Fig. 4. 10. ^{13}C NMR spectrum of Fustin.

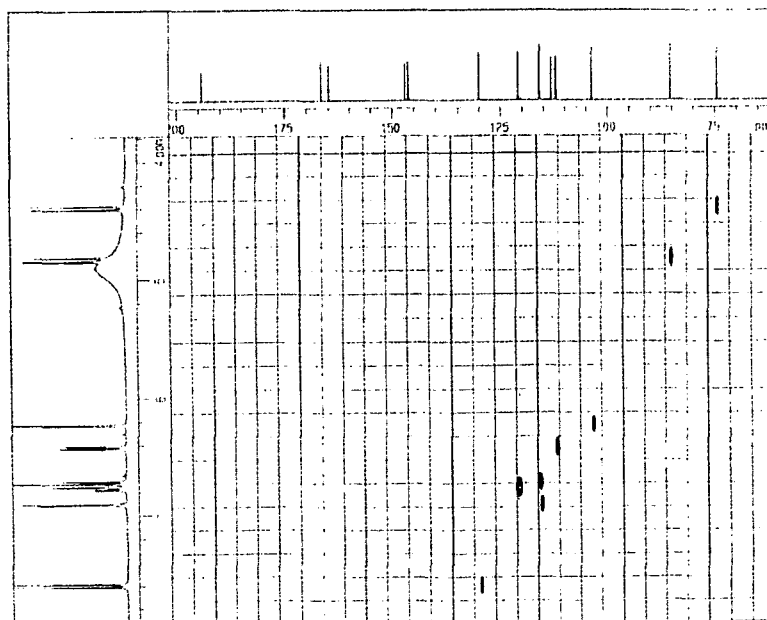


Fig. 4. 11. HETCOR spectrum of Fustin.

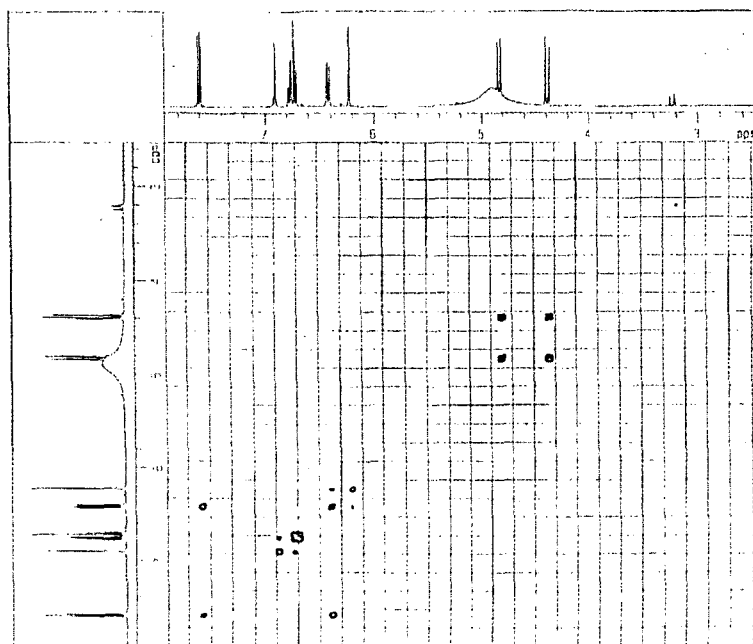


Fig. 4. 12. ^1H - ^1H COSY spectrum of Fustin.

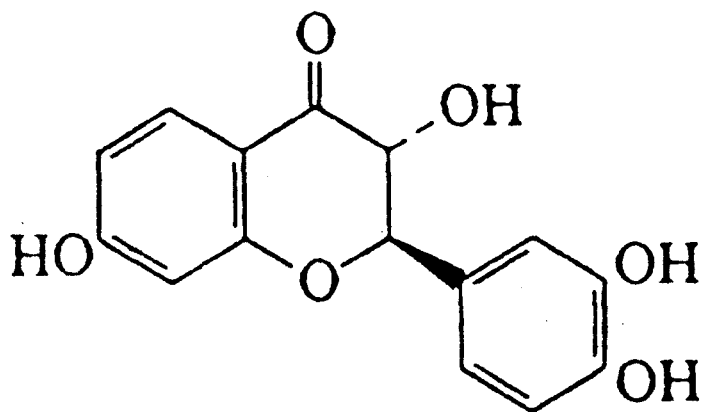


Fig. 4. 13. Chemical structure of Fustin(3,3',4',7-Tetrahydroxyflavanone)

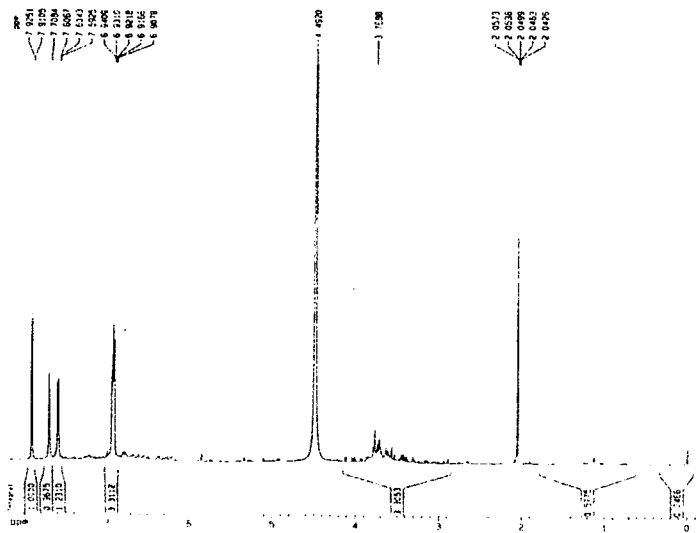


Fig. 4. 14. ^1H NMR spectrum of Fisetin.

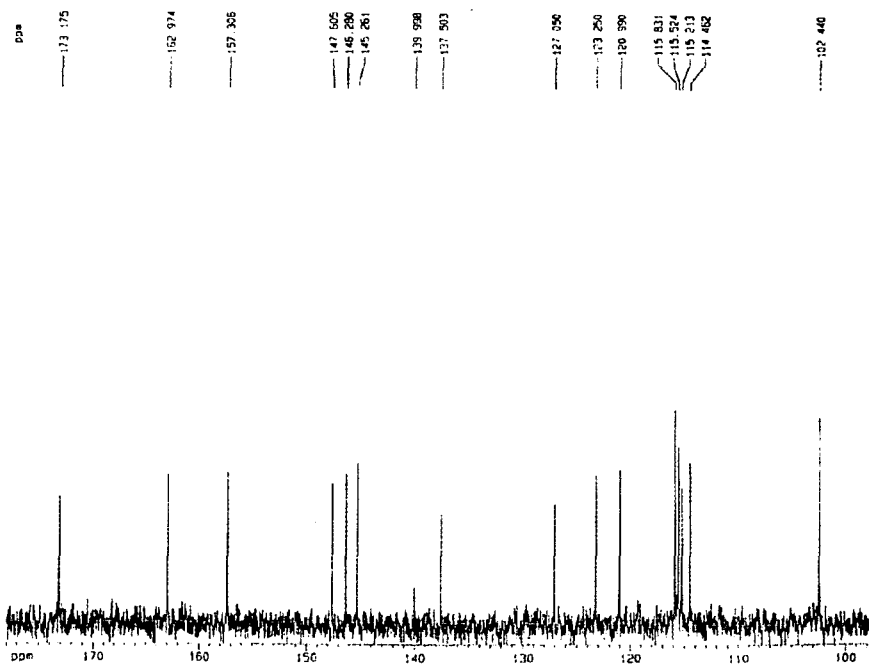


Fig. 4. 15. ^{13}C NMR spectrum of Fisetin.

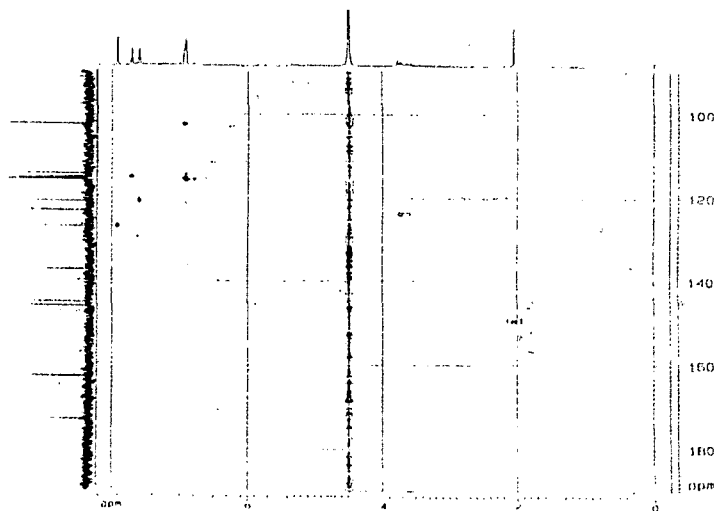


Fig. 4. 16. HETCOR spectrum of Fisetin.

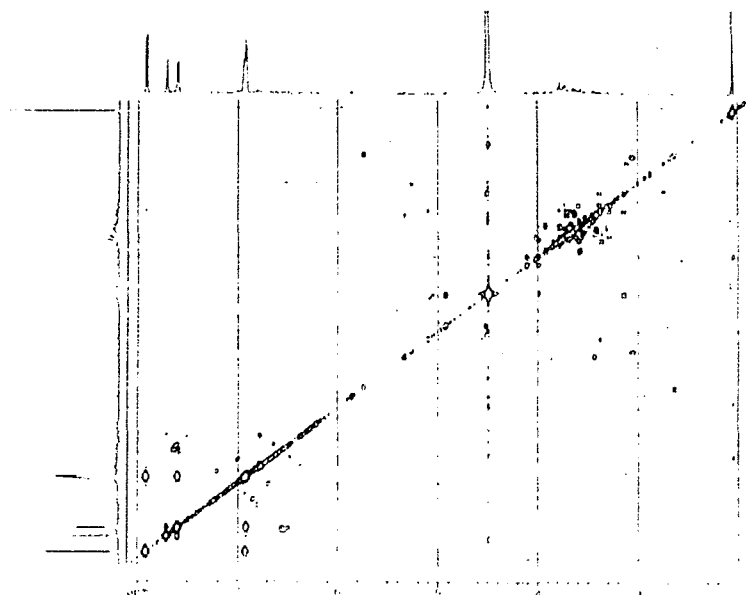


Fig. 4. 17. ^{13}C - ^1H COCY spectrum of Fisetin.

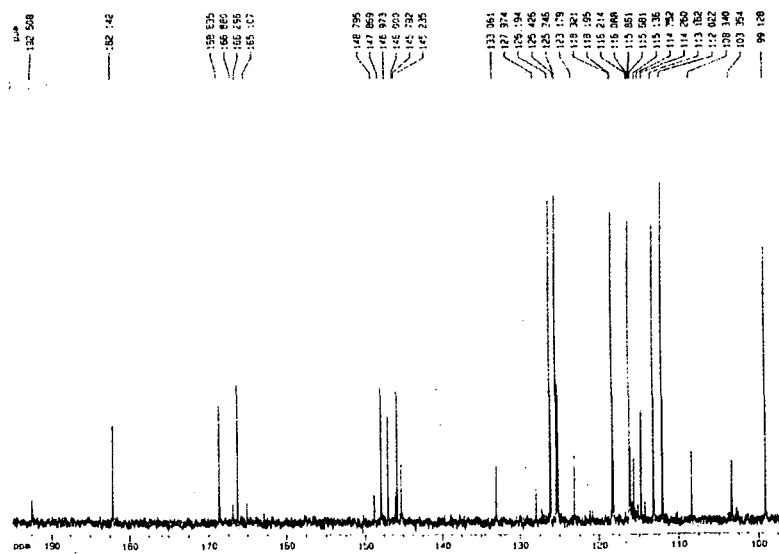


Fig. 4. 20. ^{13}C -NMR spectrum of Sulfuretin.

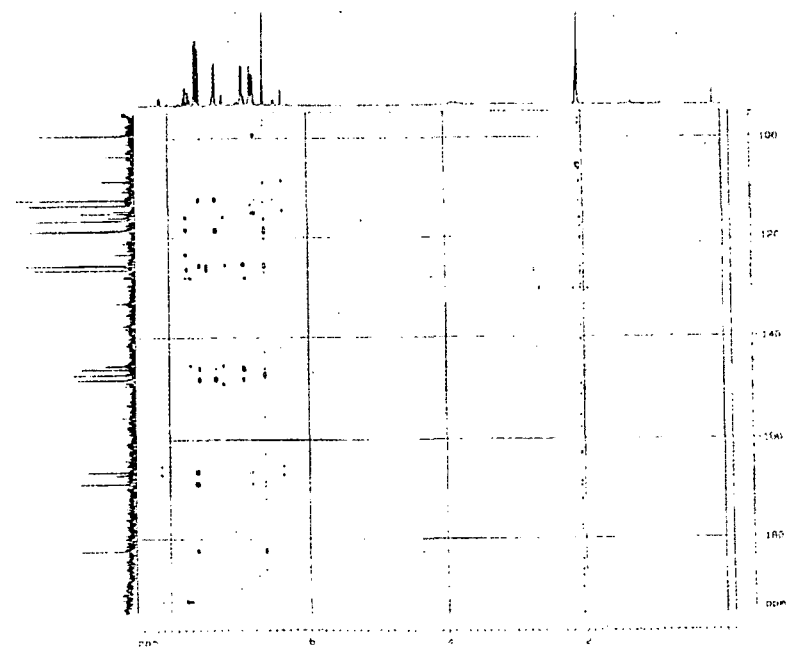


Fig. 4. 21. ^{13}C - ^1H Cosy NMR spectrum of Sulfuretin.

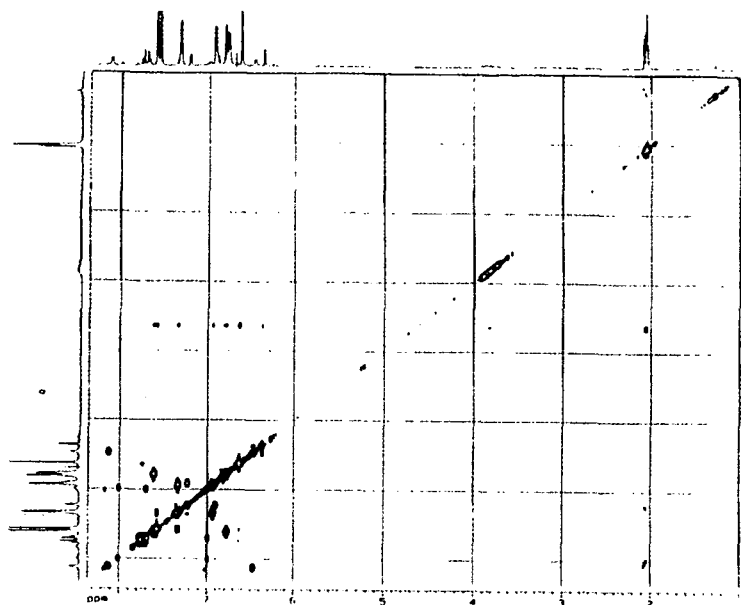


Fig. 4. 22. ^1H - ^1H COSY spectrum of Sulfuretin.

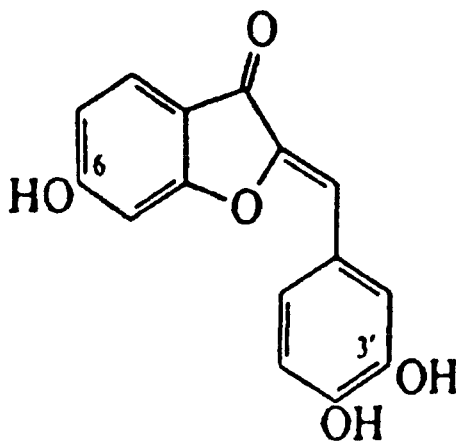


Fig. 4. 23. Chemical structure of Sulfuretin(3',4',6'-Trihydroxyaurone).

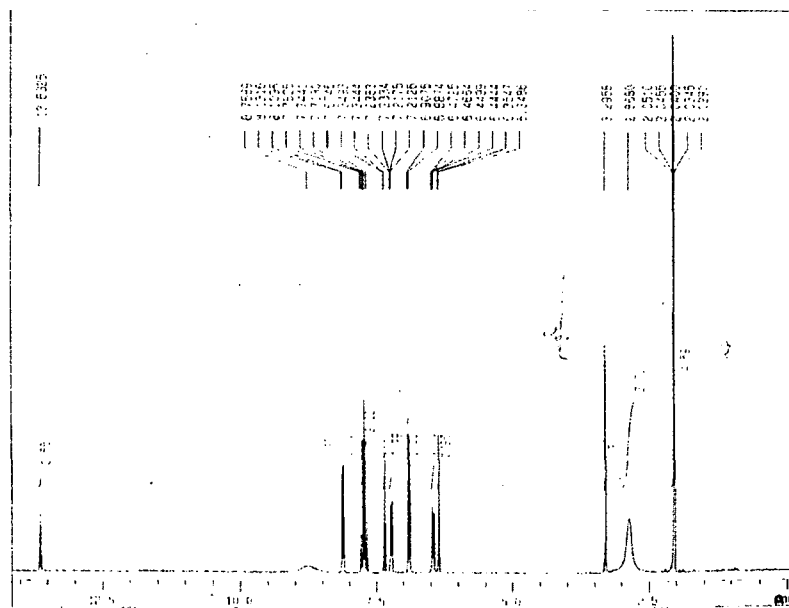


Fig. 4. 24. ^1H -NMR spectrum of Butein.

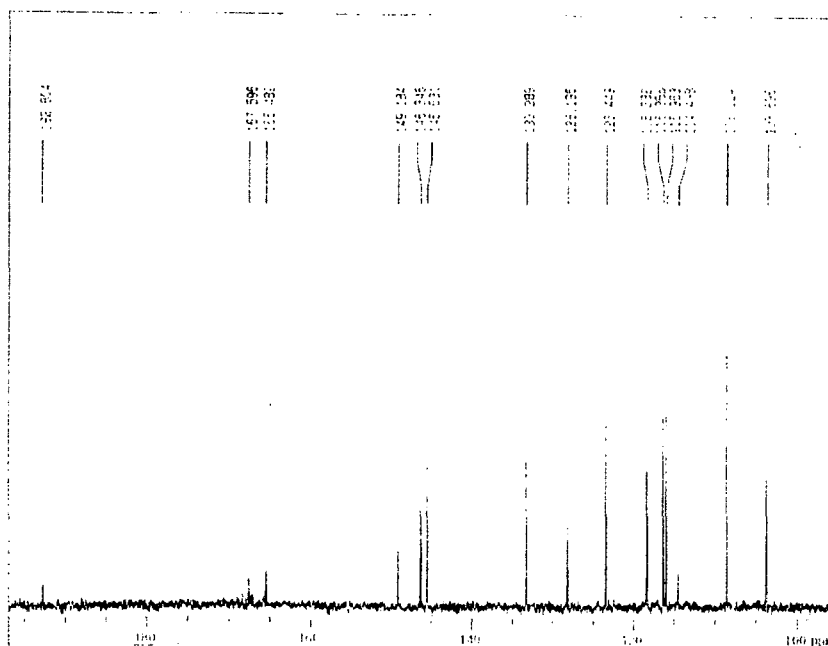


Fig. 4. 25. ^{13}C -NMR spectrum of Butein.

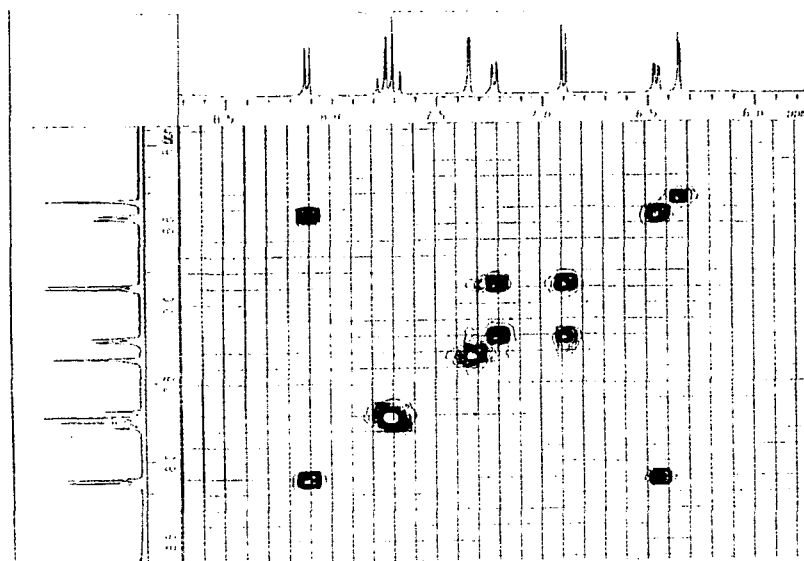


Fig. 4. 26. ^1H - ^1H COSY spectrum of Butein.

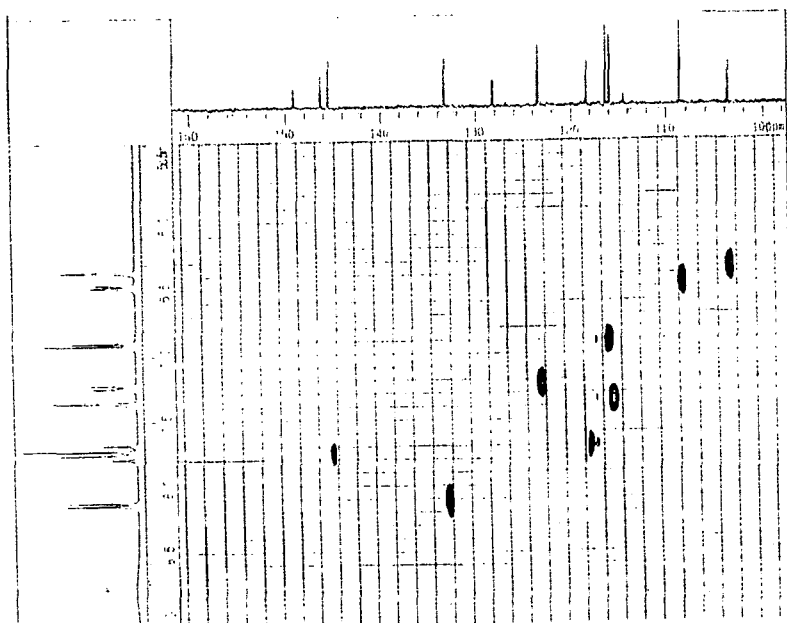


Fig. 4. 27. HETCOR spectrum of Butein.

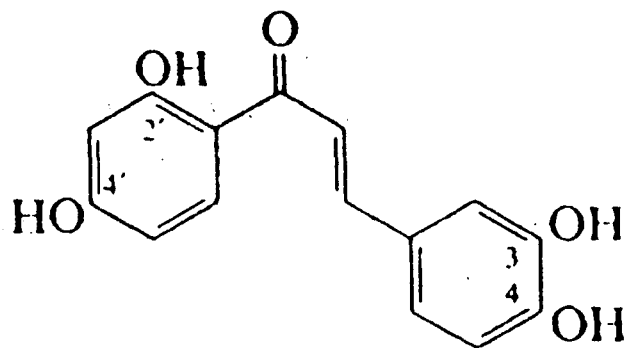


Fig. 4. 28. Chemical structure of Butein(2',3,4,4'-Tetrahydroxychalcone)

제 4 절 결 론

옻나무 조추출물의 성상은 orange yellow의 결정체이며 원소분석기(Perkin-Elmer, 미국)에 의해 원소분석을 한 결과 C(Carbon) 45.82%, H(Hydrogen) 4.62%, N(Nitrogen) 0.76%, O(Oxygen) 48.32%, Mineral이 0.48%인 물질로 밝혀졌다. 이중 N(Nitrogen)은 0.76%로 그 수치가 낮아 N(Nitrogen)은 없는 것으로 판명되었다. 옻나무 acetone 추출물 중 compound 2는 분자량 288의 fustin, compound 3은 분자량 286의 fisetin, compound 4는 분자량은 270의 sulfuretin, compound 5는 분자량 272의 Butein으로 밝혀졌다.

옻나무 조출물을 완전히 건조시킨 후 KBr pellet을 만들어 Resolution : 4, Sample gain : 2, Mirror Velocity : 0.6329, Aperture : 100.0의 조건으로 FTIR (Nocolet Co. MAGNA-IR 550 Spectrometer series II)에 의해 화학작용기를 분석하였던 결과 781.86, 806.73, 860.80, 994.4, 1008.23, 1026.63, 1084.20, 1108.18, 1140.39, 1164.30, 1271.08, 1327.30, 1354.13, 1448.79, 1468.04, 1532.65, 1581.77, 1616.13, 1678.89, 2719.06, 2851.92, 2925.38, 3386.95 cm^{-1} 의 wavenumber에서 peak를 나타냈다.

일반적으로 생체중의 유기화합물은 C/H/O를 골격으로 하므로 우선 OH기가 3387 cm^{-1} 와 1026 cm^{-1} 에 나타나 있고, 2925 cm^{-1} 와 1478 cm^{-1} 에 CH_3 가 나타나며 994 cm^{-1} 에 서는 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 가 나타났다.

탄소골격으로는 860, 807, 782 cm^{-1} 등에서 벤젠핵이 존재하고 1008 cm^{-1} 에서는 벤젠핵이 아닌 cyclic 화합물 구조가 존재함을 보여주고 있다.

대부분의 flavonoids 성분이 벤젠핵과 cyclic 화합물이 결합된 형태로 이루어진 화합물이기 때문에 IR분석 결과와 UV흡광분석 결과는 옻나무 조추출물이 flavonoids 계열의 성분이 혼합되어 있는 화합물로 추정된다.

따라서 옻나무 acetone 추출물 중 compound 2는 분자량 288의 fustin, compound 3은 분자량 286의 fisetin, compound 4는 분자량은 270의 sulfuretin, compound 5는 분자량 272의 Butein으로 밝혀졌다.

참고문헌

Ackman, R. G. (1986). WCOT(Capillary) Gas-Liquid Chromatography, in "Analysis of Oils and Fats", ed. by R. J. Hamilton and J. B. Rossell. Elsevier Applied Science Publishers. London, pp 137 - 206.

Adachi, Y., Mori, M., Maehara, Y. and Sugimachi, K., (1992). Poorly differentiated medullary carcinoma of the stomach, *Cancer* 70 : 1462-1466.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. and Yuan, J., (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell* 87 : 171.

Arrowsmith, C. H. and Morin, P., (1996). New insights into p53 function from structural studies, *Oncogene* 12 : 1379-1385.

Ashkenazi, A. and Dixit, V. M., (1998). Death receptors: signaling and modulation, *Science* 281 : 1305-1308.

Baek, N.I., Kim, D.S., Lee, Y.H., Park, J.D., Lee, C.B. and Kim, S.I. (1995). Cytotoxic of ginseng saponins and their degradation products against some cancer cell lines. *Arch. Pharm. Res.*, 18 : 164-168.

Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L. and Korsmeyer, S. J., (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18, *Cell* 41 : 899-906.

Bartkova, T., Lukas, J., Müller, H., Lützhft, D., Strauss, M. and Bartek, J. (1994). Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, 57 : 353-361.

Bian, J. and Sun, Y., (1997). p53CP, a putative p53 competing protein that specifically binds to the consensus p53 DNA binding sites: a third member of the p53 family *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 14753-14758.

Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G. and Thompson, C. B., (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death, *Cell* 74 : 597-608.

Browning, B. L. (1971). *Methods of Wood Chemistry*. Wiley -Interscience. pp 115 - 206.

Cha, H.J., Bae, S.K., Lee, H.Y., Lee, O.H., Sato, H., Seiki, M., Park, B.C., and Kim, K.W. (1996). Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Research* 56 : 2281-2284.

Chang, I. M., J. C. Ryu, Y. C. Park, H. S. Yun(Choi) and K. H. Yang. (1983). Protective activities of aucubin against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Drug and chemical toxicology* 6(5) : 443-453.

Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, M. and Basi, G., (1994). Apoptosis and the cell cycle, *Cell Mol. Biol. Res.* 40 : 603-612.

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. and Lutz, R. J., (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions, *Embo. J.* 14 : 5589-5596.

Choi, Y.H.; Baek, J.H., Yoo, M.A., Chung, H.Y., Kim, Nam Deuk, and Kim, K.W., (2001). Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *International J. Oncology* 17 : 565-571.

Choi, Y.H., Im, E.O., Shu, H., Jin, Y., Lee, W.H., Yoo, Y.H., Kim, K.W., and Kim, Nam Deuk, (2001). Apoptotic activity of novel bile acid derivatives in human leukemic T cells through the activation of caspases. *International J. Oncology* 18 : 979-984.

Chung, N.C., Biological activity of urushiol and flavonoids from lac tree(*Rhus verniciflua* Stokes). (1998). Ph.D. Thesis, Chunnam National University.

Cryns, V. and Yuan, J., (1998). Proteases to die for, *Genes Dev.* 12 : 1551-1570.

Darmon, A. J., Nicholson, D. W. and Bleackley, R. C., (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B, *Nature* 377 : 446-448.

Dickins, M. and R. E. Peterson. (1980). Effects of a hormone supplemented medium on cytochrome P-450 content and monooxygenase activities of rat hepatocytes in primary culture. *Biochem. Pharmacol.* 29 : 1231-1238.

Douglas, A.S. and M. W. Donald. (1980). Principles of Instrumental Analysis. 2^{ng}. ed. p.209.

Dulic, V., Drullinger, L.F., Lees, E., Reed, S.I. and Stein, G.H. (1993). Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-cdk2 and cyclin D1-cdk2 complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 11034-11038.

Dulic, V., Lee, E. and Reed, S.I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. Science, 257 : 1958-1961.

El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B., (1992). Definition of a consensus binding site for p53, Nat. Genet. 1 : 45-49.

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B., (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, Cell 75 : 817-825.

Ellis, R. E., Yuan, J. Y. and Horvitz, H. R., (1991). Mechanisms and functions of cell death, Annu. Rev. Cell Biol. 7 : 663-698.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S., (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, Nature 391 : 43-50.

Fearnhead, H. O., Rodriguez, J., Govek, E. E., Guo, W., Kobayashi, R., Hannon, G. and Lazebnik, Y. A., (1998). Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9, Proc Natl. Acad. Sci. USA 95 : 13664-13669.

Folkman, J. and Klagsburn, M., (1987). Angiogenic factor, Science 235 : 442-447.

Garvela, E. E. Albano, M. U., G. Poli and T. F. Slater. (1979). Effect of carbon tetrachloride on isolated rat hepatocytes ; inhibition of protein and lipoprotein secretion. Biochem. J. 178 : 509-512.

Greenlee, W. E. and A. Poland. (1978). An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity ; Interaction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, J. Pharmacol.Exp.Ther. 205 : 596-605.

Grisham, I. W. (1979). Use of hepatic cell cultures to detect and evaluate the mechanisms of action of toxic chemicals. Int. Rev. Exp. Pathol. 20 : 123-210.

Hartwell, L. H. and Kastan, M. B., (1994). Cell cycle control and cancer, Science 266 : 1821-1828.

Hayashi, H., Tatebe, S., Osaki, M., Goto, A., Suzuki, Y. and Ito, H., (1997). Expression of Fas antigen and its mediation of apoptosis in human gastric cancer cell lines, Jpn. J. Cancer Res. 88 : 49-55.

Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K. and Sasada, M., (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis, *J. Exp. Med.* 187 : 587-600.

Hong, D. H., Han, S. B., Lee, C. W., Park, S. H., Jeon, Y. J., Kim, M. J., Kwak, S. S. and Kim, H. M., (1999). Cytotoxicity of urushiols isolated from sap of Korean lacquer tree(*Rhus vernicifera* Stokes), *Arch. Pharm .Res.* 22 : 638-641.

Horwitz,W., P.Chichilo and H.Reynolds. (1970). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. pp.441 - 476.

Hunter, T. and Pines, J. (1994). Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79 : 573-582.

Hussain, R. A., Y. M. Lin, L. J. Poveda, E. Bordas, B. S. Chung, J. M. Pezzuto, D. D. Soejarto and A. D. Kinghorn. (1990). Plant-derived sweetening agents : saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. *J-Ethnopharmacol.* 28(1) : 103-115.

Ikeguchi, M., Tatebe, S., Kaibara, N. and Ito, H., (1997). Changes in levels of expression of p53 and the product of the bcl-2 in lines of gastric cancer cells during cisplatin-induced apoptosis, *Eur. Surg. Res.* 29 : 396-402.

Im E.O., Choi, Y.H., Paik, K.J., Suh, H., Jin, Y., Kim, K.W., Yoo, Y.H., and Kim, Nam Deuk, (2001). Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p3-independent pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer Letters* 163 : 83-93.

Im, E.O., Lee, S., Suh, H., Kim, K.W., Bae, Y.T., and Kim, Nam Deuk, (1999). A novel ursodeoxycholic acid derivative induces apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 5 : 293-298.

Jacobson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C., (1997). Programmed cell death in animal development, *Cell* 88 : 347-354.

Jung Hyun Ho, Hye Gwang Jeong, Tae Cheon Jeong, Young-Jin Chun, Michael Lee and Kyu-Hwan Yang. (1993). Effect of dithiol malonate derivatives(DMDs) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Korean J. Toxicol.* 9(1) : 167-175.

Jung, Hyun Ho, Hye Gwang Jeong, Michael Lee, Byung Sun Yoo and Kyu-Hwan Yang. (1993). Effect of tumor necrosis factor-alpha on cytochrome P-450-dependent drug metabolism in primary mouse hepatocytes cultures and mouse hepatoma cells. *Korean J. Toxicol.* 9(2) : 177-186.

Kalish, R. S. and Johnson, K. L., (1990). Enrichment and function of urushiol (poison ivy)-specific T lymphocytes in lesions of allergic contact dermatitis to urushiol, *J. Immunol.* 145 : 3706-3713.

Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B. and Fornace, A. J., Jr., (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia, *Cell*. 71 : 587-597.

Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G., (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res.* 53 : 3976-3985.

Kawai, K., Y. Nozawa and Y. Ogihara. (1977). Biochemical studies on peptide alkaloids : induction of ion selective mitochondrial swelling. *Experientia*. 33(11) : 1454.

Kerr, J. F., Winterford, C. M. and Harmon, B. V., (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer* 73 : 2013-2026.

Kim, S. H. (1998). Ecology and superior tree selection of *Dendropanax morbifera* Lev. Ph. D. Thesis, Gyeongsang Nat. Univ. Chinju, Korea.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R. and Newmeyer, D. D., (1997a). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science* 275 : 1132-1136.

Kluck, R. M., Martin, S. J., Hoffman, B. M., Zhou, J. S., Green, D. R. and Newmeyer, D. D., (1997b). Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system, *Embo. J.* 16 : 4639-4649.

Ko, L. J. and Prives, C., (1996). p53: puzzle and paradigm, *Genes Dev.* 10 : 1054-1072.

Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, R. and Roberts, J.M. (1992). Formation and activation of cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*, 257 : 1689-1693.

Korsmeyer, S. J., (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death, *Cancer Res.* 59 : 1693-1700.

Korsmeyer, S. J., (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death, *Blood* 80 : 879-886.

Kroemer, G., Zamzami, N. and Susin, S. A., (1997). Mitochondrial control of apoptosis, *Immunol. Today* 18 : 44-51.

Labbe, G., V. Descatoire, P. Letteron and C. Degott. (1987). The drug methoxsalen, a suicide substrate for cytochrome P-450, decreases the metabolic activation, and prevents the hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice, *Biochem. Pharmacol.* 36 : 807-914.

Laks, P. E. (1991). Chemistry of Bark, in "Wood and Cellulosic Chemistry", ed. by D.N.S. Hon and N.Shiraishi. Marcel Dekker. N.Y.

Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. and Earnshaw, W. C., (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, Nature 371 : 346-347.

Lee, H.Y., Chung, H.Y., Kim, K.H., Lee, J.J., and Kim, K.W. (1994). Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 120 : 513-518.

Lee, K.Y., Lee, Y.H., Kim, S.I., Park, J.H., and Lee, S.K. (1997). Ginsenosides-Rg5 suppresses cyclin E-dependent protein kinase activity via up-regulating p21^{Cip1/WAF1} and downregulating cyclin E in SK-HEP-1 cells. Anticancer Res., 17 : 1067-1072.

Lee, K.Y., Park, J.A., Chung, E., Lee, Y.H., Kim, S.I., and Lee, S.K. (1996). Ginsenoside-Rh2 blocks the cell cycle of SK-HEP-1 cells at the G1/S boundary by selectively inducing the protein expression of p27^{kip1}. Cancer Lett., 110 : 193-200.

Lee, Y.-N., Lee, H.-Y., Chung, H.-Y., Kim, S.-I., Lee, S.-K., Park, B.-C. and Kim, K.-W. (1996). *In vitro* induction of differentiation by ginsenosides in F9 teratocarcinoma cells. Eur. J. Cancer, 32 : 1420-1428.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J., (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, Cell 94 : 491-501.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X., (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* 91 : 479-489.

Lindstrom, T. D., M. W. Ander and H. Remmer. (1978). Effect of phenobarbital and diethyl maleate on carbon tetrachloride toxicity in isolated hepatocytes. *Exp. Mol. Pathl.* 28 : 48-57.

Lindstrom, T. D. and M. M. Anders. (1977). Effect of cycloheximide and actinomycin D on carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 42 : 167.

Liotta, L.A., Kleinman, J. and Saidal, G.M., (1974). Quantitative relationship of intravascular tumor implantation. *Cancer Res.* 34 : 997-1004.

Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T. and Wang, X., (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 8461-8466.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X., (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis, *Cell* 89 : 175-184.

Lock, R.B. and Ross, W.E. (1990). Inhibition of p34^{cdc2} kinase activity by etoposide or irradiations as a mechanism of G₂ arrest in Chinese ovary cells, *Cancer Res.*, 50 : 3767-3771.

Lukas, J., Pagano, M., Staskova, Z., Draetta, G. and Bartek, J. (1994). Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumor cell lines. *Oncogene*, 9 : 707-718.

Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C. J. and Kato, J.Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 14 : 2066-2076.

Meeks, R.G., Zaharevitz, D., and Chen, R.F., (1981). Membrane effects of retinoids: possible correlation with toxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 207 : 141-147.

Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J. H., Mercer, W. E. and Givol, D., (1994). Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway, *Cancer Res.* 54 : 3391-3395.

Miyashita, T. and Reed, J. C., (1992). bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs, *Cancer Res.* 52 : 5407-5411.

Miyashita, T. and Reed, J. C., (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell* 80 : 293-299.

Miyawaki, T., Uehara, T., Nibu, R., Tsuji, T., Yachie, A., Yonehara, S. and Taniguchi, N., (1992). Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood, *J. Immunol.* 149 : 3753-3758.

Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374 : 131-13420.

Morris, G. F., Bischoff, J. R. and Mathews, M. B., (1996). Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 895-899.

Moses, M.A., Sudhalter, J. and Langer, R., (1990). Identification of an inhibitor of neovascularization from catilage. *Science* 248 : 1408-1410.

Motoyama, T., Hojo, H. and Watanabe, H., (1986). Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas, *Acta. Pathol. Jpn.* 36 : 65-83.

Murray, A. W. and Hunt, T., (1993). *The Cell Cycle, An Introduction*, Freeman, New York

Nagata, S. and Golstein, P., (1995). The Fas death factor, *Science* 267 : 1449-1456.

Narayanan, P.K., Rudick, J.M., Walthers, E.A. and Crissman, H.A. (1997). Modulation in cell cycle and cyclin B1 expression in irradiated HeLa cells and normal human skin fibroblasts treated with staurosporine and caffeine, *Experimental Cell Research*, 233 : 118-127.

Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A., (1997). Caspases: killer proteases, Trends Biochem. Sci. 22 : 299-306.

Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A. and et al., (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis, Nature 376 : 37-43.

Nigg. E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. BioEssays, 17 : 471-480.

Nossen, J., A. C. Rustan, T. Barnard and C. H. Drevon. (1984). Inhibition by chloroquine of the secretion of very low density lipoprotein in cultured hepatocytes. Biochem. Biophys. Acta. 803 : 11-20.

Oh, M., Choi, Y.H., Choi, S.H., Chung, H.Y., Kim, K.W., Kim, S.I., Kim, D.K., and Kim, Nam Deuk, (1999). Anti-proliferating effects of ginsenoside Rh2 on MCF-7 human breast cancer cells. International J. Oncology 14 : 869-875.

Oikawa, T., Shimamura, M., Ashio-Fuge, H., Iwaguchi, T., Ishizuka, M., and Takeuchi, T., (1991). Inhibition of angiogenesis by 5-deoxyspergualin. J. Antibiot. 44 : 1030-1035.

Oikawa, T.K., Hirotsu, O., Nakamura, K., Shudo, A., Hiragun, and Iwaguchi, T., (1989). Highly potent antiangiogenic activity of retinoids. Cancer Lett. 48 : 157-162.

Oikawa, T.M., Hasegawa, M., Shimamura, H., Ashio-Fuge, S.I., Murota, and I. Morita., (1991). Eponemycin, a novel antibiotic, is a highly powerful angiogenesis inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181 : 1070-1076.

Pike, B. R., Zhao, X., Newcomb, J. K., Wang, K. K., Posmantur, R. M. and Hayes, R. L., (1998). Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septo-hippocampal cultures, *J. Neurosci. Res.* 52 : 505-520.

Recknagel, R. O. (1967). Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 19 : 145-208.

Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S., (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature* 391 : 96-99.

Saraste, A. and Pulkki, K., (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovasc. Res.* 45 : 528-537.

Sellers, W. R. and Fisher, D. E., (1999). Apoptosis and cancer drug targeting, *J. Clin. Invest.* 104 : 1655-1661.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M., (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases, *Genes Dev.* 9 : 1149-1163.

Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R. and Martin, S. J., (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner, *J. Cell Biol.* 144 : 281-292.

Smedsrfd, B. and H. Pertoft. (1985). Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of percoll centrifugation and selective adherence., *J. Leukocyte Biol.* 38 : 213-230.

Smith, M. T., H. Thor, P.Hartzell and S. Orrennius. (1982). The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 31 : 19-29.

Soengas, M. S., Alarcon, R. M., Yoshida, H., Giaccia, A. J., Hakem, R., Mak, T. W. and Lowe, S. W., (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition, *Science* 284 : 156-159.

Sohn, K.H., Lee, H.Y., Chung, H.Y., Young, H.S., Yi, S.Y., and Kim, K.W. (1995). Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Letters*, 94 : 213-218.

Stahl E. (1973). *Thin-Layer Chromatography - A laboratory handbook.* Springer-Verlag.

Stock, S. C. and B.F. Rice. (1974). *Chromatographic methods.* Chaman and Hill and Science paperbacks. p. 35.

Stripp, B., I. G. Sipes, H. M. Mailing and J. R. Gillette. (1974). Dibenzamine impairment of rat hepatic microsomal enzymes and its relation to hepatotoxicity induced by CCl₄ and dimethylnitrosamine. *Drug Metab. Dispos.* 2 : 464.

Sugano, H., Nakamura, K. and Kato, Y., (1982). Pathological studies of human gastric cancer, *Acta. Pathol. Jpn.* 32 : 329-347.

Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M. and Tsukamoto, K., (1986). An improved colorimetric assay for interleukin 2, *J. Immunol. Methods* 93 : 157-165.

Tang, D. and Kidd, V. J., (1998). Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis, *J. Biol. Chem.* 273 : 28549-28552.

Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M., (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase, *Cell* 81 : 801-809.

Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y., (1998). Caspases: enemies within, *Science* 281 : 1312-1316.

Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. and et al., (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes, *Nature* 356 : 768-774.

Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M., (1998). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c- myc to immortalize pre-B cells, *Nature* 335 : 440-442.

Vaux, D. L., (1993). Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 786-789.

Vogelstein, B. and Kinzler, K. W., (1992). p53 function and dysfunction, *Cell* 70 : 523-526.

Watson, E. S., Murphy, J. C., Wirth, P. W., Waller, C. W. and Elsohly, M. A., (1981). Immunologic studies of poisonous Anacardiaceae: I. Production of tolerance and desensitization to poison Ivy and oak urushiols using esterified urushiol derivatives in guinea pigs, *J. Invest. Dermatol.* 76 : 164-170.

Wilkerson, W. W. (1990). Anti-inflammatory phospholipase A2 inhibitors. *Drug of the Future* 15 : 140.

Williams, G. T., (1991). Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis, *Cell* 65 : 1097-1098.

Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S. A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S. W. and Mak, T. W., (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes, *Genes Dev.* 12 : 806-819.

- Wyllie, A. H., (1987). Apoptosis: cell death in tissue regulation, *J. Pathol.* 153 : 313-316.
- Wyllie, A. H., (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature* 284 : 555-556.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R., (1980). Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.* 68 : 251-306.
- Wyllie, A. H., (1995). The genetic regulation of apoptosis, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5 : 97-104.
- Yang, K. H., E. J. Choi and S. Y. Choe. (1983). Cytotoxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodi benzo-*p*-dioxin in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12 : 183-188.
- Yang, K. H., T. J. Kwon, S. Y. Choe, H. S. Yun(choi) and I. M. chang. (1983). Protective effect of *Accuba japonica* against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Drug and chemical toxicology.* 6(5) : 429-441.
- Yin, X. M., Oltvai, Z. N. and Korsmeyer, S. J., (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax, *Nature* 369 : 321-323.

Yoon, H.S., Rho, J.H., Yoo, K.W., Park, W.Ch., Rho, S.H., Choi, Y.H., Suh, H., Kim, Nam Deuk, Yoo, K.S., and Yoo, Y.H., (2001). Synthetic bile acid derivatives induce nonapoptotic death of human retinal pigment epithelial cells. *Current Eye Research* 22 : 367-374.

Yoshikawa, K., M. Nagai, M. Wakabayashi and S. Arihara. (1993). Aroma glycosides from *Hovenia dulcis*. *Phytochemistry*. 34(5) : 1431-1433.

Yoshikawa, K., T. Ueda, O. Muraoka, H. Aoyama, H. Matsuda, H. Shimoda, J. Yamahara and N. Murakami. (1995). Absolute stereostructures of hovenidulciosides A1 and A2, bioactive novel triterpene glycosides from hoveniae semen seu fructus, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. *Chem-Pharm-Bull-Tokyo*. 43(3) : 532-534.

Yoshikawa, K., Y. Nagai, M. Yoahida and S. Arihara. (1993). Antisweet natural products. VIII. Structures of hodulosides VI -X from *Hovenia dulcis* Thunb. var. tomentella Makino. *Chem-Pharm-Bull-Tokyo*, 41(10) : 1722-1725.

Zaika, L. L. (1988). Their antimicrobial activity and it's determination. *J. Food Safty*. 24(4) : 367.

Zeng, Y. X. and El-Deiry, W. S., (1996). Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways, *Oncogene* 12 : 1557-1564.

Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T. and Reed, J. C., (1996). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2, *J. Biol. Chem.* 271 : 7440-7444.

Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D. A., O'Connor, P. M. and Fornace, A. J., Jr., (1994). Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis, *Oncogene* 9 : 3743-3751.