

최 종
연구보고서

초석잠으로부터 산화스트레스를 생성하는 활성 산소 소거를 위한 신기능성 식품 소재의 실용화 기술

Development in new type of functional food resource originated from *Stachys sieboldii* for scavenger of active oxygen caused by oxidative stress.

세부과제: 초석잠으로부터 신기능성 식품 소재의 실용기술
Development of a new functional food resource from *Stachys sieboldii*.

협동과제: 초석잠으로부터 활성 산소의 소거 물질의 분리
Seperation of active oxygen scavenger from *Stachys sieboldii*.

연구기관 : 경성대학교

협동과제 연구기관 : 부산대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서는 “초석잠으로부터 산화 스트레스를 생성하는 활성 산소 소거를 위한 신기능성 식품 소재의 실용화 기술”(협동과제명 “초석잠으로부터 활성산소 소거활성물질의 분리”)에 관한 연구 최종보고서로 제출합니다.

2003년 8 월 14 일

주관연구기관명 : 경성대학교

총괄연구책임자 : 류 병 호

세부연구책임자 : 류 병 호

연 구 원 : 김 민 정

연 구 원 : 김 상 민

연 구 원 : 권 상 욱

협동연구기관명 : 부산대학교

협동연구책임자 : 송 승 구

요 약 문

I. 제 목

초석잠으로부터 산화 스트레스를 생성하는 활성 산소 소거를 위한 신기능성 식품 소재의 실용화 기술

세부과제 : 초석잠으로부터 신기능성 식품 소재의 실용화 기술

협동과제 : 초석잠으로부터 활성 산소의 소거 물질의 분리

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 초석잠으로부터 산화 스트레스를 생성하는 활성 산소 소거를 위한 신기능성 식품소재의 실용화 기술에 관한 연구는 식물의 동충하초로 알려진 초석잠을 이용하여 산화적 스트레스로 인하여 발생하는 유해한 활성산소를 제거하는 신기능성 식품 소재를 개발하는 것으로 궁극적으로 농가소득의 증대를 보장하는 것이다. 이 목표를 달성하기 위하여 아래와 같이

3가지 세부 목표를 세웠다.

첫째는 초석잠으로부터 활성 산소 소거 활성물질을 확인하고, 둘째로는 초석잠으로부터 활성산소 소거를 위한 신기능성 식품 소재를 분리·정제하고, 셋째로는 초석잠의 활성물질을 이용 하여 신기능성 식품 소재의 실용화 기술을 구축하였다. 유용식품은 현재까지 단순 건조하여 유용식품으로 이용되는 것 이외는 아직 가공방법이 확립되어 있지 않아 현대인의 수요에 맞는 기호성, 영양 및 기능성을 증진시킬 수 있는 식품소재로서 고체 식품, 음료수등 가공 식품의 개발이 시급한 과제로 대두되고 있다. 초석잠의 신기능성 물질을 활용하여 각종 제품으로 모델을 도출하므로써 농산물의 발전에 기여할 수 있고 나아가 WTO의 체제하에서 수출 증대를 통하여 국제 경쟁력을 개선할 수 있다. 초석잠과 같은 유용식품의 재배농가의 조직화를 통하여 농민이 주도적으로 유용식품의 가공 산업의 참여와 생산의 단지화 및 유통구조에 개선을 통한 재배농가의 소득증대의 크게 기여할 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 초석잠으로부터 산화 스트레스를 생성하는 활성산소 소거를 위한 신기능성 식품 소재의 실용화 기술로서 식품소재로 활용하려는 연구이다. 1차년도 연구 내용은 초석잠으로부터 신기능성 물질의 확인 및 대량 정제 공정 구축과 초석잠의 신기능성 물질을 도출하기 위하여 초석잠으로부터 향균, 향암 물질을 검색하고, 이의 분리·정제의 최적조건 확립과 추출 분리 공정의 구축하였다. 2차년도는 초석잠의 생리활성을 물질을 분리 정제하고 이에 대한 안정성을 확인한 후 산업화 전략 계획

의 구축과 제품의 실용화 모델에 의한 연구로 대량생산 체제의 확립과 물질의 자원화 이용기술 도출, 그리고 실용화 기술 모델 개발과 경제성 있는 제품의 생산을 시도하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

초석잡으로부터 신기능성 물질의 대량생산 공정을 도출함으로써 아직 개발되지 않은 각종 야생식물의 유효성분의 이용에 기여할 수 있다. 또한 초석잡에서 새로운 물질을 창출함으로써 관련 생물산업 기반기술에 응용 가능하며 최초로 Super Oxide Dismutase(SOD) 식품 및 향균, 항암 효능이 있는 신소재의 개발로 새로운 leading food로 시장에 진입할 수 있다. 그리고 취약한 농업 관련 기술을 확립함으로써 WTO 체제하에서 국제화 개방화에 대비하고 농촌의 소득 증대에 크게 기여할 것이다.

또 초석잡은 산화 스트레스를 해소할 수 있으므로 생활습관병을 예방 치료 할수 있는 특수 식품인 환자식·노인식 및 신기능성 건강 보조식품으로 활용할 수 있는 신기능성 생리활성 물질이다. 초석잡은 농촌 지역에서 쉽게 채배하여 수확이 가능하므로 농민의 소득 증대에 큰 몫을 할 수 있다. 국내에서 아직 전혀 연구가 이루어지지 않고 있는 초석잡의 SOD 식품으로서 연구결과를 발명특허를 신청한 바 있다. 그리고 연구개발이 끝나면 관련업체와 협의를 거쳐 상품화하여 시판할 것이다.

SUMMARY

I. Title

Development in new type of functional food resource originated from *Stachys sieboldii* for scavenger of active oxygen caused by oxidative stress.

II. Aims and necessity for the research

This particular research aim for the development of new functional food resource that originated from isolated extraction of *Stachys sieboldii* and among other useful plants. This study was designed to develop for the scavenger of active oxygen derives oxidated stress. This project's positive outcome will increase of the farming industry's annual income.

We have well-organized three step research procedures, which will assist us to accomplish success in this project. First of all, we identified the scavenging activity for the operative oxygen, which isolated from *Stachys sieboldii*. Secondly, to advance the method of isolation of active substance having scavenging activity from *Stachys sieboldii* and its constructed. Lastly, to elaborate the usage of natural food resource's possibility for the various forms of functional food resources and developed as food for a new model for the active substance.

Until this time period, many useful plants are not confirmed the way of its treatment and processing stages for food in materials. However, by obtain the goal of this research, can lead into producing new types of health-assistant food. For instance, to make solid form of health drink that is efficient to human body, in addition, by applying this methodology can lead into creating new health related products.

Therefore, through efficiently organized cultivation, the farming industry may apply *Stachys sieboldii* into their production line to create the benefit.

III. Aims and categories of research project.

This study was constructed to find a new functional substance from *Stachys sieboldii* to scavenge to the active oxygen as food resource. In first year of research, is to investigate extracted and identify the new functionally active substance's abilities to utilize against antibacteria or antitumor activities also, to establish cost effective procedure for functionally active substance through applied

technology. In second year, the research's focal point is to experiment on the possibility of mass isolation, purification and estimation of stability of active substance. As well, the conceivable functional activities and its effects on the biological operatives. The final approach would consist of producing protocol for the industry standard models, cost-effective products, food resource, and initiate to produce final sale product.

IV.Result of research and it propose for application

The major aims for this project is to contribute the development of a new functional food resources not only generate from *Stachys sieboldii* but also the purification of useful elements from other wild plants by develop new functional activity from *Stachys sieboldii*. This project can offer the useful basic for the biotechnology and engineering. By establishing such an advance biotechnology can assist and open the possibilities for the international targeted markets for our products in under strict WTO regulations.

Furthermore, the result of this experiment can lead into producing health-related product for such symptoms as oxidative stress, especially for the elderly and health problematic patients. This is domestic's unknown field as well, its in process of being patented as we speak. By exploring the capable possibilities can lead into farming industry's positive economical boom. When the researchand development come to conclusion, we are planning to market the product to the mass.

Content

Chapter 1. Outline of research development project.....	13
1. Aims of research development.....	13
2. Necessity and categories of research development.....	13
Chapter 2. The present conditions of domestic or outside the country for research development.....	18
Chapter 3. Contents and results of research project.....	18
1. Preface.....	20
2. Antimicrobial activity of extract of <i>Stachys sieboldii</i>	20
1) Material and method	21
2) Extraction of sample.....	22
3) Minimum inhibition concentration(MIC) of fraction.....	22
4) Is antibacterial activity of extract.....	22
5) Measurement of β -galactosidase activity.....	24
3. Scavenging activity of active oxygen by superoxide dismutase(SOD).....	25
1) Material and method.....	26
a) Material.....	26
b) Animal experiment and composition of diets.....	26
c) Measurement of superoxide dismutase(SOD).....	26
d) Measurement of peroxide value(POV).....	26
e) Measurement of lipid peroxide.....	27
4. Inhibitory effect of oxidative stress by extraction of <i>Stachys sieboldii</i> ..	27
1) Materials and method.....	28
a) Composition of diets.....	28
b) Measurement of cholesterol level.....	28
c) Measurement of cell membrane fluidity.....	29
d) Quantitative test of basic and derived free oxygen radical.....	29
e) Analysis of oxidative stress.....	29
5. Antioxidative activity of <i>Stachys sieboldii</i> extracts for human LDL.....	30
1) Antioxidative activity of LDL.....	30
a) Separation of human LDL.....	30
b) Cultivation of macrophage.....	30

c) LDL oxidation by mediated metal.....	31
d) Measurement of thiobarbituric acid reacting substance(TBARS).....	31
6. Research result of antimicrobial activity by <i>Stachys sieboldii</i>	32
1) Fraction yield of organic solvent fraction obtained from <i>Stachys sieboldii</i>	32
2) Screening test of ethanol fraction.....	32
3) Screening test of fractions.....	32
4) Minimum inhibition concentration of microbials.....	34
5) Inhibition of growth spectrum.....	34
6) Antimicrobial activity of 1st column chromatography fraction.....	35
7) Antimicrobial activity of 2nd column chromatography fraction.....	36
8) Antimicrobial activity of 3rd fraction.....	39
9) Cell changes of cell morphology.....	41
10) Activity of β -galactosidase.....	41
11) Stability of thermal and pH.....	41
7. Result of SOD activity of <i>Stachys sieboldii</i>	44
1) SOD activity.....	44
2) Inhibition of lipid peroxide.....	44
3) Activity of antioxidative enzyme system.....	46
8. Inhibition effects of oxidative stress.....	51
1) changes of contents of liver cholesterol.....	51
2) Estimation of cell membrane fluidity.....	52
(1) Membrane fluidity.....	52
(2) Estimation of basic or derived oxygen free radical.....	53
(3) Inhibition effect of lipid peroxide.....	54
9. Antioxidative activity of human LDL.....	56
1) Antioxidative effect of human LDL.....	56
2) Electrophoretic mobility of LDL.....	56
3) Comparison of antioxidative activity.....	58
10. Antitumor effect of <i>Stachys sieboldii</i>	58
1) Prefaces.....	60
2) Materials and method.....	61
3) Material.....	61
4) Preparation of <i>Stachys sieboldii</i> extraction.....	62
5) Animal experiment.....	62

6) Animal diets.....	62
7) Measurement of growth of normal cells.....	62
8) Cytotoxicity of cancer cell or normal cells.....	62
9) T-lymph.....	62
10) Measurement of nitric oxide.....	62
11) measurement of tumor necrosis factor.....	62
12) Measurement of fluorrasent microbials.....	62
13) Tumor respiratory test.....	62
11. Antioxidative activity of root of <i>Stachys sieboldii</i>	63
1) Material and Method.....	63
2) Material.....	64
3) Extraction of <i>Stachys sieboldii</i>	64
4) Measurement of total phenols.....	64
5) Hydrogen donor by DPPH.....	64
6) Measurement of inhibition of lipid peroxide.....	65
7) Measurement of nitrite scavenge.....	65
8) Isolation by column chromatography.....	65
12. Results of anticancer or immuno modulator by <i>Sachys sieboldii</i>	66
1) Effect of cell growth.....	66
2) Effect of T-lymph.....	67
3) Effect of No ; TNF-a production.....	69
4) Effect of tumor respiration.....	70
13. Results of antioxidation.....	71
1) Yield of extraction of <i>Stachys sieboldii</i>	70
2) Antioxidatively activity by DPPH.....	72
3) Inhibition effect of lipid peroxide.....	73
4) Scavenging effect of nitrite.....	74
5) Separation of fraction by column chromatography.....	75
6) Antioxidative activity of substance by column chromatography.....	76
7) Chemical structure of fraction.....	80
Chapter 4. Achievement degree of aims and relative contribution.....	86
Chapter 5. Utilization plan of research results.	88

Chapter 6. Abroad scientific information by research development process..88

Chapter 7. References.....89

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	13
제 1 절 연구개발의 목적.....	13
제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위.....	13
제 2 장 국내의 기술개발 현황.....	18
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과.....	20
제 1 절 서론.....	20
제 2 절 초석잠 추출물의 항균 활성.....	21
1. 재료 및 실험 방법.....	22
가. 재료.....	22
나. 시료의 추출.....	22
다. 분획물의 미생물에 대한 생육저해효과	24
라. 초석잠 추출물의 1차 항균효과.....	25
제 3 절 초석잠 추출물의 활성산소 소거능.....	26
1. 재료 및 실험 방법.....	26
가. 재료.....	26
나. 실험 동물 및 사료 조성.....	26
다. Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정.....	26
라. Peroxide value(POV) 측정.....	27
마. 지질과산화 측정.....	27
제 4 절 초석잠 추출물의 산화스트레스 억제 효과.....	28
1. 재료 및 실험 방법.....	28
가. 조제사료의 조성.....	28
나. 콜레스테롤의 함량 측정.....	29
다. 세포막 유동성의 측정.....	29
라. 기초 및 유도산소라디칼의 정량.....	29
마. 산화적 스트레스의 분석.....	30
제 5 절 초석잠 추출물의 LDL에 대한 항산화 활성.....	30
1. LDL의 수식에 대한 항산화 작용.....	30
가. 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리.....	30
나. Macrophage의 분리와 배양	30
다. LDL의 금속유도에 의한 산화.....	30
라. Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정.....	31

마. Diene conjugation의 측정.....	31
바. 단백질의 정량.....	31
사. 통계 처리.....	31
제 6 절 초석잠 추출물의 항균 활성의 연구 수행 결과.....	32
1. 초석잠 및 에탄올 추출물의 유기용매 분획별 수율.....	32
2. 초석잠 및 에탄올 추출물의 항균검색	32
3. 초석잠 및 분획물의 항균성 검색.....	32
4. 초석잠의 및 분획물의 최소 저해 농도 및 생육 저해 효과.....	34
5. 시험 대상균주의 생육저해 스펙트럼.....	34
6. 초석잠 및 핵산 분획물의 1차 column chromatography 소획분들의 항균 효과	35
7. 초석잠 및 핵산 분획물의 2차 column chromatography로 부터 얻은 소획분들의 항균 효과.....	36
8. 초석잠의 핵산분획물의 3차 PTLC 후 얻은 소획분들의 항균효과	39
9. F7-2-5 획분 처리시 세포의 형태변화	41
10. β -galactosidase 활성측정.....	41
11. 초석잠 및 분획물의 열 및 pH 안정성.....	41
제 7 절 초석잠 추출물의 SOD 활성의 결과.....	44
1. SOD 활성 비교.....	44
2. 과산화 지질의 억제효과.....	44
3. 항산화계 효소의 활성.....	46
제 8 절 초석잠 추출물의 항산화 스트레스 억제 효과.....	51
1. 간장 콜레스테롤 함량의 변화.....	51
2. 세포막 유동성의 평가.....	52
가. 세포막 유동성(membrane fluidity : MF).....	52
나. 기초 및 유도산소라디칼의 평가.....	53
다. 과산화 지질의 생성 억제 효과.....	54
제 9 절 초석잠 추출물의 LDL에 대한 항산화 활성.....	56
1. 초석잠 추출물의 사람 LDL에 대한 항산화 효과.....	56
2. LDL의 산화에 따른 electrophoretic mobility.....	58
3. 초석잠 추출물과 다른 항산화제와 비교.....	58
제 10 절 초석잠 추출물의 항암 및 면역 효과.....	60
(협동과제: 초석잠으로부터 활성산소소거 물질의 분리)	
1. 서 론.....	60
2. 재료 및 방법	61

가. 재료.....	62
1) 초식잡 추출물의 조제.....	61
2) 실험 동물.....	61
3) 초식잡 추출물의 마우스에 대한 공급.....	61
4) 정상 면역 세포의 증식에 미치는 초식잡 잎 추출물의 영향 측정.....	62
5) 암세포 및 정상면역세포에 대한 세포독성 측정.....	62
6) T림프구 아형.....	62
7) 대식세포에 의한 Nitric Oxide (NO) 생산 측정.....	62
8) Tumor necrosis factor(TNF)의 역가 측정.....	63
9) 대식세포의 탐식능 측정.....	63
10) 흑색종 세포 (B16F10)의 폐전이 실험.....	63
제 11 절 초식잡 뿌리 추출물의 항산화 활성.....	63
1. 재료 및 방법.....	62
가. 재료.....	63
나. 시료의 추출.....	64
1) Total polyphenols 과 flavonoids 함량 측정.....	64
2) DPPH에 의한 수소 공여능 측정.....	64
3) 과산화 지질 형성 억제능 측정.....	65
4) 아질산염 소거능 측정.....	65
5) 칼럼 크로마토그래피.....	65
6) 박층 크로마토그래피.....	65
7) 기기 분석에 의한 구조 확인.....	66
제 12 절 항암 및 면역효과 결과 및 고찰.....	66
1. 초식잡 추출물이 세포증식에 미치는 영향.....	66
2. 초식잡 잎 추출물 투여가 T세포아군의 변화에 미치는 영향.....	68
3. 초식잡 추출물이 복강대식세포의 NO 및 TNF- α 생산에 미치는 영향.....	69
4. 초식잡 추출물이 암세포의 폐전이에 미치는 영향.....	70
제 13 절 항산화 활성에 대한 결과 및 고찰.....	71
1. 초식잡 메타볼 추출물의 수율.....	71
2. DPPH에 의한 항산화 활성도 측정.....	72
3. 과산화 지질(linoleic acid) 형성 억제능 측정.....	73
4. 아질산염소거능 측정.....	74
5. 박층 크로마토그래피를 이용한 칼럼 크로마토그래피 분획물의 분리.....	75
6. 칼럼 크로마토 그래피를 이용한 에틸아세테이트 추출물의 분리 및 항산화 활성 측정.....	76

7. 기기분석에 의한 구조확인.....	80
제 4 장 연구개발 목표의 달성도 및 관련분야에의 기여도.....	86
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	88
제 6 장 해당사항 없음.....	88
제 7 장 참 고 문 헌.....	89

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 국민의 식생활 및 의식의 급격한 변화와 WTO 출범등 국제 환경의 변화에 대처하고 국민 보건 증진이라는 궁극적 목표를 달성하기 위한 목표의 일환으로 세계적으로 급속하게 연구가 진행되고 있는 신기능 식품소재를 이용한 생활습관병의 예방과 치료를 목적으로 하는 신기능성 건강 보조식품을 개발하고자 한다. 지난 수십년간 고도 경제성장과 산업사회로의 급속한 진전은 우리의 식생활 패턴을 크게 변화시키고 있다. 이러한 변화는 식품 소비구조의 전환을 초래하였고 식품 소비 성향도 고급화, 다양화되고 편의성, 안정성에 대한 선호도가 증가하고 있으며 건강 지향성으로 의식 변화가 일어나고 있다. 건강 보조식품의 개발도 1970 ~ 1980년에는 옛날부터 전래되어 오는 경험을 이용한 식품성분 자체를 가공한 건강보조식품이 많았으나 1990년대부터는 생명공학의 기법을 이용한 새로운 기능을 가진 생리활성물질로 고혈압, 당뇨병, 암, 동맥경화 등 생활습관병은 물론이고 각종 질병의 예방식품이 개발되고 있어 이러한 건강 식품 산업은 경제적으로 차지하는 비중이 높다. 우리나라의 식품산업은 연간 매출량의 3위이며 미국의 경우에는 국민 총생산량의 약 20%에 해당하는 거대시장을 가지고 있는 분야이다. 그 중 건강보조식품의 시장 규모는 1999년을 기준으로 매출액은 우리나라는 7천억, 일본은 6천억엔 그리고 미국의 경우 45억달러로 그 성장율은 매년 30%이상 증가하고 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

인간은 산소를 이용해서 생명활동에 필요한 에너지를 얻어 살아가고 있다. 산소는 사람을 포함한 호기성 생물의 생존에 필요 불가결한 요소로 경우에 따라 반응성이 높은 활성산소를 생성한다. 일상생활이나 그릇된 식습관으로 산화 stress(oxidative stress)을 받아 과잉으로 발생한 활성산소가 생체 방어계에 의하여 소거되지 않은 경우에는 활성산소에 의하여 장애가 발생한다. 즉, 산화적 스트레스로 활성산소 유리가 발생하여 발암, 동맥경화, 당뇨병등 각종 생활습관병이나 노화라는 질환이 발생한다.

현재 우리가 살아가고 있는 현대 사회에서 모든 사람들은 스트레스를 받고 살아가고 있다. 많은 의학 전문가들은 모든 질병의 원인은 산화적 스트레스에 의하여 발생한다고 주장하고 있다.

우리 인체는 방어 시스템에 의하여 활성산소 소거기능이 있다지만 스트레스에 의해

발생하는 활성산소의 폐해를 예방하기 위해서는 비타민 E나 카로테노이드, 플라보노이드 등이 풍부히 들어 있는 황록색 야채를 충분히 섭취하면 활성산소가 소거된다. 이러한 성분은 생체내 항산화 물질로서 활성산소의 생성을 억제하는 작용을 한다

이러한 배경에서 특히 주목되고 있는 것이 식물 성분 중 산화적 스트레스로 인한 활성산소의 생성을 억제하고 소거 기능을 가진 신기능성 물질이다. 지금까지 대부분의 연구는 비타민 A, C, E에 집중되었으나, 최근에 이르러 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통하여 야채, 다류, 적포도주에 함유된 flavonoides, 특히 flavon-(3)-ol 등 그 유사 물질이 생체내에서 강력한 활성산소 소거작용이 있다는 것이 알려졌다.

본 연구는 농민의 소득증대를 극대화하고, WTO 개방시대에 식품산업의 국제경쟁력 확보와 국민의 건강 증진을 최종목표로 정하여 신기능성 성분을 다량 함유하고 있는 유용식물을 재배하여 식품의 신소재로 개발하고자 한다. 유용식물 중 재배가 쉽고 효능이 뛰어난 초석잠(草石薺, 일명 식물의 동충하초)을 원료로 사용하였다. 초석잠은 1년생 풀로서 동충하초와 모양이 비슷하고 약효도 비슷하여 식물의 동충하초라고 불리기도 하며 우리나라 남부 지방에서 자생하는 특용 작물이지만 잘 알려지지 않아 방치되고 있는 실정이다. 초석잠은 중국의 중앙편에 의하면 뇌경색, 기억력 증진, 노인성 치매와 장을 강화하는 장수채(長壽菜)로서 옛날부터 애용해 왔다. 일본에서도 정월 요리에 귀하게 쓰이기도 하고 여러 가지 생활습관병과 만성병 치료에 유용하게 쓰이기도 하였다. 초석잠의 성분중 탄수화물은 감자와 같은 전분이 아니라 올리고당으로 장속의 유익 세균의 생육을 도와 장의 기능을 촉진하기도 한다.

중국 서적에 소개된 초석잠의 효능을 보면 맛이 달며 담백하고 독이 없어 몸을 쫓고 어혈, 적혈을 풀며 기를 내리게 하고 신체의 조화를 이루게 하여 무병장수에 기여한다고 기록되어 있다. 또 사지무력증, 마비증, 진신 골절통, 관절염, 신경통 등을 치유하고 초석잠 즙액으로 눈병을 낫게 하고 간을 좋게 하는 작용이 있어 황달을 낫게 한다.

본 연구의 개발목표는 초석잠을 이용하여 산화적 스트레스로 인하여 발생하는 유해한 활성산소를 제거하는 신기능성 식품소재를 개발하는 것으로 궁극적으로는 농가 소득 증대를 보장하는 것이다. 이 목표를 달성하기 위하여 아래와 같이 5가지의 내용을 세웠다.

유해한 활성산소 소거능, 항균, 항암효과가 있는 성분을 초석잠으로부터 분리 확인하여 선도물질(leading substances)을 도출하였다. 초석잠에서 도출된 선도물질을 신기능성 식품소재로 개발하여 리딩 상품(leading goods)으로 기능성 식품의 판매시장에 정착시킨다. 초석잠을 이용한 신기능성 고부가가치의 제품으로 자원화 활용 시스템을 구축 한다. 초석잠의 이용 극대화로 농촌에서 쉽게 재배하여 이를 활용하여 실용화함으로써 농가의 수익을 최대한 보장할 수 있도록 한다.

초석잠은 우리 나라 산야에 쉽게 재배가 가능하므로 전국 농가에서 재배하여 농가소

득을 증대시킬 수 있고 원료를 쉽게 구입할 수 있는 잇점이 있다. 초석잠을 이용하여 가공 적성을 알아보고 이를 이용하여 산화적 스트레스로 인하여 발생하는 유해한 활성산소를 소거하는 소거제(super oxygen dismutase (SOD))로서 신기능 신소재와 천연항균제, 항암효과 및 안정성도 검토하여 식용 가능성을 확인하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

생체내에서 산화 스트레스로 생산되는 활성산소, 즉 일중항산소(一重項酸素) super-oxide OH radical 등의 활성 산소종은 최근 주목받고 있는 NO 유래의 ONOO-도 함유하는 넓은 의미의 free radical이 생체 손상의 원인으로 알려졌다.

산화 스트레스에 의하여 발생하는 활성 산소는 체내에서 과잉으로 생성되면 반응성이 높은 유리기가 생성되어 세포벽에 과산화지질이 생성된다. 생성된 과산화지질은 세포의 유동성이 변화되고 막기능이 저하되어 세포막의 효소의 활성이 감소된다. 결국 세포막이 파괴되고 세포로부터 방출된 지질 과산화물은 혈청내 과산화지질의 농도가 급격히 증가하여 생체성분인 지질, 단백질 및 핵산 등이 손상을 받게된다. 손상 받은 세포가 회복되지 못하고 축적되어 한계에 달하면 산화 스트레스에 의하여 발생하는 활성산소 때문에 생활 습관병이라는 질병의 원인이 된다.

문제는 세포막의 주요한 구성 성분에는 인지질, 과산화하기 쉬운 불포화지방산이 있다. 활성 산소등 유리기가 연쇄반응을 일으켜 「생체 지질 과산화 반응」이 진행되어 반응성이 높은 free radical이 단백질, 효소, 핵산 등의 생체 구성 성분을 계속적으로 공격해서 산화적 손상에 의하여 최종적으로는 암, 동맥경화, 허혈성 심장질환, 치매 및 파킨슨병, 면역력 기능 저하 등 질병이 발병하며 최근에는 당뇨병성 합병증도 발병한다.

산화적 스트레스에 의한 활성산소를 소거하기 위하여 유용식물을 응용하거나 섭취함으로써 유용물질들이 lipid peroxide나 유리기들에 의한 tissue damage를 예방할 것이라고 여겨졌다. 그러나 α -tocopherol, ascorbic acid, β -carotene와 같은 천연 항산화제들을 매일 복용하여도 유리기로 유발되는 질병을 예방하는 데에는 큰 효과를 바라긴 어렵다. 그러므로, 더 새롭고 효과적인 antioxidant들을 찾는 것이 시급하다. 그 반면에 식물에 들어있는 특수성분들은 활성산소 소거능력이 *in vitro*와 *in vivo* 실험들로 증명되고, isoflavonoids가 강력한 항산화성을 갖는 대사물을 생산하는 것으로 알려졌다. 다양한 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 polyphenol의 항산화 효과를 실험한 보고가 있다. 예를 들어, 초기실험을 통하여 polyphenol 화합물들이 ADP-ascorbic acid와 ADP-NADPH이 각각 실험 쥐의 간 미토콘드리아와 마이크로솜에서 lipid peroxidation을 매우 억제하는 것을 알 수 있었다. 대부분의 polyphenol 들이 α -tocopherol보다 더 우수한 억제효과를 나타내었다.

2-azo-bis-isobutyronitrile을 photo-irradiation하여 methyl linoleate를 autooxidation 시키는 동역학 연구를 통하여 polyphenol의 억제효과가 ascorbic acid나 α -tocopherol보다 더 오래 지속되는 것을 알 수 있었다. Isoflavonoids등은 생체내에서의 기능성에 관한 연구는 많이 없으나 최근에는 많은 연구가 진행되고 있으며 식품내의 각종 유기물은 섭취 후 생체내의 동향에 관하여 분자 수준에서 연구

가 요구된다. 요즘 임상적으로 응용하는 항산화 식품의 분자설계가 일부 이루어지고 있으나 식품이라는 개념의 범위내에서 기능성을 갖는 중요성을 과학적으로 증명하여 매일 식생활로 일어나는 산화적 손상으로부터 우리 몸을 보호하여 산화 스트레스의 원인이 되는 질병인 암, 동맥경화, 당뇨병 합병증, 허혈성 심장질환 및 알츠하이머증 등은 신기능성 신소재 식품으로 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

최근 미국의 유명 대학에서 발표한 식생활 지침을 보면 선진국의 육류 중심의 식단에서 “아시아의 전통적인 식생활은 건강한 식생활의 본보기”라고 강조한 것을 보면 현재 우리의 맹목적인 서구식 위주의 식생활은 암, 고혈압, 동맥경화, 치매, 골다공증, 류머티즘 등 생활습관병을 유도하는 것으로 추정된다. 인간이 무병 장수하려면 건강해야 한다. 그런데 인체의 건강은 여러 가지 기능의 균형 속에서 이루어지는데, 그 조건은 수없이 많지만 가장 큰 비중을 차지하는 것이 식생활이다. 식생활을 통한 장수 체질의 개선을 위해서는 균형 잡힌 식생활, 금연, 운동, 과식 금지 등을 들 수 있다.

기능성 건강식품에 대한 관심 고조, 재배기술의 향상 그리고 국산 재료의 선호도 증가 등으로 이들 제품의 생산 및 유통은 앞으로 크게 증가할 것으로 예측하고 있다. 현재 건강 식품의 시장은 7,000억 규모이나 앞으로 계속 신장할 것이다.

이러한 유용식물의 유효성분을 동정하고 특성을 연구 개발하면 식품의 신소재나 대체 의약품으로서 개발이 가능하다. 그러므로 옛날부터 입으로 전해 내려오는 효능을 과학적이고 체계적으로 확립하여 우리의 유용식물을 세계화에 크게 기여할 것이다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

(세부과제: 초석잠으로부터 신기능성 식품소재의 실용화 기술)

제 1 절 서 론

산소는 지구라는 호기성(好氣性) 환경에서 생활하는 모든 동·식물에는 필요 불가결한 물질이지만 과잉의 산소에 의하여 야기되는 산소독(酸素毒)은 노화나 암 등 질병의 원인으로 알려져 있다. 대기 중에 존재하는 산소는 삼중항 산소(三重項 酸素)라고 부르는 물질로서 호흡을 통하여 1일 500L 정도로 대량 섭취하는데 이 산소 중 불과 몇 %의 산소는 활성 산소라고 하는 반응성이 높은 물질로 변화된다. 이 활성 산소는 병원균, 바이러스를 살균하는 물질로서 생체 방어의 입장에서 중요한 생리적 역할을 하고 있다. 그러나 활성 산소가 환경 오염 물질, 대사 이상, 광화학 반응 및 체내 효소계 등 각종 요인에 의하여 superoxide radical(O_2^-), hydroxy radical(OH^\cdot), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlelet oxygen, NO 유래 ONOO⁻ 및 microperoxidase에 의하여 생성되는 OCI 등을 함유한 유리기가 생체에 치명적인 산소 독성을 일으킨다[1,2,3]. 활성 산소에 의하여 산화적 손상으로 세포 구성의 주요 성분 등 생체 내 지질산화 반응이 진행되어 반응성이 높은 유리기가 단백질과 당, DNA, 효소 등에 대하여 비 가역적, 비 선택적으로 공격을 함으로써 암을 비롯한 동맥경화, 허혈성 심장 질환, 뇌졸중, 파킨슨병, 면역 질환 등 각종 질병을 유발한다[4,5,6,7].

이러한 세포내의 산화 스트레스에 의하여 만성 당뇨병의 합병증이 유발되고[8], 특히 인슐린 비 의존성 당뇨병은 가속성 동맥 경화증으로 주요 사망 원인이 된다[9]. 그리고 동맥 경화증의 원인으로 유리기에 의한 low density lipoprotein(LDL)의 산화, 지방괴(fatty streak)가 생성되어 혈관 내피 세포 부위의 섬유화, 혈소판 응집에 의한 포말세포(foam cell)가 형성되어 동맥 경화증을 유발한다[9,10]. 이와 같이 지구상에 존재하면서 산소를 이용하는 모든 생물체는 산소의 산화에 의한 조직 손상에 항상 노출되어 있어 활성 산소로부터 스스로 보호하기 위한 방어 시스템을 가지고 있다.

우리 인체는 방어 시스템에 의하여 활성산소 소거기능을 하지만 다른 한편으로는 비타민 E나 카로테노이드가 풍부히 들어 있는 황록색 야채를 충분히 섭취하면 활성 산소가 소거된다. 이러한 배경에서 특히 주목되고 있는 것이 산화적 스트레스로 인한 활성산소의 생성을 억제하고 소거 기능을 가진 신기능성 물질이다.[11]

인간의 질병에 대한 예방과 체질개선을 위한 일상생활에서의 항산화 음식과 음료

수의 섭취는 큰 주목을 받고 있다. 많은 천연 항산화물질 중에서도 polyphenol 화합물에 속하는 녹차, 포도(주), 야채류, 견과류 및 약초는 강한 활성산소 유리기 소거능력과 항암, 항동맥경화, 노화억제로 각별한 관심을 끌고 있다.

이러한 신기능성 물질은 산화적 스트레스에 의한 활성산소를 소거하기 위하여 유용식품을 응용하거나 섭취함으로써 유용물질들이 lipid peroxide나 유리기들에 의한 tissue damage를 예방할 것이라고 여겨졌다. 그러나 α -tocopherol, ascorbic acid, β -carotene와 같은 천연 항산화제들을 매일 복용하여도 유리기로 유발되는 질병을 예방하는 데에는 큰 효과를 바라긴 어렵다. 그러므로 더 새롭고 효과적인 신기능성 물질을 찾는 것이 시급하다. 최근에 식물에 들어있는 특수성분들은 활성산소 소거능력이 *in vitro*와 *in vivo* 실험들로 증명되고 있고 신기능성 천연물질은 섭취 후 생체내의 동향에 관하여 분자 수준에서 연구가 요구된다.

활성 산소에 의하여 생성되는 유리기를 소거하는 것으로는 SOD(superoxide dismutase), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPX)와 같은 항산화 효소 등이 있고, 항산화 물질로는 비타민 C[12], E[13], ubiquinone[14], polyphenol, flavonoids[15]등이 알려져 있다

특히 SOD는 유리기를 형성할 수 있는 전구물질들의 불활성 유리기의 생성을 억제시키거나, 유리기를 직접 소거하여 분자상 산소에 의한 유리기 연쇄 반응을 차단하는 작용을 한다.

우리가 매일 먹고 있는 식품 중에도 생체의 산화적 손상으로부터 보호할 수 있는 성분들이 많이 들어 있다. 특히 유용식품에는 영양 성분 이외에 각종 기능성 성분들이 많이 함유되어 있다. 유용식품의 플라보노이드인 genistein은 superoxide anion의 형성을 억제하여 과산화수소를 소거하는 작용이 있고[16], UV 조사나 Fenton 반응 시스템에서 DNA의 8-hydroxy-2-deoxyguanosine(8-OHdG)의 생성을 억제하여 항암 작용에 관여한다[17].

그외에도 유용식품 성분에 들어있는 chlorogenic, ferulic acid 및 *p*-coumaric acid 등이 상당한 항산화 효과가 있는 것으로 알려졌다[18].

이러한 관점에서 본 연구는 산화 스트레스로 인하여 발생하는 활성산소에 의하여 야기되는 질병에 대처하기 위하여 예로부터 알려져 내려오는 초식감을 재료로 하여 각종 세균에 대한 항균효과(그람양성, 음성 세균에 대한 MIC, 증식억제, 열 및 pH의 안정성, 활성산소 소거효과(SOD 활성, catalase 활성), LDL에 대한 항산화 효과, 항산화 스트레스 작용과 항암효과(인체의 암세포 3종)등에 대한 연구를 수행하였다.

제 2 절 초식감 추출물의 항균 활성

1. 재료 및 실험 방법

가. 재료

경남 밀양시 산외면 다원에서 직접 재배하여 사용하였다.

나. 시료의 추출

1) 추출물의 조제

초석잠 잎의 추출은 환류 냉각관을 부착시킨 flask내에 500g의 시료를 넣고 시료중량의 10배량의 75% 에탄올을 가하여 60℃의 수욕상에서 12시간동안 2회 반복 추출한 후 감압여과장치로 여과하였다. 여액을 rotary vacuum evaporator (Eyela N-N-series, Japan)를 사용하여 농축하고 이를 동결건조한 후 밀봉하여 4℃의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 초석잠 에탄올 추출물의 유기 용매별 분획

75% 에탄올 추출물을 극성이 다른 용매를 이용하여 단계적으로 분획하였다. 에탄올 추출물과 hexan, 물을 1:10:10의 비율로 혼합하여 추출 분획한 후 rotary vacuum evaporator로 농축하여 hexan 분획물을 얻었다. 물층 분획은 다시 분획여두에서 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물층 분획물을 얻은 후 사용하였다. Fig. 1

3) 사용균주 및 분획물의 항균력 검색

가) 항균시험에 사용된 균주 및 배지는 Table 1과 같다. 항균실험은 paper disc method를 이용하였다. 즉, 멸균된 tryptic soy agar(TSA, Difco)배지를 petri dish에 15mL 씩 분주하

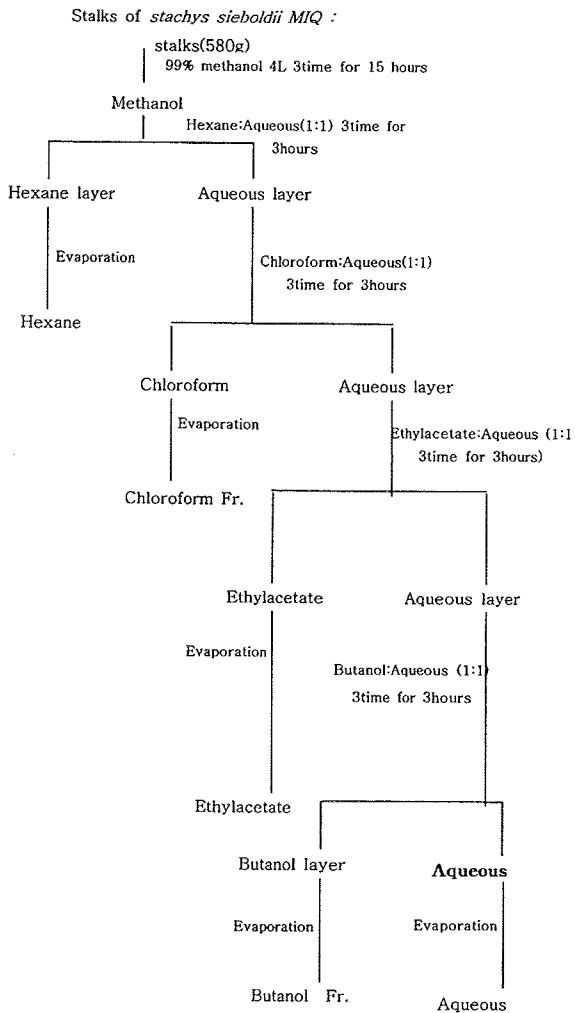


Fig. 1. Flow chart for solvent fractionation of *Stachys*

Microorganisms taste	Media used
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	TSB & TSA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	TSB & TSA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	TSB & TSA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	TSB & TSA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43256	TSB & TSA
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	NB & NA
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33844	NB & NA
<i>Esherichia coli</i> BHR-12	TSB & TSA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSB & TSA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NB & NA

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiment

TSB & TSA : Tryptic soy broth/agar(Difco)

NB & NA : Nuritent broth/agar(Difco)

여 응고시키고, 별도로 tryptic soy broth에서 35℃에서 24시간 전배양한 각종 시험균액을

무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 증충용 배지를 5mL씩 기충용 배지 위에 분주하여 2종의 평판배지를 만들었다. 각 추출물을 멸균된 paper disc에 일정량씩 흡수시킨 후, TSA배지에 올려놓고 난 다음 35℃의 incubator에서 24~48시간 배양하여 disc 주변의 clear zone(mm)을 측정하였다.

다. 분획물의 미생물에 대한 생육저해효과

동결건조한 각 분획물은 dimethylsulf- oxide(DMSO)로 녹인 후 0.2 μ m-membrane filter로 제균하고 농도별로 멸균한 TSB (tryptic soy broth, Difco) 또는 NB(nutrient broth, Difco)에 첨가하여 혼합하였다. 각 시험균의 초기농도를 일정량 조절하여 접종하고 여기에 분획물을 일정농도씩 각각 첨가하여 35℃에서 일정시간 배양하면서 각 시험균별로 1mL를 취하여 Spectrophoto- meter(DR-20, BASUSH & LOMB)를 이용하여 600nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육을 O.D. 값으로 나타내었다.[19]

라. 초식잠 추출물의 1차 항균효과

각종 시험 균주를 배양한 사면배지에서 1백금이를 취해 10mL 액체배지에 접종하여 32°C에서 24시간 배양시킨 후 이 배양액 0.1 mL를 다시 10mL 액체배지에 접종하여 32°C에서 24시간 배양하여 균체 배양액을 만들었다. 항균성 시료는 75% 에탄올로 완전히 용해시키거나 필요에 따라 회석한 후 membrane filter(0.2 μ m)로 제균하고 액체배지에 일정량씩 첨가한 후 배양 하였다. 이 배지에 균체 배양액 0.1mL를 접종한 후 32°C에서 일정시간 동안 배양하면서 12시간 간격으로 600nm에서 O.D를 측정하여 증식억제 효과를 실험하였다.

1) 최소저해 농도 측정

최소저해 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 한천 배지 확산 평판법으로 측정하였다. 항균물질을 농도별로 각각 조절한 TSA 혹은 NA를 사체에 넣어 용고 시킨 후 미리 활성화 시킨 각 실험균의 배양액을 접종한 다음 37°C에서 24-48 시간동안 배양하여 증식이 관찰되지 않은 농도로 결정하였다.

2) 초식잠 잎의 항균물질 단일획분의 항균효과

각종 실험 세균을 배양한 사면배지에서 1백금이씩 취해 10mL 액체배지에 접종한 후 32°C에서 24시간 배양하여 균수를 10×10^6 /mL 으로 조절한 후 이 균체 배양액 0.1mL를 정제된 물질이 일정농도로 첨가된 액체배지에 접종하여 32°C에서 72시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 표준평판 한천 배양법에 의해 생균수를 계수하였다.

3) 시료처리에 의한 전자현미경의 관찰

항균활성 물질을 처리한 피검 대상세균의 세포의 변화를 관찰하기 위하여 투과 전자현미경(TEM, Transmission electron microscope, HitachiH-600, Japan)으로 측정하였다. 즉, 배양하여 동결한 미생물 세포의 절취한 부위를 2.5% paraformaldehyde glutaraldehyde(4°C, phosphate buffer, pH 7.2) 고정액에서 2시간 전 고정하고, 완충액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)으로 10분씩 3회 세척한 후, 1% OsO₄(25°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)에서 2시간동안 고정하였다. 고정이 끝난 시료는 동일 완충용액으로 수회 세척한 후 ethanol 농도 상승순으로 탈수했고, propylene oxide로 치환하여 Epon-812로 포매한 다음, 60°C oven에서 36시간 중합반응시켰다. 포매된 조직은 ultramicrotome(ULTRACUTE, Leica)으로 초박절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(TEM, transmission electron microscope, Hitach H600, Japan)으로 관찰하였다.

4) β -galactosidase 활성 측정

세포막 손상정도를 추정하기 위하여 균체 효소인 β -galactosidase(β -D-galactosidase galactohydrolase ; EC3.2.1.23, 이하, β -galacto- sidase)활성을 정량하였다. 공시균주로는 *E. coli*를 이용하였으며, 세포를 파쇄하지 않고, toluene,

chloroform과 초석잠 잎 추출물을 같은 농도로 처리하였고, 기질로써 ONPG(o-nitrophenyl-β-D-galacto-pyrano- side, 4mg/mL)를 첨가하여 반응을 시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 증류수를 넣은 경우를 0으로 하고 toluene을 넣어준 경우를 100으로 하여 초석잠 잎 추출물이 세포막 손상정도를 추정하였다.

5) 열 및 pH 안정성 시험

열 안정성 시험을 위하여 *E. coli* 및 *L. monocytogenes*의 농도를 500 µg/mL으로 조절한 다음, 처리온도 40, 60, 80, 100, 120, 180°C에서 30분 동안 열처리한 후, 처리 온도별로 paper disc법을 이용하여 실험하였다. pH 안정성은 분획물을 500 µg/mL 농도가 되게 조절한 다음, buffer 용액을 이용하여 pH를 4, 6, 7, 8, 10으로 각각 처리한 후 35°C에서 1시간 방치한 다음 다시 pH 7로 중화시켜 열 안정성 시험과 같은 방법으로 생육 저해환을 측정하였다.

제 3 절 초석잠 추출물의 활성산소 소거능

1. 재료 및 실험 방법

가. 재료

경남 밀양시 산외면 다원마을에서 재배하여 사용하였다.

나. 실험 동물 및 사료 조성

본 실험에 사용된 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 rat는 화학 연구소에서 분양받아 2주 이상 실험 사육장의 환경에 적응시킨 후 7마리씩 4군으로 나누어 삼양 유지의 기본사료(control group)로써 사육하면서 대두 발효식품 농축액을 SD계 rat에 하루 200 및 500 mg/kg씩 각각 사료에 첨가 하여 사육하였다. SD 수컷 rat는 몸무게 200~220 g의 암컷, 8주령 되는 것을 사용하였고, 동물 사육실은 항온 항습 (22±2°C, 65±2% RH)하에서 삼양유지의 마우스용 pellets 사료를 주었으며, 물은 자유롭게 먹게 하고, 12시간 cycle의 조건하에서 실험하였다.

다. Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

SOD의 활성 측정은 Fridovich 방법[20]에 준해서 측정하였다. Xanthine/xanthine oxidase 반응으로 생성된 superoxide anion에 의해 cytochrome c가 환원되는 것을 측정하였고, SOD에 의하여 superoxide anion의 양이 감소하여 cytochrome c의 변화 속도가 감소하는 것으로 SOD 활성을 측정하였다.

Cytochrome c, 38 mg, 2 µM xanthine 10 mL(0.001 N NaOH), 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.8, 0.1 mM EDTA)100 mL를 혼합한 기질액 2 mL에 희석한 시료를 넣고 2분간 안정화 시킨 후 xanthine oxidase (0.2 unit/mL, 0.1 mM EDTA) 50 µL를 cuvette에 넣고 혼합하여 spectrophotometer(UV-2100, Shimazu co. Japan)

를 이용하여 550 nm에서 2분간 흡광도를 측정하였다.

라. Peroxide value(POV) 측정

시료의 지질 과산화물 생성 억제 효과를 linoleic acid를 기질로 사용하여 Nose의 방법[19]에 따라 POV를 측정하였다. Linoleic acid 100 μ L와 각 시료(5 mg/mL) 10 μ L를 1.6cm \times 6cm의 시험관에 넣어 50 $^{\circ}$ C 항온기에서 24시간 저장하여 산화를 촉진시킨 후 chloroform/acetic acid(2:3, v/v) 35 mL를 첨가하고 1분간 격렬하게 혼합한 후 암소에서 5분간 방치시키고, 여기에 증류수 75 mL와 진분 시액 1 mL를 첨가하고, 0.01 N sodium thiosulfate 용액으로 요오드를 역적정하여 POV를 측정하였다.

마. 지질과산화 측정

1) 원위 간 microsome 분획의 조제

원위의 간을 0.15 M KCl로 perfusion한 후 적출하여 잘게 자른 후 미리 냉각시킨 4배 용량의 완충 용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4)을 넣고 균질기를 이용하여 조직을 균일화하였다. 이것을 8,000 $\times g$ 로 15분간 원심 분리한 후 상정액을 다시 10,000 $\times g$ 로 20분간 원심분리하여 절편을 제거하였다. 1시간 원심 분리한 후 침강한 pellet을 균질화 용액에 현탁 시키고 100,000 $\times g$ 로 다시 한번 원심 분리하여 침강한 pellet을 microsome 분획으로 분취하였다. 조제한 이들 분획의 단백질을 정량하고 -70 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하여 사용하였다[21].

2) Fe/ascorbate system 반응액의 조제

시료를 MeOH 1 mL에 용해하여 사용하였다. 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 1.6 mL에 시료용액 0.1 mL, 간 microsome 분획(1 mL 중 1 mg의 단백질 함유) 0.1 mL, 0.1 mM ascorbate 0.1 mL, 5 mM FeSO₄ 0.1 mL를 차례로 가하여 반응액을 조제하였다[22].

3) 생체내에서 항산화 작용에 미치는 영향

사염화 탄소(CCl₄)에 의한 지질과산화 유발 : 원위 1군을 7마리로 하여 두 군은 2주간 시료를 200 mg/kg, 500 mg/kg씩 saline에 녹여서 경구 투여하였고, 두 군은 검액 대신 saline을 투여하였다. 투여 마지막 날 미리 6시간 절식 시키고 corn oil에 용해시켜 CCl₄ 0.4 mL/kg씩 경구 투여하였다. 검액은 투여하지 않고 CCl₄ 만 투여하여 양성 대조군으로 하였고, CCl₄ 및 검액을 투여하지 않고 corn oil만 투여하여 정상 대조군으로 하였다.

4) Catalase 활성 측정

H_2O_2 를 기질로 하여 H_2O_2 를 소모하는 속도를 측정하여 간 microsome의 catalase activity를 측정하였다[23]. 30% hydrogen peroxide 30 μ L를 0.05 M potassium phosphate buffer 5 mL(pH 7.0)에 녹여서 기질로 사용하였고, 효소로 간 microsome 분획을 100배 농도로 희석하여 사용하였다. 0.05 M potassium phosphate buffer(pH7.0) 570 μ L, 기질 330 μ L와 효소원으로 간 균질화물 희석액 100 μ L를 넣고 혼합한 후 240nm에서 10초 간격으로 40초간 흡광도를 측정하였다.

5) 글루타치온 퍼옥시다아제의 활성

간장의 cytosol 획분에서 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase : GSHPx)의 활성의 측정하였다[24]. 시험관에 cytosol에 인산완충용액(0.3 M phosphate buffer with 4.0 mM EDTA, pH 7.2) 0.1mL, 증류수 1,295 mL, 26.56 mM sodium azide 용액 0.5 mL, 294.37 mM GSH용액 60 μ L, 8.4 mM NADPH (35.0 mg NADPH/5.0 mL of 0.3 M phosphate buffer with 4.0 mM EDTA)110 μ L, glutathione reductase 5 mL, 1 mM hydroperoxide 320 μ L를 첨가하여 5초간 잘 혼합한 후, 분광광도계를 사용하여 340 nm에서 흡광도를 15초 간격으로 2분간 측정하여 표준검량선에 의해 GSHPx (IU/g protein)의 활성을 계산하였다.

6) Lipid peroxide 함량 측정

상기의 간 microsome 분획의 균질액에 10 % sodium dodecyl sulfate 용액을 첨가하고 실온에서 30분간 방치한 다음 0.1 M HCl과 0.37 % thiobarbituric acid 용액을 가한 후 혼합액을 끓는 물에서 45분간 반응시킨 후, 냉각하여 부칠 알코올을 가해 혼합하고 1,000 \times g에서 원심분리한 후 상층의 부칠 알코올 층을 532 nm에서 흡광도를 측정하였고, tetramethoxypropane을 표준액으로 사용하여 MDA량을 정량하였다[25].

제 4 절 초석잠 추출물의 산화스트레스 억제 효과

1. 재료 및 실험 방법

가. 조제사료의 조성

실험그룹의 사료조성은 초석잠 분말을 하루에 각각 200 및 500mg/kg BW가 섭취 되도록 0.2% 및 0.4%의 초석잠 분말을 첨가하는 대신 탄수화물을 각각 0.2% 및 0.4%씩 제외하고 조제하였다.

나. 콜레스테롤의 함량 측정

간장조직에서 분획한 mitochondria 및 microsome획분중의 콜레스테롤의 함량은 a-phthaldehyde법으로 측정하여 표준검량선에 의하여 이들 획분중의 콜레스테롤의 함량을 측정하였다.[26]

다. 세포막 유동성의 측정

간장의 mitochondria 및 microsome획분중의 세포막 유동성(membrane fluidity)은 형광 probe로서의 1,6-diphenyl-1, 3,5-hexatriene (DPH)사용에 의한 형광분광법에 따라 측정하였다. 50mM 인산완충용액(PH 7.2, 2750ul), 증류수(250uL), 시료(100uL)를 첨가·혼합하여

37℃ 항온 수조에서 5분간 방치한 다음, prove인 0.167mM 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene, P-toluene-sulfonate(TMA-DPH) 용액을 6.67uL를 첨가 혼합하여 37℃ 항온 수조에서 shaking하면서 30분간 반응시킨 후 37℃을 유지하면서 형광광도계를 이용하여 360nm(excitation)와 430nm(emission)에서 측정하였다.[27]

라. 기초 및 유도산소라디칼의 정량

간장획분에서 산화적 스트레스(oxidative stress)의 유무를 확인하기 위해서 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)을 prove로 이용한 간장세포의 mitochondria와 microsome획분의 기초활성산소(basal oxygen radical : BOR)의 생성량을 측정하였다.[28]

R의 측정은 기저상태와 라디칼 생성을 유도하기 위해 ascorbic acid와 FeSO₄·7H₂O로 자극한 유도상태의 두 가지 조건에서 비교 측정하였다. 기저상태와 라디칼 유도의 경우 모두 시료 500ul를 완충용액(40mM Tris-HCl buffer pH 7.4)으로 10배 희석하고, probe인 5uM DCF-DA (Molecular probe, USA) 12ul를 첨가, 10,000 rpm 8분간 원심분리한다. 잔사를 40mM Tris-HCl 3.0 mL에 녹인 후 라디칼 유도 상태의 경우에는 1mM ascorbic acid (300 ul)와 100 uM FeSO₄·7H₂O(150ul)를 혼합하였고 기저 상태의 경우는 아무것도 첨가하지 않았다. 이후 37℃에서 30분간 반응시킨 후 37℃ 유지하면서 형광 강도의 변화를 형광 광도계를 이용하여 488nm (excitation)와 525 nm (emission)에서 측정하였다. 이 때 분광형광광도의 변화를 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)을 표준품으로해서 표준 검량선에 의하여 생성된 DCF의 양(nmol/mg protein/min)으로 환산하고, 이 양으로써 기초 산소라디칼(vasal oxygen radical : BOR) 및 유도산소라디칼(induced ozygen radical : IOR)의 산소라디칼 생성으로 정량하였다.

마. 산화적 스트레스의 분석

간장 획분증의 과산화 지질의 함량은 분광 광도계를 사용하여 TBA법으로 말론디알데히드(MDA)의 함량을 측정하여 과산화지질(LPO)의 함량을 측정하여 정량하였다.[29] 또한 가장획분으로서 mitochondria와 microsome의 산화단백질(oxidized protein : OP)의 생성량은 carbonyl group의 생성량을 측정하여 OP의 함량을 정량하였다. carbonyl group의 양은 360nm와 370nm사이에 있는 흡광도의 파장에서 분자흡광계수 ($E=22,000$)를 이용하여 계산하였다.

제 5 절 초식잠 추출물의 LDL에 대한 항산화 활성

1. LDL의 수식에 대한 항산화 작용

가. 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리

건강한 남자의 혈액 50mL을 EDTA(1mg/H₂O 50mL)50mL을 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4℃에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분 동안 원심분리(2000×g)하여 분리한 다음 gentamycin sulfate (1mg/H₂O 25mL)1mL을 첨가하였다. 이의 LDL(d. 1.019~1.063g/mL)은 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간 동안 분리하여 얻었다. 분리된 LDL은 0.15M NaCl, 0.01M EDTA가 함유된 0.01M phosphate buffer(pH 7.4) 200mL로서 16~20시간동안 투석하였다.[30]

나. Macrophage의 분리와 배양

Female ICR mice을 CO₂로 질식사시켜 절개한 복부부위에 차게 만든 Dulbecco's phosphate buffered saline(Ca²⁺, Mg²⁺이 없는)을 넣어 세척하여 macrophage을 포집한 후 원심분리 한 다음 혈액을 제거하고 세포만 분리하였다. 이 세포는 불활성화시킨 10% fetal bovine serum과 2 mM/L, L-glutamine, 100 units/mL penicillin 및 0.17 mM/L streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)배지 1mL를 5% CO₂/air 존재하에서 배양하였다. 37℃에서 24시간 배양 후에 신선한 배지로 교환시킨 다음 5% lipoprotein-deficient serum(LPDS), L-glutamine 함유한 DMEM배지에 LDL 또는 Oxid LDL를 적당한 농도로 첨가하여 실험하였다.[31]

다. LDL의 금속유도에 의한 산화

1). Copper mediated 산화

정제한 시료용액(1mg/ ethanol mL)을 2, 4, 6, 8, 10 μ L취하여 LDL(100 μ g protein/mL) 10 μ L, 5 μ M CuSO₄ 5 μ L를 넣고 phosphate buffer saline (PBS)를 넣어

전량을 100 μ l로 한 후 (최종 농도를 20, 40, 60, 80, 100 μ g/mL) 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양하여 LDL의 산화를 조사하였다.[31]

2). Cell-mediated LDL

Macrophages 및 J774의 배양액에 LDL(100 μ g protein/mL) 10 μ l과 시료(1mg/ethanol mL)

8 μ l를 각각 첨가하고 phosphate buffer saline(PBS)를 넣어 전량을 100 μ l로 한 후 5% CO₂ 존재하에서 18시간 배양하여 LDL의 산화 정도를 실험하였다.

라. Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정

LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. LDL(100 μ g protein/mL) 10 μ l이 함유된 각 농도별 배양 혼합액 100 μ l에 20% TCA 1.5ml를 가한 다음 여기에 0.05M NaOH 2mL에 0.67% TBA 1.5mL을 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90 $^{\circ}$ C 수욕상에서 45분간 가열하였다. 이를 10분간 원심분리(2,000 \times g)한 다음 상등액의 형광을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S USA)로서 510 및 553nm에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malondialdehyde (MDA)로서 만들어진 MDA의 표준곡선으로부터 MDA의 nmole로서 나타내었다.[32]

마. Diene conjugation의 측정

LDL이 Oxid LDL로 되므로서 생성가능한 공액 2중결합의 형성을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S USA)로 234nm에서 측정하였다⁷⁶⁾. 즉 LDL(100 μ g protein/mL) 10 μ l, 5 μ M CuSO₄ 5 μ l 및 시료(1mg/mL) 160 μ l를 혼합한 후 PBS(pH 7.4)로 2mL로 희석한 후(최종농도 80 μ g/mL) 37 $^{\circ}$ C에서 210분동안 배양하면서 매 30분 간격으로 7회 측정하였다.

바. 단백질의 정량

단백질의 정량은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry등의 방법에 따라 측정하였다[33].

사. 통계 처리

통계 처리가 필요한 data는 mean \pm SD로서 나타내었다. Data는 각 실험군을 Duncan's multiple range test를 사용하여 통계 처리하였다.[33]

제 6 절 초석잠 추출물의 항균 활성의 연구 수행 결과

1. 초석잠 및 에탄올 추출물의 유기용매 분획별 수율

초석잠 및 에탄올 추출물의 활성성분에 대한 특성을 검토하기 위하여 극성이 다른 유기용매인 hexan, chloroform, ethyl acetate, 부탄올 및 물로 순차적으로 추출하여 분획하였다. 유기용매별 수율은 Table 2에서 보는바와 같이 물로써 추출한 경우 수율이 26.42%로 가장 높았으며, hexan은 9.46%로 둘째 다음이었으며 ethyl acetate, 부탄올의 수율은 각각 5% 정도였고, 반면에 chloroform 추출물의 수율은 4.53%로 가장 낮았다.

2. 초석잠 및 에탄올 추출물의 항균검색

초석잠 및 에탄올 추출물의 미생물의 종류별 항균력을 조사한 결과 Table 3에 나타내었다. 초석잠 및 에탄올 추출물은 1000 µg/disc의 농도에서 *Bacillus cereus* ATCC 13720와 *Streptococcus aureus* ATCC 25923에 대해 19mm의 생육억제대를 나타내었고, *Listeria monocytogenes*에 대해서는 균주별로 18~21mm의 생육억제대를 나타내었다. 그리고 *Escherichia coli* BHR-12 및 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853에 대하여 각각 15mm, *Salmonella enteritidis* ATCC 14028의 경우 18mm의 생육억제대를 나타내어 초석잠 및 에탄올 추출물은 그람 양성 및 음성균에 대해 항균활성이 있는 것으로 확인되었다.

3. 초석잠 및 분획물의 항균성 검색

초석잠의 항균성 물질의 분리 초기 단계로써 에탄올 추출물로부터 hexan, chloroform, ethyl acetate, 부탄올 층으로 순차 분획한 후 각 분획물에 대하여 항균 활성을 실험한 결과를 Table 4에 나타내었다. hexan 분획물에서 강한 항균활성을 나타내었으나 chloroform 분획물에서는 약간의 항균력을 나타내었고 ethyl acetate, 부탄올 및 물 분획물의 경우 모든 대상 실험군에서는 항균활성이 거의 나타나지 않았다.

hexan 분획물은 에탄올 추출물의 항균력 검사시 항균효과가 있었던 모든 대상 균주에 대하여 항균력을 나타내었으며 비교적 그람 음성세균보다 그람 양성세균에 대하여 더 강한 항균 활성을 나타내었다. 그리고 모든 대상 균주들 중에서 비교적 항균력이 높게 나타난 *Listeria monocytogenes*는 균주별로 항균활성의 차이는 보였으나 생육 억제대(inhibition zone)가 14mm 이상이 되는 균주는 ATCC 19111, 43256 및 15114으로 나타내었다. 그람 음성세균에 대한 항균 활성은 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 및 *Escherichia coli* BHR-12 균에 대하여 생육 억제대가 12mm로 나타내어 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853에 비해 다소 항균 활성이 약간 높은 것으로 나타내었다. chloroform 분획물의 경우 그람 음성세균의 경우 hexan 분획물에

비하여 비교적 향균 활성이 떨어짐을 보여주고 있다. 그러나 핵산 분획물이 *Listeria monocytogenes*의 모든 균종별에 따른 향균 활성을 나타내었으나, 클로로포름 분획물에서는 *Listeria monocytogenes* 균주 중 3개의 균주에 대해서만 약간의 향균 활성을 나타내었다. 결론적으로 초석잠 잎의 각종 유기용매 추출물이 초석잠 잎 에탄올 추출물보다 상대적으로 향균활성이 낮게 나타난 것은 추출 분획 과정에서 향균활성 성분이 핵산과 클로로포름 층으로 이동했기 때문으로 생각된다.

Table 2. The fraction yield of solvent fractions extracted from ethanol extracts of *Stachys sieboldii*.

Solvents	Yield(% , w/w)
Hexane	9.46
Chloroform	4.53
Ethylacetate	5.74
Butanol	5.33
Water	26.42
Total	51.48

Table 3. Antimicrobial activity of ethanol extract of *Stachys sieboldii* leaf on microorganisms

Microorganisms ¹⁾	Clear zone(mm)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	20
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 43256	21
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	18
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	20
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15114	18
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	19
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13720	15
<i>Escherichia coli</i> BHR-12	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15

¹⁾ Final cells concentration for each bacterium was approximately 1.0×10^6 cells/mL.

Table 4. Antimicrobial activities¹⁾ of different solvent fractions obtained from *Stachys sieboldii* leaf on test microorganisms

Microorganisms	Solvents	Inhibition zone (mm)				
		Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol	Water
<i>B. cereus</i> ATCC 13720		14	9	ND	ND	ND
<i>S. cereus</i> ATCC 25923		14	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111		14	10	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 43256		14	10	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15113		12	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15114		14	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313		13	9	ND	ND	ND
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028		12	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> BHR-12		12	ND	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		10	ND	ND	ND	ND

¹⁾ Five hundred μg of solvent extracts was absorbed into paper disc (ϕ 8mm) and the diameter (mm) of clear zone was measured.

4. 초식잠의 잎 분획물의 최소 저해 농도 및 생육 저해 효과

초식잠 잎의 용매 분획물에 대한 대상 세균의 최소 저해 농도와 농도에 따른 생육 억제 효과를 조사한 결과를 Table 5 에서 보는 바와 같이 Paper discs 방법을 사용한 결과와 일치 함을 알수 있었다. 에탄올 추출물로부터 얻은 핵산 분획물에서는 *B. cereus* ATCC 13720 와 *L. monocytogenes* 균 중에서 ATCC 43256, ATCC 15113, ATCC 19111 균이 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 생육 억제를 위한 최소 저해농도를 나타내고 있으나 *L. monocytogenes* 15313, 15313, 및 *S. aureus* ATCC25923 및 *S. typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* BHR-12 및 *P. aureginosa* ATCC 27853 균의 최소저해농도는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 클로로포름의 희분인 경우 *L. monocytogenes* ATCC 43256 및 *L. monocytogenes* ATCC 15113 균에서는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로서 최소 저해 농도를 나타내었다. 그 외 에틸 아세테이트, 부탄올 분획물에서는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서는 항균활성이 전혀 나타나지 않았다.

5. 시험 대상균주의 생육저해 스펙트럼

초식잠 잎의 핵산 분획물이 최소 저해농도를 경시적으로 억제하는 스펙트럼을 Fig. 2 에 나타내었다. 생육저해 스펙트럼을 보면 핵산 분획물을 100, 150, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 각각 첨가하여 시간경과에 따른 생육 저해도를 보면 그림 양성균 중 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 핵산 분획물을 첨가한 결과 *B. cereus* ATCC 13720의 경우 균을 접종한 다

음 배양시간의 경과에 따른 억제효과를 보면 100, 150 µg/mL 첨가시 8시간 경과 후 서서히 증식하다가 16시간 이후 부터는 증식억제 효과가 없었으나 250 µg/mL 첨가 시에는 48시간 경과후까지 생육이 억제 되었으며 500 µg/mL 첨가시에는 48시간 경과시까지 증식억제 효과가 있었다.

Staphylococcus aureus ATCC 25923의 경우 핵산 추출물을 100 및 150 µg/mL 첨가시 배양 8 시간 경과시까지의 증식억제 효과가 있었으나 배양시간이 길어질수록 증식억제 효과는 찾아 볼수 없었다. 그리고 핵산 추출물은 250 µg/mL 첨가시에는 배양 16시간 경과시까지 상당한 증식억제효과를 나타내었으나, 배양 40시간 경과시에는 다소 증식하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 핵산 추출물을 500µg/mL 첨가했을 경우 우수한 항균활성을 나타내었다. 또한 *L. monocytogenes* ATCC 19111의 경우에는 핵산 추출물을 100 및 150 µg/mL씩 각각 첨가하였을때 배양 16시간 경과후부터 증식억제 효과가 없었으나 핵산추출물을 250 및 500 µg/mL 씩 각각 첨가하여 배양한 경우 48시간까지 생육이 완전히 억제됨을 알수 있었다. 그람 음성 세균의 경우 우선 *S. typhimurium* ATCC 14028 에 대한 핵산 추출물을 50, 100 및 150 µg/mL 씩 각각 첨가하여 첨가 농도별에 따른 증식 억제 효과는 매우 미약하였으나 핵산 추출물 250 µg/mL을 첨가하여 배양한 경우 배양 24시간 까지는 항균 억제효과를 나타내었으나 40시간 이후부터는 억제효과를 찾아볼 수 없었다.

E. coli BHR-12 의 경우에도 핵산 추출물을 100 및 150µg/mL 첨가하였을 때는 증식억제 효과가 없었으나 핵산 추출물 250, 500 µg/mL을 각각 첨가하여 실험한 결과 배양경과 48시간 까지는 거의 완전한 생육억제효과를 나타냈었다. 또한 *P. aeruginosa* ATCC 27853 의 경우는 핵산 추출물을 100, 150 및 250 µg/mL 씩 각각 첨가하였을 때 항균활성이 없었으나, 핵산 추출물을 500 µg/mL 첨가한 경우 배양 48시간 경과시까지 항균억제 효과가 있었다. 이러한 결과는 초석잠 잎 핵산 추출물 500 µg/mL 의 농도에서 강한 항균력을 가지고 있으므로 향후 상업적으로 새로운 천연 보존재료의 가능성을 나타내고 있다.

6. 초석잠 잎 핵산 분획물의 1차 column chromatography 소획분들의 항균효과

초석잠 잎의 분획물로부터 항균 활성 물질을 분리하기 위하여 먼저 TLC 상에서 분리능이 우수한 용매조건을 탐색한 후에 선택된 용매조건인 핵산 : 클로로포름 : 에탄올 (5 : 0.5 : 1, 5 : 1 : 2)에서 silica gel column chromatography를 실시한 결과 총 7개의 소획분(F1- F7)을 얻었고, 각각의 소획분을 50 및 100 µg/mL 농도로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5균주에 대하여 항균효과를 실험한 결과는 Table. 6 과 같다. 소획분 F3, F4, F5, F6, 은 50 µg/mL 농도 수준에서 5균주 모두 증식억제 효과가 우수하였으며, F6, F7 획분을 50 µg/mL 첨가농도에서 완전 증식억제 효과가 있다.

F6 획분의 경우 전개용매 (hexan : 클로로포름 : 에탄올 , 5 : 1 : 2)로 전개 하여 황산용액을 분무하여 발색시 3~4개의 반점 으로 분리 되었고, 발색시 색깔이 진하게 보이는 주요 분리 물질이 없이 3~4개의 반점이 고르게 분포되어 있었다. 그러나 F7 획분의 경우 R_f 0~0.1 사이에 뚜렷한 갈색물질이 나타나면서, 그 수율도 우수하였으므로 F7획분을 2차 분리용 시료로 분류하였다.

7. 초석잠 잎 핵산 분획물의 2차 column chromatography로 부터 얻은 소획분들의 항균 효과

초석잠 잎핵산 분획물들을 1차 column chromatography 하여 얻은 소획분을 hexan : 클로로포름 : 에틸 아세테이트 : 메탄올 : 초산 (10 : 3 : 3 : 1 : 0.5) 의 혼합용매 계로 2차 silica gel column chromatography를 실시한 결과 F7-1 ~ F7-8 각각의 소획분을 얻었고 각각의 소획분을 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* 5균주의 증식에 대하여 항균효과를 실험한 결과는 Table 7 에 나타내었다. 소획분 F7-1~F7-5는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가농도에서 *L. monocytogenes* 5균주 모두에 대하여 완전증식억제 효과가 있었으며, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가수준에서는 5균주 모두 12시간까지 균증식 억제를 보이다가 그 이후에는 균이 증식 되는 것을 볼 수 있었다.

항균효과 비슷한 4개의 소획분 중 F7-2 획분은 수율이 높고, R_f 0.5에서 뚜렷한 band 가 형성되어 황산분부 발색시 갈색의 물질이 나타났으므로 F7-2획분을 3차 분리용 시료로 분류하였다.

Table 5. Minimal inhibitory concentrations(MIC) of different solvent fractions obtained from *Stachys sieboldii* leaf on test microorganism

Microorganisms ²⁾	Solvents fraction			
	MICs($\mu\text{g/mL}$)			
	Hexane	Chloroform	Ethylacetate	Butanol
<i>B. cereus</i> ATCC 13720	250	500	500<	500<
<i>S. cereus</i> ATCC 25923	500	500<	500<	500<
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	250	500	500<	500<
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 43256	250	500	500<	500<
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15113	500	500<	500<	500<
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15114	500	500<	500<	500<
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	250	500<	500<	500<
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	500	500<	500<	500<
<i>E. coli</i> BHR-12	500	500<	500<	500<
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	500<	500<	500<

¹⁾ The MICs represents the lowest concentration of antimicrobials activities that showed no growth after 24hrs incubation at 35°C.

Table 6. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the 1st column chromatography fraction($\mu\text{g/mL}$) collected from n-hexane extract of *Stachys sieboldii* leaf *Listeria monocytogenes*

Fraction No.	Yield(g)	<i>Listeria monocytogenes</i>															
		15313			19111			19113			19114			43256			
		A	T	C	CA	T	C	CA	T	C	CA	T	C	CA	T	C	C
F1	2.18	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<
F2	5.45	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<
F3	6.80	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100
F4	2.00	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100
F5	0.41	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100	50<100
F6	1.00	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
F7	7.20	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Gram(+) bacteria

Gram(-) bacteria

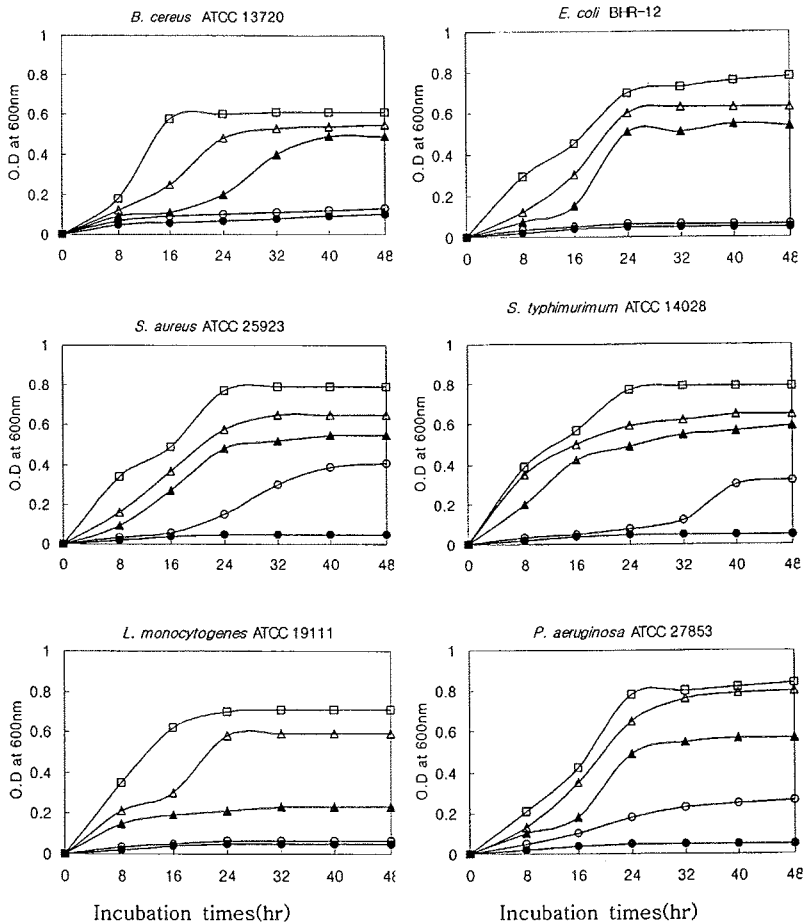


Fig 2. Growth inhibition effect of n-hexane fraction from on various pathogenic bacteria

●-● : 500µg/mL, ○-○ : 250µg/mL, △-△ : 150µg/mL, ▲-▲ : 100µg/mL,
◆-◆ : control

8. 초석잠잎의 핵산분획물의 3차 PTLC 후 얻은 소획분들의 항균효과

초석잠 잎의 핵산 분획물을 2차 column chromatography 하여 얻은 F7-2획분을 핵산 : 에틸 아세테이트 : 부탄올 (10 : 3 : 2) 의 용매계로 PTLC를 실시한 결과 F7-2-1 ~ F7-2-5등 총 5개의 소획분이 나타났으며 각각의 소획분 10 및 20 μ g/mL 농도로 배지에 첨가하여 항균효과를 조사한 결과는 Table 8과 같다. Table 8에서 보면 F7-2-4와 F7-2-5 획분을 20 μ g/mL 첨가 시킨 *L. monocytogenes* 5균주 모두 균 증식을 완전히 억제됨을 알수 있었고 F7-2-4 획분의 경우 10 μ g/mL 첨가시 5균주 모두 증식억제 효과가 없었다. F7-2-5획분은 10 μ g/mL 첨가시 *L. monocytogenes* ATCC 19113, ATCC 19114의 증식을 24시간 동안 억제하였으며, *L. monocytogenes* ATCC 19111은 36시간, *L. monocytogenes* ATCC 19112와 ATCC 15313에 대해서는 48시간 동안 균증식을 억제하였다.

이와 같은 결과에서 나타났던 바와 같이 이들 결과를 종합해볼때 초석잠 잎에서 분리한 F7-2-5획분의 항균활성은, 용해성이 높다. 그러므로 식품보존제 또는 산화제로서 가장 많이 사용되는 유기산 중에서 초산 와 프로피온산룰 2,000 μ g/mL 농도 첨가시 *L. monocytogenes* 의 성장을 완전히 억제했다는 결과와 영귤과즙 acetone 추출물을 1,500 μ g/mL 첨가시 *L. monocytogenes* ATCC 19111의 성장을 완전히 억제하였다는 결과보다도 항균력이 월등하였다. 소획분 F7-2-5를 핵산 : 에틸아세테이트 : 부탄올 (6 : 3 : 2) 의 용매로 TLC 상에서 전개시킨 후 UV상에서 관찰해 본 결과 R_f 0.42인 단일 반점으로 나타났었고, 황산분무 발색시 동일 R_f 상에서 단일반점의 갈색 물질이 나타났으므로, 순수 분리된 물질로 추정할 수 있다.

Table 7. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the 2nd column chromatography fraction($\mu\text{g}/\text{mL}$) collected from n-hexane extract of *Stachys sieboldii* leaf on *Listeria monocytogenes*

Fraction No.	Yield(g)	<i>Listeria monocytogenes</i>														
		A	T	C	CA	T	C	CA	T	C	CA	T	C	CA	T	C
		15313			19111			19113			19114			43256		
F7-1	0.38	25<50			25<50			25<50			25<50			25<50		
F7-2	2.83	25<50			25<50			25<50			25<50			25<50		
F7-3	0.46	25<50			25<50			25<50			25<50			25<50		
F7-4	0.45	25<50			25<50			25<50			25<50			25<50		
F7-5	0.42	25<50			25<50			25<50			25<50			25<50		
F7-6	0.14	50<			50<			50<			50<			50<		
F7-7	0.35	50<			50<			50<			50<			50<		
F7-8	0.40	50<			50<			50<			50<			50<		

Fig 8. Minimum inhibitory concentration of the preparative thin layer chromatography fraction collected n-hexane extract of on *Listeria monocytogenes*.

Fraction No.	Yield(g)	<i>Listeria monocytogenes</i>														
		A	T	C	CA	T	C	CA	T	C	CA	T	C	CA	T	C
		15313			19111			19113			19114			43256		
F7-2-1	5.1	25			25			25			25			25		
F7-2-2	5.4	25			25			25			25			25		
F7-2-3	4.0	25			25			25			25			25		
F7-2-4	5.3	25			25			25			25			25		
F7-2-5	18.0	25			25			25			25			25		

9. F7-2-5 획분 처리시 세포의 형태변화

초석잠 잎의 분획물인 F7-2-5 획분의 향균에 관여하는 기작을 확인하고자 공시균 주로 *E. coli* 및 *L. monocytogenes*의 세포에 F7-2-5 획분을 각각 20 µg/mL 농도로 첨가하여 32°C에서 12시간 증식시킨 균체의 표면을 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4 와 같다. Fig. 3. A에서 보면 관중 F7-2-5 획분을 처리하지 않은 정상적인 *E. coli*의 세포를 관찰한 결과 균체의 표면이 본래의 형태를 볼 수 있고 세포내부의 내용물도 정상적으로 차있는 형태를 관찰 할 수 있었으나 F7-2-5 획분으로 처리한 세포를 전자현미경으로 관찰한 결과 Fig. 4. B에서 보는바와 같이 세포의 세포막 구조가 흐트러지면서 세포내 내용물이 유출된 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 Fig. 4. A에서 나타낸바와 같이 분획물을 처리하지 않은 정상적인 세포에서는 세포의 형태가 그대로 유지되고 있으나, F7-2-5를 첨가하여 배양시킨 처리구의 경우에 세포의 형태가 깨어지면서 세포 내용물들이 유출된 것을 볼 수 있는데 이는 초석잠 잎 추출획분의 처리로 인한 세포막이 파괴되어 일어나는 현상으로 추정할 수 있다.

10. β-galactosidase 활성측정

초석잠 잎 추출물을 미생물 세포에 처리하였을 때, 세포막 손상정도를 알아보기 위하여 초석잠 잎 추출물의 존재하에서 *E. coli*의 세포질에 존재하는 β-galactosidase 활성을 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, 증류수를 가해준 대조구에서의 값을 0으로 하고 톨루엔을 가해 준 시험구를 100으로 하였을 때, 초석잠 잎 추출물 처리구는 68%의 활성을 나타내었다. 핵산을 처리하여 얻은 β-galactosidase이 12% 정도며, 이러한 결과를 보면 초석잠 잎 추출물은 핵산보다 세포막 손상효과가 더 강하며, toluene 처리구와 비교되는 세포막의 기능과파괴가 초래된 것으로 판단할 수 있었다. 이 결과는 전자현미경 실험결과에서도 잘 나타내었으며, 이와 같은 항균기작에 의해 초석잠 추출물이 항균작용을 가지는 것으로 추정되었다.[34]

11. 초석잠 잎 분획물의 열 및 pH 안정성

초석잠 잎 분획물에 대해서 열 안정성을 측정하기 위하여 초석잠 잎 분획물인 F7-2-5 µg/mL농도를 40, 60, 80, 100, 120 및 180°C에서 30분간 열처리 한 후 paper disk 법으로 생육저해 여부를 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 시험균주인 *E. coli*의 생육저해를 검사한 결과 모든 처리구에서 온도와 관계없이 생육저해환이 17~19mm이었다. 한편 pH 안정성을 확인하기 위하여 초석잠 잎 분획물을 500 µg/mL을 pH 4. 6. 7. 8 및 10으로 처리한 후 1시간 방치한 후 pH 7로 중화한 다음 24시간 배양한 후 생육 저해환을 조사한 결과 생육 저해환이 17~19mm경도이어서 분획물로써 처리하지 않는 대조구와 차이를 찾아 볼 수 없었다. 이러한 결과는 초석잠 분획물이 열이나 pH에 안정하므로 식품의 조리, 가공시 첨가하여도 항균성분이 그대로

유지 될 것으로 판단되며 천연 식품용 항균제로써 이용할 수 있을 것이다.

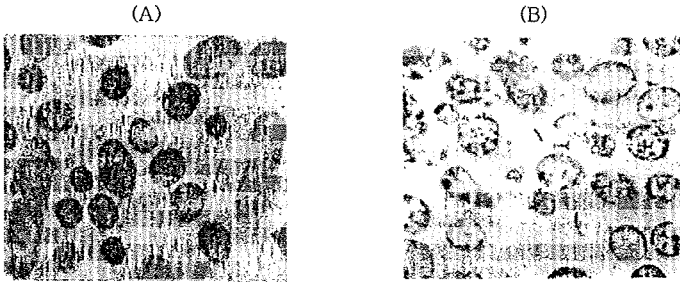


Fig. 3 Transmission electron microscope of *E. coli* BHR-12 A: Normal cells (Control) B, cells treated with F7-2-5 obtained from *Stachys sieboldii*

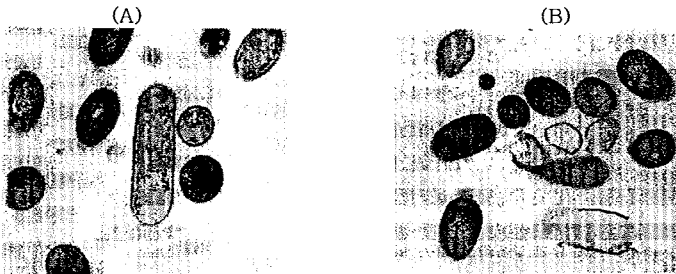


Fig. 4 Transmission electron microphage of *Listeria monocytogenes* ATCC (A) Normal cells control B, cells treated with F7-2-5 obtained from *Stachys sieboldii*

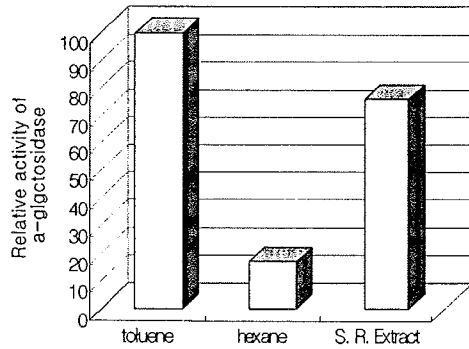


Fig 5. Membrane perturbation effect by extract *Stachys sieboldii* leaf on *E. coli* cells

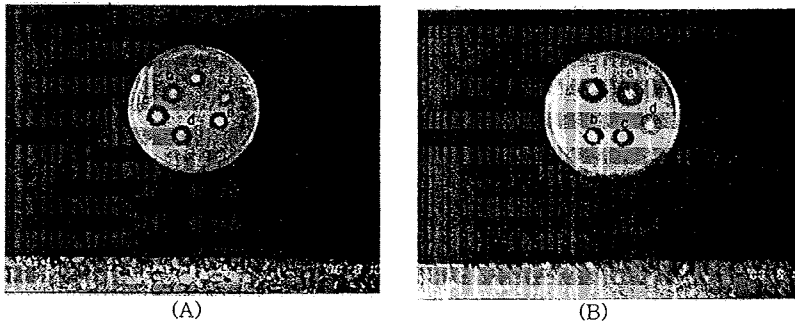


Fig 6. Thermal stability (a) and PH stability of *Stachys sieboldii* extract on *E. coli* plates

(A) Thermal drgree, a: 40°C b: 60°C c: 80°C d: 100°C e: 120°C f: 180°C

(B) pH, a: pH4 b: pH,6, c: pH7 d: pH8 e: pH9

제 7 절 초석잠 추출물의 SOD 활성의 결과

1. SOD 활성 비교

생체의 대사 과정에서 발생하는 유해 산소 중의 하나인 superoxide (O_2^-)는 superoxide dismutase (SOD)에 의하여 소거된다. 본 실험은 초석잠 추출물의 SOD 유사 활성을 알아 보기 위하여 측정된 결과를 나타내었다(Table 9). 초석잠 추출물의 SOD 활성을 확인하기 위하여 항산화 활성이 높은 것으로 알려진 플라보노이드인 quercetin 및 녹차 catechin과 비교한 결과 초석잠 추출물을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가하였을 때의 활성은 각각 47.53 ± 1.60 mg, protein에 비하여 대조구의 quercetin의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가구의 SOD가 각각 57.24 ± 1.74 mg, protein이었고 catechin의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가구에서 각각 48.96 ± 1.23 mg, protein이었다. 본 실험결과 초석잠 추출물의 SOD 대조구인 quercetin의 SOD보다는 약간 낮았으나 녹차의 catechin 활성과 거의 비슷한 활성을 나타내었다.

생체 내 산화 스트레스로 생성하는 활성 산소에 의하여 산소 중(reactive oxygen species : ROS)이 발생한다. 이러한 유리 래디칼은 세포막의 지질 성분에 작용하여 과산화 지질을 생성하고 DNA에 손상을 일으켜 변이를 촉진하고 단백질의 손상을 초래하여 생활습관병, 암 및 노화에 영향을 미친다[23].

본 실험 결과에서 초석잠 추출물이 활성 산소 소거능이 있는 것으로 판단된다.

2. 과산화 지질의 억제 효과

Linoleic acid가 지질에 대한 과산화물 생성 억제 효과는 Table 10와 같다. 과산화 지질은 대조구의 POV가 1245.2 meq/kg에 대하여 초석잠 추출물은 POV가 182.2 meq/kg으로 대조군에 비하여 85.4 %의 억제 효과를 나타내었고 현재 사용되고 있거나 알려진 항산화제로서 대조구인 catechin의 경우는 78.4%의 억제율을 나타내었고, quercetin는 80.6 %의 억제율을 나타내었다. 이상의 실험 결과에서 초석잠 추출물의 경우 항산화제로 알려진 catechin 및 quercetin과 비교해 보면 지질 과산화 효과가 약간 낮은 수준으로 활성을 나타내었다.

Table 9. Effect of ethanol fraction of *Stachys sieboldii* (S.S) on superoxide dismutase(SOD) relative activity

	(unit /mg, protein)
DMSO	0
Catechin (50 µg/mL)	48.96±1.23
Quercetin (50 µg/mL)	57.24±1.74
<i>Stachy sieboldii</i> (50 µg/mL)	47.53±1.60

Table 10. Inhibition effect of *Stachys sieboldii* (S.S) on peroxide value (POV) from rat liver microsome induced by Fe²⁺-ascorbate system

sample	POV (meq/kg)	Inhibition (%)
Control	1,205.7	-
Catechin (50 µg)	224.7	81.36
Quercetin (50 µg)	216.6	82.1
<i>Stachy sieboldii</i> (50 µg)	248.8	79.4

Inhibition Each value represents the mean value of duplicate determination.
 (%) = [1-(sample POV/control POV)]×100

In vivo 에서 간의 microsome 분획에 대한 지질과산화에 대하여 malondialdehyde (MDA)의 결과를 Table 11.에 나타내었다. 지질 과산화에 대한 실험 결과 대조군은 10.53 nmol/mg protein 이었으나, 항산화 활성이 높은 것으로 알려진 초석잠 추출물 50 µg 첨가하였을 때 2.80 nmole/mg, protein으로 73.4 %의 억제 효과를 볼 수 있었다. Catechin를 50 µg 첨가한 경우 2.64 nmole/mg protein으로 74.9 %의 억제 효과를 나타내었고, quercetin의 경우 2.10 nmole/mg, protein으로 79.3 %의 억제 효과를 나타내었다. 이상의 실험 결과로 보아 초석잠 추출물의 지질과산화 억제 효과는 상당히 높은 것으로 사료 된다.

Table 11. Inhibition effects of *Stachys sieboldii* on lipid peroxidation from rat liver microsome induced by Fe²⁺-ascorbate system

Sample	MDA (nmol/mg, protein)	Inhibition (%)
Control	10.53	-
Catechin(50 µg)	2.64	74.9
Quercetin (50 µg)	2.18	79.3
<i>Stachy sieboldii</i> (50 µg)	2.80	73.4

Each value represents the mean value of duplicate determination.

Inhibition(%) = $[1 - (\text{sample MDA} / \text{control MDA})] \times 100$ MDA means malonaldehyde.

3. 항산화계 효소의 활성

쥐를 이용한 *in vivo*에서의 항산화 활성을 알아보기 위하여 초석잠 추출물을 rat에 2주일간 사료에 섞어 먹인 후 간 microsome 분획에 존재하는 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase 등 항산화계 효소에 미치는 영향을 검토하였다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 실험 동물인 쥐에 사염화탄소(CCl₄)를 처리하여 간에 과산화 지질을 유발시킨 후 초석잠 추출물의 SOD의 활성을 23.8±1.23 U/mg, protein으로 CCl₄ 처리군의 10.3±1.24 U/mg, protein이었다. 초석잠 추출물을 200 mg/kg 첨가군에서 14.36±1.30 U/mg, protein으로 CCl₄ 처리군에 비하여 39.4% 증가하였으며, 500 mg/kg 첨가군에서는 17.28±2.04 U/mg, protein으로 67.7%의 증가로 유의성이 인정되었다.

CCl₄는 cytochrome에 의해서 C-Cl 결합이 깨어지면서 trichloromethyl radicals를 생성하고 O₂와 반응하여 trichloromethyl peroxy radicals를 생성한다. 이렇게 생성된 radicals는 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격하여 과산화 지질을 야기하여 간세포를 괴사시킨다[26]. 본 실험 결과로서 CCl₄의 처리군에 발효대두를 첨가하였을 때 SOD의 활성이 증가하는 것으로 보아 과산화 지질을 억제하는 것으로 사료된다.

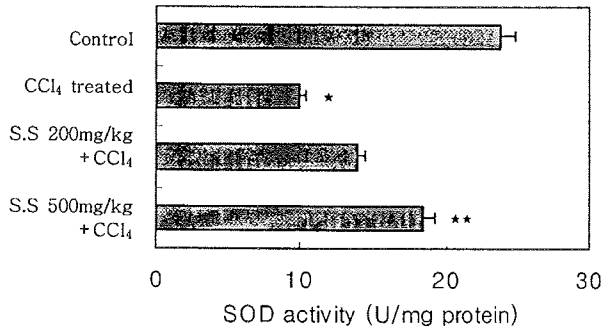


Fig. 7. Effects of extract of *Stachys sieboldii* on superoxide dismutase activity (SOD) in rat liver microsomes

S.S : *Stachys sieboldii*

★ : $p < 0.05$, significantly difference from normal control

★★ : $p < 0.05$, significantly difference from CCl₄ treatment

Each group represents the mean \pm SD

한편, Fig. 9는 초석잠 추출물을 쥐에 2주일간 투여한 후 쥐 간의 microsomes 확분에 존재하는 catalase 활성을 비교하였다. 정상 사육한 대조군의 catalase 활성은 19.05 ± 1.26 U/mg, protein이었으나 CCl₄ 처리군에서는 9.14 ± 1.41 U/mg, protein으로 CCl₄ 대조군에 비하여 54.1 % 감소하였으나 200 mg/kg 첨가군에서는 12.43 ± 1.17 U/mg, protein으로 CCl₄ 처리군에 비하여 35.9 % 증가하였고 500 mg/kg 첨가군에서는 15.07 ± 1.28 U/mg, protein으로 72.8 %의 증가를 나타내어 유의성이 있었다.

Fig. 9. 은 초석잠 추출물을 사료에 첨가하여 2주간 사육한 후 glutathion peroxidase의 활성을 측정하였다. 대조군에서는 9.80 ± 0.25 IU/g.protein 이었으나, CCl₄ 처리군에서는 2.46 ± 0.20 IU/g.protein 으로 대조군에 비하여 78.7% 감소하였다. 그러나 대두 발효를 200 mg/kg 투여한 경우 5.37 ± 0.13 IU/g.protein 으로 대조군에 비하여 glutathion peroxidase의 활성이 23.54% 증가하였고, 500 mg/kg 투여군에서는 8.08 ± 0.23 IU/g.protein으로 35.03% 증가함을 볼 수 있었다.

Fig. 8. 은 *in vivo*에서 초석잠 추출물 식이가 주간의 microsome 획득의 지질 과산화의 생성을 나타내었다. 정상 사육한 대조군의 과산화 지질의 지표인 malondialdehyde(MDA)는 1.64 ± 0.16 nmole/mg, protein이었으나 CCl_4 처리군에서는 3.34 ± 0.24 nmole/mg, protein이었으나, 200mg/kg 첨가군에서는 2.27 ± 0.11 nmole/mg, protein으로 32.4 % 감소하였고, 500 mg/kg 첨가군에서는 1.74 ± 0.15 nmole/mg, protein으로 48.7 % 감소하여 유의성이 인정되었다.

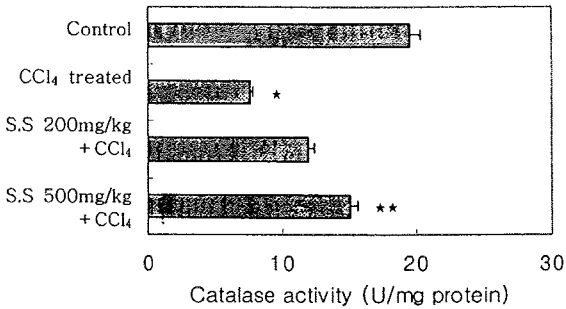


Fig. 8. Effects of extract of *Stachys sieboldii* on catalase activity (CAT) in rat liver microsome

S.S : *Stachys sieboldii*

★ : $p < 0.05$, significantly difference from normal control

★★: $p < 0.05$, significantly difference from CCl_4 treatment

Each group represents the mean \pm SD

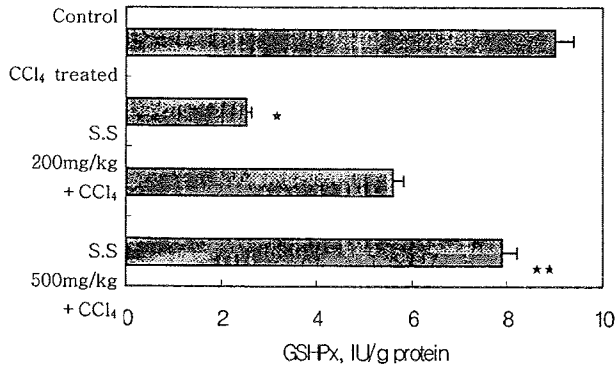


Fig. 9. Effects of extract of *Stachys sieboldii* on glutathione peroxidase activity (GTHPx) in rat liver microsomes.

S.S : *Stachys sieboldii*

★ : $p < 0.05$, significantly difference from normal control

★★ : $p < 0.05$, significantly difference from CCl₄ treatment

Each group represents the mean \pm SD

모든 생물체는 유산소 호흡을 하는 대사 과정에서 활성산소를 생성하는데 적정량의 활성 산소는 생체내 면역기능에 관계된 대식 세포의 살균 작용 등이 있으나 그 양이 많으면 활성 산소가 산화제로서 생체막의 지질 변화, DNA 변이 등 산화적 스트레스를 발생시킨다. 따라서 생물체는 이러한 활성 산소를 제거하여 생체를 보호하기 위하여 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxidase 등 항산화 효소를 가지고 있다. 유리기를 제거하는 SOD는 활성 산소를 OH⁻와 산소로 전환시키는데 효소 작용을 함으로써 활성 산소 유리기에 의해서 생기는 생체의 지질 과산화를 방어한다[6,17].

SOD는 생체 내에서 비교적 널리 분포된 효소로서 포유류에는 3종류의 SOD가 알려져 있다. Cu, Zn-SOD는 각각 세포질과 세포 외액에 존재하나 Mn-SOD는 주로 mitochondria에 존재한다. Mn-SOD는 노화과정, 발암기전에 일부 역할을 하고 산화

스트레스에 의한 각종 생활습관병 발생에 의한 저항성을 갖게 한다.

활성산소에 의하여 산화되는 동안 발생하는 superoxide anion radical(O₂⁻)은 SOD에 의하여 활성이 소실되지만 이들 유리기들이 세포막에 손상을 일으킬 것으로 사료된다.

본 실험 결과 발효 대두는 과산화 지질의 억제 효과가 상당히 높게 나타났다. 그리고 쥐를 이용한 Fe²⁺-ascorbate system에서도 catechin 과 quercetin간의 대조구로 하여 microsome의 과산화 지질의 억제 효과를 실험한 결과 이를 대표적인 항산화제와 비슷한 효과를 나타내었다. 활성 산소 소거 활성에서는 SOD의 활성이 항산화제로 알려진 catechin과 quercetin의 산화 억제 효과보다 약간 낮은 수준의 효과를 나타내었다.

초석잠 추출물의 동물 실험결과 쥐의 간의 microsome의 SOD, catalase, glutathion peroxidase 및 지질 과산화물의 생성 억제 효과를 항산화 효소의 작용으로, 생물체의 세포막을 보호하여 노화 등을 예방할 것으로 생각된다.

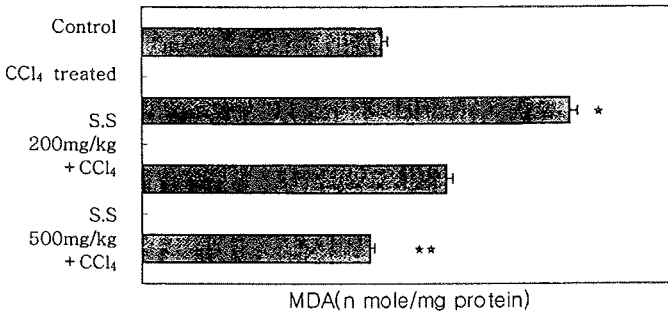


Fig. 10. Effects of *Stachys sieboldii* on lipid peroxidation activity in rat liver microsome.

S.S : *Stachys sieboldii*

★ : p<0.05, significantly difference from normal control

★★ : p<0.05, significantly difference from CCl₄ treatment

Each group represents the mean ± SD

한편, CCl_4 를 투여하여 쥐 간에 손상을 일으킨 후 발효 대두를 첨가한 식이군에서는 항산화 관련 효소 및 SOD와 catalase, glutathion peroxidase 활성이 CCl_4 처리군 보다 증가하는 경향은 발효 대두가 항산화 관련 효소의 활성화와 관련이 있는 것으로 판단된다. 그리고 CCl_4 로 간에 손상을 일으킨 쥐에 발효 대두를 첨가한 식이를 급여한 군에서 SOD, catalase, glutathion peroxidase의 활성을 억제 시켰으며 이때 유의성을 볼 수 있었다.

이러한 실험결과는 생체 내에서 초석잠 추출물이 CCl_4 에 의하여 손상되었던 간에 SOD와 catalase의 활성이 회복되는 것을 볼 수 있었고 과산화지질의 생성은 초석잠 추출물에 대하여 억제되었다.

본 실험 결과에서 초석잠은 *in vitro*에서 SOD의 활성을 증가시키면서 지질 과산화를 억제하였다.

따라서, 초석잠은 항산화 관련 효소의 활성을 높여 주고 지질 과산화를 억제 하므로 노화 등 생활습관병 예방에 기여할 것으로 생각되어진다.

제 8 절 초석잠 추출물의 항산화 스트레스 억제 효과

1. 간장 콜레스테롤 함량의 변화

SD계 랫트에 초석잠 분말을 각각 200 및 500mg/kg BW를 6주간 투여하여 본 결과, 간장중의 콜레스테롤의 함량 변화는 Table 12에서 보는 바와 같다. Table 12에서 보는 바와 같이 시료를 200 및 500mg/kg 씩 투여 그룹의 콜레스테롤 함량은 mitochondria 획분에서 131.41 ± 2.43 및 131.62 ± 6.42 mg/g protein으로서 대조그룹의 (129.45 ± 1.26 mg/g protein)에 대비하여 101.3% 및 101.1%로서, 각각 1.3% 및 1.1%의 콜레스테롤의 조직 침착효과가 인정되었다. 그러나 microsome 획분에서도 시료를 200 및 500mg/kg 씩 투여 그룹에서 대조 그룹에 대하여 각각 1.4% 및 2.8%의 콜레스테롤의 조직침착 억제 효과가 거의 없었다. 이러한 사실은 초석잠 추출물의 콜레스테롤 억제 효과와는 전혀 다른 효과일 뿐만 아니라 혈청중의 콜레스테롤이나 LDL 및 HDL-콜레스테롤의 함량이 대조그룹 대비 유의적인 억제 효과를 기대할 수 없었다는 사실을 감안한다면 간장조직에서의 콜레스테롤의 침착에 대한 억제 효과도 거의 없는 것으로 생각된다.

Table 12. Effects of *Stachys sietoldii* on cholesterol levels in liver membranes of SD rats for 6 weeks

	Control(7)	200mg/kg	500mg/kg
Mitochondria	129.45±1.26	131.41±2.43	131.62±6.42
Microsome	87.83±2.42	86.63±3.41	85.43±3.62

Powder of *Stachys sietoldii* : *Stachys sieboldii* powder of 200 and 500 mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD(mg/g protein) with 7 rats per group; ^bPercent of control values.

2. 세포막 유동성의 평가

가. 세포막 유동성(membrane fluidity : MF)

세포막 유동성(membrane fluidity : MF)이 기능이 원활해야 항상성(homeostasis)을 유지할 수 있고 체내 대사가 원만하게 진행될 수 있다. 생활습관병(chronic degenerative disease)이란 연령의 증가에 따라 세포막의 유동성이 장애를 받아서 생활습관병을 유발할 뿐만 아니라 노화까지 촉진하게 된다. 따라서 초석잠을 SD계 랫트에 6주 동안 투여한 다음, 간장 조직의 세포막 유동성을 측정하였다. Table 13에서 나타난 바와 같이 초석잠 분말을 투여 그룹의 세포막 유동성에 미치는 영향을 초석잠 분말을 각각 200 및 500mg/kg씩 투여한 결과를 보면 간장 조직의 mitochondria 획분에서 200 및 500mg/kg씩 각각 투여그룹의 MF는 2.94±0.17 및 3.29±0.31%으로서 대조 그룹의 2.65±0.43%의 대비 111.4% 및 125.2%로서, 각각 12.4% 및 25.2%의 효과적인 MF의 증가가 인정되었다. 또한 간장 조직의 microsome 획분에서 200 및 500mg/kg씩 투여 그룹의 MF는 7.42±0.32 및 8.01±0.21%으로서 대조그룹의 6.2±0.12에 비하여 119.8% 및 129.1%로서, 각각 19.8 및 29.1%로 효율적인 MF의 증가 효과가 인정되었다.

Table 13. Effects of *Stachys sieboldii* on membrane in liver membranes of SD rats for 6 weeks

	Control	200mg/kg	500mg/kg
Mitochondria	2.65±0.43 ^a	2.98±0.12 ^{**}	3.32±0.21 ^{***}
Microsome	6.2±0.13	7.43±0.12 ^{***}	8.01±0.21 ^{***}

Extract of *Stachys sieboldii* of 200 and 500 mg/kg BW/day added to basic control diet : ^aMean±SD (% polarization) with 7 rats per group; ^bPercent of control values; ^{**}p<0.01; ^{***}p<0.001 compared with control group.

이러한 사실은 초석잠 분말의 투여효과가 거의 2배이상 MF가 높다는 사실을 특기할 만하다. 초석잠 분말의 투여에 의하여 간장 조직의 mitochondria 및 microsome 획분에서 다같이 시료를 각각 200 및 500mg/kg 씩 그룹에서 콜레스테롤의 침착을 효과적으로 억제할 수 있었기 때문에 이들 초석잠 분말의 MF의 증가 효과는 조직중의 콜레스테롤의 침착과는 직접 관련이 없을 것으로 판단된다.

나. 기초 및 유도산소라디칼의 평가

SD계 랫트에 대한 초석잠 분말의 투여에 의한 간장 조직의 활성 산소의 생성량을 평가하기 위하여 기본적인 조건 및 Fe²⁺-ascorbate로 유도한 활성 산소를 각각 기초 활성 산소(basal oxygen radical : BOR) 및 유도 활성 산소(induced oxygen radical : IOR)로 구분하여 이들 활성 산소를 분석 · 평가하여 본 결과는 Table 14과 같다.

간장조직에서 BOR의 생성량 각각에 미치는 초석잠 분말의 영향을 비교하여 보면 시료를 200 및 500mg/kg 씩 투여그룹의 mitochondria 획분에서 BOR의 생성은 1.85±0.16 및 1.70±0.21 nmol/mg protein/min로서 대조그룹의(2.33±0.14 nmol/mg protein 을 100%)로 대비해 각각 20.1% 및 27.1%의 매우 유의적인 BOR의 생성 억제효과가 인정되었고 microsome 획분에서도 BOR의 생성은 2.53±0.14 및 2.48±0.16 nmol/mg protein/min으로서 대조그룹의 2.76±0.23 nmol/mg protein/min를 100%)로 대비해 각각 8.4% 및 10.2%의 유의적 BOR의 생성 억제 효과가 인정되었다. 마찬가지로 간장 획분중의 IOR의 생성량에 미치는 영향을 평가하여 보면 시료를 각각 200 및 500mg/kg씩 투여한 그룹의 mitochondria 의 획분에서는 2.1%, 11.8%의 IOR 생성 억제능을 나타내었으며, microsome 획분에서 IOR의 생성 억제 효과는 각각 15.6% 및 16.4%, 유의적인 IOR의 생성 억제효과로서 효과적인 IOR의 생성 억제 효과가 인정되었다.

Table 14. Effects of *Stachys sieboldii* on basal and induced oxygen radical formations in liver membranes of SD rats for 6 weeks

Group	Oxygen radical formation (nmol/mg protein/min)	
	Mitochondria	Microsome
Basal oxygen radical(BOR)		
Control	2.33±0.14 ^a -	2.76±0.23 -
200mg/kg	1.85±0.16 ^{**}	2.53±0.13 ^{**}
500mg/kg	1.70±0.21 ^{***}	2.48±0.16 ^{***}
Induced oxygen radical(IOR)		
Control	13.10±0.93 -	14.50±2.10 -
200mg/kg	12.83±0.82	12.25±1.58 ^{**}
500mg/kg	11.56±0.95 [*]	12.17±1.39 ^{**}

Sample, 200 and 500mg/kg : Extract of *Stachys sieboldii* of 200 and 400mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD (nmol/mg protein/ min) with 7 rats per group; ^bPercent of control values; ^{*}p<0.05; ^{**}p<0.01; ^{***}p<0.001 compared with control group.

초식잡 추출물의 투여는 활성 산소의 활성을 매우 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대되며, 초식잡 추출물의 투여시는 IOR의 억제 효과에 있어서 microsome획분에서 유의성이 인정되지 mitochondria 획분에서 유의성이 인정되지 않았다는 결과는 되었으나, 이들의 작용 메카니즘이 다르기 때문으로 생각된다.

다. 과산화 지질의 생성 억제 효과

세포막의 지질이 활성 산소의 공격을 받아 산화될 때 생성되는 LPO는 강력한 세포독성으로 인하여 생활습관병과 노화의 지표 물질로 알려져 있다. 노화의 가장 중요한 학설로서 간장 조직중의 지질성분의 산화적 스트레스로서 과산화 지질(lipid peroxide : LPO) 생성에 미치는 초식잡 추출물의 영향을 분석·비교하여 보면 Fig. 11과 같다.

산화적 스트레스의 평가에서 LPO는 말론디알데히드(malondialdehyde : MDA)의 함량, OP는 카르보닐그룹(>C=O group)의 생성량 및 핵산의 산화는 8-OHdG의 생성량을 측정하여 평가한다. 활성 산소의 공격 목표는 조직 세포중의 지질 성분의 공격에 의한 과산화 지질(lipid peroxide : LPO)의 생성, 단백질 성분의 공격에 의한 산화 단백질(oxidized protein : OP)의 생성 및 핵산의 공격에 돌연변이의 생성 등을 들

수 있다.

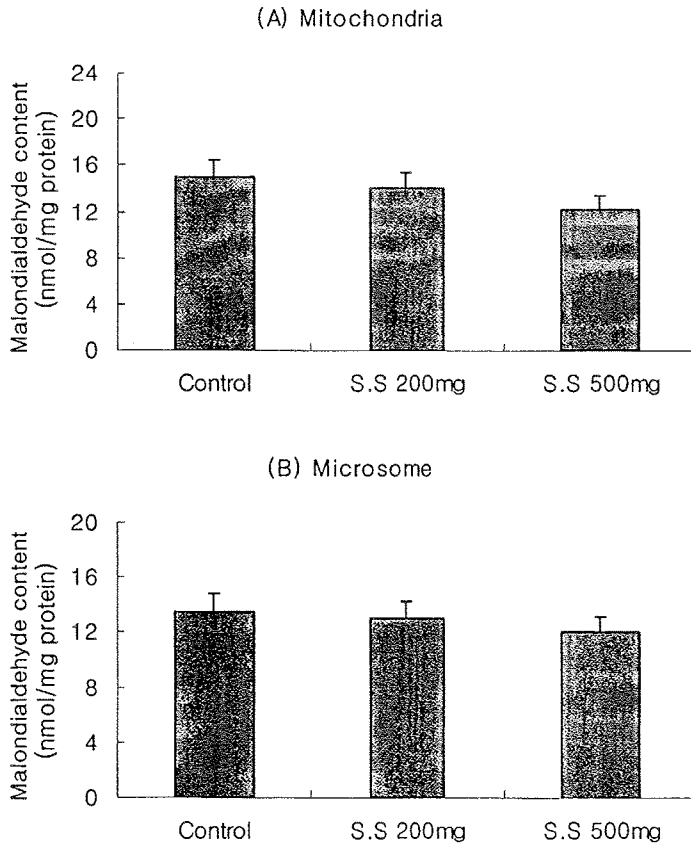


Fig. 11. Effects of *Stachys sieboldii* on lipid peroxide(LPO) leves in liver membranes SD rats for 6 wees

S.S 200mg and S.S 500mg : *Stachys sieboldii* of 200 and 500mg/kg BW.day to basic conrol diet, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared with control group.

간장 조직중의 LPO의 생성에 미치는 초석잠 분말 투여의 영향을 비교하여 보면 간장 조직의 mitochondria 획분에서는 시료를 200 및 500mg/kg씩 그룹은 14.26 ± 1.13 및 13.38 ± 0.22 nmol/mg protein 으로서 대조그룹의 14.93 ± 1.03 nmol/mg protein에 비하여 용량의존적으로 4.6% 및 11.8%의 LPO의 생성 억제 효과가 나타났지만, 유의성은 초석잠 분말 200mg/kg 투여 그룹에서만 인정되었다. 간장 조직의 microsome 획분에서도 초석잠 추출물 투여그룹에서 유의적인 LPO의 억제 효과가 인정되었다.

초석잠 추출물 200mg/kg의 투여는 활성 산소의 생성을 효과적으로 방지하여 LPO의 생성을 억제한다는 사실은 매우 중요한 의미를 갖는데, 그 이유로서는 LPO의 세포조직중의 축적은 생활습관병을 유발할 뿐만 아니라 노화를 촉진한다는 사실이 밝혀져 있기 때문이다.

제 9 절 초석잠 추출물의 LDL에 대한 항산화 활성

1. 초석잠 추출물의 사람 LDL에 대한 항산화 효과

건강한 사람의 혈장에서 분리 정제한 LDL($100\mu\text{g protein/mL}$) $10\mu\text{l}$ 에 $5\mu\text{M}$ CuSO_4 $5\mu\text{l}$ 를 첨가하고 LDL의 항산화제로서 초석잠 추출물의 최종농도가 각각 20, 40, 60, 80 및 $100\mu\text{g/mL}$ 를 되게하여 37°C 에서 18시간 동안 배양한 후 TBARS를 측정하였다. Fig. 12에서 보는 바와 같이 LDL의 산화에 대한 초석잠 추출물의 항산화 효과가 좋았다.

본 실험에서 항산화제로 첨가한 초석잠 추출물의 경우 최종농도를 20, 40, 60, 80 및 $100\mu\text{g/mL}$ 으로 조절하여 실험한 결과 20, $40\mu\text{g/mL}$ 에서도 항산화 효과가 나타났으나 80 및 $100\mu\text{g/mL}$ 에서 더 높은 항산화 효과가 있었다.

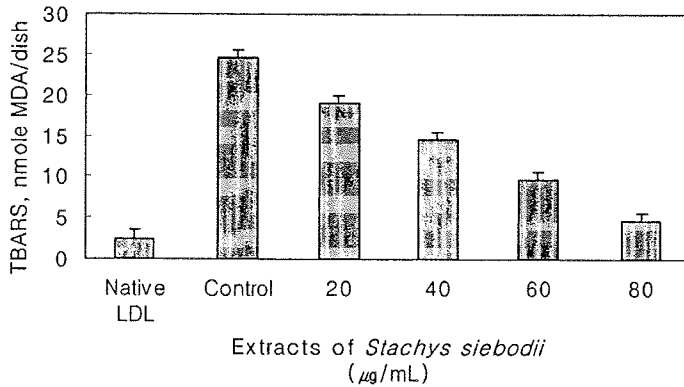


Fig. 12. Concentration-dependent inhibition of macrophage induced LDL oxidation by extract of *Stachys sieboldii*.

LDL(100 µg protein/dish) was incubated for 24hr with macrophages in Ham's F-10 medium in the presence of extract of *Stachys sieboldii* or absence(control) of the test agent. The LDL oxidation was estimated by the formation of TBARS and expressed in nmol equivalent MDA as described in Methods. TBARS produced in cell-free conditions(medium+LDL) was subtracted from dose of the dishes containing macrophages. Each point is the mean±S.E.M. of 3-5 experiments done duplicate, while the data for α-tocopherol are the average of two experiments done duplicate.

Esterbaner등은 Cu^{2+} 매개 LDL의 산화에 있어서 2~2.5시간 정도 배양하여 산화시켰다. 그러나 본 연구에서는 18시간 배양하면서 산화시켰는데 이는 사람의 혈장에서 채취하여 얻은 LDL의 제조에 있어 LDL의 자체에 존재하는 항산화제에 의하여 산화가 영향을 받기 때문이다.

혈장내에 비타민 A 및 E와 같은 항산화제가 LDL의 희분에 미량 함유되어 있을 경우 항산화 효과를 나타낼 수 있으며, 또 담배를 피우는 사람은 혈장의 LDL 희분이 담배를 피우지 않는 사람보다는 쉽게 산화가 일어날 수 있기 때문에 산화에 필요한 시간은 18시간이 적당하다.

2. LDL의 산화에 따른 electrophoretic mobility

LDL의 산화 억제를 알아보기 위하여 초석잠 추출물을 60 μ g/mL 및 80 μ g/mL을 첨가하여 실험한 결과 Table. 15에 나타내었다. 이때 LDL에 초석잠 추출물은 각각 60 μ g/mL 및 80 μ g/mL 첨가하여 macrophage에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양한 후 LDL의 이동거리를 조사한 결과 native LDL 및 대조구와는 차이가 있었다. 즉 초석잠의 첨가구는 native LDL 보다는 약간 높았으나 LDL의 대조군보다는 이동거리가 적은 것을 볼 수 있었다.[15]

Table. 15. Antioxidative effect of on LDL oxidation as extract of *Stachys sieboldii* assessed by electrophoretic mobility

Incubation Condition	Relative electrophoretic mobility	P
Native LDL	1.0	
LDL + macrophages	1.88 \pm 0.24	<0.05
LDL + macrophages + S.S 60 μ g/mL	1.23 \pm 0.14	<0.01
LDL + macrophages + S.S 80 μ g/mL	1.36 \pm 0.10	<0.01

LDL(100 μ g/mL) was incubated at 18h in DMEM medium in 35mm dishes containing macrophages in the presense or absence of the extract of *Stachys sieboldii*. The electrophoretic mobility of LDL was determined in agarose gels as described in *Methods*. The electrophoretic mobility was measured in mm. The data are presented as mean \pm S.D for experiments.

3. 초석잠 추출물과 다른 항산화제와 비교

지질 산화 즉 LDL이 산화가 진행되면 cholesterol 및 cholesterol ester 형태로 동맥 벽에 축적으로 동맥경화가 유발되기 쉽다. Macrophage, J774에 LDL 및 초석잠 추출물을 첨가하여 18시간동안 산화시킨 후 결과를 보면 TBARS는 초석잠 추출물과 α -tocopherol 및 비타민C와 비슷한 경향을 나타내었다.

결과적으로 초석잠 추출물은 사람 LDL에 대한 항산화 효과가 좋은 것으로 판단된다.

Fig. 13. 은 초석잠 추출물과 항산화능이 좋다고 알려진 비타민 C, 토코페롤에 macrophage, J774의 존재하에서 18시간 배양한 후 TBARS을 측정하였다. TBARS는 2.46 ± 0.17 nmol, MDA/mL 이였고, native LDL의 TBARS 대조군에서는 26.68 ± 0.26 nmol, MDA/mL 이였으나, 초석잠 추출물의 TBARS는 7.43 ± 0.14 nmol,MDA/mL 로 α -tocopherol의 TBARS는 7.03 ± 0.16 nmol,MDA/mL 및 비타민 C의 TBARS 6.83 ± 0.12 nmol,MDA/mL 보다 약간 높았으나, TBARS의 수치로서는 큰 차이를 찾아 볼 수 있었으므로 α -tocopherol 및 비타민 C와 비슷한 LDL에 대한 항산화능이 있는 것으로 나타났다.

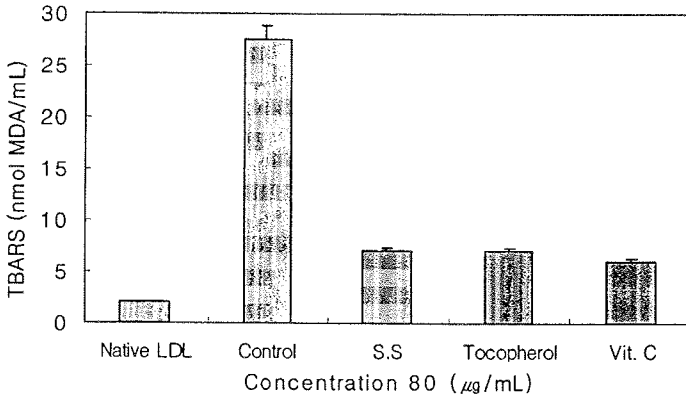


Fig. 13. Comparative antioxidative effect of extracts of *Stachys sieboldii*(S.S) vitamin C and dl- α -tocopherol.

LDL (100 μ g protein/dish) was incubated for 18 hr with macrophage, J774, in Ham's F-10 in the absence (control) or presence of *Stachys sieboldii*(S.S 80 μ g/mL), vitamin C (80 μ g/mL) and dl- α -tocopherol (80 μ g/mL) eith 10 μ mole/mL CuSO₄. Data points are means of a typical experiment (out of three)run in duplicate.

제 10 절 초석잠 추출무의 항암 및 면역 효과

(협동과제: 초석잠으로부터 활성산소소거 물질의 분리)

1. 서 론

현대 의학의 발전에도 불구하고 암은 아직도 그 원인 및 치료방법이 분명치 않아 인류의 건강을 위협하는 가장 중요한 인자로 남아 있다. 암의 공포로부터 벗어나기 위하여 오래 전부터 연구가 진행되어 많은 새로운 사실들이 밝혀지고 있으나 현재 암 치료에 이용되고 있는 화학요법, 방사선요법 및 외과적 수술요법 등은 치료적 한계성 및 부작용 등의 불가피성으로 인해 그 이용에 많은 문제점을 가지고 있다(1,2). 이런 관점에서 불 때 불완전한 기존의 암 치료법에 병행하여 현재에 이르러서는 자연계에 존재하는 천연물로부터 분리한 물질을 생체 방어기전에 이용하여 아을 예방하고자 하는 시도가 활발히 진행되고 있다(3). 최근에 와서는 해양생물(4-6), 버섯류(7-9) 등에서 항암 성분의 연구가 보고 되고 있다. 이러한 항암 성분은 면역기능을 촉진 또는 부활시킴으로써 그 효과를 나타내는 것으로 알려지고 있으며 종래의 항암제와는 달리 그 부작용이 현저히 낮고 특히 화학 요법이나 방사선요법의 병용으로 치료효과를 극대화시킬 수 있어 실용가치를 더욱 높이고 있다(2).

지금까지 암을 효과적으로 치료할 수 있는 약품을 개발하고 있으나, 임상적으로 사용할 때 정상세포의 사멸 내성발현등 치명적인 부작용을 나타내고 있어 큰 문제점으로 대두되고 있다(1). 이러한 점을 보완하기 위하여 정상세포에 독성이 없고 면역체계를 활성화시킴으로써 암을 정복하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이에 따라 최근에는 각종 천연자원으로부터 새로운 항암성분을 탐색하고 개발하려는 연구보고가 많다.

초석잠은 1년생 풀로서 여름에는 잎이 무성하고, 겨울에는 뿌리가 누에모양을 하고 있어 동충하초와 모양이 비슷하고 약효도 우수하여 식물의 동충하초라고 불리기도 한다 초석잠은 중국의 중약편에 의하면 뇌경색, 기억력 증진, 노인성 치매와 장을 강화하는 장수채(長壽菜)

로서 옛날부터 애용해 왔다. 일본에서도 정월 요리에 귀하게 쓰이기도 하고 여러 가지 성인병과 만성병 치료에 유용하게 쓰이기도 하였다. 초석잠의 성분중 탄수화물은 감자와 같은 전분이 아니라 올리고당으로 장속의 유익 세균의 생육을 도와 장의 기능을 촉진하기도 한다(10).

초석잠의 효능을 보면 맛이 달며 담백하고 독이 없어 풍을 쫓고 어혈, 적혈을 품며 기를 내리게 하고 신체의 조화를 이루게 하여 무병장수에 기여한다고 기록되어 있다. 또 사지무력증, 마비증, 전신 골절통, 관절염, 신경통 등을 치유하고 초석잠 즙액으로 눈병을 낫게 하고 간을 좋게 하는 작용이 있어 황달을 낫게 한다. 모든 증독증

상에 초석잠이 좋다고 하였고 자양강장에 효과가 있어 허약증이나 감기에 달여 먹으면 기운을 찾게 되고 기침도 멎는다고 하였다(10).

본 연구는 이와 같이 많은 효능에는 불구하고 아직까지 항암활성이나 생리 활성 물질에 대한 연구가 진행되지 않을 초석잠으로부터 항암 효과 및 항산화 활성도를 측정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

경남 밀양시 산외면에서 직접 채배하여 사용하였다.

1) 초석잠 추출물의 조제

초석잠의 추출은 환류 냉각관을 부착시킨 flask내에 500g의 시료를 넣고 시료중량의 10배량의 75% 에탄올을 가하여 60°C의 수욕상에서 12시간 동안 2회반복 추출한 후 감압여과장치로 여과하였다. 여액을 rotary vacuum evaporator (Eyela N-N-series, Japan)를 사용하여 농축하고 이를 동결건조한 후 밀봉하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 실험 동물

5-6 주령의 수컷, C57 BL/6계 마우스를 대한실험동물센터 (충북 음성)에서 구입하여 사용하였다. 온도는 20± 2, 병암주기가 12시간 단위로 유지하며 고형사료와 물을 충분히 공급하였다. 실험전 마우스를 동일한 조건하에서 사육하여 동물실 환경에서 적응시켰다. 사료는 삼양유지 사료사와 항생제 무첨가 마우스용 펠렛을 공급하였다.

3) 초석잠 추출물의 마우스에 대한 공급

초석잠 추출물 10mL에 수돗물 100mL로 희석하여 급수병에 담아 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. (케이지당 5마리).

초석잠 추출물의 공급은 21일 동안 하였으며 총량은 3g/ 5마리/21일이 되도록 하였다.

공시세포 : 비장으로부터 림프구의 분리는 다음과 같이 시행하였다. 마우스로부터 얻은 비장은 Hanks' balanced salt solution(HBSS, Sigma, St. Louis, Mo)에서 두장의 멸균된 slide glass로 부드럽게 압착하여 림프구를 비장으로부터 유리시켰다. 이 속에 포함된 적혈구는 멸균된 림프구 증류수를 사용하여 hypotonic shock로 제거하며 분리된 림프구는 완전배지에 부유시켰다. 복강대식세포는 Yoon등(1)의 방법에 따라 분리하였다. 마우스의 복강내에 Brewer's thioglycollate broth(Kifco laboratory, detroit, MI) 3 mL를 주사한 3일 후, 1% fetal calf serum(FCS), 10 mM HEPES, 그

리고 페니실린 ($100\mu\text{g}/\text{mL}$)이 첨가된 10mL HBSS(calcium 및 magnesium 무첨가)를 이용하여 복강 삼출세포를 수집하였다. 이를 RPMI 1640 완전배지에 재부유시켜 37°C에서 3시간 배양한 후 부착되지 않은 세포들을 인산 완충액으로 세척하여 제거하고 부착세포들은 2,5 mM pyrophosphate와 rubber policeman로 수집하여 복강대식세포로 사용하였다. 암 세포주로는 mouse mammary carcinoma 세포와 mouse leukemia 세포, human histocytic lymphoma를 사용하였다.

4) 정상 면역 세포의 증식에 미치는 초식잡이 추출물의 영향 측정

상기에서와 같이 준비한 세포를 flat bottomed 96 well plate의 각 well에 분주한 다음 여기에 여러 농도의 초식잡이 추출물을 가하여 총량이 0.2 mL씩 되도록 조정하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 넣고 72시간 배양하였다. 이 때 배양세포의 ³H-thymidine(³H-TdR, specific activity : 2.0 Ci/mmol, ICN Biomedicals, High Wycombe, Bucks, England) pulse는 0.5uCi의 ³H-TDR을 각 well에 배양종료 18시간 전에 가하여 실시하고, ³H-TDR incorporation의 측정은 cell harvester로 glass fiber에 세포를 수확한 후 β-counter를 이용하였다.

5) 암세포 및 정상면역세포에 대한 세포독성 측정

MTT를 이용한 방법을 변형하여 실시하였다(1,2). MTT를 PBS용액에 5mg/mL의 농도가 되도록 녹인 다음, 무균 여과하여 4°C의 어두운 곳에 보관하였고, 보관된 지 3주 이내의 것을 검사에 사용하였다. 배양 중인 micorplate의 각 well에서 상층의 배지를 조심스럽게 160μL씩 첨가하였다. 이 때 세포를 함유하지 않은 well에도 MTT 희석액을 가해 주었다. 37°C, 5% Co₂에서 4시간 배양한 후 상층의 배지를 제거하여 세포 손실을 막기 위해 약 40μL 정도는 남겼다. 각 well에 100μL의 DMSO를 가한 후 실온에서 plate shaker로 약 20-30분간 흔들여 준 다음 ELISA reader (Micor plate EL311)를 사용하여 570nm 및 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) T림프구 아형

T림프구 아형의 구성비는 phycoerythrin(PE)-conjugated rat anti-mouse CD4(L#T\$) mAb와 FITC conjugated rat anti mouse DC8(Ly-2)mAb를 이용하고 IL-2 수용체는 FITC- conjugated rat anti-mouse CD25 mAb를 이용하여 분석하였다.

7) 대식세포에 의한 Nitric Oxide (NO)생산 측정

복강대식세포를 세포배양판에 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 재부유하여 IFN-γ

(10U/mL)와 LPS (1 μ g/mL)의 자극하에 48시간 배양하고 그 배양 상청액 내의 NO를 Griess [3]반응에 의해 측정하였다. 즉 100 μ L의 배양 상청액에 1% sulfanilamide dihydrochloride(60% acetic acid)혼합액 100 μ L를 가하여 실온에서 방치하였다. 20분 후 Elisa판독기 (bIO 다 INSTRUMENTS INC, MODEL el311 sl)를 사용하여 800 μ g /ML의 유지 농도에서 570NM에서 흡광도를 측정하였다.

8) Tumor necrosis factor(TNF)의 역가 측정

Tumor necrosis factor(TNF)의 측정은 ELISA kit (Genzyme, Boston, MA)를 사용하여 시행하였다. 즉 24시간 동안 항 TNF항체를 96 well plate 에 부착시킨 뒤 세척하고 여기에 검체 100 μ l를 넣고 1시간 동안 96well plate에서 반응시켰다. Tween 20 이 10%가 되게 첨가된 인산완충액(PBS)으로 세척후 90분 동안 항 TNF 단세포균 항체와 반응시켰다. 이를 세척한 후 60분 동안 peroxidase가 결합된 항 IgG 항체를 반응시키고 다시 세척한 다음 orthophenylene diamine용액을 15분간 반응시켰다. 0.5N HCl 용액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 TNF용액을 3200,1600, 800, 400, 200, 100 및 50 pg/mL의 농도로 조절하여 함께 측정하고 표준용액에서의 측정된 흡광도를 근거로 polynomial standard regression curve를 작성하고 작성된 곡선 방정식을 기준으로 검체 내에 포함된 TNF의 양을 구하였다.(4)

9) 대식세포의 탐식능 측정

복강대식세포의 탐식능은 fluorescent micorbead를 이용하여 flow cytometer로 측정하였다. (5).

10) 흑색종 세포 (B16F10)의 폐전이 실험

본 실험의 공시한 암세포주는 B16F10 마우스 흑색종 세포 (Tumor Repoitory of the National Cancer Institute, Bethesda, MD)로서 10% 우태아 혈청, sodium pyruvate, nonessential amino acids 및 L-glutamine이 함유된 Rpmi 1640 배지에 유지하였다. 암세포의 준비는 대수증식기의 암세포를 0.05% trypsin 0.02% EDTA용액으로 수집하여 2회 수세하여 PBS를 농도를 조정하였다. B16F10 세포 (2×10^5)를 마우스 미정맥을 통하여 주사한 후 14일째에 폐를 제거하여 흑색종의 수를 관찰하여 산정하였다.(6).

제 11 절 초석잠 뿌리 추출물의 항산화 활성

1. 재료 및 방법

가. 재료

초석잠은 경남 밀양시 산외면에서 직접 재배하였다.

나. 시료의 추출

분쇄된 뿌리 건조물을 Fig. 1과 같은 계통으로 분획 추출하였다. 696.9 g의 뿌리 분쇄 건조물을 메탄올 4 L로 12시간씩 3회 추출하고 GF/C(47 mm ϕ , Whatman)로 감압 여과 시킨 후 회전식 감압 증류 장치로 농축시켰다. 농축물을 300 mL의 3차 증류수에 녹인 후 핵산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올순으로 1:1의 비율로 혼합한 후 분액 여두를 사용하여 3시간씩 3회 반복 분획하였다. 각각의 분획물을 농축하여 시료 건조물량에 대한 백분율로 추출 수율을 계산하였다.

1) Total polyphenols 과 flavonoids 함량 측정

초석잠 뿌리의 total polyphenols 함량을 Folin-Denis법[11]으로 측정하였다. 메탄올 추출물(99%메탄올 1mL에 추출물 500 μ g을 용해)용액 0.1mL에 Folin-Ciocalteau 시약 0.1mL을 섞어 3분간 실온에서 방치한 후, Na₂CO₃ 포화용액 0.2 mL을 가하여 잘 섞고 증류수로 2 mL가 되게 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 방치하였다. 그 후, 3,000G에서 10분 동안 원심분리하고 그 상등액을 취하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Caffeic acid의 농도가 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL 이 되도록 하여 작성한 검량선으로 측정된 흡광도를 농도로 환산하였다.

Total flavonoids 함량은 메탄올 추출물(99%메탄올 1 mL에 추출물 500 μ g을 용해)에 diethyleneglycol 2 mL, 1N-NaOH 0.02 mL을 가한 후, 37 $^{\circ}$ C 항온조에서 1시간 동안 방치 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하여 환산하였다[7]. 이 때 Rutin의 농도가 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL이 되도록 하여 작성한 검량선으로 농도를 산출하였다.

2) DPPH에 의한 수소 공여능 측정

DPPH는 비교적 안정한 라디칼로 메탄올에 녹이면 보라색을 나타내지만 항산화 활성을 갖는 물질과 반응하면 색이 손실된다. 이러한 성질을 이용하여 간단하게 항산화 활성을 측정할 수 있다[8]. 각 용매 별로 분획하여 추출한 시료를 각각 4,000 μ g, 2,000 μ g, 1,000 μ g, 600 μ g, 250 μ g, 125.13 μ g, 15.64 μ g, 7.81 μ g, 1.95 μ g을 취해서 메탄올 4 mL에 녹인 후, 1.5×10^{-4} M DPPH 메탄올 용액 1 mL를 첨가하였다. 그 후 대조군 BHA, BHT, α -tocopherol과 함께 30분간 실온에서 방치 한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 과산화 지질 형성 억제능 측정

과산화지질 형성 억제능 측정은 linoleic acid를 자동산화 모델로 하여 측정하였다 [9]. 시험액 조제를 위해 20 mL 유리병에 linoleic acid 용액 (linoleic acid 2.5 mg을 메탄올 1 mL에 용해) 0.57 mL와 1 M phosphate buffer (pH 7.0) 2.25 mL를 넣고, 메탄올에 각각 10 mg/mL 농도로 희석한 추출물을 30 μ L 씩 첨가하였다. 자동 산화를 진행시키기 위해 시험액을 차광시킨 3840 $^{\circ}$ C의 배양기에 투입하여 매일 생성되는 과산화물의 양을 ferric thiocyanate 방법으로 측정하였으며, 대조군으로 BHA, BHT, α -tocopherol를 사용하였다. 즉 배양된 시험액 50 μ L와 75% 메탄올 4.85 mL를 시험관에 넣고 잘 섞은 후, 30% ammonium thiocyanate 50 μ L를 반응액에 가한 후 3분 동안 반응시키고 3.5% 염산용액에 녹인 20 mM ferrous chloride 50 μ L를 반응액에 가하여 나타나는 붉은색을 UV/VIS 분광 광도계를 이용하여 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

4) 아질산염 소거능 측정

Kato 등[15]의 방법으로 1 mM NaNO₂ 용액 2 mL에 각 시료(중류수 1 mL에 추출물 1 mg을 용해)를 1 mL씩 가하고, 0.1 N HCl, 0.2 M 구연산 완충액으로 pH 1.2, 3.03, 5.97으로 조절한 후 반응 용액의 부피를 10 mL로 맞췄다. 이 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액 1 mL를 취해 2% 초산용액 2 mL와 30% 초산 용액으로 용해한 griss reagent 0.4 mL를 가한 후 실온에서 15분 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 무 첨가구의 흡광도에 대한 시료 첨가구의 흡광도의 백분율로 나타내었다.

5) 칼럼 크로마토그래피

항산화 활성도가 가장 높음을 나타낸 에틸아세테이트의 추출물을 실리카겔 칼럼 (직경:3cm, 길이:67cm, 입자크기: 63200 μ m)을 사용하여 분리하였다. 용출 용매로는 클로로포름:메탄올:중류수 (70:30:5)의 하층을 이용하였다. 칼럼의 맨 위 부분에 소량의 메탄올에 녹인 에틸아세테이트 추출물을 넣고 1.0 mL/min의 속도로 용출 용매를 전개시켜 총 6개의 분획으로 나누었으며, 용출 용매를 제거 하기 위해 회전식 감압 증류장치를 이용하였다. 각각의 분획은 DPPH방법을 이용해 항산화 활성도가 측정되고, UV/VIS 분광 광도계로 흡광도 파장이 측정되었다.

6) 박층 크로마토그래피

박층 크로마토그래피는 칼럼 크로마토그래피의 분획을 6개의 분획으로 분류하기 위해 사용되었다. 전개 상으로는 클로로포름 : 메탄올 : 중류수 (70:30:5)의 하층이 사용되었으며 UV light 검출기와 10% H₂SO₄에 1%의 Ce(SO₄)를 녹인 발색제가 사용

되어 Rf값이 구해졌다.

7) 기기 분석에 의한 구조 확인

가) HPLC에 의한 분리 정제

TLC에 의해 분리한 활성성분을 HPLC(Water CO. Model-490E, UV detector)를 이용하여 정제하였다. Hypersil ODS C18 (30cm × 3.9mm ID)column를 이용하여 270nm에서 실험하였다. Mobile phase로는 chloroform : methanol(9 : 1)의 혼합용매를 사용하였고, flow rate는 1mL/min에서 조절하면서 실험하였다.

HPLC의 분석 조건 mobile phase을 Acetonitrile : water(15 : 75), column H₂O SilC₁₈ temperature, 30℃, Flow rate(mL/min) : 1.2mL/min. Detection UV λ_{max} =322nm.

나) 기기 분석에 의한 구조 결정

(1) Infrared(IR) spectrum

정제한 물질 0.1mg을 KBr 5mg과 잘 혼합한 후 막자 사발에서 마쇄하여 KBr pellet을 만든 다음 Perkin Elmer 841(USA)를 사용하여 물질의 IR spectrum을 조사하였다.

(2) Mass spectrum

정제한 물질 소량을 CH₂Cl₂에 녹인 후 Hewlett-Packard Co.의 GC-MSD HP 6890 series를 이용하여 분석하였다(methylsilosane, 24m × 0.32mm).

(3) ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum

Varian UNITY 300(300 MHz)을 이용하여 NMR Spectrum을 조사하였다. NMR Spectrum을 조사할 때에는, 정제한 물질 0.5mg을 0.75mL CdCl₂에 녹여서 NMR용 tube에 넣고 NMR Spectrum을 찍은 후 곧 바로 여기에 acetic anhydride 10μl를 가하여 acetylation 시킨 다음 NMR Spectrum을 조사하였다(Column : 18cm × 0.5mm).

제 12 절 항암 및 면역효과의 결과 및 고찰

1. 초석잠 추출물이 세포증식에 미치는 영향

비장 세포 및 암세포를 배양하면서 배양초기에 초석잠 추출물을 첨가한 후 각 세포의 증식양상을 산정한 결과 Table 1 과 같았다. 초석잠 추출물의 농도 증가에 따라 증식능이 비장세포의 경우 현저하게 증가하였으나 암 세포주에서는 그 증식능이 다소 억제됨을 알수 있었다. 초석잠의 알코올 추출물이 각종 암세포에 의하여 저저작용을 가질 수 있음을 나타내었으며, 아울러 생체의 면역계가 다른 생체기관들과 상호 유기적으로 연관되어 있음을 고려할 때 초석잠 추출물이 면역반응 조절자

(immuno response modifier)로서의 작용 가능성도 고려된다 (15). Table 2에서 초석잠 추출물이 림프구의 증식반응에 미치는 영향을 살펴 본 결과 비장세포의 증식이 어느 정도 향진되었다. 이는 초석잠 추출물이 T 또는 B 세포를 선택적으로 증식시키는 polyclonal activity로서 작용할 수 있음을 증명한다고 하겠다. 따듯 초석잠 추출물이 T 또는 B 세포에 대한 선택적 polyclonal activity로서 활성화에 대하여는 T 또는 B 세포를 순수 분리하여 증식반응을 측정하든지 초석잠 추출물의 생체내 및 시험관내 효과를 Thy-1,2 및 막 IgM을 비롯한 T 또는 B 세포특이 분자에 대한 단클론 항체를 이용한 flow cytometric analysis 실시함이 보다 분명하게 구명되리라 사료된다 (15). 또한, 초석잠 추출물을 비장세포 배양초기에 첨가하고 48시간에 세포 생존율을 검사한 결과 Table 2와 같이 직접적인 세포 독성활성 (direct cytotoxic activity)을 관찰할 수 없었다. 또한 마우스 lymphoma cell의 증식반응은 억제되었는데 이러한 차이는 trypan blue dye exclusion에 의한 세포 생존검사로 확인한 결과 Table 2에서 나타낸 바와 같이 초석잠 추출물일 각 세포에 대한 직접적인 세포 독성의 차이에 기인하지는 않는 것으로 생각된다.

Table 1. Effects of *Stachys sieboldii* extract on the proliferation of spleen cells and cancer cells.

<i>Stachys sieboldii</i> ($\mu\text{g/mL}$)	CPM*			
	Spleen cells	FM3A/S ^b	P383/Sc	U937/S
0	3081	6769	6564	6790
250	100,134	5230	4401	4875
500	100,360	3890	3843	2330
1000	3864	1060	1034	979

Mouse spleen cells($2 \times 10^6/\text{mL}$) and FM3A/S^b, P383/Sc, U937/S^d ($1 \times 10^4/\text{mL}$) were cultured with various concentrations of *Stachys sieboldii* extracts for 48hr in a 5% CO₂ environments, and pulsed with 5H-TdR(0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) for the last 16hrs. *Count per minute

Table 2. Effect of *Stachys sieboldii* extract on Splenocytes Viability.

<i>Stachys sieboldii</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Viability(%)		
	FM3A/S ^b	P383/Sc	U937/S
0	46.8	46.6	47.2
100	52.8	50.9	53.8
250	48.6	48.7	50.7
500	51.4	46.0	50
1000	43.9	40.4	

Splenocytes($2 \times 10^6 \text{ mL}$) were cultured with various concentrations of *Stachys sieboldii* for 48h in a 5% CO₂ incubator. Viable cells were counted in a hemacytometer by trypan blue dye exclusion. Viability of splenocytes at culture initiation is 96%.

2. 초식잠 및 추출물 투여가 T세포아군의 변화에 미치는 영향

정상 대조군에 비하여 초식잠 및 추출물 급식군의 경우에 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포의 비율이 증가하였다. 그러나 CD4⁺/CD8⁺ 비는 대조군 4.3에 비하여 초식잠 추출물은 4.7로 양군간의 차이를 관찰할 수 없었다.(Table3). 초식잠 추출물을 마우스에 투여한 후 비장세포의 T 세포아형의 변화에서는 helper T(CD4⁺) 세포 및 suppressor T(CD8⁺)세포의 증가는 보였으나 CD4⁺/CD8⁺ 세포의 비는 변하지 않았으므로, 생체내에서도 면역계를 활성화시킬 수 있음을 보여주는 결과로 생각된다.

Table 3. Effect of *Stachys sieboldii* feeding on T cell subsets of spleen in mice.

	Percent of single positive cells		
	CD4 ⁺ CD8 ⁺ (L3T ⁺)	CD4 ⁺ CD8 ⁺ (Lyt2 ⁺)	Ratio of CD4 ⁺ CD8 ⁺
Normal control	20.4	5.5	4.3
<i>Stachys sieboldii</i> -fed	30.2	7.4	4.7

Spleen cells were stained with FITC-anti Lyt2 mAb and phycoerthrin-anti L3T4 mAb. Dual parameter direct immunofluorescence of CD4 and CD8 cells were analyzed by flow cytometry. *Stachys sieboldii* feeding protocols are described on the Materials and Methods. Data are from a representative experiment of three.

3. 초석잠 추출물이 복강대식세포의 NO 및 TNF- α 생산에 미치는 영향

복강 대식세포로부터의 NO 및 TNF- α 생산에 미치는 초석잠 추출물의 영향을 특정한 결과 Table.4 와 같다. 초석잠 추출물은 NO 생산을 약간 자극함을 알 수 있었으며 TNF- α 생산도 어느 정도 항진 시킬수 있음을 관찰할 수 있었다.(Figure 1.) 탐식 기능이 있는 단백 탐식세포계 세포를 활성화시킬 수 있는 superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 반응성 산소중간물질(reactive oxygen intermediate: ROI)이나 NO와같은 반응성 질소 중간 물질(reactive niteogen intermediate: RNI)을 생성하여 탐식한 세포내 미생물을 사멸시키거나 증식을 억제한다. NO는 산화를 통하여 효소의 작용을 조절하고 혈소판의 기능과 신경전달기능 및 림프구 증식을 변화시켜 암세포와 미생물에 대한 대식세포의 세포독성을 매개한다. 또한, NO 생산에 대한 초석잠 추출물의 약량반응 곡선을 알아본 바 지적 자극농도는 250 μ g/mL이었다. (Table.5) 또한 TNF- α 는 활성화된 대식세포로부터 생산되는 물질로서 특정 암 세포주에 대한 세포 독성과 항바이러스 작용이 있고 급성 및 만성 염증 질환에서 일어나는 생체 반응에도 중요한 역할을 하는 사이토카인이다.(17)

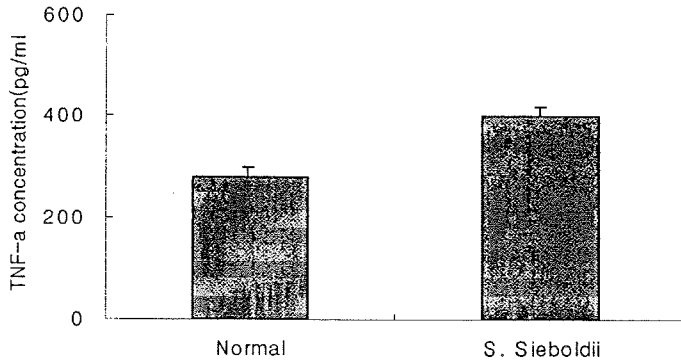


Figure 1. Effect of *Stachys sieboldii* solution feeding on TNF- α - production in mice. *Stachys Sieboldii* group of mice intaked *Stachys sieboldii* extracts solution in tap water (3g/200mL/5mice) for 21 days. All groups of mice were bled by heart puncture. Sera were prepared and assayed for TNF- α concentrations were 262 pg/mL (Normal control) and 443 pg/mL (*Stachys sieboldii* solution group). *p <0.05.

Table 4. Nitrite production from normal mice peritoneal macrophages.

Stimuli ^{a)}	NO ₂ concentration(μM)
Media only	12±0.4
<i>Stachys sieboldii</i>	28±0.6
LPS+ γ-IFN	38±0.3
LPS+ γ-IFN+ <i>Stachys sieboldii</i>	37.3±0.4

Macrophage were incubated for 48 hrs with the reagents indicated. NO₂ concentration was determined spectrophotometrically at 570nm after reaction with an equal volume of the culture suspensions (100 uL) and Griss reagent at room temperature for 10 minutes. Each value in the table represents the mean±SD of three cultures. a) The concentration used were γ-IFN 10U/mL, LPS 1μg/mL, *Stachys Sieboldii* solution 500 μg/mL.

Table 5. Nitrite production from peritoneal macrophages stimulated with various concentration of *Stachys sieboldii* extract

<i>S. sieboldii</i> (μg/mL)	NO ₂ concentration(μM)
0	4.57±0.3
50	12.4±0.2
250	16.0±0.1
500	22.0±0.2
1000	17.0±0.2

Macrophages were incubated for 37°C for 48 hrs with the *Stachys Sieboldii* concentrations indicated. NO₂ concentration was determined spectrophotometrically at 540nm after reaction with an equal volume of the culture supernants (100μL) and Griess reagent at room temperature for 10 min Each value in Table represents the mean±SD of three cultures.

4. 초석잠 추출물이 암세포의 폐전이에 미치는 영향

초석잠 추출물 급식군에서 대조군에 비하여 B16F10 세포의 폐전이는 숫적으로 감소하였으며 전이된 암세포 집락의 크기도 초석잠 추출물 급식군에 현저하게 작아 초석잠 추출물이 암세포의전이 뿐만 아니라 일단 전이된 암세포의 증식도 억제함을 알

수 있었다. (Fig 2.) 이는 T 세포에 의한 IL-2 및 IFN- γ 그리고 본 실험 결과 항진되었던 TNF- α 와 NO 외에도 복강대식 세포로부터의 IL-12, IL-15 등의 생산을 항진시켜 이에 의한 대식세포를 비롯한 면역계의 효과 세포들의 기능이 항진된 결과로 생각된다. (18) 본 연구 결과 초석잠 추출물을 이용한 항암제 또는 면역기능의 강화를 위한 면역반응 보조제로서의 개발 가능성이 기대되면 이를 기본 자료로 하여 이러한 기작들에 관한 연구가 앞으로 수행되어야 할 것이다.

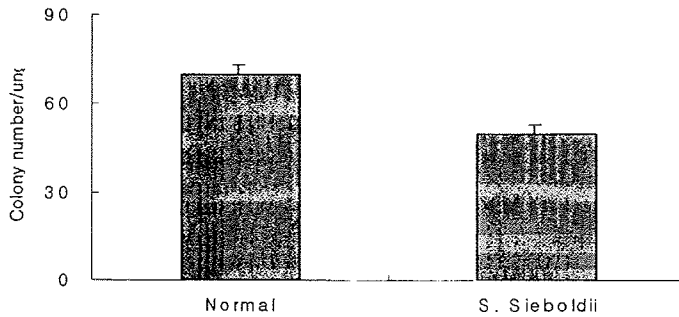


Figure 2. Inhibition of lung colonization by *Stachys sieboldii* group of mice fed *Stachys Sieboldii* for 21 days. All groups of mice were injected intravenously with 2×10^5 B16F10 melanoma cells on day. Lungs were removed on day 21, and the number of surface colonies was counted.

제 13 절 항산화 활성에 대한 결과 및 고찰

1. 초석잠 메탄올 추출물의 수율

초석잠의 메탄올 추출물에서 total polyphenols 과 flavonoids의 함량을 측정하여 Table 6에 나타내었으며, 활성 성분에 대한 특성을 검토하고자 극성이 다른 유기 용매인 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 및 부탄올순으로 순차적으로 추출물을 용출하여 얻은 수율을 Fig. 3에 나타내었다. 건조시켜 가루 상태의 초석잠 뿌리 (*Stachys sieboldii* MIQ.) 696.6g을 메탄올로 추출하여 86.37g (12.4%)의 추출물을 얻었으며 이 중 86.37g을 취하여 헥산 추출물에서 2.86g (3.31%), 클로르포름, 3.27g (3.79%), 에틸아세테이트, 1.23g (1.42%), 부탄올, 9.79g (11.34%), 증류수, 59.77g (69.19%)의 추출

물을 각각 얻었다. 그 중 에틸아세테이트의 추출물에서 높은 항산화 활성도를 보여 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 다시 분획하였다.

Table 6. Amounts of polyphenols and flavonoids extracted with methanol from *Stachys sieboldii*.

	polyphenols	flavonoids
Contain volume(%)	3.02	1.97

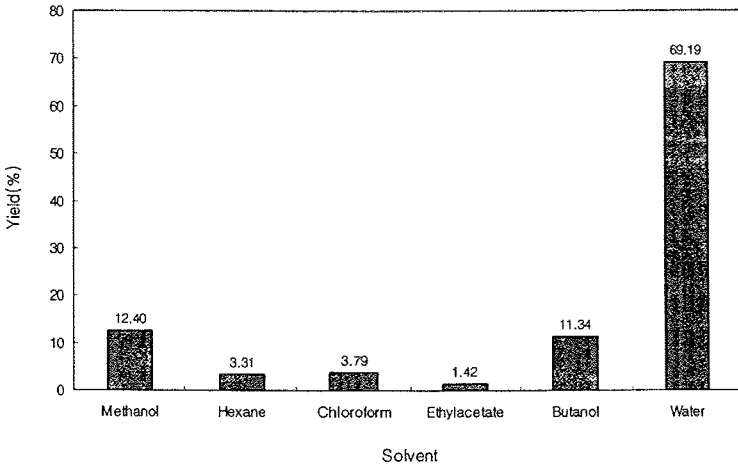


Fig. 3. Relative amounts of the extracted fractions from *Stachys sieboldii*.

2. DPPH에 의한 항산화 활성도 측정

각 용매별로 추출한 시료의 DPPH에 의한 자유 라디칼 소거작용을 측정하여 라디칼의 50%를 소거시키는 농도 값을 IC50으로 표시하였으며 Fig. 4에 각 추출 시료의 비교 값을 나타내었다. 증류수가 200 μg 으로 가장 낮은 값을 보였고 헥산 (100 μg), 클로르포름 (80 μg),

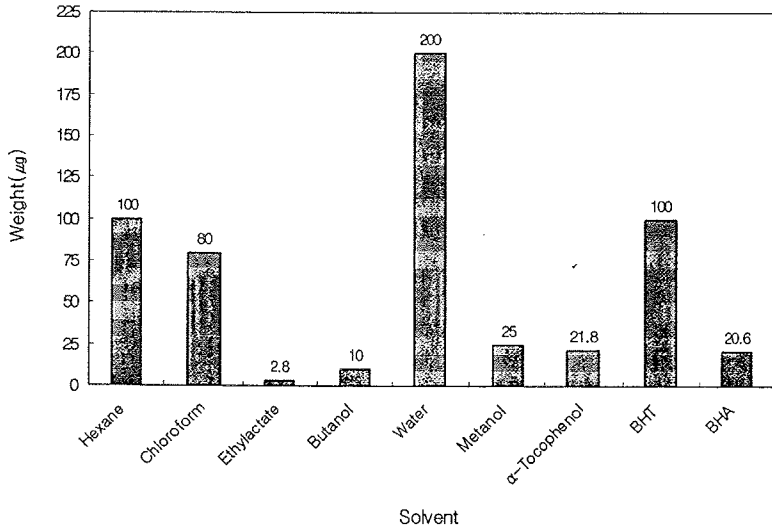


Fig. 4. Antioxidant activity of the extracted fractions from *stachys sieboldii* by DPPH method.

메탄올 (25 µg), 부탄올 (10 µg), 에틸 아세테이트 (2.8 µg)의 순으로 높은 소거능을 보이고 있다. 특히 에틸 아세테이트와 부탄올 추출물은 대조군으로 사용된 기존의 항산화제인 BHA (20.6 µg), BHT (100 µg), α-tocopherol (21.8 µg)에 비해 높은 활성도를 나타내고 있음을 알 수 있었다.

3. 과산화 지질(linoleic acid) 형성 억제능 측정

활성 산소는 우리 몸의 지질(주로 불포화 지방산)과 결합하여 과산화 지질로 변화된다. 이러한 과산화 지질은 생체 내에서 효소를 불활성화 시키고 호르몬 생합성을 저하시킬 뿐 아니라, 외부 환경이나 자극에 대한 방어능력을 상실하게 하여 각종 성인병을 유발시킨다. 특히 linoleic acid(C₁₈H₃₂O₂)는 2개의 이중결합을 가지는 불포화 지방산으로 공기 중에서 산화되기 쉬운 건성유이다. 각 분획별 초석잠 추출물을 이

용하여 이러한 과산화 지질(linoleic acid)에 대한 형성 억제능을 측정 하고 결과를 Fig. 5 에 나타내었다. control이 2일부터 급격한 산화를 보이고 있지만 용매 추출물 들은 3일 동안 흡광도가 0.1~0.2 사이로 큰 변화를 나타내지 않았다. 하지만 4일부터 증류수, 메탄올, 헥산, 클로르포름 순으로 급격한 흡광도의 변화를 보이며 산화가 되어감을 보였다. 에틸아세테이트와 부탄올은 대조군으로 사용된 기존의 항산화제인 BHA, BHT, α -tocopherol와 비슷하게 9일 동안 흡광도의 변화를 보이지 않으면서 지속적인 과산화 지질 형성 억제능을 보여 주고 있었다.

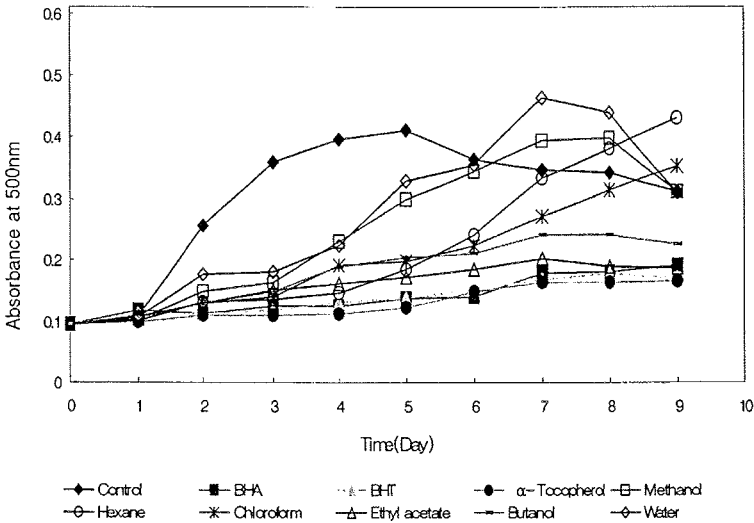


Fig 5. Antioxidant activity of the extracted fractions from *Stachys sieboldii* on the autooxidant of linoleic acid by ferric thiocyanate method.

4. 아질산염 소거능 측정

아질산염은 육제품의 발색과 *Clostridium botulinum* 성장저해제로 각종 식품에 첨가되고 있다. 질산염은 식물체내, 소화기관 및 식품의 저장과정에서 질산환원효소, 환원세균 등의 작용에 의해 아질산염으로 환원된다. 질산염이 많이 함유된 식품을

다량 섭취하게 되면 methemoglobin증 등의 중독증상과 아질산염과 제2급 및 3급 아민과의 nitroso화 반응이 위장내의 낮은 산성조건에서 쉽게 일어나서 발암물질인 nitrosamine을 생성할 수도 있다. 아질산염의 nitrosamine화 반응이 인체와 유사한 pH에서 최적 조건을 가지므로, pH 1.2, 3.03, 5.97에서 각 추출물의 아질산염의 분해 작용을 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었다. pH가 낮을수록 높은 소거능을 보였으며 특히 pH 1.2에서는 모든 추출물군에서 80~90% 이상의 분해능을 보이고 있다. pH 3.03 과 pH 5.97에서는 에틸아세테이트 추출물이 각각 83.86%, 54.35%를 나타내며 다른 추출물에 비해 우수한 소거능을 보이고 있다.

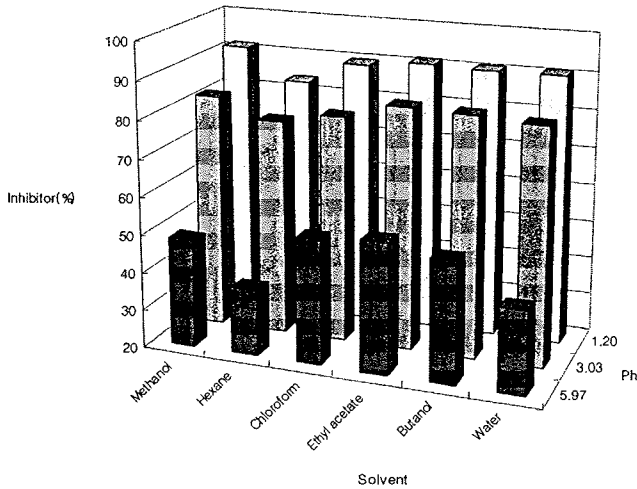


Fig 6. Nitrite scavenging ability of the extracted fractions from *Stachys seboldii*.

5. 박충 크로마토그래피를 이용한 칼럼 크로마토그래피 분획물의 분리

박충 크로마토그래피는 일정 두께를 가진 박충의 흡착제를 고정상으로 하고, 이동하는 용매상과 고정상에 대한 친화력이 물질에 따라 다른 것을 이용한 분리분석법으로 분리된 이동거리 Rf로 분석하는 장치이다. 실리카겔 칼럼을 이용해 1 mL/min

속도로 용출시킨 에틸아세테이트의 추출물을 박층 크로마토그래피를 이용해 64개의 fraction을 같은 Rf값을 가지고 있는 6개의 분획으로 나누었고 이를 각각 ES-R1(1-3), ES-R2(46), ES-R3(714), ES-R4,(1528), ES-R5(2936), ES-R6(37~65)로 명명하였다. 분리되어진 띠의 확인은 UV 254 nm와 1% Ce(SO₄)/10%H₂SO₄를 이용하였으며 그 결과를 Fig. 7 에 나타내었다. 각 분획물을 감압 증류하여 ES-R1에서는 하얀 분말을, ES-R2에서는 노란 분말을 ES-R3, ES-R4에서는 연두색 분말을 ES-R5, ES-R6에서는 갈색 분말을 얻었다. 각 띠는 높은 Rf에서 낮은 Rf으로 이동되며 이것은 비극성에서 극성으로 옮겨가는 것을 의미한다.

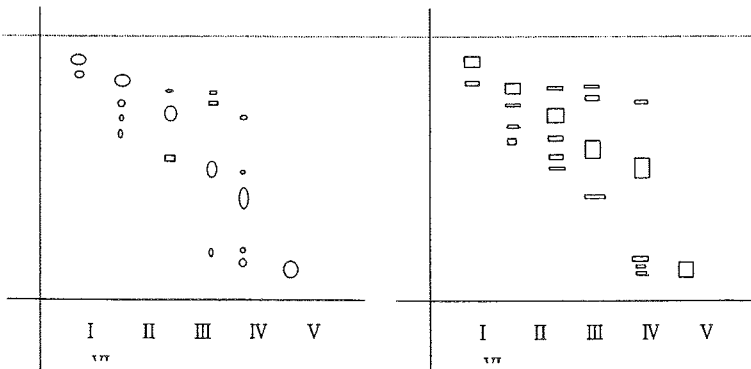


Fig. 7. TLC of the fraction separated from the silica gel column chromatography of the ethyl acetate extract from *Stachys sieboldii*. (A) under Ce(SO₄)/10%H₂SO₄; (B) under UV light 254nm.

6. 칼럼 크로마토 그래피를 이용한 에틸아세테이트 추출물의 분리 및 항산화 활성 측정

DPPH를 통한 전자 소거능, 산화 지질 형성능 억제율과, 아질산염 소거능 측정을 통해 에틸아세테이트의 추출물이 가장 좋은 항산화 활성도를 나타냄을 알 수 있으므로, 다시 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 분획 하였다. 각 분획별 흡광도의 변화를 Fig. 8에 나타내었으며 최대 흡광도값을 Table 6에 나타내었으며 칼럼

분획물은 280-330 nm 사이에서 높은 흡광도를 나타내고 있다. 각 분획을 DPPH법을 이용해 항산화 활성도를 측정하여 Fig. 9에 나타내었으며, 325nm 및 289nm에서 최대흡광도 값을 가지는 값인 ES-5가 가장 높은 활성도를 나타내었다. 이러한 모양은 phenolic acids 과 flavonoids의 UV-VIS spectral 값인 200~400nm 사이와 일치하며 특히 flavonoids 계열 중 flavones의 최대 흡광범위로 알려져 있는 띠 I 이 300~330nm, 띠 II 가 275~295nm, 와 일치하는 범위를 나타내고 있다. 이러한 범위는 초석잠 (*Stachys sieboldii*)에서 항산화 활성도가 높은 부분만을 위해 분획하여 나타난 UV-VIS spectral data의 범위와 같으므로 본 연구의 추출물 중에도 여러 phenolic compounds가 존재함을 추증 할 수 있었다.

Table 6. UV/VIS spectral data for the fractions of ethyl acetate from *Stachys sieboldii* by silica gel column chromatography

fraction	$\lambda_{max}(nm)$
ES-R1	284,315
ES-R2	317,284
ES-R3	326,287
ES-R4	322,296
ES-R5	325,289,
ES-R6	289,330

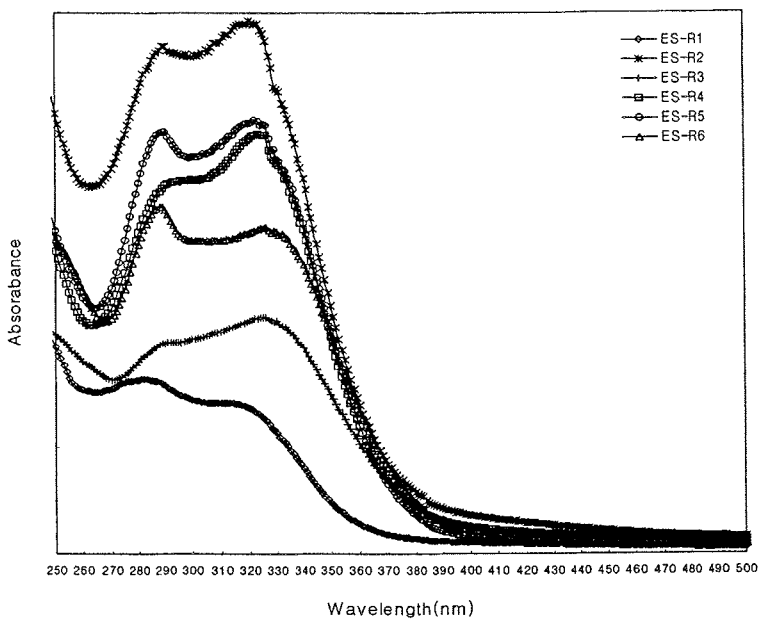


Fig. 8. UV/VIS spectral scan for the fractions of ethylacetate from *Stachys sieboldii* MIQ. roots by silica gel column chromatography.

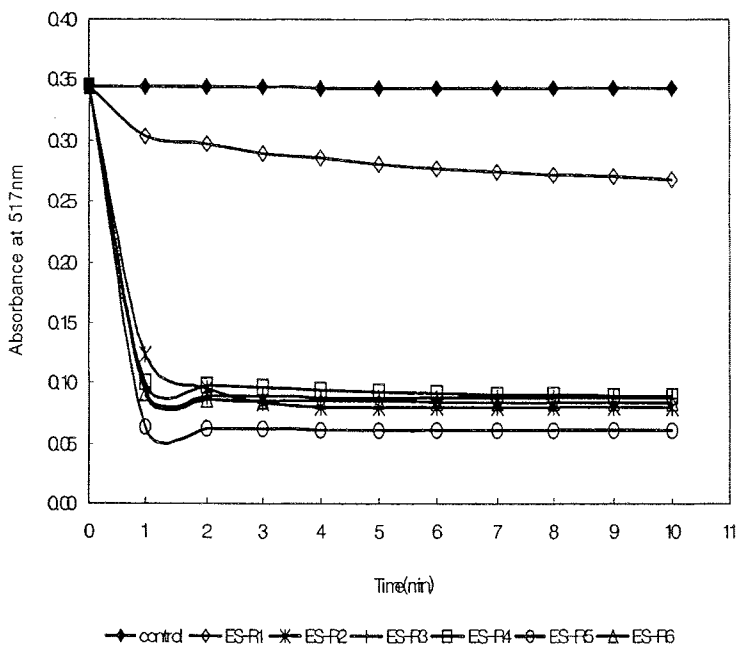


Fig. 9. Antioxidant activity of the isolated fraction of ethylacetate from *Stachys sieboldii* MIQ. roots by silica gel column by DPPH method.

7. 기기분석에 의한 구조확인

HPLC에 의한 분획한 회분을 anthon test, Liebermann-Buchard test와 $SbCl_3$ 반응으로 분리 정제된 회분을 확인하였다. Liebermann-Buchard test에서는 적색의 양성 반응이 나타났고, $SbCl_3$ 의 $CHCl_3$ 용액 및 TLC상에서는 분홍색에서 청색을 나타냈으므로 iridoid의 화학골격을 가졌음을 알 수 있었고, anthon test 양성에서 배당체임을 알 수 있었다.

UV의 231nm에서 carbonyl group이 double bond에 연결된 enol-ether system을 가진 것으로서 iridoid임을 예측할 수 있다. 또 1H -NMR의 spectrum에서 C_3H 가 7.50ppm에서 broad singlet로 나타내고 있으므로 이러한 결과는 carbonyl group이 공액이 된 enol-ether임을 알 수 있다. δ 2.08ppm에서 acetyl group을 확인하였고, δ 1.50ppm에서 3H broad singlet으로부터 acetyl group이 8번 탄소에 연결되었음을 알 수 있었다. 그밖에 δ 2.14ppm에서 broad singlet로 나타난 peak는 C_6 의 methylene이 보통 δ 2.60ppm 근처에서 나타나고 있으며 C_7 의 methylene은 보통 δ 2.30ppm 근처에서 나타나는 점과 더불어 C_7 의 methylene으로 assignment되었다. 그리고 δ 3.08ppm에서 나타난 1H , broad singlet는 C_5 및 C_9 의 methine proton이 겹쳐진 것으로 추정하였다. 또 가수분해에 의한 구성당으로서 glucose로 확인되었다. 그 구조에 1분자의 glucose가 결합하는 구조인 것으로 생각된다. 그리고 ^{13}C -NMR spectrum을 비교해 보면 glucose의 6번 탄소(δ 66.1)는 4.6ppm의 저자장의 shift 5의 탄소(δ 75.3)은 1.7ppm 고자장 shift로서 1분자의 glucose의 결합위치는 6번이었다. 이상의 결과로 초석잠 추출물은 Iridoid glycoside인 것으로 생각된다.

Stachyoside 1(1) $[\alpha]_{23}^{20} -64.1^\circ$ (c=1.41, MeOH), Anal. Calcd $C_{21}H_{34}O_{15} \cdot 3/2H_2O$: C, 45.57; H, 6.74. Found: C, 45.41; H, 6.90. GC-MS m/z : 549 (M+Na)⁺. IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3398, 2928, 1655, 1235, 1012, 944. 1H -NMR (CD_3OD): δ : 1.24 (3H, s, CH_3), 1.80 (1H, dd, $J=14$, 4Hz, H-7), 1.89 (1H, dd, $J=14$, 5Hz, H-7'), 2.54 (1H, br s, H-9), 4.59 (1H, d, $J=8Hz$, H-1 of inner glc), 4.96 (1H, dd, $J=6.5$, 1.5Hz, H-4), 5.68 (1H, d, $J=1$ Hz, H-1), 6.30 (1H, d, $J=6.5Hz$, H-3). ^{13}C -NMR: Table I.

Stachyoside 2(2) $[\alpha]_{23}^{20} -53.8^\circ$ (c=0.40, MeOH), Anal. Calcd $C_{35}H_{46}O_{19} \cdot 2H_2O$: C, 52.11; H, 6.25. Found: C, 52.33; H, 6.19. FAB-MS m/z : 771 (M+H)⁺. IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3404, 2924, 1700, 1628, 1598, 1515, 1272, 1158, 1124, 1062,

1030. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 219 (4.39), 231 sh (4.28), 246 sh (4.15), 291 (4.24), 329 (4.42). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ 1.07 (3H, d, $J=6.5\text{Hz}$, CH_3 of rham), 2.79 (2H, m, H- β), 3.88 (3H, s, OCH_3), 4.31 (1H, d, $J=7\text{Hz}$, H-1 of ara), 4.38 (1H, d, $J=8\text{Hz}$, H-1 of glc), 5.48 (1H, br s, H-1 of rham), 6.37 (1H, d, $J=16\text{Hz}$, H- β'), 6.5-7.2 (6H, aromatic H), 7.66 (1H, d, $J=16\text{Hz}$, H- γ'). $^{13}\text{C-NMR}$: Table I.

Table 7. ^{13}C -NMR Chemical Shifts 1, 2

Carbon No.	1 ^{a)}	2 ^{b)}
1	93.5	131.5
3	142.1	116.3
4	107.3	146.1
5	72.0	144.7
6	73.2	117.1
7	46.2	121.3
8	77.1	71.9
9	57.7	36.6
10	25.2	127.6
Glc-1	99.2	111.8
2	76.4	150.8
3	77.9	149.4
4	70.3	116.5
5	75.3	124.3
6	66.1	168.2
Glc-1'	98.7	115.1
2'	72.3	147.9
3'	74.0	104.2
4'	70.1	76.0
5'	72.7	82.3
6'	61.3	70.5
5		76.0
6		62.3
1		102.0
2		82.8
3		72.3
4		74.2
5		70.3
6		18.4
1		107.5
2		72.8
3		74.3
4		69.8
5		67.3
OCH ₃		56.5

a) In D₂O, b) in CDCl₃.

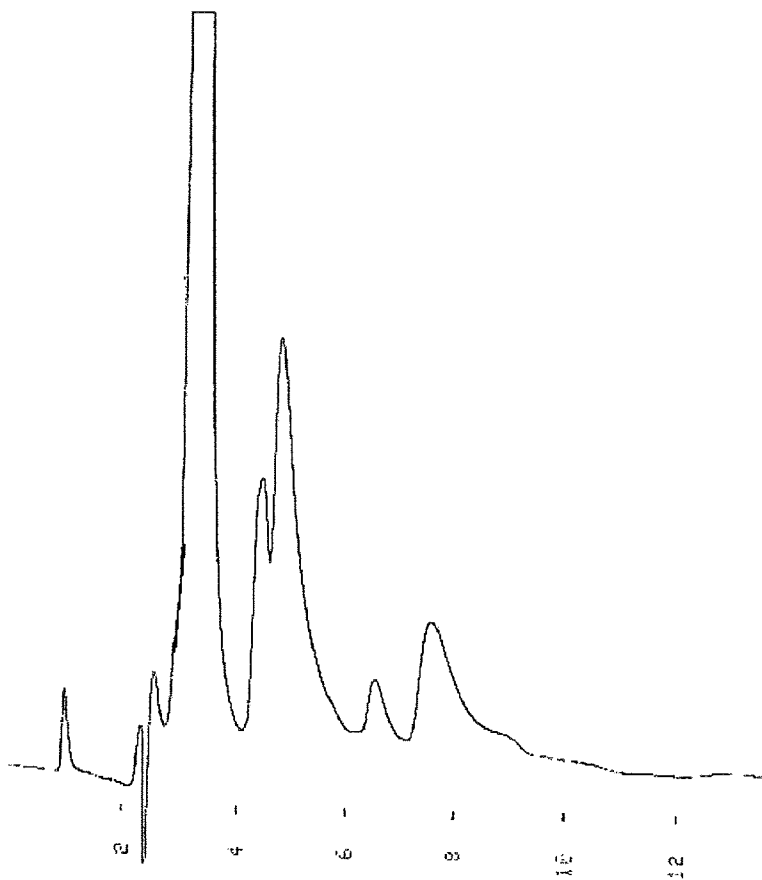


Fig. 10 HPLC chromatograms of the fraction obtained from extract of *Stachys sieboldii*.

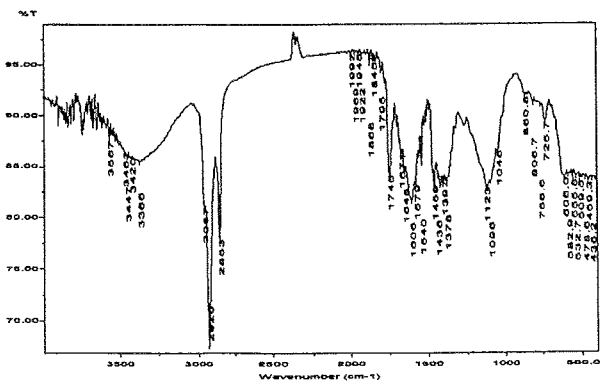
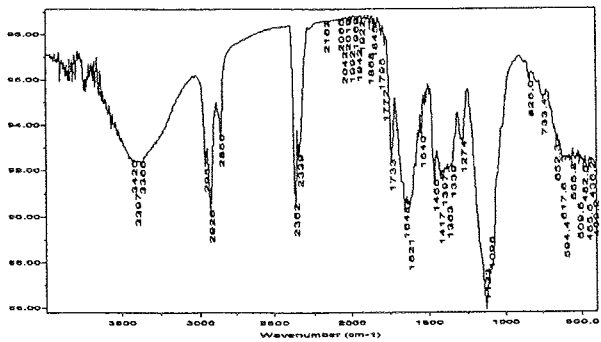


Fig. 11 IR spectrum of the fraction obtained from extract of *Stachys sieboldii*

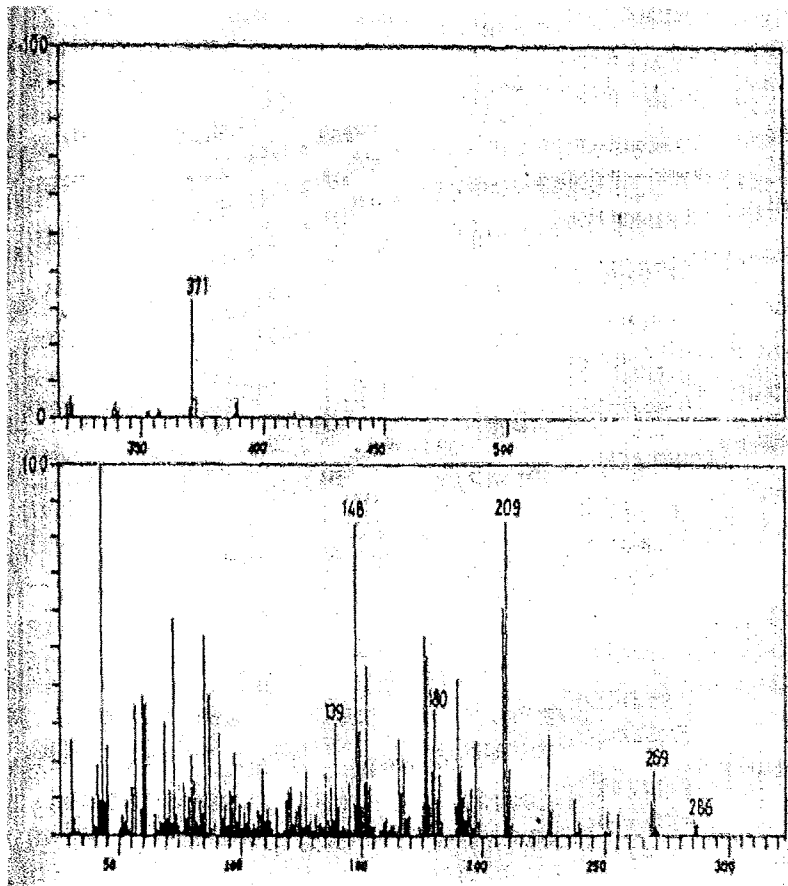


Fig. 12 Mass spectrum of the fraction obtained from extract of *Stachys sieboldii*

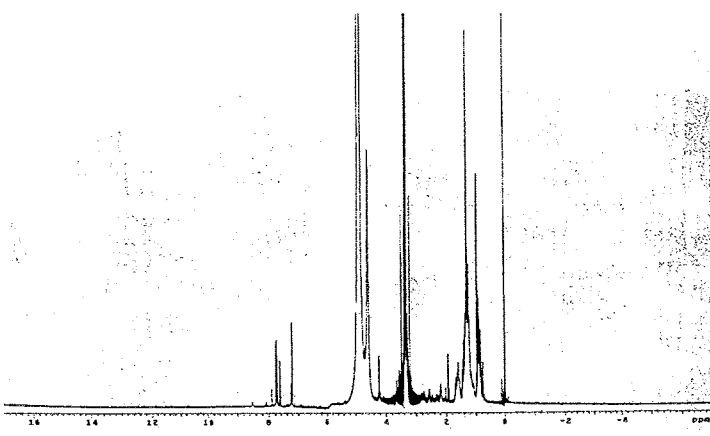
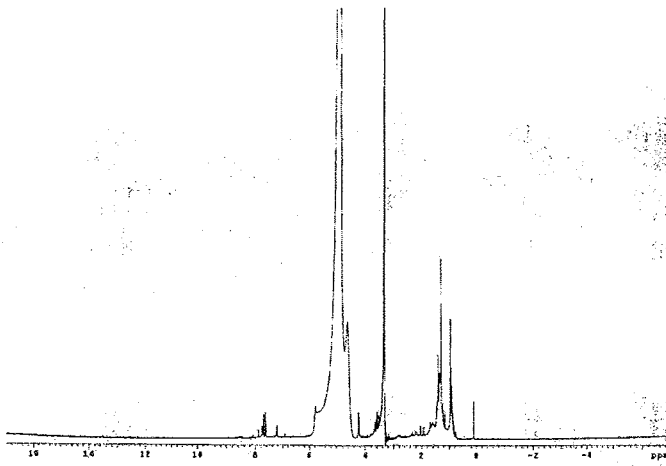


Fig. 13 1-H NMR spectrum of the fraction obtained from *Stachys sieboldii*.

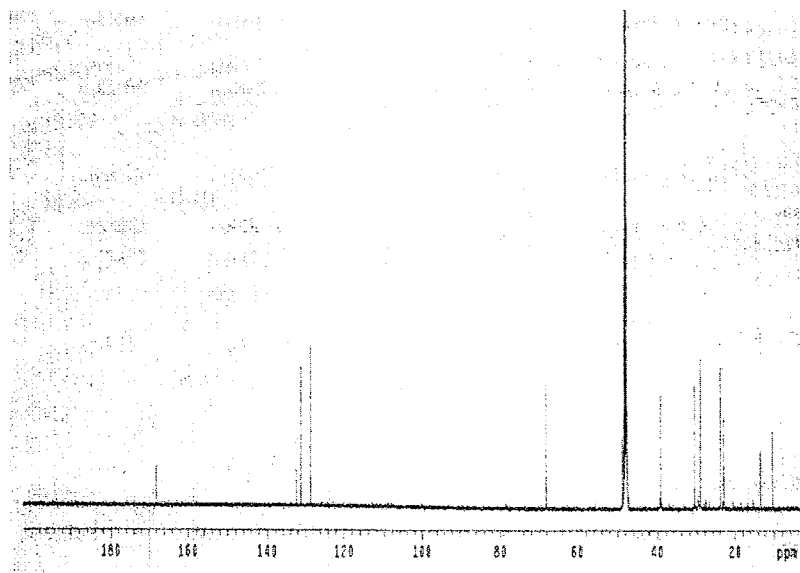


Fig. 14 C-13 NMR spectrum of the fraction obtained from *Stachys sieboldii*.

제 4 장 연구개발 목표의 달성도 및 관련분야에의 기여도

• 본과제

- 본과제에서는 초석잠을 순차 유기용매로 분리, 정제하여 항균활성을 검색한 결과 초석잠의 유기 용매 획분 중 핵산 추출물이 항균활성이 가장 높았다.
- 핵산 추출물을 TLC로 확인하여 7개의 획분을 얻은 후 항균활성 물질을 분획하였다.
- 획분 F-7을 다시 column chromatography를 하여 항균효과를 확인한 결과 획분은 단일물질로 추정할 수 있었다.
- *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 등의 식중독 세균의 생육을 억제하는 등 광범위한 항균효과를 확인하였다.
- 초석잠 추출물인 획분은 pH 및 열에 안전하였으므로 식품의 조리, 가공시 첨가하여도 항균성분은 그대로 유지될 것으로 판단되어 식품용 항균제로서 이용 가능할 것이다.
- 초석잠 추출물을 쥐를 이용한 SOD 관련 연구에서 이미 알려진 catechin, quercetin 등 강한 항산화제와 비슷한 활성이 있는 것으로 확인되었다.
- 초석잠을 동맥경화의 원인으로 알려진 사람 Low Density Lipoprotein (LDL)의 산화를 억제하는 효능이 α -tocopherol, vitamin C의 활성과 비슷한 효과가 있다는 결과를 얻었다.

• 협동과제

- 암 세포주로는 mouse mammary carcinoma 세포, mouse leukemia 세포 및 human histocytic lymphoma 세포를 사용하였다.
- 마우스 비장세포의 증식은 항진시켰으나 YAC-1 세포주의 증식능은 억제시켰다.
- CD4⁺ T세포 및 CD8⁺ T세포의 비율이 정상대조군 마우스에 비하여 증가하였으나 CD4⁺/CD8⁺ 비는 차이가 없었으며 비장세포에서 IL-2 수용체의 발현이 항진되었다.
- 복강 대식세포로부터의 nitric oxide와 TNF- α 생산을 항진시켰으며, B16 흑색종의 폐전이가 억제됨을 알 수 있었다. 따라서, 초석잠 추출물의 항암제 및 면역반응 조절자로서의 개발 가능성이 있음을 시사한다.
- 초석잠 추출물의 항산화 활성 DPPH법으로 확인한 후 nitrite scavenging activity 등을 실험하여 높은 활성이 있음을 확인하였다.
- 초석잠 추출물에서 순차유기 용매법으로 추출한 물질을 column chromatography, TLC 및 HPLC로 얻은 획분을 IR, NMR, GC/MASS로 확인한 결과 irridoid

glycoside라는 물질임을 확인하였다.

- 투고논문 연구 결과물

- 투고논문

- 류병호, 박법규 초석잠의 잎 추출물의 항균 활성, 한국생명과학회:제 12권 제 6호, 2002.
- 류병호 박법규, 송승구 : 초석잠 추출물의 항암 및 면역활성. 한국생물공학회, 제 17권 제 6호, 2002.
- 백홍석, 남영수, 류병호, 송승구 : 초석잠의 항산화 활성. 한국생물공학회, 투고 중.

- 학술발표대회

- 류병호, 송승구 : 초석잠의 활성산소 소거 효과. 한국생명과학회, 제 35차 발표대회, 2002.
- 송승구, 백홍석, 류병호 : 초석잠의 줄기 항산화 활성. 한국생물공학회, 발표대회, 2002.5
- 송승구, 백홍석, 류병호 : 초석잠의 줄기 항산화 활성. 한국생명과학회, 발표대회, 2003

- 특허

- 초석잠 유래의 항균활성 물질의 분리방법 및 항균 활성 조성물.
출원번호 : 10-2002-0057026, 출원월일 : 2002년 9월 18일
- 항암제 면역기능 강화제 및 항산화제용 초석잠 추출물을 포함하는 조성물.
출원번호 : 10-2002-0057030, 출원월일 : 2002년 9월18일

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 현재 건강증진을 위한 기능성 식품의 시장 규모가 7,000억 정도이므로 본 연구결과로 실용화되면 leading food 로 예상수익은 1년간 1,000억 규모이고 2년 후에는 시장에서 제품의 안정권에 진입할 수 있다.
- 우리 농촌에 자생하며 또 재배가 쉬워 농가에서 재배하여 쉽게 공급받을 수 있어 농가 수입의 증대에 활용할 수 있으며
- 식물의 동충하초라고 할 만큼 효능이 뛰어나고 부작용이 전혀 없어 미국, 일본, 유럽등에 수출하여 외화를 획득할 수 있다.
- 산화 스트레스를 해소할 수 있으므로 생활 습관병등 다양한 기능성 소재로 활용할 수 있다.
- 활성산소 소거제이므로 특수식품인 환자식·병원식 및 신기능성 건강 보조식품으로 활용할수 있다.
- 활성산소의 생성이 쉬운 스포츠 음료등으로 개발할 수 있다.
- 천연 항균, 항암 효과가 있는 신 기능성 소재로 개발할 수 있다.
- 연구 개발이 끝나면 관련업체와 협의를 거쳐 상품화하여 시판 할 것이다.

제 6 장 해당사항 없음.

제 7 장 참 고 문 헌

(본과제)

1. Bulkey, G. B. 1993. The role of oxygen free radicals in human disease processes, *Surgery*. 94, 407-411.
2. Halliwell, D. H. and T. E. Barry. 1991. Reactive oxygen species in living system. *Am. J. Medicine*. 91, 14-23.
3. Moody, C. S. and H. M. Hassan. 1982. Mutagenecity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 2855-2859.
4. Balin, A. K. 1982. Testing the free radical theory of aging. In: R. R. Adelman and G. S. Roth, eds., *Testing the theories of Aging*. CRC Press, Boca Raton, Fla. p.37
4. McCord, L. M. 1983. The superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology. *Surgery*. 94, 412-444.
5. Harman, D. 1956. A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-307.
6. Hertzberg, R. P. and P. B. Drevan. 1984. Cleavage of DNA with EDTA-iron(II): reaction condition and product analysis. *Biochem.* 23, 3934-3945.
7. Parker, L. 1987. Oxygen radicals in biological system, *Methods in Enzymology*. Academic press, New York. 105.
9. Doerr W. 1978. Principles of pathogenesis and an attempt at a biological classification. *Virchows Arch.* 380, 91.
10. Fogelman A. M., I. Schechter, J. Sager, M. Hokom, J. S. Child and P. A. Edward. 1980. Malonyldialdehyde alteration of low density lipoproteins lead to cholesterol ester accumulation in human monocyte macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 2214-2224.
11. Nose, M. and N. Fijino. 1982. Antioxidative activities of some vegetable foods and active component of avocado epicarp. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 29, 507-13.
12. Jisalal, I., G. L. Vega and S. M. Gundy. 1990. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Acta* 1086, 134-138.
13. Jessup, W., S. M. Rankin, C. V. De Whalley, R. S. Hault, J. Scott and D. S. Leake. 1990. α -Tocophenol consumption during low-density lipoprotein

- oxidation. *Biochem. J.* 265, 237-248
14. Stocher, R., V. W. Bowry and B. Frei. 1991. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more deficiently against lipid peroxidation than α -tocopherol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 1646-1650.
 15. Bauman, J., E. Bruchahysen and G. Wurm. 1980. Flavonoids and related compounds as inhibition of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins.* 20, 627-639
 16. Wei, H., L. Wei, K. Frenkel, R. Brown. and S. Barnes. 1993. Inhibition of tumor promitor-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutri. and Cancer.* 20, 1-20.
 17. Minto, G. and S. D. Aust. 1993. Redox cycling of iron and Lipid peroxidation. *Lipid.* 27, 219-226.
 18. Wolff, S. P., Z. Y. Jiang and J. V. Hunt. 1991. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. *Free Rad. Biol. Med.* 10, 330-352.
 19. Davidson, P. M. and M. E. Parish. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food technology* 43, 148-155
 20. Fridovich, L. and J. M. McCord. 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Bio. Chem.* 243, 5753-5760.
 21. Ohnishi, S. T. and J. K. Barr. 1978. A simplified method of quantitating proteins using the biuret and phenol reagent. *Anal. Biochem.* 86, 193-200.
 22. Wong, S. F. and H. Halliwell. 1981. The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid. *J. Inorg. Biochem.* 14, 127-134.
 23. Esterbauer, H., J. Lang, S. Zdravec and T. F. O. Slater. 1981. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York. 150, 319.
 24. Luck, H. 1971. Catalase., In *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. Bergmeyer HU), *Academic Press*, New York. p885.
 25. Nohl, H. and W. Jordan. 1986. The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem, Biophy. Res. Commun.* 138, 533-9539.
 26. Wei, H., Q. Cai. and R. Rahn. 1996. Inhibition of UV light and Fenton reactioninduced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genisein. *Carcinogenesis.* 17, 73-81.
 26. Rudel, L. L. and M. D. Morris. 1973. Determination of cholesterol using o-phthaldehyde. *J. Seric. Sci.* 39(1), 79-85
 27. Heron, D. S., M. Shinizky, M. Hershkowitz and D. Samuel. 1980. Lipid fluidity

- markedly membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 12, 7462-7467.
28. Lebel C. P., I. N. Odunze Jr and S. C. Bondy. 1989. Perturbations in cerebral oxygen radical formation and membrane order following vitamin E deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163(2), 860-866.
29. Choi, J. H. and B.P.Yu. 1990. Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker 연 새 prostaglandin synthesis in the aging kidney. *Age* 13, 61-64.
34. Robert, A. F. and G. S. Bulmer, 1988. *In vitro* effect of aqueous extract of gallic on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 70, 397-405.

(협동과제)

1. Herbert, J. R., J. Brone., M. M. Reddy, and J. C. Barcklund, 1990. Natral Killer cell activity in dietary fat intervention trial. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 54, 103 ~ 116.
2. Goldin, A., I. Kline, Z. Sofina, and A. B. Sykin 1980. Experimental evaluation of antitumor drugs in the USA and USSR clinical correlation. *NIH.* 33 ~ 44.
3. Miturka, B. M. 1981. Clinical biochemical and gematological reference values in experimental animals and humans. Massion, N. Y., p.31.
4. Kamiya, H., Y. Endo, K. Muramoto, N. A. Uchida, and U. Raj 1987. Antitumor activity of the macromolecular fraction rom a Fijan tunicate Didemnum varians. *Nippon Suisan Gokkaishi* 53, 493-504.
5. Sasaki, T., N. A. Uchida, N. Takasuka, Y. Tachihana, K. Nakamich. Y. End, and H. Kamiya 1987. Antitumor activity and immunomodulatory effect of glcoprotein fraction form scallop, Patinopectin yessoensis. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 267-273.
6. Ryu, B. H., D. S. Kim, and D. B. sin 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Kor. J. Food Sci. Technol* 21, 595-603.
7. King, C. Y., M. J. Shim, E. C. Choi, Y. N. Lee, and B. K Kim 1981. Strdies on antitumor components of Korean Basidiomycetes. Mucelial culture and antitumor components of *Ganoderma lucidum*, *Kor. Biochem. J.* 14, 100-109.
8. Kim, B. K., E. K. Park, and M. J. Shim 1972. Studies on consituents of igher fungi of Korea (XXIV), Antineoplastic activites of *Coriolus versicolr* (lex Fr.) Qule. *Pleurotus ostreatus* (Fr.) kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) *Sing. Arch. Pharm. Res.* 2, 145-151.
9. Park, D. W., M. J. Shim, and B. K. Kim 1979. Studies on consituents of higher fungi of Korea (XVII). Produc tion of antinetoplastmic components by the submerged culture of *Lentinus edodes*, Seoul Univ. *J. Pham. Sci.* 4, 199-210.
10. Yamahara, G. 1990. Studies on the *Stachys sieboldii* MIQ, *Med, Mega,* 110,932-935.
11. Yoon, H. L., K. P. Singj, S. Ratner, and J. J. Reiners Jr. 1996. Phornol ester effects on splenic lymphocyte composition and cytotoxic t cell activites of SSIN mice: a stain deficient in CD8+ T cells. *Carcinogenesis* 17, 2617-2624.
12. Yoon, H. L., C. B. Marcus, and R. W Pfeifer 1993. Infection of superosice by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetone and Tapsigargin, a non-phorbol

- ester-type tyrosine promoter, in peritoneal macrophages elicited from SENCAR and B6C3F1 mice: A permissive role for the arachidonic acid cascade in signal transduction. *Mol. Carcinog* 7, 116-125.
13. Griess, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum 1982. Analysis of nitrite, nitrate and ¹⁵N nitrate in biological fluid. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.
 14. Webb, G. C. and D. D. Haplin. 1990. Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. *J. Immunol.* 145, 1278-1285.
 15. Klein, J. 1990. Immunology. pp1-16, Blackwell Scientific Publications, New York.
 16. Higuchi, M. M., N. Higashi, H. Taki, and T. Osawa 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages: Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J. Immunol.* 144, 1425.
 17. Haberhausen, G., J. Pinsh, C. C. Kuhn, and C. M. Hahn 1998. Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 36, 628-633.
 18. Lee, S. Y., C. D. Jun, K. I. Park, and H. T. Chung 1996. Inhibition of phagocytic activity by nitrite oxide in murine peritoneal macrophages. *Kor. J. Immunol.* 18, 625-634.
 19. Segal, A. W. 1989. The Electron transfer chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 83, 1785-1793

