



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

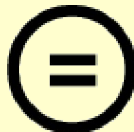
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교 육 학 석 사 학 위 논 문

연근의 항산화 효과 및
렌즈 알도즈 리닥타제 저해작용과
PTP1B 효소 저해효과



김 현 미

교 육 학 석 사 학 위 논 문

연근의 항산화 효과 및
렌즈 알도즈 리닥타제 저해작용과
PTP1B 효소 저해효과

지도교수 최 재 수

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함.

2009 년 8 월

부경대학교 교육대학원

영양교육 전공

김 현 미

김현미의 교육학석사 학위논문을

인준함

2009 년 8 월



목 차

LIST OF SCHEMES	i
LIST OF TABLES.....	ii
LIST OF FIGURES	iii
ABBREVIATIONS	iv
ABSTRACT	1
I. 서론	3
II. 재료 및 실험방법	10
1. 재료	10
2. 시약 및 기기	10
2-1. 시약	10
2-2. 기기	10
3. 실험방법	11
3-1. 추출 및 분획	11
4. <i>in vitro</i> 실험	13
4-1. DPPH radical 소거활성 실험	13
4-2. 활성산소종 생성 억제 실험	16
4-3. Aldose reuctase 억제 실험	21
4-4. Human recombinant Aldose reductase 억제 실험	24
4-5. Phosphatase 1B 억제 실험	27
5. 통계	29
III. 결과 및 고찰	30

1. <i>in vitro</i> 실험	30
1-1. DPPH radical 소거활성 실험	30
1-2. 활성산소종 생성 억제 실험	33
1-3. Aldose reductase 억제 실험	36
1-4. Human recombinant Aldose reductase 억제 실험	40
1-5. Phosphatase 1B 억제 실험	43
IV. 요약 및 결론	46
V. 참고문헌	49

감사의 글



LIST OF SCHEMES

Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of <i>Nelumbo nificera</i> Rhizomes. -----	12
Scheme 2. Measurement of DPPH radical scavenging activity.-----	15
Scheme 3. Measurement of total ROS scavenging activity.-----	20
Scheme 4. Measurement of lens aldose reductase inhibitory activity. -----	23
Scheme 5. Measurement of Human recombinant aldose reductase inhibitory activity.-----	26
Scheme 6. Measurement of Phosphatase 1B inhibitory activity. -----	28



LIST OF TABLES

Table 1. DPPH radical scavenging effects of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo nucifera</i> Rhizomes.-----	31
Table 2 Total ROS scavenging effects of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo nucifera</i> Rhizomes -----	34
Table 3. Aldose reductase inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo nucifera</i> Rhizomes -----	38
Table 4. Human recombinant Aldose reductase inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo nucifera</i> Rhizomes-----	41
Table 5. Phosphatase 1B inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo nucifera</i> Rhizomes -----	44



LIST OF FIGURES

Fig. 1. Mechanism of diabetic complication: polyol pathway.	8
Fig. 2. Structure of Tryptophan.	9
Fig. 3. DPPH radical scavenging action of Antioxidants.	14
Fig. 4. Oxidative Damage by Reactive Oxygen Species.	18
Fig. 5. Assay of the inhibitory activity on the ROS generation.	19
Fig. 6. Concentration-dependant DPPH radical scavenging effects of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo nucifera</i> Rhizomes.	32
Fig. 7. Concentration-dependant total ROS scavenging effects of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo nucifera</i> Rhizomes ----	35
Fig. 8. Concentration-dependant Aldose reductase inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo</i> <i>nucifera</i> Rhizomes.	39
Fig. 9. Concentration-dependant Human Recombinant Aldose reductase inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo nucifera</i> Rhizomes-----	42
Fig. 10. Concentration-dependant Phosphatase 1B inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from <i>Nelumbo</i> <i>nucifera</i> Rhizomes.	45

ABBREVIATIONS

CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
Fig.	: Figure
H ₂ O	: water
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
<i>n</i> -BuOH	: <i>n</i> -butanol
ROS	: reactive oxygen species
UV	: Ultraviolet
PTP1B	: Protein Tyrosine Phosphatase 1B



Antioxidant and lens aldose reductase and PTP1B inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* Rhizomes

Hyun-mi Kim

Graduate School of Education, Pukyong National University

Abstract

Nelumbo nucifera Gaertn., a perennial aquatic plant, which was distributed throughout Asia, including India, China, the Middle east and Egypt. In particular, the rhizomes of *N. nucifera*, have been used foodstuffs as well as traditional medicines in China, India and Korea. Various pharmacological activities of the *N. nucifera* rhizomes, including antimicrobial, antioxidant, antiobese, antidiabetic, anti-Alzheimer, and antihypertensive effects have been reported. However, the diabetic complications effect of the rhizomes is unclear, and its antidiabetic and antioxidant effects is yet limited. Therefore, the preventive and therapeutic potency against oxidative stress and diabetic complications of *Nelumbo nucifera* were evaluated via the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), total reactive oxygen species (ROS) assays, as well as the rat lens aldose reductase (RLAR) and the human recombinant aldose reductase (HRAR) assays. In addition, the anti-diabetic effect of the rhizomes was determined via the protein tyrosin Protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B assay.

The MeOH extract of the *N. nucifera* rhizome exhibited marginal

antioxidant effects, however the EtOAc fraction exerted significant antioxidant effects with IC_{50} values of 3.21 and 11.06 $\mu\text{g/ml}$, by compared with respective positive controls, L-ascorbic acid (IC_{50} 5.16 $\mu\text{g/ml}$) and trolox (IC_{50} 5.19 $\mu\text{g/ml}$) in the DPPH and total ROS assays, respectively. Also, the *N. nucifera* rhizome showed remarkable RLAR inhibitory effects with IC_{50} values of 7.70 $\mu\text{g/ml}$, by compared with positive control, quercetin (IC_{50} 3.28 $\mu\text{g/ml}$), however, no HRAR inhibitory effects within test concentration (f.c. 50 $\mu\text{g/ml}$). Interestingly, the EtOAc and *n*-BuOH fractions exerted predominant inhibitory effects with respective IC_{50} values of 0.15 and 0.68 $\mu\text{g/ml}$ in the RLAR assay; 10.76 and 33.95 $\mu\text{g/ml}$ in the HRAR assay. In the PTP1B assay, the CH_2Cl_2 fraction, along with the AR inhibitory EtOAc and *n*-BuOH fractions appeared significant inhibitory effects with IC_{50} values of 4.09, 0.85, and 6.76 $\mu\text{g/ml}$, by compared with a positive control, ursolic acid (IC_{50} 1.80 $\mu\text{g/ml}$). Since tryptophan was previously isolated to be antidiabetic components, the PTP1B inhibitory effect of this compound was evaluated in this study. This component showed great PTP1B inhibitory effect with an IC_{50} value of 4.75 $\mu\text{g/ml}$.

In conclusion, the above results suggest that the rhizomes of *N. nucifera*, and tryptophan contained within them, would clearly have potential uses in the development of therapeutic or preventive agents for oxidative stress, diabetic complications, and diabetes.

I. 서론

오늘날 의학기술의 발달과 더불어 생활수준의 향상으로 인해 급속하게 고령화 사회로 진입하고 있다. 그러나 당뇨병, 고혈압 등의 만성퇴행성 질환은 증가되고 있어 개인의 삶의 질의 저하 및 경제적 손실은 물론이며 이로 인한 의료비용의 증가는 사회적인 문제가 되고 있는 실정이다. 따라서 현대인들의 건강한 삶에 대한 욕구와 노화억제에 대한 관심은 커지고 있고 식품이 가진 생리활성 성분에 의한 질병의 예방 및 치료적인 효과 등이 관심의 대상이 되고 있다. 이로써 주변에서 흔히 접할 수 있는 식품들의 영양학적 가치들이 재평가되고 있으며 연근은 그 가운데 한가지 식품이라고 할 수 있을 것이다.

연(*Nelumbo nucifera*)은 인도, 중국, 일본, 한국, 시베리아 지역의 못이나 늪지에서 자라는 수련과 연속에 속하는 다년생 초본으로 원산지는 중국원산설과 이집트원산설이 가장 유력하며 근대에 이르러 연근을 식용으로 많이 이용하게 되었다. 연근을 비롯하여 연잎, 연꽃, 연자육은 식용 및 약용으로 널리 쓰여지고 있으며 혈압강하, 지혈, 치매예방, 니코틴해독, 감기, 심장병예방, 진정작용 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Yang *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 2002).

연은 여러 생리활성 물질을 함유하고 있는데 이 중 methylcorypalline은 관상동맥혈관확장(박종희, 이정규, 2002), dimethylcoclaurine은 자궁 평활근 이완 (박종희, 이정규, 2002), higenamine은 심장강화 활성(cardiotonic activity)(Chung *et al.*, 2000), β -sistosterol은 phytosterol로서 혈장 콜레스테롤 감소, 심장병과 대장암 예방효과가 있는 것으로 보고되고 있으며(Jung *et al.*, 2003) Kaempferol, quercetin 및 isoquercetin과 같은 flavonoids, tannic acid과 같은 polyphenol화합물 등이 연잎(Lee *et al.*, 2006), 연꽃(Quan, 2002),

연근(Hu *et al.*, 2002) 및 연육(Ling *et al.*, 2005)에 다량 함유되어 있어 항산화효과를 나타내고 있는 것으로 보고되었다.

연에 관한 생리활성을 다룬 문헌을 살펴보면 연잎 추출물의 free radical 소거작용을 통한 항산화 활성 (Cho *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003), alkaloid compound와 flavonoids compound의 항HIV 활성 (Kashiwada *et al.*, 2005), 추출물의 고지혈증 억제 활성 (La Cour *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2005)과 항비만 활성 (Ono *et al.*, 2006; Ohkoshi *et al.*, 2007) 등이 보고되고 있으며 연자육에서는 간보호효과와 항산화활성 (Sohn *et al.*, 2003; Rai *et al.*, 2005)이, 연심에서는 alkaloid 작용으로 인한 해열작용 (Huang, 1993), 신경안정 (Dictionary of Chinese crude drugs, 1977)과 항고혈압 (Shoji *et al.*, 1987) 활성 등이 알려져 있다.

연근의 주성분은 탄수화물로식이섬유소가 풍부하여 장활동을 촉진시키고 체내 콜레스테롤 수치를 저하시키는 작용이 있다 (Han and Koo, 1993; Kim *et al.*, 2002). 또한 연근 속의 레시틴은 혈관벽에 콜레스테롤이 침착되지 않도록 하여 혈관벽을 강화시키고 (Han and Koo, 1993; 황안국, 1998; Kim *et al.*, 2002), 신경전달물질인 아세틸콜린을 생성하여 기억력 감퇴 억제 효과가 있어 이로 인해 치매 예방 효과도 큰것으로 알려져 있다 (Han and Koo, 1993). 또한 칼륨 함량도 높고 뮤신을 함유하고 있어 콜레스테롤 저하작용과 위벽보호, 해독작용 등을 한다고 보고되었다 (Moon *et al.*, 2003).

최근에 급속한 경제발전으로 생활수준의 향상과 아울러 서구적인 생활 습관 및 환경변화 등의 복합적인 작용으로 인해 당뇨병 환자는 빠른 속도로 증가하고 있다. 특히 당뇨 합병증으로 인한 사망률이 급속히 증가하고 있어 국민의 건강을 위협하고 있는 상황이다 (김응진 *et al.*, 1998).

당뇨병은 췌장 랑게르한섬 내의 β -cell에서의 인슐린 분비 장애와 말초 조직에 대한 인슐린 저항성으로 인하여 혈중 glucose 농도가 증가하는

대사성 질환이다 (Abuja and Albertini, 2001). 고혈당 상태에서는 정상상태에 비해 free radical 생성계가 촉진되어 간조직이나 심장, 혈액내에서 지질의 과산화가 증가하여 심혈관계 합병증을 초래하게 된다 (Williamson *et al.*, 1993; Cameron and Cotter, 1995; Giugliano *et al.*, 1996).

NADPH를 조효소로 이용하는 Aldose reductase는 polyol pathway (Fig. 1)의 촉매 효소로서 하나의 aldo-keto reductase이다. polyol pathway는 당뇨병 합병증 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 glucose 대사경로를 말한다.(Maccari *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005).

당뇨병으로 인한 고혈당이 complication을 일으키는 기전으로 polyol pathway의 이상 (Sato and Rifkin, 1979), oxidative stress (Williamson *et al.*, 1993), myo-inositol의 감소와 Na^+ , K^+ -ATPase 활성의 감소 (Greene *et al.*, 1987) 등이 보고되어 있다. glucose는 체내에서 주로 에너지원으로 사용되며 insulin에 의해 cell내로 유입된 후 대부분이 해당제에서 대사되므로 polyol pathway를 통하여 대사되는 것은 약 3%에 불과하다 (Greene *et al.*, 1987). 그러나 신장 및 신경세포, 수정체, 망막세포와 적혈구 등은 glucose 유입에 있어 insulin에 의존하지 않고 확산에 의해 glucose가 유입되므로, 당뇨병에 의해 고혈당이 유발되면 이러한 세포 내 glucose에 의해 활성산소종이 생성되고, aldose reductase를 활성화시켜 정상상태의 약 2-4배의 glucose가 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose가 생성된다 (Travis *et al.*, 1974; Malone *et al.*, 1980). 축적된 sorbitol은 세포 내 삼투압 증가를 가져오고 세포 투과성을 초래하여 당뇨병성 합병증을 가져오게 된다.

Aldose reductase inhibitor로 사용되고 있는 화합물로서 succinimide 유도체인 minalrestat, tolrestat, zopolrestat, epalrestat와 imidazoline-2,4-dione 유도체인 sorbinil 등이 있다. 이들 compound는 aldoses reductase를 억제하나 동시에 aldehyde reductase를 억제시켜 또 다른 당뇨병 기전 compound인 최

중당화산물 (advanced glycation endproducts, AGEs)을 생성시키는 것을 볼 수 있다. 이는 또 다른 형태의 당뇨병 합병증을 나타내는 것이다 (Kawanishi *et al.*, 2003). 이러한 합성약물의 side-effects 때문에 보다 안전하고, 독성이 적은 aldoses reductase 억제제를 천연물로부터 찾고자 하는 노력을 기울이고 있다. Aldoses reductase 억제 효과를 가지는 천연물에는 anthraquinones, alkaloids, terpenoid, 그리고 flavonoids 등이 알려져 있다 (Kawanishi *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2005).

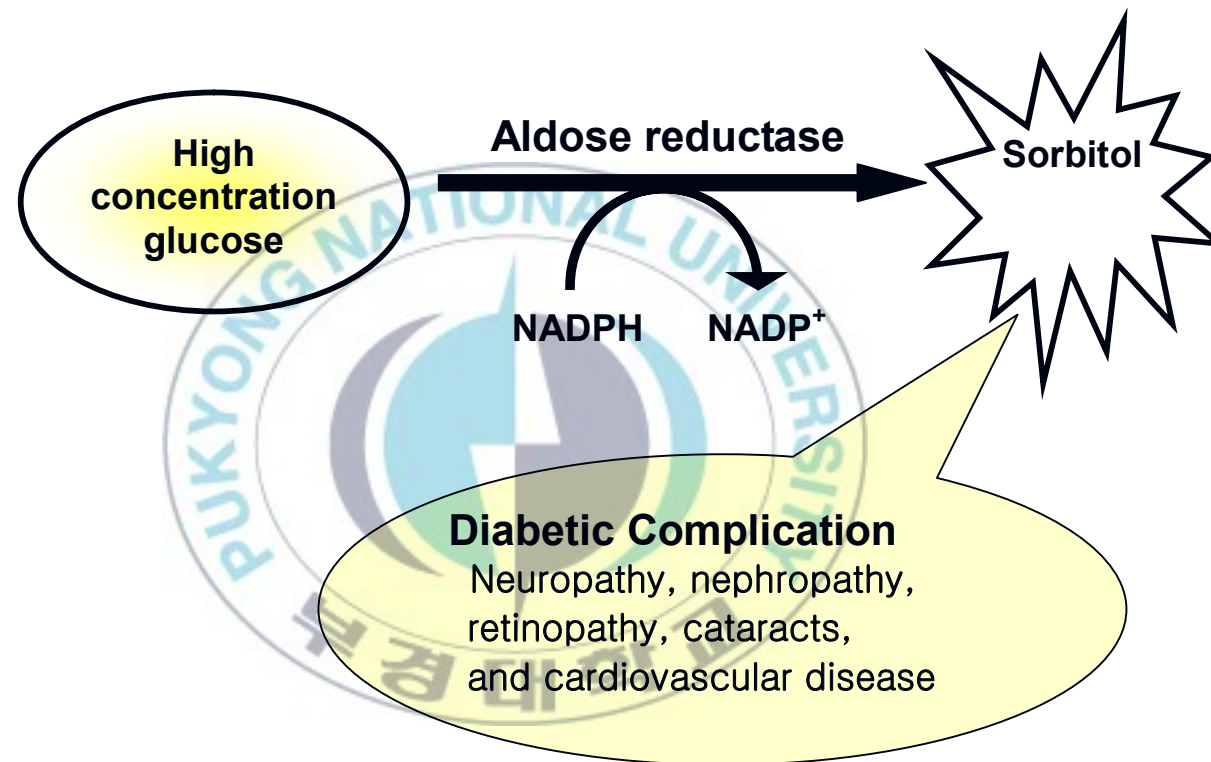
당뇨병에 의해 고혈당이 유발되면 cell내로 유입된 후 해당계에서 정상적으로 대사되지 못한 glucose에 의해 활성산소종이 생성되고, aldose reductase를 활성화시켜 정상상태의 약 2-4배의 glucose가 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose가 생성되어(Travis *et al.*, 1974; Malone *et al.*, 1980) 축적된 sorbitol은 세포 내 삼투압 증가를 가져오고 세포 투과성을 초래하여 당뇨병성 합병증을 가져오게 된다.

연근 node의 메탄올 추출물로부터 활성이 높은 fraction을 발견하고 그 fraction에서 한 아미노산을 분리하였는데 이 화합물의 구조는 tryptophan으로 밝혀졌다. tryptophan은 인위적으로 당뇨를 유발시킨 실험쥐의 혈당을 유의적으로 감소시켰다(Lee *et al.*, 2001). 이로써 연근의 혈당강하 효과는 연근 속에 들어있는 tryptophan을 포함한 또 다른 화합물들의 효과일 것으로 추측할 수 있다.

Protein tyrosine phosphatase (PTP)는 단백질의 tyrosine 잔기를 탈인산화시키는 효소로서 세포내 신호전달과 대사에 중요한 역할을 담당한다. 비록 PTP- α , leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase (LAR), SH2-domain-containing phosphotyrosine phosphatase (SHP2)와 같은 다양한 PTP가 인슐린 신호전달을 조절하는데 관여하고는 있으나 특히 PTP1B효소는 인슐린 신호전달을 조절하는 중요한 PTP 효소라고 알려져 있다. PTP1B 효소는 활성화된 인슐린 receptor (IR) 뿐만 아니라 인슐린 receptor substrate (IRS)

단백질과 반응하여 탈인산화시킨다(Johnson *et al.*, 2002; Asante-Appiah and Kennedy, 2003). 이 효소의 과발현은 IR signaling cascade를 억제하고 인슐린 저항 상태에서 발생하는 PTP1B 발현을 증가시킬뿐만 아니라(Ahmad *et al.*, 1997), 인슐린 민감성에 변화를 유발한다고 알려져 있다(Elchebly *et al.*, 1999). 인슐린 신호전달계와 마찬가지로 leptin 신호전달 역시 PTP1B에 의해서 감소되는데 이는 이 효소가 leptin 신호전달체계에도 작용하는 것을 알려준다(Johnson *et al.*, 2002). 그러므로 PTP1B 효소 활성을 감소시키거나 발현수준을 감소시키는 inhibitor를 개발하는 것은 제 2형 당뇨병을 치료하는데 사용될 뿐아니라 비만치료에도 기준이 되는 됴을 나타낸다 (Kim *et al.*, 2005).

본 연구에서는 연근 메탄올 추출물 및 이로부터 얻은 fractions에 대하여 DPPH radical 소거활성, 활성산소종 생성 억제 활성법을 이용하여 항산화 효과를 규명하고 당뇨병성 합병증에 대한 작용을 연구하기 위해 lens aldose reductase 억제활성 및 human recombinant aldose reductase 억제활성 실험을 실시하였으며 PTP1B enzyme을 저해하여 인슐린 민감성을 증진시킴으로서 혈당강하 효과를 나타내는 등의 기능성 식품으로서의 연근의 효과를 확인하고자 하였다.



**Fig. 1. Mechanism of Diabetic complication
: Polyol pathway (Kador et al., 1985).**

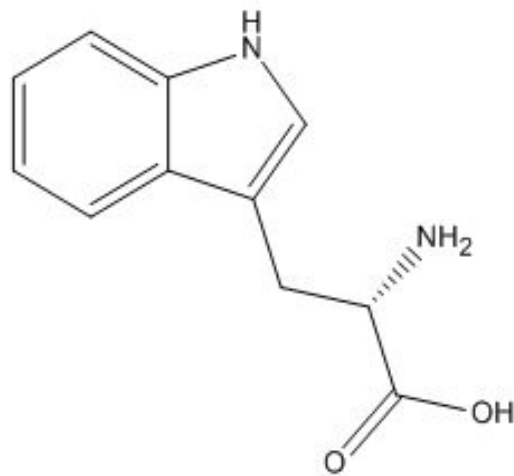
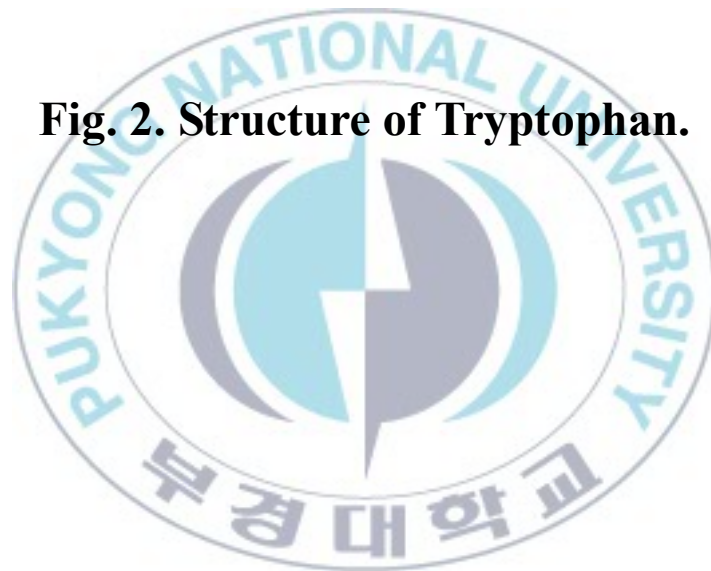


Fig. 2. Structure of Tryptophan.



II. 실험 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 연근 (*Nelumbo nucifera* Rhizomes)는 2007년 2월 인근 재래시장에 구입하여 수세하고 절단하여 자연건조한 것을 분말로 하여 사용하였고 식물 표본은 본 연구실에 보관하였다 (NO.200702).

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

L-Glyceraldehyde (G4802), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH, N1630)과 quercetin (positive control)는 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A)로부터 구입하였다. NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 과 NaOH는 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Osaka, Japan), Na_2HPO_4 는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다.

2-2. 기기

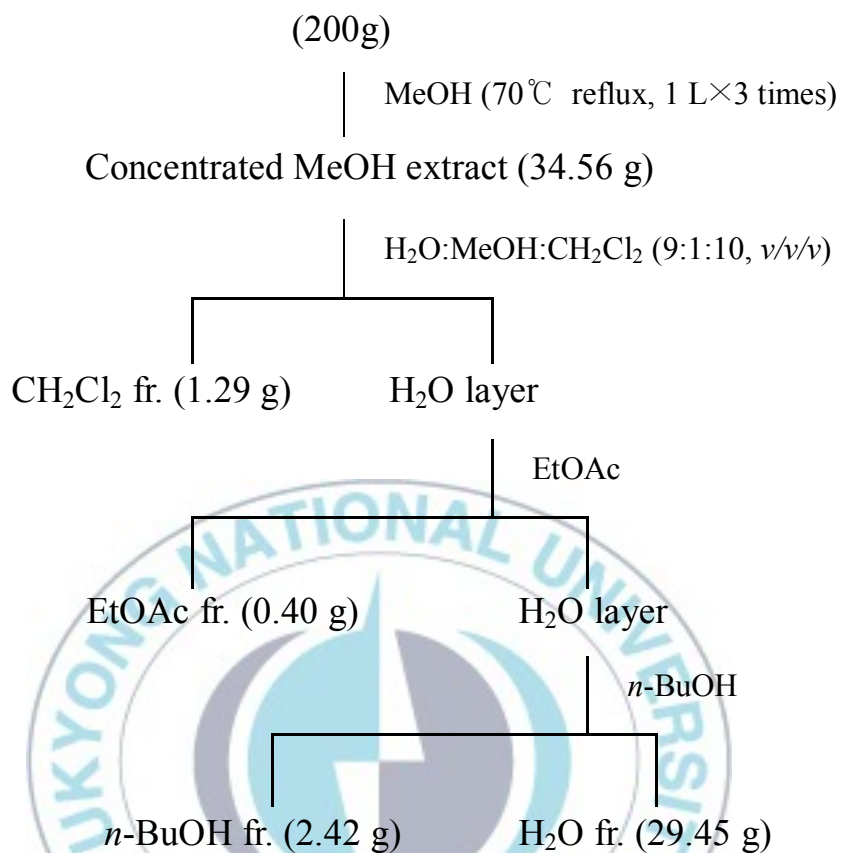
UV는 VARIAN UV-Visible spectrophotometer와 동물실험시 UV spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

3. 방법

3-1. 추출 및 분획

연근 (*Nelumbo nucifera* Rhizomes)의 MeOH 추출 및 각 용매별 분획 과정은 scheme 1에서 나타내었다. 건조한 연근 (200g)를 분쇄하여 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 1L의 MeOH을 넣은 후 수욕상에서 3시간 추출하였다. 그리고 추출액은 여과후 rotary vacuum evaporator를 사용하여 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 34.56g MeOH 추출액을 얻었다. 그 중 MeOH 추출 농축액 약 1g을 활성 실험 및 동물실험을 위해 vial에 담아 desiccator에 보관하였다. 나머지 33.56 g은 H₂O: MeOH (9/1, v/v)의 혼합용매로 녹인 다음 분획 깔대기에 부어 동량의 CH₂Cl₂를 넣어 가용부를 모아 무수망초 (sodium sulfate, anhydrous)로 처리한 다음 농축하였다. 이와 같은 방법으로 더 반복하여 CH₂Cl₂ 분획 1.29 g을 얻었다. 동일한 방법으로 EtOAc를 H₂O 분획층에 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 획분 0.4 g을 얻었다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법을 시행하여 상층의 *n*-BuOH 획분 2.42 g 과 하층의 H₂O 획분 29.45 g을 얻었다. 모든 분획 약 0.1 g은 활성 실험을 위해 vial에 담아 desiccator에 보관하였다.

Nelumbo nucifera Rhizomes



Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of *Nelumbo nucifera* Rhizomes.

4. *in vitro* 실험

4-1. DPPH radical 소거활성

DPPH radical 소거반응은 간단한 항산화 검색법으로 광범위하게 사용되고 있으며 특히 phenol 과 aromatic 화합물의 항산화 활성의 측정에 많이 사용되는 방법이다(Blois,1958).

일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 520nm에서 강한 흡수 band를 보이는 특성을 가지고 있다. 그러나 phenol 과 같이 수소나 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical 을 생성하게 된다. 이때 특징적인 흡수 band도 사라지고 안정한 분자로 된다. 즉 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색은 점점 열어지게 되고 흡광도도 감소하게 되므로 반응액 색이 보라색에서 노란색으로 변하는 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다.(Fig.3)

[Yokozawa et al., 1998;Hatano et al., 1989].

각 시료의 DPPH radical에 대한 소거활성 측정은 다음과 같다. 각 농도별 시료(1.25 -120 μ g/mL)를 MeOH에 녹인 뒤 160 μ L씩 취하여 1.5×10^{-4} M 농도로 MeOH에 용해시킨 DPPH 용액 40 μ L와 잘 혼합하였다. 이 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후 microplate reader spectrophotometer VERSAmax(U.S.A)로 520 nm에서 흡광도를 측정함으로써 radical 소거활성을 백분율로 나타내고 50% 소거농도(IC₅₀는 μ g /mL 혹은 μ M로 표현)을 계산하였다. 측정치는 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다(Scheme 2)[Yoshida et al., 1989; Yamasaki et al.,1994].

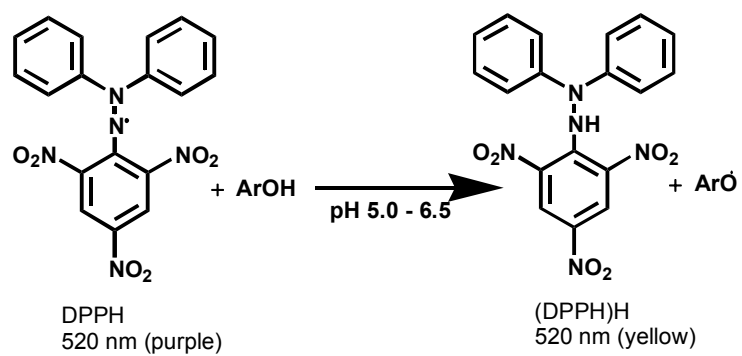


Fig. 3. DPPH radical scavenging action of antioxidants [ArOH].
(Blois, 1958)



MeOH solution of Sample at various concentrations 160 μ L

Methanolic solution of DPPH(1.5×10^{-4} M) 40 μ L



Shaking vigorously (10-20 sec)



Standing at room temperature for 30 min



Measurement of optical density at 520 nm

Scheme 2. Measurement of DPPH radical scavenging activity.



4-2. 활성산소종 생성 억제 활성

하나 또는 그 이상의 비공유 전자를 가지면서 독립적으로 존재할 수 있는 종류들을 유리기(free radical)라고 하며, 이들은 정상적인 세포 또는 병리상태의 세포의 이물질 대사 또는 이온화 조사를 통해 생성된다. 분자내 산소와 같은 전자 수용체들이 이 유리기들과 즉각 반응하여 그 자신이 radical이 되는데 이들을 reactive oxygen species(ROS)라 한다(Fig.4).

지방 산화에 의한 생물학적 조직의 손상 정도를 측정하기 위해, 세포 배양계에서 비형광 probe인 DCFH-DA를 이용하여 생물 세포의 활성 산소종을 직접적으로 정량 측정하는 방법을 이용하는데, 이는 산화적 스트레스에 의해 발생하는 초기 세포내 산화반응을 신속하게 측정할 수 있다(Hempel et al., 1999; Wang and Joseph, 1999). DCFH-DA는 안정한 비형광성 분자로 세포막에 쉽게 교차 결합하며 세포내 존재하는 esterase에 의해 deacetylation되어 비형광성 환원 물질인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)로 전환된다.

DCFH는 세포내 활성 산소가 존재하면 급격히 산화되어 형광성 산화물질인 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)가 형성되므로(Fig.5), 이 형광의 변화를 측정함으로써 세포내 활성산소종 특히, $\cdot O_2^-$ 의 초기 생성량을 정량할 수 있게 된다(LeBel and Bondy, 1990). 그러나 DCFH-DA는 수용성 활성산소종에 대해서는 특이성이 없기 때문에 그 사용에 다소 제한되는 문제가 있다.(Delia et al., 1997).

Scheme 3에 나타내었듯이, 수컷 Wistar rats(체중 150-200g)의 신선한 kidney homogenate를 준비하고, 이것을 extract나 compound의 여러 농도의 현탁액에 혼합하여 12.5mM DCFH-DA를 50mM phosphate buffer(pH 7.4) solution으로 희석하여 첨가한 후 5분간 배양한다.

생성된 reactive oxygen species(ROS)는 microplate fluorescence spectrophotometer(Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)에서 excitation

wavelength 485nm 와 emission wavelength 530 nm에서 각각 30분간 측정하였다(LeBel and Bondy, 1990). 형광 강도가 증가하지 않은 것은 실험한 화합물이 활성 산소종을 소거하여, DCFH가 산화되지 않았으므로 항산화 물질임을 의미한다.



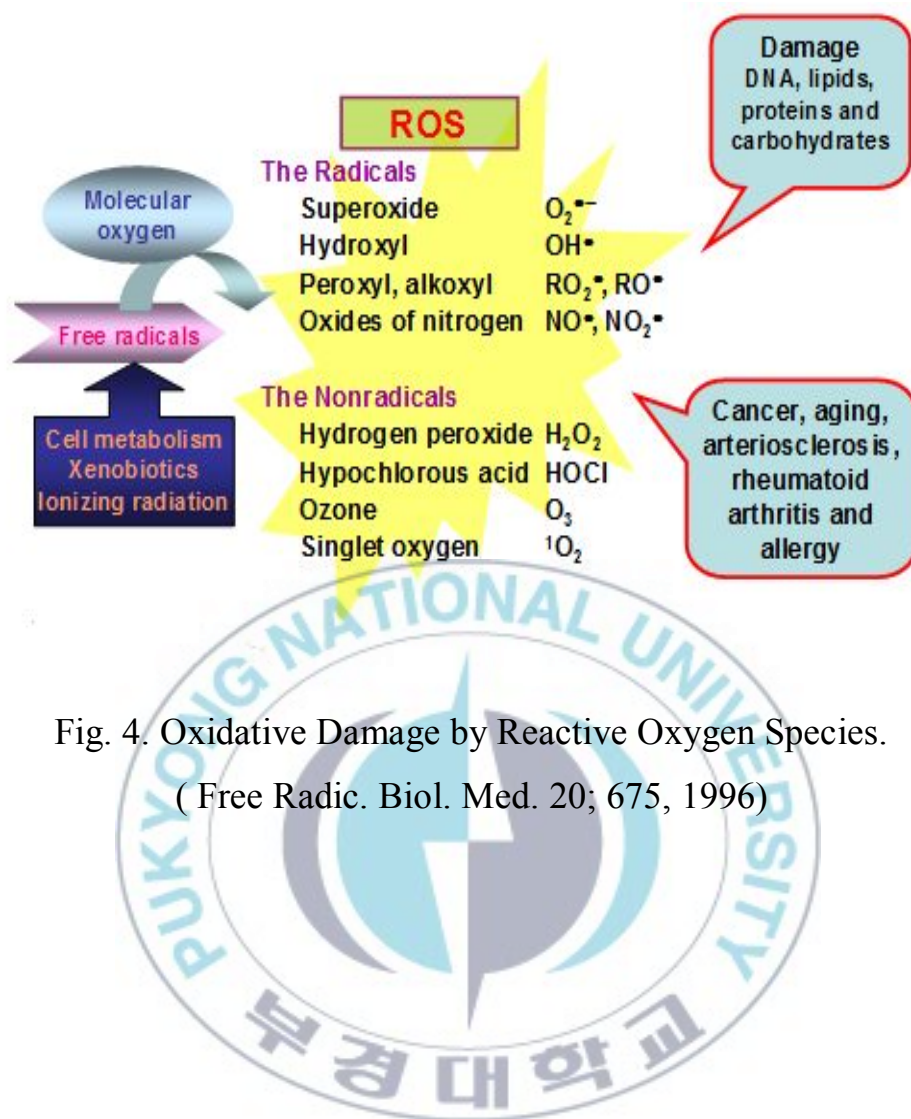


Fig. 4. Oxidative Damage by Reactive Oxygen Species.
(Free Radic. Biol. Med. 20; 675, 1996)

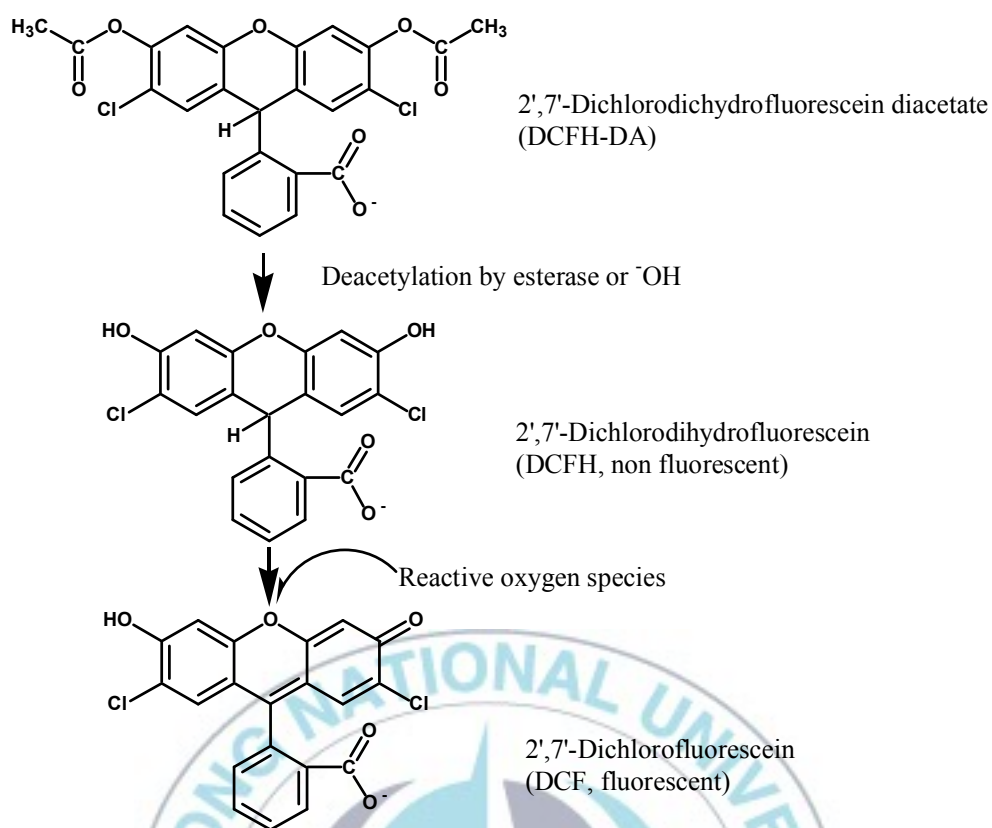
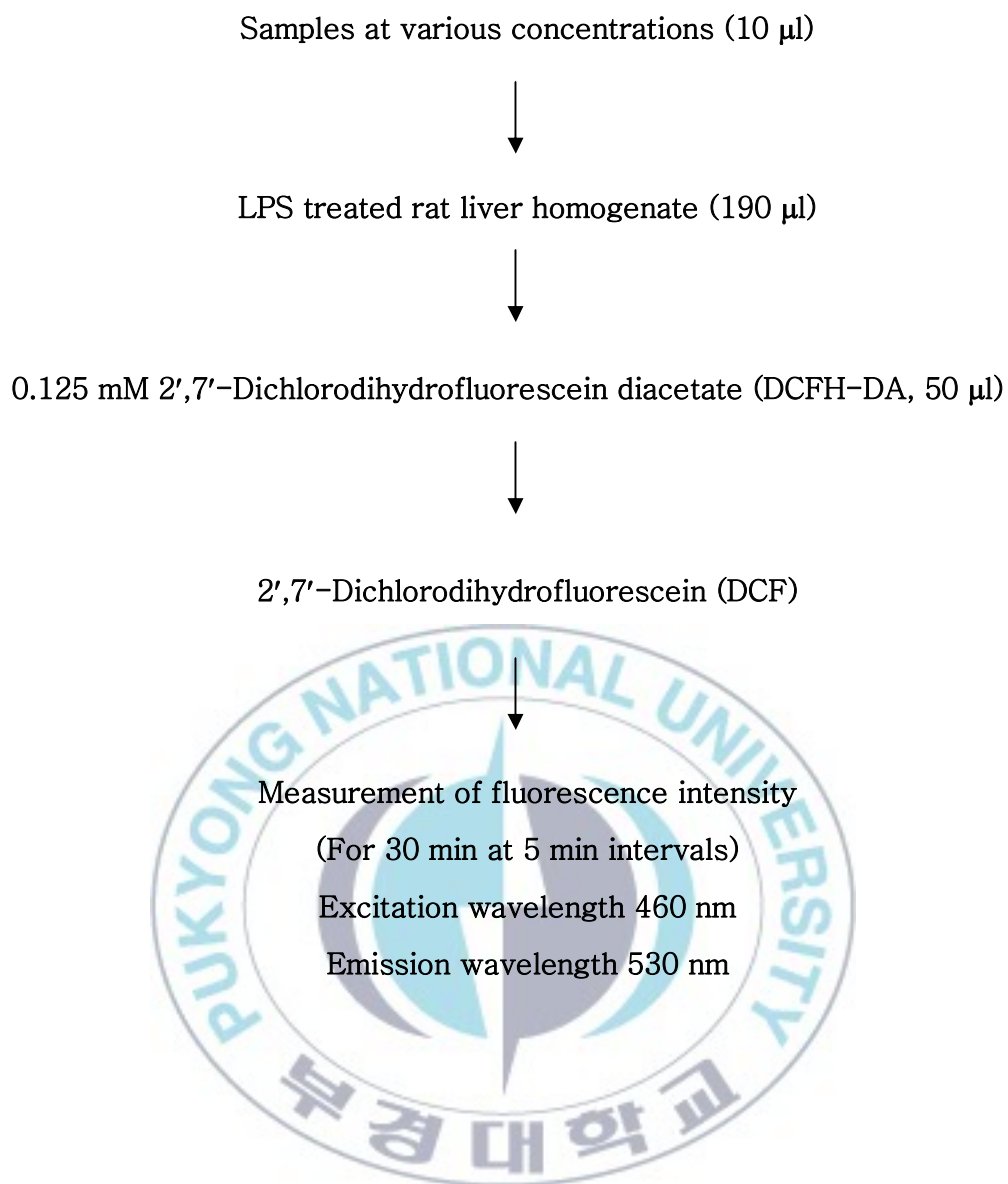


Fig. 5 . Assay of the inhibitory activity on the ROS generation.
(Label and Bondy, 1990)



Scheme 3. Measurement of total ROS scavenging activity.

4-3. Aldose reductase 억제 실험

4-3-1. 효소원 제조

Aldose reductase 억제 효과를 측정하기 위한 효소원 조제는 Hayman and Kinoshita (1965)가 사용한 방법을 변형하여 수행하였다.

흰쥐의 안구에서 수정체를 적출하고, 그 습습량에 따라 일정량 즉, 수정체 1개당 sodium phosphate buffer (pH 6.2) 0.5 ml의 phosphate buffer를 가하여 homogenization하였다. 이를 4℃에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리후 그 상층액을 취하여 효소원으로 사용하였다 (Scheme 4).

4-3-2. 실험과정

1.5 ml 석영 큐벳에 potassium phosphate beffer (pH 7.0) 621 µl와 효소 90 µl, 조효소 NADPH (1.6 mM) 90 µl, DMSO에 녹인 측정시료 9 µl와 마지막으로 기질인 DL-glyceraldehyde (0.05 M)을 90 µl 각각 넣어 총반응액 900 µl를 340 nm에서 4분간 U/V visible spectrophotometer로 측정하여 NADPH 흡광도 감소율을 측정하였다.

Aldose reductase 억제활성 %는 다음의 방정식으로 구하였다.

$$\text{측정값} = \{(0\text{분 흡광도} - 4\text{분 흡광도}) / 4(\text{측정시간})\} \times 10,000$$

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - (A_{\text{cont}} - A_{\text{sam}}) / A_{\text{cont}}\} \times 100$$

A_{sam} : 측정시료를 넣었을 때의 측정값

A_{cont} : 측정시료를 넣지 않았을 때의 측정값

각각의 측정시료의 aldose reductase 억제활성을 IC_{50} value로 나타내었다. 이는 조효소인 NADPH의 감소를 50% 억제하는 농도를 $\mu\text{g/ml}$ 혹은 μM 로 나타낸 값으로 log-dose 억제 curve로부터 계산하였다.



Rat lens homogenization in sodium phosphate buffer (pH 6.2)



Centrifugation at 10,000 rpm and 4°C for 20 min.



Supernatant (enzyme preparation)



621 μ l potassium phosphate buffer + 90 μ l NADPH
+ 90 μ l enzyme + 9 μ l test sample

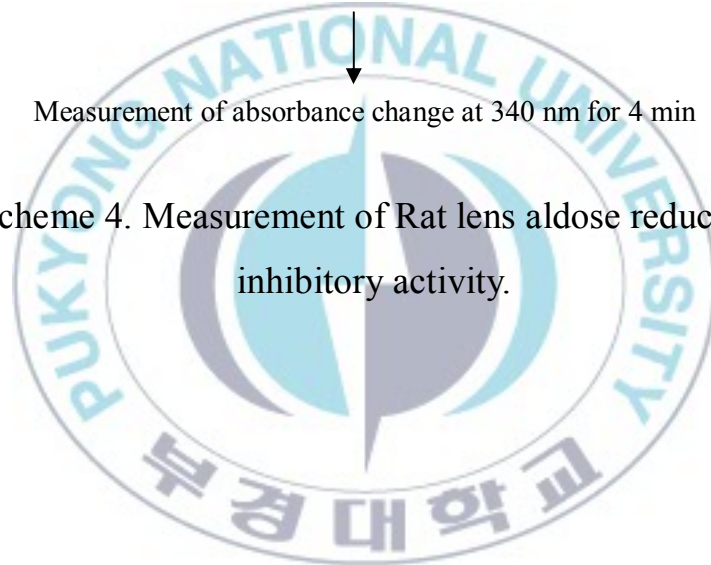


90 μ l DL-glyceraldehyde



Measurement of absorbance change at 340 nm for 4 min

Scheme 4. Measurement of Rat lens aldose reductase
inhibitory activity.



4-4. Human Recombinant Aldose reductase 억제 실험

4-4-1. 효소원

Human Recombinant Aldose reductase 억제 효과를 측정하기 위한 효소원 조제는 Hayman and Kinoshita (1965)가 사용한 방법을 변형하여 수행하였다(Scheme 5).

4-4-2. 실험과정

1.5 ml 석영 큐벳에 potassium phosphate beffer (pH 7.0) 621 μ l와 효소 90 μ l, 조효소 NADPH (1.6 mM) 90 μ l, DMSO에 녹인 측정시료 9 μ l와 마지막으로 기질인 DL-glyceraldehyde (0.05 M)을 90 μ l 각각 넣어 총반응액 900 μ l를 340 nm에서 1분간 U/V visible spectrophotometer로 측정하여 NADPH 흡광도 감소율을 측정하였다.

Human Recombinant Aldose reductase 억제활성 %는 다음의 방정식으로 구하였다.

$$\text{측정값} = \{(0\text{분 흡광도} - 1\text{분 흡광도}) / 1 (\text{측정시간})\} \times 10,000$$

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - (A_{\text{cont}} - A_{\text{sam}}) / A_{\text{cont}}\} \times 100$$

A_{sam} : 측정시료를 넣었을 때의 측정값

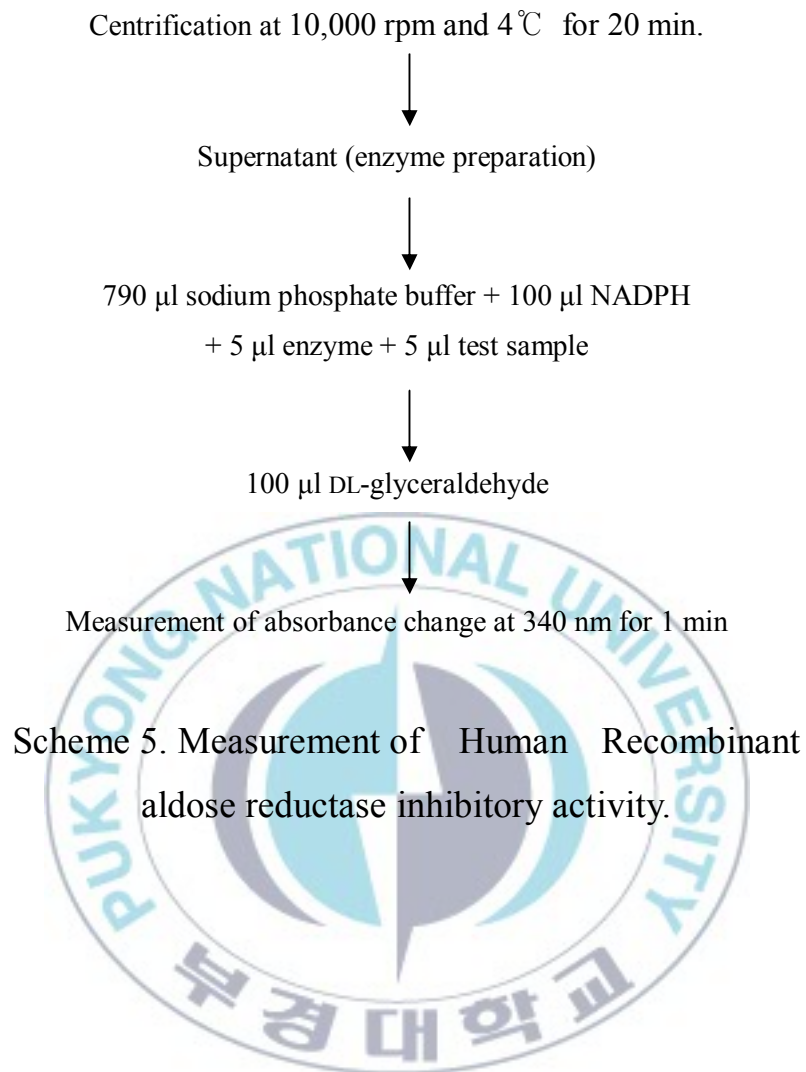
A_{cont} : 측정시료를 넣지 않았을 때의 측정값

각각의 측정시료의 Human Recombinant aldose reductase 억제활성을 IC_{50} value로 나타내었다. 이는 조효소인 NADPH의 감소를 50% 억제하는 농

도를 $\mu\text{g/ml}$ 혹은 μM 로 나타낸 값으로 log-dose 억제 curve로부터 계산하였다.



Human Recombinant homogenization in sodium phosphate buffer (pH 6.2)

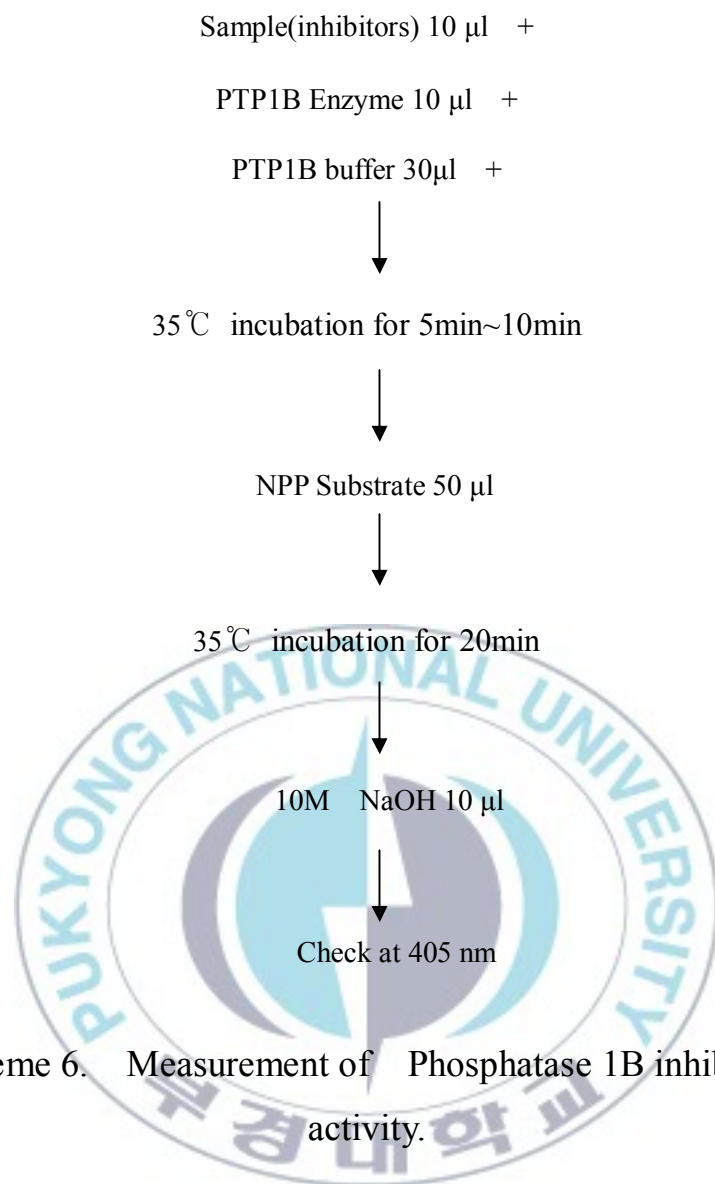


4-5. Phosphatase 1B 억제활성

PTP1B 효소 (human, recombinant)는 BIOMOL international LP(USA)로부터 구입하였으며 효소 활성은 *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP)를 기질로 하여 측정하였다. 나 등의 방법을 참고하여 실험방법을 변형시켰다(Scheme 6). (Na *et al.*, 2006) 시료 10 μ l와 효소 10 μ l, PTP1B buffer [0.1 M NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT (dithiothreitol)] 30 μ l 를 35 $^{\circ}$ C, 5~10분간 preincubation시킨 후 기질 (*p*-NPP) 50 μ l 를 첨가하여 35 $^{\circ}$ C, 20분간 incubation한 후 10M NaOH 10 μ l를 넣어 반응 종결후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 계산한다.

$$\% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{\text{sample} - \text{sample color}}{\text{control}} \right) \times 100$$





Scheme 6. Measurement of Phosphatase 1B inhibitory activity.

5. 통계처리

모든 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고, 유의성은 Student's *t*-test (Systat In., Evaston, Ill., U.S.A)로 검증하였다. 유의 수준은 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 로 검증하였다.



III. 결과 및 고찰

1. *in vitro* 실험

1-1. DPPH radical 소거 활성

연근의 MeOH 추출물 뿐만 아니라 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH과 H₂O 분획물에 대한 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 이때 대조약물로는 대표적인 항산화제로 널리 알려져 있는 L-ascorbic acid 를 선택하여 그 활성을 함께 비교하였다.

연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물의 활성정도를 Table 1에 나타냈다. 그 중 EtOAc 분획물의 활성은 IC₅₀ 수치가 3.21 µg/ml 로 추출물과 분획물 중 가장 큰 소거활성을 나타내며, 대조약물인 L-ascorbic acid 의 IC₅₀ 수치 5.16 µg/ml를 능가하는 강력한 소거활성을 나타냈다.

연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물의 농도별 소거활성정도를 Fig.6에 나타냈다.

Table 1. DPPH radical scavenging effects of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes

Extract and fractions	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)		
	Mean	$\pm$	S.E.M
MeOH	162.42	$\pm$	3.67
CH ₂ Cl ₂	113.28	$\pm$	0.91
EtOAc	3.21	$\pm$	0
BuOH	10.88	$\pm$	0.14
H ₂ O	154.30	$\pm$	1.07
L-ascorbic acid	5.16	$\pm$	0.03

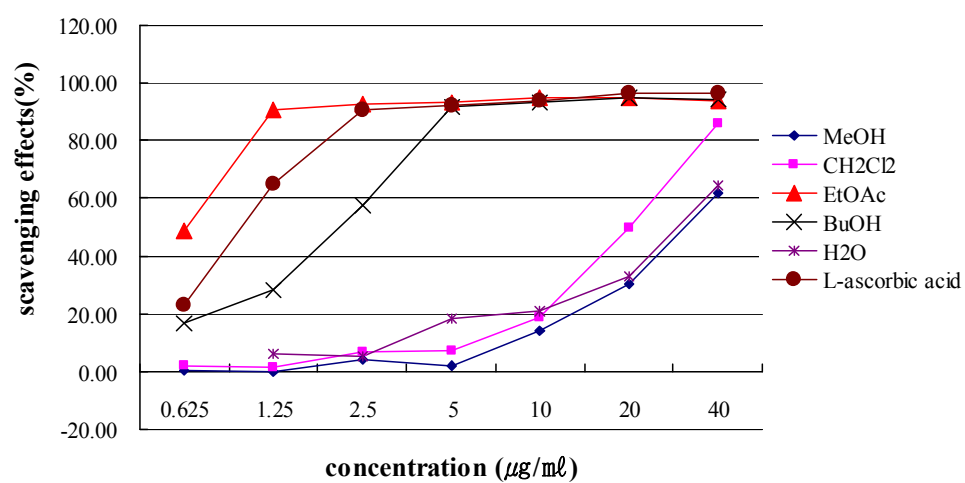


Fig.6. Concentration-dependant DPPH radical scavenging effects of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes.

1-2. 활성산소종 생성 억제 활성

연근의 MeOH 추출물 뿐만 아니라 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH과 H₂O 분획물에 대한 활성산소종 생성 억제 활성을 측정하였다. 이때 대조약물로는 Trolox를 선택하여 그 활성을 함께 비교하였다.

연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물의 활성정도를 Table 2에 나타냈다. 그중 EtOAc 분획물의 활성은 IC₅₀ 수치가 11.06 µg/ml 로 분획물 중 가장 큰 소거활성을 나타내며, 대조약물인 Trolox의 IC₅₀ 수치 5.19 µg/ml에 근접하는 소거활성을 나타냈다.

연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물의 농도별 활성산소종 생성 억제 활성을 Fig.7에 나타냈다.



Table 2. Total ROS scavenging effects of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes

Extract and fractions	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Mean	$\pm$	S.E.M
MeOH	44.15	$\pm$	1.34
CH ₂ Cl ₂	28.65	$\pm$	1.04
EtOAc	11.06	$\pm$	1.66
BuOH	24.64	$\pm$	1.25
H ₂ O	105.25	$\pm$	10.31
Trolox	5.19	$\pm$	0.3

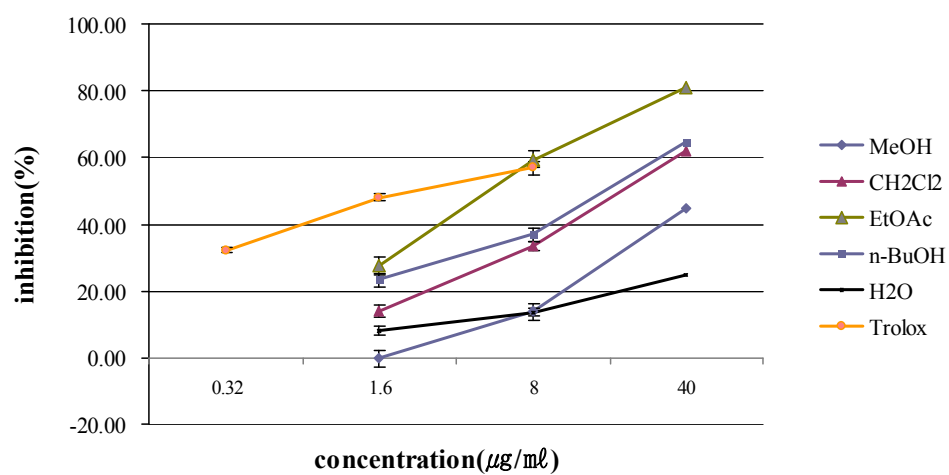


Fig.7. Concentration-dependant total ROS scavenging effects of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes.

1-3. 연근의 분획물의 aldose reductase 억제활성

연근의 MeOH 추출물 뿐만 아니라 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH과 H₂O 분획물에 대한 aldose reductase 억제활성을 측정하였다. 이때 대조약물로는 대표적인 aldose reductase 억제제로 잘 알려져 있는 quercetin (Varma *et al.*, 1975; Varma *et al.*, 1977; Leuenberger, 1978)을 선택하여 그 활성을 함께 비교하였다.

Aldose reductase 억제 활성을 확인하기 위해 연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물의 활성을 검색하여 Table 3에 나타냈다. 그중 EtOAc 분획물의 활성은 IC₅₀ 수치가 0.15 µg/ml로 추출물과 분획물 중 가장 큰 억제활성을 나타내며, 대조약물인 quercetin의 IC₅₀ 수치 3.28 µg/ml를 능가하는 강력한 억제활성을 나타냈다.

연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물의 농도별 aldose reductase 억제 활성을 Fig.8에 나타냈다.

당뇨병으로 인해 혈중에 고혈당이 지속되면 oxidative stress가 증가되고 이는 ROS를 생성시킨다. 생성된 ROS는 toxic aldehydes의 생성을 촉진시키고, 생성된 toxic aldehydes는 aldose reductase를 활성화시켜 정상상태의 약 2-4배의 glucose가 polyol pathway를 거쳐 sorbitol과 fructose가 생성된다 (Travis *et al.*, 1974; Malone *et al.*, 1980; Williamson *et al.*, 1993; Maccari *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). 선행연구에서 flavonoids는 DPPH, ONOO⁻ 그리고 ROS 등과 같은 free radical을 소거하는 항산화활성이 보고되었다 (Jung *et al.*, 2003; Aderogba *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2007; Monagas *et al.*, 2007). 강력한 항산화활성을 나타내는 flavonoid compound의 aldose reductase에 대한 억제 활성은 여러 문헌들에 의해 보고되었으며 (Varma *et al.*, 1975; Varma *et al.*, 1977; Leuenberger, 1978; Jung *et al.*, 2002; Enomoto *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), 이는 flavonoid의 강력한 항산화활성에 의해 aldose reductase 활성화를 억

제한다고 보고되었다 (Costantino *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2001; Kawanishi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Ramana *et al.*, 2006).



Table 3. Aldose reductase inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes

Extract and fractions	$\mu\text{g/ml}$	inhibition (%)			IC ₅₀ (ug/ml)		
					average	$\pm$	SEM
Quercetin	5	66.84	$\pm$	2.63	3.28	$\pm$	0.02
	1	47.86	$\pm$	0.71			
	100	82.61	$\pm$	1.09	7.70	$\pm$	0.17
MeOH	10	66.41	$\pm$	2.35			
	5	40.00	$\pm$	2.86			
	100	80.98	$\pm$	0.55	7.32	$\pm$	0.12
CH₂Cl₂	10	70.31	$\pm$	0.00			
	5	45.72	$\pm$	1.42			
	100	79.89	$\pm$	1.63	0.15	$\pm$	0.01
EtOAc	10	87.50	$\pm$	1.56			
	5	79.29	$\pm$	2.15			
	1	74.58	$\pm$	0.00			
	0.2	64.21	$\pm$	2.88			
	0.04	18.35	$\pm$	4.43			
	100	66.00	$\pm$	6.00	0.68	$\pm$	0.05
BuOH	10	82.19	$\pm$	0.00			
	5	73.12	$\pm$	0.02			
	1	62.38	$\pm$	1.62			
	0.2	31.22	$\pm$	2.11			
H₂O	100	61.34	$\pm$	1.33	77.30	$\pm$	2.77
	10	15.07	$\pm$	9.59			
	100	98.50	$\pm$	0.23	41.33	$\pm$	7.74
Tryptophan	10	22.82	$\pm$	9.86			
	2	-28.60	$\pm$	25.76			

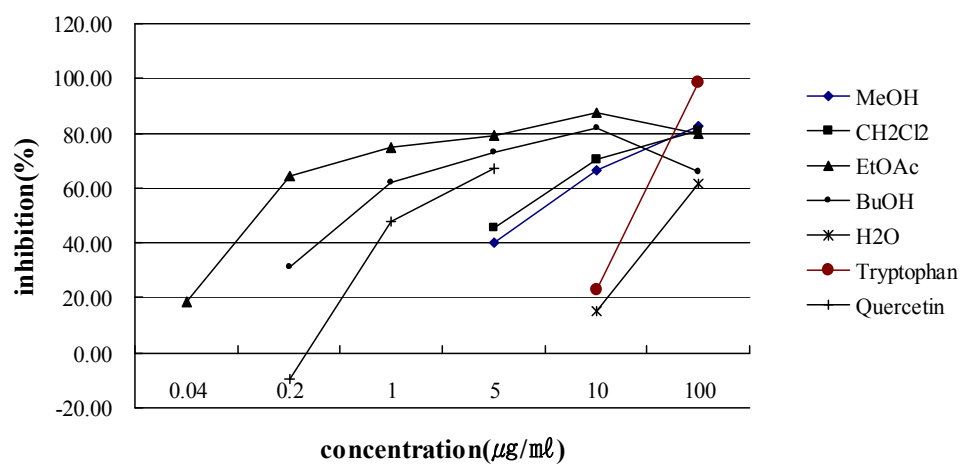


Fig.8. Concentration-dependant Aldose reductase inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes.

1-4. 연근의 분획물의 Human Recombinant aldose reductase 억제활성

연근의 MeOH 추출물 뿐만 아니라 CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH과 H_2O 분획물에 대한 Human Recombinant aldose reductase 억제활성을 측정하였다. 이때 대조약물로는 대표적인 항산화제로 널리 알려져 있는 quercetin과 Aldose reductase inhibitor 로 사용되고 있는 화합물인 succinimide 유도체인 Epalrestat를 선택하여 그 활성을 함께 비교하였다.

연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH, H_2O 분획물의 활성정도를 Table 4에 나타냈다. 그 중 EtOAc 분획물의 활성은 IC_{50} 수치가 10.76 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 추출물과 분획물 중 가장 큰 소거활성을 나타내었다.

연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH, H_2O 분획물의 농도별 Human Recombinant aldose reductase 억제 활성을 Fig.9에 나타냈다.



Table 4. Human Recombinant Aldose reductase inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes

Extract and fractions	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)		
	Mean	$\pm$	S.E.M
MeOH	>50		
CH ₂ Cl ₂	>50		
EtOAc	10.76	$\pm$	0.18
BuOH	33.95	$\pm$	0.05
H ₂ O	>50		
Epalrestat	0.04	$\pm$	0
Quercetin	1.43	$\pm$	0.07

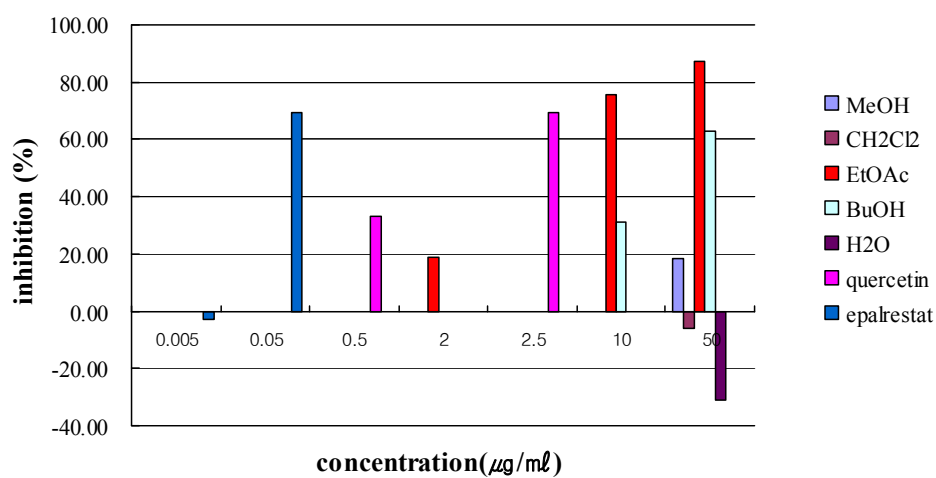


Fig.9. Concentration-dependant Human Recombinant Aldose reductase inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes.

1-5. Phosphatase 1B 억제활성

연근의 MeOH 추출물뿐만 아니라 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH과 H₂O 분획물에 대한 Phosphatase 1B 억제활성을 측정하였다. 이때 대조약물로는 Ursolic acid와 tryptophan을 선택하여 그 활성을 함께 비교하였다.

연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물의 활성정도를 Table 5에 나타냈다. 그중 EtOAc 분획물의 활성은 IC₅₀ 수치가 0.85 µg/ml 로 분획물 중 가장 큰 억제활성을 나타내며, 대조약물인 Ursolic acid의 IC₅₀ 수치 1.80 µg/ml에 근접하는 억제활성을 나타냈다.

연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물의 농도별 Phosphatase 1B 억제활성을 Fig.10에 나타냈다.



Table 5. Phosphatase 1B inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes

Extract and fractions	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)		
	Mean	$\pm$	S.E.M
MeOH	23.67	$\pm$	0.91
CH ₂ Cl ₂	4.09	$\pm$	0.28
EtOAc	0.85	$\pm$	0.21
BuOH	6.76	$\pm$	0.31
H ₂ O	> 50		
Tryptophan	4.75	$\pm$	0.08
Ursolic acid	1.80	$\pm$	0.11

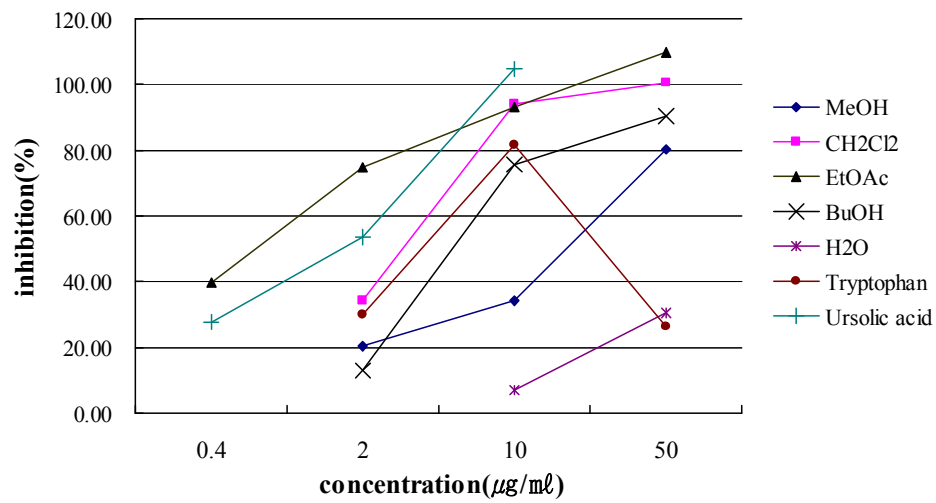


Fig.10. Concentration-dependant Phosphatase 1B inhibitory activities of the MeOH extract and soluble fractions of MeOH extract from *Nelumbo nucifera* Rhizomes.

IV. 요약 및 결론

민간요법이나 문헌에 그 효과가 널리 알려진 연근의 MeOH추출물 및 분획물을 이용하여 *in vitro* 실험을 실시하였다. 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH radical 소거 활성, 활성산소종 생성억제활성 실험을 수행하였고 당뇨병 합병증 억제 활성을 확인하기 위해 aldose reductase 억제 활성, HRAR 억제활성 실험을 실시하였으며 인슐린 감수성을 증가시켜 혈당강하 효과를 나타내는 연근의 효능을 확인하고자 PTP1B 억제활성에 대한 *in vitro* 실험을 수행하였다.

1. 연근의 MeOH 추출물뿐만 아니라 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성, 활성산소종 생성 억제활성, Aldose reductase 억제 활성, HRAR 억제활성 및 PTP 1B 억제활성 실험을 수행하였다.
2. 연근의 DPPH radical 소거 활성은 EtOAc(IC₅₀ 3.21 µg/ml), *n*-BuOH(IC₅₀ 10.88 µg/ml) 획분에서 높은 활성을 나타내었다. 이 결과로서 연근의DPPH radical 소거 활성을 지닌 성분은 대부분 EtOAc획분과 *n*-BuOH획분에 존재함을 알 수 있었다.
3. 생체 내에서 생성되는 활성산소종을 정량 측정하는 방법으로 간세포주에서 생성된 활성산소종에 의해 비형광 probe인 DCFH-DA가 강한 형광성을 띠는 DCF로 전환되는 기전을 이용하여 연근의 MeOH 추출물과 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물에 대한 활성산소종 억제효과를 측정하였다. DPPH radical 소거 활성에서도 강한 소거능을 보였던 EtOAc(IC₅₀ 11.06 µg/ml), *n*-BuOH(IC₅₀ 24.64

μg/ml) 획분에서 높은 억제효과를 나타내었다.

4. Aldose reductase 억제 활성을 확인하기 위해 연근의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물의 활성을 검색하였다. 그 중 EtOAc 분획물의 활성은 IC₅₀ 수치가 0.15 μg/ml로 추출물과 분획물 중 가장 큰 억제활성을 나타내며, 대조약물인 quercetin의 IC₅₀ 수치 3.28 μg/ml를 능가하는 강력한 억제활성을 나타냈다.
5. 연근의 MeOH 추출물 뿐만 아니라 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH과 H₂O 분획물에 대한 Human Recombinant aldose reductase 억제활성을 측정하였다. 이때 대조약물로는 대표적인 항산화제로 널리 알려져 있는 quercetin과 Aldose reductase inhibitor로 사용되고 있는 화합물로서 succinimide 유도체인 Epalrestat를 선택하여 그 활성을 함께 비교하였다. 결과 EtOAc(IC₅₀ 10.76 μg/ml), *n*-BuOH(IC₅₀ 33.95 μg/ml) 획분에서 높은 억제효과를 나타내었다.
6. 연근의 MeOH 추출물과 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH과 H₂O 분획물에 대한 Phosphatase 1B 억제활성을 측정하였다. 이때 대조약물로는 Ursolic acid를 선택하여 그 활성을 함께 비교하였다. 그 중 EtOAc 분획물의 활성은 IC₅₀ 수치가 0.85 μg/ml로 분획물 중 가장 큰 억제활성을 나타내며, 대조약물인 Ursolic acid의 IC₅₀ 수치 1.80 μg/ml에 근접하는 억제활성을 나타냈다.

이로써 연근 추출물은 천연 항산화제로서의 기능과 더불어 혈당을 강하시키고 당뇨 합병증을 예방할 수 있는 기능성 식품으로서의 가치가 있음

을 나타내고 있다.



V. 참고문헌

- 김응진, 민헌기, 최영길, 당뇨병학, 고려의학, pp. 1-549, 1998.
- 박종희, 이정규, 상용 약용식물도감. 신일상사, pp. 278-279, 2002.
- Abuja, P. M. and Albertini, R., Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta.*, 306, 1-17, 2001.
- Ahmad F, Azevedo JJ, Cortright R, Dohm GL, Goldstein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest* **100**: 449-458, 1997.
- Asante-Appiah E, Kennedy BP. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: E663-E670, 2003.
- Cameron, N. E. and Cotter, M. A., Neurovascular dysfunction in diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, 96, 1159-1163, 1995.
- Cho, E. J., Yokozawa, T., Rhyu, D. Y., Kim, S. C., Shibahara, N. and Park, J. D., Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine*, 10, 544-551, 2003.
- Chung, K.S., Yun-Choi, H.S. and Hahn, Y. High performance liquid chromatographic analyses of higenamine enantiomers in aconite roots. *Natural Product Sci.*, 6, 20-24, 2000.
- Dictionary of Chinese crude drugs, Chiang su new medical college, Zhong-Yao-Da-Ci-Dian, Shanghai scientific publisher, Shanghai, China, pp. 1806, 1977.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**: 1544-1548, 1999.
- Fernandez, M., Caballero, J., Helguera, A. M., Castro, E. A. and Gonzalez, M. P.,

- Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 3269-3277, 2005.
- Giugliano, D. C., Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 19, 257-267, 1996.
- Greene, D. A., Lattimer, S. A. and Sima, A. F., Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complication. *New Eng. J. Med.*, 316, 599-606, 1987.
- Han, S. J. and Koo, S. J., Study on the chemical composition in bamboo shoot, lotus root and burdock. *Korean J. Soc. Food Sci.*, 9, 82-87, 1993.
- Hu, M.H. and Skibsted, L.H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus(*Nelumbo Nucifera*). *Food Chem.*, 76, 327-333, 2002.
- Huang, K. C., *The pharmacology of chinese herbs*. CRC Press Inc., USA, 154-155, 1993.
- Johnson TO, Ermolieff J, Jirousek MR. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 1: 696–709, 2002.
- Jung, H.A., Kim, J.E., Chung, H.Y. and Choi, J.S. Antioxidant principles of *Nelumbo Nucifera* stem. *Arch. Pharm. Res.*, 26, 279-285, 2003.
- Kashiwada, Y., Aoshima, A., Ikeshiro, Y., Chen, Y. P., Furukawa, H., Itoigawa, M., Fujioka, T., Misashi, K., Mark Cosentino, L., Morris-Natschke, S. L. and Lee, K. H., Anti-HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 443-448, 2005.
- Kawanishi, K., Ueda, H. and Moriyasu, M., Aldose reductase inhibitor from the nature. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 1353-1374, 2003.
- Kim, S. B., Rho, S. B., Rhyu, D. Y. and Kim, D. W., Effect of *Nelumbo nucifera* leaves on hyperlipidemic and atherosclerotic bio F1B hamster. *Kor. J. Pharmacogn.*, 36, 229-234, 2005.

- Kim Y.C., Oh H, Kim BS *et al.* In vitro protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory phenols from the seeds of *Psoralea corylifolia*. *Planta Med* **71**: 87– 89,2005.
- Kim, Y. S., Chun, S. S., Jung, S. T. and Kim, R. Y., Effect of lotus root powder on the quality of dough. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.*, 18, 573-578, 2002.
- La Cour, B., Molgaard, P. and Yi, Z. Traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 125-129, 1995.
- Lee, K.S., Kim, M.G. and Lee, K.Y. Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo Nucifera*) leaf. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 35, 182-185, 2006.
- Lee, Y. S., Lee, S. H., Lee, H. S., Kim, B. K., Ohuchi, K. and Shin, K. H., Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 916-918, 2005.
- Na, M. K., Jang, J. P., Dieudonne N., Joseph T. M., Zacharias T. F., Kim, B. Y., Oh, W. K., Ahn, J. S., Protein Tyrosine Phosphatase-1B Inhibitory Activity of Isoprenylated Flavonoids Isolated from *Erythrina mildbraedii*. *J. Nat. Prod.*, 69, 1572-1576, 2006.
- Ling, Z.Q., Xie, B.J. and Yang, E.L. Isolation, characterization, and determination of antioxidative of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo Nucifera* Gaertn. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2441-2445, 2005.
- Maccari, R., Ottaná, R., Curinga, C., Vigorita, M. G., Rakowitz, D., Steindl, T. and Langer, T., Structure-activity relationships and molecular modeling of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones active as aldose reductase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 2809-2823, 2005.
- Malone, J. I., Knox, G., Benford, S. and Tedesco, T. A., Red cell sorbitol. An indicator of diabetic control. *Diabetes*, 29, 861-864, 1980.
- Moon, S. M., Kim, H. J. and Han, K. S., Purification and characterization of polyphenol oxidase from lotus root. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 35, 791-796,

2003.

- Ohkoshi, E., Miyazaki, H., Shindo, K., Watanabe, H., Yoshida, A. and Yajima, H., Constituents from the leaves of *Nelumbo nucifera* stimulate lipolysis in the white adipose tissue of mice. *Planta Med.*, 73, 1255-1259, 2007.
- Ono, Y., Hattori, E., Fukaya, Y., Imai, S. and Ohizumi, Y., Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *Journal of ethnopharmacology*, 106, 238-244, 2006.
- Quan, J.Q. Cardiovascular pharmacological effects of bibenzylisoquinoline alkaloid derivatives. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 23, 1086-1092, 2002.
- Rai, S., Wahile, A., Mukherjee, K., Saha, B. P. and Mukherjee, P. K., Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *Journal of ethnopharmacology*, 2005.
- Sato, Y. and Rifkin, D. B., Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transformation growth factor B1-like molecule by plasmin during coculture. *J. Cell. Biol.*, 109, 309-315, 1979.
- Sato, Y., Hotta, N., Sakamoto, N., Matsuoka, S., Ohishi, N. and Yagi, K., Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem. Med.*, 25, 373-378, 1981.
- Shoji, N., Umeyama, H., Saito, N., Iuchi, A. and Takemoto, T., Assimilobine and lirinidine, Serotonergic receptor antagonists, from *Nelumbo nucifera*. *J. Natural Products*, 50, 773-774, 1987.
- Sohn, D. H., Kim, Y. C., Oh, S. H., Park, E. J., Li, X. and Lee, B. H., Hepatoprotective and free radical scavenging effects of *Nelumbo nucifera*. *Phytomedicine*, 10, 165-169, 2003.
- Travis, S. F., Morrison, A. D., Clements, R. S. Jr., Winegrad, A. I. and Oski, F. A., The role of the polyol pathway in metahemoglobin reduction in human red cells. *Br. J. Haematol.*, 27, 597-605, 1974.
- Williamson, J. R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K. S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengard, J. R., Van Den Enden, M., Kilo, C. and Tilton, R. G.,

Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complication. *Diabetes*, 42, 801-813, 1993.

Wu, M. J., Wang, L. and Weng, C. Y., Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaves (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Am. J. Chin. Med.*, 31, 687-698, 2003.

Yang, H.C., Kim, Y.H., Lee, T.K. and Cha, Y.S. Physicochemical properties of lotus root. *J. Korean Agri. Chem. Soc.*, 28, 239-244, 1985.



감사의 글

본 논문이 완성되기까지 많은 분들의 도움과 관심이 있었기에 이 자리를 빌어 감사의 마음을 전하고자 합니다.

늦은 나이에 공부를 새로 시작한 저를 아껴주시고 학문에 대한 열정을 보여주시며 부족한 저를 늘 한결같이 이끌어주시며 지켜봐주신 최재수 교수님께 깊은 존경과 감사의 마음을 전합니다.

또한 바쁘신 와중에 부족한 논문을 심사해주시고, 조언을 해주신 변대석 교수님, 김형락 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 평소에 큰 가르침을 주시고 자상하게 도와 주시며 항상 따뜻하게 저를 맞이해 주신 류은순 교수님, 늘 재미있는 강의로 수업 시간을 즐겁게 해주신 류홍수 교수님, 남택정 교수님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

실험실이 익숙하지 못해 늘 어려워하던 저를 이끌어 주시고 항상 모범이 되어 주시며 배울 것이 너무 많은 정현아박사님과 현숙경박사님께 진심으로 감사드립니다. 어리지만 너무 따뜻하고 늘 챙겨주셔서 감사했던 성품과 얼굴 모두 아름다운 윤나영박사님, 언제나 듬직하고 똑똑한 후배 현영이, 실험실을 활기치게 만든 새내기 후배인 성은, 유경, 진주, 지혜님께도 진심으로 감사드립니다. 또한 얼굴도 마음도 예쁜 보현, 똑똑하고 뭐든지 잘하는 혜경, 신희의 단꿈을 꾸고 있는 민지, 열심히 실험중이라 바쁠 미송이 그리고 그 외에 많은 도움을 주신 대학원 선·후배님들께도 감사드립니다. 근무시간을 조절해 주어 공부하는데 큰 보탬이 되

어 준 진심으로 고마운 예쁜 미소를 지닌 구민희영양사님, 가끔 만나지만 서로에게 위로가 되어주는 주형, 잠깐이었지만 헤어짐이 아쉬웠던, 항상 정도를 꿈꾸며 살아가는 장은경양, 이제 엄마의 길에 접어든 박화영님께도 감사의 마음을 전합니다.

일하느라 공부하느라 바쁜 며느리를 대신해 집안살림을 도맡아 주시고 손녀까지 예쁘고 착하게 키워 주시는 시어머니 옥덕봉 여사님께 진심으로 감사드리고 빨리 합격의 기쁨을 선사하고 싶습니다. 저를 세상에 서게 하신 부모님께 감사드리며 언제나 건강하시고 오래오래 저와 함께하시길 하나님께 기도드립니다. 항상 이해심 많은 남편 반영재님과 엄마의 기쁨이 되며 항상 씩씩하게 똘똘한 딸 반혜린, 항상 고맙고 감사한 큰형님 반영숙님, 사랑하는 언니, 형부, 오빠, 율케, 그리고 눈에 넣어도 아프지 않은 조카들과 함께 기쁨을 나누고 싶습니다.

이 모든 분들께 감사드리며, 항상 최선을 다해 열심히 살아가겠습니다.

2009년 8월

김현미 올림