



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

청 콜라비의 항당뇨 및 항염증 효과



2014년 8월

부경대학교교육대학원

영양교육전공

엄 나 연

교 육 학 석 사 학 위 논 문

청 콜라비의 항당뇨 및 항염증 효과

지도교수 최 재 수

위 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함.



2014년 8월

부경대학교교육대학원

영양교육전공

엄 나 연

엄나연의 교육학석사 학위논문을 인준함

2014년 8월



주 심 이학박사 류 은 순 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

위 원 약학박사 최 재 수 (인)

목 차

ABSTRACT	i
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 재료	7
2. 시약 및 재료	
2-1. 시약	7
2-2. 기기	8
2-3. 실험세포주	8
3. 방법	9
3-1. 추출	9
3-2. RAW 264.7 세포주의 배양	10
4. 활성 실험	11
4-1. ABTS radical 소거활성	11
4-2. DPPH radical 소거활성	13
4-3. ONOO ⁻ 소거활성	16
4-4. Total phenol contents 측정	19
4-5. MTT assay를 이용한 세포독성측정	20
4-6. Nitric oxide 측정을 통한 항염증측정	21
4-7. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제 활성	22
4-8. Lens Aldose reductase 억제 활성	24
5. 통계처리	27

III. 결과 및 고찰	28
1. 실험결과	28
1-1. 청 콜라비 MeOH 추출물의 ABTS radical 소거활성	28
1-2. 청 콜라비 MeOH 추출물의 DPPH radical 소거활성	29
1-3. 청 콜라비 MeOH 추출물의 ONOO ⁻ 소거활성	30
1-4. 청 콜라비 MeOH 추출물의 Total phenol contents 측정 ...	32
1-5. 청 콜라비 MeOH 추출물의 MTT assay를 이용한 세포 세포독성측정	34
1-6. 청 콜라비 MeOH 추출물의 Nitric oxide 측정을 통한 항염증 측정	36
1-7. 청 콜라비 MeOH 추출물의 Protein tyrosine phosphatase 1B 억제 활성	38
1-8. 청 콜라비 MeOH 추출물의 Lens Aldose reductase 억제 활성	40
IV. 결론 및 요약	42
V. 참고 문헌	45

**Anti-diabetic and anti-inflammatory activities of *Brassica oleracea*
var. *gongylodes* green cultivar**

Na-yeon Ehom

Graduate School of Education, Pukyong National University

Abstract

Kohlrabi is a biennial vegetable that belongs to brassicaceae in papaveraceae. Kohlrabi is also called turnip cabbage or corm cabbage. Kohlrabi is an English name which is a compound word of German words Kohl (cabbage) and rabic (turnip). It is a biennial plant differentiated from cabbage and its place of origin is the coastal area of Northern Europe. Its varieties are divided into Asian groups and Western European groups. Asian groups have greyish green leaves and green rough corms. Western European groups that comprise major varieties have green or purple corms with smooth surfaces covered by white waxy substances.

Kohlrabi abundantly contains glucosinolates, anthocyanin, and carotenoidin known to have excellent anti-cancer effects and, in particular, its glucosinolates amounts to approximately 25 times of that of radish. Although it has been reported as having antimutagenic actions in in-vitro studies, studies on its physiological activity are insufficient.

In this study, the MeOH extract of green Kohlrabi was used to evaluate its ABTS, DPPH, and peroxynitrite eliminating activity and its effect on total phenol

measurement. Its antioxidative activity was evaluated through in vitro assays. In addition, its anti-inflammatory activity was investigated by evaluating the generation of NO induced by LPS and MTT toxicity tests using Raw 264.7 cell line obtained from mouse's macrophagocytes. In addition, its anti-diabetic and anti-diabetic complication activity was evaluated through Phosphatase 1B suppressive activity and Lens aldose reductase suppression experiments. In the results, the IC₅₀ values of ABTS, DPPH, peroxyntirite in green Kohlrabi methanol extract were shown to be 787.89±15.19 , 801.03± 0.80, and 132.20± 0.32 µg/ml respectively and green Kohlrabi had 4.64 GAE, mg/g extract of phenol content. In the MTT toxicity tests, 89.85%, 91.10%, and 97.26% were shown when MeOH extract concentrations were 200, 400, and 800 (µg/ml) respectively. Therefore, the MeOH extract of green Kohlrabi was judged to have no cytotoxicity. The generation of NO induced by LPS was shown to be 3.8%, 9.7%, and 12.3% at 200, 400, and 800 (µg/ml) concentrations thereby increasing concentration dependently to show weak NO suppressive effects. In Phosphatase 1B suppressive activity experiments, an IC₅₀ value of 207.13 +19.15 µg/ml was shown and the control group ursolic acid showed an IC₅₀ value of 5.59±0.44 µg/ml. In the Lens aldose reductase suppression experiment, no IC₅₀ value was obtained at concentrations 400, 800, and 1600 (µg/ml) but the suppression increased concentration dependently to 27%, 34%, and 42% respectively thereby showing weak suppressive activity.

Through the results of this study, the fact that the MeOH extract of green Kohlrabi has antioxidative and anti-diabetic activity was identified. The fact that it has utility value as a material of functional food can be proposed and its appropriate consumption effect as food can be expected. In addition, this extract can be effective preventive and treating agents as antioxidative and anti-diabetic treatment.

I. 서론

급속한 경제발전을 이룩한 우리나라는 생활수준의 향상과 더불어 삶의 질 향상으로 건강에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러나 서구화된 식문화와 습관으로 인해 비만, 당뇨, 고혈압, 심혈관계 질환 등 만성질환이 증가하고 있는 추세이다. 현재 수많은 식품 소재들이 방송을 통해 건강 증진 효과와 질병예방 효과가 부각되면서 소비자들이 과거 식품이 갖는 영양소 공급을 위한 1차적 기능을 넘어 만성질환의 예방과 치료에 대한 국민의 관심이 증대되고 있다 (Park *et al.*, 2004).

이중에서도 당뇨병은 전 세계적으로 증가하고 있으며 당뇨병에 걸린 전체 환자의 수는 2000년에는 171 백만명이었으며 2030년에는 366 백만명이 당뇨병에 걸릴 것으로 추측하였다. 이중에서 제2형 당뇨병 (인슐린 비의존성)이 90~95%를 차지한다 (Thomas *et al.*, 2006).

제2형 당뇨병은 인슐린을 생산하지 못하는 것이 원인이 되어 발생하는 질환이며, 인슐린은 내분비선인 췌장에서 분비되며, 혈액 속의 포도당의 양을 일정하게 유지하고, 체내의 지방과 당, 에너지의 대사 및 저장에 관여하는 중요한 호르몬이다 (Hong *et al.*, 2004). 제 2형 당뇨병 증상 중의 하나인 인슐린 저항성에 관련된 효소 중에는 Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)가 있으며, 많은 논문에 따르면 PTP1B는 인슐린의 세포 내 신호전달을 차단하고 이로 인해 인슐린 저항성을 유발한다고 증명하였다 (Ahmad *et al.*, 1997; Byon *et al.*, 1998; Goldstein *et al.*, 1998). 세포막 내에 있는 인슐린 수용체 (insulin receptor, IR)의 α -subunit에 인슐린이 결합하면 β -subunit의 세포 내 영역에 있는 tyrosine phosphatase가 활성화되

고, tyrosine 잔기의 인산화가 일어난다. 이와 함께 세포 내로 glucose 수송과 glycogen 합성 등의 반응을 야기시키는 몇몇의 신호전달체계를 활성화 시킨다 (Na *et al.*, 2006; Bialy and waldmann, 2005). PTP1B 효소는 IR와 IRS Protein을 탈 인산화를 일으키며, IR의 신호전달을 저해하고, 결과적으로 인슐린 저항성을 높여 체내로 당이 흡수되지 못하고 혈중 당 함량이 증가하게 된다 (Jeong *et al.*, 2011). 따라서 PTP1B를 억제하는 것이 인슐린 저항성 제2형 당뇨병에 유의한 치료수단이 될 수 있다. 인슐린의 기능 이상으로 고혈당 증세가 지속 될수록 만성 당뇨합병증을 야기시키게 되는데 당뇨합병증이 오기 전까지는 심각한 증상이 없기 때문에 가볍게 여기기 쉽다. 당뇨합병증의 종류로는 망막변증, 신장변증, 감각이 무디어지거나 손발 저림 과 같은 신경변증, 말초동맥질환, 족부궤양, 당뇨성 망막증 등이 있다. 최근 5년간 당뇨합병증 진료환자 수는 점차 증가하는 추세이다 (Wright *et al.*, 2006).

고혈당이 합병증을 유발하는 또 다른 기전으로 포도당이 sorbitol을 거쳐 fructose으로 변환되는 경로인 폴리올 대사계 (polyol pathway)의 이상과 관련된다 (Sato and Rifkin, 1989). polyol pathway는 당뇨 합병증 발생에 중요한 역할을 하는 glucose 대사경로이다 (Maccari *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2005). 알도즈 환원효소 (aldose reductase, AR, E.C.1.1.1.21;21)는 폴리올 대사계의 첫 번째 효소로서, NADPH를 NADP+로 환원하여 D-glucose를 D-sorbitol로의 변환을 야기시키며 (Lee, H. S., 2002), 이 효소는 인슐린에 비 의존적으로 당을 흡수를 하는 수정체, 망막, 신장, 신사구체, 적혈구 등의 기관에 다량 농축 되어있다 (Kato, A *et al.*, 2008).

또한, glucose는 체내에서 주로 에너지원으로 사용되며, polyol pathway를 통해 대사 되는 것은 3%에 불과하며 (Greene *et al.*, 1987), 신장 및 신경세포, 수정체, 망막세포, 적혈구 등은 insulin에 의존하지 않고 확산에 의

해 glucose 되므로, 당뇨병에 의해 고혈당이 유발되면 세포 내 glucose에 의해 활성산소종이 생기게 되고, aldose recuctase를 활성화시켜 정상상태의 약 2-4배의 glucose가 polyol pathway를 통해 sorbitol과 fructose가 생성된다 (Travis *et al.*, 1974 ; Malone *et al.*, 1980). 결과적으로 폴리올 대사계의 항진은 sorbitol 증가와 더불어 삼투적 스트레스로 인해 세포의 팽화와 손상을 야기하고 (Jin *et al.*, 2011), 축적된 sorbitol은 당뇨성 백내장, 당뇨성 망막증, 당뇨성 각막증, 당뇨성 신경증 등의 당뇨 합병증을 가져오게 된다 (Heath and Hamlett, 1976). 따라서 폴리올 대사의 주요한 효소 AR을 저해하는 물질은 sorbitol의 생성과 축적을 감소함으로서, 당뇨 합병증의 치료와 예방에 대한 약제로서의 개발 가능성을 가진다 (Kawanishi *et al.*, 2003).

염증은 외부로부터의 자극에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나로, 조직 변질, 순환장애, 그리고 조직 증식 등을 병발하는 복잡한 병변이다 (Tizard, 1986). 특히 염증 부위의 활성화된 machrophages는 cytokines 뿐 아니라 prostaglandins (PGs)과 일산화질소 (NO) 등을 다량 생성함으로써 염증 매개에 큰 역할을 하며, 염증의 발생 원인으로는 다양한 생화학적 현상이 관여하고 있으나, 특히 NO를 생성하는 효소인 일산화질소 생성효소 (nitric oxide synthase, NOS)와 다양한 PGs의 생합성을 매개하는 효소인 cyclooxygenase (COX)가 염증반응을 조절하는 중요한 매개체로 알려져 있다 (Lawrence *et al.*, 2002; Higuchi *et al.* , 1990; Laflamme and Rivest, 2001; Willeaume *et al.*,1996).

일반적으로 NO는 생체 내에서 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하며 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 하며 (Kubes P, 2000), l-arginine으로부터 constitutive nitric oxide (cNOS)와 inducible nitric

oxide synthase (iNOS)에 의해 생성되는데, cNOS는 일정하게 발현되어 physiological functions을 매개하는 NO를 낮은 수준으로 생성하는 반면, iNOS는 LPS와 cytokines 같은 자극에 의해 급격하게 유도되어 과량의 NO를 생성하고 (Liang *et al.*, 1999)., 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하게 되고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진 시킨다 (Yun HY *et al.*, 1996). prostaglandin E2 (PGE2)는 통증과 발열에 주로 관여하는 염증 인자로 염증 반응이 일어나면 대식세포에서 COX-2에 의해 생성되며 (Wang MT *et al.*, 2007), 따라서 염증 반응에서의 NO 생성은 대부분 iNOS에 의한 것이라 할 수 있다 (Huang *et al.*., 2001). 따라서, 염증 반응에서 생성되는 물질 중 iNOS, COX-2와 같은 물질의 생성 억제를 확인함으로써 항염증 효과를 확인 할 수 있다 (Koundouras *et al.*., 2006).

활성산소종 (reactive oxygen species ; ROS)은 반응성이 큰 산소로 당뇨병, 고혈압, 심장병, 비만과 같은 성인병과 노화, 암 등의 질병과 많은 연관이 있으며, 가능한 체내에서 필요한 양보다 많은 활성산소를 발생시키지 않도록 하며, 무엇보다 산화적 스트레스를 줄이는 것이 중요하다.

방사선, 화학 반응, 산화환원 반응에 대한 반응에서 자유 라디칼에 의해 유도되는 산화 스트레스 (oxidative stress)는 암, 죽상동맥경화증, 당뇨병, 간경화증과 관련이 있는 것으로 보고되었으며 (Halliwell *et al.*, 2003), 단백질 변성, 지질 과산화, DNA 손상 및 혈소판 기능의 변형을 유발하여 만성질환들의 원인이 되기도 한다 (Lee *et al.*, 2007). 세포 내에는 이 ROS를 방어하는 항산화물질인 비타민 A, C, E, glutathione 등의 화합물과, superoxide 을 제거하는 효소인 SOD (superoxide dismutase), 과산화수소를 제거하는 catalase, 과산화물을 제거하는 peroxidase라는 효소가 존재하여 억제되지만, 항산화 성분의 섭취에 의해서도 효과적으로 방어할 수 있

다 이러한 측면에서 볼 때 과일, 채소 등과 같이 항산화 성분이 풍부한 천연 식품의 섭취는 산화스트레스를 중화시키는 좋은 수단으로 볼 수 있다 (Imai *et al.*, 1994).

콜라비(Kohlrabi)는 양귀비목 (Papaveraceae) 배추과 (Brassicaceae)에 속하는 2년생 채소이며, 순무양배추 또는 구경양배추 라고도 한다. 품종은 아시아군과 서유럽군으로 분류하는데, 아시아군은 잎 색깔이 회색을 띤 녹색이고 구경은 녹색으로 표면이 거칠다. 서유럽군은 구경이 자주색이고 표면이 매끄러우며 흰 납질로 덮여 있다. Kohlrabi의 최초재배는 기원전 8세기에 그리스, 로마시대부터 이루어졌을 것으로 추측되고, 중세기에 지중해의 북쪽 해안지대에서 개량 된 것으로 추정된다. 개량된 Kohlrabi의 최초 재배는 1734년 아일랜드에서 일어났다고 기록되어 있다 (Bailey, 1975). 콜라비는 양배추 등 일반채소에 비하여 비타민 C가 많은 편이고, 열량이 낮고 수분과 식이섬유소가 풍부해 다이어트에 좋다는 것으로도 알려져 있다. (choi *et al.*, 2010). 우리나라에서는 주로 제주도에서 재배되고 있으며, 메스컴을 통해 자주 소개되어지면서 다소 생소한 채소에서 웰빙채소로 알려지고 있다. 콜라비는 항암효과가 우수한 물질로 알려진 glucosinolates (choi *et al.*, 2010; MaCledon *et al.*, 1990) 와 anthocyanin, carotenoid 등을 풍부하게 함유하며 (Park *et al.*, 2012), in vitro 연구에서 항돌연변이 작용도 있는 것으로 보고 (Edenharder R *et al.*, 1994; Edenharder R *et al.*, 1990) 되었으나, 생리활성에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서 , 본 연구에서는 청 콜라비의 MeOH 추출물에 대하여 DPPH radical 소거활성, Total phenolic Contents, ABTS radical 소거활성, Peroxynitrite 소거효과를 측정하여 항산화 효과를 규명하고, Phosphatase 1B 억제활성과 Lens aldose reductase 억제 실험으로 항당뇨, 항당뇨 합

병증 활성을 평가 하였으며, 또한 항염증 활성을 검증하기 위하여 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 억제활성을 평가하고자 하였다. 따라서, 청 콜라비의 항염증 효과와 항산화 기능, 혈당강하 예방 및 합병증의 예방과 치료에 효과적인 기능성 식품으로 이용할 수 있는 가능성을 제시 하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에서 사용한 청 콜라비 (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* green cultivar)는 부산 원진상사로부터 구입하여 재료로 사용하였다.

2. 시약 및 기기

2.1 시약

LPS from *Escherichia coli*, Griess reagent, dihydrorhodamine 123 (DHR 123), DPPH, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP), *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (*p*NPG), acarbose, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), quercetin, L-ascorbic acid, DL-glyceraldehyde dimer, dimethyl sulfoxide (DMSO), 2-amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazine hydrochloride (AMT), 1-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid (l-penicillamine), 6-hydroxy-2,5,

7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B, human recombinant)는 Biomol[®] International LP (Plymouth Meeting, PA, USA)에서, fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA)에서, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다.

2-2. 기기

Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성, RAW 264.7 세포에서의 cell viability 그리고 NO 생성 및 DPPH radical 측정은 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 하였다. NO[·], ONOO⁻ 측정은 microplate fluorescence reader (Bio-Tek Instruments Inc., FLx 800, Winooski, UT, USA)로 하였으며, ONOO⁻의 흡광도 측정은 UV spectrophotometer (Ultraspec[®] 2100pro, Amersham Biosciences, USA)로 하였다. AR 억제활성에서의 흡광도는 UV / Visible Spectrophotometer (Ultraspec[®] 2100 pro, Amersham Biosciences, USA)로 측정하였다.

2-3. 실험 세포주

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다.

3. 실험방법

3-1. 추 출

청 콜라비의 MeOH 추출 과정은 scheme 1에서 나타내었다. 절단한 청 콜라비 (3 kg)를 MeOH로 2회 냉침 한 후 여과하고 그 여액을 rotary vaccum evaporator에 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복 하여 총 542.92 g MeOH 추출액 얻었다.



Scheme1. Extraction of *Brassica oleracea* var. *gongylodes* green cultivar

3-2. RAW 264.7 세포주의 배양

RAW 264.7 세포를 10% heat-inactivated FBS와 100 Unit/ml streptomycin, 100 µg/ml penicillin을 포함하고 있는 DMEM을 사용하여 37℃, 5% CO₂/air mixture 조건에서 배양하였다.



4. in vitro 실험

4-1. ABTS radical 소거활성

7 mM의 ABTS (2,2-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] diammonium salt; A9941, Sigma, USA)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온. 암소에서 12~16시간 동안 방치하여 radical을 형성시켰다. ABTS 용액은 실험 직전에 735 nm에서 흡광도가 0.70 ± 0.02 (mean $\pm$ SE)이 되도록 phosphate-buffered saline (pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. 농도별 추출물 20 μ L에 ABTS 용액 180 μ L을 첨가하여 10~20초간 균질하게 섞고 실온에서 방치한 후 734nm에서 흡광도를 측정하였다 (Re 등, 1999). radical 소거활성을 백분율로 나타내고 50% 소거농도 (IC₅₀는 μ g /mL 혹은 μ M로 표현)을 계산하였다. Radical 소거능을 비교하기 위한 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하였다.

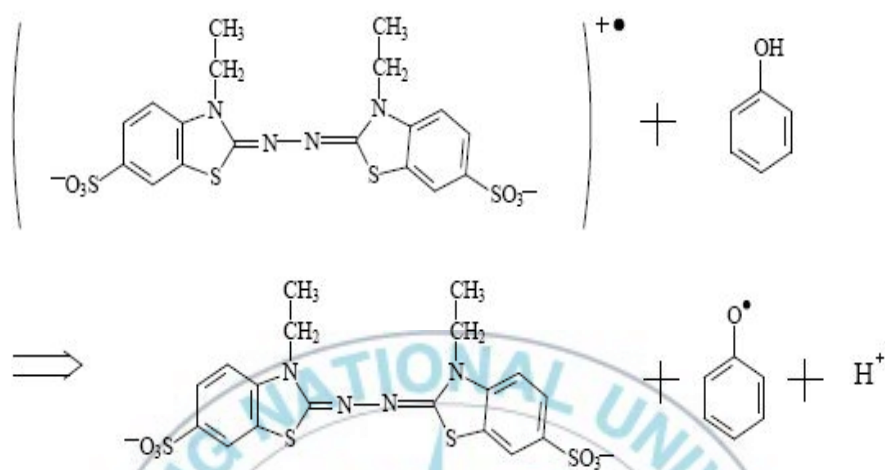


Fig. 1. Mechanism of ABTS radical cation inhibition

4-2. DPPH radical 소거활성

DPPH radical 소거 실험은 광범위하게 쓰이는 간단하고 편리한 항산화 검색법으로서, 특히 phenol과 aromatic amine 화합물의 항산화능 측정에 많이 사용된다 (Blois, 1958). 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지는 홀수 전자 때문에 520 nm에서 특징적인 흡수 band도 사라지고 안정한 분자로 전환된다. 즉, 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH 색이 노란색으로 변하여 (Fig. 2) 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 관찰할 수 있다.

각 시료의 DPPH radical에 대한 소거능 측정은 각 농도별 시료 (1.25~320 $\mu\text{g/ml}$)를 MeOH에 녹여 160 μL 씩 취하여 $1.5 \times 10^{-4}\text{M}$ 의 DPPH MeOH 용액 40 μL 와 잘 혼합한다. 이 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후, microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 520 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도 (IC_{50})를 계산하였다. 결과는 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ ($n=3$)로 나타내었다.

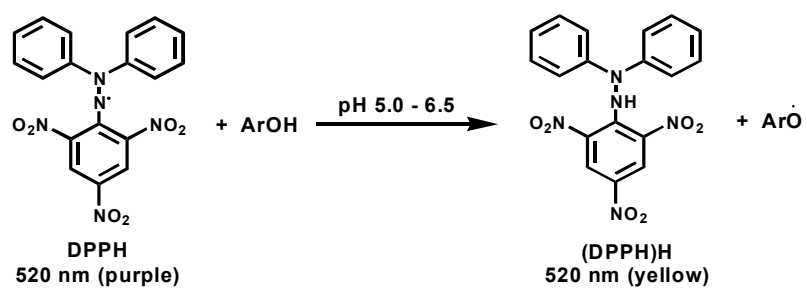


Fig. 2. DPPH radical scavenging action of antioxidants [ArOH].
(Blois, 1958)



MeOH solution (160 μ L) of Sample at various concentrations



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



Shaking vigorously (10-20 sec)



Standing at room temperature for 30 min



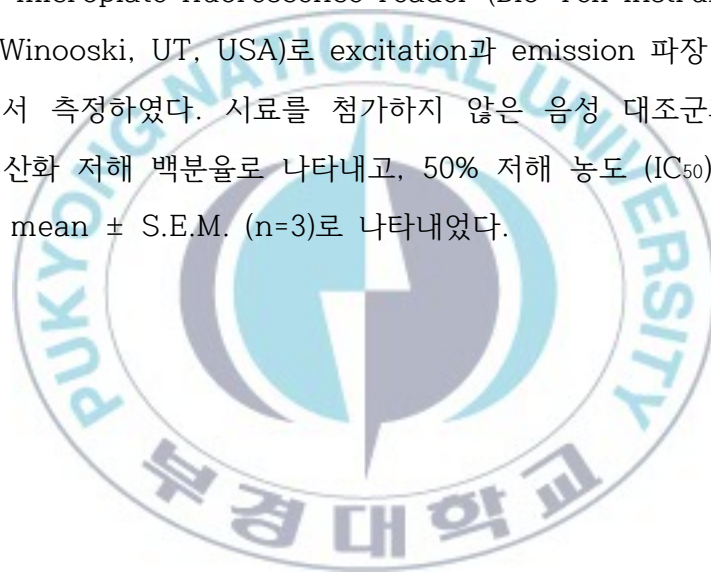
Measurement of optical density at 520 nm

Scheme 2. Measurement of DPPH radical scavenging activity.

4-3. ONOO⁻ 소거활성

ONOO⁻ 는 NO·와 ·O₂-가 반응하여 생성되는 것으로, NO·와 유사한 생리 작용을 가지며, 주요 생리 작용으로는 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanyl cyclase의 자극, tyrosine nitration 외에 lysine, protein의 methionine 잔기의 산화 및 지질 과산화 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아에 의한 호흡 억제, membrane pump 억제, GSH의 고갈, ADP ribose synthase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해와 여러 만성 질환의 병변과 관련됨이 보고되어 있다 (Althaus et al., 1994; Haenen et al., 1997; Lin et al., 1997). ONOO⁻는 다른 free radical에 비해 상대적으로 안정하지만, 생리적 pH에서 쉽게 proton화 되어 반응성이 매우 높은 peroxynitrous acid (ONOOH)로 전환되는데, 이 물질은 반감기 (1.9 s)가 매우 짧고, 여러 세포 독성 물질인 nitrogen dioxide, nitronium ion 및 hydroxyl radical의 전구체로 작용하여 oxidation, nitration, hydroxylation 반응을 유발한다 (Nonoyama et al., 1999). 그러나 세포내에서 ONOO⁻ 소거 활성에 관여하는 효소계가 없으므로, 그 소거활성물질을 찾는 것이 더욱 중요하다 (Choi et al., 2002). 지금까지 보고된 천연 또는 합성의 ONOO⁻ 소거능을 갖는 물질로는 flavonoid (Choi et al., 2002), catechin, polyphenol (Van Dyke et al., 2000, Chung et al., 1998), ergothioneine (Auroma et al., 1999), defroxamine, urate, glutathione (Menconi et al., 1998), melatonin (Cuzzocrea et al., 1999) 그리고 D-(-)-penicillamine (Fici et al., 1997) 이 있다. ONOO⁻ 소거능은 Kooy et al. (1994)의 방법을 약간 변형하여

DHR 123의 산화를 측정하였다 (Fig. 3). Dimethylformamide로 녹인 DHR 123 (5 mM)는 질소 충전하여 -80°C에서 stock solution으로 저장하였다. 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate, 5 mM potassium chloride로 조제한 buffer (pH 7.4)를 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μ M과 섞어, DHR 123의 최종 농도가 5 μ M이 되도록 한다. 이 working solution에 시료와 authentic ONOO⁻를 첨가하면 5분 후, 비형광성의 DHR 123이 형광성의 rhodamine 123으로 바뀌게 된다. 이 형광물질을 microplate fluorescence reader (Bio-Tek Instruments Inc., FLx 800, Winooski, UT, USA)로 excitation과 emission 파장 각각 480와 530 nm에서 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 DHR 123 산화 저해 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도 (IC₅₀)를 계산하였다. 결과는 mean $\pm$ S.E.M. (n=3)로 나타내었다.



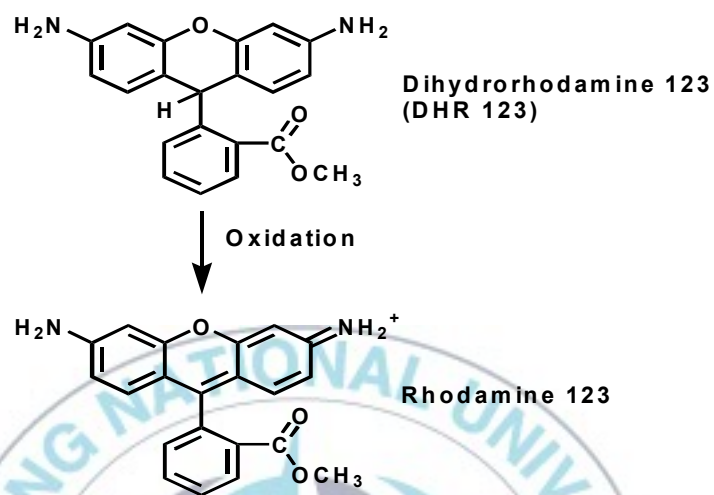


Fig. 3. ONOO^- -mediated oxidation of DHR 123
(kooy et al ., 1994)

4-4. Total phenol contents 측정

청 콜라비 추출물의 Total phenol contents는 Folin-Denis법을 응용하여 측정하였다. 1 mg/mL의 농도로 녹인 시료 0.2 mL를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 5 mL로 만든 후 Foline-Ciocalleaus' phenol reagent 0.5 mL를 첨가하여 혼합한 다음 3분간 실온에서 반응시켰다. 10% Na_2CO_3 포화용액 1 mL을 가하여 혼합한 다음 실온에서 1시간 동안 반응 시킨 후 상등액을 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 galic acid를 이용하여 시료와 동일한 방법으로 측정하여 얻은 표준검량곡선으로부터 추출물의 Total phenol contents를 구하였다.



4-5. MTT assay를 이용한 세포독성측정

RAW 264.7 세포에 대한 독성 측정은 MTT assay 방법으로 분석하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 well 당 1.0×10^5 세포가 되도록 분주한 후 24시간 배양하고, FBS-free DMEM으로 교환한 후 시료를 농도별 (200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하였다. 24시간 배양 후, 100 μL 의 MTT 용액 (0.5 mg/ml in PBS)을 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 100 μL 의 DMSO를 첨가하여 생성된 결정을 용해시키고 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군을 100%로 하여 상대적인 세포 독성을 평가하였으며, 결과는 mean $\pm$ standard deviation ($n=3$)으로 나타내었다.

4-6. Nitric oxide 측정을 통한 항염증 측정

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 well 당 1.0×10^5 세포가 되도록 분주한 후 24시간 배양하였다. FBS-free DMEM으로 교환하고, 다양한 농도의 시료를 2시간 동안 전처리 한 후, LPS ($1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. NO 는 Griess reagent를 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포 배양 상등액 100 μl 를 취하여 96-well plate로 옮긴 후 Griess reagent 100 μl 를 첨가하여 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite로 표준검량곡선을 작성하여 nitrite의 농도를 계산하고, iNOS 억제제인 AMT를 대조군으로 사용하였다. 결과는 mean $\pm$ standard deviation ($n=3$)으로 나타내었다.

4-7. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제 활성

protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)의 억제 활성을 평가하는 방법은 Na *et al.* (2006)의 방법을 변형하여 실험하였다. PTP1B (human, recombinant) 효소는 BIOMOL international LP (USA)로부터 구입하였다. 효소의 활성은 *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP)을 기질로서 사용하여 측정하였다. 시료 10 μ l와 효소 10 μ l, PTP1B buffer [0.1M NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT (dithiothreitol)] 30 μ l를 35°C, 5~10분간 preincubation 시킨 후 기질 (*p*-NPP) 50 μ l를 첨가하여 35°C, 20분간 incubation한 후 10M NaOH 10 μ l를 넣어 반응 종결 시킨다. 이후 microplate reader spectrophotometer (molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 positive control로 ursolic acid를 사용하였다. PTP1B 억제 활성은 아래의 식을 이용하여 구한 후, IC50 값으로 환산하였다. (Scheme 2).

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

A_{sam} : 측정시료를 넣었을 때의 흡광도

$A_{\text{sam-C}}$: 측정시료를 넣고 *p*NPP를 넣지 않았을 때의 흡광도

A_{Cont} : 측정시료를 넣지 않았을 때의 흡광도

Sample 10 μ l + PTP1B enzyme 10 μ l + PTP1B buffer 30 μ l



35 °C preincubation for 5~ 10 min



Substrate (*p*NPP) 50 μ l



35 °C incubation for 20 min



10 M NaOH 10 μ l



Measurement of absorbance at 450 nm

Scheme 3. Measurement of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity.

4-8. Lens Aldose reductase 억제 활성

(1) 효소원 제조

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

흰쥐의 안구에서 수정체를 적출하고, 그 습중량에 따라 일정량 즉, 수정체 1개당 sodium phosphate buffer (pH6.2) 0.5 ml의 phosphate buffer를 가하여 homogenization하였다. 이를 4°C에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리 후 그 상층액을 취하여 효소원으로 사용하였다.

(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 마지막 기질인 DL-glyceraldehyde (0.05 M)을 90 μ l 각각 넣어 총 반응액 900 μ l를 340 nm에서 4분간 U/V visible spectrophotometer로 측정하여 NADPH 흡광도 감소율을 측정하였다.

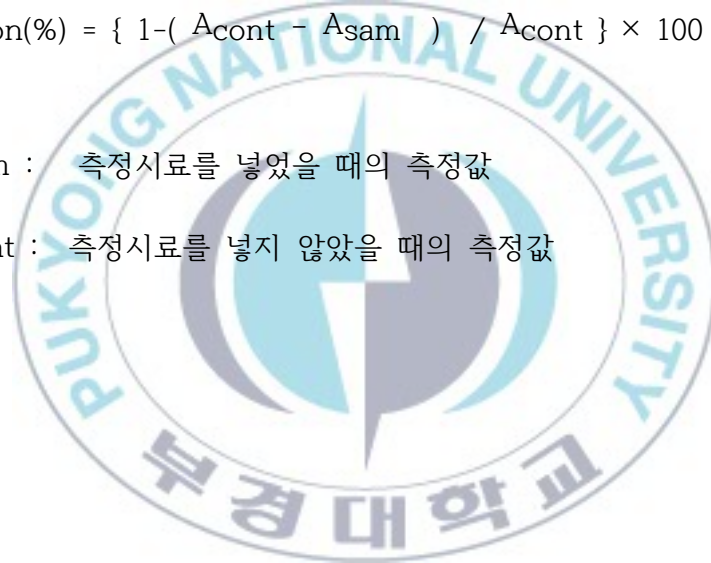
Aldose reductase 억제활성 %는 다음의 방정식으로 구하였다.

$$\text{측정값} = \{(0\text{분 흡광도} - 4\text{분 흡광도}) / 4 (\text{측정시간})\} \times 10000$$

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

A_{sam} : 측정시료를 넣었을 때의 측정값

A_{cont} : 측정시료를 넣지 않았을 때의 측정값



Rat lens homogenization in 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.

5. 통계처리

모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)에서 평균값을 분산분석 한 후, Duncan's multiple range test법에 따라 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. *in vitro* 실험 결과

1-1. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 ABTS radical 소거활성

청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 ABTS radical 소거 활성을 측정하였다. 이때 대조약물로는 대표적인 항산화제로 널리 알려져 있는 Trolox 를 선택하여 그 활성을 함께 비교하였다. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 활성정도를 table 1에 나타냈다. 청 콜라비의 MeOH 추출물 활성은 IC₅₀ 수치 $824.91 \pm 42.84 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며, 대조약물인 Trolox IC₅₀ 수치 $3.39 \pm 0.27 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 에 비해 약한 소거활성을 나타냈다.

1-2. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 DPPH radical 소거활성

청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 이때 대조 약물으로는 대표적인 항산화제로 많이 알려진 L-ascorbic acid를 선택하여 활성을 비교하였다. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 활성정도를 Table1에 나타냈다. 청 콜라비의 MeOH 추출물 활성은 IC₅₀ 수치 801.03 ± 0.80 µg/ml로 나타났으며, 대조약물인 L-ascorbic acid IC₅₀ 수치 2.64 ± 0.50 µg/ml 에 비해 약한 소거활성을 나타냈다.



1-3. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 ONOO⁻ 소거활성

청 콜라비의 MeOH 추출물의 ONOO⁻ 소거활성은 50% ONOO⁻ 소거활성을 나타내는 IC₅₀ 값 (μg/ml)으로 나타내었으며, 그 결과는 Table1에 제시하였다. 청 콜라비의 MeOH 추출물 활성은 IC₅₀ 수치 132.20 ± 0.32 μg/ml로 나타났으며, 대조약물인 L- Penicillamine은 1.21 ± 0.26 μg/ml 에서 50%의 ONOO⁻ 소거율을 보였다.



Table 1. Antioxidant activities of the MeOH extract from *Brassica oleracea* var. *gongylodes* green cultivar extract

Samples	ABTS ⁺	DPPH	Peroxynitrite
	IC ₅₀ (μg/ml)		
	Mean ± S.D		
MeOH ext.	787.89 ± 15.19	801.03 ± 0.80	132.20 ± 0.32
Trolox ^a	3.31 ± 0.05		
L- Ascorbic acid ^b		2.64 ± 0.50	
L- Penicillamine ^c			1.21 ± 0.26

1-4. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 Total phenol contents 측정

페놀성 화합물은 식물계에 많이 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며, Phenolic hydroxyl기를 가지고 있는 방향족 화합물들의 총칭으로 항산화 및 항암 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2005; Buval B *et al.*, 2001).

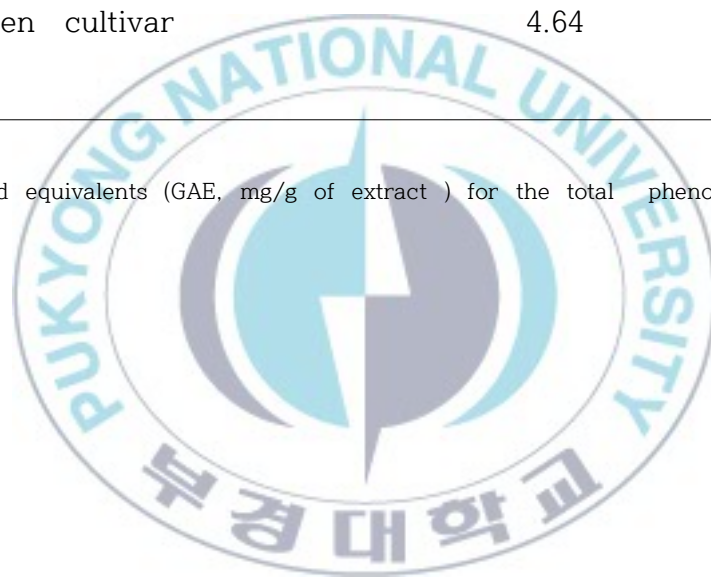
청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 Total phenol 함량은 Table2에 나타냈으며, 4.64 GAE mg/g의 총 페놀 함량을 나타냈다.



Table 2. Total phenolic contents of MeOH extract from *Brassica oleracea* var. *gongylodes* green cultivar MeOH extract

Extract	Total phenolics ^a
Green cultivar	4.64

^aGallic acid equivalents (GAE, mg/g of extract) for the total phenolic contents.



1-5. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 MTT assay를 이용한 세포독성측정

RAW 264.7 세포에 대한 청 콜라비의 MeOH 추출물의 세포독성은 table 2에 나타내었다. 청 콜라비의 MeOH 추출물은 200, 400, 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포 생존율이 각각 89.85 ± 13.49 , 91.10 ± 3.20 , 97.26 ± 0.91 %로 나타남으로써 800 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포독성이 없는 것으로 판단하였다.



Table 3. Cell viability of the MeOH extract from *Brassica oleracea* var. *gongylodes* extract in Raw 264.7

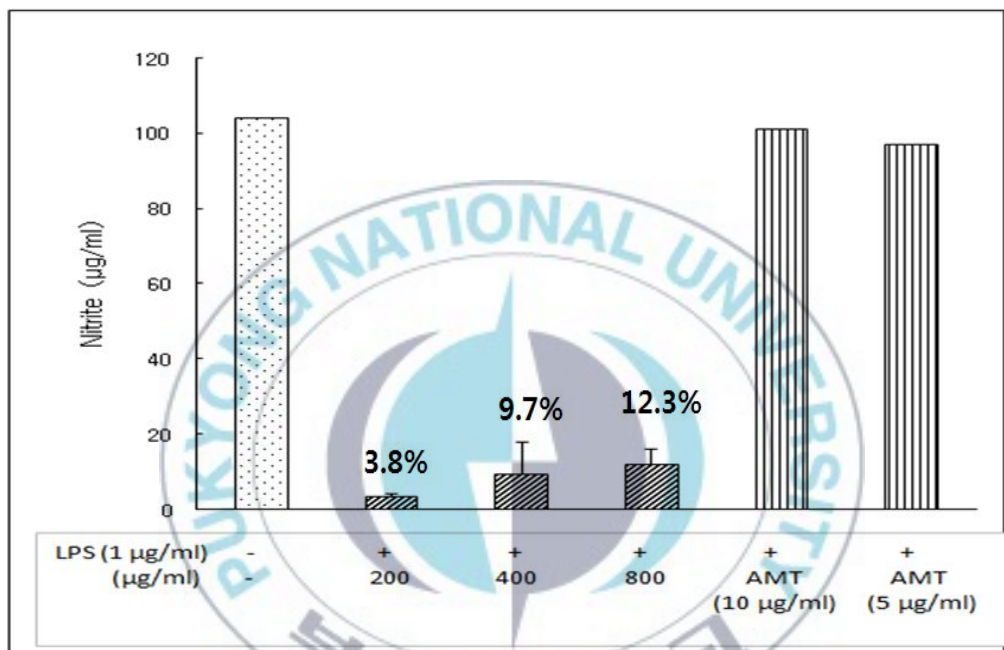
Extract	$\mu\text{g/ml}$	Cell viability (%)
Green cultivar	800	97.26
	400	91.10
	200	89.85
control		100 $\pm$ 13.10

1-6. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 Nitric oxide 측정을 통한 항염증 측정

그람음성세균의 내독소로 알려진 LPS를 대식세포에 처리하면 NO, PGs, 염증성 cytokines과 같은 다양한 물질들이 생성되어 염증반응을 조절하는 다양한 병리학적 반응이 유도된다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro* 실험 계에서 대식세포의 염증반응을 유도하기 위해 LPS를 RAW 264.7 세포에 첨가하여 실험을 진행하였으며, 생성된 NO는 Griess reagent을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태를 측정하였다.

Fig.4에 나타낸 것처럼, RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 증가된 NO의 생성은 200, 400, 800 µg/ml의 청 콜라비 MeOH 추출물의 전처리에 의해서 LPS 단독처리 군에 비해 3.77 ± 0.71 , 9.70 ± 8.53 , 12.28 ± 4.10 %으로 약한 NO 억제활성을 나타냈다.

Fig.4. Effect of MeOH extract from *Brassica oleracea* var. *gongylodes* green cultivar On LPS-induced nitrite production



1-7. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 Protein tyrosine phosphatase 1B 억제 활성

청 콜라비의 MeOH 추출물의 Protein tyrosine phosphatase 1B 억제 활성은 $207.13 \pm 19.15 \mu\text{M}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었다. 대조군인 ursolic acid 은 $5.59 \pm 0.44 \mu\text{M}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었다. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 활성정도를 table 4에 나타냈다.



Table 4. Inhibitory Activity of the MeOH extract of *Brassica oleracea* var. *Gongylodes* green cultivar on PTP1B

Extract	$\mu\text{g/ml}$	Inhibition(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Green cultivar	500	96.09	207.13 $\pm$ 19.15
	250	59.30	
	125	36.38	
ursolic acid	10	76.84	5.59 $\pm$ 0.44

1-8. 청 콜라비의 MeOH 추출물의 Lens Aldose reductase 억제 활성

청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 Rat lens aldose reductase 억제 활성을 측정하였다. 이때 대조약물로는 대표적인 aldose reductase로 알려져 있는 quercetin (Varma *et al.*, 1975; Varma *et al.*, 1977; Leuenberger, 1978)을 선택하여 그 활성을 함께 비교하였다.

청 콜라비의 MeOH 추출물의 활성정도를 table 5에 나타냈다. 청 콜라비 MeOH 추출물의 RLAR 억제활성은 1600 µg/ml 이상의 농도 IC₅₀ 값이 나오지 않았지만 농도 의존적으로 증가함으로써 약한 NO억제 효과를 나타냈다.



Table 5. Inhibitory Activity of the MeOH extract of *Brassica oleracea* var. *gongylodes* green cultivar on RLAR.

Extract	$\mu\text{g/ml}$	Inhibition(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Green cultivar	1600	42.22	> 1600
	800	34.63	
	400	27.87	
Quercetin	5	76.34	0.58 $\pm$ 0.02
	1	66.58	
	0.2	34.69	

IV. 요약 및 결과

청 콜라비의 MeOH 추출물을 이용하여 in vitro 실험을 실시하였다. 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH radical 소거활성, ABTS radical 소거활성, peroxyxynitrite 소거효과, 총 페놀함량 실험을 수행하였고 당뇨병, 당뇨병 합병증 억제 활성을 확인하기 위해 Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성 실험, lens aldose reductase 억제활성 실험을 in vitro에서 수행하였다. 그리고 항염증 실험을 위해 MTT assay를 이용한 세포독성측정과 Nitric oxide 측정을 통한 항염증 측정을 수행하였다.

1. 청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 ABTS radical 소거 활성은 대조군인 Trolox와 비교하였을 때, 청 콜라비의 MeOH 추출물 활성은 IC_{50} 수치 $787.89 \pm 15.19 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며, 대조약물인 Trolox IC_{50} 수치 $3.31 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ 에 비해 약한 소거활성을 나타냈다.

2. 청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 DPPH radical 소거 활성은 대조군인 L-ascorbic acid 와 비교하였을 때, 청 콜라비의 MeOH 추출물 활성은 IC_{50} 수치 $801.03 \pm 0.80 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며, 대조약물인 L-ascorbic acid IC_{50} 수치 $2.64 \pm 0.50 \mu\text{g/ml}$ 에 비해 약한 소거활성을 나타냈다.

3. 청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 ONOO- 소거 활성은 대조군인 L-Penicillamine 와 비교하였을 때, 청 콜라비의 MeOH 추출물 활성은 IC_{50} 수치는 $132.20 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며, 대조약물인 L-Penicillamine

IC₅₀ 수치는 $1.21 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ 의 소거활성을 나타냈다. ABTS radical, DPPH radical의 소거 활성 실험에 비해 강한 소거활성을 나타냈다.

4. 청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 Total phenol contents 측정 실험에서는 4.64 mg/g GAE 의 페놀함량을 가지는 것으로 나타났다. 페놀성 물질은 free radical 과 관련된 항산화활성 물질로 알려지고 있으며, 특히 식물에 포함된 페놀 성분은 항산화활성이 높은 것으로 알려져 있으며 다양한 생리적 효능을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

5. 청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 MTT assay를 이용한 세포독성측정 실험에서는 $800 \mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포독성이 없는 것으로 판단하였으며, RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 증가된 NO의 생성은 200, 400, $800 \mu\text{g/ml}$ 의 청 콜라비 MeOH 추출물의 전처리에 의해서 LPS 단독 처리 군에 비해 3.77 ± 0.71 , 9.70 ± 8.53 , $12.28 \pm 4.10 \%$ 으로 약한 NO 억제활성을 나타냈다.

6. PTP1B는 인슐린 감수성이 높은 간과 근육, 그리고 지방세포에서 동정되어져 왔고, endoplasmic reticulum의 cytoplasmic 표면에 위치하고 있으며 (Tonks NK, 2003), 이 효소는 인슐린과의 반응 초기에 인산화 된 인슐린 수용체와 인슐린 수용체 기질을 탈 인산화 시키는 인슐린 negative regulator이다 (Lee, 2007). 이에 따라 PTP1B를 억제하는 것은 인슐린 저항성을 완화시킴으로서 제2형 당뇨병을 치료하는 약물로 사용될 수 있음을 나타낸다. 그리하여 청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 PTP1B 억제활성을 평가 하였고, 그 결과 $207.13 \pm 19.15 \mu\text{M}$ 의 IC₅₀ 값을 나타내어 PTP1B의 억제효과를 보였다.

7. AR은 폴리올 대사계의 첫 번째 효소로서, NADPH를 NADP+로 환원하여 D-glucose를 D-sorbitol로의 변환을 야기시키며, 고혈당 상태에서 증가된 당은 폴리올 대사계 속으로 유입되고, AR 작용으로 인해 sorbitol의 과 생성을 일으킨다. 이에 sorbitol의 축적으로 인해 당뇨병 백내장, 당뇨병 망막증, 당뇨병 각막증, 당뇨병 신경증 등의 당뇨 합병증이 발병하게 된다. 이에 따라 AR을 저해하는 물질은 sorbitol의 생성과 축적을 감소함으로써 당뇨 합병증의 치료와 예방에 대한 약제로서의 개발가능성을 가진다. 이에 청 콜라비의 MeOH 추출물에 대한 RLAR 억제활성을 평가하였고, 그 결과 1600 µg/ml 이상의 농도 IC₅₀ 값이 나오지 않았지만 농도의 존적으로 증가함으로써 약한 NO억제 효과를 나타냄을 알 수 있다.

이와 같은 결과를 볼 때, 청 콜라비 MeOH 추출물이 항당뇨 및 항산화, 항염증 치료로서의 충분한 가치와 기능성을 가진 기능성 식품 소재로서 가치가 있다는 것을 증명하였고, 그에 따라 식품으로의 적절한 소비효과를 기대할 수 있다.

V. 참고 문헌

- Ahmad, F., Azevedo, J. J., Cortright, R., Dohm, G., and Goldstein, B., Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes, *J. Clin. Invest.*, 100, 449–458, 1997.
- Althaus, J. S., Oien, T. T., Fici, G. J., Scherch, H. M., Sethy, V. H., VonVoigtlander, P. F., Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers an approach to nitric oxide neurotoxicity, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 83, 243–254, 1994.
- Auroma, O. I., Spencer, J. P. E., Mahmood, N., Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 1043–1053, 1999.
- Byon, J. C. H., Kusari, A. B., and Kusari, J., Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction, *Mol. Cell. Biochem.*, 82, 101–108, 1998.
- Bailey, LH., Kohlrabi for stock-feeding. In *Cyclopedia of American Agriculture* : Vol. II- crops, pp. 289-390. Macmillan Publishing, New York, NY, U.S.A. 1975.
- Bialy, L. and Waldmann, H., Inhibitors of protein tyrosine phosphatases : Next-generation drugs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 3814-3839, 2005.
- Blois, M. S., Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199–1202, 1958.
- Choi SH, Ryu DK, Park SH, Ahn KG, Lim YP, An GH., Composition analysis between kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) and radish (*Raphanus sativus*). *Kor J Hort Sci Technol*, 28, 469-475, 2010.

- Choi, J. S., Chung, H. Y., Kang, S. S., Jung, M. J., Kim, J. W., No, J. K., Jung, H. A., The structure-activity relationship of flavonoid as scavenging of peroxynitrite, *Phytother. Res.*, 16, 232—235, 2002.
- Chung, H. Y., Yokozawa, T., Soung, D. Y., Kye, I. S., No, J. K., Baek, B. S., Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4484—4486, 1998.
- Cuzzocrea, S., Tan, D. X., Costantino, G., Mazzon, E., Caputi, A. P., Reiter, R. J., The protective role of endogenous melatonin in carrageenan-induced pleurisy in the rat, *FASEB J.*, 13, 1930—1938, 1999.
- Edenharder R, Kurz P, John K, Burgard S, Seeger K., In vitro effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline. *Food Chem Toxicol.*, 32, 443-459, 1994.
- Edenharder R, John K, Ivo-Boor H., Antimutagenic activity of vegetable and fruit extracts against in-vitro benzo(a)pyrene. *Z Gesamte Hyg.*, 36, 144-147, 1990.
- Fici, G. J., Althaus, J. S. and VonVoigtlander, P.F., Effects of lazarooids and a peroxynitrite scavenger in a cell model of peroxynitrite toxicity, *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 223—228, 1997.
- Goldstein, B. J., Ahmad, F., Ding, W., Li, P. M., and Zhang, W. R., Regulation of the insulin signaling pathway by cellular protein tyrosine phosphatases, *Mol. Cell. Biochem.*, 182, 91—99, 1998.
- 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.

- Haenen, G. R., Paquay, J. B., Korthouwer, R. E., Bast, A., Peroxynitrite scavenging by flavonoids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 591-593, 1997.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford, UK : Oxford University Press. 2003.
- Hayman, S. and Kinoshita, J. H., Isolation and properties of lens aldose reductase, *J. Biol. Chem.*, 240, 877-882, 1965.
- Heath, H. and Hamlett, Y. C., The sorbitol pathway : effect of streptozotocin induced diabetes and the feeding of a sucrose-rich diet on glucose, sorbitol and fructose in the retina, blood and liver of rats, *Diabetologia*, 12, 43-46, 1976.
- Higuchi, M., Hisgahi, N., Taki, H., Osawa, T., Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and l-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages, *J. Immunol.*, 144, 1425—1431, 1990.
- Hong, J. H., Lee, M. S., Bae, E. Y., Kim, Y. H., Oh, H. C., Oh, W. K., Kim, B. Y., and Ahn, J. S., Screening of the Inhibitory activity of medicinal plants against protein tyrosine phosphatase 1B, *Kor. J. Pharmacogn.*, 35, 16-21, 2004.
- Huang, Y. C., Guh, J. H., Cheng, Z. J., Chang, Y. L., Hwang, T. L., Liao, C. H., Tzeng, C. C., Teng, C. M., Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives: involvement of IkappaB-alpha stabilization, *Eur. J. Pharm.*, 418, 133—139, 2001.
- Imai, J., N. Ide, S. Nagae, T. Moriguchi, H. Matsuura and Y. Itakura. 1994.

- Jeong, I. K. and King, G. L., New perspectives on diabetic vascular complications: the loss of endogenous protective factors Induced by hyperglycemia, *Diabetes Metab. J.*, 35, 8-11, 2011.
- Kato, A., Minoshima, Y., Yamamoto, J., Adachi, I., Watson, A. A. and Nash, R. J., Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 8206-8211, 2008.
- Kawanishi, K., Ueda, H. and Moriyasu, M., Aldose reductase inhibitor from the nature, *Curr. Med. Chem.*, 10, 1353-1374, 2003.
- Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H., Beckman, J. S., Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 149—156, 1994.
- Koundouras S, Marinos V, Gkoulioti A, Kotseridis Y, van Leeuwen C., Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *J Agric Food Chem* 54: 5077-5086, 2006.
- Kubes P, Inducible nitric oxide synthase; a little bit of good in all of us. *Gut* 47; 6-9, 2000.
- Laflamme, N. and Rivest, S., Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components, *FASEB J.*, 15, 155-163, 2001.
- Lawrence, T., Wiilloughby, D. A. and Gilroy, D. W., Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation, *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 787—795, 2002.
- Lee, H. S., Inhibitory activity of Cinnamomum cassia bark-derived component

- against rat lens aldose reductase, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 5, 226-230, 2002.
- Lee, Y. S., Antioxiadaative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. *Korean J. Food Preserv.* 14, 78-86, 2007.
- Lee, Y.S., Lee, S. H., Lee, H. S., Kim, B. K., Ohuchi, K. and shin, K. H., Inhibitory effects of isorhanmnetin-3-*O*- β -D-glucoside from *salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissue. *Biol, Pharm. Bull.*, 28, 916-918, 2005.
- Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F., Lin, J. K., Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, *Carcinogenesis.*, 20, 1945-1952, 1999.
- Lin, K. T., Xue, J. Y., Sun, F. F., Wong, P. Y., Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 115-119, 1997.
- MaCledo G, MaCledo AJ., The glucosinolates and aroma votatiles of green Kohlrabi. *Phytochem.*, 29, 1183-1187, 1990.
- Maccari, R., Ottana, 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.

- Menconi, M. J., Unno, N., Smith, M., Aguirre, D. E., Fink, M. P., Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1425, 189-203, 1998.
- Na, M., Jang, J., Njamien, D., Mbafor, J. T., Fomum, Z. T., Kim, B. Y., Oh, W. K. and Ahn, J. S., Protein tyrosine phosphatase-1B inhibitory activity of isoprenylated flavonoids isolated from *Erythrina mildraedii*, *J. Nat. Prod.*, 69, 1572-1576, 2006.
- Nonoyamaa, N., Chibaa, K., Hisatomea, K., Suzuki, H., Shintani, F., Nitration and hydroxylation of substituted phenols by peroxynitrite. Kinetic feature and an alternative mechanistic view, *Tetrahedron Lett.*, 40, 6933-6937, 1999.
- Park, S.H, Hwang, H.S. and Han, J.H., Development of drink from composition with medicinal plants and evaluation of its physiological function. *Korean J. Nutr.*, 37, 364-372, 2004
- Park WT, Kim JK, Park S, Lee SW, Li X, Kim YB, Uddin MR, Park NI, Kim SJ, Park SU., Metabolic profiling of glucosinolate, anthocyanins, carotenoids, and other secondary metabolites in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) *J Agri Food Chem*, 60, 8111-8116. 2012
- 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, 1989.
- Thomas, T., Nancy, H., Wayne, R., Virginia J. H., John, R., Teri, M., Zheng, Z. J., Katherine, F., Christopher, O., Steven, K., Donald, L.J., David, C. G., and Jr, Y. H., Heart disease and stroke

- statistics--200 update, *American Heart Association* 113, 85-151, 2006.
- Tizard, I. R., Immunology: An introduction inflammation. 2nd ed. Saunders College Pub. Co. NewYork, 423—441, 1986.
- Tonks, N. K., PTP1B: From the sidelines to the front lines, *FEBS Lett.*, 546, 140-148, 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.
- Van Dyke, K., McConnell, P., Marquardt, L., Green tea extract and it polyphenols markedly inhibit luminal-dependent chemiluminescence activated by peroxynitrite or SIN-1. *Luminescence*, 15, 37-43, 2000.
- Willeaume, V., Kruys, V., Mijatovic, T., Huez, G., Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharide in macrophages: similarities and differences. *J. Inflamm.*, 46, 1-12, 1996.
- Wang MT, Honn KV, Nie D, Cyclooxygenases, prosta-noids and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 26, 525-534, 2007
- Yun HY, Dawson VL, DawsonTM., Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10, 291-316

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 많은 분들의 끊임없는 격려와 도움이 있었기에 이 자리를 빌어 감사의 글을 전합니다.

먼저, 많이 부족한 저에게 배움의 길을 열어 주시고 많은 조언과 가르침으로 좋은 길로 이끌어 주신 최재수 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 교수님의 학문에 대한 열정적인 모습은 잊지 못할 것 같습니다. 또한 교수님의 가르침도 잊지 않겠습니다.

그리고 바쁘신 와중에도 부족한 논문을 심사해 주시고, 조언 해 주신 류종수 교수님, 남택정 교수님, 류은순 교수님, 김재일 교수님께도 진심으로 감사 드립니다.

2년 동안 실험실에 있으면서 힘든 적도 있었지만 좋은 사람들과의 만남은 너무나 값진 시간들이었습니다. 부족한 저를 잘 이끌어주고 많은 조언과 격려를 해 준 희진 언니, 실험에 대해 모르는 부분들을 언제나 잘 가르쳐주고 항상 웃는 얼굴로 반겨주는 언지, 부족한 언니들 실험 가르쳐 주느라 많이 힘들었을, 하지만 몇 번이고 웃는 모습으로 가르쳐 준 아람이, 그리고 실험실에 오면 항상 반갑게 맞아주던 정수, 유란, 찬미 에게도 고맙단 말을 전하고 싶습니다. 그리고 전북대학교 정현아 교수님 께도 감사의 마음을 전합니다.

학교생활에 많은 도움을 주신 식품영양학과 의 조교 선생님과 대학원 선후배님, 논문 쓰느라 힘들었을 12학년 동기들에게도 감사드립니다. 5학기 동안 서로 많이 의지하고 너무나 많은 힘이 되어 준 예쁜 미희쌤, 직장을 다니면서 대학원 졸업하기 까지 옆에서 많은 배려와 격려를 해 준 배유정쌤, 대학원 오기까지 고민도 많았던 저에게 항상 진심어린 조언을 해 준 나의 멘토 선지쌤 그리고 재희, 도경, 진아쌤, 그리고 항상 응원 해준 친구들에게도 고마움을 전하고 싶습니다.

마지막으로 지금의 저를 있게 해 주신 부모님과 언니들, 형부에게 감사드립니다. 항상 힘이 되어 주시고 제 편이 되어 주신 부모님 항상 사랑하고 감사합니다. 짜증을 부려도 옆에서 항상 많이 챙겨주는 우리 언니들, 형부에게도 항상 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 또 다른 시작을 준비하는 저에게 많은 관심과 격려를 해 주신 모든 분들에게 다시 한번 감사드리며, 부끄럽지 않은 모습으로 항상 최선을 다해 열심히 살아가겠습니다.

2014년 8월 엄나연 올림