(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0036413
(43) 공개일자 2011년04월07일

(51) Int. Cl.
A61K 31/341 (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)
A61K 36/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0094070
(22) 출원일자 2009년10월01일
심사청구일자 2009년10월01일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
이영신
부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단
이용
부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이덕록

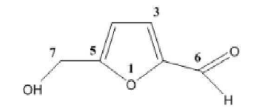
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 항산화 활성을 갖는 라우렌시아 운둘레이트 유래 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄

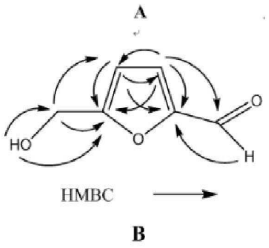
(57) 요 약

본 발명은 해양 홍조류인 라우렌시아 운둘레이트로부터 분리한 항산화 활성을 갖는 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄 및 이를 함유하는 항산화용 약제학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 화합물은 in vitro 자유 라디칼 소거 및 세포내 반응성 산소종 소거, 멤브레인 단백질 산화, 산화 효소 골수세포형성과산화수소 저해 활성을 가지며, 또한 항산화 효소 글루타치온(GSH) 및 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(SOD)을 발현시킴으로써 신규한 해양 천연 항산화제로서 식품, 화장품, 및 제약 분애에서 실제적으로 사용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde



B

(72) 발명자

천충길

부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단

김세권

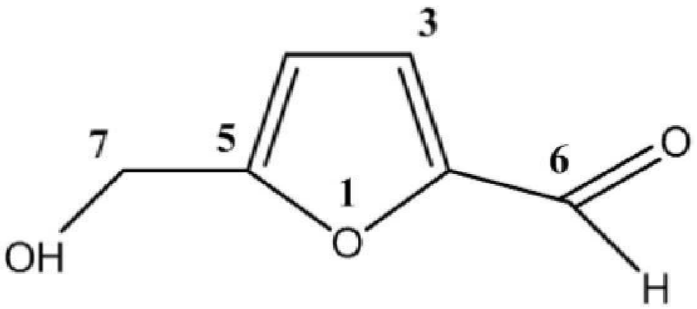
부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트 125동 1402호

특허청구의 범위

청구항 1

항산화 활성을 갖는 하기 화학식 1의 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF) 화합물.

<화학식 1>



청구항 2

5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF)를 유효성분으로 함유하는 항산화용 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 5-HMF가 라우렌시아 운둘레이트(*Laurencia undulate*)로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 항산화용 약제학적 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항산화 활성을 갖는 라우렌시아 운둘레이트(*Laurencia undulate*) 유래 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF)에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 해양 홍조류인 라우렌시아 운둘레이트로부터 분리한

[0002] 항산화 활성을 갖는 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄 및 이를 함유하는 항산화용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 최근의 문헌에 따르면, 해양 홍조류 라우렌시아 속(*Laurencia*) 다양한 생물학적 활성, 예를 들어, 항산화, 항암 활성 등을 나타내는 주로 세스퀴테르펜, 디테르펜 및 C_{15}-아세토제닌을 포함하는 광범위한 해양 생물학적 활성 대사체를 생산한다고 알려져 있다. 본 발명자들은 자연 발생 생활성 화합물에 대한 지속적인 탐색의 결과, 지금까지 거의 보고된 바 없는 식용 라우렌시아 속 중 가장 잠재적인 종 중 하나인 라우렌시아 운둘레이트(*Laurencia undulate*)를 선택하였다. 종래의 연구에서는 라우렌시아 운둘레이트가 폴리페놀, [2E]-2-트리데실헵타데크-2-에날 유도체를 함유하고, 그의 조 추출물이 항천식 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다. 이러한 점이 본 발명자들을 화학 및 생활성 분야에서 라우렌시아 운둘레이트를 미래 연구과제로 삼도록 고무시켰다.

[0004] 컬럼 크로마토그래피와 HPLC 기법에 의한 라우렌시아 운둘레이트의 메탄올 추출물의 성공적인 분리로 스테로이드(콜레스테롤 및 푸코스테롤) 및 만니톨을 포함하는 몇 가지 공통 성분들과 함께 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF)을 얻을 수 있었다. 이들 분리물 중, 5-HMF는 라우렌시아 운둘레이트뿐만 아니라 해양 조류로부터 최초로 분리되었다는 점 이외에 하기한 바와 같은 이유로 생활성 스크리닝을 위한

가장 흥미로운 후보자이다. 5-HMF와 관련된 많은 보고들이 유기물 합성의 경로, 다양한 방법에 의한 정량적 측정, 항암 활성, 신경 약물 치료, 심근 보호 효과에 응용 및 심혈관 질환의 치료에 응용, 및 단백질에 결합하여 신체에 독소의 축적을 야기시킴으로써 가로무니근 및 내장을 손상에 초점을 맞춘 잠재적인 중요성에 대한 증거를 제공하고 있다. 더욱이 최근의 연구는 5-HMF를 주요 활성 성분으로서 몇몇 전통 의약, 예를 들어, *Rehmanniae*, *Cornus*, 및 *Schisandra* 으로부터 얻을 수 있음을 나타내었다. 그러나 세포 산화 시스템에서 5-HMF를 매개로 한 자유 라디칼 손상의 저해에 대해 이용가능한 어떠한 실험적 증거도 제시된 바 없다.

[0005] 항산화제의 자유 라디칼과의 반응성 및 산화적 스트레스와의 상관관계가 과학 연구에서 많이 수행되고 있으며, 지속적으로 건강 및 의약분야에 있어 현재 토픽 리스트의 상위를 차지하고 있다. 일반적으로, 자유 라디칼은 산소-, 질소- 및 탄소-유도 반응성 종으로 통상 분류되며, 이들은 세포 대사 및 미토콘드리아 에너지 생산 동안 생성되며 세포 성분들의 산화적 손상, 신호 변환 및 유전자 발현의 조절, 및 수용체 및 핵 전사 인자의 활성화에 관여하고, DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), 하이드록실, 알킬 및 수퍼옥사이드 음이온 반응성기가 이러한 종류의 라디칼들과의 in vitro 반응에서 효과적인 체크 포인트로서 통상적으로 사용되고 있으며, 이들의 자기 신호 및 수준이, 1982년 최초로 직접적인 증거를 제공하였던 ESR 방법에 의해 정량적으로 모니터링되고 측정되고 있다. 또한, ROS는 세포 이형뿐만 아니라 단백질 손상, 효소 활성의 변성, DNA의 변형 및 멤브레인의 지질 과산화의 매개체인 것으로 나타난 바 있다. 통상적으로 ROS 및 자유 라디칼은 항산화 방어 시스템, 예를 들어 항산화 효고 및 비효소적 인자에 의해 효과적으로 제거될 수 있다. 그러나 병리적 증상 하에서는 ROS의 생성 및 제거의 균형이 깨지게 되고, 그 결과, DNA, 멤브레인 지질 및 단백질을 포함하는 생-거대분자가 ROS-매개 산화적 스트레스에 의해 손상되게 된다. 조절되지 않은 자유 라디칼의 생성은 멤브레인 지질, 단백질 및 DNA를 공격하고, 이는 많은 건강 질환, 예를 들어, 당뇨병, 암, 퇴행성 신경질환 및 염증성 질환, 특히 산화 인자에 의해 야기된 노화에 관여하는 것으로 여겨지고 있다. 따라서 과생성된 자유 라디칼을 소거하기 위하여, 산화 효고(MPO)의 저해 활성, 항산화 효소(GSH 및 SOD)의 증가 및(또는) 활성화가 세포, 조직 및 장기를 반응성 자유 라디칼의 직접 및 간접적 작용에 의해 야기된 질환으로부터 보호하기 위한 보다 효과적인 경로일 것이다.

[0006] 발암성과 같은 부작용으로 인해 합성 항산화제를 대신하여, 천연 한방 제품, 특히 극한의 해양 환경으로 인한 독특한 구조를 갖는 해양 공급원 유래의 2차 대사체를 찾는데 있어 과학자들의 관심이 더욱 크게 집중되고 있다. 합성 항산화제가 천연 항산화제에 비해 효과적이며 저렴할 지라도, 건강과 관련된 잠재적인 위험으로 인하여 이들의 용도는 제한되고 있다.

[0007] 본 발명에서는 5-HMF를 추출 및 분리하고, HPLC 및 NMR (1D 및 2D) 기법을 이용하여 구조 분석을 행하였다. 또한 5-HMF의 항산화 활성을 분자 및 세포 수준에서 다양한 분석법을 이용하여 체계적인 분석을 통해, 예를 들어, ESR 기법에 의한 자유 라디칼 소거 활성 분석, DCFH-DA 방법에 의해 세포 ROS 소거 활성 분석, PCR 기법을 통한 멤브레인 단백질 산화, MPO 저해뿐만 아니라 GSh 및 SOD 수준을 분석함으로써 평가하였다. 그 결과 5-HMF가 양성 대조군과 비교하여 잠재적인 항산화 활성을 보유하고 있음이 나타났다. 따라서 5-HMF를 식품 원료, 화장품 산업 및 제약 용도에서 항산화제로서 개발할 수 있음을 제시할 수 있었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 해양 조류 라우렌시아 운둘레이트(*Laurencia undulate*) 유래 항산화 활성을 갖는 신규한 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF)를 제공하는 것이다.

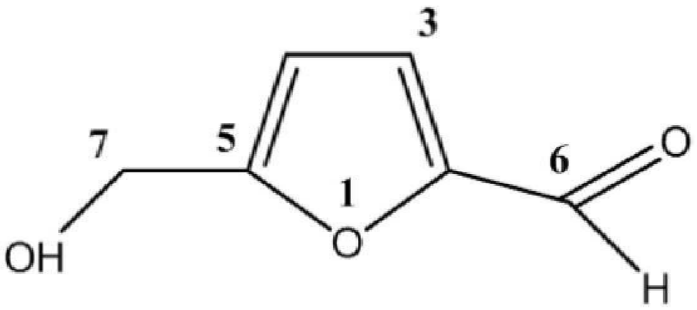
[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄을 함유하는 항산화용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적은 해양 조류 라우렌시아 운둘레이트로부터 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄을 수득하고, 이를 NMR에 의해 특성화하고, 상기 화합물의 항산화 활성 전자 스핀 공명 분광법(electron spin resonance spectrometry; ESR) 및 PCR 방법을 이용하여 확인함으로써 달성되었다.

[0011] 본 발명은 항산화 활성을 갖는 하기 화학식 1의 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF) 화합물을 제공한다.

[0012] <화학식 1>



[0013]

[0014] 또한 본 발명은 상기 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄을 유효성분으로 함유하는 항산화용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0015] 상기에서 5-HMF가 라우렌시아 운둘레이트(*Laurencia undulate*)로부터 유래된 것임을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명에 있어서, "유효성분"이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능, 효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0017] 본 발명의 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 약학 조성물의 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0019] 최근 들어 해양 홍조류 라우렌시아 속(*Laurencia* genus)이 광범위한 생활성을 갖는 독특한 천연 대사체를 생산하는 가장 중요한 공급원으로 부상하고 있다. 그러나 민간 약제로 사용되는 식용 종인 라우렌시아 운둘레이트(*Laurencia undulate*)와 관련된 보고는 지금까지 찾아볼 수 없었다.

[0020] 본 발명에서는 해양 조류 라우렌시아 운둘레이트(*Laurencia undulate*)로부터 최초로 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF)을 수득하고, 이를 NMR에 의해 특성화하였다. 또한 상기 화합물의 항산화 활성, 예를 들어 전자 스핀 공명 분광법(electron spin resonance spectrometry; ESR)에 의한 전형적인 in vitro 자유 라디칼 소거 및 세포내 반응성 산소종(intracellular reactive oxygen species; ROS) 소거; 멤브레인 단백질 산화; 산화 효소 골수세포형성과산화수소(myeloperoxidase; MPO) 저해; 뿐만 아니라 PCR 방법을 이용한 유전자 수준에서 항산화 효소 글루타치온(GSH) 및 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(SOD)의 발현을 계획적으로 평가하였다. 그 결과 본 발명에 따른 5-HMF를 식품, 화장품, 및 제약 분애에서 실제적으로 사용할 수 있는 신규한 해양 천연 항산화제 또는 잠재적인 전구체로서 개발할 수 있음을 확인하였다.

효 과

[0021] 본 발명에 따른 라우렌시아 운둘레이트(*Laurencia undulate*) 유래 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF)는 in vitro 자유 라디칼 소거 및 세포내 반응성 산소종 소거, 멤브레인 단백질 산화, 산화 효소 골수세포형성과산화수소 저해 활성을 가지며, 또한 항산화 효소 글루타치온(GSH) 및 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(SOD)을 발현시킴으로써 신규한 해양 천연 항산화제로서 식품, 화장품, 및 제약 분애에서 실제적으로 사용할 수 있는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0022] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0023] **실시예**

[0024] 라우렌시아 운둘레이트(*Laurencia undulata*)는 2007년 10월 대한민국 제주도 해안에서 수집하였다. 실험 전에, 신선한 시료를 수돗물로 깨끗이 씻어 염분, 모래 및 기생충을 제거한 후, 공기 중에서 일정 중량까지 건조한 다음 실험실 믹서로 갈아 분말화하였다. 상기 시료 분말을 사용전까지 -20℃로 보관하였다.

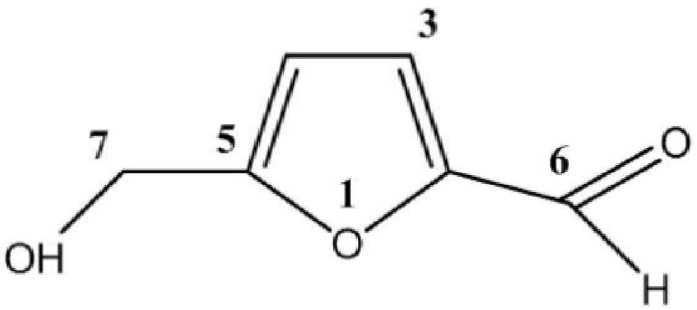
[0025] ^{1}H NMR (400 MHz) 및 ^{13}CNMR(100MHz) 스펙트럼을 내부 참조 표준 물질로서 DMSO-d_6 용매 피크(^{1}H NMR에서 2.50 ppm 및 ^{13}CNMR에서 39.5ppm)를 이용하여 JEOL JNM-ECP400 NMR 분광계(JEOL,Japan)에 기록하였다. 몇가지 신호에 대하여, 화학적 이동을 소수 셋째자리까지 어림하였다. 이는 매우 근사한 수치의 신호들을 구분하기 위한 것이나, 그럼에도 불구하고 이는 스펙트럼의 시각적 조사에 의해 명확하게 구별할 수 있다. JEOL JNM-700 분광계(JEOL,Japan)에서 MS 스펙트럼을 얻었다. 라우렌시아 운둘레이트의 추출은 추출 유닛(Extraction Unit; Dongwon Scientific Co., Korea)를 사용하여 수행하였다. ESR 스펙트럼은 JES-TE100 ESR 분광계(JEOL, Tokyo,Japan)로 기록하였다. 실리카겔 60(silica gel 60; 230-400 mesh, Merck, Germany), 세파덱스 LH-20(Sephadex LH-20; Sigma, St. Louis, MO) 및 박막 크로마토그래피(thin-layer chromatography; TLC) 플레이트(Kieselgel 60F254, 0.25mm, Merck)를 사용하여 각각 컬럼 크로마토그래피와 분석 TLC를 수행하였다. 고순도 RNA를 제조하기 위하여, TRIzol 시약(Promega Corporation)을 제외하고, DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), DMPO(5, 5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide), $FeSO_4$, H_2O_2, AAPH(2, 2-azobis-(2-amidinopropane)-hydrochloride), 4-POBN(R-(4- pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitrone), DCFH-DA(dichloro-fluorescin diacetate), 산-페놀-구아니딘 티오시아네이트 시약과, cDNA 합성에 관련된 모든 시약은 시그마 케미칼사(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO)에서 구입하였다. M-MLV 5X 반응 완충액(Promega Corporation). MRC-5(Human fetal lung fibroblasts cell line), RAW264.7(mouse macrophages cell line), 및 HL-60(human leukemic cell line)은 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 입수하였다. 세포 배양을 위한 10 % FBS(fetal bovine serum) 함유 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지, 2mM 글루타민 및 100 μg/mL 페니실린/스트렙토마이신/암포테리신은 깁코 BRL 라이프 테크놀로지스사(Gibco BRL, Life Technologies; USA)에서 구입하였다. 모든 시약은 상업적으로 시판되는 분석적 등급의 것들을 사용하였다.

[0026]

[0027] **실시예 1 : 라우렌시아 운둘레이트의 추출 및 분리**

[0028] 건조 분쇄한 라우렌시아 운둘레이트 분말(500g)을 실온에서 5 L MeOH로 3 회 연속해서 추출하였다. 수득한 추출물(136g)을 물에 현탁시킨 후, *n*-헥산, 디클로로메탄, EtOAc, 및 *n*-BuOH 순서로 용매 분획하였다. EtOAc-가용성 분획(30g)을 헥산/에틸 아세테이트 구배 용매 시스템(10:1, 5:1, 1:1, v/v, 각 4 L), 디클로로메탄(5 L), 및 디클로로메탄과 메탄올 혼합물(10:1, 5:1, 1:1, v/v, 각 4 L)로 연속해서 용출시켜 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피를 수행하고, TLC 분석을 바탕으로 12 개의 분획을 얻었다. 분획 4(Fr. 4)로부터 두 개의 공통적인 유도체(콜레스테롤 및 푸코스테롤)을 얻었다. 분획 6(Fr.6)을 추가로 세파덱스 LH-20 처리하고, HPLC로 정제하여 하기 화학식 1의 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF)(250 mg) 및 만니톨(25mg)을 수득하였다.

[0029] <화학식 1>



[0030]

[0031] 5-HMF : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ_H ppm 9.60 (1H, s, H-6), 7.22 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3), 6.52 (1H, d, J=3.6Hz, H-4), 4.72 (2H, d, J=2.1Hz, H_2-7), 5.50 (1H, d, J=2.1Hz, HO-7); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta_c$ppm177.7 (C-6), 160.4 (C-5), 152.4 (C-2), 122.6 (C-3), 109.9 (C-4), 57.6 (C-7) (표 1 참조);. LREIMS m/z:126.05 (52) $[M]^+$, 109.05 (15) $[M-OH]^+$,97.00 (100) $[M-OH-C]^+$,and81.00(12)$[M-OH-C-O]^+$.

[0032]

[0033] 상기 화합물의 LREIMS는 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터로부터 얻은 m/z126.05(52)$[M]^+$에서의 분자 이온 피크에 의해 분자식 $C_6H_6O_3$로 나타났다. 이는 세 개의 이중결합과 하나의 고리를 포함하는 네 개의 불포화도를 함유한다. ^{1}H NMR 스펙트럼에서, 다섯 개의 신호가 관찰되었고, 두 개의 이중선이 각각 6.52 및 7.22ppm의 화학적 이동 값을 갖는 방향족 영역에 존재하였다. 이러한 sp^2 양성자 신호는 3.6Hz의 동일한 커플링 정수를 나타내었다. 하나의 sp^3 양성자 이중선이 4.72 ppm에서 2.1Hz의 커플링 정수로 나타났고 이는 5.50 ppm에서 하나의 삼중선 신호와 동일한 것이며, 또한 9.60 ppm에서 하나의 특징적인 단일선인 알데하이드기의 존재를 나타내었다. ^{13}C 및 ^{13}C DEPT 스펙트럼은 하나의 메틸렌(57.7 ppm), 세 개의 메티(177.6, 122.6, 및 109.9 ppm), 및 두 개의 4급 탄소 원자 (152.4 & 160.4 ppm)로 이루어진 여섯 개의 탄소 신호를 나타내었다. 양성자와 탄소 사이의 단일결합은 하이드록실 양성자를 제외하고 HMQC 분석에 의해 명확히 지지되었다. 양성자와 탄소 사이의 광범위한 상관관계는 HMBC 데이터를 바탕으로 한 세 가지 잔기, 예를 들어, 2-치환 측쇄를 갖는 푸란 골격, 하이드록시메틸기 및 메틸 알데하이드 잔기의 배열을 가져온다. HMBC로부터의 주요한 상관관계는 각각 9.60 (^{1}H) 및 152.4 & 122.6(^{13}C) 사이, 4.72(^{1}H) 및 160.4&109.9(^{13}C) 사이 뿐만 아니라 5.50(^{1}H) 및 160.4&57.7(^{13}C) 사이에서 교차 피크를 나타내었다.

[0034] 또한 질량 스펙트럼에서 분획화 피크는 각각 m/z109.00(15)$[M-OH]^+$, 97.00(100)$[M-OH-C]^+$, 및 81.00(12)$[M-OH-C-O]^+$와 같은 최종 구조를 설명하는 보다 상세한 증거를 제공한다. 포괄적인 구조 분석을 통해, 도 1에 도시한 바와 같이, 상기 화합물은 5-하이드록시메틸-2-푸르푸랄(5-hydroxymethyl-2-furfural; 5-HMF)로 밝혀졌다.

[0035] **실험예 1 : 5-HMF의 자유 라디칼 소거 효과**

[0036] DPPH, 하이드록실. 알킬, 및 수퍼옥사이드 음이온 종을 포함하는 ESR 기술을 이용하여 5-HMF의 자유 라디칼 소거 효과를 분석하였다. 지유 라디칼 소거능을 하기 식을 바탕으로 계산하였다.

[0037] 자유 라디칼 소거능 (%) = (A_c-A_s) X 100/A_c.

[0038] **1) DPPH 라디칼 소거 효과**

[0039] 종래의 방법으로 DPPH 라디칼에 대한 5-HMF의 소거 효과를 조사하였다. 10% DMSO 중의 5-HMF 용액 25 μL를 메탄올 용액 중 DPPH (60 μM) 25 μL에 가하였다. 상기 혼합물을 10초 동안 격렬하게 혼합한 후, 용액을 100

μL 석영 모세관으로 옮기고, 정확히 2 분 후 ESR 분광계 상에서 스핀 부가생성물을 측정하였다. 계기 파라미터는 다음과 같다: 자기장 : 6.5 ± 5 mT; 전력 : 5 mW; 변조 주파수 : 9.41 GHz; 진폭: 1 × 1000; 스윕타임 : 30 s.

[0040] **2) 하이드록실 라디칼 소거 활성**

[0041] 이온-촉매화 펜톤 하버-웨이스(Fenton Haber-Weiss) 반응으로 하이드록실 라디칼을 생성시키고, 생성된 하이드록실 라디칼을 니트론 스핀 트랩(nitrone spin trap) DMPO와 빠르게 반응시켰다. ESR 분광계로 생성된 DMPO-OH 부가생성물을 검출할 수 있었다. 5-HMF (10% DMSO) 용액(15 μL)을 인산염 완충액 용액(pH 7.4) 중의 DMPO (0.3M,15μl), $FeSO_4$(10mM, 15μL) 및 H_2O_2(10mM, 15μL)와 혼합한 후, 100μL 석영 모세관으로 이송하였다. 2.5분 후, ESR 스펙트럼을 ESR 분광계를 이용하여 기록하였다. 계기 파라미터는 다음과 같다: 자기장 : 336.5 ± 5 mT; 전력 : 1 mW; 변조 주파수 : 9.41 GHz; 진폭: 1 × 200; 스윕타임 : 30 s.

[0042] **3) 알킬 라디칼 소거 활성**

[0043] 히라모토 등(Hiramoto et al.)의 방법에 따라 AAPH에 의해 알킬 라디칼을 생성시켰다. 간략하게, 15 μL의 40m MAAPH를 15 μL의 인산염-완충 염수(PBS), 20 μL의 40mM 4-POBN 및 15 μL의 지정된 농도의 5-HMF와 혼합하였다. 상기 혼합물을 볼텍싱하고 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 이어서, 상기 반응 혼합물을 밀봉된 모세관으로 이송하고, 스핀 부가생성물을 제어된 분광 조건, 즉 변조 주파수: 100 kHz; 마이크로웨이브 전력: 10mW; 마이크로웨이브 주파수 : 9441 MHz; 자기장 : 336.5 ± 5 mT; 스윕타입 : 30 s에서 기록하였다.

[0044] **4) 수퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거 활성**

[0045] UV 조사 리보플라빈-EDTA 시스템으로 수퍼옥사이드 음이온을 생성시켰다. 0.8mM 리보플라빈, 1.6mM EDTA, 800mM DMPO 15μL 및 지정된 농도의 5-HMF 분획을 함유한 반응 혼합물에 UV 램프를 사용하여 1 분 동안 365 nm로 자외선을 조사하였다. 상기 반응 혼합물을 ESR 측정용 분광계의 100 μL 석영 모세관으로 이송하였다. 계기 파라미터는 다음과 같다: 자기장 : 336.5 ± 5 mT; 마이크로웨이브 전력 : 1 mW; 변조 주파수 : 9.41 GHz; 진폭: 1 × 1000; 스탠 폭 : 10 mT.

[0046]

[0047] DPPH 라디칼은 안정한 질소-유도 유기 자유 라디칼이며, 수소-공여 항산화제의 존재 하에 전자 또는 수소를 수용할 때 반응에 의해 비-라디칼 형태의 DPPH-H로 환원될 수 있으며, 짧은 기간에 많은 시료들을 수용할 수 있고 저농도에서 활성 성분들을 검출하기에 충분히 감도가 있기 때문에, 항라디칼 활성을 스크리닝하는데 광범위하게 사용되고 있다. 도 2에 도시한 5-HMF의 DPPH 소거 활성은 각각 100 μM (75.6 %), 25 μM (56.3 %), 10 μM (35.6 %), 및 1 μM (10.4 %)의 다양한 농도에서 통계적으로 유의적인 소거 활성을 나타내었다. 대조군과 비교하여 27.1 μM의 IC_{50} 값($p< 0.05$)은 5-HMF가 DPPH 라디칼 종에 대하여 용량의존적 방식으로 잠재적인 능력을 갖고 있음을 지시하였다.

[0048] 펜톤 반응에 의해 생성된 하이드록실 라디칼에 대한 5-HMF의 소거능을 측정하고, 도 2에 나타내었다. 하이드록실 라디칼(HO·)은 가장 반응성인 ROS 중 하나로, 대부분의 모든 생물학적 분자와 빠르게 반응할 수 있고, 많은 인간 질환의 병리에 관여할 수 있다. 펜톤 반응에 의해 생성된 하이드록실 라디칼은 통상적으로 사용되는 DMPO 스핀 트랩으로부터 니트록사이드 부가생성물을 형성하는 능력으로 확인된다. 이러한 스핀 트랩은 다른 니트론 스핀 트랩들 보다 산소-중심 라디칼을 트랩핑하는 능역이 보다 크다. 부가생성물 DMPO-OH 라디칼은 특징적인 ESR 반응을 나타내고, 이는 ESR 분광계로 검출할 수 있다. 5-HMF는 각각 92% (100 μM), 62% (25 μM), 30% (10 μM), 및 7% (1 μM)의 소거율로 다양한 농도에서 하이드록실 라디칼을 소거하는 유의적인 효능을 나타내었다. 5-HMF의 IC_{50} 값은 시험 화합물로 처리하지 않은 대조군과 비교하여 22.8 μMf 계산되었다.

[0049] 알킬 라디칼에 대한 5-HMF의 효과를 ESR 방법을 사용하여 평가하였다. 알킬 라디칼은 수용성 퍼옥실 라디칼 개시제인 AAPH를 분해시켜 생성시킨 후, 알킬 라디칼을 37℃에서 30분 동안 4-POBN으로 트랩핑하였다. 도 2에 도시한 바와 같이, 다양한 농도로 모든 시험 시료에 대한 소거 활성을 용량의존적 방식으로 측정하였다. 5-HMF는 각각 76.4 % (100 μM), 44.4 % (25 μM), 28.4 % (10 μM), 및 9.4 % (1 μM)의 소거율로 소거 활성을 나타내었다. 5-HMF의 IC_{50} 값은 시험 화합물로 처리하지 않은 대조군과 비교하여 45.0 μM으로 계산되었다.

[0050] 수퍼옥사이드 음이온 라디칼에 대한 5-HMF의 소거 활성을 ESR 분광계로 측정하였다(도 2 참조). 수퍼옥사이드 음이온 라디칼은 신체에서 산화 반응이 일어날 때 생성되며, 이는 약한 산화제이나, 금속, 예를 들어, 철 및 구

리의 존재 하에 강력하고 유해한 하이드록실 라디칼로 전환될 수 있으며, 계속해서 세포 손상 및 ROS-관련 질환을 유발시킬 수 있다. 본 발명에서는 리보플라빈/EDTA 시스템에서 UV 조사에 의해 수퍼옥사이드 음이온 라디칼을 생성시켰다. 다양한 농도의 시험된 5-HMF를 사용한 결과, 33.5 μM에서 IC_{50} 값으로 강력한 활성이 나타났다. 물질 대사 또는 환경적 원인으로부터 생산된 자유 라디칼은 생물학적 시스템과 지속적으로 상호작용하고 많은 질환과 분자적 수준으로 직접적 상관관계를 비조절적으로 발생시킨다. 이러한 자유 라디칼을 정량적이고 정확하게 측정하기 위하여, ESR 방법이 편리하고, 높은 감도 및 짧은 소비 시간으로 인해 몇몇 전형적인 라디칼에 대한 강력한 방법으로서 널리 사용되고 있으며, 반응에서 남겨진 라디칼의 수준을 측정할 수 있다. 본 실시예에서는, 네 가지 종류의 전형적인 자유 라디칼, 즉 질소-유도 라디칼 DPPH, 산소-유도 하이드록실 및 수퍼옥사이드 음이온 라디칼, 및 탄소-유도 알킬 라디칼을 선택하여 5-HMF의 소거 활성을 평가하였다. 이러한 결과는 표 2에 나타낸 바와 같이, 5-HMF가 하이드록실 라디칼에 대하여 IC_{50} 22.8μM로 가장 강력한 소거 활성을 나타내었고, 알킬 라디칼에 대하여 IC_{50} 45.0μM로 상대적으로 가장 약한 소거활성을 나타내었다. 이는 ESR 방법에 의해 5-HMF의 항산화 활성을 평가한 최초의 예이다.

[0051] **실험예 2 : MTT 분석**

[0052] 37℃, 95% 공기 및 5% CO_2의 습윤 환경에서 본 실험에 사용된 MRC-5 및 RAW264.7 세포주는 DMEM 배지에서 배양하고, HL-60 세포주, 현탁액-의존성(suspension-dependent) 세포주는 RPMI(Roswell Park Memorial Institute medium) 배지에서 배양하였고, 각 배지는 10 % 열 불활성 FBS, 페니실린(100 U/ml) 및 스트렙토마이신(100 μg/ml)이 보충되었고, 배지는 하루걸러 교환해 주었다.

[0053] MTT[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide] 분석법으로 세포 생존력을 측정하였다. 세포를 마이크로타이터 96-웰 플레이트(1.5×10^3 cells/well)에서 무혈청 배지로 배양하고 다양한 농도의 5-HMF로 24 시간 동안 처리하였다. 5-HMF는 10 % 디메틸 술폭사이드(DMSO)에 용해하고, 0.22 μm 필터 멤브레이틴을 통해 여과하여 멸균시켰다. 배양 배지 중 DMSO의 최종 농도가 0.1%를 넘지 않도록 하였다. 이어서 20 μL의 MTT 염료 용액을 각 웰에 가하였다. 4 시간 배양 후, 200 μL의 DMSO 용액을 가해 포르마잔 결정을 용해하고, ENios 마이크로플레이트 리더기(TECAN Austria Gmbh, Austria)를 이용하여 540 nm에서 각 웰의 광학 밀도(OD)를 측정함으로써 흡수능을 판독하였으며, 다양한 농도의 5-HMF로 처리된 세포의 세포 생존력을 하기 식으로 계산하였다.

[0054] 세포 생존력(%) = $OD_s/OD_b \times 100\%$.

[0055] 상기 식에서,

[0056] OD_s는 5-HMF의 흡수능 값이고,

[0057] OD_b는 블랭크 군의 흡수능 값이다.

[0058] 상기와 같이, 세포 시스템에서 분자 및 세포 수준으로 5-HMF의 항산화 효과를 분석하기 위하여, 5-HMF의 세포독성 효과를 인간 폐 섬유아세포(MRC-5), 마우스 대식세포(Raw264.7), 및 인간 전골수구 백혈병(HL-60) 배양 세포주에서 측정하였다. 그 결과, 도 3A에 도시한 바와 같이, 5-HMF가 이들 세 가지 시험 배양 세포주에 대하여 세포독성 효과를 나타내지 않았고, 이들 세 가지 세포주에서 큰 차이가 없었다. 또한, 100 μM의 최고 농도에서도 이들 세가지 세포주 중 단지 약 7%의 세포만이 감소하였다. 따라서 상기 결과는 배양 세포 시스템에서의 후속 연구를 안전하고 신뢰성있게 수행할 수 있는 과학적 근거를 제공하였다.

[0059] **실험예 3 : DCFH-DA에 의한 반응성 산소종(ROS) 분석**

[0060] DCFH-DA 방법을 이용하여 종래 기술된 바와 같이 세포내 ROS 생산량을 측정하였다. 형광 마이크로타이터 96-웰 플레이트에서 생장시킨 RAW264.7 세포를 HBSS(Hank's balanced salt solution) 중의 20 μM DCFH-DA로 표지하고, 암 중에서 20분 동안 배양하였다. 이어서 세포를 다양한 농도의 5-HMF로 처리하고 추가로 1 시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후, 0.3 mM H_2O_2 100 μL를 가하였다. GENios 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 여기 파장(Ex) 485 nm 및 방출 파장 (Em) 535 nm로 형광 신호의 강도를 시간에 따라 검출하였다.

용량 의존적 및 시간 의존적 처리 효과를 군에 따라 플롯팅하고, 대조군과 블랭크 군의 형광강도와 비교하였다.

[0061] 상기한 바와 같이, 세포내 ROS 생산에 대한 5-HMF의 효과를 조사하기 위하여, RAW264.7 세포를 100 μM, 25 μM, 10 μM, 및 1 μM의 다양한 농도의 시험된 5-HMF로 1 시간 동안 전배양한 후, 상기에서 기술한 형광 프로브 DCFH-DA로 표지하였다. DCFH-DA가 생장 세포로 도입될 때, 이는 세포내 에스테라아제에 의해 탈아세틸화되어 DCFH(2′ ,7′ -dichloro-dihydrofluorescein)를 형성하고, 이는 세포 내에서 ROS와 정량적으로 반응하여 형광성인 DCF(2′ ,7′ -dichlorofluorescein) 생성시킨다. 도 3B에 도시한 바와 같이, DCFH의 ROS-매개 산화에 이은 DCF에서 방출된 형광도는 시간 경과에 따라 240 분까지 증가하였다. 5-HMF를 사용한 전배양이 DCF 형광도는 용량 및 시간 의존적 방식으로 감소시켰음이 밝혀졌다. 30분 배양 이후에도, 5-HMF는 1μM의 최저 농도에서 현저한 소거 활성을 나타내었다. 한편, 100 μM의 최고 농도에서 5-HMF는 배양 시간 전체에 걸쳐 ROS를 유의적으로 소거할 수 있었다. 210분 배양 후, 5-HMF는 100μM 농도에서 ROS의 생산을 68.8% 감소시켰다. 이러한 결과는 5-HMF의 항산화 활성이 세포성 ROS의 직접 소거에 의해 야기되고, 따라서 5-HMF를 세포성 ROS 형성을 저해하는 강력한 항산화제 후보물질로 개발할 수 있다는 사실을 나타낸다.

[0062]

[0063] **실험예 4 : 멤브레인 단백질 산화 분석**

[0064] 카르복실기에 의한 단백질의 함량을 측정하여 세포 멤브레인 단백질의 산화도를 분석하였다. 용리물을 마이크로튜브(0.5 mL)에 분취하고, 지정된 농도의 5-HMF로 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 이어서, 100 μL의 0.1 M $FeSO_4$ 및 100 μL의 2 mM H_2O_2를 가하고, 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 400 μL의 20% 트리클로로아세트산을 가한 후, 용해된 단백질(1 mg)을 원심분리하여 침전시켰다. 상등액을 제거하고, 펠렛을 2 mM HCl 중의 0.2 % 2, 4-디니트로페닐 하이드라진 150 μl에 재현탁시키고 실온에서 40분 동안 정치시켰다. 반응 혼합물을 매 10분 만다 볼텍싱하여 단백질과의 반응을 용이하게 하였다. 20 % 트리클로로아세트산으로 단백질을 재차 침전시키고, 펠렛을 에탄올/에틸아세테이트(1:1 v/v) 용액으로 3 회 세척하였다. 이어서 펠렛을 500 μL의 6N 구아니딘 하이드로클로라이드에 용해하고, 37℃에서 15분 동안 배양하였다. 6000 X g에서 5분 동안 원심분리한 후, 450nm에서 상등액의 흡수능을 보조 블랭크군에 대하여 판독하였다. 블랭크 군은 2,4-디니트로페닐 하이드라진 시약 대신에 3 mM HCl 만을 사용하는 병렬 과정으로 제조하였다. 카르보닐기 함량을 몰 흡수 계수 22000 $M^{-1}cm^{-1}$를 사용하여 nmol/단백질 mg으로 나타내었다.

[0065] 상기에서 기술한 바와 같이 배양된 RAW264.7 세포주를 이용하여 멤브레인 단백질 산화에 대한 5-HMF의 효과를 조사하였다. 도 4에 도시한 바와 같이, 마우스 대식세포 멤브레인이 Fe^{2+}-H_2O_2 펜톤 반응에 의해 생성된 HO·에 노출될 때, 카르보닐기 양의 증가를 모니터링함으로써 멤브레인 단백질 산화 정도가 증가하였다. 5-HMF 처리군에서 단백질 카르보닐기의 양은 대조군에 비해 보다 작았다. 5-HMF로 30분 동안 전처리함으로써 단백질 카르보닐기 양이 각각 0.63 (100 μM), 0.96 (25 μM), 1.20 (10 μM), 및 1.60 (1 μM)로서 나타낸 바와 같이 멤브레인 단백질의 산화가 용량의존적으로 저해되었다. 세포내 ROS로부터 발생한 멤브레인 단백질 산화는 많은 질환을 유발시키는 주요 인자로 여겨지며, 그에 따라 기능성기, 예를 들어, 라이신, 아르기닌, 폴린 및 히스티딘을 함유한 아미노산 측쇄의 변형을 가져와, 단백질 산화에 대한 초기 마커로서 간주되며 단백질 손상의 계량에 이용되는 카르보닐 잔기(주로 알데하이드 및 케톤)을 생성시킨다. 멤브레인의 산화적 손상은 또한 멤브레인 유동성 증가, 통합성 손상 및 멤브레인-결합 수용체 및 효소의 불활성화를 가져온다.

[0066]

[0067] **실험예 5 : 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase; MPO) 활성 분석**

[0068] *o*-디아니시딘 방법을 변형하여 HL60, 인간 전골수구 백혈병 세포(human promyelocytic leukemia cells)에 의해 방출된 MPO의 양을 측정하였다. HL-60 세포를 페놀 레드와 FBS 없이 RPMI-1640에 현탁시키고, 96-웰 플레이트에 접종하였다. 세포를 다양한 농노의 시료로 30분 동안 전배양한 후, 37℃에서 30분 동안 TNF-R (0.05 μg/mL)로 자극하였다. 이어서 세포에 0.1 M 인산염 완충액(pH 6.0) 중의 2 mM H_2O_2 0.05 mL 및 탈이온수 중의 0.02 M *o*-디아니시딘(신규 제조) 0.05 mL를 함유한 분석 혼합물을 가하였다. 방출된 MPO의 양을 460nm에서j 분광광도법으로 측정하고, MPO 활성에 대한 5-HMF의 저해율을 계산하였다.

[0069] MPO 저해율(%) =[1 (As-Ab)/(Ac-Ab)] X 100%.

[0070] 상기 식에서,

[0071] A_s는 5-HMF의 흡수능 값이고,

[0072] A_b는 블랭크군의 흡수능 값이며,

[0073] A_c는 대조군의 흡수능 값이다.

[0074] 대조군 및 블랭크군의 세포는 5-HMF 없이 배양하였고, 블랭크 군은 TNF-α에 의한 자극 없이 제조하였다. MPO에 대한 5-HMF의 효과를, 도 5에 도시한 바와 같이, TNF-α로 촉진시킨 HL-60 배양 세포주에서 측정하였다. 5-HMF는, TNF-α-촉진 대조군과 비교하여 MPO의 활성을 감소시킬 수 있었다. MPO의 활성은, 다양한 농도의 5-HMF로 전처리 함으로써 각각 91.4 % (100 μM), 78.4 % (25 μM), 53.2 % (10 μM), 및 32.0 % (1 μM)의 저해 활성으로 용량의존적으로 저해되었다. MPO는 백혈구 유도 햄 퍼옥시다아제로 예전부터 비특이적 면역 방어 시스템에 중추적으로 결합된 미생물 효소로 여겨지고 있다. MPO는 다형핵 호중구(polymorphonuclear neutrophils; PMNs)에 의한 산화제 생산에서 중요한 역할을 한다. 이는 과산화수소(H_2O_2)와 염화물을 이용하여 하이포아염소산(HOCl)의 생산을 촉매화시키며, HOCl은 가장 강력한 산화제이며 미생물 사멸 및 숙주 조직의 후속 산화적 손상에 기여하여 심각한 염증 질환을 촉발시킨다. 따라서 이러한 결과는 5-HMF가 살아있는 세포 시스템에서 간접적 경로를 통해 세포성 항산화제로서 작용할 수 있음을 나타낼 수 있었다.

[0075]

[0076] **실험예 6 : RNA 분리 및 PCR 분석**

[0077] 공급자의 프로토콜에 따라 트리아졸 시약을 사용하여 총 Raw264.7 세포 RNA를 추출하고, 260nm에서 측정하였다. 간략하게, 1 μg의 총 RNA를 사용하여, 긴 mRNA 주형(>5kb)에 의한 cDNA 합성에 사용할 수 있는 RNA 의존성 DNA 폴리메라아제인 M-MLV RT(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)로 1차 가닥 cDNA를 합성하였다. 이어서, 상기 1차-가닥 cDNA를 1:9의 비율로 물로 희석하고, 분취액을 가공하여 GSH 및 SOD의 산화 방어 메카니즘과 관련된 유전자를 증폭시켰다. GSH의 서열은 다음과 같다.

[0078] GSH sense, 5′ -GGGTGTTCTTCTTTGTGATCC-3′ ;

[0079] GSH antisense, 5′ -TCACAGG AGGAATCTTCATC-3

[0080] SOD 프라이머는 다음과 같다.

[0081] SOD sense, 5'-GTAATGGACCAGTGAAGGTGTG-3';

[0082] SOD antisense, 5'-CAATTACACCACAAGCCAAACG-3'.

[0083] 마지막으로, PCR 방법에 의해 Top-*Taq*™ 폴리메라아제(Core-Bio-System) 및 프라이머(GSH 및 SOD)를 사용하여 cDNA 증폭도를 측정하였다. 순환과정의 조건은 다음과 같다: 초기 변성 94℃에서 4분; 30 사이클: 94° C에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 4 분; 최종 신장 72℃에서 5 분. 튜브를 95℃에서 3 분 동안 가열하고, 얼음위에서 적어도 3분 동안 스냅 냉각시켰다. 100 V에서 30분 동안 시료를 1.5% 아가로스 겔에 주입한 후, 에티디움 브로마이드로 30분 동안 건조한 다음, 영상화(Gel Image Analysis System)를 위해 시료에 305 nm의 자외선을 조사하였다.

[0084] 모든 데이터는 3회 측정의 평균과 표준편차로 나타내었고, 스튜던츠 t-테스트로 통계적 비교를 수행하였다. P<0.05를 유의적인 것으로 고려하였다.

[0085]

[0086] 5-HMF가 유전자 수준에서 GSH 및 SOD의 발현에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위하여, RAW264.7 세포를 다양한 농도의 시험된 5-HMF로 처리하고, cDNA의 유효 경향을 도 7에 도시한 바와 같은 PCR 방법으로 측정하였다. 시험된 5-HMF는 용량의존적 활성을 나타내어 각각 GSH 및 SOD 효소에 대한 발현을 명확하게 개선시켰다. 1 μM의 최소 농도에서, 비처리된 블랭크군에 비해 명확한 cDNA 밴드를 관찰할 수 있었다. The increase regulations of GSH 및 SOD 유전자 발현의 상승 조절이 농도 의존적 방식으로 관찰되었다. 따라서 이러한 결과는 5-HMF의 항산화 효과가 재차 유전자 수준에서 입증되었음을 나타내었다.

[0087] 세포에서 생성된 자유 라디말 및 반응성 산소종은 항산화 효소, 예를 들어 GSH, SOD 등으로 이루어진 항산화 방어 시스템에 의해 효과적으로 소거된다. 항산화 방어 시스템의 활성이 감소되거나 ROS 생산이 증가하면, 산화적 스트레스가 발생할 수도 있다. GSH는 세포에서 가장 풍부한 저분자량 티올 화합물이며, 항산화 방어 및 해독 작용에서 중요한 역할을 한다. GSH는 자유 라디칼 소거능으로 인해 산화적 스트레스에 대한 주요 방어수단을 제공하거나, GSH 퍼옥시다아제에 의해 촉매화된 H_2O_2의 감소에 관여한다. GSH의 감소는 산화적 손상에 대한 세포 방어를 손상시킬 수 있고, 세포 사멸에 이르게 할 수도 있다. 고동도의 5-HMF 100 uM의 처리는 GSH 유전자 발현 수준을 유의적으로 증가시켰다. 또한 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(SOD) 수퍼옥사이드 라디칼의 파괴를 촉진시키고, 따라서 이들 자유 라디칼의 유해 효과로부터 산소-대사 세포를 보호한다. 5-HMF 처리는 산화적 스트레스를 감소시킴으로써 이러한 산화적 스트레스에 대한 5-HMF의 방어 효과에 대한 메카니즘의 일부를 차지할 수 있다.

[0088] 5-HMF는, 상기의 연구를 바탕으로 분자, 세포 및 유전자 수준에서 그의 잠재적인 항산화 특성을 보여주었다. 이는 자유 라디칼(DPPH, 하이드록실, 알킬, 및 수퍼옥사이드 음이온) 및 세포성 ROS를 효과적으로 소거할 뿐만 아니라 산화적 스트레스로부터 멤브레인을 보호하고, 또한 산화 효소 MPO의 활성을 저해할 수 있다. 한편, 5-HMF는 반응성 자류 라디칼로부터 산화적 손상을 방어하는데 중요한 역할을 하는 항산화 효소인 GSH 및 SOD의 발현을 유의적으로 증가시킬 수 있다.

[0089] 여기서, 구조적-활성 관계(structure-activity relationship; SAR)는 다음과 같이 제시될 수 있었다. 5-HMF의 구조적 관점에서, 이는 몇몇 흥미로운 기능적 반응성기, 예를 들어 이중결합, 알데히드 산소 원자 및 푸란 고리에서 나온 다른 산소를 함유하며, 이들은 쉽게 전자를 유인할 수 있으며, 또한 하나의 히드록실기는 하나의 수소 이온을 공여한 후 빈 산소(bare oxygen)를 형성할 수도 있다. 이러한 특징은, 신체에서 생산된 자유 라디칼을 소거하고, 특정 생물학적 경로에서 산화 효소(MPO)의 활성을 감소시키거나 항산화 효소(GSH 및 SOD)의 활성을 증가시키는 5-HMF의 항산화 활성에 대한 주요 인자임이 틀림없다.

[0090] 결론적으로, 식품 분야, 제약 산업 및 임상적 용도로 사용하기 위한 잠재적인 후보물질을 생산하는 라우렌시아 속에서 가장 주목되는 해양 조류 중 하나인 라우렌시아 운둘레이트는 추후 연구에 보다 많은 관심이 필요할 것이다. 또한 5-HMF는 차후, 본 발명에서 기술한 현저한 항산화 특성뿐만 아니라 몇몇 전통 약초에서 주요 활성성분으로서 나타나기 때문에 과학자들의 관심이 집중될 것이다. 그러나, 5-HMF는 실제 사용하기 위하여, 그의 불안정한 특성으로 인하여 구조적인 개질 후 나아가야 할 길이 멀다.

도면의 간단한 설명

[0091] 도 1은 본 발명에 따른 5-HMF의 구조(A) 및 HMBC 상관관계(B)를 나타낸 도이다.

[0092] 도 2는 ESR 분광계로 측정한 라우렌시아 운둘레이트 유래 5-HMF의 자유 라디칼 소거 활성을 나타낸 도이다.

[0093] 도 3은 MRC-5, RAW246.7, 및 HL-60 세포주에 대한 라우렌시아 운둘레이트 유래 5-HMF의 세포독성 효과를 나타낸 도이다.

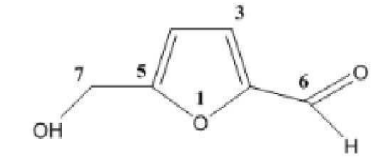
[0094] 도 4는 RAW264.7 세포주에서 세포 멤브레인 단백질 산화에 대한 라우렌시아 운둘레이트 유래 5-HMF의 저해 효과를 나타낸 도이다.

[0095] 도 5는 HL-60 세포주에서 MPO에 대한 라우렌시아 운둘레이트 유래 5-HMF의 저해 효과를 나타낸 도이다.

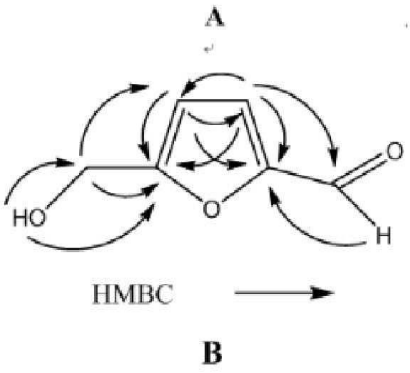
[0096] 도 6은 GSH 및 SOD에 의해 표준화된 DNA 쌍 및 효소적 항산화 방어와 관련된 유전자의 mRNA 발현에 대한 실시간 PCR 결과를 나타낸 도이다.

도면

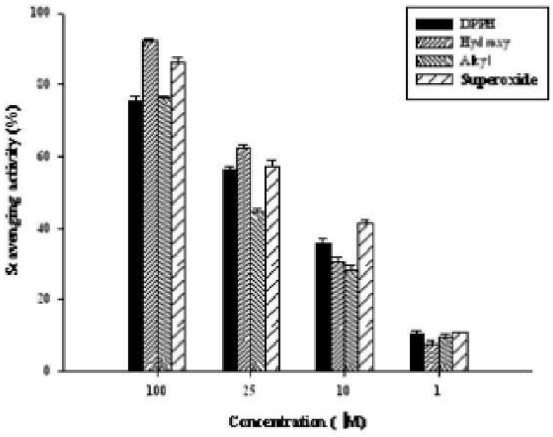
도면1



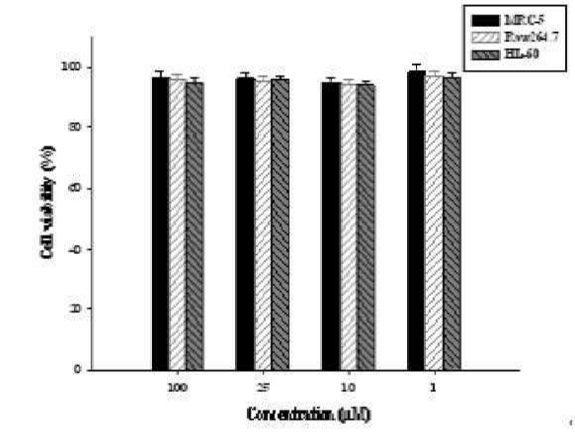
5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde



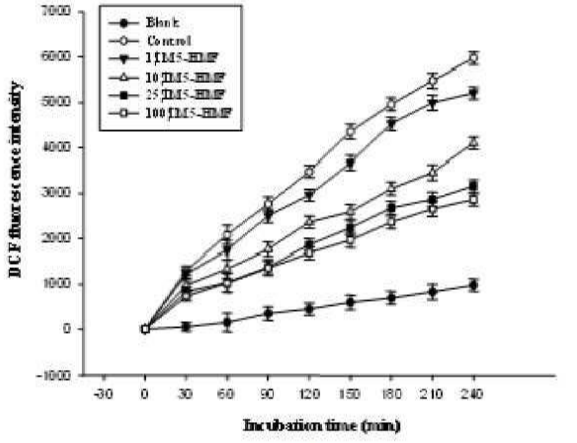
도면2



도면3

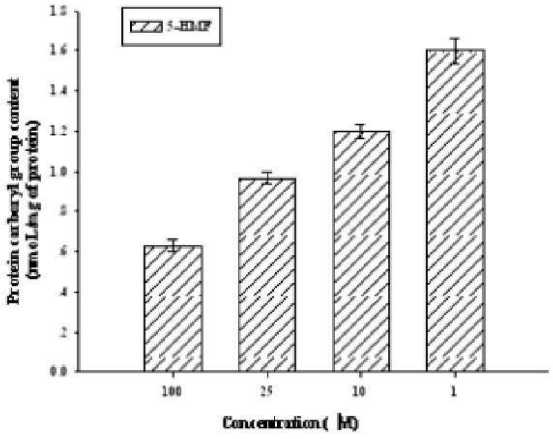

MRC-5
Raw264.7
HL-60
Cell viability (%)
100
25
10
1
Concentration (μM)

A

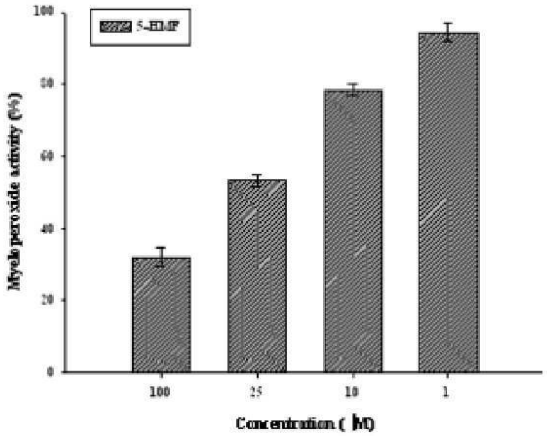

Blank
Control
1 μM 5-HMF
10 μM 5-HMF
25 μM 5-HMF
100 μM 5-HMF
DCF fluorescence intensity
Incubation time (min)

B

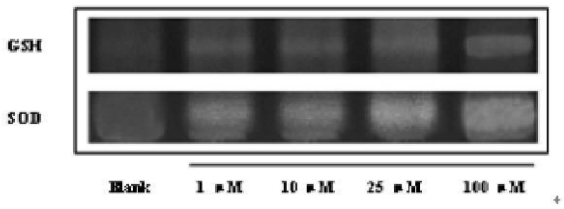
도면4


5-HMF
Protein carbonyl group content
100
25
10
1
Concentration (μM)

도면5


100
80
60
40
20
0
Myeloperoxide activity (%)
100
25
10
1
Concentration (M)

도면6


GSH
SOD
Blank
1 M
10 M
25 M
100 M