

## 소나무과 일부 수종의 에탄올 추출물에 대한 생물학적 평가

안 정 엽<sup>†</sup> · 배 중 환

(주)생그린 기술연구소

(2005년 2월 15일 접수, 2005년 3월 2일 채택)

### Evaluation of Biological Activities on the Extractives of *Pinaceae*

Jeung-Youb Ahn<sup>†</sup> and Jong-Hwan Bae

Section of Biosciences, SaengGreen R&D center, 224-1, Jeongchon-ri, Seonggeo-eup, Chonan-si, Chungnam 330-833, Korea  
(Received February 15, 2005; Accepted March 2, 2005)

**요약:** 소나무과는 우리 생활과 친숙한 수종이지만 천연물로서 그 평가는 전래되는 사용범위에 국한되어 있다. 본 연구에서는 소나무과 수종 *Pinus koraiensis* S et Z, *Pinus banksiana* LAMBERT, *Pinus rigida* MILL, *Pinus densiflora* S. et Z.의 에탄올 추출물에 대하여 피부 노화방지에 대한 화장품 소재로서의 평가를 수행하였다. 추출물은 각 수종의 식물 부위를 껍질, 잎, 심재 등의 부위별 제조되었으며 각 부위에 따른 추출물은 생물학적 평가에 항산화 효과(DPPH, superoxide radical 소거실험), elastase 활성 억제 효과 및 세포 생존율에 관한 MTT assay를 실시하였다. 항산화 효과는 수종에 차이 없이 껍질 > 잎 > 심재 순으로 활성이 나타났으며 껍질과 잎은 10 µg/mL 농도에서 L-ascorbic acid나 α-tocopherol과 유사한 항산화 효과를 나타내었다. Human keratinocyte cell line인 HaCaT 세포주를 사용하여 추출물을 10, 100 µg/mL 농도로 처리하여 세포 생존율을 실험하였다. 껍질부분의 추출물은 농도에 상관없이 세포 증식효과를 나타내었으며 잎과 심재 부분의 추출물 10 µg/mL 농도에서 세포 증식 효과가 보이나 100 µg/mL 농도에서는 세포 증식이 저하되었다. 또한 세포기저층을 형성하는 분자 중 elastin을 분해하는 elastase 활성 억제를 측정하여 사용된 식물 부위 중 껍질에서 elastase 활성 억제효과를 확인하였다. 따라서 소나무과 수종의 활용에 있어 껍질 부분의 활용을 기대할 수 있으며 일반적 조림용 이외 목재로 사용되는 경우 산림폐기물을 이용한 부가가치를 극대화하는 기능성화장품 소재로서의 사용이 가능할 것이다.

**Abstract:** Most of the cells, specially in the skin, free radicals and reactive oxygen species induced aging, accompanying with diseases. The *pinaceae* family is very familiar plant with Korean spirit. However, those plants were not estimated for natural products in manufactural process. We employed 4 different plants, *Pinus koraiensis* S et Z, *Pinus banksiana* LAMBERT, *Pinus rigida* MILL, *Pinus densiflora* S. et Z. in *pinaceae* family. The ethanol extracts were prepared for three different parts of plant, wood, bark and leaf, respectively. In this study, we carried out free radical and superoxide radical scavenging assay to investigate the anti-oxidative activity. The bark and leaf part of plants showed similar anti-oxidant effect, L-ascorbic acid and α-tocopherol at 10 µg/mL. Also we tried to investigate inhibitory effects of elastase activity in *in vitro* experiments on *pinaceae* plant extract as a matters for functional cosmetics. Among those plants, the bark of *Pinus rigida* MILL. and *Pinus densiflora* S. et Z. showed inhibitory effect. The cell viability was evaluated with MTT assay. The potential relationship was shown between the cell viability and anti-oxidant effect because the anti-oxidant effects were positively correlated with the cell growth in MTT assay. As the results in our experiments, we expect the potential activities of *pinaceae* as a material of functional cosmetics.

**Keywords:** *pinaceae*, MTT, antioxidant, elastase

## 1. 서 론

인체의 노화과정 속에서 피부의 변화는 필수적이며 피부의 QOL (quality of life)을 높이는 방법의 일환이 미용

이다. 미용을 통해 인체의 건강과 아름다움을 표현하는 외적 아름다움은 사회 의학적 자신감을 나타내는 방법이 기도하다. 최근 사회의 저변을 확대해가는 wellbeing의 바람은 이러한 개념을 반증하는 것이며 기능성화장품 제도 도입 이후 국내화장품의 연구개발에 열기를 한층 가열시키고 있다.

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: ahnahnjy@hotmail.com)

또한 천연물을 사용한 소재 및 제품 개발에 있어서 식물 유래의 성분이 각광을 받고 있다. 천연 성분의 유용한 물질의 발굴은 활성 산소를 제거하는 효능 평가를 위주로 초기 검색 조건을 설정하고 있다. 자유라디칼 소거에 의한 효능평가는 *in vivo*에서 자유라디칼에 의한 당뇨병 및 동맥경화 질병의 유발 및 자유라디칼 소거에 의한 질병 치유에 대한 연구 성과가 집적된 결과라 할 수 있다 [1-3]. 항산화제 및 기타 유효성분의 흡수를 촉진시켜 자유라디칼에 의한 피부를 보호하는 것은 피부노화억제에도 도움을 줄 수 있다[4]. 화장품 소재개발의 또 다른 일면으로는 생명과학의 발달로 피부 기능과 관련된 기전에 관여하는 유전자 제어를 통한 천연물의 소재 발굴이 적용되고 있다. 이러한 기능성이 강조되는 화장품은 치유 기능이 부여된 *cosmeceutical*의 개발로 이어지며 약품 산업과의 경계를 모호하게 하는 문제점을 낳기도 했다. 그러나 이는 화장품개발의 원동력으로도 작용할 수 있을 것이다. 현재 널리 사용되는 화장품의 소재로는 과일, 야채와 민간 및 전통전래 생약, 한약제 등으로 피부노화 방지의 검토는 다양한 각도에서 시도되고 있다. 지구상에는 300,000종의 식물이 있고 500종도 안되는 식물이 사람에게 이용되고 있다고 한다[5].

피부는 외부 환경에 노출되어 있는 신체 기관으로써 자외선에 의한 영향을 직접 받는다. 자외선은 피부에 활성 산소종을 유발시키고 피부세포의 손상, 색소 침착을 증가시키며 이는 직접적인 피부 노화로 이어진다. 이러한 산화적 스트레스로부터 피부를 보호할 필요가 있으며 이는 화장품의 소재 개발에서 이를 수 있다. 기능성 소재 발굴과 개발에는 방법이 다양하겠지만 한국자생식물에 대한 효능 평가와 처방을 개발하는 신도불이 원료 발굴이 그 중의 하나라 할 수 있다.

소나무과는 10속 220종이 북반구의 온대에 분포하며 긴 가지에는 비늘잎, 짧은 가지에 바늘잎이 달리는 소나무속 *pinus*, 짧은 가지가 없는 잣나무속 *abies* 등으로 나뉜다. 소나무는 한국의 수종 중 가장 넓은 분포면적을 가지고 있으며 개체수도 가장 많다. 또한 소나무는 장수의 상징으로 십장생(十長生)의 하나로 여겨져 왔다. 이렇듯 소나무는 물질적·정신적으로 우리에게 많은 영향을 끼쳤으며, 민족의 나무로서 한국인에게 가깝게 느껴지는 식물이다. 본 연구는 소나무과 소나무속의 4수종의 에탄올 추출을 제조하여 그 결과 얻어진 조추출물을 실험에 사용하였다. 항산화활성 및 세포기저층 구성 분자의 분해를 유발하는 elastase, 효소 활성억제 실험을 통하여 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

#### 2.1.1 추출물 제조

본 실험에 사용된 추출물은 국립산림과학연구원으로부터 한국자생식물 중에서 소나무과 소나무속 4종(*Pinus koraiensis* Siebold et Zucc. *Pinus banksiana* LAMBERT. *Pinus rigida* MILL. *Pinus densiflora* Siebold et Zucc.)을 사용하여 심재, 껍질, 잎의 부위별 에탄올 추출물을 제공받았다.

#### 2.1.2. 표준물질

표준물질은 항산화 실험에는 BHA (butylated hydroxyanisole, Acros, NJ), BHT (butylated hydroxytoluene, Sigma, MO), quercetin (Acros, NJ), L-ascorbic acid (Sigma, MO),  $\alpha$ -tocopherol (Sigma, MO)을 사용하였으며, elastase inhibitory assay에는 ursolic acid (Sigma, MO)가 사용되었다.

#### 2.1.3 세포 배양

위에서 준비된 한국자생수종 에탄올 조추출물을 세포의 증식 및 독성 정도를 실험하기 위하여 human keratinocyte cell line인 HaCaT을 사용하였다. 세포 배양에는 1% penicillin-streptomycin, 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco, MN)를 포함하는 DMEM (dulbecco's modified eagle medium, Gibco, MN)을 사용하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

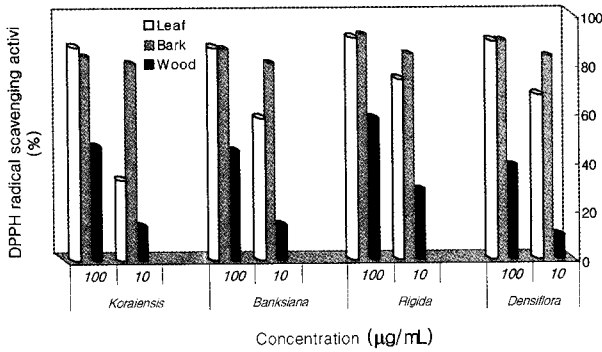
### 2.2 실험 방법

#### 2.2.1. Cell Viability Assay

세포의 생존율을 조사하기 위하여 Mosmann의 방법을 수정하여 진행하였다[6]. HaCaT cell을 사용하여 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하여 24 well-plate에  $5 \times 10^4$  cells/well을 24 h 동안 전 배양한 후 배지 교환시 일정 농도의 추출물을 첨가하여 48 h 배양하였다. 48 h 배양 후 배지를 제거하고 MTT (Acros, NJ)를 0.5 mg/well이 되도록 처리하여 생성된 formazan을 isopropanol에 녹여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.2.2. Elastase 활성 억제 측정

세포기저층에는 피부 노화와 관련하여 주름형성 및 피부 처짐에 영향을 미치는 탄력섬유 단백질(elastin)과 교원섬유 단백질(collagen)이 위치하고 있다. 이들을 분해하



**Figure 1.** DPPH radical scavenging activity of *Pinaceae*. Three different part of each plant, leaf, bark and wood were used. L-ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol were used as the standard materials. The DPPH radical scavenging activities of standard material showed  $85.2 \pm 1.1$  and  $80.2 \pm 0.6$  at  $10 \mu\text{g/mL}$ , respectively.

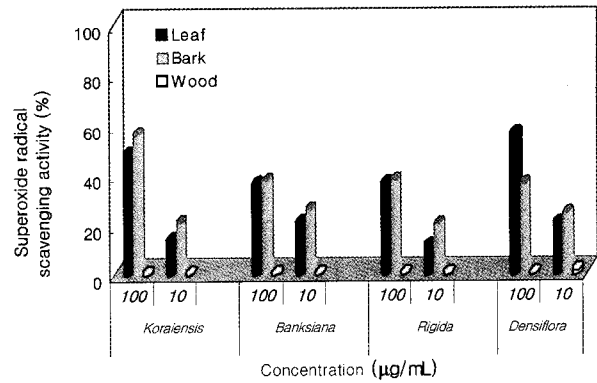
는 각각의 효소 elastase 및 collagenase에 의해 기질 단백질이 분해되면 피부의 노화 현상을 가지적으로 나타나게 한다. 실험에는 0.2 M의 Tris-HCl buffer를 사용하였다. 추출물중의 elastase 효소 활성을 억제하는 실험에 elastin이 효소에 의한 절단부위를 포함하며 p-nitroanilide가 결합된 기질(Sigma, MO)을 사용하여 추출물 첨가 후 elastase (Sigma, MO) 2 mU를 넣어 25°C에서 25 min 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.3. DPPH Radical 소거실험

항산화활성은 Blois의 방법[7]을 수정하여  $200 \mu\text{M}$  DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, MO)로 methanol에 용해하여 제조한 후 시료와 일정 비율(1:4)로 혼합하여 실온에서 30 min 동안 암소에서 반응 후 visible spectrophotometer (Model 550, Bio-Rad, CA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.4. Superoxide Radical 소거 실험

Xanthine/xanthine oxidase 반응계를 이용하여 형성된 superoxide radical을 소거하는 효과를 NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma, MO)을 사용하여 측정하였다[8]. 반응액은 15 mM K2EDTA, 3 mM hypoxanthine, 0.6 mM NBT를 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4)로 제조하여 사용하였으며 반응액에 추출물 첨가 후 xanthine oxidase (Calbiochem, CA) 50  $\mu\text{L}$ 를 넣어 실온에서 20 min 반응시킨다. Superoxide radical 소거효과는 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

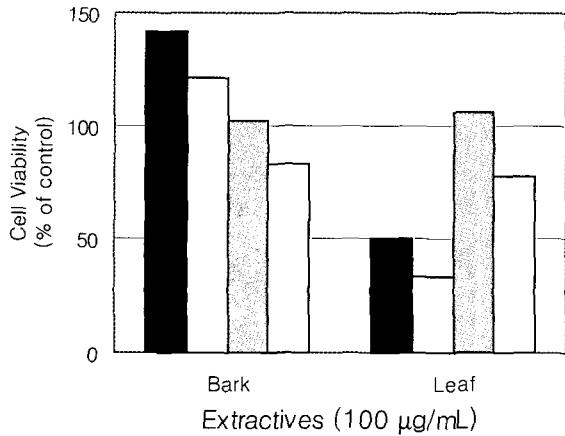


**Figure 2.** Superoxide radical scavenging activity of *P. koraiensis*, *P. banksiana*, *P. densiflora* and *P. rigida*. Three different part of each plant, leaf, bark and wood were used. L-ascorbic acid, quercetin and BHA were used as standard materials. The superoxide radical scavenging activities of standard material showed  $9.4 \pm 0.2$ ,  $21.9 \pm 1.7$  and  $7.1 \pm 0.6$  at  $10 \mu\text{g/mL}$ , respectively.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 효과

피부는 외부 환경에 노출(광노화)과 내재적 인자에 의한 자연노화에 의해서 항상 활성산소종의 생성이 왕성한 상태에 놓여지게 된다. 이미 잘 알려진 항산화제인 비타민 C, 비타민 E, 카로티노이드, 플라보노이드 등은 화장품의 영원한 소재로 쓰임을 받고 있으며 소재개발에 있어 식의약품 모든 분야에서 안정된 천연 항산화제의 개발은 산업계의 숙원이라 할 수 있다. 우수한 항산화제로 알려진 BHA 또는 BHT는 안정하기는 하지만 합성물질로써 천연 유래 성분에 대한 바람이 남아있다. 천연물 유래의 항산화물질의 개발과 동시에 비타민 C와 E가 갖는 안정성 문제점을 보완하는 대체 물질의 성과를 기대하고 있다. 본 연구에서는 소나무과 4수종을 대상으로 심재, 나무껍질, 잎 등으로 나누어 에탄올 추출하여 얻어진 조추출물을 사용하여 자유라디칼 소거 정도를 DPPH 실험을 수행하여 사용된 수종의 식물 부위별 추출물의 항산화능력을 검토하였다. 또한 superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 소거 반응은 xanthine/xanthine oxidase 반응계에서 생성된 superoxide anion을 소거하여 NBT에 의해 측정하였다. 이 반응계에 의한 항산화 효과는 xanthine oxidase에 대한 저해 활성과 SOD-like 활성을 나타내는 지표로써 나타낼 수 있다. 각 실험의 결과를 Figure 1과 2에 나타내었다. 두 방법에서 네 가지 수종 모두 껍질 > 잎 > 심재 순으로 항산화 효과를 나타내었으며 또한 농도 의존적으로  $100 \mu\text{g/mL} > 10 \mu\text{g/mL}$  나타났다. DPPH 실험에서 표준물질로 L-ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 사용하였으며 10



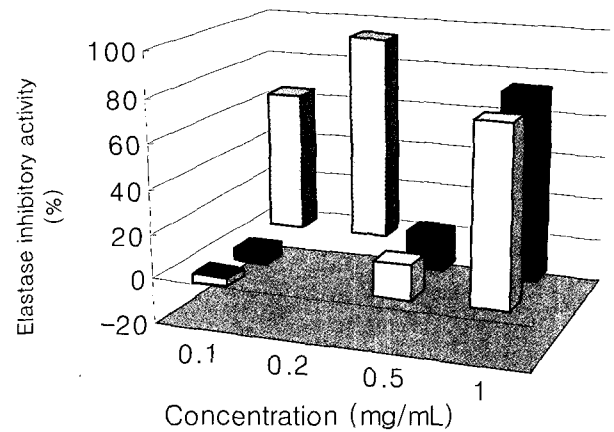
**Figure 3.** Cell viability activity of *P. koraiensis* (■), *P. banksiana* (□), *P. densiflora* (▨) and *P. rigida* (▩) on human keratinocyte cell line, HaCaT.

µg/mL에서 각각 80% 및 85%의 자유라디칼 소거능을 나타내었다. 껍질 부분은 4수종 모두에서 표준물질의 항산화 활성과 유사하게(10 µg/mL) 나타났었다. 그리고 잎 부분은 100 µg/mL > 10 µg/mL으로 농도 의존적으로 100 µg/mL에서 표준물질보다 높게 나타났으나 10 µg/mL에서 *P. rigida* > *P. densiflora* > *P. banksiana* > *P. koraiensis* 항산화 활성(73.5 ~ 32.8%)을 보였다. Superoxide radical 소거 효과에 대한 결과는 심재 추출물에서 100, 10 µg/mL 처리시 DPPH 실험에서 57 ~ 10% 정도였던 것에 비해 거의 측정되지 않았다(Figure 2). 이 실험에서 표준물질은 L-ascorbic acid, quercetin, BHA 등이 사용되었으며 각각의 superoxide radical 소거 효과(10 µg/mL)는 9.4, 21.9, 7.1%로 측정되었다. 표준 물질의 측정결과와 비교하여 껍질 부분은 높게 나타났으며 잎 부분에서는 표준물질의 L-ascorbic acid (21.9%, at 10 µg/mL) 효과와 유사한 수준으로 검토되었다.

DPPH 방법은 자유 라디칼을 소거하는 효과를, superoxide radical 소거 실험은 세포내 SOD-like 효과로써 인체에 oxidative stress에 의한 DNA 손상, 염증 반응, 세포 파괴로부터 보호할 수 있는 자유 라디칼 제거효과인 항산화 효과를 나타낸다. 본 연구에 사용된 소나무과 네 가지 수종은 껍질과 잎 부위에서 표준물질을 상회하는 항산화 효과를 나타내어 가능성 있는 소재로 기대할 수 있다.

### 3.2. 세포 증식에 미치는 효과

세포 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 human keratinocyte cell line인 HaCaT를 사용하였으며 소나무과 4가지의 수종은 심재, 껍질, 잎 부분을 에탄올 추출하여 100, 10 µg/mL로 처리하였다. 추출물 처리 농도 10 µg/mL



**Figure 4.** Elastase inhibitory activity of bark part on *P. densiflora* and *P. rigida*. The standard material was used ursolic acid as mentioned on materials and methods. Elastase inhibitory activity of ursolic acid was about 94% at 200 µg/mL.

에서는 식물 부위별 세포 생육을 저해하지 않았으며 100 µg/mL에서 보다 높은 세포 생존율을 나타내었다(data not shown). Figure 3은 껍질과 잎 부분을 100 µg/mL 처리시 세포 생육에 미치는 결과를 나타내었다. 100 µg/mL 처리시 소나무과 4가지 수종 모두의 심재부분은 8 ~ 78% 정도로 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 낮은 세포 생육을 나타내었다. 같은 100 µg/mL 처리시 *P. koraiensis*의 껍질 부분이 가장 높은 세포 증식 효과를 나타내었으며, 잎 부분에서는 *P. densiflora*가 생육 저해를 나타내지 않았다. 이 결과는 항산화 효과 측정 결과 각 수종의 껍질 및 잎 부분이 항산화 효과가 높게 나타난 수종과 부위에서 세포 생존율이 높게 나타나는 연관성을 제시하였다.

### 3.3. Elastase 활성억제 효과

피부의 노화는 외부 환경, 자외선 노출, 흡연, 환경오염, 정신적 스트레스 등의 영향을 받아 활성 산소종의 과잉 생산에 따른 피부 세포의 기질의 파괴를 초래하며 발생한다. 이 세포외기질의 구성 성분으로 주름 형성, 탄력저하 및 처짐에 관여하는 elastase는 과잉 생성된 활성 산소종에 의해 활성화되어 세포 매트릭스를 파괴하게 된다. 본 연구에서는 화장품 소재 평가시 산화적 스트레스에 의해 세포 매트릭스 파괴를 조절 가능성을 제시하고자 소나무과 추출물을 사용하여 *in vitro* 실험, elastase inhibitory assay를 수행하였다. 사용된 소나무과 네 가지 수종 중 *P. densiflora*와 *P. rigida*의 껍질 부분에서만 검토된 범위 내(0.1 ~ 1 mg/mL)에서 농도 의존적으로 elastase 활성 억제 효과를 나타내었다(Figure 4). 이는 표준 물질로 사용된 ursolic acid이 0.2 mM에서 94% 정도의

elastase 효소활성 억제를 보이거나 Figure 4에서와 같이 80% 정도의 elastase 효소활성 억제를 나타내었다. 껍질 부분에서 elastase 활성 억제효과를 나타낸 것은 항산화 효과 및 세포 증식 효과와 일치되는 결과이다.

우리나라에 자생하고 있는 소나무류는 풍부한 식물자원으로써 목재로써 사용되고 있으나 *P. koraiensis* S et Z. *P. densiflora* S. et Z.는 약재로써도 사용되어 온 소나무과 수종이다. 소나무과 나무 중에는 소나무가 가장 많이 연구되어 온 것으로 조사되며 그 사용 부위로써는 꽃가루, 순, 잎, 가지, 줄기 등 대부분을 사용하며 우리 일상과도 가까이 그 사용 예를 찾아 볼 수 있다. 그 중에서는 잎에 대한 연구가 다수를 차지하였다. 화장품 소재로써도 다양한 용매로 추출하여 그 활성을 조사되었다[9-11]. 그러나 화장품의 소재로써의 적용은 구하기 쉬운 잎에 국한되어 있으며 가장 최근에 이루어지고 있음을 알 수 있다. 또한 소나무의 향에 관한 terpenoids의 연구가 진행되고 있다[12-14].

#### 4. 결 론

항산화 효과 측정은 DPPH assay와 superoxide anion scavenging 효과를 관찰하였다. 그 결과 100, 10  $\mu\text{g/mL}$  처리시 두 방법 모두에서 껍질과 잎 부분에서 심재보다 높은 항산화 효과를 나타내었다. 심재 부분의 항산화 효과는 껍질이나 잎 부분과 비교하여 현저하게 낮게 나타났다. 소나무과 수종의 에탄올 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향은 항산화 효과가 있는 껍질과 잎 부분을 첨가한 세포 실험에서는 항산화 효과가 낮게 측정된 심재 부분에 비해 높은 생존율을 보여 항산화 효과가 세포 생존율에 영향을 미치는 것으로 두 실험 간의 상관성을 추론 가능하게 하였다. 이는 서론에서 제시한 질병과 항산화 효과에 의한 설명을 본 연구의 *in vitro* 실험을 통해 상호 연관성을 설명할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 참 고 문 헌

1. J. M. Tolmasoff, T. Ono, and R. G. Culture, Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species, *Proc. Natl. Sci. USA*, **77**, 2777 (1980).
2. A. Collier, R. Wilson, H. Bradley, J. A. Thomson, and M. Small, Free radical activity in type 2 diabetes, *Diabetic Medicine*, **7**, 27 (1990).
3. B. Halliwell, Antioxidants and human disease: a general introduction, *Nutrition Reviews*, **55**, S44 (1997).
4. M. J. Petersen, C. Hansen, and S. Craig, Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, **99**, 440 (1992).
5. D. E. Pratt and B, J, F, Hudson, Natural antioxidant notexplored commercially In "Food Antioxidant" B, J, F, Hudson (ed), Elsevier, **171** (1990).
6. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
7. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
8. K. Furano, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Null.* **25**, 19 (2002).
9. Y.-C. Boo, C.-O. Jeon, J.-Y. Oh, and E.-J. Kim, Anti-melanogenesis effect of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone, an antioxidant isolated from pine needles, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **20** (1994).
10. J.-M. Seong, N.-Y. Park, and S.-H. Lee, Effect of *schizandra chinensis* and pine Neddle on growth of pathogens relate to acne, *Kor. J. Microbiol, Bio-technol.*, **31**(1), 69 (2003).
11. M.-J. Yang, M.-G. Kim, S. Lim, H.-S. Ann, and R.-M. Ahn, Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis, *Yakhak Hoeji* **43**(4), 494 (1999).
12. 이은주, 김종희, 소나무과 식물이 지닌 Monoterpenes가 *Escherichia coli*와 *Aspergillus nidulans*의 성장 저해에 미치는 영향, *한국생태학회지*, **25**(3), 213 (2002).
13. H. J. Kim, E. H. Choi, and I. S. Lee, Two lano-stane triterpenoids from *Abies koreana*, *Phytochemistry*, **65**(18), 2545 (2004).
14. H. J. Kim, QK Le, M. H. Lee, T. S. Kim, H. K. Lee, Y. H. Kim, K. Bae, and I. S. Lee, A cytotoxic secocycloartenoid from *Abies koreana*, *Arch. Pharm. Res.*, **24**(6), 527 (2001).