

청목노상 뽕잎으로부터 분리한 *Helicobacter pylori* 저해물질에 대한 *In Vivo* 안전성 평가

김병오¹ · 조영제^{2*}

¹경북대학교 생물응용전공
²경북대학교 식품공학부, 식품생물산업연구소

Evaluation of *In Vivo* Safety of Inhibitory Compounds from *Cheongmoknosang* Mulberry Leaves against *Helicobacter pylori*

Byong-Oh Kim¹ and Young-Je Cho^{2*}

¹Dept. of Applied Biology, Kyungpook National University, Gyeongbuk 742-711, Korea

²School of Food Science & Biotechnology, Food & Bio-Industry Research Institute,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Biological compounds (caffeic acid, rosmarinic acid, and chlorogenic acid) from mulberry leaf extracts were administered to mice in order to confirm their stability. All male and female mice survived upon a 4,000 mg/g dose in an acute toxicity test, and they also survived after injection of 2,000 mg/kg for 13 weeks repeatedly. Therefore, the level of toxicity was not high. In a comparison of the control and test groups, there were no significant differences upon naked eye inspection, and the weights of stomachs infected by *Helicobacter pylori* were not significantly different. Regarding the effects on immune cells, NO of macrophages decreased more than that of control when medicine was administered. The spleens of the female mice group proliferated slightly in LPS and Con A within 48 hr, whereas the other test group showed a similar level and the cell toxicity of natural killing cells decreased. Therefore, we concluded that caffeic acid, rosmarinic acid, and chlorogenic acid from mulberry leaf extracts are not harmful for the treatment of infected patients the development as a healthy functional food.

Key words: safety, toxicity, inhibitory compounds, *Helicobacter pylori*, mulberry leaves

서 론

*Helicobacter pylori*는 소화성 궤양과 만성 전정부 위염, 위암이나 점막연관 림프조직종 위림프종 등의 원인으로 알려져 있으며(1,2), 1994년 세계보건기구(WHO)에서는 *H. pylori*를 위암의 제1군 발암인자로 규정한 이후 *H. pylori*의 위험성이 더욱 부각되고 있다. *H. pylori* 감염으로 유발되는 임상 표현형은 경미한 부증상 위염에서 위암에 이르기까지 다양하며, *H. pylori*는 인위적으로 제균을 시도하지 않는 한 대부분에서 평생 감염이 지속된다(3,4). 1983년 Warren과 Marshall에 의해 처음으로 분리 동정된 나선형 몸통과 편모를 가지고 있는 그람음성 세균인 *H. pylori*는 방어인자를 변경시켜 산을 생성함으로써 위염과 위궤양을 발생시킨다고 알려져 이 균의 박멸이 임상에서 다양하게 시도되어 왔으며(5), Hirayama 등(6)이 *H. pylori*에 대한 *in vivo* 실험결과를 보고하였다. *in vivo* 상태에서 *H. pylori*의 제균 방법은

bismuth(BIS) 제제, proton pump inhibitor(PPI), ranitidine bismuth citrate(RBC) 등을 근간으로 하는 3중 요법과 BIS를 근간으로 하는 3제 요법에 PPI를 추가하는 4중 요법 등이 사용되고 있다(7). 하지만 현재 시판되고 있는 여러 종류의 궤양 치료제가 위산 분비를 억제하거나 위점막을 보호하여 세포가 손상되는 것을 막아주는 기능에 머무르고 있어 궤양 재발에 문제점으로 대두되고 있고, 이 원인에 대하여 *H. pylori*가 궤양관련 질병에 깊게 관여하며, 최근에는 이 균에 의한 위암에 연관성도 보고되고 있다(1,2). 이와 같이 1983년 *H. pylori*가 보고된 후 지난 30여 년간 *H. pylori*에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있고, 약제를 사용한 제균 방법이 어느 정도 성공을 거두어 *H. pylori*에 대한 치료로 널리 시행되고 있다. 그러나 항생제를 장기간 투여하는 것에 따른 항생제 내성을 갖는 새로운 균주가 나타나고 사용한 약물에 의한 부작용이 있을 수 있기 때문에 다른 접근 방식이 요구되고 있다. 이에 본 저자는 특용작물 중 오디(8)와 청목노상 뽕잎

*Corresponding author. E-mail: yjcho@knu.ac.kr
Phone: 82-53-950-7755, Fax: 82-53-950-6772

(9)과 진달래꽃(10) 및 영실(11)에 *H. pylori* 억제물질이 존재함을 보고하였고, 억제물질의 구조 분석과 *in vitro* 상태에서의 항균력에 대하여 보고한 바 있다(12,13).

본 연구에서는 뽕잎으로부터 분리한 *H. pylori* 억제물질이 건강기능식품으로 산업화되기 위한 전제조건으로 *in vivo* 실험에서 이들 유용성분의 일반 독성평가와 면역 독성평가를 실시하여 안전성 여부를 검토하였다.

재료 및 방법

Helicobacter pylori 항균력 측정을 위한 시료 제조

실험재료는 뽕잎의 한 종류인 청목노상 뽕잎을 경북상주 소재의 잠사시험장에서 수확하여 추출물을 제조하고, Sephadex LH-20과 MCI gel CHP-20 등의 column chromatography로 정제한 다음 *Helicobacter pylori* 억제효과가 뛰어난 caffeic acid, rosamarinic acid, chlorogenic acid 등 3가지 물질을 동정하여 동물실험을 위한 시료로 사용하였다(12).

*Helicobacter pylori*에 대한 *in vitro* 억제력 측정

실험재료인 청목노상 뽕잎으로부터 분리한 *Helicobacter pylori* 억제물질(12)인 caffeic acid, rosamarinic acid, chlorogenic acid를 1:1:1(w/w/w)로 혼합하여 이용하였으며 *Helicobacter pylori* 최적배지 plate(액체배지 50 mL당 special pepton 0.5 g, agar 0.75 g, NaCl 0.25 g, yeast extract 0.25 g, beef extract 0.2 g 및 pyruvic acid 0.025 g)에 *Helicobacter pylori* 균 100 μ L를 분주하여 멸균 유리병으로 도말한 다음, 멸균된 disc paper(Φ 8 mm)를 올리고 0.45 μ m membrane filter로 제균한 억제물질 혼합액(200 μ g/100 μ L)을 흡수시키고, 대조구로는 멸균수를 흡수시킨 후 37°C의 미호기성 조건에서 24시간 동안 incubation한 다음, disc 주위의 clear zone 생성 유무를 확인하였다.

독성검사 시험동물

사용된 실험동물은 8~12주령의 C57BL/6(SPF) 마우스를 오리엔트바이오 주식회사(경기도 성남시 소재)로부터 구입하여 사용하였고, 마우스는 실험 전 약 1주일간 순환시켰으며 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 이용하였다. 시험기간 중 사육환경은 온도 23 \pm 3°C, 상대습도 55 \pm 15%, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux로 설정하여 사육하였고, 실험자들은 모두 고압증기 멸균(121°C, 20분)된 작업복, 두건, 마스크 및 장갑 등을 착용하고 작업을 실시하였다.

시험물질의 투여

시험물질은 Cho 등(12)이 청목노상 뽕잎으로부터 *H. pylori* 억제 물질로 분리하여 보고한 caffeic acid, rosamarinic acid, chlorogenic acid를 냉장보관하며 경구투여 하였다. 투여직전에 멸균한 증류수와 DMSO를 매체로 하여 시험물질을 조제하였다. 매체 대조군의 동물에는 매체인 20% DMSO만을

투여하였다. 투여는 투여 전 하룻밤을 절식시킨 후 경구투여용 주사기를 이용하여 조제시험물질을 강제 경구투여 하였다. 투여는 급성독성은 10일간, 만성독성은 13주 동안 같은 시간에 개체별로 투여하였으며, 투여를 시작한 첫날에 측정된 체중을 기준으로 하여 투여량을 계산하였다.

투여량 및 시험군의 구성

본 시험 물질들은 식물 추출물로 알려져 있으나, 혼합하여 사용되어진 예가 없어 투여량은 150 μ L/head로 고정하고 용량을 2000, 3000, 4000 mg/kg로 하여 매체를 투여하는 매체 대조군만을 두었다. 단, 식품의약품 안전청의 '의약품등의 독성시험기준'에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에 임의로 설정하여 투여하였다.

관찰 및 검사항목

일반증상 및 사망동물의 관찰은 투여 첫날은 투여 후 6시간 후에 관찰하였고 다음 날부터는 아침, 점심, 저녁, 매일 3회씩 일반 증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 체중측정은 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시전과 투여 후 2 또는 3일 간격으로 급성독성은 10일간, 만성독성은 13주 동안 측정하였다. 부검은 생존동물을 ether 마취 후 개복하여 방혈치사 시킨 후 육안적으로 내부 장기를 관찰하였다.

NO의 생성도 측정

뽕잎으로부터 분리한 유용성분을 투여하고 20시간 후에 분리한 macrophage를 4, 20, 30, 40시간 동안 더 배양한 후, 상등액 100 μ L만을 취하여 96 well plate에 옮긴 후 100 μ L Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm 흡광도에서 측정하였다. Sodium nitrite의 검량선으로부터 macrophage가 분비하는 nitric oxide를 계산하였다.

대식세포의 탐식능 측정

뽕잎으로부터 분리한 유용성분이 대식세포의 탐식능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 zymosan particle 도입방법을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 매체 대조군과 투여군 쥐의 대식세포를 1 \times 10⁵ cells/well의 농도로 각각 넣고 zymosan을 5 \times 10⁶ particles/mL이 되도록 가한 후 NBT 0.6 mg/mL을 가하고 1시간 동안 배양하였다. 냉각된 N-ethylmaleimide의 생리식염수 용액으로 2회 세척한 후 생성된 formazan을 DMSO로 녹인 다음 ELISA reader로 540 nm에서 phagocytic activity를 측정하였다.

LPS와 ConA에 의한 세포증식 측정

뽕잎으로부터 분리한 유용성분을 투여하고 20시간 후에 분리한 mice thymocyte를 96 well plate에 well 당 5 \times 10⁵개의 세포로 넣고 10 μ g/mL lipopolysaccharide(LPS)와 2.5 μ g/mL concanavalin A(ConA)를 첨가하여 각각 lymphocyte의 증식력을 측정하였다. 전체 배양 부피는 200 μ L로 하여, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양 후 각각 MTT

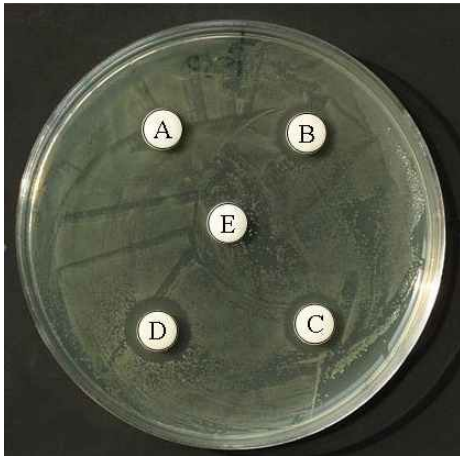


Fig. 1. Inhibitory activity by purified inhibitory compounds mixture (caffeic acid, rosamarinic acid and chlorogenic acid, 1:1:1 w/w/w) from *Cheongmoknosang* mulberry leaves against *Helicobacter pylori*. A: phenolic contents 50 µg/100 µL, B: phenolic contents 100 µg/100 µL, C: phenolic contents 150 µg/100 µL, D: phenolic contents 200 µg/100 µL, E: control.

를 가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

YAC-1에 대한 NK cell 활성 측정

뽕잎으로부터 분리한 유용성분을 투여하고 20시간 후에 분리한 splenocyte를 96 well plate에 well 당 5×10^5 개의 세포를 넣고 effector cell로 이용하였다. Target cell로는 YAC-1 세포를 이용하였으며 effector cell과 target cell의 비율을 50:1로 하여 함께 배양한 후 20시간 후에 MTT-assay를 실시하였다. *in vitro* 방법은 뽕잎으로부터 분리한 유용성분을 100, 10, 1 µg/mL 농도로 처리하고, 암세포와 함께 20시간 배양하였다. 세포 증식을 알아보기 위해 MTT(2 µg/mL) 25 µL를 가하고 4시간 동안 더 배양한 후, 생성된 formazan을 DMSO로 녹이고 ELISA reader로 540 nm에서 측정하였으며, NK cell 활성은 $\text{Alive Yac-1}/(\text{Alive Yac-1} + \text{Dead Yac-1}) \times 100$ 으로 나타내었다.

결과 및 고찰

*Helicobacter pylori*에 대한 *in vitro* 항균활성 측정

만성 위, 십이지장 질병과 관련이 있는 것으로 알려진 *Helicobacter pylori*에 대해 저해효과가 있는 것으로 보고된 (12) 청목노상 뽕잎 정제물인 caffeic acid, rosamarinic acid 및 chlorogenic acid(1:1:1, w/w/w)의 혼합물은 Fig. 1과 같이 200 µg/100 µL의 농도에서 clear zone을 형성하여 저해활성을 나타내었다. 이러한 결과로 보아 위장 내에서 위궤양을 일으키는 원인균인 *Helicobacter pylori*의 억제제로 산업화에 적용시킬 수 있는 source로 활용이 가능할 것이라 판단되어, 청목노상 뽕잎을 이용한 *Helicobacter pylori*에 대한 항균제로써 활용하기 위한 전단계로 식품에 적용하기 위하여 동물 생체 내에서의 독성검사를 수행하였다.

Table 1. The survival individuals by acute toxicity and 13 weeks repeated toxicity

Type	Dose (mg/kg)	Sex	Individual (a head)	Survive (a head)
Acute toxicity	Vehicle	Male	5	5
		Female	5	5
	2000	Male	5	5
		Female	5	5
	3000	Male	5	5
		Female	5	5
	4000	Male	5	5
		Female	5	5
13 weeks repeated toxicity	Vehicle	Male	6	6
		Female	6	6
	2000	Male	6	6
		Female	6	6
	4000	Male	6	6
		Female	6	0

뽕잎으로부터 분리한 *Helicobacter pylori* 억제물질에 대한 독성 평가

사망율 및 LD₅₀값은 시험 물질 뽕잎에서 추출한 유용 성분인 caffeic acid, rosamarinic acid와 chlorogenic acid의 혼합물의 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 C57BL/6 마우스를 암수 각각의 용량에 5마리씩 10일간 같은 양을 경구 투여 하여 10일간의 사망률을 관찰한 결과, Table 1에서와 같이 시험물질에 의한 사망률은 암수의 대조군 및 고용량 4000 mg/kg 투여군에서 시험기간을 통하여 사망동물은 관찰되지 않았으며, 암수동물에 대한 본 시험물질의 급성독성에 대한 LD₅₀값은 각각 4000 mg/kg을 상회할 것으로 판단되었다. 만성 독성을 관찰하기 위하여 13주 반복 독성검사를 수행하였으며 시험기간 동안 수컷에서는 대조군과 투여군 모두에서 사망동물이 관찰되지 않았으나, Table 1에서와 같이 암컷의 약물 투여군에서는 투여량 4000 mg/kg의 투여군에서 모두 사망함을 관찰하였으며, 사망 관찰시점은 시험 시작 4주에서 8주 사이로 사망동물을 확인하였다. 암컷 투여군이 모두 사망한 이후에 13주 반복독성 평가에서는 암수 모두가 생존한 투여량 2000 mg/kg에서 약물을 투여하였으며, 이후 암수 구분을 하지 않고 대조군 실험의 관찰을 수행하였다.

일반증상

일반증상은 table화하기 어려워 결과를 제시하지 않았으나 급성독성 검사 시 수컷군의 투여 3일 후부터 피부의 털이 윤기가 떨어져 거칠어지는 현상 등 이상이 약간 발생되었으나 이는 매체 시험물질에서도 나타나는 것으로 보아 시험물질들의 투여에 따른 이상소견이라기보다는 매체에 의한 증상으로 보였으며, 암컷군에서는 이상 증상이 발견되지 않았다. 13주 반복 독성검사에서도 수컷군의 시험물질 투여 3일 후부터 피부의 털에서 이상이 발생되었으나 이도 매체에 의한 증상으로 보였으나, 시험물질 투여 6주가 지난 후에는

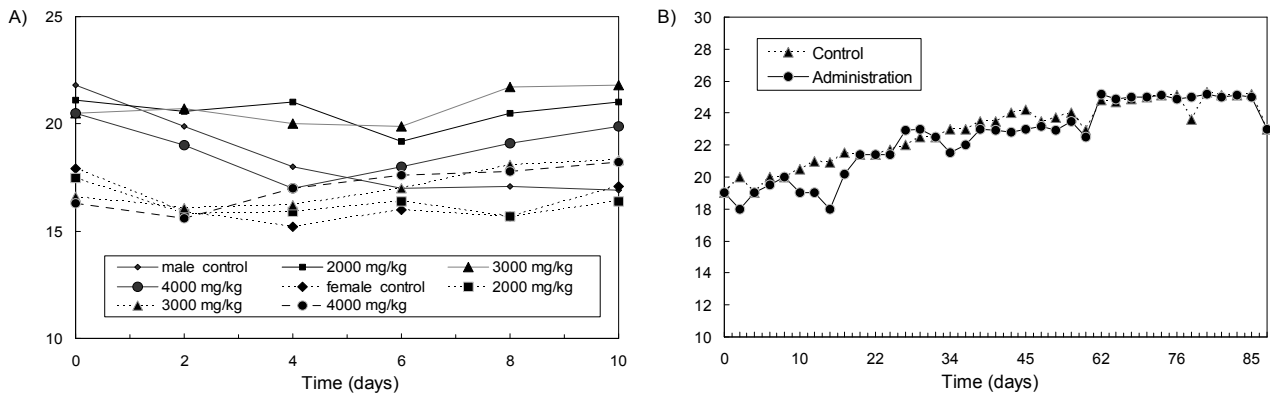


Fig. 2. Change of body weight after an autopsy. (A) acute toxicity, (B) 13 weeks repeated toxicity.

매체대조군과 같은 상태로 유지되었다. 또한 시험물질 투여군의 mouse들이 대조군보다 더 활발히 움직이는 것을 관찰할 수 있었다.

체중변화

암수의 모든 시험군에서 투여 기간 동안 2일 간격으로 각 농도별로 체중변화를 확인한 결과 급성독성 검사의 경우, Fig. 2-A에서와 같이 10일 투여 후 암컷과 수컷 mouse 모두 투여 후 체중변화가 큰 차이는 보이지 않았고, 13주 반복 독성검사의 경우, Fig. 2-B에서와 같이 대조군과 약물 투여군 모두 체중이 증가되는 것을 확인하였다. 대조군은 3.72 g 증가하였고, 약물투여군은 3.78 g 증가하였다. 두 그룹 간

에 체중변화의 차이는 거의 없었다.

부검소견

급성독성 검사에서는 암수 mouse의 모든 시험군에서 육안으로는 이상이 관찰되지 않았다. 또한, 시험이 종료된 후 mouse의 부검을 실시한 후 장기의 무게를 측정할 결과, Fig. 3-A, B 및 C에서와 같이 장기 무게의 변화는 수컷이나 암컷 mouse 모두에게서 나타나지 않았다. 13주 반복 독성검사에서 부검 결과 수컷 mouse의 모든 시험군에서 육안으로 이상소견은 관찰되지 않았으나, 부검 후 장기 무게를 측정할 결과 Fig. 3-D에서와 같이 신장(대조군: 1.72%, 약물투여군: 0.43%)과 간(대조군: 4.32, 약물투여군: 4.89%)의 무게가 다

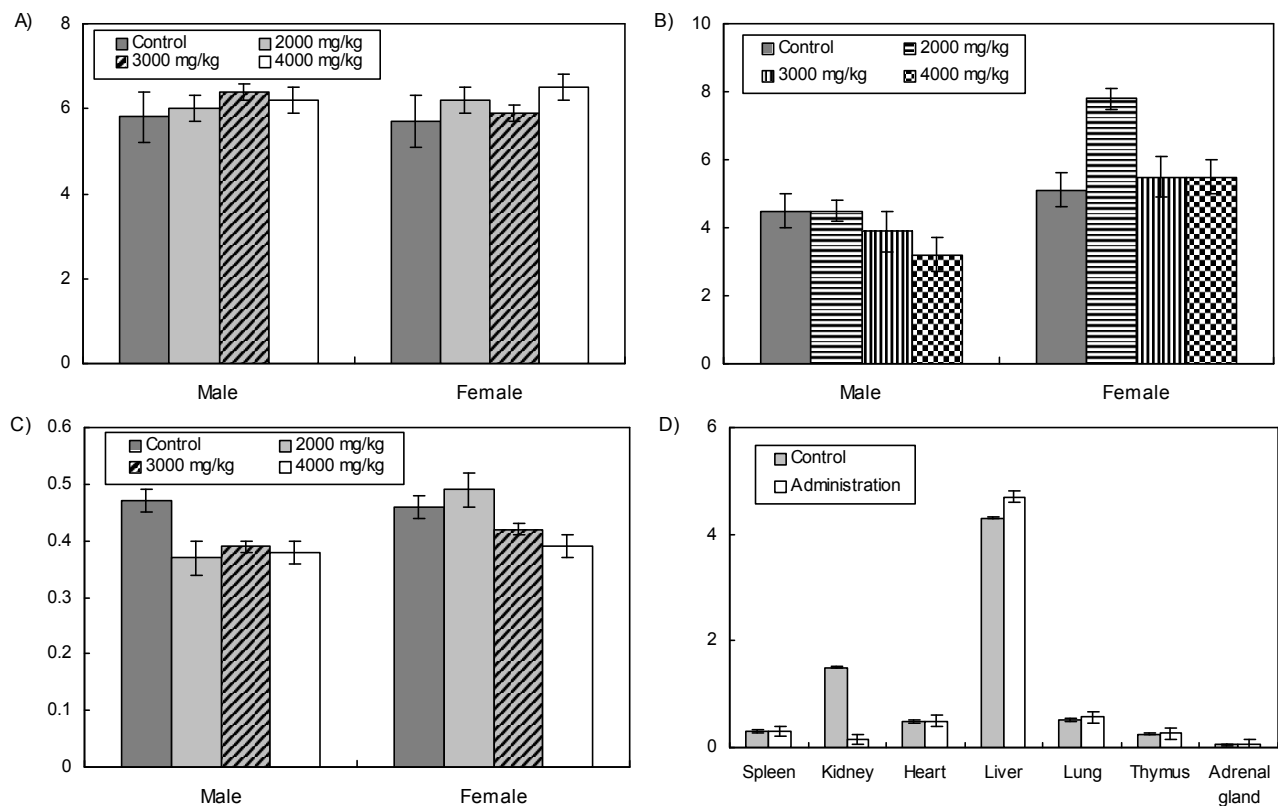


Fig. 3. Change of internal organs weight after an autopsy. (A) liver, (B) kidney, (C) spleen, (D) 13 weeks repeated toxicity.

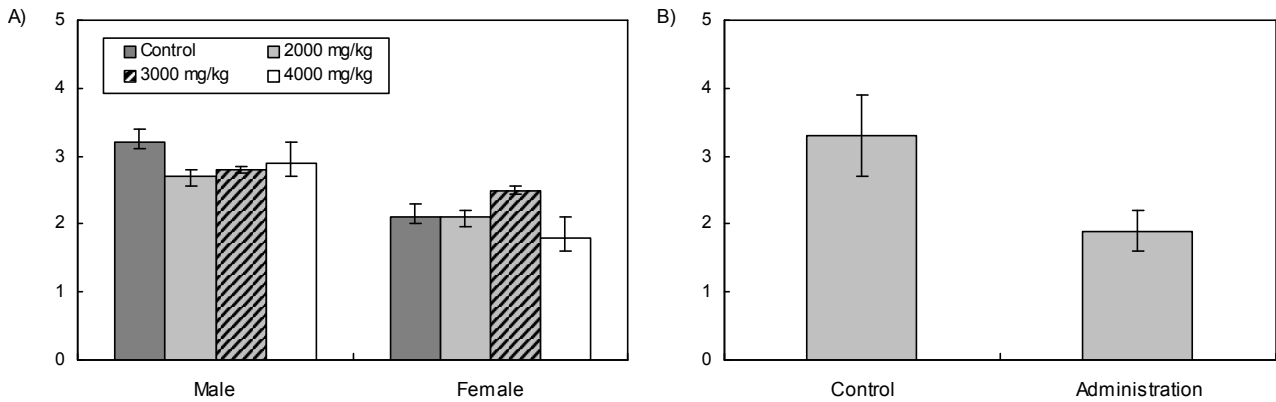


Fig. 4. Product of NO from macrophage. (A) acute toxicity, (B) 13 weeks repeated toxicity.

소 차이가 있었다. 신장과 간은 세포 면역반응에 중요한 역할을 담당하는 장기이므로 몇 가지 중요한 면역반응 실험들을 실시하였다.

NO의 생성도 측정

뿔잎 정제물이 LPS 처리에 의해 활성화된 대식세포로부터 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 각 약물을 농도별로 24시간 처리한 Raw 264.7 cell line, 그리고 급성독성(10일), 만성독성(13주) 동안 경구투여로 사육한 마우스의 대식 세포로부터 생성되는 NO의 양을 Griess reagent를 사용하여 측정하였다. Raw 264.7 cell line에서의 NO의 생성은 급성독성에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나(Fig. 4-A) 13주 반복 독성의 경우 대조군(3.32 μ M)에 비하여 약물 투여군(2.89 μ M)에서 NO의 생성이 억제되었다(Fig. 4-B). 대식세포에서 생성되는 NO는 체내 방어기능 등 다양한 생리기능을 가지고 있으며, NO의 생성은 박테리아나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하기도 하지만 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며, 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발시키므로 NO의 적절한 억제로 인해 면역증강 효과를 기대할 수 있다(14-16). 이로써 뿔잎 추출물이 복강 대식세포의 NO생성을 억제시켜 면역증강 효과의 가능성을 제시하는 것으로 판단된다.

대식세포의 탐식능 측정

대식세포의 탐식능은 외부 물질을 제거하기 위해 가장 먼저 일어나는 선천적 면역 반응이다. 또한 항원을 처리하여 T 및 B 세포에 전달하는 과정에 탐식이 선행되어야 하기 때문에 탐식 능은 대식세포의 항미생물 기능 및 항암기능의 기본적인 지표이다. 뿔잎에서 분리한 약물을 13주 동안 경구 투여로 사육하여 그 대식세포의 탐식능을 측정하였다. 대조군(O.D=0.053)에 비해 약물 투여군(O.D=0.082)에서 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과는 뿔잎에서 분리한 약물이 대식세포의 활성을 증가시키는 것으로 판단된다.

LPS와 ConA에 의한 세포증식 측정

비장 T 세포는 항원 자극에 의해 활성화되어 분열 및 분화

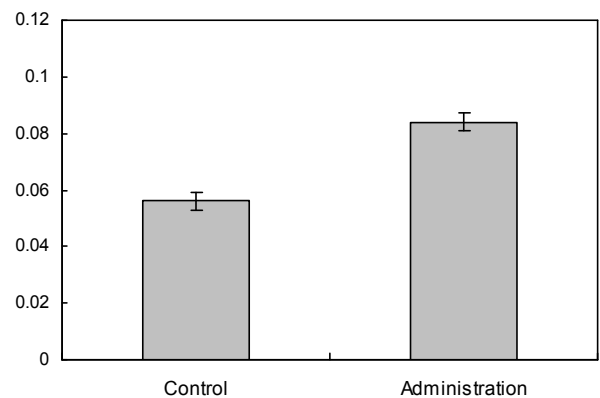


Fig. 5. Phagocytic activity of macrophage.

후 세포성 면역 반응 및 체액성 면역반응에 관여하게 된다. 따라서 T 세포의 증식능은 그 기능 수행에 있어 매우 중요하며 이에 대한 영향은 면역 독성의 중요지표로 사용될 수 있다. T 세포의 활성을 증폭을 유도하기 위해 비장세포를 분리하여 LPS 또는 ConA와 투여물질을 첨가한 후 24시간 배양 후에 세포증식을 측정할 결과, 급성독성 검사에서는 Fig. 6-A와 B에서와 같이 3000, 4000 mg/kg 투여한 암컷군에서는 LPS와 Con A에 의해 세포가 약간 증식되었으나 나머지 군에서는 변화가 없는 것을 확인하였다. 13주 반복 독성검사에서는 동일한 방법으로 72시간 동안 처리하여 세포증식을 측정할 결과 Fig. 6-C에서와 같이 LPS와 Con A 첨가 48시간 후에 비장세포가 증식하는 것을 확인하였으나, 72시간 처리 시 대조군과 큰 차이를 보이지 않아 비장세포의 증식에 영향을 주지 않았다. 따라서 뿔잎에서 분리한 약물은 면역독성이 없는 것으로 판단된다.

YAC-1에 대한 NK cell 활성 측정

뿔잎에서 분리한 약물을 농도별로 10일, 13주 동안 경구 투여로 섭취한 실험동물에서 비장 세포를 분리하여 NK 세포의 활성을 측정하였다. Fig. 7-A에서와 같이 대조군에 비해 모든 군에서 변화가 없음을 확인하였으나, 암컷 4000 mg/kg 군에서 감소하였다(대조군: 21.2%, 4,000 mg/kg 군: 11.4%). 13주 반복 독성검사에서는 YAC-1 세포에 대한 NK cell

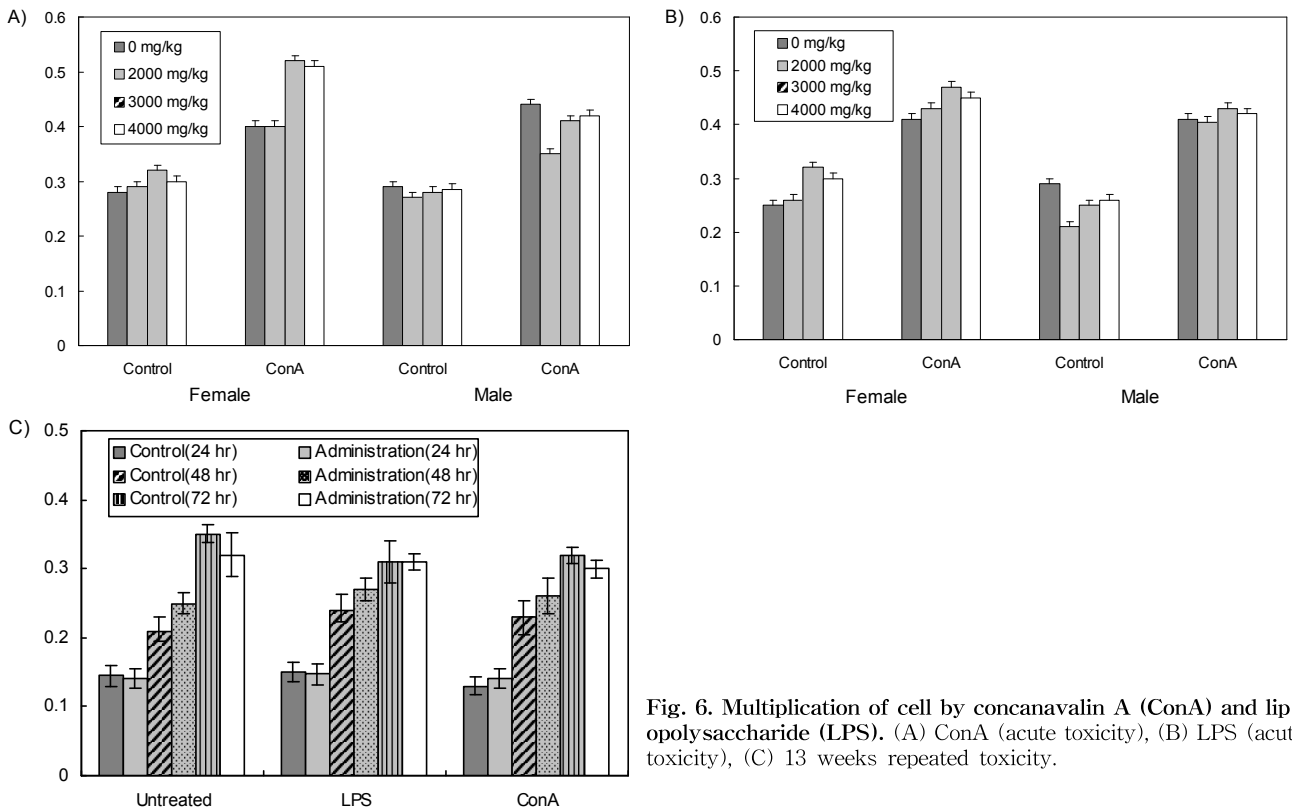


Fig. 6. Multiplication of cell by concanavalin A (ConA) and lipopolysaccharide (LPS). (A) ConA (acute toxicity), (B) LPS (acute toxicity), (C) 13 weeks repeated toxicity.

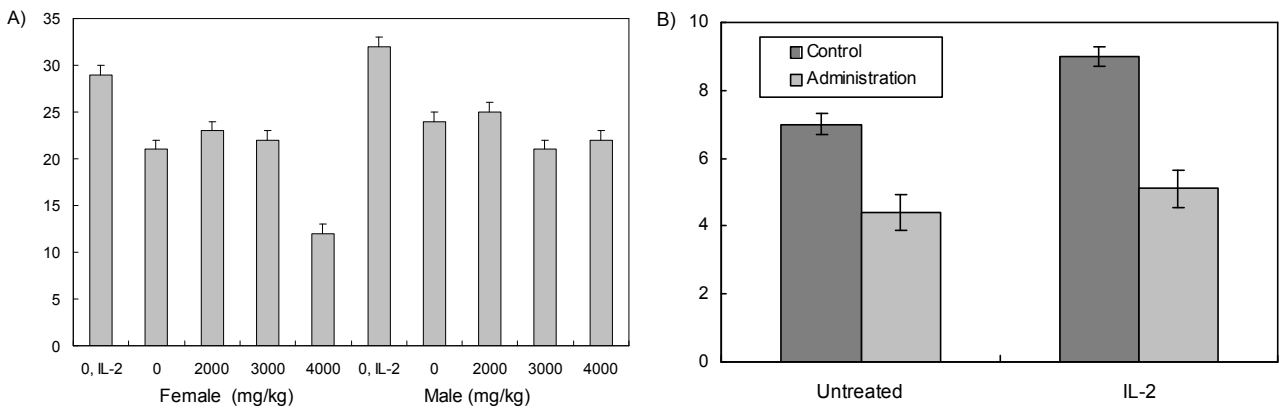


Fig. 7. NK cell activity about YAC-1 cell. (A) acute toxicity, (B) 13 weeks repeated toxicity.

의 활성을 FACS를 이용하여 측정된 결과 Fig. 7-B에서와 같이 시험물질 투여군에서 세포독성능이 감소된 것으로 확인하였다. 따라서 뿌잎에서 분리한 약물은 세포 독성이 없는 것으로 판단되었다.

요 약

뿌잎에서 분리한 유효성분의 혼합물에 대한 안전성을 확인하기 위하여 경구 투여하여 시험한 결과, 투여량 4000 mg/kg에서 암수 mouse 모두가 생존하여 급성독성은 없을 것으로 판단하였으며, 13주 반복 독성 시험에서도 투여량 2000 mg/kg에서 암수 mouse 모두가 생존하여 약물의 독성에 의

한 문제는 없을 것으로 판단되었다. 육안으로는 대조군과 비교 시 이상이 확인되지 않았으며 부검 후 *H. pylori*의 감염에 영향을 받을 수 있는 위의 무게 역시 대조군과의 차이를 확인할 수 없었다. 면역세포에 대한 영향은 약물 투여 시 매체 대조군에 비해 대식세포의 독성 물질인 NO의 생성이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 암컷군에서 48시간에서만이 LPS와 Con A에 의해 비장세포가 약간 증식되었을 뿐 다른 실험군에서는 대조군과 비슷한 수치를 나타내었으며, 자연 살해세포의 세포독성은 감소되었다. 뿌잎에서 분리한 유효성분인 caffeic acid, rosmarinic acid와 chlorogenic acid가 *H. pylori*의 감염환자의 치료용 또는 예방의 목적으로 임상적으로 사용할 경우 아무런 독성이 없을 것으로 판단되어

빵잎을 건강기능성 식품으로 개발하는데 있어서 안전성 문제는 없는 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 연구는 지식경제부에서 시행한 지역산업기술개발사업(중점기술개발사업)의 기술 개발 결과이며, 연구개발비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Fridovich I. 1989. Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264: 7761-7762.
2. Halliwell B, Aruoma OJ. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Lett* 281: 9-19.
3. Higasi GS. 2000. Appraisalment of antioxidative activity from vegetables. *Jpn J Food Ind* 57: 56-64.
4. Hubue G, Wray V, Nahrstedt A. 1999. Flavonol oligosaccharides from the seeds of *Aesculus hippocastanum*. *Planta Med* 65: 636-642.
5. Iwuoha CI, Aina JO. 1997. Effects of steeping condition and germination time on the alpha-amylase activity, phenolics content and malting loss of Nigerian local red and hybrid short kaura sorghum malt. *Food Chem* 58: 289-295.
6. Jennings PE, Barnett AH. 1998. New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic microangiopathy. *Diabetic Med* 5: 111-117.
7. Jorge M, Ricardo DS, Jacques R, Vemonique C, Anni C, Michel M. 1991. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* 30: 1259-1264.
8. Cho YJ, Chun SS, Lee KH, Kim JH, Kwon HJ, An BJ, Kim MU. 2006. Screening of the antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* and antioxidant by extracts from mulberry fruits. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 15-20.
9. Cho YJ, Ju IS, Kim BO, Kim JH, Lee BG, An BJ, Choo JW. 2007. The antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* and antioxidant effect from the extracts of mulberry leaves. *J Kor Soc Appl Biol Chem* 50: 334-343.
10. Ju IS, Cho YJ. 2009. Purification and identification of phenol compounds with inhibitory activity on *Helicobacter pylori* from *Rhododendron mucronulatum* Flos. extracts. *J Life Sci* 19: 1125-1131.
11. Park KT, Kim JS, Jo BS, An BJ, Chun SS, Kim JH, Cho YJ. 2010. Isolation and identification of inhibitory compounds on *Helicobacter pylori* from *Rosa multiflora Thunberg* fruit extracts. *J Life Sci* 20: 1511-1518.
12. Cho YJ, Lee KH, Cha WS, Ju IS, Yun DH, An BJ, Lee SH, Kim MU, Chun SS. 2009. Purification and identification of inhibitory compounds from *Cheongmoknosang* mulberry leaves on *Helicobacter pylori*. *J Appl Biol Chem* 52: 65-69.
13. Yun DH, Cha WS, Lee SH, An BJ, Kim JH, Chun SS, Bae JH, Cho YJ. 2010. Purification and identification of inhibitory compounds on *Helicobacter pylori* from *Cheongminknosang* callus for biomass. *J Life Sci* 20: 374-380.
14. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 178: 749-754.
15. Stuehr DJ. 1999. Mammalian nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Acta* 1411: 217-230.
16. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *J Biochem* 316: 209-215.

(2011년 7월 29일 접수; 2011년 8월 19일 채택)