

우슬뿌리 추출물의 Cathepsin B에 대한 저해효과

이가순[†] · 이진일 · 이종국 · 이정 · 김기돈 · 오만진¹
충남농업기술원, ¹충남대학교 식품공학과

Inhibition Effect of *Achyranthes japonica* N. Root Extract on Cathepsin B

Ka-Soon Lee[†], Jin-Il Lee, Jong-Kuk Lee, Jeong Lee, Gi-Don Kim and Man-Jin Oh¹

Chungnam Agricultural Research and Extension Services, Yesan 340-861, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the cathepsin B inhibition effect by *Achyranthes japonica* N. root extract *in vitro*. The methanol/H₂O(4:1, v/v) extract was fractionated by ethyl acetate(F1), chloroform(F2), chloroform/methanol(3:1, v/v)(F3) and methanol(F4). The yield of F4 in *Achyranthes japonica* N. root was 8.27%. As an index material of *Achyranthes japonica* N. root, 20-hydroxy ecdysone was detected by TLC, and HPLC and its content was 0.33%. Three isolates(F1, F3, F4) showed the cathepsin B inhibition activity, and F4 showed the highest inhibition activity among them. In the inhibition activity on cathepsin B, leupeptin, 20-hydroxy ecdysone and F4(at the same concentration of 20-hydroxy ecdysone.) were 92, 88 and 97% on BANA(N α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide) substrate, and 62, 36 and 67% on CLN(N α -CBZ(carbobenzlyoxy)-L-lysine p-nitrophenyl ester HCl) substrate, respectively.

Key words : *Achyranthes japonica* N. root, cathepsin B inhibition effect, 20-hydroxy ecdysone

서 론

우슬(*Achyranthes japonica* N.)은 비름과(Amaranthaceae)에 속하는 다년생식물로서 우리나라 각지의 들판이나 길가에 자생되고 있으며 일본과 중국에도 분포하고 있다. 키는 60~150 cm정도 자라고 줄기는 녹자색으로 모난 4각형을 이루며 그 마디 부위는 특별히 굵어 소의 무릎 같은 형태를 이루고 있어 일명 쇠무릎이라고도 한다. 또한 꽃은 양성화로 8월 중순경에 가지 끝에 조 이삭 모양으로 피며 종자는 광택이 있는 다갈색의 포과로 타원형인데 꽃받침에 둘러싸여 있다(1).

우슬(牛膝)의 뿌리에는 oleanolic계 saponin(2)과 steroid계 inokosterone, ecdysterone(3) 등의 성분이 함유되어 있어

예로부터 귀중한 한약재로 사용하고 있으며 약리효과(4)는 진통작용, 혈압강하작용, 고혈압, 류머티스 및 관절통과 같은 율혈의 치료제, 이노 및 강장제 등의 치료 및 민간요법(5,6)으로 널리 사용되어지고 어린순은 나물로 먹기도 한다고 한다. 한편 일본에서는 약리 활성물질과 관련된 연구가 활발하게 진행되고 있는데 강한 알레르기와 항종양 활성을 보였다고 한 바 있다(7).

최근 여러 질병 중에 암, 류머티스 관절염과 노인성 치매 등의 발병이 많이 나타나고 있는데 이는 간, 비장, 폐 등의 여러 조직 세포에 존재하여 생리적 조절작용 및 면역작용에 관여하고 있다는 cathepsin B이라는 세포외막에 존재하는 cysteine계 효소가 과다 출현하게 되면 세포의 기저막을 분해하여 만성적 질환을 일으키며 각종 염증성 질환을 초래하게 된다는 보고가 있다(8-11).

따라서 cysteine계 cathepsin B효소의 과다발현으로 인하여 세포내의 질병발생의 원인 규명 및 치료를 위한 연구가

[†]Corresponding author. E-mail : lkasn@chungnam net,
Phone : 82-41-330-6297, Fax : 82-41-330-6290

꾸준히 이루어지고 있다(12,13).

Cathepsin B 저해물질의 개발연구로 인체 내의 Urine 으로부터 cystatin(14), 난백으로부터 cystatin (15),이 분리되었으며 토양미생물로부터 leupeptin(16), antipain(17), E-64(18) 등의 저해물질이 개발되는 등 cathepsin B에 대한 저해물질 탐색연구가 이루어지고 있다(19). 이러한 cathepsin B의 과다출현에 의한 질병을 미리 예방하기 위하여 cathepsin B의 저해물질 탐색연구가 생체 내에서나 토양미생물로부터 이루어지고 있는 바이다.

이 연구에서는 우슬뿌리가 예전부터 민간요법으로 관절염치료에 이용되어오고 있는 바 우슬뿌리의 cathepsin B에 대한 저해효과를 알아보기 위하여 우슬뿌리를 각 용매로 계통분획·분리한 후 그 분획추출물에 대하여 cathepsin B의 활성억제효과를 검토하여 보았다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 우슬은 충남 부여군 초촌면에서 2003 년도에 채배한 것을 수확하여 세척 건조하여 사용하였다. 효소로 사용한 cathepsin B(EC 3.4.22.1)는 bovine 으로부터 추출한 Sigma사 제품을 사용하였다. 효소의 기질로 사용한 CLN(Na-CBZ(carbobenzlyoxy)-L-lysine p- nitrophenyl ester HCl)과 BANA(Na-benzoyl-DL-arginine β-naphthylamide), 저해효과를 비교검토하기 위하여 저해제로 개발되어진 leupeptin과 우슬의 지표물질인 20-hydroxy ecdysone 등의 시약은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

일반성분, 무기질, 및 사포닌

우슬뿌리의 일반성분은 AOAC방법에 따라 분석하였다 (20). 즉 수분함량은 105℃ 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조회분은 건식회화법, 조단백질은 Kjeldahl 법으로 분석하였으며 무기이온 분석은 습식법으로 전처리 하였다. 즉 건조시료 1 g 을 질산, 과염소산과 질산액의 혼합액 및 염산을 순차적으로 이용하여 분해시킨 후 일정량 으로 희석, 여과한 후 ICP analyzer (GBC integra XMP, Australia)를 사용하여 원자흡광 광도법으로 정량하였다 (21). 사포닌함량은 시료분말 5 g을 등근플라스크에 취한 후 70% methanol 100 mL로 80℃ 수욕조에서 2시간씩 3회 반복 추출하여 얻은 추출액을 여과지(whatman No. 41)로 여과한 후 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 회수하였다 이 상정액을 농축하여 증류수로 용해한 다음 분액여두에 옮겨서 diethylether로 탈지시킨 다음 남은 수층 에 수포화탄을 50 mL 씩 3회 반복추출이행 하여 회수, 농축한 것을 조사포닌으로 계산하였다(22).

우슬뿌리 추출물의 용매분획

우슬뿌리는 세척, 건조한 후 분쇄기를 이용하여 분쇄한 뒤 사용하였다. 시료를 메탄올:물(4:1, v/v)의 비율의 용매로 추출한 후 Fig. 1과 같이 용매별로 순차적으로 추출 분획하였다. 얻어진 각각의 추출물들을 감압 농축한 다음 각각의 추출수율(%)을 계산하였다.

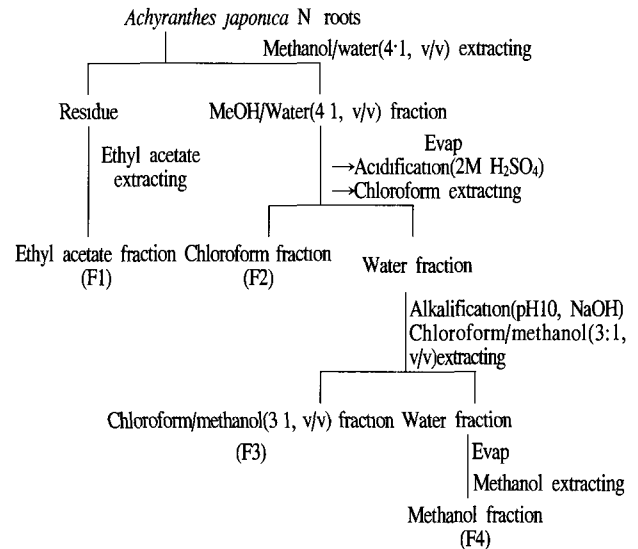


Fig. 1. Isolation and fractionation of *Achyranthes japonica* N. roots.

Cathepsin B 저해물질의 활성도 측정

Cathepsin B 저해물질의 활성도 측정은 Han 등(19)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 분광광도계의 1 mL cuvette내에 25 mM sodium acetate buffer(pH 5.2)에 1 mM EDTA를 녹인 incubation buffer 0.8 mL를 넣고 기질 N α-CBZ-L-lysine p-nitrophenyl ester HCl(CLN) 5.22 mM을 dimethylsulfoxide에 녹여 사용하였고 N α-benzoyl-DL-arginine-β-naphthylamide(BANA)는 171 mM농도를 n,n-dimethylformamide에 녹여 각 50 μL를 녹여 반응시켰으며 저해물질 용액은 100 μL를 취하여 반응시켰다. CLN 기질의 경우 326 nm에서 BANA 기질의 경우 340 nm에서 25℃에 각 반응시간에 따라 반응시킨 후 저해활성의 기울기 값(V0)을 이용하여 저해활성도를 측정하였다(23). 즉 저해물질이 첨가되지 않은 기질과 효소의 반응을 A, 기질과 효소 그리고 저해물질을 첨가한 반응을 B, 효소가 첨가되지 않은 기질과 저해물질의 반응을 C라고 할 때 저해활성도를 다음 식으로 계산하였다. 이때 쇄무릎추출물의 cathepsin B의 저해활성도를 비교검토하기 위하여 cathepsin B 저해제로 알려진 leupeptin(16)의 일정량을 반응시켜 저해활성을 비교 분석하였다.

$$\text{저해활성}(\%) = (B - C / A - C) \times 100$$

Thin-layer chromatography와 High performance liquid chromatography

Cathepsin B 저해활성이 있는 분획이 우슬뿌리에 많이 함유되어있는 성분인 20-hydroxy ecdysone 물질인지를 확인하기 위하여 Son 등(24) 및 Kim(25)의 방법에 준하여 각 용매로 추출 분획한 추출물을 가지고 silica gel 60F254 TLC plate(20×20 cm, Merck Art. 5642)상에 점적한 후 물질을 확인하였다. 이때 20-hydroxy ecdysone을 전개시킨 용매로는 ethanol/ethylacetate(1:5, v/v)를 사용하였으며 UV 254 nm에서 확인하였다.

TLC에서 band가 확인된 F4분획을 HPLC를 이용하여 다시 우슬뿌리의 지표물질인 20-hydroxy ecdysone의 여부를 재확인 하였다. 이때 사용된 HPLC는 Waters 510(USA) 기기를 이용하였으며 그 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Operating conditions of preparative HPLC for analysis of 20-hydroxy ecdysone in *Achyranthes japonica* N. roots

Instrument	HPLC Waters 510
Mobile phase solvent	CH ₃ CN/H ₂ O (18:82, v/v)
Column	Novapak C ₁₈ (3.9×300 mm)
Detector	UV 254 nm
Flow rate	0.75 mL/min,
Injection	10 µL

결과 및 고찰

우슬뿌리의 일반성분 및 무기질함량

우슬뿌리의 일반성분을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 세척 건조한 우슬뿌리의 회분 함량은 7.63%이었으며 조단백질은 9.84%, 조지방은 1.32% 그리고 총당함량은 20.65%이었다. 또한 조사포닌 함량은 31.52%이었다.

Table 2. Proximate composition of *Achyranthes japonica* N. roots (%, dry basis)

Ash	Crude protein	Crude lipid	Total carbohydrate	Crude saponin
7.63	9.84	1.32	20.65	31.52

우슬뿌리의 무기질 함량은 Table 3과 같았다. 무기질 중 다량원소로는 칼륨이 주이었으며 칼슘, 마그네슘, 인 순이었고 미량원소로는 알루미늄, 철, 나트륨 및 붕소 순으로 함유하고 있었다. 이는 Kim(25)이 보고한 바에 의하면 사양토보다는 양토에서, 무피복 재배보다는 흑색비닐 피복재배에서, 수확시기가 빠른 것보다 12월 중순정도로 늦어질수록, 재배 연수가 1년보다는 2년 재배 시 무기질 함량이 더 높게 나타났다고 보고하였다. 이에 본 실험에서 사용한 우슬의 무기질 함량과는 다소 차이가 있었는데 이러한 재배조건에 따라 다소 차이가 있는 것을 알 수 있었으며 무기질

Table 3. Inorganic contents of *Achyranthes japonica* N. roots (mg %, dry basis)

Macro elements				Minor elements				
K	Ca	Mg	P	Al	B	Fe	Mn	Na
3467	399.4	720.4	161.1	80.18	27.41	68.04	12.42	51.31

함량분포는 거의 비슷한 함량을 보여주었다.

우슬뿌리의 추출용매분획별 수율

충남 부여군 초촌면 일대에서 재배 수확한 우슬 뿌리를 세척 건조한 후 분쇄하여 30 g을 환류냉각기를 부착시킨 플라스크에 넣은 후 시료 중량의 20배의 methanol/water (4:1, v/v)용매로 추출하여 Fig. 1과 같은 방법으로 추출 분획하여 얻은 용매별 추출물을 감압 농축하여 얻은 추출수율은 Table 4와 같았다.

Table 4. Extraction yield of *Achyranthes japonica* N. roots by fractionation (% yield)

Fraction ¹⁾	F1	F2	F3	F4
Yield	0.27	0.31	2.97	8.27

¹⁾F1 Ethyl acetate fraction, F2 Chloroform fraction, F3 Chloroform/methanol(3:1, v/v) fraction, F4 Methanol fraction

우슬 뿌리 methanol/water(4:1, v/v) 추출물을 각 용매를 이용하여 순차적으로 분획한 후 수율을 측정한 결과 마지막 단계인 methanol 분획에서 수율이 8.27%로 가장 높았으며 다음으로chloroform/methanol(3:1, v/v) 분획에서 2.97%로 수율이 높았다.

분획별 추출물의 Cathepsin B 에 대한 저해활성도 측정

각각 용매로 추출한 분획별 추출물을 0.1 %의 비율로 buffer에 용해한 후 cathepsin B에 대한 저해 활성도를 측정한 결과 Fig. 2와 같다. F4인 methanol 분획에서 cathepsin B에 대한 저해활성이 가장 높게 나타났으며 다음으로 F1인 ethyl acetate 분획, F3인 chloroform/methanol(3:1, v/v)분획에서 cathepsin B에 대한 저해활성이 나타났는데 chloroform 분획에서는 오히려 cathepsin B에 대한 저해활성보다는 촉진효과가 나타났다. 이는 분획물 자체가 정제된 단일물질이 아니어서 그 분획물 내에 cathepsin B에 대한 활성을 억제 및 촉진하는 인자가 존재하고 있는 것으로 생각되며 이는 앞으로 더 연구해볼 필요가 있다고 생각된다.

Thin-layer chromatography와 High performance liquid chromatography

우슬에 많이 들어있는 지표물질인 20-hydroxy ecdysone

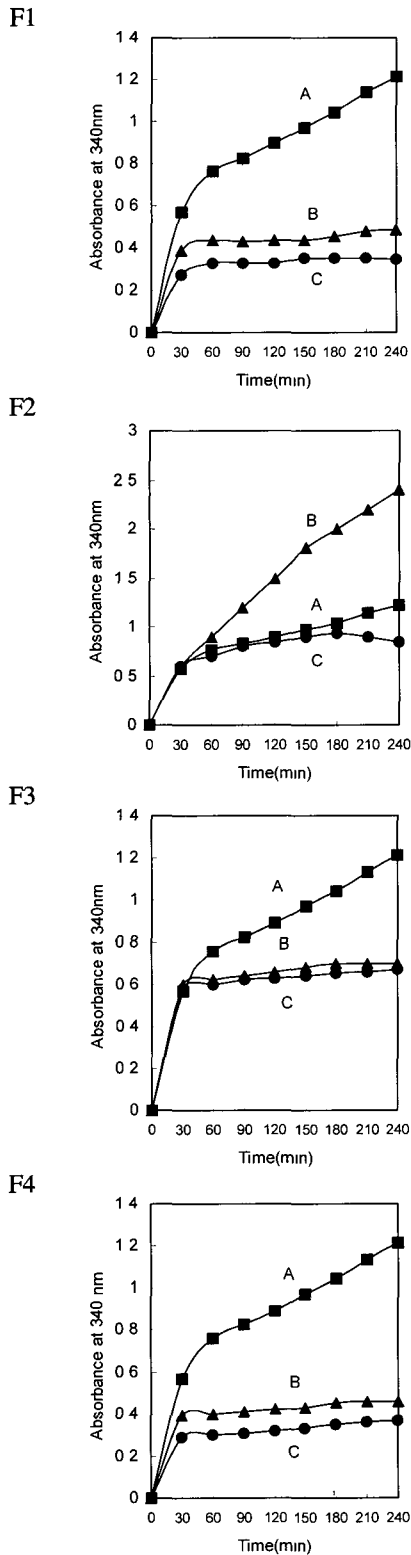


Fig. 2. Effects of extracts of *Achyranthes japonica* N. roots by fractionation on cathepsin B using a substrate, N α-benzoyl-DL-arginine β-naphthylamide(BANA).

A(■), the absence of extracts, B(▲), the presence of extracts; C(●), the absence of cathepsin B
 F1 . Ethyl acetate fraction, F2 Chloroform fraction, F3 Chloroform/methanol(3 1, v/v) fraction, F4 Methanol fraction

(24, 25)이 어느 분획에서 많이 검출되는지를 확인하기 위하여 순차별로 얻어진 각 분획을 TLC plate에 전개시킨 결과 Fig. 3과 같다. 전개용매를 ethanol/ethyl acetate(1:5, v/v)를 사용하여 20-hydroxy ecdysone만을 전개시킨 결과 UV 254 nm에서 Rf 0.44에서 표준물질과 같은 band가 F4 분획에서 뚜렷하게 확인되었으며 F3 분획에서도 미비하게 나타나는 것이 확인되었다.

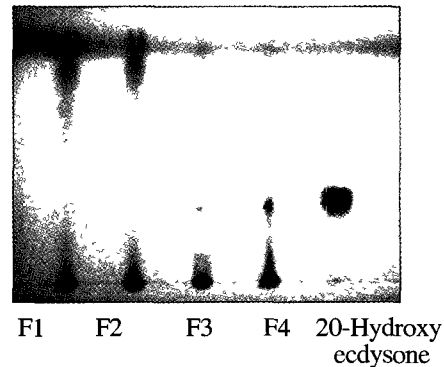


Fig. 3. TLC chromatogram of extract of *Achyranthes japonica* N. roots by fractionation.

F1, F2, F3 and F4 are the same as in Fig. 2

TLC에서 우슬의 지표물질이 다량 함유된 fraction 4를 HPLC로 분석한 결과 Fig. 4와 같이 RT가 19.65에서 20-hydroxy ecdysone의 peak와 같은 peak를 확인할 수 있었으며 우슬에 함유되어 있는 20-hydroxy ecdysone함량이 약 0.33%정도이었다. 이는 Son 등(24)이 우슬이 약재로서 지표물질을 0.07%이상 함유하고 있어야 한다고 보고한 것에 비하면 상당히 높은 량을 보였다. 또한 Kim(25)이 재배 방법 별, 재배 년수별 및 수확시기별에 따라 그 함량이 차이가 있다는 것을 보고한 것에 의하면 우슬에서의 주요성분의 함량은 재배조건에 따라서 그 함량이 큰 차이를 보이고 있음을 알 수 있었으며 본 실험에 사용된 우슬은 지표물질의 함량이 상당히 높았음을 알 수 있었다.

20-hydroxy ecdysone의 Cathepsin B 에 대한 저해활성도 측정

우슬의 지표물질인 20-hydroxy ecdysone의 cathepsin B 에 대한 저해활성을 나타내는지를 확인하기 위하여 BANA 와 CLN을 기질로 하여 cathepsin B 에 대한 저해활성을 측정하였으며 이를 F4추출물과 cathepsin B저해물질인 leupeptin과 함께 그 활성을 비교한 결과 Fig. 5와 같다. 20-hydroxy ecdysone, leupeptin 및 우슬 추출분획인 F4 모두가 기질을 BANA로 사용하였을 경우 cathepsin B 에 대한 저해력이 80%이상을 보였지만 CLN을 기질로 하였을 경우는 낮은 저해력을 보였다. 기질이 BANA일 경우 leupeptin은 92%, 20-hydroxy ecdysone은 88% 그리고 우슬 추출분획 F4에서는 97%가 나타났으며 기질이 CLN일 경우는 leupeptin

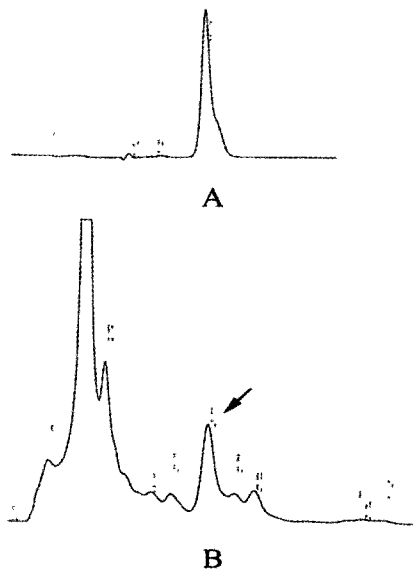


Fig. 4. HPLC chromatogram of extract of *Achyranthes japonica* N. roots by fractionation.

A 20-Hydroxy ecdysone, B Fraction 4 of *Achyranthes japonica* N root extract.

은 62%, 20-hydroxy ecdysone은 36% 그리고 우슬 추출분획 F4에서는 67%가 나타났다. 이는 Bajkowski 등(23)의 보고에 의하면 cathepsin B는 BANA보다 CLN인 기질에서 더 높은 활성을 보여주는 것은 BANA기질은 ester결합을 하고 있고 CLN기질은 amide결합을 하고 있어 그 결합 차이에 따른 것으로 보고하고 있는 것으로 보아 cathepsin B의 저해 활성을 촉진 또는 상승시킬 수 있는 인자가 부수적으로 관여할 수 있음을 시사하고 있다고 사료된다.

이상의 결과로 볼 때 우슬의 지표물질인 20-hydroxy ecdysone은 cathepsin B에 대한 저해력을 어느 정도 가지긴 하지만 F1분획과 같은 농도의 20-hydroxy ecdysone를 함유한 우슬 추출분획인 F4에서 cathepsin B에 대한 저해력이 더 높은 것을 볼 때 우슬 뿌리 추출물이 cathepsin B에 대한 저해활성이 높아 예로부터 관절염 예방 및 치료에 우슬을 한약재로 사용하였을 경우 효과가 있었을 것으로 생각되며 또한 이 우슬 지표물질이 관절염 예방의 주된 원인 물질이 아니고 또 다른 물질이 관여함을 알 수 있었다. 이에 현재까지 보고된 것들 중 cathepsin B에 대한 저해력이 높은 물질들을 미생물 배양 시 생산되는 물질로부터 분리한 연구들(13, 16, 17, 19, 24)과 난백으로부터 저해물질로 분리 보고한 cystatin 등(15)의 구조 분석 결과를 살펴본바 대부분이 질소를 함유한 염기성유기화합물인 알칼로이드류 물질로 나타난 것으로 미루어 보아 본 실험에서 용매별 순차 분획한 분획 중 F4 분획물이 알칼로이드 물질 분리 분획인 것으로 볼 때 20-hydroxy ecdysone이외에 질소를 함유한 알칼로이드 물질이 관여할 것으로 생각되어 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

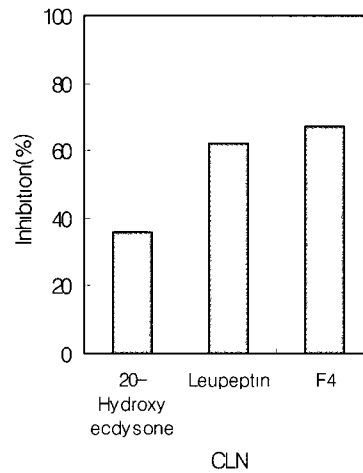
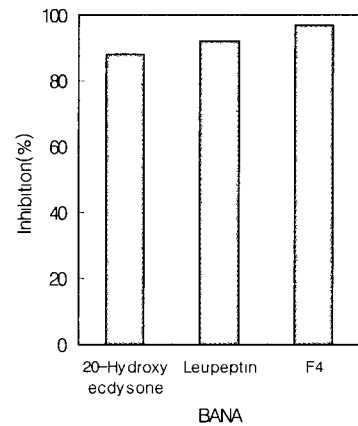


Fig. 5. Inhibition of hydrolysis between cathepsin B and N α -CBZ-L-lysine p-nitrophenyl ester HCl(CLN), N α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide(BANA) substrates on 20-hydroxy ecdysone, leupeptin and fraction 4 of *Achyranthes japonica* N. root extract.

20-hydroxy ecdysone and leupeptin of 10 mg/mL were used, F4 was used at the same concentration of 20-hydroxy ecdysone
F4 was the same as in Fig 2

요 약

우슬이 민간요법으로 관절염 치료에 우수한 한약재로 알려진 바 우슬 추출물이 cathepsin B에 대한 저해력을 검토하기 위하여 각종 용매로 우슬 추출물을 순차 분획하고 분획 추출물에 대하여 cathepsin B에 대한 저해활성을 검토하였으며 우슬의 지표물질인 20-hydroxy ecdysone이 추출 분획에 검출되는지 TLC 및 HPLC를 이용하여 분석하였으며 우슬의 지표물질이 cathepsin B에 대한 저해활성여부를 확인한바 다음과 같은 결과를 얻었다. 우슬 뿌리에 대해 methanol/water(4:1, v/v) 추출물을 ethyl acetate, chloroform, chloroform/methanol(3.1, v/v), methanol의 각 용매로 분획한 결과, 분획 F4(methanol 분획)에서 우슬이 가장 높아

8.27%를 나타내었다. 각 분획별에 따라 cathepsin B에 대한 저해활성을 측정된 결과 F4분획물에서 가장 저해활성이 높았으며 F1분획에서도 높은 저해활성을 나타내었다. F4분획물 중 우슬의 지표물질인 20-hydroxy ecdysone이 검출되었으며 우슬에 함유되어있는 함량은 0.33%이었다. 20-hydroxy ecdysone에 대하여 cathepsin B저해활성을 보기 위하여 cathepsin B저해활성제로 알려진 leupeptin과 활성을 비교해본 결과 기질을 BANA로 사용하였을 경우 leupeptin은 저해율이 92%인데 비하여 20-hydroxy ecdysone은 88%이었으며 F4분획물은 97%를 나타내었고 기질을 CLN으로 사용하였을 경우 leupeptin은 저해율이 62%인데 비하여 20-hydroxy ecdysone은 36%이었으며 F4추출물은 67%를 나타내었다.

참고문헌

1. 육창수 (1990) 원색한국약용식물도감. 아카데미서적. p.175
2. Hahn, D.R. and Lee, M.W. (1991) Studies on the constituents of *Achranthis Radix*(I) oleanolic acid bisdesmoside from the roots. *Yakhak Hoeji*, 35, 457-460
3. Ogawa, S.N., Nishimoto, N. Okamoto and Takemoto, T. (1971) Studies on the constituents of *Achyranthis Radix*(VIII). The insect-moulting substances in *Achyranthis* genus. *Yakugaku Zasshi*, 91, 916-920
4. Sun, S.P., Li, K.H. and Sun, S.S. (1985) Pharmacological studies on *Achyranthis bidentata*. *Hanan Trad Chin. Med.*, 47, 39-40
5. 이승택, 채영압 (1996) 약용작물재배. 향문사. 서울, p.159-1625
6. 박인현, 이상래, 이상득, 송원섭 (1993) 약용식물재배. 선진문화사 서울, p.281-283
7. Entou, Y.M. (1997) 牛膝 および 牛膝 關聯 植物の 成分 研究. 昭和大碩士論文, p.1-44
8. De Duve, C. (1969) In "Lyosomes in Biology and Pathology" J. T. Dingle and H. B. Fell, eds, North-Holland Publ., Amsterdam. 1, p.3-42
9. Ebert, W., Knoch, H., Werle, B., TRefz, G., Muley, T. and Spiess, E. (1994) Prognostic value of increased lung tumor tissue cathepsin B. *Anticancer Res.*, 14, 895-900
10. Lemny, J.F. (1980) Inhibitors associated with the proteinases of mammalian cells and tissues. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 17, 25-57
11. Sloane B.F., Moin, K., Krepela, E. and Rozhin, J. (1990) Cathepsin B and its endogenous inhibitors:role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev.*, 9, 333-352
12. Duffy, M. J. (1996) Protease as Prognostic markers in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2, 613-618
13. Han, K.H. and Kim. S.D.(1997) Selection and identification of a strain KT-10 producing the cathepsin B inhibitor. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 333-340
14. Barret, A.J., Davies, M.E. and Grubb, A. (1984) The place of human gamma-trace(cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem. Biophysical Res. Commun.*, 120, 631-636
15. Engh, R.A., Dieckmann, W.T., Bode, E., Auerswald, A.V., Huber, R. Turk. and Oschkinat, H. (1993) Conformational variability of chicken cystatin. Comparison of structures determined by X-ray diffraction and NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 234, 1060-1069
16. Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, T., Kawamura, K., Kondo, S., Hamada, M., Maeda, K. and Umezawa, H. (1969) Leupeptins, new protease inhibitor isolated from *Actinomycetes*. *J. Antibiot*, 22, 283-286
17. Suda, H., Aoyagi, T, Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1972) Antipain, new protease inhibitor isolated from *Actinomycetes*. *J. Antibiot.*, 25, 263-266
18. Sreedharan, S.K., Verma, C.L., Caves, S.D. and Brocklehurst, S.M. (1966) Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane(E-64) is one of the most effective low inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64- β -trypsin complex. *J. Biochem.*, 316, 777-786
19. Han, K.H. and Kim. S.D. (2001) Isolation and characterization of cathepsin B inhibitor produced by *Streptomyces leuteognseus* KT-10. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 84-89
20. A.O.A.C. (1995) Official Method of Analysis(16th Edition) Association of Official Analytical Chemist, Washington, D.C.
21. Perkin-Elmer Corporation. (1968) Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy, Perkin-Elmer Corp. Norwalk, Comm.
22. 김찬호, 김만욱, 최강주, 손현주, 고성룡, 김석창, 위재준, 허정남 (1991) 인삼성분분석법. 한국인삼연구회, 13-18
23. Bajkowski, A.S. and Frankfater, A. (1975) Specific spectrophotometric assays for cathepsin B *Anal. Biochem.*, 68, 119-127
24. Son, K.H., Hwang, J.H., Lee, S.H., Park, J.H., Kang, S.J., Chang, S.Y. and Lee, K.S. (1999) Isolation and Quantitative determination of 20-Hydroxyecdysone from

Achyranthes radix. Korean J. Pharmacogn., 30, 335-339
25. Kim, M.S. (2003) A study on optimal cultivation conditions

of medicinal components in *Native Achyranthes japonica*
N. Ph. D. Thesis. Chonnam National University, p.21-24

(접수 2005년 3월 21일, 채택 2005년 5월 20일)