

최 종  
연구보고서

국내 자생 백화사설초를 이용한 복합 기능성 신소재  
개발에 관한 연구

Development of new functional materials of mixture by  
Korean *Oldenlandia diffusa*

연구기관

경희대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 자생 백화사설초를 이용한 복합 기능성 신소재 개발에 관한 연구”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11월 10 일

주관연구기관명 : 경희대학교

총괄연구책임자 : 김 성 훈

세부연구책임자 : 백 남 인

연 구 원 : 이 효 정

연 구 원 : 이 재 호

연 구 원 : 김 관 현

연 구 원 : 이 은 옥

연 구 원 : 김 하 나

협동연구기관명 : RNL 생명과학

협동연구책임자 : 라 정 찬

# 요 약 문

## I. 제 목

국내 자생 백화사설초를 이용한 복합기능성 신소재 개발 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근에 국내에서 추진되고 있는 한약재를 이용한 기능성식품의 개발은 최첨단의 생명공학기술을 이용하여 부가가치의 창출과 그 기능성을 극대화하려는 방향으로 진행되고 있다. 기능성식품의 사업화는 일부 대기업을 중심으로 기존의 식품산업에 첨단 생명공학기술을 접목하려는 시도가 부분적으로 이뤄지고 있으며, 또한 식품첨가물이나 식품신소재 등의 분야를 중심으로 최선의 생명공학 기술을 접목시켜 기능성식품을 개발하려는 기업이 증가하고 있다. 백화사설초가 포함된 복합제인 Bio-Q의 기능성 가공식품인 복합신소재를 개발하여 식품, 의약산업, 농업분야에 기여하고자 한다.

### 1. 국내산 백화사설초가 중국산보다 민간약효능이 우수하다라는 입증할수 있는 과학적 연구의

#### 필요성

백화사설초는 대부분 중국에서 수입되고 있어, 국산 농작물의 보호와 신기능성 작물개발을 통해 경쟁력 확보가 필요하다. 국내에서도 제주도와 남부지방에서 자생하거나 재배하고 있으며 국산 백화사설초가 임상과 민간요법에서는 보다 효과적이라는 보고가 있다. 그러나 이것을 입증할만한 과학적인 결과의 부족하다

### 2. 백화사설초가 포함된 복합제의 효능연구

백화사설초가 포함된 복합제가 림과구의 증식을 촉진한다는 연구가 발표되었으며, <항암본초도보>에서도 백화사설초 다당체와 다른 복합제가 대식세포 탐식능을 증가시켰다고 보고한 바 있지만 이에 대한 구체적 연구는 미흡한 실정이다. 이런 백화사설초 복합제의 효능을 보기위하여 Bio-Q라 명명하여 연구를 통해 강력한 복합신소재를 개발하고자 함이다

### 3. 국내산 백화사설초의 우수성의 입증으로 국내 재배농가의 소득증대에 영향을 주기 위하여

최근 값싼 중국산 약재의 반입으로 인하여 국내 약용식물 농가의 재정적 어려움과 더불어 각종 중금속 및 농약으로 오염된 중국산 약재는 국민건강을 크게 위협하고 있어 국내산 약재의 개발과 보전이 시급한 상황이다. 그러므로 국산 백화사설초의 우수성의 입증은 국내 재배농가의 소득증대에 큰 영향을 미칠 것으로 사료되며, 국산 한약재의 경쟁력을 키우기 위해 현재 한의학계에서 수 년동안 사용되어온 백화사설초를 식품안전청에서 건강 식품으로 분류될 경우 이의 활용도는 높고 수입억제, 국산 백화사설초의 재배 증대에 따른 국내재배농가의 소득 증대로 이어질 것이다.

### 4. 백화사설초가 식품안전청의 허가를 얻지 못한점

현재 민간에서 백화사설초가 다양하게 사용되고 있지만 국내에서는 백화사설초가 식품안전청에서 허가하는 식용 한약으로 분류되지 않아 건강보조식품으로 활용될 수 없으며, 이미 국내에서 백화사설초를 이용한 제품을 만들어 판 경우가 있었으나 식품안전청의 허가품목이 아니며 제품이 수거되었다고 한다. 따라서 안전성을 밝혀 식품안전청의 식품허가 획득하는 것이 중요하다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 제 1 세부과제명 : 국내산 백화사설초의 면역조절 작용

백화사설초에 대한 연구문헌을 분석하면 백화사설초는 항염증 작용이 있으며 대식세포 탐식능과 nitric oxide (NO)의 생성을 촉진시키는 작용이 있고 세포성 면역과 상관된다는 보고가 있다. 이를 바탕으로 국내산 백화사설초가 중국산 보다 우수한 생리기능을 찾고, 이를 소재로한 백화사설초 복합제인 Bio-Q(생리적 활동의 질을 좋게하는 복합제)를 선정하여 면역조절 작용을 평가하고 그 작용기전을 연구하여 결국 기능성 신소재 개발을 목표로 한다.

#### 제 2 세부과제명: 국내산 백화사설초의 항암 효과에 관한 연구

백화사설초에 대한 문헌고찰에 의하면 백화사설초는 항암 작용이 있는 것으로 조사 되었음. 따라서 국내산과 중국산 백화사설초의 추출 수득율과 항암작용을 비교분석함. 백화사설초의 전초와 뿌리에 대한 항암 작용을 비교함과 동시에 국내산 백화사설초를 기본으로한 신소재 Bio-Q를 개발한다. 국내산 백화사설초로부터 항암활성을 나타내는 유효물질을 분리함. Bio-Q의 항암작용에 대한 기전연구를 수행한다.

#### 협동과제명 : 국내산 백화사설초를 이용한 식품 소재화 및 소재화 기반 연구

백화사설초를 식품 소재화 하기 위해서는 백화사설초의 원료 수급문제가 우선 해결되어야 한다. 백화사설초는 현재 국내에서 경작되어지기 보다는 중국에서 수입되어 지고 있는 실정이다. 따라서 국내 백화사설초를 이용하여 식품을 만들기 위해 우선 원료의 국산화가 우선시 되어져야 하기 때문에 경작 및 세포배양공학 방법을 통하여 원료 문제를 해결하고 유효성분을 비교하여 더 우수한 원료 공급을 받고자 한다. 그 후 백화사설초 식품 소재화를 위하여 식품 소재에 적합한 추출방법을 확립하고, 식품으로의 안전성 검증을 통하여 식품 소재로 가능하게 한 후 기능성 식품으로 제품화 하고자 한다.

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1 차 년	1. 국내산 백화사설초의 면역조절작용 평가  2. 국내산 백화사설초의 진초와 뿌리에 대한 면역조절작용 평가	국내산 백화사설초(진초 및 뿌리)를 이용하여, 1. FACS analysis에 의해 imunophenotype 평가(CD3, CD4, CD8, CD18, NK)  2. Th1, Th2의 cytokine 및 대식세포 활성화 측정  3. 기초면역기능에 대한 영향 평가를 통해 백화사설초 복합제제의 선정
	1. 국내산 백화사설의 항암활성 구명  2. 국내산 백화사설초의 진초와 뿌리에 대한 항암활성 구명	1. 메탄올과 같은 유기용매를 사용하여 국내산 및 중국산 백화사설초(진초 및 뿌리)를 추출하여 그 수득율을 비교분석  2. <i>In vitro</i> 항암 효과; 암 세포 성장 억제조사, 세포부착 실험, Molecular work(uPA, MMP2, MMP9, TOPO-1, TIMP).  3. <i>In vitro</i> angiogenesis assay; HUVEC cell proliferation, tube formation assay.
2 0 0 2 년	기능성물질의 기내 대량 생산을 위한 식물세포 유도 및 배양법 개발	1. 백화사설초 식물세포 유도 2. 유도된 식물세포 액체 배양 3. 진초와 식물세포의 유효성분 비교  4. 배양된 식물세포의 항암 및 면역조절 작용 평가

2차 년도 (2003년)	국내산 백화사설초를 중심으로한 면역조절성 신소재 Bio-Q의 개발	국내산 백화사설초를 중심으로 한 Bio-Q를 이용하여 1. FACS analysis에 의해 imunophenotype 평가 - CD3, CD4, CD8, CD18, NK cell 2. Th1, Th2의 cytokine 및 대식세포 활성화 측정
	국내산 백화사설초를 중심으로한 항암성 신소재 Bio-Q의 개발	1. Bio-Q의 항암효과 측정 1). <i>In vitro</i> 항암 효과; 암 세포 성장 억제조사, 세포부착실험, Molecular work(uPA, MMP2, MMP9, TOPO-1,TIMP), 2) <i>In vivo</i> 암성장 억제, 3) <i>In vivo</i> 암전이 억제실험 4). <i>In vitro</i> angiogenesis assay; BCE cell proliferation 조사, tube formation 관찰, 5) <i>In vivo</i> CAM angiogenesis assay
	국내산 백화사설초의 안정성 평가와 식품 안정성 허가 취득	1. 식품화를 위한 안정성 평가 임상증상, 사료 섭취량 측정, 음수 섭취량 측정, 체중 측정, 뇨검사, 안과학적 검사, 혈액학적 및 혈청 생화학적 검사, 병리조직 검사 2. 식품공진 등재
3차 년도 (2004년)	1.국내산 백화사설초(전초 및 뿌리)로부터 면역활성을 나타내는 유효물질의 분리 2.Bio-Q의 면역활성 기전연구	1. Column chromatography법을 이용한 순수물질 분리 2. Bio-Q의 동물실험 및 면역조절 작용 기전 연구 - 체혈 및 혈청의 분리 - 비장의 분리 및 비장세포 부유액의 준비 - 지연성 과민반응 검사 - 적혈구 응집소가 및 용혈소가의 측정 - 비장세포수 측정 및 Rosette 형성세포의 측정 - Plaque forming cell(PFC) 측정 - Carbon clearance 측정
	1.국내산 백화사설초(전초 및 뿌리)로부터 항암활성을 나타내는 유효물질의 분리 2.Bio-Q의 항암작용 기전연구	1. Column chromatography법을 이용한 순수물질 분리 2. Bio-Q의 항암작용 기전 연구 Apoptosis와 관련된 기전연구: DNA laddering, <i>in vivo</i> tunnel assay, FACS분석, Cell cycle analysis, Caspase 및 PARP 발현 비교.
	Bio-Q의 가공식품 개발	1. Bio-Q 를 이용한 기능성 음료제품 개발 - 백화사설초 추출물의 적정 첨가 농도 결정시험 - 음료의 향미 및 영양성 강화시험 - 침전형성 억제를 위한 처리시험 - 포장형태 결정 및 적정 살균조건 검토 2.식품화를 위한 다양한 제형 설계

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발결과

#### 가. 국내산 백화사설초 전초 및 뿌리의 면역조절효과

국내산 전초 뿌리가 모두 T 림프구인 CD3, B림프구인 CD19, helper T cell인 CD4, Cytotoxic T 림프구인 CD8이 증가하는 것을 확인할수 있었다. 또한 마크로파지의 활성화 증가로 면역활성 조절 물질인 TNF-alpha 가 국내산 전초와 뿌리 모두 8시간에서 가장 높은 TNF-alpha activity를 보였으며, IL-6 국내산 전초와 뿌리는 400% 가까이 활성이 증가함을 확인할수 있었다. 이는 국내산 백화사설초의 전초와 뿌리 모두 외부침입에 의한 방어기작으로 면역반응을 조절하는 효능을 가짐을 시사하는 내용이며, 특히 백화사설초의 뿌리도 전초와 같이 유사한 효능을 보였다.

#### 나. 국내산 백화사설초 전초 및 뿌리의 항암효과

국내산 백화사설초 전초 및 뿌리의 메탄올 추출물은 HT1080 암주에 대하여 세포독성을 나타내지 않았으나, 암세포의 세부부착 저지 실험에서는 37 %까지 저해하였다. 또한 전이에 관련된 MMP2 와 uPA의 mRNA 수준을 감소 시켰다. bFGF로 유도된 혈관내피세포의 분화를 억제 하였다. 이상의 결과로 보아 국내산 백화사설초 전초 및 뿌리는 혈관형성 저해를 통해 전이를 차단하고 암의 성장을 조절함으로써 항암효과를 나타냄을 확인할수 있었다.

#### 다. 백화사설초의 반복투여독성 평가

백화사설초의 독성을 평가하기 위하여 랫드를 이용하여 90일간 반복투여 시험을 하였다. 임상증상, 체중변화 및 사료, 음수 섭취량, 혈액학적 및 생화학적 검사, 병리조직학적 검사를 통한 효과를 평가 하였다. 임상증상과 체중변화, 사료, 음수 섭취량, 안과학적, 뇨검사, 혈액학적 검사 결과는 전 기간동안 시험물질 투여에 의한 특이한 변화는 없었으며, 이것은 용량 상관 없이 독성이 낮은 것으로 사료된다. 생화학적 검사에서 간손상지표인 AST 및 ALT 검사에서 ALT 수치는 증가 하였으나, 상대적으로 AST 와 cholesterol의 수치가 감소함에 따라 간세포 보호효과를 가지고 있음을 확인 할수 있었다. 부검시의 육안적인 관찰에 있어서 용매 대조군과 시험물질 투여군 모두에서 외관상 어떠한 병변이나 이상은 확인되지 않았지만, 장기중량에서 대조군과 시험물질 투여군에서 중량의 변화는 있었으나, 그 변동폭이 적은 것으로 보아 독성학적 중요성은 낮은 것으로 사료 되었다. 그러나 비장의 경우 고용량과 중간용량군에서 대조군과 비교하여 증가하는 것으로 보아 이것은 면역 기능항진과 관련있는 것으로 추론 가능하였다. 조직 병리학적인 소견에서도 시험



물질로 인한 병변이 거의 관찰 되지 않은 것으로 보아 생화학적 검사의 지표 변화는 조직손상에 의한 것은 아님을 추측할 수 있었다. 따라서 백화사설초의 용량에 따른 평가를 하는데에는 다소 어려움이 있지만, 면역 증진 효과와 약리 작용에 따르는 변화 외에 조직병리학적 이상을 초래할만한 독성이나 부작용은 유발 되지 않을 것으로 여겨진다.

#### 라. 백화사설초가 복합된 Bio-Q의 면역조절 효과

Bio-Q의 면역활성을 실험적으로 평가하기 위하여, Balb/c 생쥐의 비장세포를 분리하여, 비장세포의 증식능 효과와 면역세포 유형에 따른 면역 효과, 비장세포에서의 cytokine 발현양상에 미치는 효과를 평가하였다. 비장세포의 증식능 실험에서 Bio-Q는 단독 Con A만 처리한 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 보여 주었지만, 정상군에 투여한 경우나 LPS를 처리한 투여군에서는 유의성 있는 변화가 없었다. 또한 이를 확인하기 위해 Bio-Q를 경구 투여하고 FACS를 이용한 면역유형 평가에서도, Bio-Q는 T림프구인 CD3, B 림프구인 CD19, helper T helper 림프구인 CD4, T cytotoxic 림프구인 CD8 및 NK cell 들을 모두 증가시켜 세포성 및 체액성면역에 관여함을 확인할 수 있었다. 사이토카인중 Con A로 활성화 시킨 INF- $\gamma$ 의 발현양상은 50 mg/kg과 100 mg/kg에서 유의성 있는 증가를 보였지만, TNF- $\alpha$ 의 발현에서는 유의적인 변화가 없었다. 이러한 결과를 종합하면 보익기혈하는 한약으로 구성된 Bio-Q는 면역조절을 통해 질병의 예방과 치료에 널리 활용 가능할 것으로 된다.

#### 마. 백화사설초가 복합된 Bio-Q의 항암 효과

본 실험에서 *in vitro*에서 사용할 A549 cell과 *in vivo*에서 사용할 LLC 의 두 폐암주를 가지고 24시간 Bio-Q를 농도별로 처리한 세포독성결과 A549와 LLC cell에서 모두 250  $\mu$ g/ml에서 1000  $\mu$ g/ml 모두에서 독성이 없는 것으로 나타났다. HUVEC 내피세포의 증식억제효과에서는 Bio-Q가 500  $\mu$ g/ml과 1000  $\mu$ g/ml에서 혈관내피세포 증식을 억제하였다. Bio-Q는 농도의존적으로 내피세포의 증식 억제를 나타내었으며, Bio-Q 500ug/ml에서부터는 10%, 1000ug/ml 농도에서 30% 증식 억제를 나타내었다. HUVEC 내피세포의 신생혈관 형성 억제효과에서 대조군에서는 4시간이 경과되면서 세포들이 분화하기 시작 하였으며, 5시간에는 tube를 형성하기 시작하였다. Bio-Q를 처리한 250, 500, 1000 ug/ml에서 모두 대조군에 비하여 농도의존적으로 혈관망 형성이 저조한 소견을 보였다. Bio-Q의 항암활성효과 중 항전이 실험으로 세포 외 기질 분해 효소인 uPA, MMP2, 그것의 억제인자인 TIMP2의 mRNA발현을 보았다. 세포외 기질 분해효소인 uPA는 500  $\mu$ g/ml에서부터 감소하여 1000  $\mu$ g/ml에서는 대조군에 비하여 감소한 것을 확인할수 있었으며, MMP2에서도 500  $\mu$ g/ml에서부터 발현이 감소함을 확인할 수 있었으나, TIMP2에는 변화가 없었다. CAM

assay를 통한 혈관형성 억제효과는 대조군에 비하여 5, 10 µg/egg 모두 억제하는 효과를 보였다. 대조군에서는 평균 13.3개의 혈관이 생성된 반면, 5 µg/egg에서는 6개의 혈관이 10 µg/egg에서는 4.66개의 혈관이 생겨 50% 이상의 혈관형성 억제효과를 보여 주었다. LLC 암세포의 성장 억제 실험에서는 대조군에 비하여 Bio-Q의 50 mg/kg 용량에서 26.6%의 억제 효과가 나타내어 전이억제 효과가 있음을 시사하고 있다.

## 2. 기대효과 및 활용방안

### 가. 기술적 측면

- 각종 생명공학 기법 확립(면역조절 및 항암효과)
- 식품가공법 확립(백화사설초 복합제 개발)
- 핵심기술의 개발형태는 음료, 식품 첨가제로 개발하고, 대체 주식의 형태도 고려한다.
- 연구결과 개발된 기술의 성과물에 대한 기호성은 본 (주)RNL sience에서 개발한다.
- 본 연구의 성과물은 식품이기에 기호성에 관한 제품의 개발은 (주)RNL sience에서 실시한다.
- 본 제품의 시판은 (주)RNL sience 및 LG의 유통망을 이용하여 상용화 한다.
- 본 기술의 개발과정에서 특허는 최소한 2편, 연구논문은 5여편 이상 기대한다.

### 나. 경제 · 산업적 측면

- 백화사설초의 수입 대체, 국산 재배 증대, 농민소득 증대
- 백화사설초 복합제의 다기능성 식품 개발
- 백화사설초의 다양한 질환 활용
- 식품안전청의 허가 취득 → 활용도 증대

### 다. 활용방안

- 국내산 백화사설초의 효능이 더 우수할 경우 더욱 활용도 높고 재배가 활성화 된다.
- 백화사설초 복합제의 다기능성(면역조절 및 항암효과 등) 식품으로 개발
- 백화사설초 유효물질을 식품첨가제로 활용
- 백화사설초 복합제와 첨가물의 시판은 (주)RNL sience 및 LG의 유통망을 이용하여 상용화 한다.

# SUMMARY

## **1. Immunodulatory Effect of Korean *Oldenlandiae* Herba and Radix**

Korean *Oldenlandiae* Herba and Radix enhanced T and B lymphocytes, macrophage and natural killer cells by flow cytometry. LPS-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were increased by Korean *Oldenlandiae* Herba and Radix compared with untreated control. These results suggest that Korean *Oldenlandiae* Herba and Radix have immunomodulatory activity through regulation of cell-mediated immune and humoral immune response.

## **2. Anti-tumor Effect of Korean *Oldenlandiae* Herba and Radix**

Korean *Oldenlandiae* Herba and Radix effectively showed antimetastatic activity through inhibition of the adhesion HT-1080 cells to gelatin, downregulated the expression of MMP2 and uPA. They also inhibited tube formation of HUVECs induced by bFGF. These results suggest that Korean *Oldenlandiae* Herba and Radix exert anticancer activity via antimetastatic and antiangiogenic activity.

## **3. Repeated-Dose Toxicity Study on *Oldenlandiae* Herba**

Repeated-dose toxicity of *Oldenlandiae* herba was investigated in rats. Sprague-Dawley rats were *ad libitum* administered with *Oldenlandiae* herba at dose of 0.001, 0.01 and 0.1 %(w/w) for 90 days. In the results, there were no significantly differences in the body weight gain between control and *Oldenlandiae* herba treatment groups. Also, no significantly changes in daily feed intake, water consumption and hematological analysis were observed throughout the experimental period. Interestingly, serum biochemical parameters including aspartate transaminase (AST) and cholesterol, related to hepatic injuries, decreased at high dose (0.1 %(w/w)) after 90 days treatment with *Oldenlandiae* herba, suggestive of protective effects against tissue damage. There are trends of increase in spleen weight, suggestive of inflammatory response or immune enhancement. However, no gross and histopathological lesions were seen at all doses. Taken all together, it is proposed that repeated treatment with *Oldenlandiae* herba, available of oriental clinics, may not exert considerable side effects, and that rather protect against tissue injuries and enhance immune function.

#### 4. Immunomodulatory Effect of Bio-Q

We attempted to prepare a new herbal prescription, so-called, Bio-Q, containing ten crude drugs/herbs. It contains a partially extracted mixture of ten different herbs: *Oldenlandia diffusa* (20 g), Red Ginseng extract (4 g), *Grifola umbellata* (4 g), *Poria cocos* Wolf (4 g), *Citrus Aurantium L. subsp. nobilis markino* (C. nobilis Loun.) (4 g), *Angelica acutilobae* (4g), *Dioscorea Batatas Decaisne* (4g), *Atractylodes japonica* (4g), *Agaricus blazei* Murill (10 g) and *Prunus mume extract* (2g). In the present study, immunomodulatory effect of Bio-Q was examined. After oral administration of Bio-Q for 7 days to Balb/c mice, splenocytes were isolated and immunological experiments were performed. Bio-Q significantly increased the proliferation of splenocytes exposed to concanavalin A (Con A), while it did not in case of lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Bio-Q also significantly increased CD3/CD19, CD4/CD8 and NK cells by flow cytometric analysis. In addition, Bio-Q significantly enhanced the level of INF- $\gamma$  in splenocytes, but not TNF- $\alpha$  by ELISA. These results strongly suggest that Bio-Q has immunomodulatory activity through the regulation of T cell mediated immune pathway.

#### 5. Anti-tumor Effect of Bio-Q

Bio-Q is a mixture of ten herbs with anti-angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and anti-tumor effects in Lewis lung carcinoma cells (LLC) bearing mice. Basic fibroblast growth factor (bFGF) is a potent angiogenic factor found in various tumors. In this study, we found that the Bio-Q decreased bFGF-induced endothelial cell proliferation and tube formation in a dose-dependent manner. The chicken chorioallantoic membrane assay revealed that addition of Bio-Q displayed an anti-angiogenic effect *in vivo*. Bio-Q inhibited tumor growth in LLC-bearing mice at a daily dose of 10 and 50 mg/kg. These results suggest that the Bio-Q inhibits the proliferation of endothelial cells induced by bFGF, which may explain its anti-angiogenic properties.

#### 6. Isolation of compounds from the *Oldenlandia diffusa*

*Oldenlandia diffusa* Roxb. (Rubiaceae) is a common medicinal plant endogenous to India and China. and has also been classified as *Hedyotis diffusa* Willd. The aerial parts of this plant have been used as a treatment for cancer, as well as inflammations such as appendicitis, urethritis and bronchitis, due to its antibacterial activity. The chemical constituents of O.

*diffusa* have been studied by a number of researchers. For example, iridoid glycosides including asperuloside, feretoside, asperulosidic acid, geniposidic acid and scandoside , as well as an anthraquinone, have been isolated from *O.* An iridoid glycoside, oldenlandoside III was isolated from the n-butanol fraction of methanol extracts of the aerial parts of *Oldenlandia diffusa* Roxb. along with six others previously characterized iridoid glycosides; geniposidic acid, scandoside, feretoside, 10-O-benzoylscandoside methyl ester, asperulosidic acid and deacetylasperulosidic acid.

# CONTENTS

Summery (in Korean) .....	1
Summery .....	9
Contents .....	12
Contents (in Korean) .....	13
Chapter 1. General Introduction .....	14
Chapter 2. Current Status of Technical Development .....	17
Chapter 3. Contents and Results of Research and Development .....	19
Materials and methods	
1st year .....	19
2nd year .....	29
3rd year .....	40
Results	
1st year .....	52
2nd year .....	73
3rd year .....	114
Chapter 4. Achievements and contribution of the studies to the related fields .....	134
Chapter 5. Plans for the application of the research .....	137
Chapter 6. Overseas of science and technology .....	138
Chapter 7. References .....	141

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	19
재료 및 방법	
1차 년도 .....	19
2차 년도 .....	29
3차 년도 .....	40
결 과	
1차 년도 .....	52
2차 년도 .....	73
3차 년도 .....	114
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	134
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	137
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	138
제 7 장 참고 문헌 .....	141

## 제 1 장 연구개발과제의 개요



### 백화사설초

백화사설초는 꼭두서니과(茜草科; Rubiaceae)에 속하는 1년생 초본인 쌍낙시돌풀 *Hedyotis lindleyana* var. *hirsuta* HARA(꼭두서니과) or *Oldenlandia diffusa* L. ROXB.의 전초로서 一年草로서 높이 20-40cm이고 밑부분이 옆으로 자라면서 가지가 갈라져서 비스듬히 서며 다세포로 된 백색털이 다소 있다. 잎은 대생하고 난형이며 길이 2-4cm, 나비 1-2cm 로서 끝이 뾰족하고 밑부분이 둥글고 좁다. 털이 없거나 적고 잎의 길이가 4 cm정도이며 꽃받침통이 없는 것을 민탐라풀이라고 한다.

백화사설초

### 백화사설초 서식지

산지는 습기가 많은 산기슭에 자라는데 중국에서는 복건, 광둥, 광서, 운남 및 양장강 남쪽지방에 주로 분포하며, 우리나라에서는 전남의 백운산, 제주도에 자생하고 있으며 김포, 부산에서 재배하고 있다.

### 백화사설초의 민간효능

백화사설초의 차가우나 독이없고 맛은 달고 쓰며, 작용하는 경락은 위경, 대장경, 소장경 등이고, 본초학적으로 淸熱解毒, 利水通淋, 活血化癥, 消癰의 효능이 있어 폐열기침, 편도선염, 인후염, 충수염, 이질, 황달, 자궁부속기염, 관절염 등의 각종 염증 및 소화기암, 간암, 폐암, 임파암 및 인후암 등 각종 암에 활용되고 있다.



## 백화사설초 식용 근거

1)성미와 독성;탕제 內服 1-2냥, 煑 搗汁, 外用 搗敷

<廣西中藥志> 微苦甘 性溫 無毒, <廣東中藥> 辛澁, 寒, 無毒

2)복용법에서 물로 진탕, 즙액을 복용하고 특히 대표적인 항암본초로 대부분의 처방에 37.5-75g 까지 활용되고 있다. 중약대사전, 항암본초도보, 식약본초, 중약약리여응용 등 수종 본초서에서 백화사설초는 이미 식품안전청에서 식품으로 허가해 주고 있는 다른 한약보다 사용가능한 용량이 많고 독성이 적은 것으로 나타나 있다.

## 백화사설초의 안전성

생쥐에 대한 복강주사 LD50이 104 g/kg로 독성이 없는 것으로 나타났다. 참고로 인삼에 대한 생쥐 LD50이 16.5 mg/kg인 것에 비해 독성이 거의 없는 것으로 보인다

## 연구개발의 필요성

1. 백화사설초는 대부분 중국에서 수입되고 있으며, WTO 체제에 대비하여 국산 농작물의 보호와 신기능성 작물개발을 통해 경쟁력 확보가 필요함.
2. 국내에서도 제주도와 남부지방에서 자생하거나 재배하고 있으며 국산 백화사설초가 임상과 민간요법에서 보다 효과적이라는 보고 있으나 과학적인 실험근거 부족.
3. 현재 민간에서 백화사설초가 다양하게 사용되고 있지만 국내에서는 백화사설초가 식품안전청에서 허가하는 식용 한약으로 분류되지 않아 건강보조식품으로 활용될 수 없음.
4. 이미 국내에서 백화사설초를 이용한 제품을 만들어 판 경우가 있었으나 식품안전청의 허가품목이 아니어서 제품이 수거되었다고 함. 또 제주도에서 제주도 특산품으로 판매하려는 움직임이 있음. 따라서 안전성을 밝혀 식품안전청의 허가를 득하는 것이 과제임. -식품안전청에서 정한, 90일 반복투여 독성과 유전독성 검사가 구비되면 식품허가를 받을 수 있음

5. 예비결과상 국산 백화사설초가 효능이 중국산 보다 우수하다고 하나 실험적으로 비교한 연구결과가 아직 없음.

6. 한방복합방이 항암효과가 있었는데 여기에는 백화사설초가 포함되어 있는데 이를 Bio-Q라고 명명하여 2차연구를 통해 보다 강력한 복합신소재를 개발하고자 함.

7. 백화사설초에는 다당체(Oldenlandoside 등)가 포함되어 있는데 이의 분리의 습득이 필요하고 Bio-Q라는 복합제를 가장 유효하게 효능을 확보하는 기법등의 습득이 필요한데 특히 PARC (pacific agri-food research center)에서 기능성식품의 제제방법 등에 대한 다양기법을 확보하고 있어 본 방문을 통해 i)기능성식품과 영양제약물 수치법(Functional Foods and Nutraceuticals processing method), ii)다당체, flavonoid의 추출, 분리, 동정 iii)방향성 물질의 분리, 구종 동정 iv) 유효물질과 대사산물의 bio-active-rich extracts의 분리와 생리활성 등에 대한 기법을 습득할 필요성이 있음.

**연구개발목표 및 내용**

**연구목표**

백화사설초와 그 복합제로부터 면역조절작용 및 항암작용을 구명하고 이를 이용한 식품소재 및 기능성 가공제품을 개발

**추진전략**

- 국내산 및 중국산 백화사설초의 면역 및 항암작용 비교
- 백화사설초로부터 유효물질을 분리, 기전연구
- 생리활성 스크링을 통해 기능성 효능을 가지는 복합제 (Bio-Q) 선정, 기능성 식품으로 개발
- 백화사설초 안전성 검사를 통해 식품안전성 식품허가 획득
- 복합제(Bio-Q)의 면역 및 항암효과 탐색-식품첨가물 및 드링크제로 개발

**추진사업**

국내산 백화사설초 성분의 식품첨가물 개발  
국내산 백화사설초 복합제의 기능성 식품소재화  
국내산 백화사설초의 신작물로 개발-농민경작증대-소득증대

실질적인 인체보건 향상, 국내농가의 소득증대 도모 및  
국내 농산물의 활용도 증대

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 암 연구 현황

백화사설초 전탕액을 이용한 항암 연구로는 *in vitro*에서 사람 백혈병과 간암 세포, *in vivo*에서 Walker-256, cervical carcinoma 14, sarcoma 180 및 간암 세포에 대한 항종양 효과가 보고 되었다. 백화사설초의 항암 효과로 세망내피계와 백혈구의 탐식능 촉진 효과와, 대식세포의 탐식능과 반응질소 중간물질의 형성능 촉진을, hepatic S-9에 의해 활성화된 benzo [a]pyrene (BaP)과 aflatoxin B1(AFB1)에 의한 mutagenesis, DNA 합성 및 대사 억제작용과 macrophage의 기능을 활성화시켜 *in vivo*에서 암세포의 성장을 억제함을 보고하였다. 또한 백화사설초의 핵산분획이 여러 가지 암세포에 대해서 세포독성이 있음을 관찰하였을뿐만 아니라 분리한 iridoid 계통의 물질인 asperuloside 혼합 투여시 핵산분획의 항암효과를 상승시킴을 관찰하였다. 백화사설초의 성분은 전초에서 ursolic acid, oleanolic acid,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-d-glucoside, p-coumaric acid 등이 밝혀졌고, Huang은 새로운 iridoids로서 oldenlandoside를 보고한 바 있다. 한편, 국산 백화사설초의 효능이 중국산 보다 우수하다고 하나 실험적으로 비교한 연구결과가 아직 없는 실정임. 백화사설초가 식품안전청의 허가를 얻지 못하여 활용이 쉽지 않다는 문제점과 국산 백화사설초가 농약등 환경호르몬을 처리 하지 않아서 토양조건에 따라 중국산보다 안전하고 유효하다는 민간보고와 국내산 백화사설초의 민간 효능을 입증할만한 과학적 연구의 필요성이 있고 나아가 복합 신소재 개발을 시도하고자 하며 RNL life science가 이에 관심을 가져 산학공동연구를 수행하였다. 최근 값싼 중국산 약재의 반입으로 인하여 국내 약용식물 농가의 재정적 어려움과 더불어 각종 중금속 및 농약으로 오염된 중국산 약재는 국민건강을 크게 위협하고 있어 국내산 약재의 개발과 보전이 시급한 상황임. 그러므로 국산 백화사설초의 우수성의 입증은 국내 재배농가의 소득증대에 큰 영향을 미칠 것으로 사료되었다.

### 면역조절 연구 현황

길경탕에 백화사설초를 가미한 가미길경탕의 면역효능을 비교하였는데 백화사설초를 가할 경우 더욱 효과적이라고 하였으며, 또한 백화사설초에서 분리된 oldenlandoside가 대식세포 탐식효과가

있다고 보고 하였으며, 백화사설초가 포함된 복합제가 림과구의 증식을 촉진했다고 하였으며, <항암본초도보>에서도 백화사설초 다당체가 대식세포 탐식능을 증가시켰다고 보고한 바가 있지만 이에 대한 구체적 연구는 미흡한 실정이다.

## 기능성 식품개발 현황

건강기능성 식품은 99년 현재 미국시장에서만 275억불을 점할 정도로 대규모 시장을 형성하고 있는데 이 것은 95년 91억불에서 4년간 300% 급 신장한 결과이다. 미국의 경우 제도적 지원에 따라 상업화된 기능성식품 소재 시장만 94년 78개 소재의 50억불에서 99년 900개 소재 150억불 규모로 급신장 하였다. 일본의 경우 건강식품 전체 시장규모는 47억불 규모이며 허가된 특정보건용 식품은 99년 현재 167개 품목에 달한다. 우리 나라의 경우 기능성 식품소재를 이용하는 건강보조식품 매출액은 최근 10년 사이에 200배 이상 비약적으로 신장하였고 1999년도의 매출액은 약 1조원에 달한다. 과학기술 예측조사보고(유럽의 LFRA/Trade Estimates사 및 미국의 Datamonitor America사 분석)에 의하면 기능성 식품시장은 향후 자동차 시장과 대등하게 성장할 것으로 예상되고 있다.

## 앞으로의 전망

국산 한약재의 경쟁력을 키우기 위해 현재 한의학계에서 수년동안 사용되어온 백화사설초를 식품 안전청에서 건강 식품으로 분류될 경우 이의 활용도는 높고 수입억제, 국산 백화사설초의 재배 증대, 관련 제품 개발이 활발해 질 것으로 사료되며, 미국의 경우 의료보험을 통해 연간 공식적으로 지불되는 전체 의료수가와 같은 수준으로 기능성 식품에 미국인들이 투자하는 것으로 미국의 FDA는 보고하고 있다. 따라서 미국FDA의 경우 기능성식품에 관한 연구에 엄청난 예산을 투입할 예정이다. 21세기는 암, 당뇨병, 환경오염에 의한 피해에 의한 난치병 및 성인병을 고치기 위해 대체 의학으로서 식품 등으로 부터 유효성분에 대한 연구가 전세계적으로 붐을 이루고 있는 실정이다. 따라서 본 연구를 통하여 기능성 식품에 대한 전세계적인 필요와 상품에 대한 시장은 과히 상상을 초월하는 수준일 것으로 예상된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구수행내용

#### 1. 1차년도

##### 가. 실험 재료

##### 1) 재료 및 추출

가) 재료:

백화사설초 국산 잎과 뿌리는 부산의 대도농산에서 공급받았으며, 중국산 백화사설초 잎은 대효제약으로부터 구입하였으며, 백화사설초 callus는 RNL에서 공급받아 미세분말하여 실험에 사용하였다.

나) 백화사설초 중국산, 국산, 국산 뿌리로부터 유기용매 추출

백화사설초 중국산(C), 국산(K), 국산 뿌리(KR) powder를 1 kg 무게 달아 상온에서 100 % MeOH 10 L에 담가 성분 추출하였으며, 0.22um pore filter paper로 여과하고 남은 여액에 다시 10 L의 MeOH를 이용, 3번의 추출을 하였다. 이를 rotary vaccum evaporatoe를 이용하여 감압 농축하였다. 이를 100 % DW에 녹여 fluid로 만든 후 separating funnel에 넣어 비극성 용매부터 극성 용매로의 유기용매 분획하였는데, n-Hx, EtOAc, MC, n-BuOH, residual로 나누어 역시 각각 감압 농축하였다

다) Thin layer chromatography

백화사설초 중국산(Ch), 국산(Ko), 국산 뿌리(KO-r)의 MeOH 추출물에 대한 구성 성분 비교를 위해 silica gel이 도포된 plate에 loading 후 mobile solvent로 CHCl<sub>3</sub> : MeOH 비율을 조절하여 TLC chamber에서 전개시켰으며, 이에 대한 UV 흡광도를 측정하였고, 10% 황산에 발색하였다.

## 2) 동물

동물은 체중이 20-25인 6주령의 수컷 Balb/C 생쥐를 대한실험동물센터로부터 공급받아 실험당일까지 고품사료(삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃, 습도 60±5%, 12시간의 밤, 낮 cycle을 유지하면서 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다

## 3) 시약 및 기기

추출 및 분획에 따른 유기용매 MeOH, n-BuOH(Buthanol), CHCl<sub>3</sub>(Chloroform), MC(methylene chloride), EtOAc(ethyl acetate), n-Hx(Hexane) 시약은 대정화학의 EP급 1급 용매를 사용하였고, 분리에 사용된 silica gel은 230-400 mech, thin layer chromatography(TLC)의 silica gel GF-254 precoated plates는 Merck 제품을 사용하였다. TLC의 UV absorption 확인을 위한 발색 10 % aq H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 역시 Merck.를 이용하였다.

기타 시약은 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), trypsin, EDTA, 5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), XTT, penicillin-streptomycin, antibiotics, gelatine, sodium bicarbonate, M199, heparine, ECGS(endothelial cell growth serum) 등은 Sigma 제품을 사용하였다. VEGF(vascular endothelial cell growth factor), bFGF(basic fibroblast growth factor)는 R&D에서 공급받아 실험하였다.

기기는 CO<sub>2</sub> incubator(vision scientific Co., Model VS-9108MS), clean bench((vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge(Beckman Co., GS-6R), inverted microscope(Nikon Co., Japan), ELISA-reader(Emax, U.S.A), rotary vaccum evaporatoe(Buchi 461), autoclave(Hirayama, Japan), micro-pipet(Gilson, U.S.A), culture flask(Falcon3024), multiwell plate(96 well., Falcon) 등을 사용하였다.

## 1. 1. 제 1 세부 과제명 : 국내산 백화사설초의 면역조절 작용

### 가. 검액의 투여

각각의 검액을 실험 시작에서부터 마지막날까지 1일 1회 경구투여하였다. 대조군에는 약물을 녹이는데 사용한 PBS buffer(pH 7.2)를, 실험군에는 국산 및 중국산 전초와 뿌리 투여군으로 나누어 10일간 경구투여하였다.

### 나. 항원 및 면역

항원으로 사용된 Sheep Red Blood Cell(SRBC)는 한국배지(Korea Media Co.)로부터 구입하여 사용하였다. SRBC는 PBS를 가하여 적적 수로 조정하거나 희석하여 사용하며, 4°C에서 보존하고, 보존 1주일 이내의 것만 사용하였다.

검액을 10일간 경구투여한 후 실험군과 대조군의 복강내에  $1 \times 10^9$  cells/ml의 농도로 조정된 면양 적혈구 부유액을 0.2ml 주사하여 면역시켰다. 4일 후에  $4 \times 10^9$  cells/ml로 조정된 면양적혈구 부유액 0.025 ml를 후측후지족척피내에 주사하여 2차면역시켰다.

### 다. 지연형 과민반응(Delayed Type Hypersensitivity)

지연형 과민반응의 측정은 Mitsuoka 등의 방법에 따라 1차 면역시킨 4일 후에  $4 \times 10^9$  cells/ml로 조정된 면양적혈구 부유액 0.025ml를 후측후지 족척피내에 주사하여 2차 면역 시켜 측정하였다. 주사직전, 주사후 24시간째에 족척부종검사(Footpad swelling reaction)를 시행하였다.

족척부종정도는 Mitutoyo engineer's micrometer(No. 2052-08, Mitutoyo, MFG. Co. Tokyo, Japan)를 사용하여 좌우측후지족척 두께를 0.01mm까지 측정하여 좌우족척 두께의 차이를 계산하였다. 종창증가의 정도는 다음 공식에 따라 %로 표시하였다.

$$\% \text{ increase, } = \{(T_{24} - T_0) / T_0\} \times 100$$

### 라. 채혈 및 혈청분리

지연형과민반응검사가 끝난 후 생쥐를 ether로 마취하여 1회용 주사기로 심장에서 약 1ml의

혈액을 채취한 후 5ml plastic tube(falcon, oxford, CA., U.S.A.)에 옮겨 1시간동안 실온에서 방치한 후 2,000rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 상층의 혈청을 ependorf tube에 옮긴다. 이 혈청을 56℃에서 30분동안 비동화(inactivation)시킨 후 적혈구용혈소가 및 적혈구응집소가의 측정에 사용하였다. 적혈구용혈소가 측정은 보체(complement)로 사용된 토끼 혈청을 sigma로부터 구입하여 비동화(inactivation) 하지 않은 상태로 사용하였다.

#### 마. 적혈구 응집소가의 측정 & 적혈구 용혈소가의 측정

면양적혈구에 대한 응집소가(hemagglutinin titer)를 측정하기 위하여 면역을 유발시킨 생쥐의 심장에서 채혈한 혈청을 분리하여 얻은 혈청을 56℃에서 30분동안 비동화시킨 다음, 96 well의 microtitration plate의 각 well에 PBS buffer(pH 7.2)로 2배로 serial dilution한 희석한 혈청 50ul에 2% 면양적혈구 부유액을 50ul씩 가하여 잘 혼합한 다음 37℃, 5%, CO<sub>2</sub> incubator내에서 1시간 방치한 후 적혈구응집정도를 관찰하였으며, 적혈구 응집을 일으키는 혈청의 최고희석배수를 응집소가로 측정하였다.

면양적혈구에 대한 용혈소가(hemolysin titer)를 측정하기 위하여 면역을 유발시킨 생쥐의 심장에서 채혈한 혈청을 분리하여 얻은 혈청을 56℃에서 30분동안 비동화시킨 다음, 96 well의 microtitration plate의 각 well에 PBS buffer(pH 7.2)로 2배로 serial dilution한 희석한 혈청 25ul에, 보체로써 5배 희석한 토끼의 혈청을 25ul씩 가한 후, 0.5% 면양적혈구 부유액을 50ul씩 가하여 잘 혼합한 다음 37℃, 5%, CO<sub>2</sub> incubator내에서 1시간 방치한 후 면양적혈구가 완전히 용혈을 일으키는 혈청의 최고희석배수를 용혈소가로 측정하였다.

#### 바. 비장세포현탁액 조제

2차면역후 24시간후에 동물을 치사시키고 비장을 적출하여 비장세포수가  $5 \times 10^7$  cells/ml이 되도록 세포수를 조정하였다.

#### 사. Rosette forming cell assay

spleen cell을  $3 \times 10^6$  cells/ml 로 PBS에 희석하고 면양의 SRBC 도 PBS로 2번 이상 세척하여  $3 \times 10^8$  cells/ml로 맞추어 놓았다. plastic tube에 각각 500 $\mu$ l 씩 섞고 혼합한 다음 800rpm에서 3분간 원심 분리한 다음 4℃에서 24시간 incubation 하였다. 0.3% methylene blue로 염색하고 hematocytometer에 넣고 spleen에 SRBC가 4 배 이상 binding 한 forming cell 만 count 하였다.



#### 아 . Plaque forming cell assay

spleen cell을  $5 \times 10^6$  cells/ml 로 PBS에 희석하고 SRBC는  $4 \times 10^9$  cells/ml 로 만들었다. guinea pig complement (Gibco)  $100 \mu\text{l}$  와 SRBC  $200 \mu\text{l}$ 를 혼합하여 ice에서 30분간 방치한 혼합액에 비장 부유액 1ml을 가하고 slide glass와 cover glass 사이에 이 혼합액  $200 \mu\text{l}$ 를 주입한 뒤  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 이상 incubation 한 후 생성된 plaque 수를 count 하였다.

#### 자. Carbon clearance

BALB/C 계 생쥐에 13일 동안 검액을 투여한 후 Thorbeck 등의 방법에 준하여 측정하였으며 ink  $100 \mu\text{l}$ 를 생쥐 RH리의 미정맥에 주사한 다음 retroorbital venous plexus 로부터 heparin 처리된 capillary로  $20 \mu\text{l}$ 씩 5분, 10분, 15분 동안 각각 채혈하여 0.1% sodium carbonate 2ml에 용혈시킨 다음 spectrophotometer를 사용하여 675nm에서의 흡광도를 재어 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Phagocytic index K} = \frac{\log C_1 - \log C_2}{T_2 - T_1}$$

(C: 해당 시간대의 흡광도, T: 시간)

#### 차. Proliferation assay

spleen cell을  $1 \times 10^7$  cells/ml 로 RPMI 배지에 희석한 다음 96well-plate에  $100 \mu\text{l}$ 씩 가하고  $100 \mu\text{g/ml}$ ,  $200 \mu\text{g/ml}$ ,  $400 \mu\text{g/ml}$  의 검액을 농도별로 RPMI 배지로 만들어  $100 \mu\text{l}$ 씩 spleen cell 이 들어있는 plate에 가했다. 48시간동안  $37^\circ\text{C}$  incubator에서 배양한 다음 XTT( $1 \text{mg/ml}$ ) 1ml에 PMS( $1.53 \text{mg/ml}$ )  $10 \mu\text{l}$ 를 가한 혼합액  $40 \mu\text{l}$ 를 가하고 2시간 정도  $37^\circ\text{C}$ 에 방치한다. microplate reader 기에서 450nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

#### 카. ELISA assay

ELISA 는 Becton Dickinson 사의 Mouse ELISA kit를 사용하였으며 manufacturer protocol에 의 해 실시하였다. 사용한 cytokine assay antibody의 종류는 IFN- $\gamma$ (cat# 550582), IL-6 (cat# 550950), TNF (cat# 551502) 였으며 microplate reader를 사용하여 450nm 파장에서의 흡광도를

측정하였다.

#### 타. Flow cytometric analysis

면역형광염색이 완료된 세포들을 마지막 세척 뒤 500ul의 완충액에 부유시켜 Becton Dikins사의 FACStar를 이용하여 분석하였다. 분석자료는 시료당 10,000개의 세포에 대하여 list mode로 취합하였으며 Consort 30 program을 이용해 처리하였다. 분석자료의 취합은 forward scatter(FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot상에서 적혈구와 죽은 세포가 밀집된 부분(FSC와 SSC값이 모두 작은 부분)을 제거한 나머지 세포들에 대해서만 gating하여 FSC, SSC, FL1, FL2의 4가지 parameter를 취하였다. 취합한 data의 SSC/FSC의 dot gplot상에서 전체세포(SSC:0-255, FSC:0-255) 및 임파구영역(FSC:41-62, SSC:4-99)과 마크로파지 영역(FSC:62-199, FSC:9-91)에 대해 gating하여 Ig, CD4, CD8의 분석은 전체 영역 및 임파구 영역, Mac-1(macrophage.granulocyte)은 전체영역 및 마크로파지 영역에서의 상대비율을 관찰하였다. 염색된 비율은 FL1을 parameter로 한 histogram상에서 marker를 설정하여 강하게 양성으로 나타난 부분의 %를 취하였다.

#### 파. Cytokine assay

IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 측정은 immunoassay kit를 사용하였다.

#### 하. TPA로 분화시킨 U937 cell line에서 백화사설초로 인한 inflammation에 관여 하는 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 발현측정

U937 세포주는 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건에서 배양하며 사용하였다. U937 cell의 배양시 TPA(Sigma, USA)를 20 ng/ml의 농도로 처리하여 48시간 배양한 후 세정하여 바닥에 붙은 세포들을 2일간 배양하였다. 4X10<sup>6</sup>/well 로 seeding 하여 TPA(20 ng/ml)와 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한다. 세포를 수거하여 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고, cDNA를 사용하여 PCR을 수행하였다.

## 1, 2. 제 2 세부 과제명: 국내산 백화사설초의 항암효과에 관한 연구

### 가. 세포배양

백화사설초의 *in vitro* 세포독성 cytotoxicity 측정에는 사람의 Fibro sarcoma HT1080 배양액은 l-glutamine이 포함된 RPMI 1640 배지에 56 °C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 FBS를 10 % 혼합하고, 1 % 항생제(antibiotics)와 NaHCO<sub>3</sub> 2 g을 첨가하여 제조하였다. 정상 혈관 내피 세포인 HUVEC은 삼성산부인과에서 공급받아 분리하여 primary culture한 것을 2세대 배양 후 사용하였으며, 0.1 % gelatine coating한 plates에서 media인 M199에 ECGS와 5 unit로 heparin, antibiotic fmf 첨가하여 배양하였다. 암 세포의 계대는 2-3일에 1회씩 하였으며, monolayer 암주를 부착면으로부터 분리하기 위하여 phosphate buffered saline 용액에 0,25 % trypsin과 EDTA를 녹인 용액을 사용하였다.

### 나. Cytotoxicity

백화사설초 국내산, 중국산, 국내산 뿌리를 MTT를 이용하여 세포 독성을 측정하였다. 종양세포로는 HT-1080 세포를 사용하였으며 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건에서 배양하며 사용하였다. *In vitro* 세포고성 효과를 조사하기 위하여 1×10<sup>4</sup> cells과 약제를 섞어 well당 100 μl씩 96 well plate에 분주하였다. 이를 24h 배양한 후 배양액을 모두 버리고 MTT(5 mg/ml) 10 μl씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 PBS로 세척한 후 DMSO 100 μl를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 ELISA 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 다. *In vitro* tumor cell adhesion assay

gelatin(0.1%)가 coating된 plate의 각 well에 HT1080 cell(1×10<sup>6</sup>/well)를 시료와 함께 처리한다음 37°C 배양기에서 대조군 cell이 붙을때 까지 배양한다. 세포를 phosphate-buffered solution(PBS)로 조심스럽게 세척하고 MTT법으로 well에 붙어있는 세포를 염색한후, 570nm의 흡광도에서 OD값을 측정하였다. 시료의 세포부착저지 활성은 대조군의 OD값과 비교하여 측정하였다.

## 라. Tube Formation

Schnaper et al (1993)방법에 의거하여 24well plate에 Matrigel(Bekton dickinson, U.S.A.) 200 $\mu$ l를 코팅하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation하여 Matrigel을 굳힌다. positive 대조군으로 M199 media에 5ng/ml의 bFGF를 첨가한 배지를 사용하였으며 이와 같은 배지에 백화사설초- K(한국산 전초), KR(한국산 뿌리), C(중국산 전초)를 섞어 각 well에 농도별로 첨가 한 후 HUVEC를  $4 \times 10^4$ cells/ml로 각각의 well에 균일하게 seeding한다. 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 6시간 동안 배양하고 형성된 tube network를 사진 촬영하여 대조군과 비교하였다.

## 마. RT-PCR analysis for uPA, MMP2 and TIMP2

HT1080 cell(human fibrosarcoma cells)을  $5 \times 10^5$ /well로 seeding하여 24시간 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C의 조건에서 배양하였다. 24시간 후 시료를 농도별로 처치하였으며 24시간 후에 세포를 수거하여 Trizol Reagent를 이용한 방법으로 RNA를 추출하였으며, RT-PCR analysis로 cDNA를 합성하고, cDNA를 가지고 uPA, MMP2, TIMP2 각각의 primer로 PCR을 수행하였다.

## 바. DNA Topoisomerase I assay

실험에 사용된 DNA topoisomerase I은 calf thymus에서 유래된 것이며, supercoiled pBR322 DNA는 E.coliC 600의 것을 사용하였다. 또한 DNA topoisomerase I의 IC<sub>50</sub>값을 결정하기 위해 relaxation assay를 실시하였으며 Topo I의 활성은 Liu와 Miller의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 35mM Tris-HCl(pH 8.0), 72mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM dithiothreitol(DTT), 5mM spermidine, 0.01% bovine album serum(BSA)를 함유하는 용액에 0.5 $\mu$ g pBR 322 supercoiled DNA와 효소만 가하여 총 반응액을 20 $\mu$ l가 되게한 것을 대조군으로 하고, 0.5 $\mu$ g pBR 322 DNA와 효소, 시료를 가하여 총 반응액을 20 $\mu$ l되게 한것을 시험군으로 하여 이들을 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 반응은 2% SDS(sodium dodecyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 반응 종결액 5 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 종결시키고 이를 TBE running buffer(50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)에 전기영동을 한 후 agarose gel을 0.5 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide용액에서 1시간동안 염색, 자외선하에서 사진을 찍었다.

## 사. S-180 암세포에 대한 생존비 측정

ICR 마우스의 복강내에 7일간 배양된 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 멸균된 냉생리식염수를 가하여 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포를 냉멸균 생리식염수에 부유시켜 다시 원심분리하여 상층액을 제거한후 혼재된 적혈구를 용혈시키고 sarcoma 180 세포만을 취하였다. 동일한 방법으로 3회 세척한 후 hemacytometer로 107cell/ml의 농도가 되도록 세포 부유액을 만들고 이 부유액을 0.1ml씩 복강내에 이식하였다. 이식 후 24시간부터 각 군당 7마리씩 배정하였다. 시료는 생리식염수로 용해시켜 보존용액(25mg/mouse, 50mg/mouse)을 만든 후 4℃에 보존하였으며 0.2ml씩 일주일간 연속 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수액을 투여하였다. 생존비(T/C%)는 미국립 암연구소 protocol에 언급된 식에 따라 계산하였다.

### 1, 3. 협동과제명 : 백화사설초를 이용한 식품 소재화 및 소재화 기반 연구

#### 가. 무균 조건하 발아

백화사설초의 종자를 70% 알코올에 1분간 살균 후, 멸균한 증류수로 세척하였다. 세척한 종자를 1% NaOCl에 15분간 멸균 후, 멸균한 증류수로 3회 세척하였고, 성장조절제가 없는 MS, SH, White 배지에서 발아시켰다.

#### 나. 캘러스 및 현탁세포 유도

무균 조건 하에서 발아된 백화사설초의 잎에 상처를 낸 다음, 2,4-D와 kinetin을 농도별로 첨가한 MS, SH 배지에서 캘러스를 유도하였다. 캘러스를 SH 배지에 넣고 25℃, 100 rpm, 암조건에서 배양하여 현탁세포를 유도하였다.

#### 다. Oleanolic acid의 추출 및 분석

건조량을 측정한 현탁세포를 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 추출에 사용하였다. 현탁세포 1.5 g에 70% ethanol을 10 mL 첨가하여 50℃ 항온수조에서 1시간 동안 추출하였으며, 상등액 5 mL를 취하여 ethanol을 증발시킨 뒤 chloroform을 2 mL 첨가한 후 섞어 주었다. 여기서 1 mL의 chloroform 층을 회수하여 농축시킨 후 다시 1 mL의 methanol에 녹여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. Oleanolic acid의 분석을 위해 Rexchrom S5-100-ODS column을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile과 water를 80:20으로 하였으며, 1.0 mL/min의 유속조건으로 200 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

## 2. 2차년도

### 가. 실험 재료

#### 1) 재료 및 Bio-Q 제조

##### 가) 재료:

백화사설초 국내산은 부산의 대도농산에서 공급받았으며, 중국산 백화사설는 대효제약으로부터 구입하였다.

##### 나) Bio-Q 제조

본 실험에서 사용한 약재 중 아가리쿠스는 부여 아가리쿠스 영농조합에서 구입하였으며, 매실농축액은 지리산 서재골 농원에서 구입, 홍삼농축액은 라이프트레컴에서 공급받았으며, 나머지약제는 대효제약에서 구입하였다. 추출 방법은 Bio-Q 60g에 증류수 1500ml을 넣어 2시간 열탕추출 하였으며, 열탕추출을 두 번 반복하여 실행하였다. 추출액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였고, 동결 건조하여 19.05g(yield: 31.75%) 의 분말을 얻어 검액으로 제조 하여 사용하였다. In vitro실험과 in vivo 실험시에는 증류수에 분말을 용해하여 사용하였다

Table 1. Prescription of Bio-Q

약재명	용량
백화사설초 (국내산)	20g
홍삼 엑기스(국내산)	4g
저령(중국산)	4g
백복령(중국산)	4g
진피(국내산)	4g
당귀(국내산)	4g
산약(국내산)	4g
백출(중국산)	4g
아가리쿠스 (국내산)	10g
매실 농축액추출물(국내산)	2g
총량	60 g

## 2) 국산 및 중국산 백화사설초의 중금속 함량 분석

사용약재:

본 실험에 사용된 시료는 바이오 Q의 주성분인 백화사설초 이므로, 수입이 많이 되고 있는 중국산과 국내산 백화사설초의 중금속 함량을 통해 Bio-Q의 주성분인 백화사설초를 선택하였다. 한국 기초과학 연구소에 의뢰하여 한약재 내에 함유된 납, 구리 카드뮴, 크롬, 수은, 비소의 양을 Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES)를 사용하여 분석하였다. 분석용 표준 용액은 각 중금속의 1000mg/L 표준용액을 단계별로 희석하여 사용하였다. 실험에 사용한 탈 이온수는 초순수제조기로 제조하였다.

## 3) 동물

면역실험을 위한 동물은 Balb/C mice 4주령의 수컷과 항암실험을 위한 C57BL/6 mice 5주령의 수컷을 대한바이오링크 부터 공급받아 실험당일까지 고형사료(삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃, 습도 60±5%, 12시간의 밤,낮 cycle을 유지하면서 3일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다



## 2, 1. 제 1 세부 과제명 : 국내산 백화사설초의 면역조절 작용

### 가. Bio-Q의 투여

국내산 백화사설초를 중심으로한 면역조절성 신소재 Bio-Q의 개발을 위하여 Balb/C mice를 사용하여 7일간 Bio-Q를 10, 50, 100 mg/kg 농도로 경구투여 하였다. Bio-Q에 의한 면역효과를 9일째 비장세포를 적출하였다.

### 나. Splenocyte Proliferation assay

spleen cell을  $2 \times 10^5/50 \mu\text{l}$  로 RPMI 배지에 희석한 다음 96well-plate에 가하고 mitogen으로 ConA( $2 \mu\text{g/ml}$ )와 LPS( $10 \mu\text{g/ml}$ )를 넣어주었으며,  $62.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $125 \mu\text{g/ml}$ ,  $250 \mu\text{g/ml}$  의 Bio-Q를 농도별로 spleen cell 이 들어있는 plate에 가했다. 72시간동안  $37^\circ\text{C}$  incubator에서 배양한 다음 XTT( $1 \text{mg/ml}$ )  $1 \text{ml}$ 에 PMS( $1.53 \text{mg/ml}$ )  $10 \mu\text{l}$ 를 가한 혼합액  $30 \mu\text{l}$ 를 가하고 2시간 정도  $37^\circ\text{C}$ 에 방치한 후 . microplate reader 기에서 450nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

### 다. Flow cytometric analysis

#### 1) 비장 백혈구 현탁액 조제

BALB/C를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 비장을 적출하고 Scheme 1과 같이 비장 백혈구 현탁액을 제조한다. 세포 처리 및 형광염색용 완충액으로는  $\text{Ca}^{2+}$ 과  $\text{Mg}^{2+}$ 이 들어 있지 않은 Satining buffer를 사용한다. 적출한 비장을 100 mesh (sigma,U.S.A)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 조직을 분쇄한다. 15ml conical tube(Becton dickinson,U.S.A)에 옮겨 약 5분간 방치하여 조직덩어리를 침전시킨 후 상층액을 취해 2회 세척하고 0.83 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$  용액을 넣고 5분간 incubation시켜 赤血球를 용혈시킨다. 다시 2회 세척하고 RPMI1640-10%FBS (sigma, U.S.A)로  $1 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 희석한다.

#### 2) 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)

면역 형광염색은 전과정을  $0-4^\circ\text{C}$ 에서 실시하였고, 배양한 비장 세포를 회수하여 PBS로 3회 세척한 후 5ml FACS tube(Becton Dikinson,U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex한 후 원심분리(1300rpm,5min)한다. 각각의 1차항체 Culture sup.을  $100 \mu\text{l}$  씩을 5ml FACS tube에 넣고 vortex한 후 40분간 ice에서 반응시킨다. 사용한 1차항체는 3회 세척 후, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rat Ig F(ab)<sub>2</sub> fragment

1:100(Tagco,U.S.A) 희석액 50 $\mu$ l를 가하고 40분간 반응시켜 후 30회 세척 후 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex한 후 FACScan(Becton dickinson,U.S.A)으로 분석한다.

### 3) 유세포 분석

염색이 완료된 세포들을 0.3ml의 staining buffer에 부유시켜 FACS tcan(Becton dickinson,U.S.A)를 이용하여 분석한다. 시료당 5,000개의 세포에 대하여 list mode로 자료를 취합하였으며 Consort 30 프로그램을 이용, 분석한다. data의 분석은 forward scatter(FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot 위에서 전체 비장세포와 small lymphocyte 영역 및 lymphoblast 영역을 구분하여 CD3,CD19,CD4, CD8, NK cell의 비율을 산출 하였다.

## 라. Measurement of cytokine production

ELISA 는 Becton Dickinson 사의 Mouse ELISA kit를 사용하였으며 manufacturer protocol에 의해 실시하였다. 사용한 cytokine assay antibody의 종류는 IFN- $\gamma$ (cat# 550582), IL-6 (cat# 550950), TNF (cat# 551502) 였으며 microplate reader를 사용하여 450nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

## 2. 2. 제 2 세부 과제명: 국내산 백화사설초의 항암효과에 관한 연구

### 가. 세포암주 및 배양

실험에 사용된 암주는 A549(human lung adenoma)와 LLC(lewis lung carcinoma) 이다. 세포주는 10%의 FBS가 함유된 RPMI-1640배지를 사용하여 배양하였다.

### 나. Cytotoxicity

Bio-Q를 MTT를 이용하여 세포 독성을 측정하였다. 종양세포로는 A549와 LLC 세포를 사용하였으며 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건에서 배양하며 사용하였다. In vitro 세포고성 효과를 조사하기 위하여  $1 \times 10^4$  cells을 seeding 24h후 약제를 well당 100  $\mu$ l 씩 96 well plate에 분주하였다. 이를 24h 배양한 후 배양액을 모두 버리고 MTT(5 mg/ml) 10  $\mu$ l 씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 PBS로 세척한 후 DMSO 100  $\mu$ l 를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 ELISA 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 다. In vitro tumor cell adhesion assay

gelatin(0.1%)가 coating된 plate의 각 well에 A549 cell( $1 \times 10^6$ /well)를 시료와 함께 처리한다음 37°C배양기에서 대조군 cell이 붙을때 까지 배양한다. 세포를 phosphate-buffered solution(PBS)로 조심스럽게 세척하고 XTT법으로 well에 붙어있는 세포를 염색한후, 450nm 의 흡광도에서 OD값을 측정하였다. 시료의 세포부착저지 활성은 대조군의 OD값과 비교하여 측정하였다.

### 라. HUVEC cell culture

혈관내피세포는 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) Jaffe등의 방법으로 사람의 탯줄에서 분리하여 0.1% gelatin이 코팅된 플라스크에서 20% heat-inactivated FBS, 3 ng/ml bFGF, 5 units/ml heparin와 100 units/ml antibiotic-antimycotic이 첨가된 M199 배지에서 배양하였다. 혈관내피세포는 3-6세대까지 배양된 세포를 사용하였다.

#### 마. HUVEC cell proliferation assay

Proliferation assay는 XTT 방법을 이용하여 실시하였다. 혈관내피세포를 0.1% gelatin이 코팅된 96-well 플레이트에  $5 \times 10^3$ 으로 분주하여 12시간 이상 배양시킨 후 5% heat-inactivated FBS만 첨가된 M199배지로 6시간 동안 starvation 시켰다. 5% heat-inactivated FBS, 5 ng/ml bFGF와 5 units/ml heparin이 첨가된 M199배지로 약재를 농도별로 희석하여 100  $\mu$ l씩 첨가하여 48시간 동안 배양시켰다. 1 ml XTT (1 mg/ml in PBS) stock solution과 10  $\mu$ l PMS (1.53 mg/ml in PBS)를 혼합후 50  $\mu$ l를 각 well당 첨가하여 배양 후 microplate reader (Molecular Devices Co.) 450 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교하여 세포의 생존율을 계산하였다.

#### 바. Tube Formation assay

Schnaper et al (1993)방법에 의거하여 24well plate에 Matrigel(Bekton dickinson, U.S.A.) 200 $\mu$ l를 코팅하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation하여 Matrigel을 굳힌다. positive 대조군으로 M199 media에 5ng/ml의 bFGF를 첨가한 배지를 사용하였으며 이와 같은 배지에 Bio-Q를 각 well에 농도별로 첨가 한 후 HUVEC를  $1.6 \times 10^5$ cells/ml로 각각의 well에 균일하게 seeding한다. 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 5시간 동안 배양하고 형성된 tube network를 사진 촬영하여 대조군과 비교하였다.

#### 사. RT-PCR analysis for uPA, MMP2 and TIMP2

A549 cell을  $5 \times 10^5$ /well로 seeding하여 24시간 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C의 조건에서 배양하였다. 24시간 후 시료를 농도별로 처치하였으며 24시간 후에 세포를 수거하여 Trizol Reagent를 이용한 방법으로 RNA를 추출하였으며, 2 $\mu$ g RNA로 cDNA를 합성하여, cDNA를 가지고 uPA, MMP2, TIMP2 각각의 primer로 PCR을 수행하였다. PCR조건은 Pre-denaturation 94 $^{\circ}$ C 5분, Denaturation 94 $^{\circ}$ C, Annealing 58-65 $^{\circ}$ C 30초, polymeration 72 $^{\circ}$ C 30초, Extend polymeration 72 $^{\circ}$ C 5분 으로 30 cycle을 수행하였다.

#### 아. DNA Topoisomerase I assay

실험에 사용된 DNA topoisomerase I은 calf thymus에서 유래된 것이며, supercoiled pBR322

DNA는 E.coliC 600의 것을 사용하였다. 또한 DNA topoisomerase I의 IC50값을 결정하기 위해 relaxation assay를 실시하였으며 Topo I의 활성은 Liu와 Miller의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 35mM Tris-HCl(pH 8.0), 72mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM dithiothreitol(DTT), 5mM spermidine, 0.01% bovine album serum(BSA)를 함유하는 용액에 0.5 $\mu$ g pBR 322 supercoiled DNA와 효소만 가하여 총 반응액을 20 $\mu$ l가 되게 한 것을 대조군으로 하고, 0.5 $\mu$ g pBR 322 DNA와 효소, 시료를 가하여 총 반응액을 20 $\mu$ l되게 한것을 시험군으로 하여 이들을 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 반응은 2% SDS(sodium dodecyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 반응 종결액 5 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 종결시키고 이를 TBE running buffer(50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)에 전기영동을 한 후 agarose gel을 0.5 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide용액에서 1시간동안 염색, 자외선하에서 사진을 찍었다.

#### 자. Chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay

Chan등의 방법을 이용하여 CAM assay를 실시하였다. 수정란을 37 $^{\circ}$ C 90%의 습도의 조건에서 3일간 부화시키고 3일째에 수정란의 air sac쪽에서 알부민을 3-5 ml정도 뽑아낸 후 원형창을 만들고 투명테이프로 창을 막고 동일한 조건에서 배양하였다. 10일배에서 CAM이 형성된 것을 확인 후 약제와 bFGF (100 ng/egg)를 혼합하여 말린 thermanox disk (Nunc, Naperville, IL)를 CAM위에 올리고 2-3일간 더 배양하였다. 배양 완료 후 사진을 찍어 기존혈관에서 새로 형성된 혈관의 수를 관찰하였다.

#### 차. Measurement of tumor growth and lung metastasis in LLC-bearing mice

세포를 5X10<sup>5</sup>/cells(100 $\mu$ l) mice의 flank부위에 이식한 후 Bio-Q를 경구투여하고 3일에 한번씩 tumor의 크기를 측정 하였다. 암전이 실험은 21일 후에 폐를 적출하여 폐에 전이된 종양의 군집수를 counting 하였다. 대조군과 비교하여 약제에 의한 종양의 억제비율을 계산하였다.

#### 카. 통계처리

통계적 유의성은 Duncan's multiple range test로서 검정하였으며, p<0.05일때 통계적으로 유의성 있다고 판정하였다.

## 2, 3. 협동과제명 : 백화사설초를 이용한 식품 소재화 및 소재화 기반 연구

RNL생명과학(주)

시험제목 : 랫드에서의 90일간 백화사설초 반복투여 독성시험

시험목적 : 본 시험은 랫드를 이용하여 백화사설초를 90일간 반복투여 함으로써 독성 유무를 관찰하기 위해 실시하였다.

### 가. 시험물질

- (1) 명칭 : 백화사설초
- (2) 보관조건 : 상온보관 (20 °C)
- (3) 시험물질의 안전성 및 균질성 : 상온, 저온 및 실온에서 안정하다.
- (4) 보관조건 : 반투명용기, 상온보관

### 나. 재료 및 방법

#### (1) 실험동물

- 1) 동물 종(계통) : 랫드 (Sprague Dawley)
- 2) 성별 및 입수 시 주령 : 수컷 3주령, 암컷 3주령
- 3) 선택이유 : 본 시험에 사용될 랫드 (Sprague Dawley)는 지금까지 독성시험에 많이 사용되어 왔기 때문에 비교할 많은 생리, 해부 및 독성학적 기초자료가 있어서 선택하였다.
- 4) 공급원 : 한림실험동물 (주)
- 5) 입수일 : 2002년 10월 14일
- 6) 입수동물수 : 암컷 50 마리, 수컷 50마리
- 7) 검역 및 순화기간 : 실험실에 순화시키는 기간을 약 1주일 두었으며, 그 기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.
- 8) 사용동물수 : 암컷 40마리, 수컷 40마리
- 9) 시험시 주령 및 체중범위 : 4주령의 수컷 85g - 95g, 4주령의 암컷 85g - 95g
- 10) 균 분리법: 무작위법

#### (2) 사육조건

##### 1) 환경조건

본 시험은 온도  $22 \pm 3$  °C, 상대습도  $50 \pm 10$  %, 환기 회수 10 - 12회/hr, 조명시간 12시간 (07:00 - 19:00), 조도 150 - 200 lux로 설정된 서울대학교 수의과대학 실험동물 사육실 (1동 본관 1호실)에서 실시하였다.

2) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

순화기간 및 시험기간 중에 polycarbonate 케이지 (26×42×18cm, 명진기계제작)에 사육하였다. 사육상자에는 시험번호, 동물번호 및 투여량을 기입한 tag을 붙였다.

3) 사료 및 음수의 급여

백화사설초 (줄기 5: 뿌리 1)를 건조하여 분쇄 후 시험물질의 농도에 적합하게 사료분말과 전분을 배합하여 사료를 자유 섭취시키며, 음수는 상수도를 자유섭취시켰다.

다. 투여방법

1) 투여경로 : 경구

2) 투여회수 및 투여기간 : 1일 1회, 주 7회 90일간 투여하였다.

3) 투여법 : RNL생명과학 (주)이 제공한 백화사설초 (줄기 5: 뿌리 1)를 건조하여 분쇄 후 시험물질의 농도에 적합하게 사료분말과 전분을 배합하여 사료를 만든 후 자유섭취 시켰다.

(4) 군 구성

1) 시험군 구성

군	성별	동물수	동물번호
용매대조군	Male	10	CMA1 - 5 CMB1 - 5
	Female	10	CFA1 - 5 CFB1 - 5
저용량 투여군 (사료0.001%(w/w))	Male	10	LMA1 - 5 LMA1 - 5
	Female	10	LFA1 - 5 LFB1 - 5
중간용량 투여군 (사료0.01%(w/w))	Male	10	MMA1 - 5 MMB1 - 5
	Female	10	MFA1 - 5 MFB1 - 5
고용량 투여군 (사료0.1%(w/w))	Male	10	HMA1 - 5 HMB1 - 5
	Female	10	HFA1 - 5 HFB1 - 5

2) 투여용량 설정이유

기존자료를 근거로 의뢰자와 상의하여 사료의 부피 0.1%의 백화사설초를 섞어 저용량으로 정하고 일정한 공비(×10)로 중간용량과, 고용량을 설정하며, 용매대조군은 백화사설초를

혼합하지 않고 시험물질과 같은 방법으로 만들어 투여하였다.

### 3) 군분리 및 개체식별

시험물질을 처치 전에 체중을 측정하여 군간 체중 차이가 없게 무작위법으로 군분리를 실시하였다. 랫드의 식별은 꼬리에 유성매직으로 표시하며, 사육상자별 tag표시법을 이용하였고 사육 동물실의 입구에는 시험번호, 표제, 동물실, 시험기간, 시험책임자명을 기재한 label을 부착하였다.

## (5) 시험방법

### 1) 시험방법

투여직전 각 동물을 체중대비 무작위 군 분리한 다음 투여는 경구로 주 7회 90일간 투여하였다.

### 2) 관찰항목

- ① 임상증상 관찰 : 시험 기간 중에 1일 1회 실시하였다. 관찰방법은 일반임상증상의 종류 (anorexia, salivation, diarrhea, polyuria, anuria, fecal change 등)와 그 정도 등을 기록하였다.
- ② 사료 섭취량 측정 : 사육상자별로 급여총량과 잔량을 투여개시 후 13주간 주 2회 측정하였다.
- ③ 음수 섭취량 측정 : 사육상자별로 급수총량과 잔량을 투여개시 후 13주간 주 1회 측정하였다.
- ④ 체중 측정 : 모든 동물에 대하여 투여개시 전, 투여개시 후, 시험종료시까지 매주 2회 측정하였다.
- ⑤ 뇨검사 : 시험기간 중 무작위로 각 군당 5마리씩의 동물에 대하여 1회 채뇨한 후, 그 뇨에 대하여 외관과 뇨량 및 색을 관찰한 다음, 즉시 뇨검사용 시험지 (Ames사의 N-multistix)를 사용하여 pH, gravity, nitrite, protein, ketone body, urobilinogen, bilirubin, glucose 및 occult blood을 측정하였다.
- ⑥ 안과학적 검사 : 투여기간중 무작위로 각군당 5마리씩의 동물에 대하여 육안 및 검안경을 이용한 안과학적 검사를 1회 실시하였다.
- ⑦ 혈액학적 및 혈청 생화학적 검사  
일반 혈액학적 검사는 혈액자동분석기 (Coulter S880과 H1, technicon, USA)를 이용하여 투여전 및 부검전 전 동물에 대하여 적혈구수 (RBC), 총백혈구수 (WBC), 헤모글로빈 (hemoglobin), hematocrit, MCV, MCH, MCHC, platelet, 호산구 (eosinophil), 호중구 (neutrophil), 임파구 (lymphocyte), 단핵구 (monocyte), 호염구 (basophil), 혈액응고시간 [Prothrombin time(PT), Partial thromboplastin time (PTT)]은 APTT, PT reagent (國際



試藥, Japan)를 이용하여 직접 검사하였다. 혈청 생화학적 검사도 투여전 및 부검전 전 동물에 대하여 채취한 혈액의 일부를 실온에 30분간 방치하고 응고후 원심분리 (3,000rpm, 30min)하여 얻은 혈청에 대해서 혈청자동분석기 (Express 550과 SPOCHEM<sup>TM</sup> SP-440, ARKRAY, Japan)를 이용하여 alaninetransaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), albumin, total bilirubin, BUN, cholesterol, creatinine, glucose, Ca, total protein, triglyceride 등을 측정하였다.

⑧ 장기중량 및 크기측정

전 시험동물에 대하여 간장, 신장 (좌우), 비장, 심장, 부신 (좌우), 뇌, 뇌하수체, 난소 (좌우), 자궁, 고환 (좌우), 폐장, 흉선, 갑상선 (좌우) 등의 절대장기 중량 및 체중에 대한 상대장기 중량을 측정하였다.

⑨ 조직병리학적검사

전 시험동물에 대하여 ether로 마취한 다음 복대동맥을 절단하여 충분히 방혈 시킨다. 장기중량 측정이 끝난 모든 장기를 10% 중성 포르말린에 고정시켰다. 2주 이상의 충분한 고정을 거친 후 장기조직을 파라핀 포매기 (SAKURA, Tissue-Tek VIP, vacuum infiltration Processor)에 포매하고 마이크로톰 (Microm, HM340E)으로 4-5 $\mu$ m 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하여 조직을 관찰하였다.

⑩ 통계학적 방법

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS (Statistical Analysis System)를 이용하여 등분산 검정후 one-way ANOVA에서 유의한 F 값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 용량군 사이에 유의수준  $p < 0.05$ 로 Dunnet's t-test를 이용하여 비교하였고, 조직병리학적으로 관찰된 병변이 관찰시 발생빈도는  $\chi^2$  (Chi-square)로 검정을 하였다.

### 3. 3차년도

#### 3, 1. Column chromatography법을 이용한 백화사설초로부터 순수물질 분리, 동정

##### 가. 실험재료

본 실험에서 사용된 시료는 부산의 대도농산에서 받은 한국산 백화사설초로 추출 및 농축하여 사용하였다.

##### 나. 시약및기기

Thin layer chromatography는 Merck사에서 생산한 HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254를 사용하였다.

시료분획에 사용한 유기용매는대정화학주식회사에서 생산한 1급 시약을 사용하였다. 시료의 발색에는 UV lamp와 10% aq. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다.

UV lamp는 Spectrometer(Model ENF-240C/F, spetronics corporation, USA)를 사용 하였고, NMR spectrum은 Varian Inova AS 400(Varian, USA)을 사용하였다.

##### 다. 실험방법

#### 백화사설초로부터 활성물질의 분리

건조 세절한 백화사설초(*Oldenlandiae diffusae* Herba)의 전초 2.8kg에 80% aq. MeOH을 가하여 가끔 진탕하면서 실온에서 하루씩 3회 반복하여 추출하였다. 그 추출액을 감압 농축하여 MeOH Ext.를 436g 얻었고, 이 추출물에 증류수 3ℓ를 가하여 현탁시키고 동량의 EtOAc 및 *n*-BuOH의 순으로 용매 분획하여 EtOAc(51g), *n*-BuOH(86g) 및 물 분획물을 얻었다. 이들 중 TLC에서 다양하고 뚜렷한 spot을 보이는 *n*-BuOH에서 활성 물질을 분리하였다.

*n*-BuOH 분획물(ODB)을 silicagel column chromatography(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 10 : 1 → 7 : 1 → 5 : 1 → 3 : 1)를 실시하여 24개의 분획물(ODB1 - ODB24)을 얻었다. 그 중 major 성분을 포함하고 있는 ODB15(5g) 분획물을 silica gel c.c.(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 5 : 1)를 실시하여 11개의 분획물(ODB15-1 - ODB15-11)을 얻었고 그 중 ODB15-4(163mg)를 ODS c.c.(MeOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 10)를 반복 사용하여 화합물 1를 얻었다. 또한 ODB15-2(287mg)를 NH<sub>2</sub> c.c.(CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 7 : 1)로 정제하여 화합물 2(41mg)을 얻었다.

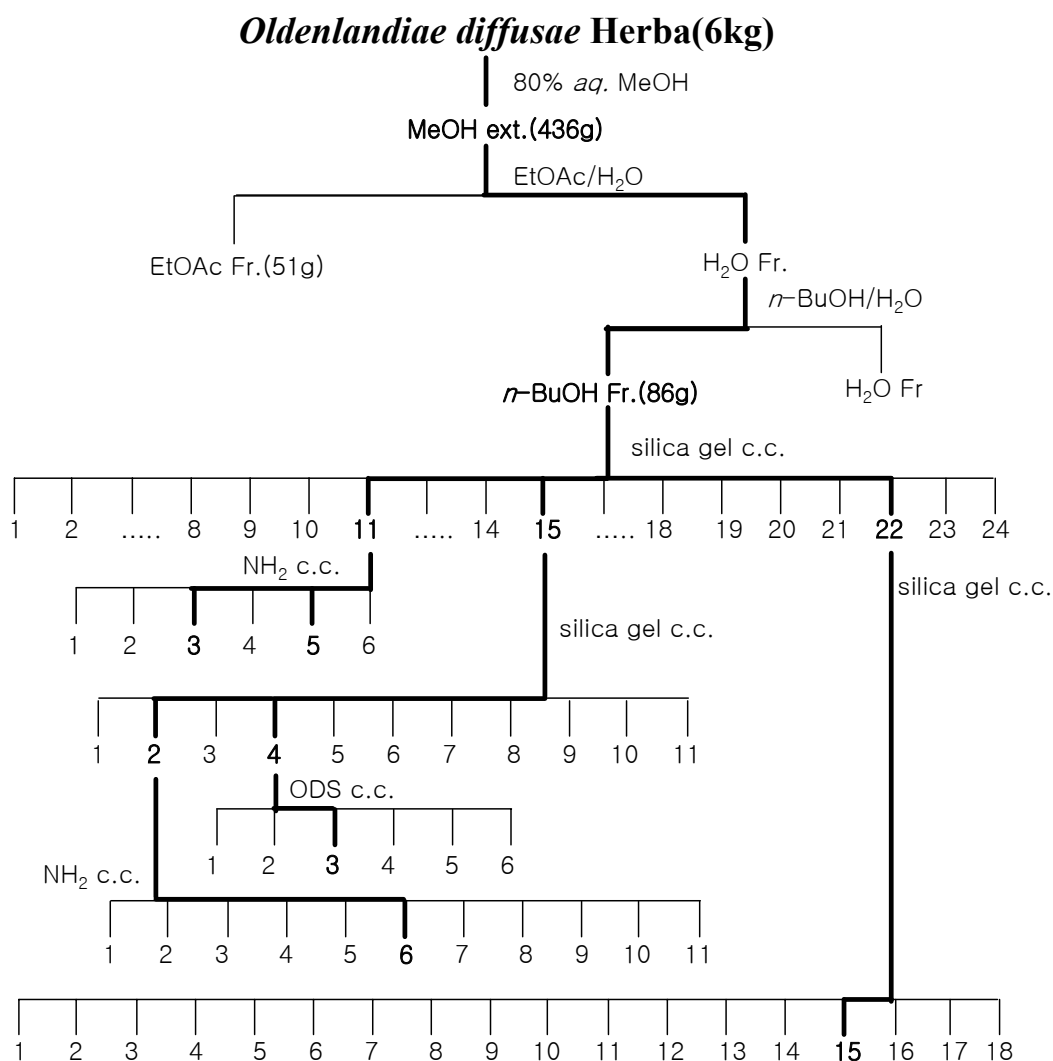


Fig. 1. Isolation procedure of cyclohexylethanoids from the flower of *Oldenlandiae diffusae* Herba.

**화합물 1:**  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- $d_5$ ,  $\delta$ ) 7.68(1H, s, H-3), 6.31(1H, s, H-7), 5.80(1H, *d*,  $J=5.6$  Hz, H-1), 5.37(1H, *d*,  $J=8.4$  Hz, H-1')  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- $d_5$ ,  $\delta$ ) 167.95(C-11), 152.30(C-3), 146.58(C-8), 129.58(C-7), 109.70(C-4), 100.47(C-1'), 97.05(C-1), 80.59(C-6), 78.36(C-5'), 77.89(C-3'), 74.26(C-2'), 70.80(C-4'), 61.94(C-6'), 59.87(C-10), 50.73(OCH<sub>3</sub>), 46.53(C-9), 44.55(C-5).

**화합물 2:**  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- $d_5$ ,  $\delta$ ) 7.69(1H, *d*,  $J=1.1$  Hz, H-3), 5.94(1H, br s, H-7), 5.67(1H, *d*,  $J=6.8$  Hz, H-1), 5.38(1H, *d*,  $J=8$  Hz, H-1'), 4.76(1H, *d*,  $J=15.1$  Hz, H-10a), 4.51(1H, *dd*,  $J=15.1, 2$  Hz, H-10b), 3.32(1H, *dq*,  $J=8.4, 1.2$  Hz, H-5), 3.01(1H, br t,  $J=7.6$  Hz, H-9), 2.86(1H, *dd*,  $J=16.4, 8.4$ , H-6a), 2.15(1H, *m*)  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- $d_5$ ,  $\delta$ ) 167.56(C-11), 152.39(C-3), 145.28(C-8), 126.54(C-7), 111.72(C-4), 101.06(C-1'), 97.66(C-1), 78.74(C-5'), 78.35(C-3'), 74.84(C-2'), 71.35(C-4'), 62.43(C-6'), 60.71(C-10), 50.93(OCH<sub>3</sub>), 46.95(C-9), 38.92(C-6), 35.48(C-5).

또 다른 major 성분을 포함하고 있는 ODB11(446mg)을 NH2 column chromatography (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 11 : 1)로 정제하여 화합물 **3**(97.8mg)과 **4**(44.6mg)를 얻었다.

**화합물 3:**  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) 7.96(2H, *d*,  $J=7.6$  Hz, H-2'', 6''), 6.50(1H, *dd*,  $J=7.6, 7.6$  Hz, H-4''), 7.43(1H, s, H-3), 7.36(2H, *dd*,  $J=7.6, 7.6$  Hz, H-3'', 5''), 5.80(1H, s, H-7), 5.40(1H, *d*,  $J=15.2$  Hz, H-10a), 4.70(1H, *d*,  $J=7.6$  Hz, H-1'), 4.60(1H, *d*,  $J=15.2$  Hz, H-10b), 3.69(OCH<sub>3</sub>), 3.38(OCH<sub>3</sub>)  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) 168.96(C-11), 166.50(C-7''), 152.55(C-3), 139.65(C-8), 133.36(C-4''), 130.04(C-7), 129.61(C-2'', 6''), 129.15(C-1''), 128.36(C-3'', 5''), 109.29(C-4), 99.92(C-1'), 99.44(C-1), 81.37(C-6), 76.08(C-5', 3'), 73.09(C-2'), 68.88(C-4'), 62.65(C-6'), 61.02(C-10), 51.88(OCH<sub>3</sub>), 50.38(OCH<sub>3</sub>), 46.55(C-9), 45.62(C-5).

**화합물 4:**  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) 5.52(1H, *t*,  $J=3.5$  Hz, H-12), 3.48(1H, *dd*,  $J=10.3, 4.1$  Hz, H-3), 2.66(1H, *d*,  $J=3.5$  Hz, H-18), 1.27, 1.25, 1.08 and 1.05(each 3H, s, H-23, 27, 26, 24), 1.02(3H, *d*,  $J=6.6$  Hz, H-30), 0.97(3H, *d*,  $J=6.3$  Hz, H-29) and 0.91(3H, s, H-25).  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) 176.0(C-28), 138.0(C-13), 125.8(C-12), 79.0(C-3), 55.3(C-18), 52.7(C-5), 47.9(C-17), 47.6(C-9), 42.0(C-14), 39.6(C-4), 39.1(C-8), 38.7(C-1), 37.0(C-22), 36.7(C-10), 33.0(C-7), 30.6(C-19), 30.4(C-20), 29.4(C-15), 27.3(C-21), 24.2(C-27), 23.7(C-11), 23.5(C-2), 23.4(C-30, 23), 23.3(C-16), 21.1(C-29), 18.3(C-6), 17.0(C-25, 24), 15.5(C-26)

ODB22(3.5g)을 silica gel c.c.(CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 6 : 4 : 1)로 정제하여 화합물 5(57mg)를 얻었다.

**화합물 5:** <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ) 7.31(1H, d, *J*=1.2 Hz, H-3), 5.79(1H, s, H-7), 4.68(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1') <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ) 172.22(C-11), 150.39(C-3), 147.32(C-8), 129.88(C-7), 115.88(C-4), 100.26(C-1'), 99.36(C-1), 83.06(C-6), 78.23(C-5'), 77.71(C-3'), 74.84(C-2'), 71.43(C-4'), 62.51(C-6'), 61.50(C-10), 48.13(C-9), 47.23(C-5)

**화합물 6:** Amorphous powder (CHCl<sub>3</sub>-MeOH); [α]<sub>D</sub> -22.5<sub>o</sub> (MeOH,c1.0); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> nm (log ε): 213 (3.60); IR (Films) ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3375, 2875, 1705, 1630; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.97 (1H x 2, d, *J* = 7.8 Hz, H-2', 6'), 7.49 (1H, dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, H-4'), 7.43 (1H, s, H-3), 7.36 (1H x 2, dd, *J* = 7.8, 7.6 Hz, H-3', 5'), 5.80 (1H, br s, H-7), 5.40 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H-10a), 4.70 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1"), 4.67 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-1), 4.60 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H-10b), 4.50 (1H, br s, H-6), 3.69 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.88 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, H-5), 2.83 (1H, dd, *J* = 8.2, 6.8 Hz, H-9); pos. FABMS *m/z*: 531 [M+Na]<sup>+</sup>, HR-FABMS *m/z*: 531.1483 (Calculated for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>12</sub>Na, 531.1478).

**화합물 7:** Amorphous powder (MeOH-H<sub>2</sub>O); [α]<sub>D</sub> +7.7° (MeOH/DMSO,c0.6); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> nm (log ε): 228 (3.15), 204(3.11); IR (Films) ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3369, 2919, 1716, 1643, 1548; <sup>1</sup>H-NMR (pyridine-d<sub>5</sub>, 400 MHz): δ 8.20 (1H x 2, d, *J* = 7.6 Hz, H-2', 6'), 7.88 (1H, s, H-3), 7.70 (1H, dd, *J* = 7.4, 7.4 Hz, H-4'), 7.58 (1H x 2, dd, *J* = 7.6, 7.4 Hz, H-3', 5'), 6.04(1H, br s, H-7), 5.52 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1), 5.36 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-10a), 5.32 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-10b), 5.23 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1"), 4.84 (1H, d, *J* = 6.8, H-1'''), 3.61 (1H, br dd, *J* = 15.0, 7.2 Hz, H-5), 3.24 (1H, dd, *J* = 15.0, 8.0, H-6a), 2.94 (1H, dd, *J* = 7.8, 7.2 Hz, H-9), 2.53(1H, m, H-6b); <sup>13</sup>C-NMR (pyridine-d<sub>5</sub>, 100 MHz): δ 175.2(C-11), 166.8 (C-7'), 148.9 (C-3), 138.8 (C-8), 133.6 (C-4'), 131.2 (C-7), 130.7 (C-1'), 129.9 (C-2', 6'), 129.0 (C-3', 5'), 118.3 (C-4), 105.0 (C-1'''), 100.5 (C-1''), 97.7 (C-1), 77.7 (C-5''), 77.3 (C-3''), 74.5 (C-2''), 73.9 (C-3'''), 72.0 (C-2'''), 71.5 (C-4''), 69.4 (C-6''), 69.0 (C-4'''), 66.4 (C-5'''), 63.9 (C-10), 47.2 (C-9), 40.0 (C-6), 37.4 (C-5); pos. FABMS *m/z*: 611[M+H]<sup>+</sup>, HR-FABMS *m/z*: 611.1980 (Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>O<sub>15</sub>, 611.1976).

**화합물 8:** Amorphous powder (MeOH-H<sub>2</sub>O); [α]<sub>D</sub> +22.7<sub>o</sub> (MeOH,c0.6); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> nm

(log  $\epsilon$ ): 201.5 (3.80), 239.1(4.00); IR (Films)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3368, 2927, 1737, 1634, 1371;  
1H-NMR (CD3OD, 400 MHz):  $\delta$  7.62 (1H, s, H-3), 6.01(1H, br s, H-7), 5.05 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1), 4.93 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-10a), 4.82 (1H, br s, H-6), 4.80 (1H, d, J =15.4 Hz, H-10b), 4.72 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1'), 3.01 (1H,br dd, J = 8.0, 6.4 Hz, H-5), 2.62 (1H, dd, J = 8.0, 8.0 Hz,H-9), 2.08 (3H, s, Ac-Me); 13C-NMR (CD3OD, 100 MHz)  $\delta$ 172.4 (CO-AcO), 171.2 (C-11), 154.8 (C-3), 145.8 (C-8),131.8 (C-7), 108.3 (C-4), 101.1 (C-1), 100.5 (C-1'), 78.5(C-5'), 77.8 (C-3'), 75.4 (C-6), 74.9 (C-2'), 71.5 (C-4'),63.8 (C-10), 62.9 (C-6'), 46.3 (C-9), 42.6 (C-5), 20.8 (Ac-Me); pos. FABMS m/z: 433 [M+H]<sup>+</sup>, HR-FABMS m/z:433.1350 (Calculated for C18H25O12, 433.1346).

**화합물9:** Amorphous powder (MeOH-pyridine);  $[\alpha]_D^{25} +4.13^\circ$  (MeOH,c0.6); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 202.0 (3.70), 233.0(3.80); IR (Films)  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3340, 2921, 1730, 1645, 1557, 1404;  
1H-NMR (D2O, 400 MHz):  $\delta$  7.49 (1H, s, H-3), 5.99(1H, br s, H-7), 4.91 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1), 4.82 (1H, brs, H-6), 4.80 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-1'), 4.41 (1H, d, J =15.4 Hz, H-10a), 4.23 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-10b), 3.05(1H, br dd, J = 8.0, 6.4 Hz, H-5), 2.59 (1H, dd, J = 8.0,8.0Hz, H-9); 13C-NMR (D2O, 100 MHz)  $\delta$  173.5 (C-11), 152.8(C-3), 149.4 (C-8), 128.8 (C-7), 110.0 (C-4), 100.5 (C-1),99.1 (C-1'), 76.3 (C-5'), 75.9 (C-3'), 74.5 (C-6), 73.0 (C-2'), 69.7 (C-4'), 60.8 (C-6'), 60.4 (C-10), 44.7 (C-9), 41.4(C-5); pos. FABMS m/z: 391 (M+H)<sup>+</sup>, HR-FABMS m/z:391.1245 (Calculated for C16H23O11, 391.1240).

### 3, 2. 제 1 세부 과제명 : 국내산 백화사설초의 면역조절 작용

#### 가. Bio-Q의 투여

국내산 백화사설초를 중심으로한 면역조절성 신소재 Bio-Q를 Balb/C mice를 사용하여 7일간 Bio-Q를 50, 100 mg/kg 농도로 경구투여 한뒤 8일째 SRBC로 1차 면역 반응을 시키고 다시 7일간 경구투여를 시킨뒤 다음날 2차 면역반응을 시켰다.

#### 나. 항원

항원으로 사용된 Sheep Red Blood Cell(SRBC)는 한국배지(Korea Media Co.)로부터 구입하여 사용하였다. SRBC는 PBS를 가하여 적적 수로 조정하거나 희석하여 사용하며, 4℃에서 보존하고, 보존 1주일 이내의 것만 사용하였다.

#### 다. 면역

검액을 10일간 경구투여한 후 실험군과 대조군의 복강내에  $1 \times 10^9$  cells/ml의 농도로 조정된 면양적혈구 부유액을 0.2ml 주사하여 면역시켰다. 4일 후에  $4 \times 10^9$  cells/ml로 조정된 면양적혈구 부유액 0.02 ml를 후측후지족척피내에 주사하여 2차면역시켰다.

#### 라. 지연형 과민반응(Delayed Type Hypersensitivity)

지연형 과민반응의 측정은 Mitsuoka 등의 방법에 따라 1차 면역시킨 4일 후에  $4 \times 10^9$  cells/ml로 조정된 면양적혈구 부유액 0.02ml를 후측후지 족척피내에 주사하여 2차 면역 시켜 측정하였다. 주사직전, 주사후 24시간째에 족척부종검사(Footpad swelling reaction)를 시행하였다. 족척부종정도는 Mitutoyo engineer's micrometer(No. 2052-08, Mitutoyo, MFG. Co. Tokyo, Japan)를 사용하여 좌우측후지족척 두께를 0.01mm까지 측정하여 좌우족척 두께의 차이를 계산하였다. 종창증가의 정도는 다음 공식에 따라 %로 표시하였다.

$$\% \text{ increase, } = \{(T_{24} - T_0)/T_0\} \times 100$$

#### 마. 채혈 및 혈청분리

지연형과민반응검사가 끝난 후 생쥐를 ether로 마취하여 1회용 주사기로 심장에서 약 1ml의 혈액을 채취한 후 5ml plastic tube(falcon, oxford, CA., U.S.A.)에 옮겨 1시간동안 실온에서 방치한 후 2,000rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 상층의 혈청을 ependorf tube에 옮긴다. 이 혈청을 56℃에서 30분동안 비동화(inactivation)시킨 후 적혈구용혈소가 및 적혈구응집소가의 측정에 사용하였다. 적혈구용혈소가 측정은 보체(complement)로 사용된 토끼 혈청을 sigma로부터 구입하여 비동화(inactivation) 하지 않은 상태로 사용하였다.

#### 바. 적혈구 응집소가의 측정

면양적혈구에 대한 응집소(hemagglutinin titer)를 측정하기 위하여 면역을 유발시킨 생쥐의 심장에서 채혈한 혈청을 분리하여 얻은 혈청을 56℃에서 30분동안 비동화시킨 다음, 96 well의 microtitration plate의 각 well에 PBS buffer(pH 7.2)로 2배로 serial dilution한 희석한 혈청 50ul에 2% 면양적혈구 부유액을 50ul씩 가하여 잘 혼합한 다음 37℃, 5%, CO<sub>2</sub> incubator내에서 1시간 방치한 후 적혈구응집정도를 관찰하였으며, 적혈구 응집을 일으키는 혈청의 최고희석배수를 응집소가로 측정하였다.

#### 사. 적혈구 용혈소가의 측정

면양적혈구에 대한 용혈소(hemolysin titer)를 측정하기 위하여 면역을 유발시킨 생쥐의 심장에서 채혈한 혈청을 분리하여 얻은 혈청을 56℃에서 30분동안 비동화시킨 다음, 96 well의 microtitration plate의 각 well에 PBS buffer(pH 7.2)로 2배로 serial dilution한 희석한 혈청 25ul에, 보체로써 5배 희석한 토끼의 혈청을 25ul씩 가한 후, 0.5% 면양적혈구 부유액을 50ul씩 가하여 잘 혼합한 다음 37℃, 5%, CO<sub>2</sub> incubator내에서 1시간 방치한 후 면양적혈구가 완전히 용혈을 일으키는 혈청의 최고희석배수를 용혈소가로 측정하였다.



### 3, 3. 제 2 세부 과제명: 국내산 백화사설초의 항암효과에 관한 연구

#### 가. 세포암주 및 배양

실험에 사용된 암주는 A549(human lung adenoma)이다. 세포주는 10%의 FBS가 함유된 RPMI-1640배지를 사용하여 배양하였다.

#### 나. DNA fragmentation

Bio-Q를 처리한 cell을 수거하여 PBS로 세척한후 lysis buffer( 20 mM Tris-Hcl(pH8.0), 10 mM EDTA(pH8.0), 0.2 % Triton X-100) 450  $\mu$ l를 넣고 pipetting을 한뒤 ice에서 20분 방치한 후, 13000g 4°C에서 15분간 원심분리한다. 원심분리 후 상층액을 취하여 20 mg/ml proteinase K를 50  $\mu$ l를 넣고, 50°C에서 overnight을 한다. 2 volume 100% EtoH, 1/10 wolume 3M sodium acetate를 넣고 inverting 10번정도 한후 -70°C에서 2시간 방치한후, 12000g 4°C에서 15분간 원심분리를 한 뒤 상층액을 버리고 70% EtoH 1ml를 넣고 12000g 4°C에서 10분간 washing을 2번 반복한다. pellet을 dry한 후 RNase(10 mg/ml) 20  $\mu$ l와 멸균 증류수 180  $\mu$ l를 만들어서 DNA에 30  $\mu$ l씩 넣고 tapping해서 녹인후, 37°C 30분 동안 incunation한뒤 1.5% agarose gel 에 loading한다.

#### 다. 세포주기 분석

Bio-Q를 처리한 cell을 수거하여 PBS로 세척한 후 75% cold ethanol을 넣고 -20°C에서 1시간이상 방치하였다.원심분리한후 상층액을 제거하고 PBS로 세척하였다. PBS 100  $\mu$ l 에 cell을 부유한 후 RNase A (20 mg/ml) 10  $\mu$ l를 처리하고 37°C에서 30분간 방치하였다. PI( 50  $\mu$ g/ml) 400  $\mu$ l를 첨가한후 실온, 암실에서 30분간 방치한후 FACS로 분석하였다.

#### 라. Western blot ( Caspase & PARP 발현)

Bio-Q를 처리한 cell을 수거하여 PBS로 세척하고 100ul lysis buffer(50mM Tris-HCl, pH7.4,150mM NaCl, 10% Triton X-100, 0.1%SDS, 1mM EDTA, protease inhibitor cocktail)을 넣고 얼음상에서 30분간 방치한 후 12000rpm,4°C에서 20분간 원심분리한다. 상층액의 단백질을

Bio-Rad DC protein assay kit II를 이용하여 정량한 후 20ug 의 단백질을 4XSDS sample buffer 와 혼합하여 5분간 끓인다. 얼음상에서 5분간 식힌후 살짝 원침하여 4-12% SDS-polyacrylamide gels에서 전기영동한다. 이후 300mA에서 2시간동안 nitrocellulose membrane에 transfer한다. Transfer된 membrane을 0.1% Tween 20와 5% skim milk가 포함된 TBS buffer로 실온에서 3시간 blocking시킨후 mouse anti-human caspase-3, mouse anti-human PARP를 0.1% Tween 20와 3% skim milk가 포함된 TBS buffer에 희석하여 4℃ overnight으로 반응시킨다. 0.1% Tween 20이 포함된 TBS buffer로 10분간 4회 세척후 1:2000으로 희석한 goat anti-rabbit IgG Hoseradish peroxidase conjugated secondary antibody를 실온에서 2시간동안 반응시킨다. 0.1% Tween20이 포함된 TBS buffer로 10분간 4번 세척한 후 ECL western blotting detection kit로 발색시킨후 X-ray films에 노출시켜 확인한다.

### 3, 4. 협동과제명 : 백화사설초를 이용한 식품 소재화 및 소재화 기반 연구

Bio-Q를 이용한 기능성 음료제품개발-RNL생명과학(주)

#### 가. 실험재료

##### 1). 재료

본 실험에서 사용된 백화사설초는 부산의 대도농산에서 공급받았으며 홍삼엑기스는 보락(주)에서 공급받아 사용하였다. 매실 농축액은 (주)코맥스인터네셔널에서 공급받았고 나머지 저령, 백봉령, 진피, 당귀, 산약, 백출, 아가리쿠스는 경동시장내의 동양한약유통(주)에서 구입하여 사용하였다.

##### 2). 약재 전처리

백화사설초, 저령, 백봉령, 진피, 당귀, 산약, 백출, 아가리쿠스버섯을 각각 분쇄기를 사용하여 마쇄한 후 각각 백화사설초 200g, 저령 40g, 백봉령 40g, 진피 40g, 당귀 40g, 산약 40g, 백출 40g, 아가리쿠스버섯 100g 씩 혼합하여 시료를 준비하였다.

#### 나. 시약 및 기기

Rotary Vacuum Evaporator는 Eyela N-2-AJ (선일이엘라, Japan)을 사용하였고 추출에 사용된 Water bath는 비전과학의 기기를 사용하였다. 약재 분쇄시 사용한 분쇄기는 한일전기사의 HMF-370 모델을 사용하였으며, 증류수제조장치는 Millipore사의 Water purification system을 사용하였고 살균시 사용한 autoclave는 대륜과학 DR 1204를 사용하였다.

#### 다. 실험방법

##### 1). 추출 및 건조

준비된 시료를 5시간동안 2회 반복 열수추출 하였으며, 45℃에서 감압 농축한 후 추출물을 동결 건조하여 본 음료용 개발 원료로 사용하였다.

2). 음료의 향미 및 영양성강화 시험

음료의 기호성 향상 및 영양성 강화를 위해 이소말토올리고당, 프락토올리고당분말, 결정 과당, 비타민 C, 사과산, 매실향, 사과향을 조절하여 기호성이 높은 최적 배합비를 정하였다.

3). 관능검사

바이오 Q를 정수에 용해하여, 맛과 색상을 파악하고, 맛과 어울릴 수 있는 당류를 선발하였고, 비타민C와 산미료를 가하면서 적당한 맛과 그 때의 pH를 결정하였다. 제품의 물성 및 항암효능의 상승을 위하여 정장작용이 있는 올리고당류를 첨가하여 맛에 미치는 영향을 조사하였다. 제품 개발 중의 관능검사는 5인 이상의 당사 연구소 및 관리 직원을 대상으로 Scoring test로 평가하였고, 최종 제품의 경우에는 10인을 대상으로 평가하였다.

표. 1. 기능성 음료 설문지

<p><b>기능성음료 설문지</b></p> <p>(평가일 : 2005. . . .)</p> <p>* 다음 시료를 맛보시고, 각 시료별로 점수를 1점 ~ 9점까지 기록해 주십시오. (1점 : 아주 좋지 않다 3점 : 좋지 않다 5점 : 보통이다 7점 : 좋다 9점 : 아주 좋다)</p> <p>1. 제품의 단맛은 어떻습니까?</p> <p>2. 제품의 신맛은 어떻습니까?</p> <p>3. 제품의 쓴맛은 어떻습니까?</p> <p>4. 제품의 향미는 어떻습니까?</p> <p style="text-align: center;">감사합니다!</p>
---

#### 4). 용기형태 결정 및 적정 살균조건 검토

용기형태는 고급 드링크를 표방하고자 대형마트의 고급 음료들을 위주로 시장조사를 실시하였으며 용기의 재질은 살균의 편의성을 위해 유리재질로 결정하였다. 100℃에서 30분간 살균후 총균수와 대장균군 검사를 실시하였으며 총균수 검사에는 SPC agar를 이용하였고 대장균군 검사는 3M사의 페트리 필름을 이용하여 시험하였다.

## 제 2 절 연구수행 결과

### 1. 1차년도

#### 1, 1. 제 1 세부 과제명: 백화사설초의 면역조절 작용 연구

##### 가. 지연형 과민반응(Delayed Type Hypersensitivity)

면양세포를 족척에 주사하여 야기된 부종이 대조군에서  $0.109\pm 0.035$ 로 나타났으며 중국산 백화사설초가 농도 의존적으로  $0.144\pm 0.055$ ,  $0.147\pm 0.041$ 로 모두 유의성있게 증가하였지만 국산 백화사설초와 국산백화사설초 뿌리에서서는 대조군과 별차이가 없거나 대조군보다 이하의 수치를 나타냈다.

Table. 1. Effects of *Oldenlandia Diffusae Herba* on delayed type hypersensitivity response to SRBC in BALB/C Mice

Group	No. of animals	Footpad Sweeling(mm)
Control	10	$0.109\pm 0.035$ ab*
K25	10	$0.079\pm 0.042$ b*
K50	10	$0.085\pm 0.034$ b*
KR25	10	$0.099\pm 0.036$ b*
KR50	10	$0.103\pm 0.028$ b*
C25	10	$0.144\pm 0.055$ a*
C50	10	$0.147\pm 0.041$ a*

\*  $p < 0.05$

나. 적혈구 응집소가의 측정

Table. 2. Effects *Oldenlandiae Herba* and *Oldenlandiae Herba* cortex on hemagglutinin titer of response of SRBC in BALB/C Mice

Group	No. of animals	Hemagglutinin (log2 titer)
Control	6	8.3±0.52
K25	6	8.2±0.45
K50	6	7.8±0.41
KR25	6	8±0.0
KR50	6	8.2±0.45
C25	6	8.3±0.52
C50	6	8.2±0.45

Mean ± Standard Error

(K: 국산 백화사설초, KR: 국산 백화사설초 뿌리, C: 중국산 백화사설초, 25: 25mg/mouse, 50:50mg/mouse)

실험결과 대조군과 차이 없이 적혈구 응집소가에는 유의적인 효과가 보이지 않았다.

적혈구 용혈소가의 측정

Table. 3 . Effects *Oldenlandiae Herba* and *Oldenlandiae Herba* cortex on hemolysin of response of SRBC in BALB/C Mice

Group	No. of animals	Hemolysin (log2 titer)
Control	6	8.8±0.41
K25	6	9.4±1.14
K50	6	8.5±0.55
KR25	6	8.8±0.41
KR50	6	8.8±0.45
C25	6	8.8±0.41
C50	6	8.8±0.45

Mean ± Standard Error

(K: 국산 백화사설초, KR: 국산 백화사설초 뿌리, C: 중국산 백화사설초, 25: 25mg/mouse, 50:50mg/mouse)

실험결과 대조군과 차이 없이 적혈구 용혈소가에는 유의적인 효과가 보이지 않았다

다. 비장의 무게와 세포수를 측정한 결과

비장의 무게와 세포수를 측정한 결과 유의한 결과를 보이는 것은 한국산 전초 50mg/mouse로 투영한 군과 한국산 뿌리 각각의 군이었으며 특히 한국산 뿌리의 경우 25mg/mouse와 50mg/mouse의 경우 각각  $2.88 \pm 0.09$ 과  $3.01 \pm 0.11$ 으로 평균 0.06에서 0.2g 정도 증가한 것으로 나타났다. 중국산 전초의 경우에는 오히려 세포수가 비슷하거나 감소한 것으로 나타나 독성이 강한 것으로 보여졌다.

Table. 4.Effects of oldenlandiae diffusa Herba on spleen weight of response in BALB/C mice. d: Mean  $\pm$  standard error, P value: Statistically significant value compared with control data.(\*; P<0.05, \*\*; P<0.01)

Group	No. of animals	Dosage (mg/animal)	Spleen weight (g/animal)	Total spleen cells ( $\times 10^7$ /ml/mouse)
Normal	10	0	0.1441	$2.82 \pm 0.2^d$
Control	10	0	0.1443	$2.79 \pm 0.18$
Korea	9	25	0.1688	$2.82 \pm 0.11^*$
Korea	9	50	0.1701	$3.02 \pm 0.03^*$
Korea, Roots	10	25	0.1642	$2.88 \pm 0.09^*$
Korea, Roots	8	50	0.1714	$3.01 \pm 0.11^{**}$
China	10	25	0.1566	$2.8 \pm 0.12^{**}$
China	10	50	0.1685	$2.82 \pm 0.08^*$



**마. Rosette forming cell assay**

Rosette forming cell assay 에서는 대조군이  $58 \pm 5.56$  인 데 비해 한국산 전초, 한국산 뿌리 모두 유의한 결과를 보였다. 특히 한국산 뿌리 50mg/mouse를 투여한 경우  $80.2 \pm 5.52$ 로 가장 효과적인 결과를 보였다. 중국산 전초는 25mg/mouse와 50mg/mouse를 투여한 경우 각각  $63.5 \pm 6.25$ 와  $57.2 \pm 5.78$  으로 대조군보다 조금 높거나 낮은 수치를 보였다.

Table. 5. Effects of oldenlandiae diffusa Herba on appearance of Rosette Forming Cells response in BALB/C mice. d: Mean  $\pm$  standard error, P value: Statistically significant value compared with control data.

Group	No. of animals	Dosage (mg/animal)	$10^3\text{RFC}/10^6$ spleen cells	P-value
Normal	10	0	$52 \pm 1.2^d$	
Control	10	0	$58 \pm 5.56$	
Korea	9	25	$72.3 \pm 3.32$	< 0.01
Korea	9	50	$75.2 \pm 4.45$	< 0.01
Korea, Roots	10	25	$76.5 \pm 3.68$	< 0.01
Korea, Roots	8	50	$80.2 \pm 5.52$	< 0.01
China	10	25	$63.5 \pm 6.25$	< 0.01
China	10	50	$57.2 \pm 5.78$	< 0.01

**바. PFC assay**

PFC assay에서도 마찬가지로 한국산 뿌리, 한국산 전초의 순으로 유의한 결과를 보였으며 특히 한국산 뿌리의 경우 대조군에 비해 1.8배에 가까운 plaque forming cell을 보여 가장 효과적임을 나타내었다.

Table. 6. Effects of oldenlandiae diffusa Herba on appearance of Plaque Forming Cells response in BALB/C mice. d: Mean  $\pm$  standard error, P value: Statistically significant value compared with control data.

Group	No. of animals	Dosage (mg/animal)	$10^3$ RFC/ $10^6$ spleen cells	P-value
Normal	10	0	138 $\pm$ 22.3 <sup>d</sup>	
Control	10	0	142.4 $\pm$ 31.2	
Korea	9	25	211.5 $\pm$ 30.2	< 0.05
Korea	9	50	221.3 $\pm$ 28.4	< 0.05
Korea, Roots	10	25	236.2 $\pm$ 21.9	< 0.05
Korea, Roots	8	50	257.6 $\pm$ 23.2	< 0.05
China	10	25	156.3 $\pm$ 21.8	< 0.05
China	10	50	147.8 $\pm$ 18.2	< 0.05

#### 사. carbon clearance assay

carbon clearance 의 경우에는 한국산 전초를 제외하고 모두 유의한 결과를 보였으며 한국산 뿌리의 경우에는 농도에 관계없이  $0.023 \pm 0.003$  전후의 값을 보였으나 10~15분의 Phagocyte index K 의 경우  $0.012 \pm 0.002$  에서  $0.015 \pm 0.004$  로 유의성 있게 증가하였으며 한국산 전초도 10~15분의 Phagocyte index K 가  $0.009 \pm 0.003$  에서  $0.016 \pm 0.002$ 으로 증가하여 가장 높은 증가폭을 나타내었다. 중국산 전초는 초기 Phagocyte index K값은 유의성있게 증가하였으나 10~15분의 Phagocyte index K값은 대조군보다 낮아 유효성은 없는 것으로 보인다.

Table. 7. Effects of oldenlandiae diffusa Herba on Phagocytic index K of response in BALB/C mice. d: Mean  $\pm$  standard error, P value: Statistically significant value compared with control data. (\*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$ )

Group	No. of animals	Dosage (mg/animal)	Phagocyte index K	
			K <sub>5-10</sub>	K <sub>5-15</sub>
Normal	10	0	$0.016 \pm 0.002^d$	$0.005 \pm 0.006$
Control	10	0	$0.016 \pm 0.003$	$0.008 \pm 0.004$
Korea	9	25	$0.018 \pm 0.002^{**}$	$0.009 \pm 0.003^{**}$
Korea	9	50	$0.022 \pm 0.001^*$	$0.016 \pm 0.002^*$
Korea, Roots	10	25	$0.023 \pm 0.003^*$	$0.012 \pm 0.002^{**}$
Korea, Roots	8	50	$0.023 \pm 0.001^{**}$	$0.015 \pm 0.004^*$
China	10	25	$0.021 \pm 0.004^{**}$	$0.012 \pm 0.003^*$
China	10	50	$0.027 \pm 0.003^{**}$	$0.013 \pm 0.005^*$

## 아. Proliferation assay

Proliferation assay를 시행한 결과 한국산 전초 25mg/mouse 의 경우 400 $\mu$ g/ml 의 배지에서 126% 의 proliferation 증가치를 기록하였으나 200 $\mu$ g/ml의 농도에서는 positive control 보다 낮았으며 50 mg/mouse 의 경우 꾸준히 증가하는 경향을 나타내었으나 128% 이상 증가하지는 않았다. 한국산 뿌리의 경우 25mg/mouse, 50mg/mouse 모두 각각 증가하였으며 특히 50mg/mouse 의 경우 400 $\mu$ g/ml 의 배지에서 160% 이상 증가하여 가장 효과적임을 입증하였다. 중국산 전초의 경우 25mg/mouse 는 대조군의 편차에 머무르는 수준이었으며 50mg/mouse의 경우는 오히려 proliferation이 계속 감소하는 것으로 나타났다. 이는 중국산 전초의 독성 때문인 것으로 생각된다. 처방을 이용한 경우 1mg/mouse 보다는 5mg/mouse 의 proliferation 효과가 gnjFTLs 좋은 것으로 나타났으나 농도별 증가율은 1mg/mouse 가 효과적으로 나타났다. Huvec cell 의 assay 결과는 300 $\mu$ g/ml 의 처방농도에서 118% 증가하는 것으로 나타났지만 positive control 보다 낮은 증가율로 유의한 결과를 보이진 못했다. 처방은 monocytic cell에서는 효과적이었지만 epithelial cell에서는 효과적이지 못했다.

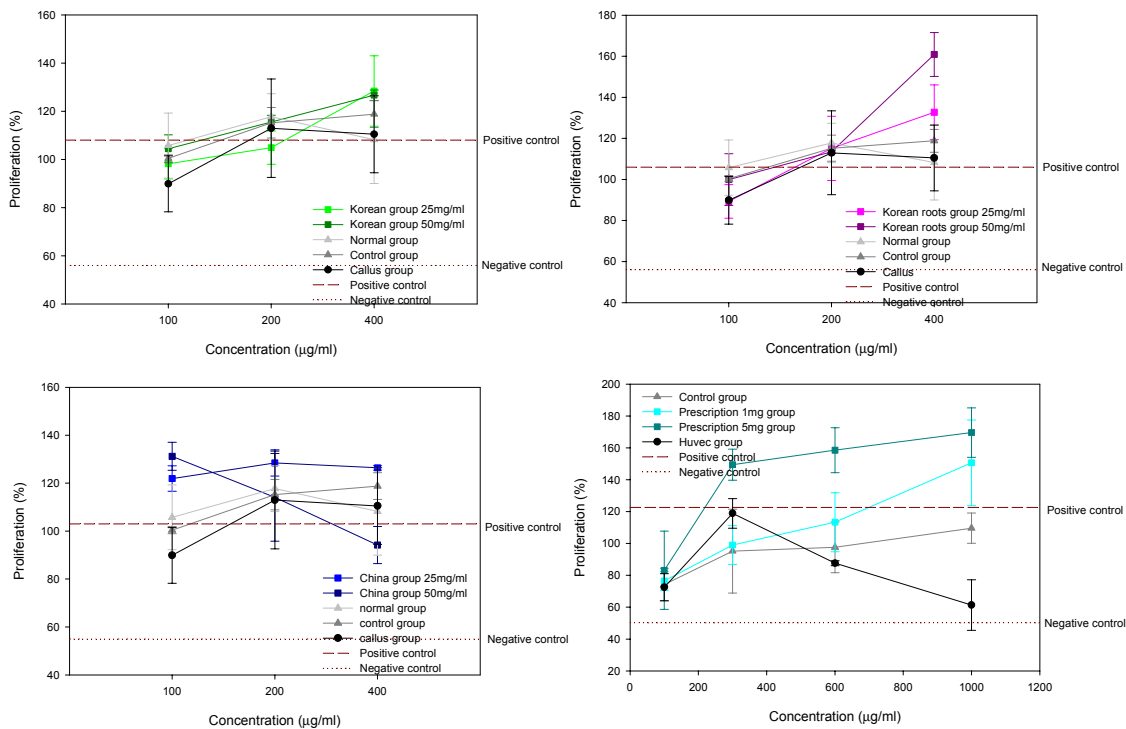
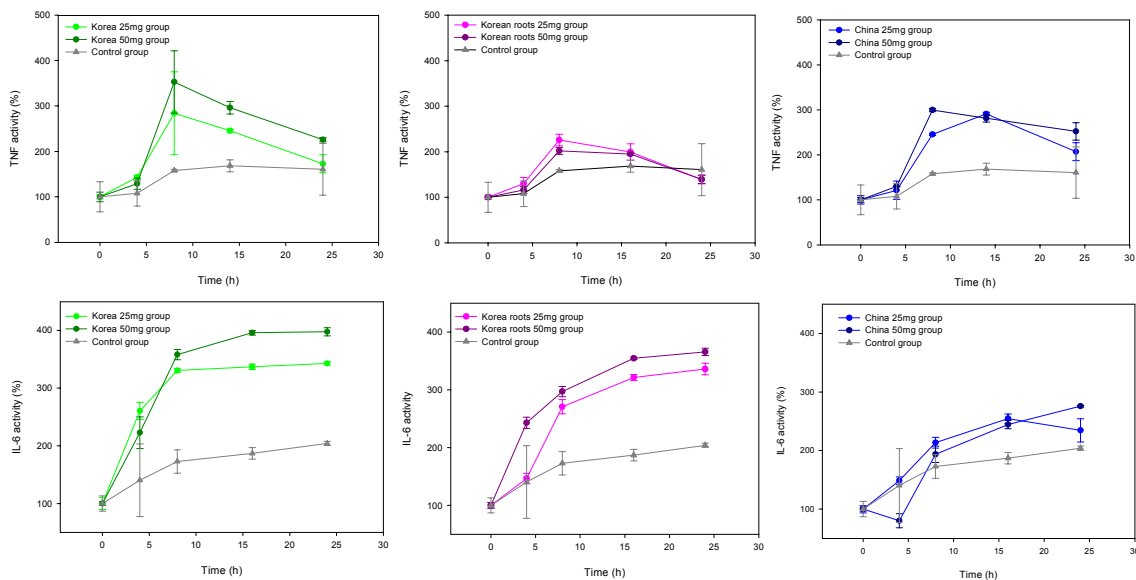


Fig. 1. Effects of oldenlandiae diffusa Herba or prescription on proliferation of murine spleenocytes and huvec cells.

## 자. ELISA assay

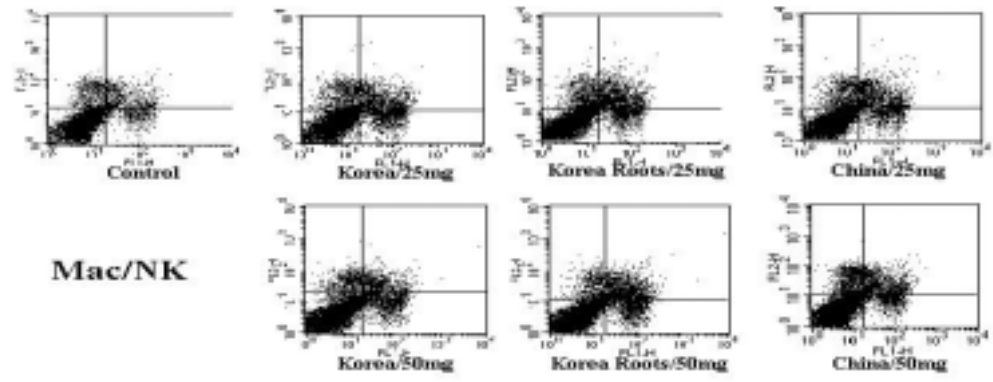
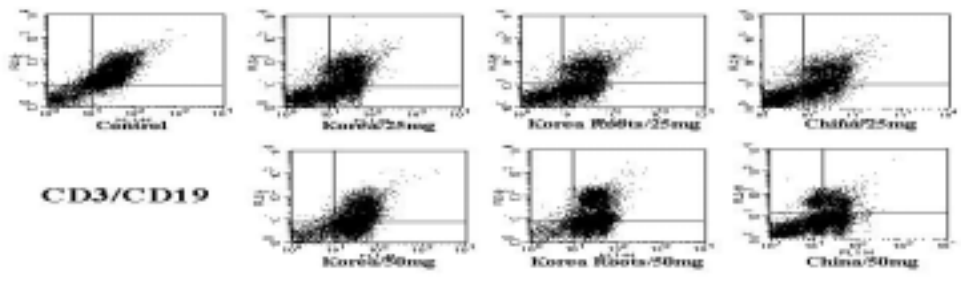
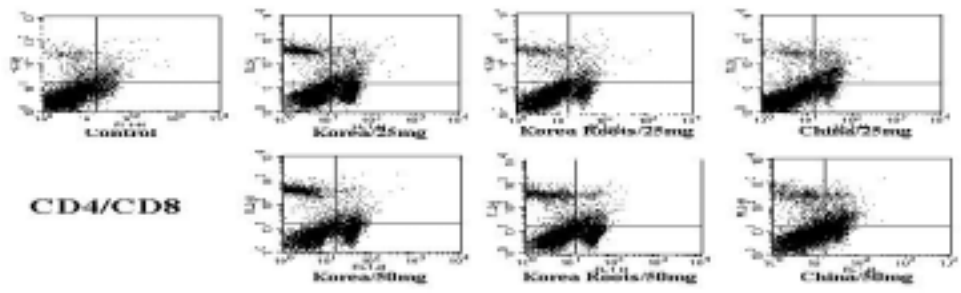
ELISA assay의 titration은 1로 오차범위 0.001 미만의 값만 선별하여 통계를 낸 결과 중국산 전초의 경우 TNF- $\alpha$  는 200% 정도 증가하는 것으로 나타났다. 중국 전초의 농도는 25mg/mouse의 TNF- $\alpha$  최고점에 도달하는 시간이 8시간쯤인데 비해 50mg/mouse 의 경우 4시간안에 도달했다는 것이다. 이것으로 TNF- $\alpha$  activity의 경우 농도 비례적으로 움직이는 것을 발견할 수 있는데 이는 proliferation assay 결과에서와 같이 오히려 50mg/mouse 의 경우 proliferation 이 오히려 억제되는 경우와 일치하고 있다. 한국산 전초는 어느 농도에서나 8시간에 가장 높은 activity를 보이다가 급격하게 감소하는 추세를 보이고 있으며 한국산 뿌리의 경우에는 activity가 거의 나타나지 않고 있는 것을 볼 때 한국산 전초나 뿌리는 TNF- $\alpha$  activity를 억제하거나 TNF- $\alpha$  까지 도달하는 어떤 경로를 차단함으로써 inflammation을 억제할 수 있는 것으로 생각된다. IL-6의 경우도 마찬가지로 중국산 전초의 경우 260% 이상을 넘지 못한 반면 한국산 전초와 한국산 뿌리는 400% 가까이 증가함으로써 interleukin 반응에 영향을 끼치고 있는 것으로 나타났다. 또한 interleukin-6 의 경우 중국산 전초, 한국산 전초, 한국산 뿌리 모두의 농도에 상관없이 200% 미만으로 증가했다가 감소하거나(중국산 전초), 350% 이상 급격히 증가함(한국산 전초 및 뿌리) 을 보여 농도와의 유의성은 보이지 않고 있었다.



## 차. Flow cytometry

Flowcytometry의 결과 중국산 전초의 경우 농도에 상관없이 CD8 (PE) 의 비율이 32.4% 이상 되었고 한국산 전초나 한국산 뿌리에서는 CD3/CD4 (FITC) 의 비율이 65.5% 이상으로 증가한 것을 볼 수 있었다. murine cell 이 첫 번째로 분화하는 형태가 CD3 (mature), CD4 (helper) 그리고 CD8 (cytotoxic) 이다. 한국산 전초와 뿌리의 경우 CD3와 CD4/CD8 의 분화를 촉진하기는 했지만 중국산에서는 CD4의 발현율이 낮게 측정되었고 major histocompatibility complex (MHC) class I type의 macrophage, B cells 은 거의 나타나지 않고 대조군과 같은 수준의 발현을 보였다. flowcytometry 분석 결과 CD3/CD4/CD8로 분화하는 비율은 유의성 없이 농도에 의존하지 않고 분화하는 정도가 비슷하며 중국산에서는 CD8의 비율이 한국산 전초와 뿌리는 CD3/CD4의 발현율에 더 효과적임을 발견하였다.

Samples	Dasage (mg/mouse)	CD3 / CD19 (FLH1/FLH2)	CD4 / CD8 (FLH1/FLH2)	Mac / NK (FLH1/FLH2)
Normal	0	5.2±0.1/0.8±0.1	4.8±0.1/1.8±0.1	2.2±0.1/0.5±0.2
Control	0	7.9±0.3/1.1±0.1	6.1±0.2/1.3±0.1	1.9±0.2/0.3±0.1
Korea	25	51.2±0.1/11.2±0.1	48.9±0.3/21.3±0.3	5.8±0.1/1.8±0.1
	50	60.2±0.1/12.2±0.3	58.1±0.3/22.2±0.3	4.8±0.3/2.8±0.2
Korea, Roots	25	58.8±0.1/9.8±0.2	55.7±0.1/21.5±0.2	3.9±0.2/1.4±0.2
	50	65.5±0.1/12.2±0.3	64.2±0.1/25.6±0.2	5.2±0.2/2.8±0.1
China	25	41.2±0.1/13.2±0.1	45.2±0.1/30.2±0.3	5.2±0.1/2.2±0.3
	50	35.5±0.1/13.8±0.2	48.4±0.1/32.4±0.1	6.5±0.1/1.6±0.1



카.

카. TPA로 분화시킨 U937 cell line에서 백화사설초로 인한 inflammation에 관여 하는 cytokine인 IL-1 $\beta$ 의 발현측정



Fig. 2. Effect of Korea, china and Korea root of *Oldenlandia diffusa* WILLD on the expression of IL-1 $\beta$  mRNA in U937 cells. TPA induced IL-1 $\beta$  production in U937 cells. (lane 1: Control, lane 2: 국내산 100  $\mu$ g/ml, lane 3: 국내산 200  $\mu$ g/ml, lane 4: 국내산 400  $\mu$ g/ml, lane 5: 중국산 100  $\mu$ g/ml, lane 6: 중국산 200  $\mu$ g/ml, lane 7: 중국산 400  $\mu$ g/ml, lane 8: 국내산 뿌리 100  $\mu$ g/ml, lane 9: 국내산 뿌리 200  $\mu$ g/ml, lane 10: 국내산 뿌리 400  $\mu$ g/ml)

Inflammation에 관여하는 IL-1 $\beta$ 의 cytokine의 발현양상을 본 결과 국내산 100  $\mu$ g/ml에서는 IL-1 $\beta$ 의 발현이 감소됨을 확인 할 수 있었으며, 중국산은 100  $\mu$ g/ml 에서 400  $\mu$ g/ml까지 모두 IL-1 $\beta$ 의 발현이 감소됨을 확인 할 수 있었다. 국내산 뿌리는 200  $\mu$ g/ml과 400  $\mu$ g/ml에서 IL-1 $\beta$ 의 발현이 감소됨을 확인 할 수 있었다.



## 1, 2. 제 2 세부 과제명: 백화사설초의 항암효과에 관한 연구

### 가. 세포독성 측정

암주에 대한 세포 독성은 함암성을 평가하는데 가장 기반이 되는 실험으로 약제의 독성을 검증하여 항암 실험에 대한 방향을 설정하게 해줄 수 있다. 본 실험에서는 각지 HT1080에 대한 세포 독성을 실험하였다. 비교적 국산 뿌리와 중국산 백화사설초가 그중 독성이 높게 보여지나 이 역시 세포 독성이 크지 않았다.

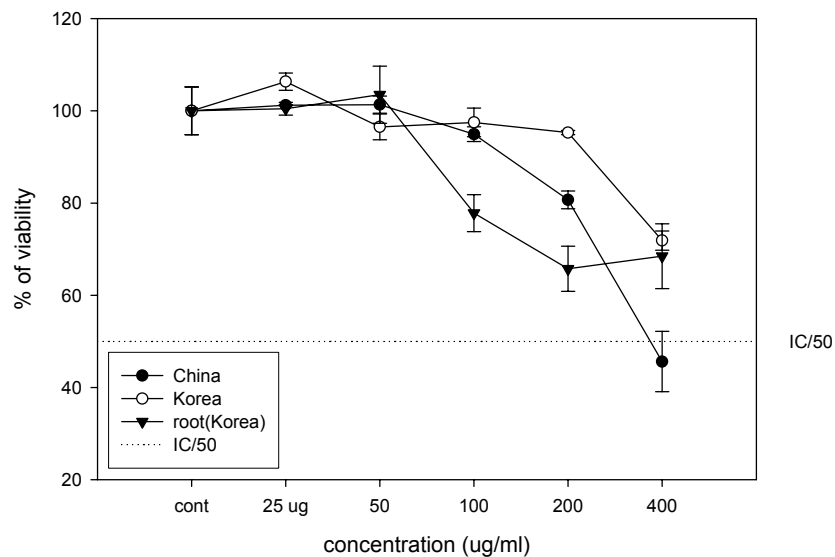


Fig. 1. Cytotoxicity of China, Korea and Korea root from *Oldenlandia diffusa* WILLD. on HT1080

## 나. 암세포 부착저지 효과

백화사설초의 암세포 부착저지 효과를 측정하였던바, 중국산 백화사설초, 국산 백화사설초, 국산백화사설초의 뿌리에서는 20-40%의 부착저지효과를 보이는 반면 국산백화사설초의 callus 400ug/ml의 농도에서 60%의 부착저지 효과를 보였다.

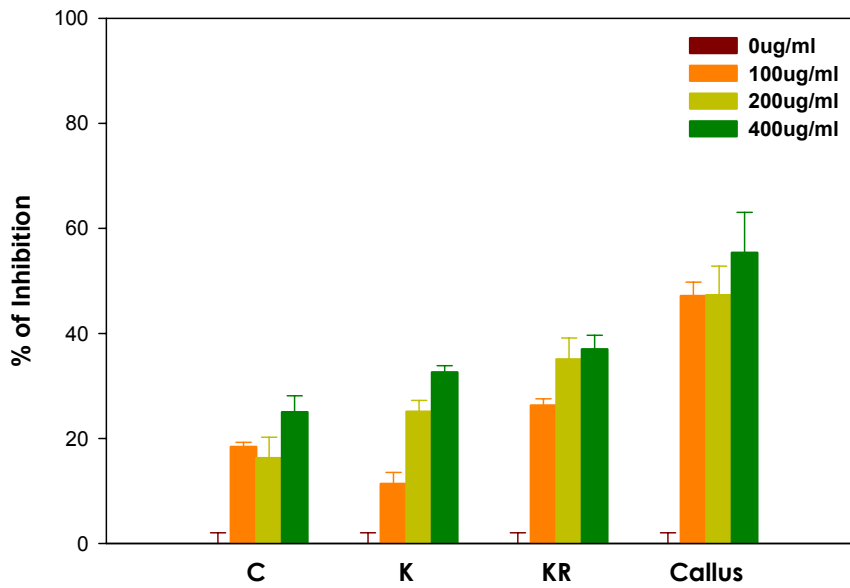


Fig. 2. Inhibitory effects of *Oldenlandiae Herba* on the adhesion of HT1080 into gelatin

#### 다. Tube formation

HUVEC을 이용한 Tube Formation assay에서 positive control에서는 tube 형성수가 22개인데 반해 나머지 모든 백화사설초 에서는 tube형성이 되지 않았음을 확인할수 있었다. 그러므로 산지별, 부위별 차이 없이 모든 농도에서 혈관 내피세포의 분화에 의한 혈관형성을 저해시켰다.

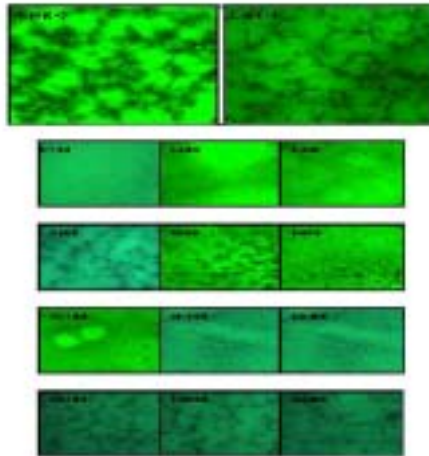


Fig.3 . Tube Formation assay of *Oldenlandia Diffusae Herba*  
K(한국산), KR(한국산뿌리), C(중국산), Ca(국산 Callus)  
100(100ug/ml), 200(200ug/ml), 400(400ug/ml)

라. 국내산 백화사설초의 전초, 뿌리와 중국산 백화사설초의 항암활성효과

백화사설초 국내산, 중국산, 국내산 뿌리의 항암활성효과 중 항전이 실험으로 세포 외 기질 분해 효소인 uPA, MMP2, 그것의 억제인자인 TIMP2의 mRNA 발현을 보았다. 국내산 전초는 세포 외 기질 분해효소인 MMP2의 발현이 200  $\mu\text{g/ml}$  에서부터 400  $\mu\text{g/ml}$  까지 발현이 감소됨을 확인 하였으나, uPA와 TIMP2의 발현에는 변화가 없었다. 중국산 전초는 세포외 기질분해효소인 MMP2의 억제인자인 TIMP2의 발현이 100  $\mu\text{g/ml}$  에서부터 400  $\mu\text{g/ml}$  까지 농도의존적으로 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 그러나 uPA와 MMP2의 발현에는 변화가 없음을 확인할 수 있었다. 국내산 뿌리는 세포 외 기질분해효소 중 하나인 uPA의 발현이control에 비해 감소됨을 확인할 수 있었으며 또한 TIMP2의 발현이 증가함을 알 수 있었다.

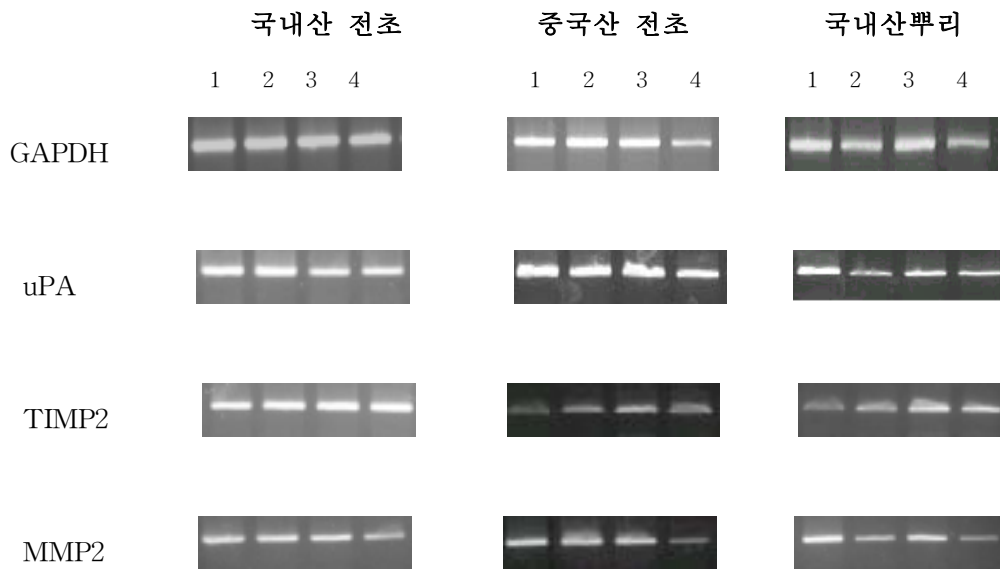


Fig. 4. Effect of Korea, china and Korea root of *Oldenlandia diffusa* WILLD on the expression of uPA, TIMP2 and MMP2 mRNA in HT1080 cells by RT-PCR analysis. (lane 1:Control, lane 2: 100  $\mu\text{g/ml}$ , lane 3: 200  $\mu\text{g/ml}$ , lane 4: 400  $\mu\text{g/ml}$ )

#### 마. DNA Topoisomerase I assay

DNA의 synthesis에 작용을 하여 세포의 증식을 억제하는 효능을 가지고 있는지의 여부를 확인하고자 DNA Topoisomerase I assay를 실행한 결과 Fig. 에서 보는바와 같이 DNA만을 처리한 실험군은 supercoiled form으로 나타났으며, DNA에 Topo-I을 처리한 대조군은 relaxed form으로 전환되었다. 백화사설초 국내산, 중국산, 국내산 뿌리는 Topo-I의 활성을 억제하지 못한 것으로

보아 DNA synthesis에는 관여하지 않는 것으로 확인 할 수 있었다.



Fig. 5 .Korea china and Korea root of *Oldenlandia diffusa* WILLD inhibit DNA Topoisomerase I.( lane 1: DNA only, lane 2:DNA+TOPO I, lane 3: 국내산 100 µg/ml, lane 4: 국내산 200 µg/ml, lane 5: 국내산 400 µg/ml, lane 6: 중국산 100 µg/ml, lane 7: 중국산 200 µg/ml, lane 8: 400 µg/ml, lane 9: 국내산 뿌리 100 µg/ml, lane 10: 국내산 뿌리 200 µg/ml, lane 11: 국내산 뿌리 400 µg/ml)

**바. S-180이 이식된 생쥐의 생존비에 미치는 효과**

S-180 이 이식된 생쥐에 국산 및 중국산 백화사설초를 7일간 경구 투여한 후 체중증가를 측정하였던바, 복수암으로 인한 체중 증가는 대조군에서는 암주 이식 후 8일에 급격히 증가하여 10일에 모두 죽었다. 평균 생존일수에서 대조군의 MST는 8.3일, 국산 백화사설초 전초 25mg, 50mg에서 각각 10.6일, 11.2일로 중국산 백화사설초 전초 25mg, 50mg는 각각 12일 18.3일, 국산 백화사설초 뿌리 25mg, 50mg의 농도 각각에서 10.1일, 14.2일로 나타났다. (Table 1., Fig. 6.)

Table 1. Effect of *Oldenlandiae Herba* on MST and T/C% in ICR Mice Bearing

Group	No. of animals	MST(day)	T/C %
Control	7	8.3	100
K25	7	10.6	127.7
K50	7	11.2	134.9
C25	7	11.5	138.5
C50	7	18.25	219.9
KR25	7	10.6	127.7
KR50	7	14.2	171

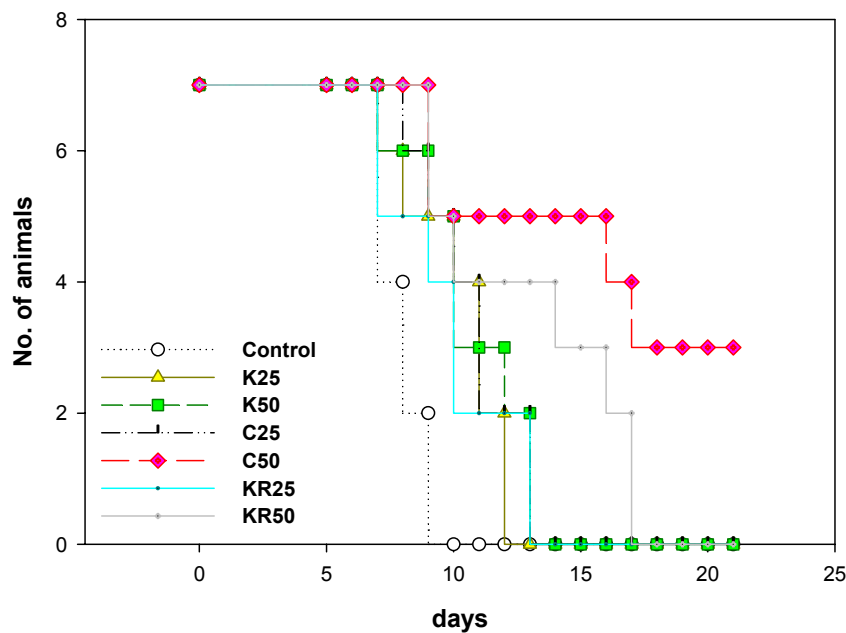


Fig.6 . Effect of *Oldenlandiae Herba* on the survival of sarcoma 180 tumor bearing mice.(K: 국산 백화사설초, KR: 국산 백화사설초 뿌리, C: 중국산 백화사설초, 25: 25mg/mouse, 50:50mg/mouse)

S-180이 이식된 생쥐의 생존비에 미치는 효과에서는 생리식염수만을 경구 투여한 control군보다 백화사설초를 경구투여한 모든 군에서 T/C%가 높게 나왔으며 그 중에서도 중국산과 국산 백화사설초 50mg/mouse 농도에서 각각 219%, 171%로 가장 높게 나왔다.

### 1, 3,. 협동과제:백화사설초를 이용한 식품 소재화 및 소재화 기반 연구

#### 가. 백화사설초의 현탁세포배양에 의한 oleanolic acid 생산

중국 약용 식물들은 중국에서 전통적으로 많은 질병을 예방하거나 치료하는데 쓰여 왔다. 중국 약용 식물 중의 하나인 백화사설초는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 1년 생 초본인 쌍낚시돌풀 *Oldenlandia diffusa*(Willd.) Roxb.의 전초로서 항암효과, 소염작용 등의 효능이 있다. 이는 습기가 많은 산기슭에 자라는데 중국에서는 복건, 광둥, 광서, 운남성 및 양자강 남쪽지방에 주로 분포하며, 우리나라에서는 전남의 백운산 및 제주도에 자생하고 있으며 부산에서 재배하고 있다<sup>1)</sup>. Triterpenoid 화합물인 oleanolic acid와 ursolic acid는 이성질체이며 백화사설초에 포함되어 있다. 이들은 간 보호, 항염증, 항암, 항체형성 촉진 등의 효과가 알려져 있다<sup>2)</sup>.

식물세포배양은 직접적인 식물재배와는 달리 지리적, 환경적 영향을 받지 않으면서 다양한 유용물질들을 생산할 수 있다. 식물세포배양의 장점은 식물체에 비하여 생장이 빠르므로 유전적으로 균일한 개체의 급속 증식이 가능하며, 성장 조건의 조정, 유전자 조작 등으로 여러 가지 변화를 줄 수 있다는 것이다.

본 연구에서는 oleanolic acid의 생산을 위해 백화사설초의 현탁세포를 유도하여 배양하였고, oleanolic acid의 추출 및 분석 조건을 확립하였다.

백화사설초의 캘러스를 유도하기 위하여 먼저, 백화사설초의 종자를 표면멸균을 하여 발아시켰다. 무균 조건하에서 발아시킨 백화사설초의 잎을 사용하여 0.5 mg/L 2,4-D와, 0.1 mg/L kinetin이 첨가된 SH배지에서 캘러스를 유도하였다. 또한 동일한 배지를 사용하여 캘러스로부터 현탁세포를 유도하였다(Figure 1).

Oleanolic acid가 소수성 물질이라는 것에 착안하여 역상 컬럼을 사용한 HPLC로 분석하였다. 분석에 사용한 컬럼으로는 Rexchrom S5-100-ODS column, Metasil 5 $\mu$  ODS column, Capcell Pak C18 column이며, 이 중에서 Rexchrom S5-100-ODS column의 분리능이 가장 좋았다. Photodiode array detector로 oleanolic acid의 최적 UV 파장을 검색한 결과, 200 nm에서 최적의 UV 흡광도가 나타났다. 이동상은 acetonitrile과 water를 80:20으로 하고, 유속은 1.0 mL/min로 결정하였다. 백화사설초의 현탁세포 추출물의 oleanolic acid 추정 피크, oleanolic acid, ursolic acid의 retention time은 각각 12.6분, 12.6분, 12.9분이었다. 백화사설초의 현탁세포 추출물의 추정 피크가 맞다는 것을 명확하



게 하기 위해 현탁세포 추출물에 같은 농도가 되도록 oleanolic acid를 첨가하여 분석하였다(Figure 2). 한편, 현탁세포 추출물에

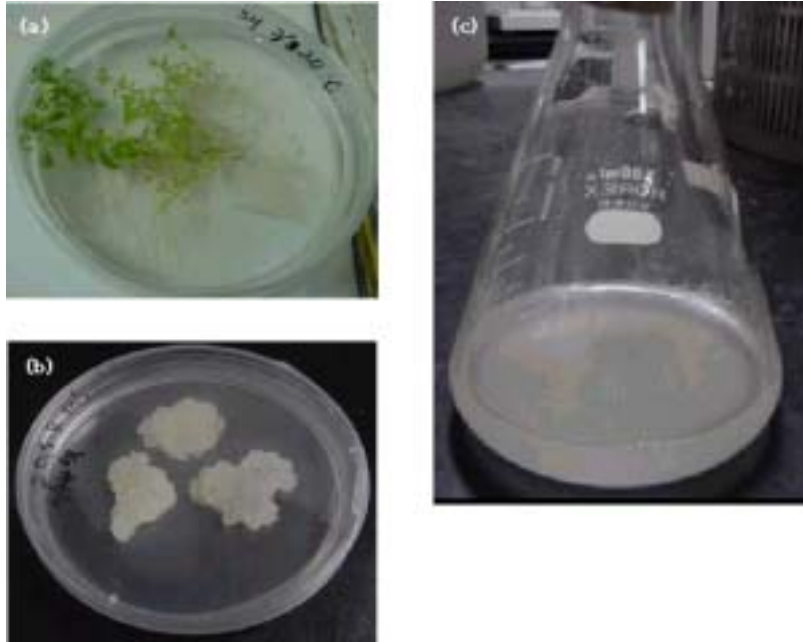


Figure 1. Plantlet (a), callus (b), suspension culture (c) of *Oldenlandia diffusa*

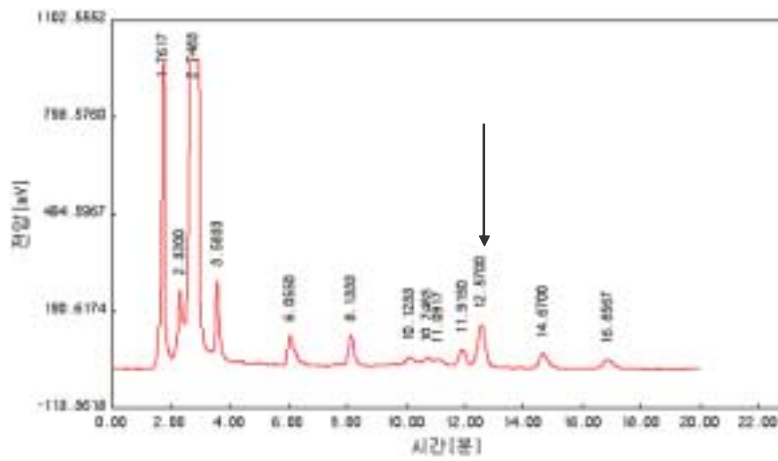


Figure 2. HPLC chromatogram of *O. diffusa* suspension cell extracts spiked with oleanolic acid

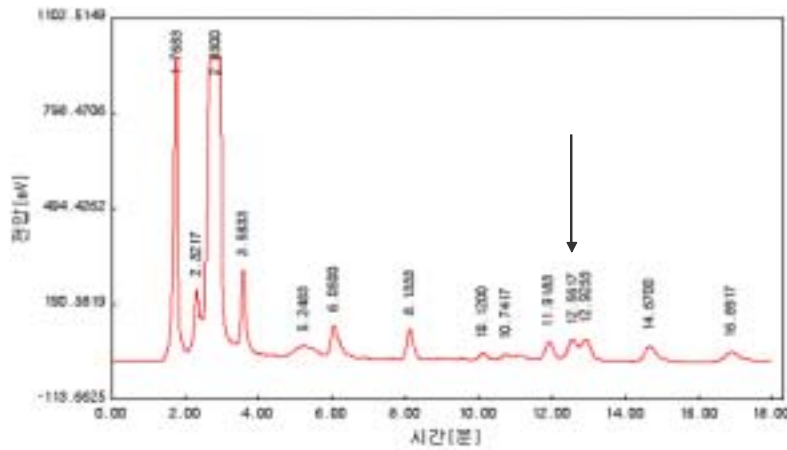


Figure 3. HPLC chromatogram of *O. diffusa* suspension cell extracts spiked with ursolic acid

같은 농도가 되도록 ursolic acid를 첨가하여 분석하였다(Figure 3).

백화사설초 현탁세포 추출물에 oleanolic acid를 첨가하여 분석하였을 경우, oleanolic acid의 retention time인 12.6분에서의 피크 면적이 증가하였다. 한편, 백화사설초 현탁세포 추출물에 ursolic acid를 첨가하여 분석하였을 경우에는 12.6분과 12.9분에서 두 개의 피크가 나왔다. 따라서 백화사설초 현탁세포에서 oleanolic acid가 생산된다고 결론을 내렸다. 정량 분석 결과, 건조 세포 1 g 당 0.41 mg의 oleanolic acid가 생산되었다. 요컨대 백화사설초에 함유되어 있는 oleanolic acid를 세포배양을 이용하여 생산하기 위한 연구를 수행하였다. Oleanolic acid를 생산하기 위해, 백화사설초의 캘러스와 현탁세포를 2,4-D 0.5 mg/L, kinetin 0.1 mg/L가 포함된 SH 배지에서 유도하였다. Oleanolic acid의 분석을 위해, Rexchrom S5-100-ODS column을 사용한 HPLC를 이용하였다. 분석 결과, oleanolic acid의 retention time은 12.6분 이었고, 그 양은 0.41 mg/g dry weight였다.

## 2. 2차년도

### 가. 백화사설초의 중금속 함량분석

1차년도 연구결과 국내산 백화사설초와 중국산 백화사설초 모두 유의성이 있었지만, 두 산지간에 유의적인 편차가 인정되지 않았다. 그러나 기능성 식품개발에 대비하여 보다 안전성을 보이는 산지 백화사설초를 선택하기 위하여 백화사설초의 중금속 함량을 검사한 결과 Zn을 제외한 Cr, Mn, Ni, Cu, As, Cd, Sb, Pb, Hg의 함량이 국내산 백화사설초에 비해 중국산 백화사설초가 높게 나타났다. 특히 Zn, Mn, Cu를 제외한 Hg, Pb, Sb, As, Sn, Cd, Ni, Cr은 원래 식품중에 함유된 것이 아니라 식품의 제조가공 또는 공장, 광산등의 배기폐수 및 화학비료, 농약등에서 유래된 것으로 인체에 악영향을 미치며 생리작용에 필요한 미량원소도 인체에 과량 축적되면 오히려 유해하기에, 국내산 백화사설초가 안전함을 확인 하였다. 그래서 향후 Bio-Q 주재료인 백화사설초는 국내산 백화사설초로 선정하였다.

**Table 1. The concentrations of heavy metal elements in Chinese and Korean Oldenlandiae Herba (unit: ppm)**

sample ID	국내산		중국산	
	mean	Std Dev	mean	Std Dev
Cr	<b>0.80</b>	0.00	2.44	0.01
Mn	<b>59.55</b>	0.10	194.19	<b>0.73</b>
Ni	<b>0.97</b>	0.00	3.92	0.06
Cu	<b>6.43</b>	0.14	19.56	0.05
Zn	<b>152.24</b>	3.31	67.77	0.15
As	<b>0.10</b>	0.00	0.58	0.00
Cd	<b>0.55</b>	0.02	2.84	0.03
Sb	<b>&lt;0.10</b>		1.19	0.01
Pb	<b>1.48</b>	0.01	4.98	0.03
Hg	<b>&lt;0.10</b>		0.36	0.00

All samples were analyzed three times and averaged(mean)

## 2, 1. 제 1 세부 과제명: 백화사설초의 면역조절 작용 연구

### 가. Bio-Q의 비장세포 증식능

비장세포에 T 및 B세포의 mitogen으로 알려진 ConA(2  $\mu\text{g/ml}$ ) 및 LPS(10  $\mu\text{g/ml}$ )를 Bio-Q 와 함께 농도별로 처리하여 mitogen에 대한 반응성을 조사한 결과 ConA와 Bio-Q를 비장세포에 처리한 농도(62.5, 125, 250  $\mu\text{g/ml}$ )에서 단독 ConA만 처리한 대조군에 비해 T lymphocyte의 상승효과가 유의적으로 있음을 보여 주었다.

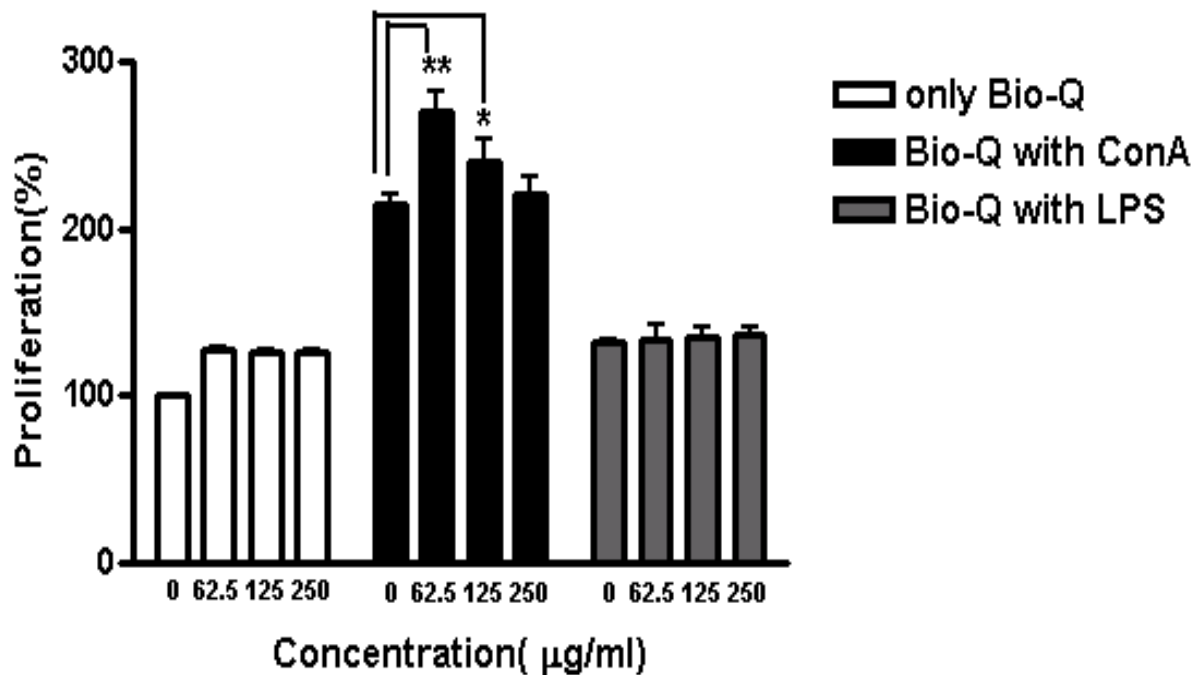


Fig. 1. Effect of Bio-Q on mitogen-induced proliferative activity of spleen cells

\*; Statistically significant value compared with untreated control(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

#### 나. Bio-Q의 면역세포 유형에 대한 효과

Bio-Q를 7일간 경구투여 한 Balb/c mice를 9일째 비장을 적출하여 면역세포에 대한 작용을 평가하기 위하여 FACS 분석법에 의해 CD3, CD19, CD4, CD8, NK cell 대한 영향을 분석하였다. lymphoblast 생성능 실험에서는 Bio-Q를 10, 50, 100 mg/kg으로 하여 histogram을 분석 하였다. CD3(Total T-cell)/CD19(Total B-cell)생성능 실험에서는 CD3는 대조군에 비하여 10 mg/kg에서

부터 2배이상의 T-cell을 유의성있게 증가됨을 보여주었으며, CD19은 50, 100 mg/kg에서부터 대조군에 비하여 1.5배 유의성 있게 증가 하였다(Fig. 2). CD4(Helper T-cell)/CD8(Cytotoxic T-cell)생성능 실험에서는 CD4는 대조군에 비하여 50 mg/kg에서 유의성있는 증가를 보여주었으며, CD8은 50, 100 mg/kg에서 유의성있는 증가를 보여 주었으며, 50 mg/kg에서는 2배의 증가를 보여 주었다 (Fig. 3)

NK cell 생성능 실험에서는 대조군에 비하여 10, 50 mg/kg에서 2배의 유의성있는 증가를 보여 주었다 (Fig. 4)

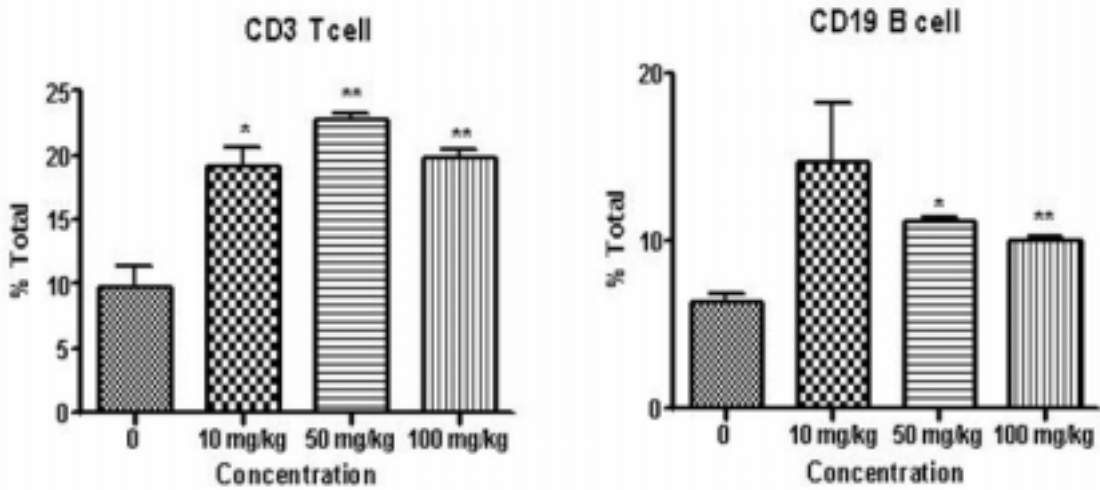
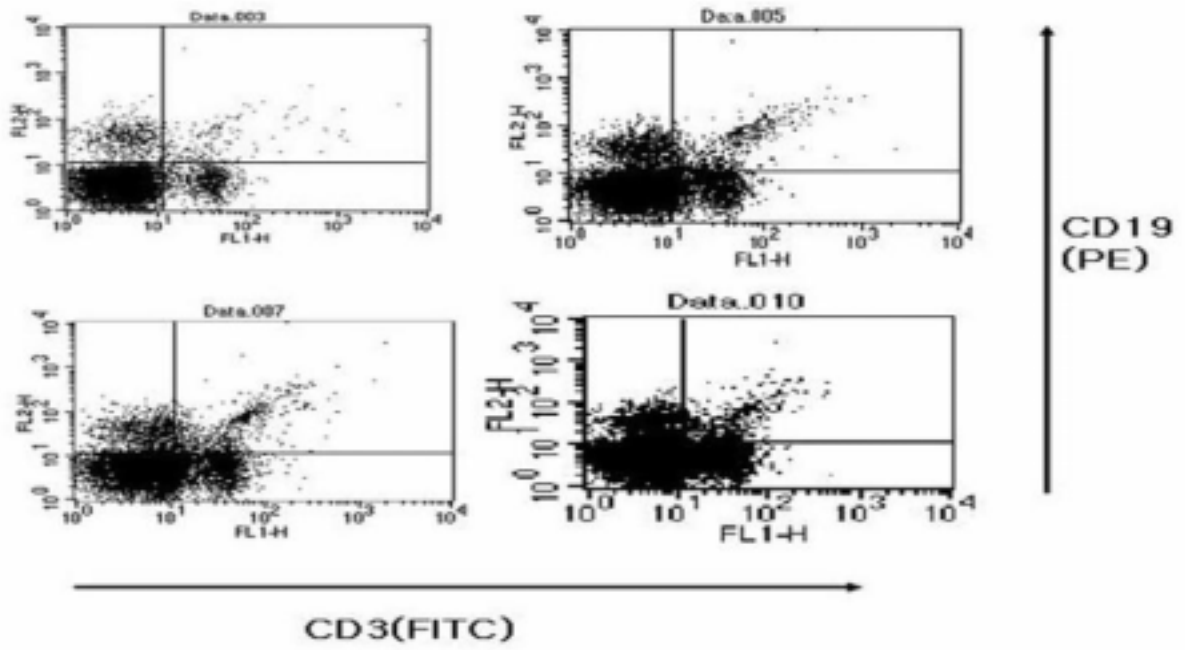


Fig. 2. Effects of Bio-Q on CD3/CD19 phenotypes of spleen cells of Balb/C

\*; Statistically significant value compared with untreated control(\* p<0.05, \*\* p<0.01)

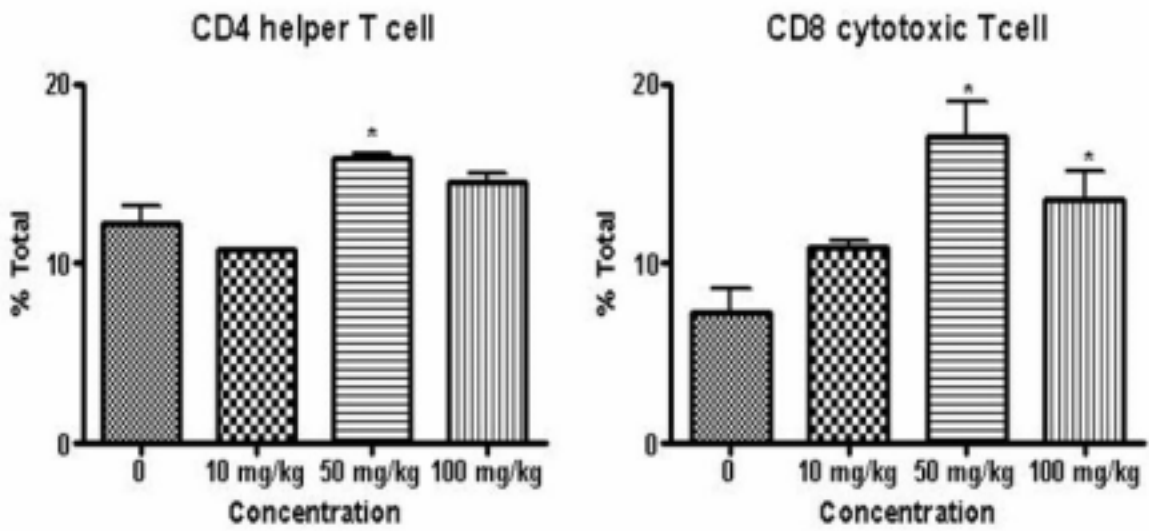
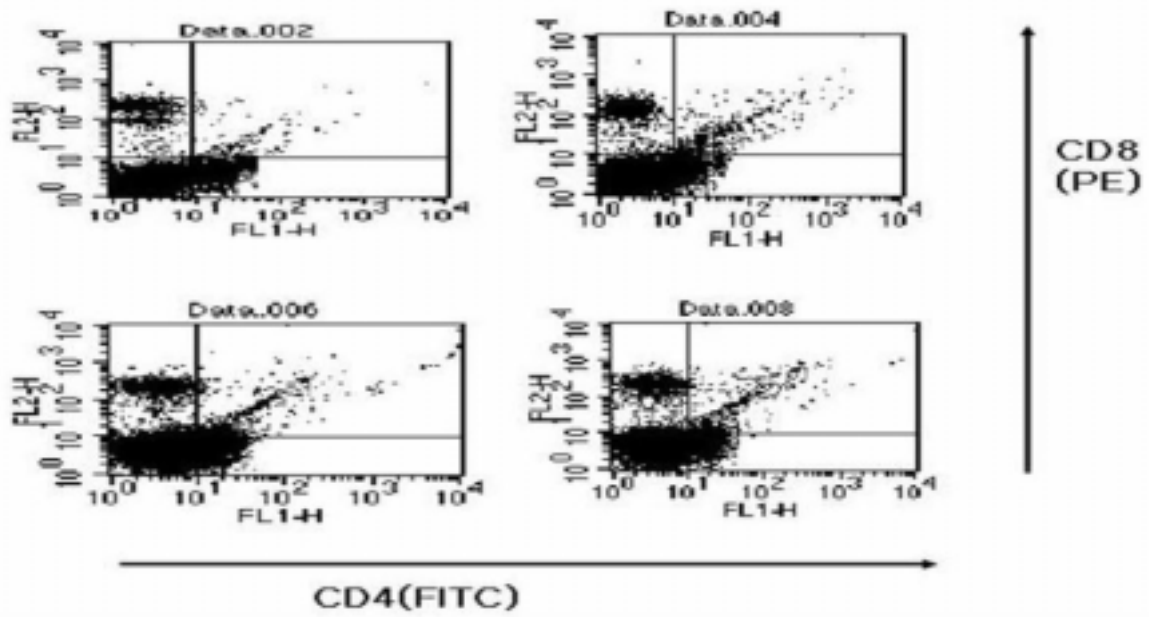


Fig. 3. Effects of Bio-Q on CD4/CD8 phenotypes of spleen cells of Balb/C  
 \*; Statistically significant value compared with untreated control(\* p<0.05, \*\* p<0.01)

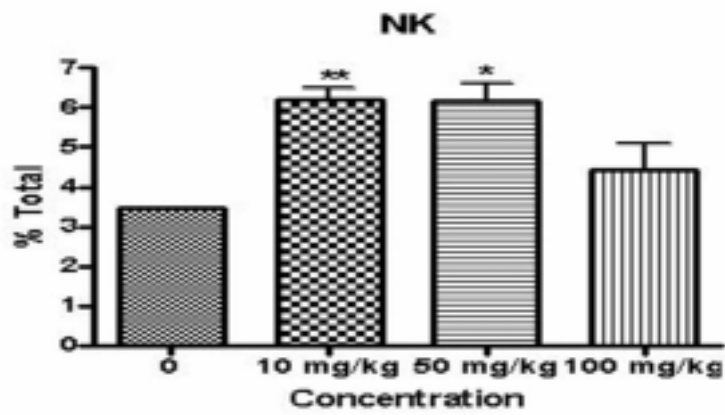
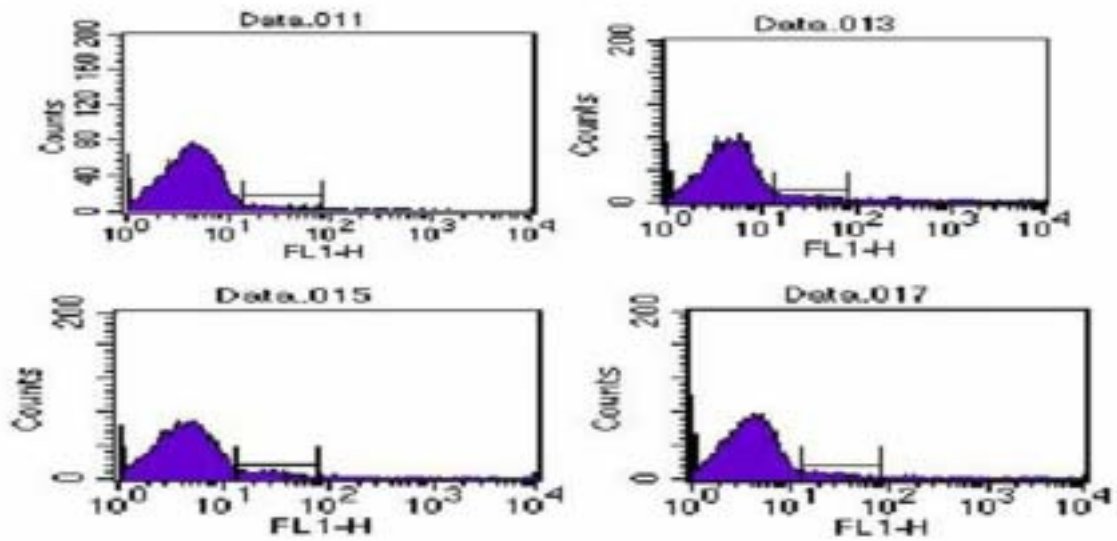


Fig. 4. Effect of Bio-Q on NK cells in the spleens of Balb/C

\*; Statistically significant value compared with untreated control(\* p<0.05, \*\* p<0.01)



#### 다. Bio-Q의 cytokine 생산능

mitogen인 ConA와 LPS에 의해 자극 받아 분비되는 Cytokine중 INF- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ , IL-6 cytokine 이 Bio-Q에 의하여 면역세포의 기능을 활발하게하는 interleukin이나 interferon의 생성을 촉진하는 지를 ELISA 법을 이용하여 측정하였다.

ConA에 자극을 받은 INF- $\gamma$ 는 단독 ConA 와 비해서 Bio-Q를 50, 100 mg/kg에서 유의적으로 INF- $\gamma$ 의 생성이 촉진됨을 알수 있었다.(Fig. 5). LPS에서 자극을 받은 TNF- $\alpha$ 는 농도별로 생성이 촉진 되었지만, 유의적인 효과는 보이지 않았다.(Fig. 6). 또한 LPS에 의해 자극을 받은 IL-6는 LPS 단독 대조군에 비하여 50, 100 mg/kg에서 7배이상의 유의성 있는 생성 촉진을 보여 주었다 (Fig. 7).

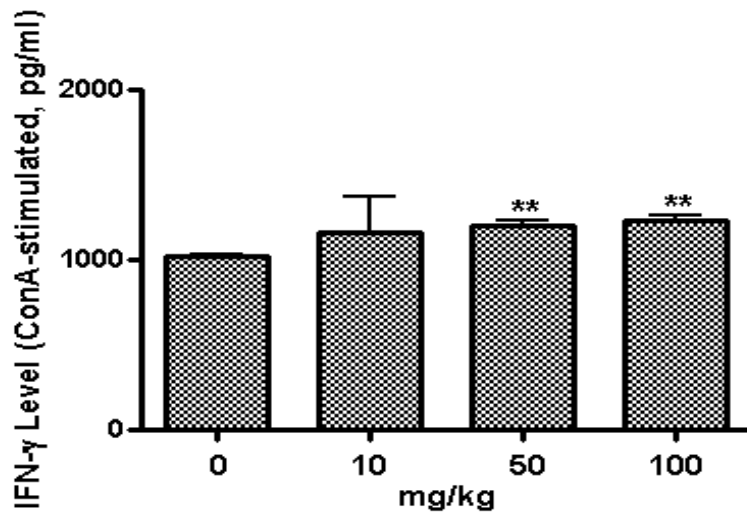


Fig. 5. Effect of Bio-Q on the level of IFN- $\gamma$  in splenocytes. \*; Statistically significant value compared with untreated control(\* p<0.05, \*\* p<0.01,\*\*\* p<0.001)

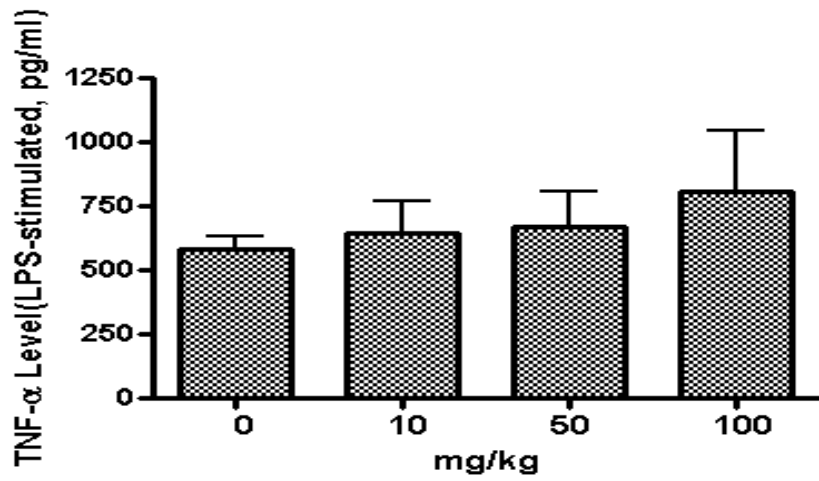


Fig. 6. Effect of Bio-Q on the level of TNF- $\alpha$  in splenocytes.

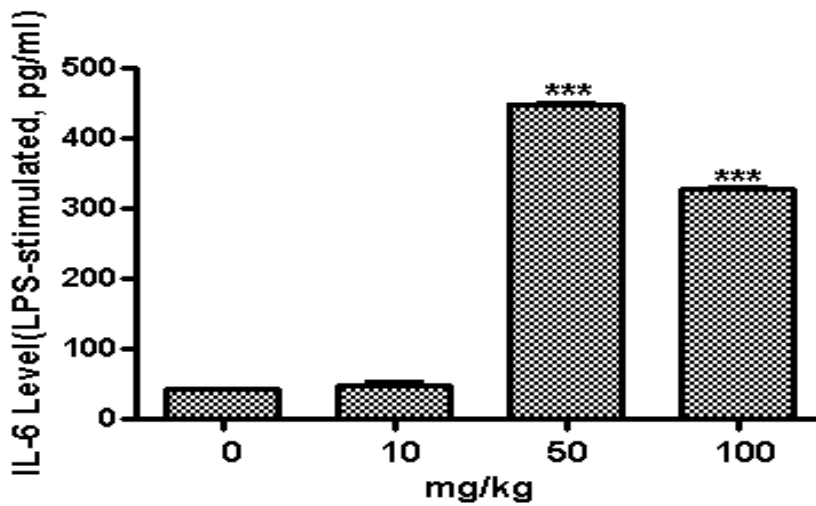


Fig. 7. Effect of Bio-Q on the level of IL-6 in splenocytes. \*; Statistically significant value compared with untreated control(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

## 2, 2. 제 2 세부 과제명: 백화사설초의 항암효과에 관한 연구

### 가. Bio-Q의 세포독성 효과

본 실험에서 *in vitro*에서 사용할 A549 cell과 *in vivo*에서 사용할 LLC 의 두 폐암주를 가지고 세포 독성을 실험하였다. 24시간 Bio-Q를 농도별로 처리한 세포독성결과 A549와 LLC cell에서 모두 250  $\mu\text{g/ml}$ 에서 1000  $\mu\text{g/ml}$  모두에서 독성이 없는 것으로 나타났다.

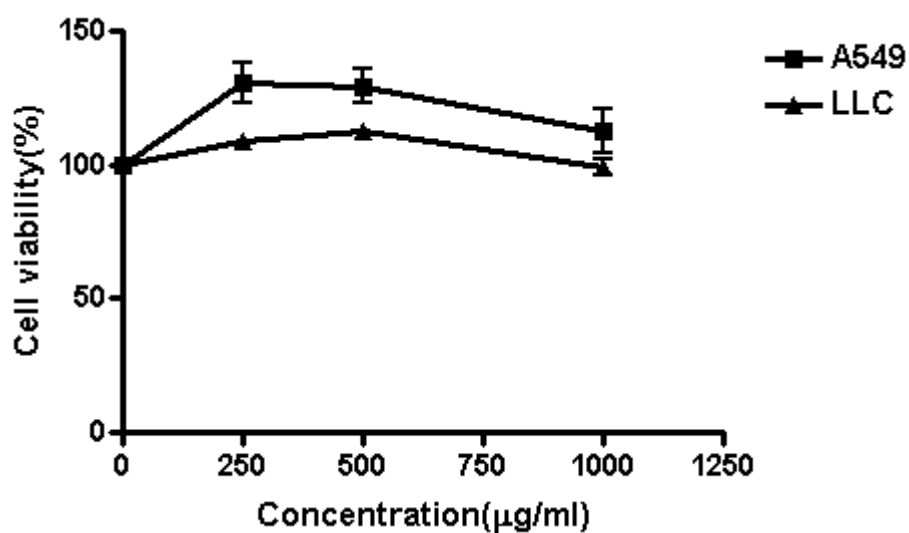


Fig.1. Cytotoxic effect of Bio-Q on A549 and LLC cells.

#### 나. Bio-Q의 암세포 부착저지 효과

Bio-Q의 암세포 부착저지 효과를 0.1% gelatin에서 측정하였던바, 부착저지 효과에는 효과가 나타나지 않은 것으로 나타났다. 암세포의 부착이 되는 세포외 기질 성분 중 gelatin 성분에서는 억제 효과가 없으나, 다른 세포외 기질에 대해서는 실험이 더 필요하다.

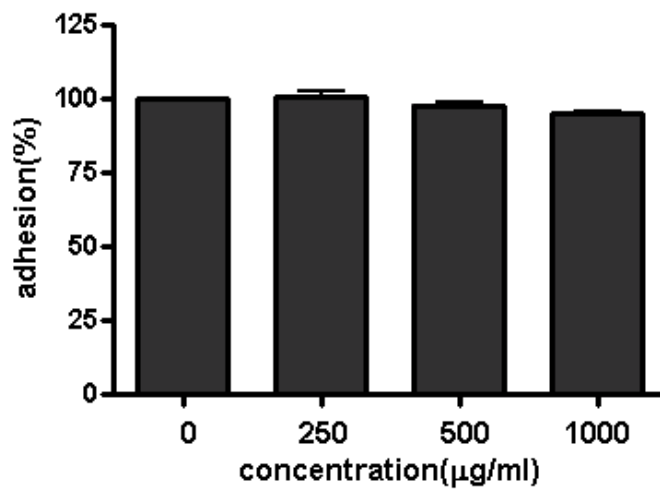


Fig. 2. Inhibitory effects of Bio-Q on the adhesion of A549 to gelatin

#### 다. Bio-Q의 내피세포 증식억제효과

HUVEC 내피세포의 증식억제효과에서는 Bio-Q가 500  $\mu\text{g/ml}$ 과 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 혈관내피세포 증식을 억제하였다. Bio-Q는 농도의존적으로 내피세포의 증식 억제를 나타내었으며, Bio-Q 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터는 10%, 1000 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 30% 증식 억제를 나타내었다.

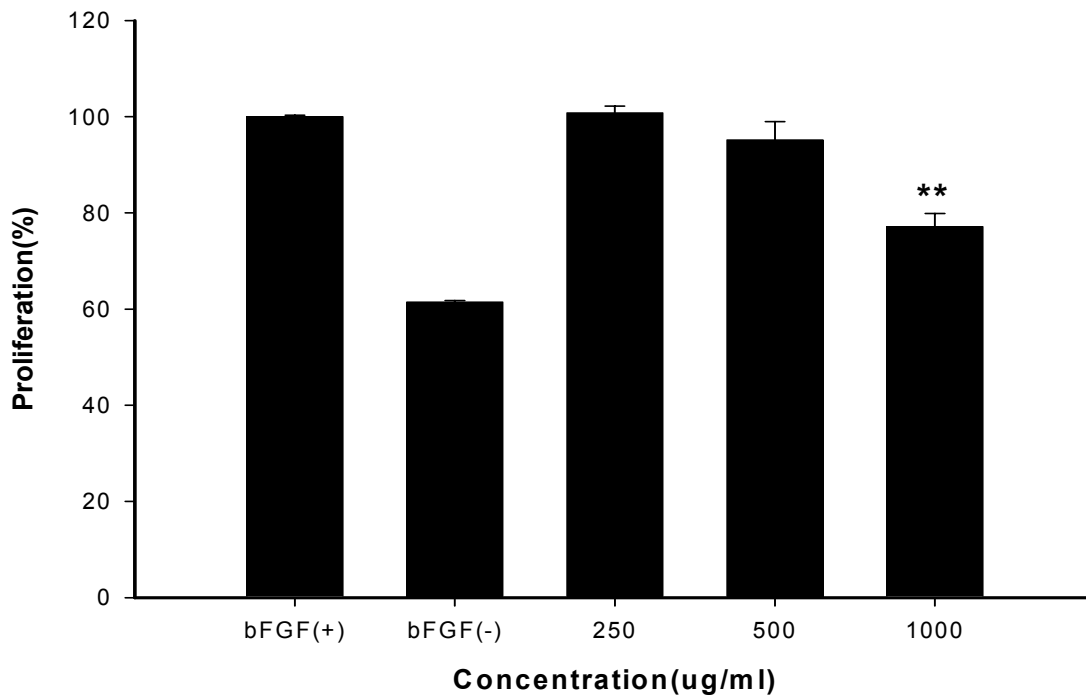


Fig 3. Inhibitory effect of Bio-Q on the proliferation of HUVECs

\*; Statistically significant value compared with untreated control(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

라. Bio-Q의 tube formation 억제효과

HUVEC 내피세포의 신생혈관 형성 억제효과에서 대조군에서는 4시간이 경과 되면서 세포들이 분화하기 시작 하였으며, 5시간에는 tube를 형성하기 시작하였다. Bio-Q를 처리한 250, 500, 1000 ug/ml에서 모두 대조군에 비하여 농도의존적으로 혈관망 형성이 저조한 소견을 보였다.

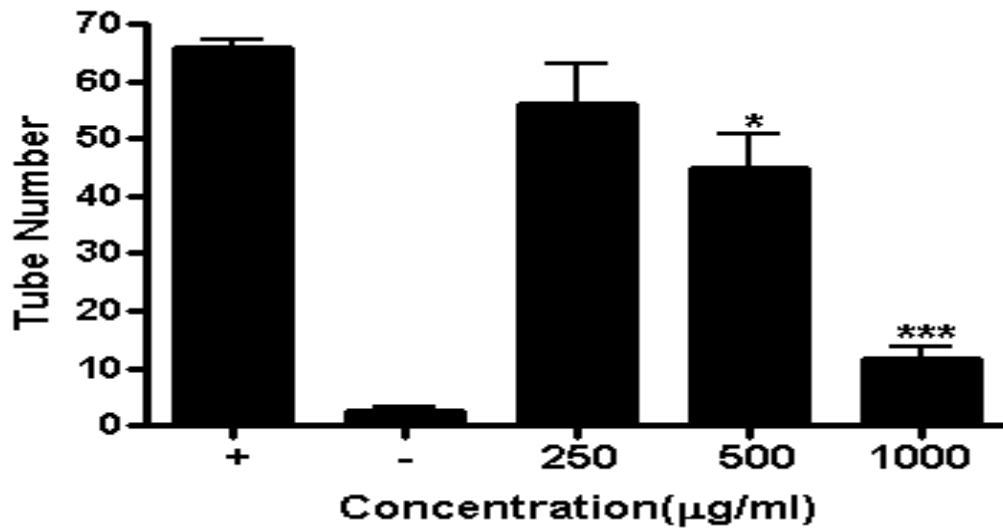
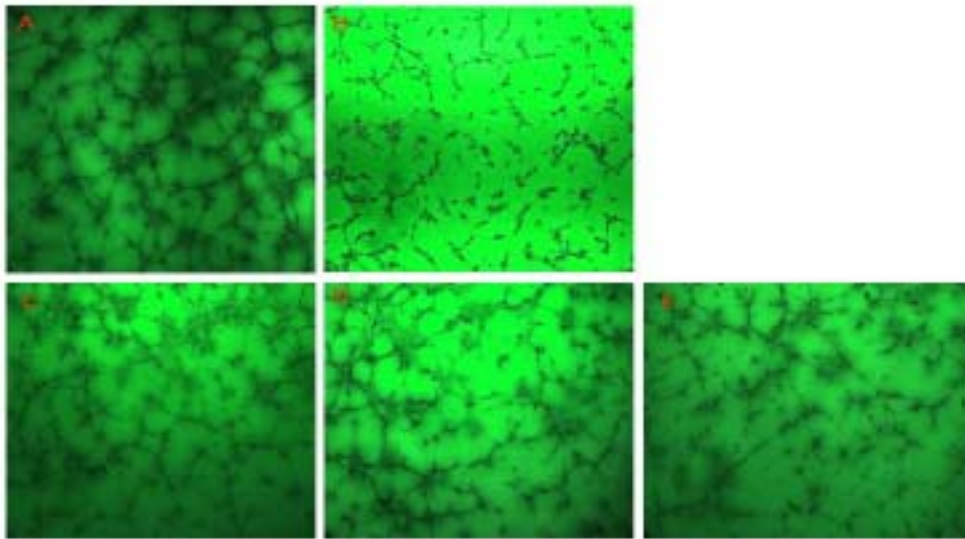


Fig.4 . Effect of Bio-Q on tube formation of bFGF treated HUVECs assay

A: Positive control, B: Negative control, C: Bio-Q treated 250, D:500, E: 1000 µg/ml.

\*, Statistically significant value compared with untreated control(\* p<0.05, \*\* p<0.01,\*\*\* p<0.001)

마. Bio-Q의 분자생물학적 항암활성 효과

Bio-Q의 항암활성효과 중 항전이 실험으로 세포 외 기질 분해 효소인 uPA, MMP2, 그것의 억제 인자인 TIMP2의 mRNA발현을 보았다. 세포외 기질 분해효소인 uPA는 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 감소하여 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조군에 비하여 감소한 것을 확인할수 있었으며, MMP2에서도 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 발현이 감소함을 확인 할 수 있었으나, TIMP2에는 변화가 없었다.

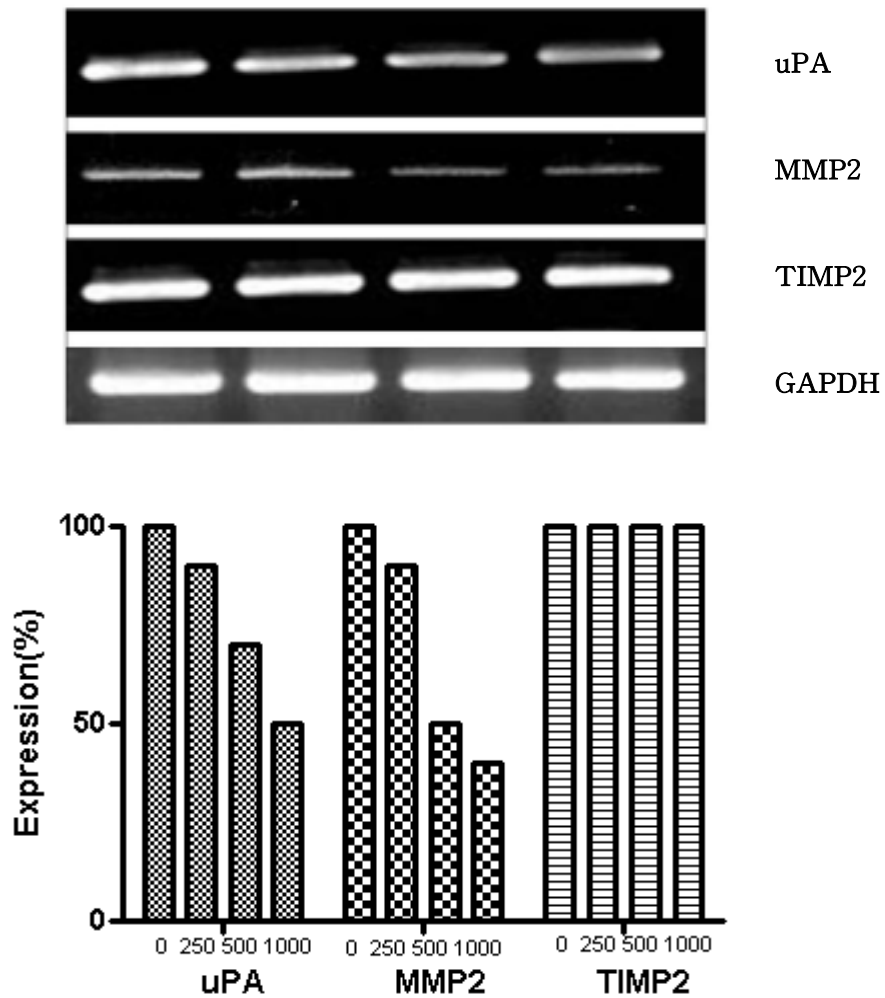


Fig. 5. Effect of Bio-Q on the expression of uPA, MMP2 and TIMP2 mRNA in A549 cells. lane 1; Control, lane 2; 250, lane 3; 500, lane; 1000  $\mu\text{g/ml}$

#### 바. Bio-Q의 DNA Topoisomerase I 억제효과

DNA의 synthesis에 작용을 하여 세포의 증식을 억제하는 효능을 가지고 있는지의 여부를 확인하고자 DNA Topoisomerase I assay를 실행한 결과 Fig. 에서 보는바와 같이 DNA만을 처리한 실험군은 supercoiled form으로 나타났으며, DNA에 Topo-I을 처리한 대조군은 relaxed form으로 전환되었다. 백화사설초 국내산, 중국산, 국내산 뿌리는 Topo-I의 활성을 억제하지 못한 것으로 보아 DNA synthesis에는 관여하지 않는 것으로 확인 할 수 있었다.

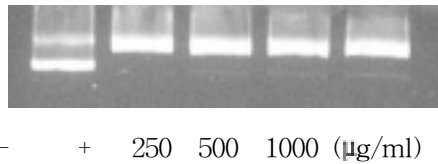


Fig. 6. Effect of Bio-Q on DNA topoisomerase I



사. Bio-Q의 수정란 혈관 신생 억제효과

CAM assay를 통한 혈관형성 억제효과는 대조군에 비하여 5, 10  $\mu\text{g}/\text{egg}$  모두 억제하는 효과를 보였다. 대조군에서는 평균 13.3개의 혈관이 생성된 반면, 5  $\mu\text{g}/\text{egg}$ 에서는 6개의 혈관이 10  $\mu\text{g}/\text{egg}$ 에서는 4.66개의 혈관이 생겨 50% 이상의 혈관형성 억제효과를 보여 주었다.

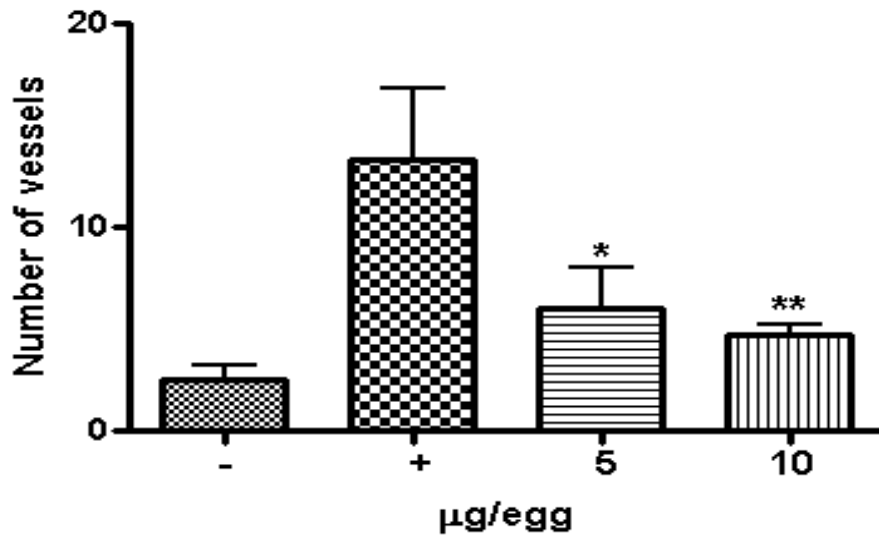
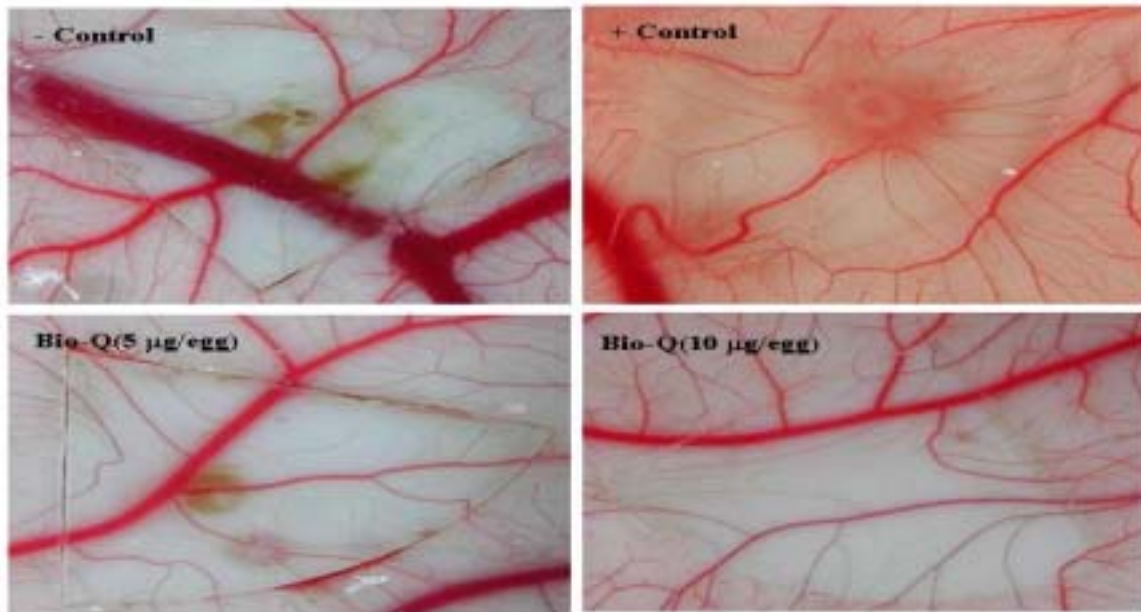


Fig. 7. Bio-Q inhibits bFGF-induced angiogenesis *in vivo*. \*; Statistically significant value compared with untreated control(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

아. Bio-Q의 마우스 폐암주에 대한 암의 성장과 전이 억제효과

LLC 암세포의 성장 억제 실험에서는 대조군에 비하여 Bio-Q의 50 mg/kg 용량에서 26.6%의 억제 효과가 나타내어 전이억제 효과가 있음을 시사하고 있다. 폐장 전이 실험에서는 대조군에서 폐의 표면에 비정상적인 돌기가 관찰되었지만, Bio-Q처리군에서는 상대적으로 억제하는 양상을 보이고 있으나 추후 다른 전이암주를 이용하여 재연성 확인 실험이 필요하다고 사료된다.

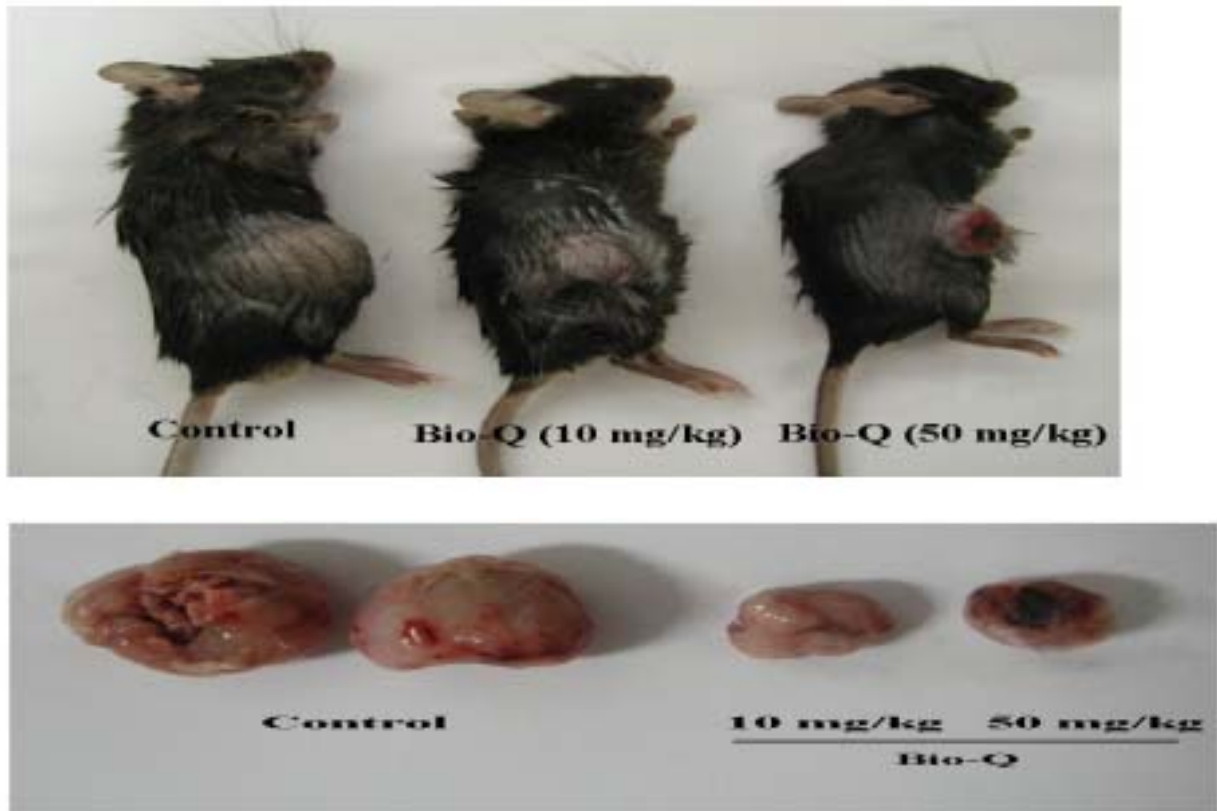


Fig. 8. Bio-Q inhibited tumor growth in LLC-bearing mice. Values are mean±SE of 4-5 mice. \*; Statistically significant value compared with untreated control(\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001)

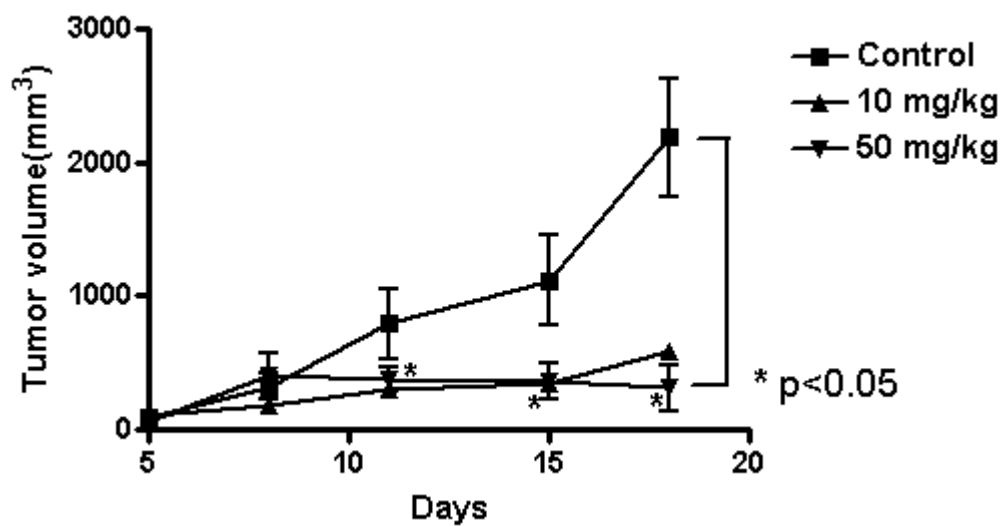


Fig. 9. Bio-Q inhibited lung metastasis of LLC.

## 2, 3. 협동과제:백화사설초를 이용한 식품 소재화 및 소재화 기반 연구

RNL생명과학(주)

시험제목 : 랫드에서의 90일간 백화사설초 반복투여 독성시험

### (1) 임상증상

저용량군, 중간용량군, 고용량군 및 용매대조군에서 전 기간동안 시험물질 투여로 인한 임상증상은 관찰하지 못하였다.

### (2) 사망률

저용량군, 중간용량군, 고용량군 및 용매대조군에서 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.

### (3) 체중변화 (Fig. 1)

수컷의 경우, 전 시험물질 투여군에서 투여 7일째에 용매대조군 ( $128.1 \pm 16.34$ )에 비해 약 14g의 높은 유의적인 체중증가율의 증가가 나타났으며, 90일째에서는 용매대조군 ( $402.2 \pm 33.45$ )에 비해 체중의 유의적인 변화는 없었으나 대조군을 포함한 전개체가 10~30g의 체중이 감소하는 양상이 나타났다. 암컷의 경우에는 14, 21, 35일째에서 중간용량투여군 ( $165.1 \pm 12.20$ ,  $186.1 \pm 15.32$ ,  $220.2 \pm 20.28$ )은 용매대조군 ( $181.6 \pm 14.77$ ,  $203.9 \pm 14.47$ ,  $240.1 \pm 19.58$ )에 비해 유의적인 체중감소가 28일째에서는 고용량군 ( $204.7 \pm 19.14$ )과 중간용량군 ( $203.4 \pm 19.26$ ) 모두에서 용매대조군 ( $222.6 \pm 16.80$ )에 비해 유의적인 체중감소가 관찰되었다. 그리고 49일째에는 전 용량 시험물질 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었지만 용매대조군 ( $227.6 \pm 26.93$ )에서 체중이 일주일 전보다 22g정도 감소해 시험물질 투여군과 유의적인 차이가 관찰되었다.

### (4) 사료섭취량 변화 (Fig. 2)

수컷에서는 투여 7일째 용매대조군 ( $14.49 \pm 2.466$ )에 비해 중간용량군 ( $18.31 \pm 0.737$ )에서, 투여 21일째에는 용매대조군 ( $20.06 \pm 2.325$ )에 비해 중간용량군 ( $23.13 \pm 1.545$ )에서 사료 섭취량의 유의적인 증가가 나타났으며, 28일째에는 용매대조군 ( $20.43 \pm 1.855$ )에 비해 고용량군 ( $25.30 \pm 2.129$ )에서 유의적인 사료섭취량 증가가 나타났다. 또한, 투여 35일째에서는 고용량군 ( $18.63 \pm 2.787$ )과 중간용량군 ( $22.21 \pm 1.633$ )에서 용매대조군 ( $24.60 \pm 2.654$ )에 비해 유의적인 감소가, 42일째에서는 중간용량군 ( $20.87 \pm 2.418$ )과 저용량군 ( $21.47 \pm 2.868$ )에서 유의적인 사료

섭취량의 증가가 관찰되었다.

암컷의 경우 투여 7일째에 용매대조군 ( $16.65 \pm 1.193$ )에 비해 고용량군 ( $15.32 \pm 1.231$ )과 중간용량군 ( $18.05 \pm 1.280$ ), 저용량군 ( $14.85 \pm 0.406$ ) 모두에서 유의적인 증가가 나타났으며, 21일째에서 저용량군 ( $16.20 \pm 1.161$ )에서 용매대조군 ( $14.07 \pm 1.093$ ) 비해 유의적인 사료섭취량 증가가 관찰되었다. 또한 투여 28일째와 35일째에서도 전 용량 투여군에서 용매대조군에 비해 사료섭취량의 유의성이 나타났으며, 투여 63일째에서는 고용량군 ( $16.44 \pm 1.381$ )이 용매대조군 ( $18.24 \pm 1.016$ )에 비해 유의적인 사료섭취량 감소가 관찰되었다.

(5) 음수량 변화 (Fig. 3)

수컷에서는 시험물질 투여 14, 21, 35, 77일 후 용매대조군에 비해 저용량군에서 음수량이 유의적인 변화를 볼 수 있었고, 투여 70, 77일째에서는 고용량군에서 유의적인 음수량의 감소를 관찰할 수 있었다. 암컷의 경우, 투여 7, 63일째에서 용매대조군에 비해 모든 용량군에서 음수량의 유의적인 변화가 관찰되었고, 14, 28, 77일째에서는 고용량군에서 28, 77일째에서는 중간용량군에서 21일째는 저용량군에서 유의적인 음수량의 차가 나타났다.

(6) 뇨검사 소견 (Tables 1 and 2)

모든 투여군에서 용매대조군과 비교해 시험물질의 투여로 인해 나타난 것으로 사료되는 유의적인 결과를 관찰할 수 없었다.

(7) 안검사

모든 투여군에서 용매대조군과 비교해 시험물질의 투여로 인해 나타난 것으로 사료되는 유의적인 결과를 관찰할 수 없었다.

(8) 혈액학적 및 혈청 생화학적 검사 소견 (Tables 3, 4, 5, 6, and 7)

혈액학적 검사 결과를 볼 때, 수컷과 암컷 모두 대조군과 비교해 시험물질 투여로 인한 것으로 사료되는 변화를 관찰하지 못했다.

혈청생화학적 검사 결과를 보면, 수컷은 Glucose가 용매대조군 ( $78.60 \pm 15.534$ )에 비해 중간용량군 ( $114.20 \pm 18.794$ )과 저용량군 ( $103.20 \pm 16.053$ )에서 유의적인 증가가 나타났고, ALP수치에서도 용매대조군 ( $183.00 \pm 26.344$ )에 비해 고용량군 ( $274.00 \pm 38.249$ ), 중간용량군 ( $264.60 \pm 64.388$ ), 저용량군 ( $259.40 \pm 24.172$ ) 모두에서 유의적인 증가를 나타냈으며, TG수치에서 용매대조군 ( $47.20 \pm 8.585$ )에 비해 저용량군 ( $66.00 \pm 18.601$ )에서 유의적인 증가를 나타냈다. 암컷은 Albumin이 용매대조군 ( $2.92 \pm 0.239$ )에 비해 저용량군 ( $2.48 \pm 0.164$ )에서 유의적인 증

가를 나타냈고, Glucose에서는 용매대조군 ( $100.60 \pm 22.941$ )에 비해 중간용량군 ( $126.40 \pm 17.170$ )과 저용량군 ( $138.00 \pm 20.579$ )에서 통계적 유의성이 있는 증가를 나타냈다. Cholesterol의 경우, 용매대조군( $69.80 \pm 11.777$ )에 비해 고용량군 ( $50.80 \pm 10.134$ )이 Na수치의 경우, 용매대조군 ( $140.80 \pm 7.981$ )에 비해 중간용량군 ( $135.60 \pm 0.894$ )과 저용량군 ( $135.00 \pm 1.000$ )에서 유의적인 감소를 나타냈다.

(9) 절대장기 중량 및 체중에 대한 각 장기의 상대중량비

(Tables 8, 9, 10, and 11)

절대장기는 수컷의 경우 흉선에서 용매대조군( $0.38 \pm 0.0065$ )에 비해 고용량군 ( $0.55 \pm 0.121$ )에서 유의적인 증가가 나타났으며 부고환 좌, 우 모두 용매대조군 (좌 :  $0.69 \pm 0.142$ , 우 :  $0.70 \pm 0.159$ )에 비해 중간용량군 (좌 :  $0.55 \pm 0.068$ , 우 :  $0.53 \pm 0.061$ )에서 유의적인 감소를 관찰할 수 있었다. 암컷의 경우 자궁에서 용매대조군 ( $0.60 \pm 0.271$ )에 비해 고용량군 ( $0.93 \pm 0.099$ )에서 유의적 증가를 나타냈다. 상대장기는 수컷의 경우 흉선에서 용매대조군 ( $0.096 \pm 0.0212$ )에 비해 고용량군 ( $0.145 \pm 0.0420$ )에서 유의적인 증가가 관찰되었으며 그리고 부고환의 좌, 우에서 용매대조군 (좌 :  $0.174 \pm 0.0337$ , 우 :  $0.176 \pm 0.0445$ )에 비해 중간용량군 (좌 :  $0.133 \pm 0.0204$ , 우 :  $0.128 \pm 0.0203$ )에서 유의적인 상대중량의 감소가 나타났다. 암컷의 경우 간에서 용매대조군( $2.747 \pm 0.3285$ )에 비해 고용량군 ( $2.473 \pm 0.2003$ )과 중간용량군 ( $2.413 \pm 0.1793$ )에서 유의적 감소를 나타냈고, 타액선은 용매대조군 ( $0.013 \pm 0.0030$ )에 비해 중간용량군 ( $0.010 \pm 0.0023$ )과 저용량군 ( $0.009 \pm 0.0022$ )에서 유의적 차이를 나타냈다. 그리고 흉선에서 용매대조군 ( $0.215 \pm 0.0543$ )에 비해 고용량군 ( $0.136 \pm 0.0419$ ) 유의적인 상대중량의 감소가 자궁에서 용매대조군 ( $0.234 \pm 0.1169$ )에 비해 고용량군 ( $0.346 \pm 0.1394$ )에 비해 유의적인 상대중량의 증가가 관찰되었다.

(10) 육안적 부검검사 소견 (Tables 12 and 13)

모든 투여군에서 용매대조군과 비교해 시험물질의 투여로 인해 나타난 것으로 사료되는 유의적인 결과를 관찰할 수 없었다.

(11) 조직병리학적검사 소견 (Tables 14 and 15, Figures 4-19)

신장의 경우 모든 실험군에서 증식성사구체신염이 의심되기는 하나 대조군을 포함한 전 실험군에서 나타난 조직소견으로서 물질투여에 의한 독성으로는 사료되지 않는다. 백화사설초에 대해 랫드를 이용한 90일간 반복투여독성시험에서의 조직병리학적인 독성은 관찰되지 않았다.

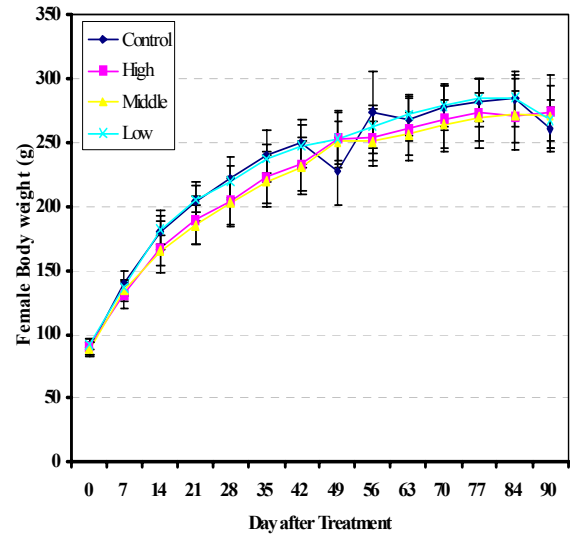
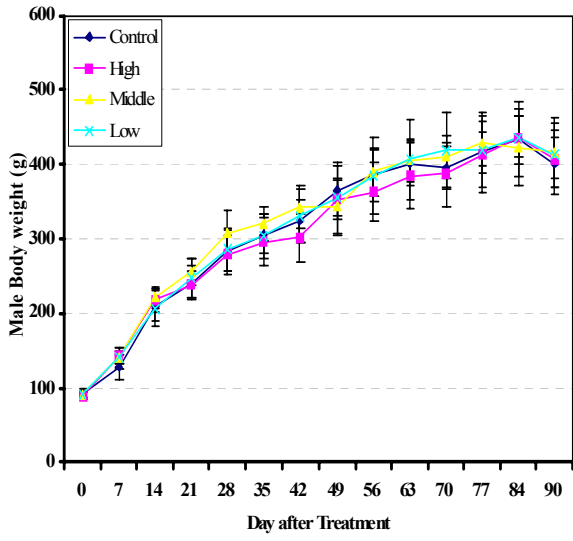


Fig. 1. Daily mean body weights in male rats and female rats orally treated with *Oldenlandia diffusa* Herba

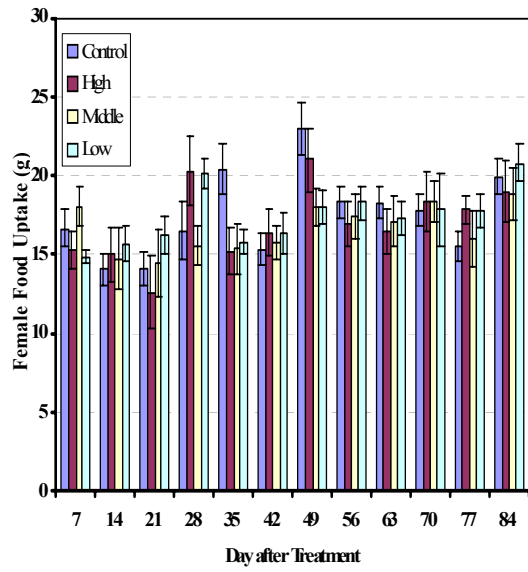
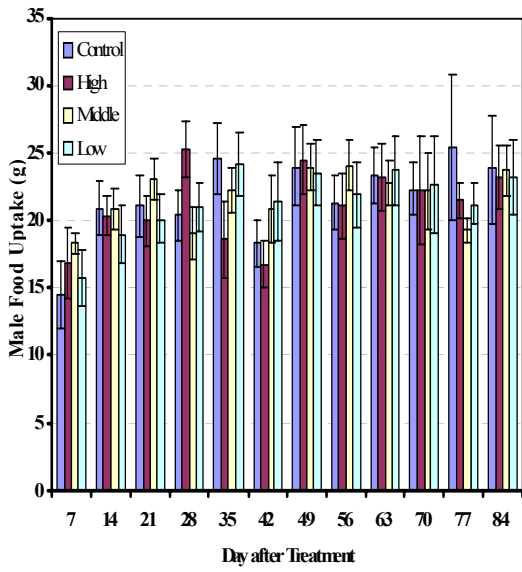


Fig. 2. Daily mean food uptake in male rats and female rats orally treated with *Oldenlandia diffusa* Herba

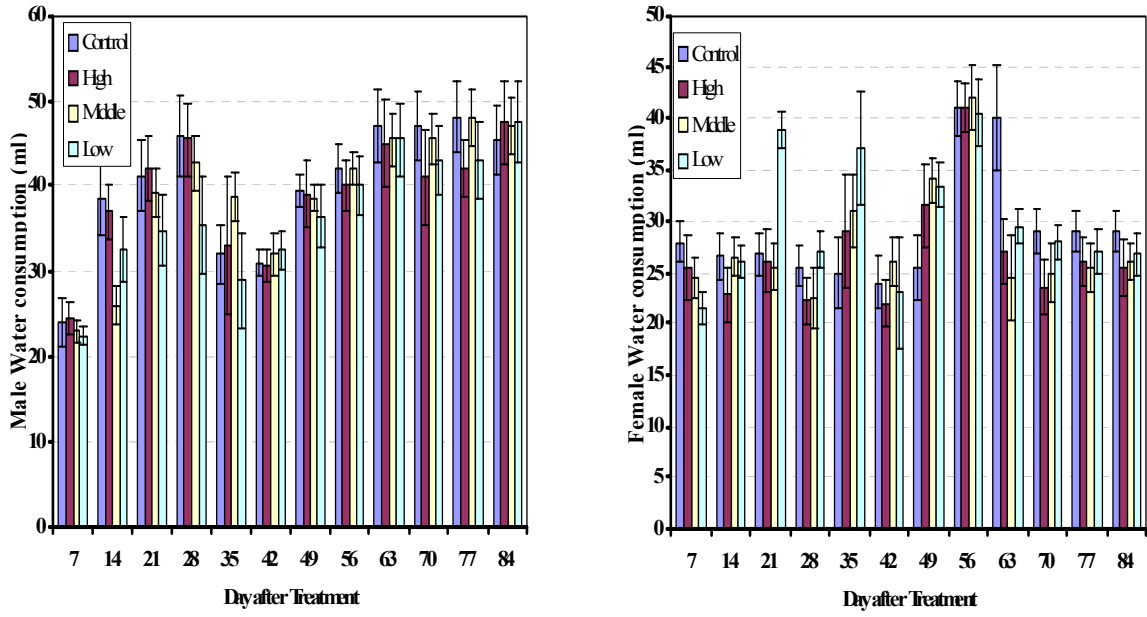


Fig. 3. Daily mean water consumption in male rats and female rats orally treated with *Oldenlandiae diffusa* Herba



**Table. 1. Urinanalysis in male rats orally treated with *Oldenlandia diffusa* Herba**

Parameter	Group	Control	High	Middle	Low
	Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
	No. of animal	10	10	10	10
Nitrite		-	-	+	-
		-	-	-	-
		-	-	-	+
		-	-	-	-
		-	-	+	-
Urobilinogen (Ehrlich unit/dl)		normal	normal	normal	normal
		normal	normal	normal	normal
		normal	normal	normal	normal
		normal	normal	normal	normal
		normal	normal	normal	normal
Protein (mg/dl)		30	30	-	30
		30	30	30	30
		30	-	250	30
		-	30	30	30
		30	-	30	30
pH		6	8	7	5
		6	6	8	6
		6	5	6	7
		6	7	7	6
		6	6	6	6
Occult blood		5-10	-	25	250
		250	250	50	250
		-	250	250	250
		250	250	25	250
		5-10	5-10	250	250
Ketone body (mg/dl)		++	++	-	++
		+	++	++	++
		++	+	+++	+
		+	++	++	++
		+++	-	-	++
Bilirubin		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
Glucose (g/dl)		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
Leukocyte		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-

**Table. 2. Urinanalysis in female rats orally treated with Oldenlandiae diffusa Herba**

Parameter	Group Dose(%(w/w)) No. of animal	Control 0 10	High 10 10	Middle 1 10	Low 0.1 10
Nitrite		-	-	-	-
		-	-	+	-
		-	-	+	-
		+	-	-	-
		-	-	+	-
Urobilinogen (Ehrlich unit/dl)		normal	normal	normal	normal
		normal	normal	normal	normal
		normal	normal	normal	normal
		normal	normal	normal	normal
		normal	normal	normal	normal
Protein (mg/dl)		30	30	-	30
		30	30	30	30
		30	-	250	30
		-	30	30	30
		30	-	30	30
pH		6	8	7	5
		6	6	8	6
		6	5	6	7
		6	7	7	6
		6	6	6	6
Occult blood		250	50	50	-
		250	250	50	250
		250	25	50	50
		5-10	50	-	-
		250	50	250	250
Ketone body (mg/dl)		++	++	-	++
		+	++	++	++
		++	+	+++	+
		+	++	++	++
		+++	-	-	++
Bilirubin		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
Glucose (g/dl)		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
Leukocyte (Leuko/ $\mu$ l)		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-
		-	-	-	-

**Table 3. Hematological values of male rats orally treated with *Oldenlandiae diffusa* Herba**

Parameter	Group Dose(%(w/w)) No. of animal	Control 0 5	High 10 5	Middle 1 5	Low 0.1 5
Neutrophil (%) <sup>b)</sup>		2.01±0.388 <sup>a)</sup>	2.45±0.495	2.69±0.281	3.03±1.144
Lymphocyte (%)		5.06±2.204	5.99±2.336	5.32±0.887	6.52±1.963
Monocyte (%)		0.38±0.114	0.43±0.181	0.39±0.075	0.60±0.196
Eosinophil (%)		0.09±0.077	0.17±0.993	0.23±0.279	0.17±0.163
Basophil (%)		0.04±0.037	0.02±0.016	0.01±0.013	0.02±0.013
WBC (×10 <sup>3</sup> /μl)		7.57±2.73	9.06±2.840	8.63±0.935	10.32±3.200
RBC (×10 <sup>6</sup> /μl)		8.70±0.585	8.19±0.442	8.36±0.109	8.63±0.254
HGB (g/dl)		14.96±2.462	41.80±0.442	14.58±0.792	14.58±0.359
HCT (%)		44.66±2.463	42.72±3.323	42.08±1.720	42.30±0.359
MCV (fL)		51.46±3.448	52.30±3.072	50.32±1.530	49.03±2.051
MCH (pg)		17.22±0.968	18.24±2.194	17.44±0.767	16.88±0.126
MCHC (g/dl)		33.52±2.063	34.82±3.015	34.64±0.586	34.48±1.223
PLT (×10 <sup>3</sup> /μl)		849.80±103.734	650.40±319.038	892.60±68.457	801.75±81.835

<sup>a)</sup>, Values were expressed as mean±S.D. ; <sup>b)</sup>, Percentage of Total WBC

<sup>\*</sup>, Significantly different from control at p<0.05

WBC, white blood cell ; RBC, red blood cell ; HGB, hemoglobin ; HCT, hematocrit ; MCV, mean corpuscular volume ; MCH, mean corpuscular hemoglobin ; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration ; PLT, platelet.

**Table 4. Hematological values of female rats orally treated with Oldenlandiae diffusa Herba**

Parameter	Group	Control	High	Middle	Low
	Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
	No. of animal	5	5	5	5
Neutrophil (%) <sup>b)</sup>		2.52±0.785 <sup>a)</sup>	2.08±0.633	2.30±0.582	1.85±0.308
Lymphocyte (%)		6.35±1.647	4.90±2.138	5.80±1.453	5.21±1.283
Monocyte (%)		0.53±0.238	0.38±0.152	0.42±0.196	0.39±0.065
Eosinophil (%)		0.11±0.079	0.17±0.100	0.12±0.052	0.06±0.041
Basophil (%)		0.04±0.032	0.01±0.011	0.02±0.021	0.01±0.007
WBC (×10 <sup>3</sup> /μl)		9.55±2.431	7.54±2.706	8.67±2.242	7.50±1.109
RBC (×10 <sup>6</sup> /μl)		8.07±0.980	7.60±0.321	8.04±0.233	8.17±0.745
HGB (g/dl)		16.48±5.057	13.80±0.255	14.80±0.100	14.58±0.858
HCT (%)		42.75±5.408	40.80±0.848	44.00±1.572	44.32±4.185
MCV (fL)		52.98±1.921	53.78±2.602	54.76±1.401	54.26±2.163
MCH (pg)		20.18±4.237	18.18±0.531	18.43±0.666	17.90±1.290
MCHC (g/dl)		38.05±7.470	33.82±0.687	33.63±1.222	33.08±2.929
PLT (×10 <sup>3</sup> /μl)		843.50±198.093	909.40±62.115	804.67±89.198	679.2±318.082

<sup>a)</sup>, Values were expressed as mean±S.D. ; <sup>b)</sup>, Percentage of Total WBC  
WBC, white blood cell ; RBC, red blood cell ; HGB, hemoglobin ; HCT, hematocrit ; MCV, mean corpuscular volume ; MCH, mean corpuscular hemoglobin ; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration ; PLT, platelet.

**Table 5. Serum biochemical values of male rats orally treated with *Oldenlandiae diffusa* Herba**

Parameter	Group	Control	High	Middle	Low
	Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
	No. of animal	5	5	5	5
TP (g/dl)		6.30±0.265 <sup>a)</sup>	6.36±0.114	6.16±0.134	6.18±0.340
Albumin (g/dl)		2.34±0.182	2.22±0.130	2.28±0.837	3.00±0.082
AST (IU/l)		229.40±46.377	223.40±31.262	253.80±27.490	243.20±42.281
ALT (IU/l)		55.00±9.849	63.00±16.386	65.20±29.098	59.80±9.985
TB (mg/dl)		0.16±0.134	0.34±0.114	0.22±0.045	0.30±0.141
GLU (mg/dl)		78.60±15.534	99.00±16.628	114.20*±18.794	103.20*±16.053
ALP (u/l)		183.00±26.344	274.00*±38.249	264.60*±64.388	259.40*±24.172
CHOL (mg/dl)		46.80±10.941	47.80±2.280	55.20±16.814	44.60±9.017
TG (mg/dl)		47.20±8.585	44.20±7.362	49.00±4.123	66.00*±18.601
BUN (mg/dl)		19.40±4.615	20.20±3.899	20.60±3.209	21.20±2.168
CREAT (mg/dl)		0.66±0.055	0.66±0.055	0.70±0.071	0.64±0.055
Na (mEq/l)		138.60±1.342	137.20±1.643	137.80±1.304	136.80±1.095
K (mEq/l)		7.56±0.688	8.06±0.688	7.48±0.228	7.64±0.313
CL (mEq/l)		103.00±1.225	101.00±1.414	103.20±1.304	102.00±1.581

<sup>a)</sup>, Values were expressed as mean±S.D. \*, Significantly different from control at p<0.05 TP, total protein ; TB, total bilirubin ; AST, aspartate transaminase ; ALT, alanine transaminase ; A/G ratio, Albumin/Globulin ratio ; GLU, glucose ; ALP, alkaline phosphatase ; CHOL, cholesterol ; TG, triglyceride ; BUN, blood urea nitrogen ; CREAT, creatinine ; Na, sodium ; K, potassium ; CL, chloride

**Table 6. Serum biochemical values of female rats orally treated with *Oldenlandiae diffusa* Herba**

Parameter	Group	Control	High	Middle	Low
	Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
	No. of animal	5	5	5	5
TP (g/dl)		7.34±0.760 <sup>a)</sup>	6.60±0.339	7.12±0.492	6.70±0.316
Albumin (g/dl)		2.92±0.239	2.60±0.158	2.94±0.378	2.48*±0.164
AST (IU/l)		290.40±38.734	185.00±38.529	395.00±362.273	198.00±65.734
ALT (IU/l)		65.60±11.717	140.00±44.749	99.20±84.298	139.60±21.455
TB (mg/dl)		0.88±0.769	0.30±0.100	1.74±1.901	0.40±0.000
GLU (mg/dl)		100.60±22.941	99.60±8.019	126.40*±17.170	138.00*±20.579
ALP (u/l)		88.40±31.926	44.00±5.788	100.40±33.426	139.60±21.455
CHOL (mg/dl)		69.80±11.777	50.80*±10.134	58.40±12.116	72.40±9.529
TG (mg/dl)		51.00±16.016	39.00±3.536	97.00±70.161	75.60±9.660
BUN (mg/dl)		22.40±2.074	17.60±3.050	19.40±2.302	20.20±2.950
CREAT (mg/dl)		0.88±0.084	0.92±0.130	0.94±0.055	0.96±0.055
Na (mEq/l)		140.80±7.981	136.20±0.837	135.60*±0.894	135.00*±1.000
K (mEq/l)		9.52±1.457	7.78±0.683	10.28±2.588	7.89±0.179
CL (mEq/l)		103.60±2.074	101.60±1.140	105.00±2.828	103.40±2.302

<sup>a)</sup>, Values were expressed as mean±S.D. \*, Significantly different from control at p<0.05 TP, total protein ; TB, total bilirubin ; AST, aspartate transaminase ; ALT, alanine transaminase ; A/G ratio, Albumin/Globulin ratio ; GLU, glucose ; ALP, alkaline phosphatase ; CHOL, cholesterol ; TG, triglyceride ; BUN, blood urea nitrogen ; CREAT, creatinine ; Na, sodium ; K, potassium ; CL, chloride

Table 7. Prothrombin time and thromboplastin time of rats orally treated with *Oldenlandia diffusa* Herba  
(unit: second)

	Group	Control	High	Middle	Low
Sex	Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
	No. of animal	5	5	5	5
Male	PT	15.44±1.419 <sup>a)</sup>	14.76±0.297	15.00±0.255	14.925±0.330
	PTT	28.28±12.119	24.80±1.908	17.62±5.657	19.73±4.215
Female	PT	14.10±0.849	14.78±0.589	16.50±0.000	14.40±0.412
	PTT	29.05±16.617	24.76±2.166	41.40±0.000	22.18±2.559

<sup>a)</sup>, Values were expressed as mean±S.D.

<sup>\*</sup>, Significantly different from control at p<0.05

**Table 8. Absolute organ weights of male rats orally treated with Oldenlandiae diffusa Herba** (unit : g)

Parameter	Group Dose(%(w/w)) No. of animal	Control 0 10	High 10 10	Middle 1 10	Low 0.1 10
Liver		8.75±1.080 <sup>a)</sup>	10.00±1.320	9.84±1.302	9.46±1.485
Spleen		0.67±0.061	0.61±0.178	0.64±0.106	0.64±0.188
Kidney (left)		1.30±0.194	1.30±0.188	1.29±0.156	1.24±0.212
Kidney (right)		1.32±0.188	1.32±0.203	1.31±0.136	1.28±0.239
Adrenal gland (left)		0.04±0.009	0.04±0.011	0.04±0.005	0.03±0.007
Adrenal gland (right)		0.04±0.010	0.04±0.010	0.04±0.007	0.03±0.007
Heart		1.30±0.256	1.23±0.193	1.23±0.228	1.21±0.224
Lung		1.98±0.390	2.01±0.412	2.05±0.239	2.25±0.441
Thymus		0.38±0.065	0.55*±0.121	0.42±0.051	0.33±0.140
Testis (left)		1.77±0.209	1.68±0.117	1.68±0.109	1.74±0.159
Testis (right)		1.75±0.186	1.74±0.173	1.68±0.138	1.72±0.149
Epididymis (left)		0.69±0.142	0.60±0.076	0.55*±0.068	0.69±0.150
Epididymis (right)		0.70±0.159	0.62±0.093	0.53*±0.061	0.68±0.147
Salivary Gl. (left)		0.34±0.090	0.30±0.126	0.29±0.060	0.35±0.092
Salivary Gl. (right)		0.34±0.095	0.35±0.105	0.27±0.0446	0.33±0.058
Prostate		2.58±0.526	2.51±0.722	2.80±0.311	2.11±0.450
Brain		1.97±0.193	1.83±0.148	1.97±0.132	1.90±0.124
Hypophysis		0.01±0.000	0.01±0.003	0.01±0.003	0.01±0.000



**Table 9. Absolute organ weights of female rats orally treated with Oldenlandiae diffusa Herba**

(unit : g)

Parameter	Group	Control	High	Middle	Low
	Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
	No. of animal	10	10	10	10
Liver		7.14±0.733 <sup>a)</sup>	5.27±0.401	5.13±0.392	5.10±0.333
Spleen		0.55±0.131	0.55±0.079	0.57±0.109	0.54±0.093
Kidney (left)		0.87±0.154	0.65±0.048	0.69±0.054	0.69±0.058
Kidney (right)		0.90±0.144	0.66±0.048	0.69±0.065	0.67±0.071
Adrenal gland (left)		0.04±0.007	0.04±0.005	0.02±0.005	0.02±0.0004
Adrenal gland (right)		0.04±0.016	0.03±0.005	0.03±0.005	0.02±0.007
Heart		1.02±0.116	0.69±0.084	0.73±0.071	0.75±0.051
Lung		1.79±0.268	1.14±0.053	1.14±0.085	1.22±0.198
Thymus		0.54±0.145	0.46±0.065	0.50±0.060	0.56±0.079
Ovary (left)		0.06±0.005	0.07±0.018	0.06±0.017	0.07±0.010
Ovary (right)		0.07±0.020	0.07±0.028	0.06±0.011	0.07±0.019
Uterus		0.60±0.271	0.93*±0.299	0.63±0.116	0.59±0.236
Salivary Gl. (left)		0.30±0.117	0.20±0.029	0.20±0.046	0.25±0.048
Salivary Gl. (right)		0.27±0.081	0.19±0.032	0.21±0.034	0.23±0.043
Brain		1.93±0.118	1.84±0.016	1.68±0.176	1.80±0.138
Hypophysis		0.01±0.000	0.01±0.000	0.01±0.000	0.01±0.000

<sup>a)</sup>, Values were expressed as mean±S.D.

\*, Significantly different from control at p<0.05

Table 10. Relative organ weights of male rats orally treated with *Oldenlandia diffusa* Herba (unit : g)

Parameter	Group	Control	High	Middle	Low
	Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
	No. of animal	10	10	10	10
Liver		2.111±0.3288 <sup>a)</sup>	2.458±0.1707	2.375±0.2700	2.276±0.3638
Spleen		0.167±0.0220	0.153±0.0492	0.153±0.0143	0.154±0.0444
Kidney (left)		0.324±0.0512	0.319±0.0382	0.313±0.0520	0.301±0.0525
Kidney (right)		0.403±0.2560	0.325±0.0451	0.318±0.0451	0.312±0.0584
Adrenal gland (left)		0.010±0.0027	0.010±0.0033	0.016±0.0243	0.008±0.0017
Adrenal gland (right)		0.010±0.0027	0.010±0.0034	0.008±0.0016	0.008±0.0018
Heart		0.324±0.0626	0.299±0.0369	0.297±0.0608	0.294±0.0534
Lung		0.497±0.1174	0.498±0.1108	0.497±0.0607	0.594±0.1964
Thymus		0.096±0.0212	0.145*±0.0420	0.102±0.0173	0.080±0.0307
Testis (left)		0.441±0.0442	0.419±0.0580	0.409±0.0628	0.422±0.0447
Testis (right)		0.435±0.0390	0.433±0.0808	0.411±0.0664	0.419±0.0514
Epididymis (left)		0.174±0.0337	0.150±0.0279	0.133*±0.0204	0.168±0.0402
Epididymis (right)		0.176±0.0445	0.153±0.0201	0.128*±0.0203	0.164±0.0381
Salivary Gl. (left)		0.086±0.0263	0.073±0.0287	0.070±0.0146	0.083±0.0190
Salivary Gl. (right)		0.086±0.0234	0.086±0.0218	0.066±0.0137	0.080±0.0142
Prostate		0.643±0.1247	0.610±0.1398	0.681±0.1012	0.512*±0.1078
Brain		0.490±0.0529	0.437±0.0642	0.480±0.0784	0.464±0.0540
Hypophysis		0.003±0.0005	0.003±0.0010	0.003±0.0010	0.002±0.0004

<sup>a)</sup>, Values were expressed as mean±S.D.

\*, Significantly different from control at p<0.05

Table 11. Relative organ weights of female rats orally treated with *Oldenlandiae diffusa* Herba (unit : g)

Parameter	Group	Control	High	Middle	Low
	Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
	No. of animal	10	10	10	10
Liver		2.747±0.3285 <sup>a)</sup>	2.473*±0.2003	2.413*±0.1793	2.566±0.2092
Spleen		0.210±0.0551	0.218±0.0323	0.214±0.0263	0.199±0.0390
Kidney (left)		0.442±0.1965	0.324±0.0281	0.312±0.0346	0.318±0.0348
Kidney (right)		0.494±0.2308	0.338±0.0376	0.316±0.0253	0.313±0.0460
Adrenal gland (left)		0.013±0.0030	0.011±0.0032	0.010*±0.0023	0.009*±0.0022
Adrenal gland (right)		0.012±0.0039	0.011±0.0019	0.011±0.0020	0.011±0.0020
Heart		0.393±0.0467	0.351±0.0390	0.373±0.0590	0.344±0.0509
Lung		0.690±0.1114	0.680±0.0793	0.654±0.0811	0.664±0.1435
Thymus		0.215±0.0543	0.136*±0.0419	0.195±0.0820	0.175±0.0451
Ovary (left)		0.025±0.0020	0.026±0.0074	0.024±0.0054	0.027±0.0048
Ovary (right)		0.027±0.0076	0.027±0.0111	0.021±0.0038	0.026±0.0075
Uterus		0.234±0.1169	0.346*±0.1394	0.235±0.0625	0.223±0.0971
Salivary Gl. (left)		0.114±0.0460	0.084±0.0242	0.108±0.0312	0.090±0.0250
Salivary Gl. (right)		0.105±0.0324	0.094±0.0264	0.107±0.0300	0.104±0.0222
Brain		0.739±0.03677	0.677±0.07514	0.708±0.05843	0.720±0.0523
Hypophysis		0.004±0.0003	0.004±0.0005	0.004±0.0005	0.004±0.0003

<sup>a)</sup>, Values were expressed as mean±S.D.

\*, Significantly different from control at p<0.05

**Table 12. Autopsy findings of male rats orally treated with Oldenlandia diffusa Herba**

Group	Control	High	Middle	Low
Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
No. of animal	10	10	10	10
Liver	NSL <sup>a)</sup>	NSL	NSL	NSL
Spleen	NSL	NSL	NSL	NSL
Lung	NSL	NSL	NSL	NSL
Kidney	NSL	NSL	NSL	NSL
Adrenal gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Thyroid gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Parathyroid gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Heart	NSL	NSL	NSL	NSL
Thymus	NSL	NSL	NSL	NSL
Esophagus	NSL	NSL	NSL	NSL
Salivary gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Lymphnode	NSL	NSL	NSL	NSL
Stomach	NSL	NSL	NSL	NSL
Intestine	NSL	NSL	NSL	NSL
Pancreas	NSL	NSL	NSL	NSL
Cerebrum	NSL	NSL	NSL	NSL
Cerebellum	NSL	NSL	NSL	NSL
Bone marrow	NSL	NSL	NSL	NSL
Testis	NSL	NSL	NSL	NSL
Urinary bladder	NSL	NSL	NSL	NSL
Prostate gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Muscle	NSL	NSL	NSL	NSL
Sciatic nerve	NSL	NSL	NSL	NSL

<sup>a)</sup>, NSL : no significantly lesions

**Table 13. Autopsy findings of female rats orally treated with Oldenlandia diffusa Herba**

Group	Control	High	Middle	Low
Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
No. of animal	10	10	10	10
Liver	NSL <sup>a)</sup>	NSL	NSL	NSL
Spleen	NSL	NSL	NSL	NSL
Lung	NSL	NSL	NSL	NSL
Kidney	NSL	NSL	NSL	NSL
Adrenal gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Thyroid gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Parathyroid gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Heart	NSL	NSL	NSL	NSL
Thymus	NSL	NSL	NSL	NSL
Esophagus	NSL	NSL	NSL	NSL
Salivary gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Lymphnode	NSL	NSL	NSL	NSL
Stomach	NSL	NSL	NSL	NSL
Intestine	NSL	NSL	NSL	NSL
Pancreas	NSL	NSL	NSL	NSL
Cerebrum	NSL	NSL	NSL	NSL
Cerebellum	NSL	NSL	NSL	NSL
Bone marrow	NSL	NSL	NSL	NSL
Ovary	NSL	NSL	NSL	NSL
Urinary bladder	NSL	NSL	NSL	NSL
Uterus and Vagina	NSL	NSL	NSL	NSL
Muscle	NSL	NSL	NSL	NSL
Sciatic nerve	NSL	NSL	NSL	NSL

<sup>a)</sup>, NSL : no significantly lesions

**Table 14. Histopathological findings of male rats orally treated with *Oldenlandiae diffusa* Herba**

Group	Control	High	Middle	Low
Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
No. of animal	10	10	10	10
Liver	NSL <sup>a)</sup>	NSL	NSL	NSL
Spleen	NSL	NSL	NSL	NSL
Lung	NSL	NSL	NSL	NSL
Kidney	NSL	NSL	NSL	NSL
Adrenal gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Thyroid gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Parathyroid gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Heart	NSL	NSL	NSL	NSL
Thymus	NSL	NSL	NSL	NSL
Esophagus	NSL	NSL	NSL	NSL
Salivary gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Lymphnode	NSL	NSL	NSL	NSL
Stomach	NSL	NSL	NSL	NSL
Intestine	NSL	NSL	NSL	NSL
Pancreas	NSL	NSL	NSL	NSL
Cerebrum	NSL	NSL	NSL	NSL
Cerebellum	NSL	NSL	NSL	NSL
Bone marrow	NSL	NSL	NSL	NSL
Testis	NSL	NSL	NSL	NSL
Urinary bladder	NSL	NSL	NSL	NSL
Prostate gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Muscle	NSL	NSL	NSL	NSL
Sciatic nerve	NSL	NSL	NSL	NSL

<sup>a)</sup>, NSL : no significant lesions

Table 15. Histopathological findings of female rats orally treated with *Oldenlandia diffusa* Herba

Group	Control	High	Middle	Low
Dose(%(w/w))	0	10	1	0.1
No. of animal	10	10	10	10
Liver	NSL <sup>a)</sup>	NSL	NSL	NSL
Spleen	NSL	NSL	NSL	NSL
Lung	NSL	NSL	NSL	NSL
Kidney	NSL	NSL	NSL	NSL
Adrenal gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Thyroid gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Parathyroid gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Heart	NSL	NSL	NSL	NSL
Thymus	NSL	NSL	NSL	NSL
Esophagus	NSL	NSL	NSL	NSL
Salivary gland	NSL	NSL	NSL	NSL
Lymphnode	NSL	NSL	NSL	NSL
Stomach	NSL	NSL	NSL	NSL
Intestine	NSL	NSL	NSL	NSL
Pancreas	NSL	NSL	NSL	NSL
Cerebrum	NSL	NSL	NSL	NSL
Cerebellum	NSL	NSL	NSL	NSL
Bone marrow	NSL	NSL	NSL	NSL
Ovary	NSL	NSL	NSL	NSL
Urinary bladder	NSL	NSL	NSL	NSL
Uterus and Vagina	NSL	NSL	NSL	NSL
Muscle	NSL	NSL	NSL	NSL
Sciatic nerve	NSL	NSL	NSL	NSL

<sup>a)</sup>, NSL : no significant lesions

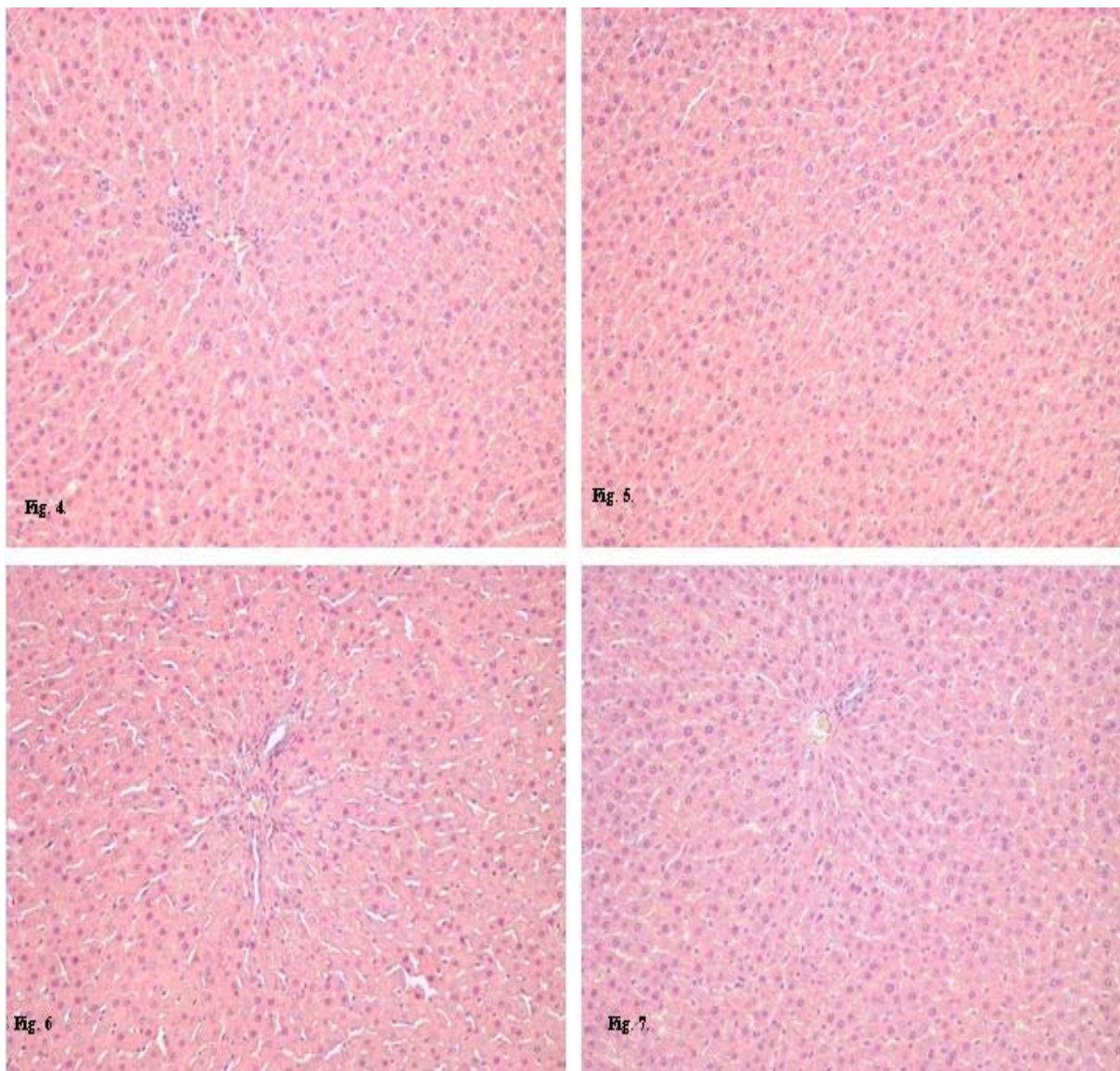


Figure 4. Histopathological finding in the liver of male rat after treatment with vehicle for 90days

Figure 5. Histopathological finding in the liver of male rat after treatment with high dose of Oldenlandiae diffusa Herba for 90days

Figure 6. Histopathological finding in the liver of male rat after treatment with middle dose of Oldenlandiae diffusa Herba for 90days

Figure 7. Histopathological finding in the liver of male rat after treatment with low dose of Oldenlandiae diffusa Herba for 90days



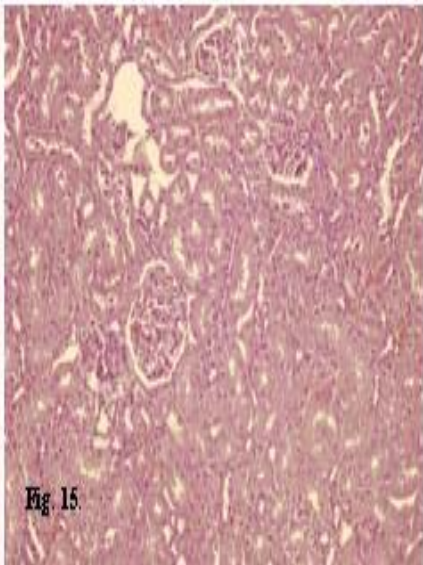
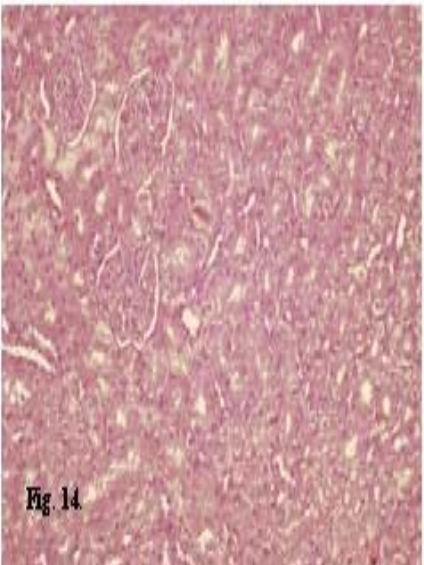
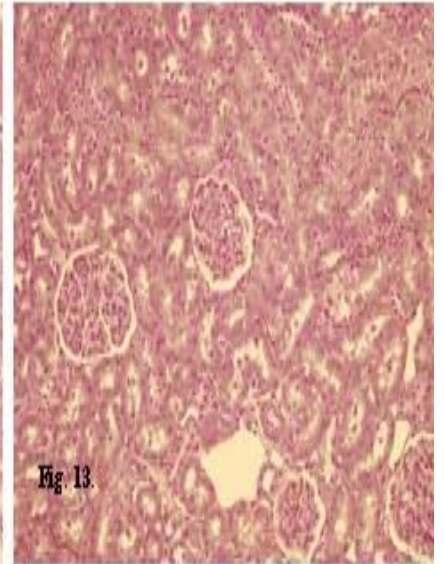
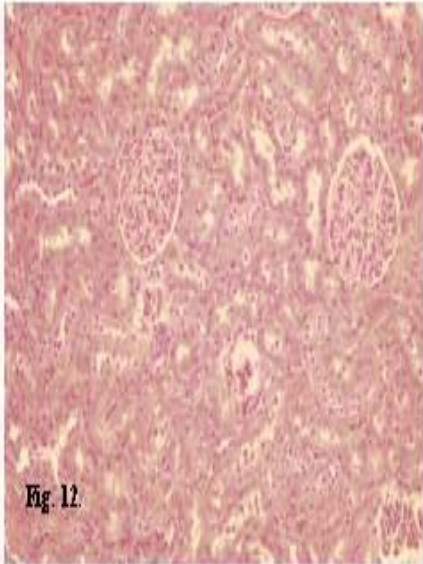
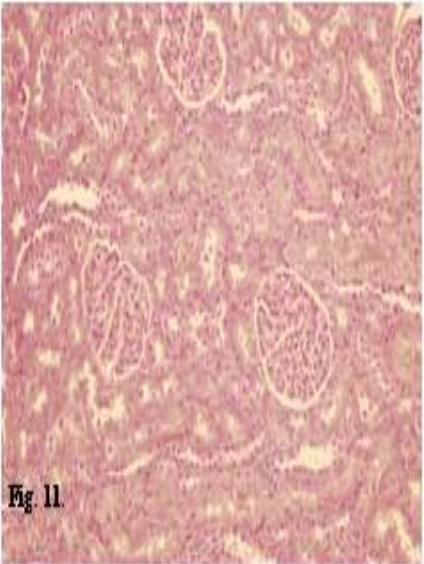
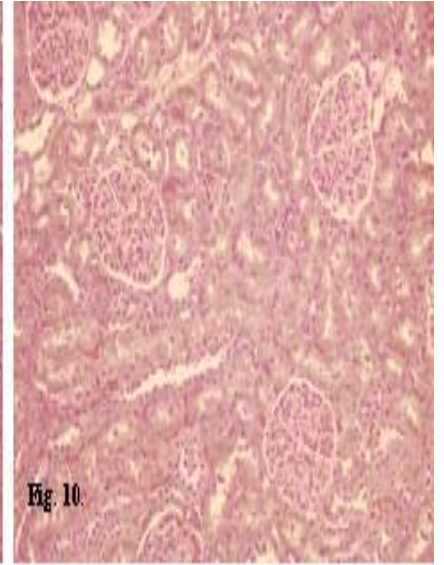
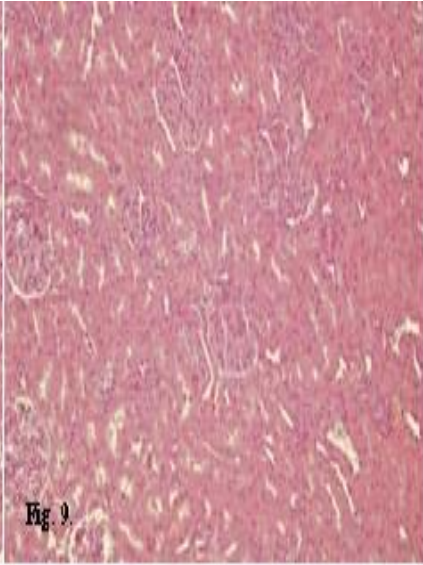
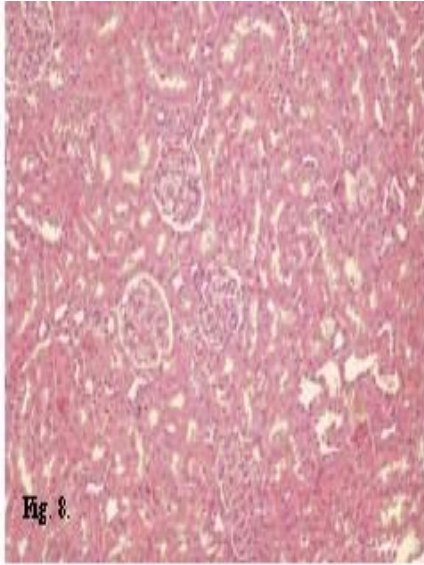


Figure 8. Histopathological finding in the kidney of male rat after treatment with vehicle for 90days

Figure 9. Histopathological finding in the kidney of female rat after treatment with vehicle for 90days

Figure 10. Histopathological finding in the kidney of male rat after treatment with high dose of *Oldenlandiae diffusa* Herba for 90days

Figure 11. Histopathological finding in the kidney of female rat after treatment with high dose of *Oldenlandiae diffusa* Herba for 90days

Figure 12. Histopathological finding in the kidney of male rat after treatment with middle dose of *Oldenlandiae diffusa* Herba for 90days

Figure 13. Histopathological finding in the kidney of female rat after treatment with middle dose of *Oldenlandiae diffusa* Herba for 90days

Figure 14. Histopathological finding in the kidney of male rat after treatment with low dose of *Oldenlandiae diffusa* Herba for 90days

Figure 15. Histopathological finding in the kidney of female rat after treatment with low dose of *Oldenlandiae diffusa* Herba for 90days

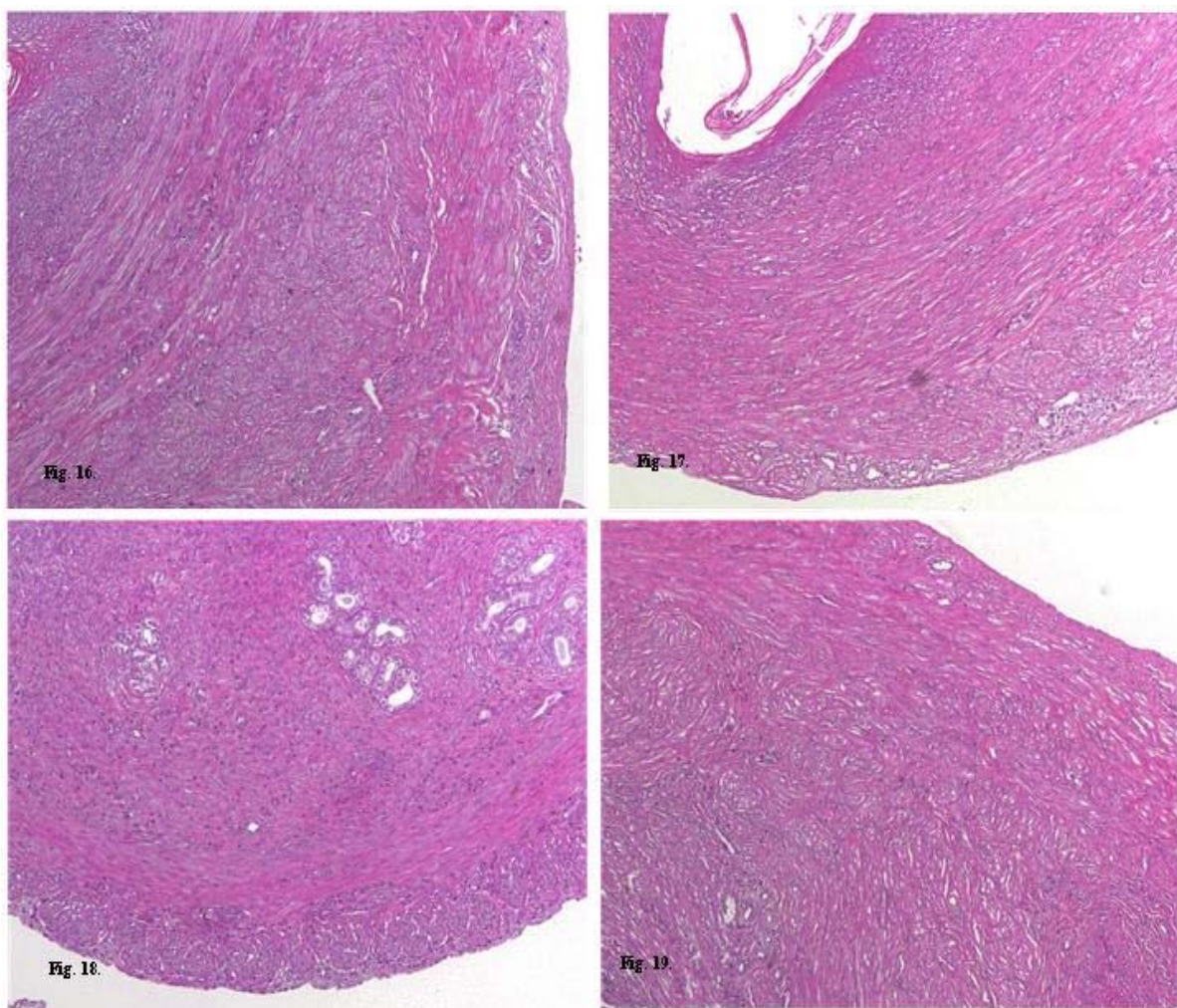


Figure 16. Histopathological finding in the uterus of female rat after treatment with vehicle for 90days

Figure 17. Histopathological finding in the uterus of female rat after treatment with high dose of Oldenlandiae diffusa Herba for 90days

Figure 18. Histopathological finding in the uterus of female rat after treatment with middle dose of Oldenlandiae diffusa Herba for 90days

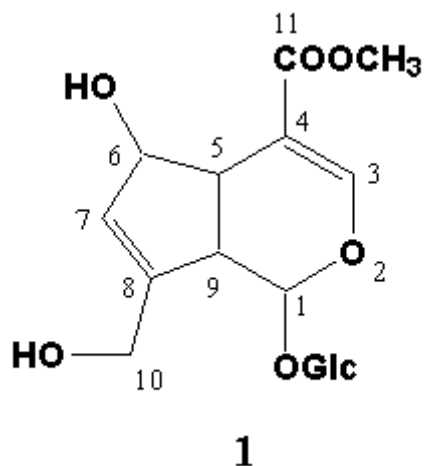
Figure 19. Histopathological finding in the uterus of female rat after treatment with low dose of Oldenlandiae diffusa Herba for 90days

### 3. 3차년도

#### 3, 1. Column chromatography법을 이용한 백화사설초로부터 순수물질 분리, 동정

백화사설초 전초의 MeOH 추출물로부터 화합물을 분리, 동정하였다.

##### -화합물 1의 구조 (Feretoside)



화합물 1은 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 밝은 청색으로 발색 되는 것으로 보아 iridoid 화합물임이 추정되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 7.68(1H, s) 및 6.31(1H, s)의 signal로부터 olefinic methine proton 두 개를 관측할 수 있었고,  $\delta$  5.80(1H, d, J=5.6 Hz) 및  $\delta$  4.76(1H, s)의 signal로부터 두 개의 oxygenated methine proton이 존재함을 알 수 있었다.  $\delta$  5.37(1H, d, J=8.4 Hz)에서 anomeric proton으로 보여지는 signal과  $\delta$  4.2 -  $\delta$  3.0사이에서 다수의 methine proton과 methylene proton이 관측되어 한 분자의 당이 존재함을 확인할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 총 16개의 탄소

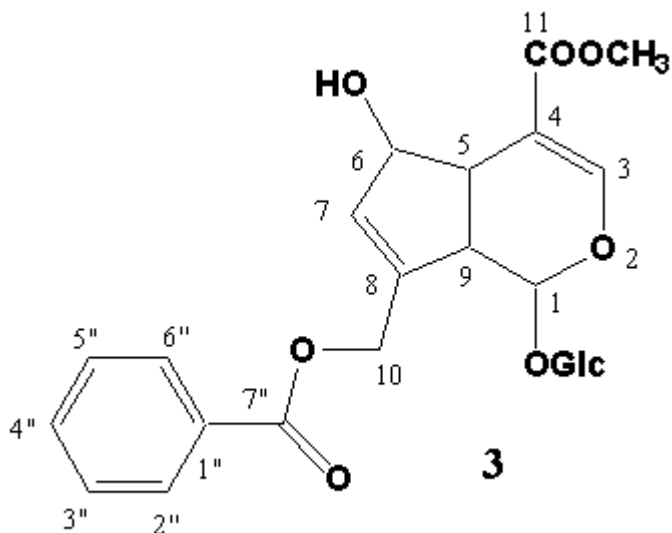
소가 관측되었으며,  $\delta$  167.95에서 한 개의 esteric carbon signal을 관측할 수 있었다. 당 signal은 문헌비교 조사 결과 glucose로 판명되었으며, 이 모든 자료와 2D-NMR spectrum을 종합한 결과 화합물 1은 1번 탄소에 glucose 한 분자가 결합되어 있는 feretoside로 구조 동정 하였다.

##### -화합물 2의 구조(Geneposide)

화합물 2은 feretoside(화합물 1)와 NMR spectrum이 거의 유사한 것을 알 수 있었고, feretoside의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 oxygenated methine proton이었던 signal이 2.86(1H, dd, J=16.4, 8.4)과 2.15(1H, m)의 methylene signal로 바뀌었고, 화합물 1에서는 관측되었던 벤젠 고리에서 유래한 proton signal이 화합물 3에서는 관측되지 않았다. 이러한 구조변화는 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서도 증명되었으며, 그리하여 화합물 3은 feretoside의 6번 탄소가 환원되어 methylene이 된 geniposide로 구조 동정 하였다.

##### -화합물 3의 구조

화합물 3은 <sup>1</sup>H-NMR spectrum의 olefine 영역에서  $\delta$  7.96(2H, d, J=7.6 Hz),  $\delta$  6.50(1H, dd, J=7.6,

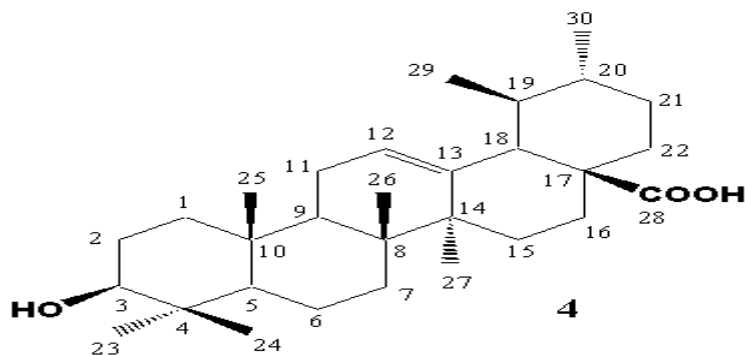


7.6 Hz) 및  $\delta$ 7.36(2H, dd,  $J=7.6, 7.6$  Hz, H-3'', 5'')의 signal이 관측된 것으로 보아 한 개의 벤젠고리가 존재함을 알 수 있었고,  $\delta$ 4.70(1H, d,  $J=7.6$  Hz)에서 anomeric proton으로 보여지는 signal과  $\delta$ 3.9 -  $\delta$ 3.1 사이에서 다수의 methine proton과 methylene proton이 관측되어 한 분자의 당이 존재함을 확인할 수 있었다. 벤젠 고리와 당을 제외한 나머지 signal을 문헌과 비교해 본 결과 iridoid의

feretoside와 비슷한 골격이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta$ 168.96과  $\delta$ 166.50에서 두 개의 esteric carbon이 관측되었고,  $\delta$ 99.92에서 anomeric carbon이 확인되었다.  $\delta$ 76.08 -  $\delta$ 62.65에서 다수의 signal들이 관측되어 chemical shift 값을 문헌과 비교해 본 결과 glucose로 판명되었다. 벤젠 고리와 당의 signal을 제외한 나머지 shift 값과 2D-NMR spectrum을 조사해 본 결과 이 화합물은 6번 탄소에 hydroxyl group, 7번의 탄소에는 이중결합이 존재하고, 8번 탄소에 결합한 ethyl group에 benzoic acid가 결합되어 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 glucose는 1번 탄소의 hydroxyl group에 결합되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이 모든 자료를 종합해 본 결과 화합물 3은 feretoside(화합물 1)의 10번 탄소의 hydroxyl group에 benzoic acid 한 분자가 결합한 물질로 구조 동정 하였다.

#### -화합물 4의 구조 (ursolic acid)

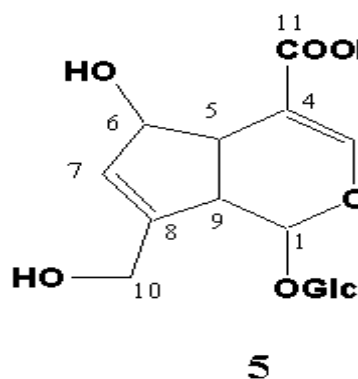
화합물 4은  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta$ 5.52(1H, t,  $J=3.5$  Hz)의 shift 값을 가지는 한 개의 olefinic methine proton과  $\delta$ 3.48(1H, dd,  $J=10.3, 4.1$  Hz)의 shift 값을 가지는 한 개의 oxygenated methine proton을 확인 하였다. 또한  $\delta$ 2.66 -  $\delta$ 0.91 사이에서 다수의 methine 및 methylene proton signal



이 관측되었고, 4개의 singlet methyl기와 2개의 doublet methyl기를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 탄소수 30개를 확인 하였고  $\delta$ 176.0에서 한 개의 carboxylic carbon을 확인할 수 있었으며,  $\delta$ 138.0과  $\delta$ 125.8에서 각각 olefinic quaternary carbon과 olefinic methine signal을 관측할 수 있었다.  $\delta$ 79.0에서는 한 개의

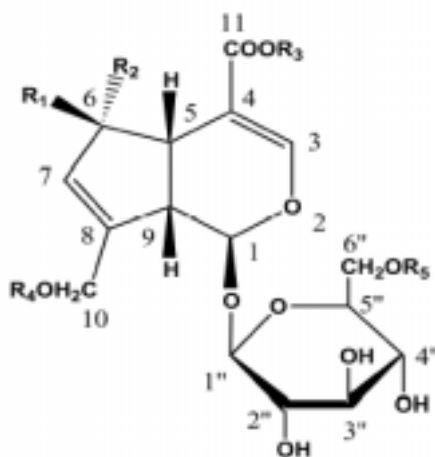
oxygenated methine signal이 관측되었고,  $\delta$ 55.5 이하의 저자장 영역에서는 다수의 methine 및 methylene signal이 관측되었다. 이 결과와 기존 문헌을 비교하여 화합물 4를 탄소 수 30개의 ursolic acid로 동정 하였다.

-화합물 5의 구조 (Scandoside)



화합물 5는 feretoside(화합물 1)와 NMR spectrum의 chemical shift 값을 비교해 본 결과 feretoside에서는  $\delta$ 167.95에서 관측되었던 esteric carbon 대신  $\delta$ 172.22에서 한 개의 carboxyl group이 관측된 것을 제외하고 거의 유사하였다. 그러므로 화합물 5는 feretoside의 4번 탄소에 한 개의 carboxyl group이 결합되어 있는 scandoside로 구조 동정 하였다.

-화합물6(10-O-Benzoylscandosidemethylester),7(OldenlandosideIII),8(Asperulosidic acid),9(Deacetylasperulosidicacid)의 구조



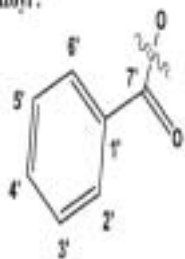
Compound 6 had not been previously isolated from *O. diffusa*. Compound 7 showed absorbance bands due to the hydroxy (3369  $\text{cm}^{-1}$ ), carbonyl (1716  $\text{cm}^{-1}$ ) and olefine (1643  $\text{cm}^{-1}$ ) groups in the IR spectrum and a molecular ion peak  $[M+H]^+$  at  $m/z$  611 in the positive FABMS spectrum. The NMR spectral features were similar to those of compound 6, except for the absence of a methoxy group bonded to a carboxylic acid and a hydroxylated methine

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
6	OH	H	CH <sub>3</sub>	benzoyl	Glc
7	H	H	H	benzoyl	Glc-Ara
7a	H	H	H	benzoyl	acetyl Glc-Ara
8	H	OH	H	Ac	Glc
9	H	OH	H	H	Glc

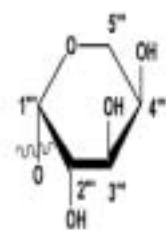
group, the presence of one methylene group ( $\delta$ H 3.24 (d, J = 6.8 Hz),  $\delta$ H 2.53 (m);  $\delta$ C 40.0), and an  $\alpha$ -L-arabinopyranose ( $\delta$ H 4.84, d, J = 6.8 Hz;  $\delta$ C 105.0, 73.9, 72.0, 69.0, 66.4) (Seo et al., 1978).

The position of the methylene and the arabinosyl unit was confirmed to be C-6 and C-6'',

benzoyl:



Ara:



respectively, by gHMBC analysis. The gHMBC spectra showed cross peaks between C-6 ( $\delta_C$  40.0) and H-7 ( $\delta_H$  5.04), between C-6 and H-5 ( $\delta_H$  3.61), and between C-6'' ( $\delta_C$  69.4) and H-1''' ( $\delta_H$  4.84). Additionally, acetylation of compound 7 produced a hexaacetate form (5a), as

indicated by NMR signals characteristic of six acetyl groups. Thus, compound 7 was determined to be a new compound, and was named oldenlandoside III. In addition, the iridoid glycosides with an oxygen atom in the R-groups at position C-6, such as compounds 6, 8 and 9, showed a blue color when sprayed with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and then heated on silica gel TLC, whereas the iridoid glycosides with no oxygen in the C-6 substituents, as in compounds 6 and 7, stained a dark brown color. This novel finding may be useful as a diagnostic tool to differentiate among glycosides *diffusae* Herba.

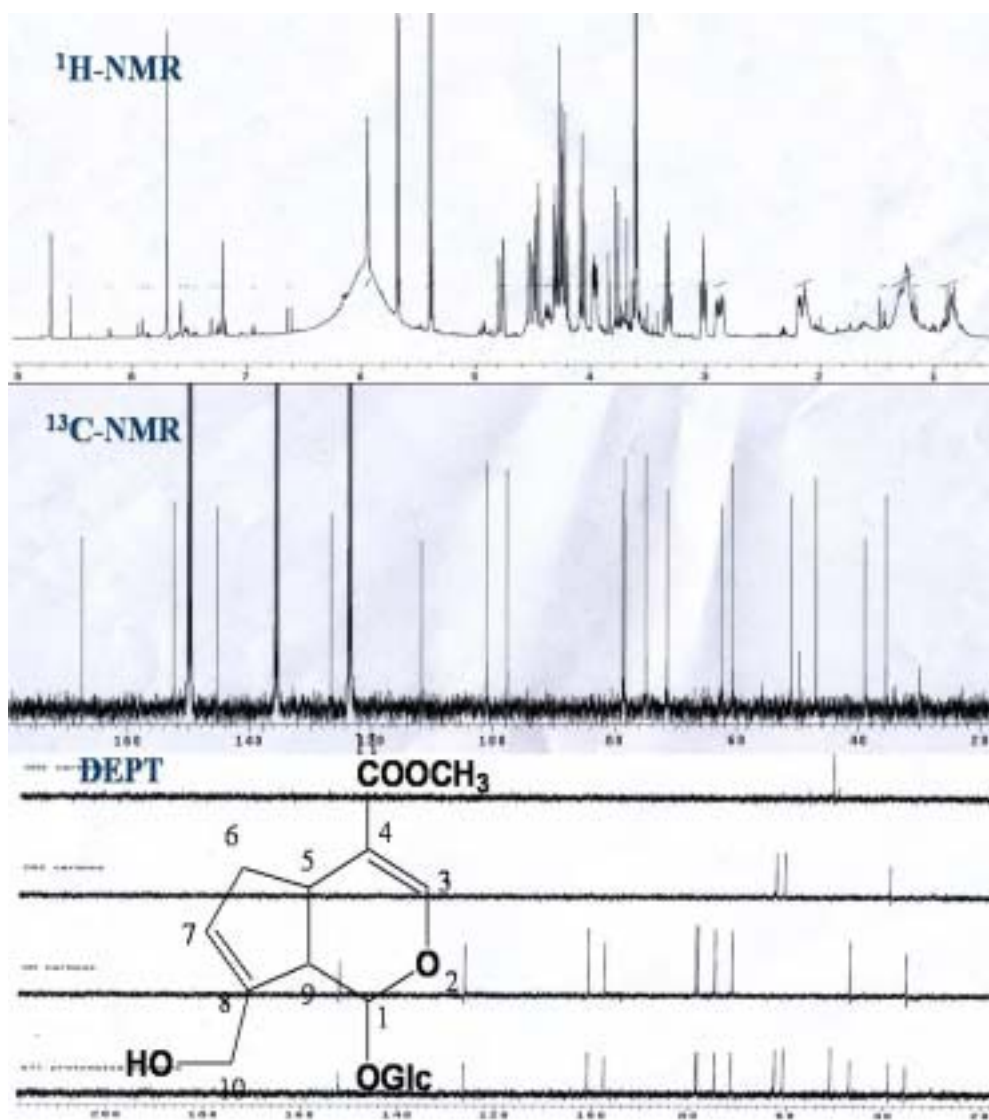


Fig. 2.  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$  & DEPT(100MHz) spectra of geniposide from *Oldenlandiae*



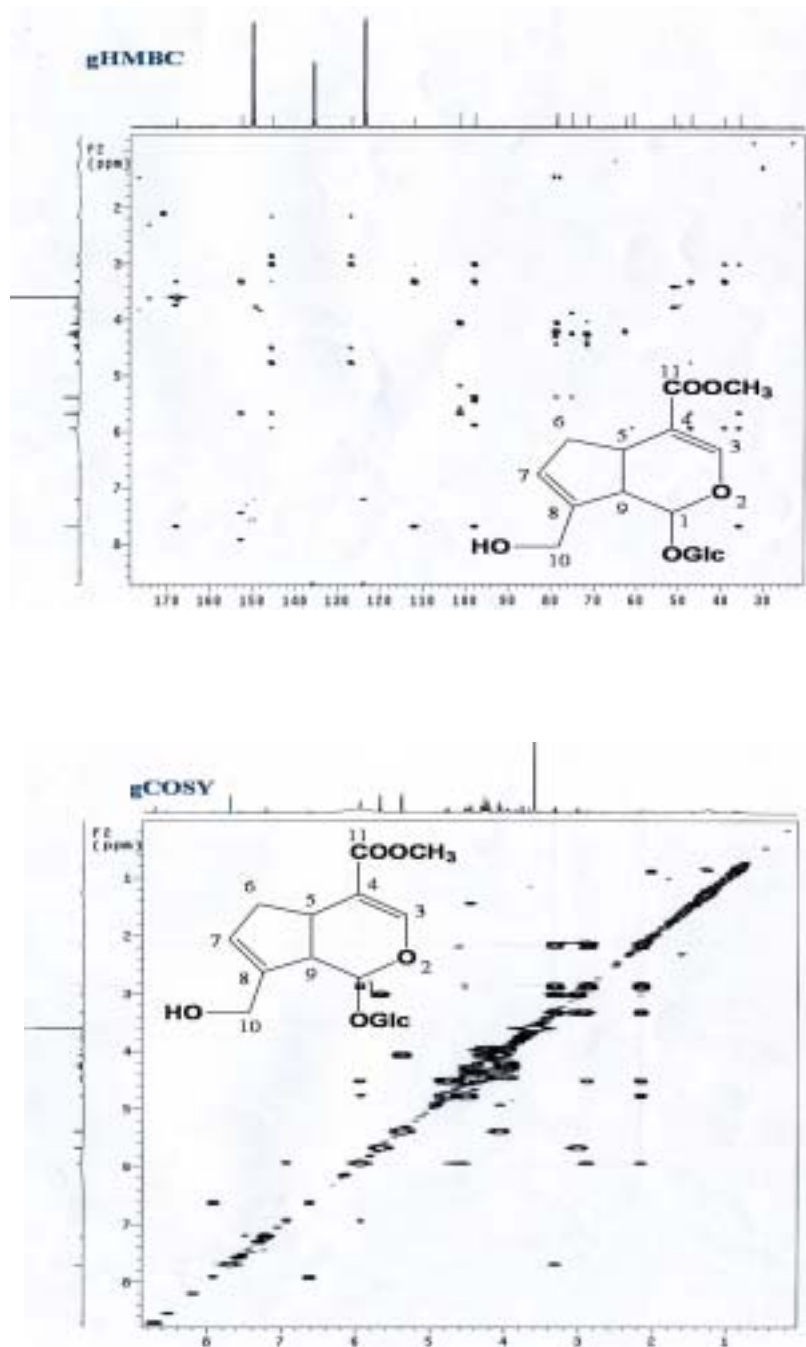


Fig. 3. gCOSY & gHMBC spectra of geniposide from *Oldenlandiae diffusae* Herba.

가. 백화사설초에서 분리된 Compound의 혈관내피세포 증식억제효과

bFGF로 유도된 HUVEC 내피세포의 증식억제효과에서는 Deacetylasperulosidic acid와 Asperulosidic acid가 혈관내피세포의 증식을 억제하였다. 두 compound는 80  $\mu$ M과 160  $\mu$ M에서 bFGF로 유도된 혈관내피세포 증식을 40 % 까지 억제하였으나, 나머지 Compound는 혈관 내피증식을 억제함을 보이지 않았다.

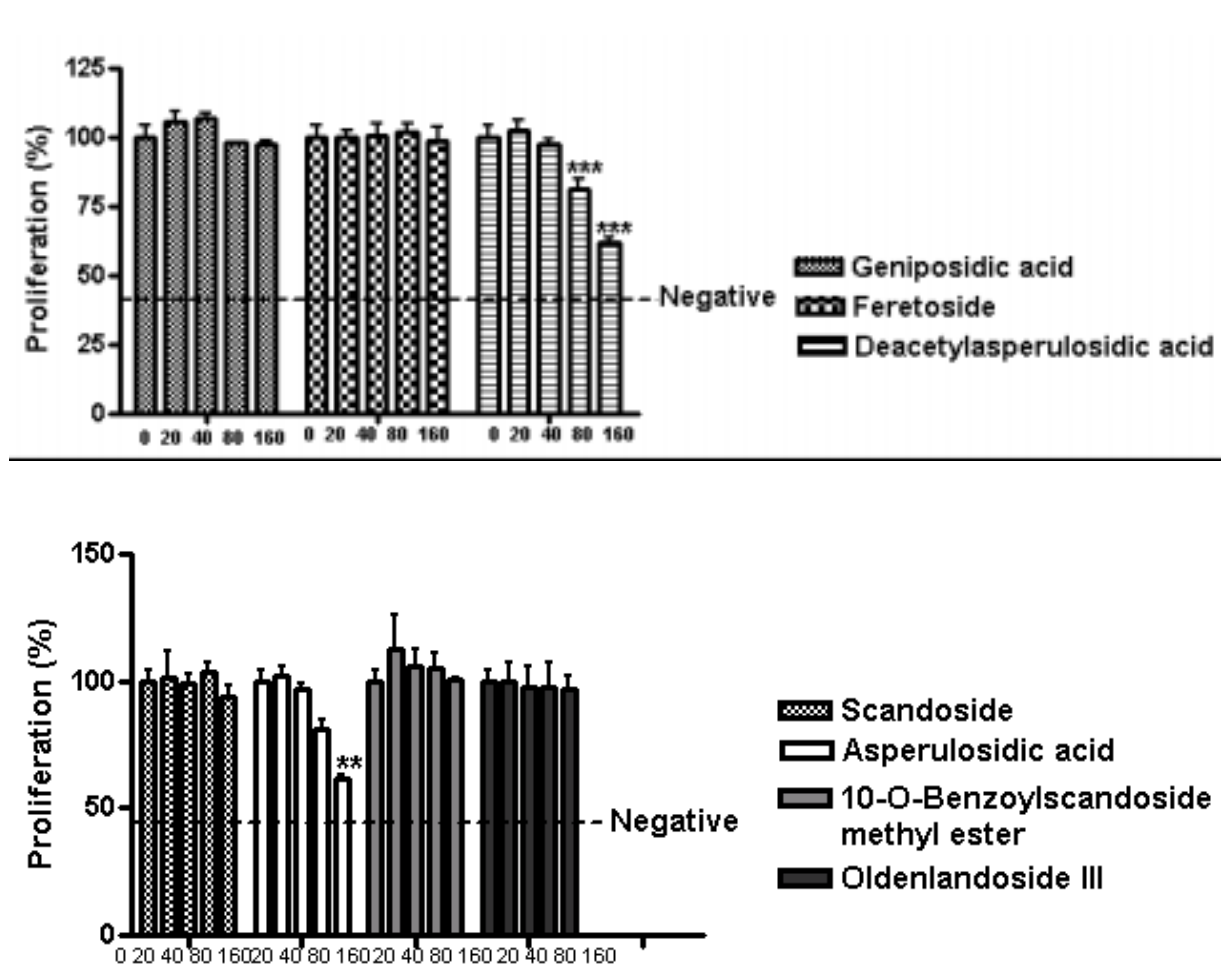
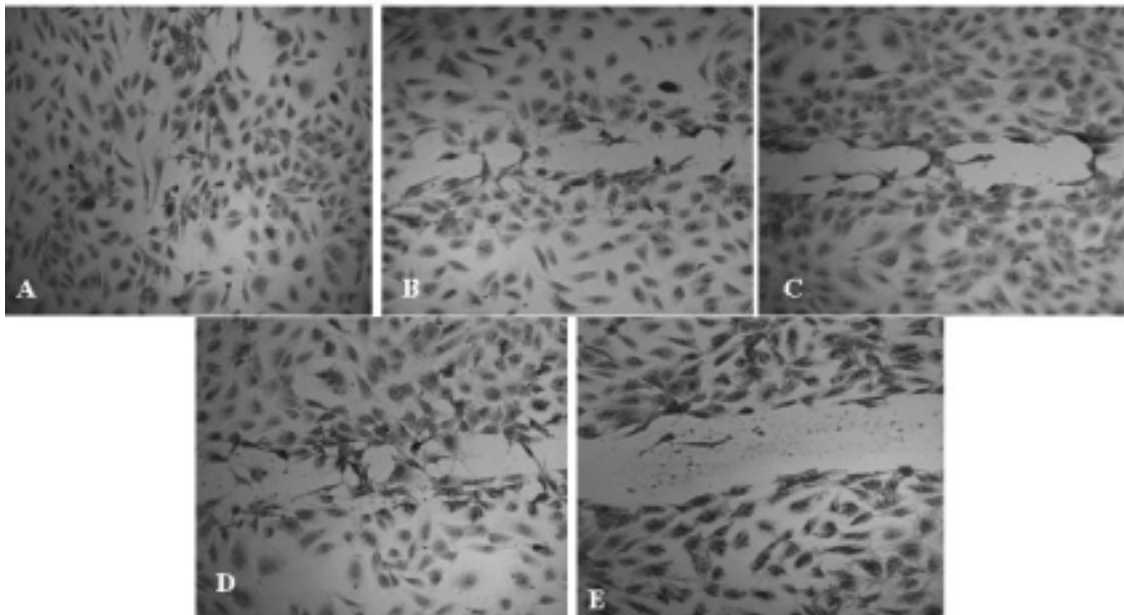


Fig. 4. Inhibitory effect of compounds on the proliferation of HUVECs \*; Statistically significant value compared with untreated control(\*\* p<0.01,\*\*\* p<0.001)

나. 백화사설초에서 분리된 Compound의 혈관내피세포의 이동 억제효과

bFGF로 유도된 HUVEC 내피세포의 이동억제효과에서는 Deacetylasperulosidic acid와 Asperulosidic acid 가 혈관내피세포의 이동을 억제하였다. 두 compound는 80  $\mu$ M과 160  $\mu$ M에서 bFGF로 유도된 혈관내피세포 이동을 억제하였다.



A: Control (bFGF 5ng/ml)  
B: Deacetylasperulosidic acid (80  $\mu$ M), C: Deacetylasperulosidic acid (160  $\mu$ M)  
D: Asperulosidic acid (80  $\mu$ M), E: Asperulosidic acid (160  $\mu$ M)

Fig. 5. Inhibitory effect of compounds on the migration of HUVECs

#### 다. 백화사설초에서 분리된 Compound의 혈관내피세포의 분화 효과

HUVEC 내피세포의 증식억제효과에서를 보였던 compound인 Deacetylasperulosidic acid와 Asperulosidic acid로 혈관내피세포의 분화 억제 효과를 보았다. HUVEC 내피세포는 대조군에서는 4시간이 경과 되면서 세포들이 분화하기 시작 하였으며, 5시간에는 tube를 형성하기 시작하였다. Deacetylasperulosidic acid와 Asperulosidic acid를 80  $\mu$ M과 160  $\mu$ M처리한 군 모두 대조군에 비하여 혈관망 형성을 억제하지는 않았다.

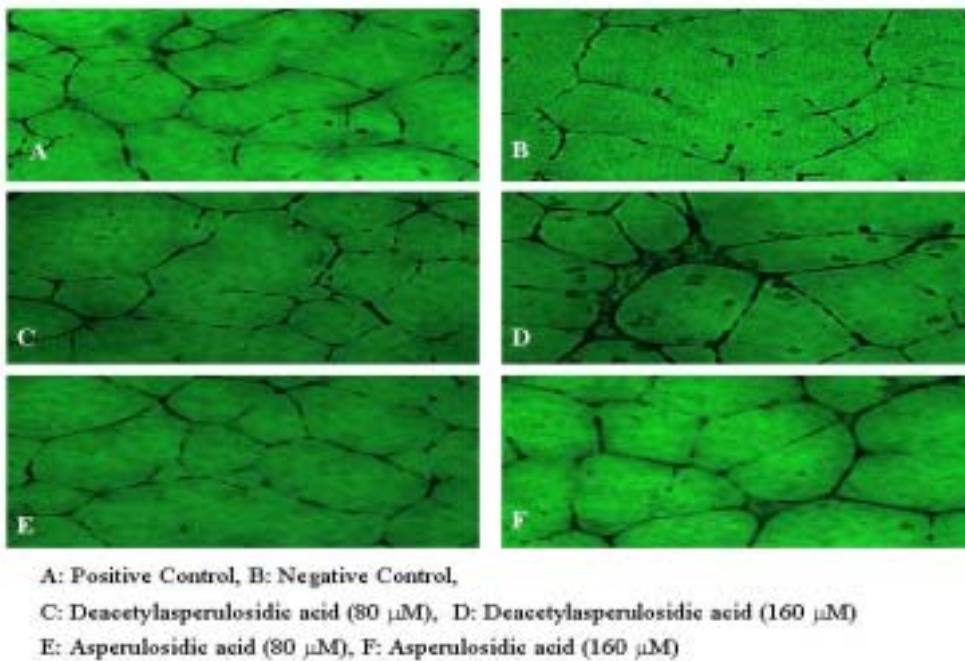


Fig. 6. Effect of compounds on tube formation of bFGF treated HUVECs assay

라. 백화사설초에서 분리된 Compound의 암세포성장 억제효과

전립선암주인 PC3 cell line으로 암세포 성장억제 실험결과 Scandoside compound가 160  $\mu$ M에서 30% 억제하는 효과를 보였으며, 백화사설초에서 분리된 나머지 iridoid 의 구조들의 compound는 암세포성장을 억제하지는 않았다.

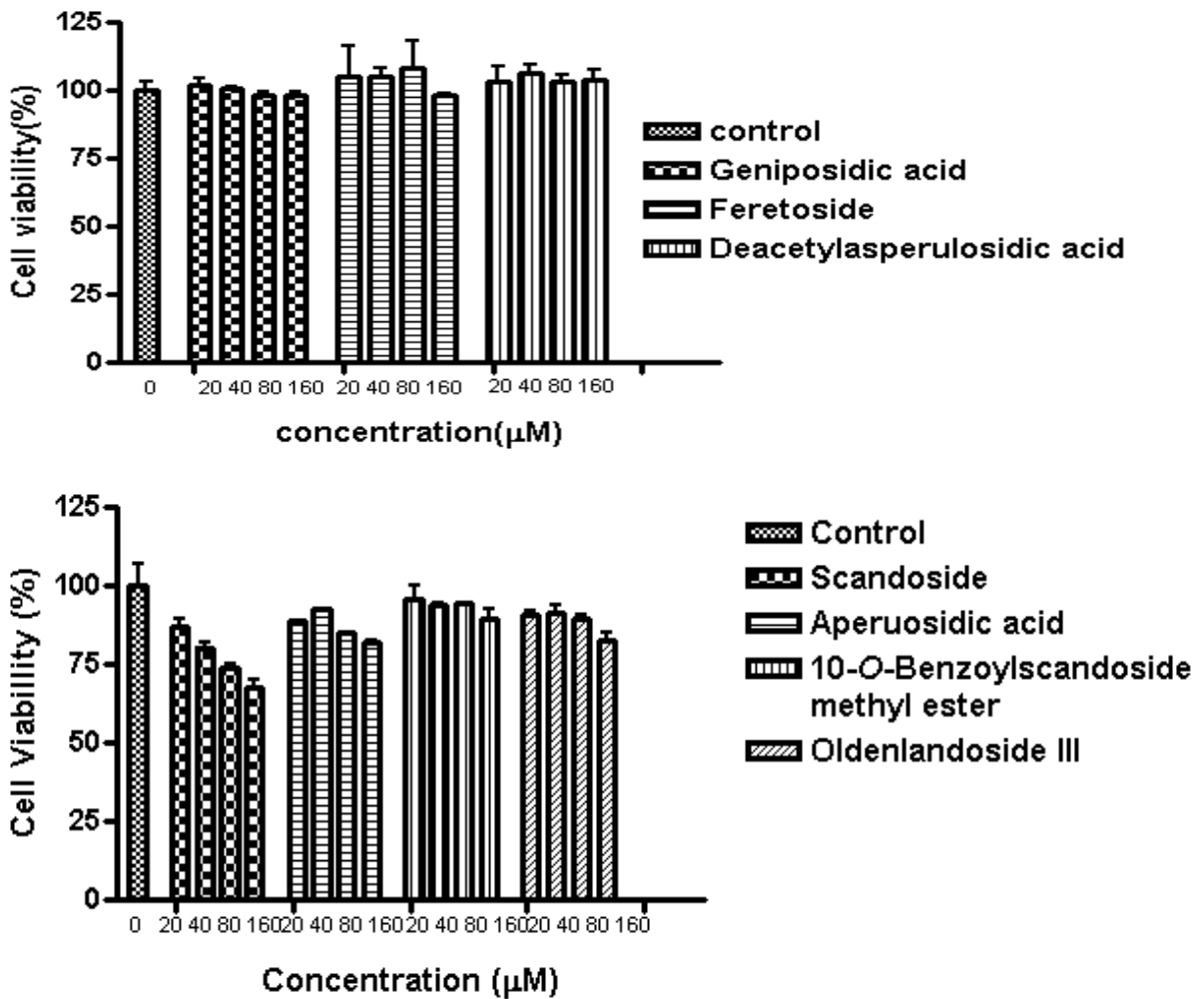


Fig. 7. Cytotoxic effect of compound on PC3 cells.

### 3, 2. 제1세부 과제명: 백화사설초의 면역조절 작용 연구

#### 가. 지연형 과민반응(Delayed Type Hypersensitivity)

면양세포를 즉척에 주사하여 야기된 부종이 대조군에서  $23.3 \pm 13.1$  로 나타났으며 Bio-Q 50 mg/kg과 100 mg/kg을 경구투여한 군에서는 용량의존적으로  $39.0 \pm 13.1$ ,  $52.4 \pm 29.67$ 로 유의성있게 증가함을 나타내었다.

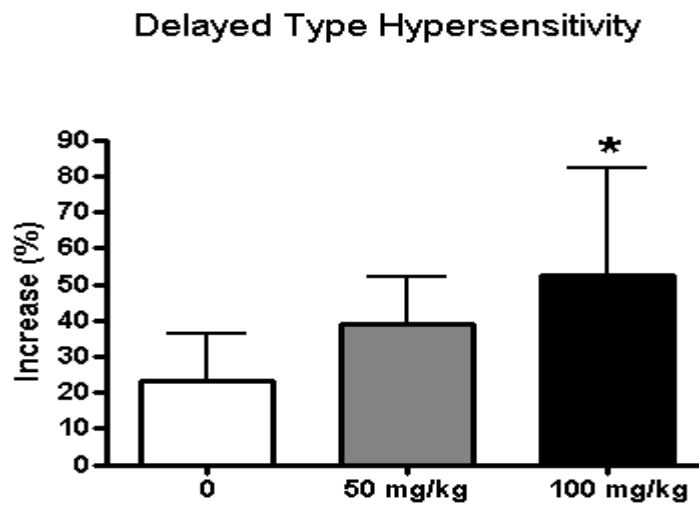


Fig. 1. Effects of Bio-Q on delayed type hypersensitivity response to SRBC in BALB/C Mice. \*; Statistically significant value compared with untreated control (\*  $p < 0.05$ )

#### 나. 적혈구 응집소가의 측정

실험결과 Bio-Q를 50, 100 mg/kg으로 경구투여한 군에서 대조군에 비하여 응집소가가  $2^{10}$  이상임을 확인하였다.

Table 1. Effects Bio-Q on hemagglutinin titer of response of SRBC in BALB/C Mice

Group	No. of animals	Hemagglutinin
Control	7	$2^8$
50 mg/kg	7	$2^{10}$ 이상
100 mg/kg	7	$2^{10}$ 이상

#### 다. 적혈구 용혈소가의 측정

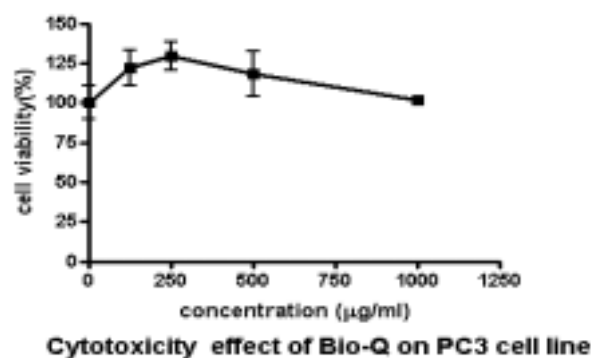
실험결과 Bio-Q를 50, 100 mg/kg으로 경구투여한 군에서 대조군에 비하여 용혈소가가  $2^{10}$  이상임을 확인하였다.

Table 2. Effects Bio-Q on hemolysin of response of SRBC in BALB/C Mice

Group	No. of animals	Hemolysin
Control	7	$2^7$
50 mg/kg	7	$2^{10}$ 이상
100 mg/kg	7	$2^{10}$ 이상

### 3, 3. 제 2 세부 과제명: 백화사설초의 항암효과에 관한 연구

#### 가. Bio-Q의 세포독성 효과



본 실험에서 *in vitro*에서 사용할 A549 cell과 PC3 cell을 가지고 세포 독성을 실험하였다. 24시간 Bio-Q를 농도별로 처리한 세포독성결과 A549와 PC3 cell에서 모두 250 µg/ml에서 1000 µg/ml 모두에서 독성이 없는 것으로 나타났다.

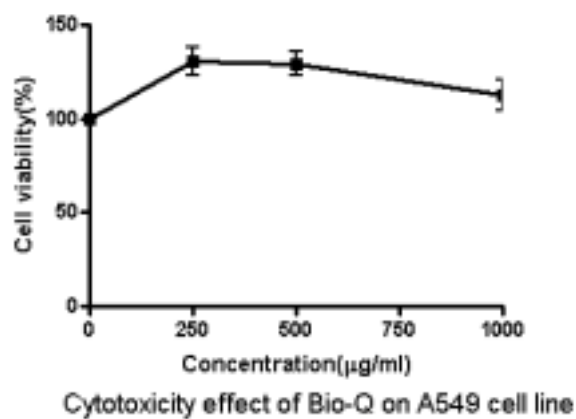


Fig.1.Cytotoxic effect of Bio-Q on A549 and PC3 cells.



## 나. Bio-Q의 세포고사 유도효과

Bio-Q가 세포고사를 유도하는지를 세포주기분석을 통하여 확인하였다. 세포주기는 DNA의 함량에 따라 G0/G1, S, G2/M 부분으로 이뤄지지만, sub G1 부분은 세포괴사 (necrosis) 가 아닌 세포고사(apoptosis)로 사멸했다는 것을 의미한다. A549 세포에 Bio-Q를 처리한 결과 sub G1 부분이 미세한 증가를 하였으나, 세포고사가 유도될만한 증가를 나타내진 않았다.

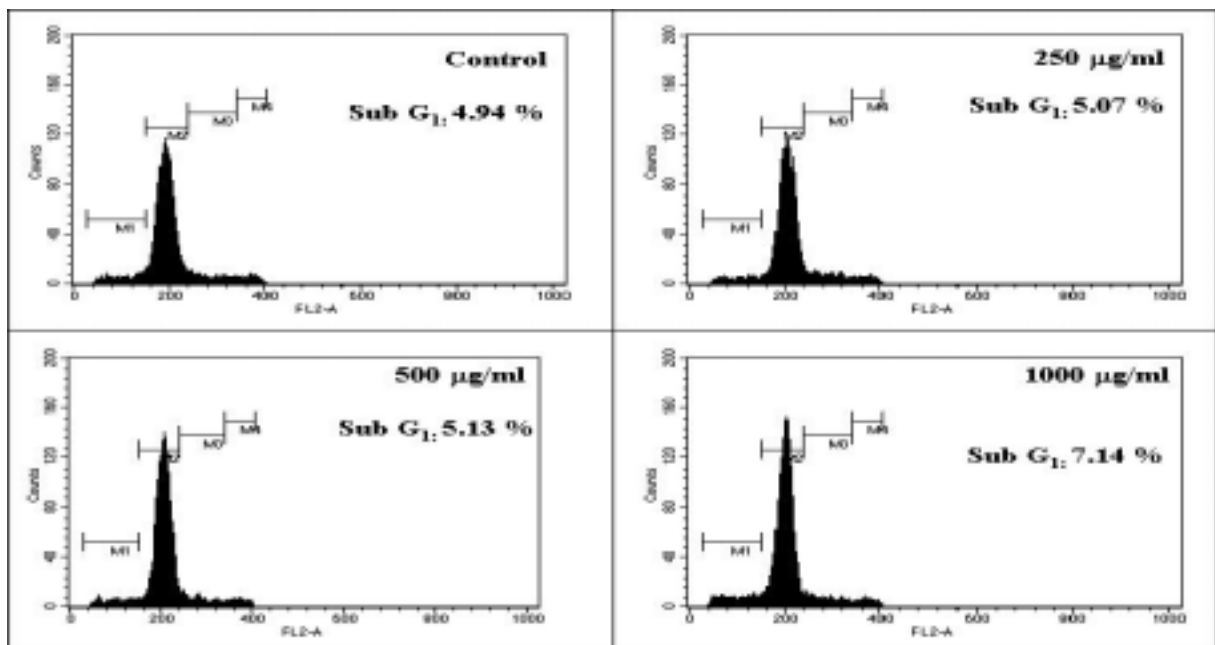
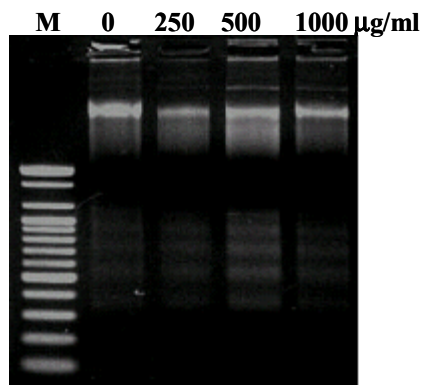


Fig. 2 .Effect of Bio-Q on cell cycle of A549 cells

### 다. Bio-Q의 DNA 분절효과



A549 세포에 Bio-Q를 250, 500, 1000 µg/ml로 24h 처리하여 세포고사에 따른 DNA의 분절효과를 본 결과 Bio-Q는 세포고사를 유도 하지 않음을 세포주기분석 결과와 일치 하였다.

### 라. Caspase 와 PARP 발현비교

Bio-Q에서 유도하는 세포고사의 기전을 알아보기 위해 세포고사에 관여하는 관련인자를 Western blot으로 확인하였다. Caspase의 활성화는 세포고사 유도의 중요한 과정으로 caspase는 initiator caspases (2, 8, 9, 10) 와 effector caspases(3, 6, 7)로 나뉘지며 이들은 불활성 상태로 만들어진 후 어떠한 자극에 의해 활성화 된다. 특히 활성화된 caspase 3은 DNA repair 효소인 PARP를 쪼갬으로써 세포고사를 나타내게 된다. 그러나 Bio-Q는 세포고사를 유도하는 Caspase 3을 활성화 시키지 않으므로 인하여 PARP를 절단시키지 않음을 확인 하였다.

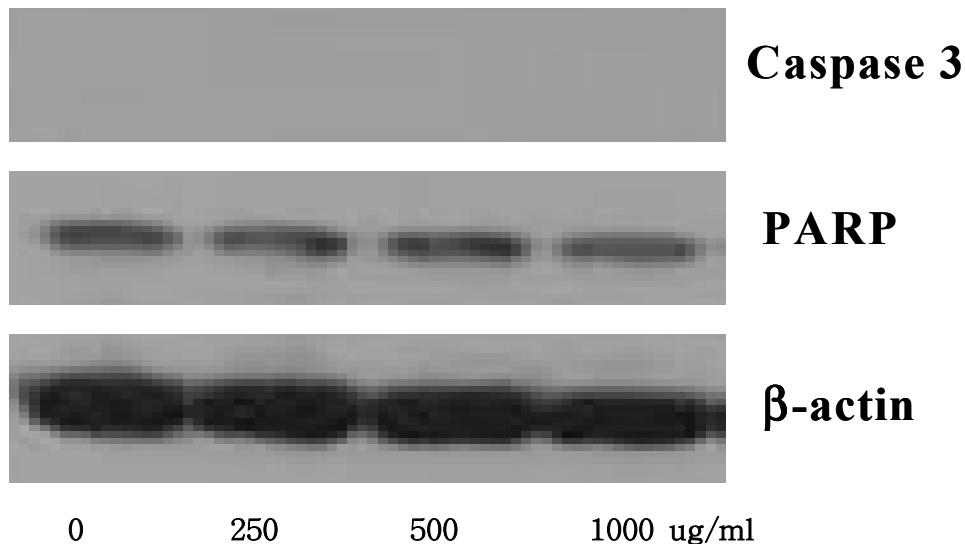


Fig. 3. Effect of Bio-Q on caspase3 and PARP

### 3, 4. 협동과제: 백화사설초를 이용한 식품 소재화 및 소재화 기반 연구

#### 가. 제조공정

백화사설초 200g, 저령 40g, 백봉령 40g, 진피 40g, 당귀 40g, 산약 40g, 백출 40g, 아가리쿠스 버섯 100g 첨가하여 총 540g을 칭량 후 섞은 후에 물 6L를 첨가하여 5시간동안 2회반복 열수 추출하였다. 홍삼엑기스 및 매실농축액추출물의 경우는 이미 추출 농축물이므로 이것은 나중에 첨가하였다.

추출물을 1L까지 농축시킨 후 deep freezer를 이용하여 70℃에서 24시간 동결시킨 후 동결건조기에서 24시간 동건건조하여 74.4g의 건조물을 얻었다. 분말상의 검체를 예상하였으나 분말이 아닌 고점성의 고체 검체를 얻었으며 Bio-Q의 조성비율을 맞추기 위하여 총고형분 함량 시험을 실시한 결과 90.6%가 나왔다. 음료의 제조공정도는 다음의 그림. 1과 같다.



그림 1. 바이오 Q 음료 제조공정도

## 나. 음료의 향미 및 영양강화 시험

### 1) 바이오큐와 어울리는 당류의 선정 :

설탕은 건강측면으로 기피하는 경향이 있어 제외하고 액상과당과 이소말토올리고당, 포도당을 비교하였다. 이 중에 BIO-Q 특유의 맛과 잘 소화되는 맛으로서 이소말토올리고당과 결정과당을 선택하였다. BIO-Q 0.65%와 홍삼농축액 0.18%, 매실농축액 0.09%와 잘 소화되는 당류의 함량은 이소말토올리고당 6%와 결정 과당 4%로 나타났다.

### 2) 산미료의 선정 :

보존성 및 기호도 상승, 영양 강화를 위하여 산미료인 비타민 C 첨가량 결정 실험을 하였다. 비타민C 첨가량은 성인 하루 권장량을 고려하여 0.1%로 설정하였다. 여기에 기호성 향상을 위하여 사과산을 0.02% 첨가하였다. 이렇게 조정한 음료의 pH는 3.72로 나타났다.

### 3) 향료의 선정 :

바이오큐를 비롯한 당류와 산미료로 기본적인 배합률을 완성하였고, 여기에 맛의 기호성을 좀 더 높이기 위하여 적합한 향료를 선발하였다. 여러 가지 과일 중에서 적합할 것으로 예상되는 맛을 1차 선발하였는데, 알로에 향료, 파인애플 향료, 복숭아 향료, 사과 향료, 매실 향료 들 중에서 최종적으로 사과 향료와 매실 향료 두 가지를 선발하여 비교하였다.

## 다. 관능검사

당류와 산미료, 향료의 선발에 대한 관능평가를 9점 대비 Scoring test(점수법)으로 실시한 결과는 다음과 같았다.

당류 관능평가 결과는 표. 2와 같았으며 이소올리고당에 결정과당을 첨가한 군인 D군의 기호성이 가장 좋게 나타났다.

표. 2. 당류 관능평가

항목/ 당류	이소말토올리고당 (A)	액상과당 (B)	포도당 (C)	이소말토올리고당 + 결정과당(D)
단맛	6.5	5.6	4.9	7.2
신맛	4.6	4.0	3.8	4.0
쓴맛	4.3	3.9	3.6	5.5
향미	5.1	4.6	4.7	6.0
합계	20.5	18.1	17.0	22.7

산미료 관능평가 결과는 표 3과 같았으며 기본 베이스는 D로서 여기에 산미료를 더 첨가하여 관능평가를 진행한 결과 비타민 C 1%+사과산 0.02%를 첨가한 H군의 기호도가 가장 좋았다.

표. 3. BIO-Q음료 제형의 산미료 관능평가

항목/ 산미료	비타민C 0.6% (E)	비타민C 1.0% (F)	비타민C 1% + 사과산0.01%(G)	비타민C 1% + 사과산0.02%(H)
단맛	7.5	7.6	7.6	7.8
신맛	5.6	6.1	7.0	7.5
쓴맛	5.2	5.4	5.5	5.5
향미	5.5	5.8	5.7	6.0
합계	23.8	24.9	25.8	26.8

향료 관능평가 결과는 표 4와 같았으며 여기서 기본 베이스는 H로서, 여기에 향료를 더 첨가하여 관능평가를 진행하였다.

표. 4. BIO-Q 음료 제형의 향료 관능평가

항목/ 산미료	사과향료 0.02% (I)	사과향료 0.03% (J)	매실향료 0.02% (K)	매실향료 0.03% (J)
단맛	7.7	7.8	7.9	8.0
신맛	7.6	7.6	8.0	7.9
쓴맛	5.2	5.6	6.2	6.0
향미	7.0	6.5	7.8	6.6
합계	27.5	27.5	29.9	28.5

향료의 첨가량이 매실향료 0.02% 가 가장 좋았으며 쓴맛을 제외한 나머지 항목에서 대체 로 좋은 기호성을 나타내었다. 따라서 당류와 산미료와 향료 선발에 있어서 최종적으로 K시료가 가장 좋았다.

#### 라. 침전형성 억제시험

침전형성이 많을 경우 효소처리 및 안정제, 분산제등의 방법을 써서 제거하려 했으나 본 음료의 경우 필터를 사용한 여과만으로도 침전형성이 거의 생기지 않아서 별도의 침전억제 시험이 필요치 않았다.

#### 마. 용기형태 결정 및 적정 살균조건 검토

제품의 용기는 고급스러운 이미지를 살리고자 고급 음료에 사용되는 병을 사용하였는데 저장성을 높이기 위해 고온살균이 가능한 유리재질이 적합하였다. 라벨 디자인은 간결하게 디자인해 보았으며 추후 산업화 시 용기와 라벨디자인은 전문업체와 협의하여 좀더 고급스럽고 소비자 기호에 맞는 디자인으로 변경할 것이다.

적정 살균조건은 일반적인 건강음료의 살균조건을 적용하여 100℃에서 15분간 진행하였고 살균 후 총균수와 대장균군 검사를 실시한 결과 총균수는 100/ml 이하 및 대장균군 음성으로 추출음료에 적합한 판정이 나왔다.



그림. 2. BIO-Q 음료 시제품

#### 바. 최종제형

제품의 관능검사 및 영양강화시험에서 얻은 최적 배합비를 사용 하여 최종제형을 결정 하였다. 최적제형은 100g당 바이오큐(혼합추출물) 0.65g을 첨가하였으며 전년도 연구에서는 추출단계에서 홍삼농축액, 매실농축액을 첨가하여 열수 추출하는 방법을 사용했으나 금년도 연구에서는 약간 변경하여 약재 추출시에는 약재만 추출하고 나중에 음료 제형시에 농축액을 첨가하였다. 그 조성은 표 5와 같다.

표. 5. BIO-Q 음료 성분표

성분	함량(%)
바이오큐(혼합추출물)	0.65
홍삼농축액(65Brix)	0.18
매실농축액(65Brix)	0.09
이소말토올리고당	6.00
프락토올리고당분말	4.00
결정 과당	4.00
비타민 C	0.10
사과산	0.02
매실향료	0.02
정수	84.94
합계	100

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2002)	○국내산 백화사설초의 면역조절 작용에 대한 연구가 이루어졌나?	20
	○국내산 백화사설초의 전초와 뿌리에 대한 면역조절 작용 연구가 이루어졌나?	20
	○국내산 백화사설초의 항암작용에 대한 비교연구가 이루어졌나?	20
	○국내산 백화사설초의 전초와 뿌리에 대한 항암작용 비교연구가 이루어졌나?	20
	○식물세포 유도 및 배양연구가 이루어졌나?	20
2차년도 (2003년)	○국내산 백화사설초를 중심으로한 면역조절성 신소재 Bio-Q를 개발하였는가?	33
	○국내산 백화사설초를 중심으로한 항암성 신소재 Bio-Q를 개발하였는가?	33
	○백화사설초 복합제의 항암작용 연구가 수행되었나?	34
3차년도 (2004년)	○국내산 백화사설초를 중심으로한 면역조절성 신소재 Bio-Q를 개발과 기전연구가 이루어졌는가?	33
	○국내산 백화사설초를 중심으로한 항암성 신소재 Bio-Q를 개발과 기전연구가 이루어졌는가?	33
	○국내산 백화사설초의 안전성 평가와 식품 안정성 허가 취득 신청하였는가?	34
최종평가	○Bio-Q의 면역활성 기전에 대한 연구가 수행되었나?	33
	○Bio-Q의 항암활성 기전에 대한 연구가 수행되었나?	33
	○Bio-Q의 가공식품을 개발하였는가?	34



## 연구개발 목표의 달성도

구분	연구개발목표	달성도			
		1차	2차	3차	달성도
1차년도 (2003)	국내산 및 중국산 백화사설초 (전초& 뿌리)의 면역 및 항암작용 비교	■			100%
2차년도 (2004)	국내산 백화사설초를 중심으로한 면역 및 항암성 신소재 Bio-Q의 개발		■		100%
3차년도 (2005)	1. 국내산 백화사설초로부터 면역 및 항암활성을 나타내는 물질의 분리 2. Bio-Q의 면역 및 항암작용 기전 연구			■	100%

본 연구에서 국내산과 중국산의 백화사설초 효능을 비교 실험을 한 결과 국내산 백화사설초와 중국산 백화사설초 모두 유의성이 있었으며, 두 산지간에 유의적인 편차가 인정되지 않았다. 그러나 기능성 식품개발에 대비하여 보다 안전성을 보이는 산지 백화사설초를 선택하기 위하여 백화사설초의 중금속 함량을 검사한 결과 Zn을 제외한 Cr, Mn, Ni, Cu, As, Cd, Sb, Pb, Hg의 함량이 국내산 백화사설초에 비해 중국산 백화사설초가 높게 나타났다. 특히 Hg, Pb, Sb, As, Sn, Cd, Ni, Cr은 인체에 악영향을 미치며 생리작용에 필요한 미량원소도 인체에 과량 축적되면 오히려 유해하기에, 국내산 백화사설초가 안전함을 확인 하였다. 그 결과 Bio-Q 주재료인 백화사설초는 국내산 백화사설초로 선정하였다.

국내산 백화사설초를 주 재료로 배합한 한 Bio-Q를 만들어 면역조절 효과와 항암성을 *in vitro* 와 *in vivo*에서 평가하였으며, 식품공전에 백화사설초를 등재하기 위한 작업으로 국산 백화사설초에 대한 안전성평가가 이루어졌으며, Bio-Q을 이용한 기능성 음료제품을 개발하였다.

1) Bio-Q의 면역실험에서 비장세포에 대해 T 세포 활성을 촉진하였으며, mitogen에 의한 cytokine분비 실험에서도 IFN- $\gamma$ 와 IL-6의 생산을 증가 시켜 주어 Bio-Q가 세포성면역 조절작용이 있음을 확인하였다.

2)항암실험에서도 Bio-Q는 사람제대내피세포인 HUVEC cell의 증식,tube formation의 억제효과를 보였으며, 수정란을 이용한 CAM assay에서도 신생혈관 억제효과를 나타내었으며, 마우스의 폐암 주에 대한 암의 성장과 전이 억제효과를 보였다.

3) 백화사설초의 안정성 평가에서는 흰쥐를 이용한 90일간 반복투여독성 시험중 임상증상, 사료와 음수섭취량 검사, 혈액, 혈청의 생화학검사, 뇨검사, 체중증상, 조직병리학적 실험에서 독성이 관찰되지 않아 안전성이 있음을 확인하였다.

## 연구개발 목표의 기여도(농업, 산업, 의학 분야)

이 결과는 국산 백화사설초가 중국의 백화사설초보다 중금속으로부터의 안전함은 최근 시장경제에서의 경쟁력을 키울수 있을수 있으며, 현재 한의학계에서 수년동안 사용되어온 백화사설초를 식품안전청에서 건강 식품으로 분류될 경우 이의 활용에 대한 수요는 엄청날것이라 생각하며 이것은 바로 국산 백화사설초의 재배 증대 및 관련 제품 개발로 인한 우리나라의 농업과 산업분야 발전에 기여할수 있을것이라 사료된다. 또한 의학 분야에서도 암, 당뇨병, 환경오염에 의한 피해에 의한 난치병 및 성인병을 고치기 위해 대체의학으로서 식품등으로 부터 유효성분에 대한 연구가 전세계적으로 붐을 이루고 있는 실정이다. 따라서 본 연구를 통하여 의학분야에서도 많은 의학개발하는것에 기여할수 있으니라 사료된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

백화사설초는 대부분 중국에서 수입되고 있기에 WTO 체제에 대비하여 국산 농작물의 보호와 신기능성 작물개발을 통해 경쟁력 확보가 필요한 실정이다. 국내에서도 제주도와 남부지방에서도 재배를 하고 있으며, 민간에서 효과적이라는 보고가 있다. 이렇게 민간에서는 백화사설초가 다양하게 사용되지만 국내에서는 백화사설초가 식품안전청에서 허가하는 식용 한약으로 분류되지 않아 건강보조식품으로 활용될 수 없었다. 또한 백화사설초를 복합제로 한 복합방이 항암효과가 있다는 연구의 결과와 문헌이 보고 되고 있다. 서두에서도 언급하였지만 중국산의 수입에 따른 국내 재배농가의 소득 저하로 인한 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서 국내산과 중국산의 백화사설초 효능을 비교 실험을 한 결과 국내산 백화사설초와 중국산 백화사설초 모두 유의성이 있었으며, 두 산지간에 유의적인 편차가 인정되지 않았다. 그러나 기능성 식품개발에 대비하여 보다 안전성을 보이는 산지 백화사설초를 선택하기 위하여 백화사설초의 중금속 함량을 검사한 결과 Zn 을 제외한 Cr, Mn, Ni, Cu, As, Cd, Sb, Pb, Hg의 함량이 국내산 백화사설초에 비해 중국산 백화사설초가 높게 나타났다. 특히 Zn, Mn, Cu를 제외한 Hg, Pb, Sb, As, Sn, Cd, Ni, Cr은 원래 식품중에 함유된 것이 아니라 식품의 제조가공 또는 공장, 광산등의 배기폐수 및 화학비료, 농약등에서 유래된 것으로 인체에 악영향을 미치며 생리작용에 필요한 미량원소도 인체에 과량 축적되면 오히려 유해하기에, 국내산 백화사설초가 안전함을 확인 하였다. 그 결과 Bio-Q 주재료인 백화사설초는 국내산 백화사설초로 선정하였다. 본 연구 수행 내용은 국내산 백화사설초의 면역 및 항암 활성을 보며, 백화사설초를 복합제로 한 Bio-Q의 면역 및 항암활성에 대한 효과를 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 수행하였다. 또한 식품안전청의 식품허가를 얻기 위하여 90일간의 반복투여 독성실험을 수행하였다. 지금까지의 백화사설초의 민간효능은 사람들의 경험을 통한 효과라면 본 연구의 결과는 그 결과를 뒷받침 할 수 있는 과학적인 연구결과를 얻었으며, 백화사설초를 복합한 복합제의 효능으로 새로운 신소재 개발을 할 수 있는 토대를 마련하였다.

첫째로 국내산 백화사설초의 효능이 우수함에 따라 활용도가 높아지고 국내재배농가의 활성화가 될 것이다. 둘째 백화사설초의 복합제의 다기능성(면역조절 및 항암효과 등) 식품으로 개발의 가능하다. 셋째 백화사설초 유효물질을 식품첨가제로 활용한다. 넷째 기능성 식품에 관심이 많은 일본, 유럽, 미국으로의 수출 가능성이 높아진다. 다섯째 유효물질 탐색 및 복합방에 대한 지속적인 연구와 산업화를 추진 할 수 있다. 여섯째 이러한 백화사설초 복합제와 첨가물의 시판은 (주)RNL science를 통하여 상용화 될 수 있다

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 세계 생약자원의 의약품, 식품산업 개발과 기능성식품의 시장

#### 미국

세계 생약자원의 의약품, 식품산업 개발과 기능성식품의 시장은 1997년 650억 달러에서 2000년 1,380억 달러로 높은성장을 보이고 있으며, 2005년도에는 현재 시장의 10배 이상의 규모로 증가할 것으로 예상되고 있다. NBJ (Nutrition Business Journal, 2000) 의 자료에 의하면 , 미국이 99년에 445억 달러로 세계 생약자원의 의약품, 식품산업 개발과 기능성식품 전체 해외시장의 35%를 차지하였으며, 유럽은 422억 달러(33%), 일본은 232억 달러(18%)를 차지하는 것으로 나타나 선진국을 중심으로 시장이 형성되고 있음을 알 수 있다.

또한 2000년 현재 미국 생약자원의 의약품, 식품산업 개발과 기능성식품의 시장의 약 40%는 비타민 이, 30%는 허브류가 차지하고 있으며, 5년간의 변화율을 볼 때, 허브류가 56%로 가장 높은 수치를 보이고 있어 허브류, 식물유래 기능성식품에 대한 미국인의 관심이 대단히 높다는 것을 알 수 있다.

1997년 미국의 프리벤션지에 의하면, 미국인의 42%가 감기, 화상, 두통, 알레르기, 불면증 등의 치료에 허브를 사용하고 있으며, 허브에 지출되는 비용이 연간 54억 달러에 이른다 허브류를 제품별로 살펴보면, 해마다 순위에는 차이가 있지만 에키나시아 (Echinacea/면역력증진), 은행잎 추출물(*Ginkgo biloba*/기억력, 혈행 개선), 세인트존스워트(St. Johns's wort/우울증 개선), 마늘(Garlic/혈행 개선), 알로에(Aloe/면역력증진, 배변) 등 각각의 효능이 입증된 허브류가 그 유용성을 기반으로 기능성식품 시장에서 높은 점유율을 보이고 있다. 다만, 조미료나 향신료 등은 오랫동안 안전하게 섭취해 온 반면, 허브는 의약품이나 식품으로 취급되어야 하는지 의문을 제기하는 사례가 많다. 각국 정부와 업계는 실제 허브의 성분표시, 품질 기준, 투여량에 많은 관심을 가지고 있으며, 표준화가 이루어지지 않은 제품은 인명손실을 초래할 수 있다는 우려가 나오고 있는 것이 현실이다. 한 조사에 따르면, 미국의 기능성 식품 관련 연구개발자들은 영양소 강화식품, 기능성 식용식물 및 phytochemicals의 소재화, 허브, 의약품 대체 기능성식품의 개발, 젊은 층 대상의 제품개발, 소비자 맞춤형제품, 생활 활력 증진 소재 개발에 관심이 많은 것으로 나타났다. 특히 식품으로 사용되고 있는 식용식물의 추출물 또는 해당 식물의 주 생리활성 phytochemicals의 소재화에 대한 연구개발이 활발히 이루어지고 있으며, 해초에서 얻는 효소소재, 마카, 노팔선인장, 톱야자, 산사나무 열매, 콩소재, 버섯 추출물 소재, 콜린소재, 로즈메린산과 같은 항산화물질, 누룩효모나 전립 곡물, 브로콜리, 매실, 버섯 등에 들어있는 크롬소재, 감자소재 등이 신소재로 주목받고 있다. 또한 대체의학요법의 확산과 함께 허브의 생리 및약리 활성에 관한 연구개발이 국가연구사업으로 자리잡고 있다. 미국인들의 상당수는 특히 천연재료를 사용한 기능성식품이 부작용을 완화 시킬 수 있다는 점에서 의약품을 대체할 수 있을 것으로 선호하고 있으며, 의약품 중

특히 OTC제품의 상당부분은 기능성식품으로 대체할 수 있을 것으로 예상하고 있다.

### 일본

일본은 1980년대 후반에 처음으로 “기능성식품”이 등장하여 1991년에 “특정보건용식품”이라는 이름으로 제도화되었으며, 최근 미국의 통상압력의 영향으로 비타민, 미네랄, 허브류 등이 포함되는 “보건기능성식품” 제도가 마련되어 2001년 4월부터 시행하고 있다. 일본의 주요 기능성식품 품목으로는 비타민, 미네랄, 인삼, 마늘, 영지, 로열젤리 등이며, 2000년 현재 시장규모는 8,100억 엔에 이르는 것으로 추산된다. 일본에서는 건강식품에 대해 범위나 기준, 규격을 법률적으로 정하고 있지는 않으며, 일본건강은 영양식품협회가 제정한 건강식품 제품의 기준 규격에 따라 자율적으로 50품목이 설정되어 관리되고 있다.

### 유럽

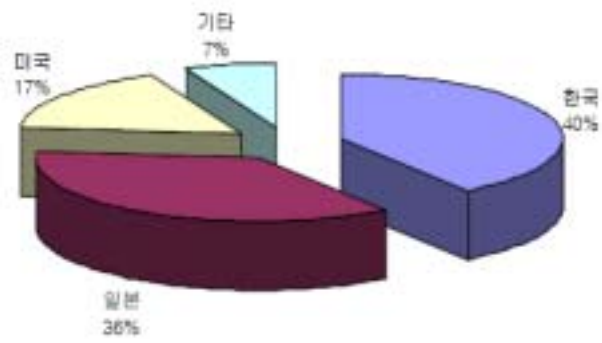
유럽은 기능성식품을 위한 국제기구와 활동체제가 조직되어 체계적인 연구개발이 행해지고 있으며, British Journal of Nutrition에 발표된 “유럽의 기능성식품과학 현상” 회의의 연구보고서에 따르면, 유럽의 기능성식품은 ① 성장, 발달, 분화에 관한 기능성식품과학, ② 물질대사에 관한 기능성식품과학, ③ 반응성 산화물질로부터 방어에 관한 기능성식품과학, ④ 심장혈관계에 관한 기능성식품과학, ⑤ 소화관생리와 기능에 관한 기능성식품과학, ⑥ 행동및 심리에 관한 기능성식품과학의 6가지 항목이 중심이 되어 연구되고 있다.독일은 1998년 독일 의약품집에 게재된 의약품의 13.4%에 해당하는 1,266가지의 처방이 약용허브의 조제에 의한 것이며, 1993년부터 약용허브를 이용한 식물요법의 의사국가고시의 필수항목이 될 정도로 허브류가 각광을 받고있고, 식품 또는 의약품으로 사용되고 있다.

### 해외 특허 출원인현황

출원인들의 국적별 비율을 살펴보면, 아래 그림과 같이 내국인이 40%를 차지하며, 일본인이 36%, 미국인 17%의 순으로 나타나 한약재를 식품개발에 응용하는 데 있어 역사적, 문화적 배경이 유사하고, 자원이 풍부한 우리나라와 일본이 기술개발을 주도하고 있음을 알 수 있다.

### 기술별 현황

한약재를 이용한 기능성식품 관련 특허기술별 현황을 알아보기 위해 국제 특허분류(IPC)를 활용하여 분석한 결과는 A61K-035/78(식물유래의 의약품 제제)이 783건으로 가장 많으며, A23L-001/30(첨가물이 함유된 식품 또는 식료품), A23L-001/29(식품의 영양개선, 다이어트식품), A23L-002/38(다른 비알코올성 음료)의 순으로 나타나 한약재의 약리 기능을식품의 첨가물, 다이어트용 식품, 음료 개발에 응용하려는 연구가 주를 이루고 있음을 알 수 있다. 또한 한약재를 이용한 기능성식품의 개발기술이 식물 추출과 관련된 제제기술과 각종 식료품 개발기술이 접목하



는 복합적 기술로 이루어진 점을 감안할 때, 기능성식품의 소재로 한약재를 이용하는 기술의 개발은 생약(生藥)의 연구개발에 거의 준하는 효능과 안전성에 기초한 신중한 연구개발이 이루어져야 함을 시사한다고 볼 수 있다.

## 제 7 장      참고문헌

- 1) 梁學道:臨床微生物學 및 免疫學, p 67, 新學社, 서울, 1979.
- 2) 菊地浩吉會:最新免疫學(李淵臺譯), p 33,315, 集文堂, 서울, 1985.
- 3) 서울대학교 의과대학편:면역학, p 265,272, 서울대학교출판부, 1989.
- 4) 洪元植編:精校黃帝內經東洋醫學研究院, p 13,69,318, 서울, 1981.
- 5) 劉正才:中醫免疫,中國, p 8-13, 重慶出版社, 1983,
- 6) 金光湖 外:數種韓藥劑가 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生産抑制作用에 미치는 影響,조영식博士華甲論文集, p 1041-1051, 1981.
- 7) 嚴宗正:正邪論新釋, 6:5-6, 新中醫, 1984.
- 8) 沈承抗:中醫與免疫,浙江中醫學院報14(2):22-24,1990.
- 9) 金德鎬:歸茸湯이 免疫機能에 미치는 實驗的 研究,大韓韓醫學會誌,6(2):55-63,1985.
- 10)河大有 外:人蔘에 關한 細菌學 및 免疫學的 研究,第Ⅱ報,人蔘抽出物投與가 細菌感 染에 對한 抵抗에 미치는 影響,全北大學校論文集, 45, 1979.
- 11) Artsson, P., Edman, P. and Ericsson, J. L. E.:Macrophage stimulation with some structurally related polysaccharides. Scand. J.Immunol. 25, 245, 1987.
- 12) Petersen, R. D., Reinhold, W. and Tyborczyk, J. Cytokines in cosmetology. cosmetic and Toietries Magazine. 112, 165, 1997.
- 13) Goldsby, R. A., Kindt, T. J.. and Osborne, B.A Kuby immunology 4th ed.,W.H. Freeman and Company, New York, 303, 2000.
- 14). 김성훈. 백화사설초로부터 분리된 항암성물질에 관한 연구, 대전대학교 한의학연구소, 한의학 논문집, 273-297, 1996.
- 15). 김영희, 백화사설초의 성분에 관한 연구, 한국약용작물학회, 한국약물작물학회지, 31(2) : 91-95, 1995.
- 16).식품의약품안전청, 21세기신약개발 중심국가로 가는 한약.생약제제 및 천연물 신약 신제품개발 지원설명회, 식품안전청, 서울, 2002.

- 17) Kang BH, Kim YB, Lee HS, Kim YH, Im WJ & Ha CS, Background data on hematology, blood biochemistry and organ weights for 2 weeks and 4 weeks repeated-dose toxicity studies using Sprague-Dawley (SD) rats, Korean J lab Ani Sci, 20: 134-140, 2004.
- 18) Ko YC, Seok HJ & Song KH, Effects of multi-exerts of Mori folium and of exercise on serum lipid profiles and tissue differentiation in streptozotocin- induced diabetic rats, Nut Sci 6:209-215, 2003.
- 19) Lim DW, Kim DH & You DY, Effect of KGT immunologic control function, J Orient Gynecol 12: 253-280, 1999.
- 20) Wang SS, Zhao WJ, Han XW, Liang XM, Two new iridoid glycosides from the Tibetan folk medicine *Swertia franchetiana*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2005 Jun;53(6):674-6
- 21) Battegay, E.J., 1995. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. J. Mol. Med. 73, 333346.
- 22) Gourley, M., Williamson, J.S., 2000. Angiogenesis: new targets for the development of anticancer chemotherapies. Curr. Pharm. Des. 6, 417 439.
- 23) Risberg T, Lund E, Wist E, Kaasa S, Wilsgaard T. Cancer patient use of nonproven therapy: 5-year follow-up study. J Clin Oncol 1998;16:612.
- 24) Eisberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR, Delbanco TL. Unconventional medicine in the United States: prevalence, costs, and patterns of use. N Engl J Med 1993;328: 246252.
- 25) Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Rompay MV, Kessler RC. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997 JAMA 1998;280:1569-1575.
- 26) Chen S, Ruan Q, Bedner E, Deptala A, Wang X, Hsieh TC, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Effects of the flavonoid baicalin and its metabolite baicalein on androgen receptor expression, cell cycle progression and apoptosis of prostate cancer cell lines. Cell Prolif. 2001 Oct;34(5):293-304.



- 27) Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, et al. Secretion of TNF- $\alpha$ , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro. *Cell Struct Funct* 2001;26:103-8.
- 28) Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kobori H, Moriguchi K, et al. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus Blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 1998;46:14759.
- 29) Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62:434-7.
- 30) Wang HX, Ng TB, Ooi VE, Liu WK, Chang ST. A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Tricholoma mongolicum* with immunoenhancing and antitumor activities. *Biochem Cell Biol* 1996;74:95-100.
- 31) Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J Nutr* 2001;131:1409-13.
- 32) Sorimachi K, Ikehara Y, Maezato G, Okubo A, Yamazaki S, et al. Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:1645-7.
- 33) Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, et al. Antitumor h-glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol Pharm Bull* 2001;24:820-8.
- 34) Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. Treatment of operated late gastric carcinoma with prescription of strengthening the patient's resistance and dispelling the invading evil in combination with chemotherapy: follow-up study of 158 patients and experimental study in animals. 1990 Dec;10(12):712-6, 707.
- 35) Wong BY, Lau BH, Jia TY, Wan CP. *Oldenlandia diffusa* and *Scutellaria barbata* augment

macrophage oxidative burst and inhibit tumor growth. *Cancer Biother Radiopharm.* 1996 Feb;11(1):51-6.

36) Shan BE, Yoshida Y, Sugiura T, Yamashita U Stimulating activity of Chinese medicinal herbs on human lymphocytes in vitro. *Int J Immunopharmacol.* 1999 Mar;21(3):149-59.

37) Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, Shan BE, Yamashita Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and *Oldenlandia diffusa* in particular. *Int J Immunopharmacol.* 1997 Jul;19(7):359-70.

38) Luo H, Treatment of upper respiratory infection with mixt. 716 compound] *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1993 Dec;13(12):730-2, 709. Chines

39) Wong BY, Lau BH, Yamasaki T, Teel R, Inhibition of dexamethasone-induced cytochrome P450-mediated mutagenicity and metabolism of aflatoxin B1 by Chinese medicinal herbs. *Eur J Cancer Prev.* 1993 Jul;2(4):351-6.

40) Wong BY, Lau BH, Yamasaki T, Teel R, Modulation of cytochrome P-450IA1-mediated mutagenicity, DNA binding and metabolism of benzo[a]pyrene by Chinese medicinal herbs. *Cancer Lett.* 1993 Jan 15;68(1):75-82

41) Wong BY, Lau BH, Tadi PP, Teel RW, Chinese medicinal herbs modulate mutagenesis, DNA binding and metabolism of aflatoxin B1. *Mutat Res.* 1992 Jun 1;279(3):209-16.

42) Fang JY, Effect of fu-zheng qu-xie on gastric disease infected with *Campylobacter pyloridis*] *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1991 Mar;11(3):150-2, 133. Chinese.

43) TSAI CT, QIAN XL, JIANG DQ, DJIANG D, CHEMICAL INVESTIGATION OF OLDENLANDIA DIFFUSA (WILLD.) ROXB. *Yao Xue Xue Bao.* 1964 Dec;11:809-14. Chines

44) Ono M, Ueno M, Masuoka C, Ikeda T, Nohara, Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2005 Oct;53(10):1342-4.

- 45) Ono M, Morinaga H, Masuoka C, Ikeda T, Okawa M, Kinjo J, Nohara T, New Bisabolane-Type Sesquiterpenes from the Aerial Parts of *Lippia dulcis*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2005 Sep;53(9):1175-7.
- 46) Tomassini L, Gao J, Serafini M, Nicoletti, Iridoid glucosides from *Viburnum sargentii*. *Nat Prod Res*. 2005 Oct;19(7):667-71.
- 47) Kupeli E, Harput US, Varel M, Yesilada E, Saracoglu I, Bioassay-guided isolation of iridoid glucosides with antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Veronica anagallis-aquatica* L. *J Ethnopharmacol*. 2005 Nov 14;102(2):170-6. Epub 2005 Jul 1
- 48) Bianco A, Guiso M, Nicoletti M, Foddai S, Piccin A, Serafini M, Ballero M, Poli F, A comparative chemotaxonomic study on *Vinca sardoensis* and *Vinca difformis* Pourret. *Nat Prod Res*. 2005 Sep;19(6):615-7
- 49) Itoh A, Kumashiro T, Yamaguchi M, Nagakura N, Mizushima Y, Nishi T, Tanahashi T, Indole alkaloids and other constituents of *Rauwolfia serpentina*. *J Nat Prod*. 2005 Jun;68(6):848-52.
- 50) Goren AC, Zhou BN, Topcu G, Kokdil G, Kingston DG, DNA damaging activities of methanol extract of *Ajuga reptans* and iridoid glucoside reptoside. *Nat Prod Res*. 2005 Jul;19(5):457-60.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

