

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “어성초로부터 지방간 예방 및 치료를 위한 새로운 기능성 치료소재 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 12월 25일

주관연구기관명 : 건국대학교

주관연구책임자 : 강현

협동연구기관명 : (주)마크로케어

협동연구책임자 : 김무성

요 약 문

I. 제 목 : “어성초로부터 지방간 예방 및 치료를 위한 새로운 기능성 치료소재 개발에 관한 연구”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 필요성

- ▶ 간은 체중의 2% 정도를 차지하는 최대 장기로서 대사의 중추적인 역할을 담당한다. 간은 영양소의 대사 뿐 아니라 약물과 독소의 해독, 담즙 생성, 장관으로부터 유입되는 혈액의 여과, 요소합성, 다양한 호르몬들의 불활성화, 면역 글로불린과 같은 혈장 단백질 생성 등 생명을 유지하는데 필요한 기능을 담당하는 곳이다. 특히 지방 대사 측면에서는 지방산의 베타산화 및 아세토아세테이트 생성, 지단백 합성, 콜레스테롤 및 인지질 합성, 당과 단백질로부터 지방합성 등의 기능을 가지고 있다.
- ▶ 인체에서 중요한 에너지원인 지방은 지방세포에 저장되어 있다가 지방분해효소인 리파제에 의해 분해되어 지방산 형태로 혈액에 방출된다. 이러한 지방산은 두 가지 경로를 거쳐 간 축적이 가능하며, 하나는 식이를 통해 장에서 흡수되어 들어오거나 또는 지방세포의 분해로 외부에서 간으로 들어오는 경우와 간 세포에서 포도당과 아미노산 대사에서 생성된 아세테이트로부터 지방산을 만드는 경우이다.
- ▶ 간에 존재하는 지방산은 에스테르화 과정을 거쳐서, 중성지방, 인지질, 콜레스테롤 에스테르로 변환 후 지단백과 결합하여 혈중으로 나가게 되고 일부는 미토콘드리아와 마이크로솜에서 베타산화 과정을 거쳐서 ATP생성에 이용된다. 또한 장기적인 혈중 지방산의 상승은 말초조직 인슐린저항성의 발생과 밀접한 관련이 있다고 한다.. 이렇게 유발된 인슐린저항성은 다시 건강에 나쁜 중성지방과 저밀도 콜레스테롤 (LDL)을 증가시키고 건강에 유익한 고밀도 콜레스테롤 (HDL)을 증가시키고 건강에 유익한 HDL을 감소시킨다고 한다.

- ▶ 간에서 지방대사의 이상은 지방간, 지방간염, 간섬유증, 간경변 등의 만성 간 질환 뿐 아니라 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등 각종 만성 질환의 발병과 밀접한 관련이 있다.
- ▶ 최근 한국인의 건강수준에서 간암에 의한 사망률은 10만 명당 23.4명으로 세계1위이고 만성 간질환의 경우도 28.8명으로 3번째로 조사되었다. 또한 최근 통계청에서 우리나라 40대의 경우 인구 10만 명당 56.1명이 간질환 으로 가장 높은 사망원인으로 발표하였다. 우리나라의 술 소비량은 북유럽 다음으로 세계 상위권에 들고 있다. 이에 따라 알코올성 간질환이 많이 발생하고 있다.
- ▶ 알코올성 간질환은 과도한 음주로 인하여 발생하는 각종 간질환으로 지방간, 알코올성간염, 알코올성 간경변증 등이 여기에 속한다.술 소비량이 늘어나는 것과 비례해서 경제 사회적 손실 규모도 커지고 있다. 직간접 의료비, 사고 및 숙취로 인한 생산성 손실 등 음주 때문에 빚어지는 연간 경제 사회적 손실 규모는 97년의 경우 국민총생산(GNP)의 4%인 16조6566억원으로 추산되었다.
- ▶ 삶의 질 향상으로 인해 만성 또는 난치성 질환이 증가하여 기존의 치료적 개념의 의료보다 예방적 개념의 의료의 필요성이 높아지고 있으며,또한, 최근 선진국에서는 치료에서 예방으로 역할이 증가하여 천연물을 이용한 건강기능식품이 재조명 천연물의 의약품으로서의 가치와 가능성을 인정여 새로운 형태의 의약 품으로 자리 잡을 가능성이 매우 높아졌다.
- ▶ 따라서 본 사업단에서는 천연고체발효물 및 그 원료식물로부터 당뇨와 간조직 보호효과를 보일 것으로 기대되는 후보 화합물들의 확인을 통해 당뇨 및 간질환 예방 및 치료 개선을 가지는 의약품후보 소재를 개발하고자 본과제를 수행이 필요하게 되었다.

나. 연구개발의 목적

최근 산업화가 급속히 진전되어 지방간 발생빈도가 급격히 증가하고 있고, 특히 비알코올성 간 질환은 앞으로 해결해야 할 최대 보건의료 문제이다. 국내 500여종의 천연물 추출물로부터 지방간에 대한 어성초의 효력을 cell-based assay에 의해 스크리닝하고, 그 생리활성 작용기전을 분석하여, 생체내 간기능 강화 효능을 가진 새로운 기능성 치료 소재를 개발하여 지방간 예방 및 치료을 위한 기능성 소재를 원료 제품화하고자 하였으며 세부연구목적은 다음과 같다.

- 국내 천연물 추출물의 기능성 개선 소재로의 활용 극대화
- 어성초를 이용한 기능성 개선 소재의 약리활성을 표적 단백질을 통해 최적화
- 어성초를 이용한 고부가가치 창출이 가능한 기능성 개선소재 개발
- 기능성 개선소재 개발의 대량생산 방법, 조성 파악 및 구조분석
- 지방간 개선소재를 함유한 시제품 제작, 기시범 확보, 건기식 허가용 전임상 준비

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발은 사업화 기술개발사업으로서 (주)마크로케어에서 기 확보하고 있는 소재개발을 기반으로 제조한 어성초추출물의 건강기능적 효능을 평가하여 개별인정형 건강기능식품을 준비하고 어성초 추출물로부터 유효성분을 분리정제하여 건강기능식품 후보 신소재로 활용하고자 하였다. 이를 위해 아래와 같은 연구추진내용에 의해 연구개발을 진행하였다.

- 국내 천연물 추출물 라이브러리로부터 세포내 생리활성 검색
- 지방간 개선개발의 표적이 되는 생체분자를 이용하여 cell-based 스크리닝
- 대량 생산을 위한 기능성 개선 소재의 정량적 분리 및 정제의 최적화
- 모델동물로부터 지방간을 위한 기능성 개선 소재의 효력 검증
- 천연물 추출물 단독 혹은 복합 혼합하여 지방간에 선택·특이적인 기능성 개선소재 개발

[1차년도 연구범위 및 연구수행 내용]

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
추출물의 세포내 독성검사	MTT 세포독성 검사	HepG2 세포에서의 세포사멸 활성 측정
ESR 분석을 통한 어성초 추출물의 항산화 활성분석	ESR 기기를 사용한 라디칼 소거 활성 측정	순획분리된 어성초 추출물로부터 프리 라디칼 소거능 측정
추출물 처리 전·후 세포사 및 염증 관련유전자단백질의 발현양상 분석	BV-2 세포에서의 항염증 활성 규명	생체의 면역분석, 항염증 소재 분리 및 정제
추출물 처리 전·후 세포사 및 염증 관련유전자단백질의 발현양상 분석	단백질 추출 및 Western blot	항염증 등의 생리활성 측정 완료.
ELISA, PCR, Western blot 기법을 활용하여 유전자 및 단백질 레벨에서 cytokine 측정	ELISA, RT-PCR, 등	항산화, 항염증 등의 생리활성 및 생리기능성 규명
어성초 추출 방법 개발	- 식품으로 사용 가능한 용매인 물과 Et-OH만을 사용 - 농도별 추출 효율, 추출 방법에 따른 효율 비교	물과 Et-OH의 농도별 추출 및 환류, 정치추출 효율을 비교하여 70% Et-OH, 환류 추출 방법 확보
정제조건 개발	성분 및 분획을 위하여 Et-OH 추출후 용매별 정제 시행	흡착수지 및 Hexane, EA, chlorform 등 8종 단계별 용매 분획에 의해 Ethyl acetate 분획 선정
성분 분석법 확보 및 분석	- HPLC 분석 및 분취용 LC 등을 이용한 분리 - 기기분석을 통한 구조확인	분획 성분의 반복적 분취 및 IR, NMR, LC/MS 등에 의한 주성분 1종을 quercetin 으로 규명
효능시험용 시료제공	- 효능시험을 위한 시료 적기 제공 - 분획별 항산화 기능 비교	분획별 시료 제공 완료. 기본 항산화 및 효능 측정. 다량 시료제조로 구조 확인
원료확보방안 확립	- 생산 예상한 안정적 원료 확보 - 분석을 위한 실험실적 추출, 정제 이외에 생산공정 조기 진행	유기농 대량 원료 입수선 확보. 생산 scale 에서의 추출, 흡착수지를 이용한 정제 기본 공정확립

[2차년도 연구범위 및 연구수행 내용]

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
동물모델에서 추출물의 효능분석	화학물질들에 의한 급성 간손상 유발	동물모델에서의 생리기능성 물질로서의 활성 측정. 간세포 내 항산화 효소, SDO, GST 활성 측정
동물모델을 이용한 어성초 추출물의 면역항체학적 (IHC) 분석	마우스 간 채취(Immuno Histo Chemistry-IHC용, RNA용 및 Immunoblot용) 검체분석	동물모델에서의 간보호 효능검증/간 손상 유발, 혈액 분석, 조직학적 변화 관찰, 간기능 지표 및 혈액과 간조직의 지질함량 분석
원료 안전성 등의 확보	단회투여 독성실험 (급성)/아 급성독성시험 (아급성)	생리기능성 물질의 산업화를 위한 안정성 확보
분리 성분의 규명 및 조합 확인/안정성, 제형적용성 시험	- Quercetin 이외의 추가 분리 성분의 규명 (NMR, LC/MS 기기분석 등) - 추가성분 포함된 시료제조 - 식품유형따른 제제화 및 안정성 측정	- Quercetin 이외의 추가 성분으로서 Quercitrin, caffeic acid 등 규명 - 생산공정에 의한 시료제조 - 추출성분의 안정성 등 기본 측정 - 4종 식품유형별 제제화 적용성 확인 및 경시변화 측정
파일럿 공정 개발 및 생산 공정 개발	- 1차년도에 기본 공정 조기 진행. - 적용가능 대량화 제조 진행.	- 흡착컬럼 이용한 대량화 제조 방법 확보, 원료 시생산
기시법 확보 등 (건기식 원료화 준비 작업 등)	- 건기식 원료화를 위한 예비 작업으로서 원료규격 등	- 원료 규격 및 시험법, 제조공정 등 확보.

IV. 연구개발 결과

어성초(魚腥草, *Houttuynia cordata*)로부터 지방간, 간기능 개선으로 위한 활성성분 확보하고자 하였으며, 어성초로부터 간기능 개선 유용소재의 분리 및 동정에 의한 간기능 개선을 in vitro 와 in vivo에서 규명하며, 유용소재의 대량 제조공정 및 제품화를 위한 시제품 개발하고자 하였다.

1) 기능성분의 추출 및 규명

- 어성초 폴리페놀류의 효율적 추출조건으로서 70% ethanol 추출 공정을 확보
- 추출물을 분획하여 항산화력을 기준으로 성분을 분리
- 분리 분획을 정제하고 NMR, LC/MS 등을 통하여 성분 규명
- 일차 성분으로서 Quercetin을 확인, 이후 Quercetin 이외의 성분으로서 Quercitrin, Caffeic acid 등 분리, 규명.

2) 효능 및 기전 시험

- 다양한 간기능 개선, 간보호 효과 검증 (in vitro 및 in vivo)
- 간기능 개선, 간보호 효과 분자수준에서의 mechanism 확인

- 타 간개선 소재와의 비교 확인
- 기능성 유효소재 안전성 검사 진행

3) 생산용 제조공정 개발 및 제품 적용 준비

- 흡착수지 적용을 위주로 식품 소재로서 적용가능한 생산용 제조공정 확보.
- 제조 시료의 조성, 안정성, 맛 등 기본 특성 확인.
- 제조 시료를 가지고 4종의 식품유형(액상파우치, 스틱, 정제, 캡슐 타입)으로 제제화.
- 제제화 유형의 경시변화 진행
- 표준 제조공정 및 원료규격서 제작.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구개발 사업을 통하여 기능성이 뛰어난 어성초 추출물을 생산하는 기술을 확립하고 5종의 시제품을 제작하는 동안 SCI 논문을 포함한 국외 우수 저널에 4편의 논문이 투고중이며 한편의 논문이 국제적인 SCI 논문에 게재되었다. 특히 특허출원 3건을 통해 간기능 개선용 건강기능식품 개발에 활용할 수 있는 원천기술 확보되어 국내 우수 제약사들과 기술이전에 대한 협의가 진행중이다. 특히, 본 연구 개발 과제를 통해 한건의 기술이전된 성과는 본과제의 기술적인 파급효과가 크다고 하겠다. 향후 해외에도 기술이전과 함께 수출산업에 활용할 수 있을 것으로 사료되고, 이 연구개발 사업을 진행하는 동안 관련사업의 발전에 필요한 인재 양성하여 생명과학 후학양성에도 기여하게 되었다. 주요 연구성과 및 성과활용 계획은 다음과 같다.

- 어성초 추출물의 지방간 개선 효능에 대한 의학적 활용으로 국민의 평균수명 연장
- 어성초 추출물의 지방간 개선 효능 및 생리활성 작용기전의 이해
- 어성초 추출물을 함유한 고부가가치 새로운 원료 시장을 창출
- 시제품 제작, 기시범 확보, 건기식 허가용 전임상 준비

SUMMARY

(영문요약문)

Active ingredients for liver function were identified from *Houttuynia cordata*. A process was developed for industrial production, and the product(extract) was applied to food products.

1) Extraction and identification of active ingredient

- A process using 70% ethanol was developed as an efficient extraction method,
- The extract was fractionated depending on antioxidative activity.
- Active ingredients were purified from the fractions and their structure were identified by NMR, LC/MS, etc.
- As results, quercetin, quercitrin and caffeic acid were identified from as extract of *Houttuynia cordata*.

2) Anti-inflammatory Effects of *Houttuynia cordata* Extract

- Ethyl acetate (HC-EA) extract of *H. cordata* significantly scavenged DPPH free radicals in a concentration-dependent fashion. The increased levels of NO, iNOS and IL-6 in LPS-stimulated BV-2 microglial cells were also suppressed by HC-EA extract in a concentration-dependent manner.
- HC-EA extract exhibited strong anti-oxidant properties and inhibited the excessive production of pro-inflammatory mediators, including NO, iNOS and IL-6, in LPS stimulated BV-2 cells.

3) Hepatoprotective and Anti-hyperlipidemic Effect of *Houttuynia cordata* against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damage In Experimental Mice

- CCl₄-induced morphological changes in hepatocyte architecture were studied by haematoxylin and eosin (H&E) staining. In vitro alkyl and hydroxyl free radical scavenging assays were performed to evaluate the antioxidant effect of HCE.
- Administration of HCE extract significantly reduced the elevated serum levels of ALT, AST, and ALP and regulated the altered levels of total serum cholesterol, TG, HDL and LD/VLDL levels in CCl₄-induced hepatotoxicity in mice.
- The morphological changes in hepatocyte architecture were also reversed by HCE pre-treatment. Further, HCE showed significant antioxidant actions by scavenging the alkyl and hydroxyl free radicals.
- HCE extract exhibited hepatoprotective and anti-hyperlipidemic activities in CCl₄-induced hepatotoxicity in mice

4) *Houttuynia cordata* extract attenuates the expression of lipogenic genes in human HepG2 hepatocytes via activation of AMPK and inhibition of lipid biosynthesis

- HepG2 cells were pretreated with various concentration of HCE (0, 10, 20, 40 and 80 μ g/ml) and treated with serum-free medium with normal glucose (5 mM) for 1 h, followed by exposure to high glucose (25 mM D-glucose) for 24 h.

- HCE attenuated lipid accumulation in human HepG2 hepatocytes when exposed to high glucose (25 mM D-glucose) significantly and dose dependently ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ at 20, 40 and 80 μ g/ml concentrations), respectively.

- HCE attenuated the expression of fatty acid synthase (FAS) and sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). The adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) was also activated by HCE treatment when exposed to high glucose (25 mM D-glucose) in human HepG2 hepatocytes.

5) *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver in experimental rats

- Investigated the effects of *H. cordata* ethyl acetate (HC-EA) extract on high-fat diet (HFD)-induced hepatic steatosis and elucidated the molecular mechanisms involved in an animal model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). After being fed a HFD for two weeks, rats were orally dosed with HC-EA extract (100, 200, or 300 mg/kg) once daily for 6 weeks.

- HC-EA extract induced dose-dependent reductions in plasma lipid levels, decreased the overall hepatic lipid accumulation and improved HFD-induced hepatic histological lesions.

- The morphological changes observed using Hematoxylin-Eosin and Oil-Red O staining in HFD fed rat hepatocytes were reversed with HC-EA treatment.

- Mechanistic study revealed that HC-EA extract enhanced the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and its primary downstream targeting enzyme, acetyl-CoA carboxylase, up-regulated the gene expression of carnitine palmitoyl transferase 1, and down-regulated sterol regulatory element binding protein 1, fatty acid synthase, and glutamate pyruvate transaminase protein levels in the livers of HFD-fed rats.

- HC-EA extract might act by regulating the AMPK-dependent signaling pathway and related mediators.

6) Development of manufacturing process and Application of extract to food products

- An efficient process using absorptive resin was developed for preparation of food material.

- Basic characterization of the extract, such as composition, heat stability and taste, were performed.

- The extract was applied to 4 type of food (liquid pouch, stick, tablet and capsule), and changes according to time were investigated.

- Standard operation procedure and basic specification including test methods were prepared for production.

In summary, HC-EA extract might be developed as a promising therapeutic strategy for the prevention and treatment of obesity-related non-alcoholic fatty liver disease.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction14

Chapter 2. Status of Research and Development.....26

Chapter 3. Methods and Results33

Chapter 4. Acomplishment.....129

Chapter 5. Application130

Chapter 6. Research Information of Other Countries.....135

Chapter 7. References137

목 차

제 1 장 연구개발의 개요	14
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	26
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과.....	33
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	129
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	130
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	135
제 7 장 참고문헌	137

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목표

간질환은 그 연간 유병자율이 1998 년에 인구 1,000 명당 131 명에서 2001 년에 149 명으로 증가하였다고 보고하였고, 간으로 인한 사망률은 그 순위가 변하지 않았다. 간질환의 가장 큰 위험 요인이 되는 바이러스에 대해 지난 1993 년부터 2000 년까지 분석한 결과 B 형 간염은 줄어들고 있고, C 형 간염은 다소 줄어들긴 했지만 큰 변동은 보이지 않았다고 보고하였다. 또한 간질환의 원인으로 알코올과 비만을 주목할 만한 원인으로 추정하고 있고, 최근 서구화된 생활습관에 따라 간질환의 유병률이 높아진다고 보고되고 있다

최근 산업화가 급속히 진전되어 지방간 발생빈도가 급격히 증가하고 있고, 특히 비알코올성 간 질환은 앞으로 해결해야 할 최대 보건의료 문제이다. 국내 500여종의 천연물 추출물로부터 지방간에 대한 어성초의 효력을 cell-based assay에 의해 스크리닝하고, 그 생리활성 작용기전을 분석하여, 생체내 간기능 강화 효능을 가진 새로운 기능성 치료 소재를 개발하여 지방간 예방 및 치료 개선을 위한 기능성 소재를 발굴하여 원료 제품화하고자 하였다. 본 연구개발의 주요연구 목표는 다음과 같다.

- 국내 천연물 추출물의 기능성 개선 소재로의 활용 극대화
- 어성초를 이용한 기능성 개선 소재의 약리활성을 표적 단백질을 통해 최적화
- 어성초를 이용한 고부가가치 창출이 가능한 기능성 개선소재 개발
- 기능성 개선소재 개발의 대량생산 방법, 조성 파악 및 구조분석
- 지방간 개선소재를 함유한 시제품 제작, 기시범 확보, 건기식 허가용 전임상 준비

제 2 절 연구개발 필요성

○ 간질환의 사회적 영향

▶ 최근 한국인의 건강수준에서 간암에 의한 사망률은 10만 명당 23.4명으로 세계1위이고 만성 간질환의 경우도 28.8명으로 3번째로 조사되었다. 또한 우리나라 40대의 경우 인구 10만 명당 56.1명이 간질환으로 가장 높은 사망원인으로 최근 통계청에서 발표하였다.

▶ 우리나라의 술 소비량은 북유럽 다음으로 세계 상위권에 들고 있다. 이에 따라 알코올성 간

질환이 많이 발생하고 있다. 알코올성 간질환은 과도한 음주로 인하여 발생하는 각종 간질환으로 지방간, 알코올성간염, 알코올성간경변증 등이 여기에 속한다.

○ 국내 천연물 기술개발의 장점

▶ 천연물 이용한 신약의 개발은 연구개발비와 소요시간이 기존 화학합성물을 이용한 의약품개발보다 훨씬 적게 들어 경제적이며 임상 3상까지의 진입이 효율적이라는 것이 전문가들의 견해이다. 즉, 전통의학의 지식분야에서 외국에 비해 상대적으로 우위를 확보하고 있어서 성공가능성이 훨씬 높다고 하겠다.

▶ 화학합성신약개발에 비해 약효가 입증돼 있고 상대적으로 독성이 적어 신약개발 실패 요인 중 13-25%를 차지하는 독성 및 안전성 문제를 극복할 수 있어서 그 가능성은 더욱 향상된다. 여기에 국내 생명과학 연구여건이나 천연물신약 연구에 대한 필요한 잠재력이 성숙돼 있다는 점도 큰 장점으로 평가되고 있다.

○ 천연물 소재를 이용한 지방간 치료제 개발의 필요성

▶ 현재까지 천연식물에서 추출되어 실제 임상에서 응용되고 있는 간 기능 보호제로서는 실리뎀 마리아넘 (Silybummarianum)이라는 식물에서 추출된 실리빈(silybin), 실리디아민(silydiamine), 실리크리스틴(silycristine) 등의 이성체로 구성된 실리마린(silymarin) 제제가 있다. 이와 같이, 천연물로부터 간질환 치료제를 개발하려는 수많은 노력에도 불구하고 실제로 치료제로 현재 사용 중이거나 임상시험 중인 예는 극히 드물다.

▶ 현대의학을 비롯 화학합성물에 의한 의약품 등의 여러 한계성이 가시화됨에 따라 전세계가 대체의학 또는 전통의학의 재조명과 천연물에 의한 신약창출에 활기를 더해가고 있다. 최근, 염증치료제인 노바티스(Novartis)의 COX-2 저해제인 '프렉시지'(Prexige, lumiracoxib)가 캐나다와 호주에서 부작용으로 시판금지된 것이 그 일례라 할 수 있다. 국내에서도 최근 기존 화학합성물 보다 효과가 뛰어나고 부작용이 적은 천연물을 이용한 치료제를 개발, 실용화가 가능하다. 이미 실용화된 천연물 이용 의약품들이 수중에 이르고 있고 한방의학이 활성화 돼 있는 우리나라로서는 앞으로 더 많은 신약이 개발될 전망이다.

○ 천연물 기능성 소재 신약의 경제성과 성장가치

▶ 동아제약의 약썩을 원료로 한 위염치료제 스티렌이 국내에서 이미 450억여원의 시장을 확보했으며, 위령선, 팔루근, 하고초 등 한방처방을 근거로 개발된 신약인 관절염치료제 조인스도 100여억원의 매출을 기록했다. 천연물 유래의 치료제의 시장성이 급격하게 성장하고 있으며, 기초과학적으로 효능이 검증된 질환을 예방/치료할 수 있는 산업화 소재 개발의 필요성이 증대되고 있다.

▶ 이미 알려져 있는 것처럼 신물질창출과 전임상시험에 이르기까지의 연구력 및 개발비 비중은 합성의약품이 38%, 한약재가 30%로 거의 비슷한 수준이지만 연구개발비용은 합성의약품이 900억여원인데 비해 30분의 1가량(20-30억여원)이 소요된다. 또 임상1상 시험이 천연물에서는 면제되는 경우가 많아 합성의약품 개발보다 비용(480억원 대) 부담이 없고 소요기간이 단축된다.

▶ 임상 2상과 3상이 합성에서 540억여원, 360억여원이 소요되는데 비해 최대 10억여원, 50억여원으로 엄청난 차이를 보인다. 기간도 2상에서 24개월 대 14개월, 3상에서 30개월 대 24개월로 짧다. 생약은 이 임상3상에 35%의 비중을 두는 것으로 전문가들은 평가하고 있다. 결국 최종 신약허가를 받기까지의 총 비용은 합성이 2,340억여원, 생약이 58 ~ 95억여원이 소요되며 기간은 11년 6개월 대 7년 7개월 ~ 10년 1개월이 걸린다.

▶ 제약연구개발 제조사회사인 파마프로젝트는 2008년 연례 제약 R&D 트렌드 분석보고를 통해, 2008년의 세계 제약 파이프라인에는 전년보다 19.1% 증가한 9217개 제제가 개발되고 있는 가운데 치료 계열별로는 항당뇨제가 27.7%, 비-NSAID 진통제가 26.8%, 항염제가 32.8% 씩 늘어 가장 큰 증가를 보이고 있다.

○ 어성초 추출물을 이용한 지방간 치료제 개발의 필요성

▶ 폴리페놀류는 유해산소를 제거하는 항산화 작용이 보고되므로서 건강식품 및 신의약품 창출의 새로운 대상으로 주목 받고 있다. 현대의학에서 산화적 스트레스는 염증질환, 동맥경화, 당뇨병, 발암, 심근경색, 뇌졸중, 노화 등 각종 질병발생의 주요 원인으로 제시되고 있어 이에 대한 잠재적 시장성은 무한 하다고 하겠다.

▶ 어성초 추출물에서 분리한 폴리페놀류는 수용성 폴리페놀류로서 주요기능으로 항산화 기능을 포함하며, 추출물에서는 Gallic acid, Chlorogenic acid, Protocatechuic acid, Gentisic acid,

Catechin, 4-hydroxybenzoate, Caffeic acid, Hesperidin, Coumaric acid, Ferullic acid와 Narirutin이 동정되었다.

▶ 분리된 어성초 추출물에서 가장 중요한 항산화, 항염증, 항알러지, 항암, 콜레스테롤 저하효과를 나타내는 폴리페놀로는 Ferullic acid, Chlorogenic acid, Coumaric acid와 Caffeic acid가 동정되었다. 특히, Ferullic acid는 5-lipoxygenase 유전자 기능을 특이하게 억제하여 비만을 조절하며, 자외선으로부터 피부를 보호한다.

▶ Chlorogenic acids는 N-nitrosation 반응으로 항암효과를 나타내는 것이 특징이며, Glucose-6-phosphate효소의 가수분해를 억제시켜 인체에서 당 (glucose)을 억제하는 효과가 있다.

▶ Caffeic acid는 항알러지/항염증 효과가 있음이 알려져 있으며, 암유발 물질에 대한 생체내 방어효과가 있다.

▶ 또한 분리된 어성초 추출물에서 Gallic acid는 Aspergillus가 생산하는 mycotoxins대한 항독소효과를 나타냄이 밝혀졌다.

▶ 생물자원에 대한 안정성, 고품질 그리고 효능에 대한 과학적 증거의 요구가 급증. 따라서, 과학적 검증을 통한 고부가 기능성 소재 발굴과 개발이 필요하다.

▶ 한편, 산소는 생물체의 생명유지에 절대적으로 필요하지만, 아울러 체내에서 효소계, 환원대사 등의 화학적 요인에 의하여 반응성이 매우 큰 활성산소 (reactive oxygen)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지닌다.

▶ 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등을 비선택적으로 파괴함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으킨다.

▶ 생체내에는 활성산소에 대한 방어기구로서 SOD, catalase 및 peroxidase 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C 및 glutathione 등과 같은 항산화물질이 존재하여 스스로 보호하지만, 이와 같은 생체 방어기구에 이상이 초래되거나 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 활성

산소의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스 (oxidative stress)가 야기된다.

▶ 따라서 free radical 및 반응산소종을 소거할 수 있는 화합물 및 세포내에서의 지질과산물의 생성을 억제할 수 있는 항산화제들은 이들 산화물에 기인하는 항암 및 각종 질환의 억제 또는 치료제로 기대된다.

▶ 우리나라에서는 1980년대 이후 경제성장과 더불어 알코올의 섭취량이 크게 증가하였다. 우리나라의 알코올 섭취량은 2004년 성인 1인당 1일 평균 음주량이 맥주 8병으로 1962년에 비해 6.2배 증가한 것으로 나타났다 (2001 National Nutrition Survey Report in Korea. 보건복지부). 과도한 음주는 다양한 질병의 원인이 되지만 특히 식도암, 만성췌장염, 구강인두 후두암, 간경변 등의 발병과 밀접한 관련이 있다. 또한 암환자는 전 세계 3000만 명이 투병 중에 있고, 해마다 증가하는 추세이며 2030년에는 7500만 명에 이를 것으로 추정된다.

▶ 현재 우리나라는 전국적으로 약 50만 명이 암으로 고통받고 있으며 이는 2000년에 비해 2.26배 증가한 것으로 위암, 대장암, 폐암, 간암, 갑상선암, 유방암 등이 발병률 6대 암이다. 따라서, 암 예방 및 치료 목적의 고부가 건강기능성식품 개발 시급하다.

<한국 발병률 6대 암 현황>



▶ 간은 인체내에서 각종 대사 작용, 해독, 분해, 합성 및 분비를 담당하는 중요한 장기로, 그 기능은 첫째, 에너지 대사를 관리하는 기능이 있어 음식물에서 흡수된 모든 영양소들을 에너지를 생산할 수 있는 물질로 대사시켜 전신에 공급하거나 저장한다. 둘째, 간은 많은 효소, 알부민, 응고인자들의 혈청단백, 담즙산, 인지질, 콜레스테롤 등의 지방을 합성하고 저장하며 분배하는 기능이 있다. 셋째, 간은 각종 대사산물을 담관을 통해 십이지장으로 배

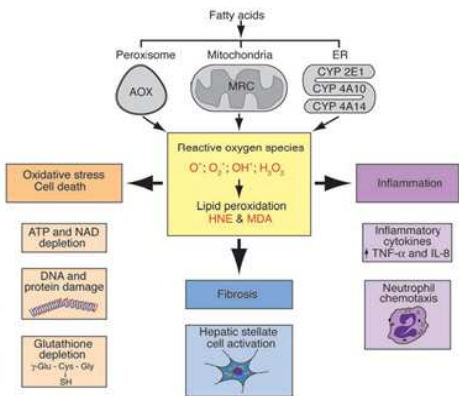
설하는 기능이 있으며, 면역기능이 있어서 생명유지에 중요한 역할을 한다. 마지막으로, 간은 해독 및 분해 기능이 있어 약물, 독성물질, 술 등을 해독시킨다. 하지만 이러한 간의 해독기능은 간세포를 손상시키기 쉬워 약물성, 독성, 알코올성 간질환 등을 유발시킬 수 있다.

▶ 알코올성 간질환은 임상증상에 따라 알코올성 지방간, 알코올성 간염, 알코올성 간경변증으로 크게 나눌 수 있고 대개 하루 60~80 g의 알코올을 10년 정도 마실 때 발생한다. 알코올성 지방간은 과도한 알코올 섭취로 인해 간세포 안에 콜레스테롤과 중성지방이 축적되어 발생하

는 것으로 금주만 하게 되면 곧 회복할 수 있으나, 계속 음주하게 되면 간염으로 발전하게 된다. 알코올성 간염은 간세포의 괴사와 염증이 발생한 상태로, 피로감, 식욕부진, 체중감소, 황달, 발열, 등의 다양한 증상을 보이며, 이를 앓는 환자 중 약 40%는 알코올성 간경변증으로 발전하게 된다. 알코올성 간경변증은 정상 간으로 회복이 불가능한 상태로, 전신피로감, 식욕감퇴, 복수, 식도정맥류, 출혈, 간성뇌증, 혼수 등의 다양한 증상을 보이며, 간염 바이러스에 의한 간경변증 보다 예후가 불량하여 구미(歐美)에서는 말기 간질환으로 인한 사망의 50%가 알코올에 의한 것으로 알려져 있다. 따라서 알코올성 간질환 사망률을 줄이기 위해서는 초기 알코올성 간질환인 알코올성 지방간을 적절히 치료해야한다. 하지만 현재까지 상기 간질환을 치료하기 위한 적절한 치료제가 개발되지 않은 실정이다.

▶ 비알코올성 간질환 (NAFLD)은 NAFLD는 전체 간 질환 중에서 가장 흔한 질환이며, 발생

비알코올성 간질환 (NAFLD) 손상기전



빈도는 여러 나라에서 다양하게 보고 되는데 일반인에서 2.8~20% 정도이며, 비만인에서는 76%까지 보고 된다. NAFLD는 아시아에서도 16~30%로 보고하고 있다. NAFLD는 전 연령에 걸쳐서 생길 수 있는데, 대개 10대 이후 전 연령층에서 보일 수있으며 호발 연령은 40~60대로 알려져 있다. 최근에는 특히 소아에서 NAFLD가 흔하면서도 중요한 질환으로 자리 잡게 되었는데, 소아에서 유병률이 2.6% 정도인데 비만 소아에서는 52.8%까지도 보고

된다. NAFLD는 다른 간질환과 동시에 발병하기도 하는데, NAFLD가 있는 경우에는 간이 바이러스나 독성물질, 알콜 등에 손상 받을 위험이 훨씬 높아서 C형 바이러스 감염 등이 NAFLD와 동반된 경우에는 간경화로 진행할 위험이 높다. NAFLD에서의 지방으로 인한 세포 손상 기전으로는 산화스트레스와 염증으로 설명하는데, 세포내에서 산화 스트레스로 인해 reactive oxygen species (ROS)가 생성되고, 미토콘드리아내에서 손상된 mitochondrial respiratory chain(MRC)의 활성이 superoxide anion과 hydrogen peroxide를 형성한다.

▶ 간 내 중성 지방 축적은 비만과 인슐린 저항성으로 인한 비만세포에서 유리지방산의 유리 증가로 설명한다. 지방조직이 많아지고 hormone-sensitive lipase의 활성이 증가되면 중성지방의 가수분해가 증가하여 혈중 유리지방산이 증가하게 된다. 간 내 유리지방산의 유입 속도는 직접적으로 혈중 유리지방산 농도에 비례한다. 간 내로 유입된 유리지방산은 산화되어 ATP를 생성하거나 중성지방의 형태로 저장되는데 이런 경로 중에 문제가 생기면 간내 지방 축적이 일어나게 된다.

○ 연구개발의 필요성

▶ 미국, 일본, 유럽의 선진사회에서는 인구의 노령화가 진전되어 65세 이상의 노인 인구가 전체 인구의 15~18%를 차지하며, 한국도 점점 증가하고 있는 추세이다. 이에 따른 간질환의 증가는 중요한 사회문제가 되고 있으며, 그 중 알코올성 지방간 질환의 증가는 많은 문제점을 제기한다. 간질환은 연령이 증가할수록 발생빈도가 급격히 증가하며 모든 질병의 원인 된다 앞으로 평균 수명이 증가할수록 점점 더 큰 사회 문제가 되고 있다.

▶ 간질환의 치료는 근본적인 치료보다는 증상을 약화시키는데 주력하고 있다.

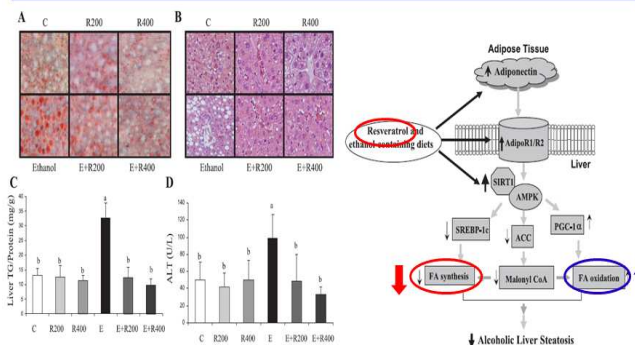
▶ 간세포의 과민화에 의한 염증반응이 염증성질환의 주된 원인 및 결과로 주목 받고 있다. 거식세포 (macrophage)를 구성하는 중요한 세포가운데 하나로, 적절히 활성화된 거식세포와 잘 조절된 염증반응은 간세포 보호작용이 있으나, 이들 세포가 과도한 염증반응을 수반하여 적절히 조절되지 못할 경우 이들이 생산해내는 염증매개 물질 (cytokine, chemokine)들은 세포 독성을 나타낼 수 있다.

▶ 빠르게 고령화가 진행됨에 따라 간질환 연구의 필요성이 절실해 지는 시점에서 기초과학적으로 효능이 검증된 간질환을 예방/치료할 수 있는 산업화 소재 개발의 필요성이 증대되고 있다.

○ 폴리페놀 (Resveratrol)의 알코올성 지방간 치료 효과 작용기작

▶ 미국 사우스플로리다 대학의 연구진이 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 최근호에 발표한 논문에 의하면, Resveratrol이 알코올을 섭취한 마우스의 간

Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice
 Joanne M. Ajmo, Xiaomei Liang, Christopher Q. Rogers, Brandi Pennock and Min You
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 295:G833-G842, 2008. First published 28 August 2008; doi:10.1152/ajpgi.90358.2008



에 축적되는 지방의 양을 감소시켰으며, 이와 동시에 간에서 지방이 분해되는 속도를 증가시켰다고 밝혔다.

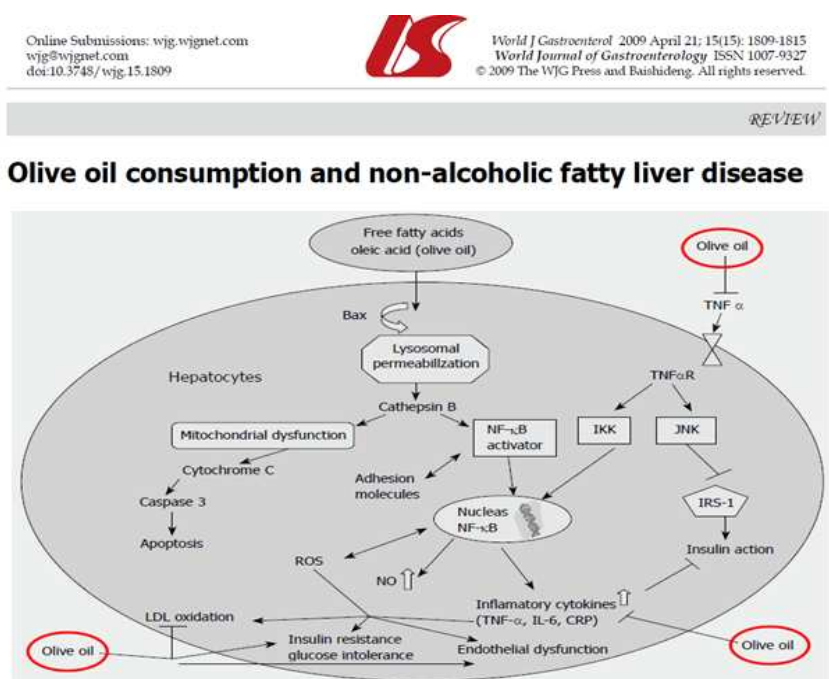
▶ 이 연구는 "알코올이 간에서 신호전달과 지방의 분해에 관여하는 두 개의 분자(AMPK, SIRT1)를 저해한다"는 선행연구 결과에 기초를 두고 있다. 선행연구들은 알코올이

MPK(AMP-activated protein kinase)와 SIRT1(sirtuin 1)을 불활성화함으로써 간에 지방이 축적되는 결과를 초래한다고 밝혔다. Resveratrol을 투여받은 마우스들은 SIRT1의 발현이 증가하고 AMPK의 활성이 증가한다. 나아

가 SIRT1과 AMPK의 발현은 SREBP-1(sterol regulatory element binding protein)의 감소, PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator alpha)의 활성화, 혈중 아디포넥틴(지방세포가 생성하는 호르몬으로서 비만을 조절하는 역할을 함)의 농도 증가, 간에서 아디포넥틴 수용체의 발현 증가의 결과들은 Resveratrol이 지방대사를 제어하는 분자들을 조절함으로써 알코올성 지방간을 억제한다.

▶ Resveratrol이 알코올로부터 간을 보호하는 작용은 전적 또는 부분적으로 SIRT1-AMPK 신호전달 시스템의 상향조절(up-regulation)에 의한 것"이라는 것이다. 이러한 결과는 알코올성 지방간의 예방·치료제를 개발하는 데 크게 기여할 것으로 보인다.

◎ 폴리페놀의 비알코올성 지방간 치료 효과 작용기작



▶ 어성초 추출물의 주요성분인 Quercetin은 항염증 기능이 있으며, 모든 페놀류는 면역계를 조절 효과가 있다. 특히 Caffeic acid는 산화적 DNA손상을 억제하며, Hydroxytyrosol은 lipoxygenase를 억제하는 효과가 있다. 또한 Protocatechuic acid는 arachidonic산 생성을 저해하여 지방생성을 억제한다 (Assy et al., World J

Gastroenterol, 2009, 15(15): 1809-1815).

- ▶ 이 연구는 어성초 추출물이 아닌 어성초만 사용하여 본 연구진이 수행하고자 하는 기술개발과는 차별성이 있음.
- ▶ 비알코올성 분자 의학적 작용기작은 염증 사이토카인이 생성되면 인슐린 감수성이 저하되고 JNK kinase가 활성화되며, Cathepsin B의 발현이 증가 되어 mitochondrial에 이상으로 간세포가 손상 된다.
- ▶ 어성초 (Olive oils)는 NF-kB 활성을 억제하여 염증사이토카인 분비를 억제하며, LDL 산화와 인슐린 저항성을 향상시킴이 보고 되었다.

제 3 절 연구개발 범위

[1차년도 연구범위 및 연구수행 내용]

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
추출물의 세포내 독성검사	MTT 세포독성 검사	HepG2 세포에서의 세포사멸 활성 측정
ESR 분석을 통한 여성초 추출물의 항산화 활성분석	ESR 기기를 사용한 라디칼 소거 활성 측정	순획분리된 여성초 추출물로부터 프리 라디칼 소거능 측정
추출물 처리 전·후 세포사 및 염증 관련유전자단백질의 발현양상 분석	BV-2 세포에서의 항염증 활성 규명	생체의 면역분석, 항염증 소재 분리 및 정제
추출물 처리 전·후 세포사 및 염증 관련유전자단백질의 발현양상 분석	단백질 추출 및 Western blot	항염증 등의 생리활성 측정 완료.
ELISA, PCR, Western blot 기법을 활용하여 유전자 및 단백질 레벨에서 cytokine 측정	ELISA, RT-PCR, 등	항산화, 항염증 등의 생리활성 및 생리기능성 규명
여성초 추출 방법 개발	- 식품으로 사용 가능한 용매인 물과 Et-OH만을 사용 - 농도별 추출 효율, 추출 방법에 따른 효율 비교	물과 Et-OH의 농도별 추출 및 환류, 정치추출 효율을 비교하여 70% Et-OH, 환류 추출 방법 확보
정제조건 개발	성분 및 분획을 위하여 Et-OH 추출후 용매별 정제 시행	흡착수지 및 Hexane, EA, chlorform 등 8종 단계별 용매 분획에 의해 Ethyl acetate 분획 선정
성분 분석법 확보 및 분석	- HPLC 분석 및 분취용 LC 등을 이용한 분리 - 기기분석을 통한 구조확인	분획 성분의 반복적 분취 및 IR, NMR, LC/MS 등에 의한 주성분 1종을 quercetin 으로 규명
효능시험용 시료제공	- 효능시험을 위한 시료 적기 제공 - 분획별 항산화 기능 비교	분획별 시료 제공 완료. 기본 항산화 및 효능 측정. 다량 시료제조로 구조 확인
원료확보방안 확립	- 생산 예상한 안정적 원료 확보 - 분석을 위한 실험실적 추출, 정제 이외에 생산공정 조기 진행	유기농 대량 원료 입수선 확보. 생산 scale 에서의 추출, 흡착수지를 이용한 정제 기본 공정확립

[2차년도 연구범위 및 연구수행 내용]

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
동물모델에서 추출물의 효능분석	화학물질들에 의한 급성 간손상 유발	동물모델에서의 생리기능성 물질로서의 활성 측정. 간세포 내 항산화 효소, SDO, GST 활성 측정
동물모델을 이용한 어성초 추출물의 면역항체학적 (IHC) 분석	마우스 간 채취(Immuno Histo Chemistry-IHC용, RNA용 및 Immunoblot용) 검체분석	동물모델에서의 간보호 효능검증/간 손상 유발, 혈액 분석, 조직학적 변화 관찰, 간기능 지표 및 혈액과 간조직의 지질함량 분석
원료 안전성 등의 확보	단회투여 독성실험 (급성)/아 급성독성시험 (아급성)	생리기능성 물질의 산업화를 위한 안정성 확보
분리 성분의 규명 및 조합 확인/안정성, 제형적용성 시험	- Quercetin 이외의 추가 분리 성분의 규명 (NMR, LC/MS 기기분석 등) - 추가성분 포함된 시료제조 - 식품유형따른 제제화 및 안정성 측정	- Quercetin 이외의 추가 성분으로서 Quercitrin, caffeic acid 등 규명 - 생산공정에 의한 시료제조 - 추출성분의 안정성 등 기본 측정 - 4종 식품유형별 제제화 적용성 확인 및 경시변화 측정
파일럿 공정 개발 및 생산 공정 개발	- 1차년도에 기본 공정 조기 진행. - 적용가능 대량화 제조 진행.	- 흡착컬럼 이용한 대량화 제조 방법 확보, 원료 시생산
기시법 확보 등 (건기식 원료화 준비 작업 등)	- 건기식 원료화를 위한 예비 작업으로서 원료규격 등	- 원료 규격 및 시험법, 제조공정 등 확보.

제 4 절 연구개발 추진체계



연구추진내용

세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진계획 (총 24 개월)												소요 연구비
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	
어성초 추출물을 이용한 간보호 및 간기능 개선 효능분석 (in vivo)	동물실험계를 이용한 어성초 추출물의 간기능 개선 효능 검증	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	동물실험계를 이용한 항염증 활성에 관여하는 염증관련 유전자/단백질 신호 전달 연구			■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	제품화 방안 및 전임상/임상준비										■	■	■	
어성초 추출물 원료 제조공정 확립	성분 규명 및 조성 확립			■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	대량 생산을 위한 파일럿 공정 개발 및 본 공정 개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	제품화 방안 및 임상준비									■	■	■		

제 5 절 연구개발의 기대효과

○ 연구개발의 중요성과 기대효과

구분	기술개발 내용의 중요성
기술적 측면	<ul style="list-style-type: none"> ○ 어성초 추출물의 지방간 치료 효능을 확보할 수 있다. ○ 어성초 추출물의 지방간 치료 효능에 대한 과학적 기초자료 (어성초 추출물의 지방간 치료제의 분자적 작용기작)를 얻을 수 있다. ○ 지질대사 작용기작에 대한 연구개발 토대를 마련할 수 있다.

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 다양한 폴리페놀류를 융합한 지방간 치료제에 대한 치료 가능성을 제시할 수 있다. ○ 부가적으로 고지혈증의 치료개선을 도모할 수 있다.
경제·산업적 측면	<ul style="list-style-type: none"> ○ 어성초 추출물을 이용한 지방간 치료에 대한 기술개발은 전무하므로, 새로운 산업적 활용에 대한 가능성을 제시할 수 있다. ○ 어성초 추출물의 상업적 활용도를 높일 수 있다. ○ 어성초 추출물을 함유한 새로운 고부가 기능성 치료제 시장을 확보할 수 있다. ○ 식물자원을 고부가가치 기능성 치료소재로 활용 할 수 있다.
활용방안 (사업화 방안)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 어성초 추출물을 함유한 새로운 지방간 치료제 개발 ○ 항염증, 항노화, 항산화 및 미백제의 타 원료로 사용 가능하다 ○ 전임상 및 임상 효능 확인을 통한 기능성 지방간 치료제로 등록여 제품화를 극대화 한다.

○ 연구개발의 경제적·산업적 중요성

- ▶ 폴리페놀은 발암인자, AIDS, 항산화 작용, 히스타민 유리, 간 독성 등을 억제하는 효과가 보고되고 있으나 국내에서의 폴리페놀을 이용한 기술·제품화는 선진국에 비해 미약하다. 이는 폴리페놀원료의 대량확보가 다른 식물자원에서는 그 함량이 천연물 시약으로의 이용에 한계가 있다.
- ▶ 폴리페놀은 피부 미용제 등이 시중에 널리 이용되고 있으나, 아직까지 고부가가치 다기능성 소재 개발과 산업화는 되지 않고 있다.
- ▶ 여러 연구팀에 의하여 어성초 추출물은 항산화 활성 및 피부 보호작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 폴리페놀 중 Ellagic acid는 간보호 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 어성초의 잎에 관한 연구는 많으나, 어성초 추출물에 관한 연구는 거의 없다.
- ▶ 어성초 추출물에 함유된 생리활성물질의 생체효용성과 생체내 효과를 이용한 새로운 기능성 식의약품은 생산되지 않고 있다.
- ▶ 어성초 추출물은 비교적 가격이 저렴하고, 국내에서의 대량재배로도 안정적인 원료의 공급이 가능하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

○ 국내 식물자원 연구 개발 현황

▶ 식물 4000여 종 탐색, 종자·추출물은행 구축되었으며, 천연물과학 연구소가 천연물 과학분야 전문연구기관으로서 동식물 천연자원으로부터 성분의 분리, 화학구조의 규명, 새로운 생리활성의 탐색 등 연구를 수행하여 왔다. 또한 한국생명공학연구원내 한국식물은행은 국내 자생식물추출물은행 구축사업을 통해 확보된 3,000개 이상의 식물추출물과 성분을 확보하고 분양했다.

▶ 2000년에 정부는 '천연물신약개발연구촉진법'을 발표했다. 2000-2005년도 제1차 천연물신약연구개발촉진계획 기간에서 가시적인 연구성과들이 있었고 동아제약의 '스티렌(Stillen)정'과 SK케미칼의 '조인스(Joins)정'은 이 기간의 대표적인 결과라고 할 수 있다.

▶ 같은 해에 과학기술부의 21C 프론티어연구개발 사업의 일환으로 자생식물 이용기술 개발사업단'이 발족해 실질적인 연구·개발에 나섰다. 자생식물이용기술개발사업단의 사업기간은 2010년까지로 국내 자생식물 4000여종의 종자·추출물은행을 구축함과 동시에 난치성질환 치료, 예방용 식품의약개발, 고부가가치 천연신약소재 개발이라는 목표를 내걸고 있어 천연물 신약연구 개발촉진계획의 목표와도 맞물려 있다.

○ 국외기술 현황

▶ 천연물로부터 인간의 질병을 예방 또는 치료할 수 있는 신물질을 찾고자 하는 시도는 고대시대 부터 많은 과학자들의 연구대상이 되어 왔다. 그간 이들 자원을 이용한 의약품의 개발로 현재 사용되고 있는 의약품의 50% 이상이 천연물로부터 유래된 것이고 미국의 경우 사용하는 의약품 중 30%가 식물로부터 얻어진 것으로서, 미국 FDA로부터 승인된 의약품이 120종으로 시장 규모는 약 10조 달러에 이르고 있으나, 천연물에서부터 지방간 질환 치료제 소재를 개발하려는 그 동안의 수많은 노력에도 불구하고 실제로 치료제로 현재 사용중이거나 임상시험을 수행중인 예는 소수에 불과하다

○ 국외 제약 시장규모

▶ IMS 헬스가 발표한 '글로벌 제약 및 치료제 예측(2008)'에 따르면, 세계제약시장 판매는 2008년 5~6% 증가해 7350억달러에서 7450억달러에 이를 것으로 추정된다.

▶ 2009년 글로벌 제약시장 매출은 4.5~5.5% 증가, 8천2백만 달러 규모를 넘어설 전망이다. 또한, 한국, 중국, 브라질, 인도, 멕시코, 터키, 러시아 등의 제약신생(pharmerging) 시장의 2009년

결합매출액은 1천5백만~1천150만 달러 규모로 14~15% 성장이 전망되고 있다.

○ 국외 천연물 의약품 시장규모

▶ BCC리서치사가 최근 발표한 새로운 보고서에 따르면 전 세계 식물 및 식물 추출 약물 시장은 2008년 195억달러에서 2013년 329억달러로 연간 11.0% 성장할 전망이다.

▶ WHO의 전통의학전략보고서에 따르면 세계 전통의학시장 규모는 1993년 491억달러였으나, 1998년은 850억달러, 2002년 1000억달러로 9년만에 두배 성장했다. 또한, WHO는 2008년 세계 전통의학 시장은 2000억달러 까지 성장할 것으로 예측했다.

○ 국내기술 현황 및 국내 제약 시장규모

▶ IMS 헬스 데이터 자료에 따르면 2008년도 국내 제약시장 규모는 10조 8459억원이며 이중 전문의약품은 9조1555억원, 일반의약품은 1조6904억원이다.

▶ MBN의 보도에 의하면 지난 2008년 시장규모는 2007년 보다 9.5% 성장한 것으로 집계되고 있으며, 앞으로도 연간 7~9%씩 증가할 것으로 추정하고 있다.

○ 국내 천연물 의약품 시장규모

▶ 천연물 의약품 약 4,000억원, 천연물 공산품 5,000억원 그리고 수입 천연물 제품 3,000억원으로 정부의 자체 분석결과 천연물을 이용한 건강관련 제품의 연간 시장규모는 10조원을 상회한다고 추산한다.

▶ 한방산업 시장규모는 2008년 기준 4조5600억원 규모(보건복지가족부 추산)이며, 세계시장의 2.6% 수준이다.

▶ 한약제제 시장은 2005년 2477억 원에서 2010년 9400억 원, 한의약 R&D는 4,068 억원에서 4,288 억 원으로 늘어날 것으로 전망됐다.

▶ 현재 한국은 신약 개발에 쏟는 자본 규모와 후보물질 연구 수준에서 선진국과 큰 차이가 있다. 한국 37개 상장 제약사의 전체 연구개발비는 3000억원을 약간 상회하는 수준으로 이는 세계 50위권 제약사의 연구개발비에 해당한다.

○ 건강기능식품분야의 제품 및 시장 현황

- ▶ 건강식품이란 '일반적인 식품보다 건강에 유익함을 주는 식품으로 정의되고 있는데, 비타민, 미네랄, 아미노산과 효소 등)이 포함되어 건강,미용 등 을 위한 보조식품으로 입으로 섭취하는 제품'으로 규정하고 있음.건강기능식품의 세계시장 성장이 지속되면서 우리나라에도 점차 하나의 산업군으로 자리 잡고 있는 추세이다.
- ▶ 현대인들은 건강에 대한 인식이 질병 치료보다는 예방의 중요성이 크게 인지되어가고 있고, 자가 치료조절에 대한 인지도가 점차 증가되어 건강기능식품 시장도 성장을 지속할 것으로 예상된다.
- ▶ 현재 건강기능식품은 질병발생위험감소기능, 생리활성기능 및 영양소기능으로 구분할수 있으며, 생리활성기능은 과학적 근거 정도에 따라 3가지 등급으로 구분되는데, 국내 건강기능식품 시장의 2011년 생산액은 13,682억원,수출액은 556 (4.1%)억원으로 내수시장을 중심으로 빠르게 성장하고 있다.
- ▶ 건강기능식품 중 홍삼이 가장 큰 시장을 형성하고 있으며, 2011년 전체 건강기능식품 생산액의 52.6% (7천억원)를 차지하고 있음.특히 최근에는 홍삼제품의 면역효과 이외에 피부미용 및 주름개선 등의 미용기능이 각광받기 시작하면서 전년대비 성장률이 23.6%를 기록하는 등 국내 건강기능식품시장의 성장을 주도하고 있다.
- ▶ 세계 건강기능식품 중 점유율이 가장 큰 품목인 비타민과 무기질은 국내 시장에서도 급속히 증가하여 2011년 비타민 및 무기질의 생산액은 전년 (991억원)대비 57.5% 상승한 1.561 억원으로 나타났으며, 소비자들이 쉽게 구매할 수 있기 때문이다.
- ▶ 개별인정형 건강기능식품의 성장세도 두드러지게 나타나고 있는데, 2011년도 개별인정형 제품은 전년 대비 27.1% 성장한 1435억원으로 이중 생산액 1위는 간 건강 제품 (532억원)이었으며,그 다음으로는 면역기능에 도움을 주는 제품 (179억원), 관절/뼈건강 제품 (153억원)순으로 나타나 간 건강 제품에 대한 소비 수요 증대와 함께 소비자 관심 증가되고 있다.
- ▶ 간건강 관련 원료는 7건이 있는데, 본 연구개발 에서 개발하고자 하는 제품은 간질환 예방 및 치료개선과 관련한 제품으로서 알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 주는 소재 개발이었다.

○ 국외 관련제품의 생산 및 시장 현황

▶ 2011년 세계 건강기능식품 시장규모는 89십억달러이며, 향후 2016년에는 120십억달러를 상회할 것으로 예상되는데, 연평균 7%의 성장을 지속할 것으로 예측된다. 일반식품이나 제약시장의 성장률 4%의 두 배에 가까운 성장임. 지속적인 성장은 노령화 인구의 증가와 의료비 지출 상승, 그리고 기능식품의 효능 입증과 관련된 학술적 진보, 해양기업들의 혁신노력의 결과로 판단된다.

▶ 특히, 개발도상국에서의 성장률이 향후 2016년까지 약 12%의 수준을 유지할 것으로 예상된 반면 선진국들은 약 3%의 낮은 성장률을 유지할 것으로 예상되어, 향후 세계 건강기능 식품 시장은 이들 개발도상국에 의해 주도될 것으로 판단된다.

○ 국내 천연물 유래의 간질환 치료제의 시장성

▶ 국내에서는 제약사를 위주로 기존의 제형을 개량하는 연구개발이 진행되고 있으며, 학계를 중심으로는 지방간 치료제에 대한 연구가 있다. 그러나 학계에서 진행되고 있는 연구개발성과에 대한 보고는 미비한 상태이다.

▶ 현재 제제나 제형을 개량한 지방간 치료제에 대한 연구결과는 건일제약, 유한양행, 종근당, 한미약품에서 일정정도 성과를 보이고 있으나, 이들 대부분은 기존 약물을 개량하는 수준으로 신약개발은 아직 이루어지지 않고 있다. 또한 제제기법을 수출하여 일부회사에서 로열티를 받고 있지만, 원료물질의 경우 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다.

▶ 따라서, 지질대사 작용과 관련된 세포내 분자적 기작규명으로 지방간 치료제 관련 원천기술을 확보가 절실하다.

○ 국내·외 특허 현황

▶ 어성초 추출 관련 국내 특허는 424여 편으로서, 그 중 어성초를 이용한 생활용품 제조가 71.62%로 가장 많은 특허 등록이 이루어졌으며, 그 다음은 화장품에 관한 특허로 28.6%의 특허 등록율을 나타내었다.

▶ 하지만 본 연구내용과 관련된 내용인 지방간 치료의 생리활성 및 그로부터 신소재 개발과 관련된 국내 특허 등록율은 약 0%에 이었다.

▶ 현재 세계적인 제약 회사들이 PPAR-alpha 고질혈증에 치료효과를 가지는 치료용 항체의 실용화에 박차를 가하고 있다. 스위스의 Hoffmann-LaRoche, 노바티스사와 미국의 Pfizerdhk Centocor사가 생산되면서 고지혈증 치료효과를 가지는 약제의 실용화가 가속화되었다.

▶ 그러나 본 연구진이 개발하고자 하는 어성초 추출물을 이용한 지방간 치료제 유효성분인 폴리페놀에 관한 기술개발은 극히 미미한 상태이며, 특히 알코올성과 비알코올성 지방간 치료 두 타겟 (듀얼 메카니즘)으로 작용하는 천연물 신소재의 발굴은 본 연구진이 새롭게 최초로 시도하는 것으로, 향후 의학적으로 지방간 치료제로서 중요하다고 하겠다.

○ 국내 시장규모

▶ 천연물 의약품 약 4,000억원, 천연물 공산품 5,000억원 그리고 수입 천연물 제품 3,000억원으로 정부의 자체 분석결과 천연물을 이용한 건강관련 제품의 연간 시장규모는 10조원을 상회한다고 추산한다.

▶ 한방산업 시장규모는 2008년 기준 4조5600억원 규모(보건복지가족부 추산)이며, 세계시장의 2.6% 수준이다.

▶ 한약제제 시장은 2005년 2477억 원에서 2010년 9400억 원, 한의약 R&D는 4,068 억원에서 4,288 억 원으로 늘어날 것으로 전망됐다.

▶ 현재 한국은 신약 개발에 쏟는 자본 규모와 후보물질 연구 수준에서 선진국과 큰 차이가 있다. 한국 37개 상장 제약사의 전체 연구개발비는 3000억원을 약간 상회하는 수준으로 이는 세계 50위권 제약사의 연구개발비에 해당한다.

○ 국내 천연물 유래의 간질환 치료제의 시장성

▶ 국내에서는 제약사를 위주로 기존의 제형을 개량하는 연구개발이 진행되고 있으며, 학계를 중심으로는 지방간 치료제에 대한 연구가 있다. 그러나 학계에서 진행되고 있는 연구개발성공에 대한 보고는 미비한 상태이다.

▶ 현재 제제나 제형을 개량한 지방간 치료제에 대한 연구결과는 건일제약, 유한양행, 종근당, 한미약품에서 일정정도 성과를 보이고 있으나, 이들 대부분은 기존 약물을 개량하는 수준으로

신약개발은 아직 이루어지지 않고 있다. 또한 제제기법을 수출하여 일부회사에서 로열티를 받고 있지만, 원료물질의 경우 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다.

▶ 따라서, 지질대사 작용과 관련된 세포내 분자적 기작규명으로 지방간 치료제 관련 원천기술을 확보가 절실하다.

○ 국외 시장규모

▶ 천연물로부터 인간의 질병을 예방 또는 치료할 수 있는 신물질을 찾고자 하는 시도는 고대 시대 부터 많은 과학자들의 연구대상이 되어 왔다. 그간 이들 자원을 이용한 의약품의 개발로 현재 사용되고 있는 의약품의 50% 이상이 천연물로부터 유래된 것이고 미국의 경우 사용하는 의약품 중 30%가 식물로부터 얻어진 것으로서, 미국 FDA로부터 승인된 의약품이 120종으로 시장 규모는 약 10조 달러에 이르고 있으나, 천연물에서부터 지방간 질환 치료제 소재를 개발하려는 그 동안의 수많은 노력에도 불구하고 실제로 치료제로 현재 사용중이거나 임상시험을 수행중인 예는 소수에 불과하다

○ 국외 제약 시장규모

▶ IMS 헬스가 발표한 '글로벌 제약 및 치료제 예측(2008)'에 따르면, 세계제약시장 판매는 2008년 5~6% 증가해 7350억달러에서 7450억달러에 이를 것으로 추정된다.

▶ 2009년 글로벌 제약시장 매출은 4.5~5.5% 증가, 8천2백만 달러 규모를 넘어설 전망이다. 또한, 한국, 중국, 브라질, 인도, 멕시코, 터키, 러시아 등의 제약신생(pharmerging) 시장의 2009년 결합매출액은 1천5백만~1천150만 달러 규모로 14~15% 성장이 전망되고 있다.

○ 국외 천연물 의약품 시장규모

▶ BCC리서치사가 최근 발표한 새로운 보고서에 따르면 전 세계 식물 및 식물 추출 약물 시장은 2008년 195억달러에서 2013년 329억달러로 연간 11.0% 성장할 전망이다.

▶ WHO의 전통의학전략보고서에 따르면 세계 전통의학시장 규모는 1993년 491억달러였으나, 1998년은 850억달러, 2002년 1000억달러로 9년만에 두배 성장했다. 또한, WHO는 2008년 세계 전통의학 시장은 2000억달러 까지 성장할 것으로 예측했다.

○ 국외 기능성 식품 시장규모

▶ 미국의 건강기능성 식품 시장은 1994년 ‘영양 보조식품 건강 교육법(DSHEA)’ 제정 이후 매년 두 자릿수의 성장을 보였으며 2005년 기준, 미국 기능성 식품 시장규모는 약 41억 달러로써 2000년에 비해 약 80% 이상의 성장을 보였으며 작년에 비해 8% 증가했으며, 현재의 성장 추세로 보아 향후 10년간 매년 약 10%의 성장을 지속할 것으로 전망되고 있다.

▶ 기능성 식품 시장은 소비자에 의해 주도되며 노령층 증가에 따라 건강을 유지하고 질병을 예방하며 정상적인 활동을 영위할 수 있는 부분에 많은 관심을 기울이고 있다. 미국인의 약 50% 가량이 식품이 의약품을 대체할 수 있다고 믿는 것과 같이 다수의 사람들이 의약품(처방약/OTC)의 대체품에 많은 관심을 기울이고 있다.

▶ 유럽은 기능성식품에 대한 특별한 법적 제도가 마련되지 않으나 ‘영양학적인 효과 이상으로 다른 신체 기능에 효과를 가진 식품’으로 인식하고 있으며 정제나 캡슐 형태의 Dietary supplements는 기능성 식품에 포함하지 않고 있다. 국가별 관심 요인에 대한 조사에선 영국의 경우는 에너지 충전, 튼튼한 뼈, 치아 건강, 유방암 위험률 감소, 콜레스테롤 저하 순이었다. EU는 통일 시장 형성을 하려고 하지만 아직 각국간의 시장 격차가 크다. 미국 NBJ 조사에 따르면 유럽 전체의 건강보조식품 시장 규모는 145억달러이고 나라별로 보면 독일이 56억 달러, 프랑스 25억달러, 영국이 15억달러, 이탈리아가 11억달러, 북유럽 각국이 10억달러, 스페인이 8억달러, 네덜란드가 5억달러로 조사됐다.

▶ 일본에서는 1980년대 후반에 기능성 식품이 등장해 1991년 특정보건용식품 제도를 제도화한 최초의 국가이다. 2005년도 건강기능 식품 매출액은 2266억엔으로 제도 정비 후 매년 10%이상의 고속성장을 해 왔다. 그러나 2006년도 매출액은 전년도 대비 6% 하향되었는데, 이는 후생성의 건강식품에 대한 규제강화, 감독에 의한 영향이 컸다.

○ 국외 (주로 일본) 천연물 유래의 간질환 치료제의 시장성

▶ 천연물에서 분리되어 개발된 대표적인 간장질환 치료제인 실리마린은 간장질환의 치료나 예방의 목적으로 이용되어 온실리붐 마리아눔(*Silybum marianum*)의 성숙한 과실과 관모(冠毛)에서 분리되었다 (히끼노 등, *Planta Med.*50, 213-218 1984). 실리빈, 이소실리빈, 디히드로실리빈, 실리디아닌 및 실리크리스틴 등의플라보리그난 계열 물질의 혼합물인 실리마린은 간세포의 RNA 폴리머라제를 활성화하여 단백질의 합성을 증가시켜 손상된 간조직의 재생을 촉진한다. 실리마린은 만성 전염성 간장 질환, 간경화 및 알코올성 간장 질환 등의 치료제로 현재임상에서 이용.

▶ 한방에서 강장제나 간장 질환의 예방 목적으로 사용되어온 오미자 (*Schizandra chinensis*)의 과실에서 분리된 리그난계 물질인 고미신 A는 유도체인 DDB로 합성되어 만성 간염의 치료제

로 사용되고 있다. 고미신 A외에도 우웨이저수(wuweizisu) C, 쉬잔드린 D, 데옥시고미신 및 고미신 N 등의 유도체도 사염화탄소나 갈락토사민으로 유발시킨 간독성에 대한 회복효과가 보고되어 있다 (키소 등, *Planta Med.*50, 81-85, 1984).

▶ 최근에는 (+)-시아니다놀-3으로 알려진 (+)-카테킨을 급성 바이러스성 간염의 치료제로 개발하기 위한 임상실험이진행중이다. 또한 일본에서는 글리시리진을 급성 바이러스성 간염이나 만성간염의 치료제로 개발하기 위한 임상 실험이이루어지고 있다 (타부르 등, *Phytotherapy Res.*10, 461-467, 199)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

가. 국내산 어성초 추출물의 추출 및 정제

어성초(魚腥草, *Houttuynia cordata*)는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본의 야생 약초로서 중국, 일본 및 한국이 원산지이다. 잎은 마주 나고 심장모양의 타원형이며 길이 3-8cm, 폭 4-6cm로 끝이 뾰족하다. 꽃은 작고 꽃잎은 없으며 흰색으로 5-6월에 핀다. 약모밀, 집약초, 즈채, 취재, 필관채, 십약, 즈채, 중약초, 자배어성초(紫背魚腥草), 취저소(臭猪巢) 라고도 불리운다. 어성초가 약용으로 쓰인 것은 역사가 매우 오래 되는데 중국 남지조(南地朝)시대에 저술된 『명의별록(名醫別錄)』이라는 책에 처음으로 기록되어 있다. 그러나 식용으로는 이보다 앞서 춘추전국시대에 어성초를 가지고 김치를 담가 먹은 기록도 있다. 어성초는 전통 약용 식물로서 수종, 매독, 방광염, 자궁염, 폐염 및 중풍 등 광범위한 치료효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 정장작용, 청혈기능, 이뇨작용, 소염작용 등이 회자되고 있다.

근래에 어성초가 약용식물로 많은 사람의 관심을 끈 후 전국 각지에서 다량 재배되고 있다. 현재까지 어성초에 관한 연구로는 어성초 뿌리, 잎의 항균활성, 항산화, 항종양, 항백혈병 및 고지혈 억제효과 등이 보고되고 있다. 그러나 아직 항산화성을 기반으로 한 간기능 개선 효과 같은 관련 연구는 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 어성초의 페놀성 화합물을 위주로 추출성분 확보과 효능 확인을 통해 간기능 개선의 기능성 식품 소재로서의 어성초가 갖는 산업적 활용 가능성을 제시하고자 하였다.



그림 1. 어성초 (생물 및 건조물)

한편 어성초는 약모밀이라는 원재료명으로 식품의약품안전청의 전체 부위 식용 가능한 생약재로 아래와 같이 등재되어 있다.

1. 어성초 추출 방법 개발

1) 어성초 입수 및 보관

본 연구에서는 초기에는 충북지역 어성초를 입수하여 사용하기도 하였으나, 대량 안정적인 수급을 위하여 전라남도 보성군의 어성초(유기농 인증, 제 16-1-35호)를 사용하였다. 입수된 어성초는 세척후 40℃로 건조하고 -20℃에서 냉동보관하면서 사용하였다.

어성초는 생육초기인 4월 중순에 수확했을 때 quercetin 함량은 0.72%로 양파의 0.03-0.05%에 비하면 15배가량 많은 양을 함유하고 있다는 보고가 있으며, 부위별 quercetin 함량은 꽃에서 2.06%로 가장 높았으며, 잎, 줄기, 뿌리 중에서는 잎에서 상당부분 포함된 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 생육시기를 특별히 조정할 수는 없었으나, 유효성분이 비교적 다량 존재하는 지상부(잎, 잔줄기) 만을 가지고 실험을 진행하였다.

2) 추출방법 개발

건조 어성초는 분쇄기로 조분쇄한 후 식품으로서의 원료임을 감안하여 물과 ethanol 수용액 만으로 추출을 진행하였다. 물로만의 추출은 추출은 <어성초 100g에 증류수 1 liter 첨가 --> 80℃에서 12시간 열수 추출 --> Whatman No. 2 여과지 여과>의 순서로 진행하였으며,

원재료명	약모밀	
이명	집약초, 즙채, 취재, 필관채, 심약, 즙채, 어성초, 종약초, 자배어성초(紫背魚腥草), 취저소(臭猪藥), Houttuynia	
학명	Houttuynia cordata Thunb.	
생약명	어성초 (魚腥草, Houttuyniae Herba)	
원재료 분류	식물	
식용가능 여부	가능	
	제한적	전체
	불가능	
	※ 해당부위를 클릭하시면 부위별 상세정보를 확인 할 수 있습니다.	



이제 클릭해서 풀리페놀 함량을 측정할 수 있습니다.

1 2 3

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

특성/분포	삼백초과(Saururaceae)의 여러해살이풀. 높이는 20~50센티미터이며 주로 땅속줄기로 번식한다. 꽃이 피기 전의 풀 전체를 미노제, 구종제 따위로 쓴다. 잎이 매밀의 잎과 비슷하고 약으로 쓰이므로 약모밀이라고 한다. 한국, 중국, 일본 등지에 분포한다.[1]
주요성분(부위별)	생전초에는 정유가 0.005% 있다. 그 주성분은 Methylnonylketone, Myrcene, Auricaldehyde, Afzerin, Capric aldehyde, Capric acid, Quercitrin, Isoquercitrin, Decanoyl Acetaldehyde(특유의 고기 비린내 성분)이다. 미외에 물에 풀리는 무기성분 2.7%가 있다. 그의 주성분은 칼리움염이다. 꽃과 열매이삭에는 쿠에르피트린과 이소쿠에르피트린이 있다. [Afzelin · alpha-Pinene(+,-) · beta-Sitosterol · Borneol acetate · Chlorogenic acid · 1,8-Cineole · cis-N-(4-Hydroxystyryl)benzamide · cis-N-(4-Hydroxy-styryl)-benzamide · Decanoyl acetaldehyde · Dodecan-1-al · Geraniol · Hyperoside · Linalool · p-Cymene · Quercitrin · Thymol · trans-N-(4-Hydroxystyryl)benzamide · trans-N-(4-Hydroxy-styryl)-benzamide · Undecan-2-one]
안전성/독성	1. 몸이 허약하고 찬 사람은 복용을 피해야 한다. 2. 알레르기 반응이 일어날 수 있다.
식용외 용도 (이용부위)	약용, 관상용
기타	
근거자료	한국과학식품회, 식품과학사전, (주)교문사, 2012. 농촌진흥청 호남농업시험장, 원색구황식물도감, (1976) 현대생약학, 생약학연구회, 학창사, (1991) 안덕균, 원색한국본초도감, 교학사, (1998) 미영노, 원색한국식물도감, 교학사, (1996) 이우철, 원색한국기준식물도감, 아카데미서적, (1996) 미창복, 대한식물도감, 향문사, (1979) 한약자원식물학, 학문출판(주), (1996) 정태현, 한국식물도감, 신지사, (1958) 김태정, 한국의야생화, 교학사, 326p, 2001 홍원식, 약초의성분과이용, 일월서각, 157~158p, (1999) http://www.tradimed.co.kr Chang H.M. et al., Advances in chinese medicinal research, world scientific pub. Co., Singapore, 120, 198
최종수정일	2012-11-29 18:49
NDSL 검색	<input type="text" value="약모밀"/> <input type="button" value="검색"/> ※ NDSL(과학기술정보 서비스 플랫폼)의 검색 서비스를 이용하고 싶으신 분은 검색을 클릭하세요.

ethanol 수용액 즉 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ethanol 수용액을 사용한 추출은 <각각 어성초 100g에 50, 60, 70, 80, 90% Et-OH 1L를 첨가 --> 상온에서 7일 방치 또는 60℃에서 환류냉각하여 3시간씩 2회 추출 --> Whatman No. 2 여과지 여과 --> 40℃에서 vaccum evaporator로 농축>의 순서로 진행하였다.

각 추출 방법에 의한 수율은 아래 표 1에 나타난 바와 같이, 70% ethanol을 환류시켜 추출하였을 때 가장 효과가 좋았으며, 이후 70% ethanol을 기본 추출 용매로 하였다. 추출시험시의 수율은 어성초 건조중량에 대한 각 추출물의 중량 백분율로 산정하였으며 별도로 주요 생리활성 성분인 총 폴리페놀의 함량을 지표로 측정하였다. 총 폴리페놀의 함량은 다음과 같은

방법에 의해 측정하였다. 즉 추출조건에 따라 제조된 추출물을 희석한 후, 희석액 5 ml에 folin reagent 5 ml를 가하고 5분간 정치시킨 다음 5 ml의 10% sodium carbonate 용액을 가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 정치한 다음 분광광도계(UV/Vis Spectrophotometer, Jasco, Japan)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하고 (+)catechin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

표 1. 추출방법별 수율

추출방법	수율 (중량 %)	폴리페놀양 (mg/g)
물, 80℃	6.5	17.0
50% Et-OH, 상온침적	7.4	24.1
60% Et-OH, 상온침적	7.6	25.8
70% Et-OH, 상온침적	8.1	29.9
80% Et-OH, 상온침적	7.9	27.6
90% Et-OH, 상온침적	7.3	22.6
50% Et-OH, 60℃ 환류	7.9	25.5
60% Et-OH, 60℃ 환류	8.7	26.9
70% Et-OH, 60℃ 환류	9.2	28.5
80% Et-OH, 60℃ 환류	8.9	27.7
90% Et-OH, 60℃ 환류	7.6	26.0

2. 정제조건 개발

1) 용매 분획

Ethanol 추출된 추출물은 일차적으로 흡착수지인 HP20을 사용하여 폴리페놀류 성분들 만을 흡착한 후 washing 하고 다시 ethanol 용출하여 사용하였다. 어성초 추출물의 성분 분리를 위해서는 다양한 용매를 사용하여 순차적으로 분획하였다 (그림 2). 즉 어성초 추출물 100ml에

n-Hexane 100ml을 첨가하고 30분 교반한 후 n-Hexane 분획하고 이후 동일한 방법으로 Chloroform 분획 --> Ethyl acetate 분획 --> Butanol 분획 --> Ether 분획 --> DMF --> DMSO 등으로 분획하였다.

각각의 용매로 분획한 결과물의 폴리페놀 함량을 측정한 결과, 표 2에 나타난 바와 같이 chloroform 과 ethyl acetate 분획에서 폴리페놀이 높게 측정되었으며 특히 ethyl acetate 에서의 폴리페놀 함량이 다른 용매 분획에 비해 현격히 높은 것으로 나타났다.

표 2. 용매 분획에 따른 총 폴리페놀 함량

용매 분획	총 폴리페놀 함량 (mg/g 에탄올 추출물)
n-Hexane	15
Chloroform	145
Ethyl acetate	355
Butanol	2.5
Ether	1.0
DMF	0.5
DMSO	-

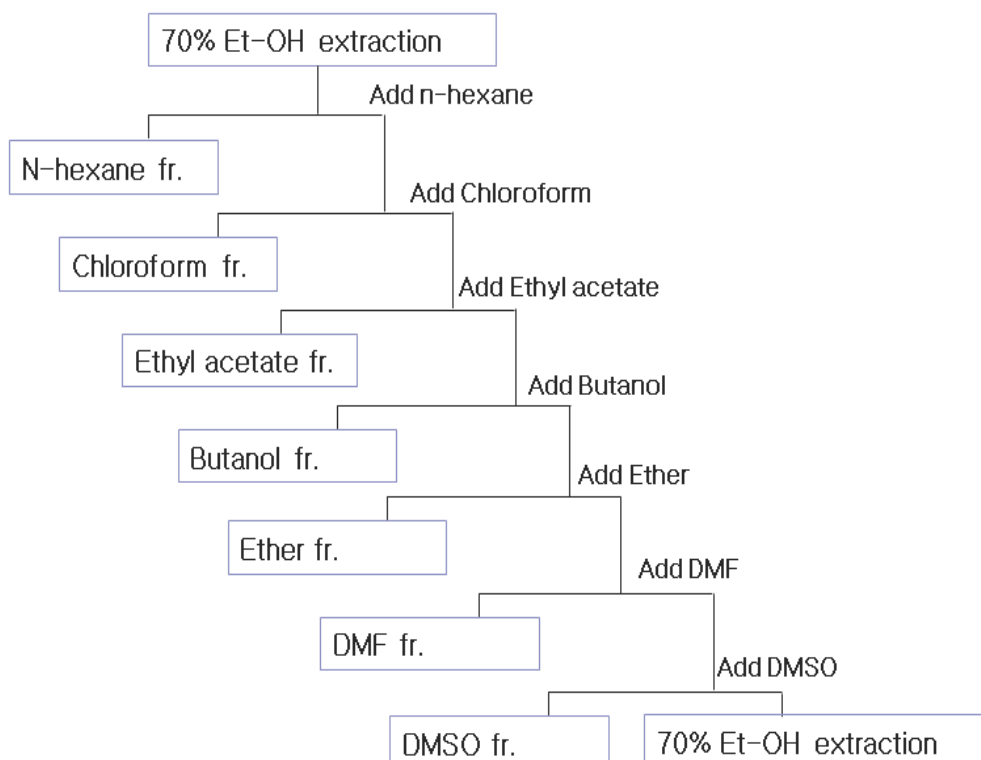


그림 2. 어성초의 용매 분획

2) 항산화 기능 비교

생체의 많은 기능은 항산화 기작을 기본으로 진행되는 것이 많으며, 폴리페놀은 대부분 항산화 성분으로서 작용할 수 있는 바, 폴리페놀 함량이 각기 다른 어성초 분획의 항산화활성을 측정하였다. 항산화활성은 전자 공여능에 의한 항산화활성을 측정하였다. 전자 공여작용에 의한 항산화활성 측정은 DPPH와 같은 안정한 free radical을 이용하여 LOO의 model계에서 radical에 대한 항산화물질의 반응성을 radical의 감소량이나 감소 속도로부터 직접 평가하는 방법으로 항산화 물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하고, DPPH는 항산화 물질로부터 받은 전자나 수소에 의해 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로, 전자 공여능으로부터 항산화 활성을 측정할 수 있다. 본 실험에서 전자 공여능(electron donating ability, EDA)은 Blois 등의 방법을 사용하여 측정하였다. 즉 각 시료 0.2ml(6.0mg/ml)에 4×10^{-4} M DPPH 용액(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)을 첨가하고 10분 후 분광광도계를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하였다.

시료인 어성초 추출물 용매 분획의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 폴리페놀의 함량과 마찬가지로 chloroform 과 ethyl acetate 분획에서의 항산화 활성이 다른 분획과 비교하여 많은 차이를 보였으며 ethyl acetate 분획이 가장 높은 활성을 나타내었다. 항산화 물질인 vitamin C와 비교한 항산화력을 그림 3에 나타내었다.

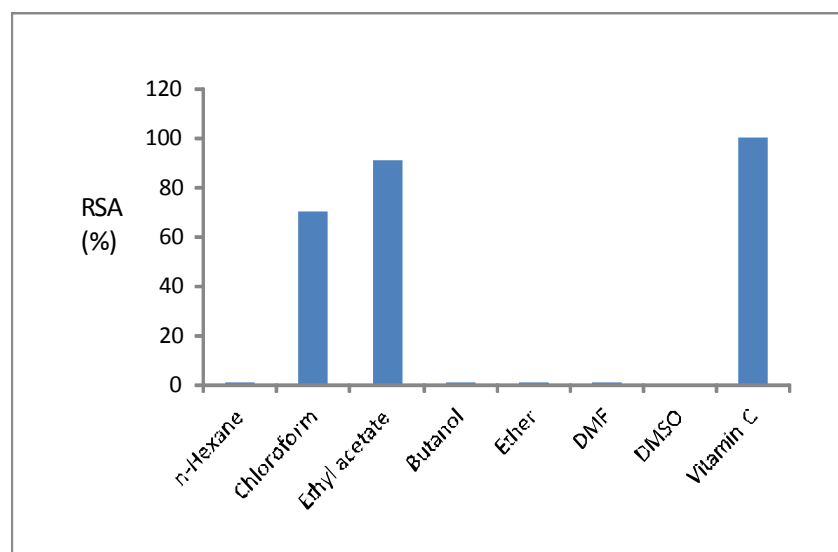


그림 3. 어성초 추출물 용매분획의 항산화활성 상대비교

나. 어성초 추출물의 성분분석

1. 성분 분석법 확보 및 분석

1) 성분 분석을 위한 분획

용매 분획중 ethyl acetate 분획을 다양한 조건의 HPLC로 분석하면서 단일 분획을 취하고자 하였다. 상기 진행한 유기용매 분획 시험을 바탕으로, 보다 효율적으로 추출 및 지표물질 확인을 위한 기본 분획 process 를 아래 그림과 같이 확립하였다. 즉 70% ethanol로 추출한 추출액은 ethanol을 증류한 후 흡착수지를 이용하여 흡착/용이함으로써 컬럼정제하고 이를 ethyl acetate로 분획한 시료는 다시 silica column을 사용하여 좀 더 정제하였다. 모아진 분획물은 감압증류하여 용매를 제거하고 다시 분취용 HPLC 로 반복하여 분획을 모아 사용하였다. 이때 필요에 따라 HPLC의 조건은 다소 조정하면서 사용하였다.

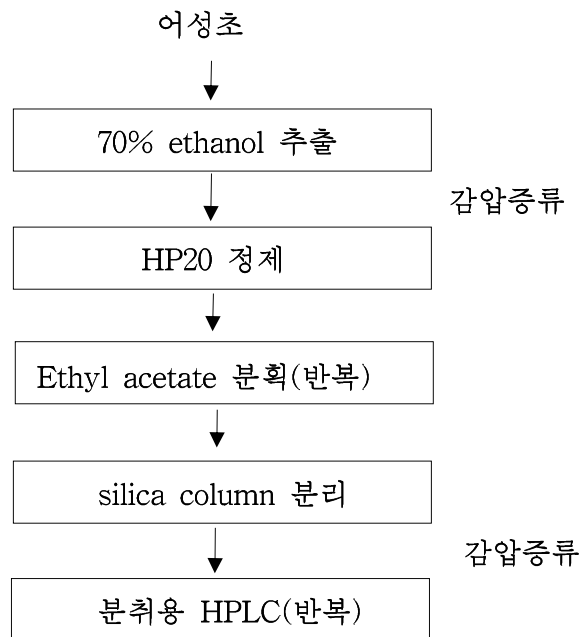


그림 4. 어성초의 추출 및 분획 기본 Process

HPLC의 조건은 필요에 따라 isocratic 조건 및 gradient 조건을 병행하여 사용하였다. 초기에 기본적으로 아래와 같은 조건을 사용하였으나, 경우에 따라서는 일부 용매 종류 및 조건 등을 다양하게 변경하여 사용 하였다.

* Isocratic HPLC 조건

Column : μ Bondapak C18

Mobile phase : MeOH : D.W : Acetic acid = 15 : 3 : 1

Flow rate : 1.0ml/min

Temp. : 30°C

Detection : UV

* Gradient HPLC 조건

Column : μ Bondapak C18 or Optimapak C18

Temp. : 30°C

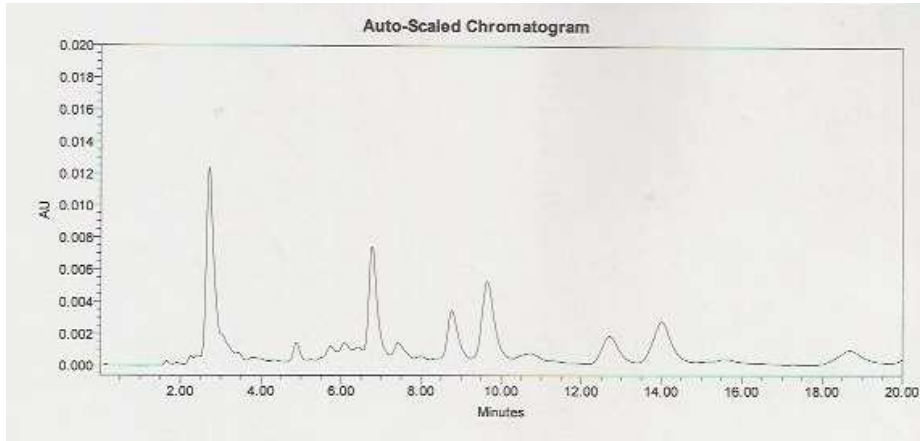
Detection : UV

Flow : rate & Mobile phase

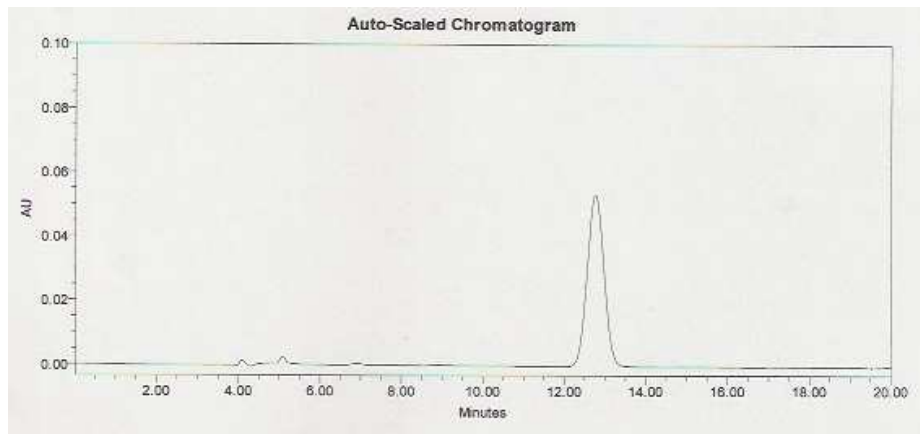
time (min)	flow rate (ml/min)	Mobile phase(A) 40% MeOH(3mM phosphoric acid)	Mobile phase(B) 80% MeOH(3mM phosphoric acid)
0	1.2	100	0
20	1.2	100	0
25	1.2	30	70
30	0.9	0	100
60	0.8	0	100

추출 분획물의 HPLC profile은 그림 5와 같다. 비교적 구별이 용이한 peak 중 회수되는 양이 극히 적은 것을 제외하고 회수된 peak 들의 DPPH 소거능을 확인하였으며(그림 6) 순차적으로 성분 구조를 확인코자 하여, 일차로 회수가 용이한 성분 에 대한 특성을 확인코자 하였

다.



(a)



(b)

그림 5. 정제 단계별 HPLC profile

(a) Crude Ethyl acetate 분획

(b) 단일 분획

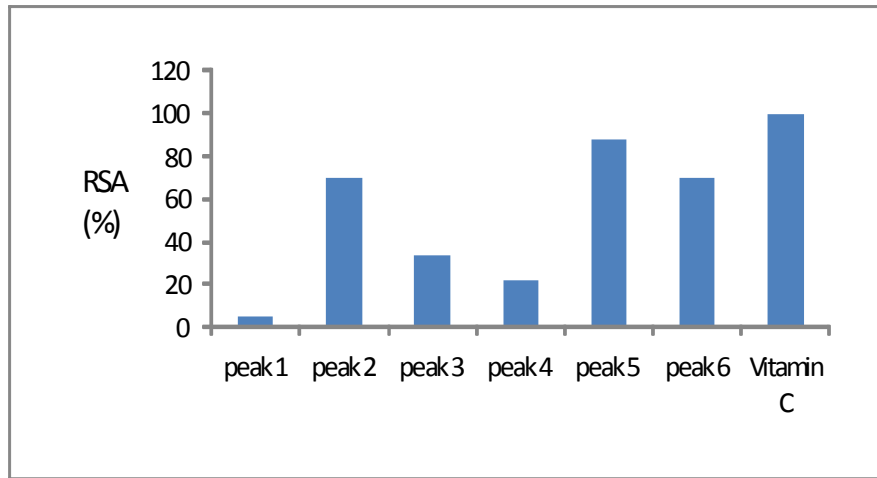


그림 6. 분획 Peak 의 항산화력 비교

2) 성분 분석

어성초의 다양한 생리활성 성분의 주성분은 Methylnonylketone, Myrcene, Auricaldehyde, Afzerin, Capric aldehyde, Capric acid, Quercitrin, Isoquercitrin, Decanoyl Acetaldehyde(특유의 고기 비린내 성분) 등이며, Afzelin · alpha-Pinene(+,-) · beta-Sitosterol · Borneol acetate · Chlorogenic acid · 1,8-Cineole · cis-N-(4-Hydroxystyryl)benzamide · cis-N-(4-Hydroxy-styryl)- benzamide · Decanoyl acetaldehyde · Dodecan-1-al · Geraniol · Hyperoside · Linalool · p-Cymene · Thymol · trans-N-(4-Hydroxystyryl)benzamide · trans-N-(4-Hydroxy-styryl)-benzamide · Undecan-2-one 등의 성분들이 보고되었다.

폴리페놀류는 유해산소를 제거하는 항산화 작용이 보고되므로서 건강식품 및 신의약품 창출의 새로운 대상으로 주목 받고 있다. 현대과학에서 산화적 스트레스는 염증질환, 동맥경화, 당뇨병, 발암, 심근경색, 뇌졸중, 노화 등 각종 질병발생의 주요 원인으로 제시되고 있어 이에 대한 잠재적 시장성은 무한하다고 하겠다.

본 연구에서 어성초 추출물의 기능성분에 대한 연구는 폴리페놀류를 위주로 진행하였으며, 성분확인 은 미미한 양의 신규 폴리페놀의 발견보다는 양적으로 다량 함유되어 있는 성분들을 대상으로하여 기존 폴리페놀 pool과 기기분석 reference를 적극 활용하여 진행하였다.

그림 4에 나타난 방법에 의해 최종 단계에서 분취용 HPLC에 의해 지표물질로 분석된 성분은 IR, NMR 및 MS spectrum 자료 등과 melting point 등을 바탕으로 지표 성분을 검색하였다. 성분분석에 사용한 기기는 아래와 같다.

* FT-IR

- 모델명 Nicolet is5 (Thermo Fisher Scientific)

* NMR

- 모델명 : Bruker DPX-500
- 시료 용해 용매 : DMSO

* LC-ESI-MS/MS 분석 조건

Instrument	Agilent 1260
Column	Inertsil ODS-3V, 5um, 4.8*250mm
Mobile phase	A: 0.5% Formic acid in Water B: 100% Acetonitrile
Gradient	A:95%-10% B:5%-90%
Detection ABS.	DAD 290nm/340nm
Flow rate	0.8ml/min
Injection vol.	20 μ l
Mass Scan	160-1200/(Negative mode)

앞에서 일차로 분리한 peak에 대하여 LC/MS 분석을 진행한 결과 그림 7과 같은 profile을 얻었으나 명확히 구별하기 어려워, 수회 분취용 컬럼을 이용하여 반복 분리한 성분에 대해 다시 IR, NMR을 진행하였고, 이들 spectrum 자료(그림 7-11) 등과 melting point 측정치(315 ℃) 등을 바탕으로 일차 분리 성분 I은 flavonoid의 일종으로 과일, 채소 등에 널리 존재하는 강력한 항산화 기능의 생리활성물질인 quercetin(그림 12)으로 판단되었다.

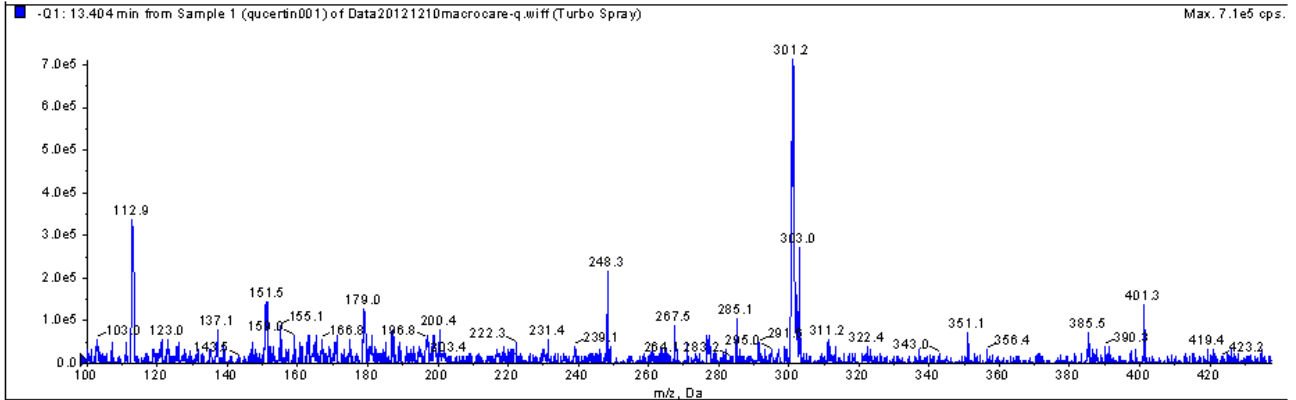


그림 7. 어성초 추출물 성분 I의 LC/MS data

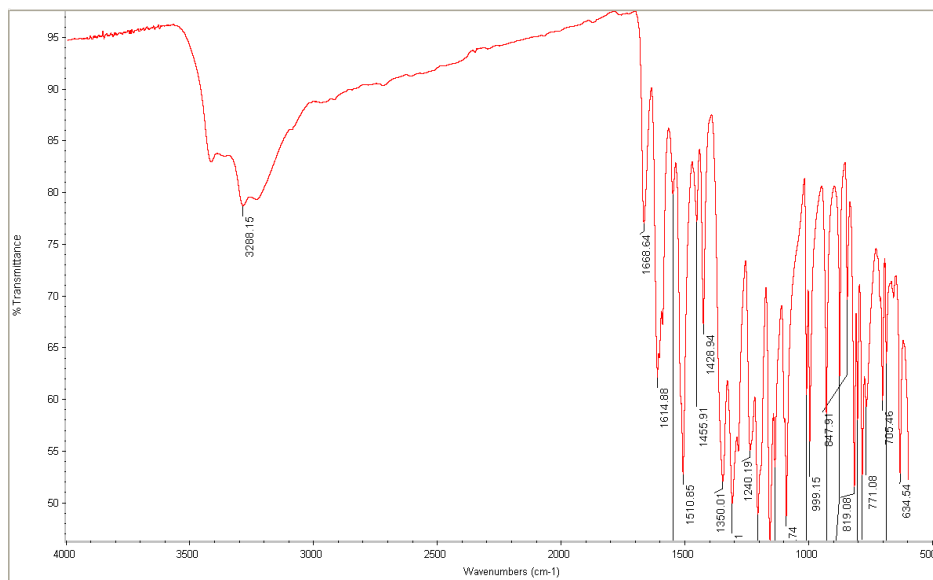


그림 8. 어성초 추출물 성분 I의 IR spectrum

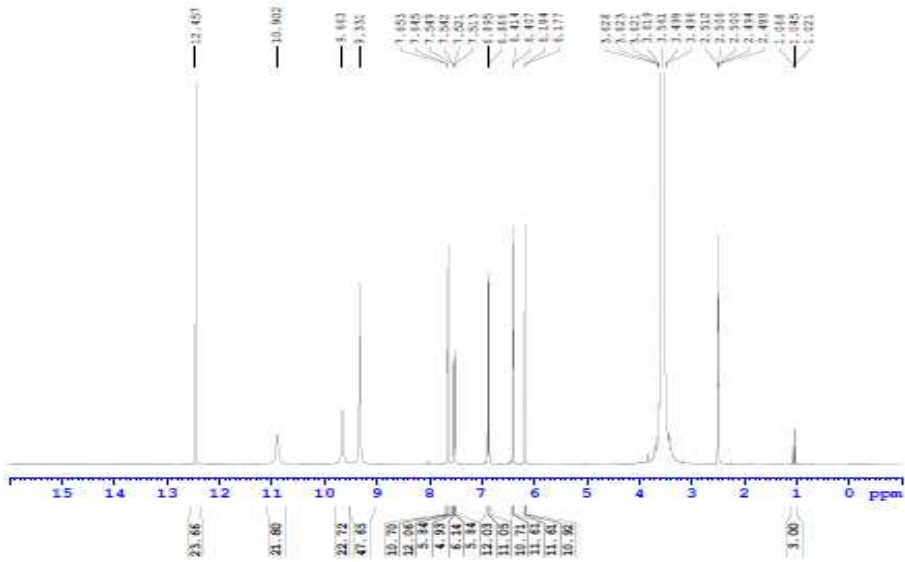


그림 9. 어성초 추출물 성분 I의 ¹H NMR

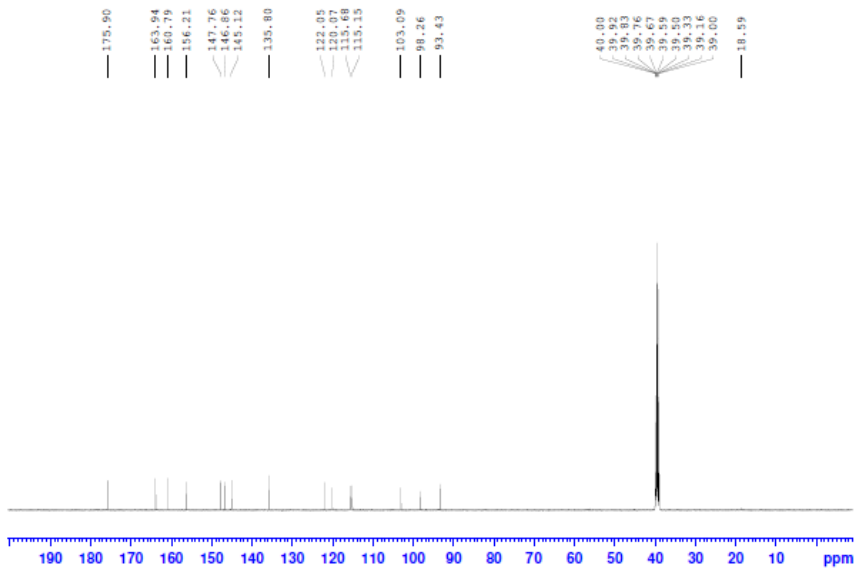


그림 10. 어성초 추출물 성분 I의 ¹³C NMR

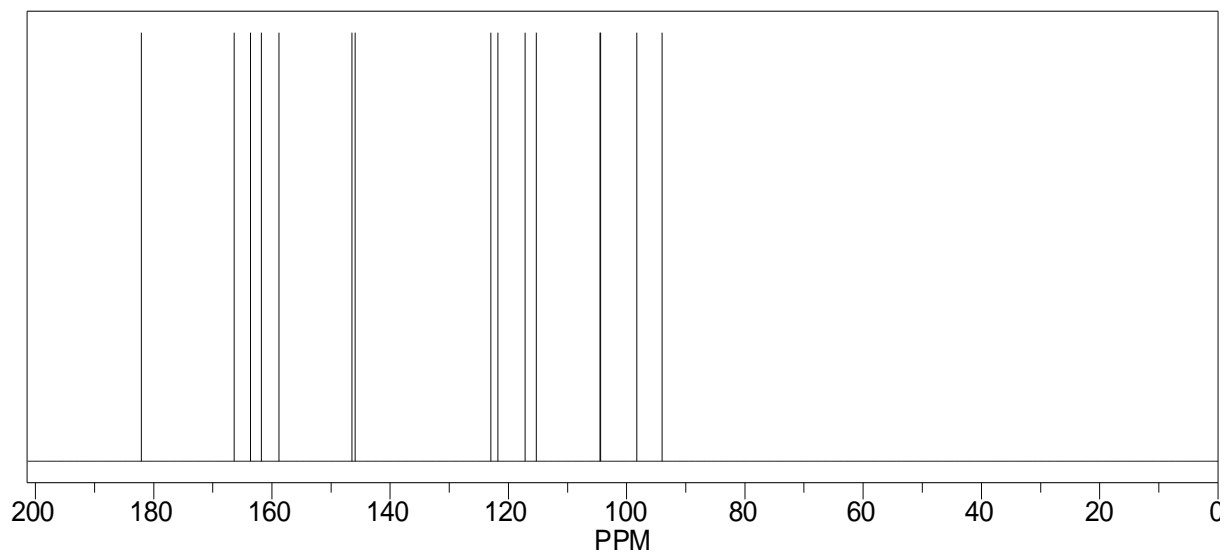


그림 11. Reference (Quercetin의 13C NMR)

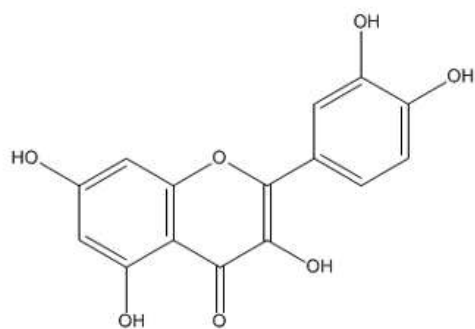


그림 12. Proposed compound, Quercetin

페놀성 화합물의 항산화 기능이나 생체 기능은 단독 성분뿐 아니라 서로의 조합에 의해 기능이 향상될 수 있다. 어성초에서 분리된 성분 I인 quercetin은 그 자체의 형태 또는 유도체의 형태로 존재하기도 하며, 당(sugar) 성분의 결합 위치, 당 성분의 종류 등에 따라 quercetin 이외에도 quercitrin, hyperoside, rutin 등의 형태로 존재할 수 있다. 또 이외에도 다양한 phenol 성 화합물이 포함되어 있는 바, 실제 효능은 복합적인 성분들의 작용에 의한 것으로 추정할 수 있어 타 성분의 규명도 진행하였다.

분리된 분획성분 I 이외에 다른 분획 성분도 분리하면서 성분을 확인코자 하였다. 용매 분획으로 얻어진 성분들 중 분획 II에 대하여 기기분석을 진행한 결과 아래 그림 13의 LC/MS 자료를 얻었으며, 그림 14와 같은 ¹³C NMR 자료를 확인하였다. Reference pool을 이용하여 추정하는 바로는 quercetin aglycone의 3번 위치에 rhamnose가 결합된 glycoside 형태로서 역시 강력한 항산화 기능 및 생리활성을 나타내는 성분으로 알려져 있다.

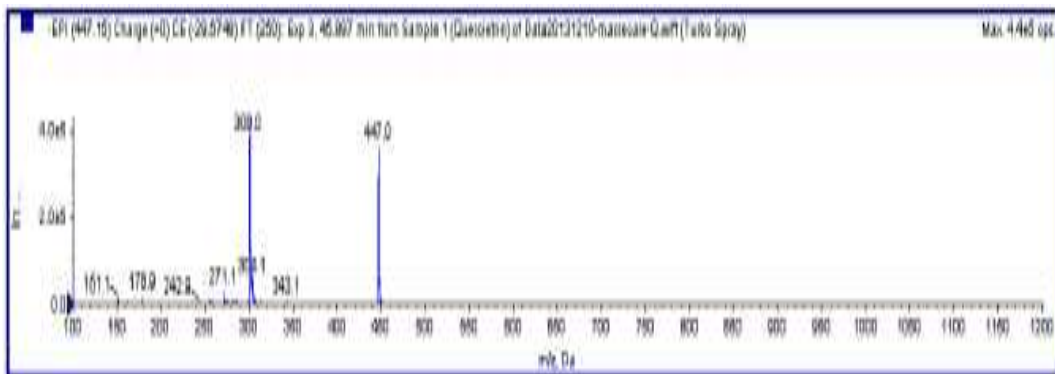


그림 13. 어성초 추출물 성분 II의 LC/MS data

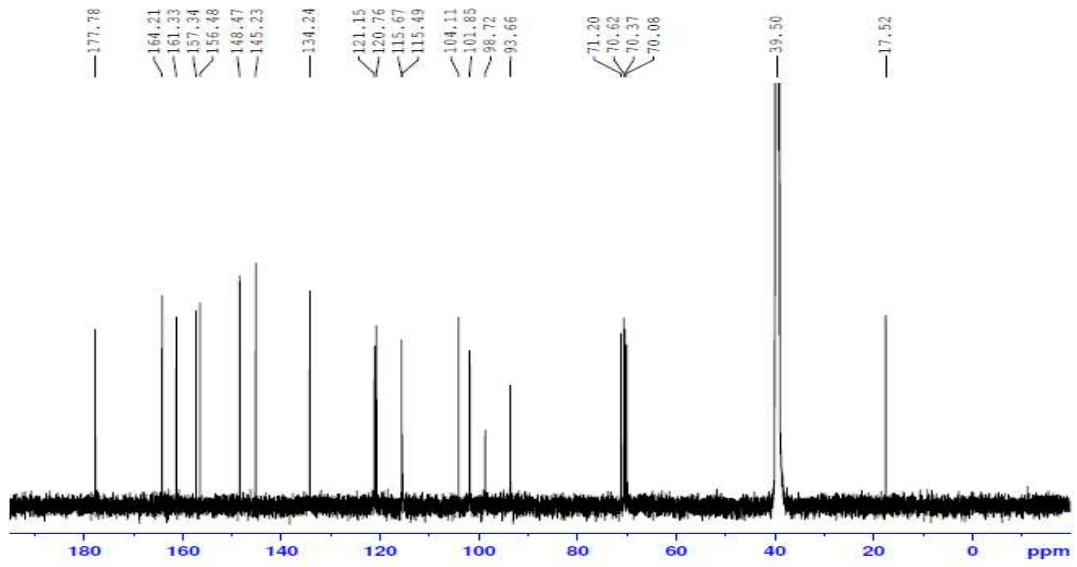


그림 14 어성초 추출물 성분 II의 ^{13}C NMR

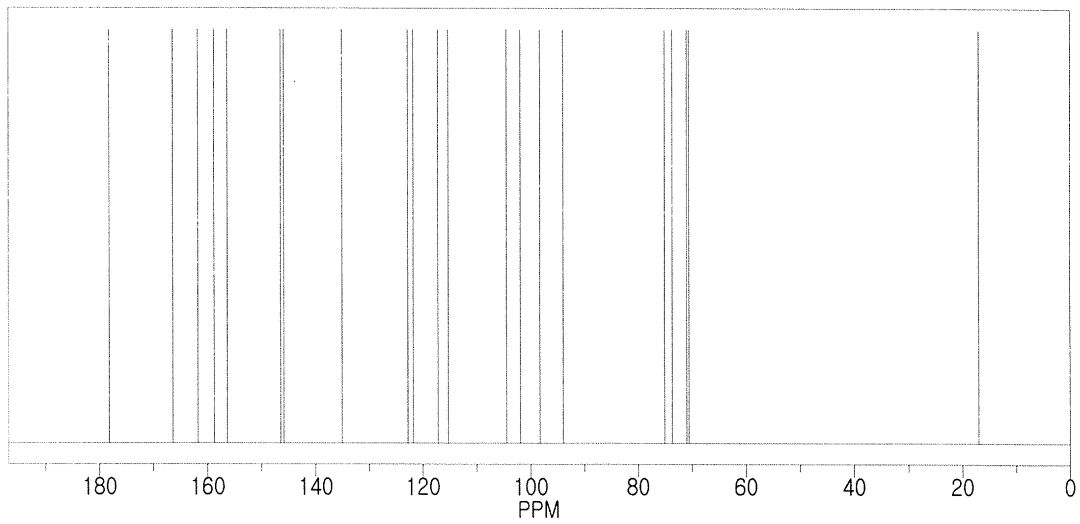


그림 15 Reference (Quercitrin의 ^{13}C NMR)

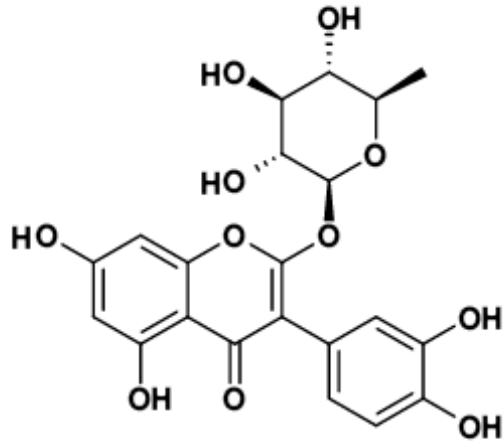


그림 16. Proposed compound, Quercitrin

상기 분석에 의해 확인된 quercetin, quercitrin 이외에 또한 성분으로서 분획을 분석한 결과, 그림 17과 같은 LC/MS profile 및 그림 18과 같은 ¹³C NMR spectrum을 얻었으며, 확인 결과 3,4-Dihydroxy cinnamic acid(caffeic acid) 인 것으로 추정하였다. Caffeic acid 는 식물에서 lignin의 intermediate로 알려져 있으며, 항산화 기능, 면역촉진 기능 및 항염증 기능 등이 연구되었다.

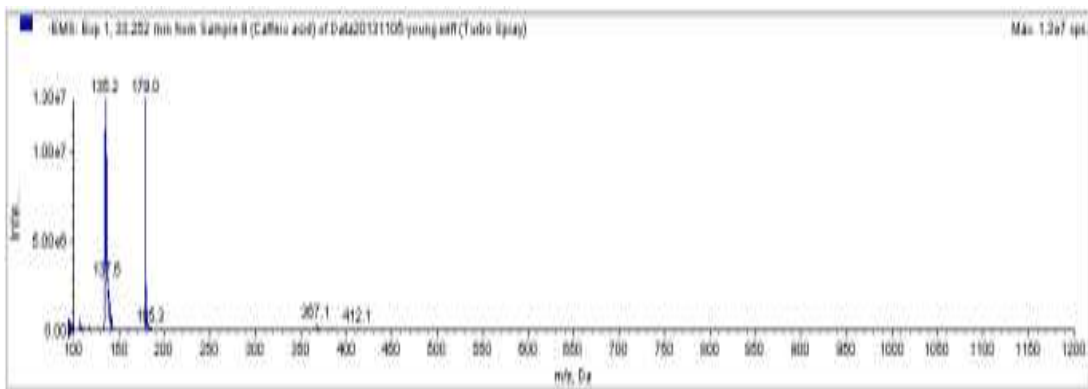


그림 17. 어성초 추출물 성분 III의 LC/MS data

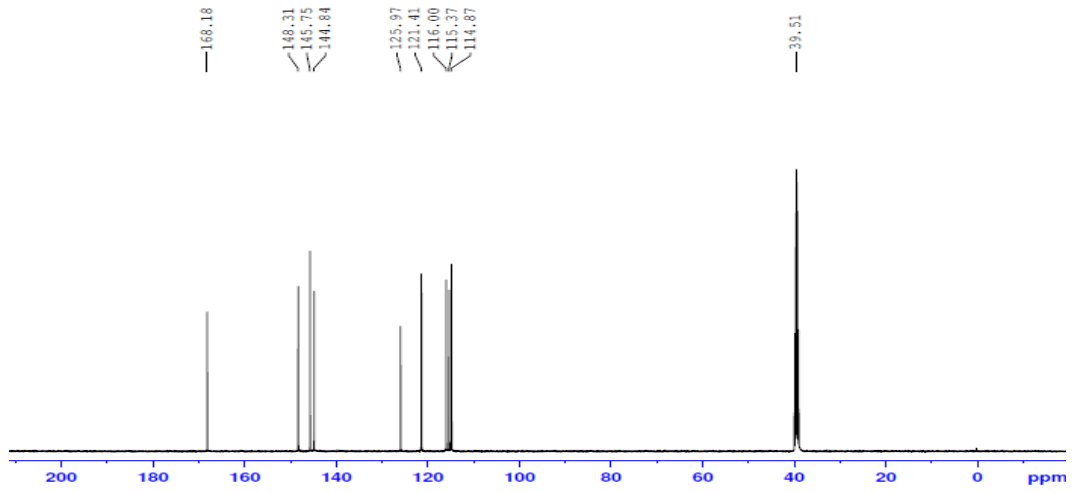


그림 18 어성초 추출물 성분 III의 ^{13}C NMR

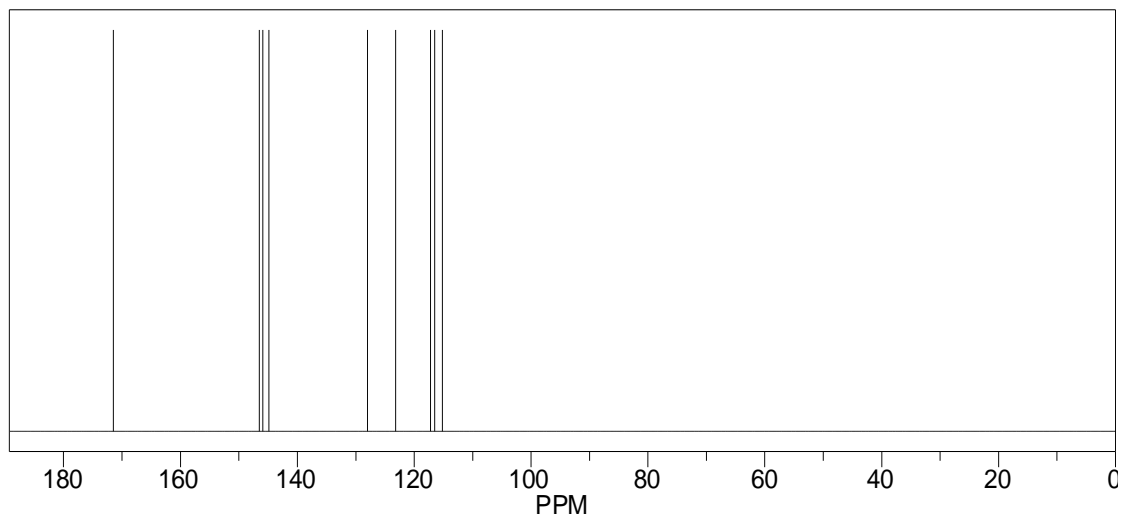


그림 19 Reference (Caffeic acid의 ^{13}C NMR)

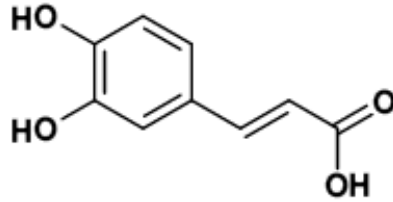


그림 20. Proposed compound, Caffeic acid

다. 어성초 추출물의 효능 및 안전성

1. 어성초 추출물 세포독성 및 항염증 활성 스크린

1. 추출물의 세포내 독성검사 및 간세포 손상 및 항산화 억제능 검색

(시료: 주관기관에서 제공한 어성초 에틸아세테이트 추출물을 사용하였다.)

○ 어성초 추출물의 세포생존을 조사

▶ 세포에 어성초 추출물을 농도별로 처리하고 세포생존력의 정량적 측정인 Cell viability test (Promega kit)와 염증반응 조사로는 NO assay를 수행하였다. Cell viability test는 활성을 가지는 세포의 수를 확인하는 방법으로 어성초 추출물에 의한 세포내 독성 유무를 측정할 수 있다. 측정결과 어성초 추출물을 처리한 세포군에서 독성을 보이는 추출물도 있었으며, 독성을 보이는 추출물을 제외하고 독성이 없는 추출물들만을 NO assay를 수행하였다. 세포를 배양한 후, 세포 배양액에 LPS와 농도별 어성초 추출물을 가하여 48시간 배양하였다. 그 후 일정량의 cell supernatant를 취하여 Griess assay를 수행하였다.

▶ NO assay는 NO의 농도를 측정함으로써 대조군에 비하여 어성초 추출물을 처리 한 세포

군에서 NO 농도가 낮아짐을 알 수 있다. 이는 어성초 추출물이 LPS에 의해 유도되는 염증반응을 억제하여 NO의 농도가 낮아졌음을 의미한다.

▶ LPS로 자극된 HepG2세포에서 LPS 및 어성초 에틸아세테이트로 순획 추출한 추출물이 세포 생존에 미치는 영향을 확인 하였다. Cell viability 측정 결과 LPS 및 어성초 추출물을 단독으로 또는 같이 처리한 모든 실험군에서 대조군에 비하여 세포 생존율이 변하지 않음을 확인 하였다 (그림 21).

▶ 이는 염증 유도 물질인 LPS와 간기능 강화 물질인 어성초 추출물이 세포 생존에는 영향을 주지 않음을 나타낸다.

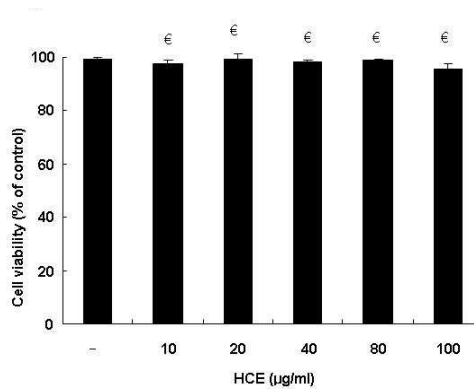


그림 21. LPS로 자극된 HepG2세포에서 어성초 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향

▶ 어성초로부터 에틸아세테이트로 분획 추출한 추출물은 세포 생존에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

○ 간세포에 어성초 추출물 처리 후 LPS에 의해 유도되는 Nitric oxide 농도 의존적인 저해

▶ 어성초 추출물 투여 후 Nitric oxide 변화를 확인하였다. Nitric oxide 분석은 LPS로 간세포를 활성화 시켜 어성초 추출물을 농도별로 각각 처리 하였다. ELISA에 의해 Nitric oxide 농도를 측정하여 LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 Nitric oxide가 거의 없음을 확인할 수 있었으며 (그림 22. lane 1),

▶ LPS를 처리한 실험군에서는 Nitric oxide가 뚜렷하게 증가하였다 (그림 22. lane 2), 어성초

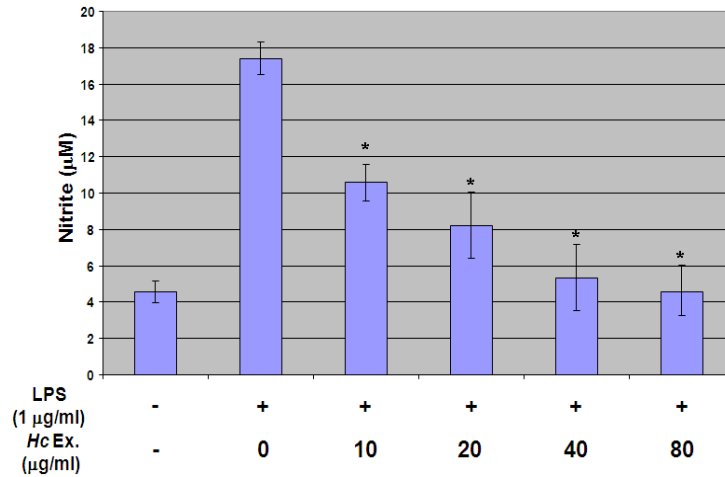


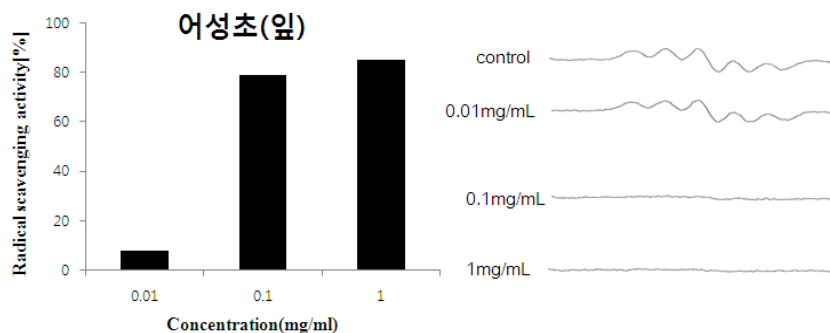
그림 22. 어성초 에틸아세테이트 추출물의 LPS로 활성화된 간세포에서 아질산염 (NO)의 생산 저해 효능

추출물 처리 후 농도 의존적으로 감소하는 양상을 확인하였다 (그림 22. lane 3, 10 uM 어성초 에틸아세테이트 추출물; lane 4, 20 uM 어성초 에틸아세테이트 추출물; lane 5, 40 uM 에틸아세테이트 어성초 추출물; lane 6, 80 uM 어성초 에틸아세테이트추출물) (그림 22).

▶ 어성초로부터 에틸아세테이트로 순회 추출은 LPS 의해 유도된 농도 의존적으로 Nitrite를 억제하는 효과가 있어 항염증 억제작용이 있음을 밝혔다.

2. ESR 분석을 통한 어성초 추출물의 항산화 활성분석

▶ 어성초로부터 추출한 잎과 뿌리에서 DPPH 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성을 분석한 결과 잎에서 항산화 활성이 높았음을 알 수 있었다 (그림. 23). 그림 23의 right panel은 DPPH 라디칼의 소거능을 ESR signal로 나타낸 것이다.



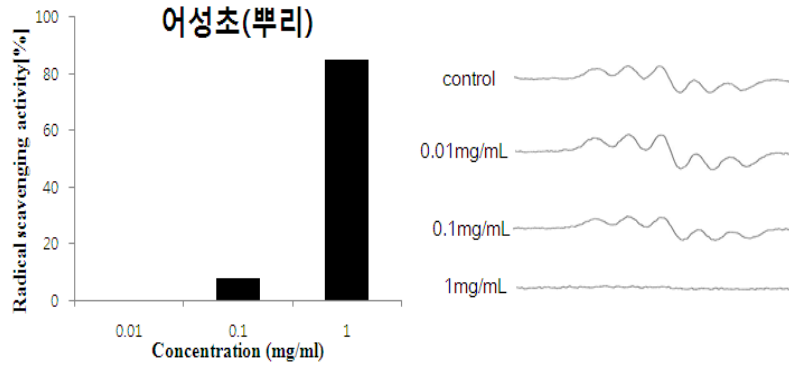


그림 23. 어성초 잎과 뿌리의 ESR에 의한 DPPH 라디칼 소거능 측정

▶ 에탄올 추출물에 용매의 극성에 따라서 클로로포름, 에틸아세테이트, 클로라이드 및 헥산을 순차적으로 얻은 각 분획물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 그림 24. 는 클로라이드와 헥산 DPPH 라디칼 소거능 측정한 결과이며, 클로라이드가 헥산 보다는 항산화 효과가 높았음을 알 수 있었다. 그림24.의 right panel은 DPPH 라디칼 의 소거능을 ESR signal로 나타낸 것이다.

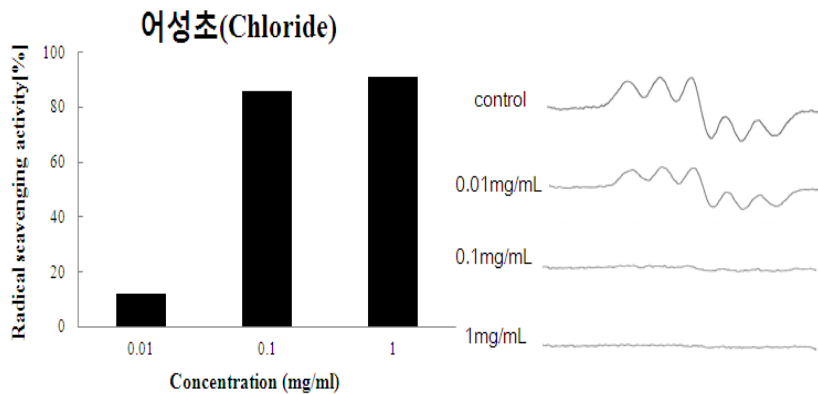
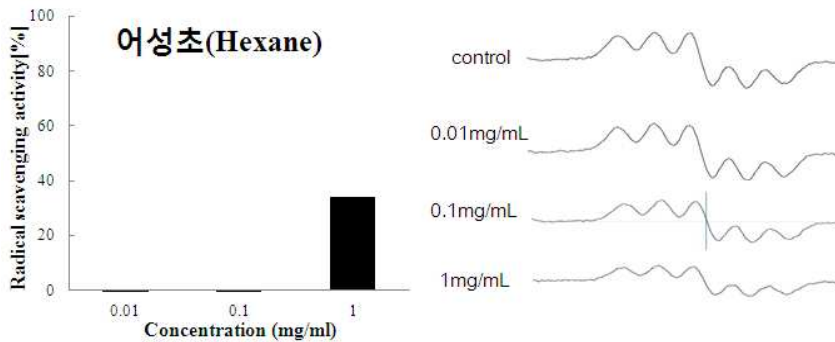


그림 24. 어성초 Hexan과 Chrolide 순획 추출물의 ESR에 의한 DPPH 라디칼 소거능 측정

▶ 그림 26의 결과에서와 같이 어성초로부터 에틸아세테이트로 순획 추출물은 농도의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가함을 나타내었으며 그 중 100 ug/ml이 가장 높은 활성을 보였다. 그 IC₅₀ 값은 48.1 ug/ml로 판명되었다. 그림 26B는 DPPH 라디칼 소거능을 ESR signal로 나타낸 것으로 농도의존적으로 DPPH 라디칼이 감소하는 것으로 나타났다.

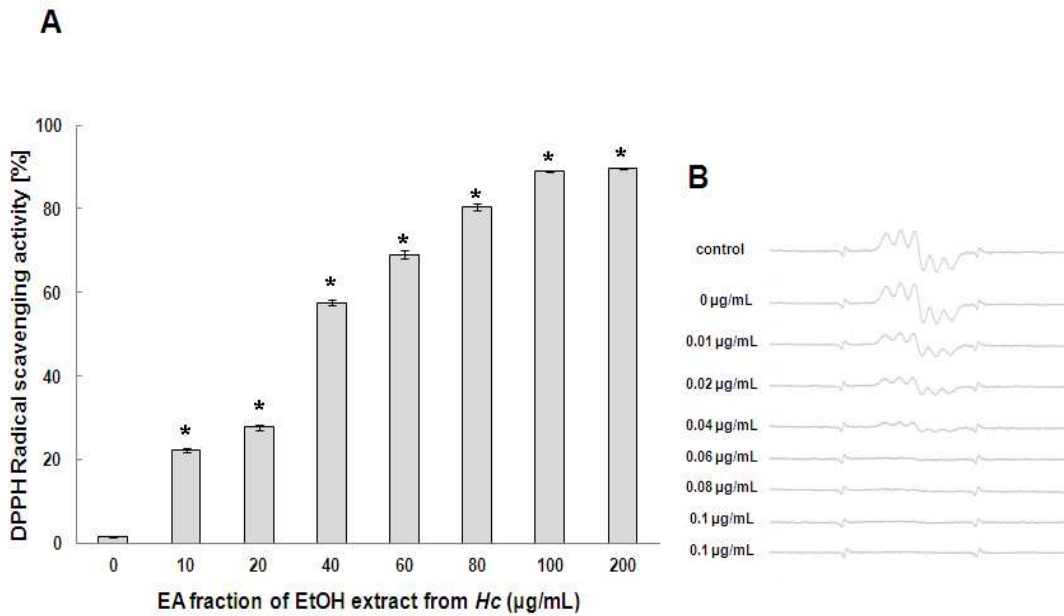


그림 26. 어성초로부터 에틸아세테이트로 순획 추출물의 ESR에 의한 DPPH 라디칼 소거능 측정

▶ 어성초 부위별 항산화 효과는 잎에서 항산화 효과가 가장 높았으며, 용매의 극성에 의한 에틸아세테이트로 추출한 순획 추출물이 항산화 효과가 가장 높았다.

3. 항염증 활성을 갖는 어성초 추출물의 항산화 기전 규명(*in vitro*)

1. 추출물 처리 전·후 세포사 및 염증 관련유전자 단백질의 발현양상 분석

○ 간세포에 어성초 추출물 처리 후 LPS에 의해 유도되는 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 단백질 발현의 농도 의존적인 저해

▶ 어성초 추출물 투여 후 iNOS 단백질 발현양상 변화를 확인하였다. iNOS 단백질 발현분석은 LPS로 간세포를 활성화 시켜 iNOS 단백질 발현 시킨 후, 어성초 추출물을 농도별로 각각 처리 하였다. 면역분석 (immunoblot)을 통하여 iNOS 단백질이 LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 발현량이 거의 없음을 확인할 수 있었으며 (그림 27. lane 1),

▶ LPS를 처리한 실험군에서는 iNOS 단백질의 발현이 뚜렷하게 증가하였다 (그림 27. lane 2), 어성초 추출물 처리 후 농도 의존적으로 감소하는 발현변화 양상을 확인하였다 (그림 27. lane 3, 20 uM 어성초 추출물; lane 4, 40 uM 어성초 추출물; lane 5, 80 uM 어성초 추출물). 단백질 정량분석의 대조군으로 beta-actin를 사용하였다 (그림 27).

▶ 염증생성에 관여하는 효소인 COX-1/COX-2(cyclooxygenase type 2)의 단백질의 발현양상의 변화를 알아보기 위하여, 본 연구에서는 BV2 cell에 LPS 및 어성초로부터 에틸아세테이트 추출물을 농도별로 처리하고 시간별로 배양하였다. 18시간 후 단백질을 동정하여 Western blot 을 시행하여 COX-1/COX-2 단백질의 발현 양상을 확인 하였다. LPS만 처리한 군에서의 발현 양은 대조군에 비해 증가 된 것을 확인하였고, 어성초로부터 에틸아세테이트 추출물을 농도 별로 처리한 발현양은 LPS만 처리한 군에 비하여 농도 의존적으로 COX-1 단백질의 발현양을 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 27, middle panel).

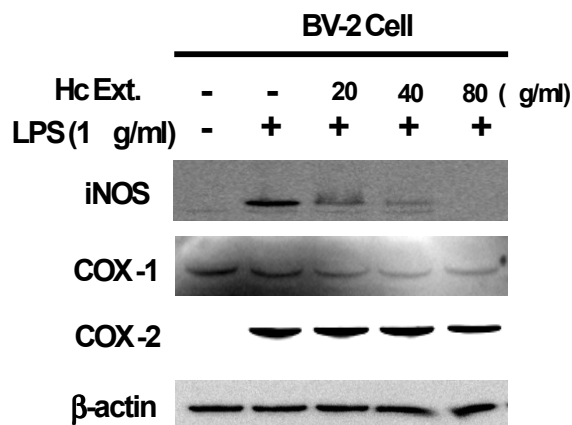


그림 27. 어성초 에틸아세테이트 추출물에 의한 iNOS, COX-1 및 COX-2 단백질의 발현양상

▶ 어성초로 부터 순획 추출은 LPS 의해 유도된 염증을 억제하는 효과가 있었고, 항산화 효과로 인한 항염 작용, 특히 iNOS와 COX-1 억제 하였다

4. 항염증 활성을 갖는 어성초 추출물의 항염증 기전 규명(*in vitro*)

○ 염증성 cytokine 측정

▶ 어성초 에틸아세테이트 소재가 염증성 cytokine을 억제하는 지를 확인하기 위하여 대표적 염증성 cytokine인 IL-6를 kit를 사용하여 측정하였다. 이는 어성초 에틸아세테이트 소재가 IL-6 농도에 미치는 영향을 확인한 것이다. 그림 8에서 보는 바와 같이 염증성 cytokine인 IL-6 농도를 LPS 처리 후에 측정한 결과 LPS 처리군에서는 IL-6 가 현저히 증가되었으나 상대적으로 어성초 에틸아세테이트 소재 투여 군에서 감소하였음을 알 수 있다. 따라서 어성초 에틸아세테이트 소재가 염증성 cytokine인 IL-6를 농도의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다. (그림 28).

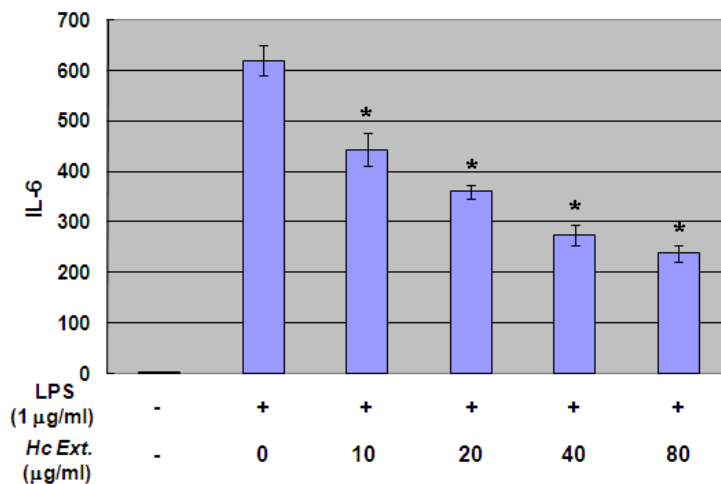


그림 28. 염증성 cytokine인 IL-6의 측정

▶ 종합적으로 볼 때 어성초 에틸아세테이트 소재는 항산화, 항염증에 효과가 있음을 본연구 개발의 여러 실험방법에 의해 증명되었다. 염증반응을 억제함에 있어서는 Quercitrin 함유한 에틸아세테이트 분획추출물이 효과를 나타내었음을 알 수 있었다 (“나” 단락 “어성초 추출물의 성분분석” 참조).

5. 동물모델을 이용한 어성초 추출물 의 간기능 개선 효능 검증 (화학물질에 의한 간손상 개선)

1. 동물모델에서 추출물의 효능분석

○ 급성 및 만성 간 독성을 일으키는 물질에 대한 어성초 추출물의 간보호 효과

▶ 본 실험에서는 급성과 만성 그룹에 각 3주령 마우스 25마리를 사용하였으며, 총 5군으로 군 당 5마리를 사용하였다. 어성초 추출물 crude와 순획 분리한 에틸 아세테이트 각각 200 mg/kg을 사용하였으며, 사염화탄소(CCl₄)는 10 mg/kg을 사용하였고, Corn oil은 음성대조군, 실리마린은 양성대조군으로 사용하였다 [표 3]

○ 화학물질들에 의한 급성 및 만성 간손상 유발

▶ 실험용 마우스(3주령, male)가 동물실험실에 입고된 후 일주일간 안정화 시켰다. 안정화된 쥐들에게 급성 간 손상을 유발하기 위하여 총 5일동안 화학물질을 투여하였는데, 어성초 Crude와 에틸 아세테이트 순획 추출물은 200 mg/kg으로, DMSO(Dimethyl Sulfoxide)를 이용하여 녹여 3일 동안은 위와 같이 준비되어진 어성초 crude와 E.A만을 복강을 통해 직접적으로 주입하였으며, 이 기간동안 CCl₄군에는 DMSO, 실리마린 군에는 DMSO에 녹인 실리마린만을 투여하였으며, 이 후 마지막 이틀은 음성대조군은 corn oil만을 투여하였고, 나머지 네 군에 대해서는 10% CCl₄를 복강 투여 하고 6시간 후에 처음 3일동안 했던 것과 마찬가지로 각 군에 대한 실리마린과 어성초 추출물을 복강 투여하였다.

▶ 한편 만성 그룹은 간 손상 유발을 위한 화학물질 투여 기간을 7주로 계획하였으며, 급성 그룹과 마찬가지로 안정화 기간을 거치게 하였다. 1주차 기간 동안 실리마린, 어성초 crude, 어성초 에틸아세테이트 순획 추출물을 DMSO에 용해시켜 경구를 통해 투여하였고, 사염화탄소군은 DMSO만을 경구 투여 하였다. 2주~7주차 기간동안은 1% CCl₄를 경구 투여한 후, 6시간이 지난 후에 실리마린, 어성초 추출물을 경구 투여 하였다. 급성 간 손상 유발 그룹과 마찬가지로 음성대조군은 corn oil 만을 경구 투여 하였다. 위와 같은 과정을 통해 급성, 및 만성 간 손상을 유발시켰으며 간과 혈액을 적출하기 전 날 저녁 9시부터 절식을 하고 18시간 후에 실험용 쥐들의 간을 적출하였다.

【표3】

급성	군	control	ccl4	ccl4+실리마린	ccl4 +어성초 crude	ccl4 +어성초 E.A.
	시약조성	corn oil	10% ccl4 in corn oil	10% ccl4 in corn oil	10% ccl4 in corn oil	10% ccl4 in corn oil
				silymarin	어성초 crude	어성초 E.A
만성	군	control	ccl4	ccl4+silymarin	ccl4 +어성초 crude	ccl4 +어성초 E.A
	시약조성	corn oil	1% CCl4 in corn oil	1% CCl4 in corn oil	1% CCl4 in corn oil	1% CCl4 in corn oil
				silymarin	어성초 crude	어성초 E.A

○ 마우스 간 채취

▶ 사염화탄소의 투여로 인해 급성 간 손상이 유발된 쥐들에게서 간과 혈액을 채취하였다. 먼저 케타민 100 μ l을 이용하여 마취시켰으며 마취가 완전히 된 상태에서 쥐들의 몸무게를 측정하고 개복하여 심장에서 혈액을 채취하였다 (1 ml syringe로 혈액을 채취하여 E.P tube로 옮긴 후 4 $^{\circ}$ C에서 1,600g, 15분간 원심분리하여 상층액만을 따로 새로운 에펜도우프 tube로 옮겨 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다). 다음으로 O2가 용해되어 있는 PBS를 간 아래 쪽에 위치한 간 문맥을 통해 간 내의 혈관으로 주입하여 간에 남아있는 혈액을 모두 제거하고 적출하였다. 적출한 간은 그 무게를 측정 후 사진을 촬영하였다. 이후 실험을 위해 적출한 간을 3등분하였다. (Immuno Histo Chemistry-IHC용, RNA용 및 Immunoblot용). IHC용 간은 포르말린 (Formalin solution neutral 버퍼 10%, SIGMA) 4 $^{\circ}$ C에 냉장보관 하였다. 냉장보관 다음날, 15ml tube에 포르말린 5ml을 넣고 간 1개당 1tube로 옮긴다. Real-Time PCR에 이용될 간은 미리 준비된 RNAlater (QIAGEN, Mat No. 1018087)에 넣어 RNA가 분해되지 않도록 하였으며, 4 $^{\circ}$ C 냉장보관 하여 실험에 사용되기 전까지는 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다. Immunoblot용 검체는 에펜도우프 튜브에 넣어서 바로 액체질소에 넣어 얼린 후, 검체보관함에 넣어 냉동고 (-70 $^{\circ}$ C) 보관한다.



그림 29. 동물모델에 사용된 마우스 간 적출 및 혈액채취

○ 혈액 내 알라닌 아미노트랜스퍼라제(Alanine aminotransferase; ALT) 활성도 측정

▶ ALT는 GPT(Glutamate Pyruvate Transaminase)라고도 하는데 AST와 마찬가지로 생체중의 Amino acid와 Keto acid간에 Amino기를 전이시키는 것을 촉매하는 효소이다. 생체내에서는 TCA cycle에 있어서 대사산물과 Amino Acid사이에서 Amino기 전이를 조절하며, 간과 신장에 많이 존재한다. ALT의 기질은 Alanine, 알파-ketoglutaric acid로 ALT수치는 심근경색, 간질환(급성간염, 만성간염, 간경변, 간암)등의 질병을 가질 때 약간 상승하는 경향이 있다. 한편 ALT와 동시에 혈액 내 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(Aspartate Aminotransferase; AST) 활성도 역시 측정하였다. AST는 GOT(Glutamate Oxalacetate Transaminase)라고도 하며, 심근과 간에 많이 존재한다. AST의 기질은 Aspartic Acid, α-ketoglutaric acid로 AST수치가 상승했다는 것은, 심근경색(발병 4~6시간 사이에 증가하기 시작하며 24~36시간 사이에 최고도), 간질환(급성간염, 만성간염, 간경변, 간암)등의 질병이 있다고 판단할 수 있다. AST와 비교해서는 심근질환과 관련하여 진단을 할 때에 AST가 ALT에 비하여 감수성이 높으며, 간질환에 있어서는 AST보다는 ALT가 감수성이 높다. ALT와 AST모두 Biovision사의 ALT, AST assay kit를 이용하였으며 ALT, AST 모두 혈청 2ul을 실험에 이용한 결과는 다음과 같다.

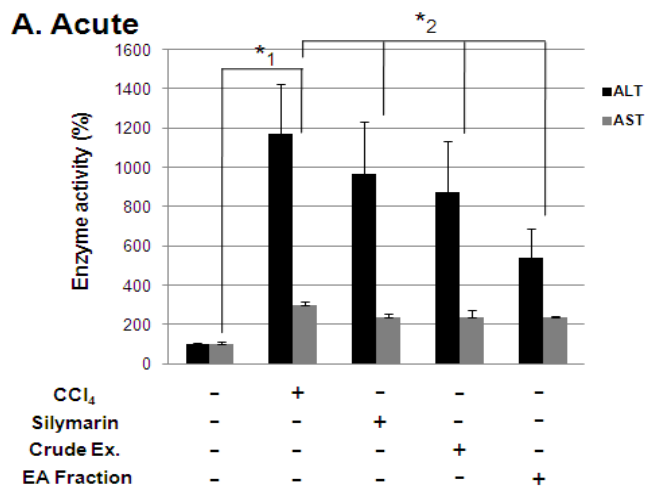
○ 어성초 소재의 사염화탄소로 유도한 마우스 간 독성 개선 효과 (동물모델)

▶ 어성초 소재 시료는 사염화탄소 독성으로 인한 간 손상을 완화시킬 수 있을 것으로 사료되고, 사염화탄소에 의해 유도되는 지질과산화물 생성을 완화시켜 간 손상을 억제하였다. 정상군과 CCl₄ 투여 대조군, CCl₄ 투여 silymarin군, CCl₄ 투여 어성초 소재-crude군 및 어성초 소재 E.A군 사이의 체중, 식이섭취량, 간 무게는 상대적으로 화학물질 투여 기간이 짧았던 급성 그룹에서는 각 군의 평균 몸무게는 특이사항이 없지만 간의 무게를 비교하여 보았을 때, CCl₄ 군에서 간의 무게가 가장 많이 나가는 것으로 보아 음성대조군에 비하여 보았을 때, 간의 특이적인 변화가 있었다고 판단할 수 있으며, 상대적으로 오랜 기간동안 실험 기간을 계획했던 만성그룹은 7주 동안 실험동물에게 지급하였던 사료에 대한 각 개체들의 사료 섭취량 등의 차이에서 기인한 평균 몸무게의 차이가 나타나고 있지만 간의 무게는 음성대조군 또는 양성대조군과 비교하여 보았을 때 사염화탄소 군에서 가장 많이 나감으로써 이 또한 급성 그룹과 마찬가지로 간에 특이적인 변화가 있었다고 판단할 수 있으며, 이는 이제까지 실험한 결과와 비교하여 보았을 때, 급성 또는 만성적인 간 손상은 간의 무게를 증가시킨다고 결론을 내릴 수 있다. 하지만 양성대조군과 어성초 투여군에서는 CCl₄를 투여하고 있음에도 불구하고 간의 평균 무게가 감소한 것으로 보아 급성과 만성 모두 간 손상정도가 완화되었음을 알 수 있었다.

2) 혈액 분석

▶ 사염화탄소 투여군의 혈장 ALT 및 AST 활성은 정상대조군에 비해 유의적으로 높게 나타나 사염화탄소 투여에 의한 간 손상이 일어난 것으로 나타났다. 급성군에서 양성대조군의 혈장 ALT 및 AST 활성은 각각 967.4 ± 267.5 IU/L, 237.0 ± 18.6 IU/L로 사염화탄소군 (1170.7 ± 256.7 IU/L, 297.7 ± 21.4 IU/L)에 비해 유의적으로 감소하였다. 어성초-crude군의 혈장 ALT 및 AST 활성은 각각 873.3 ± 260.3 IU/L, 237.0 ± 36.5 IU/L로 사염화탄소에 비해 유의적으로 감소하였다. 어성초 E.A군의 혈장 ALT 및 AST 활성은 539.1 ± 152.3 IU/L, 238.7 ± 36.5 IU/L로 나타나 사염화탄소군과 비교하여 보았을 때 현격하게 감소하였다 (그림 22). 만성군에서 양성대조군의 혈장 AST 및 ALT 활성은 각각 354.2 ± 56.9 IU/L, 337.7 ± 37.5 IU/L로 사염화탄소 군 (378.0 ± 30.3 IU/L, 435.5 ± 22.3 IU/L)에 비해 유의적으로 감소하였다. C어성초 E.A군의 혈장 AST 및 ALT 활성은 각각 228.3 ± 55.9 IU/L, 271.0 ± 95.4 IU/L로 이 역시 사염화탄소군과 비교하였을 때 현격하게 감소하였다.

▶ 한편, 사염화탄소 투여군의 혈장내 ALP는 정상대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 (그림 30). 급성그룹에서의 양성대조군 및 어성초 crude군의 혈장 ALP는 각각 9.38 ± 0.32 mg/dL, 7.24 ± 0.06 mg/dL로 사염화탄소군 (10.10 ± 0.07 mg/dL)에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, 어성초 E.A군의 경우 혈장 ALP는 8.97 ± 0.38 mg/dL 로 측정되었고 만성그룹에서의 양성대조군 및 어성초 crude군의 혈장 ALP는 각각 8.01 ± 0.09 mg/dL, 8.06 ± 0.12 mg/dL 였으며 어성초 E.A군의 경우에도 혈장 ALP는 8.16 ± 0.19 mg/dL 로 사염화탄소 (9.94 ± 0.03 mg/dL)에 비해 급성과 마찬가지로 유의적으로 낮게 나타났다. 따라서 어성초 추출물 소재의 섭취는 혈장내의 AST, ALT, ALP 활성도는 사염화탄소군에 비해 유의적으로 감소시켰으며, 어성초 추출물 소재의 섭취는 독성으로 인한 간 손상을 완화시킬 수있을 것으로 사료된다.



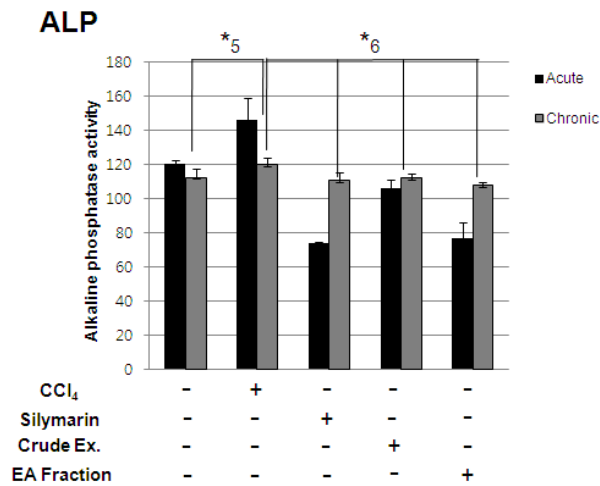
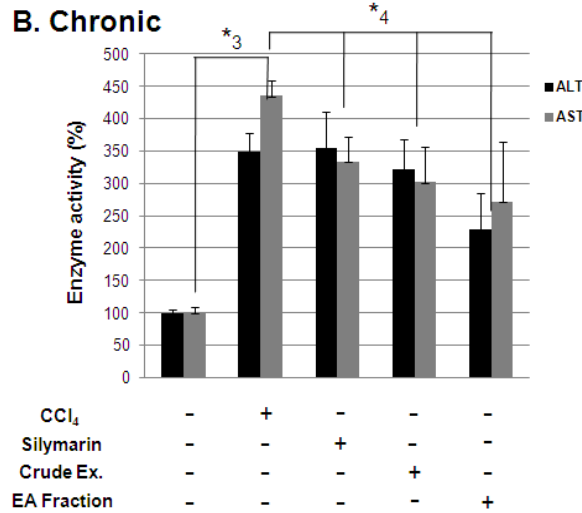


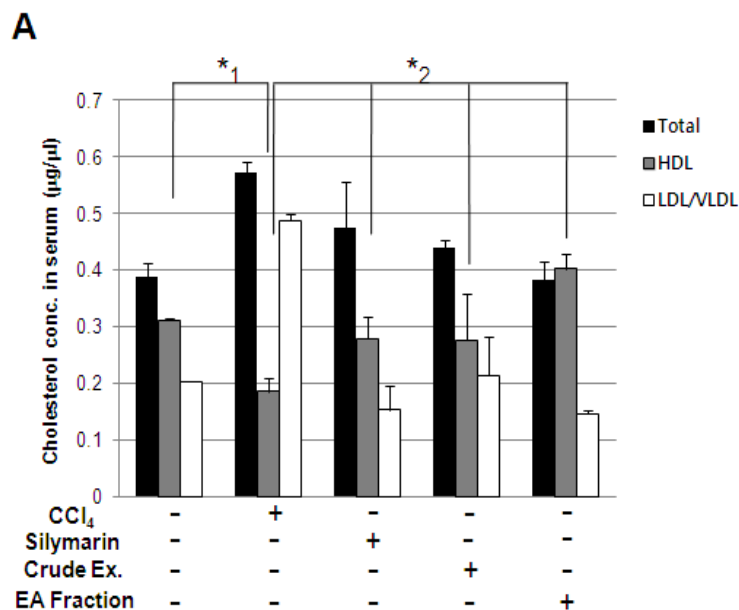
그림 30. 급성 간 독성을 일으키는 물질에 대한 혈액내 알라닌 아미노트랜스퍼라제(Alanine aminotransferase; ALT)와 알라닌 아스팔테이트 아미노트랜스퍼라제(Aspartate aminotransferase; AST) 활성도와 알칼리성포스파타아제(alkaline phosphatase; ALP)의 활성도 측정

▶ 급성 간 독성을 일으키는 물질에 대하여 혈액 내에 존재하는 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (Alanine aminotransferase; ALT)와 아스팔테이트 아미노트랜스퍼라제(Aspartate aminotransferase; AST), 그리고 알칼리성 포스파타아제(alkaline phosphatase)의 활성도를 측정하였다 (그림 30). 급성과 만성 군에서 사염화탄소를 처리한 군은 control군에 대하여AST와 ALT의 활성도가 현저히 높아짐이 확인 되었으며 이를 통해 사염화탄소로 인한 급성 간 손상이 유발되었다는 것을 확인하였다. 급성과 만성 각 군의 어성초 추출물에 대한 ALT와 AST의 활성도는 어성초 추출물을 처리하지 아니하고 사염화탄소만을 처리한 군에 비하여 현저히 감소하

였다. 특히 같은 어성초 잎에도 불구하고 에틸아세테이트 순획 추출물은 어성초 crude군과 비교하여 더 낮은 활성도 값을 나타냄으로써 ESR기기를 이용하여 에틸아세테이트 순획추출물이 DPPH 라디칼 소거능을 통해 항산화, 항염증능이 주목할 만하다는 위의 결과를 ALT와 AST 활성도 측정을 통해 다시 한 번 확인할 수 있었다. 이 뿐만 아니라 종합적으로 보았을 때, 어성초 추출물이 간 독성 물질에 대한 조절제로 그 역할을 할 수 있다는 것을 밝혔다.

▶ 한편 알칼리성포스파타제(alkaline phosphatase; ALP)의 측정 또한 간 관련 질환을 나타낼 수 있는 지표가 될 수 있는데, 높은 수치를 나타낼수록 급성 간염, 간경변, 종양을 포함하는 질환이 있음을 의미한다. 급성과 만성 모두 사염화탄소만을 처리한 군에서는 ALP의 활성도가 높아짐을 확인함으로써 간 연관 질환이 발병하였거나 이에 준하는 간의 손상을 가지고 있다고 판단할 수 있으며, 어성초 추출물을 처리한 군에서는 이 수치가 낮아진 것으로 보아 어성초 추출물은 간 관련 질환에 대한 조절능력이 있으며 ALT, AST 활성도 측정과 마찬가지로 간 손상이 유발된 경우 에틸아세테이트 순획 추출물이 그 조절 능력이 특히 뛰어나다는 것을 확인할 수 있었다.

▶ 급성, 만성 각 군의 어성초 추출물을 전 처리한 군은 어성초 추출물을 처리하지 아니하고 사염화탄소만을 처리한 군에 비해 HDL 콜레스테롤이 급성과 만성시험에서 Silymarin에 비해 증가하였으며, 특히 어성초 혈장 LDL의 측정량은 양성대조군($0.1986 \pm 0.042 \text{ ug/ul}$)과 어성초 crude 군 ($0.1533 \pm 0.068 \text{ ug/ul}$)이 사염화탄소군 ($0.2137 \pm 0.012 \text{ ug/ul}$)에 비하여 유의적으로 감소하였다. 어성초 E.A군의 경우 ($0.013 \pm 0.007 \text{ ug/ul}$)의 경우 사염화탄소군과 비교하였을 때, LDL의 혈장내 양이 감소한 것으로 보아 급성, 만성 각 군의 어성초 추출물을 전 처리한 군이 콜레스테롤을 조절하는 조절제로 역할함을 최초로 밝혔다.



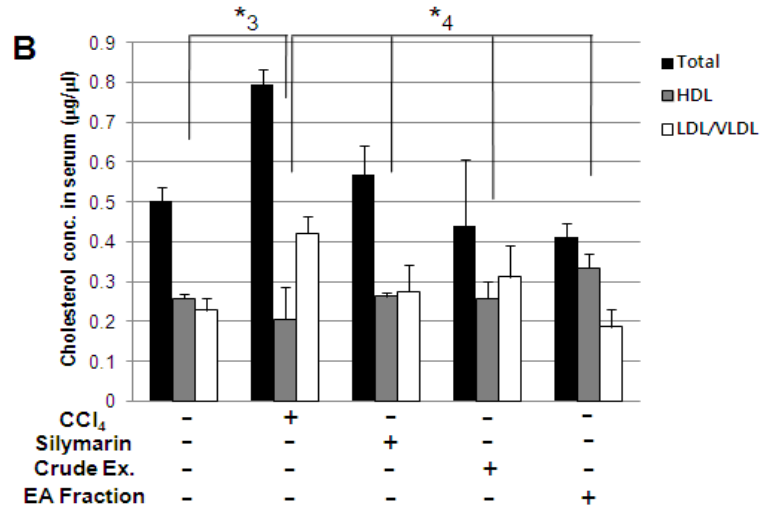


그림 31. 급성 간 독성을 일으키는 물질에 대한 혈청 중 총 지질, HDL 및 LDL 콜레스테롤 함량 측정

○ 어성초 추출물이 HepG2 세포내에서 SREBP-1c 발현억제 효과 확인

▶ LPS도 CCl₄와 비슷한 기전으로 간에 염증을 유발 하므로, HeG2 세포에 LPS 1 ug/ml을 2 시간 처리한 다음 어성초 처리군 (그림 32. 3 lanes 과 대조군(PBS, 1. Lane)시료를 Immunoblot을 시행하여 어성초 추출물이 유의하게 스테롤 조절인자 결합단백질-1c (sterol regulatory element binding protein: SREBP-1c)의 발현을 억제함을 밝혔다.

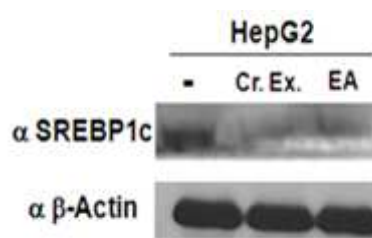


그림 32. 어성초 추출물이 HepG2 세포내에서 SREBP-1c 발현억제 효과 확인

○ 어성초 추출물의 간 조직 내 SREBP-1c 발현억제 효과 확인

▶ 동물실험에서 확인한 어성초추출물의 의 간 지방증 치료효과가 간 조직 내 SREBP-1c 발현 억제와 관련이 있는지 확인하기 위해 다음과 같이 SREBP는 지방산과 콜레스테롤의 생합성 경

로에 관여되는 효소를 활성화하여 간에서 지방산과 콜레스테롤 합성을 조절하는 중요한 전사 활성 인자로써 간 조직에서 SREBP-1c가 많이 발현이 되는 경우에 간 지방증을 유발할 수 있다. 어성초 추출물 Crude와 EA추출물이 간 조직 내 SREBP-1c 발현억제 효과가 있음을 밝혔다 (그림 33).

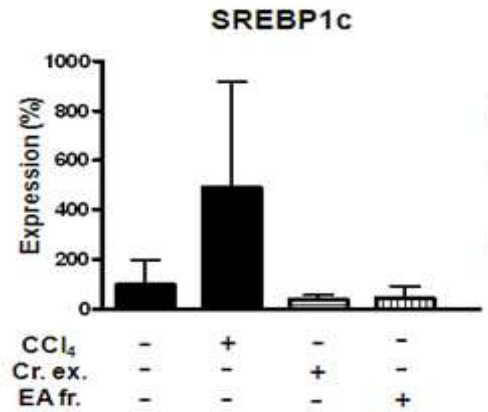


그림 33. 어성초 추출물의 간 조직 내 SREBP-1c 발현억제 효과 확인

○ 마우스 체중 및 간 무게 (g)

【표 4】

급성

Body		control	CCl ₄	Silymarin	C. U	E. A
(단위:g)		27±1	27±1	27±1	27±1	27±1

Liver		control	CCl ₄	Silymarin	C. U	E. A
(단위:g)		1.45±0.08	1.52±0.1	1.32±0.15	1.21±0.18	1.52±0.09

만성

Body		control	CCl ₄	Silymarin	E. A
(단위:g)		33±1	29±1	25±1	25±1

Liver		control	CCl ₄	Silymarin	E. A
(단위:g)		1.53±0.16	1.88±0.07	1.51±0.24	1.44±0.16

▶ 그림 34에 나타낸 바와 같이 어성초 투여군과 비치료군(Corn Oil 투여), 실리마린 투여군의 대표적인 마우스 간적출 사진이며, 표 4는 실험에 사용된 동물모델들의 몸무게와 간의 무게이다. 상대적으로 화학물질 투여 기간이 짧았던 급성 그룹에서는 각 군의 평균 몸무게는 특이사항

항이 없지만 적출한 간의 무게를 비교하여 보았을 때, CCl₄군에서 간의 무게가 가장 무거웠으며 나가는 것으로 보아 음성대조군에 비교하여, 간의 특이적인 변화가 있었다고 판단할 수 있었다. 상대적으로 오랜 기간동안 실험 기간을 시행했던 만성그룹은 7주 동안 실험동물에게 주었던 사료에 대한 각 개체들의 사료 섭취량 등의 차이에서 기인한 평균 몸무게의 차이가 나타나고 있지만, 간의 무게는 음성대조군 또는 양성대조군과 비교하여 보았을 때 사염화탄소 군에서 가장 많이 나감으로써 이 또한 급성 그룹과 마찬가지로 간에 특이적인 변화가 있었다고 판단할 수 있었다.

▶ 따라서 실험한 결과와 비교하여 보았을 때, 급성 또는 만성적인 간 손상은 간의 무게를 증가시킨다고 결론을 내릴 수 있다. 그러나 양성대조군과 어성초 투여군에서는 CCl₄를 투여하고 있음에도 불구하고 간의 평균 무게가 감소한 것으로 보아 급성과 만성 모두 간 손상정도가 완화되었음을 추측 할 수 있었다.

▶ 이처럼 어성초 추출물이 간 세포 손상을 유발하는 반응성 유해산소종의 발생을 억제하여 간 손상의 지표로 간 손상시 간 세포에서 혈장으로 유리된 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT)와 아스팔테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 활성이 감소와 함께 간 조직에서 중성지방 합성에 관여하는 유전자 및 단백질의 전사인자인 스테롤 조절인자 결합단백질-1c (sterol regulatory element binding protein: SREBP-1c)의 발현을 효과적으로 억제함으로써, 간질환 예방 및 치료 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

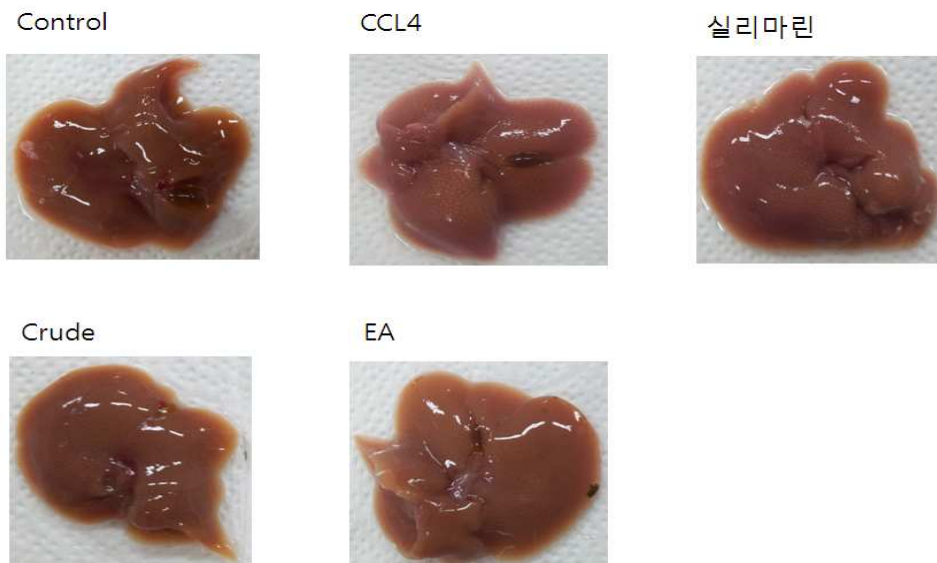


그림 34. 간 독성을 일으키는 물질에 대한 마우스 체중 및 간 무게 (g)

▶ 실험용 쥐를 각 실험군 모두 최종시료 투여 후 조직 병변을 관찰하기 위하여 급성군과 만성군을 각각 시험하였다. 이에 대한 실험은 간장의 일부를 채취하고 10%의 중성 formalin에 고정한 후 hematoxylin-eosin으로 염색하고 광학현미경(X200)으로 간세포 조직을 관찰하면서 지방 변성, 괴사, 섬유화현상 및 간조직의 재생 등을 각 실험군 별로 비교 검토하였다. 그 결과, 사염화탄소로 유발한 간독성에 미치는 어성초 추출물의 효과를 측정하기 위한 실험 종료 후, 간조직을 병리학적으로 관측한 결과는 그림 35과 같다.

▶ 그림 35에서와 같이 대조군의 간세포와 세포핵의 형태는 일정하게 세밀하고, 퇴화나 변성이 관찰되지 않았으나 사염화탄소를 단독투여한 간조직에 있어서는 간세포의 형태, 색깔이 모두 불분명하고 핵의 위치나 모양도 일정하지 않았으며 지방 변성 및 괴사가 현저하게 관찰되어 손상의 정도가 심함을 알 수 있었다. 사염화탄소와 양성대조물질인 silymarin을 투여한 군의 간조직에서도 세포괴사가 관찰되었지만 사염화탄소 단독 투여군보다 손상된 조직의 회복이 관찰되었다.

▶ 조직괴사가 일어난 부분에 세포 재생의 신호인 핵의 밀집을 관찰할 수 있었으며 다른 괴사 부분에서도 핵이 나타나 세포 재생이 시작되었음을 확인하였다. 어성초 에틸아세테이트 순획 추출물을 투여한 간조직에서는 세포의 괴사가 급성군과 만성군에서도 관찰되지 않아 그만큼 세포 재생속도가 빠른 것으로 판단되었다. 따라서 어성초 추출물은 사염화탄소로 인한 간 손상을 재생시키는데 효과적인 것으로 사료되었고, 손상된 조직을 회복시키는 속도는 양성대조물질인 silymarin보다 우수한 것으로 사료되었다.

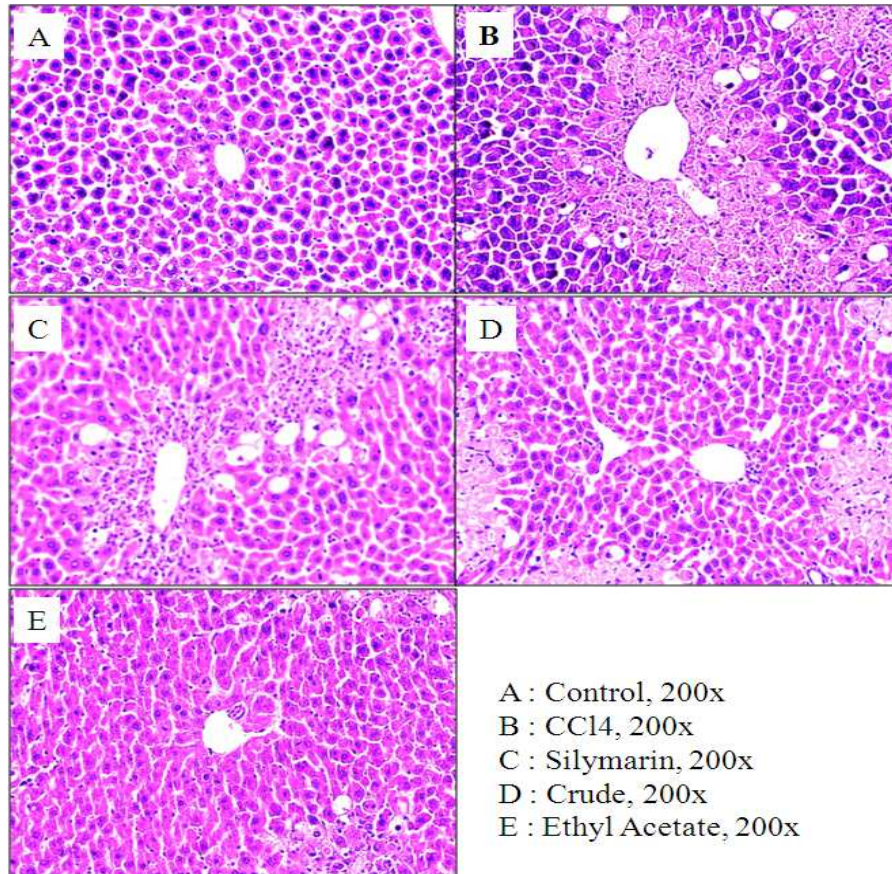


그림 35. 급성 간 독성시험에서 Hematoxylin-eosin으로 염색에 의한 간의 병리학적 변화

6. 어성초 추출물이 HepG2 간세포에서 AMPK 활성화와 지질생합성에 미치는 효과

본 연구는 결과 사람의 간세포주인 HepG2 세포에 어성초 추출물을 처리할 경우 농도의존적으로 AMPK의 인산화가 증가됨을 확인함으로써 어성초 추출물이 이 간조직에서도 AMPK의 활성화시킬 수 있음을 알 수 있었다.

- ▶ 비알콜성 지방간질환은 알코올 섭취력은 거의 없지만 알코올성 지방간과 유사한 간조직 소견을 가지는 질환으로 지방간에서부터 지방간염, 간경변증에 이르기까지 다양한 병변을 통칭한다.
- ▶ 비알콜성 지방간 질환은 최근 여러 연구를 통하여 비만, 당뇨병, 고혈압, 지질대사이상 등을 포함하는 대사증후군과 관련 있음이 입증 되었고, 그 중에서도 비만이 중요한 원인 인자로 알

려져 있다.

- ▶ 비만으로 인한 고글루코스혈증은 비알콜성 지방간질환의 병태생리학적 발생기전의 원인으로 생각되고 비알콜성 지방 간질환을 간에서 일어나는 대사증후군의 한 형태로 보는 견해가 우세하다.
- ▶ 비알콜성 지방간질환의 발병 시작은 중성지방 합성의 증가로 인해 세포 내 중성지방이 증가하는 것을 특징이며, 글루코스는 간의 지방 생합성에 중요한 호르몬 중의 하나이다. 고글루코스혈증으로 인한 간에서 지방산합성은 지방산 생합성 경로에 중요한 효소인, acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 fattyacidsynthase (FAS)유전자의 전사활성 증가를 통하여 일어나며 이 과정에서 sterol regulatory element binding protein (SREBPs)가 글루코스의 역할을 매개하는 중요한 전사인자로 알려져 있다.
- ▶ SREBPs는 지방산과 콜레스테롤의 생합성 경로에 관련되는 효소들을 활성화하여 간에서 지방산과 콜레스테롤 합성을 조절하는 중요한 전사활성인자이다. SREBP에는 1a, 1c 및 2의 세 가지 종류가 있으며, SREBP-1a와 SREBP-1c는 주로 지방산 및 중성지방의 합성에 관여하고 SREBP-2는 콜레스테롤 대사에 관여 하는 것으로 알려져 있다.
- ▶ 간조직에서는 SREBP-1c의 발현이 우세하며 간세포에서의 중성지방 합성과 관련된 FAS, ACC, 등과 같은 유전자의 발현을 조절한다. 간의 SREBP-1c의 발현을 증가시킴으로써 지방산의 생합성을 증가시키고 결과적으로 간조직에 중성지방의 축적을 유발한다. 이러한 글루코스 저항성과 간에서 중성지방의 축적에 대한 SREBP-1c의 역할은 transgenic, knock-out 등 여러 in vivo 실험을 통해서 증명 되어졌다.
- ▶ 비알코올성 지방간질환은 간에서 발현되는 대사증후군의 한 형태이다. 간에서 SREBP-1c를 활성화시키고 지방 합성에 중요 효소인 FAS 및 ACC 등의 발현을 증가시켜 지방 축적을 유발한다. 최근 여러 연구에서 세포 내 에너지 항상성을 조절하는 AMPK가 간조직에서의 지방대사에 중요한 역할 수행함이 보고되었다.
- ▶ AMPK는 세포의 에너지 수준을 감지하는 역할을 하는 이질이합체로 세포 내 AMP가 증가되면 활성화가 이루어져 지방산의 β -산화를 자극하고 지방생성을 억제한다. AMPK가 인산화되면 지방합성기전에 관여하는 ACC와 같은 효소들이 비 활성화되어 간의 지방산합성이 감소하

게 된다. 또한 인산화된 AMPK는 SREBP-1c의 발현을 억제하여 SREBP-1c의 표적 유전자로 알려진 FAS, L-type pyruvate kinase(LPK) 등의 발현을 감소시킨다.

▶ Metformin과 thiazolidinedione 계열의 약물인 pioglitazone과 rosiglitazone이 간세포에서 AMPK를 활성화시켜 SREBP-1c 발현을 감소시킬 뿐만 아니라, SREBP-1c의 표적 유전자를 감소시켜 간에서의 지방합성을 억제함이 보고 되었다. 따라서 간세포에서 어성초 추출물이 AMPK를 활성화시키는지와 AMPK 활성을 통해 SREBP-1c의 발현을 억제시키는지를 알아보았다.

○ 어성초 추출물이 글루코스 정상농도와 고농도로 유도된 HepG2세포에서의 세포독성 효과

▶ 실험방법으로는 세포 배양 사람 간암 세포주(human hepatoma cell line)인 HepG2세포는 minimum essential medium (MEM) 배지에 항생제 (antibiotics)와 fetal bovine serum (FBS)을 첨가하여 배양하였다. 세포는 일정한 습도를 유지하는 37°C 항온기에서 5% CO₂의 상태에서 배양하고 3-4 일 마다 계대 배양하였다.

▶ HepG2세포는 글루코스 처리하기 전 무혈청배지와 5 mM의 정상적인 글루코스가 첨가된 MEM 배지에서 1시간 동안 배양하였다. 그리고, 25 mM 글루코스를 24시간 동안 처리하였고, 25mM 글루코스를 처리하기 전에 어성초 추출물을 농도 별로 처리하여 세포독성을 확인하였다.

○ 어성초 추출물이 고농도로 유도된 HepG2세포에서 중성지방 및 콜레스테롤 생성 억제

▶ HepG2세포는 글루코스 처리하기 전 무혈청배지와 5 mM의 정상적인 글루코스가 첨가된 MEM 배지에서 1시간 동안 배양하였다. 그리고, 25 mM 글루코스를 24시간 동안 처리하였고, 25 mM 글루코스를 처리하기 전에 어성초 추출물을 10, 20, 40과 80 ug/ml로 24시간 동안 처리하여 Nile-red 염색에 의해 확인한 결과 어성초 처리군은 염색이 약하게 되어 있음을 FACS 분석에 의해 확인할 수 있었다 (그림 37).

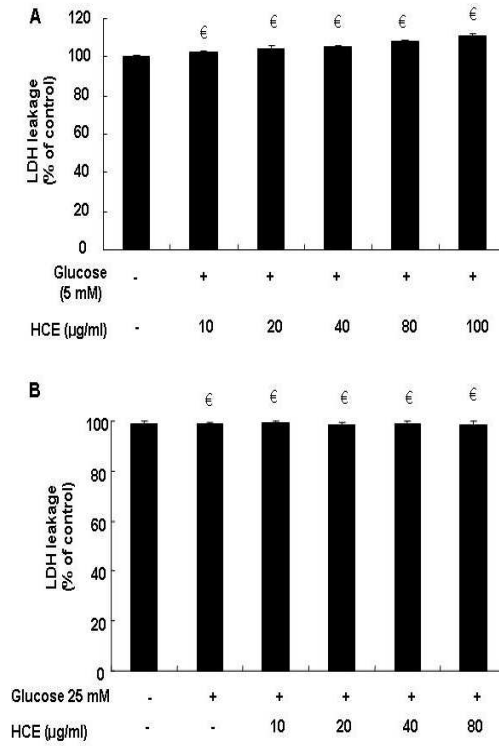


그림 36. HepG2세포에서의 어성초 추출물에 대한 세포독성 효과

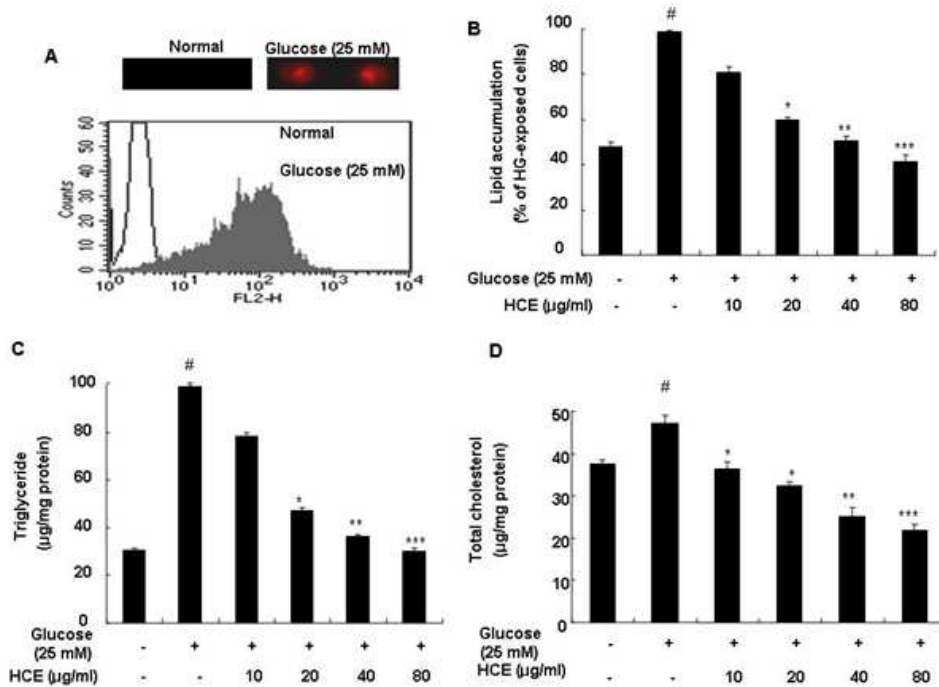


그림 37. HepG2 간세포에서 어성초 추출물의 지방생성 저해 효과

▶ Nile-red 염색은 다음과 같이 실행하였다. HepG2세포를 6well plate에 키운다음 25 mM 글루코스와 어성초 추출물을 10, 20, 40과 80 ug/ml로 24시간 동안 처리 하 한다음 PBS로 2회 세척한 후 4% formaldehyde로 한시간 동안 고정한 다음 30분 동안 실온에서 Nile red (1 ug/ml)로 염색하였다. 염색 후 세포내의 지방분포를 FACS 유세포 분석기에 의해 분석하였다 (Becton Dickinson Mountain View, CA, USA). 지방이 결합된 형광은 위상차 형광 현미경에 의해 관찰할 수 있었다.

FACS 유세포 분석기에 의해 지방축적을 정량적으로 비교 분석한 결과 고농도 글루코스 처리 세포군에서는 지방 축적이 상당히 높았고, 어성초추출물을 10, 20, 40과 80 ug/ml로 처리한 세포군에서는 지방축적이 22%, 30.7%, 49.9%과 57%로 감소되었다 (그림 37A)

어성초 추출물에 의한 중성지방과 콜레스테롤도 상당히 감소되었으며, 어성초추출물을 10, 20과 40 ug/ml로 처리하였을 때 중성지방의 억제율은 51.2%, 63.5%과 68.8%, 이었다 (그림 37C). 또한 어성초 추출물이 고농도로 유도된 HepG2세포에서 농도의존적으로 20, 40과 80 ug/ml로 처리하였을 때 49.7%, 64.5%, and 68.8%로 현저히 감소됨을 알 수 있었다 (그림 37D)

○ 어성초추출물의 고글루코스로 유도된 HepG2 세포에서의 SREBP-1c, FAS발현에 미치는 영향:

SREBP family는 구조적으로 basic-helix-loop-helix (bHLH)형태를 가진 지방 분화에 관여하는 전사인자로서, 이들 중 SREBP-1c단백질은 소포체막에 비활성화된 상태로 결합되어 있다. 콜레스테롤의 결핍이나 글루코스에 의해 SREBP cleavage-activation protein (SCAP)이 활성화 되면 SREBP-1c는 골지체로 이동하게 되며, 이후에 Site1 Protease(S1P)와 Site2Protease(S2P)에 의해 분해되어 활성형이 핵으로 이동하여 SREBP-1c의 표적 유전자의 발현을 유도한다.

▶ SREBP-1c는 FAS 프로모터를 조절할 뿐만 아니라 FAS region에 있는 -150 SRE와 -65 E-box에 결합하여 지방생성에 관여하므로 중요한 타겟 단백질이다.

▶ 고글루코스로 유도된 HepG2 세포에서의 지방생성 억제는 지방생성중 세포내 분자들의 변화 중 FAS발현과 관계가 있다는 사료되어 본 실험을 병행하였다.

▶ 실험 재료로는 SREBP-1c항체는 BD Bioscience (SanJose, CA, USA)에서 구입하였고, FAS 항체는 Cellsignaling Technology (Danvers, MA, USA), Beta-actin 항체는 Sigma

(SaintLouis,MD,USA)에서 구입하였다. 웨스턴 블롯에 의한 단백질 분석은 HepG2 간세포에 Lysis 완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP-40, 100 μ M PMSF), 1 μ g/ml 단백질 분해효소 억제제 (Luepetin, Aprotinin), 1mM DTT를 처리하여 단백질을 추출하였다. 각 시료를 시료 완충액과 섞어 5 분간 끓인 후 얼음 위에서 식혔다.

▶ Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide겔에서 전기영동 하여 단백질을 분리한 후 Immobilon-P transfermembrane (Milipore,Billerica)으로 이동시켰다. 차단 완충액 (blocking buffer)으로 차단하고 SREBP-1c항체 및 FAS 항체 등으로 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시킨 후, horseradish peroxidase가 표지 된 이차 항체로 상온에서 2시간 반응시켰다. ECL plus (Amersham Biosciences)를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. Membrane 을 actin항체와 다시 반응시켜 일정한 양의 단백질을 사용하였는지 확인하였다. 고농도 글루코스로 유도된 HepG2 세포가 SREBP-1c 단백질발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 세포에 어성초 추출액을 농도별로 처리하고 웨스턴 블롯을 시행하였다. 고농도 글루코스로 유도된 HepG2 세포 (25 mM)에서 SREBP-1c와 FAS 단백질발현은 어성초 추출액 10, 20과 40 μ g/ml에서 현저히 감소하였다 (그림 38).

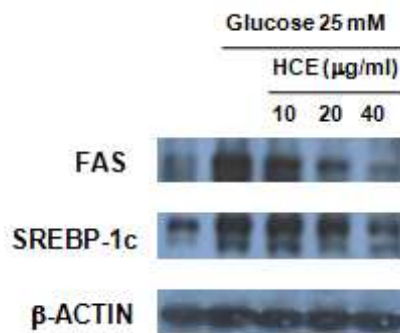


그림 38. 어성초 추출물이 고농도 글루코스로 유도된 HepG2 세포에서 SREBP-1c, FAS발현 억제

○ 어성초 추출물이 SREBP-1c전사활성에 미치는 효과

▶ SREBP-1c전사인자의 Luciferase활성 측정; 어성초 추출물이 글루코스로 유도된 HepG2세포에서의 SREBP-1c전사활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Lipofectamin (Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)을 이용하여 HepG2세포에 SREBP-1c promoter 발현 벡터를 트랜

스펙션시켰고, 발현정도를 효율을 보정하기 위하여 pCMV-β-gal 플라스미드 벡터를 co-transfection 하였다. 형질도입 5 시간 후에 0.5% FBS 가 들어있는 배지로 교체를 해 준 후, 24시간 더 배양하였다. 이후 세포를 완충액으로 두 번 세척하고 100 μl의 reporter lysis buffer (Promega, WI, USA)를 이용하여 분해하였다. 4°C, 1200rpm에서 10분 동안 원심분리 후 20 ul의 상등액을 발광분석기(Berthold, Pforzheim, Germany)를 사용하여 전사활성을 측정하였다. β-galactosidase활성은 상등액 20ul를 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 420 nM에서 측정하고 이 값을 luciferase활성 수치를 보정 하는데 사용하였다. 모든 실험은 독립적으로 3회 이상 실시하여 통계 처리를 하였다.

▶ 어성초 추출물이 SREBP-1c의 발현을 억제하는 효과가 전사활성을 시험하기 위하여 luciferase assay를 통해 HepG2세포에 사람 SREBP-1c 전사조절부위를 발현시키고 글루코스 단독 혹은 글루코스과 어성초 추출물의 동시 처리가 SREBP-1c 프로모터유전자의 활성도에 미치는 효과를 측정 하였다.

▶ 글루코스 (25 mM)은 SREBP-1c촉진자의 활성을 현저히 증가시켰고, 어성초 추출물을 10, 20, 40와 80 ug/ml로 처리할 경우 글루코스에 의하여 증가된 SREBP-1c전사 활성이 농도의존적으로 억제되었다 (그림 39).

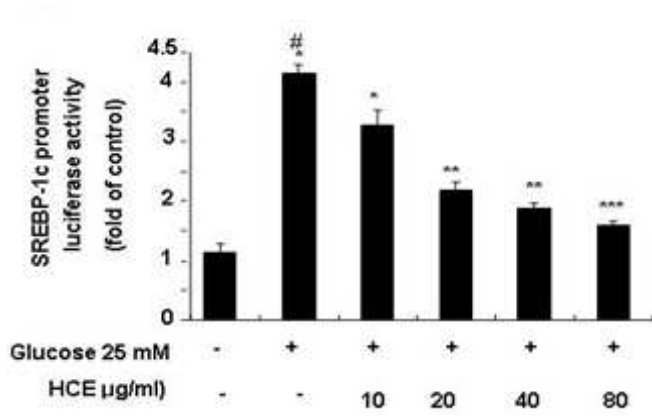


그림 39. 어성초 추출물에 의한 SREBP-1c 프로모터유전자 전사활성 저해

○ 어성초 추출물이 AMPK 활성화에 미치는 효과

▶ 어성초 추출물에 의한 p-AMPK 의 발현은 농도의존적으로 확인하기 위해서 어성초 추출물

을 10, 20, 40, 80 ug/ml로 고농도 글루코스로 유도된 HepG2 세포에 24시간 동안 처리하였다. 실험방법은 위와 같다.

▶ 어성초 추출물이 HepG2 세포세포에서 AMPK를 활성화 시키는지를 알아보기 위하여 HepG2세포에 어성초 추출물을 용량 별로 처리하고 AMPK의 인산화 (Phosphorylation) 를 조사하였다. 어성초 추출물 처리에 의해 전체 AMPK 발현은 변화가 없었으나, AMPK의 인산화는 농도의존적으로 증가하였다 (그림 40).

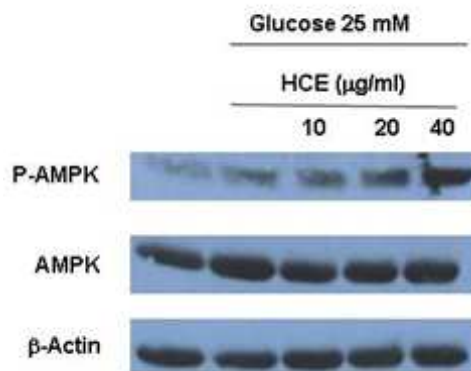


그림 40. 어성초 추출물이 AMPK 활성화에 미치는 억제효과

이상의 결과들을 요약하면, 글루코스는 HepG2 세포에서 SREBP-1c의 mRNA와 단백질 발현을 증가시켰고, 어성초 추출물은 글루코스에 의하여 증가된 SREBP-1c 전사 프로모터 유전자 활성화 과 단백질 발현을 억제하였다.

어성초 추출물이 SREBP-1c의 발현억제 기전에는 AMPK의 활성화가 부분적으로 관여할 것으로 이라는 가설이 성립되어 향 후 이에 대한 연구도 진행되어야 한다. ,어성초 추출물이 SREBP-1c의 발현 억제기전에 AMPK 활성화 이외의 다른 기전이 있는 지에 대한 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

7. 동물모델 이용한 어성초 추출물의 간기능 개선 효능 검증

(고지방식이군에 의한 간기능 간손상 개선)

최근 식생활의 서구화로인해 비만, 당뇨, 고혈압 등의 대사성 증후군이 증가함에 따라 NAFLD의 유병율은 전인구의 20% 이상을 차지할 정도로 중요한 사회적 문제로 대두되고 있고, NAFLD의 발생기전에 대한 연구가 많이 진행되고 있지만 현재까지 정확한 원인은 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 어성초 추출물이 고지방식이군에 의한 간기능 간손상 개선을 증명하기 위하여 실험을 진행하였다.

○ 실험동물 및 식이

▶ 본 연구에서 사용한 실험동물은 Sprague-Dawley (SD)계 랫트로 32마리 를 구입하여, 체중에 따라 난괴법에 의하여 정상식이군 (NF)과 지방식이군 (HFD), 고지방식이+어성초 에틸아세테이트 추출물 (HFD+HC-EA100 mg/kg), 고지방식이+어성초 에틸아세테이트 추출물 (HFD+HC-EA200 mg/kg) 및 고지방식이+어성초 에틸아세테이트 추출물 (HC-EA, HFD+HC-EA300 mg/kg)으로 나누었다. 실험동물식은 AIN-93G diet를 기본으로 식이조성을 조절하였다. 실험 식이는 표 4와 같다.

본 연구에서 사용한 실험동물은 한 마리씩 stainless steel cage에서 물과 식이를 자유롭게 섭취하도록 하고, 동물 사육실 온도는 24±1℃, 상대습도는 50±10%로 조절하고, 명암주기는 12 시간 간격으로 유지하여 5주일간 적응시켰다. 모든 실험 식이는 사육기간 동안 4℃에서 냉장 보관 하였다. 실험식으로 5주간 사육하며, 식이 섭취량은 매주 2회, 체중은 매주 1회씩 일정 시각에 측정하였다. 본 실험은 건국대학교 동물실험윤리위원회 가이드라인에 따라 동물실험이 진행되었다.

실험동물에게 제공될 실험용 식이 사료의 칼로리 비율은 표 1과 같다.

표 5. Compositions of experimental diets

Ingredient	Normal Diet (g/kg)	High fat-cholesterol diet(g/kg)
Rat Control	1,000	581.5
Butter		180
Com oil		100
Sucrose		50
Casein		50
Minerals Mixture		19
Vitamin Mixture		8
Methionine		15
Cholesterol		10
	Control(% calories)	High-fat diet(% calories)
Carbohydrates	74.5%	33%

Fat	3.5%	52%
Protein	22%	15%

Control: rat Control from Superfeed Co., Korea

¹⁾Mineral mixture : AIN-76A(Teklad, USA)

²⁾Viramin mixture : AIN-76A(Teklad, USA)

○ 시료의 채취 및 분석

시료의 채취 하루 전 부터 다음날까지 절식시킨 랫트를 20% urethane 1.5g/kg을 복강으로 투여 마취시켜 복대동맥을 통하여 혈액을 채취하고 실험사 시킨 후 간과 복부지방을 적출하였다. 적출한 간은 냉장 생리식염수로 세척한 뒤 액화질소에서 급속 동결 시킨 후 분석을 시행할 때까지 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 복부지방으로 후 복막강(retroperitoneal) 지방과 부고환(epididymal) 주위 지방을 적출해 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 즉시 4℃에서 3,000rpm으로 20분간 원심분리 하여 상청액을 회수하여 -80℃의 초저온 냉동고에 보관하였다.

○ 혈장 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase) 측정

간세포의 손상 유무를 알아 볼 수 있는 AST 및 ALT 활성도 측정은 Reitman-Franke법에 의한 분석 키트 (아산제약)을 사용하여 측정 하였다.

○ 혈장 포도당, 중성지방, 콜레스테롤 함량 분석

혈장 포도당, 중성지방, 총 콜레스테롤 및 고밀도-콜레스테롤은 효소법을 이용한 분석 키트 (아산제약)을 사용하여 측정하였고, 저밀도-콜레스테롤 함량은 Friedewald 등 의 계산법에 의해 산출하였다.

○ 간 조직의 지질 분석

간 지질은 Folch법에 의하여 Chloroform : Methanol (2:1) 혼합액을 사용하여 조직과 Chloroform-Methanol 혼합액을 1:20의 비율로 혼합하여 분쇄하고 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 Chloroform 층을 획득하였다. 획득한 Chloroform 층에서 TritonC-100 1%를 혼합하고 이 혼합액을 건조한 다음 일정량의 증류수에 녹여 앞에 설명한 방법으로 중성지방과 총콜레스테롤을 정량하였다.

○ 병리조직학적 검사

같은 부위에서 적출한 간조직을 10% 중성 포르말린액에 고정하고 탈수한 후 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 4mm의 박절편을 만들어 hematoxylin-eosin염색하여 광학현미경 (Olympus Optical Co., Japan)으로 관찰하였다.

2. 결과

1). 체중, 식이섭취량, 식이효율 변화

① 체중 및 식이효율

본 실험은 일반식이군, 고지방식이군, 고지방식이에 HC-EA 농축액이 100 mg, 200mg 과 300 mg을 첨가한 HFD+HC-EA100군, HFD+HC-EA200군, HFD+HC-EA300군 5군으로 나누어서 6주간 사육하여 체중변화, 식이섭취량, 식이효율 등을 관찰하였다 (표 5). 사육 5주 후 체중을 살펴보면, Control 군은 374±5.7

g, HF군은 433±6.2 g, HFD+HC-EA100군은 424±12.9 g, HFD+HC-EA200군은 406±7.3 g, HFD+HC-EA300군은 396±21.4 g으로 NF군과 HFD+HC-EA300군에서 HF군 보다 유의적으로 체중 증가가 감소되었다 ($p<0.05$).

본 실험에서 고지방식이에 HC-EA 농축액을 첨가한 식이를 공급하였을 때, 식이 섭취량과 식이효율에 있어서는 유의적인 차이가 없었지만, 체중은 유의적으로 감소하여, HC-EA 섭취가 체중 감소에 도움이 될 것으로 예상된다.

표 6 Effect of *Houttuynia cordata* extracts on body weight in rats fed high fat-cholesterol diet

	Body weight (g)		Gain in BW(g)
	Initial	final	
Control	118±2.7	374±5.7	256±4.4
HFD	110±3.5	433±6.2	313±5.7*
HFD+HC-EA100	118±2.3	424±12.9	297±12.4*
HFD+HC-EA200	110±2.6	406±7.3	296±7.7*
HFD+HC-EA300	116±3.4	396±21.4	290±18.4*

Values are mean±S.E..

* $P<0.05$ vs. Control

Control; normal rat Control diet

HFD; high fat-cholesterol diet

HFD+HC-EA100: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 100 mg/ml

HFD+HC-EA200: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 200 mg/ml

HFD+HC-EA300: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 300 mg/ml

② 장기 무게

고지방식이에 첨가된 HC-EA 추출액 섭취로 인한 간, 신장, 비장, 흉선 무게의 변화는 표 6와 같다. 간 조직의 무게는 NF군 10.63 ± 0.35 g, HFD군 14.26 ± 0.87 g, HFD+HC-EA 100군 14.60 ± 0.72 g, HFD+HC-EA 300군 13.21 ± 0.56 g, HFD+HC-EA 300군 13.21 ± 0.56 g으로 NF군 보다 고지방을 섭취한 군에서 유의적으로 무거웠으며 HFD군과 HC-EA 추출액을 첨가한 고지방식이 군들 사이에서는 유의적인 차이가 없었다.

신장의 무게는 NF군 2.16 ± 0.07 g, HFD군 2.36 ± 0.08 g, HFD+HC-EA100이군 2.40 ± 0.03 g, HFD+HC-EA200군 2.31 ± 0.06 g, HFD+HC-EA300군 2.22 ± 0.06 g으로 각 군 간에 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

비장의 무게는 NF군 0.68 ± 0.02 g, HF군 0.76 ± 0.02 g, HFD+HC-EA100이군 0.82 ± 0.06 g, HFD+HC-EA200군 0.75 ± 0.06 g, HFD+HC-EA300군 0.70 ± 0.03 g으로 NF군 에 비해 HF군에서 더 높게 나타났고, HF군에 비해 HC-EA 추출액을 섭취한 HFD+HC-EA100군에서 높았고, HFD+HC-EA300군에서는 더 낮게 나타나는 유의적인 차이를 보였다.

흉선의 무게는 NF군 0.65 ± 0.02 g, HF군 0.68 ± 0.04 g, HFD+HC-EA100이군 0.70 ± 0.06 g, HFD+HC-EA300군 0.68 ± 0.06 g, HFD+HC-EA300군 0.67 ± 0.06 g으로 각 군 간의 유의적인 차이가 없었다.

지방조직은 복부지방, 신장지방, 부고환 지방 조직을 제거하여 무게를 측정하였다. 내장지방의 무게는 NF군이 1.79 ± 0.13 g, HF군이 2.15 ± 0.19 g, HFD+HC-EA100군이 2.11 ± 0.30 g, HFD+HC-EA200군이 1.96 ± 0.30 g, HFD+HC-EA300 군 1.93 ± 0.19 g으로 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

신장지방의 무게는 HFD+HC-EA300군 3.52 ± 0.59 g으로 가장 낮게 측정되었으나 각 군 간에 유의적인 차이가 보이지 않았다. 부고환 지방의 무게는 HFD+HC-EA300군이 4.11 ± 0.26 g으로 가장 낮게 측정되었으나 각 군간에 유의적인 차이가 없었다.

총 지방조직 무게는 HFD+HC-EA300군이 9.36 ± 0.93 g으로 가장 낮게 측정되었으며, NF군 10.36 ± 0.95 g, HF군 11.03 ± 0.51 g, HFD+HC-EA100이군 11.7 ± 1.11 g, HFD+HC-EA100이군 9.66 ± 1.11 g, HFD+HC-EA300군 9.46 ± 0.90 g으로 고지방식이 HC-EA 추출액의 섭취가 지방축적을 억제하는 경향을 보이거나 유의적이지는 않았다.

[표 7] Organ weight of rats

Parameter	NF ¹⁾	HFD	HFD+HC-EA100	HFD+HC-EA200	HFD+HC-EA300
Liver	10.63±0.35	14.26±0.87	14.50±0.72	13.99±0.56	13.21±0.36
Kidney	2.16±0.07	2.36±0.09	2.40±0.03	2.31±0.06	2.22±0.06
Spleen	0.68±0.02	0.76±0.02	0.82±0.06	0.75±0.05	0.70±0.03
Thymus	0.65±0.02	0.68±0.04	0.70±0.06	0.68±0.06	0.67±0.04
Adipose tissues					
Internal fat	1.79±0.12	2.15±0.18	2.11±0.20	1.96±0.18	1.93±0.17
Kidney fat	4.07±0.45	4.18±0.44	4.09±0.58	3.72±0.79	3.52±0.59
Epididymal fat	4.66±0.44	4.79±0.29	4.52±0.41	4.41±0.26	4.11±0.26
Total fat	10.36±0.95	11.03±0.51	11.7±1.11	9.66±0.41	9.36±0.93

1) NF: Normal AIN-93G diet, HF: High fat diet,

2) 혈액 내 혈당과 인슐린 함량

고지방식이에 첨가된 HC-EA 추출액의 섭취가 랫트의 혈액 내 혈당조절 관련 혈당과 인슐린에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보하고자 하였다 (표 8).

혈당량 조절 중추는 간뇌로, 혈당량에 변화가 생기면 이를 감지하고, 적절한 혈당량을 유지시킨다. 혈당은 간에서의 포도당 공급량과 말초조직에서의 포도당 이용량의 균형을 통하여 조절되며, 이때 간의 작용을 중심으로 하여 인슐린, 글루카곤, 에피네프린, 당 질 코르티코이드, 부 신 피 질 자극 호르몬, 갑상선호르몬 등 각종 호르몬의 상호작용이 일어난다.

혈액 내 글루코스는 NF군이 145.4±7.4 mg/dL, HF군이 137.8±7.2 mg/dL, HFD+HC-EA100군이 132.3±2.6 mg/dL, HFD+HC-EA200군이 127.0±5.8 mg/dL, HFD+HC-EA300군이 122.0±4.5 mg/dL으로 NF군에 비해 HF군에서 낮게 나타났고(p<0.05), HF군에 비해 HFD+HC-EA군에서는 유의적 차이가 보이지 않았다.

인슐린의 경우는 NF군이 0.654±0.021 ng/mL, HF군이 0.695±0.012 ng/mL, HFD+HC-EA100군이 0.677±0.023 ng/mL, HFD+HC-EA200군이 0.653±0.045 ng/mL, HFD+HC-EA300군이 0.643±0.0059 ng/mL으로 NF군에 비해 HF군에서 더 높게 나타났고, HF군에 비해 HFD+HC-EA군에서 더 낮게 나타났다(p<0.05).

랫트의 공복 시 혈당은 98-152 mg/dL인 것으로 알려져 있다. 따라서 고지방식이 HC-EA 추출액의 섭취가 랫트의 혈액 내 혈당을 억제하는 경향을 나타내는 것으로 보인다.

[표 8] Organ weight of rats

Parameter	NF ¹⁾	HF	HFD+HC -EA100	HFD+HC -EA200	HFD+HC -EA300
Glucose (mg/dL)	145.4±7.4	137.8±7.2	132.3±2.6	127.0±5.8	122.0±4.5
Insulin (ng/mL)	0.654±0.021	0.695±0.012	0.677±0.023	0.653±0.045	0.649±0.073

1) NF: Normal AIN-93G diet, HF: High fat diet

3) 혈장 포도당과 중성지방, 콜레스테롤 분석

혈장 중의 포도당과 중성지방, 총콜레스테롤, 고밀도-콜레스테롤 및 저밀도-콜레스테롤 함량은 표 9, 10에 나타내었다. 혈장 포도당의 함량(mg/dl)은 NF군이 128±6.2, HF군이 158±12.3, HFD+HC-EA100군이 136±3.1, HFD+HC-EA200군이 130±3.8, HFD+HC-EA300군이 129±4.3이었다. HFD는 Control에 비하여 21.2% 높은 차이를 나타내었다.

혈장 중성지방의 함량(mg/dl)은 NF군이 19.6±1.23, HF군이 47.8±5.92, HFD+HC-EA100군이 24.5±2.24, HFD+HC-EA200군이 20.7±1.32, HFD+HC-EA300군이 20.3±2.62이었으며. 각각 48.9, 56.8, 54.3% 낮게 나타내었다, HFD는 Control에 비해 138% 높은 차이를 나타내었다.

혈장 총콜레스테롤 함량(mg/dl)은 NF군이 42.4±0.41, HF군이 56.2±1.80*, HFD+HC-EA100군이 45.9±4.54, HFD+HC-EA200군이 43.5±4.63, HFD+HC-EA300군이 41.5±2.34이었다. HFD는

Control에 비해 24.1% 높은 차이를 나타내었다.

혈장 고밀도 콜레스테롤 함량(HDL, mg/dl)은 NF군이 21.7±2.35, HF군이 17.4±1.51, HFD+HC-EA100군이 17.9±3.02, HFD+HC-EA200군이 18.9±3.10, HFD+HC-EA300군이 20.9±0.93이었으며, 혈장 저밀도 콜레스테롤 함량(HDL, mg/dl)은 NF군이 19.3±2.35, HF군이 28.3±1.76, HFD+HC-EA100군이 23.3±4.07, HFD+HC-EA200군이 22.4±5.39, HFD+HC-EA300군이 20.9±0.93이었다

표 8. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on plasma glucose and triglyceride concentration in rats fed high fat-cholesterol diet

Group	Glucose (mg/dl)	TG (mg/dl)
Control	128±6.2	19.6±1.23
HFD	158±12.3*	47.8±5.92*
HFD+HC-EA100	136±3.1 [#]	24.5±2.24 [#]
HFD+HC-EA200	130±3.8 [#]	20.7±1.32 [#]
HFD+HC-EA300	129±4.3 [#]	20.3±2.62 [#]

Values are mean±S.E

*p<0.05 vs. Control, #p<0.05 vs. HFD.

TG : triglyceride

Control; normal rat Control diet

HFD; high fat-cholesterol diet

HFD+HC-EA100: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 100 mg/ml

HFD+HC-EA200: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 200 mg/ml

HFD+HC-EA300: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 300 mg/ml

표 9. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on plasma cholesterol concentrations in rats fed high fat-cholesterol diet

Group	T-chol (mg/dl)	HDL-chol (mg/dl)	LDL-chol (mg/dl)
Control	42.4±0.41	21.7±2.35	19.3±2.35
HFD	56.2±1.80*	17.4±1.51	28.3±1.76
HFD+HC-EA100	45.9±4.54	17.9±3.02	23.3±4.07
HFD+HC-EA200	43.5±4.63 [#]	18.9±3.10	22.4±5.39
HFD+HC-EA300	41.5±2.34 [#]	20.9±0.93	21.5±1.68

Values are mean±S.E

*p<0.05 vs. Control, #p<0.05 vs. HFD.

T-chol: total cholesterol.

HDL-chol: high density lipoprotein cholesterol.

LDL-chol: low density lipoprotein cholesterol.

Control; normal rat Control diet
 HFD; high fat-cholesterol diet
 HFD+HC-EA100: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 100 mg/ml
 HFD+HC-EA200: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 200 mg/ml
 HFD+HC-EA300: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 300 mg/ml

4) 간 조직 지질 분석

간 조직 증의 중성지방과 총콜레스테롤 함량은 표 10에 나타내었다.

간 조직의 중성지방의 함량(mg/g)은 HFD(14.7±0.32)에 비하여 HFD+HC-EA200 (12.1±0.35)와 HFD+HC-EA300(11.5±0.31)는 각각 낮게 나타났다.

총콜레스테롤의 함량(mg/g)은 NF군이 1.3±0.18, HF군이 4.6±0.29, HFD+HC-EA100군이 4.4±0.14, HFD+HC-EA200군이 4.0±0.36, HFD+HC-EA300군이 3.8±0.22이었던. 고지방-콜레스테롤 식이군들은 Control에 비하여 각각 높은 수치를 나타내었다

표 10. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on liver triglyceride and total - cholesterol concentrations in rats fed high fat-cholesterol diet

Group	Triglyceride (mg/g)	T-chol (mg/g)
Control	9.9±0.37	1.3±0.18
HFD	14.7±0.32*	4.6±0.29*
HFD+HC-EA100	12.5±0.79*#	4.4±0.14*#
HFD+HC-EA200	12.1±0.35*#	4.0±0.36*
HFD+HC-EA300	11.5±0.31*	3.8±0.22*#

Values are mean±S.E

*p<0.05 vs. Control, #p<0.05 vs. HFD

Control; normal rat Control diet

HFD; high fat-cholesterol diet

HFD+HC-EA100: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 100 mg/ml

HFD+HC-EA200: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 200 mg/ml

HFD+HC-EA300: high fat-cholesterol diet + *Houttuynia cordata* EA 300 mg/ml

5) 간 조직에서 지질대사 관련 단백질 mRNA 발현

○ 간 조직에서 콜레스테롤 합성 조절 단백질 mRNA 발현

간에서 콜레스테롤 생합성 경로의 조절효소인 Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMG-CoA reductase)의 mRNA 발현은 NF군을 기준하였을 때 HF군이 2.14, HF+HC-EA100군이 1.76, HF+HC-EA300군이 0.65로 NF군에 비해 HF군에서 높은 값을 보였고,

HF군에 비해 HF+HC-EA군들이 유의적으로 낮은 값을 보였다($p < 0.05$).

ACAT (Acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase)는 세포내에서 free cholesterol과 long chain fatty CoA를 기질로 하여 cholesterol ester (CE)의 형성을 전환시키는 효소로 활성이 증가 하면 소장에서의 콜레스테롤 흡수, 간에서 lipoprotein 형성, 혈관 내벽 상처부위 세포에서의 CE가 축적되는 것을 막아주어 콜레스테롤의 체내축적과 동맥경화증의 예방 및 치료 효과를 기대할 수 있다. ACAT의 mRNA 발현은 NF군을 기준하였을 때 HF군이 19.56, HF+HC-EA100군이 8.75, HF+HC-EA300군이 2.37로 NF군에 비해 HF군에서 높은 값을 보였고, HF군에 비해 HF+HC-EA 군들이 유의적으로 낮은 값을 보였다($p < 0.05$).

HMG-CoA reductase는 생체 내에서 콜레스테롤의 합성을 조절하는데 중요한 역할을 하는 효소이며, HMG-CoA reductase의 활성이 저하되면 LDL-receptor의 활성이 증가하여 혈청 콜레스테롤 농도가 감소한다. Santosh Kumar Rai 등의 연구에서도 간 조직에서 대조군에 비해 HMG-CoA reductase의 활성이 유의적으로 감소되었다. 본 연구에서도 HC-EA 추출액을 섭취한 군이 고지방식이군 보다 HMG-CoA reductase가 유의적으로 낮게 나타났다. HC-EA 추출액을 섭취한 군의 HMG-CoA reductase 발현 저해는 간에서의 콜레스테롤 생합성을 억제하여 세포내 콜레스테롤 공급과 ACAT활성을 감소시킴으로써 혈장 중의 콜레스테롤을 감소시키는 것이다 (그림 41).

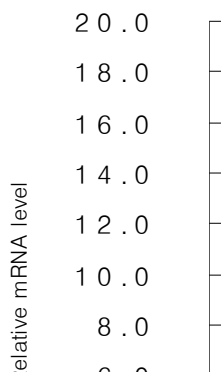


그림 41. Effect of HC-EA extract on mRNA expression of HMG-CoA reductase and ACAT protein related to cholesterol synthesis in liver of rats. HMG-CoA reductase: Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, ACAT: Acyl-CoA cholesterol acyltransferase,

○ 간 조직에서 혈중 콜레스테롤 저하 조절 관련 단백질 mRNA 발현

CYP7A1 (Cholesterol 7 α -hydroxylase 1)는 간에서 콜레스테롤을 담즙산으로 분해시키는 과정의 속도제한 효소이다. 콜레스테롤을 담즙산으로 배설을 증가시키는 CYP7A1의 mRNA 발현은 NF군을 기준하였을 때 HF군이 0.57, HF+HC-EA100군이 1.98, HF+HC-EA300군이 4.67로 NF군에 비해 HF군에서 낮은 값을 보였고, HF군에 비해 HF+HC-EA군들이 유의적으로 높은 값을 보였다($p < 0.05$).

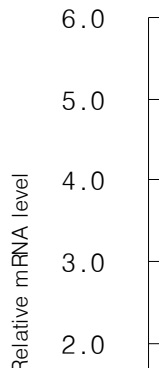


그림 42. Effect of HC-EA extract on mRNA expression of CYP7A1 protein related to cholesterol reduce in liver of rats. CYP7A1: Cholesterol 7 α -hydroxylase1

○ 간 조직에서 지방산 및 중성지방 합성 촉진 관련 단백질 mRNA 발현

Sterol regulatory element binding protein (SREBPs)가 인슐린의 역할을 매개하는 중요한 전사인자로 알려져 있다. SREBPs는 지방산과 콜레스테롤의 생합성 경로에 관련되는 효소들을 활성화하여 간에서 지방산과 콜레스테롤 합성을 조절하는 중요한 전사활성인자이다. SREBP에는 1a, 1c 및 세 가지 종류가 있으며, SREBP-1a와 SREBP-1c는 주로 지방산 및 중성지방의 합성에 관여하고 SREBP-2는 콜레스테롤 대사에 관여하는 것으로 알려져 있다. 간 조직에서는 SREBP-1c의 발현이 우세하며, 인슐린 저항성으로 인해 발생하는 고인슐린혈증은 간의 SREBP-1c의 발현을 증가시켜 지방산의 생합성을 증가시키고 간 조직에 중성지방의 축적을 유발한다 (그림 43).

글리타존이나 metformin같은 약물의 혈당강하 효과가 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성을 통한다는 학설이 제시된 바 있다. Rosiglitazone은 골격근에서 AMPK를 활성화시키고, 지방산 산화를 촉진하며, pioglitazone은 간 조직에서 AMPK를 활성화시킴이 보고되었다. 한편 metformin과 글리타존은 간에서 SREBP-1을 감소시키고, fatty acid synthase (FAS)를 감소시킨다. AMPK활성화가 간조직에서도 지방산의 산화를 촉진하기 때문에, HC-EA의

NAFLD 호전 효과가 AMPK에 의한 가능성이 많으나 아직 이에 대한 연구 보고는 없는 상태이다.

이에 본 연구에서 HC-EA 추출액이 섭취한 군이 고지방식이군에 비해 SREBP-1c의 발현이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이것으로 보아 HC-EA 추출액의 섭취가 지방산 및 중성지방 합성에 관여하는 SREBP-1c의 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다

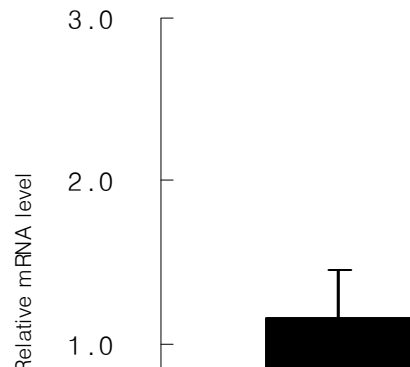


그림 43. Effect of HC-EA extract on mRNA expression of SREBP-1C transcription factor and enzymes related to fatty acid and triglyceride. SREBP-1C: Sterol regulatory element binding protein

○ 간 조직에서 지방산 산화 촉진 관련 단백질 mRNA 발현

지방산 및 축적되어 있던 지방산을 미토콘드리아 내부로 유입시켜 지방산 산화를 촉진하는 역할을 하는 CPT1 (Carnitine Palmitoyltransferase-1)의 mRNA 발현은 NF군을 기준하였을 때 HF군이 0.57, HF+HC-EA100군이 0.93, HF+HC-EA300군이 0.94로 NF군에 비해 HF군에서 낮은 값을 보였고, HF군에 비해 HF+HC-EA군들이 유의적으로 높은 값을 보였다 (그림 44).

CPT1은 acyl-CoA를 미토콘드리아 막내부로 전달하는 효소로 세포외에서 유입도니 지방산또는 세포내 축적되어 있던 지방산을 미토콘드리아 내부로 유입시켜 지방산 산화를 촉진하는 역할을 한다. Robert 등의 연구에 의하면 CPT1은 식이섭취 상태가 충분하거나 지방산의 산화가 억제될 때는 효소의 활성도가 낮게 나타나지만, 기아상태나 지방산의 산화가증가할 때는 그 활성이 높아진다고 보고하였다. Malonyl-CoA는 ACC에 의하여 acetyl-CoA로부터 합성되는데, 이는 CPT1의 활성을 저해시키는 물질로써 지질의 합성에 관여한다. 따라서 malonyl-CoA가 증가하면 지질의 합성이 증가하고, CPT1이 증가하면 지질의 산화가 증가한다. 본 연구에서 HC-EA

추출액이 섭취한 군이 고지방식이군에 비해 CPT1의 발현이 증가된 것으로 보아 HC-EA 추출액의 섭취가 지방산 산화를 촉진하는 것으로 사료된다.

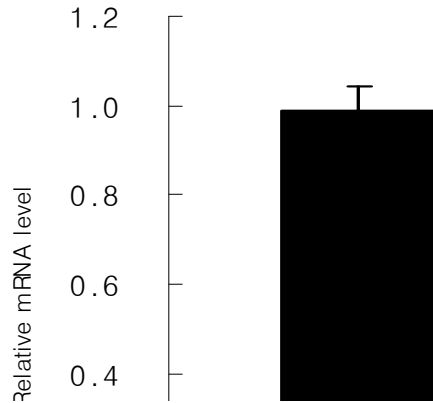


그림 44. Effect of HC-EA extract on mRNA expression of CPT1 protein in liver of rats.
CPT1: Carnitine palmitoyll transferase1

7) 항산화 기능

① 혈장 지질산화물 농도

혈장 지질 산화물 농도는 NF군 1.75 nmole/mL, HF군 1.58 nmole/mL, HF+HC-EA100이군 1.59nmole/mL, HF+HC-EA300군 0.87 nmole/mL으로 NF군에 비해 HF군에 비해 HF+HC-EA군에서 유의적으로 낮은 값을 보였다 (그림 45).

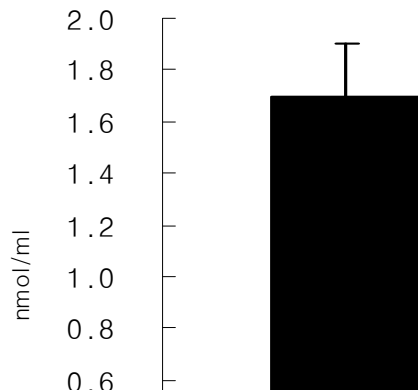


그림 45. Effect of HC-EA extract on lipid oxidation in rats

○ 혈장 총 항산화능 (Total antioxidant assay)

혈장 총 항산화능은 NF군 0.86 mmol Trolox eqv./L, HF군 0.83 mmol Trolox eqv./L, HF+HC-EA100이군 1.12 mmol Trolox eqv./L, HF+HC-EA300군 1.15 mmol Trolox eqv./L으로 NF군에 비해 HF군에서 유의적 차이가 없었고, HF군에 비해 HF+HC-EA군에서 유의적으로 높은 값을 보였다(그림 46).

실험 결과 고지방식이를 섭취한 군의 총 항산화능이 일반식이군의 총 항산화능 보다 낮은 것으로 보아 free radical의 반응이 고지방 식이를 하였을 때 더 우세하다고 사료된다. 그리고 고지방식이에 HC-EA 추출액이 섭취한 군의 총 항산화능이 고지방식이만 제공한 군보다 유의적으로 더 높은 것으로 보아 어성초 추출물의 섭취가 항산화 작용에 영향을 줄 가능성이 있는 것으로 보인다.

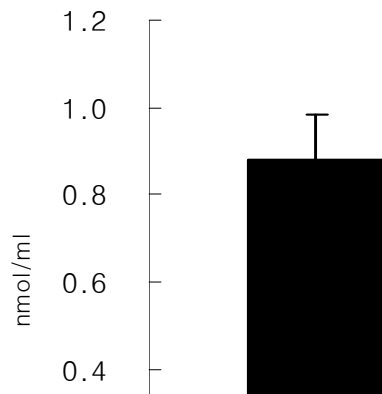


그림 46. Effect of HC-EA extract on total antioxidant activity in rats

○ 혈장 내 항산화 효소 활성

혈장 내 항산화 효소 활성을 알아보기 위해 혈장 내 SOD활성, catalase활성, GSH-Px활성 분석하였다(표 10). 혈장 내 SOD활성은 NF군 93.84±0.78 U/mL, HF군 95.99±0.26 U/mL, HF+HC-EA100군 96.75±0.34 U/mL, HF+HC-EA200군 95.71±0.25 U/mL, HF+HC-EA300군 94.56±0.72 U/mL으로 NF군에 비해 HF군에서 유의적으로 높은 값을 보였고(p<0.05), HF군과 HF+HC-EA군 사이에는 유의적 차이가 보이지 않았다.

혈장 내 catalase활성은 NF군 23.08±5.12 U/mL, HF군 8.31±1.33 U/mL,

HF+HC-EA100군 18.82 ± 3.52 U/mL, HF+HC-EA200군 28.32 ± 2.42 U/mL, HF+HC-EA300군 39.34 ± 0.15 U/mL으로 NF군에 비해 HF군에서 유의적으로 낮은 값을 보였고($p<0.05$), HF군에 비해 HF+HC-EA300군은 유의적으로 높은 값을 보였다($p<0.05$).

혈장 내 glutathione peroxidase (GSH-Px)는 NF군 0.382 ± 0.023 U/mL, HF군 0.369 ± 0.021 U/mL, HF+HC-EA100이군 0.623 ± 0.054 U/mL, HF+HC-EA200이군 0.567 ± 0.043 U/mL, HF+HC-EA300군 0.470 ± 0.014 U/mL으로 NF군에 비해 HF군에서 유의적으로 감소하였고($p<0.05$), HF군에 비해 HFBF군에서 유의적으로 증가하였다(표 12).

SOD는 superoxide를 과산화수소나 산소분자로 전환하는 작용을 하며, 여러 연구 결과 비만인 사람의 혈중 SOD 활성이 유의적으로 낮게 나타났다. Catalase는 H₂O₂를 H₂O로 분해하는 효소로 작용하며, 동물 세포에서 간과 신장에 높게 분포되어 있다. 본 연구에서는 혈장 내 활성도에서 HC-EA 추출액을 첨가한 군의 catalase 활성도가 유의적으로 높게 측정되었다.

GSH-Px는 살아있는 세포의 과산화물 독성치료 메커니즘을 제공하는 것으로 과산화물 분해를 촉진하는 free radical의 작용으로 생기는 세포 손상을 보호하는 효소이다. 본 연구에서는 HC-EA 추출액이 섭취한 군의 혈장 내 glutathione peroxidase 활성도가 유의적으로 높게 측정되었다.

[표 12] Effect of HC-EA extract on antioxidant enzyme activity in plasma (U/mL)

Parameter	NF1)	HF	HF+HC-EA100	HF+HC-EA200	HF+HC-EA300
SOD	93.84 ± 0.78	95.99 ± 0.26	96.75 ± 0.34	95.71 ± 0.25	94.56 ± 0.72
Catalase	23.08 ± 5.12	8.31 ± 1.33	18.82 ± 3.52	28.32 ± 2.42	39.34 ± 0.15
GSH-Px	0.382 ± 0.023 ₃	0.369 ± 0.021	0.623 ± 0.054	0.567 ± 0.043	0.470 ± 0.014

1) NF: Normal AIN-93G diet, HF: High fat diet

○ 간 내 항산화 효소 활성

간 내 항산화 효소 활성을 알아보기 위해 간 내 SOD활성, catalase활성, GSH-Px활성을 분석하였다 (표 13). 간 내 SOD활성은 NF군 315.07 ± 1.8 U/mg , HF군 298.30 ± 2.13 U/mg, HF+HC-EA100이군 281.75 ± 2.59

U/mg, HF+HC-EA200이군 289.95±3.594 U/mg, HF+HC-EA300군 302.95±4.10 U/mg 으로 NF군에 비해 HF군에서 유의적으로 낮은 값을 보였고(p<0.05), HF군에 비해 HFBF군에서 유의적으로 높은 값을 보였다(표 13).

간 내 catalase활성은 NF군 1131.46±56.41 U/mg, HF군 1117.76±55.98 U/mg, HF+HC-EA100이군 1330.28±74.59U/mg, HF+HC-EA200이군 1580.28±74.69 U/mg, HF+HC-EA300군 1851.01±94.78U/mg으로 NF군과 HF군 사이에는 유의적 차이가 없었으나 HF+HC-EA300군에서는 유의적으로 높은 값을 보였다(표 13).

간 내 glutathione peroxidase (GSH-Px)활성은 NF군 1.71±1.02 U/mg protein, HF군 1.68±0.57 U/mg, 2.55±1.24 U/mg, HF+HC-EA200이군 2.45±1.47 U/mg, HF+HC-EA300군 2.28±0.8 U/mg으로 NF군에 비해 HF군에서 유의적 차이가 없고, HF군에 비해 HF+HC-EA군에서 유의적으로 높은 값을 보였다(표 13).

[표 13] Effect of HC-EA extract on antioxidant enzyme activity in liver (U/mg protein)

Parameter	NF ¹⁾	HF	HF+HC-EA100	HF+HC-EA200	HF+HC-EA300
SOD	315.07±1.8	298.30±2.13	281.75±2.59	289.95±3.594	302.95±4.10
Catalase	1131.46±56.41	1117.76±55.98	1330.28±74.59	1580.28±74.69	1851.01±94.78
GSH-Px	1.71±1.02	1.68±0.57	2.55±1.24	2.45±1.47	2.28±0.85

1) NF: Normal AIN-93G diet, HF: High fat diet

○ 간 조직에서 항산화와 관련 단백질 mRNA 발현

간 조직에서 항산화와 관련된 단백질의 mRNA 발현을 알아보았다. Heme oxygenase (decycling) 1 (Hmox 1)는 세포손상을 막는 항산화제 역할을 한다[60-61].Hmox1의 발현은 NF군을 기준으로 했을 때, HF군은 유의적으로 감소하였고, HF+HC-EA100군, HF+HC-EA300군은 유의적으로 증가하였다(p<0.05).

산화 스트레스는 심혈관계 질병과 암을 포함한 많은 질병의 발생과 연관된다. 산화 스트레스에 대항한 보호 메커니즘 중 하나가 세포를 보호하는 단백질들의 발현을 전사적으로 증가시키는 것이다. 산화 스트레스에 노출이 되면, nuclear factor erythroid 2-like 2(NFE2L2)로도

알려진, NRF2가 항산화 반응 요소와 관련된 DNA 서열에 결합하여 하위의 유전자의 전사를 활성화시킨다. Nfe2의 발현은 NF군을 기준으로 했을 때, HF군은 유의적으로 감소하였고, HF+HC-EA100군, HF+HC-EA300군은 유의적으로 증가하였다(그림 43).

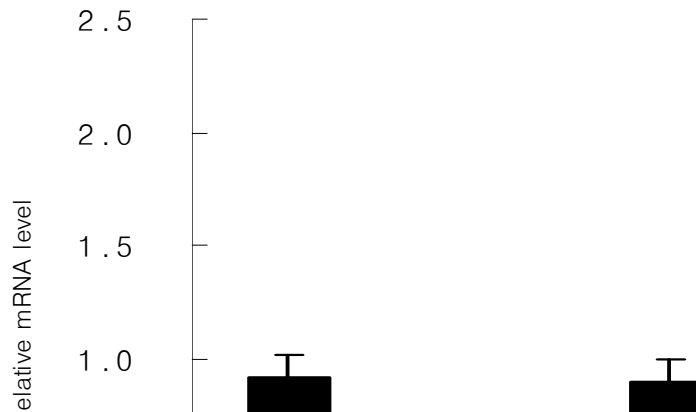


그림 43. Effect of HC-EA extract on mRNA expression of Hmox1 9(left panel) and Nfe2 (right panel) protein related to oxidant in liver of rats. Hmox1: heme oxygenase (decycling), Nfe2: nuclear factor, erythroid derived 2

8) 간 기능 검사

간 기능을 알아보기 위해 혈액 중 AST(Aspartate aminotransferase)와 ALT(Alanine aminotransferase)를 분석하였다 (표 14). AST와 ALT는 간세포에 다량 존재하는 효소이며 간 손상 시 세포외로 다량 유출되어 혈액중에 증가함으로써 간 손상의 지표로 이용된다. AST는 심장, 간, 골격, 신장, 뇌 및 췌장등에 분포하며 간염, 폐쇄성 황달 등의 간질환 외에도 심근경색, 진행성근이영양증에서 상승한다.

ALT는 혈중으로 유리되기 쉬운 구조를 가졌으며 심근, 간, 근육 및 혈구 등에 다량존재한다. AST는 NF군 81.54 ± 1.57 IU/L, HF군 98.71 ± 1.45 IU/L, HF+HC-EA100이군 86.52 ± 1.78 IU/L, HF+HC-EA100이군 85.42 ± 0.58 IU/L, HF+HC-EA300군 81.21 ± 1.53 IU/L으로 NF군에 비해 HF군에서 유의적으로 높은 값을 보였고($p < 0.05$), HF군에 비해 HF+HC-EA군에서 유의적으로 낮은 값을 보였다 ($p < 0.05$).

ALT는 NF군 60.06 ± 0.63 IU/L, HF군 78.01 ± 1.68 IU/L, HF+HC-EA100이군 67.03 ± 1.43

IU/L, HF+HC-EA200이군 65.12±2.67IU/L, HF+HC-EA300군 62.32±0.72 IU/L으로 NF군에 비해 HF군에서 유의적으로 높은 값을 보였고(p<0.05), HF군에 비해 HF+HC-EA군에서 유의적으로 낮은 값을 보였다 (표 14). 본 연구에서는 AST와 ALT 활성은 HC-EA 추출액이 섭취한 군에서 유의적으로 낮게 나타났다.

[표 14] Effect of HC-EA extract on AST and ALT activity

Parameter	(IU/L)				
	NF ¹⁾	HF	HF+HC-EA100	HF+HC-EA200	HF+HC-EA300
AST	81.54±1.57	98.71±1.45	86.52±1.78	85.42±0.58	81.21±1.53
ALT	60.06±0.63	78.01±1.68	67.03±1.43	65.12±2.67	62.32±0.72

1) NF: Normal AIN-93G diet, HF: High fat diet

9) 간의 병리조직학적 검사

Hematoxylin-Eosin (H&E) 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과는 그림 1과 같다. Chow에서는 간세포가 고르게 배열되어 있으며 세포와 세포사이의 경계구분이 잘 이루어져 있어 지방의 침착이나 지방입자의 지방구 형성 등을 보이지 않았다. 또한 간세포의 팽창, 괴사, 염증 등의 증상은 보이지 않았다.

이에 반하여, 고지방콜레스테롤 식이군들에서는 간세포의 배열이 불규칙적이며 세포와 세포와의 경계가 명확하지 않았으며, 지방입자의 지방구 형성을 쉽게 관찰할 수 있었다. 그러나 HFD+HC-EA100군, HFD+HC-EA200군, HFD+HC-EA300군에서는 HFD에 비하여 지방구의 숫자와 크기가 감소됨이 관찰되었다. 팽창, 염증반응 및 섬유증은 HFD에서 보였다.

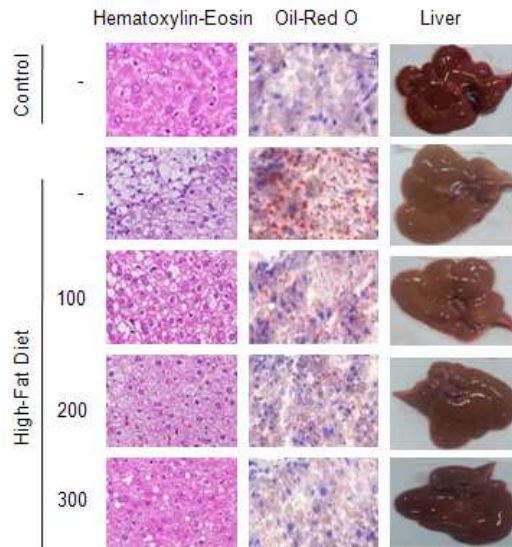


그림 44. 어성초 추출물로 처리한 고지방 식이군에 유도된 랫트에서의 간에 대한 조직병리학적 관찰

○ 어성초 추출물 (HC-EA)에 의한 간세포의 조직병리학적 변화

▶ 정상 식이군 (control)에서는 비정상적인 조직학적 소견이 없었고, 8주 동안 고지방 식이군에 유도된 군에서는 간세포에서 많은 양의 지방이 축적과 함께 세포질 공포가 팽윤되어 있었다. 고지방 식이군에 유도된 군과 비교하였을 때 300 mg/kg 어성초 추출물을 처리한 군에서는 지방 축적 저해와 함께 현저히 감소됨을 알 수 있었다 (그림 44. left pannel).

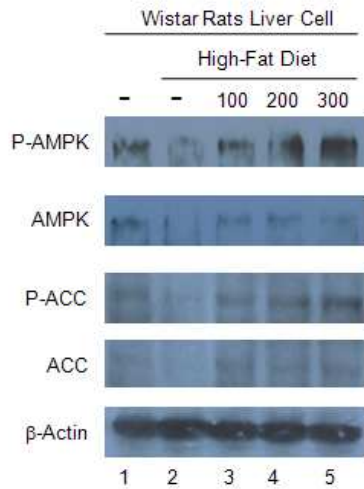
▶ Oil-red O 간세포 염색결과 정상식이군과 비교해보면, 고지방 식이군에 유도된 군에서는 Oil-red O(ORO) 지질유적 (lipid droplets) 크게 분포되어 있음을 알수있었다. 300 mg/kg 어성초 추출물을 처리한 군에서는 지질유적분포가 현저히 적게 분포되어 있음을 알수 있었다 (그림 44. middle pannel).

○ 어성초 추출물에 의한 고지방식으로 유도된 간세포에서의 AMPK와 ACC 인산화 활성화

▶ AMPK는 일반적으로 세포내에서 에너지 준위를 모니터링하는 센서 역할을 하고 있음. 운동을 하거나 허기진 상태에서 근육세포, 간세포 그리고 지방세포는 필요한 에너지를 공급하기 위하여 지방, 글리코젠 등의 합성을 억제하며, 지방으로부터 지방분해를 통하여 몸에서 필요한 에너지를 생성케 한다.

- ▶ AMPK는 지방세포로부터 분비되는 렙틴과 아디포넥틴의 세포내 신호전달물질로도 알려져 있음. 특히 아디포넥틴은 비만인 사람의 혈중에서 정상체중의 사람에 비교하여 낮은 농도로 측정되는 것으로 보아, 비만으로 기인한 인슐린저항성과 높은 관계가 있다.
- ▶ AMPK는 세포의 영양상태나 운동, stress등에 의해 변화하는 세포의 에너지 상태 (ATP/AMP ratio)에 반응하여 그 활성이 조절되는 인산화 효소로서 글루코스transport, fatty acid synthesis, cholesterol synthesis등의 여러 가지 생리작용에 영향을 미치고 있다. 최근 보고에 의하면 운동에 의하여 촉진되는 근세포에서의 글루코스 uptake에 AMPK가 관여한다고 보고되었다.
- ▶ 운동스위치 역할을 하는 효소인 AMPK의 활성화는 지방 합성을 억제하고 지방의 연소를 촉진하는 효과를 갖고있어 대사성질환의 여러 증상들에 좋은 효과를 나타낸다. 따라서 AMPK 활성화 물질을 찾으려는 연구는 세계적으로 대사성 증후군 치료제를 발굴하려는 타겟으로 알려져 있다.
- ▶ 최근 멜론 추출물 성분이 체내 대사를 조절하는데 관여하는데, 이 추출물이 AMPK를 활성화 하는 것으로 보고되었다. 또한 중요한 발견으로 글루코스 transporter4(GLUT4)의 세포내로 이동과 관련성을 보고하여 천연물 소재가 AMPK 활성화 물질 탐색을 위한 소재임을 제시하여 이 실험을 하게되었다.
- ▶ 고지방식으로 유도된 군에서는 정상식으로 유도된 군보다 AMPK (AMP-activated protein kinase)와 ACC (acetyl-CoA carboxylase) 인산화 정도가 감소됨을 알 수 있었다 (그림 A. upper panel),
- ▶ 고지방식으로 유도된 군에서는 AMPK인산화/AMPK와 ACC인산화/ACC 단백질 발현비율은 각각 50.2와 51.8%로 현저히 감소되었다. 반면에 고지방식으로 유도된 군과 300 mg/kg 어성초 추출물 처리군에서는 비교군과 비교할 때 73.6%와 87.8%로 현저히 증가함을 알 수 있었다 (그림 45).

A



B

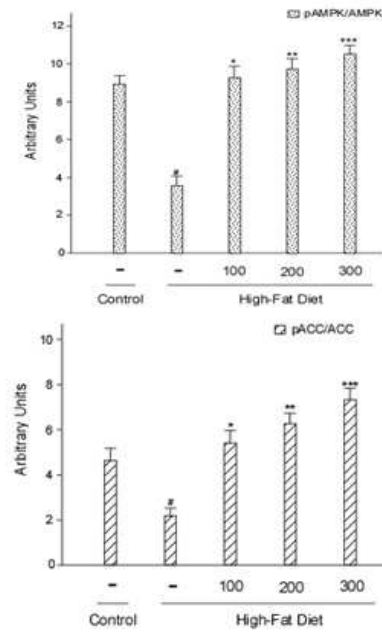


그림 45. 어성초 추출물에 의한 고지방식으로 유도된 간세포에서의 AMPK와 ACC 인산화 활성

○ 어성초 추출물에 의한 고지방식으로 유도된 간세포에서의 SREBP-1, FAS와 CTP-1의 단백질 발현 양상조사

▶ 정상 식이군에서 보다 고지방 식이군에 유도된 군에서는 SREBP-1와 FAS 발현양이 증가되었으며, 300 mg/kg 어성초 추출물 처리군에서는 비교군과 비교할 때 SREBP-1와 FAS 발현양이 54.4%, 41.2%로 감소 됨을 알 수 있었다. 또한 어성초로 처리한 군에서 CPT-1단백질은 2배이상 증가 되었음을 알 수 있어 어성초 추출물이 CPT-1 단백질 발현을 상향조절함을 알 수 있었다 (그림 46).

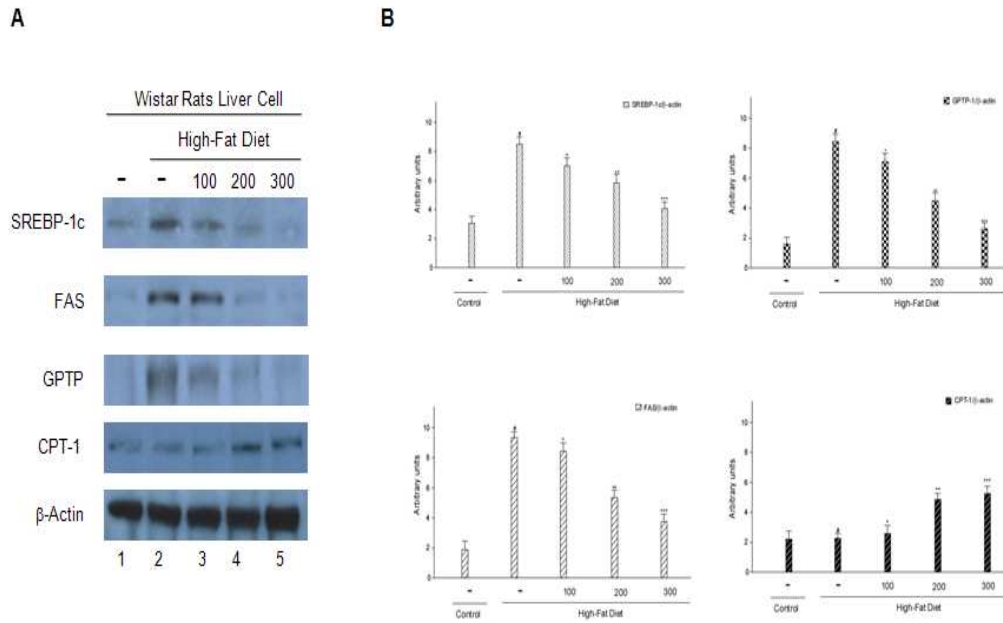


그림 46. 어성초 추출물에 의한 고지방식으로 유도된 간세포에서의 SREBP-1, FAS와 CTP-1의 단백질 발현 양상

○ 어성초 추출물에 대한 간기능 개선, 간보호 효과 결과요약

- ▶ 어성초 추출물 HC-EA가 고지방식이를 섭취한 랫트의 지방대사 및 항산화에 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다. 고지방식이군에 비해 고지방식에 HC-EA 300를 섭취한 군이 체중이 낮게 나타나 HC-EA 섭취가 지방축적을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 HC-EA 섭취가 혈당을 낮추는 것으로 나타났다.
- ▶ 고지방식이군에 비해 고지방식에 HC-EA 300를 섭취한 군이 혈액과 간 내 총 지질, 콜레스테롤, 중성지방 농도가 낮았다. 고지방식에 HC-EA300를 섭취한 군의 혈장 내 HDL-colestetol을 유의적으로 높게 나타났다.
- ▶ 고지방식이군에 비해 고지방식에 HC-EA 300를 섭취한 군에서 간 조직의 HMG-CoA reductase의 mRNA 발현이 유의적으로 감소하였고, HC-EA 추출액 섭취한 군의 간에서 콜레스테롤을 담즙산으로 전환시키는 CYP7A1의 mRNA 발현이 증가하였다.

- ▶ 지방산 및 중성지방 합성 촉진 관련 SREBP-1C 발현은 감소하였으며, 또한 HC-EA 추출액을 섭취한 군의 간 조직에서 지방산 산화 촉진 관련 CPT1의 mRNA도 증가하였다.
- ▶ 어성초 추출물을 섭취한 군에서 혈장 내 지질 산화물이 감소했고, 혈장 내 총 항산화능을 촉진시켰다. 또한 HC-EA섭취한 군에서 혈장 내 항산화 효소 활성과 간 내 항산화 효소 활성을 촉진시켰다.
- ▶ 고지방식이군에 비해 고지방식이에 HC-EA300를 섭취한 군의 간 조직에서 세포손상을 막는 항산화제 역할하는 Hmox1과 Nfe2의 발현이 HC-EA 추출액을 섭취한 군에서 증가하였다.
- ▶ 고지방식이군에 비해 고지방식이에 HC-EA 300를 섭취한 군의 간 조직에서 AST와 ALT 활성은 낮게 나타났다.
- ▶ 결과를 종합해 보며, HC-EA이 고지방식이를 섭취한 랫트의 지방대사와 항산화의 상태를 개선하는 것으로 사료된다.

8. 어성초추출물 소재의 안전성 연구

어성초 추출물소재의 효능에 더하여 향후 제품화 방안 및 전임상/임상준비의 일환으로 어성초추출물의 급성, 아급성 독성을 검토하였다. 시료는 생산공정으로 제조한 추출물을 사용하였다.

1. 시험방법

1) 단회투여 독성실험-급성

① 어성초 추출물 소재 400, 800, 1,200, 1,600, 2,000 mg/kgbw 투여량 시료를 각 처리구는 멸균 증류수를 사용하여 stock를 만들어서 희석하여 사용하였고, ICR mouse 암·수 각각 5마리에 복강투여 (0.2 ml, 1회)하여 시험하였다.

② 측정은 일반증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 부검, 통계학적 분석하였다.

2) 아급성독성시험-아급성

① 대조군으로 Saline을 사용하였으며, ICR mouse 암·수 각각 10마리에 강제 경구 투여하였다. 30일 동안 1주일에 2회 투여하고, 2회 체중을 측정하고 부검 24시간 전 절식시킨 후 부검하였다.

② 일반증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 사료 섭취량 및 물 섭취량, 노검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 조직병리검사, 장기 적출, 육안적 소견 및 장기중량, 조직병리 검사, 통계학적 분석하였다.

2. 결과

1) 유효성분의 안전성시험을 위한 마우스에 대한 급성시험

어성초추출물 소재는 마우스의 급성 및 아급성 실험에서 독성을 보이지 않았음

① 급성독성에 대한 임상증상 및 독성효과

어성초추출물 소재에 대한 시료를 농도별로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성 독성시험을 수행하면서 7일간 사망수를 조사하였고 (표 15), 여러 임상학적인 변화를 관찰하였다 (표 16). 투여 당일부터 7일 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 투여당일 5시간 관찰한 결과 점차적으로 행동이 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 어성초추출물 소재가 경구 급성 독성실험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

[표 15] Mortality of mice treated orally with olive extract for 7 days

Sex	Group mg/kgbw	Days after treatment								Final mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	0	0/5 ¹⁾	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	400	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

	800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1,200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1,600	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	400	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	800	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1,200	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1,600	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

1) Values are expressed as animal numbers (cumulative mortality number of mice/total number of mice).

[16] Clinical signs in mice treated, orally with olive extract for 7 days

Sex	Group mg/kgbw	Clinical sign	Duration (day)								
			0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	0	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
	400	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
	800	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1,200	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1,600	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
	2,000	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Female	0	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		400	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
			NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
800		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
1,200		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
1,600		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	
2,000		NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5	

Mice were used in all treatment.

NAD : not abnormalities detected, DMA : decrease of motor activity.

② 체중관찰

어성초추출물 소재 시료를 농도별 (0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/kgbw)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 몸무게의 변화를 측정하였다 (표 17). 투여 후 7일 동안 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다.

표 17. Body weights in mice treated orally with olive extract for 7 day

Sex	Group mg/kgbw	Day after treatment			
		0	4	7	Gain
Male	0	30.2±1.0	33.9±1.3	33.6±1.6	2.3
	400	30.1±1.3	32.6±1.2	33.0±1.6	2.9
	800	30.7±1.6	32.5±1.6	33.4±1.4	3.7
	1,200	30.9±1.0	33.7±0.9	34.1±0.8	3.2
	1,600	30.9±1.0	33.7±1.3	34.1±1.7	3.2
	2,000	30.2±1.2	32.5±1.0	33.3±1.4	3.1
Female	0	23.2±1.1	26.5±1.3	24.8±1.2	1.6
	400	23.9±1.0	27.0±0.8	26.1±0.9	2.2
	800	21.3±0.8	23.3±1.2	23.3±0.8	2.0
	1,200	23.6±0.8	26.9±0.9	25.5±1.6	1.9
	1,600	20.1±1.0	23.7±1.7	21.5±0.4	1.4
	2,000	21.2±0.8	23.8±1.2	22.9±0.6	1.7

③ 육안적 해부소견

어성초추출물 소재 시료를 농도별 (0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/kgbw)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 장기 (cecum, intestine, stomach, adr. gland, brain, heart, liver, kidney, spleen, testis, thymus)의 정상/비정상 증상을 육안적으로 조사하였

다 (표 18, 19). 시료 투여 후 7일 후 장기를 적출하여 유착, 확장, 종대를 조사한 결과 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다. 따라서 이 “어성초추출물 소재”는 ICR mouse 장기의 유착이나, 확장 및 종대 등에는 암수 모두에서 체중을 감소시키지 않았다.

[표 18]. Gross findings in male mice treated orally with olive extract for 7 days

Organ	Clinical sign	Group (mg/kgbw)					
		0	400	800	1,200	1,600	2,000
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-	-
	NGF ¹⁾	5(100%) ²⁾	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr.gland	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

1) NGP : No gross Finding.

2) () : % of finding from animal number 5.

[표 19]. Gross findings in female mice treated orally with olive extract for 7 days

Organ	Clinical sign	Group (mg/kgbw)					
		0	400	800	1,200	1,600	2,000
Organ	Adhesiion	-	-	-	-	-	-
	NGF ¹⁾	5(100%) ²⁾	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr.gland	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

1) NGP : No gross Finding.

2) () : % of finding from animal number 5.

④ 혈액학적 검사

어성초추출물 소재 시료를 농도별 (0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/kgbw)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일 후에 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (표 20). 수컷에서 대조구에 비해 42.3 mg까지 RBC, Hb, Hct 및 BLP가 증가하였다. 또한 암컷에서도 RBC, Hb, Hct, 및 BLP가 증가하였다. 따라서 이 “어성초추출물 소재”는 mouse의 암수 혈액학적인 인자에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

표 20. Hematological findings in mice treated orally with olive extract for 7 days

Item ¹⁾	Male Group (mg/kgbw)						Female Group (mg/kgbw)					
	0	400	800	1,200	1,600	2,000	0	400	800	1,200	1,600	2,000
WBC(X10 ⁶ /μg)	9.2	10.8	8.3	8.1	8.4	8.2	1.6	0.8	0.9	1.4	0.8	0.9
RBC(X10 ³ /μg)	7.3	7.3	9.2	10.1	11.4	11.2	7.9	6.3	8.1	7.6	8.4	8.3
Hb(g/dL)	13.3	13.7	14.3	20.1	21.2	20.4	15.5	13.7	16.2	16.1	15.5	15.7
Hct(%)	38.5	40.5	48.8	58.4	57.5	58.3	40.4	31.6	42.9	42.1	44.9	44.2
BLP(X10 ³ /μg)	1385	1275	1613	1635	1536	1442	789	1035	1013	1125	1078	1018
MCV	48	52	49	52	51	47	50	47	50	51	49	51
MCH	18.1	18.7	17.7	17.2	18.2	18.2	18.7	20.7	17.3	21.3	18.8	18.9
MCHC	38.2	35.1	34.9	33.7	34.4	33.8	37.2	40.4	37.1	37.2	38.1	38.2

1)WBC : white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration

2) 유효성분의 안전성시험을 위한 마우스에 대한 아급성시험

어성초추출물 소재에 대한 안전성의 경우 경구 투여시 아급성 독성을 보이지 않음.

① 아급성 독성에 대한 임상증상 및 독성효과

어성초추출물 소재에 대한 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mg/kgbw)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 mouse 사망수를 조사하였고 (표 21), 또한 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (표 22). 투여 당일부터 4주간 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서도 변화된 관찰은 없었다. 이 결과는 어성초 추출물이 경구 아급성 독성실험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

[표 21] Mortality of mice treated orally with olive extract for 4 weeks

Sex	Group (mg/kgbw)	week after treatment					Final mortality
		0	1	2	3	4	
Male	0	0/10 ¹⁾	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	1000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

1)Values are expressed as animal numbers (cumulative mortality number of mouses/total number of mouses).

표 22. Clinical signs in mice treated, orally with olive extract for 4 week1)

Sex	Group (mg/kgbw)	Clinical sign	week after treatment				
			0	1	2	3	4
Male	0	NAD ²⁾	10	10	10	10	10
	500	NAD ³⁾	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10
	1000	NAD	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10
	2000	NAD	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10
	Female	0	NAD	10	10	10	10
500		NAD	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10
1000		NAD	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10
2000		NAD	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10

- 1) Mice were used in all treatment.
- 2) NAD : not abnormalities detected.
- 3) DMA : decrease of motor activity.

② 체중측정, 사료 섭취량 및 물 섭취량

어성초추출물 소재 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mgkgbw) 로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 몸무게의 변화를 측정하였다. 4주가 경과하면서 수컷 마우스들의 평균 몸무게는 5.6~8.1 까지 증가하였다. 대조군과 처리군의 평균 몸무게 변화는 없었다. 사료의 섭취량은 대조군의 25.19 g 과 유사하게 섭취하였다. 물의 섭취

는 대조군의 45.04ml 보다는 약간 적게 섭취하는 경향을 나타내었지만 생리작용에 이상을 가져올 정도는 아니었다. 암컷 마우스들은 4주가 경과하면서 평균 몸무게는 2.2~3.3 까지 증가하였다. 대조군과 처리군의 평균 몸무게 변화는 없었다. 사료의 섭취량은 대조군의 23.48 g 과 유사하게 섭취하였으며 물의 섭취는 대조군의 34.65 ml 과 비슷하게 섭취하였다 (표 23).

[표 23] Body weight, food consumption and Water consumption of male mice treated orally with olive extract for 4 weeks.

Sex	Group (mg/kgbw)	Body weight (g)	Food intake (g)	Water intake (ml)
Male	0	36.33 ± 1.16	26.20 ± 9.53	46.79 ± 11.12
	500	35.49 ± 0.38	24.96 ± 11.22	37.83 ± 11.34
	1000	35.82 ± 1.25	25.01 ± 9.85	37.73 ± 8.37
	2000	34.17 ± 0.80	25.83 ± 9.68	37.36 ± 8.94
Female	0	34.83 ± 1.23	23.58 ± 7.11	35.76 ± 6.53
	500	33.58 ± 0.81	24.94 ± 6.81	36.33 ± 10.42
	1000	34.13 ± 0.55	24.32 ± 5.21	33.33 ± 12.06
	2000	32.98 ± 0.27	21.45 ± 8.66	35.12 ± 9.05

③ 육안적 해부소견

여성초추출물 소재 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mg/kgbw)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 장기 (cecum, intestine, stomach, adr. gland, brain, heart, liver, kidney, spleen, testis, thymus)의 정상/비정상 증상을 육안적으로 조사하였다(표 24). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 유착, 확장, 종대를 조사한 결과 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다. 따라서 4주간의 아급성 독성시험에서 “여성초추출물 소재”는 ICR mouse 장기의 육안적 소견에 아무런 영향을 미치지 않았다.

표 24. Gross finding in mice treated orally with olive extract for 4 weeks

Sex	Group (mg/kgbw)	Liver (g)	Stomach (g)	Spleen (g)	Kidney (g)	Lung (g)
Male	0	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	500	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	1000	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	2000	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Female	0	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	500	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	1000	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	2000	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

Values are expressed as animal numbers. () : % of finding.

④ 장기 중량측정

어성초추출물 소재 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mg kgbw)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성독성시험을 4주간 수행하면서 장기 (간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 무게를 조사하였다 (표 25). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 무게를 측정한 결과 무게에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

표 25. Organ weight in male mice treated orally with olive extract for 4 weeks

Sex	Group (mg/kgbw)	Liver (g)	Stomach	Spleen	Kidney		Lung
					R	L	
Male	0	1.65±0.18	0.26±0.13	0.12±0.03	0.33±0.04	0.32±0.05	0.22±0.02
	500	1.79±0.16	0.23±0.09	0.11±0.02	0.33±0.06	0.34±0.04	0.21±0.03
	1000	1.51±0.19	0.21±0.13	0.10±0.04	0.32±0.04	0.32±0.05	0.20±0.03
	2000	1.61±0.22	0.23±0.13	0.12±0.06	0.33±0.05	0.34±0.04	0.24±0.04
Female	0	1.60±0.17	0.24±0.09	0.11±0.04	0.30±0.02	0.31±0.03	0.21±0.02
	500	1.57±0.16	0.22±0.12	0.12±0.04	0.33±0.05	0.31±0.01	0.22±0.01
	1000	1.79±0.16	0.27±0.08	0.12±0.02	0.36±0.04	0.35±0.03	0.24±0.03
	2000	1.81±0.15	0.23±0.07	0.14±0.01	0.31±0.03	0.32±0.04	0.22±0.02

⑤ 혈액학적 및 혈액생화학적 검사 검사

어성초추출물 소재 시료를 농도별 (0, 500, 1,000, 2,000 mg/kgbw)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (표 26).

표 26. Hematological findings in mice treated orally with olive extract for 4 weeks

Item	Male Group (mg/kgbw)				Female Group (mg/kgbw)			
	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
WBC(Thous/ul)	3.1	2.9	2.5	2.3	2.9	2.1	3.3	2.6
RBC(Mil/ul)	7.6	7.8	8.7	7.3	8.5	8.6	8.7	7.8
Hb(g/dL)	12.3	12.7	12.8	11.9	13.2	12.9	13.2	12.2
Hct(%)	41.4	42.2	46.6	38.9	43.2	45.9	43.2	43.6

MCV(fL)	41.3	51.7	52.2	51.4	53.9	54.4	54.4	54.6
MCH(pg)	15.9	15.8	14.1	15.2	15.6	15.2	15.4	15.5
MCHC(g/dL)	29.3	30.1	27.4	27.3	28.8	27.4	28.2	28.5
Platelet(Thous/ul)	598	602	721	578	593	555	563	457
Segment(%)	25.3	23.9	24.7	27.3	24.9	21.8	24.5	25.7
Lymphocyte(%)	60.4	56.8	57.7	61.8	65.3	67.8	67.5	66.8
Monocyte(%)	6.2	6.8	7.4	5.8	2.5	4.9	5.7	3.8
Eosinphill(%)	2.9	3.7	2.7	3.5	6.3	5.8	5.3	3.5
Basophil(%)	0.7	0.8	0.8	0.7	1.5	1.2	1.8	0.8

Measured in samples from 4 weeks after treatment. WBC : White blood cell, RBC : Red blood cell, Hb : Hemoglobin, Hct : Hematocrit, BLP : blood platelet, MCV : mean corpuscular volume, MCH : Mean corpuscular hemoglobin, MCHC : mean corpuscular hemoglobin concentration.

이상과 같이 어성초 추출물에 대한 안전성 시험결과 암.수 모든 시험물질 투여군에서 시험물질로 인한 사망례가 발견되지 않았고, 투여물질에 의한 체중감소,혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검소견에서 시험물질에 대한 영향이 없는 것으로 인정되어 어성초의 안전성을 확인할 수 있었다.

라. 어성초 추출물의 제조공정 개발

1) 추출법의 상용화 공정 개발

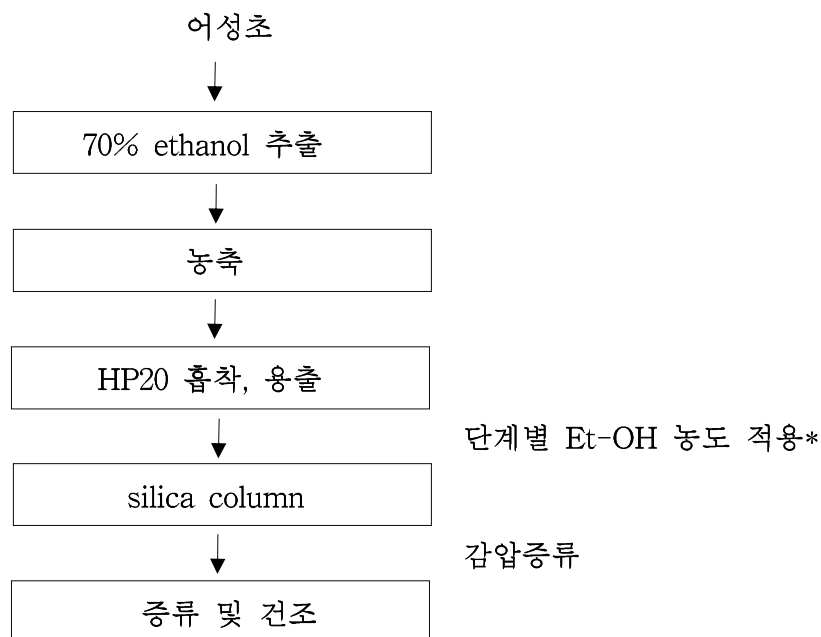
일차적인 효능측정과 일부 분획물의 효능측정 및 성분 규명을 통해 확인된 후보 추출물을 대상으로 생산을 위한 공정을 병행하여 검토하였다. 생산을 위해서는 효능이외에도 색상, 냄새, 성상 등에 따라 원료로서의 적용여부 또는 원료화를 위한 processing 이 필요하게 된다. 또 본 원료는 식품으로서의 적용을 위하여 ethanol 이외의 용매를 사용할 수 없는 만큼, 성분 규명에 사용한 용매를 사용하지 않으면서도 성분변화를 최소화하고 색/냄새가 제거되는 대량화, 경제성 확보 공정을 개발코자 하였다.

어성초는 생육초기인 4월 중순에 수확했을 때 quercetin 함량은 0.72%로 양파의 0.03-0.05%에 비하면 15배가량 많은 양을 함유하고 있다는 보고가 있으며, 부위별 quercetin 함

량은 꽃에서 2.06%로 가장 높았으며, 잎, 줄기, 뿌리 중에서는 잎에서 상당부분 포함된 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 생육시기를 특별히 조정할 수는 없었으나, 유효성분이 비교적 다량 존재하는 지상부(잎, 잔줄기) 만을 가지고 제조를 진행하였다.

천연물에서 Flavonoid 등 기능성분을 추출한 후 분리정제하는 방법은 기본적으로 유기용매의 분획에 의한 방법과 이온교환수지 또는 흡착수지를 충전한 컬럼을 이용하는 방법이 사용되고 있다. 본 원료 정제시에 전체적으로 알콜 추출시에는 색이 진해져 향후 사용에 문제가 있을 것으로 판단되었으며 물추출시는 활성성분의 용출(회수)이 제한될 우려가 있어, 70% ethanol 추출 후에 흡착수지인 HP20을 사용하여 정제를 진행하였다. 성분 분리를 통한 성분 규명에는 다양한 유기용매를 사용하여 분리하였으나 식품으로서의 적용을 감안하여 대량화 공정에서는 용매사용을 지양하고 HP20 사용하여 ethanol 만으로 분획하여 부분 정제를 진행하였다. 즉 흡착후 용리시에 우선 20% ethanol을 사용하여 일차 쉽게 용리되는 성분들을 제거하고 이후 80% ethanol을 사용하여 용리된 액을 사용하였다. 대량화 기본 공정은 아래 그림 21에 나타내었다.

상기 공정에 의해 제조된 시료는 색, 냄새 등에서 식품으로서 원료화가 어려울 정도의 큰 문제를 보이지 않았을 뿐 아니라, 그림 47에 나타난 바와 같이 지표성분으로 일차 선정된 quercetin 등의 flavonoid 을 거의 포함하는 것으로 확인되었다.



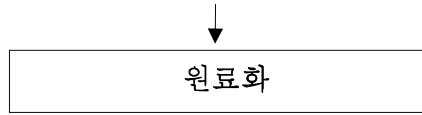


그림 47. 어성초 추출물의 생산 Process
 (*필요에 따른 적용여부 조정)

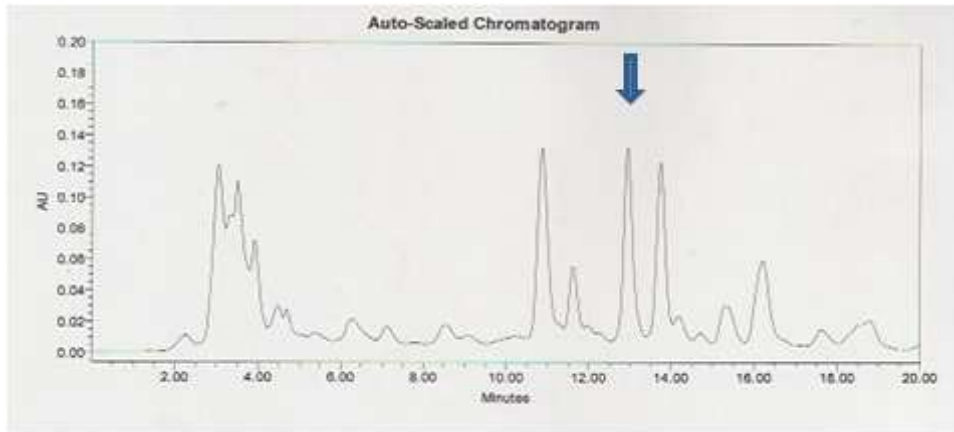


그림 48. 대량 제조 공정에 의해 제조된 시료의 HPLC profile
 (표시된 peak: quercetin)

마. 어성초 추출물의 생산시료의 특성

1. 생산시료의 조성

어성초추출 성분은 지표물질인 quercetin, quercitrin 등을 포함한 다양한 flavonoid, terpenoid 등 기능성분을 함유하고 있으며, 이들의 기능이 synergy 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다. 70% ethanol로 추출하고 부분정제하여 제조된 시료의 조성은 표 27과 같다. 통상 총 폴리페놀 성분은 50% 전후 였으며 폴리페놀중 quercetin, quercitrin 의 비율은 약 5-10% 였다.

표 27. 어성초 추출 시료의 조성

항목	시료
----	----

수분(%)	5.2
조단백(%)	4.3
조지방(%)	6.9
탄수화물(%)	16.1
회분(%)	3.2
폴리페놀 성분(%)	51.6

2. 생산시료의 열안정성 측정

추출성분의 기본적인 안정성 측정을 위하여 100℃에서의 안정성을 측정하였다. 가열처리 전후의 각 성분 함량을 HPLC로 측정한 결과, 각 지표성분은 모두 100±2%의 안정한 결과를 나타내었다(자료 생략).

3. 맛 측정

어성초 추출물에 대해 쓴 맛을 위주로 맛을 패널 테스트 하였다. 테스트 결과는 표 4에 요약한 바와 같이, 어성초 추출물 자체는 약한 쓴 맛을 나타내었고, 이는 flavonoid glycoside 성분 들의 고유한 맛 등이 나타내는 것으로 추정하였다. 향후 쓴 맛 등 이미(異味) 상쇄를 위해서는 encapsulation 또는 제제화시 맛 masking 을 사용 할 수 도 있으나, 그 강도가 심하지 않아 그대로 추출물을 사용하여 식품 유형에 따른 제제화를 시험하였다.

바. 적용성 시험

1. 제제화

1) 추출분말에 의한 유형별 제조

상기 제조된 어성초 추출분말을 가지고 식품으로서 다양한 유형의 제조 가능성을 시험하였다. 대표적으로 파우치 타입의 액상은 폴리페놀 성분들 특히 quercetin 등의 flavonoid

aglycone 형태들이 물에 대한 용해성이 그리 높지 않아 파우치 타입으로 정하였으며, 고형 타입으로서 분말(또는 granule) 형태의 스틱 타입, 정제 타입, 캡슐 타입 의 4가지 유형에 대한 제조 시험을 진행하였으며, 제제화시 타 일반 성분들과의 조합에 별다른 문제점을 보이지 않음을 확인하였다.

유형별 제조 방법은 아래와 같으며, 제조된 시료는 그림 48-51에 나타내었다.

A. 액상파우치 유형

제품명	H분말 액상	공정	혼합- 유동층조립- 건조- 포장
내용량	50 ml	식품의유형	제품화 제형제안용
제형	50ml 스탠딩파우치	포장방법	미정
섭취방법	미정	배합량	Set 300 g 제조
표시량	미정	담당	

시험번호 :

배합비결정일:

품번	순서	코드	성분명	배합비 (%)	제품함량 (mg)	필요량 (kg)	함량	안전율	비고
1	o	신규	H분말	0.500	0.250	1.500			
2			액상과당	15.000	7.500	45.000			
3			홍삼농축액	0.600	0.300	1.800			
4			식물혼합농축액	0.550	0.275	1.650			
5			맥아당	0.500	0.250	1.500			
6			덱스트린	0.500	0.250	1.500			
7			타우린	0.300	0.150	0.900			
8			구연산	0.080	0.040	0.240			
9			허브향[액상/혼합제제]	0.060	0.030	0.180			
10			영지농축액	0.050	0.025	0.150			
11			녹용추출물	0.030	0.015	0.090			
14			정제수	81.830	40.915	245.490			
합 계				100.0000	50.000	300.000			

B. 스틱 유형 제조

제품명	H분말 스틱	공정	혼합-유동층조립-건조-포장
내용량	2000 mg	식품의유형	제품화 제형제안용
제형	2.0g 스틱포	포장방법	
설치방법	150ml 따뜻한 물에 타서 섭취	배합량	Set 300 g 제조
표시량		담당	

시험번호 :

배합비결정일:

품번	순서	코드	성분명	배합비 (%)	제품함량 (mg)	필요량 (kg)	함량	안전율	비고
1	조립	신규	H 분말	25.000	500.000	75.000			
2	조립		유당혼합분말	66.700	1,334.000	200.100			
3	조립		홍차추출분말	5.000	100.000	15.000			
4			홍차분말향	3.000	60.000	9.000			
			이산화규소	0.300	6.000	0.900			
합계				100.0000	2,000.000	300.000	-		

C. 정제 유형 제조

제품명	H분말 정제	공정	혼합-타정-코팅
내용량	500 mg	세분류	제품화 제형제안용
제형	500mg 장방형 小 장방형 정제	기능성 표시 사항	미정
섭취방법	물과 함께 섭취(예시)	배합량	400 kg
PM		포장방법	미정

시험번호 :

배합비결정일:

품번	순서	성분명	배합비 (%)	제품함량 (mg)	필요량 (kg)	제조원	코드번호	안전율	표시량	비고
1	o	H 분말	10.000	50.00	40.000		신규			
2		결정셀룰로오스102	48.000	240.00	192.000					
3		유당혼합분말	40.000	200.00	160.000					
4		스테아린산마그네슘	1.000	5.00	4.000					
7	코팅	히드록시프로필메틸셀룰로오스	0.900	4.50	3.600					
8	코팅	자당지방산에스테르	0.100	0.50	0.400					
합 계			100.000							

D. 캡슐 유형 제조

제품명	H분말 캡슐	공정	혼합-충전-탈분-포장
내용량	300 mg	식품의유형	제품화 제형제안용
제형	300mg, 녹색 1호 경질캡슐	표시량	
1일 섭취량		배합량	300 g
PM		포장방법	미정

시제번호 :

배합비결정일:

품번	합량	성분명	배합비 (%)	제품함량 (mg)	필요량 (kg)	제조원	코드번호	안전율	비고
1	신규	H 분말	10.000	30.000	30.000		신규		
2	00004	결정셀룰로오스102	49.000	147.000	147.000				
3	04988	유당혼합분말	40.000	120.000	120.000				
4	00032	스테아린산 마그네슘	1.000	3.000	3.000				
5									
합 계			100.000	300.000	300.000				
<녹색 경질캡슐>									
1	00451	캡셀1호 녹색		-	-				
합 계			-	-	-				



그림 48. 액상파우치 유형



그림 49. 스틱포 유형

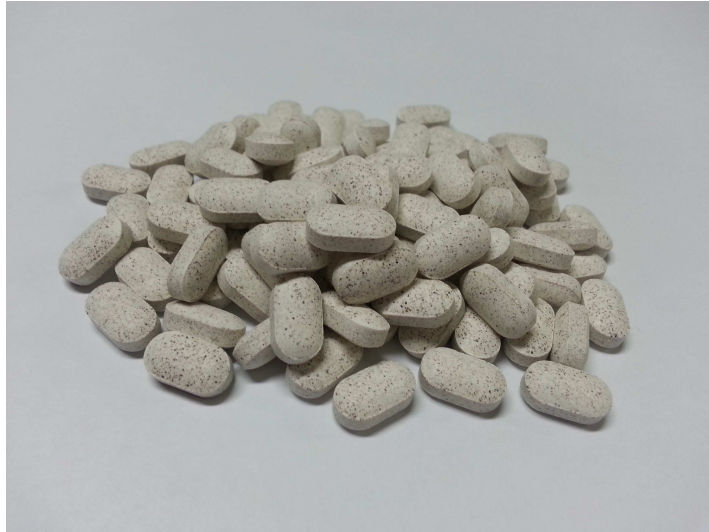


그림 50. 정제 유형



그림 51. 캡슐 유형

2) 제형에서의 안정성 경시변화

어성초 추출성분을 함유한, 함량이 다른 각 식품 유형에서의 안정성을 측정하였다. 제조된 각각의 분말 유형과 액상 파우치는 실온과 37°C에서 색상, 냄새, 뭉침, 지표성분 함량 등을 측정하였다.

A. 액상파우치 유형

실온과 37°C에서 색상, 냄새, 뭉침 등 전체적으로 양호하였으며, 함량에 있어서도 90% 이상 거의 변화를 보이지 않아 상당히 안정함을 확인하였으나 고온에서 성상이나 함량변화가 되는지에 대해 지속적으로 확인할 필요가 있었다(표 27). 역시 향후 장기 안정도와 함께 보다 다양한 제제 성분과의 혼합 안정도를 확인할 필요가 있을 것이다.

표 27. 액상파우치 유형에서의 경시변화

시험군		초기	1개월	2개월	3개월
실온	색상	○	○	○	○
	냄새	○	○	○	○
	뭉침	○	○	○	○
	함량	100%	>95%	>95%	>95%
37°C	색상	○	○	○	○
	침전	○	○	○	△
	뭉침	○	○	○	○
	함량	100%	>95%	>90%	>90%

○양호; △약간 이상; ×이상; NT - Not Tested

B 스틱포 유형

스틱포 유형도 실온과 37°C에서 색상, 냄새, 뭉침 등 전체적으로 양호하였으며, 함량에 있어서도 거의 변화를 보이지 않아(약간의 차이는 분석 오차인 것으로 판단) 상당히 안정함을 확인하였고(표 28), 역시 향후 장기 안정도와 함께 보다 다양한 제형 성분과의 혼합 안정도를 확인할 필요가 있을 것이다.

표 28. 스틱포 유형에서의 경시변화

시험군		초기	1개월	2개월	3개월
실온	색상	○	○	○	○
	냄새	○	○	○	○
	뭉침	○	○	○	○
	함량	100%	>95%	>95%	>95%
37°C	색상	○	○	○	○
	침전	○	○	○	○
	뭉침	○	○	○	○
	함량	100%	>95%	>95%	>95%

○양호; △약간 이상; ×이상; NT - Not Tested

C. 정제 유형

정제 유형도 실온과 37°C에서 색상, 냄새, 뭉침 등 전체적으로 양호하였으며, 함량에 있어서도 거의 변화를 보이지 않아(약간의 차이는 분석 오차인 것으로 판단) 상당히 안정함을 확인하였고(표 29), 역시 향후 장기 안정도와 함께 보다 다양한 제형 성분과의 혼합 안정도를 확인할 필요가 있을 것이다.

표 29. 정제 유형에서의 경시변화

시험군		초기	1개월	2개월	3개월
실온	색상	○	○	○	○
	냄새	○	○	○	○
	뭉침	○	○	○	○
	함량	100%	>95%	>95%	>95%
37°C	색상	○	○	○	○
	냄새	○	○	△	○
	뭉침	○	○	○	○
	함량	100%	>95%	>95%	>95%

○양호; △약간 이상; ×이상; NT - Not Tested

D. 캡슐 유형

캡슐 유형도 실온과 37°C에서 색상, 냄새, 뭉침 등 전체적으로 양호하였으며, 함량에 있어서도 거의 변화를 보이지 않아(약간의 차이는 분석 오차인 것으로 판단) 상당히 안정함을 확인하였고(표 30), 역시 향후 장기 안정도와 함께 보다 다양한 제형 성분과의 혼합 안정도를 확인할 필요가 있을 것이다.

표 30. 캡슐 유형에서의 경시변화

시험군		초기	1개월	2개월	3개월
실온	색상	○	○	○	○
	냄새	○	○	○	○
	뭉침	○	○	○	○
	함량	100%	>95%	>95%	>95%
37°C	색상	○	○	○	○
	침전	○	○	○	○
	뭉침	○	○	○	○
	함량	100%	>95%	>95%	>95%

○양호; △약간 이상; ×이상; NT - Not Tested

사. 규격 확립

1. 표준 공정 확립

상기 확립한 기본 공정은 아래와 같이 제품 표준 공정화(요약)하여 생산토록 하였다.

<p style="text-align: center;">어성초 추출물 제조공정 요약 Standard Operation Process for <i>Houttuynia cordata</i> Extract</p>		
공정	작업	검사
<pre> graph TD A[어성초] --> B[70% 메탄올 추출] B --> C[증류] C --> D[원심분리] D --> E[흡착수지] E --> F[용리] F --> G[실리카 컬럼] G --> H[증류] H --> I[건조] I --> J[제제화] </pre>	<p>세척, 조분쇄</p> <p>70% Et- OH</p> <p>50℃ 이상</p> <p>HP20, SV 조절</p> <p>단계별 용리 (20- 80%) SV 조절</p> <p>SV 조절</p> <p>40- 50℃</p> <p>동결건조</p> <p>필요시 dextrin 혼합</p>	<p>이물질, pH, 입자</p> <p>성분 함량</p> <p>온도, 고형분 함량</p> <p>성분 함량, 고형분 함량</p> <p>통과액 성분 함량</p> <p>용리액 성분함량 고형분 함량</p> <p>탁도, 색, 성분함량</p> <p>고형분, 성분 함량</p> <p>중량, 수분량</p> <p>부형제량, 성분함량</p>

2. 표준 원료 규격서

상기 원료는 아래와 같이 원료제품 표준 규격서(요약)를 작성하여 생산토록 하였다.

별첨 표준규격서

어성초추출물

***Houttuynia cordata* Extract**

이 원료는 어성초(*Houttuynia cordata*) 에서 추출한 폴리페놀 등의 성분 추출물로 이 원료는 어성초추출물과 말토덱스트린을 함유하며 정량할 때 어성초추출물은 quercetin, quercitrin의 총 성분함량이 2.5% 이상이다.

제조방법

건조된 어성초 2kg을 18메쉬 이하로 분쇄한 다음, 중량대비 10배의 70% 에탄올 수용액을 사용하여 환류냉각기를 달아 수욕상에서 4시간 교반하며 가열하여 추출물을 얻는다. 추출물은 여과지를 이용하여 여과한다. 여액은 흡착수지를 통과하여 주 성분을 흡착시키고 80% 에탄올 수용액으로 용리시킨 다음 실리카 정제과정을 거친 후 가온하여 에탄올을 감압 증류시킨다. 농축된 액은 회전 감압 농축기로 40- 50℃에서 수분을 제거 후 동결건조기를 이용하여 파우더 상의 시료를 얻는다. 시료는 quercetin, quercitrin의 총 성분함량이 2.5% 이상이 되도록 하며 필요시 말토덱스트린을 혼합한다.

성 상

이 원료는 갈색의 가루로 특이한 냄새가 있다.

확인실험

이 원료 0.2g에 메탄올 2ml를 넣어 수욕상에서 2분간 가온한 다음 여과한다. 여액에 마그네슘 0.1g 및 염산 1ml를 가하여 방치하였을 때 플라보노이드류의 특성인 적갈색을 나타낸다.

순도시험

- 1) 이 원료 0.1g을 에탄올 100ml에 넣어 녹일 때 액은 옅은 황색이며 맑다.
- 2) 중금속 : 이 원료 1.0g을 달아 식품공전 시험법에 따라 조작하여 시험한다. 비교액에는 납표준액 1.0ml를 넣는다.(10ppm 이하)
- 3) 비소 : 이 원료 1.0g을 달아 식품공전 시험법에 따라 조작하여 시험한다. 비교액에는

비소표준액 2.0mℓ를 넣는다.(1ppm 이하)

4) 잔류용매(에탄올) : 이 원료 0.2g을 정밀하게 달아 디메틸포름아미드를 넣어 정확하게 10mℓ로 하여 검액으로 한다. 따로 에탄올 표준품을 0.2g을 정밀하게 디메틸포름아미드를 넣어 정확하게 100mℓ로 하고, 이 액 10mℓ을 정확하게 취하여 여기에 디메틸포름아미드를 넣어 정확하게 100mℓ로 하여 표준액으로 한다. 검액과 표준액 각 1μℓ씩을 가지고 다음의 조작조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 시험하여 에탄올의 피크면적 A_T 및 A_S 를 이용하여 에탄올 잔류량을 구한다(에탄올 5000ppm 이하).

$$\text{에탄올의 양(mg)} = \frac{A_T}{A_S} \times \text{에탄올 표준품의 양(mg)}$$

조작조건(HEWLETT PACKARD 5890)

검출기 : 불꽃이온화 검출기(Waters, SYS. IMT. MDD)

칼럼 : 안지름 0.2mm, 길이 50m의 관에 폴리에틸렌글라이콜 TPA가 교차결합된 HP- FFAP를 0.3μm 두께로 피복 처리한 칼럼

칼럼 온도 : 주입 후 7분 까지 50℃로 유지하고 230℃가 될 때까지 매분 당 10℃로 상승시킨 다음 5분간 유지시킨다.

주입구온도 : 240℃

검출기온도 : 240℃

이동상 : 헬륨

유속 : 0.8mℓ/min.

건조감량

6.0% 이하(1g, 105℃, 1시간)

강열잔분

0.6% 이하(1g, 제 3법)

정량법

이 원료 약 50mg을 정밀하게 달아 에탄올로 녹여 정확하게 100mℓ로 하여 검액으로 한다. 따로 quercetin, quercitrin 표준품 10mg을 정밀하게 달아 에탄올에 녹여 정확히 100mℓ로 하여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 10μℓ씩을 취하여 다음의 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 어성초추출물 포접체에서 quercetin, quercitrin 각각의 피크면적의 비율로 각 성분의 양을 구하고 이를 합하여 어성초 추출물의 양을 구한다.

<계 산> 어성초 추출물 성분의 양(mg) = quercetin의 양(mg) + quercitrin 의 양(mg)

조작조건 (Waters 510)

검 출 기 : 자외부흡광광도계(M486, 254nm)

칼 럼 : 내부직경 4.6mm, 길이 250mm인 스테인레스관에 5 μ g의 액체크로마토그래프
용 옥타데실 실란화한 실리카겔을 충전한다.

칼럼온도 : 30 $^{\circ}$ C

이 동 상 및 유속 :

이동상 - MeOH : D.W : Acetic acid = 15 : 3 : 1

유속 - 1.0ml/min

검사성적서

1. 검체내용

제품명	Houttuynia cordata Extract	접수번호	1391223-0031
제품유형	원료분말	접수일자	2013. 12. 23
검사목적	참고용	제조일자	-
업소명	㈜마크로케어	유통기한	-
소재지	충북 청원군 오창읍 각리 641-13	의뢰인	김무성

귀사에서 우리 센터에 의뢰한 검체에 대한 결과는 다음과 같습니다.

2. 시험결과

검사항목	기준 및 규격	결과	적·부
성상	갈색 가루, 특이한 냄새	-	-
확인법	적갈색	-	-
중금속(mg/kg)	10 mg/kg 이하	불검출	-
비소(mg/kg)	1 mg/kg 이하	불검출	-
잔류용매-에탄올(mg/kg)	5000 mg/kg 이하	불검출	-
수분(g/100g)	6.0 g/100g 이하	2.50	-
회분(g/100g)	0.6 g/100g 이하	0.32	-
성분-케르세틴+케르시트린(g/100g)	2.5 g/100g 이상	2.90	-
세균수(CFU/g)	10 ³ CFU/g 이하	음성	-
판정	-		

비고:

1. 식품위생법시행규칙제4조의2 규정에 의하여 위와 같이 성적서를 발급합니다.
2. 이 성적서는 홍보 및 광고 등의 용도로 사용을 금합니다.
3. 의뢰기관에서 제공한 기준 및 시험법을 참고하여 시험하였습니다.

2014년 01월 06일

건국대학교 바이오 식·의약 연구



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011)	어성초로부터 지방간 예방 및 개선용 새로운 기능성 개선소재 개발(주관)	국내산 어성초 추출물 세포독성 및 항염증 활성 스크린	100	추출물의 세포내 독성검사 및 간세포 손상 및 항산화 억제능 검색
		항염증 활성을 갖는 어성초 추출물의 항산화 기전 규명(<i>in vitro</i>)	100	ESR 분석을 통한 어성초 추출물의 항산화 활성분석
		항염증 활성을 갖는 어성초 추출물의 항염증 기전 규명(<i>in vitro</i>)	100	추출물 처리 전·후 세포사 및 염증 관련유전자단백질의 발현양상 분석
	어성초로부터 간기능 개선소재 실용화 기술 개발(참여)	국내산 어성초 추출물의 추출 및 정제	100	식품으로 사용 가능한 용매의 조건별 추출 효율을 비교하여 70% Et-OH, 환류 추출 방법 확보, 흡착수지이용 및 단계별 용매분획에 의해 Ethyl acetate 분획 선정
어성초 추출물의 성분분석		100	분획 성분의 분리 및 IR, NMR, LC/MS 등에 의한 주성분 1종 규명	
어성초 추출물의 기능성 물질 효능 및 항산화제로서의 개발 가능성 분석		100	분획별 시료 제공. 기본 항산화 및 효능 측정, 유기농 대량 원료 입수선 확보, 분석을 위한 실험실적 추출, 정제 이외에 생산 scale 에서의 추출, 정제 기본 공정확립	
2차 년도 (2012)	어성초로부터 지방간 예방 및 개선용 새로운 기능성 개선소재 개발(주관)	동물실험계를 이용한 어성초 추출물의 간기능 개선 효능 검증	100	동물모델에서 추출물의 효능분석/사염화탄소로 유도된 간독성 개선효과, 면역조직화학법, 간조직의 지질과산화물 함량 및 항산화효소계 활성 측정, 간기능 지표 및 혈액 지질 profile
		동물실험계를 이용한 항염증 활성에 관여하는 염증관련 유전자/단백질 신호 전달 연구	100	동물모델을 이용한 어성초 추출물의 면역항체학적 분석/간손상 유발, 혈액 분석, 조직학적 변화 관찰, 간기능 지표 및 혈액과 간조직의 지질함량 분석
		제품화 방안 및 전임상/임상준비	100	단회투여 독성실험 (급성)-측정은 일반증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 부검, 통계학적 분석/아급성독성시험 (아급성)-일반증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 사료 섭취량 및 물 섭취량, 노검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 조직병리검사, 장기 적출, 육안적 소견 및 장기중량, 조직병리 검사, 통계학적 분석
	어성초로부터 간기능 개선소재 실용화 기술 개발(참여)	성분 규명 및 조성 확립	100	분리 성분의 규명 및 조합 확인/안정성, 제형적용성 시험. 추가 성분의 규명 및 성분간 조합 시료 제조. 추출성분의 열, 효소, pH 등에 대한 안정성 측정 및 식품 제형 적용성 확인.
		대량 생산을 위한 파일럿 공정 개발 및 본 공정 개발	100	파일럿 공정 개발 및 생산 공정 개발/1차년도에 기본 공정 조기 진행. 공정 보완하여 대량화 제조 진행.
		제품화 방안 및 임상준비	100	기시법 확보 등 (건기식 원료화 준비 작업 등)건기식 원료화를 위한 작업 수행(원료 규격, 기준 및 시험법 등 확보).

관련분야 기여도

○ 국내에서 간 질환 유병률의 지속적 증가와 대사증후군 치료제 시장의 지속적인 성장에도 불구하고, 직접적인 작용점을 가진 약물의 부재로 치료를 목적으로 하는 신약 개발의 필요성이 어느 때보다 절실히 요구되고 있다. 이에 많은 국내외 제약사와 건강기능식품 업체들이 만성 간질환 치료제를 비롯한 대사 증후군 치료제 개발에 박차를 가하고 있다.

○ 본 연구개발을 통한 효능이 뛰어난 간질환 예방 및 치료개선제 개발은 고령사회에 대비한 건강하며 풍요로운 삶을 위한 원천기술 개발에 기여할 것이며, 이를 통한 국민의 삶의 질을 향상시키고, 고가의 해외신약을 대체하는 국내신약 및 기능성식품 개발로 급증하는 의료 비용을 절감시킬 수 있다. 우리나라에 뿐만 아니라 전 세계적으로 간질환 환자가 발생률이 지속적으로 증가하여 전 세계적으로 간질환 치료제 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

○ 국내 건강기능식품 소재로서 헛개나무 추출물, 표고버섯균사체 추출물, 밀크씨슬 추출물 등이 개발되어 있으나 본 연구의 간기능 개선과는 mechanism 측면에서 다른 것으로 사료되어, 본 연구의 개발 산물은 시장을 확대하고 보다 국민 건강에 기여 할 수 있을 것으로 판단된다. 또 국내 뿐 아니라 해외에서도 간기능 개선의 새로운 소재는 상당히 시장성이 있을 것으로 보인다 (참여 기업의 해외 업체와의 시장성 논의 등).

○ 간 보호 치료개선제의 개발은 합성물질 보다 가격이 저렴하고 부작용이 없는 천연물 소재로부터 간질환 예방 및 재발을 줄일 수 있는 치료법 개발에 이용할 수 있다는 중요하다는 사실을 알 수 있어 본 연구개발이 지속적으로 진행되어야 한다고 사료된다.

○ 간질환 예방 및 치료개선 소재개발의 최소화된 개발 비용과 연구기간으로 보다 효율적으로 신소재 후보물질을 도출하는 전략을 활용하였으며, 본 연구의 결과로 나온 소재의 용도 특허 획득 후, 식품회사나 제약사와의 연계 개발이 가능하게 될 것이다. 건강기능성식품의 개발 경험이 활발한 기업에 기술 이전할 경우 공동 연구 체계를 구축하여 건강기능식품 및 신약 개발의 성공률을 높일 수 있는 효과가 기대된다.

○ 본 연구과제에 참여하는 과정에서 대학원생을 포함한 여러기관의 참여 연구 인력의 연구능력향상을 통해 관련 분야의 제품개발을 위한 우수 연구인력의 확보와 국가 연구수준 향상에 기여할 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		논문		기타
		출원	등록	SCI	비SCI	
1차 년도	목표					
	달성	2				
2차 년도	목표	1		1		
	달성	1		1		
계	목표	1		1		
	달성	3		2		
	달성도(%)	300%		200%		2편의 논문이 투고중

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구계획에 따라 도출된 것으로 예시와 같이 작성

(2) 연구성과 활용 목표

구분		기술실시(이전)	* 상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1				
	달성	1	1				

(단위 : 건수)

* 2014년도 상반기에 (주) 화니핀 코리아에 기술이전되어 상품화 되었음

나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	1)	김무성	강현	박태규	TJPR	2013; 12 (4): 523-528	국외	SCI
투고중		김무성	강현	박태규	Molecules		국외	SCI
2014	2)	Koppula	강현	박태규	AJCM		국외	SCI
투고중		김무성	강현	박태규	IJPS		국외	SCI

1)

Original Research Article

Anti-Neuroinflammatory Effects of *Houttuynia cordata* Extract on LPS-Stimulated BV-2 Microglia

Tae-Kyu Park¹, Sushruta Koppula¹, Moo-Sung Kim², Seung-Hyo Jung¹ and Hyun Kang^{1*}

¹Department of Biotechnology, Research Institute for Biomedical & Health Science, College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, Chungju, 380-701, ²R&D Center, Macrocure Tech., Ltd, Ochang 363-883, Republic of Korea, ³KuGen Healthcare Institute, Chungju, 380-150, Republic of Korea

*For correspondence: Email: hkang@kku.ac.kr; Tel: 82-43-840-3603; Fax: 82-43-852-3616

Received: 10 April 2013

Revised accepted: 7 July 2013

Abstract

Purpose: To evaluate the anti-neuroinflammatory effects of *Houttuynia cordata* extract (*H. cordata*) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV-2 microglial cells, and its anti-oxidant properties.

Methods: Anti-oxidant properties were evaluated by 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging assay. Cell viability was assessed by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. LPS was used to stimulate BV-2 cells. Nitric oxide (NO) levels were measured using Griess assay. Inducible NO synthase (iNOS) expression, interleukin (IL)-6 expression level were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot analysis.

Results: Ethyl acetate (HC-EA) extract of *H. cordata* significantly scavenged DPPH free radicals in a concentration-dependent fashion. The increased levels of NO, iNOS and IL-6 in LPS-stimulated BV-2 microglial cells were also suppressed by HC-EA extract in a concentration-dependent manner.

Conclusion: The result indicate that the HC-EA extract exhibited strong anti-oxidant properties and inhibited the excessive production of pro-inflammatory mediators, including NO, iNOS and IL-6, in LPS-stimulated BV-2 cells. The anti-oxidant phenolic compounds present in HC-EA extract might play an important role in ameliorating neuroinflammatory processes in LPS-stimulated BV-2 microglial cells.

Keywords: *Houttuynia cordata*, DPPH radicals, antioxidant, neuroinflammation, BV-2 cells, iNOS, COX-2, IL-6.

Tropical Journal of Pharmaceutical Research is indexed by Science Citation Index (SciSearch), Scopus, International Pharmaceutical Abstract, Chemical Abstracts, Embase, Index Copernicus, EBSCO, African Index Medicus, JournalSeek, Journal Citation Reports/Science Edition, Directory of Open Access Journals (DOAJ), African Journal Online, Bioline International, Open-J-Gate and Pharmacy Abstracts

2)

CC: editor@ajcm-us.com

Ref: Ms. No. AJCM-D-13-00110R
 Houuttynia cordata Attenuates Lipid Accumulation via Activation of AMP-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in HepG2 Cells
 The American Journal of Chinese Medicine

Dear Dr Hyun Kang,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in The American Journal of Chinese Medicine. Your manuscript will be published in the AJCM, volume 42, issue 3 (in June 2014).

You should receive the galley proofs via e-mail directly from the publisher in April or May 2014. Please respond to the proofs within 48 hours after the receipt.

As we mentioned to you in our previous communication, there is \$35 per printed page charge to be paid to the publisher when you receive the galley proofs of your article. The page charge is mandatory, and failing to do so will cause administrative withdrawal of your published article.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Hui He
 Managing Editor
 The American Journal of Chinese Medicine

Please let us know immediately if there is a change in your e-mail address (hkang@kku.ac.kr) and/or mailing address.

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012	1)	강현	대한민국	10-2012-0088402					
2012	2)	강현	대한민국	10-2012-0118389					
2012	2)	강현	대한민국	10-2013-0152112					

1) 여성초 추출물을 포함하는 항염증 및 염증성 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2012.08.13
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2012-0088402 (접수번호 1-1-2012-0646540-13)
출원인명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
대리인성명 특허법인 수(9-2012-100162-1)
발명자성명 정승호 박호순 강현
발명의명칭 여성초 추출물을 포함하는 항염증 및 염증성 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

2) 여성초 추출물을 함유한 간질환 치료 및 개선 조성물.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2012.10.24
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2012-0118389 (접수번호 1-1-2012-0867278-27)
출원인명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
대리인성명 특허법인 수(9-2012-100162-1)
발명자성명 강현
발명의명칭 여성초 추출물을 함유한 간질환 치료 및 개선 조성물

특 허 청 장

2) 여성초 추출물을 유효성분으로 포함하는 지방간 예방 또는 치료용 조성물.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2013.12.09
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2013-0152112 (접수번호 1-1-2013-1123309-74)
 출원인명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
 대리인성명 한양특허법인(9-2000-100005-4)
 발명자성명 강현
 발명의명칭 여성초 추출물을 유효성분으로 포함하는 지방간 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
3,225,000	3,225,000		3,225,000

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
13	4	7	1	1	4	6			13

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

기술이전 계약서

■ 계약의 명칭 : “어성초 추출물을 포함하는 항염증 및 염증성 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물”에 관한 기술이전

2013년 12 월 31 일

계약당사자

‘갑’

주소 : 서울시 광진구 능동로 120

기관 : 건국대학교 산학협력단
대표 : 단장 서 정 향 (인)

연구개발자 : 글로벌캡퍼스 의료생명대학
생명과학부 강 현 교수

담당자 : 기술이전팀 안덕준과장
연락처 : 02) 2049-6290

‘을’

주소 : 충청북도 충주시 노은면 감노로 1574(신흥리)

상호 : ㈜화니핀코리아
대표 : 김 회 기 (인)

담당자 : 김단현이사
연락처 : 043-853-2649

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 1 건)				고용창출 성과 (단위 : 3 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
	1				3	3

○ 연구성과 목표 및 달성 현황

▶ 연구수행기간 중 달성한 연구목표는 아래 표와 같음. 지적재산권의 경우 특허출원과 목표를 초과 달성하였으나, 논문의 경우 SCI논문 달성율은 현재까지 100% 수준이나 현재 심사 및 투고 중인 논문까지 고려하면 400% 달성 가능할 것으로 예상된다.

○ 연구결과 활용목표 및 달성현황

▶ 연구결과를 바탕으로 어성초의 항염증 효과에 관한 기술이전은 (주)화니핀코리아에 2013년 12월에 이전되었다.

○ 특허, 논문 등 지식재산권 활용 계획

▶ 본 연구개발을 통하여 가능성이 뛰어난 어성초 간기능 예방 소재를 생산하는 기술을 확립하고 5종의 시제품을 제작하는 동안 해외 우수 저널에 4편의 논문을 보고할 예정이며, 특허출원 3건을 통해 간기능 개선용 건강기능식품 개발에 활용할 수 있는 원천기술 확보하였다. 이는 향후 기술료 획득과 건강기능식품 수출산업에 활용할 수 있을 것으로 생각되며, 특허의 해외 licensing out은 제약시장에 서의 수입대체 및 수출효과를 가질 수 있을 것으로 기대된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 간 질환 예방 및 개선 기술분야 기술분야 연구 논문의 동향

▶ 간 질환 예방 및 개선 기술분야 관련 분야의 논문은 1990년 이후로 꾸준히 증가하고 있는 추세이며, 특히 지난 세기의 과학 3대 혁명으로 손꼽히는 분자생물학 분야의 비약적인 발전과,

서구화된 식습관과 생활방식의 변화로 인해 늘어나는 대사증후군 질환과 관련 치료제 개발 필요성으로 인해, 2000년대 이후 해당 연구가 기하급수적으로 증가하고 있는 추세이다.

▶ 국가별 동향을 살펴보면 전체 논문 중 20% 이상을 차지할 정도로 중국이 가장 많은 논문을 게재하며, 이들 중 대부분은 한약추출물에 대한 연구이다. 다음으로 미국에서 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이들의 대부분은 2000년 초반 이후 간 질환에 대한 작용점 발굴과 기전연구에 집중되어 있다.

○ 간 질환 예방 및 개선 기술분야 특허의 동향

▶ 알코올성 및 비알코올성 지방간염을 포함하는 간 질환 예방 및 개선 관련 분야 특허는 미국 특허가 가장 많은 비중을 차지하고 있으며, 특히 90년대 후반부터 건강에 대한 관심이 높아지면서 출원건수가 꾸준히 증가하는 추세를 보이고 있다.

▶ 간 질환 예방 및 개선 관련 분야 특허는 미국특허가 602건 (47%)으로 가장 많으며, 그 다음에 유럽특허 270건 (21%), 한국특허 228건 (18%), 일본특허 181건 (14%) 순으로 나타났다. 종합적으로 간 질환 예방 및 개선 관련 특허에 대한 기술주기 변화를 살펴보면, 가장 많은 특허를 보유한 미국의 특허출원 및 출원인의 증가세가 꾸준히 이루어지다가 최근 소폭 하락함에 따라 성숙기 진입 단계에 들어선 것으로 보인다.

▶ 일반적인 특허등록이 아닌 핵심 기술을 보유하고 있는 선도 기업의 개량 기술 특허에 대한 출원이 주도적으로 이루어지고 있어 향후 이들 질환에 대한 치료제에 대한 특허소송 및 기술경쟁이 이루어질 것으로 예측된다. 국내 기업의 기술 개발 및 소송 대비 전략 등이 시급한 것으로 판단된다.

본 연구개발과 관련된 해외에서 수집된 기술정보는 다음과 같다.

○ 기존의 기술개발과의 차별성

- ▶ 어성초 추출물에 대한 간보호 효능 및 간기능 개선 연구 전무
- ▶ 어성초와 관련된 특허가 현재 없음
- ▶ 항염증과 관련 피부외용제에 국한
- ▶ 어성초와 관련된 기능성 바이오 의약이 전무함

○ 기존 기술정보내용의 문제점과 그 대안은 다음과 같다.

▶ 아래 표에서 보는 바와 같이 본 연구진이 시도하고자하는 알코올성과 비알코올성 지방간 치료 두 타겟을 대상으로 한 연구는 보고된 바가 없다.

▶ 본 연구진이 시도하고자 하는 어성초 추출물을 이용한 지방간 치료제에 대한 시도가 없

였으며, 이들 인자에 대한 명확한 기능규명도 시도되지 않았다.

저널명	저자	제목	주요발견	취약점
Endocrinology 2009; 150: 5384-5394	Qiaohua Kang 등	Curcumin Inhibits Srebp-2 Expression in Activated Hepatic Stellate Cells in Vitro by Reducing the Activity of Specificity Protein-1	폴리페놀인 Cucumin의 효능 분석 (Srebp-2 억제)	Cucumin이 수용성이 아님
Endocrinology 2010; 151: 4168-4177	Youcai Tang 등	Curcumin Protects Hepatic Stellate Cells against Leptin-Induced Activation in Vitro by Accumulating Intracellular Lipids	Cucumin이 지방간 세포에서의 효과 (AMPK 억제)	비알코올성 지방간 치료만 적용됨
World J Gastroenterol 2009; 15 : 1809-1815	Nimer Assy 등	Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease	Caffeic acid는 DNA손상을 억제, Hydroxytyrosol은 lipoxygenase를 억제 Protocateucic acid는 arachidonic산 생성을 저해하여 간에서 지방생성을 억제	여성초추출물이 아닌 여성초에서만 결과임
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008; 295: 833-842	Joanne M. Ajmo 등	Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice	Resveratrol이 비알코올성 지방간에 효과 SIRT-1/AMPK 억제	알코올성 지방간 치료만 적용됨
U. S. Patent Application Publication 2011/0112201 A1	Jiankang Liu 등	Hydroxytyrosol Benefits Mitochondria	폴리페놀인 Hydroxytyrosol이 세포내 미토콘드리아의 손상을 보호하는 효과	천연물 소재가 아님

▶ 본 연구진이 발견한 새로운 여성초 추출물을 이용한 지방간 치료의 유효성분의 발견은 간장의 지질대사를 조절하는 연구개발 분야에서 중대한 발견이며, 이러한 유효성분의 작용기작을 밝혀 의학적으로 활용과 함께 사업화가 가능하게 되어 천연물 소재로서의 지방간 예방 및 치료 개선을 위한 새로운 패러다임을 제시하게 되었다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항없음

제 8 장 참고문헌

1. 히끼노 등, Planta Med.50, 213-218 1984
2. 키소 등, Planta Med.50, 81-85 , 1984
3. 타부르 등, Phytotheraphy Res.10, 461-467, 199
4. Qiaohua Kang 등 , Endocrinology 2009; 150: 5384-5394
5. Youcai Tang 등 , Endocrinology 2010; 151: 4168-4177
6. Nimer Assy 등 , World J Gastroenterol 2009; 15 : 1809-1815
7. Johanna M Geleijnse 등 , Am J Clin Nutr 2008; 88: 12-3]

8. Joanne M. Ajmo 등 , Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008; 295: 833-842
9. Jiankang Liu 등 , U. S. Patent Application Publication 2011/0112201 A1
10. 간세포보호활성을 갖는 고로쇠 잎 추출물 및 이로부터 분리된 페놀성 화합물, 대한민국특허청, 10-2003-0060351
11. 땃땃이나무 추출물을 포함하는 간 질환 예방 및 치료효과를 가지는 약제학적 조성물, 대한민국특허청, 10-2005-0063026
12. 간 질환 예방 또는 치료용 가공된 알로에 베라 추출물 및 가공된 알로에 베라 추출물과 밀크씨슬의 배합요법, 대한민국특허청, 10-2010-0096566
13. 오록실린 A를 유효성분으로 함유하는 간질환의 치료 및 예방을 위한 조성물, 대한민국특허청, 10-2009-0059231
14. 구기자로부터 분리된 간보호 활성을 갖는 신규 피롤유도체 및 이를 함유한 조성물, 대한민국특허청, 10-2001-0019749
15. 후박 추출물 또는 추출정제물을 포함하는 지방간 질환 예방 및 치료용 조성물, 및 추출정제물의 제조방법, 대한민국특허청, 10-2009-0022637
16. 견피브로인을 유효성분으로 포함하는 알코올성 지방간형성 예방제, 대한민국특허청, 10-2000-0031159
17. Clark JM 등, Gastroenterology 2002;122:1649-57.
18. Angulo P, N EngJMed 2002;346:1221-31.
19. Marceau P, 등, J Clin Endocrinol Metab 1999;84:1513-7.
20. Kim TH, 등 The Korean Journal of Internal Medicine 2005;68:347-9.
21. Marchesini G, 등 Diabetes 2001;50:1844-50.
22. Hillgartner FB, 등 Physiol Rev 1995;75:47-76.
23. Horton JD, 등 Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:5987-92.
24. Brown MS, 등 Cell 1997;89:331-40.
25. Shimomura I, 등, J Clin Invest 1997;99:838-45.
26. Horton JD, 등, J Clin Invest 2002;109:1125-31.
27. Shimomura I, 등, J Biol Chem 1999;274:30028-32.
28. Foretz M, 등, Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:12737-42.
29. Halaas JL, 등, Science 1995;269: 543-6.
30. Yahagi N, 등, J Biol Chem 2002;277:19353-7.
31. Biewenga GP, 등, General Pharmacology 1997;29:315-31.
32. Packer K, 등, Nutrition 2001;17:888-95.
33. Lee WJ, 등, Biochem Biophys Res Commun 2005;332:885-91.
34. Tarling E, 등, Biochem Soc Trans 2004;32:107-9.
35. You M, 등, Gastroenterology 2004;127:1798-808.
36. Hardie DG, Endocrinology 2003;144:5179-83.
37. Zhou G, 등, Clin Invest 2001;108:1167-74.
38. Fryer LGD, 등, J Biol Chem 2002;277:25226-32.
39. Saha AK, J Biol Chem 2002;277:25226-32.

40. Neuschwander-Tetti BA, *Hepatology* 2003;38:1008-17.
41. Lee WJ 등, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2488-94.
42. Shimomura I 등, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13656-61.
43. Azout-Marniche D 등, *Biochem J* 2000;350:389-93.
45. Deng X 등, *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:256-62.
46. 김형진 등, *대한내분비학회지*, 2002;17:514-25
47. 박승하 등, *대한소화기학회지*, 2003;41:366-73
48. 박정현. *대한간학회지*, 2006;12(1):16-30
49. 서상혁 등, *대한내과학회지*, 2006;70:26-32
50. 송광식 등, *대한당뇨병학회지 초록*, 2000
51. 이영석 등, *대한간학회*, 2002
52. 이정안 등, *대한내과학회지*, 2004;67(5):506-12
53. Adams LA 등, *CMAJ*, 2005;172:977-86
54. Akbar D, *Diabetes Int J*, 2002;12:47-9
55. Akbar D 등, *Aliment Pharmacol Ther*, 2003;17:977-86
56. Alberti KG 등, *Hepatology*, 1999;30:1356-62
57. Angulo P. *N Engl J Med*, 2002;346:1221-31
58. Assy N 등, *Dig Dis Sci*, 2000;45:1929-34
59. Bacon BR 등, 1994; 107:1103-9
60. Bellentani S 등, *Ann Intern Med*, 2000;132:112-7
61. Bugianesi E 등, *J Clin Endocrinol Metab*, 2005;90:3498-504
62. Cem A 등, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2006;18:175-80
63. Clark JM 등, *Diabetes*, 2001;50:A38
64. Clark JM 등, *JAMA*, 2003;289:3000-4
65. Claudio P 등, *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar;91(3):1081-6.
66. Claudio P 등, *European J Endocrinology*, 2005;152:113-8
67. Cnop M 등, *Diabetologia*, 2003;46:459-69

본문 작성 요령

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 ○○○○○○사업(해당사업 표기)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 ○○○○○○사업(해당사업 표기)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

[부 표]

인 쇄 내 용

I. 인쇄규격

1. 크기 : A4 신판(가로 210mm * 세로297mm)
2. 제본 : 좌철
3. 용 지
 - 가. 표지 200g/m² 양면 아트지
 - 나. 내용 80g/m² 모조지
4. 인쇄방법
 - 가. 표지 : 바탕 백색,활자 흑색
 - 나. 내용 : 흑색 지정활자
 - 다. 양면인쇄

II. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 요약문
4. 영문 요약서(Summary)
5. 영문 목차(Contents)
6. 목 차
7. 본 문
8. 뒷면지

III. 참고사항

전자조판 인쇄 시에는 이에 준한다.