

발간등록번호

11-1543000-000829-01

인지기능개선과 뇌세포를 보호하는 수검초 및 유효성분
Compound A등을 이용한 기능성 산업화 소재 개발
(고부가가치식품기술개발사업)

(Development of industry material
for the regulation of neuronal system using compound A)

건국대학교 글로컬산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “인지기능개선과 뇌세포를 보호하는 수검초 및 유효성분 Compound A등을 이용한 기능성 산업화 소재 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 1월 25일

주관연구기관명 : 건국대학교 글로벌산학
협력단

주관연구책임자 : 최 동 국

제1세부연구책임자 : 최 동 국

제2세부연구책임자 : 김 시 관

제3세부연구책임자 : 한 상 돈

연 구 원 : 김 병 옥

연 구 원 : Hemant Kumar

연 구 원 : Sandeep More

연 구 원 : 임 형 우

연 구 원 : 홍 순 민

연 구 원 : 강 성 목

연 구 원 : 송 수 열

연 구 원 : 박 신 영

연 구 원 : 박 정 인

협동연구기관명 : (주) 예당 지엔비

협동연구책임자 : 박 영 일

협동연구기관명 : (주) 한일 그린팜

협동연구책임자 : 이 강 용

요 약 문

I. 제 목

인지기능개선과 뇌세포를 보호하는 수검초 및 유효성분 Compound A등을 이용한 기능성 산업화 소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요

미국, 일본, 유럽의 선진사회에서는 인구의 노령화가 진전되어 65세 이상의 노인 인구가 전체 인구의 15-18 %를 차지하며, 한국도 점점 증가하고 있는 추세이다. 이에 따른 노인성 질환의 증가는 중요한 사회문제가 되고 있으며, 그중 신경변성질환의 증가로 인한 인지기능 저하로 많은 문제점을 제기한다. 퇴행성 질환은 연령이 증가할수록 발생빈도가 급격히 증가하여, 앞으로 평균 수명이 증가할수록 점점 더 큰 사회 문제를 야기하리라 예상되며 현재 최대의 노화질환일 뿐 아니라 앞으로 인류가 당면할 최대의 보건문제 중 하나로 등장하고 있으며, 신경변성질환은 21세기 최대 난치 질환 중 하나로 뇌 활동의 감퇴로 인하여 인지기능의 손상을 유발하며, 환자의 삶을 황폐하게 하며, 결국에는 사망에 이르게 한다. 또한 고령사회 도래와 함께 웰빙과 LOHAS에 대한 사회적 요구가 절실하여 바이오융합기술을 기반으로 하는 천연소재의 고부가가치 기능성 식품 시장이 확대되고 있다.

천연물 이용한 기능성 식품개발은 연구개발비와 소요시간이 기존 화학합성물을 이용한 개발보다 훨씬 적게 들어 경제적이다. 즉, 전통의학의 지식분야에서 외국에 비해 상대적으로 우위를 확보하고 있어서 성공가능성이 훨씬 높다고 자신하고 있다. 또한 화학합성물에 비해 상대적으로 독성이 적어 독성 및 안전성 문제를 극복할 수 있어서 그 가능성은 더욱 향상된다. 여기에 국내 연구여건이나 천연물신약 연구에 필요한 잠재력이 성숙돼 있다는 점도 큰 장점으로 평가되고 있다.

빠르게 고령화가 진행됨에 따라 퇴행성 뇌질환 연구의 필요성이 절실해 지는 시점에서 기초과학적으로 효능이 검증된 인지기능 개선에 효능을 가지는 산업화 소재 개발의 필요성이 증대되고 있다. 수검초는 오랫동안 식용 및 약용으로 사용되고 있는 천연물로서 동의보감과 같은 고서에 의하면 여러 효능을 보인다고 한다. 또한 여러 연구팀에 의하여 항경련, 뇌허혈의 신경방어효과, 항산화효능, 살균, 살충효과 등에 효능이 있다고 보고되고 있다. 그러나 수검초 및 유효성분에 대한 인지기능 개선 효능과 관련한 연구는 미비한 실정이라 이를 이용하여 인지기능 개선 효능을 토대로 퇴행성신경질환의 예방 및 치료소재를 개발하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 내용

가. 수검초 추출물 및 그 유효성분을 이용한 신경세포 보호효능 및 인지기능 개선 기능성 소

재 개발

신경변성질환의 주요인으로 주목되고 있는 신경염증의 억제 및 조절을 배양세포 모델(*in vitro*), 초대 배양 신경교세포 (primary microglia cell), 실험동물모델(*in vivo*)을 이용한 수검초 추출물 및 α -asarone의 신경염증 억제 및 뇌신경보호효능을 입증하고 인지기능 개선 효능의 분석은 Ach 활성 저해 및 인지기능 손상 동물모델(*in vivo*)을 이용하여 생화학적 지표 분석 및 동물행동실험 등을 통하여 인지기능 개선 효능을 분석한다.

나. 수검초를 이용한 실용화 기술 개발

수검초 추출물의 분리·정제 및 유효성분의 구조를 규명하고 추출조건별 유효성분의 함량 변화 분석을 통하여 기능성 강화를 위한 최적 추출 조건을 확립하여 원료의 대량 생산가능성을 모색하고, 원료 표준화의 자료를 확보한다. 또한 효능 분성이 완료 및 규격화된 소재를 활용하여 기능성 식품 배합비를 결정하여 건강기능식품 소재를 개발한다.

다. 수검초를 이용한 기능성 식품을 이용한 인체적용 예비 시험

예비 인체적용시험을 위하여 IRB승인 신청 및 이에 대한 연구계획을 수립하고 개발된 기능성 식품소재를 이용하여 경도인지 장애환자에 대하여 위약군과의 대조를 통하여 효능을 분석하고, 혈액검사를 통하여 유해성을 분석한다.

2. 연구개발의 범위

가. 수검초 추출물 및 그 유효성분을 이용한 뇌 보호효능 및 인지기능 개선 기능성 소재 개발

- 수검초 추출물 및 그 유효성분의 *in vitro* 효능 분석
 - 수검초의 신경염증 억제 효능 확인
 - 유효성분의 신경염증 억제 효능 분석
 - 수검초 및 유효성분의 신경염증 억제 기전 규명
 - 수검초 추출물의 항산화력 측정
 - 수검초 추출물의 아세트콜린 분해 효소 활성 저해 효능 분석
- 수검초 추출물 및 그 유효성분의 *in vivo* 효능
 - 신경손상 동물모델에서 수검초 및 그 유효성분의 효능 분석
 - 신경염증 억제 및 신경세포보호효능 분석
 - 인지기능 손상 동물모델에서 수검초 및 그 유효성분의 효능 분석

나. 수검초 추출물을 이용한 실용화 기술 개발

- 수검초의 분리 및 정제

- 수검초 최적 추출 조건 확립
- 지표물질 확립
- 유효성분의 구조분석
- 지표성분 분석 방법 확립

○ 신경염증 억제 및 인지기능 식품의 제조

- 기능성 식품 원료의 제조공정 확립
- 임상시험용 시제품 제조

다. 수검초를 이용한 기능성 식품을 이용한 임상 예비 시험

○ IRB 승인

- IRB 승인 심사 자료 수집
- IRB 승인 취득

○ 인체 적용 시험

- 위약대조 비교 인체 적용시험
- 유효성 평가 (간기능검사 및 혈액검사)

IV. 연구개발결과

가. 수검초 추출물 및 그 유효성분을 이용한 뇌 보호효능 및 인지기능 개선 기능성 소재 개발

○ 수검초 및 그 유효성분의 *in vitro* 효능

- 수검초 추출물(100 ug/ml)이 아질산염 발생을 약 90% 억제함을 확인하였으며, 활성성분인 α -asarone (알파아사론)은 250 uM의 농도, β -asarone (베타아사론)은 100 uM의 농도에서 아질산염 발생을 약 70%이상 억제함을 확인

- 분리성분 7종의 NO 저해능 확인 NO 저해능 50% 이상 : 2종(7:1, 9:1 Fr), 25% 이상 2종 (MeOH, 4:1 Fr.) 확인

- 수검초 분리성분에 대한 AChE 활성 저해능 분석 결과 MeOH 70% 조추출에서 30% 저해능 확인, E.A Fr. 6종의 AChE 활성 저해능 확인 : 50% 이상 저해능 2종 확인

- 초대배양 신경교세포 (Primary microglia cell)을 이용한 수검초 및 유효성분(Compound A 등)의 아질산염 방출 저해능 분석으로 저해 효능을 확인: Morphology 확인 및 NO assay 분석

- 수검초 추출물 및 그 유효성분에 의해 기전 분석 결과 전염증성 사이토카인의 발현억제 및 NF- κ B의 분해 억제 기전 규명

- 염증 메커니즘의 하나인 MAPKs 기전분석 결과 수검초 및 그 유효성분에 의해 발현 억제 기전 규명

- ESR 및 DCFH-DA를 이용한 수검초 추출물의 항산화력 측정 결과 황산화 활성 확인

- 수검초 추출물 및 α -asarone의 AChE 활성저해능 실험 결과 약 50% 저해 확인

- 선별 소재의 독성 검사 및 최적 추출물의 안정성 검사

○ 수검초 및 그 유효성분의 *in vivo* 효능

- 신경손상모델에서 α -asarone (알파아사론)에 의해 정상교세포 및 미세아교세포의 활성을 억제 확인
- 신경손상모델에서 α -asarone (알파아사론)에 의해 염증매개인자 iNOS와 COX-2의 유전자 및 단백질의 발현 억제 및 NF- κ B의 분해 억제 확인
- 신경손상모델에서 α -asarone (알파아사론)에 의해 중뇌의 도파민성 신경세포 보호 효능 확인
- LC/MS (Liquid chromatography - mass spectrometry)를 이용한 염증성 신경손상모델에서 α -asarone (알파아사론)에 의해 신경전달물질 보호 효능 확인
- 신경손상모델에서 동물 행동실험 (Animal behavior test)을 통한 α -asarone (알파아사론)의 효능 분석 결과 변경 행동력 (Percentage alternation,)의 개선 효능, 서동증 (운동완만) 완화 효능 입증
- LC/ESI-MS 법을 활용한 α -asarone (알파아사론)의 Pharmacokinetics 분석을 통하여 BBB 통과 여부 분석
- 인지기능 손상 동물모델에서 수동 회피 (Passive avoidance) 및 Y-미로실험을 통한 학습능력 효과 측정 결과 α -asarone (알파아사론)의 인지기능 개선 효능 입증
- 인지기능 손상 동물모델에서 α -asarone (알파아사론)에 의해 해마 및 대뇌피질의 아세틸콜린에스터라제 활성 측정 결과 분해 저해 확인
- 인지기능 손상 동물모델에서 α -asarone (알파아사론)의 기전 분석 결과 지질과산화물의 생성 억제 확인

나. 수검초를 이용한 실용화 기술 개발

○ 수검초의 분리 및 정제

- 수검초에서의 유효성분 분획 다량 함유 분획 제조 및 단일 성분 분리
- 유기 용매별 유효성분 추출 함량 비교 및 E·A를 이용한 분획법 확립
- 추출 용매별 유효물질 함량 확인 및 유효성분 다량 함유 분획제조
- Silca flash -> silica gel chromatography를 수행하여 단일 물질 제조
- 각 분획별 TLC를 이용한 각 성분별 유효성분 확인
- HPLC를 이용한 성분의 순도 확인
- ^1H NMR, ^{13}C NMR 분석을 통한 유효성분 α -asarone (알파아사론), β -asarone(베타아사론)의 구조 규명
- ICH가이드란의 9가지 지표에 따른 두 활성 성분의 유효화된 분석법 확립 및 적용성 검토
- 유효성분 최대 함유 추출법 공정 개발 완료

○ 뇌보호 및 인지기능 식품의 제조

- 기능성 식품 원료의 제조공정 확립

- 임상시험용 시제품 제조

다. 수검초를 이용한 기능성 식품을 이용한 임상 예비 시험

- 인체 적용 시험
 - IRB 승인 신청 및 승인 완료
 - 임상 시험자 모집 완료
 - 1차 기초검사 완료
 - 위약대조 비교 인체 적용시험
 - 유효성 평가 (간기능검사 및 혈액검사 등)

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 논문개제 성과

- Cognitive enhancing effects of alpha asarone in amnesic mice by influencing cholinergic and antioxidant defense mechanisms. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(8):1518-22. 국외 SCI
- Promising Therapeutics with Natural Bioactive Compounds for Improving Learning and Memory – A Review of Randomized Trials. *Molecules.* 2012, 17, 10503-10539. 국외 SCI
- The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism *Int J Mol Sci* 2012;13(8):10478-504. 국외 SCI
- The role of bioactive compounds on the promotion of neurite outgrowth. *Molecules.* 2012 Jun 4;17(6):6728-53 국외 SCI
- Advances in neuroprotective ingredients of medicinal herbs by using cellular and animal models of Parkinson's disease. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:957875 국외 SCI
- Traditional Korean East Asian medicines and herbal formulations for cognitive impairment *Molecules.* ;18(12):14670-93. 국외 SCI
- Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat Prod Rep.* 2014 Jan;31(1):109-39. 국외 SCI
- A novel synthetic HTB derivative, BECT inhibits lipopolysaccharide-mediated inflammatory response by suppressing the p38 MAPK/JNK and NF-κB activation pathways. *Pharmacol Rep.* 66(3):471-9. 국외 SCI
- * α-Asarone attenuates microglia-mediated neuroinflammation by inhibiting NF kappa B activation and mitigates MPTP-intoxicated behavioral deficits in a mouse model of Parkinson's disease. (Submitted) *Neuropharmacology* 국외 SCI

나. 특허 성과

- 10-1458764 수검초 추출물 및 알파 아사론을 포함하는 인지 기능 개선 및 치료용 조성물 20141031 특허등록
- 10-2012-0074360 수검초 추출물 및 알파 아사론을 포함하는 인지 기능 개선 및 치료용 조성물 20120729 특허출원
- 10-2013-0127675 단일 화합물인 베타-아사론을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물 20131025 특허출원
- 10-2014-0130045 알파아사론을 유효성분으로 함유하는 인지능력 개선용 조성물 20140929 특허출원
- 10-2014-0130044 알파아사론을 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 조성물 20140929 특허출원

다. 기타 성과

- 기술이전 : 수검초 추출물 및 알파아사론을 포함하는 인지기능 개선용 건강기능식품 제조 기술을 (주)한일그린팜, (주)에당지앤비에 기술이전
- 수상
 - 2014년 한국식품과학회 김병욱 “Therapeutic effects of α -Asarone against LPS-induced microglial activation and MPTP intoxicated PD Mice Model.” 제 81차 한국식품과학회 학술대회 대학원생 우수논문 선발대회 우수상 수상 (2014.08.26.)
 - 2014년 건국대학교 대학원 Hemant Kumar “Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases.” 건국대학교 대학원생 최우수학술상 (2014.08.22.)
 - 2013년 한국식품과학회 김병욱 “Alpha-asarone attenuates LPS-stimulated neuroinflammatory responses in BV-2 microglia and reverses behavioral impairments in MPTP-intoxicated mice model of PD” 제80차 한국식품과학회 학술대회 우수포스터상 수상 (2013.08.30.)
- 전문인력양성 : 이학박사 2인, 이학석사 3인 인력양성

2. 활용방안

가. 기술적 측면

- 기능성 식품 소재로서 수검초의 효능을 증명함으로써 식품 소재 연구의 새로운 전기를 가져올 뿐만 아니라, 이를 뇌세포 보호 및 인지기능 개선 기능성 식품에 활용 가능성을 제시할 수 있을 것으로 판단되며, 수검초의 신경염증 억제 기전을 규명함으로써 기타 염증 관련 질환 등에도 공통적으로 적용되는 병리기전을 제시할 수 있을 것이며, 약물 작용점이나 치료, 예방법 개발에 응용될 수 있을 것이다.

나. 경제·산업적 측면

- 급속한 고령화 사회로의 진행으로 인한 퇴행성 뇌질환에 의한 의료비와 같은 사회적 비용이 점진적으로 증가되고 있음으로 뇌세포 보호 및 인지기능 증가용 소재의 필요성은 증가되고 있다. 그러나 효능이 입증된 소재가 아직은 미비한 실정이다. 이에 수검초 추출물 및 유효성분의 뇌세포 보호 및 인지기능 개선 효능 입증 및 산업화로 인하여 이러한 사회적 비용을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.
- 국내외에서 요구가 높은 신경염증 억제제 제조관련 천연물유래 신소재의 개발에 있어 전임상 시험이 완료하면 일반적인 *in vitro*만의 연구 수행에 비해 그 상품적 가치가 극대화된다.
- 기술 이전을 통한 고부가가치 식품의 개발에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.
 - 본과제와 관련된 기능성 식품 제조기술을 산업체에 기술이전하여 수검초의 뇌세포보호 및 인지기능 개선용 기능성 식품을 제조할 계획이며 제형도 확대할 계획이다.
- 신경 손상 질환 환자를 위한 다양한 제품의 개발로 국민건강에 기여할 수 있다.

SUMMARY

(영문요약문)

I . TITLE

Development of industry material for the regulation of neuronal system using compound A

II . OBJECTIVE AND JUSTIFICATION

Neuroinflammation is closely related with pathogenesis of several neurodegenerative diseases. Current drug therapies for neurodegenerative disease are symptomatic and appear to bear little effect on the progressive neurodegenerative process. Cognitive disorders can be associated with brain trauma, neurodegenerative disease or as a part of physiological aging. Aging in humans is generally associated with deterioration of cognitive performance and, in particular, learning and memory. Different therapeutic approaches are available to treat cognitive impairment during physiological aging and neurodegenerative or psychiatric disorders. Furthermore, dysfunction of central cholinergic neurotransmission and oxidative stress plays a major role in the cognitive deficits observed in Alzheimer's disease (AD). Learning is the experience-dependent acquisition of knowledge and skills, whereas memory is the retention and retrieval of facts or events composed of experiences. Memory disorders can range from mild to severe and can be progressive (neurodegenerative disease) or immediate (brain injury). Almost all are linked with some damage to neuroanatomical structures, either in part or full, which hinders acquisition (learning), consolidation (storage of labile stable memory), and retrieval (recall). Cognition represents different stages including acquisition, consolidation, retention, retrieval and performance. Cognition deficits produced by cholinergic antagonism mimic the cognitive symptomology of AD. Drugs approved for AD therapy act by preventing the degradation of acetylcholine (ACh) by acetylcholinesterase (AChE) thereby increasing ACh levels in the brain. AChE inhibition serves as a strategy for the treatment of AD, senile dementia, ataxia and Parkinson's disease.

Synthetic drugs cause undesirable adverse effects, whereas natural products are considered safe and effective. Herbal medicines are becoming popular for improving quality of life with either limited or no side effects. An extract of *Acorus gramineus* Solander rhizome (AGR) has been used as remedy for senile dementia in Korea. The Korean pharmacopoeia lists a number of pharmacological activities of AGR which includes sedative, digestive, analgesic, diuretic and antifungal activities. Therefore, this study aimed to develop the functional materials from *Acori graminei* extract and its active compound to be safe and evaluated for efficacies against cognitive deficits and

neurodegenerative disorders. This may help in development of therapeutic and further allow performing clinical trials using active compounds isolated from acorus species.

III. Research Contents and Scope

1. Preparation of AGR extract and isolation of active constituents.
 - a) Extract procurement, identification and authentication
 - b) Isolation and purification of bioactive compound from AGR extract using bioactivity guided approach
 - c) Characterization of active constituent (α -asarone)

2. Evaluation of AGR extract and its active constituent (α -asarone) for probable neuroprotective mechanism *in vitro* and *in vivo* experimental models of dopaminergic neurotoxicity.
 - a) Inhibition of NO and iNOS production by α -asarone in activated BV-2 microglial cells and primary culture
 - b) Evaluating the effect of α -asarone on the production of the pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 at the transcriptional level.
 - c) Evaluating the effect of α -asarone on NF- κ B (p65) activation and I κ B- α degradation in LPS-stimulated BV-2 microglial cells
 - d) Effect of α -asarone on brain microglial activation in MPTP intoxicated mouse model (Behavioral and biochemical parameters)

3. Evaluation of beneficial effect of α -asarone and their underlying mechanism in improving cognition.
 - a) Evaluate the beneficial effect of α -asarone in cognitive and behavioral deficits induced by scopolamine in mice using passive avoidance and Y-maze tests
 - b) Check the AChE inhibiting activity and the levels of oxidative markers MDA and SOD in specific brain areas of cerebral cortex and hippocampus

4. Making the prototypes for clinical trials for memory improvement and neuroprotection.
 - a) Establishment of criteria and testing methods
 - b) Safety test of functional materials : single dose oral toxicity

IV. Project Results and Their Application

Acorus gramineus Solander (AG) (Araceae) is an aquatic perennial herbaceous plant widely distributed in East Asia. The protective effects of AG (ethanol extract) and a

-Asarone isolated from AG on microglia-mediated neuroinflammation were examined. Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV-2 microglial cells were used to evaluate the *in vitro* effects. The results indicated that AG as well as its active component α -Asarone, significantly attenuated the LPS-stimulated increase in neuroinflammatory response and suppressed pro-inflammatory cytokine production in BV-2 cells.

α -Asarone, an active compound found in Araceae and Annonaceae plant species, has been used to improve various disease conditions including central nervous system diseases. In the present study, the *in vitro* and *in vivo* protective effects of α -asarone isolated from the rhizome of *Acrous gramineus* Solander on microglia-mediated neuroinflammation and neurotoxicity were examined. 1-methyl-4 phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-intoxicated mouse model of PD was utilized to study the neuroprotective effects of α -asarone *in vivo*. LPS -stimulated BV-2 microglial cells were used to evaluate *in vitro* effects. The results indicated that *in vivo* MPTP intoxication of mice resulted in brain glial activation and significant behavioral deficits. Prophylactic treatment with α -asarone suppressed microglial production of proinflammatory molecules via Nuclear Factor Kappa B signaling and attenuated PD-like behavioral impairments as assessed by the Y-maze and pole tests. Furthermore, α -asarone significantly attenuated the LPS-stimulated increase in neuroinflammatory responses and suppressed pro-inflammatory cytokine production in BV-2 cells. Mechanistic study revealed that α -asarone inhibited the LPS-stimulated activation of NF- κ B by blocking degradation of inhibitor kappa B- α in BV-2 microglial cells.

Moreover, the memory enhancing effects of α -asarone on scopolamine-induced amnesic mice was studied. Scopolamine, an anticholinergic drug induced significant memory impairment and behavioral deficits in mice. Treatment with α -asarone attenuated the scopolamine-induced cognitive deficits as evaluated by passive avoidance and Y-maze test. Further, the effect of α -asarone on the levels of acetylcholinesterase (AChE), (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were also determined using the brain tissues of mice injected with scopolamine. Prophylactic treatment with α -asarone improved memory and cognitive functions as indicated by an increase in transfer latency time and spontaneous alternation in passive avoidance and the Y-maze test, respectively. Furthermore, α -asarone decreased the scopolamine-induced increase of AChE activity and normalized MDA and SOD levels in the brain tissues.

These results collectively suggest that α -asarone is a promising bioactive compound/functional food for preventing and treating microglia-mediated neuroinflammatory conditions and may be useful for cognitive improvement in neurodegenerative disorder.

CONTENTS

Chapter 1. Project Overview -----	14
Chapter 2. Current Status in Technology Development of Related Project in Domestic and Overseas -----	17
Chapter 3. Contents and Results of the Project -----	26
Section 1. Evaluation of efficacy for neuroprotection and cognitive function using <i>Acorus gramineus</i> and its active compound -----	26
Section 2. Development of industry material using <i>Acorus gramineus</i> and its active compound -----	51
Section 3. Making the prototypes for clinical trials for memory improvement and neuroprotection -----	71
Chapter 4. Project Achievements and Contributions to Related Fields -----	80
Section 1. Project Achievement by Year -----	80
Section 2. Contributions to Related Fields -----	83
Chapter 5. Project Outcomes and Their Applications -----	84
Chapter 6. Collected New Science and Technology Information of Project in Domestic and Overseas -----	90
Chapter 7. References -----	99

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	26
제 1 절	수검초 추출물 및 그 유효성분을 이용한 뇌 보호효능 및 인지기능 개선 기능성 소재 개발 -----	26
제 2 절	수검초를 이용한 실용화 기술 개발 -----	51
제 3 절	수검초를 이용한 기능성 소재를 이용한 예비임상시험 -----	71
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	80
제 1 절	연차별 연구개발목표의 달성도 -----	80
제 2 절	연구결과의 관련분야 기여도 -----	83
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	84
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	90
제 7 장	참고문헌 -----	99

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 현대 사회는 과도한 스트레스, 환경오염, 영양과잉 등의 다양한 형태의 질병 유발원이 증가하면서 만성, 난치성 질병으로 그 증상이 바뀌어 가고 있는 실정이다. 특히 신경변성질환 등과 같은 만성 난치성 질환들의 근본적인 원인은 염증 제어의 불균형에서 초래된 것이 대부분이다.
- 신경염증반응 (neuroinflammation)이 알츠하이머병, 파킨슨씨병, multiple sclerosis, AIDS dementia 등과 같은 신경질환의 병리기전에 관여한다는 것이 알려져 있으며, microglia 및 astrocytes의 과민화에 의한 염증반응이 대표적 신경변성질환 중 하나인 파킨슨병의 주된 원인 및 결과로 주목 받고 있다. 신경교세포는 중추신경계 (central nervous system)를 구성하는 중요한 세포 가운데 하나로, 적절히 활성화된 신경교 세포와 잘 조절된 염증반응은 신경세포 및 조직 보호 작용이 있으나, 이들 세포가 과도한 염증반응을 수반하여 적절히 조절되지 못할 경우 이들이 생산해 내는 염증매개 물질들은 신경세포 독성을 나타낼 수 있으며 신경조직의 퇴행성 변이를 초래할 수 있다. 염증성 산화효소인 myeloperoxidase (MPO), NADPH oxidase, cyclooxygenase, lipoxygenase, heme oxygenase 등의 발현이 염증반응에서 유도되며, 염증매개 물질, free radical 등을 생성하여 염증반응에서 전형적으로 나타나는 host defense와 tissue injury의 이중 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.
- 신경계의 퇴행성질환은 뇌와 척수의 특정한 신경세포군이 그 기능을 잃고 신경세포의 수가 감소하는 질환을 총칭하는 질환으로 대표적으로 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD) 등이 있다. 현재까지 지난 30년에 걸쳐 축적되어 온 분자생물학 및 면역조직화학염색 연구 등을 통하여 퇴행성 신경변성질환은 뇌신경계의 정보전달에 가장 중요한 신경세포의 사멸과 뇌신경 세포 상호간의 정보를 전달하는 시냅스의 형성이나 기능상의 문제, 뇌신경의 전기적 활동성의 이상적 증가나 감소로 인하여 발병되는 것으로 알려져 있으며 이러한 현상은 연령이 높아지면 더욱 증가한다. 현재 인구의 고령화는 신흥경제국 및 서구를 중심으로 전 세계에서 급격하게 진행되고 있으며 한국도 2011년 65세 이상 고령인구가 500만명을 넘어서 전체인구의 11.4%를 차지하고 있으며, 2060년에는 40.1%에 달할 것으로 예측되고 있다.
- 고령화 추세는 전 세계에서 가장 빠른 고령화 추세를 보였던 일본보다 빠르게 진행되고 있는 것이며, 일본의 경우 고령인구가 7%에서 20%로 증가하는데 36년이 소요된 반면 한국의 경우 26년의 소요될 것으로 예상되고 있다. 이러한 노인 인구의 증가에 따라 각종 퇴행성신경변성질환의 발병이 급속히 증가하는 추세에 있으며 이로 인한 개인의 삶의 질 저하는 물론 치료에 많은 시간과 경제적 부담이 요구되고, 노동력 상실이라는 사회적 문제를 야기하고 있다. 미국에서는 2011년 한 해 동안 신경변성질환 중 발병률이 가장 높은 알츠하이머병의 경우 사회적으로 감당해야하는 직간접적인 비용이 2100억 달러에 달한다고 한다.

- 미국, 일본, 유럽의 선진사회에서는 인구의 노령화가 진전되어 65세 이상의 노인 인구가 전체 인구의 15-18 %를 차지하며, 한국도 점점 증가하고 있는 추세이다. 이에 따른 노인성 질환의 증가는 중요한 사회문제가 되고 있으며, 그중 신경변성질환의 증가로 인한 인지 기능 저하로 많은 문제점을 제기한다. 퇴행성 질환은 연령이 증가할수록 발생빈도가 급격히 증가하여, 앞으로 평균 수명이 증가할수록 점점 더 큰 사회 문제를 야기하리라 예상되며 현재 최대의 노화질환일 뿐 아니라 앞으로 인류가 당면할 최대의 보건문제 중 하나로 등장하고 있으며, 신경변성질환은 21세기 최대 난치 질환 중 하나로 뇌 활동의 감퇴로 인하여 인지기능의 손상을 유발하며, 환자의 삶을 황폐하게 하며, 결국에는 사망에 이르게 한다.
- 기억/학습능력, 운동능력과 같은 뇌 활동은 태어나면서부터 사망하는 시점까지 모든 동물의 보편적 활동이지만, 노화에 의해서 이러한 뇌 활동이 점차 감퇴한다. 뇌 활동 저하는 외부 요인에 크게 영향을 받으며, 그 중 하나가 외부 자극에 의한 스트레스를 들 수 있겠다. 이러한 요인들로 인하여 노화에 따른 신경변성질환에 의한 인지기능 저하가 발생한다.
- 현재 신경변성질환의 예방, 치료 및 관리를 위하여 줄기세포 치료법을 포함하여 다각적인 연구가 대규모로 진행되고 있지만, 이와 병행하여 여러 가지 대체요법들을 강구하고 있다. 또한 이러한 연구에 의하여 여러 물질들이 신경보호 및 인지기능개선 효능에 있는 것으로 보고되었지만 정작 인간에게 효과가 있다고 증명된 것은 하나도 없다.
- 빠르게 고령화가 진행됨에 따라 퇴행성 뇌질환 연구의 필요성이 절실해 지는 시점에서 기초과학적으로 효능이 검증된 인지기능 개선에 효능을 가지는 산업화 소재 개발의 필요성이 증대되고 있다.
- 천연물 및 약용 식물을 이용한 신경염증 억제제 및 항산화제 개발의 필요성
 - ▶ 염증은 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내의 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체 방어기전의 발현이라고 할 수 있다. 기존의 항염제는 크게 스테로이드성과 비스테로이드성 항염제로 구분되며 합성 항염제는 여러 가지 부작용을 수반하는 경우가 많아 효력이 강하면서도 부작용이 적은 항염증제의 개발이 꾸준히 요구되고 있는 실정이다.
 - ▶ 현대의학을 비롯해 화학합성물에 의한 의약품 등의 한계성이 가시화됨에 따라 전세계가 대체의학 또는 전통의학의 재조명과 천연물에 의한 신약창출에 활기를 더해가고 있음. 최근, 염증 치료제인 노바티스(Novartis)의 COX-2 저해제인 ‘프렉시지’(Prexige, lumiracoxib)가 캐나다와 호주에서 부작용으로 퇴출된 것이 그 일례라 할 수 있다. 국내에서도 최근 기존 화학 합성물 보다 효과가 뛰어나고 부작용이 적은 천연물을 이용한 치료제를 개발, 실용화를 눈앞에 두고 있다. 또한, 이미 실용화된 천연물 이용 의약품들이 수종에 이르고 있고 한방의학이 활성화 돼 있는 우리나라는 앞으로 더 많은 천연물 신약개발이 기대된다.
- 우리나라의 건강식품관련 기업체의 연구개발 현황을 살펴보면 몇몇 대기업을 제외하면 중소기업 내지 영세한 벤처기업이 대부분이며 기능성 식품 소재 개발 기술력이 미흡하여

초기 연구단계에서 중단되는 경우가 많이 있다. 특히 기능성 소재의 추출정제, 화학구조 등이 규명되지 못하여 국내외 특허로 보호받지 못하는 경우가 상당히 있어 산업경쟁력이 위축되고 있는 상황이다.

- 현재 항신경염증제, 뇌신경 세포보호제, 피부노화 방지제 및 식품 첨가물의 개발을 목적으로 제약회사 등의 기업과 대학 및 연구소 등에서 free radical scavenger, 지질 과산화억제물질 탐색연구가 수행되고 있다.
- 우리나라의 천연물 기술개발의 장점
 - ▶ 천연물, 특히 생약자원은 생리적·약리적 유효성을 근간으로 하여 식품, 의약품, 화장품 등의 분야에서 고부가가치 상품의 기능적 소재로 활용가치가 매우 높다. 실제로 많은 제약회사나 바이오벤처기업들이 천연물을 이용한 신약을 개발하고 있으며, 그 전단계로 한약재에서 유효성분을 추출하여 기능성 식품이나 화장품으로 개발하여 상품화하고 있다.
 - ▶ 천연물 이용한 신약의 개발은 연구개발비와 소요시간이 기존 화학합성물을 이용한 의약품 개발보다 훨씬 적게 들어 경제적이며 임상 3상까지의 진입이 효율적이라는 것이 전문가들의 견해이다. 즉, 전통의학의 지식분야에서 외국에 비해 상대적으로 우위를 확보하고 있어서 성공가능성이 훨씬 높다고 자신하고 있다. 화학합성신약개발에 비해 명확한 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 연구여건이나 천연물신약 연구에 필요한 잠재력이 성숙돼 있다는 점도 큰 장점으로 평가되고 있다.
- 수검초는 오랫동안 사용되어 지고 있는 한약재로서 동의보감에는 맛은 쓰고 매우며 성질은 약간 따뜻하고 독이 없다고 기록되어있다. 수검초의 뿌리 달인액은 한방약리학과 중약대사전에 의하면 열병으로 인한 혼수, 건망증, 이명증, 기폐이농, 위통, 복통, 화농성 종양, 타박상을 치료한다고 기록되어 있으며, 수검초는 여러 연구팀에 의하여 항경련, 뇌허혈의 신경방어효과, 항산화효능, 살균, 살충효과 등에 효능이 있다고 보고되고 있다.
- 오랫동안 식용 및 약용으로 사용해 온 수검초는 대한 연구는 최근 활발하게 진행되고 있으나, 수검초 및 α -asarone을 인지기능 개선 효능과 관련한 연구는 미비한 실정이라 수검초 및 α -asarone을 이용하여 인지기능 개선 효능을 토대로 퇴행성신경질환의 예방 및 치료소재를 개발하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 미세아교세포는 뇌 전역에 걸쳐 존재하며 뇌에서 면역기능을 담당하는 신경원세포의 일종이다. 뇌세포의 약 10%를 차지하며 중추신경계의 발달, 병원체 인식 (선천면역역할), 식세포 활동 (Phagocytosis), 염증반응의 조절 등 신경-면역 상호작용에 중요한 역할을 담당한다. 미세아교세포는 정상상태에서는 가늘고 긴 가지와 작은 세포체의 모양을 가지나, 미세아교세포의 활성화를 유도하는 물질들인 LPS (lipopolysaccharide), 인터페론 감마, 환경 독소(농약, 중금속 등) 그리고 신경 손상 등과 같은 요인에 의해 아메바 모양의 굵고 짧은 가지와 뚱뚱한 세포체를 가지는 활성화된 모양으로 변화한다. 활성화된 미세아교세포는 외부 독소로부터의 신경 세포를 보호하는 기능 외에도 신경 세포의 구조를 유지하게 하고 신경 보호 물질을 분비하여 신경 세포의 기능을 유지·보조하는 역할을 수행하지만 미세아교세포가 과도하게 활성화되면 신경세포에게 유해한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS), 산화질소 (nitric oxide), 염증성 사이토카인과 같은 신경독소와 염증매개물질들을 생성, 분비하여 더 많은 신경세포의 사멸을 유도시키는 양면적인 기능을 수행하기도 한다.
- 미세아교세포의 활성화는 알츠하이머병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭경화증 (Amyotrophic Lateral Sclerosis), 다발성 경화증 (Multiple Sclerosis) 그리고 파킨슨병과 같은 신경변성 질환의 진행에 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 미세아교세포의 활성화는 활성산소종 및 여러 가지 염증매개 물질의 생산량을 증가시켜 도파민 신경세포 손상의 시작 혹은 가중 원인이 되는 것으로 알려져 있다. LPS를 중뇌의 흑색피질부에 직접 투여한 실험에서 미세아교세포의 활성화 및 도파민 신경세포의 선택적 사멸이 확인되었다. 또한, 도파민신경세포에 선택적으로 손상을 주는 rotenone, MPTP, paraquat 등에 의해 미세아교세포가 활성화되는 것이 관찰되었다.
- 신경변성질환자의 혈액과 뇌에서 높은 농도의 염증성 사이토카인이 측정되며, 신경변성질환자의 흑질(SN)에서 미세아교세포가 활성화되어 있음을 알 수 있다. 신경변성질환자의 PET (positron emission tomography) 등을 분석한 연구에서도 중뇌 흑질부의 미세아교세포가 활성화되어 있음이 보고되고 있고 이는 도파민 신경세포의 감소와 연관되어져 있음이 확인되었다. 신경세포와 미세아교세포의 동시 배양을 통한 연구에서도 LPS에 의한 염증반응에 의해 과량의 TNF- α , 초산화물 (superoxide) 그리고 산화질소가 생성되며 도파민 신경세포 손상을 가져온다. 또한 파킨슨병 환자의 면역글로불린, trisialoganglioside 등과 같은 Fc gamma 수용체 활성인자를 주사한 동물모델에서 도파민 신경세포의 사멸과 미세아교세포의 활성화가 관찰된다.
- 염증반응으로 인하여 활성화된 미세아교세포로부터 생성되는 여러 유해물질 중에서 가장 대표적인 물질은 활성산소종이며, 신경세포에 직접적인 손상을 주고 활성산소종에 의한 산화적 스트레스가 신경변성질환의 주요요인중 하나로 보고되고 있다 (그림 1). 활성산소종은 초산화물(O_2^-), 과산화물(H_2O_2), 수산화 라디칼(OH^\bullet) 그리고 과산화질소($ONOO^-$)로 구

성되며 여러 가지 경로를 통하여 생성되고 다양한 병인에 의하여 생성된 활성산소종은 효소의 활성 및 단백질합성의 저해, DNA의 손상 등에 의해 세포손상을 일으키며, NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 산화효소, iNOS (inducible Nitric oxide synthases), MPO (myeloperoxidase), LOX (lipoxygenase), 그리고 COX (cyclooxygenase) 와 같은 염증성 효소들에 의해 생성된다(그림 1).

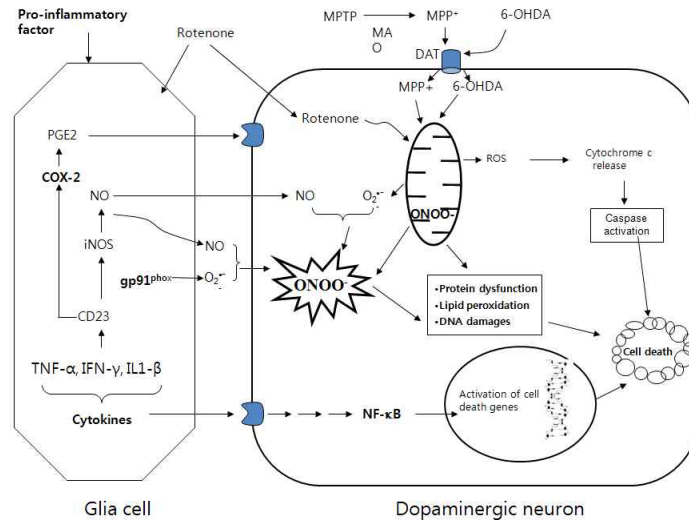


그림 1. 활성산소종에 의한 신경손상의 모식도

- 미세아교세포는 T-,B-lymphocyte의 마커인 MHC (Major Histocompatibility Complex) 항원을 가지는데 이는 APCs (antigen-presenting cells)의 역할을 수행함을 의미하나 일반적인 APCs와 달리 T-세포와의 결합이 없이도 활성화된다. 미세아교세포의 활성화는 여러 가지 경로를 통해 이루어지는데 toll-like receptor family(TLRs)가 대표적인 활성화 경로로 TLRs는 여러 개가 세포내 존재하며 각각 다른 자극에 대하여 반응하며 미세아교세포에는 TLR1에서 TLR9까지가 발현된다. 대표적인 염증유발인자인 LPS (lipopolysaccharide)는 TLR4에 의해 하위 신호전달경로인 MyD88, IRAK, ERK, p38, JNK kinase를 통하여 NF-κB의 transcription을 조절한다. 또한 신경변성질환의 Pathological protein들에 의해 미세아교세포가 활성화되는데 이는 Pathological protein에 의해 사멸된 신경세포의 항원을 인식하여 활성화된다 (그림. 2).

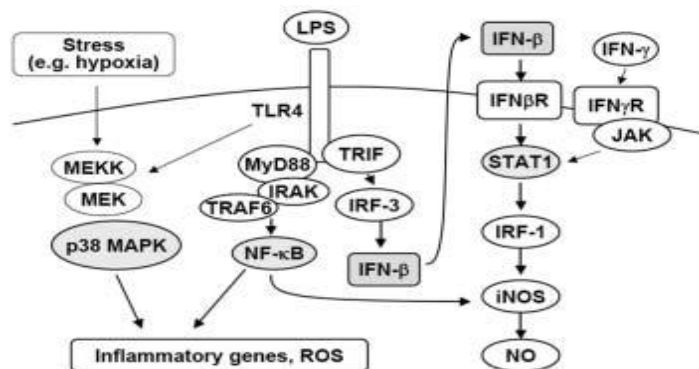


그림 2. TLR4에 의한 염증반응 모식도

- iNOS의 저해제는 많은 수가 개발되어 있으며 iNOS의 활성을 저해하는 것으로 GW274150 ([2-[(1-iminoethyl) amino] ethyl]-L-homocysteine), L-N-iminoethyl-lysine (L-NIL), aminoguanidine (AG), Quercetin 등이 있다. GW274150은 실험동물에서 도파민 신경세포의 선택적 신경독소인 6-OHDA에 의한 또한 식물에서 GW274150을 7일간 일일 2회씩 경구투여하였을 때 iNOS의 발현을 억제함을 확인하였으며, L-NIL은 외상에 의한 뇌손상에서 iNOS의 발현을 저해한다. 또한 AG는 여러 논문들에 의해 신경세포보호효능을 가진다고 보고된 물질로 L-DOPA에 의해 증가된 NO의 증가를 억제함이 확인되었다. 식물에서 발견된 flavonoid인 Quercetin은 zebrafish와 PC12세포에서 6-OHDA에 의한 신경세포사에서 iNOS/NO system의 저해를 통하여 신경보호 효능을 보이는 물질이다.
- 신경변성질환에서 미세아교세포의 활성화에 의해 사이토카인이 발현되기도 하는데 이러한 사이토카인은 전염증성사이토카인으로 TNF- α , IL-1, IL-6가 발현되어 염증반응을 증폭 및 지속시킨다. 특정 부위에서 발현된 사이토카인은 혈류를 통하여 확산되어 염증반응을 증폭한다. IL-1은 면역반응의 중요한 initiator로 뇌손상에 의해 빠른 시간에 뇌척수액과 뇌 해면조직에서 높은 농도의 IL-1 β 가 검출된다. 정상세포에서 IL-1은 IL-6의 발현을 유도하며 iNOS의 활성을 자극하며 신경세포의 AChE (acetylcholinesterase)의 활성을 증가시킨다. IL-6는 host defense에서 다양한 역할을 하는 사이토카인으로 염증반응에서 주요 조절인자로 작용하며 신경세포에서 직·간접적으로 neurotrophic effect를 가지며 정상교세포증 (astrogliosis)를 촉진하며 미세아교세포의 활성화한다. TNF- α 는 염증반응의 사이토카인 경로 조절에서 중추적인 역할을 수행하는 사이토카인으로 26 kDa의 막결합 단백질로 반응에 의해 17 kDa로 분해된다. 건강한 뇌에서는 TNF- α 의 발현이 현저히 낮지만 미세아세포의 활성화에 의해서 발현이 급격하게 증가된다. TNF- α 가 제거된 쥐에 MPTP를 주사한 실험에서 흑질의 도파민성 신경세포의 감소에는 영향이 없었지만 striatal terminal의 손상이 줄어들어 관찰되었다. 이러한 염증성 사이토카인 중 더욱이, 파킨슨병 환자의 대뇌 흑질에서는 TNF- α 혹은 IL-1 β 에 대한 면역반응을 보이는 아교세포가 존재함이 보고되었다.
- 염증성 사이토카인들의 조절을 통해서 신경변성질환을 예방 또는 치료할 수 있을 것이다. 염증반응은 조절하기 위하여 NSAIDs (Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs)이 개발되었으나 신경변성질환 환자에서 효능을 보지 못 하였으며 항생제로 잘 알려진 Minocycline은 미세아교세포의 활성화에 의한 염증성 사이토카인을 억제하는 것이 확인되었으며 여러 신경변성질환 동물모델에서 효능이 보였으나, 임상실험에서는 효능을 입증하지 못했다. 이처럼 항염제로부터 신경변성질환의 예방 및 치료효과가 미미하기 때문에 자연적으로 발생하는 항염증성 사이토카인을 이용하기 시작했다. 예로 IL-1의 저해제인 IL-1ra를 이용한 연구에서는 뇌졸중 환자에게 재조합 IL-1ra가 효능을 보였으며 NMDA에 의해 유도된 중추신경계 및 신경세포손상에서 손상을 막는 효과가 보고되고 있다.
- 국내 천연생물자원 연구 개발 현황:
 - ▶ 천연물 물질은행 구축 사업으로 한약재 성분 등을 분석, 정제해 저장해 두고 연구소, 대

학 등의 연구기관에 공급하는 사업이 진행되고 있음. 천연물과학 연구소가 천연물 과학분야 전문연구기관으로서 동식물 천연자원으로부터 성분의 분리, 화학구조의 구명, 새로운 생리활성의 탐색 등 연구를 수행하여 왔음. 또한 한국생명공학연구원 내 한국식물은행은 국내 자생식물 추출물 은행 구축사업을 통해 확보된 3,000개 이상의 식물추출물과 성분을 확보하고 분양하였다.

- ▶ 한약 제형 현대화 사업은 탕제가 주를 이루는 전통 한약은 복용이 불편하고 보관이 어려워 한방 산업 발전을 위해 한국한방산업진흥원은 복용, 보관, 휴대가 편리한 캡슐, 과립 제형 한약 개발을 본격화하고 있음. 한국한방산업진흥원은 다양한 성과를 창출하고 있는데, 국화과에 속하는 선복화라는 한약재에서 추출한 천연물질로 세계 최초의 천식 치료 신약을 개발해 지난해 11월 유한양행에 기술 이전되었다.
 - ▶ 최근 건강기능식품 연구현황을 살펴보면 기업체의 경우 36.2%, 연구단체의 경우 44.8%가 항산화 효과 연구 중으로 건강기능식품 연구 분야 중 가장 높은 비율을 차지하고 있다.
 - ▶ 기업체의 경우 항산화효과에 이어 면역기능증진 (32.8%), 관절건강 (32.8%), 영양보충 (31%), 비만조절 (27.6%), 장건강 (27.6%) 분야의 순으로 연구 중이라고 밝혀졌으며, 반면 연구단체의 경우 면역기능증진 (34.5%), 비만조절 (34.5%), 관절건강 (34.5%), 콜레스테롤저하 (27.6%), 당뇨조절 (27.6%) 분야의 순으로 연구가 진행되고 있다.
 - ▶ 2000년에 정부는 '천연물 신약개발 연구 촉진법'을 발표하였음. 2000-2005년도 제1차 천연물 신약연구 개발 촉진계획 기간에서 가시적인 연구성과들이 있었고 동아제약의 '스티렌(Stillen) 정'과 SK케미칼의 '조인스(Joins) 정'은 이 기간의 대표적인 결과라고 할 수 있다.
 - ▶ 과학기술부의 21C 프론티어 연구개발 사업의 일환으로 '자생식물 이용기술 개발사업단'이 발족해 실질적인 연구·개발에 몰두하고 있음. 자생식물 이용기술 개발 사업단은 국내 자생식물 4,000 여종의 종자·추출물 은행을 구축함과 동시에 난치성 질환 치료, 예방용 식품의약 개발, 고부가 가치 천연신약소재 개발을 수행하였다.
 - ▶ 현재 산화적 손상에 기인하는 염증성 질환 시장에서는 수입되어 사용되고 있는 아사콜(Asacol)과 같은 메살라진 (Mesalazine) 계열 약물의 이용자가 증가하였고 레미케이드(Remicade)가 높은 가격의 영향으로 6억 달러 이상의 매출을 올리면서 시장을 주도하고 있다.
 - ▶ 최근 승인을 받은 애토티의 휴미라 (Humira)의 매출은 염증성 질환에 대해서 5000만 달러에 이르지 못했지만 향후 10년 안에 레미케이드의 성장이 정체 될 것으로 전망되며 휴미라는 지속적인 성장을 이루어 10억 달러 이상의 매출을 올릴 것으로 예상하고 있다.
 - ▶ UCB 파마의 심지아 (Cimzia)도 조만간 출시 될 것으로 예상되고 레미케이드 및 휴미라와 경쟁하면서 2015년 예상 판매는 6억 달러 이상을 예측하고 있다.
- 2005년도 건강기능식품의 국내 제조업소는 310개소에서 42개 품목 (고시형 37개, 개별인정형 5개)을 생산하고 있으며, 매출액은 6,856억원 (국내 판매액:6,433억원, 수출액:423억원)으로 집계되고 있다. 이는 2004년도의 매출액에 비해 약 20%증가한 것으로 국민들의 건강기능식품에 대한 관심이 증가하고 있음을 의미한다.

- 국내 기업뿐만 아니라 한국암웨이, 엘트웰, SMK, 허벌라이프, 파마넥스 등 다국적기업의 성장세도 두드러지게 나타나고 있으며 위탁 생산의 전면적인 허용으로 업체들의 제품 제조 시설 가동률이 크게 증가하고 있는 추세이다.
- 국내 건강기능식품 시장은 홍삼제품 (1,919억원), 알로에제품 (971억원), 영양보충용제품 (949억원), 클루코사민제품 (643억원), 클로렐라제품 (576억원) 등의 제품류가 높은 실적을 나타내며 국내 바이오벤처 중심의 약리적, 과학적 근거에 의한 고급 기술을 기반으로 노화 억제, 생리 활성 증진, 면역 기능 향상, 비만 및 당뇨 등 만성 질환 개선 등의 분야 연구가 활발히 이뤄지고 있다.
- 미국 - 미국의 건강기능성 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.
- 기존 수검초를 이용한 특허의 경우 수검초를 피부외 용제, 향균활성을 가지는 식품첨가물의 용도 등으로 특허출원/등록되어 있으나, 인지기능에 대한 특허는 전무한 실정이다. 또한 수검초와 그 유효성분인 α -asarone에 대한 기존 논문 중 뇌신경 보호에 대한 논문들도 다수 존재하나, 인지기능 개선에 대한 논문은 많지 않고 이 또한 동물모델에서의 실험이 없다.

- 국내 및 국외시장 분석결과 수검초를 이용한 제품 중 국내·외적으로 삼푸의 원료와 같은 헤어제품으로 생산 및 판매가 이루어지고 있으며, 현재 국내에서의 건강기능식품의 규모는 상당한 규모를 가지고 있으나, 그 범위가 한정적이다.
- 우리나라는 2016년까지 10년간 총 19조 (연 14.8% 증가)을 생명공학 사업 확대와 신규 사업에 투자해 2조 4,000억 원의 시장을 60조 규모의 시장으로 확대시켜 생명공학 분야 세계 7위의 기술 강국의 '바이오 경제'를 구현할 방침이며, 농축산 식품 분야의 경우 향후 생명과학을 바탕으로 고유의 핵심기술 개발을 통한 원천 기반기술 강화 등을 통한 고부가가치 동식물 생산, 질병 예방 및 조기 치료가 가능한 세계적 기능성 식품 개발을 중점적으로 추진해 나갈 예정이다. 또한, 전통 한방의 처방에 근거해 인삼, 현삼 등의 한약재를 기능성분으로 하는 뇌보호소재에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 이에 근거해 과학적이고 체계적인 연구개발 및 엄격한 원료 선정을 통해 제품을 생산하고자 하는 시도가 이루어지고 있다.
- 'ESP-102L'은 서울대학교 약대 교수진이 개발한 천연 소재로 당귀, 삼백초, 오미자 등의 한방재료를 원료로 한 복합 조성물로, 뇌신경세포 사멸을 억제해 기억력 및 인지기능을 활성화하는 것으로 알려져있다. 아미노산 분해추출물인 가바(GABA)는 신경흥분을 억제해 스트레스를 낮춰 학습능력을 높여주는 효과가 있으며, 팔라티노스는 천연당 성분으로 집중력과 주의력 향상에 도움이 된다.
- 일양약품의 브레인300은 서울대 의대 교수팀이 개발한 'BT-11'에 천연물을 포함한 조성물로, 뇌의 신경전달 물질인 아세틸콜린을 분해하는 효소의 활성과 뇌 내 아밀로이드-베타 단백질, C 단백질 등 흥분성 아미노산의 독성을 억제하고 혈중 코르티코스테론을 감소시켜 뇌신경 세포를 보호하고 뇌기능 손상을 방지하는 것으로 기억력과 학습력을 향상시키는데 도움이 된다.
- 아래의 표는 국내 건강기능식품과학의 국내 기술수준을 보여주고 있다.

기술	선진국대비 기술수준(%)	기술격차(년)	국내 기술발전 단계
식품공학기술	71.2	2.9	성장기
식품안전성평가 관리기준	72.2	5.4	성장기
유전공학기술	56.7	4.4	도입기
단백질공학기술	65.9	3.1	도입기
탄수화물공학기술	65.0	5.3	도입기
미생물이용기술	63.2	5.0	도입기
효소공학기술	71.7	5.8	도입기
생물공정기술	82.0	2.9	성장기
동물자원이용기술	65.8	6.2	도입기

표 1. 건강기능식품 관련기술 기술수준 및 기술격차
(출처: 보건산업기술동향 통권호(2001))

- 국내 식품과학 관련 기술들의 선진국 대비 기술수준은 약 65%선에 위치하고 있지만 핵심 기술의 기술격차는 5년 이상을 보이고 있을 뿐만 아니라 대부분의 기술들이 도입기에 있어 건강기능식품 기술의 기반기술인 식품과학 관련 기술의 선진화가 요구되고 있다.

분류	세분류	기술활용도	기술격차(년)
기능성 및 식품신소재 탐색기술	미생물 소재 탐색기술	1.2	1.9
	동물소재 탐색기술	0.95	1.3
	식품소재 탐색기술	1.7	2.7
	기타 기능성 및 식품신소재 탐색 관련기술	-	-
식품 기능성 규명 및 평가기술	기능성 소재 동정 및 정량기술	2.6	2.53
	<i>in vitro</i> 기능성 평가기술	2.55	2.3
	<i>in vivo</i> 기능성 평가기술	1.75	2.4
	식품 기능성 규명 임상평가 관련기술	0.6	1.73
	기타 식품 기능성 규명 및 평가 관련기술	-	-
기능성 식품소재 개발기술	전통식품 유래 기능성 소재 개발기술	2.3	2.2
	기능성 탄수화물소재 개발기술	1.65	2.25
	기능성 단백질 및 펩타이드 소재 개발기술	1.25	1.75
	기능성 지질소재 개발기술	1.05	1.4
	식품성분 소재 개발이용 기술	2.1	2.25
	기타 기능성 식품소재 개발 관련 기술	-	-
식품 신소재 개발기술	식품 풍미소재 개발기술	1.45	2.2
	식품 색소소재 개발기술	0.75	0.75
	식품 물성소재 개발기술	1.25	1.8
	기타 식품신소재 개발 관련기술	-	-
기능성 및 식품신소재 생산공정 기술	기능성 및 식품 신소재 분리 및 정제기술	2.2	1.7
	기능성 및 식품 신소재 대량생산 기술	2.25	2.65
	기능성 및 식품 신소재 제품화 기술	2.5	2.95
	기타 기능성 및 식품 신소재 생산공정 관련기술	-	-
기타 기능성 식품 신소재 관련기술	-	-	-

표 2. 건강기능식품 기반기술 선진국 대비 기술격차 (출처: 한국식품개발연구원 보고서)

- 최근 한국보건산업진흥원에서 [미래식품과학 기술예측 식품과학기술자문위원] 11명을 대상으로 해당기술의 활용도를 필수기술3점, 활용기술 2점, 관련기술 1점으로, 최고선진국과의 기술격차를 연수로 각각 건강기능식품 신소재기술을 평가한 바 기술격차에서 2년을 보이고 있으나 역시 핵심기술은 높은 기술격차를 보이고 있는 것으로 나타나 핵심기술 개발에 대한 투자가 시급하다고 볼 수 있다.
- 더욱이 선진국 기술대비 한국기술수준의 특징은 downstream 기술에서는 60% 이상의 수준

을 보이고 있는 반면 upstream 기술, 핵심기술에서는 20~30% 수준에 머무르고 있어 건강 기능식품 소재산업의 국제경쟁력이 매우 취약함을 알 수 있다.

분야	대상기술	선진국	한국	기술의 특징	
탐색 및 효능평가 기술	유효소재 탐색기술	80	30	목적 유효성분의 경제적 탐색기술 필요	
	신속 유효소재 효능 검정기술	70	30	동물실험에 대한 합리적이고 과학적인 실험설계가 필수적임	
	노화억제효과	40	10	- 신속검정 kit개발 - 생체산화방지를 통한 노화억제 - 장기간 지속적인 투자가 필요한 고난도 기술개발 필요	
	의식동원에 기초한 질환의 예방 분야	40	20	- 보신식품을 과학화 할 수 있는 분야 - 임상실험 수행능력이 기술의 관건	
	구조분석 및 개발기술	생리활성 물질을 이용한 건강증진기술	40	10	- 저이용 자원 활용 및 신상품 개발 가능 - 전 세계적으로 도입기에 있어 기술선진국 진입가능
		유효성분의 분리기술	80	40	- HPLC등 각종 분리장치를 이용하여 유효성을 이용하여 구조분석
		기능성물질의 구조결정	90	50	분리된 물질의 구조를 NMR, MS, FT-IR등을 이용하여 구조분석
		신소재 물질 디자인 기술	60	10	- 구조분석에 근거하여 기능성과 구조와의 연관관계를 규명하여 새로운 물질 디자인 - 신물질의 기능성 연구
단백질 및 펩타이드 개발기술	60	40	- 단백질 공학 기술, 단백질 구조분석기술 - 신호소 디자인 기술 - 펩타이드 생산 기술		
생명공학 기술	탄수화물 유래 개질 기술	70	45	- 고기능성 올리고당 생산기술 - 환올리고당 생산 기술 - Phytochemical생산기술	
	유효성분 대량정제 기술	70	30	- Pilot규모의 대량정제 생산 기술 - 유효성분의 손실 방지 기술 - 신물질의 기능성 연구	
	생물공학적 생산기술	80	40	- 효소 등에 의한 생물학적 합성 연구 - 합성반응 기술	
	건강기능식품의 상품화 기술	100	60	-기능성 물질을 포함한 식품 개발 - 식품소재로 사용	
	건강보조식품 관련 기술	40	20	- 부존 자원 발굴이 가능한 분야 - 기존 기술의 개선으로 국산화 가능	
	효소이용 신소재 개발 기술	80	30	- 향균효소 개발 - 단세포화 효소 이용 기술 개발 - 식품공정 고기능 아밀라제 개발 기술	
	Probiotics 이용 기술	50	20	- 유용균주 작용 메카니즘 규명 - 체내작용 유지 기술	
	항균물질 개발	70	40	- 박테리오파지 이용 기술 - 항균물질 생산 기술	
	Bioprocessing 기술 개발	70	40	- 생물고정 이용생산 기술 - 적정 효소 생산 기술	
	저열량 식품개발	60	20	- 지방대체 단백질 개발 - 체내 비축적 지방식품 개발	

표 3. 건강기능식품 소재기술의 선진국 대비 국내현황 (출처: 한국보건산업진흥원)

- 2000년대 초반에 들어 웰빙의 붐이 일어나면서 질 좋은 삶을 위한 운동, 식품, 의류, 환경 등의 시장이 급격히 확대되었다. 그로 인한 경제적인 효과가 지금까지도 꾸준히 늘어가고 있으며, 웰빙의 여러 분야에서도 새로운 소재로 만들어진 식품관련 제품은 속속들이 출시되고 있다. 또한, 인구의 고령화 추세에 따라 치매 및 알츠하이머병, 파킨슨씨병 등과 같은 퇴행성신경변성질환이 증가 되고 있고 이로 인하여 신경보호 및 인지기능 개선, 기억력 향상에 도움이 되는 소재 개발에 많은 연구진들이 노력하고 있다.
- 최근 농촌진흥청 인삼특작이용팀 연구진에서 “노루궁뎅이버섯”의 추출물이 인지기능 개선에 효능이 있다고, 발표하였으며 또한 하버드 의대 연구진에서는 초콜릿의 주원료인 “카카오”가 뇌혈류 개선 및 기억력, 인지기능에도 효과가 우수하다고 발표하였다.
- 이와 같이 지속적인 신경보호 및 인지기능 개선, 기억력 향상에 대한 소재 개발 및 연구가 이루어지고 있으며, 고령화사회로 진입됨에 따라 기능성 식품을 찾는 수요층이 증가하므로, 본 연구에서 다루는 수검초 및 그 유래성분들의 많은 효능들이 밝혀져 시장에 진입할 경우 부가가치 증대 등 효과가 매우 클 것으로 예측된다.
- 12년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조4,091억원으로 2011년대비 3% 증가하였으며, 건강기능식품 생산증가율은 2012년 국내총생산액 (GDP, 1,272조원) 증가율 2.82%와 국내 제조업총생산액 (GDP, 356조원) 증가율2.48%을 약간 웃도는 수준이며, 건강기능식품 수출액은 584억원으로 ‘11년 556억 원 보다 5% 가량 소폭 증가한 것으로 분석되었다. 또한 현재 생산되고 있는 기능성 식품 중 인지기능개선 효능 식품은 생산이 미비한 실정이다.

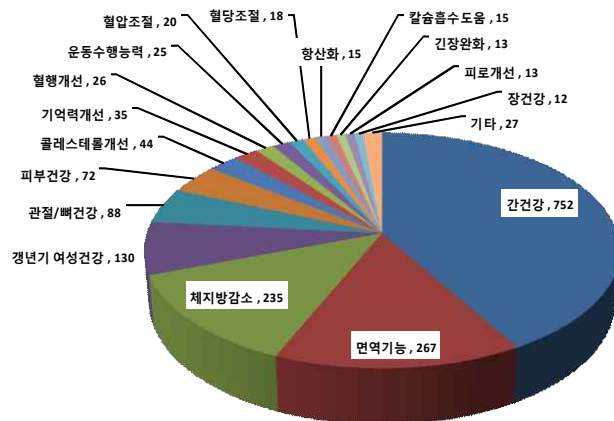


그림 3. 개별인정형 건강기능식품 기능성 별 생산실적(2012년/억원)((출처: 식약청))

- 현재 식약청에 등록되어 있는 기능성 개별인정 원료는 총 146종으로 2010년 이후 등록된 원료는 이중 본연구와 관련되어 있는 인지기능개선에 관련된 원료는 3종으로 65종이지만 이 중 인지기능 개선 효능을 가지는 기능성 원료의 등록은 이루어지고 있지 않다. 또한 현재 등록되어 있는 인지기능 개선 기능성 원료는 단 2종으로 참당귀뿌리추출물, 포스파티딜세린이 있을 뿐이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 . 수검초 추출물 및 그 유효성분을 이용한 신경세포 보호 효능 및 인지기능 개선 소재 개발

1, 수검초 및 그 유효성분의 *in vitro* 효능 분석

가. 수검초의 *in vitro* 효능 분석 및 기전 연구

- 수검초 추출물의 NO방출 및 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 유전자 및 단백질의 발현 억제

신경교세포에서의 염증유도는 LPS (lipopolysaccharide)에 의하여 아질산염 (NO)의 생산이 수반되며, 아질산염 (NO)의 증가는 뇌 손상 시 세포독성에 매우 중요하게 작용하는 병리학적 기전임이 많은 보고를 통하여 알려져 있다. 수검초 추출물의 뇌세포 보호효능 분석을 위하여 신경아교세포의 염증반응에 의해 생성되는 아질산염의 억제 및 아질산염의 생성에 직접적인 영향을 미치는 iNOS의 유전자 및 단백질 발현 조절 효능을 검사하였다. BV-2 신경교세포에서 LPS에 의해서 유도되는 아질산염(NO)은 대조군이 9배 증가함에 비해, 수검초 추출물은 처리한 신경교세포에서 농도 의존적으로 NO 발생을 저해하는 것을 확인하였었다 (그림 4A). 또한 발현분석을 통하여 아질산염의 합성 효소인 iNOS의 전사 및 단백질 단계에서의 저해 효능을 확인하였다 (그림 4 B,C,D).

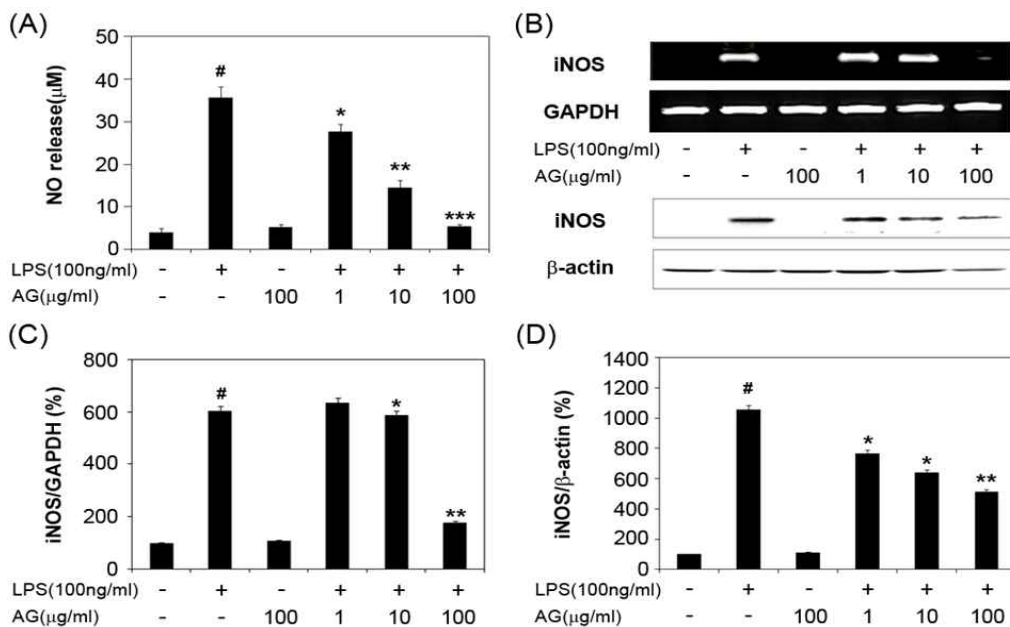


그림 4. LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 NO의 방출 (A)과, iNOS의 전사 및 단백질 단계 (B,C,D)에서 수검초 추출물의 농도에 따른 저해 효능

○ 수검초 추출물의 COX-2 (cyclooxygenase type2) 유전자 및 단백질의 발현저해 작용

뇌염증반응에 의해 야기되는 신경아교세포의 활성화는 여러 가지 경로의 신호전달과정을 거쳐 야기되는데 이 경로의 첫 번째가 iNOS와 COX-2등의 효소에 의한 것이다. COX-2는 PGE₂ (prostaglandin 2)의 전사조절 인자로 작용하여 COX-2의 발현 증가는 PGE₂의 발현을 증가시켜 염증반응을 매개한다. 이에 수검초의 염증억제 효능을 검증하기 위하여 COX-2의 발현 분석을 수행하였다. BV-2 마이크로글리아 세포에 LPS 및 수검초 추출물을 농도별로 처리하고 염증 생성에 관여하는 효소인 COX-2의 유전자 및 단백질의 발현 양상을 분석해보았다. 발현 분석을 시행한 결과 LPS를 처리한 대조군에 비하여 COX-2 단백질의 발현양이 농도의존적으로 감소되는 것을 확인하였다(그림 5A, B).

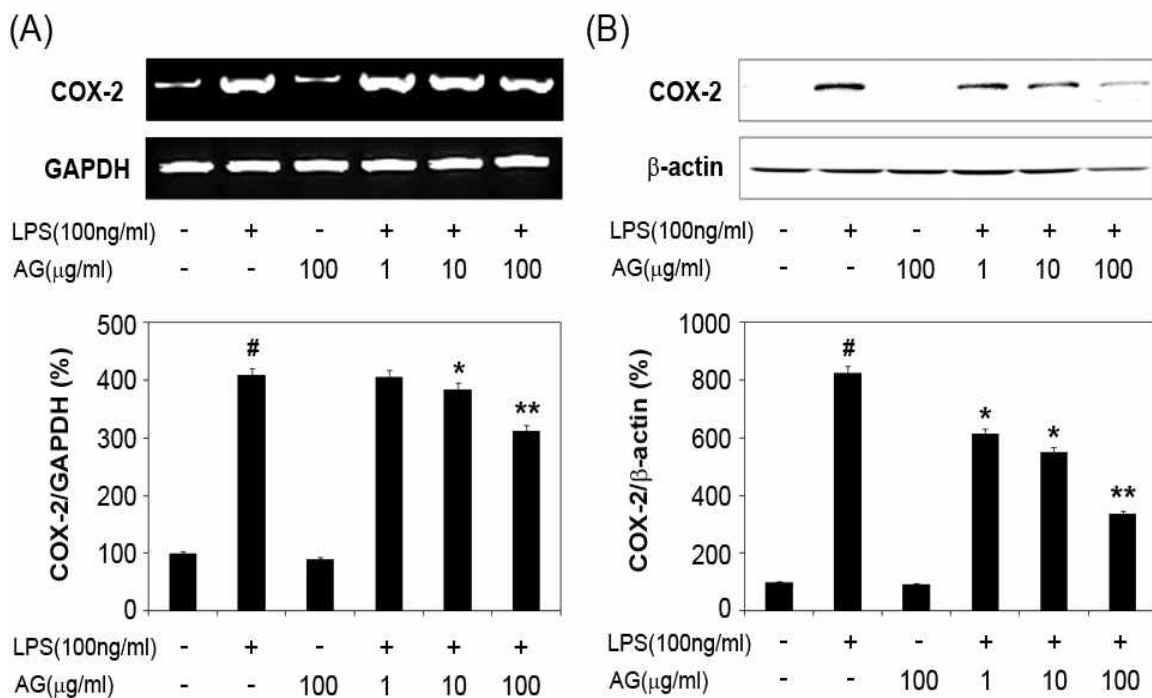


그림 5. LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 COX-2의 유전자(A) 및 단백질(B) 단계에서의 수검초 추출물 농도에 따른 저해 효능

○ 수검초 추출물의 염증매개 cytokine의 발현저해 작용

신경변성질환에서 미세아교세포의 활성화에 의해 사이토카인이 발현되기도 하는데 이러한 사이토카인은 전염증성 사이토카인으로 TNF-α, IL-1, IL-6가 발현되어 염증반응을 증폭 및 지속시킨다. 정상세포에서 IL-1은 IL-6의 발현을 유도하며 iNOS의 활성을 자극하며 신경세포의 AChE (acetylcholinesterase)의 활성을 증가 시킨다. IL-6는 생체방어에서 다양한 역할을 하는 사이토카인으로 염증반응에서 주요 조절인자로 작용하며 신경세포에서 직·간접적으로 neurotrophic effect를 가지며 정상교세포증 (astrogliosis)를 촉진하며 미세아교세포의 활성화한다. TNF-α는 염증반응의 사이토카인 경로 조절에서 중추적인 역할을

수행하는 사이토카인으로 일반적으로 뇌에서는 TNF- α 의 발현이 현저히 낮지만 미세아교세포의 활성화에 의해서 발현이 급격하게 증가된다. 이에 수검초의 신경염증 억제능을 분석하기 위하여 염증 매개 cytokine 유전자의 발현 양상을 BV-2 마이크로글리아 세포에 LPS 및 수검초 추출물을 농도별로 처리하고 발현분석을 통하여 발현 양상을 분석한 결과 TNF- α , IL-1 β , IL-6가 추출물 농도 의존적으로 감소하는 발현변화 양상을 확인하였다(그림 6A, B, C, D).

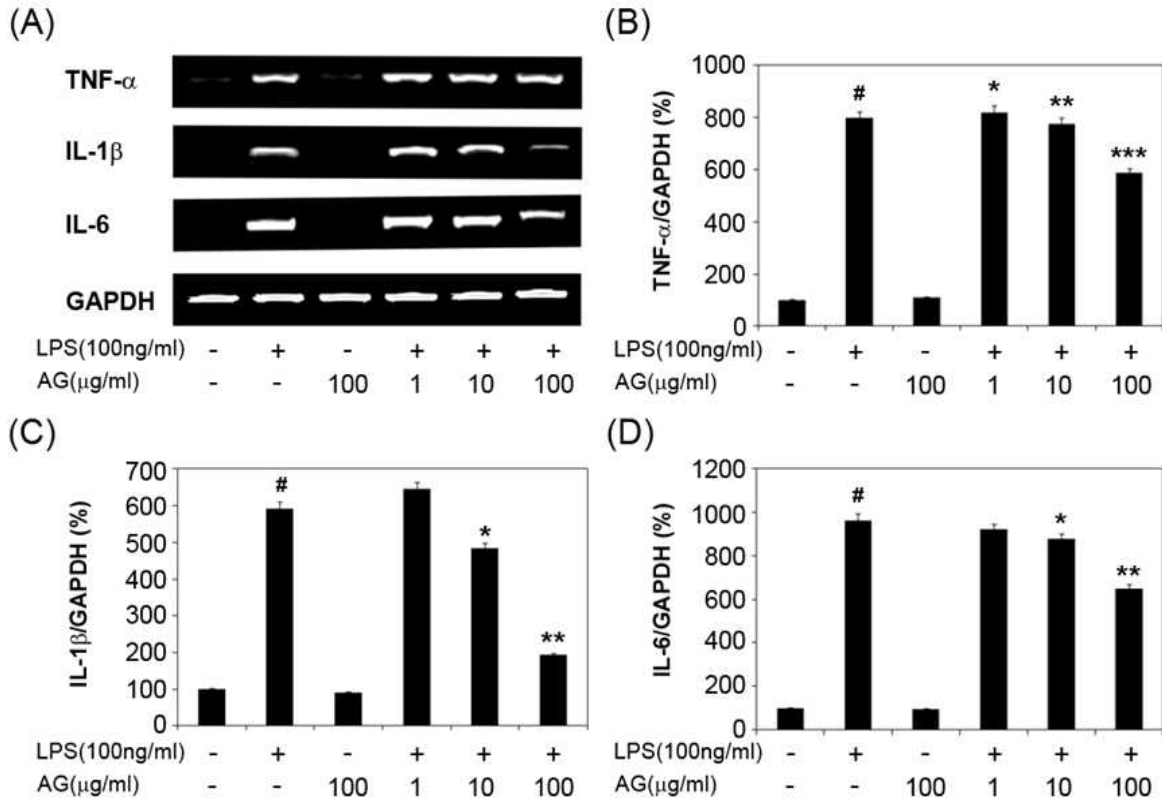


그림 6. LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 전염증성 매개체인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 사이토카인의 수검초 추출물 농도에 따른 저해 효능

○ 초대배양 신경교세포 (Primary microglia cell)를 이용한 수검초 추출물의 신경보호 효능 검증

초대배양 신경교세포를 획득하기 위하여, 1~3일 된 Sprague-Dawley rats의 대뇌피질과 흑질을 사용하여 분리하였으며, 10% FBS를 첨가한 MEM 배지로 75-cm² T-flasks에 습도가 유지되는 5% CO₂, 95% O₂ incubator에서 2주간 배양하였다. 세포의 수는 각 플레이트에 따라 6-well plates (5×10⁵cells/well), 60-mm²dishes (8×10⁵cells/dish), 또는 100-mm²dishes (2×10⁶cells/dish)로 배양하였으며 미세교세포가 순수하게 분리되었는지 CD-11B 항체를 이용하여 염색하여 확인하였다. 신경독소 물질인 LPS (50 ng/ml)와 수검초 추출물을 처리하여 nitro oxide 측정(Griess assay) 및 세포의 형태학적 변화를 측정하였다(그림 7). 초대배양 신경교세포에 LPS (50 ng/ml) 및 수검초를 농도별로 처리하고 24시간

경과 후, 형태학적 변화를 억제시키는 것을 확인하였다 (그림 7A).

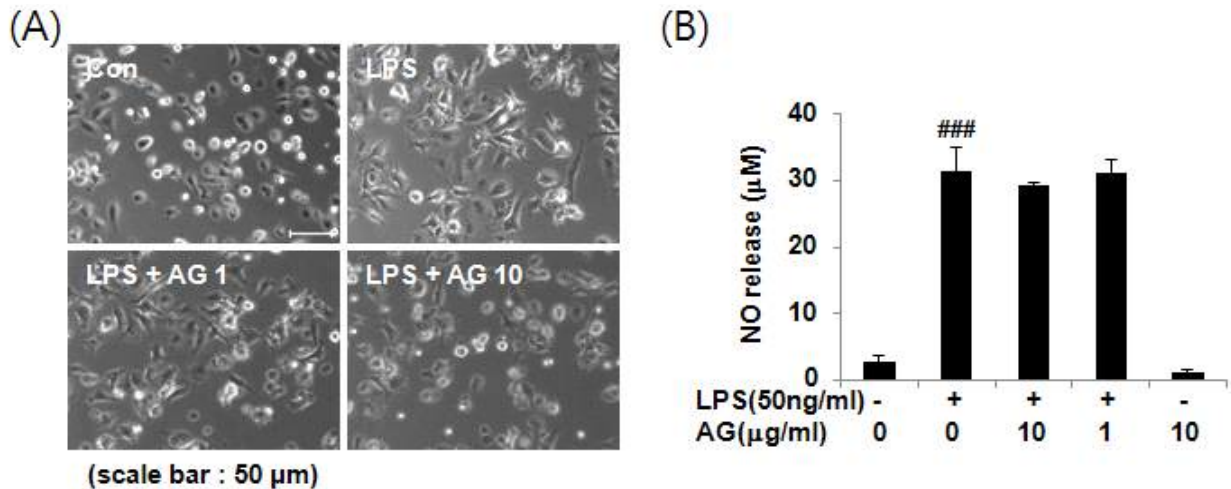


그림. 7 LPS로 자극된 primary 신경교세포에서 수검초추출물의 형태학적 변화 효능 (A) 및 수검초추출물 의 NO 저해능 (B)

○ 수검초 추출물의 활성산소 제거능 확인

활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)은 여러 질병을 일으키는 원인으로 지난 20년 동안 여러 연구자들에 의해 입증되었다. ROS의 과잉 생산은 산화적 스트레스, 세포 기능의 손상으로 인하여 궁극적으로 세포사나 세포괴사로 이르게 한다. 또한 ROS는 세포내 신호전달 체계의 신호전달자로서의 역할을 한다. 세포 생존 및 죽음에 중요한 역할을 하는 미토콘드리아는 전자전달시스템을 통한 ROS와 산화환원 반응에 의한 ROS의 primary intercellular source이다.

수검초 추출물의 활성산소 제거능을 확인하기 위하여, ESR 스펙트로미터를 이용하여 자유라디칼 소거능(free radical scavenging activity)을 측정하였다. 그 결과, 그림 8. 에서 보는 바와 같이 수검초 추출물의 농도에 의존적으로 hydroxyl radical 소거능을 확인 할 수 있었으며, IC_{50} 은 0.589 ± 0.042 mg/ml.이었다(그림 8A). 또한 그림 8B 에서 보는 바와 같이 수검초 추출물의 농도에 따라 alkyl radical 소거능을 확인 할 수 있었으며, IC_{50} 은 0.521 ± 0.071 mg/ml 이었다.

세포내 활성산소의 제거능을 확인하기 위하여 LPS로 자극된 BV-2 microglia 세포에 DCFH-DA (dichlorofluorescein diacetate) 염색 방법을 사용하였다. DCFH-DA는 reactive oxygen species (ROS)에 특이적인 표지물질이며, DCFA-DA는 세포내 유입되는 non-fluorescent compound로 intracellular esterases에 의해 분해되고 intracellular peroxides에 의해 fluorescent species인 DCF로 환원된다. DCF는 nitric oxide와 hydroxyl free radical에는 민감하며, Fluorescent plate reader를 이용하여 ROS intensity를 측정하였다. 측정결과 수검초 추출물의 최고 농도인 100μg/ml에서 $51.9 \pm 5.5\%$ 정도의 ROS 소거능을 확인하였다(그림 9).

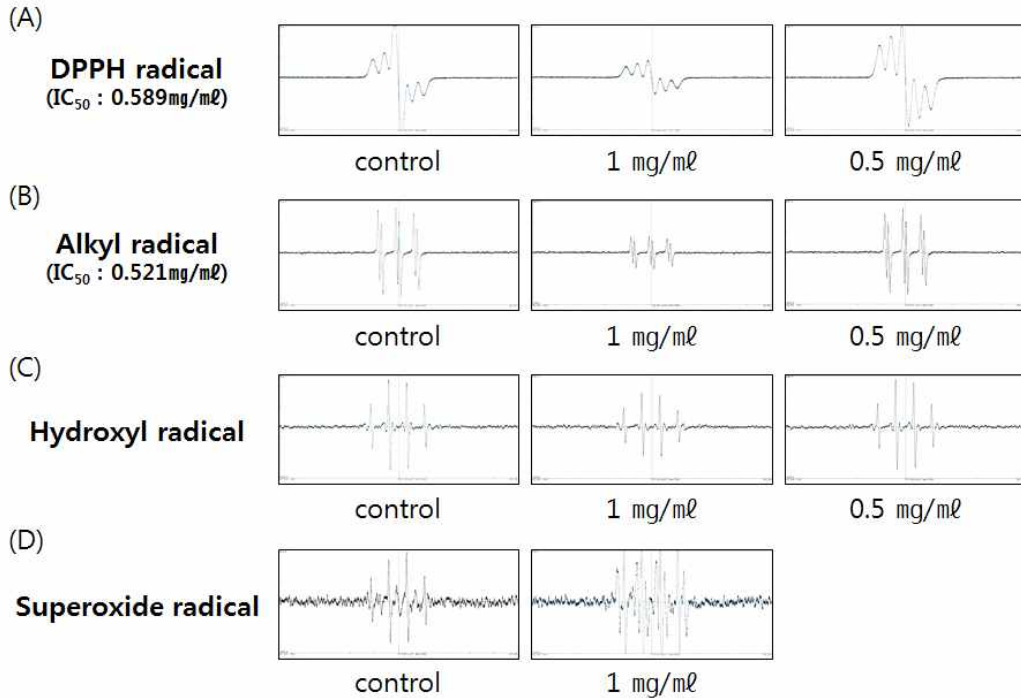


그림 8. 수검초 추출물의 활성산소 제거능 확인

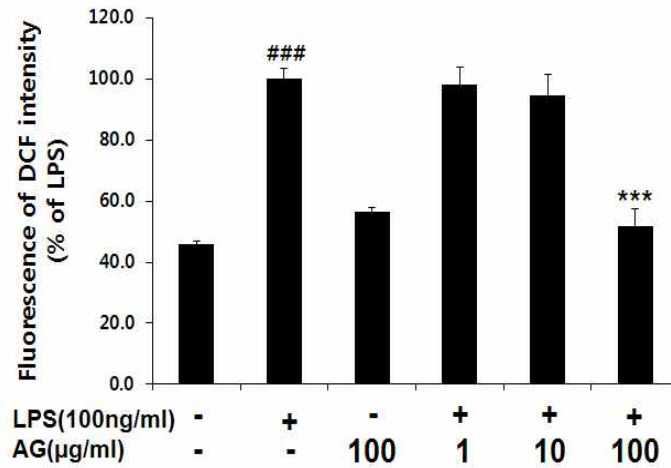


그림 9. 수검초 추출물의 ROS 소거능.

- 수검초 추출물의 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase) 활성 측정(AchE activity assay)

수검초 추출물(AG extract)은 Ellman 법을 이용하여 AchE 활성 저해 효능을 확인하였으며, 대조군으로 Tacrine hydrochloride hydrate (THA)를 사용하였다. 아세틸콜린은 신경전달물질로 이를 분해하는 효소가 아세틸콜린에스테라제이다. 이 아세틸콜린에스테라제의 활성이 증가하면 신경전달이 제대로 이루어지지 않아 뇌의 해마로 가는 기억회로에 영향을 끼친다. 분석 결과 수검초 추출물이 AchE 활성을 농도 의존적으로 억제하는 것이 확인되

었으며, 이는 수검초 추출물 (AG extract)이 아세틸콜린에스테라제 활성을 저해하여 아세틸콜린의 분해를 저해하는 것을 확인할 수 있었다(그림 10).

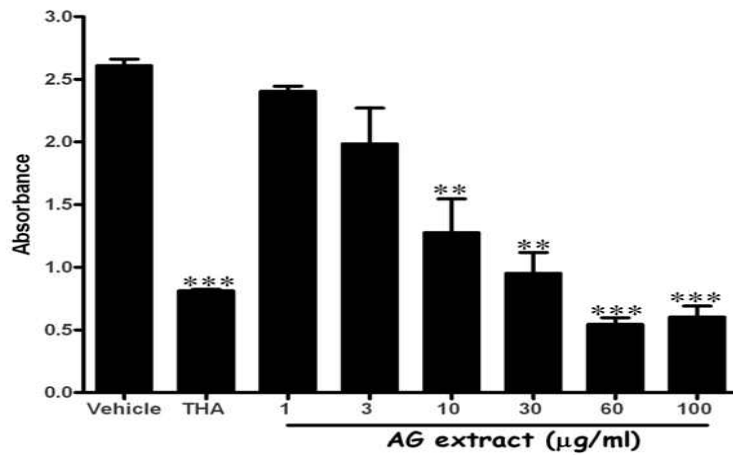


그림 10. AG extract의 AchE활성 분석 (in vitro)

2. 수검초 유효성분의 효능분석 및 기전 연구

○ 수검초에서 분리 정제한 성분들의 세포 독성 검사

LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 분리 정제한 성분들이 세포 생존에 미치는 영향을 확인 하였다. 세포 독성 검사는 MTT assay를 수행하였으며, MTT 측정 결과 조추출물인 70% MeOH, EA fraction(Fr.) 그리고 CHCl₃:MeOH Fr. 12:1에서 세포 생존율이 감소함을 확인 하였으며 MeOH, CHCl₃:MeOH 4:1, 7:1, 9:1은 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인 하였다 (그림 11).

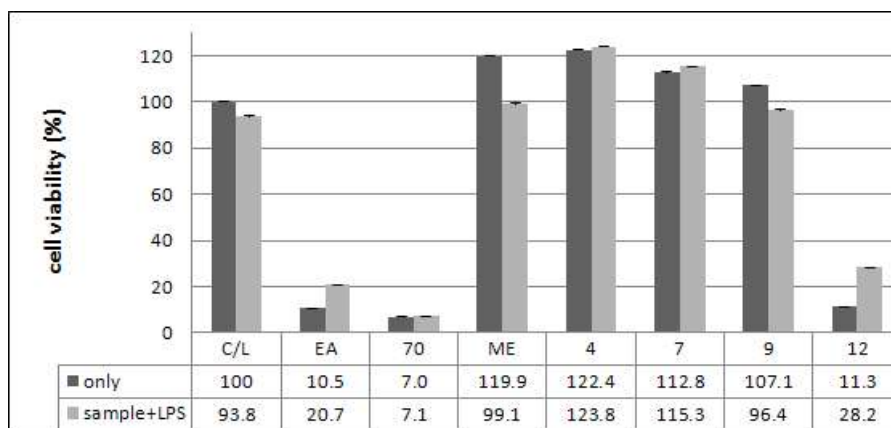


그림 11. 수검초에서 분리 정제한 성분이 세포 생존율에 미치는 영향

○ 수검초에서 분리 정제한 성분의 농도 의존적인 NO 방출 저해 작용

신경염증 효능을 분석하기 위하여 신경염증 유발 인자인 LPS (100 ng/ml)로 자극된 BV-2 신경교세포에서 생산되는 아질산염(NO)의 농도 의존적으로 저해효능을 보이는지 분석하였다. 아질산염 (NO)의 측정은 Griess 시약을 이용한 NO assay를 사용하였으며, BV-2 신경교세포에서 LPS에 의해서 유도되는 아질산염 (NO)은 약 4배의 증가를 보였으며, 실험군으로 분리 정제 성분을 농도별로 처리를 한 결과 농도 의존적으로 아질산염 (NO)의 양이 각각 줄어드는 것을 확인 하였다(그림 12).

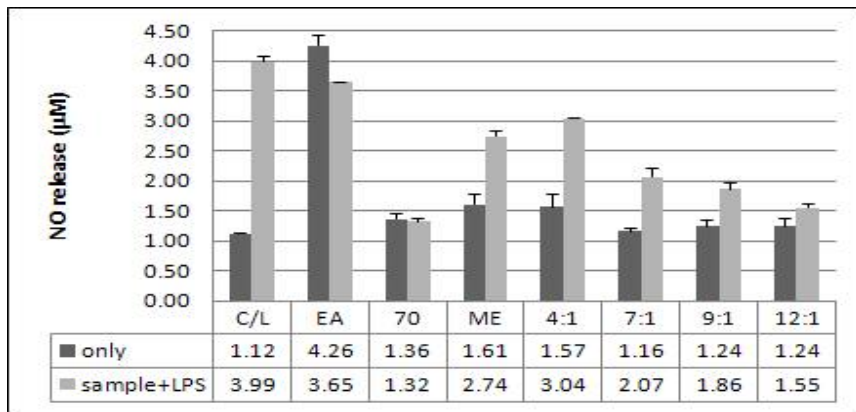


그림 12. 수검초에서 분리 정제한 성분이 NO방출에 미치는 영향

○ *in vitro* 신경염증 모델에서 수검초 추출물 (AG)의 유효성분인 알파아사론의 효능 분석

LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 알파아사론의 농도 의존적인 NO 방출

BV-2 신경교세포에서 LPS에 의해서 유도되는 아질산염 (NO)은 $30.42 \pm 0.85 \mu\text{M}$ 로 대조군으로 사용한 $3.79 \pm 0.74 \mu\text{M}$ 에 비하여 약 8배의 증가를 보였으며, 실험군으로 알파아사론을 농도별로 처리를 한 결과 각각 $27.48 \pm 1.29 \mu\text{M}$, $20.08 \pm 0.76 \mu\text{M}$, $10.05 \pm 0.7 \mu\text{M}$ 로 아질산염 (NO)의 양이 줄어드는 것을 확인 하였다(그림 13).

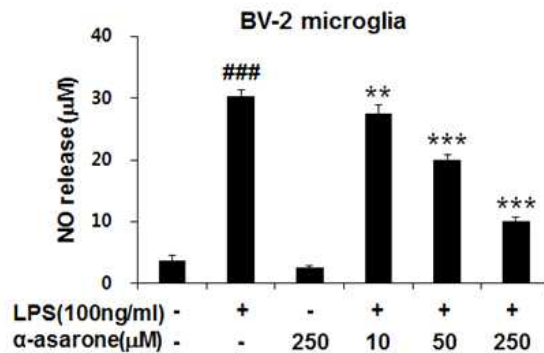


그림 13. 알파아사론이 NO방출에 미치는 영향

- LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 알파아사론의 iNOS, COX-2 유전자 및 단백질의 발현저해

아질산염 (NO)의 합성 유도 효소인 iNOS의 유전자 및 단백질 단계에서의 단일 화합물인 알파-아사론이 농도 의존적으로 발현을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. (그림 14.) iNOS 유전자의 발현 양상을 LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 iNOS 유전자의 발현량이 거의 없음을 확인 할 수 있었다. LPS를 처리한 실험군에서는 iNOS 유전자의 발현량이 확연히 증가하였고, α -asarone (알파아사론)의 농도 의존적으로 감소하는 발현변화 양상을 확인 하였다 (그림 14. ‘LPS 단독처리 시 1781.81% \pm 127.7, 알파아사론 (1, 10, 100 μ g/ml)처리 시 1132.17% \pm 51.15, 972.00% \pm 47.81, 376.27% \pm 26.94’). 또한 iNOS 단백질의 발현 양상을 분석하기 위하여 iNOS 유전자의 분석과정과 같은 농도의 LPS 및 알파아사론을 처리하여 iNOS 단백질의 발현 변화를 정량적으로 분석하였다. iNOS 단백질의 발현 변화는 iNOS 유전자와 같은 변화 양상을 확인 하였다(그림 14. ‘LPS 단독처리 시 750.52% \pm 11.37, 알파아사론 (1, 10, 100 μ g/ml)처리 시 747.41% \pm 92.20, 557.13% \pm 59.96 and 211.58% \pm 22.33’).

염증생성에 관여하는 효소인 COX-2의 유전자 및 단백질의 발현양상의 변화를 알아보기 위하여 LPS 및 단일 화합물인 알파아사론을 농도별로 처리하고 COX-2 유전자의 발현 양상의 변화를 확인 하였다. LPS만 처리한 군에서의 발현양은 대조군에 비해 1818.58% \pm 158.43의 증가를 확인하였고, 알파아사론을 농도별로 (1, 10, 100 μ g/ml)처리한 발현양은 1405.09% \pm 207.59, 1103.37% \pm 115.73 and 631.05% \pm 74.19로 LPS만 처리한 군에 비하여 농도 의존적으로 COX-2 유전자의 발현량을 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다(그림 14.).

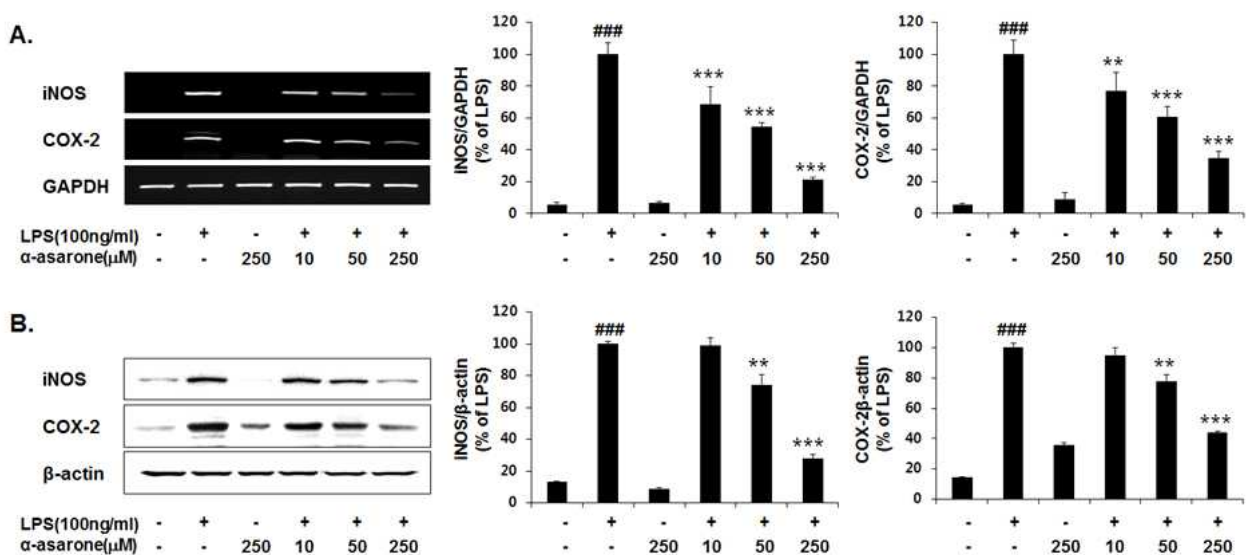


그림 14. LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 iNOS, COX-2의 유전자 및 단백질 단계에서의 α -asarone 농도에 따른 저해 효능

- LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 염증 매개 cytokine의 생산 시, α -asarone의 농도 의존적인 억제 효능

α -asarone의 염증성사이토카인 억제능 분석한 결과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 유전자의 발현량이 거의 없음을 확인 하였으며 (그림 15), LPS (100 ng/ml)를 처리한 실험군에서는 대조군에 비하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6 유전자의 발현량이 확연히 증가 (TNF- α ; 1884.03% \pm 162.95, IL-1 β ; 2507.13% \pm 38.3, IL-6; 1408.51% \pm 57.98)하였고, α -asarone 물질 처리 시, 농도 의존적으로 감소 (TNF- α ; 1941.8% \pm 6.39, 1819.56% \pm 12.22 and 927.87% \pm 29.04, IL-1 β ; 2559.55% \pm 74.75, 2520.19% \pm 88.55 and 10.54% \pm 29.00, IL-6; 1105.63% \pm 59.12, 893.65% \pm 57.01 and 152.02% \pm 13.65)하는 발현변화 양상을 확인 하였다.

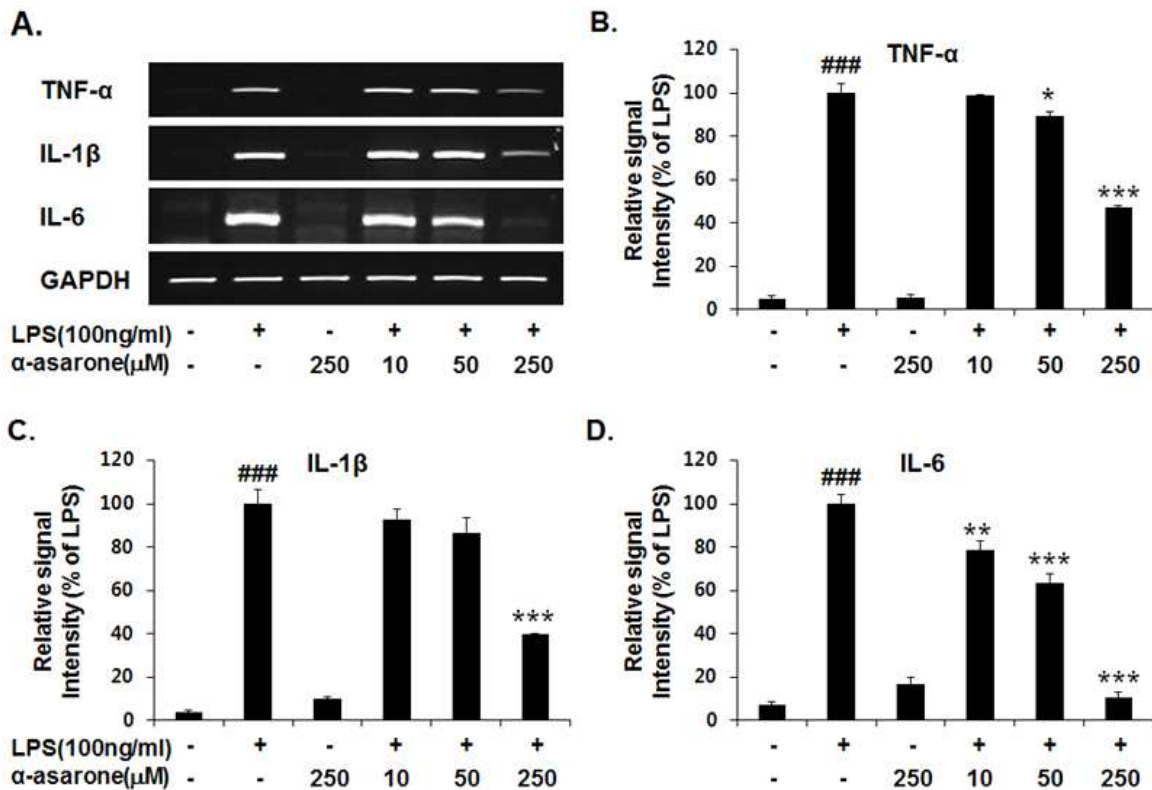


그림 15. LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 전염증성 매개체인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 사이토카인의 α -asarone 농도에 따른 저해 효능

- LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 α -asarone의 NF- κ B의 억제를 매개로 한 농도 의존적인 효능

수검초 추출물 (AG)의 유효성분인 α -asarone의 효능 확인을 위하여 LPS에 의한 염증 유도 시 전염증성 cytokine들을 발현시키는 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 NF- κ B를 구성하는 p65의 핵질에서 핵 안으로의 유입과, I κ B α 의 분해로 인한 p-I κ B α 의 발현을 Western blot을 통해 확인하였다 (그림 16). BV-2 cell에 LPS (100 ng/ml) 및 α -asarone을 농도별

로 처리하고 30분 동안 배양한 후, 면역형광법을 통하여 NF- κ B를 구성하는 p65 단백질이 핵질에서 핵 안으로의 유입되는 정도를 확인할 수 있다. LPS 미처리 시 단백질 p65가 핵 질에 많이 내재됨을 확인할 수 있고, LPS 처리 시 단백질 p65가 핵 안으로 많이 유입됨을 알 수 있으며, α -asarone을 처리하니 단백질 p65의 핵 안으로의 유입을 방지하는 사실을 확인할 수 있다 (그림 16C).

정확한 분석을 위해 핵단백질을 동정하여 Western blot을 시행함으로써 핵단백질의 발현 양상을 정량적으로 확인하였다. LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 NF- κ B p65의 발현이 거의 없었지만, LPS를 처리한 실험군에서는 NF- κ B p65의 발현이 증가하였고, α -asarone을 처리하면 그 발현 정도가 감소하는 사실을 확인할 수 있다 (그림. 16B). Nucleolin은 핵 단백질의 정량 확인을 위한 대조 단백질이다. 또한, LPS 처리 시, I κ B α 는 분해되어 p-I κ B α 양이 증가하는 사실을 확인할 수 있고, α -asarone의 농도 의존적으로 단백질 p-I κ B α 양이 감소함을 확인할 수 있다 (그림 16A). β -actin은 정량 확인을 위한 대조 단백질로 사용하였다.

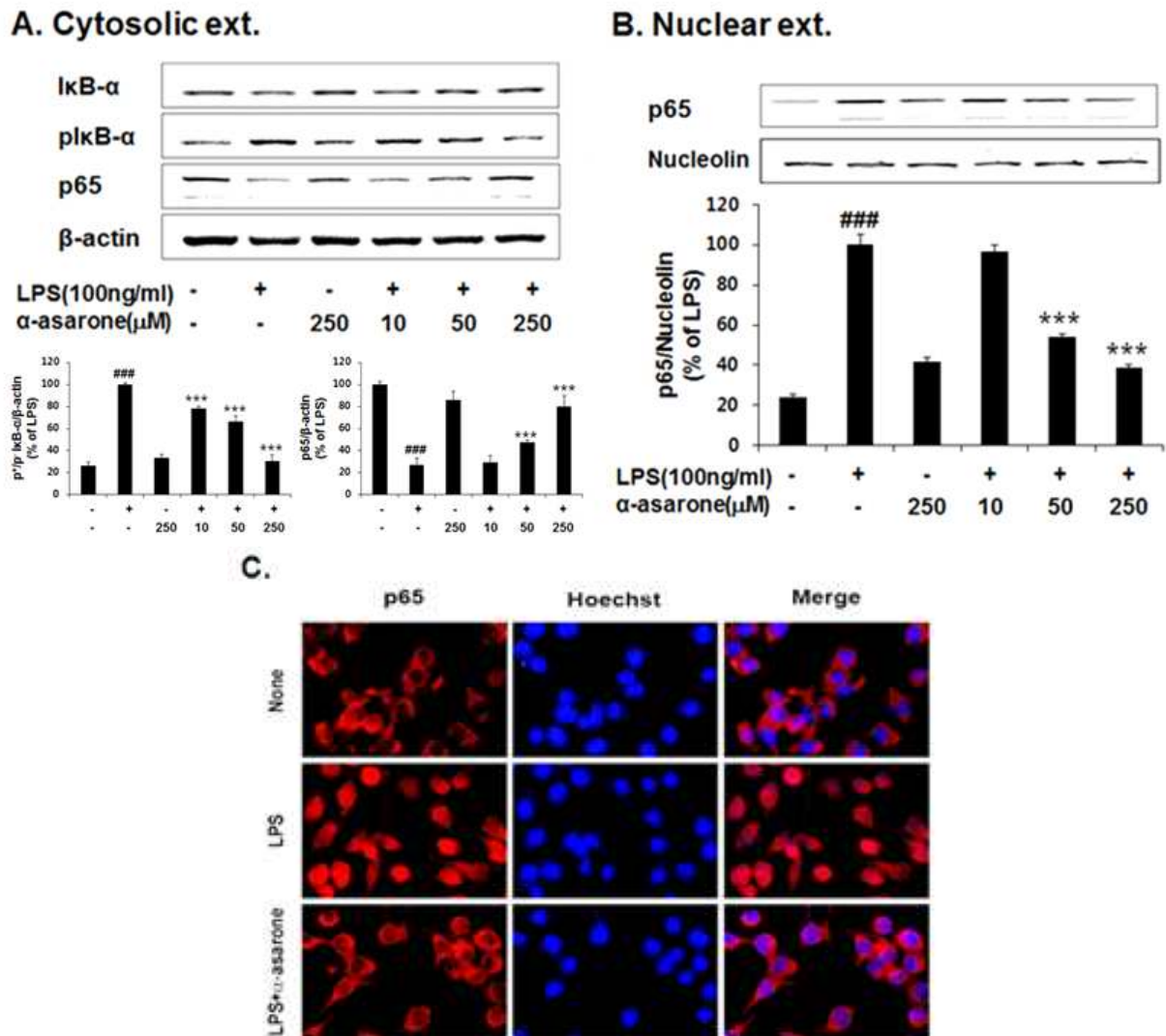


그림 16. 수검초의 유효성분인 α -asarone의 NF- κ B 활성화 효능 분석

○ *in vitro* 신경염증 모델에서 AG의 유효성분인 β -asarone의 효능 분석

- β -asarone와 LPS의 세포 독성 검사

LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 LPS 및 수검초 추출물 (AG)의 유효성분인 β -asarone (베타아사론)이 세포 생존에 미치는 영향을 확인 하였다. 세포 독성 검사는 MTT assay를 수행하였으며, MTT 측정 결과 LPS 및 β -asarone 단독으로 또는 같이 처리한 모든 실험군에서 대조군에 비하여 세포 생존율이 변하지 않음을 확인 하였다 (그림 17). 이는 신경염증 유도 물질인 LPS와 β -asarone이 세포 생존에는 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

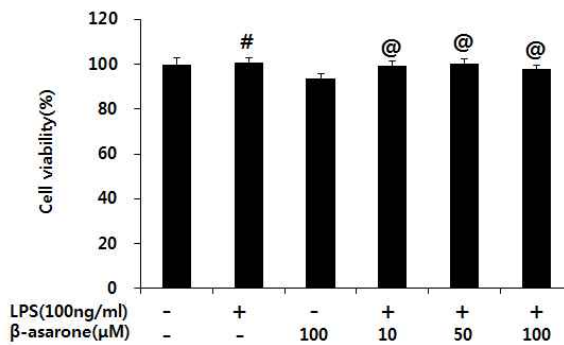


그림 17. β -asarone이 세포 생존율에 미치는 영향

- LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 β -asarone의 농도 의존적인 NO 방출 및 iNOS 유전자의 발현저해 작용

β -asarone의 항염증 효능을 분석하기 위하여 본 연구에서는 동일한 신경염증 유발 인자인 LPS (100 ng/ml)로 자극된 BV-2 신경교세포에서 생산되는 아질산염 (NO)의 농도 의존적으로 저해효능을 보이는지 확인하였다. 아질산염 (NO)의 측정은 Griess 시약을 이용한 NO assay를 사용하였으며, BV-2 신경교세포에서 LPS에 의해서 유도되는 아질산염 (NO)은 약 40배의 증가를 보였으며, 실험군으로 β -asarone을 농도별로 처리한 결과 농도 의존적으로 아질산염 (NO)의 양이 10uM-13%, 50uM-29%, 100uM-64%로 줄어드는 것을 확인하였다 (그림 18A). 또, 아질산염(NO)의 합성 유도 효소인 iNOS 유전자의 발현 양상을 BV-2 신경교세포에 LPS 및 β -asarone을 농도별로 처리하고 6시간 배양한 후, RNA를 동정하여 발현분석을 시행하여 유전자의 발현 양상을 정량적인 방법을 통하여 분석하였다. LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 iNOS 유전자의 발현량이 거의 없음을 확인할 수 있었다. LPS를 처리한 실험군에서는 iNOS 유전자의 발현량이 확연히 증가하였고, β -asarone의 농도 의존적으로 감소하는 발현변화 양상을 확인 하였다 (그림 18B). 또한 단백질 발현량을 분석한 결과 RNA 발현량의 저해와 같은 결과를 확인하였다 (그림 18C, D).

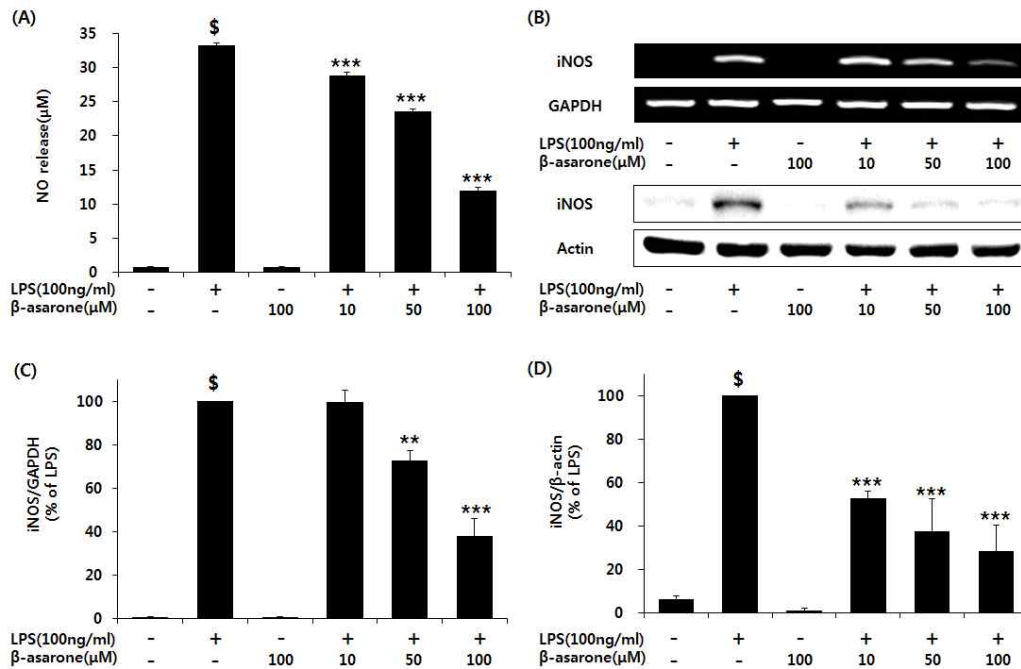


그림 18. β-asarone의 NO의 방출과, iNOS의 유전자 및 단백질 발현에서 저해 효능

- LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 β-asarone의 COX-2의 level 발현저해 작용

염증생성에 관여하는 효소인 COX-2 (cyclooxygenase type 2)의 유전자 및 단백질의 발현 양상의 변화를 알아보기 위하여, 본 연구에서는 BV-2 cell에 LPS 및 단일 화합물인 β-asarone를 농도별로 처리하고 시간별로 배양하였다. 6시간 후 RNA를 동정하여 발현분석을 시행하여 유전자의 발현 양상을 정량적인 방법을 통하여 분석하여 COX-2 유전자의 발현 양상의 변화를 확인 하였다. LPS만 처리한 군에 비하여 β-asarone 처리군이 농도 의존적으로 COX-2 유전자의 발현량을 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 19).

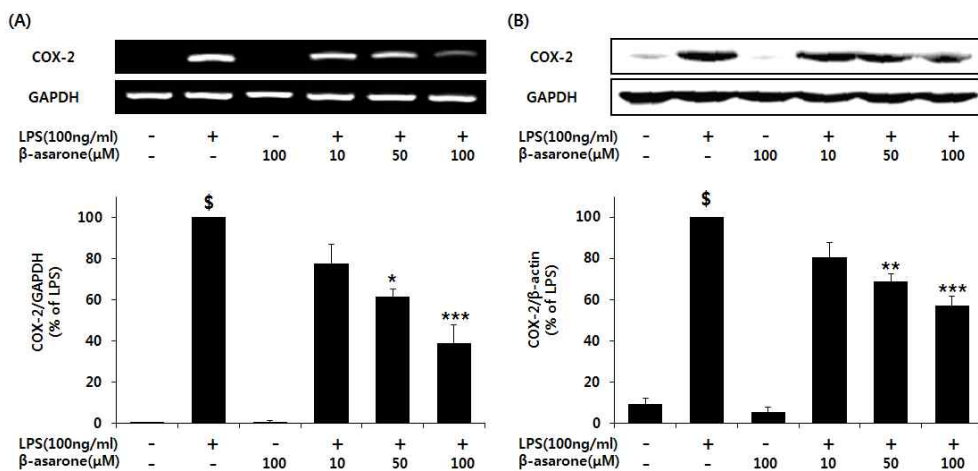


그림 19. COX-2의 level에서의 β-asarone 농도에 따른 저해 효능

- LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 염증매개 cytokine의 생산 시, β -asarone의 농도 의존적인 억제 효능

염증 매개 cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 유전자의 발현 양상의 변화를 도출하기 위하여 본 연구에서는 염증매개 cytokine 유전자의 발현 양상을 BV2 cell에 LPS 및 β -asarone를 농도별로 처리하고 6시간 배양한 후, RNA를 동정하여 RT-PCR을 시행하여 유전자의 발현 양상을 정량적인 방법을 통하여 분석하여 세 가지 유전자에서 공통적인 발현 변화를 확인 할 수 있었다. LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 유전자의 발현량이 거의 없음을 확인 하였으며, LPS (100 ng/ml)를 처리한 실험군에서는 대조군에 비하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6 유전자의 발현량이 확연히 증가하였고, β -asarone 물질 처리 시, 농도 의존적으로 감소하는 발현변화 양상을 확인 하였다 (그림 20).

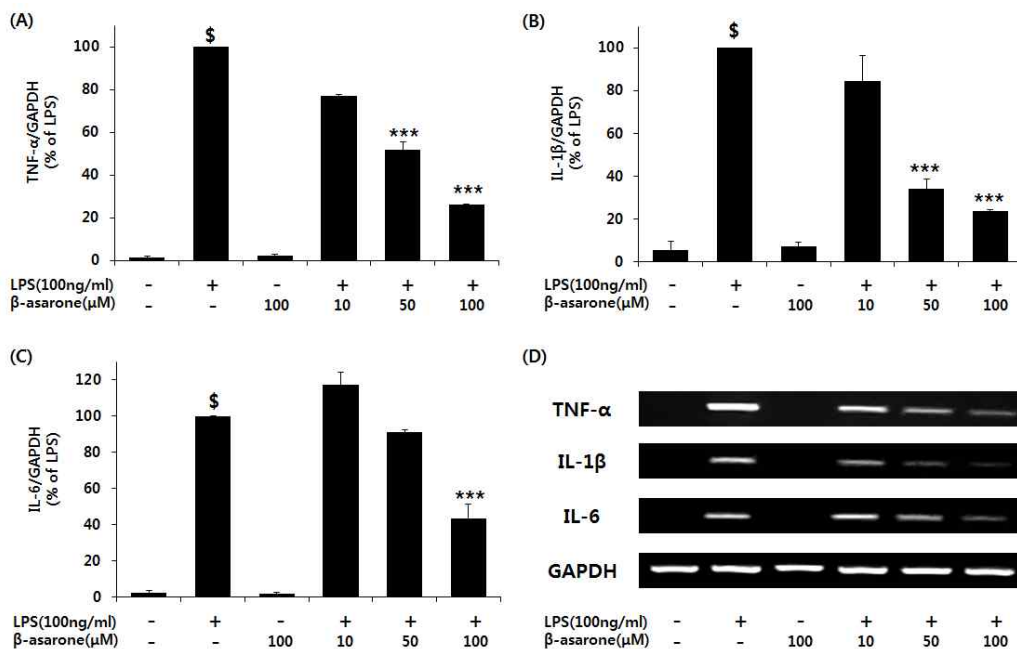


그림 20. LPS로 자극된 BV2 신경교세포에서 전염증성 매개체인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 사이토카인의 β -asarone 농도에 따른 저해 효능.

- LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 β -asarone의 NF- κ B의 억제를 매개로 한 농도 의존적인 효능

수검초의 유효성분인 β -asarone의 효능 확인을 위하여 LPS에 의한 염증 유도 시 전염증성 cytokine들을 발현시키는 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 NF- κ B를 구성하는 p65의 핵질에서 핵 안으로의 유입을 면역형광 염색법을 통하여 확인하였고, 핵단백질을 동정하여, 핵 내에서의 NF- κ B p65의 발현을 Western blot을 통하여 확인하였다. BV-2 신경교세포에 LPS (100 ng/ml) 및 β -asarone을 농도별로 처리하고 30분 동안 배양한 후, 면역형광법을 통하여 NF- κ B를 구성하는 p65 단백질이 핵질에서 핵 안으로의 유입되는 정도를 확인 할 수 있다. LPS 미처리 시 단백질 p65가 핵질에 많이 내재됨을 확인할 수 있고, LPS 처리 시 단백질 p65가 핵 안으로 많이 유입됨을 알 수 있으며, β -asarone를 처리하니 단백

질 p65의 핵 안으로의 유입을 방지하는 사실을 확인할 수 있었다 (그림 21A).

핵단백질을 분리하여 Western blot을 분석하여 핵단백질의 발현 양상을 정량적으로 확인하였다. LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 NF- κ B p65의 발현이 거의 나타나지 않았지만, LPS를 처리한 실험군에서는 NF- κ B p65의 발현이 증가하였고, β -asarone를 처리하면 그 발현 정도가 감소하는 사실을 확인할 수 있다 (그림 21B). Nucleolin은 핵단백질의 정량 확인을 위한 대조 단백질로 사용되었다. 또한, LPS 처리 시, I κ Ba는 분해되어 p-I κ Ba 양이 증가하는 사실을 확인할 수 있고, β -asarone의 농도 의존적으로 단백질 p-I κ Ba양이 감소함을 확인할 수 있다 (그림 21C).

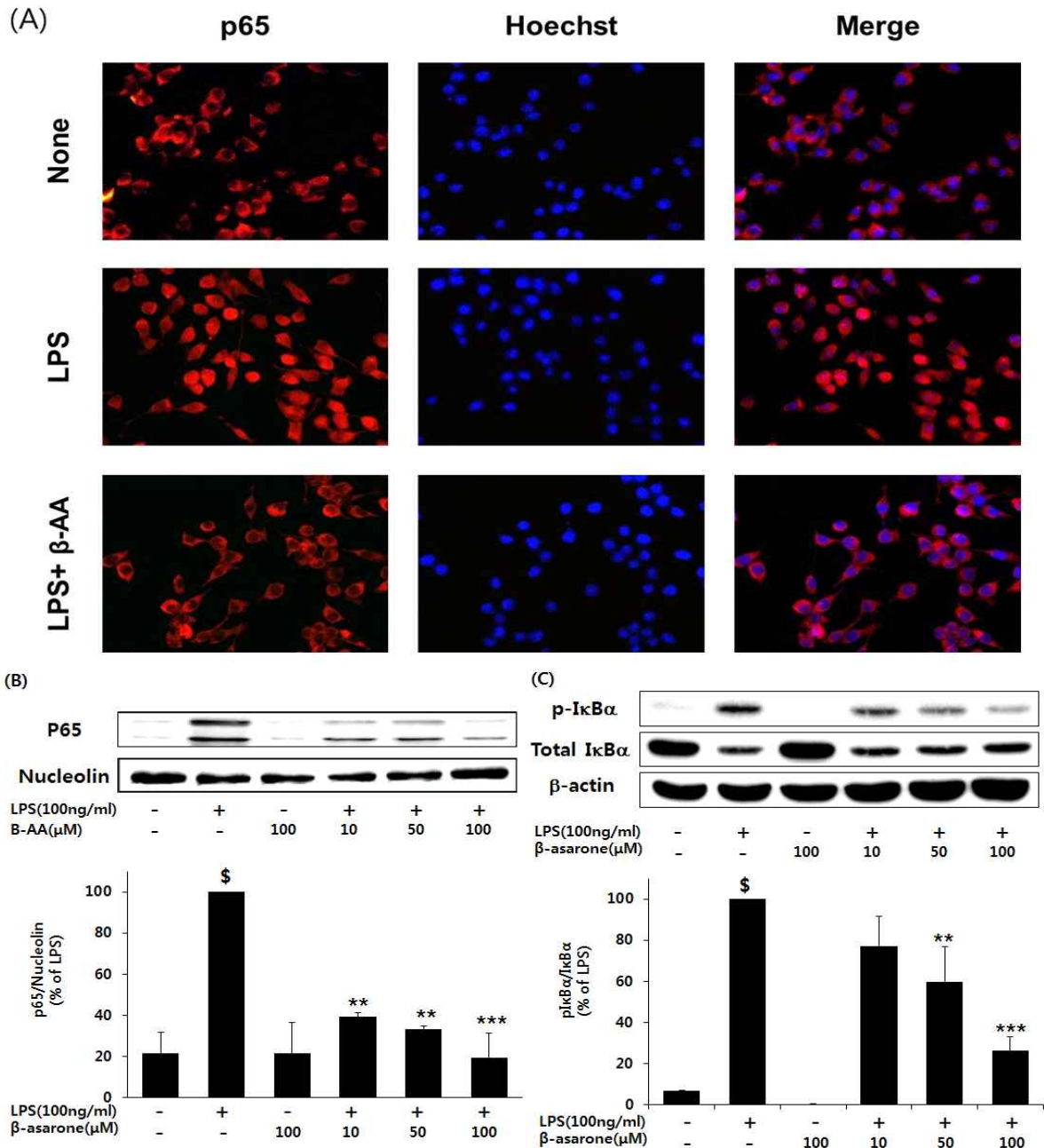


그림 21. LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 NF- κ B 활성화에 따른 β -asarone의 농도 의존적인 저해 효능. (A) NF- κ B p65의 면역형광염색 분석. (B) 핵내의 p65 단백질 발현 분석.

(C) 세포질내의 I κ Ba 및 p-I κ Ba의 단백질 발현분석

- LPS로 자극된 BV-2 신경교세포에서 β -asarone의 MAPK (Mitogen-activated protein kinases) 중 JNK의 농도 의존적인 억제 효능

LPS처리를 통한 신경염증반응이 대표적으로 MAPKs pathway를 통하여 발현이 진행되며 실제 β -asarone이 MAPK 경로를 통하여 염증반응의 억제를 하는지를 확인하였다. MAPKs의 구성요소 중 하나인 JNK에서 LPS 처리 시 인산화 되는 양이 대조군에 비하여 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 β -asarone를 처리한 결과 그 인산화 정도가 β -asarone의 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 22).

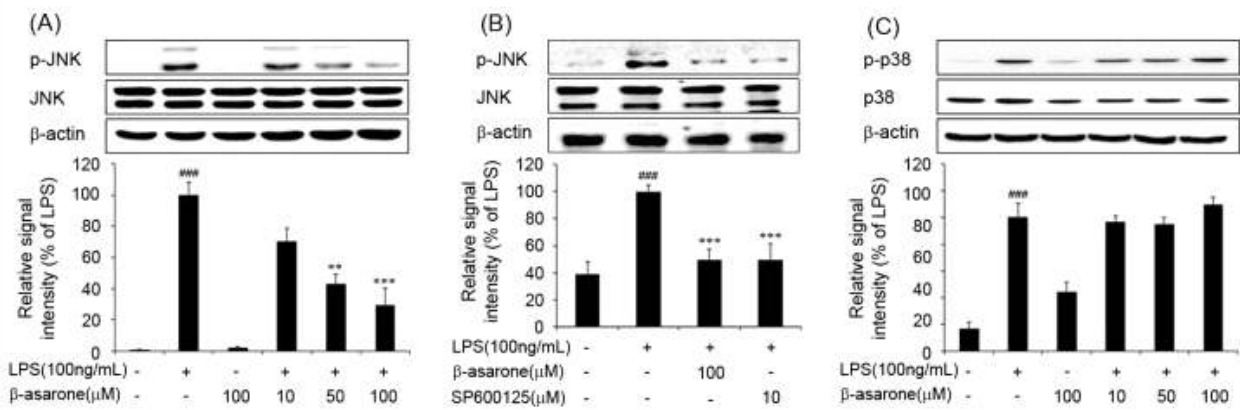


그림 22. LPS로 자극된 신경교세포에서 β -asarone의 JNK-MAPKs 억제 효능

○ 초대배양 신경교세포(Primary microglia cell)를 이용한 수검초 유효성분의 신경보호 효능 검증

초대배양 신경교세포에 신경독소 물질인 LPS (50 ng/ml)와 수검초 유효성분을 처리하여 nitro oxide 측정 (Griess assay)를 측정하였다. Primary 신경교세포에 LPS (50 ng/ml) 및 유효성분을 농도별로 처리하고 24시간 경과 후, 아질산염의 방출을 억제시키는 것을 확인하였다 (그림 23).

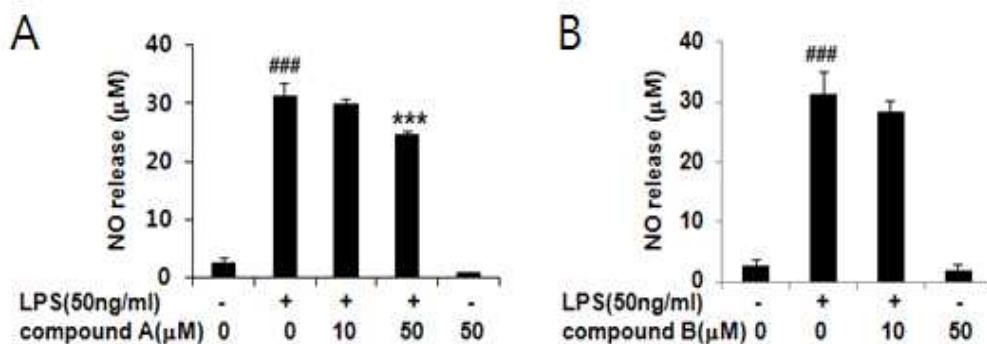


그림 23 LPS로 자극된 primary 신경교세포에서 수검초 유효성분의 NO 저해능

2. 수검초 추출물 및 그 유효성분의 *in vivo* 효능

가. 신경손상 동물모델에서 수검초 및 그 유효성분의 효능 분석

- 도파민신경세포사 동물모델에서 수검초의 유효 성분인 α -asarone의 효능분석 및 기전 연구

도파민 신경세포의 손상을 연구하기 위한 도파민 세포에 특이적 독성을 나타내는 MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine)의 발견이 파킨슨병의 병인 및 신경물질의 변화, 치료법의 개발에 큰 역할을 하였다. 또한 MPTP의 투입방법에 따라 급성과 만성 질환 모델을 만들 수 있는 장점이 있다. 본 연구과제에서는 뇌세포의 염증반응을 중심으로 하여 실험을 수행하였으며, 수검초 추출물을 이용한 뇌세포보호 효능을 분석하고자 하였다. 실험결과를 바탕으로 알파아사론을 15일간 경구 투여한 후, 중뇌 흑질의 도파민 신경세포에 손상을 주는 신경독소인 MPTP를 주사하여 실험동물 모델을 제작하였다 (그림 24.) MPTP 주사 후, 시간경과에 따라 (1day, 2day 7day), 행동실험을 진행 하였으며, 이후 뇌 조직을 적출하여 실험을 진행하였다.

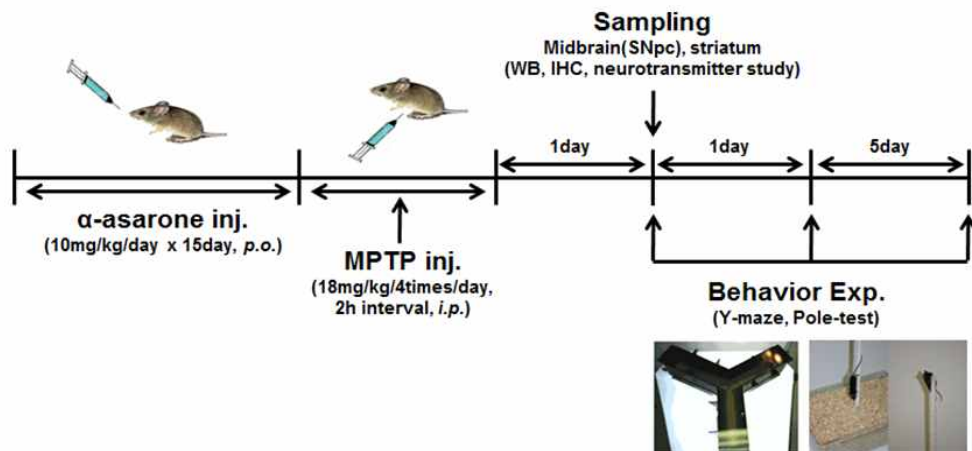


그림 24. 신경손상동물모델 제작 방법 및 α -asarone의 효능 실험 모식도

- 신경손상동물 모델에서 α -asarone의 정상교세포 (Astroglia) 활성화 억제 효능 검증

C57BL/6 mouse에 MPTP·HCl (18 mg/kg)를 매 두 시간마다 4번 복강 주사 하여 MPTP-PD mice model에서 정상교세포의 활성을 확인하기 위하여, 정상교세포의 마커인 glial fibrillary acidic protein (GFAP)를 사용하였다. 면역조직화학염색 (immunohistochemistry; IHC) 실험을 통하여 GFAP-immunoreactivity (IR) 세포의 활성을 확인한 결과, 아사론이 MPTP에 의해 활성화된 정상교세포를 감소시켜주는 것을 확인하였다 (그림 25A). 또한 전사단계와 단백질 단계에서도 동일한 결과를 확인하였다 (그림 25B).

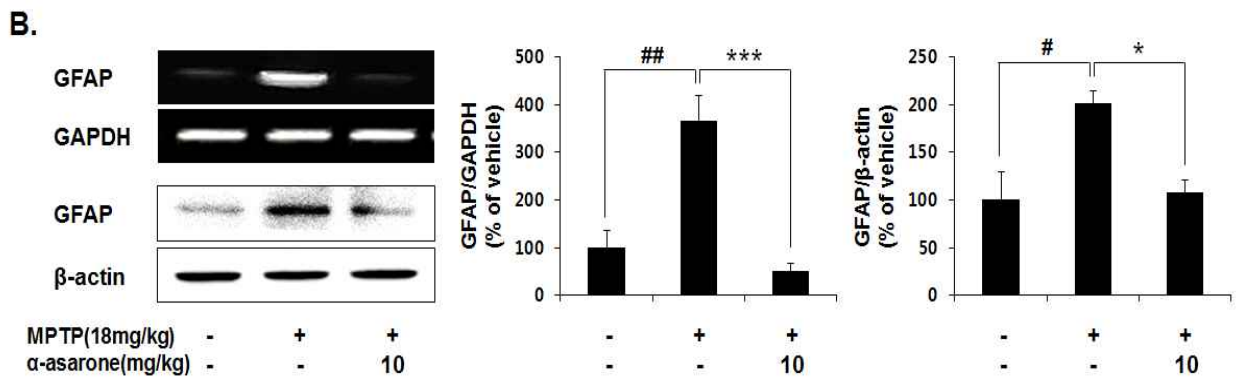
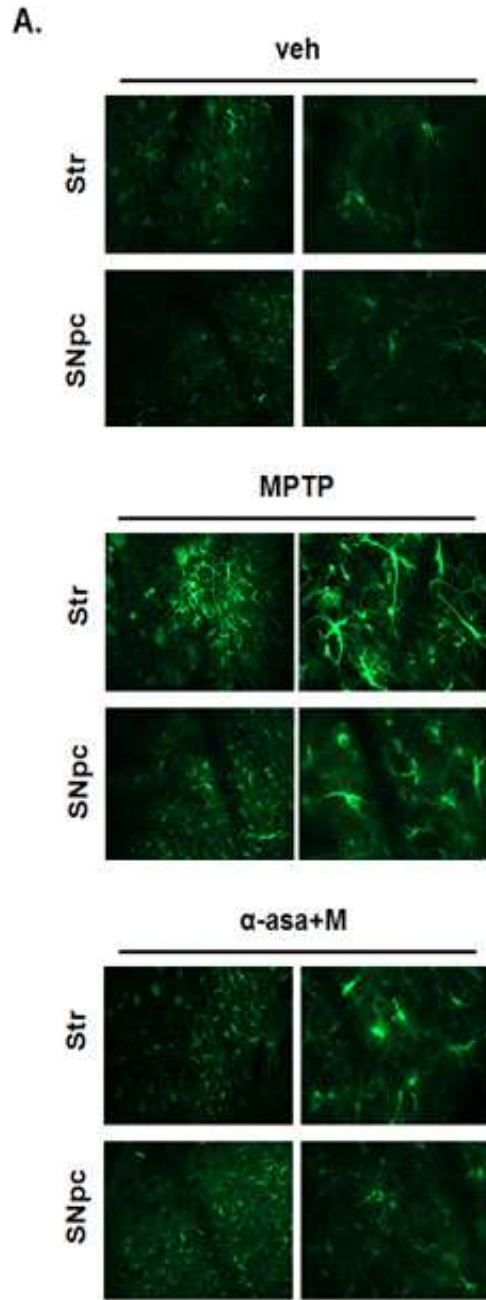


그림 25. α-Asarone suppression of MPTP-induced activated astroglia

- 신경손상동물 모델에서 α -asarone의 미세아교세포 (Microglia) 활성화 억제 효능 검증

미세교세포의 마커인 macrophage Ag complex-1 (Mac-1)의 IR를 확인한 결과 MPTP에 의해 활성화가 일어나고, 알파아사론이 그 활성을 억제해준다는 것을 확인하였다 (그림 26A). 미세교세포의 다른 마커인 cluster of differentiation 68 (CD-68), ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) 등을 이용하여 확인한 결과 전사단계와 단백질단계에서도 동일하게 억제해주는 것을 확인하였다 (그림 26B, C).

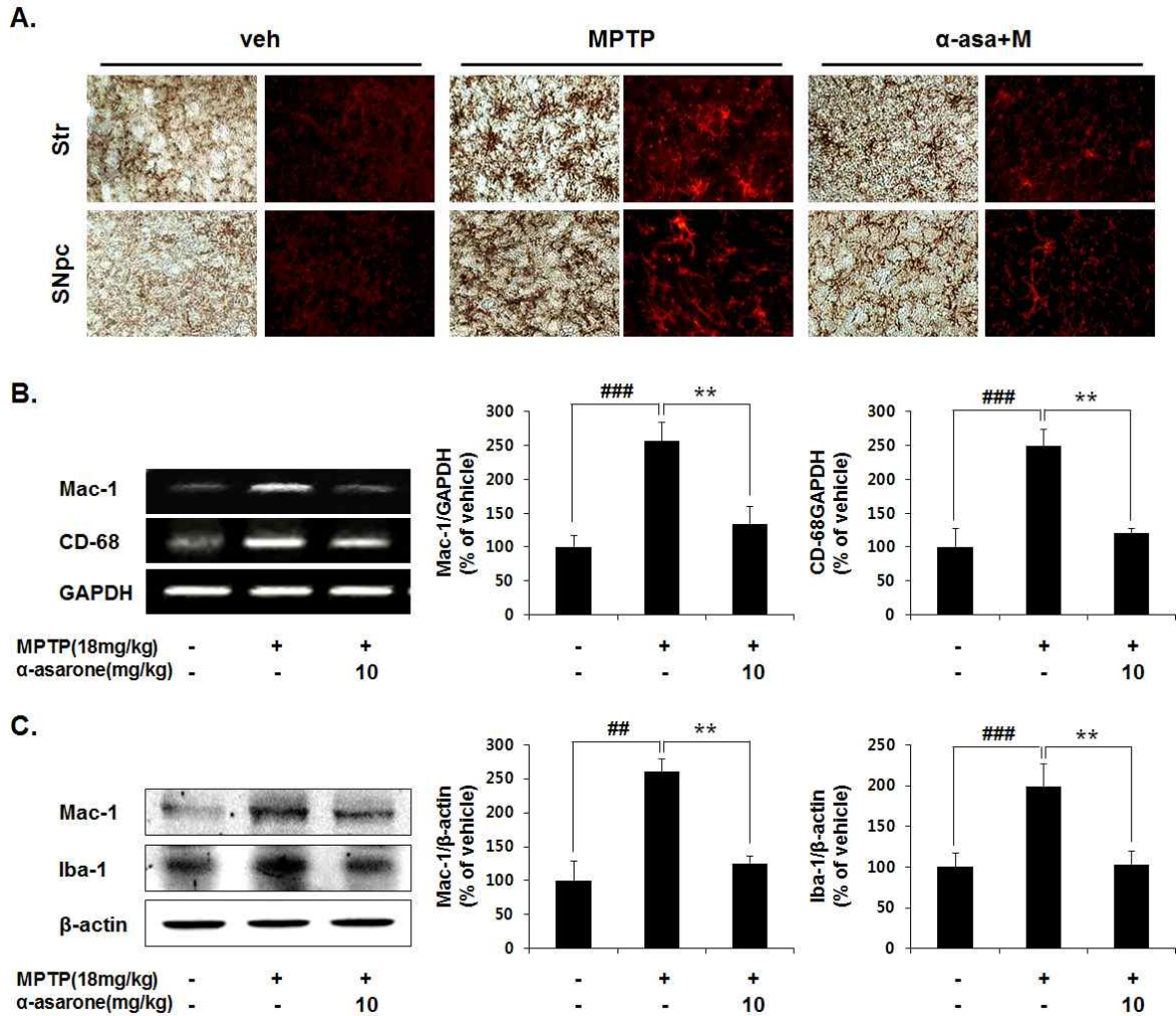


그림 26. α -Asarone suppression of MPTP-induced activated microglia

- 신경손상동물 모델에서 α -asarone의 신경염증 억제 효능 검증

미세교세포의 활성화에 의해 방출되는 염증매개 인자인 iNOS, COX-2가 어떻게 변하는지 분석하였다. MPTP 투여 후 증가하는 iNOS와 COX-2의 유전자 및 단백질의 발현을 알파아사론이 각각의 전사단계와 단백질 단계에서 억제해주는 것을 확인하였다 (그림 27).

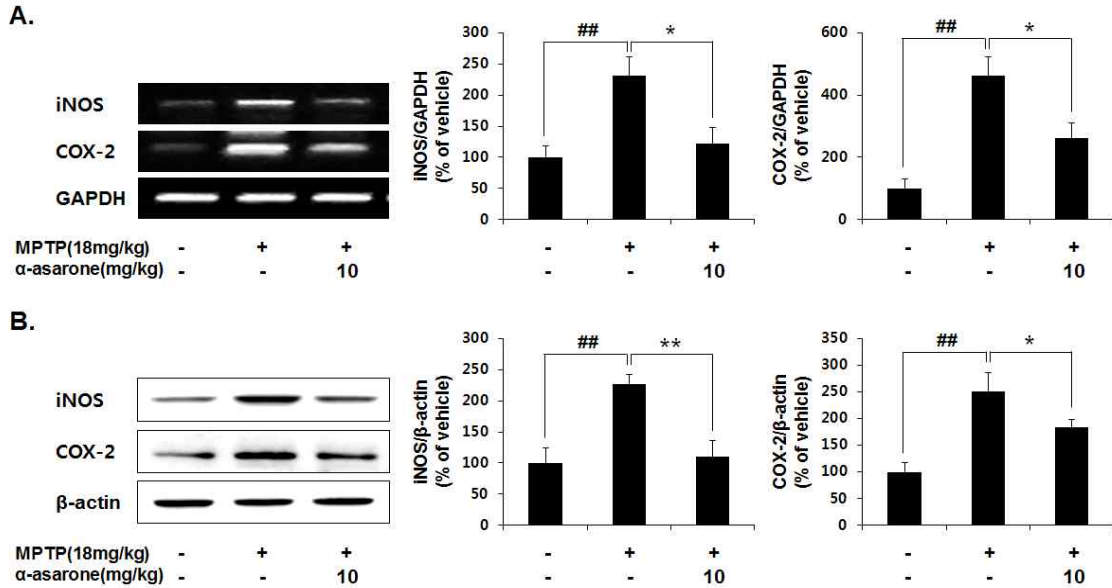


그림 27. α -Asarone inhibited the expression of iNOS and COX-2

- 신경손상동물 모델에서 α -asarone의 NF- κ B의 활성화 억제 효능 확인

이러한 신경독소들이 어떠한 경로를 통해 조절되는지 확인해보기 위하여 신경염증의 대표 기전 중 하나인 MAPKs, NF- κ B기전을 확인해 보았으며, NF- κ B기전을 통해 신경교세포의 염증반응이 조절되는 것을 확인하였다. (그림 28.)

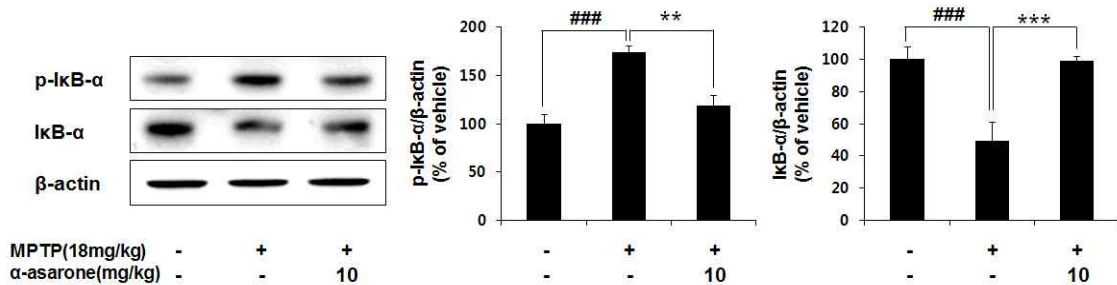


그림 28. α -Asarone suppressed IkB- α phosphorylation and IkB- α degradation

- 신경손상동물 모델에서 α -asarone(의 신경세포 보호 효능

MPTP 투여 동물 모델에서 알파아사론이 신경세포를 보호 하는지 확인하기 위하여, 도파민신경세포의 마커인 Tyrosine hydroxylase (TH)를 사용하였다. 면역조직화학염색 (immunohistochemistry; IHC) 실험을 통하여, TH-immunoreactivity (IR) 세포의 활성을 확인한 결과, MPTP에 의하여 TH가 흑질치밀부 (Substantia Nigra Pars Compacta; SNpc) 와 선조체 (Striatum; STR)에서 감소하는 것을 확인하였으며 도파민 신경세포의 손상이 유도되는 것을 확인하였다. 하지만 알파아사론을 처리한 군에서는 MPTP에 의해 소멸되는 TH를 억제시키는 것을 확인하였다 (그림 29A). 또한 단백질 단계에서도 TH의

발현양을 분석한 결과 동일하게 TH의 감소를 억제하는 것을 확인하였다 (그림 29B).

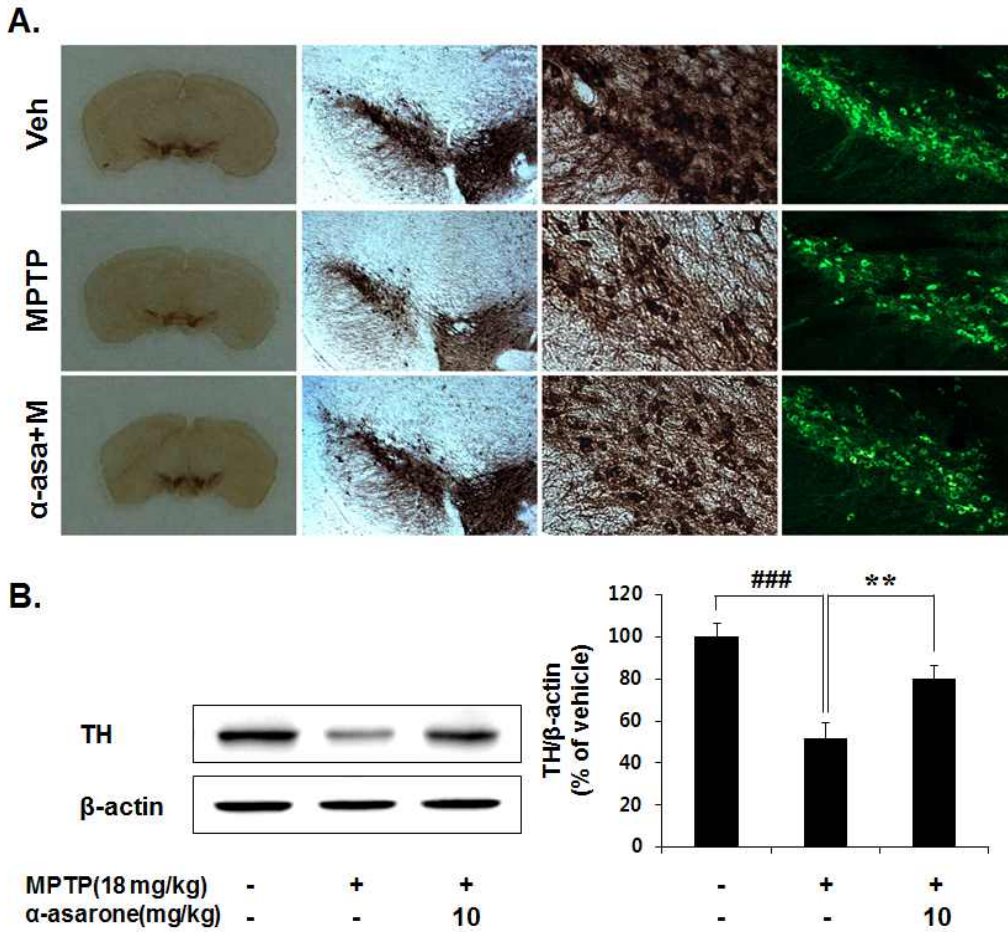


그림 29. Protective effects of α-Asarone against MPTP

- 선조체에서 TH fibers의 면역염색 결과 MPTP에 의하여 TH fibers가 줄어들음을 확인하였으며, 알파아사론이 TH fibers의 소실을 억제하는 것을 확인하였다 (그림 30.)

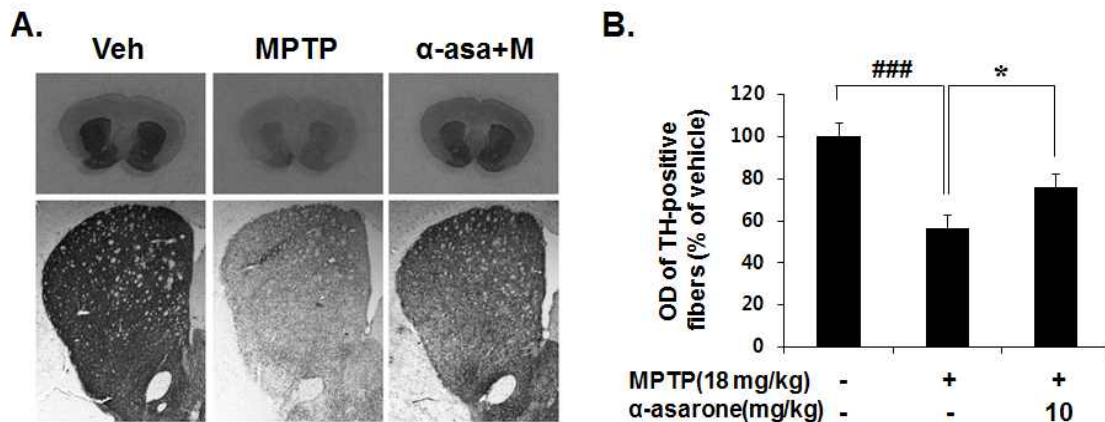


그림 30. Protective effects of α-Asarone against MPTP

- 신경손상동물모델에서 α -asarone의 신경전달물질 조절 효능

도파민 신경세포는 도파민이라는 뇌 내 신경전달물질을 분비함으로써 운동조절이나 호르몬 조절 등에 영향을 미친다고 보고되어 있다. 따라서, MPTP 투여 후 DA의 변화량을 LC-MS (Liquid chromatography - mass spectrometry)를 이용하여 확인한 결과 MPTP에 의해 줄어드는 도파민의 양을 확인 할 수 있었고 아사론에 의해 증가되는 것을 확인하였다 (그림 31A). 도파민의 대표대사체인 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)과 또 다른 대사체인 homovanillic acid (HVA), 3-methoxytyramine (3-MT)에 대해서도 LC-MS를 이용하여 분석한 결과 아사론이 대표대사체인 DOPAC에서 유의적으로 MPTP에 의한 손실을 억제하는 것을 확인하였다.

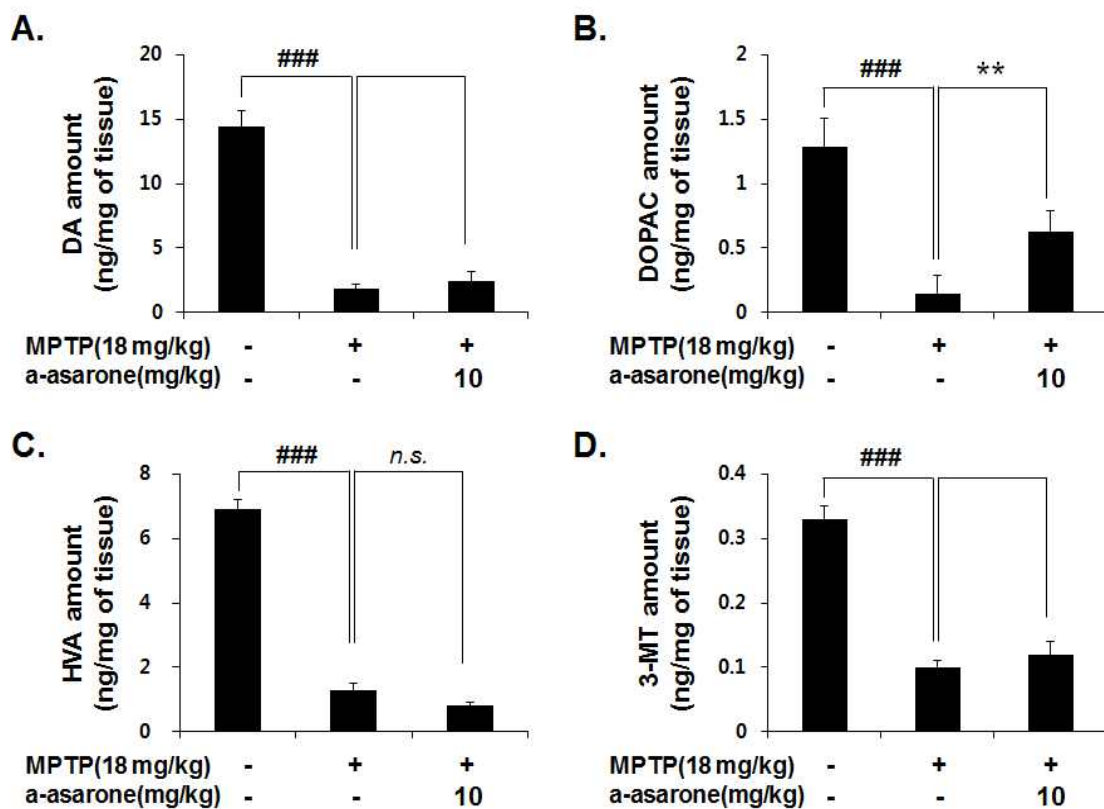


그림 31. Effect of α -asarone on neurotransmitter in MPTP-intoxicated mouse

- 동물 행동실험(Animal Behavior test)을 통한 α -asarone의 개선 효능 분석

MPTP 투여 후, 동물 행동실험 (Behavior test)을 통하여 행동학적으로 인지기능의 손상 여부, 행동성 및 운동느림 (서동증)에 관련 하여 수검초의 유효성분인 α -asarone에 의하여 그 기능이 회복 되는지 Y-maze test와 Pole test 등의 방법을 이용하여 분석하였다 (그림 32). Y-maze test를 통하여 MPTP 실험동물 모델에서 α -asarone 효능을 행동학적으로 분석해본 결과 α -asarone를 처리한 군과 대조군의 변경 행동력 (Percentage alternation, 인지능력)의 개선 효능은 MPTP 만 처리한 군에 비해 조금 우수 하였으나, 통계적 유의성이

없는 것을 확인하였다 (그림 32A). 하지만 총 입장횟수 (Total Arm entry, 행동성)는 MPTP만 처리한 군의 1day, 2day 군에 대하여 α -asarone를 투여 후 MPTP를 처리한 군에서 확연히 증가 하는 것을 확인하였고 7일째는 행동성이 회복되는 것을 확인하였다 (그림 32B). Pole test는 서동증 (운동완만)을 측정하기 위하여 사용하였다. MPTP만 투여한 군에서는 투여 후 1일과 2일의 군에서 바닥까지 도달 시간이 아무것도 처리하지 않은 군에 비하여 유의적으로 차이를 나타내었다. 하지만 α -asarone를 투여 후 MPTP를 처리한 군에서 1일에서 유의적으로 도달시간이 줄어드는 것을 확인 하였고, 2일 째에서는 아무것도 처리하지 않은 군과 거의 유사하게 회복되는 것을 확인 하였다 (그림 32C).

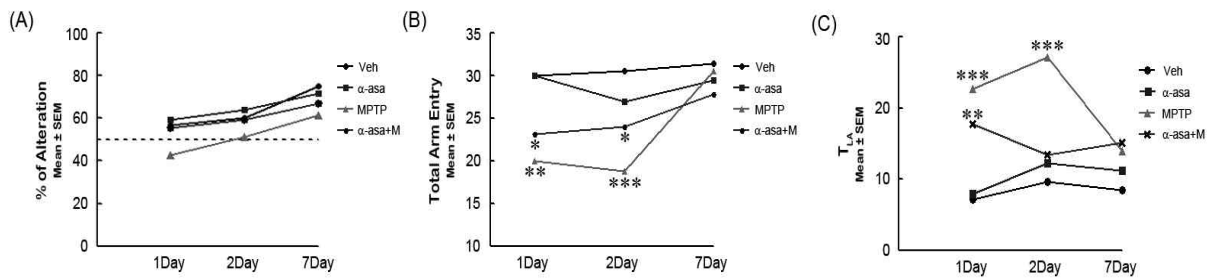


그림 32. MPTP-intoxicated mouse model에서 α -asarone의 행동학적 개선 효능. (A) Y-maze test를 이용한 변경 행동력 검증. (B) Y-maze test를 이용한 총 입장횟수 (운동성) 검증. (C) Pole test를 이용한 운동완만 (서동증) 검증.

○ 동물실험을 이용한 수검초 유효성분(α -asarone; 알파아사론)의 뇌혈관장벽(BBB) 통과여부 실험

뇌에 존재하는 ‘혈액 뇌 장벽 (Blood Brain Barrier, BBB)’은 모세혈관 벽으로 구성되어 있어서 약물 혹은 다른 물질들이 뇌로 전달되는 것을 방해한다. 효능이 우수한 물질이라도 BBB를 통과하지 못하면 뇌로 전달될 수 없으므로 C57BL/6 mouse 이용하여 수검초의 유효성분인 알파아사론을 경구투여 (p.o.) 및 복강주사 (i.p.) 후, α -asarone이 뇌 안으로의 투입여부를 확인하였고, 알파아사론이 체내로 유입되어 분해되는 반감기를 분석하였다. MPTP 실험동물모델에서 사용되는 C57BL/6 mouse에 α -asarone(알파아사론)를 복강주사 및 경구투여 후 정해진 시간 (0, 5, 10, 20, 30분)에 맞춰 혈액채취 및 뇌 조직을 적출하고 lysate를 이용하여 HPLC-MS의 기기를 사용하여 수검초 유효성분인 알파아사론의 유무와 반감기를 확인하였다 (그림 33). 측정 결과 경구 투여와 복강주사 모두 BBB를 통과하는 것을 확인하였으며 알파아사론의 반감기는 혈액 내에서 경구투여: 10.53 min, 복강주사: 4.19 min임을 확인하였다. 또한, 뇌 조직에서는 경구투여: 28.42 min, 복강주사: 19.06 min에 흡수된 알파아사론의 양이 절반으로 분해되는 것을 확인하였다. 이를 통하여 경구 투여 시, 알파아사론의 뇌 내 축적이 가장 길다는 것을 확인하였고, 이 후의 실험동물모델의 실험은 경구 투여를 통하여 진행하였다 (표 4, 그림 34).

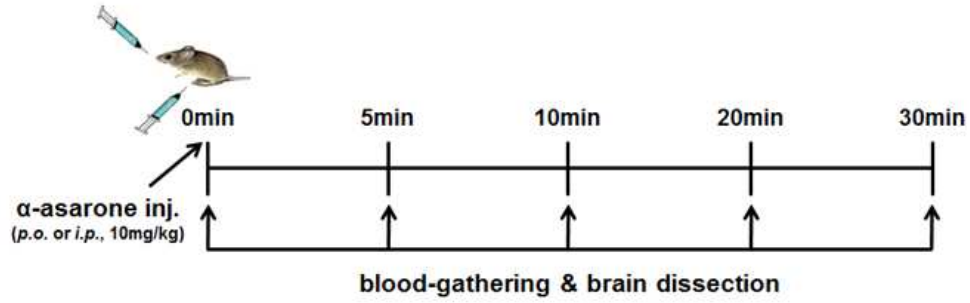


그림 33. α -asarone; 알파아사론의 half-life 측정 동물실험

Time (min)	<i>i.p.</i> brain		<i>i.p.</i> blood		<i>p.o.</i> brain		<i>p.o.</i> blood	
	value	SD	value	SD	value	SD	value	SD
0	100		100		100		100	
5	96.2	0.03	40.4	2.74	82.82	0.01	90.36	1.38
10	90.4	0.22	21.5	5.07	65.75	1.59	50.94	2.08
20	45.8	3.9	15.3	4.00	55.04	0.74	33.12	0.60
30					41.42	0.41		
$T_{1/2}$	19.06min		4.19 min		28.42 min		10.53 min	

표 4. Pharmacokinetics of α -Asarone study

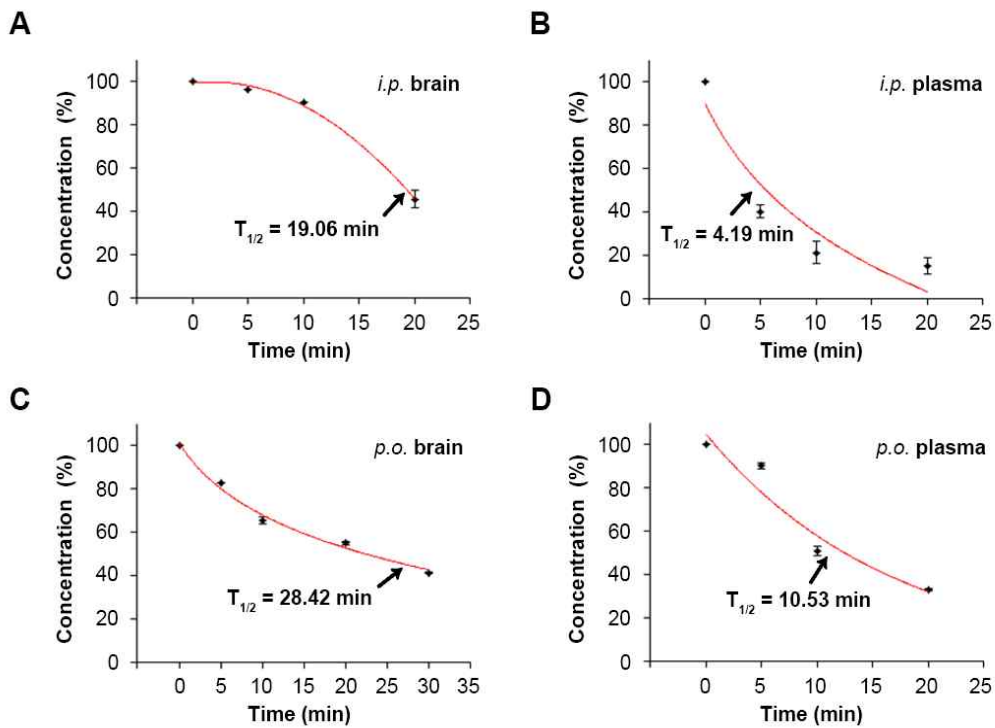


그림 34. Half-life of α -asarone elimination

나. 인지기능 손상 동물모델에서 수검초 및 그 유효성분의 효능 분석

○ *in vivo* 인지기능 손상모델에서 AG의 유효성분인 α -asarone의 효능 분석

- 수동 회피 (Passive avoidance) 실험을 통한 학습 능력 효과 측정

Scopolamine을 이용한 인지기능 손상 동물모델에서 α -asarone를 농도별로 처리하여 수동 회피 실험을 진행하였다. 어두운 방과 밝은 방, 그리고 전기적 자극을 주어 인지기능이 손상된 마우스 모델에서 밝은 방에서 어두운 방으로 회피하는데 걸리는 시간 TLT (Transfer latency time)을 컴퓨터를 통해 기록한 결과 α -asarone를 처리한 군에서 확연히 효능을 보이는 것을 확인하였다 (그림 35).

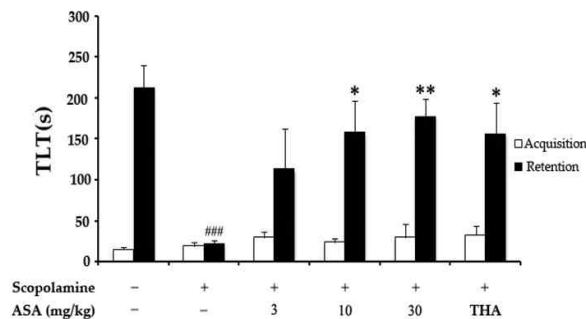


그림 35. 인지 손상 동물모델에서 α -asarone의 TLT(Transfer latency time) 분석

- Y-미로실험 (Y-maze test)

Y자 미로실험을 통하여 α -asarone 효능을 행동학적으로 분석해 본 결과 α -asarone를 처리한 군에서 대조군에 비하여 총 입장횟수 (Total Arm entr, 행동성)가 소폭 증가되는 것을 확인하였고 (그림 36A), 변경 행동력 (Percentage alternation, 인지능력)의 개선 효능이 확연히 증가하는 것을 확인하였다 (그림 36B).

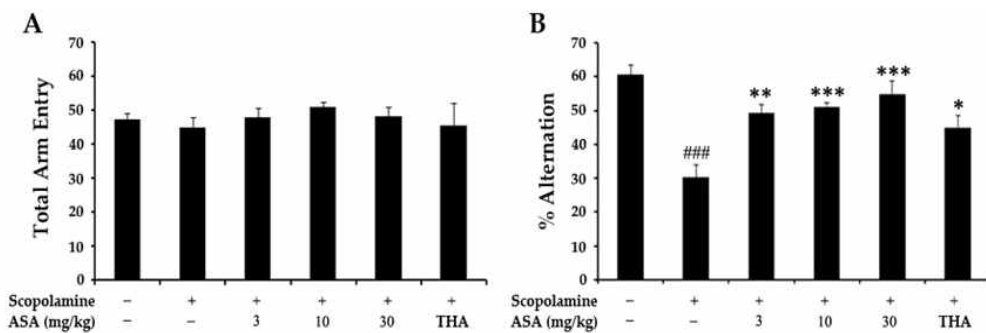


그림 36. 인지 손상 동물모델에서 α -asarone의 Y자 미로실험 분석

- 아세틸콜린에스터라제 활성 측정(AchE activity assay)

정상마우스와 인지력을 저해 시킨 마우스에 시료를 처리한 후, 행동실험을 진행 하였다. 이후, 뇌를 적출 하여 해마 (Hippocampus)와 대뇌피질 (Cerebral cortex) 부분을 분리하여 AChE 활성 실험을 분석한 결과 *in vivo*상에서 AchE 활성을 억제하는 것을 확인되었으며 이는 α -asarone이 acetylcholinesterase의 분해를 저해하는 것을 알 수 있었다(그림 37).

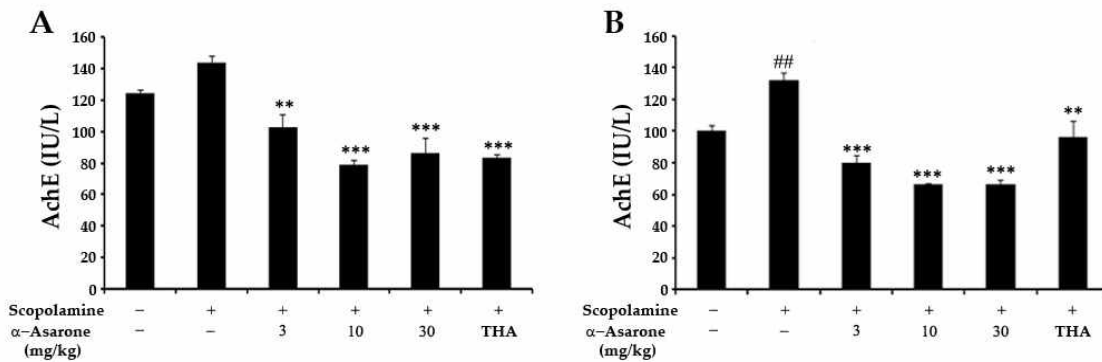


그림 37. 인지 손상동물모델에서 α -asarone의 AchE활성 분석

- 지질 과산화 측정 (MDA Assays) 결과

지질 과산화물 (Lipid peroxidation)을 측정하기 위하여 그의 산물인 MDA (malondialdehyde) level을 측정하였다. α -asarone를 처리하니 MDA level이 대뇌피질(그림 38A)에서는 전체 적으로 저해 하는 것을 확인 하였으며 해마(그림 38B)에서는 농도 의존적으로 저해하는 것 을 확인하였다. 이는 α -asarone가 지질과산화물의 축적을 억제하는 것을 알 수 있었다.

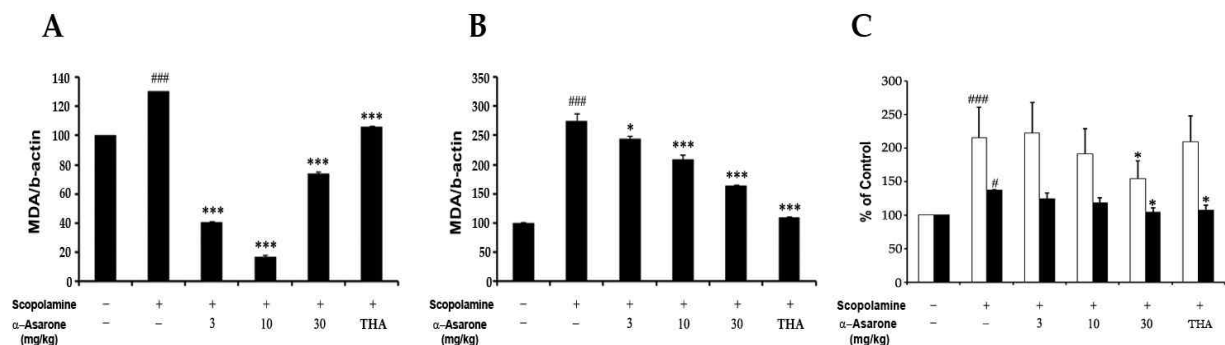


그림 38. 인지 손상 동물모델에서 α -asarone의 MDA 및 SOD level 확인

제 2절. 수검초를 이용한 실용화 기술 개발

1. 수검초의 분리 및 정제

가. 수검초 추출물의 지표물질 분석

○ 수검초 유래 유효성분(지표성분) 분리 및 정제

본 연구의 결과로 수검초에서의 α -asarone, β -asarone 다량 함유 분획 제조와 분리 및 정제를 하였으며, 그 과정은 다음과 같다. 건조된 수검초를 1 Kg을 세절하여 70% 메탄올 (2.4 L)을 첨가하여 환류 추출(80°C) 3회 실시한 후 추출액을 모와 여과한 다음 여액을 감압농축하여 조추출물(250 g)을 얻었다. 조추출물 1g을 증류수에(50 mL) 현탁하여, 동량의 hexane, ethyl acetate, n-butanol로 순차적으로 이상간 분배를 하였다. 그 중 ethyl acetate 층에서 다량의 α -asarone을 확인하여, 조추출물 240 g을 ethyl acetate를 이용한 이상간 분배를 하여 ethyl acetate 분획물을 61.5 g을 얻었다. 이를 silica gel flash (CHCl_3 : MeOH = 12:1 \rightarrow 9:1 \rightarrow 7:1 \rightarrow 4:1 \rightarrow MeOH) 를 실시하여, 다량의 α -asarone가 포함된 분획(Fr. A, B; 1.37 g)을 얻었다. 이 분획을 다시 silica gel column chromatography (CHCl_3 : MeOH = 15:1)를 실시하여 분획을 TLC (silica gel, 전개액: CHCl_3 : MeOH = 15:1, 발색시약 20% 황산) 상에서 단일 spot을 확인할 수 있었으며, (Fr. A-5) 46.8 mg을 얻었다. 이를 분석용 역상 C18 칼럼에서 확인 한 결과 두 개의 이성체를 확인하여, 이를 분리하기 위하여 재결정화 및 분취 HPLC 다음과 같은 조건에서 수행한 결과 (50% acetonitrile, UV 210 nm, C-18 column) 최종적으로 compound A, B로 분리 및 정제하였다. 분리 한 물질의 구조동정(NMR, IR, UV, LC/MS), 순도검사(원소분석, 용점, TLC, HPLC, 수분함량, 잔류용매, 선광도) 및 함량 분석을 수행 중이다. 특히 함량 분석은 본 과제의 최종 목표인 제품화이기 때문에 식약청 기능성분 인증을 받기 위한 HPLC를 이용한 validation을 수행하였다.

다음 표는 수검초에서 α, β -asarone(알파, 베타아사론)를 분리 정제 하는 모식도로서, 각 분획별 양과 분리 방법을 도식화 하였다 (그림 39).

수검초의 α, β -asarone은 oil 성분으로 물에는 용해되지 않는 특성을 가지는 물질로 비극성 용매에 잘 녹는 성질을 가진다. 또한 수검초에 최대 1% 미만의 함량을 가지는 물질로 본 연구과제에서 분리/동정한 결과 두 성분의 추출함량은 kg당 알파 아사론은 29.6 mg, 베타 아사론은 88.8 mg이었다.

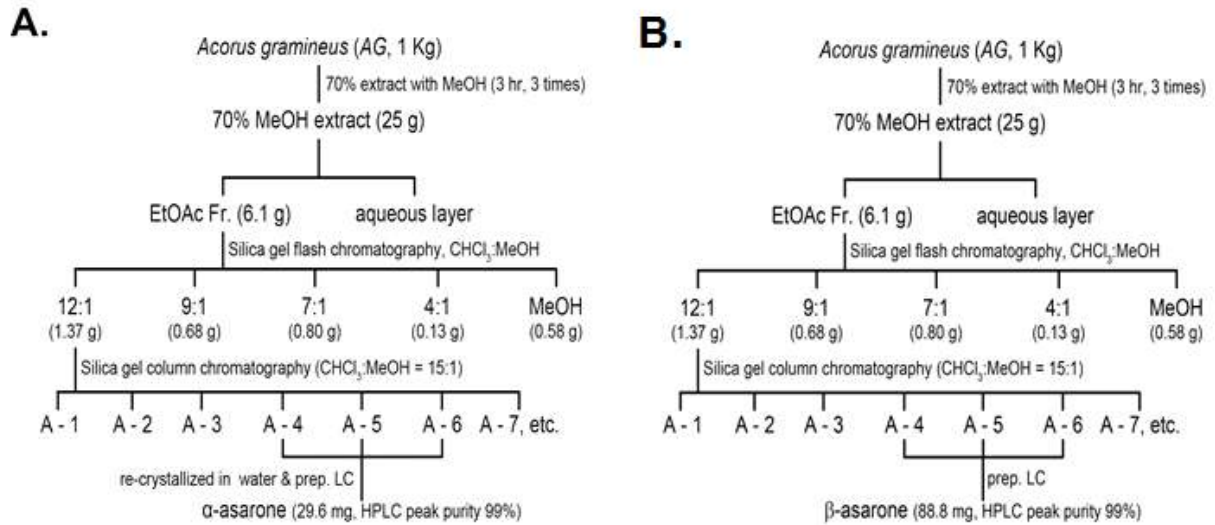


그림 39. Fractionation and isolation of α,β-asarone from *Acorus gramineus*

- 수검초의 유효성분을 분리하기 위해 Ethyl acetate 이용한 이상간 분배에서 α,β-asarone이 다량 함유되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 40).
- CC(silica gel column chromatography CHCl₃:MeOH =15:1)를 이용한 α-asarone의 다량 함유 분획 TLC fingerprint를 수행하였다 (그림 41).



그림 40. α-asarone, β-asarone을 다량 함유한 E·A분획 TLC fingerprint



그림 41. α-asarone, β-asarone을 다량 함유한 CC (Fr. 5~6) TLC fingerprint

- CC (Fr. 5~6) 단일 spot을 감압 농축하여 재결정화 및 HPLC를 이용한 순도 검사. LC 조건은 50% acetonitrile, 210 nm, 5 uL inj., C18 column, 30 min.

- α -asarone, B의 재결정화 및 prep. LC를 이용한 이성체 분리 정제.

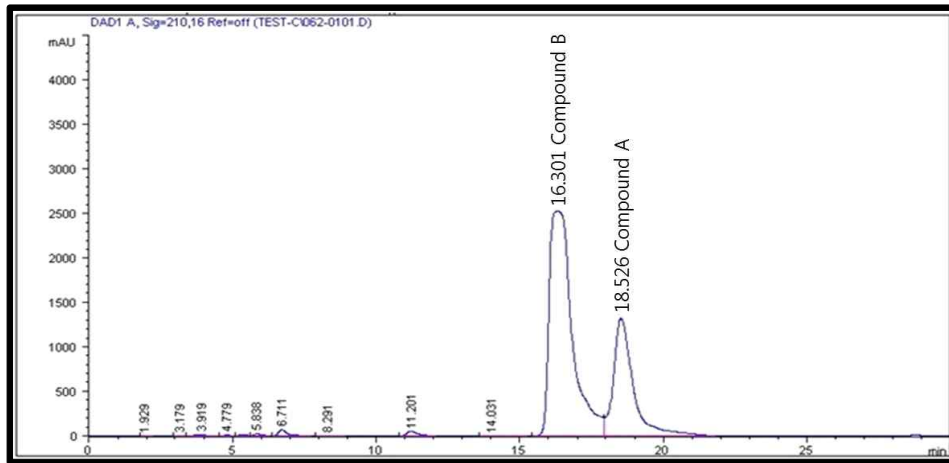


그림 42. α, β -asarone를 다량 함유한 CC (Fr. 5) HPLC fingerprint

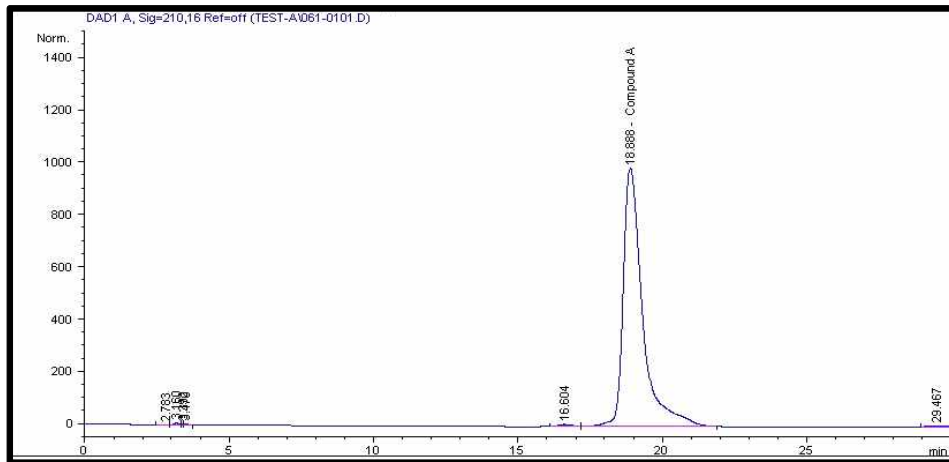


그림 43. α -asarone의 HPLC fingerprint

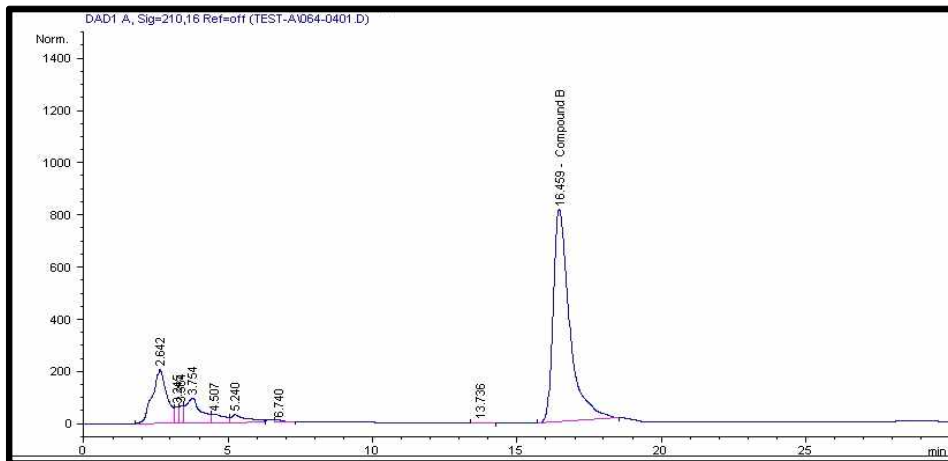


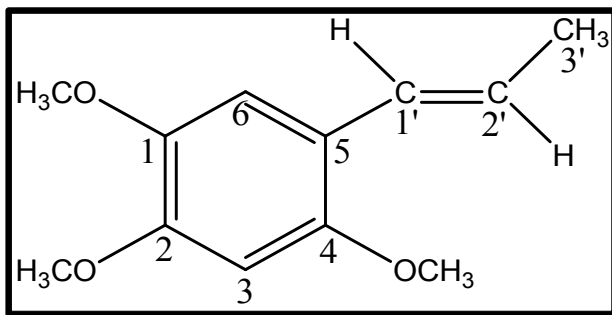
그림 44. β -asarone의 HPLC fingerprint

○ 유효성분의 구조분석

- 기술한 분리/정제방법을 이용하여 탁월한 신경보호 효능을 보이는 두 개의 분획물을 이용하여 두 개의 분획물을 HPLC 순도 99% 이상 화합물 분리 및 구조 동정을 통해 두 개의 화합물의 구조를 확인하였다.

- α-asarone에 대한 일반 특성

α-asarone에 대한 분리된 결과 asarone (1,2,4-Trimethoxy-5-[(E)-prop-1-enyl] benzene)으로 구조 동정되었다.



유사어: alpha-Azaron, α-asarone

CAS number: 2883-98-9

시정식: C₁₂H₁₆O₃

분자량: 208.254 g/mol

융점: 62-63°C

생물학적 출처: 수검초 (*Acorus calamus*)

그림 45. Compound A의 구조

- α-asarone의 분리 및 정제

구조 동정 및 순도 검사를 위해 α-asarone 함유 분획을 대량으로 확보하였으며, 이후 silica flash (CHCl₃/MeOH= 20:1→18:1→15:1→12:1→7:1→4:1→MeOH), silica column chromatography (CHCl₃/MeOH=12:1)를 통해 α-asarone 다량 함유 분획을 확보하였다. 이후 에탄올을 이용하여 재결정을 유도, 고순도의 물질을 확보하였다. 물질 동정은 ¹H NMR, ¹³C NMR, UV spectra 등을 통해 얻은 데이터를 문헌에 기록된 값과 비교함으로써 α-asarone의 물리화학적 특성 :UV MeOH^{max}211, 256, 311. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃-d): 1.88 (3H, dd, J=1.2, 7.2 Hz, H-3'), 3.82 (3H, s, -OCH₃), 3.86 (3H, s, -OCH₃), 3.89 (3H, s, -OCH₃), 6.50 (1H, s, H-3), 6.64 (1H, dq, brd, H-1'), 6.95 (1H, s, H-6); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃-d): 19.00 (C-3'), 56.31 (OCH₃), 56.68 (OCH₃), 56.93 (OCH₃), 98.16 (C-3), 109.98 (C-6), 119.23 (C-5), 124.57 (C-2'), 125.23 (C-1'), 143.57 (C-1), 148.93 (C-2), 150.84 (C-4)로, α-asarone으로 동정할 수 있었다.

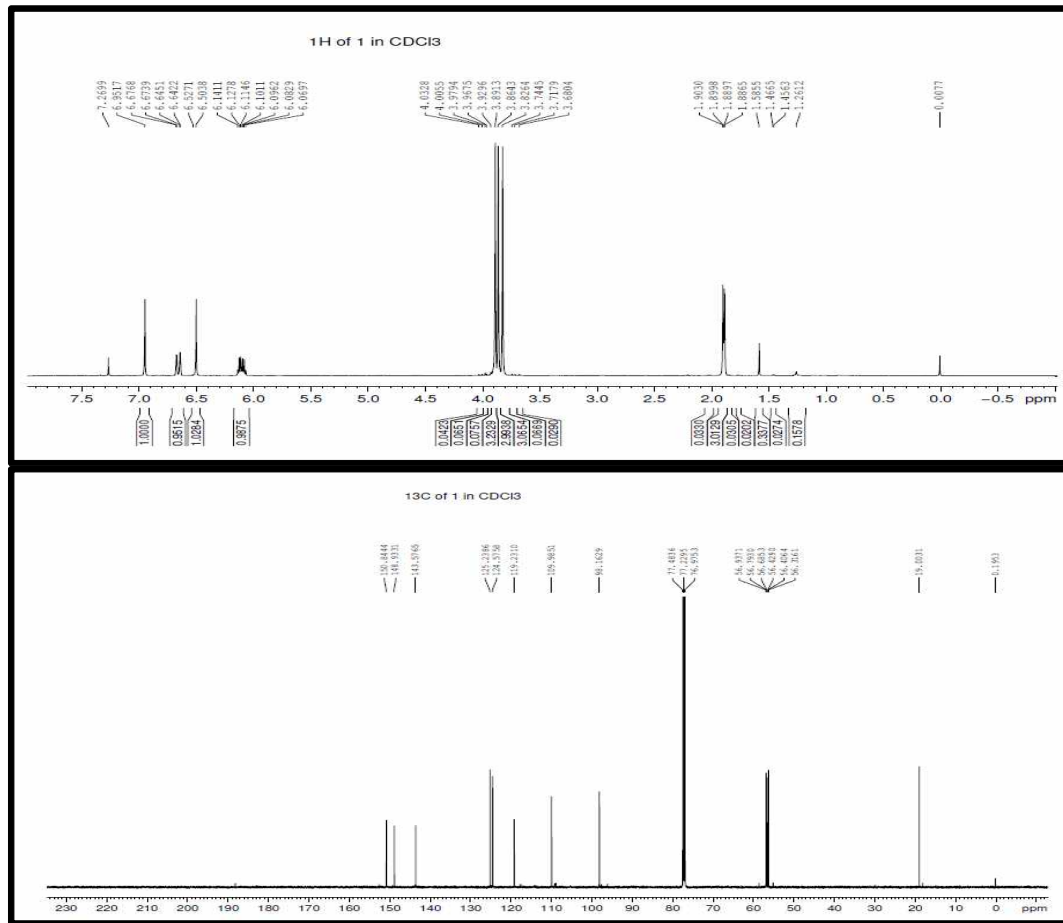
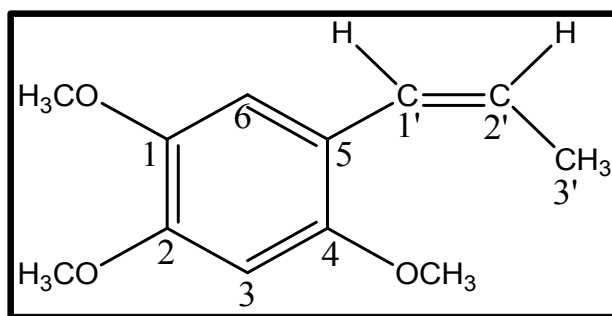


그림 46. α -asarone의 ^1H , ^{13}C NMR 분석 결과

- β -asarone에 대한 일반 특성

분리한 β -asarone에 대해서도 α -asarone와 동일한 구조동정 방법을 적용하여 확인한 결과 β -asarone (2,4,5-trimethoxyphenyl-2-propene)으로 동정되었다.



유사어: cis-isoelemicin, β -asarone

CAS number: 5273-86-9

시정식: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$

분자량: 208.254 g/mol

융점: 62-63°C

생물학적 출처: 수검초 (*Acorus calamus*)

그림 47. β -asarone의 구조

- β-asarone의 분리 및 정제

구조 동정 및 순도 검사를 위해 1차년도에는 β-asarone가 다량 함유된 분획을 대량으로 확보하였으며, 이후 silica flash (CHCl₃/MeOH= 20:1→18:1→15:1→12:1→7:1→4:1→MeOH), silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH=12:1)를 통해 β-asarone가 다량 함유된 분획을 확보하였다. 이후 Prep. LC를 이용하여 β-asarone에 상응하는 peak를 대량 분취, 농축함으로써 고순도의 β-asarone를 확보하였다. 물질에 대한 동정은 ¹H NMR, ¹³C NMR, UV spectra 등을 통해 구조 동정한 결과 compound B의 물리화학적 특성 : UV MeOH^{max}211, 256, 311. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d): 1.84 (3H, dd, J=1.2, 7.5 Hz, H-3'), 3.80 (3H, s, -OCH₃), 3.83 (3H, s, -OCH₃), 3.89 (3H, s, -OCH₃), 5.76 (1H, dq, J=7.2, 11.4 Hz, H-2'), 6.49 (1H, dq, brd, H-1'), 6.53 (1H, s, H-3), 6.84 (1H, s, H-6); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃-d): 14.80 (C-3'), 56.21 (OCH₃), 54.56 (OCH₃), 56.76 (OCH₃), 97.68 (C-3), 109.91 (C-6), 118.18 (C-5), 124.94 (C-2'), 125.91 (C-3'), 142.52 (C-2), 151.65 (C-4)로, compound B는 β-asarone으로 동정되었다.

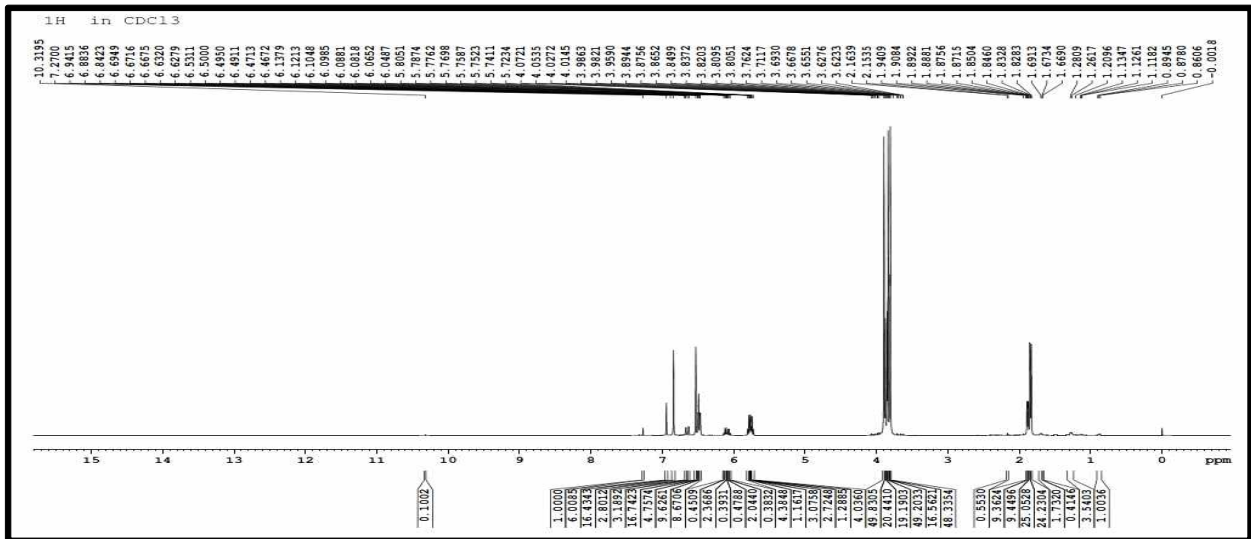


그림 48. β-asarone의 ¹H NMR 분석 결과

○ α,β-asarone의 순도 분석

α,β-asarone의 순도 분석은 100% method에 의거한 HPLC system을 이용하여 수행하였으며, 이는 ICH 가이드라인 "Validation of analytical procedure: methodology"에서 요구하는 선택성, 정밀도, 정확성, 직선성, 회수율, 정량한계, 검출한계 및 강건성을 조사함으로써 가능하였다.

○ α,β-asarone의 유효화된 분석법의 확립

HPLC/DAD 기기 분석: HPLC 칼럼은 C18 (YMC 4.6 mm X 250 mm, 5μm)이었으며, 이 동상으로는 water (A)와 acetonitrile (B)를 사용하여 1.0 mL/min의 유속으로 시료 20 μL를 주입하여 isocratic mobile phase 조건으로 분석하였다.

Equipment : Hewlett Packard 1100
 Column : YMC C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm
 Detector : UV/VIS detector 203 nm
 Integrator : Chemstation for LC 3D
 Temperature : room temperature
 Injection volume : 20 μL
 Mobile phase A: acetonitrile (50%)
 B: water
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Analytical time : 30 min

○ α,β-asarone 지표물질(RM)의 표준 용액 조제

총 5 mg의 α,β-asarone RM을 5 mL (1.0 mg/mL)의 HPLC 급 methanol에 용해한 다음 2배씩 희석하여 최종 농도가 62.5 mg/mL가 될 때까지 5단계 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

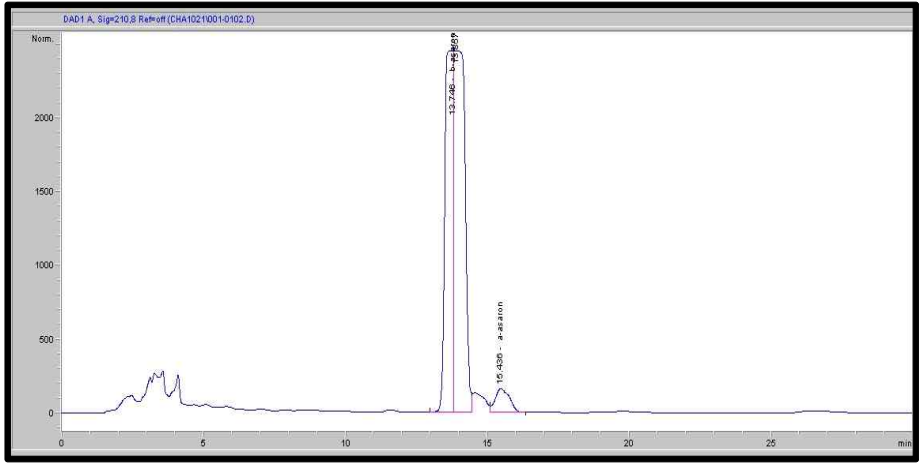
○ HPLC 100% 분석법 결과

본 HPLC 100% system에서 α-asarone, B RM에 해당하는 피크는 각각 13.6분, 15.4분에 출현 하였으며, 다른 유기물에 기인된 피크는 관측되지 않았고, 3개 농도, 4회 반복 수행한 결과 본 분석법은 재현성과 선택성이 뛰어나다고 할 수 있다.

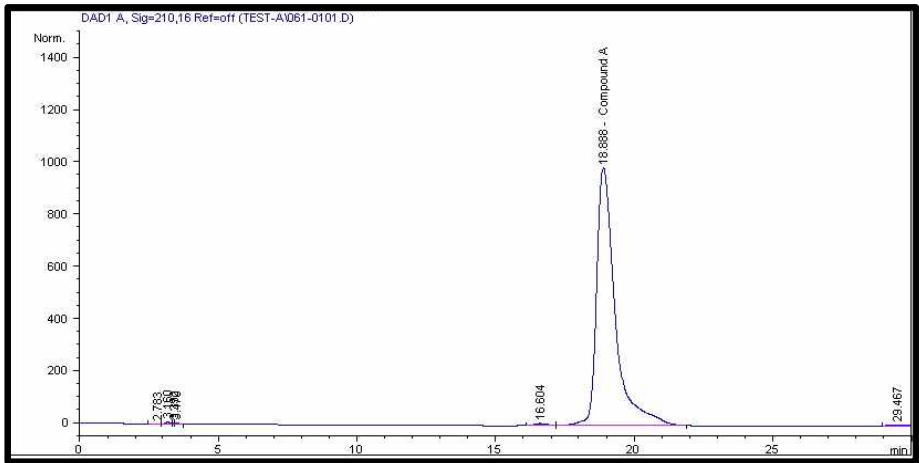
Treatment	250 μg/mL		500 μg/mL		1 mg/mL	
	α-asarone	β-asarone	α-asarone	β-asarone	α-asarone	β-asarone
1	34708.2	24215.8	67845.7	49151.4	107027.7	85239.3
2	34738.7	24221.4	67806.2	49111.8	107734.4	84483.4
3	34707.7	24268.7	67898.1	49129.4	107976.2	85276.2
4	34752.3	24227	67943.2	49124.2	107506.3	85123.3
Mean (peak area)	34726.7	24233.23	67873.3	49129.2	107561.2	85030.55
S.D.	19.38	20.86	51.87	14.32	349.95	320.89
RSD(%)	0.0558	0.08608	0.076	0.029	0.325	0.377

표 5. α,β-asarone의 HPLC 100% 분석 정밀도

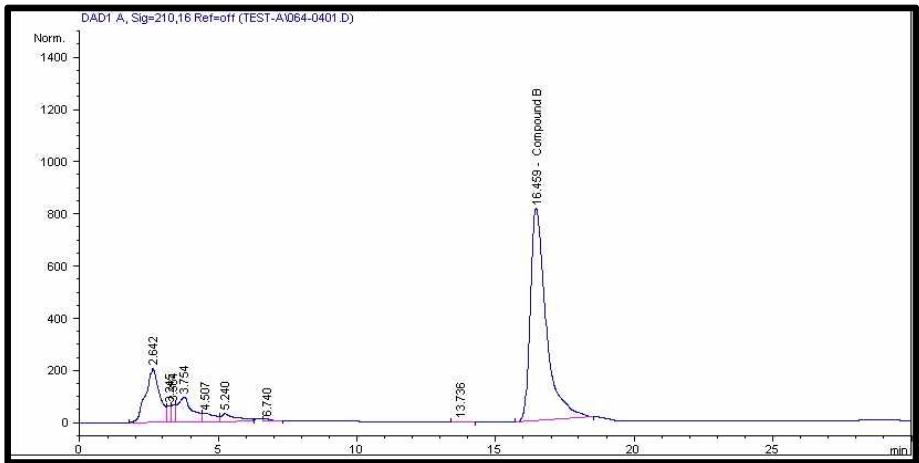
본 분석법에 따른 α,β -asarone의 분리능은 $R \geq 2.0$ 으로 매우 양호 하였으며, 그림. 18 같이 제품에서의 적용성에도 매우 양호하게 분리되는 것을 확인 한 결과, 본 2세부에서는 다음과 같은 HPLC 분석법을 이용하여 validation을 수행하였다.



(A)



(B)



(C)

그림 49. 조추출물(A), α -asarone(B), β -asarone(C)

○ 유효화 된 α , β -asarone validation 분석법 확립

특이성: 역상 칼럼을 사용한 본 분석법으로 수검초의 유효성분인 α , β -asarone의 분리능은 $R \geq 2.0$ 으로 상당히 양호하였으며, 이를 이용한 제품(조추출물)에서도 잘 분리되는 것을 확인 할 수 있었다. 각각 α , β -asarone의 머무름 시간은 15.4 분과 13.8 분으로 확인 되었으며, HPLC/DAD 검출기를 이용한 UV peak purity 확인 결과(그림 50.)로 나타났으며, 스펙트럼 190~400 nm 스캔 결과 다음 그림과 같이 특이파장 260 nm, 310 nm을 확인 할 수 있었다. 그림 50은 조추출물(A), α -asarone, B (B, C)에서 양호하게 분석 가능한 것을 보여준다.

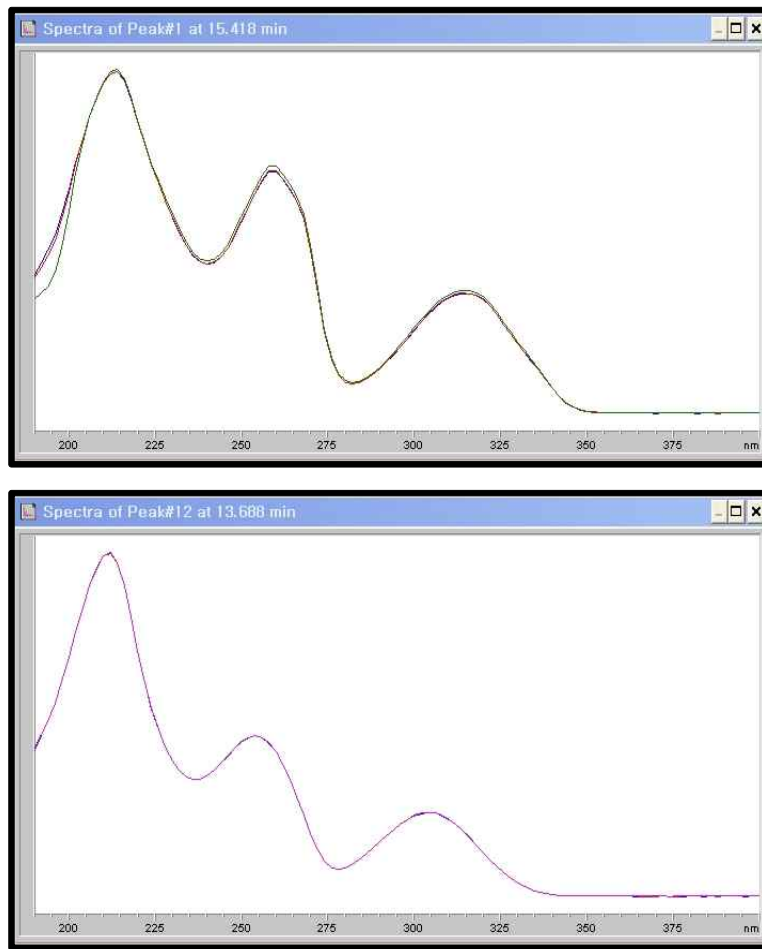
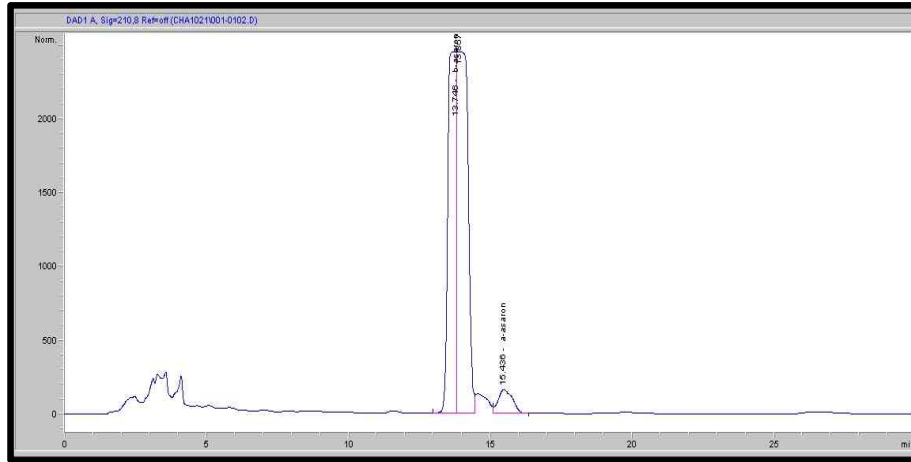
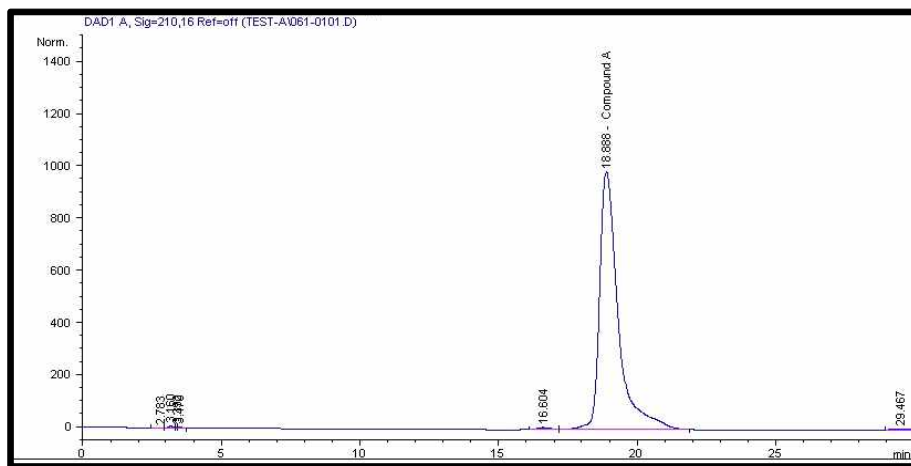


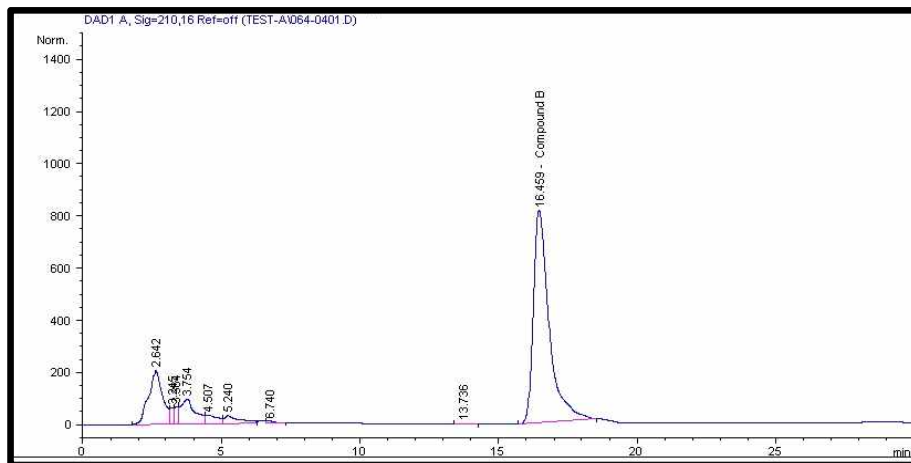
그림 50. α , β -asarone의 190 ~ 400 nm UV 스펙트럼



(A)



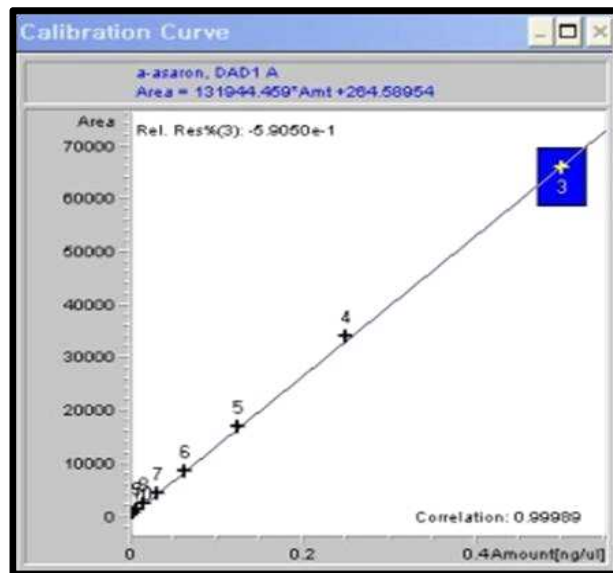
(B)



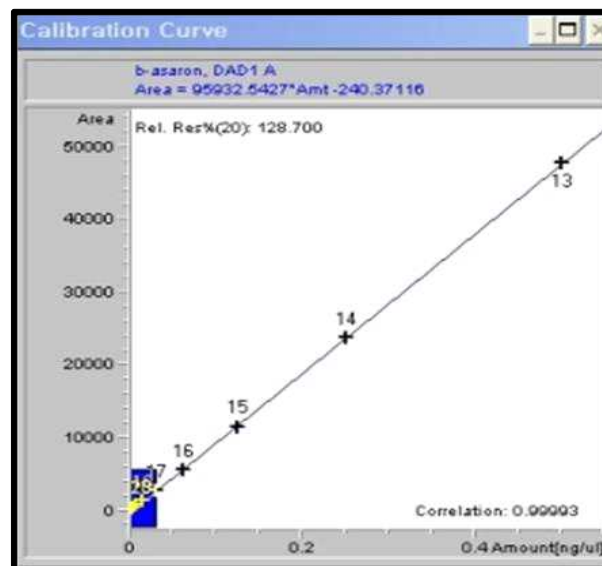
(C)

그림 51. 조추출물(A), α -asarone(B), β -asarone(C)

- 범위 및 직선성: 두 화합물의 범위를 알아보기 위해 0.488 μg ~ 2.0 mg/mL 에서 조사를 하였으며, 그 중 0.48 μg ~ 1.2 mg/mL에서 양호한 직선성을 나타냈다. $R^2 = 0.999$ 으로 α -asarone, B $Y = 131944.459X + 264.58954$, $Y = 95932.5427X - 240.37116$ 을 나타냈으며, 시중 제품(조추출물 함량 기준)에서의 α , β -asarone의 적정 함량을 기준으로 하여 3.9 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 직선성을 구하였다. 각각의 α , β -asarone의 $R^2 = 0.9998$ 과 $R^2 = 0.9999$ 으로 유의한 값을 나타냈다 (그림 52).



(A)



(B)

그림 52. α -asarone(A), β (B)의 검량선(R^2)

- 정밀성 : 정밀성을 확인하기 위하여 반복시험의 재현성 (repeatability)과 분석일자별 정밀성 (intermediate precision)을 측정하였다.
- 재현성 (repeatability) : 반복시험의 재현성은 3개 농도(250, 500, 1000 µg/mL)에서 동일한 전처리 과정을 4회 반복 하여 얻은 각 peak area 값으로서, 각 농도별 %RSD는 α-asarone의 경우 0.06445, 0.08826과 0.37568으로 나타났으며, compound B의 경우 0.09940, 0.03366, 과0.43577로 나타났다 (표 5).

Treatment	250µg/mL		500µg/mL		1 mg/mL	
	α-asarone	β-asarone	α-asarone	β-asarone	α-asarone	β-asarone
1	34708.2	24215.8	67845.7	49151.4	107027.7	85239.3
2	34738.7	24221.4	67806.2	49111.8	107734.4	84483.4
3	34707.7	24268.7	67898.1	49129.4	107976.2	85276.2
4	34752.3	24227	67943.2	49124.2	107506.3	85123.3
Mean (peak area)	34726.7	24233.23	67873.3	49129.2	107561.2	85030.55
S.D.	19.38	20.86	51.87	14.32	349.95	320.89
RSD(%)	0.0558	0.08608	0.076	0.029	0.325	0.377

표 5. 농도별 α, β-asarone재현성 결과

- 분석일자별 정밀성 (intermediate precision) : 분석일자별 정밀성을 확인하기 위하여 농도 (500 µg/mL)를 제조하여 4°C 냉장고에서 보관하면서 0 hour, 24 hour, 48 hour를 반복 조작하여 측정한 %RSD의 결과는 α-asarone의 경우 0.06794%, Compound B는 0.04038%로 나타났다 (표 6).

Hour	α-asarone	β-asarone
0	67845.7	49151.4
24	67806.2	49111.8
48	67898.1	49129.4
Mean(peak area)	67850	49130.87
S.D.	46.10065	19.84070
RSD(%)	0.067945	0.04038

표 6. α, β-asarone의 분석일자별 정밀성

- 정확성 : Asaron 원료에 대한 매트릭스의 영향을 조사하고자 spiking/recovery 방법으로 정확성을 평가하였다. 즉, 표준용액의 검량선 범위 이내에서 취한 검체량에 표준물질인 α -asarone와 Compound B를 각각 125, 250, 500 $\mu\text{g/g}$ 가하여 회수율을 측정하였다. 표준물질을 가한 질량에 따른 회수율을 비교한 결과 α -asarone의 경우 회수율은 각각의 첨가량에서 95.55, 99.38, 99.78%, %RSD는 0.21, 0.12, 0.16%로, compound B의 경우 96.47, 97.30, 95.07%의 회수율과 %RSD는 0.52, 0.11, 0.16%로 매우 나타났다 (표 7).

Recovery rate (%)						
	125 $\mu\text{g/g}$		250 $\mu\text{g/g}$		500 $\mu\text{g/g}$	
Treatment	α -asarone	β -asarone	α -asarone	β -asarone	α -asarone	β -asarone
1	95.26	95.92	99.46	97.26	99.60	95.28
2	95.65	96.36	99.21	97.20	99.77	95.01
3	95.73	97.13	99.47	97.45	99.98	94.91
Mean	95.55	96.47	99.38	97.30	99.78	95.07
S.D	0.21	0.50	0.12	0.11	0.16	0.16
%RSD	0.21	0.52	0.12	0.11	0.16	0.16

표 7. α , β -asarone의 정확성 결과

- 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) : α -asarone의 LOD (Limit of detection)는 0.488 $\mu\text{g/mL}$, LOQ (Limit of quantification)은 1.2 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. Compound B의 LOD (Limit of detection)는 0.488 $\mu\text{g/mL}$, LOQ (Limit of quantification)은 1.2 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

2. 뇌 보호 및 인지기능 식품의 제조

가. 기능성 식품 원료의 제조공정 확립

○ 수검초 유래 유효성분의 분리 및 정제과정에서는 효율을 높이기 위해 유기 용매를 이용한 추출법을 이용하였으며, 기능 식품의 원료는 물 추출물, 농도별 주정을 이용하였다.

○ 수검초 기능식품 원료의 물 추출물 및 주정 농도별 추출물 타당성 조사

본 과제 결과는 (주) 예당 지앤비와 공동으로 수검초 유래 유효성분이 다량 함유된 기능 식품 원료 제조를 위해 물(정제수) 추출물, 50% 주정, 70% 주정 100% 주정으로 추출한 결과이다. 수검초 100 g을 각각 물, 50%, 70% 및 100% 주정을 800 mL 첨가하여 추출하여 감압 여과 후 평균 brix를 확인한 결과 물 추출물은 2.0, 50% 주정은 18.5, 70% 주정은 21.7, 100% 주정은 22.0을 나타내었다. 또한 수율을 조사한 결과 각각 76.5%, 78.1%,

77.5% 및 77.6%로 나타났다. 또한 유효 성분 α -asarone와 B의 함유 결과 물 추출물보다 70% 주정 추출물에서 높게 나타났다. 이를 통해 기능 식품 원료 추출을 위해서는 70% 주정을 이용한 추출법이 좋은 것으로 사료된다.

○ 수검초 원료 수급 및 확보 방안 수립. 수검초를 확보하여 정제수와 70%주정으로 추출 : 추출용매에 따른 brix와 수율 비교

정제수로 추출하였을 때 평균 brix : 2.0, 수율 : 76.5%을 확인하였으며 70%주정으로 추출하였을 때는 평균 brix : 21.7, 수율 : 77.5%를 확인하였다 (그림 53, 54).

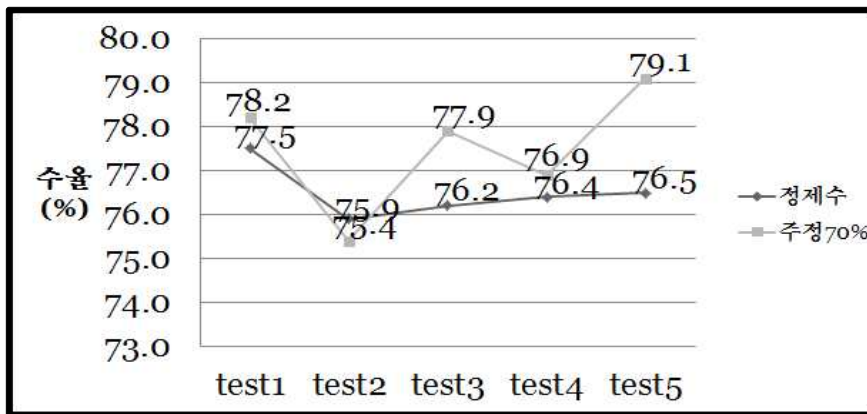


그림 53. 추출 용매에 따른 수율 확인

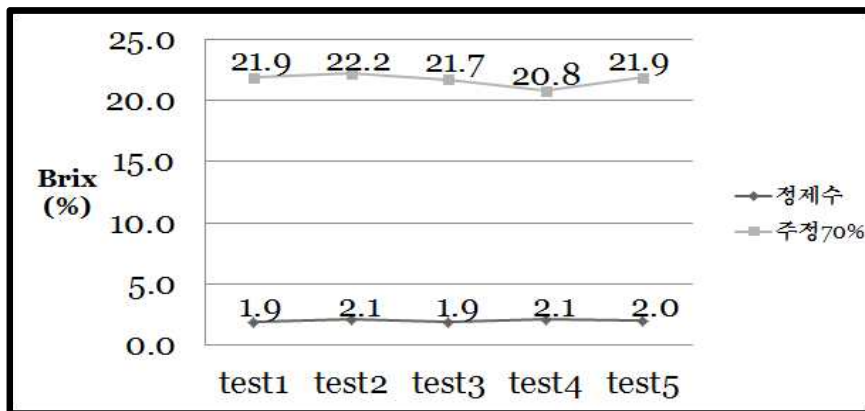


그림 54. 추출 용매에 따른 brix 확인

○ 신경세포 보호 및 인지기능 관련 약용식물 및 한방 조제 분석

한국 [Traditional Korean medicine (TKM)로 명명] 및 동아시아 전통의료에서 기억력 개선과 인지기능향상에 사용되었던 대표적인 한방(탕)과 약용식물 관련 백여 편의 논문을 본 연구진이 종합적으로 분석해 보았으며 향후 이를 토대로 인지기능개선 제품제작 및 효능 분석 등에 사용하고자 한다.

표 8. Evidence linked herbal formulation used in Korea for memory enhancing effect

Formulation	Traditional plants	Experimental evidence
Chongmyeong-tang [총명탕]	<i>Acorus gramineus</i> (석창포), <i>Polygala tenuifolia</i> (원지), <i>Poria cocos</i> (복령)	CMT may be useful for cognitive improvement via regulation of cholinergic marker enzyme activities and the antioxidant defense system.
Palmul-chongmyeong-tang (PMCMT) [팔물총명탕]	<i>Ginseng radix</i> (인삼), <i>Atractylodis macrocephalae</i> (백출), <i>Poriacocos</i> (복령), <i>Glycyrrhiza radix</i> (감초), <i>Angelicae gigantis radix</i> (한국당귀), <i>Ligusticum rhizome</i> (고본), <i>Rehmanniae radix</i> (숙지황), <i>Paeoniae radix</i> (작약), <i>Acorus gramineus</i> (석창포), <i>Polygalae radix</i> (원지)	Treatment with PMCMT reduced the loss of cholinergic immunoreactivity in the hippocampus induced by cerebral ischemia and improved memory. It might be useful for the treatment of vascular dementia.
Guibi-tang (GBT) (Quipi-tangorKihit-To) [귀비탕]	<i>Panax ginseng</i> (인삼), <i>Astragalus membranaceus</i> (황기), <i>Atractylodes macrocephala</i> (백출), <i>Poria cocos</i> (복령), <i>Zizyphus jujuba</i> (대추씨), <i>Euphoria longan</i> (용안육), <i>Angelica sinensis</i> (당귀), <i>Polygala tenuifolia</i> (원지), <i>Saussurea lappa</i> (목향), <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (감초)	GBT improves learning and memory but also increases the proliferation of cells in the DG of the hippocampus.
Yukmijihwang-tang or Luweidihuang-wang (YMJ) [육미지황탕]	<i>Corni fructus</i> (산유육), <i>Rehmannia radix</i> (숙지황), <i>Poriacocos</i> (복령), <i>Discoreae radix</i> (산약), <i>Mountain cortex radices</i> (목단피), <i>Alismatisradix</i> (택사)	YMJ prevents the deterioration of learning and memory ability in senescent accelerated mice and hydrocortisone-treated mice. YMJ cause significant reversal of ibotenic acid-induced deficit in learning and memory.
Sipjeondaebotang [십전대보탕]	<i>Panax ginseng</i> (인삼), <i>Astragalus membranaceus</i> (황기), <i>Atractylodes japonica</i> (백출), <i>Paeonia albiflora</i> (백작약), <i>Angelica gigas</i> (당귀), <i>Cnidium officinale</i> (천궁), <i>Citrusunshiu</i> (진피), <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (감초), <i>Polygonum multiflorum</i> (하수오), <i>Cinnamomum cassia</i> (유계)	SDT may participate in improvement of declined cerebral energy production and cholinergic neurotransmitter synthesis in senile dementia.
Gami-chunghyul-dan (GCD) [가미청혈단]	<i>Rheum palmatum</i> (대황), <i>Scutellaria baicalensis</i> (황금), <i>Gardenia jasminoides</i> (치자), <i>Plantago asiatica</i> (질경이), <i>Cannabis sativa</i> (대마), <i>Prunus humilis</i> (옥리인), <i>Areca</i>	GCD treatment rescues cognitive impairment induced by soluble oligomeric forms of amyloid beta (A β O) as well as protects against A β O-induced hippocampal cell loss.

	<i>catechu</i> (대복자)	
INM 176 (K-1107)	Ethanolic extract of <i>Angelica gigas</i> (참당귀주정추출물)	INM 176 showed benefits in placebo-controlled clinical trial in the old aged subjects with memory impairment.
		INM-176 inhibited AChE activity in the hippocampal tissue <i>in vitro</i> and <i>ex vivo</i> .
* 열거한 7종외에 총 26종의 기억력 및 인지기능 개선 효능 한방(탕) 및 약용식물 조사 분석 진행하였고 국제전문 학술지에 발표하였음		

○ 선별 소재의 독성 검사 및 최적 추출물의 안정성 검사 (*in vitro*)

- 도파민 신경세포 (SH-SY5Y human neuroblastoma)를 이용한 수검초 최적 추출물의 독성검사

도파민성 신경세포인 SH-SY5Y 세포에서 수검초 추출물을 농도별로 처리 후 독성검사 (MTT assay)를 진행하였고, 신경독소인 MPP⁺를 처리하여 신경세포사에서 수검초 추출물의 세포보호 효능을 분석하였다. 그 결과, SH-SY5Y 세포에서는 수검초 최적추출물이 100 µg/ml 까지 독성이 없는 것을 확인하였다. 하지만 200 µg/ml에서 10.2±2.7 %정도의 독성을 지니는 것이 관찰되었다 (그림 55A). 수검초 추출물의 신경세포사 억제 효능을 검색하기 위하여 신경독소 MPP⁺ 1mM을 처리한 결과 50, 100 µg/ml에서 효능을 보였다 (그림 55B).

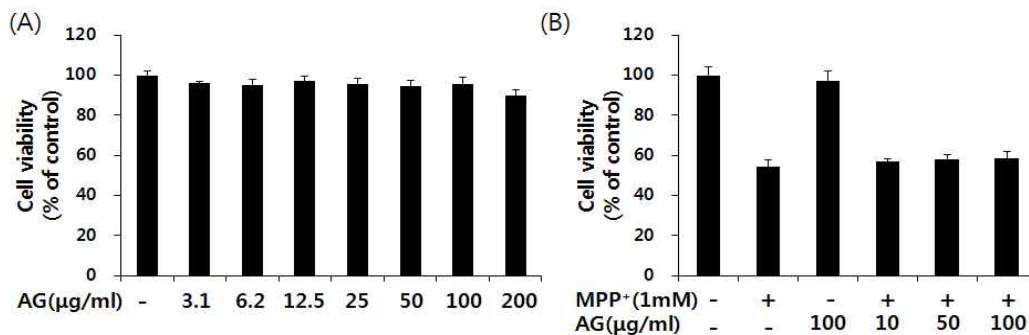


그림 55. SH-SY5Y 세포에서 수검초 최적 추출물의 안정성 검사. (A) 수검초 최적 추출물의 세포생존력 검사. (B) 수검초 최적 추출물의 신경세포 보호 효능 분석.

- BV-2 신경교세포를 이용한 수검초 최적 추출물 및 유효성분의 독성검사

BV-2 신경교세포에 수검초 최적 추출물 및 유효성분의 독성 및 안정성확인을 위하여 물질을 농도별로 전처리한 후, 신경 독소인 LPS (100 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양 뒤 MTT assay를 진행하여 분석하였다. 수검초 최적추출물 200µg/ml까지 LPS를 처리하여 신경염증을 유발하였으나 세포독성이 전혀 없는 것을 확인하였다 (그림 56A). 수검초의 유효 성분 α-asarone는 500 µM에서 LPS 처리 시, 23.2±5.4% LPS를 처리하지 않았을 때 17.4±0.9%의 독성을 가지는 것을 확인하였고, 250 µg/ml는 전혀 독성을 나타내지 않았다 (그림 56B). 다른 유효성분인 β-asarone에서는 100 µg/ml까지 LPS를 처리하여도 세포독

성이 전혀 없는 것을 확인하였다 (그림 56C).

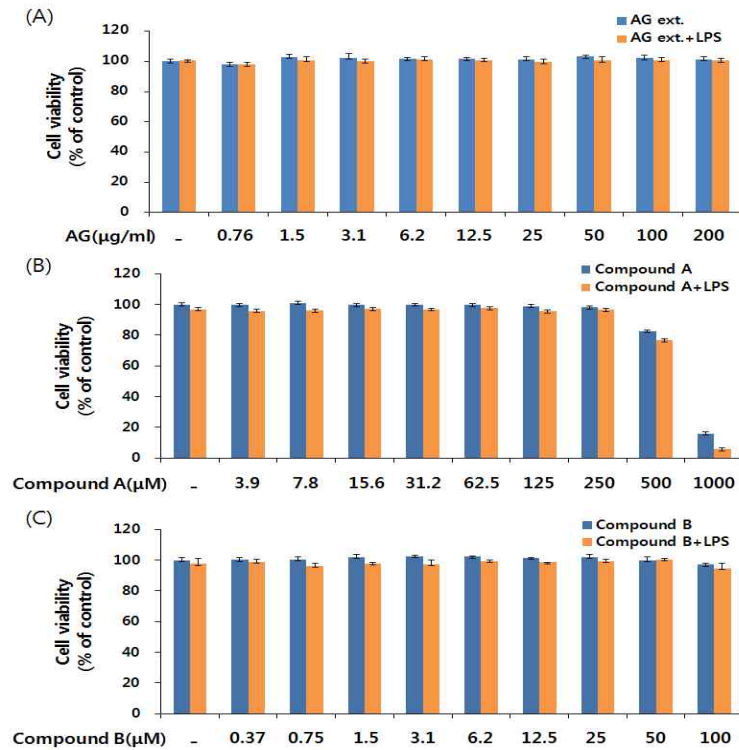


그림 56. BV-2 신경교세포에서 수검초 최적 추출물 및 유효성분의 안전성 검사

○ 임상시험용 제형의 제조공정 확립

- 원료의 표준화 및 전처리

수검초는 한국을 비롯한 동남아 일대에 자생하는 식물로 한국에는 주로 제주도와 안동을 중심으로 재배·판매되고 있다. 본 과제에서는 안동석창포영농조합을 통하여 원료를 구매하여 사용하였다.

원료 구매 후 2~3회의 수쇄를 실시하여 토양 및 불순물을 제거하고 이를 3~5cm의 길이로 절단한 후 수분함량 10%이하로 50℃의 온도에서 열풍 건조를 실시하여 추출물을 제조한다.

- 추출방법 최적화

시료로부터 추출물을 분리하기 위하여 추출공정에서 선정되어야 할 용매의 종류, 혼합용매의 농도, 온도, 추출시간, 시료 입자 등의 영향을 연구하고 공정을 최적화하고, 시료에서 생산되는 비휘발성 대사산물을 물, 에탄올, 메탄올 등 여러 가지 친수성 용매를 이용하여 추출하며, 추출공정에서 중요한 공정변수인 추출온도, 시간, 시료입자의 크기를 달리하여 추출을 시행하고 수율을 분석하여 각 변수에서의 최적조건을 확립한다. 결과를 바탕으로

공정의 경제성, 목적산물의 수율 등을 최대화 할 수 있는 조건을 최적 공정으로 결정하였다.

- 참여기업인 (주)예당 지앤비와 공동으로 수검초 유래 유효성분이 다량 함유된 기능식품 원료 제조를 위해 물(정제수) 추출물, 50% 주정, 70% 주정 100% 주정으로 추출한 결과이다. 수검초 100 g을 각각 물, 50%, 70% 및 100% 주정을 800 mL 첨가하여 추출하여 감압 여과 후 평균 brix를 확인한 결과 물 추출물은 2.0, 50% 주정은 18.5, 70% 주정은 21.7, 100% 주정은 22.0을 나타내었다. 또한 수율을 조사한 결과 각각 76.5%, 78.1%, 77.5% 및 77.6%로 나타났다. 또한 유효 성분 α -asarone와 B의 함유 결과 물 추출물보다 70% 주정 추출물에서 높게 나타났다. 이를 통해 기능 식품 원료 추출을 위해서는 70% 주정을 이용한 추출법이 좋은 것으로 사료된다.

- 임상시험용 제품 제작을 위한 원료 제조 공정

건조 수검초를 대량 추출기를 이용하여 물을 건조 중량의 10배 첨가한 후 60°C에서 24시간 추출하며, 추출 시 순환펌프를 이용하여 추출액이 순환시킨다. 추출이 끝나면 여과하여 농축조로 추출액을 이송하며 이를 2회 반복한다. 추출액 1ton을 농축조에서 감압저온 농축을 실시하여 최종 brix가 20이상 되게 농축한 후 -80°C에서 24시간 동결 후 1주일 간 동결 건조를 실시하여 동력건조기 내부 온도가 상온으로 올라갔을 때를 완료시점으로 하였다.



그림 57. 수검초의 대량 생산 공정도

- 추출물 표준품 제작

위의 추출방법을 이용하여 20Brix 농축액을 제조하여 이를 LC-MS방법을 활용하여 본과 제에서 지표성분으로 확립한 α-Asarone의 함량을 측정하여 5~10% 함량을 가지는 추출물을 제품 제작에 사용하였다.

- 제품 제형에 대한 연구

수검초를 이용하여 소비자가 쉽게 선택하여 섭취할 수 있는 제형을 찾고 이 제형을 만들기 위한 Foemulation을 탐색하고, 안정성이 확보된 제품을 개발되도록 함에 있다. 일반적으로 건강기능식품으로서 소비자가 가장 쉽게 접하는 제형은 고형제로는 경질캡슐, 연질캡슐, 정제가 있는 드링크제 등으로 구분할 수 있으며, 수검초의 활성성분이 안정적인 제형이 만들어 지도록 하는데 있다.

수검초 추출 분말의 기본 물성은 갈색의 한약재 특유의 향이 있으며, 맛이 쓴 단점이 있다. 이러한 성상으로 인하여 기호성이 떨어지는 단점이 있으므로 수검초 추출물을 활용한 제형의 변화로 다양한 소비자의 요구에 대응하고자 다양한 제형으로 시제품을 생산하였다. 아래의 표와 같은 배합비를 바탕으로 소비자들에게 익숙한 홍삼 및 비타민C를 첨가하여 2가지 제형으로 제조하였다. 1차적으로 환으로 제작하였으며 섭취용량이 다량이라는 단점을 극복하기 위하여 경질캡슐의 형태로 시제품을 생산하였다.

시제품의 제작은 각 원료를 식품공전 및 첨가물공전상의 적합한 원료를 구입하여 사용하였으며, 검수된 적합한 원료를 전자저울을 이용하여 배합비율에 맞게 칭량하여 배합탱크에 투입하여 배합하여 성상, 세균수, 대장균군 등의 검사를 실시하였다.



그림 58. 시제품의 제조공정도

구분	성분	대조군	제품 A	제품 B
배합비율	수검초 추출 분말 (20 Brix)	0	10	20
	비타민 C	50	50	50
	포도당	28	18	8
	블루베리 분말	8	8	8
	합계	100	100	100

표 9. 시제품 배합비



그림 59. 수검초를 원료로 하여 생산된 시제품.

- 수검초를 원료로 하는 제품에 대한 향후 연구

본 과제를 통하여 수검초의 뇌세포 보호 및 인지기능 손상억제에 대한 효능을 입증하였으며, 이를 바탕으로 여러 유형의 제품을 제작하고자 한다. 우선 본과제에서 생산한 시제품을 생산한 경질캡슐이 아닌 연질캡슐로 제품을 생산할 계획이며, 수검초의 활성성분인 아사론의 물성을 이용하여 아로마 오일형태의 제품을 개발하려 계획중이다.



기능성 식품

인지기능 개선
천연생물소재
"건강기능식품"



아로마 오일

신경안정
"아로마 오일"



인지기능 강화
"기능성 시리얼"
수험생용 시리얼
고령자용 시리얼
(씨알푸드)



발효 수검초
(원료)

(한국발효)

그림 60. 수검초를 원료로 생산가능 제품군

제 3절. 수검초를 이용한 기능성 소재를 이용한 예비임상시험

○ 인체 적용 시험

- 인체적용시험의 명칭 및 단계

수검초 추출물로 개발된 건강기능식품을 경구 투여하여 인지기능 개선 변화 효과 관련 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험

- 인체적용시험 실시기관명 및 주소

실시기관명; 건국대학교 글로벌캠퍼스 충주병원 (신경과)

주소; 충북 충주시 국원대로 82

- 인체적용시험책임자, 담당자 및 공동연구자의 성명 및 직명

인체적용시험의 직명	소속	성명	직명
시험책임자	건국대학교 의과대학 의학교육학과	한상돈	부교수
공동연구자	건국대학교 의과대학 신경과	최진영	교수
공동연구자	건국대학교 의과대학 신경과	조운식	임상조교수

- 인체적용시험 목적 및 배경

- 1) 본 시험의 주 목적은 건강한 대상자에게 수검초 추출물로 개발된 건강기능식품을 아침, 저녁 식사 후 1정씩 1일 총 2회 2정을 경구 투여하였을 때의 인지기능개선 효과 등의 기능성을 평가하려는 것이다.
- 2) 두 번째 목적은 생명징후, 실험실적 수치들에 대한 영향, 이상반응의 측면에서 수검초 추출물로 개발된 건강기능식품의 안전성을 평가하려는 것이다.
- 3) 기억/학습능력, 운동능력과 같은 뇌 활동은 태어나면서부터 사망하는 시점까지 모든 동물의 보편적 활동이지만, 노화에 의해서 이러한 뇌 활동이 점차 감퇴한다. 특히 뇌활동 중 인지기능과 관련된 뇌활동은 노화에 의하여 급격하게 감소하는 경향을 보이는데 이를 억제하는 예방/치료제는 없는 실정이다. 이에 농림자원으로 활용되고 있는 수검초 추출물을 이용하여, 신경보호 효능 및 작용기전을 분석하여, 뇌세포 보호 및 인지기능 개선 효능을 가진 신기능성 산업화 소재를 개발하고자 한다

- 인체적용시험용 식품의 품명, 원료식품의 분량 및 제형

ㄱ.수검초 추출물로 개발된 건강기능식품

ㄴ.원료식품의 분량 및 제형

1) 시험군;

이 식품 1정(500mg) 중 수검초추출물 10mg

	1정	점유율 (%)
수검초 추출물	10	20
비타민 c	250	50
포도당	40	8
포도분말	70	14
블루베리 분말	40	8
합계	500.00	100.00

2) 대조군;

이 식품 1정 (500mg)

	1정	함유율(%)
비타민 c	250	50
포도당	140	28
포도분말	70	14
블루베리 분말	40	8
합계	500.00	100.00

ㄷ. 시험식품의 관리

시험책임자 및 인체적용시험 담당자는 시험 식품을 별도 마련된 시건장에 지정한 조건 (직사광선을 피하고 상온 보관)과 관계 법령에 따라 보관하여야 하며, 인체적용시험 담당자에 의해 시험 식품을 관리 또는 배부하여야 한다. 인체적용시험 담당자는 재고를 관리하여야 하며, 시험 식품의 수령, 배분, 회수 등을 관리하였다.



- 연구대상

주관적인 기억력 저하를 호소하지만 치매를 진단받지 않은 60세 이상의 정상 건강인 인지기능에 영향을 줄 수 있는 다른 질환이나 급성기 치료가 필요한 상태의 환자는 제외

ㄱ. 인체적용시험 기간

각 대상자 별로 총 6주(스크리닝 2주, 약제투여기간 4주)가 소요되며 전체 40명의 대상 지원자를 모집하는데 필요한 기간은 약 4주 이상 예상되어, 총 인체적용시험 실시기간은 최초 모집시점으로부터 10주 이상 소요되었다.

ㄴ. 대상자의 선정기준, 제외기준, 목표한 대상자 수 및 그 근거

a. 선정기준

- 1) 만 60세 이상의 주관적인 기억력 저하를 호소하는 신체 건장한 남, 녀 대상자
- 2) 피험자 동의서에 서면 동의한 대상자

b. 제외기준

- 1) 최근 2주 이내에 인지기능에 영향을 주는 약을 복용한 적이 있는 대상자
- 2) 치매로 진단 받은 적이 있는 대상자
- 3) 심한 두부 외상으로 입원한 적이 있는 대상자
- 4) 뇌졸중으로 입원한 적이 있는 대상자
- 5) 심한 우울증으로 치료를 받은 적이 있는 대상자
- 6) 간기능 이상으로 입원치료를 받은 적이 있는 대상자
- 7) 신장기능 이상으로 입원치료를 받은 적이 있는 대상자
- 8) 급성기 치료를 요하는 다른 병이 있는 상태
- 9) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 대상자

ㄷ. 대상자 수

대상자 선정기준 및 제외기준에 적합한 지원자를 군당 20명 이상 등록하여 최종 군당 25명 이상을 분석하기로 계획하였다.

	시험군	대조군	합계
유효성 평가 대상자 수	20명	20명	40명
Drop out (20%)을 감안한 대상자 수	25명	25명	50명

- 인체적용시험 방법

ㄱ. 인체적용시험 설계

본 시험의 목적은 일반인 대상자에게 수검초 추출물로 개발된 건강기능식품을 1일 2회, 아침, 저녁 각각 식후 1정씩 총 2정을 경구 투여했을 때 Baseline(0주) 대비 4주 후의 인

지기능관련 지표의 변화 관련 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험이다.

ㄴ. 투여량, 투여방법 및 투여기간

a. 투여량 및 투여방법

대상자는 방문 1에서 본 인체적용시험에 적합한 지 판정 받게 된다. 적합 판정된 대상자들은 방문2에서 무작위 배정되어 이후 4주 동안의 투약하였다.

■ 시험군: 1일 2회 복용(아침, 저녁 식후 30분에 1정씩)을 baseline (0주)부터 4주간 경구 투약하였다.

■ 대조군: 1일 2회 복용(아침, 저녁 식후 30분에 1정씩)을 baseline (0주)부터 4주간 경구 투약하였다.

b. 투여기간

무작위 배정된 날로부터 4주 (28±5일)

ㄷ. 병용요법의 허용 및 금기약물/식품

a. 병용약물의 허용

시험식품 복용 외에 일반약 또는 운동요법, 식이요법 등은 금기항목이 아닌 경우 필요하다면 허용할 수 있다.

1) 기타 대상자가 본 인체적용시험에 참여하기 전부터 복용하고 있던 병용약물 중 본 연구의 결과해석에 영향을 미치지 않을 것으로 사료되는 병용약물은 시험자의 판단 하에 허용하였다.

2) 연구자 판단에 따라 연구시작 2개월 전부터 연구기간 내내 지속적으로 같은 약을 용량 변동 없이 복용하는 경우는 복용이 가능하다.

모든 병용약물 투여 시(타 질환 또는 이상반응 발현 시 치료약물 포함) 해당 약물에 대한 정보(제품명, 투약목적, 투여용량, 투여기간 등)를 증례기록서에 상세히 기록하였다.

b. 금기약물 및 식품

다음에 열거하는 약물은 인체적용시험기간 동안 병용투여를 금지한다.

1) 암페타민, 모든 항우울제, 항세로토닌약, 항정신병약은 본 시험기간 동안 투약할 수 없다. 시험자의 판단에 따라 임상시험 기간 중 병용금지 약물의 사용이 필요한 경우에는 해당 대상자의 인체적용시험을 중단해야 하며, 증례기록서의 마지막 체이지에 이와 관련하여 자세히 기록하였다.

- 무작위 배정

선정된 대상자는 시험군 또는 대조군에 1:1의 비율로 무작위 배정된다. 무작위 배정 코드는 통계학자에 의해 제공하였다.

① 연구대상으로 선정한 환자를 확률에 의거한 무작위배정 방법으로 각 군에 배정하였다.

② 무작위 배정표 SPSS 프로그램의 난수(random number)를 발생시키는 함수를 이용하여 작성하였다.

③ 두 군 중의 한 군에 방문일 (Day 0) 순서대로 낮은 번호부터 할당된다. 즉, 인체적용시

b. 기초 조사

기초 조사는 대상자의 생년월일, 성별 등과 같은 인구학적 정보를 조사하였다.

c. 신체검사

신장, 체중 등의 신체검사는 방문1 및 방문2에서 실시하되 신장은 방문1에서만 실시하며, 방문2에서는 최초 측정치를 사용한다. 신장의 측정은 신발을 벗고 cm 단위로 측정하였다.

d. 활력징후

활력징후는 5분간 안정을 취한 후 동일한 위치에서 혈압, 맥박수, 체온을 매 방문 시마다 측정하여 대상자가 받아야 할 계획된 검사 실시 이전에 측정하도록 하였다.

e. 병력 및 동반질환

외과적 수술력, 알러지력 등을 포함한 3년 이내의 과거력 및 현병력에 대하여 발생시기(발생년도 또는 발생년월), 시험자의 의견 등을 적도록 하였다.

f 생활습관 조사

방문1에서 시행하며, 대상자의 흡연, 음주, 식사, 운동 습관에 대하여 조사하였다.

g. 실험실적 검사

대표적인 인지기능 검사 방법인 세라드검사를 시행한다. 세라드검사에는 언어유창성검사, 보스톤 이름대기 검사, 간이 정신상태 검사, 단어목록기억 검사, 구성행동 검사, 단어목록 회상 검사, 단어목록재인 검사, 구성회상 검사, 길만들기 검사 등이 포함되며, 실험실적 검사를 위한 혈액채취는 방문1, 방문2에서 이루어졌다. 대상자는 채혈하기 전 최소 8시간 이상 금식한 상태로 내원해야 한다. 단 방문1의 실험실적 검사는 방문1 이전 2주 내에 실시한 실험실적 검사결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 방문1에서 시행해야 할 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 하였다.

혈액학적 검사 : WBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets

혈액생화학적 검사 : BUN, Creatinine, ALT, AST, Albumin, Na, K, Cl

소변검사 : pH, Protein, Glucose, WBC, RBC, Specific gravity

만일 인체적용시험 종료 시점에서 시행한 실험실적 검사에 임상적으로 문제가 있을 경우에는 추적 조사 방문 시에 이러한 검사들을 다시 시행하였다. 실험실적 검사결과는 시험자가 시기 적절하게 이를 검토해야 한다. 실험실적 검사치가 정상 범위를 벗어날 경우 시험자는 이에 대한 임상적 의미를 규명하고 해결될 때까지 또는 시험자가 임상적인 관련이 없다고 판정할 때까지 추적조사 하였다.

- K-MMSE (Korean version of Mini-Mental State Exam) 분석

항목		반응	점수	항목		반응	점수
지남력 (시간) [5]	년(1)			주의집중 및 계산 [5]	100-7(1)		
	월(1)				-7(1)		
	일(1)				-7(1)		
	요일(1)				-7(1)		
	계절(1)				-7(1)		
지남력 (장소) [5]	나라(1)			기억회상 [3]	비행기(1)		
	시.도(1)				연필(1)		
	무엇하는 곳(1)				소나무(1)		
	현재 장소명(1)			언어 및 시공간 구성 [9]	이름대기(1)		
몇 층(1)			명령시행(1)				
비행기(1)			따라말하기(1)				
연필(1)			오각형(1)				
기억등록 [3]	소나무(1)			읽기(1)			
				쓰기(1)			
				총점	/30		

- CERAD(the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) 분석

순 번	검 사	검 사 내 용
1	언어유창성 검사	정해진 시간동안 동물 이름대기
2	보스톤 이름대기 검사	그림을 보여주고 이름대기
3	간이 정신상태 검사	시간, 장소, 계산 등의 기억력에 대한 screening 검사
4	단어 목록 기억 검사	10개의 단어목록을 보여주고 기억하여 이름대기를 세 차례 반복
5	구성 행동 검사	원, 마름모 등으로 구성된 도형 따라 그리기
6	단어 목록 회상 검사	단어목록 기억검사에서 시행한 단어 중 기억된 이름대기
7	단어 목록 재인 검사	단어목록 기억검사에 없었던 10개를 포함한 20개의 단어를 주고 목록에 있었는지 없었는지를 확인
8	구성회상 검사	구성행동검사시 사용되었던 그림을 회상하여 다시 그리기
9	길 만들기 검사 A, B	무작위로 흩어져 있는 숫자에 순서대로 연결선 긋기

h. 무작위 배정

선정기준/제외기준에 합당한 대상자를 선정 후 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정하고, 해당하는 인체적용시험용 식품을 처방한다. 무작위 배정은 선정기준/제외기준(대상자 적합성 평가) 방문1에 방문순서에 따라 배정되며, 무작위 배정 후 인체적용시험용 식품을 처방받도록 하였다.

i. 선행/병용약물 조사

선행약물 조사는 시험 참가 4주 이내 약물 복용력에 대하여 조사한다. 조사 시 병용금지 약물에 해당되는 약물일 경우, 최소 중단기간의 휴약기를 가진 후 본 연구를 진행하도록 하였다. 또한 병용약물 조사는 인체적용시험용 식품 복용 후 매 방문 시 인체적용시험용 식품과 병용한 약물의 변화를 평가하는 것으로 투여 중지, 용량, 용법의 변경 및 새로운 약물의 투여(이상반응의 처치의 목적으로 사용되는 약물 포함)등이 이에 해당된다. 병용이 가능한 약물은 병용약물의 허용에 해당되는 경우만 허용되며, 병용약물에 변화가 있다면 이를 증례기록서에 자세하게 기록하였다.

j. 이상반응

시험 중 발생하는 모든 이상반응을 기록하는 것은 시험자의 의무이다. 이상반응은 WHO-ART용어로 기록하여야 하며, 이것이 불가능한 경우 시험자가 관찰하거나 보고한 증상 및 징후에 대한 용어를 기록하여야 한다. 증례기록지에는 이상반응의 증상 및 증후, 시작일 및 시작시간, 종료일 및 종료시간, 마지막 투약일 및 투약시간, 총기간, 중증도, 경과, 결과, 경증도, 약물과의 인과관계, 취해진 조치가 기재되어야 하며, 세부적인 치료 내용은 증례기록서의 이상반응 페이지에 기록하였다.

k. 복약 순응도 평가

식품 및 위약 복용 여부를 확인하기 위하여 매 2주마다 유선으로 복용 순응도를 평가하도록 한다. 복용 순응도가 2회 연속 80% 미만인 경우 순응도가 낮은(non-compliant)것으로 간주하여 인체적용시험에서 통계 처리 시 제외시키도록 하였다.

- 중지, 탈락기준

모든 대상자는 언제 어느 경우라도 특정 이유의 유무와 상관없이 중도 탈락할 수 있으며, 중도 탈락할 경우 대상자에게 주어질 권리 등예의 어떠한 불이익 또는 이익에의 손실은 없다. 대상자는 정해진 치료 기간을 완료하기 전에 특정한 이유로 인해 중도 탈락될 수 있다. 인체적용시험 실시기관에 다시 방문하는 것을 거절한 대상자를 제외하고, 어떠한 이유로든 치료기간 중 중도 탈락 또는 조기 종료한 모든 대상자는 조기 종료 평가를 완료하도록 한다. 대상자의 요청, 이상반응의 발생, 중대한 계획서 위반, 기타의 인체적용시험을 진행할 수 없는 경우에는 조기 종료될 수 있다. 이 때 인체적용시험책임자는 이를 모니터 요원에게 구두, 전화 및 서면으로 이를 알려야 한다. 그리고 이에 대한 기록을 증례기록지에 자세히 기록하였다.

○ 인체 적용 시험 결과

- 수검초를 20%함유한 시제품군과 대조군을 4주간 투약한 후 CERAD방법을 통하여 인지기능을 측정해 본 결과 시험군의 인지기능 개선 효능이 미미한 차이를 보이는 하지만 통계학적인 유의성은 없었다. MMSE와 길만들기 검사에서 아래 표 10에서 제시한바와 같이 차이를 보인다. (MMSE 26.7 Vs 15.6, 길만들기 검사 B 103.1 Vs 130.47, MMSE는 높을

수록, 길만들기 검사는 낮을수록 인지기능 양호)

- 이러한 결과의 원인은 투여 기간이 짧았고 대상자 수가 적었기 때문으로 분석된다.

	복용 전				복용 후				변화			
	시험군		대조군		시험군		대조군		시험군		대조군	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
간이 정신상태 검사 (MMSE)	26.71	4.00	25.63	3.79	26.88	3.67	25.81	3.94	0.18	0.53	0.18	0.60
단어목록기억 검사 (Word list learning)	25.59	3.57	21.38	8.83	26.53	3.10	23.50	7.40	0.94	1.03	0.64	0.92
단어목록회상 검사 (Word list recall)	8.18	1.07	6.69	1.82	8.29	1.16	7.00	2.00	0.12	0.49	0.42	0.79
단어목록재인 검사 (Word list recognition)	7.47	1.46	6.94	1.73	7.88	0.99	7.00	1.55	0.41	0.71	0.08	0.67
구성회상 검사 (Constructional recall)	8.53	1.81	7.25	2.35	8.94	1.52	8.19	2.14	0.41	1.00	1.08	1.24
구성행동 검사 (Constructional praxis)	10.41	1.23	8.75	2.46	10.41	1.23	9.00	2.39	0.00	0.00	0.27	0.90
언어유창성검사 (Verbal fluency)	14.24	3.67	14.38	2.87	14.71	3.62	14.94	2.57	0.47	0.87	0.55	1.04
보스톤 이름대기 검사 (Modified Boston naming test)	13.29	2.52	12.06	2.67	13.76	2.08	12.69	2.21	0.47	0.87	0.73	0.90
길만들기 검사 A (Trail making test A)	47.88	12.92	51.63	16.05	45.71	12.32	48.19	16.70	-2.18	1.81	-3.58	4.14
길만들기 검사 B (Trail making test B)	103.12	30.25	130.47	74.15	99.18	31.04	123.07	70.36	-3.94	3.03	-6.36	11.50

표 10. CERAD를 이용한 시제품 섭취 전후 변화

- 또한 대상자들에게 식품 복용 전후 피검사 및 소변검사 실시한 결과 (복용 전; 대상자로서의 적절성 평가, 복용 후; 식품으로 인한 유해성 평가) 복용 전 이상이 있는 경우는 제외하였으며, 복용 후에는 이전과 비교해 임상적으로 의미 있는 이상소견 없었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연차별 연구개발 목표의 달성도.

구분 (연도)	연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발 내용
1차 년도 (2012)	○ 수검초 추출물 및 α -asarone 를 이용한 뇌인지기능 개선 기 능성 소재 개발		• 수검초 추출물의 항산화 활성 측정
	- 수검초 추출물 및 유효성분의 신경염증 억제효능 분석 (<i>in vitro</i>)	100	• 수검초 및 분리성분의 세포독성, NO 방출저 해 효능 및 AChE 활성 측정
	- 수검초 추출물 및 분리 성분 에 대한 신경세포 보호 효능 분 석 및 기전 규명 (<i>in vitro</i>)	100	• 수검초 및 분리성분의 iNOS, COX-2 등 염 증관련 유전자 및 단백질의 발현 분석
	- 수검초 추출물 및 분리 성분 의 인지기능 개선 효능 분석 및 기전 규명 (<i>in vitro</i>)	100	• 수검초 및 분리성분의 염증성 사이토카인 분비 억제능 확인
	- α -asarone의 인지기능 개선 기전 규명 (<i>in vivo</i>)	100	• 수검초 및 α -asarone에 대한 신경염증반응 에 대한 기전 분석(MAPKs, NF-kB pathway 등)
			• α -asarone의 AChE 활성 저해능 확인
			• α -asarone의 동물행동실험(수동회피실험등) 을 통한 학습능력 측정
			• 인지기능 손상 동물모델에서 Y자미로 및 MDA 활성 분석
	○ 수검초 및 α -asarone 을 이용 한 실용화 기술 개발		
	- 수검초의 추출, 분리 및 정제 (유효성분 확인)	100	• 수검초에서의 유효성분 분획 다량 함유 분 획 제조 및 단일 성분 분리
	- 수검초 최적 추출 조건 확립	100	• 유기 용매별 유효성분 추출 함량 비교 및 E·A를 이용한 분획법 확립

구분 (연도)	연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발 내용
2차 년도 (2013)	○ 수검초 및 α -asarone를 이용한 뇌인지기능 개선 기능성 소재 개발		<ul style="list-style-type: none"> 초대배양 신경교세포 (Primary microglia cell)을 이용한 수검초 및 유효성분(α-asarone 등)의 NO 방출 저해능 분석
	-활성성분(α -asarone) 및 최적 추출물의 뇌신경보호 및 인지기능개선 효능 분석 및 기전 연구 (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)	100	<ul style="list-style-type: none"> 신경조직 손상 동물모델을 이용한 α-asarone의 신경보호 및 신경염증 억제 효능 분석
	-수검초 최적 추출물의 항산화 효능 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 신경조직 손상 동물모델을 이용한 α-asarone의 행동학적 개선 효능 검증
	-활성성분(β -asarone)의 뇌신경보호 효능 분석(<i>in vitro</i>) 및 기전 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> DCFH-DA를 이용한 수검초 추출물의 항산화 효능 검증
	-수검초 유효성분의 뇌혈관장벽(BBB) 통과여부 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 수검초의 유효성분인 β-asarone의 뇌세포보호 (신경염증 억제) 효능 기전 분석 동물실험을 이용한 수검초 유효성분의 뇌혈관장벽(BBB) 통과여부 및 투여물질의 Biological half-life 측정
	○ 수검초 및 α -asarone를 이용한 실용화 기술 개발		<ul style="list-style-type: none"> 70% MeOH 추출, E·A 분획, Silica gel flash, Silica gel CC, prep. LC, 재결정을 통한 고순도의 두 활성 성분 확보
- 활성 성분의 분리 정제 및 구조 동정을 통한 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> ^1H NMR, ^{13}C NMR 구조 동정 및 분석 	
- ICH 가이드라인에 따른 유효화된 두 활성성분의 분석법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> ICH가이드라인의 9가지 지표에 따른 두 활성 성분의 유효화된 분석법 확립 및 적용성 검토 	
- 기능성 식품 개발을 위한 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> 제품 배합비 및 제형검토 	

구분 (연도)	연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발 내용
3차 년도 (2014)	○ 수검초 및 α-asarone를 이용한 뇌인지기능 개선 기능성 소재 개발 - 수검초 및 그 활성성분의 뇌신경보호 및 인지기능 개선 기전 분석 - α-asarone 투여 후 뇌내 신경전달 물질 변화량 분석 - 소재의 최적 효능 함량 결정 - 소재의 안정성 검사 - 기능성원료 개별인정 인허가 준비	100 100 100 100 80	<ul style="list-style-type: none"> • 신경조직 손상 동물모델을 이용한 유효성분의 신경보호 및 신경염증억제 효능 분석 • 신경조직 손상 동물모델을 이용한 수검초 유효성분의 뇌신경보호 효능 및 기전 분석 • LC-MS 분석을 이용한 뇌내신경전달물질 변화량 측정 • 선별 소재의 최대 효능 구간 설정 • 선별 소재의 독성 검사 및 최적 추출물의 안정성 검사 • 개별인정 인허가 준비
	○ 수검초 및 α-asarone를 이용한 실용화 기술 개발 - 파일럿 공정 개발 - 임상실험 시제품 제작 ○ 수검초 추출물을 이용한 예비인체적용시험 - 임상시험 타당성 및 임상시험윤리위원회 심의 - 시제품을 이용한 임상예비시험	80 100 100	<ul style="list-style-type: none"> • 대량 생산을 위한 제품 개발 공정 개발 • 인체 적용 시험을 위한 시제품 제작 • IRB 승인 신청 및 허가 취득 • 위약군과의 대조를 통한 제품의 효능 분석 • 혈액검사를 통한 생체내 적용성 확인

제 2절. 연구결과의 관련분야 기여도

연구개발의 목표	기술발전 기여도
○ 수검초 및 α-asarone을 이용한 뇌인지기능 개선 기능성 소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 수검초 추출물의 항산화력 및 항신경염증 분석을 통하여 수검초 추출물을 활용한 기능성 식품 개발 및 뇌세포 보호 및 인지기능손상 개선용 제품의 개발에 기여함 • 수검초의 활성성분인 알파아사론과 베타아사론의 항신경염증 억제 및 인지기능 손상 개선 효능 분석을 통하여 이를 이용한 기능성 식품 및 약제 개발에 기여함 • 수검초의 효능 분석을 통하여 고소득 대체 작물의 가능성에 기여함 • 신경변성질환 예방 및 치료제 개발에 관련하여 성공적인 효능 분석을 통하여 이와 관련된 시장의 증대에 기여함 • 신경변성질환의 병인에 대한 제시를 통하여 신경변성질환 연구의 방법을 제시함
○ 수검초 및 α-asarone을 이용한 실용화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 국내산 수검초로부터 유효성분을 최대 추출하기 위한 최적추출방법 및 양산조건을 확립함으로써 원료의 개발과 기능성 제품의 생산효율에 기여함 • 수검초의 기능성 원료의 지표물질을 확립하고 표준화하여 기능성 식품 개발에 기여함 • 수검초를 이용한 제품을 개발하여 이의 제조공정을 확립하여 건강기능식품 개발에 기여함 • 수검초 기능성 식품의 기준 및 시험법을 확립하여 제품 개발에 기여함
○ 수검초 추출물을 이용한 예비인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> • 수검초를 이용한 인지기능 손상 억제 기능성 임상시험을 진행하여 차후 이와 관련된 기능개선 건강기능식품의 개발에 기여함

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발성과

(1) 연구개발결과의 성과 및 목표대비 실적

과학기술/학술적 연구성과 (단위 : 14건)											
구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문게재		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	1								1	
	달성	1							4		
2차 년도	목표	1							1		
	달성	1							3		
3차 년도	목표	2							2		
	달성	2	1						1		
계	목표	4							3	1	
	달성	4	1						8	0	

(2) 특허, 품종, 논문 등 지적재산권과 관련한 성과

1) 논문개재성과

전문학술지 논문개재 성과정보							
개재연월	논문제목	저자명	학술지명	권(호)	학술지구 분	sci여부	impact Factor
201208	Cognitive enhancing effects of alpha asarone in amnesic mice by influencing cholinergic and antioxidant defense mechanisms.	Kumar H, Kim BW, Song SY, Kim JS, Kim IS, Kwon YS, Koppula S, Choi DK.	Biosci Biotechnol Biochem	2012;76(8):1518-22	국외	SCI	1.206
201209	Promising Therapeutics with Natural Bioactive Compounds for Improving Learning and Memory – A Review of Randomized Trials	Kumar H, More SV, Han SD, Choi JY and Choi, DK	Molecules.	2012, 17, 10503-10539	국외	SCI	2.095
201208	The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism	Kumar H Lim HW, More SV, Kim BW, Koppula S, Kim IS, Choi DK.	Int J Mol Sci	2012;13(8):10478-504.	국외	SCI	2.339
201206	The role of bioactive compounds on the promotion of neurite outgrowth.	More SV, Koppula S, Kim IS, Kumar H, Kim BW, Choi DK.	Molecules.	2012 Jun 4;17(6):6728-53	국외	SCI	2.095
201309	Advances in neuroprotective ingredients of medicinal herbs by using cellular and animal models of Parkinson's disease.	More SV Kumar H, Kang SM, Song SY, Lee K, Choi DK.	Evid Based Complement Alternat Med.	2013;2013:957875	국외	SCI	2.175
201311	Traditional Korean East Asian medicines and herbal formulations for cognitive impairment	Kumar H, Song SY, More SV, Kang SM, Kim BW, Kim IS, Choi DK.	Molecules.	2013;18(12):14670-93.	국외	SCI	2.095
201401	Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases.	Kumar H, Kim IS, More SV, Kim BW, Choi DK.	Nat Prod Rep.	2014 Jan;31(1):109-39.	국외	SCI	10.715
201406	A novel synthetic HTB derivative, BECT inhibits lipopolysaccharide-mediated inflammatory response by suppressing the p38 MAPK/JNK and NF-κB activation pathways.	Kang SM, More SV, Park JY, Kim BW, In PJ, Yoon SH, Choi DK.	Pharmacol Rep.	2014;66(3):471-9.	국외	SCI	2.165
201501	α-Asarone attenuates microglia-mediated neuroinflammation by inhibiting NF kappa B activation and mitigates MPTP-intoxicated behavioral deficits in a mouse model of Parkinson's disease.	Kim BW, Kumar H, More SV, Koppula S, Han SD, Song SY, Kang SM, Kim IS, Choi DK.	Neuro-pharmacology	Submitted	국외	SCI	4.819

2) 특허출원성과

지식재산권 성과정보							
출원등록연월	재산권 구분	출원등록 구분	발명제목	출원등록인	출원등록국	발명자명	출원등록번호
20141031	특허	등록	수검초 추출물 및 알파 아사론을 포함하는 인지 기능 개선 및 치료용 조성물	건국대학교 산학협력단	대한민국	최동국, 헤몬트, 김병욱, 박영일	10-1458764
20120729	특허	출원	수검초 추출물 및 알파 아사론을 포함하는 인지 기능 개선 및 치료용 조성물	건국대학교 산학협력단	대한민국	최동국, 헤몬트, 김병욱, 박영일	10-2012-0074360
20131025	특허	출원	단일 화합물인 베타-아사론을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물	건국대학교 산학협력단	대한민국	최동국, 임형우, 김병욱, 송수열, 김인수	10-2013-0127675
20140929	특허	출원	알파아사론을 유효성분으로 함유하는 인지능력 개선용 조성물	건국대학교 산학협력단	대한민국	최동국, 김병욱	10-2014-0130045
20140929	특허	출원	알파아사론을 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 조성물	건국대학교 산학협력단	대한민국	최동국, 김병욱, 박정인, 김인수	10-2014-0130044

(3)산업지원성과

해당년도	기술지도	기술이전	기술평가	합계
2012	2			2
2013		1		1
2014				

1) 기술이전성과

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

: 수검초 추출물 및 알파아사론을 포함하는 인지기능 개선용 건강기능식품 제조기술을 (주)한일그린팜, (주)에당지앤비에 기술이전 하였음. (2013.02.04. ~ 2023.02.03)

(4) 인력지원성과

지원 총 인원	지원대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남자	여자	서울	수도권	기타지역
5	2	3	-	-	4	1	2		3

(5) 학술대회 논문발표

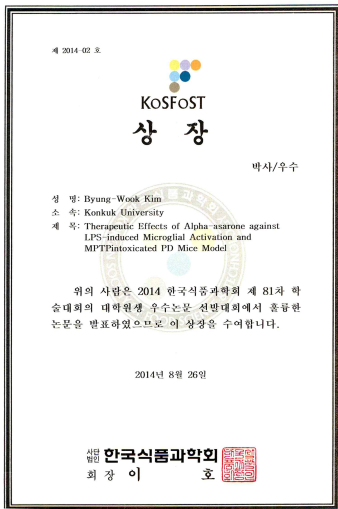
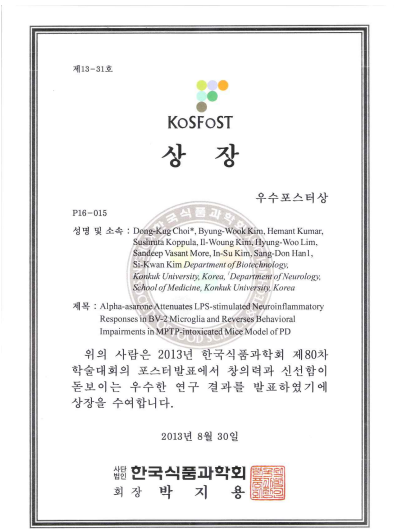
학술대회 논문발표 성과정보					
발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
201202	12 th International Congress of Entheopharmacology	Kumar Hemant, Byung-Wook Kim, Hyung-Woo Lim, Sushruta Koppula, Dong-Kug Choi*	Ameliorating effect of α - AA in LPS induced BV-2 microglia and MPTP-intoxicated mice: - Focus on neuroinflammation	국외학술대회	INDIA
201206	제 13회 한국분자세포생물학회	Hyoeng-Woo Lim, Seong-Mook Kang, Soon-Min Hong, Shin-Young Park, Dong-Kug Choi*	β - AA attenuates proinflammatory mediators through inhibiting NF- κ B signaling in LPS activated BV-2 microglia cells	국내학술대회	대한민국
201308	제 80차 한국식품과학회	Byung-Wook Kim, Hemant Kumar, Sushruta Koppula, Il-Woung Kim, Hyung-Woo Lim, Sandeep Vasant More, In-Su Kim, Sang-Don Han, Si-Kwan Kim, Dong-Kug Choi*	Alpha-asarone attenuates LPS-stimulated neuroinflammatory responses in BV-2 microglia and reverses behavior impairments in MPTP-intoxicated mice model of PD	국내학술대회	대한민국
201408	제 15회 한국분자세포생물학회	Byung-Wook Kim, Hemant Kumar, Sushruta Koppula, Il-Woung Kim, Hyung-Woo Lim, Sandeep Vasant More, In-Su Kim, Sang-Don Han, Si-Kwan Kim, Dong-Kug Choi*	Therapeutic effects of alpha-asarone against LPS-induced microglial activation and MPTP-intoxicated PD mice model	국내학술대회	대한민국
201408	제 15회 한국분자세포생물학회	Hyung-Woo Lim, Byung-Wook Kim, Hemant Kumar, Il-woung Kim, Jeong-In Park, Sandeep V. More, Si-Kwan Kim, Dong-Kug Choi*	β - AA attenuates pro-inflammatory mediators by inhibiting NF- κ B signaling and JNK patyway in LPS activated BV-2 microglia cells	국내학술대회	대한민국
201408	제 81차 한국식품과학회	Byung-Wook Kim, Hemant Kumar, Sushruta Koppula, Il-Woung Kim, Hyung-Woo Lim, Sandeep Vasant More, In-Su Kim, Sang-Don Han, Si-Kwan Kim, Dong-Kug Choi*	Therapeutic effects of alpha-asarone against LPS-induced microglial activation and MPTP-intoxicated PD mice model	국내학술대회	대한민국
201408	제 81차 한국식품과학회	Hyung-Woo Lim, Byung-Wook Kim, Hemant Kumar, Il-woung Kim, Jeong-In Park, Sandeep V. More, Si-Kwan Kim, Dong-Kug Choi*	β - AA attenuates pro-inflammatory mediators by inhibiting NF- κ B signaling and JNK patyway in LPS activated BV-2 microglia cells	국내학술대회	대한민국

(5) 기타성과

2013년 한국식품과학회 김병욱 “Alpha-asarone attenuates LPS-stimulated neuroinflammatory responses in BV-2 microglia and reverses behavioral impairments in MPTP-intoxicated mice model of PD”
제80차 한국식품과학회 학술대회 우수포스터상 수상 (2013.08.30.)

2014년 한국식품과학회 김병욱 “Therapeutic effects of α -Asarone against LPS-induced microglial activation and MPTP intoxicated PD Mice Model.”
제 81차 한국식품과학회 학술대회 대학원생 우수논문 선발대회 우수상 수상 (전국 2위) (2014.08.26.)

2014년 건국대학교 대학원 Hemant Kumar “Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases.”
건국대학교 대학원생 최우수학술상 (2014.08.22.)



2. 성과 활용계획

(1). 후속연구 계획

- 본 연구를 통하여 수검초의 뇌세포 보호 및 인지기능 강화 기능성 식품 원료 개발 가능성을 확인하였으며, 이를 이용하여 여러 제형의 시제품을 생산할 계획이다.
- 기본적인 추출물의 세포내 독성은 실험실 규모에서 확인하였지만, 기능성 원료 인증을 위한 자료 수집을 위해서는 대량의 동물모델을 이용한 독성시험이 필요함에 의하여 향후 후속연구로서 추출물에 대한 동물 독성연구가 필요한 실정이다.
- 본 연구에서 진행한 예비 인체 적용시험은 시험군이 매우 작고 투약기간이 짧아 효능에 대한 통계학적 유의성을 보기 어려웠으므로, 이후 추후 기간과 대상자를 늘려 진행하고 보다 정밀한 무작위 배정을 통해 오류가 발생하지 않도록 해야 할 것이다.
- 본 연구 결과 및 후속연구를 통하여 수검초의 독성 및 효능 결과를 취합하여 기능성 원료 인증을 취득할 계획이다.

(2). 성과 활용계획

- 본 과제를 통하여 1건의 기술이전을 실시하였으나, 향후 후속연구 및 이로 발생하는 기술들에 대하여서도 기술이전을 실시하여 수검초를 이용한 기능성 식품의 생산에 활용할 것이다.
- 국내외에서 요구가 높은 항염제 제조관련 천연물유래 신소재의 개발에 있어 전임상 시험이 완료하면 일반적인 *in vitro*만의 연구 수행에 비해 그 상품적 가치가 극대화된다.
- 현재 퇴행성신경질환을 근본적으로 치료할 치료방법, 치료약 개발이 미비한 실정이다. 성공적인 연구결과는 학문적 및 임상적으로 파급효과가 아주 크다고 할 수 있다.
- 본 연구결과는 기타 염증 관련 질환 등에도 공통적으로 적용되는 병리기전을 제시할 수 있을 것이며, 약물 작용점이나 치료, 예방법 개발에 응용될 수 있을 것이다.
- 연구결과의 성공적인 제품화를 통해 인구의 노령화와 더불어 급격하게 증가하는 퇴행성신경계질환으로 유발되는 사회적, 경제적 문제를 줄일 수 있다.
- 전임상을 마친 신소재의 확보로 의약, 식품, 화장품의 신제품 개발이 가능하다.
- 신경 손상 질환 환자를 위한 다양한 제품의 개발로 국민건강에 기여할 수 있다.
- 약용 식물자원로부터 고부가가치성 기능성제품화에 활용될 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 국내의 관련분야 환경변화

가. 신정보호 및 인지기능 개선 후보 소재인 수검초의 연구 동향

- 수검초(*Acorus gramineus* Soland)는 신농본초경, 본초강목, 향약집성방, 동의보감과 같은 옛 의학문헌에도 실려 있으며 두뇌를 맑게 한다는 총명탕의 원료로 사용되어져 왔다. 수검초는 노인성 치매, 진정효과, 소화촉진, 진통제, 이뇨제로 효과가 있다고 보고되어 왔다.
- 최근 발표된 연구논문 중 수검초를 재료로 사용한 한약에서 단기기억상실모델에서 아세틸콜린 분해효소(AChE)의 활성을 저해하고 행동실험에서 유의적인 결과를 획득하였으며(J Ethnopharmacol. 132(1), 70-74, 2010), 수검초로부터 분리된 페놀계열 조성물들이 항암 및 항염증 효능을 보인다고 발표하였다(Bioorg Med Chem Lett. 22(19), 6155-9, 2012).
- 또한 본과제의 α -asarone는 신정보호 효능(Limon ID등, Neurosci Lett. 453(2), 98-103, 2009) 및 본 연구진이 발표한 기억력보호(Kumar H 등, Biosci Biotechnol Biochem, 76(8), 1518-22, 2012) 외에도, 항경련 (Pages N 등, Neurosci Res, 68(4), 337-44, 2010), 과지방혈증(Garduno L 등, Journal of ethnopharmacology, 55(2), 161, 1997) 등과 같은 다양한 용도로도 연구되고 있다.
- 활성성분 중 하나인 Compound B는 진통제, 방향제, 구풍제, 해열제 등으로 왔다고 보고되었다. (Chang S.M 등, 학문당, Chinese Medicine Plant, 318-319, 1996). 이와 같이 다양한 용도로 연구가 진행되고 있는 수검초 및 그 유래성분을 이용하여 제품을 개발 한다면 시장 진입, 그리고 개별인정신청 및 획득이 용이할 것으로 사료된다.

나. 인지기능 개선 소재에 대한 최근 동향

(단위 : 백 만원)

구분	2005 (최근년도)	2006 ~2010	2011 ~2015	2016 ~2020	연평균 증가율	
					2005 ~2010	2010 ~2020
노인성질환	6,073,084	11,530,128	22,430,473	36,756,493	32.5%	31.4%
뇌혈관질환	450,906	566,782	721,709	788,057	7.2%	0.5%
암질환	1,560,810	1,995,166	2,705,052	3,327,007	7.9%	3.6%
심혈관질환	892,365	1,164,824	1,630,641	2,078,124	8.6%	4.4%

표 11. 2020년까지 주요 질환의 시장전망 (출처: FDA 분석 보고서)

- 건강에 대한 관심 증가, 고령화 가속화 등으로 건강기능식품에 대한 수요는 전 세계적으로 증가 추세에 있으며, 세계 건강기능식품 시장규모는 2010년 약 845억달러이며, 2016년

에는 1,235억달러까지 성장할 전망이다.

- 전세계 건강기능식품 시장에서 미국의 시장규모는 292억달러, 서유럽 157억달러, 일본 106억달러, 중국이 106억달러이며, 한국의 시장규모는 12억달러로, 전세계 시장의 1.4%를 차지하고 있으며, 국내 건강기능식품 시장은 연평균 27.4% 수준으로 성장하고 있다.

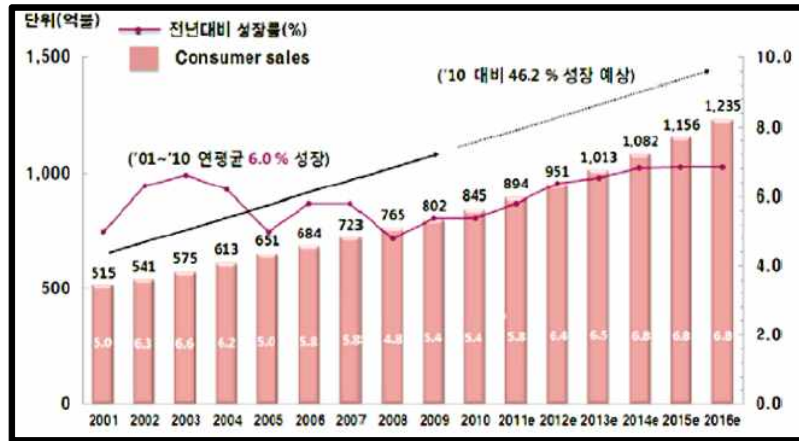


그림 61. Global Dietary Supplement 세계 시장 규모 및 전망
(출처: Nutrition Business Journal (2012))

- 세계 농림수산물 소재 건강기능식품 시장은 herbal & botanical extracts 47.4%, fish oils 35.3%, non-herbal extracts 16.1%로 구성되어 있다. Herbal & botanical extracts 시장은 주로 면역, 심혈관 건강, 에너지 증진, 정신건강 관련 기능성 소재가 관심영역이다.

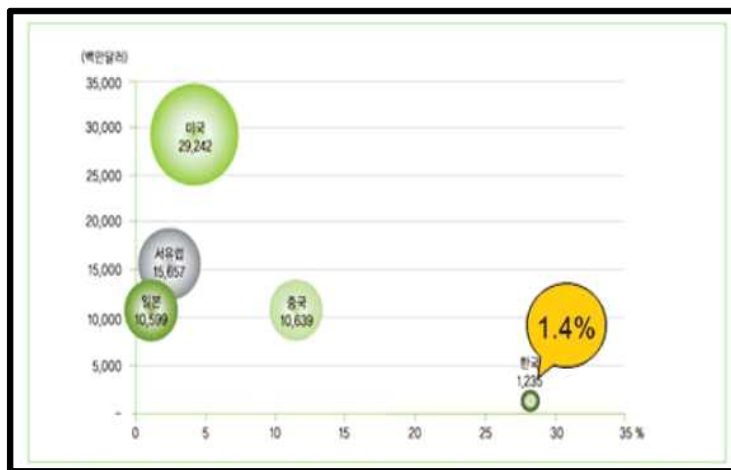


그림 62. 국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률
(출처: 식약청 건강기능식품 생산실적 및 분석결과 발표 보도자료(2012))

- 단일 허브추출물로 제조한 보충제의 경우 관심이 하강하고 있으며, 특정 질병 관련 성분들이 조합된 보충제가 유망하다.
- 염증억제 및 면역증대 소재로 echinacea, 콜레스테롤과 혈압 조절용 소재로 garlic, 정신건강과 혈행개선 소재로 ginkgo biloba, 에너지 증진소재로 ginseng, 전립선 건강 소재로 saw palmetto, 우울·불면 소재로 St. John's Wort 등이 있으며, 기타 중국전통의약품,

ayurvedic compounds 등의 소재가 있다.

○ Fish oils 시장은 주로 fish oils과 미세조류에서 추출한 PUFAs가 있으며, 성인과 소아를 대상으로 한 식품, 음료, 식이보충제에 활용되고 있다.

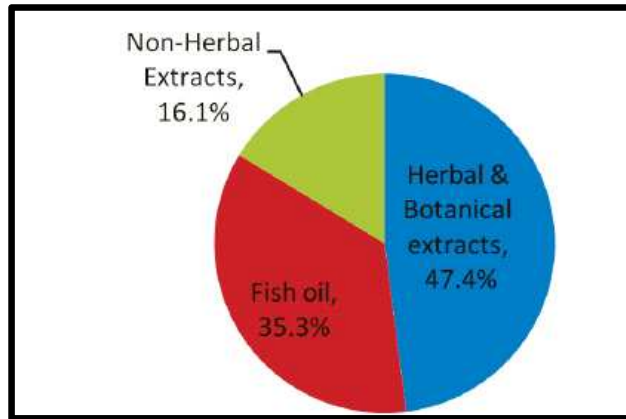


그림 63. 세계 Herbal & Related ingredients 시장
(출처: The Freedonia Group Inc.(2011))

○ 아래의 표는 신경변성질환, 기억력 증대, 인지기능 개선과 관련되어 최근 해외에서 사용되어 지고 있는 천연물 및 상세 효능에 관한 것을 정리·요약한 것이다.

표 12. Plants used in Europe in the context of age related CNS disorders

Plant	Family	Traditional use
Anacardium oriental auct. ex Steud.	Anacardiaceae	A 'Confectio Sapientum' – a 'wisdomcandy'
ArtemisiaabsinthiumL.	Asteraceae	Traditionally for lost or declining cognitive function
Caryophyllus spp.	Caryophyllaceae	Strengthen the brain and the memory
Convallaria majalis L.	Convallariaceae	A candy to treat fever and strengthen the brain, senses and memory
Coriandrum sativum L.	Apiaceae	Covered in a little sugar can be taken to strengthen head, brain and memory
Corydalis sp.	Papaveraceae	Several species used in folk medicine for treatment of memory dysfunction
Euphrasia officinalis complex Hayne	Orobanchaceae	Powdered herb when taken in wine may cure a 'stupid' brain and strengthens the brain
Ferula gummosa Boiss.	Apiaceae	Oil can be applied to the neck or drunk for improving memory
Matricaria recutita L.	Asteraceae	Flowers soaked in water. Drunk and used to wash feet to retain good memory
Melissa officinalis L.	Lamiaceae	To sharpen the senses and improve memory,

		strenghtens the brain, clears the head
Lavendula stoechas L.	Lamiaceae	To strengthen a 'stupid' and dizzy brain.
Ocimum basilicum L.	Lamiacea	for abdominal cramps, upset stomach, nervous migraine, memory, 'strengthens the heart and head' loss and forgetfulness
Origanum majorana Moench	Lamiaceae	To return lost speech and strengthen brain and memory, cleanses the brain
Peroselinum vulgare (Mill.) Nym. and A.W. Hill	Apiaceae	Soaked in good wine can improve brain function and memory
Rosmarinus officinalis L.	Lamiaceae	As a circulatory stimulant for improving concentration and memory. To stimulate the mind, in particular the memory. Used by herbalists and aromatherapists for memory problems
Salvia officinalis L.	Lamiaceae	Remedies help those who shiver and suffer the effects stroke and strengthen weak minds and memories, for a sensitive stomach, general debility, irregular menstruation and dementia
Syzygium aromaticum (L.) Merrill and Perry	Myrtaceae	Remedy against 'weakness of the brain', stroke and loss of memory

⌘ 13. Plants used in North America in the context of age related CNS disorders

Plant	Family	Traditional use
Erythroxylum catuaba A.J. Silva	Erythroxylaceae	It is used as aphrodisiac, stimulant of the CNS, for sexual impotence, general exhaustion, fatigue, poor memory and insomnia related to hypertension
Capsicum annuum L.	Solanaceae	Native healers blend these herbs assisting memory, as well as for
Centella asiatica (L.) Urban	Apiaceae	eczema, emphysema, asthma and other ailments of aging
Chrysanthemum sp.	Asteraceae	
Clematis sp.	Ranunculaceae	
Ginkgo biloba L.	Ginkgoaceae	
Larrea tridentata (Sess'e et Mo c.) Coville	Zygophyllaceae	
Oplopanax horridus Sm. Mic.	Araliaceae	
Rosmarinus officinalis L.	Lamiaceae	
Lachnanthes tinctoria Ell.	Haemodoraceae	A tincture of the roots was used against typhus and typhoid fevers, pneumonia, various and severe forms of brain diseases, rheumatic wry-neck and laryngeal cough

☒ 14. Plants used in Central America and the Caribbean Islands in the context of age related brain disorders

Plant	Family	Traditional use
<i>Brugmansia candida</i> Pers.	Solanaceae	Tea or decoction is used for memory problems
<i>Lantana camara</i> L.	Verbenaceae	Tea of the leaves is believed to prevent weakness of memory and enhances intellect and cognition
<i>Medicago sativa</i> L.	Fabaceae	To improve the memory, cure skin eruptions, kidney pain, cough, sore muscles and inflammation
<i>Tagetes lucida</i> Cav.	Asteraceae	To treat fever, fear, dementia, lightning stroke and as a diuretic
<i>Theobroma cacao</i> L.	Sterculiaceae	In a potion for stupor

☒ 15. Plants used in Asia in the context of age related CNS disorders

Origin	Plant	Family	Traditional use
India	<i>Aindrarasayana</i>		This preparation is considered to alleviate dementia This recipe is believed to prevent dementia, improve digestion and complexion
	<i>Acorus calamus</i> L.	Araceae	
	<i>Alternanthera sessilis</i> (L.) R. Br.	Amaranthaceae	
	<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Pennell	Scrophulariaceae	
	<i>Convolvulus pluricaulis</i> Choisy	Convolvulaceae	
	<i>Piper longum</i> L.	Piperaceae	
	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	Apiaceae	
	<i>Convolvulus pluricaulis</i> Choisy	Convolvulaceae	
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Fabaceae; Menispermaceae	
	<i>Tinospora cordifolia</i> Miers		
Brahmarasayana	<i>Acorus calamus</i> L.	Araceae	
	<i>Alternanthera sessilis</i> (L.) R. Br.	Amaranthaceae	
	<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Pennell	Schrophulariaceae	

	Baliospermum montanum (Willd.)	Euphorbiaceae	
	Boerhavia diffusa L.	Nyctaginaceae	
	Coelogyne evalis Lindl.	Orchidaceae	
	Emblica officinalis Gaertn.	Euphorbiaceae	
	Desmodium gangeticum (L.) DC.	Fabaceae	
	Embelia ribes (Roxb. ex. Willd.) DC.	Myrsinaceae	
	Polygonatum verticillatum (L.) All.	Liliaceae	
	Terminalia chebula Retz.	Combretaceae	
	Sida spinosa L.	Malvaceae	
	Semecarpus anacardium L. fil.	Anacardiaceae	
	Butea monosperma (Lam.) Taub	Fabaceae	The formula is recommended for a life span of 100 years, to preserve youth, full vigor and cognitive function
	Emblica officinalis Gaertn.	Euphorbiaceae	
	Piper longum L.	Piperaceae	
	Acorus calamus L.	Araceae	The plant is said to be capable of improving memory and intellect, treats various diseases including epilepsy and mental ailments
	Withania somnifera (L.) Dun.	Solanaceae	Withania somnifera is used in cases of debility from old age
China	Qingkailing (QKL)		QKL is not mentioned as 'traditional': Studies suggest that the most frequent causes of dementia associated with stroke are heat, phlegm and blood stasis syndromes. Treatment should re-establish the energy balance and remove the causes. QKL resolves phlegm and clears the heat
	Isatis tinctoria L.	Brassicaceae	
	Lonicera sp.	Caprifoliaceae	
	Pittosporum sp.	Pittosporaceae	
	Scutellaria sp. cow-bezoar	Lamiaceae	
	Coptis chinensis	Ranunculaceae	

	Franch.		cognitive and memory decline
	Huperzia serrata Thunb.	Lycopodiaceae	Huperzine A is found to be an active cognition enhancer that facilitates memory and motor activity in aged persons Qian Ceng Ta is a traditional Chinese formula to alleviate problems of memory loss. The formula is prepared from Huperzia serrata Huperzia serrata has been used and is still a component of various formulae in traditional Chinese medicine to alleviate problems of memory loss, fever, inflammation and for symptoms of aging
	Polygala tenuifolia Willd.	Polygalaceae	Effect upon the will and mental powers, improving understanding and strengthening the memory
Japan	Choto-san		The Choto-san formula is usually prescribed to middle-age patients of considerable build with a weak physical constitution as well as for chronic headache, painful tension of the shoulders and cervical muscle, vertigo, morning headaches, a heavy feeling of the head, feelings of uprising heat, tinnitus and insomnia
	Gypsum fibrosum	Sulphate mineral	
	Chrysanthemum sp.	Asteraceae	
	Citrus aurantium L.	Rutaceae	
	Glycyrrhiza glabra L.	Fabacea	
	Ledebouriella seseloides (Hoffm.) Wolff.	Apiaceae	
	Ophiopogon japonicus Thunb.	Convallariaceae	
	Panax ginseng C. A. Mey.	Araliaceae	
	Pinellia ternata Thunb.	Araceae	
	Poria cocos (Schw.) Wolff	Polyporaceae	
	Uncaria tomentosa Willd.	Rubiaceae	
	Zingiberis officinalis L.	Zingiberaceae	

- 현재 국내에서는 뇌세포 보호 및 인지기능 개선에 대한 기능성 식품은 미비한 실정이다. 그러나 해외의 경우 아래의 그림과 같은 여러 유형의 기능성 식품이 판매되고 있는 실정이다.



그림 64 . 해외에서 판매되고 있는 뇌세포 보호 및 인지기능 개선 기능성 식품군

○ 본 연구에서 사용되어진 수검초를 함유하는 해외 여러 제품을 분석하여 요약·정리한 것이다.

표 16. *Acorus gramineus* used in the functional food

	Functions	Indications	Ingredients
	<p>helps to energize the body and sharpens intelligence.</p>		<p>Ferula asafoetida linn Zingiber officinalis Roscoe Piper longum Piper nigrum linn Acorus gramineus Soland Alum Milk Butter Vitis vinifera Phoenix dactilyfera Oryza sativum</p>
	<p>Regulates Communication between Heart and Kidney, Calms the Shen, Stabilizes Jing-essence, Astringes the Leakage of Fluids</p>	<p>Urinary disorders, especially with incontinence</p>	<p>Os draconis Chinemys reevesii shell-prep Tenodera sinensis egg-case Panax ginseng root Poria cocos fungus, Acorus gramineus rhizome Angelica sinensis root Polygala tenuifolia root</p>
	<p>Tonifies Yin, Nourishes Blood, Calms the Hun and Shen, Subdues Liver Yang, Clears Deficiency Heat, Regulates Qi and Blood</p>	<p>Emotional or psychological disorders.</p>	<p>Margaritifera concha shell Polygonum multiflorum vine Ligustrum lucidum fruit Salvia miltiorrhiza root Eclipta prostrata herb Cuscuta chinensis seed Albizia julibrissin bark Rehmannia glutinosa root-raw Schisandra chinensis fruit Acorus gramineus rhizome.</p>
	<p>To be used as a supplement to a balanced diet during bouts of depression, unhappiness or pre-menstrual tension.</p>		<p>Bupleurum chinense Radix Curcuma long Tuber Triticum aestivum Fructus Zizyphus jujuba Fructus Glycyrrhizae uralensis Radix Citrus aurantium Fructus Mature Salvia miltiorrhiza Radix Draconis os (Stegodon orientalis) Ostrea gigas Concha Acorus gramineus Rhizoma Paeoniae lactiflorae Radix</p>

제 7 장 참고문헌

- 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 8, 131-168.
- Bessler, H., Djaldetti, R., Salman, H., Bergman, M., and Djaldetti, M. (1999). IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* 53, 141-145.
- Block, M.L., and Hong, J.S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76, 77-98.
- Boche, D., Perry, V.H., and Nicoll, J.A. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 3-18.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., and van Noort, J.M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 1013-1021.
- Carson, M.J. (2002). Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications for multiple sclerosis. *Glia* 40, 218-231.
- Eikelenboom, P., Bate, C., Van Gool, W.A., Hoozemans, J.J., Rozemuller, J.M., Veerhuis, R., and Williams, A. (2002). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia* 40, 232-239.
- Floyd, R.A. (1999). Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med* 26, 1346-1355.
- Gao, H.M., and Hong, J.S. (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol* 29, 357-365.
- Gao, H.M., Jiang, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J.S., and Liu, B. (2002). Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 81, 1285-1297.
- Griffiths, M.R., Gasque, P., and Neal, J.W. (2009). The multiple roles of the innate immune system in the regulation of apoptosis and inflammation in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 217-226.
- Hunot, S., Boissiere, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (1996). Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 72, 355-363.
- Kang SM, More SV, Park JY, Kim BW, In PJ, Yoon SH and Choi DK, (2014) A novel synthetic HTB derivative, BECT inhibits lipopolysaccharide-mediated inflammatory response by suppressing the p38 MAPK/JNK and NF-kappaB activation pathways. *Pharmacol Rep* 66:471-479.
- Kaur, C., Sivakumar, V., Zou, Z., and Ling, E.A. (2012). Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain. *Brain Struct Funct*.
- Konsman, J.P., Parnet, P., and Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 25, 154-159.
- Kumar H, Kim BW, Song SY, Kim JS, Kim IS, Kwon YS, Koppula S and Choi DK, (2012) Cognitive enhancing effects of alpha asarone in amnesic mice by influencing cholinergic and antioxidant defense mechanisms. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:1518-1522 .
- Kumar H, More SV, Han SD, Choi JY and Choi DK, (2012) Promising therapeutics with natural bioactive compounds for improving learning and memory--a review of randomized trials.

Molecules 17:10503–10539.

- Kumar H, Lim HW, More SV, Kim BW, Koppula S, Kim IS and Choi DK, (2012) The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci* 13:10478–10504.
- Kumar H, Song SY, More SV, Kang SM, Kim BW, Kim IS and Choi DK, (2013) Traditional Korean East Asian medicines and herbal formulations for cognitive impairment. *Molecules* 18:14670–14693.
- Kumar H, Kim IS, More SV, Kim BW and Choi DK, (2014) Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat Prod Rep* 31:109–139 .
- Lee, S.J., and Lee, S. (2002). Toll-like receptors and inflammation in the CNS. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1, 181–191.
- More SV, Koppula S, Kim IS, Kumar H, Kim BW and Choi DK, (2012) The role of bioactive compounds on the promotion of neurite outgrowth. *Molecules* 17:6728–6753.
- More SV, Kumar H, Kang SM, Song SY, Lee K and Choi DK, (2013) Advances in neuroprotective ingredients of medicinal herbs by using cellular and animal models of Parkinson's disease. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:957875.
- Mrak, R.E., and Griffin, W.S. (2001). Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22, 903–908.
- Perry, R.T., Collins, J.S., Wiener, H., Acton, R., and Go, R.C. (2001). The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22, 873–883.
- Reynolds, A., Laurie, C., Mosley, R.L., and Gendelman, H.E. (2007). Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* 82, 297–325.
- Rogers, J., Strohmeyer, R., Kovelowski, C.J., and Li, R. (2002). Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 40, 260–269.
- Rossi, F., and Bianchini, E. (1996). Synergistic induction of nitric oxide by beta-amyloid and cytokines in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 474–478.
- Sawada, M., Imamura, K., and Nagatsu, T. (2006). Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 373–381.
- Shibata, N., and Kobayashi, M. (2008). The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain Nerve* 60, 157–170.
- Skaper, S.D. (2007). The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. *Ann N Y Acad Sci* 1122, 23–34.
- Smith, J.A., Das, A., Ray, S.K., and Banik, N.L. (2012). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 87, 10–20.
- Soane, L., Cho, H.J., Niculescu, F., Rus, H., and Shin, M.L. (2001). C5b-9 terminal complement complex protects oligodendrocytes from death by regulating Bad through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Immunol* 167, 2305–2311.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335–376.
- Takuma, K., Tanaka, T., Takahashi, T., Hiramatsu, N., Ota, Y., Ago, Y., and Matsuda, T. (2012). Neuronal nitric oxide synthase inhibition attenuates the development of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-Parkinsonian rats. *Eur J Pharmacol* 683, 166–173.
- Tansey, M.G., McCoy, M.K., and Frank-Cannon, T.C. (2007). Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic

intervention. *Exp Neurol* 208, 1-25.

Wake, H., Moorhouse, A.J., and Nabekura, J. (2011). Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron Glia Biol* 7, 47-53.

Winter, C.D., Iannotti, F., Pringle, A.K., Trikkas, C., Clough, G.F., and Church, M.K. (2002). A microdialysis method for the recovery of IL-1beta, IL-6 and nerve growth factor from human brain in vivo. *J Neurosci Methods* 119, 45-50.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.