

제 출 문

농산자원을 이용한 비melatonin계 건강수면식품의 개발 (Development of non-melatonin type sleep enhancing foods from agricultural resources)

농림수산물부 장관 귀하

이 보고서를 “농산자원을 이용한 비melatonin계 건강수면식품의 개발” 과제(세부과제 “비melatonin계 건강수면식품의 개발”, 협동과제 “수면증진 소재의 임상평가”, 위탁과제 “수면증진 소재의 작용기작 연구”)의 보고서로 제출합니다.

비melatonin계 건강수면식품의 개발 (세부과제)
(Development of non-melatonin type sleep enhancing foods)

수면증진 소재의 임상평가 (협동과제)
(Human trials of sleep enhancing materials)

수면증진 소재의 작용기작 연구 (위탁과제)
(Study on mechanism of sleep enhancing materials)

2010년 5월 29일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
주관연구책임자 : 김영명
세부연구책임자 : 김영명
연구 원 : 조승목 한찬규
도정룡 김병목
정철균 양혜진

협동연구기관명 : 가톨릭대학교 의과대학
협동연구책임자 : 홍승철
연구 원 : 강현실

위탁연구기관명 : 디지털지노믹스(주)
위탁연구책임자 : 황상준
연구 원 : 유창혁

참여기업명 : (주)아프로플렌

한국식품연구원

농 립 수 산 식 품 부

요 약 문

I. 제 목

농산자원을 이용한 비melatonin계 건강수면식품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

수면증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 국내 농산자원의 수면증진 효과를 세포, 동물 및 임상실험을 통해 과학적으로 규명하며, 효과가 우수한 농산자원을 선정하여 기능성분의 분리·동정 및 제조 조건의 최적화 연구를 통해 부가가치가 높은 수면증진 식품을 개발하고자 하였다.

2. 연구개발의 필요성

수면은 인간 수명의 1/3을 차지하고 있으며 가장 근본적이고 필수적인 생리현상으로 건강 유지 및 정신적 안정에 있어 매우 중요한 요소이다. 세계 인구의 30% 정도가 불면증을 경험하고 있으며 10%는 만성적인 불면증을 겪고 있을 만큼 수면장애가 큰 문제가 되고 있으며, 국내의 경우도 불면증이 빠르게 증가하여 선진국 수준에 근접하고 있다. 서구 선진국에서는 자연요법에 대한 관심이 높아짐에 따라 수면보조제(sleep aids)의 시장이 확대되고 있으며, 2013년에는 75,900만 달러(1조 2천억 원) 규모로 성장할 것으로 전망되고 있다. 현재 국내의 수면증진 기능성식품의 시장은 형성단계에 있다고 볼 수 있는데 현재 국내 불면증의 급격한 증가 추세를 감안할 때 향후 5년 이내에 년 500억 원 이상의 시장 형성이 가능할 것으로 예상된다. 따라서 우리나라의 민간요법 및 한방 고문헌에서 알려진 국내 농산자원의 수면증진 효과를 탐색하고 과학적으로 입증된 우수한 제품의 개발이 긴요한 실정이다. 또한 서구 선진국에 비해 식품 및 한방 소재의 수면증진 효과에 대한 연구가 활성화 되어 있지 못해 식품성분의 수면증진 효과 평가체계를 확립하고 이를 통해 고부가가치 수면증진 제품을 개발하는 것은 매우 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 수면증진 소재의 in vitro/vivo 효능 평가 및 제조조건의 최적화 (세부과제)

수면증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 국내 농산자원을 선정하기 위하여 동의보감 등 고문헌, 민간에서 전해오는 요법 및 전문가 자문을 통해 20종을 선정하였다. 원료의 활성을 탐색하기 위하여 물과 에탄올로 각각 추출물을 제조하였으며, 수면과 관련이 깊은 GABA_A-benzodiazepine 및 5-HT_{2C} receptor binding assay를 수행하였다. GABA_A 및 5-HT_{2C} receptor에 활성을 가지는 소재를 대상으로 pentobarbital을 이용한 수면유도 실험과 뇌파(EEG) 및 근전도도(EMG) 분석을 통한 수면구조 분석을 통해 in vivo 수면증진 효과를 평가하였다. 또한 최초의 연구내용에서 추가로 분리정제 연구를 수행하였다. 분리된 활성성분은 in vitro 및 vivo 실험을 통해 그 수면증진효과를 규명하였다. 또한 임상평가를 위해 급성경구독성 시험 및 의사결정도 기법을 활용한 안전성을 검토하였다. 활성이 높은 소재를 제조하기 위하여 반응표면분석법을 이용하여 추출공정을 최적화하였다.

2. 수면증진 소재의 임상 평가 (협동과제)

임상시험에 앞서 20세 이상 성인 남·여 247명을 모집단으로 하여 불면증 및 수면 유도 식품과 관련된 설문조사를 실시하였다. 2010년 2월에서 5월까지 불면이 주 3회 이상 있다고 한 불면증 환자 19명과 신체질환이나 수면장애가 없는 지원자 22명을 정상 대조군으로 하였다. 환자군에게는 수면다원검사(PSG:Polysomnography) 검사 전 최소 14일간 어떤 약물도 복용하지 않도록 하였고 진찰을 통해 내과적 질환이나 신경과적 질환이 없음을 확인하였다. 수면장애정도와 수면패턴을 알아보기 위해 불면증 평가에 흔히 사용하는 PSQI 설문지를 하였다. 환자군에게 복용 전과 후에 PSG를 실시하였다. 모든 연구대상자들에게 연구의 내용과 방법 등을 본인 및 보호자에게 설명한 후 서면동의를 받았고 연구기간동안 가톨릭 중앙의료원 임상연구 관리규정을 준수하였다.

3. 수면증진 소재의 작용기작 연구 (위탁과제)

수면증진 및 건강수면 유도와 관련된 분자생물학적 기작 규명을 위해 Microarray를 이용한 분석방법을 채택하였으며 이를 통해 건강수면 유도효과와 관련된 pathway 및 관련 유전자를 추출하고 분자수준에서 유전자 및 pathway간 상관관계를 분석하였다.

IV. 연구개발 결과

1. 수면증진 소재의 in vitro/vivo 효능 평가 및 제조조건의 최적화 (세부과제)

20종의 식품 및 한방소재를 탐색하여 감초 및 단삼의 GABA_A-benzodiazepine receptor 결합 억제활성과 인삼, 홍삼, 합환피 및 신선초의 5-HT_{2C} receptor 결합 억제활성을 확인하였다. 제조단가 및 동물 수면증진 효과를 고려하여 감초와 합환피를 최종 소재로 선정하였다. 반응표면분석법을 이용하여 도출된 감초의 최적조건은 에탄올 농도(X_1) = 29.3%, 추출 시간(X_2) = 12.0 hr, 추출 온도(X_3) = 41.2°C였으며, 합환피의 최적조건은 에탄올 농도(X_1) = 60.3%, 추출 시간(X_2) = 57.9 hr, 추출 온도(X_3) = 20°C였다. 감초와 합환피 에탄올 추출물이 pentobarbital 수면유도 실험 및 수면구조 분석을 통해 유의적인 수면증진 효과를 확인하였다. 또한 감초 및 합환피 추출물에 대한 급성경구독성시험을 수행한 결과 사망사례가 없었으며 대조군과 같이 정상적인 체중 및 증상을 보였다. 감초 에탄올 추출물로부터 5개의 유효성분(glabrol, glabridin, kanzonol U, abyssinine II, isoliquiritigenin)을 동정하였으며, 합환피로부터는 15개의 단일물질을 얻었다. 감초의 isoliquiritigenin은 GABAA receptor의 agonist로써 세포의 억제성 신경전달을 증대시켜 수면증진 효과가 있다는 것을 brain slice patch 및 in vivo 수면증진 효능 평가를 통해 처음으로 입증하였다. 반면에 합환피 성분들의 경우 세포 내 칼슘 농도를 억제시키지 못하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 개발된 수면증진 소재를 수면제 및 2 종류의 시판품과 비교한 결과 2종류의 시판품 보다 좋은 효과를 나타내어 산업화 성공 가능성이 높을 것으로 사료된다.

2. 수면증진 소재의 임상 평가 (협동과제)

건강수면식품 복용 후 불면증이 증상이 주관적 평가에서는 첫째, 잠이 오는데 걸리는 시간이 단축되었고 둘째, 총수면시간의 증가 셋째, 자신의 수면에 대한 만족이 증가하였다. 건강수면식품 투여 후 수면다원검사에 의한 불면증 증상이 객관적 평가에서는 알은 수면(1단계 수면)이 줄어들었다. 이전 연구결과에서 마찬가지로 수면다원검사에서 불면증의 증상호전에 대한 평가는 한계가 있었으며(일반적으로 불면증의 진단 및 평가를 위해서 수면다원검사를 반드시 시행되어야 하는 것은 아니며 따라서 검사로서 추천되지는 않음, 미국수면학회(AASM, 2003)) 환자의 주관적인 평가에 의해 불면증의 호전 여부를 보는 설문지 평가에서는 건강수면식품 투여 후 불면 증상의 호전과 수면에 대한 불만족이 감소하였다.

3. 수면증진 소재의 작용기작 연구 (위탁과제)

두 종류의 한약재 감초(GCh)와 합환피(HHP)를 rat에 각 3시간 경구투여한 후, 시상하부(hypothalamus, Hy) 및 기저전뇌(basal forebrain, BF)에서 수면 관련 효과를 분석하기 위하여 유전자 수준에서의 발현양상을 분석하였다. 두 종류의 한약재를 비교한 결과, 약재의 작용보다는 조직 특이적인 발현 양상이 있는 것으로 나타났으며, 시상하부에서 감초에 의한 생물학적 이벤트가 더 있는 것으로 나타났다. 기존의 연구결과로부터 수면 관련 유전자를 추출하고, 본 연구에서 감초에 의해 발현 차이가 있는 유전자 중 neuropeptide Y 및 receptor Y1 그리고 Y5 유전자를 후보 유전자로 선정하였다. 본 유전자 그룹이 수면과 관련하여 주요 작용점(mode of action)에 있을지 여부는 추가적인 검증실험이 요구된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

그 동안 수면증진 효과가 보고되지 않았던 감초와 합환피의 수면증진 효과를 과학적으로 입증하였다. 특히 국내뿐만 아니라 세계적으로 널리 활용되고 있는 감초에서 flavonoid 성분인 isoliquiritigenin이 GABA_A receptor에 결합하여 synaptic inhibition을 증대시켜 수면증진 효과를 나타내는 것을 처음으로 입증하였다. 본 연구개발을 통해 다양한 in vitro 및 vivo 수면증진 효과 평가체계를 구축할 수 있었다.

2. 성과활용 계획

본 연구개발에 따른 논문 및 특허는 현재 심사 및 출원 중이며, 개발된 기술은 참여 기업에 기술이전하여 산업화를 할 계획이다. 또한 감초의 수면증진 효과를 나타내는 성분인 isoliquiritigenin에 대한 논문을 준비하여 게재시에는 홍보를 적극적으로 할 계획이다.

SUMMARY

I . Title

Development of non-melatonin type sleep enhancing foods from agricultural resources

II . Objectives and Importance of the Project

Insomnia is a widespread health complaint and the most common sleep disorder. Approximately 10% to 15% of adult population suffers from chronic insomnia, and additional 25% to 35% have transient or occasional insomnia. Conventional pharmacological treatments for insomnia include benzodiazepines (GABA_A receptor agonists), antidepressants (5-HT receptor antagonists) and antihistamines. However, the use of these sedative-hypnotic drugs beyond four weeks is generally not recommended because of their various side-effects such as impaired cognitive function, memory and general daytime performance. In addition, long term administration results in tolerance and dependence. In recent years, herbal sleep aids are becoming popular as an alternative to prescription drugs to improve sleep quality and avoid side-effects. In western societies, herbal sleep aids such as valerian (*Valeriana officinalis*), St. John's wort (*Hypericum perforatum*), passion flower (*Passiflora incarnata*), hops (*Humulus lupulus*) and kava kava (*Piper methysticum*) are readily available. It has been suggested that these herbal extracts induce sedative-hypnotic effects by regulating neurotransmission such as GABAergic or serotonergic systems in the central nervous system. There are many medicinal plants used traditionally for treatment of insomnia in Korea. However, scientific evidence and precise mechanism for hypnotic activity of those and other oriental medicinal plants have not been fully investigated. In Korea, finding the suitable herbal sleep aids is in high demand due to the limited availability of the western herb preparations.

III . Contents and Scopes of the Research

Subject 1. In *vitro/vivo* evaluation of sleep enhancing effects and processing optimization of sleep enhancing materials

In the present study, we investigated twenty medicinal plants used traditionally for treatment of insomnia in Asia, mainly in Korea. Binding inhibition of the medicinal plant extracts (water and ethanol) for GABA_A and 5-HT_{2C} receptors was evaluated. The hypnotic activities of the ethanol extracts of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) and silk tree (*Albizia julibrissin* Durazzini) with high binding affinity to GABA_A and 5-HT_{2C}, respectively, were evaluated by the pentobarbital-induced sleep test in mice and analysis of sleep structure (NREM, REM sleep) in rat. In order to identify active compounds, the ethanol extracts of licorice and silk tree were separated and purified as the binding activity.

Subject 2. Human trials of sleep enhancing materials

Questionnaires about insomnia and sleep enhancing materials were filled in by a group of 247 males and females selected from those who were over 20 years old before undergoing clinical trials. 19 patients who replied that they suffered from insomnia 3 times or more per week from February to May 2010 and 22 volunteers who had neither physical disease nor sleep disorder were selected as a control group. The patient group was composed of 19 people (PSG: Polysomnography testers: 10); The patient group was kept from taking any medication for a minimum of 14 day period before PSG testing and confirmed through medical examination that they did not have any internal disease or psychological disorder. The common evaluation method for insomnia, the PSQI questionnaire was chosen to find out the level of sleep disorders and sleep patterns. They were examined to baseline and 1 after week. Hand-written signatures were collected from the participants or their guardians after the content and methodology of research were explained to them and clinical research regulations of Catholic Medical Center were observed during the research period.

Subject 3. Analysis on mechanism of sleep enhancing materials

IV. Results of the Research

Subject 1. In *vitro/vivo* evaluation of sleep enhancing effects and processing optimization of sleep enhancing materials

In the GABA_A receptor binding assay, the most active extracts were ethanol extracts of licorice (LE) and danshen (DE), which displaced over 90% of [³H] flumazenil binding at a concentration of 10 mg/ml. The IC₅₀ values of LE and DE were 0.064 mg/ml and 0.137 mg/ml, respectively. The ethanol extracts of ginseng (GE) and silk tree (SE) showed an effective binding activity in the 5-HT_{2C} assay. The IC₅₀ values of GE and SE were 0.064 mg/ml and 0.137 mg/ml, respectively.

The oral administration of LE and SE produced a dose-dependent decrease in sleep latency and increase in sleep duration in mice treated with hypnotic dose (45 mg/kg) of pentobarbital. LE significantly decreased sleep latency ($p < 0.01$) and increased sleep duration ($p < 0.05$) at a high dose of 1,000 mg/kg, compared to the control group. The significant hypnotic activity of SE was observed at 500 ($p < 0.05$) and 1,000 ($p < 0.01$) mg/kg. However, lower doses (100 and 250 mg/kg) of both LE and SE had no significant hypnotic effect. The administration of LE, SE and their combination produced decrease in sleep latency and increase in NREM sleep in rats.

To investigate the hypnotic activity of LE and SE when administered together, the concentration of each extract was chosen at low dose of 250 mg/kg, at which each extract did not significantly potentiate the pentobarbital-induced sleep. LE and SE alone did not affect both sleep latency and sleep duration. However, co-administration of LE and SE showed a significant hypnotic activity ($p < 0.05$). Combination of LE and SE was more effective on the shortening in sleep latency and increasing in sleeping duration than commercial product A and B.

Oral acute toxicity tests in ICR mice were conducted evaluate the toxicity of LE, SE and their combination respectively. no deaths occurred in all the tested groups during 14 day observation period. There were also no abnormalities in the general conditions, body weight changes and on necropsy findings in all groups.

The five active compounds (glabrol, glabridin, abyssinone II, kanzonol U, isoliquiritigenin)

were isolated from ethanol extract of licorice. We demonstrated that isoliquiritigenin have hypnotic effect modulating GABA_A receptor in the brain slice patch and pentobarbital-induced sleep test in mice. We have isolated twelve single compounds from extracts of silk tree, but all compounds did not inhibit the Ca²⁺ signal.

Subject 2. Human trials of sleep enhancing materials

The subjective test on insomnia symptoms after taking SEM (sleep enhancing materials) shows: First, the time to first sleep entry was shortened. Second, total sleep time increased. Third, self satisfaction with sleep increased. According to the objective test result of insomnia symptoms caused by PSG (Polysomnography), light sleep (stage 1 sleep) decreased after administrating of SEM. Alike previous research results, PSG assessment of improvement in insomnia symptoms. According to the questionnaire assessment asking patients whether they recovered from insomnia using the subjective evaluation by patients themselves, discontent with their sleep decreased and insomnia symptoms improved after administrating of SEM.

Subject 3. Analysis on mechanism of sleep enhancing materials

We have studied gene expression pattern for analysing sleep related effects in basal forebrain and hypothalamus after oral administration of licorice and silk tree to rats. As a result of comparison among two components, we have founded specific expression pattern in tissues more than drugs and founded biological events under the gene level with licorice in hypothalamus. Therefore, we have chose neuropeptide Y, receptor Y1 and Y5 as the candidate genes among the genes that showing difference expression pattern. We think that it need additional study to investigate mode of action related sleep in this gene group as above.

V. Research Achievements and Their Application Plans

We demonstrated that LE and SE display effective binding activities to GABA_A-benzodiazepine and 5-HT_{2C} receptors, respectively, and produce hypnotic activity in the

pentobarbital-induced sleep. Therefore, LE and SE or their combination preparation might provide a useful means for the treatment of insomnia. Especially, We demonstrated that isoliquiritigenin has hypnotic effect potentiating synaptic inhibition of neuron by modulation of GABA_A receptor using brain slice patch and pentobarbital-induced sleep test in mice.

CONTENTS

Chapter 1. General Introduction of the Research Project	19
Section 1. Objectives of the Research	19
Section 2. Necessities of the Research	19
1. Research Background	19
2. Industrial and Economic Necessities	21
3. Scientific and Technical Necessities	23
Section 3. Scopes of the Research	24
1. The Final Purpose of the Research	24
2. Annual Research Contents	25
Chapter 2. Current Status of R&D in Domestic and Overseas	26
Section 1. Patents	26
Section 2. Research Papers	29
Section 3. Significances and Position of the Research	32
Chapter 3. Contents and Results of the Research and Development	33
[Research Part 1] <i>In vitro/vivo</i> Evaluation of Sleep Enhancing Effects and Optimization of Processing Conditions	33
Section 1. Introduction	33

Section 2. Materials and Methods	34
1. Materials	34
2. Preparation of Extracts	35
3. Animals	36
4. GABA _A -Benzodiazepine Receptor Binding Assay	36
5. 5-HT _{2C} Receptor Binding Assay	37
6. Decision Tree for Safety Assessment	38
7. Acute Oral Toxicity Test	40
8. Pentobarbital-Induced Sleep Test	40
9. Analysis of Sleep Structure	41
10. Response Surface Methodology	43
11. Separation and Purification	45
12. Statistical Analysis	45
Section 3. Results and Discussion	46
1. Binding Activities in the GABA _A and 5-HT _{2C} receptor	46
2. Processing Optimization Using Response Surface Methodology	59
3. Evaluation of <i>In Vivo</i> Sleep-Enhancing Effects	79
4. Acute Oral Toxicity Test and Safety Assessment	102
5. Separation and Purification	111
Section 4. Conclusions	138

[Research Part 2] Human Trials of Sleep Enhancing Materials 139

Section 1. Introduction	139
Section 2. Materials and Methods	140
1. Materials	140
2. Preparation of Sleep Enhancing Materials	140
3. Survey for Insomnia and Sleep Enhancing Foods	140
4. Human Trials	140
5. Statistical Analysis	143

Section 3. Results and Discussion	144
1. Results of Survey	144
2. Human Trials	147
Section 4. Conclusions	155

[Research Part 3] Analysis on Mechanism of Sleep Enhancing Materials ... 156

Section 1. Introduction	156
Section 2. Materials and Methods	156
1. Materials	156
2. Quality Control	157
3. Sample Labeling and Hybridization	157
4. Scan and Data Analysis	158
Section 3. Results and Discussion	159
1. Study for Mechanism of Sleep Enhancing Materials	159
Section 4. Conclusions	184

Chapter 4. Goal Accomplishments and Contributions 186

Chapter 5. Research Achievements and Their Application Plans 189

Chapter 6. Scientific Information from Abroad 192

Chapter 7. References 193

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	19
제 1 절 연구개발의 목적	19
제 2 절 연구개발의 필요성	19
1. 연구 배경	19
가. 수면의 중요성	19
나. 국내외 불면증 현황	19
2. 산업·경제적 필요성	21
가. 수면경제(Sleeponomics)의 대두	21
나. 수면증진 기능성식품(Natural sleep aids)의 성장	21
다. 국내 수면증진 기능성식품 현황	22
3. 과학·기술적 필요성	23
가. 국내 농산자원의 과학적인 수면증진 효과 검증	23
나. 창의적인 융합/협동 연구의 필요성	24
제 3 절 연구개발의 범위	24
1. 연구개발의 최종목표 및 주요 연구내용	24
2. 연차별 연구개발 목표 및 내용	25
제 2 장 국내외 기술개발 현황	26
제 1 절 국내외 특허 현황	26
1. 해외 특허 현황	26
2. 국내 특허 현황	28
제 2 절 국내외 논문 현황	29
1. 해외 논문 현황	29
2. 국내 논문 현황	31
제 3 절 본 연구개발의 의의 및 기술수준 비교	32

1. 본 연구개발의 의의	32
2. 본 연구개발 관련 국내외 기술수준 비교	32

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	33
-----------------------------	----

[세부] 수면증진 소재의 <i>in vitro/vivo</i> 효능 평가 및 제조조건의 최적화	33
--	----

제 1 절 서 론	33
제 2 절 재료 및 방법	34
1. 탐색 대상 원료의 선정	34
2. 추출물의 제조	35
3. 실험 동물	36
4. GABA _A -benzodiazepine receptor binding assay	36
5. 5-HT _{2C} (Serotonin type 2C) receptor binding assay	37
6. 의사결정도 기법을 이용한 안전성 검토	38
7. 급성경구독성 시험	40
8. Pentobarbital 수면유도 실험	40
9. 설치류 수면구조 분석	41
10. 반응표면분석법 (Response Surface Methodology)	43
11. 분리정제	45
12. 통계처리	45
제 3 절 연구 결과 및 고찰	46
1. 수면 관련 신경전달물질 수용체 결합력 분석	46
가. 수면증진 소재의 탐색 방법 설정	46
나. GABA _A -benzodiazepine receptor 결합력 분석	48
다. 5-HT _{2C} (Serotonin type 2C) receptor	55
2. 반응표면분석법(RSM)을 이용한 제조조건의 최적화	59
가. 반응표면모텔식의 도출 및 진단	59
나. 종속변수에 대한 독립변수의 영향	68
다. 최적 제조조건의 설정 및 검증	73
라. 최종 추출물의 동물 수면증진 효과 비교 및 소재선정	77

3. 감초 및 합환피 에탄올 추출물의 <i>in vivo</i> 수면증진 효과	79
가. Pentobarbital 유도 수면에 대한 상승 효과	79
나. 수면구조 분석을 통한 수면증진 효과 분석	89
다. 수면제 및 주요 시판품과의 수면증진 효과 비교	98
4. 급성경구독성 시험 및 안전성 검토	102
가. 급성경구독성 시험	102
나. 의사결정도 기법을 이용한 안전성 검토	105
5. 감초 및 합환피 에탄올 추출물의 분리·정제	111
가. 감초 에탄올 추출물의 분리·정제	111
나. 합환피 에탄올 추출물의 분리정제	133
제 4 절 결 론	138

[협동] 수면증진 소재의 임상평가 139

제 1 절 서 론	139
제 2 절 재료 및 방법	140
1. 재료	140
2. 수면증진 소재 제조	140
3. 불면증 현황 및 수면증진 식품에 대한 설문조사	140
4. 수면증진 소재 임상실험	140
가. 수면설문조사	141
나. 수면다원검사	141
5. 통계분석	143
제 3 절 연구 결과 및 고찰	144
1. 불면증 현황 및 수면증진 식품에 대한 설문조사	144
가. 불면증의 여부	144
나. 불면증의 빈도	144
다. 불면증으로 인한 불편감의 여부·정도	144
라. 불면증으로 인한 주간 졸림 여부 및 주간 기능의 장애 여부	145
마. 불면증으로 인한 주간 기능의 장애 정도	145
바. 식품 섭취가 수면에 도움이 되는지 여부	145

사. 수면에 도움이 되는 식품	145
아. 조사 대상자의 평균 수면시간	146
자. 수면에 도움이 되는 식품개발의 필요성 여부	146
차. 건강수면식품에 대한 구매 의사	147
2. 수면증진 소재 임상실험	147
가. 수면설문조사	147
나. 수면다원검사	152
제 4 절 결 론	155

[위탁] 수면증진 소재의 작용기작 연구 156

제 1 절 서 론	156
제 2 절 재료 및 방법	156
1. 재료	156
2. 시료 확보 및 QC	157
3. 샘플 Labeling 및 Hybridization	157
4. Scan 및 Data분석	158
제 3 절 연구 결과 및 고찰	159
1. 수면증진 소재의 작용기작 연구	159
가. 수면 조절과 관련된 뇌영역	159
나. RNA QC 결과	160
다. 시상하부 및 기저전뇌의 발현 양상 변화	161
라. 발현 변화 유전자들이 관련 Pathway 분석 변화	163
마. 수면 관련 유전자의 추출과 상관관계 규명	182
바. 수면 관련 후보유전자	184
제 4 절 결 론	184

제 4 장	목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	186
제 1 절	연구개발목표의 달성도	186
1.	연구평가의 착안점 및 달성도	186
2.	연차별 세부연구개발목표 및 달성도	187
제 2 절	관련분야 기여도	188
1.	과학·기술적 측면	188
2.	경제·산업적 측면	188
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	189
제 1 절	연구개발 성과	189
제 2 절	추가연구의 필요성	190
제 3 절	산업화 추진방안	191
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	192
제 7 장	참고문헌	193

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

수면증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 국내 농산자원을 탐색하고 우수한 농산자원을 선정하여 동물 및 임상실험을 통해 과학적으로 수면증진 효과 및 작용기작을 규명하고자 하였다. 이를 바탕으로 제조 조건의 최적화 및 기능성분의 분리·동정 연구를 통해 부가가치가 높은 수면증진 식품을 개발하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구 배경

가. 수면의 중요성

수면은 인간 수명의 1/3을 차지하고 있으며 가장 근본적이고 필수적인 생리현상으로 건강 유지 및 정신적 안정에 있어 매우 중요한 요소이다. 충분한 수면은 국민 건강 및 삶의 질을 높일 수 있는 가장 중요한 요소임에도 불구하고 최근 국내 수면장애 유병률이 크게 증가하고 있어 수면의 중요성을 국가차원에서 새롭게 인식해야 할 시점에 있다. 만성적인 수면 부족 및 장애는 심혈관 질환 및 고혈압, 기억과 학습, 대사조절 및 체중, 면역력 및 암 저항력, 당뇨병, 안전사고(졸음운전, 근로사고), 기분(우울증, 활력저하) 등 전반적인 신체·정신적 건강에 부정적인 영향을 끼친다(Fig. 1)(Harvard Medical School, 2010). 특히, 노인의 경우 수면을 정상적으로 취하지 못하면 평균수명이 단축되는 경향을 보여 고령화시대에 수면의 중요성은 더욱 확대되고 있다(Dew et al., 2003).

나. 국내의 불면증 현황

세계 인구의 30% 정도가 불면증을 경험하고 있으며 10%는 만성적인 불면증을 겪고 있을 만큼 수면장애로 인한 문제가 최근 크게 대두되고 있다(Mendelson et al., 2004). 미

국 국립수면협회(National Sleep Foundation USA, 2008)의 조사에 따르면, 미국 성인의 50% 정도가 1주일에 1회 이상 불면증을 경험하고 있으며, 30-40%가 일과성 불면증(3주 지속), 10-15%는 만성적인 불면증(4주 이상 지속)을 겪고 있는 것으로 나타났다. 또한, 미국 국민의 50% 정도가 자신의 수면에 대해 만족하지 못하는 것으로 조사되었다.

최근 국내의 불면증 및 수면장애 유병률은 빠르게 선진국 수준에 근접해가고 있다. 본 연구팀의 설문조사 결과에 따르면, 약 40% 정도가 불면증을 경험한 것으로 나타났으며, 이중 46%는 이로 인한 불편감을 느끼고 있는 것으로 조사되었다. 그리고 수면장애 실진료 환자 수가 2001년 5만 1000명에서 2008년 22만 8000명으로 나타나 최근 8년간 4.5배 증가했다(국민건강보험공단, 2009). 세계적 수면학 권위자인 미국 Stanford 대학교의 Maurice M. Ohayon 교수는 한국인의 평균 수면시간은 6시간 15분으로 미국(7시간) 및 영국(6시간 45분)에 비해 적으며, 수면의 질도 떨어지는 것으로 조사되어 수면 시간과 질을 높여야 한다고 강조하였다(조선일보, 2008. 2. 26). 하지만 국내의 경우 아직 수면에 대한 관심이 높지 못하며, 특히, 의학적 치료를 받아야 한다거나 질환으로 생각하는 인식이 형성되고 있지 못한 실정으로 향후 불면증 및 수면장애에 대한 홍보 및 적절한 치료적 접근이 필요할 것이다.

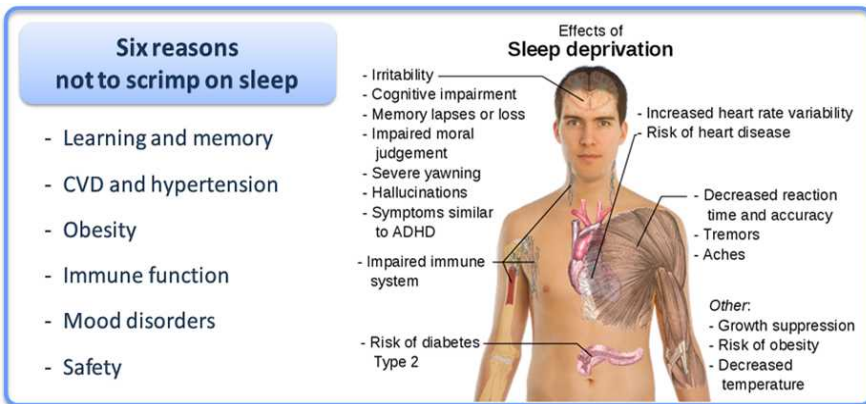


Fig. 1. Effects of sleep deprivation on physical and mental health (Harvard Medical School, 2010)

2. 산업·경제적 필요성

가. 수면경제(Sleeponomics)의 대두

수면(sleep)과 경제(economy)의 합성어인 수면경제(sleeponomics)란 신조어가 생겨날 정도로 최근 세계적으로 수면 관련 시장규모와 수면장애로 인한 사회적 비용이 크게 증가하고 있다. 미국의 수면 관련 시장은 년 200억 달러 규모로 수면 클리닉, 천연 수면보조제, 기능성 칩구류 등 다양한 산업 분야로 영역이 확대되고 있다(New York Times, 2007). 신경의약품 중 수면제의 성장률이 약 20%로 가장 높게 나타났으며, 최근에는 선진국뿐만 아니라 개발도상국에서도 시장이 확대되고 있다(IMS World Review, 2006). 이러한 수면장애의 중요성과 경제적 파급력을 국가적으로 중요하게 인식한 미국의 경우는 미국수면연구재단(National Sleep Foundation)과 국민수면질환연구센터(National Center On Sleep Disorders Research)에서 관련 연구를 활발히 진행하고 있다.

나. 수면증진 기능성식품(Natural sleep aids)의 성장

수면제의 경우 현재 약 70%가 장기복용자, 50%가 60세 이상의 고령층에서 소비되고 있는데 4주 이상의 장기복용은 의존성 및 부작용의 문제를 가지며, 노인 및 임산부 등은 섭취가 제한되기도 한다(Sleep in America Poll, 2005). 따라서 최근에는 수면을 증진시킬 수 있는 자연요법에 대한 관심이 높아짐에 따라 서구 선진국을 중심으로 천연의 수면보조식품이 크게 인기를 모으고 있다. 미국의 시장조사 및 리서치 기업인 Packaged facts사의 2008년 보고서에 따르면, 매년 4,000만 명의 미국인이 만성적인 수면장애를 겪고 있으며, 수면이 식품 섭취 및 운동만큼이나 중요한 것이라는 인식이 확산되고 있는 것으로 나타났다. 소비자들의 수면을 증진시킬 수 있는 자연요법에 대한 관심이 높아짐에 따라 OTC(Over-The-Counter, 비처방) 수면보조제(sleep aids)의 시장이 확대되고 있으며, 2013년에는 75,900만 달러(1조 2천억 원) 규모로 성장할 것으로 전망되고 있다. LOHAS 트렌드의 확산과 수면에 대한 관심 증가에 따라 수면의 질을 높이려고 하는 욕구가 높아지고 있어 불면증 환자뿐만 아니라 일반인의 수면증진 기능성식품에 대한 수요도 더욱 확대될 것으로 보인다. 현재 서구 선진국에서는 다양한 수면증진 기능성식품이 판매되고 있는데 대표적으로 valerian, St. John's wort, hop, chamomile, passion flower, skullcap 등이 있다(Fig. 2).



Fig. 2. Various natural sleep aid products in the West.

Table 1. Sleep aid products in Korea

제품명	굿나잇	
제조원	(주)천호식품	
식품유형	기타가공품	
주요성분	산조인, 연근, 연자육, 토란대	
효능	불면증완화, 수면증진	
섭취방법	하루 2~3회, 1회당 1포	
제품명	굿슬립	
제조원	안국건강(주)	
식품유형	기타가공품	
주요성분	산조인, 백복령, 하수오, 원지, 당귀	
효능	불면증완화, 수면증진, 체력보강	
섭취방법	하루 1회, 1회당 1포	

다. 국내 수면증진 기능성식품 현황

국내 개별인정형 건강기능식품 및 기능성원료 가운데 수면증진 및 개선에 대한 제품은 2010년 5월 1일 기준으로 전무한 실정이다. 미국 및 유럽의 선진국에서는 다양한 천연 수면보조제(natural sleep aids)들이 시장에 출시되고 있어 향후 외국제품에 의해 국내시장이 잠식될 가능성이 있다. 근래 서울우유에서 ‘굿나잇 밀크’가 출시되었는데 2008년 히트상품으로 선정될 만큼 인기를 모았다. 이는 수면을 증진시키고자 하는 국내 소비자의 요구가 매우 높다는 것을 단적으로 보여주는 좋은 예라고 볼 수 있을 것이다. 개별인정을 받은 제품은 아니지만 최근 천호식품 및 안국건강에서 각각 ‘굿나잇’ 및 ‘굿슬립’이라는 수면증진에 도움이 되는 제품들이 기타가공품의 형태로 출시되었다(Table 1). 두 제품 모두 이미 효과가 밝혀진 산조인(酸棗仁, 뱀대추씨, *Zizyphus jujuba* Miller)을 주요 소재로 하고 있는데 이는 중국에서 오랫동안 사용되어온 불면증 처방인 suanzaorentang의 주요 원료이기도 하다(Yi et al., 2007). 이 외에도 민간에서 진정효과가 있는 것으로 알려진 연근, 하수오, 원지 등이 함유되어 있다.

현재 국내의 수면증진 기능성식품의 시장은 형성단계에 있다고 볼 수 있는데 현재 국내 불면증의 급격한 증가 추세를 감안할 때 향후 5년 이내에 년 500억 원 이상의 시장 형성 가능성이 있을 것으로 예상된다. 따라서 우리나라의 민간요법 및 한방 고문헌에서 알려진 국내 농산자원의 수면증진 효과를 탐색하고 과학적으로 입증된 우수한 제품의 개발이 긴요한 실정이다.

3. 과학·기술적 필요성

가. 국내 농산자원의 과학적인 수면증진 효과 검증

서구 선진국의 경우 천연 수면보조제 시장에 대한 요구를 반영하듯이 관련 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있으며, 수면증진 효과가 있다고 알려진 대부분의 허브들에 대한 연구가 수행되었다. 가장 대표적인 valerian의 경우 meta 분석까지 이루어졌을 정도로 폭 넓게 연구되었다(Bent et al., 2006). 새로운 식품 소재 및 다양한 식물자원에 대한 연구들도 활발히 진행되고 있다. 한편, 같은 아시아 지역인 일본 및 중국에서도 전통적인 한방소재 및 식품의 수면증진 효과를 과학적으로 입증하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 반면에 국내의 경우는 흔히 알려져 있는 상추(채래종으로 추정됨)를 비롯하여 신선초, 백하수오, 인삼 등 한의학 고문헌 및 민간요법을 통해 알려진 농산자원에 대한 수면증진 효과가 과학적으로 입증되지 못하였다. 따라서 농산자원의 수면증진 효과 평가체계를 확립하고 이를 통해 고부가가치 수면증진 제품을 개발하는 것은 매우 긴요하다.

나. 창의적인 융합/협동 연구의 필요성

농산자원 및 식품의 수면증진 효과에 대한 국내 연구가 그 동안 활발하게 진행되지 못했던 것은 수면에 대한 기초연구가 부족하고 과학적인 효능평가가 가능한 협동 연구시스템이 이루어지지 못했기 때문이다. 수면증진 효과를 세포 수준, 동물 및 임상에서 평가할 수 있는 융합/협동 연구를 통한 제품화가 요구된다. 특히, 본 연구는 식품과학기술 분야에서도 매우 창의적인 분야로 이에 대한 활발한 연구지원이 이루어져야 할 것으로 판단된다. 이러한 연구 수행 결과는 향후 수면증진 천연물 신약개발의 기초자료로도 충분히 활용될 수 있을 것이다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 연구개발의 최종목표 및 기관별 주요 연구내용

본 연구개발의 최종목표는 ‘농산자원의 수면증진 효과에 대한 과학적 입증 및 이를 통한 건강수면식품의 개발’로 효율적인 과제수행을 위해 주관기관인 한국식품연구원과 가톨릭대학교 의과대학(협동) 및 디지털지노믹스(위탁)가 연구에 참여하였다. 참여 연구기관별 주요 연구내용은 아래와 같다.

구분	주요 연구내용
[세부과제] 한국식품연구원	<ul style="list-style-type: none"> 대상 농산자원의 신경전달물질 수용체 결합력 탐색 수면증진 소재의 제조조건 최적화 설치류를 이용한 수면증진 효과 분석 기능성분의 분리정제 연구 및 안전성 검토(추가연구) 시제품 개발 및 기존 제품과의 효능 비교평가
[협동과제] 가톨릭대학교 의대	<ul style="list-style-type: none"> 탐색 대상 소재의 선정 및 수면 관련 설문조사 설치류 수면증진 효과의 공동 분석 수면증진 소재의 임상평가
[위탁과제] 디지털지노믹스	<ul style="list-style-type: none"> 수면증진 소재의 작용기작 연구

2. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차 년도	세부 과제	<ul style="list-style-type: none"> 탐색 대상 소재의 선정 및 추출물 제조 	<ul style="list-style-type: none"> 자료 수집을 통한 수면증진 효과를 기대할 수 있는 소재 20종 선정 식품공전상 등재된 부위를 원료로 물 및 에탄올 추출물 제조
		<ul style="list-style-type: none"> 대상 소재의 신경전달물질 수용체 결합력 탐색(GABA) 	<ul style="list-style-type: none"> 역제성 neurotransmitter인 GABA의 type A 수용체 결합력 평가
	협동 과제	<ul style="list-style-type: none"> 탐색 대상 소재의 선정 및 수면 관련 설문조사 	<ul style="list-style-type: none"> 식품연구와 공동으로 대상소재 선정 불면증 현황 및 건강수면식품 관련 설문조사 및 분석
2차 년도	세부 과제	<ul style="list-style-type: none"> 대상 소재의 신경전달물질 수용체 결합력 탐색(5-HT) 	<ul style="list-style-type: none"> 5-HT_{2C}(serotonin type 2C) 수용체 결합력 평가 수행(추가연구)
		<ul style="list-style-type: none"> 수면증진 소재의 제조조건 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> 반응표면분석법(RSM)을 통한 결합력이 우수한 소재의 추출조건 확립
		<ul style="list-style-type: none"> 설치류 수면구조 분석을 통한 수면증진 효과 분석 	<ul style="list-style-type: none"> Rat 뇌파(EEG) 및 근전도도(EMG) 측정을 통한 수면구조 분석
	협동 과제	<ul style="list-style-type: none"> 설치류 수면증진 효과의 공동 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 식품연구와 공동으로 FFT 알고리즘을 이용하여 동물 수면구조 분석
	위탁 과제	<ul style="list-style-type: none"> 수면증진 소재의 작용기작 연구 	<ul style="list-style-type: none"> Microarray 분석을 통한 예상되는 pathway 도출
3차 년도	세부 과제	<ul style="list-style-type: none"> 단회 급성경구독성시험 및 안전성 검토 	<ul style="list-style-type: none"> 2,000 mg/kg의 고농도로 mouse에 대한 급성경구독성을 평가 의사결정도 기법을 이용한 소재의 안전성 평가
		<ul style="list-style-type: none"> 기능성분의 분리정제 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 감초 및 함환피 에탄올 추출물의 분리정제 및 기능성분 동정
	협동 과제	<ul style="list-style-type: none"> 수면증진 시제품 개발 및 동물효능 비교평가 	<ul style="list-style-type: none"> 수면제 및 시판품과의 동물 효능 비교 실험 실시
	협동 과제	<ul style="list-style-type: none"> 수면증진 소재의 임상평가 	<ul style="list-style-type: none"> 설문조사를 통한 평가 및 분석 수면다원검사를 통한 임상 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 특허 현황

수면증진 효능을 가지는 제품에 대한 국내외 특허 현황을 파악하기 위하여 아래와 같은 조건에 따라 검색을 실시하였다. 총 검색건수 323건 중 실질적으로 본 연구와 관련성이 높은 보조제(aid), 약초(herb) 및 기능성식품(functional food, nutraceutical, phytochemical, dietary supplement)에 대한 유효특허 79건을 선정하여 분석하였다.

대상국가	국내 및 해외 (미국, 일본, 유럽)
특허 DB	Thomson Innovation (www.thomsoninnovation.com) 및 특허정보원 DB (www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 13년간 (1995~2008)
검색범위	제목, 초록, 청구항
Keyword	sleep or sleep disorder or insomnia or sedative or hypnotic
검색건수	323
유효특허건수	79

1. 해외 특허 현황

수면증진 효능을 가지는 기능성식품에 대한 특허는 대부분 해외에서 출원 및 등록된 것으로 조사되었으며, 미국과 일본이 각각 34건 및 18건으로 가장 큰 비중을 차지하였다. 관련 특허는 2000년 이후 출원 및 등록이 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 특허 중 본 연구과제와 관련성이 높은 핵심특허를 분석하여 해외의 기술개발 현황을 파악하였다(Table 3). Gardiner 등(2007)은 입면 및 수면 유지 효능을 가지는 분말 형태의 조성물을 개발하였는데 주성분인 valerian 추출물 외에 버드나무 추출물, 멜라토닌, 라벤더, CoQ10, 레몬밤 등의 부가적인 추출물이 함유되었다. Luciano(2008)는 *Calea zacatechichi* 허브 추출물을 주요 성분으로 하여 5-hydroxytryptophan 및 melatonin과 같은 부원료와 함께 비타민, 아연, 마그네슘을 추가로 포함하는 숙면 향상을 위한 영양보충제를 개발하였다. Marder 등(2002)은 valerian 추출물의 주요성분인 apigenin 및 valerenic acid의 효능을 강화시킨 제

품으로 GABA_A-benzodiazepine binding site에 대한 결합력 활성을 검증하였다. 조사된 전체 특허를 종합적으로 분석해보면 사용된 원료의 경우는 수면증진 효과로 잘 알려진 valerian, passion flower, St. John's wort, hop, melatonin 등이 많았다. 대부분의 특허는 이러한 소재들이 혼합된 조성물의 형태로 소재의 종류 및 비율이 상이할 뿐 전반적으로 유사한 경향을 나타내었다. 그리고 수면제의 작용기작으로 잘 알려진 GABA_A receptor에 대한 결합 활성을 평가한 특허들이 많았다.

Table 2. Critical overseas patents related with natural sleep aids

특허명	Compositions and methods for the induction and maintenance of quality sleep		
공개년도	2007	보유국	미국
주요내용	Valerian 뿌리 추출물, 버드나무 수피 추출물, 멜라토닌 또는 그 유도체를 포함하는 통증완화 또는 수면유도 효능을 가진 정제 또는 분말 형태의 조성물 개발 기술. 추가적으로 호프, 라벤더, 패션플라워, CoQ10, 레몬밤 추출물 중 하나 이상이 포함될 수 있어 지속적인 약물 방출 효과를 가질 수 있음		
특허명	Dietary supplement and a method to enhance sleep and lucid dreaming		
공개년도	2008	보유국	미국
주요내용	<i>Calea zacatechichi</i> 추출물을 주성분으로 하여 5-Hydroxytryptophan, vinpocetine, melatonin 및 녹차 추출물을 포함하며, 다양한 비타민, 아연, 마그네슘과 칼슘을 추가적으로 포함하는 숙면 향상을 위한 영양보충제 개발기술		
특허명	Sedative materials and treatments		
공개년도	2002	보유국	영국
주요내용	진정, 수면 유도 또는 항불안제 활성을 갖는 valerian 뿌리 및 지하경 추출물을 포함하는 조성물로서 apigenin과 valerenic acid의 효능강화를 강화한 제품 및 기능성분 분리방법 개발기술. 상기 분획물의 GABA _A -benzodiazepine binding site에 대한 활성을 확인함		

2. 국내 특허 현황

국내의 수면증진 또는 수면개선 관련 특허들은 거의 대부분이 해외 제약기업의 약학 조성물에 대한 것으로 기능성식품 및 천연 소재를 활용한 제품은 드문 실정이다. 본 연구사업은 2007년 시작되었는데 당시 검색에서는 조사되지 않았던 특허 2건이 2010년 공개되었다(Table 3). Eun 등(2010)은 발아현미, 인삼 및 용안육 추출물을 주성분으로 하여 동물(mouse)의 입면시간을 단축하고 수면시간을 연장시키는 불면증상 개선용 조성물을 개발하였다. 앞서 설명한 최근 출시된 ‘굿나잇’ 제품에 대한 특허도 등록되었는데 Kim(2010)은 수면에 도움을 준다고 알려진 산조인, 토란대, 연자육 및 연근을 이용한 건강식품을 개발하였다. 두 가지 특허 모두 pentobarbital을 이용한 수면유도 실험을 통하여 동물 효능을 평가하였으며, 뇌파(EEG) 및 근전도도(EMG) 측정을 통한 동물 수면구조 및 질에 대한 평가하지 못하였다. 최근의 추세를 감안할 때 향후에는 수면증진 관련 기능성식품에 대한 특허가 더욱 활성화될 것으로 전망되며, 다양한 원료의 수면증진 효과가 과학적으로 증명될 것으로 기대된다.

Table 3. Critical domestic patents related with natural sleep aids

특허명	불면 증상의 예방 및 개선용 조성물과 그의 제조방법		
공개년도	2010	보유국	한국
주요내용	불면 증상의 예방 및 개선용 조성물과 그의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 발아현미 추출물, 인삼 추출물 및 용안육 추출물을 혼합 사용함으로써, 수면 유도시간을 단축하고, 수면시간을 연장시키는 효과를 나타내는 불면증상의 예방 및 개선용 조성물과 그의 제조방법에 관한 것		
특허명	수면장애 개선과 쾌면을 위한 건강식품 조성물		
공개년도	2010	보유국	한국
주요내용	천연물 중에서 쾌면에 도움을 준다고 알려진 산조인, 토란대, 연자육, 연근과 마그네슘으로 구성된 환으로 멜라토닌 함량이 높아 우수한 수면장애 개선 효능을 나타내는 수면 장애 개선과 쾌면을 위한 건강식품 조성물에 관한 것		

제 2 절 국내외 논문 현황

수면증진 효능을 가지는 제품에 대한 국내외 논문 현황을 파악하기 위하여 아래와 같은 조건에 따라 검색을 실시하였다. 총 검색건수 758건 중 실질적으로 본 연구와 관련성이 높은 보조제(aid), 약초(herb) 및 기능성식품(functional food, nutraceutical, phytochemical, dietary supplement)에 대한 유효논문 98건을 선정하여 분석하였다.

대상국가	국내 및 해외
논문 DB	Web of Science, Pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), NDSL, 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 10년간 (2000~2010)
검색범위	제목, 초록, 키워드
Keyword	sleep or sleep disorder or insomnia or sedative or hypnotic
검색건수	758
유효논문건수	98

1. 해외 논문 현황

특허 현황에서 언급한 바와 같이 서구권에서는 valerian, passion flower, St. John's wort, hop 등 다양한 허브들의 수면진정 효과가 연구되었다. 이 중 valerian은 가장 대표적인 것으로 지표성분인 valerenic acid은 억제성 신경전달을 조절하는 GABA_A 수용체에 작용하여 수면진정효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Khom et al., 2007). 가장 일반적으로 사용되는 수면제들이 GABA_A 수용체에 작용하기 때문에 허브류에서도 GABA_A 수용체에 대한 작용기작에 초점을 맞추고 있다. 하지만 GABA_A 수용체에 작용하는 성분이라도 5-HT, dopamine, histamine 수용체에도 작용할 가능성이 높아 최근에는 다양한 수용체에 대한 연구가 이루어지고 있다. 한편 2000년대 들어 중국, 일본, 대만 등 아시아권 국가들의 관련 논문들이 크게 증가하고 있는 실정이다. 각국에서 전통적으로 사용되어 온 한방처방 및 허브류들의 수면진정 효과를 과학적으로 입증하고 있으며, 실제 제품화로도 이어지고 있는 실정이다. 따라서 최근의 아시아권 국가들의 논문을 중심으로 분석하여 Table 3에 나타내었다.

Table 4. Critical overseas research papers related with natural sleep aids

논문명	Effects of kava-kava extract on the sleep-wake cycle in sleep-disturbed rat		
학술지명	<i>Psychopharmacology</i> 180, 564-569		
계재년도	2005	저자	Shinomiya et al.
주요내용	Kava-Kava 추출물의 수면증진 효과를 뇌파(EEG) 측정을 통한 수면 구조분석으로 평가하였음. Kava-Kava 추출물 처리시 NREM 수면 중 delta power가 유의적으로 증가하여 불면증 치료에 효과적인 약초로 제안되었음		
논문명	Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor mediates suanzaorentang, a traditional Chinese herb remedy, -induced sleep alteration		
학술지명	<i>Journal of Biomedical Science</i> 14, 285-297		
계재년도	2007	저자	Yi et al.
주요내용	중국에서 전통적으로 사용되어온 한약재 suanzaorentang은 부작용 없이 불면증 완화에 널리 효과적으로 사용되어 왔음. Suanzaorentang은 자발적인 수면 활동을 증가시키며 그 효과는 GABA _B 수용체가 아니라 GABA _A 수용체를 통해 중재됨		
논문명	Extract of <i>Ganoderma lucidum</i> potentiates pentobarbital-induced sleep via a GABAergic mechanism		
학술지명	<i>Pharmacology, Biochemistry and Behavior</i> 86, 693-698		
계재년도	2007	저자	Chu et al.
주요내용	<i>Ganoderma lucidum</i> (영지버섯) 물 추출물의 수면진정 효과를 동물실험을 통해 확인하였음. 추출물 120 mg/kg 투여시 일반적인 rat에서는 아무런 영향이 없었지만 pentobarbital로 수면이 유도된 rat에서는 유의적으로 수면을 증가시켰음. GABA _A 수용체 길항제에 의해 그 효과가 억제되어 GABA _A 수용체의 효능제 역할을 하는 것으로 밝혀짐		

2. 국내 논문 현황

국내에서 최근 수면증진 효과를 가지고 있는 한방소제에 대한 연구가 이루어지고 있는데 어지고 있는데 산조인의 주요성분인 sanjoinine A와 용안육 메탄올 추출물이 pentobarbital로 유도된 수면을 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3). 산조인 및 용안육 모두 GABA_A receptor의 활성을 증대시킴으로써 수면을 유도할 것으로 제안되었다(Ma et al., 2007; 2009). 아직 국내에서는 뇌파(EEG) 및 근전도도(EMG) 측정을 통한 수면구조 분석 연구는 미흡한 실정이다. 또한 GABA_A receptor를 중심으로 연구가 되고 있어 5-HT, histamine, adenosine 등 수면과 관련된 다양한 신경전달물질 수용체에 대한 연구는 활성화 되지 않고 있다. 국내에서도 전통적으로 알려진 자원들이 많아 이에 대한 폭 넓은 효능 평가와 작용기작의 연구가 요구된다.

Table 5. Critical domestic research papers related with natural sleep aids

논문명	Sanjoinine a isolated from <i>Zizyphi Spinosi Semen</i> augments pentobarbital-induced sleeping behaviors through the modification of GABAergic systems		
학술지명	<i>Biological & Pharmaceutical Bulletin</i> 30, 1748-1753		
계재년도	2007	저자	Ma et al.
주요내용	우리나라에서 잘 알려진 산조인의 주요 alkaloid 성분인 sanjoinine A가 pentobarbital 수면유도 실험에서 수면증진 효과를 나타내었으며, 소뇌 세포의 chloride influx를 증가시켰음		
논문명	Methanol extract of <i>Longanae Arillus</i> augments pentobarbital-induced sleep behaviors through the modification of GABAergic systems		
학술지명	<i>Journal of Ethnopharmacology</i> 122, 245-25		
계재년도	2009	저자	Ma et al.
주요내용	용안육 메탄올 추출물이 pentobarbital 수면유도 실험에서 수면증진 효과를 나타내었으며, 소뇌 세포의 chloride influx를 증가시켰음		

제 3 절 본 연구개발의 의의 및 기술수준 비교

1. 본 연구개발의 의의

식품 또는 허브류의 수면증진 효과 연구 및 제품화 기술개발은 지금까지 외국에 비해 상당히 미흡하였다. 하지만 국내에서도 최근 불면증이 만연하고 처방 없이 구입이 가능한 천연 건강수면식품에 대한 요구가 높아짐에 따라 학계 및 산업계의 관심이 높아지고 있는 실정이다. 본 연구를 통해 다양한 농산자원의 수면증진 효과를 규명할 수 있었으며, 이를 통해 스크리닝 및 *in vivo* 효능 평가 체계를 구축할 수 있었다. 또한 본 연구개발 기술은 그 동안 식품과학기술 분야에서 시도되지 않았던 것으로 관련 연구 활성화에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 '농림수산식품 연구개발사업' 지원 하에 수행된 본 연구개발사업의 의의는 크다고 볼 수 있다.

본 연구개발의 수행을 통해 '약방의 감초'로 잘 알려진 감초와 합환피의 수면증진 효과를 구명하였으며, 특히 감초의 flavonoid 성분인 isoliquiritigenin을 동정하고 수면증진 효과가 있음을 동물실험을 통해 확인하였다. 또한 협동연구기관인 가톨릭대학교 성빈센트병원에서 수면다원검사 및 설문조사를 통한 임상평가 체계를 구축한 것도 매우 의미가 크다. 연구 수행 중 동물 수면구조 분석 분야의 세계적 연구기관인 OBI(Osaka Bioscience Institute)의 Urade 박사의 도움으로 국내에서 드물게 *in vivo* 평가체계를 구축한 것 또한 그 의의가 크다고 볼 수 있다.

2. 본 연구개발 관련 국내의 기술수준 비교

개발기술 내용	관련기술 최고보유국	신청전 기술수준		완료후 기술수준
		우리나라	연구신청팀	
숙면소재 탐색을 위한 신경전달물질 수용체 활성 평가기술	미국	70	60	90
설치류 수면구조 분석 및 평가기술	일본	50	50	90
수면증진 식품의 임상평가 기술	미국	60	60	90
숙면소재의 산업화 기술	미국	60	60	90

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

[세부] 수면증진 소재의 *in vitro/vivo* 효능 평가 및 제조조건 최적화

제 1 절 서 론

최근에는 수면을 증진시킬 수 있는 자연요법에 대한 관심이 높아짐에 따라 서구 선진국을 중심으로 천연의 수면보조식품이 크게 인기를 모으고 있으며, valerian, passion flower, St. John's wort, hop 등 다양한 허브들의 수면진정 효과가 연구되었다. 가장 대표적인 valerian의 경우 meta 분석까지 이루어졌을 정도로 폭 넓게 연구되었다(Bent et al., 2006). 한편, 같은 아시아 지역인 일본 및 중국에서도 전통적인 한방소재 및 식품의 수면증진 효과를 과학적으로 입증하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 반면에 국내의 경우는 흔히 알려져 있는 상추(재래종으로 추정됨)를 비롯하여 신선초, 백하수오, 인삼 등 한의학 고문헌 및 민간요법을 통해 알려진 농산자원에 대한 수면증진 효과가 과학적으로 입증되지 못하였다. 따라서 국내 농산자원 및 식품소재의 수면증진 효과에 대한 연구가 중요한 의미를 가질 것으로 판단된다.

본 연구에서는 수면증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 국내 농산자원을 선정하기 위하여 동의보감 등 고문헌, 민간에서 전해오는 요법 및 전문가 자문을 통해 20종을 선정하였다. 원료의 활성을 탐색하기 위하여 물과 에탄올로 각각 추출물을 제조하였으며, 수면과 관련이 깊은 GABA_A 및 serotonin type 2C(5-HT_{2C}) 수용체를 타겟으로 설정하였다. GABA_A receptor agonist는 GABA_A receptor의 activity를 높여 chloride current을 활성화시킴으로써 신경전달을 억제하여 수면진정 효과를 나타낸다. 5-HT_{2C} receptor antagonist는 5-HT에 의해 일어나는 세포 내의 calcium의 증가를 억제하여 수면을 증진시킨다. GABA_A 및 5-HT_{2C} receptor에 활성을 가지는 소재를 대상으로 pentobarbital을 이용한 수면유도 실험과 뇌파(EEG) 및 근전도도(EMG) 분석을 통한 수면구조 분석을 통해 *in vivo* 수면증진 효과를 평가하였다. 또한 최초의 연구내용에서 추가로 분리정제 연구를 수행하였다. 분리된 활성성분은 *in vitro* 및 *vivo* 실험을 통해 그 수면증진효과를 규명하였다. 또한 임상평가를 위해 급성경구독성 시험 및 의사결정도 기법을 활용한 안전성을 검토하였다. 활성이 높은 소재를 제조하기 위하여 반응표면분석법(Response Surface Methodology)를 이용하여 추출 공정을 최적화하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 탐색 대상 원료의 선정

수면증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 국내 농산자원을 선정하기 위하여 동의보감 등 고문헌, 민간에서 전해오는 요법 및 전문가 자문을 통해 20종을 선정하였다. 그리고 원료에 대한 국문 명칭, 영문명, 학명, 효능 및 식품공전 등재여부를 Table 1-1에 나타내었다. 이 외에도 다른 원료들도 있었으나 기존의 연구 논문 및 특허에서 밝혀진 경우는 탐색 대상에서 제외하였다.

Table 1-1. Agricultural resources for screened for sleep enhancing activity

분류	원료명 (영문명)	학 명	신경계 작용기능	식품공전 등재여부
종자류	오미자 (Chinese magnolia)	<i>Schizandra chinensis Baillon</i>	중추신경계 억제작용	등재
	대추 (Chinese magnolia)	<i>Zizyphs jujuba Miller var</i>	중추신경계 진정작용	등재
	석류 과육 (Chinese magnolia)	<i>Punica granatum</i>	식욕조절	등재
근류	단삼 (Danshen)	<i>Salvia miltiorrhiza Bunge</i>	진정 작용, 불면증 및 심계항진 등에 활용	등재 (부원료)
	당귀 (Gigantic angelica)	<i>Angelica gigas Nakai</i>	진정, 뇌혈전성 중풍과 두통	등재
	백출 (Japanese atractylodes)	<i>Atractylodes japonica Koidzumi</i>	비장 안정, 현기증	등재 (부원료)
	감초 (Licorice)	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischer</i>	진정작용	등재
	홍삼 (Red ginseng)	<i>Panax ginseng C.A. Meyer</i>	면역기능 향상, 강장효과, 원기회복	등재
인삼 (Ginseng)	<i>Panax ginseng</i>	정신 안정, 두뇌 촉진작용 중추신경 진정, 흥분 작용	등재	
건강 (Ginger)	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	중추신경계진정, 두통, 면역세포증진	등재	

채소류	양파 (Onion)	<i>Allium cepa L.</i>	신경안정제, 진정제, 신경쇠약	등재
	신선초 (Angelica)	<i>Angelica utilis Makino</i>	정서안정, 정신집중	등재
	대파 (Welsh onion)	<i>Allium fistulosum</i>	홍분, 두통, 저혈압에 도움	등재
	상추 (Lettuce)	<i>Lactuca sativa L.</i>	스트레스해소, 피로회복	등재
기타	부추 (Leek)	<i>Allium tuberosum Rottlerex Spreng</i>	간과 신장에 좋음 위열을 없앴	등재
	합환피 (Silk tree)	<i>Albizia julibrissin Durazzini</i>	정신불안증상 치료	등재
	영지 (Reishi mushroom)	<i>Ganoderma lucidum Karsten</i>	건망증, 심장병, 정신안정	등재
	복령 (Hoelen)	<i>Paria cocos</i>	정신불안, 스트레스성 증상	등재 (부원료)
	옥죽 (동글레) (Solomon's seal)	<i>Polygonatum odoratum var. pluriflorum</i>	중추신경을 진정, 강장, 자양 성분이 많이 함유	등재
선인장 (Cactus)	<i>Opuntia ficus indica Mill</i>	진해작용과 신경안정	등재	

2. 추출물 제조

수면증진 효과 탐색을 위해 선정된 원료로부터 물 및 에탄올 추출물을 제조하였다. 물 추출물은 분쇄 시료 100 g에 증류수 1 L를 넣어 3시간 동안 100℃로 가열하였다. 에탄올 추출물은 시료에 95% 에탄올을 10배 가하여 50℃ incubator에서 3 days 동안 추출되었으며, 하루에 90 min간 3번씩 초음파처리되었다. 물 및 에탄올 추출물을 3,000 rpm에서 원심분하여 잔사를 제거하고 농축 및 동결건조하였다. 동물실험에 사용된 감초(*Glycyrrhiza uralensis Fisher*) 및 합환피(*Albizia julibrissin Durazzini*) 추출물은 각각 30% ethanol, 41℃, 12 hr 및 60% ethanol, 20℃, 58 hr의 조건에서 제조되었다. 추출 후 여과, 감압농축 및 동결건조를 한 후 분말화하여 사용하였다.

3. 실험 동물

ICR mouse(18-22 g, male) 및 SD rat(200-250 g, male)는 각각 (주)나라바이오텍 및 (주)오리엔트바이오에서 분양받아 실험동물용 사육상자에 일주일간 적응된 후 실험에 사용되었다. 동물의 사육은 온도 23±1℃, 습도 55± 5%, light-dark cycle(light on from 09:00 to 21:00), 조도 3000 Lux의 조건하에 이루어졌으며, 사료 및 음수는 자유 급여하였다. 모든 동물들은 KFRI-IACUC(Korea Food Research Institute, Institutional Animal Care and Use Committee)의 실험동물 사용지침에 의해 관리되었다.

4. GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay

수면증진 소재를 탐색하기 위하여 대표적인 억제성 신경전달 물질인 GABA의 type A receptor에 대한 결합력을 측정하였다. SD rat의 cerebral cortex(대뇌피질), cerebellum(소뇌), hippocampus(해마), striatum(선조체)을 적출한 후 즉시 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, keep at 4℃) 20 mL에 넣어 균질화 시키고 10 s 동안 초음파를 처리하였다. 이후 27,000×g 및 4℃의 조건에서 15 min간 원심분리한 후 상층액을 버리고 다시 buffer 20 mL을 취하여 원심분리하였으며, 이 과정을 3번 반복하였다. 뇌 조직의 endogenous GABA를 제거하기 위하여 37℃의 water bath에서 30 min간 incubation 시키고 원심분리한 후 pellet을 수집하였다. Membrane peppet은 binding assay에 사용하기까지 -80℃에서 보관하였다. 동결된 membrane을 해동시킨 후 27,000×g 및 4℃의 조건에서 10 min간 원심분리한 후 상층액을 버리고 50 mM Tris-citrate buffer(binding buffer, pH 7.1, keep at 4℃) 20 mL을 넣고 원심분리하였다. 이 과정을 3번 반복한 후 membrane을 binding buffer에 500 mL buffer/original tissue g의 농도로 현탁시켜 binding assay에 사용하였다. 96-well plate에 membrane suspension 180 uL, 추출물 10 uL 및 [³H] flumazenil(1 nM, final concentration)(Ro 15-1788; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA) 10 uL을 넣고 ice-bath에서 40 min간 incubation 하였다. 이 후 glass fiber filter(GF/C, Whatman)을 이용하여 harvest 하였다. 샘플의 radioactivity는 Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzers(Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA)를 통해 측정되었다. 비특이적 결합(nonspecific binding, NSB)은 clonazepam(1 uM, final concentration)을 이용하여 그 값을 결정하였다. Binding inhibition 값(%)은 아래와 같이 계산하였다. 본 실험에

앞서 [³H] flumazenil의 사용 농도를 구하기 위하여 saturation 실험을 실시하였다(Fig. 1-1).

$$\text{Binding inhibition (\%)} = 100 - \frac{(\text{Extract DPM} - \text{NSB DPM})}{(\text{TB DPM} - \text{NSB DPM})} \times 100$$

(DPM: disintegrations per minute, TB: total binding, NSB: nonspecific binding)

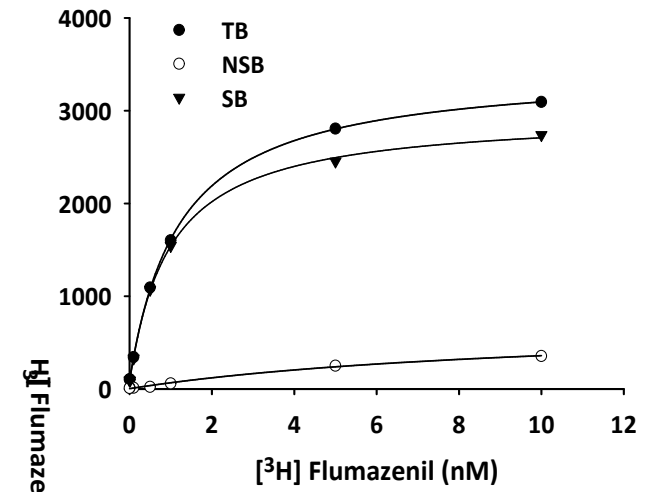


Fig. 1-1. Saturation curve for GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay.

5. 5-HT_{2C} (Serotonin type 2C) receptor binding assay

5-HT_{2C} receptor binding assay는 human 5-HT_{2C} receptor를 발현시킨 membrane을 사용하였다(ES-315-M400UA; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA). 동결된 5-HT_{2C} receptor membrane을 녹인 후 assay buffer(50 mM Tris, pH 7, 4 mM CaCl₂, 0.1% ascorbic acid)에 4 µg/180 µl의 농도로 희석하였다. Membrane suspension 180 µl, 추출물 10 µl 및 [³H] mesulergine(2 nM, final concentration)(PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA) 10 µl을

96-well plate에 혼합시킨 후 27°C에서 60 min 간 incubation 하였다. 이 후의 harvest 및 radio activity의 측정은 GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay와 같은 조건에서 이루어졌다. NSB는 mainserin(100 μM, final concentration)을 이용하여 측정하였다. 본 실험에 앞서 [³H] mesulergine의 사용 농도를 구하기 위하여 saturation 실험을 실시하였다 (Fig. 1-2).

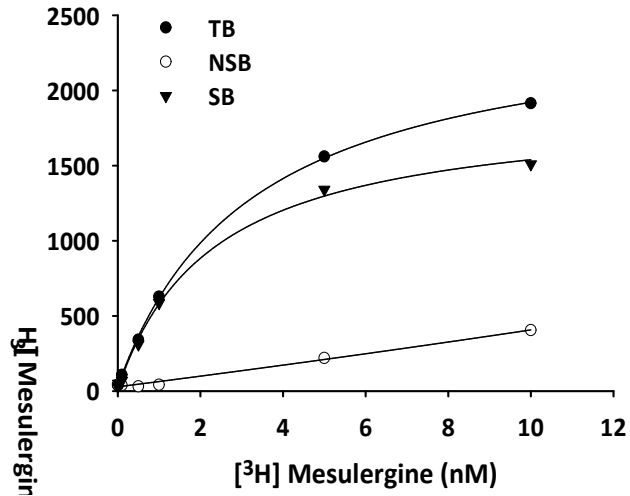


Fig. 1-2. Saturation curve for 5-HT_{2c} receptor binding assay.

6. 의사결정도 기법을 이용한 안전성 검토

의사결정도 기법을 이용한 감초 및 합환피 에탄올 추출물의 안전성 검토를 식품의약품 안전청의 가이드라인(건강기능식품의 안전성 평가를 위한 의사결정도 적용, 식품의약품안전청, 2007)에 따라 수행하였다(Fig. 1-3). 개별인정형 기능성원료의 신청을 위해 제출되어야 하는 섭취근거, 제조방법, 부작용, 독성, 섭취량 등에 대한 자료를 Table 1-2에서 제시된 데이터베이스를 활용하여 수집하였다. 국내 자료는 주로 식품공전, 건강기능식품공전, 대한약전, 대한약전의한약(생약)규격집과 같이 법적 근거가 있는 자료를 우선적으로 검색하였다. 국외 자료의 경우 미국 약전, 일본약국방, FDA, Natural Medicines Comprehensive Database 등을 활용하였다.

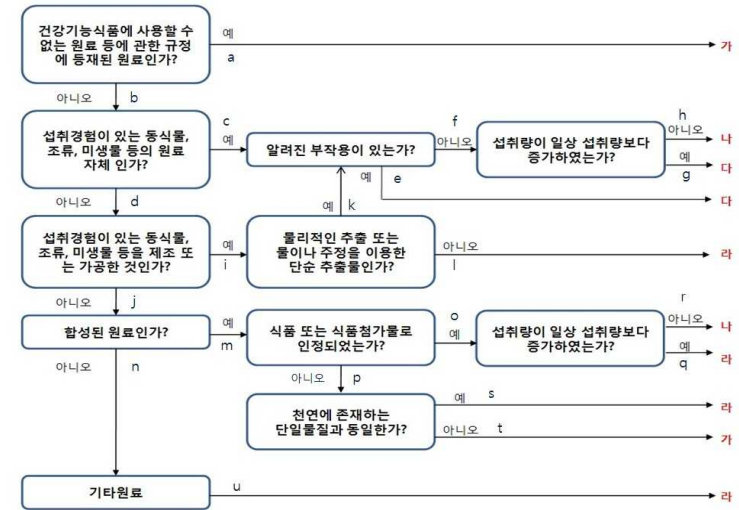


Fig. 1-3. Decision tree for safety assessment of functional food ingredients.

Table 1-2. Domestic and international database for decision tree for safety assessment

국내 DB
<ul style="list-style-type: none"> 식품공전/식품첨가물공전/건강기능식품공전 대한약전/대한약전의한약(생약)규격집 국민영양조사 전통적 사용이 기록되어 있는 과학적 자료 또는 역사적 사용 기록 요리서(30년 이상)
국외 DB
<ul style="list-style-type: none"> 미국 약전(USP-U.S. Pharmacopeia: http://www.usp.org), 일본약국방, 중국약전 미국 동종요법 약전(homeopathic Pharmacopoeia of US: http://www.hpus.com) 미국 국가처방전(National Formulary) GRAS(Generally recognized as safe) FDA(http://www.fda.gov/) EU Food Laws/EU Novel food (http://efsa.europa.eu) Natural Medicines Comprehensive Database (http://www.naturaldatabase.com) American Botanical Council의 Expanded Commission E (http://www.herbalgram.org)

7. 급성경구독성 시험

급성경구독성 시험을 위해 적응을 마친 mouse 중 건강하다고 판단되는 개체를 선택하여 무작위적으로 그룹을 분리하였다. 추출물은 암수로 구분된 그룹(n=10)에 1,000 mg/kg 및 2,000 mg/kg의 농도로 경구투여(p.o.)되었다(Table 1-3). 추출물은 시험 당일 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC)-saline 용액에 현탁시켜 사용하였다. 임상증상 및 사망동물은 투여 직후 6 hr 동안 매 시간 관찰하였으며, 투여 익일부터 14일 동안 일반적인 상태, 체중, 사망 유무를 확인하였다. 시험종료 후 동물의 체중을 측정한 후 ether로 마취하고 설하동맥 및 복부대동맥을 절단하여 치사시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안으로 상세히 관찰하였다.

Table 1-3. Group separation and dosage adjustment of LE, SE and their combination

Groups	Dosage (mg/kg)	Sex	
		Male	Female
Control (saline-CMC, ml/kg)	10	10	10
LE	1,000	10	10
	2,000	10	10
SE	1,000	10	10
	2,000	10	10
LE + SE (75:25, w/w)	1,000	10	10
	2,000	10	10

LE: licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) ethanol extract.

SE: silk tree (*Albizia julibrissin* Durazzini) ethanol extract.

8. Pentobarbital 수면유도 실험

Pentobarbital 수면유도 실험은 오후 1시에서 5시 사이의 일정한 시간 내에 진행되었다. 그룹 당 10마리(n=10)의 mouse를 사용하였으며, 실험 전 24 hr 동안 mouse를 절식시켜

사용하였다. 모든 시료는 0.5% CMC-saline 용액을 이용하여 제조되었으며, pentobarbital 투여 45분 전에 경구투여(p.o.)되었다. 일반 Control 실험군은 0.5% CMC-saline 수용액을 10 mg/kg의 농도로 처리하였으며, Diazepam은 대표적인 수면제 중 하나로 추출물의 수면 증진 효과를 비교하기 위하여 positive control 약물로 사용하였다. Pentobarbital은 실험디자인에 따라 각각 30 mg/kg(sub-hypnotic dosage) 및 45 mg/kg(hypnotic dosage)의 농도로 복강주사(i.p.)를 통해 사용되었다. Pentobarbital이 처리 후 각각의 개체를 독립된 공간에 옮겨서 sleep latency(입면시간)와 duration(수면시간)을 측정하였다. Sleep latency는 pentobarbital을 복강주사한 후 정반사(righting reflex)를 1 min 이상 상실할 때까지의 경과시간으로 간주하였고, sleep duration은 다시 정반사를 회복할 때까지의 시간으로 설정하였다(Fig. 1-4). Pentobarbital 투여 후 10분이 지나도 수면행동을 보이지 않은 mouse는 실험에서 제외되었다. Sub-hypnotic dosage 실험에서 sleep onset은 다음과 같이 계산되었다: Sleep onset (%)=No. falling asleep / Total No. × 100.

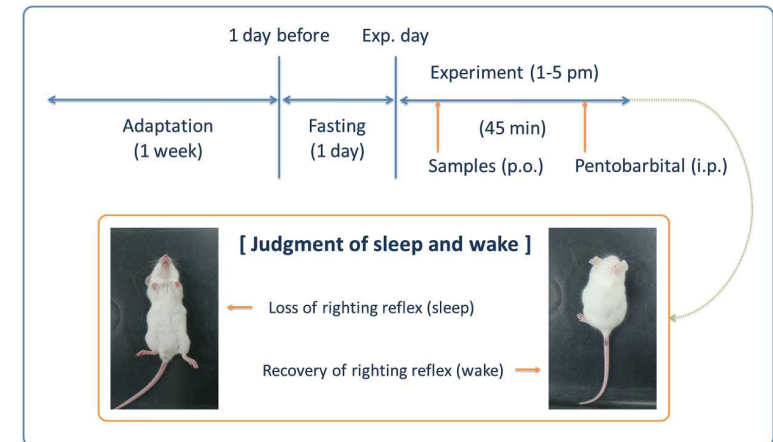


Fig. 1-4. Protocol of pentobarbital-induced sleep behaviour test in mice.

9. 설치류 수면구조 분석

SD rat(200-250 g)를 1주일간 적응시킨 후 뇌파(Electroencephalogram, EEG) 및 근전도도(Electromyogram, EMG) 측정을 위해 전극 삽입 수술을 실시하였다. Rat를 pentobarbital(50 mg/kg, i.p.)로 마취시키고 뇌정위기(stereotaxic instrument)에 두부를 고

정시켰다. 두부 피하 결합조직을 절개한 후 EEG 및 EMG 측정을 위하여 stainless-steel screw 와 silver electrode line을 Fig. 1-5(A)와 같이 삽입하였다. 이후 치과용 dental cement로 고정시키고 봉합하였다. 수술부위의 소독 및 항생제 투여를 3일 동안 실시하여 수술로 인한 염증을 예방하였으며, 7일간 회복기간을 두었다. 측정환경에 적응시키기 위하여 측정 4일 전부터 control 실험군에 사용하는 0.5% CMC-saline 용액을 경구투여(p.o.) 한 후 recording 장치를 연결하여 본 실험과정에 순응하도록 유도하였다(Fig. 1-5(B)). EEG 및 EMG는 시료 경구투여 후 5분간 안정화 시킨 다음 PAL-8200 series(Pinnacle Technology Inc, Oregon, USA)를 이용하여 10:00부터 16:00까지 6시간동안 측정하였다. EEG 및 EMG의 sampling rate는 200 Hz로 설정하고(epoch time: 10 s), EEG는 0.1-25 Hz, EMG는 10-100 Hz의 필터 영역을 설정하여 데이터를 기록하였다. 수면구조 분석은 fast Fourier transform(FFT) 알고리즘에 의해 수행되었으며, SleepSign 프로그램(Ver. 3.0, Kissei Comtec, Nagano, Japan)을 이용하였다. 분석결과는 wake, REM sleep(rapid eye movement, theta band: 6-10 Hz), NREM sleep(non-rapid eye movement, delta band: 0.65-4 Hz)으로 구분하여 나타내었다. Sleep latency(입면시간)는 10 s epoch 단위의 NREM 수면이 12번 이상 연속적으로 나타나는데 걸리는 시간으로 설정하였다.

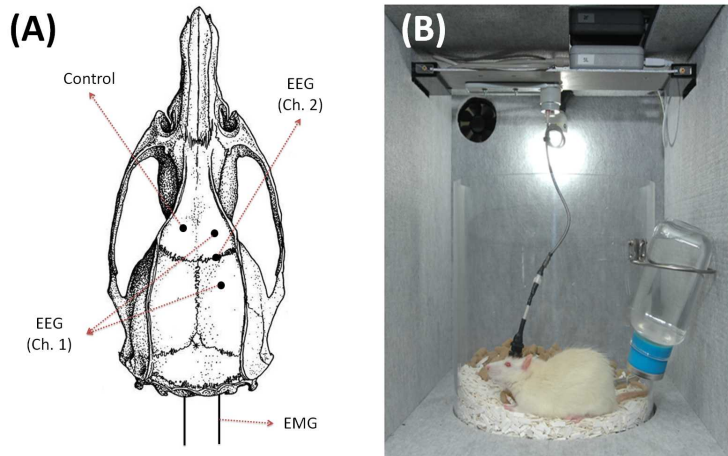


Fig. 1-5. Positions of EEG and EMG in rat skull (A) and the recording chamber (B).

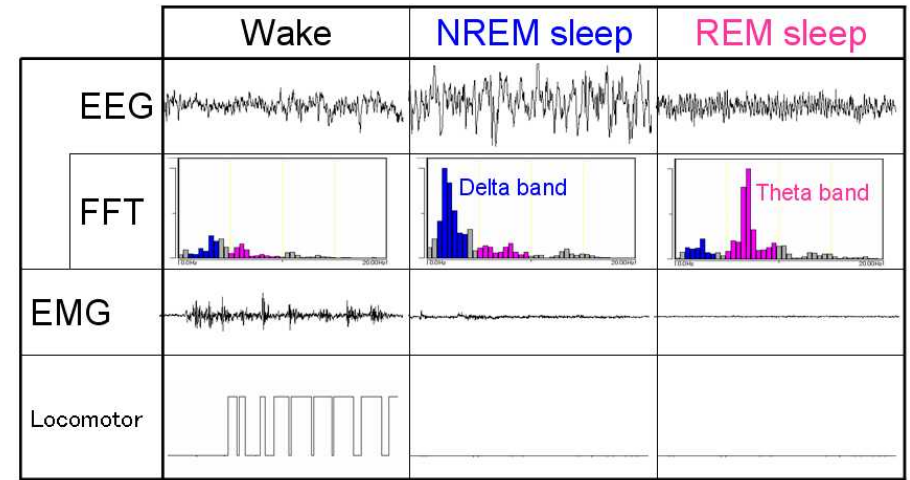


Fig. 1-6. Typical waveform and fast Fourier transform (FFT) spectrum of rat.

10. 반응표면분석법 (Response Surface Methodology)

GABA_A 및 5-HT_{2C} receptor binding assay에서 결합 활성이 높은 감초, 단삼, 합환피 및 신선초의 에탄올 추출조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용하였다(Box & Wilson, 1951). 실험디자인(experimental design)은 중심합성계획법(Central Composite Design, CCD)에 의하여 설정되었다(Fig. 1-7). 반응에 영향을 미치는 인자(parameter)인 독립변수(independent variable)는 에탄올 농도(X_1), 추출 시간(X_2) 및 추출 온도(X_3)으로 설정하였다. 독립변수의 중심값과 범위는 예비실험을 통해 설정되었으며, 5가지 수준(-1.682, -1, 0, +1, +1.682)으로 부호화하여 통계분석을 실시하였다(Table 1-4). 가수량의 경우는 10배 이상에서 거의 영향을 미치지 않아 10배로 고정하였다. 종속변수(dependent variable)로는 10 mg/ml 농도에서의 결합억제 활성(Y_1)과 수율(Y_2)을 설정하였다. 감초와 단삼은 GABA_A receptor, 합환피와 신선초는 5-HT_{2C} receptor에 대한 결합억제 활성을 측정하였다. 실험에서 기대하지 않는 오차를 줄이기 위하여 실험구들은 무작위적으로 선택되어 실시되었다.

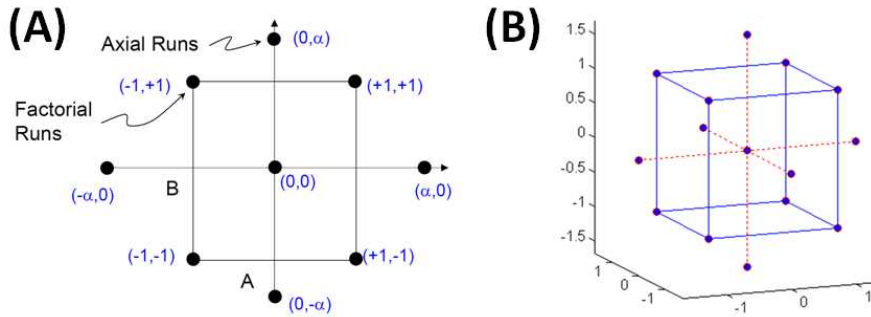


Fig. 1-7. The example points of a central composite design with two (A) and three (B) input parameters.

Table 1-4. Experimental range and values of the independent process variables in the central composite design for ethanol extraction

Independent variables	Symbol	Range and levels				
		-1.682	-1	0	1	+1.682
Ethanol concentration (% v/v)	X_1	20.0	36.2	60.0	83.8	100.0
Extraction time (hr)	X_2	12.0	24.2	42.0	59.8	72.0
Extraction temperature (°C)	X_3	20.0	28.1	40.0	51.9	60.0

반응표면모델식(response surface model equation)은 95% 수준에서 유의성을 가지는 2차 다항식의 형태로 아래의 식과 같이 나타내었다. 모든 통계처리는 MINITAB(Version 13, Minitab Inc., USA)을 사용하였으며, 3차원 그래프는 Maple(Version 7, Waterloo Maple Inc., Canada)을 이용하여 나타내었다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j$$

11. 분리정제

최적조건에서 제조된 감초 에탄올 추출물(300 g)로부터 계통분획법에 의해 순차적으로 D.W, hexane, chloroform, ethylacetate, n-buthanol 분획물을 제조하였다. 용매분획을 통해 얻어진 분획물들은 GABA_A-benzodiazepine 및 5-HT_{2C} receptor binding assay를 이용한 활성추적분획법(activity-guided chromatography)을 통해 분리되었다. 활성분획으로부터 silica gel, RP-silica gel 등의 각종 matrix를 적절히 이용하였고, 다양한 용출용매로 column chromatography를 실시하였다. TLC pattern 및 10% H₂SO₄에 의한 발색양상에 따라 소분획 및 활성물질로 나누고, 각 분획물 및 활성물질의 receptor binding activity를 확인하는 과정을 반복하였다. 최종적으로 분리된 유효 단일물질은 NMR spectrum 분석을 통해 구조가 분석되었다. ¹H-NMR spectrum상의 chemical shift로부터 수소관련 화학적 환경 해석과 coupling constant로부터 인접 수소와의 입체배열을 해석하였으며 integration으로부터 수소 signal의 개수를 확인하였다. H₂SO₄ ¹³C-NMR spectrum으로부터 화합물을 구성하는 탄소수 및 탄소의 주위 환경을 해석하였고, DEPT NMR data로부터 탄소의 다중도를 확인하였다. H₂SO₄ ¹H-¹H COSY spectrum으로부터 인접 수소의 환경을 해석하였고, 부분구조와 ¹H-¹³C COSY spectrum으로부터 수소와 탄소의 직접적인 연결을 확인하였으며, HMBC spectrum으로부터 부분 구조를 포함한 전체적인 화학구조를 확인하였다. H₂SO₄ NOE spectrum으로부터 공간적 입체적 상대구조를 해석하였고, NOESY spectrum으로부터 더 확실한 상대적 입체구조를 확인하였다.

12. 통계 처리

Binding assay에서 IC₅₀ 값은 Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 계산하였으며, displacement binding curve는 one-site competition binding model을 적용시켜 도출하였다. 모든 동물실험의 결과는 평균과 표준오차(mean±SEM)로 나타내었고, 각 군과 대조군과의 통계적인 비교는 Dunnet's test에 의한 One-way analysis of variance(ANOVA)를 통해 평가하였다. 유의수준의 표시는 P<0.05(*), P<0.01(**), P<0.005(***) 수준에서 유의성이 보이는 결과를 별표로 표시하였다. 또한, 두 그룹간의 유의적인 차이는 t-test를 통해 평가되었으며, P<0.05(#), P<0.01(##)으로 표시하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 수면 관련 신경전달물질 수용체 결합력 탐색

가. 수면증진 소재의 탐색 방법 설정

수면은 인간의 생리현상 중 가장 중요하고 기본적인 것으로 신체 및 정신 상태에 따라 많은 영향을 받게 된다. 그리고 신경과학 및 분자생물학적 관점에서 볼 때 수면은 GABA(γ -aminobutyric acid), 5-HT(serotonin), adenosine, melatonin, dopamine 및 histamine 등 다양한 신경전달물질(neurotransmitter)에 의해 조절되고 있다. 그 동안 많은 연구를 통해 수면에 대한 mechanism들이 밝혀졌지만, 여전히 명확히 규명되지 않는 부분들도 많다. 본 연구에서는 수면증진 소재를 탐색하기 위하여 수면과 관련이 깊은 GABA 및 serotonin(5-HT) 수용체를 타겟으로 설정하였다. 현재까지 개발된 수면제의 경우 크게 benzodiazepine 계열, 항우울제 계열 및 항히스타민 계열로 구분할 수 있다.

Table 1-5. Comparison of sleep drug classes

Class/Drug	Mechanism of Action	Adverse Effects
BZDs Estazolam, flurazepam, quazepam, temazepam, triazolam	CNS effect due to allosteric interactions of BZD receptors with GABA _A receptors facilitating opening of chloride channels	Sedation, confusion, anterograde amnesia
Non-BZDs Zolpidem, zaleplon, eszopiclone	Interact with GABA _A receptor complex at binding domains located near to or allosterically coupled to BZD receptors	Dizziness, somnolence
Antidepressants Trazodone	Weak but selective blockade of 5-HT reuptake at the presynaptic neuronal membrane; metabolite blocks CNS 5-HT ₂ receptors	Weight changes, sweating, priapism
Amitriptyline	Blocks reuptake of NE and 5-HT at the neuronal membrane	Weight gain, bloating, CV changes
Mirtazapine	Antagonist at central presynaptic α_2 -adrenergic autoreceptors and heteroreceptors; antagonist at CNS 5-HT ₂ and 5-HT ₃ receptors	↑ Appetite, ↑ serum cholesterol, ↑ TG
Antihistamines Diphenhydramine	First generation antihistamine that is an antagonist at the H ₁ receptor	Dizziness, somnolence

Source: Borja and Daniel, Clinical Therapeutics 28, 2006.

Benzodiazepine계 약물들은 GABA_A receptor를 활성화시켜 chloride current를 증가시킴으로 인해 수면진정 효과를 나타낸다(Fig. 1-8). GABA는 중추신경계의 활성을 억제하는 기능을 가지는 신경전달물질로 사이신경세포(interneuron)에 주로 존재하고 있는데 이러한 GABA가 결합하게 되는 GABA receptor는 수면, 진정과 같은 다양한 생리적인 현상과 밀접한 관련이 있으며, GABA_A, GABA_B 및 GABA_C 3가지가 밝혀져 있다. GABA_A receptor는 α , β , γ , δ 및 ρ 의 5개의 subunit로 구성되어 있는데 GABA는 GABA_A receptor의 α 및 β subunit에 결합하여 이온통로를 여는 작용을 하는데 염소이온이 신경세포 내로 유입이 되면 신경이 억제되는 현상이 나타난다. 대부분의 수면제는 GABA_A receptor의 α 및 δ subunit의 benzodiazepine 부위에 결합하여 GABA_A receptor의 activity를 높여 이온통로가 열리는 횟수를 증가시킴으로 신경세포 내로 염소이온이 들어오게 되어 신경전달을 억제하는 메커니즘을 이용하고 있다. GABA_A receptor는 뇌 부위 중 cerebral cortex(대뇌피질)에 가장 많이 분포하고 있으며 이 외에도 cerebellum(소뇌), hippocampus(해마), striatum(선조체)에도 존재한다. 본 연구에서는 농산자원의 건강수면효과를 탐색하기 위한 실험방법으로 방사선 동위원소(RI)를 이용한 GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay를 수행하였다.

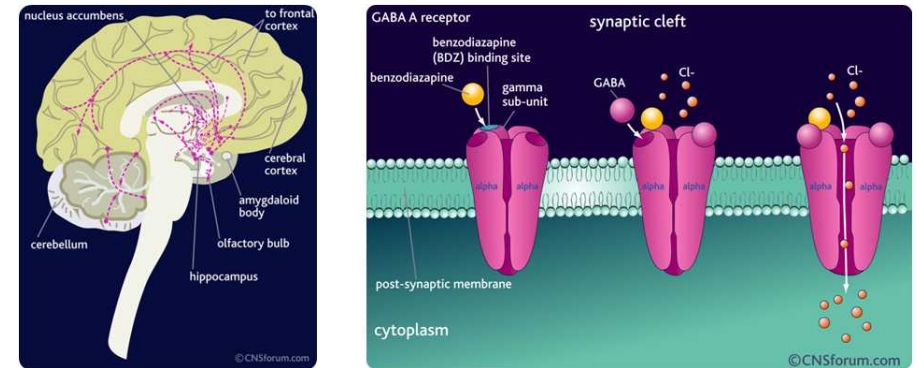


Fig. 1-8. GABA pathway and mechanism of GABA_A-benzodiazepine receptor.

Source: CNS forum.

항우울제 계열의 약물들은 대부분 5-HT₂ receptor에 작용하여 세포 내 calcium 증가를 억제함으로써 항우울 및 진정효과를 나타내게 된다(Fig. 1-9). 5-HT₂ receptor는 2A, 2B, 2C 세 개의 subtype이 있는데 본 연구에서는 2C receptor를 설정하여 탐색하였다. 5-HT_{2C} receptor antagonist는 깊은 수면인 NREM sleep을 증가시키며, 우울증으로 인한

불면증 치료에 효과적이다. 또한 5-HT receptor는 GPCR(G protein-coupled receptor)로 2C에 효능이 있는 약물들은 대부분 2A 및 histamine receptor와 같은 다른 GPCR에도 효능을 가지는 경우가 많다. 5-HT₂ receptor binding assay는 초기 연구내용상에는 없었지만 GABA assay에서 감초와 단삼만이 효과를 보여 다른 소재를 찾고자 추가적으로 수행되었다.

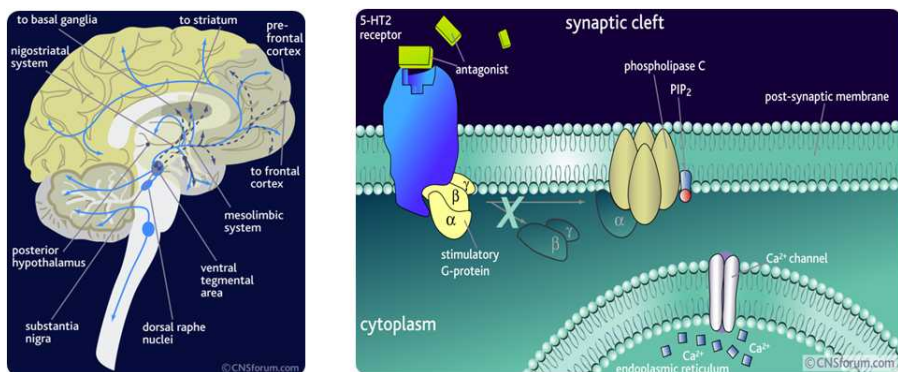


Fig. 1-9. 5-HT pathway and mechanism of 5-HT₂ receptor.

Source: CNS forum.

나. GABA_A-benzodiazepine receptor 결합력 분석

종자류 3종(대추, 오미자, 석류), 근류 7종(단삼, 당귀, 백출, 감초, 홍삼, 인삼, 건강), 채소류 5종(양파, 신선초, 대파, 상추, 부추), 기타 5종(합환피, 영지, 복령, 옥죽, 선인장)의 물 및 에탄올 추출물을 대상으로 GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay를 수행하였다. 실험에 사용된 농도는 10 mg/mL에서 0.001 mg/mL까지 5 구간으로 설정하였으며, [³H] flumazenil binding의 억제활성을 분석하였다. 물 추출물의 binding 억제 활성은 대부분의 소재에서 나타나지 않았으며, 감초(licorice) 물 추출물이 약 50%의 binding 억제 활성을 나타내었다. 감초의 경우 에탄올 추출물이 매우 높은 활성을 나타내었는데 물 추출물 또한 비교적 효과가 있어 활성성분이 물과 에탄올 모두에서 추출되는 것으로 사료된다. 에탄올 추출물의 경우는 건강(ginger)과 신선초(angelica)에서 약 50% 정도의 억제활성을 보였으며, 가장 큰 억제 활성은 감초 및 단삼(danshen)에서 확인되었다.

Table 1-6. Oriental medicinal plants screened for GABA_A-BZD and 5-HT_{2C} receptor binding assays

Common name	Scientific name	Plant part analyzed	Traditional usage for neuropsychology
Onion	<i>Allium cepa</i> Linn	Whole	CNS ^a sedation
Scallion	<i>Allium fistulosum</i>	Whole	Relaxation
Lettuce	<i>Lactuca sativa</i> Linn	Whole	CNS sedation
Leek	<i>Allium tuberosum</i> Rottler	Whole	Relaxation
Reishi mushroom	<i>Ganoderma lucidum</i> Karsten	Whole	Relaxation
Hoelen	<i>Paria cocos</i>	Whole	Treatment of anxiety symptoms
Chinese jujube	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	Fruit	CNS sedation
Chinese magnolia	<i>Schizandra chinensis</i> Baillon	Fruit	Inhibition of CNS
Pomegranate	<i>Punica granatum</i>	Fruit	Appetite improvement
Danshen	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	Root	CNS sedation
Gigantic angelica	<i>Angelica gigas</i> Nakai	Root	Treatment of insomnia
Licorice	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	Root	CNS sedation
Red ginseng ^b	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	Root	CNS sedation
Ginseng	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	Root	CNS sedation
Ginger	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Root	CNS sedation
Solomon's seal	<i>Polygonatum odoratum</i>	Root	CNS sedation
Kitam	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi	Root	Relaxation
Angelica	<i>Angelica utilis</i> Makino	Leaves	Relaxation
Cactus	<i>Opuntia ficus indica</i> Miller	Leaves	CNS sedation
Silk tree	<i>Albizzia julibrissin</i> Durazzini	Bark	Treatment of anxiety symptoms

^aCNS: central nervous system.

^bRed ginseng: the product type air-dried and steamed at 100°C.

Table 1-7. *In vitro* displacement of [³H] flumazenil binding of plant water extracts to the GABA_A-BZD receptor in rat cerebral cortex

Common name (Scientific name)	Displacement (%) of [³ H] flumazenil binding				
	0.001 mg/ml	0.01 mg/ml	0.1 mg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml
Onion (<i>Allium cepa</i> Linn)	21.6±6.5	13.8±2.3	22.2±5.4	15.1±7.3	18.0±9.1
Scallion (<i>Allium fistulosum</i>)	25.8±5.4	15.9±5.4	11.3±4.6	2.7±6.9	12.9±4.1
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> Linn)	11.6±7.7	16.0±9.7	18.0±3.9	15.6±6.6	21.2±6.3
Leek (<i>Allium tuberosum</i> Rottler)	20.6±5.4	31.7±2.7	13.2±6.9	17.5±5.6	18.6±3.5
Reishi mushroom (<i>Ganoderma lucidum</i> Karsten)	13.8±12.3	14.5±9.7	11.0±11.1	10.6±10.4	4.5±12.0
Hoelen (<i>Paria cocos</i>)	3.5±12.6	3.8±8.9	1.7±10.6	4.7±8.6	-6.3±10.8
Chinese jujube (<i>Zizyphus jujuba</i> Miller)	10.9±18.5	18.8±6.1	14.4±14.4	4.6±16.2	17.2±10.5
Chinese magnolia vine (<i>Schizandra chinensis</i> Baillon)	22.6±4.8	20.4±14.1	11.8±17.3	16.1±11.1	25.3±12.8
Pomegranate (<i>Punica granatum</i>)	26.9±10.6	11.7±22.3	18.1±17.9	5.0±23.1	12.7±36.1
Danshen (<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge)	17.8±15.6	26.7±19.2	20.8±20.9	25.8±18.1	38.2±16.0
Gigantic angelica (<i>Angelica gigas</i> Nakai)	-0.7±14.5	20.9±7.7	17.0±13.0	4.3±9.9	12.4±13.0
Licorice (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer)	8.8±9.4	7.6±11.1	11.7±16.4	19.9±13.4	49.6±13.8
Red ginseng (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)	8.7±26.6	9.3±18.4	7.2±4.3	-10.5±12.4	7.7±9.4
Ginseng (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)	16.5±6.9	10.2±13.8	5.0±24.3	3.8±1.4	11.3±9.2
Ginger (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	25.8±11.0	-7.7±16.6	17.0±25.2	32.5±16.8	36.5±28.9
Solomon's seal (<i>Polygonatum odoratum</i>)	6.6±14.6	11.6±12.3	8.8±15.6	11.0±19.0	4.0±34.5
Kitam (<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi)	19.5±5.6	14.5±3.7	12.9±6.2	17.8±6.2	25.5±2.4
Angelica (<i>Angelica utilis</i> Makino)	21.6±15.2	15.9±12.0	12.6±13.3	12.9±23.9	11.1±19.0
Cactus (<i>Opuntia ficus indica</i> Miller)	18.2±8.8	22.5±6.8	17.5±9.0	14.5±7.5	20.5±5.2
Silk tree (<i>Albizzia julibrissin</i> Durazzini)	3.1±22.2	20.3±23.0	0.6±16.5	-3.0±23.9	9.6±21.0

Table 1-8. *In vitro* displacement of [³H] flumazenil binding of plant ethanol extracts to the GABA_A-BZD receptor in rat cerebral cortex

Common name (Scientific name)	Displacement (%) of [³ H] flumazenil binding				
	0.001 mg/ml	0.01 mg/ml	0.1 mg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml
Onion (<i>Allium cepa</i> Linn)	18.2±5.2	17.6±3.1	19.6±1.2	16.6±3.5	8.2±3.7
Scallion (<i>Allium fistulosum</i>)	-1.3±2.3	-18.4±2.5	-36.0±2.3	-28.5±3.5	-36.5±1.9
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> Linn)	13.8±2.6	14.2±3.1	18.6±0.3	15.1±3.2	16.4±2.9
Leek (<i>Allium tuberosum</i> Rottler)	31.3±8.4	21.7±2.1	23.9±0.9	17.3±2.5	21.6±2.9
Reishi mushroom (<i>Ganoderma lucidum</i> Karsten)	13.3±13.9	10.2±17.8	10.4±25.9	18.2±23.7	40.1±15.0
Hoelen (<i>Paria cocos</i>)	-15.1±6.2	1.1±6.9	-0.1±6.9	3.1±6.8	6.3±3.5
Chinese jujube (<i>Zizyphus jujuba</i> Miller)	15.5±7.8	18.4±4.7	18.8±3.5	17.1±5.3	26.3±5.0
Chinese magnolia vine (<i>Schizandra chinensis</i> Baillon)	28.5±3.2	18.8±0.9	18.8±0.3	13.9±0.7	19.2±2.4
Pomegranate (<i>Punica granatum</i>)	21.3±0.7	21.1±1.1	26.5±0.4	21.9±0.3	33.7±1.3
Danshen (<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge)	3±4.3	8.1±4.6	40.1±6.8	71.8±3.2	90.2±0.7
Gigantic angelica (<i>Angelica gigas</i> Nakai)	17.9±3.0	17.6±3.1	12.6±10.3	26.3±3.5	67.8±2.0
Licorice (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer)	1.4±4.6	22.7±6.8	54.0±2.8	81.7±3.3	97.7±0.4
Red ginseng (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)	2.0±1.5	-0.6±7.0	-6.6±1.2	-4.4±5.5	-6.8±5.8
Ginseng (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)	6.3±5.3	12.5±4.6	10.0±2.2	5.1±6.9	-2.9±1.8
Ginger (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	-6.1±11.6	20.1±8.8	15.0±5.8	13.9±3.0	46.6±3.7
Solomon's seal (<i>Polygonatum odoratum</i>)	26.1±4.4	25.4±1.2	18.9±5.2	21.9±0.9	39.1±5.9
Kitam (<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi)	1.1±0.7	0.6±1.7	2.7±2.3	-7.2±5.4	0.9±0.3
Angelica (<i>Angelica utilis</i> Makino)	13.5±2.9	9.0±5.3	9.8±8.9	19.8±17.2	45.2±0.4
Cactus (<i>Opuntia ficus indica</i> Miller)	17.0±4.5	15.2±4.7	13.4±6.8	11.3±3.0	13.9±6.3
Silk tree (<i>Albizzia julibrissin</i> Durazzini)	-20.7±24.8	-12.2±15.2	-3.2±3.3	-4.8±4.3	16.5±2.3

감초 및 단삼의 경우 10 mg/mL의 농도에서 [³H] flumazenil binding을 90% 이상 억제하였으며, 농도의존적으로 억제활성이 나타났다. 감초 추출물(LE) 및 단삼 추출물(DE)의 dose-response curve 및 IC₅₀ 값을 Fig. 1-10에 나타내었다. 감초 및 단삼의 IC₅₀ 값은 각각 0.064 및 0.137로 감초가 다소 높은 것으로 나타났다. 최근의 연구결과(Fang et al., 2010)에 따르면, 단삼 에테르 추출물(600 mg/kg)이 pentobarbital 수면유도 실험에서 수면 증진 효과가 있는 것으로 보고되었다. 따라서 단삼 *in vivo* 수면증진 효과는 GABA_A receptor에 대한 작용으로 기인한 것으로 보인다. 감초의 경우는 이전의 연구에서 GABA_A receptor에 대한 binding activity가 보고되지 않았으며, 본 연구에서 처음으로 규명되었다. 특히, 감초는 약방의 감초로 국내에 가장 널리 알려진 한방 소재이며, 세계적으로도 가장 오랜 역사를 가지는 약용식물 중 하나이다. 감초에는 triterpenoid saponin(glycyrrhizin 등), flavonoid(liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritin, isoliquiritigenin, rhamnoliquiritin 등) 및 isoflavones(glabridin, galbrene, glabrone and shimperocarpin 등) 등이 주요 성분이다 (Mae et al., 2003). 특히 flavonoid 성분들의 GABA_A receptor에 대한 작용이 많이 보고되고 있어(Johnston, 2005) 감초의 liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritin, isoliquiritigenin과 같은 성분들이 작용할 가능성이 높다고 보여진다.

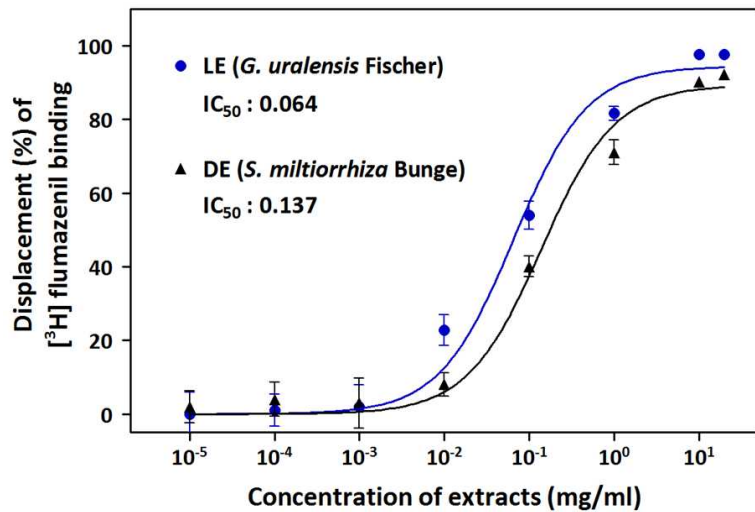


Fig. 1-10. Dose-response curves and IC₅₀ values of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer) and DE (danshen, *S. miltiorrhiza* Bunge) in the GABA_A-BZD receptor binding assay. Each data point is expressed as mean±SD (n=3).

GABA_A receptor는 뇌 영역 전체에 고르게 분포하고 있는데 subunit의 구성에 따라 분포 조금씩 상이하다. α1β2γ2 형태의 GABA_A receptor가 60% 이상의 가장 큰 비중을 차지하고 있으며 다음으로 α1β3γ2 및 α3βγ2의 형태가 많다(Table 1-9). GABA_A receptor의 subunit 구성에 따라 약리적인 특징이 조금씩 다르지만 대부분 수면진정 및 항불안효과와 밀접하게 관련되어 있다. 스크리닝 단계에서는 대뇌피질(cerebral cortex)을 대상으로 했기 때문에 다양한 뇌 영역에서도 같은 활성을 보이는지 확인할 필요가 있다. 따라서, 감초(LE) 및 단삼(DE)의 binding activity를 서로 다른 subunit 조성의 GABA_A receptor가 존재하고 있는 소뇌(cerebellum), 선조체(striatum) 및 해마(hippocampus) 영역을 대상으로 알아보았다.

Table 1-9. Distribution and physiological properties and functions associated with GABA_A receptor classes

Subunit	Abundance	Roles/properties	Location
α1β2γ2	60%	Sedation, amnestic, anticonvulsant: High affinity for BZ agonists, ZOL and FLU	cerebral cortex cerebellum striatum hippocampus
α1β3γ2	15-20%	Anxiolytic; high affinity for classical BZ agonists and FLU. Intermediate affinity for ZOL	cerebral cortex striatum hippocampus
α3βγ2	10-15%	Anxiolytic; high affinity for classical BZ agonists and FLU. Intermediate affinity for ZOL	cerebral cortex cerebellum hippocampus
α4βγ/α4βnδ	<5%	Insensitive to classical BZ agonists and ZOL High affinity for classical BZ agonists and FLU	cerebral cortex hippocampus
α5β1/3γ2	<5%	Very low affinity for ZOL	

감초 추출물(LE) 및 단삼 추출물(DE) 모두 대뇌피질(cerebral cortex)에서와 마찬가지로 소뇌(cerebellum), 선조체(striatum) 및 해마(hippocampus)에서도 농도의존적으로 binding activity를 나타내었다(Fig. 1-11, 1-12, 1-13). 이러한 결과를 통해 감초 추출물(LE) 및 단삼 추출물(DE)이 다양한 subunit 조성의 GABA_A receptor에 작용할 수 있음을 알 수 있었다.

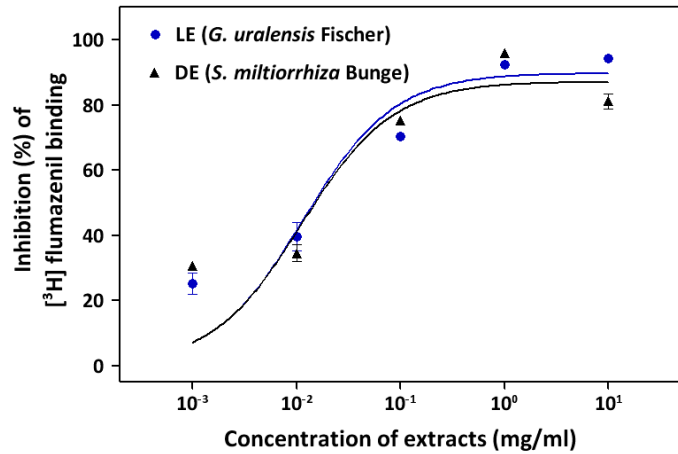


Fig. 1-11. *In vitro* inhibition of [³H] flumazenil binding to GABA_A-benzodiazepine receptor in the cerebellum of rat brain by ethanol extracts of danshen (DE) and licorice (LE). Each data point is expressed as mean±SD (n=3).

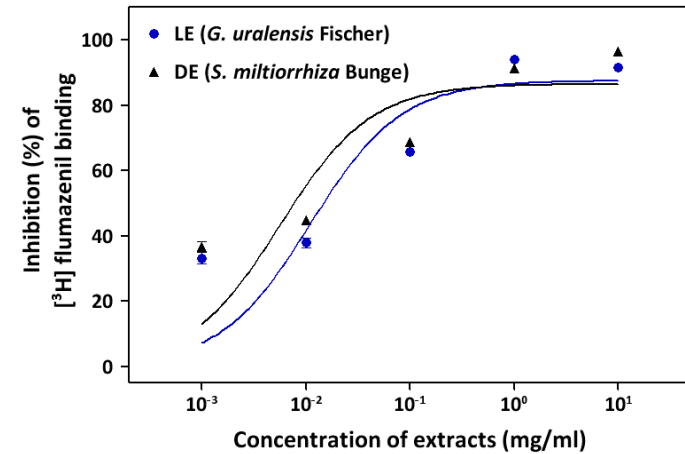


Fig. 1-13. *In vitro* inhibition of [³H] flumazenil binding to GABA_A-benzodiazepine receptor in the hippocampus of rat brain by ethanol extracts of danshen (DE) and licorice (LE). Each data point is expressed as mean±SD (n=3).

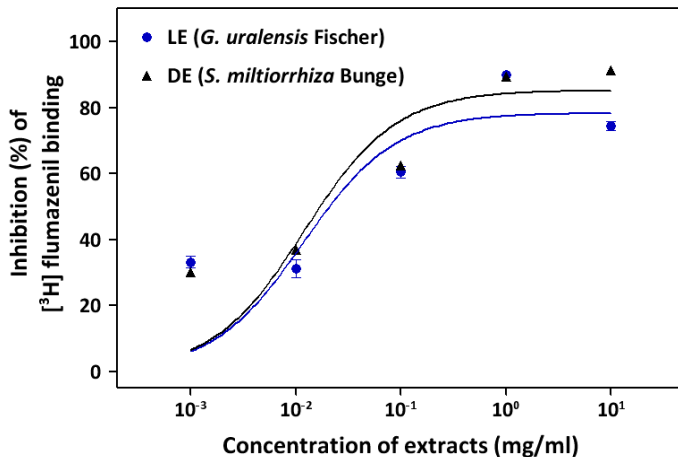


Fig. 1-12. *In vitro* inhibition of [³H] flumazenil binding to GABA_A-benzodiazepine receptor in the striatum of rat brain by ethanol extracts of danshen (DE) and licorice (LE). Each data point is expressed as mean±SD (n=3).

다. 5-HT_{2C} (Serotonin type 2C) receptor 결합력 분석

5-HT_{2C} receptor binding assay는 초기 연구내용상에는 없었지만 GABA assay에서 감소와 단삼만 효과를 보여 다른 소재를 찾고자 추가적으로 수행되었다. 그동안 허브류의 수면증진 효과의 연구들은 GABA_A-benzodiazepine receptor에 초점을 맞추어 이루어졌다. 하지만 5-HT_{2C} receptor도 수면진정 효과(Smith et al., 2002) 및 항불안 효과(Harada et al., 2006)에 대한 약리학적 타겟이 되고 있다. 5-HT_{2C} receptor antagonist인 ritanserin은 인간(Viola et al., 2002)과 rat(Kantor et al., 2002)에서 slow wave sleep을 증가시킨다는 보고가 있다. 5-HT_{2C} receptor binding assay도 GABA_A receptor와 마찬가지로 모든 물 및 에탄올 추출물의 [³H] mesulergine binding 억제활성을 분석하였다. 물 추출물의 binding 억제 활성은 대부분의 소재에서 나타나지 않았다(Table 1-10). 에탄올 추출물에서는 인삼, 홍삼, 신선초 및 합환피가 높은 binding 억제 활성을 나타내었다(Table 1-11). 특히, 인삼과 홍삼의 경우 가장 대표적인 국내의 한방소재로써 이러한 활성은 향후 다른 연구에도 좋은 자료가 될 것으로 판단된다. 인삼의 가장 대표적인 기능성분인 saponin의 경우 pentobarbital 수면유도 실험에서 효과가 있는 것으로 보고되었으며(Jung and Jin, 1996), 홍삼 에탄올 추출물도 NREM sleep을 증가시키는 것으로 보고되었다(Ma et al., 2009b).

Table 1-10. *In vitro* displacement of [³H] mesulergine binding of plant water extracts to membrane expressing human recombinant 5-HT_{2c} receptor

Common name (Scientific name)	Displacement (%) of [³ H] mesulergine binding				
	0.001 mg/ml	0.01 mg/ml	0.1 mg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml
Onion (<i>Allium cepa</i> Linn)	5.0±2.7	7.3±7.9	25.6±12.7	24.5±10.9	25.6±9.8
Scallion (<i>Allium fistulosum</i>)	11.9±5.8	31.3±4.9	25.9±4.5	19.0±8.6	36.2±11.6
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> Linn)	22.1±11.5	22.7±13.9	40.9±12.9	41.9±7.4	31.8±9.2
Leek (<i>Allium tuberosum</i> Rottler)	27.4±8.6	36.8±11.9	34.6±12.6	22.0±9.1	7.0±9.7
Reishi mushroom (<i>Ganoderma lucidum</i> Karsten)	40.7±6.7	44.2±0.6	35.3±2.9	24.8±2.1	44.8±1.0
Hoelen (<i>Paria cocos</i>)	-25.3±8.4	-86.9±11.1	-30.2±5.1	-10.5±6.5	-25.3±5.9
Chinese jujube (<i>Zizyphus jujuba</i> Miller)	38.4±8.0	28.8±8.3	20.9±8.2	-13.7±5.0	-27.0±7.2
Chinese magnolia vine (<i>Schizandra chinensis</i> Baillon)	35.7±6.0	47.8±3.3	26.7±8.7	29.1±9.9	50.4±8.8
Pomegranate (<i>Punica granatum</i>)	33.3±5.8	35.4±1.8	35.3±2.1	38.5±6.2	44.6±3.2
Danshen (<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge)	6.5±11.9	-14.4±3.2	-6.5±6.4	-16.0±5.8	8.0±6.0
Gigantic angelica (<i>Angelica gigas</i> Nakai)	-21.7±8.8	-15.7±8.7	-22.8±6.7	-50.1±5.2	-5.6±6.5
Licorice (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer)	48.4±7.0	28.6±8.3	22.6±8.6	33.7±1.7	67.1±5.7
Red ginseng (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)	19.5±0.6	26.1±6.0	28.4±3.7	21.5±4.1	31.3±2.8
Ginseng (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)	40.9±6.2	46.6±0.6	45.5±10.7	31.5±6.5	0.8±9.7
Ginger (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	9.0±5.7	-26.7±8.2	-24.3±1.3	-53.1±5.3	-61.7±7.9
Solomon's seal (<i>Polygonatum odoratum</i>)	32.9±7.7	17.0±10.5	14.1±9.9	-15.1±1.7	-12.4±7.9
Kitam (<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi)	19.4±6.7	38.5±6.3	3.1±11.2	6.0±12.7	8.8±3.2
Angelica (<i>Angelica utilis</i> Makino)	34.8±2.8	27.2±0.4	20.2±0.5	14.5±9.3	37.6±6.9
Cactus (<i>Opuntia ficus indica</i> Miller)	32.0±3.3	34.4±4.0	27.5±5.0	45.3±7.3	51.1±6.7
Silk tree (<i>Albizia julibrissin</i> Durazzini)	11.4±6.0	21.4±0.9	-11.2±1.5	-39.0±8.9	-49.8±7.8

Table 1-11. *In vitro* displacement of [³H] mesulergine binding of plant ethanol extracts to membrane expressing human recombinant 5-HT_{2c} receptor

Common name (Scientific name)	Displacement (%) of [³ H] mesulergine binding				
	0.001 mg/ml	0.01 mg/ml	0.1 mg/ml	1 mg/ml	10 mg/ml
Onion (<i>Allium cepa</i> Linn)	15.7±6.1	25.8±8.9	30.1±10.2	27.3±8.1	28.8±9.2
Scallion (<i>Allium fistulosum</i>)	38.8±11.2	40.0±8.2	23.6±3.6	19.5±7.8	21.4±5.3
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> Linn)	41.9±6.3	23.1±5.2	16.6±8.1	21.0±7.9	13.9±4.2
Leek (<i>Allium tuberosum</i> Rottler)	60.1±3.6	30.5±6.1	21.7±3.2	16.5±10.7	20.1±10.5
Reishi mushroom (<i>Ganoderma lucidum</i> Karsten)	21.0±9.6	5.6±11.6	3.2±6.6	5.5±5.8	2±0.7
Hoelen (<i>Paria cocos</i>)	16.6±2.9	5.9±1.1	21.0±2.6	12.0±2.2	6.5±0.6
Chinese jujube (<i>Zizyphus jujuba</i> Miller)	37.8±0.5	28.4±2.8	37.3±2.8	44.2±1.7	39.6±1.8
Chinese magnolia vine (<i>Schizandra chinensis</i> Baillon)	33.3±5.8	35.4 ±1.8	35.3±2.1	38.5±6.2	44.6±3.2
Pomegranate (<i>Punica granatum</i>)	-42.9±5.5	-49.7±1.0	-60.0±9.7	-48.6±6.8	8.0±6.0
Danshen (<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge)	31.4±0.1	23.3±2.3	22.7±1.6	4.7±8.1	7.5±1.4
Gigantic angelica (<i>Angelica gigas</i> Nakai)	22.1±9.8	20.1±6.3	4.6±6.9	-1.4±4.0	-6.1±8.4
Licorice (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer)	14.5±11.0	16.5 ±7.3	12.2±0.7	9.5±7.8	-14.8±0.1
Red ginseng (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)	4.1±10.8	8.7±6.9	5.0±8.6	47.1±7.0	90.1±2.0
Ginseng (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)	4.1±4.3	9.1±2.4	37.8±5.3	56.6±2.2	98.7±0.4
Ginger (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	10.8±6.1	7.9±9.2	13.9±8.6	10.7±1.7	-12.0±6.5
Solomon's seal (<i>Polygonatum odoratum</i>)	21.0±8.1	14.8±7.0	22.9 ±7.6	31.0±3.7	13.5±0.4
Kitam (<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi)	6.7±8.7	18.1±6.2	15.8±3.2	16.9±2.2	39.7±7.7
Angelica (<i>Angelica utilis</i> Makino)	21.0±4.6	27.8±0.7	31.3±6.1	45.4±4.2	83.1±0.7
Cactus (<i>Opuntia ficus indica</i> Miller)	19.6±4.6	28.7±3.4	26.7±5.4	24.0±10.2	37.2±1.0
Silk tree (<i>Albizia julibrissin</i> Durazzini)	5.0±5.2	7.2±2.6	25.2±5.3	50.3±2.9	87.9±1.1

합환피는 아시아 지역에 널리 분포하고 있으며, 한방 처방에서 불면증 치료와 마음을 진정시키는 데 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2007). 합환피의 주요 성분으로는 saponins, phenolic glycosides, triterpenes 등이 있다(Kinjo et al., 1992; Chen and Zhang, 1997). 합환피의 수면증진 효과는 아직 연구된 바가 없으며, 자귀나무 꽃 추출물이 pentobarbital 수면유도 실험에서 수면증진 효과가 있는 것으로 보고되었다(Kang et al., 2000). 인삼 추출물(GE) 및 합환피 추출물(SE)의 dose-response curve 및 IC₅₀ 값을 Fig. 1-14에 나타내었다. 인삼과 합환피의 IC₅₀ 값은 각각 0.722 및 0.479로 인삼이 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서 탐색된 20종의 원료 중 GABAA 및 5-HT_{2C} receptor에 대한 binding activity를 보이지 않은 원료들도 수면증진 효과가 없다고 할 수는 없다. 두 가지 receptor 외에도 수면과 관련된 많은 receptor들이 있기 때문에 향후 이에 대한 추가적인 연구도 필요할 것으로 사료된다.

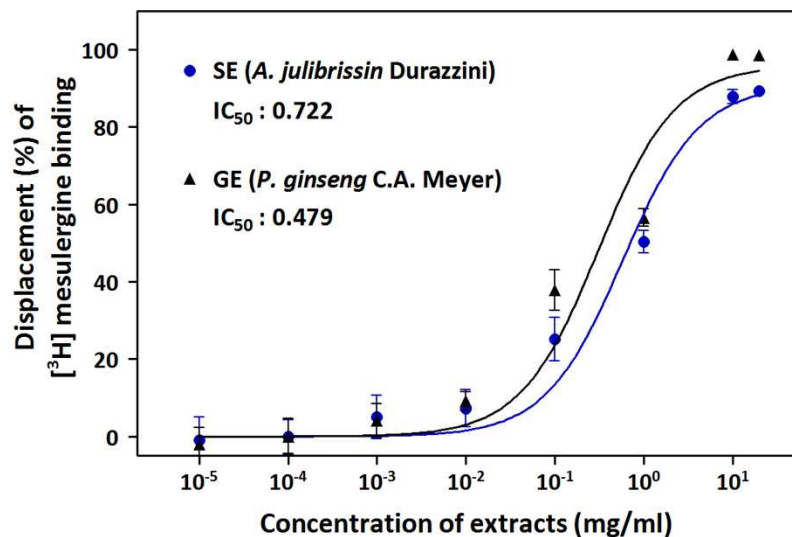


Fig. 1-14. Dose-response curves and IC₅₀ values of SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) and GE (ginseng, *P. ginseng* C.A. Meyer) in the 5-HT_{2c} receptor binding assay. Each data point is expressed as mean±SD (n=3).

2. 반응표면분석법(RSM)을 이용한 제조조건의 최적화

가. 반응표면모델식의 도출 및 진단

GABAA receptor binding assay에서 활성이 높았던 감초(licorice) 및 단삼(danshen)과 5-HT_{2C} receptor binding assay에서 활성이 높았던 합환피(silk tree) 및 신선초(angelica)의 에탄올 추출조건을 최적화하였다. 5-HT_{2C} receptor binding assay에서 인삼 및 홍삼 에탄올 추출물이 효과가 뛰어나지만 원료의 단가가 높고 이미 다양한 제품으로 출시되고 있어 다음으로 효과가 좋은 신선초와 합환피를 소재로 선정하였다. 제조조건의 최적화는 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용하였는데 RSM은 제조조건을 최적화하거나 변수에 대한 영향을 모니터링하는데 매우 효과적인 통계기법으로 최근 식품공학에 있어서도 널리 사용되고 있다(Cho et al., 2005). 중심합성계획법(Central Composite Design, CCD)에 따라 정해진 17개의 실험구들은 무작위적으로 실행되었으며, 그에 따른 종속변수(dependent variable)인 결합억제 활성(Y_1)과 수율(Y_2)의 값들은 Table 1-12에 나타내었다. 감초와 단삼은 GABA_A receptor, 합환피와 신선초는 5-HT_{2C} receptor에 대한 결합억제 활성을 측정하였다.

RSM의 가장 기본적인 원리는 영향을 미치는 독립변수와 이에 따라 반응하는 종속변수 사이의 상호관계를 나타내는 반응표면모델식(response surface model equation)을 결정하는 것이다(Edward & Jutan, 1997). 반응표면모델식 도출을 위한 1차항(X_1, X_2, X_3), 2차항(X_1X_1, X_2X_2, X_3X_3), 교차항(X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3) 및 상수항(constant)에 대한 coefficient 및 P -value를 Table 1-13,14,15,16에 나타내었다. 에탄올 추출조건을 반응표면모델식은 95% 수준에서 유의성이 없는 항들을 제외하고 종속변수에 영향을 미치는 독립변수를 조합하여 도출되었다(Table 1-17,18,19,20,21). 모든 반응표면모델식은 결정계수(R^2) 및 유의수준(P -value)이 각각 0.9 이상 및 0.05 이하로 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났다. 이러한 높은 결정계수와 유의수준을 보이는 것은 예비실험을 통해 독립변수의 중심값과 범위를 설정했기 때문으로 판단된다.

Lack-of-fit(적합결여검정)은 모형의 타당성을 나타내주는 지표로써 유의수준이 0.05 이상 클수록 반응표면모델이 타당한 것을 의미한다. 신선초의 binding 억제활성(Y_1)을 제외한 모든 반응표면 모형에서 유의수준이 0.05 이상으로 모델식이 타당한 것으로 나타났다. 반응표면모델식의 analysis of variance (ANOVA) 결과에 따르면, 모든 모델에서 독립변수의 교차항(Cross-product)은 유의성이 없는 것으로 나타났다.

Table 1-12. Central composite design and responses of the dependent variables for ethanol extraction to the independent variables

Run No.	Coded levels of variable			Response							
				Licorice		Danshen		Silk tree		Angelica	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂
Factorial portion											
1	-1	-1	-1	85.2	27.1	28.3	39.4	77.3	8.5	7.6	23.2
2	1	-1	-1	68.6	14.1	55.0	11.5	83.4	6.0	92.8	11.4
3	-1	1	-1	85.3	31.5	29.4	41.7	87.2	10.6	19.4	23.3
4	1	1	-1	68.7	19.4	68.6	14.8	91.2	9.3	93.7	12.6
5	-1	-1	1	89.2	28.8	35.7	46.7	87.5	10.3	28.6	25.0
6	1	-1	1	55.7	16.7	51.2	13.0	85.3	7.8	84.8	16.4
7	-1	1	1	84.9	34.9	26.4	39.5	89.6	11.8	26.0	24.6
8	1	1	1	64.7	22.6	45.5	18.3	85.4	10.9	81.4	18.2
Star portion											
9	-1.682	0	0	79.5	30.0	23.9	38.9	71.4	10.0	5.0	27.4
10	1.682	0	0	55.6	5.2	73.7	1.9	58.0	4.5	86.8	5.7
11	0	-1.682	0	85.2	26.0	41.4	34.4	93.1	8.5	57.9	14.8
12	0	1.682	0	80.8	32.6	37.5	44.5	94.5	12.7	19.2	19.7
13	0	0	-1.682	69.8	29.5	45.9	41.2	93.3	10.2	74.9	21.7
14	0	0	1.682	65.2	29.9	38.5	40.4	93.5	12.9	48.9	24.5
Center portion											
15	0	0	0	83.4	29.1	41.0	38.4	90.9	11.3	79.0	19.4
16	0	0	0	81.4	30.6	43.8	41.0	92.0	12.0	78.6	20.6
17	0	0	0	83.6	30.5	42.0	40.5	88.1	12.3	76.6	20.0

X₁ (Ethanol concentration, %, v/v), X₂ (Extraction time, hr), X₃ (Extraction temperature, °C).

Y₁ (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y₂ (Yield, %).

Licorice and dashen: GABA_A receptor binding, Silk tree and angelica: 5-HT_{2c} receptor binding.

Table 1-13. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for responses based on t-statistic in ethanol extraction of licorice

Parameter	Y ₁		Y ₂	
	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Constant	82.5936	0.001	30.1226	0.001
X ₁	-9.3057	0.001	-6.6783	0.001
X ₂	-0.1831	0.873	2.4016	0.001
X ₃	-1.5403	0.207	0.8473	0.074
X ₁ X ₁	-4.6770	0.006	-4.6000	0.001
X ₂ X ₂	0.7841	0.541	-0.4645	0.331
X ₃ X ₃	-4.6947	0.006	-0.3231	0.491
X ₁ X ₂	1.6625	0.289	0.0875	0.873
X ₁ X ₃	-2.5625	0.120	0.0875	0.873
X ₂ X ₃	0.5625	0.709	0.2875	0.603

X₁ (Ethanol concentration, %, v/v), X₂ (Extraction time, hr), X₃ (Extraction temperature, °C).
Y₁ (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y₂ (Yield, %).

Table 1-14. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for responses based on t-statistic in ethanol extraction of danshen

Parameter	Y ₁		Y ₂	
	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Constant	42.3337	0.001	40.2908	0.001
X ₁	13.4910	0.001	-12.5883	0.001
X ₂	-0.5022	0.460	1.5147	0.273
X ₃	-2.5587	0.005	0.6410	0.630
X ₁ X ₁	2.0776	0.022	-8.0366	0.001
X ₂ X ₂	-1.2273	0.126	-1.3031	0.383
X ₃ X ₃	-0.2553	0.729	-0.8259	0.574
X ₁ X ₂	2.0125	0.048	1.6875	0.344
X ₁ X ₃	-3.9125	0.002	-0.0125	0.994
X ₂ X ₃	-3.7125	0.003	-0.9375	0.591

X₁ (Ethanol concentration, %, v/v), X₂ (Extraction time, hr), X₃ (Extraction temperature, °C).

Y₁ (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y₂ (Yield, %).

Table 1-15. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for responses based on *t*-statistic in ethanol extraction of silk tree

Parameter	Y ₁		Y ₂	
	Coefficient	<i>P</i> -value	Coefficient	<i>P</i> -value
Constant	90.1869	0.001	11.8843	0.001
X ₁	-1.3793	0.235	-1.2045	0.001
X ₂	1.6294	0.169	1.2494	0.001
X ₃	0.6616	0.553	0.8011	0.002
X ₁ X ₁	-8.5546	0.001	-1.6929	0.001
X ₂ X ₂	1.7313	0.182	-0.5088	0.026
X ₃ X ₃	1.5899	0.216	-0.1730	0.370
X ₁ X ₂	-0.5125	0.723	0.3500	0.147
X ₁ X ₃	-2.0625	0.181	0.0500	0.822
X ₂ X ₃	-1.9375	0.205	-0.1000	0.655

X₁ (Ethanol concentration, %, v/v), X₂ (Extraction time, hr), X₃ (Extraction temperature, °C).
Y₁ (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y₂ (Yield, %).

Table 1-16. Estimated coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for responses based on *t*-statistic in ethanol extraction of angelica

Parameter	Y ₁		Y ₂	
	Coefficient	<i>P</i> -value	Coefficient	<i>P</i> -value
Constant	77.600	0.001	19.9722	0.001
X ₁	29.922	0.001	-5.4179	0.001
X ₂	-4.275	0.274	0.8011	0.111
X ₃	-2.667	0.483	1.3479	0.018
X ₁ X ₁	-9.756	0.043	-1.1233	0.053
X ₂ X ₂	-12.354	0.017	-0.8759	0.113
X ₃ X ₃	-4.101	0.335	1.1919	0.043
X ₁ X ₂	-1.462	0.765	0.4125	0.496
X ₁ X ₃	-5.987	0.244	0.9375	0.147
X ₂ X ₃	-2.338	0.635	0.0125	0.983

X₁ (Ethanol concentration, %, v/v), X₂ (Extraction time, hr), X₃ (Extraction temperature, °C).
Y₁ (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y₂ (Yield, %).

Table 1-17. Response surface model for ethanol extraction conditions

Responses	Quadratic polynomial model equations	R ²	<i>P</i> -value
Licorice	Y ₁ Y ₁ = 82.5936 - 9.3057X ₁ - 4.6770X ₁ ² - 4.6947X ₃ ²	0.938	0.002
	Y ₂ Y ₂ = 30.1226 - 6.6783X ₁ + 2.4016X ₂ - 4.6000X ₁ ²	0.984	0.001
Danshen	Y ₁ Y ₁ = 42.3337 + 13.4910X ₁ - 2.5587X ₃ + 2.0776X ₁ ² + 2.0125X ₁ X ₂ - 3.9125X ₁ X ₃ - 3.7125X ₂ X ₃	0.987	0.001
	Y ₂ Y ₂ = 40.2908 - 12.5883X ₁ - 8.0366X ₁ ²	0.951	0.001
Silk tree	Y ₁ Y ₁ = 90.1869 - 8.5546X ₁ ²	0.924	0.004
	Y ₂ Y ₂ = 11.8843 - 1.2045X ₁ + 1.2494X ₂ + 0.8011X ₃ - 1.6929X ₁ ² - 0.5088X ₂ ²	0.970	0.001
Angelica	Y ₁ Y ₁ = 77.6000 + 29.9220X ₁ - 9.7560X ₁ ² - 12.3540X ₂ ²	0.924	0.004
	Y ₂ Y ₂ = 19.9722 - 5.4179X ₁ + 1.3479X ₃ + 1.1919X ₃ ²	0.964	0.001

X₁ (Ethanol concentration, %, v/v), X₂ (Extraction time, hr), X₃ (Extraction temperature, °C).

Y₁ (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y₂ (Yield, %).

Licorice and dashen: GABA_A receptor binding, Silk tree and angelica: 5-HT_{2C} receptor binding.

Table 1-18. Analysis of variance (ANOVA) for responses in ethanol extraction of licorice

Responses	Sources	DF	SS	MS	F-value	P-value
Y ₁	Regression					
	Linear	3	1215.62	405.205	24.17	0.001
	Quadratic	3	493.53	164.511	9.81	0.007
	Cross-product	3	77.17	25.725	1.53	0.288
	Total model	9	1786.32	198.480	11.84	0.002
	Residual					
	Lack of fit	5	114.39	22.877	15.46	0.062
	Pure error	2	2.96	1.480		
	Total error	7	117.35	16.764		
	Total	16	1903.67			
Y ₂	Regression					
	Linear	3	697.730	232.577	104.19	0.001
	Quadratic	3	257.549	85.850	38.46	0.001
	Cross-product	3	0.784	0.261	0.12	0.947
	Total model	9	956.063	106.229	47.59	0.001
	Residual					
	Lack of fit	5	14.220	2.844	4.04	0.210
	Pure error	2	1.407	0.703		
	Total error	7	15.626	2.232		
	Total	16	971.689			

DF (Degrees of Freedom), SS (Sum of Square), MS (Mean Square).

Table 1-19. Analysis of variance (ANOVA) for responses in ethanol extraction of danshen

Responses	Sources	DF	SS	MS	F-value	P-value
Y ₁	Regression					
	Linear	3	2578.76	859.588	152.45	0.001
	Quadratic	3	93.20	31.067	5.51	0.029
	Cross-product	3	265.12	88.375	15.67	0.002
	Total model	9	2937.09	326.343	57.88	0.001
	Residual					
	Lack of fit	5	35.44	7.089	3.52	0.236
	Pure error	2	4.03	2.013		
	Total error	7	39.47	5.638		
	Total	16	2976.56			
Y ₂	Regression					
	Linear	3	2201.30	733.768	33.16	0.001
	Quadratic	3	764.74	254.912	11.52	0.004
	Cross-product	3	29.81	9.938	0.45	0.726
	Total model	9	2995.85	332.873	15.04	0.001
	Residual					
	Lack of fit	5	151.09	30.218	15.88	0.060
	Pure error	2	3.81	1.903		
	Total error	7	154.90	22.128		
	Total	16	3150.75			

DF (Degrees of Freedom), SS (Sum of Square), MS (Mean Square).

Table 1-20. Analysis of variance (ANOVA) for responses in ethanol extraction of silk tree

Responses	Sources	DF	SS	MS	F-value	P-value
Y ₁	Regression					
	Linear	3	68.22	22.742	1.48	0.302
	Quadratic	3	1178.48	392.826	25.49	0.001
	Cross-product	3	66.16	22.055	1.43	0.313
	Total model	9	1312.87	145.874	9.46	0.004
	Residual					
	Lack of fit	5	99.81	19.962	4.94	0.177
	Pure error	2	8.09	4.043		
	Total error	7	107.90	15.414		
	Total	16	1420.76			
Y ₂	Regression					
	Linear	3	49.8998	16.6333	45.16	0.001
	Quadratic	3	33.7325	11.2442	30.53	0.001
	Cross-product	3	1.0800	0.3600	0.98	0.456
	Total model	9	84.7122	9.4125	25.55	0.001
	Residual					
	Lack of fit	5	2.0517	0.4103	1.56	0.435
	Pure error	2	0.5267	0.2633		
	Total error	7	2.5783	0.3683		
	Total	16	87.2906			

DF (Degrees of Freedom), SS (Sum of Square), MS (Mean Square).

Table 1-21. Analysis of variance (ANOVA) for responses in ethanol extraction of angelica

Responses	Sources	DF	SS	MS	F-value	P-value
Y ₁	Regression					
	Linear	3	12575.7	4191.91	23.65	0.001
	Quadratic	3	2193.3	731.10	4.13	0.056
	Cross-product	3	347.6	115.87	0.65	0.606
	Total model	9	15116.7	1679.63	9.48	0.004
	Residual					
	Lack of fit	5	1237.3	247.46	149.67	0.007
	Pure error	2	3.3	1.65		
	Total error	7	1240.6	177.23		
	Total	16	16357.3			
Y ₂	Regression					
	Linear	3	434.503	144.834	54.83	0.001
	Quadratic	3	53.283	17.761	6.72	0.018
	Cross-product	3	8.394	2.798	1.06	0.425
	Total model	9	496.180	55.131	20.87	0.001
	Residual					
	Lack of fit	5	17.771	3.554	9.87	0.095
	Pure error	2	0.720	0.360		
	Total error	7	18.491	2.642		
	Total	16	514.671			

DF (Degrees of Freedom), SS (Sum of Square), MS (Mean Square).

나. 종속변수에 대한 독립변수의 영향

종속변수인 결합 억제활성(Y_1) 및 수율(Y_2)에 대한 독립변수인 에탄올 농도(X_1), 추출 시간(X_2) 및 추출 온도(X_3)의 영향을 쉽게 알아보기 위하여 각 원료에 대한 3차원 반응표면 그래프를 나타내었다.

감초의 경우 결합 억제활성(Y_1) 및 수율(Y_2) 모두 에탄올 농도(X_1)에 가장 크게 영향을 받았으며, 농도가 낮을수록 최대가 되는 경향을 보여 산업적인 대량 추출시 효과적인 것으로 사료된다(Fig. 1-14). 추출시간(X_2)이 길어질수록 수율은 증가하는 반면에 결합 억제활성은 떨어져 추출시간이 길어질 경우 기능성분 외의 다른 성분들이 추출되는 것을 알 수 있었다. 추출 온도(X_3)는 결합 억제활성에는 영향을 미쳤으나 수율에는 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

단삼의 경우 에탄올 농도(X_1)가 100%에 가까워질수록 증가한 반면 수율은 최소화되어 활성성분이 고농도의 에탄올에서 추출되는 것으로 알 수 있었다(Fig. 1-15). 추출시간(X_2)이 길어질수록 결합 억제활성 및 수율 모두 증가하는 경향을 나타내었으나 상대적으로 에탄올 농도에 대한 영향보다는 적은 것을 알 수 있었다. 추출 온도(X_3)는 수율에는 거의 영향을 미치지 않았지만 결합 억제활성의 경우 추출온도가 높아질수록 급격히 감소하는 경향을 보여 저온 및 고농도의 에탄올에서 기능성분이 주로 추출되는 것을 알 수 있었다.

합환피는 결합 억제활성은 전적으로 에탄올의 농도에만 영향을 받는 것으로 나타났다(Fig. 1-16). 수율과 결합억제능 모두 에탄올 농도의 변화에 따라 증가하다가 다시 감소하는 유사한 경향을 나타내었다. 추출시간(X_2)이 길어질수록 결합 억제활성 및 수율 모두 증가하는 경향을 나타내었으나 상대적으로 에탄올 농도에 대한 영향보다는 적은 것을 알 수 있었다. 추출 온도(X_3)가 높아질수록 결합 억제활성은 감소한 반면 수율은 증가하는 경향을 나타내었다.

신선초는 단삼과 유사하게 에탄올 농도가 높을수록 결합 억제활성이 증가하였으며, 수율은 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1-17). 추출시간(X_2)은 결합 억제활성에만 영향을 미치는 것으로 나타났다. 추출 온도(X_3)는 높아질수록 결합 억제활성이 떨어지는 경향을 보였으며, 수율은 급격히 증가하였다.

모든 추출 최적화 공정에서 에탄올 농도(X_1)가 가장 큰 영향을 주는 독립변수였으며, 종속변수인 결합 억제활성(Y_1) 및 수율(Y_2)는 독립변수의 변화에 따라 반비례하는 경우가 많았다.

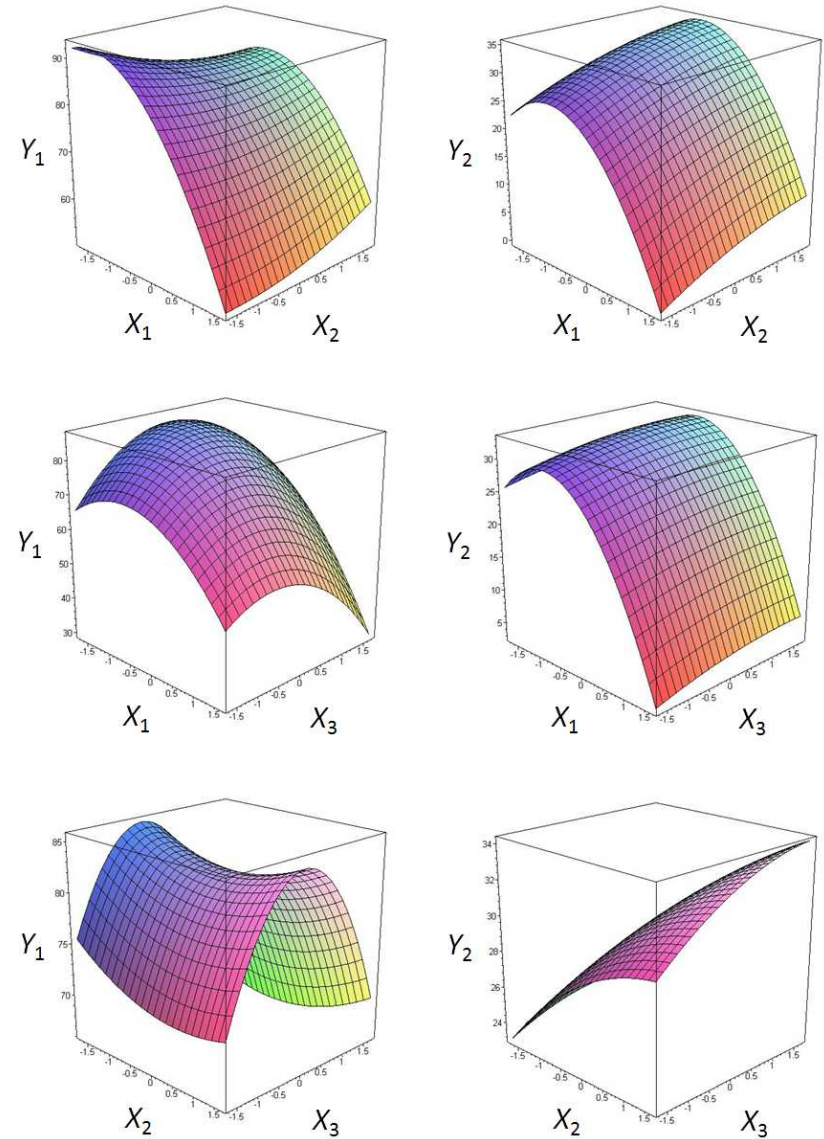


Fig. 1-14. Response surface 3D plots for optimization of ethanol extraction from licorice.

X_1 (Ethanol concentration, %, v/v), X_2 (Extraction time, hr), X_3 (Extraction temperature, °C). Y_1 (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y_2 (Yield, %).

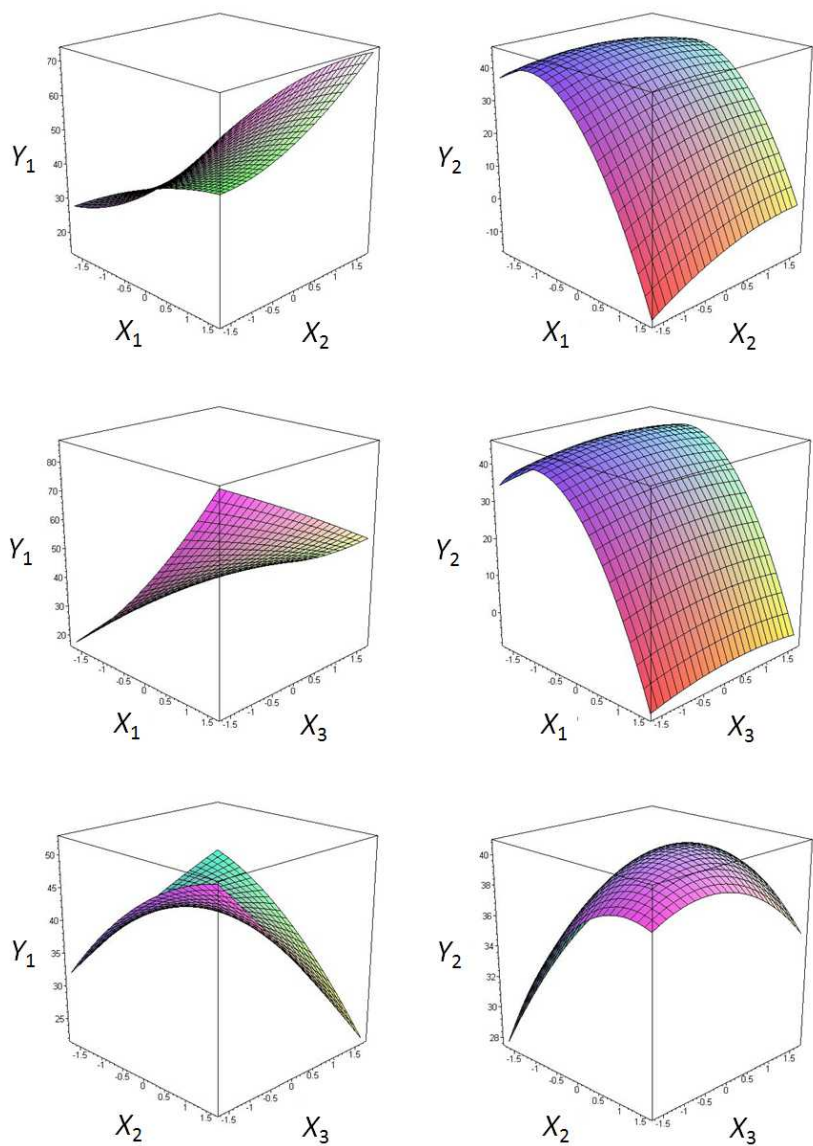


Fig. 1-15. Response surface 3D plots for optimization of ethanol extraction from danshen.

X_1 (Ethanol concentration, %, v/v), X_2 (Extraction time, hr), X_3 (Extraction temperature, °C).
 Y_1 (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y_2 (Yield, %).

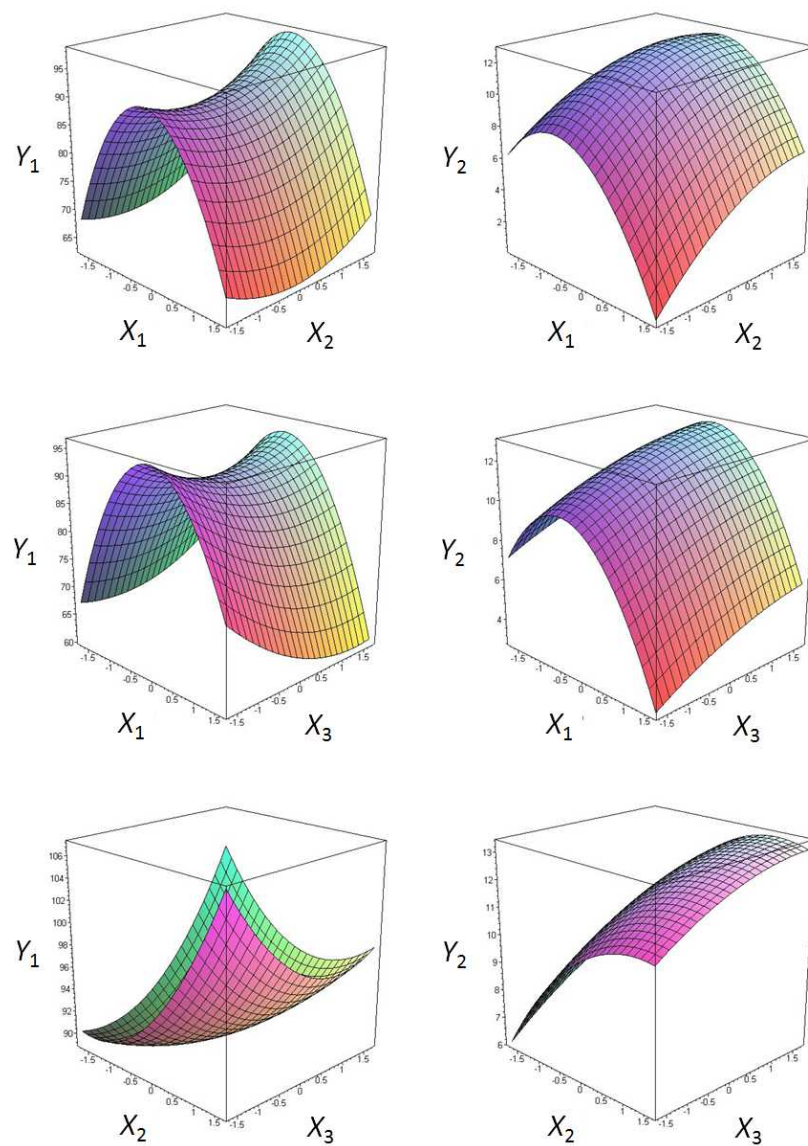


Fig. 1-16. Response surface 3D plots for optimization of ethanol extraction from silk tree.

X_1 (Ethanol concentration, %, v/v), X_2 (Extraction time, hr), X_3 (Extraction temperature, °C).
 Y_1 (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y_2 (Yield, %).

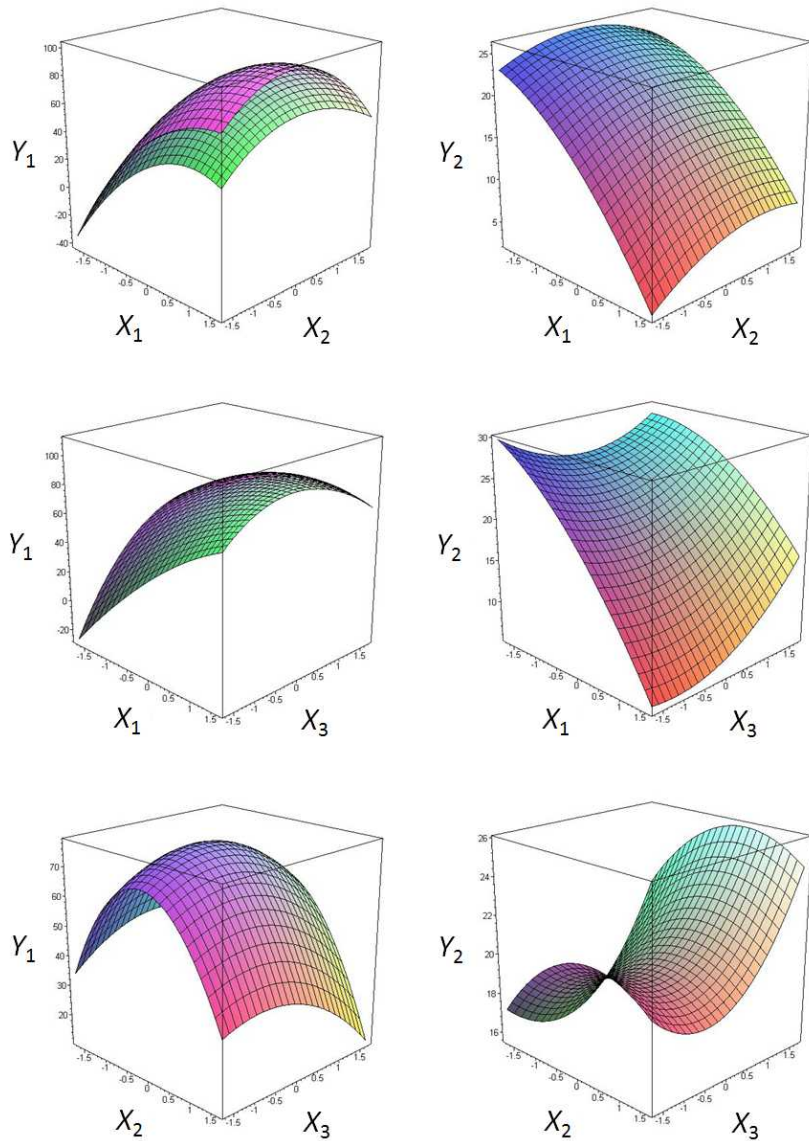


Fig. 1-17. Response surface 3D plots for optimization of ethanol extraction from angelica.

X_1 (Ethanol concentration, %, v/v), X_2 (Extraction time, hr), X_3 (Extraction temperature, °C).
 Y_1 (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y_2 (Yield, %).

다. 최적 제조조건의 설정 및 검증

각 원료의 에탄올 추출조건 최적화는 결합 억제활성(Y_1)이 최대화되는 지점에서 통계적으로 도출되었으며, 수율(Y_2)도 함께 모니터링하여 최적조건에서의 수율을 함께 알아보았다. 추출조건의 최적화시 다소 수율이 낮더라도 높은 활성이 가지는 것이 활성이 있는 성분들이 많다는 것을 의미하기 때문에 산업화시 보다 효과적일 것으로 사료된다. 추출조건의 최적화는 Minitab 프로그램의 response optimizer를 사용하였으며, Table 1-22에 그 결과를 실제값으로 변환하여 나타내었다.

감초의 최적조건은 에탄올 농도(X_1) = 29.3%, 추출 시간(X_2) = 12.0 hr, 추출 온도(X_3) = 41.2°C으로 4가지 원료 중 가장 낮은 수준의 에탄올 농도 및 처리시간을 보였다.

단삼의 최적조건은 에탄올 농도(X_1) = 96.3%, 추출 시간(X_2) = 72.0 hr, 추출 온도(X_3) = 20°C으로 감초에 비해 높은 농도의 에탄올과 긴 처리시간이 필요하였으며, 감초 대비 20% 정도의 낮은 수율을 보였다.

Table 1-22. Response optimization for ethanol extraction and verification of predicted and experimental values

	Responses	Target value	Optimal conditions	Predicted value	Experimental value
Licorice	Y_1	Maximum	$X_1 = 29.3\%$	92.9	91.3 ± 2.7
	Y_2	-	$X_2 = 12.0 \text{ hr}$ $X_3 = 41.2^\circ\text{C}$	25.9	26.5 ± 1.1
Danshen	Y_1	Maximum	$X_1 = 96.3\%$	92.6	90.9 ± 3.5
	Y_2	-	$X_2 = 72.0 \text{ hr}$ $X_3 = 20^\circ\text{C}$	4.9	4.2 ± 0.4
Silk tree	Y_1	Maximum	$X_1 = 60.3\%$	99.3	97.2 ± 3.2
	Y_2	-	$X_2 = 57.9 \text{ hr}$ $X_3 = 20^\circ\text{C}$	10.9	11.3 ± 0.8
Angelica	Y_1	Maximum	$X_1 = 79.8\%$	99.9	96.8 ± 4.5
	Y_2	-	$X_2 = 37.6 \text{ hr}$ $X_3 = 27.1^\circ\text{C}$	13.4	13.8 ± 1.2

X_1 (Ethanol concentration, %, v/v), X_2 (Extraction time, hr), X_3 (Extraction temperature, °C).
 Y_1 (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y_2 (Yield, %).

합환피의 최적조건은 에탄올 농도(X_1) = 60.3%, 추출 시간(X_2) = 57.9 hr, 추출 온도(X_3) = 20°C으로 신선초에 비해 낮은 농도와 온도를 보였으나 수율이 약간 낮게 나타났다. 신선초의 최적조건은 에탄올 농도(X_1) = 79.8%, 추출 시간(X_2) = 37.6 hr, 추출 온도(X_3) = 27.1°C으로 합환피에 비해 높은 에탄올 농도와 온도를 요구하였다.

최적조건에서의 결합 억제활성(Y_1)의 최대값은 감초 92.98%, 단삼 92.65%, 합환피 99.36% 및 신선초 99.90%로 산출되었으며, 이에 따른 수율은 25.95%, 4.91%, 10.90%, 13.46%로 각각 통계적으로 예상되었다. 최적조건에서 통계적으로 산출된 종속변수 결합 억제활성(Y_1) 및 수율(Y_2)의 예상값을 최적조건으로 실제 실험을 통해 구한 값과 비교하여 검증을 하였는데 결합 억제활성(Y_1) 및 수율(Y_2)의 예상값 모두 실제 최적조건하의 추출물의 값들과 큰 차이를 보이지 않아 본 실험 디자인 및 최적화가 타당한 것으로 나타났다.

GABA_A 및 5-HT_{2C} receptor binding assay에서 결합 억제활성이 높은 감초, 단삼, 합환피 및 신선초 추출물을 반응표면분석법(RSM)을 이용하여 최적화하였다. 결합 억제활성이 높다고 해서 반드시 수면증진 효과를 가진다고 단정할 수 없다. 따라서 17개의 실험구에서 결합 억제활성이 가장 높은 그룹과 가장 낮은 그룹의 *in vivo* 수면증진 효과를 알아보았다 (Fig. 1-18). 4가지 원료 중 감초와 합환피를 선정하여 실험을 실시하였다. 감초 추출물 중 84.9%로 가장 높은 결합 억제활성을 보인 7번 추출물은 pentobarbital을 이용한 수면유도 실험에서 sleep duration을 유의성 있게 증가시켰고($p < 0.01$), sleep latency는 감소시켰다. 또한, 합환피에서도 93.3%의 결합 억제활성을 보인 13번 실험구가 유의성 있는 sleep duration의 증가($p < 0.01$)와 sleep latency($p < 0.05$)의 감소를 나타내었다. 반면, 결합 억제활성이 낮은 6번 감초 추출물과 10번 합환피 추출물은 control 그룹과 비교하였을 때 유의적인 차이를 보이지 않았다. 본 연구결과를 종합해보면 결합 억제활성이 높은 실험구의 수면증진 효과가 결합 억제활성이 낮은 실험구 보다 높아 binding assay를 통한 제조조건의 최적화 방법이 적절한 것으로 판단된다. 이러한 제조조건의 최적화는 동물실험의 시간과 비용 절감할 수 있는 중요한 방법으로 사료된다.

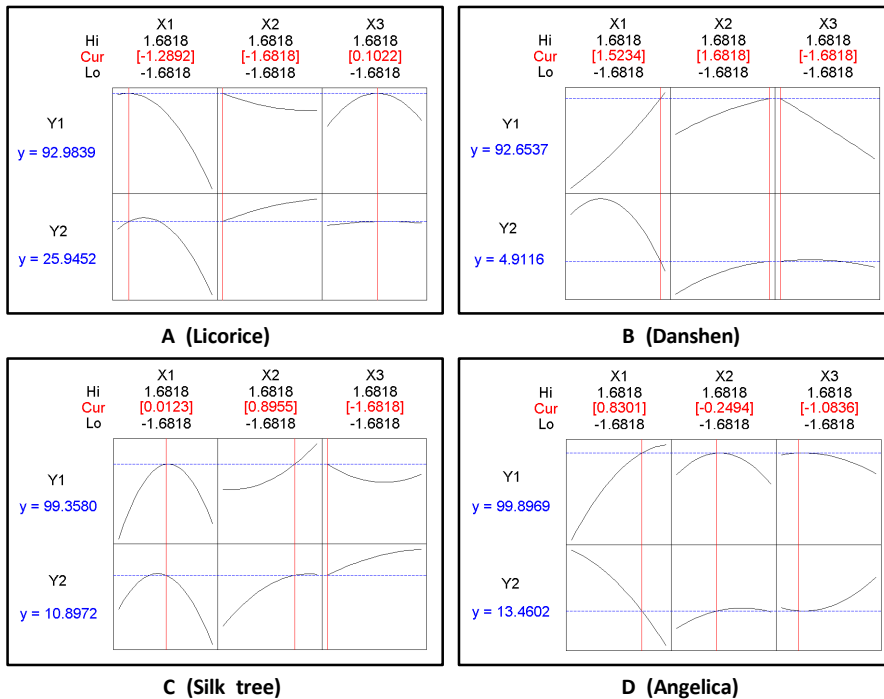


Fig. 1-18. Optimal conditions for ethanol extraction of licorice (A), danshen (B), silk tree (C) and angelica (D). X_1 (Ethanol concentration, %, v/v), X_2 (Extraction time, hr), X_3 (Extraction temperature, °C). Y_1 (Binding inhibition at 10 mg/ml, %), Y_2 (Yield, %).

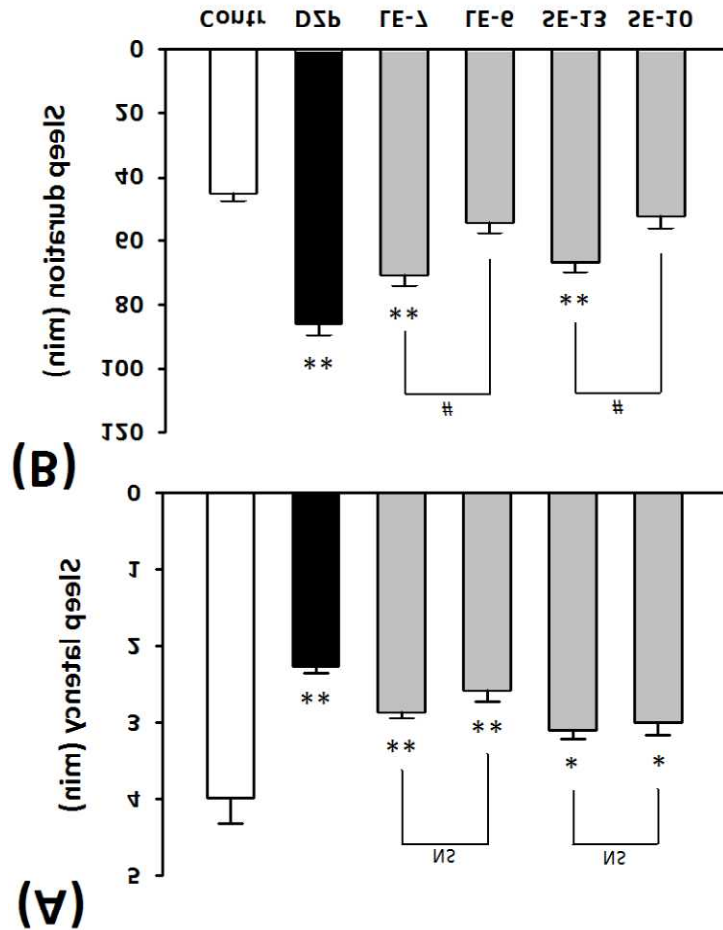


Fig. 1-18. Effects of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer) and SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. DZP: diazepam (2 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant as compared to the control group (Dunnett's test). # $p < 0.05$ vs the group treated with LE or SE alone, respectively (Student's t-test). NS: no significant.

라. 최종 추출물의 동물 수면증진 효과 비교 및 소재 선정

최종적인 소재의 선정을 위해 감초 추출물(LE), 단삼 추출물(DE), 합환피 추출물(SE) 및 신선초 추출물(AE)의 최적조건에서 가공시 소요되는 제조단가(Table 1-23) 및 동물실험에서의 효능(Fig. 1-19)을 비교하였다. 국내에서 유통되고 있는 감초, 합환피, 단삼 및 신선초 1 kg의 평균적인 가격은 각각 36,000원, 18,000원, 80,000원 및 24,000원이다. 다른 원료에 비해 단삼의 원료가격이 월등히 높은 것으로 나타났다. GABA_A receptor binding assay에서 활성을 나타낸 감초와 단삼을 비교해 보면, 감초 에탄올 추출물 1 kg을 가공하는데 소요되는 감초 원료의 가격이 104,400원으로 단삼(544,000원)에 비해 5배 정도 저렴하였다. 5-HT_{2c} receptor binding assay에 활성을 보였던 합환피와 신선초의 경우 에탄올 추출물 kg 당 소요되는 원료 가격이 합환피가 180,000원으로 신선초(189,600원)에 비해 다소 낮은 것으로 나타났다.

Table 1-23. Amount and price of raw materials for production of licorice, danshen, silk tree and angelica ethanol extracts

Resources	Price/kg (won)	Yield (%)	Raw material amount /extract kg (kg)	Raw material price /extract kg (won)
Licorice	36,000	34.9	2.9	104,400
Silk tree	18,000	10.2	10.0	180,000
Danshen	80,000	14.8	6.8	544,000
Angelica	24,000	12.6	7.9	189,600

감초(LE), 단삼(DE), 합환피(SE) 및 신선초(AE) 추출물의 *in vivo* 수면증진 효과를 비교해보면, 4가지 추출물 모두 control 그룹에 비해 유의적인 sleep duration의 증가와 sleep latency의 감소를 나타내었다($p < 0.01$). 감초 추출물(LE)과 단삼 추출물(DE) 그리고 합환피 추출물(SE)과 신선초 추출물(AE) 사이의 유의적인 차이는 없었다. 본 연구에서는 제조 단가가 낮으며, 동물실험에서 수면증진 효과가 높았던 감초와 합환피를 최종소재로 선정하였다.

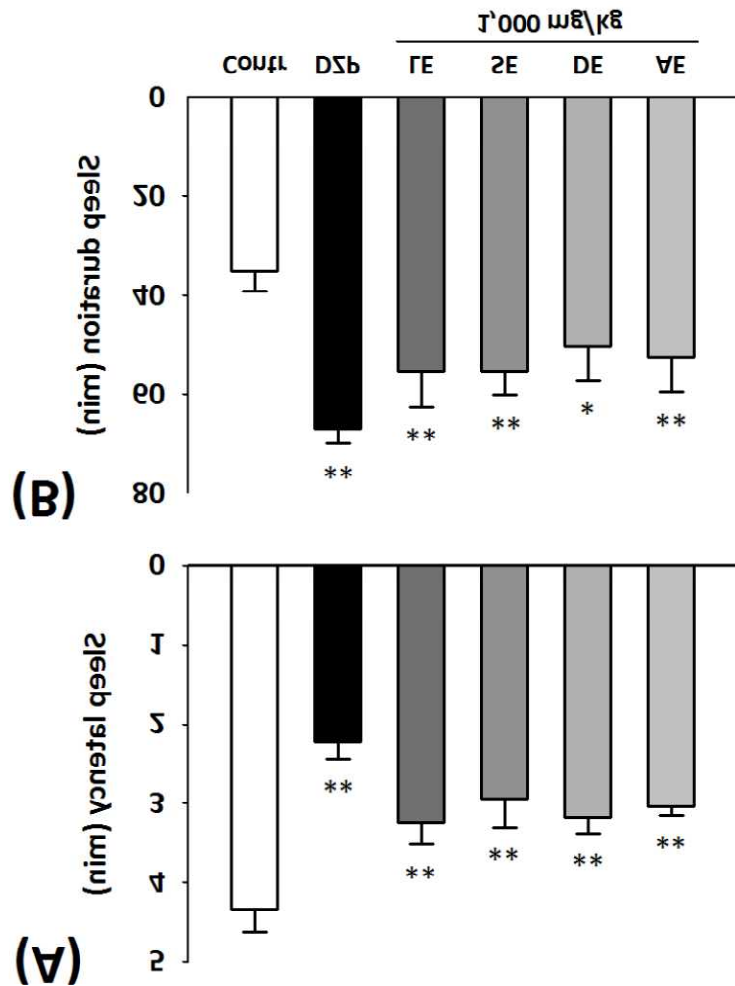


Fig. 1-19. Effects of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer), SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini), DE (danshen, *S. miltiorrhiza* Bunge) and AE (angelica, *A. utilis* Makino) on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. DZP: diazepam (2 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant as compared to the control group (Dunnett's test).

3. 감초 및 합환피 에탄올 추출물의 *in vivo* 수면증진 효과

감초 에탄올 추출물(licorice ethanol extract, LE) 및 합환피 에탄올 추출물(silk tree ethanol extract, SE)의 GABA_A 및 5-HT_{2C} receptor에 대한 높은 binding activity는 각각 GABA_A 및 5-HT_{2C} receptor에 작용하여 수면증진 효과를 나타낼 가능성이 있음을 시사한다. 수면증진 소재의 활성을 규명하기 위해 blood-brain barrier(BBB) 통과여부를 확인하는 것이 매우 중요하지만, 추출물의 경우 다양한 성분이 혼재되어 있어 그 여부를 판단하기가 어렵다. 따라서 동물실험을 통해 실제 *in vivo*에서 수면증진 효과가 있는지를 확인하고 이를 통해 간접적으로 통과여부를 가늠할 수 있다. 본 연구에서는 수면증진 효과를 평가하기 위하여 pentobarbital을 이용한 수면유도 실험과 뇌파(EEG) 및 근전도도(EMG) 분석을 통한 수면구조 분석을 병행하여 수행하였다. 특히, 수면구조 분석은 수면의 양적인 지표뿐만 아니라 질적인 측면까지 평가할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

가. Pentobarbital 유도 수면에 대한 상승 효과

(1) Pentobarbital, diazepam, 감초 및 합환피 추출물의 직접적인 수면유도효과 비교

예비실험으로 pentobarbital의 정확한 hypnotic(수면유도) 및 sub-hypnotic(준수면유도) 농도를 알아보기 위해 pentobarbital을 25-50 mg/kg의 여러 농도로 mouse에 복강주사(i.p.)하여 수면유도 효과를 알아보았다. Pentobarbital을 mouse에게 45 mg/kg 농도로 복강주사 하였을 때 15마리 모두 수면유도 효과를 나타내었으나, 30 mg/kg 농도에서는 진정효과를 나타내었으나 정반사를 잃어버리지 않아 수면을 유도하지 못했다. 따라서 실험에 사용할 pentobarbital의 hypnotic 농도는 45 mg/kg, sub-hypnotic 농도는 30 mg/kg로 설정하였다(Table 1-24). 이는 pentobarbital의 hypnotic 농도를 45-55 mg/kg으로 하여 수면유도 효과를 보고한 연구(Ma et al., 2007)와 sub-hypnotic 농도를 24-30 mg/kg으로 하여 수면유도 효과를 보고한 연구(Ma et al., 2008)와 유사하였다. 본 연구에서 positive control로 사용된 diazepam(DZP)은 대표적인 수면제 중 하나로 2 mg/kg의 농도로 단독 투여시 수면을 유도하지 못하였다. 감초 추출물(LE)과 합환피 추출물(SE)의 경우 1,000 mg/kg의 고농도를 투여하였음에도 수면을 유도하지 못하였다. 이러한 결과는 pentobarbital은 직접적으로 수면을 유도하지만, DZP(2 mg/kg), 감초 추출물(1,000 mg/kg), 합환피 추출물(1,000 mg/kg)은 직접적인 수면을 유도하지 못한다는 것을 알 수 있었다.

Table 1-24. Sleep-inducing effects of pentobarbital, DZP, LE and SE in mice

Groups	Dose (mg/kg)	No. falling asleep/Total	Sleep duration (min)
Pentobarbital	30	0/15	-
	45	15/15	39.6 ± 3.9
DZP	2	0/15	-
LE	1,000	0/15	-
SE	1,000	0/15	-

DZP: diazepam, LE: licorice ethanol extract, SE: silk tree ethanol extract.

(2) 감초, 합환피 추출물의 hypnotic dose pentobarbital 수면유도 증진효과

감초 추출물(LE)과 합환피 추출물(SE)을 100, 250, 500 및 1,000 mg/kg의 농도로 경구투여(p.o.)한 후 pentobarbital(45 mg/kg, i.p.)에 의한 수면유도 효과를 알아보았다. 감초 및 합환피 추출물 모두 용량의존적으로 sleep latency를 감소시켰으며, sleep duration을 증가시켜 수면증진 효과를 나타내었다. 감초 추출물은 control 그룹과 비교할 때, 1,000 mg/kg의 농도에서 sleep duration ($p<0.05$)의 유의적인 증가와 sleep latency ($p<0.01$)의 유의적인 감소가 나타났다. 합환피 추출물(SE)의 경우는 500 ($p<0.05$)과 1,000 ($p<0.01$) mg/kg에서 유의적인 수면증진효과가 나타났다. 하지만 낮은 농도 (100, 250 mg/kg)에서는 감초와 합환피 추출물 모두 유의적인 수면효과가 나타나지 않았다. Positive control로 사용된 DZP(2 mg/kg)의 수면증진 효과가 가장 크게 나타났다. 감초 추출물과 합환피 추출물은 이전의 연구를 통해 항우울 및 항불안과 같은 효과가 보고된 예가 있다. Wang et al. (2008)의 보고에 의하면, 감초에서 추출한 isoliquiritin과 liquiritin이 항우울 유사 효과를 가지는 것으로 나타났다. 또한 합환피의 경우 5-HT_{1A} receptor에 작용하여 항불안 효과 (Kim et al., 2004)와 항우울(Kim et al., 2007) 효과를 나타내었다. 하지만, 감초와 합환피의 수면증진 효과는 그동안 보고되지 않았으며, 본 연구사업을 통해 처음으로 규명되었다. 특히 감초는 '약방의 감초'로 매우 잘 알려진 약재로 대부분의 한방처방에 들어가고 있어 감초에 대한 수면증진 효과의 입증은 큰 의미를 가진다.

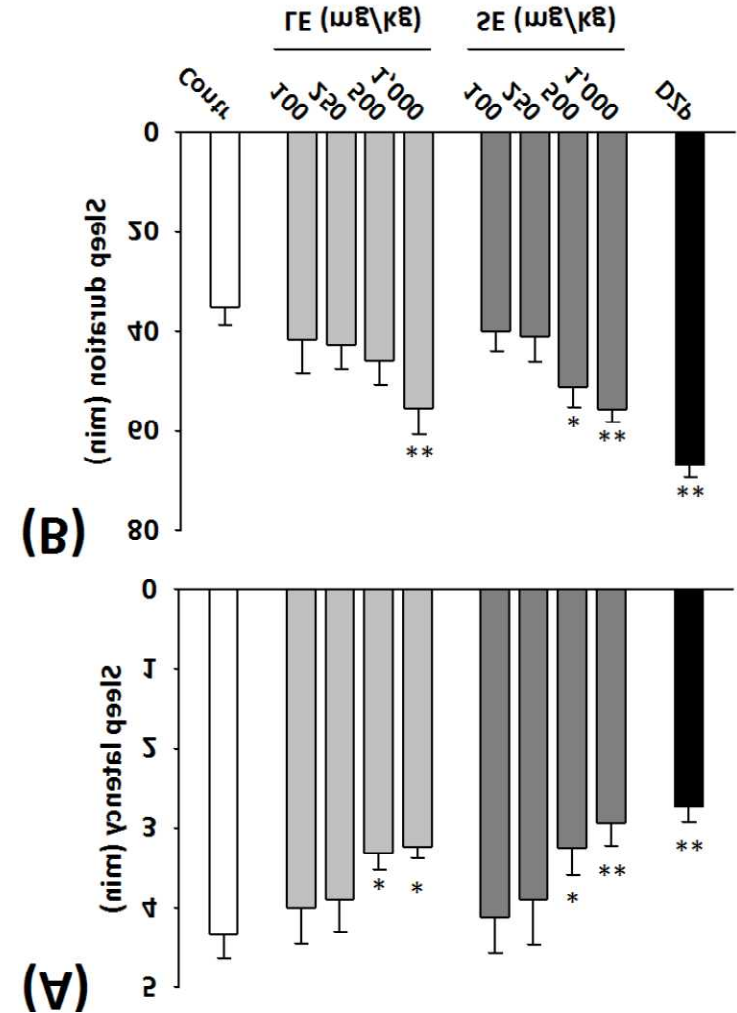


Fig. 1-20. Effects of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer) and SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. DZP: diazepam (2 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, significant as compared to the control group (Dunnnett's test).

(3) 감초, 합환피 추출물의 sub-hypnotic dose pentobarbital 수면유도 증진효과

감초 추출물(LE)과 합환피 추출물(SE)이 sub-hypnotic(30 mg/kg) 농도에서의 수면유도 실험에서 어떠한 효과를 나타내는지를 알아보았다. 두 추출물에 의한 sleep onset과 sleep duration 결과를 Table 1-25에 나타내었다. Sub-hypnotic 농도의 pentobarbital 유도실험에서 control 그룹의 mouse 15마리 모두 잠에 들지 않았다. 반면에 positive control인 DZP(2 mg/kg)를 투여한 그룹은 15마리 중 14마리가 수면이 유도되었으며, sleep onset이 93%로 가장 높았다. 감초 및 합환피 추출물도 용량의존적으로 sleep onset과 sleep duration을 증가시켰다. 특히, 1,000 mg/kg의 농도에서는 sleep onset이 각각 80%와 67%로 나타났다. 이러한 결과를 통해 감초와 합환피 추출물이 수면제인 DZP과 마찬가지로 수면을 유도하는 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

Table 1-25. Effects of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer) and SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) on sleep latency and sleep duration in mice induced by sub-hypnotic dose (30 mg/kg, i.p.) of pentobarbital

Groups	Dose (mg/kg)	No. falling asleep/Total	Sleep onset (%)	Sleep duration (min)
Control		0 / 15	0	0.0 ± 0.0
DZP	2	14 / 15	93	22.3 ± 3.6
	250	5 / 15	33	7.4 ± 1.3
LE	500	8 / 15	53	16.3 ± 4.5
	1,000	12 / 15	80	26.6 ± 3.7
	250	3 / 15	20	9.5 ± 1.9
SE	500	6 / 15	40	12.2 ± 2.8
	1,000	10 / 15	67	16.8 ± 4.1

Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. If the mouse did not lose righting reflex in 60 min after treatment, the sleeping time were recorded 0 min, respectively. DZP: diazepam (2 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Control: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Sleep onset (%) = No. falling asleep / Total No. × 100. Data represents the mean±SEM (n=15).

(4) 감초와 합환피 추출물의 혼합투여의 pentobarbital 수면유도 증진 효과

감초 추출물(LE)과 합환피 추출물(SE)의 병용경구투여에 대한 수면효과를 알아보았다. 투여농도는 250 mg/kg으로 설정하였으며, 이는 유의적으로 pentobarbital 수면유도에 영향을 주지 않는다. 감초 추출물(LE)과 합환피 추출물(SE)을 단독으로 250 mg/kg의 농도로 수면유도효과를 보았을 때 sleep latency와 sleep duration의 효과가 나타나지 않았지만, 감초 추출물(LE)과 합환피 추출물(SE)을 병용경구 투여하여 수면유도효과를 보았을 때에는 수면 효과가 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$) (Fig. 1-21). 감초 추출물(LE)과 DZP을 병용경구투여 하였거나, 합환피 추출물(SE)과 DZP을 병용경구투여 하였을 때 역시 sleep latency의 유의적인 감소와 sleep duration의 유의적인 증가가 나타났다. 하지만, DZP (0.5 mg/kg, p.o.)을 단독으로 경구투여 하였을 때에는 수면효과가 나타나지 않았다. 5개의 그룹 중 가장 수면증진효과가 뛰어난 그룹은 감초 추출물(LE, 250 mg/kg, p.o.)과 DZP (0.5 mg/kg, p.o.)을 병용경구투여 한 그룹 이었다. DZP과 감초 추출물(LE)의 병용경구 투여 시 수면증진 효과는 감초의 작용 기작이 DZP과 같은 GABA_A receptor의 agonist인 것으로 사료되며, 감초의 작용 기작을 밝히기 위한 세부적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

(5) 감초와 합환피 혼합추출물의 비율에 따른 pentobarbital 수면유도 증진효과

감초 추출물(LE)과 합환피 추출물(SE)의 혼합 비율을 달리한 병용경구투여의 pentobarbital 수면유도효과를 알아보기 위하여 감초 추출물(LE) 500 mg/kg과 합환피 추출물(SE) 500 mg/kg을 25%:75%, 50%:50%, 75%:25%의 비율로 혼합하여 혼합추출물을 제조하였다. 비율을 달리한 혼합추출물을 1,000 mg/kg의 농도로 pentobarbital에 의한 수면유도효과를 알아본 결과, 감초 추출물(LE) 75: 합환피 추출물(SE) 25의 비율인 혼합추출물에서 가장 뛰어난 수면유도 효과를 나타내었다($p < 0.01$) (Fig. 1-22). sleep latency는 DZP (2 mg/kg, p.o.)만이 유의성 있게 감소하였고($p < 0.01$), 혼합추출물에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 반면, sleep duration은 감초 추출물(LE)와 합환피 추출물(SE)의 비율에 관계없이 3 그룹의 혼합추출물에서 모두 유의성 있는 결과를 나타내었다($p < 0.01$). 이는 기존 단일 물질보다 물질들을 혼합하였을 때 높은 수면유도 효과가 나타나는 것으로 판단되며, 앞으로 감초와 합환피 혼합추출물을 이용한 기능성 식품으로써의 가능성을 시사하며, 감초 추출물(LE) 75: 합환피 추출물(SE) 25의 비율이 좋은 혼합비율일 것으로 사료된다.

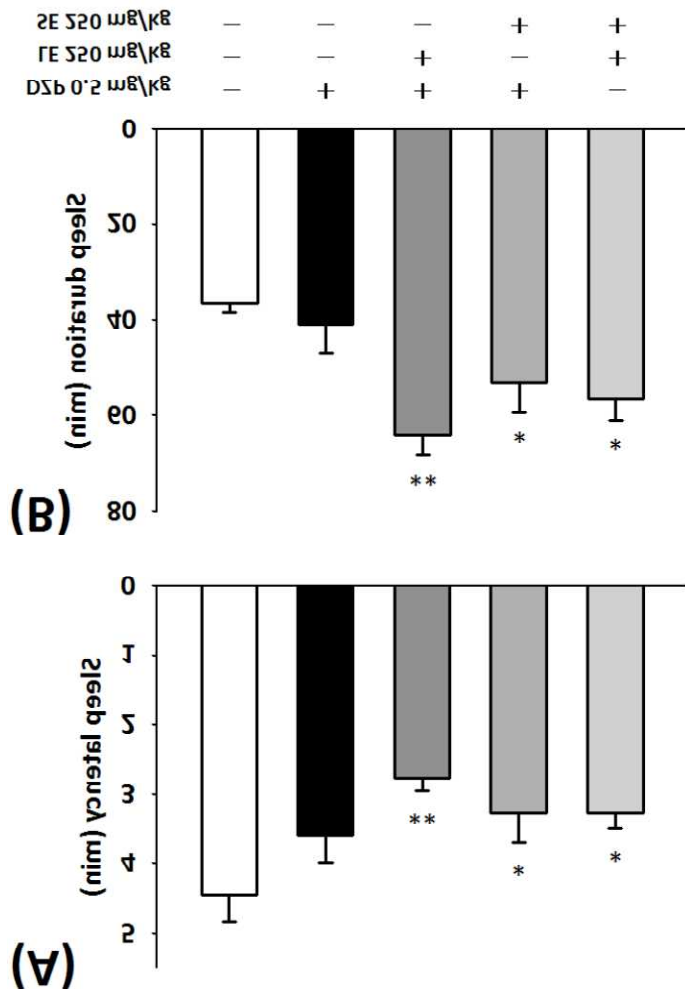


Fig. 1-21. Effects of combination of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer) and SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) and their co-administration with DZP on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. DZP: diazepam (0.5 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant as compared to the control group (Dunnett's test).

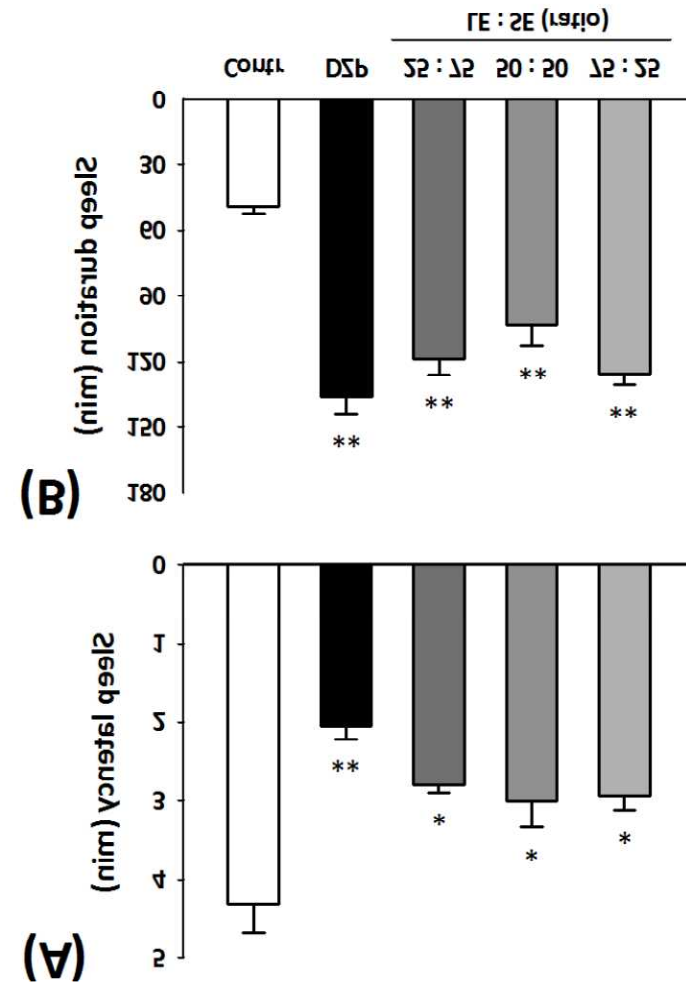


Fig. 1-22. Effects of combination ratio of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer) and SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. DZP: diazepam (2 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant as compared to the control group (Dunnett's test).

(6) 감초와 합환피 추출물의 장기투여 효과

감초 및 합환피 추출물의 연속 투여에 대한 수면증진 효과를 알아보기 위해 유의적으로 pentobarbital 수면유도에 영향을 주지 않는 250 mg/kg의 농도로 7일간 매일 투여한 후 수면유도 증진효과를 알아보았다. 감초 추출물은 유의적으로 sleep latency ($p<0.05$)를 감소시켰으며, sleep duration($p<0.01$)을 증가시켰다(Fig. 1-23). 반면에 합환피 추출물의 경우는 평균값은 control 군에 비해 높았지만 유의적인 차이를 보이지는 못했다. 수면제인 DZP(0.5 mg/kg) 또한 7일간의 연속 투여에 의해 유의적인 sleep latency의 감소($p<0.05$)와 유의적인 sleep duration의 증가($p<0.01$)를 보였다. 이러한 결과는 낮은 농도일지라도 장기적으로 투여할 경우 수면증진 효과가 있음을 나타내고 있다. 따라서 제품화시 지속적인 투여도 바람직할 것으로 사료된다.

(7) 감초 추출물의 *in vivo* 작용기작

GABA_A-benzodiazepine receptor에 작용하여 수면증진 효과를 나타낼 것으로 기대되는 감초 추출물(LE)의 *in vivo* 작용기작을 알아보기 위해 GABA_A-benzodiazepine receptor antagonist인 flumazenil을 이용한 동물실험을 수행하였다. Flumazenil은 수용성 imidazobenzodiazepine으로 중추신경계의 GABA_A receptor에 diazepam과 함께 경쟁적으로 작용함으로써 길항 작용을 하게 되며, diazepam에 의한 부작용 발현시 해독제로 사용되고 있다(Lee, 1999). 감초 추출물을 경구투여 하기 10분전 5 mg/kg의 flumazenil을 복강주사한 후 pentobarbital로 수면을 유도하였다. Control 그룹은 flumazenil 투여에 의해 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. DZP(2 mg/kg)과 감초 추출물(1,000 mg/kg)은 기대대로 유의적인 sleep latency의 감소($p<0.05$)와 sleep duration의 증가($p<0.01$)를 나타내었다. 반면에 flumazenil이 처리된 DZP와 감초 추출물 그룹의 경우는 flumazenil에 의한 길항작용으로 인해 수면증진 효과가 감소하였다. 감초 추출물은 sleep duration에서 $p<0.01$ 수준에서 유의적인 감소를 나타내었지만 DZP는 평균값이 감소는 하였지만 유의성을 나타내지는 못했다. 이는 사용된 flumazenil의 농도(5 mg/kg)가 DZP(2 mg/kg)의 작용을 억제하기에 부족한 것으로 판단된다. 이러한 결과를 종합해볼 때 감초 추출물은 DZP과 같이 GABA_A receptor의 agonist로 작용하는 성분들을 함유하고 있다는 것을 의미한다. 따라서, 분리정제를 통해 실제 효능을 나타내는 성분을 규명하고 뇌조직에서 GABA_A receptor를 활성화시키는지 여부를 알아보는 것이 필요하다.

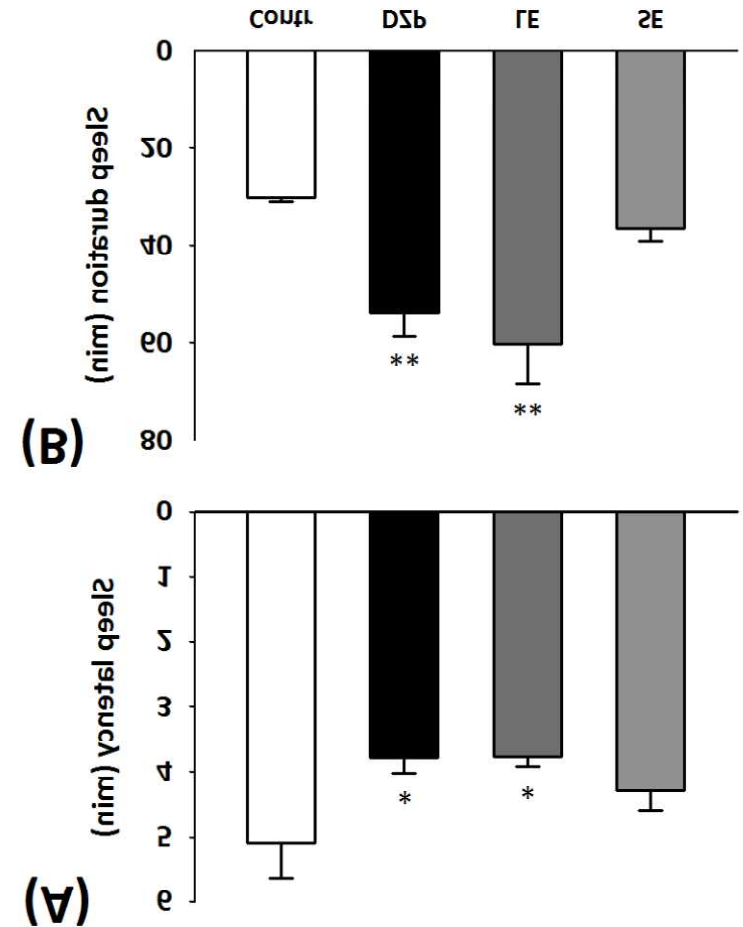


Fig. 1-23. Effects of long-term (1 week) administration of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer) and SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini)(250 mg/kg) on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. DZP: diazepam (0.5 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, significant as compared to the control group (Dunnett's test).

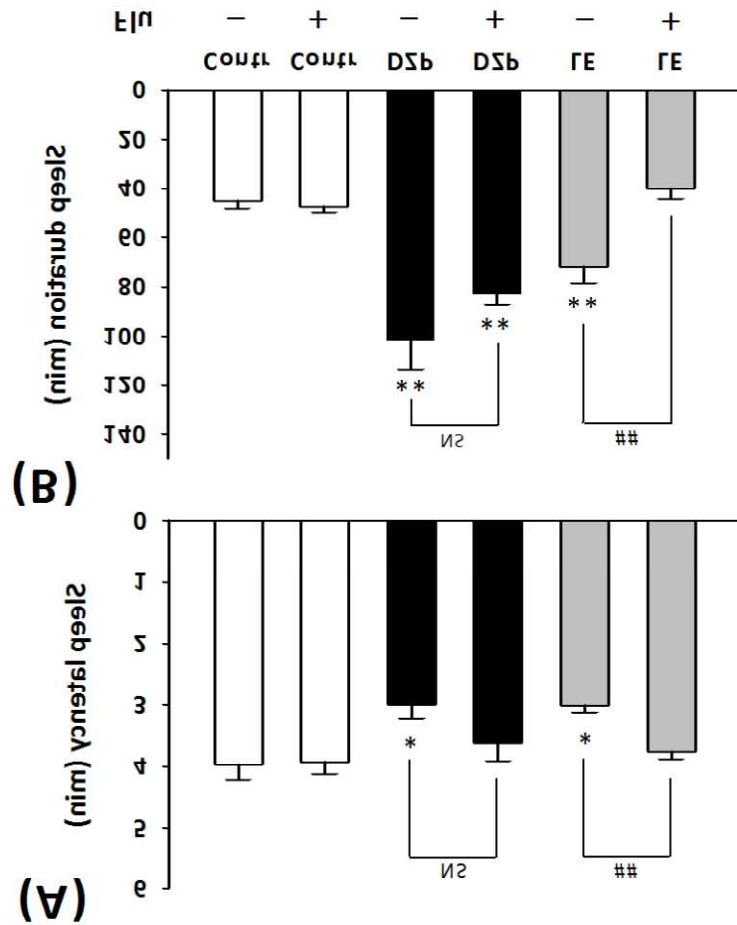


Fig. 1-24. Effects of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer) with DZP on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. Flu: flumazenil (5 mg/kg, i.p.). DZP: diazepam (2 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant as compared to the control group (Dunnett's test). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs the group treated with LE or DZP alone, respectively (Student's t-test). NS: no significant.

나. 수면구조 분석을 통한 수면증진 효과 분석

(1) 감초 및 합환피 추출물의 농도에 따른 입면시간(sleep latency)의 변화

Sleep latency는 추출물을 경구투여(p.o.)하고 뇌파측정을 시작한 후 10초 epoch 단위의 NREM 수면이 12번 이상 연속적으로 나타난 첫 epoch에 도달하는데 걸리는 시간으로 정의 하였고 Fig. 1-25에 나타내었다. Control은 평균 24.4분으로 입면시간이 가장 오래 걸렸고 농도가 250 mg/kg 일 때 감초 추출물이 20.5분, 합환피 추출물이 19.2분, 감초와 합환피 추출 혼합물은 20.7분으로 3개의 추출물 및 추출혼합물의 입면시간이 비슷하게 나타났다. 또한 농도가 500 mg/kg 일 때에도 감초 추출물이 16.8분, 합환피 추출물이 16.4분 그리고 감초와 합환피 추출혼합물이 15.9분으로 역시 비슷하였다.

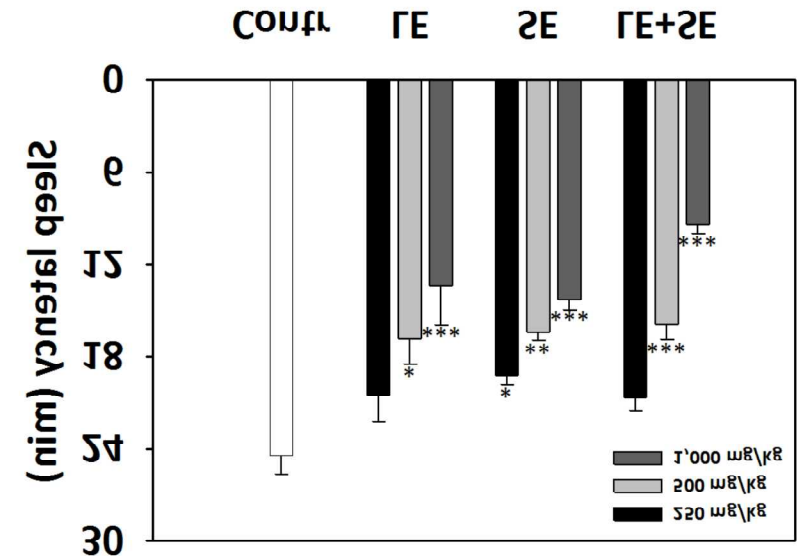


Fig. 1-25. Effects of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer), SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) and combination of LE and SE on sleep latency. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ significant as compared to the control group (Dunnett's test).

하지만 농도가 1,000 mg/kg 일 경우는 감초와 합환피 추출물은 각각 13.4분과 14.3분으로 비슷하나 감초와 합환피 추출혼합물이 9.4분으로 입면시간이 가장 빠른 것으로 나타났다. 전반적으로 감초 및 합환피 추출물과 감초와 합환피 추출혼합물은 농도의존적으로 sleep latency가 유의적으로 감소하였다. Shin et al.(2007)은 수면을 박탈한 rat에서 1,000 mg/kg의 valerian extract preparation(BIM)과 valerian extract의 sleep latency가 각각 약 70분, 50분으로 보고하였으며, Kazuaki et al.(2005)은 수면을 박탈한 rat에서 3,000 mg/kg의 valerian을 투여한 후의 sleep latency가 약 45분이라고 보고하였다. 이로 미루어 보아 상대적으로 valerian과 비교해 보면 감초 및 합환피 추출물과 감초와 합환피 추출혼합물의 입면시간이 월등히 우수함을 알 수 있었고 천연수면보조제로써의 가능성을 보였다.

(2) 감초 및 합환피 추출물의 농도에 따른 각성시간(Wake time)의 변화

6시간 동안의 수면측정 중 rat의 총 각성 시간을 Fig. 1-26에 나타내었다. control군의 총 각성시간은 195.9분으로 전체 360분의 54.4%에 달하며 각 추출물의 농도가 250 mg/kg 일 때 감초 추출물이 192.2분, 합환피 추출물이 182.7분 그리고 감초와 합환피 추출혼합물이 169.9분이었다. 농도가 500 mg/kg일 경우는 감초 추출물이 178.6분, 합환피 추출물이 172.7분 그리고 감초와 합환피 추출혼합물이 156.8분이었다. 또한 농도가 1,000 mg/kg에서는 감초 추출물이 160.1분으로 전체 뇌파측정시간의 44.5%였고, 합환피 추출물이 165.5분으로 46.0%였으며 감초와 합환피 추출혼합물이 133.8분으로 37.2%로 총 각성시간이 가장 적었다. 전체적으로 보았을 때 농도의존적으로 감소하는 경향이 뚜렷하게 나타났으며 sleep latency와 비슷한 경향을 나타내었다.

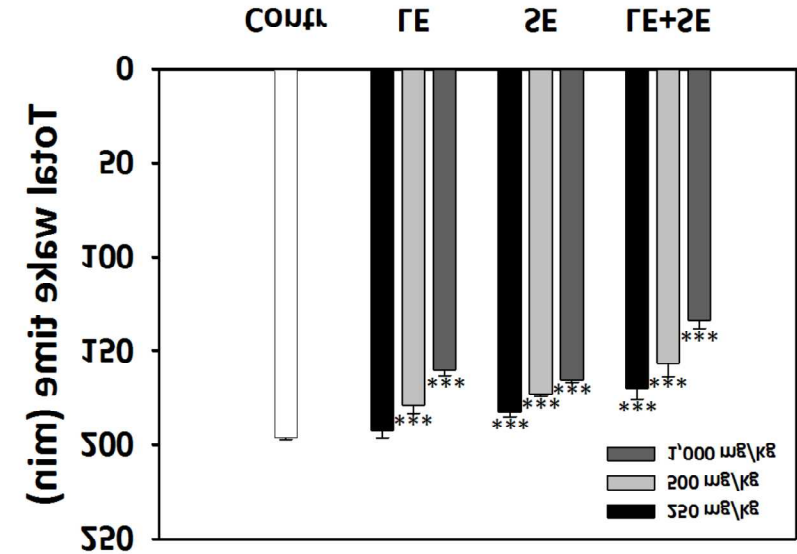


Fig. 1-26. Effects of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer), SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) and combination of LE and SE on total wake time. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=8). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005 significant as compared to the control group (Dunnett's test).

(3) 감초 및 합환피 추출물의 농도에 따른 NREM sleep time의 변화

수면의 질을 나타내는 지표중의 하나인 NREM sleep time의 각 추출물과 추출혼합물의 농도에 따른 변화를 Fig. 1-27에 나타내었다. 0.5% CMC-saline을 경구 투여한 control의 NREM sleep time은 151.1분으로 전체의 약 42%였으며 감초 추출물 및 합환피 추출물 그리고 감초와 합환피 추출혼합물의 농도가 250 mg/kg일때의 NREM sleep time이 각각 160.6분, 169.7분, 178.6분으로 Control에 비하여 증가하였으며 감초와 합환피 혼합추출물의 NREM sleep time이 가장 길었고 그다음 합환피 및 감초 추출물 순이었다. 각추출물 및 추출혼합물의 농도가 500 mg/kg 일 때에도 감초 및 합환피 추출물과 감초와 합환피 추출혼합물의 NREM sleep time이 각각 173.4분, 180.7분, 194.4분으로 농도가 250 mg/kg일

때와 같은 경향을 보였다. 하지만 각 추출물 및 추출혼합물의 농도가 1,000 mg/kg일 경우에는 감초와 합환피 추출혼합물이 213.3분으로 가장 높았고 다음으로 감초 추출물 및 합환피 추출물 순이었다. NREM sleep time은 농도가 증가할수록 유의적으로 길어짐을 알 수 있다.

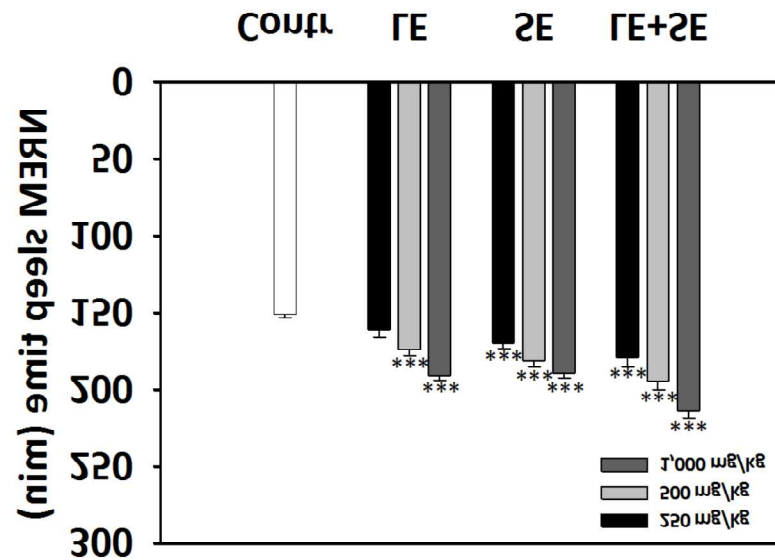


Fig. 1-27. Effects of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer), SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) and combination of LE and SE on NREM sleep time. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=8). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005 significant as compared to the control group (Dunnett's test).

(4) 감초 및 합환피 추출물의 농도에 따른 REM sleep time의 변화

Fig. 1-28는 감초, 합환피 추출물 및 감초와 합환피 추출혼합물의 농도에 따른 REM sleep time의 변화를 나타낸 것이다. Total wake time 과 NREM sleep time에 시간이 아주 짧음을 알 수 있고 각추출물 및 추출혼합물에 따른 경향이 나타나지 않았으며 농도에 따른 변화도 유의적이지 않았다.

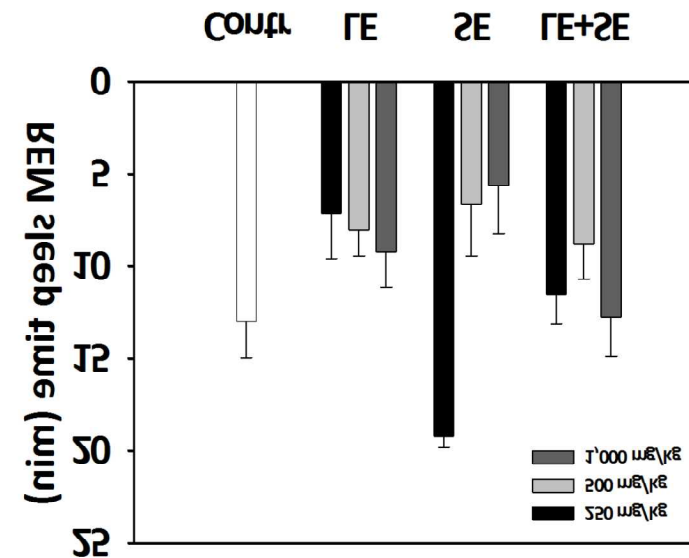


Fig. 1-28. Effects of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer), SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini) and combination of LE and SE on REM sleep time. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=8).

(5) 감초 및 합환피 추출물의 농도에 따른 시간별 수면구조의 변화

감초 추출물 1,000을 투여한 후 rat의 뇌파를 측정하는 동안 매 시간별 wake, NREM sleep 및 REM sleep time의 비율을 Fig. 1-29에 나타내었다. control의 경우 처음 3시간 동안 wake time 시간이 점차 감소하면서 상대적으로 NREM sleep time이 증가하였다. 이것으로 보아 감초 추출물의 수면 증진 효과는 복용 후 초반에 작용함을 알 수 있었고 REM sleep time의 경우는 일정한 경향이 나타나지 않았다. 반면 합환피 추출물의 NREM sleep time은 초반에는 control과 비슷하다가 3시간 후부터 증가하였고 감초 추출물과 마찬가지로 wake time이 상대적으로 감소하였다(Fig. 1-30). 따라서 합환피의 수면증진효과는 복용 후 3시간 후에 나타날 것이라 판단된다. 감초와 합환피 추출혼합물의 NREM sleep time은 처음 1시간은 control에 비하여 상당히 높게 나타났고 1시간 이후 3시간이 될 때 까지 감소하다가 3시간 이후에 다시 점차 증가하였다(Fig. 1-31). 이와 같은 경향은 초반에는 감초 추출물이 수면 증진효과가 나타나고 3시간을 기준으로 후반부에 들어서는 합환피 추출물이 rat의 수면을 증진 시켰으리라 판단되었다. sleep latency 및 NREM sleep time의 결과로 보았을 때 감초 및 합환피의 단일 추출물 보다는 두 추출물의 혼합형이 수면의 양과 질에서 증진시키기에 더 효과적이라 판단된다.

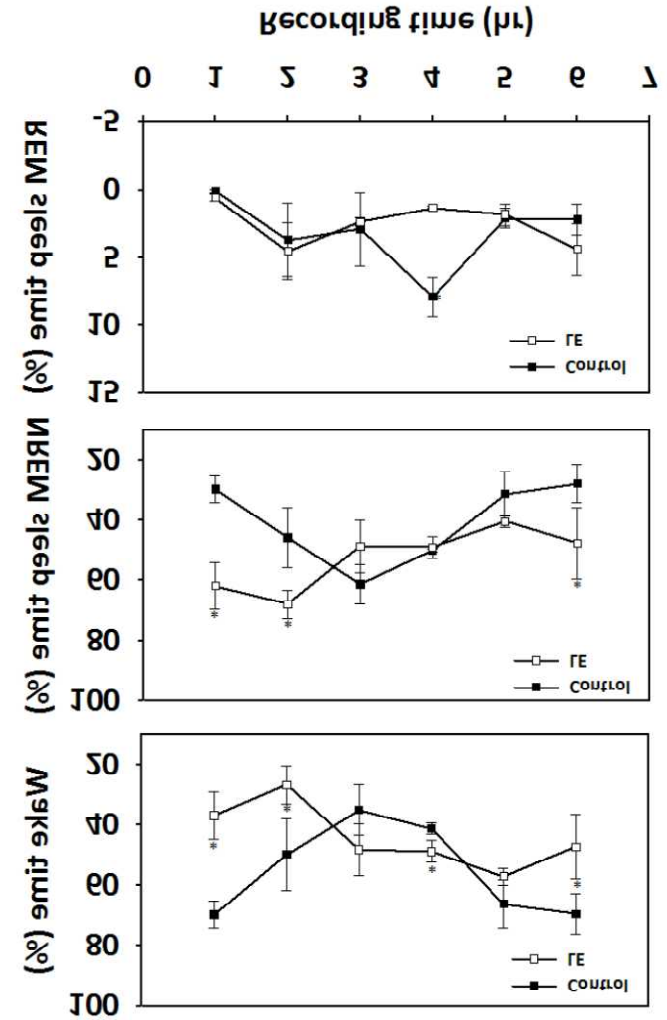


Fig. 1-29. Changes in hourly wake, NREM sleep and REM sleep time by administration of 1,000 mg/kg of LE (licorice, *G. uralensis* Fischer). Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=8). * p<0.05 significant as compared to the control group (Dunnett's test).

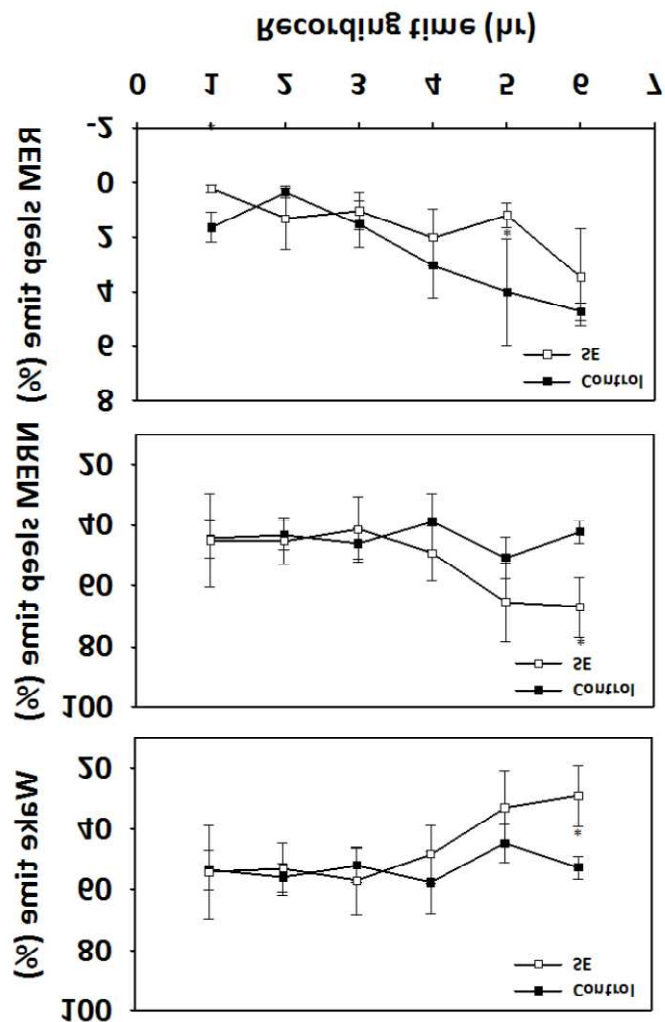


Fig. 1-30. Changes in hourly wake, NREM sleep and REM sleep time by administration of 1,000 mg/kg of SE (silk tree, *A. julibrissin* Durazzini). Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=8). * p<0.05 significant as compared to the control group (Dunnett's test).

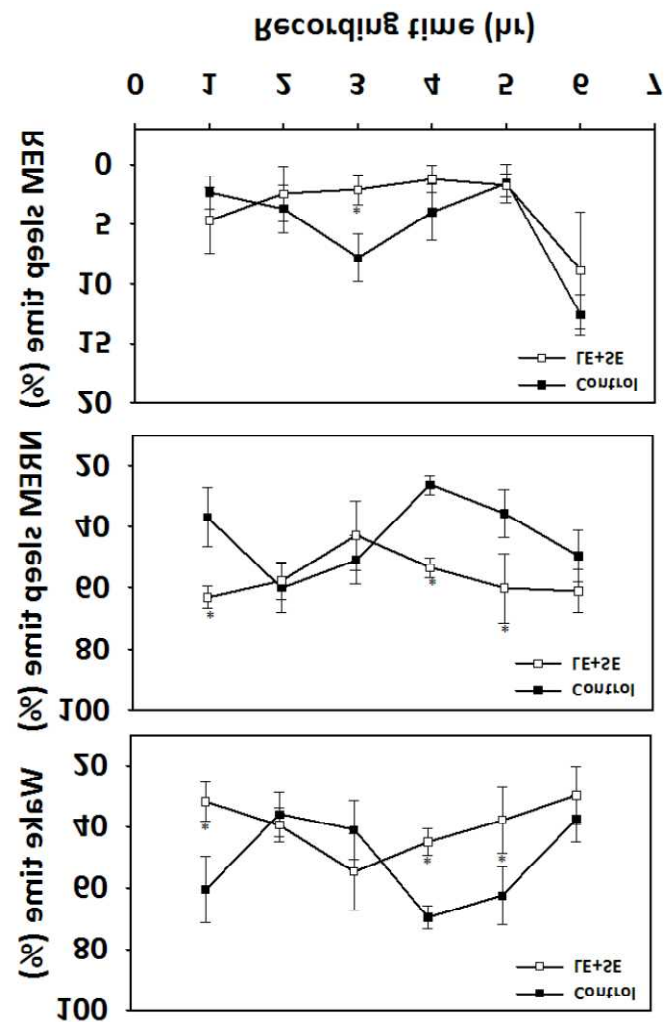


Fig. 1-31. Changes in hourly wake, NREM sleep and REM sleep time by administration of combination (1,000 mg/kg) of LE and SE. Contr: control (0.5% CMC-saline 10 ml/kg, p.o.). Each column represents the mean±SEM (n=8). * p<0.05 significant as compared to the control group (Dunnett's test).

다. 수면제 및 주요 시판품과의 수면증진 효과 비교

(1) Pentobarbital-induced sleep test

감초 추출물(LE)과 합환피 추출물(SE)을 75:25(w/w) 비율로 혼합한 수면증진 소재의 *in vivo* 활성을 시판되고 있는 제품 및 수면제와 비교하였다. 시판품과 감초 및 합환피 혼합소재의 pentobarbital 수면유도 실험에서의 수면증진 효과를 Fig. 1-32에 나타내었다. 제품 A는 control 그룹과 비교하였을 때 99% 유의수준에서 sleep latency의 감소와 sleep duration의 증가가 나타났지만 제품 B는 sleep duration에서 유의적인 효과가 나타나지 않았다. 혼합소재(LE+SE)의 경우 유의적으로 sleep latency를 감소시켰으며, sleep duration 또한 크게 증가시켰다($p < 0.01$). 혼합소재(LE+SE)의 sleep duration은 제품 A 및 B 보다 높은 것으로 나타났다. 수면제인 DZP의 경우는 기대대로 가장 뛰어난 수면증진 효과를 나타내었다.

(2) 수면구조의 분석

감초 추출물(LE)과 합환피 추출물(SE)이 75:25(w/w) 비율로 혼합추출물과 최근 출시된 2종의 시판품 및 시중에서 수면제로 사용되는 DZP의 sleep latency를 비교하여 Fig. 1-33에 나타내었다. 전 sample이 control 보다 입면시간이 상당히 짧았고 그 중에서도 감초와 합환피의 에탄올 추출혼합물의 입면시간이 9.4분으로 가장 빨랐다. 감초와 합환피 추출혼합물과 2종의 시판제품 및 DZP의 수면구조를 분석하여 Fig. 1-34에 나타내었다. 전 제품에서 total wake time이 감소하는 반면 상대적으로 NREM sleep time이 유의적으로 증가하였다. 그중에서 시판품 A와 감초와 합환피 추출혼합물의 NREM sleep time이 모두 192.0분이었으며 control의 NREM sleep time과 비교하여 보았을 때 약 40분 가량 증가하여 수면증진효과는 비슷하였으나 생산단가 등을 고려 하여 볼 때 감초와 합환피 추출혼합물이 상업적으로 더 상품가치가 있다고 판단된다.

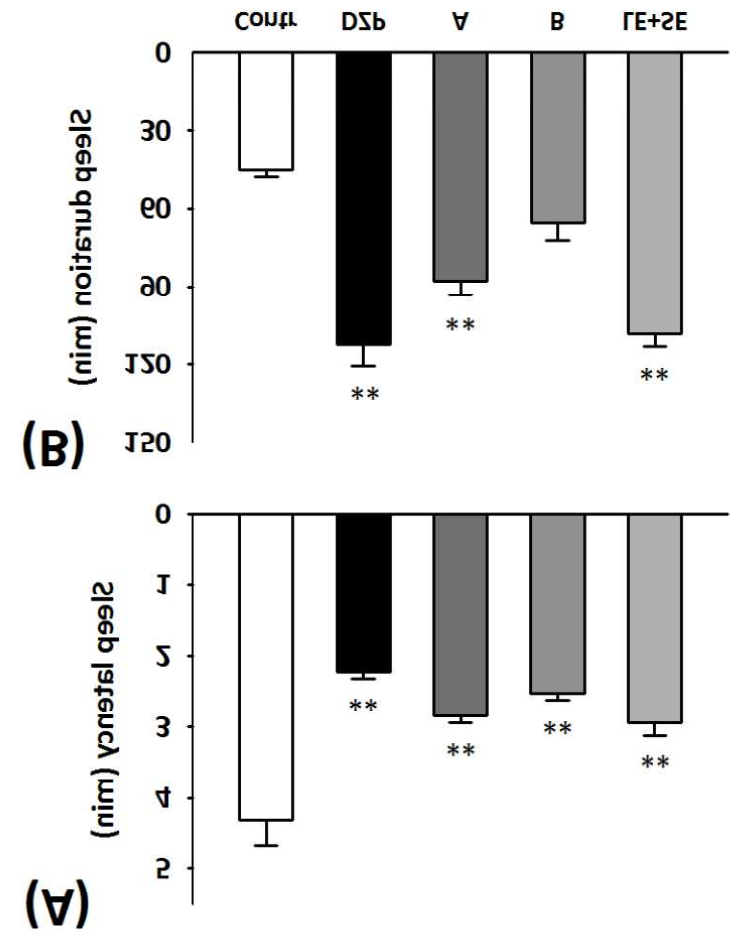


Fig. 1-32. Effects of combination of LE+SE (1,000 mg/kg, 75:25, w/w), A (1,000 mg/kg) and B (1,000 mg/kg) with DZP on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. DZP: diazepam (2 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant as compared to the control group (Dunnett's test).

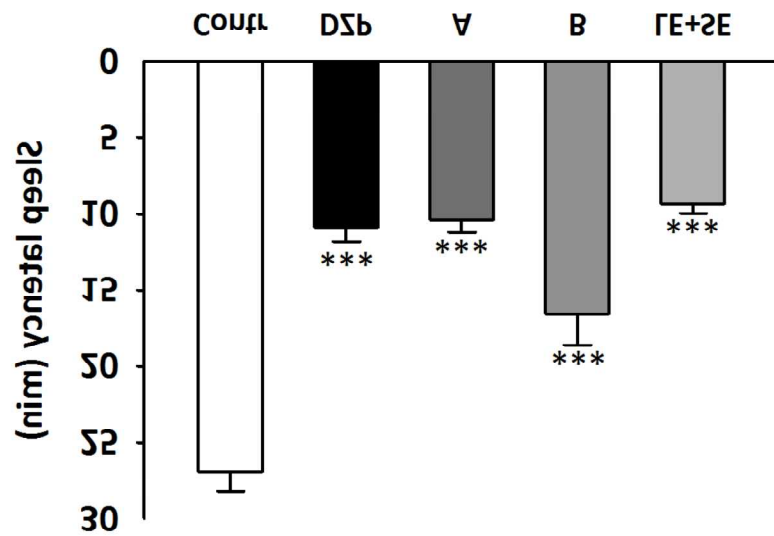


Fig. 1-33. Effects of combination of LE and SE (1,000 mg/kg, 75:25, w/w), commercial products A, B (1,000 mg/kg) and DZP (2 mg/kg) on sleep latency. Each column represents the mean±SEM (n=10). *** $p < 0.005$, significant as compared to the control group (Dunnett's test).

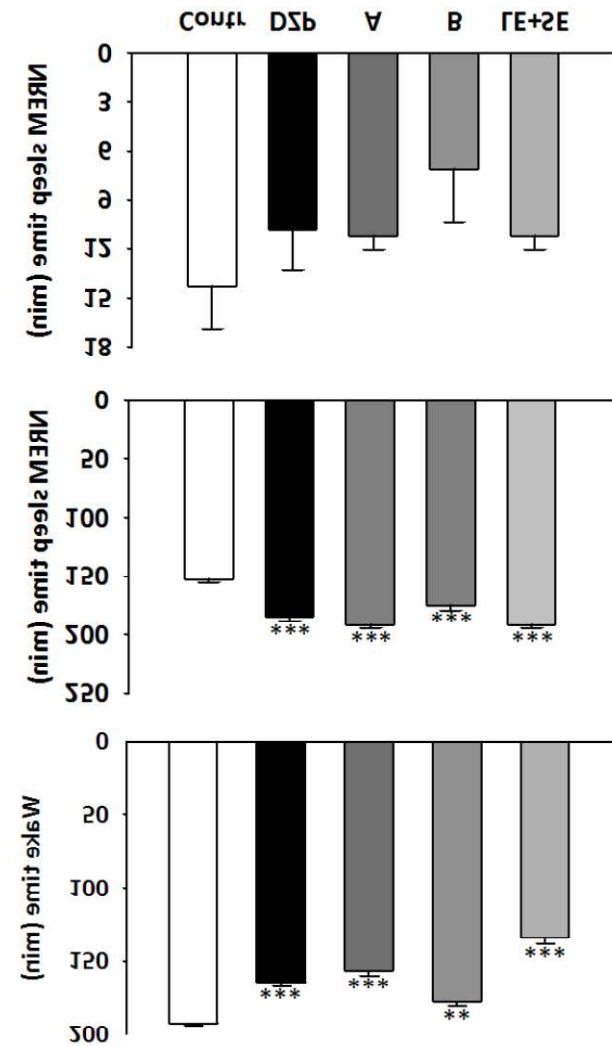


Fig. 1-34. Total Wake, NREM sleep and REM sleep time of combination of LE+SE (1,000 mg/kg, 75:25, w/w), commercial products A, B (1,000 mg/kg) and DZP (2 mg/kg). Each column represents the mean±SEM (n=8). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ significant as compared to the control group (Dunnett's test).

4. 급성경구독성 시험 및 안전성 검토

가. 급성경구독성 시험

(1) 일반 증상 및 사망 동물의 관찰

감초 추출물(LE), 합환피 추출물(SE) 및 그것들의 혼합물(LE+SE)을 4주령의 ICR mouse 암수 10마리로 구성된 각 시험군에서 1,000 및 2,000 mg/kg의 농도로 경구투여 (p.o.)하여 14일간 관찰한 사망예를 Table 1-26에 나타내었다. 사망된 동물은 실험기간 동안 발견되지 않았으며, 실험이 종료된 후 부검하였을 때 병리학적인 이상 또한 나타나지 않았다. 14일간 임상증상을 관찰하였을 때 특별한 의심 또는 비특이적인 증상 또한 나타나지 않았고, 대조군에 비해 경구투여 후 초기에 진정효과를 나타내었으며, 다음날부터는 대조군과 마찬가지로 정상적인 움직임을 나타내었다. 급성경구독성시험 평가 시 경구투여 후 사망예가 보통 6시간 안에 나타나는 것에 비해 본 실험에서는 사망예가 나타나지 않았고, 실험기간 동안 별다른 임상증상이 나타나지 않았다. 따라서 모든 추출물의 1회 투여 최고용량은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 판단되며, 감초 추출물(LE), 합환피 추출물(SE) 및 그것들의 혼합물(LE+SE)의 급성경구독성 시험에 있어서의 안전성은 비교적 높다고 사료된다.

(2) 체중측정

감초 추출물(LE), 합환피 추출물(SE) 및 그것들의 혼합물(LE+SE)을 4주령의 ICR 마우스 암수 10마리로 구성된 각 시험군에서 1,000 및 2,000 mg/kg의 농도로 경구 투여하여 14일간 관찰한 체중 증감의 변화는 Fig. 1-35에 나타내었다. 실험결과, 시험물질 투여군과 대조군 모두 시험기간 14일 동안 정상적인 체중의 증가를 보였으며, male 및 female 그룹간의 체중 변화율도 차이를 보이지 않았다.

(3) 부검

추출물 투여 후 시험 종료된 모든 동물을 대상으로 부검을 실시하였으나 특이할 만한 해부소견은 관찰되지 않았으며, 감초 추출물(LE), 합환피 추출물(SE) 및 그것들의 혼합물(LE+SE) 그룹들과 대조군을 비교한 결과 특이한 증상은 없었다. 시험물질 2,000 mg/kg은

체중이 60 kg인 사람의 경우 120 g에 해당되는 고농도로써, 감초 추출물(LE), 합환피 추출물(SE) 및 그것들의 혼합물(LE+SE)들은 비교적 안전한 물질로 사료된다.

Table 1-26. Survivals in ICR mice orally administered LE, SE and their combination

Groups	Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment								Final survivals	
			1	2	3	4	5	7	10	14		
Control (saline-CMC)	Male	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
	Female	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
LE	Male	1,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		2,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
	Female	1,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		2,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
SE	Male	1,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		2,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
	Female	1,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		2,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
LE + SE (75:25, w/w)	Male	1,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		2,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
	Female	1,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		2,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10

LE: licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) ethanol extract.

SE: silk tree (*Albizia julibrissin* Durazzini) ethanol extract.

나. 의사결정도 기법을 이용한 안전성 검토

본 연구개발에서 수면증진 효과가 입증된 감초 및 합환피 에탄올 추출물의 향후 개별인정 신청을 위해 식약청의 가이드라인(식품의약품안전청, 2007)을 따라 의사결정도 기법을 도입하여 안전성을 검토하였다. 생약제의 경우 오랜 기간 사용해 왔기 때문에 비교적 안전하다는 인식이 있지만 최근 천연 기능성 물질에 대한 안전성 확보가 강화되고 있는 실정이다. 기능성 원료에 대한 의사결정도는 처음 International Life Science Institute(ILSI) 유럽 지부에 의해 제안되었다(Kroes and Walker, 2004). 원재료 또는 원료의 안전한 섭취 경험, 제조의 복잡성, 알려진 부작용 정보, 기존 섭취량과의 비교 등에 의해 독성평가의 필요성이 달라지는 것을 인지하고 예상되는 노출량에 따라 달라지는 위해도 평가가 필요할 것으로 제안되었다. 이러한 과정을 검토할 수 있는 방법으로 의사결정도 기법이 유용한데 섭취근거, 제조방법, 부작용 유무와 섭취량에 따라 안전성 평가 자료 요구도가 달라지고 전통적 독성시험 자료 이외의 자료를 안전성 확보에 이용할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 식품의약품안전청에서도 [건강기능식품 기능성원료 인정에 관한 규정(식약청고시 제 2006-36호)]에 따라 영업자가 안전성을 입증하기 위한 자료를 제출하고자 할 때 자료의 범위를 명확히 하고 일관된 기준에 따라 안전성 자료를 제출할 수 있도록 의사결정도가 도입되었다.

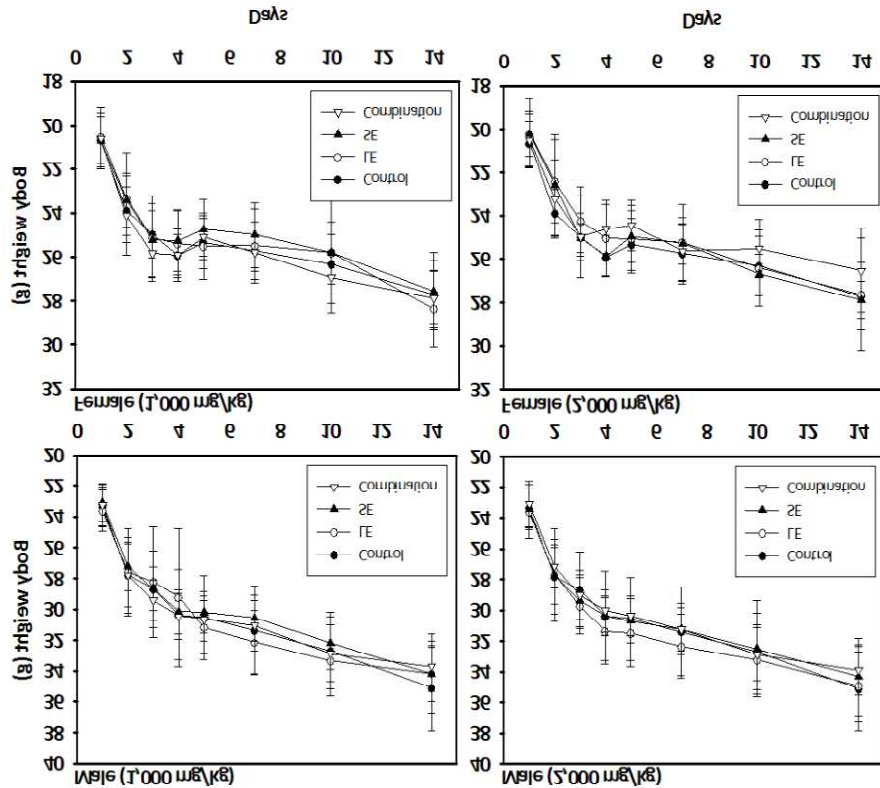


Fig. 1-35. Changes in body weight in ICR mice orally administered LE, SE and their combination. LE: licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) ethanol extract, SE: silk tree (*Albizzia julibrissin* Durazzini) ethanol extract.

(1) 감초 (*Licorice, Glycyrrhiza uralensis* Fisher)

(가) 의사결정도 단계 : [b]-[d]-[i]-[k]-[e]

(나) 단계별 의사결정 판단근거

① [b] 단계

사용된 원료 감초는 “건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 등에 관한 규정”(식품의약품안전청고시)에 등재되어있지 않다.

② [d]-[i]-[k] 단계

- 제조방법 : 건조된 감초 뿌리 100 g 당 1 L의 비율로 30% 주정으로 12시간 추출한 후 동결건조하였다.

• 섭취경험의 근거

근거자료 1	출처	식품원재료 DB (http://fse.foodnara.go.kr/origin)			
	요약	식품원재료 DB에서 아래와 같이 검색이 되며, 식용여부가 가능함			
		학명	이명	생약명	식용여부
		<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch(만주감초)	미초(美草), 말초(蜜草), Glycyrrhiza, Liquorice root, Licorice 등	감초(甘草)	가능
		<i>Glycyrrhiza gabra</i> Linne(유럽감초)			
근거자료 2	출처	한글동의보감 (http://hidream.or.kr/bbs/view.php?id=dongeuibogam&no=4948)			
	요약	동의보감에 따르면 맛이 달며 독이 없고. 온갖 약의 독을 풀어 주고 72가지의 광물성 약제와 1,200가지의 초약(草藥) 등 모든 약을 조화시키는 효과가 있으며 모든 혈맥을 잘 돌게 할 뿐만 아니라 힘줄과 뼈를 든든하게 하고 살찌게 하는 효과가 있다고 함			
근거자료 3	출처	대한약전의한약(생약)규격집			
	요약	대한약전의한약(생약)규격집에 독성감소, 약효 증강, 약성변화 등을 목적으로 하는 포제품인 감초밀자(감초를 꿀에 채어 볶은 것), 감초초(감초를 그냥 볶은 것)의 규격이 제정되어있다.			
근거자료 4	출처	PDR for Herbal Medicines (http://www.pdrhealth.com)			
	요약	감초는 기관지염, 암, 만성위염, 만성피로증후군, 감기, 간염, 궤양의 치료에 사용되는 herbal medicine이다.			
근거자료 5	출처	Natural Standard (http://www.naturalstandard.com/)			
	요약	감초의 뿌리와 건조된 뿌리줄기는 약용으로 이용되며, 현재 대부분의 감초는 그리스, 터키, 아시아에서 생산되고 있다.			
근거자료 6	출처	I. K. Hwang et al. Neuroprotective effects of roasted licorice, not raw form, on neuronal injury in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. <i>Acta Pharmacologica Sinica</i> . 27, 8, 959-965 (2006).			
	요약	감초의 주성분인 glycyrrhizin은 사막다람쥐에서 신경적인 손상 및 일시적인 국소빈혈의 신경보호 효과를 나타냈으며, 뇌졸중, 신독성과 관련된 질병의 보호에 효과를 보였다.			

근거자료 7	출처	H. J. Pan et al. Immunological adjuvant effect of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. <i>Vaccine</i> , 24, 1914-1920 (2006).
	요약	감초의 주 성분인 glycyrrhizin은 면역작용에 결정적으로 중요한 활동을 하는 것으로 증명하였다.
근거자료 8	출처	Yu, X. et al. In vitro and in vivo neuroprotective effect and mechanisms of glabridin, a major active isoflavan from <i>Glycyrrhiza glabra</i> (licorice). <i>Life Sciences</i> 82, 68-78 (2008).
	요약	감초에 함유된 주요물질인 flavonoids는 동물의 뇌졸중, 대뇌의 손상을 약하게 해주며, glabridin은 flavonoids의 주된 성분이고, 다양한 약물적인 활성을 나타내었다.
근거자료 9	출처	식품의약품안전청 연구보고서-한약재 생리활성성분의 효능 확인 연구
	요약	항염증 효과, 항알러지 효과, 항진균 효과, 간 보호 활성, 간경화 억제 활성, 위염 및 위궤양 억제 활성, 호흡기계 질환 억제 활성의 실험을 통하여 감초의 주요 지표성분으로 glycyrrhizin, liquiritigenin, licoricidin을 제시하였다.

③ [e] 단계

근거자료 10	출처	식품의약품안전청 연구보고서 - 약용식물의 부작용 정보 구축
	요약	감초는 한약재 유통량 중 상위 10위 안에 포함되는 물질로서 문헌 및 임상에 의해 밝혀진 부작용은 혈압에 영향을 미치며, 고령자의 경우 glycyrrhithic acid 40 mg 이상의 경우, 체제 1g 함유는 금기하며, 임신부와 산모의 경우도 금기시키고 있다.
근거자료 11	출처	Natural Standard (http://www.naturalstandard.com/)
	요약	감초는 glycyrrhiza라고 불리는 화학물질을 함유하고 있는데, 이 성분을 다량 복용하게 되면 두통, 혈압 상승 등의 부작용이 나타날 수 있으나 일반적으로 치료에 이용되고 있는 herbal supplement는 glycyrrhiza가 가공과정에서 제거 되기 때문에 신진대사에 영향을 미치지 않는다.

(다) 의사결정 결과 및 요약

① 결과 : 다

② 요약

감초는 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료로 등재되어 있지 않으며, 식약청의 식품원 재료 DB에서 식용이 가능한 것으로 등록되어 있다. PDR for Herbal Medicines 및 Natural standard에 따르면, 감초는 예로부터 아시아 및 유럽에서 약용으로 이용되었으며, 여러 문헌들의 연구결과를 종합해 볼 때 섭취경험에 관한 근거자료가 충분하다고 판단된다. 특히, 국내에서는 약방의 감초로 잘 알려질 정도로 대부분의 한방처방에 사용되고 있다.

(라) 제출되어야 하는 안전성 자료의 범위

제출되어야 하는 안전성 자료	제출 여부 (결과: 다)
섭취 근거 자료	✓
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료	✓
섭취량 평가자료	✓
영양자료, 생물학적유용성자료, 인체시험자료	✓

(2) 합환피 (Silk tree, *Albizia julibrissin* Durazz)

(가) 의사결정도 단계 : [b]-[d]-[i]-[k]-[f]-[h]

(나) 단계별 의사결정 판단근거

① [b] 단계

사용된 원료 감초는 “건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 등에 관한 규정”(식품의약품 안전청고시)에 등재되어있지 않다.

② [d]-[i]-[k] 단계

- 제조방법 : 건조된 합환피(자귀나무 껍질) 100 g 당 1 L의 비율로 60% 주정으로 56.9시간 추출한 후 동결건조하였다.

• 섭취경험의 근거

근거자료 1	출처	식품원 재료 DB (http://fse.foodnara.go.kr/origin)							
	요약	식품원재료 DB에서 아래와 같이 검색이 되며, 식용여부가 가능함 <table border="1"> <thead> <tr> <th>학명</th> <th>이명</th> <th>생약명</th> <th>식용여부</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Albizia julibrissin</i> Durazz</td> <td>자귀나무, 야합수, 계수나무, 합장수, 합춘수, 자귀대 등</td> <td>합환피(合歡皮)</td> <td>가능</td> </tr> </tbody> </table>	학명	이명	생약명	식용여부	<i>Albizia julibrissin</i> Durazz	자귀나무, 야합수, 계수나무, 합장수, 합춘수, 자귀대 등	합환피(合歡皮)
학명	이명	생약명	식용여부						
<i>Albizia julibrissin</i> Durazz	자귀나무, 야합수, 계수나무, 합장수, 합춘수, 자귀대 등	합환피(合歡皮)	가능						
근거자료 2	출처	한글동의보감 (http://hidream.or.kr/bbs/view.php?id=dongeuibogam&no=4948)							
	요약	동의보감에 따르면 맛이 달며 독이 없으며 5장을 편안하게 하고 정신과 의 지를 안정시키며 근심을 없애고 마음을 즐겁게 한다							
근거자료 3	출처	T. J. Kim. Korean Resources Plants. II, Seoul National University Press, Korea, pp. 194-195 (1996).							
	요약	합환피는 중국, 일본, 한국에서 불면증, 이뇨증, 강장, 좌상 등에 이용되어 왔다.							
근거자료 4	출처	Go et al. Phytochemical constituents of the root bark from <i>Albizia julibrissin</i> Durazz. <i>Kor. J. Pharmacogn.</i> 35(3), 194-198 (2004).							
	요약	반복적인 컬럼크로마토그래피를 실시하여 euscaphic acid ester glucoside, luteolin-7-O-neohesperidoside, (+)-medioresinol, (-)-syringaresinol 의 4가지 화합물을 분리하였으며, 세포독성이 없는 것으로 사료된다.							
근거자료 5	출처	Tang et al. Chinese drugs of plant origin. Springer-Verlag, New york (1992).							
	요약	합환피는 자귀나무의 수피를 건조한 것으로서 한방에서는 불면증, 강장, 흥분, 이뇨, 진통, 구충제로 널리 사용되어 왔다.							
근거자료 6	출처	Chen et al. Structure determination of three saponins from he stem bark of <i>Albizia julibrissin</i> Durazz. <i>Acta pharmaceutica Sinica.</i> 2, 110-115 (1997).							
	요약	합환피의 구성성분으로 큰 비중을 차지하는 사포닌은 인체의 면역력을 높이는 성분으로 합환피로부터 3종류의 사포닌의 구조를 분석하였다							

(다) 의사결정 결과 및 요약

① 결과 : 나

② 요약

합환피는 식품공전, 동의보감에 등재되어 있으며, 중국, 일본, 한국에서 예로부터 불면증, 강장, 진통 등에 이용되어 온 약재로 부작용이 없으며, 여러 문헌들의 연구결과는 섭취 경험에 관한 충분한 근거자료로 제시되고 있다고 판단되었다.

감초는 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료로 등재되어 있지 않으며, 식약청의 식품원재료 DB에서 식용이 가능한 것으로 등록되어 있다. PDR for Herbal Medicines 및 Natural standard에 따르면, 감초는 예로부터 아시아 및 유럽에서 약용으로 이용되었으며, 여러 문헌들의 연구결과를 종합해 볼 때 섭취경험에 관한 근거자료가 충분하다고 판단된다. 특히, 국내에서는 약방의 감초로 잘 알려질 정도로 대부분의 한방처방에 사용되고 있다.

(라) 제출되어야 하는 안전성 자료의 범위

제출되어야 하는 안전성 자료	제출 여부 (결과: 나)
섭취 근거 자료	✓
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료	✓
섭취량 평가자료	✓

5. 감초 및 합환피 에탄올 추출물의 분리·정제

가. 감초 에탄올 추출물의 분리·정제

감초의 수면증진 활성성분을 구명하기 위하여 최적조건 하에서 제조된 감초 에탄올 추출물을 대상으로 분리정제 연구를 수행하였다. 감초 에탄올 추출물은 5가지 용매(chloroform, H₂O, *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH)를 사용하여 분획되었다. 그 중 GABA_A receptor에 대한 binding activity와 수율을 고려하여 선정된 chloroform 분획물로부터 5가지의 유효성분(glabrol, glabridin, abyssinone II, kanzonol U, isoliquiritigenin)을 동정하였다(Fig. 1-36).

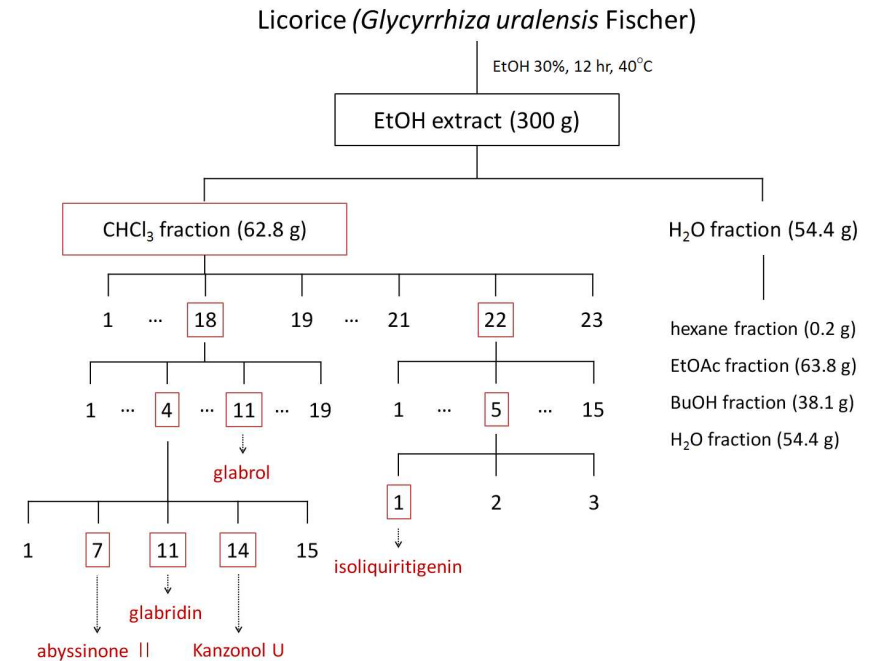


Fig. 1-36. Isolation scheme of five active compounds from chloroform fraction of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) ethanol extract.

(1) 용매에 따른 분획물의 제조 및 활성

감초 용매분획(chloroform, H₂O, *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH)에서 획득한 분획물의 GABA_A receptor에 대한 결합 억제활성을 분석한 결과, chloroform 분획물에서 좋은 활성을 나타내었다(Fig. 1-37). hexane 분획물도 활성이 높았으나 수율이 극히 낮게 나타났다. 따라서 감초의 분리정제는 활성 및 수율을 고려하여 chloroform 분획물을 대상으로 진행되었다.

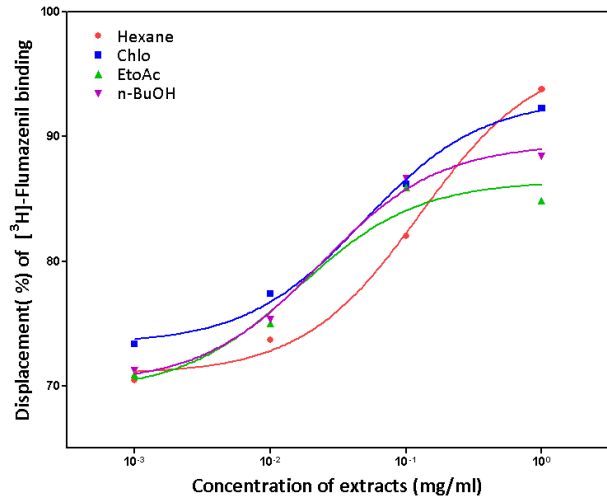


Fig. 1-37. *In vitro* [³H]-flumazenil binding inhibition of each fractions to GABA_A receptor.

(2) CHCl₃ 분획물로부터 활성획분의 분리

Chloroform 분획물을 분리정제하여 23종의 획분을 얻을 수 있었으며, 이 중 GUC18, GUC19, GUC21, GUC22에서 높은 결합 억제활성을 나타냈다(Fig. 1-39). CHCl₃ 분획물로부터 분리한 분획 중 GABA_A receptor 결합 억제활성이 높았던 GUC18과 GUC22의 하위 분획에서는 GUC18-4번 분획은 0.1mg/ml의 농도에서 36% 억제능을 보였고, 1.0mg/ml과 10mg/ml의 농도에서는 각각 80%이상의 억제능을 나타냈다. GUC 18-11번 분획은 0.1mg/ml의 농도에서 44.8% 억제능을 보였고, 1.0mg/ml과 10mg/ml의 농도에서는 각각 66.7%, 90.3%의 억제능을 나타냈다. GUC 22-5번 분획은 0.1mg/ml의 농도에서 60% 억

제능을 보였고, 1.0mg/ml과 10mg/ml의 농도에서는 각각 93.9%, 98.5%의 높은 억제능을 나타냈다(Fig. 1-40). GUC19와 GUC21은 분리과정에서 활성을 소실하였다.

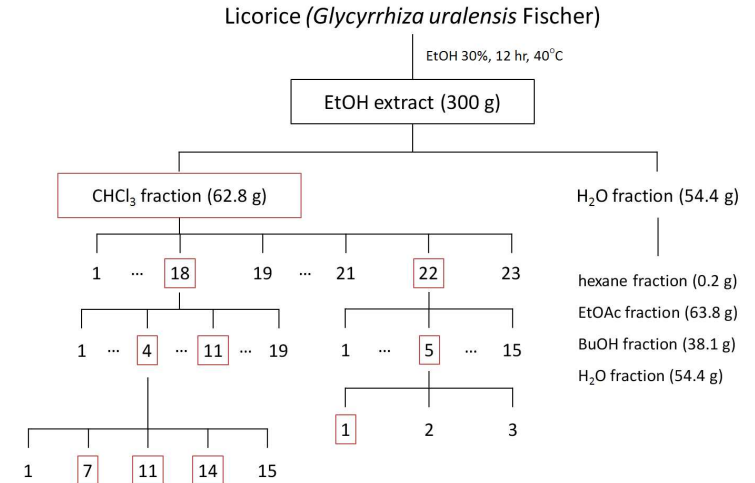


Fig. 1-38. Isolation scheme of active fractions from chloroform fraction of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) ethanol extract.

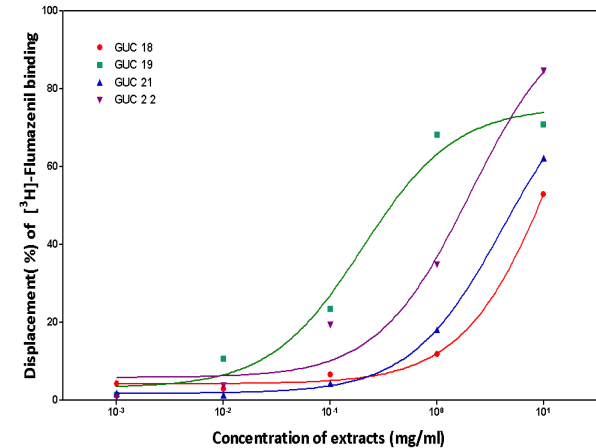


Fig. 1-39. *In vitro* [³H]-flumazenil binding inhibition of GUC 18, GUC 19, GUC 21 and GUC 22 to GABA_A receptor.

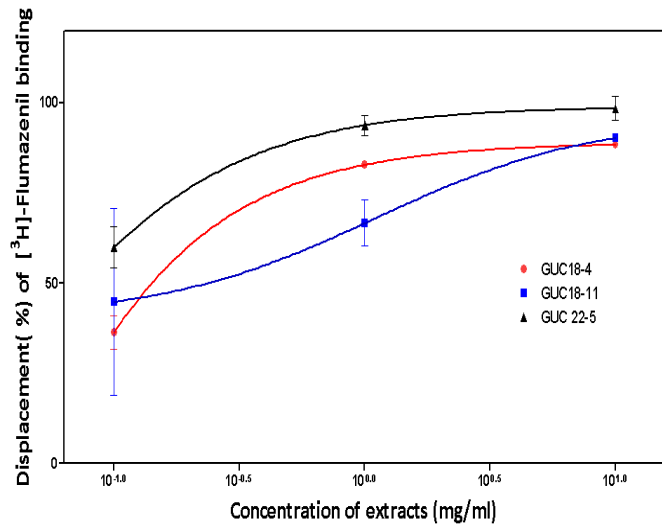


Fig. 1-40. *In vitro* [³H]-flumazenil binding inhibition of GUC 18-4, GUC 18-11 and GUC 22-5 to GABA_A receptor.

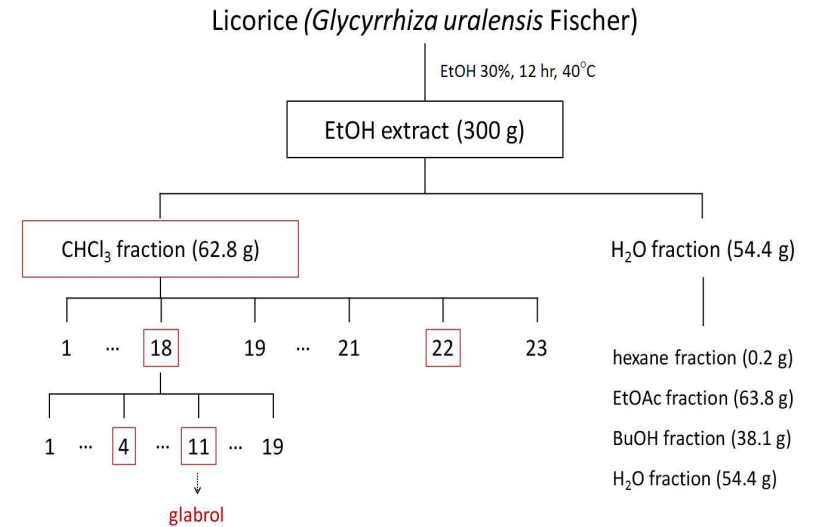
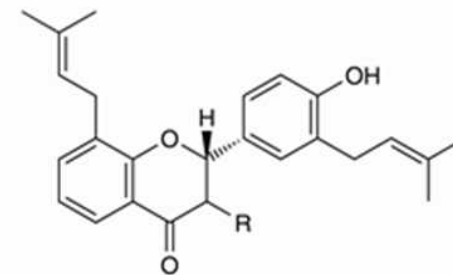


Fig. 1-41. Isolation scheme of glabrol from chloroform fraction of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) ethanol extract.

② 구조식



Chemical Formula: C₂₅H₂₈O₄
Exact Mass: 392

glabrol

Fig. 1-42. Structure of glabrol isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR, and Dept NMR.

(3) 활성 획분으로부터 유효한 단일성분의 분리

(가) Glabrol의 분리 및 동정

① 분리과정

CHCl₃ 분획(62.8 g)으로부터 SiO₂ column chromatography(c.c.) (φ 8 × 20 cm, *n*-hexane-EtOAc)를 실시하여 23개의 분획물(GUC-1~GUC-23)을 얻었다. 그 중 GUC-18 분획(1.47 g)에 대하여 ODS c.c.(φ 5 × 13 cm, MeOH-H₂O = 2:1)를 실시하여 19개의 분획(GUC-18-1~GUC-18-19)으로 나누었고, **glabrol**[GUC-18-11, 20 mg, TLC(ODS F_{254S}) R_f 0.6, H₂O-MeOH = 5:1]을 분리하였다(Fig. 1-41).

③ NMR spectrum

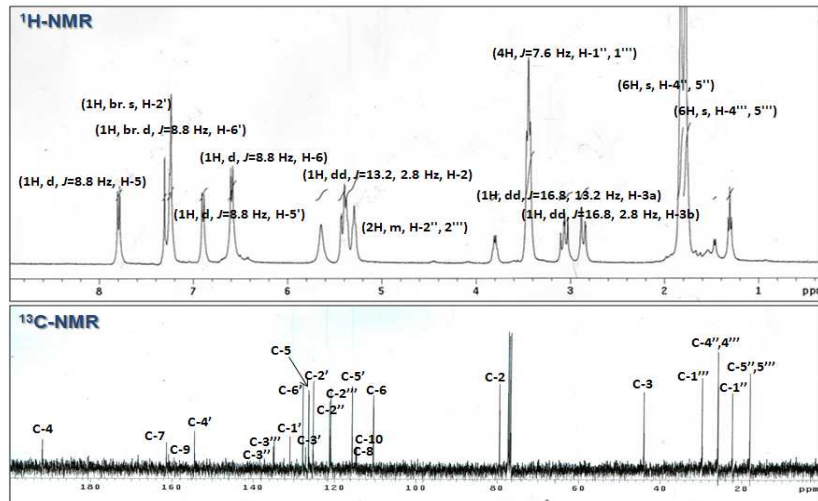


Fig. 1-43. NMR spectrum of glabrol from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer.

glabrol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 7.78 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-5), 7.25 (1H, br. s, H-2'), 7.26 (1H, br. d, *J*=8.8 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-5'), 6.58 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-6), 5.40 (1H, dd, *J*=13.2, 2.8 Hz, H-2), 5.29 (2H, m, H-2'', 2'''), 3.43 (4H, *J*=7.6 Hz, H-1'', 1'''), 3.03 (1H, dd, *J*=16.8, 13.2 Hz, H-3a), 2.83 (1H, dd, *J*=16.8, 2.8 Hz, H-3b), 1.83 (6H, s, H-4'', 5''), 1.79 (6H, s, H-4''', 5'''); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ_C) 191.95 (C-4), 161.42 (C-7), 161.20 (C-9), 154.45 (C-4'), 135.02 (C-3'''), 134.84 (C-3'''), 130.99 (C-1'), 127.85 (C-6'), 127.10 (C-3'), 126.40 (C-5), 125.29 (C-2'), 121.26 (C-2''), 121.00 (C-2'''), 115.70 (C-5'), 114.72 (C-8), 114.57 (C-10), 110.46 (C-6), 79.43 (C-2), 44.02 (C-3), 29.77 (C-1'''), 25.89 (C-4''), 25.83 (C-4'''), 22.31 (C-1''), 17.98 (C-5''), 17.92 (C-5''')

(나) Abyssinone II의 분리 및 동정

① CHCl₃ 분획으로부터 abyssinone II의 분리과정

GUC-18 분획(1.47 g)에 대하여 ODS c.c.(φ 5 × 13 cm, MeOH-H₂O = 2:1)를 실시하여 19개의 분획(GUC-18-1~GUC-18-19)으로 나누었고, GUC-18-4 분획(40 mg)에 대하여 Sephadex LH-20 c.c.(φ 2 × 50 cm, 70% MeOH)를 실시하여 15개의 분획(GUC-18-4-1~GUC-18-4-15)으로 나누어, **abyssinone II** [3.5 mg, TLC(ODS F_{254S}) R_f 0.4, MeOH-H₂O = 3:1]를 분리하였다(Fig. 1-44).

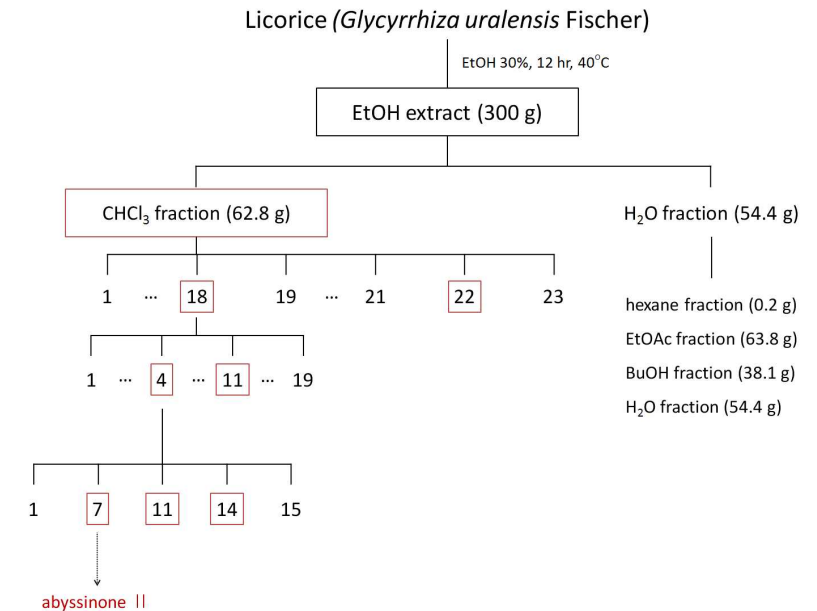
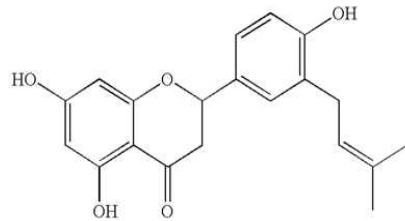


Fig. 1-44. Isolation scheme of abyssinone II from chloroform fraction of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) ethanol extract.

② Abyssinone II의 구조식



Chemical Formula: C₂₀H₁₅O₄
Exact Mass: 324.14

Abyssinone II

Fig. 1-45. Structure of abyssinone II isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR, and Dept NMR.

③ Abyssinone II의 NMR spectrum

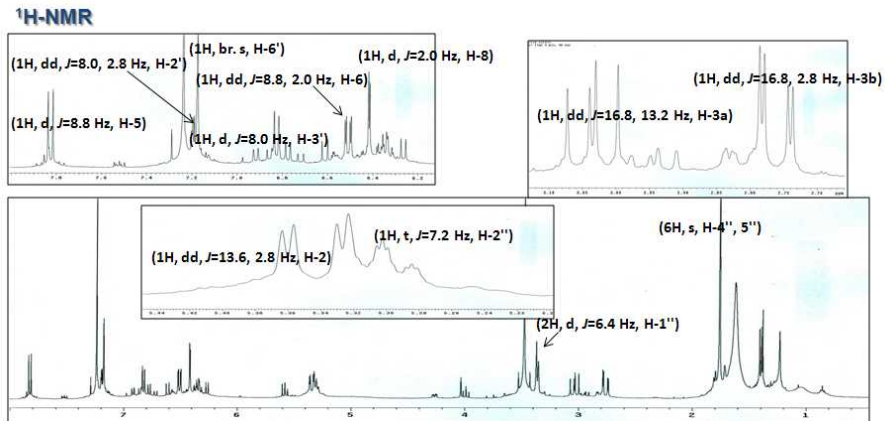


Fig. 1-46. NMR spectrum of abyssinone II from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer.

Abyssinone II

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 7.82 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-5), 7.19 (1H, dd, *J*=8.0, 2.8 Hz, H-2'), 7.17 (1H, br. s, H-6'), 6.82 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-3'), 6.50 (1H, dd, *J*=8.8, 2.0 Hz, H-6), 6.42 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 5.36 (1H, dd, *J*=13.6, 2.8 Hz, H-2), 5.31 (1H, t, *J*=7.2 Hz, H-2''), 3.36 (2H, d, *J*=6.4 Hz, H-1''), 3.07 (1H, dd, *J*=16.8, 13.2 Hz, H-3a), 2.77 (1H, dd, *J*=16.8, 2.8 Hz, H-3b), 1.76 (6H, s, H-4'', 5''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) 192.67 (C-4), 164.42 (C-7), 164.10 (C-9), 155.27 (C-4'), 135.61 (C-3''), 130.99 (C-1'), 129.87 (C-5), 128.69 (C-6'), 127.85 (C-2'), 126.14 (C-5'), 121.72 (C-2''), 116.39 (C-3'), 115.03 (C-10), 112.27 (C-6), 103.89 (C-8), 80.19 (C-2), 44.36 (C-3), 30.14 (C-1''), 26.22 (C-4''), 18.33 (C-5'').

(다) Glabridin의 분리 및 동정

① CHCl₃ 분획으로부터 glabridin의 분리과정

GUC-18 분획(1.47 g)에 대하여 ODS c.c.(φ 5 × 13 cm, MeOH-H₂O = 2:1)를 실시하여 19개의 분획(GUC-18-1~GUC-18-19)으로 나누었고, GUC-18-4 분획(40 mg)에 대하여 Sephadex LH-20 c.c.(φ 2 × 50 cm, 70% MeOH)를 실시하여 15개의 분획(GUC-18-4-1~GUC-18-4-15)으로 나누어, **glabridin**[6 mg, TLC(ODS F₂₅₄S) R_f 0.2, MeOH-H₂O = 3:1] 를 분리하였다(Fig. 1-47).

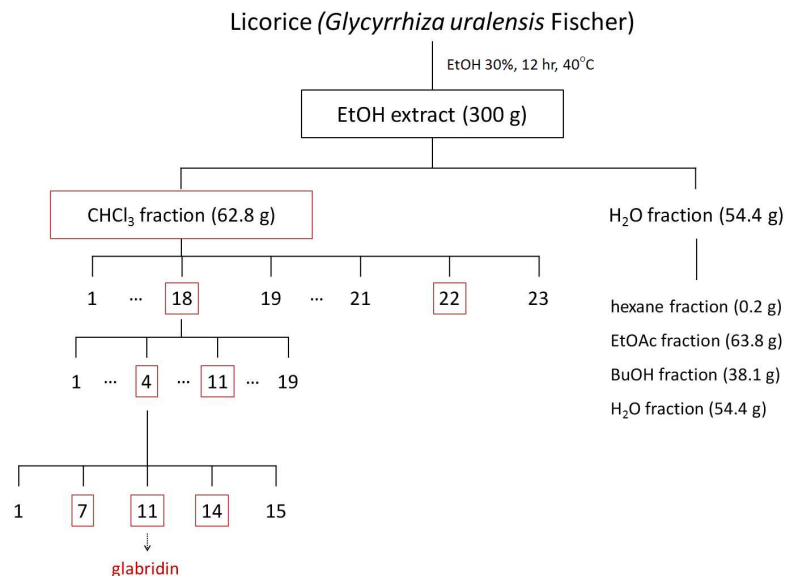


Fig. 1-47. Isolation scheme of glabridin from chloroform fraction of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) ethanol extract.

② Glabridin의 구조식

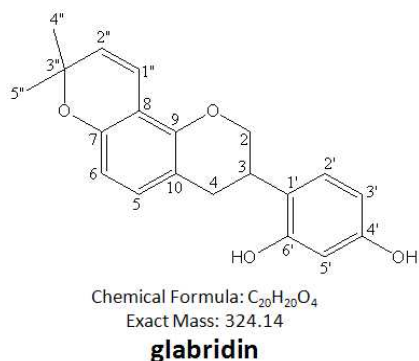


Fig. 1-48 Structure of glabridin isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR, and Dept NMR.

③ Glabridin의 NMR spectrum

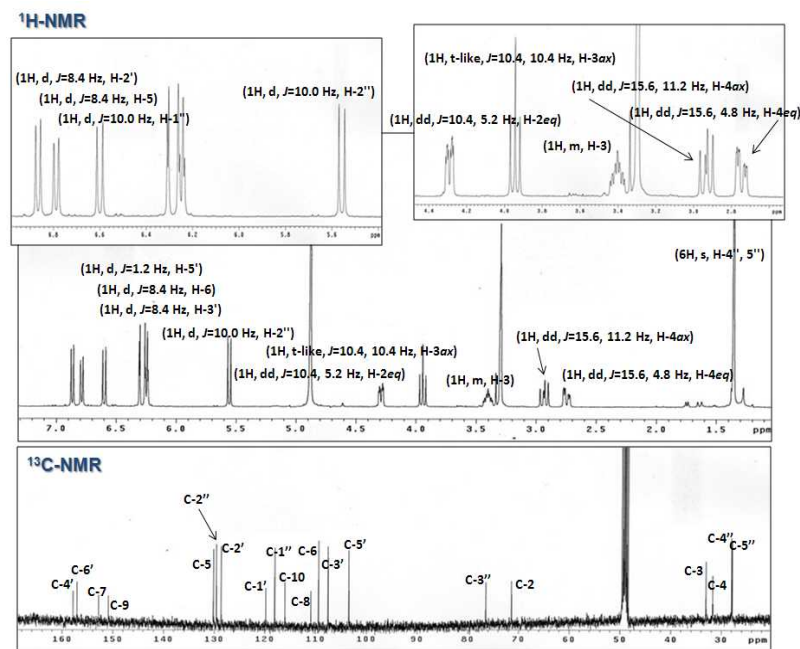


Fig. 1-49. NMR spectrum of glabridin from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer.

glabridin

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 6.88 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-2''), 6.78 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 6.61 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-1''), 6.31 (1H, d, *J*=1.2 Hz, H-5'), 6.26 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6), 6.25 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-3'), 5.57 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-2''), 4.31 (1H, dd, *J*=10.4, 5.2 Hz, H-2eq), 3.97 (1H, t-like, *J*=10.4, 10.4 Hz, H-3ax), 3.41 (1H, m, H-3), 2.96 (1H, dd, *J*=15.6, 11.2 Hz, H-4ax), 2.77 (1H, dd, *J*=15.6, 4.8 Hz, H-4eq), 1.37 (6H, s, H-4', 5''); ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD, δ_C) 157.86 (C-4'), 157.12 (C-6'), 152.85 (C-7), 150.89 (C-9), 130.17 (C-5), 129.58 (C-2''), 128.63 (C-2'), 119.80 (C-1'), 118.03 (C-1''), 116.03 (C-10), 110.88 (C-8), 109.39 (C-6), 107.52 (C-3'), 103.451 (C-5'), 76.43 (C-3''), 71.38 (C-2), 33.02 (C-3), 31.68 (C-4), 27.97 (C-4''), 27.84 (C-5'').

(라) Kanzonol U의 분리 및 동정

① CHCl_3 분획으로부터 kanzonol U의 분리과정

GUC-18 분획(1.47 g)에 대하여 ODS c.c.(φ 5 × 13 cm, MeOH-H₂O = 2:1)를 실시하여 19개의 분획(GUC-18-1~GUC-18-19)으로 나누었고, GUC-18-4 분획(40 mg)에 대하여 Sephadex LH-20 c.c.(φ 2 × 50 cm, 70% MeOH)를 실시하여 15개의 분획(GUC-18-4-1~GUC-18-4-15)으로 나누어, kanzonol U[9 mg, TLC(ODS F_{254S}) R_f 0.3, MeOH-H₂O = 3:1]를 분리하였다(Fig. 1-50).

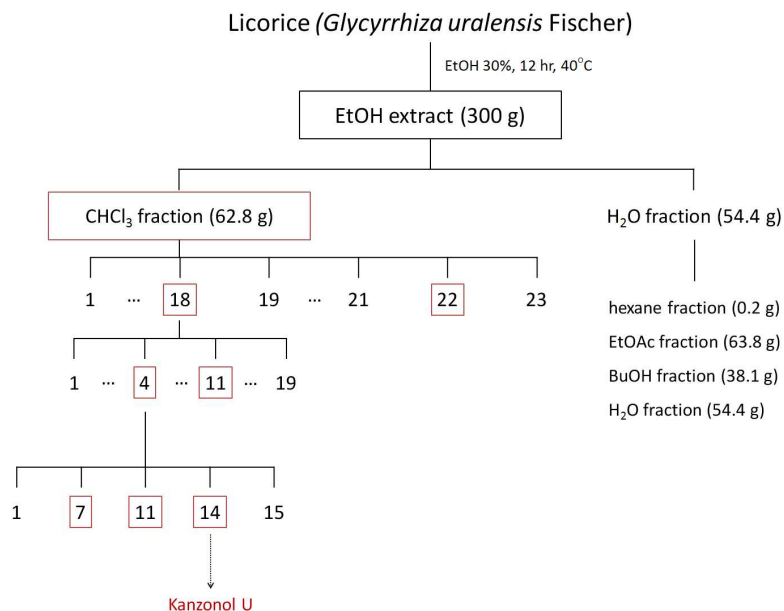


Fig. 1-50. Isolation scheme of kanzonol U from chloroform fraction of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) ethanol extract.

② Kanzonol U의 구조식

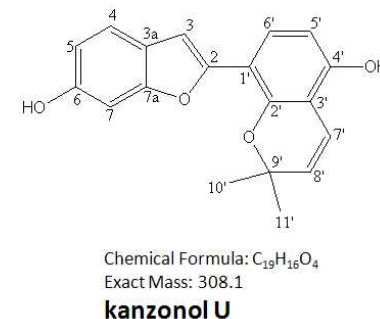


Fig. 1-51. Structure of kanzonol U isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR, and Dept NMR.

③ Kanzonol U의 NMR spectrum

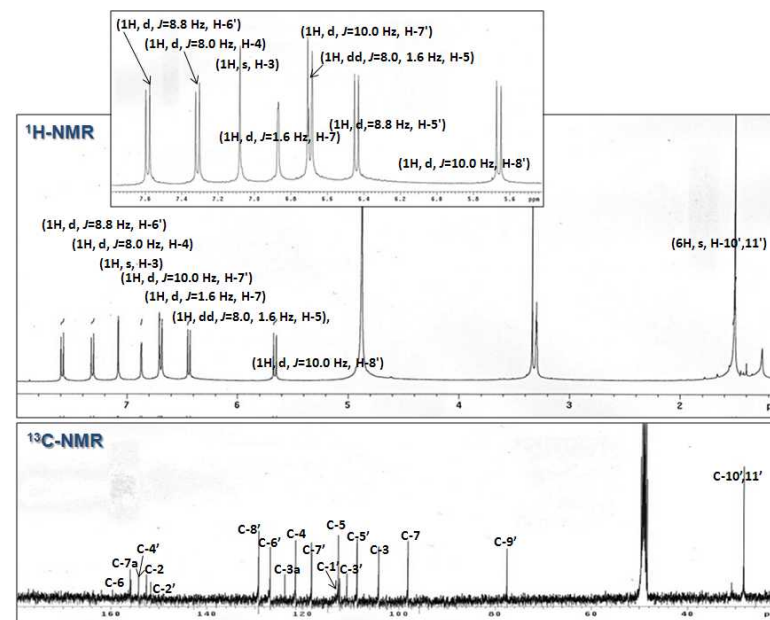


Fig. 1-52. NMR spectrum of kanzonol U from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer.

kanzonol U

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 7.59 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-6'), 7.32 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-4), 7.08 (1H, s, H-3), 6.87 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-7), 6.71 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-7'), 6.70 (1H, dd, *J*=8.0, 1.6 Hz, H-5), 6.44 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-5'), 5.67 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-8'), 1.51 (6H, s, H-10',11'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 155.98 (C-6), 155.82 (C-7a), 154.23 (C-4'), 152.63 (C-2), 151.71 (C-2'), 129.20 (C-8'), 126.78 (C-6'), 123.74 (C-3a), 121.48 (C-4), 118.19 (C-7'), 112.58 (C-5), 112.30 (C-1'), 100.81 (C-3'), 108.69 (C-5'), 104.20 (C-3), 98.15 (C-7), 77.56 (C-9'), 28.27 (C-10',11').

(마) Isoliquiritigenin의 분리 및 동정

① CHCl₃ 분획으로부터 isoliquiritigenin의 분리과정

GUC-22 분획 (748 mg)에 대하여 ODS c.c.(φ 4 × 5 cm, MeOH-H₂O = 1:1→3:1)를 진행하여 15개의 분획(GUC-22-1~GUC-22-15)으로 나누었으며, GUC-22-5 분획에 대하여 Sephadex LH-20 c.c.(φ 2 × 50 cm, 70% MeOH)를 실시하여 2개의 분획으로 나누어, **isoliquiritigenin**[3.5 mg, TLC(SiO₂ F₂₅₄) R_f 0.6, CHCl₃-MeOH = 10:1]을 분리하였다.

Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer)

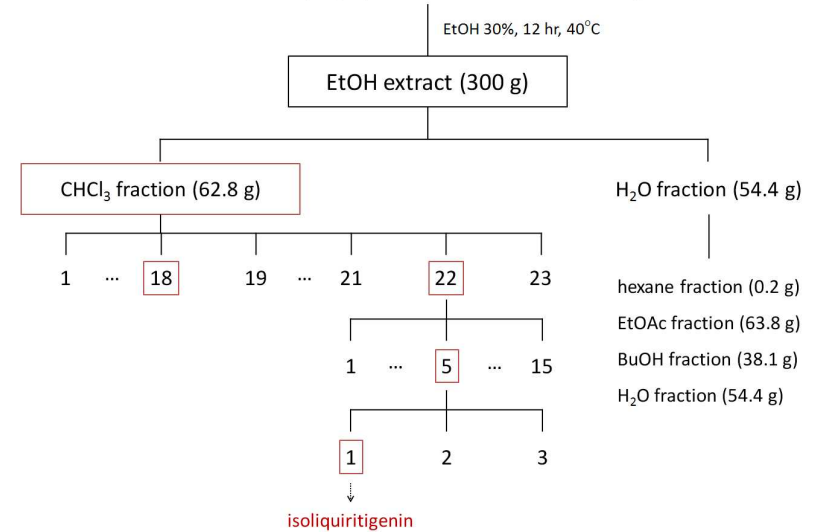
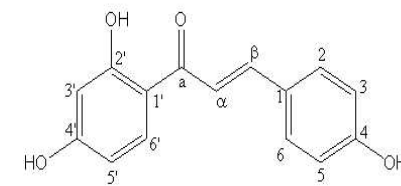


Fig. 1-53. Isolation scheme of isoliquiritigenin from chloroform fraction of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) ethanol extract.

② Isoliquiritigenin의 구조식



Chemical Formula: C₁₅H₁₂O₄
Exact Mass: 256.25

isoliquiritigenin

Fig. 1-54. Structure of isoliquiritigenin isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR, and Dept NMR.

③ Isoliquiritigenin의 NMR spectrum

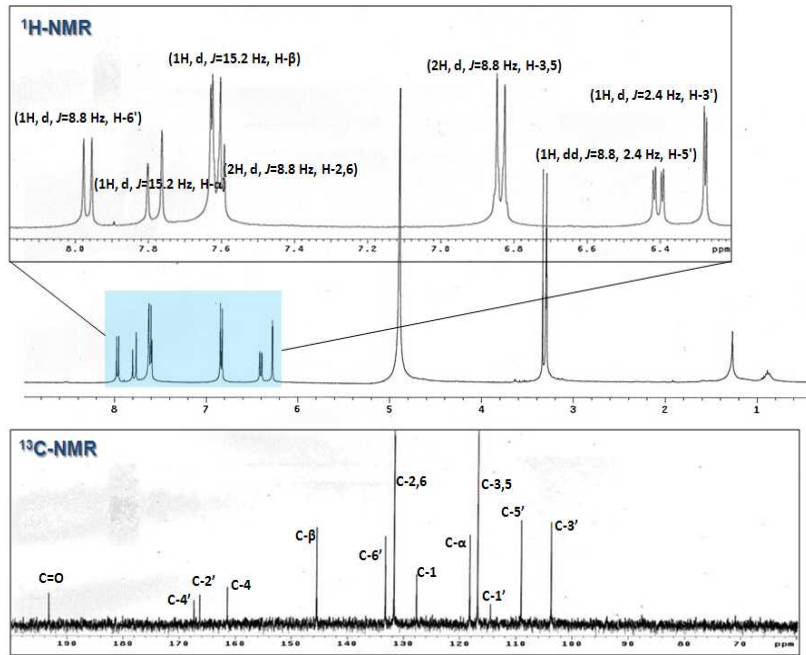


Fig. 1-55. NMR spectrum of isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Fischer.

isoliquiritigenin

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 7.98 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-6'), 7.76 (1H, d, *J*=15.2 Hz, H-α), 7.63 (1H, d, *J*=15.2 Hz, H-β), 7.61 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2,6), 6.83 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3,5), 6.42 (1H, dd, *J*=8.8, 2.4 Hz, H-5'), 6.27 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-3'); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 193.26 (C=O), 167.36 (C-4'), 166.34 (C-2'), 161.42 (C-4), 145.48 (C-β), 133.24 (C-6'), 131.71 (C-2,6), 127.71 (C-1), 118.22 (C-α), 116.81 (C-3,5), 114.55 (C-1'), 109.09 (C-5'), 103.72 (C-3').

(바) 감초 주요 성분의 활성 비교

감초의 대표적인 구성성분이라고 알려져 있는 glycyrrhizic acid, Glycyrrhetic acid, liquiritin, isoliquiritigenin의 표품을 구입하여 GABA_A receptor binding assay를 수행하였다. Glycyrrhetic acid, glycyrrhizic acid, liquiritin은 활성이 전혀 나타나지 않은 반면에

isoliquiritigenin은 2.6 uM 농도에서 100%에 가까운 억제 활성을 나타내었다(Fig. 1-56).

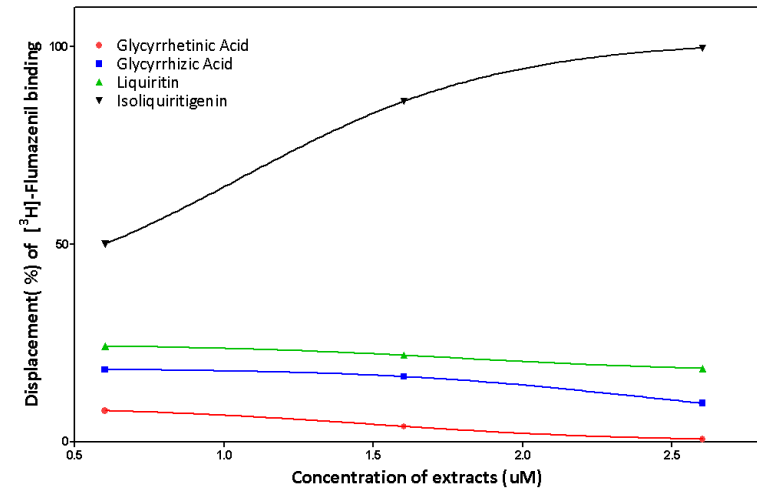


Fig. 1-56. *In vitro* [³H]-flumazenil binding inhibition of glycyrrhetic acid, glycyrrhizic acid, liquiritin and isoliquiritigenin to GABA_A receptor.

(사) Isoliquiritigenin 및 glabridin의 활성 평가

감초 에탄올 추출물을 분리 정제하여 얻은 22-5번 화합물인 isoliquiritigenin의 수면증진 효과와 작용기작을 살펴보기 위해 pentobarbital 수면유도 실험과 brain slice patch 실험을 진행하였다. 분리정제된 isoliquiritigenin의 양이 동물실험을 하기에는 부족하여 Sigma사에서 표품을 구입하여 사용하였다. 감초의 성분은 대체로 triterpenoid 유도체, flavone analogs, isoflavone계의 세 계열로 구분된다(Kamei et al., 2003). Triterpenoid인 glycyrrhizin은 이미 연구가 많이 수행되었지만, isoflavone계의 chalcone인 isoliquiritigenin의 효능 및 작용기전에 대한 연구는 많지 않다. 현재까지 isoliquiritigenin에 대한 수면증진 연구는 시행된 바 없으며, 본 연구가 시초이다. Kim et al. (2006)은 isoliquiritigenin이 H₂ histamine receptor(H₂R)에 선택적인 억제능이 있다고 보고하였으며, 항산화 활성을 나타내며 종양발생을 억제하고(Yamamoto et al., 1991) 신생혈관 생성(angiogenesis)을 억제한다고 보고하였다(Kobayashi et al., 1995). 또한, isoliquiritigenin이 apigenine, luteolin, kaempferol, quercetin, naringenin, genistein, daidzein등 유력한 flavonoid에 비해 암세포

사멸효과가 특히 뛰어나 항암작용이 우수하다고 하였다(Jung et al., 2006).

Isoliquiritigenin이 brain의 GABA_A receptor를 활성화시키는지를 알아보기 위하여 brain slice patch를 수행하여 그 결과는 나타내었다(Fig. 1-57). Isoliquiritigenin을 1 μ M 농도로 처리하였을때 spontaneous inhibitory post synaptic currents(sIPSC)의 decay를 연장시켰으며, GABA_A receptor antagonist인 flumazenil에 의해 sIPSC의 decay가 baseline 수준으로 떨어져 isoliquiritigenin이 수면제인 diazepam과 같이 GABA_A receptor에 의한 synaptic inhibition을 증대시키는 것을 알 수 있었다. 추가연구를 통해 dose response test로 IC₅₀를 구하고 같은 농도에서 diazepam의 효능과 비교할 계획이다.

Pentobarbital 수면유도 실험 결과, 농도 의존적으로 isoliquiritigenin의 sleep latency 감소와 sleep duration이 증가하였다. isoliquiritigenin 10, 25 mg/kg 농도에서 control 그룹과 수면 증진효과를 비교하였을 때 유의적인 결과가 나타나지 않았지만, isoliquiritigenin 50 mg/kg 농도에서는 $p < 0.05$ 유의수준에서 유의적인 sleep latency의 감소와 sleep duration의 증가가 나타났다. 본 연구를 통해 증명된 isoliquiritigenin의 수면증진 효과는 감초를 이용한 다양한 건강기능성 제품의 수요창출을 위한 과학적 근거로 사용될 것이며, isoliquiritigenin의 GABA_A receptor에 대한 활성화와 수면유도 효과는 본 연구에서 처음으로 입증되었다.

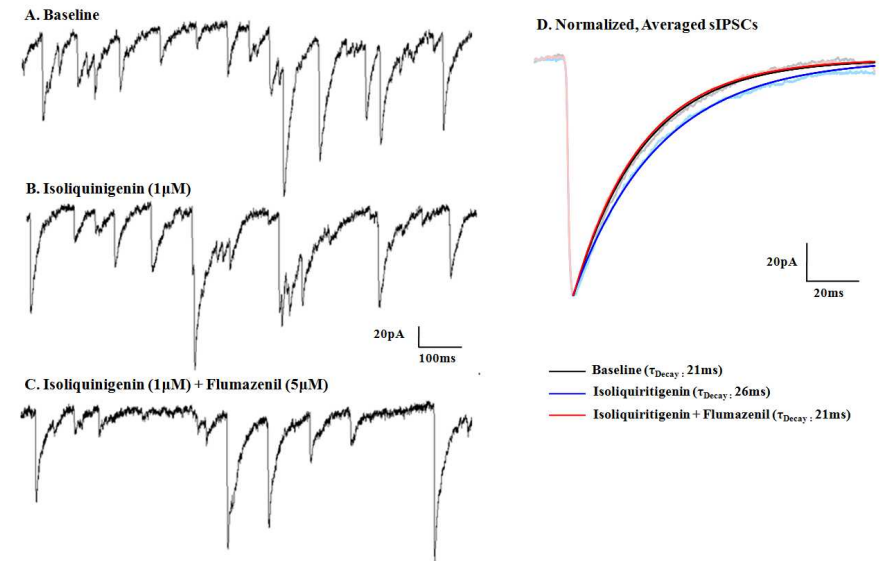


Fig. 1-57. The effect of isoliquiritigenin on spontaneous inhibitory post synaptic currents. A. B. C. Representative spontaneous IPSCs (sIPSCs). D. Normalized, averaged sIPSCs. Average traces are 37 events from baseline, 30 from isoliquiritigenin, and 35 from isoliquiritigenin+flumazenil. Decay was fitted to one-exponential functions.

Slice preparation

Male mice, aged 28 days. Slice thickness : 300 or 350 μ m.

Preparation solution (in mM) : 130 NaCl, 24 NaHCO₃, 3.5KCl, 1.25NaH₂PO₄, 1CaCl₂, 3MgCl₂ and 10glucose.

Bath solution (ACSF) : 130 NaCl, 24 NaHCO₃, 3.5KCl, 1.25NaH₂PO₄, 1.5CaCl₂, 1.5MgCl₂ and 10glucose

Electrophysiology

V_H: -60mV.

For mIPSCs recording, AP-5 (20 μ M), CNQX (10 μ M) were applied in the bath solution.

Pipettes were filled with an intracellular solution containing (in mM) : 140 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 10 QX-314 (pH 7.4; 300mOsm. 3 ~5 M Ω).

Recording protocol : Baseline (3min), Isoliquiritigenin (5min), Isoliquiritigenin + Flumazenil (5min).

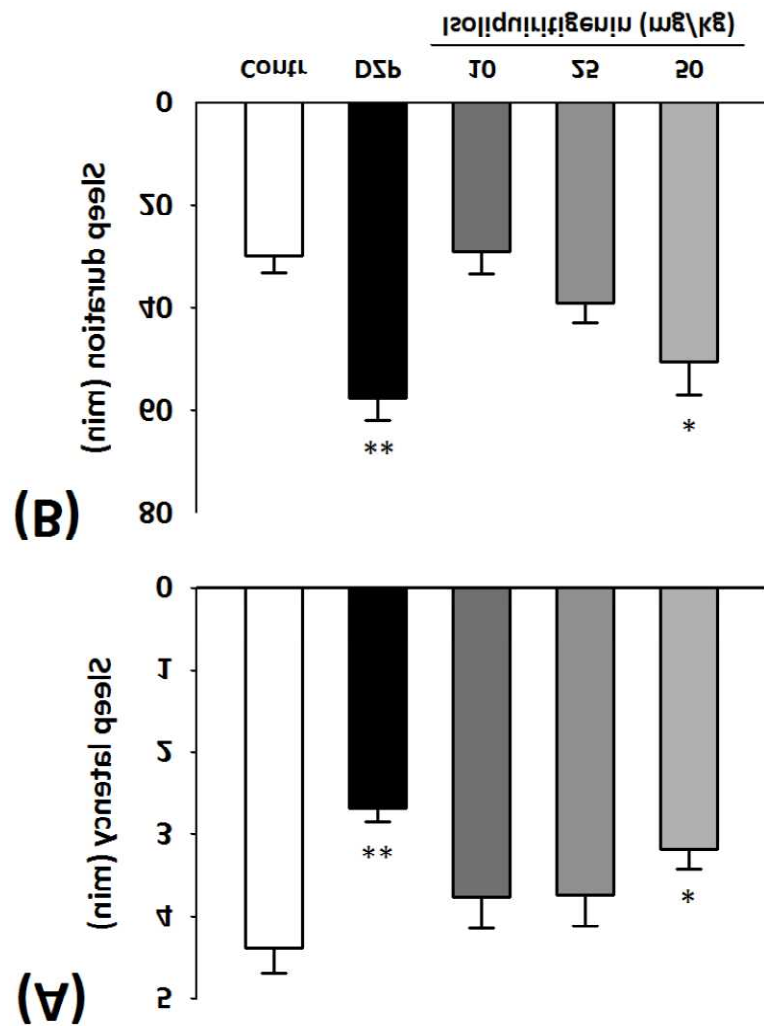


Fig. 1-58. Effects of combination of Isoliquiritigenin (10, 25, 50 mg/kg) with DZP on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. DZP: diazepam (2 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, significant as compared to the control group (Dunnett's test).

감초 에탄올 추출물을 분리 정제하여 얻은 18-4번 화합물인 glabridin의 수면증진 효과와 작용기작을 살펴보기 위해 pentobarbital 수면유도 실험을 진행하였다(Fig. 1-59). glabridin은 감초 뿌리에 함유되어 있고, 감초의 주요 성분으로 알려져 있다. Ishikawa et al. (1999)은 glabridin이 체내에서 인체에 해로운 low density lipoprotein(LDL)의 산화는 억제시키는 효과가 있다고 보고하였고, Nishioka et al. (1999)은 glabridin이 피부에 중요한 영향을 끼치는 hydrophobic 한 물질 중의 하나로 피부 미백에 탁월한 효과를 지니고 있다고 보고하였다. 실험결과, sleep latency에서 유의적으로 농도 의존적인 감소($p<0.05$)가 나타났으나, sleep duration에서는 glabridin 25 mg/kg에서 유의적인 증가($p<0.05$)가 나타났을 뿐, 50 mg/kg에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 본 실험에서 glabridin은 수면증진에 효과가 없는 것으로 확인되었으며, 앞으로 glabridin의 작용기작을 규명하기 위해서는 좀 더 세부적인 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

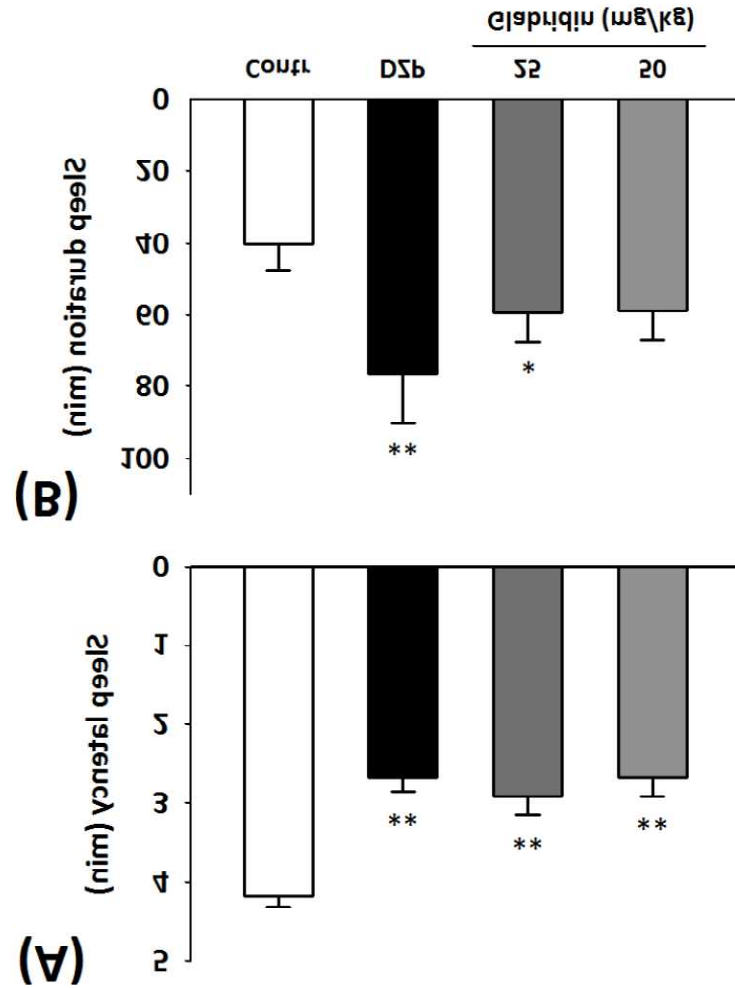


Fig. 1-59. Effects of combination of Glabridin (25, 50 mg/kg) with DZP on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45 min after administration of all samples. DZP: diazepam (2 mg/kg, p.o.), the reference sedative-hypnotic drug. Each column represents the mean±SEM (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant as compared to the control group (Dunnett's test).

나. 합환피 에탄올 추출물의 분리정제

합환피 3 kg을 반응표면분석법(RSM)을 이용하여 최적화한 조건(EtOH 60%, 57 hr, 20°C)에서 추출하여 동결건조하여 분말화 하였다. 분말화 한 합환피 EtOH 추출물을 3가지 용매(H₂O, EtOAc, *n*-BuOH)을 사용하여 분획하였다. 합환피의 분리정제 시, 시간관계 및 동위원소 실험관계상 단일물질로 분리해서 진행하였다(Fig. 1-61). 분리된 단일물질을 5-HT_{2C} receptor binding activity를 측정 한 결과, 그 중 EtOAc 층에서 나온 12가지 물질의 binding affinity가 높게 나타났다(Table 1-27).

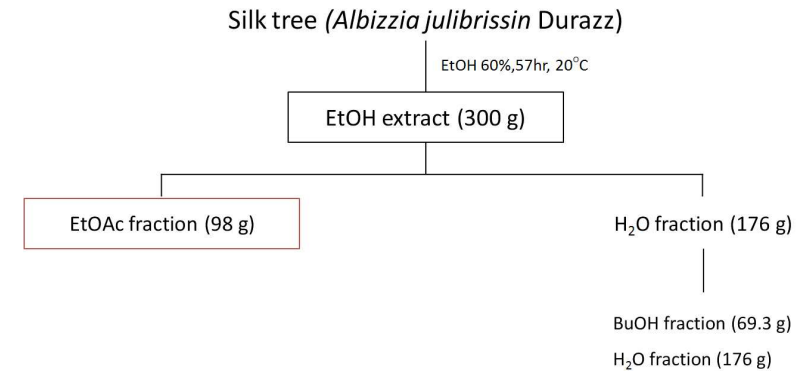


Fig. 1-60. Isolation scheme of EtOAc fraction from licorice (*Albizzia julibrissin Durazzini*) ethanol extract.

(1) 용매에 따른 분획물의 제조 및 활성 측정

합환피의 EtOH 추출물 300 g을 이용하여 EtOAc, H₂O, *n*-BuOH로 순차적으로 분획하여 각각의 분획을 얻었고, 용매분획을 통해 얻어진 분획물 3가지의 주요성분을 각종 chromatography (순상 및 역상 column, 순상 및 역상 TLC 등) 을 이용하여 성분을 분리하였고, 그 중 EtOAc층에서 19종의 분획물을 얻었고, 19종의 분획물을 각종 chromatography (순상 및 역상 column, 순상 및 역상 TLC 등) 을 이용하여 성분을 분리하여 주요구성 성분들을 분리정제하여, 15종의 single compound를 정제하였다(Table 1-27). 합환피의 ethanol 추출물의 EtOAc층을 분리정제하여 얻은 15종의 single compounds들의 Serotonin(5-HT_{2C}) receptor에 대한 결합 억제활성을 측정해 보았다. Table 1-28에서 나타내었듯이, EtOAc 층에서 분리한 물질들의 binding affinity가 낮은 농도에서도 50% 가량

유지되는 것을 확인할 수 있다.

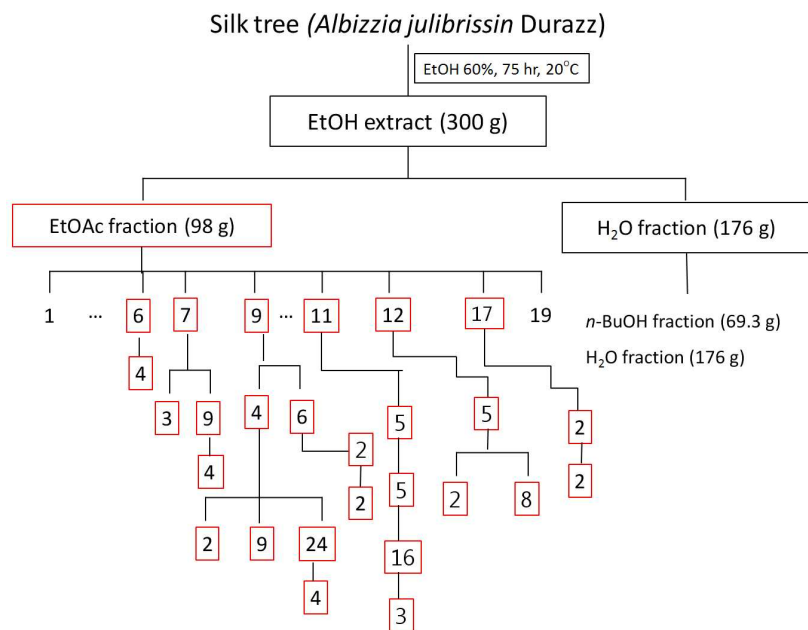


Fig. 1-61. Isolation scheme of single compounds from silk tree (*Albizzia julibrissin* Durazzini) ethanol extract.

Table 1-27. Single compounds from ethanol extract of *Albizzia julibrissin* Durazzini

no.	Compounds	Amount (mg)	Yield (%)
1	AJE-6-4+5+6+7	45.8	0.001527
2	AJE-7+8-3	104.8	0.003496
3	AJE-7+8-9+10-4	23.9	0.000797
4	AJE-9+10-4-2	20.9	0.000697
5	AJE-9+10-4-9+10	36.6	0.001220
6	AJE-9+10-4-24-5+6	16.5	0.000550
7	AJE-9+10-6+7+8-5+6-2-2	19.9	0.000663
8	AJE-11-5-5+6+7-14	31.2	0.001040
9	AJE-11-5-5+6+7-16-3	88.9	0.002963
10	AJE-12+13-5-2	24	0.000800
11	AJE-12+13-5-8	23.1	0.000770
12	AJE-17-2-2	88.7	0.002957
13	z1	1.2	0.000040
14	z8	1	0.000033
15	z10	11	0.000037

AJE: *Albizzia julibrissin* EtOAc extract

Table 1-28. *In vitro* [³H]-Mesulergine binding inhibition of various single compounds from ethanol extract of *Albizzia julibrissin* Durazzini

fraction	Binding of Mesulergine (%)		
	10mg/ml	1mg/ml	0.1mg/ml
AJE-6-4+5+6+7	38.135	46.915	61.368
AJE-7+8-3	48.936	53.287	74.188
AJE-7+8+9+10-4	44.895	51.966	99.285
AJE-9+10-4-2	48.236	55.229	64.087
AJE-9+10-4-9+10	51.267	51.267	101.15
AJE-9+10-4-24-5+6	59.503	80.793	111.018
AJE-9+10-6+7+8-5+6-2-2	3.895	3.59	53.387
AJE-11-5-5+6+7-14	15.659	18.195	49.939
AJE-11-5-5+6+7-16-3	20.223	22.049	45.68
AJE-12+13-5-2	63.232	87.164	71.235
AJE-12+13-5-8	42.253	65.019	61.834
AJE-17-2-2	37.824	51.655	68.361
Z1	102.483	121.673	130.438
Z8	106.999	86.813	103.745
Z10	195.445	100.624	68.353

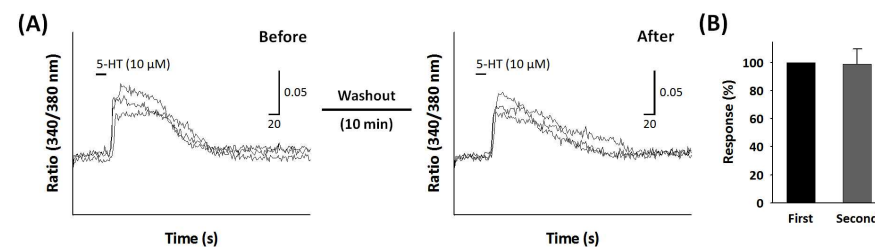


Fig. 1-62. Changes in Ca²⁺ signals by 5-HT treatment in HEK cells expressing human 5-HT_{2c} receptor.

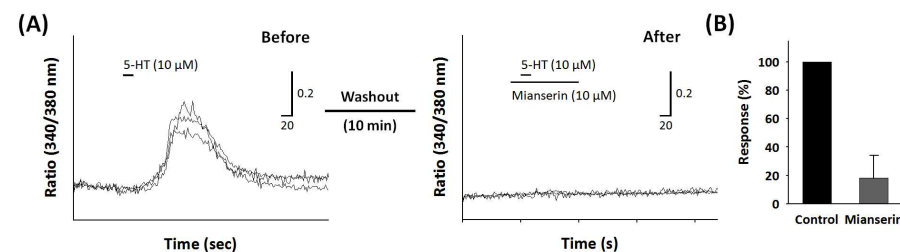


Fig. 1-63. Changes in Ca²⁺ signals by mianserin (5-HT_{2c} receptor antagonist) in HEK cells expressing human 5-HT_{2c} receptor.

칼슘을 감지할 수 있는 형광 물질을 세포내에 투입시켜 세포내의 칼슘농도를 측정할 수 있는 Ca²⁺ imaging를 통해 분리된 성분들이 antagonist로써 작용하는지를 알아보았다. 5-HT_{2c} receptor는 GPCR로써 5-HT가 결합하여 활성화 될 때 세포내 칼슘을 증가시킨다. 따라서 칼슘을 증가가 억제되는지를 확인함으로써 antagonist의 활성을 평가할 수 있다. 먼저 실험방법에 대한 확립을 위하여 5-HT에 의한 칼슘농도 증가가 재연성있게 나오는지를 확인하였으며, 10분 간격이 적절함을 알 수 있었다(Fig. 1-62). 5-HT_{2c} 억제물질인 mianserin으로 5-HT에 의한 칼슘증가를 시험한 결과, 칼슘 증가가 80% 이상 억제되었다. 하지만 본 연구에서 분리된 모든 성분들을 대상으로 실험한 결과 1 mM의 고농도에서 칼슘 증가를 유의적으로 억제하지 못하였다. 5-HT receptor는 GPCR(G protein-coupled receptor)로 2C에 효능이 있는 약물들은 대부분 다른 GPCR에도 효능을 가지는 경우가 많아 추후 2A 및 histamine receptor에 대한 억제활성을 평가할 계획이다.

제 4 절 결 론

본 연구에서는 수면증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 20종의 농산자원에 대한 GABA_A 및 5-HT_{2C} receptor binding assay를 수행하였다. GABA_A receptor binding assay에서는 감초 및 단삼의 결합 억제활성이 높게 나타났으며, 5-HT_{2C} receptor binding assay에서는 인삼, 홍삼, 합환피 및 신선초가 활성이 우수하였다. 이들 소재 중 제조단가 및 동물 수면증진 효과를 평가하여 감초와 합환피를 최종소재로 선정하여 pentobarbital을 이용한 수면유도 실험과 뇌파(EEG) 및 근전도도(EMG) 분석을 수행하여 수면증진 효과가 있음을 입증하였다. 그리고 반응표면분석법(Response Surface Methodology)를 이용하여 제조조건을 최적화하였는데 이를 통해 경제적인 추출물의 제조가 가능하였으며 수용체에 대한 결합 억제 활성이 높은 최적조건에서 동물 효능 또한 높아 최적화조건에 적절한 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 연구결과의 완성도를 높이기 위하여 계획되지 않았던 분리정제 연구를 연차평가의 추천 의견에 따라 추가적으로 수행하였다. 분리정제 과정은 순조롭게 진행되었으나, 감초 에탄올 추출물에서 활성을 보이는 물질들이 다양하고 함량이 적어 확보를 수집하는데 애로가 있었다. 다행히 표준품으로 나와있는 제품들이 있어 본 연구에서 처음으로 감초의 주요 flavonoid인 isoliquiritigenin이 GABA_A receptor의 agonist로써 작용하여 수면 증진효과가 있다는 것을 brain slice patch 및 동물실험을 통해 입증하였다. 감초는 국내에서 가장 많이 사용되고 있는 한방소재로써 그 의의가 크다고 할 수 있다. 반면에 합환피에서 분리한 성분들은 실제 칼슘이미징 실험에서 효능을 나타내지 못했다. 5-HT_{2C} receptor 외에도 다른 receptor에 작용할 가능성도 있기 때문에 추가연구를 통해 이를 밝히고자 한다.

대표적인 수면제 중 하나인 diazepam과 수면증진 식품으로 판매되고 있는 제품과의 동물 효능을 비교하여 본 제품의 가능성을 타진하였다. 그 결과 시판 제품에 비해 효능이 높아 향후 제품의 경쟁력 확보가 가능할 것으로 판단된다.

[협동] 수면증진 소재의 임상평가

제 1 절 서 론

수면은 인간 수명의 1/3 정도를 차지하며, 건강 유지 및 정신적 안정에 있어 매우 중요한 필요 요소이다. 수면부족 증상이 계속되면 각종 질병과의 연관성이 매우 높아지기 때문에 적절한 수면을 통해 건강을 유지시켜야 한다. 수면장애의 대표적 질환인 불면증은 잠이 들기 힘들고, 이른 아침에 깨거나 수면 시 자주 깨며, 자고 일어나도 잔 것 같지 않는 증상이 한 가지 이상 나타나 이로 인해 낮 기능이 저하 될 때 진단되는 질병이다. 불면증이 지속적으로 나타나면 일상생활에 어려움이 있고, 업무수행 및 학습능력의 감퇴를 유발하며, 비만, 당뇨병, 위장장애, 인지기능의 저하 등을 일으키는 것으로 알려져 있다. 국내 연구기관에서는 일반인의 12%(약 400 만명)가 주 3회 이상 잠을 못자는 불면증이 있다고 보고하였으며, 이 연구결과는 수면이 국민 건강 및 삶의 질을 높일 수 있는 요소이며, 불면증의 진단과 치료가 중요한 과제임을 역설하고 있다.

수면에 대한 평가는 크게 수면다원검사를 통한 객관적 검사와 설문지를 이용한 주관적 평가로 나눌 수 있는데 특히, 불면증에 대한 평가는 증상 자체의 특성상 주관적 평가를 주로 한다(미국 수면학회, 2003). 설문지를 통한 불면증 평가 시에는 잠이 드는데 걸리는 시간, 깨는 횟수, 총 수면시간, 아침에 일어났을 때의 수면의 만족도 등을 지표로 사용한다. 또한, 수면다원검사를 통해서 수면 단계별 수면의 양을 측정하는 동시에 수면 시 호흡 상태와 다리의 움직임 등을 측정하여 수면장애를 진단할 수 있다. 위의 두 가지 평가를 병행 시에는 객관적 및 주관적 평가를 동시에 할 수 있다는 장점을 가진다.

불면증의 치료는 크게 수면제와 안정제를 이용한 약물치료 외에도 비 약물치료로 알려진 인지행동 치료, 광 치료법 등이 있다. 하지만, 약물치료 시에는 부작용과 내성, 의존성이 문제가 되며, 인지행동치료 시에는 시간 및 경제적 비용이 너무 크고 수용한계가 있다는 어려움이 있어 현재, 상기의 치료법 이외에도 수면을 도와주는 방법에 대한 다양한 시도가 이뤄지고 있다.

따라서 본 연구에서는 수면증진 효과가 있을 것으로 여겨지는 감초 추출물과 합환피 추출물을 임상실험을 통해 과학적으로 규명하여 부가가치가 높은 기능성 수면증진식품을 개발하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisher)는 30% ethanol, 41°C에서 12시간 추출하였고, 합환피(*Albizia julibrissin* Durazzini)는 60% ethanol, 20°C에서 58시간 추출하였다. 추출 후 여과지로 여과 한 후 농축기로 감압농축 하였다. 이 농축액을 동결건조 후 분말화하여 실험에 사용하였으며, 이는 수면증진 동물실험에 사용된 것과 동일하다.

2. 수면증진 소재 제조

용량배합은 감초 추출물과 합환피 추출물을 7:3비율로 하였으며, 한 capsule 당 300 mg으로 감초 추출물은 한 capsule 당 210 mg, 합환피 추출물은 한 capsule 당 90 mg을 사용하였다. 한국식품연구원에서 개발한 수면증진 소재를 1차 수면다원검사 다음날부터 복용하였으며, 동물실험결과에 의거하여 투여용량을 남자는 3 capsule(900 mg) 여자는 2 capsule(600 mg)로 설정하였다. 또한, 환자에게는 건강수면식품제만 복용하게 했으며, 그 외에 수면에 영향을 줄 수 있는 수면제나 기타약제는 복용하지 않았다.

3. 불면증 현황 및 수면증진 식품에 대한 설문조사

불면증 현황 및 수면증진 식품에 대한 설문조사를 20세 이상 성인 남·여 247명을 모집 단으로 하여 실시하였으며, 주요 설문 내용은 수면에 도움이 되는 식품에 대한 조사, 특정 식품의 불면증에 대한 주관적 효과에 대한 평가, 불면증의 빈도와 불면증으로 인한 장애의 빈도 및 건강수면식품의 개발 필요성 여부 및 구매의사에 대한 내용을 조사하였다.

4. 수면증진 소재 임상실험

2010년 2월에서 5월까지 불면증상이 주 3회 이상 있다고 한 불면증 환자 21명과 신체 질환이나 수면장애가 없는 지원자 22명을 정상 대조군으로 하였다. 환자군은 총 21명(수면 다원화 검사 시행군:10명)이며, 이 중 2명이 도중 탈락하여 연구 제외되었다. 탈락이유는 수면검사 시 협조가 잘 이루어지지 않아 자료가 불충분했던 경우(1명)와 2회 검사를 모두

마치지 않고 임의로 탈락한 경우 (1명)였다. 환자군 예게는 수면검사 전 최소 14일간 어떤 약물도 복용하지 않도록 하였고, 진찰을 통해 내과적 질환이나 신경과적 질환이 없음을 확인하였다. 최종적으로 완료 된 불면증 환자는 19명으로 남자가 7명, 여자가 12명이며, 연령 분포는 26-57세 (37.9±11.3)였다. 정상 대조군은 남자가 10명, 여자가 12명이며, 연령 분포는 26-57세(29.5±3.3)였다. 환자군과 정상 대조군은 연령분포, 남녀비의 차이가 거의 없도록 하였고, 모든 연구대상자들에게 연구의 내용과 방법 등을 본인 및 보호자에게 설명한 후 서명동의를 받았고 연구기간동안 가톨릭 중앙의료원 임상연구 관리규정과 헬싱키 선언을 준수하였다.

가. 수면설문조사

수면 설문조사는 수면장애 정도와 수면패턴을 알아보기 위해 불면증 평가에 흔히 사용하는 피츠버그 수면설문지를 사용하였다. 일주일에 3회 이상 불면이 있는 환자들을 대상으로 하였으며, 대상 환자들에게 임상증상의 평가는 스텐포드 수면클리닉에서 개발한 Sleep Disorders Questionnaire(SDQ)를 사용하였고, 수면검사 전후로는 피츠버그 수면설문지 (Pittsburgh Sleep Quality Index : PSQI)와 Clinical Global Inventory(CGI)를 사용하였다.

나. 수면다원검사

기준 수면다원검사 1회와 수면증진 소재 복용 1주 후에 1회 시행하여 총 환자군에게 2회 수면다원검사를 실시하였다(Fig. 1). 수면은 검사당일 오후 9시부터 오전 9시 사이에 평상시 취침시간에 맞춰 8 시간동안 기록하였다. 검사기기 모델은 Embla를 사용하였으며, 기록 시 뇌파 (EEG)전극은 C3, O1/A2에 단극성으로 부착하였고, 안전도(EOG) 전극은 좌측 외안각 상방 1 cm와 우측 외안각 하방 1 cm에 단극성으로 부착하였으며, 근전도(EMG) 전극은 이하근(submentalis m.)에 양극성으로 부착하였다. 기록속도(paper speed)는 30 mm/sec, 교정전압(calibration)은 5 mm/50 μ V, 고역감쇠필터(high cut filter)는 35 Hz로 고정하였으며, 수면단계의 판정은 Rechtschaffen과 Kales의 판정법에 의거하여 수작업으로 판정을 하였다. 본 연구에 사용된 각 수면용어의 정의 및 수면다원화 검사 기록지는 각각 Table 1과 Fig 2에 나타내었다.



Fig. 2-1. Polysomnography testing of insomnia patient.

Table 2-1. Definition of EEG sleep variables

Sleep continuity	1. Time in bed (TIB): time from the lights out until standing up
	2. Sleep latency (SL): time in minutes between lights out and first epoch of stage 1
	3. Sleep period time (SPT): TIB - (SL + time awake before standing up)
	4. Total sleep time (TST): SPT - awake time during the night
	5. Sleep efficiency index (SEI): ratio of TST to TIB x 100
Sleep architecture	1. Minutes of each stage of sleep.
	2. Percentage of each stage of sleep expressed as a ratio to Sleep Period.
REM sleep	1. REM latency (REML): minutes from sleep onset to the first REM epoch.

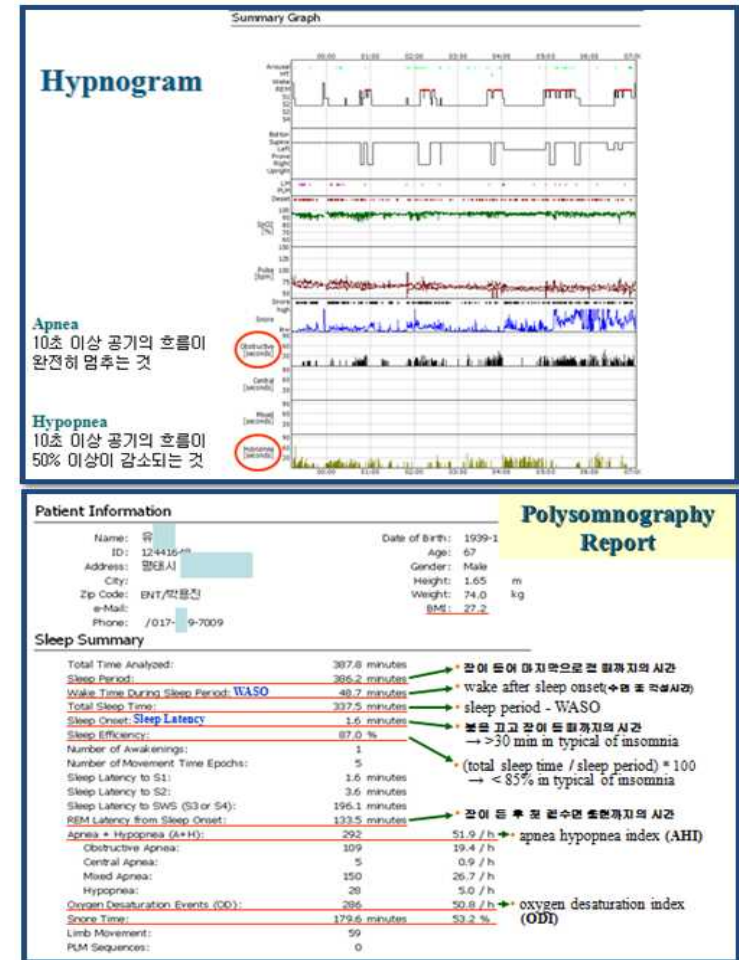


Fig. 2-2. Polysomnography Report.

5. 통계 처리

모든 실험의 결과는 평균과 표준편차 (mean±SD)로 나타내었고, 각 군과 대조군과의 통계적인 비교는 SPSS/PC+를 통해 평가하였다. 약물투여 전에 환자군과 정상대조군의 비교와 환자군의 약물투여 전후비교는 t-tests를 통해 평가하다.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 불면증 현황 및 수면증진 식품에 대한 설문조사

가. 불면증의 여부

20세 이상의 남녀 247명을 대상으로 불면증 평가 설문을 한 결과 96명인 38.9%가 불면증을 경험한 것으로 나타났으며, 대규모의 조사 결과는 아니지만 선진국의 불면증 환자 수준에 근접하는 것을 알 수 있었다.



나. 불면증의 빈도

불면증을 호소한 대상자 중 만성적인 수면장애로 이어질 가능성이 높은 일주일에 3일 이상의 불면증을 겪는 사람의 비중이 50%로 매우 높게 나타났다.



다. 불면증으로 인한 불편감의 여부·정도

불면증을 호소한 대상자 중 절반에 가까운 46.2%가 일상 생활에 대한 불편함을 경험하는 것으로 나타났으며 특히, 불편감을 느끼는 사람 중 50% 이상이 불편함의 정도가 상당히 심한 것으로 나타나 정상적인 일상 생활에 큰 장애가 되는 것으로 판단되었다.



라. 불면증으로 인한 주간 졸림 여부 및 주간 기능의 장애 여부

불면증을 호소한 대상자 중 84.9%가 주간에 졸림증을 경험하는 것으로 나타났으며, 불면증으로 인한 주간 졸림은 기억력, 집중력 등에 장애를 주게 되며 이로 인해 학습이나 업무수행에 지장을 초래하게 되는데 본 조사에서도 불면증을 호소한 대상자의 대부분인 87%가 주간의 기능장애를 경험하였다.

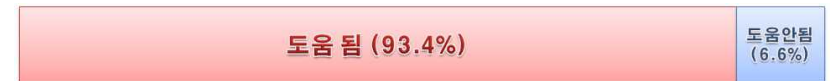
마. 불면증으로 인한 주간 기능의 장애 정도

주간의 기능 장애를 겪는 응답자 중 32% 정도가 주간 기능 장애로 인한 어려움이 큰 것으로 나타났다.



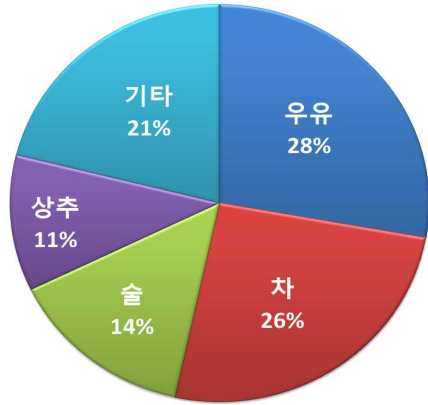
바. 식품 섭취가 수면에 도움이 되는지 여부

전체 응답자 247명 중 93.4%가 식품의 섭취가 수면에 도움이 되는 것으로 생각하고 있어 수면 장애 극복을 위한 중요한 수단으로 인식되는 것을 알 수 있었다.



사. 수면에 도움이 되는 식품

실제 수면에 도움이 되었던 식품을 조사한 결과, 일반적으로 많이 알려진 따뜻한 우유(27.8%)가 가장 큰 비중을 차지하였으며 다음으로 따뜻한 차(대추차, 인삼차, 유자차 등)가 26%, 술이 14%, 상추가 11%로 나타났다.



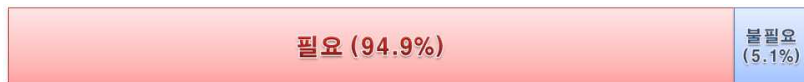
아. 조사 대상자의 평균 수면시간

일반적으로 성인의 적정 수면시간은 7-8시간 정도로 알려져 있는데, 본 조사 대상자의 평균 수면시간은 6시간 15분으로 적정 수면시간에 비해 1시간 정도 부족한 것으로 나타났으며 이는 2007년 국내 직장인을 대상으로 조사한 평균 수면시간인 6시간과 유사한 결과와 유사하였다. (한강타임즈, 2007. 01. 10)

평균 취침시간	평균 기상시간	평균 수면시간
12시 30분	6시 45분	6시간 15분

자. 수면에 도움이 되는 식품개발의 필요성 여부

전체 대상자의 95%가 수면에 도움이 되는 식품이 필요하다고 응답하여 불면증을 경험한 응답자 뿐 아니라 정상인의 경우도 건강수면식품의 개발 필요성을 높게 인식하였다.



차. 건강수면식품에 대한 구매 의사

불면증을 경험하게 되면 수면에 도움이 되는 식품을 구매하고자 하는 의향이 있는 사람이 전체 대상자 중 80.5%로 매우 높게 나타나 본 연구사업 결과의 사업화 성공 가능성이 높을 것으로 기대된다.



2. 수면증진 소재 임상실험

가. 수면 설문조사

(1) 인구학적 특성

불면증 환자는 남자가 7명, 여자가 12명이었으며, 평균연령 37.9±11.3세, 체질량 지수(BMI)는 23.8±5.3이었다. 정상인 대조군은 남자가 10명, 여자가 12명이었으며, 평균연령에서 의미 있는 차이는 없었다.(Table 1).

Table 2-2. Demographic and clinical characteristics of insomnia patients and normal controls

	Insomnia patients (N=19)	Controls (N=22)
Gender(M/F)	(7/12)	(10/12)
Age(Mean±SD)	37.9±11.3	29.5±3.3
BMI(Mean±SD)	23.8±5.3	21.2±3.1

(2) 임상증상

평균 수면시간에서 불면증 환자와 정상인 대조군은 차이를 보이지 않았으며 잠을 들기까지 걸리는 시간(Sleep latency)에서는 불면증환자가 평균 62.7분이 걸렸으나 정상인에서는 14.2분으로 큰 차이를 보였다. 평균 기상시간과 총 수면시간에서도 불면증 환자와 정상인 대조군과의 차이는 없었다.(Table 2).

불면증 환자의 수면증진 소재 복용 전과 후를 비교하였을 때 평균 수면시간에서는 차이가 나타나지 않았으나, 잠이 들기까지 걸리는 시간(Sleep latency)에서는 복용 전에는 평균 62.7분이 걸렸으나 복용 후에는 36분으로 유의한 차이를 나타내었다.($p=0.02$) 또한, 총 수면시간에서도 복용 전에는 5.1 시간이었으나 복용 후에는 5.9 시간으로 유의한 차이를 보였다($p=0.003$)(Table 3).

Table 2-3. Comparison of insomnia patients and normal controls by Pittsburgh Sleep Quality Index : PSQI)

	Insomnia patients (N=19)	Controls (N=22)
Average sleep time (hr)	P.M. 11 hr 5 min	P.M. 12 hr 8 min
Sleep latency (min)	62.7 min	14.2 min
Average wake time (hr)	A.M. hr 4 min	A.M. 7 hr 1 min
Total sleep time (hr)	5.1 hr	6.1 hr

Table 2-4. Comparison of baseline and after treatment in insomnia patients by Pittsburgh Sleep Quality Index : PSQI)

	Baseline (N=19)	After 1 week (N=19)	Unpaired t-test P-value (two-tailed)
Average sleep time (hr)	P.M. 11 hr 5 min	P.M. 11 hr 3 min	NS
Sleep latency (min)	62.7 min	36 min	0.02
Average wake time (hr)	A.M. 6 hr 4 min	A.M. 6 hr 5 min	NS
Total sleep time (hr)	5.1 hr	5.9 hr	0.003

(3) 수면설문조사

수면장애정도와 수면패턴을 알아보기 위해 일주일에 3회 이상 불면이 있는 환자들을 대상으로 불면증 평가에 흔히 사용하는 피츠버그 수면설문지를 사용하여 수면설문조사를 하였다. 불면증의 빈도를 조사하였을 때, 수면장애 환자군 대상이 복용 전 만성적인 수면장애로 이어질 가능성이 높은 1주일에 3일 이상의 불면증을 겪은 비중이 75%이었으나 복용 후 89%로 1주일에 불면증을 겪는 날이 3일 미만으로 줄었다(Fig. 1). 불면증으로 인한 불편감의 여부를 조사하였을 때, 수면장애 환자군 대상이 복용 전 69%가 일상생활에서 불면증으로 인해 불편감을 느꼈으나, 복용 후 57.9%에서 일상생활에 불편감을 전혀 느끼지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2).

수면증진 소재 복용 전·후 수면의 각성 정도를 알아본 결과(Fig.3), 복용 전 불면증으로 인하여 만성 불면증으로 이어질 확률이 큰 주 3회 이상이 74%였으나 복용 후에는 53%에서 1주일에 한번 미만으로 감소되었음을 알 수 있었다. 또한, 수면증진 소재 복용 전·후 수면의 만족도를 조사한 결과(Fig. 4), 복용 전 불면증으로 인하여 수면 만족도는 26%였으나 복용 후에는 84%가 만족하는 것으로 만족도가 크게 증가되었음을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 수면증진 소재를 1주일간 복용하였을 때 불면증 빈도와 불편함이 감소되고, 수면에 효과가 있었으며 수면 질이 향상됨을 확인 할 수 있었다.

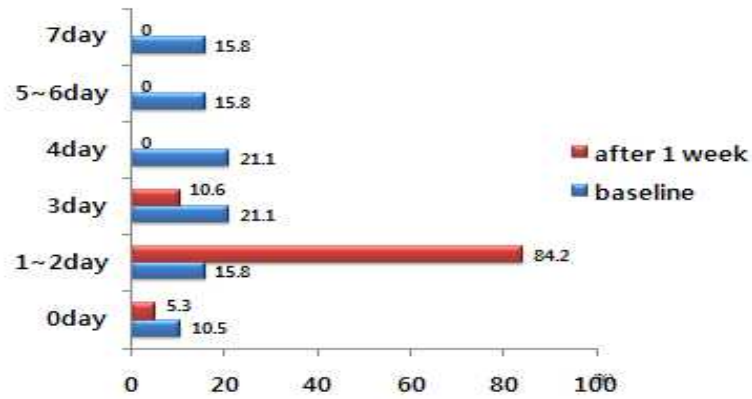


Fig 2-3. The frequency of insomnia.

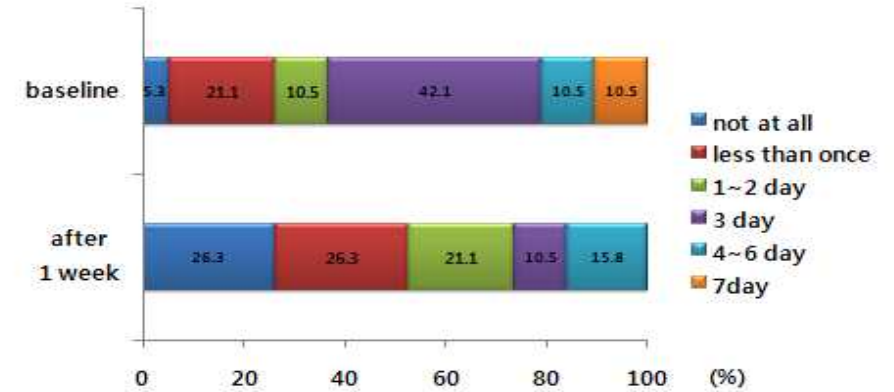


Fig 2-5. Comparison of baseline and after treatment in insomnia patients according to awakenings.

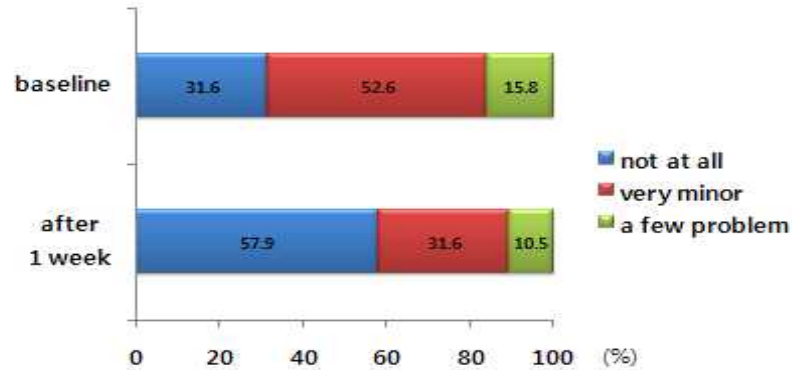


Fig 2-4. The inconvenience by insomnia.

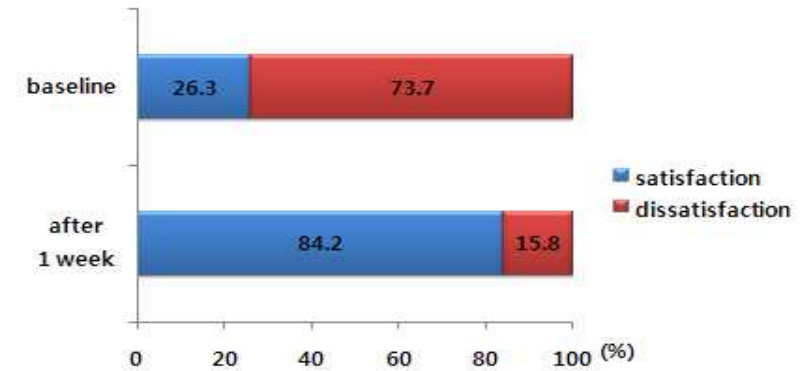


Fig. 2-6. Comparison of baseline and after treatment in insomnia patients according to sleep satisfaction measurement.

나. 수면다원검사 (Polysomnography)

수면증진 소재의 확인을 위해 수면다원검사를 실시하였으며, 불면증 환자를 대상으로 복용 전과 정상 대조군을 비교한 결과는 Table 1에 나타내었다. 두 그룹 간 통계적 유의성은 없었으나 잠들 때 까지 걸리는 시간(SL)에서 정상 대조군은 6.3±2.4 min이었고, 불면증 환자군은 21.9±27.4 min로 측정되었다. 또한, 수면도중 각성 횟수는 정상 대조군 7.2±7.8 min이었고 불면증 환자군은 14.5±12 min로 각성 횟수가 더 빈번하였으며, 수면효율은 정상 대조군이 93.4±6.7 min이었고 불면증 환자군은 86.6±19.8 min로 불면증 환자군이 정상 대조군보다 수면효율이 낮은 것으로 확인되었다.

불면증 환자를 대상으로 수면증진 소재 1주일 복용 전과 후를 비교한 결과는 Table 2에 나타내었다. 수면연속성에서 전과 후의 통계적 유의성은 없었으나, 총 수면시간이 375.4±134.2 min에서 426.6±22.7 min로 증가하였으며 수면잠재기는 21.85 min에서 21.8 min로 변화가 없었다. 또한, 수면도중 각성 시간은 44.8±67.1 min에서 25.1±20.2 min로 감소한 결과를 보였으며, 각성 횟수는 14.5±12 min에서 11.7±8.9 min로 감소하고 수면효율은 86.6±19.8 min에서 90.3±5.8 min로 증가하였다. 복용 전과 후의 수면구조를 비교하였을 때, 1단계수면이 34.7±12.7 min에서 25.1±8.2 min로 감소된 변화를 보여주었고 (p=0.02), 서파수면은 수면증진 소재 투여 전과 후의 차이를 찾을 수 없었다. REM 수면 역시 88.5±42.2 min에서 93.6±34.8 min로 변화가 없었고, 렘수면 잠재기도 88.3±43.6 min에서 90.6±55 min으로 변화가 없었다.

결론적으로 불면증 환자가 수면증진 소재를 복용 하였을 때 복용 전보다 총 수면시간이 크게 증가하였고 각성시간도 감소하였으며, 수면효율도 증가한 것으로 보아 본 연구에서 개발한 수면증진 소재인 감초+합환피 추출물은 불면증에 큰 효능이 있는 것으로 사료된다.

Table 2-5. Comparison of polysomnographic findings between insomnia patients and normal controls

	Patients (N=10)	Controls (N=10)	Unpaired t-test P-value (two-tailed)
TIB (min)	471.9±21.1	478.8±6.8	NS
SPT (min)	450.2±34.1	472.6±7.1	NS
TST (min)	375.4±134.2	443.4±27.5	NS
SL (min)	21.9±27.4	6.3±2.4	NS
SEI (%)	86.6±19.8	93.4±6.7	NS
Number of awakenings	14.5±12	7.2±7.8	NS
REML (min)	88.3±43.6	87.3±50.3	NS
ST1 (min)	34.7±12.7	30.2±24.3	NS
ST2 (min)	247.4±57	259.4±26.7	NS
ST3&4 (min)	34.9±29.1	38±29.8	NS
REM (min)	88.5±42.2	115.8±52.4	NS
Wake (min)	44.8±67.1	29.2±30.6	NS
PLMI (N/hr)	3.6±7.5	0	NS
PLMA (LMA)(N/hr)	10±7.9	3.5±2.2	NS
RA (N/hr)	2.5±4	1.3±1.5	NS
LA (N/hr)	0.4±0.9	0	NS
SA (N/hr)	6.4±3	4.3±1.4	NS
Longest (sec)	34.6±22	22.3±21.5	NS
AHI (Apnea/hr+Hypopnea/hr)	5.3±7.9	1.8±1.8	NS

Table 2-6. Comparison of polysomnographic findings between baseline and after 1 week in insomnia patients

	baseline	After 1 week	Unpaired t-test
	(N=10)	(N=10)	P-value (two-tailed)
TIB (min)	471.9±21.1	473.6±11.2	NS
SPT (min)	450.2±34.1	451.8±26.7	NS
TST (min)	375.4±134.2	426.8±22.7	NS
SL (min)	21.9±27.4	21.8±30.9	NS
SEI (%)	86.6±19.8	90.3±5.8	NS
Number of awakenings	14.5±12	11.7±8.9	NS
REML (min)	88.3±43.6	90.6±55	NS
ST1 (min)	34.7±12.7	25.1±8.2	0.02
ST2 (min)	247.4±57	273.4±38.3	NS
ST3&4 (min)	34.9±29.1	34.7±28.2	NS
REM (min)	88.5±42.2	93.6±34.8	NS
Wake (min)	44.8±67.1	25.1±20.2	NS
PLMI (N/hr)	3.6±7.5	6.8±12.9	NS
PLMA (LMA)(N/hr)	10±7.9	13.3±13.4	NS
RA (N/hr)	2.5±4	3.5±5.1	NS
LA (N/hr)	0.4±0.9	2.2±5.4	NS
SA (N/hr)	6.4±3	6.1±3.2	NS
Longest (sec)	34.6±22	26.3±16.3	NS
AHI (Apnea/hr+Hypopnea/hr)	5.3±7.9	4.8±5.9	NS

제 4 절 결 론

수면증진 소재를 1 주일 복용한 후 설문지를 통한 불면증 증상에 대한 주관적 평가에서 본 연구에서 개발한 감초+합환피 혼합 추출물이 불면증 개선에 큰 작용을 하였다. 실험결과에서 잠이 오는데 걸리는 시간이 62.7분에서 36분으로 단축되었고, 깨는 횟수가 14.5회에서 7.2회로 감소하였다. 또한, 총 수면시간이 375분에서 426분으로 증가하였고, 자신의 수면에 대한 만족이 26%에서 84%로 크게 증가 하였다. 불면증의 증상이 잠이 들기 힘들고(입면장애), 자주 깨는(유지 장애) 증상으로 인하여 수면에 대한 불만족도가 증가하는 것인데 본 연구에서는 건강수면식품이 불면증상을 호전시키는 결과를 얻었으며 총 수면시간도 크게 증가하는 결과를 나타내었다.

수면증진 소재 투여 전후의 수면다원검사 결과에서는 얇은 수면에 해당하는 1단계 수면이 감소하였는데, 이 결과는 각성에서 수면으로 가는 과정에 해당되는 1단계 수면이 감소한 것으로 불면증의 호전과 관련이 있는 소견이다. 불면증의 진단과 평가는 주관적인 평가에 의거하므로 설문지 등을 포함한 주관적 평가를 통해서 불면증의 호전여부를 측정하는데 본 연구 결과 역시 수면다원검사에 의거한 평가에서는 한계가 있었으나 설문지를 통한 주관적 평가에서는 대상 환자의 불면증 증상이 호전되었음을 밝히는 결과를 얻었다.

결론적으로 본 연구 사업에서 개발한 수면증진 소재인 감초+합환피 혼합추출물은 불면증을 완화시키고 수면의 질을 향상시키는데 큰 영향을 끼치는 것으로 확인되었으며, 과학적으로 규명된 본 연구결과에 따라 부가가치가 높은 기능성 수면증진식품을 개발할 수 있을 것으로 여겨진다.

[위탁] 수면증진 소재의 작용기작 연구

제 1 절 서론

현대인의 수면 장애는 심각한 수준이며 이는 졸음운전과 작업 중 사고 등을 유발하며 심하게는 정신과 질병을 초래한다. 인간 수면의 질이 유전적 요인에 중대한 영향을 받는다는 사실이 알려지면서 인간 수면의 유전적 연구가 시작되었으며 2000년 초파리도 인간의 수면과 유사한 생리현상을 가진다는 것이 밝혀지면서 전 세계적으로 초파리를 이용한 수면의 유전적 연구가 시작되었다. 이에 따라 지금까지 도파민, 세로토닌, cAMP, GABA, K+ Channel 등의 요인들이 수면장애를 일으키는 원인으로 밝혀졌다. 본 연구에서는 건강수면 유도효과와 관련된 물질을 모델 동물에 투여하고 Microarray 데이터 분석을 통해 수면 조절 유전자를 발굴하고, 해당 유전자의 발현과 활성 조절을 통해 수면 조절의 분자적 기작을 밝힘과 동시에 건강수면 유도효과와 관련된 Pathway를 유추하고 이를 확인하기 위한 일련의 분자생물학적 접근을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료

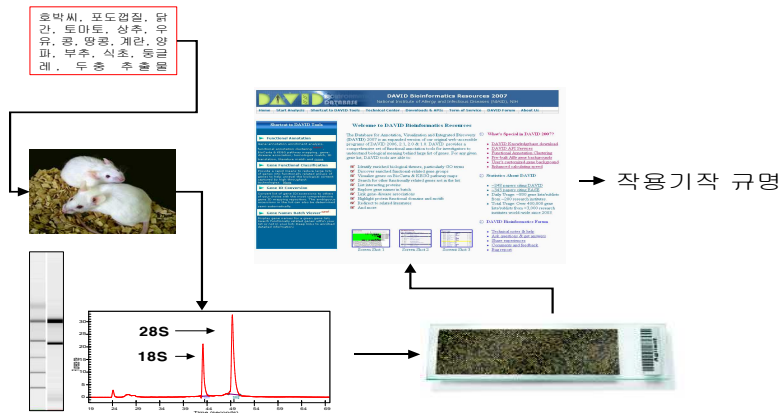


Fig. 3-1. Methods of test for studying sleep mechanisms with microarray.

2. 시료 확보 및 QC

한국식품연구원에서 감초 추출물(GCh)과 합환피 추출물(HHP)을 rat에 각 3시간 경구 투여한 후, 시상하부(hypothalamus, Hy) 및 기저전뇌(basal forebrain, BF) 조직을 분리하고 Tri Reagent RT RNA-Isolation Reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 RNA Clean-up RNeasy Mini Kit(Qiagen GmbH., Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 RNA는 Bio Analyzer 2100(Agilent Technologies., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 28S/18S의 비율이 1.0 이상일 경우 실험이 가능하다고 판단하여 사용하였다.

3. 샘플 Labeling 및 Hybridization

2 ug의 Total RNA 에 T7 Oligo-dT Primer를 넣어 최종 Volume이 12 ul이 되도록 한다. Mixture를 70°C에서 10분간 Incubate 한 후 아이스에서 5분간 방치한다. Mixture에 10X First-strand Buffer 2 ul, 5mM dNTP Mix 4 ul, RNase inhibitor(20U/ul) 1ul, SuperscriptTMIIRNaseH-reversetranscriptase(200U/ul)1ul를 넣어 최종 Volume이 20 ul 가 되도록 한다. 제조된 Mixture를 42°C에서 2시간 동안 Incubate 한다. Second-strand cDNA를 합성하기 위해, Mixture와 10X Second-strand Buffer 10 ul, Nuclease-free Water 63 ul, 5mM dNTP Mix 4 ul, DNA Polymerase mix(20U/ul) 2 ul, RNase H(2U/ul) 1 ul를 혼합한다. Reaction Mixture를 16°C에서 2시간 동안 Incubation 한다. dsDNA가 정화되면 dsDNA Solution의 Final Volume을 14 ul로 맞추기 위해 Drying Solution을 사용하거나 Nuclease-free Water를 사용한다. IVT(invitrotranscription)를 위해, 14 ul의 dsDNA Solution과 10X Reaction Buffer 4 ul, ATP, CTP, GTP Mix(25mM) 12 ul, UTP(50mM) 3 ul, Amino Alkyl UTP 3 ul, T7 Enzyme Mix 4 ul를 혼합한다. Reaction Mix를 37°C에서 14시간 동안 Incubation시켜 cRNA를 Purify하였다. cRNA Yield는 260 nm의 UV Absorbance를 이용하여 계산하고 각 샘플 내 3 ug의 cRNA는 Cy-dye(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)와 결합된다. Cy-dye 와 표지 된 cRNA(Target)는 Hybridization을 위해 단편화된다. Fragmentation의 결과는 대략 100에서 200 Base의 사이의 사이즈로 단편화가 된다. 단편화된 Target은 Agilent Whole Rat Genome Microarray Kit(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)의 Hybridization에 쓰인다. 단편화된 Target을 Agilent의 In situ Hybridization Kit의 2X Hybridization Buffer 에다 넣은 후 Hybridization Solution은 Agilent Whole Rat Genome Microarray Kit

(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)에 올라가며 60°C에서 16시간 동안 Hybridize된다. 이후 Wash Solution I(6X SSC, 0.00005% Triton-X 102)을 이용하여 실온에서 10분간 Wash 한 뒤, 다시 4°C 에서 10분간 Wash Solution II(0.1X SSC, 0.00005% Triton-X 102)를 이용하여 Washing한다. 추출된 RNA는 Ambion(Ambion Inc, Austin, TX, USA) Cy5의 One-dye Labeling 분석방법으로 진행되며, 시료의 양이 적을 경우 유전자 증폭과정을 거쳐 유전자를 확보한 후 이를 Cy5로 Labeling하였다.

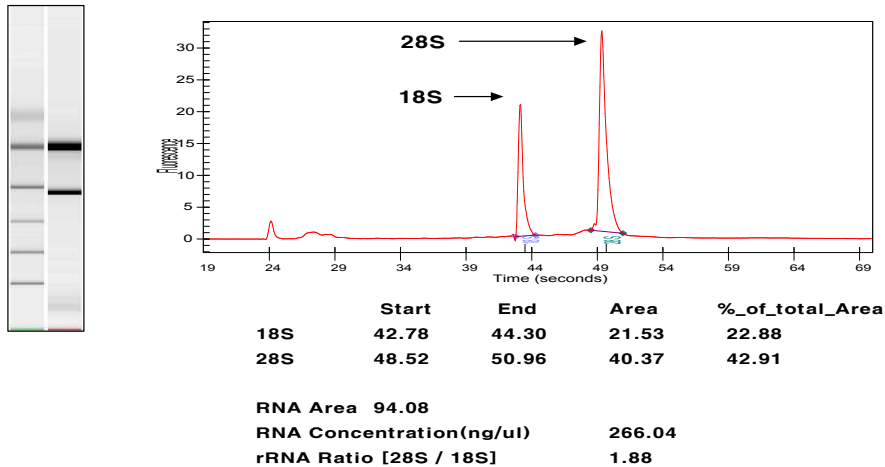


Fig. 3-2. Example of the RNA QC result through Bio Analyzer 2100.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 수면증진 소재의 작용기작 연구

가. 수면 조절과 관련된 뇌영역

Microarray 연구 수행 시 뇌의 기능에 따른 영역별 기작 연구가 효과적일 것으로 판단 하되어 기저전뇌(basal forebrain, BF) 및 시상하부(hypothalamus, Hy)로 구분하여 분석하였다. 시상하부는 자율 신경계의 고차 중추 및 체온, 수면, 생식, 물질 대사 등의 중추 역할을 하는데 sleep-wake switch가 존재하고 있는 곳으로 수면을 조절하는 핵심 영역이며, 기저전뇌는 시상하부의 전측, 배측에 있는 전뇌의 부위로서 깨어있음을 촉진하는 세포다발들과 수면을 촉진하는 다발들을 포함하며 이것이 손상될 경우 각성의 저하, 학습과 주의의 손상, NREM수면 시간이 증가하며 알츠하이머 질환 발병 시 가장 많이 손상되는 부위(주의 산만, 기억장애)로 알려져 있다. 따라서 두 종류의 한약재 감초(GCh)와 합환피(HHP)를 rat 에 각 3시간 경구투여한 후, 시상하부(hypothalamus, Hy) 및 기저전뇌(basal forebrain, BF)에서 수면 관련 효과를 분석하기 위하여 유전체 수준에서의 발현양상을 분석하였다.

4. Scan 및 Data 분석

Microarray는 GenePix 4000B Scanner(Axon Instruments, San Diego, CA, USA)를 이용하여 스캐닝을 하고, 스캐닝된 이미지는 GenePix v6.0 Software를 이용하여 분석된다. Raw data는 Weighted Scatter-plot Smoother(LOWESS) Normalization방법을 이용하여 Normalized 하였다.

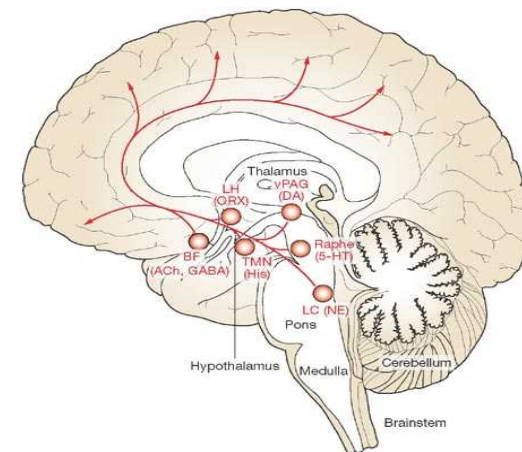


Fig. 3-3. Brain Regions related to Sleep Regulation.

나. RNA QC 결과

Rat 시상하부와 기저전뇌에서 추출한 RNA는 1.0 이상의 28S/18S 비율을 나타내어 실험을 진행하였다.

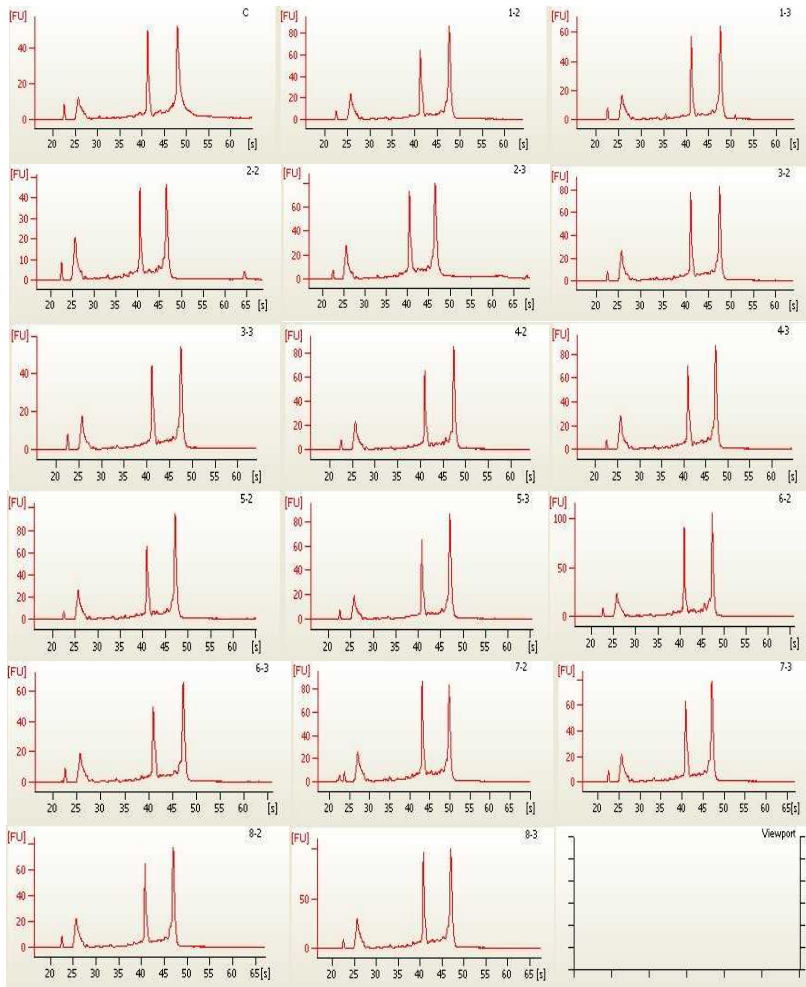


Fig. 3-4. RNA QC DATA.

다. 시상하부 및 기저전뇌의 발현 양상 변화

두 종류의 한약제를 비교한 결과, 약제의 작용보다는 조직 특이적인 발현 양상이 있는 것으로 나타났으며, 시상하부에서 감초에 의한 생물학적 이벤트가 더 있는 것으로 나타났다. 또한 합환피 보다 감초에서 더 유의한 효과가 있는 것으로 나타났다.

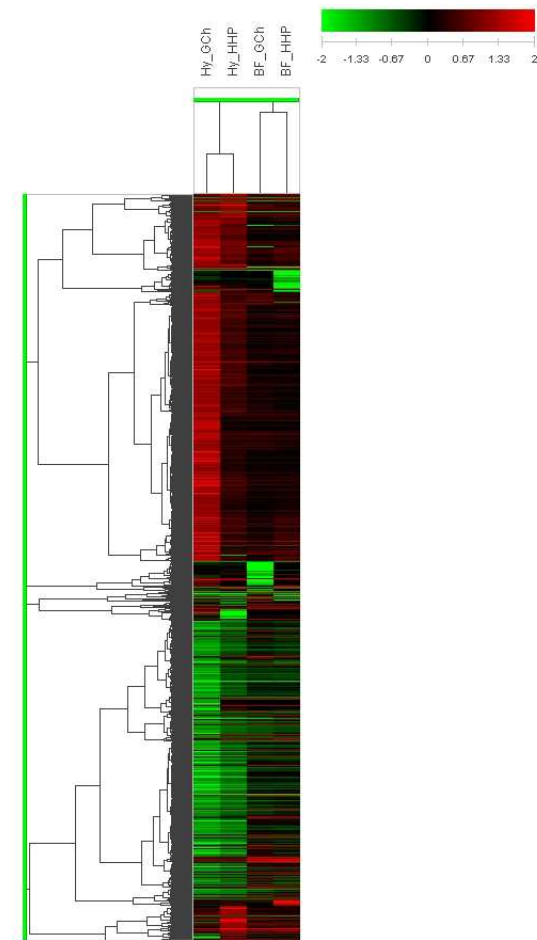


Fig. 3-5. Clustering Image.

2-fold regulated genes의 각 유전자 수를 정리하면 다음과 같다.

Table 3-1. 2-fold Increased, Decreased Gene Number

	시상하부/감초	시상하부/합환피	기저전뇌/감초	기저전뇌/합환피
>2-fold	1,318	291	189	191
<2-fold	1,116	347	180	166

시상하부에서 발현 양상은 감초의 경우 1,318개의 유전자가 2배 이상의 증가를 보였으며 1,116개 유전자가 2배 이상의 감소를 보였다. 또한 합환피의 경우 291개의 유전자가 2배 이상의 증가를 보였으며 347개 유전자가 2배 이상의 감소 결과를 나타내었다. 기저전뇌에서 감초 및 합환피에 대한 발현 양상은 감초의 경우 189개의 유전자가 2배 이상의 증가를 보였으며 180개 유전자가 2배 이상의 감소를 보였다. 또한 합환피의 경우 191개의 유전자가 2배 이상의 증가를 보였으며 166개 유전자가 2배 이상의 감소 결과를 나타내었다. 한편 4개 시료 모두에서 2배 이상 증가 혹은 감소한 유전자(2-fold up & down regulated genes)는 다음과 같다. 각 시료에서 각 한약재의 생리활성 효과를 다음의 유전자로부터 살펴볼 수 있을 것이며, 차후 개개의 유전자를 대상으로 문헌분석 및 기능연구를 수행할 필요가 있다고 사료된다.

Table 3-2. 2-fold Increased, Decreased Gene List

Abcc9	LOC315970	RGD1559623_predicted
Arf6	LOC691066	RGD1561261_predicted
Asb9_predicted	Nnat	RGD1562622_predicted
C12orf10	Nsfl1c	Samhd1_predicted
Cpn1	Olr176_predicted	Sim1_predicted
Cyb561_predicted	Pdxp	Slc8a1
Ece1	Pigk	Svp4
Fbxo46	Pstpip1_predicted	Tktl2_predicted
Gpx2	Ptprz1	Ube2n
Hoxc8_mapped	Rdh10	Zfp238
Hspb7	RGD1306477	Zw10
Kcmf1	RGD1307524_predicted	
Krthb3_predicted	RGD1307909_predicted	
LOC302548	RGD1308699	
LOC312299	RGD1309439_predicted	

라. 발현 변화 유전자들과 관련 Pathway 분석 변화

본 실험조건에서 가장 현저한 발현 양상을 보인 감초에 의한 시상하부에서의 결과로부터 (2배 이상 증가-**1,318 유전자** 및 2배 이상 감소-**1,116 유전자** 구분) gene ontology 및 pathway 분석을 수행하고 생물학적 의미를 고찰하였다.

Table. 3-3. 2-fold Increased GO Term

Term	Count
GO:0010556~regulation of macromolecule biosynthetic process	85
GO:0045725~positive regulation of glycogen biosynthetic process	3
GO:0015031~protein transport	35
GO:0051056~regulation of small GTPase mediated signal transduction	13
GO:0048193~Golgi vesicle transport	13
GO:0016197~endosome transport	8
GO:0010959~regulation of metal ion transport	8
GO:0010827~regulation of glucose transport	5
GO:0032891~negative regulation of organic acid transport	3
GO:0032411~positive regulation of transporter activity	3

감초에 의한 시상하부에서의 결과로부터 2배 이상 증가한 **1,318 유전자**에서 gene ontology 분석 결과 중, 수면 유도 및 관련 있는 카테고리를 엄선하면 위와 같다. 이는 Dr. Pack(2009년) 그룹에 의해 리뷰된 바 있는 수면 및 각성(sleep and wakefulness)에 따른 gene regulation 정보에 입각하여 설명할 수 있다[Mackiewicz et al., 2009]. 수면 및 각성 관련 유전자 발현양상의 변화는 아래 그림처럼 상당히 잘 밝혀진 바 있다[Mackiewicz et al., 2009]. 따라서 감초에 의한 수면 유도 관련 원인 유전자를 규명하는데 참고하고자 한다.

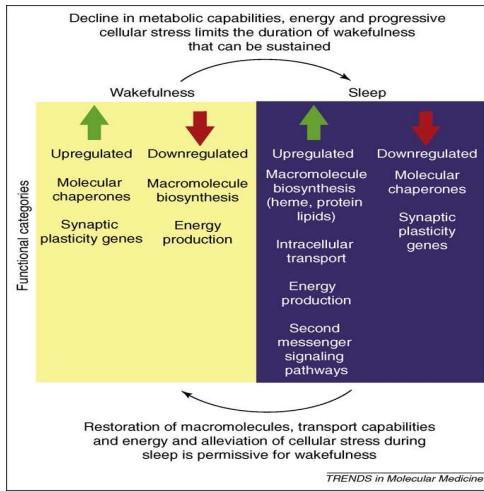


Fig. 3-6. Restoration of Macromolecules, Transport Capabilities and Energy and Alleviation of Cellular Stress during Sleep is permissive for Wakefulness.

한편 시상하부에서 감소에 의해 induction 된 유전자 중, 신경영양물질인 neurotrophin 시그널링 관련 기전에 주목할 필요가 있다.

Neurotrophin Signaling pathway(mo04722)						
Probe ID	Name	Bf CT값초 Normalized	Bf CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Gene ID
A_42_P631184	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	1.773	1.54	1.62	1.77	26054
A_42_P794901	Tyrosine 3-monooxygenase/tyrosine 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	1.885	2.141	1.314	1.196	25576
A_43_P13040	Ras homolog gene family, member A	1.089	0.997	0.968	1.006	117273
A_44_P145671	c-src tyrosine kinase	1.028	1.123	0.911	1.102	315707
A_44_P158216	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2	0.925	0.879	1.352	0.714	29741
A_44_P162583	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	1.786	1.905	0.971	0.96	363875
A_44_P187874	Thymoma viral oncogene 2	1.14	1.266	2.123	1.233	25233
A_44_P189660	Zinc finger protein 110	1.17	0.92	0.95	1.536	308362
A_44_P219585	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	1.457	1.279	0.97	1.55	24525
A_44_P242499	Insulin receptor substrate 2	1.242	1.325	0.96	1.435	29376
A_44_P322093	Ribosomal protein S6 kinase polypeptide 6 (predicted)	NODATA	0.422	0.56	0.7	317203
A_44_P479930	Kinase D-interacting substance 220	0.962	1.029	0.963	1.124	116478
A_44_P567217	Mitogen activated protein kinase kinase 5	1.955	1.904	0.96	1.364	29568
A_42_P729496	Similar to apoptosis signal-regulating kinase 1 (predicted)	1.142	0.914	0.344	0.473	114203
A_44_P150594	Tumor protein p53	0.806	0.889	0.375	0.565	24842
A_44_P164804	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	NODATA	NODATA	0.223	NODATA	363875
A_44_P315437	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	1.028	0.972	0.467	0.736	26054
A_44_P322362	Mitogen activated protein kinase kinase 1	0.726	0.704	0.489	0.689	116667
A_44_P416968	Brain derived neurotrophic factor	NODATA	NODATA	0.235	NODATA	360557
A_44_P437896	Ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1	0.117	NODATA	0.851	0.107	24225
A_44_P483728	Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	0.597	0.592	0.478	0.582	81771
A_44_P587335	Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	1.174	1.074	0.465	0.56	64465

Fig. 3-8. Neurotrophin Signaling Pathway Based Data.

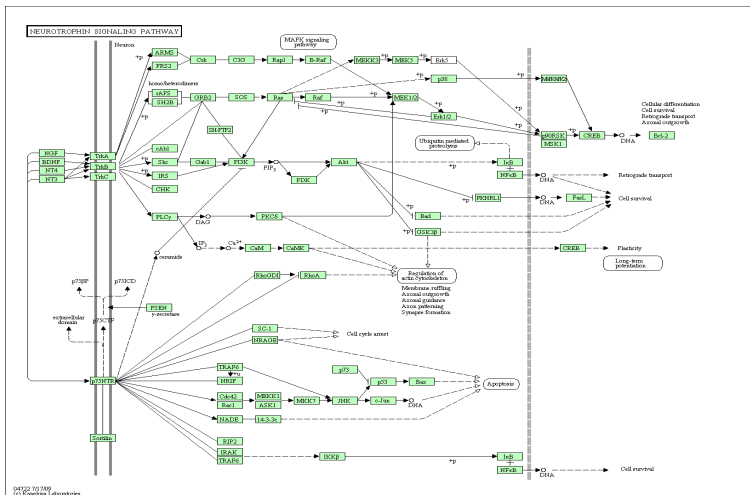


Fig. 3-7. Neurotrophin Signaling Pathway.

Table 3-4. Neurotrophin Signaling Pathway

Gene_ID	Description
315707	c-src tyrosine kinase
29376	insulin receptor substrate 2
116478	kinase D-interacting substrate 220
29568	mitogen activated protein kinase kinase 5
117273	ras homolog gene family, member A; ras homolog gene family, member C
363875	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
317203	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 6
24525	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
25233	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
308362	zinc finger protein 110

2배 이상 감소하는 발현 양상을 보이는 1,116 유전자에 대한 gene ontology 분석 결과 중, 신경관련 작용점에 있는 유전자의 그룹은 아래와 같다. 이중 neurogenesis(신경세포 생성)에 관여하는 48개의 유전자는 다음의 표와 같다. 일반적으로 수면장애(sleep deprivation) 혹은 스트레스는 neurogenesis를 억제하는 것으로 알려져 있다[Mirescu et al., 2006]. 수면 유도 관점에서는 감소에 의해 neurogenesis 관련 유전자가 up-regulation 되어야 하나, 본 연구에서는 반대의 결과로 나타났다. 다른 수면 유도 관련 주요 경로가 세포 내에서 작동하여, 항상성의 관점에서 오히려 neurogenesis를 억제하는 현상이 일시적으로 표현된 것인지 등의 원인은 향후 분석할 필요가 있다.

Table 3-5. 2-fold decreased GO Term

Term	Count
GO:0022008~neurogenesis	48
GO:0048667~cell morphogenesis involved in neuron differentiation	17
GO:0050767~regulation of neurogenesis	16
GO:0045664~regulation of neuron differentiation	11
GO:0048663~neuron fate commitment	9
GO:0014033~neural crest cell differentiation	5
GO:0021889~olfactory bulb interneuron differentiation	3
GO:0021527~spinal cord association neuron differentiation	3
GO:0021892~cerebral cortex GABAergic interneuron differentiation	3
GO:0051580~regulation of neurotransmitter uptake	2
GO:0060163~subpallium neuron fate commitment	2

Table 3-6. 2-fold decreased Gene List

GeneID	Description
64186	achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila)
25081	apolipoprotein A-I
362572	artemin
64465	cell division cycle 42 (GTP binding protein)
296500	distal-less homeobox 1
296499	distal-less homeobox 2
24318	dopamine receptor D2
171287	Eph receptor A7
313633	Eph receptor B2
499335	frataxin
364676	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1
114500	gastrulation brain homeobox 2
84422	GDNF family receptor alpha 3
296654	gelsolin
25453	glial cell derived neurotrophic factor
24408	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
252833	growth differentiation factor 7
364140	GS homeobox 2
79225	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)
25585	inhibitor of DNA binding 3
307721	iroquois homeobox 3
25473	laminin, beta 2
294303	lipoma HMGIC fusion partner-like 5
81686	matrix metalloproteinase 2
114524	netrin 2-like (chicken)
60329	neurogenin 3
25054	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
56761	Notch homolog 3 (Drosophila)
245980	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6
114502	paired box 3
364152	paired-like homeobox 2b
29609	paired-like homeodomain 3
192183	poliovirus receptor-related 1
171355	POU domain, class 4, transcription factor 2
305198	PR domain containing 8
363875	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
364910	sal-like 3 (Drosophila)
116639	similar to CCAAT displacement protein isoform b; cut-like homeobox 1
65047	slit homolog 1 (Drosophila)
50554	SMAD family member 4
29361	SRY (sex determining region Y)-box 10
84046	SRY (sex determining region Y)-box 11
302965	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a
24842	tumor protein p53
85489	twist homolog 1 (Drosophila)
29151	urocortin
64572	ventral anterior homeobox 2
363247	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5

한편 시상하부에서 감소에 의해 reduction 된 유전자 중, 관찰된 pathway는 MAP kinase 시그널링 경로 등이 있다(관여 유전자 수, 17 genes).

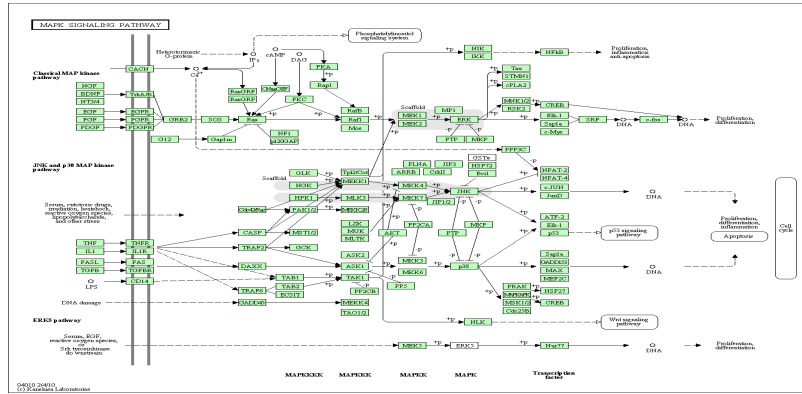


Fig. 3-9. MAPK Signaling Pathway.

Probe ID	Name	BF CT감소 Normalized	BF CT증가 Normalized	Hy CT감소 Normalized	Hy CT증가 Normalized	Gene ID
A_42_P631184	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	1.773	1.135	1.32	1.72	25054
A_43_P14911	Interleukin 1 beta	0.977	1.135	1.466	2.424	24424
A_44_P1011780	Phospholipase A2, group XIA (predicted)	1.38	1.508	1.724	1.823	352039
A_44_P1042876	Heat shock 70kD protein	0.987	0.984	1.325	1.472	24472
A_44_P108175	Gap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2 (predicted)	1.059	1.274	1.33	1.944	310533
A_44_P162583	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	1.760	1.905	2.072	2.36	353875
A_44_P187874	Thymoma viral proto-oncogene 2	1.14	1.266	1.233	1.233	25233
A_44_P219585	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	1.457	1.276	1.23	1.16	24526
A_44_P251959	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	1.134	1.104	2.171	1.421	24574
A_44_P322093	Ribosomal protein S6 kinase subfamily 9 (predicted)	NODATA	0.422		0.7	317203
A_44_P409270	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 12	1.910	1.35		1.75	25579
A_44_P414615	Fas death domain-associated protein	0.351	0.339	1.404	1.725	140920
A_44_P458237	Muscle and microspikes RAS	1.38	1.435	1.57	1.353	25482
A_44_P567217	Mitogen activated protein kinase kinase 5	1.502	1.404	1.57	1.384	29558
A_44_P640828	Transforming growth factor, beta, receptor 1	NODATA	NODATA	1.25	1.262	29591
A_43_P13080	Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 7	0.905	0.876	0.416	0.562	140728
A_43_P13147	Fibroblast growth factor 6	0.752	0.885	0.431	0.544	170700
A_43_P15319	Phospholipase A2, group 2	1.182	0.896	0.413	0.547	29526
A_43_P15978	Fibroblast growth factor 4	0.859	0.702	0.433	0.506	115490
A_44_P150594	Tumor protein p53	0.808	0.885	0.376	0.568	24842
A_44_P151189	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase (predicted)	0.0682	NODATA	1.064	1.018	309361
A_44_P164804	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	NODATA	NODATA	0.223	NODATA	353875
A_44_P1315437	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	1.926	0.972	0.467	0.738	25054
A_44_P322362	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1	0.728	0.791	0.489	0.549	115567
A_44_P437896	Brain derived neurotrophic factor	0.117	NODATA	0.823	0.797	24226
A_44_P458332	Jun D proto-oncogene	0.876	0.827	0.128	0.176	24510
A_44_P483728	Ribosomal protein S6 kinase subfamily 1	0.597	0.592	0.478	0.562	81771
A_44_P517880	Fibroblast growth factor 1	0.843	0.828	0.274	0.395	25317
A_44_P540963	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5	0.832	0.876	0.429	0.475	29544
A_44_P545717	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1E subunit	0.752	0.825	0.378	0.704	54234
A_44_P558547	Transforming growth factor, beta 2	NODATA	0.424	NODATA	NODATA	81809
A_44_P587335	Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	1.174	1.107	0.466	0.53	64465
A_44_P992908	Heat shock 27kDa protein 1	0.978	0.977	0.389	0.778	24471

Fig. 3-10. MAPK Signaling Pathway Based Data.

그 외 다른 Pathway에 대한 결과는 다음과 같다.

Probe ID	Name	BF CT감소 Normalized	BF CT증가 Normalized	Hy CT감소 Normalized	Hy CT증가 Normalized	Gene ID
A_42_P258206	Cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae) (predicted)	1.556	1.426	1.708	1.952	380821
A_42_P794901	Tyrosine 3-monooxygenase activation protein, sigma polypeptide	1.895	2.441	1.314	1.198	25576
A_44_P411505	Cyclin D1	1.015	1.137	1.452	1.984	58919
A_44_P503490	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)	NODATA	NODATA	2.37	1.303	171576
A_44_P1057211	Physical division cycle 20 related 1 (Drosophila) (predicted)	0.887	0.755	0.482	0.757	314542
A_44_P150594	Tumor protein p53	0.806	0.889	0.376	0.565	24842
A_44_P169937	MAD homolog 4 (Drosophila)	NODATA	NODATA	0.108	NODATA	59554
A_44_P349002	E2F transcription factor 1	0.589	0.621	0.425	0.535	399489
A_44_P505039	Cyclin dependent kinase 2	0.906	0.932	0.473	0.85	352817
A_44_P558547	Transforming growth factor, beta 2	NODATA	0.424	NODATA	NODATA	81809
A_44_P702192	Retinoblastoma 1	0.743	0.856	0.368	0.497	24708

Fig. 3-11. Cell Cycle Based Data

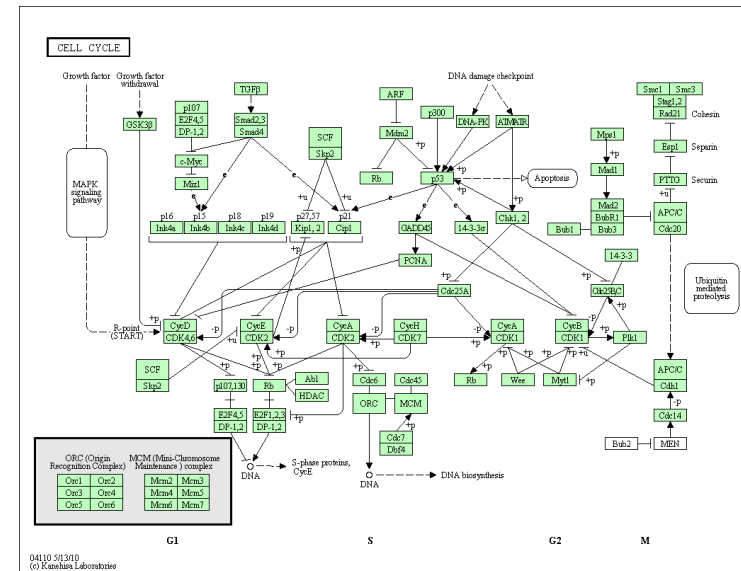


Fig. 3-12. Cell Cycle.

Neuroactive ligand-receptor interaction(rno04080)						
Probe ID	Name	Bf CT값초 Normalized	Bf CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Gene ID
A_42_P527961	Pro-melanin-concentrating hormone	0.843	0.655	0.831	0.655	24659
A_42_P543670	"Glutamate receptor, ionotropic, kainate 4"	0.99	1.09	0.935	1.148	24408
A_42_P664121	Adenosine A2a receptor	1.00	0.937	1.44	1.397	25369
A_43_P11937	"Cholinergic receptor, muscarinic 5"	1.102	1.188	2.893	1.437	53949
A_43_P15862	"Gamma-aminobutyric acid A receptor, delta"	1.413	1.523	2.78	2.66	65197
A_44_P1051501	Prolactin receptor	NODATA	NODATA	1.922	1.922	24684
A_44_P146851	"Glycine receptor, alpha 1 subunit"	1.311	1.45	1.484	1.484	25674
A_44_P285681	Plasminogen	1.325	1.355	1.76	1.76	85253
A_44_P294825	"Glycine receptor, alpha 3 subunit"	1.164	1.406	1.92	1.92	114516
A_44_P343615	"Angiotensin II receptor, type 2"	1.023	1.02	2.387	1.824	24182
A_44_P365057	"Gamma-aminobutyric acid A receptor, epsilon"	1.165	1.218	2.784	1.543	29707
A_44_P371317	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	NODATA	NODATA	2.182	1.028	60332
A_44_P437749	Putative G protein-coupled receptor and PCP32	1.334	1.27	1.371	2.398	69025
A_44_P442889	Neuropeptide Y receptor Y1	1.178	1.127	2.26	1.402	29358
A_44_P471577	"Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1"	1.143	1.159	1.371	2.331	29559
A_44_P488003	"Glutamate receptor, ionotropic, 4"	NODATA	NODATA	2.164	1.037	29829
A_44_P529226	"Gamma-aminobutyric acid A receptor, epsilon"	1.325	1.439	2.68	1.738	65191
A_44_P545705	"Cholinergic receptor, muscarinic 1"	1.01	1.478	1.182	1.748	25229
A_42_P514501	"Glutamate receptor, metabotropic 5"	1.17	1.101	0.423	0.825	24416
A_42_P576525	Somatostatin receptor 2	1.488	1.218	0.487	0.878	54305
A_42_P761436	Prepro-Neuropeptide W polypeptide	0.793	0.796	0.499	0.853	269224
A_42_P794812	Thyroid stimulating hormone receptor	NODATA	NODATA	NODATA	0.01	25380
A_43_P11540	"Adrenergic receptor, alpha 2a"	0.871	0.826	0.246	0.381	25083
A_43_P11603	Somatostatin receptor 5	0.754	0.684	0.365	0.43	25354
A_43_P11897	"Gamma-aminobutyric acid A receptor, delta"	0.708	0.764	0.493	0.822	29669
A_43_P11944	Arginine vasopressin receptor 2	0.83	0.839	0.482	1.072	25108
A_43_P13083	Tachykinin receptor 2	1.122	1.123	0.441	0.479	25007
A_44_P1020655	Oxytocin	1.083	0.816	1.622	0.483	25504
A_44_P121351	Dopamine receptor 2	0.886	0.884	0.473	0.698	24318
A_44_P257254	Prolactin releasing hormone receptor	0.608	0.632	0.436	0.554	248075
A_44_P328205	Bradykinin receptor B1	0.865	0.822	0.397	0.815	81509
A_44_P424405	Neuropeptides BW receptor 1	1.221	0.934	0.418	0.578	297795
A_44_P425143	"Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2D"	0.819	0.787	0.216	0.321	24412
A_44_P435767	"Glutamate receptor, metabotropic 1"	0.897	0.912	0.454	0.521	24414
A_44_P452171	Arginine vasopressin	0.896	1.172	1.268	0.496	24221
A_44_P498620	"Glycoprotein hormones, alpha subunit"	0.827	1.043	0.451	0.651	116700
A_44_P513101	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	NODATA	0.173	1.205	1.133	29595
A_44_P522701	Adenylate cyclase activating polypeptide 1	0.531	0.57	0.319	0.493	24188
A_44_P536333	"Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate, 1"	1.093	1.021	0.393	0.559	24408

Fig. 3-17. Neuroactive ligand-receptor interaction Based Data.

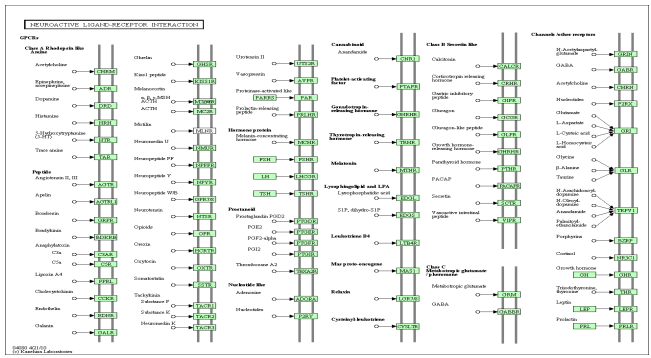


Fig. 3-18. Neuroactive ligand-receptor interaction.

Focal adhesion(rno4510)						
Probe ID	Name	Bf CT값초 Normalized	Bf CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Gene ID
A_42_P811423	Vinculin (predicted)	1.147	1.521	2.04	1.504	305679
A_43_P13040	"Ras homolog gene family, member A"	1.069	0.987	0.78	1.408	112723
A_44_P101644	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	0.95	1.103	0.846	1.141	25537
A_44_P118540	V-erbB2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived onco protein, human (avian)"	1.686	1.694	2.554	2.075	24337
A_44_P158216	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2"	2.325	2.477	1.352	2.114	29741
A_44_P162583	Ras-related G3 botulinum toxin substrate 1	1.788	1.905	2.879	3.288	363875
A_44_P163519	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	1.444	1.741	0.74	1.608	25537
A_44_P187874	Thymoma viral proto-oncogene 2	1.14	1.286	0.523	1.233	25233
A_44_P197290	Procollagen, type V, alpha 3"	1.746	2.008	1.299	1.557	60379
A_44_P208304	P21 (CDKN1A)-activated kinase 3	1.212	1.25	0.65	1.355	29433
A_44_P330542	Baculoviral IAP repeat-containing 2	1.264	1.28	2.713	1.803	60371
A_44_P335806	Laminin, alpha 5"	NODATA	NODATA	0.971	NODATA	140433
A_44_P411505	Cyclin D1	1.918	1.167	0.67	0.681	58919
A_43_P12864	Placental growth factor	0.99	0.924	0.433	0.532	94203
A_43_P21423	P21 (CDKN1A)-activated kinase 4 (predicted)	0.741	0.649	0.394	0.695	292756
A_44_P1070510	Procollagen, type IV, alpha 1"	0.868	0.81	0.366	0.58	290905
A_44_P132081	Integrin binding signal protein	NODATA	NODATA	0.42	NODATA	24477
A_44_P164804	Ras-related G3 botulinum toxin substrate 1	NODATA	NODATA	0.223	NODATA	353875
A_44_P258751	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	0.837	0.829	0.443	0.578	81745
A_44_P332618	Actinin alpha 4	1.021	0.845	0.346	0.387	63839
A_44_P435375	Laminin, beta 2"	0.854	0.829	0.319	0.56	25473
A_44_P554675	Insulin-like growth factor 1	0.097	NODATA	0.74	NODATA	24482
A_44_P587335	Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	1.174	1.107	0.466	0.58	64465
A_44_P827955	P21 (CDKN1A)-activated kinase 6 (predicted)	0.712	0.81	0.383	0.455	296078
A_44_P973249	Integrin alpha V (predicted)	NODATA	NODATA	0.966	0.0587	299456

Fig. 3-19. Focal Adhesion Based Data.

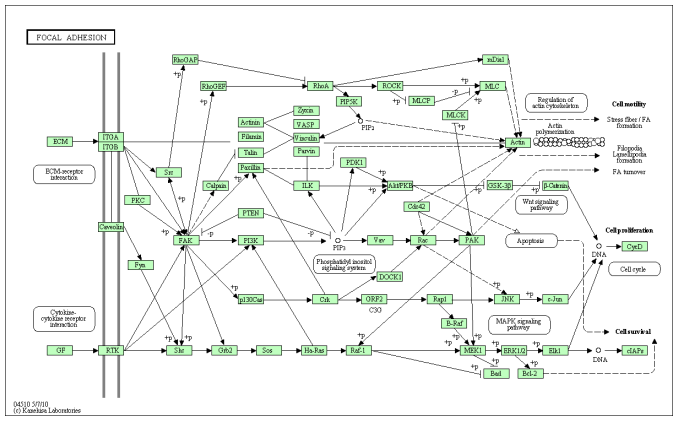


Fig. 3-20. Focal Adhesion.

Calcium signaling pathway(rno04020)						
Probe ID	Name	Bf CT감초 Normalized	Bf CT함정미 Normalized	Hy CT감초 Normalized	Hy CT함정미 Normalized	Gene ID
A_42_P664121	Adenosine A2a receptor	0.908	0.917	1.44	1.361	25369
A_43_P11937	Cholinergic receptor, muscarinic 5*	1.102	1.188	0.96	1.411	53849
A_44_P1027101	GNAS complex locus	0.918	0.981	1.088	1.033	24896
A_44_P118540	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neurofiblioblastoma derived oncogene homolog (avian)	1.888	1.894	2.154	2.019	24337
A_44_P251959	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	1.114	1.104	2.111	1.421	24674
A_44_P276034	Adenylate cyclase 2	1.153	1.377	0.95	1.253	81636
A_44_P282482	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2*	1.251	1.372	0.353	1.491	29993
A_44_P371317	5-Hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	NODATA	NODATA	0.155	1.028	65032
A_44_P545705	Cholinergic receptor, muscarinic 1*	0.911	1.479	1.192	1.746	25229
A_43_P13083	Tachykinin receptor 2	1.332	1.123	0.441	0.479	25007
A_43_P21626	Phospholipase C, delta 3 (predicted)	0.792	0.911	0.403	0.599	287745
A_44_P280599	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 5*	0.54	0.571	0.396	0.594	25176
A_44_P290391	Solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1*	0.182	0.198	0.184	0.238	29715
A_44_P328205	Bradykinin receptor B1	0.885	0.822	0.397	0.615	81509
A_44_P351412	Adenylate cyclase 7	0.874	0.705	0.377	0.82	84420
A_44_P425143	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2D*	0.819	0.787	0.215	0.321	24412
A_44_P435767	Glutamate receptor, metabotropic 1*	0.897	0.912	0.454	0.521	24414
A_44_P498516	Troponin C type 1 (slow)	0.588	0.879	0.322	0.843	290561
A_44_P513101	5-Hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	NODATA	0.173	1.205	1.133	29595
A_44_P527325	Ryanodine receptor 1, skeletal muscle*	NODATA	NODATA	0.305	NODATA	114207
A_44_P536333	Glutamate receptor, ionotropic, L-methyl D-aspartate 1*	1.093	1.021	0.393	0.559	24408
A_44_P545717	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1E subunit	0.792	0.825	0.378	0.704	54234

Fig. 3-21. Calcium Signaling Pathway Based Data.

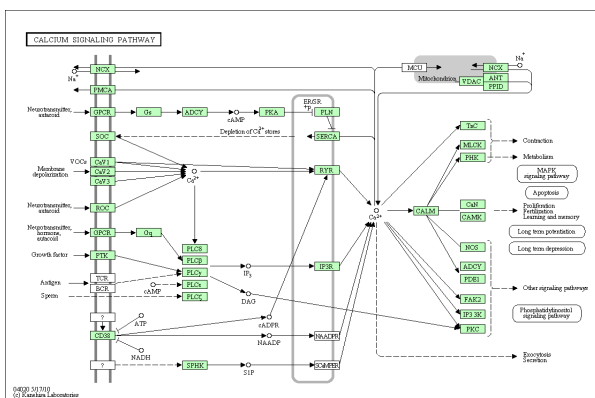


Fig. 3-21. Calcium Signaling Pathway.

Wnt signaling pathway(rno04310)						
Probe ID	Name	Bf CT감초 Normalized	Bf CT함정미 Normalized	Hy CT감초 Normalized	Hy CT함정미 Normalized	Gene ID
A_43_P13040	Ras homolog gene family, member A*	0.969	0.997	0.96	1.406	112723
A_44_P101644	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	0.95	1.103	2.348	1.141	26537
A_44_P162583	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	0.998	0.992	0.91	0.988	363875
A_44_P163519	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	1.444	1.741	0.31	1.805	25537
A_44_P206973	F-box and WD-40 domain protein 11 (predicted)	1.146	1.167	1.888	1.301	303024
A_44_P251959	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	1.114	1.104	2.111	1.421	24674
A_44_P276106	Adenomatous polyposis coli	1.418	1.543	2.311	1.961	24205
A_44_P358444	Wingless-related MMTV integration site 2	1.092	0.876	0.734	0.994	114487
A_44_P411505	Cyclin D1	0.918	1.187	0.98	0.98	58919
A_44_P422420	Secreted frizzled-related protein 4	NODATA	NODATA	2.044	NODATA	89803
A_44_P729572	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3 (predicted)	1.028	0.996	0.328	1.155	361400
A_43_P11733	Parasitome proliferator activated receptor delta	0.753	0.841	0.493	0.59	25682
A_44_P150594	Tumor protein p53	0.806	0.889	0.375	0.565	24842
A_44_P164804	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	NODATA	NODATA	0.223	NODATA	363875
A_44_P169937	MAPK homolog 4 (Drosophila)	NODATA	NODATA	0.108	NODATA	50554
A_44_P192275	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3 (predicted)	NODATA	NODATA	NODATA	0.32	361400
A_44_P234675	Frizzled homolog 6 (Drosophila)	NODATA	NODATA	0.319	NODATA	282581
A_44_P239368	Lymphoid enhancer binding factor 1	NODATA	0.252	NODATA	NODATA	161452
A_44_P336626	Beta-transducin repeat containing	0.0464	NODATA	0.984	1.035	361765
A_44_P513059	Secreted frizzled-related protein 1	0.858	0.793	0.457	0.978	84402
A_44_P538808	Wingless-type MMTV integration site family, member 11*	0.679	0.671	0.389	0.554	140584

Fig. 3-22. Wnt Signaling Pathway Based Data.

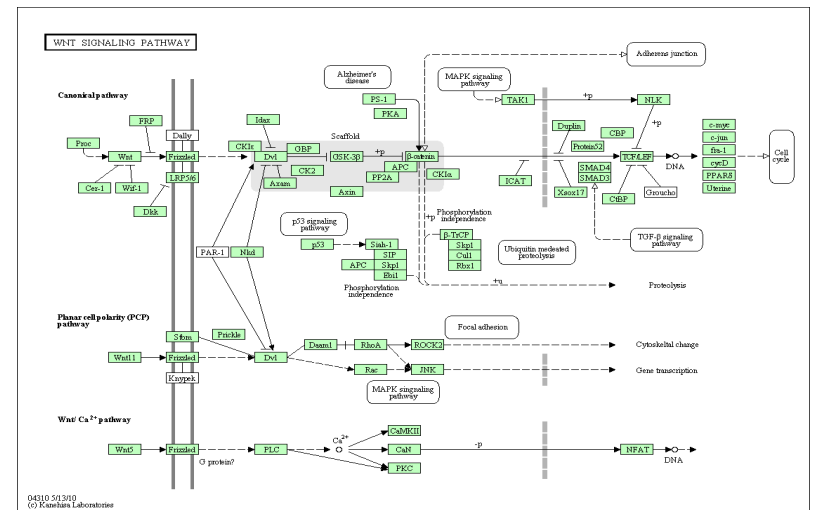


Fig. 3-23. Wnt Signaling Pathway.

Spliceosome(rn003040)						
Probe ID	Name	BF CT/감초 Normalized	BF CT/감초 Normalized	Hy CT/감초 Normalized	Hy CT/감초 Normalized	Gene ID
A_43_P10813	Similar to putative nucleic acid binding protein RY-1, EST 1449093 (predicted)	1.201	1.164	0.958	1.218	362392
A_43_P16884	Apoptotic chromatin condensation inducer 1	1.476	1.476	0.943	1.542	305884
A_44_P1037217	Similar to RNA binding motif protein 25 (predicted)	1.11	1.031	0.962	1.399	497885
A_44_P1042876	Heat shock 70kD protein 1A	0.987	0.984	0.934	1.323	24472
A_44_P171902	Mago-nashi homolog, proliferation-associated (Drosophila) (predicted)	1.225	1.237	0.917	1.173	298385
A_44_P240074	Similar to RNA binding motif protein 25 (predicted)	1.071	1.295	1.48	0.959	497885
A_44_P257011	FUS interacting protein (serine-arginine rich) 1	1.104	1.563	0.912	1.936	362630
A_44_P285444	Similar to U5 snRNP-specific protein (Pnp6-binding) (predicted)	1.45	1.335	0.91	1.617	313056
A_44_P368101	RNA binding motif protein 17	0.977	1.107	0.964	1.277	291295
A_44_P379461	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	1.636	1.532	1.725	0.31	294232
A_44_P399966	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	0.956	1.062	0.91	1.584	362152
A_44_P526060	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0.928	0.843	1.227	1.064	117282
A_44_P532459	Similar to CG9346-PA (predicted)	0.958	0.89	0.916	1.993	315903
A_44_P533347	RNA binding motif protein 25 (predicted)	1.519	1.52	0.213	1.698	366693
A_42_P565437	Splicing factor 3a, subunit 2, 66kDa	0.97	0.999	0.417	0.054	299620
A_43_P18203	Splicing factor 3a, subunit 2	NODATA	0.129	1.644	1.653	313583
A_44_P1024529	Similar to splicing factor, arginine/serine-rich 2	NODATA	NODATA	0.499	NODATA	494445
A_44_P122661	Splicing factor 3b, subunit 1	NODATA	NODATA	0.275	NODATA	84486
A_44_P183252	Beta catenin-like 1	NODATA	NODATA	0.0878	296320	
A_44_P925824	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	0.674	0.691	0.246	0.397	362687

Fig. 3-24. Spliceosome Based Data.

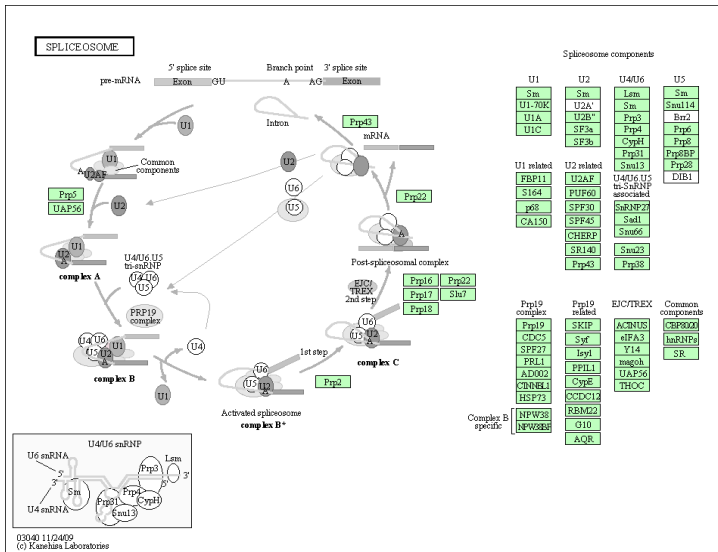


Fig. 3-25. Spliceosome.

Chemokine signaling pathway(rn06062)						
Probe ID	Name	BF CT/감초 Normalized	BF CT/감초 Normalized	Hy CT/감초 Normalized	Hy CT/감초 Normalized	Gene ID
A_43_P13040	Ras homolog gene family, member A	1.069	0.997	0.999	1.406	112723
A_44_P101644	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	0.95	1.103	0.948	1.141	25537
A_44_P1034439	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	NODATA	1.255	0.959	1.269	24772
A_44_P1039128	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1.385	1.252	0.906	1.294	245920
A_44_P113974	Chemokine (C-C motif) receptor 5	0.999	1.036	0.935	1.262	117029
A_44_P145671	C-src tyrosine kinase	1.055	1.123	0.91	1.102	315707
A_44_P158216	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2"	0.205	0.477	1.352	0.114	29741
A_44_P162583	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	1.786	1.905	0.978	0.266	363875
A_44_P163519	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	1.444	1.741	0.61	1.906	25537
A_44_P187874	Thymoma viral proto-oncogene 2	1.14	1.266	0.923	1.233	25233
A_44_P214512	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	NODATA	NODATA	0.968	0.986	304109
A_44_P219585	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	1.457	1.279	0.97	1.55	24525
A_44_P270366	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	1.033	0.894	0.927	1.196	60665
A_44_P276034	Adenylyl cyclase 2	1.453	0.977	0.916	1.253	81636
A_44_P481825	Signal transducer and activator of transcription 1	NODATA	NODATA	0.985	1.088	25124
A_44_P497033	Wiskott-Aldrich syndrome homolog (human) (predicted)	1.095	1.19	0.481	1.604	317371
A_44_P1032538	Guanine nucleotide binding protein (G protein), β 3 subunit 3	0.942	1.052	0.436	0.55	114117
A_44_P151189	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase (predicted)	0.0582	NODATA	1.064	1.018	309361
A_44_P164804	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	NODATA	NODATA	0.223	NODATA	363875
A_44_P351412	Adenylyl cyclase 7	0.675	0.705	0.377	0.52	84420
A_44_P587335	Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	1.174	1.107	0.466	0.56	64485

Fig. 3-26. Chemokine Signaling Pathway Based Data.

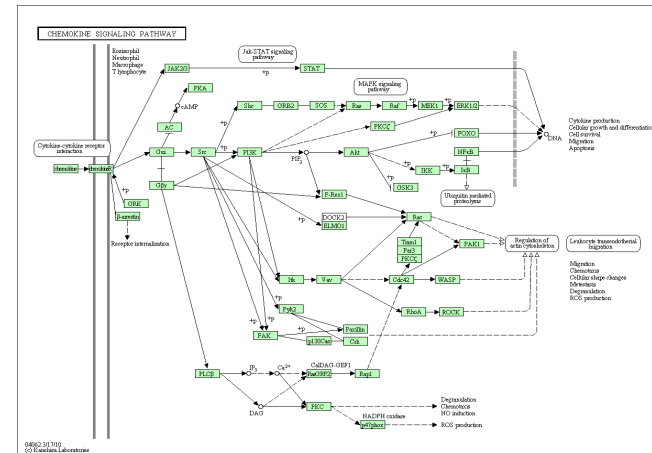


Fig. 3-27. Chemokine Signaling Pathway.

Alzheimer's disease(rno05010)						
Probe ID	Name	BF CT감초 Normalized	BF CT합환피 Normalized	Hy CT감초 Normalized	Hy CT합환피 Normalized	Gene ID
A_44_P417682	Presenilin 2	NODATA	NODATA	0.837	0.838	81751
A_43_P19892	Anterior pharynx defective 1a homolog (C. elegans)	0.898	0.837	0.487	0.707	365872

Fig. 3-28. Alzheimer's Disease Based Data.

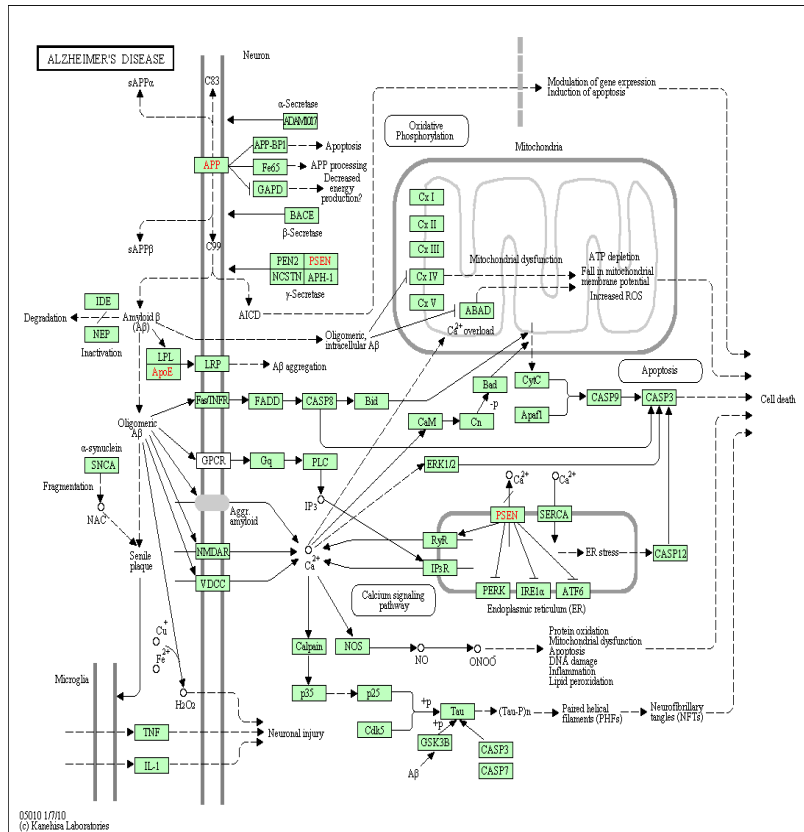


Fig. 3-29. Alzheimer's Disease.

Ubiquitin mediated proteolysis(rno04120)						
Probe ID	Name	BF CT감초 Normalized	BF CT합환피 Normalized	Hy CT감초 Normalized	Hy CT합환피 Normalized	Gene ID
A_43_P10034	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	0.884	0.810	0.988	1.207	116725
A_44_P1007008	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	0.888	1.079	1.389	0.814	295704
A_44_P134761	Hect domain and RLD 4	1.476	1.243	0.907	0.964	309758
A_44_P206973	F-box and WD-40 domain protein 11 (predicted)	1.146	1.167	0.908	1.301	303024
A_44_P330542	Baculoviral IAP repeat-containing 2	1.264	1.28	2.713	1.603	60371
A_44_P389735	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	1.337	1.422	0.905	1.583	297930
A_44_P455985	Ring finger protein 7 (predicted)	1.371	1.424	0.911	1.465	300948
A_44_P480623	Similar to Rnf37-pending protein	0.945	0.810	1.34	0.971	296161
A_44_P484969	F-box only protein 2	0.888	0.888	1.852	0.888	85273
A_43_P16107	"Ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC45 homolog, yeast)"	0.621	0.593	0.455	0.626	361013
A_44_P1051607	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C (putative) (predicted)	0.907	0.754	0.189	0.263	292522
A_44_P1057211	Fizzy/cell division cycle 20 related 1 (Drosophila) (predicted)	0.887	0.755	0.482	0.757	314642
A_44_P108772	"Ubiquitin factor E4B (UFD2 homolog (S. cerevisiae) (predicted))"	NODATA	0.385	0.954	0.402	298952
A_44_P160401	"Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC45 homolog, yeast)"	NODATA	NODATA	0.499	NODATA	81920
A_44_P322362	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1	0.728	0.791	0.488	0.689	116667
A_44_P420614	"Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC45 homolog, yeast)"	0.442	0.415	0.495	0.575	81920
A_44_P540205	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (predicted)	0.722	0.704	0.499	0.688	294331

Fig. 3-30. Ubiquitin Mediated Proteolysis Based Data.

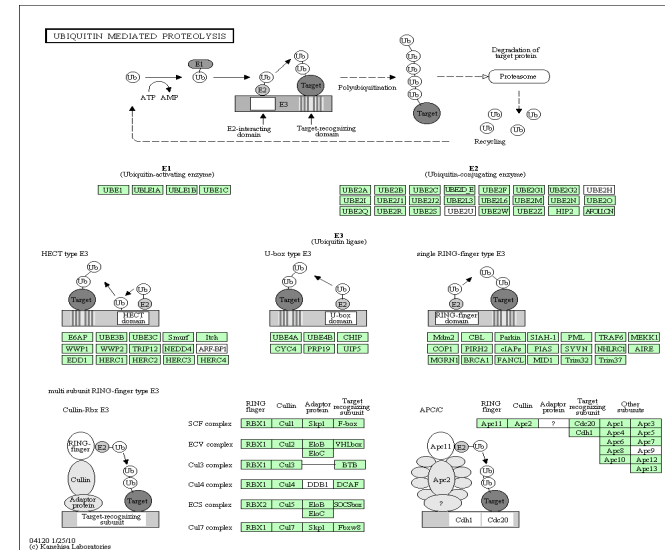


Fig. 3-31. Ubiquitin Mediated Proteolysis.

Huntington's disease(rno05016)						
Probe ID	Name	BF CT값초 Normalized	BF CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Gene ID
A_44_P540910	Caspase 6	1.493	1.447	1.472	1.472	83584
A_44_P150594	Tumor protein p53	0.806	0.889	0.376	0.565	24842
A_44_P437896	Brain derived neurotrophic factor	0.117	NODATA	0.851	1.017	24225

Fig. 3-32. Huntington's Disease Based Data.

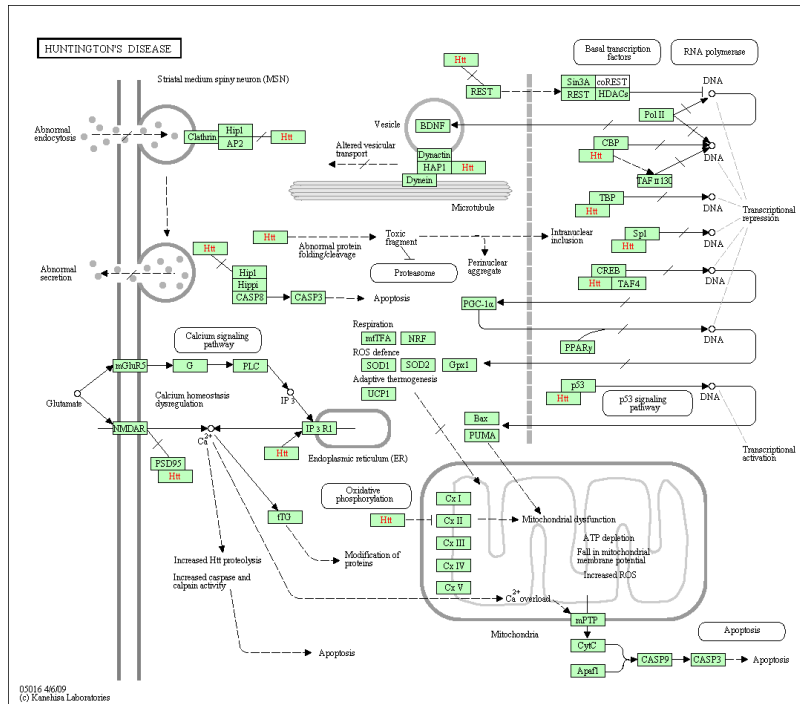


Fig. 3-33. Huntington's Disease.

PPAR signaling pathway(rno03320)						
Probe ID	Name	BF CT값초 Normalized	BF CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Hy CT값초 Normalized	Gene ID
A_44_P172489	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	1.084	1.008	0.904	1.100	25288
A_44_P235462	Malic enzyme 1	1.03	1.277	0.906	1.914	24552
A_44_P262091	Fatty acid binding protein 3	1.272	1.332	0.920	1.499	79131
A_44_P761708	*Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4"	1.195	1.234	0.907	1.468	311839
A_42_P700817	Apolipoprotein A-V	0.602	0.421	0.522	0.664	140638
A_43_P11720	Apolipoprotein A-II	0.658	0.673	0.494	0.546	25649
A_43_P11733	Peroxisome proliferator activated receptor delta	0.753	0.841	0.493	0.59	25682
A_44_P258751	S-phosphoinositide dependent protein kinase-1	0.637	0.629	0.443	0.578	81745
A_44_P283518	*Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1"	0.771	0.789	0.481	0.579	94172
A_44_P493946	*Acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl"	0.945	0.985	1.241	0.484	83522
A_44_P503215	Cd36 antigen	NODATA	NODATA	0.26	NODATA	29184
A_44_P612314	Apolipoprotein A-I	0.786	0.701	0.496	0.704	25081
A_44_P997755	*Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2"	NODATA	NODATA	0.268	1.311	65192

Fig. 3-34. PPAR Signaling Pathway Based Data.

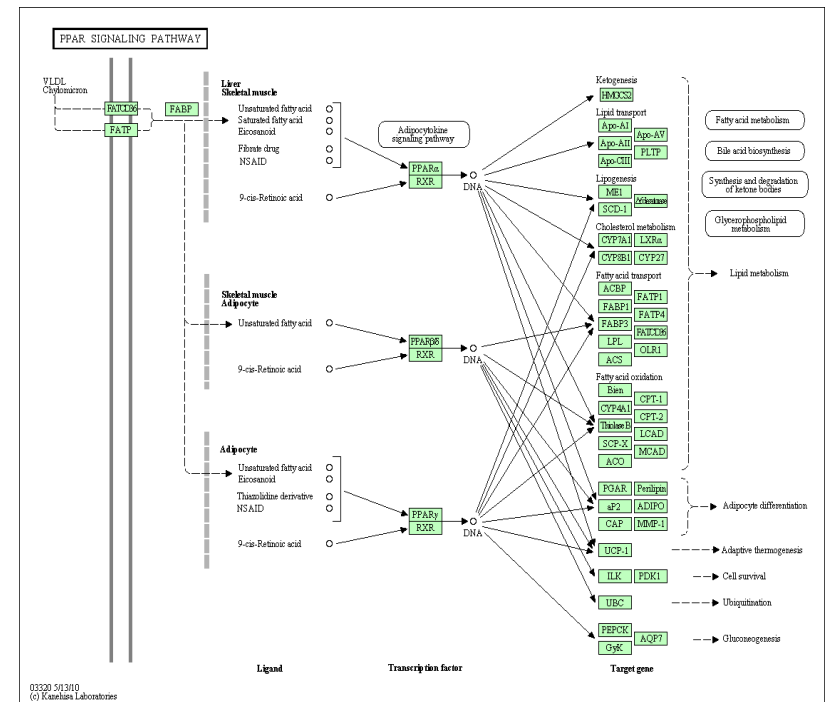


Fig. 3-35. PPAR Signaling Pathway.

Olfactory transduction(rno04740)						
Probe ID	Name	BF CT감초 Normalized	BF CT합환피 Normalized	Hy CT감초 Normalized	Hy CT합환피 Normalized	Gene ID
A_44_P147300	"Chloride channel, calcium activated, family member 2 (predicted)"	NODATA	NODATA	0.36	0.724	308016
A_44_P180099	Cyclic nucleotide-gated channel alpha 4	0.75	0.757	0.472	0.571	85258

Fig. 3-36. Olfactory Transduction Based Data.

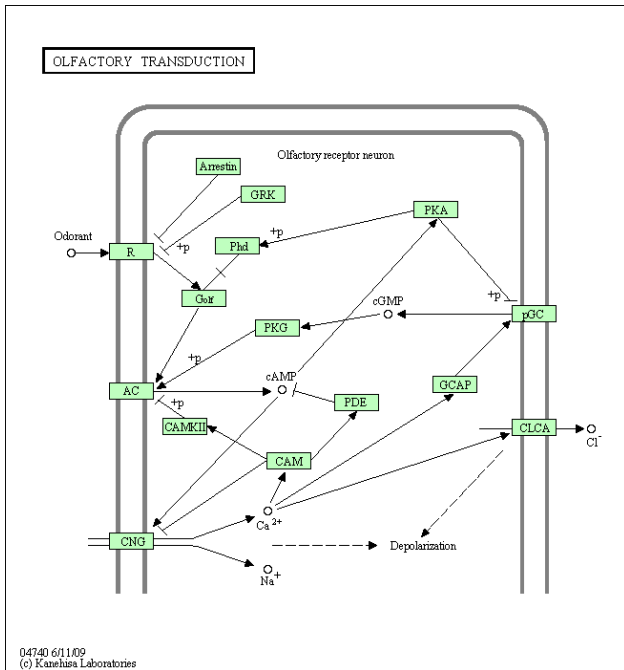
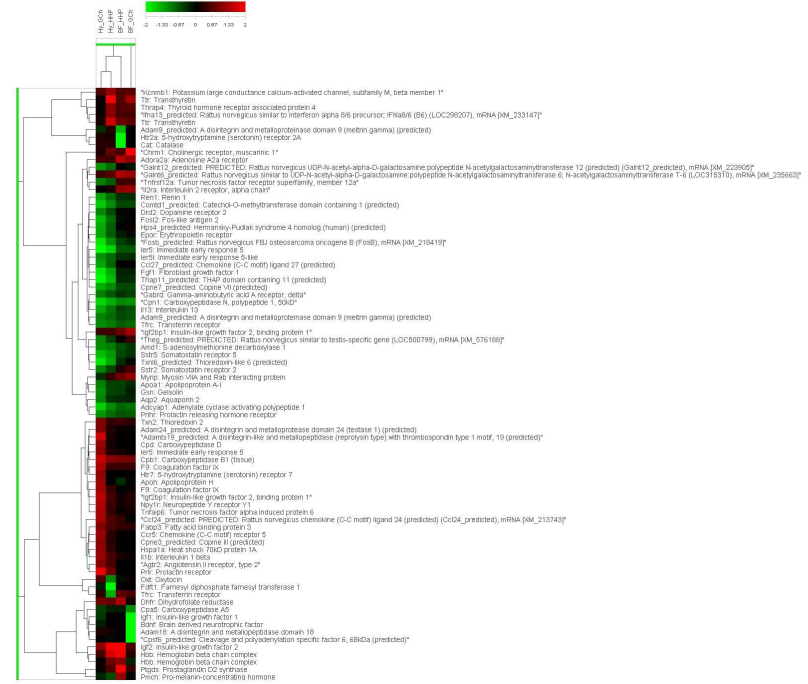


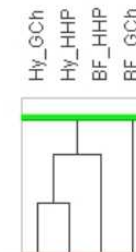
Fig. 3-37. Olfactory Transduction.

마. 수면 관련 유전자의 추출과 상관관계 규명

지금까지의 연구 및 보고된 자료에 근거(GeneCards)하여 수면과 관련 있는 유전자 (sleep-related genes)를 추출하였다. 본 DNA microarray 분석 결과에서 이들 수면 관련 유의한 유전자(2-fold changed genes, at least 1-experiment)를 선별하고 clustering 분석을 수행했다.



두 종류의 한약제 및 조직 간의 상관관계는 앞서 설명된 2배 이상의 발현 차이가 있는 유전자를 대상으로 clustering한 결과와 유사하다. 즉, 시상하부에서 감초에 의한 생물학적 효과가 가장 높은 것으로 나타났으며, 시상하부에서 감초에 의한 결과로부터 수면 유도 관련 후보 유전자(mode of action)를 발굴할 필요가 있다.



바. 수면 관련 후보유전자

본 연구결과로부터 후보 유전자를 탐색하기 위해서는 문헌고찰에서부터 본 보고서에 언급된 일련의 유전자간의 상호 작용점을 각 확인하고 선정해야할 것이다. 현 단계에서는 neuropeptide Y 및 receptor Y1 그리고 Y5 유전자의 induction에 주목하고자 한다.

Gene_Symbol	Description	Hy_GCh	Hy_HHP	BF_GCh	BF_HHP
Npy	Neuropeptide Y	0.73*	0.75	0.41	0.36
Npy1r	Neuropeptide Y receptor Y1	1.34	0.49	0.23	0.17
Npy5r	Neuropeptide Y receptor Y5	0.73	0.68	ND	ND

*각 signal intensity 값은 log2 값임. 즉, +1의 값은 2-fold up regulation을 의미하며, -1의 값은 2-fold down regulation을 의미함.

여러 연구에서 neuropeptide Y(NPY)의 기능을 잘 설명하고 있다. 즉, 시상하부에서 NPY의 up-regulation은 불안해소 및 수면 유도에 관여한다(3-8). 따라서 감초에 의한 수면 유도효과는 본 NPY 및 그의 수용체에 의해 개시될 가능성이 있으며, 이의 확인 연구가 요구된다.

제 4 절 결 론

수면과 관련된 연구는 유전학적인 관점에서 인간과 같이 중추 신경계를 가지며 눈, 다리, 심장 등 많은 부분에서 유사성을 갖은 초파리를 대상으로 활발하게 이루어지고 있는데, 초파리를 이용한 수면장애 및 카페인에 관한 연구(Lindskog et al., 2002)를 통해 초파리에서도 포유류가 수면을 취할 때와 비슷한 행동학적, 분자생물학적인 변화가 관찰된다고 보고된 바 있다. 또한 인간의 경우에서와 마찬가지로 카페인이나 항히스타민 제재에 영향을 받으며, 포유류의 수면과 기상을 조절하는 분자적 요소들의 일부를 공유한다고 보고된 바 있다(Lindskog et al., 2002). 그 외에 마취제의 수면 유도 작용과 같이 시상하부에서 수면 유도에 필요한 체온 및 호흡 조절하며 GABA_A라는 특정 신경 전달 물질을 제어함으로써 진정 효과(sedative effect)를 나타낸다는 보고(Nelson et al., 2002) 등의 생리학적 연구 뿐만 아니라 수면을 취하는 동안 호르몬 변화에 의한 면역 시스템 강화에 관한 면역학적 연구(Lange et al., 2003) 등 여러 분야에서 연구가 진행되고 있다. 또한 멜라토닌

(melatonin)의 약물학적 기능과 맹인들의 수면 구조 향상에 관한 연구(Fischer et al., 2003)를 통해 수면 유도 및 조절과 관련된 조직 특이적 반응에 관한 결과가 보고된 바 있다.

본 연구에서 수면증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 두 종류의 한약재 감초(GCh)와 합환피(HHP)에 대한 두 조직, 시상하부(hypothalamus, Hy) 및 기저전뇌(basal forebrain, BF)의 유전체 수준에서의 발현양상을 분석하였다. 두 종류의 한약재를 비교한 결과, 조직 특이적인 발현 양상이 있는 것으로 나타났으며, 특히 시상하부에서 감초에 의한 생물학적 이벤트가 더 있는 것으로 나타났다. 감초의 경우, 기존의 신경 전달 물질을 억제 하는 물질인 GABA_A receptor와 결합할 경우, 진정효과, 불안해소 기작을 유발 한다는 보고(Winsky-Sommerer, 2009) 및 항 경련효과, 근육이완작용 등 수면과 관련된 기작을 유발 한다고 보고(Simbrey et al., 2004) 된 바, 본 연구에서도 GABA_A receptor의 활성화와 관련된 pathway에서 발현 양상이 두드러지게 나타났다. 이에 감초에 의해 발현 차이가 있는 유전자 중 neuropeptide Y 및 receptor Y1 그리고 Y5 유전자를 후보 유전자로 선정하였다. 또한 합환피의 경우, 기존의 항우울증 치료제의 작용으로 서파수면(slow wave sleep)과 램 수면 잠복기를 연장시키는데 관여하는 5-HT의 활성화에 관한보고(Landolt et al., 2009) 및 5-HT의 재흡수가 억제되면 5-HT의 분비가 일어나며 수면이 유도된다는 보고(Peñalva et al., 2003)에서와 같은 pathway 및 관련 유전자의 발현 양상이 뚜렷하게 나타났다.

본 연구에서 감초 및 합환피의 투여에 따른 GABA_A 및 5-HT의 변화를 통해 두 물질이 수면 증진 기작에 관여하고 있음을 확인 할 수 있었으며 해당 유전자 그룹이 수면과 관련하여 주요 작용점(mode of action)에 있을지 여부는 추가적인 검증실험이 요구된다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

2. 연차별 세부연구개발 목표 및 달성도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

1. 연구평가의 착안점 및 달성도

본 연구개발은 2007년 5월부터 2010년 5월까지 3년간 수행되었으며, 계획된 연구개발 목표들은 성공적으로 달성되었다. 스크리닝 단계에서 GABA_A receptor 외에도 5-HT_{2C} receptor binding assay를 추가로 수행하였으며, 연구의 완성도를 높이기 위하여 분리정제 연구를 수행하였다. 그 결과 특허 및 논문으로 보고된 적이 없었던 감초와 함환피 에탄올 추출물의 수면증진 효과를 구명할 수 있었으며, 감초에서 분리된 flavonoid 성분인 isoliquiritigenin의 수면증진 효과를 확인하였다.

구분	연구개발 목표	평가의 착안점	가중치	연구 수행내용	목표 달성도
세부	• 신경전달물질 수용체 결합력 탐색	스크리닝 및 후보 소재 선정 여부	20%	- 24종 원료의 GABA 및 5-HT 결합력 시험 수행 및 후보 소재 선정	100%
	• 수면증진 소재의 제조조건 최적화	RSM을 이용한 최적화 여부	15%	- RSM을 통해 원료 4종의 최적 제조조건 확립	100%
	• 설치류를 이용한 수면증진 효과 분석	NREM/REM 등 지표 분석 여부	30%	- 수면구조 분석을 통해 수면증진효과 구명	100%
	• 기능성분의 분리정제 연구 및 안전성 검토	유효성분 분리 및 안전성 검토 여부	25%	- 기능성분 동정 및 추출물의 안전성 검토 수행	100%
	• 시제품 개발 및 시판품과 동물효능 비교	수면제 및 시판품 효능비교 여부	20%	- 시제품을 개발하고 시판품과 효능 비교 수행	100%
	계			100%	100%
협동	• 소재의 선정/동물효과 분석/설문조사	식품연과 공동수행 여부	20%	- 식품연과 소재 선정/동물효과/설문조사를 수행	100%
	• 수면증진 소재의 임상평가	수면다원검사 수행 여부	80%	- 설문조사 및 수면다원검사 수행	100%
	계		100%	100%	
위탁	• 수면증진 소재의 작용기작 연구	Microarray 분석 및 pathway 도출	100%	- 수면증진 관련 Pathway 및 후보 유전자 추출	100%
	계		100%	100%	

구분	세부 연구개발 목표	평가의 착안점	연도별 가중치	연구 수행내용	목표 달성도
1차 년도	• 탐색 대상 소재의 선정 및 추출물 제조	소재선정 및 추출 여부	30%	- 수면증진 효과를 기대할 수 있는 24종 선정 - 물/에탄올 추출물 제조	100%
	• GABA _A receptor에 대한 결합력 탐색	스크리닝 및 후보 소재 선정 여부	50%	- RI를 이용하여 GABA _A receptor 결합력 분석 - 후보 추출물 2종 선정	100%
	• 대상 소재의 선정 및 수면 관련 설문조사	소재선정 및 설문조사 여부	20%	- 관련 문헌 수집 및 소재를 식품연과 함께 선정 - 수면 및 건강수면식품에 대한 설문조사 실시	100%
2차 년도	• 5-HT _{2C} receptor에 대한 결합력 탐색	스크리닝 및 후보 소재 선정 여부	20%	- RI를 이용하여 5-HT _{2C} receptor 결합력 분석 - 후보 추출물 2종 선정	100%
	• 수면증진 소재의 제조조건 최적화	RSM을 이용한 최적화 여부	30%	- 감초 등 총 4종의 원료의 최적 제조조건 확립	100%
	• 설치류 수면구조 분석을 통한 효과 분석	NREM/REM 등 지표 분석 여부	30%	- Pentobarbital을 이용한 입면 및 수면시간 평가 - Rat EEG/EMG 측정 및 NREM/REM 분석 수행	100%
	• 수면증진 소재의 작용기작 연구	Microarray 분석 및 pathway 도출	20%	- 수면증진 관련 Pathway 및 후보 유전자 추출	100%
3차 년도	• 단회 급성경구독성시험 및 안전성 검토	독성 및 안전성 평가 여부	10%	- 1 및 2 g/kg의 고농도로 독성시험 수행 및 의사결정도기법을 활용하여 안전성 검토 수행	100%
	• 기능성분의 분리정제 연구	단일성분의 분리 및 효능평가 여부	30%	- 감초 및 함환피의 단일성분 분리 - 단일성분의 구조 분석 및 효능 평가 수행	100%
	• 시제품 개발 및 시판품과 동물효능 비교	수면제 및 시판품 효능비교 여부	20%	- 분말 및 캡슐형태의 시제품 개발 - 수면제 및 국내 시판제품과의 효능 비교	100%
	• 수면증진 소재의 임상평가	수면다원검사 및 설문 활용 여부	40%	- 설문조사 및 수면다원검사 수행	100%

제 2 절 관련분야 기여도

1. 과학·기술적 측면

농산자원으로부터 수면증진 소재를 개발하고 효능을 평가한 본 연구개발 기술은 그 동안 식품과학기술 분야의 새로운 시도로 관련 연구 활성화에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 아울러 수면증진 효과가 뛰어난 천연물 신약 개발의 기초자료로도 활용될 수 있을 것이다.

본 연구개발을 통해 확립된 설치류를 활용한 수면구조 분석 평가기술은 다양한 식품소재의 수면증진 효과를 평가하는데 매우 유용하게 활용될 수 있으며, 비만 등의 다른 기능성 연구에도 활용될 수 있다. 또한 관련 연구를 여건상 하지 못하는 중소기업들에 대한 기술지원이 가능하여 국내 식품산업에 있어서도 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

임상평가 수행을 통해 수면제와는 다르게 식품성분의 수면증진효과를 탐색할 수 있는 평가시스템을 구축했는데 이는 향후 관련 연구에 있어서 건강수면 유도효과의 생리활성 검증 방법 확립에 대한 자료로 활용 및 수면과 관련된 홍보자료에 과학적 효능 입증 자료로 활용 되어 향후 동일계 연구에 크게 기여할 것으로 보인다.

감초 및 합환피의 경우 본 연구개발을 통해 처음으로 수면증진 효과가 입증되었다. 특히, 감초의 경우 국내에서 가장 널리 사용되고 있는 한방소재로서 그 의의가 크다고 할 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

수면제는 반드시 처방이 필요하기 때문에 일상에서 쉽게 구입하기가 쉽지 않다. 따라서 본 연구에서 개발된 수면증진 소재의 산업화는 수면제를 보조하거나 대체할 수 있어 국내에서 새로운 시장을 창출 할 수 있을 것으로 기대된다.

수면이 건강에 미치는 영향이 지대하다는 것을 고려할 때 수면증진 소재의 개발을 통해 수면장애로 인한 사회적 비용의 감소에 다소나마 기여를 할 수 있을 것이다.

해외에서 개발된 다양한 수면증진 기능성식품의 수입 대체 효과를 기대할 수 있으며, 수면증진 효과가 높은 신규 소재의 개발로 향후 수출 또한 기대할 수 있을 것이다.

본 연구개발 수행을 통해 축적된 관련 기술 및 노하우들은 국내 식품 R&D에 있어서 유용하게 활용되어 국내 식품산업 발전에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 학술회의 발표

발표 제목	학술대회명	발표일자
Screening of sleep-inducing effects of agricultural resources using GABA _A -benzodiazepine receptor binding assay	한국식품과학회	2008. 06. 19
Sleep-enhancing effects of plants used in traditional medicine in Korea for insomnia	한국식품영양과학회	2009. 11. 06
Effect of ethanol extracts of licorice and silk tree on pentobarbital-induced sleep behavior	한국식품과학회	2010. 06. 18

2. 논문

논문명	학술지명	비고
Hypnotic effects and binding studies for GABA _A and 5-HT _{2C} receptors of traditional medicinal plants used in Asia for insomnia	<i>Journal of Ethnopharmacology</i>	심사중
Isoliquiritigenin from licorice potentiates GABA _A receptor and has hypnotic effects on rats	<i>Neuropharmacology</i>	준비중
Effect of ethanol extracts of licorice and silk tree on pentobarbital-induced sleep behavior and sleep structure	<i>Journal of Ethnopharmacology</i>	준비중
Optimization of ethanol extraction of sleep-enhancing materials from licorice and silk tree	<i>Food Science and Biotechnology</i>	준비중
감초 및 합환피 에탄올 추출물의 임상평가: 수면다원 검사 및 설문조사 중심	수면의학	준비중

3. 특허

구분	특허명	출원국가명 (출원번호)	출원일
출원	수면증진효과를 가지는 감초 및 합환피 주정 추출 조성물 및 그 제조방법	대한민국	출원중
준비	수면유도 효과를 가지는 isoliquiritigenin을 지표성분으로 하는 감초 추출물 및 그 제조방법	대한민국	준비중

4. 세미나 및 홍보

구분	발표명	발표 장소	발표일자
세미나	감초 및 합환피 에탄올 추출물의 수면증진 효과 연구	동경대학교 (일본)	2009
세미나	식품 및 한방소재로부터 수면증진 소재의 탐색 및 산업화	고려대학교 안암병원 (한국)	2009

5. 기술이전

구분	기술명	이전 기업명	비고
기술이전	수면증진 효과를 가지는 감초 및 합환피 에탄올 추출물 제조 방법	(주)아프로플랜	2010년 6월 예정

제 2 절 추가연구의 필요성

본 연구개발을 통해 다양한 식품 소재 및 농산자원의 수면과 관련된 GABAA 및 5-HT_{2C} receptor에 대한 결합 억제활성을 평가하였다. 활성을 나타내지 않았던 소재들의

경우 수면증진 효과가 없다고 할 수 없으며, 다른 신경전달물질 수용체에 작용할 가능성이 있다. 따라서 다른 소재들에 대한 연구도 필요할 것으로 보인다.

수면증진 효과를 평가하기 위한 동물실험에 필요한 성분의 양을 분리정제하는데 여건상 한계가 있다. 따라서 향후 추가적인 연구를 통해 활성성분의 수집하고 이에 대한 동물 효능을 연구해야 할 것으로 사료된다.

감초의 경우 분리된 isoliquiritigenin은 동물에서 수면증진 효과가 입증되었으며, brain slice patch 연구에서 GABA_A receptor를 활성화 시키는 것을 확인하였다. 하지만 향후 연구를 통해 in vivo 작용기작에 대한 추가 연구가 요구된다.

제 3 절 산업화 추진방안

본 연구사업의 참여기업인 (주)아프로플랜은 본 개발기술을 이전 받아서 우선 기타가공 식품 유형으로 산업화할 계획이며, 동시에 개별인정을 신청하여 수면증진 분말소재를 다양한 형태의 제품에 첨가하여 차별화된 제품을 개발하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

식품 및 허브류를 이용한 수면증진 기능성식품 개발에 대한 국내 연구가 활성화되어 있지 못해 연구개발 과정에 있어서 해외의 전문가들에게 많은 자문을 받게 되었다. 우선 Copenhagen 약대의 Anna K. Jager 교수로부터 방사선동위원소를 이용한 neurotransmitter receptor binding assay에 대한 전반적인 자문을 구할 수 있었다. 본 연구개발에 있어서 가장 중요한 것은 in vivo에서 수면증진 효과가 있는 것을 검증하는 것인데 결합력 및 in vitro 수준의 효능만으로는 한계가 있기 때문이다. 특히 동물에서의 효과는 BBB를 통과할 수 있음을 간접적으로 나타내준다. Pentobarbital을 이용한 수면유도 실험을 통해서도 동물에서의 수면증진 효과를 가늠할 수 있으나 이는 입면 및 수면시간과 같은 수면의 양적인 지표만을 알 수 있기 때문에 delta power와 같은 수면의 질을 판단할 수 있는 수면구조의 분석이 요구된다. 동물(설치류) 수면구조 분석에 있어서 세계적인 수준에 있는 OBI(Osaka Bioscience Institute)의 Urade 박사의 도움으로 직접 연구소를 방문하여 rat의 뇌파(EEG) 및 근전도도(EMG) 측정을 통한 수면구조 분석 방법을 전수받았다. 이를 통해 한국식품연구원에 본 실험을 할 수 있는 연구시스템을 성공적으로 구축할 수 있었다.

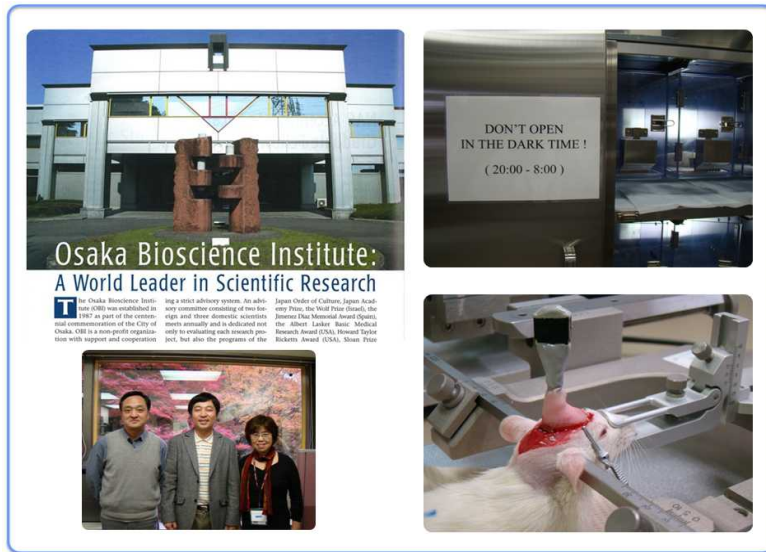


Fig. 3. Osaka Bioscience Institute and Pictures of the laboratory

제 7 장 참고문헌

[세부] 수면증진 소재의 in vitro/vivo 효능 평가 및 제조조건 최적화

1. Abourasheda, E.A. Koetterb, U., Brattstro, A., 2004. In vitro binding experiments with a Valerian, Hops and their fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptors. *Phytomedicine* 11, 633-638.
2. Asl, M.N., Hosseinzadeh, H., 2008. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research* 22, 709-724.
3. Attele, A.S., Xie, J.T., Yuan, C.S., 2000. Treatment of insomnia: an alternative approach. *Alternative Medicine Review* 5, 249-259.
4. Bateson, A.N., 2006. Further potential of the GABA receptor in the treatment of insomnia. *Sleep Medicine* 7 (Supplement 1), 3-9.
5. Borja, N.L., Daniel, K.L., 2006. Ramelteon for the treatment of insomnia. *Clinical Therapeutics* 28, 1540-1555.
6. Chen, S.P., Zhang, R.Y., 1997. Studies on the triterpene saponins from Albizziae cortex. *Yao Xue Xue Bao* 32, 144-147.
7. Chu, Q.P., Wang, L.E., Cui, X.Y., Fu, H.Z., Lin, Z.B., Lin, S.Q., Zhang, Y.H., 2007. Extract of *Ganoderma lucidum* potentiates pentobarbital-induced sleep via a GABAergic mechanism. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 86, 693-698.
8. Doghramji, K., 2006. The epidemiology and diagnosis of insomnia. *American Journal of Managed Care* 12, 214-220.
9. Fang, X., Hao, J., Zhou, H., Zhu, L., Wang, J., Song, F., 2010. Pharmacological studies on the sedative-hypnotic effect of *Semen Ziziphi spinosae* (Suanzaoren) and *Radix et Rhizoma Salviae miltiorrhizae* (Danshen) extracts and the synergistic effect of their combinations. *Phytomedicine* 17, 75-80.
10. Feng, J., Cai, X., Zhao, J., Yan, Z., 2001. Serotonin receptors modulate GABA receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *The Journal of Neuroscience* 21, 6502-6511.
11. Harada, K., Aota, M., Inoue, T., Matsuda, R., Mihara, T., Yamaji, T., Ishibashi, K., Matsuoka, N., 2006. Anxiolytic activity of a novel potent serotonin 5-HT_{2C} receptor antagonist FR260010: a comparison with diazepam and buspirone. *European Journal of Pharmacology* 553, 171-184.
12. Huang, F., Xiong, Y., Xu, L., Ma, S., Dou, C., 2007. Sedative and hypnotic activities of the ethanol fraction from *Fructus Schisandrae* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 471-475.
13. Imanshahidi, M., Hosseinzadeh, H., 2006. The pharmacological effects of *Salvia* species on

- the central nervous system. *Phytotherapy Research* 20, 427–437.
14. Jerman, J.C., Brough, S.J., Gager, T., Wood, M., Coldwell, M.C., Smart, D., Middlemiss, D.N., 2001. Pharmacological characterisation of human 5-HT₂ receptor subtypes. *European Journal of Pharmacology* 414, 23–30.
 15. Johnston, G.A.R., 2005. GABA_A receptor channel pharmacology. *Current Pharmaceutical Design* 11, 1867–1885.
 16. Jung, N.P., Jin, S.H., 1996. Studies on the physiological and biochemical effects of Korea red ginseng. *Journal of Ginseng Science* 20, 431–471.
 17. Kang, T.H., Jeong, S.J., Kim, N.Y., Higuchi, R., Kim, Y.C., 2000. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizzia julibrissin* Durazz. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 321–323.
 18. Kantor, S., Jakus, R., Bodizs, R., Halasz, P., Bagdy, G., 2002. Acute and long-term effects of the 5-HT₂ receptor antagonist ritanserin on EEG power spectra, motor activity, and sleep: changes at the light–dark phase shift. *Brain Research* 943, 105–111.
 19. Kavvadias, D., Monschein, V., Sand, P., Riederer, P., Schreier, P., 2003. Constituents of sage (*Salvia officinalis* L.) with in vitro affinity to human brain benzodiazepine receptor. *Plant Medicine* 69, 113–117.
 20. Kavvadias, D., Sand, P., Youdim, K.A., Qaiser, M.Z., Rice–Evans, C., Baur, R., Sigel, E., Rausch, W.D., Riederer, P., Schreier, P., 2004. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood–brain barrier and exhibits anti-convulsive effects. *British Journal of Pharmacology* 142, 811–820.
 21. Kim, J.H., Kim, S.Y., Lee, S.Y., Jang, C.G., 2007. Antidepressant-like effects of *Albizzia julibrissin* in mice: Involvement of the 5-HT_{1A} receptor system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 87, 41–47.
 22. Kim, W.K., Jung, J.W., Ahn, N.Y., Oh, H.R., Lee, B.K., Oh, J.K., Cheong, J.H., Chun, H.S., Ryu, J.H., 2004. Anxiolytic-like effects of extracts from *Albizzia julibrissin* bark in the elevated plus-maze in rats. *Life Sciences* 75, 2787–2795.
 23. Kinjo, J., Araki, K., Fukui, K., Higuchi, H., Ikeda, T., Nohara, T., Ida, Y., Takemoto, N., Miyakoshi, M., Shoji, J., 1992. Six new triterpenoidal glycosides including two new sapogenols from *Albizzia* cortex. *V. Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 40, 3269–3273.
 24. Lee, C.M., Wong, H.N., Chui, K.Y., Choang, T.F., Hon, P.M., Chang, H.M., 1991. Miltirone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*. *Neuroscience Letters* 127, 237–241.
 25. Ma, Y., Ma, H., Eun, J.S., Nam, S.Y., Kim, Y.B., Hong, J.T., Lee, M.K., Oh, K.W., 2009. Methanol extract of *Longanae Arillus* augments pentobarbital-induced sleep behaviors through the modification of GABAergic systems. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 245–250.
 26. Ma, Y., Kim, Y.B., Nam, S.Y., Cheong, J.H., Park, S.H., Kim, H.J., Hong, J.T., Oh, K.W., 2009. Effects of red ginseng extract on sleep architecture and electroencephalogram power spectra in rats. *Sleep and Biological Rhythms* 7, 78–83.
 27. Mae, T., Kishida, H., Nishiyama, T., Tsukagawa, M., Konishi, E., Kuroda, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Takahashi, K., Kawada, T., Nakagawa, K., Kitahara, M., 2003. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand-binding activity affects diabetes in KK-Ay mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutrition* 133, 3369–3377.
 28. Matteo, V.T., Giovanni, G.D., Esposito, E., 2000. SB 242084: A selective 5-HT_{2C} receptor antagonist. *CNS drug Reviews* 6, 195–205.
 29. Meletis, C.D., Zabriskie, N., 2008. Natural approaches for optimal sleep. *Alternative and Complementary Therapies* 14, 181–188.
 30. Meoli, A.L., Rosen, C., Kristo, D., Kohrman, M., Gooneratne, N., Aguillard, R.N., Fayle, R., Troell, R., Townsend, D., Claman, D., Hoban, T., Mahowald, M., 2005. Oral nonprescription treatment for insomnia: an evaluation of products with limited evidence. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 1, 173–187.
 31. Pearson, N.J., Johnson, L.L., Nahin, R.L., 2006. Insomnia, trouble sleeping, and complementary and alternative medicine: Analysis of the 2002 national health interview survey data. *Archives of Internal Medicine* 166, 1775–1782.
 32. Porter, R.H., Benwell, K.R., Lamb, H., Malcolm, C.S., Allen, N.H., Revell, D.F., Adams, D.R., Sheardown, M.J., 1999. Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *British Journal of Pharmacology* 128, 13–20.
 33. Risa, J., Risa, A., Adersen, A., Gauguin, B., Stafford, G.I., van Staden, J., Jäger, A.K., 2004. Screening of plants used in southern Africa for epilepsy and convulsions in the GABA_A-benzodiazepine receptor assay. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 177–182.
 34. Smith, A., Simpson, P., 2003. Methodological approaches for the study of GABA_A receptor pharmacology and functional responses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377, 843–851.
 35. Smith, M.I., Piper, D.C., Duxon, M.S., Upton, N., 2002. Effect of SB-243213, a selective 5-HT_{2C} receptor antagonist, on the rat sleep profile: A comparison to paroxetine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 71, 599–605.
 36. Thomas, R., Christopher, D., 2004. Evolution of insomnia: current status and future direction. *Sleep medicine* 5 (Supplement 1), 23–30.
 37. Toro, J.P.H., Valenzuela, C.F., Harris, R.A., 1996. Modulation of GABA_A receptor function by G protein-coupled 5-HT_{2C} receptors. *Neuropharmacology* 35, 1355–1363.
 38. Viola, A.U., Brandenberger, G., Toussaint, M., Bouhours, P., Macher, J.P., Luthringer, R., 2002. Ritanserin, a serotonin-2 receptor antagonist, improves ultradian sleep rhythmicity in young poor sleepers. *Clinical Neurophysiology* 113, 429–434.
 39. Wang, W., Hu, X., Zhao, Z., Liu, P., Hu, Y., Zhou, J., Zhou, D., Wang, Z., Guo, D., Guo, H., 2008. Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in

the forced swimming test and tail suspension test in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32, 1179-1184.

40. Xiang, Y.Z., Shang, H.C., Gao, X.M., Zhang, B.L., 2008. A comparison of the ancient use of ginseng in traditional Chinese medicine with modern pharmacological experiments and clinical trials. *Phytotherapy Research* 22, 851-858.
41. Yi, P.L., Lin, C.P., Tsai, C.H., Lin, J.G., Chang, F.C., 2007. The involvement of serotonin receptors in suanzaorentang-induced sleep alteration. *Journal of Biomedical Science* 14, 829-840.

[협동] 수면증진 소재의 임상평가

1. Huang, F., Xiong, Y., Xu, L., Ma, S., Dou, C., 2007. Sedative and hypnotic activities of the ethanol fraction from *Fructus Schisandrae* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 471-475.
2. Sadock BJ, Sadock VA. Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry behavioral Science/Clinical Psychiatry. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. 527-78.
3. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders, 4th edition-text revision(DSM-IV-TR). Washington, DC: American Psychiatric press; 2000.
4. Rechtschaffen A, Kales AA. A manual of standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages of human Subjects. Washington DC : Government Printing Office; 1968
5. Clare Stevinson*, Edzard Ernst. Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. *Sleep Medicine* 2000 (1), 91-99.
6. Gillin JC, Byerley WF. The diagnosis and management of insomnia. *N Eng J Med* 1990;322(4):239-240
7. Lindahl O, Lindwall L. Double blind study of a valerian preparation. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;32:1065-1066
8. Schulz H, Jobert M, HuEbner WD. The quantitative EEG as a screening instrument to identify sedative effects of single doses of plant extracts in comparison with diazepam. *Phytomedicine* 1998;5(6):449±458
9. Patrick L, Talinir ML, Nava Z. Prolonged-release melatonin improves sleep quality and morning alertness in insomnia patients aged 55 years and older and has no withdrawal effects. *J Sleep Res*. 2007(16), 372-380
10. Bos R, Woerdenbag HJ, DeSmet PAGM, Scheffer JJ. Valeriana species. In: DeSmet PAGM, Keller K, Hansel R, Chandler RF, editors. Adverse effects of herbal drugs.
11. Berlin: Springer; 1997. p. 165-80.

[위탁] 수면증진 소재의 작용기작 연구

1. Mackiewicz, M., Zimmerman, JE., Shockley, KR., Churchill, GA., Pack, AI., 2009. What are microarrays teaching us about sleep? *Trends Mol Med* 15, 79-87.
2. Mirescu, C., Peters, JD., Noiman, L., Gould, E., 2006. Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 19170-19175.
3. Fuxe, K., Agnati, LF., Harfstrand, A., Zini, I., Tatemoto, K., Pich, EM., et al. 1983. Central administration of neuropeptide Y induces hypotension bradypnea and EEG synchronization in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica* 118, 189-192.
4. Britton, KT., Southerland, S., Van Uden, E., Kirby, D., Rivier, JE., Koob, G., 1997. Anxiolytic activity of NPY receptor agonists in the conflict test. *Psychopharmacology* 132, 6-13.
5. Kask, A., Rago, L., Harro, J., 1997. Alpha-helical CRF(9-41) prevents anxiogenic-like effect of NPY Y1 receptor antagonist BIBP3226 in rats. *NeuroReport* 8, 3645-3647.
6. Ehlers, CL., Somes, C., Lopez, A., Kirby, D., Rivier, JE., 1997. Electrophysiological actions of neuropeptide Y and its analogs: new measures for anxiolytic therapy? *Neuropsychopharmacology* 17, 34-43.
7. Ehlers, CL., Somes, C., Seifritz, E., Rivier, JE., 1997. CRF/NPY interactions: a potential role in sleep dysregulation in depression and anxiety. *Depression & Anxiety* 6, 1-9.
8. Antonijevic, IA., Murck, H., Bohlhalter, S., Frieboes, RM., Holsboer, F., Steiger, A., 2000. Neuropeptide Y promotes sleep and inhibits ACTH and cortisol release in young men. *Neuropharmacology* 39, 1474-1481.
9. Nelson, LE., Guo, TZ., Lu, J., Saper, CB., Franks, NP., Maze, M., 2002. The sedative component of anesthesia is mediated by GABA(A) receptors in an endogenous sleep pathway. *Nat Neurosci* 5, 979-84.
10. Lindskog, M., Svenningsson, P., Pozzi, L., Kim, Y., Fienberg, AA., Bibb, JA., Fredholm, BB., Nairn, AC., Greengard, P., Fisone, G., 2002. Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature* 418, 774-778.
11. Lange, T., Perras, B., Fehm, HL., Born, J., 2003. Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination. *Psychosom Med* 65, 831-835.
12. Gallopin, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, PH., Rossier, J., Audinat, E., Mühlethaler, M., Serafin, M., 2000. Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404, 992-995.
13. Fischer, S., Smolnik, R., Herms, M., Born, J., Fehm, HL., 2003. Melatonin acutely improves the neuroendocrine architecture of sleep in blind individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5315-5320.
14. Simbrey, K., Winterhoff, H., Butterweck, V., 2004. Extracts of St. John's wort and various

- constituents affect beta-adrenergic binding in rat frontal cortex. *Life Sci* 74, 1027-1038.
15. Winsky-Sommerer, R., 2009. Role of GABAA receptors in the physiology and pharmacology of sleep. *Eur J Neurosci* 29, 1779-94.
16. Landolt, HP., Wehrle, R., 2009. Antagonism of serotonergic 5-HT_{2A/2C} receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood? *Eur J Neurosci* 29, 1795-809.
17. Peñalva, RG., Lancel, M., Flachskamm, C., Reul, JM., Holsboer, F., Linthorst, AC., 2003. Effect of sleep and sleep deprivation on serotonergic neurotransmission in the hippocampus: a combined in vivo microdialysis/EEG study in rats. *Eur J Neurosci*. 17, 1896-906.

주 의

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