

보안과제(), 일반과제(O)

과제번호 106048031CG000

오미자의 대량번식, 생리활성물질 분리,
구조동정 및 기능성 제품 개발

Mass Production, Isolation and Identification of
Bioactive Compounds and Biofunctional
Products of *Schisandra chinensis*

부산대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “오미자의 대량번식, 생리활성물질 분리, 구조동정 및 기능성 제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 일

주관연구기관명 : 부산대학교
주관연구책임자 : 최 영 환
세부연구책임자 : 손 병 구
세부연구책임자 : 이 영 근
세부연구책임자 : 배 순 식
연 구 원 : 강 점 순
연 구 원 : 이 용 재
연 구 원 : 김 용 철
연 구 원 : 김 치 대
연 구 원 : 신 동 수
연 구 원 : 문 자 영
연 구 원 : 추 성 태
연 구 원 : 이 유 진
연 구 원 : 신 우 정
연 구 원 : 김 정 아
연 구 원 : 박 다 정
연 구 원 : 김 미 라
연 구 원 : 김 윤 체
연 구 원 : 백 민 근

요 약 문

I. 제 목

오미자의 대량번식, 생리활성물질 분리, 구조동정 및 기능성 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

오미자는 한국, 일본, 중국 북동지방, 남부 사할린, 동 러시아의 야생에서 성장하고 있다. 과육과 껍질은 신맛과 단맛을 내고, 종자는 매운맛, 쓴맛과 짠맛을 내므로 우리나라에서는 오미자 (omicha), 일본에서는 고미시 (gomishi), 중국에서는 유웨이지 (wu-wei-zi)라고 하여 5가지의 맛을 내는 과실을 의미하며, 맛의 독특함 때문에 생리활성물질에 관한 관심이 집중되었다. 오미자로부터 30여종의 dibenzo[a,c]cyclooctene 유도체인 리그난 (lignans)이 분리되었는데, 과실과 종자에는 7.2-19.2%, 줄기에는 1.3-10%가 함유되어 있다. 리그난은 ① 항간세포독성, ② 항산화, ③ 독성제거, ④ 항발암성 및 ⑤ 피로회복 등에 효과가 높은 것으로 알려져 있다. 한의학에서 오미자의 효과는 폐와 신장의 채널 및 위에 관여하고, 기침과 천식으로 숨을 헐떡이는 신장과 폐의 결합에 사용되며, 설사를 멈추게 하며, 식은 땀이 나는 것을 멈추게 하며, 건망증과 불면증에 사용하고, 정신을 온화하게하는 것으로 알려져 있다.

이러한 약리학적인 효과 때문에 천연물로부터 신약 개발에 관한 돌파구를 찾기 위해서 지난 10여년 동안 오미자의 lignans에 관한 연구가 집중적으로 이루어졌다. 오미자로부터 추출된 리그난의 효과 외에도 오미자의 추출물은 스트레스에 의한 국소빈혈기관, 국소재관류, 흥분성, 강한 빛에 의한 대사장애와 산소유리기와 관련된 병의 치료는 물론, 최근에는 HIV와 AIDs에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다.

따라서 본 연구에서는 약리효과가 높은 오미자를 농가 작물화하여 농가의 신소득작물로 개발하고 그 추출물을 산업화하기 위한 목표를 집약하면 다음과 같다.

- 오미자의 대량번식 체계 확립
- 오미자의 고극성 추출물로부터 생리활성이 높은 물질의 순수분리 및 구조 동정
- 생리활성물질을 기준으로 표준품 품질평가 기준 마련
- 식물체로부터 추출한 물질의 허혈-재관류, 간 손상에 대한 보호 효과 및 작용기전 구명
- 생리활성물질을 함유한 기능성 제품의 개발 및 산업화

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1세부 : 대량번식 체계 확립

1. 종자의 휴면타파를 통한 종자발아 촉진
 - 오미자 종자의 휴면성 검정
 - 채종시기별 종자의 휴면성 검정
 - 성장조절제를 이용한 휴면타파 방법의 개발
 - 저온습윤 처리 및 GA₃의 처리를 통한 종자의 휴면 타파
 - 매장 및 GA₃의 처리를 통한 종자의 발아촉진
2. 오미자로부터 추출한 리그난이 몇가지 채소종자의 발아 및 유묘생육에 미치는 영향
 - 천연물 : Schisandrin, schisandrin C, gomisin A, gomisin N
 - 천연물의 농도 : 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 및 10⁻⁷ M
 - 채소종자 : 무, 상추, 고추
3. 오미자의 생육시기, 식물체의 기관 및 재배지역별 리그난 함량 분석
 - 채취시기와 식물체의 기관별 함량비교
 - 재배지역 및 농가별 함량 비교

제 2세부: 생리활성물질 추출 및 구조 동정

1. 오미자의 극성별 분획 (Hexane, Chloroform, MeOH)
2. Hexane, Chloroform 및 MeOH 추출물로부터 물질의 순수분리 및 구조 동정
 - Normal SiO₂, C₁₈ SiO₂ 및 LH20 등을 이용한 분리
 - HPLC나 GC-MS, LC-MS, FT-IR spectrum을 이용한 물질의 분자량 확인
 - NMR을 이용한 물질의 구조 동정(신물질의 경우 1D, 2D NMR)
3. 순수분리 한 리그난 및 다른 화합물의 생리활성 검증
 - 항암, 항간염, 항염증, 미백효과, 면역증강 효과 등
4. HPLC를 이용한 순수분리 물질의 표준화 기술 개발
 - 기능성 물질을 이용한 표준품의 품질평가 기준 마련

제 3세부: 기능성 제품 개발

1. 제품 제조공정의 확립
2. Large scale 분리 및 정제 공정기술 개발
3. 기능성물질의 이화학적 특성을 이용하는 고농도 원료의 분리 및 정제기술 (증류비점분리, 동결빙점분리 및 비누화분리 등)의 새로운 공정 개발
4. 본 제품의 활성과 기능성을 증대시킬 수 있는 제품 개발: 식초, 혈행개선기능식품 등
5. 최종제품의 유효 기능성 성분 함량 및 영양학적 평가
6. 최종제품의 안전성 분석 및 개별인정기준 취득

제 4세부: 생리활성 검정

1. Lignan계 물질의 간세포 보호에 대한 작용기전 연구
 - 화학물질, 면역자극 및 산소유리기에 의한 간세포 손상에 대한 세포 보호 작용 구명

2. 항염증 효과에 대한 연구
3. 생체실험을 통한 허혈-재관류에 의한 간세포 손상에 대한 세포 보호 작용

IV. 연구개발 결과

제 1세부 : 대량번식 체계 확립

1. 종자의 휴면타파를 통한 발아 촉진

오미자 종자의 휴면성을 규명하고, 생장조절제를 처리하여 휴면을 타파를 수행하였으나 생장조절제 단독처리만으로는 휴면타파가 매우 어려웠다. 오옥신류와 cytokine류는 오미자종자의 휴면을 타파시키지 못하였으나, GA 1,000 mg/L는 약 17%의 정도의 아주 낮은 발아율을 보였다. 오미자의 종자를 이용하여 대량번식시킬 수 있는 방법을 확립하기 위하여 저온습윤처리를 하였다. 그 결과 처리 30일에는 발아율이 0%로 매우 낮았으나, 변온처리에서 가장 높았다. 60일 후에는 10℃의 처리에서 75% 이상의 발아율을 보여 실용화 할 수 있을 것으로 예상된다. 5℃와 15℃의 변온처리는 두 가지의 어떠한 단독 처리보다도 발아율이 높아, 변온처리에 의한 휴면타파 효과가 있었다. 저온습윤처리 후 GA₃의 처리는 저온습윤처리의 효과가 높았던 5℃에서는 GA₃의 처리효과가 전혀 없었으나, 발아율이 40% 이하로 낮았던 처리구에서는 GA₃의 처리효과가 있었다. 그러나 저온습윤처리의 효과는 종자의 휴면성, 후숙도 및 생리적인 연령 등에 따라서 다를 것으로 생각된다. 종자는 저온습윤처리 기간중에도 발아하였는데, 비교적 고온인 15℃보다 5℃와 10℃ 및 5℃-15℃의 변온에서 발아율이 높은 것으로 보아 저온에 의해서 휴면 타파가 된 다음에 발아한 것으로 생각된다.

종자발아 촉진 효과의 결과를 농가에 적용시키기 위하여 종자와 과실에 GA₃를 처리한 다음 야외에 매장하여 그 효과를 검토한 결과, 종자에 GA₃처리 후 파종하는 것이 과실에 GA₃를 처리하는 것보다 발아율이 현저히 향상되었다. 500 mg/L의 GA₃를 처리하였을 때에 발아율이 가장 높았으며 매장 시기가 빠를 수록 발아 촉진효과가 현저하였으며, 12월 이후에 매장하였을 경우에는 10% 이하의 발아율을 보였다. 따라서 오미자를 종자로 대량번식시키기 위해서는 과피를 제거하고, GA₃를 전처리 한 다음에 5-10 cm로 11월 중순 이전에 매장한다면 대조구에 비교하여 약 30% 이상 발아율을 촉진시킬 수 있었다.

2. 오미자로부터 추출한 리그난이 몇가지 채소종자의 발아 및 유묘생육에 미치는 영향

오미자로부터 순수분리한 schisandrin, schisandrin C, gomisin A 및 gomisin N 등 4 종류의 리그난이 무, 고추 및 상추 종자의 발아에 미치는 영향을 조사하였다. 고추종자에 Schisandrin의 처리효과는 10⁻⁷M을 처리하였을 때에 처리 96시간 이후에 발아율이 대조구에 비하여 약간 높았으며, Gomisin A의 처리는 모든 농도에서 발아율이 억제되었으며, 농도가 높을수록 억제효과가 높았다. 그러나 Gomisin N처리는 대조구에 비교하여 모든 농도에서 발아율이 촉진되었다. 무와 상추 종자는 모든 처리구에서 대조구에 비교하여 발아속도가 빨랐다.

발아 초기 즉 48시간 또는 108시간에 종자의 발아율을 대조구를 기준으로 하여서 촉진 또는 억제효과를 비교하였다. 고추종자의 경우에는 schisandrin 처리 48시간 후에는 고농도인 10⁻⁵ M 처리시에 발아율이 촉진되었으나, 10⁻⁶ M 이하의 저농도에서는 오히려 억제되었다. Schisandrin C와 gomisin A는 농도가 낮을 수록 감소하는 경향이었으며, gomisin N은 10⁻⁵

M의 고농도에서는 대조구에 비하여 발아를 억제시켰다. 발아 후기 즉 184시간 이후에 대조구와 비교하여 종자의 발아촉진 또는 억제효과를 비교한 결과, 고추, 상추 및 무의 경우 거의 모든 처리에서 발아율이 대조구와 비교하여 억제되었다. 따라서 본 실험에서 수행한 오미자로부터 분리한 리그난의 경우 생육의 촉진 또는 억제 효과가 있었으므로 식물호르몬 또는 다른 용도의 농약으로서 개발 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

오미자로부터 순수분리한 리그난 성분이 무종자의 유묘생육에 미치는 효과를 대조구와 비교하여 촉진 또는 억제효과를 비교한 결과, Schisandrin과 schisandrin C처리시 하배축의 생육은 10^{-6} M 이하의 농도에서는 농도가 낮을수록 생육이 촉진되었다. 그러나 gomisin A와 gomisin N의 처리시에는 모든 농도에서 생육이 촉진되기는 하였으나, 농도 의존적인 생육의 촉진 또는 억제효과는 나타나지 않았다. 유식물체당 총 생체중 및 건물중을 대조구와 비교하여 촉진 또는 억제효과를 비교한 결과, schisandrin을 처리하였을 경우에는 농도가 높을수록 억제되었으나, 10^{-7} M의 저농도로 처리하였을 때에 현저하게 촉진되었다.

리그난 처리 후 상추 유묘의 총 무게를 비교할 결과, schisandrin과 gomisin A 10^{-5} M 처리시에 생체중과 건물중이 대조구와 비교하여 약간 무거웠으나, 10^{-6} M 이하의 농도에서는 오히려 감소하였다. Schisandrin C처리시에는 10^{-6} M에서 생육억제가 현저하였으며, 그 다음은 10^{-7} M 및 10^{-5} M의 순으로 억제효과가 낮았다.

토마토 유묘의 생체중과 건물중을 대조구와 비교한 결과, schisandrin 처리시에 생체중은 10^{-7} M의 저농도에서 현저히 증가하였으며, gomisin A의 처리시에는 10^{-6} M 이상의 고농도에서는 농도가 증가할 수록 생체중이 감소하였으나, 10^{-7} M의 저농도에서는 생체중이 오히려 촉진되었다. Gomisin N 처리시에는 모든 농도에서 대조구와 비교하여 생체중이 증가되었으며, 농도가 낮을수록 효과는 더 높았다.

3. 식물체의 부위, 채취시기 및 지역별 리그난 함량 분석

우리나라 주요 오미자 재배지인 문경지역의 2 농가를 선정하여 신초발생 이전기인 3월부터 수확기까지 과실, 잎, 줄기, 뿌리 및 땅속줄기 등 식물체의 각 기관별 채취시기에 따른 4가지 리그난 함량의 변화를 비교하였다. 리그난의 함량은 땅속줄기에서 가장 많았는데, 함량이 많은 시기에는 약 10%까지 상승하였다. 그 다음은 과실에서 가장 많았으며, 채취시기에 따라서 함량은 변화는 상당한 차이가 있었는데 6월 21과 7월 6일 사이에 총 함량이 4% 정도로서 수확기의 2%보다 2배 이상 많았다. 잎, 줄기, 뿌리에서는 리그난 함량이 아주 낮았다. 시기별 함량은 일정하게 증가되거나 감소되는 것이 아니라 파동 (fluctuation)이 있었는데, 함량이 sink와 source간에 유연관계가 있을 것으로 예측하였으나, 과실에서 함량이 증가할 때에 다른 영양기관에서도 함량이 증가하였다.

재배지역별 함량의 차이는 M지역에서 재배한 과실의 함량이 가장 많았으며, 다음은 J지역, K지역 및 H지역 순으로 낮았다. 재배지역내에서도 농가간의 차이가 있었고, 4가지 리그난이 차지하는 비율은 항상 일정한 비율로 동일한 것이 아니라 농가 또는 재배지역별로 약간의 차이가 있었다. 이러한 원인은 재배하고 있는 계통간의 차이 또는 기후 환경의 차이 때문일 것으로 추측된다.

제 2세부: 생리활성물질 추출 및 구조 동정

1. Hexane, CHCl₃ 및 MeOH 추출물로부터 성분의 순수 분리 및 구조 동정

오미자로부터 hexane과 CHCl₃으로부터 10종의 lignan을 분리 하였으며, MeOH 추출물로부터 7종의 물질을 순수분리하였다. 순수분리한 물질의 구조분석은 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR의 1D NMR과 Dept-NMR, COSY, HSQC 및 HMBC 등의 2D NMR spectrum, MS spectrum을 이용하여 물질의 구조를 동정하였다.

Hexane 추출물에서 분리된 38개의 분획물 중 SCKH8, SCKH11, SCKH37PA를 선택하여 silica gel open column chromatography를 사용하여 1.1437 g의 schisandrin을 순수 분리함으로써 대량의 분리기술을 획득하였다. Gomisins A는 261.1 mg, gomisins N은 213.4 mg, schisandrin C는 160.9 mg, isoanwulignan은 23.5 mg, angeloylgomisin P는 5.4 mg, gomisins J는 130 mg, gomisins G는 19.1 mg, 그리고 gomisins B는 12.3 mg 및 dimethylgomisins J는 44.6 mg을 순수분리하였다. MeOH추출물로부터는 7종의 물질을 순수분리하였는데, 대부분 유기산의 종류로서 카르복시기를 함유하고 있었다.

2. 활성분획 추적법을 이용한 혈관이완 효능물질의 탐색

Hexane, CHCl₃, 및 MeOH 추출물에 대한 혈관이완효과를 검증 결과, hexane 추출물이 가장 높아 hexane 추출물 120 g으로부터 open column chromatography를 사용하여 38개의 분획물을 얻었다. 38개의 분획물에 대한 혈관이완 측정결과, 혈관이완에 대한 효과가 있었으며, 생리활성이 높은 SCKH29 분획물을 선택하여 활성이 높은 물질을 찾아가는 방법을 통해서 261.1 mg의 gomisins A를 분리하였다. Gomisins A는 혈관의 내피세포 존재 또는 제거시 농도가 증가할수록 혈관 이완력도 증가하여, 오미자 혈관이완 효과의 지표성분으로 지정할 수 있을 것이다.

3. 오미자로부터 순수분리한 생리활성 성분의 검증방법 확립

추출 방법에 따른 lignan 함량 분석을 비교하기 위하여 순차적으로 추출하였을 경우 hexane 추출물에서 4종의 lignan 성분이 모두 추출된 반면, hexane 추출 후 남은 부분을 이용하여 추출한 ethyl acetate, chloroform과 methanol 추출물에서는 lignan이 검출되지 않았다. 각각의 용매를 이용하여 직접 추출 시에는 hexane, CHCl₃, EtOAc, 및 MeOH 추출물에 함유된 리그난의 함량 차이는 경미하였다. 순차적 추출 또는 각각의 용매로 직접 추출의 경우 lignan 함량은 schisandrin이 가장 많았으며, gomisins N, gomisins A, 및 schisandrin C의 순으로 함량이 낮았다.

4. 항염증 및 면역증강 효능 신물질의 순수분리 및 구조 동정

활성분획추적법을 통하여 항염증 및 면역증강 효능이 강한 α-iso-cubebene을 순수분리하였으며, 그 구조를 동정하였다. 아직 보고되지 않은 신물질은 α-iso-cubebene보다 강한 활성을 나타내었으며, 그 기작을 연구 중에 있다.

5. 실험 계획서 외의 추가실험 결과

가. SCI 논문게재

- (1) 오미자로부터 추출된 신물질의 사람 호중구세포에서 CXCL8의 생성과 세포간 칼슘증가 효과 (Identification of a novel compound that stimulates intracellular calcium increase and CXCL8 production in human neutrophils from *Schisandra chinensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications 379 (2009) 928–932)
 - 주요결과 : 오미자로부터 신물질을 추출하여 구조를 밝힌 다음 α -iso-cubebene으로 명명하고, α -iso-cubebene이 intracellular calcium signaling과 CXCL8 생성으로 촉진하여 면역조절 천연물신약 (immune-modulating agent.)으로서 개발 가능성 제시
 - Abstract : *Schisandra chinensis* has been regarded as a useful material in the preventive or treatment of several human diseases. The study of the *Schisandra chinensis*' molecular identity has been prioritized because it has been found to regulate cellular responses. Here, we examined the effects from various extracts of *Schisandra chinensis* to monitor the relative intracellular calcium increase in human neutrophils. We identified an active molecule and structural configuration of a new active compound (α -iso-cubebene), based on the discovery of a cubebene backbone using NMR, MS, and CD spectral data. In terms of its functional aspect, we observed that α -iso-cubebene strongly stimulated CXCL8 production in human neutrophils. Also, α -iso-cubebene-induced CXCL8 production was almost completely inhibited by the calcium chelator, EGTA, thus highlighting the role of calcium signaling in the process. Taken together, our results demonstrate that α -iso-cubebene is a novel natural compound which stimulates intracellular calcium signaling and CXCL8 production. As a result, α -iso-cubebene should be useful for the development of an immune-modulating agent.

- (2) 오미자로부터 순수분리한 Wuweizisu C의 C6 glioma세포에서 membrane potential의 감소 (Wuweizisu C from *Schisandra chinensis* decreases membrane potential in C6 glioma cells. Acta Pharmacol Sin 2008 Sep; 29 (9): 1006–012)
 - 주요결과 : 오미자로부터 순수분리한 wuweizisu C가 membrane potential과 $[Ca^{2+}]_i$ 의 농도를 감소시킨다는 중요한 효과와 기작을 밝힘
 - Abstract : Aim: To study the effects of dibenzocyclooctadiene lignans isolated from *Schisandra chinensis*, such as wuweizisu C, gomisin N, gomisin A, and schisandrin, on the membrane potential in C6 glioma cells. Methods: The membrane potential was estimated by measuring the fluorescence change in DiBAC-loaded glioma cells. Results: Wuweizisu C decreased the membrane potential in a concentration-dependent manner. Gomisin N and gomisin A, however, showed differential modulation and no change was induced by schisandrin or dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate, a synthetic drug derived from

dibenzocyclooctadiene lignans. We found no involvement of Gi/o proteins, phospholipase C, and extracellular Na⁺ on the wuweizisu C-induced decrease of the membrane potential. Wuweizisu C by itself did not change the intracellular Ca²⁺ [Ca²⁺]_i concentration, but decreased the ATP-induced Ca²⁺ increase in C6 glioma cells. The 4 lignans at all concentrations used in this study did not induce any effect on cell viability. Furthermore, we found a similar decrease of the membrane potential by wuweizisu C in PC12 neuronal cells. Conclusion: Our results suggest that the decrease in the membrane potential and the modulation of [Ca²⁺]_i concentration by wuweizisu C could be important action mechanisms of wuweizisu C.

나. SCI 투고중인 논문

(1) 오미자로부터 순수분리한 gomisin N의 hepatic carcinoma의 pro-apoptotic과 강력한 세포증식 억제효과 (Gomisin N isolated from *Schisandra chinensis* was significantly induced anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the hepatic carcinoma)

- 주요결과 : 인체 hepatic carcinoma의 세포증식과 세포사멸을 유도하는 항암제 후보물질의 가능성 제시.
- ABSTRACT : A lignans isolated from *Schisandriachinensis* were generally prescribed in anti-cancer and anti-hepatitis in Chinese medicine. To investigate the new function of compounds isolated from *Schisandria chinensis* on therapy of hepatic carcinoma, the killing ability of lignans were screened with cell proliferation assay. Especially, Gomisin N showed the high killing ability for hepatic carcinoma compare with other compounds. Furthermore, cell morphology and flow cytometry analysis showed that this compounds were only induced the cell death at high concentration, while did not induce the any change of cell death at low concentration. In addition, the expression level of Bcl-2 and Bax protein involving in apoptotic pathway were markedly increased in only 320 uM treated group compare to vehicle and other treated groups, while the expression level of p53 protein remained unchange in this condition. Thus, these results suggest the possibility that Gomisin N should be considered as candidate of anti-cancer to inhibit the proliferation of human hepatic carcinoma and induce apoptosis.

(2) 오미자 추출물의 항동맥경화 효과

- 오미자로부터 순수분리한 신물질 1종과 리그난 성분의 활성을 검증한 결과, SCKH1PA로부터 세계최초로 분리된 신물질인 SCKH1PAIBPB에 의해 VCAM-1 및 E-selectin과 같은 주요 세포부착분자 뿐만 아니라 IL-6 및 IL-8과 같은 주요 염증성 사이토카인 유전자의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었으며, 동맥경화증의 발병기전에 가장 중요한 매개인자로 알려진 VCAM-1 유전자 및 단백질의 발현을 매우 유의하게 억제한다는

중요한 사실을 증명할 수 있었다. 그리고 SCKH1PAIBPB는 혈관내피세포와 단핵세포 사이의 부착능력도 감소시켰다. 또한 gomisins N, gomisins J, SCKH7, SCKH9등은 혈관내피세포의 증식을 촉진하였고 SCKH7과 SCKH9는 혈관내피세포의 생존능을 증가시켰다. LPS로 자극한 혈관내피세포에서 오미자 핵산 추출물 중 SCKH10, SCKH19 및 SCKH1PA는 E-selectin의 발현을 감소시켰고, SCKH19, SCKH1PA, SCKH7, SCKH9, SCKH13 및 SCKH17은 ICAM-1의 발현을 감소시켰으며 SCKH1PA는 VCAM-1의 발현을 억제하였다. 또한 SCKH1PA는 MCP-1, IL-6 및 IL-8의 발현도 감소시켰으며 혈관내피세포와 단핵세포 간의 부착능력도 감소시켰다.

다. 투고 계획중인 결과

(1) CCl₄를 이용한 급성간염유발 쥐에서 Gomisins A의 항간염 효과

- 주요결과 : 오미자로부터 다량 분리한 Gomisins A의 간대사에 미치는 영향을 분석하기 위하여 SD랫드에 CCl₄를 이용하여 간 독성을 유발하고 Gomisins A를 처리한 후 다양한 생리화학적 지표 분석과 효능 검증
- 실험동물의 체중에는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 신장, 심장, 폐 등의 장기에 도 영향이 없었다. 그러나 간은 CCl₄만을 처리그룹보다 Gomisins A와 CCl₄를 동시에 처리한 집단에서 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과를 바탕으로 간 조직내에 세포의 변화를 관찰하기 위하여 조직학적 분석을 실시하였으며, CCl₄ 그룹은 조직세포의 파괴가 뚜렷이 관찰되었으나 Gomisins A를 처리한 집단은 CCl₄에 의한 세포파괴현상이 현저히 감소됨을 관찰하였다. 또한 간 조직의 기능을 나타내는 지표의 분석에서, ALP, AST, ALT 등은 CCl₄에 의해서 증가된 후 Gomisins A에 의해서 유의적으로 감소하는 것으로 관찰되었다. Gomisins A가 간 조직의 신호전달과정에 미치는 영향을 분석하기 위하여 MAP kinase에 의한 신호전달 단백질의 변화를 관찰하였다. 그 결과 ERK, JNK, p38 단백질의 인산화가 CCl₄에 의해서 유의적으로 감소되었다가 Gomisins A 처리에 의해 증가되는 것을 확인하였다. 이상의 결과로 볼 때, Gomisins A는 CCl₄에 의해 유발된 간독성을 유의적으로 개선시켜주는 효과가 있으며, 이러한 효능은 세포내 신호전달과정인 MAP kinase pathway가 관여함을 증명하였다.

(2) Induction of G1 arrest and apoptosis by schisandrin C in human leukemia U937 cells

- 주요결과 : Schisandrin C에 의한 인체혈구암세포인 U937 세포에서의 증식억제 및 형태변화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있었으며, 이러한 apoptosis 유발에는 죽음의 수용체, Bcl-2 family 및 IAP family의 발현변화와 그에 따른 caspase-3의 활성화의 변화에 의한 기질단백질들의 단편화 현상과 직접적인연관성이 있음을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 schisandrin C의 생화학적 항암기전과 연관된 실험의 기초자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

(3) 오미자로부터 순수분리한 성분의 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성 억제 효과

- 주요결과 : 오미자로부터 순수분리한 성분을 멜라닌 합성과 tyrosinase의 활성 억제 효과를 검토한 결과 오미자의 MeOH추출물로부터 활성이 강한 성분을 찾아 내었고, 그

기작을 규명한 다음 미백제로서의 개발 가능성을 검토하기 위하여 추후에 연구를 계속 진행 할 것이다.

(4) HTS를 이용한 활성 검증 및 작용기작 규명

- 오미자는 항암, 항간염, 미백효과 등의 다양한 질병을 치료하기 위해 사용되었다. 본 실험에서는 오미자로부터 리그난과 메탄올 추출물로부터 순수분리한 성분 등 15종의 성분들이 큰포식세포에서 inducible NO synthase (iNOS) 유전자의 발현을 억제시키는 기전을 밝혀내기 위하여 수행하였다. 본 실험에서 Western blot분석에 의하면 오미자로부터 순수분리한 성분의 처치는 쥐의 큰포식세포 RAW 264.7 세포군에서, 일산화질소 생성과 iNOS전사를 억제한다는 것을 확연하게 밝혀내었다. 본 연구에서 가장 중요한 발견은 YSCH12003이 확실히 iNOS의 발현을 억제하였다는 것이다. 결론적으로 본 실험은 신물질은 YSC12003가 큰포식세포에 작용하여 iNOS유전자발현 억제를 통하여 일산화질소의 생성을 억제한다는 것을 보여주었다. 이러한 효과는 오미자로부터 순수분리한 YSCH12003의 천연물신약으로 개발하기 위하여 전임상 실험을 수행 한 후에 앞으로 계속적으로 수행되어야 할 과제이다.

제 3세부: 기능성 제품 개발

오미자의 원료가공과정 중 건조 및 추출공정의 적정조건을 도출하기 위하여, 각 건조방법 및 조건 그리고 각 추출방법 및 조건을 임의로 설정하고 가공한 원료의 휘발성 terpene류의 함량과 색의 변화를 비교하였다.

생오미자의 GC/MS 분석 결과, 15종의 monoterpene류, 28종의 sesquiterpene류 및 7종의 terpene alcohol류가 확인되었다. 그러나 50°C와 70°C의 열풍건조, -70°C의 진공동결건조의 3종 방법으로 시행한 건조과정의 초기에 생오미자 terpene류의 절반이상이 감소되었으며, 그 후 건조기간의 경과에 따른 추가적 감소는 아주 적었다.

그리고 terpene alcohol류는 진공동결 건조한 시료에서 그 함량이 비교적 많이 남았으나, 고온인 70°C에서 열풍건조한 시료에서는 가장 적게 남아 있었다. 건조방법에 따른 L값은 동결건조, 50°C 열풍건조, 70°C 열풍건조 순서로 높았으며, a값 및 b값도 동결건조에서 가장 높았으며 70°C 열풍건조에서 가장 낮게 나타났다. 따라서 50°C 열풍건조의 경우 색도의 소폭 퇴화, 테르펜함량의 감소가 다소 있더라도 시간적, 경제적 효율을 감안하면 동결건조 및 70°C 열풍건조에 비하여 적절한 공정이라고 결론을 내렸다.

추출공정별 비교에서는, 온침법이 타 추출법보다 월등히 높은 terpene함량을 나타냈으나 색도의 퇴색이 가장 많았다. 반면에 감식초를 첨가한 냉침법은 비록 terpene의 추출량은 온침법에 비하여 적지만 pH를 낮춰줄 뿐 아니라 감식초 내에 존재하는 성분에 의해 효율적인 추출이 이뤄졌다고 추정되며, 성분의 열변성 및 파괴가 일어날 수 있는 고온의 온침법을 대체하고 pH를 내릴 수 있는 가장 효율적인 방법이라고 판단하였다.

오미자원료의 가공공정을 활용하여 오미자음료, 오미자와인, 오미자브랜드, 오미초 및 schizandrin 고농축캡슐의 5종의 가공품의 원료배합비율, 제조공정을 개발하고 각 시제품을 제작하였다. 오미자음료, 오미자와인 및 오미초는 상용이 즉시 가능할 수준이나, 오미자브랜드는 주도가 목표수준보다 낮아 향후 실용화 단계에서는 다단연속식 증류기의 적용이 필요하

며, 주도를 목표수준 만큼 높였을 때 관능적 품질검사가 추가되어야 한다. 또한 schizandrin 고농축캡슐은 실험단계상 캡슐 충전이 현실적으로 불가능하여 미완의 부분으로 남겨졌다.

제 4세부: 생리활성 검정

본 세부과제에서는 오미자로부터 순수 분리된 물질 및 중간분획을 이용해, 다양한 세포의 이동, 증식, 사멸, 활성산소 생성 및 혈관의 이완/수축에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 다수의 순수 분리물질에 대한 생리활성을 검증하였고 그 작용기전을 규명하였으며 일부 중간 분획에서 위에 언급한 생리활성 작용이 있음을 규명하였다. 특히 순수 분리된 리그난 계열의 물질이 배아섬유세포의 이동을 강력하게 촉진함을 규명하였고, 세포의 이동이 Gi 단백질의 저해제인 pertussis toxin에 의해 완전히 봉쇄됨을 보임으로써 리그난 계열에 의한 세포의 이동 촉진은 Gi가 결합되어 있는 수용체를 경유함을 짐작할 수 있었다. 이러한 결과들과 더불어 리그난 계열에 의한 세포의 이동은 LPA 수용체의 길항제인 Ki16425에 의해 완전히 봉쇄됨과 동시에 PDG에 의한 세포 내 칼슘유리 또한 Ki16425에 의해 완전히 봉쇄됨으로써 리그난 계열에 의한 세포의 이동에는 LPA 수용체의 활성화 및 칼슘유리가 관여함을 알 수 있었다. 마지막으로 리그난 계열에 의한 세포의 이동은 PI3K의 저해제인 LY294002에 의해 봉쇄되었으며 Akt1이 없는 배아섬유세포는 리그난 계열에 의한 세포의 이동이 저해되었으나 Akt2가 결손된 배아섬유세포는 리그난 계열에 의한 세포의 이동이 정상적으로 일어남을 확인할 수 있었기 때문에 리그난 계열에 의한 세포의 이동에는 Akt1 동위효소가 특이적으로 관여함을 밝혔다. 따라서 식물체에 다량으로 존재하는 리그난 계열은 세포의 이동을 LPA 수용체를 활성화 시켜 조절함을 알 수 있었고 여기에는 칼슘 유리 및 Akt1 신호전달 체계가 신호전달을 매개함을 알 수 있었다.

또한 본 연구과제에서는 오미자는 한국의 폐경기 이후의 여성에 대한 혈관 건강을 향상시키는데 사용하고 있다는 사실에 착안하여 오미자의 효과에 대한 과학적 근거를 제시하고자 하였다. 오미자에서 추출한 Gomisins A는 내피세포가 존재하는 흉부 대동맥에서 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰을 뿐만 아니라, N(G)-nitro-L-arginine 혹은 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-one으로 전처리하여 내피세포를 제거하였을 때에도 Gomisins A의 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰지만 그 정도는 내피세포 존재시보다는 약했다. Gomisins A에 의한 대동맥에 NO의 생성 증가 또한 확인했다. 내피세포 비존재 시, Gomisins A에 의한 혈관 이완은 MLC phosphatase 저해제인 calyculin A에 의해 명백하게 저해되었다. 또한 phenylephrine에 의해 MLC phosphorylation이 증가된 비율도 Gomisins A에 의해 상당히 감소하였다. 이러한 결과를 바탕으로, Gomisins A는 부분적으로 내피세포에 의존하여 NO 경로를 통하고, 부분적으로는 MLC dephosphorylation을 통해서 혈관의 이완을 유도한다는 것을 알 수 있었다. 또한 오미자 핵산 추출물이 내피세포 존재의 유무에 관계없이 농도 의존적으로 흉부 대동맥을 이완시켰다.

오미자 핵산 추출물의 이완력은 내피세포가 존재했을 때 더 눈에 띄게 좋았다. 오미자 핵산 추출물의 혈관 이완력은 산화질소 합성 저해제인 L-NAME, sGC 저해제인 ODQ에 의해 저해되었지만, 칼륨 채널 저해제인 tetraethylammonium에 의해 저해되진 않았다. 또한 오미자 핵산 추출물의 혈관 이완 효과는 eNOS activation 뿐만 아니라, NO signal pathway를 통해서 유도되었다. 내피세포를 제거했을 시, 오미자 핵산 추출물의 혈관 이완력은 MLC phosphatase

저해제인 calyculin A에 의해 저해되었지만, MLC kinase 저해제인 ML-9에 의해서는 저해되지 않은 점으로 보아, 오미자 핵산 추출물의 혈관 이완 효과는 MLC phosphatase activation 경로와 관련이 있음을 알수 있었다. phenylephrine에 의해 MLC phosphorylation이 증가된 비율도 오미자 핵산 추출물에 의해 상당히 감소하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 다수의 연구논문과 특허 출원/등록을 하였으며 이는 기초의학 연구발전뿐만 아니라 오미자를 이용한 면역억제제, 고혈압치료제, 상처치료제 등 산업화를 이룰 수 있는 기반을 확보했다고 볼 수 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

제 1세부 : 대량번식 체계 확립

1. 생장조절제, 저온습윤처리 및 매장방법의 개발을 통한 종자의 휴면 타파

가. 연구성과 : 생장조절제를 처리하지 않았을 경우에는 종자의 휴면으로 인하여 전혀 발아하지 않았으나, GA₃ 처리로 17% 발아 촉진, 습윤처리와 GA₃ 동시처리로 약 75%, 매장과 GA₃ 동시 처리로 80% 발아율까지 발아율 촉진시킬 수 있었으며 종자의 대량휴면타파 방법 확립

나. 성과활용 : 육묘농장 또는 농가의 자가 육묘시에 활용

2. 오미자로부터 순수분리한 리그난의 발아 및 생육효과

가. 연구성과 : 오미자로부터 순수분리 한 리그난의 종류 또는 농도에 따라서 종자의 발아 및 유묘의 생육촉진 효과

나. 성과활용 : 현재까지의 연구결과와 종자의 휴면 타파 또는 유도 등에 미치는 영향을 검토한 후에 생장조절제로서 가능성 제시

3. 채취시기, 식물체의 기관 및 재배지역에 따른 리그난 성분 함량 비교

가. 연구성과 : 오미자의 주요 생리활성물질인 리그난의 함량이 가장 많은 시기는 수확시기인 9월 중순이 아니었고, 7월 말경이었다. 재배지역에 따라서 상당한 차이를 나타냄

나. 성과활용 :

- 가공용 또는 리그난 생산용 등의 목적에 따라 오미자의 채취시기 규명.
- 농가 또는 가공식품회사에서 품질 평가 방법으로서 활용이 가능함.
- 재배지역 또는 농가에 따라서 리그난의 함량 차이가 달랐는데, 이러한 결과는 고품질의 균일한 오미자 공급이 불가능 할 것이다. 따라서 본 연구의 결과 활용시 고품질의 균일한 생리활성 성분을 함유한 고품질 오미자 공급이 가능함.

제 2세부: 생리활성물질 추출 및 구조 동정

1. Hexane과 CHCl₃로부터 리그난 생리활성물질의 순수분리 및 구조동정

가. Hexane 추출물로부터 순수물질 분리

(1) 연구성과

- 신물질 : 2종 이상
- 대량분리 (Schisandrin : 약 5 g, Gomisin A, Gomisin N, Schisandrin C : 약 1 g 이상)
- 총 분리 종류 : 리그난 9종, Chamigrenal

(2) 성과활용

- 신물질의 생리활성 검증 후 천연물 신약으로 개발하기 위해서 다양한 제약회사와 논의 중에 있음.
- 순수분리물질의 다양한 생리활성검증으로 오미자의 기능별 표준화 지표 선정

나. 활성추적법을 이용한 혈관이완 촉진효능 성분의 순수분리

(1) 연구성과 : 고혈압억제제로 사용이 가능한 혈관이완 효능이 있는 성분의 대량 순수분리 (1 g 이상)로 실용화 가능

- (2) 성과 활용 : 본 연구팀이 혈관이완 효과를 최초 규명한 결과를 산업화하기 위해서 건강 기능성식품을 개발하기 위하여 동물실험을 준비 중에 있으며, 동물실험 효능 검증 후 산업화 가능성 높음

다. 오미자로부터 천연물신약의 후보물질인 신물질의 순수분리

(1) 연구성과

- 항염증 및 면역증강 효능 신물질의 순수분리 및 구조동정 : 1 종 다량 분리 가능
- 항암 및 항염증 효능 신물질의 순수분리 및 구조동정 : 1종

(2) 성과활용 :

- 천연물 신약개발을 위해서 국내 특허와 유니테프로부터 특허출원 지원금을 받아서 국제 특허 (PCT)을 준비 중에 있음
- 제약회사와 천연물신약으로 개발하기 위해서 공동연구 논의 중에 있음

2. MeOH 추출물로부터 리그난 생리활성물질의 순수분리 및 구조 동정

(1) 연구성과:

- 순수분리 물질 : 7종
- 신물질 : 1종
- 생리활성 효능 (미백효과 : 1종, 항염증 : 1종)

(2) 성과활용

- 천연물 미백화장품으로 개발하기 위해서 작용기작 등을 연구 중에 있음

3. 추출방법이 리그난 성분 추출효율에 미치는 영향

(1) 연구성과 : 품질표준화 기준 확립

(2) 성과활용 :

- 가공공장의 제품 품질 평가시에 활용
- 농가의 고품질 오미자 생산을 위한 품질 평가 자료로 활용

4. 계획서 이외의 연구결과

(1) 연구성과

- 오미자로부터 추출한 신물질인 α -iso-cubebene의 면역증강 효능 증명 : 천연물의 추출에 관한 연구내용은 포함되어 있으나, 면역 및 항염증에 관한 시험을 포함되어 있지 않았음
- C6 glioma cell에 Wuweisizu C의 효능 검증
- 간암세포에 대한 Gomisins N의 항암 효과 검증
- 동물실험을 통한 Gomisins A의 간염증 효능성분의 증명 및 기작 구명
- 항동맥경화 효능 신물질의 증명
- 혈구암세포에 대한 Schisandrin C의 세포사멸 효능 검증 및 기작 규명
- 미백효과 신물질의 기작 및 효능 검증 (MeOH추출물로부터 순수분리한 신물질)
- Hexane 추출물로부터 순수분리한 신물질의 항암 효능 검증 및 항염증 효과 (항염증 효과는 이미 보고 한 성분보다 수십배 이상 높음, 항암 효과가 아주 낮은 농도에서 있으므로 기작 규명 중에 있음)

(2) 성과활용

- 국내 특허 출원 중에 있으며, 유니테프로부터 PCT특허 출원지원금을 받아서 출원 중에 있으며 산업화를 위해서 동물실험 계획 중에 있음

- 천연물 신약으로서 개발하기 위하여 제약회사 및 식품회사와 가능성 검토 중
- MeOH 추출물로부터 분리한 성분은 효능이 상당히 높기 때문에 천연물화장품으로서 가능성 검토 중

제 3세부: 기능성 제품 개발

(1) 연구성과

- 오미자를 이용한 가공품을 개발하기 위하여 먼저 오미자의 원료가공과정 중 건조 및 추출공정의 적정조건을 도출하였으며, 이 공정을 활용하여 오미자음료, 오미자와인, 오미자브랜디, 오미초 및 schizandrin 고농축캡슐의 5종의 가공품의 원료배합비율, 제조공정을 개발하고 각 시제품의 제작.
- 오미자음료, 오미자와인 및 오미초는 상용이 즉시 가능할 수준이나, 오미자브랜디는 주도가 목표수준보다 낮아 향후 실용화 단계에서는 다단연속식 증류기의 적용이 필요하며, 주도를 목표수준 만큼 높였을 때 관능적 품질검사가 추가되어야 함.
- Schizandrin 고농축캡슐 증진용으로 개발 가능성 도출.

(2) 활용계획

- 오미자음료, 오미자와인 및 오미초는 상용이 가능하여 협력업체 등 관련업체에의 기술이전 계획 중에 있음.
- 오미자브랜디는 주도가 목표수준보다 낮아 향후 생산 희망업체가 있을 경우 산업체의 다단연속식 증류기를 적용하여 주도를 목표수준 만큼 높인 후 시제품의 품질을 검토하여 대량생산 여부를 결정하여야 함.
- schizandrin 고농축캡슐의 경우 산업화를 희망하는 업체와 본 연구진이 개별기준 및 규격'의 작성 및 허가과정을 거친 후 실제 생산이 가능함.

제 4세부: 생리활성 검정

(1) 연구성과

- Pinoreosinol 4,4'-di-O-β-D-glucoside(PDG)가 lysophosphatidic acid (LPA) 수용체를 통해 세포내 칼슘을 유리하고 세포의 이동을 촉진하며 여기에는 PI3K/Akt 신호전달 기전을 경유함을 밝힘.(연구논문: Phytomedicine 2009.02.03; 특허출원: 10-2008-0068474)
- 오미자로부터 순수 분리된 Gomisin A가 NO 형성을 촉진함으로써 대동맥 혈관의 이완을 촉진한다는 것을 밝힘. (연구논문: Planta Medicine 2007.12.01; 특허등록: 10-2007-0060558)
- 오미자의 핵산 추출물이 대동맥 혈관의 이완을 촉진한다는 것을 밝힘. (연구논문: J. Ethnopharmacology 2009.01.12; 특허출원: 10-2008-0053169, 10-2008-0053209)

(2) 성과활용

- PDG를 실험연구를 위한 LPA 수용체 효현제 또는 세포내 칼슘유리 물질로 산업화 할 예정이며 이미 출원된 특허를 등록하여 세포이동 및 칼슘유리가 관련되어 있는 면역억제제 및 상처치료제로 개발하여 활용할 예정임.
- Gomisin A는 이미 혈관이완 촉진물질로 특허가 등록된 상태이며 이를 이용해 차후 혈

관 수축성 고혈압 완화제로 개발하여 산업화를 이룰 예정이며 실험연구 중에 혈관이완 촉진제로 개발하여 활용할 예정임.

- 기타 핵산 분획 등 부분 분리된 오미자 추출물을 NO 형성 촉진물질로 활용할 예정이며 이들의 혈관생리조절 기전에 대한 연구를 수행할 예정임.

SUMMARY

Subject 1. Establishment of Mass propagation with seeds and practical use of lignans for seed germination and seedling growth

1. Improvement of seed germination via seed dormancy breaking

In effort to elucidate and break the seed dormancy in Omija, the treatment plant growth regulators (PGRs) was conducted. However, the treatment of PGRs only was not effective for breaking seed dormancy. Seed dormancy breaking was not successful with Auxin and Cytokinin, but 1,000 mg/L GA treatment resulted in a low germination at the rate of 17%. For seed propagation, the seeds were treated in a humid and low temperature condition. At 30 day treatment, the germination rate was 0%, but highest at fluctuated temperatures. The germination rate was higher than 75% at 10°C for 60 days, which can be practically used. The treatment at 15°C following at 5°C showed higher germination than independent treatment of the two temperature, indicating better effects of alternative temperature treatment for dormancy breaking. GA₃ improved the germination rate when treated to the condition showing germination rate lower than 40%, but no beneficial effect of GA₃ treatment was shown from the condition at low temp of 5°C and humid condition which was effective for seed germination. However, it was considered that the effect of low temperature and humid condition may vary depending on different levels seed dormancy, maturation, physiological growth stages. Seeds were germinated during the treatment of low temp. humid condition. Given that higher better germination was observed from relatively low 5 and 10°C or from successive temp. of 5~15°C compared to 15°C, it was considered that seeds may germinate after dormancy break by low temperature.

In order to apply the germination results for the growers, the seeds and fruits were treated by GA₃ and buried under the ground. significantly improved germination was observed from seeding after seed treatment with GA₃ than fruits, The treatment of 500 mg/L GA₃ resulted in the best germination, and it's effect was better as the time of burring was earlier: Burry after December resulted in only 10% germination rate. In conclusion, germination rate was promoted up to 30% compared to control by eliminating the epicarp and burying 5~10 cm underground before mid-November after GA₃ treatment.

2. Effects of lignan extracted from chinensis on seed germination and seedling growth in several vegetables

The effects of four types of lignan, schisandrin, schisandrin C, gomisin A and gomisin N extracted from Omija on seed germination of radish, pepper, and lettuce was investigated. For effect of Schisandrin on pepper seeds, the treatment of 10^{-7} M showed better germination after 96 hrs compared to control. The treatment of Gomisin A suppressed the germination at all treatments and the suppressing effects increased as the concentration increased. However, Gomisin N treatment promoted the germination at all concentration compared to control. For radish and lettuce seeds, all treatment facilitated the germination compared to control

The treatment effect on germination at the early germination stage of 48 hr and 108 hr was compared to controls. The germination of pepper seeds treated by 10^{-5} M schisandrin was improved at 48 hr post-treatment(hpt), while it was suppressed at the concentration lower than 10^{-6} M. For treatment by Schisandrin C and gomisin A, the seed germination rate tended to decrease as the concentration decreased, while gomisin N of 10^{-5} M suppressed the germination compared to control. The comparison of the effects on the germination at 184 pth to control showed that the germination of pepper, lettuce and radish was suppressed by all cases of the treatment. Therefore, the promoting or suppressing effects of lignans extracted from Omija on plant growth, it is considered that this materials has can be developed as a new type of PGR or an agrichemical of alternative purpose.

The comparison of effects of lignan extracted from Omija on seedling growth of radish to control showed that the growth of hypocotyl was improved by the treatment with schisandrin and schisandrin C of 10^{-6} M or lower concentrations. Even though when gomisin A and gomisin N were treated, the seedling growth was promoted at all concentrations, but no concentration-dependent effect on the growth was observed.

When schisandrin was treated, fresh weight and dry weight of each plantlet decreased as the concentration of schisandrin increased while they were significantly increased by the treatment of a low concentration of 10^{-7} M.

By treating schisandrin and gomisin A, fresh and dry weights of radish plantlets slightly increased at 10^{-5} M, but decreased at 10^{-6} M or lower concentrations. Significant suppression effect of Schisandrin C on plant growth was observed at 10^{-6} M but decreased in order of 10^{-7} M and 10^{-5} M.

Significantly increase in fresh weight for tomato was observed when the plant was treated by Schisandrin of 10^{-7} M. For the treatment of gomisin at high concentration above 10^{-6} M, the fresh weight decreased as the concentration increased, but rather increased at a low concentration of 10^{-7} M. For the treatment of Gomisin N, fresh weight increased at all concentrations, and at the lower concentrations the better effects were observed.

3. Analysis of lignan contents depending on plant organs, collection times and cultivation areas

Two growers in Moongyeong city, a major Omija production areas were selected, and changes in the contents of four lignans depending on organ collection times were investigated for the fruit, leaf, stem and root across March to harvest season. Underground stem had the highest amount of lignan of 10% at its peak season. Second highest amount was observed from the fruit, for which significant changes in lignan content occurred depending on the tissue collecting time; the amount between June, 21 and July 6 was 4% which was two times higher than 2% at the harvest season. Very low lignan content was detected from leaf, stem, root. Seasonal lignan contents fluctuated without constant increase or decrease, and unlike the anticipation for the presence of sink-source relationship, the content in other vegetative organs increased as the content in the fruit increased.

For lignan contents in different cultivation area, the fruit produced from M area had the highest content, followed by J, K, and H area. The lignan contents varied among the different farmers within the same location, and the contents of four lignans was not identical at a constant rate but different depending on farmers and locations. This may be due to the differences in plant genotypes cultivated or climatic conditions.

Subject 2. Isolation and elucidation of structure of pure compounds

1. Isolation and elucidation of structure from Hexane, CHCl₃ and MeOH extracts

The pure lignans were isolated from hexane, CHCl₃ and MeOH extracts of *Schisandra chinensis* grown in MunKyoung and their structures were elucidated by using ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and Dept NMR. The highest vasorelaxation activity was observed from the hexane extract, and we obtained 38 fractions from 120 g of hexane extract through open column chromatography on a silica-gel.

Among 38 fractions separated from hexane extracts, SCKH8, SCKH11, and SCKH37PA were chosen, and 1.1437 g of pure schisandrin, including 261.1 mg of gomisin A, 213.4 mg of gomisin N, 160.9 mg of schisandrin C, 23.5 mg of isoanwulignan, 5.4 mg of angeloylgomisin P, 130 mg of gomisin J, 19.1 mg of gomisin G, 12.3 mg of gomisin B and 44.6 mg of dimethylgomisin J, was obtained by open column chromatography. We have got 7 pure compounds from MeOH extracts and one novel compounds of 7 compounds.

2. Development of vasorelaxating compounds using activity-guided fractionation

The 38 fractions demonstrated effectiveness on vasorelaxation activity. Gomisin A from the fraction SCKH29 was designated an indicator's compound of vasorelaxation in *Schisandra chinensis*. In both endothelium-intact and endothelium-denuded vascular treatment, the effectiveness on vasorelaxation increased as the amounts of gomisin A increased.

3. Quantitative determination of lignan constituents in organs from *Schisandra chinensis* by HPLC

In the comparison of extraction efficiency of two different methods, all four kinds of lignan were detected from hexane extracts when successive extraction was employed: no lignan was detected from chloroform, ethyl acetate, or methanol extracts obtained from the remaining samples derived after hexane extraction. On the other hand, when directly extracted using each of the solutions, no significantly different amounts of lignans were observed from hexane, CHCl₃, EtOAc, and MeOH extracts. In both case of successive extraction and direct extraction using each solutions, schisandrin was obtained in the highest amount, and the amount decreased in the order of gomisin N, gomisin A, and schisandrin C.

4. Additional Experiments

가. SCI Printed

(1) Identification of a novel compound that stimulates intracellular calcium increase and CXCL8 production in human neutrophils from *Schisandra chinensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications 379 (2009) 928–932

○ Abstract : *Schisandra chinensis* has been regarded as a useful material in the preventive or treatment of several human diseases. The study of the *Schisandra chinensis*' molecular identity has been prioritized because it has been found to regulate cellular responses. Here, we examined the effects from various extracts of *Schisandra chinensis* to monitor the relative intracellular calcium increase in human neutrophils. We identified an active molecule and structural configuration of a new active compound (α-iso-cubebene), based on the discovery of a cubebene backbone using NMR, MS, and CD spectral data. In terms of its functional aspect, we observed that α-iso-cubebene strongly stimulated CXCL8 production in human neutrophils. Also, α-iso-cubebene-induced CXCL8 production was almost completely inhibited by the calcium chelator, EGTA, thus highlighting the role of calcium signaling in the process. Taken together, our results demonstrate that α-iso-cubebene is a

novel natural compound which stimulates intracellular calcium signaling and CXCL8 production. As a result, α -iso-cubebene should be useful for the development of an immune-modulating agent.

(2) Wuweizisu C from *Schisandra chinensis* decreases membrane potential in C6 glioma cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008 Sep; 29 (9): 1006-012

- Abstract : Aim: To study the effects of dibenzocyclooctadiene lignans isolated from *Schisandra chinensis*, such as wuweizisu C, gomisins N, gomisins A, and schisandrin, on the membrane potential in C6 glioma cells. Methods: The membrane potential was estimated by measuring the fluorescence change in DiBAC-loaded glioma cells. Results: Wuweizisu C decreased the membrane potential in a concentration-dependent manner. Gomisins N and gomisins A, however, showed differential modulation and no change was induced by schisandrin or dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate, a synthetic drug derived from dibenzocyclooctadiene lignans. We found no involvement of Gi/o proteins, phospholipase C, and extracellular Na⁺ on the wuweizisu C-induced decrease of the membrane potential. Wuweizisu C by itself did not change the intracellular Ca²⁺ [Ca²⁺]_i concentration, but decreased the ATP-induced Ca²⁺ increase in C6 glioma cells. The 4 lignans at all concentrations used in this study did not induce any effect on cell viability. Furthermore, we found a similar decrease of the membrane potential by wuweizisu C in PC12 neuronal cells. Conclusion: Our results suggest that the decrease in the membrane potential and the modulation of [Ca²⁺]_i concentration by wuweizisu C could be important action mechanisms of wuweizisu C.

4. SCI submitted

(1) Gomisins N isolated from *Schisandra chinensis* was significantly induced anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the hepatic carcinoma

- ABSTRACT : A lignans isolated from *Schisandriachinensis* were generally prescribed in anti-cancer and anti-hepatitis in Chinese medicine. To investigate the new function of compounds isolated from *Schisandria chinensis* on therapy of hepatic carcinoma, the killing ability of lignans were screened with cell proliferation assay. Especially, Gomisins N showed the high killing ability for hepatic carcinoma compare with other compounds. Furthermore, cell morphology and flow cytometry analysis showed that this compounds were only induced the cell death at high concentration, while did not induce the any change of cell death at low concentration. In addition, the expression level of Bcl-2 and Bax protein involving in apoptotic pathway were markedly increased in only 320 μ M treated group compare to vehicle and other treated groups, while the

expression level of p53 protein remained unchanged in this condition. Thus, these results suggest the possibility that Gomisins should be considered as candidates of anti-cancer to inhibit the proliferation of human hepatic carcinoma and induce apoptosis.

(2) The effect of pure compound from Omija on anti-arteriosclerosis

- The activity evaluation of a new compound extracted from Omija including lignans indicated that the gene expression for major adhesion molecules like VCAM-1 and E-selectin and inflammatory cytokines like IL-6 and IL-8 could be reduced by SCKH1PAIBPB which has been isolated from SCKH1PA for the first time. In addition, our results suggested an evidence that the new compound significantly suppressed the expression of VCAM-1 gene and protein which has been known as the most important intermediate in the pathogenesis of atherosclerosis. SCKH1PAIBPB also reduced the adhesion property between Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and single nucleic cell. Gomisins N, gomisins J, SCKH7, SCKH9 promoted the propagation of blood cells in veins, and SCKH7 and SCKH9 promoted the survival of HUVECs. Among the omija hexane extracts, SCKH10, SCKH19 and SCKH1PA suppressed the gene expression of E-selectin in HUVECs stimulated by LPS. SCKH19, SCKH1PA, SCKH7, SCKH9, SCKH13 and SCKH17 down regulated the expression of ICAM-1 and SCKH1PA suppressed the expression of VCAM-1. SCKH1P reduced the expression of MCP-1, IL-6 and IL-8 in addition to the adhesion between HUVECs and single-nuclear cell.

㉔. Research papers in preparation for SCI journal publication

(1) Antihepatitis effect of Gomisins on acute hepatitis in rat induced by CCl₄

- No significant difference in weight of the tested rats and no effect on kidney, heart, and lung was detected. However, for liver, the weight significantly increased from the simultaneous treatment of Gomisins and CCl₄. Anatomical analysis was performed for the observation of cellular changes in liver tissue. Clear destruction of tissue cells was observed from CCl₄ group, while cell damage was distinctly reduced in Gomisins treated group. In addition, from index test for liver tissue function, it was evident that ALP, AST, ALT increased by CCl₄ and then significantly reduced by Gomisins. The effect of Gomisins on signal transduction in liver tissue was evaluated based on the changes in MAP kinase-mediated transduction protein. The phosphorylation of ERK, JNK, p38 protein was significantly reduced, but recovered by Gomisins. In conclusion, our results indicated that Gomisins has influenced the recovery of liver from hepatitis induced by CCl₄, and the cellular signal transduction pathway of MAP kinase was associated with this effect.

- (2) Induction of G1 arrest and apoptosis by schisandrin C in human leukemia U937 cells
- Main results : Growth suppression and morphological changes of human leukemic cells (U937 cells) by Schisandrin C was closely related to the induction of apoptosis. The induced apoptosis involved the changes in the gene expression of cell death signal receptors, Bcl-2 family and IAP family and subsequent changes in caspase-3 activation and internucleosome DNA fragmentation of substrate proteins. Our experimental outcomes might provide fundamental information for the study in schisandrin C-associated biochemical mechanism of anticancer.
- (3) Increase of melanin synthesis and suppression on tyrosinase activation by YSCM12007 extracted from Omija
- Main results : From melanin synthesis and its effect on the suppression of tyrosinase activity, MeOH extracts from Omija with a strong activity were identified. Further study is under the process that is needed to the development of whitening sources from the substances after the elucidation of biochemical mechanism.
- (4) Activity test and elucidation of the mechanism using HTS
- Omija has been used for cure of the major diseases including cancer and hepatitis. This study was conducted to find out the effects of lignan isolated from Omija and pure compounds isolated from MeOH extracts on the suppression of expression of inducible NO synthase (iNOS) in RAW264.7 cells. Western blotting results demonstrated that the extracted substances suppressed transcription of iNOS and generation of NO in RAW 264.7 cell line. The most important discovery from our study was the fact that YSCH12003 clearly suppressed the expression of iNOS. In conclusion, the new compound identified in this study, YSCH12003 suppressed the generation of nitrogen monoxide via the suppression of the gene expression of iNOS by interaction with RAW 264.7 cells. Pre-clinical demonstration in order to develop the compound YSCH12003 as a new natural drug must be conducted.

Subject 3. Development of functional foods

Various drying and extraction process were compared to determine optimal prime process of Schizandra fruit (*Schizandra chinensis fructus*).

It were dried by three drying processes, 50°C (50HAD), 70°C hot air (70HAD) and freeze drying process (FRD), and extracted by three processes, such as hot water(8

5°C), water extraction and vinegar added water extraction, and then compared each terpene content and color, respectively. Terpenoid were collected by SDE(Simultaneous Steam Distillation-Extraction) and followed by GC-MSD analysis. Also colour profile of each dried samples were measured by Hunter colorimeter. From fresh schizandra fruit, were detected 15 kinds of monoterpene, 28 kinds of sesquiterpene and 7 kinds of terpene alcohol. The dried samples lost more than half of terpenoid content of fresh schizandra fruit at early time of drying process.

The residual content of terpene alcohols by FRD was more than by any other process, but that by 70HAD were less than. Brightness parameter L^* decreased with increasing drying temperature, so resulted in FRD, 50HAD and 70HAD, in high order, and redness parameter a^* and yellowness b^* showed similar trend to parameter L^* . Therefore, 50HAD was considered to be most optimal drying process.

The content of terpene was highest in extracts by hot water process, but browning was also highest in the process. vinegar added water process had more terpene content than water process and less browning change than hot water process, so it was considered to be most optimal extraction process.

The 5 experimental goods produced from schizandra fruit, such as schizandra beverage, schizandra wine, brandy, vinegar and schizandrin rich capsule. schizandra beverage, schizandra wine and vinegar can be manufactured immediately by real industry, but production of brandy with optimal alcohol content need continuous multi-steps still and the process of schizandrin rich capsule remained capsule filling process.

Subject 4. Evaluation of Pharmacological Activities

Our group has investigated several pure compounds or partially purified compounds on migration, proliferation, apoptosis, reactive oxygen species (ROS) generation, and vascular relaxation/contraction in various cell lines. As results, we have identified physiological activities of several pure or partially purified compounds on cell migration, ROS generation, vascular relaxation/contraction as well as their signaling mechanism of action. Based on these results, we have published several research papers, applied or registered patents by which stimulates researches in medical science as well as industrial basis for the development of immunomodulatory drugs, anti-hypertensive drugs, and wound healing drugs.

1. Gomisin A from *Schizandra chinensis* induces endothelium-dependent and direct relaxation in rat thoracic aorta

Schizandra chinensis (SC) fruit has long been used to promote the vascular health of postmenopausal women in Korea. To provide a scientific rationale for such uses,

this study investigated the vasoactive effects of gomisin A (GA) from SC fruit on the rat thoracic aorta. GA ($10^{-6}\text{M} - 3 \times 10^{-4}\text{M}$) caused a concentration-dependent relaxation in endothelium-intact rings precontracted with phenylephrine (10^{-5}M). By removal of endothelium, the effect was not abolished but reduced significantly. N^{G} -nitro-L-argininemethylester (10^{-4}M), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) significantly attenuated the vasodilatory effect of GA, but indomethacin (10^{-5}M) and tetraethylammonium (10^{-3}M) did not influence the vascular effect of GA. Direct measurement of nitrite, the metabolite of nitric oxide, confirmed that nitric oxide production in isolated aorta was increased by GA in a concentration-dependent manner. In the endothelium-denuded specimens, the relaxation by GA were clearly inhibited by calyculin A ($3.6 \times 10^{-8}\text{M}$), an inhibitor of MLC phosphatase. Based on these results, it is suggested that GA induced vascular relaxation through partially activation of endothelium-dependent nitric oxide pathway, and partially MLC dephosphorylation via activating MLC phosphatase.

2. Endothelium-dependent and direct relaxation induced by hexane extract of *Schisandra chinensis* in rat thoracic aorta

Schisandra chinensis (SC) has long been used to promote the vascular health for postmenopausal women in Korea. To provide a scientific rationale for such uses, this study investigated the vascular effects of hexane extract (HE) from SC. In the endothelium (ED)-intact rings of rat thoracic aorta, HE (50 – 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) caused a concentration-dependent relaxation in isolated vessel rings that had been precontracted by phenylephrine (10^{-5}M). The HE-induced vasorelaxation was markedly attenuated not only by removal of endothelium but also by pretreatment with N^{G} -nitro-L-argininemethylester (10^{-4}M) or 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one ($3 \times 10^{-5}\text{M}$). Direct measurement of nitrite, the metabolite of nitric oxide (NO), confirmed that NO production in isolated aorta was increased by HE in a concentration-dependent manner. Furthermore, HE induced an NO-liberation from human coronary endothelial cells as measured by diaminofluorescein. In the ED-denuded specimens, the relaxation by HE was not abolished but reduced significantly. The relaxation by HE in ED-denuded aortic rings were clearly inhibited by calyculin A ($3.6 \times 10^{-8}\text{M}$), an inhibitor of MLC phosphatase. Based on these results, it is concluded that HE induced vascular relaxation through partially activation of ED-dependent NO pathway, and partially MLC dephosphorylation via activating MLC phosphatase.

CONTENTS

Chapter 1. A Summary of Research Project	30
Chapter 2. Current Status of Technology in Domestic and Abroad	31
Chapter 3. Results of Research	33
Part 1. Theoretical and Experimental Approach	33
Part 2. Research Contents	34
Subject 1. Establishment of Mass Proliferation	34
Subject 2. Isolation and Structure Elucidation of Biological compounds	35
Subject 3. Development of Functional Foods	36
Subject 4. Evaluation of Pharmacological Activities	37
Part 3. Results in Developmental Research	39
Subject 1. Establishment of Mass Proliferation	39
1. Promoting Germination of Seeds by Breaking Dormancy	39
2. Effect of Lignans from Omija on Vegetable Seeds Germination	46
3. Effect of Lignans from Omija on Seedling Growth	51
4. Effect of Extraction Methods and Solvents on Lignans Contents	64
5. Analysis of Lignan Contents affected by Season, Organ and Cultural Location	69
Subject 2. Isolation and Structure Elucidation of Biological compounds	82
1. Structure Elucidation of Pure Compounds Isolated from Hexane and CHCl ₃	82
2. Novel Compounds isolated by Activity-Guided Fractionation	115
3. Standardization of Quality Evaluation by HPLC	118
4. Effect of Extraction Methods on Lignans Contents	120
5. Structure Elucidation of Pure Compounds from MeOH Extracts	127
6. Additional Experiments	135
가. Identification of a novel compound that stimulates intracellular calcium increase and CXCL8 production in human neutrophils from <i>Schisandra chinensis</i>	136
나. Wuweizisu C from <i>Schisandra chinensis</i> decreases membrane potential in C6 glioma cells	141
다. Gomisins N isolated from <i>Schisandra chinensis</i> was significantly induced anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the hepatic carcinoma	154
라. Effect of Gomisins A on Antihepatitis induced by CCl ₄	172
마. Effect of Extracts from Omija on Arteriosclerosis	183
바. Induction of Apoptosis and G1 Arrest by Schisandrin C in Human Leukemic Cells	189
사. Inhibitory Effects of Melanin Synthesis and Tyrosinase Activity from Pure Compounds	203
아. Anticancer, Antiinflammatory and Antioxidant Activity Test by HTS ...	208

Subject 3. Development of Functional Foods	218
1. Determination of Manufacturing Process	218
(1) Determination Method of Manufacturing Process	221
(2) Results of Determination of Manufacturing Process	235
2. Development of New Products	243
(1) Beverage	243
(2) Vinegar	245
(3) Wine	248
(4) Brandy	252
(5) Schizandrin Rich Capsule	254
 Subject 4. Evaluation of Pharmacological Activities	 258
1. Evidence of Pharmacological Activity in Immune System	258
2. Evidence of Cardiovascular Disease from Omija Compounds	264
3. Evidence of Anticancer from Omija Compounds	272
 Chapter 4. Achievement and Contribution	 276
 Chapter 5. Application of Developed Technology	 281
 Chapter 6. Overseas Scientific Information Obtained	 287
 Chapter 7. Literature	 288

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	30
제 2 장 국내외 기술개발 현황	31
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	33
제 1절 이론적 실험적 접근방법	33
제 2절 연구개발 수행 내용	34
제 1세부: 대량번식 체계 확립	34
제 2세부: 생리활성물질 추출 및 구조 동정	35
제 3세부: 기능성 제품 개발	36
제 4세부: 생리활성 검정	37
제 3절 연구개발 결과	39
제 1세부 : 대량번식 체계 확립	39
1. 종자의 휴면타과를 통한 종자발아 촉진	39
2. 오미자로부터 추출한 리그난이 몇가지 채소종자의 발아에 미치는 영향	46
3. 리그난 성분이 몇가지 채소의 유묘생육에 미치는 영향	51
4. 오미자의 추출방법 및 기관별 리그난 함량 분석	64
5. 식물체 채취시기, 식물체 부위 및 재배지역별 리그난 함량 비교	69
제 2세부: 생리활성물질 추출 및 구조 동정	82
1. Hexane, CHCl ₃ 및 MeOH로부터 생리활성물질 순수분리 및 구조동정	82
2. 활성분획 추적법을 통한 항염증 및 면역증강 효능 신물질의 순수분리	115
3. HPLC를 이용한 기능성 물질의 품질 평가 기준 마련	118
4. 추출방법이 리그난 성분 추출효율에 미치는 영향	120
5. 오미자의 MeOH 추출물로부터 순수분리한 성분의 구조 동정	127
6. 연구계획서 이외의 결과	135
가. Identification of a novel compound that stimulates intracellular calcium increase and CXCL8 production in human neutrophils from <i>Schisandra chinensis</i>	136
나. Wuweizisu C from <i>Schisandra chinensis</i> decreases membrane potential in C6 glioma cells	141
다. Gomisins N isolated from <i>Schisandra chinensis</i> was significantly induced anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the hepatic carcinoma	154
라. CCL ₄ 를 이용한 급성간염유발 쥐에서 Gomisins A의 항간염 효과	172
마. 오미자 추출물의 항동맥경화 효과	183
바. Schisandrin C에 의한 인체 혈구암세포의 세포사멸 및 G1 arrest 유도	189
사. 오미자로부터 순수분리한 성분의 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성도 억제 효과	203
아. HTS를 이용한 오미자로부터 순수분리한 성분의 항산화, 항암 및 항염증 효	208

능 검증	
제 3세부: 기능성 제품 개발	218
1. 원료가공공정의 확립	218
(1) 건조공정	221
(2) 추출공정	235
2. 제품개발	243
(1) 오미자 음료	243
(2) 오미초 (오미자 식초)	245
(3) 오미자와인 개발	248
(4) 오미자 브랜드	252
(5) Schizandrin 고농축 캡슐	254
제 4세부: 생리활성 검증	258
1. 면역계 생리활성 효능 검증	258
2. 심혈관계에 대한 효능 검증	264
3. 항암효과에 대한 효능 검증	272
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	276
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	281
제 1절 실용화·산업화 계획	281
제 2절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획	281
제 3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 계획	284
제 4절 추가연구, 타 연구에 활용 계획	286
제 5절 연구기획사업 등	286
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	287
제 7 장 참고문헌	288

연구결과

제 1 장 연구개발과제의 개요

오미자는 한국, 일본, 중국 북동지방, 남부 사할린, 동 러시아의 야생에서 성장하고 있다. 과육과 껍질은 신맛과 단맛을 내고, 종자는 매운맛, 쓴맛과 짠맛을 내므로 우리나라에서는 오미자(omicha), 일본에서는 고미시(gomishi), 중국에서는 유웨이지(wu-wei-zi)라고 하여 5가지의 맛을 내는 과실을 의미하며, 맛의 독특함 때문에 생리활성물질에 관한 관심이 집중되었다. 오미자로부터 30여종의 dibenzo[a,c]cyclooctene 유도체인 리그난(lignans)이 분리되었는데, 과실과 종자에는 7.2-19.2%, 줄기에는 1.3-10%가 함유되어 있다. 리그난은 ① 항간세포독성, ② 항산화, ③ 독성제거, ④ 항발암성 및 ⑤ 피로회복 등에 효과가 높은 것으로 알려져 있다. 한의학에서 오미자의 효과는 폐와 신장의 채널 및 위에 관여하고, 기침과 천식으로 숨을 헐떡이는 신장과 폐의 결합에 사용되며, 설사를 멈추게 하며, 식은 땀이 나는 것을 멈추게 하며, 건망증과 불면증에 사용하고, 정신을 온화하게하는 것으로 알려져 있다.

이러한 약리학적인 효과 때문에 천연물로부터 신약 개발에 관한 돌파구를 찾기 위해서 지난 10여년 동안 오미자의 lignans에 관한 연구가 집중적으로 이루어졌다. 오미자로부터 추출된 리그난의 효과 외에도 오미자의 추출물은 스트레스에 의한 국소빈혈기관, 국소재관류, 흥분성, 강한 빛에 의한 대사장애와 산소유리기와 관련된 병의 치료는 물론, 최근에는 HIV와 AIDs에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다.

따라서 본 연구에서는 약리효과가 높은 오미자를 농가 작물화하여 농가의 신소득작물로 개발하고 그 추출물을 산업화하기 위한 목표를 집약하면 다음과 같다.

- 오미자의 대량번식 체계 확립
- 오미자의 고극성 추출물로부터 생리활성이 높은 물질의 순수분리 및 구조 동정
- 생리활성물질을 기준으로 표준품 품질평가 기준 마련
- 식물체로부터 추출한 물질의 허혈-재관류, 간 손상에 대한 보호 효과 및 작용기전 구명
- 생리활성물질을 함유한 기능성 제품의 개발 및 산업화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

세계적인 BT산업의 활성화, 생명자원에 대한 보호주의 확산 및 지적 재산권 협약 등으로 외국 자원 또는 기술의 도입은 점차 어려워지고 있으며, 이러한 기술을 도입할 경우에는 막대한 royalty를 지불해야 한다. 우리나라에는 옛날부터 한의학이 발달되었으나, 한약재로부터 생리활성을 탐색한 후 식 의약품, 보건식품 또는 식품첨가제의 개발에 관한 연구는 유럽연합이나 미국 등의 선진국에서 오히려 뒤지고 있다. 우리나라에서도 최근 들어 생약제를 이용한 식품보조제나 건강식품의 개발에 의한 생물산업이 활성화되고 있는데, 이에 부응하기 위하여 오미자 추출물질의 산업화와 체계적인 번식방법의 확립은 농가의 소득작물 개발에 필연적인 과제로 부각되고 있다. 이에 따른 국내외의 바이오 분야 기술개발 현황을 집약하면 다음과 같이 요약할 수 있다.

- 산업의 발달과 더불어 인류의 적인 질병은 더욱 다양하여지고 치료제의 개발은 항상 질병을 뒤따라가고 있다. 이러한 질병은 90% 이상이 물리적인 환경이나 화학물질에 노출됨으로서 발생하고 있으며, 이러한 요인 중 40-60%는 식이와 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근 삶의 질과 의료복지의 향상, "well-being"붐이 조성됨에 따라 일상에서 섭취하고 있는 생리활성물질에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있음
- 또한 WTO, DDA 협상 및 FTA확대 등으로 인해서 외국 농산물이 우리나라로 수입될 것이다. 이에 대응하기 위해서는 우리나라 농산물의 우수성을 기능성을 가진 물질을 기준으로 하여서 품질을 평가할 수 있는 기술을 필연적으로 도입하여서 기능성을 바탕으로 한약재의 표준품 판단 기준이 우선적으로 설정되어야 함.
- 바이오시장은 세계적으로 팽창하고 있는데, 우리나라에서 재배하고 있는 약용작물은 점차 감소하여 최근 약용작물의 수입량은 80년대에 비해서 약 14.2배로 증가하였으며, 중국으로부터 대부분 수입되었는데, 수입품은 품질이 나쁘고, 농약, 중금속 오염 등으로 인하여 국민 보건을 위협하는 한 요인이 되고 있음.
- 지구상에 자생하고 있는 자원생물은 수만 종에 이르나 수천종이 실질적으로 사용되고 있다. 우리나라에는 수백 종의 약용식물이 자생하고 있는 것으로 알려져 있으나 농업적으로 재배되고 좋은 사십여 종에 불과.
- 최근 우리나라의 건강보조식품에 대한 관심이 증가되어 소비가 매년 10% 이상 증가하고 있으며, 시장규모도 약 1조 2000억원 정도로 추산.
- 국내 기업은 물론 다국적 기업인 엘트웰, 허브라이프, SMK, 파마넥스, 한국암웨이 등의 성장이 두드러지고 있어서 약용식물은 이용한 바이오 산업은 경쟁이 더욱 치열해질 것으로 예상.
- 따라서 우리나라에서 재배된 친환경 약용작물에 대한 관심이 고조되고 있으며, 약리효능이 우수한 오미자는 그 수요가 증대될 것으로 전망.
- 식품 업체는 물론 제약 업체에서도 기능성 식품 시장에 계속적으로 진입하고 있으므로 그 수요는 지속적인 증가세를 보일 것으로 예측.
- 이에 편승하여 최근 국내 바이오 벤처기업의 창업으로 건강보조식품은 더욱 활기를 띠기 시작하였고, 약리성분의 분리 동정, 과학적 근거에 의한 신 의약품 개발 등으로 시장 전망은 매우 밝은 편이나 과다 경쟁으로 인한 특성화된 기술 개발 요구.
- 특히, 오미자로부터 추출한 dibenzocyclooctadiene계 리그난 및 추출물은 약용가치가 높

고, 식용 가능한 식물이므로 제품개발을 위한 좋은 재료임에도 불구하고 대부분 중국으로부터 수입하고 있는데 수입상품은 품질이 낮다. 우리나라에서는 재배에 의한 상품화는 이루어지지 않고 있으며, 아직도 산채한 것을 이용하고 있으므로 본 연구에 의해서 고부가가치 농산물로 거듭나게 될 오미자의 대량증식방법이 미비한 실정임.

- 본 연구팀은 저극성인 Hexane 추출물로부터 단리한 물질의 항암, 항산화, 세포 흡수 등에 관한 보고를 한 바 있으며, 그 결과 특허 1편, SCI 등재지에 3편의 논문 게재하여 물질의 분리 및 동정에 관한 기술을 이미 확보.
- 따라서 국내외에서 수집한 정보와 축적된 기술을 바탕으로 오미자로부터 고극성 물질의 추출 및 생리활성 효과의 검증으로, 오미자를 원료로 하여 제품의 산업화가 가능할 것이다. 이러한 결과들로부터 오미자의 효용가치는 더욱 높아질 것이므로 농가의 신소득작물로서 자리매김할 것으로 확신.

(1) 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	○	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

(2) 국내수준

개념정립 단계	○	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

(3) 국내·외의 연구현황

- 국내외 기술개발의 현황 요약

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국의 대학 및 연구소	- 오미자로부터 5-6종의 lignans 추출 - 본 연구팀은 Hexane분획으로부터 총 13개의 순수분리한 lignans계 물질 중 1개의 신물질 발굴 - 항암, 항산화 효과 검증	- 물질의 NFAT (nuclear factor of activated T-cell) transcription 효과 검증 - 한의서 근간의 차 개발 - 신물질 특허 출원 중
미국천연물연구소 (NCNPR)	- 오미자로부터 lignans 물질의 분리 - 상업화되어 있는 제품의 기능성 물질 함량 비교	- Lignans 물질을 이용하여 산업화된 상품의 품질 비교 - 오미자 추출물의 판매
일본의 대학 및 연구소	- 오미자로부터 물질분리 후 구조 동정	- 오미자를 이용한 차 등의 판매
대만의 대학 및 연구소	- 우리나라와는 다른 종의 오미자로부터 다른 계통의 lignans을 순수분리 하여서 B형간염의 효과 검증	- 오미자 추출물 또는 다른 한약제와 혼용품의 판매
중국의 대학 및 연구소	- 오미자로부터 추출한 물질을 화학적으로 변형시킴	- 화학적으로 변형된 물질을 간염치료제로서 이용
러시아의 연구소	- 피로 회복, 인내력 증가, 운동선수의 운동력을 증가 - 경마용말의 주력 향상	- 국제적 체육행사시에 일부 선수들 복용

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 이론적 실험적 접근방법

오미자 나무는 낙엽성 목본인 덩굴식물이며 붉은 색의 과실을 생약재 및 식품원료로 이용하는 주요 약용식물로서 옛날부터 여러 종류의 식품으로 가공되어 이용되었으며, 식품분야 이외에도 한방 분야에서도 널리 통용되고 있으나, 오미자 추출물의 생리효능에 대한 정확한 기전에 대한 연구가 체계적으로 수행되지 않았다. 따라서 오미자로부터 추출된 중간분획 및 순수분리한 물질 등이 기존 오미자의 효능으로 알려진 면역활성, 항암작용, 항독성, 항염증 미백효과 등에 대한 심도 있는 효능 검증 연구가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 다음의 4가지 세부과제를 수행하게 되었다.

제 1세부: 대량번식 체계 확립

오미자는 야생식물을 작물화한 식물로서 종자의 휴면이 길고 발아가 잘되지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 오미자의 휴면을 타파시킬 수 있는 방법을 개발하여 농산업체 또는 농가가 직접 활용 할 수 있는 방법을 확립하고자 하였다. 오미자의 주요 생리활성 물질은 리그난인 것으로 알려져 있는데, 오미자의 주요 물질인 리그난을 대량으로 분리하여 그 성분들을 식물생장조절제로서 활용할 수 있는 방법을 규명하기 위하여 몇 가지 채소종자의 발아와 유묘생육에 미치는 영향을 조사하여서 그 가능성을 검토하였다. 또는 주요 성분이 오미자의 생육기간 중에 축적되는 양상과 많이 축적되는 장소를 확인하기 위하여 시기별, 식물체의 기관별 및 재배지역 별 성분함량을 조사하여서 효과적으로 이용할 수 있는 방법을 확립하였다.

제 2세부: 생리활성물질 추출 및 구조 동정

여러 가지 중요한 생리활성을 나타내는 오미자의 약리적 기능과 선행 연구를 바탕으로 오미자에 함유된 다양한 성분들에 대한 생리활성을 규명하고자 연구를 계획하였으며, 오미자 과실의 추출물에 존재하는 성분의 유효한 생리활성 물질을 순수분리 하기 위하여 hexane, chloroform, 및 methanol로서 순차적으로 추출하였다. 추출한 각각의 추출물들로부터 silica gel open column chromatography를 사용하여 순수한 물질을 분리하고 분리된 물질의 구조를 GC, NMR, 및 IR 등의 분광학적 방법을 통해서 동정하고 유효한 생리활성을 나타내는 물질을 탐색하였다.

제 3세부: 기능성 제품 개발

본 연구는 오미자를 활용한 기능성제품의 개발을 목표로, 먼저 산업화에서 오미자의 연간 안정된 원료수급을 위하여, 적절한 건조공정의 설정, 그리고 오미자에서 기능성 물질의 추출효율을 제고하기 위한 적절한 추출공정의 설정하기 위하여, 각 공정의 효율성 비교는 terpene류와 색도를 기준으로 실시하였다.

이러한 원료가공공정을 활용하여 오미자에 특징적으로 많이 함유되어 있는 terpene류 및 schizandrin 등의 기능성 물질을 활용한 제품개발은 기능성 물질의 특성과 함량의 손실이 적고 오미자의 고유색상과 향미를 살리는 제품으로 설계하고 시제품을 제작하였다. 개발된 각 제품의 품질은 식품위생법상의 기준 및 규격에 적합토록 설계하였다.

제 4세부: 생리활성 검정

항암작용에 대한 효능을 검증하기 위해, 세포의 증식, 사멸, 활성산소 생성 등에 대한 생리활성을 검증하였으며, 면역활성에 대한 효능을 알아보기 위해, 세포의 이동, 칼슘유리 등에 대한 효능을 측정하였다. 또한 심혈관계에 미치는 영향을 알아보기 위해, 쥐의 대동맥 또는 위장동맥 등을 적출한 뒤 동맥혈관의 이완/수축에 대한 효능을 측정하고 이로부터 분리된 혈관내피세포에서의 nitric oxide 형성을 측정함으로써 혈관의 이완/수축에 대한 작용 메커니즘을 규명하였다.

제 2절 연구개발 수행 내용

제 1세부 : 대량번식 체계 확립

1. 종자의 휴면타파를 통한 발아 촉진

(가) 오미자 종자의 휴면성 검정

- 종자의 채취 : 문경에서 재배중인 오미자를 2006년 9월 1일에 수확
- 휴면검증 : 15일 간격으로 발아율 조사

(나) 채종시기별 종자의 휴면성 검정

- 종자의 채취 : 문경에서 재배중인 오미자를 2006년 7월 1일 - 9월 1일까지 2주일 간격으로 채취
- 발아율 조사 : 22℃의 완전 암

(다) 휴면타파 방법의 개발

- 종자의 채취 : 문경에서 재배중인 오미자를 2006년 9월 1일에 수확
- 생장조절제 : GA₃, BAP, Kinetin, IBA
- 농도 : 0, 25, 50, 100, 250, 500 및 1,000 ppm을 처리 후 20℃의 완전암하에서 발아

(라) 저온습윤 처리에 의한 종자의 휴면 타파

- 종자의 채종 : 2006년 9월 1일에 수확
- 처리시기 : 2007년 3월 1일에 저온습윤처리
- 처리방법 온도 : 0, 5, 10, 15℃의 항온과 5℃와 15℃를 12시간 주기로 변온처리
- 처리 기간 : 5일, 10일 15일 30일, 45일, 60일

(마) 저온습윤처리 후 GA₃의 처리 효과

- 종자의 채종 : 2006년 9월 1일에 수확
- GA₃의 처리농도 : 1,000 mg /L - (다)의 실험결과 적용

- 처리방법 온도 : 0, 5, 10, 15°C의 항온과 5°C와 15°C를 12시간 주기로 변온처리
- 처리 기간 : 30일, 60일, 90일

2. 오미자로부터 추출한 리그난이 몇가지 채소종자의 발아에 미치는 영향

- 천연물 : Schisandrin, schisandrin C, gomisin A, gomisin N
- 천연물의 농도 : 10^{-5} M, 10^{-6} M, 및 10^{-7} M
- 채소종자 : 무, 상추, 고추

3. 리그난 성분이 몇가지 채소의 유묘생육에 미치는 영향

- 천연물 : Schisandrin, schisandrin C, gomisin A, gomisin N
- 천연물의 농도 : 10^{-5} M, 10^{-6} M, 및 10^{-7} M
- 채소종자 : 무, 상추, 고추

4. 오미자의 생육시기, 기관별 및 재배지역별 리그난 함량 분석

가. 채취시기별과 식물체의 기관별 함량비교

- 채취시기 : 3월 초순부터 10월 4일까지 2주 간격으로 채취
- 채취기관 : 과실, 잎, 줄기, 뿌리, 지하줄기 등
- 생리활성 물질 : Schisandrin, schisandrin C, gomisin A, gomisin N

나. 재배지역 및 농가별 함량 비교

- 채취시기 : 9월 20일에 일시 수확 후 동결건조
- 채취기관 : 과실
- 생리활성 물질 : Schisandrin, schisandrin C, gomisin A, gomisin N

제 2세부: 생리활성물질 추출 및 구조 동정

1. Hexane과 CHCl_3 로부터 리그난 생리활성물질의 순수분리 및 구조동정

가. Hexane 추출물로부터 리그난 성분의 순수분리

나. 활성추적법을 이용한 혈관이완 촉진효능 성분의 순수분리

- (1) 고혈압억제제로 사용이 가능한 혈관이완 효능이 있는 성분의 순수분리

다. 활성추적법을 통한 오미자로부터 천연물신약의 후보물질인 2종의 신물질의 순수분리

- (1) 항염증 및 면역증강 효능을 가진 신물질의 순수분리 및 구조동정
- (2) 항암 및 항염증 효능을 가진 신물질의 순수분리 및 구조동정 : 1 종

2. MeOH 추출물로부터 리그난 생리활성물질의 순수분리 및 구조동정

가. 미백 효능성분의 분리

나. 항염증 효능성분의 분리

3. 추출방법이 리그난 성분 추출효율에 미치는 영향

- 가. 효율적인 추출방법 확립
- 나. 재배지역 또는 농가별 성분분석 방법 확립
- 다. 오미자의 생리활성 성분을 기준으로 한 품질 평가방법 확립

4. 계획서 이외의 연구결과

- 가. 오미자로부터 추출한 신물질인 α -iso-cubebene의 면역증강 효능 증명
 - 천연물 신약으로서 개발 가능성 검토 중
 - 국내 특허출원 중이며, 유니테프로부터 특허출원 지원금을 받아서 PCT출원 중에 있음
- 나. C6 glioma cell에 Wuweisizu C의 효능 검증
- 다. 간암세포에 대한 Gomisins N의 항암 효과 검증
- 라. 동물실험을 통한 Gomisins A의 간염증 효능성분의 증명 및 기작 규명
- 마. 항동맥경화 효능 신물질의 증명
- 바. 혈구암세포에 대한 Schisandrin C의 세포사멸 효능 검증 및 기작 규명
- 사. 미백효과 신물질의 기작 및 효능 검증 (MeOH추출물로부터 순수분리한 신물질)
- 아. Hexane 추출물로부터 순수분리한 신물질의 항암 효능 검증 및 항염증 효과

제 3세부: 기능성 제품 개발

1. 제품의 제형 결정

- 가. 관련제품 조사 : 국내외 시장조사는 2~3명의 조사원을 활용하여 실 시장 조사 및 자료 조사를 통하여 오미자 관련제품 및 자료 수집.
- 나. 소비자 기호도 조사 : 관련 제품의 소비자 기호도 조사는 관련제품의 연간 판매량 및 전문가의 조언 등을 근거 자료로 활용하였음.
- 다. 개발할 제품의 제형결정 : 오미자의 특성, 기 개발된 관련제품의 형태, 연간 생산량, 소비자 기호도, 전망 등의 자료를 토대로 개발할 제품의 제형을 참여기업(주, 청보)과 협의 결정하였음.

2. 원료 가공공정 확립

- 가. 오미자원료의 건조공정: 원료의 지속적이고 안정적 저장 및 공급에 필요한 건조공정의 적정 방식 및 조건의 설정을 위하여 열풍건조, 동결건조 등의 공정별 원료의 품질변화 비교
- 나. 오미자원료의 추출공정: 음료 등 액상형태의 제품 가공을 위한 최적의 원료추출공정의 확립

3. 제품개발

- 가. 오미자음료 개발: 원료의 건조 및 추출공정의 결과를 감안하여 오미자의 색과 향이 담긴 음료 개발

- 나. 오미자 함유 식초개발: 오미자 첨가한 초산발효에 의한 양조식초의 개발
- 다. 오미자와인 개발: 오미자를 주원료로 알콜발효 공정을 거친 와인의 개발
- 라. 오미자브랜드 개발: 오미자를 알콜발효한 발효주를 증류하여 일종의 증류주인 브랜드의 개발
- 마. Schizandrin 고농축 캡슐 개발: 오미자의 대표적 기능성 물질인 schizandrin의 함량을 대폭 높인 고농축의 물질 수득 공정 개발 및 제품 개발

4. 개발제품의 품질검사

- 가. 식품규격 검사: 식품공전[1]에 수재된 유형의 제품은 해당 규격의 검사
- 나. 안전성 검사: 식품공전에 수재된 메탄올, 아세트알데히드 등의 검사
- 다. 영양성 및 기능성 물질 검사: 에탄올 등 목적성분과 schizandrin 등의 기능성 물질의 함량 검사

제 4세부: 생리활성 검정

1. 면역계 생리활성 효능 검증

가. 추출물에 대한 세포 이동성 측정

- 면역계의 활성화기전에는 면역계 세포의 이동, 칼슘 유리, 활성산소 형성 등이 중요한 역할을 수행한다. 따라서 본 연구에서는 오미자로부터 추출된 물질들이 세포의 이동에 미치는 효능을 검증함으로써 기존의 오미자 효능에 대한 과학적 자료를 제공하고자 하였다. 또한 오미자의 추출물뿐만 아니라 식물의 주요 성분으로 알려진 Lignan계열의 화합물들이 세포의 이동에 미치는 영향을 측정함으로써 면역 활성화제로의 개발에 대한 기초 자료를 확보하고자 하였다. 특히 이들이 생리활성에 미치는 영향의 작용기전을 규명함으로써 학문적 가치 증대뿐만 아니라 이후 개발될 치료제에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

나. 추출물이 칼슘유리에 미치는 영향 측정

- 칼슘 유리는 매우 다양한 생리활성 조절기전에 있어 필수적인 기능을 담당하고 있다. 특히 면역세포에서의 칼슘유리는 세포의 이동을 탐식, 활성산소 생성을 통한 잠식 활성화에 필수불가결한 생리활성 반응으로 면역체계의 전반적인 활성화에 매우 중요한 활성화이다. 따라서 본 연구에서는 면역활성의 기초 반응이 되는 칼슘유리에 오미자로부터 추출된 물질 및 식물체의 주요 구성 성분인 Lignan계열의 화합물이 미치는 영향을 측정하여 오미자 추출물의 생리활성을 검증하고자 하였다.

2. 심혈관계 생리활성 효능 검증

가. 오미자의 추출물에 의한 혈관 이완/수축 측정

- 비정상적인 혈관의 이완/수축은 현대인의 만성질환인 고혈압, 심혈관질환 등 매우 다양한 병적 상태를 초래한다. 특히 혈관이완은 발기, 혈압하강, 수축성 혈관의 유지 등에

필수적인 기능을 수행한다. 따라서 본 연구에서는 오미자의 중간 분획물 및 순수분리 물질들이 혈관의 이완/수축에 미치는 영향을 측정함으로써 오미자가 심혈관계에 미치는 영향을 검증하고자 하였다. 특히 혈관의 이완을 촉진하는 추출물에 대해 그 하위기전을 규명함으로써 오미자 추출물이 심혈관계에 미치는 영향에 대한 신호전달 기전을 구축하고자 하였다.

나. 내피세포 의존적 NO 생성에 대한 효능 검증

- 혈관내피세포의 eNOS에 의한 NO의 형성은 발기뿐만 아니라 혈관의 이완에 매우 필수적인 역할을 수행한다. 오미자로분리된 순수 물질 또는 중간 분획물에 의한 혈관의 이완이 내피세포 의존적 NO의 형성에 의해 매개되는지 조사하기 위해 nitric oxide synthase (NOS) 저해제인 L-NAME, soluble guanylyl cyclase (sGC) 저해제인 ODQ, cyclooxygenase (COX) 저해제인 Indomethacin 및 K⁺ channel 차단제인 TEA가 추출물에 의한 혈관이완에 미치는 영향을 측정함으로써 NO 형성에 대한 효능을 검증하고자 하였다. 또한 직접적으로 NO의 형성을 측정하기 위해 DAF-FM 형광 dye를 혈관내피세포에 전처리하고 오미자 추출물을 처리한 후 실시간으로 발광을 측정하였다.

다. 오미자 추출물이 혈관평활근세포의 이완 조절에 대한 효능 검증

- 혈관의 장력은 궁극적으로 혈관평활근의 이완/수축에 의해 조절된다. 혈관평활근의 이완/수축 조절은 myosin light chain(MLC)의 인산화가 필수적인 역할을 담당하며 MLC의 인산화는 혈관평활근 세포내의 칼슘농도, MLC kinase (MLCK) 및 MLC phosphatase (MLCP)의 활성이 중요한 역할을 담당한다. 혈관평활근세포의 이완/수축에 대한 조절 메커니즘 규명을 위해 MLCP의 저해제인 calyculin A 또는 MLCK의 저해제인 ML-9 등과 MLC의 인산화를 측정함으로써 오미자 추출물에 의한 혈관의 이완/수축 조절기전을 조사하고자 하였다.

3. 항암 효능 검증

가. 오미자의 추출물에 의한 세포의 증식 측정

- 암의 발생은 비정상적인 세포의 성장 및 증식에서 비롯된다. 따라서 암세포는 정상세포에 비해 훨씬 빠른 성장을 가지고 활성산소 및 다른 세포사멸 유도인자에 대한 반응이 낮다. 따라서 본 연구에서는 오미자 추출물이 세포의 증식에 미치는 영향을 검증하고 다른 성장에 인자에 의한 세포의 증식 저해효과를 측정함으로써 항암 효능을 검증하고자 하였다.

나. 오미자의 추출물에 의한 사멸 측정

- 항암 효능을 가지기 위해서는 크게 증식 및 전이를 저해하고 세포의 사멸을 유도해야 한다. 따라서 본 과제에서는 오미자 추출물에 의한 세포의 사멸을 조사하고 또한 활성산소에 의한 세포의 사멸에 있어 오미자 추출물이 미치는 영향을 측정함으로써 세포보호 기능을 알아보하고자 하였다.

제 3절 연구개발 결과

제 1세부 : 대량번식 체계 확립

1. 종자의 휴면타파를 통한 종자발아 촉진

가. 재료 및 방법

(1) 오미자 종자의 휴면성 검정

오미자 종자의 휴면성을 조사하기 위하여 9월 1일에 수확한 종자를 15일 간격으로 3월 25일까지 25℃의 완전암하에서 발아율을 조사하였다.

(2) 채종시기별 종자의 휴면성 검정

7월 1일부터 9월 1일까지 오미자를 15일 간격으로 채취하여 1월 15일에 발아를 시켰으나 전혀 발아하지 않았다.

(3) 생장조절제를 이용한 휴면타파 방법의 개발

종자의 휴면타파를 위하여 GA₃, BAP, Kinetin, IBA를 각각 0, 25, 50, 100, 250, 500 및 1,000 ppm을 처리하여 20℃의 완전암하에 둔 다음 매일 발아율을 조사하였다.

(4) 저온습윤 처리에 의한 종자의 휴면 타파

발아율을 높이기 위하여 저온습윤 처리를 2006년 9월 1일에 수확한 종자에 2007년 3월 1일에 저온습윤처리를 하였다. 저온습윤처리는 10 cm petridish에 Whatman No. 2 여과지 2장을 깔고 증류수 5 ml을 넣고 종자 100립을 치상하였다. 각각의 petridish를 0, 5, 10, 15℃의 항온과 5℃와 15℃를 12시간 주기로 변온처리를 한 생육상에 두었다. 저온처리 기간은 각각의 저온처리 온도에서 5일, 10일 15일 30일, 45일 60일 후에 종자를 꺼집어 내어서 20℃의 항온기에서 발아를 시켰다. 5℃ 이상의 저온습윤처리 조건에서는 처리 기간 중에 곰팡이가 많이 발생하였으므로 곰팡이가 발생하면 증류수로 세척하였다. 종자의 발아율은 종자 치상 후 30일까지 매일 조사하였다. 저온습윤처리 60일 이후에는 종자가 발아하였는데, 발아한 종자는 GA₃처리실험에서 제외하였다.

(5) 저온습윤처리 후 GA₃의 처리 효과

60일까지 저온습윤 처리에서 기대할 만큼의 연구 결과를 얻지 못하였다. 따라서 실험 1에서 1,000 mg/L의 GA₃ 처리효과가 좋았으므로 30일, 60일, 및 90일간 저온습윤 처리한 종자를 GA₃ 1000 1,000 mg/L에 1시간 동안 침지한 후 20℃의 항온기에서 발아시켰다. 기타 저온습윤처리 온도 및 관리는 실험 (4)와 동일하였다. 저온습윤처리 60일 이후에는 종자가 발아하였는데, 발아한 종자는 GA₃처리실험에서 제외하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 오미자 종자의 휴면성 검정

오미자 종자의 휴면성을 조사하기 위하여 9월 1일에 수확한 종자를 15일 간격으로 2월 25일까지 25℃의 완전암하에서 발아율을 조사한 결과 전혀 발아하지 않았으므로 휴면성이 매우 긴 것으로 생각된다. 휴면성을 확인하기 위하여 차후 종자를 15일 간격으로 계속 발아율을 검토할 것이다.

(2) 채종시기별 종자의 휴면성 검정

7월 1일부터 9월 1일까지 오미자를 15일 간격으로 채취하여 1월 15일에 발아를 시켰으나 전혀 발아하지 않았다.

(3) 성장조절제를 이용한 휴면타파 방법의 개발

종자의 휴면타파를 위하여 GA₃, BAP, Kinetin, IBA 및 NAA를 각각 0, 25, 50, 100, 250, 500 및 1,000 ppm을 처리하여 20℃의 완전암하에 둔 다음 발아율을 매일 조사하였다. 종자의 발아율은 1,000 mg/l GA₃에서 17.6%로서 가장 높았고, 다음은 500 mg/l GA₃에서 7.3%로서 발아율이 아주 낮았다. BAP, Kinetin, IAA 및 NAA의 농도 0 ~ 1,000 mg/l에서는 전혀 발아하지 않았다.

Table 1. Effect of GA₃, BAP, Kinetin, IAA and NAA concentration on % germination of *Schisandra chinensis* BAIL after month. Seeds were harvested September 15 2006 and then they were germinated at Jan. 15 2007.

Concentration (mg/l)	Plant growth regulators				
	GA ₃	BAP	Kinetin	IAA	NAA
0	0.0 ²⁾	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
250	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
500	6.3 ± 2.1	0.0	0.0	0.0	0.0
1,000	17.6 ± 1.7	0.0	0.0	0.0	0.0

²⁾Data represent means ± SEM from 3 replications.

(4) 저온습윤 처리에 의한 종자의 휴면 타파

종자의 휴면성을 타파하기 위하여 여러 가지의 성장조절제를 사용하였으나, 가장 효과가 좋았던 GA₃를 처리하였을 경우에도 발아율이 18% 이하로서 매우 낮았다. 따라서 발아율을 높이기 위하여 저온습윤처리를 한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 저온습윤처리 15일까지

는 어떠한 처리온도에서도 전혀 발아하지 않았다. 처온습윤처리 30일 후에는 15℃에서 발아율이 8.7% 가장 높았다.

Table 2. Effect of prechilling days and temperature (°C) on % germination of *Schisandra chinensis* B_{AIL} after 1 month. Seeds were harvested September 15 2006 and then they were germinated at March. 1 2007.

Prechilling added dH ₂ O		Germination (%)
Days after prechilling	Temperature (°C)	
0	0	0.0 ± 0.0 ^{z)}
5	0	0.0 ± 0.0
	5	0.0 ± 0.0
	10	0.0 ± 0.0
	15	0.0 ± 0.0
	5~15	0.0 ± 0.0
10	0	0.0 ± 0.0
	5	0.0 ± 0.0
	10	0.0 ± 0.0
	15	0.0 ± 0.0
	5~15	0.0 ± 0.0
15	0	0.0 ± 0.0
	5	0.0 ± 0.0
	10	0.0 ± 0.0
	15	0.0 ± 0.0
	5~15	0.0 ± 0.0
30	0	0.0 ± 0.0
	5	2.7 ± 1.2
	10	6.7 ± 1.4
	15	8.7 ± 1.3
	5~15	4.0 ± 0.0
45	0	0.0 ± 0.0
	5	10.0 ± 3.5
	10	18.7 ± 2.3
	15	6.7 ± 2.3
	5~15	25.3 ± 5.8
60	0	0.0 ± 0.0
	5	38.7 ± 3.0
	10	76.7 ± 3.1
	15	10.7 ± 1.2
	5~15	48.0 ± 8.4

^{z)}Data represent means ± SEM from 3 replications.

45일 후에는 5℃와 15℃의 변온처리에서 25.3%로서 가장 높았고, 다음은 10℃와 5℃였다. 그러나 30일 후의 변온처리에서 발아율이 가장 높았던 15℃에서는 30일 처리와 차이가 없었으며, 45일 후에는 저온습윤처리 효과가 없었다. 저온습윤처리 60일 후에는 10℃에서 76%의 발아율을 보여서 아주 좋은 결과를 얻었으며, 변온처리에서 48% 및 5℃에서 37%로서 처리 기간이 길수록 발아율은 증가하였다. 저온습윤처리 온도는 10℃가 가장 적당한 온도인 것으로 확인되었다.

(5) 저온습윤처리 후 GA₃의 처리 효과

60일까지 저온습윤 처리에서 기대할 만큼의 연구 결과를 얻지 못하였다. 따라서 저온습윤처리 30일, 60일, 및 90일 후에 실험 (1)에서 효과가 좋았던 GA₃ 1,000 mg/L를 저온습윤처리 한 종자를 1시간 동안 침지한 후 20℃의 항온기에서 발아시킨 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 처리 30일 후에 GA₃를 처리하였을 때에 발아율이 약간 증가하였다. 저온습윤처리 60일 후에 발아율이 83%로서 가장 높았던 5℃와 10℃에서는 통계적인 유의차는 없었으나 GA₃를 처리함으로써 발아율이 약간 감소하였으나, 변온에서는 약간 증가하였다. 변온처리 90일 후에는 5℃의 변온처리에서는 GA₃처리와 관계없이 85%로서 가장 높았으며, 10℃와 변온처리 후에 GA₃를 처리함으로써 발아율을 향상시켰다. 그러나 15℃의 고온에서 저온처리를 하였을 경우에는 거의 발아하지 않았으며, GA₃의 처리효과도 없었다. Table 2와 3의 저온습윤처리 60일 후의 발아율이 서로 달랐던 원인은 Table 2는 수확 75일 후에 Table 3은 수확 222일 후에 처리하였으므로 종자의 생리적인 활성, 후숙 등에 차이가 있었기 때문일 것으로 추측된다.

Table 3. Effect of prechilling days, temperature (°C) and GA₃ after prechilling on % germination of *Schisandra chinensis* B_{AIL} after 1 month. Seeds were harvested September 1 2006 and then they were germinated at May 7 2007.

Prechilling added dH ₂ O		Concentration of		Germination (%)	
Days after prechilling	Temperature (°C)	GA ₃ (mg/L)			
30	0	0	0	0.0 ± 0.0 ^{z)}	
		5	0	4.0 ± 1.0	
		10	0	8.3 ± 1.5	
		15	0	4.0 ± 1.7	
		5~15	0	9.0 ± 1.0	
		0	1000	1.0 ± 1.0	
		5	1000	7.0 ± 1.7	
		10	1000	11.0 ± 2.6	
		15	1000	6.0 ± 1.0	
		5~15	1000	10.3 ± 0.6	
	60	0	0	0	0.0 ± 0.0
			5	0	83.3 ± 3.5
			10	0	48.3 ± 1.5
			15	0	1.7 ± 0.6
			5~15	0	38.3 ± 2.5
		0	1000	0.0 ± 0.0	
		5	1000	81.7 ± 2.5	
		10	1000	46.3 ± 4.2	
		15	1000	0.0 ± 0.0	
		5~15	1000	53.3 ± 4	
90		0	0	0	0.0 ± 0.0
			5	0	85.0 ± 3.6
			10	0	38.3 ± 2.9
			15	0	0.0 ± 0.0
			5~15	0	20.0 ± 2.0
		0	1000	0.0 ± 0.0	
		5	1000	85.0 ± 5.0	
		10	1000	50.3 ± 3.5	
		15	1000	1.7 ± 1.2	
		5~15	1000	33.3 ± 2.9	

^{z)}Data represent means ± SEM from 3 replications.

(6) 저온 습윤처리기간 중의 발아율 조사

저온습윤 처리를 하는 기간 중에 종자가 일부발아를 하였으므로, 저온습윤처리 기간중의 발아율을 조사하였다 (Table 4). 저온습윤 처리 60일에는 10℃와 변온에서 각각 16.5%와 17.6% 발아하였으나, 0℃, 5℃ 및 15℃에서는 전혀 발아하지 않았다. 90일 후에는 변온처리에서 38.3%로 가장 높았으며, 60일 후에는 전혀 발아하지 않았던 5℃에서는 10℃와 거의 유사한 발아율을 보였다.

Table 4. Effect of prechilling temperature (°C) on % germination of *Schisandra chinensis* BAIL after 2 and 3 months. Seeds were harvested September 15 2006 and then they were germinated at May 7 2007.

Prechilling temperature added dH ₂ O (°C)	Germination (%) after prechilling	
	60 days	90 days
0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5	0.0 ± 0.0	29.2 ± 3.0
10	16.5 ± 3.0	31.6 ± 2.2
15	0.0 ± 0.0	5.8 ± 3.5
5~15	17.6 ± 3.5	38.3 ± 12.2

²⁾Data represent means ± SEM from 3 replications.

(7) 노천매장과 GA₃처리를 통한 발아 촉진

이상의 결과에서 종자발아를 촉진시키기 위해서는 저온습윤처리와 동시에 GA₃를 처리하였을 때에 가장 효과가 좋았다. 이러한 결과를 농가에 적용시키기 위해서 과육을 포함한 과실과 과육을 제거한 종자에 GA₃를 처리한 다음 야외에 파종 깊이를 각각 2 cm, 5 cm 및 10 cm의 깊이로 2008년 11월 19일, 12월 6일 및 1월 18일 3회에 매장한 후 2009년 4월 5일에 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

종자를 파종하였을 경우에는 GA₃의 농도에 따라서 다소 차이는 있었으나, 과실을 파종하였을 때보다 발아율이 현저히 향상되었다. 가장 발아율이 높은 GA₃의 농도는 500 mg/L를 처리하였을 때에 가장 효과적이었으며, 매장깊이가 깊을수록 발아율이 더 높았다. 그러나 GA₃를 고농도로 처리하였을 경우에는 매장 깊이가 깊을수록 발아율은 현저히 감소하였다. 또한 파종 시기가 빠를 수록 발아 촉진효과가 현저하였으며, 12월 이후에 매장하였을 경우에는 10% 이하로서 그 효과가 현저히 감소하여 1월 중순에 파종한 경우에는 전혀 발아하지 안함이다 (자료 미제시). 따라서 오미자를 종자로 번식할 경우에는 과피를 제거하고, GA₃를 전처리 한 다음에 5-10 cm로 11월 중순 이전에 매장한다면 대조구에 비교하여 약 30% 이상 발아율을 촉진시킬 수 있었다.

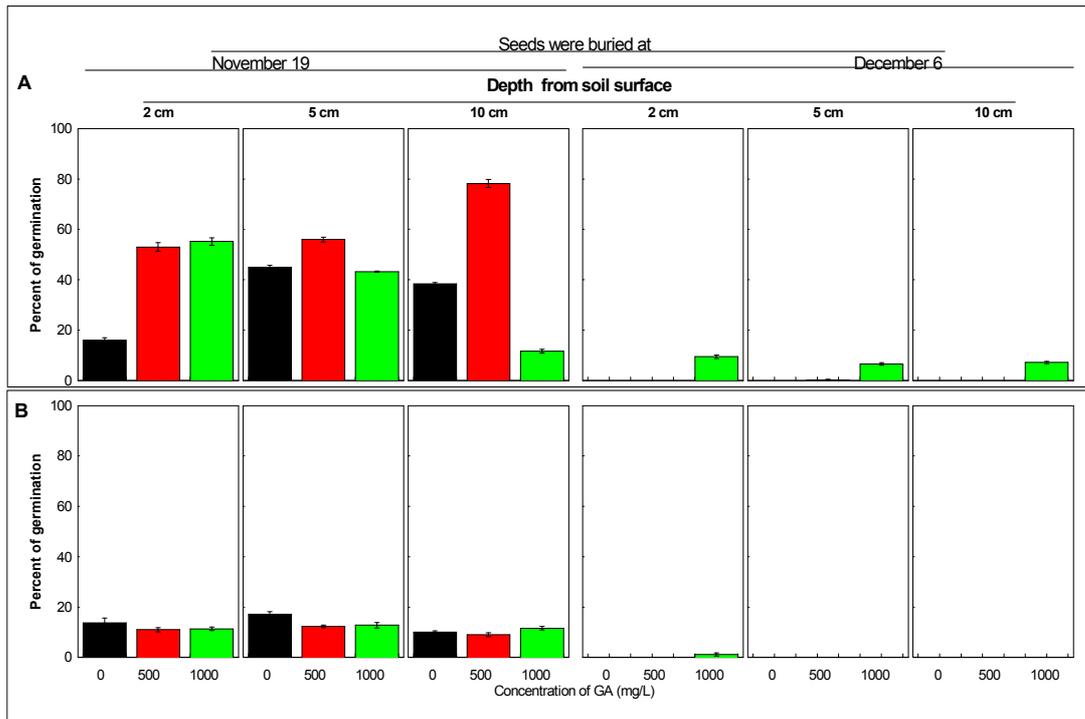


Fig. 1. Effects of buried date and GA₃ on seed germination. Seeds were buried 2 cm, 5, cm, and 10 cm depth from soil surface in November 19, December 6 in 2008, and January 18 in 2009. Seeds germination was measured at April 4 2009.

2. 오미자로부터 추출한 리그난이 몇가지 채소종자의 발아에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

본 실험에 사용된 공시품종은 고추, 상추, 및 토마토로서 2008년 구입한 종자를 5℃의 냉장고에 저장한 후 실험에 사용하였다.

오미자로부터 무, 상추 및 고추 종자의 발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여 순수분리한 schisandrin, schisandrin C, gomisins A 및 gomisins N를 사용하였으며, 처리농도는 10^{-5} M, 10^{-6} M, 및 10^{-7} M였다. 리그난의 종자처리 방법은 종자 330립을 세어서 리그난의 농도가 조절된 50 ml의 용액에 1시간 동안 침지하였다. 처리 후 종자를 수세하여 실온에서 건조한 다음 9 cm의 페트리디쉬에 Whatman No. 2 filter paper를 깔고, 증류수 5 ml을 첨가하여 종자를 치상 한 후 25℃의 항온기에서 발아율을 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

오미자는 다양한 종류의 리그난이 함유되어 있으며, 동물세포에서 항염증, 항암, 항간독성, 혈관확장 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 최근에는 식물체로부터 분리한 이차대사산물은 천연제초제, 종자의 발아와 유식물체의 성장 촉진 또는 억제에 관한 연구가 많이 수행되고 있다. 따라서 본 실험에서는 오미자로부터 순수분리한 schisandrin, schisandrin C, gomisins A 및 gomisins N 등 4 종류의 리그난 성분이 무, 고추, 상추 및 토마토 종자의 발아 및 유묘생육에 미치는 영향을 조사하였다.

(1) 몇 가지 채소종자의 발아에 미치는 리그난의 효과

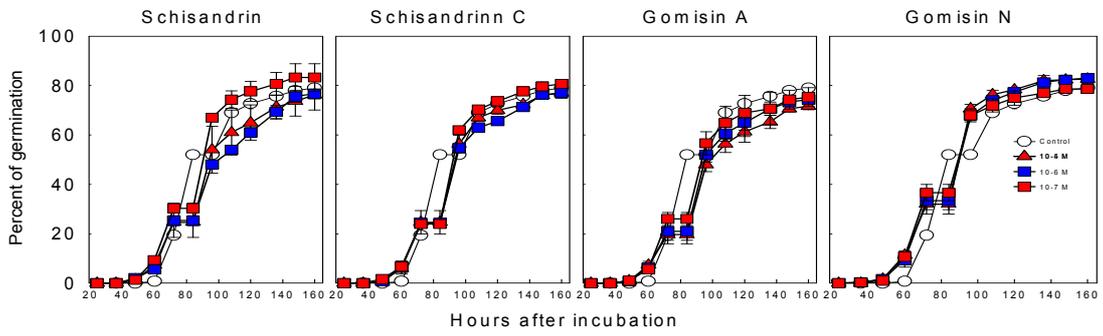
Schisandrin, schisandrin C, gomisins A 및 gomisins N이 고추, 상추, 무 및 토마토 종자의 발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 리그난 농도를 10^{-5} M, 10^{-6} M 및 10^{-7} M로 처리하여 발아율을 조사한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

고추종자에 schisandrin의 처리효과는 10^{-7} M을 처리하였을 때에 처리 96시간 이후에 발아율이 대조구에 비하여 약간 높았으나, 10^{-5} M과 10^{-6} M의 농도에서는 오히려 감소하였다. Schisandrin C는 대조구와 통계적인 유의차가 없었으며, 처리농도 간에 차이가 없었다. Gomisins A의 처리는 모든 농도에서 발아율이 억제되었으며, 농도가 높을수록 억제효과가 높았다. Gomisins N처리는 대조구에 비교하여 모든 농도에서 발아율이 높았다.

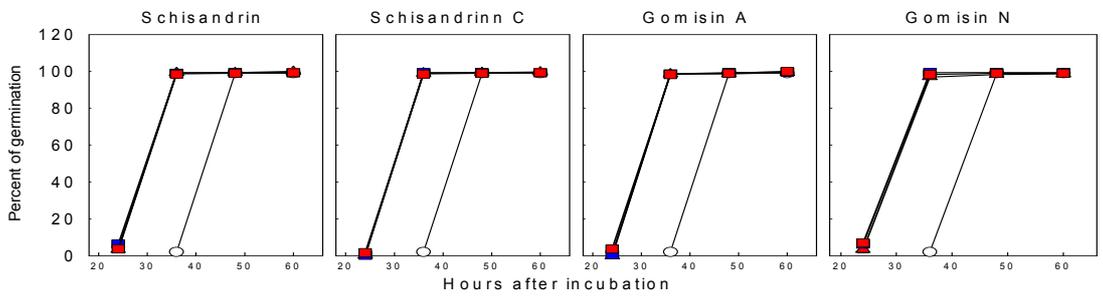
상추와 무 종자는 발아속도가 매우 빨라서 발아 60시간 이내에 모두 발아하였다. 4가지의 리그난을 처리하였을 때에 24시간 이내에 100% 발아하였으나, 대조구에서는 48시간에 100% 발아하였는데, 이러한 원인은 리그난 처리시에 1시간 동안 침지한 후에 발아시켰기 때문에 수분흡수 후에 종자 내에서 생리적인 활성이 빨리 일어나서 발아가 빨랐을 것으로 생각된다.

무 종자 역시 발아속도가 빨랐는데, 60시간 이후에 거의 100% 발아하였다. 상추종자와 마찬가지로, 모든 처리구에서 대조구에 비교하여 발아속도가 빨랐다.

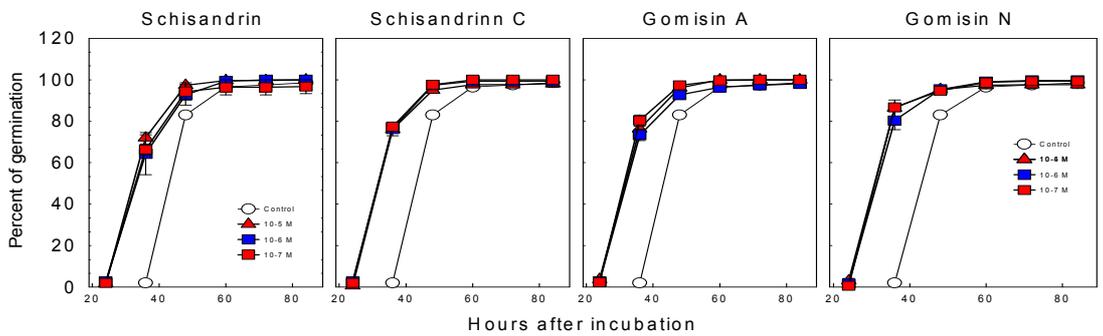
A (고추)



B (상추)



C (무)



N

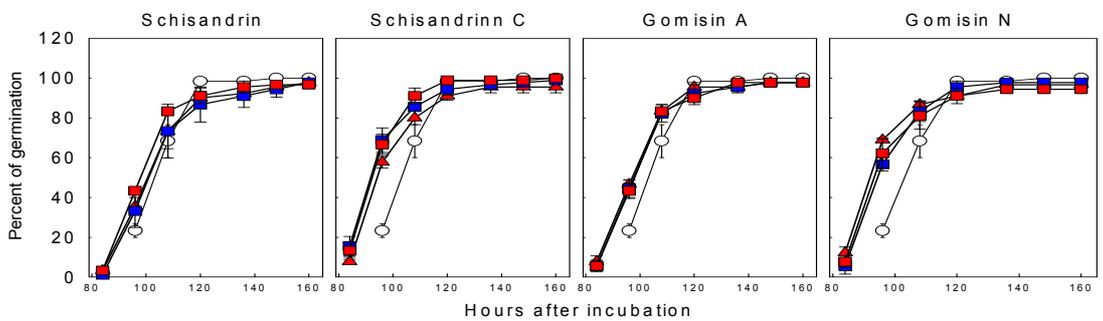
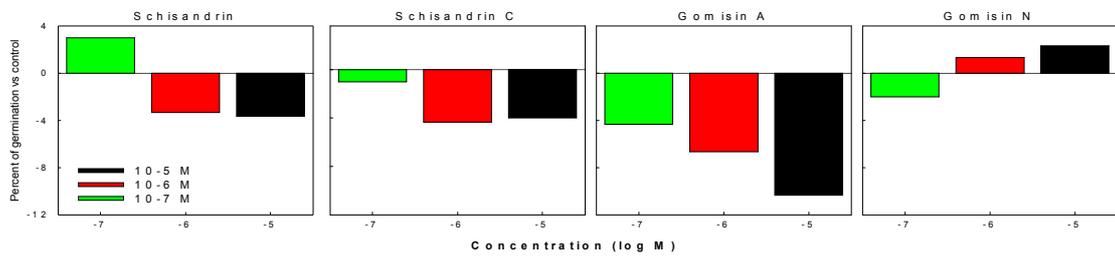


Fig. 2. Effect of lignans on seed germination of pepper (A), Lettuce (B), and radish (C) and tomato (N). Seeds were immersed each concentrations for 1 hours.

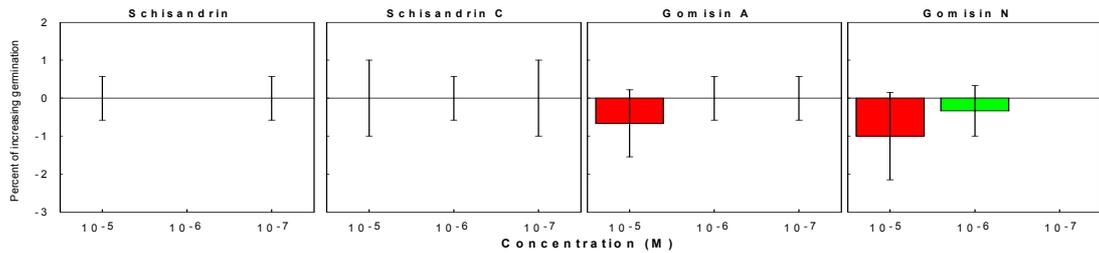
발아 초기 즉 48시간 또는 108시간에 종자의 발아율을 대조구를 기준으로 하여 촉진 또는 억제효과를 비교하였다 (Fig. 3). 고추종자의 경우에는 schisandrin 처리 48 시간 후에는 고농도인 10^{-5} M 처리시에 대조구에 비교하여 발아율이 촉진되었으나, 10^{-6} M 이하의 저농도에서는 오히려 억제되었다. Schisandrin C와 gomisin A는 농도가 낮을 수록 감소하는 경향이였으며, gomisin N은 10^{-5} M의 고농도에서는 대조구에 비하여 발아를 억제시켰으나, 10^{-6} M이하에서는 농도가 낮을수록 통계적인 유의차는 없었으나 발아율이 촉진되었다. 그러나 발아속도가 빠른 상추는 거의 차이가 없었다.

무 종자의 경우 schisandrin과 gomisin A처리시에는 10^{-6} M의 농도에서 발아율이 억제되었다. 그러나 schisandrin C와 gomisin N의 처리는 농도가 높을수록 발아율이 억제되었다.

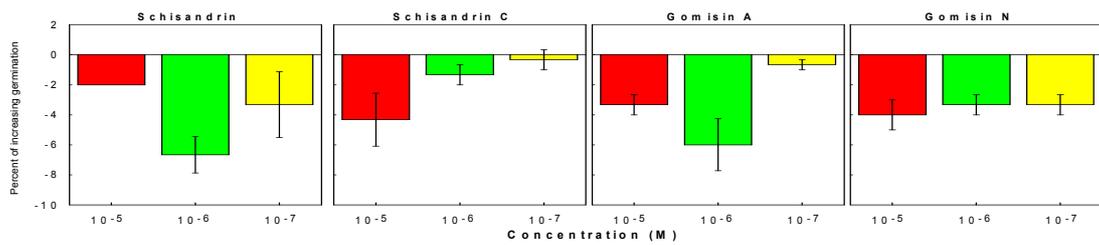
A (고추) - 48시간 후



B (상추) - 48시간 후



C (무) - 48시간 후



N - 108시간 후

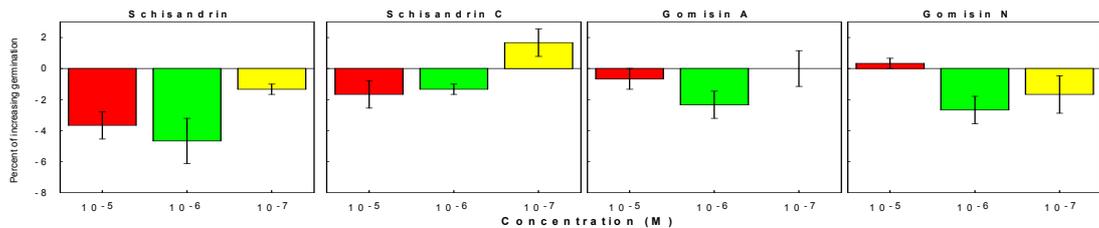
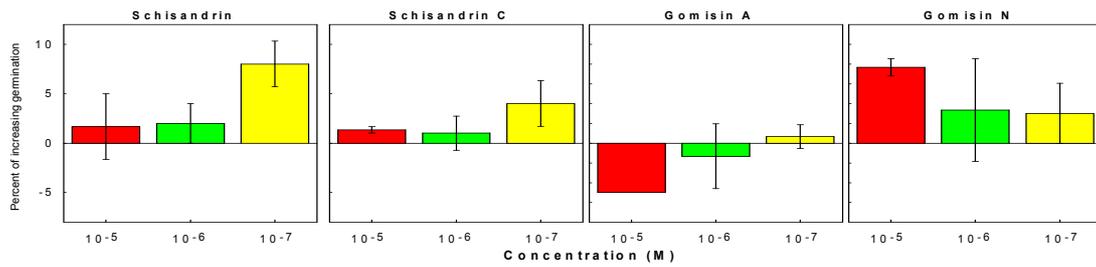


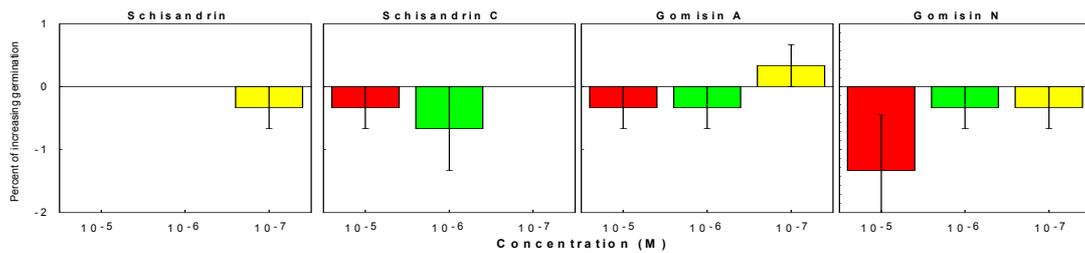
Fig. 3. Effect of lignans on seed germination of pepper (A), Lettuce (B), and radish (C). Values are presented as percentage differences from control. Seeds germination were measured at 48 or 108 hours.

발아 후기 즉 184시간 이후에 대조구와 비교하여 종자의 발아촉진 또는 억제효과를 비교한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 고추종자의 경우 통계적의 유의차는 없었으나 농도가 낮을수록 대조구와 비교하여 발아율이 증가하였으며, gomisin N의 처리 역시 대조군과 비교하여 발아율이 촉진되는 경향이었으나 농도가 낮을수록 감소하였다. 그러나 gomisin A의 처리는 10^{-6} M의 고농도에서는 발아가 억제되었으며, 농도가 높을수록 억제율은 더 높았다. 상추와 무 종자의 경우에는 거의 모든 처리에서 발아율이 억제되었다.

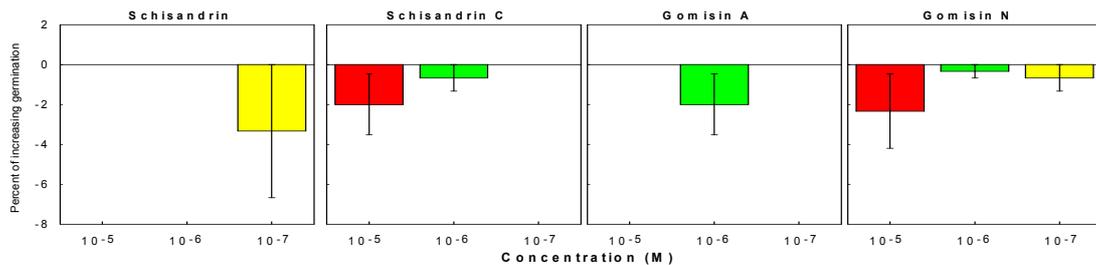
A (고추) - 184시간 후



B (상추)



C (무)



N - 120시간 후

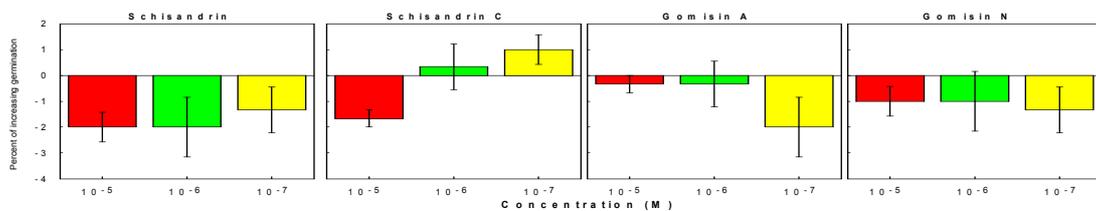


Fig. 4. Effect of lignans on seed germination of pepper (A), Lettuce (B), and radish (C). Values are presented as percentage differences from control. Seeds germination were measured at 184 hours.

식물로부터 추출된 리그난의 생리활성은 항암, 항바이러스 등 다양한 효능이 보고되었다. 그러나 리그난이 종자의 발아 및 생육에 미치는 효과에 관한 보고는 거의 전무한 실정이다. Szabo와 Garay (1970)는 lariciresinol-*O*-glucoside, monoepoxylignans 및 리그난 류들이 발아를 억제시킨다고 하였다 (Lavie, et al., 1974; Yoshihara et al., 1982; Francesca et al., 2003). 최근에는 Rimando et al. (1999)가 *Leucophyllum frutescens*로부터 식물독성을 가진 furofuran lignans 을 순수분리하여 보고하였는데, diastereoisomeric compounds가 *La. sativa*와 *A. cepa*에 서로 다른 억제효과가 있는 것으로 보고하였다. 게다가 Oliva et al. (2002)은 *Podophyllum* 로부터 분리한 aryltetralin lignans이 상추, 양파 및 호밀에 독성을 일으키는 물질로 보고하였다. 또한 *B. fruticulosa*로부터 추출한 성분이 식물체에 독성을 가진 화합물로서 농약으로서 사용 가능성이 높은 것으로 보고하였다. 따라서 본 실험에서 수행한 오미자로부터 분리한 리그난의 경우에도 생육의 촉진 또는 억제의 효과가 있었으므로 생장을 촉진시킬 수 있는 식물호르몬 또는 다른 용도의 농약으로서 개발 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

3. 리그난 성분이 몇 가지 채소의 유묘생육에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

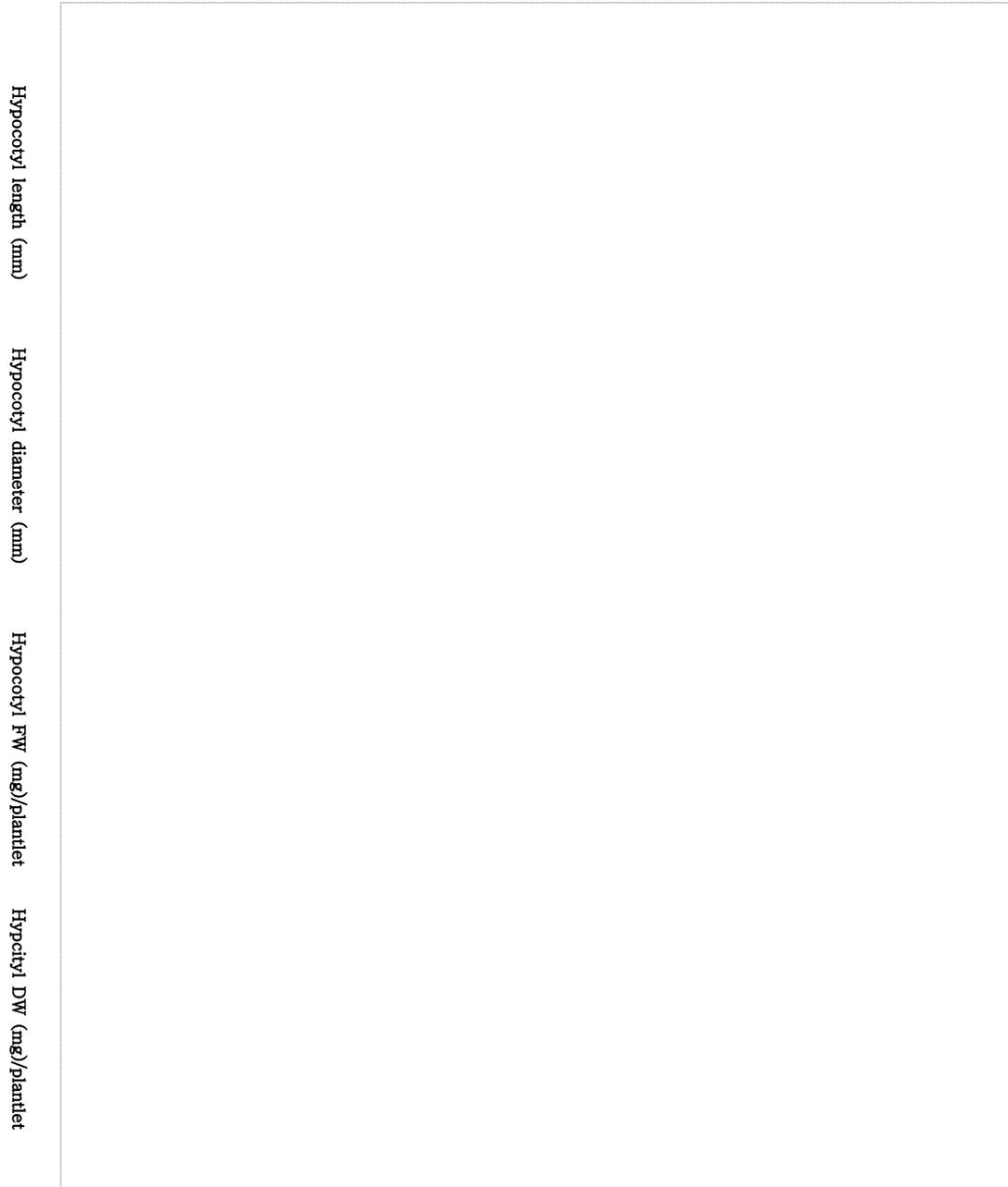
오미자로부터 순수분리한 리그난이 유묘의 성장촉진 또는 억제효과를 조사하였다. 리그난 처리가 유묘의 생육효과를 조사하기 위하여 균일하게 발아된 종자를 선별하여서 사용하였다. 리그난의 처리방법은 직경 9 cm, 높이 5 cm의 페트리디쉬에 10 cm Whatman No. 2 filter paper를 깔고 10 ml의 용액을 첨가한 후에 균일하게 발아된 종자 10립씩을 치상하였다. 치상된 페트리디쉬는 5,000 lux의 광도가 조절된 성장상에서 2주 동안 생육시킨 유묘를 10주씩 3반복으로 채취하여 하배축과 뿌리의 생육 및 생체중과 건물중을 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 무의 유묘생육에 미치는 영향

오미자로부터 순수분리한 리그난 성분이 무종자의 유묘생육에 미치는 효과를 대조구와 비교하여 촉진 또는 억제효과를 비교한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다.

Schisandrin과 schisandrin C처리시 하배축의 생육은 10^{-6} M 이하의 농도에서는 농도가 낮을수록 생육이 촉진되었다. 그러나 gomisins A와 gomisins N의 처리시에는 모든 농도에서 생육이 촉진되기는 하였으나, 농도 의존적인 생육의 촉진 또는 억제효과는 나타나지 않았다. 하배축의 직경은 schisandrin 10^{-6} M 처리시에 억제율이 가장 높았으며, schisandrin C의 처리구에서는 고농도에서는 억제되었고, 10^{-5} M의 저농도에서는 오히려 촉진되었다. 생체중과 건물중은 유사한 경향으로서 schisandrin 처리시에 대조구와 비교한 결과로서 10^{-5} M의 고농도에서는 억제되었으나 10^{-6} M 이하의 저농도에서는 농도가 낮을수록 촉진되었다. Schisandrin C의 처리시에는 schisandrin과 유사한 경향이었으나 그 효과가 낮았으며, gomisins A와 gomisins N의 처리시에는 촉진 또는 억제효과가 거의 없었다.



Hypocotyl length (mm)

Hypocotyl diameter (mm)

Hypocotyl FW (mg)/plantlet

Hypocotyl DW (mg)/plantlet

Fig. 5. Effect of lignans on hypocotyl growth of radish. Values are presented as growth differences from control.

무 뿌리의 길이생장을 대조구와 비교한 결과 (Fig. 6), schisandrin의 처리시에 10^{-5} M의 고농도에서 현저하게 촉진되었으나, 10^{-6} M 이하의 저농도에서는 오히려 억제되었다. gomisin N의 경우에는 10^{-6} M에서 촉진효과가 현저하였으며, gomisin A의 처리시에는 대조구와 거의 차이가 없었다. 생체중과 건물중을 비교한 결과 일정한 경향을 설명할 수 없었다.

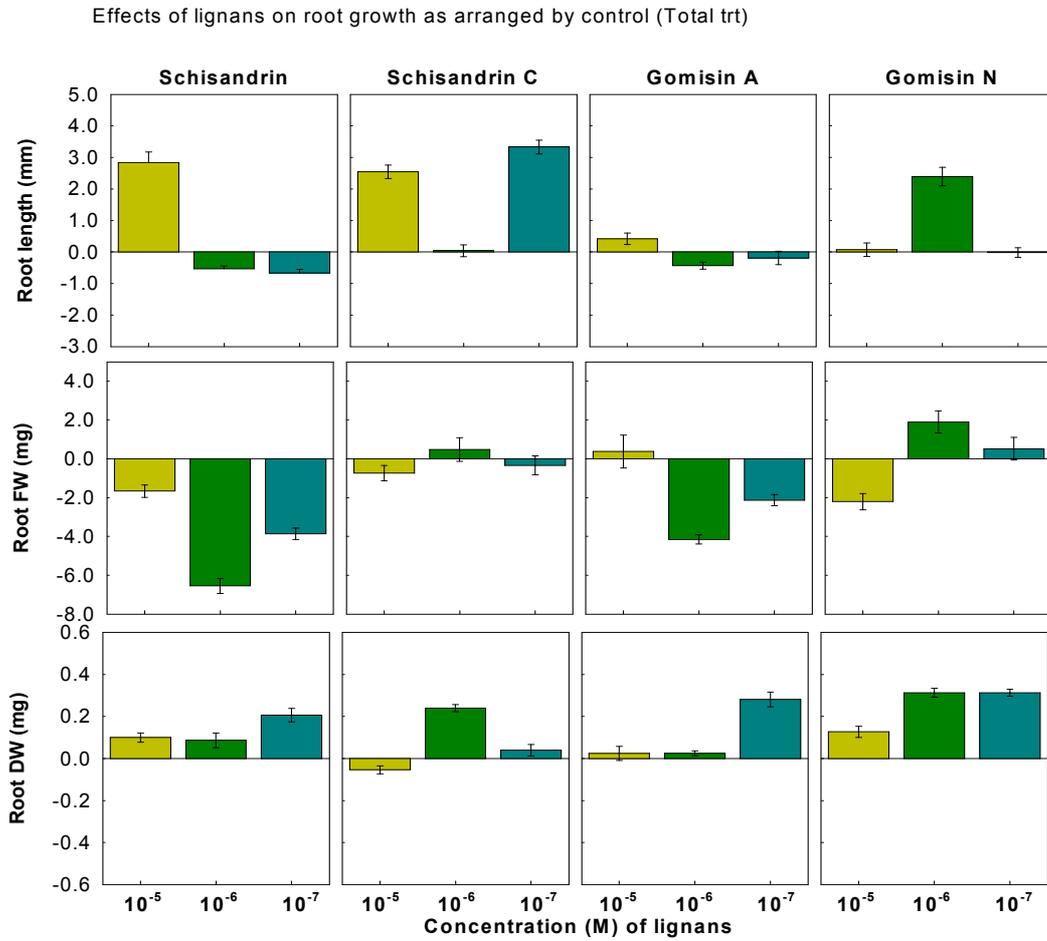


Fig. 6. Effect of lignans on root growth of radish. Values are presented as growth differences from control.

Effects of lignans on cotyledon growth as arranged by control (Total trt)

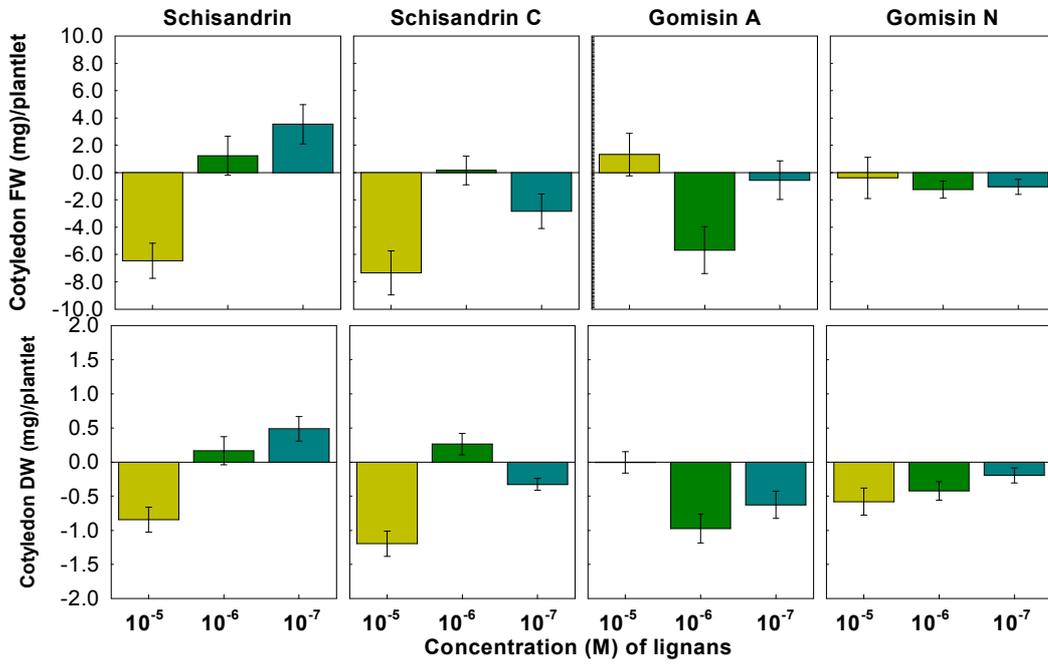


Fig. 7. Effect of lignans on root growth of radish. Values are presented as growth differences from control.

유식물체당 총 생체중 및 건물중을 대조구와 비교하여 촉진 또는 억제효과를 비교한 결과 (Fig. 8), schisandrin을 처리하였을 경우에는 농도가 높을수록 억제되었으나, 10^{-7} M의 저농도로 처리하였을 때에 현저하게 촉진되었다.

Schisandrin C의 처리시 10^{-5} M의 고농도 처리시에 생체중과 건물중이 현저하게 감소되었으나, 10^{-5} M 처리시에는 생육이 오히려 촉진되었다.

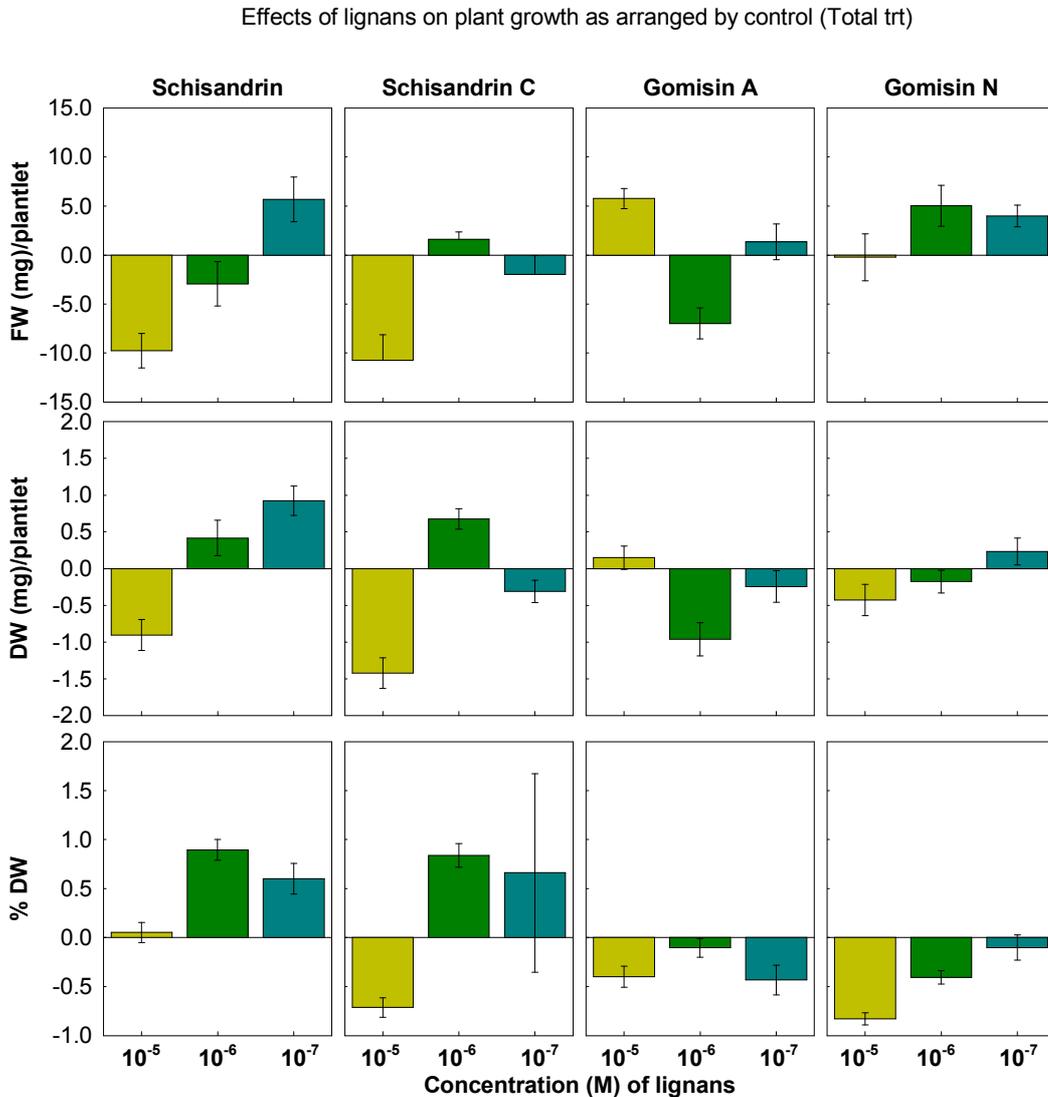


Fig. 8. Effect of lignans on root growth of radish. Values are presented as growth differences from control.

(2) 리그난 처리가 상추의 생육에 미치는 영향

상추종자에 오미자로부터 순수분리한 리그난 성분을 처리하여 대조구와 비교하여 생육의 촉진 또는 억제효과를 비교한 결과는 Fig. 9 - 13에서 보는 바와 같다. Schisandrin의 처리가 하배축의 길이 및 직경의 생육에 미치는 영향을 비교할 결과, 10^{-6} M의 처리에서 생육이 현저하게 억제되었으며, 10^{-5} M과 10^{-7} M의 농도에서도 억제 정도가 약간 낮았으나 농도간에 거

의 차이가 없었다. Schisandrin C의 처리시 하백축의 길이는 10^{-6} M 이하의 고농도에서는 농도가 낮을수록 감소하였으며, 직경은 10^{-6} M에서는 현저하게 억제되었으며, 10^{-7} M의 저농도에서는 대조구와 비교하여 현저하게 촉진되어서 농도간에 뚜렷한 차이를 나타내었다. Gomisins A와 gomisins N은 농도간에 촉진 또는 억제하였으나 그 효과는 아주 낮았다.

생체중과 건물중을 대조구와 비교하여 본 결과 리그난의 종류와 농도간에 유사한 경향을 보였다. Schisandrin의 처리시에 농도가 감소할수록 현저하게 생육이 억제되었으며, schisandrin C의 처리시에는 10^{-5} M의 고농도에서 대조구와 비교하여 생체중이 약간 무거웠으나, 10^{-6} M 처리시에는 생체중과 건물중이 현저히 감소하였다. Gomisins A와 gomisins N의 처리시에는 10^{-5} M의 고농도에서 생체중과 건물중이 모두 대조구와 비교하여 무거웠으나, 농도가 낮을수록 오히려 억제되었다.

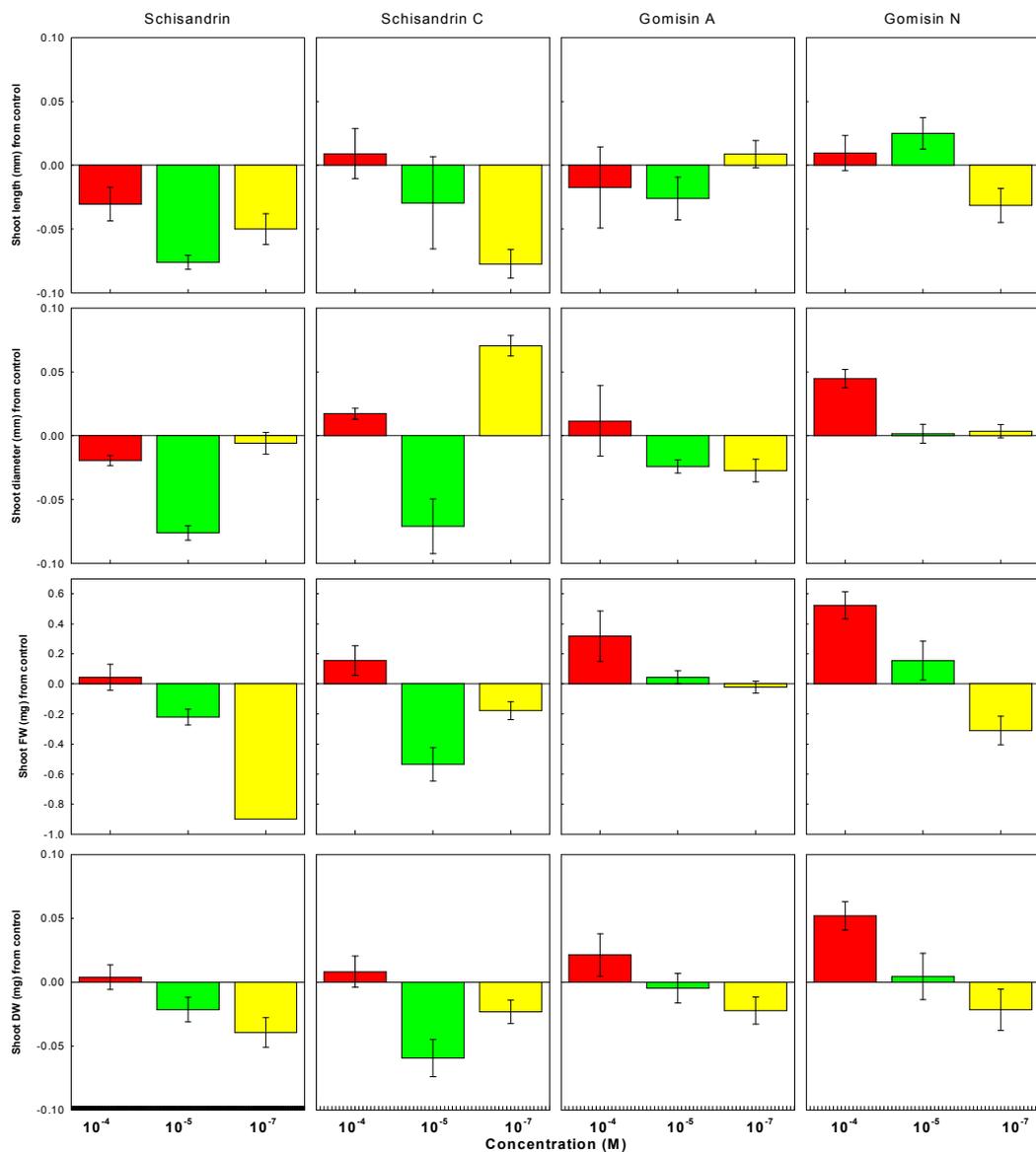


Fig. 9. Effect of lignans on hypocotyl growth of lettuce. Values are presented as growth differences from control.

자엽의 생체중과 건물중을 대조구와 비교한 결과 (Fig. 10), schisandrin처리 결과 농도가 낮을수록 억제되었으며, schisandrin C의 처리시에는 10^{-6} M 처리시에 가장 낮았으며, gomisin A처리시에는 농도가 높을수록 억제되었다.

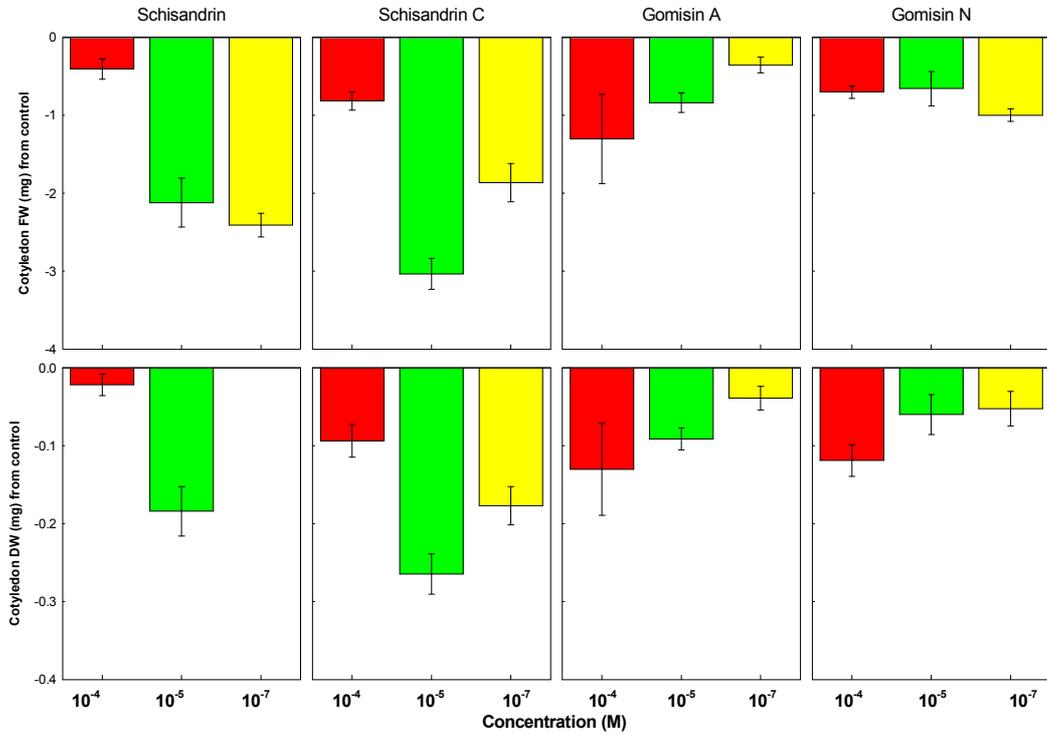


Fig. 10. Effect of lignans on cotyledon growth of lettuce. Values are presented as growth differences from control.

발아 후 제 1엽의 생체중과 건물중을 비교한 결과는 Fig. 11에서 보는 바와 같다. schisandrin 처리시에 저농도인 10^{-7} M에서 생육이 촉진되었으며, Schisandrin C의 처리시에는 10^{-6} M에서 현저하게 억제되었으나, 10^{-5} M과 10^{-7} M에서는 약간 촉진되었다. Gomisin A 처리구에서는 고농도에서 생육이 약간 촉진되었으며, 저농도에서는 오히려 억제되었다. Gomisin N처리시에는 고농도인 10^{-5} M처리시에 대조구와 비교하여 생체중과 건물중이 감소하였고, 10^{-6} M 이하의 농도에서는 생육이 촉진되었다.

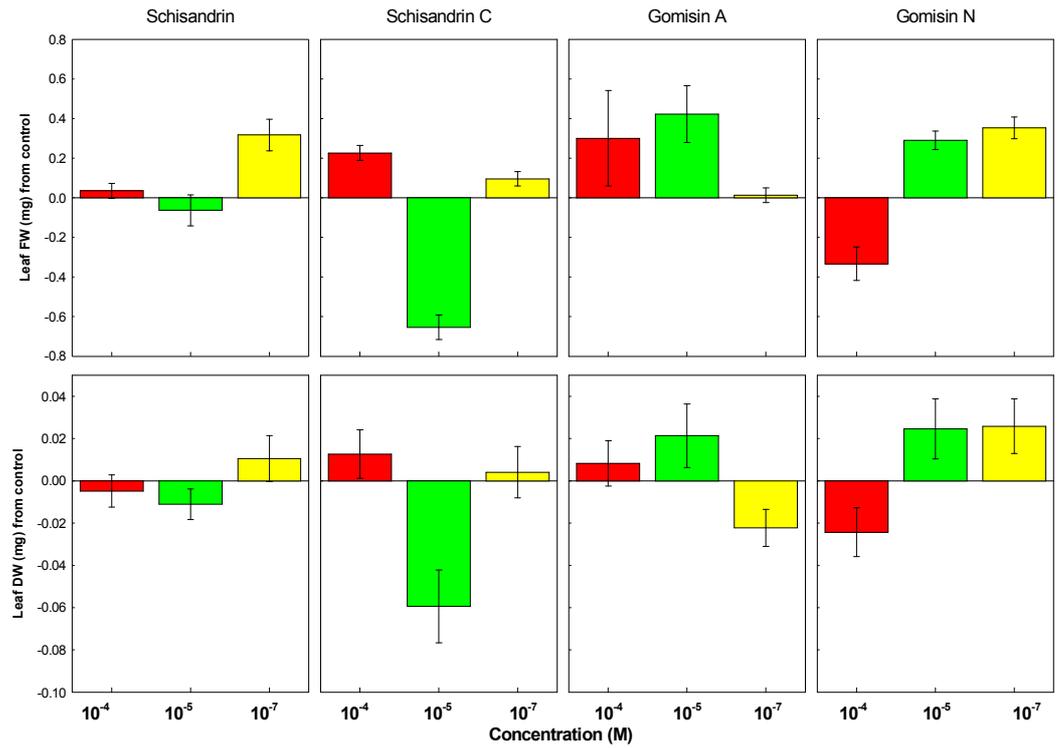


Fig. 11. Effect of lignans on leaf growth of lettuce. Values are presented as growth differences from control.

상추의 뿌리생육을 비교한 결과 (Fig. 12), schisandrin처리시에는 10^{-6} M 이상의 농도에 서는 촉진되었으나, schisandrin C처리시에는 생체중과 건물중이 10^{-6} M처리시에 현저하게 감소하였다. Gomisins A처리시에는 모든 처리에서 뿌리의 생육이 촉진되었는데, 농도가 높을수록 생육촉진 효과가 현저하였다. Gomisins N의 처리시에는 10^{-6} M 이하의 농도에서 약간 촉진되었다.

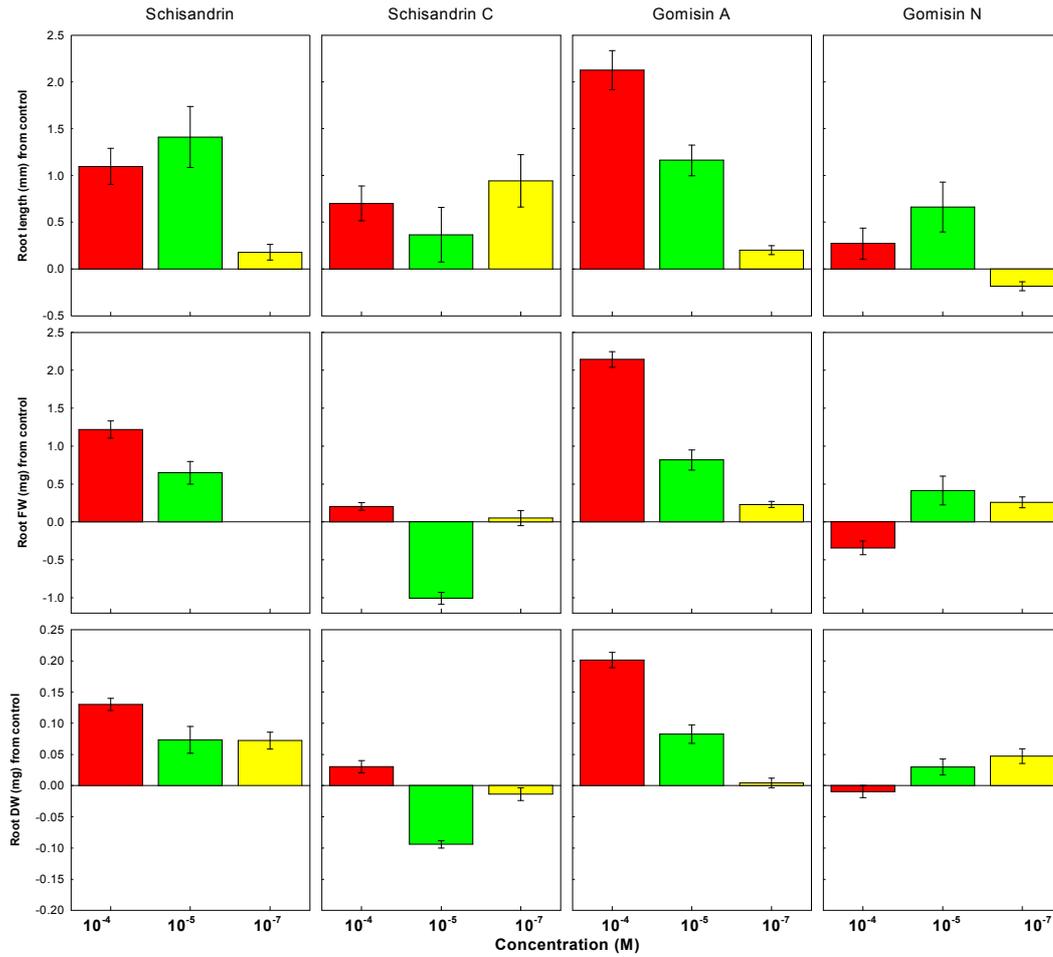


Fig. 12. Effect of lignans on root growth of lettuce. Values are presented as growth differences from control.

리그난 처리 후 상추의 총 무게를 대조구와 비교할 결과 (Fig. 13), schisandrin과 gomisin A 처리시 10^{-5} M에서 생체중과 건물중이 약간 무거웠으나, 10^{-6} M 이하의 농도에서는 오히려 감소하였다. Schisanrin C 처리시에는 10^{-6} M에서 생육억제가 현저하였으며, 그 다음은 10^{-7} M 및 10^{-5} M의 순으로 억제효과가 낮았다.

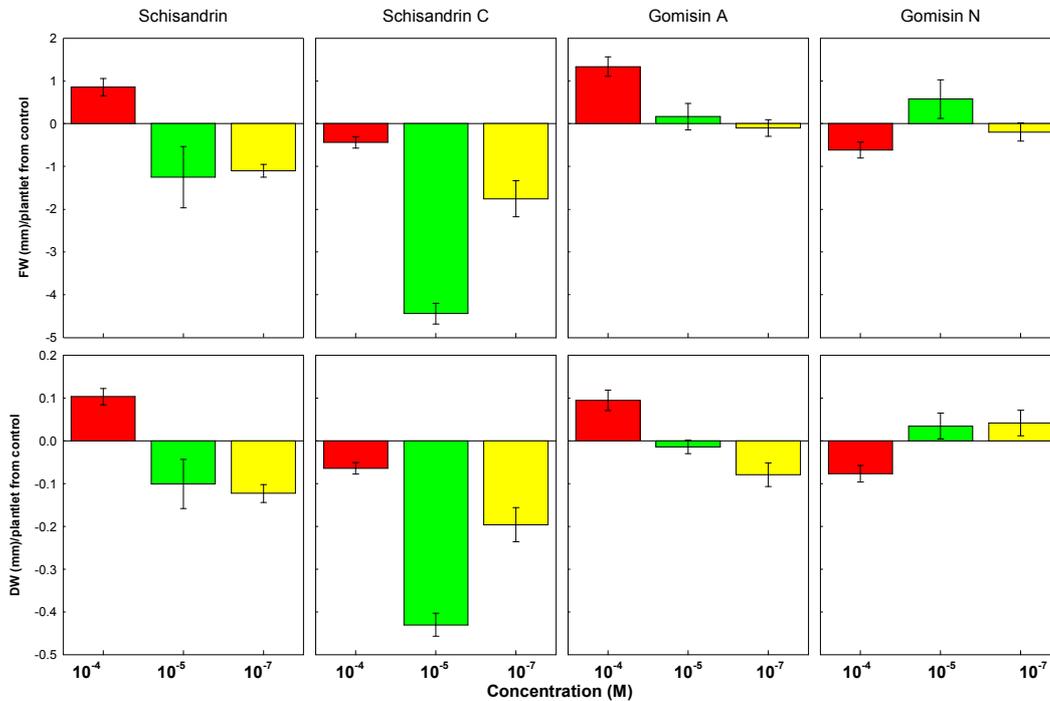


Fig. 13. Effect of lignans on total growth of lettuce. Values are presented as growth differences from control.

(3) 토마토의 유묘생육에 미치는 영향

오미자로부터 순수분리한 schisandrin, schisandrin C gomisin A 및 gomisin N이 토마토의 유묘생육에 미치는 효과를 대조구와 비교하여서 생육 촉진 또는 억제효과를 비교한 결과는 다음의 Fig. 14 - 16에서 보는 바와 같다. Schisandrin과 gomisin A 처리시에 하배축의 길이는 농도가 낮을수록 생장이 촉진되었으나, 하배축의 직경은 10^{-6} M 이상으로 농도가 높아지면 생장이 억제되었으나, 10^{-7} M의 저농도에서는 오히려 생장이 촉진되었다. Schisandrin C의 처리시 하배축의 길이생장은 농도간에 일정한 경향을 보기 어려웠으나, 직경은 농도가 높을수록 감소하는 경향이였다. 하배축의 생체중은 schisandrin과 schisandrin C의 처리시에 효과가 아주 낮았으며, 농도간에 큰 차이가 없었다. Gomisin A 처리시에는 10^{-6} M 이상에서 농도가 높을수록 대조구와 비교하여 생육이 억제되어 생체중이 감소하였으나, 10^{-7} M의 저 농도에서는 생육이 약간 촉진되었다. Gomisin N 처리구에서는 모든 처리 농도에서 생육이 촉진되었는데, 농도가 낮을수록 생육 촉진 효과는 증가되었다.

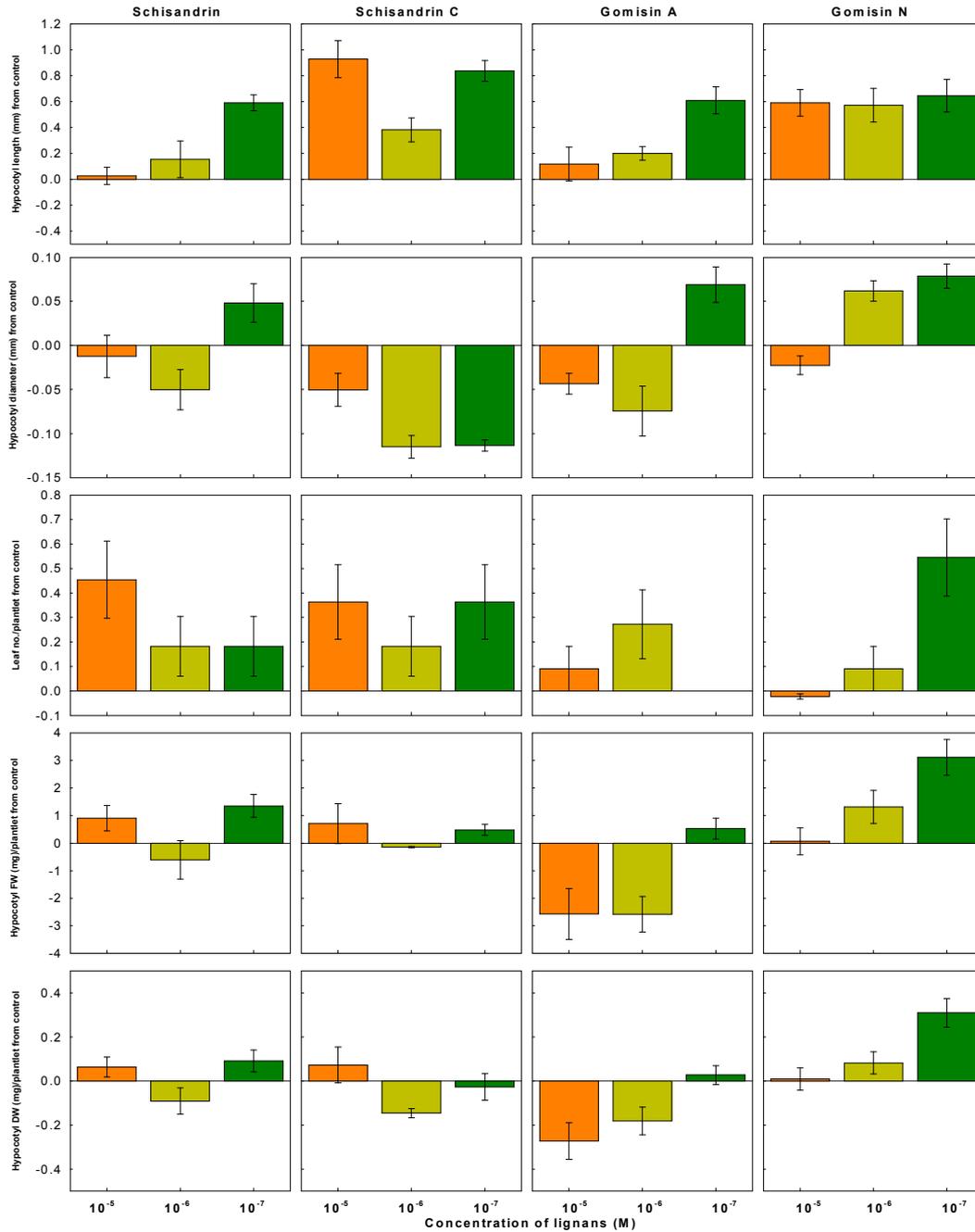


Fig. 14. Effect of lignans on hypocotyl growth of tomato. Values are presented as growth differences from control.

뿌리의 길이생장은 대조구와 비교하여 생육이 촉진되었는데, schisandrins의 처리구에서는 10⁻⁶ M 처리구서 가장 높았고, schisandrins C의 처리구에서는 고농도인 10⁻⁵ M에서 가장 높았으며, gomisin N 처리시에는 대조구와 비교하여 생육이 촉진되었으나 농도간의 차이는 없었다. 그러나 gomisin A의 처리시에는 10⁻⁵ M에서는 길이생장이 억제되었으나, 10⁻⁶ M 이하의 저농도에서는 농도가 낮을수록 길이생장이 촉진되었다. 뿌리의 생체중과 건물중도 거의 유사한 경향이였다.

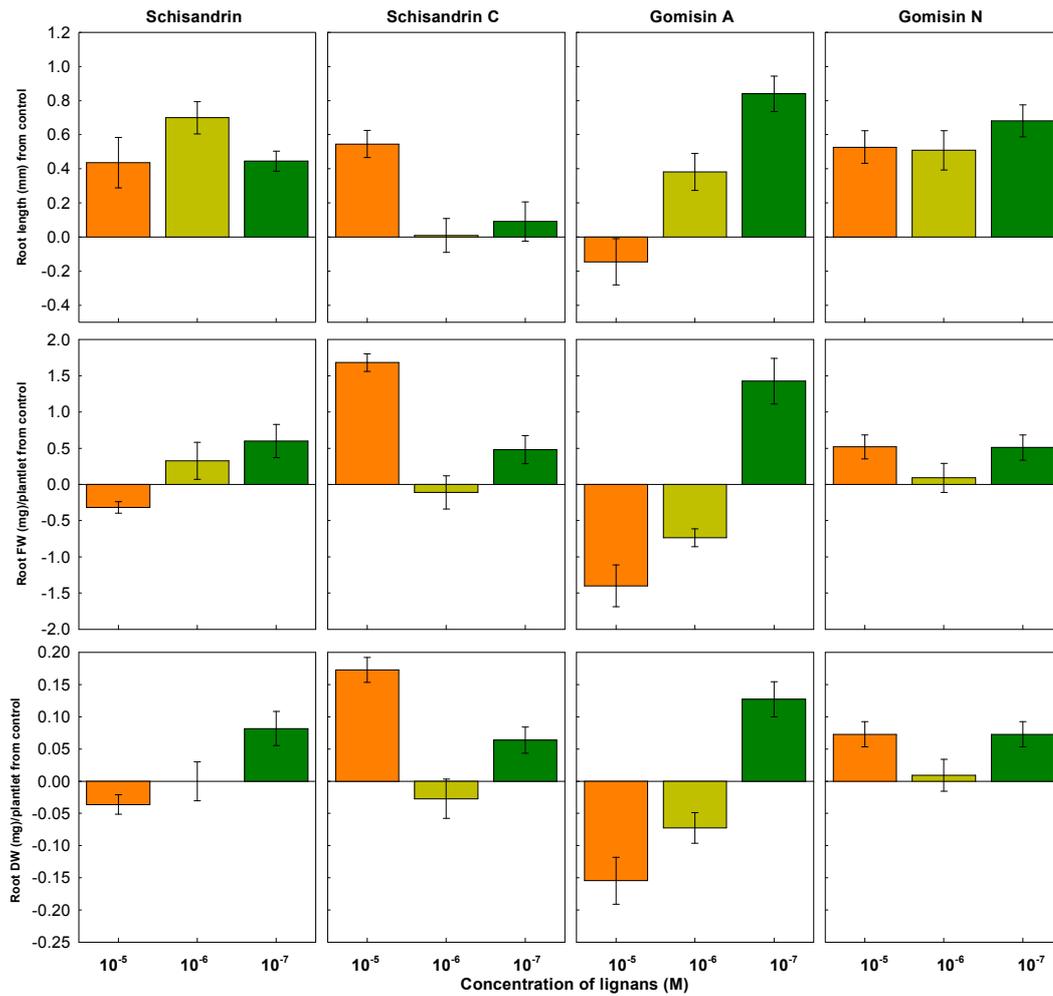


Fig. 15. Effect of lignans on root growth of tomato. Values are presented as growth differences from control.

토마토의 생체중과 건물중을 대조구와 비교한 결과는 Fig. 16에서 보는 바와 같다. Schisandrins 처리시에 생체중은 10^{-7} M의 저농도에서 현저히 증가하였으며, gomisins A의 처리시에는 10^{-6} M 이상의 고농도에서는 농도가 증가할수록 생체중이 감소하였으나, 10^{-7} M의 저농도에서는 생체중이 오히려 촉진되었다. Gomisins N 처리시에는 모든 농도에서 대조구와 비교하여 생체중이 증가되었으며, 농도가 낮을수록 효과는 더 높았다. 건물중은 생체중과 유사한 경향이였다.

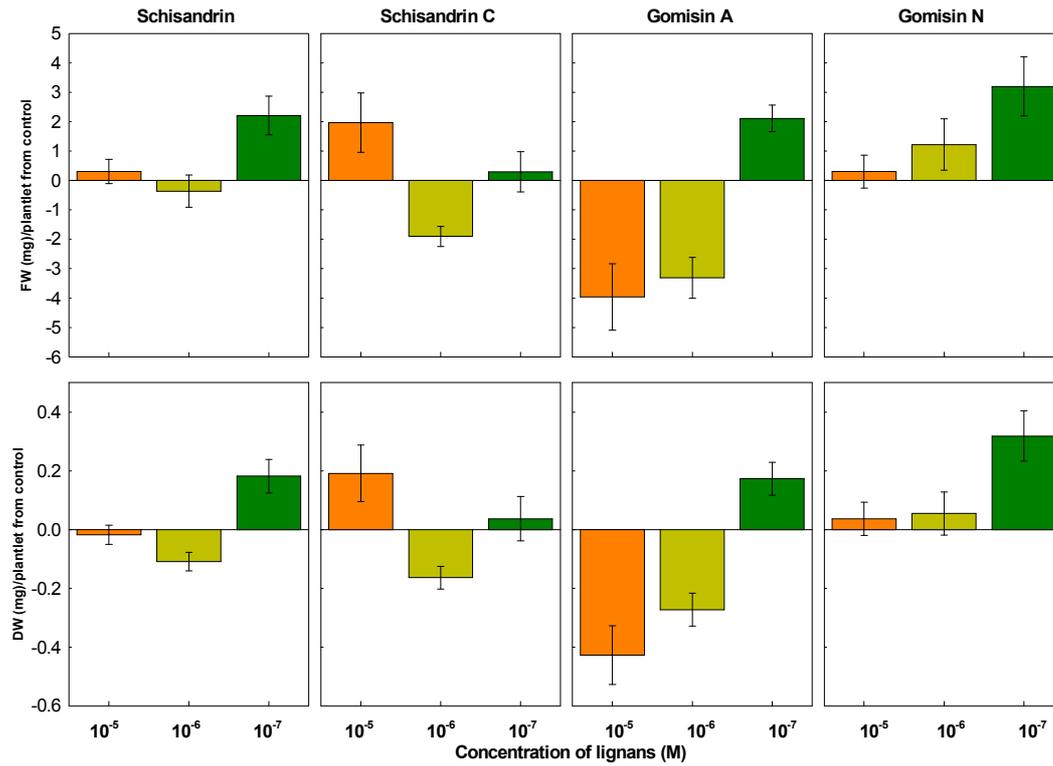


Fig. 16. Effect of lignans on total growth of tomato. Values are presented as growth differences from control.

4. 오미자의 추출방법 및 기관별 리그난 함량 분석

가. 재료 및 방법

(1) 재료 수집 및 조제

오미자 수집 지역별 리그난 함량분석을 위한 공시재료는 문경, 무주, 진안, 거창, 및 함양 등에서 재배하던 식물체로부터 2008년 9월 20일에 수확한 과실을 공시재료로 사용하였다. 수확한 오미자시료는 동결건조 후 분석재료로 사용하였다. 샘플의 조제는 완전히 분쇄한 0.5 g의 재료를 동시정량을 위해서 100% 메탄올 용매 2.5 ml을 이용하여 실온의 sonicator에서 1시간씩 3회 추출하였다. 각각의 추출물을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상정액을 10.0 ml로 맞추었다. 얻어진 용액을 10배로 희석 한 다음 기기분석 시료로 사용하였다. 분석기기는 HPLC를 이용하였으며, Agilent (Agilent, USA), 컬럼은 C₁₈-Luna ((Phenomenex, 150 × 4.6 mm I.D.; 5 µm particle size), 이동상은 Acetonitrile: Methanol을 gradient, 유속 1.0 ml/min, 검출기 UV 215 nm, 검출감도는 0.05 AUFS의 조건으로 분석하였다. 조사된 리그난 성분은 schisandrin, schisandrin C, gomaiin A 및 gomisinsin N 등 4종류의 리그난 함량을 분석하였다.

Table 5. Operational conditions of HPLC for analysis of lignans of *Schisandra chinensis*.

Instrument	HPLC (Agilent, USA)
Column	C ₁₈ -Luna
Mobile phase	Acetonitrile : Methanol gradient
Flow rate	1.0 ml/min
Detection	UV 215 nm
Sensitivity	0.05AUFS

(2) 시약 및 기기

TLC plate는 Kieselgel 60F₂₅₄ precoated plate (Merk)를 사용하였다. 컬럼크로마토그래피 용 silica gel은 Kieselgel 60 (70-230 mesh, Merk)을 사용하였다. 시약과 용매는 특급 또는 1급 시약을 사용하였으며, HPLC용매는 HPLC grade (Fisher)를 사용하였다. 리그난의 분리는 제 1절에서 설명하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 생육시기별 과실의 생육 비교

과실의 생장은 착과 후에 지속적으로 성장하여 9월 21일까지 생체중이 증가하였다. 특히 10월 4일에는 생체중과 건물중이 모두 감소하였는데 그 원인은 조기 수확으로 인하여 건건하지 못한 과실을 수확하였기 때문이다.

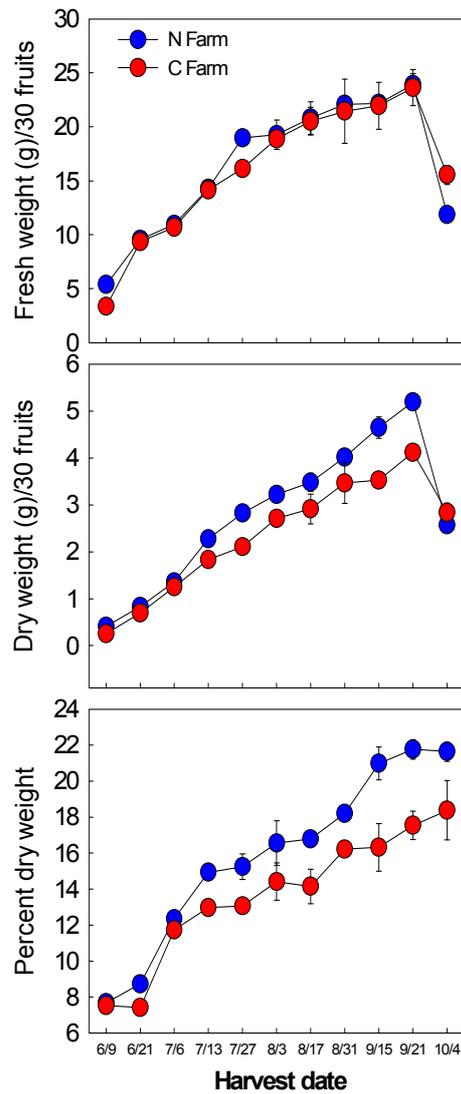


Fig. 17. Fruit growth affected by growth stage of *Schisandra chinensis*.

(2) 추출방법에 따른 오미자의 Lignan 함량 분석

(가) 순차적 추출방법

오미자 시료 0.5 g을 hexane, ethyl acetate, chloroform, 및 methanol로서 순차적 또는 독립적으로 추출하였다. 순차적 추출물에 대하여 schisandrin C, gomisins N, gomisins A 및 schisandrin을 표준으로 하여 함량을 비교 분석한 결과, hexane 추출물에서 모든 lignan이 모두 추출되었으며, hexane으로 추출한 후 남은 잔여물에 대하여 ethyl acetate, chloroform, 및 methanol로 순차적 추출물에서는 리그난이 전혀 없었다 (Fig. 18). Hexane 추출물에서 분리된 4종의 lignan 함량을 비교하면 schisandrin의 함량이 가장 높았으며, 다음은 gomisins N, gomisins A, schisandrin C의 순으로 lignan 함량이 낮았다.

따라서 오미자로부터 lignan을 추출하기 위해서는 다양한 용매를 사용할 수 있으나, 본 연구의 결과, hexane을 이용하면 오미자에 포함되어 있는 lignan을 모두 추출할 수 있었다. 오미자로부터 lignan이 많이 함유되어 있는 제품을 생산하기 위해서는 hexane을 이용하는 것이 가장 효과적인 방법이 될 것이다.

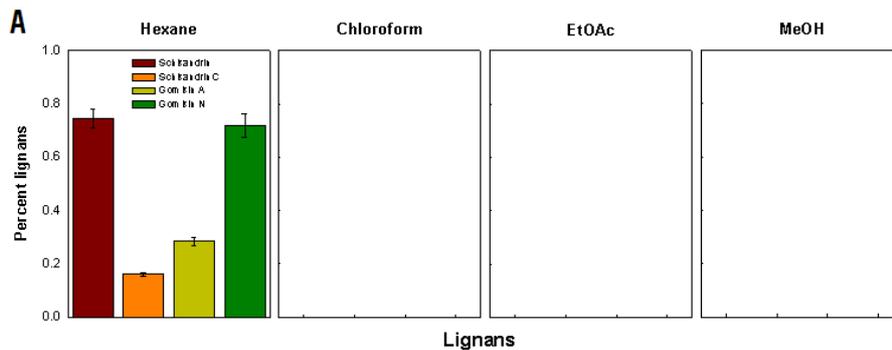


Fig. 18. Comparative analysis of lignan contents obtained from successive (A) extraction with hexane, ethyl acetate, chloroform, and methanol.

(나) 독립 용매 추출 방법

건조과실을 마쇄하여 0.5 g의 시료를 hexane, ethyl acetate, chloroform, 및 methanol의 용매로 각각 추출한 추출물에 함유된 lignan성분의 함량을 비교한 결과는 Fig. 19에서 보는 바와 같다. 오미자에서 분리된 4종의 lignan 함량을 비교한 결과, schisandrin은 hexane, EtOAc, CHCl_3 , 및 MeOH의 모든 용매로서 lignan의 추출이 가능하였다. 그 중에서 hexane과 EtOAc 추출물에서 schisandrin 함량이 낮았으며, methanol과 CHCl_3 추출물에서의 schisandrin의 함량이 비교적 높았다.

Schisandrin과는 유사하게 gomisins N은 CHCl_3 추출물에서의 함량이 제일 높았으며 methanol, EtOAc, 및 hexane 순으로 작아졌다. Schisandrin과 gomisins N의 함량이 높는데 비하여, schisandrin C와 gomisins A의 함량이 상대적으로 낮았다. 오미자에서 분리된 4종의 lignan 물질인 schisandrin, schisandrin C, gomisins N 및 gomisins A의 함량은 극성이 높은 추출물과 극성이 낮은 추출물에서 모두 함유되어 있었으며 그 차이는 적었다. 또한 4종의 물

질은 hexane 추출물에서도 함량이 높았는데, 이는 극성이 낮은 용매 추출로서 대량의 lignan 성분을 쉽게 획득할 수 있음을 알 수 있다.

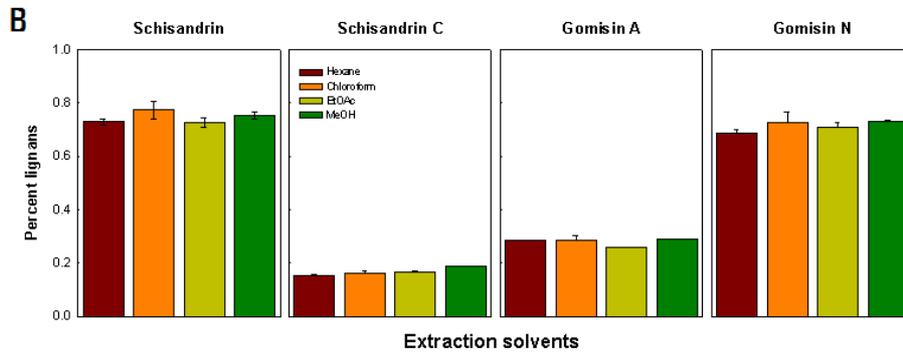


Fig. 19. Comparative analysis of lignan contents obtained from dependent (B) extraction with hexane, ethyl acetate, chloroform, and methanol.

(다) 암꽃과 수꽃의 함량 비교

암꽃과 수꽃에서 리그닌 함량을 재배농가별로 분석한 결과, 암꽃이 수꽃에서보다 리그닌의 함량이 많았으며, 재배농가에 따라서 4가지 리그닌 모두 차이가 있었다 (Fig. 20).

Lignans affected by sex in flower and farms. Harvested at April 24, 2008.

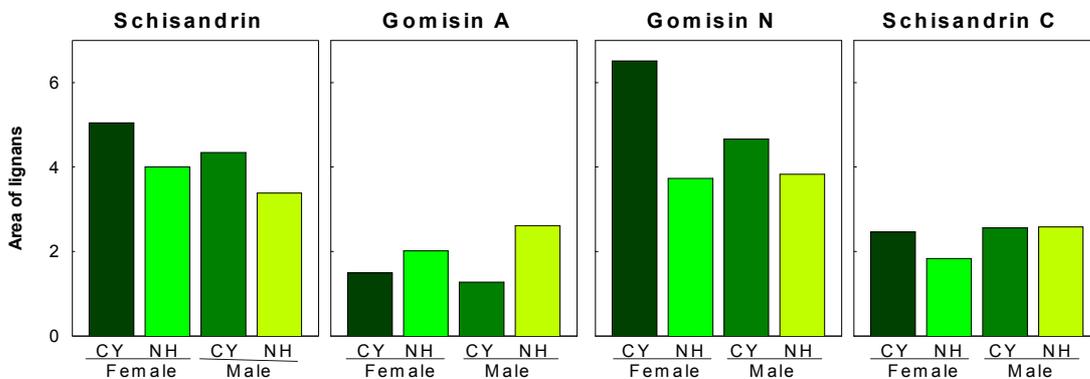


Fig. 20. Lignans concentration (%) affected by female, male and farms.

(라) 수정과실과 미수정과실의 lignans 함량 비교

또한 수정된 과실과 미수정 과실의 리그닌 함량은 수정된 과실에서 많았으며, 미수정된 과실에서는 현저하게 낮았다 (Fig. 21).

Lignans affected by fertilization and farmers. Harvested at April 24, 2008.

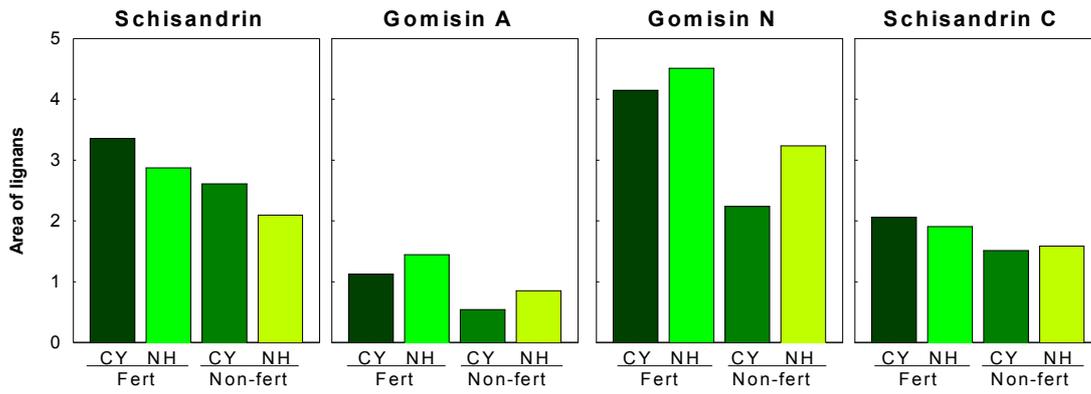


Fig. 21. Lignans concentration (%) affected by fertilized and non-fertilized fruits. Fruits were harvested at April 24, 2008.

5. 식물체 채취시기, 식물체 부위 및 지역별 리그난 함량 비교

가. 재료 및 방법

(1) 표준물질에 대한 정량곡선의 작성

오미자로부터 순수분리 한 schisandrin, schisandrin C, gomisin A 및 gomisin N 등 4종의 표준품 약 1 mg을 정확하게 달아 각각을 메탄올에 녹여서 mg/mL의 용액을 만든 후 4°C에서 냉장보관시키고, 각각의 용액을 동량 희석하여 그 최종농도를 0.5, 0.1, 0.05 및 0.01 μ g/mL로 하여 검량선용 표준용액을 조제하였다. 각각의 표준용액 10 μ L를 취하여 분석을 실시한 후 피크면적을 산출하여 농도변화에 따른 calibration curve를 작성하였고, [Schisandrin: $Y=29016.627+2.107973$ ($R^2=0.9991$); Schisandrin C: $Y=27591.845X+6.124759$ ($R^2=0.9985$); Gomisin A: $Y=25455.883X+4.866677$ ($R^2=0.9989$); Gomisin N: $Y=21673.684X+16.82368$ ($R^2=0.9983$), 하루에 3회 시행하여 일내 정밀성과 정밀성 구하였으며 연속하여 3일간 실험을 행하여 일간 정밀성 및 정확성을 구하였다. 정밀성은 측정값에 대한 상대표준편차(RSD %)로 나타내었으며, 정확성은 실험치에 대한 이론치의 백분율(%)로 표시하였다.

(2) 검액의 조제 및 표준물질의 정량

문경의 2개 농가를 지정하여 잎, 줄기, 뿌리 및 과실을 2주 간격으로 재료를 채취한 후, 동결건조하여 냉동고에 보관하였다. 재료를 잘게 분쇄하여 0.5을 정확하게 달아 각각을 2.5 ml의 메탄올을 가하여 1시간 초음파로 3회반복 추출하였다. 추출한 용액을 0.45 μ m membrane filter에 여과시킨 후 최종 10 ml 정량하였다. 이 액 10 μ L를 HPLC에 주입하였다. 이때 얻어진 피크면적을 미리 작성된 검량선에 적용하여 시호 시료에 함유된 표준물질의 함량을 산출하였다. HPLC 분석은 Luna C18 column (Merck, 10 μ m, ID 0.46 cm \times 25 cm)에 MeOH/acetonitril (20:80)을 gradient의 이동상으로 하여 검출하여 정량하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 채취 시기별 잎의 리그난 함량 변화

오미자 주요 재배지인 문경시의 2 농가를 선정하여 잎의 채취시기별 schisandrin, gomisin A, gomisin N 및 schisandrin C의 함량을 비교한 결과는 Fig. 22에서 보는 바와 같다.

채취시기별 잎내의 리그난 함량을 분석한 결과 재배농가간의 차이가 약간 있었으며, 조사한 모든 리그난 즉 schisandrin, gomisin A, gomisin N 및 schisandrin C 등은 채취시기에 따라서 함량변화의 차이를 나타 내었다. 잎내의 schisandrin, gomisin A 및 schisandrin C의 함량은 0.1% 이하로서 낮은 함량이었으며, gomisin N은 0.1-0.5% 사이로서 함량이 가장 높았으며, 총 리그난 함량도 0.25-0.5% 정도로서 식물체의 다른 기관보다 함량이 아주 낮았다.

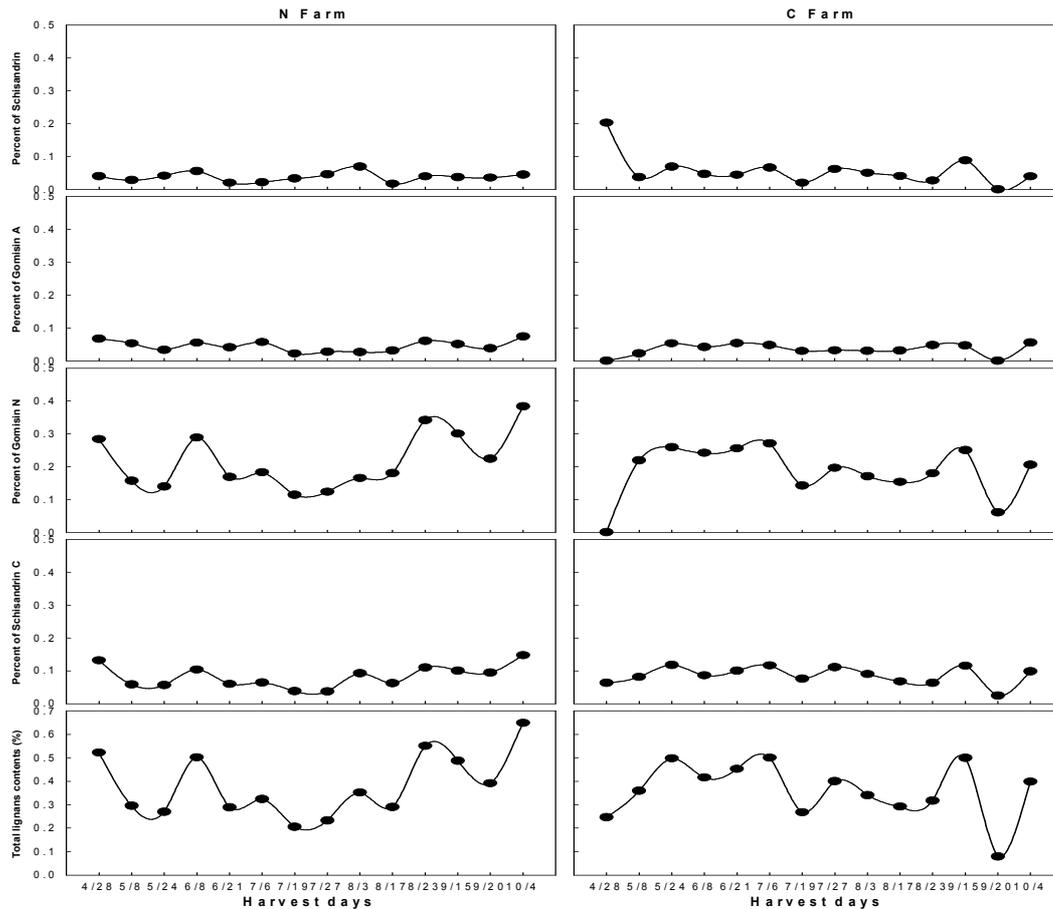


Fig. 22. Seasonal changes in lignans from leaves of *Schisandra chinensis*.

(2) 채취시기별 신초의 리그난 함량 변화

오미자 주요 재배지인 문경시의 2 농가를 선정하여 줄기의 채취시기별 schisandrin, gomisins A, gomisins N 및 schisandrin C의 함량 (%)을 비교한 결과는 Fig. 23과 24에서 보는 바와 같다. Schisandrin, gomisins A, gomisins N 및 schisandrin C 등 4종의 리그난은 두 재배농가 모두 7월 6일에 채취한 줄기에서 함량이 가장 많았다. 또한 줄기의 리그난 함량은 N 농가의 경우 9월 15일에는 거의 0%까지 감소하였다가 9월 20일 이후에는 급속하게 증가하였다. 이러한 원인은 9월 20일 경은 오미자의 수확이 거의 끝나는 시기로서 과실로 이동할 sink source가 없어졌기 때문에 9월 20일 이후에는 줄기 내에 많이 축적되었을 것으로 생각된다. 7월 6일 이외의 리그난의 축적 양상은 N농가와 C농가 간에 약간의 차이가 있었는데, N 농가에서는 7월 6일 이후에 급격히 감소하다가 8월 3일에 축적량이 증가하다가 감소하여 9월 20일 이후에 급격히 증가하는 등의 파동 (fluctuation)양상을 나타내었다. 그러나 C 농가로부터 채취한 줄기에서는 8월 23일 이후에 서서히 증가하는 경향이였다.

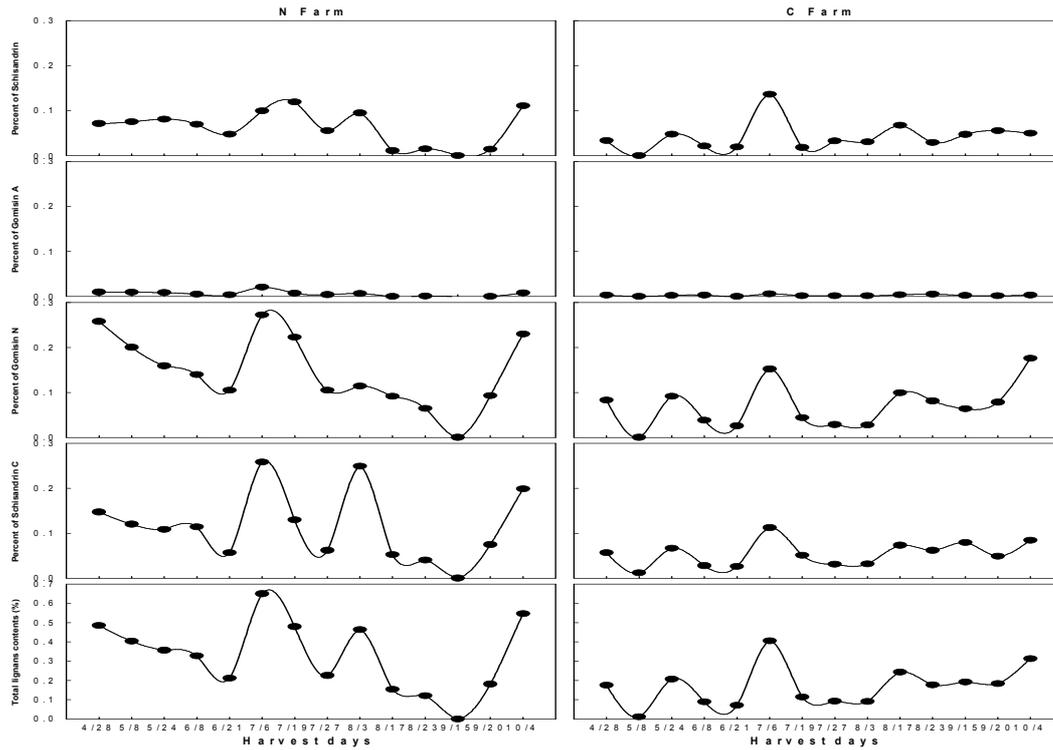


Fig. 23. Seasonal changes in lignans from shoots of *Schisandra chinensis*.

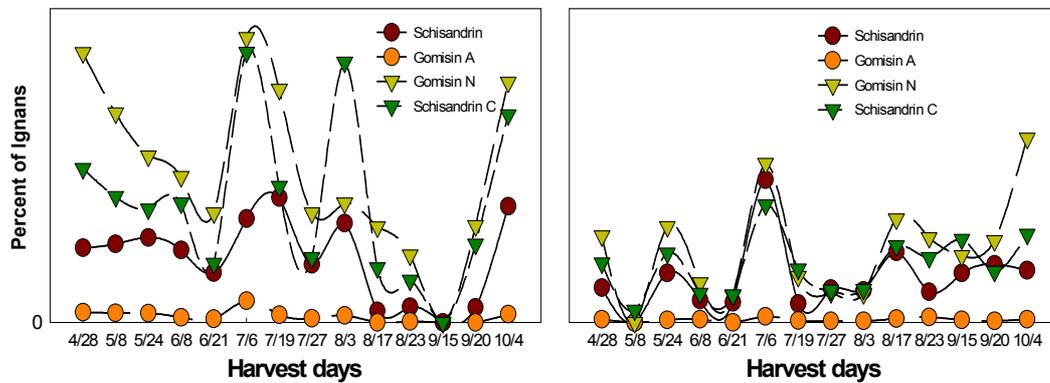


Fig. 24. Seasonal changes in lignans from shoots of *Schisandra chinensis*.

(3) 채취 시기별 과실의 리그난 함량 변화

오미자 주요 재배지인 문경시의 2 농가를 선정하여 줄기의 채취시기별 schisandrin, gomisin A, gomisin N 및 schisandrin C의 함량 (%)을 비교한 결과는 Fig. 25에서 보는 바와 같다. 그리난의 함량은 채취 시기에 따라서 상당한 차이를 보였는데, 가장 많이 함유되어 있는 schisandrin은 착과 후에 서서히 증가하여서 줄기에서와 마찬가지로 7월 6일에 함량이 가장 많았는데 약 1.5% 정도까지 증가되었으며, 그 이후에는 급격히 감소되었다. 수확 후기인 9월 20일 이후에는 약간 증가되는 경향이였다. 오미자 수확기인 9월 초 중순경에는 함량이 현

저히 감소되어 약 0.7% 이내였다. 특이하게 채취시기가 늦은 10월 4일에도 함량이 현저히 감소되었다. Gomisin A, gomisin N 및 schisandrin C도 같은 채취시기에 따른 함량의 변화는 schisandrin과 거의 유사한 경향이였다.

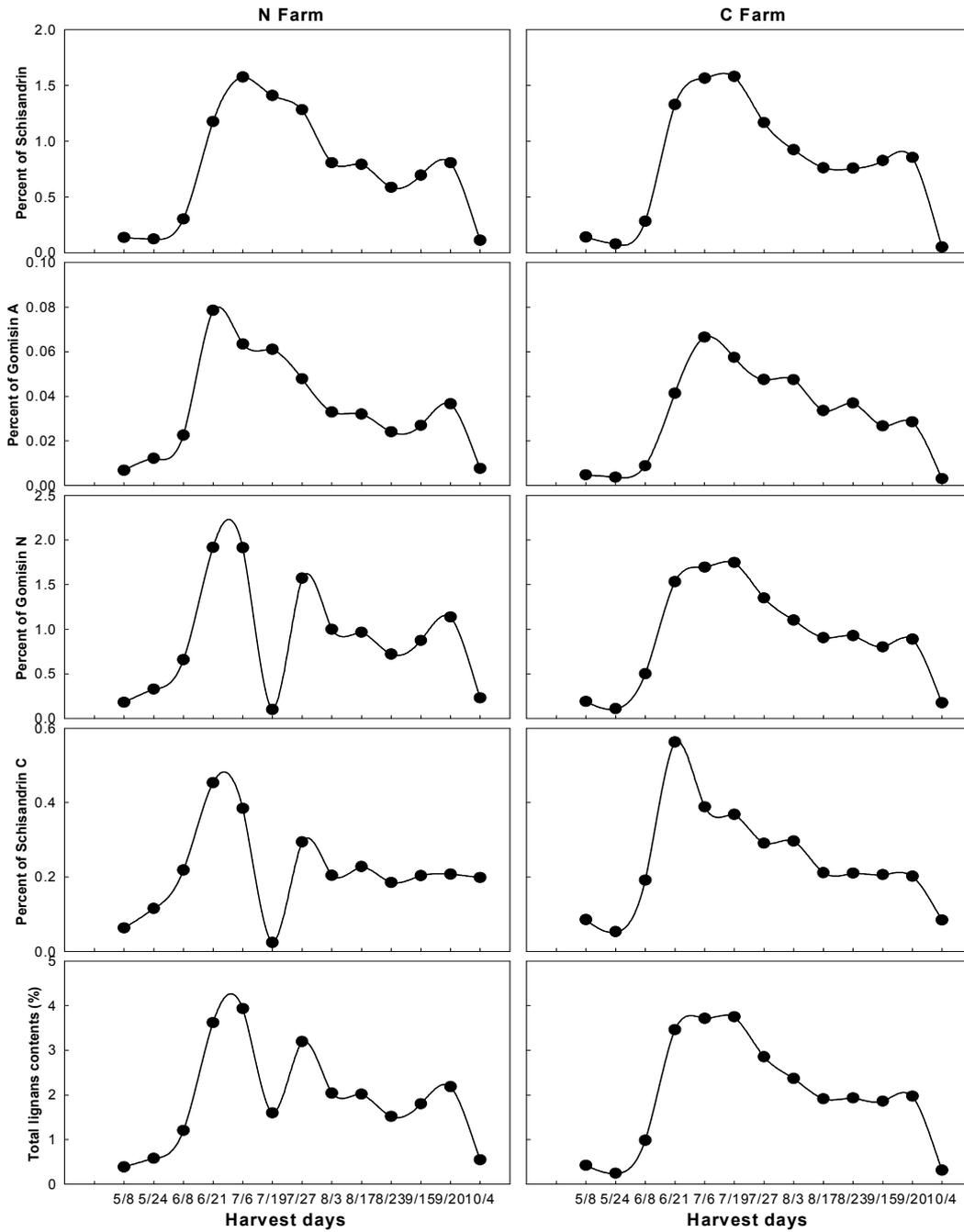


Fig. 25. Seasonal changes in lignans from fruits of *Schisandra chinensis*.

(4) 채취시기별 땅속줄기의 리그난 함량 변화

오미자 주요 재배지인 문경시의 2 농가를 선정하여 땅속줄기의 채취시기별 schisandrin, gomisin A, gomisin N 및 schisandrin C의 함량 (%)을 비교한 결과는 Fig. 26에서 보는 바와 같다. 땅속줄기의 리그난은 함량이 가장 많았던 과실보다 10배 이상 많이 축적되어 있었다. 채취시기별 schisandrin, gomisin A, gomisin N 및 schisandrin C의 함량은 N 농장의 경우에는 5월 8일과 7월 19일 가장 높았으며, 이러한 경향은 시기별로 높고 낮아지는 파동(fluctuation)의 형상을 나타내었다. C농장의 경우에도 5월 초와 8월 중순경에 가장 많았으며, 6월 20일과 수확기인 9월 중순경에 가장 낮게 나타나는 등의 파동 형상을 나타내었다.

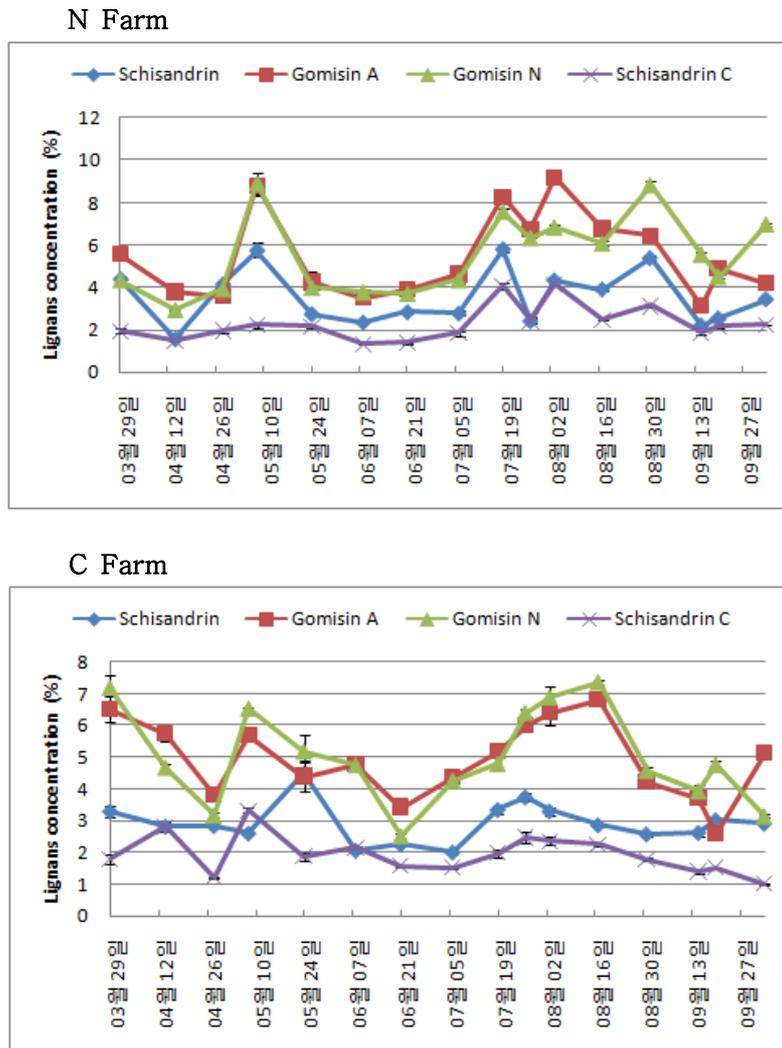


Fig. 26. Seasonal changes in lignans from subterranean stem of *Schisandra chinensis*.

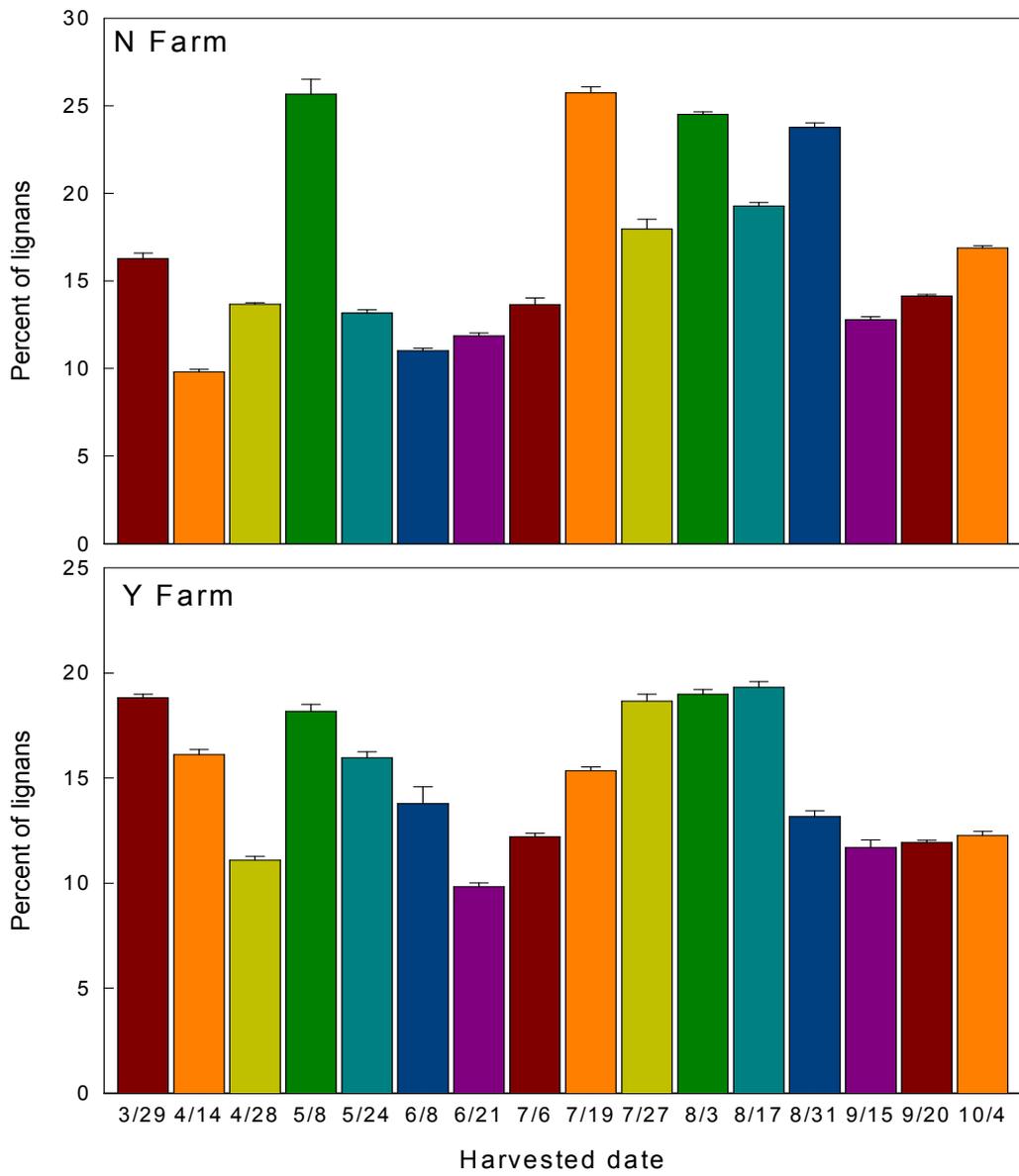


Fig. 27. Seasonal changes in total lignans from subterranean stems of *Schisandra chinensis*.

(5) 채취시기별 1년생 신초의 리그난 함량 변화

오미자 주요 재배지인 문경시의 2 농가를 선정하여 신초의 채취시기별 schisandrin, gomisin A, gomisin N 및 schisandrin C의 함량 (%)을 비교한 결과는 Fig. 28에서 보는 바와 같다. N 농장의 경우 과실에서 함량이 가장 많았던 7월 6일에 신초에서도 가장 많았으며, 리그난 간의 약간의 차이는 있었으나, 8월 3일에 그 다음으로 높은 경향이였다. C농장의 경우에는 N 농장의 경우보다 파동의 주기가 짧았으며, 과실의 수확후기인 9월 이일 이후에 증가하였다.

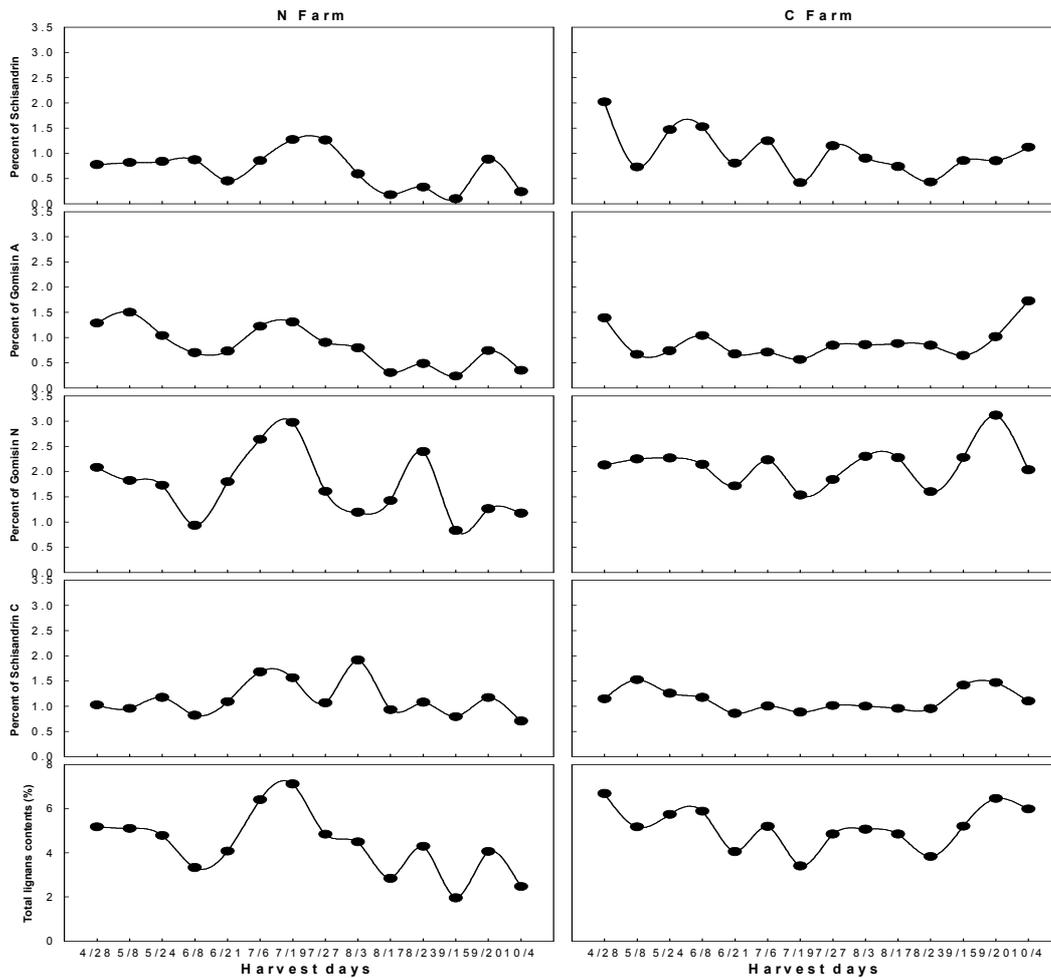


Fig. 28. Seasonal changes in lignans from one year shoots of *Schisandra chinensis*.

(6) 뿌리로부터 발생한 신초 리그난 함량의 계절적인 변화

오미자 주요 재배지인 문경시의 2 농가를 선정하여 뿌리로부터 발생한 신초의 채취시기별 schisandrin, gomisin A, gomisin N 및 schisandrin C의 함량 (%)을 비교한 결과는 Fig. 29에서 보는 바와 같다. 리그난의 총 함량을 비교한 결과 5월 8일에 함량이 가장 많았으며, 7월 27일에 약간 증가하다가, 수확 후기인 9월 20일 이후에 급격히 증가하였다. C 농장의 경우에는 N 농장보다 파동 주기가 짧았으며, 9월 15일 경에 증가하다가 수확 후기에는 급격히 감소하였다.

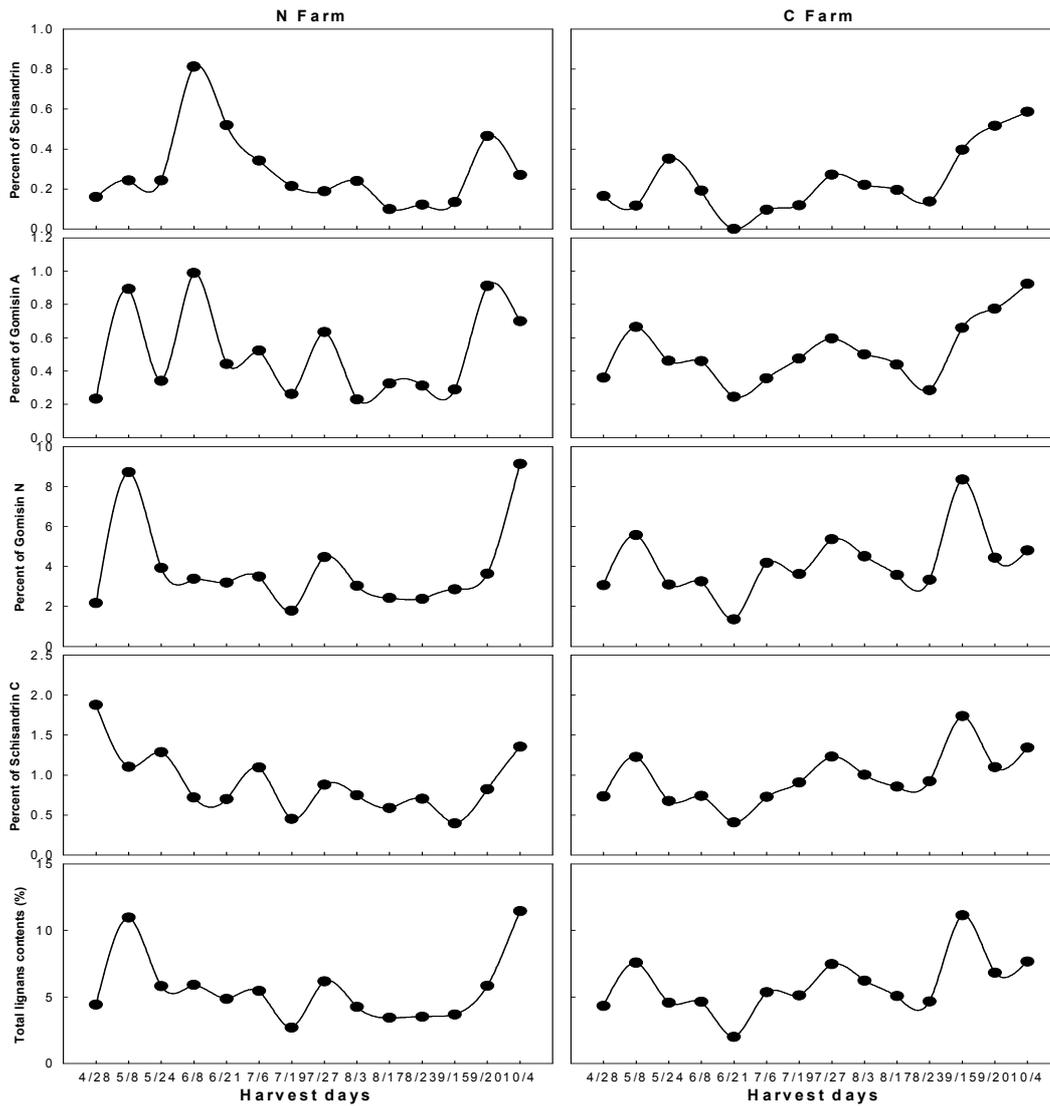


Fig. 29. Seasonal changes in lignans from subterranean stem's shoots of *Schisandra chinensis*.

(7) 재배지역별 리그난 함량의 차이

재배지역별 리그난 함량을 조사하기 위하여 J, K, H 및 M 지역의 3-4농가에서 2008년 9월 20일에 수확한 과실을 동결건조하여 리그난 함량을 조사하였다 (Fig. 30). 총 리그난 함량이 가장 많은 농가는 MA와 CU 농가였으며, 특히 HJ지역의 농가에서 채취한 종자의 경우에는 현저히 낮았다. 같은 지역일지라도 각각의 리그난 함량은 상당한 차이가 있었는데, 이러한 원인은 시비방법, 관수방법, 지역간의 미세한 환경 변화 등에 기인한 것으로 생각된다.

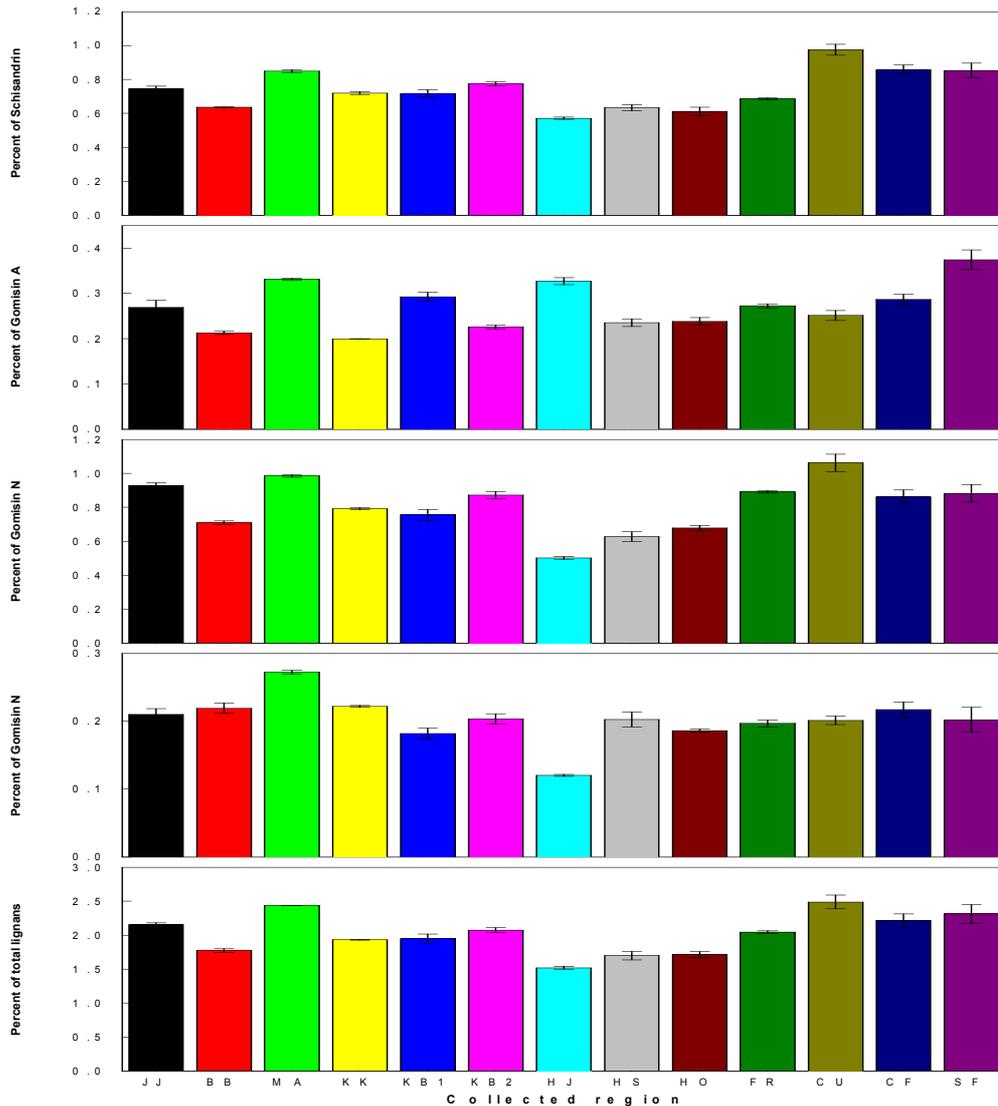


Fig. 30. Comparison with lignans concentrations affected by collected location. Fruits were collected at September 20, 2008.

지역별로 리그난 함량을 평균하여서 비교한 결과, M 지역에서 수확한 과실에서 가장 높았으며, 다음은 J 지역, K 지역 및 H 지역의 순으로 함량이 낮았다.

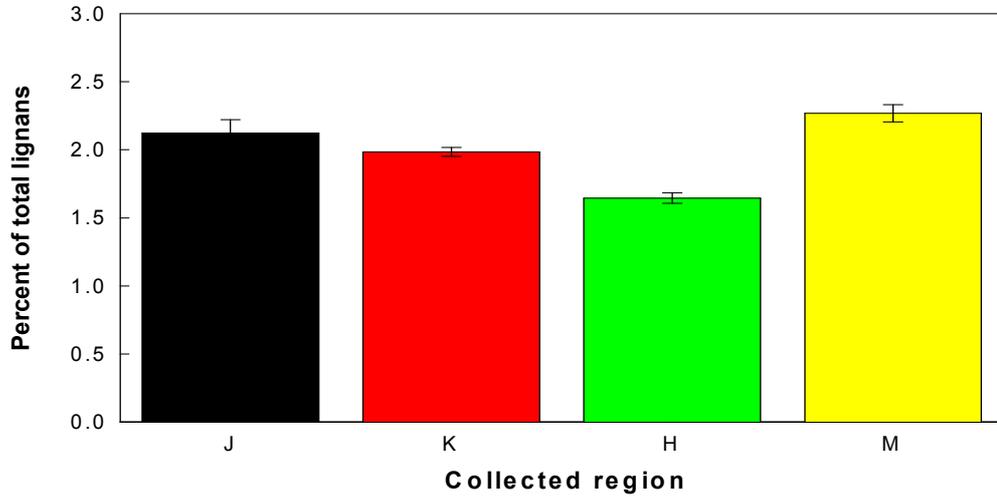


Fig. 31. Comparison with total lignans (schisandrin, schisandrin C, gomisin A and gomisin N) concentrations affected by collected location. Fruits were collected at September 20, 2008.

각 지역별 schisandrin, schisandrin C, gomisin A 및 gomisin N 등 4 종류의 리그난 함량을 100%로 가정하였을 때에 각 성분의 함량차이를 비교한 결과 (Table 5), schisandrin과 schisandrin C의 함량은 지역간에 거의 차이가 없었으나, gomisin A와 gomisin N은 지역에 따라서 각각 약 \pm 6%의 차이가 있었다.

Table 5. Effect of collected location on schisandrin, gomisin A, gomisin N, and schisandrin C. Fruits were collected at September 20 2008.

Collected location	Schisandrin	Gomisin A	Gomisin N	Schisandrin C
JJ	45.2	15.8	39.6	10.4
BB	45.6	13.6	37.1	13.5
MA	44.4	17.2	37.6	12.1
Mean	45.40	14.70	38.35	11.95
KK	46.3	11.6	38.4	13.4
KB1	46.1	18.2	36.2	10.6
KB2	46.7	12.8	40.0	10.8
Mean	46.20	14.90	37.30	12.00
HJ	51.0	27.2	27.1	6.8
HS	46.7	17.0	33.5	13.0
HO	44.9	16.5	37.0	12.1
Mean	48.85	22.10	30.30	9.90
NF	43.0	16.1	41.2	10.8
KU	50.4	12.5	39.0	8.4
CF	48.6	16.5	34.9	10.7
SF	47.3	20.2	34.7	9.4
Mean	47.33	15.03	38.37	9.97

다. 적 요

오미자 종자의 휴면성을 구명하고, 생장조절제를 처리하여 휴면을 타파를 수행하였으나 생장 조절제 단독처리만으로는 휴면타파가 매우 어려웠다. 오옥신류와 cytokine류는 오미자종자의 휴면을 전혀 타파시키지 못하였으나, GA 1,000 mg/L는 약 17%의 정도로 아주 낮은 휴면타파 효과가 있었다. 오미자 종자를 이용한 대량번식을 위하여 저온습윤처리를 한 결과, 30일에는 발아율이 0%였으나, 60일 후에는 10°C에서 75% 이상의 발아율을 보여 실용화 할 수 있을 것으로 예상된다. 5°C와 15°C의 변온처리는 두 가지의 어떠한 단독 처리보다도 발아율이 높아, 변온처리에 의한 휴면타파 효과가 있는 것으로 생각된다. 저온습윤처리의 효과는 종자의 휴면성, 후속도 및 생리적인 연령 등에 따라서 다를 것으로 생각된다. 종자는 저온습윤처리 기간중에도 발아하였는데, 비교적 고온인 15°C보다 5°C와 10°C 및 5°C-15°C의 변온에서 발아율이 높은 것으로 보아 저온에 의해서 휴면 타파가 된 다음에 발아한 것으로 생각된다.

종자발아 촉진 효과의 결과를 농가에 적용시키기 위하여 종자와 과실에 GA₃를 처리한 다음 야외에 매장하여 그 효과를 검토한 결과, 종자에 GA₃처리 후 매장하는 것이 과실보다 발아율이 현저히 향상되었다. 500 mg/L의 GA₃를 처리하였을 때에 발아율이 가장 높았으며 매장 시기가 빠를수록 발아 촉진효과가 현저하였으며, 12월 이후에 매장하였을 경우에는 10% 이하의 발아율을 보였다. 따라서 오미자를 종자번식시에는 과피를 제거하고, GA₃를 전처리 한 다음에 5-10 cm로 11월 중순 이전에 매장한다면 대조구에 비교하여 약 30% 이상 발아율을 촉진시킬 수 있었다.

오미자로부터 순수분리한 schisandrin, schisandrin C, gomisins A 및 gomisins N의 4 종류의 리그난 성분이 무, 고추 및 상추 종자의 발아에 미치는 영향을 조사하였다. 고추종자에 Schisandrin의 처리효과는 10⁻⁷M을 처리하였을 때에 처리 96시간 이후에 발아율이 대조구에 비하여 약간 높았으며, Gomisins A의 처리는 모든 농도에서 발아율이 억제되었으며, 농도가 높을수록 억제효과가 높았다. 그러나 Gomisins N처리는 대조구에 비교하여 모든 농도에서 발아율이 촉진되었다. 무와 상추 종자는 모든 처리구에서 대조구에 비교하여 발아속도가 빨랐다. 따라서 본 실험에서 수행한 오미자로부터 분리한 리그난의 경우 생육의 촉진 또는 억제 효과가 있었으므로 식물호르몬 또는 다른 용도의 농약으로서 개발 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

오미자로부터 순수분리한 리그난 성분이 무종자의 유묘생육에 미치는 효과를 대조구와 비교하여 촉진 또는 억제효과를 비교한 결과, Schisandrin과 schisandrin C처리시 하배축의 생육은 10⁻⁶ M 이하의 농도에서는 농도가 낮을수록 생육이 촉진되었다. 그러나 gomisins A와 gomisins N의 처리시에는 모든 농도에서 생육이 촉진되기는 하였으나, 농도 의존적인 생육의 촉진 또는 억제효과는 나타나지 않았다. 유식물체당 총 생체중 및 건물중을 대조구와 비교하여 촉진 또는 억제효과를 비교한 결과, schisandrin을 처리하였을 경우에는 농도가 높을수록 억제되었으나, 10⁻⁷ M의 저농도로 처리하였을 때에 현저하게 촉진되었다.

리그난 처리 후 상추 유묘의 총 무게를 비교할 결과, schisandrin과 gomisins A 처리시 10⁻⁵ M에서 생체중과 건물중이 대조구와 비교하여 약간 무거웠으나, 10⁻⁶ M 이하의 농도에서는 오히려 감소하였다. Schisandrin C처리시에는 10⁻⁶ M에서 생육억제가 현저하였으며, 그 다음은 10⁻⁷ M 및 10⁻⁵ M의 순으로 억제효과가 낮았다.

토마토 유묘의 유묘생육은 Schisandrin 처리시에 생체중은 10⁻⁷ M의 저농도에서 현저히

증가하였으며, gomisin A의 처리시에는 10^{-6} M 이상의 고농도에서는 대조구와 비교하여 농도가 증가할 수록 생체중이 감소하였으나, 10^{-7} M의 저농도에서는 생체중이 오히려 촉진되었다. Gomisin N 처리시에는 모든 농도에서 대조구와 비교하여 생체중이 증가되었으며, 농도가 낮을수록 효과는 더 높았다.

제 2세부: 생리활성물질 추출 및 구조 동정

1. Hexane, CHCl₃ 및 MeOH로부터 생리활성물질 순수분리 및 구조동정

가. 재료 및 방법

(1) 오미자 수집

본 실험에 사용된 오미자는 2006년 문경에서 수확하여 건조시킨 종자를 문경시의 동로 농협으로부터 열풍 건조한 과실을 구입한 것으로 외관상 모양이 고른 오미자 과실을 선택하여 시료로 사용하였다.

(2) 시료 및 시약

문경에서 재배하고 수확하여 구입한 오미자 과실을 사용하였으며 시료의 추출 및 분리 용매로는 특급 또는 일급의 hexane, chloroform, methylene chloride, methanol, 및 acetone 등을 사용하였다. HPLC용 시약으로는 HPLC grade 용 ethyl acetate, acetone, chloroform, methylene chloride, methanol, water를 사용하였다. 물질의 순수분리는 open column chromatography를 사용하였으며, thin layer chromatography (TLC)는 TLC silica gel 60 F₂₅₄ (20 × 20 cm), Merk 제품을 사용하였다. 오미자로부터 순수분리 된 물질 분석을 위한 NMR solvent 용매로는 chloroform-d 와 methanol-d₄를 사용하였다.

(3) 기 기

순수 분리 화합물의 구조분석을 위한 NMR은 500 MHz FT-NMR spectrometer (Verian, Inova 500)로 분석하였다.

(4) 오미자로부터의 물질의 순수분리

문경에서 수집한 건조한 오미자 (Fig. 33) 과실을 선별하여 분쇄기로 분쇄하여 5l삼각플라스크에 채운 다음 용매를 3l채워서 시료와 잘 섞이게 흔들어 준 다음 2시간 동안 sonication을 시킨 후 상등액 층을 vacuum pump를 사용하여 Whatman no. 2 filter paper로 여과하였다.

이와 같은 방법으로 3회 반복 추출하여 hexane 추출물 308 g을 얻었다. Hexane으로 추출하고 남은 잔여물에 chloroform을 3l 넣은 다음 hexane 추출 방법과 같은 방법으로 3회 반복 추출하여 chloroform 추출물 14 g을 얻었으며, chloroform 추출 후 남은 잔여물에 또 다시 3l의 methanol로 3회 반복 추출하여 1,368 g의 methanol 추출물을 얻었다.

오미자를 순차적으로 추출한 물질인 hexane 추출물 (SCKH), chloroform 추출물 (SCKC), 및 methanol 추출물 (SCKM)로 분류하였으며 (Fig. 33), 물질의 분리 순서는 생리 활성이 높은 분획물부터 선택하여 분리하였다.



Fig. 32. A photographic image of *Schisandra chinensis* BAILL.

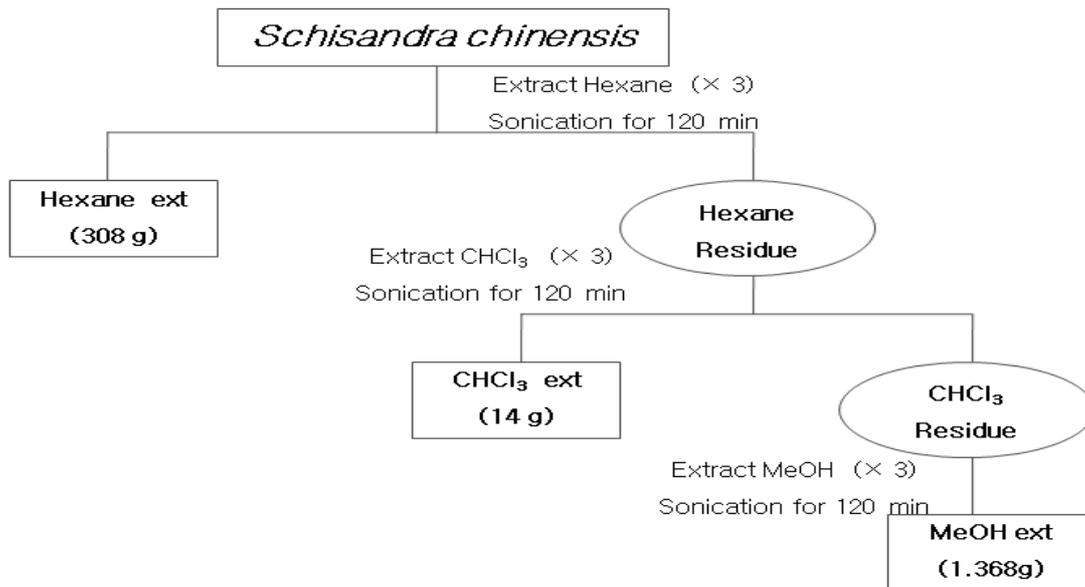


Fig. 33. Extraction scheme with hexane, chloroform, and methanol extracts from *Schisandra chinensis*.

(5) Hexane 추출물로부터 리그난 성분의 순수 분리

오미자로부터 순차적으로 추출하여 얻은 SCKH, SCKC, 및 SCKM 추출물에 대한 혈관이완 효능 활성을 측정한 결과, 활성이 높았던 hexane 추출물을 105 × 10 cm 칼럼에 3043 g의 silica gel 을 hexane 용매에 섞은 다음 충전 시켰다. 충전 시킨 칼럼 상층 부분에 hexane 추출물 (SCKH) 120 g을 넣은 다음 100% hexane, hexane : EtOAc (18:2), hexane : EtOAc (16:4), CHCl₃ : MeOH (19:1)로 용매의 극성을 높이면서 순차적으로 추출하여 38개의 분획물을 얻었으며, SCKH1 ~ SCKH38로 분류하였다. Hexane 추출물로부터 분리된 38개의 분획물을 선별하여 생리활성 검증을 하였으며, 혈관이완 효능이 높은 분획에 대하여 활성이 높은 물질을 순수분리 하였다. 위와 같은 방법으로 용매를 섞어 순차적으로 추출하여 얻어진 분획물들의 분리정도를 확인하기 위하여 TLC에 전개한 다음 그 물질들의 순수분리 정도를 확인하였다. 전개된 TLC의 물질을 확인하기 위하여 단파장 (254 nm)과 장파장 (365 nm)을 동시에 확인할 수 있는 UV-lamp로 확인하였다 (Fig. 34).

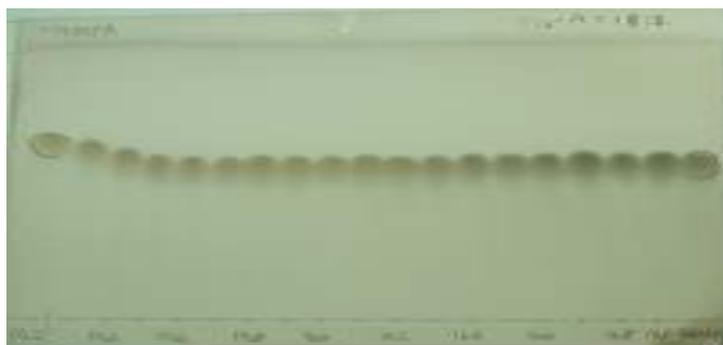


Fig. 36. Schematic representation of TLC separation of schisandrin with methylene chloride and acetone ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{A}=19:1$) from *Schisandra chinensis*.

(나) Schisandrin C의 순수 분리

Hexane 추출물에서 분리된 38개의 분획물 중 분류된 SCKH8의 분획물 1,5794 g을 100% methylene chloride를 이동상 용매 조건으로 하여 open column에 silica gel을 충전하여 1,5794 g의 물질을 loading 하였다. 추출한 분획물을 확인하기 위해서 TLC로 전개하여 21개의 분획물을 분류하였으며, 각각의 분획물들을 KH8IA ~ KH8IT로 구분하였다. 이 중 KD8ID (317.3 mg)를 silica gel이 충전된 open column에 loading하여 100% methylene chloride를 흘려보내면서 얻은 분획을 TLC로 전개하여 UV-lamp로 물질을 확인하여 비슷하게 나온 물질을 그룹으로 나누었다. 분리된 분획물 중 160.9 mg (KH8IDPC)의 물질의 순수분리 하였다 (Fig. 37, 38).

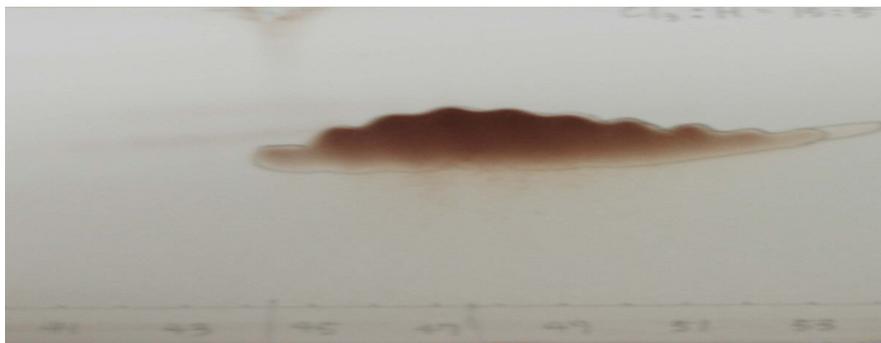


Fig. 37. Schematic representation of TLC separation of schisandrin C with methylene chloride (CH_2Cl_2) from *Schisandra chinensis*.

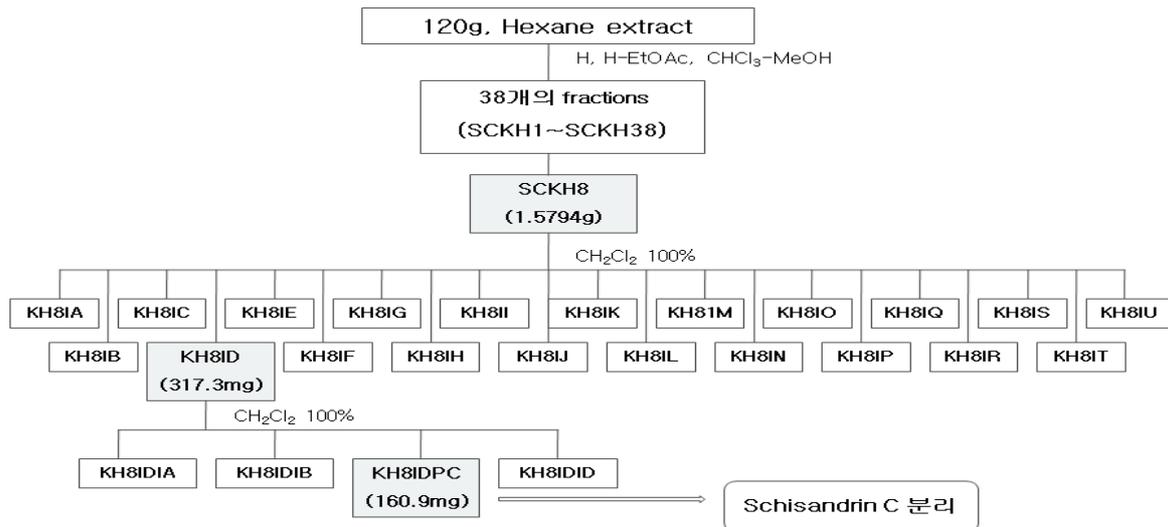


Fig. 38. Isolation scheme of schisandrin C with hexane, ethyl acetate, methylene chloride, and methanol from *Schisandra chinensis*.

(다) Gomisins N 의 순수분리

Hexane 추출물 중 3,4758 g의 SCKH11 분획물을 1차 순상 open column chromatography에 hexane : CHCl₃ : MeOH (15:5:0.02)의 용매를 섞어 순차적으로 추출하여 Fig. 8에서 보는 바와 같은 결과를 얻었으며, TLC와 UV-lamp의 확인으로 5개의 분획물을 얻었다. 5개의 분획물 중에서 분리도가 높은 KH11IA (404.5 mg)의 분획물을 silica gel이 충전된 open column에 loading 한 다음 CHCl₃ : acetone (19:1) 용매로 흘려보내면서 물질을 순수분리 하였는데, 8개의 분획 중에서 213.4 mg (KH11IAPB)의 물질을 순수분리 하였다 (Fig. 39, 40).



Fig. 39. Schematic representation of TLC separation of gomisins N with chloroform, and acetone (CHCl₃:A=19:1) from *Schisandra chinensis*.

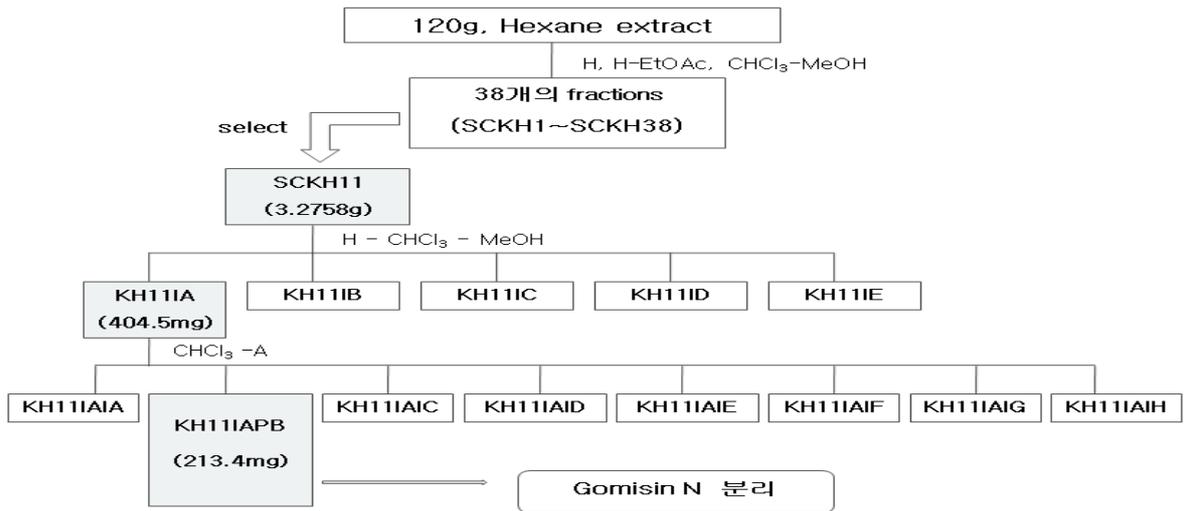


Fig. 40. Isolation scheme of gomisin N with hexane, ethyl acetate, chloroform, and methanol solvents from *Schisandra chinensis*.

나. 결과 및 고찰

(1) 오미자 과실로부터 추출

문경시 동로면에서 수집한 오미자 과실을 선별하여 분쇄기로 완전히 분쇄하였다. 분쇄한 과실 2 kg으로부터 hexane 추출물 308 g (KH), chloroform 추출물 (KC), 14 g 및 methanol 추출물 (KM), 1,368 g의 MeOH층을 얻었다.

(2) 순수 분리된 물질의 구조 동정

순수 분리된 물질 중 이미 알려진 물질은 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 Dept-NMR로서 그 구조를 확인하였다.

오미자 과실을 hexane 추출물로부터 분리한 주요 화합물은 gomisin A, gomisin N, schisandrin 및 schisandrin C였는데, 이 4종류의 물질은 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 12개의 aromatic carbon, methylene dioxy group, methoxy, 2개의 methyl기 및 aliphatic 탄소로 구성된 dibenzocyclooctadiene의 기본 골격을 가진 lignan계 화합물이었다 (Table 6).

Table 6. ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) chemical shifts of lignans isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAILL.

Carbon No	Schisandrin	Schisandrin C	Gomisin N	Gomisin A	
1	151.9	141.3	151.7	152.1	
2	140.8	134.8	140.2	140.8	
3	152.3	147.7	151.6	152.3	
4	110.5	106.1	110.7	110.4	
5	131.8	132.6	134.1	132.1	
6	40.9	38.9	39.2	40.6	
7	71.0	33.7	33.6	71.7	
8	41.8	40.8	40.8	42.1	
9	34.4	35.4	35.6	33.8	
10	133.8	138.2	137.8	132.5	
11	110.1	103.1	102.9	105.9	
12	152.0	148.7	148.7	147.9	
13	140.3	134.4	134.6	135.0	
14	151.6	141.1	141.6	141.3	
15	122.8	121.1	121.4	121.9	
16	124.2	122.3	123.4	124.2	
17	15.9	21.7	21.5	15.8	
18	29.7	12.7	12.9	30.1	
OCH ₃	C-1,14	60.5(×2)	59.6(×2)	60.5, 59.6	60.6, 59.6
	C-2,13	60.9(×2)		61.0	61.0
	C-3,12	56.0(×2)		55.9	56.0
OCH ₂ O		100.6(×2)	100.7	100.8	

(가) Schisandrin의 구조 동정

Schisandrin은 무색의 프리즘(ether-*n*-hexane), 분자식은 C₂₄H₃₂O₇, [α]²²_D 값은 88.7° (in CHCl₃)을 나타내었다. 또한 ¹H과 ¹³C NMR data 분석 결과 ¹³C-NMR spectrum에서 151.9 (C-1), 140.8 (C-2), 152.3 (C-3), 110.5 (C-4), 131.8 (C-5), 40.9 (C-6), 71.0 (C-7), 41.8 (C-8), 34.4 (C-9), 133.8 (C-10), 110.1 (C-11), 152.0 (C-12), 140.3 (C-13), 151.6 (C-14), 122.8 (C-15), 124.2 (C-16), 15.9 (C-17), 29.7 (C-18), 60.5(×2) (C-1, 14), 60.9(×2) (C-2, 13), 56.0(×2) (C-3, 12)의 24개의 C로 구성된 dibenzocyclooctadiene 의 구조를 가진 schisandrin^{14, 46)}으로 확인되었다 (Fig. 41, 42, 43과 Table 7).

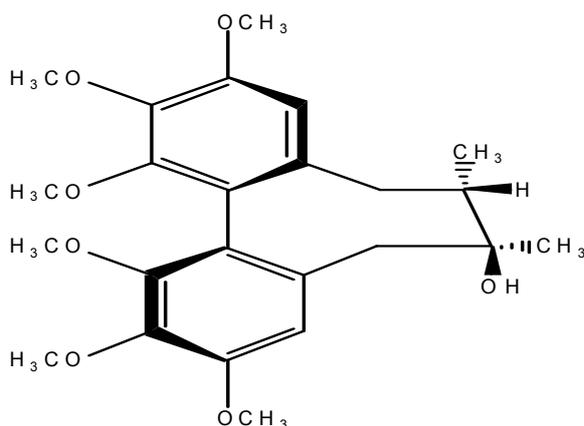


Fig. 41. Structure of schisandrin isolated from *Schisandra chinensis* and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR, and Dept NMR.

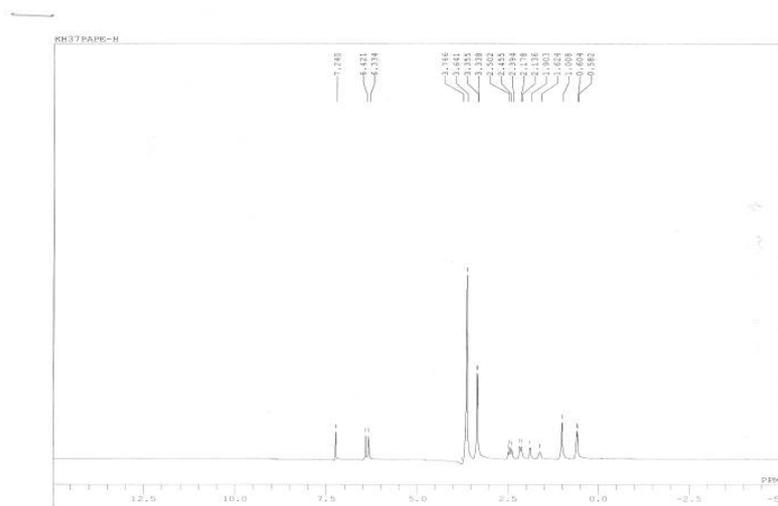


Fig. 42. ¹H NMR spectrum (500 MHz, CDCl₃) of schisandrin from *Schisandra chinensis*.

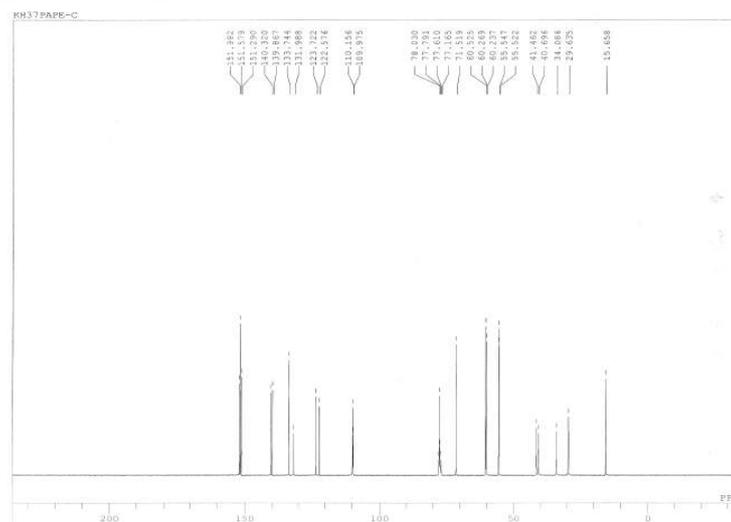


Fig. 43. ^{13}C NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3) of schisandrin from *Schisandra chinensis*.

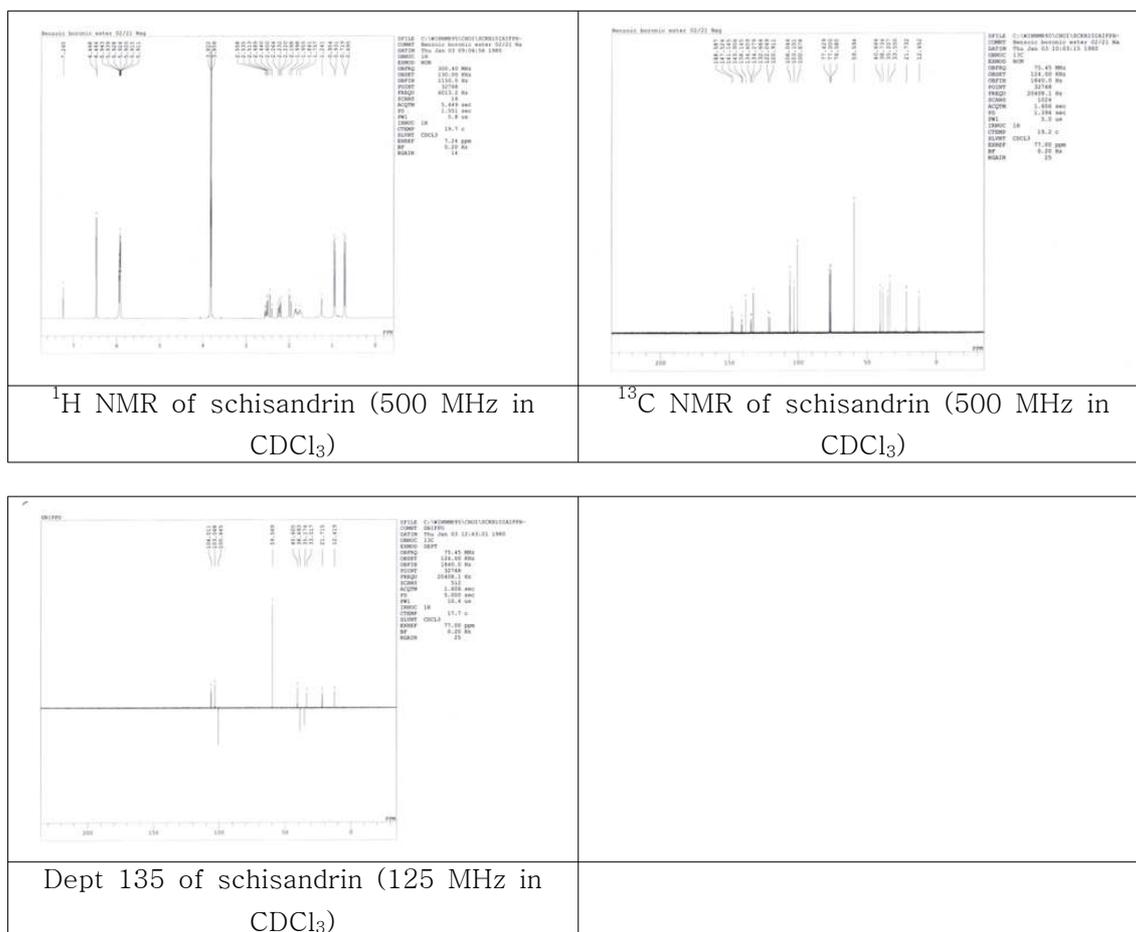


Fig. 44. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) and Dept NMR (125 MHz, CDCl_3) spectrum of schisandrin from *Schisandra chinensis*.

Table 7. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) and ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) chemical shifts of schisandrins isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAILL.

Carbon No.	δ_{C}	δ_{H}	
1	151.9		
2	140.8 ⁷⁾		
3	152.3		
4	110.5	6.60, s	
5	131.8		
6	40.9	6 α -H: 2.70 d, (14) 6 β -H: 2.32 d, (14)	
7	71.0	1.86, (OH)	
8	41.8	1.80 m, (H)	
9	34.4	9 α -H: 2.33 dd, (14/7) 9 β -H: 2.68 dd, (14/2)	
10	133.8		
11	110.1	6.53, s	
12	152.0		
13	140.3		
14	151.6		
15	122.8		
16	124.2		
17	15.9	0.82 d, (7)	
18	29.7	1.25 s	
OCH ₃	C-1, 14	60.5(\times 2)	3.59(\times 2)
	C-2, 13	60.9(\times 2)	3.90(\times 2)
	C-3, 12	56.0(\times 2)	3.92(\times 2)
OCH ₂ O	-		

(나) Schisandrins C의 구조 동정

Schisandrins C는 Wuweizisu C라고 불리기도 하며 분자식은 $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_6$, $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ 는 -58.8 (CHCl_3)이었다 (Fig. 45).

Schisandrins C의 ^{13}C -NMR spectrum는 δ_{C} : 141.3 (C-1), 134.8 (C-2), 147.7 (C-3), 106.1 (C-4), 132.6 (C-5), 38.9 (C-6), 33.7 (C-7), 40.8 (C-8), 35.4 (C-9), 138.2 (C-10), 103.1 (C-11), 148.7 (C-12), 134.4 (C-13), 141.1, (C-14), 121.1 (C-15), 122.3 (C-16), 21.7 (C-17), 12.7 (C-18), 59.6(\times 2) (C-1, 14), 100.6(\times 2) (C-12, 13)의 22개의 탄소로 이루어져 있으며, schisandrins C의 ^1H -NMR data를 분석한 결과, 벤질기에 두 개의 methylenedioxy기 [δ_{C} 5.97, d, 2H, δ_{C} 5.95, d, 2H], 2개의 methoxyl기 [δ_{C} 3.86, s, 3H, δ_{C} 3.85, s, 3H]가 있으며, cyclooctadiene ring에 2개의 methyl기, [δ_{C} 0.98, d, 3H, δ_{C} 0.74, d, 3H], 2개의 benzylic methylene기 [δ_{C} 2.56, m, 6 α -H, δ_{C} 2.48, m, 6 β -H, δ_{C} 2.26, m, 9 α -H, 2.02, d, 9 β -H]를 가지고 있다. Ikeya 등 (1982)등의 보고한 ^1H 과 ^{13}C NMR 및 IR 스펙트럼을 비교 한 결과 schisandrins C⁴⁶⁾ 로 확인되었다 (Fig. 16, 17, 18, 19과 Table 8).

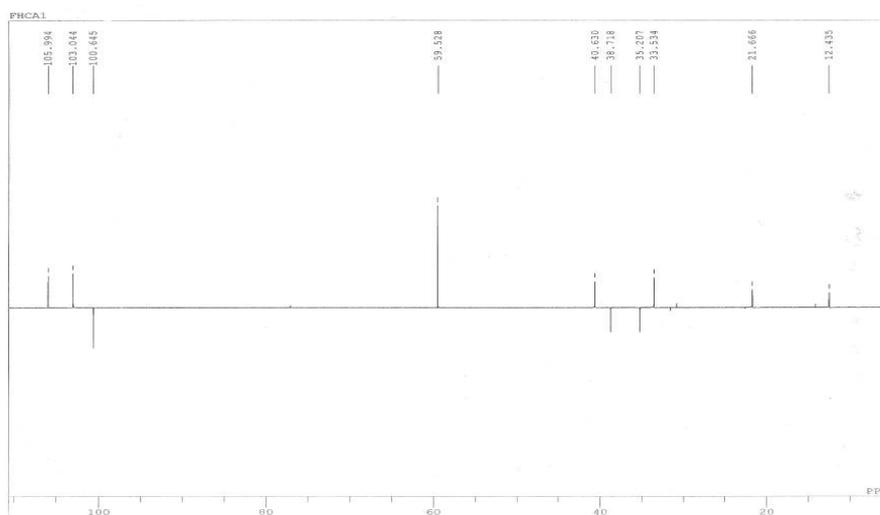


Fig. 48. DEPT 135 NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3) of schisandrin C from *Schisandra chinensis*.

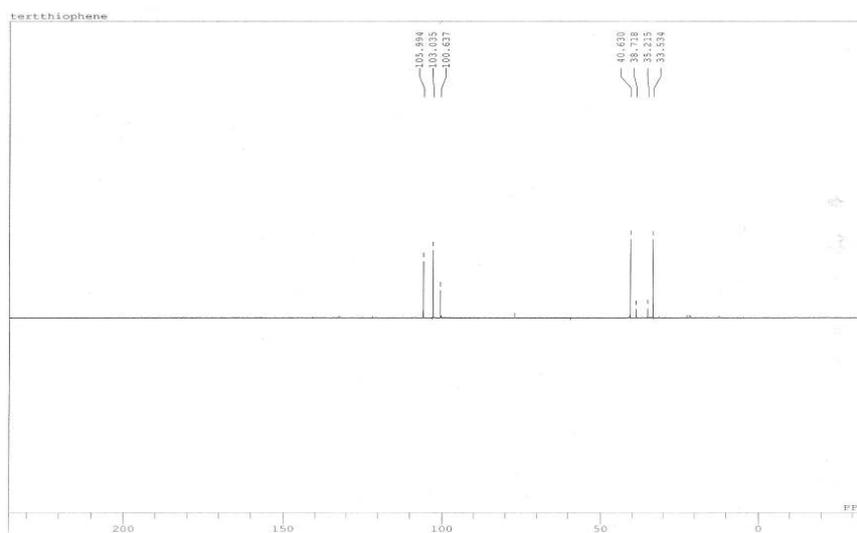
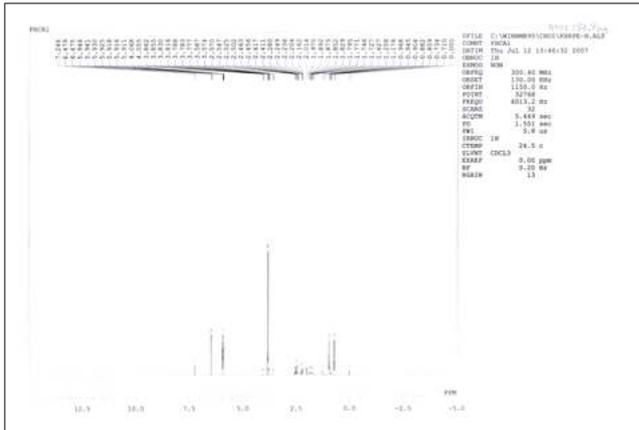
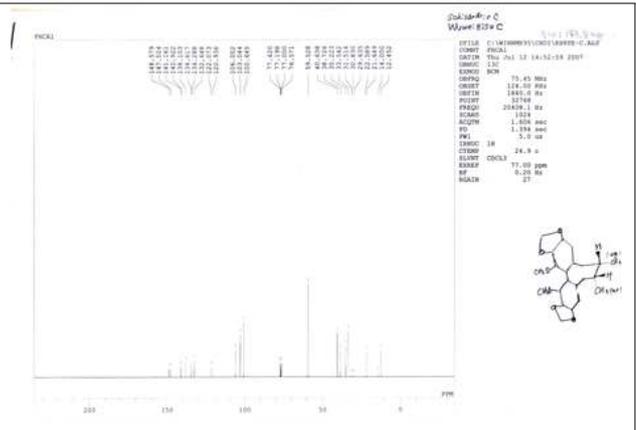


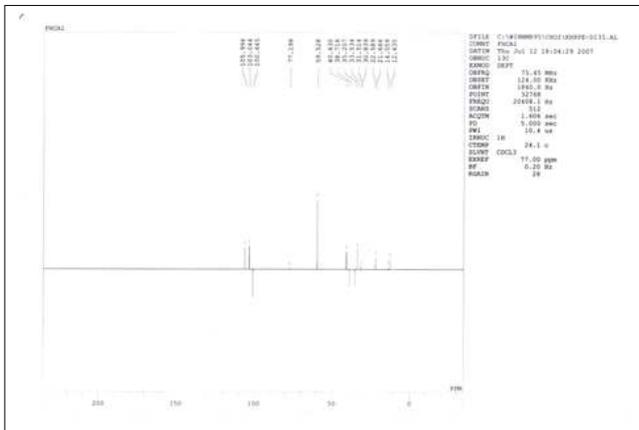
Fig. 49. DEPT 90 NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3) of schisandrin C from *Schisandra chinensis*.



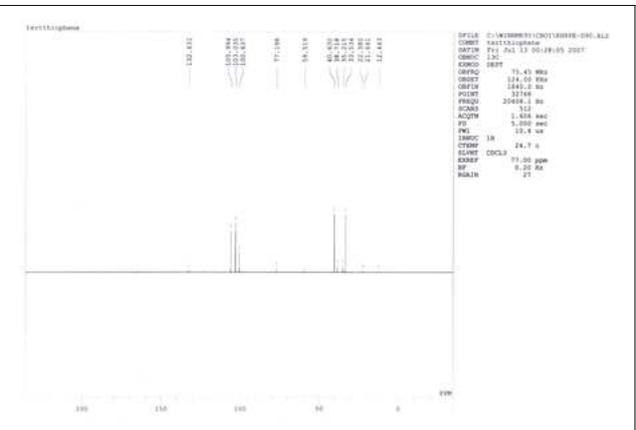
¹H NMR of schisandrin C (500 MHz in CDCl₃)



¹³C NMR of schisandrin C (125 MHz in CDCl₃)



DEPT 135 NMR of schisandrin C (125 MHz in CDCl₃)



DEPT 90 NMR of schisandrin C (125 MHz in CDCl₃)

그림 50. 오미자로부터 분리된 schisandrin C의 spectrum

Table 8. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) and ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) chemical shifts of schisandrin C isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAILL.

Carbon No.	δ_{C}	δ_{H}	
1	141.3		
2	134.8		
3	147.7		
4	106.1	6.509, s	
5	132.6		
6	38.9	6 α -H: 2.56, m 6 β -H: 2.48, m	
7	33.7	1.79, m	
8	40.8	1.90, m	
9	35.4	9 α -H: 2.26, m 9 β -H: 2.02, d, (13.2)	
10	138.2		
11	103.1	6.506, s	
12	148.7		
13	134.4		
14	141.1		
15	121.1		
16	122.3		
17	21.7	0.98, d, (7.2)	
18	12.7	0.74, d, (7.2)	
	C-1, 14	59.6(X2)	3.86, s, 3.85, s
OCH ₃	C-2, 13	-	
	C-3, 12	-	
OCH ₂ O		100.6(X2)	5.97, d, 5.95, d

(다) Gomisins N의 구조 동정

Gomisins N (Fig. 20)은 무색프리즘을 나타내었고, 분자식은 $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_6$, 분자량은 400인 $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -84.7^\circ$ (in CHCl_3)의 물질이었다. Infra-red (IR) 스펙트럼에서 OH기의 peak는 없었는데, 이러한 결과는 gomisins N이 OH기가 없는 dibenzocyclooctadiene lignan 물질임을 알 수 있다. ^1H NMR 스펙트럼으로부터 방향성 물질에 1개의 methylenedioxy와 4개의 methoxy groups이 있다는 것을 확인 할 수 있었고, 2개의 methyl기와 2개의 benzylic methylene 그룹이 있었다. ^1H 과 ^{13}C -NMR 및 IR 스펙트럼을 비교하여 (Table 9) 볼 때 gomisins N으로 확증할 수 있었다 (Fig. 51, 52, 53, 54).

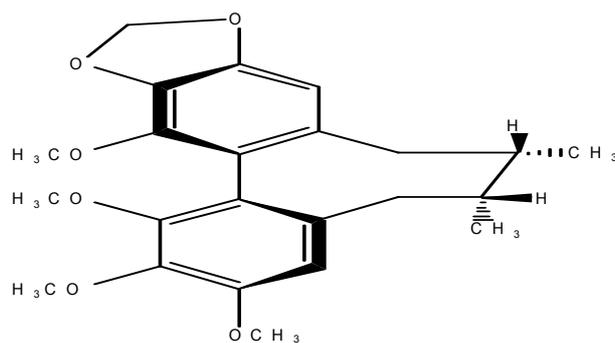


Fig. 51. Structure of gomisin N isolated from *Schisandra chinensis* and identified by ^1H NMR, ^{13}C NMR, and Dept NMR.

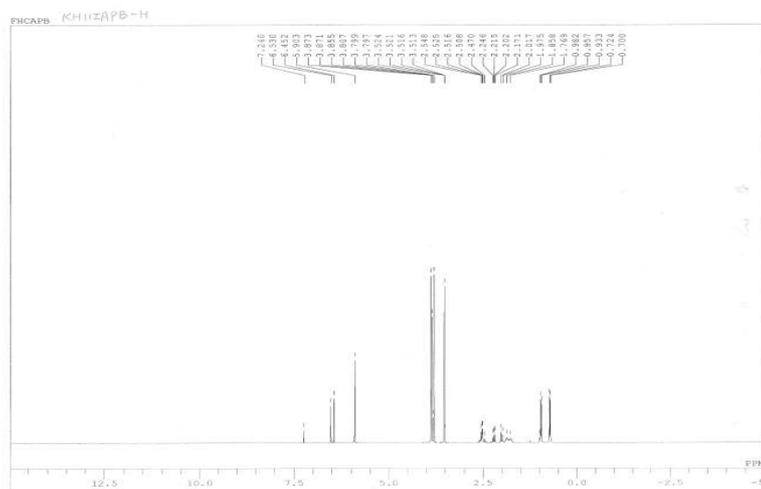


Fig. 52. ^1H NMR spectrum (500 MHz, CDCl_3) of gomisin N from *Schisandra chinensis*.

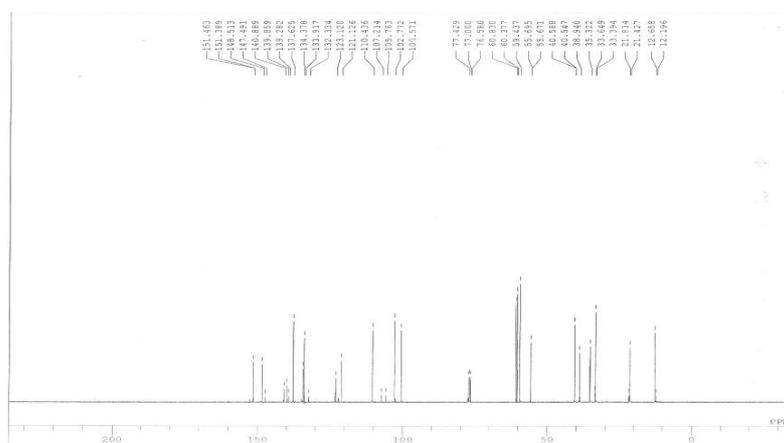


Fig. 53. ^{13}C NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3) of gomisin N from *Schisandra chinensis*.

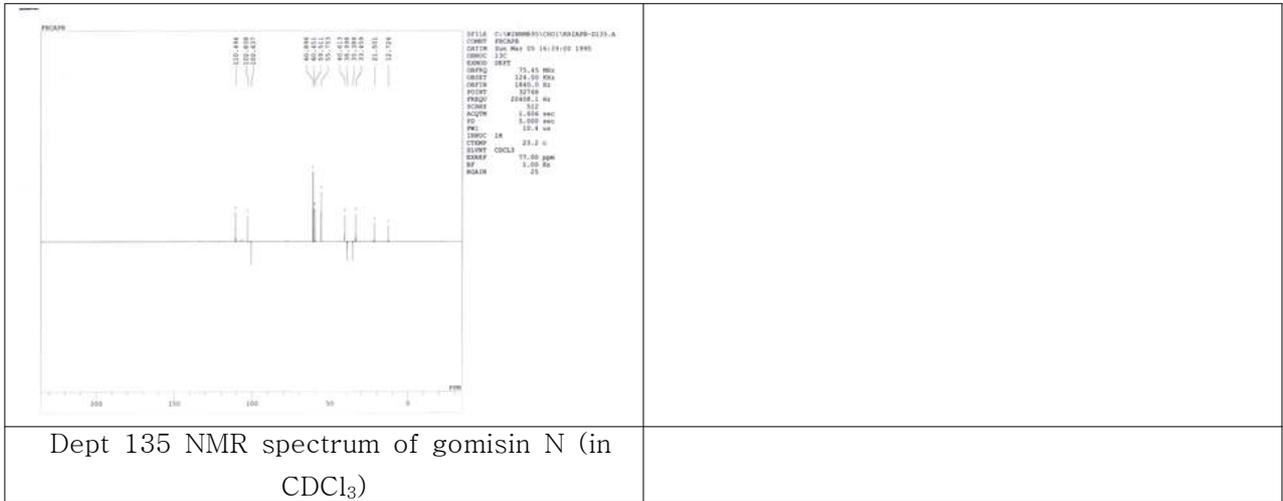
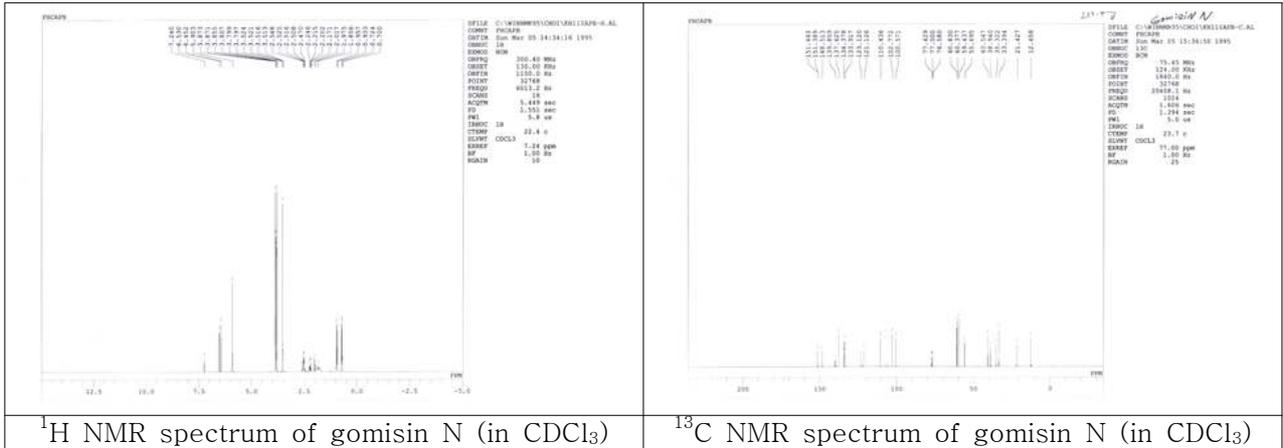


그림 54. 오미자로부터 분리된 gomisin N의 spectrum

Table 9. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) and ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) chemical shifts of gomisin N isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAILL.

Carbon No.	δ_{C}	δ_{H}	
1	151.7		
2	140.2		
3	151.6		
4	110.7	6.57, s	
5	134.1		
6	39.2	2.56 center, (2×H, m)	
7	33.6	1.91, m	
8	40.8	1.81, m	
9	35.6	9 α -H: 2.25 dd, (9.6/9.2) 9 β -H: 2.04 dd, (8/8)	
10	137.8		
11	102.9	6.50, s	
12	148.7		
13	134.6		
14	141.1		
15	121.4		
16	123.4		
17	21.5	0.98 d, (7.2)	
18	12.9	0.75 d, (6.8)	
	C-1, 14	60.5, 59.6	3.57, 3.84
OCH ₃	C-2, 13	61.0, -	3.90, -
	C-3, 12	55.9, -	3.91, -
OCH ₂ O		100.7	5.96, s

(라) Gomisin A의 구조 동정

Gomisin A는 무색의 침상 (colorless needles from MeOH), 분자식은 $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 67.9^\circ$ (in CDCl_3)으로서 dibenzocyclooctadiene lignan이다 (Fig. 55). Gomisin A의 ^{13}C -NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3)에서 olefine영역의 12개 aromatic carbon중에서 methoxy group과 연결된 4개의 quaternary carbon [δ_{C} 151.2 (C-1), 140.7 (C-2), 152.3 (C-3), 141.2 (C-14)], methylenedioxy와 연결된 2개의 quaternary carbon [δ_{C} 147.9 (C-12), 134.9 (C-13)] 및 2개의 methine carbon [δ_{C} 110.3 (C-4), 105.9 (C-11)]이 있었다. 1개의 methylenedioxy group [δ_{C} 100.8 (C-12, C-13)]에 결합하며 4개의 methoxy group [δ_{C} 60.6 (C-1), 61.0 (C-2), 56.0 (C-3), 59.7 (C-14)], 2개의 methyl기 [δ_{C} 30.1 (C-18), 15.8 (C-17)]가 있었으며, 4개의 aliphatic 탄소 중 2개의 methylene group [δ_{C} 40.5 (C-6), 33.7 C-9)], 1개의 methine δ_{C} 42.0 (C-8), 및 tertiary carbon δ_{C} 71.6 (C-8)의 23개의 carbon으로 구성된 dibenzocyclooctadiene의 구조를 가진 lignan계 화합물인 gomisin A로 밝혀졌다 (Fig. 56, 57과 Table 10).

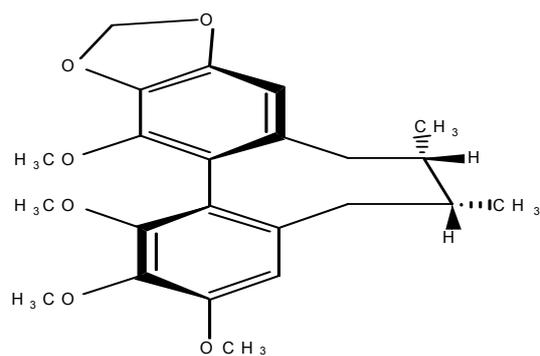


Fig. 55. Structure of gomisin A isolated from *Schisandra chinensis* and identified by ^1H NMR, ^{13}C NMR, and Dept NMR.

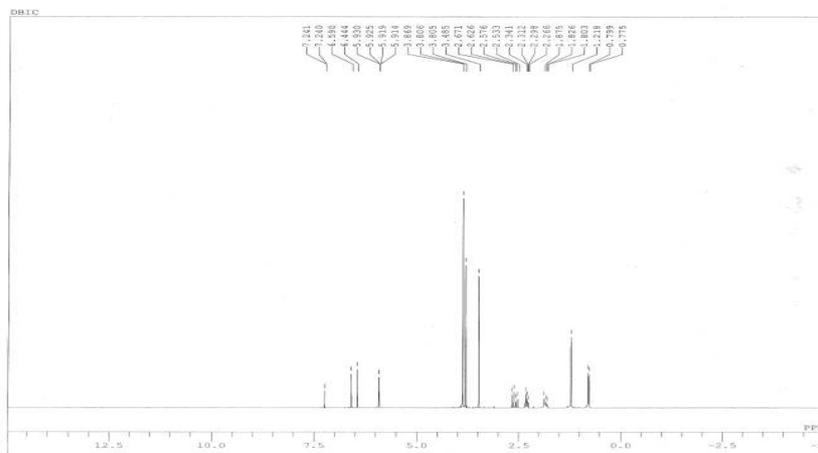


Fig. 56. ^1H NMR spectrum (500 MHz, CDCl_3) of gomisin A from *Schisandra chinensis*.

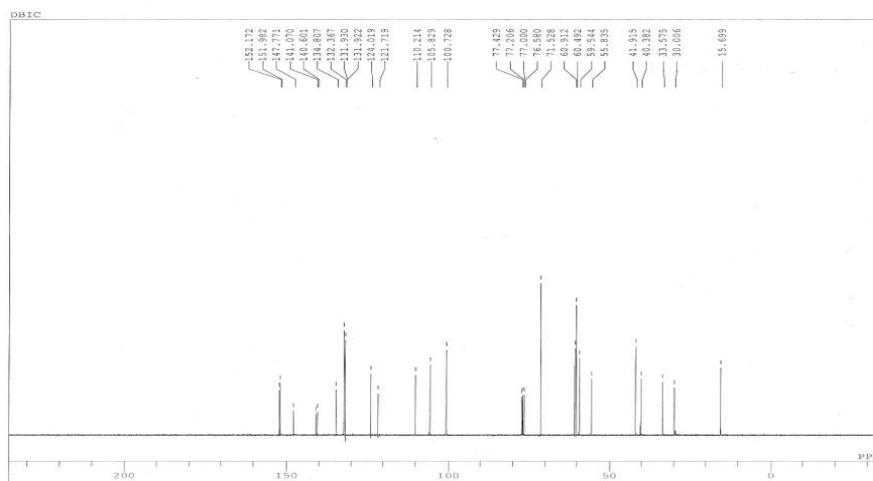


Fig. 57. ^{13}C NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3) of gomisin A from *Schisandra chinensis*.

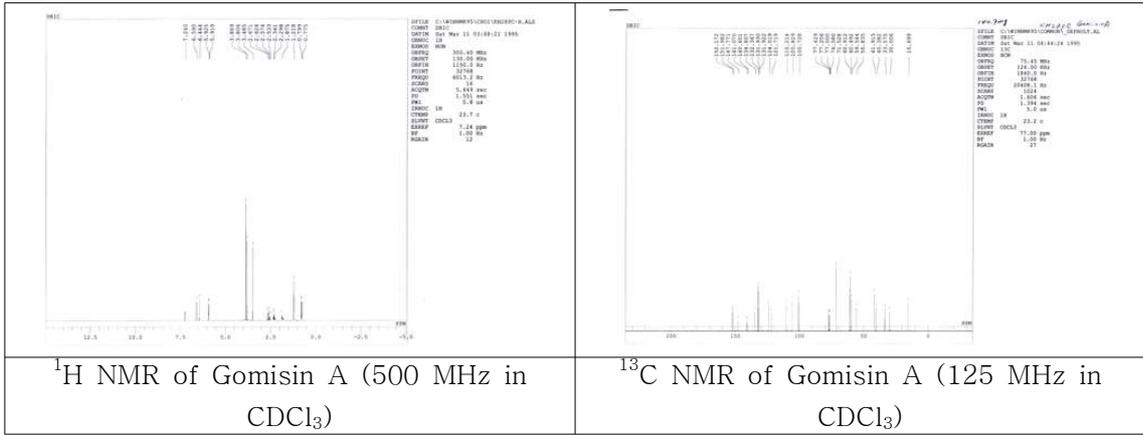


그림 58. 오미자로부터 분리된 gomisin A의 spectrum

Table 10. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) and ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) chemical shifts of gomisin A isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAILL.

Carbon No.	δ_{C}	δ_{H}	
1	152.1		
2	140.8		
3	152.3		
4	110.4	6.63, s	
5	132.1		
6	40.6	6 α -H: 2.69 d, (13.6) 6 β -H: 2.38 d, (13.6)	
7	71.7	1.91 s	
8	42.1	1.87 m	
9	33.8	9 α -H: 2.34 dd, (7.6/3.2) 9 β -H: 2.56 d, (14.0)	
10	132.5		
11	105.9	6.49, s	
12	147.9		
13	135.0		
14	141.3		
15	121.9		
16	124.2		
17	15.8	0.82 d, (7.6)	
18	30.1	1.26 s	
	C-1, 14	60.6, 59.6	3.91 ($\times 2$)
OCH_3	C-2, 13	61.0, -	3.53, -
	C-3, 12	56.0, -	3.85, -
OCH_2O		100.8	5.97 d, (3.2)

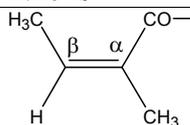
(마) Gomisin B (Angeloylgomisin P)

Gomisin B의 분자식은 $C_{28}H_{34}O_9$ 으로서 분자량이 514이었다. Gomisin B의 1H -NMR은 벤질기에 하나의 methylenedioxy기, 4개의 methoxyl가 있으며, cyclooctadiene ring에 2개의 메틸기, 1개의 hydroxyl, 1개의 benzylic methylene기 및 1개이 angeloyl기를 가지고 있다. 1H 과 ^{13}C NMR 및 IR 스펙트럼을 비교하여 볼 때 그림 9의 물질은 gomisin B로 확인되었다.

Table 11. ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) and H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) chemical shifts of gomisin B isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAIL.

Carbon No.	δ_C	δ_H
1	152.1	
2	148.7	
3	153.0	
4	109.8	6.79, s
5	130.6	
6	84.4	5.63, s
7	72.2	1.78
8	42.4	1.96, m
9	36.4	9 α -H: 2.31, dd, (9.6/9.6) 9 α -H: 2.16, d, (14.0)
10	134.2	
11	102.6	6.48, s
12	151.9	
13	134.6?	
14	139.9	
15	122.3	
16	121.1	
17	18.9	1.15, d, (6.8)
18	28.1	1.35 s
	C-1, 14	60.6, 59.0 60.8, - 55.8, - 3.58, 3.75 3.92 ($\times 2$)
OCH ₃	C-2, 13	100.5
	C-3, 12	-
OCH ₂ O	107.2(X2)	5.92, d, (10.8) 5.91 s 5.89 s

a) Angeloyl-



Angeloyl

C=O, 165.7, C=C 135.1, 127.1, α -CH₃ 15.7, β -CH₃ 19.7

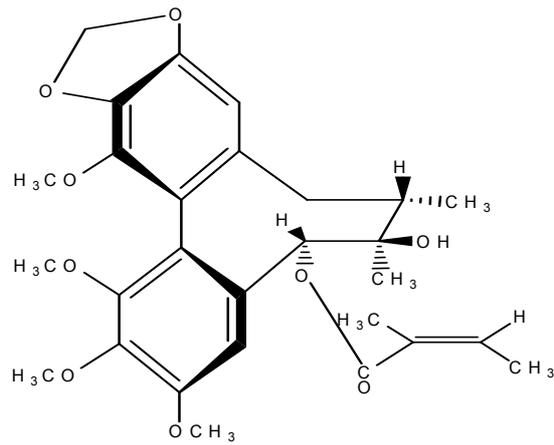


그림 59. 오미자로부터 분리된 gomisin B의 구조

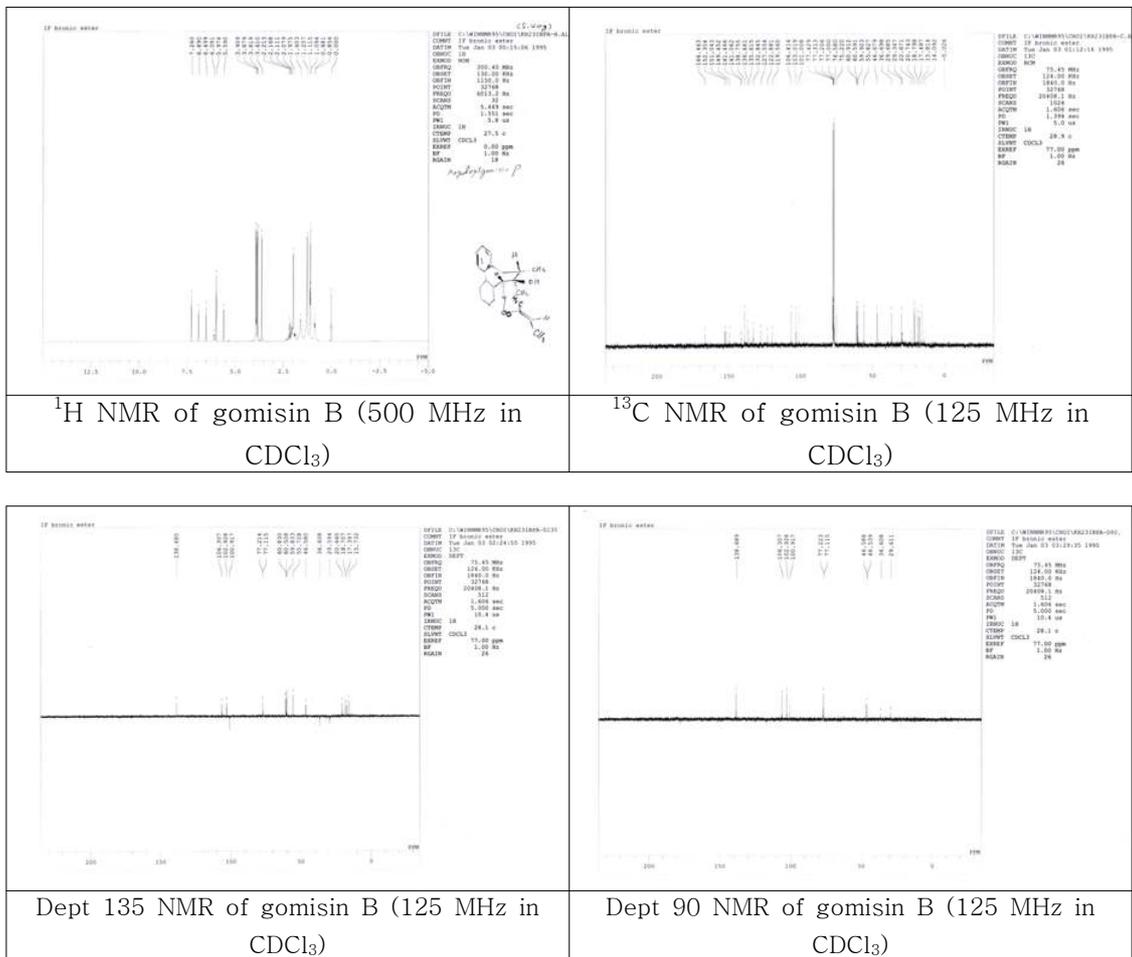


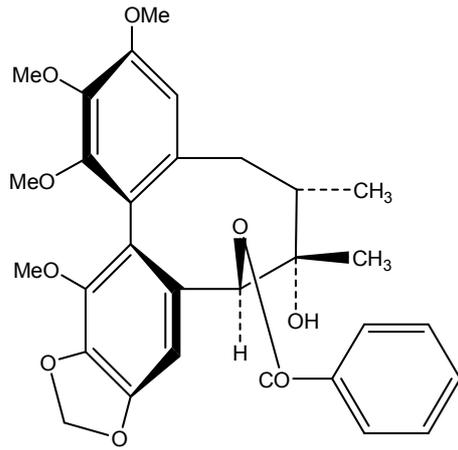
그림 60. 오미자로부터 분리된 gomisin B의 spectrum

(바) Gomisin G

Gomisin G의 분자식은 $C_{30}H_{32}O_9$ 으로서 분자량이 536이었다. Gomisin B의 1H -NMR은 벤질기에 하나의 methylenedioxy기, 4개의 methoxyl가 있으며, cyclooctadiene ring에 1개의 메틸기, 1개의 benzylic methylene기 및 1개의 carboxy기를 가지고 있다. 1H 과 ^{13}C NMR 및 IR 스펙트럼을 비교하여 볼 때 그림 9의 물질은 gomisin G로 확인되었다 (참고자료: Ikeya, 등 1990. Chem. Pharm Bull. 38(5):1408-1411; Ikeya 등 1979. Chem. Pharm Bull. 27(6): 1382-1394.)

Table 12. ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) and H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) chemical shifts of Gomisin G isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAIL.

Carbon no.	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
	164.779	
	153.257	
	150.730	
	148.084	
	141.673	
	139.854	
	137.124	
	136.552	
	133.231 (CH_1)	7.45 t
	129.505 (CH_1) 2H	7.36 d (7.6)
	129.239	
	128.754	
	128.121 (CH_1) 2H	7.26 t
	122.259	
	121.822	
	107.262 (CH_1)	6.68 s
	106.170 (CH_1)	6.77 s
	101.409 (CH_2)	6.00 d (6.4)
	84.364 (CH_1)	5.87 s
	72.465	
	60.128 (CH_3)	3.38 s
	59.899 (CH_3)	3.14 s
	59.784 (CH_3)	3.81 s
	56.084 (CH_3)	3.97 s
	42.191 (CH_3)	2.14 m
	36.760 (CH_2)	2.46 dd (10.4/10.4) 2.29 d (13.6)
	29.703 (CH_2)	?
	28.264 (CH_3)	1.33 s
	18.957 (CH_3)	1.19 d (7.2)



Gomisin G

그림 61. 오미자로부터 분리된 gomisin G의 구조

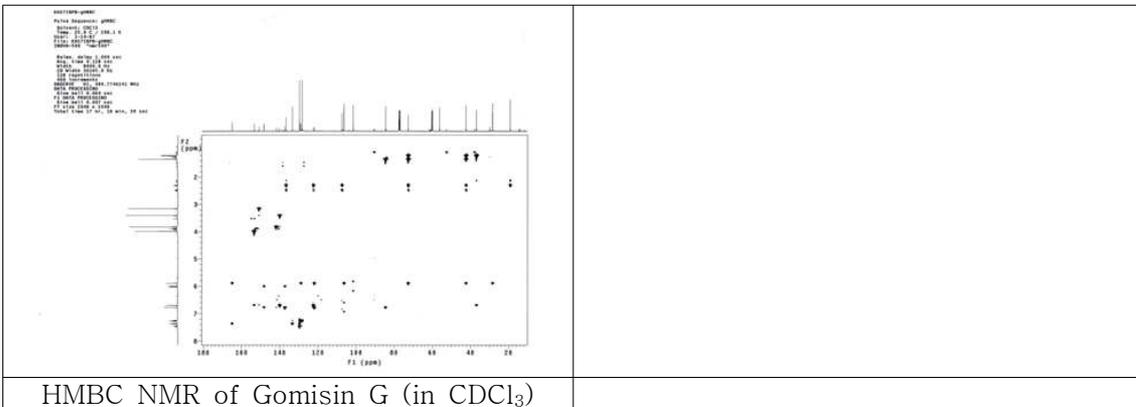
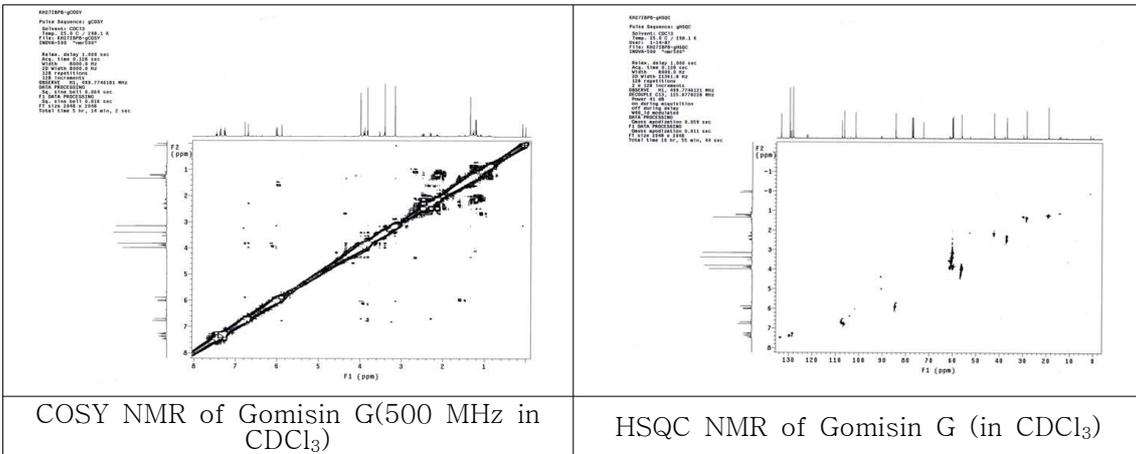
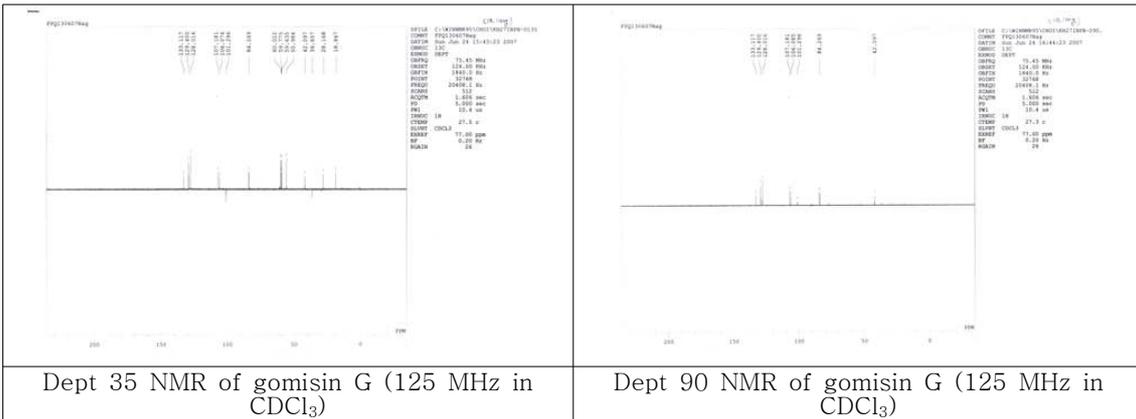
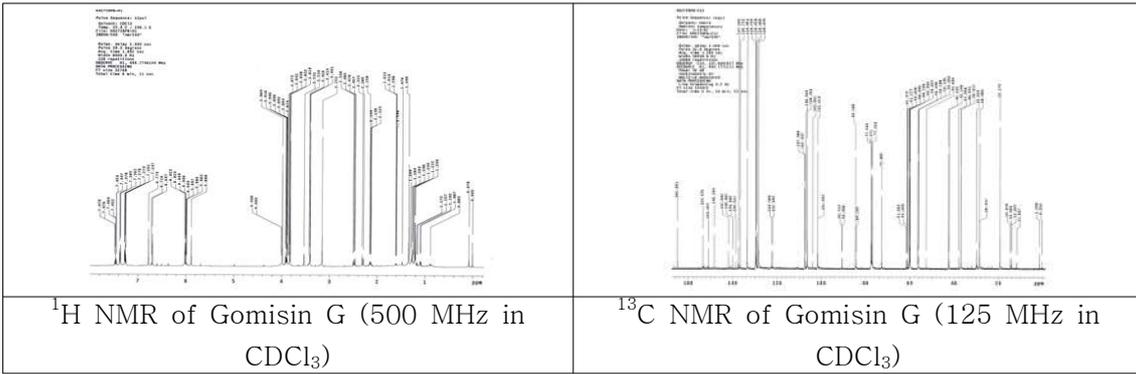


그림 62. 오미자로부터 분리된 gomisin G의 spectrum

(사) Gomisins J

Table에 표시된 물질의 proton, carbon 및 Dept 등을 비교한 결과, 분자식 C₂₂H₂₈O₆, 분자량이 388인 물질로서 구조는 이미 알려진 gomisins J으로 동정되었다 (Chem. Pharm. Bull. 28(8) 2414-2421. 1980. The constituents of *Schisandra chinensis* BAILL. VI. ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy of dibenzocyclooctadiene lignans. Yukinobu Ikeya, Heihachiro Taguchi, Hiroshi Sakai, Karou Nakajima, and Itiro Yosioka. 참고).

Table 13. ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) and H-NMR (500 MHz, CDCl₃) chemical shifts of Gomisins J isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAILL.

Carbon	δ_H	
1	150.1	
2	137.6	
3	147.4	
4	113.2	
5	134.8	
6	38.7	
7	33.6	
8	40.8	
9	35.1	
10	140.1	
11	110.1	
12	148.6	
13	137.3	
14	150.3	
15	121.3	
16	122.3	
17	21.7	
18	12.4	
	C-1, 14	60.0
OCH ₃	C-2, 13	60.9
	C-3, 12	
OCH ₂ O		

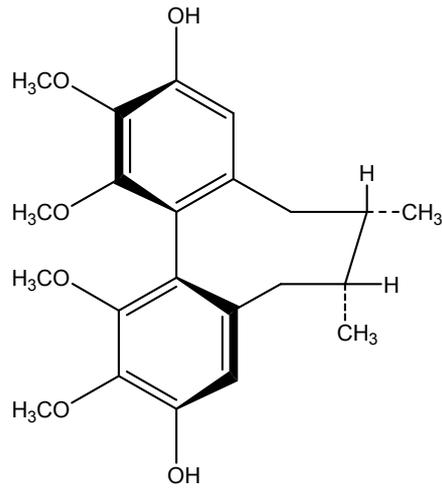


그림 63. 오미자로부터 분리된 gomisin J의 구조

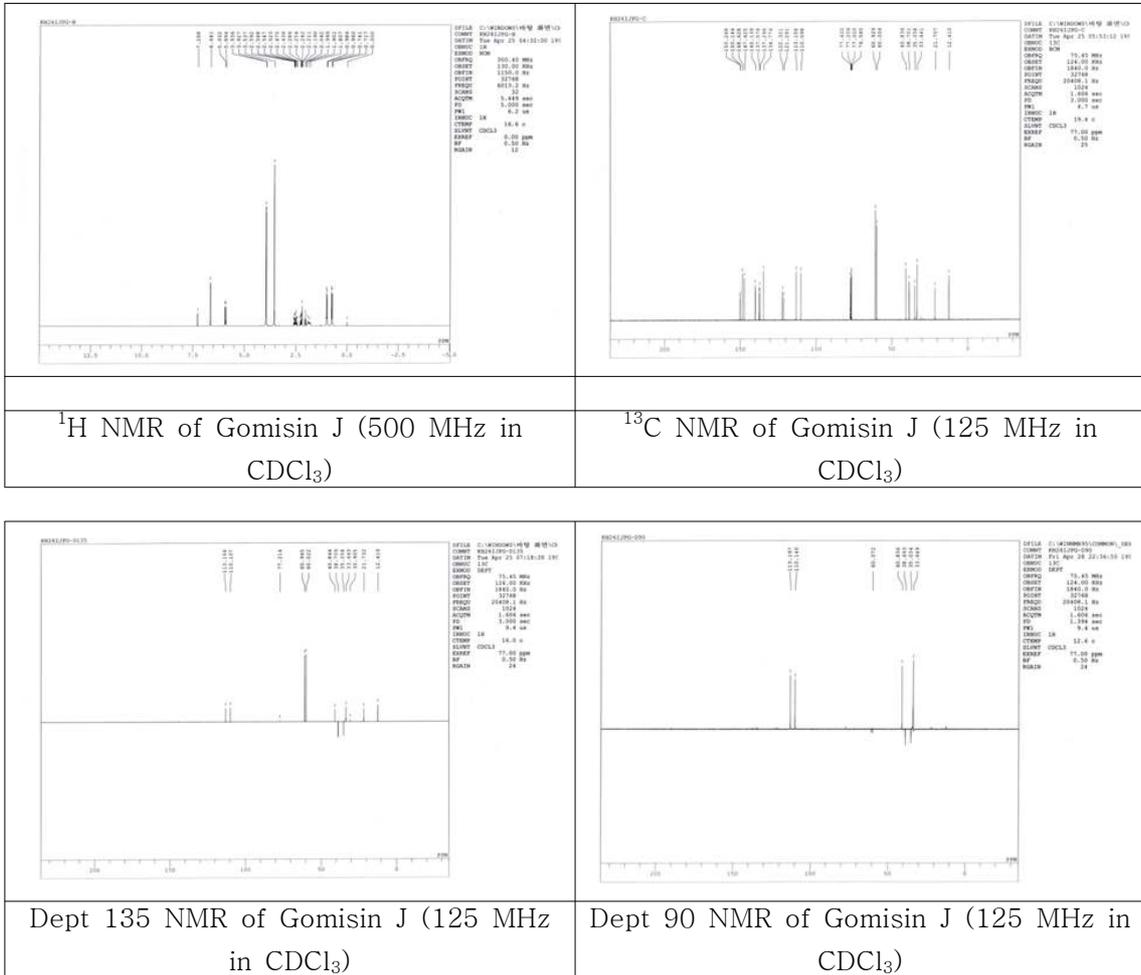


그림 64. 오미자로부터 분리된 gomisin J의 spectrum

(아) Dimethylgomisin J

Table에 표시된 물질의 proton, carbon 및 Dept 등을 비교한 결과, 물질의 분자식은 $C_{24}H_{32}O_6$, 분자량은 416으로서 이미 분리된 dimethylgomisin J으로 동정되었다 (Chem. Pharm. Bull. 28(8):2414-2421 참고).

Table 14. ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) and H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) chemical shifts of Dimethylgomisin J isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAIL.

Carbon		δ_c
	1	151.5
	2	140.1
	3	151.4
	4	110.5
	5	133.9
	6	39.1
	7	33.8
	8	40.8
	9	35.6
	10	139.2
	11	107.2
	12	152.9
	13	139.7
	14	151.6
	15	122.3
	16	123.4
	17	21.8
	18	12.7
	C-1, 14	60.6($\times 2$)?
OCH ₃	C-2, 13	61.0, 60.9
	C-3, 12	55.92, 55.89
OCH ₂ O		

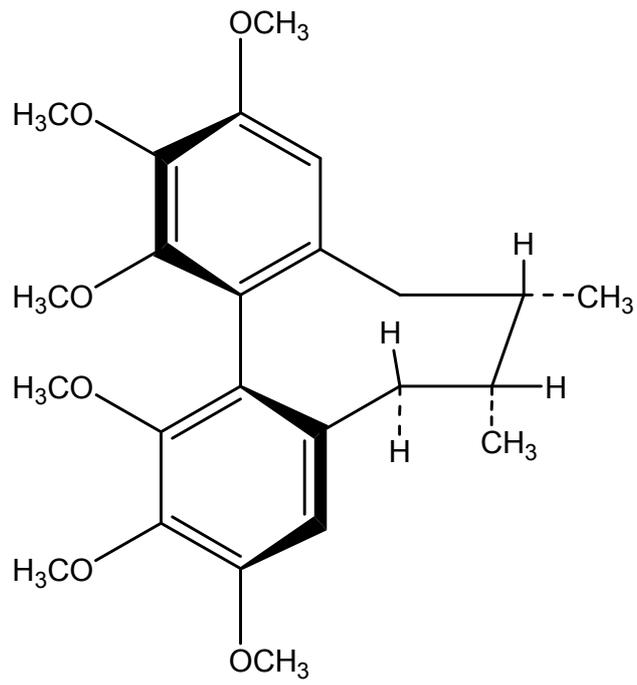


그림 65. 오미자로부터 분리된 dimethylgomisin J의 구조

(자) Isoanwulignan

오미자로부터 분리된 물질을 proton, carbon, COSY, HSQC, 및 HMBC의 NMR data를 분석한 결과를 토대로 구조를 분석하였다. 물질의 구조는 이미 분리된 isoanwulignan으로 동정되었다.

Table 15. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3), COSY, Dept, HSQC and HMBC chemical shifts of isoanwulignan isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAIL.

Atom no.	δ_c (ppm)		δ_H (ppm)
	147.5	C	
	146.3	C	
	145.5	C	
	143.6	C	
	135.7	C	
	133.7	C	
	121.8	CH	6.61, dd, J=9.5/1.5
	121.7	CH	6.64, dd, J=9.0/1.5
	114.0	CH	6.83, d, J=8.5
	111.5	CH	6.62, d, J=1.5
	109.3	CH	6.65, d, J=1.5
	107.9	CH	6.72, d, J=8.0
	100.7	CH_2	5.91, dd, J=3.0/1.5
	55.8	CH_3	3.86, s
	39.4	CH	1.73, m,
	39.3	CH	2.27, dd,
	39.1	CH_2	2.26(2H), dd, J=19.0/9.5/4.5
	38.9	CH_2	2.72(2H), dd, J=14.5/6.0
	16.2	CH_3	0.83+
	16.1	CH_3	0.83(6H)_

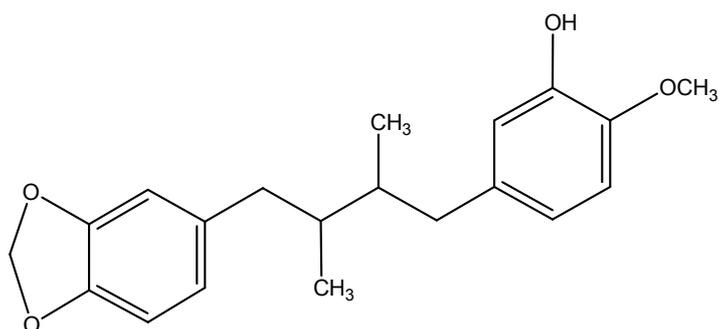
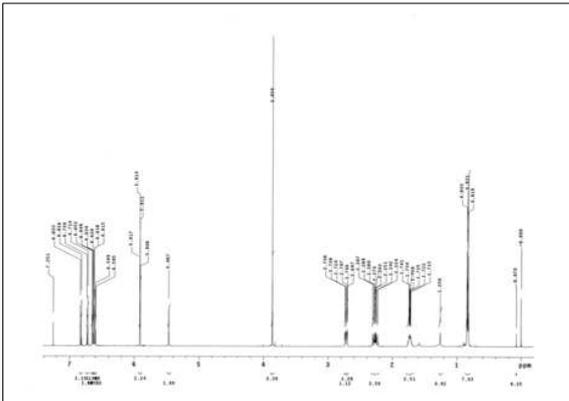
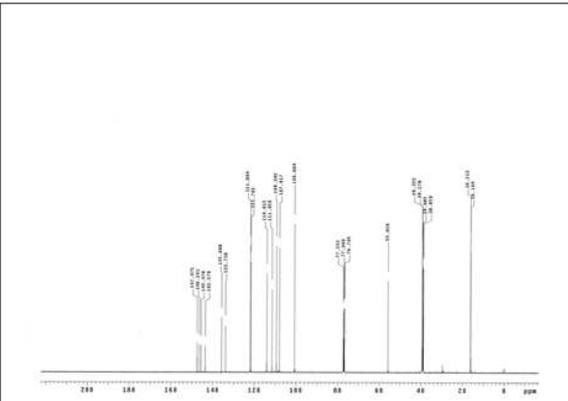


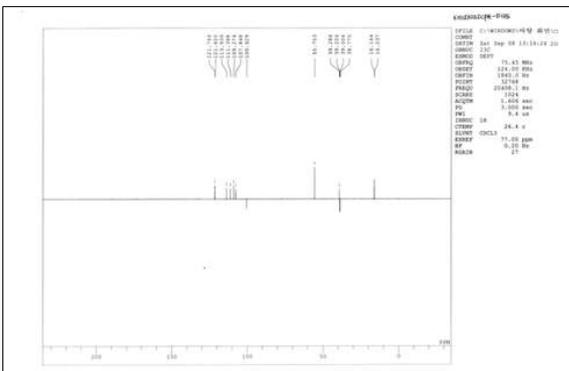
그림 66. 오미자로부터 분리된 isoanwulignan의 구조



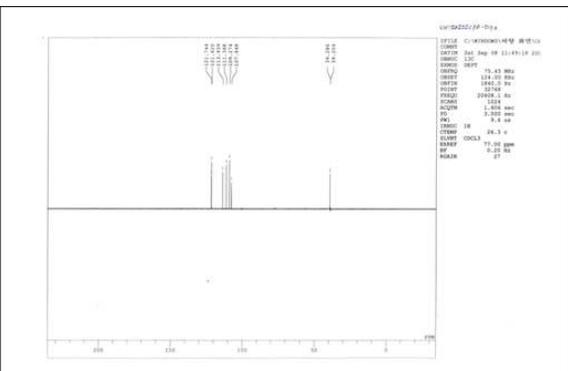
^1H NMR of Isoanwulignan (500 MHz in CDCl_3)



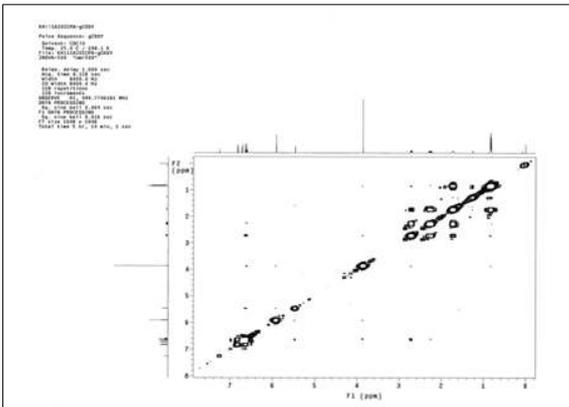
^{13}C NMR of Isoanwulignan (125 MHz in CDCl_3)



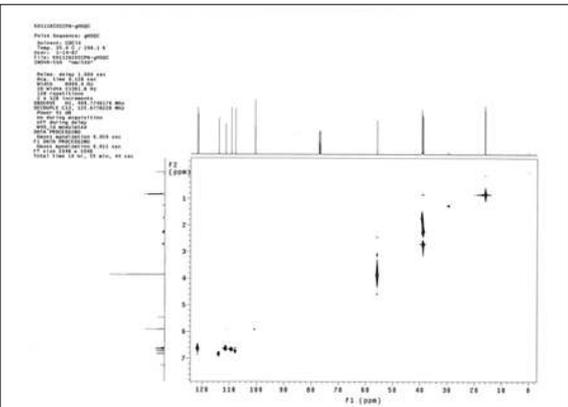
DEPT 135 NMR of Isoanwulignan (125 MHz in CDCl_3)



DEPT 90 NMR of Isoanwulignan (125 MHz in CDCl_3)



COSY NMR of Isoanwulignan (500 MHz in CDCl_3)



HSQC NMR of Isoanwulignan (in CDCl_3)

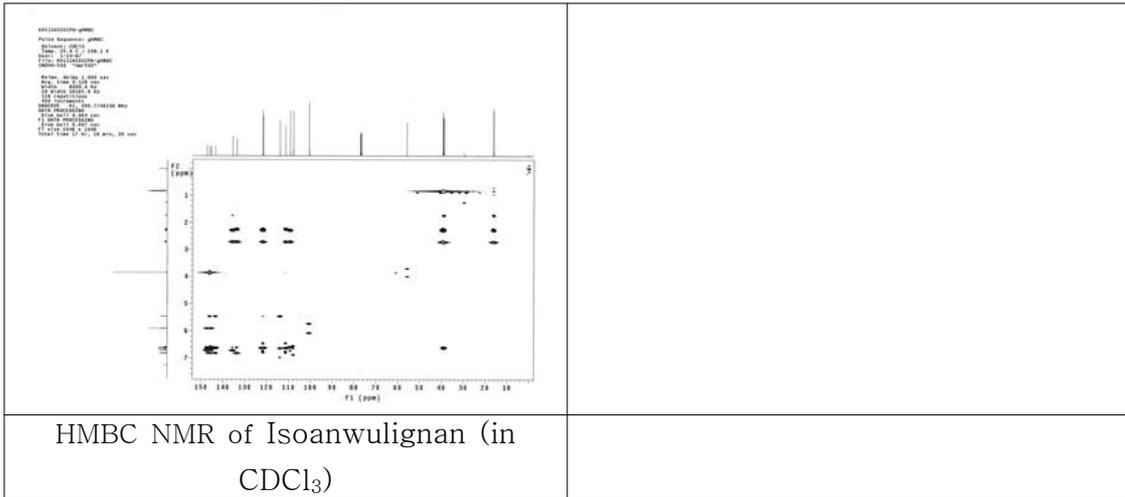


그림 67. 오미자로부터 분리된 isoanwulignan 의 spectrum

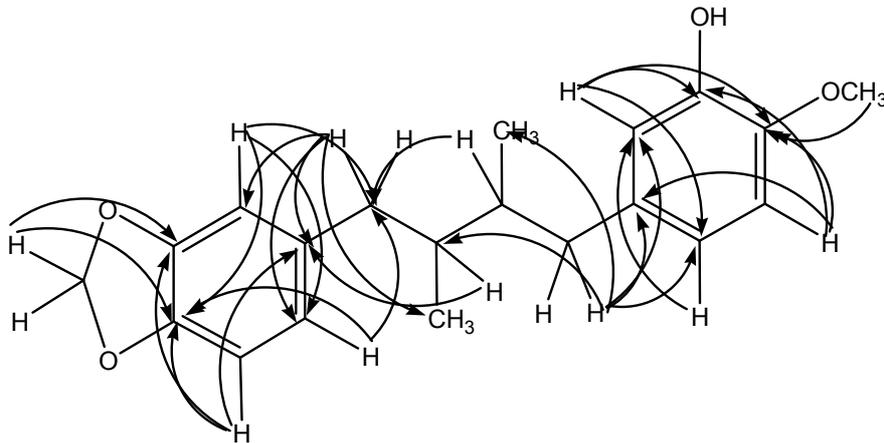


그림 68. 오미자로부터 분리된 isoanwulignan의 주요 HMBC.

(차) Chamigrenal

Colorless oil, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), 9.35 (1 H, s, H-14), 6.79 (1H, dd, 3.9 Hz, H-2), 4.85, 4.35 (each 1H, both br. s, H-15 α or H-15 β), 2.40-1.56 (methylene), 0.91, 0.87 (each 3H, both s, H-12, 13). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), 192.89 (C-14), 150.32 (C-2), 147.84, 140.28 (C-1, 7), 110.25 (C-15), 45.47, 36.33 (C-4, 11), 36.74, 31.45, 30.09, 24.49, 23.08, 18.65 (methylene, C-3, 5, 8, 9, 10), 24.41, 22.65 (c-12, 13).

화합물 1(chamigrenal)은 무색의 오일물질로서 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) spectrum의 결과, 1개의 aldehyde (δ_{C} 192.89, d), 4개의 olefine성 탄소 (δ_{C} 150.32 (d), 147.84 (s), 140.28 (s), 110.25 (t)] 및 고자장 영역세어 2개의 사급탄소 (δ_{C} 45.47, 36.33), 6개의 methylene (δ_{C} 36.74-18.65), 2개의 methy (δ_{C} 24.41, 22.65) signal이 관측되어, aldehyde 와 2상의 2중결합을 갖는 sesquiterpene 화합물로 판명되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400 MHz, CDCl_3)에서도 aldehyde (δ_{H} 9.35, s), olefinic methine (δ_{H} 6.79, br, s), exomethylene (δ_{H} 4.85, br, s; δ_{H} 4.35, br, s), 2개의 singlet methyl (δ_{H} 0.91, 0.87) 및 다수의 methylene (δ_{H} 2.48-1.02) signal이 관측되었다. 이상의 결과를 바탕으로 문헌¹⁷⁾ 과 비교하여 화합물 1을 chamigrenal로 동정하였다.

Table 16. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3), COSY, Dept, HSQC and HMBC chemical shifts of isoanwulignan isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* BAIL.

Carbon No.	δ_{C}
	193.8
	151.2
	148.3
	140.7
	110.7
	45.9
	37.2
	36.7
	31.8
	30.5
	24.9
	24.9
	23.5
	23.0
	19.0

2. 활성분획 추적법을 통한 항염증 및 면역증강 효능 신물질의 순수분리

(1) α -iso-cubebene의 순수분리 및 구조 동정

오미자 분쇄물 2 kg을 헥산, 클로로포름, 메탄올을 이용하여 순차적으로 추출하여 헥산 추출물 308 g, 클로로포름 14 g 및 메탄올 추출물 1368 g을 얻었다. 각각의 추출물에 대해서 항염증, 면역 및 헬리코박터 파이로리 균의 성장억제 시험결과, 헥산 추출물의 효과가 가장 높았다. 따라서 헥산 추출물 120g을 1 kg의 silica gel을 충전한 컬럼의 위 표면에 첨가하였다. 분획을 얻기 위하여 헥산, 헥산-에틸아세트 및 클로로포름-메탄올 혼합용액을 일정량 첨가하여서 38개의 분획을 얻었다. 각각의 분획을 분류하여 항염증과 면역활성물질의 활성을 검증한 결과 모두 1번 분획에서 효과가 높았다. 따라서 1번 분획으로부터 물질을 순수분리하였다. 순수분리한 물질의 구조를 밝히기 위하여 1D와 2D NMR 스펙트럼을 이용하여 그 구조를 동정한 결과는 표 17과 그림 70에서 보는 바와 같이 확정하였다. 본 연구의 활성분획검증에 의해서 순수분리하여 밝힌 구조는 신물질로 판명되었다.

Table 17. Two dimensional NMR correlations of new compound.

Carbon No.	δ_C		δ_H	HMBC
1	39.4	C		
2	30.9	CH ₂	2.21, dd, J=5.0/2.5	142.5, 117.1, 48.3, 43.2, 39.4,
3	142.5	C		
4	117.1	CH	5.28, m	43.2, 30.9, 23.3
5	43.2	CH	2.03, d, J=6.0	142.5, 117.1, 48.3, 44.7, 39.4
6	44.7	CH	1.67, m	117.1, 48.3, 43.2, 39.4, 32.5, 30.9, 22.2
7	45.5	CH	1.52, m	45.5, 43.2, 39.4, 36.7, 32.5, 22.2
8	22.2	CH ₂	0.90, m	45.5, 32.5
9	36.7	CH ₂	1.74, t	48.3, 45.5, 39.4, 22.2, 19.1
10	48.3	CH	1.62, m	48.3, 43.2, 39.4, 36.7, 22.2
11	32.5	CH	1.52, m	45.5, 44.7, 22.2
12	19.9	CH ₃	0.891, m	45.5, 32.5, 19.3
13	19.3	CH ₃	0.890, m	45.5, 32.5, 19.9
14	19.1	CH ₃	0.79, s	48.3, 39.4, 36.7
15	23.3	CH ₃	1.68, m	142.5, 117.1, 30.9

GC-MS의 분자이온 시그날은 204였으며, 분자식은 ¹H, ¹³C 및 Dept NMR의 데이터로부터 C₁₅H₂₄로 확정하였다. 분리한 물질은 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) spectrum으로부터 4개의 primary carbon (δ_C 19.1, 19.3, 19.9, 23.3), 3개의 secondary carbon (δ_C 22.2, 30.9, 36.7), 6개의 tertiary carbon (δ_C 32.5, 43.2, 44.7, 45.5, 48.3, 117.1) 및 2개의 quaternary carbon (δ_C 39.4, 142.5)가 있었다.

이러한 데이터로부터 하나의 2중 결합이 있다는 것을 알 수 있었다. 분자식 C₁₅H₂₄의 구성 원소들을 볼 때 3개의 사이클링 링(tricyclic ring)과 4개의 불포화 결합 및 1개의 double bond가 있음을 알 수 있다. 본 물질의 ¹H NMR로부터 1개의 methyl singlet (δ_H 0.79, 14-H), 2개의 methyl doublet (δ_H 0.890-0.891, 12-H and 13H)와 down-field로 이동한 1개의 methyl multiplet (δ_H 1.68, H-15)이 있다. 또한 1개의 olefinic proton (δ_H 5.28, H-3)이 관찰되었다. 두 개의 cyclopropane proton이 δ_H 1.67 (H-6)과 δ_H 2.03 (H-5)에 관측되었

다. 2개의 비정상적인 methylene groups이 δ_H 0.90 (H-8)과 δ_H 1.74 (H-9)에 나타났다. 이 두개의 high-field proton은 cyclopropane ring system의 anisotropic range에 있음을 증명한다. 이 두 개의 methylene proton은 서로 인접해 있다는 것을 gCOSY 데이터로서 확인할 수 있었다.

본 물질의 이러한 구조 결정은 HMBC로서 확정었는데, C-11은 H-12와 H-13에 연결(coupling)되어 있었고, C-7은 H-12, H-13, H-5, H-8 및 H-9에 연결되어 있다. H-9는 methine proton H-10와 methyl doublet인 H-14에 연결되어 있다. Quaternary carbon인 C-1은 H-2, H-3, H-6, H-9, H-10과 H-14에 연결되어 있으며, 이러한 구조는 전형적인 cubane sesquiterpene skeleton이다. 1D 또는 2D NMR을 종합하면 본 실험에서 순수분리하여 추출한 물질의 구조는 그림과 같이 확정할 수 있고, 이 물질은 신물질로 알려졌다.

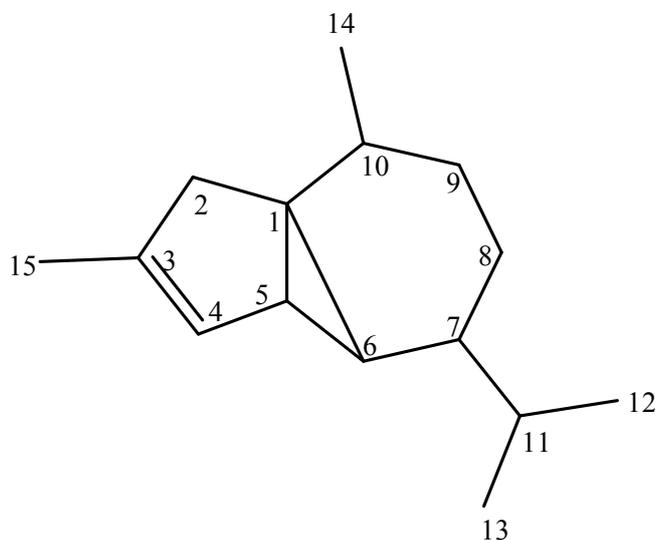


그림 70. 오미자로부터 분리한 신물질의 화학구조

Chemical Formula: $C_{15}H_{24}$

Molecular Weight: 204.35

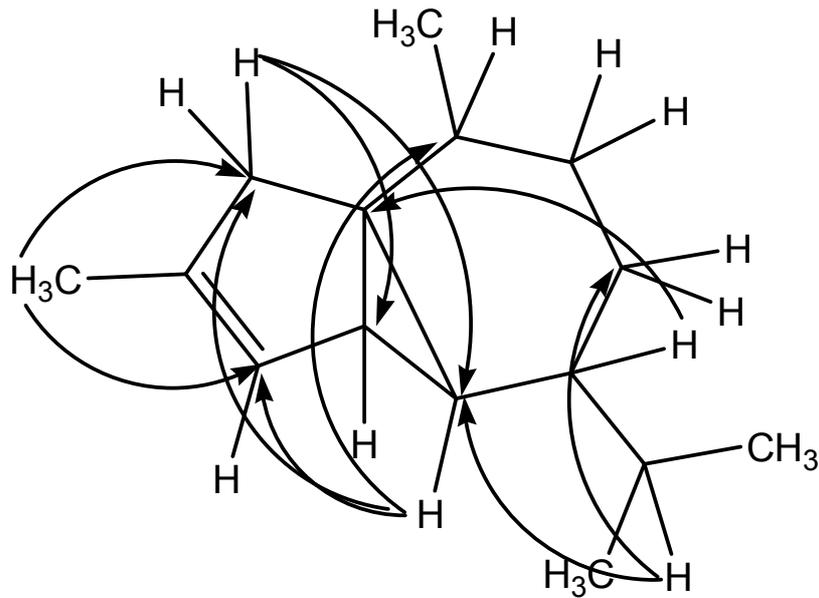


그림 71. 오미자로부터 분리한 신물질의 주요 HMBC 연관.

(2) YSCH1005의 순수분리 및 구조 동정

hexan 추출물로부터 물질을 순수분리하여 1D와 2D NMR 스펙트럼을 이용하여 그 구조를 동정한 결과 분자량은 220 이었으며, sesquiterpene계의 물질을 순수분리하였는데, 신물질로 증명되었다. 물질의 1D와 2D NMR 구조는 다음과 같았으며, 현재 이물질은 저농도에서 다양한 약리효능을 나타내고 있으므로 작용기작을 규명한 후에 특허 출원을 진행시키고 천연물신약으로 개발하기 위하여 연구를 진행중에 있다. 따라서 본 연구진이 발굴한 신물질은 다음(최종 구두발표)에서 보고할 것이다.

**국제특허 시에
문제가 야기되므로
다음에 따로 보고**

그림 72. 오미자로부터 분리한 신물질의 화학구조

3. HPLC를 이용한 기능성 물질의 품질 평가 기준 마련

나. 결과 및 고찰

오미자에 많이 함유되어 있는 Lignans 중에서 schisandrin, schisandrin C, gomisin A 및 gomisin N 등을 순수분리하여 HPLC조건을 확정하였다. 확정된 HPLC조건을 이용하여 지역간에 주요 리그난 물질의 양을 측정하여서 생리활성 효능이 높은 물질을 기준으로 품질 평가 기준을 설정하였다.

수집지역별 순수분리한 리그난의 함량을 조사한 결과는 그림에서 보는 바와 같다. 시산드린과 고미신 A는 1과 2지역에서 가장 많았으며 3지역에서 가장 낮았다. 티글로일고미신 H와 시산드린 C는 지역간에 큰 차이가 없었으나, 고미신 C는 1지역에서 고미신 B는 4와 5지역에서 현저히 많았다. 반면 고미신 N은 1, 3, 4 및 5지역보다 2지역에서 수집한 과실에서 현저히 낮았다.

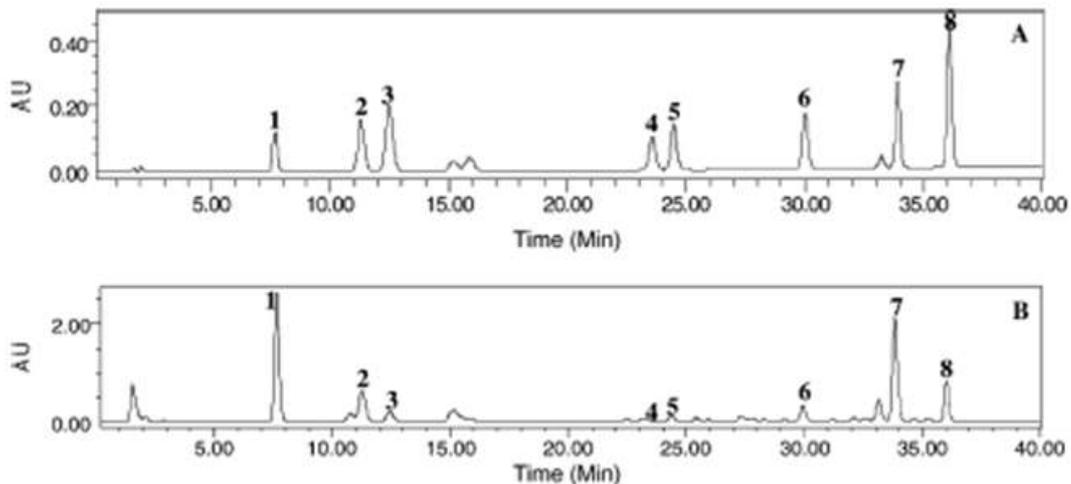


그림 73. 오미자로부터 추출한 8종류의 lignans 물질의 HPLC 크로마토그램 Fig. 1, schisandrin; 2, gomisin A; 3, tigloylgomisin H; 4, gomisin C; 5, gomisin B; 6, schisandrin A; 7, gomisin N; 8, schisandrin C.

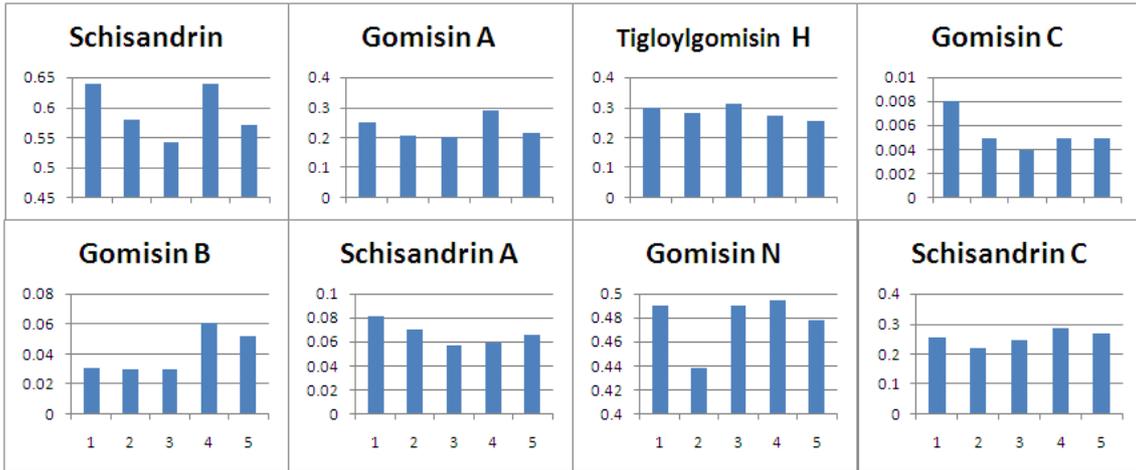


그림 74. 오미자로부터 순수분리한 리그난의 수집지역별 함량 차이

오미자로부터 추출한 각각의 리그난 함량은 지역간에 다양한 차이가 있었으며, 본 연구에서 분리한 8가지의 리그난을 합한 총 리그난 함량을 비교한 결과는 그림 75에서 보는 바와 같다. 총 리그난 함량은 1과 4지역에서 수집한 샘플에서 현저히 많았으며, 2지역에서 수집한 과실의 총 리그난 함량이 가장 낮았다.

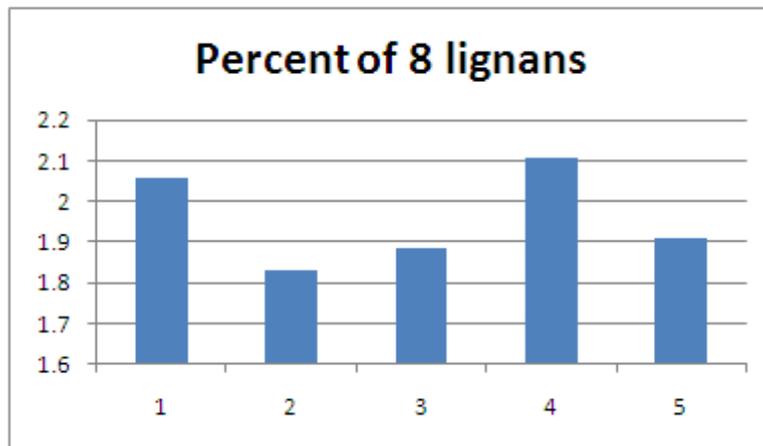


그림 75. 수집지역별 총리그난의 함량 (%)

4. 추출방법이 리그난 성분 추출효율에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

(1) Hexane, Ethyl acetate, Chloroform, 및 Methanol 의 순차 추출

오미자 시료 0.5 g을 15 ml tube에 정취하여 hexane 2.5 ml를 넣고 30분 동안 sonication하였다. Sonication 이 후 가라앉은 시료와 용매가 잘 섞이게 vortex를 한 다음 3300 rpm의 속도로 15분간 원심분리를 하였다. 원심분리가 끝난 다음 분리된 상등액 부분을 취하였다. 3회 반복 추출하여 hexane 추출물을 얻었다. Hexane 추출이 끝나고 남은 잔여물에 추출용매 ethyl acetate 2.5 ml 첨가하여 30분 동안 sonication 한 다음에 hexane 추출한 방법과 동일하게 원심 분리하여 상등액 부분을 취하고 이러한 과정을 3반복하여 ethyl acetate 추출물을 얻었다. Ethyl acetate 추출이 끝나고 남은 잔여물에 chloroform 2.5 ml 첨가하여 30분 동안 sonication 한 다음에 hexane 추출한 방법과 동일하게 원심 분리하여 상등액 부분을 취하고 이러한 과정을 3반복하여 chloroform 추출물을 얻었다. Chloroform 추출 후 남은 잔여물에 methanol 2.5 ml을 넣고 위와 동일한 방법으로 3회 반복 추출하여 methanol 추출물을 얻었다. 이렇게 순차적으로 추출한 hexane, ethyl acetate, chloroform, 및 methanol 추출물의 불순물을 제거하기 위해 filtering한 후 볼륨을 10 ml로 낮추고 10배 희석하여 hexane, ethyl acetate, chloroform, 및 methanol의 추출물을 분석 시료액으로 사용하였다. 순차적 용매 추출의 HPLC 분석기기의 조건은 Table 1에서 보는 바와 같다.

(2) Hexane, Ethyl acetate, Chloroform, 및 Methanol의 용매별 추출

건조된 과실을 분쇄하여 0.5 g의 시료를 각각 4개의 15 ml test tube에 hexane, chloroform, ethyl acetate, 및 methanol 2.5 ml을 넣은 다음 30분간 sonication하였다. Sonication 후 15분 동안 3300 rpm의 속도로 원심분리 하여 상등액 부분을 취하였다. 1차 추출이 끝나고 남은 잔여물에 각각의 용매를 첨가하여 2차와 3차의 3회 반복 추출을 통하여 hexane, chloroform, ethyl acetate, 및 methanol 추출물을 획득하였다. 각각의 용매 추출에 의해 얻은 추출물의 불순물을 제거하기 위해 filtering하고 난 다음 10 ml로 낮춘 후 10배 희석하여 분석시료로 사용하였으며, HPLC 분석 조건을 Table 1과 같다.

Table 18. The condition of HPLC analysis

Column	: RUNA C18 (Phenomenex, 150 × 3.00 mm, 5μ)
Mobile phase	: acetonitrile : Water (20:80%)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Injection volume	: 10 μl

나. 결과 및 고찰

(1) 순차적 추출방법

오미자 시료 0.5 g을 hexane, ethyl acetate, chloroform, 및 methanol로서 순차적으로 추출하였다. 순차적 추출물에 대하여 schisandrin C, gomisin N, gomisin A 및 schisandrin을 표준으로 하여 함량을 비교 분석하였다 (Fig. 76). 오미자로부터 분리된 4종의 lignan 물질 함량을 분석한 결과, hexane 추출물에서 모든 lignan이 추출되었으며, hexane으로 추출한 후 남은 잔여물에 대하여 ethyl acetate, chloroform, 및 methanol 추출물에서는 리그난이 전혀 없었다. Hexane 추출물에서 분리된 4종의 lignan 함량을 비교하면 schisandrin의 함량이 제일 높았으며, 다음은 gomisin N, gomisin A, schisandrin C의 순으로 lignan 함량이 낮았다. 따라서 오미자로부터 lignan을 추출하기 위해서는 다양한 용매를 사용할 수 있으나, 본 연구의 결과, hexane을 이용하면 오미자에 포함되어 있는 lignan을 모두 추출할 수 있었다. 오미자로부터 lignan이 많이 함유되어 있는 제품을 생산하기 위해서는 hexane을 이용하는 것이 가장 효과적인 방법이 될 것이다.

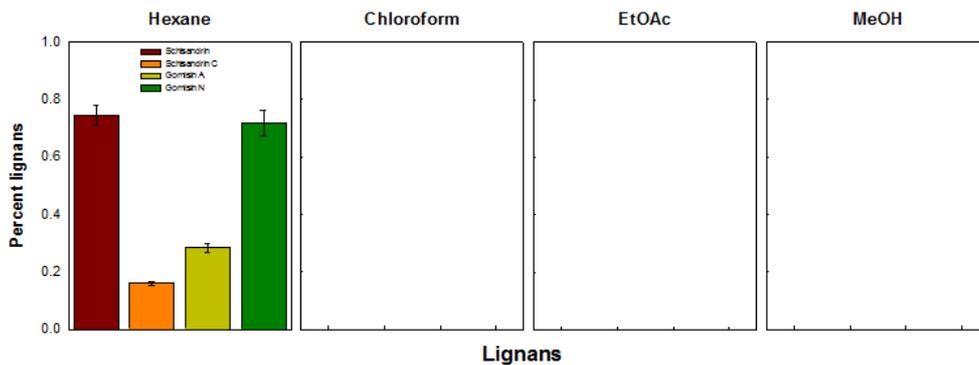


Fig. 76. Comparative analysis of lignan contents obtained from successive extraction with hexane, ethyl acetate, chloroform, and methanol.

(2) 독립 용매 추출 방법

건조과실을 마쇄하여 0.5 g의 시료를 hexane, ethyl acetate, chloroform, 및 methanol의 용매로 각각 추출한 추출물에 함유된 lignan성분의 함량을 비교한 결과는 Fig. 77에서 보는 바와 같다. 오미자에서 분리된 4종의 lignan 함량을 비교한 결과, schisandrin은 hexane, EtOAc, CHCl_3 , 및 MeOH의 모든 용매로서 lignan의 추출이 가능하였다. 그 중에서 hexane과 EtOAc 추출물에서 schisandrin 함량이 낮았으며, methanol과 CHCl_3 추출물에서의 schisandrin의 함량이 비교적 높았다.

Schisandrin과는 유사하게 gomisin N은 CHCl_3 추출물에서의 함량이 제일 높았으며 methanol, EtOAc, 및 hexane 순으로 작아졌다. Schisandrin과 gomisin N의 함량이 높은데 비하여, schisandrin C와 gomisin A의 함량이 상대적으로 낮았다. 오미자에서 분리된 4종의 lignan 물질인 schisandrin, schisandrin C, gomisin N 및 gomisin A의 함량은 극성이 높은 추출물과 극성이 낮은 추출물에서 모두 함유되어 있었으며 그 차이는 적었다. 또한 4종의 물

질은 hexane 추출물에서도 함량이 높았는데, 이는 극성이 낮은 용매 추출로서 대량의 lignan 성분을 쉽게 획득할 수 있음을 알 수 있다.

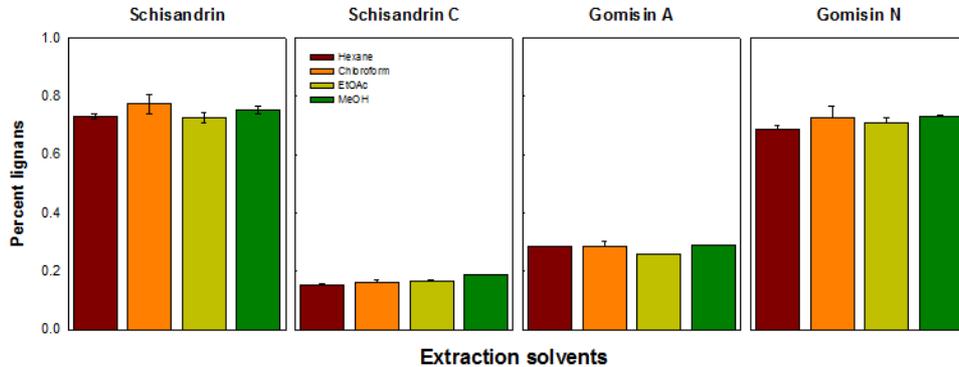


Fig. 77. Comparative analysis of lignan contents obtained from each extraction solution of hexane, ethyl acetate, chloroform, and methanol.

다. 적 요

이상의 결과를 종합적으로 정리하면 다음과 같다. 오미자는 목련과에 속하는 낙엽성 목본식물로서 과실을 채취하여 사용한다.¹⁾ 채취한 과실은 예로부터 한방과 민간에서 거담, 자양, 강장제, 수렴, 익기증진,¹⁷⁾의 약효를 가지고 있어 생약원료로 이용하였으며 약리작용은 대뇌피질의 기능을 향상시키고 심혈관 기능을 조절하고 혈액순환장애개선 등의 질병에 사용되어 왔다.¹⁸⁾ 오미자의 주요 약리 효능을 나타내는 성분으로는 lignan 화합물로서 생리활성 연구로 고지혈증 수치를 낮게 해 준다는 보고²⁵⁾가 있다. Schisandrin의 함량이 높아서 간 보호 효과에 가장 크게 기여한 것으로 여겨지고 있다.³⁵⁾ 그 외에도 gomisin A는 간독성을 개선시키며,³⁶⁻³⁷⁾ gomisin N도 흰 쥐에서 항산화 작용을 통해 지질과산화를 억제시키고³⁸⁻³⁹⁾ 간암발생⁴⁰⁾을 낮아지게 하며 간 재생을 촉진시킨다고 하였다.

본 실험은 오미자에 함유된 lignan 성분 중 schisandrin, schisandrin C, gomisin N, 및 gomisin A를 순수 분리하여 구조를 동정하고 생리활성에 대한 효과를 검증하기 위해 수행되었다.

오미자로부터 순수 분리된 4종류의 물질을 TLC로 전개하여 1차적으로 분리 (Fig. 5, 6, 8, 및 10)하고 그 물질의 구조 동정은 이미 보고가 되어 있는 물질로서 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Dept-NMR로서 구조를 확인하였다.^{13-15, 42, 45-46)}

Schisandrin의 분리와 구조 동정 (Fig. 12)에 대한 ¹H-NMR, ¹³C-NMR data 결과 (Table 3)는 Ikeya 등 (1979)의 보고¹³⁾와 동일하게 18개의 carbon에 6개의 methoxy group, 2개의 methyl기, 2개의 methylene기, OH기가 있는 dibenzocyclooctadiene의 기본골격 구조를 가지고 있는 lignan계 물질임을 알 수 있었다.

Schisandrin C (Fig. 15)와 gomisin N¹⁵⁾ (Fig. 20)은 Ikeya 등 (1982)⁴⁶⁾의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR data를 비교한 결과 18개의 carbon을 가지고 있으며 작용기의 종류 또는 위치에 따라 물질이 다르다는 것을 알 수 있었다. schisandrin C (Table 4)는 두 개의

methylenedioxy기가 100.6 ppm에 peak가 있으며, C-1과 C-14에 두 개의 methoxy기가 있으며 2개의 methyl기, 2개의 methylene기가 있는 dibenzocyclooctadiene의 기본골격구조를 가진 lignan계 화합물이었다.

Gomisin N의 구조는 100.7 ppm에 1개의 methylenedioxy기, 4개의 methoxy기, 2개의 methyl기, 2개의 methylene기가 있으며, IR spectrum data에서 OH기의 peak이 없었는데 이는 gomisin N이 OH기가 없는 lignan 물질이라는 것을 의미하는 것으로 Choi 등 (2006)⁴²⁾과 Slanina 등(1997)¹⁵⁾의 gomisin N에 대한 data 보고와 동일하였다 (Table 5).

Gomisin A의 구조는 Ikeya 등 (1979)의 문헌¹³⁾과 동일하게 ¹³C-NMR spectrum (Fig. 23)에서 C-12와 C-13에 연결된 methylenedioxy, 4개의 methoxy group (C-1, 2, 3, 14), 2개의 methyl기가 있었으며, 2개의 methylene group, 1개의 methine기가 결합되어서 23개의 carbon으로 구성된 dibenzocyclooctadiene계의 화합물이었다.

본 실험에서 오미자의 hexane 추출물은 혈관 이완력을 촉진시켰는데(Fig. 28), 이러한 결과는 Rhyu 등 (2006)의 연구 결과⁴⁴⁾와 유사하였다. 또한 활성도가 높은 hexane 추출물로부터 gomisin A 라는 물질을 분리하여 혈관 이완력을 측정 한 결과, 혈관 내피 세포를 제거 또는 제거하지 않은 내피세포의 혈관 이완력을 증가시켰으므로 오미자의 혈관이완을 촉진시키는 지표성분으로 활용이 가능 할 것이다.

분리된 4종의 리그난을 표준으로 하여 추출방법에 따른 함량 분석을 위해 HPLC를 사용하였다. 순차적 추출방법 (Fig. 29)으로 분석을 한 결과 hexane 추출물에서 lignan 물질을 많이 함유하고 있었던 반면, chloroform, methanol 추출물에서는 lignan 물질이 추출되지 않았다. 각각의 용매로 직접 추출하였을 경우 (Fig. 30)에는 lignan 함량은 schisandrin이 가장 많았으며 gomisin N, gomisin A, schisandrin C의 순으로 함량이 낮았다. 김관수 등 (2002)⁴³⁾은 methanol 추출물에 함유된 리그난 물질 함량 분석결과 schisandrin이 가장 높고 gomisin A, gomisin N의 순으로 함량이 낮았다고 보고하였다. 이는 순차추출방법으로서 hexane으로 대부분의 lignan을 추출할 수 있었으며, 용매별로 직접 추출하였을 때에 chloroform과 methanol로 추출에서 함량이 약간 높았다. 따라서 오미자로부터 lignan을 추출하기 위해서는 다양한 용매를 사용할 수 있으나, 본 연구의 결과로 hexane 만으로도 lignan 성분을 모두 추출할 수 있음을 알 수 있다.

라. 참고문헌

1. 이창복, 1993. 대한식물도감, p. 375.
2. Jung, G. T., I. O. Ju, J. S. Choi, and J. S. Hong. 2002. The antioxidative, antimicrobial and scavenging effect of *Schizandra chinensis* Ruprecht (*Omijacina*) seed. Kor. J. Food Sci. Tech., 32(4): 928-935.
3. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균. 1998. 완역중약대사전, 서울정담, p. 3958-3968.
4. Hsu, H. Y., Y. P. Chen, S. J. Hsu, C. C. Chen, and H. C. Chang. 1986. Oriental materia medica, oriental healing arts institue, California, USA: 624-625.
5. Hwang, S. J., B. S. Pyo, and B. Hwang. 2004. Detection of lignans from transformed root cultures of *Schsandra chinensis* Baillon. Kor. J. Med. Crop Sci., 12(6): 448-453.

6. 이상인, 1980. 본초학, 수서원, p. 172.
7. Yang, H. C., J. M Lee, and K. B. Song. 1982. Anthocyanins in cultured omi ja (*Schizandra chinensis* baillon) and its stability. Kor. J. Agri. Chem. Soc., 25(1): 35-43.
8. 이춘영, 김우정, 1987. 천연향신료와 식용색소, 향문사, p. 95.
9. Hyun, K. H., H. J. Kim, and H. C. Jeung. 2002. A study on determining chemical composition of *Schizandra chinensis*. Kor. J. Plant Res., 15(1): 1-7.
10. Kim, O. C., and H. J. Jang. 1994. Volatile components of *Schizandra chinensis* Baillon. Kor. J. Agri. Chem. and Biochech., 37(1): 30-36.
11. 田口平八郎 1985. 五味子 の 化學 現代東洋醫學, 6 (4) : 6 5 - 7 4 .
12. Tang, W., and G. Eisenbrand. 1992. *Schizandra chinensis* Baill. Chap.111. In chinese drugs of plant origin chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine, Springer-verkag. berlin, germany, p. 903-917.
13. Ikeya, Y., H. Taguchi, I. Yosioka, and H. Kobayashi. 1979. The constituents of *Schizandra chnensis* BAILL. I. Isolation and structure determination of five new lignans, gomisins A, B, C, F and G, and the absolute structure of schizandrin. Chem. Pharm. Bull., 27(6): 1383-1394.
14. Kochetkov, N. K., A. Y. Khorlin, O. S. Chizhov, and V. I. Sheichenko. 1961. Schisandrin, a lignan of unusual structure. Tetrahedron Lett., 2(20): 730-734.
15. Slanina, J., E. Taborska, and L. Lojkova. 1997. Lignans in the seeds and fruits of *Schisandra chinensis* cultured in europe. Planta Med., 63(3): 277-280.
16. Nakajima, K., H. Taguchi, Y. Ikeya, T. Endo, and I. Yosioka. 1983. The constituents of *Schizandra chinensis* BAILL. XIII. Quantitative analysis of lignans in the fruits of *Schizandra chinensis* BAILL. by high-performance liquid chromatography. Jpn. J. Pharm. Soc., 103(7): 743-749.
17. Bao, T. T., G. T. Liu, Z. Y. Song, G. F. Xu, and R. H. Sun. 1980. A comparison of the pharmacologic actions of 7 constituent isolated from fructus schisandrae. Chin.[in chinese and abstract] Acta Pharm. Jan., 93(1): 41-47.
18. 김종석, 1995. 신중국한의학, 유성출판사.
19. 육창수, 1975. 현대본초학, 고문사, 서울, p. 194-195.
20. 구정희, 1991. 동약학개론, 고강출판사, 서울, p. 390-399.
21. 중약대사전편찬위원회, 1997. 중약대사전, 도서출판 정담, 서울.
22. Kim, H. K., G. M. Na, S. H. Ye, and H. S. Han. 2004. Extration characteristics and antioxidative activity of *Schizandra chinensis* extracts. Kor. J. Food Culture, 19(5): 484-490.
23. Donald, M. W., and G. H. Neil. 1984. Biological activities of lignans, Phytochemistry, 23(6): 1207.
24. Ock, E. S., 1995. Effect of *Schizandra chinensis* extract in hyperlipidemic rats. Kor. J. Soc. Food. Nutr., 24(5): 658-662.
25. Lee, J. S., and S. W. Lee. 1990. Effects of water extracts in fruits of omija

- (*Schizandra chinensis* Baillon) on alcohol metabolism. Kor. J. Dietary Culture, 5(2): 259-263.
26. Lee, J. S., and S. W. Lee. 1990. Effect of water extract in fruits of omi ja (*Schizandra chinensis* Baillon) on CCl₄ toxicity. Kor. J. Dietary Culture, 5(2): 253-257.
 27. Lee, J. W., J. H. Choi, and S. M. Kang. 1992. Screening of medicinal plants having hepatoprotective activity effect with primary cultured hepatocytes intoxicated using carbon tetrachloride cytotoxicity. Kor. J. Pharmacogn., 23(4): 268-275.
 28. Matsuzaki, Y., T. Matsuzaki, H. Ono, S. Koguchi, S. Takeda, S. Funo, M. Aburada, E. Hosoya, and T. Oyama. 1991. Studies on the metabolic fate of gomisins A (TJN-101) II absorption and excretion in CCl₄ treated rats. Yakugaku Zasshi., 111(9): 531-537.
 29. Jang, E. H., Y. H. Pyo, and M. S. Ahn. 1996. Antioxidant effect of omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts. Kor. J. Soc. Food Sci., 12(3): 372-376.
 30. Park, U. Y., D. S. Chang, and H. R. Cho. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. Kor. J. Soc. Food Nutr., 21(1): 91-96.
 31. Lee, S. H., and Y. S. Lim. 1997. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract against *Listeria monocytogenes*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 25(5): 442-447.
 32. Lee, S. H., and Y. S. Lim. 1997. Effect of omija (*Schizandra chinensis*) extract on the growth of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 25(2): 224-228.
 33. 이상호, 1997. 오미자 추출물의 항균활성 및 작용 메카니즘. 중앙대학교 박사 논문.
 34. Lee, S. H., and Y. S. Lim. 1998. Antimicrobial effects of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganism. Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr., 27(2): 239-243.
 35. 황자영, 1998. 오미자의 조리조건과 추출 용매에 따른 lignan 함량 변화. 서울대학교 석사 논문.
 36. Ohkura, Y., Y. Mizoguchi, Y. Sakagami, K. Kobayashi, S. Yamamoto, S. Morisawa, S. Takeda, and M. Aburada. 1987. Inhibitory effect of TJN-101 ((+)-(6S, 7S, R-biar)-5, 6, 7, 8, - tetrahydro-1, 2, 3, 12,-terametoxy-6, 7,-demethyl-10, 11-methylene dioxy-6-dibenzo [a, c] cyclooctenol) on immunologically induced liver injuries. Jpn. J. Pharmacol., 44(2): 179-185.
 37. Zamada, S., Y. Murawaki, and H. Kawasaki. 1993. Preventive effect of gomisins A, a lignan component of *Schizandra* fruits, on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Biochem. Pharmacol., 46: 1081-1085.
 38. Liu, G. T., 1989. Pharmacological action and clinical use of fructus *Schizandrae*. Chin. Med. J., 102(10): 740-749.
 39. Liu, K. T., and P. Lesca. 1982. Pharmacological properties of dibenzo[a,c]cyclooctene derivatives isolated from fructus *Schizandrae chinensis*. I. Interaction with rat liver cytochrome P-450 and inhibition of xenobiotic metabolism

- and mutagenicity. *Chem. Biol. Interat.*, 39(3): 301-314.
40. Ohtaki, Y., M. Nomura, T. Hida, K. Miyamoto, M. Kanitani, T. Aizawa, and M. Aburada. 1994. Inhibition by gomisin A, a lignan compound, of hepatocarcinogenesis by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 17(6): 808-814.
 41. Mak, D. H. F., S. P. Ip, P. Ch. Li, M.K. T. Poon, and K. M. Ko. 1996. Effects of schisandrin B and α -tocopherol on lipid peroxidation, in vitro and in vivo. *Mol. and Cell. Biochem.*, 165(2): 161-165.
 42. Jung, J. T., I. A. Khan, and Y. W. Choi. 2006. Isolation and synthesis of dibenzocyclooctadiene lignans: (\pm)-Schisandrin and its analogues. *Synthetic communications*, 36: 2259-2268.
 43. Kim, K. S., S. S. Kang, and S. N. Ryu. 2002. Quantitative analysis of lignans from fruits of *Schizandra chinensis*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 33(4): 272-276.
 44. Rhyu, M. R., E. Y. Kim, B. K. Lee, and S. N. Chen. 2006. Aqueous extract of *Schizandra chinensis* fruit causes endothelium-dependent relaxation of isolated rat thoracic aorta. *Phytomedicine*, 13(9): 651-657.
 45. Ikeya, Y., N. Ookawa, H. Taguchi, and I. Yosioka. 1982. The constituents of *Schizandra chinensis* BAILL. XI¹ The structure of three new lignans, Angeloyl gomisin O, and Angeloyl- and benzoylisogimisin O. *Chem. Pharm. Bull.*, 30(9): 3202-3206.
 46. Ikeya, Y., N. Ookawa, H. Taguchi, and I. Yosioka. 1982. The constituents of *Schizandra chinensis* BAILL. XII. The structure of three new lignan, gomisin R, the absolute structure of wuweizisu C and isolation of schisantherin D. *Chem. Pharm. Bull.*, 30(9): 3207-3211.

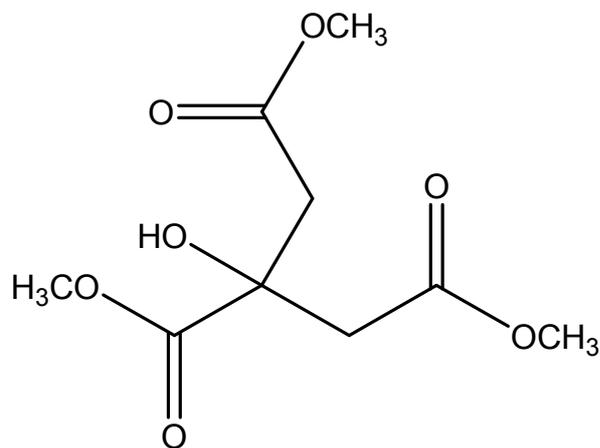
5. 오미자의 MeOH추출물로부터 순수분리한 성분의 구조 동정

오미자의 메탄올 추출물로부터 8개 이상의 성분을 순수분리하였다. 이 물질들은 일부 1D와 2D NMR과 다른 spectrum으로부터 구조를 일부 동정하였다. 그러나 이러한 성분들 중 신물질이 2개정도 포함되어 있으며, 구조도 매우 간단한 형태이다. 또한 본 연구과제에는 포함되어 있지 않지만, 화장품으로서 이용할 수 있는 미백효과가 있는 물질이 있으며, 그 외에도 신경계 세포와 다른 여러 가지 생리활성을 검증하고 있다. 이들 중 1-2 물질은 상당히 좋은 생리활성을 나타내고 있으므로 추후에 특허권을 획득한 다음에 산업화 방안을 검토할 것이다.

MeOH로부터 분리한 성분의 구조는 물질의 1D NMR spectrum만을 제시하였으며, 2D NMR spectrum은 생략하였는데, 현재 진행중인 생리활성 검증을 완료하고, 특허를 출원한 이후에 보고하고자 합니다.

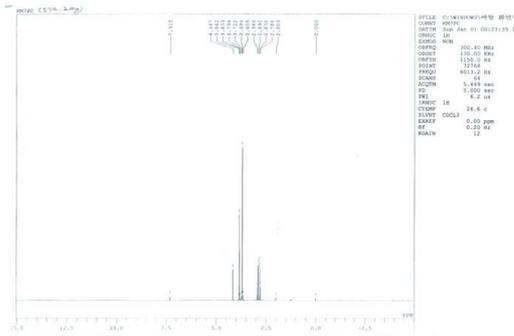
(1) MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM7PC의 구조동정

오미자의 MeOH추출물로부터 순수분리한 KM7PC 성분을 1 D NMR 또는 2 D NMR을 이용하여 구조를 분석한 결과는 Fig. 78과 79에서 보는 바와 같이 추정할 수 있다. 그러나 KM7PC의 최종적인 구조를 확정할 수 있으며, 최종적인 구조는 LC-MS data가 필요한데 현재 진행중에 있다. 따라서 다음 구조를 확인한 결과 보고된 바가 없었으므로 KM7PC의 분자식은 $C_9H_{14}O_7$, 분자량은 234.2033인 신물질로 추정할 수 있다.

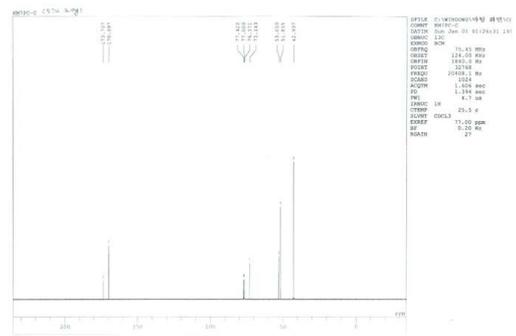


Chemical Formula: $C_9H_{14}O_7$
Exact Mass: 234.074
Molecular Weight: 234.2033

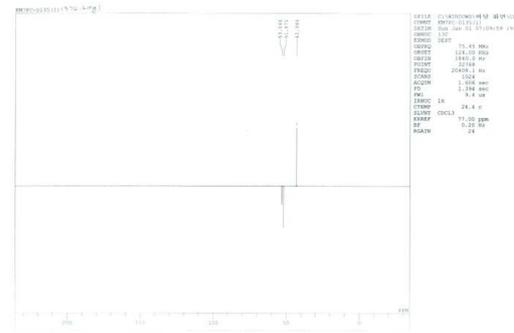
그림 78. 오미자 메탄올 추출물로부터 분리된 KM7PC의 구조



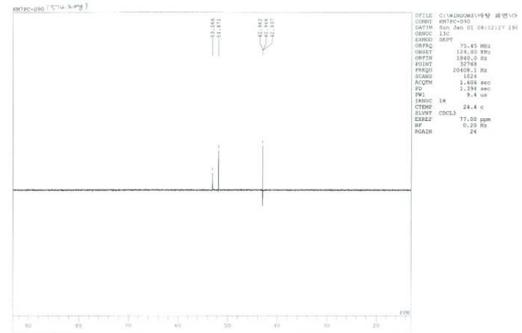
^1H NMR of KM7PC (500 MHz in CDCl_3)



^{13}C NMR of KM7PC (125 MHz in CDCl_3)



DEPT 135 NMR of KM7PC (125 MHz in CDCl_3)



DEPT 90 NMR of KM7PC (125 MHz in CDCl_3)

gCOSY NMR of KM7PC (500 MHz in CDCl_3)

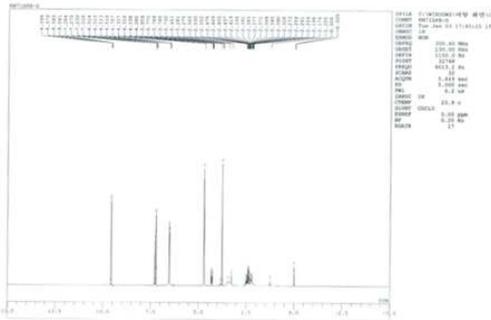
HSQC NMR of KM7PC (in CDCl_3)

HMBC NMR of KM7PC (in CDCl_3)

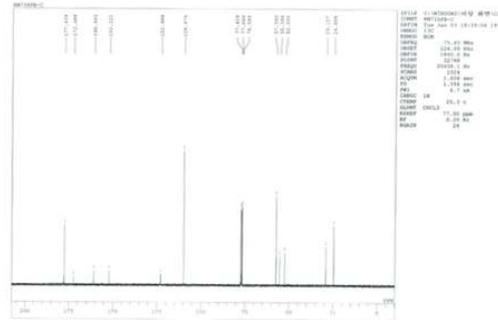
그림 79. 오미자의 MeOH추출물로부터 분리된 KM7PC의 1D와 2D NMR spectrum

(2) MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM7IHPB의 NMR 데이터

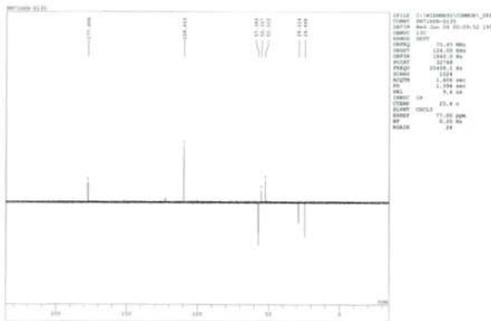
MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM7IHPB의 1D NMR 데이터는 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 구조는 다음에 밝힐 예정이다.



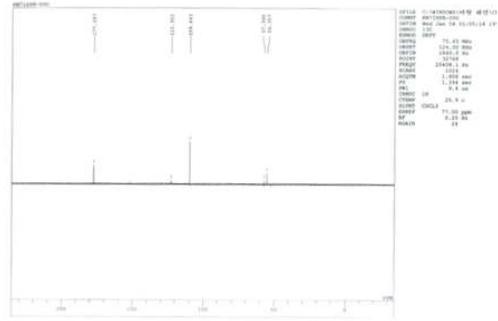
¹H NMR of KM7IHPB (500 MHz in CDCl₃)



¹³C NMR of KM7IHPB (125 MHz in CDCl₃)



DEPT 135 NMR of KM7IHPB (125 MHz in CDCl₃)



DEPT 135 NMR of KM7IHPB (125 MHz in CDCl₃)

gCOSY NMR of KM7IHPB (500 MHz in CDCl₃)

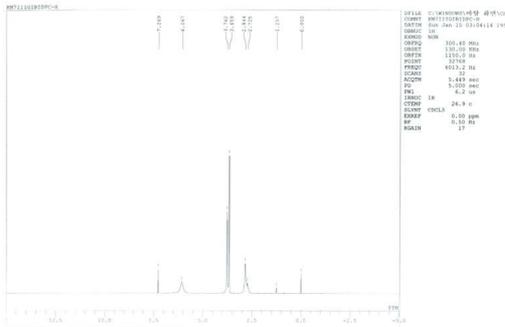
HSQC NMR of KM7IHPB (in CDCl₃)

HMBC NMR of KM7IHPB (in CDCl₃)

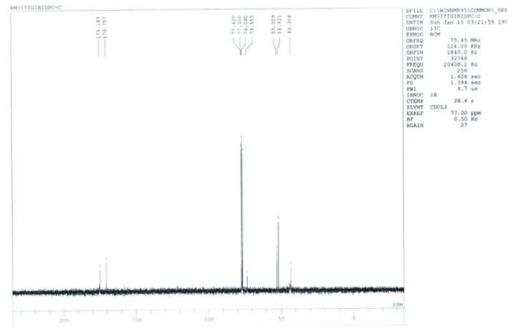
그림 80. 오미자의 MeOH추출물로부터 분리된 KM7IHPB의 1D 및 2D NMR spectrum

(3) MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM7IIIIGIBIDPC의 NMR 데이터

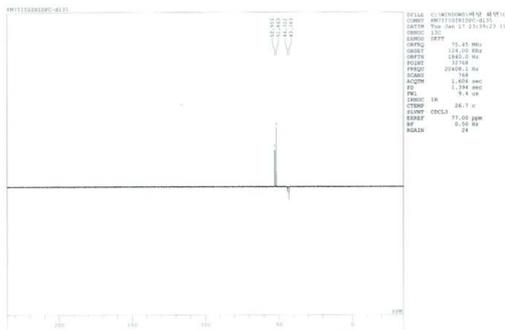
MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM7IIIIGIBIDPC의 1D NMR 데이터는 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 구조는 다음에 밝힐 예정이다.



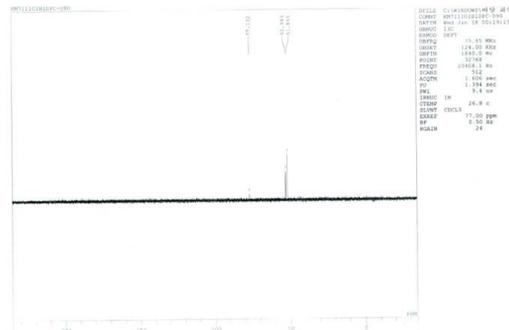
¹H NMR of KM7IIIIGIBIDPC (500 MHz in CDCl₃)



¹³C NMR of KM7IIIIGIBIDPC (125 MHz in CDCl₃)



DEPT 135 NMR of KM7IIIIGIBIDPC (125 MHz in CDCl₃)



DEPT 90 NMR of KM7IIIIGIBIDPC (125 MHz in CDCl₃)

gCOSY NMR of KM7IIIIGIBIDPC (500 MHz in CDCl₃)

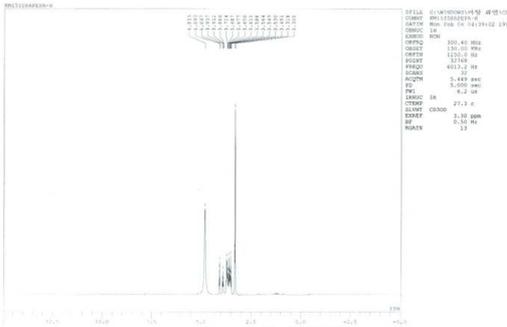
HSQC NMR of KM7IIIIGIBIDPC (in CDCl₃)

HMBC NMR of KM7IIIIGIBIDPC (in CDCl₃)

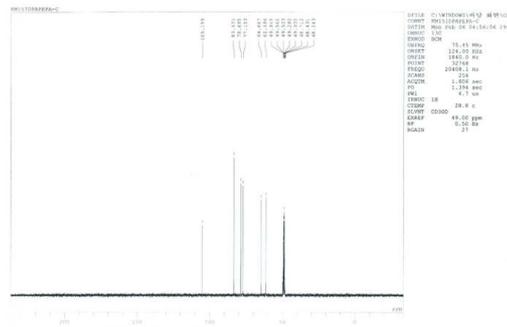
그림 81. 오미자의 MeOH추출물로부터 분리된 KM7IIIIGIBIDPC의 1D 및 2D NMR spectrum

(4) MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM15IDPAPEPA의 구조 및 NMR 데이터

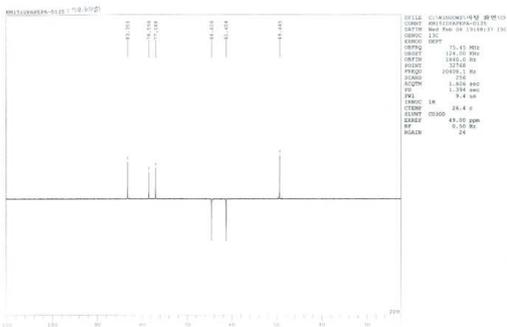
MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM15IDPAPEPA의 1D NMR 데이터는 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 구조는 다음에 밝힐 예정이다.



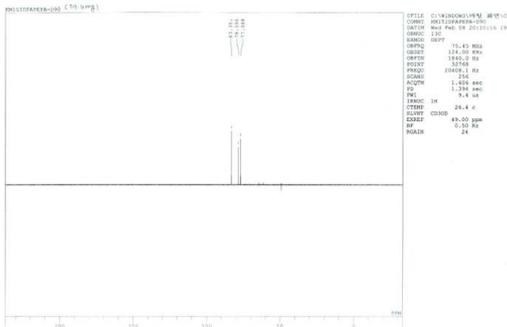
¹H NMR of KM15IDPAPEPA (500 MHz in CD₃OD)



¹³C NMR of KM15IDPAPEPA (125 MHz in CD₃OD)



Dept 135 NMR of KM15IDPAPEPA (125 MHz in CDCl₃)



Dept 90 NMR of KM15IDPAPEPA (125 MHz in CDCl₃)

gCOSY NMR of KM15IDPAPEPA (500 MHz in CD₃OD)

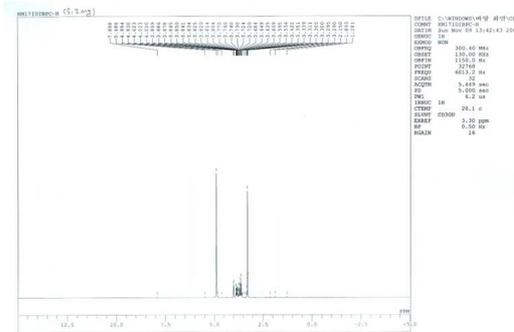
HSQC NMR of KM15IDPAPEPA (in CD₃OD)

HMBC NMR of KM15IDPAPEPA (in CD₃OD)

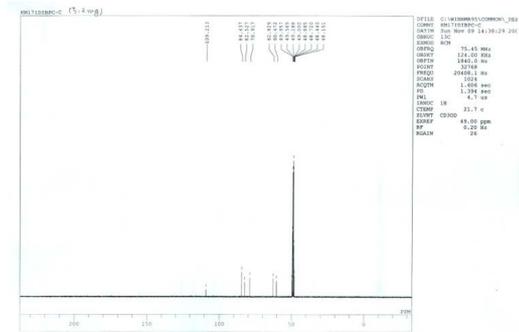
그림 82. 오미자의 MeOH추출물로부터 분리된 KM15IDPAPEPA의 1D 및 2D NMR spectrum

(5) MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM7IDIBPC의 NMR 데이터

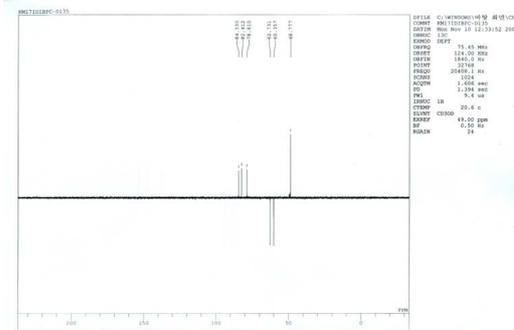
MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM7IDIBPC의 1D NMR 데이터는 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 구조는 다음에 밝힐 예정이다.



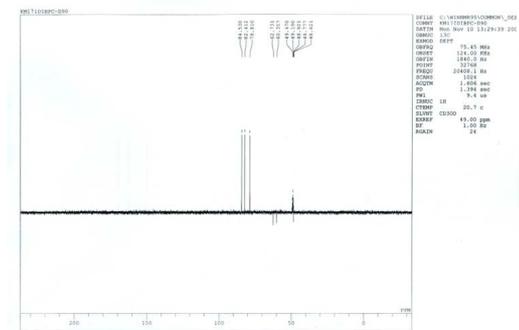
¹H NMR of KM7IDIBPC (500 MHz in CD₃OD)



¹³C NMR of KM7IDIBPC (125 MHz in CD₃OD)



Dept 135 NMR of KM7IDIBPC (125 MHz in CD₃OD)



Dept 90 NMR of KM7IDIBPC (125 MHz in CD₃OD)

그림 83. 오미자의 MeOH추출물로부터 분리된 KM7IDIBPC의 1D NMR spectrum

(6) MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM3PCPC의 NMR 데이터

MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM3PCPC의 1D NMR 데이터는 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 구조는 다음에 밝힐 예정이다.

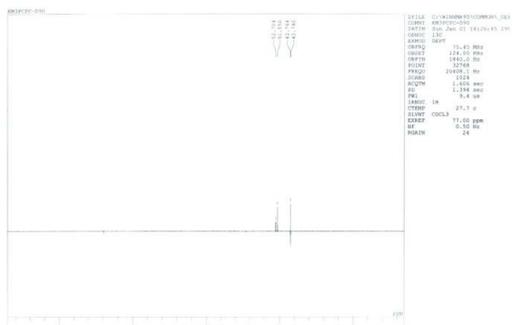
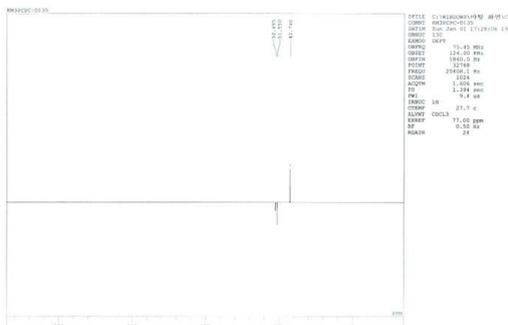
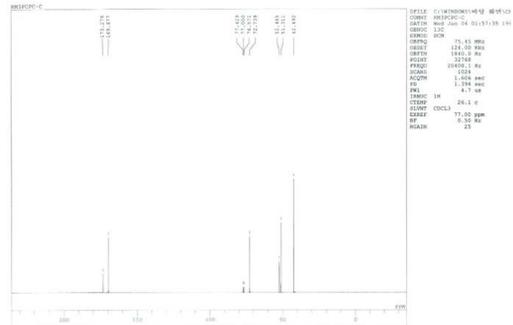
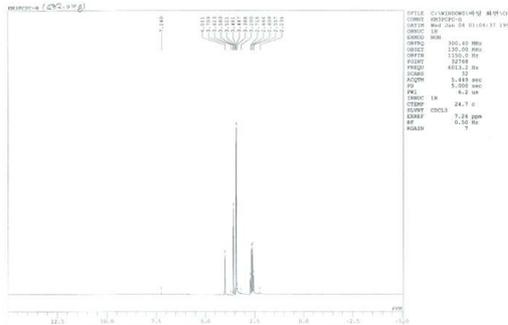


그림 84. 오미자의 MeOH추출물로부터 분리된 KM3PCPC의 1D NMR spectrum

(7) MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM5IE의 NMR 데이터

MeOH 추출물로부터 순수분리한 KM5IE의 1D NMR 데이터는 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 구조는 다음에 밝힐 예정이다.

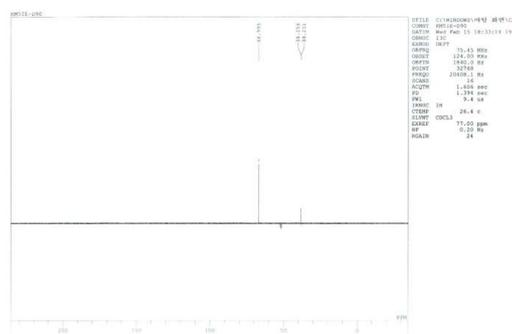
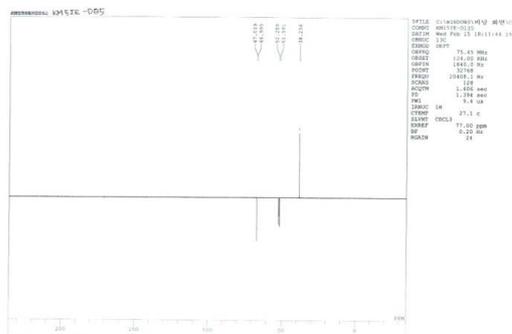
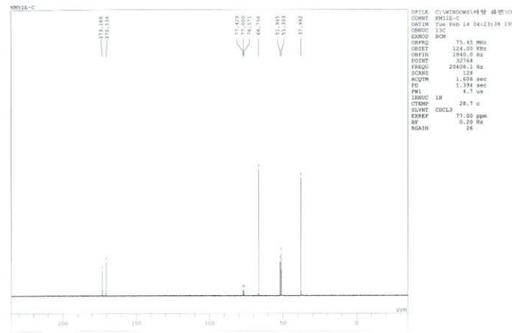
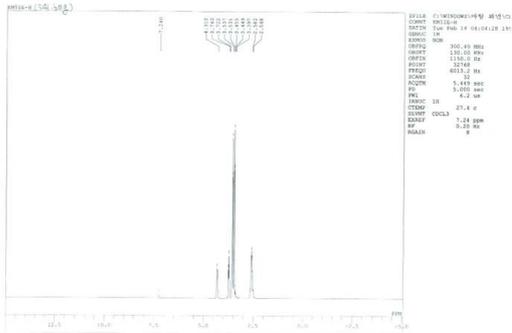


그림 85. 오미자의 MeOH추출물로부터 분리된 KM5IE의 1D NMR spectrum

6. 연구계획서 이외의 결과

가. Identification of a novel compound that stimulates intracellular calcium increase and CXCL8 production in human neutrophils from *Schisandra chinensis*

Biochemical and Biophysical Research Communications 379 (2009) 928–932



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



Identification of a novel compound that stimulates intracellular calcium increase and CXCL8 production in human neutrophils from *Schisandra chinensis*

You Jin Lee^{a,1}, Jae Woong Shim^{b,1}, Yong Jae Lee^a, Young Hoon Park^a, Ha Young Lee^b, Sang Doo Kim^b, Young-Whan Choi^{a,*}, Yoe-Sik Bae^{b,*}

^a Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Republic of Korea

^b Department of Biochemistry, College of Medicine, Dong-A University, Busan 602-714, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 December 2008
Available online 10 January 2009

Keywords:
Schisandra chinensis
Neutrophils
 α -iso-cubebene (a novel compound)
Calcium increase
CXCL8

ABSTRACT

Schisandra chinensis has been regarded as a useful material in the preventive or treatment of several human diseases. The study of the *Schisandra chinensis*' molecular identity has been prioritized because it has been found to regulate cellular responses. Here, we examined the effects from various extracts of *Schisandra chinensis* to monitor the relative intracellular calcium increase in human neutrophils. We identified an active molecule and structural configuration of a new active compound (α -iso-cubebene), based on the discovery of a cubebene backbone using NMR, MS, and CD spectral data. In terms of its functional aspect, we observed that α -iso-cubebene strongly stimulated CXCL8 production in human neutrophils. Also, α -iso-cubebene-induced CXCL8 production was almost completely inhibited by the calcium chelator, EGTA, thus highlighting the role of calcium signaling in the process. Taken together, our results demonstrate that α -iso-cubebene is a novel natural compound which stimulates intracellular calcium signaling and CXCL8 production. As a result, α -iso-cubebene should be useful for the development of an immune-modulating agent.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Schisandra chinensis has been regarded as a useful material in the regulation of various (patho)physiological conditions over the last several decades in Korea, China, and Japan [1]. Previous studies have shown that several C18 dibenzocyclooctadiene lignan isolates from *Schisandra chinensis* have anti-cancer properties [2,3] anti-hepatocarcinogenesis [4], anti-hepatotoxic [5], anti-HIV [6], antioxidant [3,7], and anti-inflammatory [8] activities. *Schisandra chinensis* has also been employed for the treatment and prevention of some chronic diseases such as inflammation, hepatitis, and cancer [9], which may result from biomolecular damage by free radicals and reactive oxygen species.

The identification of components from natural resources that modulate physiological responses has been an important issue in medical research. Consequently, the identification of *Schisandra chinensis*' cellular target molecules and action mechanisms will be very informative for the generation of potential drug targets. In this study, we screened a series of extract fractions from *Schisandra chinensis*, in an effort to identify a molecule that can stimulate intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) signaling in human neutrophils. We found that a novel active compound stimulates a $[Ca^{2+}]_i$ increase

in human neutrophils. In addition, we determined the structure of the compound. By studying the immunological role of this compound, we can determine whether the compound will be useful in the development of an immune-modulating agent.

Materials and methods

Materials. *Schisandra chinensis* fruits were collected in September 2005 from Moonkyeng, Korea. A voucher specimen (Accession number SC-PRDR-1) has been deposited in the Herbarium of The Pusan National University. RPM1 1640 was from Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) and fetal bovine serum from Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT). Fura-2 pentaacetoxymethyl ester (fura-2/AM) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). U-73122, SK&F, nifedidine, diltiazem, and thapsigargin were obtained from Calbiochem (San Diego, CA).

Extraction of a new α -iso-cubebene. The dried fruits of *Schisandra chinensis* (2.5 kg) were ground to a fine powder and then successively extracted at room temperature with *n*-hexane, $CHCl_3$, and MeOH. The hexane extract (308 g) was evaporated in vacuo and chromatographed on a silica gel (40 μ m, Baker, NJ) column (100 \times 10 cm) with a step gradient 0%, 5%, 20% EtOAc in hexane and 5% MeOH in $CHCl_3$ to obtain 38 fractions. The fraction 1 (KH1PA, 3689 mg) was separated on a silica gel column (100 \times 3.0 cm) with 15% acetone in CH_2Cl_2 to obtain nine fractions.

* Corresponding authors. Tel.: +82 55 350 5522; fax: +82 55 350 5529 (Y.W. Choi), tel.: +82 51 240 2889; fax: +82 51 241 1321 (Y.-S. Bae).

E-mail addresses: ywchoi@pusan.ac.kr (Y.-W. Choi), yoosik@dau.ac.kr (Y.-S. Bae).

¹ These authors contributed equally to this work.

Next, the fraction 2 (KH1PA1B, 999 mg) was separated on a silica gel column (100 × 3.0 cm) with 15% acetone in CH₂Cl₂ to yield α -iso-cubebene (316 mg). Pure α -iso-cubebene was identified by HPLC on a Phenomenex Luna C18 column (Phenomenex, 150 × 4.6 mm ID; 5 μ m particle size) with an acetonitrile-water-reagent alcohol gradient at a flow rate of 1.0 ml per minute.

Isolation of human neutrophils. Peripheral blood leukocytes were obtained from young healthy donors. Human neutrophils were isolated by standard dextran sedimentation, the hypotonic lysis of erythrocytes, and by using a lymphocyte separation medium gradient, as described previously [10]. Isolated human neutrophils were used promptly.

Measurement of [Ca²⁺]_i. The chemically induced [Ca²⁺]_i rise was measured using fura-2/AM [11]. Freshly prepared human neutrophils were incubated in serum free RPMI 1640 medium with 3 μ M of fura-2/AM at 37 °C for 30 min with continuous stirring. After washing with serum free RPMI 1640 medium, the cells were suspended in serum free RPMI containing 250 μ M of sulfinpyrazone to prevent dye leakage. About 2 × 10⁶ cells were suspended in Locke's solution (158.4 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 5 mM Hepes pH 7.3, 10 mM glucose, 0.2 mM CaCl₂, and EGTA) for each measurement. Changes in the fluorescence ratio were measured at an emission wavelength of 500 nm for dual excitation wavelengths at 340 nm and 380 nm. The calibration of the fluorescence ratio versus [Ca²⁺]_i was performed as described by Grynkiewicz [11].

Determination of the structure of active compound. The chemical structure of α -iso-cubebene was verified by LC-MS (Bruker BioApex FT mass spectrometer) and NMR analysis (Varian Inova 500 spectrometer). The optical rotations were recorded on a JASCO DIP-370 digital polarimeter. The IR spectra were recorded on an AATI Mattson Genesis Series FTIR. The NMR spectra (¹H, ¹³C) were recorded in CDCl₃ on a Varian Inova spectrometer at 500 MHz for proton and 125 MHz for carbon-13, running gradients and using residual solvent peaks as internal references. High-resolution mass spectra were recorded on a Bruker BioApex FT mass spectrometer.

Cytokine assay. Cytokine measurement was performed as previously described [12]. Neutrophils (3 × 10⁶ cells/0.3 ml) were placed in RPMI 1640 medium containing 5% FBS in 24-well plates and kept in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. After stimulation, cell-free supernatants were collected, centrifuged, and measured for CXCL8 by enzyme-linked immunosorbent assay (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) according to the instruction of the vender.

Statistics. The results are expressed as means ± SE of the number of determinations indicated. Statistical significance of differences was determined by Student *t*-test. Significance was accepted when *P* < 0.05.

Results

Identification of a compound that strongly stimulates an intracellular calcium increase in human neutrophils

In this study, we tested the effect of several extracts (hexane, chloroform, methanol, and water extracts) from *Schisandra chinensis*, in an effort to find a molecule that can stimulate intracellular calcium signaling in human neutrophils. As shown in Fig. 1A, the hexane extract (1 mg/ml) stimulated an increase in intracellular calcium in human neutrophils, while the other extracts did not. We further fractionated the active hexane extract into 38 different fractions, and once again tested their effect on calcium signaling. Among these, one fraction of hexane extract (KH1PA1B) proved to be the most potent in terms of its ability to stimulate intracellular calcium increase (Fig. 1B and data not shown). We also found that the active fraction contained an almost pure (>99%) compound via HPLC analysis (Fig. 1C).

Determination of the structure of active compound

The active compound was obtained as a white oil with [α]_D²⁵ – 13 (c 0.51, CHCl₃). The positive high-resolution time-of-flight mass spectrometry (HRTOFMS) indicated a molecular ion at *m/z* 222, corresponding to [M + NH₄]⁺, and thus indicating that its molecular

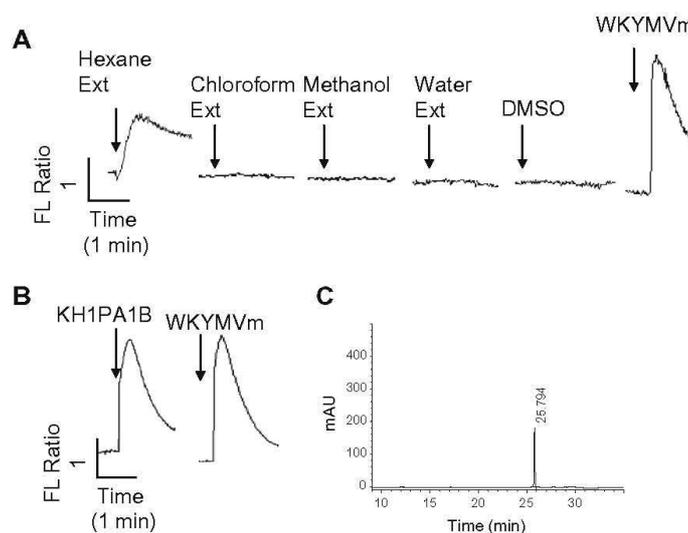


Fig. 1. Effect of extracts of *Schisandra chinensis* on Ca²⁺ increase in human neutrophils. Human neutrophils were treated with several extracts of *Schisandra chinensis* (1 mg/ml) (A). Neutrophils treated with 200 μ g/ml of KH1PA1B or 100 nM of WKYMVm (B). The relative intracellular Ca²⁺ concentrations are expressed as fluorescence ratios (340:380 nm). The data represents five independent experiments (A and B). (C) HPLC profile of α -iso-cubebene.

formula is $C_{15}H_{24}NH_4$. An analysis of the 1D and 2D NMR data with homo- and heteronuclear direct and long-range correlations permitted the assignments of the 1H and ^{13}C NMR resonances as shown in Fig. 2A. The ^{13}C NMR and DEPT spectra showed 15 signals, including 2 olefinic carbons (δ 142.5 and 117.1) and four methyl groups (δ 23.3, 19.9, 19.3 and 19.1).

From the molecular ion signal at m/z 204 of α -iso-cubebene the elemental composition of $C_{15}H_{24}$ can be concluded. This finding was confirmed by the ^{13}C NMR/DEPT technique, which showed four primary (δ 23.3, 19.9, 19.3, 19.1), three secondary (δ 36.7, 30.9, 22.2), six tertiary (δ 117.1, 43.2, 44.7, 45.5, 48.3, 32.5), and two quaternary carbons (δ 142.5, 39.4). From these data, the presence of one double bond is derived. The elemental composition of $C_{15}H_{24}$ indicates four unsaturations in a tricyclic ring system in addition to the presence of a double bond. The 1H NMR of α -iso-cubebene shows three methyl doublets in the region of δ = 0.79–0.89 (H-12, H-13, H-14) and one down-field shifted methyl signal at δ = 1.68 (H-15). The absorption of one olefinic proton is detected at δ = 5.28 (H-4), while two cyclopropane protons show resonances at δ = 2.03 (H-6) and 1.67 (H-5).

This finding was further confirmed by the multiple-bond CH correlation (HMBC), where proton H-11 couples to both C-6 and C-8 (Fig. 2B). The same applies to proton H-7, which also couples to C-1, C-5 and C-9, while H-12 and H-13 additionally couple to C-7 and C-11. The HMBC correlations observed between H-15 and C-4, C-3, and C-2 suggest the presence of a methyl group at C-3 of the cyclopropane ring. Cross-peaks were also observed be-

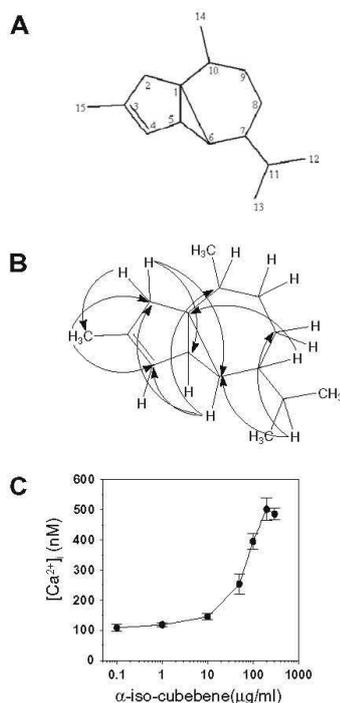


Fig. 2. Identification of α -iso-cubebene as a novel molecule that stimulates human neutrophils. (A) Structure of α -iso-cubebene. (B) Key HMBC correlations of α -iso-cubebene. (C) Neutrophils treated with several concentrations of purified α -iso-cubebene. The peak level of $[Ca^{2+}]_i$ was recorded and the results are presented as the means \pm SE of three independent experiments, which were performed in duplicate (C).

tween H-15 and C-2 as well as between C-15, H-2, and H-4. As H-9 couples to the methane carbon C-10 and the methyl doublet C-14, the connectivities in the six-membered ring are established. The adjacent quaternary carbon C-1 reveals correlations to H-2, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10 and H-14, which is consistent with the cubebene sesquiterpene skeleton.

The purified compound, α -iso-cubebene stimulated an intracellular calcium increase in a concentration-dependent manner, indicating that the maximal activity is approximately 200 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2C).

α -iso-cubebene-stimulated calcium increase was mediated by the thapsigargin-sensitive pathway

Since α -iso-cubebene stimulated intracellular calcium increase in human neutrophils, we investigated what source $[Ca^{2+}]_i$ is increased by the compound. Generally, an increase in intracellular calcium can be induced from two different sources; calcium release from the endoplasmic reticulum and the calcium influx from the extracellular medium [13]. As shown in Fig. 3, 200 $\mu\text{g/ml}$ of α -iso-cubebene caused an elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of extracellular calcium. α -iso-cubebene failed to stimulate the elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in the absence of extracellular calcium (data not shown), suggesting that the compound induces Ca^{2+} influx across the plasma membrane in human neutrophils. Pretreatment with the phospholipase C inhibitor (U73122) did not affect α -iso-cubebene-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase (Fig. 3), ruling out the possible role of phospholipase C-mediated response. Since increasing Ca^{2+} influx through different Ca^{2+} channels has been suggested as a potential mechanism for the cellular response to extracellular calcium concentration, we examined the effect of α -iso-cubebene on the increase of $[Ca^{2+}]_i$ via the calcium channel. The α -iso-cubebene-induced increase of $[Ca^{2+}]_i$ was not inhibited by preincubating with voltage-sensitive L-type calcium channel inhibitors (1 μM nifedipine, 10 μM diltiazem, or 10 μM SK&F) (Fig. 3). However, pretreatment of thapsigargin prior to α -iso-cubebene completely inhibited α -iso-cubebene-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in human neutrophils (Fig. 3). These results strongly indicate that the α -iso-cubebene compound increases Ca^{2+} influx via the thapsigargin-sensitive signaling pathway, however, not by the calcium channel-dependent pathway in human neutrophils.

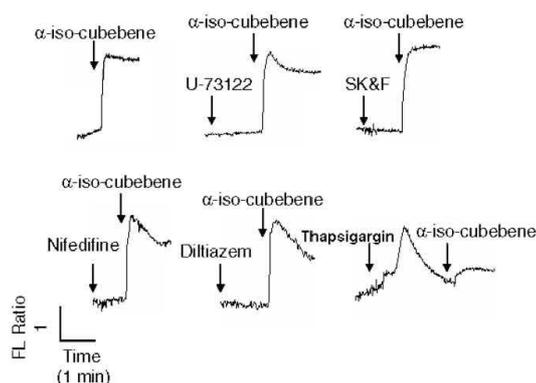


Fig. 3. Effect of several inhibitors for calcium channel and calcium signaling on α -iso-cubebene-induced calcium increase. Human neutrophils were preincubated with or without SK&F (10 μM), nifedipine (1 μM), diltiazem (10 μM), or thapsigargin (10 μM), and then stimulated with α -iso-cubebene (200 $\mu\text{g/ml}$). The relative $[Ca^{2+}]_i$ are expressed as fluorescence ratios (340:380 nm). The data are representative of three independent experiments.

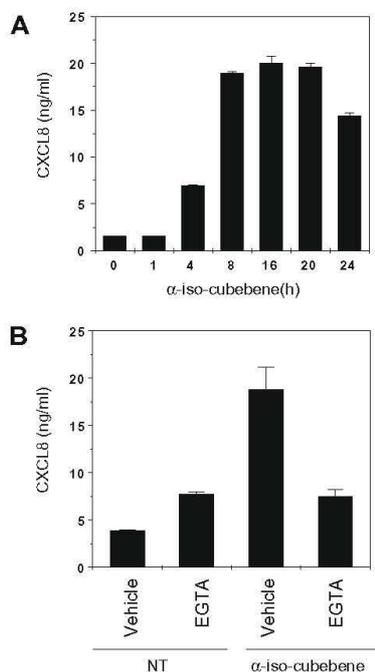


Fig. 4. The production of CXCL8 by α -iso-cubebene from human neutrophils. Freshly isolated human neutrophils were stimulated with 200 μ g/ml of α -iso-cubebene for series of time periods (A). The secretion of CXCL8 by 200 μ g/ml of α -iso-cubebene-stimulated neutrophils was determined with or without EGTA (2 mM). The secreted cytokine levels were determined by ELISA (A and B). Data are presented as means \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate.

The stimulation of human neutrophils with α -iso-cubebene induces CXCL8 production

To investigate the effect of α -iso-cubebene on the primary cytokines in human neutrophils, freshly isolated human neutrophils were stimulated with 200 μ g/ml of α -iso-cubebene for a series of time periods. α -iso-cubebene-induced CXCL8 production was apparent after 2 h of stimulation and increased until 24 h of stimulation (Fig. 4A). It has been previously reported that Ca^{2+} mobilization is required for the secretion of several molecules, including cytokines [14]. To characterize the signaling pathway associated with CXCL8 secretion by α -iso-cubebene, we examined the role of Ca^{2+} mobilization on α -iso-cubebene-induced CXCL8 production by preincubating human neutrophils with EGTA, an intracellular Ca^{2+} chelating agent, prior to adding α -iso-cubebene. As shown in Fig. 4B, EGTA completely blocked α -iso-cubebene-induced CXCL8 production, suggesting that Ca^{2+} mobilization has a critical role in CXCL8 secretion.

Discussion

In this study, we identified a novel natural compound, α -iso-cubebene, which stimulates intracellular calcium increase in human neutrophils. In studying its immunological role, we determined that α -iso-cubebene stimulates CXCL8 production, which was mediated by an intracellular calcium increase in neutrophils.

For the molecular mechanism involved in the α -iso-cubebene-induced calcium increase, we observed that an α -iso-cubebene-in-

duced $[Ca^{2+}]_i$ increase was inhibited by thapsigargin, but not by several other kinds of inhibitors for L-type Ca^{2+} channel. It is therefore, possible that the interaction of certain types of molecules and α -iso-cubebene lead to an increase in $[Ca^{2+}]_i$ through the thapsigargin-sensitive calcium pool. This might ultimately lead to the activation of the signaling pathway that is critical for CXCL8 production. It has been demonstrated that calcium is a well established regulator of transcriptional change in gene expression, which is important for cellular function, differentiation, and proliferation [15–17]. Several intracellular signaling molecules such as CaMKII have been regulated by calcium signaling, leading to the activation of some transcription factors. The activation of calcium signaling and production of CXCL8 suggests the role of an unknown target receptor for α -iso-cubebene. Further studies evaluating the identification of the receptor interacting with the compound and their signaling pathway should be investigated.

CXCL8, which is a chemoattractant, targets leukocytes expressing the CXCL8 receptors CXCR1 and CXCR2 [18]. Moreover, CXCL8 is a well-known major neutrophil activating cytokine, and is produced by several human cell types [19]. It has been reported that the production of CXCL8 at the site of an inflammation can activate neutrophils in an autocrine mode [20]. Some of leukocytic cells, such as monocytes and a subpopulation of T cells express CXCR1 or CXCR2, and CXCL8 recruits and activates the cells locally, resulting in a modulation of the cell-mediated immune response [21]. Keeping in mind that CXCL8 plays a crucial role in the modulation of several immune responses, and that α -iso-cubebene stimulates CXCL8 production in neutrophils, we can suggest that α -iso-cubebene should be regarded as a target molecule for the development of immunomodulators of CXCL8-related diseases.

Acknowledgments

This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry (106048-03-3-CG000), Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea, and the Korea Science and Engineering Foundation(KOSEF) grant funded by the Korea government(MOST) (No. R01-2007-000-11241-0).

References

- G.T. Chang, S.K. Kang, J.H. Kim, K.H. Chung, Y.C. Chang, C.H. Kim, Inhibitory effect of the Korean herbal medicine, Dae-Je-Whan, on platelet-activating factor-induced platelet aggregation, *J. Ethnopharmacol.* 102 (2005) 430–439.
- D.F. Chen, S.X. Zhang, M. Kozuka, Q.Z. Sun, J. Feng, Q. Wang, T. Mukainaka, Y. Nobukuni, H. Tokuda, H. Nishino, H.K. Wang, S.L. Morris-Natschke, K.H. Lee, Ictenoltherins C and D, two new lignans from *Kadsura interior* and antitumor-promoting effects of related neolignans on Epstein-Barr virus activation, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 1242–1245.
- Y.W. Choi, S. Takamatsu, S.I. Khan, P.V. Srinivas, D. Ferreira, J. Zhao, I.A. Khan, Schisandrene, a dibenzocyclooctadiene lignan from *Schizandra chinensis*: structure-antioxidant activity relationships of dibenzocyclooctadiene lignans, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 356–359.
- Y. Ohtaki, T. Hida, K. Hiramatsu, M. Kanitani, T. Ohshima, M. Nomura, H. Wakita, M. Aburada, K.I. Miyamoto, Deoxycholic acid as an endogenous risk factor for hepatocarcinogenesis and effects of gomisins A, a lignan component of *Schizandra* fruits, *Anticancer Res.* 16 (1996) 751–755.
- M.D. Wu, R.L. Huang, L.M.Y. Kuo, C.C. Hung, C.W. Ong, Y.H. Kuo, The anti-HBsAg (human type B hepatitis, surface antigen) and anti-HBeAg (human type B hepatitis, e antigen) C18 dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura matsudai* and *Schizandra arisanensis*, *Chem. Pharm. Bull.* 51 (2003) 1233–1236.
- D.F. Chen, S.X. Zhang, L. Xie, J.X. Xie, K. Chen, Y. Kashiwada, B.N. Zhou, P. Wang, L.M. Cosentino, K.H. Lee, Anti-AIDS agents-XXVI. Structure-activity correlations of gomisins-G-related anti-HIV lignans from *Kadsura interior* and of related synthetic analogues, *Bioorg. Med. Chem.* 5 (1997) 1715–1723.
- H. Lu, G. Liu, Anti-oxidant activity of dibenzocyclooctene lignans isolated from *Schizandraceae*, *Planta Med.* 58 (1992) 311–313.
- K. Yasukawa, Y. Ikeya, H. Mitsuhashi, M. Iwasaki, M. Aburada, S. Nakagawa, M. Takeuchi, M. Takido, Gomisins A inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin, *Oncology* 49 (1992) 68–71.

- [9] J.L. Hancke, R.A. Burgos, F. Ahumada, *Schisandra chinensis* (Turcz.), *Baill Fitoterapia* 70 (1999) 451–471.
- [10] Y.S. Bae, H. Bae, Y. Kim, T.G. Lee, P.G. Suh, S.H. Ryu, Identification of novel chemoattractant peptides for human leukocytes, *Blood* 97 (2001) 2854–2862.
- [11] Y.S. Bae, H.J. Yi, H.Y. Lee, E.J. Jo, J.L. Kim, T.G. Lee, R.D. Ye, J.Y. Kwak, S.H. Ryu, Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands, *J. Immunol.* 171 (2003) 6807–6813.
- [12] H.Y. Lee, S.D. Kim, J.W. Shim, S.Y. Lee, H. Lee, K.H. Cho, J. Yun, Y.S. Bae, Serum amyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes, *J. Immunol.* 181 (2008) 4332–4339.
- [13] M.J. Berridge, Inositol trisphosphate and calcium signaling, *Nature* 361 (1993) 315–325.
- [14] R. Mukherjee, F.G. Spinale, L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30 (1998) 1899–1916.
- [15] G.R. Monteith, D. McAndrew, H.M. Faddy, S.J. Roberts-Thomson, Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport, *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 519–530.
- [16] J.H. Park, M.Y. Lee, J.S. Heo, H.J. Han, A potential role of connexin 43 in epidermal growth factor-induced proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺/PKC, p44/42 and p38 MAPKs pathways, *Cell Prolif.* 41 (2008) 786–802.
- [17] S.J. Cook, P.J. Lockyer, Recent advances in Ca(2+)-dependent Ras regulation and cell proliferation, *Cell Calcium* 39 (2006) 101–112.
- [18] P.M. Murphy, Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines, *Semin Hematol.* 34 (1997) 311–318.
- [19] J. Van Damme, A. Wuyts, G. Froyen, E. Van Coillie, S. Struyf, A. Billiau, P. Proost, J.M. Wang, G. Opdenakker, Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage, *J. Leukoc Biol.* 62 (1997) 563–569.
- [20] H.U. Zeilhofer, W. Schorr, Role of interleukin-8 in neutrophil signaling, *Curr. Opin. Hematol.* 7 (2000) 178–182.
- [21] N. Sekido, N. Mukaida, A. Harada, I. Nakanishi, Y. Watanabe, K. Matsushima, Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8, *Nature* 465 (1993) 654–657.

Wuweizisu C from *Schisandra chinensis* decreases membrane potential in C6 glioma cells

Acta Pharmacol Sin 2008 Sep; 29 (9): 1006–1012



Full-length article

Wuweizisu C from *Schisandra chinensis* decreases membrane potential in C6 glioma cells¹

Young-whan CHOI^{2,4}, Kyeok KIM^{3,4}, Ji-yeong JO³, Hyo-lim KIM³, You-jin LEE², Woo-jung SHIN², Santosh J SACKET³, Mijin HAN³, Dong-soon IM^{3,5}

²Department of Horticultural Bioscience Pusan National University, Miryang-si 627-706, Republic of Korea; ³Laboratory of Pharmacology, College of Pharmacy (BK21 project) and Longevity Life Science and Technology Institutes, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea

Abstract

Aim: To study the effects of dibenzocyclooctadiene lignans isolated from *Schisandra chinensis*, such as wuweizisu C, gomisins N, A, and schisandrin, on the membrane potential in C6 glioma cells. **Methods:** The membrane potential was estimated by measuring the fluorescence change in DiBAC-loaded glioma cells. **Results:** Wuweizisu C decreased the membrane potential in a concentration-dependent manner. Gomisins N and A, however, showed differential modulation and no change was induced by schisandrin or dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate, a synthetic drug derived from dibenzocyclooctadiene lignans. We found no involvement of Gi/o proteins, phospholipase C, and extracellular Na⁺ on the wuweizisu C-induced decrease of the membrane potential. Wuweizisu C by itself did not change the intracellular Ca²⁺ [Ca²⁺]_i concentration, but decreased the ATP-induced Ca²⁺ increase in C6 glioma cells. The 4 lignans at all concentrations used in this study did not induce any effect on cell viability. Furthermore, we found a similar decrease of the membrane potential by wuweizisu C in PC12 neuronal cells. **Conclusion:** Our results suggest that the decrease in the membrane potential and the modulation of [Ca²⁺]_i concentration by wuweizisu C could be important action mechanisms of wuweizisu C.

Key words

Schisandra chinensis lignan; wuweizisu C; membrane potential; glioma; dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate

Introduction

Schisandra chinensis Baill grows wild in Russia, China, Korea, and Japan. In Oriental countries, ripe *Schisandra* fruits have been used as a tonic[1]. The fruit of *Schisandra chinensis* has been found to be effective in viral and chemically-induced hepatitis[2]. It is enriched in lignans, and more than 30 lignans have been isolated from this fruit[3,4]. Several lignans, including wuweizisu C and gomisin A, have been reported to protect the liver from hepatotoxic chemicals[5--7]. Pharmacological studies of lignans have also revealed anti-inflammatory[8] and anti-HIV effects[9]. Gomisin A also suppresses liver carcinogenesis by tumor-promoting agents[10--12]. Dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB), a synthetic drug derived from dibenzocyclooctadiene lignans, was developed as a supplement for acute and chronic hepatitis patients[13--17].

In a previous study, wuweizisu C, gomisin N, and deoxyschisandrin exhibited significant neuroprotective activities against glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells[18]. Gomisin A improved scopolamine-induced memory impairment via the enhancement of the cholinergic nervous system in mice[19]. In addition, the beneficial effect of *Fructus schisandrae* on cycloheximide-induced amnesia was found to be enhanced by treatment with serotonergic 5-HT₂ receptor antagonists, but was attenuated by serotonergic 5-HT_{1A} receptor agonists and cholinergic antagonists[20,21]. *Schisandra chinensis* fruit was accepted as a main herbal prescription for the improvement of learning performance in senescence-accelerated mice and for scopolamine-induced memory impairment in mice[22,23].

Ion channels for K⁺ and Cl⁻ are involved in regulating the proliferation rate through the modulation of the membrane potential and cell volume[24]. Chlorotoxin, a putative Cl⁻ channel-specific inhibitor, has been shown to interfere with glioma cell invasion and is now in phase II of clinical trials for the treatment of gliomas[25]. The modulation of the membrane potential plays an important role in neuronal and smooth muscle cells. However, it has been poorly investigated in glioma cells, although voltage-gated ion channels expressed in glia cells function to modulate the membrane potential and cell cycle[26]. Thus in this study, we tested the effect of 4 dibenzocyclooctadiene lignans, wuweizisu C, gomisin N, gomisin A, and schisandrin isolated and identified from *Schisandra chinensis* on the membrane potential in C6 glioma and PC12 neuronal cells (Figure 1) and further characterized the response with specific pharmacological inhibitors.

Materials and methods

Extraction and isolation Fruits of *Schisandra chinensis* were collected in September 2002 from Mujoo, Korea. A voucher specimen (Accession No SC-NCNPR-1) was

deposited at the herbarium of The University of Mississippi (USA). The plant was identified by one of the authors (Young-whan CHOI). The compounds wuweizisu C, gomisin N, gomisin A, and schisandrin (Figure 1) were isolated from the fruits of *Schisandra chinensis* [27], and the purity checked with HPLC was 92%–96% [28].

Chemical agents DiBAC4(3) was acquired from Biotium (Hayway, CA, USA). U73122 was from Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA), and DDB was kindly provided by PharmaKing (Seoul, Korea).

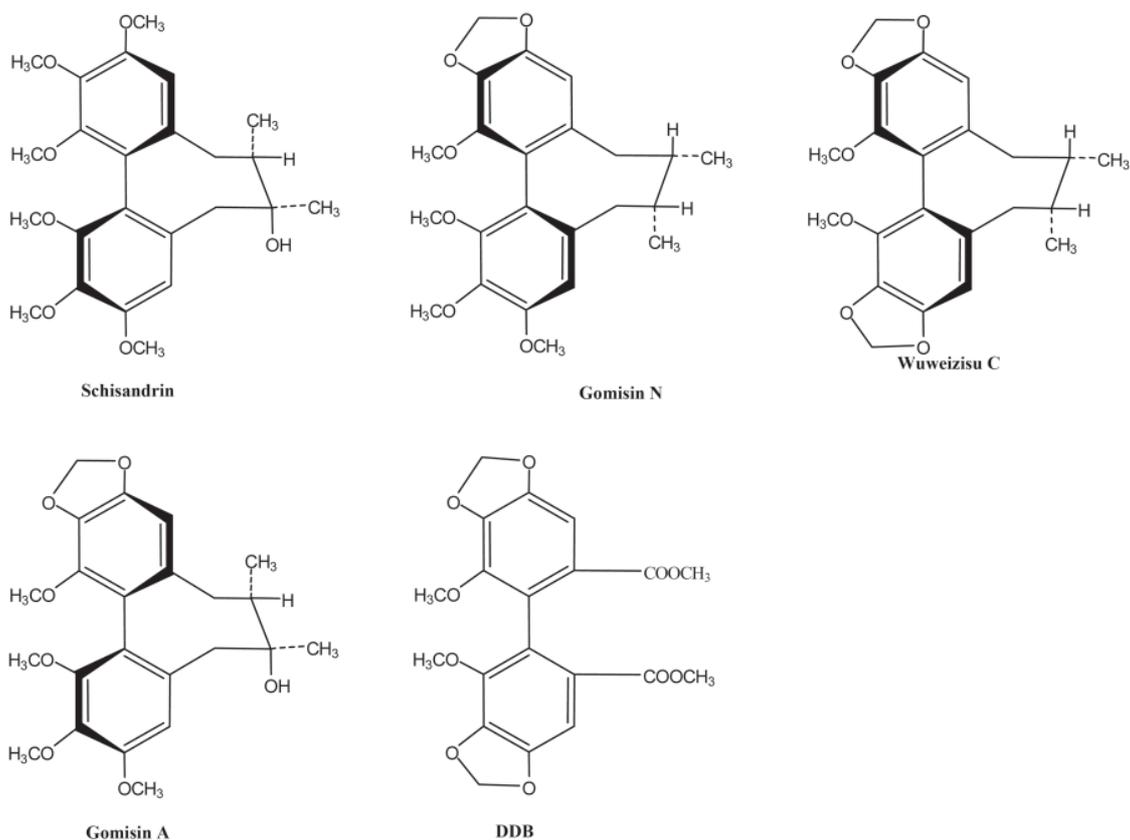


Figure 1. Chemical structures of the 4 lignans isolated from *Schisandra chinensis* and DDB.

Cell culture Rat C6 glioma cells were maintained in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 2 mmol/L glutamine, and 1 mmol/L sodium pyruvate at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator [29]. PC12 cells were maintained in RPMI-1640 containing 5% (v/v) fetal bovine serum, 15% (v/v) horse serum, 100 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 2 mmol/L glutamine, and 1 mmol/L sodium pyruvate at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Measurement of membrane potential The cells were trypsin digested, sedimented,

and resuspended in HEPES buffered medium consisting of 20 mmol/L HEPES (pH 7.4), 103 mmol/L NaCl, 4.8 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 1.2 mmol/L MgSO_4 , 0.5 mmol/L CaCl_2 , 25 mmol/L NaHCO_3 , and 15 mmol/L glucose, and then incubated for 30 min with 5 $\mu\text{mol/L}$ DiBAC₄(3). Fluorescence emission from the excitation wavelength (488 nm) was measured at 530 nm every 0.1 s by a F4500 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Japan). The membrane potential was estimated from measurements of the fluorescence change of DiBAC loaded cells[29].

Measurements of intracellular Ca^{2+} concentration Cells were trypsin digested, sedimented, resuspended in HEPES-buffered medium (20 mmol/L HEPES [pH 7.4], 103 mmol/L NaCl, 4.8 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 1.2 mmol/L MgSO_4 , 0.5 mmol/L CaCl_2 , 25 mmol/L NaHCO_3 , 15 mmol/L glucose, and 0.1% bovine serum albumin [fatty acid free]), and incubated for 40 min with 5 $\mu\text{mol/L}$ Fura-2/AM for the Ca^{2+} measurement. Intracellular Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i was estimated from the change in fluorescence of the Fura 2-loaded cells[30]. The fluorescence emissions at 510 nm from excitation wavelengths of 340 and 380 nm were measured every 0.1 s, and the ratio of fluorescence intensities from the 2 wavelengths (340/380) was monitored to estimate [Ca^{2+}]_i [31].

Data presentation Representative traces for the membrane potential were chosen from 3 independent experiments and are shown in Figures 2–5. The results from 3 independent experiments, shown as the percentage of the control level, are shown in Figures 2 and 5.

Results

Lignans from *Schisandra chinensis* induce changes of membrane potential in C6 glioma cells In C6 glioma cells, wuweizisu C decreased the membrane potential in a concentration-dependent manner (Figure 2A, 2E). Gomisins N and gomisins A decreased the membrane potential by 100 $\mu\text{mol/L}$ (Figure 2C, 2D, 2G, 2H). Schisandrin, however, did not change the membrane potential up to 100 $\mu\text{mol/L}$ (Figure 2B, 2F). Similarly, DDB did not change the membrane potential, even at 100 $\mu\text{mol/L}$ (data not shown).

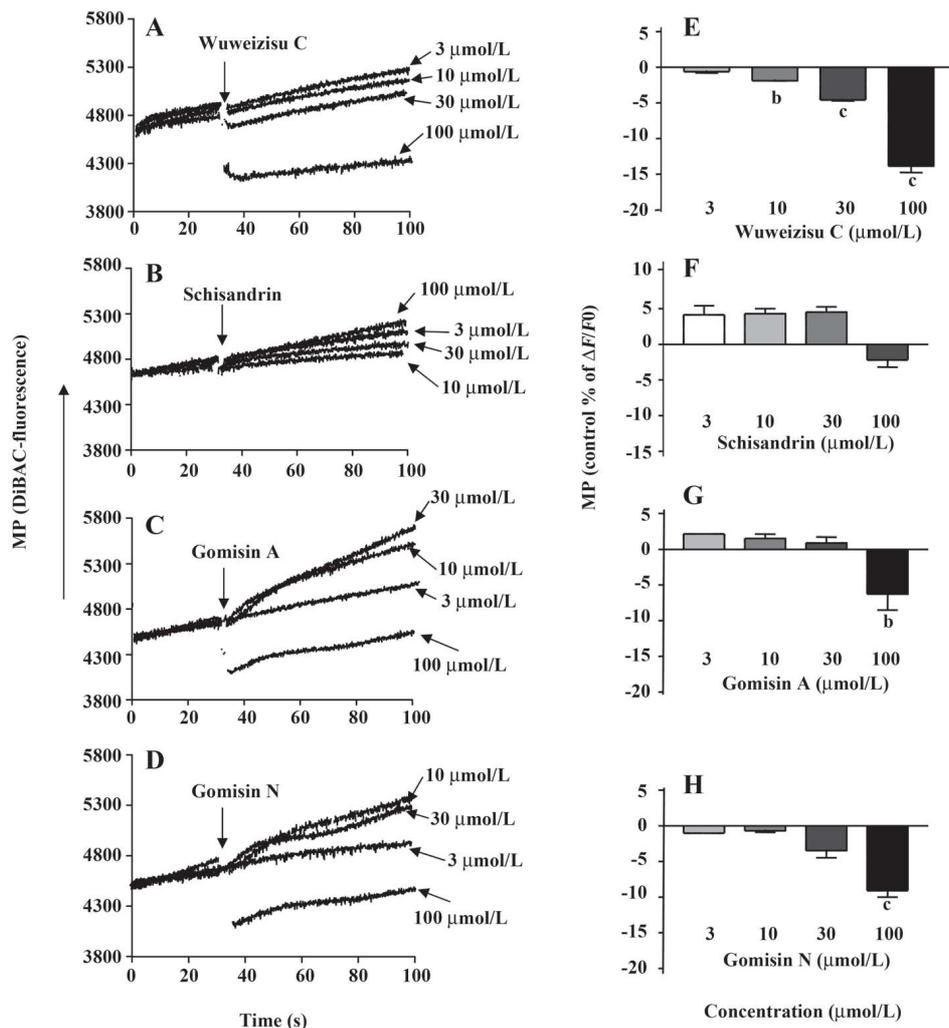


Figure 2. Effect of lignans from *Schisandra chinensis* on the membrane potential in C6 glioma cells. Representative traces of the membrane potential with various concentrations of wuweizisu C (A), schisandrin (B), gomisins A (C), and gomisins N (D) in DiBAC-loaded C6 glioma cells are shown. Lignans were added as indicated by the arrow (30 s). Concentration dependence of wuweizisu C- (E), schisandrin- (F), gomisins A- (G), and gomisins N (H)-induced decrease in the membrane potential (E). MP, membrane potential; F₀, fluorescence value before addition of wuweizisu C; ΔF , maximum fluorescence change after the wuweizisu C addition. $bP < 0.05$, $cP < 0.01$ vs control.

Involvement of G proteins and phospholipase C in wuweizisu C-induced membrane potential Pertussis toxin has been used to elucidate the involvement of Gi/o-type G proteins in various signaling pathways[29,32]. Thus we treated C6 glioma cells with pertussis toxin (100 ng/mL, 24 h). However, the wuweizisu C-induced decrease in the membrane potential was not blunted, suggesting no involvement of G-protein-coupled receptors coupled to Gi/o-type G proteins (Figure 3A). U73122 is a pharmacological tool to test the involvement of phospholipase C located in the plasma membrane and activated through Gq/11-protein-coupled receptors[32]. We treated C6 glioma cells with U73122 (5 μ mol/L, 10 min) and found no change in the wuweizisu C-induced decrease in the membrane potential (Figure 3B).

Effects of 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) and Na⁺-free media on the wuweizisu C-induced membrane potential We next tested the effects of EIPA and Na⁺-free media on the wuweizisu C-induced change in the membrane potential. EIPA is an inhibitor of the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE). By itself, EIPA treatment dramatically decreased the membrane potential and this decrease lasted for 30 min (Figure 3C). After 30 min of EIPA treatment, it was impossible to say whether NHE was a component of the wuweizisu C-induced decrease in the membrane potential because the resting membrane potential was decreased by the EIPA treatment. However, EIPA-sensitive NHE was definitely a regulator of the membrane potential in C6 cells[33].

When the effect of wuweizisu C on the membrane potential was measured in Na⁺-free medium, the wuweizisu C-induced decrease in the membrane potential was not affected by the depletion of Na⁺ in the extracellular medium (Figure 3D), suggesting that extracellular Na⁺ is not important for the membrane potential decrease by wuweizisu C in C6 glioma cells.

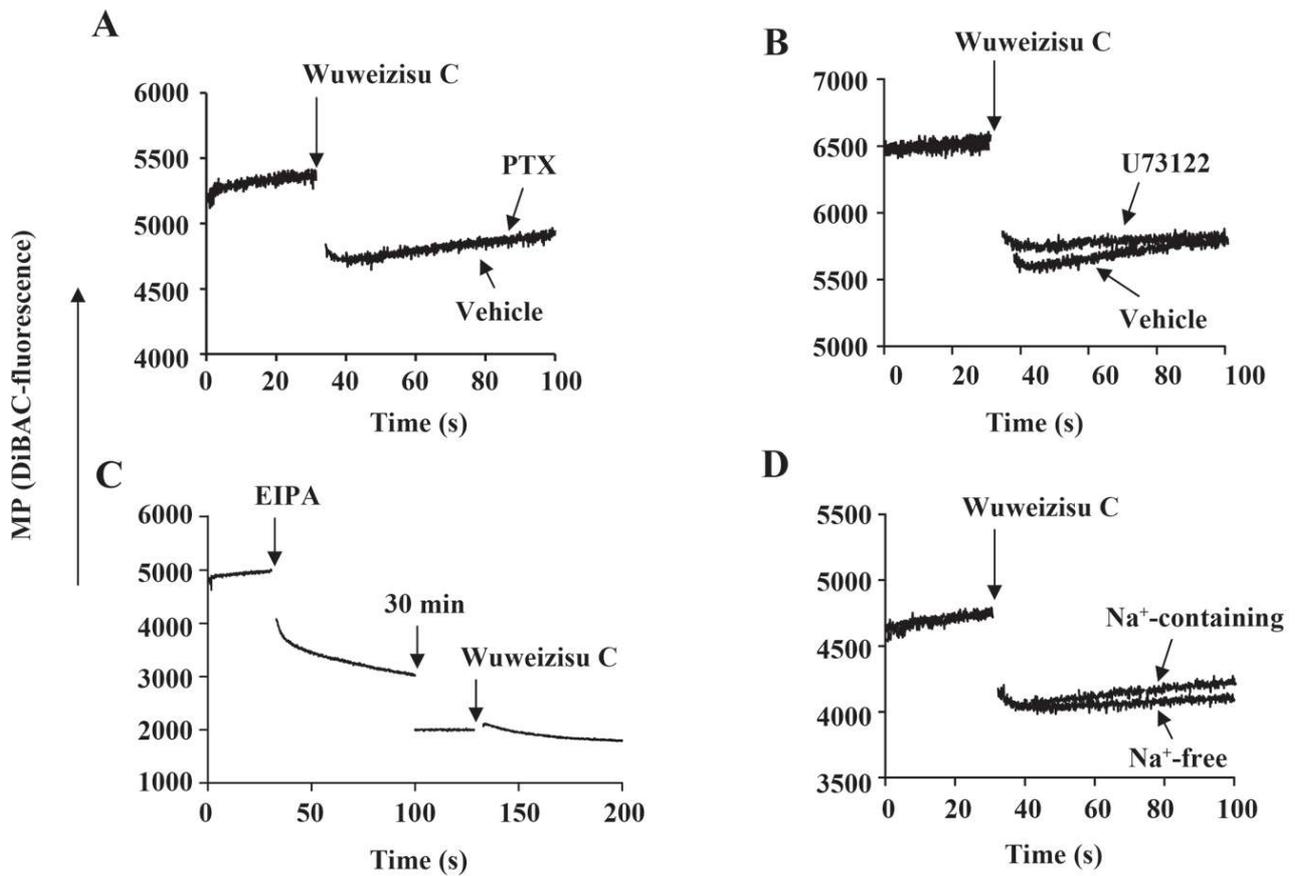


Figure 3. Effect of pharmacological inhibitors on wuweizisu C-induced decrease of the membrane potential. Representative traces of the membrane potential with 100 $\mu\text{mol/L}$ wuweizisu C in DiBAC-loaded C6 glioma cells treated with pertussis toxin (A, 100 ng/mL, 24 h), U73122 (B, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 min), or vehicle are shown. Representative traces of the membrane potential with 100 $\mu\text{mol/L}$ wuweizisu C in EIPA-treated cells (C, 100 $\mu\text{mol/L}$, 30 min) or Na⁺-free media (D) in DiBAC-loaded C6 glioma cells are shown.

Effect of wuweizisu C on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration We also measured changes in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration. By themselves, the 4 lignans did not change $[\text{Ca}^{2+}]_i$, with the exception of gomisin N (Figure 4C). Gomisin N slowly increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ however, the increase did not affect the following the ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. Wuweizisu C inhibited the ATP-induced increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, but the increase was not inhibited by other lignans (Figure 4E-4H). The wuweizisu C-induced inhibition and gomisin N-induced increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ implied the modulation of Ca^{2+} homeostasis by the lignans from *Schisandra chinensis*.

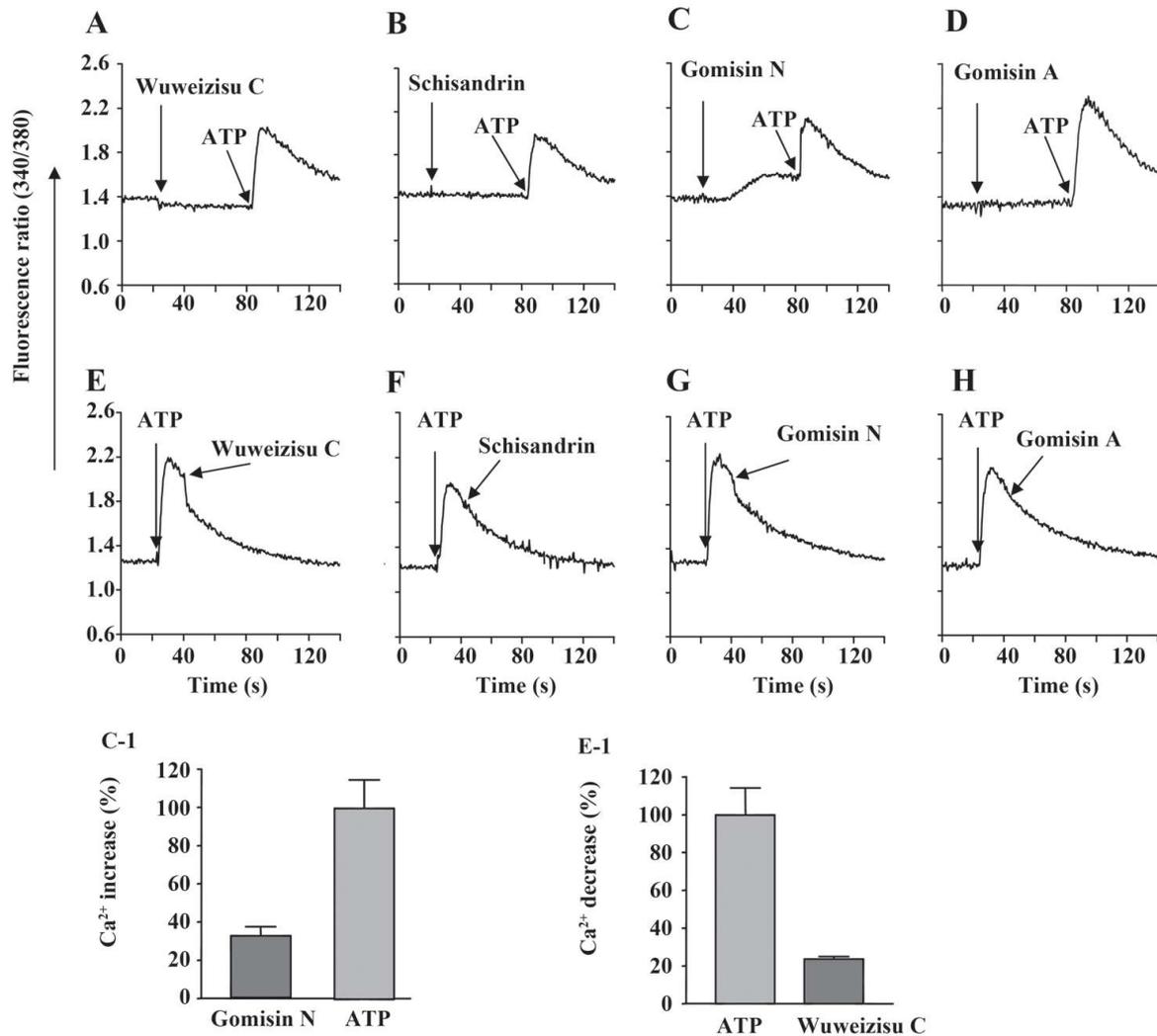


Figure 4. Effect of wuweizisu C on $[Ca^{2+}]_i$ concentration in C6 glioma cells. Representative traces of $[Ca^{2+}]_i$ concentration with 100 $\mu\text{mol/L}$ wuweizisu C (A,E), schisandrin (B,F), gomisin N (C,G), and gomisin A (D,H) in Fura-2-loaded C6 glioma cells are shown. Each lignan (100 $\mu\text{mol/L}$) was added as indicated by the first arrow (30 s), and ATP (10 mmol/L) was added as indicated by the second arrow (90 s) in the upper panels (A-D). ATP (10 mmol/L) was added as indicated by the first arrow (30 s) and each lignan (100 $\mu\text{mol/L}$) was added as indicated by the second arrow (45 s) in the lower panels (E-H). Histograms show mean \pm SEM of $[Ca^{2+}]_i$ change from 3 independent experiments (C-1 and E-1). C-1 shows increase of $[Ca^{2+}]_i$ by gomisin N (100 $\mu\text{mol/L}$) and ATP (10 mmol/L). E-1 shows decrease of $[Ca^{2+}]_i$ by ATP (10 mmol/L) and wuweizisu C (100 $\mu\text{mol/L}$).

Wuweizisu C induces a decrease in membrane potential in PC12 neuronal cells To see the effects of these 4 lignans on the membrane potential in neurons, changes in the membrane potential induced by the lignans were measured in PC12 neuronal cells. Similarly, wuweizisu C decreased the membrane potential in a concentration dependent manner (Figure 5A, 5E). Gomisin N decreased the membrane potential only at 100 $\mu\text{mol/L}$ (Figure 5C). Schisandrin and gomisin A, however, did not change the membrane

potential even at 100 $\mu\text{mol/L}$ (Figure 5B, 5D), suggesting differential sensitivity of PC12 neuronal cells to each lignan.

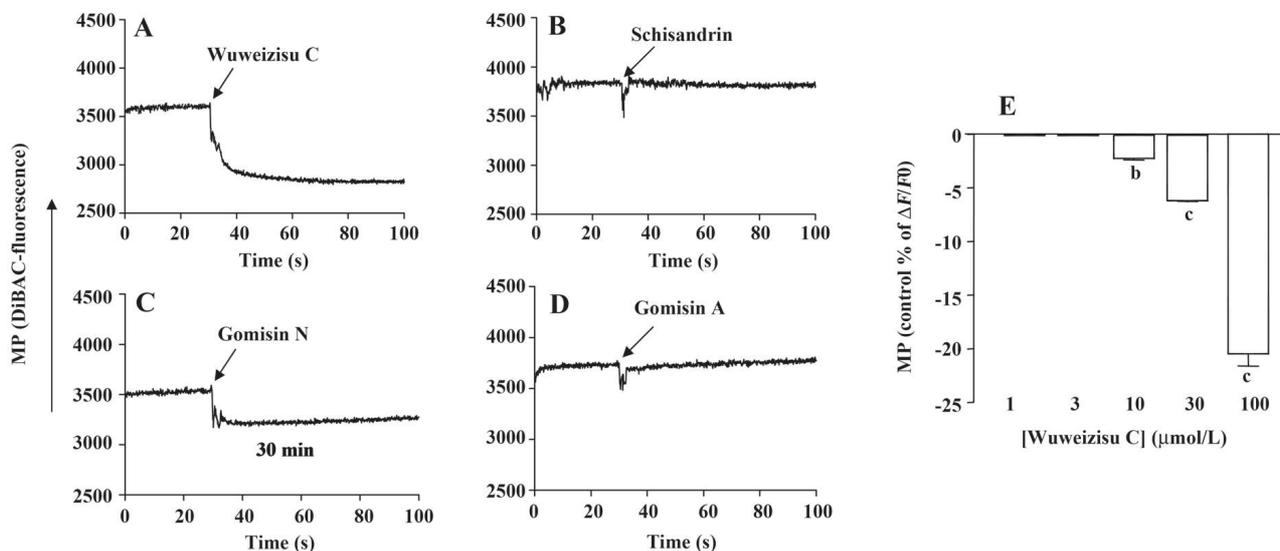


Figure 5. Effect of lignans from *Schisandra chinensis* on the membrane potential in PC12 neuronal cells. Representative traces of the membrane potential with 100 $\mu\text{mol/L}$ of wuweizisu C, schisandrin, gomisin N, and gomisin A in DiBAC-loaded PC12 neuronal cells are shown. Lignan was added as indicated by the (30 s). Concentration dependence of wuweizisu C-induced decrease of the membrane potential (E). MP, membrane potential; F₀, fluorescence value before addition of wuweizisu C; DF, maximum fluorescence change after addition of wuweizisu C. $bP < 0.05$, $cP < 0.01$ vs control.

Discussion

In this study, the effects of wuweizisu C, gomisin A, gomisin N, and schisandrin, which are dibenzooctadiene lignans of *Schisandra* fruits, on the membrane potential were investigated in C6 glioma cells. We previously observed an increase of the membrane potential with sarcotride A and bio-active lysophospholipids, such as lysophosphatidic acid and lysophosphatidylserine in C6 glioma cells [29,33,34]. In the present study, we showed decreases of the membrane potential by wuweizisu C, gomisin N, and gomisin A. Although the precise mechanism for the decreases was not elucidated, we found independence of pertussis-sensitive G proteins, U73122-sensitive phospholipase C, and extracellular Na^+ . Furthermore, we found that wuweizisu C decreased the membrane potential in PC12 neuronal cells. We also found that wuweizisu C inhibits the ATP-induced increase of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration, and by itself, gomisin N increases the basal Ca^{2+} concentration. In primary-cultured rat cortical cells, the kainic acid-induced Ca^{2+} influx was significantly inhibited by wuweizisu C and gomisin N, supporting our observation[18].

Because schisandrin, gomisin A, and gomisin N have been shown to reverse cancer drug resistance by targeting P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) or multidrug resistance associated protein 1 (ABCC1)[35–1], we tested the effect of probenecid on the membrane potential in C6 glioma cells. However, probenecid (50 and 500 $\mu\text{mol/L}$) did not change the membrane potential in C6 glioma cells, excluding the possibility that wuweizisu C decreases the membrane potential through the modulation of P-gp in C6 glioma cells (data not shown).

The modulation of the membrane potential was induced by wuweizisu C, gomisin N, and gomisin A, but not by schisandrin. Three modulatory lignans have 1-methylenedioxy groups on dibenzocyclooctadiene, but not in the schisandrin structure. Furthermore, gomisin N and gomisin A, which have just 1 methylenedioxy group, showed a decrease of the membrane potential at a 100 $\mu\text{mol/L}$ concentration. Wuweizisu C, which has 2 methylenedioxy groups, showed a concentration-dependently decrease of the membrane potential. Thus we presumed that the 2 methylenedioxy groups are important for the modulation of the membrane potential and tested DDB, which has 2 methylenedioxy groups, but not the cyclooctadiene ring. DDB did not change the membrane potential like schisandrin in C6 glioma cells (data not shown), suggesting the importance of the cyclooctadiene ring as well as the methylenedioxy groups. This idea is supported by the changes in the membrane potential in PC12 neuronal cells because gomisin N decreased the membrane potential, but gomisin A did not, showing differential responses in glioma and neuronal cells to lignans containing 1 methylenedioxy group.

In summary, we showed the decrease in the membrane potential by wuweizisu C in C6 glioma and PC12 neuronal cells and its inhibition of the ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. Although the precise mechanism for this decrease was not elucidated, the present study provides useful information for the elucidation of the action mechanisms of *Schisandra chinensis*, especially the lignans and drug development using *Schisandra chinensis* (fruits) or active lignans.

Author contribution

Young-whan CHOI and Dong-soon IM designed research; Kyeok KIM, Ji-yeong JO, Hyo-lim KIM, You-jin LEE, Woo-jung SHIN, Santosh J SACKET, and Mijin HAN performed research; Young-whan CHOI, Kyeok KIM analyzed data; Dong-soon IM wrote the paper.

References

- 1 Liu GT. Pharmacological actions and clinical use of *Fructus schizandrae*. Chin Med J (Engl) 1989; 102: 740–749.
- 2 Cyong JC, Ki SM, Iijima K, Kobayashi T, Furuya M. Clinical and pharmacological studies on liver disease treated with Kampo herbal medicine. Am J Chin Med 2000; 28: 351–360.

- 3 Ikeya Y, Taguchi H, Yosioka I, Kobayashi H. The constituents of *Schizandra chinensis* Baill. I. Isolation and structure determination of five new lignans, gomisin A, B, C, F and G, and the absolute structure of schizandrin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1979; 27: 1383–1394.
- 4 Lee YW, Voyksner RD, Pack TW, Cook CE, Fang QC, Ito Y. Application of countercurrent chromatography/thermospray mass spectrometry for the identification of bioactive lignans from plant natural products. *Anal Chem* 1990; 62: 244–248.
- 5 Maeda S, Takeda S, Miyamoto Y, Aburada M, Harada M. Effects of gomisin A on liver functions in hepatotoxic chemicals-treated rats. *Jpn J Pharmacol* 1985; 38: 347–353.
- 6 Kiso Y, Tohkin M, Hikino H, Ikeya Y, Taguchi H. Mechanism of antihepatotoxic activity of wuweizisu C and gomisin A. *Planta Med* 1985; 331–334.
- 7 Yamada S, Murawaki Y, Kawasaki H. Preventive effect of gomisin A, a lignan component of shizandra fruits, on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 1081–1085.
- 8 Wang JP, Raung SL, Hsu MF, Chen CC. Inhibition by gomisin C (a lignan from *Schizandra chinensis*) of the respiratory burst of rat neutrophils. *Br J Pharmacol* 1994; 113: 945–953.
- 9 Fujihashi T, Hara H, Sakata T, Mori K, Higuchi H, Tanaka A, *et al.* Anti-human immunodeficiency virus (HIV) activities of halogenated gomisin J derivatives, new nonnucleoside inhibitors of HIV type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2000–2007.
- 10 Yasukawa K, Ikeya Y, Mitsuhashi H, Iwasaki M, Aburada M, Nakagawa S, *et al.* Gomisin A inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 1992; 49: 68–71.
- 11 Miyamoto K, Wakusawa S, Nomura M, Sanae F, Sakai R, Sudo K, *et al.* Effects of gomisin A on hepatocarcinogenesis by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene in rats. *Jpn J Pharmacol* 1991; 57: 71–77.
- 12 Nomura M, Nakachiyama M, Hida T, Ohtaki Y, Sudo K, Aizawa T, *et al.* Gomisin A, a lignan component of Schizandra fruits, inhibits development of preneoplastic lesions in rat liver by 3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene. *Cancer Lett* 1994; 76: 11–18.
- 13 Park EY, Ki SH, Ko MS, Kim CW, Lee MH, Lee YS, *et al.* Garlic oil and DDB, comprised in a pharmaceutical composition for the treatment of patients with viral hepatitis, prevents acute liver injuries potentiated by glutathione deficiency in rats. *Chem Biol Interact* 2005; 155: 82–96.
- 14 Akbar N, Tahir RA, Santoso WD, Soemarno, Sumaryono, Noer HM, *et al.* Effectiveness of the analogue of natural Schisandrin C (HpPro) in treatment of liver diseases: an experience in Indonesian patients. *Chin Med J (Engl)* 1998; 111: 248–251.
- 15 Kim SN, Kim SY, Yim HK, Lee WY, Ham KS, Kim SK, *et al.* Effect of dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedio-xybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB) on chemical-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 93–95.
- 16 Huber R, Hockenjos B, Blum HE. DDB treatment of patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 1732–1733.
- 17 Gao H, Zhou YW. Anti-lipid peroxidation and protection of liver mitochondria against injuries by picoside II. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3671–3674.
- 18 Kim SR, Lee MK, Koo KA, Kim SH, Sung SH, Lee NG, *et al.* Dibenzocyclooctadiene lignans

- from *Schisandra chinensis* protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced toxicity. *J Neurosci Res* 2004; 76: 397-405.
- 19 Kim DH, Hung TM, Bae KH, Jung JW, Lee S, Yoon BH, *et al.* Gomisin A improves scopolamine-induced memory impairment in mice. *Eur J Pharmacol* 2006; 542: 129-135.
- 20 Hsieh MT, Wu CR, Wang WH, Lin LW. The ameliorating effect of the water layer of *Fructus Schisandrae* on cycloheximide-induced amnesia in rats: interaction with drugs acting at neurotransmitter receptors. *Pharmacol Res* 2001; 43: 17-22.
- 21 Hsieh MT, Tsai ML, Peng WH, Wu CR. Effects of *Fructus schizandrae* on cycloheximide-induced amnesia in rats. *Phytother Res* 1999; 13: 256-257.
- 22 Nishiyama N, Chu PJ, Saito H. An herbal prescription, S-113m, consisting of biota, ginseng and schizandra, improves learning performance in senescence accelerated mouse. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 388-393.
- 23 Kang SY, Lee KY, Koo KA, Yoon JS, Lim SW, Kim YC, *et al.* ESP-102, a standardized combined extract of *Angelica gigas*, *Saururus chinensis* and *Schizandra chinensis*, significantly improved scopolamine-induced memory impairment in mice. *Life Sci* 2005; 76:1691-1705.
- 24 Rouzair-Dubois B, Milandri JB, Bostel S, Dubois JM. Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells. *Pflugers Arch* 2000; 440: 881-888.
- 25 Weaver AK, Bomben VC, Sontheimer H. Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells. *Glia* 2006; 54: 223-233.
- 26 Higashimori H, Sontheimer H. Role of Kir4.1 channels in growth control of glia. *Glia* 2007; 55: 1668-1679.
- 27 Choi YW, Takamatsu S, Khan SI, Srinivas PV, Ferreira D, Zhao J, *et al.* Schisandrene, a dibenzocyclooctadiene lignan from *Schisandra chinensis*: structure-antioxidant activity relationships of dibenzocyclooctadiene lignans. *J Nat Prod* 2006; 69: 356-359.
- 28 Avula B, Choi YW, Srinivas PV, Khan IA. Quantitative determination of lignan constituents from *Schisandra chinensis* by liquid chromatography. *Chromatographia* 2005; 61: 515-518.
- 29 Lee YK, Im DS. Distinct effects of lysophospholipids on membrane potential in C6 glioma cells. *J Appl Pharmacol* 2006; 14: 25-29.
- 30 Chang YJ, Lee YK, Lee EH, Park JJ, Chung SK, Im DS. Structure-activity relationships of dimethylsphingosine (DMS) derivatives and their effects on intracellular pH and Ca²⁺ in the U937 monocyte cell line. *Arch Pharm Res* 2006; 29: 657-665.
- 31 Yun MR, Okajima F, Im DS. The action mode of lysophosphatidylcholine in human monocytes. *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 45-50.
- 32 Im DS, Fujioka T, Katada T, Kondo Y, Ui M, Okajima F. Characterization of sphingosine 1-phosphate-induced actions and its signaling pathways in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997; 272: G1091-1099.
- 33 Lee YK, Kim K, Kim HL, Sackett SJ, Han M, Jo JY, *et al.* Lysophosphatidylserine increases membrane potentials in rat C6 glioma cells. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1096-1001.
- 34 Lee YK, Liu Y, Jung JH, Im DS. Effect of sarcotride A on membrane potential in C6 glioma cells. *J Appl Pharmacol* 2006; 14: 110-113.
- 35 Pan Q, Lu Q, Zhang K, Hu X. Dibenzocyclooctadiene lignans: a class of novel inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 99-106.

- 36 Qiangrong P, Wang T, Lu Q, Hu X. Schisandrin B— novel inhibitor of P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 406-411.
- 37 Li L, Lu Q, Shen Y, Hu X. Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 584-595.
- 38 Li L, Pan Q, Sun M, Lu Q, Hu X. Dibenzocyclooctadiene lignans: a class of novel inhibitors of multidrug resistance-associated protein 1. *Life Sci* 2007; 80: 741-748.
- 39 Wan CK, Zhu GY, Shen XL, Chattopadhyay A, Dey S, Fong WF. Gomisins A alters substrate interaction and reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in HepG2-DR cells. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 824-837.
- 40 Fong WF, Wan CK, Zhu GY, Chattopadhyay A, Dey S, Zhao Z, *et al.* Schisandrol A from *Schisandra chinensis* reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by affecting P-gp-substrate complexes. *Planta Med* 2007; 73: 212-220.
- 41 Sun M, Xu X, Lu Q, Pan Q, Hu X. Schisandrin B: a dual inhibitor of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1. *Cancer Lett* 2007; 246: 300-307.

ㄷ. Gomisin N isolated from *Schisandra chinensis* was significantly induced anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the hepatic carcinoma

ABSTRACT

A lignans isolated from *Schisandriachinensis* were generally prescribed in anti-cancer and anti-hepatitis in Chinese medicine. To investigate the new function of compounds isolated from *Schisandria chinensis* on therapy of hepatic carcinoma, the killing ability of lignans were screened with cell proliferation assay. Especially, Gomisin N showed the high killing ability for hepatic carcinoma compare with other compounds. Furthermore, cell morphology and flow cytometry analysis showed that this compounds were only induced the cell death at high concentration, while did not induce the any change of cell death at low concentration. In addition, the expression level of Bcl-2 and Bax protein involving in apoptotic pathway were markedly increased in only 320 uM treated group compare to vehicle and other treated groups, while the expression level of p53 protein remained unchange in this condition. Thus, these results suggest the possibility that Gomisin N should be considered as candidate of anti-cancer to inhibit the proliferation of human hepatic carcinoma and induce apoptosis.

Key Words: Bcl-2, Bax

INTRODUCTION

Schisandra chinensis usually called “Chinese Magnolia” and has a well recognized history in traditional Chinese medicine. Also, it widely distributed in Eastern regions of Siberia, China, Japan and Korea (Panossian and Wikman, 2008). During the last 20 years, many active compounds with various action mechanism including Gomisin A, B, C, D, E, F, G, K3, N, J, Schisandrol B, Schisandrin, and Schisandrin C were isolated from this plant (Panossian and Wikman, 2008; Azzam et al., 2007). Therapeutic properties of these compounds were classified into major four categories as follows; adaptogenic action, hepatic protector, hepatic stabilizer and hepatic regeneration. Firstly, studies for adaptogenic action were performed on specific action mechanism such as energizing, stimulation of nervous system, oxygenator, immune-modulator, anti-oxidant and skin protector (Panossian and Wikman, 2008; Panossian, 1999; Chiu et al., 2002; Ko, 2002; Nakamura et al., 2003). Especially, several studies showed that these compounds reduced the hyperlipemia and significantly inhibited the development of arteriosclerosis (Yim and Ko, 1999). Second is the function as a hepatic protector. These compounds were tightly correlated with the increase of the hepatic level of ascorbic acid, the inhibition of NADPH oxidizing and lipid peroxydizing, and the

induction effect on the microsome hepatic cytochrome P-450 enzymatic system. Also, these compounds prevent the cholestasis induced by toxic substances (Baek et al., 2001; Iwata et al., 2004; Chang et al., 2007; Ko et al., 1995). Finally, these compounds contributed to the hepatic regeneration process through induction of the mRNA transcription for the growth factor of the hepatocyte, the stimulation of hepatocyte proliferation and the increases of the blood flow to the liver. In addition, these compounds were induced the increase of the levels of mitochondrial hepatic glutation and the activity of the mitochondrial reductase glutation in order to improve the capacity of regeneration of the reduced glutation and the synthesis of hepatic glucogen (Chen et al., 2008; Kubo et al., 1992). However, few functional studies have been conducted to investigate whether compounds isolated from *Schisandra chinensis* could effect on the cell death of the hepatic carcinoma *invitro*.

In this study, to investigate the new function of several compounds isolated from *Schisandra chinensis* on anti-cancer effect, four compounds were screened with MTT assay. Of the four compounds, GomisinN was significantly induced the cell death of hepatic carcinoma. Therefore, these results suggested that Gomisin N was considered as a novel candidate compound having the ability for the anti-cancer effects.

MATERIALS and METHODS

Regents

Minimum Essential Medium (MEM) powder, Trypsin and antibiotics (100 unit/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycine) were purchased from GIBCO (Grand Island, NY, USA). Fetal Bovine Serum was supplied by Invitorogen (NZ, USA). All other chemicals were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

Plant material

The fruits of *Schisandra chinensis* used in this study were collected from Moonkyeng-city in Korea at September 2005. A voucher specimen (accessionnumber SC-PNUNPRL-1) has been deposited in the Herbarium of Pusan National University.

Extraction and structure elucidation of compounds

The dried fruits of *Schisandra chinensis* (2.5kg) were ground to a fine powder and were successively extracted at room temperature with *n*-hexane, EtOAc, and MeOH. The hexane extract (308g) was evaporated in vacuo and chromatographed on a silica gel (40 μ m, J.T. Baker, NJ, USA) column (70x8.0 cm) with a step gradient 0,5%, 10%, 20%, 30% EtOAc in hexane (each 1 L) (Choi et al. 2006). The fraction 11 (3,476 mg) were separated on a silicagel column (100x3.0 cm) with 25% hexane in CHCl₃ to give

5 fractions. Fraction 11IA was further purified by column chromatography on silicagel eluting with CHCl_3 -acetone (19:1) to give a Gomisins N (774mg). The fraction 8 (1.579 mg) were separated on a silicagel column (100x3.0 cm) with CH_2Cl_2 to give a Schisandrin C (501 mg). The fraction 29 (1,992 mg) were separated on a silicagel column (100x3.0 cm) with 15% CHCl_3 in acetone to give a Gomisins A (97 3mg). The fractions 36, 37, and 38 (10,533 mg) were separated on a silicagel column (100x3.0 cm) with 5% CH_2Cl_2 in acetone to give a Schisandrin (4,606 mg). Pure Gomisins A was identified by HPLC on a Phenomenex Luna C18 column (Phenomenex, 150 x 4.6 mm I.D.; 5 μm particle size) (Avula et al., 2007). In addition, the chemical structure of lignans was verified by LC-MS (Bruker BioApex FT mass spectrometer) and NMR analysis (Varian inova 500 spectrometer). Optical rotations were recorded on a JASCO DIP-370 digital polarimeter. IR spectra were recorded on an AATI Mattson Genesis Series FTIR. NMR spectra (^1H , ^{13}C) were recorded in CDCl_3 on a Varian inova 500 spectrometer operating at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C , running gradient and using residual solvent peaks as internal references. High-resolution mass spectra were recorded on a Bruker BioApex FT mass spectrometer.

Cell culture and treatment

HepG2 cell, a human hepatoblastoma cell line, was purchased from Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea). These cell line were grown as monolayers in MEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and antibiotics (100 unit/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin), incubated at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO_2 in air.

Assay of cell proliferation

Firstly, the wells in 96-well plate were divided into four groups involving Vehicle, 40 μM , 80 μM , 160 μM and 320 μM and assign three well per each group. HepG2 cells were seeded at density of 4×10^4 cell/200 μl in 96-well plate and grown for 24 hrs at 37°C incubator. When the cells attained to 70-80% confluence, various concentrations of Gomisins N dissolved in DMSO were added to each well. Thereafter, these cells were further incubated for another 24 hrs. Cell proliferation were evaluated using a tetrazolium compound MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma M2128). After supernatant in compound-treated well and vehicle-treated well was discarded, 200 μl of fresh MEM solution and 50 μl of MTT solution (2 mg/ml in PBS) were added each well. And these cells were incubated at 37°C incubator. MTT is reduced by metabolically active cells to insoluble purple formazan dye crystals. After 4 hrs, 220 μl of MTT mixture was removed from each well and MTT formazan precipitates were dissolved in 150 μl of DMSO. Finally, the absorbance of sample in the well was directly read using a SoftMax Pro5

spectrophotometer (Molecular Device, USA). The optimal wavelength for absorbance is 570 nm. Also, the data is analysed by cell number versus absorbance, allowing quantification of changes in cell proliferation.

Flow cytometric analysis

The percentage of cell undergoing apoptosis process and dead cells was detected with staining methods of FITC Annexin V (BD Bioscience, USA). HepG2 cells were seeded at density of 2×10^6 cells in 100 mm^2 dish and grown for 24-48 hrs at 37°C incubator. When the cells attained to 70-80% confluence, various concentration of Gomisin N dissolved in DMSO was added to each culture dish. Thereafter, these cells were further incubated for another 00 hrs. Then each group of cells were harvested, washed twice with ice-cold PBS and then resuspend cells in 1x Binding buffer at a concentration of 1×10^6 cells/ml. About 1×10^5 cells in 100 ul of solution were transferred into a round-bottom culture tube. Five ul of FITC Annexin V were added to stain these cells. After the incubation for 15 min at room temperature, 400 ul of 1x Binding buffer were added into each tube and analyze by FACSCalibur (BD Biosciences, USA) within 1 hr.

Western blot analyses

The HepG2 cell harvested from 100 mm^2 culture dish solubilized with 1% Nonidet P-40 in 150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl (pH 7.5), and 1 mM EDTA, supplemented with a protein inhibitor mixture (Roche, Germany). They were then centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C . The homogenated proteins were separated on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels for 3 hrs and transferred to nitrocellulose membranes for 2 hrs at 40 V. The membranes were then incubated with the primary antibodies [anti-Bcl-2 (SC-7382), anti-Bax (SC-493), anti-p53 (SC-6243) and anti- α -tubulin (Sigma, MI)], which were used to detect Bcl-2, Bax, p53 and anti- α -tubulin. Each antigen-antibody complex was then visualized with a biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit)-conjugated HRP streptavidin (Zymed, Histostain-Plus Kit) diluted to 1:1,500 in PBS.

Statistical analysis

Tests for significance between vehicle-treated and compounds-treated groups were performed using a One-Way ANOVA test of variance (SPSS for Windows, Release 10.10, Standard Version, Chicago, IL). All the values are reported as the mean \pm standard deviation (SD). A p value <0.05 was considered significant.

Results

Isolation of four compounds from Schisandra chinensis

Firstly, in order to prepare compounds to use the study of anti-cancer effects, *Schisandra chinensis* were extracted by three extraction chemicals involving *n*-hexane, EtOAc and MeOH. From these experiments, we harvested the four compounds that were usually extracted with large amount compare to other compounds. Also, to identify the exact name of these compounds, their structures were analyzed by LC-MS and NMR analysis. And then, these compounds were identified as Gomisin N, Schisandrin, Schisandrin C and Gomisin A (Fig. 95). Furthermore, to verify the purity of these compounds for anti-cancer effects test, the chromatography was performed for four compounds purified from *Schisandra chinensis*. The results of chromatography showed that these compounds had the purity enough to apply the test of anti-cancer effects (Fig. 96). Therefore, all of these results showed that four compounds for testing anti-cancer effects were successfully isolated from *Schisandra chinensis*.

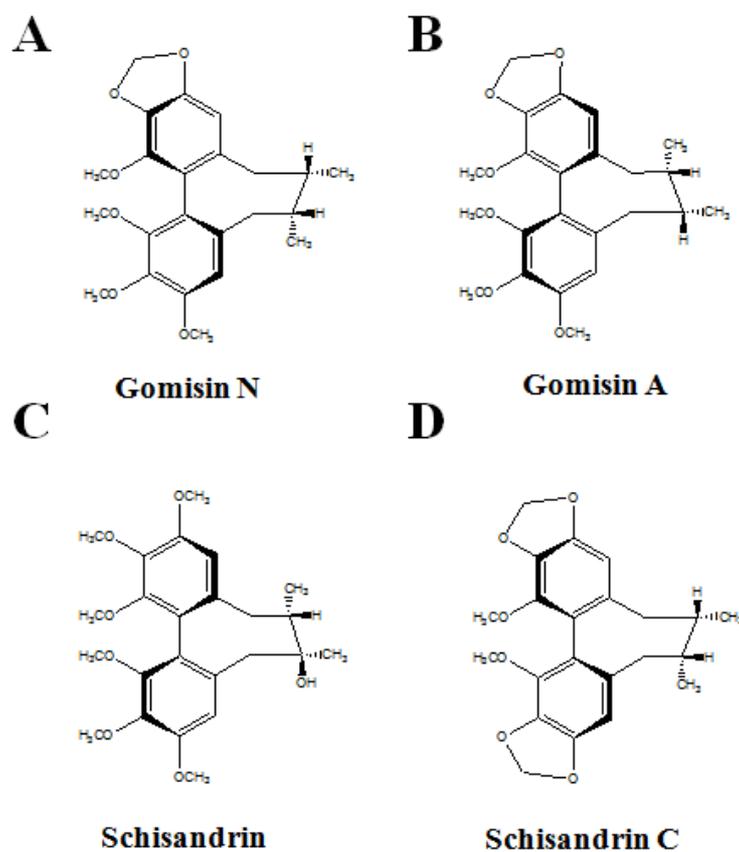


Fig. 95. Chemical structures of gomisin N (A), gomisin A (B), schisandrin (C), and schisandrin C (D) isolated from *Schisandra chinensis*.

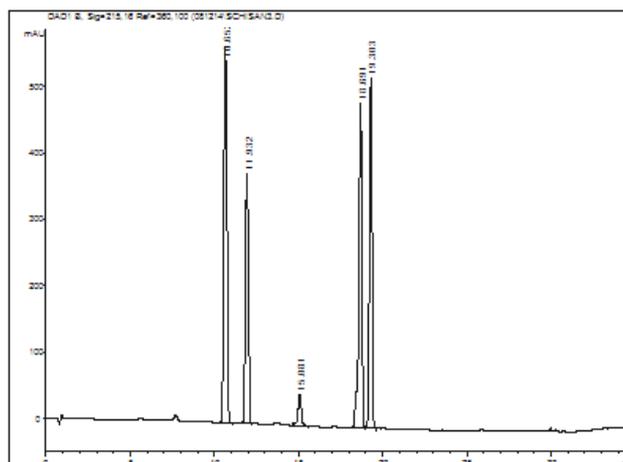


Fig. 96. HPLC profile of gomisin N (A), gomisin A (B), schisandrin (C), and schisandrin C (D) from *Schisandra chinensis*.Bail. HPLC analysis showed the isolated lignans had a purity of more than 96%.

Effects of fours extracts on cell proliferation

To select the best compounds which have the highest ability of cell killing for hepatic carcinoma in four compounds, the proliferation activity were screened in all group that had received four compound on various concentration using MTT assay. For Schisandrin C, MTT assay represented that these compounds induced the cell proliferation rather than the cell death of HepG2 cell from 40 uM to 160 uM (Fig. 97). Also, the cell proliferation in Gomisin A-treated group remained at constant level (Fig. 97), However, MTT screening results of the four compounds also showed that two compounds involving Gomisin N and Schisandrin was significantly induced the cell death compare to other two compounds. For the Gomisin N-treated group, the cell proliferation in 40 uM treated groups was slightly increased compare to vehicle group. However, these proliferations were rapidly decreased in the range from 80 uM to 320 uM of Gomisin N concentration (Fig. 97).

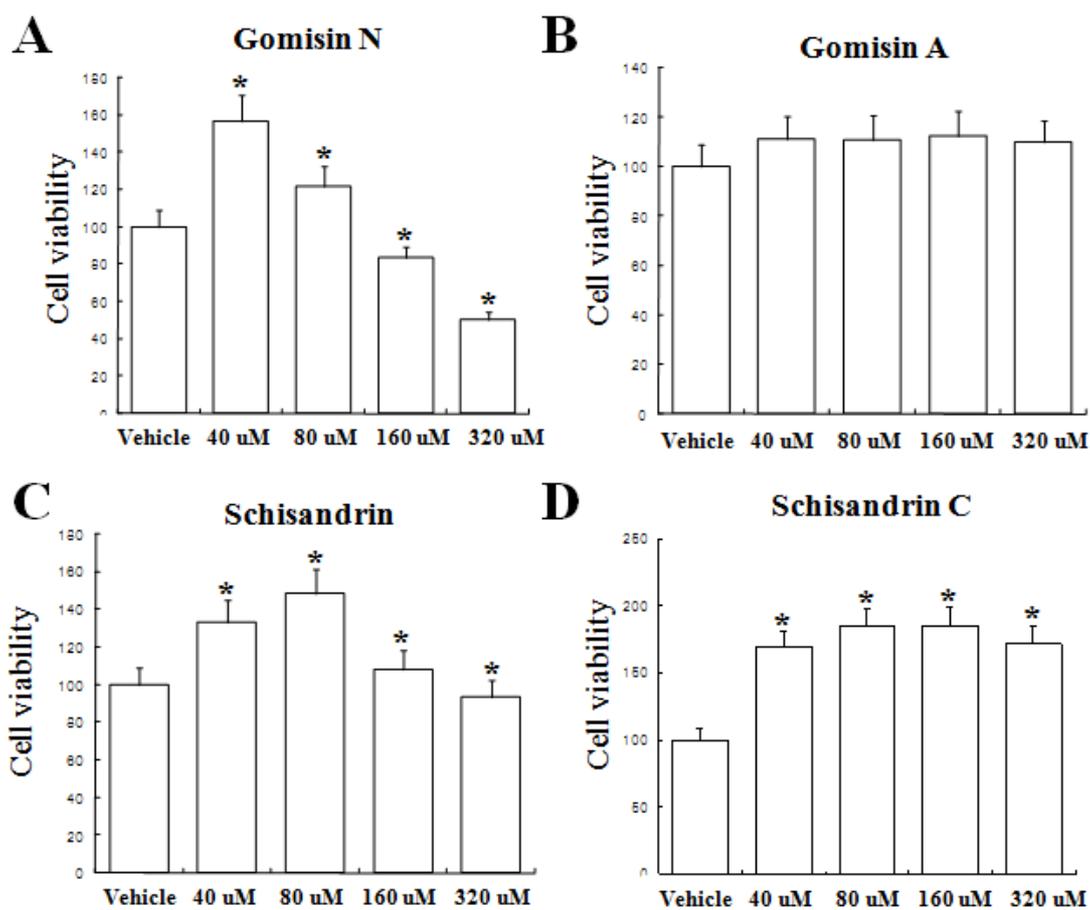


Fig. 97. Atin-proliferative effect of four compounds on HepG2 cell. Cells were cultured with four compounds at various concentrations for 24 hrs. Vehicle-treated cell were treated with DMSO as using the dissolving agents of four compounds. Activity of cell proliferation was measured using MTT assay. The values of data represented mean \pm SD of three experiments.

In addition, Schisandrin were also induced the cell death in the high concentration, but the effect ratio of cell death were lower than Gomisin N (Fig. 97). These results suggested that Gomisin N treatment is highly effective in inducing the death of HepG2 cells at the high concentrations, while did not contribute to the cell death process at low concentrations. Therefore, we selected Gomisin N as a best candidate compounds having ability of anti-proliferation and pro-apoptosis to use further analysis.

Effects of Gomisin N on cell morphology

Furthermore, in order to study whether the cell death effects of Gomisin N observed from MTT assay was consistently observed on cell morphology, the microscope image of HepG2 cells were observed by phase-contrast microscope after

24 hrs of treatment with various concentrations. In the 40 μM -treated group, the number and morphology of HepG2 cell were more crowded than those in the vehicle treated group. However, HepG2 cells in 80 μM -treated groups showed the similar pattern of vehicle treated group. For 160 μM -treated group, few number of dead cell were firstly observed in the microscope image of HepG2 cells. And the number of these cells was markedly increased in the 320 μM -treated groups (Fig. 98). These results showed that the results exerted from cell morphology analysis under the Gomisin N-treated condition were reflected the results of MTT assay at the same condition.

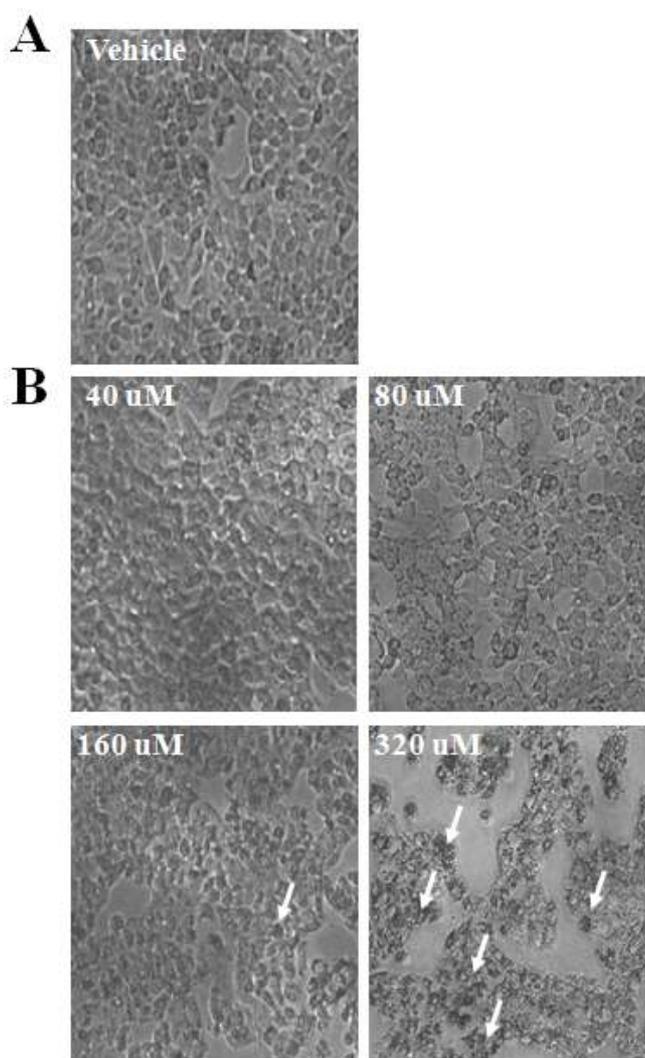


Fig. 98. Microscope images of HepG2 cells after 24 hrs of treatment with Gomisin N at various concentrations. Vehicle-treated cell were treated with DMSO as using the dissolving agents of four compounds. A cell morphology was viewed with a microscope 20x magnification.

Effects of Gomisin N on apoptosis

Generally, FITC Annexin V is used to quantitatively determine the percentage of cells within a population that are actively undergoing apoptosis (Andree et al., 1990; Casciola-Rosen et al., 1996). To investigate the effect of Gomisin N on apoptosis process, HepG2 cells treated with various concentration of Gomisin N were stained with FITC Annexin V and the activity of fluorescence were detected by Flow cytometry. As shown in Fig. 5, Gomisin N significantly induced the increase the number of cells that are undergoing apoptosis from 15% to 98% in 24 hrs. However, this reaction was induced at even low concentration of Gomisin N, and this level of induction remained at a constant level until high concentration.

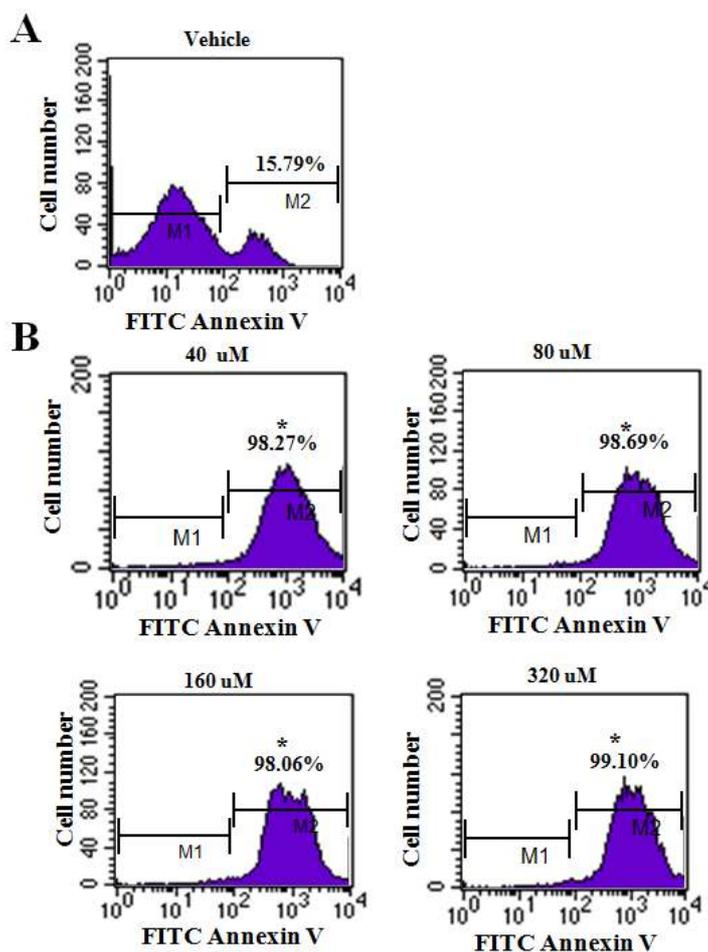


Fig. 99. Identifying cells that are undergoing apoptosis. HepG2 cell were incubated with Gomisin N at various concentrations for 24 hrs, and stained with FITC Annexin V to detect the apoptotic cells. The fluorescence exposing these cells were analyzed by Flow cytometer. M1 indicated a live cells and M2 indicated either undergoing apoptosis or had already died. The values of data represented mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle treated group.

Therefore, these results suggested that Gomisin N could induce the apoptosis of HepG2 cells with the dose-independent pattern. Especially, Gomisin N may induce the loss of plasma membrane asymmetry, one of early event in apoptosis process, for the most of cell treated at 40 uM concentration.

Effects of Gomisin N on apoptic pathway

Family of proteins belong Bcl-2 include both pro- and anti-apoptotic members. Of these members, Bcl-2 proteins stimulate the anti-apoptotic process and Bax protein significantly inhibits the anti-apoptotic actions of bcl-2 protein (Tsujiimoto, 1998; Tsujiimoto and Shimizu, 2000). In order to study the effects of Gomisin N treatment on proteins associated with the apoptosis signaling pathway, the expression level of Bcl-2 and Bax protein were determined in the vehicle-treated group and Gomisin N-treated group using western blot analysis. The expression level of Bcl-2 protein did not change in the low concentration range compare to vehicle group. However, the high concentration range involving 160 uM and 320 uM-treated groups showed the higher expression level of Bcl-2 protein than those in low concentration range. In case of Bax protein, the expression level of this protein were markedly increased in only 320 uM treated group compare to vehicle and other treated groups. Furthermore, to examine whether the tumor suppressor gene would be affected by the Gomisin N in HepG2 cell, the expression level of p53 protein were detected in vehicle and Gomisin N-treated group. The expression level of p53 protein remained unchanged in both the four treated group and vehicle group (Fig. 100). Therefore, these results suggested that Gomisin N could simultaneously induce the increase of the proteins associated with anti-apoptotic and pro-apoptotic process, but do not affects any change on expression level of tumor suppressor protein.

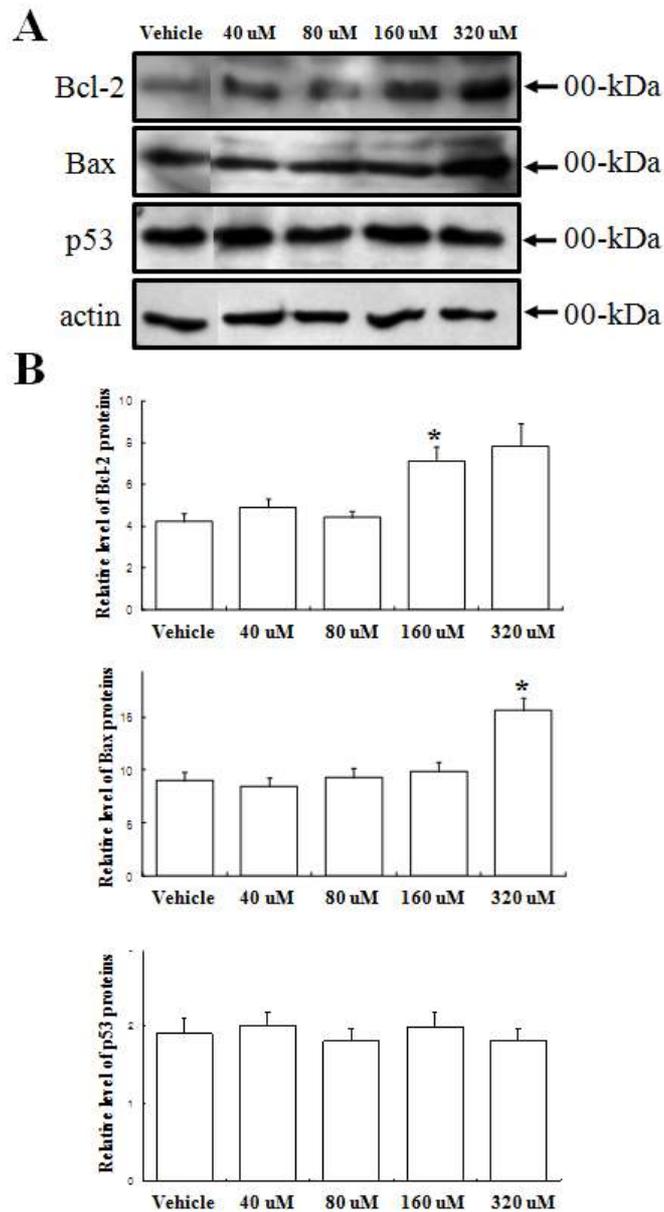


Fig. 100. Effects of Gomisin N on apoptotic pathway and the expression level of tumor suppressor gene. Expression levels of the Bcl-2, Bax and p53 proteins were analyzed using Western blot analysis. The membranes were incubated with antibodies for Bcl-2, Bax, p53 proteins and the β -actin proteins from the HepG2 cells under the various concentration of Gomisin N treatment condition. Expression levels were quantified by an Imaging Densitometer and the sizes of products were indicated, respectively. The values of data represented mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle treated group.

DISCUSSION

Hepatocellular carcinoma is a primary malignancy of the hepatocyte, generally leading to death within 6–20 months. This disease also is the fifth most popular cancer in men and the eighth most popular cancer in women worldwide (Bosch et al., 2004). Furthermore, cirrhosis of any etiology was known the major risk factor for hepatocellular carcinoma (Adami et al., 2008). Until now, about 80% of patients with newly diagnosed hepatocellular carcinoma have preexisting cirrhosis in the liver organ. Especially, this cirrhosis was mainly caused by excessive alcohol use, hepatitis C infection, and hepatitis B infection (El-Serag and Mason, 2000). In addition, a many therapeutic strategies were conducted to give medical treatment of hepatocellular carcinoma involving surgical resection and liver transplantation, although available treatment options depend on the characteristics of tumor (Thomas and Zhu, 2005; Bruix and Sherman, 2005). In this study, we investigated the new function of compounds isolated from *Schisandra chinensis* on the anti-tumor ability. Therefore, our study shown that Gomisin N was significantly induced the cell death of hepatic carcinoma using cell proliferation assay.

Lignans are the most common constituents of *Schisandra chinensis*(Turcz. Baill. (Magnoliaceae). Major lignans in European seeds are reported to be deoxyschisandrin (0.07–1.09%), gomisin N (0.24–1.49%), schisandrin (0.75–1.86%), wuweizisu C (0.01–0.34%), and gomisin A (0.13–0.90%)(He et al., 1997). Furthermore, several C18 dibenzocyclooctadiene lignans isolated from *Schisandra chinensis* showed various therapeutic activities involving anti-cancer (Chen et al., 2002, Yasukawa et al., 1992), anti-hepatocarcinogenesis (Ohtaki et al., 1996, Nomura et al., 1992), anti-hepatotoxic (Wu et al., 2003), anti-HIV (Chen et al., 1997), anti-oxidant (Choi et al., 2006; Lu and Liu, 1992), anti-inflammatory (Yasukawa et al., 1992) and vascular relaxation (Park et al, 2007) in previous studies. Especially, our laboratory discovered a hexane extract of the fruits of *Schisandra chinensis* (Schisandraceae), which is indigenous to Korea, Japan and China, and had the ability of the cancer inhibition (Choi et al., 2006). However, very limited literature is available on the pharmacological mechanism of action of *Schisandrachinensis*.

Schisandrin B (Sch B) is the most active and abundant dibenzocyclooctadiene derivative isolated from *Schisandra chinensis* (Li,1991). Generally, this derivative was used for treatment of viral and chemical hepatitis. Also, several studies showed that Sch B could protect against free radical-mediated hepatocellular damage and enhance the hepatic glutathione antioxidant status in the mitochondria (Ip et al., 1995; Ip and Ko, 1995). There has been reported that Schisandrin B have enantiomers ((+)Sch B and (-)Sch B) (Chiu et al., 2006). Furthermore, these two compounds were showed the ability having the different function. (+) Sch B could be affected on the proliferation and apoptosis. Especially, (+) Sch B significantly enhanced doxorubin-induced apoptosis of a human hepatic carcinoma cell line and a human

breast cancer cell (Li et al., 2006). (-) Sch B was called a Gomisin N. Also, pretreatment of this compound protected against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of H9c2 cells (Chiu et al., 2008). However, there are no reported that Gomisin N could affect on the cell proliferation and apoptosis. In our results, Gomisin N show the highest activity in four compounds involving as Gomisin N, Schisandrin, Schisandrin C and Gomisin A screened in this study. Especially, Gomisin N was significantly inhibited the cell proliferation about 50% at high concentration, while did not contribute to the cell death process in low concentrations.

The cell death program is characterized by some morphological feature involving loss of plasma membrane asymmetry and attachment, fragmentation and condensation of nucleus, formation of cytoplasm vesicle (Schwartz et al., 1993; Bursch et al., 2000). Especially, loss of plasma membrane is one of the earliest features, and detected by Annexin V conjugated FITC (Homburg et al., 1995; Koopman et al., 1994). In our study, the results obtained from this technique showed that Gomisin N markedly induce the loss of plasma membrane asymmetry at low concentration. These effects remained unchanged in other concentration level.

Apoptosis or programmed cell death plays a critical role in a variety of physiological processes during fetal development and in adult life. Defects in apoptosis process lead to progress of many diseases involving progressive cell accumulation and cancer in the most of case. Apoptosis process involves many kinds of family proteins. Of these proteins, Bcl-2 proteins as one of key molecules in apoptosis induce the anti-apoptotic process (Apakama et al., 1996). Also, previous study suggested that this protein is inappropriately over expressed in many solid tumors, and contributing to resistance to chemotherapy and radiation-induced apoptosis (Apakama et al., 1996; Joensuu et al., 1996). Unlike many other known human oncogenes, Bcl-2 exerts its influence by enhancing cell survival rather than stimulating cell division (Joensuu et al., 1996). In this study, we investigated whether the expression level of Bcl-2 protein would be affected Gomisin N treatment in hepatic carcinoma. As shown in Fig. 0, expression level of Bcl-2 protein remained to consistent level at low concentration. But, high concentration treatment of Gomisin N were significantly induced the expression level of Bcl-2 protein.

Bax protein, another member of Bcl-2 family, inhibits the anti-apoptotic actions of Bcl-2. However, some reports suggested that Bax acts as a classic tumor suppressor gene in vivo. Several human tumors involved loss of function mutations for this protein and knockout of the Bax gene induce to tumorigenesis in mice (Bakelendt et al., 2000; Harima et al., 2000; Ito et al., 1999). When we examined the effects of Gomisin N treatment on the expression level of Bax protein by western blot, the expression level of Bax protein significantly increased in the only 320 μ M-treated group. These results suggested that the increase of the Bax expression treated with Gomisin N could contribute to cell death inhibiting the anti-apoptotic actions.

All of the aforementioned results showed that Gomisin N can serve as novel candidate for therapeutic treatment of hepatic carcinoma. However, intensive work is still needed to define the role of this compound in inducing the cell death of hepatocellular carcinoma in order to clinical applicant the patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry (106048031CG00), This research was mainly supported by the Pusan National University Research Grant, 2008.

REFERENCES

Adami A, Hunter D, and Trichopoulos D. Cancer of the Liver and Biliary Tract. In: *Textbook of Cancer Epidemiology*. Second Edition. Oxford England: Oxford University Press; 2008:308-332.

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. (1990) Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*. 265(9):4923-4928.

Apakama I, Robinson MC, Walter NM, Charlton RG, Royds JA, Fuller CE, Neal DE, Hamdy FC. (1996) Bcl-2 overexpression combined with p53 accumulation correlates with hormone refractory prostate cancer. *Br J Urol* 74:1258-1262.

Avula B, Dentali S, Khan IA. (2007) Simultaneous identification and quantification by liquid chromatography of benzethonium chloride, methyl paraben and triclosan in commercial products labeled as grapefruit seed extract. *Pharmazie*. 62(8):593-596.

Azzam HS, Goertz C, Fritts M, Jonas WB. (2007) Natural products and chronic hepatitis C virus. *Liver Int*. 27(1):17-25.

Baek MS, Kim JY, Myung SW. (2001) Metabolism of dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate (DDB) by human liver microsomes: characterization of metabolic pathways and of cytochrome P450 isoforms involved. *Drug Metab Dispos*. 29(4 Pt 1): 381-388.

Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, Tropé CG, Kristensen GB. (2000) Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 18:3745-3747

Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. (2004) Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 127:S5-S16.

Bruix J, Sherman M. (2005) Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42(5): 1208-1236.

Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Fröhwein U, Schulte-Hermann R. (2000) Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci*. 926:1-12.

Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(4):1624-1629.

Chang HF, Lin YH, Chu CC, Wu SJ, ,(2007) Protective effects of Ginkgo biloba, Panax ginseng, and *Schizandra chinensis* extract on liver injury in rats. 35(6):995-1009.

Chen DF, Zhang SX, Xie L, Xie JX, Chen K, Kashiwada Y, Zhou BN, Wang P, Cosentino LM, Lee KH. (1997) Anti-AIDS agents--XXVI. Structure-activity correlations of gomisin-G-related anti-HIV lignans from *Kadsura interior* and of related synthetic analogues. *Bioorg Med Chem*. 5(8):1715-1723.

Chen N, Chiu PY, Ko KM. (2008) Schisandrin B enhances cerebral mitochondrial antioxidant status and structural integrity, and protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Biol Pharm Bull*. 31(7):1387-1391.

Chen DF, Zhang SX, Kozuka M, Sun QZ, Feng J, Wang Q, Mukainaka T, Nobukuni Y, Tokuda H, Nishino H, Wang HK, Morris-Natschke SL, Lee KH. (2002) Interiotherins C and D, two new lignans from *Kadsura interior* and antitumor-promoting effects of related neolignans on Epstein-Barr virus activation. *J Nat Prod*. 65(9):1242-1245.

Chiu PY, Mak DH, Poon MK (2002) In vivo antioxidant action of a lignan-enriched extract of *Schizandra* fruit and an anthraquinone-containing extract of *Polygonum* root in comparison with schisandrin B and emodin. *Planta Med*. 68(11):951-6.

Chiu PY, Leung HY, Poon MK, Mak DH, Ko KM. (2006) (-)-Schisandrin B is more potent than its enantiomer in enhancing cellular glutathione and heat shock protein production as well as protecting against oxidant injury in H9c2 cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*. 289(1-2): 185-191.

Chiu PY, Luk KF, Leung HY, Ng KM, Ko KM. (2008) Schisandrin B stereoisomers protect against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and inhibit associated changes in Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition and mitochondrial membrane potential in H9c2 cardiomyocytes. *Life Sci.* 82(21-22):1092-1101.

Choi YW, Takamatsu S, Khan SI, Srinivas PV, Ferreira D, Zhao J, Khan IA. (2006) Schisandrene, a dibenzocyclooctadiene lignan from *Schisandra chinensis*: structure-antioxidant activity relationships of dibenzocyclooctadiene lignans. *J Nat Prod.* 69(3):356-359.

El-Serag HB, Mason AC. (2000) Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *ArchInternMed.* 160(21):3227-3230.

Harima Y, Nagata K, Harima K, Oka A, Ostapenko VV, Shikata N, Ohnishi T, Tanaka Y. (2000) Bax and bcl-2 protein expression following radiation therapy versus radiation plus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical carcinoma. *Cancer* 88:132-138

He XG, Lian L-Z, Lin L-Z (1997) Electrospray high performance liquid chromatography-mass spectrometry in phytochemical analysis of kava (*Piper methysticum*) extract. *Plant Med* 63; 70-74

Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. (1995) Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood.* 85(2):532-540.

Ip SP, Poon MK, Wu SS, Che CT, Ng KH, Kong YC, Ko KM. (1995) Effect of schisandrin B on hepatic glutathione antioxidant system in mice: protection against carbon tetrachloride toxicity. *Planta Med.* 61:398-401.

Ip SP, Ko KM. (1996) The crucial antioxidant action of schisandrin B in protecting against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice: a comparative study with butylated hydroxytoluene. *Biochem Pharmacol.* 52:1687-1693.

Ito T, Fujieda S, Tsuzuki H, Sunaga H, Fan G, Sugimoto C, Fukuda M, Saito H. (1999) Decreased expression of bax is correlated with poor prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 140:81-91

Iwata H, Tezuka Y, Kadota S. (2004) Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in Schisandra fruit extract. *Drug Metab Dispos.* 32(12):1351-1358

Joensuu H, Pylkkänen L, Toikkanen S. (1994) Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 145:1191-1198.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 84(5):1415-1420.

Ko KM, Ip SP, Poon MK, Wu SS, Che CT, Ng KH, Kong YC. (1995) Effect of a lignan-enriched fructus schisandrae extract on hepatic glutathione status in rats: protection against carbon tetrachloride toxicity *Planta Med.* 61(2):134-137.

Ko KM. (2002) Schisandrin B protects against tert-butylhydroperoxide induced cerebral toxicity by enhancing glutathione antioxidant status in mouse brain. *Mol Cell Biochem.* 238(1-2): 181-186.

Kubo S, Ohkura Y, Mizoguchi Y, Matsui-Yuasa I, Otani S, Morisawa S, Kinoshita H, Takeda S, Aburada M, Hosoya E. (1992) Effect of Gomisins A (TJN-101) on liver regeneration. *Planta Med.* 58(6):489-492.

Li XY. (1991) Bioactivity of neolignans from fructus Schizandrae. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 86:31-37.10.

Li L, Lu Q, Shen Y, Hu X. (2006) Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells. *Biochem Pharmacol.* 71(5):584-595.

Lu H, Liu GT. (1992) Anti-oxidant activity of dibenzocyclooctene lignans isolated from Schisandraceae. *Planta Med.* 58(4):311-313.

Nakamura K, Yoshida M, Uchiwa H. (2003) Down-regulation of melanin synthesis by a biphenyl derivative and its mechanism. *Pigment Cell Res.* 16(5):494-500.

Nomura M, Nakachiyama M, Hida T, Ohtaki Y, Sudo K, Aizawa T, Aburada M, Miyamoto KI. (1994) Gomisins A, a lignan component of Schizandra fruits, inhibits development of preneoplastic lesions in rat liver by 3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene. *Cancer Lett.* 76(1):11-8.

Ohtaki Y, Hida T, Hiramatsu K, Kanitani M, Ohshima T, Nomura M, Wakita H, Aburada M, Miyamoto KI. (1996) Deoxycholic acid as an endogenous risk factor for hepatocarcinogenesis and effects of gomisins A, a lignan component of Schizandra

fruits. *Anticancer Res.* 16(2):751-755.

Panossian AG. (1999) Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. *Phytomedicine.* 6(1):17-26.

Panossian A, Wikman G. (2008) Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail.: an overview of Russian research and uses in medicine. *J Ethnopharmacol.* 118(2):183-212.

Schwartz LM, Smitho SW., Jones MEE, Osborne BA (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 90: 980-984

Thomas MB, Zhu AX. (2005) Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *JClinOncol.* 23(13):2892-2829.

Tsujimoto Y. (1998) Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3, 697-707.

Tsujimoto Y, Shimizu S. (2000) Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466: 6-10.

Wu MD, Huang RL, Kuo LM, Hung CC, Ong CW, Kuo YH. (2003) 2: The anti-HBsAg (human type B hepatitis, surface antigen) and anti-HBeAg (human type B hepatitis, e antigen) C18 dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura matsudai* and *Schizandra arisanensis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 51(11):1233-1236.

Yasukawa K, Ikeya Y, Mitsunashi H, Iwasaki M, Aburada M, Nakagawa S, Takeuchi M, Takido M. (1992) Gomisins A inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology.* 49(1):68-71.

Yim TK, Ko KM. (1999) Schisandrin B protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by enhancing myocardial glutathione antioxidant status. *Mol Cell Biochem.* 196(1-2):151-156.

라. CCL₄를 이용한 급성간염유발 쥐에서 Gomisin A의 항간염 효과

(1) 실험목적

Gomisin A의 간대사에 미치는 영향을 분석하기 위하여 SD랫드에 CCl₄를 이용하여 간 독성을 유발하고 Gomisin을 처리한 후 다양한 생리화학적 지표를 분석하였다.

(2) 실험방법

SPF 상태의 SD (Sprague-Dawley) 흰쥐 15마리 샘타코(주)로부터 구매하여 동물을 5마리씩 세 그룹으로 나누고, 몸무게를 측정 후 명칭은 No treat group, Vehicle group, Gomisin A group으로 한다.

CCl₄와 Olive oil은 Sigma로부터 구입하고, 사용전에 두 시약을 1:1로 동량 혼합액으로 조제한다. Gomisin A는 olive oil에 20 mg/ml의 농도로 녹여 준비한다. 동물투여를 위해 Control group은 아무것도 처리하지 않은 상태로 사육한다. Vehicle group은 0.1 ml의 Olive oil을 존데를 이용하여 경구투여하고 (1회/일, 4일 동안), 24시간 후 CCl₄를 0.1 ml을 복강내로 주사하고 (1회), 다시 24시간 후에 동물을 부검한다. Gomisin A group은 1 ml의 gomisin A를 존데를 이용하여 경구투여하고 (1회/일, 4일 동안), 24시간 후 CCl₄를 0.1 ml을 복강내로 주사하고 (1회), 다시 24시간 후에 동물을 CO₂가스로 안락사한 후 부검한다. 분석을 위해서는 체중, 혈액, 각 장기무게 등을 분석하고, 조직에 대한 histology를 관찰하였다. 간에서 나타나는 세포신호전달과정은 western blot를 이용하여 분석하였다.

(3) 동물실험 결과

CCl₄로서 간염을 유발하기 전에 gomisin A를 주사한 후 신장, 심장, 폐 등의 장기의 체중의 변화를 측정한 결과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 간은 CCl₄만을 처리그룹보다 Gomisin A와 CCl₄를 동시에 처리한 집단에서 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다.

이러한 결과를 바탕으로 간 조직내에 세포의 변화를 관찰하기 위하여 조직학적 분석을 실시하였으며, CCl₄ 그룹은 조직세포의 파괴가 뚜렷이 관찰되었으나 Gomisin A를 처리한 집단은 CCl₄에 의한 세포파괴현상이 현저히 감소됨을 관찰하였다. 또한 간 조직의 기능을 나타내는 지표의 분석에서, ALP, AST, ALT 등은 CCl₄에 의해서 증가된 후 Gomisin A에 의해서 유의적으로 감소하는 것으로 관찰되었다.

마지막으로 Gomisin A가 간 조직의 신호전달과정에 미치는 영향을 분석하기 위하여 MAP kinase에 의한 신호전달 단백질의 변화를 관찰하였다. 그 결과 ERK, JNK, p38 단백질의 인산화가 CCl₄에 의해서 유의적으로 감소되었다가 Gomisin A 처리에 의해 증가되는 것을 확인하였다.

이상의 결과로 볼 때, Gomisin A는 CCl₄에 의해 유발된 간독성을 유의적으로 개선시켜주는 효과가 있으며, 이러한 효능은 세포내 신호전달과정인 MAP kinase pathway가 관여함을 제시하고 있다.

결과 및 고찰

(1) 오미자로부터 분리한 gomisin A의 구조

오미자로부터 추출한 gomisin A의 구조는 ^1H , ^{13}C 및 Dept 자료와 기존에 보고된 문헌과 비교하여 구조를 확정하였으며, 물질의 순도는 HPLC로 확인한 결과 97% 이상의 순도를 가진 것으로 확인되었다.

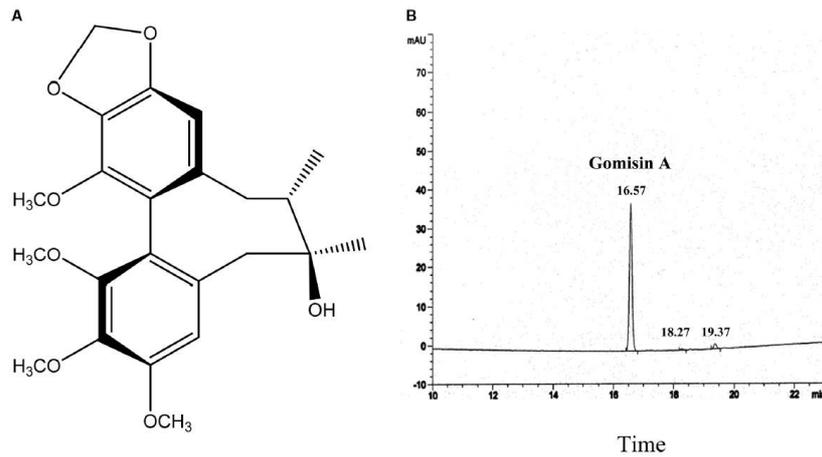


Fig. 101. 오미자로부터 추출한 Gomisin A (A) 의 구조 및 HPLC chromatogram (B).

(2) CCl₄와 gomisin A치리에 따른 생체중 변화

CCl₄를 처리하기 4일 전부터 gomisin A 20 mg을 매일 SD (Sprague-Dawley) 흰쥐의 복강에 주사하였으며, CCl₄와 gomisin A 처리 후 체중을 측정한 결과는 그림에서 보는 바와 같다. 쥐의 체중은 처리 4일까지 거의 변화가 없었으며, 대조구, CCl₄ 처리구 및 CCl₄ + gomisin A처리구간에 체중에는 통계적인 유의차가 없었다.

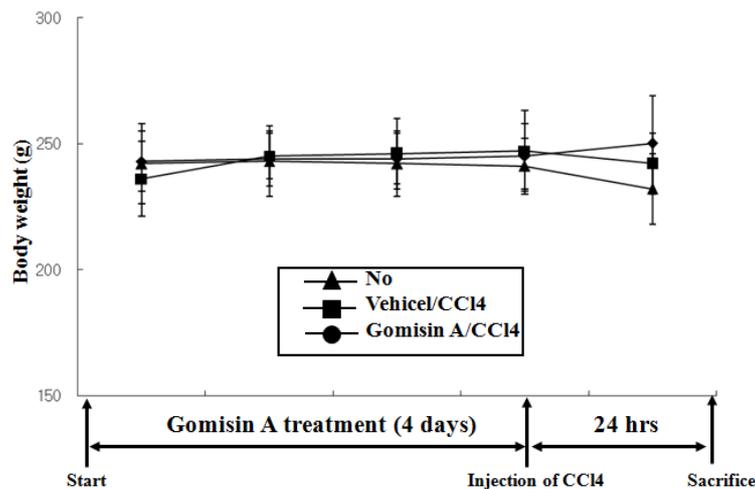


Fig. 102. Sprague-Dawley (SD) 흰쥐의 체중 변화

Gomisin A와 CCl₄처리 후에 SD (Sprague-Dawley) 흰쥐의 간, 신장, 심장 및 폐의 생체 중을 측정된 결과 간의 무게는 CCl₄를 처리하였을 때에 증가하였으며, gomisin A처리 후 CCl₄를 처리한 쥐의 간 생체중이 현저히 증가하였다. 신장 (kidney)의 생체중, 심장 (heart), 폐 (lung), 췌장 (spleen) 및 thymus의 생체중은 통계적인 유의차는 없었으나, CCl₄ 처리구에서는 약간 감소하였고, gomisin A 처리구에서는 생체중이 약간 감소하였다.

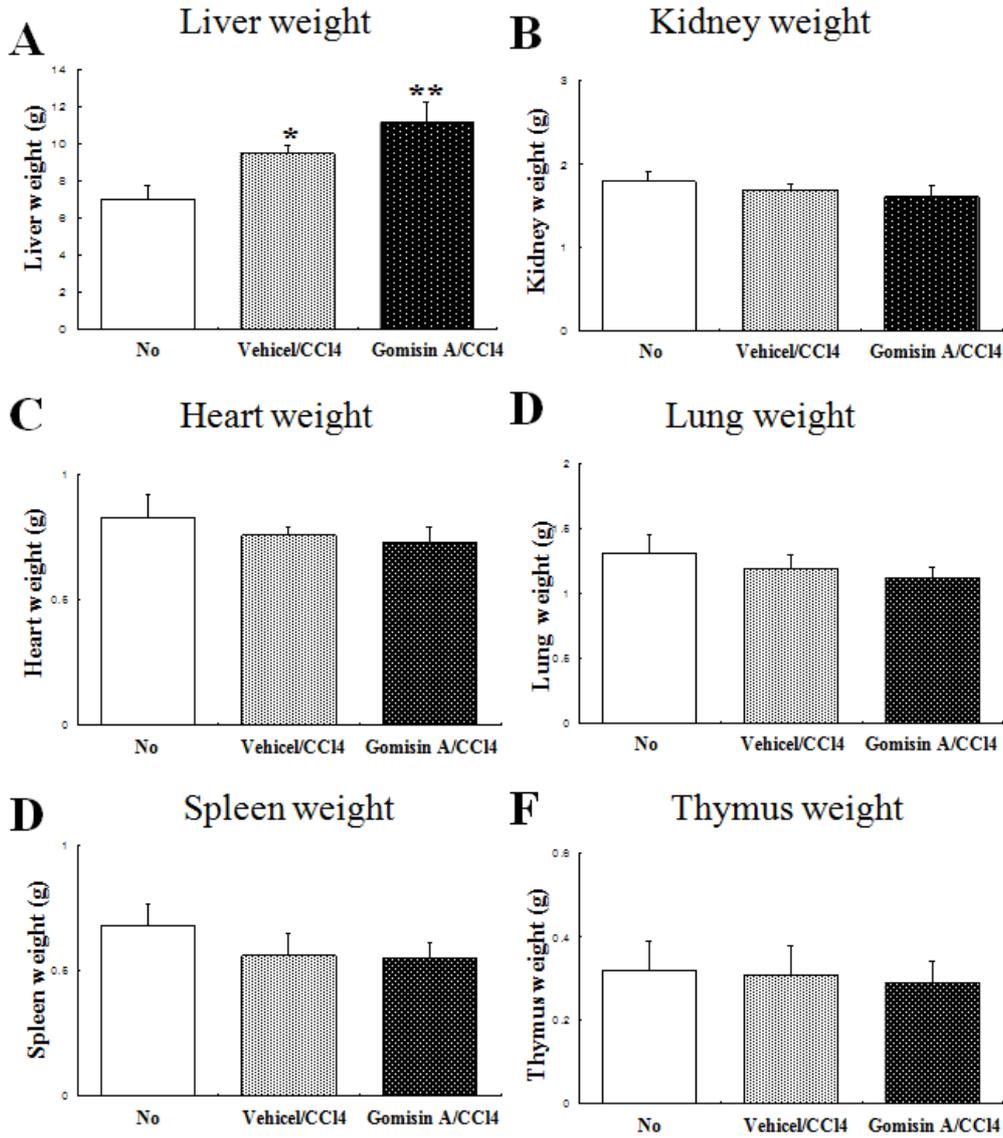


Fig. 103. Sprague-Dawley 흰쥐에 Gomisin A 처리가 간, 신장, 심장, 폐, 췌장 및 흉선의 무게에 미치는 영향

(3) 급성간염 유발 마우스에서 gomisin A의 처리에 의한 조직화학적 변화

Gomisin A의 처리가 SD 랫드의 간 조직내에 세포의 변화를 관찰하기 위하여 간의 조직학적 분석을 실시한 결과, CCl₄ 처리그룹은 세포의 괴사가 일어나 노란색으로 보였으나, gomisin A를 투여한 쥐는 괴사에 의한 노란색이 현저히 감소하였다 (그림 A). CCl₄ 그룹은 조직세포의 파괴가 뚜렷이 관찰되었으나 Gomisin A를 처리한 집단은 CCl₄에 의한 세포파괴현상이 현저히 감소됨을 관찰하였다 (그림 104).

간의 피질에 신장의 구조적 기능적 단위인 네프론 (nephron)의 구조를 관찰한 결과 CCl₄ 투여한 쥐에서는 파괴되었으나, gomisin A 처리 후 CCl₄를 처리한 쥐에서는 회복되었다.

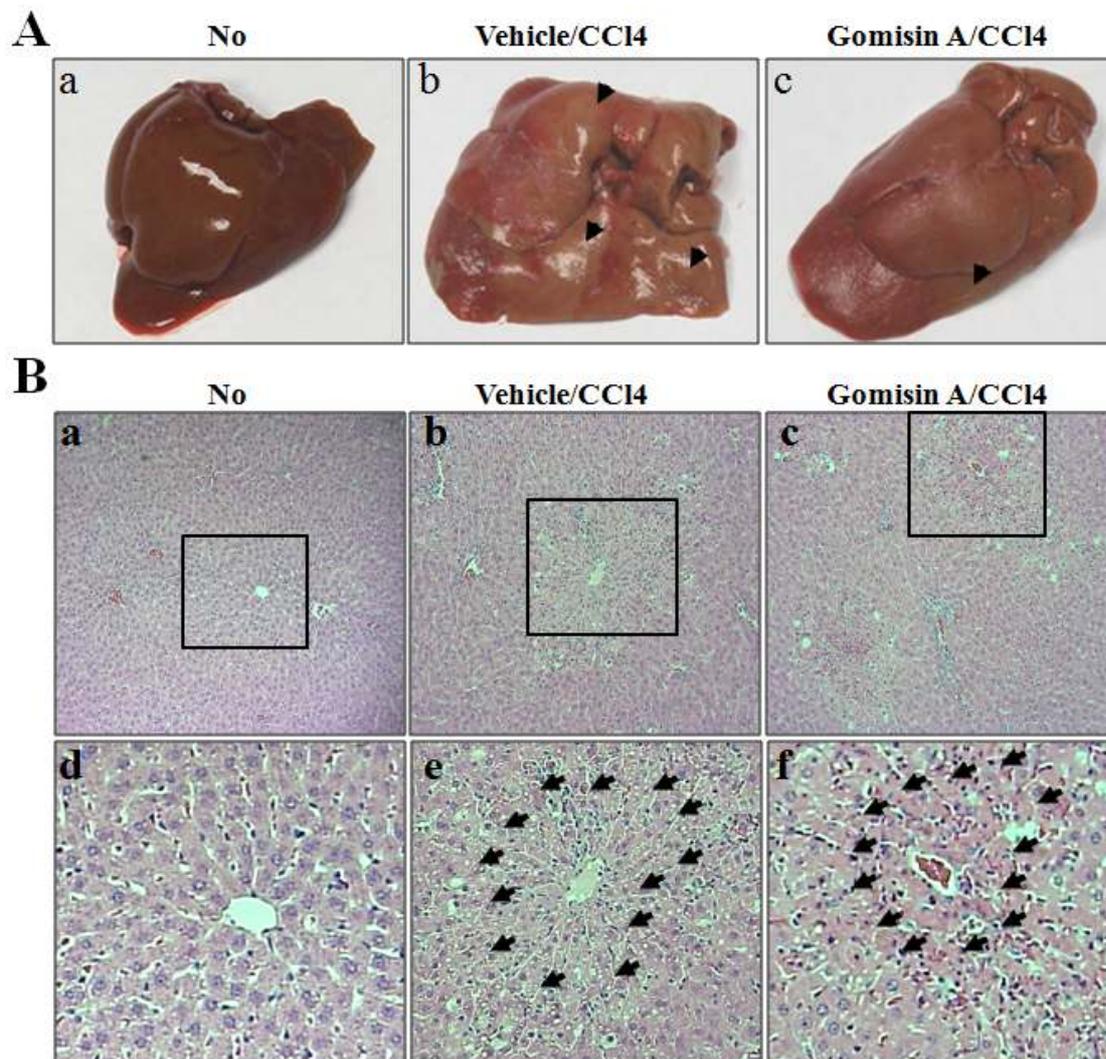


Fig. 104. Sprague-Dawley 흰쥐에 Gomisin A의 처리가 간의 조직학적 변화에 미치는 영향

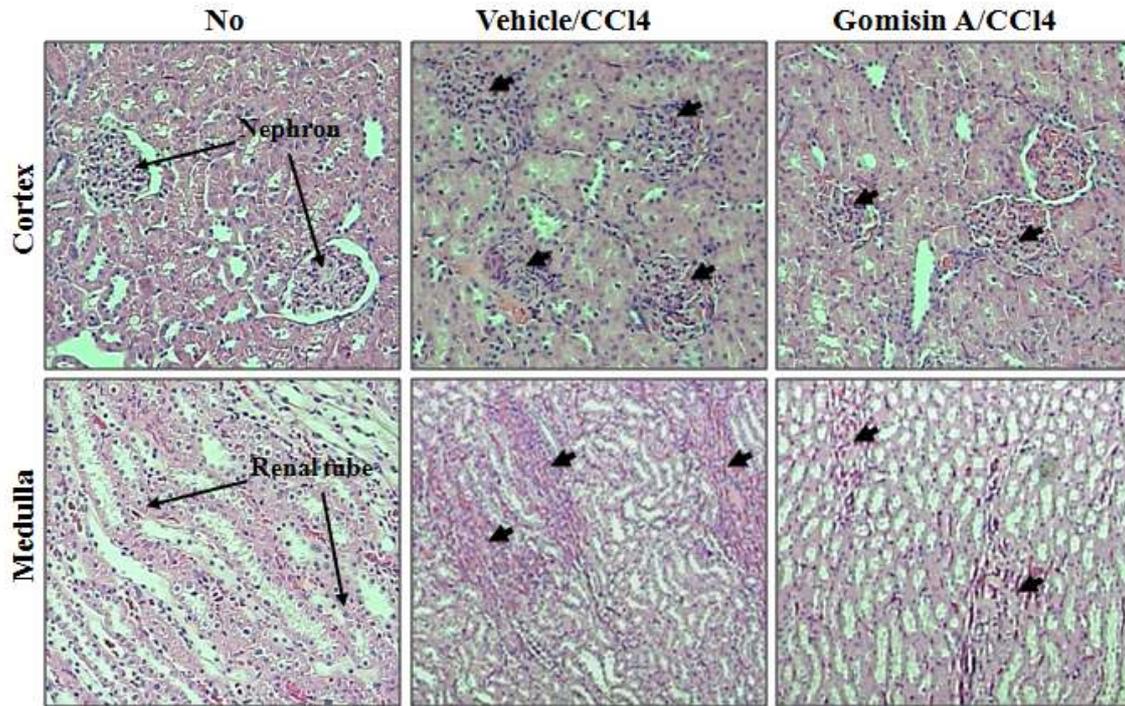


Fig. 105. Sprague-Dawley 흰쥐에 gomisin A의 처리가 간과 신장의 조직에 미치는 영향

(4) 급성 간염을 유발시킨 SD랫드서 gomisin A의 간기능 회복 효과

SD 랫드에서 CCl₄에 의하여 유발된 간독성에 Gomisin A처리가 미치는 효과 및 기전을 규명하고자 하였다. 즉 CCl₄를 0.1ml/kg의 용량으로 16시간 절식시킨 SD랫드에 복강주사하여 간손상을 유발시킨 후 gomisin A를 투여하여 혈청 ALP (Alkaline phosphatase), 간, 심장, 골격근의 손상 시 증가하는 AST (aspartate aminotransferase)와 간의 손상이 현재 있는지 여부를 나타내는 민감도를 나타내는 ALT (alkaline aminotransferase) 등을 측정하였다. AST 및 ALT는 간세포 안에 들어있는 효소로서 간세포가 파괴되거나 손상을 받으면 유출되어 혈중 농도가 증가하게 되며, 급성이나 만성간염 시 이들 수치가 올라간다. 따라서 간염의 정도를 알 수 있는 지표로 사용되고 있다. 본 연구에서는 CCl₄로 간 손상을 일으킨 SD 랫드의 증가한 혈청ALP, ALT와 AST의 활성에 대하여 gomisin A 20 mg 투여로 ALP와 ALT 활성도는 현저한 감소를 보였다. 이는 간세포의 괴사를 억제함으로써 혈청중에 유리된 transaminase를 억제한 것으로 보인다. 간장질환이나 뼈의 이상에 pH 10 정도에서 잘 나타나는 진단지표인 ALP의 활성이 낮아진 것은 gomisin A가 phosphate ester들을 가수분해하여 일어난 것으로 생각된다.

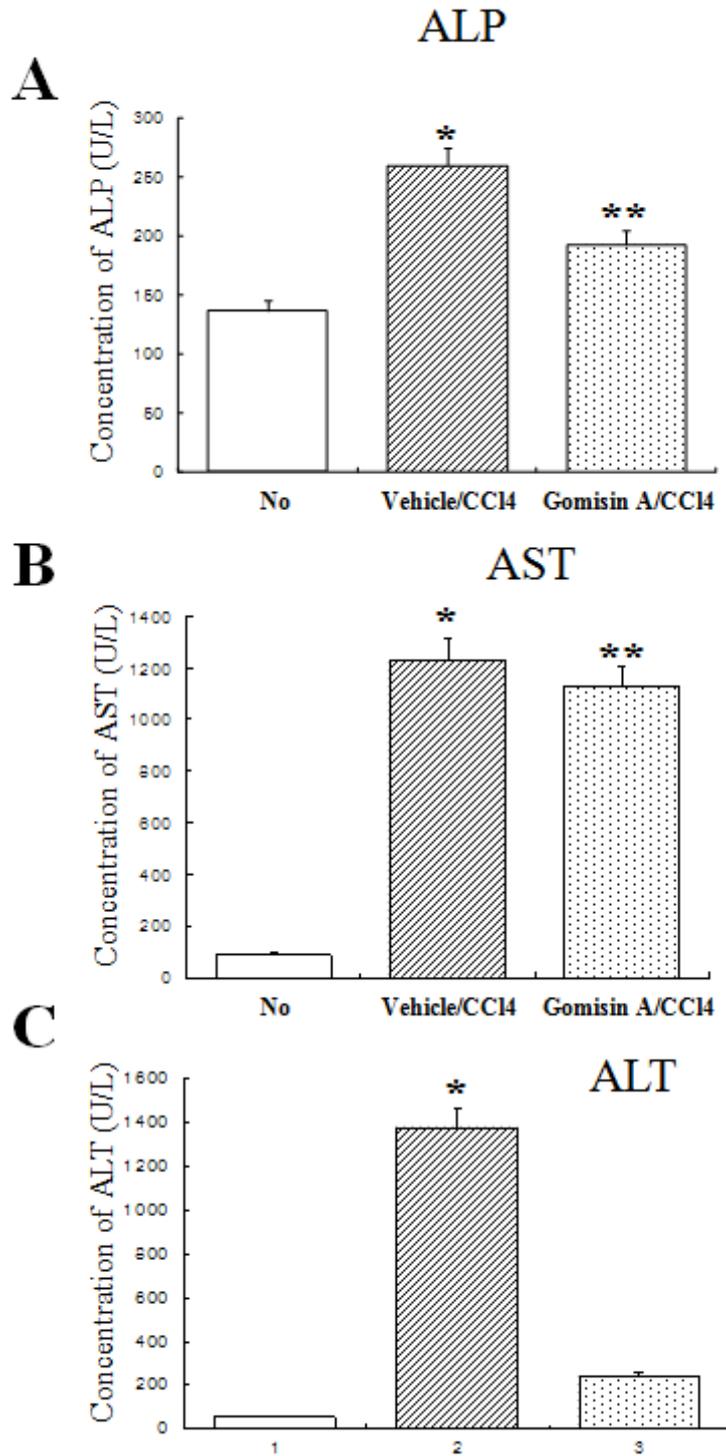


Fig. 106. Sprague-Dawley 흰쥐에 Gomisin A의 처리가 간내 ALP, AST 및 ALT의 농도에 미치는 영향

BUN (blood urea nitrogen; 혈액요소질소)은 사구체로부터 여과되어 약 40%는 세뇨관에서 재 흡수되고, 나머지가 요중으로 배설된다 (Horiguchi et al., 2001). 특히 BUN은 신장 기능 장애로 인해 신장의 배설기능이 나쁘면 혈중 요소질소의 농도가 상승하므로 신장질환 진단

의 지표가 되는데 신장 질환 때 혈중의 nitrogen retention 증가로 인한 요독증에서 효소 활성치가 현저히 증가하는 특징을 가지고 있다. 따라서 요소질소의 측정은 신장기능이 정상인지 어떤지를 알기 위한 중요한 지표가 된다. 본 실험에서 gomisin A를 투여한 SD 랫드에서 BUN이 대조군과 거의 비슷한 정도로 감소되었으며, gomisin A의 투여군이 낱 투여군에 비해 BUN의 활성이 현저히 감소된 것은 신장에서 CCl₄ 독성에 의한 신장 기능 장애를 gomisin A가 완화시킨 것으로 사료된다.

혈청 중 creatine은 크레아틴 대사 종말산물로 생리적으로는 불필요하다. 따라서 creatine은 신세뇨관에서 재 흡수없이 거의 모두가 요중으로 배설된다. 따라서 혈중 크레아티닌 측정은 신장기능이 정상인지 어떤지를 파악하는데 매우 중요하며, 크레아티닌 농도가 증가하면 증가할수록 신장장애가 크다는 것을 의미한다. 특히, 혈청 creatine의 농도는 요독증, 만성 신장염 등의 신장질환에서 증가하므로 신장기능 장애의 정도를 평가하는데 좋은 지표가 된다(Wyss & Kaddurch-Daouk, 2000). 본 실험에서는 CCl₄ 투여 후, gomisin A 투여군이 군이 현저히 감소하여 대조군과 비슷하게 낮은 효소 활성도를 나타내어 신장기능 장애를 완화시킨 것으로 사료된다.

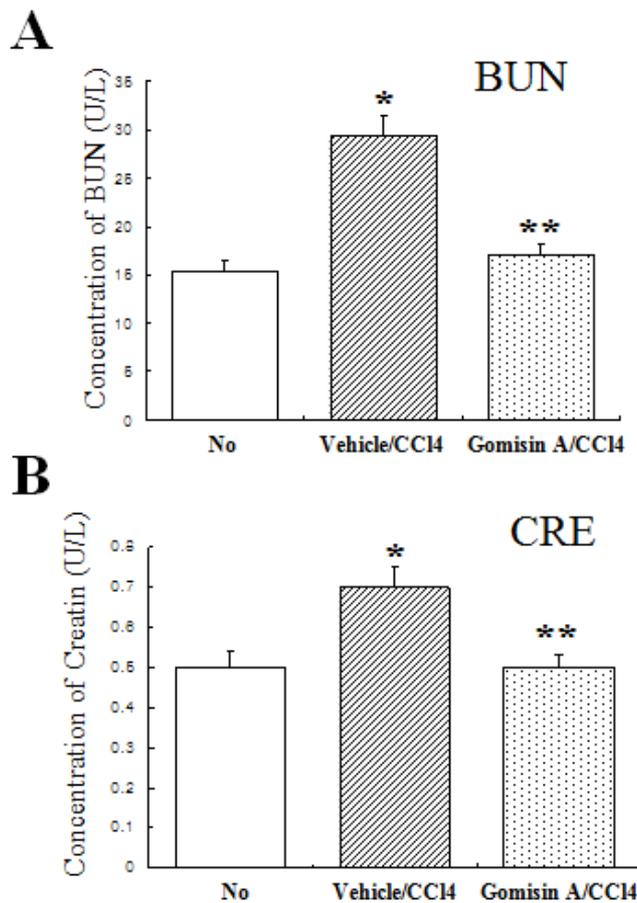


Fig. 107. Sprague-Dawley 흰쥐에 gomisin A의 처리가 신장내 BUN과 Creatine의 농도에 미치는 영향.

(4) MAP kinase에 의한 신호전달 단백질의 변화

MAPK를 경유하는 신호전달경로는 모든 진핵세포의 신호전달에서 중심적인 역할을 하는 단백질 키나아제 경로로 MAPK가 그 중심적인 인자이다. MAPK family는 세린/트레오닌 키나아제(serine/threonin kinase)로 적어도 3가지, 즉 extracellular signal-regulated kinase (ERK), JNK 및 p38로 분류된다. ERK의 활성화는 단백질 티로신 키나아제 (tyrosin kinase)와 G 단백질 연결 수용체를 통해 작용하는 성장인자에 의해 유도되는 세포증식 신호전달에서 중심적인 역할을 하는 세포의 증식과 분화를 촉진시킨다. 반면 JNK와 p38은 성장 인자뿐 아니라 여러 시토카인(cytokine)과 환경적 스트레스에 의해서도 유도되며, ERK와는 다르게 세포 성장을 억제하고 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 신생 흰쥐에서 CCl₄로 독성을 야기시켜서 간과 신장의 성장장애에서의 분자생물학적 신호전달경로를 알아보고자, 세포의 성장장애, 특히 세포자멸사와 관련된 MAPK로 알려진 JNK와 p38의 발현을 중심으로 관찰하였다.

그 결과 ERK, JNK, p38 단백질의 인산화가 CCl₄에 의해서 유의적으로 감소되었다가 Gomisin A 처리에 의해 증가되는 것을 확인하였다.

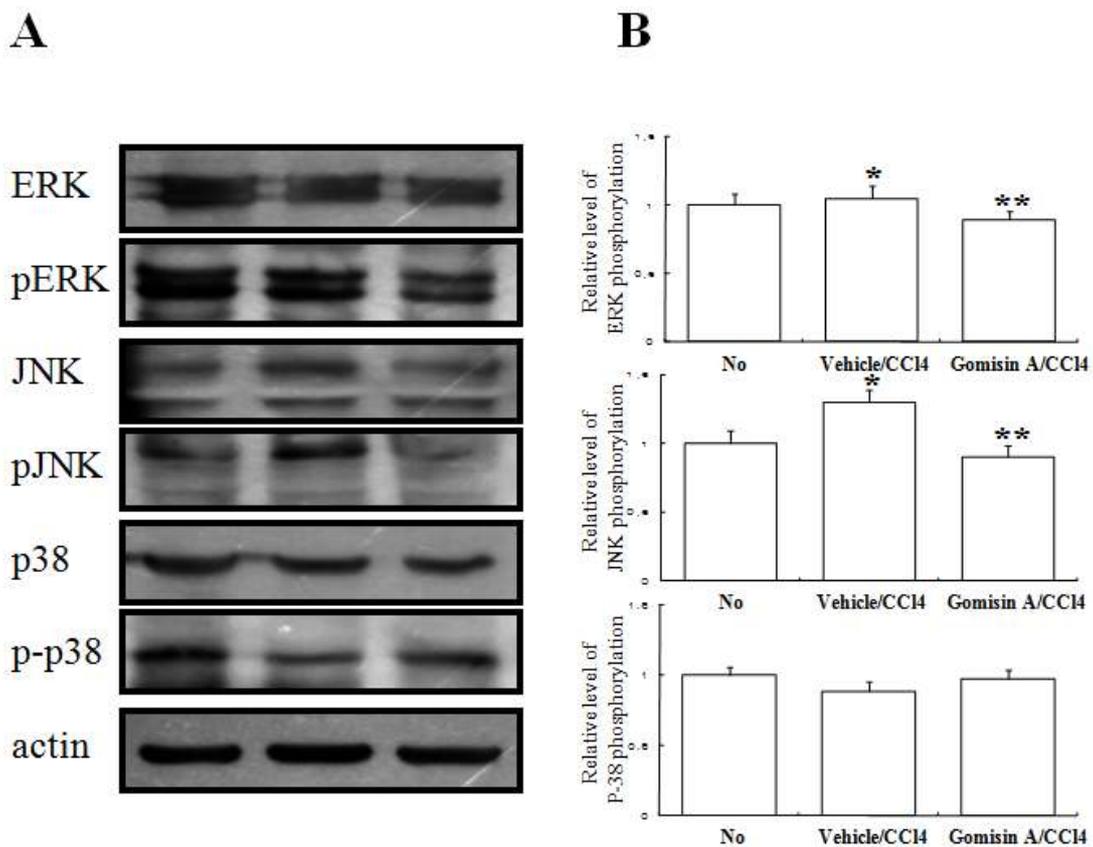


Fig. 108. Sprague-Dawley 흰쥐에 gomisin A의 처리가 신장내 ERK, JUN 및 p38의 활성화에 미치는 영향.

JNK는 주로 고장성, 자외선, 열 충격, 염증성 시토카인(proinflammatory cytokines) 등의 세포 스트레스인자(cell stressor)에 의해 유도되어 stress-activated protein kinase(SAPK1)라고도 알려져 있다. JNK는 3가지의 종류, 즉 JNK-1(p46), JNK-2(p54) 그리고 뇌 특이성의 JNK-3(p49)가 보고되고 있다. JNK를 경유하는 신호전달경로(JNK cascade)는 아직까지 완전히 이해되지는 않지만, 세포 성장 장애의 일부분을 담당하는 것으로 알려져 있고 특히 세포자멸사의 중요한 중간물로 생각되어 지고 있다 (Schaeffer et al., 1999; Bokemeyer et al., 1996; Tian et al., 2000; Xia et al., 1995; Ichijo et al., 199; Bonventre and Force, 1998)

Omori 등 (2000)은 Sprague-Dawley 흰쥐의 정상적인 신장의 발달 과정에서 MAPK family의 발현을 면역조직화학 염색과 웨스턴블롯 분석으로 관찰하였는데, 또 다른 세포자멸사와 관련된 MAPK는 p38로서 JNK와 같이 시토카인과 세포 스트레스인자에 의해 유도되어 세포 성장을 억제하고 세포자멸사를 유도하는 것(Xia et al., 1995; Ichijo et al., 199; Bonventre and Force, 1998)으로 알려져 있으나, 신장에서 서로 다른 생리적 기능을 가지는 것으로, 특히 발달하고 있는 신장에서는 서로 다르게 표현되는 것으로 생각되고 있다(Eckert et al., 2003).

MAPK family는 일반적으로 인산화가 되면서 활성화가 되므로 MAPK의 활성화 정도를 알기 위해서 인산화된 MAPK, 즉 phospho-MAPK의 발현에 대한 연구가 필요할 것이며, 또한 JNK와 p38의 효과기(effector)로 알려져 있는 activating transcription factor-2(ATF-2) (van Dam et al., 1995; Livingstone et al. 1995; Waas et al., 2001)의 발현 변화에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되며, 이를 토대로 신장의 성장과 발달에서의 MAPK의 활성화되는 경로에 대한 보다 충분한 이해가 이루어 질 수 있을 것이다.

이상의 결과로 볼 때, Gomisin A는 CCl₄에 의해 유발된 간독성을 유의적으로 개선시켜주는 효과가 있으며, 이러한 효능은 세포내 신호전달과정인 MAP kinase pathway가 관여함을 제시하고 있다.

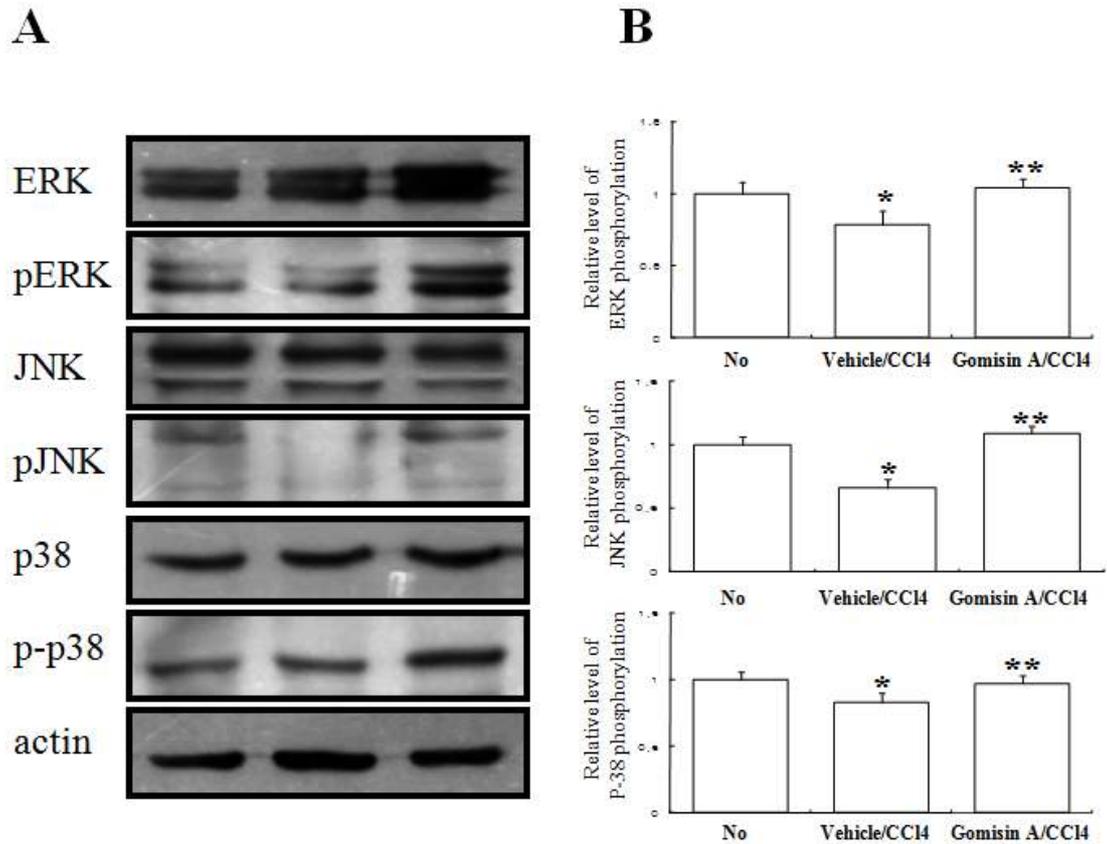


Fig. 109. Sprague-Dawley 흰쥐에 gomisin A의 처리가 간의 ERK, JUN 및 p38의 활성화에 미치는 영향.

참고문헌

최병민, 오미혜, 유기환. 신생 백서신장에서 안지오텐신 전환효소 억제제가 MAPK Family 발현에 미치는 영향에 관한 연구. Korean Journal of Pediatrics 2004. 47, No. 3, 2004

Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases : specific messages from ubiquitous messengers. Mol Cell Biol 1999;19:2435-44.

Bokemeyer D, Sorokin A, Dunn MJ. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. Kidney Int 1996;49:1187-98.

Tian W, Zhang Z, Cohen DM. MAPK signaling and the kidney. Am J Physiol Renal Physiol 2000;279:F593-604.

Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. Curr Opin Cell Biol 1997;9:180-6.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-31.

Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997;275:90-4.

Bonventre JV, Force T. Mitogen-activated protein kinases and transcriptional responses in renal injury and repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7:425-33

Omori S, Hida M, Ishikura K, Kuramochi S, Awazu M. Expression of mitogen-activated protein kinase family in rat renal development. *Kidney Int* 2000;58:27-37.

Eckert RL, Efimova T, Balasubramanian S, Crish JF, Bone F, Dashti S. p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface—a function for p38 delta. *J Invest Dermatol* 2003;120:823-8.

van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, Angel P. ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J* 1995;18:1798-811.

Livingstone C, Patel G, Jones N. ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J* 1995;18:1785-97.

Waas WF, Lo HH, Dalby KN. The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by p38 mitogen-activated protein(MAP) kinase alpha. Implications for signal/response profiles of MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 2001;276:5676-84.

마. 오미자 추출물의 항동맥경화 효과

(1) LPS로 자극한 혈관내피세포에서 오미자 hexan 추출물의 부착분자 및 사이토카인 유전자 발현 조절 효과

Adhesion molecule 발현을 감소시키는 오미자 hexan 추출물의 찾기 위해 혈관내피세포에 LPS (200 ng/ml) 처리 2시간 전에 오미자 hexan 추출물을 처리하여 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과 오미자 hexan 추출물 중에서 SCKH10, SCKH19, SCKH1PA에 의해 E-selectin의 발현이 감소되었고, SCKH19, SCKH1PA, SCKH7, SCKH9, SCKH13, SCKH17에 의해 ICAM-1의 발현이 감소되었으며 VCAM-1의 발현은 SCKH1PA에 의해서만 감소됨을 보였다 (Fig. 110).

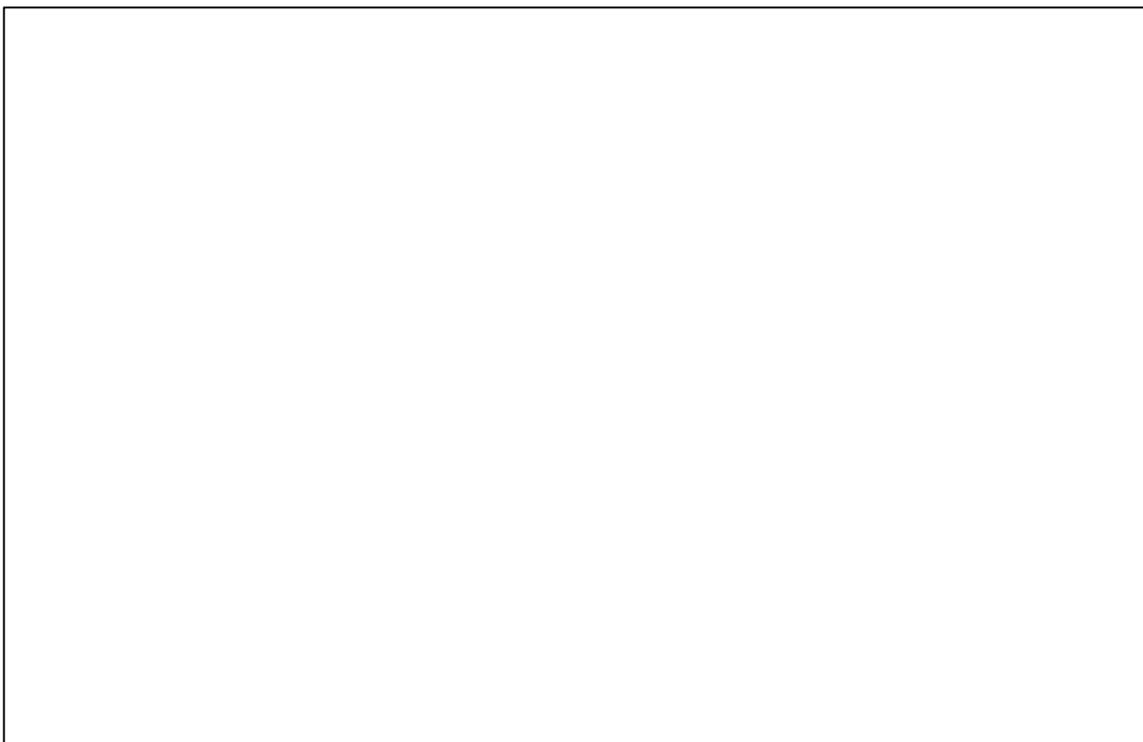


Fig. 110. The effects of hexane extracts of *S. chinensis* on adhesion molecules expression in HUVECs treated with LPS. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were incubated for 2 h after treatment with the fractions of hexane extract of *S. chinensis*, and then followed by incubation for 6 h after treatment with LPS (200 ng/ml). RT-PCR analysis for gene expression of E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 and GAPDH was performed. The density of each band was measured by a scanning densitometry. Data are expressed as ratios of adhesion molecules mRNA normalized to GAPDH mRNA and then expressed as the mean \pm SD.

특히 SCKH1PA가 혈관내피세포에서 LPS의해 유도된 세포부착분자의 발현을 감소시킨다는 사실을 확인한 후 SCKH1PA로부터 세계최초로 분리된 신물질인 SCKH1PAIBPB를 이용하여 VCAM-1, E-selectin, MCP-1, IL-6 및 IL-8의 발현조절 효과를 분석하였다. 그 결과 SCKH1PAIBPB에 의해 VCAM-1 및 E-selectin과 같은 주요 세포부착분자 뿐만 아니라 IL-6 및 IL-8과 같은 주요 염증성 사이토카인 유전자의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 111).

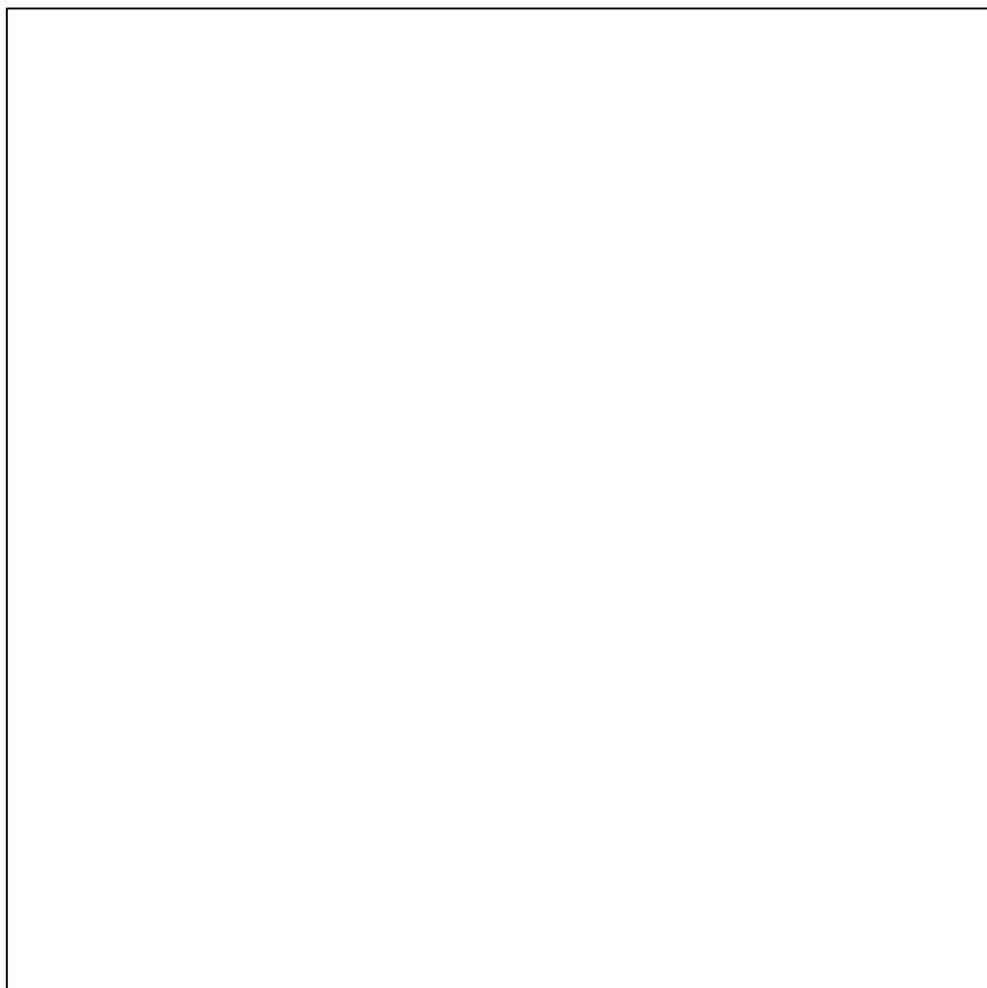


Fig. 111. The effects of SCKH1PAIBPB from hexane extracts of *S. chinensis* on VCAM-1, MCP-1, IL-6 and IL-8 expression in HUVECs treated with LPS. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were incubated for 2 h after treatment with KH1PAIBPB (1PA) from hexane extracts of *S. chinensis*, and then followed by incubation for 6 h after treatment with LPS (200 ng/ml). RT-PCR analysis for gene expression of VCAM-1, MCP-1, IL-6, IL-8 and GAPDH was performed. The density of each band was measured by a scanning densitometry. Data are expressed as ratios of VCAM-1, MCP-1, IL-6 and IL-8 mRNA normalized to GAPDH mRNA and then expressed as the mean \pm SD.

(2) 유세포분석기를 이용한 혈관내피세포 표면 부착분자 발현 분석

HUVEC 세포에 SCKH1PAIBPB를 처리한 후 6시간이 경과되었을 때 TNF- α (20 ng/ml)를 처리하고 8시간 후 유세포분석기를 이용해 HUVEC 세포의 VCAM-1 발현정도를 분석하였다. 그 결과 TNF- α 에 의해 증가한 VCAM-1의 발현이 KH1PAIBPB에 의해 감소되었다 (Fig. 112).

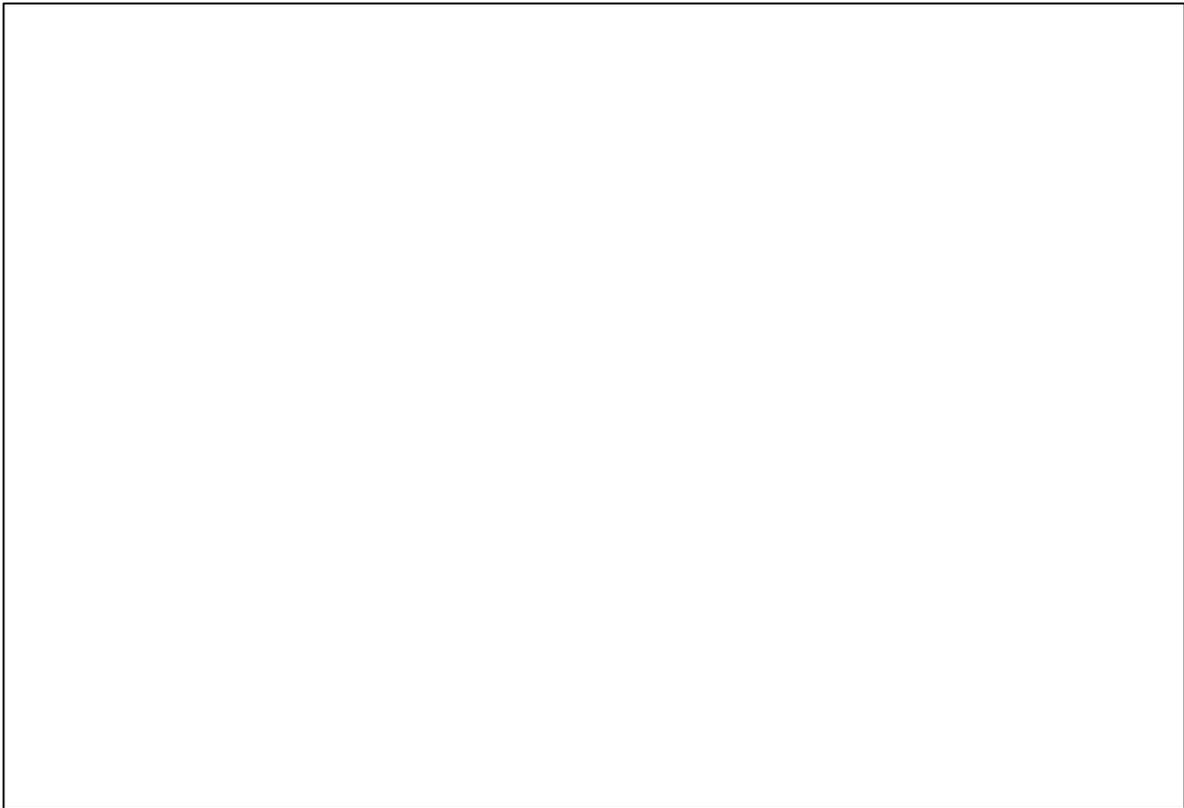


Fig. 112. Flow cytometric analysis of the effects of SCKH1PAIBPB from hexane extracts of *S. chinensis* on VACM-1 expression in HUVECs treated with TNF- α . Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were incubated for 6 h after treatment with KH1PAIBPB from henane extracts of *S. chinensis*, and then followed by incubation for 8 h after treatment with TNF- α (20 ng/ml). Data are expressed as percent VCAM-1⁺ cells.

(3) 형광현미경을 이용한 혈관내피세포 표면 부착분자 발현 분석

HUVEC 세포에 오미자 핵산 추출물을 처리한 후 12시간이 경과되었을 때 TNF- α (20 ng/ml)를 처리하고 8시간 후 형광현미경을 이용해 HUVEC 세포의 VCAM-1 발현정도를 분석하였다. 그 결과 TNF- α 에 의해 증가한 VCAM-1의 발현이 SCKH1PAIBPB에 의해 감소되었다 (Fig. 113)

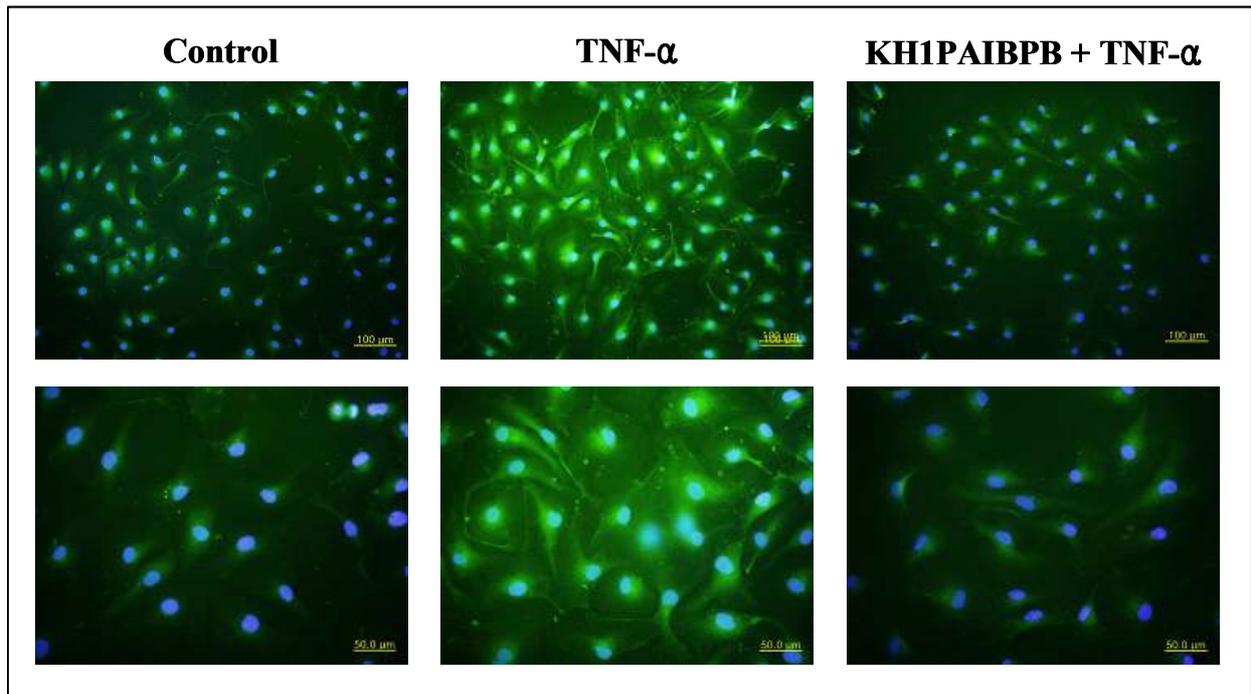


Fig. 113. Effects of KH1PAIBPB on VCAM-1 expression in TNF- α stimulated human umbilical vein endothelial cells by immunofluorescent microscopy.

(4) 혈관내피세포와 단핵세포 사이의 부착능 측정

HUVEC 세포에 오미자 헥산 추출물을 처리한 후 6시간이 경과되었을 때 LPS (200 ng/ml) 처리하고 단핵세포와 반응을 시켰다. 그로부터 4시간 후 혈관내피세포와 부착한 단핵세포의 수를 산정하였다. 그 결과 LPS에 의해 증가한 부착률이 SCKH1PAIBPB를 처리군에서 감소를 보였다 (Fig. 114).

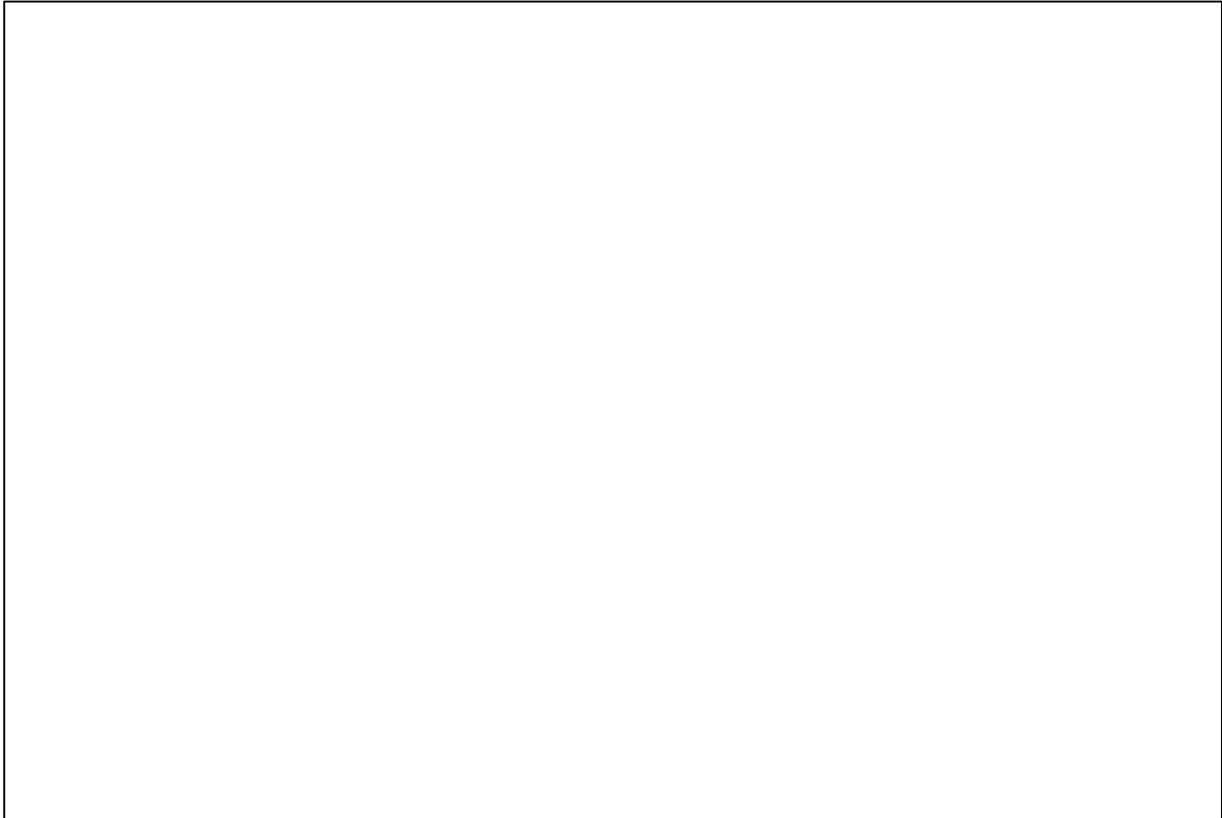


Fig. 114. The effect of *S. chinensis* on U937 monocyte adhesion in LPS-stimulated HUVECs. Cells were pretreated with KH1PAIBPB from hexane extracts of *S. chinensis* for 2 h followed by the LPS (200 ng/ml) for 4 h. The number of adherent monocytes to HUVECs was determined by cell counting. Data are expressed as the mean \pm SD.

(5) 적 요

오미자의 추출물 중 gomisin N, gomisin J, SCKH7, SCKH9 등은 혈관내피세포의 증식을 촉진하였고 SCKH7과 SCKH9는 혈관내피세포의 생존능을 증가시켰다. LPS로 자극한 혈관내피세포에서 오미자 핵산 추출물 중 SCKH10, SCKH19 및 SCKH1PA는 E-selectin의 발현을 감소시켰고, SCKH19, SCKH1PA, SCKH7, SCKH9, SCKH13 및 SCKH17은 ICAM-1의 발현을 감소시켰으며 SCKH1PA는 VCAM-1의 발현을 억제하였다. 또한 SCKH1PA는 MCP-1, IL-6 및 IL-8의 발현도 감소시켰으며 혈관내피세포와 단핵세포 간의 부착능력도 감소시켰다. 특히 SCKH1PA로부터 세계최초로 분리된 신물질인 SCKH1PAIBPB에 의해 VCAM-1 및 E-selectin과 같은 주요 세포부착분자 뿐만 아니라 IL-6 및 IL-8과 같은 주요 염증성 사이토카인 유전자의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었으며, 동맥경화증의 발병기전에 가장 중요한 매개인자로 알려진 VCAM-1 유전자 및 단백질의 발현을 매우 유의하게 억제한다는 중요한 사실을 증명할 수 있었다. 그리고 SCKH1PAIBPB은 혈관내피세포와 단핵세포 사이의 부착능력도 감소시켰다.

따라서 이와 같은 오미자 추출물의 혈관내피세포 증식능 및 생존능 향상작용, 항염증효과 그리고 혈관 이완 유도 작용을 응용하여, 동맥경화 및 고혈압 등과 같은 심장혈관 질환의 치료 또는 예방 의약학 분야에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

바. Schisandrin C에 의한 인체 혈구암세포의 세포사멸 및 G1 arrest 유도

재료 및 방법

(1) 오미자로부터 순수분리한 schisandrin과 schisandrin C의 구조

오미자로부터 순수분리한 schisandrin과 schisandrin C의 구조는 제 2 세부과제의 물질분리 및 구조동정 과제에서 설명하였으며, 순수분리한 물질의 구조 (Fig. 115) 및 순도 (Fig. 116)는 다음의 그림에서 표시하였는데, 두 종류의 리그난 모두 약 96% 이상의 순도를 나타내었다.

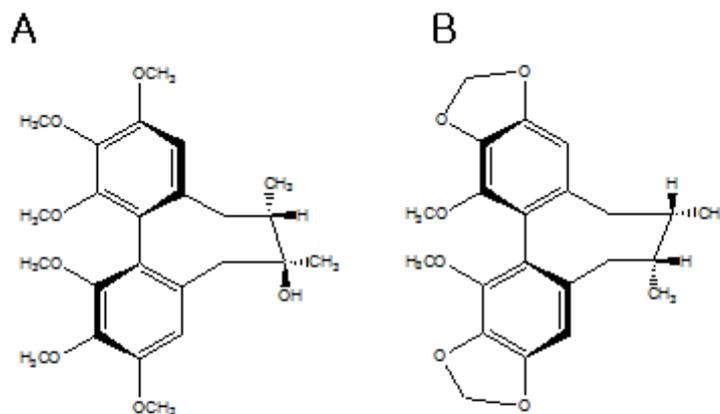


Fig. 115. Chemical structures of schisandrin (A) and schisandrin C (B) from *Schisandra chinensis*. Bail.

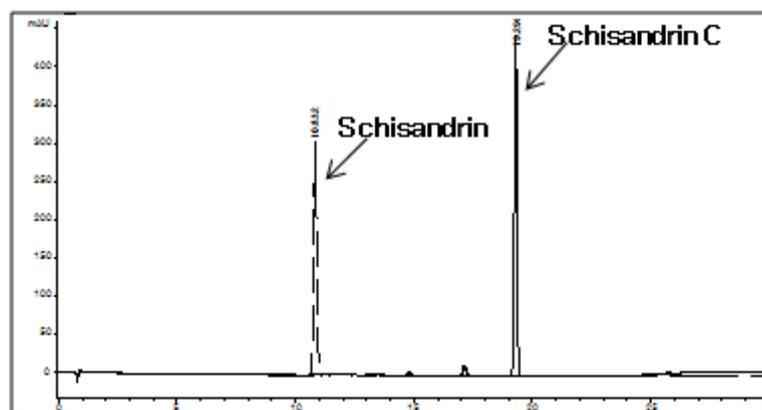


Fig. 116. HPLC profile of schisandrin and schisandrin C from *Schisandra chinensis*. Bail. HPLC analysis showed the isolated lignans had a purity of more than 96%.

(2) 암세포의 배양

실험에 사용한 U937 인체혈구암세포는 생명공학연구소 (KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C의 조건하에서 배양하였다.

(3) MTT assay에 의한 세포 증식억제 조사

세포 배양용 6 well plate에 5×10⁴개/ml 정도로 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 schisandrin과 schisandrin C를 적정농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 적정량 분주하고 3시간 동안 CO₂ incubator에서 배양시킨 다음 DMSO로 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다.

(4) DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

정상 및 schisandrin과 schisandrin C을 각각 처리한 배지에서 48시간 동안 배양시킨 세포를 모아서 PBS로 충분히 씻은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상층액만 버리고 남은 세포를 PBS로 잘 부유시키고, 차가운 ethanol을 첨가하여 4°C에서 한 시간동안 고정시켰다. 고정된 세포들을 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/ml; Sigma)와 10 k unit의 RNase (Sigma)를 처리하여 암실, 4°C에서 1시간 동안 염색하였다. 다시 PBS로 두 번 washing 과정을 거친 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) program을 사용하여 분석하였다.

(5) SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

정상 및 schisandrin과 schisandrin C가 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4°C에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 ECL (Enhanced Chemi Luminescence) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

(6) *In vitro* caspase-3, -8 및 -9의 activity 측정

Caspases의 활성 정도가 schisandrin과 schisandrin C 처리에 의하여 어떠한 변화를 유발하는지 알아보기 위하여 정상 및 schisandrin과 schisandrin C가 처리된 배지에서 48시간 배양된 세포를 모은 뒤 상기와 동일한 방법으로 단백질을 추출하고 정량하였다. 이렇게 준비된 단백질 150 μ g에 fluorogenic peptide 기질 100 μ M이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 μ l을 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 μ l가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고 caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 빛을 차단한 다음 3시간 동안 incubation 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

(1) Schisandrin과 schisandrin C U937 세포의 증식 억제

U937 백혈병 세포의 증식에 미치는 schisandrin과 schisandrin C의 영향을 조사하기 위하여 MTT assay로 비교하였다. Fig. 2은 다양한 농도의 schisandrin과 schisandrin C 처리 48 시간 후의 결과로서 세포주에서 schisandrin C는 처리 농도 의존적으로 증식 억제 효과를 관찰할 수 있었으나, schisandrin은 세포증식 억제효과가 없었다. 이러한 암세포의 증식 억제 효과는 schisandrin C의 농도 증가에 따른 심한 형태적 변형과도 연관성이 있었다 (Fig. 117).

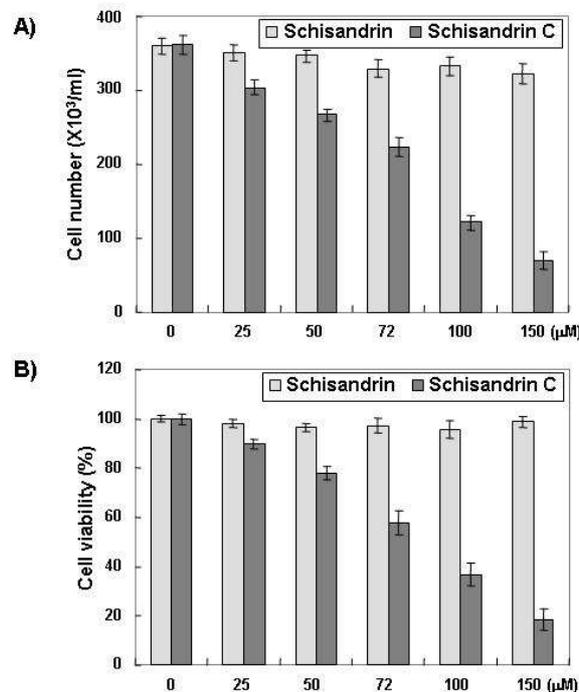


Fig. 117. Growth inhibition of Human leukemic cells (U937) after treatment with schisandrin and schisandrin C (A). Human leukemic cells (U937) were plated at 1×10^5 cells per 60 mm plate, and incubated for 24 hr. The cells were treated with various concentrations of schisandrin and schisandrin C for 48 hr. The growth inhibition was measured by the metabolic-dye-based MTT assay (B). Results are expressed as the means \pm S.E. of three independent experiments.

(2) Schisandrin과 schisandrin C에 의한 세포 생존율 억제 및 apoptosis 유발

U937 인체혈구암세포의 오미자로부터 순수분리한 schisandrin과 schisandrin C이 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 U937 세포에 schisandrin과 schisandrin C를 48시간 동안 처리한 후, trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 계수하였다. Fig. 118에 나타낸 바와 같이 schisandrin C의 농도가 증가될수록 U937 세포의 생존율은 대

우 감소되었다. Schisandrin과 schisandrin C의 처리에 의한 U937 세포의 생존을 저하가 apoptosis 유발과 상관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI staining을 실시하여 핵의 형태를 조사하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 schisandrin과 schisandrin C가 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 U937 세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 schisandrin C가 처리된 세포의 경우, 염색질 응축(chromatin condensation)에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body의 출현이 schisandrin C 처리 농도 의존적 증가되었다. 이는 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과[5]이므로 schisandrin C의 처리에 의한 암세포의 생존을 저하는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 따라서 schisandrin C 처리에 따른 U937 세포의 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 비교 평가하기 위하여 동일한 조건으로 배양된 세포들을 대상으로 flow cytometry 분석을 통한 세포주기의 sub-G1기에 해당되는 세포들의 빈도를 조사한 결과는 Fig. 118 C에 나타낸 바와 같다.

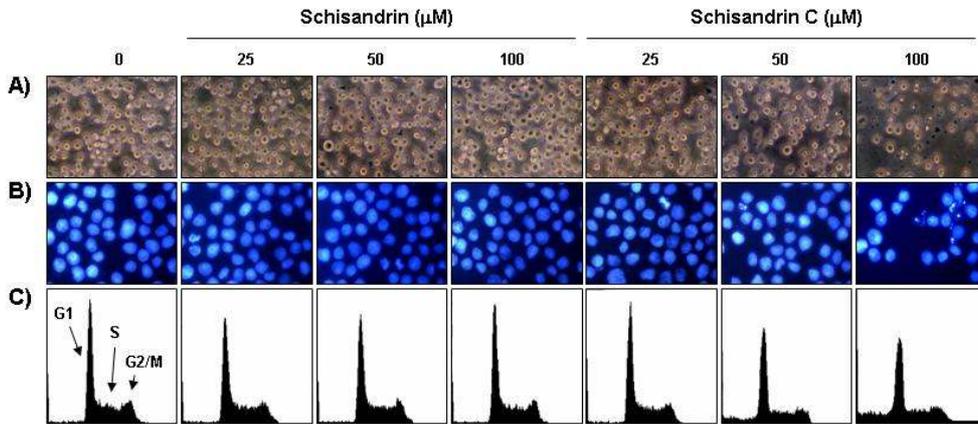


Fig. 118. Effects of schisandrin and schisandrin C on cell cycle distribution of U937 cells. Exponentially growing cells were treated for 48 hr with indicated concentrations of schisandrin and schisandrin C. The cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry. Arrows mean the frequency sub-G1 cell population. Results are expressed as average from two separate experiments.

Table. 19. Fractions of each cell cycle phase of U937 human leukemic cells cultured in the presence or absence of various concentration of schisandrin and schisandrin C for 48 hr.

Concentration (μ M)	Number of cells (%)		
	G1	S	G2/M
0	54.91	24.02	21.07
Schisandrin			
25	54.61	23.78	21.61
50	54.70	23.31	21.99
100	55.76	23.24	21.00
Schisandrin C			
25	56.41	22.97	20.62
50	57.89	21.50	20.64
100	69.88	16.15	13.97

(3) Schisandrin과 schisandrin C에 의한 U937 세포의 G2/M arrest

다음은 schisandrin과 schisandrin C의 암세포 증식억제 현상이 특정 세포주기 교란 현상과의 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 PI 염색 후 flow cytometry 분석을 실시한 결과는 Fig. 118에 나타낸 바와 같다. Fig. 118의 결과에서 sub-G1기를 제외한 나머지 세포군을 대상으로 세포주기 각각의 시기에 해당되는 세포의 빈도를 정량화한 결과는 Table 19에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 정상 조건에서 배양된 U937 세포의 경우 G1기에 해당되는 세포의 빈도가 약 55% 정도인데 비하여 S 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 각각 약 24% 및 21% 정도였다. 그러나 schisandrin C가 처리된 배지에서 배양된 U937 세포의 경우 S기 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도가 schisandrin C 처리 농도가 증가할수록 매우 감소되어 각각 16%와 14%로 나타났으며, G1기에서는 증가되어 약 70%로 나타났다. 그러나 schisandrin처리시 처리농도간의 세포주기는 차이가 없었다.

(4) p21 등의 발현에 미치는 schisandrin과 schisandrin C의 영향

다음은 schisandrin과 schisandrin C의 처리에 의해 유발되는 U937 혈구암세포에서의 apoptosis가 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절억제 인자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 전체적인 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 p21의 발현에 미치는 schisandrin과 schisandrin C의 영향을 조사하였다. Fig. 119의 결과에서 볼 수 있듯이 p21의 전사 수준에서 schisandrin and schisandrin C의 처리에 따른 발현의 증가가 관찰되었다.

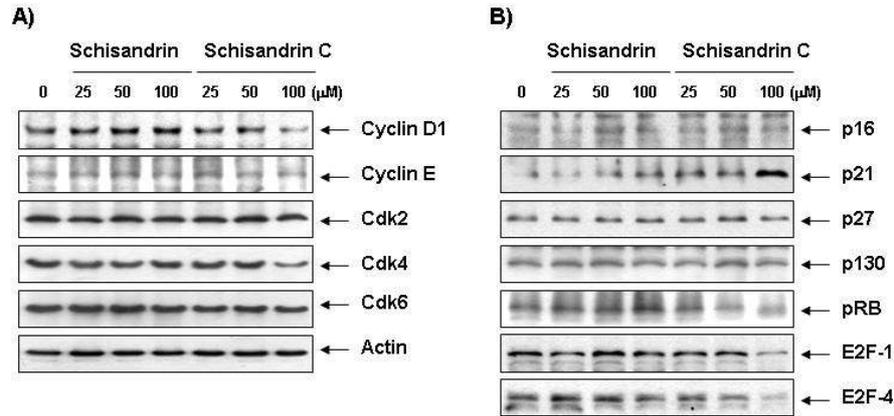


Fig. 119. Induction of p16, p21 and p27 by schisandrin and schisandrin C treatment in human leukemic cells. (A) After 48 hr incubation with schisandrin and schisandrin C. The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-p16 and anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

(5) DNA 단편화

Schisandrin과 schisandrin C가 세포사멸을 유도함에 있어서 DNA 단편화를 형성하는 지를 관찰하기 위해 schisandrin and schisandrin C를 처리한 U 937 세포로부터 DNA를 분리하여 DNA 단편화 형성을 살펴보았다 (Fig. 120). 그 결과, schisandrin C 농도를 25 μM로 처리한 경우 뚜렷한 DNA 단편화를 확인할 수 없었으나 100 μM 처리한 경우 DNA laddering이 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, Hoechst 염색의 결과처럼 schisandrin 처리는 DNA가 단편화되지 않았으나 schisandrin C에서는 현저한 DNA 단편화가 관찰되었다. Jayaprakasha 등의 bromide staining을 통한 *Poncirus trifoliata* (L.) Raf의 추출물을 처리한 대장암 세포주(colon cancer, HT-29)에서 세포사멸이 관찰된 것과 Yi 등의 탕자 과육 열수 추출물로부터 농도 증가에 따른 전골수성 백혈병 세포의 세포사멸체 형성 증가와 DNA 단편화의 증가 등에 의한 연구 결과들도 본 연구 결과와 유사함을 나타낸 결과와 마찬가지로 오미자로부터 순수분리한 schisandrin C가 암세포의 DNA 단편화를 유발함을 확인할 수 있었다.

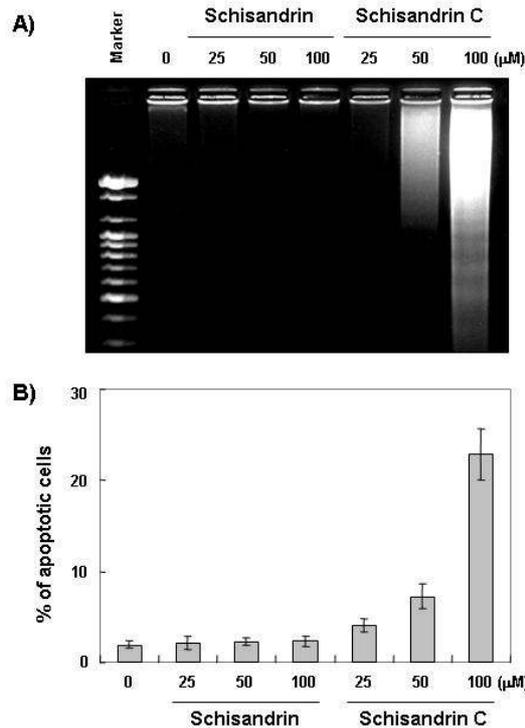


Fig. 120. DNA ladder pattern formation in the U937 leukemia cells after treatment with schisandrin and schisandrin C. After schisandrin and schisandrin C treatment for 24 hr, the cells were collected and DNA was extracted. The DNAs were separated on 1.5 % agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with EtBr.

(6) TRAIL, DR4, DR5, Fas 및 FasL의 발현에 미치는 schisandrin과 schisandrin C의 영향

외재적 경로를 통한 apoptosis 과정에 있어서 중요한 역할을 하는 죽음의 수용체에 속하는 유전자들의 발현 변화를 관찰한 결과, Fig. 121에 나타난 바와 같이 schisandrin C를 처리하였을 때에 TRAIL, DR4, DR5 및 FasL의 발현이 단백질 수준에서 감소하였다.

외재적 경로를 통한 apoptosis에 있어서 죽음의 수용체에 속하는 유전자들 중, TRAIL은 DR4 및 DR5와 결합하고 FasL는 Fas와 결합함으로써 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 죽음의 수용체에 속하는 단백질들이 schisandrin과 schisandrin C 처리에 의하여 어떠한 변화가 유발되는지를 확인한 결과, Fig. 121에서와 같이 schisandrin C 처리시에 TRAIL, DR4, DR5 및 FasL의 발현이 감소하는 것으로 나타나 apoptosis 유발은 외재적 경로가 어느 정도 관여하는 것으로 생각되어진다.

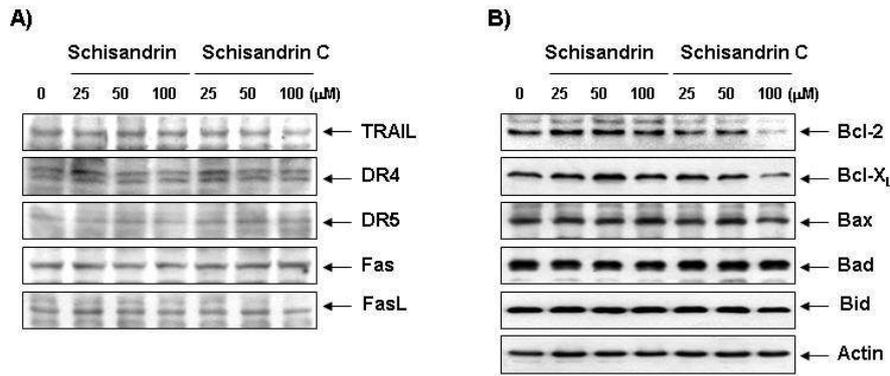


Fig. 121. Effect of schisandrin and schisandrin C treatment on IPA family protein in U937 human leukemic cells. Cells were incubated with schisandrin and schisandrin C for 48 hr, lysed and cellular proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-Bax and anti-Bcl-2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

상기의 결과들에서 알 수 있듯이 schisandrin C가 함유된 배지에서 자란 혈구암세포의 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 schisandrin C 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 대표적인 유전자산물들의 발현 변화여부를 조사하였다.

Apoptosis 현상을 매개하는 대표적인 유전자인 Bcl-2/Bax family 중 apoptosis 유발을 억제하는 anti-apoptotic 분자인 Bcl-2 및 apoptosis 유발을 촉진하는 pro-apoptotic 분자인 Bax는 밀접한 연관성을 가지고 있다 (Jurgensmeier et al., 1998; Antonsson and Martinou, 2000). 이들 두 유전자는 mitochondria로부터 cytochrome C를 유리시켜 종양억제 유전자인 P53, caspase 및 DNA 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다 (Antonsson and Artino, 2000; Reed, 1998; Rosse et al., 1998). 이들 유전자는 서로 dimer를 이루고 있는데 발현 수준의 변화가 일어나면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다 (Antonsson and Martinou, 2000; Lenza et al., 1999). 따라서 오미자로부터 순수분리한 schisandrin과 schisandrin C에 의한 인체 혈구암세포의 apoptosis 유발과정에 Bcl-2/Bax family의 관련 여부를 조사하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 schisandrin C를 처리하였을 경우에 U937세포에서는 조사된 Bax 및 Bax family에 속하는 Bad, Bcl-2 및 Bcl-2 family에 속하는 Bcl-X_{S/L} 단백질의 변화에서 Bcl-2의 발현 감소만이 두드러진 현상이었으며, 나머지 단백질의 발현에는 약간 감소하였다. 따라서 U937 세포에서 schisandrin C 처리에 의한 apoptosis의 유발에 Bcl-2 family가 중요한 역할을 하고 있으며, Bcl-xL의 감소나 Bax의 증가보다는 Bcl-2의 발현 감소에 따른 Bax의 상대적 발현 증가로 인한 apoptosis 유발 관련 인자들의 활성화가 이루어지고 있음을 시사하여 주는 것이다.

(7) Caspase-3 선택적 저해제가 schisandrin C에 의한 apoptosis에 미치는 영향

한편 ICE/CED-like protease family인 caspase는 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로서 작용하는데 [Antonsson and Martinou, 2000; Chiarugi, 1994; Nagata, 1997], 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 존재하며, Bcl-2/Bax family 발현의 변화에 따라 이들의 활성화가 조절되는 것으로 알려져 있다 [Antonsson and Martinou, 2000; Chiarugi, 1994; Miyashita and Reed, 1995]. 따라서 지금까지 알려진 caspase 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여 주는 caspase-3 (CPP32)의 발현 정도를 서로 다른 농도의 schisandrin과 schisandrin C가 처리된 혈구암세포를 대상으로 조사하였다.

다음은 Apoptosis 유발에서 가장 핵심적인 역할을 하는 caspases 중에서 가장 대표적인 caspase-3, -8 및 -9의 발현 및 활성화에 미치는 schisandrin과 schisandrin C의 영향을 조사한 결과, Fig. 122에서 나타난 바와 같이 initiator caspase인 caspase-8 및 -9의 경우는 schisandrin 처리에 따른 큰 변화가 관찰되지 않았지만, schisandrin C를 처리하였을 경우에는 농도가 높을수록 감소하였다. Effector caspase로 알려진 caspase-3의 경우는 schisandrin C의 처리 농도가 높았을 때에 활성형 단백질의 발현이 감소되었다.

오미자로부터 순수분리한 schisandrin과 schisandrin C에 의한 apoptosis 유발의 생화학적 증명을 위하여 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 표적 단백질인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) [Decker and Muller, 2002; Kaufmann 등, 1993; Lieberthal 등, 1998]의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 특정 내, 외부 신호전달에 의하여 세포 내에서 apoptosis가 일어나면 PARP 단백질의 분해가 수반되며, 그 결과 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편을 관찰할 수 있다[Kaufmann 등, 1993; Lieberthal 등, 1998]. 특히 PARP는 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며 [Tewari 등, 1995], apoptosis의 과정 중 caspase의 활성화에 의해 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다 [Decker and Muller, 2002; Tewari 등, 1995]. 이를 확인하기 위하여 48시간 동안 정상 및 schisandrin과 schisandrin C이 함유된 배지에서 자란 암세포에서의 PARP 발현을 조사한 결과, Fig. 7에서 볼 수 있듯이 정상과 schisandrin 배지에서 배양된 세포들의 경우 116 kDa 위치에 강한 주 band를 볼 수 있었다. Schisandrin C가 처리된 배지에서 배양된 세포의 경우 고농도에서 85 kDa 위치에서 발현되는 band는 관찰할 수 있었으나 PARP 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다. Fig. 7에서 알 수 있듯이 schisandrin C의 처리에 의하여 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 PARP의 발현은 감소되었거나 또는 단편화가 유발되었다. 이는 schisandrin C 처리에 따른 caspase-3의 활성 감소가 apoptosis 유발에 직접적인 관련이 있음을 의미하는 것이다.

이상의 결과에서 schisandrin C에 의한 U937 인체혈구암세포의 성장억제는 apoptosis 유발과 깊은 상관성이 있었으며, schisandrin C에 의한 인체혈구암세포의 apoptosis 유발에는 Bcl-2 유전자의 발현 감소 및 Bax 유전자 발현의 증가에 의한 caspase-3의 활성화에 의한 것으로 요약될 수 있었다. 이러한 결과는 세포주기 조절 양성 인자인 cyclins 및 Cdks의 발현 억제와 종양억제 유전자 p21의 발현 증가에 따른 Cdk inhibitor p21 및 p27 발현의 증가 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 특이 유전자들의 발현과 연관된 암세포의 성장억제는 본 결과에서 제시한 몇 가지 유전자들의 발현 조절을 통하여 apoptosis를 유발시킬 것으로 추측되어

진다. 그러나 schisandrin의 정확한 항암 효과의 조사를 위해서는 보다 다양한 세포증식억제 기전해석이 추가적으로 실시되어야 할 것이다.

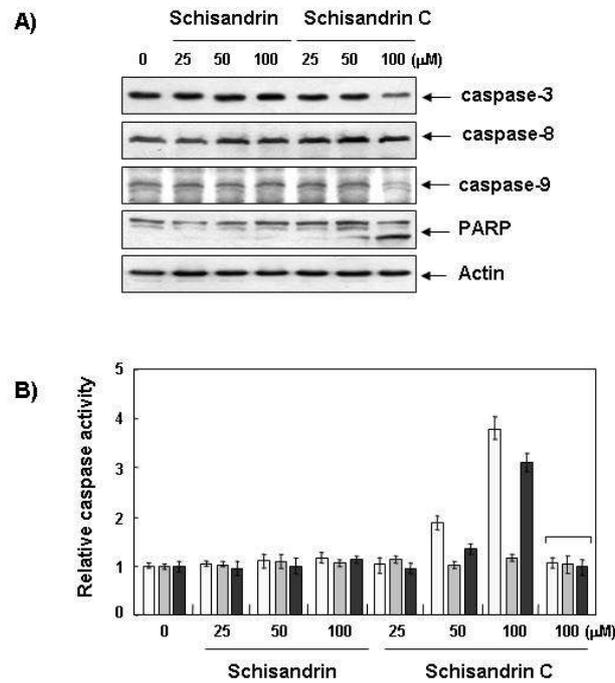


Fig. 122. Effects of schisandrin and schisandrin C treatment on the levels and activities of caspases in Human leukemia cells (U937). (A) U937 cells were treated with indicated concentrations of schisandrin and schisandrin C for 48 hr, collected and then lysed. The cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) Cells grown under the same conditions as (A) were collected and then lysed. Aliquots (150 μg proteins) were incubated with DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for caspase-3, -8, -9 and PARP activity, respectively, at 37°C for 3 hr. The released fluorescent products were measured. The data shown are means \pm SD of three independent experiments.

이상의 결과에서 schisandrin C에 의한 U937 세포의 apoptosis에 caspase-3이 매우 중요한 역할을 할 것으로 나타났기 때문에 caspase-3의 활성을 억제할 경우 schisandrin C에 의해 유발되는 apoptosis에 어떠한 변화가 나타나는지의 여부를 조사하였다. 먼저 DAPI 염색을 이용하여 핵의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 123에서 나타난 바와 같이, 정상배지에서 자란 U937 세포의 경우는 핵의 형태가 정상으로 염색된 반면에 schisandrin C가 처리된 배지에서 자란 암세포의 경우는 전형적인 apoptotic body가 관찰되었다. 그러나 caspase-3 선택적 저해제인 z-DEVD-fmk를 1시간 선처리하였을 경우 정상배지에서 자란 세포와 마찬가지로 apoptotic body가 관찰되지 않았다. 이는 U937 혈구암세포에서 schisandrin C에 의하여 유발

되는 apoptosis에 있어서 caspase-3이 매우 중요한 역할을 하고 있음을 확인시켜 주는 결과로 생각된다.

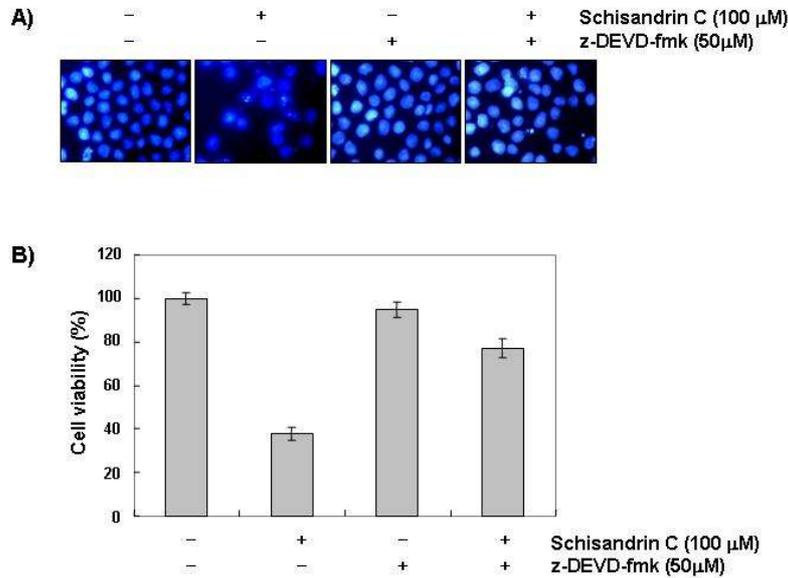


Fig. 123. Caspase-3 inhibitor, z-DEVD-fmk, alleviated schisandrin C-induced apoptosis in Human leukemia cell lines (U937). U937 cells were pretreated for 1 hr with or without z-DEVD-fmk (50 μM), and then with schisandrin C (100 μM) for additional 48 hr. The cells were stained with DAPI for 10 min and photographed with a fluorescence microscope using a blue filter. Magnification, × 400. Caspase-3 activity (B) was determined using manufacturer's protocol and a flow cytometer after 48 hr in the presence of the caspase-3 inhibitor z-DEVD-fmk (50 μM) for 1 hr before schisandrin C (100 μM) treatment. Data are expressed as mean±SD of three independent experiments.

이상의 결과에서 schisandrin C에 의한 인체 혈구암세포인 U937 세포에서의 증식억제 및 형태 변화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있었으며, 이러한 apoptosis 유발에는 죽음의 수용체, Bcl-2 family 및 IAP family의 발현 변화와 그에 따른 caspase-3의 활성 감소에 의한 기질 단백질들의 단편화 현상과 직접적인 연관성이 있음을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 schisandrin C의 항암 효능의 검증 및 생화학적 항암기전과 연관된 실험의 기초 자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

요약

본 연구에서 schisandrin과 schisandrin C의 apoptosis 유도에 의한 항암기전 효능을 U937 혈구암세포를 대상으로 조사하였으며, apoptosis 유발에 관여할 것으로 예상되는 중요한 유전자들의 발현 및 활성화에 미치는 봉독의 영향을 조사하였다. U937 세포의 생존율은 schisandrin C의 처리 농도 증가에 따라 강력하게 억제되었으며, 이는 염색질 응축 현상을 동반한 apoptosis 유발에 의한 것임을 알 수 있었다. Schisandrin C 처리에 의한 apoptosis 유발은 Bax 및 Bcl-xL의 발현 변화와 Bcl-2의 발현 감소에 따른 상대적인 Bax의 발현 증가와 IAP family에 속하는 인자들의 발현 감소 및 caspase의 활성화 감소와 연관성이 있었다.

참고문헌

- Allen, R. T., M. W. Cluck and D. K. Agrawal. 1998. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol. Life Sci.* 54, 427-445.
- Vegran, F., R. Boidot, C. Oudin, J. M. Riedinger and S. Lizard-Nacol. 2005. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull. Cancer* 92, 219-26.
- Decker, P. and S. Muller. 2002. Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3, 275-283.
- Kaufmann, S.H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N.E. Davidson and G.G. Poirier. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985.
- Lieberthal, W., J.S. Koh and J.S. Levine. 1998. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin. Nephrol.* 18, 505-518.
- Tewari, M., L.T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D.R. Beidler, G.G. Poirier, G.S. Salvesen and V.M. Dixit. 1995. Yama/CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.
- Antonsson, B. and J.C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256, 50-57.
- Chiarugi, V., L. Magnelli, A. Turchetti, M. Cinelli, S. Cavari and M. Ruggiero. 1994.

Cell survival and death programmes. *Pharmacol. Res.* 29, 101-110.

Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.

Miyashita, T. and J.C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.

사. 오미자로부터 순수분리한 성분의 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성도 억제 효과

재료 및 방법

(1) 세포 생존능 (cell viability)의 측정

배양한 세포의 활성은 formazan에 대해서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide의 환원값으로 측정하였다. PPC처리 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 안정화를 시킨 후 오미자로부터 분리한 순수물질 0.1 µg/ml을 농도로 처리를 한 후 48 시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well의 배지들을 제거하고 MTT solution (1 mg/ml in PBS)을 배지의 1/10 volume으로 각각의 well에 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 MTT solution을 제거하고, 각 well에 100 µl의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 첨가하여 15~20분간 plate shaker로 흔들어 준 다음 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) MTT assay를 이용한 세포 성장억제 조사

세포배양용 6 well plate에 well 당 1×10^5 개의 U937 세포를 분주하고 schisandrin과 schisandrin C를 농도별로 처리한 다음 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma) 시약을 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 µl씩 분주하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 100 µl씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

(3) 멜라닌 함량 측정

멜라닌 함량은 본 연구진이 보고한 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 간단하게 요약하면, α-MSH (200 nM)와 오미자 (0.5 µg/ml)를 첨가한 DMEA에서 5일 동안 세포를 배양하였다. 10% DMSO를 첨가한 1 N NaOH 500 µl용액에 세포 덩어리를 넣은 후, 1시간 동안 80°C에서 녹였다. 멜라닌함량은 ELISA reader기를 이용하여 475 nm의 흡광도에서 측정하였다.

(4) Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 tyrosinase의 작용결과 생성되는 DOPA 생성물의 흡광도를 흡수분광광도계를 이용하여 실험하였다. 세포배양용 6 well plate에 well 당 1×10^5 개의 세포를 분주하고 DMEM에 α-MSH (200 nM)와 오미자 (0.5 µg/ml)를 첨가하여 3일 동안 배양하였다. 기질로서 10 mM L-DOPA 0.2 mL, 0.175 M phosphate buffer (pH=6.8) 0.2 mL 및 시료용액 0.5 mL의 혼합용액에 mushroom tyrosinase (110unit mL⁻¹) 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시킨 DOPA 생성물의 흡광도를 흡수분광광도계를 이용하여 405 nm에서 측정하여 저해율을 조사하였다. 이상의 실험은 모두 4반복으로 하여 평균값을 구하였다.

결과 및 고찰

(1) 오미자로부터 순수분리한 물질의 미백효능 검증을 위한 MTT assay

천연물을 미백제로 검증하기 위해서는 반드시 세포독성을 검증한 후에 수행하여야 한다. 효능을 나타내는 농도에서 독성을 검증한 결과 헥산으로부터 순수분리한 물질은 1.0 µg/ml에서는 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 124).

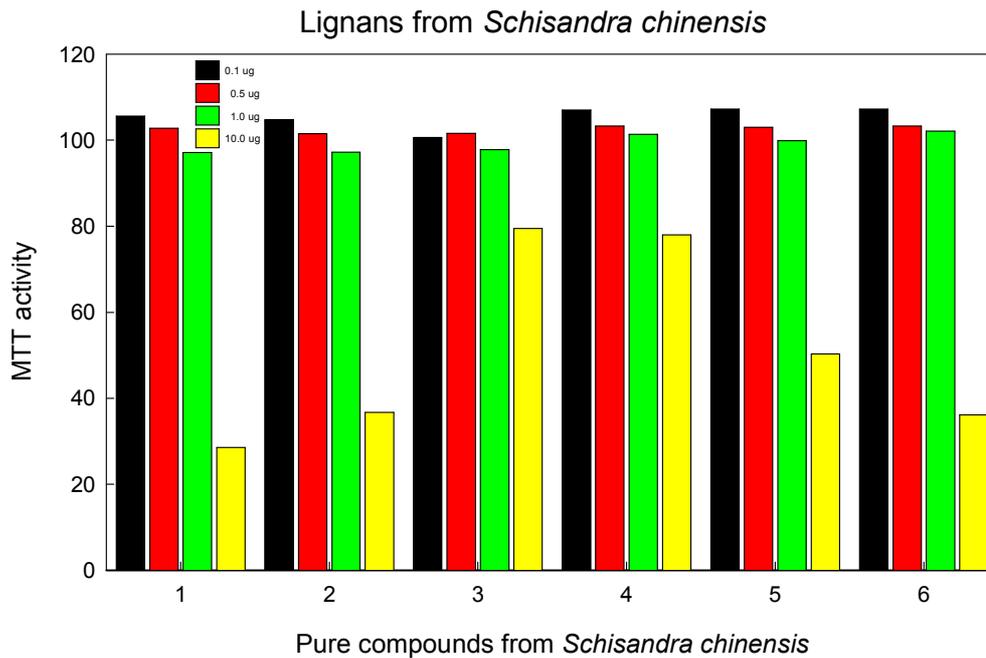


Fig. 124. Cell viability of B16F10 melanoma cells after treatment with pure compounds from *Schisandra chinensis*. The cells were cultured in the presence of various concentrations of several compounds for 48 hours. The viability of the cells was measured by MTT assay. Each bar represents the mean \pm S.E. (n=5).

메탄올 추출물로부터 순수분리한 물질의 세포독성을 검증한 결과, 역시 효능을 나타내는 1.0 µg/ml의 농도에서는 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 125).

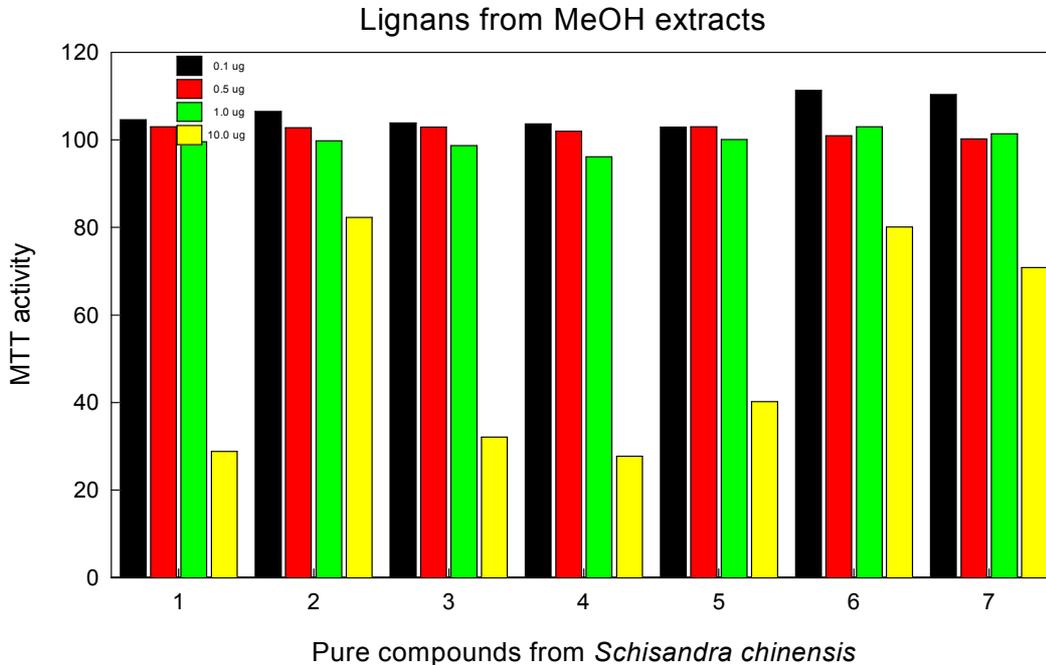


Fig. 125. Effect of pure compounds from MeOH extracts in *Schisandra chinensis* on MTT activity.

(2) α-MSH 멜라닌 생성유도 후 오미자 순수분리 성분의 멜라닌 생성억제 효과

멜라닌 생성 유도 물질인 α-MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 가지 말초조직에서 분비되는 pleiotropic molecule로써 표피세포의 성장과 증식, 국소조직의 면역 조절, 멜라닌 색소 생성 등 다양한 생리적 기능에 관여한다. 이는 세포막 수용체 (melanocortin receptor 1, MC1R)와 결합하여 Gs 단백질을 활성화시키고, 이차적으로 adenylate cyclase활성에 의해 cAMP가 증가되고 연속적으로 protein kinase A (PKA), tyrosinase 활성 등을 통하여 멜라닌 생성을 촉진시키며 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 단백질의 발현을 증가시켜 tyrosinase 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 실제로 Hunt 등은 α-MSH에 의해 멜라닌 형성 및 tyrosinase 활성이 증가되었다고 보고한 바 있다.

이에 본 연구에서도 B16F10 melanoma 세포에 α-MSH를 투여함으로써 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성에 오미자의 핵산추출물로부터 순수분리한 리그난물질들과 메탄올로부터 순수분리한 물질들이 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 오미자로부터 순수분리한 리그난들이 멜라닌을 생성하는 세포 수준에서 미백효과가 있는지를 확인하기 위하여 α-MSH로 자극한 B16F10 melanoma 세포에서 멜라닌 생성을 관찰하였다 (Fig. 126).

B16F10 melanoma 세포에서 1 µM의 α-MSH로 유도된 군은 무처리군에 비하여 멜라닌 생성량이 240.6% 증가하였다. 여기에 대조군으로 사용되고 있는 arbutin 50 µg/ml의 농도로

처리된 경우 150.8%로 감소하였으며, 헥산 추출물로부터 분리한 리그난 중에서는 SCH37PAPE가 183.7%로 가장 낮았다. 메탄올 추출물로부터 순수분리한 물질중에서는 KM15IE과 KM15IDPAPEPA이 각각 168.0%와 166.8%로서 멜라닌의 생성 감소율이 가장 높았다. 따라서 KM15IE과 KM15IDPAPEPA의 미백 효능기작을 연구 중에 있으며, 기작이 밝혀진다면 천연물 미백 화장품으로서 개발의 가능성이 기대된다.



Fig. 126. Inhibitory effect of pure compounds from *Schisandra chinensis* on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells stimulated by 1 μ M α -MSH. Cells were seeded at 2×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with various concentrations of pure compounds and α -MSH for 48 hours. Then, melanin contents were measured at 405 nm. Each bar represents the mean \pm S.E. (n=4).

(3) Tyrosinase의 활성 저해

멜라닌 색소의 주된 생성과정의 생합성 경로는 tyrosine을 출발물질로 하여 tyrosinase의 효소작용에 의해서 생성되는 dopaquinone 등의 유도체를 경유하여 아미노산 및 단백질과의 중합반응으로 생성된다 (Lerner과 Fitzpatrick, 1950; Pawelek와 Korner, 1982). 멜라닌 생성 억제작용 기전으로는 멜라닌 생성의 효소인 tyrosinase 효소 자체를 직접 억제하는 유형과 세포로부터 분리한 tyrosinase에 대해서는 직접적인 억제를 나타내지 않지만 피부 색소 세포 내에서 멜라닌 생성을 억제하는 유형이 있다 (Kahn과 Andrawis, 1985; Tomita 등, 1990). 본 연구에서는 오미자로부터 순수분리한 물질이 멜라닌색소의 중요한 단계를 촉매하는 효소인 tyrosinase 활성의 저해효과를 조사하기 위해 기존의 대조구인 arbutin과 오미자의 헥산과 메탄올 추출물로부터 순수분리한 물질들을 0.5 μ g/ml의 저농도를 처리하여 tyrosinase의 저해 활성을 비교하였다 (Fig. 127). 1차적으로 미백제로서 개발 가능성을 검증하기 위해서 저농도인 0.5 μ g/ml처리한 결과, 헥산으로부터 순수분리한 리그난 물질 중에서는 멜라닌의 활성을 감소시켰던 SCH37PAPE가 가장 효과가 있었다. 메탄올로부터 순수분리한 물질중에서는 멜라

닌의 활성을 억제시켰던 KM15IE와 KM15IDPAPEPA가 tyrosinase의 활성을 감소시켰다.

이상의 결과를 종합해 보면 오미자로부터 분리한 순수물질은 SCH37PAPE, KM15IE과 KM15IDPAPEPA가 멜라닌 및 tyrosinase의 활성을 동시에 감소시켰다. 이는 피부의 멜라닌 색소 형성 억제효과 뿐 아니라, 특히 천연물의 경우 식품첨가물로서 독성의 염려가 적다는 점, 오미자로부터 대량의 순수분리가 가능한 물질이 높은 tyrosinase 저해 효과와 멜라닌생성을 억제시킨다는 점에서 화장품의 미백제로의 활용이 매우 기대된다.

2D Graph 1

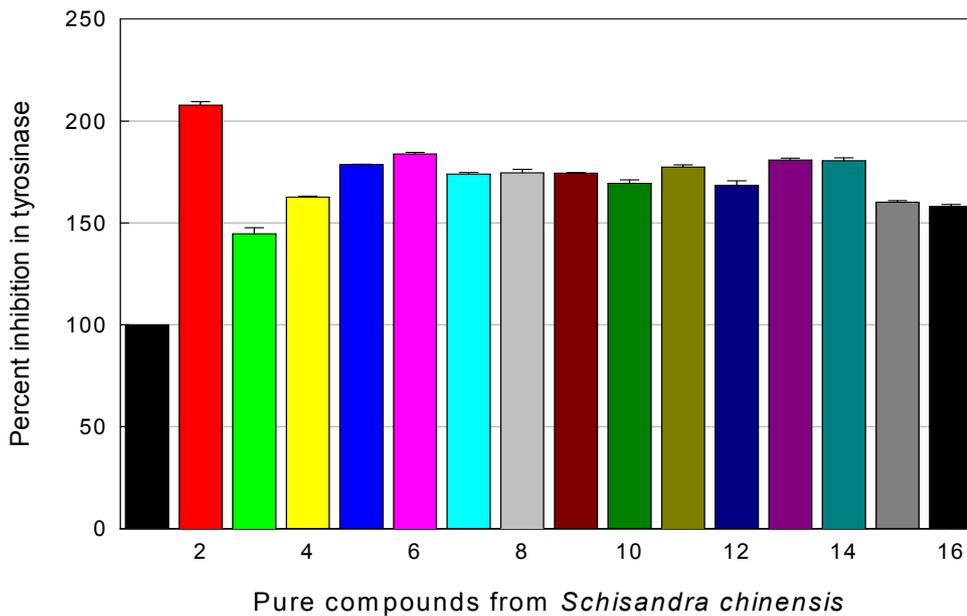


Fig. 127. Inhibitory effect of pure compounds (0.5 $\mu\text{g/ml}$) from *Schisandra chinensis* on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells stimulated by 1 μM α -MSH. Cells were seeded at 2×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with various concentrations of several pure compounds and α -MSH for 48 hours. Then, tyrosinase activity was measured at 490 nm. Each bar represents the mean \pm S.E. (n=3).

적 요

오미자로부터 순수분리한 물질들이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아봄으로써 미백제로서의 개발 가능성 여부를 확인하기 위하여 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성도에 대한 실험의 결과 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성도는 SCH37PAPE, KM15IE과 KM15IDPAPEPA이 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서 억제효과가 매우 높았다. 이러한 결과를 고려할 때 오미자로부터 순수분리한 SCH37PAPE, KM15IE과 KM15IDPAPEPA은 B16F10 melanoma 세포의 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성도 억제 작용을 나타내므로 앞으로 작용기작을 규명하고, 미백 활성 물질로서의 가능성을 검토하여 산업화 할 수 있는 방법을 찾아갈 계획이다.

아. HTS를 이용한 오미자로부터 순수분리한 성분의 항산화, 항암 및 항염증 효능 검증

재료 및 방법

(1) HTS-DPPH radical scavenging assay

시료를 96 well plate에 0.1 ml씩 분주하고 0.4 mM DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 용액을 동량 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 (Wallac 1420, USA) 측정하였다. 3반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다.

Electronic donating ability (%) = [(공시료군 - 반응군)/공시료군] × 100

(2) HTS-MTT assay

휴면 위암세포주 (AGS)를 penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μ g/mL) solution 과 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)이 포함된 RPMI (GIBCO BRL, USA) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양시켜 사용한다. 우선 24 well에 휴면 위암세포주 1 × 10⁵개를 분주하고, 4시간 뒤에 새 배지로 교체 후 5 μ g/ml의 물질을 24시간 동안 처리하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphebyltetrazolium bromide (0.1 mg/ml)을 각 well에 처리하여 4 시간 배양한 후 형성된 insoluble formazan을 DMSO에 녹이고 ELISA reader (Wallac 1420, USA) 를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정 하였으며, 3반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다. % Inhibition = (반응군/대조군) × 100

(3) HTS-cell base NO assay

마우스 대식세포 (RAW 264.7 ATCC 번호 TIB-71)를 penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μ g/mL) solution과 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum)이 포함된 DMEM (GIBCO BRL, USA) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양시켜 사용한다. 우선 24 well에 마우스 대식세포주 5 × 10⁵개를 분주하고, 4시간 뒤에 새 배지로 교체 후 5 μ g/ml의 시료를 1시간 동안 전처리 후 LPS (stimulator)를 1 μ g/mL로 16 시간 동안 처리하였다. 세포배양 상층액 100 μ l를 96 well에 덜어놓고 Griess 용액 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄) 100 μ l를 첨가하고 5분 후 ELISA reader (Wallac 1420, USA)를 이용해서 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다. % Inhibition = 1 - [(반응군 - 색보정군)/대조군] × 100

(4) HTS-MTT assay

마우스 대식세포 (RAW 264.7 ATCC 번호 TIB-71)를 penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μ g/mL) solution과 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum)이 포함된 DMEM (GIBCO BRL, USA) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양시켜 사용한다. 우선 24 well에 마우스 대식세포주 5 × 10⁵개를 분주하고, 4시간 뒤에 새 배지로 교체 후 일정농도 (2.5, 5, 10 mg/ml)의 시료를 24시간 동안 처리하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphebyltetrazolium bromide (0.1 mg/ml)을 각 well에 처리하여 4 시간 배양한 후 형성된 insoluble formazan을 DMSO에 녹이고 ELISA reader

(Wallac 1420, USA) 를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정 하였으며, 3반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다. % Inhibition= (반응군/대조군)*100

(5) HTS-cell base NO assay

마우스 대식세포 (RAW 264.7 ATCC 번호 TIB-71)를 penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL) solution과 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum)이 포함된 DMEM (GIBCO BRL, USA) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양시켜 사용한다. 우선 24 well에 마우스 대식세포주 5 × 10⁵개를 분주하고, 4시간 뒤에 새 배지로 교체 후 일정농도 (5, 10, 15, 20 ug/ml)의 시료 및 L-NAME (iNOS inhibitor)를 1시간 동안 전처리 후 LPS (stimulator)를 1 µg/mL로 16시간 동안 처리하였다. 세포배양 상층액 100 µl를 96 well에 넣어놓고 Griess 용액 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄) 100 µl를 첨가하고 5분 후 ELISA reader (Wallac 1420, USA) 를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다. % Inhibition=1-[(반응군-색보정군)/대조군]*100

(6) iNOS protein assay : SDS_PAGE and western blotting

마우스 대식세포 (RAW 264.7 ATCC 번호 TIB-71)를 penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL) solution과 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum)이 포함된 DMEM (GIBCO BRL, USA) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양시켜 사용한다. 우선 24 well에 마우스 대식세포주 5 × 10⁵개를 분주하고, 24시간 뒤에 새 배지로 교체 후 일정농도 (15, 20 ug/ml)의 시료를 1시간 동안 전처리 후 LPS (stimulator)를 1µg/mL로 16시간 동안 처리하였다. PBS로 2번 washing 한 후 RIPA Lysis buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. SDS-polyacrylamide gel에 분리된 단백질을 PVDF membrane으로 옮긴 후 PBS로 7분간 3회 세척하고 1% skim milk in PBS에 넣어 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 다음, primary antibody를 1 : 1,000~1 : 2,000 정도가 되도록 PBS에 녹인 1% skimmed milk로 희석하여 membrane과 함께 상온에서 1시간 배양하였다. Membrane을 PBS-T로 7분간 3회 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1 : 1,500~1 : 2,000으로 희석하여 membrane과 함께 상온에서 30분 배양하였다. 이를 PBS로 7분간 3회 세척한 후 ECL western blotting detection reagents를 처리하여 생성된luminescence를 X-ray film에 감광해 확인하였다.

결과 및 고찰

(1) HTS-DPPH radical scavenging assay

DPPH (α,α'-diphenyl-β-picrylhydrazyl)법을 이용하여 오미자의 핵산추출물로부터 분리한 리그난 물질 5 µg/ml을 첨가하여 항산화 효과를 검증한 결과는 Fig. 128에서 보는 바와 같다. 리그난 성분들 중에서 schisandrin C, gomisins N 및 shisandrin은 7% 이상의 억제효과를 나

타내었으며, gomisin G, gomisin B 및 gomisin A는 약 5% 정도의 효과가 있었다.

오미자의 메탄올 추출물로부터 분리한 순수물질 5 μ g/ml을 DPPH (α,α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl)법을 이용하여 항산화 효과를 검증한 결과는 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 메탄올 추출물중에서 YSCM012001과 YSCM012004의 항산화효과가 가장 높았으며, YSCM012002, YSCM012005, YSCM012006 및 YSCM012007이 그 다음이었으며, YSCM012003이 가장 낮았다.

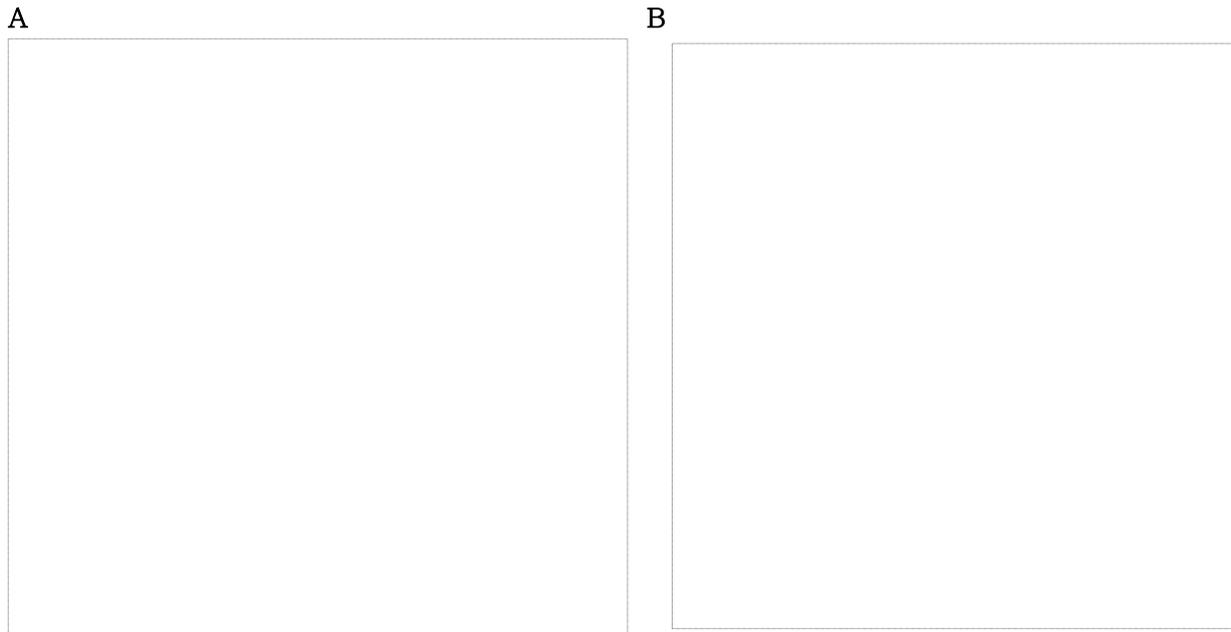


Fig. 128. Effect of natural pure compounds from hexane (A) and MeOH (B) extracts in *Schisandra chinensis* on HTS-DPPH radical scavenging assay.

(2) HTS-MTT assay

천연물의 항염증 효과를 검증하기 위해서는 우선적으로 세포독성을 확인한 다음에 독성을 나타내지 않는 농도에서 항염증의 활성을 검증할 수 있다. 따라서 오미자로부터 분리한 순수물질들의 휴먼 위암세포주 (AGS)에 대한 세포독성을 확인한 결과 헥산추출물로부터 순수분리한 YSCH012001 ~ YSCH012009과 메탄올 추출물로부터 순수분리한 YSCM012001 ~ YSCM012007 모두 세포독성이 없었다 (Fig. 129).

A



B

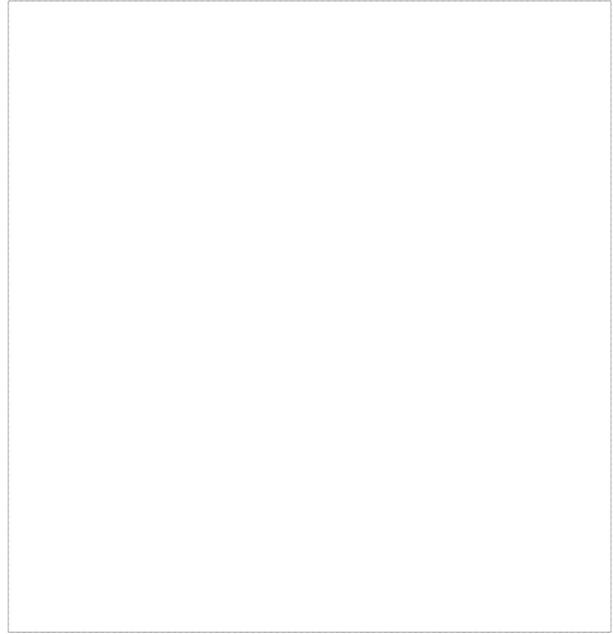


Fig. 129. Effect of natural pure compounds from hexane (A) and MeOH (B) extracts in *Schisandra chinensis* on MTT assay in RAW 264.7 cells.

(3) HTS-cell base NO assay

마우스 대식세포 (RAW 264.7 ATCC 번호 TIB-71)를 penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL) solution과 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum)이 포함된 DMEM (GIBCO BRL, USA) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양시켜 사용하였다.

오미자의 헥산 및 메탄올 추출물로부터 순수분리한 성분이 LPS에 의해 유도되는 마우스 대식세포 (RAW 264.7 ATCC 번호 TIB-71)의 iNOS에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 iNOS에 의해 유도되는 NO 생성에 대한 시험물질의 저해 활성을 Griess 반응을 이용하여 확인하였다 (Fig. 130). 그 결과 헥산 추출물로부터 순수분리된 YSCH12003, YSCH12005, YSCH12006 및 YSCH12009와 메탄올 추출물로부터 순수분리된 YSCM12003 이 상대적으로 뛰어난 NO 생성 저해능을 나타내었다.

생체 내에서 혈관 평활근 확장, 병원균 제거, 신경전달물질로서의 기능을 가지는 질소산화물인 nitric oxide (NO)는 (Lowenstein et al., 1994) 이식 거부 반응에서도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Tsoufias and Geller, 2001). 이와 같은 NO는 병원균 제거 및 면역계와 관련하여 macrophage가 염증활성 상태에서 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 다량 생산함으로써 arginine으로부터 NO를 생성, 염증 반응을 촉진하며, pro-inflammatory 인자로서 작용을 하게 된다 (Hobbs et al., 1999). 특히 bacteria와 같은 세균감염 시 방출된 lipopolysaccharide (LPS)가 host receptor와 결합하여 세포 내 신호 전달이 일어나는데, 이때 IκB kinase (IKK) complex가 활성화되어 IκB의 phosphorylation 및 degradation이 유발된다 (Shin et al., 2004). 따라서 오미자로부터 순수분리한 성분들은 보다 우수한 효능을 지닌 천연 항염증 물질의 개발 가능성이 높은 것으로 사료된다.

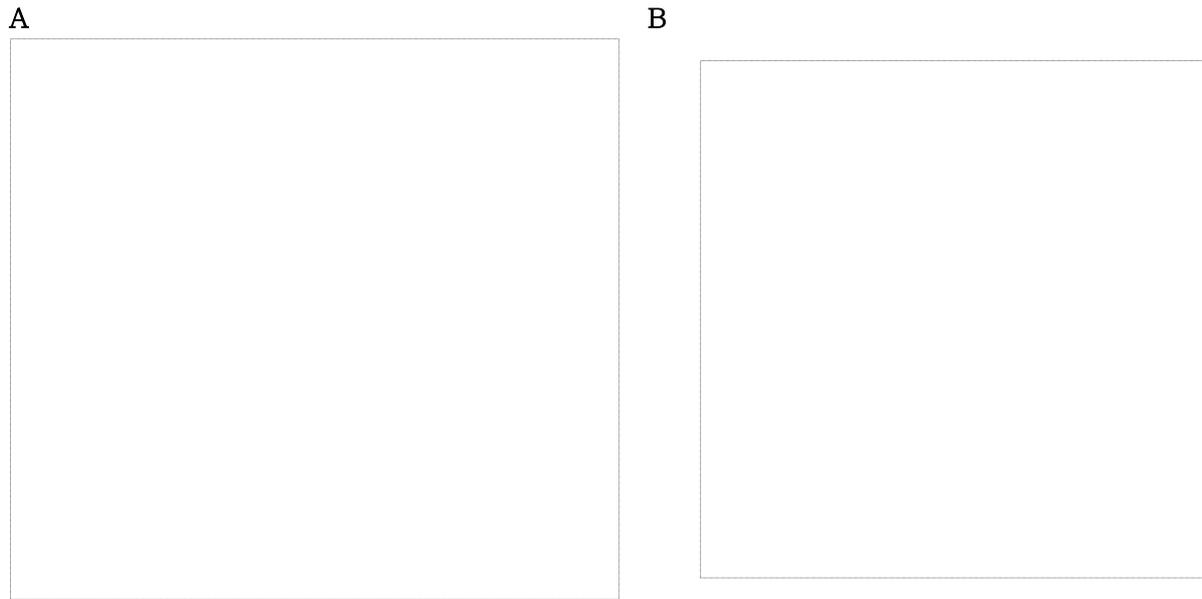


Fig. 130. Effect of natural pure compounds from hexane (A) and MeOH (B) extracts in *Schisandra chinensis* on cell based NO assay.

(4) HTS-MTT assay

마우스 대식세포를 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양시켜 HTS-MTT를 측정된 결과, 본 연구에서 사용된 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 131).

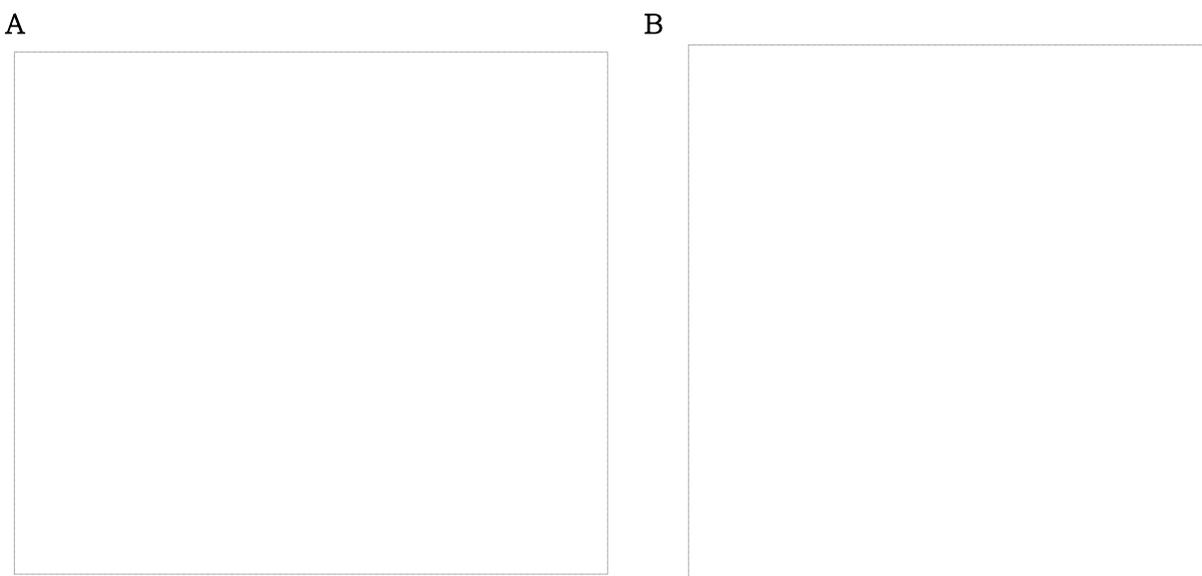


Fig. 131. Effect of natural pure compounds from hexane (A) and MeOH (B) extracts in *Schisandra chinensis* on MTT assay in RAW 264.7 (ATCC No TIB-71).

(5) HTS-cell base NO assay

HTS screening을 통해서 1차적으로 활성이 높았던 순수성분 및 그 유도체가 LPS에 의해 유도되는 iNOS에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 iNOS에 의해 유도되는 NO 생성에 대한 시험물질의 저해 활성을 Griess 반응을 이용하여 확인하였다 (Fig. 132). 그 결과 YSCH12005, YSCH12003 및 YSCH12006이 뛰어난 NO 생성 저해능을 나타내었다. 그 외에도 YSCH12008과 YSCH12001도 농도 의존적으로 NO생성 저해능을 나타내었다. 메탄올 추출물로부터 순수분리하여 1차적으로 선별한 모든 물질 역시 농도 의존적으로 NO생성을 억제시켰다. 따라서 iNOS억제효과가 탁월하였으며, 신물질로 밝혀진 YSCH12003에 대하여 작용기작을 밝힐 것이며, 다른 물질들에 대하여도 앞으로 연구를 계속 수행할 것이다.

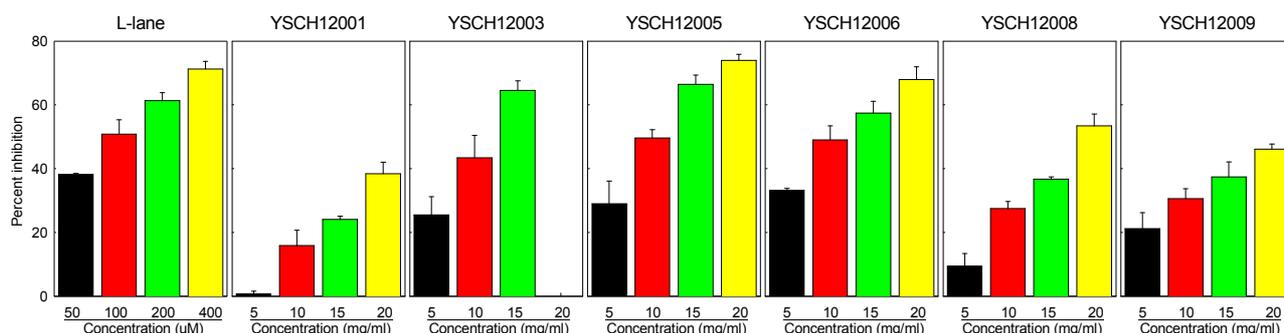


Fig. 132. Inhibition of nitrite (NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells (ATCC No TIB-71) by lignans from *Schisandra chinensis*. NO concentration was examined under Griess reagent system by taking culture media at 12 h and 24 h.

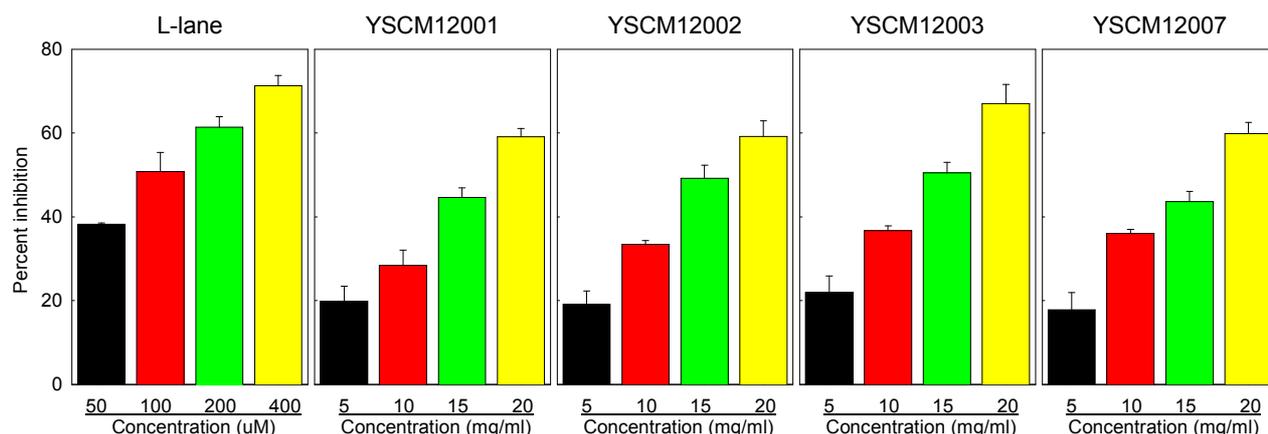


Fig. 133. Inhibition of nitrite (NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells (ATCC No TIB-71) by natural pure compounds from MeOH extracts in *Schisandra chinensis*. NO concentration was examined under Griess reagent system by taking culture media at 12 h and 24 h.

(6) iNOS protein assay : SDS_PAGE and western blotting

그람음성세균의 세포벽성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 강력한 면역시스템 활성화 물질로서 국소염증, 항체생성, 및 심한 감염의 경우에는 패혈성 속(septic shock)을 유발한다 (Rietschel & Brade, 1992). 큰포식세포는 세균감염에 대한 숙주방어기전에서 중요한 역할을 수행하며 LPS 작용의 주된 표적세포이다. 큰포식세포가 활성화되면, 큰포식세포들은 종양세포와 병원체의 성장을 광범위하게 억제한다. 일산화질소 (nitric oxide, NO)는 큰포식세포의 세포용해작용에 관여하는 것으로 보고되었다 (Palmer *et al.*, 1988). LPS와 IFN- α 에 의한 생쥐의 큰포식세포 자극은 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 발현시키는데, 이 효소는 L-arginine과 분자산소로부터 많은 양의 NO생성을 촉진시킨다 (Hibbs *et al.*, 1987).

오미자의 핵산 추출물과 메탄올 추출물로부터 순수분리한 성분들에 대하여 iNOS 단백질 생성억제를 Western blot assay로 확인하였다. RAW 264.7세포에 KIOM-79를 LPS와 동시에 처리한 후 anti-iNOS 항체를 이용하여 Western blot 실험을 수행한 결과, YSCH12003 20 μ g/ml 처리는 강력한 iNOS 단백질의 생성을 억제함을 확인할 수 있었다 (Fig. 134). RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하면 iNOS 단백질의 양이 현저하게 증가하고, 이러한 증가는 YSCH12003에 의하여 용량 의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때 YSCH12003에 의한 일산화질소 생성억제는 iNOS유전자발현 억제에 기인한 것임을 알 수 있었다. 그 외에도 약간의 억제효과를 나타내는 물질이 다수 있었으므로 이에 대한 연구를 추후에 진행시킬 것이다.

Inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 일정하게 발현되는 neuronal NOS (nNOS) 및 endothelial NOS (eNOS)와 달리, interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), lipopolysaccharide (LPS) 등과 같은 염증유발인자 및 암발생인자에 의해 발현되어, 과량의 nitric oxide (NO)를 생성한다. 생성된 NO는 프리라디칼의 일종으로 혈관확장 (vasodilation), 비선택적 숙주방어 (nonspecific host defense) 등의 작용을 하지만, 지속적 과발현은 만성 염증 (chronic inflammation), 천식 (asthma), 퇴행성 뇌질환 (neurodegenerative disease), 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 관절염 (arthritis), 암의 진행 및 악화 등을 유발한다 (Lala and Chakraborty, 2001). 따라서 본 연구에서 수행하고 있는 오미자로부터 순수분리한 다수의 물질이 항염증 효과를 나타내고 있으므로 향후 기작을 밝힌 후 실용화 할 수 있는 가능성을 찾기 위하여 지속적인 연구를 수행할 것이다.

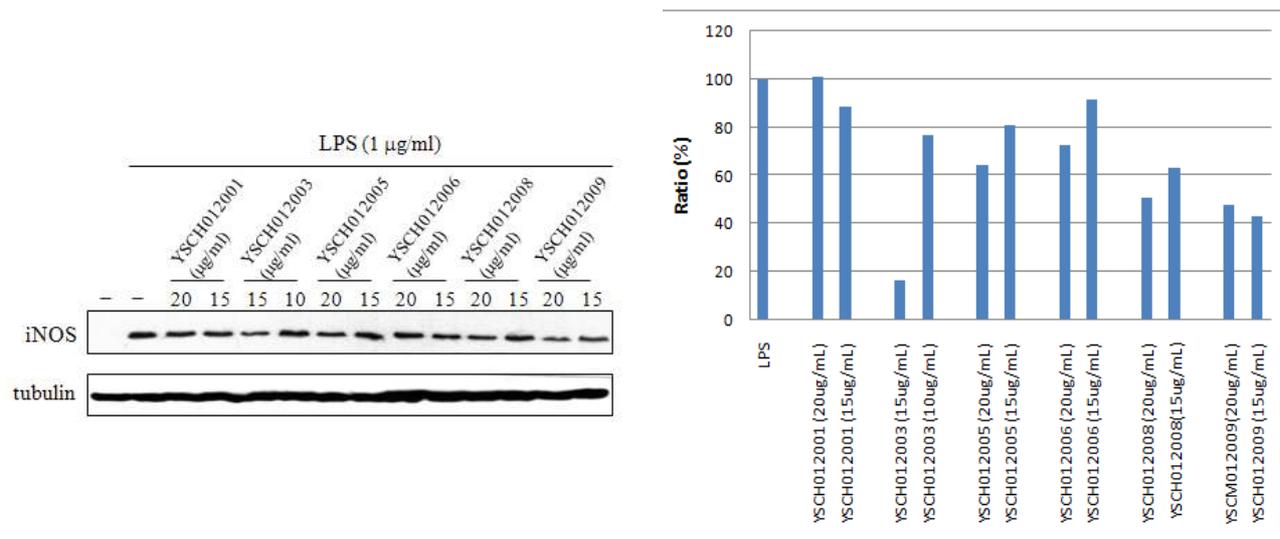


Fig. 134. The effects of lignans from *Schisandra chinensis* on LPS-induced iNOS protein in RAW264.7 cells. Lysates were prepared from control or 24 h LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimulated cells or from LPS plus lignans (10, 15, or 20 μM). Total cellular proteins (40 μg) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and detected using specific antibodies, as described in Materials and methods. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

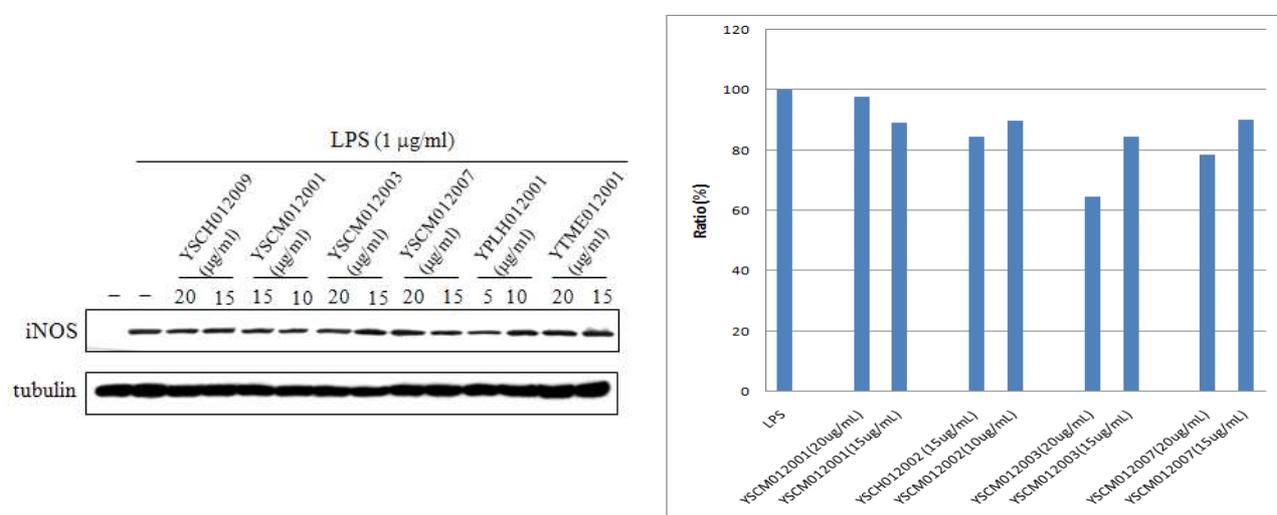


Fig. 135. The effects of pure compounds from MeOH extracts in *Schisandra chinensis* on LPS-induced iNOS (A) protein in RAW264.7 cells. Lysates were prepared from control or 24 h LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimulated cells or from LPS plus lignans (10, 15, or 20 μM). Total cellular proteins (40 μg) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and detected using specific antibodies, as described in Materials and methods. The experiment was repeated three times and similar results were obtained.

본 실험에서 오미자로부터 순수분리한 성분의 처치는 쥐의 큰포식세포 RAW 264.7 세포군에서, 일산화질소 생성과 iNOS전사를 억제한다는 것을 확연하게 밝혀내었다. 본 연구에서 가장 중요한 발견은 YSCH12003이 확실히 iNOS의 발현을 억제하였다는 것이다. iNOS 단백질은 NO를 생성함으로써 큰포식세포의 염증반응 유발에 중요한 역할을 수행한다. 큰포식세포가 활성화되면, 큰포식세포들은 병원체의 성장을 광범위하게 억제하는데 이 과정에서 일산화질소는 큰포식세포의 세포용해작용에 관여하는 것으로 보고되었다(Palmer *et al.*,1988). LPS 의한 생쥐의 큰포식세포 자극은 iNOS를 발현시키는데, 이 효소는 Larginine과 분자산소로부터 많은 양의 일산화질소 생성을 촉진시킨다 (Hibbs *et al.*,1987). 특히 신물질인 YSCH12003의 큰포식세포 활성화 억제와 iNOS 발현억제는 YSCH12003가 강한 소염작용을 나타냄을 시사한다.

결론적으로 본 실험은 YSCH12003이 큰포식세포에 작용하여 iNOS유전자발현 억제를 통하여 일산화질소의 생성을 억제한다는 것을 보여주었다. 이러한 효과는 오미자로부터 순수분리한 YSCH12003의 천연물신약으로 개발하기 위하여 전임상 실험을 수행 한 후에 앞으로 계속적으로 수행되어야 할 과제이다.

적 요

오미자는 항암, 항간염 등의 다양한 질병을 치료하기 위해 사용되었다. 본 실험에서는 오미자로부터 순수분리한 리그난과 다양한 성분들이 큰포식세포에서 inducible NO synthase (iNOS) 유전자의 발현을 억제시키는 기전을 밝혀내기 위하여 수행하였다. Western blot분석에 의하면 YSCH12003이 LPS에 의한 iNOS의 발현 을 억제함을 확인 할 수 있다. 추후 신물질인 YSCH12003 및 오미자로부터 순수분리한 물질의 작용기작을 밝힐 것이며, 이러한 결과는 항염증 천연물신약 개발의 가능성을 보여주고 있다.

ABSTRACT We demonstrate that YSCH12003, novel pure compound isolated from *Schisandra chinensis*, inhibits LPS-induced expression of iNOS gene in RAW 264.7 cells. Treatment of RAW 264.7 cells with YSCH12003 inhibited LPS-stimulated nitric oxide production in a dose related manner. Due to the critical role that NO release plays in mediating inflammatory responses, the inhibitory effects of novel YSCH12003 on iNOS suggest that YSCH12003 may represent a useful anti-inflammatory agent.

참고문헌

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120:227-237, 1994

Tsoufias G, Geller DA: NF-kappaB in transplantation: friend or foe. *Transpl Infect Dis* 3:212-219, 2001

Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S: Inhibition of nitric oxide synthase as a potential

therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39;191-220, 1999

Shin HM, Kim MH, Kim BH, Jung SH, Kim YS, Park HJ, Hong JT, Min KR, Kim Y: Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF- κ B without affecting IkappaB degradation. *FEBS Lett* 571;50-54, 2004

Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* 2, 149-156, 2001.

제 3세부: 기능성 제품 개발

1. 원료가공공정의 확립

가. 재료 및 방법

(1) 가공공정의 비교 분석

산업적 생산과정에서는 원료의 수급안정과 보관의 용이함을 위하여 수확한 오미자를 구입 후 건조하거나 생산지에서 기 건조한 제품을 구입하여 제품 원료로 사용하고 있다. 오미자의 건조과정에서 리그난 등의 불휘발성 물질들의 손실은 적을 것이지만 휘발성인 mono와 sesquiterpene류의 손실은 피할 수 없을 것으로 추정된다.

따라서 본 실험에서는 여러 가지 건조조건별로 건조효율과 휘발성 terpene류의 함량변화를 조사하여, 오미자를 이용한 기능성제품 개발의 제조공정 확립의 기초자료로 삼고자 하였다.

(가) 건조공정 비교 분석방법

① 실험재료

본 실험에 사용된 오미자는 경북 문경시 동로면에서 재배하여 2006년 9월 수확한 것을 구입하여 냉동 보관한 후, 가지, 잎 등 이물질과 모양이 고르지 못한 것을 제거하고 외관이 양호한 것을 선별하여 사용하였다.

그리고 각종 분석에 필요한 유기용매 및 일반시약은 Merck사(독일) 및 Junsei화학공업사(일본)의 특급 및 1급 시약들을, 그리고 휘발성화합물의 동정에 사용한 기타 표준품은 Sigma 사의 제품을 사용하였다.

② 건조공정

오미자의 건조과정은 50℃ 및 70℃의 열풍건조기(Memmert, DE/ULE 400, USA)와 -70℃의 진공동결건조기(SFDSHM12, 삼원냉열)로 진행하였으며, 열풍건조는 각 1, 2, 3 및 4일간, 진공동결건조에서는 1, 2, 3, 4, 6, 8, 및 10일간 건조한 시료를 각각 채취하여 비교하였다.

③ 건조공정별 수분함량

각 건조공정 별 건조효율을 비교하기 위한 수분함량의 측정은, 공정별 각각 지정된 시간이 경과 후 각 시료를 채취하여 수분함량(dry base)을 110℃에서 2시간 상압가열건조법으로 측정하였다.

③ 휘발성 정유성분

건조과정에서 휘발성 정유성분의 손실을 비교하기 위하여, 각 시료의 휘발성 terpene류를 분석하였으며, 그 방법은, 각 시료 50 g(wet base)을 증류수 100 ml과 함께 SDE (Simultaneous Steam Distillation-Extraction)연속추출장치에 넣고 내부표준물질로 1,000

ppm의 4-decanol 1 ml을 첨가한 후 3시간동안 diethyl ether로 환류하여 휘발성 terpene 류를 포집하고, 무수황산나트륨으로서 탈수시킨 후 40℃ 회전감압농축기로써 3 ml로 농축하고 0.22 µm membrane filter로 여과한 것을 GC/MS 분석용 시험액으로 하였다.

GC-MS (HP 6890 series GC system+HP 5973 MSD, Hewlett Packard Co. USA)분석 조건은, FFAP-capillary column (free fatty acid phase; 30 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary, film thickness 0.25 µm; J & W Scientific, Agilent, Waldbronn, Germany), carrier gas는 He (32.6 ml/min.), 오븐 온도조건은 initial temp.(time) 70℃(5 min.), rate는 5℃/min., final temp.(time) 220℃(5 min.)이며, injection port temp. 250℃, interface temp. 240℃, 70 eV의 ionization voltage의 조건으로 분석하였다.

각 화합물들의 동정은 mass spectrum을 해석한 결과를 토대로 Willey library 및 문헌을 참고하였으며, 각 화합물의 정량은 각 피크의 면적을 내부표준물질인 4-decanol과 비교하여 아래의 계산식으로 산출하였으며, 이때의 response factor는 1로 가정하였다.

화합물의 농도(µg/g) = {화합물의 피크면적 × 내부표준물질 첨가량(µg) × 1,000} / {내부표준물질 피크면적 × 시료량(mg)}

④ 색도 측정

시료의 색 측정(CIE $L^* a^* b^*$ colour space)은 각 건조공정 및 건조기간별 시료를 50 mesh 분말로 분쇄한 후 5 mm 두께로 고르게 편 후 Hunter colorimeter (Minolta Co. Chroma meter CR-200, Japan)로 측정하였으며, chromatic reference standard는 white C₂-15222로 하였을 때 L=92.6, a=0.8, 그리고 b=0.322 이었다.

그리고 총 색의 차(total color difference value, ΔE)는 상법(15,16)에 따라 다음 식으로 구하였다. $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$

(나) 추출공정 비교분석방법

① 실험재료

본 실험에 사용된 오미자는 경북 문경시 동로면에서 재배하여 2006년 9월 수확한 것을 구입하여 냉동 보관한 후, 가지, 잎 등 이물질과 모양이 고르지 못한 것을 제거하고 외관이 양호한 것을 선별하여 사용하였다. 그리고 각종 분석에 필요한 유기용매 및 일반시약은 Merck사(독일) 및 Junsei화학공업사(일본)의 특급 및 1급 시약들을, 그리고 휘발성화합물의 동정에 사용한 기타 표준품은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

② 실험방법

50℃에서 3일간 열풍건조하여 수분함량이 12% 이하인 오미자의 과육에 흠집을 주어 추출이 용이하도록 마쇄기로 수 초간 마쇄하였으며, 이 건오미자 100 g을 증류수 400 ml과 함께 수기에 넣은 후 온침법은 85℃의 항온수조에, 냉침법1은 실온에서 추출하였다. 그리고 냉침법2는 증류수에 감식초(총산 2.6 w/v%이상, 청정원) 10%를 첨가한 400 ml에 건오미자 100 g을 넣고 실온에서 추출하였으며, 이때의 pH는 3.07이었다. 또한, 아세트산으로 냉침법2와 동일한 pH를 설정하여 추출하였으며 이를 아세트산추출법이라 하였다. 추출방법에 따라 각

각 6, 12, 18시간 구간을 설정하여 추출하였으며, 추출액은 여과지(Toyo, No. 2)로 Büchner funnel을 사용하여 흡인여과한 200 ml의 여과액을 시료로 하여 휘발성 terpene류 및 색도를 추출효율의 지표로써 측정하였다.

여과액 200 ml을 2 L 둥근 플라스크에 넣고 정량분석을 위해 내부표준물질로서 1000 ppm의 4-decanol 1 ml을 첨가하였다. 추출용매로는 diethyl ether 30 ml을 사용하였으며 상압하에서 3시간 동안 환류하여 휘발성 향기성분을 포집하고 무수황산나트륨(Na₂SO₄)으로서 탈수시킨 후 rotary vacuum evaporator로 5 ml까지 농축하고 0.45 µm membrane filter로 여과한 것을 GC/MS 분석용 시험액으로 하였다. GC/MS의 분석조건은 Table 20과 같다.

Table 20. GC-MS¹⁾ operation condition for analysis of volatile terpenoid

Items	Conditions	
Column	HP-5 (5% phenyl methyl siloxane capillary, 30.0m×250µm×0.25µm)	
Mode	split	
Carrier gas	He (flow rate : 32.6 ml/min)	
Split ratio	30.0 : 1	
Oven program	Initial temp.	70°C
	Initial time	5 min
	Ramping	5°C/min
	Final temp.	220°C
	Final time	5 min
Injection port temp.	250°C	
Interface temp.	240°C	
Ionization voltage	70 eV	

¹⁾ HP 6890 series GC + HP 5973 MSD

각 화합물들의 동정은 mass spectrum을 해석한 결과를 토대로 Willey library 및 문헌을 참고하였으며, 각 화합물의 정량은 각 피크의 면적을 내부표준물질인 4-decanol과 비교하여 아래의 계산식으로 산출하였으며, 이때의 response factor는 1로 가정하였다.

화합물의 농도(µg/g) = {각 화합물의 피크면적×내부표준물질 첨가량(µg)×1,000} / {내부표준물질피크면적×시료량(mg)}

색도의 측정은 여과액을 석영 cell에 넣어 Hunter colorimeter(Chroma meter CR-200, Minolta, Japan)로 하였으며, chromatic reference standard는 white C2-15222로 하였을 때 L=92.08, a=1.19, b=-0.706이었다.

측정치는 Hunter's color value 값인 L(white +100 ↔ 0 black), a(red +60 ↔ -60 green), b(yellow +60 ↔ -60 blue) 및 전체적인 색차를 나타내는 ΔE(total color difference value)값은 상법에 따라 다음 식으로 구하였다[21,22].

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

나. 결과 및 고찰

(1) 건조공정

(가) 건조공정별 수분의 변화

생오미자의 수분함량은 75.48%이었으며, 각 건조방법별 건조효율을 비교한 결과 Fig. 136에서와 같이, 50℃와 70℃에서 4일간 열풍건조한 시료의 수분함량 제거율은 각각 88.75%, 93.15%이었으며, 10일간 동결건조한 시료는 88.04%이었다.

이와 같이 각 건조조건에 따른 수분함량은 열풍건조 70℃에서 건조한 시료가 단시간에 가장 높은 제거율을 보였다. 그러나 동결건조는 열풍건조와 유사한 수준의 수분 제거를 위해서는 10일 이상의 많은 건조시간이 소요되었다.

식물체의 저장시 별도의 조치없이도 저장이 가능하기 위한 수분함량은 10% 이하로 추정되며 이를 달성하기 위하여서는 보다 고온의 공정이 필요할 것이나 각 건조온도별 품질변화를 감안하여야 할 것이다. 또한 진공동결건조의 경우 비록 품질의 변화는 적을 것이나 건조시간과 비용이 과다한 점이 단점으로 작용할 것으로 추정되었다.

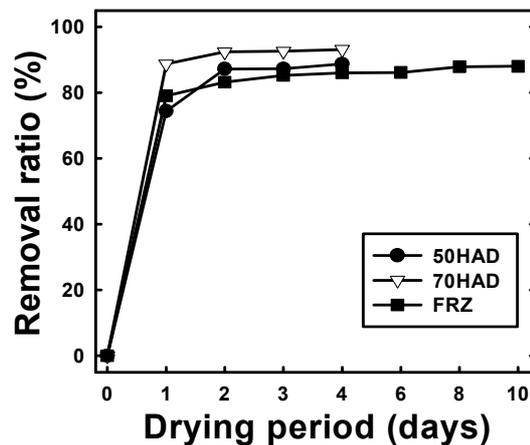


Fig. 136. Removal ratio(%) of moisture content of fresh *Schizandra* fruit (moisture content ; 75.48%) during three drying processes. Symbols represent as, 50 HAD; 50℃ hot air drying, 70 HAD; 70℃ hot air drying, FRD; freeze drying.

(나) 건조공정별 색상의 비교

각 건조공정별 Hunter색도의 측정에 앞서 분말의 색상을 사진으로 촬영하여 다음과 같이 나타내었다.

① 50℃ 열풍건조



Fig. 137. Picture of 50℃ hot air drying for 1 day



Fig. 138. Picture of 50℃ hot air drying for 2 days



Fig. 139. Picture of 50℃ hot air drying for 3 days



Fig. 140. Picture of 50℃ hot air drying for 4 days

50℃ 열풍건조한 오미자분말의 색상은 1일 건조시보다 2, 3 및 4일간 건조한 것이 다소 밝고 붉은 색이 강한 것으로 보이며, 이러한 이유는 1일 건조한 시료의 경우 건조가 충분하지 못하여 아직 남아 있는 수분의 영향으로 보이며 4일간 건조하여도 색상은 여전히 선홍색이 남아 있었다.

② 70℃ 열풍건조



Fig. 141. Picture of 70℃ hot air drying for 1 day



Fig. 142. Picture of 70℃ hot air drying for 2 days



Fig. 143. Picture of 70℃ hot air drying for 3 days



Fig. 144. Picture of 70℃ hot air drying for 4 days

70℃ 열풍건조시에는 50℃와 달리, 2일 이상 건조한 시료들은 갈변반응의 결과로 인하여 검은 색이 크게 증가하였으며, 육안으로도 제품의 원료로 사용하기에는 부적당하다고 판단되었다.

③ 동결건조

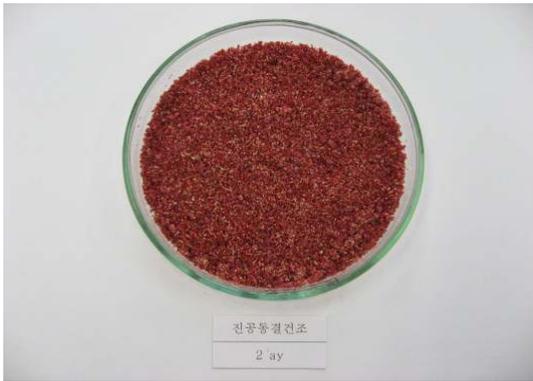


Fig. 145. Picture of freeze drying for 2 days



Fig. 146. Picture of freeze drying for 4 days

진공동결건조한 오미자분말의 사진을 보면 2일 보다 4일간 건조한 시료의 색상이 더욱 선명한 홍색인 것은 수분의 감소로 인한 빛의 산란 감소효과로 추정되며, 이후 10일간 건조하여도 오미자 고유의 선홍색은 상당한 정도로 남아 있어, 고유의 색상을 중요시 하는 제품개발의 경우에는 건조시간과 비용이 늘어나더라도 진공동결 건조공정을 선정하여야 할 것으로 판단되었다.



Fig. 147. Picture of freeze drying for 6 days



Fig. 148. Picture of freeze drying for 8 days



Fig. 149. Picture of freeze drying for 10 days

(다) 건조공정별 색도의 비교

50℃와 70℃ 열풍건조, 그리고 -70℃의 동결건조과정 중 색의 변화를 측정하기 위하여 각각의 건조방법으로 건조한 오미자를 마쇄하여 L, a, b 및 ΔE 값을 측정하였으며, 그 결과를 Table 21에 나타내었다.

건조방법에 따른 오미자의 색 변화는 L, a, b 값이 전체적으로 동결건조한 시료에서 가장 높았으며, 50℃, 70℃ 열풍건조 순으로 높았다. L값은 흑색의 0에서 백색의 100까지의 범위로 명암도를 나타내는 값으로, 각 건조방법에 따라 1일 건조한 시료의 L값은 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 건조기간이 경과할수록 건조조건에 따른 차이가 나타났다.

그러나 열풍건조 1일 이후, 동결건조 2일 이후의 L값은 유의적인 차이를 보이지 않아, 건조 초기 이후에는 거의 일정한 값을 나타내어 건조기간에 따른 영향은 적은 것으로 사료된다. a값은 녹색(-60)과 적색(+60)을 나타내는 값으로, L값과 비슷한 양상을 보였으나 각 건조방법에 따른 a값의 차이는 L값의 것보다 더 컸다.

50℃ 열풍건조한 시료는 건조2일 이후 서서히 감소하였고, 70℃ 열풍건조한 시료는 건조 첫날부터 크게 감소하는 것으로 나타났으며, 동결건조한 시료는 건조기간이 길어짐에 따라 대체적으로 증가하는 경향을 보여, 건조 온도가 높아짐에 따라 적색도는 크게 감소하는 것으로 나타났다.

Anthocyanin 색소는 온도가 높을 때 파괴 또는 갈변에 의해 퇴색되는데[2,3,4], 송 등[5]도 온도가 낮을수록 anthocyanin 색소의 잔존율이 높았다고 보고하였다. 또한 임 등[6]은 거베라 꽃의 분홍색 품종인 shirley 꽃 건조 시 anthocyanin 색소의 흡광도는 온도가 높을수록 감소하는 경향을 보였으며, a값도 유의적으로 감소하는 것으로 나타났는데, 특히 60-70℃에서 크게 낮아져 적색 색소가 파괴되었다고 보고하였다.

b값은 청색(-60)과 황색(+60)을 나타내는 값으로, 동결건조 초기 2일까지는 건조기간에 따라 큰 변화가 없는 50℃ 열풍건조보다 낮았으나 서서히 증가하여 3일 이후에는 더 높게 나타났다. 또한 70℃ 열풍건조한 시료의 b값은 감소하는 경향을 보였으며 건조기간이 경과할수록 그 감소속도는 조금씩 둔화되었다.

Table 21. Changes in Hunter Color Value of Schizandra Fruit (*Schizandra chinensis fructus*) during Freezing Dry processing

Replication Condition	1st	2nd	3rd	4th	Mean score
2 days	L:34.70	L:33.56	L:33.21	L:35.36	L:34.21
	a:34.35	a:33.88	a:34.01	a:33.59	a:33.96
	b:18.35	b:19.98	b:19.31	b:20.70	b:19.59
4 days	L:38.65	L:37.76	L:36.44	L:37.59	L:37.61
	a:42.44	a:42.62	a:46.46	a:43.64	a:43.79
	b:24.29	b:24.37	b:23.56	b:23.86	b:24.02
6 days	L:41.03	L:38.23	L:39.76	L:39.56	L:39.65
	a:44.29	a:44.50	a:45.04	a:46.09	a:44.98
	b:24.80	b:25.89	b:24.75	b:25.20	b:25.16
8 days	L:37.77	L:38.30	L:39.76	L:40.01	L:38.96
	a:43.44	a:42.88	a:43.48	a:44.74	a:43.64
	b:25.67	b:25.53	b:24.27	b:25.13	b:25.15
10 days	L:39.10	L:38.70	L:38.90	L:38.20	L:38.73
	a:44.77	a:45.15	a:46.06	a:46.17	a:45.54
	b:25.23	b:25.62	b:25.79	b:25.98	b:25.66

(라) 건조공정별 휘발성 정유성분

오미자의 휘발성 terpene류를 SDE (Simultaneous Steam Distillation -Extraction) 연속 추출장치로써 포집하고 GC/MS로 분석한 결과, Table 22, 23 및 24와 같이 15종의 monoterpene류, 28종의 sesquiterpene류 및 7종의 terpene alcohol류가 확인되었으며, 또한 myrcene(56.97 $\mu\text{g/g}$)과 γ -terpinene(58.49 $\mu\text{g/g}$)이 monoterpene류, β -elemene(120.16 $\mu\text{g/g}$), α -bergamotene (103.45 $\mu\text{g/g}$), γ -selinene (75.97 $\mu\text{g/g}$), β -cubebene(66.69 $\mu\text{g/g}$), aristolene (51.25 $\mu\text{g/g}$) 및 α -ylangene(28.06 $\mu\text{g/g}$) 등이 sesquiterpene류, 그리고 T-muurolol (96.45 $\mu\text{g/g}$)과 terpinen-4-ol(46.02 $\mu\text{g/g}$)이 terpene alcohol류의 주성분이었다.

오미자의 terpene류 중 그 함량이 120.16 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많은 β -elemene은 천연의 항암제로서 이미 널리 알려져 있는 약리성분이며[7,8,9], terpinen-4-ol은 그람 양성균 박테리아에 항균활성을 가지고 있으며[10,11], 체내 염증 유발인자의 생성 억제[12], 흑색종 세포의 성장 억제[13] 및 고혈압의 완화[14] 등의 약리적 기능을 가지는 것으로 알려져 있다.

또한, 일명 eucalyptol로도 불리는 1,8-cineole은 오미자에 비록 5.91 $\mu\text{g/g}$ 의 미량으로 함유되어 있지만 기침 및 천식의 완화[15], 심장혈관 이완[16] 및 알코올로 인한 위장막손상 치유[17] 등의 여러 가지 약리적 기능을 가지는 것으로 밝혀져 있다.

전반적으로 휘발성 테르펜함량은 건조온도가 높을수록 감소하였으나 70°C에서 건조한 시료보다 50°C에서 건조한 시료의 함량이 적게 나타났으며, 이는 고온에서 건조 시 급속하게 형성된 건조피막의 형성에 의하여 휘발이 억제되어 나타난 결과로 추정된다.

각 건조방법에서 terpene류의 함량변화를 Fig. 150, 151 및 152에서 보면, 생오미자에 비하여 건조개시 후 처음 측정한 1일(열풍건조) 또는 2일(동결건조)에 크게 감소하였으나, 50℃ 열풍건조에서는 그 감소량이 비교적 적었다. 그리고 70℃ 열풍건조의 경우 건조 1일에서 가장 급격한 감소를 보였으며 그 감소량의 대부분 monoterpene류와 terpene alcohol류의 손실에 기인하여 휘발성이 큰 monoterpene류와 terpene alcohol류는 건조온도가 높을수록 손실량이 많은 것을 알 수 있었다.

그러나, 건조시간의 추가 경과에 따른 변화는 가장 미미하여 70℃의 고온의 경우 건조 1일에 휘발가능한 화합물들 대부분 이미 휘발된 것으로 추정되었다. 70℃ 열풍건조에 비해 50℃ 열풍 및 동결건조에서는 monoterpene류와 terpene alcohol류의 손실이 적으며 특히 동결건조에서는 terpene alcohol류와 sesquiterpene류의 함량이 건조 6일까지 증가하였으나 이후 감소하였는데 이는 결빙에 의한 세포파괴와 휘발의 복합적 관계에 의한 결과로 추정되었다.

또한, terpene alcohol류의 함량이 동결건조한 시료에서 가장 높은 결과는 동결 및 음건한 시료의 휘발성 향기성분에서는 alcohol류의 비중이 많았다는 이 등[18]의 보고와 일치하였으며, 동결건조한 시료의 총terpene 함량은 열풍건조한 시료에 비하여 전반적으로 높게 나타나서 동결건조가 열에 의한 휘발성 향의 손실이 비교적 적은 건조방법으로 간주되었다.

김 등[19]은 SDE장치를 이용하여 오미자를 열풍건조하였을 때, monoterpene류와 terpene alcohol류는 감소하였으나, sesquiterpene류는 상대적으로 증가하는 경향을 보였다고 보고하였으며, Koller[20]는 thyme과 sage의 휘발성 향기성분을 50℃와 80℃의 열풍건조 및 동결건조하여 비교한 결과 동결건조와 50℃ 열풍건조한 시료의 휘발성 향기패턴은 유사하게 나타났으나 80℃로 건조한 시료의 경우에는 패턴이 다르게 나타났다고 보고하여 건조조건이 휘발성 물질의 잔존 및 변화에 크게 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

Table 22. Volatile Compounds of Fresh Schizandra Fruit (*Schizandra chinensis fructus*) and Changes of Those during 50°C Hot Air Dry Processing (µg/g, wet base)

Group	Volatile compounds	Fresh	50°C Hot Air			
			1 day	2 days	3 days	4 days
Mono- terpenes	α-Pinene	23.61	6.61	2.85	3.02	6.84
	Camphene	19.59	5.30	2.36	2.54	5.28
	Sabinene	7.27	1.53	0.76	0.88	1.69
	β-Pinene	11.08	2.67	1.22	1.63	2.58
	Myrcene	56.97	16.83	11.67	10.97	20.41
	α-Phellandrene	10.52	3.38	1.94	2.06	3.13
	δ-Carene	2.07	-	-	-	-
	α-Terpinene	21.88	6.75	4.46	4.27	7.18
	β-Cymene	21.67	6.72	4.00	4.32	6.58
	Limonene	20.66	6.52	3.99	4.19	6.21
	cis-Ocimene	3.65	0.87	-	0.56	0.84
	trans-β-Ocimene	16.41	4.27	2.83	2.81	4.15
	γ-Terpinene	58.49	17.00	13.01	12.32	19.93
	α-Terpinolene	13.44	4.55	3.36	3.11	4.17
Total(13)	273.87	79.45	51.09	52.57	88.82	
Sesqui- terpenes	δ-Elemene	5.93	0.76	1.35	1.06	1.33
	α-Ylagine	28.06	9.13	19.60	18.89	26.67
	α-Copaene	8.28	2.08	2.30	2.04	3.00
	β-Bourbonene	13.24	3.59	4.31	3.38	4.75
	β-Elemene	120.16	25.79	32.06	26.71	37.30
	Epizonaren	3.18	0.99	1.11	1.07	1.24
	β-Cadinene	7.35	-	-	-	-
	Aristolene	51.25	12.62	17.14	14.57	17.92
	Naphthalene	3.77	0.98	1.21	1.06	1.31
	Germacrene-D	1.41	-	-	-	-
	Germacrene-B	2.33	-	-	-	1.13
	β-Patchoulene	4.61	-	-	1.04	1.47
	trans-β-Farnesene	38.03	8.87	10.62	9.64	13.34
	γ-Selinene	75.97	20.73	25.43	21.12	24.66
	β-Cubebene	66.69	15.24	20.41	16.73	20.52
	β-Selinene	30.33	9.10	10.72	9.29	15.93
	α-Bergamotene	103.45	27.38	37.71	35.25	44.07
	α-Selinene	45.08	13.11	15.33	13.21	20.70
	β-Himachalene	23.32	5.59	11.18	9.19	14.70
	Valencene	27.76	6.98	9.16	6.51	14.20
	γ-Cadinene	7.38	1.90	2.58	2.23	3.64
	7-epi-α-Selinene	4.66	0.92	1.00	0.89	1.27
	δ-Cadinene	31.02	7.59	10.60	9.27	13.14
	Aromadendrene	4.31	0.85	1.32	1.18	1.49
Acoradiene	3.94	0.93	2.05	2.07	2.81	
α-Longipinene	4.73	0.84	1.91	1.64	2.38	
α-Gurjunene	7.79	1.53	2.34	1.87	2.61	
Calarene	7.03	2.57	3.04	2.71	3.44	

	δ -Selinene	20.27	5.77	6.84	6.14	8.44
	Total(30)	1,004.93	259.52	295.57	265.19	383.84
Terpene alcohols	1,8-Cineole	5.91	2.43	1.41	1.44	1.83
	L-Linalool	5.48	1.40	0.83	0.89	0.85
	Borneol	4.92	1.39	1.13	1.30	1.35
	Terpinen-4-ol	46.02	12.04	12.39	10.75	13.46
	p-Cymen-8-ol	2.14	-	-	-	-
	α -Terpineol	23.07	5.89	5.85	5.69	6.23
	Citronellol	11.15	2.07	1.61	1.77	1.63
	Nerolidol	25.57	4.65	6.81	6.10	7.06
	T-Muurolol	96.45	28.08	34.42	27.27	40.88
	Total(9)	511.32	134.41	128.96	120.29	181.03
Terpene esters	Bornyl acetate	28.37	6.83	7.85	6.75	9.25
	Citronellyl acetate	23.56	5.32	7.02	5.86	7.97
	Total(2)	539.69	141.24	136.81	127.04	190.28
Others	Furfural	1.95	2.27	0.76	0.75	3.79
	1-Isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene	13.11	2.56	3.09	2.64	3.86
	2-Undecanone	5.80	0.98	1.05	1.06	1.40

Table 23. Volatile Compounds of Fresh Schizandra Fruit (*Schizandra chinensis fructus*) and Changes of Those during 70°C Hot Air Dry Processing (µg/g, wet base)

Group	Volatile compounds	Fresh	70°C Hot Air			
			1 day	2 days	3 days	4 days
Mono- terpenes	α-Pinene	23.61	5.08	4.80	2.30	3.32
	Camphene	19.59	5.44	4.57	2.37	3.63
	Sabinene	7.27	-	-	-	-
	β-Pinene	11.08	1.72	2.11	0.83	0.78
	Myrcene	56.97	9.52	10.39	6.14	6.93
	α-Phellandrene	10.52	1.43	1.43	0.92	1.08
	δ-Carene	2.07	-	-	-	-
	α-Terpinene	21.88	5.19	4.65	2.97	3.70
	β-Cymene	21.67	5.91	4.84	3.94	4.88
	Limonene	20.66	4.30	3.88	2.76	3.32
	cis-Ocimene	3.65	-	-	-	-
	trans-β-Ocimene	16.41	1.59	1.75	1.17	1.23
	γ-Terpinene	58.49	18.98	15.73	12.10	14.95
	α-Terpinolene	13.44	2.99	2.69	2.09	2.45
	Total	273.87	60.16	56.15	38.5	47.82
Sesqui- terpenes	δ-Elemene	5.93	1.46	1.51	1.53	1.42
	α-Ylagine	28.06	14.74	14.46	13.15	21.54
	α-Copaene	8.28	4.11	3.55	3.90	3.43
	β-Bourbonene	13.24	4.59	4.25	4.60	3.88
	β-Elemene	120.16	33.29	31.96	33.23	30.60
	Epizonarene	3.18	1.19	1.20	1.22	1.14
	β-Cadinene	7.35	-	-	-	-
	Aristolene	51.25	19.97	20.98	20.60	19.23
	Naphthalene	3.77	1.44	1.51	1.53	1.33
	Germacrene-D	1.41	0.81	0.74	0.93	0.80
	Germacrene-B	2.33	1.02	1.30	1.33	1.24
	β-Patchoulene	4.61	1.44	1.55	1.19	1.26
	trans-β-Farnesene	38.03	15.81	14.31	14.91	12.27
	γ-Selinene	75.97	22.53	21.96	20.12	19.75
	β-Cubebene	66.69	17.57	21.15	16.16	12.91
	β-Selinene	30.33	23.02	18.35	22.21	20.70
	α-Bergamotene	103.45	35.14	49.64	48.42	43.15
	α-Selinene	45.08	27.09	22.87	26.14	24.18
	β-Himachalene	23.32	12.46	11.48	10.80	12.24
	Valencene	27.76	9.67	10.15	6.23	6.37
	γ-Cadinene	7.38	4.85	3.90	4.97	4.45
	7-epi-α-Selinene	4.66	1.17	1.04	1.18	1.00
	δ-Cadinene	31.02	16.26	14.52	15.81	13.27
Aromadendrene	4.31	1.37	1.35	1.27	1.15	
Acoradiene	3.94	1.85	1.85	1.82	2.44	
α-Longipinene	4.73	2.66	2.50	2.57	2.51	
α-Gurjunene	7.79	3.37	2.93	3.24	2.94	
Calarene	7.03	1.75	2.42	1.59	1.33	
δ-Selinene	20.27	4.18	6.36	3.02	2.52	

	Total	1,004.93	340.79	339.58	319.15	314.35
Terpene alcohols	1,8-Cineole	5.91	-	-	-	-
	L-Linalool	5.48	-	-	-	-
	Borneol	4.92	1.27	1.15	0.99	1.07
	Terpinen-4-ol	46.02	5.43	5.37	4.60	4.50
	p-Cymen-8-ol	2.14	-	-	-	-
	α-Terpineol	23.07	4.33	3.89	3.59	3.66
	Citronellol	11.15	1.34	1.58	0.70	0.50
	Nerolidol	25.57	3.80	5.22	3.93	3.39
	T-Muurolol	96.45	22.47	35.37	17.81	12.54
	Total	1,129.19	356.96	356.79	332.96	327.47
Terpene esters	Bornyl acetate	28.37	1.06	0.96	1.09	1.00
	Citronellyl acetate	23.56	4.87	6.69	5.63	7.65
	Total	1,157.56	358.02	357.75	334.05	328.47
Others	Furfural	1.95	4.11	3.06	3.68	4.04
	1-Isopropyl-2-methoxy-4-methyl benzene	13.11	7.88	6.63	6.74	8.14
	2-Undecanone	5.80	4.35	4.38	5.17	4.91

Table 24. Changes of volatile compounds of fresh and during Freeze Drying process($\mu\text{g/g}$, wet basis)

Group	Volatile compounds	Fresh	Freeze Drying						
			1 day	2 day	3 day	4 day	6 day	8 day	10 day
Mono-terpenes	α -Pinene	8.02	4.04	4.28	7.70	3.26	3.13	2.70	3.91
	Camphene	6.82	3.29	2.95	4.78	2.16	1.73	1.66	2.45
	Sabinene	3.97	2.21	2.14	3.81	1.87	2.16	1.80	1.76
	β -Pinene	3.41	2.68	2.51	4.39	2.10	2.03	1.66	2.16
	Myrcene	34.79	16.97	20.27	34.03	17.53	19.51	16.66	19.09
	α -Phellandrene	3.51	2.22	2.63	4.48	2.46	2.36	2.22	2.83
	δ -Carene	1.18	-	0.45	0.69	0.39	-	-	0.47
	α -Terpinene	7.92	4.51	5.20	8.38	4.87	4.43	4.27	5.97
	β -Cymene	6.28	4.38	4.39	6.87	3.91	3.50	3.35	4.34
	Limonene	6.95	4.64	4.93	7.56	4.41	4.09	4.05	5.12
	cis-Ocimene	1.15	0.70	0.93	1.44	0.91	0.84	0.74	1.07
	trans- β -Ocimene	6.79	4.38	5.18	7.73	4.89	4.86	4.53	5.39
	γ -Terpinene	24.38	14.27	14.39	20.72	12.46	11.19	12.04	13.66
	α -Terpinolene	8.30	3.20	3.60	5.09	3.56	3.08	3.20	4.42
	Total	115.17	65.29	72.25	115.58	65.22	65.83	63.68	78.22
Sesqui-terpenes	δ -Elemene	2.36	2.30	2.58	1.98	2.42	2.62	2.27	1.79
	α -Ylagine	35.56	16.03	14.66	8.71	11.21	9.48	12.84	7.39
	α -Copaene	3.88	3.59	3.51	3.24	3.81	3.40	3.28	2.80
	β -Bourbonene	6.84	7.55	7.35	5.49	7.00	6.66	6.08	5.30
	β -Elemene	48.60	57.87	50.60	40.56	48.68	48.85	43.52	34.05
	Epizonaren	2.49	-	0.97	0.76	0.93	0.97	1.18	0.73
	β -Cadinene	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aristolene	32.93	17.59	18.91	16.34	17.90	19.34	20.78	13.71
	Naphthalene	2.29	0.85	1.12	0.85	1.31	1.42	1.44	1.00
	Germacrene-D	1.41	0.82	0.82	0.65	0.98	0.94	0.73	0.70
	Germacrene-B	2.06	1.49	1.57	0.80	1.76	1.87	1.59	1.11
	β -Patchoulene	2.30	1.76	1.60	1.38	1.74	1.84	1.86	1.16
	trans- β -Farnesene	15.87	14.63	15.18	14.14	15.56	15.37	15.26	10.74
	γ -Selinene	25.01	26.83	26.73	24.36	28.16	27.36	23.99	19.25
	β -Cubebene	33.78	35.39	32.65	29.83	30.49	33.01	28.49	20.57
	β -Selinene	10.85	11.09	12.06	11.08	13.49	13.01	11.64	9.13
	α -Bergamotene	60.84	45.52	26.45	40.22	29.39	31.42	36.17	21.09
	α -Selinene	19.51	16.23	16.72	15.62	17.53	18.20	16.00	12.06
	β -Himachalene	18.11	12.22	9.46	8.02	9.19	8.85	9.82	5.79
	Valencene	17.08	12.82	10.63	12.38	10.42	10.92	7.71	6.66
	γ -Cadinene	3.64	2.98	3.22	2.68	3.51	3.60	-	2.31
	7-epi- α -Selinene	2.33	-	1.09	0.82	1.25	1.26	1.05	0.82
	δ -Cadinene	13.25	14.00	14.46	12.43	15.79	16.04	14.83	9.91
Aromadendrene	1.78	1.47	1.34	1.06	1.41	1.48	1.35	0.86	
Acoradiene	2.92	1.83	1.32	0.94	1.24	1.21	1.32	0.74	
α -Longipinene	2.36	2.05	1.70	1.28	1.83	1.81	1.99	1.18	
α -Gurjunene	2.13	2.01	2.49	2.04	2.84	2.98	2.78	1.74	

	Calarene	3.51	2.15	?	2.19	4.55	2.50	5.66	?
	δ-Selinene	10.13	6.10	7.45	5.93	9.10	9.07	7.20	4.72
	Total	488.86	376.36	351.44	375.43	349.61	352.24	337.31	270.81
Terpene alcohols	1,8-Cineole	2.05	1.38	1.62	2.52	1.65	1.71	1.45	2.08
	L-Linalool	1.88	1.11	1.36	1.54	1.36	1.24	1.40	1.28
	Borneol	1.06	1.32	1.26	1.16	1.20	0.95	1.13	1.07
	Terpinen-4-ol	14.91	13.83	14.26	15.84	13.98	13.04	12.72	13.05
	p-Cymen-8-ol								
	α-Terpineol	3.97	4.82	5.40	5.99	5.58	5.01	5.19	4.89
	Citronellol	2.13	2.91	2.28	1.97	2.25	2.14	2.44	1.90
	Nerolidol	7.69	7.21	7.40	6.15	6.93	8.31	6.86	4.27
	T-Muurolol	40.13	40.43	41.27	40.54	46.21	55.76	44.31	24.23
	Total	522.55	408.94	385.02	410.6	382.56	384.64	368.5	299.35
Terpene esters	Bornyl acetate	15.97	9.90	7.77	7.41	7.26	5.86	6.43	5.64
	Citronellyl acetate	10.95	8.88	8.98	8.28	9.10	10.31	9.46	7.95
	Total	538.52	418.84	392.79	418.01	389.82	390.5	374.93	304.99
Others	fural	1.38	2.25	1.42	2.18	1.30	0.87	2.51	1.40
	1-Isopropyl-2-methoxy-4-methyl benzene	5.88	4.39	3.80	3.95	3.67	2.92	3.41	3.08
	2-Undecanone	2.57	1.91	1.98	1.75	1.94	1.85	1.84	1.61

각 건조공정 및 건조기간 별 채취한 오미자의 terpene류의 group별 함량변화를 Fig. 150 및 151에 도시하였다. 그림에서 보는 바와 같이 각 terpene group의 함량은, 열풍건조의 경우 건조온도 및 시간의 증가에 따라 감소하였으며, 특히 생체에 비하여 건조 1일부터 급격히 감소하며, 감소량은 70℃ 열풍건조>50℃ 열풍건조>진공동결건조의 순으로 많았다.

그리고 sesquiterpene류의 감소량은 비교적 적었으나 terpene alcohol 및 terpene ester류의 함량은 다소 많이 감소되었다. 한편 진공동결건조의 경우에는 건조 후 그 감소량이 적을 것으로 예상되었으나 결과는 다소 많았는데, 건조과정에서 수분의 증발과 더불어 저분자인 terpene류도 함께 휘발한 결과인 것으로 추정되었다.

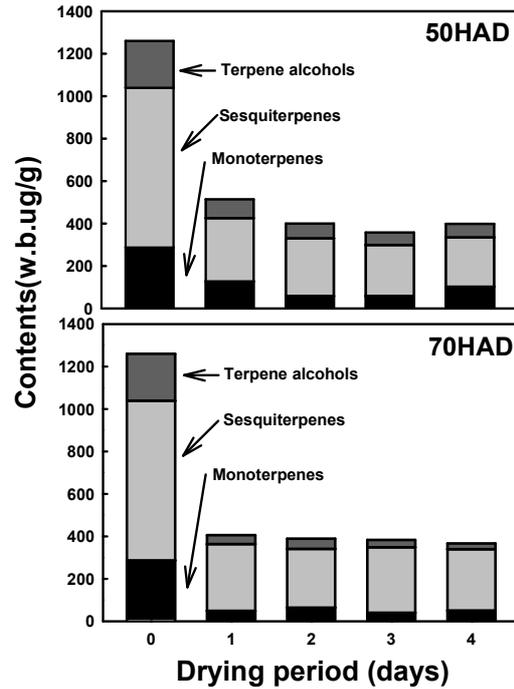


Fig. 150. Changes of the contents of volatile terpenoid groups of *Schizandra* fruit during hot air drying processes at 50°C and 70°C. Symbols represent as, 50 HAD; hot air drying process at 50°C, 70 HAD; hot air drying process at 70°C.

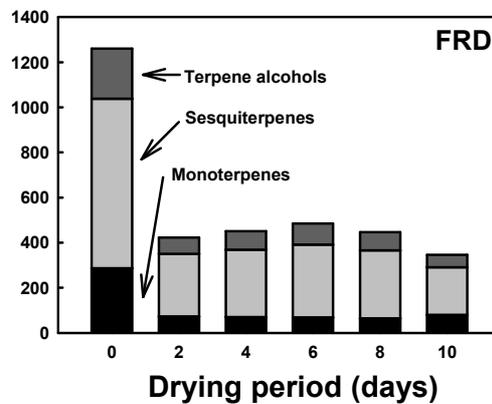


Fig. 151. Changes of the contents of volatile terpenoid groups of *Schizandra* fruit during freeze drying process at -70°C. Symbols represent as, FRZ; freeze drying.

최종적으로, 건조공정별 수분의 감소효율 및 테르펜함량의 감소 및 색도의 상관관계에서 50°C 열풍건조가 색도의 퇴화, 테르펜함량의 감소가 다소 있더라도 시간적, 경제적 효율을 감안하면 동결건조 및 70°C 열풍건조에 비하여 적절한 공정이라고 결론을 내렸다.

(2) 추출과정

(가) 추출공정의 비교

오미자 추출액은 음료제품 개발 시 중요한 원료로서, 추출과정이 매우 중요하기에 몇 가지 추출법에 따라 시간을 설정하여 추출액의 terpene류의 함량 변화를 알아보았는데, 온침법은 85°C의 고온에서, 냉침법 1은 실온에서 각각 증류수로 추출하였으며, 냉침법 2는 증류수에 감식초 10%를 첨가하여 실온에서 추출하였고 이때의 pH는 3.07이었다.

냉침법 2의 결과가 냉침법 1의 결과와 다르다면 감식초 자체의 성분에 의한 영향인지 pH를 낮춰 준 영향인지 알아보기 위해 아세트산을 첨가하여 냉침법 2와 동일한 pH를 설정하여 비교하였다. 추출시간은 각각 6, 12 및 18시간이며, 그 결과는 Table 25-28, Fig. 152과 153에 나타내었다.

각 조건에 따라 추출한 오미자의 terpene류의 주요 화합물은 α -ylangene, α -bergamotene, β -himachalene 등이었으며, 온침법은 총 41종, 냉침법 1은 18종, 냉침법 2는 17종 그리고 아세트산법은 23종의 화합물이 검출되었다.

추출온도가 높은 온침법에서의 alcohol류는 α -terpineol이, 실온에서 추출한 냉침법 1, 냉침법 2 및 아세트산법은 terpinen-4-ol이 주요 alcohol류임을 알 수 있었다.

Table 25. Changes of volatile terpenoid content of *Schizandra* fruit during hot-water extraction processing at 85°C ($\mu\text{g/g}$)

Group	Terpenes	Fresh	Extract time		
			6 ^{a)}	12	18
Mono- terpenes	Camphene	19.59	ND ^{b)}	ND	0.28
	Myrcene	56.97	ND	0.40	0.64
	α -Terpinene	21.88	ND	ND	0.91
	β -Cymene	21.67	0.67	0.55	0.73
	Limonene	20.66	ND	0.26	0.46
	1,8-Cineole	5.91	0.64	0.38	0.31
	trans- β -Ocimene	16.41	ND	ND	0.22
	γ -Terpinene	58.49	0.99	1.00	2.32
	α -Terpinolene	13.44	ND	ND	1.53
Sesqui- terpenes	α -Ylangene	28.06	25.33	16.11	28.79
	α -Copaene	8.28	ND	0.26	0.57
	β -Bourbonene	13.24	ND	0.33	0.71
	β -Elemene	120.16	ND	2.36	4.77
	Epizonaren	3.18	ND	ND	0.18
	Aristolene	51.25	0.54	0.61	1.04
	Naphthalene	3.77	1.27	ND	0.20
	β -Patchoulene	4.61	ND	ND	1.59
	trans- β -Farnesene	38.03	1.01	1.34	2.46
	γ -Selinene	75.97	4.41	4.89	7.43
	β -Cubebene	66.69	ND	7.84	ND
	β -Selinene	30.33	1.90	2.48	3.96
	α -Bergamotene	103.45	11.90	10.52	19.34
	α -Selinene	45.08	ND	5.91	7.89
	β -Himachalene	23.32	10.00	6.91	13.52
	Valencene	27.76	6.01	6.14	11.59
	γ -Cadinene	7.38	2.46	0.65	1.17
	7-epi- α -Selinene	4.66	ND	0.21	0.29
	δ -Cadinene	31.02	ND	2.80	4.58
	Aromadendrene	4.31	1.15	0.89	1.49
	Acoradiene	3.94	3.87	2.58	4.46
α -Longipinene	4.73	1.71	1.03	2.04	
α -Gurjunene	7.79	ND	0.76	1.18	
Calarene	7.03	ND	ND	1.12	
δ -Selinene	20.27	4.47	4.28	3.70	
Terpene alcohols	L-Linalool	5.48	ND	0.16	0.10
	Borneol	4.92	1.32	1.45	1.49
	Terpinen-4-ol	46.02	5.20	3.13	2.50
	α -Terpineol	23.07	9.86	8.93	9.30
	Citronellol	11.15	1.38	1.43	1.38
	Nerolidol	25.57	0.52	0.67	0.73
T-Muurolol	96.45	8.10	5.99	1.36	

a) : hours

b) ND : Not detected

Table 26. Changes of volatile terpenoid content of *Schizandra* fruit during aqueous extraction processing 1 at room temperature ($\mu\text{g/g}$)

Group	Terpenes	Fresh	Extract time		
			6 ^{a)}	12	18
Mono- terpenes	β -Cymene	21.67	0.35	0.31	0.27
	1,8-Cineole	5.91	0.31	0.16	0.15
	γ -Terpinene	58.49	0.11	ND ^{b)}	ND
Sesqui- terpenes	α -Ylangene	28.06	2.10	1.23	1.54
	γ -Selinene	75.97	0.42	0.14	ND
	α -Bergamotene	103.45	1.60	0.82	0.87
	β -Himachalene	23.32	0.93	0.42	0.51
	Valencene	27.76	0.56	0.29	0.38
	δ -Cadinene	31.02	0.26	0.27	0.38
	Acoradiene	3.94	0.34	ND	ND
	α -Longipinene	4.73	0.17	ND	ND
Terpene alcohols	δ -Selinene	20.27	0.22	ND	ND
	L-Linalool	5.48	0.69	0.23	0.80
	Borneol	4.92	0.21	ND	ND
	Terpinen-4-ol	46.02	2.24	2.27	2.47
	α -Terpineol	23.07	0.86	0.88	0.96
	Citronellol	11.15	0.34	0.22	0.26
	T-Muurolol	96.45	0.49	0.58	0.85

a) : hours

b) ND : Not detected

Table 27. Changes of volatile terpenoid content of *Schizandra* fruit during aqueous extraction processing 2 at room temperature ($\mu\text{g/g}$)

Group	Terpenes	Fresh	Extract time		
			6 ^{a)}	12	18
Mono- terpenes	β -Cymene	21.67	0.36	0.36	0.32
	α -Ylangene	28.06	2.75	3.51	4.28
	trans- β -Farnesene	38.03	ND ^{b)}	ND	0.30
	γ -Selinene	75.97	0.62	0.74	0.93
	β -Selinene	30.33	ND	0.26	0.37
Sesqui- terpenes	α -Bergamotene	103.45	2.48	2.53	3.50
	α -Selinene	45.08	ND	0.85	1.02
	β -Himachalene	23.32	1.47	1.64	1.97
	Valencene	27.76	1.08	1.11	1.34
	δ -Cadinene	31.02	0.40	0.44	0.58
	Acoradiene	3.94	ND	0.50	0.61
	δ -Selinene	20.27	0.56	0.62	0.59
	L-Linalool	5.48	0.78	0.79	0.83
Terpene alcohols	Terpinen-4-ol	46.02	2.50	2.95	3.02
	α -Terpineol	23.07	0.92	0.92	1.13
	Citronellol	11.15	0.32	0.33	0.32
	T-Muurolol	96.45	1.62	2.02	1.70

^{a)} : hours

^{b)} ND : Not detected

Table 28. Changes of volatile terpenoid content of *Schizandra* fruit during acetic acid extraction processing at room temperature ($\mu\text{g/g}$)

Group	Terpenes	Fresh	Extract time (pH 3.07)		
			6 ^{a)}	12	18
Mono- terpenes	α -Terpinene	21.88	0.22	0.13	0.14
	β -Cymene	21.67	0.38	0.37	0.35
	1,8-Cineole	5.91	0.41	0.36	0.49
	γ -Terpinene	58.49	0.11	0.14	0.06
Sesqui- terpenes	α -Ylangene	28.06	0.72	2.01	1.01
	β -Elemene	120.16	ND ^{b)}	0.13	0.10
	trans- β -Farnesene	38.03	ND	ND	0.13
	γ -Selinene	75.97	0.18	0.33	0.31
	β -Selinene	30.33	ND	0.07	0.07
	α -Bergamotene	103.45	0.67	1.65	1.22
	α -Selinene	45.08	0.10	0.20	0.21
	β -Himachalene	23.32	0.28	0.97	0.58
	Valencene	27.76	0.27	0.64	0.45
	δ -Cadinene	31.02	0.08	0.19	0.19
	Acoradiene	3.94	ND	0.27	0.14
	α -Longipinene	4.73	ND	0.09	ND
	δ -Selinene	20.27	0.27	0.33	0.57
T e r p e n e alcohols	L-Linalool	5.48	0.68	0.74	0.80
	Borneol	4.92	0.11	0.18	0.23
	Terpinen-4-ol	46.02	2.68	3.18	3.74
	α -Terpineol	23.07	0.82	1.02	1.05
	Citronellol	11.15	0.33	0.42	0.48
	T-Muurolol	96.45	0.46	0.72	1.31

a) : hours

b) ND : Not detected

추출조건에 따른 terpene류의 함량에서는 monoterpene류, sesquiterpene류 및 terpene alcohol류의 3 그룹 모두 온침법이 냉침법 1, 냉침법 2 및 아세트산법에 비해 월등히 높은 함량을 나타냈다. 또한, 온침법은 시간이 경과할수록 mono 및 sesquiterpene류의 함량이 증가하였으나 terpene alcohol류의 함량은 일정한 속도로 감소하는 것으로 나타났다. 이는 terpene alcohol류의 경우 sesquiterpene류보다 비점이 낮아 고온에서 장시간 노출 시 열변성 및 휘발되어 그 함량이 감소되었을 것으로 추정된다.

온침법에서는 terpene alcohol류의 함량이 시간의 경과에 따라 감소하였음에도 불구하고 sesquiterpene류가 큰 폭으로 증가하여 총 terpene류의 함량도 12시간이후 크게 증가된 결과가 나타났다. 냉침법 1, 냉침법 2 및 아세트산추출은 시간의 경과에 따른 뚜렷한 차이는 없었지만 전체적으로 냉침법 2는 아세트산추출법과 비슷한 패턴을 나타냈으며, 냉침법 1 및 아세트산추출법에 비해 높은 함량을 나타냈다. 따라서 온침법은 18시간동안 추출하는 것이 총 terpene류의 함량이 가장 높았으며, 냉침법1은 6시간, 냉침법 2은 18시간, 아세트산추출법은 12시간 동안 추출하는 것이 높은 terpene 함량을 나타내었다.

식물체의 향기와 밀접한 관련이 있는 terpene alcohol류는 냉침법 1, 냉침법 2 및 아세트산추출법이 온침법보다 추출량은 낮았으나, 총 terpene류의 함량에 대한 terpene alcohol류의 비율은 높게 나타났다.

윤 등은 dynamic headspace법을 이용하여 감식초의 휘발성 향기성분을 분석한 결과, acids 2종, alcohols 6종, aldehydes 4종, esters 8종을 확인하였으며, 감식초는 사과식초, 현미식초, 양조식초에 비해 다양한 alcohols을 함유하는 것이 특징이라고 보고하였다[21].

서 등은 headspace법과 SPME법을 이용하여 감식초의 휘발성 향기성분을 분석하였는데, 총 37개의 화합물이 있었고, 6종의 acids, 8종의 aldehydes, 7종의 alcohols, 10종의 esters, 2종의 hydrocarbones, 1종의 ketones과 기타 3종의 휘발성 성분이 확인되었으며, 감식초의 주된 휘발성 성분으로 acetic acid, ethyl acetate, 3-hydroxy-2-butanone, ethanol, phenethyl alcohol 등 이라고 보고하였다[22]. 이러한 연구 결과에서 알 수 있듯이 감식초의 휘발성 향기성분에서는 terpene류의 화합물이 확인되지 않았다.

효율적인 추출방법을 알아보려고 수행되었던 냉침법 2는 온침법보다는 현저히 낮은 terpene 함량을 보였으나 실온에서 추출한 냉침법 1과 아세트산추출법보다는 높은 terpene 함량을 보였다. 또한 냉침법1과 아세트산추출법은 시간이 경과함에 따라 감소 혹은 일정한 값을 나타내는 반면 냉침법 2는 비록, 적은 증가폭이지만 일정하게 증가하는 것을 알 수 있었다.

따라서 감식초를 첨가함으로써 pH를 낮춰줄 뿐 아니라 감식초 내에 존재하는 성분에 의해 효율적인 추출이 이뤄졌다고 추정되며, 성분의 열변성 및 파괴가 일어날 수 있는 고온의 온침법을 대체하고 pH를 내릴 수 있는, 다소 안전한 첨가물인 감식초 혹은 다른 산성의 첨가물을 첨가한 추출방법이 가장 효율적이며 이에 대한 연구가 더 많이 이뤄져야 될 것으로 판단되었다.

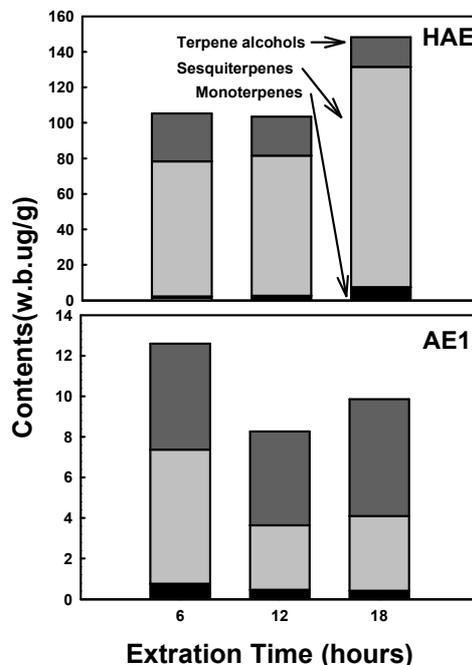


Fig. 152. Changes of the contents of volatile terpenoid groups of *Schizandra* fruit during extraction processes. Symbols represent as, HWE; hot-water extraction, AE1; aqueous extraction 1.

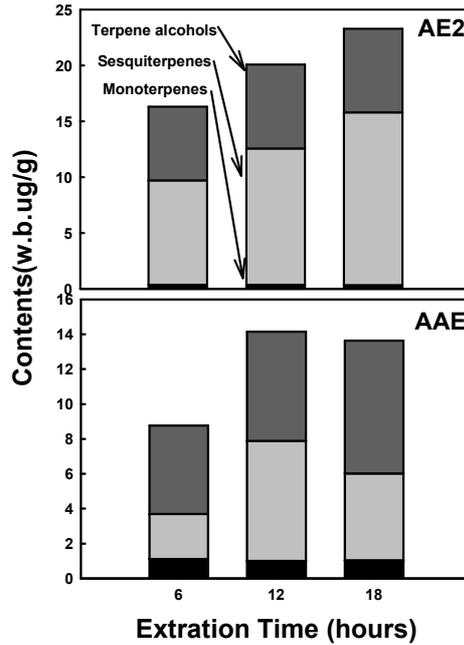


Fig. 153. Changes of the contents of volatile terpenoid groups of *Schizandra* fruit during extraction processes. Symbols represent as, AE2; aqueous extraction 2 , AAE; acetic acid extraction.

각 조건에 따라 추출한 추출·여과액의 색도의 변화를 조사하기 위해 L, a, b 및 ΔE 값을 측정하였으며, 그 결과를 Table 29에 나타내었다.

Table 29. Changes of Hunter color value and total color difference of *Schizandra* fruit at various extraction conditions

Extraction method	Hours	Hunter color value ¹⁾			
		L	a	b	ΔE
Hot-water extraction	6	17.43 ^{a2)} ±0.01	4.11 ^b ±0.10	0.41 ^a ±0.04	74.72 ^c ±0.02
	12	17.79 ^b ±0.02	3.92 ^a ±0.11	0.46 ^b ±0.05	74.35 ^b ±0.02
	18	18.64 ^c ±0.03	4.38 ^c ±0.14	1.01 ^c ±0.05	73.53 ^a ±0.03
Aqueous extraction 1	6	17.30 ^a ±0.03	5.21 ^c ±0.08	0.78 ^c ±0.04	74.90 ^c ±0.03
	12	17.34 ^b ±0.01	4.70 ^b ±0.04	0.65 ^b ±0.03	74.83 ^b ±0.02
	18	18.17 ^c ±0.02	4.27 ^a ±0.06	0.24 ^a ±0.03	73.98 ^a ±0.02
Aqueous extraction 2	6	17.60 ^a ±0.03	5.08 ^a ±0.09	0.73 ^a ±0.05	74.60 ^c ±0.03
	12	17.83 ^b ±0.02	5.40 ^b ±0.07	0.98 ^c ±0.04	74.39 ^b ±0.02
	18	17.95 ^c ±0.02	5.34 ^b ±0.06	0.90 ^b ±0.04	74.26 ^a ±0.02
Acetic acid extraction	6	17.22 ^c ±0.02	5.11 ^c ±0.10	0.86 ^c ±0.05	74.98 ^a ±0.03
	12	17.10 ^b ±0.01	5.03 ^b ±0.06	0.69 ^b ±0.04	75.09 ^b ±0.01
	18	17.03 ^a ±0.02	4.72 ^a ±0.10	0.62 ^a ±0.03	75.14 ^c ±0.02

¹⁾ L = Lightness, a = redness, b = yellowness,

$$\Delta E(\text{total color difference value}) = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

²⁾ abc Means in a column by different superscripts are significantly different at the p<0.05 significance level by Duncan's multiple range test.

L값은 흑색의 0에서 백색의 100까지의 범위로 명암도를 나타내는 값으로, 온침법과 냉침법 1은 12시간까지 변화의 폭이 낮았지만 그 이후 큰 폭으로 상승하는 것을 알 수 있었으며 냉침법 2는 추출시간이 경과함에 따라 일정한 속도로 증가하였다.

또한 아세트산법은 추출시간이 경과함에 따라 일정한 속도로 감소하였지만 대체적으로 큰 변화는 없었다.

a값은 녹색(-60)과 적색(+60)을 나타내는 값으로 냉침법 1은 시간이 경과함에 따라 일정한 속도로 감소하고 있으며, 냉침법 2는 서서히 증가하다 거의 변화가 없었다. 아세트산법은 냉침법 2와 비슷한 패턴을 보였지만 전체적으로 낮은 a값을 나타냈고 온침법은 약간 감소하다 12시간 이후 증가하였지만 실온에서 추출된 시료에 비해 상대적으로 a값이 낮게 나타났는데 가열시간이 증가함에 따라 오미자의 붉은색이 소실되었기 때문이며, 감식초 10%를 첨가한 냉침법 2는 pH가 낮아져 anthocyanin 색소의 안정성이 높아졌기 때문에 전체적으로 a값이 높게 나타난 것으로 사료된다.

청색(-60)과 황색(+60)을 나타내는 b값은 온침법의 경우 12시간까지 서서히 증가하다 그 이후에는 급격히 증가하였는데, 이는 오미자의 당류가 높은 온도로 인해 furfural과 같은 갈색의 maillard 반응생성물로 전환되어 나타난 결과로 해석된다. 냉침법 1은 추출시간이 길어짐에 따라 감소하는 폭 또한 커졌다.

냉침법 2는 전체적으로 다른 추출방법보다 b값이 높았으며 12시간까지 증가하다 이후에 서서히 감소하는 것으로 나타났고, 아세트산법은 일정하게 감소하는 모습을 보였다. b값은 전반적으로 추출시간에 따른 패턴이 일정하지 않고 안정적이지 못한 결과를 나타냈는데, 이는 온도와 시간에 대한 복잡한 화학적 감수성을 나타내는 것으로 추측된다.

2. 제품개발

(1) 오미자 음료

(가) 개발과정

오미자의 추출공정을 거친 추출원액에 여러 가지 부원료를 배합하여 관능검사에 의한 품질 평가를 거쳐 최종적으로 확인한 오미자음료의 제조과정과 그 배합비율은 다음과 같다.

이 제품의 유형은 물에 희석하여 음용하는 액상음료이며, 소비자들이 직접 음용시 물에 타서 마셔야 하는 번거로움이 예상되지만 소비자 측면에서 보는 원가는 훨씬 낮은 것으로 산출되었다.

(나) 성분 및 배합 비율(1차)

첨가물	농도 (%)
건 오미자	10.0
액상과당	60.0
이소말토올리고당	1.0
감식초	1.0
비타민 C	0.05
스테비오사이드	0.2

(다) 제조공정

① 모든 사용원료는 식품 및 식품첨가물공전 규격에 적합한 원료만을 검수해서 사용한다. 남은 원료는 열풍건조법으로 건오미자로 가공하여 보관한다.

② 구입한 오미자를 선별 후 세척한다.

③ 세척된 오미자를 추출탱크에 넣고 물을 적량 넣어 상온에서 냉침법으로 4시간 추출한다.

④ “다”의 추출액과 액상과당 등 나머지 식품첨가물을 배합비율에 의거 첨가하여 완전히 녹을 때까지 교반한다.

⑤ 완전히 용해된 배합 액을 열교환기로 90℃ 이상에서 3~5초간 순간살균 한 다음 5마이크로 여과기를 통과시켜 여과한다.

⑥ 살균, 여과된 배합 액을 충전 기로 일정량씩 세척된 용기에 자동 충전 한다.

⑦ 충전 된 용기에 뚜껑을 덮고 실링기로 실링 한다.

⑧ 실링 된 제품을 라벨을 부착하고 포장한다.

⑨ 제품분석 후 규격에 적합한 제품만 포장하여 상품화 한다.



그림 154. 오미자 음료 시제품

표 30. 오미자음료 최종 시제품의 품질규격

시험항목	규격기준	시제품의 규격
납(mg/Kg)	0.3 이하	적합
카드뮴(mg/Kg)	0.1 이하	0.01
세균수	100/ml 이하	적합
대장균군	음성	적합
보존료(g/Kg)	안식향산으로서 0.6 이하	불검출
	파라옥시안식향산으로서 0.1 이하	
	소르빈산으로서 1.0 이하	

(2) 오미초 (오미자 식초)

(가) 개발과정 및 결과

오미자의 독특한 향미를 가지는 식초를 개발하고자 오미자의 배합비율을 달리하여 발효한 식초 시제품의 산도 및 관능적 품질을 조사한 결과, 오미자 자체의 산도가 높고 당의 함량은 낮아 알콜발효 및 초산발효가 불량하여 점진적으로 당질원료를 첨가하는 공정을 시도하였다. 당질원료로서 포도를 선정하였으며 포도와 오미자의 원료 배합비율을 89:11 정도로 하였을 때 향미 및 색상 등의 관능적 품질이 가장 양호하였다. 최종적으로 결정한 오미초의 배합비율과 제조공정은 표 31와 같으며 최종 시제품의 사진은 그림 155와 같다.

표 31. 오미초의 원료배합 및 제조공정도

01	원료입고 및 검수		입고중량 및 선도를 검수
	↓		
02	원료세척		자동세척기로 세척, 줄기 제거
	↓		
03	파쇄		자동파쇄기, 7m/m 이하로 파쇄
	↓	↔ 원료 온도 유지(28 ± 2℃)	
04	알콜발효(1단담금)	↔ 주모 배양 주입	포도 700kg
	↓		
05	알콜발효(2단담금)		포도 3,750kg 합계:4,450kg
	↓		
06	착즙		유압착즙기로 액과 박 분리
	↓		
07	추출	↔ 오미자 투입	착즙액 약 2,670Kg, 오미자 550Kg
	↓		
08	초산발효	↔ 밀초, 종초배양 주입	추출액 투입
	↓		
09	침전		저장탱크
	↓		
10	1차 여과	↔ (원심력 8,000rpm)	세퍼레이타 여과(8,000/RPM)
	↓		
11	2차 여과	(규조토 #200, 500)	규조토 여과기
	↓		
12	속성		저장탱크
	↓		
13	살균		H·T·S·T 순간살균 95℃ - 10sec
	↓		
14	3차 여과	(1μFilter)	1μFilter 250m/m × 6EA
	↓		
15	주액		중량 = 비중 × 내용량
	↓		
16	Capping(밀봉)		캡 밀봉
	↓		
17	Labeling	↔ Date Coding	품질유지기한 인쇄 Z-Print
	↓		
18	검수 및 보관		제품을 sampling하여 검사한다.
	↓		
19	운송		합격된 제품에 한하여 출고한다.



그림 155. 오미초 시제품

(나) 오미초 품질검사

① 검사방법

개발된 오미초 시제품의 품질검사는 식품공전의 5-21-1 식초의 규격과 시험방법에 의하여 다음과 같이 시행하였다.

㉠ 총산: 검체 10ml을 취하고, 이에 끓여서 식힌 물을 가하여 100ml로 하고 그 20ml을 phenolphtalein시액을 지시약으로 하여 0.1N 수산화나트륨액으로 적정하였다.

㉡ 타르색소: 식품공전 제10. 일반시험법 5. 착색료시험법중 모사염색법으로 시험하였다.

㉢ 보존료: 식품공전 제10. 일반시험법 2. 보존료 시험법에 따라 시험하였다.

㉣ Shizandrin분석: 시료 500 mg을 취하여 methanol 2.5 ml과 함께 마쇄한 후, 3000

rpm에서 15분 동안 원심분리하는 과정을 3회 반복하여 얻은 상등액을 수집하여 일정량으로 한 것을 시험액으로 하여, Agilent 1100 series HPLC에 Phenomenex사의 Luna 5U C18(150×3mm) column을 장착하여 파장 215 nm, mobile phase 및 gradient ratio는 증류수: acetonitrile의 비율을 80:20에서 20:100까지 28분간 지속하고 이후 35분 까지 80:20으로 변화시켰으며 이때 flow rate는 1.0 ml/min이었다.

② 검사결과

검사한 결과는 다음 표와 같다.

표 32. 오미초의 품질규격

시험항목	규격기준	시제품의 규격
총산 (초산으로서, w/v%)	4.0~29.0 미만	6.2
타르색소	검출되어서는 아니된다	불검출
보존료 (g/L)	0.1이하 (파라옥시안식향산으로서)	불검출
schisandrin (µg/ml)	-	1.6

(3) 오미자와인 개발

(가) 1차 개발

오미자를 이용한 주류의 개발 일환으로 오미자와인을 개발하기 위하여 다음과 같은 발효 공정을 거쳐 제조하였으며 제조한 제품은 관능검사의 결과에 따라 제조공정의 수정 및 개선작업을 반복하였다.

표 33. 오미자와인공정 (20 L 기준)

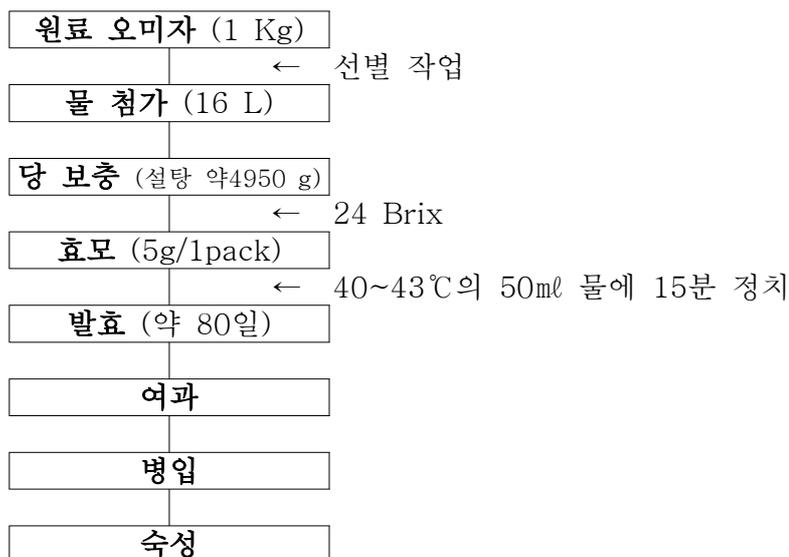




그림 34. 오미자와인 1차 시제품

(나) 오미자와인 2차 개발

① 재료

실험용 오미자는 생 오미자(경북 문경시)를 구입하여 사용하였다. 반 건조 오미자는 생 오미자의 줄기를 제거한 후 흐르는 물에 세척하여 자연광에 4일간 건조한 것을 사용하였고, 설탕은 시판 설탕(CJ Corp, Korea)을 구입하여 사용하였다. 효모로서는 일반적으로 사용되는 맥주효모를 사용하였다.

② 반 건조 오미자로 만든 오미자 와인의 제조

자연광에 4일간 건조한 오미자 1kg을 20ℓ크기의 통에 담고 물10ℓ, 설탕 700g 맥주효모 5.5g을 첨가하였다.

이때 대조군으로 생 오미자로 만든 오미자 와인을 대조군으로 하여 동일한 조건에서 제조·보관한 후 매일 설탕을 500g씩 첨가한 후 Brix를 측정하고 5일후 Brix를 측정하여 두 와인이 동일한 Brix (20 Brix)가 되도록 설탕을 첨가하였다. 최종적으로 반 건조 오미자로 만든 오미자 와인에는 설탕 5.2kg, 생 오미자로 만든 오미자 와인에는 설탕 2.72kg이 첨가되었고, 품질의 변화를 막기 위하여 와인을 담근 통을 입구를 봉한 후 어두운 곳에서 보관한 후 분석을 행하였다.

③ Brix의 변화

반 건조 오미자 와인과 생 오미자 와인을 5일간 담근 후 측정하였을 때 각 와인의 Brix는 14.7 Brix, 20.1 Brix로 측정되었다. 이때 20 Brix가 되도록 설탕을 첨가한 후 약 3개월 숙성시킨 후의 Brix는 반 건조 오미자 와인이 34.7 Brix, 생 오미자 와인이 22.7 Brix 측정 되었다.

표 35. 오미자 와인의 저장기간에 따른 Brix의 변화

	저장기간(days)						
	1	2	3	4	5(설탕 첨가 전)	5(설탕 첨가 후)	최종
반 건조 오미자의 Brix	6.3	8.5	11.4	13.8	14.7	20.2	34.7
생 오미자의 Brix	5.2	9.3	16.2	18.0	20.1	20.1	22.7

④ Alcohol의 변화

Alcohol도수의 측정은 각 와인을 3개의 샘플로 나누어 주정계를 띄워 측정하였다. 각 샘플의 측정 값의 평균값을 최종 Alcohol 도수로 보았으며, 이때 와인의 최종 Alcohol 도수는 반 건조 오미자 와인이 9.4도, 생 오미자 와인이 6.8도로 측정되었다.

표 36. 오미자 와인의 Alcohol도수의 변화

Alcohol 도수	A	B	C	평균
반 건조 오미자	9.2	9.3	9.6	9.4
생 오미자	6.9	6.5	7.0	6.8



그림 156. 오미자와인 2차 시제품

(다) 품질검사

① 에탄올

주세법 규정에 따라 시행하였다.

② 메탄올

시료를 15℃에서 검정한 100 mL 메스플라스크의 눈금까지 취하고 이것을 약 300~500 mL 플라스크에 옮긴 다음 이 메스플라스크를 약 15 mL의 물로 2회 씻은 액을 플라스크에 합치고 냉각기에 연결한 다음 메스플라스크를 받는 용기로 하여 증류한다.

유액이 70 mL(소요시간은 약 20분 내외)가 되면 증류를 중지하고 내부표준용액을 최종농도 10~100 mg/L되게 가한 후 물을 가하여 15℃에서 메스플라스크의 눈금까지 채운다음 잘 흔들어 시험용액으로 한다.

시험용액 1~5 µL를 가스크로마토그래프에 주입하여 얻어진 크로마토그램으로부터 메탄올피크의 높이 또는 면적을 구하여 미리 메탄올표준액 계열을 검체와 같은 방법으로 처리하여 작성한 검량선에 의하여 메탄올 함량을 구한다.

- 측정조건 -

① 기기 : 가스크로마토그래프 수소염이온화 검출기(Flame Ionization detector)

② 칼럼 : Polyethylene glycol 계열의 물질이 코팅된 캐필러리 칼럼, 50 m×0.2 mm×0.3 µm 또는 이와 동등한 것

③ 칼럼온도 : 60~150℃

④ 시료주입부 온도 : 150~200℃

⑤ 검출기 온도 : 150~200℃

⑥ 운반기체 : N₂ 또는 He

⑦ 캐리어 가스 유량 : 1 mL/min

③ 보존료(g/L)

식품공전 제10. 일반시험법 2. 보존료 시험법에 따라 시험하였다.

④ Shizandrin분석

시료 500 mg을 취하여 methanol 2.5 ml과 함께 마쇄한 후, 3000 rpm에서 15분 동안 원심분리하는 과정을 3회 반복하여 얻은 상등액을 수집하여 일정량으로 한 것을 시험액으로 하여, Agilent 1100 series HPLC에 Phenomenex사의 Luna 5µ C18 (150×3mm) column을 장착하여 파장 215 nm, mobile phase 및 gradient ratio는 증류수: acetonitrile의 비율을 80:20에서 20:100까지 28분간 지속하고 이후 35분 까지 80:20으로 변화시켰으며 이때 flow rate는 1.0 ml/min이었다.

표 37. 오미자 와인 최종 시제품의 품질규격

시험항목	규격기준		시제품의 규격
에탄올 (v/v%)	표시도수의 ± 0.5		9.4
메탄올 (mg/mL)	1.0 이하		불검출
보존료 (g/L)	소르빈산 소르빈산칼륨 소르빈산칼슘	0.2 이하 (소르빈산으로서)	불검출
	파라옥시안식향산부틸	0.05 이하	
schisandrin ($\mu\text{g/ml}$)	-		1.0

(4) 오미자 브랜드

(가) 제품개발

오미자를 원료로 한 브랜드 개발은 이미 제조한 오미자와인을 증류하는 방식을 채택하였으며, 증류는 100℃ 이상으로 가열 후 냉각관으로 응축하는 통상적 방법 및 장치를 이용하여 시행하였으며 발효주에 대한 수율은 대략 40% 정도이었다. 증류주에 맛, 색 및 향을 개선하기 위하여 오미자추출액을 첨가하고 기타 식품첨가물을 조합하는 과정으로 진행하였다.

① 1차 증류주

- 1차증류주의 품질

1차 증류에서 획득한 증류주의 주도는 약 12.3이었으며, 오미자로부터 유래된 schisandrin 함량은 0.054mg/ml이었다.



그림 157. 1차 증류주 시제품



그림 158. 2차 증류주 (브랜드) 시제품

② 2차 증류주

㉠ 제품의 품질

2차 증류주의 제조는 1차 증류주의 재증류 방식으로 행하였으며, 2차 증류에서 얻은 증류주에 오미자의 고유색을 첨가하고 향미를 부여한 최종 시제품은 사진과 같으며, 이 시제품의 품질은 표 38과 같이 19.2%의 주도로써 일반 브랜드의 약 40% 전후 주도에 비하여 너무 낮게 나타났다. 이는 본 증류공정에서 사용한 증류기가 단식의 batch방식 인 탓으로 생각된다. 그러나 2차 증류에서 오미자의 schisandrin이 전혀 검출되지 않은 결과로 볼 때, 주도를 제고하기 위한 목적만으로 증류횟수를 증가할 경우 오미자 고유성분의 잔류량이 거의 없어질 것으로 추정되기에 이 방식의 증류로는 2차 증류가 한계라고 여겨지며, 이를 개선하기 위하여서는 다단연속증류기를 사용하여야 하는 것으로 판단되지만 실험용 또는 파일럿용 다단연속증류기를 현실적으로 이용할 곳은 없었다.

(나) 품질검사

① 에탄올

주세법의 규정에 따른다.

- 메탄올: 27-1 탁주 6) 시험방법 (3) 메탄올에 따라 시험한다.

- 알데히드: 검체 5 mL에 물 45 mL를 가하여 공전병에 넣고 0.01 N 요오드액 10 mL에 대응하는 0.01 N 아황산수소나트륨액을 가하여 흔들어 섞고 마개를 막아 30분간 방치한 다음 0.01 N 요오드액 10 mL를 넣고 이에 전분시액 2~3방울 가하여 청자색이 없어질 때까지 0.01 N 티오황산나트륨액으로 적정한다.

$$\text{검체 100 mL중의 알데히드함량(mg)} = a \times f \times 0.22 \times \frac{100}{5}$$

a : 0.01 N 티오황산나트륨액의 적정 mL수

f : 0.01 N 티오황산나트륨액의 역가

0.01 N 티오황산나트륨 1 mL = 0.22 mg 알데히드

② Shizandrin 분석

시료 500 mg을 취하여 methanol 2.5 ml과 함께 마쇄한 후, 3000 rpm에서 15분 동안 원심분리하는 과정을 3회 반복하여 얻은 상등액을 수집하여 일정량으로 한 것을 시험액으로 하여, Agilent 1100 series HPLC에 Phenomenex사의 Luna 5U C18(150×3mm) column을 장착하여 파장 215 nm, mobile phase 및 gradient ratio는 증류수: acetonitrile의 비율을 80:20에서 20:100까지 28분간 지속하고 이후 35분 까지 80:20으로 변화시켰으며 이때 flow rate는 1.0 ml/min이었다.

표 38. 오미자 브랜드 최종 시제품의 품질규격

시험항목	규격기준	시제품의 규격
에탄올 (v/v %)	표시도수의 ±0.5	19.2
메탄올 (mg/mL)	1.0 이하	불검출
알데히드 (mg/100mL)	70.0 이하	4.5
schisandrin (µg/ml)	-	불검출

(5) Schisandrin 고농축 캡슐

(가) 제품의 개발

① 개발과정

Schisandrin을 주요 기능성물질로 하는 캡슐제품을 개발하고자 오미자의 각 가공형태별 schisandrin함량을 조사한 결과 표와 같이 생오미자에는 0.27%이었으나 건조한 종자에서 13.2%로 나타나서 대부분의 schisandrin이 종자에 함유되어 있음을 알수 있었다.

그러나 종자에서 추출한 종자유에서는 12.86%로 다소 감소하여 유지의 추출시 schisandrin의 일부는 종자막에 거의 비슷한 비율로 잔존하고 있었다.

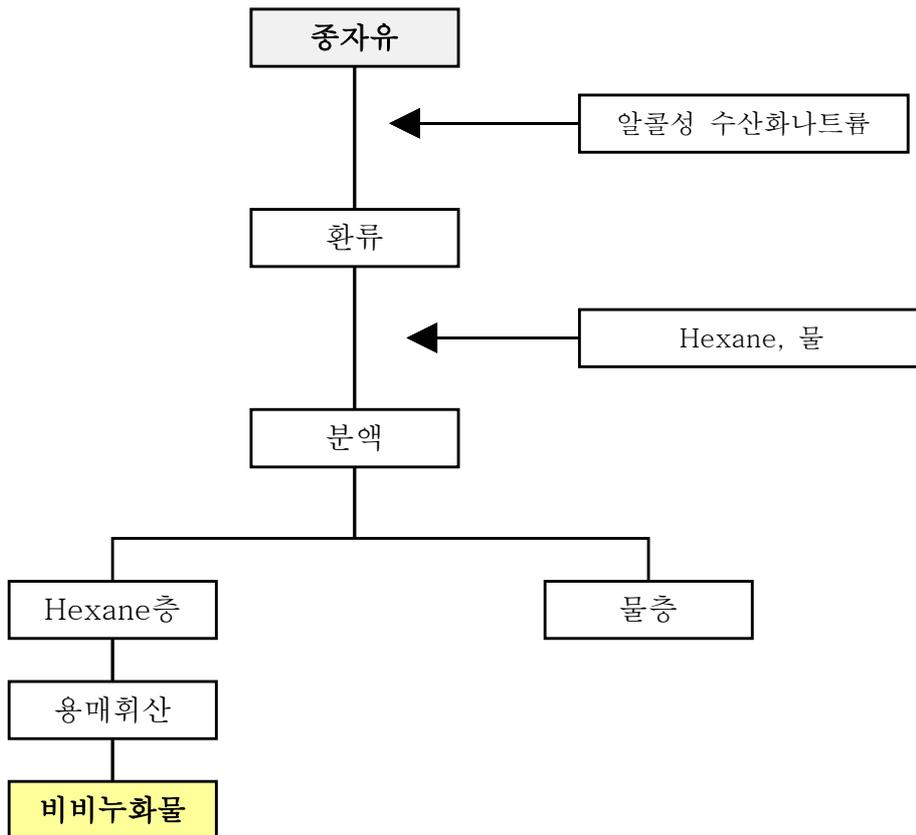
그러나 종자 중 종자유의 비중이 70.2%임을 감안하면 종자 중의 schisandrin의 대부분을 추출한 편이며 더구나 종자는 식용으로 하기에는 맛과 질감으로 볼 때 곤란한 재료라고 판단되기에 종자유를 활용함이 타당하다고 판단하였다.

종자유의 schisandrin함량을 더 높이기 위하여, 유지의 비누화반응을 활용하여 유지의 대부

분을 점유하고 있는 지방산을 제거하고 남은 비비누화물을 획득한 후 이의 schisandrin 함량을 조사한 결과 42% 정도의 고농축 물질을 개발하였다. 그 제조공정은 그림과 같으며, 식품첨가물인 수산화나트륨과 hexane을 사용하여 식용에 문제가 없도록 설계하였으며, 연질캡슐 형태의 건강기능식품으로 제형을 결정하였다.

다만, 식품공전 및 건강기능식품공전에 아직 수재되지 않은 형태의 신개발제품이기에 별도의 개별기준 및 규격을 설정하여야 하는 과정이 남아 있다.

그림 159. 제조공정도



(나) 품질검사

① Shizandrine 분석

시료 500 mg을 취하여 methanol 2.5 ml과 함께 마쇄한 후, 3000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하는 과정을 3회 반복하여 얻은 상등액을 수집하여 일정량으로 한 것을 시험액으로 하여, Agilent 1100 series HPLC에 Phenomenex사의 Luna 5U C18(150×3mm) column을 장착하여 파장 215 nm, mobile phase 및 gradient ratio는 증류수: acetonitrile의 비율을 80:20에서 20:100 까지 28분간 지속하고 이후 35분 까지 80:20으로 변화시켰으며 이때 flow rate는 1.0 ml/min 이었다.

② GC/MS에 의한 성분분석

오미자유의 schisandrin 농축물의 schisandrin 이외의 개략적 조성물을 확인하기 위하여 실

시한 GC/MS의 분석은 GC-MS (HP 6890 series GC system+HP 5973 MSD, Hewlett Packard Co. USA)에서, HP-5MS capillary column (30.0m×250 μ m i.d., 0.25 μ m film thickness, Hewlett Packard Co. USA), carrier gas는 He (32.6 ml/min.), Split ratio 30:1, 오븐 온도조건 initial temp.(time) 100 $^{\circ}$ C(15 min.), 1차 rate는 5 $^{\circ}$ C/min., middle temp.(time) 220 $^{\circ}$ C(5 min.), 2차 rate는 5 $^{\circ}$ C/min., 그리고 final temp.(time)는 220 $^{\circ}$ C(5 min.)이며, injection port temp. 250 $^{\circ}$ C, interface temp. 240 $^{\circ}$ C 및 70 eV의 ionization voltage의 조건으로 분석하였다. 각 화합물들의 동정은 mass spectrum을 해석한 결과를 토대로 Willey library 및 문헌을 참고하였다.

그 결과, GC/MS로 분석한 TIC (Total Ion Chromatography)는 그림과 같게 나타났으며 각 피크의 mass spectrum을 해석한 결과, massborneol, carvacrol, α -ylagene, β -elemene, trans- β -farnesene, acoradiene, widdrene, β -chamigrene, germacrene D, α -longipinene, α -amorphene, β -himachalene, 1,5-dimethyl-1,5-cyclooctadiene, γ -cadinene, epizonaren 및 farnesol 등으로 대부분 타 식물체에서는 보기 어려운 테르펜류가 주성분이었으며, 이 성분들에 관한 심도 있는 연구가 이루어질 경우 흥미로운 결과가 기대되었다.

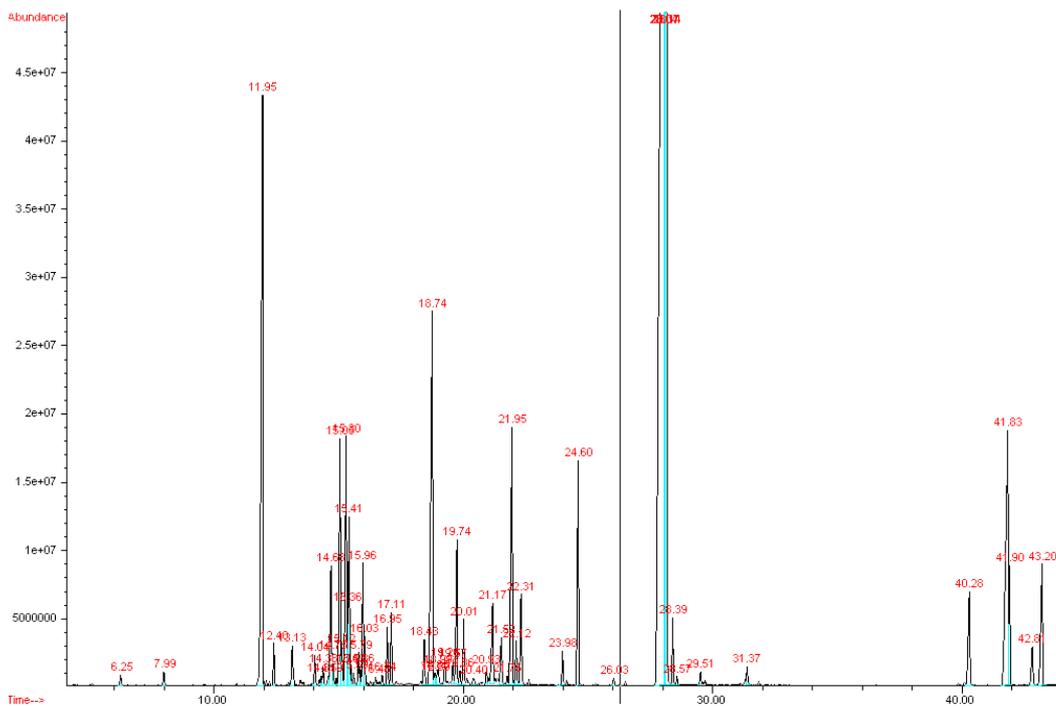


그림 160. Schisandrin 고농축물의 GC/MS TIC.

표 39. 오미자의 가공형태별 shizandrin의 함량

가공형태	조성 (%/생오미자)	Shizandrin함량 (%)
생오미자	100	0.27
건오미자 (70℃ 열풍, 4일)	24.2	0.63
건오미자 (동결건조10일)	28.8	0.53
과육 (열풍건조)	7.6	0.12
종자 (열풍건조)	17.5	0.91
종자유	12.3	0.86
불검화물	2.4	2.51

제 4세부: 생리활성 검정

1. 면역계 생리활성 효능 검증

가. 재료 및 방법

(1) 추출물에 대한 세포 이동성 측정

면역계의 활성화기전에는 면역계 세포의 이동, 칼슘 유리, 활성산소 형성 등이 중요한 역할을 수행한다. 따라서 본 연구에서는 오미자로부터 추출된 물질들이 세포의 이동에 미치는 효능을 검증함으로써 기존의 오미자 효능에 대한 과학적 자료를 제공하고자 하였다. 또한 오미자의 추출물뿐만 아니라 식물의 주요 성분으로 알려진 Lignan계열의 화합물 들이 세포의 이동에 미치는 영향을 측정함으로써 면역 활성화제의 개발에 대한 기초 자료를 확보하고자 하였다. 특히 이들이 생리활성에 미치는 영향의 작용기전을 규명함으로써 학문적 가치 증대뿐만 아니라 이후 개발될 치료제에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

(2) 추출물이 칼슘유리에 미치는 영향 측정

칼슘 유리는 매우 다양한 생리활성 조절기전에 있어 필수적인 기능을 담당하고 있다. 특히 면역세포에서의 칼슘유리는 세포의 이동을 탐식, 활성산소 생성을 통한 잠식 활성화에 필수불가결한 생리활성 반응으로 면역체계의 전반적인 활성화에 매우 중요한 활성화이다. 따라서 본 연구에서는 면역활성의 기초 반응이 되는 칼슘유리에 오미자로부터 추출된 물질 및 식물체의 주요 구성 성분인 Lignan계열의 화합물이 미치는 영향을 측정하여 오미자 추출물의 생리활성을 검증하고자 하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 세포의 이동을 촉진하는 물질 탐색

오미자의 추출물중 면역세포 활성화에 필수적인 세포의 이동을 촉진시키는 물질을 분리하기 위해 오미자의 핵산 추출물을 크로마토그래피로 분획하여 각 분획에서 세포의 이동을 촉진시키는 분획을 확인하였다 (그림 161).

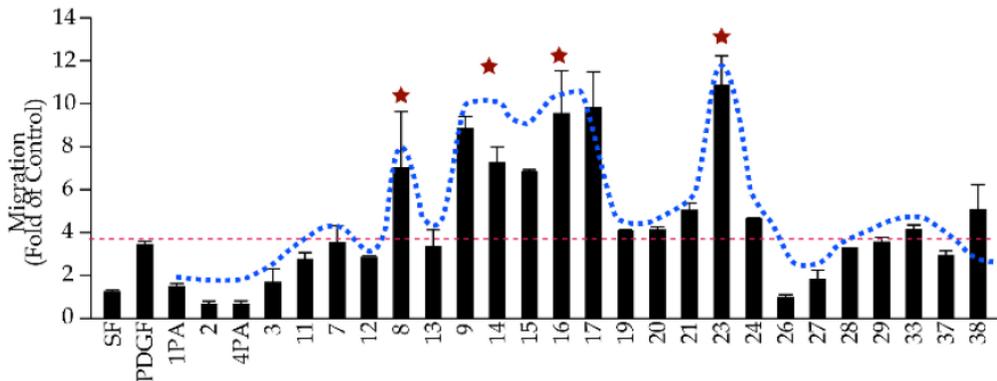


그림 161. 오미자 핵산 추출물로부터 세포의 이동을 촉진시키는 크로마토그래피 분획 탐색

(2) 오미자로부터 순수분리정제된 추출물의 세포이동 촉진 영향 검증

크로마토그래피 상에서 세포의 이동을 촉진시키는 분획을 정하고 이 분획으로부터 순수분리된 물질을 이용해 세포의 이동을 다시 측정하였다 (그림 162). 그림에서 보듯이 크로마토그래피 상에서 세포의 이동을 촉진시키는 분획인 16번과 23번에서 분리된 순수물질이 세포의 이동을 촉진함을 알 수 있었고 현재 이들 물질에 대한 NMR구조 및 화학식을 도출하고 있는 중이다.

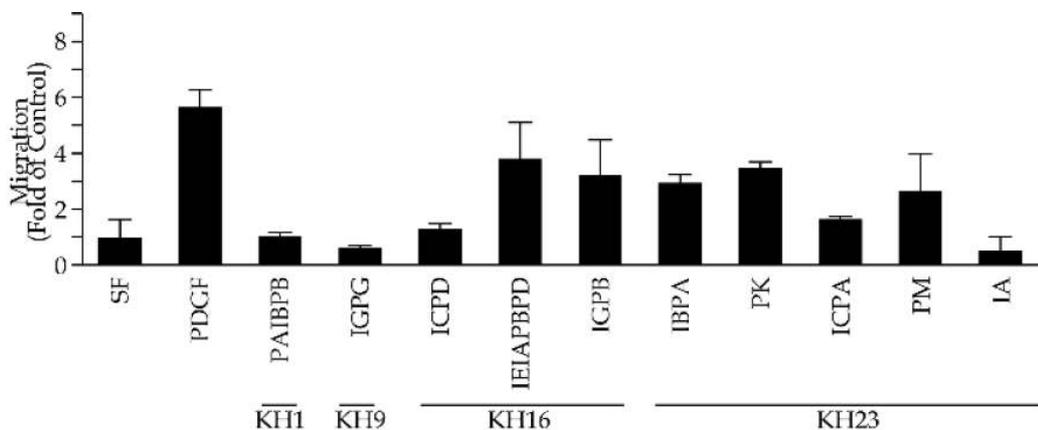


그림 162. 오미자의 핵산 추출물로부터 순수분리된 성분에 대한 세포의 이동 촉진 측정

(3) 세포의 이동을 촉진시키는 순수분리 물질 탐색

순수분리정제된 리그난 계열의 물질 및 오미자로부터 순수 분리된 물질들이 세포의 이동에 미치는 영향을 탐색하였다 (그림 163). 이로서 Pinosresinol Moiety를 가지는 리그난 들이 세포의 이동을 촉진함을 알 수 있었다. 이 중 VO7 (pinoresinol 4,4'-di-β-D-glucose, PDG)에 의한 세포이동의 신호전달 기전을 규명하고자 하였다.

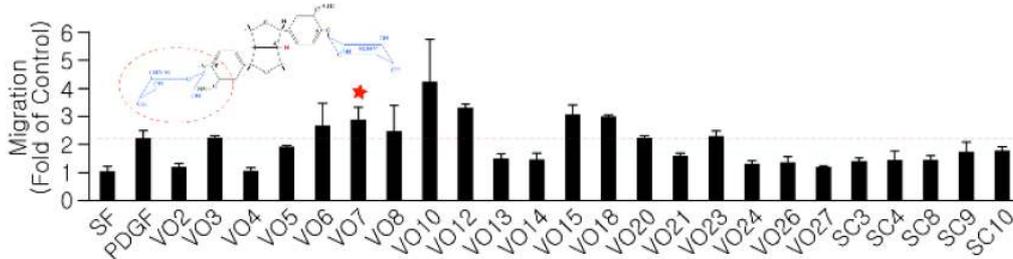


그림 163. *Valeriana officinalis*로부터 순수분리된 성분에 대한 세포의 이동 촉진 효과

(4) PDG의 구조 및 EC₅₀

PDG는 pinoresinol moiety에 두 개의 당체가 4-와 4'-에 결합된 당복합체로써 세포의 이동을 촉진시키는 EC₅₀가 약 ~2 μM로써 매우 낮은 농도에서도 세포의 이동을 촉진시키는 것으로 확인됐다 (그림 164).

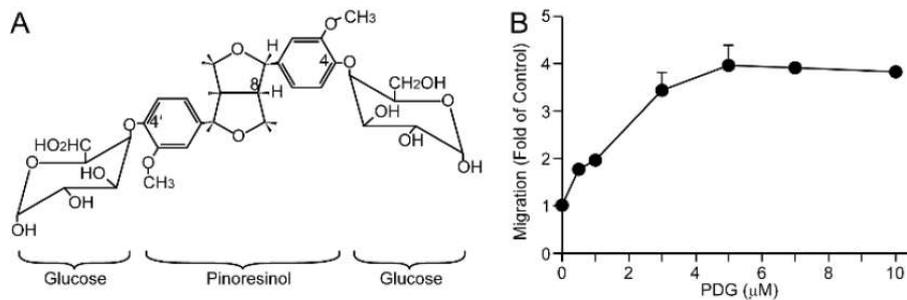


그림 164. Lignan 계열의 구조 및 pinoresinol 4,4'-di-O-β-D-glucose (PDG)에 의한 세포 이동 촉진

(5) 세포의 이동을 촉진시키는 Lignan계열의 순수분리 물질

순수 분리된 Lignan 계열의 물질을 탐색한 결과 세포의 이동을 촉진시키는데 필수적인 화학적 구조는 당체에 결합된 methoxybenzyl ring인 것으로 확인되었으며 glucose 자체는 세포의 이동을 촉진시키지 못한다는 것을 확인하였다 (그림 165). 이로써 좀 더 간단한 화학구조식을 가지는 물질들을 확인하였으며 이 후 이러한 물질들은 세포의 이동성 및 이로부터 파생되는 질병들에 대한 약물을 제조하는데 기본적인 물질로 함유될 수 있을 것이다.

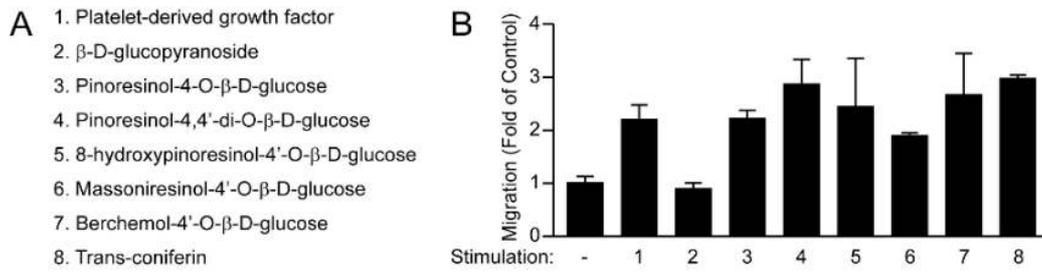


그림 165. 세포의 이동을 촉진시키는 lignan계열의 물질 효과

(6) PDG는 PI3K 및 Akt1의 활성을 통해 세포의 이동을 촉진한다

PDG에 의한 세포의 이동 촉진 기전을 규명하기 위해 대부분의 세포의 이동을 조절한다고 알려져 있는 PI3K의 활성을 약리학적 저해물질인 LY294002을 처리하여 저해하였다 (그림 166). 이로 인해 PDG에 의한 세포의 이동이 완벽하게 저해되었으나 p38 MAPK 및 MEKK의 저해제들은 PDG에 의한 세포의 이동을 저해하지 못했다. 또한 PDG에 의한 세포의 이동은 Akt1이 결손된 적중생쥐로부터 유래된 세포주에서는 유도되지 않았으며 Akt1이 결손된 세포주의 이동은 다시 Akt1을 발현시킴으로써 유도되었다. 따라서 PDG는 세포의 이동을 PI3K 및 Akt1의 활성을 통해 유도한다는 결과를 얻었다.

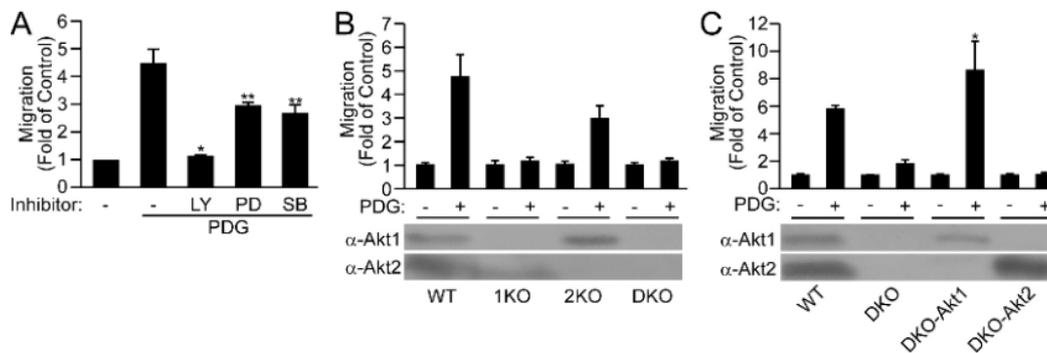


그림 166. PDG에 의한 세포의 이동은 PI3K 및 Akt1의 신호전달 기전을 통해서 일어남.

(7) PDG는 Gi가 활성화되는 GPCR인 LPA 수용체를 통해 세포의 이동을 촉진시킨다.

PI3K 및 Akt는 다양한 경로를 통해 활성화된다. PDG에 의한 PI3K 및 Akt의 활성화 기전을 규명하기 위해 PDG에 의한 세포의 이동 측정 시 receptor tyrosine kinase 저해제 (Genistein) 및 Gi를 저해하는 pertussis toxin, LPA 수용체를 저해하는 Ki16425등을 전처리 하였다 (그림 167).

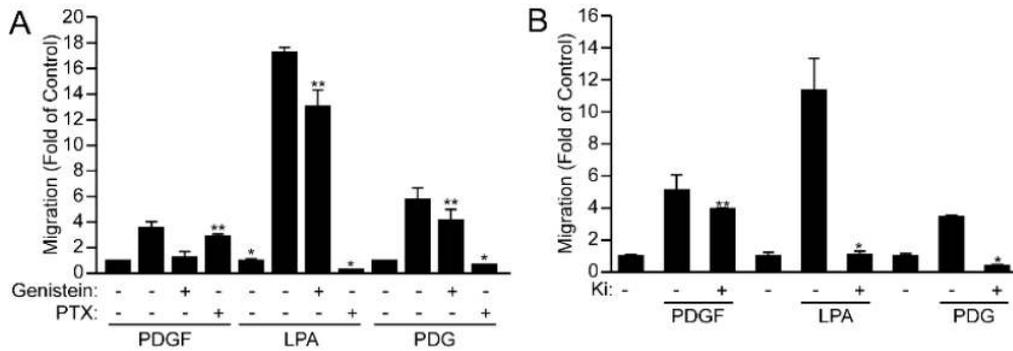


그림 167. PDG에 의한 세포의 이동은 GPCR이 결합되어 있는 LPA 수용체를 통해서 일어남.

Genistein은 receptor tyrosine kinase인 PDGF 수용체 활성화에 의한 세포의 이동을 완벽하게 봉쇄하였지만 LPA와 같이 GPCR의 활성을 경유해 세포의 이동을 촉진시키는 것에는 영향을 미치지 못했다. 반면 GPCR에 연결되어 있는 Gi 단백질을 ADP-ribosylation시킴으로써 저해한다고 알려져 있는 pertussis toxin (PTX)에 의해서는 LPA 뿐만 아니라 PDG에 의한 세포의 이동이 봉쇄되었다. 따라서 PDG는 GPCR의 활성을 통해 세포의 이동을 촉진시킴을 알 수 있었다. 다음 어느 수용체에 의해 PDG가 세포의 이동을 촉진하는지 알아보기 위해 LPA 수용체의 봉쇄제인 Ki16425를 전처리 한 후 PDG에 의한 이동을 측정하였다. Ki16425는 PDGF와 같이 receptor tyrosine kinase 수용체를 활성화하여 세포의 이동을 촉진하는 PDGF에는 영향이 없었지만 LPA와 같이 LPA 수용체를 경유하여 이동을 촉진하는 것은 완벽하게 봉쇄하였다. 특히 PDG도 LPA 수용체 봉쇄제인 Ki16425에 의해 세포의 이동이 봉쇄되었다. 따라서 이러한 결과들을 바탕으로 PDG는 LPA 수용체를 활성화 하고 Gi 단백질을 활성화 함으로써 세포의 이동을 촉진한다고 할 수 있으며 이후 PI3K 및 Akt의 활성이 PDG에 의한 세포의 이동에 필수적인 역할을 한다고 볼 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 식물체로부터 순수 분리된 물질들이 세포의 이동 등 생리활성에 미치는 작용기전을 정확하게 규명함으로써 약용 식물 및 기호식물들의 생리효능 평가에 표준화를 제공할 수 있는 기반을 제공할 수 있다고 볼 수 있다.

(8) PDG는 LPA 수용체를 경유하여 세포내 칼슘유리 촉진

위의 연구결과에 의하면 세포의 이동에는 LPA 수용체를 경유하여 이루어짐을 알 수 있었다. 또한 세포의 이동 및 면역계의 활성화에 필수적인 세포내 칼슘유리 또한 LPA 수용체를 경유하는지 알아보기 위해 PDG에 의한 칼슘유리 측정 시 다양한 봉쇄제를 이용하였다 (그림 168). 다음의 결과에서 알 수 있듯이 PDG는 세포의 칼슘유리를 강하게 조절하고 있으며 이러한 칼슘 유리는 LPA수용체의 저해제인 Ki16425에 의해 봉쇄됨을 알 수 있다. 또한 LPA를 전처리 하여 LPA 수용체를 down regulation 한 후 PDG에 의한 칼슘유리 효과를 관찰하였을 경우 PDG에 의한 칼슘유리가 현저히 감소되어 있음을 알 수 있었다. 이는 세포의 이동과 마

찬가지로 PDG에 의한 칼슘 유리는 LPA 수용체의 자극에 의해서 이루어짐을 알 수 있다. 결론적으로 Lignan 계열인 PDG는 LPA 수용체를 활성화함으로써 칼슘을 유리시키고 이를 통해 세포의 이동이 조절됨을 예측할 수 있다.

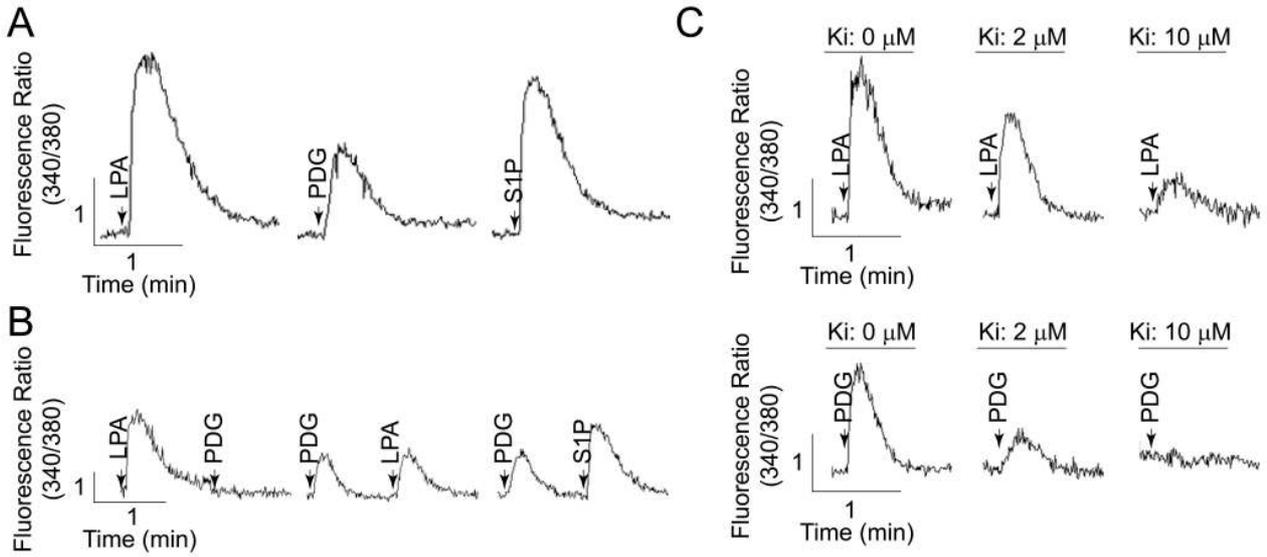


그림 168. PDG에 의한 칼슘유리는 LPA 수용체를 경유하여 이루어 진다.

2. 심혈관계에 대한 효능 검증

가. 재료 및 방법

(1) 오미자의 추출물에 의한 혈관 이완/수축 측정

비정상적인 혈관의 이완/수축은 현대인의 만성질환인 고혈압, 심혈관질환 등 매우 다양한 병적 상태를 초래한다. 특히 혈관이완은 발기, 혈압하강, 수축성 혈관의 유지 등에 필수적인 기능을 수행한다. 따라서 본 연구에서는 오미자의 중간 분획물 및 순수분리 물질들이 혈관의 이완/수축에 미치는 영향을 측정함으로써 오미자가 심혈관계에 미치는 영향을 검증하고자 하였다. 특히 혈관의 이완을 촉진하는 추출물에 대해 그 하위기전을 규명함으로써 오미자 추출물이 심혈관계에 미치는 영향에 대한 신호전달 기전을 구축하고자 하였다.

(2) 내피세포 의존적 NO 생성에 대한 효능 검증

혈관내피세포의 eNOS에 의한 NO의 형성은 발기뿐만 아니라 혈관의 이완에 매우 필수적인 역할을 수행한다. 오미자로분리된 순수 물질 또는 중간 분획물에 의한 혈관의 이완이 내피세포 의존적 NO의 형성에 의해 매개되는지 조사하기 위해 nitric oxide synthase (NOS) 저해제인 L-NAME, soluble guanylyl cyclase (sGC) 저해제인 ODQ, cyclooxygenase (COX) 저해제인 Indomethacin 및 K^+ channel 차단제인 TEA가 추출물에 의한 혈관이완에 미치는 영향을 측정함으로써 NO 형성에 대한 효능을 검증하고자 하였다. 또한 직접적으로 NO의 형성을 측정하기 위해 DAF-FM 형광 dye를 혈관내피세포에 전처리하고 오미자 추출물을 처리한 후 시간으로 발광을 측정하였다.

(3) 오미자 추출물이 혈관평활근세포의 이완 조절에 대한 효능 검증

혈관의 장력은 궁극적으로 혈관평활근의 이완/수축에 의해 조절된다. 혈관평활근의 이완/수축 조절은 myosin light chain(MLC)의 인산화가 필수적인 역할을 담당하며 MLC의 인산화는 혈관평활근 세포내의 칼슘농도, MLC kinase (MLCK) 및 MLC phosphatase (MLCP)의 활성이 중요한 역할을 담당한다. 혈관평활근세포의 이완/수축에 대한 조절 메커니즘 규명을 위해 MLCP의 저해제인 calyculin A 또는 MLCK의 저해제인 ML-9 등과 MLC의 인산화를 측정함으로써 오미자 추출물에 의한 혈관의 이완/수축 조절기전을 조사하고자 하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 오미자의 핵산 추출물에 의한 혈관 이완력 측정

그림 169에서 보는 바와 같이 혈관에 내피세포가 존재할 경우, 혈관에 처리한 오미자의 핵산 추출물의 농도가 약 1000 µg/ml에서 이완값은 $57.7 \pm 1.5\%$ 로 최대치를 나타냈으며, 오미자의 핵산 추출물의 농도가 증가함에 따라 혈관의 이완력도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 내피세포를 제거한 혈관의 경우, 오미자의 핵산 추출물의 농도가 약 1 mg/ml에서 이완값은 $28.6 \pm 11.4\%$ 로 최대치를 나타냈으며, 오미자의 핵산 추출물의 농도가 증가함에 따라 혈관의 이완력도 증가하나, 혈관에 내피세포가 존재할 때보다 오미자의 핵산 추출물의 농도에 따른 혈관 이완력 증가정도는 경미하였다. 따라서 오미자의 핵산 추출물은 혈관에 내피세포가 존재시에 내피세포에 의존하여 혈관의 이완을 유도하기도 하고, 혈관에 내피세포를 제거하였을 때 내피세포에 의존하지 않고 직접 평활근 (smooth muscle)에 영향을 미쳐 혈관의 이완을 유도한다는 것을 확인하였다.

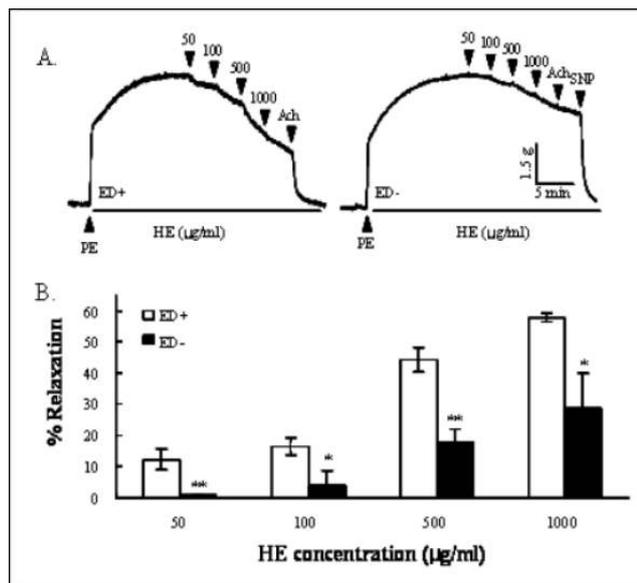


그림 169. 오미자의 핵산 추출물에 의한 혈관이완 촉진

(2) 내피세포가 존재하는 혈관에서의 오미자의 핵산 추출물에 의한 혈관 이완 경로 규명

그림 170에서 보는 바와 같이, 핵산 추출물에 의한 혈관의 이완력은 NO 형성을 저해하는 L-NAME 및 ODQ가 전처리된 혈관에서 약화되었으며, 다른 활성산소 형성을 저해하는 약물 들인 INDO 및 TEA에 의해서는 혈관에 대한 이완력의 감소가 측정되지 않았다. 이는 오미자의 핵산 추출물이 혈관 내피세포에서 생성되는 NO의 생성량을 증가시켜 혈관의 이완을 유도 한다는 것을 나타내며 위의 그림에서 보는 바와 같이 NO가 형성되는 곳은 혈관내피세포임을

알 수 있다.

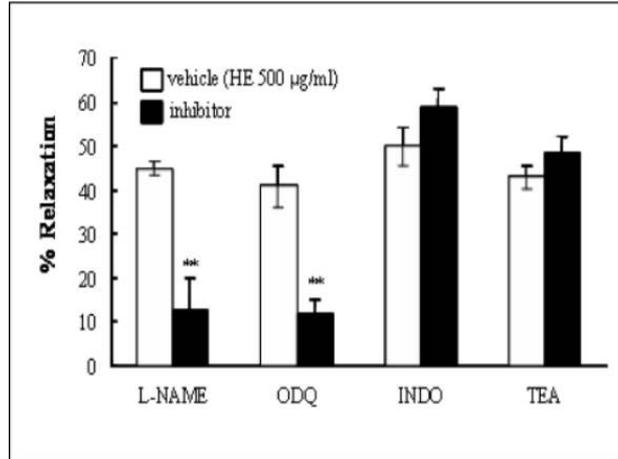


그림 170. NO 형성에 의한 오미자의 헥산 추출물의 이완 촉진

(3) 내피세포가 존재하는 혈관과 HCAECs (Human Coronary Artery Endothelial Cells) 에서 오미자의 헥산 추출물에 의한 NO 생성량 측정

그림 171에서 보는 바와 같이, 오미자의 헥산 추출물은 사람의 관상동맥으로부터 유래된 내피세포에서 양적으로 증가시키며 처리하였을 때 NO의 형성 또한 증가되는 것을 알 수 있었다. 따라서 다시 한번 헥산추출물은 혈관내피세포에서 NO의 형성을 유도함을 알 수 있었다. 이는 오미자의 헥산 추출물은 전방위의 혈관에 거쳐 혈관내피세포의 NO의 형성을 촉진함으로써 혈관이완을 야기시킬 수 있음을 시사한다.

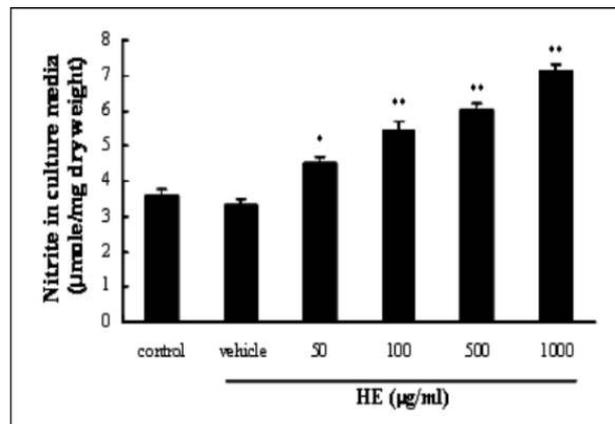


그림 171. 내피세포에서 오미자 헥산 추출물에 의한 NO의 형성 측정

(4) 혈관내피세포에서 NO 형성 관찰

그림 172에서 보는 바와 같이, 오미자의 헥산 추출물을 혈관내피세포에 처리하고 DAF-AM을 이용해 NO의 형성을 형광으로 관찰하였을 때 NO가 형성됨을 확인할 수 있었다.

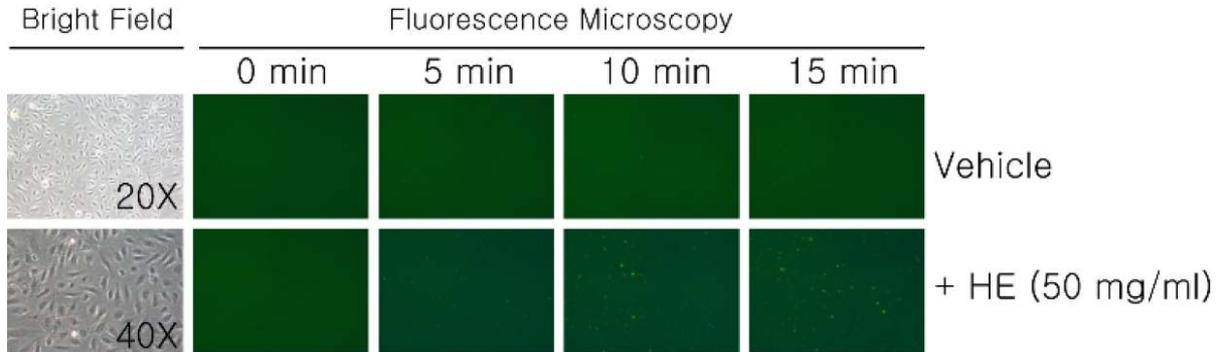


그림 172. 내피세포에서 오미자 헥산 추출물에 의한 NO형성을 형광현비경으로 측정

(5) 내피세포가 존재하지 않는 혈관에서 오미자 헥산 추출물에 의한 혈관 이완 경로 규명

그림 173에서 보는 바와 같이, 헥산 추출물에 의한 혈관의 이완은 MLCK의 저해제인 ML-9에 의해서는 유도되었으나 phosphatase의 저해제인 calyculin A에 의해 강력하게 봉쇄됨을 확인할 수 있다. 따라서 헥산 추출물에 의한 혈관의 이완 작용은 MLC의 탈인산화 작용에 의해 유도됨을 확인할 수 있었고 이는 NO에 의해 유도되는 탈인산화 작용기작에 의해 이루어짐을 짐작할 수 있다. 특히 이 실험은 혈관내피세포가 없는 혈관평활근 세포만으로 진행되었기 때문에 헥산추출물은 혈관평활근 세포를 직접적으로 제어함으로써 혈관의 이완을 촉진한다고 볼 수 있다.

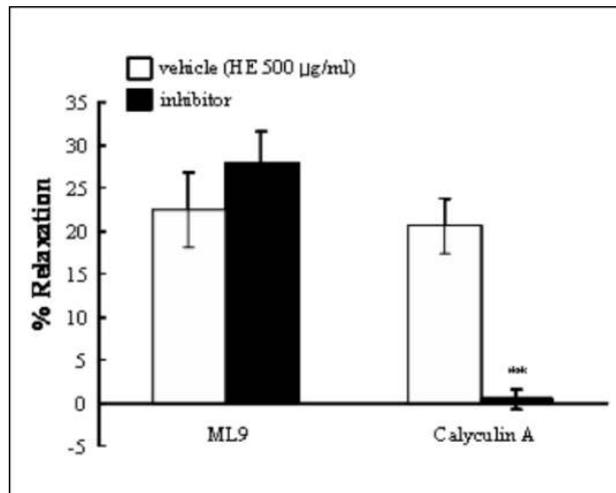


그림 173. MLC의 탈인산화 저해에 의한 이완 효과 측정

(6) 오미자의 핵산 추출물에 의한 MLC phosphorylation 측정

그림 174에서 보는 바와 같이, 혈관에 수축을 유도할 수 있는 PE를 처리하게 되면 MLC의 phosphorylation이 증가하여 혈관의 수축이 일어나는데, 여기에 오미자의 핵산 추출물을 처리하게 되면 PE에 의해서 인산화된 MLC의 탈인산화를 일으키고, MLCP 저해제인 calyculin A을 전처리한 혈관에서는 MLC의 탈인산화가 어느정도 저해됨을 확인할 수 있었다. 따라서 핵산 추출물은 혈관평활근에 직접적으로 작용하여 MLC의 탈 인산화를 유도하고 이로 인해 수축되었던 혈관이 이완됨을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 오미자의 추출물에는 혈관을 이완시킬 수 있는 물질들이 함유되어 있으며 이러한 물질들은 혈관평활근의 수축에 필수적인 인산화 반응을 저해함으로써 얻어진다고 볼 수 있다.

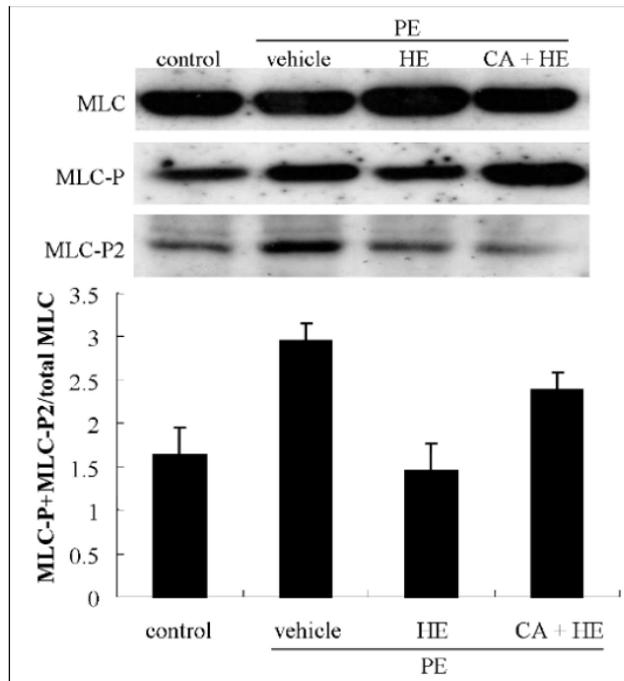


그림 174. 오미자의 핵산 추출물에 의한 MLC의 탈인산화 유도

(7) 혈관근 이완에 대한 gomisin A (GA)의 효과 검증

혈관에 내피세포가 존재할 경우, 그림 1.에서 보는 바와 같이 혈관에 처리한 GA의 농도가 약 300 μ M에서 이완값은 65.2 ± 8.8 %로 최대치를 나타냈으며, GA의 농도가 증가함에 따라 혈관의 이완력도 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 175). 혈관에 내피세포를 제거할 경우, 혈관에 처리한 GA의 농도가 300 μ M에서 이완값은 35.5 ± 6.5 %로 최대치를 나타냈으며, GA의 농도가 증가함에 따라 혈관의 이완력도 증가하나, 혈관에 내피세포가 존재할 때보다 오미자의 핵산 추출물의 농도에 따른 혈관 이완력 증가 정도는 경미하였다. 따라서 오미자의

헥산 추출물은 혈관에 내피세포가 존재시에 내피세포에 의존하여 혈관의 이완을 유도하기도 하고, 혈관에 내피세포를 제거하였을 때 내피세포에 의존하지 않고 직접 평활근 (smooth muscle)에 영향을 미쳐 혈관의 이완을 유도한다는 것을 확인하였다.

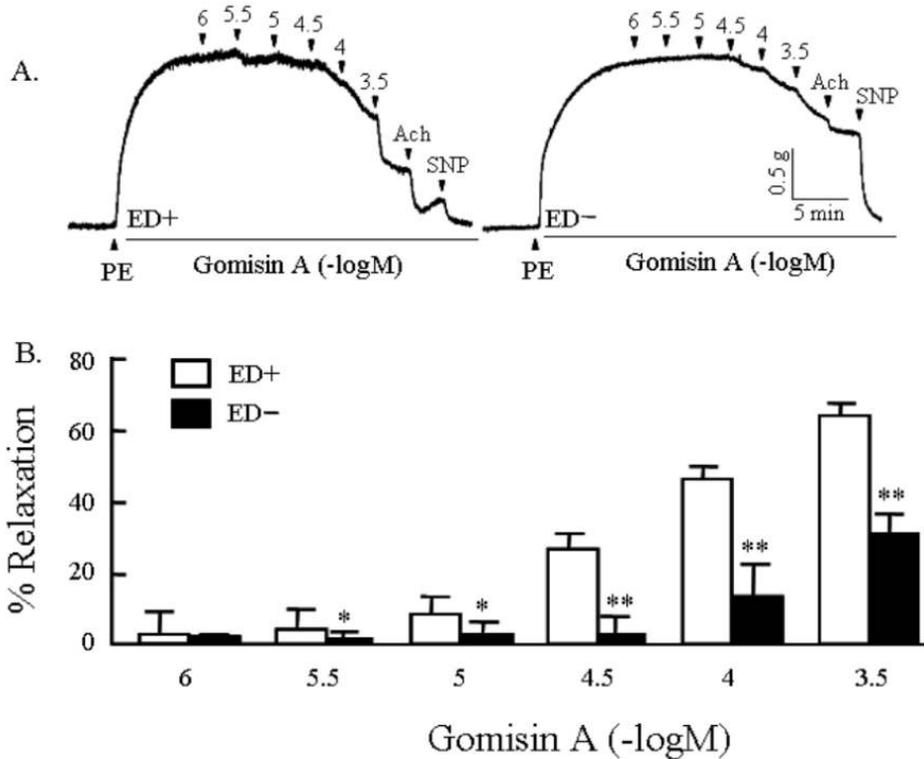


그림 175. Gomisin A는 내피세포를 통해 혈관이완을 촉진시킨다.

(8) 혈관근 이완에 대한 메커니즘 규명

(가) 내피세포가 존재할 경우, GA에 의한 혈관 이완 경로 규명

그림 176에서 보는 바와 같이, 측정된 혈관의 이완력은 NOS 저해제인 L-NAME 및 sGC 저해제인 ODQ로 전처리된 혈관에서 약화되었는데, 이는 GA가 내피세포에서 생성되는 NO의 생성량을 증가시켜 혈관의 이완을 유도한다는 것을 나타낸다.

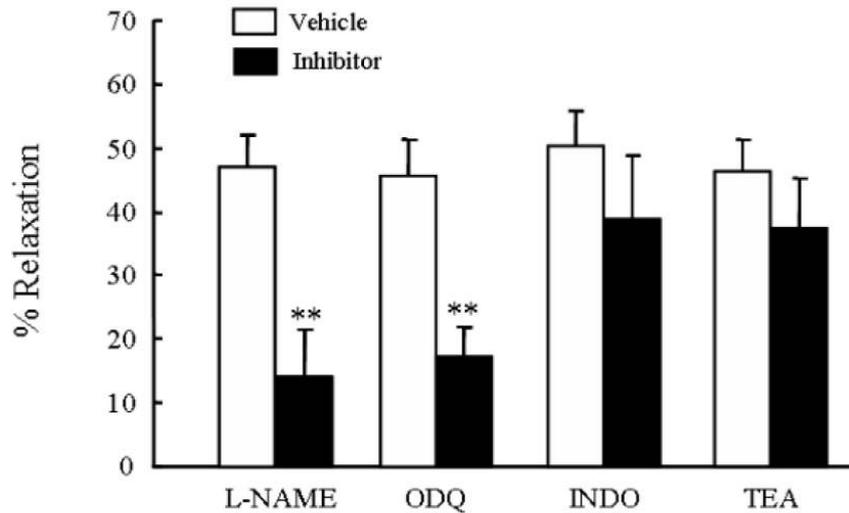


그림 176. Gomsin A는 NO의 형성을 통해 혈관을 이완시킨다.

(나) 내피세포가 존재할 경우, GA에 의한 NO 생성량 측정

그림 177은 GA가 내피세포에서 생성되는 NO 생성량을 증가시켜 혈관의 이완을 유도한다는 것을 증명하기 위하여 혈관에 처리한 GA의 농도에 따른 NO 생성량을 측정한 것이다. 그 결과, GA로 처리한 내피세포가 존재하는 혈관의 NO 생성량이 많았고, 특히 GA의 농도가 증가할수록 NO 생성량도 증가한다는 것을 확인하였다.

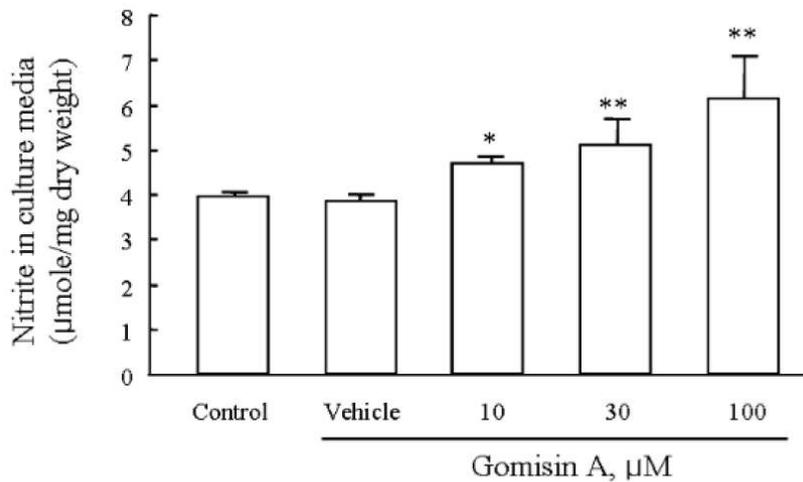


그림 177. Gomsin A의 NO를 형성 촉진

(다) 내피세포가 존재하지 않을 경우, GA에 의한 혈관 이완 경로 규명

그림 178에서 보는 바와 같이 GA에 의한 혈관의 이완력은 calyculin A로 전처리된 혈관에서 약화되었으며, 이는 GA가 평활근 세포의 MLCP의 활성을 직접적으로 촉진시켜 혈관의

이완을 유도한다는 것을 나타낸다.

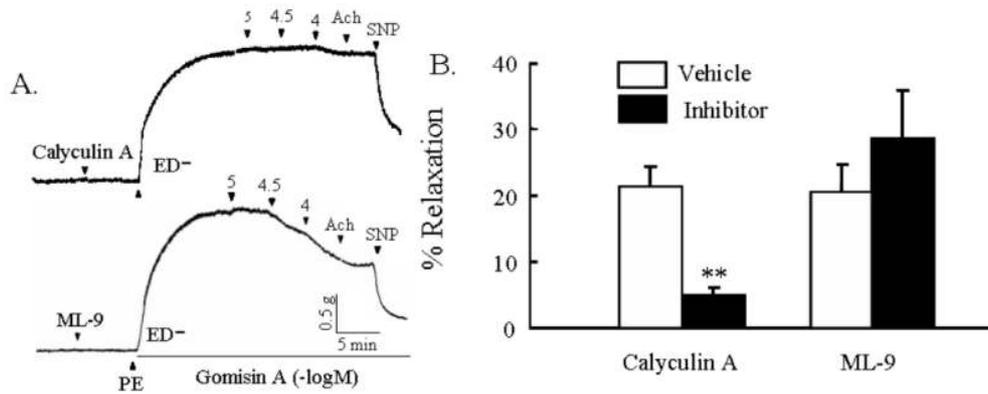


그림 178. Gomisins A에 의한 혈관평활근의 MLCP 활성.

(라) GA에 의한 MLC phosphorylation 측정

GA에 의해서 PE에 의해 phosphorylation된 MLC가 dephosphorylation되는지를 확인하였다. 그림 179에서 보는 바와 같이, 혈관에 PE를 처리하게 되면 MLC phosphorylation이 증가하여 혈관의 수축이 일어나는 것을 확인할 수 있는데, 여기에 GA를 처리하게 되면 PE에 의해서 phosphorylation된 MLC를 dephosphorylation을 일으키고, MLCP 저해제인 calyculin A을 전처리한 혈관에서는 phosphorylated MLC의 dephosphorylation을 어느 정도 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

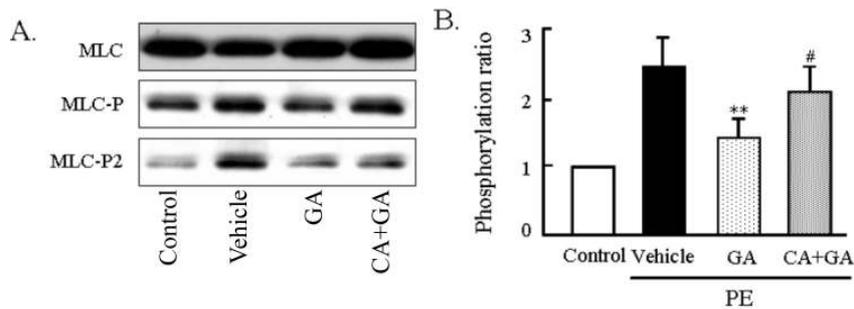


그림 179. Gomisins A에 의한 혈관평활근의 MLC의 탈인산화 촉진.

3. 항암효과에 대한 효능 검증

가. 재료 및 방법

(1) 오미자의 추출물에 의한 세포의 증식 측정

암의 발생은 비정상적인 세포의 성장 및 증식에서 비롯된다. 따라서 암세포는 정상세포에 비해 훨씬 빠른 성장을 가지고 활성산소 및 다른 세포사멸 유도인자에 대한 반응이 낮다. 따라서 본 연구에서는 오미자 추출물이 세포의 증식에 미치는 영향을 검증하고 다른 성장에 인자에 의한 세포의 증식 저해효과를 측정함으로써 항암 효능을 검증하고자 하였다.

(2) 오미자의 추출물에 의한 사멸 측정

항암 효능을 가지기 위해서는 크게 증식 및 전이를 저해하고 세포의 사멸을 유도해야 한다. 따라서 본 과제에서는 오미자 추출물에 의한 세포의 사멸을 조사하고 또한 활성산소에 의한 세포의 사멸에 있어 오미자 추출물이 미치는 영향을 측정함으로써 세포보호기능을 알아보하고자 하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) PDGF에 의한 세포의 증식을 억제하는 추출물 탐색

혈관평활근세포의 증식 향진이 폐쇄성 혈관질환, 특히 죽상경화증의 발생에 있어서 매우 중요하다. 이러한 관점에서 죽상경화증의 발생을 예방하고 치료하기 위한 방법을 개발하기 위하여 VSMC 증식 조절법을 개발할 필요성이 있다. 따라서 본 연구에서는 오미자와 valerian의 추출물에서 VSMC 증식 억제성 물질을 찾아 보고자 하였다. 그림 180에서 보는 바와 같이 VSMC는 PDGF에 의하여 증식이 현저히 증가되었고, 이러한 PDGF에 의한 VSMC 증식 반응이 VO compound와 SC compound에 의하여 억제되지 아니하고 오히려 증가되었다. 이러한 연구 결과로 보아 이들 추출물에서 VSMC 증식 조절을 통한 죽상경화증 치료 물질을 발굴하기는 매우 어려울 것으로 사료된다. 하지만, 세포 증식이 치료에 도움이 되는 상황(상처치유 등)에는 이들 물질이 매우 유용하게 적용될 수 있을 것으로 추측된다.

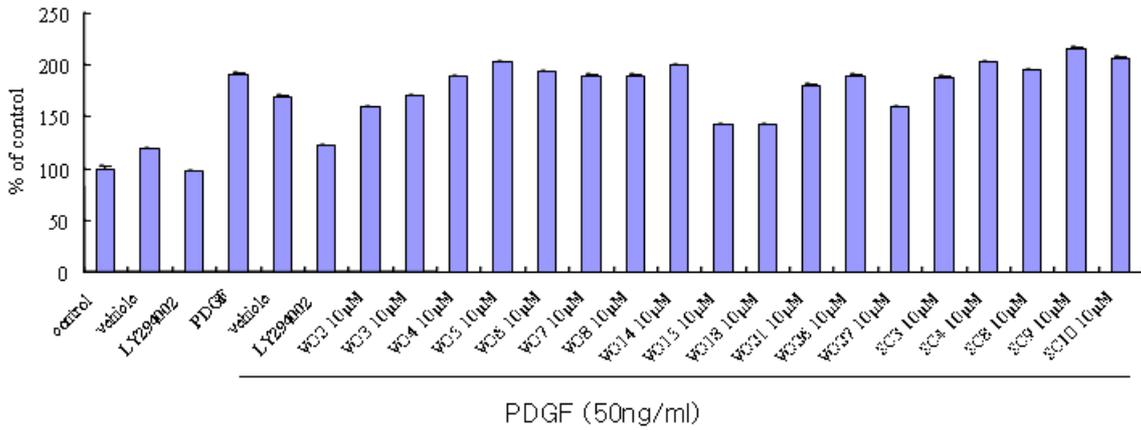


그림 180. 오미자의 헥산 분획물로부터 PDGF에 의한 세포의 증식을 억제하는 추출물 탐색

(2) 오미자 추출물의 세포증식 촉진 효과 검증

Fibroblast 증식 향진을 통한 상처치유에 있어서 SC compound와 VO compound의 활용가능성을 규명하기 위하여 사람의 피부에서 분리된 fibroblast 증식반응에 대한 이들 추출물의 효과를 검증하고자 하였다. 그림 181에서 보는 바와 같이 PDGF (50 ng/ml)에 의하여 fibroblast의 증식반응이 현저히 증가되었다. 본 연구에서 VO14 뿐만 아니라 SC3, 4, 8, 9, 10에 의한 fibroblast 증식반응이 현저히 증가되었다.

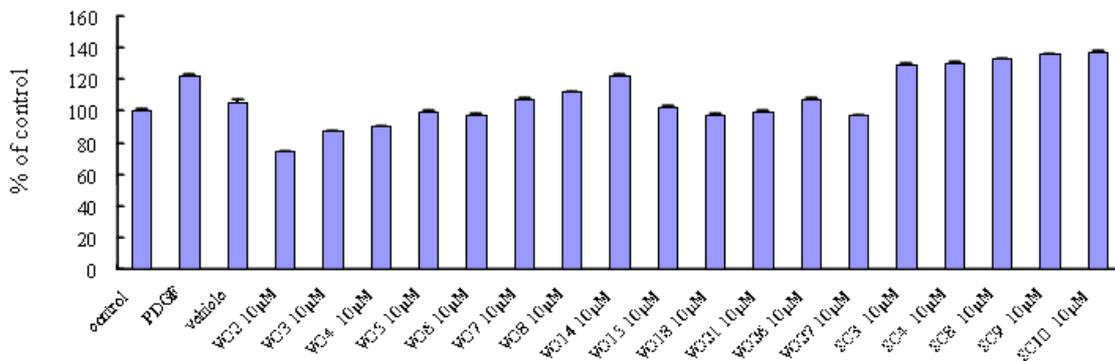


그림 181. 오미자의 헥산 분획물의 세포의 촉진효과

(3) SC-8에 의한 증식 촉진의 작용기전 규명

SC8에 의한 fibroblast 증식반응에 관계하는 신호전달 체계를 규명하기 위하여 SC8에 의한 세포증식에 대한 각종 세포내 신호전달체계 억제제, 즉, PD98059, SP600125, SB203580, wortmannin, LY294002, H-7, Genstein의 효과를 관찰하였다. 그림 182에서 보는 바와 같이 SC8에 의한 세포증식 반응이 ERK 억제제인 PD98059와 JNK 억제제인 SP600125에 의하여

억제되었으나, 다른 억제제에 의하여서는 영향을 받지 아니하였다. 이러한 연구결과로 보아 SC8에 의한 fibroblast의 증식반응이 ERK-JNK와 관련된 신호전달체계를 통하여 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

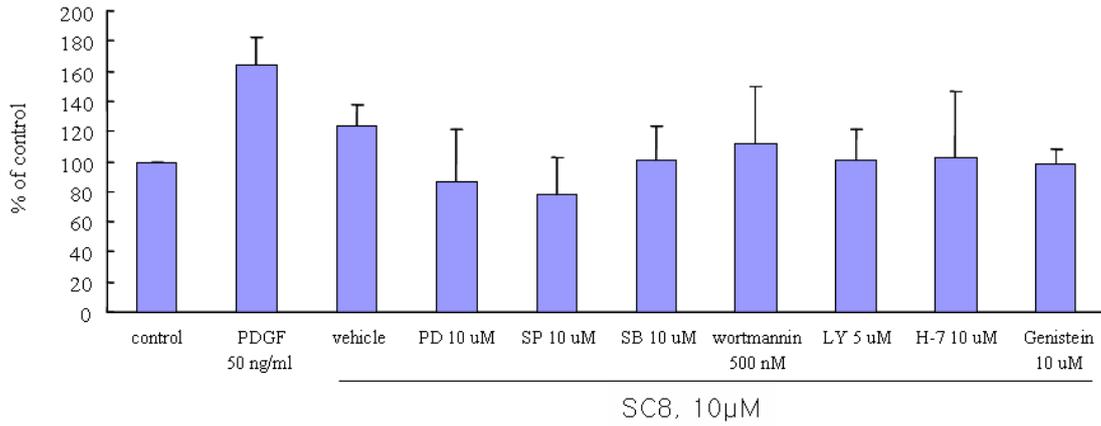


그림 182. SC-8에 의한 증식 촉진의 작용

(4) 활성산소에 의한 세포손상에 대한 추출물의 효과 검증

산소유리기는 다양한 세포내 신호전달체계에 영향을 미칠 뿐만 아니라 직접적으로 강력한 세포 독작용을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 오미자와 valerian의 추출물에서 항산화 작용을 통한 세포보호물질을 발굴하고자 산소유리기에 의한 세포손상에 대한 이들 추출물의 효과를 검증하고자 하였다. 그림 183에서 보는 바와 같이 VSMC의 생존율이 100 uM H₂O₂에 의하여 현저히 저하되었고, 이러한 H₂O₂에 의한 VSMC 손상이 VO compound, 특히 VO6, 12, 13, 14, 15 및 21 뿐만 아니라 SC compound 중에서 SC3과 SC4에 의하여 현저히 억제되었다. 이러한 연구결과로 보아 SC compound와 VO compound가 산화성 스트레스에 의하여 야기되는 다양한 형태의 세포손상을 예방하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

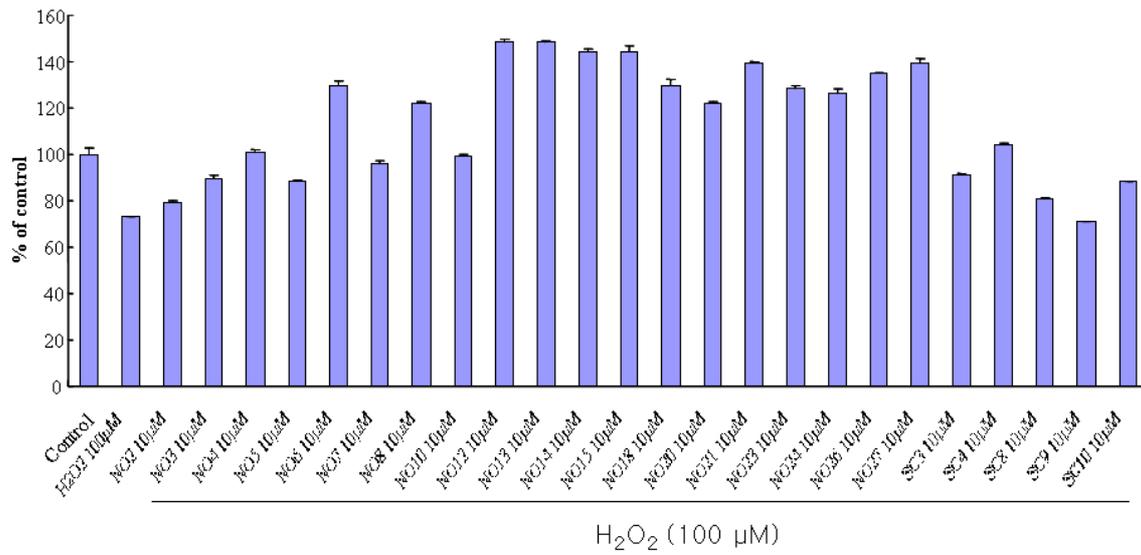


그림 183. 활성산소에 의한 세포손상에 대한 오미자 추출물의 효과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

대량번식 체계 확립

구분	평가의 착안점 및 기준	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오미자의 휴면성을 검증하였는가? ○ 종자 휴면타과를 위한 다양한 성장조절제가 처리되었는가? ○ 종자의 휴면타과를 위한 다양한 성장조절제의 처리농도 시험이 수행되었는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오미자 수확시기에 종자를 채취 후 15일 간격으로 휴면성을 검정 ○ GA₃, IBA, Kinetin, BAP 등의 성장조절제 처리하여 약간의 발아 촉진 효과 검증 ○ GA₃, IBA, Kinetin, BAP 등을 0, 25, 50, 100, 250, 500 및 1,000 ppm으로 처리로서 오미자의 휴면타과를 통한 발아율 향상
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 종자의 휴면타과를 위한 노천매장 시험은 수행되었는가? ○ 종자의 발아촉진을 위한 Priming처리 등이 효과적으로 이루어 졌는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 무처리의 경우에 전혀 발아하지 않는 종자를 저온습윤처리 및 GA₃ 처리 등으로 80% 이상 발아를 촉진 시킬 수 있는 방법 확립으로 종묘회사 또는 농가 연구결과의 직접 활용 가능 ○ priming 처리 효과가 전혀 없었으며, priming처리 효과를 얻기 위해서는 추후에 휴면을 완전히 타과 시킨 후에 수행하면 가능 할 것임
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연차별 종자수명 시험이 수행되었는가? ○ 종자와 영양번식으로 번식시킬 수 있는 방법이 확립되었는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2006년도에 수확한 종자를 초기에는 15일 간격 후기에는 1개월 간격으로 약 2년 동안 종자발아 시험 수행하였으나 전혀 발아하지 않음 ○ 무처리의 경우에 전혀 발아하지 않는 종자를 저온습윤처리 및 GA₃ 처리 등으로 80% 이상 발아를 촉진 시킬 수 있는 방법 확립 ○ 삼목법은 2차례 실시하였으나, 실패하였음
계획서 외 수행 결과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오미자로부터 순수분리한 물질의 종자의 발아력과 유묘생육 효능 검증 ○ 생육 시기 및 식물체의 기관별로 주요 생리활성물질인 리그난 성분의 함량 분석 ○ 재배지역 및 농가별 리그난 함량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 종자발아 에 미치는 효과 검증 : 오미자로부터 분리한 schisadrin, schisandrin C, gomisin A 및 gomisin N 등의 순수물질을 이용하여 무, 고추 및 토마토의 종자발아 촉진, 억제 효과 검증 ○ 유묘의 생육에 미치는 효과 검증 : schisadrin, schisandrin C, gomisin A 및 gomisin N 등의 순수물질을 이용하여 무 고추 및 토마토의 유묘 생육에 미치는 효과 검증 ○ 3월 초부터 10월 4일까지 식물체의 각 기관별로 주요성분인 리그난의 함량 분석 ○ 5개 주요재배지역의 오미자 재배농가별 리그난 함량 분석

생리활성물질 추출 및 구조동정

구분	평가의 착안점 및 기준	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분획된 추출물의 분리방법을 확립하였는가? ○ Hexane 추출물로부터 물질을 순수분리하였는가? ○ 순수분리한 물질의 구조는 동정되었는가? ○ 순수분리한 물질의 구조동정을 위한 spectrum은 정상적으로 수행되었는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hexane, CHCl₃, MeOH 등으로 추출하여 추물 물별로 전혀 다른 물질의 순수분리 ○ 2개의 신물질과, 13개의 lignans 물질을 순수분리하였으며, 신물질 1종은 유니테프로부터 지원을 받아서 PCT특허 출원 중 - 천연물신약 개발 후보물질로 개발 가능성 있음 ○ 2개의 신물질 구조 동정 및 10개의 리그난 성분 구조분석 완료 하였음 ○ 신물질의 구조를 동정하기 위해서는 NMR, MS, FT-IR 등의 등의 spectrum이 필요한데, 모두 갖추었음
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Chloroform 및 MeOH의 일부 분획물로부터 물질을 순수분리하였는가? ○ 순수분리한 물질의 구조동정은 이루어 졌는가? ○ 물질의 동정할 수 있는 spectrum은 모두 갖추었는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 3종류의 물질을 분리하였는데, hexane 추출물로부터 분리한 물질과 동일 하였으나, 극 소량이 함유되어 있었음 ○ CHCl₃로부터 순수분리한 물질은 구조동정을 밝혀서 보고서에 보고하였으나, MeOH로부터 순수분리한 성분은 PCT특허 출원시에 문제가 되므로 추후에 보고할 것임 ○ 충분한 spectrum으로 구질의 구조를 완벽하게 동정하여 IF 2.3의 BBRC에 논문게재 하였음
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성물질을 기초로한 품질표준화방법이 설정되었는가? ○ MeOH 분획물로부터 물질을 순수분리하였는가? ○ 순수분리한 물질의 구조 동정은 되었는가? ○ 물질의 동정할 수 있는 spectrum은 갖추었는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오미자로부터 순수분리한 물질중에 gomisin A는 다양한 생리활성을 나타내고 있으며, schisandrin, schisandrin C, gomisin N 등의 표준화 ○ 8종의 물질을 순수분리하였음 ○ 다양한 spectrum을 이용하여서 대략적인 구조를 밝혔으며, 2종은 신물질로 예상함 ○ PCT특허 출원 등을 위해서 추후에 구조 밝힘 ○ 순수분리한 8종 모두 1D와 2D NMR spectrum을 확보하였음
계획서 외 수행 결과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오미자로부터 추출한 신물질인 α-iso-cubebene의 면역증강 효능 증명 ○ C6 glioma cell에 Wuweisizu C의 효능 검증 ○ 간암세포에 대한 Gomisin N의 항암 효과 검증 ○ 동물실험을 통한 Gomisin A의 간염증 증명 및 기작 규명 ○ 항동맥경화 효능 신물질 증명 ○ Schisandrin C의 혈구암세포에 대한 세포사멸 효능, 기작규명 ○ 미백효과 신물질의 기작 및 효능 검증 (MeOH추출물로부터 순수분리한 신물질) ○ Hexane 추출물로부터 순수분리한 신물질의 항암 효능 검증 및 항염증 효과 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 면역 및 항염증 효능을 동시 나타냄. ○ 천연물 신약으로서 개발 가능성 검토 중 ○ 국내 특허 출원 중에 있으며, 유니테프로 부터 PCT특허 출원 지원금을 받아서 출원 중에 있음 ○ 이러한 결과로부터 Wuweisizu C는 약학적인 억제자 (pharmacological inhibitors)로서 작용할 수 있을 것이다 ○ 오미자의 항간염 효과는 잘 알려져 있으며, 항간암 효과 구명으로 새로운 효능 검증 ○ Mircoarray 등을 통한 기작을 구명이 가능함 ○ 신물질인 α-iso-cubebene의 효능 추가 검증 ○ 혈구암에 대한 오미자 효능성분 규명 및 식의약품으로 가공시 활용 가능함 ○ 효능이 상당히 높기 때문에 천연물화장품으로서 가능성 검토 중 ○ 항염증 효과 : α-iso-cubebene보다 수십배 이상의 효과 있음 ○ 항암 효과가 아주 낮은 농도에서 있으므로 기작 규명 중에 있음

기능성 제품 개발

구분	평가의 착안점 및 기준	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품의 제형결정을 위한 적당한 방법이 수행되었는가? ○ 제품설계를 위해서 많은 사항을 충분히 고려하였는가? ○ 제품의 제조공정 방법은 정상적으로 이루어졌는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형결정을 위한 문헌조사 및 시장조사 등 적절한 방법 수행하였음. ○ 원료의 특성과 장점 등의 사항을 고려하였음. ○ 제조공정은 각 가능한 조건을 설정하고 조건별 적정공정을 도출토록 비교하였음.
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 물질의 대량분리 및 정제공정 기술은 개발하였는가? ○ 제품의 활성과 기능성을 증대시킬 수 있는 방법이 만들어졌는가? ○ 시작품의 관능검사 등이 철저하게 수행되고 제품에 반영이 잘 되었는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성물질의 대량분리 및 정제기술 개발은 미흡- 3차년도 완료예정 ○ 활성 및 기능성 유지를 위한 증류주 및 식초 개발 완료단계 ○ 제품개발의 각 단계마다 관능검사 결과에 따른 수정, 개선과정을 수행하고 있음
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최종제품의 품질검사를 위한 시험은 제대로 수행되었는가? ○ 관능시험에 의한 결과를 제품의 생산을 위해서 제대로 반영되었는가? ○ 유효성분의 함량 및 영양적인 평가가 이루어졌는가? ○ 최제 제품의 안전성은 분석되었는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2차년도 미진사항 schizandrin 정제기술완료 ○ 최종제품의 품질검사 시행하였음. ○ 각 가공 단계별 관능시험을 품질개선에 반영하였음. ○ 기능성 성분 등 유효성분과 영양성분의 분석이 시행되었음. ○ 대장균, 세균검사 및 중금속 검사 등의 안전성 검사가 필요한 제품의 경우 분석이 시행되었음

생리활성 검증

구분	평가의 착안점 및 기준	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 화학물질에 의한 간세포 손상에 대한 세포 보호 작용에 대한 연구가 수행되었는가? ○ 면역자극, Macrophage 활성화 및 Lipopolysaccharide 등에 의한 간세포 손상 세포보호 작용 연구가 수행되었는가? ○ 순수분리한 물질의 산소유리기에 의한 간세포 손상에 대한 세포보호 작용 시험하였는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산소유리기인 H₂O₂에 의한 세포의 사멸 시 오미자 분리물질의 효고나를 검증한 결과 VO6, 12, 13, 14, 15 및 21 뿐만 아니라 SC compound 중에서 SC3과 SC4 등이 산소유리기에 의한 세포 독성을 완화시켰다. 따라서 오미자 추출물들은 활성산소에 의한 간 독성에 대한 예방 및 치료제 개발에 중요한 역할을 기여할 것으로 기대하고 있다. ○ 면역계 세포의 활성화에 필수적인 세포의 이동 칼슘 유리 등에 대한 연구를 수행한 결과 세포의 이동을 촉진하는 다수의 Lignan 계열 및 오미자 추출물을 검증하였고 이들은 LPA 수용체의 활성을 통해 이루어짐을 확인하였다. 따라서 이들은 면역력 약화 시 면역력을 강화시키는 약물로 의 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. ○ 화합물질 중 간세포에 가장 큰 독성을 미치는 것은 대사활성 중에 발생하는 산소유리기이다. 본 과제에서는 산소유리기인 H₂O₂의 독성 작용을 다수의 오미자 추출물이 억제함을 검증하였으며 이를 통해 이들을 이용한 간세포 보호제 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대하고 있다.
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 순수분리물질의 항산화 효과에 관한 시험을 수행하였는가? ○ 항염증에 관한 연구를 수행하여 그 결과를 얻었는가? ○ 혈관내피세포의 세포 부착성인자의 발현에 대한 효과에 관한 시험을 수행하였는가? ○ 염증세포의 활성화에 대한 효과를 시험하였는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오미자로부터 추출된 물질들은 항산화 효과를 통한 산화성 스트레스의 완화작용을 수행함과 동시에 NO같은 활성산소의 생성을 촉진함으로써 혈관이완 작용을 동시 촉진함을 규명하였으며 이러한 연구내용은 고혈압 치료제의 개발 및 간세포 보호제 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대 ○ 오미자의 추출물들이 세포의 이동 및 칼슘의 유리에 미치는 영향을 조사하였으며 그 결과 세포의 이동을 칼슘유리를 통해 조절한다는 것을 규명하였다. 이러한 결과는 염증반응에 대한 inflammatory cytokine이 미치는 영향 연구의 필요성을 높이는 계기를 제공할 것으로 추측 ○ 오미자 추출물 및 리그난이 세포내 칼슘유리를 강하게 촉진하고 NO 형성을 촉진함을 알 수 있었다. 따라서 혈관의 이완을 촉진할 뿐만 아니라 세포의 부착성인자의 발현을 억제함으로써 죽상동맥경화 발병도 억제시킬 것으로 예측된다. 향후 이러한 예측에 대한 검증실험이 진행될 경우 혈관질환에 대해 다양한 효과를 가진 약물을 오미자 추출물로부터 개발할 수 있을 것으로 예상 ○ 염증세포의 활성화에 필수적인 세포의 이동 및 칼슘유리의 촉진 규명, 그 원인은 세포의 이동 및 칼슘유리를 촉진하는 lysophosphatidic acid 수용체의 활성을 통해 이루어진다는 사실을 규명하였다. 따라서 본 과제의 연구결과를 통해 오미자 추출물이 염증세포의 활성화에 중요한 영향을 미침을 확인하였고 향후 면역제어 물질의 개발에 오미자 추출물이 응용될 수 있음을 제시

생리활성 검증 - 계속

구분	평가의 착안점 및 기준	평가의 착안점 및 기준
3차 년도	<p>생리활성 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 화학물질에 의한 간세포 손상에 대한 세포 보호 작용은 구명되었는가? ○ 면역자극에 의한 간세포 손상에 대한 세포 보호 작용에 관한 연구가 수행되었는가? ○ 허혈-재관류에 의한 간세포 손상에 대한 세포 보호 작용에 관한 연구는 수행되었는가? 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오미자로부터 분리된 다수의 물질이 산소유리기에 의해 세포가 손상됨을 구명하였고, 특히 저농도에서 세포 보호 작용이 강한 nitric oxide를 eNOS의 활성을 통해 형성함으로써 세포 보호 작용을 나타냄과 동시에 혈관평활근세포의 이완을 촉진한다는 사실을 구명함으로써 고혈압 치료제 개발에 대한 가능성을 제시하였다. ○ 오미자 추출물이 활성산소에 의해 세포의 손상 촉진을 억제하는 것을 증명하였다. 이러한 연구 결과는 향후 면역세포에서 분비되는 inflammatory cytokine의 역할 세포보호기전 규명이 가능함 ○ 허혈-재관류에 의한 세포손상에 오미자 추출물이 세포 보호 작용을 갖는지 알아보기 위해 H₂O₂에 의한 세포사멸이 오미자추출물에 대해 어떻게 영향을 받는지 구명하였다. 그 결과 오미자 추출물은 산소유리기에 의한 세포손상을 억제함을 밝혔고 여기에는 항산화 효과가 중요한 영향을 미침을 확인하였다. 이러한 연구결과를 토대로 오미자 추출물은 Occlusive Vascular disease 수술시 세포보호제로 개발될 수 있을 것으로 예측되고 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

가. 계획 중인 과제

- Gomisin A를 유효성분으로 함유하는 혈관이완용 건강기능성 식품의 기술 이전
- 오미자로부터 순수분리한 신규한 물질인 sesquiterpene계 물질의 천연물신약개발을 위한 전임상 시험 후, 제약회사에 기술 이전
- 오미자음료, 오미자와인 및 오미초는 상용이 가능하여 향후 협력업체 등 관련업체에의 기술이전 협의 계획
- 본 과제를 수행하는 기간 중 축적된 세포주 배양기술, 세포이동 증식 측정기술, 혈관 이완/수축 측정기술, 활성산소 측정기술 등을 적용한 대용량 탐색기술 (High throughput screening technology)을 지역 산업체와 연계하여 실용화 및 산업화 할 계획에 있다. 이를 위해 현재 1단계로 의공학 분야의 연구진과 공동연구로 활성산소를 single cell 수준에서 측정하는 기술을 개발하고 있으며 이 기술이 실용화 되면 수많은 농작물로부터 순수분리된 물질들을 단시간에 탐색하여 생리활성을 가진 물질을 규명할 수 있을 것이며 이러한 기술들이 산업화 되면 국가경제 발전에 이바지할 것으로 예상된다.

제 2절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

가. The 6th InterBiz Bio-Patnering & Investment Forum 2008

- 본 연구진의 기술 홍보내용
 - 오미자의 과실로부터 sesquiterpene계 화합물을 순수분리하여 구조동정한 결과 신물질로 확인-항염증 면역증강 효과 탁월
 - 오미자로부터 분리한 lignans중 혈관이완 효과가 높은 물질을 발굴하여 고혈압 효능 물질의 발굴을 통한 산업화
- 기술 홍보효과
 - 10개 회사와 오미자로부터 분리한 신규한 물질의 산업화에 관한 홍보 및 공동연구에 관한 논의
 - 참여회사 : CJ제일제당, SK케미칼, 유한양행, 동화약품공업, 대웅제약, 건일제약, 태평양제약, 환인제약, 부광약품, 동일팜텍 등
- 일시 : 2008년 7월 3일 (목) - 7월 5일 (토)
- 장소 : 제주휘트니스아일랜드
- 주최 : 인터비즈바이오파트너링&투자포럼조직위원회
- 주관 : 한국신약개발연구조합, 한국과학기술원 등
- 후원 : 보건복지부, 지식경제부, 교육과학기술부, 제주특별자치도

나. 2008 TECH-TRANS FAIR in PHARMA & BIO에 기술 이전 홍보

- 본 연구진의 기술 홍보내용
 - 천연물의 순수분리 및 구조동정을 통한 산업화 (부산대학교, Lab 명: 천연물연구실)
- 기술 홍보효과
 - 6개 회사와 오미자로부터 분리한 신규한 물질의 산업화에 관한 홍보 및 공동연구에 관한 논의
 - 참여회사 : SK케미칼, 유한양행, 대웅제약, 태평양제약, 환인제약, 부광약품
- 일시 : 2008년 9월 26일 (금)
- 장소 : 삼정호텔 신관 2층 (서울)
- 주관 : 한국신약개발연구조합, 한국학술진흥재단, (사)한국대학기술이전협회
- 후원 : 교육과학기술부

다. SK Chemicals 세미나

- 제목 : 천연물의 대량순수분리 및 구조동정
- 일시 : 2008년 10월 17일 14:00
- 참석대상 : 천연물연구실팀, 생리활성팀
- 오미자로부터 분리한 천연물의 효능 및 산업화를 위한 토의

라. 부산대학교 허혈조직재생연구센터 세미나

- 연제 : Biological Activities of Lignans from Schisandra chinensis
- 장소 : 부산대학교 의학전문대학원 제3세미나실
- 일시 : 2006-08-24 17:00
- 연사 : 최영환 교수

마. 2008 문경오미자축제 학술세미나

- 주최 : 문경시와 문경시오미자축제추진위원회
- 제목 : 문경 오미자 산업화를 위한 오미자 기능성 분석 및 효능
- 2008년 9월 20일
- 장소 : 문경시 동로면사무소 강당
- 참가자 : 농민 300여명

바. 국제 학술회의 참가

- (1) The 6th Korea-Japan Join Symposium on Vascular Biology
 - 발표제목 : Effects of a-iso-cubebene on TNF- α -induced expression of cell adhesion molecules and inflammatory cytokines on human umbilical vein endothelial cells
 - 주최기관 : Japan Vascular Biology and Medicine Organization
 - 개최국가 : 일본

(2) Asian Symposium on Medicinal Plants, Spices and Other Natural Products (ASOMPS)

- 발표제목 : α -iso-cubebene from the fruits of Schisandra chinensis Bail
- 주최기관 : α -iso-cubebene from the fruits of Schisandra chinensis Bail
- 개최국가 : India

(3) 1st Pacific symposium on Angiogenesis and Lymphangiogenesis

- 발표제목 : Effects Schisandra chinensis henane extracts on lipopolysaccharide-induced expression of cytokines and adhesion molecules in human umbilical endothelial cells
- 개최국가 : 대한민국

(4) 응용약물학회

- 발표제목 : Schisandrin C from Schisandra chinensis decreases membrane potential in C6 glioma cells
- 주최기관 : 응용약물학회
- 개최국가 : 대한민국

(5) 대한약학회 추계학술대회

- 발표제목 : Wuweizisu C from Schisandra Chinensis decreases membrane potential in C6 glioma cells
- 주최기관 : 대한약학회
- 개최국가 : 대한민국

○ Schizandrin 고농축캡슐의 경우 산업화를 희망하는 업체와 본 연구진이 개별기준 및 규격'의 작성 및 허가과정을 공동으로 수행 후 실 생산화 가능하며, 고농축 기술만 별도 이전도 가능함.

○ 본 과제를 수행하는 과정에 활성산소측정, 세포의 이동 측정, 칼슘유리 측정, 세포내 단백질의 활성화 측정, 혈관적출, 혈관 이완/수축 측정 기술 등이 확립되었으며 석박사급 연구 인력을 중심으로 이러한 기술들을 수행할 수 있도록 지도하고 있다. 또한 연구과정 중에 확립된 기술 및 특허내용을 특허 박람회나 학회 등을 통해 홍보하였으며 학내 또는 지역 내 전산망을 통해 연구 성과를 홍보하였다. 앞으로도 이러한 기술 보유 및 연구 성과를 지속적으로 홍보하고 기술들을 확산할 예정이다.

제 3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

가. 특허출원

(1) 출원중인 항목

번호	발명의 명칭	출원번호	출원일자	발명자
1	Gomisin A를 유효성분으로 함유하는 혈관이완용 약학 조성물	10-2007-0060558	2007. 6. 20	최영환, 김치대, 박지영
2	오미자 핵산 추출물을 이용한 포유동물내 혈관 이완방법 및 혈관 확장용 조성물	10-2008-0053209	2008. 6. 05	최영환, 김치대, 윤식, 이영근, 추성태
3	오미자로부터 추출한 신규한 α -isocubebene 화합물 및 이를 유효성분으로 하는 면역 예방 및 치료제	10-2008-0053194	2008. 6. 05	최영환, 윤식, 배외식, 심재웅, 이유진
4	오미자로부터 추출한 신규한 α -isocubebene 화합물을 유효성분으로 함유하는 항염증 질환에 대한 예방 및 치료제	10-2008-0053169	2008. 6. 05	최영환, 윤식, 김치대, 손병구, 강점순, 이유진, 신우정, 이희우, 박지민, 김지영, 김지희
5	오미자로부터 추출한 신규한 α -isocubebenol 화합물	10-2008-0082340	2008. 8. 22	최영환, 이유진
6	C6 신경교종 세포 및 PC12 신경세포내 막 전위를 저감시키는 약리학적 억제제	10-2008-0088172	2008. 9. 08	최영환, 임동순, 김계옥

(2) 특허출원 계획 중인 항목

번호	발명의 명칭	출원번호	출원일자	발명자
1	오미자로부터 신규한 YSC012005의 항염증 효과 및 그 기작 구명			
2	오미자로부터 신규한 YSC012005의 항암 및 그 기작 구명			
3	오미자로부터 순수분리한 성분의 미백효과 및 그 기작 구명			
4	오미자로부터 순수분리한 리그난의 몇가지 채소종자에 대한 종자 발아 및 유묘생장 효과			

나. 논 문

(1) SCI 게재논문

1. Vamsi L. M. Madgula, Bharathi Avula, Young W. Choi, Srinivas V. Pullela, Ikhlas A. Khan, Larry A. Walker and Shabana I. Khan. 2008. Transport of *Schisandra chinensis* extract and its biologically-active constituents across Caco-2 cell monolayers -. an in-vitro model of intestinal transport. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60: 363-370.
2. Young-whan CHOI, Kyeok KIM, Ji-yeong JO, Hyo-lim KIM, You-jin LEE, Woo-jung SHIN, Santosh J SACKET, Mijin HAN, Dong-soon IM. 2008. Wuweizisu C from *Schisandra chinensis* decreases membrane potential in C6 glioma cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 29(9): 1006 - 1012.
3. Ji Young Park, Hwa Kyoung Shin, You Jin Lee, Young Whan Choi, Sun Sik Bae, Chi Dae Kim. 2009. The mechanism of vasorelaxation induced by *Schisandra chinensis* extract in rat thoracic aorta. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(1): 69-73.
4. You Jin Lee, Jae Woong Shim, Yong Jae Lee, Young Hoon Park, Ha Young Lee, Sang Doo Kim, Young-Whan Choi, and Yoe-Sik Bae. 2009. Identification of a novel compound that stimulates intracellular calcium increase and CXCL8 production in human neutrophils from *Schisandra chinensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379 (4), 928-932.

(2) 국내 논문

1. 김윤제, 이영근, 최영환, 김용철. 2008. 8. 건조조건이 오미자의 휘발성 terpene류 및 색도에 미치는 영향. *생명과학회지* 18(8): 1066-1071. (Yun-Je Kim, Young-Guen Lee, Young-Whan Choi and Yong-Chul Kim. 2008. Effects of Drying Conditions on the Profile of Volatile Terpenoid and Colour of Schizandra Fruit (*Schizandra Chinensis* fructus). *Journal of Life Science* 18(8), 1066~1071)

(3) SCI 투고 중인 논문

1. Gomisins N isolated from *Schisandra chinensis* was significantly induced anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the hepatic carcinoma.
2. Induction of G1 arrest and apoptosis by schisandrin C in human leukemia U937 cells.
3. 오미자로부터 추출한 항동맥경화 효과

(4) SCI 준비 중인 논문

1. CCL₄를 이용한 간염유발 쥐에서 Gomisins A의 항간염 효과
2. 오미자로부터 신규한 YSC012005의 항염증 효과 및 그 기작 구명
3. 오미자로부터 신규한 YSC012005의 항암 및 그 기작 구명
4. 오미자로부터 추출한 물질의 미백효과 및 그 기작 구명
5. 생육기간 중에 오미자 생리활성물질인 리그난 물질의 변화 양상 및 실용적인 활용방법 구명
6. 생장조절제 및 증적저장법을 이용한 오미자 종자의 휴면타파 방법

- 7. 오미자로부터 순수분리한 리그난 성분이 채소종자의 발아에 미치는 영향
- 8. 오미자로부터 순수분리한 리그난이 몇가지 채소의 유묘생장에 미치는 영향

제 4절 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등

가. 추가연구

- 오미자로부터 추출한 2가지의 신규물질을 천연물 신약으로서 개발하기 위하여 인증된 기관에서의 동물 실험 필요
- 오미자로부터 순수분리한 신물질 또는 이미 알려진 성분의 항염증, 항암, 미백효능 검증
- 오미자의 혈관확장용 건강기능성 제품개발을 위한 전임상시험이 필요
- 오미자브랜드는 주도가 목표수준보다 낮아 향후 생산 희망업체가 있을 경우 산업체의 다 단연속식 증류기를 적용하여 주도를 목표수준 만큼 높은 시제품의 품질을 추가 검토하여 생산 여부를 결정하여야 함.

나. 타 연구에 활용 계획

- ARPC로부터 연구비를 받아서 수행하고 있는 흑마늘 과제와 맥문동 과제에 오미자 연구에서 확립한 방법을 활용할 계획임
- 본 연구과제의 수행 중에 개발된 많은 추출물이 매우 다양한 생리활성을 가지는 것을 확인하였다. 따라서 현재 각각의 추출물이 어떤 기전을 통해 생리활성을 조절하는지에 대한 연구를 지속적으로 수행할 예정이며 본 연구과제에서 확립된 연구기술들을 타 연구과제에서도 활용할 예정이다. 특히 본 과제에서 PDG가 LPA 수용체 대한 효현재임을 밝혔고 이를 이용해 타 연구과제에서는 암세포의 전이에 미치는 영향을 검증하고자 하고 있다. 또한 Gomisin A가 혈관의 이완을 촉진함을 확인하였고 차후 타 연구과제에서 동물실험을 통해 Gomisin A가 혈관의 이완을 촉진을 통해 혈압하강 효과가 있는지에 대해 연구할 예정이다.

제 5절 연구기획사업 등

가. 천연물 신약 개발

- 오미자로부터 추출한 신물질의 함염증 또는 항암제로서 개발을 위한 전임상, 임상시험
- 미백효능물질의 작용기작 구명 및 산업화를 위한 연구

나. 건강기능성 식품

- 혈관확장 효능이 있는 지표성분과 활성이 높은 추출방법을 확립하였으므로, 그 지표성분을 근거로 하여서 건강기능성 식품 개발을 위한 전임상 시험

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

식물체 추출물에는 수천가지 이상의 화합물이 존재하고 있으며 전통적으로 식물체의 종류에 따라 각각 서로 다른 효능을 가지고 있음이 알려졌다. 이는 각 식물체마다 함유하고 있는 성분 조성이나 양의 차이점에 의해 나타난다고 알려져 있다. 또한 기존에는 이러한 화합물이 흡수되어 인체에 영향을 미친다고 생각하였다. 하지만 최근에는 이러한 화합물이 인체에 흡수될 때에는 위장관 내의 효소나 생균들에 의해 변형되고 변형된 것들이 흡수되어 인체에 영향을 미친다고 보고되고 있다 (Xie *et al.* 2003). 따라서 분리된 화합물의 효능과 실제 알려진 효능이 서로 다른 경우가 있을 수 있다. 본 연구에서도 밝혀진 바와 같이 지금까지 오미자의 효능은 항암작용, 항산화작용 등이 주된 것으로 알려져 왔으나 본 연구의 결과에 의하면 오미자 추출물의 주된 기능은 세포의 이동 조절 및 혈관생리활성 조절 등이다. 즉 소화기계를 통해 흡수된 오미자 추출성분은 항암작용 및 항산화작용을 가지는 것들이지만 오미자 추출물을 직접적으로 투여할 경우 세포의 이동 및 혈관생리조절을 조절하는 활성도가 훨씬 높다고 볼 수 있다. 단적인 예로 식물체에 다량으로 존재하는 Lignan계열의 화합물은 기존에 진정작용이나 항우울작용이 약하게 있는 것으로 알려져 있으나 이러한 생리활성 조절에 대한 기전에 대해 알려져 있지 않았다. 하지만 본 연구개발 결과에 의하면 Lignan 계열의 화합물이 LPA 수용체를 활성화 한다. 최근 연구결과에 의하면 생쥐의 뇌에 LPA 수용체를 Knock-out 시키면 우울증 및 정신분열증세가 보인다고 보고하였다 (Roberts *et al.* 2005). 따라서 Lignan 계열의 화합물은 체내에 흡수되어 뇌세포에 있는 LPA 수용체를 자극하게 되고 이는 진정작용이나 항우울 작용으로 나타난다고 볼 수 있다. 이와 같이 식물체가 가지는 화합물은 매우 다양한 효능을 가진 집합체이고 이들 성분의 효능을 검증하고 작용기전을 규명하게 된다면 매우 다양한 분야에 효과적으로 적용할 수 있는 약물 개발의 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 생각되어 진다.

제 7 장 참고문헌

제 1 세부과제: 대량번식 체계 확립

Abe, F.; Yamauchi, T. Tanegosides A, B and C lignan glycosides from *Trachelospermum liukiunense*. *Chem. Pharm. Bull.* 1990, *38*, 2143-2145.

Bedows, E.; Hatfield, G. M. An investigation of the antiviral activity of *Podophyllum peltatum*. *J. Nat. Prod.* 1982, *45*, 725-728.

Besombes, S.; Robert, D.; Utille, J.; Taravel, F. R.; Mazeau, K. Molecular modeling of syringil and *p*-hydroxyphenyl β -O-4 dimers. Comparative study of the computed and experimental conformational properties of lignin β -O-4 model compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51*, 34-42.

D'Abrosca, B.; DellaGreca, M.; Fiorentino, A.; Monaco, P.; Previtiera, L.; Simonet, A. M.; Zarrelli, A. Potential allelochemicals from *Sambucus nigra*. *Phytochemistry* 2001, *58*, 1073-1081.

DellaGreca, M.; Molinaro, A.; Monaco, P.; Previtiera, L. Neolignans from *Aurum italicum*. *Phytochemistry* 1994, *35*, 777-779.

Fonseca, S. B.; De Paiva Campello, J.; Barata, L. E. S.; Ruveda, E. A. ¹³C-NMR analysis of lignans from *Araucaria augustifolia*. *Phytochemistry* 1978, *17*, 499-502.

Francesca C., B. D. M. ABROSCA, D. Arina, F. Antonio, and Z. Armandio. Lignans and Neolignans from *Brassica fruticulosa*: Effects on Seed Germination and Plant Growth. *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51*, 6165-6172

Heisey, R. Allelopathic and herbicidal effects of extracts of tree of heaven (*Alantus altissima*). *Am. J. Bot.* 1990, *77*, 662-670.

Hess, F. D.; Bayer, D. J. Binding of herbicide trifluralin to *Chlamydomonas* flagellar tubulin. *J. Cell. Sci.* 1977, *15*, 351-360.

Houghton, P. J. Lignans and neolignans from *Buddleja daVidii*. *Phytochemistry* 1985, *24*, 819-826.

Huang, J.; Ogihara, Y.; Gonda, R.; Takeda, T. Novel biphenyl ether lignans from rhizomes of *Curcuma chuanyujin*. *Chem. Pharm. Bull.* 2000, *48*, 1228-1229.

Kuima, K.; Oztuka, H.; Ide, T.; Ogimi, C.; Hirata, E.; Takushi, A.; Takeda, Y. Sesquiterpene

- glycosides and sesquignan glycosides from stems of *Alangium premnifolium*. *Phytochemistry* 1998, 48, 669-676.
- Lavie, D.; Levy, E. C.; Cohen, A.; Evenari, M.; Gutterman, Y. New germination inhibitor from *Aegilops oVata*. *Nature* 1974, 249, 388.
- Lavie, D.; Levy, E. C.; Cohen, A.; Evenari, M.; Gutterman, Y. New germination inhibitor from *Aegilops oVata*. *Nature* 1974, 249, 388.
- Li, S.; Lundquist, K.; Wallis, A. F. A. Revised structure for a neolignan from *Brucea jaVanica*. *Phytochemistry* 1998, 49, 2125-2128.
- Lin, L. J.; Peiser, B. P.; Ying, K.; Mathias, F.; Karasina, Z.; Wang, Z.; Itatani, J.; Green, L.; Yang, S. Identification of plant growth inhibitory principles in *Alianthus altissima* and *Castela tortusa*. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 1708-1711.
- Lin-gen, Z.; Seligmann, O.; Jurcic, K. K.; Wagner, H. Constituents of *Daphne tangutica*. *Planta Med.* 1982, 45, 172-176.
- Macias, F. A.; Castellano, D.; Molinillo, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2512-2521.
- MacRae, W. D.; Towers, G. H. Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 1983, 23, 1207-1220.
- Matsuda, S.; Kadota, S.; Tai, T. Isolation and structures of hedyotisol-A, -B, and -C novel dilignans from *Hedyotis lawsoniae*. *Chem. Pharm. Bull.* 1984, 32, 5066-5069.
- Oliva, A.; Moraes, R. M.; Watson, S. B.; Duke, S. O.; Dayan, F. E. Aryltetralin lignans inhibit plant growth by affecting the formation of mitotic microtubular organizing centers. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2002, 72, 45-54.
- Oliva, A.; Moraes, R. M.; Watson, S. B.; Duke, S. O.; Dayan, F. E. Aryltetralin lignans inhibit plant growth by affecting the formation of mitotic microtubular organizing centers. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2002, 72, 45-54.
- Richard, G. A.; Hussey, P. J. Dinitroaniline herbicides resistance and the microtubule cytoskeleton. *Trends Plant Sci.* 1999, 4, 112-116.
- Rimando, A. M.; Dayan, F. E.; Mikell, J. R.; Moraes, R. M. Phytotoxic lignans of *Leucophyllum frutescens*. *Nat. Toxins* 1999, 7, 39-43.

- Rimando, A. M.; Dayan, F. E.; Mikell, J. R.; Moraes, R. M. Phytotoxic lignans of *Leucophyllum frutescens*. *Nat. Toxins* 1999, 7, 39-43.
- Russel, G. B.; Singh, P.; Fenemore, P. G. Insect-control chemicals from plants. Toxic lignans from *Libocedrus bidwillii*. *Aust. J. Biol. Sci.* 1976, 29, 99-103.
- Shabana, E. F.; Battah, M. G.; Kobbia, I. A.; Eladel, H. M. Effect of pendimethalin on growth and photosynthetic activity of *Protosiphon botryoides* in different nutrient states. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2001, 49, 106-110.
- Szabo, M.; Garay, A. Changes in phenolics during the germination of *Arctium lappa* with special respect to arctiine. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* 1970, 16, 207.
- Szabo, M.; Garay, A. Changes in phenolics during the germination of *Arctium lappa* with special respect to arctiine. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* 1970, 16, 207.
- Takeshi, D.; Takako, I.; Shizuka, K.; Sansei, N. The constituents of *Eucommia ulmoides* OLIV. VI. Isolation of a new sesquilignan and neolignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* 1987, 35, 1803-1807.
- Thompson, L. U.; Rickard, S. E.; Orcheson, L. J.; Seidl, M. M. Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1996, 17, 1373-1376.
- Thompson, L. U.; Seidl, M. M.; Rickard, S. E.; Orcheson, L. J.; Fong, H. H. Antitumorogenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr. Cancer* 1996, 26, 159-165.
- Urones, J. G.; De Pascual, Teresa J.; Sanchez Marcos, I.; Diez Martin, D. *Ent*-isolariciresinol in *Reseda suffruticosa*. *Phytochemistry* 1987, 26, 1540-1541.
- Yoshihara, T.; Katsuyoshi, Y.; Sakamura, S. A lignan stress compound in potato infected with nematode (*Globodera rostochiensis*). *Agric. Biol. Chem.* 1982, 46, 853-854.
- Yoshihara, T.; Katsuyoshi, Y.; Sakamura, S. A lignan stress compound in potato infected with nematode (*Globodera rostochiensis*). *Agric. Biol. Chem.* 1982, 46, 853-854.
- Yoshikawa, K.; Kageyama, H.; Arihara, S. Phenolic glucosides and lignans from *Ehretia ovalifolia*. *Phytochemistry* 1995, 39, 659-664.
- Yuen, M. S. M.; Xue, F.; Mak, T. C. W.; Wong, H. N. C. On the absolute structure of optically active neolignans containing a dihydrobenzo[*b*]furan skeleton. *Tetrahedron* 1998, 54, 12429-12444.

제 2 세부과제: 생리활성물질 추출 및 구조 동정

- Borenfreund, E.; Babich, H.; Martin-Alguacil, N. *In Vitro Cell. DeV. Biol.* **1990**, *26*, 1030-1034.
- Cavin, A.; Potterat, O.; Wolfender, J. L.; Hostettmann, K.; Dyatmyko, W. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1497-1501.
- Chang, G. T.; Kang, S. K.; Kim, J. H.; Chung, K. H.; Chang, Y. C.; Kim, C. H. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *102*, 430-439.
- Chen, D. F.; Zhang, S. X.; Kozuka, M.; Sun, Q. Z.; Feng, J.; Wang, Q.; Mukainaka, T.; Nobukuni, Y.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Wang, H. K.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1242-1245.
- Chen, D. F.; Zhang, S. X.; Xie, L.; Xie, J. X.; Chen, K.; Kashiwada, Y.; Zhou, B. N.; Wang, P.; Cosentino, L. M.; Lee, K. H. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1715-1723.
- Chung, H. S.; Chang, L. C.; Lee, S. K.; Shamon, L. A.; van Breemen, R. B.; Mehta, R. G.; Farnsworth, N. R.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 36-41.
- D.F. Chen, S.X. Zhang, L. Xie, J.X. Xie, K. Chen, Y. Kashiwada, B.N. Zhou, P. Wang, L.M. Cosentino, K.H. Lee, Anti-AIDS agents-XXVI. Structure-activity correlations of gomisin-G-related anti-HIV lignans from *Kadsura interior* and of related synthetic analogues, *Bioorg. Med. Chem.* *5* (1997) 1715-1723.
- D.F. Chen, S.X. Zhang, M. Kozuka, Q.Z. Sun, J. Feng, Q. Wang, T. Mukainaka, Y. Nobukuni, H. Tokuda, H. Nishino, H.K. Wang, S.L. Morris-Natschke, K.H. Lee, Interiotherins C and D, two new lignans from *Kadsura interior* and antitumorpromoting effects of related neolignans on Epstein-Barr virus activation, *J. Nat. Prod.* *65* (2002) 1242-1245.
- G.R. Monteith, D. McAndrew, H.M. Faddy, S.J. Roberts-Thomson, Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport, *Nat. Rev. Cancer* *7* (2007) 519-530.
- G.T. Chang, S.K. Kang, J.H. Kim, K.H. Chung, Y.C. Chang, C.H. Kim, Inhibitory effect of the Korean herbal medicine, Dae-Jo-Whan, on platelet-activating factor-induced platelet aggregation, *J. Ethnopharmacol.* *102* (2005) 430-439.
- H. Lu, G. Liu, Anti-oxidant activity of dibenzocyclooctene lignans isolated from Schisandraceae, *Planta Med.* *58* (1992) 311-313.
- H.U. Zeilhofer, W. Schorr, Role of interleukin-8 in neutrophil signaling, *Curr. Opin. Hematol.* *7* (2000) 178-182.
- H.Y. Lee, S.D. Kim, J.W. Shim, S.Y. Lee, H. Lee, K.H. Cho, J. Yun, Y.S. Bae, Serum amyloid A

induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes, *J. Immunol.* 181 (2008) 4332-4339.

Hancke, J. L.; Burgos, R. A.; Ahumada, F. *Fitoterapia* **1999**, *70*, 451-471.

Hassan, A. G.; Bedir, E.; Takamatsu, S.; Ferreira, D.; Khan, I. A. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2499-2505.

Hwang, B. Y.; Kim, H. S.; Lee, J. H.; Hong, Y. S.; Ro, J. S.; Lee, K. S.; Lee, J. J. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 82-84.

Ikeya, Y.; Taguchi, H.; Yosioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 1383-1394.

Ikeya, Y.; Taguchi, H.; Yosioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 2422-2427.

Ikeya, Y.; Taguchi, H.; Yosioka, I.; Kobayashi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 1576-1582.

Ikeya, Y.; Taguchi, H.; Yosioka, I.; Kobayashi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 2695-2709.

J. Van Damme, A. Wuyts, G. Froyen, E. Van Coillie, S. Struyf, A. Billiau, P. Proost, J.M. Wang, G. Opdenakker, Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage, *J. Leukoc Biol.* 62 (1997) 563-569.

J.H. Park, M.Y. Lee, J.S. Heo, H.J. Han, A potential role of connexin 43 in epidermal growth factor-induced proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺/PKC, p44/42 and p38 MAPKs pathways, *Cell Prolif.* 41 (2008) 786-802.

J.L. Hancke, R.A. Burgos, F. Ahumada, Schisandra chinensis (Turcz.), *Baill Fitoterapia* 70 (1999) 451-471.

K. Yasukawa, Y. Ikeya, H. Mitsuhashi, M. Iwasaki, M. Aburada, S. Nakagawa, M. Takeuchi, M. Takido, Gomisins A inhibits tumor promotion by 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin, *Oncology* 49 (1992) 68-71.

Labuza, T. D. *Crit. Rev. Food Technol.* **1971**, *7*, 355-395.

Li, X.; Zhao, B.; Liu, G.; Xin, W. *Biol. Med.* **1990**, *9*, 99-104.

Lin, T. J.; Liu, G. T.; Li, X. J.; Zhao, B. L.; Xin, W. J. *Acta Pharmacol. Sin.* **1990**, *11*, 534-539.
Lu, H.; Liu, G. *Planta Med.* **1992**, *58*, 311-313.

M.D. Wu, R.L. Huang, L.M.Y. Kuo, C.C. Hung, C.W. Ong, Y.H. Kuo, The anti-HBsAg (human type B hepatitis, surface antigen) and anti-HBeAg (human type B hepatitis, e antigen) C18

dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura matsudai* and *Schizandra arisanensis*, *Chem. Pharm. Bull.* 51 (2003) 1233–1236.

M.J. Berridge, Inositol trisphosphate and calcium signaling, *Nature* 361 (1993) 315–325.

Masuda, T.; Matsumura, H.; Oyama, Y.; Takeda, Y.; Jitoe, A.; Kida, A.; Hidaka, K. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 609–613.

Musza, L. L.; Killar, L. M.; Speight, R.; McElhiney, S.; Barrow, C. J.; Gillum, A. M.; Cooper, R. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1369–1378.

N. Sekido, N. Mukaida, A. Harada, I. Nakanishi, Y. Watanabe, K. Matsushima, Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8, *Nature* 465 (1993) 654–657.

Nomura, M.; Nakachiyama, M.; Hida, T.; Ohtaki, Y.; Sudo, K.; Aizawa, T.; Aburada, M.; Miyamoto, K. I. *Cancer Lett.* **1994**, *76*, 11–18.

Ohtaki, Y.; Hida, T.; Hiramatsu, K.; Kanitani, M.; Ohshima, T.; Nomura, M.; Wakita, H.; Aburada, M.; Miyamoto, K. I. *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 751–755.

Osawa, T.; Yoshida, S.; Kawakishi, S.; Yamashita, K.; Ochi, H. In *Protective Role of Dietary Antioxidants in Oxidative Stress. Oxidative Stress and Aging* Cutler, R. G., Packer, L., Bertman, J., Moris, A., Eds.; Birkhauser Verlag: Basel, 1995; pp 367–377.

P.M. Murphy, Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines, *Semin Hematol.* 34 (1997) 311–318.

R. Mukherjee, F.G. Spinale, L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30 (1998) 1899–1916.

Rajbhandari, I.; Takamatsu, S.; Nagle, D. G. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 693–695.

S.J. Cook, P.J. Lockyer, Recent advances in Ca(2+)-dependent Ras regulation and cell proliferation, *Cell Calcium* 39 (2006) 101–112.

Seo, S. M.; Lee, H. J.; Park, Y. K.; Lee, M. K.; Park, J. I. Paik, K. H. *Nat. Prod. Sci.* **2004**, *10*, 104–108.

Takamatsu, S.; Galal, A. M.; Ross, S. A.; Ferreira, D.; Elsohly, M. A.; Ibrahim, A. R.; El-Feraly, F. S. *Phytotherapy Res.* **2003**, *17*, 963–66.

Thomson, R. H. *Naturally Occurring Quinones*, 2nd ed.; Academic Press: New York, 1971.

Westenburg, H. E.; Lee, K. J.; Lee, S. K.; Fong, H. H. S.; van Breemen, R. B.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1696–1698.

Wu, M. D.; Huang, R. L.; Kuo, L. M. Y.; Hung, C. C.; Ong, C. W.; Kuo, Y. H. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1233-1236.

Y. Ohtaki, T. Hida, K. Hiramatsu, M. Kanitani, T. Ohshima, M. Nomura, H. Wakita, M. Aburada, K.I. Miyamoto, Deoxycholic acid as an endogenous risk factor for hepatocarcinogenesis and effects of gomisin A, a lignan component of Schizandra fruits, *Anticancer Res.* **16** (1996) 751-755.

Y.S. Bae, H. Bae, Y. Kim, T.G. Lee, P.G. Suh, S.H. Ryu, Identification of novel chemoattractant peptides for human leukocytes, *Blood* **97** (2001) 2854-2862.

Y.S. Bae, H.J. Yi, H.Y. Lee, E.J. Jo, J.I. Kim, T.G. Lee, R.D. Ye, J.Y. Kwak, S.H. Ryu, Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands, *J. Immunol.* **171** (2003) 6807-6813.

Y.W. Choi, S. Takamatsu, S.I. Khan, P.V. Srinivas, D. Ferreira, J. Zhao, I.A. Khan, Schisandrene, a dibenzocyclooctadiene lignan from Schisandra chinensis: structure-antioxidant activity relationships of dibenzocyclooctadiene lignans, *J. Nat. Prod.* **69** (2006) 356-359.

Yasukawa, K.; Ikeya, Y.; Mitsuhashi, H.; Iwasaki, M.; Aburada, M.; Nakagawa, S.; Takeuchi, M.; Takido, M. *Oncology* **1992**, *49*, 68-71.

Yasukawa, K.; Ikeya, Y.; Mitsuhashi, H.; Iwasaki, M.; Aburada, M.; Nakagawa, S.; Takeuchi, M.; Takido, M. *Oncology* **1992**, *49*, 68-71.

제 3세부과제: 기능성 제품 개발

보건복지부. 2008. 식품공전

Flora, L. F. 1976 . Time temperature on 'Muscadin' grape juice quality. *J. Food Sci.*, **41**, 1312-1316.

Lee, L. S. and J. W. Rhim. Thermal kinetics color changes of purple sweet potato anthocyanin pigment. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 497-501.

Ponting, J. D., D. W. Sanshuck and J. E. Brekke. 1960. Color measurement and deterioration in grape and berry juices and concentrates. *Food Res.* **25**, 471-476.

Song, C. E, Y. J. Park and B. G. Heo. 2001. Stability of anthocyanins from flowers of *Lycoris radiata* as natural colorants. *J. Life Sci. Nat. Res.* **23**, 27-32.

Im, M. H., Y. K. Yoo and Y. S. Park. 2003. Effects of Drying Conditions on Changes of Flower

Color and Diameter in *Gerbera hybrida* after Drting. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **44**, 102–106.

Li, X., G. Wang, H. Ding, C. Cunnigham, F. Chen, D. C. Flynn, E. Reed and Q. Q. Li. 2005. Antiproliferative effect of β -elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the G2-M phase. *Cellular & Molecular Life Sci.* **62**, 894–904.

Peng, X., Y. Zhao, X. Liang, L. Wu, S. Cui, A. Guo and W. Wang. 2006. Assessing the quality of RCTs on the effect of β -elemene, one ingredient of a Chinese herb, against malignant tumors. *Contemporary Clinical Trials* **27**, 70–82.

Wang, G., X. Li, F. Huang, J. Zhao, H. Ding, C. Cunningham, J. E. Coad, D. C. Flynn, E. Reed and Q. Q. Li. 2005. Antitumor effect of β -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. *Cellular & Molecular Life Sci.* **62**, 881–893.

Carson, C. F. and T. V. Riley. 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 264–269.

Southwell I. A., A. J. Hayes, J. L. Markham and D. N. Leach. 1993. The search for optimally bioactive Australian tea tree oil. *Acta. Hort.* **334**, 265–275.

Hart P. H., C. Brand, C. F. Carson, T. V. Riley, R. H. Prager and J. J. Finlay-Jones. 2000. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm. Res.* **49**, 619–626.

Calcabrini A., A. Stringaro, L. Toccaceli, S. Meschini, M. Marra, M. Colone, G. Salvatore, F. Mondello, G. Aracia and A. Molinari. 2004. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 349–360.

Lahlou S., L. F. Leal-Interaminense, J. H. Leal-Cardoso and G. P. Duarte. 2003. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Blackwell Publishing Fundamental & Clinical Pharmacology* **17**, 323–330.

Juergens, U. R., M. Stober, L. Schmidt-Schilling, T. Kleuver and H. Vetter. 1998. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. *Eur. J. Med. Res.* **3**, 407–412.

Lahlou, S., A. F. Figueiredo, P. J. Caldas Magalhães and J. H. Leal-Cardoso. 2002. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in

normotensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**, 1125-1131.

Santos, F. A. and V. S. N. Rao. 2001. 1,8-cineole, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Dig. Dis. Sci.* **46**, 331-337.

Lee, M. S. and H. S. Choi. 1996. Volatile flavor components of *Capsella bursa-pastoris* as influenced by drying methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 814-821.

Kim, K. S., J. S. Song and J. K. Bang. 2000. Changes in volatile compounds of *Schizandra chinensis* fruits according to drying and extracting methods. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **8**, 49-57

Koller, W. D. 1988. Problems with the flavour of herbs and spices. In *Frontiers of Flavor. Proceeding of the 5th international flavor conference.* G. Charalambous (Ed.), Elsevier Science Publishers Co., Inc., Amsterdam, Netherlands. 123.

Yoon, H. N., S. Y. Moon and S. H. Song. 1998. Volatile compounds and sensory odor properties of commercial vinegar. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 299-305

Seo, J. H., N. Y. Park and Y. J. Jeang. 2001. Volatile Components in Persimmon Vinegars by Solid-Phase Microextraction. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **33**, 153-156

제 4 세부과제: 생리활성 검증

Chen, D.F., Zhang, S.X., Xie, L., Xie, J.X., Chen, K., Kashiwada, Y., Zhou, B.N., Wang, P., Cosentino, L.M., Lee, K.H., 1997. Anti-AIDS agents—XXVI. Structure-activity correlations of gomisin-G-related anti-HIV lignans from *Kadsura interior* and of related synthetic analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **5**, 1715-1723.

Chen, Y.G., Qin, G.W., Xie, Y.Y., Cheng, K.F., Lin, Z.W., Sun, H.D., Kang, Y.H., Han, B.H., 1998. Lignans from *Kadsura angustifolia*. *Journal of Asian Natural Products Research* **1**, 125-131.

Chiu, P.Y., Mak, D.H., Poon, M.K., Ko, K.M., 2002. In vivo antioxidant action of a lignanenriched extract of Schisandra fruit and an anthraquinone-containing extract of Polygonum root in comparison with schisandrin B and emodin. *Planta Medica* **68**, 951-956.

Choi, Y.W., Takamatsu, S., Khan, S.I., Srinivas, P.V., Ferreira, D., Zhao, J., Khan, I.A., 2006. Schisandrene, a dibenzocyclooctadiene lignan from *Schisandra chinensis*: structure-antioxidant activity relationships of dibenzocyclooctadiene lignans. *Journal of Natural Products* **69**, 356-359.

de Moura, R.S., Miranda, D.Z., Pinto, A.C., Sicca, R.F., Souza, M.A., Rubenich, L.M., Carvalho, L.C., Rangel, B.M., Tano, T., Madeira, S.V., Resende, A.C., 2004. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine.

Journal of Cardiovascular Pharmacology 44, 302–309.

Ernst, E., 2005. The efficacy of herbal medicine—an overview. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 19, 405–409.

Fitzpatrick, D.F., Hirschfield, S.L., Ricci, T., Jantzen, P., Coffey, R.G., 1995. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 26, 90–95.

Grimm, M., Haas, P., Willipinski-Stapelfeldt, B., Zimmermann, W.H., Rau, T., Pantel, K., Weyand, M., Eschenhagen, T., 2005. Key role of myosin light chain (MLC) kinase-mediated MLC2a phosphorylation in the α 1-adrenergic positive inotropic effect in human atrium. *Cardiovascular Research* 65, 211–220.

Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F., Hartshorne, D.J., 2004. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Molecular and Cellular Biochemistry* 259, 197–209.

Kuo, Y.H., Kuo, L.M., Chen, C.F., 1997. Four new C19 homolignans, schiariansins A, B, and D and cytotoxic schiariansin C, from *Schizandra arisanensis*. *The Journal of Organic Chemistry* 62, 3242–3245.

Li, P.C., Poon, K.T., Ko, K.M., 1996. *Schizandra chinensis*-dependent myocardial protective action of sheng-mai-san in rats. *The American Journal of Chinese Medicine* 24, 255–262.

Luscher, T.F., 1991. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *European Heart Journal* 12, 2–11.

Matsuzaki, Y., Ishibashi, E., Koguchi, S., Wakui, Y., Takeda, S., Aburada, M., Oyama, T., 1991. Determination of gomisins A (TJN-101) and its metabolite in rat serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Yakugaku Zasshi* 111, 617–620.

Park, J.Y., Lee, S.J., Yun, M.R., Seo, K.W., Bae, S.S., Park, J.W., Lee, Y.J., Shin, W.J., Choi, Y.W., Kim, C.D., 2007. Gomisins A from *Schizandra chinensis* induces endothelium-dependent and direct relaxation in rat thoracic aorta. *Planta Medica* 73, 1537–1542.

Raghavan, S.A., Dikshit, M., 2001. L-Citrulline mediated relaxation in the control and lipopolysaccharide-treated rat aortic rings. *European Journal of Pharmacology* 431, 61–69.

Rhyu, M.R., Kim, E.Y., Yoon, B.K., Lee, Y.J., Chen, S.N., 2006. Aqueous extract of *Schizandra chinensis* fruit causes endothelium-dependent and -independent relaxation of isolated rat thoracic aorta. *Phytomedicine* 13, 651–657.

Roberts C, Winter P, Shilliam CS, Hughes ZA, Langmead C, Maycox PR, and Dawson LA, (2005) *Neurochem. Res.* 30, 371–377

Wang, C., Makela, T., Hase, T., Adlercreutz, H., Kurzer, M.S., 1994. Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 50, 205-212.

Wazlawik, E., Da Silva, M.A., Peters, R.R., Correia, J.F., Farias, M.R., Calixto, J.B., Ribeiro-Do-Valle, R.M., 1997. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49, 433-437.

Wu, M.D., Huang, R.L., Kuo, L.M., Hung, C.C., Ong, C.W., Kuo, Y.H., 2003. The anti-HBsAg (human type B hepatitis, surface antigen) and anti-HBeAg (human type B hepatitis, e antigen) C18 dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura matsudai* and *Schizandra arisanensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 51, 1233-1236.

Xie LH, Akao T, Hamasaki K, Deyama T, and Hattori M (2003) *Chem. Pharm. Bull.* 51, 508-515.

Xu, M., Wang, G., Xie, H., Wang, R., Wang, W., Li, X., Li, H., Zhu, D., Yue, L., 2005. Determination of schizandrin in rat plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and its application in rat pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 828, 55-61.

Xu, M.J., Wang, G.J., Xie, H.T., Huang, Q., Jia, Y.W., 2007. Enzyme kinetics of schizandrin metabolism and sex differences in rat liver microsomes. *Yao Xue Xue Bao* 42, 730-734.

Yasukawa, K., Ikeya, Y., Mitsuhashi, H., Iwasaki, M., Aburada, M., Nakagawa, S., Takeuchi, M., Takido, M., 1992. Gomisins A inhibits tumor promotion by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 49, 68-71.

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.