

발간등록번호
--------

11-1543000-000616-01
----------------------

면역 강화 및 조혈 증진 효능을 가지는  
항암 치료 후 부작용 개선 식품 개발

Development of nutritional supplement for reducing  
adverse effects of cancer therapy by modulating of  
immune system and hematopoiesis

애경산업(주)

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “면역 강화 및 조혈 증진 효능을 가지는 항암 치료 후 부작용 개선 식품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 9 월 18 일

주관연구기관명 : 애경산업(주)

주관연구책임자 : 조 인 식

세부연구책임자 : 조 인 식

연 구 원 : 김 한 영

연 구 원 : 한 동 성

연 구 원 : 이 정 환

연 구 원 : 백 현 거

연 구 원 : 김 근 회

연 구 원 : 이 혜 숙

연 구 원 : 한 상 동

연 구 원 : 이 재 화

위탁연구기관명 : 대전대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 김 승 형

위탁연구기관명 : (주)엔자임바이오

위탁연구책임자 : 김 영 남

# 요 약 문

## I. 제 목

“면역 강화 및 조혈 증진 효능을 가지는 항암 치료 후 부작용 개선 식품 개발”

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

- 가. 농수산물을 이용하여 항암치료 후 부작용 개선을 위한 천연식품소재 개발
- 나. 확보된 농수산물의 효능 향상을 위한 재배법 및 가공법 개발
- 다. 전통 음식 제조법의 활용 및 섭취가 용이한 식품의 개발

### 2. 연구개발의 필요성

- 암은 우리나라 국민의 사망원인 1위로서, 국민건강을 위협하는 대표적인 요인임.
- 최근 건강검진, 의료기술향상, 복합치료전략 등에 힘입어 암환자의 생존률이 높아짐에 따라 항암치료 후 암 유병자의 삶의 질 향상을 위한 연구의 필요성이 높아지고 있음.
- 암환자들은 화학요법이나 방사선치료와 같은 항암치료로 암세포 뿐만 아니라 정상세포, 특히 면역 및 조혈에 관련된 세포들의 손상이 심하게 일어남. 이로 인하여 면역기능의 저하, 식욕부진, 피로감과 같은 여러 가지 부작용에 고통 받고 있으며, 이러한 부작용으로 암환자들이 필요로 하는 영양소의 섭취가 점점 더 어려워지게 됨.
- 이러한 원인으로 암으로 사망하는 환자의 20% 이상에서 나타나는 직접적인 사망 원인은 영양실조이며, 암환자의 평균 63%가 영양실조로 고통 받고 있는 것으로 조사에서 나타남. 따라서, 암환자의 빠른 회복을 위해서는 손상된 세포의 정상화를 위한 영양성분의 공급이 무엇보다도 중요하며, 이를 위해서는 단기간 내에 항암치료 후 부작용을 극복할 수 있는 방안이 필요함.
- 현재 부작용별로 추천되는 영양소 및 음식은 어느 정도 알려져 있지만, 실제로 체력과 소화기능이 저하된 환자의 부작용 개선이나 이를 위한 체계적인 가이드가 부족한 상황임. 따라서 섭취와 흡수가 용이하고, 조혈계와 면역계의 기능 회복 및 세포재생을 위한 전문 식품소재의 발굴이 절실함.
- 아울러, WTO 체제하에서 국제 경쟁력 제고 및 국내산 천연자원 활용의 극대화를 위하여 우리 고유의 천연 식품 재료로부터 고부가가치 식품을 창출하기 위한 기술 개발이 요구됨.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 항암치료의 부작용 개선을 위한 천연소재 탐색

- 가. 조혈 증진 천연 식품소재의 탐색
- 나. 조혈 증진 혼합 추출물 효능 평가
- 다. 면역 증진 천연 식품소재의 탐색
- 라. 세포성장 촉진 천연 식품소재의 탐색

## 2. 선별된 소재를 활용한 기본 복합 처방 및 암종별 처방 개발

- 가. 조혈 증진 / 면역 강화 / 세포성장 촉진 기본 처방 확립
- 나. 기본 처방의 *In vivo*, *In vitro* 효능 검증 및 발효 전후 효능 비교
- 다. 한의학적 암종별 처방 개발 및 환자용 균형영양식 기준 영양성분 보완

## 3. 천연물 수득 방법의 개선 및 공정 확립

- 가. 새싹 수득 방법의 확립
- 나. 발효 제법의 확립
- 다. 단백질 강화 버섯 수득 방법의 확립
- 라. 제형 개발, 양산화 공정 확립 및 시제품의 제조

## 4. 암 환자의 항암치료 후 회복 증진에 대한 인체적용 평가

- 가. 평가용 발효선식의 제조
- 나. 평가용 발효선식의 영양성분 분석
- 다. 한의학적 암종별 유병자 대상 인체적용 평가

# IV. 연구개발결과

## 1. 항암치료의 부작용 개선을 위한 천연소재 탐색

- 가. 조혈 증진 천연 식품소재 2종 발굴 (작두콩, 다채쌈)
- 나. 면역 강화 천연 식품소재 2종 발굴 (오가피, 우영)
- 다. 세포성장 촉진 천연 식품소재 2종 발굴 (유채쌈, 들깨쌈)

## 2. 선별된 소재를 활용한 기본 복합 처방 및 암종별 처방 개발

- 가. 조혈 증진 / 면역 강화 / 세포성장 촉진 기본 처방 확립  
(작두콩, 다채쌈, 오가피, 유채쌈)
- 나. 기본 처방의 *In vivo*, *In vitro* 효능 검증 및 발효 후 효능 증대 확인
- 다. 한의학적 암종별 처방 3종 개발(혈액암, 근육암, 림프암) 및 환자용 균형영양식 기준 영양성분 보완 방안 수립

## 3. 천연물 수득 방법의 개선 및 공정 확립

- 가. 다채, 유채, 메밀 새싹 재배법의 확립
- 나. 유산균을 활용한 발효 제법의 확립
- 다. 콩섬유박 고체배지를 활용한 단백질 강화 버섯 재배법의 확립

라. 제형 4종 개발, 양산화 공정 확립 및 제형별 / 암종별 시제품 12종 제조

#### 4. 암 환자의 항암치료 후 회복증진에 대한 인체적용 평가

가. 평가용 발효선식 3종 제조(혈액암, 근육암, 림프암)

나. 평가용 발효선식 3종 영양성분 분석

다. 한의학적 암종별 유병자 대상 인체적용 평가 결과, 피부혈색, 대소변활동원활, 소화기능 개선 확인

### V. 연구성과 및 성과활용 계획

#### 1. 연구성과

가. 항암치료 후 부작용 개선을 위한 조혈 증진 / 면역 강화 / 세포성장 촉진 천연 식품 소재 6종 발굴

나. 혈액암, 근육암, 림프암에 따른 천연 식품 처방 3종 개발

다. 발효선식, 과립, 환, 발효초 식품제형 및 제조공정 개발

#### 2. 성과활용 계획

가. 개발된 시제품은 조혈 증진 / 면역 강화 / 세포성장 촉진 식품 개발에 활용

(1) 항암치료 후 부작용 개선을 위한 간편식 개발에 활용

(2) 조혈/면역 기능저하 극복을 위한 식품으로 활용

(3) 환자용균형영양식 제품화에 활용

나. 자가기술훈을 통한 실용화 추진

다. 항 후 조혈/면역 관련 건강기능식품 개별인정형 인증 획득을 위한 후속 연구 추진

# SUMMARY

## I. Title

**“Development of nutritional supplement for reducing adverse effects of cancer therapy by modulating of immune system and hematopoiesis”**

## II. Objective and Necessity of the Research and Development

### 1. Objective of the Research and Development

- A. Development of natural food for reducing adverse effect of cancer therapy
- B. Development of cultivating and manufacturing method for efficacy enhancement
- C. Application of traditional cooking method and development of food for cancer patients

### 2. Necessity of the Research and Development

- Cancer is the most famous disease threatens public health as the number one cause of death in Korea.
- Backed by recent medical examinations, medical technology improves, combination therapy strategies has increased the need for research for improving the quality of life of the cancer patients after anticancer treatments according to the increased survival of cancer patients.
- Cancer patients are cancer cells as well as the severely damage of cells involved in normal cells, in particular the immune and hematopoietic caused by anticancer treatments, such as chemotherapy or radiation therapy. And suffering from a number of side effects such as decreased immune function, loss of appetite and fatigue, because of this, becomes increasingly difficult uptake of nutrients by these side effects.
- In the investigation appears to be suffering from malnutrition, the average 63% of cancer patients appear in more than 20% of patients who died of cancer in this cause is the direct cause of death. Thus, the supply of nutrients for the normalization of damaged cells is important and is needed to overcome the side effects in a short period of time after anti-cancer treatment for the rapid recovery in cancer patients.
- Some known side effects are recommended nutrients and foods. However, it is insufficient to systematic guide the improvement of the patient's side effects or decrease in the strength and digestive function. Therefore, it is necessary to facilitate the uptake and absorption of the professional food excavated material for functional recovery of the hematopoietic system and immune system and

cell regeneration.

- In addition, there is a need for technology to create high value-added food products from natural ingredients of our own in order to maximize and enhance the international competitiveness of domestic natural resources under the WTO system.

### **III. Contents and Scope of the Research and Development**

#### **1. Screening of natural materials for reducing adverse effects of cancer therapy**

- A. Screening of natural materials for improvement of hematopoiesis
- B. Screening of natural material mixtures for improvement of hematopoiesis
- C. Natural materials for modulating of immune system
- D. Screening of natural materials for promoting cell viability

#### **2. Basic Recipe Development by Cancer Type**

- A. Recipe Development for improvement of hematopoiesis / modulating of immune system / promoting cell viability
- B. *In vivo* and *In vitro* assay for varification of efficacy

#### **3. Development of Method to gain more Valuable Natural Materials**

- A. Research of sprout cultivation condition
- B. Research of Fermentation Process
- C. Research of Method to Protein enhanced Mushroom
- D. Development of Various type of Food and Manufacturing test Products

#### **4. Clinical evaluation of developed product for recovery in the cancer patients**

- A. Manufacturing fermented powdered Meal
- B. Nutritional contents analysis of fermented powdered Meal
- C. Clinical evaluation by Cancer type

### **IV. Results of the Research and Development**

#### **1. Screening of natural materials for reducing adverse effects of cancer therapy**

- A. Development of Two Natural Food Materials for improvement of hematopoiesis
- B. Development of Two Natural Food Materials for modulating of immune system
- C. Development of Two Natural Food Materials for promoting cell viability

#### **2. Basic Recipe Development by Cancer Type**

- A. Selection of Four Natural Food Materials for improvement of hematopoiesis / modulating of immune system / promoting cell viability
- B. Efficacy Verification by *In vivo* and *In vitro* assay
- C. Recipe Development by Cancer Type and Nutrients Supplementation

### **3. Development of Method to gain more Valuable Natural Materials**

- A. Establishment of Four Kind of Sprout Cultivation Condition
- B. Establishment of Fermentation Process
- C. Establishment of Method to Protein enhanced Mushroom
- D. Development of Four types of Food and Manufacturing Dozen kind of test Products

### **4. Clinical evaluation of developed product for recovery in the cancer patients**

- A. Manufacturing Three Types of fermented powdered Meal
- B. Nutritional contents analysis of Three Types of fermented powdered Meal
- C. As a Clinical evaluation Results, Improve Color of Skin, Urination, Defecation and Digestion in the Cancer Patients

## **V. Application Plan of the Project Results**

### **1. Results**

- A. Development of Six Natural Food Materials for Reducing Adverse Effects of Cancer Therapy
- B. Development of Three Recipes by Cancer Type
- C. Development of Fermented Powdered Meal, Granule, Tablet and Fermented Beverage

### **2. Application Plan**

- A. Application for Development of Functional Foods for Improvement of Hematopoiesis / Modulating of Immune System / Promoting Cell Viability
- B. Certificate Acquisition of Korean Health Functional Food



# CONTENTS

<b>Chapter 1. Overview of the Project</b> .....	<b>18</b>
Section 1. Objective of the Research and Development .....	18
Section 2. Necessity of the Research and Development .....	18
Section 3. Scope of the Research and Development .....	20
<b>Chapter 2. State of the Art Report</b> .....	<b>21</b>
Section 1. Status of Related Technology Development .....	21
Section 2. Different of Other Research and Development .....	23
<b>Chapter 3. Contents and Results</b> .....	<b>24</b>
Section 1. Screening of natural materials for reducing adverse effects of cancer <b>thrapthy</b> .....	<b>24</b>
1. Scope and Contents .....	24
2. Methods .....	25
3. Results and Discussion .....	34
A. Screening of natural materials for improvement of hematopoiesis .....	34
(1) Cytotoxicity of natural materials on Human fibroblast cells .....	34
(2) Improvement of hematopoiesis for bone marrow stem cell by real-time PCR .....	34
(3) Evaluation of hematopoiesis improvement on hematopoietic stem cell (HSCs) by real-time PCR .....	36
(4) Evaluation of hematopoiesis improvement on hematopoietic stem cell (HSCs) by ELISA .....	41
(5) Analysis of c-kit (CD117) expression on hematopoietic stem cell (HSCs) .....	44
(6) Analysis of phosphorylation activity for GATA-1/STAT on hematopoietic stem cell (HSCs) .....	45
(7) Evaluation of hematopoietic stem cell (HSCs) colony formation on Semi-solid media .....	46
B. Screening of natural material mixtures for improvement of hematopoiesis .....	48
(1) Analysis of Biomarkers for natural materials .....	48
(2) Cytotoxic effect of natural material mixtures .....	50
(3) Evaluation of hematopoiesis improvement on hematopoietic stem cell (HSCs) by real-time PCR .....	51
(4) Evaluation of hematopoiesis improvement on hematopoietic stem cell (HSCs) by ELISA .....	53
(5) Analysis of hematopoietic progenitor by FACS .....	55
(6) Analysis of phosphorylation activity for JAK2/GATA-1/STAT-5 on hematopoietic stem cell (Sca-1+HSCs) .....	56

(7) Evaluation of hematopoietic stem cell (HSCs) colony formation on Semi-solid media .....	57
C. Natural materials for modulating of immune system .....	59
(1) Inhibitory effect of pro-inflammatory cytokine(IL-6와 TNF-α) expression on peritoneal macrophage cells of Balb/c mice .....	59
(2) Evaluation of IL-10 and IFN-γ production level on splenocytes of Balb/c mice by ELISA .....	61
(3) Evaluation of NO production level on peritoneal macrophages of Balb/c mice .....	62
(4) Analysis of inflammatory cytokines .....	63
(5) Synergistic effect of natural food materials .....	67
(6) Effect of natural food materials extract and mixture on cachexia-induced mice .....	69
D. Screening of natural materials for promoting cell viability .....	83
(1) Cell viability test of human keratinocyte .....	83
<b>Section 2. Basic Recipe Development by Cancer Type .....</b>	<b>84</b>
1. Scope and Contents .....	84
2. Methods .....	85
3. Results and Discussion .....	90
A. Varification of efficacy .....	90
(1) Analysis of Biomarkers for natural materials .....	90
(2) Cytotoxic effect of natural material mixtures .....	92
(3) Evaluation of hematopoiesis improvement on hematopoietic stem cell (HSCs) by real-time PCR .....	92
(4) Evaluation of hematopoiesis improvement on hematopoietic stem cell (HSCs) by ELISA .....	95
(5) Analysis of CD117+ /Sca-1+ expression on hematopoietic stem cell (HSCs) .....	97
(6) Analysis of phosphorylation activity for JAK2/GATA-1/STAT-5 on hematopoietic stem cell (HSCs) .....	98
(7) Evaluation of hematopoietic stem cell (HSCs) colony formation on Semi-solid media .....	99
(8) Research on efficacy of AKP, AKP_F and Red Ginseng for reducing adverse effects .....	101
B. Basic Recipe Development by Cancer Type .....	113
<b>Section 3. Development of Method to gain more Valuable Natural Materials .....</b>	<b>125</b>
1. Methods .....	125
2. Results and Discussion .....	128
<b>Section 4. Clinical evaluation of developed product for recovery in the cancer patients .....</b>	<b>145</b>
1. Methods .....	145
2. Results and Discussion .....	149
<b>Chapter 4. Achievement of R&amp;D Goals and Contribution in Related Field .....</b>	<b>155</b>
<b>Section 1. Achievement of R&amp;D Goals .....</b>	<b>155</b>
<b>Section 2. Contribution to the advancement of technology in related field .....</b>	<b>162</b>

Chapter 5. Application Plan of the Project Results .....	163
Chapter 6. Collected Overseas Information during R&D Period .....	164
Section 1. Collected information from overseas exhibition .....	164
1. Hi-Japan / S-tec (2011) .....	164
2. Vitafoods Swiss (2013) .....	167
Chapter 7. References .....	168

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	18
제 1 절	연구개발과제의 목적 .....	18
제 2 절	연구개발과제의 필요성 .....	18
제 3 절	연구개발과제의 범위 .....	20
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	21
제 1 절	국내외 관련분야에 대한 기술개발현황 .....	21
제 2 절	연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 .....	23
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	24
제 1 절	항암치료의 부작용 개선을 위한 천연 소재 탐색 .....	24
1.	연구 내용 .....	24
2.	연구 방법 .....	25
가.	조혈 증진 천연 식품 소재의 탐색 .....	25
(1)	천연물 내역 및 추출물의 제조 .....	25
(2)	Human fibroblast cells을 이용한 세포독성 실험 .....	25
(3)	골수세포에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진작용 스크리닝 .....	25
(4)	조혈모세포(HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효능 검증 .....	25
(5)	조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효능 검증 .....	26
(6)	조혈모세포(HSCs)에서 c-kit (CD117) 유세포 발현 분석 .....	26
(7)	조혈모세포(HSCs)에서 GATA-1/STAT의 인산화 활성 분석 .....	26
(8)	반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정 .....	26
나.	조혈 증진 혼합 천연 식품 소재의 탐색 .....	27
(1)	천연물식품 혼합소재 .....	27
(2)	지표성분 분석 .....	27
(3)	세포독성에 미치는 영향 .....	28
(4)	조혈모세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효과 분석 .....	28
(5)	조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효과 분석 .....	28
(6)	조혈모세포(HSCs)에서 유세포 형광분석 .....	28

(7) 조혈모세포(Sca-1+HSCs)에서 JAK2/GATA-1/STAT-5 인산화활성분석	29
(가) 세포배양 및 다채색, 작두콩 그리고 두 조합 추출물 처리	29
(나) Immunoblotting 및 면역침강(immunoprecipitation)	29
(8) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정	29
다. 면역 증진 혼합 천연 식품 소재의 탐색	29
(1) Balb/c생쥐의 복강대식세포에서 천연식품소재의 염증사이토카인 유전자 억제 효과	29
(2) Balb/c생쥐의 복강대식세포에서 천연식품소재의 염증사이토카인 유전자 억제 효과	30
(3) Balb/c 생쥐의 복강대식세포에서 산화질소 생성능 측정	30
(4) 염증유발 사이토카인 분석 및 천연식품 조합물에 의한 synergistic 효과	30
(5) 천연식품소재 조합에 의한 synergistic 효과	30
(6) Cachexia를 유도한 생쥐에서 기능성 천연식품소재 조제물을 첨가한 정상식이의 효과	31
(가) 천연식품소재 조제물이 LPS처리한 생쥐의 body weight와 tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )에 미치는 영향	31
(나) 정상식이와 천연식품소재 조성물 동시 투여로 LPS 처리한 생쥐의 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 그리고 Leptin의 생산에 미치는 영향	31
(7) Colon26 세포주로 유도된 cachexia 생쥐모델에서 정상식이와 혼합천연식품소재 조성물이 cachexia syndrome 억제에 미치는 영향	31
(가) Colon26 세포주 배양	31
(나) Cachexia 유발 및 약물 투여	31
(다) 정상식이 섭취량 측정	31
(라) Body weight 및 tumor weight 측정	31
(마) 염증유발 사이토카인 및 Leptin 생산량 측정	32
(바) 생명연장곡선 측정	32
라. 세포성장 촉진 천연식품소재 개발	32
(1) 천연물 내역 및 추출물의 제조	32
(2) Human Keratinocyte를 이용한 세포성장률 실험	33
<b>3. 연구 결과 및 고찰</b>	<b>34</b>
가. 조혈증진 천연 식품 소재의 탐색	34
(1) Human fibroblast cells을 이용한 세포독성 실험	34
(2) 골수세포에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진작용 스크리닝	34
(3) 조혈모세포(HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효능 검증	36
(4) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효능 검증	41
(5) 조혈모세포(HSCs)에서 c-kit (CD117) 유세포 발현 분석	44
(6) 조혈모세포(HSCs)에서 GATA-1/STAT의 인산화 활성 분석	45
(7) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정	46
나. 조혈 증진 혼합 천연 식품 소재의 탐색	48
(1) 지표성분 분석	48
(2) 세포독성에 미치는 영향	50
(3) 조혈모세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효과 분석	51
(4) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효과 분석	53
(5) 조혈모세포(HSCs)에서 유세포 형광분석	55
(6) 조혈모세포(Sca-1+HSCs)에서 JAK2/GATA-1/STAT-5 인산화활성분석	56
(7) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정	57

다. 면역증진 천연식품소재 .....	59
(1) Balb/c 생쥐의 복강대식세포에서 천연식품소재의 염증사이토카인 유전자 억제 효과 .....	59
(2) Balb/c 생쥐의 배양 비장세포에서 활성 T 세포활성물질 IL-10과 IFN- $\gamma$ ELISA 측정 .....	61
(3) Balb/c 생쥐의 복강대식세포에서 산화질소 생성능 측정 .....	62
(4) 염증유발 사이토카인 분석 및 천연식품 조합물에 의한 synergistic 효과 .....	63
(5) 천연식품소재 조합에 의한 synergistic 효과 .....	67
(6) Cachexia를 유도한 생쥐에서 기능성 천연식품소재 조제물을 첨가한 정상식이의 효과 .....	69
(가) 천연식품소재 조제물이 LPS처리한 생쥐의 body weight와 tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )에 미치는 영향 .....	69
(나) 정상식이와 천연식품소재 조성물 동시 투여로 LPS 처리한 생쥐의 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 그리고 Leptin의 생산에 미치는 영향 .....	71
(다) Colon26 세포주로 유도된 cachexia 생쥐모델에서 정상식이와 혼합천연식품소재 조성물이 cachexia syndrome 억제에 미치는 영향 .....	74
① 정상식이 섭취량 측정 .....	74
② Body weight 및 tumor weight 측정, 혈액성분 분석 .....	74
③ 염증유발 사이토카인 및 Leptin 생산량 측정 .....	79
④ 생명연장곡선 측정 .....	82
라. 세포성장 촉진 천연식품소재 개발 .....	83
(1) Human Keratinocyte를 이용한 세포성장률 실험 .....	83

## 제 2 절 선별된 소재를 활용한 기본 복합 처방 및 암종별 처방 개발 ..... 84

<b>1. 연구 내용 .....</b>	<b>84</b>
가. 효능 검증을 통한 기본 처방 확립 .....	84
나. 한의학적 암 분류에 따른 맞춤형 처방 개발 .....	85
<b>2. 연구 방법 .....</b>	<b>85</b>
가. 세포재생/조혈증진/면역강화 기본 처방 확립 .....	85
(1) 최종 선정된 효능 천연물 .....	85
(2) 선정된 효능 천연물의 일반 특징 .....	86
나. 기본 처방의 효능 검증 .....	87
(1) 지표성분 분석 .....	87
(2) 세포독성에 미치는 영향 .....	87
(3) 조혈모세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효과 분석 .....	87
(4) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효과 분석 .....	87
(5) 조혈모세포(HSCs)에서 유세포 형광분석 .....	88
(6) 조혈모세포(Sca-1+HSCs)에서 JAK2/GATA-1/STAT-5의 인산화활성분석 .....	88
(가) 세포배양 및 CGD, ASS, CGD_ASS, chlorogenic acid 그리고 RG추출물 처리 .....	88
(나) Immunoblotting 및 면역침강(Immunoprecipitation) .....	88
(7) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정 .....	88
(8) CTX로 유도한 Leucopenia 및 thrombocytopenia유발생쥐모델에서 AKP, AKP_F, and Red Ginseng의 부작용 감소 효과연구 .....	89
<b>3. 연구 결과 및 고찰 .....</b>	<b>90</b>
가. 기본 처방의 효능 검증 .....	90
(1) 지표성분 분석 .....	90

(2) 세포독성에 미치는 영향 .....	92
(3) 조혈모세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효과 분석 .....	92
(4) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효과 분석 .....	95
(5) 조혈모세포(HSCs)에서 유세포 형광분석 .....	97
(6) 조혈모세포(Scal-1+HSCs)에서 JAK2/GATA-1/STAT-5의 인산화활성분석 .....	98
(7) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정 .....	99
(8) CTX로 유도한 Leucopenia 및 thrombocytopenia유발생쥐모델에서 AKP, AKP_F, and Red Ginseng의 부작용 감소 효과연구 .....	101
(가) 혈액을 분석을 통한 WBC수의 측정 .....	101
(나) ELISA로 IL-3와 SCF의 혈청 수준(level)의 측정 .....	102
(다) 비장무게, 총 비장세포수, 총DLN수, 총홍선세포수 분석 .....	102
(라) 대퇴골내의 총골수 세포수 분석 .....	104
(마) Peripheral blood mononuclear cell(PBMC)을 분리하여 FACS로 분석 .....	104
(바) 총 DLN세포 측정 및 FACS 분석 .....	107
(사) 총 홍선세포 측정 및 FACS 분석 .....	109
(아) 총 비장세포를 측정 및 FACS 분석 .....	109
(자) 골수세포에서 real-time PCR을 이용한 조혈유전자 c-kit과 SCF의 mRNA 유전자 발현 측정 ..	111
나. 한의학적 암 분류에 따른 맞춤형 처방 개발 .....	113
(1) 암 유병자 유형별 분류 .....	113
(2) 기본 조성물의 선정과 배합비 .....	113
(가) 기본곡류베이스 .....	114
(나) 암종별 천연물 .....	114
① 혈액암의 유형 및 조성물 .....	114
② 근육암의 유형 및 조성물 .....	115
③ 림프암의 유형 및 조성물 .....	117
(다) 환자용 균형영양식 기준에 부합하는 영양성분 보완 .....	118
① 혈액암 유병자를 위한 시제품 영양성분 보완 방안 .....	118
㉠ 한국식품연구원 분석자료 .....	118
㉡ 환자용 균형영양식 규정에 따른 시제품의 영양성분 보완 .....	119
② 근육암 유병자를 위한 시제품 영양성분 보완 방안 .....	120
㉠ 한국식품연구원 분석 결과 .....	120
㉡ 환자용 균형영양식 규정에 따른 시제품의 영양성분 보완 .....	121
③ 림프암 유병자를 위한 시제품 영양성분 보완 방안 .....	123
㉠ 한국식품연구원 분석 결과 .....	123
㉡ 환자용 균형영양식 규정에 따른 시제품의 영양성분 보완 .....	124

### 제 3 절 천연물 수득 방법의 개선 및 공정 확립 .....

1. 연구 방법 .....	125
가. 천연 소재의 수득 방법 확립 .....	125
(1) 새싹 재배법의 적용 .....	125
(가) 재배 조건 분석 .....	125
① 종자 발아율의 측정을 위한 처리 조건 .....	125
② 재배기간에 따른 미생물의 변화 측정 .....	125

(나) 다채 및 유채 새싹 재배법 설정 .....	125
(다) 발아에 의한 소화흡수 개선 방법 연구 .....	125
① 새싹 수득 방법 .....	125
② 단백질 용출 용이성 확인 방법 .....	126
③ 단백질 정량 시험 방법 .....	126
(2) 발효 제법 확립 .....	126
(가) 식품조성물의 발효 조건 .....	126
① 발효 균주 (유산균) .....	126
② 조성물의 고체발효 조건 .....	126
(3) 단백질 함량을 증가시킨 버섯 재배법 .....	127
(가) 콩섬유박(비지) 고체배지 조성물과 재배조건 .....	127
<b>2. 연구 결과 및 고찰 .....</b>	<b>128</b>
가. 천연 소재의 수득 방법 확립 .....	128
(1) 재배조건 분석 .....	128
(가) 종자의 소독처리 및 재배수가 발아율에 미치는 영향 .....	128
(나) 재배기간에 따른 미생물의 변화 .....	129
(2) 발아에 의한 소화흡수 개선 방법 연구 .....	129
나. 발효 제법 확립 .....	130
(1) 발효에 따른 조성물의 pH 및 산도의 변화 .....	130
(2) 발효에 따른 조성물의 미생물 생육변화 .....	130
다. 단백질 함량을 증가시킨 버섯 재배법 확립 .....	132
(1) 버섯의 생육 및 영양소 변화 .....	132
라. 제형 개발 및 양산화 공정 확립 .....	132
(1) 발효선식 .....	132
(가) 원료 전처리 .....	133
① 기본 곡류 베이스 .....	133
② 공통원료 .....	133
③ 근육암 유병자용 조성물 .....	134
④ 림프암 유병자용 조성물 .....	134
⑤ 혈액암 유병자용 조성물 .....	134
(나) 조성물의 혼합과 발효 .....	135
(다) 발효물의 건조와 분쇄(발효선식 최종 완제품) .....	135
(라) 영양소 첨가 및 완제품(환자용 균형영양식) .....	136
(마) 발효선식 제조 공정에 따른 원료 투입량 및 최종 생산량 .....	137
(2) 과립 .....	138
(3) 환 .....	138
(4) 타블렛 .....	138
(5) 발효초 .....	140
(가) 원료 전처리 .....	140
① 기본(곡류) 베이스 .....	140
② 건 원료 .....	140
③ 유형별 식물원료 .....	140
(나) 1차 발효 : 알콜발효 .....	140



(다) 2차 발효 : 초산발효 .....	141
(라) 정제 및 살균 .....	141
마. 양산화를 위한 원료 및 제품의 공급과 관리 .....	142
(1) 원료수급 방안 .....	142
(2) 제품생산비용 산정 .....	143
(3) 암 유형별 원료 구매비용 .....	143
<b>제 4 절 암 환자의 항암치료 후 회복증진에 대한 인체적용 평가 .....</b>	<b>145</b>
<b>1. 연구 방법 .....</b>	<b>145</b>
가. 식품조성물 섭취 후 유병자 패널 설문평가 .....	145
(1) 설문평가용 식품 견본(발효선식)의 제조 .....	145
(가) 원료배합비 .....	145
(나) 제조공정 .....	145
① 원료별 전처리 방법의 설정 .....	145
② 전처리 원료의 가공 .....	145
③ 섭취방법의 설정 .....	145
나. 설문평가용 식품 견본의 영양성분 분석 .....	146
다. 한의학적 암종별 유병자 대상 설문 평가 방법 .....	146
<b>2. 연구 결과 및 고찰 .....</b>	<b>149</b>
가. 설문평가용 식품 견본의 영양성분 분석 .....	149
(1) 혈액암 유병자용 발효 식품조성물의 영양성분 .....	149
(2) 근육암 유병자용 발효 식품조성물의 영양성분 .....	150
(3) 림프암 유병자용 발효 식품조성물의 영양성분 .....	150
나. 한의학적 암종별 유병자 대상 설문 평가 .....	151
(1) 혈액암 유병자 설문 결과 .....	151
(2) 근육암 유병자 설문 결과 .....	152
(3) 림프암 유병자 설문 결과 .....	152
(4) 전체 유병자 평균 .....	153
(5) 결과 종합 .....	153

## **제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....** 155

### **제 1 절 목표달성도 .....** 155

<b>1. 연도별 연구목표 및 달성도 .....</b>	<b>155</b>
<b>2. 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 .....</b>	<b>158</b>
가. 연구개발결과의 목표 대비 실적 .....	158
나. 평가의 착안점 및 기준 대비 실적 .....	158
다. 논문게제성과 .....	159
라. 특허성과 .....	159
마. 기술료 징수 현황 .....	161

제 2 절	관련분야의 기술발전예의 기여도 .....	162
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	163
제 1 절	실용화, 산업화 계획(기술실시 등) .....	163
제 2 절	추가연구, 타연구에 활용 계획 .....	163
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	164
제 1 절	해외 전시회 입수 정보 .....	164
1.	Hi-Japan / S-tec (2011) .....	164
2.	Vitafoods Swiss (2013) .....	167
제 7 장	참고문헌 .....	168

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발과제의 목적

- 농수산물을 이용하여 항암치료 후 부작용 개선을 위한 천연식품소재 개발
- 확보된 농수산물의 재배 및 가공법 개발
- 전통 음식 제조법을 접목하여 섭취가 용이한 식품의 개발

## 제 2 절 연구개발과제의 필요성

암은 우리나라 국민의 사망원인 1위로서 국민건강을 위협하는 대표적인 요인이다. 최근 건강검진(조기발견), 의료기술향상, 복합치료전략, 항암치료발달 등에 힘입어 암 발생자의 생존률이 높아짐에 따라, 암유병자수가 지속적으로 증가하고 있다. (2011년 기준 5년 암유병자수 68만명)

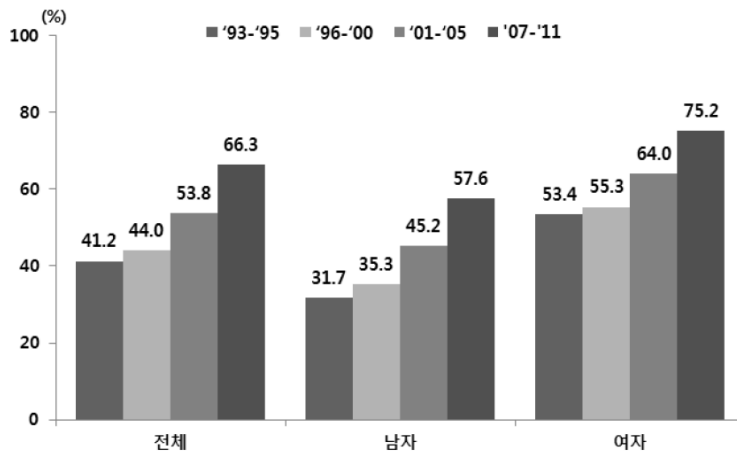


Fig. 1. 모든 암의 5년 상대생존율 (보건복지부 중앙암등록본부 2013)

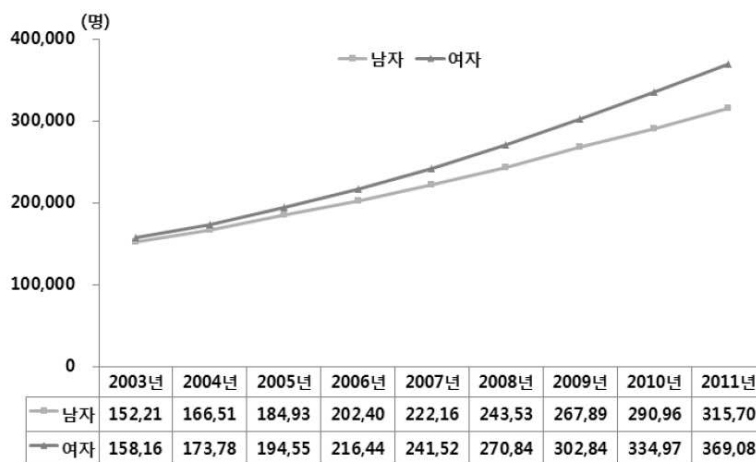


Fig. 2. 5년 암유병자수 추이 (보건복지부 중앙암등록본부 2013)

따라서, 암치료 후 유병자들의 삶의 질 향상을 위한 연구의 필요성이 높아지고 있다. 암환자들은 항암화학요법이나 방사선치료와 같은 항암치료로 인해 암세포 뿐만 아니라 정상세포도 손상을 입게 되어 여러 가지 부작용이 발생하게 되며, 이러한 부작용으로는 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 입과 목의 통증, 입맛의 변화, 입안건조증, 체중변화, 변비, 설사, 면역기능의 저하, 피로감과 우울증, 탈모, 기억력감퇴 등이 있다.(국가암정보센터)

암환자의 빠른 회복을 위해서는 손상된 세포의 정상화를 위한 영양성분의 공급이 중요한데, 항암치료로 체력과 소화기능이 저하된 환자들의 부작용 개선을 위해서는 의약품/한약재 보다는 천연 식품 소재를 이용한 보완 대체 요법이 바람직하다. 국내 뿐만 아니라 미국, 유럽 등 선진국의 경우에도 암환자의 상당수가 부작용 개선 및 치료를 위하여 보완대체요법을 사용하고 있다.

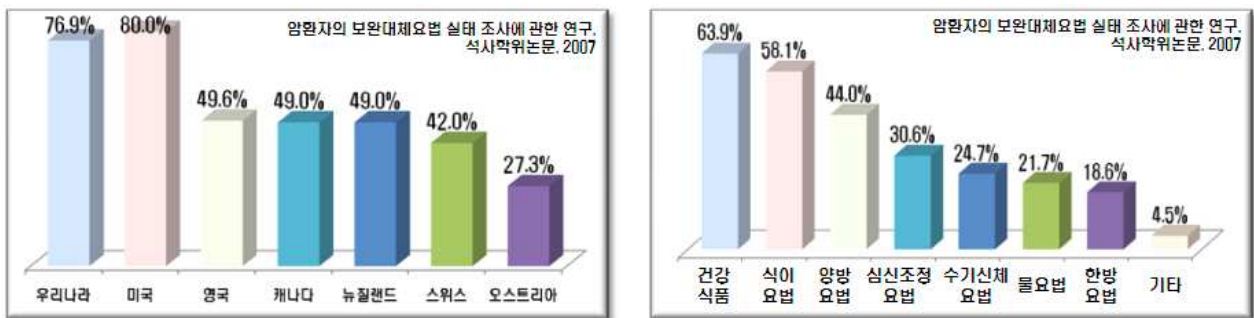


Fig. 3. 세계 각국 암환자의 보완대체요법 사용 현황

현재 부작용별로 추천되는 영양소 및 음식은 어느 정도 알려져 있지만, 실제로 체력과 소화기능이 저하된 환자의 부작용 개선이나 이를 위한 체계적인 가이드가 부족한 상황이다. 따라서 섭취와 흡수가 용이하면서도, 조혈계와 면역계의 기능 회복 및 세포재생을 위한 전문 식품소재의 발굴이 절실하다.



Fig. 4. 전문 식품 소재 발굴 필요성 및 방향

### 제 3 절 연구개발과제의 범위

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	항암치료 부작용 개선 천연소재 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>-세포재생 / 조혈 / 면역증진 천연소재의 발굴</li> <li>-관련 평가법의 확립 및 이를 통한 스크리닝</li> </ul>
	최적 수득 방법 개발 (재배법 등)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-효능 강화를 위한 수득 조건 확립</li> <li>-흡수가 용이한 형태로의 수득 조건 연구</li> </ul>
2차년도	생체효능 검증 및 최적 적용조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>-동물모델에서 조혈 및 면역증진 효과 검증</li> <li>-항암치료 동물모델에서의 회복효과 연구</li> </ul>
	맞춤형 처방 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>-처방별 세포재생/조혈/면역증진 최적용량 산정</li> <li>-한의학적 암 분류에 따른 맞춤형 처방 개발</li> <li>-항암치료 후 유병자 대상 설문평가</li> </ul>
3차년도	식품 제형 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>-선정된 소재에 적합한 전통 가공법 연구</li> <li>-다양한 제형 개발</li> <li>-필수 영양소 복합식품 개발</li> <li>-안정성 확보를 위한 제형 연구</li> </ul>
	양산화 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>-대량 재배 및 원료 수급 방안 수립</li> <li>-대량 원료화 방안 수립</li> <li>-품질관리 기준 확립</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황

최근 천연물로부터 생체조절 및 생체방어 시스템을 향진시키는 생리활성물질을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 건강기능식품이나 천연물 의약품으로 산업화에 이르고 있다. 한편, 국내에서는 과학적으로 효능이 검증되지 않는 건강보조식품이 난립함에 따라 2004년 1월부터 “건강기능식품에 관한 법률”을 시행하고 있으며, 건강기능식품의 생리적 효능에 대한 과학적인 검증을 통해 소비자들의 신뢰를 회복함과 동시에 관련 시장의 활성화가 기대되고 있다.

인체의 생리활성 중에서 면역 및 조혈기능은 생체내의 주요 방어시스템으로 작용함으로써 다양한 질병의 예방 및 건강증진에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 국내에서는 인삼, 버섯 다당체, 프로바이오틱스 등의 천연물에 대한 면역 및 조혈기능증진 효능에 대한 연구가 이루어졌으며 일부 건강기능식품으로 상용화되고 있다. 현재 식약처의 개별인정형 기능성 원료로 인정받은 144건중 면역기능개선 효능을 인정받은 원료가 12건을 차지하고 있다<sup>1-3)</sup>.

미국에서의 기능성식품에 대한 연구는 국립암연구소에서 1990년부터 “designer food”라는 용어를 사용함으로써 기능성식품에 대한 연구가 본격적으로 수행되었으며, 최근에는 질병의 예방 및 치료를 위하여 천연물 또는 식품소재 유래의 생리조절물질을 이용하는 ‘대체의학’의 개념을 적극적으로 수용하고 NIH 산하에 전문연구집단을 구성하여 광범위한 천연 식품소재로부터 생체방어/생리활성조절 유효성분의 개발을 연구하고 있다. 국내에서는 ‘천연물연구기금’ 조성 관련 법안이 제정되고 ‘한방치료기술연구개발사업’ 등이 활성화되어 면역조혈증진, 항암, 항산화 등의 활성을 갖는 천연물질/식품의 개발 연구가 광범위하게 수행중이다.

그러나 미국 등 선진국에서의 기능성 식품에 대한 연구에서와 같이 특정의 생리학적기능을 보이는 단일 성분에 주안점을 둘 경우 식품의 종합적인 효능을 간과할 수 있는 것이 문제점으로 대두되고 있다. 이에 따라 중국, 일본을 비롯한 동양권에서는 전통 생약제를 중심으로 한 연구가 많이 이루어지고 있으나, 대부분 추출원액을 대상으로 하고 있다. 그러나 추출물의 특정 효능만을 연구하는 경우에는 효능의 극대화나 더 부가가치가 높은 중간원료의 개발이나 단일물질 제제의 개발로의 발전가능성이 적은 문제점이 있다. 한편, 최근 기능성 식품내의 성분들간의 상승적 효과에 대한 보고가 있어, 생약재의 복합을 통한 효능 증대 기능성 식품의 개발 및 실용화의 필요성이 증대되고 있다(Fig. 5).

## 국내 건강기능식품 연구진행 분야

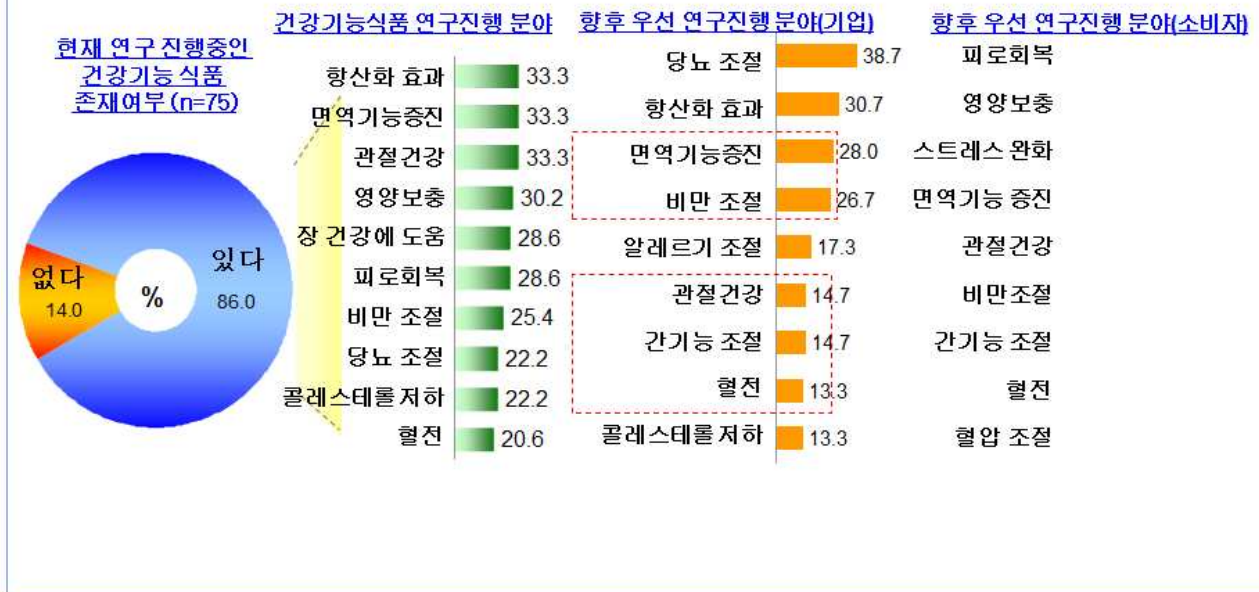


Fig. 5. 국내 건강기능식품 연구동향

현재 국내의 기능성식품 산업은 2012년에는 1조4091억원(식약처) 정도로 년 평균 성장율은 약 15%대에 이르고 있으며 2004년 1월 건강기능식품법 시행에 따라 건강기능식품업계의 활성화를 위한 선도기술로서 기능성 식품의 생체 기능성 평가, 대량생산 및 제품화 기술, 임상 효능 평가등의 실용화 기술이 요구되고 있다. 또한 2001년 기준으로 기능성식품의 수입액은 1,733억원에 이르는 상황에서 고유의 천연식품소재를 이용한 기능성식품의 개발은 국내 관련 산업의 국제 경쟁력 강화를 통한 국가 경제발전에 크게 기여할 것으로 기대되고 있다.

면역 및 조혈증진 기능성식품의 경우, 면역 및 조혈기능이 외부 위해요인으로부터 생체를 방어하고 생체의 항상성을 유지시킴으로써 건강을 증진시키고 각종 질병을 예방하는데 중요한 역할을 한다는 점에서 주목을 받고 있다. 또한, 방사선 또는 항암제 치료 암환자의 경우, 면역 및 조혈기능이 저하되고 각종 염증 등 이상 면역반응 등의 부작용이 치료효과에 큰 영향을 미치기 때문에, 면역 및 조혈증진 기능성식품은 이러한 암환자의 면역 및 조혈기능저하를 경감시키고 각종 부작용을 억제함으로써 암치료 보조제로서의 활용 가능성이 높아지고 있다. 2014년 우리나라의 사망 원인 1위는 암이었으며, 암발생률이 증가추세에 있으며 암으로 인한 의료비 지출이 급증하고 있어 면역조혈증진 및 암치료 보조 기능성 식품의 실용화는 질병예방과 암예방 및 항암치료효과 개선으로 간접적인 경제적 파급효과뿐만 아니라, 국민 삶의 질 향상에 크게 기여할 것으로 기대되고 있다.

면역조혈증진 식품의 경우, 천연약용 식물, 버섯류의 다당체 및 저분자 물질, casein 펩타이드,  $\beta$ -1,3-glucan 등의 물질에 의한 각종 면역세포 활성화 및 기능 조절연구들이 수행되고 있다. 생약유래의 다당체는 일반인의 면역기능 증진뿐 아니라 암환자의 방사선이나 화학요법치료 부작용을 완화시킬 수 있다는 것이 규명되어지고 있다. 국내에서는 면역조혈 증진 및 항암치료

보조 기능성 식품으로서 최근 인삼, 홍삼, 유산균, 알로에, 오가피, 생약재, 버섯, 키토산, 울리고당 등을 이용한 상품들이 출시되어 있으나, 추출물 형태에 대한 효능 연구가 주를 이루고 있으며 천연식품복합소재 및 임상 효용성, 생체적용 기술에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 따라서 본 연구에서는 농림축산식품부 자유응모과제사업의 지원으로 개발된 면역조혈 기능 증진 천연식품복합소재(AKP)를 실용화하고자 세포실험 및 동물시험을 통하여 생물전환 전과 후의 효능강화 연구 및 생체내 기능성 평가 확립 등의 연구를 수행하였다.

## 제 2 절 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

막대한 비용을 투자하여 새로운 물질들을 개발하고 있지만, 비교적 부작용이 적은 천연물로부터 암환자의 면역증진 및 항암 치료 후 부작용 개선 조절증진 효과가 있는 생체반응조절물질 (Biological Response Modifier, BRM) 신약을 개발하지 못하고 있는 형편이다.

한국이 원산지인 작두콩, 다채썩, 유채썩, 오가피로 조합된 천연식품복합소재(AKP)를 이용하여 암환자의 면역증진 및 항암 치료 후 부작용 개선 조절증진 효과를 밝혀낸 이번 연구결과는 부작용이 없는 생체반응조절물질(BRM)로부터 밝혀냈다는데 의미를 둘 수 있다. 또한 이번 연구의 결과로써 생물전환을 통하여 면역조절 및 조절증진의 효능강화가 있는 것으로 밝혀낸 바, 앞으로 천연식품복합소재(AKP)에서 생체반응조절물질(BRM) 성분을 찾아 내기 위한 좀 더 심화된 연구를 할 수 있는 길을 열게 되었다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 항암치료의 부작용 개선을 위한 천연 소재 탐색

#### 1. 연구 내용

대부분의 항암제는 골수에 작용하여 혈구를 만들어 내는 능력을 감소시키고, 따라서 골수에서 생성되는 백혈구, 혈소판, 그리고 적혈구를 비롯하여 머리카락세포, 위장관의 상피세포, 정자 난자를 만들어내는 생식세포 등이 손상된다. 이에 따라 백혈구 감소로 침입하는 균을 죽이지 못하므로 감염이 잘되어 병에 대한 면역력이 약해지고, 입안이 험고, 구토, 설사, 머리카락 빠짐, 생식기능 장애 등의 부작용이 생긴다<sup>4)</sup>. 조혈작용(hematopoiesis)은 골수 내에 있는 조혈모세포 (hematopoietic stem cells, HSCs)가 분화되어 성숙한 혈액세포 (mature blood cells)가 되는 과정이며, 이는 조혈모세포의 성장과, 자기복제 (self-renewal), 분화(differentiation)에 의해 조절되는 미소 서식 환경으로, 조혈작용은 인체의 항상성을 유지하는데 매우 중요하다. 그러므로 화학요법 또는 방사선 요법중 이러한 조혈 작용의 손상을 최소화하고, 회복하는 것은 반드시 필요하다. 그래서 질병을 치료하기 위해 화학치료 및 방사선치료를 사용하고 있으나, 이는 조혈 줄기세포의 수를 감소시키기 때문에 암 환자의 질병을 오히려 더 진행시키는 부작용이 있다. 따라서 이러한 부작용을 예방하거나 치료할 수 있는 조혈증진 천연 생약제제의 개발이 시급한 실정이다<sup>5)</sup>. HSC의 분화를 유도하는 조혈사이토카인은 stem cell factor(SCF), thrombopoietin(TPO), erythropoietin(EPO), granulocyte-macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF), and interleukins(IL)-1, -3, -6, -7, 그리고 -11을 분비하는 공급원으로 기저세포 (stromal cells)가 알려져 있고<sup>9)</sup>, 기저세포의 세포표면 분자와 조혈 줄기세포의 표면분자와의 상호작용으로 혈구형성이 조절된다고 보고되었다<sup>6-7)</sup>. 또한 최근 연구에서 조혈 줄기세포의 분화에 GATA 단백질이 혈액 세포 발달에 필수적으로 조혈사이토카인의 유전자 활성이 제대로 조절되는데, GATA-1과 GATA-2라는 두 가지 신호전달단백질이 관여한다<sup>8-9)</sup>. GATA 단백질은 혈액 세포 발달에 필수적인 물질이며 이 단백질이 있어야만 혈액 세포 발달에 관여하는 유전자 활성이 제대로 조절될 수 있다. GATA-2 단백질은 조혈 줄기세포가 전구세포로 분화하는 데 필요하며 이와 달리 GATA-1이란 단백질은 전구세포로부터 특정 혈액세포가 형성되는 데 필요하다. 또한 Janus Kinase(JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription(STAT)과 같은 전사인자가 신호전달통로를 활성화하는데, 이는 사이토카인 수용체-매개 세포간 신호전달(cytokine receptor-mediated intracellular signaling) 및 조혈 줄기세포의 성장 및 분화에 중요한 역할을 수행한다고 보고되었다<sup>10)</sup>. 따라서 본 연구과제를 통해 수종 천연물에 대한 조혈증진 효능을 확인코자 하였다.

## 2. 연구 방법

### 가. 조혈 증진 천연 식품 소재의 탐색

#### (1) 천연물 내역 및 추출물의 제조

**Table 1. Natural food materials**

No.	천연식품소재	학 명	약 어
1	연근	Nodus Nelumbinis Rhizomatis	NNR
2	사과	Malus Pumila miller	Apple
3	연근+ 사과	Nodus Nelumbinis Rhizomatis, Malus Pumila miller	NNR+ Apple
4	다채싹	Brassica campestris var narinosa (Tatsoi sprouts)	BCN
5	시금치	Spinacia oleracea L.	Spinach
6	석이버섯	Umbilicaria esculenta	UE
7	우영	Arctium lappa, L	ARL
8	오가피	Acanthopanax sessiliflorum Seeman	ASS
9	작두콩	Canavalia gladiata dc	CGD
10	미강	Oryza sativa L. (Rice Bran)	RB

건조된 각각의 천연물 시료 100g에 물 1~2L를 가하고 150분간 끓여 추출한 후 실온으로 냉각하여 부호너 깔때기와 filter paper로 여과하고 rotary evaporator로 감압농축하여 추출물 시료를 제조하였다.

#### (2) Human fibroblast cells을 이용한 세포독성 실험

9종의 식품소재의 세포독성을 정상 사람 섬유아세포(human fibroblast cells)에서 측정하였다. 9종의 식품소재를 사용하여 48시간 동안 정상 사람 섬유아세포에 다양한 농도로 처리한 다음, 4 °C에서 1 시간 동안 50 % 차가운 트리클로로아세트산으로 고정하고 실온에서 30분 동안 0.4 % SRB / 1% 아세트산으로 염색하였다. 이어서, 세포를 10 mM 트리스염 용액으로 재용해 시킨 후 미세역가 플레이트 판독기(Molecular Devices E-max)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (3) 골수세포에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진작용 스크리닝

C57BL/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 골수세포를 분리하여 9개의 식품소재 추출물(200, 100 µg/ml)과 4시간 동안 동시 배양한 후 real-time PCR로 IL-3, SCF, c-kit mRNA의 유전자 발현을 Taqman probe법으로 비교 분석하였다.

#### (4) 조혈모세포(HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효능 검증

C57BL/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3(100 U/ml)와 rSCF(100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 BCN(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 및 1 $\mu$ g/ml 농도)와 CGD(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 및 1 $\mu$ g/ml 농도) 추출물을 4시간 동안 동시 배양한 후 real-time PCR로 EPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF mRNA의 유전자 발현을 Taqman probe법으로 비교 분석하였다.

(5) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효능 검증

C57BL/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3(100 U/ml)와 rSCF(100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 BCN(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 및 1 $\mu$ g/ml 농도)과 CGD(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 및 1 $\mu$ g/ml 농도) 추출물을 72시간 동안 동시 배양한 후 IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF의 ELISA kit로 조혈 관련 단백질 발현량을 비교 분석하였다.

(6) 조혈모세포(HSCs)에서 c-kit (CD117) 유세포 발현 분석

C57BL/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3(100 U/ml)와 rSCF(100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 BCN(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 및 1 $\mu$ g/ml 농도)와 CGD(100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 및 1 $\mu$ g/ml 농도) 추출물을 48시간 동안 동시 배양한 후 c-kit (cd117)<sup>+</sup> /sca-1<sup>+</sup>로 염색하여 세포수 (%)를 FACSCalibur 유체 세포 분석기 (Becton Dickinson)를 사용하여 CellQuest Software로 분석하였다.

(7) 조혈모세포(HSCs)에서 GATA-1/STAT의 인산화 활성 분석

C57BL/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3(100 U/ml)와 rSCF(100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 BCN(10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml 농도)과 CGD(10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml 농도) 추출물을 20분 동안 동시 배양한 후 GATA-1/STAT5 경로를 활성 인산화시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 면역침강법 및 western blot을 실시하여 GATA-1 및 STAT5a/b의 인산화를 분석하였다.

(8) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정

C57BL/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 35 mm 플레이트중 rEPO 및 rIL-3이 포함된 두베코 반고체 매트릭스 배양 배지(Methocult H4100, StemCell Technologies)에 실시하였음. BCN과 CGD를 처리하여 14일 후에 콜로니 수를 inverted 현미경(NIKON)으로 관찰하고 1x10<sup>4</sup> HSCs 당 콜로니 수를 계산하였다. 8개의 과립구 및 erythrocytes 또는 3개 이상의 erythroid cluster를 포함하는 콜로니를 CFU-GEMM 또는 BFU-E(Erythroid-committed Stem Cells)로 콜로니 형성 상에서의 BCN과 CGD의 상승 효과를 측정하였다.

## 나. 조혈 증진 혼합 천연 식품 소재의 탐색

### (1) 천연물식품 혼합소재

선별된 4개의 혼합천연식품소재에 대한 조혈증진 효과를 확인하였다.

**Table 2. Natural food materials combination of synergistics.**

혼합천연식품소재	학 명
1. 다채쌈+ 작두콩(EtOH)	Brassica campestris var narinosa, Canavalia gladiata dc
2. 다채쌈+ 우엉+ 작두콩(water)	Brassica campestris var narinosa, Arctium lappa, L, Canavalia gladiata dc
3. 다채쌈+ 우엉+ 작두콩(EtOH)	Brassica campestris var narinosa, Arctium lappa, L, Canavalia gladiata dc
4. 작두콩(EtOH)+ 오가피	Canavalia gladiata dc, Acanthopanax sessiliflorum Seeman
5. 다채쌈+ 우엉+ 작두콩(water)+ 오가피	Brassica campestris var narinosa, Arctium lappa, L, Canavalia gladiata dc, Acanthopanax sessiliflorum Seeman

### (2) 지표성분 분석

다채쌈과 작두콩 추출물 분석을 위한 HPLC는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector(Agilent Technologies, Germany), degasser(Agilent Technologies, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software(Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로는 컬럼 오븐의 온도 25°C, 분석과장 250 nm, 유속 0.3 ml/min를 사용하였고, 컬럼은 Luna C18 column(250mm x 4.6 mm; particle size 5 µm, Phenomenex, USA)을 사용하였다. A용매로 0.1% trifluoroacetic acid 함유 3차 증류수 및 B용매로 아세토니트릴을 사용하였으며 용매계는 용매기울기 용리로서 Table 3과 같다. 다채쌈과 작두콩의 조합물의 지표성분 분석을 위해 Genistin을 표준시료로 하여 함량분석을 실시하였다.

**Table 3. – Solvent gradient condition for HPLC-DAD**

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A <sup>1)</sup>	B <sup>2)</sup>
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

<sup>1)</sup>Water with 0.1% formic acid.

<sup>2)</sup>Acetonitrile with 0.1% formic acid.

(3) 세포독성에 미치는 영향

세포독성방법은 EZ-Cytox assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. 사람의 정상섬유아세포 (human fibroblast cells, hFCs)는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간 배양한 후 다채씩, 작두콩 그리고 두 조합 추출물 (최종 농도 500, 250, 100, 50, 25, 10, 1 µg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 µl씩 각 well에 가하고 실험 종료 시까지 배양한다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA READER (molecular devices, U.S.A)에서 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

(4) 조혈모세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효과 분석

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 다채씩 (50 µg/ml, 10 µg/ml 농도), 작두콩 (50 µg/ml, 10 µg/ml 농도), 그리고 두 조합물 (100 µg/ml, 20 µg/ml 농도) 추출물을 3시간동안 배양기 (37°C, CO<sub>2</sub>, Napco, USA)에 배양하였다. 배양한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzol<sup>B</sup>를 이용하여 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 real-time-PCR에 사용하였다.

(5) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효과 분석

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 다채씩 (50 µg/ml, 10 µg/ml 농도), 작두콩 (50 µg/ml, 10 µg/ml 농도), 그리고 두 조합물 (100 µg/ml, 20 µg/ml 농도) 추출물을 48시간동안 배양기 (37°C, CO<sub>2</sub>, Napco, USA)에 배양하였다. 배양한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하여 냉동고에 보관 한 후, ELISA (R&D system)로 배양상층액내의 TPO, IL-3, SCF 단백질의 양을 측정하였다.

(6) 조혈모세포(HSCs)에서 유세포 형광분석

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 다채씩 (50 µg/ml 농도), 작두콩 (50 µg/ml 농도), 그리고 두 조합물 (100 µg/ml 농도) 추출물 처리하고, 6시간 후 RPMI-1640 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액으로 24 시간 동안 CO<sub>2</sub> 조직배양기에서 배양하였다.

배양한 후 상층액을 제거한 다음 Sca-1<sup>+</sup>HSCs세포를 5 × 10<sup>5</sup> Cells/ml 세포로 조정 한 후 4°C에서 면역 형광염색(immunofluorescence staining)을 실시하였으며, 각각에 anti-CD117-FITC, anti-Sca-1-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다.

반응 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD117<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> 활성세포수를 백분율(%)로 분석 산출하였다.

(7) 조혈모세포(Sca-1<sup>+</sup>HSCs)에서 JAK2/GATA-1/STAT-5 인산화활성분석

다채색, 작두콩 그리고 두 조합물에 의한 단백질 인산화(protein phosphorylation) 연구를 수행하였다.

(가) 세포배양 및 다채색, 작두콩 그리고 두 조합 추출물 처리

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1<sup>+</sup> isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 다채색 (50 µg/ml농도), 작두콩 (50 µg/ml농도) 그리고 두 조합물 (100 µg/ml농도) 추출물을 20분 동안 동시 배양하였다.

(나) Immunoblotting 및 면역침강(immunoprecipitation)

다채색, 작두콩 그리고 두 조합추출물을 처리한 세포의 cell lysates (≈20 µg)에 각각 anti-phosphotyrosine, anti-GATA-1, anti-STAT-5a/b (10 µg/ml)와 proteinA-sepharose를 첨가하여 4°C에서 4시간 반응시킨 후 3회 D-PBS로 세척하고, 면역복합체를 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF membrane에 전이시켜 anti-phosphotyrosine-HRP(1:4000)와 반응시켜 immunoblotting 분석하였다.

(8) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1<sup>+</sup> isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 35mm 플레이트중 rEPO 및 rIL-3이 포함된 돌베코 반고체 매트릭스 배양 배지(Methocult H4100, StemCell Technologies)에 실시하였다.

다채색(50 µg/ml농도), 작두콩(50 µg/ml농도) 그리고 두 조합물(100 µg/ml농도)을 처리한지 14일 후에 콜로니 수를 inverted 현미경(NIKON)으로 관찰하고 1x10<sup>4</sup> HSCs 당 콜로니 수를 계산하였다.

8개의 과립구 및 erythrocytes 또는 3개 이상의 erythroid cluster를 포함하는 콜로니를 CFU-GEMM 또는 BFU-E(Erythroid-committed Stem Cells)로 콜로니 형성상에서의 각각의 다채색과 작두콩보다는 두 조합물에서의 상승 효과를 측정하였다.

## 다. 면역 증진 혼합 천연 식품 소재의 탐색

(1) Balb/c생쥐의 복강대식세포에서 천연식품소재의 염증사이토카인 유전자 억제 효과

Balb/c계 생쥐에 proteose peptone(Difco) 10 % 수용액 1.5 ml을 복강 내에 투여한 후, 3일 후 치사시키고 알코올로 복부를 소독하였다. 복부의 피부를 가위로 자르고 복막을 노출시킨 다음 냉각시킨 HBSS를 주사기로 복강 내에 5 ml 주입하고 30초간 복부를 마사지한 후 주사기로 3회 회수하였다. 회수한 복강대식세포를 얼음에 냉각시킨 다음 동일 HBSS 용액으로 2회 세척한 후 냉각된 배지(RPMI1640)에 현탁시키고, trypan blue 염색에 의해 살아있는 대식세포를 계산하여 2x10<sup>6</sup> cells/ml이 되도록 조정한 후 24 well 배양접시에 분주하였다. 복강대식세포에 9가지 천연식품소재 추출물(100 µg/ml 및 10 µg

/ml 농도)을 처리한 1시간 후 lipopolysaccharide(LPS)(2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 4시간 자극하여 real-time PCR로 염증사이토카인 IL-6와 TNF- $\alpha$  mRNA의 유전자 발현을 Taqman probe법으로 비교 분석하였다.

(2) Balb/c 생쥐의 복강대식세포에서 천연식품소재의 염증사이토카인 유전자 억제 효과

Balb/c계 생쥐에 proteose peptone(Difco) 10 % 수용액 1.5 ml을 복강 내에 투여한 후, 3일 후 치사시키고 알코올로 복부를 소독하였다. 복부의 피부를 가위로 자르고 복막을 노출시킨 다음 냉각시킨 HBSS를 주사기로 복강 내에 5 ml 주입하고 30초간 복부를 마사지한 후 주사기로 3회 회수하였다. 회수한 복강대식세포를 얼음에 냉각시킨 다음 동일 HBSS 용액으로 2회 세척한 후 냉각된 배지(RPMI1640)에 현탁시키고, tryphan blue 염색에 의해 살아있는 대식세포를 계산하여  $2 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 조정한 후 24 well 배양접시에 분주하였다. 복강대식세포에 9가지 천연식품소재 추출물(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도)을 처리한 1시간 후 LPS(2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 4시간 자극하여 real-time PCR로 염증사이토카인 IL-6와 TNF- $\alpha$  mRNA의 유전자 발현을 Taqman probe법으로 비교 분석하였다.

(3) Balb/c 생쥐의 복강대식세포에서 산화질소 생성능 측정

8주령의 Balb/c계 생쥐(male)에 양성대조군으로 홍삼 엑기스(100 mg/kg), 우영 추출물(200 mg/kg, 50 mg/kg), 그리고 오가피 추출물(200 mg/kg, 50 mg/kg)을 14일간(2주간) 경구 투여함. Proteose peptone(Difco) 10 % 수용액 1.5 ml을 생쥐 복강 내에 투여한 후, 3일 후에 치사시키고 알코올로 복부를 소독하였다. 복부의 피부를 가위로 자르고 복막을 노출시킨 다음 냉각시킨 HBSS를 주사기로 복강 내에 4.5 ml 주입하고 30초간 복부를 마사지한 후 주사기로 회수하였다. 회수한 세포를 냉각시킨 다음 동일 HBSS 용액으로 2회 세척한 후 냉각된 배지(RPMI1640)에 현탁시키고, tryphan blue 염색에 의해 살아있는 세포를 계산하여  $2 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 조정한 후 96 well 배양접시에 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. CO<sub>2</sub> 배양기에서 1~2 시간 배양하여 대식세포를 부착시킨 다음 37°C의 HBSS 용액으로 3회 세척하여 부유세포를 제거하고 100  $\mu\text{l}$ 의 배지(RPMI 1640)를 넣었다. CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양 후 배양 상등액을 회수하여 냉동 보존하였다. 배양상등액 100  $\mu\text{l}$ 를 취하고 증류수 2 ml과 그리스(Griese) 시약 I 200  $\mu\text{l}$ 를 혼합. 신속하게 Griese 시약 II 200  $\mu\text{l}$ 를 넣고 교반 후 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 염증유발 사이토카인 분석 및 천연식품 조합물에 의한 synergistic 효과

BALB/C 생쥐를 경추탈골로 치사시킨 후 복강에 6 ml의 cold D-PBS를 주사하고, 1분간 가볍게 복부를 마사지한 후 부유액을 흡입하여 분리하고, 대식세포를 24 well plate의 각 well에  $2 \times 10^6$  cells씩 분주한 후 1시간 동안 starvation하였다. 천연식품소재(최종 농도 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  그리고 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 각 well에 처리하고 1시간 후 lipopolysaccharide (LPS, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )와 5시간 동안 동시 배양하였다.

(5) 천연식품소재 조합에 의한 synergistic 효과

천연식품소재의 염증유발 사이토카인 유전자 발현에 관한 분석 자료를 근거로 하여 각

각 4개의 천연식품소재를 33  $\mu$ l씩 천연식품소재 조합을 만든 후 염증유발 사이토카인 유전자 발현 억제를 분석하였다.

(6) Cachexia를 유도한 생쥐에서 기능성 천연식품소재 조제물을 첨가한 정상식이의 효과

(가) 천연식품소재 조제물이 LPS처리한 생쥐의 body weight와 tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )에 미치는 영향

BALB/c 생쥐는 4 군으로 나누어 다채썩(200 mg/kg), 우영(200 mg/kg), 작두콩(200 mg/kg), 혼합천연식품소재(Mixture, 200  $\mu$ l/animal)를 14일간 각각 1일 1회 경구투여하였다. 경구투여 종료 후 LPS(5 mg/kg)를 복강에 주사하고 48시간 후 생쥐 혈청에서 TNF- $\alpha$  생산량을 측정하였다.

(나) 정상식이와 천연식품소재 조성물 동시 투여로 LPS 처리한 생쥐의 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$

그리고 Leptin의 생산에 미치는 영향

8주령 BALB/c 생쥐에 정상식이(Table 2)를 자유식하고, 혼합천연식품소재 조제물(BCN + ARL + CGD)를 3%, 5%, 7%군으로 나누어 1일 1회 0.2ml씩 14일간 경구투여하였다. 14일 후 LPS (5 mg/kg)를 복강에 주사한 후 4 시간 경과한 다음 희생시켜 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IL-1 $\beta$  enzyme-linked immuno-sorbent assay와 TNF- $\alpha$ (ELISA, Endogen, USA), 그리고 Leptin(R&D system, USA)의 분비량을 측정하였다. Microwell에 혈청(serum)을 50  $\mu$ l씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 완충용액으로 2회 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하여 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 그리고 Leptin의 양을 분석하였다.

(7) Colon26 세포주로 유도된 cachexia 생쥐모델에서 정상식이와 혼합천연식품소재

조성물이 cachexia syndrome 억제에 미치는 영향

(가) Colon26 세포주 배양

Colon26 adenocarcinoma(mouse C-26) 세포주는 National Cancer Institute(Frederick, MD)에서 공급 받아 RPMI1640 배양액에 10% 우태아 혈청, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100  $\mu$ g/ml) 그리고 10  $\mu$ g/ml의 gentamycin이 함유된 배양액에 95% air, 5% CO<sub>2</sub>인 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양하였다.

(나) Cachexia 유발 및 약물 투여

BALB/c 생쥐 (6-8주령)의 subcutaneously (S.C)에 colon26 (5x10<sup>5</sup>세포)을 피하주사하여 cachexia를 유도하였음. 정상식은 자유식 및 혼합천연식품소재 조제물을 3%, 5%, 7% 군으로 나누어 1일 1회 0.2ml씩 14일간 경구투여하였다.

(다) 정상식이 섭취량 측정

Cachexia 유도된 생쥐에 정상식이를 자유식한 후 14일간 2일 간격으로 섭취한 식이량을 측정하였다.

(라) Body weight 및 tumor weight 측정



BALB/c mice는 colon26 주입하고, 14일 후에 diethyl ether로 마취하여 cardiac puncture 방법을 이용하여 희생하였다. Body weight는 Colon26 주입 후 2일 간격으로 14일간 측정하였으며, carcass weight는 먼저 carcass wet weight를 측정하고 3일간 80℃ 오븐에서 건조한 후 carcass dry weight를 측정하였다. Tumor weight는 caliper를 이용하여 종양의 길이(a ; length, mm)와 넓이(b ; width, mm)를 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Tumor weight (mg)} = 1/2 \times a \times b^2$$

Serum은 4℃의 5000rpm 에서 9분간 원심분리 하였고, 냉동 보관하여 total protein, albumin, free fatty acid(FFA), glucose, cholesterol, HDL-cholesterol, ferritin 등을 Chemical analyzer Model TBA-550FR(Toshiba)로 측정하였다.

(마) 염증유발 싸이토카인 및 Leptin 생산량 측정

14일 후 분리된 혈청에서 IL-1β enzyme-linked immuno-sorbent assay와 TNF-α (ELISA, Endogen, USA), 그리고 Leptin(R&D system, USA)의 분비량을 측정하였다.

(바) 생명연장곡선 측정

Colon26 주입 후, 정상식이와 혼합천연식품소재 조제물을 투여하기 시작한 날부터 시작하여 사멸하는 날짜를 수시로 기록하였다. 모든 생쥐가 사멸하기 전까지 혼합천연식품소재 조제물을 계속 경구투여 하였다.

## 라. 세포성장 촉진 천연식품소재 개발

(1) 천연물 내역 및 추출물의 제조

Table 4. Natural food materials

No.	천연물명	학명	약어	비고
1	작두콩	Canavalia gladiata dc	CGD	- 구입처 : 황금농원식품 (www.jakdookong.co.kr)
2	다채싹	Tatsoi sprouts	BCN	- 구입처 : 대농바이오 (www.daenongbio.com)
3	들깨싹	Perilla frutescens sprout	PFS	- 종자 구매하여 새싹 재배
4	연자심	Nelumbo nucifera	NN	
5	지치싹	Lithospermum erythrorhizon sprout	LES	- 종자 구매하여 새싹 재배
6	유채싹	Brassica campestris sprout	BCS	- 구입처 : 대농바이오

건조된 각각의 천연물 시료 100g에 물 1L를 가하고 150분간 끓여 추출한 후 실온으로 냉각하여 부호너 깔때기 및 filter paper로 여과하고 rotary evaporator로 감압농축하여 추출물 시료를 제조하였다.

## (2) Human Keratinocyte를 이용한 세포생장률 실험

식품소재에 대한 세포생장률 촉진 실험을 사람의 각질세포(Human keratinocyte)인 HaCaT cell을 이용하여 실시하였다. 세포배양은 DMEM 배지에 5% FBS를 넣어 배양액으로 사용하였으며 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하고 세포생장 촉진 효과를 알아보기 위해 MTT 시험법을 수행하였다.

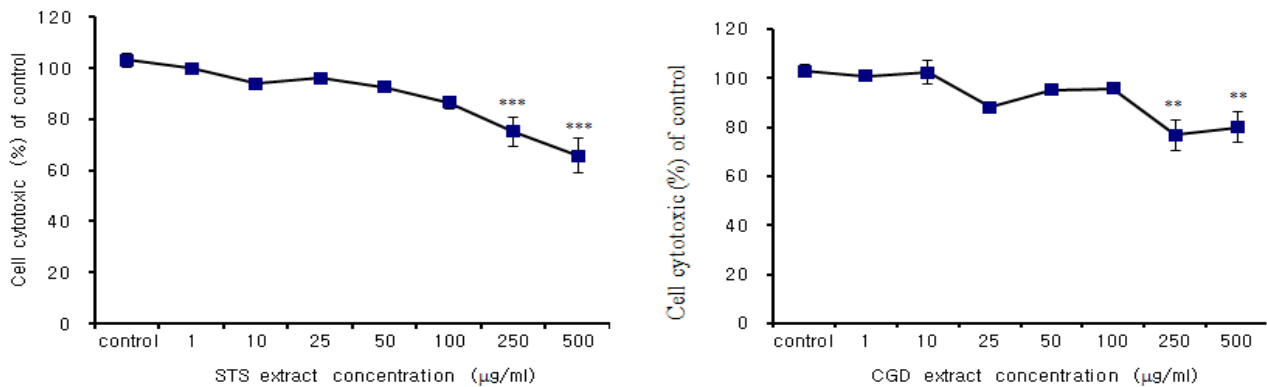
우선, 전배양한 사람의 각질세포를 혈색소계(Hemocytometer)를 이용하여 세포수를 세어  $5 \times 10^4$  cell/ml이 되도록 맞추고 96 well plate에 세포액 100ul(Well 당  $5 \times 10^3$  cell)를 넣고, 1일간 배양하였다. 1일간 배양 후 각각의 시료를 DMEM 배지에 최종 시료 농도의 2배가 되도록 희석한 후, 각 시료액을 1일간 배양한 세포가 있는 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 첨가하여 시료의 농도를 serial dilution하였다. 시료를 처리한 96 well plate를 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>하에서 1일간 배양한 후, 0.1 mg(20  $\mu$ l of 5 mg/ml)의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)용액을 모든 well에 첨가하였다. 37℃에서 4시간 더 배양한 후, 플레이트를 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 배지를 모두 제거하고 각각의 well에 DMSO 200 $\mu$ l씩을 가하여, 생성된 formazan salt가 완전히 녹을 수 있도록 하였으며 Microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정 후, 세포의 성장 정도를 판단하였다. 각 well 컬럼의 평균 OD540 값을 구하여 대조군의 평균 OD540 값에 대한 백분율 값을 산출하였다.

### 3. 연구 결과 및 고찰

#### 가. 조혈증진 천연 식품 소재의 탐색

##### (1) Human fibroblast cells을 이용한 세포독성 실험

다채썩(BCN)과 작두콩(CGD)이 100  $\mu\text{g/ml}$ 까지는 임의의 세포독성을 보이지 않았으나, 보다 높은 농도(250 및 500  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리한 경우에는 세포 생존성이 유의적으로 감소하였음을 알 수 있다( $p < 0.001$ ). 이는 다채썩과 작두콩이 생리적으로 연관된 농도에서 독성을 나타내지는 않는다는 것을 의미하는 것으로, 이로부터 다채썩과 작두콩은 정상 섬유세포에서 세포독성이 없음을 확인하였으며 다채썩과 작두콩을 제외한 나머지 식품소재에서는 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.



**Fig. 6. Cytotoxicity effects of BCN & CGD extract on human fibroblast cells(hFCs).**

Human fibroblast cells(hFCs) were pretreated with various concentration BCN & CGD extract. The results are expressed the mean $\pm$ S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ).

##### (2) 골수세포에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진작용 스크리닝(Fig. 7)

조혈증진관련 유전자인 IL-3, SCF, c-kit mRNA를 분석한 결과, IL-3 mRNA 유전자 발현은 다채썩과 작두콩을 처리한 경우 3배 이상 현저한 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ )

Stem Cell Factor는 c-kit ligand라고도 하며 c-Kit에 binding 하여 hematopoietic progenitor 세포의 기능과 성장 그리고 생존하는데 중요한 mediator로, 또한 다른 cytokine 과 작용하여 hematopoietic progenitor 세포의 hematopoiesis 작용에 synergy 효과를 나타낸다. c-kit은 CD117로 HSCs의 세포표면에 존재하는 수용체(receptor) c-kit ligand(SCF)가 binding하여 hematopoietic progenitor 세포의 기능과 성장 그리고 생존하는데 중요한 수용체이다. 우리의 연구결과, 다채썩, 시금치, 작두콩은 c-kit mRNA 유전자 발현을 2배 이상 통계학적으로 유의성 있게 증가시켰다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). 그리고 시금치, 오가피, 작두콩, 미강 등에서 SCF mRNA 유전자 발현이 통계학적으로 유의성 있게 증가하였으며( $p < 0.001$ ), 사과, 다채썩, 석이버섯, 우영 등도 증가는 하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 이러한 결과로 보아 다채썩과 작두콩의 조혈증진 작용이 우수한 것으로 판단되어, HSCs의 기전연구를 진행하였다.

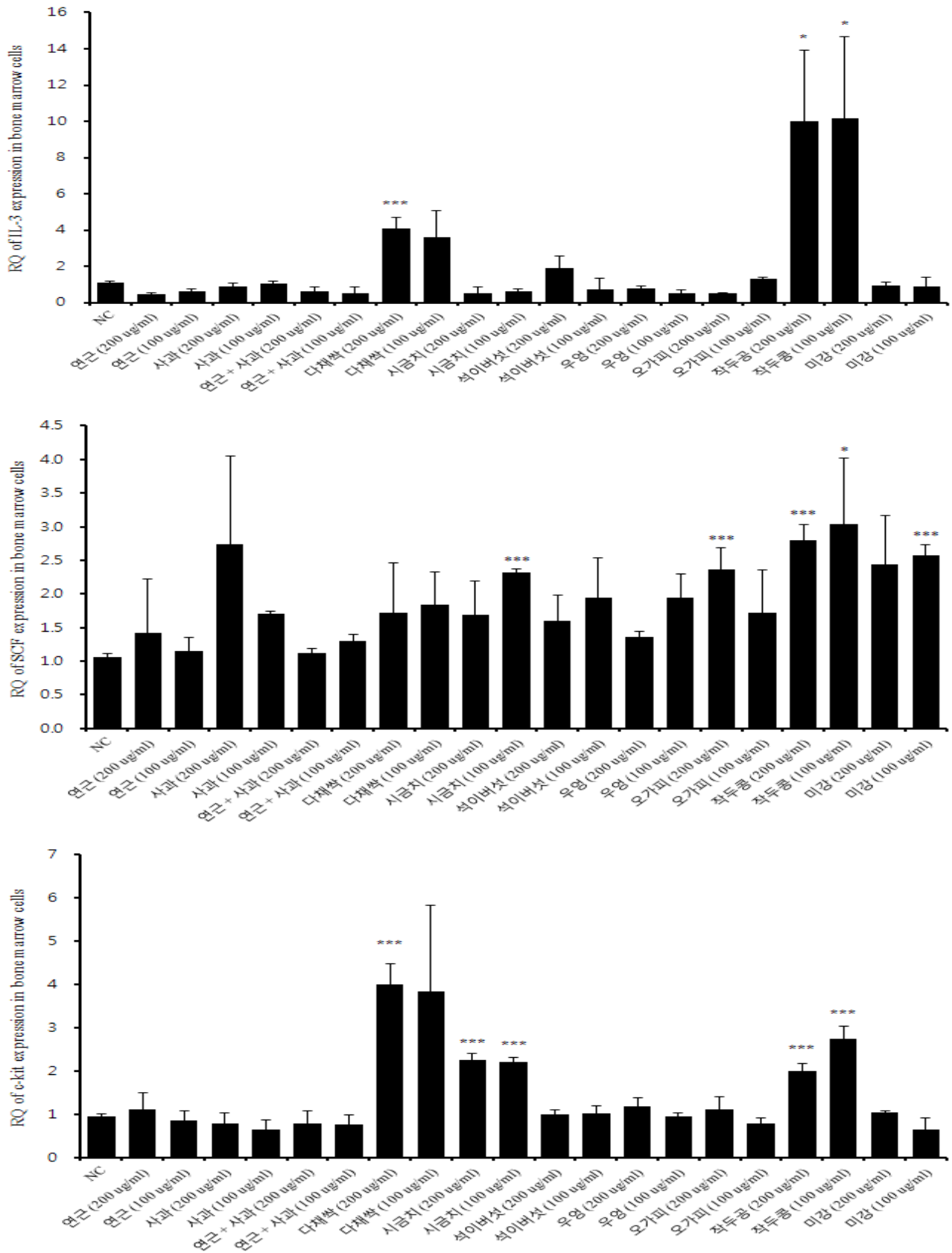
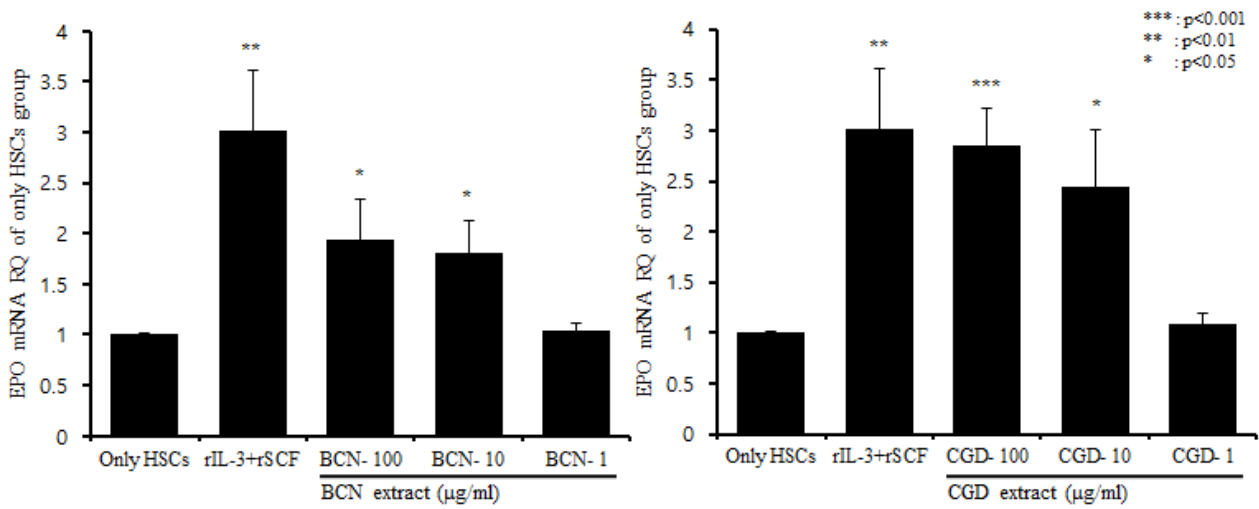


Fig. 7. Quantitative Real-Time PCR Using Taqman probe on mouse bone marrow cells. Statistically significant value compared with control group data by T test(\*p<0.05, \*\*p<0.01).

(3) 조혈모세포(HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효능 검증(Fig. 8~12)

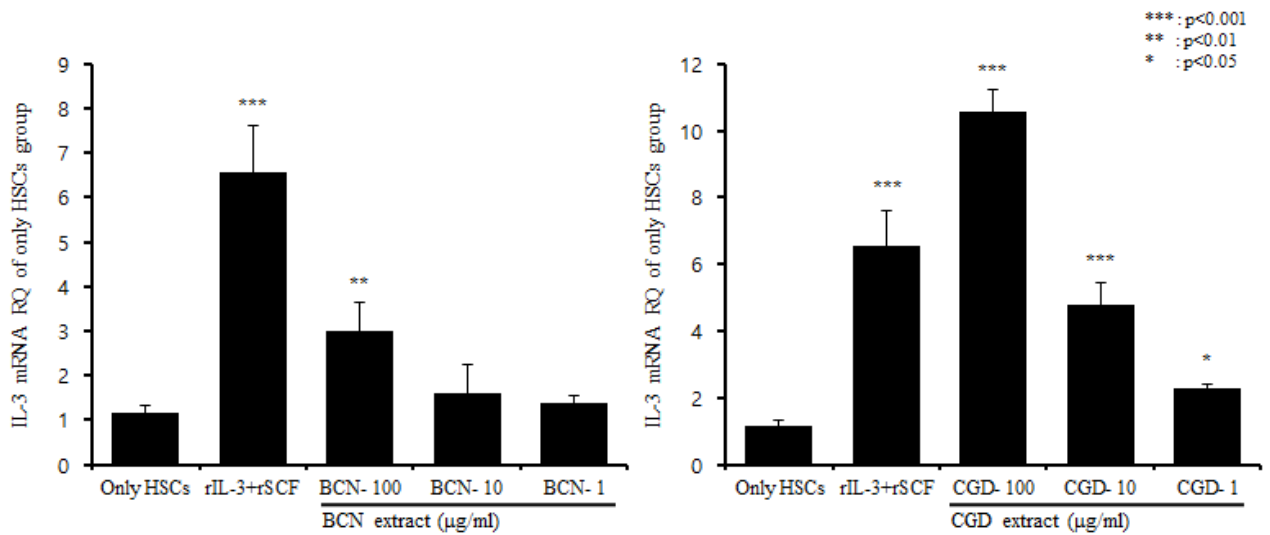
HSCs에서 조혈증진 관련 유전자인 EPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF mRNA를 분석한 결과, Only HSCs인 음성대조군에 비하여 양성대조군인 rIL-3+rSCF에서 IL-3, SCF, GM-CSF, EPO 및 c-kit의 유전자 발현이 통계학적 유의성 있게 크게 증가하였다. 그리고 Only HSCs인 음성대조군에 비하여 BCN과 CGD는 농도 의존적으로 EPO(Fig.3), IL-3(Fig.4), SCF(Fig.5), GM-CSF (Fig.6), 및 c-kit(Fig.7)의 mRNA 발현을 통계학적으로 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD)이 HSCs에서 조혈성 사이토카인의 발현을 유도한다는 것을 의미한다.



**Fig. 8. Effects of BCN & CGD extract on erythropoietin mRNA expression in hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10, 1 µg/ml). HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with BCN & CGD extract for 4hrs. EPO mRNA express were measured real-time PCR. The amount of taqman probe was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

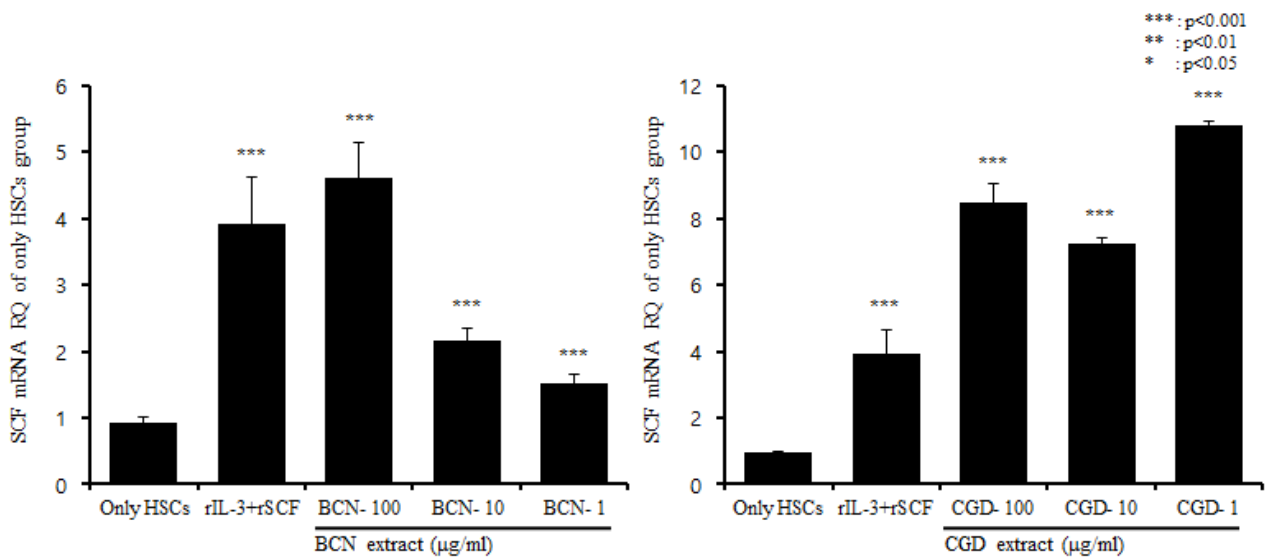
Data represent means±S.E (N=2). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).



**Fig. 9. Effects of BCN & CGD extract on interleukin-3 mRNA expression in hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10, 1 µg/ml). HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with BCN & CGD extract for 4hrs. IL-3 mRNA expression were measured real-time PCR. The amount of taqman probe was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

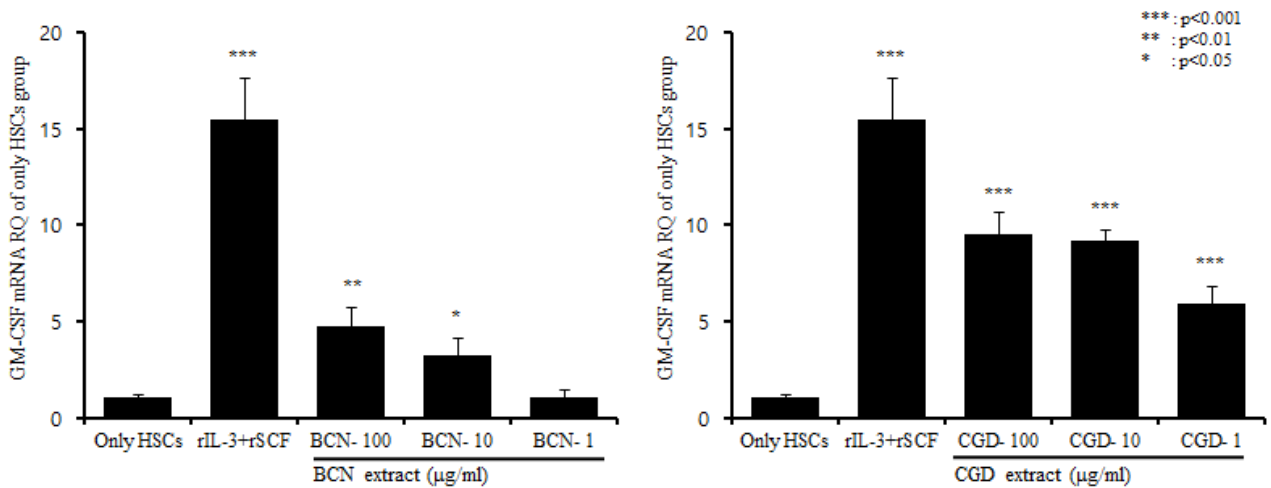
Data represent means±S.E (N=2). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).



**Fig. 10. Effects of BCN & CGD extract on Stem Cell Factor mRNA expression in hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10, 1 µg/ml). HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with BCN & CGD extract for 4hrs. SCF mRNA express were measured real-time PCR. The amount of taqman probe was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

Data represent means±SE (N=2). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

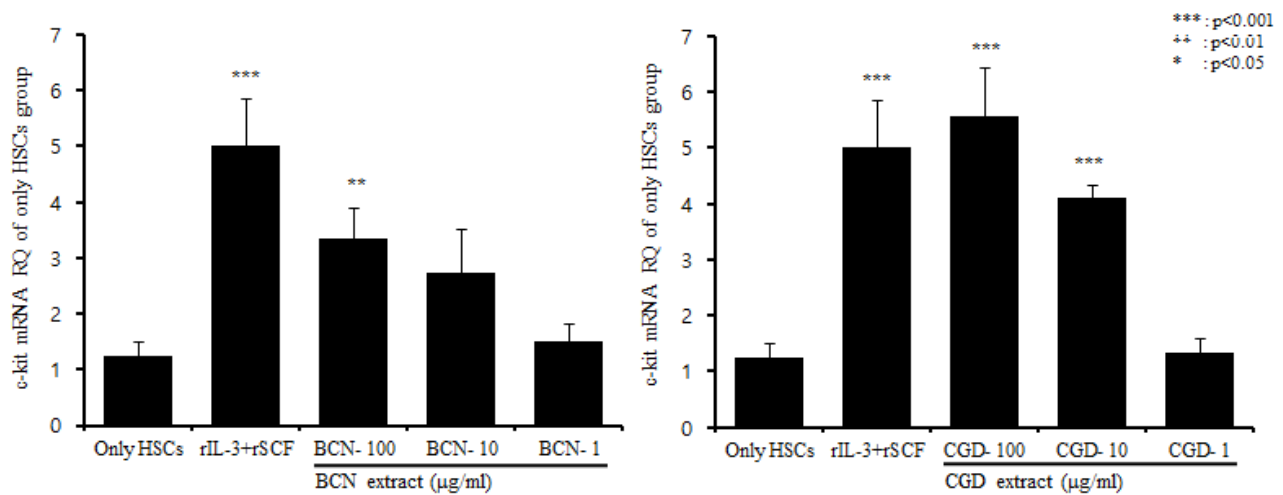


**Fig. 11. Effects of BCN & CGD extract on Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating growth Factor mRNA expression in hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10, 1 µg/ml). HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with BCN & CGD extract for 4hrs. GM-CSF mRNA express were measured real-time PCR. The amount of taqman probe was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

Data represent means±S.E (N=2). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).





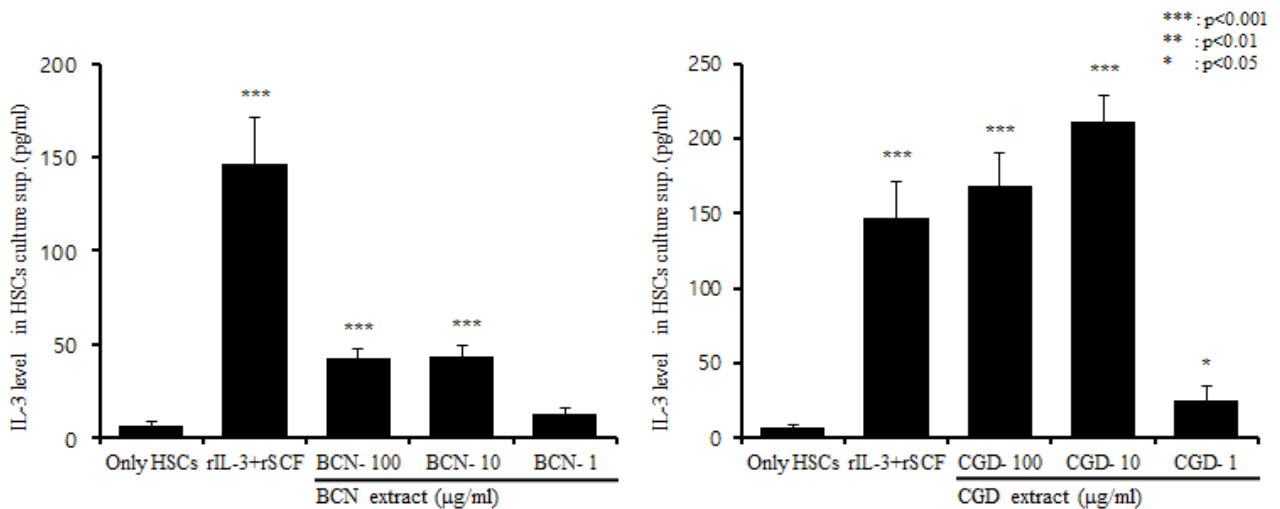
**Fig. 12. Effects of BCN & CGD extract on c-kit mRNA expression in hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10, 1 µg/ml). HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with BCN & CGD extract for 4hrs. c-kit mRNA express were measured real-time PCR. The amount of taqman probe was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system.

Data represent means±S.E (N=2). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

(4) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효능 검증(Fig. 13~15)

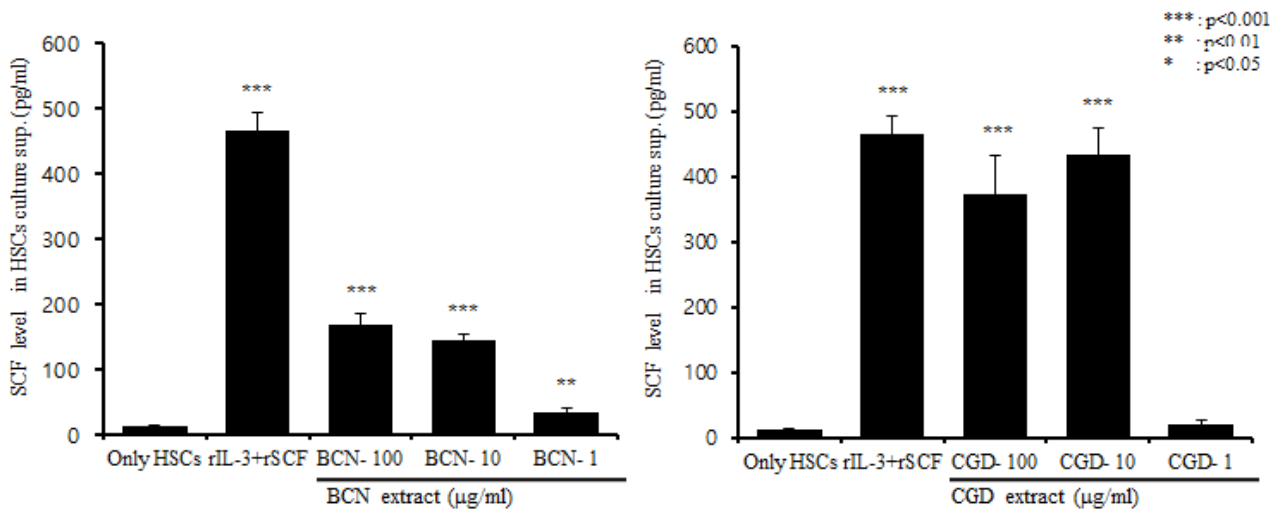
HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 IL-3, SCF, GM-CSF의 생산량을 측정한 결과, Only HSCs인 음성대조군에 비하여 양성대조군인 rIL-3+rSCF에서 IL-3(Fig.8), SCF(Fig.9), 그리고 GM-CSF(Fig.10)의 생산량이 통계학적으로 유의성 있게 현저히 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 그리고 Only HSCs인 음성대조군에 비하여 BCN과 CGD는 100  $\mu\text{g/ml}$ 과 10  $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 IL-3(Fig.8), SCF(Fig.9), 그리고 GM-CSF(Fig.10)에서 통계학적으로 유의성 있게 생산량을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD)이 HSCs에서 조혈성 사이토카인의 생산을 조절한다는 것을 알 수 있다.



**Fig. 13. Effects of BCN & CGD extract on interleukin-3 production in hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ ). HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with BCN & CGD extract for 72hrs. The production of IL-3 was measured at the ELISA kit (R&D system, USA).

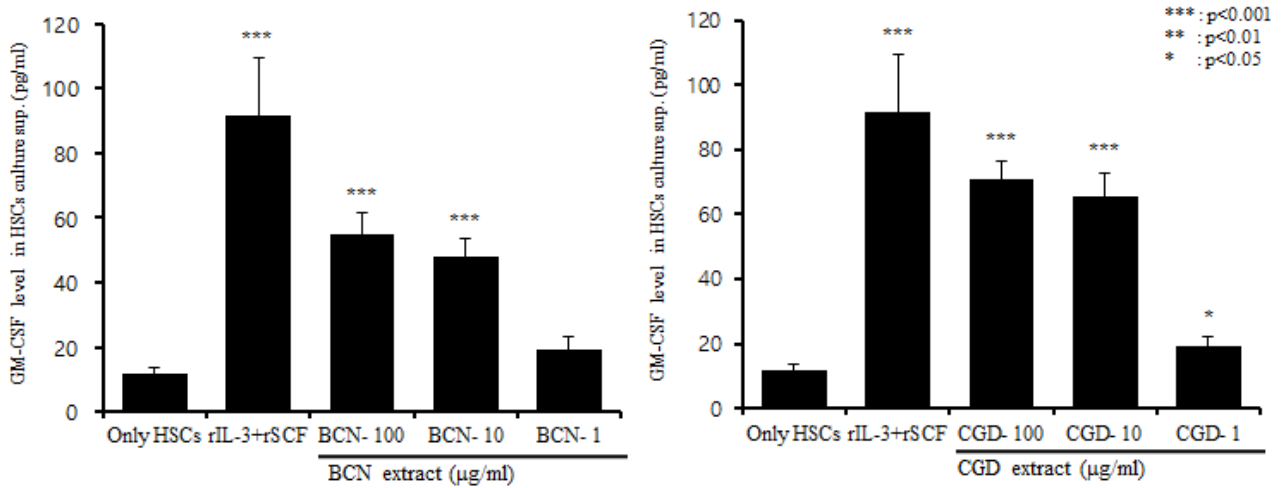
Data represent means $\pm$ S.E (N=4). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Fig. 14. Effects of BCN & CGD extract on SCF production in hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10, 1 µg/ml). HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with BCN & CGD extract for 72hrs. The production of SCF was measured at the ELISA kit (R&D system, USA).

Data represent means±S.E (N=4). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).



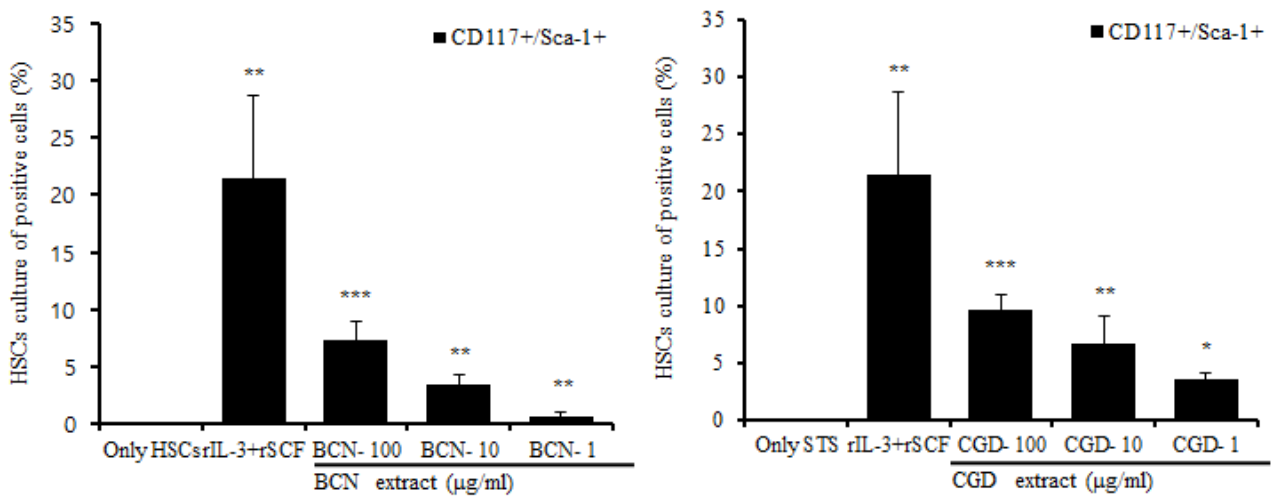
**Fig. 15. Effects of BCN & CGD extract on GM-CSF production in hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10, 1 µg/ml). HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with BCN & CGD extract for 72hrs. The production of GM-CSF was measured at the ELISA kit (R&D system, USA).

Data represent means±S.E (N=4). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

(5) 조혈모세포(HSCs)에서 c-kit (CD117) 유세포 발현 분석(Fig. 16)

HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 c-kit(CD117)의 발현량을 측정한 결과, Only HSCs인 음성대조군에 비하여 양성대조군인 rIL-3+rSCF이 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>(Fig.11) 활성화세포수가 통계학적으로 유의성 있게 현저히 증가하였으며(p<0.01) Only HSCs인 음성대조군에 비하여 BCN과 CGD가 각각 농도 의존적으로 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml 농도에서 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>(Fig.11) 활성화세포수를 통계학적으로 유의성 있게 현저히 증가시켰다 (p<0.051, p<0.01, p<0.001). 이러한 결과로부터 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD)이 HSCs에서 c-kit 조혈성 유전자 발현을 조절한다는 것을 알 수 있다.

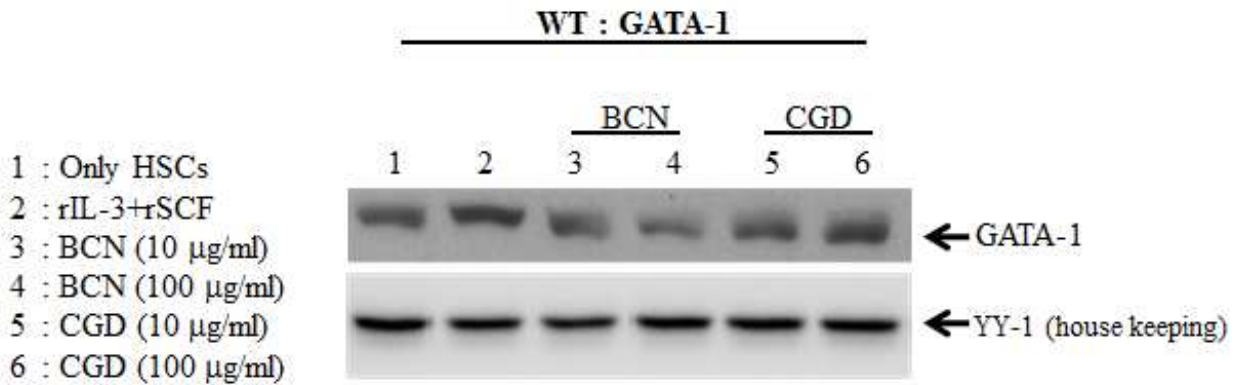


**Fig. 16. Effects of BCN & CGD extract on c-kit<sup>+</sup> positive cells in hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10, 1 µg/ml). HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with BCN & CGD extract for 48hrs. After 48hrs, the cells were harvested, and assayed for c-kit (cd117)<sup>+</sup> /sca-1<sup>+</sup> positive cells by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. Data represent means±S.E (N=2). Statistically significant value compared with only HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

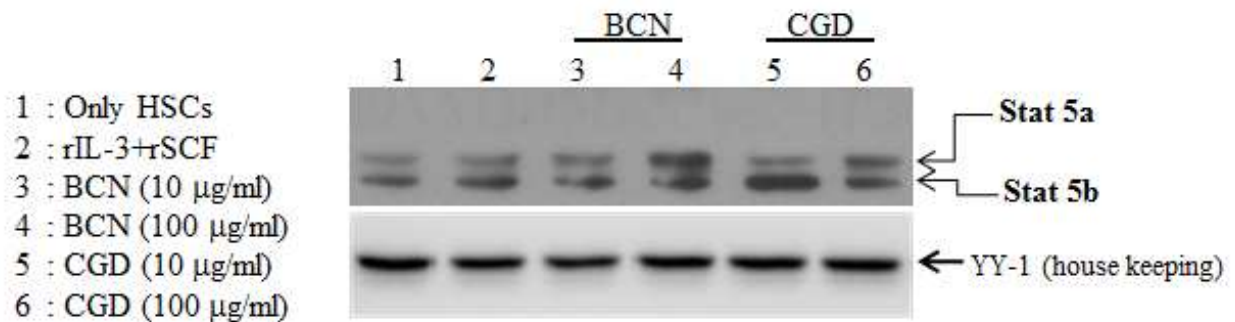
(6) 조혈모세포(HSCs)에서 GATA-1/STAT의 인산화 활성 분석(Fig. 17~18)

HSCs에서 GATA-1/STAT5 경로의 활성 인산화를 분석한 결과, Only HSCs인 음성대조군에 비하여 양성대조군인 rIL-3+rSCF에서 GATA-1/STAT5 경로의 활성 인산화(Fig.12~13)가 증가되었으며, Only HSCs인 음성대조군에 비하여 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD)에서 각각 농도 의존적으로 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 GATA-1/STAT5 경로의 활성 인산화(Fig.12 ~ 13)가 증가되었다.



**Fig. 17. BCN & CGD extract promotes the tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of GATA-1 in Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with BCN & CGD extract for 20 min. After 20min, then subjected to immunoprecipitation with a-GATA-1 (1:5000).



**Fig. 18. BCN & CGD extract promotes the tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of GATA-1 in Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells.**

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with BCN & CGD extract (1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (normal; only cells), co-cultured with BCN & CGD extract for 20 min. After 20min, then subjected to immunoprecipitation with a-GATA-1 (1:5000).

(7) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정(Fig. 19~20)

Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 CFU-GEMM과 BFU-E로의 분화 상승효과를 분석한 결과, Only HSCs인 음성대조군에 비하여 대조군인 rIL-3+rEPO 처리군의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 수가 12배 이상 증가하였다. rIL-3+rEPO와 BCN 추출물 100 µg/ml 및 10 µg/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는, 두 군락을 합한 수와 CFU-GEMM이, 대조군인 rIL-3+rEPO에 비하여 53% 이상 증가를 나타내었으나 BFU-E는 대조군과 BCN 추출물 처리군에서 군락 수의 큰 차이가 없었다. BCN이 CFU-GEMM을 증가시켜 백혈구계혈을 증식시키는 것으로 보아 백혈구감소증이나 혈소판감소증에 효능이 있을 것으로 판단된다.

그리고 rIL-3+rEPO와 CGD 추출물 100 µg/ml 및 10 µg/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E 두 군락을 합한 수는 대조군인 rIL-3+rEPO에 비하여 2.1배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다(p<0.001). BFU-E의 군락 수는 대조군에 비하여 100 µg/ml 및 10 µg/ml농도의 CGD 추출물 처리군에서 각각 3.7배와 2.6배 이상 현저하게 유의성 있는 증가를 나타내었다(p<0.001). 따라서 작두콩(CGD) 추출물은 특히 BFU-E를 증가시켜 적혈구계혈 조혈전구세포를 증식시키는 것으로 보아 Aplastic anemia 동물 모델에 효능이 있을 것으로 판단된다.

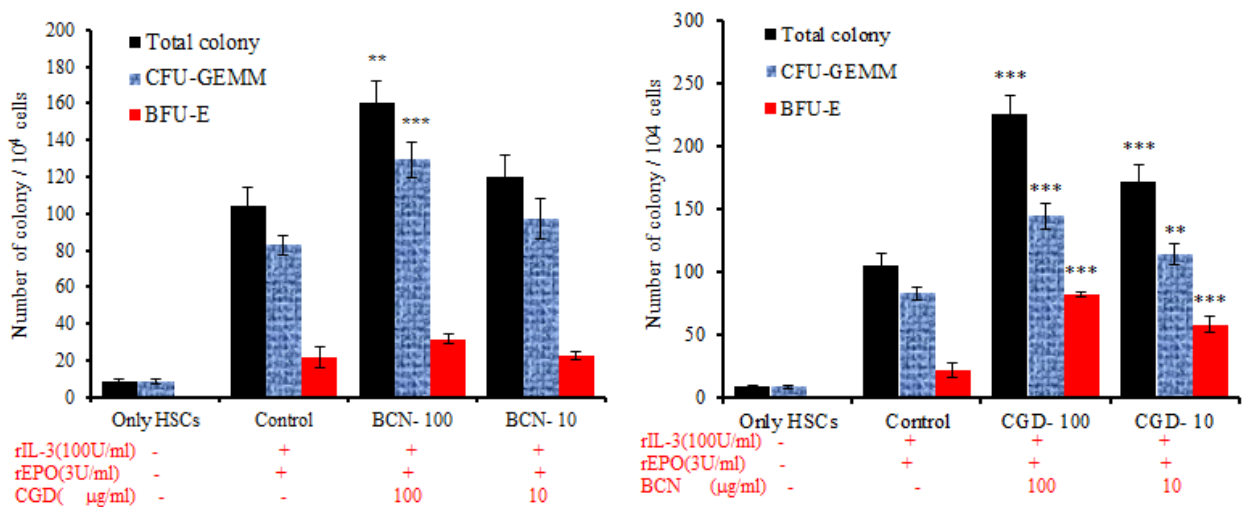
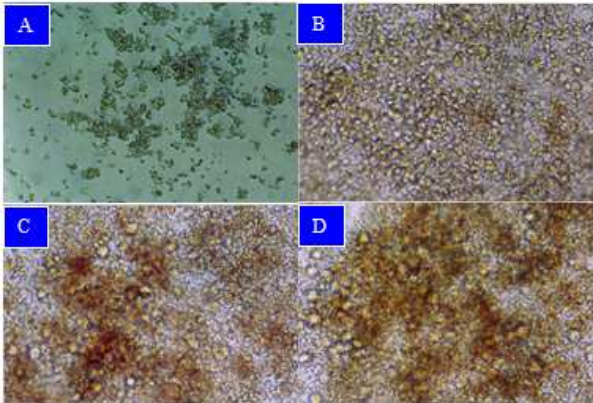


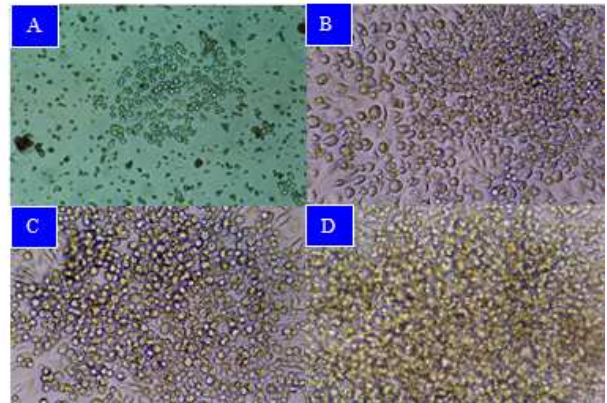
Fig. 19. Effects of BCN & CGD extract of CFU-GEMM and BFU-E colony formation during 14-day culture in the presence of two different cocktails of recombinant cytokine and BCN & CGD extract

Isolated hematopoietic stem cells (HSCs) from normal C57BL/6 mouse bone marrow in normal C57BL/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rEPO (3 U/ml) or treated with BCN & CGD extract (100, 10 µg/ml). Number and composition of hematopoietic colonies per 1x10<sup>4</sup> Sca-1<sup>+</sup>HSCs after 14 days of culture in semi-solid medium.

Effects of CGD extract to BFU-E colony formation in the presence of recombinant cytokine.



Effects of BCN extract of CFU-GEMM colony formation during 14-day culture in the presence of two different cocktails of recombinant cytokine



**Fig. 20. Effects of BCN & CGD extract to CFU-GEMM colony formation in the presence of recombinant cytokine.**

Sca-1<sup>+</sup> hematopoietic stem cells ( $\times 10^4$  cells) were cultured in semisolid media with cytokine combination of 3 units/ml erythropoietin (rEPO), recombinant IL-3 (rIL-3) and CGD & BCN extract (100, 10 mg/ml) for 14 days, and sequentially photomicrographed at indicated time period and observed 3 day (A), 5 day (B), 10 days (C), and 14 days (D) of BFU-E & CFU-GEMM.



## 나. 조혈 증진 혼합 천연 식품 소재의 탐색

### (1) 지표성분 분석

본 실험에 사용한 다채썩과 작두콩은 대전대학교 부속한방병원에서 정선하여 구입한 후 추출물을 분리하였다. HPLC-DAD 분석을 통하여 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD) 추출물 성분에 함유된 지표성분을 동정하였다. 지표성분으로 확인된 genistin 표준품의 UV spectrum과 머무름 시간이 일치하는 작두콩(CGD) 추출물의 genistin(Fig.21A)의 패턴을 확인하여 지표성분을 동정하였고, 마찬가지로 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD)의 조합물(Fig.21B)에서도 지표성분을 확인하였다. 함량 분석 결과(Table 5) 작두콩(CGD) 추출물의 Genistin 함량은 0.063 mg/g이었고, 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD) 조합물의 genistin 함량은 0.035 mg/g로 확인되었다. Genistin은 최근에 면역반응, 염증, 조혈과정, 세포의 증식 및 분화 효능이 보고되어 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD) 조합물의 지표성분과 활성성분이 일치하는 것으로 판단된다.

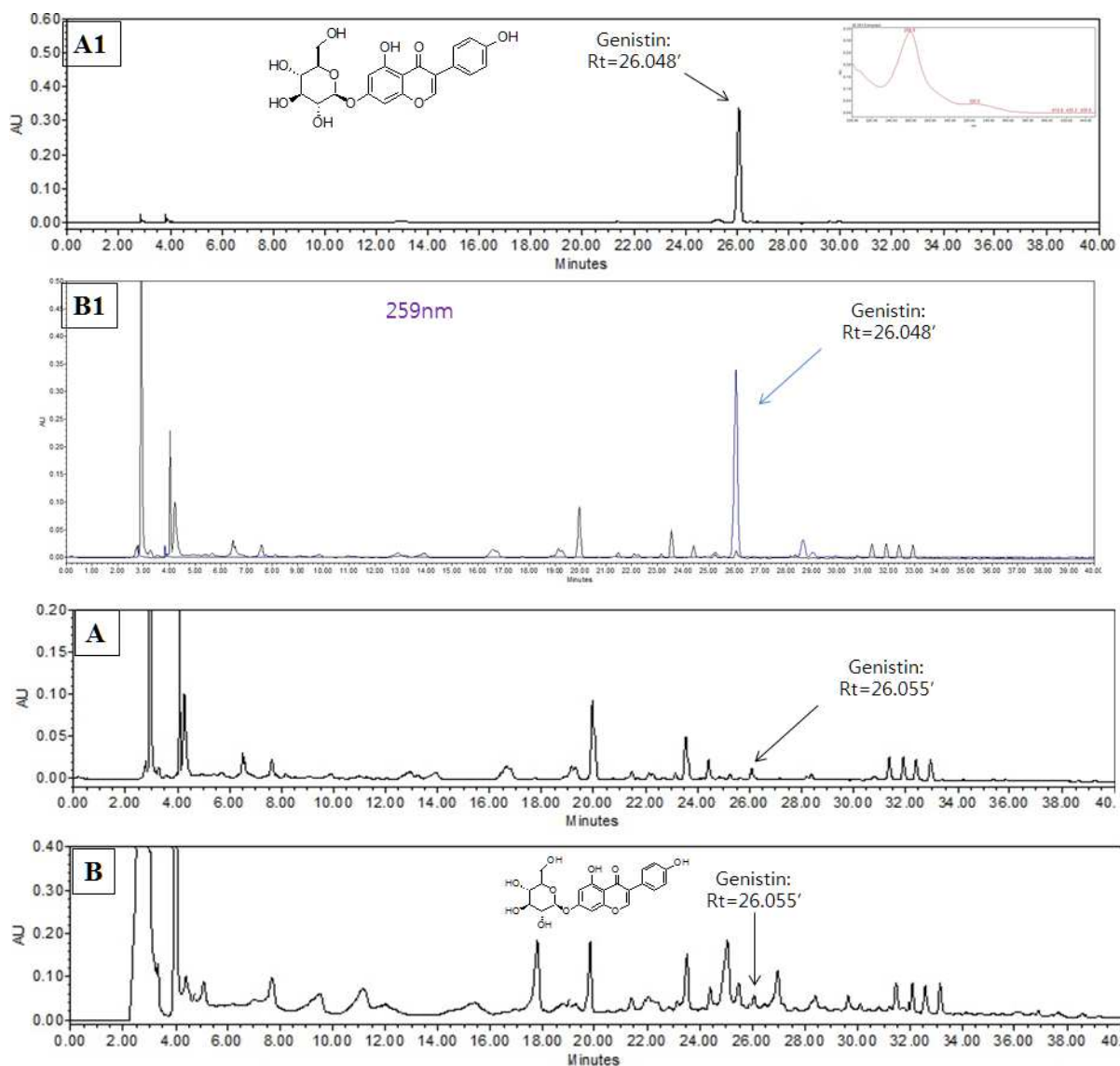


Fig. 21. HPLC chromatograms of standard mixture and extract of the *Brassica*

***campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription.**

Chromatograms of *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, A) and *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN) and *Canavalia gladiata* DC semen 1:1 mixed (B) are recorded at 259 nm. Peaks of Genistin are shown. The HPLC analysis was carried out on Waters 2695 system (Waters Co. Milford, MA, USA), consisting of a solvent delivery unit, an online degasser, an autosampler, and a photodiode array detector. A Luna C18 column (250mm x 4.6 mm; particle size 5  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA) was used for analysis, and the mobile phase 0.1% trifluoroacetic acid in water (A) and acetonitrile (B). The gradient flow was as follows: (A)/(B) = 10/90 (0 min; hold for 10 min)  $\rightarrow$  (A)/(B) = 60/40 (40 min)  $\rightarrow$  (A)/(B) = 0/100 (41 min; hold for 7 min)  $\rightarrow$  (A)/(B) = 10/90 (50 min; hold for 10 min). The flow rate was 1.0 mL/min, and the injection volume was 20  $\mu$ l.

**Table 5. Index Components in Quality of *the Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract.**

Component	Concentration (mg/ml)	Rt(min)	Area	Genistin content (%)	Genistin content (mg/g)
Genistin	0.1	26.048	3,1588	100	
CGD	20	26.055	98,845	0.0063	0.063
BCN + CGD (1:1 mixed)	20	26.055	54.914	0.0035	0.035

(2) 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 정상 사람 섬유아세포 (human fibroblast cells)에서 EZ-Cytox assay 분석한 결과, 多彩추출물(BCN)은 250  $\mu\text{g/ml}$  이상에서부터 세포독성이 나타났고, 작두콩 (CGD)와 두 조합물 (BCN+CGD) 처리군은 500  $\mu\text{g/ml}$  이상에서부터 세포독성이 나타났다 (Fig. 22). 그래서 in vitro에서 Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 조혈증진관련 실험은 세포독성이 나타나지 않은 100  $\mu\text{g/ml}$  이내에서 수행하였다.

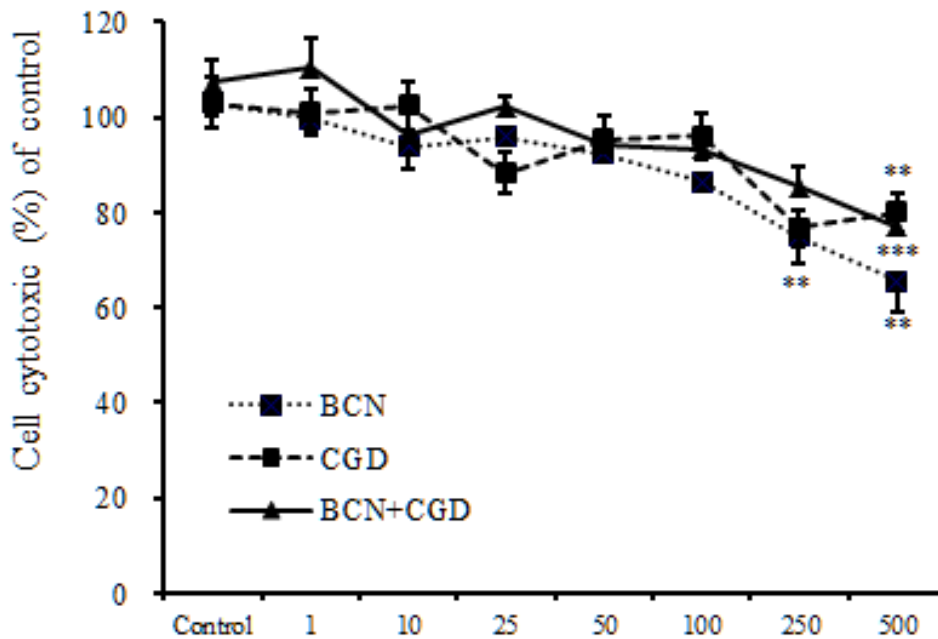


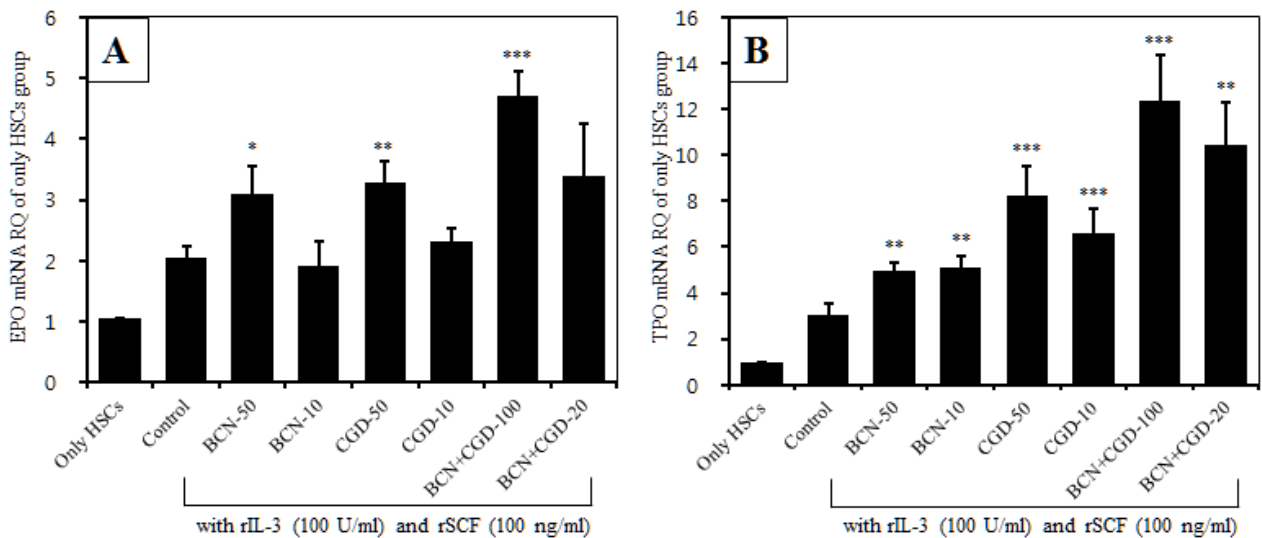
Fig. 22. Cytotoxicity effects of *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract on human fibroblast cells (hFCs).

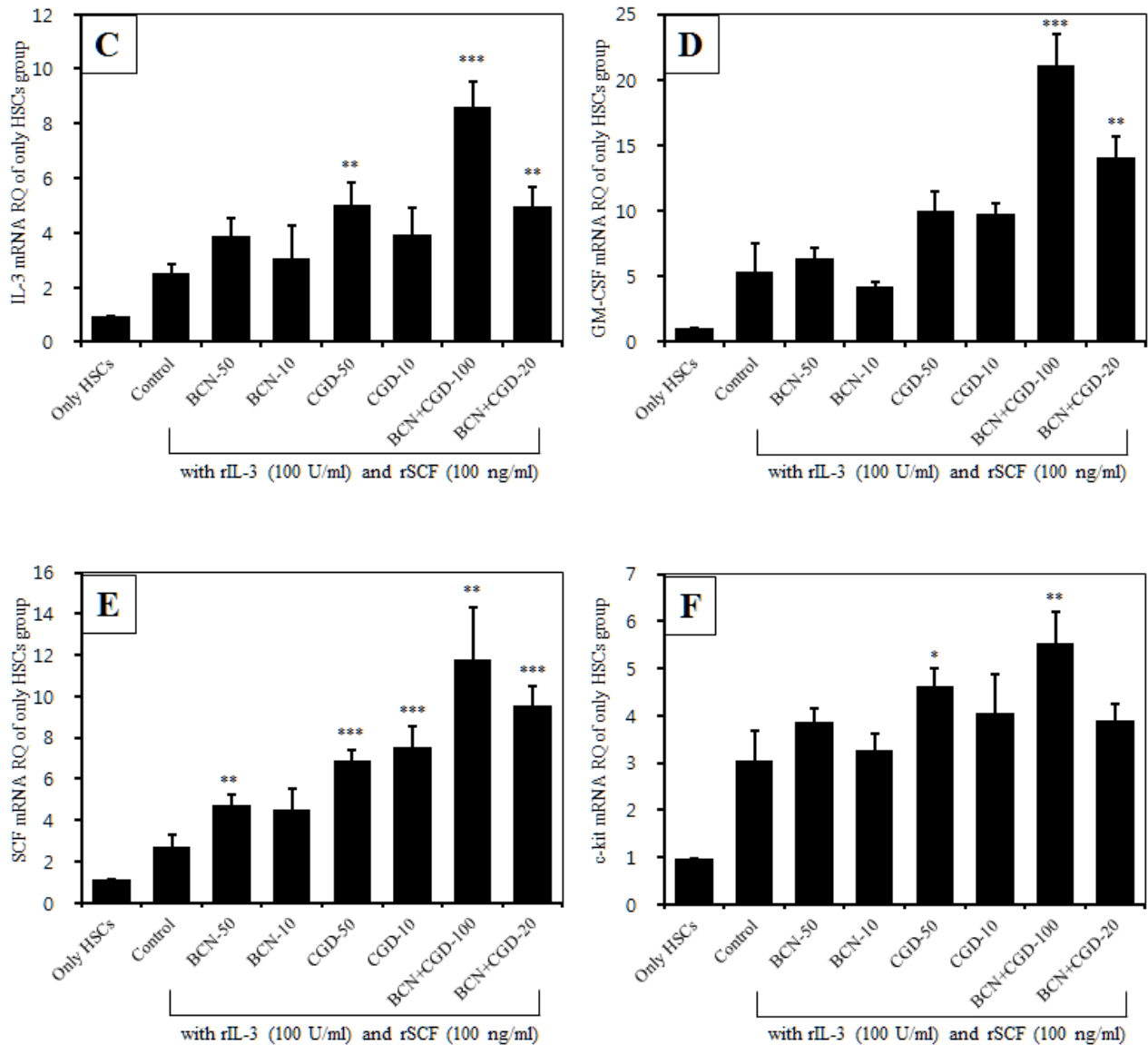
Human fibroblast cells (hFCs) were pretreated with various concentration *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD) and their combinational prescription (BCN+CGD) extract. The results are expressed the means $\pm$ S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

(3) 조혈모세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효과 분석

Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 EPO, TPO, IL-3, SCF, c-kit, GM-CSF mRNA를 분석한 결과, 무처리군인 only HSCs군에 비하여 rIL-3+rSCF을 처리한 대조군이 EPO, TPO, IL-3, SCF, GM-CSF 및 c-kit의 mRNA 유전자 발현이 2배 이상 증가하였다. 대조군(control)에 비하여 다채썩(BCN) 추출물은 EPO(Fig. 23A)(p<0.05), TPO (Fig. 23B)(p<0.01), 그리고 SCF(Fig.23E)(p<0.01)의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 그리고 대조군(control)에 비하여 작두콩(CGD) 추출물은 EPO(Fig.23A)(p<0.01), TPO(Fig.23B)(p<0.001), IL-3 (Fig.23C) (p<0.01), SCF(Fig.23E)(p<0.001), 그리고 c-kit(Fig.23F)(p<0.05)의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 또한 다채썩과 작두콩의 조합물은 대조군(control)에 비하여 EPO(Fig.23A)(p<0.001), TPO(Fig.23B)(p<0.001), IL-3(Fig.23C)(p<0.001), GM-CSF(Fig.23D)(p<0.001), SCF(Fig.23E)(p<0.01), 그리고 c-kit(Fig.23F)(p<0.01)의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과로 볼 때 두 조합물(BCN+CGD)이 각각의 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD) 추출물 투여군에 비하여 조혈증진관련 유전자 발현에 대하여 상승효과를 나타내는 것으로 판단된다.





**Fig. 23. Effects of *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract on hematopoietic-related gene mRNA expression in Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells.**

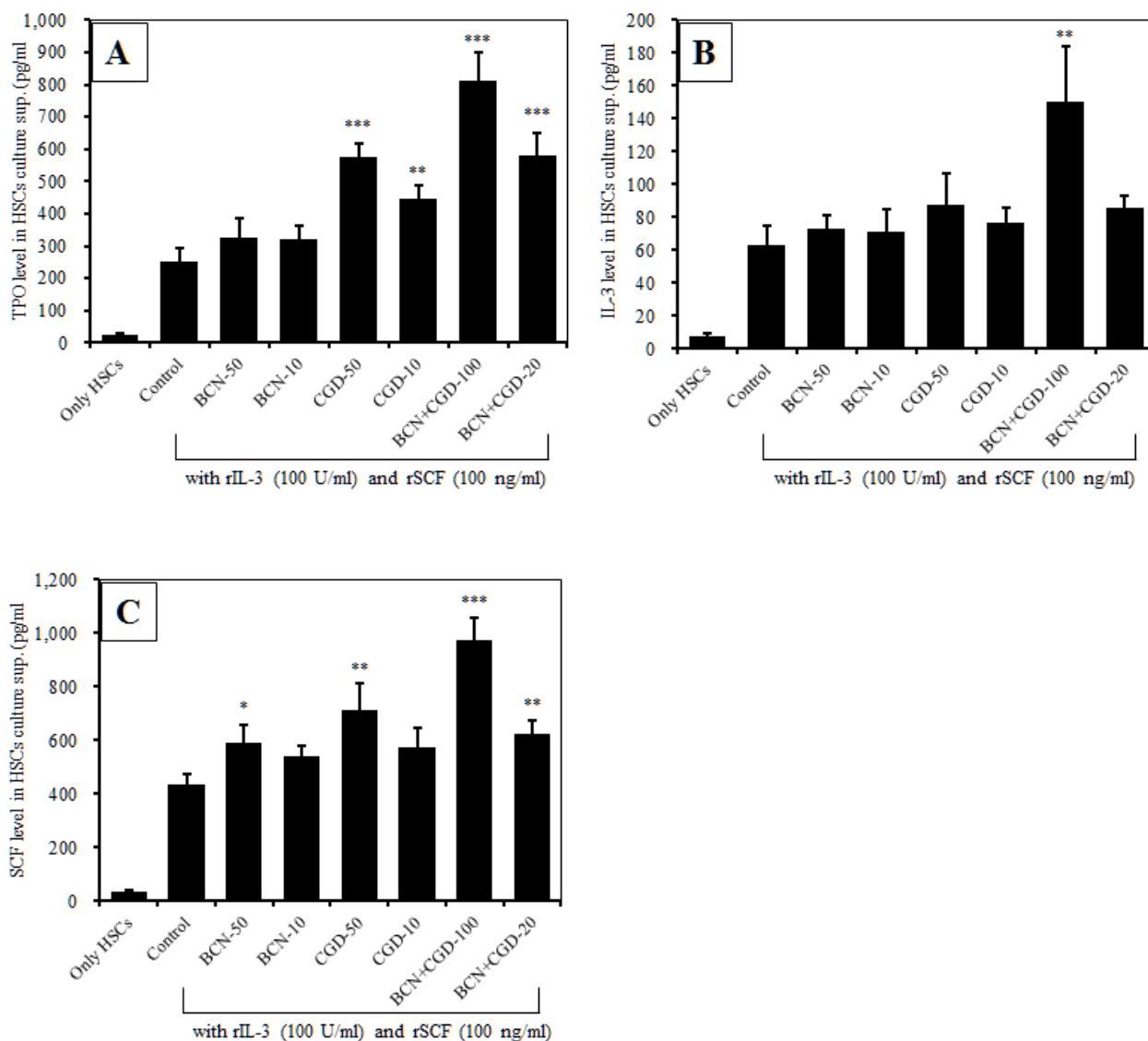
Isolated Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50, 10 µg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50, 10 µg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD) extract (100, 20 µg/ml) with rIL-3/rSCF. Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50, 10 µg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50, 10 µg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD, 100, 20 µg/ml) for 4hrs. EPO (A), TPO (B), IL-3 (C), GM-CSF (D), SCF (E), and c-kit (F) mRNA express were measured real-time PCR. Data represent means±S.E (N=2). Statistically significant value compared with only Sca-1<sup>+</sup>HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

#### (4) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효과 분석

Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 TPO, IL-3, SCF의 생산량을 측정한 결과, 대조군(control)에 비하여 다채썩(BCN)추출물은 SCF (Fig.24C) ( $p < 0.05$ )와 작두콩 (CGD) 추출물은 TPO (Fig.24A) ( $p < 0.001$ )와 SCF (Fig.24C) ( $p < 0.01$ )의 단백질 생산량이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다.

또한 다채썩과 작두콩의 조합물(BCN+ CGD)의 경우, 대조군(control)에 비하여 TPO (Fig.24A) ( $p < 0.001$ ), IL-3 (Fig.24B) ( $p < 0.01$ ), 그리고 SCF (Fig.24C) ( $p < 0.001$ )의 단백질 생산량을 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과는 조합물(BCN+ CGD)이 각각의 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD) 추출물 투여군에 비하여 더 크게 조혈성 사이토카인의 생산을 조절한다는 것을 알 수 있다.



**Fig. 24. Effects of *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract on hematopoietic-related gene expression production in Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells.**

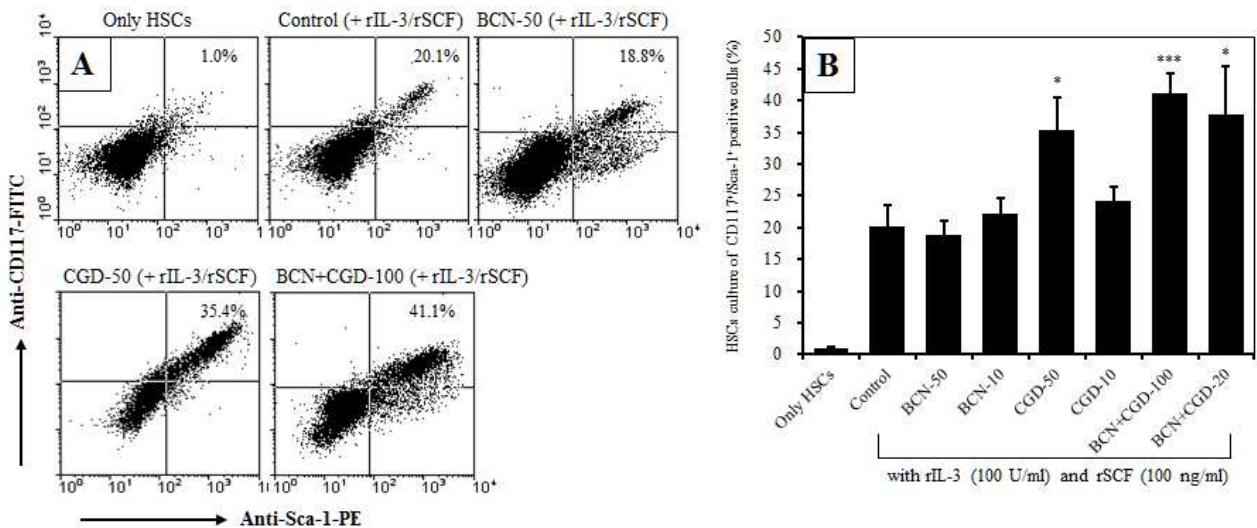
Isolated Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with extract. Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50, 10  $\mu$ g/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50, 10  $\mu$ g/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD) extract with rIL-3/rSCF for 72hrs. The production of TPO (A), IL-3 (B), SCF (C) was measured at the ELISA kit (R&D system, USA). Data represent means $\pm$ S.E (N=4). Statistically significant value compared with only Sca-1<sup>+</sup>HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

(5) 조혈모세포(HSCs)에서 유세포 형광분석

c-kit은 CD117로 HSCs의 세포표면에 존재하는 수용체(receptor) c-kit ligand(SCF)가 binding하여 hematopoietic progenitor 세포의 기능과 성장 그리고 생존하는데 중요한 수용체이다.

Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 C57bl/6 생쥐의 대퇴골에서 Sca-1<sup>+</sup> isolation kit를 이용하여 순수분리하여 HSD-B 추출물과 48시간 동안 동시 배양한 후 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>로 염색하여 FACS로 분석하였다.

그 결과, Fig.25A에서 보듯이 FACS로 분석한 dot-plot으로 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>를 염색한 것으로 only HSCs에 비하여 rIL-3/rSCF 대조군의 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> 활성세포가 20.1%로 현저하게 증가하였고, 작두콩(CGD) 추출물 및 다채썩과 작두콩의 조합물(BCN+CGD) 추출물 처리군은 각각 35.4%와 41.1%로 대조군에 비하여 현저하게 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> 활성세포가 증가를 나타내었다. Fig.25B는 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> 활성세포 수를 나타낸 것으로 대조군(control)에 비하여 작두콩(CGD) 추출물(p<0.05) 및 다채썩과 작두콩의 조합물(BCN+CGD) 추출물 (p<0.001) 처리군이 통계학적 유의성 있게 증가하였다 (p<0.001).



**Fig. 25. Effects of *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract on CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> positive cells in Sca-1<sup>+</sup> hematopoietic stem cells.**

Isolated Sca-1<sup>+</sup> hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with extract. Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50, 10 µg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50, 10 µg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD, 100, 20 µg/ml) extract with rIL-3/rSCF for 72hrs. The production of TPO (A), IL-3 (B), SCF (C) was measured at the ELISA kit (R&D system, USA). Data represent means±S.E (N=4). Statistically significant value compared with only Sca-1<sup>+</sup>HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

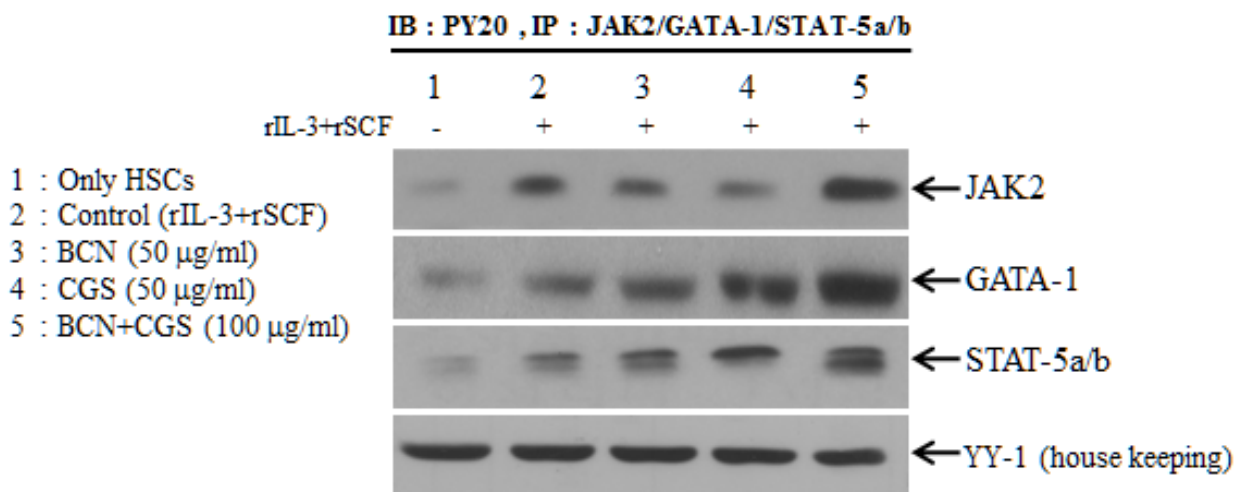


(6) 조혈모세포(Sca-1<sup>+</sup>HSCs)에서 JAK2/GATA-1/STAT-5 인산화활성분석

Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 JAK2/GATA-1/STAT5 경로의 활성 인산화를 분석한 결과, 무처리군인 only HSCs군(Fig.26, lane 1)에 비하여 rIL-3+rSCF를 처리한 대조군(lane 2)이 JAK2/GATA-1/ STAT5 경로의 활성 인산화가 증가되었다. 그리고 작두콩(CGD) 추출물(lane 4)은 대조군(lane 2)에 비하여 GATA-1/STAT5 경로의 활성 인산화가 증가되었다.

다채썩과 작두콩의 조합물(BCN+ CGD) 추출물 처리군(lane 5)은 100 µg/ml 농도에서 JAK2/ GATA-1/STAT-5a/b 경로의 활성 인산화가 대조군(lane 2)에 비하여 현저하게 증가가 이루어진 것을 알 수 있었다.

이러한 결과는 조합물(BCN+ CGD)이 각각의 다채썩(BCN)과 작두콩(CGD) 추출물 투여군에 비하여 인산화된 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 단백질이 증가되었고, 이는 JAK2/GATA-1/ STAT-5a/b 신호전달을 따르는 조혈성사이토카인 발현에 조절되는 중요한 기전연구를 뒷받침 해주는 결과라 할 수 있다.



**Fig. 26. *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract promotes the tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of GATA-1 and STAT-5a/b in Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells.**

Isolated Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50 µg/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50 µg/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD, 100 µg/ml) with rIL-3/rSCF. Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD) and their combinational prescription (BCN+CGD) extract with rIL-3/rSCF for 20 min. After 20 min, then subjected to immunoprecipitation with α-Jak2 (1:5,000), α-GATA-1 (1:5000), α-STAT-5a/b (1:5000) and anti-phosphotyrosine-HRP (1:4000).

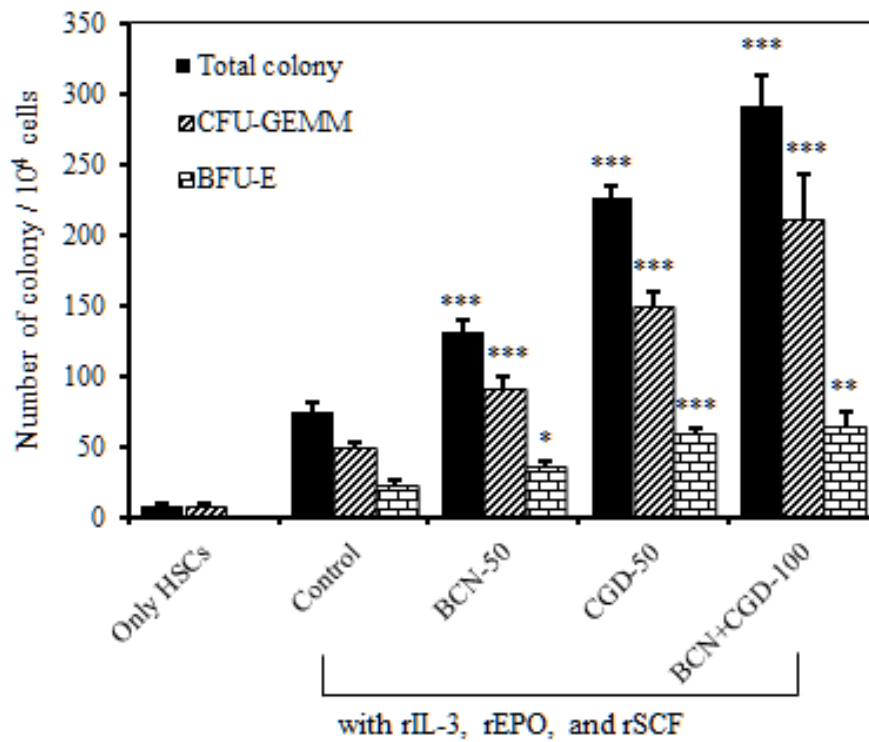
(7) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정

Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 CFU-GEMM과 BFU-E로의 분화 상승효과를 분석한 결과, Fig.27에서 보듯이 무처리군인 only HSCs군에 비하여 rIL-3+rSCF을 처리한 대조군의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 수는 8배 이상 증가 하였고, rIL-3+rEPO와 다채색(BCN) 추출물 50  $\mu$ g/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군(control)인 rIL-3+rEPO에 비하여 1.7배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다 ( $p < 0.001$ ).

그리고 rIL-3+rEPO와 작두콩(CGD) 추출물 50  $\mu$ g/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군(control)인 rIL-3+rEPO에 비하여 3.0배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다( $p < 0.001$ ).

또한 rIL-3+rEPO와 두 조합물(BCN+CGD) 추출물 100  $\mu$ g/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군(control)인 rIL-3+rEPO에 비하여 3.8배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다( $p < 0.001$ ).

이러한 결과로 CFU-GEMM의 군락 수는 대조군(control)에 비하여 작두콩(CGS)과 두 조합물(BCN+CGD) 추출물 처리군에서 각각 2.9배와 4.2배로 이상 현저하게 유의성 있는 증가를 나타내었다( $p < 0.001$ ). 그러므로 두 조합물(BCN+CGD)이 각각의 다채색(BCN)과 작두콩(CGD) 추출물 투여군에 비하여 CFU-GEMM 분화에 대하여 상승효과와 과립구계, 적혈구계, 거핵구계 미성숙세포집락을 형성할 수 있는 조혈모세포를 증식시키는 효과가 있을 것으로 판단된다.



**Fig. 27. Effects of *Brassica campestris* var *narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen and their combinational prescription extract of CFU-GEMM and BFU-E colony formation during 14-day culture in the presence of two different cocktails of recombinant cytokine**

Isolated Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rEPO (3 U/ml) or treated with *Brassica campestris* var *narinosa* (BCN, 50  $\mu$ g/ml), *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, 50  $\mu$ g/ml) and their combinational prescription (BCN+CGD, 100  $\mu$ g/ml) with rIL-3/rSCF. Number and composition of hematopoietic colonies per  $1 \times 10^4$  Sca-1<sup>+</sup>HSCs after 14 days of culture in semi-solid medium.

## 다. 면역증진 천연식품소재

### (1) Balb/c 생쥐의 복강대식세포에서 천연식품소재의 염증사이토카인 유전자 억제 효과

대식세포에서 염증사이토카인인 IL-6 mRNA와 TNF- $\alpha$  mRNA 발현량을 비교한 결과, 정상군(Only cells)에 비하여 LPS만을 처리한 대조군의 IL-6 mRNA와 TNF- $\alpha$  mRNA 발현량이 현저하게 증가하였고, 9가지 식품소재 중에서 우엉(*Arctium lappa* L, ARL) 추출물과 오가피 (*Acanthopanax sessiliflorum* Seem, ASS) 추출물이 200  $\mu$ g/ml 및 50  $\mu$ g/ml에서 농도 의존적으로 pro-inflammatory cytokine(IL-6와 TNF- $\alpha$ )을 크게 억제하여 항염 효과를 나타내어 면역증진 효능을 나타내었다(Fig. 28).

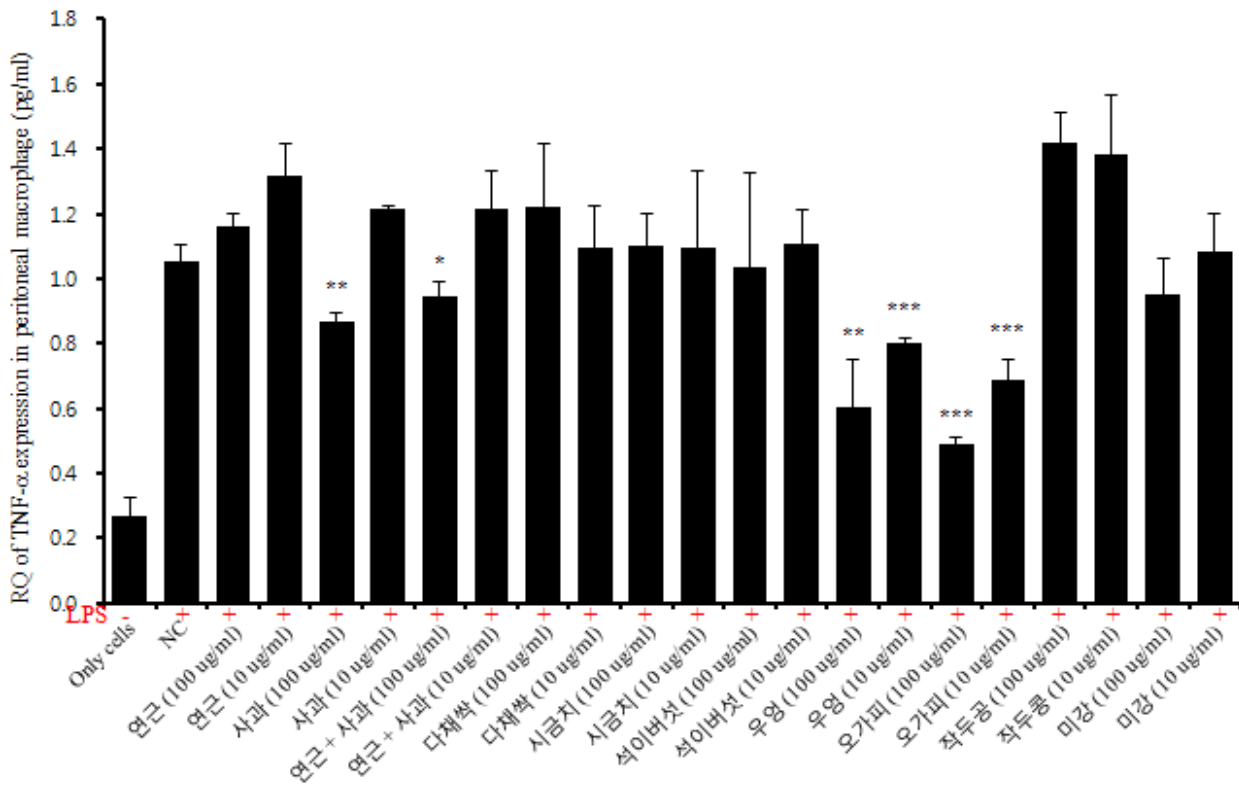
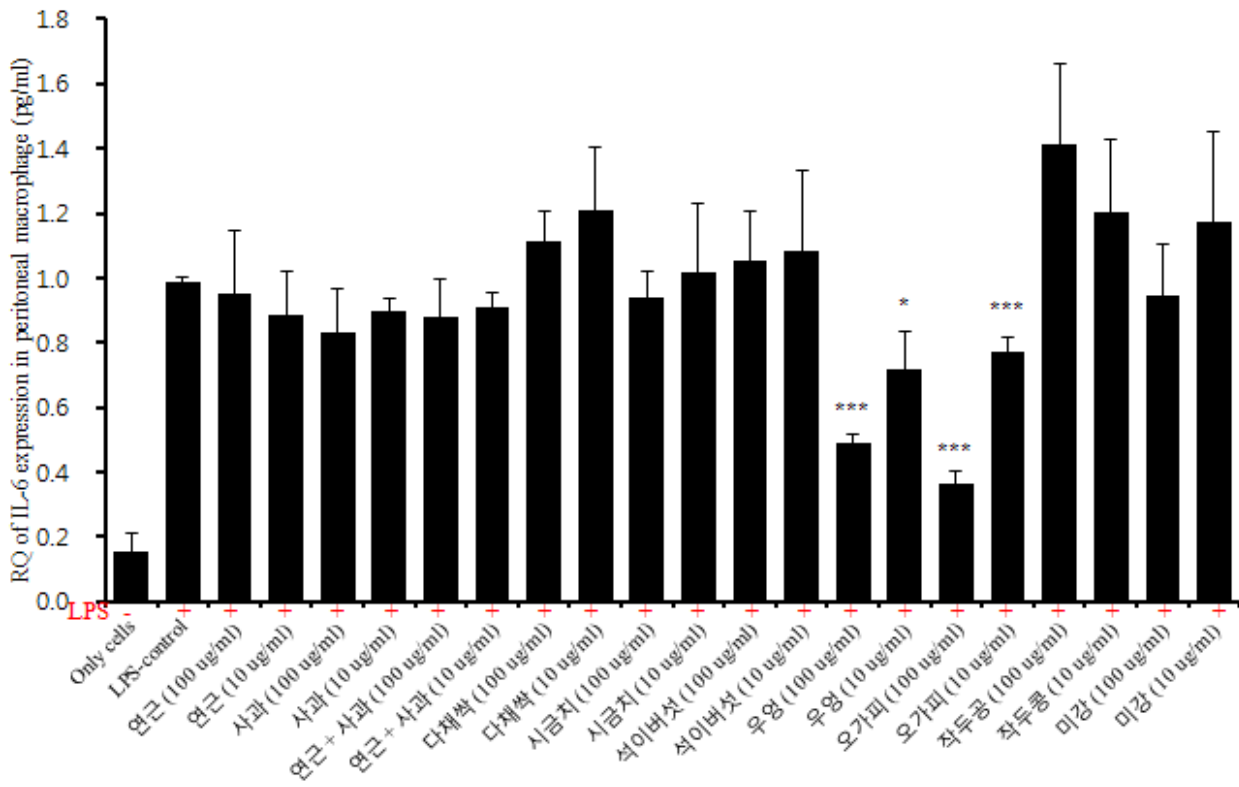


Fig. 28. Effects of natural food materials extract on IL-6 and TNF-α pro-inflammatory cytokine expression in mouse peritoneal macrophage cells.

(2) Balb/c 생쥐의 배양 비장세포에서 활성 T 세포활성물질 IL-10과 IFN- $\gamma$  ELISA 측정

세포매개성 면역반응에서 Th 세포는 항체생성과정(IL-4) 뿐만 아니라 세포성 면역(IFN- $\gamma$ )에서 중심적 역할을 하여 IL-4와 IFN- $\gamma$ 의 증가는 면역반응을 증진시키는 역할을 한다. 또한 생체 내에서 면역불균형으로 염증성 면역질환 발병이 유발되는데, 이를 조절하는 면역중계물질이 IL-10, TGF- $\beta$ 와 같은 anti-inflammatory 기능을 하는 싸이토카인이다.

우리의 연구결과는 2주간 시료를 투여한 후 비장세포를 분리하여 미리 CD3 mAb를 coating한 plate에 48 시간 동시 배양하여 배양 상층액내에서 IL-10과 IFN- $\gamma$  생산량을 측정한 결과이다(Fig. 29). IL-10 생산량은 대조군(NC)에 비하여 홍삼엑기스 투여군( $p < 0.05$ ), 우영 추출물(200 mg/kg)( $p < 0.01$ ), 우영추출물(50 mg/kg)( $p < 0.001$ ), 오가피 추출물 투여군(200 mg/kg)( $p < 0.01$ ) 그리고 오가피 추출물 투여군(50 mg/kg)( $p < 0.01$ )이 모두 비슷하게 약 30% 이상 IL-10과 IFN- $\gamma$  생산량이 통계학적으로 유의성 있게 증가하였으며, 특히 오가피 추출물 투여군(200 mg/kg)은 대조군에 비하여 약 79% 이상 통계학적으로 유의성 있게 현저한 증가를 나타내었다( $p < 0.001$ ).

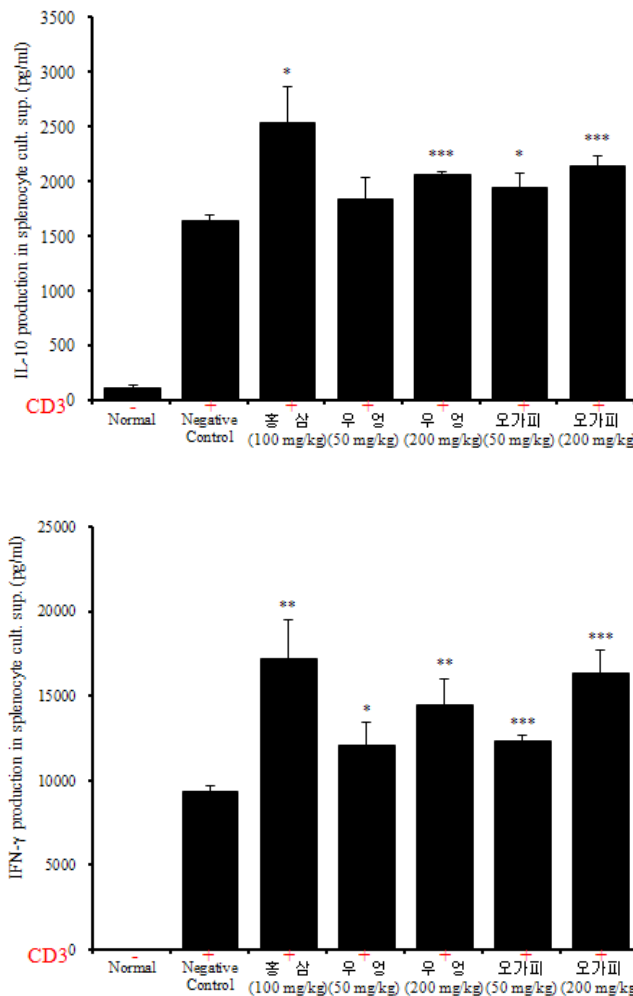


Fig. 29. Effects of ARL and ASS extract on IL-10 and IFN- $\gamma$  production level in splenocytes culture supernatants

(3) Balb/c 생쥐의 복강대식세포에서 산화질소 생성능 측정

면역기능을 갖는 대식세포는 식균작용이 있기 때문에 항원을 잡아먹을 수 있어 자연면역에서 중요한 기능을 나타낸다. 활성화된 대식세포는 미생물, 항원, 죽은 조직, 적혈구 등을 식균작용으로 파괴할 수 있다. 면역반응에서 대식세포 활성화의 지표로서 산화질소 생성은 침입한 병원체를 없애고 기본적인 숙주 방어체계를 작동시키는 역할을 하며 특히 Th 세포의 분화단계 중 Th0 세포가 Th1 세포와 Th2 세포로 분화될 때, Th1 세포로의 분화를 돕는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

우리의 연구결과는 Balb/c계 생쥐에 홍삼 엑기스(100 mg/kg), 우엉 추출물(200 mg/kg, 50 mg/kg), 그리고 오가피 추출물(200 mg/kg, 50 mg/kg)을 14일간(2주간) 경구 투여하고, 투여 종료 3일전에 proteose peptone(Difco) 10 % 수용액 1.5 ml을 생쥐 복강 내에 투여한 후 복강에서 복강대식세포를 분리하여 72시간 동안 배양한 후 배양상층액에서 산화질소 농도를 측정한 결과이다(Fig. 30).

산화질소 생산량이 대조군(NC)에 비하여 양성대조군인 홍삼투여군, 우엉 추출물(200 mg/kg, 50 mg/kg) 투여군, 오가피 추출물(200 mg/kg, 50 mg/kg) 투여군에서 약 28% 이상 통계학적으로 유의성 있게 증가를 나타내었다 ( $p < 0.001$ ).

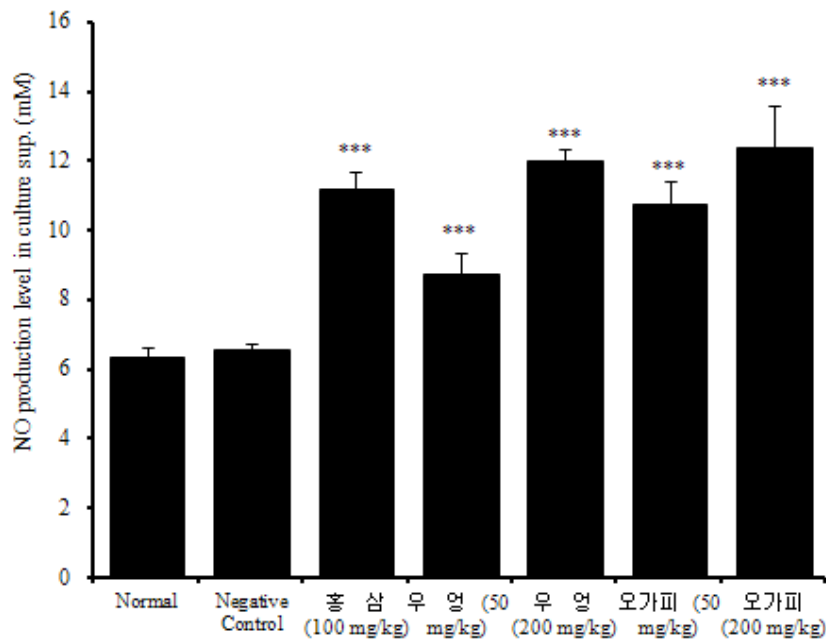


Fig. 30. Effects of Hurum extract on NO production level in peritoneal macrophages culture supernatants

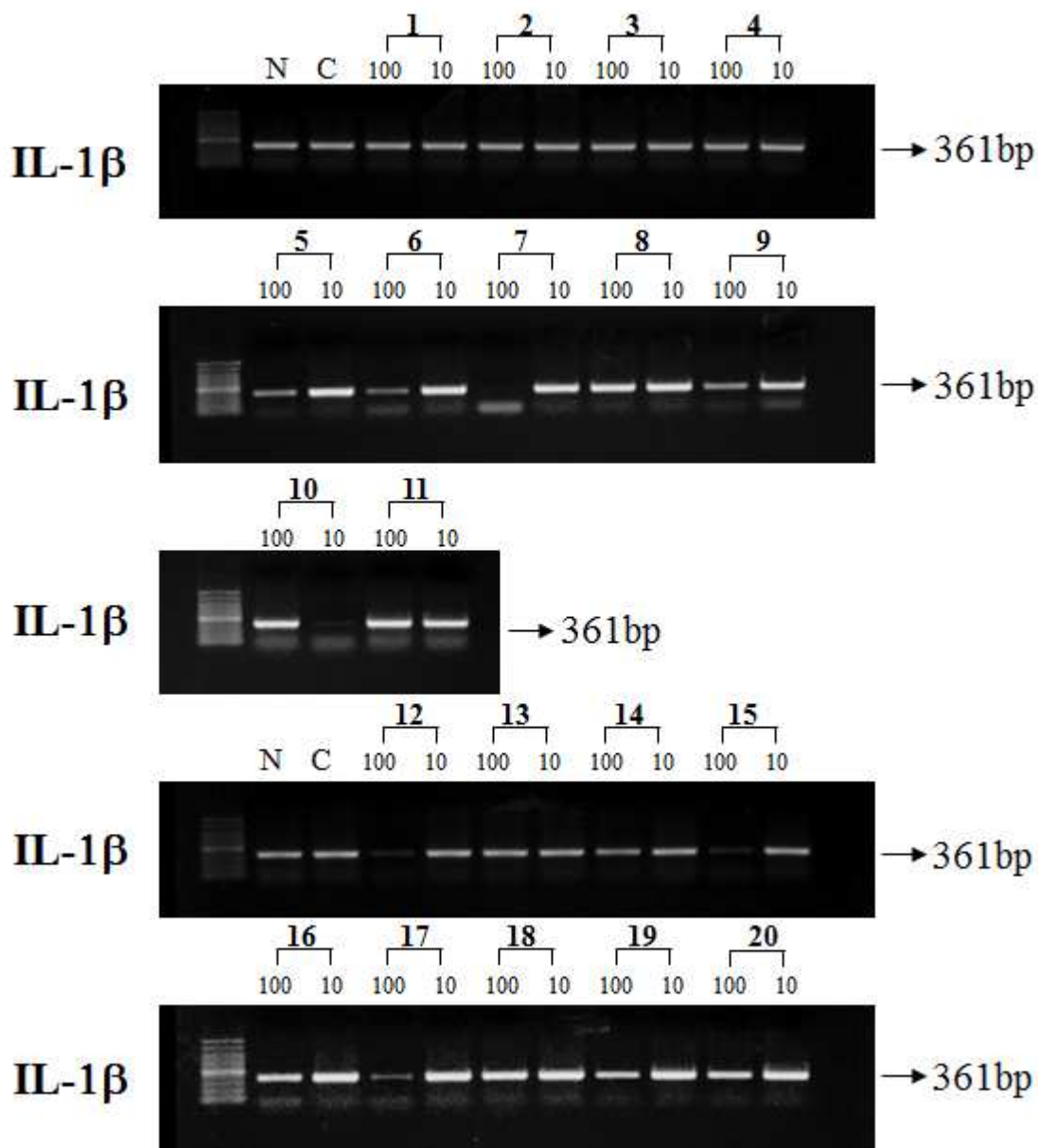
(4) 염증유발 사이토카인 분석 및 천연식품 조합물에 의한 synergistic 효과

Table 6. Natural food materials combination of synergistics.

순번	시료내역
1	연근 (100 ug/ml)
2	연근 (10 ug/ml)
3	사과 (100 ug/ml)
4	사과 (10 ug/ml)
5	연근 + 사과 (100 ug/ml)
6	연근 + 사과 (10 ug/ml)
7	시금치 (100 ug/ml)
8	시금치 (10 ug/ml)
9	다채쌈(100 ug/ml) : <i>Brassica campestris var narinosa</i> (BCN)
10	다채쌈(10 ug/ml)
11	석이버섯 (100 ug/ml)
12	석이버섯 (10 ug/ml)
13	우엉 (100 ug/ml) : <i>Arctium lappa L.</i> (ARL)
14	우엉 (10 ug/ml)
15	오가피 (100 ug/ml) : <i>Acanthopanax cortex</i> (ACC)
16	오가피 (10 ug/ml)
17	작두콩(100 ug/ml) : <i>Canavalia gladiata</i> DC (CGD)
18	작두콩(10 ug/ml)
19	미강(100 ug/ml)
20	미강(10 ug/ml)

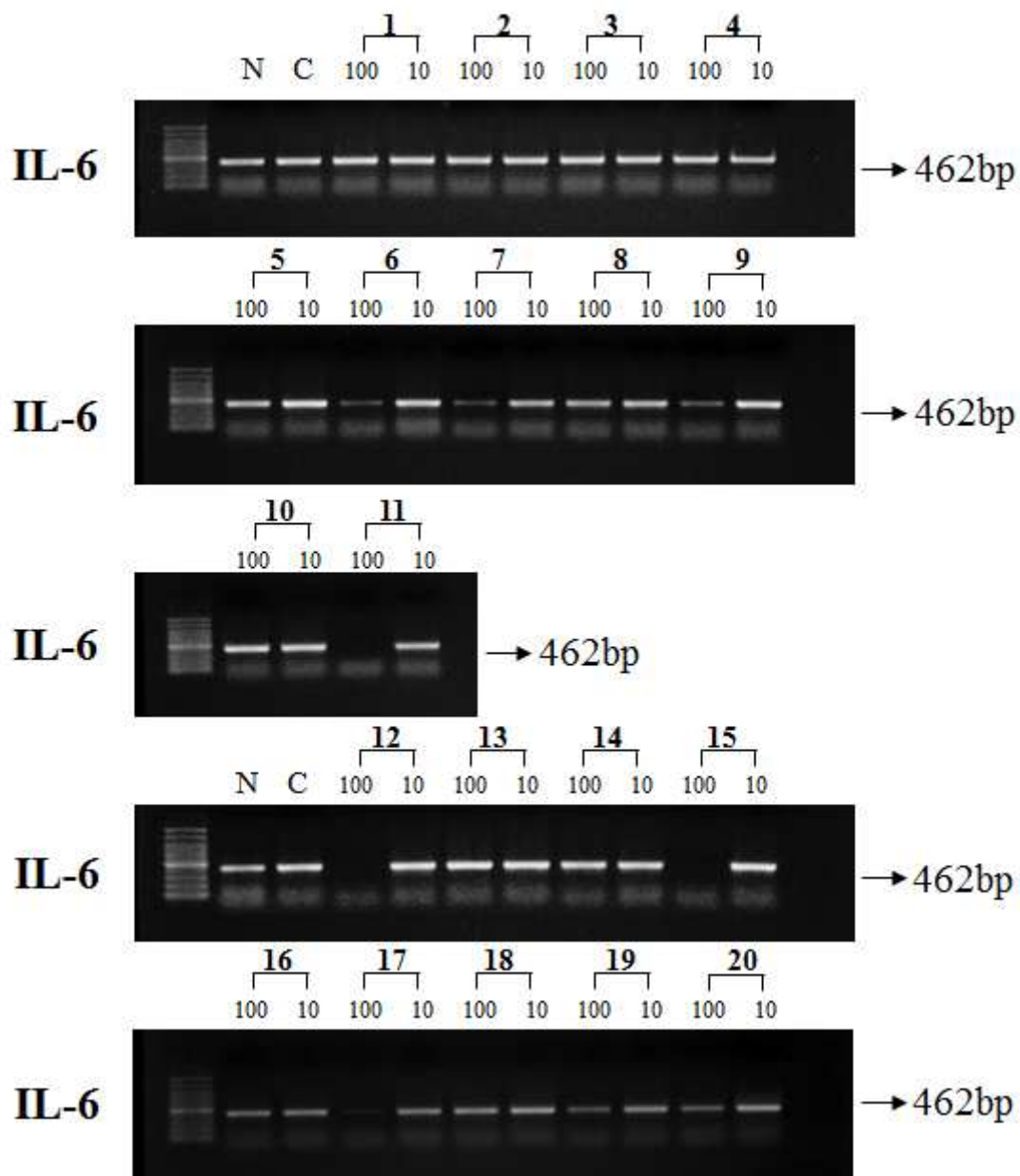
생체내의 물리적 조직손상, 감염 및 염증반응에 의한 자극이 세포에 가해지면 세포는 염증반응 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )의 과잉생산을 초래하게 된다. 이러한 염증반응 사이토카인은 세포의 사멸이나 염증세포의 증식을 유도하여 질병의 악화와 2차 질병을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 생쥐 대식세포를 분리한 후 LPS로 염증반응을 유도하여, 20가지 단일한약재 추출물이 염증반응 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )의 유전자 발현을 억제하는지를 탐색하고자 하였다. 그 결과 Fig. 31, Fig. 32, 그리고 Fig. 33에서와 같이 9번(다채쌈), 13번(우엉), 15번(오가피), 그리고 17번(작두콩)이 100  $\mu$ g/ml 과 10  $\mu$ g/ml에서 공통적으로 현저한 염증반응 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )의 유전자 발현을 억제함을 확인하였다(Fig. 31~33).





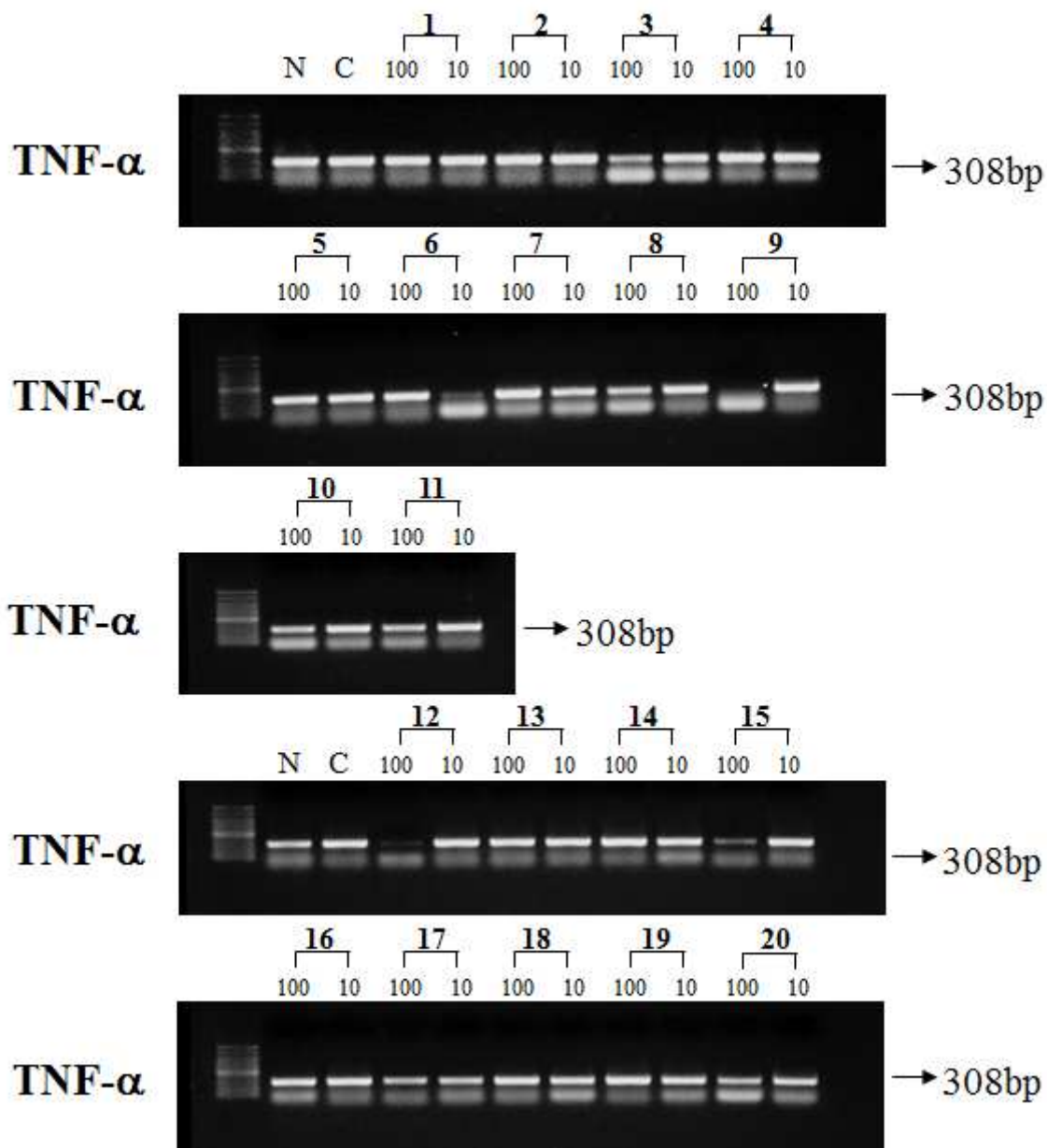
**Fig. 31. Inhibitory effects of natural food materials extract on IL-1 $\beta$  m-RNA expression in activated mouse macrophages by lipopolysaccharide(LPS).**

Macrophages from healthy BALB/c mice treated with natural food materials (100 and 10 mg/ml) extract (Table 1), and 30 minutes later LPS (10 mg/ml) was cocultured for screening pro-inflammatory cytokines inhibitory drugs. Macrophages were cultured or cocultured with natural food materials extracts and LPS for 6 hrs. The gene expression of productive IL-1 $\beta$  transcripts was evaluated by reverse transcriptase-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.



**Fig. 32. Inhibitory effects of natural food materials extract on IL-6 m-RNA expression in activated mouse macrophages by lipopolysaccharide (LPS).**

Macrophages from healthy BALB/c mice treated with natural food materials (100 and 10 mg/ml) extract (Table 1), and 30 minutes later LPS (10 mg/ml) was cocultured for screening pro-inflammatory cytokines inhibitory drugs. Macrophages were cultured or cocultured with natural food materials extracts and LPS for 6 hrs. The gene expression of productive IL-6 transcripts was evaluated by reverse transcriptase-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.



**Fig. 33. Inhibitory effects of natural food materials extract on TNF- $\alpha$  m-RNA expression in activated mouse macrophages by lipopolysaccharide (LPS).**

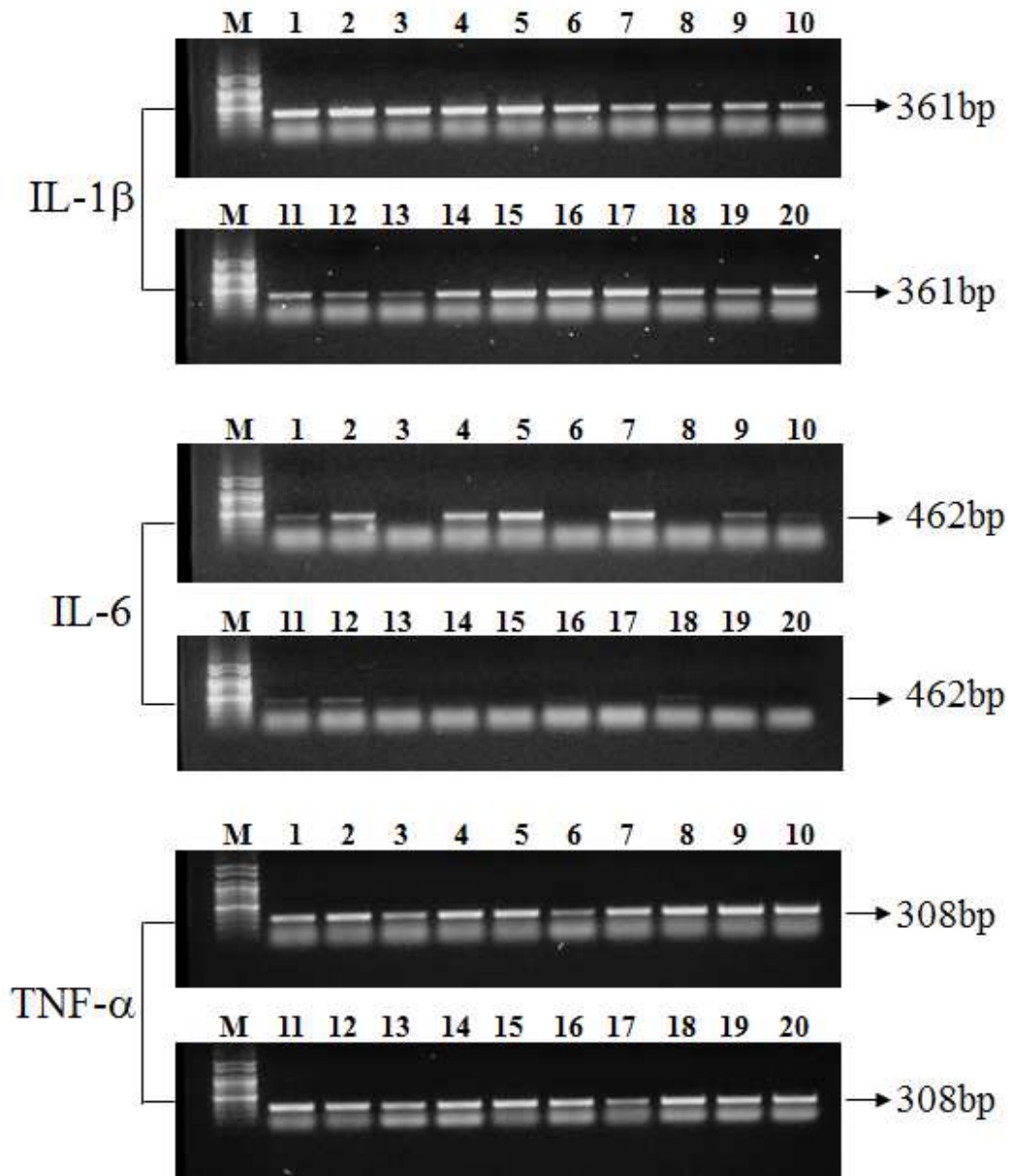
Macrophages from healthy BALB/c mice treated with natural food materials (100 and 10 mg/ml) extract (Table 1), and 30 minutes later LPS (10 mg/ml) was cocultured for screening pro-inflammatory cytokines inhibitory drugs. Macrophages were cultured or cocultured with natural food materials extracts and LPS for 6 hrs. The gene expression of productive TNF- $\alpha$  transcripts was evaluated by reverse transcriptase-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

(5) 천연식품소재 조합에 의한 synergistic 효과

Table 7. Natural food materials combination of synergistics.

조합 No	다채썩(BCN)	우영(ARL)	오가피(ACC)	작두콩(CGD)
1	Macrophage only cell ( $2 \times 10^6$ )			
2	LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ )			
3	33 $\mu\text{l}$			
4		33 $\mu\text{l}$		
5			33 $\mu\text{l}$	
6				33 $\mu\text{l}$
7			33	33
8	33	33	33	
9	33			33
10	33	33		
11	33		33	33
<b>12</b>	<b>33</b>			<b>33</b>
<b>13</b>	<b>33</b>	<b>33</b>		<b>33</b>
14		33	33	33
15		33	33	
16		33		33
17			33	33
18	25	25	25	25
19	25	25	25	
20		25	25	25

탐색된 기능성 천연식품소재 (다채썩, 우영, 오가피, 작두콩)들을 여러 가지로 혼합하여 염증반응 사이토카인(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )의 유전자 발현 억제를 관찰한 결과, Fig. 34 에서처럼 다채썩과 작두콩이 혼합된 혼합천연식품소재에서 가장 큰 염증반응 억제를 관찰할 수 있었다.



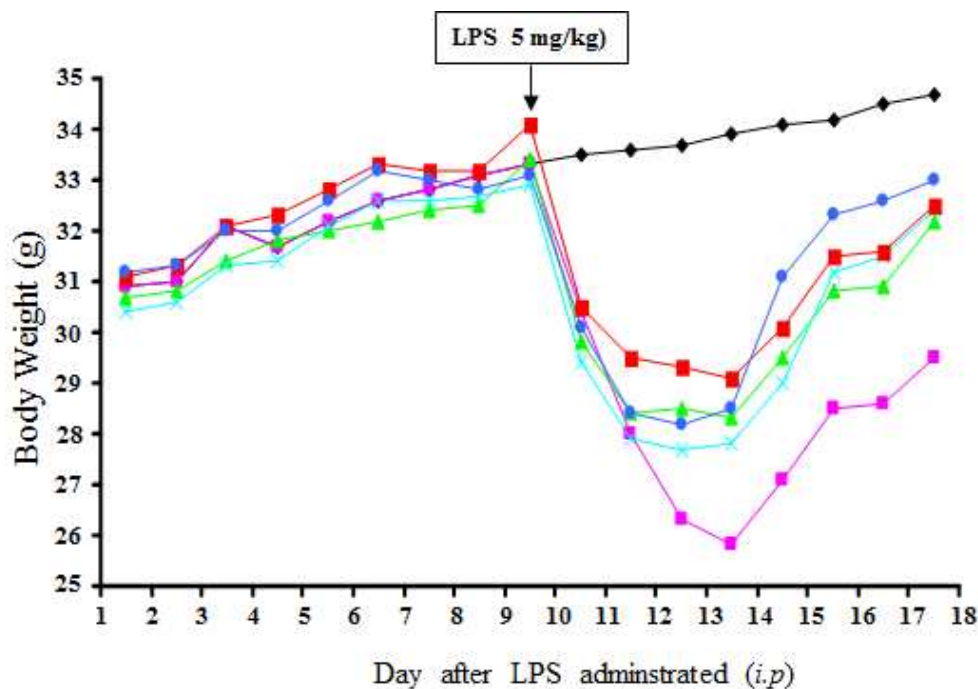
**Fig. 34. Inhibitory synergic effects of natural food materials extract mixture on pro-inflammatory cytokines m-RNA expression in activated mouse macrophages by lipopolysaccharide (LPS).**

Macrophages from healthy BALB/c mice treated with natural food materials (100 mg/ml) extract mixture combination (Table 3), and 30 minutes later LPS (10 mg/ml) was cocultured for screening pro-inflammatory cytokines inhibitory drugs. Macrophages were cultured or cocultured with natural food materials extracts mixture and LPS for 6 hrs. The gene expression of productive IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  transcripts was evaluated by reverse transcriptase-PCR. Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel. The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

(6) Cachexia를 유도한 생쥐에서 기능성 천연식품소재 조제물을 첨가한 정상식이의 효과

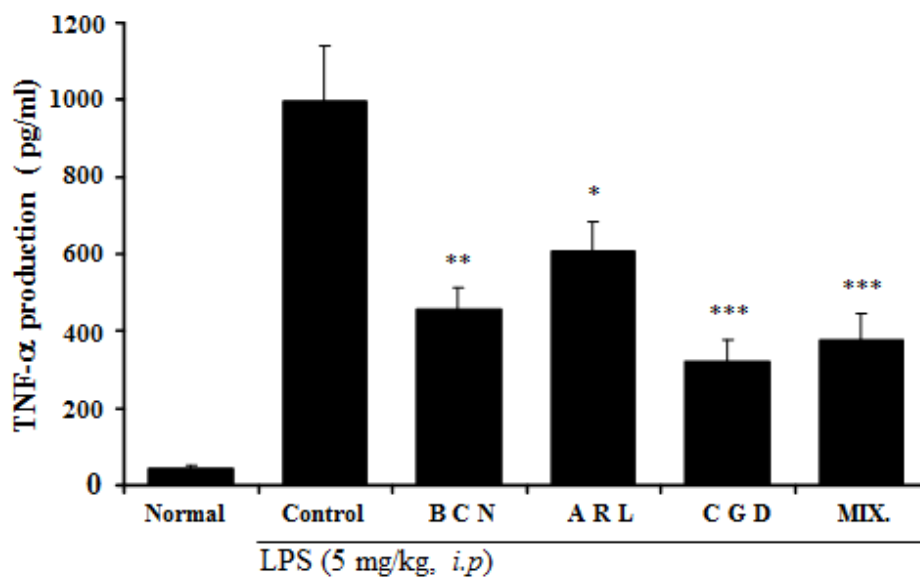
(가) 천연식품소재 조제물이 LPS처리한 생쥐의 body weight와 tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )에 미치는 영향

기능성 천연식품소재가 LPS처리한 생쥐의 body weight에 미치는 영향을 살펴보면 LPS처리한 그 당시부터 약 3~4일은 급격한 체중감소를 보이다가 14일 이후 증가되기 시작하였다(Fig. 35). 이는 LPS에 의해 cachexia가 유발되었지만, 기능성 혼합천연식품소재의 영향으로 체력소모가 감소됨을 알 수 있었다. TNF- $\alpha$ 생산량은 기능성 혼합천연식품소재 섭취군들이 대조군에 비해 눈에 띄게 적게 생산되었다(Fig. 36). 특히, 작두콩과 혼합천연식품소재의 섭취군들이 TNF- $\alpha$ 생산량이 가장 낮았다.



**Fig. 35. Effect of natural food materials extract and mixture on body weight of LPS-treated mice.**

Mice pre-treated with natural food materials extract and mixture, and 10 day later LPS (5 mg/kg) was *i.p* injected in BALB/c mice. Mice were orally administered with BCN extract (200 mg/kg, ▲), ARL extract (200 mg/kg, ×), CGD extract (200 mg/kg, ■), and natural food materials extract (200 mg/kg, ●) for 10 day once daily. Normal mice (◆) were Not-treated group and LPS-treated mice group (■). Mice were used in groups of 20. Each point represents the mean.



**Fig. 36. Effect of natural food materials extract and mixture on serum TNF- $\alpha$  level of LPS-treated mice.**

Mice pre-treated with natural food materials extract and mixture, and 10 day later LPS (5 mg/kg) was *i.p* injected in BALB/c mice. Mice were orally administered with BCN extract (200 mg/kg), ARL extract (200 mg/kg), CGD extract (200 mg/kg), and natural food materials extract mixture (200 mg/kg, MIX.) for 10 day once daily. Normal mice were Not-treated group and LPS-treated mice group (control). The mice serum were collected 48 hrs later LPS-treated and serum TNF- $\alpha$  level was assay by ELISA kit, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. The results are expressed the means $\pm$ S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001).

(나) 정상식이와 천연식품소재 조성물 동시 투여로 LPS 처리한 생쥐의 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  그리고 Leptin의 생산에 미치는 영향

정상식이와 혼합 천연식품소재 조제물을 동시 투여하여 LPS(5 mg/kg)처리한 생쥐의 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 생산량을 살펴본 결과 혼합천연식품소재 조제물 Mixture 5%와 Mixture 7%가 유의적으로 낮게 생산되었다(Fig. 37, Fig. 38). Leptin의 생산량을 살펴보면, 혼합 천연식품소재 조제물 Mixture 7% 섭취군이 가장 낮았다(Fig. 39). 결과적으로, LPS처리로 cachexia 유도한 생쥐에게 정상식이와 혼합천연식품소재 조제물을 동시에 투여하면 염증유발 사이토카인 및 Leptin 생산량을 감소시킬 수 있었다.

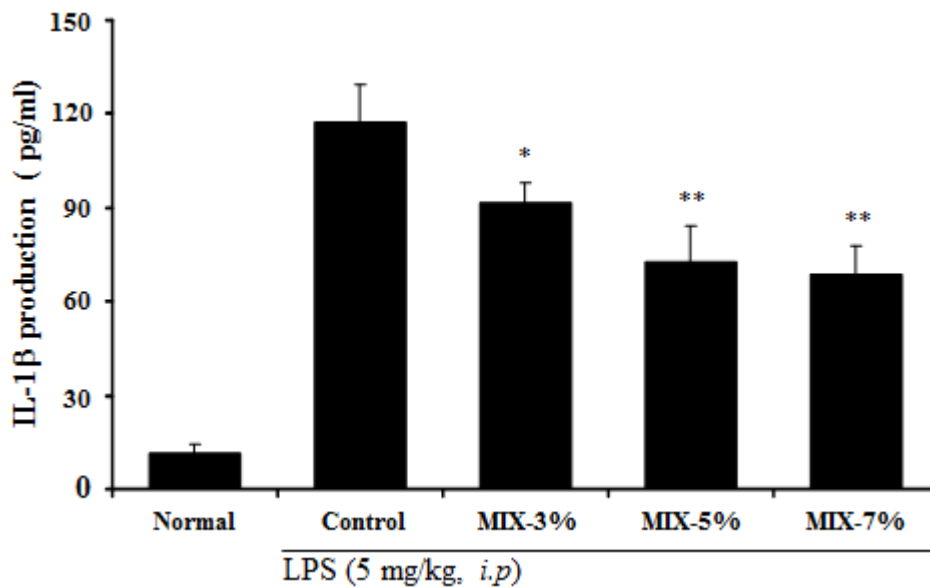
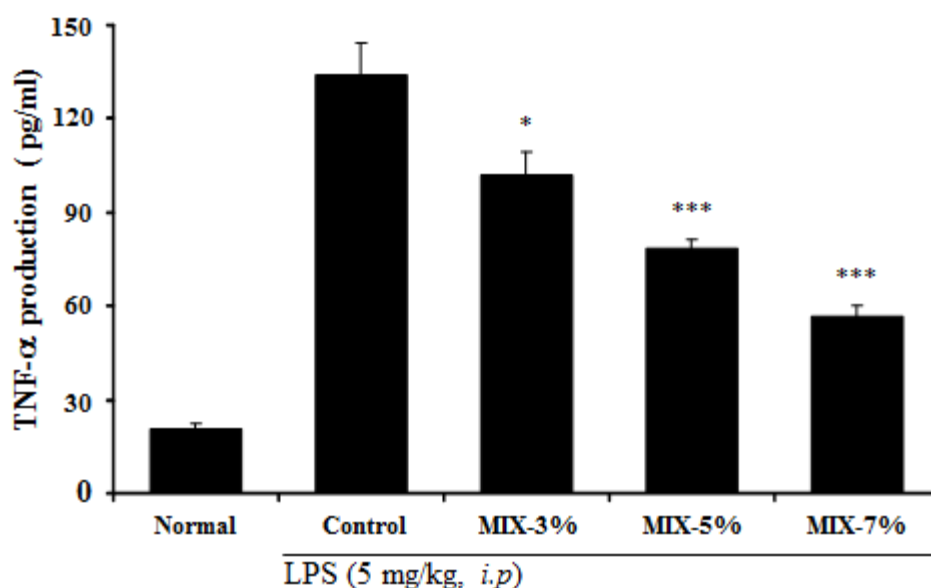


Fig. 37. Inhibitory Effect of natural food materials extract mixture and American Institute of Nutrition-76 (AIN-76) semipurified diet on serum IL-1b level in mice receiving exogenous LPS.

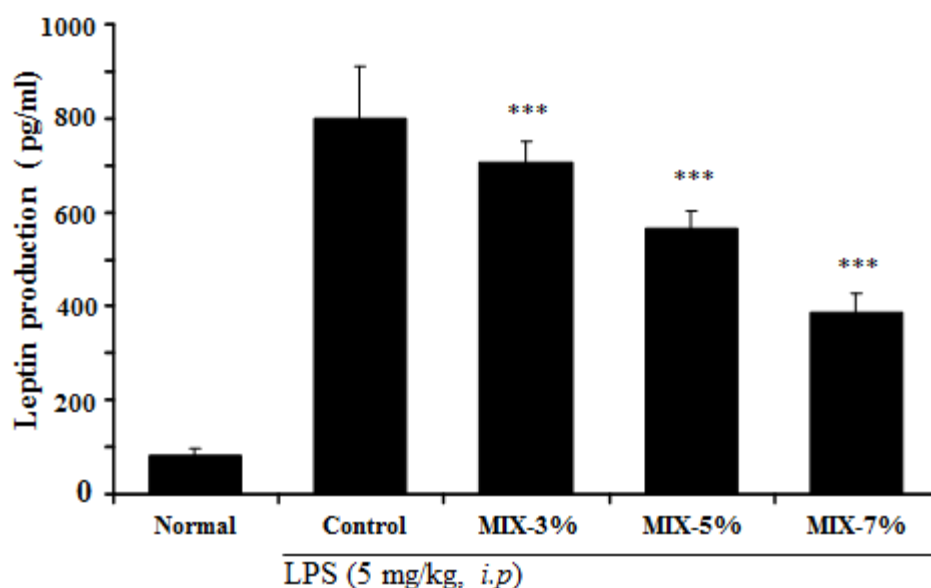
Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later LPS (5 mg/kg) *i.p* was measured in BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and LPS-treated mice group (control). The mice serum were collected 16 hrs later LPS-treated and serum IL-1b level was assay by ELISA kit, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. The results are expressed the means $\pm$ S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001).





**Fig. 38. Inhibitory Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on serum TNF- $\alpha$  level in mice receiving exogenous LPS.**

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later LPS (5 mg/kg) *i.p* was measured in BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and LPS-treated mice group (control). The mice serum were collected 16 hrs later LPS-treated and serum TNF- $\alpha$  level was assay by ELISA kit, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods. The results are expressed the means $\pm$ S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001).



**Fig. 39. Inhibitory Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on serum Leptin level in mice receiving exogenous LPS.**

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later LPS (5 mg/kg) *i.p* was measured in BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and LPS-treated mice group (control). The mice serum were collected 16 hrs later LPS-treated and serum Leptin level was assay by ELISA kit, and the other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. The results are expressed the means $\pm$ S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001).

(다) Colon26 세포주로 유도된 cachexia 생쥐모델에서 정상식이와 혼합천연식품소재 조제물이 cachexia syndrome 억제에 미치는 영향

① 정상식이 섭취량 측정

Colon26 세포주로 cachexia를 유도한 생쥐에게 정상식이와 혼합천연식품소재 조제물을 경구투여하여 식이 섭취량을 측정하였다(Table 8). 처음 1주일동안은 별다른 이상을 보이지 않았으나, 2주에 접어들면서 섭취량이 약간 감소하였으며, 마지막 14일째에는 섭취량이 거의 없어 생명연장에 큰 어려움을 주었다. 정상군도 다른 군같이 정상식이 섭취량이 줄어들어 결과의 시비를 어렵게 하였으나, 이는 대조군과 다른 실험군들의 생쥐들의 고통을 옆에서 지켜보던 동료애에 의한 심리적인 문제라 추측된다.

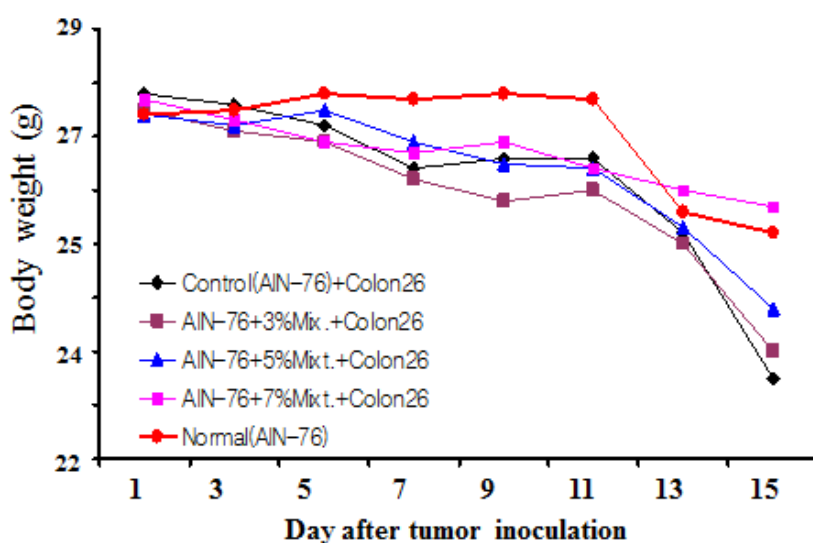
② Body weight 및 tumor weight 측정, 혈액성분 분석

Fig. 40은 Colon26 세포주로 cachexia를 유도한 생쥐에게 정상식이와 혼합천연식품소재 조제물을 경구투여 하였을 때 Body weight를 측정하였다. 정상군에 비해 혼합천연식품소재 조제물 Mixture 7% 섭취군의 체중변화가 약간 감소하였으며, 그 외에 대조군과 Mixture 3%, Mixture 5% 섭취군들은 10일 이후 급격히 감소하였다. Tumor weight 측정은 대조군에 비해서 혼합천연식품소재 조제물의 섭취군들이 유의적으로 낮았다(Fig. 41). 특히, Mixture 7%군이 가장 낮았다. 따라서 혼합천연식품소재 조제물의 농도에 비례하여 tumor weight가 눈에 띄게 작아졌다. Carcass weight(wet and dry carcass dry weight) 측정 결과 혼합천연식품소재 조제물 Mixture 7% 섭취군이 유의적으로 낮았다(Fig. 42). Table 9와 Table 10은 Colon26 세포주로 cachexia를 유도한 생쥐에게 정상식이와 혼합천연식품소재 조제물을 경구투여하여 혈청성분을 분석한 결과이다. Total Protein과 Albumin, 그리고 Ferritin의 함량은 혼합천연식품소재 조제물 농도가 짙을수록 그 수치가 높아졌다. 그러나 Glucose는 개별의 다양성이 너무나 커서 별다른 영향을 주지 못하였으며, 그 외에 Triglyceride와 Total Cholesterol, HDL-Cholesterol, 그리고 Free Fatty Acid(FFA) 등의 함량에 영향을 주지 못하였다. 결과적으로, 혈청 성분 중 지방에는 별다른 상관성이 없었다.

**Table 8. Effect of NFM extract mixture on AIN-76 food intake of colon26 bearing mice.**

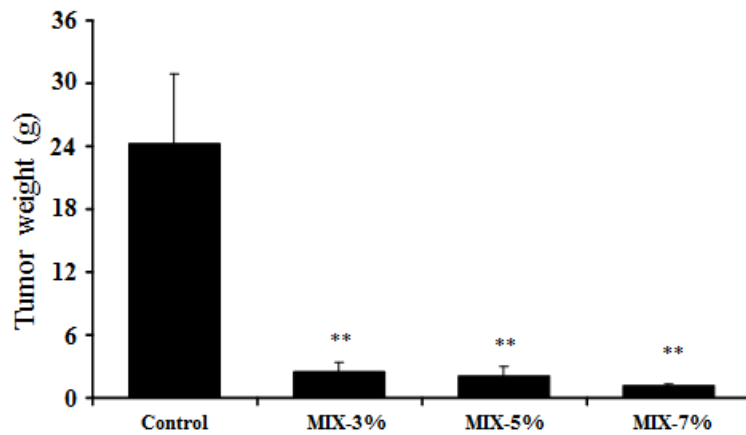
Group	Colon26 S.C	AIN-76 Food Intake(g/mouse/day)			
		Day 3-4	Day 7-8	Day 10-11	Day 13-14
Normal	Not-S.C	3.35	2.95	2.95	1.37
Control	5×10 <sup>5</sup>	3.46	2.21	2.68	0.63
MIX-3%	5×10 <sup>5</sup>	3.56	2.37	2.56	0.75
MIX-5%	5×10 <sup>5</sup>	3.67	2.63	2.40	0.32
MIX-7%	5×10 <sup>5</sup>	3.59	2.75	2.16	0.77

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later colon26 cell line *S.C* was measured for body weight in cachexia-induced BALB/c mice. Time course Of AIN-76 food intake was measured for body weight on two interval day. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and Colon26 *S.C* injected mice group (control). Mice were used in group of 10.



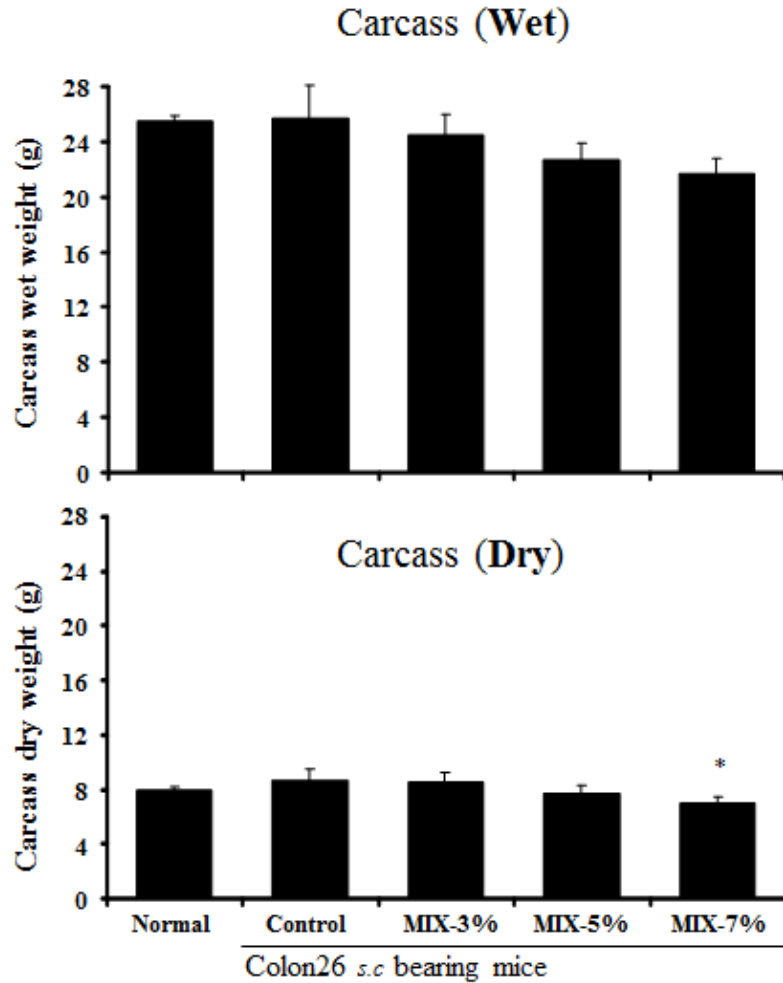
**Fig. 40. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on body weight of colon26 bearing mice**

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later colon26 cell line *S.C* was measured for body weight in cachexia-induced BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3% ■, 5% ▲, and 7% ■) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and Colon26 *S.C* injected mice group (control, ◆), only AIN-76 semipurified diet group (Normal, ●). Mice were used in group of 10. Each point represents the mean.



**Fig. 41. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on tumor weight of colon26 bearing mice**

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later colon26 cell line *S.C* was measured for tumor weight in cachexia-induced BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and Colon26 *S.C* injected mice group (control). The results are expressed the means±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).



**Fig.42. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on weight of carcass (wet and dry) of colon26 bearing mice.**

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later colon26 cell line *S.C* was measured for weight of carcass (wet and dry) in cachexia-induced BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and Colon26 *S.C* injected mice group (control). Normal mice were conducted only one for AIN-76 semipurified diet group. The results are expressed the means±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

**Table 9. Effect of NFM extract mixture on blood parameters of colon26 bearing mice**

Group	Colon26 S.C	Serum parameter level			
		Total Protein (g/dL)	Albumin (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Ferritin (ng/ml)
Normal	Not-S.C	1.60±0.50	0.55±0.14	31.5±5.49	0.09±0.010
Control	5×10 <sup>5</sup>	1.25±0.65	0.60±0.20	59.0±10.1	0.15±0.001
MIX-3%	5×10 <sup>5</sup>	2.30±0.84	0.80±0.18	46.0±4.80	0.16±0.010
MIX-5%	5×10 <sup>5</sup>	4.85±0.14	1.75±0.04	47.2±7.01	0.18±0.001
MIX-7%	5×10 <sup>5</sup>	2.70±0.90	1.81±0.44	38.8±6.13	0.17±0.017

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and fourteen day later colon26 cell line *S.C*, the blood was collected and the level of each parameters in serum was measured in cachexia-induced BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for fourteen day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and Colon26 *S.C* injected mice group (control). Normal mice were conducted only one for AIN-76 semipurified diet group. The results are expressed the means±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

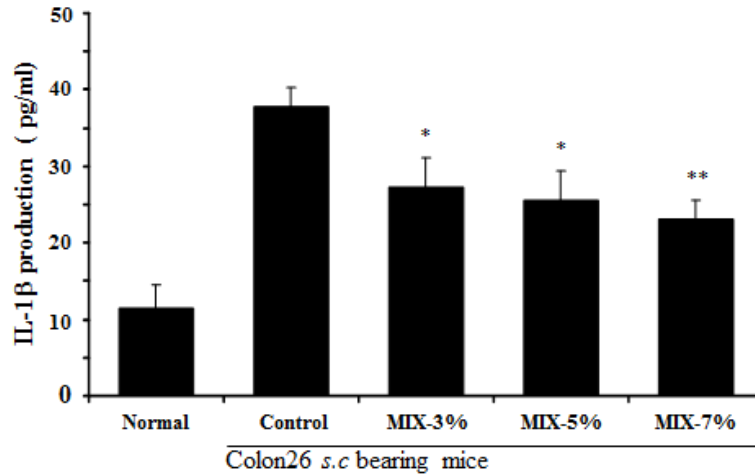
**Table 10. Effect of NFM extract mixture on plasma and serum parameters of colon26 bearing mice**

Group	Colon26 S.C	Serum parameter level			
		Triglyceride (mg/dL)	Total Cholesterol (mg/dL)	HDL Cholesterol (mg/dL)	Free Fatty acid (uEq/L)
Normal	Not-S.C	45.3±6.17	26.5±14.5	104.4±2.69	3120±193
Control	5×10 <sup>5</sup>	24.75±1.88	65.5±24.5	92.0±4.66	1585±105
MIX-3%	5×10 <sup>5</sup>	64.5±21.50	39.0±11.5	93.5±7.43	1834±59
MIX-5%	5×10 <sup>5</sup>	36.3±4.41	134±2.0	68.5±11.06	2323±165
MIX-7%	5×10 <sup>5</sup>	32.6±7.30	72.0±21.4	74.5±5.72	2278±277

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and fourteen day later colon26 cell line *S.C*, the blood was collected and the level of each parameters in plasma (TG) and serum (other parameters) was measured in cachexia-induced BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for fourteen day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and Colon26 *S.C* injected mice group (control). Normal mice were conducted only one for AIN-76 semipurified diet group. The results are expressed the means±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

③ 염증유발 사이토카인 및 Leptin 생산량 측정

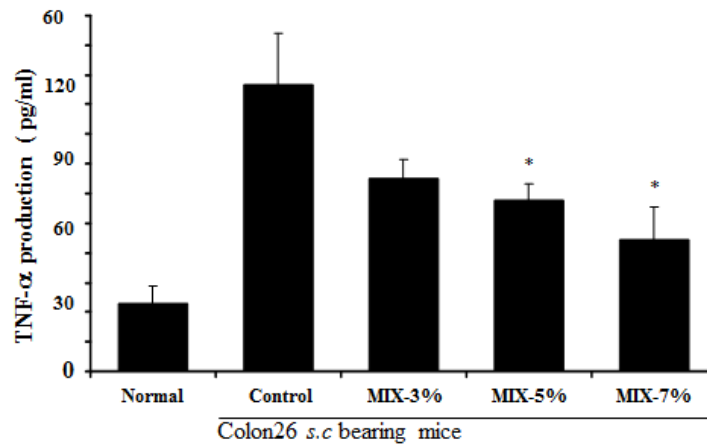
Fig. 43과 Fig. 44, 그리고 Fig. 45는 Colon26 세포주로 cachexia를 유도한 생쥐에게 정상식이와 혼합천연식품소재 조성물을 경구투여하여 염증유발 사이토카인 및 Leptin 생산량을 분석한 결과이다. 실험 결과 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Leptin 생산량이 유의적으로 낮았다. 이러한 결과는 cachexia 증상을 약화시킨 것으로 추측된다.



**Fig. 43. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on serum IL-1b level of colon26 bearing mice.**

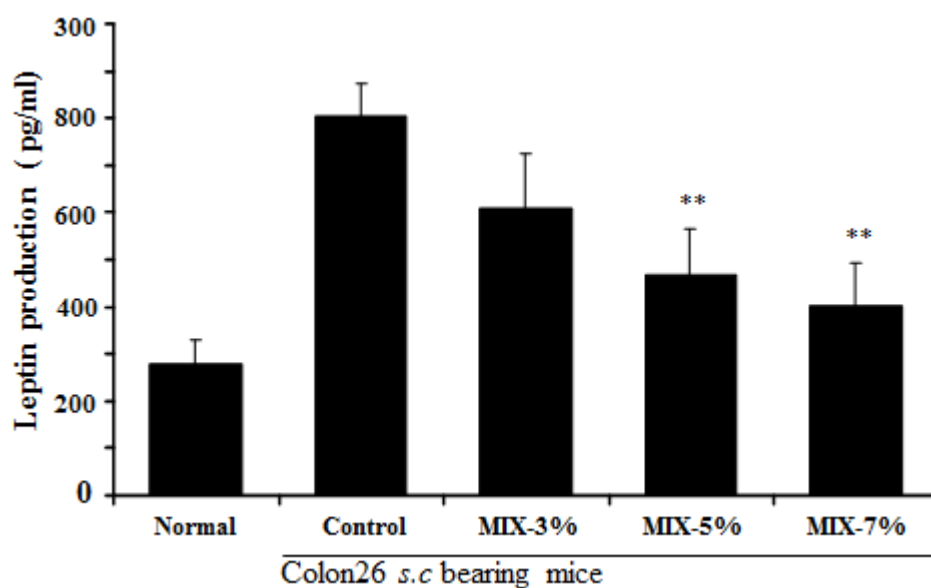
Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later colon26 *s.c* inject was measured in BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and colon26 *s.c* injected mice group (control). Normal mice were conducted only one for AIN-76 semipurified diet group. The mice serum were collected 14 day hrs later colon26 *s.c* injected and serum IL-1b level was assay by ELISA kit. and the other methods for assay were performed as described *in Materials and Methods*. The results are expressed the means $\pm$ S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001).





**Fig. 44. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on serum TNF- $\alpha$  level of colon26 bearing mice.**

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later colon26 *s.c* inject was measured in BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and colon26 *s.c* injected mice group (control). Normal mice were conducted only one for AIN-76 semipurified diet group. The mice serum were collected 14 day hrs later colon26 *s.c* injected and serum TNF- $\alpha$  level was assay by ELISA kit. and the other methods for assay were performed as described *in Materials and Methods*. The results are expressed the means $\pm$ S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001).

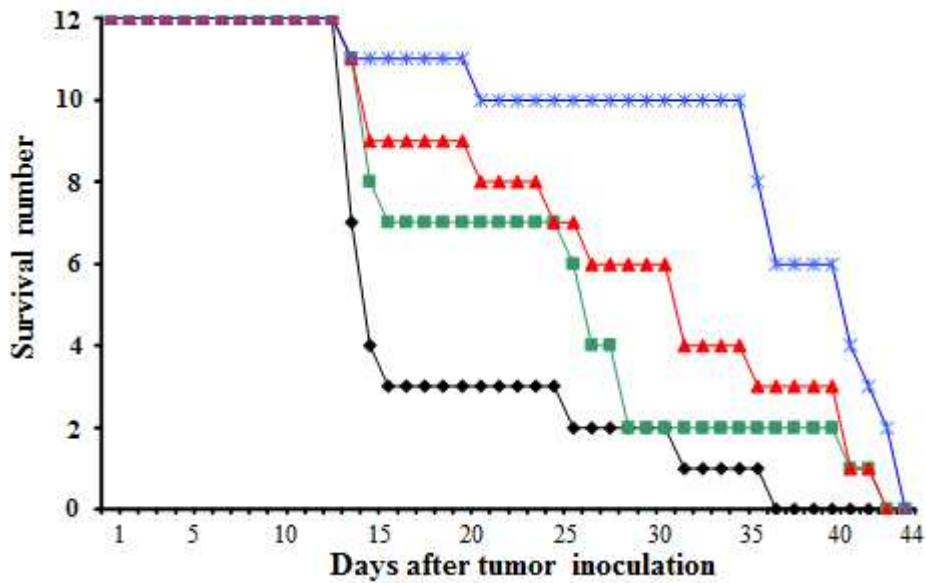


**Fig. 45.** Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on serum Leptin level of colon26 bearing mice.

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later colon26 *s.c* inject was measured in BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3%, 5%, and 7%) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and colon26 *s.c* injected mice group (control). Normal mice were conducted only one for AIN-76 semipurified diet group. The mice serum were collected 14 day hrs later colon26 *s.c* injected and serum Leptin level was assay by ELISA kit. and the other methods for assay were performed as described *in Materials and Methods*. The results are expressed the means±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

④ 생명연장곡선 측정

Fig. 46은 Colon26 세포주로 cachexia를 유도한 생쥐에게 정상식이와 혼합천연식품소재 조성을 경구투여하여 단순히 생명연장을 살펴본 것이다. 대조군은 일찍부터 사멸하기 시작하여 최종 생존일 37일로 다른 군들에 비해서 짧은 편이었다. 혼합천연식품소재 조제물 Mixture 3% 섭취군은 17~25일까지 꾸준히 사멸되다가 다시 28~40일 사이에 사멸이 일어났다. Mixture 5% 섭취군은 사멸수의 비율이 일정하였으며, Mixture 7% 섭취군은 20~35일 사이가 사멸시기였으며, 이 시기를 벗어나면 44일까지 생존하였다. 이것으로 미루어 혼합천연식품소재 조제물 Mixture 7% 섭취군에서 생명연장의 의미를 찾을 수 있었다.



**Fig. 46. Effect of natural food materials extract mixture and AIN-76 semipurified diet on survival time of colon26 bearing mice.**

Mice pre-treated with natural food materials extract mixture (*BCN + ARL + CGD*) and 14 day later colon26 *s.c* inject was measured in BALB/c mice. Mice were orally administered with natural food materials extract mixture (3% ■, 5% ▲, and 7% ×) for 14 day once daily. All mice were conducted one for AIN-76 semipurified diet and colon26 *s.c* injected mice group (control, ◆) and drug treatment was continued until the host mice died and the other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*. Mice were used in group of 10. Note that orally administered of 7% natural food materials mixture (×) and AIN-76 significantly prolonged survival.

## 라. 세포성장 촉진 천연식품소재 개발

### (1) Human Keratinocyte를 이용한 세포성장률 실험

들깨씨와 유채씨가 대조군 대비 100 % 이상의 세포 성장율을 나타내었다. 들깨씨의 경우 0.16 PPM의 농도에서 21.8 %, 유채씨의 경우는 0.078 PPM의 농도에서 14.8 %의 세포성장률 증가를 나타내었으며, 그 밖의 4종의 식품소재에서는 세포 성장률 증가 양상이 나타나지 않았다(Fig. 47).

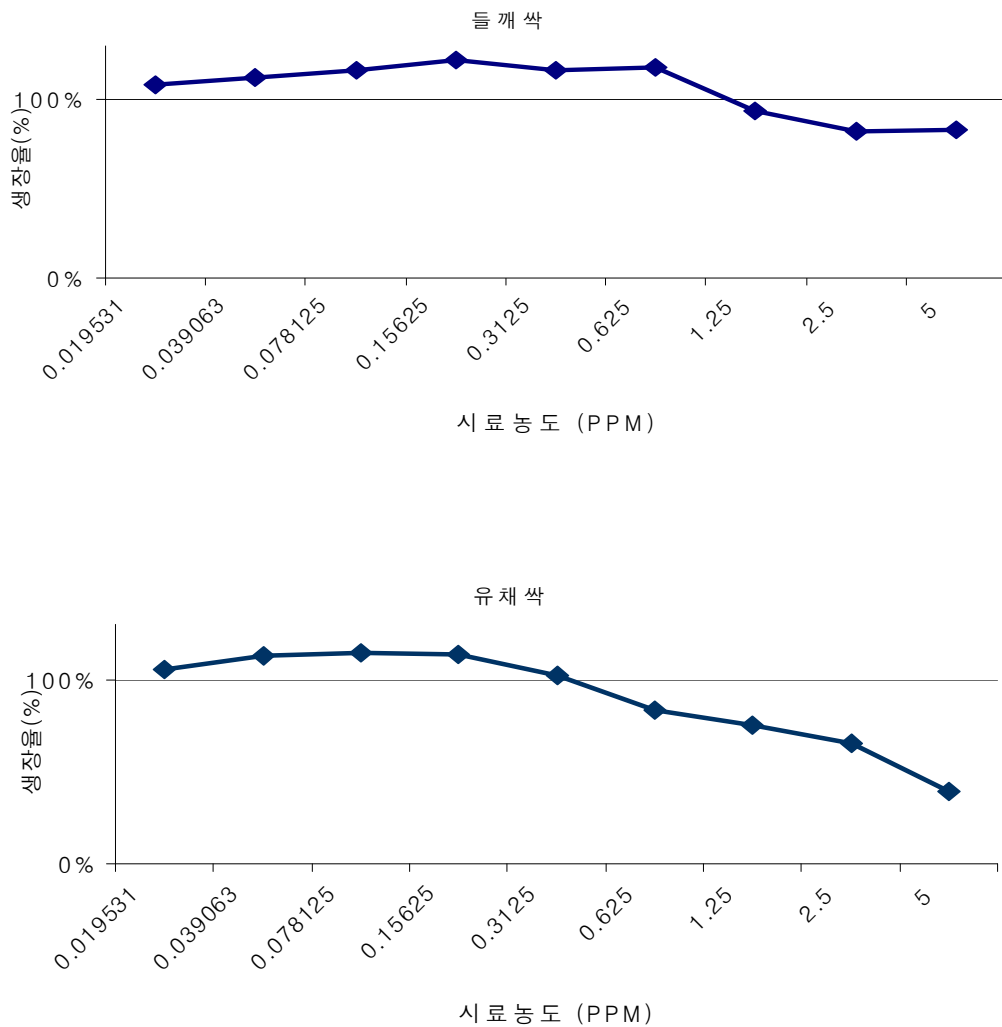


Fig. 47. HaCat cell growth rate of PFS & BCS extract.

## 제 2 절 선별된 소재를 활용한 기본 복합 처방 및 암종별 처방 개발

### 1. 연구 내용

#### 가. 효능 검증을 통한 기본 처방 확립

항암제의 부작용은 항암제가 암 세포뿐만 아니라 정상 세포까지도 독성을 나타내어 종양 세포를 살해하는 동시에 골수 조혈 기능을 억제하고, 소화 기능 및 전신에 반응하여 부작용을 유발하여 인체의 면역기능을 저하시키는 문제점이 노출되고 있는데, 항암제의 부작용의 95%에서 골수 조혈 기능과 90%에서 면역계통에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 암 환자에 있어서 항암치료에 의한 골수부전으로 혈구감소증 등의 부작용을 감소시키는 조혈증진 식품인 AKP(기본곡류베이스인 현미, 찰흑미, 율무, 마 및 공통효능원료인 작두콩, 다채썩, 유채썩, 오가피 혼합 분말)와 이를 발효한 AKP\_F에 관한 조혈증진 시험을 시행하였다. HPLC분석으로 isoorientin의 패턴을 확인하여 지표성분을 동정하였고, 마찬가지로 ASS의 조합물에서도 chlorogenic acid, caffeic acid, sesamin 지표성분을 확인하였다. CGD, ASS, BCN, BCS 복합추출물의 성분함량을 분석한 결과, isoorientin 함량은 0.008 (%)이었고, chlorogenic acid 함량은 3.358 (%), caffeic acid 함량은 0.057 (%), 그리고 sesamin 함량은 0.072 (%)로 나타났다. CTX로 골수부전이 유도된 생쥐의 골수에서 Sca-1+ 조혈모 세포를 분리한 후 CGD, CGD\_ASS, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, chlorogenic acid, RG에 대한 조혈증진 효과를 관찰하여 IL-3, SCF, 그리고 c-kit mRNA 유전자 발현과 IL-3,와 SCF 생산량을 유의성 있게 증가시켰다. 이러한 결과에서 CGD\_ASS\_BCS\_BCN과 RG 처리군이 조혈증진관련 IL-3, SCF, c-kit mRNA 유전자 발현에 대하여 상승효과를 나타내는 것으로 생각된다. ELISA 결과는 CGD\_ASS\_BCS\_BCN 복합물이 각각의 CGD, ASS, BCS, BCN 처리군에 비하여 조혈성사이토카인의 생산을 더 상승 조절한다는 것을 알 수 있다. 그리고 CGD\_ASS\_BCS\_BCN과 RG 추출물 처리군은 대조군에 비하여 각각 2배 이상 통계학적으로 유의성 있게 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> 활성세포가 증가를 나타내었다 (p<0.001). 그러나 AKP와 AKP\_F 처리군의 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> 활성세포 수는 대조군(control)과 차이를 나타내지 않았다. CGD, ASS, CGD\_ASS, chlorogenic acid 그리고 RG 처리군에 비하여 인산화된 JAK2/GATA-1/ STAT-5a/b 단백질이 증가되었고, 이는 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 신호전달을 따르는 조혈성사이토카인 발현에 조절되는 중요한 기전연구를 뒷받침 해주는 결과라 할 수 있다. CGD\_ASS 혼합추출물이 각각의 ASS와 CGD 투여군에 비하여 인산화된 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 단백질이 증가되었고, 이는 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 신호전달을 따르는 조혈성사이토카인 발현에 조절되는 중요한 기전연구를 뒷받침 해주는 결과라 할 수 있다. 또한 CGD\_ASS\_BCS\_BCN이 각각의 CGD, ASS, BCS, BCN 투여군에 비하여 CFU-GEMM 분화에 대하여 상승효과와 과립구계, 적혈구계, 거핵구계 미성숙세포집락을 형성할 수 있는 조혈모세포를 증식시키는 효과가 있을 것으로 생각된다. C57BL/6 생쥐를 각각 10마리씩 구분한 후 정상군, 대조군(CTX 주사), 14일간 CGD\_ASS\_BCS\_BCN (200 mg/kg), AKP (200 mg/kg), AKP\_F (200 mg/kg) 그리고 RG추출물 (200 mg/kg) 실험군으로 구분하였다. CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F

그리고 RG추출물을 경구투여 10일후 CTX (100 mg/kg)을 복강에 주사하였다. CTX 주사 4일 후에 ethyl ether로 마취한 후 실험결과를 도출하였다. AKP 추출물 200 mg/kg 투여군 보다도 유산균 발효한 ALP\_F 투여군의 개선 효과가 좀더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 효능강화의 결과라고 생각된다.

## 나. 한의학적 암 분류에 따른 맞춤형 처방 개발

항암치료 후 암 유병자의 빠른 회복을 돕고 건강증진 및 건강유지의 목적으로 편리하게 섭취할 수 있는 식품 조성을 구성하기 위한 접근방법으로는 (주)엔자임바이오가 운영하는 자연치유 건강수련센터(바이오마을)에서 현재까지 15년간 암 유병자를 대상으로 하는 정기 건강수련회에서 축적된 임상자료를 기본 자료로 활용하였다.

바이오마을에서는 암 유병자를 한의학적 원리를 근간으로 하여 혈액암, 근육암, 림프암의 3가지 유형으로 분류하는 접근방식을 취하였다. 이에 따라 간암, 뇌혈류 관련 질병(혈전증, 중풍)을 포함하는 혈액암 유형, 위암, 대장암, 직장암, 담도암, 피부암, 자궁(근종), 신장암을 포함하는 근육암 유형, 그리고 순환계 및 호르몬 계통 관련, 유방암, 임파선 암, 갑상선암, 전립선 암, 자궁(근종)을 포함하는 림프암 유형으로 분류하였다.

이를 이용하여 암종별 처방을 개발하였다.

## 2. 연구 방법

### 가. 세포재생/조혈증진/면역강화 기본 처방 확립

소재 스크리닝 연구결과를 토대로 각각 효능별로 조혈, 면역증진, 세포재생 효능을 갖는 소재 중 효능이 뛰어나고 원료의 수급이 용이한 원료를 선별하여 공통원료로 하였다. 각 효능별로 한 가지씩의 소재를 선정하되, 조혈의 경우는 작두콩과 다채싹이 상호 상승효과를 나타내는 것을 확인하여 두 가지 소재를 모두 사용하였다.

#### (1) 최종 선정된 효능 천연물

선별된 4개의 혼합천연식품소재(Table 11)에 대한 조혈증진효과를 홍삼(RG, (주)휴림)과 비교 관찰함.

Table 11. Prescription of CGD, BCN, ASS, BCS extract

No.	천연식품소재	학 명	약 어	효능
1	작두콩	Canavalia gladiata dc	CGD	조혈
2	다채싹	Brassica campestris var narinosa sprout	BCN	조혈
3	오가피	Acanthopanax sessiliflorum Seeman	ASS	면역
4	유채싹	Brassica campestris sprout	BCS	세포생장

\*Red ginseng extract : (주)휴림에서 공급

(2) 선정된 효능 천연물의 일반 특징

Table 12. 조혈 증진, 면역 강화, 세포성장 촉진 효능 천연물 및 특징

천연물명	특징
작두콩	<p>열대 아시아 원산이며 식용으로 재배함. 잎은 잎자루가 길고 3개의 작은잎으로 됨. 작은잎은 달걀 모양의 긴 타원형으로 끝이 뾰족하고 길이 10cm 정도이며 가장자리는 물결 모양임. 꽃은 연한 홍자색 또는 흰색이고, 여름에 잎겨드랑이에서 긴 꽃줄기가 자라서 총상으로 달림. 꼬투리 끝이 굽어 있거나 갈고리 모양을 하고 있고 길이 20~30cm, 나비 5cm 내외이며 10개 내외의 콩이 들어 있음. 콩은 3cm 정도이고 한쪽에 긴 좌(座)가 있으며 붉은색 또는 흰색임. 적색종은 꼬투리를 이용하고, 백색종은 콩을 주로 이용함. 치질·축농증·중이염·위염·대장염 등에 큰 효과가 있음. 열매가 작두같이 생겼으므로 작두콩이라고 함.(두산백과)</p> <p>학문적으로 작두콩(<i>Canavalia gladiata</i>, sword bean)은 장미목 콩과에 속하는 한해살이 덩굴성 식물로서, 줄기에는 털이 없으며 콩 낱알 한 개의 길이가 2~3 cm이고, 무게는 1.5~3 g으로, 콩의 여러 종류 중에서 크기가 가장 크고 맛도 가장 뛰어난 것으로 알려져 있음. 작두콩의 색깔은 붉은색 또는 흰색이 있으며, 모두 식용으로 사용가능함. 작두콩의 종자, 껍질, 잎, 줄기, 뿌리 등 모든 부위는 식품소재로 활용될 수 있으며, 작두콩에는 가수분해 효소인 우레아제(urease), 혈구응집소(hemagglutinin), 카나발린(canavalin), 리놀렌산, 사포닌, 콜린, 레시틴, 식이 섬유소, 그리고 단백질 등의 다양한 생리활성물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있어, 기능성 식품 및 의약품 소재로서 주목받고 있음. 작두콩은 한방에서는 도두(刀豆)라고 하며, 염증을 없애는 작용이 뛰어나고 신체의 면역력을 키워주기 때문에 각종 중기나 화농성 질병에 효과가 있으며, 뱃속을 따뜻하게 하고 친식, 가래, 관절염, 신허요통에 효과가 있고, 신장을 튼튼하게 하고 이수작용이 있어 관절염, 신허요통, 변비, 비만증 등을 두루 치료한다고 알려져 있음.</p>
다채쌈	<p>다채(<i>Brassica campestris</i> var <i>narinosa</i>, BCN, Tatsoi)는 십자화과에 속하는 녹황색 채소임. 비타민 성분이 많이 함유되어, 비타민 또는 비타민채라고도 함. 본래는 포기를 크게 키우는 것이지만, 우리나라에서는 주로 싹기름채소(새싹채소)로 이용됨. 비타민A의 전구체인 카로틴의 함량이 시금치의 2배나 되며, 대채 100g에 성인 하루 비타민 필요량의 80%를 함유하고 있어, 조혈 작용을 돕고 혈액 순환을 좋게 하여, 빈혈을 예방한다고 보고하고 있음<sup>8)</sup>.</p>
오가피	<p>성질은 따뜻하며[溫](약간 차다[微寒]고도 한다) 맛은 맵고 쓰며[辛苦] 독이 없다. 5로 7상을 보하며 기운을 돕고 정수를 보충한다. 힘줄과 뼈를 단단히 하고 의지를 굳세게 하며 남자의 음위증과 여자의 음부가려움증을 낫게 한다. 허리와 등골뼈가 아픈 것, 두 다리가 아프고 저린 것, 뼈마디가 조여드는 것, 다리에 힘이 없어 늘어진 것 등을 낫게 한다. 어린이가 3살이 되어도 걷지 못할 때에 먹이면 걸어다닐 수 있게 된다.(동의보감)</p> <p>산과 들에 있는데 나무는 잔 떨기나무이고 줄기에는 가시가 돋고 다섯갈래의 잎이 가지 끝에 난다. 꽃은 복숭아꽃 비슷한데 향기롭다. 음력 3-4월에 흰 꽃이 핀 다음 잘고 푸른 씨가 달린다. 6월에 가면 차츰 검어진다. 뿌리는 광대싸리뿌리 비슷한데 검은 검누른 빛이고 속은 희며 심은 단단하다. 음력 5월과 7월에는 줄기를 베고 10월에는 뿌리를 캐어 그늘에서 말린다(본초강목)</p>
유채쌈	<p>성질이 따뜻하고[溫] 맛이 매우며[辛] 독이 없다. 유풍(遊風), 단종(丹腫), 유옹(乳癰)을 치료하며 경결과 어혈을 해친다.(동의보감)</p> <p>맛이 맵고 성질이 따뜻하다. 결절을 풀어 해치고 어혈을 제거하고 독을 풀어낸다.(본초강목)</p> <p>비타민C, 카로틴, 단백질의 함량이 높다.</p>

## 나. 기본 처방의 효능 검증

### (1) 지표성분 분석

CGD, ASS, BCS, BCN 복합추출물 분석을 위한 HPLC(Waters 2695 system, Waters Co. USA)는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector(Agilent Technologies, Germany), degasser(Agilent Technologies, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software(Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 25°C, 분석과장은 250 nm, 유속은 0.3 ml/min를 사용하였고, 컬럼은 Luna C18 column(250mm x 4.6 mm; particle size 5 µm, Phenomenex, USA)를 사용하였다. A용매로 0.1% trifluoroacetic acid 함유 3차 증류수 및 B용매로 아세트니트릴을 사용하였으며 용매계는 용매기울기 용리로서 다음과 같다(Table 1). CGD, ASS, BCS, BCN 복합추출물의 조합물의 지표성분으로 isoorientin, chlorogenic acid, caffeic acid, sesamin을 표준시료로 하여 함량분석을 하였다.

### (2) 세포독성에 미치는 영향

세포독성방법은 EZ-Cytox assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. 사람의 정상섬유아세포 (human fibroblast cells, hFCs)는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간 배양한 후 CGD, ASS, BCS, BCN 그리고 조합혼합추출물 AKP, 이를 발효시킨 AKP\_F, 또한 RG (홍삼)추출물 (최종 농도 400, 200, 100, 50 µg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 µl씩 각 well에 가하고 실험 종료 시까지 배양한다. 이 plate를 plate shaker(Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA LEADER (molecular devices, U.S.A)에서 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

### (3) 조혈모세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효과 분석

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1<sup>+</sup> isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 CGD, ASS, BCS, BCN, AKP, AKP\_F, RG (100 µg/ml, 10 µg/ml 농도)와 chlorogenic acid (20 µg/ml, 2 µg/ml 농도)를 3시간동안 배양기 (37°C, CO<sub>2</sub>, Napco, USA)에 배양하였다. 배양한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 RNAzol<sup>B</sup>를 이용하여 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 real-time-PCR에 사용하였다.

### (4) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효과 분석

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서



Sca-1<sup>+</sup> isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG (100 μg/ml, 10 μg/ml 농도) 추출물을 48시간동안 배양기 (37°C, CO<sub>2</sub>, Napco, USA)에 배양하였다. 배양한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하여 냉동고에 보관 한 후, ELISA (R&D system)로 배양상층액내의 IL-3와 SCF 단백질의 양을 측정하였다.

#### (5) 조혈모세포(HSCs)에서 유세포 형광분석

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1<sup>+</sup> isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG (100 μg/ml, 10 μg/ml 농도) 추출물 처리하고, 6시간 후 RPMI-1640 배양액으로 각 well을 세척한 후 새로운 배양액으로 24 시간 동안 CO<sub>2</sub> 조직배양기에서 배양하였다. 배양한 후 상층액을 제거한 다음 Sca-1<sup>+</sup>HSCs세포를  $5 \times 10^5$  Cells/ml 세포로 조정된 후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였으며, 각각에 anti-CD117-FITC,와 anti-Sca-1-PE를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 PBS로 수세한 후 flow cytometry의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD117<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> 활성세포수를 백분율(%)로 분석 산출하였다.

#### (6) 조혈모세포(Sca-1<sup>+</sup>HSCs)에서 JAK2/GATA-1/STAT-5의 인산화활성분석

CGD, ASS, CGD\_ASS, chlorogenic acid 그리고 RG에 의한 단백질 인산화(protein phosphorylation)

##### (가) 세포배양 및 CGD, ASS, CGD\_ASS, chlorogenic acid 그리고 RG추출물 처리

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide(CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1<sup>+</sup> isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 양성 대조군으로서 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)로 자극시키거나 또는 rIL-3 (100 U/ml)와 rSCF (100 ng/ml)에 CGD (100 μg/ml), ASS (100 μg/ml), CGD\_ASS (100 μg/ml), chlorogenic acid (20 μg/ml), 그리고 RG (100 μg/ml) 추출물을 30분 동안 동시 배양하였다.

##### (나) Immunoblotting 및 면역침강(Immunoprecipitation)

CGD, ASS, CGD\_ASS, chlorogenic acid 그리고 RG추출물을 처리한 세포의 cell lysates(≈20 μg)에 각각 anti-phosphotyrosine, anti-GATA-1, anti-STAT-5a/b(10 μg/ml)와 proteinA-sepharose를 첨가하여 4°C에서 4시간 반응시킨 후 3회 D-PBS로 세척하고, 면역복합체를 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF membrane에 전이시켜 anti-phosphotyrosine-HRP(1:4000)와 반응시켜 immunoblotting 분석하였다.

#### (7) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정

C57bl/6 생쥐에 cyclophosphamide (CTX)를 주사하고 4일 후 대퇴골(femur)에서 Sca-1+ isolation kit를 이용하여 Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 순수분리하여 35mm 플레이트중 rEPO 및 rIL-3이 포함된 돌베코 반고체 매트릭스 배양 배지 (Methocult H4100, StemCell Technologies)에 실시하였다. CGD\_ASS\_BCS\_BCN (10 µg/ml), AKP (10 µg/ml), AKP\_F (10 µg/ml) 그리고 RG (10 µg/ml)를 처리한 지 14일 후에 콜로니 수를 inverted 현미경 (NIKON)으로 관찰하고 1x10<sup>4</sup> HSCs 당 콜로니 수를 계산하였다. 8개의 과립구 및 erythrocytes 또는 3개 이상의 erythroid cluster를 포함하는 콜로니를 CFU-GEMM 또는 BFU-E (Erythroid-committed Stem Cells)로 콜로니 형성상에서의 콜로니 수를 측정하였다.

(8) CTX로 유도한 Leucopenia 및 thrombocytopenia유발생쥐모델에서 AKP, AKP\_F, and Red Ginseng의 부작용 감소 효과연구

Cyclophosphamide(CTX)는 무색 분말로 hydrated form 으로 존재하여 독성(toxic), 암유발(carcinogenic), 그리고 돌연변이를 유발(mutagenic)하는 물질로 알려져 있다. CTX를 동물에 투여하면 활성화되어 alkylating agent로 전환되어 다양한 non-malignant diseases에 사용되어 antineoplastic agent 및 면역억제제 (immunosuppressive) 역할을 하고, 그 부작용으로 골수, 말초, 림프, 흉선, 비장에서 백혈구감소증(leucopenia)과 혈소판감소증(thrombocytopenia)을 유발한다. 또한 골수에서는 미분화된 조혈모세포가 말초혈액으로 이동(migration)하는 원인을 제공하는 물질이다. C57BL/6 생쥐를 각각 10마리씩 구분한 후 정상군, 대조군(CTX 주사), 14일간 CGD\_ASS\_BCS\_BCN(200 mg/kg), AKP(200 mg/kg), AKP\_F(200 mg/kg) 그리고 RG 추출물(200 mg/kg) 실험군으로 구분하였다. CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F 그리고 RG추출물을 경구투여 10일후 CTX(100 mg/kg)를 복강에 주사하였다. CTX 주사 4일 후에 ethyl ether로 마취한 후에 다음과 같은 실험을 진행하였다.

- (가) 혈액을 분석하여 WBC 수의 변화 측정
- (나) ELISA로 IL-3와 SCF의 혈청 수준(level)을 측정
- (다) 마우스의 비장무게, 총 비장세포수, 총DLN수, 총흉선세포수, 대퇴골내의 총골수 세포수를 분석
- (라) 대퇴골내의 총골수 세포수를 분석
- (마) peripheral blood mononuclear cell (PBMC)을 분리하여 FACS로 분석
- (바) DLN를 적출하여 DLN세포를 분리하여 총DLN세포를 측정한 후 FACS로 분석
- (사) 흉선을 적출하여 흉선세포를 분리하여 총 흉선세포를 측정한 후 FACS로 분석
- (아) 비장을 적출하여 비장세포를 분리하여 총 비장세포를 측정한 후 FACS로 분석
- (자) 골수에서 골수세포를 분리하여 real-time PCR 로 조혈유전자 발현인 c-kit과 SCF의 mRNA 유전자 발현을 taqman 법으로 측정

### 3. 연구 결과 및 고찰

#### 가. 기본 처방의 효능 검증

##### (1) 지표성분 분석

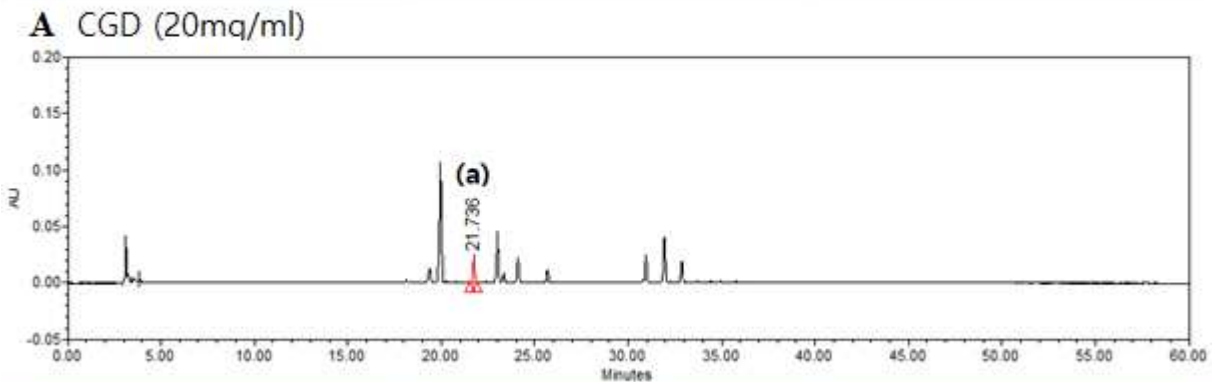
본 실험에 사용한 CGD, ASS, BCS, BCN 복합추출물은 대전대학교 부속한방병원에서 정선하여 구입한 후 추출물을 분리하였다. HPLC-DAD 분석을 통하여 CGD, ASS, BCS, BCN 복합추출물 성분에 함유된 지표성분을 동정하였다.

Table 13. Index Components in Quality of *the Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata DC* semen, *Tatsoi* sprouts, and *Acanthopanax sessiliflorum* seaman of combinational prescription extract.

	지표성분	CGD:ASS:BCS:BCN 성분함량(%)
(a)	Isoorientin	0.008
(b)	Chlorogenic acid	3.358
(c)	Caffeic acid	0.057
(d)	Sesamin	0.072

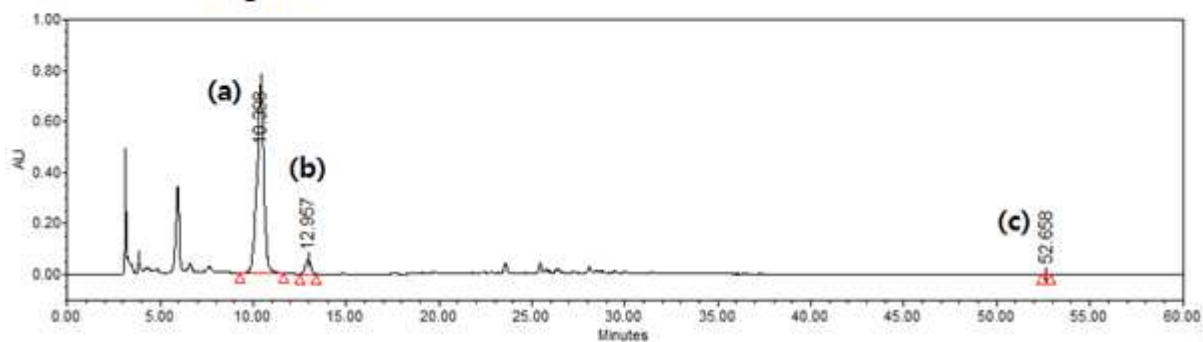
지표성분으로 확인된 isoorientin, chlorogenic acid, caffeic acid, sesamin 표준품의 UV spectrum과 머무름 시간이 일치하는 CGD 추출물의 isoorientin(Fig. 48A)의 패턴을 확인하여 지표성분을 동정하였고, 마찬가지로 ASS의 조합물(Fig. 48B)에서도 chlorogenic acid, caffeic acid, sesamin 지표성분을 확인하였다. CGD, ASS, BCS, BCN 복합추출물의 성분함량을 분석한 결과(Table2), isoorientin 함량은 0.008(%)이었고(Fig. 48D, 48C), chlorogenic acid 함량은 3.358(%), caffeic acid 함량은 0.057(%), 그리고 sesamin 함량은 0.072(%)로 나타났다 (Fig.48D, 48C). chlorogenic acid는 최근에 면역 반응, 염증, 조혈과정, 세포의 증식 및 분화 효능이 보고되어 CGD, ASS, BCS, BCN 복합추출물의 지표성분과 활성성분이 일치하였다.

	지표성분	함량(%)
<b>[a]</b>	<b>Isoorientin</b>	<b>0.013</b>



	지표성분	함량[%]
[a]	Chlorogenic acid	7.674
[b]	Caffeic acid	0.120
[c]	Sesamin	0.134

**B** ASS(20mg/ml)



	지표성분	CGD:ASS:BCN:BCS 성분 함량[%]
(a)	Isoorientin	0.008
(b)	Chlorogenic acid	3.358
(c)	Caffeic acid	0.057
(d)	Sesamin	0.072

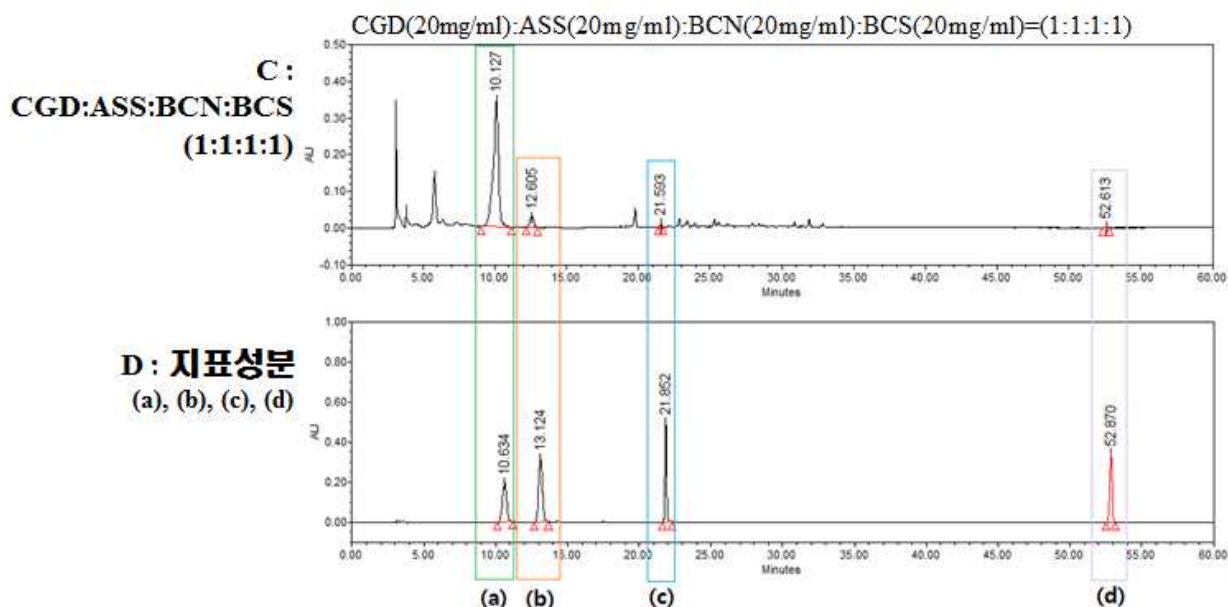


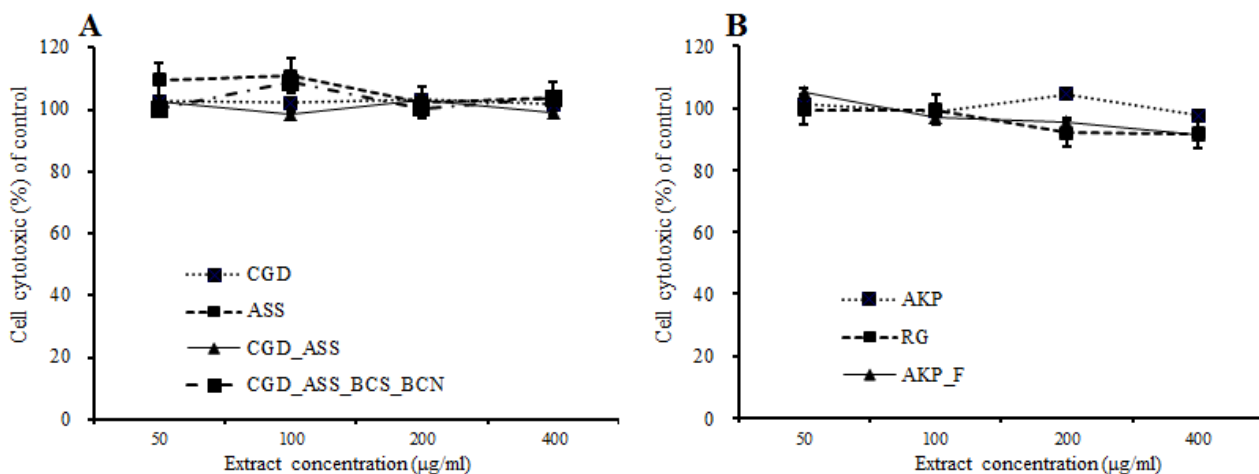
Fig. 48. HPLC chromatograms of standard mixture and extract of the *Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen, *Tatsoi* sprouts, and *Acanthopanax sessiliflorum* seaman of combinational prescription.

Chromatograms of *Canavalia gladiata* DC semen (CGD, A), *Acanthopanax sessiliflorum* seaman (ASS, B) and CGD, ASS, BCS, BCN 1:1:1:1 mixed (C) are recorded at 259 nm. Peaks of

Genistin are shown. The HPLC analysis was carried out on Waters 2695 system (Waters Co. Milford, MA, USA), consisting of a solvent delivery unit, an online degasser, an autosampler, and a photodiode array detector. A Luna C18 column (250mm x 4.6 mm; particle size 5  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA) was used for analysis, and the mobile phase 0.1% trifluoroacetic acid in water (A) and acetonitrile (B). The gradient flow was as follows: (A)/(B) = 10/90 (0 min; hold for 10 min)  $\rightarrow$  (A)/(B) = 60/40 (40 min)  $\rightarrow$  (A)/(B) = 0/100 (41 min; hold for 7 min)  $\rightarrow$  (A)/(B) = 10/90 (50 min; hold for 10 min). The flow rate was 1.0 ml/min, and the injection volume was 20  $\mu$ l.

## (2) 세포독성에 미치는 영향

세포독성을 정상 사람 섬유아세포 (human fibroblast cells)에서 EZ-Cytox assay 분석한 결과, CGD, ASS, BCS, BCN (Fig.49A) 그리고 조합혼합추출물 AKP, 이를 발효시킨 AKP\_F, 또한 RG (홍삼)추출물(Fig.49B)등 모든 처리군은 400  $\mu$ g/ml 이상에서부터 세포독성이 나타나지 않았다. 그래서 in vitro에서 Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 조혈증진관련 실험은 세포독성이 나타나지 않은 200  $\mu$ g/ml 이내에서 수행해도 안전하다는 결과를 얻었다.



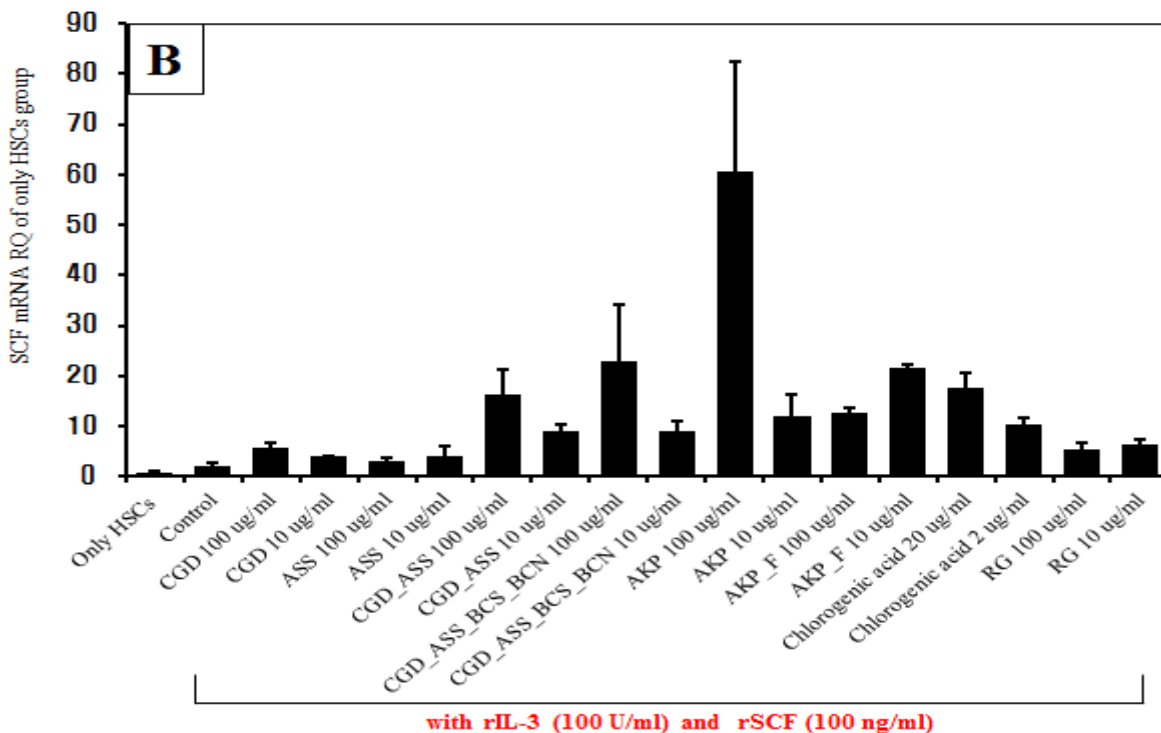
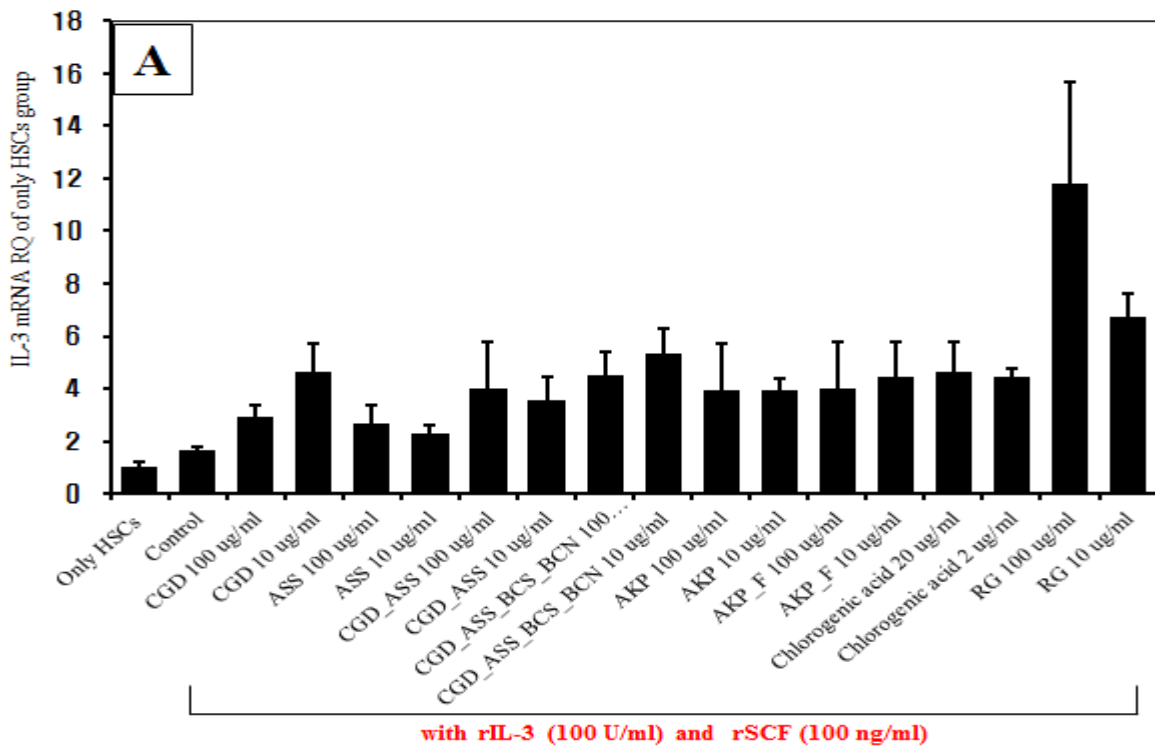
**Fig. 49.** Cytotoxicity effects of the *Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen, *Tatsoi* sprouts, and *Acanthopanax sessiliflorum* seeman of combinational prescription, extract (AKP), and its *Lactobacillus acidophilus* fermented product, AKP\_F on human fibroblast cells (hFCs).

Human fibroblast cells (hFCs) were pretreated with various concentration CGD, ASS, BCS, BCN and their combinational prescription, AKP, and its *Lactobacillus acidophilus* fermented product, AKP\_F. The results are expressed the mean $\pm$ S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01).

## (3) 조혈모세포 (HSCs)에서 real-time PCR을 이용한 조혈증진 효과 분석

Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 IL-3, SCF, c-kit mRNA를 분석한 결과, 무처리군인 only HSCs군에 비하여 rIL-3+rSCF을 처리한 대조군이 IL-3와 SCF mRNA

유전자 발현이 2배 이상 증가하였다. 대조군 (control)에 비하여 CGD, CGD\_ASS, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, chlorogenic acid, RG가 IL-3 (Fig. 50A)와 그리고 SCF (Fig. 50B) mRNA 발현이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 그리고 c-kit (Fig. 50C) mRNA 유전자 발현은 CGD\_ASS\_BCS\_BCN과 RG 처리군에서 대조군에 비하여 현저하게 증가를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 두 CGD\_ASS\_BCS\_BCN과 RG 처리군이 조혈증진관련 IL-3, SCF, c-kit mRNA 유전자 발현에 대하여 상승효과를 나타내는 것으로 생각된다.



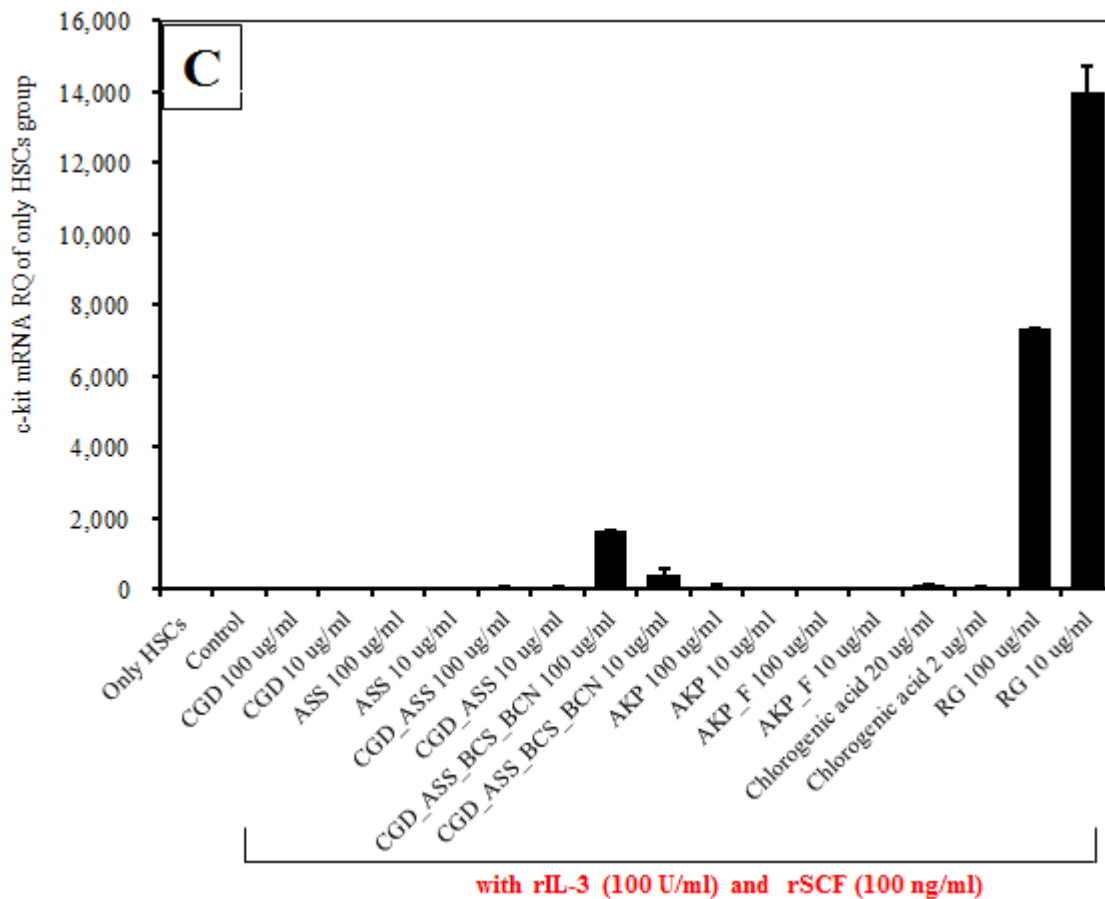
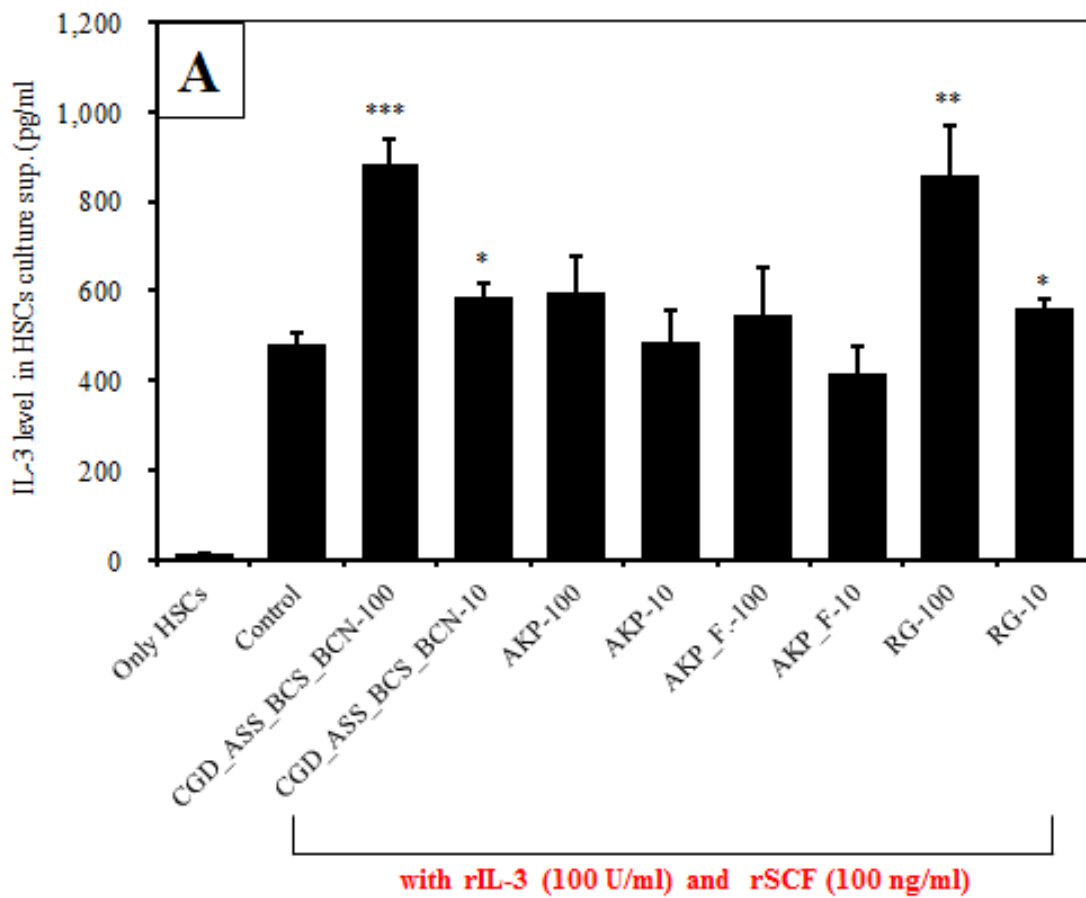


Fig. 50. Effects of the *Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen, *Tatsoi* sprouts, and *Acanthopanax sessiliflorum* seaman of combinational prescription. extract (AKP), and its *Lactobacillus acidophilus* fermented product, AKP\_F, and red ginseng (RG) on hematopoietic-related gene mRNA expression in Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells.

Isolated Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with CGD, ASS, BCS, BCN, AKP, AKP\_F, RG (100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) and chlorogenic acid (20  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml) with rIL-3/rSCF. Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with CGD, ASS, BCS, BCN, AKP, AKP\_F, RG (100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) and chlorogenic acid (20  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml) for 4hrs. IL-3 (A), SCF (B), and c-kit (C) mRNA express were measured real-time PCR. Data represent means $\pm$ S.E (N=2). Statistically significant value compared with only Sca-1<sup>+</sup>HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

(4) 조혈모세포(HSCs)에서 ELISA 분석을 이용한 조혈증진 효과 분석

Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 조혈증진관련 유전자인 IL-3와 SCF의 생산량을 측정 한 결과, 대조군 (control)에 비하여 CGD\_ASS\_BCS\_BCN과 RG(100 μg/ml, 10 μg/ml 농도) 추출물은 IL-3 (Fig. 51A) (p<0.001)와 SCF (Fig. 51B) (p<0.01)의 단백질 생산량이 농도 의존적으로 통계학적 유의성 있게 증가시키는 것을 알 수 있었다. 그러나 AKP와 AKP\_F는 대조군 (control)에 비하여 IL-3 (Fig. 51A)(p<0.05)와 SCF (Fig. 51B)의 단백질 생산량은 차이를 나타나지 않았다. 이러한 결과로 CGD\_ASS\_BCS\_BCN 복합물이 각각의 CGD, ASS, BCS, BCN 처리군에 비하여 조혈성사이토카인의 생산을 더 상승 조절한다는 것을 알 수 있다.





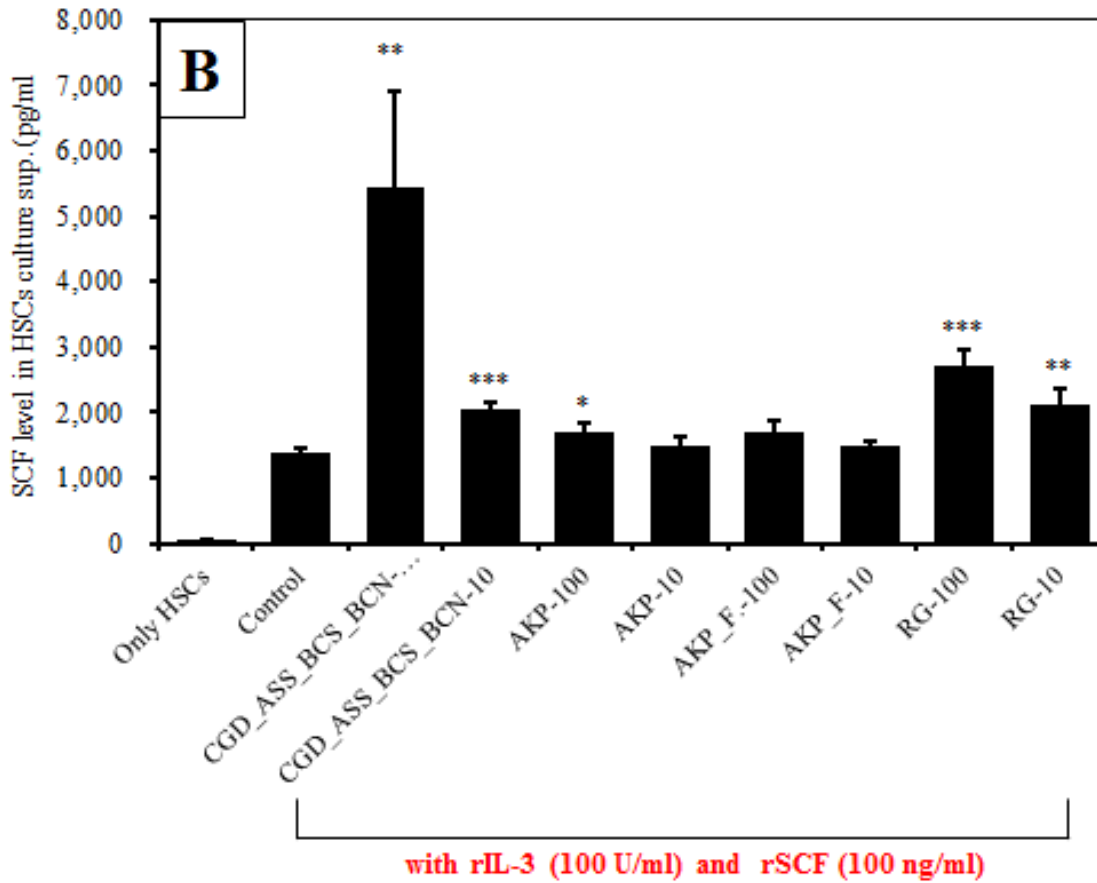


Fig. 51. Effects of the *Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen, *Tatsoi* sprouts, and *Acanthopanax sessiliflorum* seeman of combinational prescription. extract (AKP), and its *Lactobacillus acidophilus* fermented product, AKP\_F, and red ginseng (RG) on hematopoietic-related gene expression production in Sca-1<sup>+</sup> hematopoietic stem cells.

Isolated Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG (100 μg/ml, 10 μg/ml) with rIL-3/rSCF. Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG (100 μg/ml, 10 μg/ml) for 4hrs. The production of IL-3 (A), SCF (B) was measured at the ELISA kit (R&D system, USA). Data represent means±S.E (N=4). Statistically significant value compared with only Sca-1<sup>+</sup>HSCs group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

(5) 조혈모세포(HSCs)에서 유세포 형광분석

c-kit은 CD117로 HSCs의 세포표면에 존재하는 수용체 (receptor) c-kit ligand (SCF)가 binding하여 hematopoietic progenitor 세포의 기능과 성장 그리고 생존하는데 중요한 수용체이다. Sca-1<sup>+</sup>HSCs를 C57bl/6 생쥐의 대퇴골에서 Sca-1<sup>+</sup> isolation kit를 이용하여 순수분리하여 CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물을 48시간 동안 동시배양한 후 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>로 염색하여 FACS로 분석하였다. 그 결과, Fig. 52에서 보듯이 FACS로 분석한 dot-plot으로 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>를 염색한 것으로 only HSCs에 비하여 rIL-3/rSCF 대조군의 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> 활성화세포가 10배 이상 현저하게 증가하였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN과 RG 추출물 처리군은 대조군에 비하여 각각 2배 이상 통계학적으로 유의성 있게 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> 활성화세포가 증가를 나타내었다 (p<0.001). 그러나 AKP와 AKP\_F 처리군의 CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> 활성화세포 수는 대조군(control)과 차이를 나타내지 않았다.

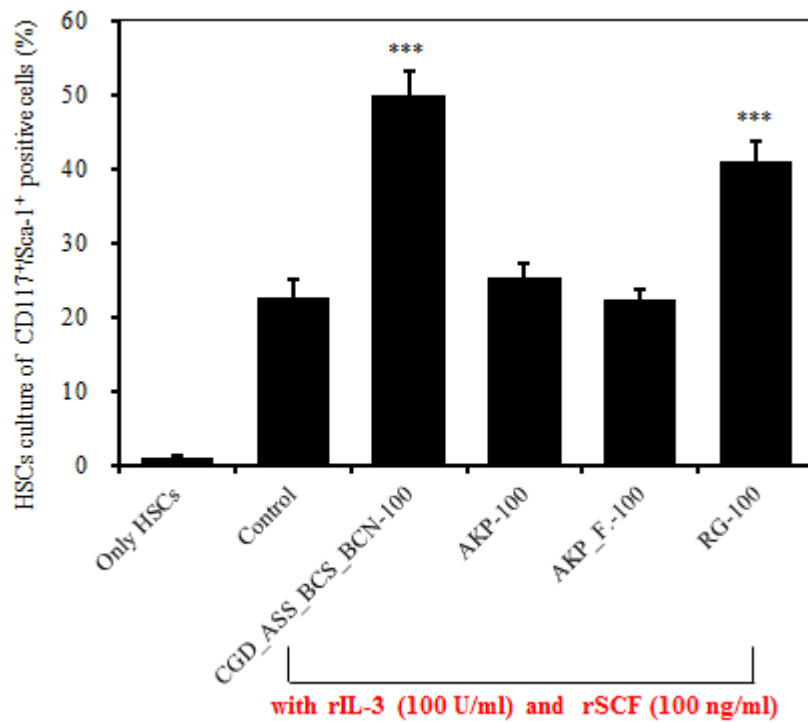


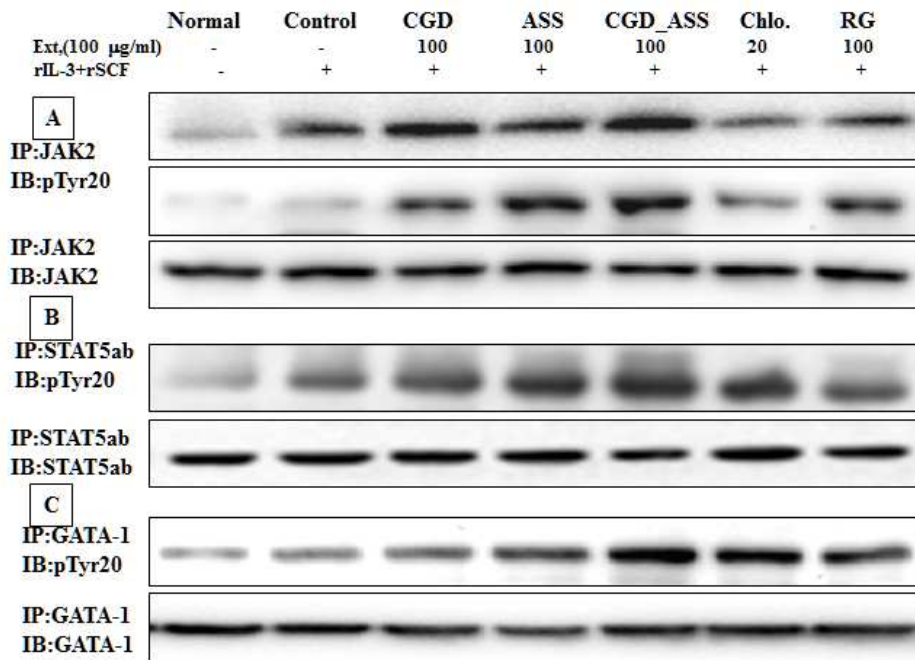
Fig. 52. Effects of the *Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata* DC semen, *Tatsoi* sprouts, and *Acanthopanax sessiliflorum* seeman of combinational prescription. extract (AKP), and its *Lactobacillus acidophilus* fermented product, AKP\_F, and red ginseng (RG) on CD117<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> positive cells in Sca-1<sup>+</sup> hematopoietic stem cells.

Isolated Sca-1<sup>+</sup> hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG (100 µg/ml, 10 µg/ml) with rIL-3/rSCF. Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG (100 µg/ml, 10 µg/ml) for 24hrs.

(6) 조혈모세포(Sca-1<sup>+</sup>HSCs)에서 JAK2/GATA-1/STAT-5의 인산화활성분석

Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 JAK2/GATA-1/STAT5 경로를 활성 인산화를 분석한 결과, 무처리군인 only HSCs군 (Fig. 53A, 53B, 53C, lane 1)에 비하여 rIL-3+rSCF을 처리한 대조군 (lane 2)이 IP:JAK2/STAT5ab 경로에서 활성 인산화가 증가되었다. 그리고 CGD 추출물 (lane 3)과 ASS 추출물 (lane 4)을 각각 처리한 후 보다는 CGD\_ASS 혼합추출물 (lane 5)이 IP:JAK2/GATA-1/STAT5 경로에서 활성인산화가 증가되었다. 그리고 ASS에 많이 함유된 chlorogenic acid 처리군 (lane 6)은 대조군에 비하여 IP:JAK2/GATA-1/STAT5 경로에서 활성인산화가 증가되었다. 또한 RG 처리군 (lane 7)은 IP:GATA-1 경로에서만 대조군에 비하여 활성인산화가 증가되었다.

이러한 결과에서 CGD\_ASS 혼합추출물이 각각의 ASS와 CGD 투여군에 비하여 인산화된 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 단백질이 증가되었고, 이는 JAK2/GATA-1/STAT-5a/b 신호전달을 따르는 조혈성사이토카인 발현에 조절되는 중요한 기전연구를 뒷받침 해주는 결과라 할 수 있다.

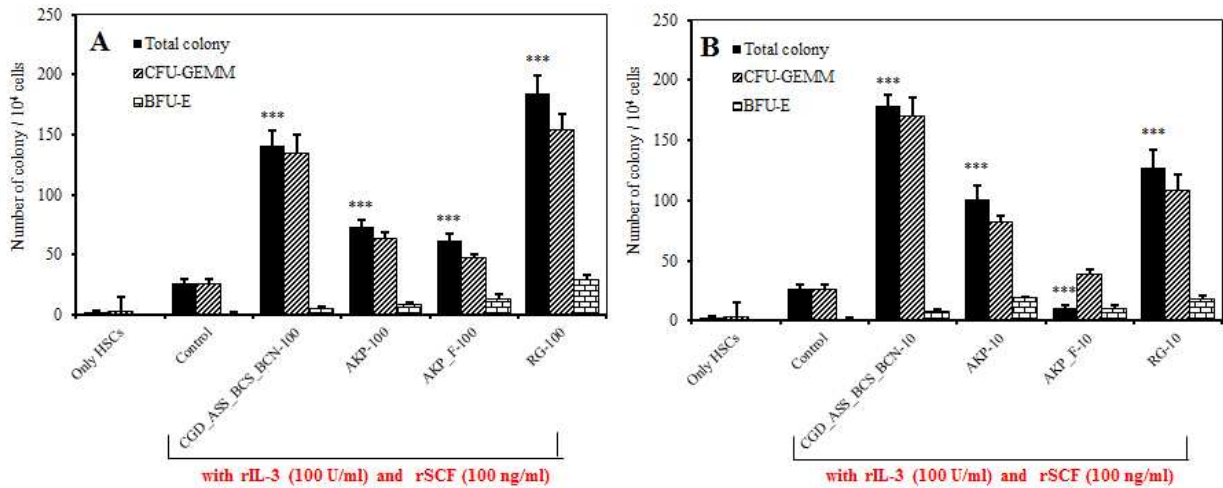


**Fig. 53. Effects of the *Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata DC* semen, *Tatsoi* sprouts, and *Acanthopanax sessiliflorum* seeman of combinational prescription. extract promotes the tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of GATA-1 and STAT-5a/b in Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells.**

Isolated Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG (100 µg/ml, 10 µg/ml) with rIL-3/rSCF. Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract with rIL-3/rSCF for 20 min. After 20 min, then subjected to immunoprecipitation with α-Jak2 (1:5,000), α-GATA-1 (1:5000.), α-STAT-5a/b (1:5000) and anti-phosphotyrosine-HRP (1:4000).

(7) 반고체 집락형성 분석법으로 조혈모세포 분화 효과 측정

Sca-1<sup>+</sup>HSCs에서 CFU-GEMM과 BFU-E로의 분화 상승효과를 분석한 결과, Fig. 54A와 54B에서 보듯이 무처리군인 only HSCs군에 비하여 rIL-3+rSCF을 처리한 대조군의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 수는 9배 이상 증가 하였고, rIL-3+rEPO와 CGD\_ASS\_BCS\_BCN 혼합추출물 100과 10  $\mu$ g/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군(control)인 rIL-3+rEPO에 비하여 5.2배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다(p<0.001). 그리고 rIL-3+rEPO와 RG 추출물의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군(control)인 rIL-3+rEPO에 비하여 6.8배 이상 유의성 있게 증가를 나타내었다(p<0.001). 또한 rIL-3+rEPO와 口·키와 AKP\_F 100  $\mu$ g/ml에서의 CFU-GEMM과 BFU-E는 두 군락을 합한 군락 수는 대조군(control)과 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과로 CFU-GEMM의 군락 수는 대조군(control)에 비하여 CGD\_ASS\_BCS\_BCN 혼합추출물 100과 10  $\mu$ g/ml 처리군의 군락 수는 각각 5.2배와 6.5배로 현저하게 유의성 있는 증가를 나타내었다(p<0.001). 그러므로 CGD\_ASS\_BCS\_BCN이 각각의 CGD, ASS, BCS, BCN 투여군에 비하여 CFU-GEMM 분화에 대하여 상승효과와 과립구계, 적혈구계, 거핵구계 미성숙세포집락을 형성할 수 있는 조혈모세포를 증식시키는 효과가 있을 것으로 생각된다.



**Fig.54. Effects of the *Brassica campestris var narinosa*, *Canavalia gladiata DC* semen, *Tatsoi* sprouts, and *Acanthopanax sessiliflorum* seaman of combinational prescription. extract (AKP), and its *Lactobacillus acidophilus* fermented product, AKP\_F of CFU-GEMM and BFU-E colony formation during 14-day culture in the presence of two different cocktails of recombinant cytokine.**

Isolated Sca-1<sup>+</sup>hematopoietic stem cells (Sca-1<sup>+</sup>HSCs) from negative control C57bl/6 mouse bone marrow in negative control C57bl/6 mice femur were either stimulated with rIL-3(100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml) or treated with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG (100 µg/ml, 10 µg/ml) with rIL-3/rSCF. Sca-1<sup>+</sup>HSCs were not treated (negative control; only cells), co-cultured with rIL-3 (100 U/ml) plus rSCF (100 ng/ml)(positive control), and with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG (100 µg/ml, 10 µg/ml)

(8) CTX로 유도한 Leucopenia 및 thrombocytopenia유발생쥐모델에서 AKP, AKP\_F, and Red Ginseng의 부작용 감소 효과연구

(가) 혈액을 분석을 통한 WBC수의 측정

혈구세포에 미치는 영향으로 WBC의 수는 Fig. 55에서 보듯이 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군의 WBC 수는 약 3.5배 감소하였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 2배 이상 유의성 있게 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 그러나 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 증가를 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다. 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 효능강화가 있는 것으로 생각할 수 있다.

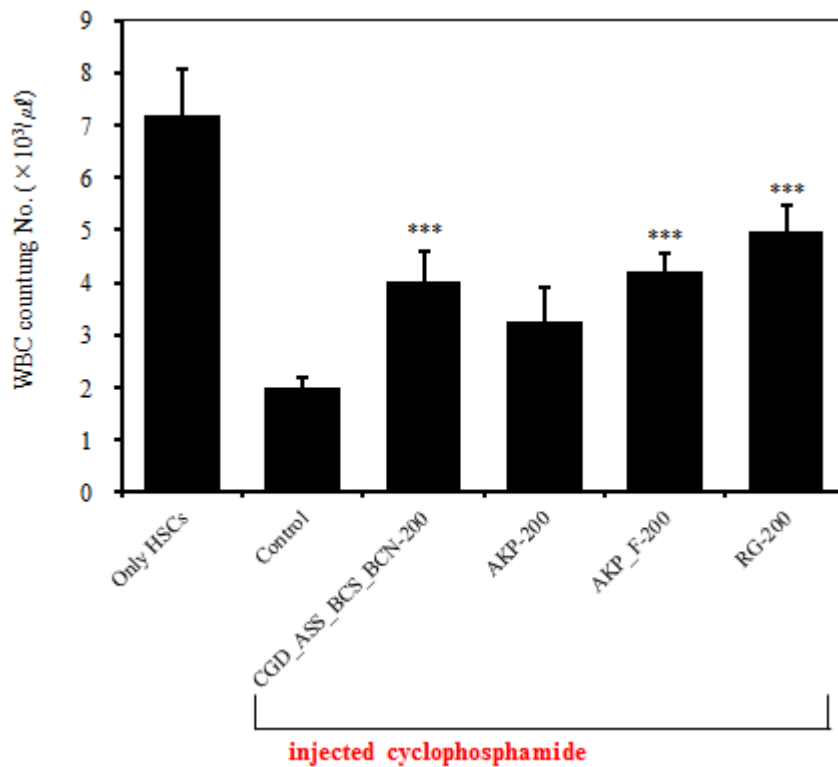
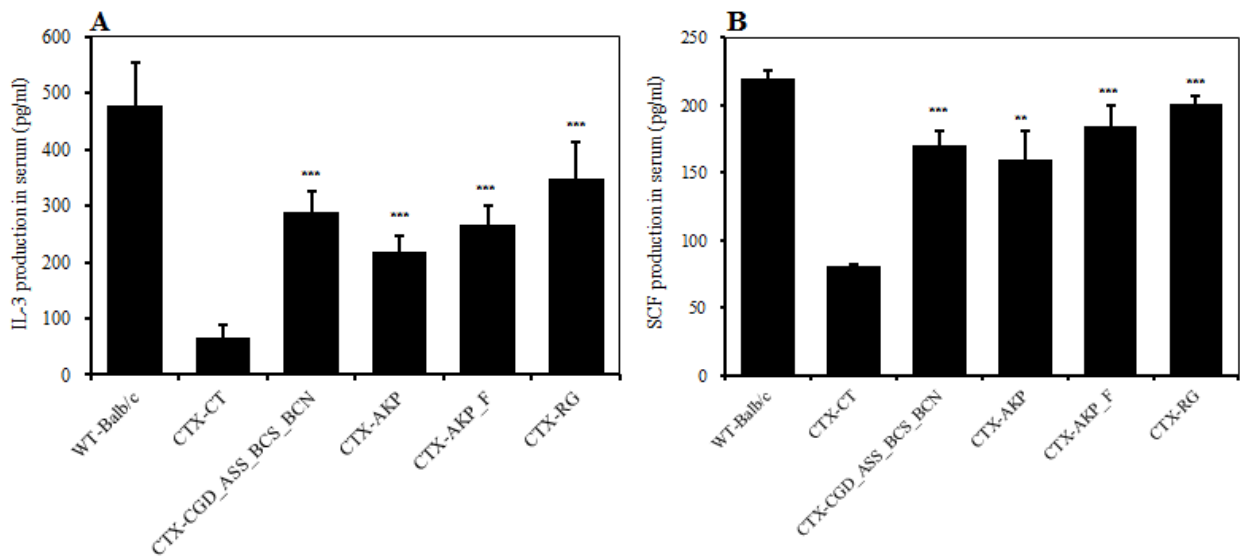


Fig. 55. Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on the hematological parameters in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.

Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p*) for 4 days after 10 days beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, and analyzed for hematology change as described in *Material and Methods*. Data represent means  $\pm$  S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

(나) ELISA로 IL-3와 SCF의 혈청 수준(level)의 측정

혈구세포에 미치는 영향으로 혈청중 IL-3와 SCF 생산량은 Fig. 56에서 보듯이 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군의 IL-3 (Fig. 56A)와 SCF (Fig. 56B) 생산량은 각각 약 3.5배 및 6배 감소하였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 3배 이상 유의성 있게 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 AKP\_F 투여군의 개선 효과가 좀더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 효능강화가 있는 것으로 생각할 수 있다.



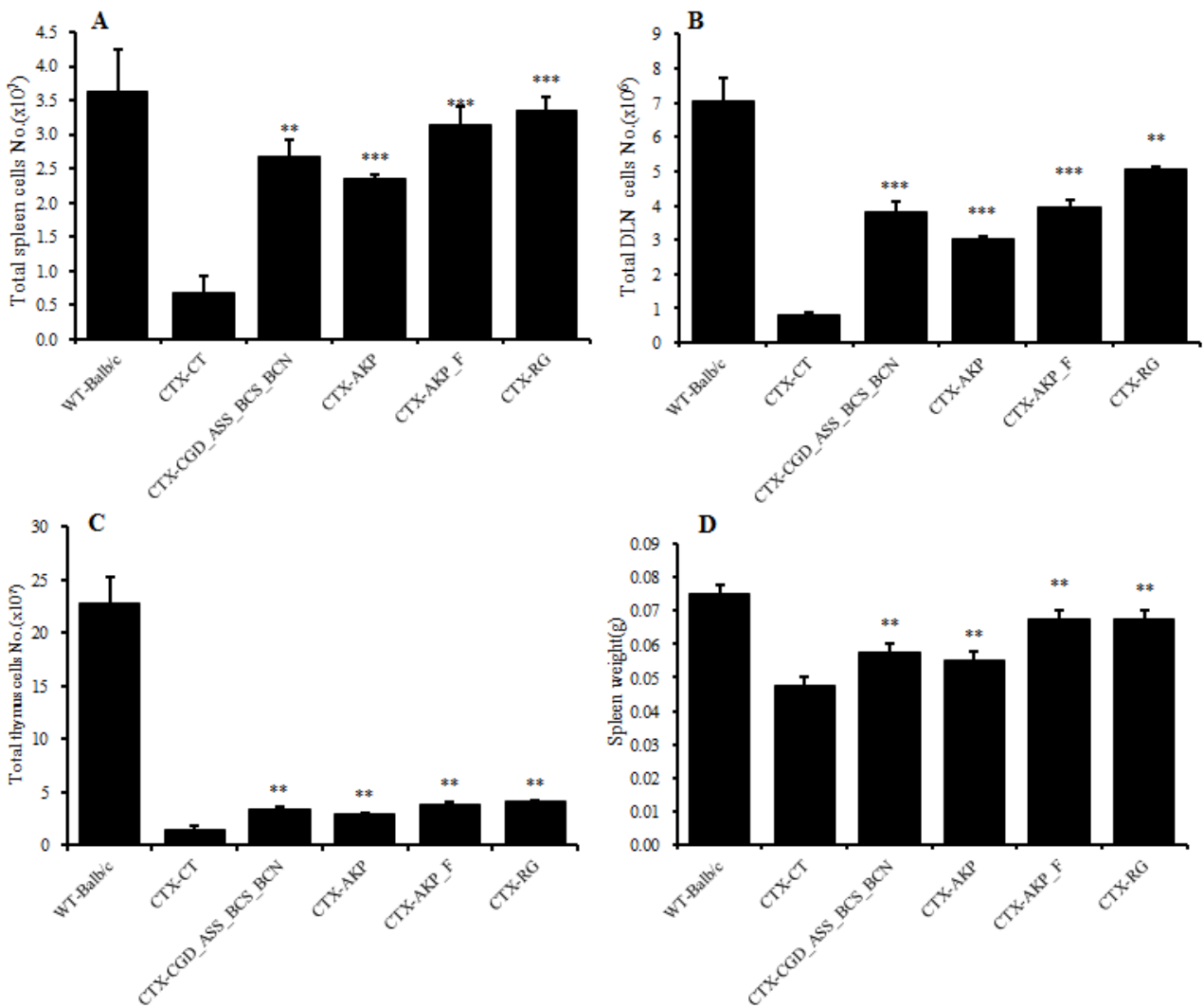
**Fig. 56. Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on IL-3 and SCF production level in serum in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.**

Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p*) for 4 days after 10 days beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, and Plasma samples were obtained by centrifugation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. IL-3 (A), and SCF (B) production levels were measured by a sandwich ELISA using an mouse ELISA kit I (R&D system, USA) in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia. Data represent means  $\pm$  E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

(다) 비장무게, 총 비장세포수, 총DLN수, 총흉선세포수 분석

Fig. 57A, 57B, 57C, 57D에서 보듯이 총비장세포수(A), 총 DLN 세포수 (B), 그리고 총 흉선세포수 (C)에 미치는 영향으로 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 현저하게 감소를 나타내었고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 3배 이상 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발

효한 ALP\_F 투여군의 개선 효과가 좀더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 효능강화로 총비장세포수(Fig. 57A), 총 DLN 세포수(Fig. 57B), 그리고 총 흉선세포수(Fig. 57A, 57C)의 회복이 관찰 되었다. 비장무게(Fig. 57D)에 미치는 영향으로 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 약 25% 비장무게 감소를 나타내었고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 ALP\_F 투여군의 개선 효과가 좀더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 효능강화의 결과라고 생각된다.



**Fig. 57. Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on the spleen weight, and the total cell number of spleen, DLN, thymus organ in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.**

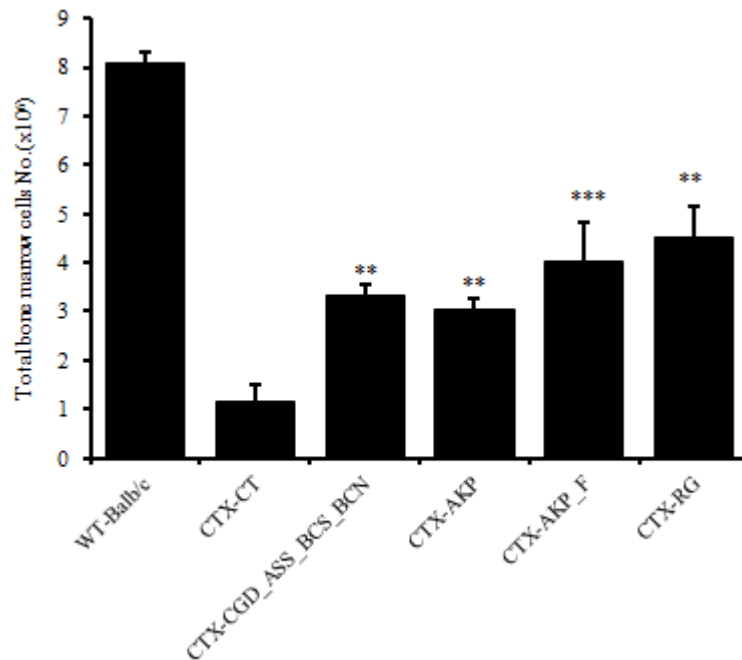
Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p*) for 4 days after 10 days



beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, and, and analyzed for cell counting change as described in *Material and Methods*. Data represent means±.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

(라) 대퇴골내의 총골수 세포수 분석

Fig. 58에서 보듯이 총골수 세포수에 미치는 영향으로 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 현저하게 감소를 나타내었고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 3배 이상 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다(p<0.01, p<0.001). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 AKP\_F 투여군의 개선 효과가 좀더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능강화의 결과라고 생각된다.



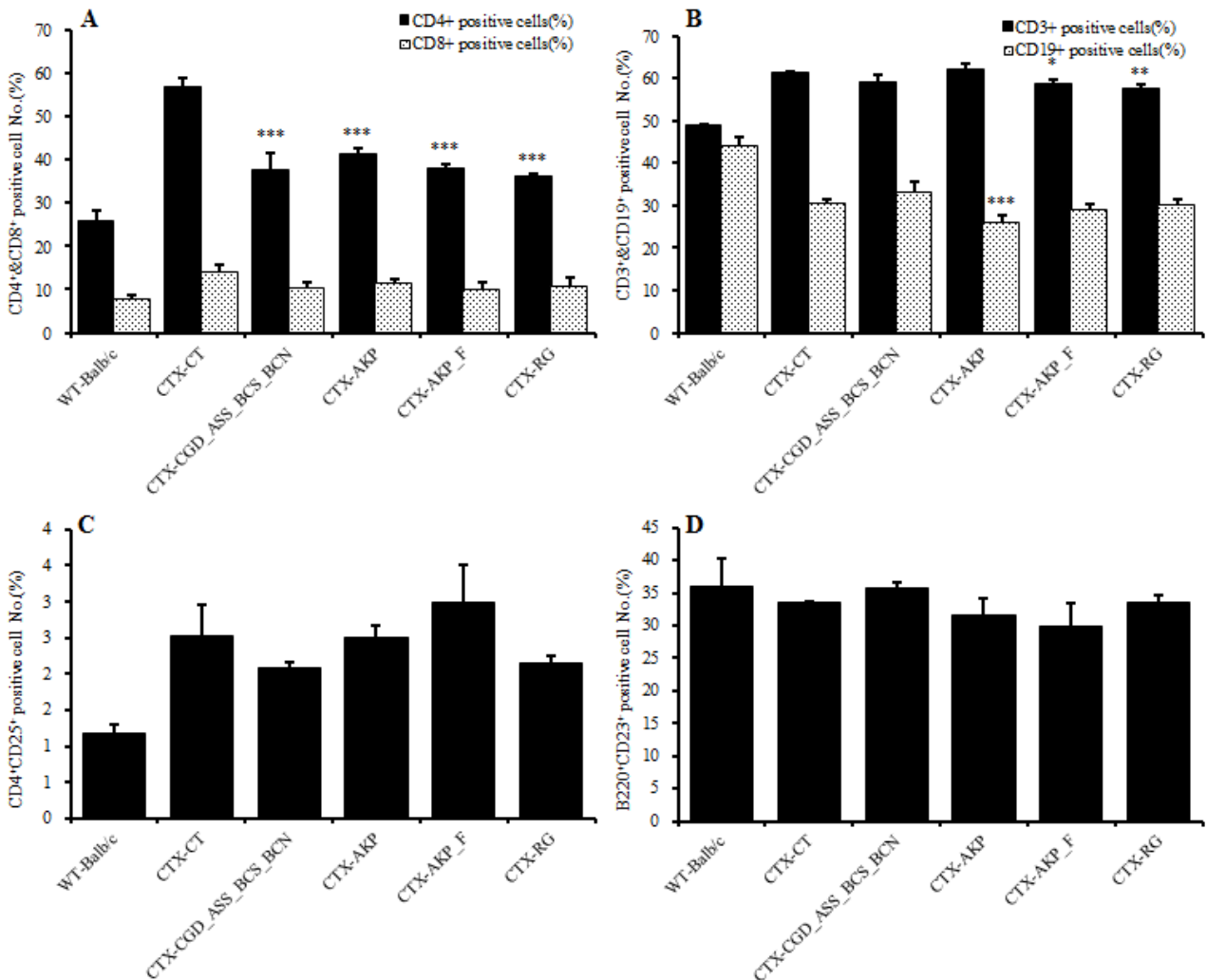
**Fig. 58. Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on the total cell counting of bone marrow in femur in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.**

Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p*) for 4 days after 10 days beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, and analyzed for cell counting change as described in *Material and Methods*. Data represent means±.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

(마) Peripheral blood mononuclear cell(PBMC)을 분리하여 FACS로 분석

Fig. 59A와 59B에서 보듯이 CD4세포(Fig. 59A)와 CD3세포(Fig. 59B)에 미치는 영향으로 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 총활성세포수(%)가 증가를 하

였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다 ( $p < 0.001$ ). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 AKP\_F 투여군의 개선 효과가 좀 더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능강화의 결과라고 생각된다. 그러나  $CD4^+/CD25^+$  세포는 정상군에 비하여 대조군의 총활성세포수 (%)가 증가를 하였고,  $B220^+/CD23^+$  세포에서 대조군에 비하여 약간 감소를 하였다. 그러나 Fig. 59C와 Fig. 59D에서 보듯이  $CD4^+/CD25^+$  세포와  $B220^+/CD23^+$  세포에서는 CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여 모두에서 차이가 없었다.

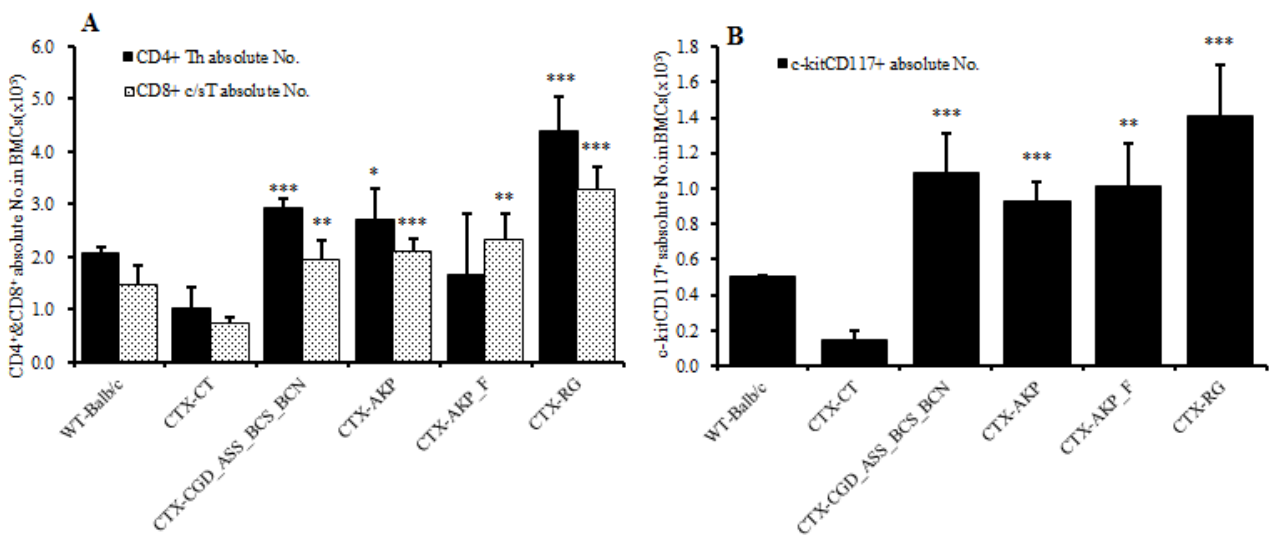


**Fig. 59.** Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on the total cell counting of bone marrow in femur in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.

Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p*) for 4 days after 10 days beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, and C57bl/6 mice of PBMCs ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were isolated, and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Total cell content of  $CD4^+$ & $CD8^+$  (A),  $CD3e^+$  &  $CD19^+$  (B),

CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (C), and B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup> (D) in PBMCs in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia. Data represent means±E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

Fig. 60A에서 보듯이 골수에서 FACS상의 활성화세포에 총골수세포수를 적용한 골수내 총CD4<sup>+</sup> T 세포와 총CD8<sup>+</sup> c/sT 세포 absolute number는 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 현저하게 감소를 하였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 (p<0.001). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 AKP\_F 투여군의 개선 효과가 좀 더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능강화의 결과라고 생각된다. 그리고 Fig.35B에서 골수세포 (BMC)에서 조혈증진 활성화세포 (c-kit CD117<sup>+</sup>)을 측정된 결과, 대조군에 비하여 CGD\_ASS\_BCS\_BCN과 AKP, AKP\_F, 그리고 홍삼 (RG) 처리군에서 유의성 있는 효능이 나타났음. 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능강화의 결과라고 생각된다. Fig.35C에서 보듯이 골수에서 FACS상의 활성화세포에 총골수세포수를 적용한 골수내 총 CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> 세포 absolute number는 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 현저하게 감소를 하였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 (p<0.001). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 AKP\_F 투여군의 개선 효과가 좀 더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능강화의 결과라고 생각된다.



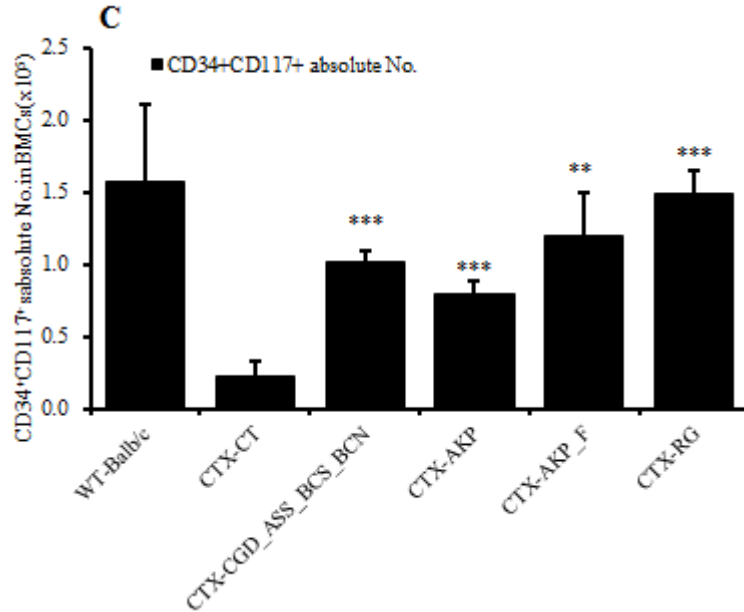


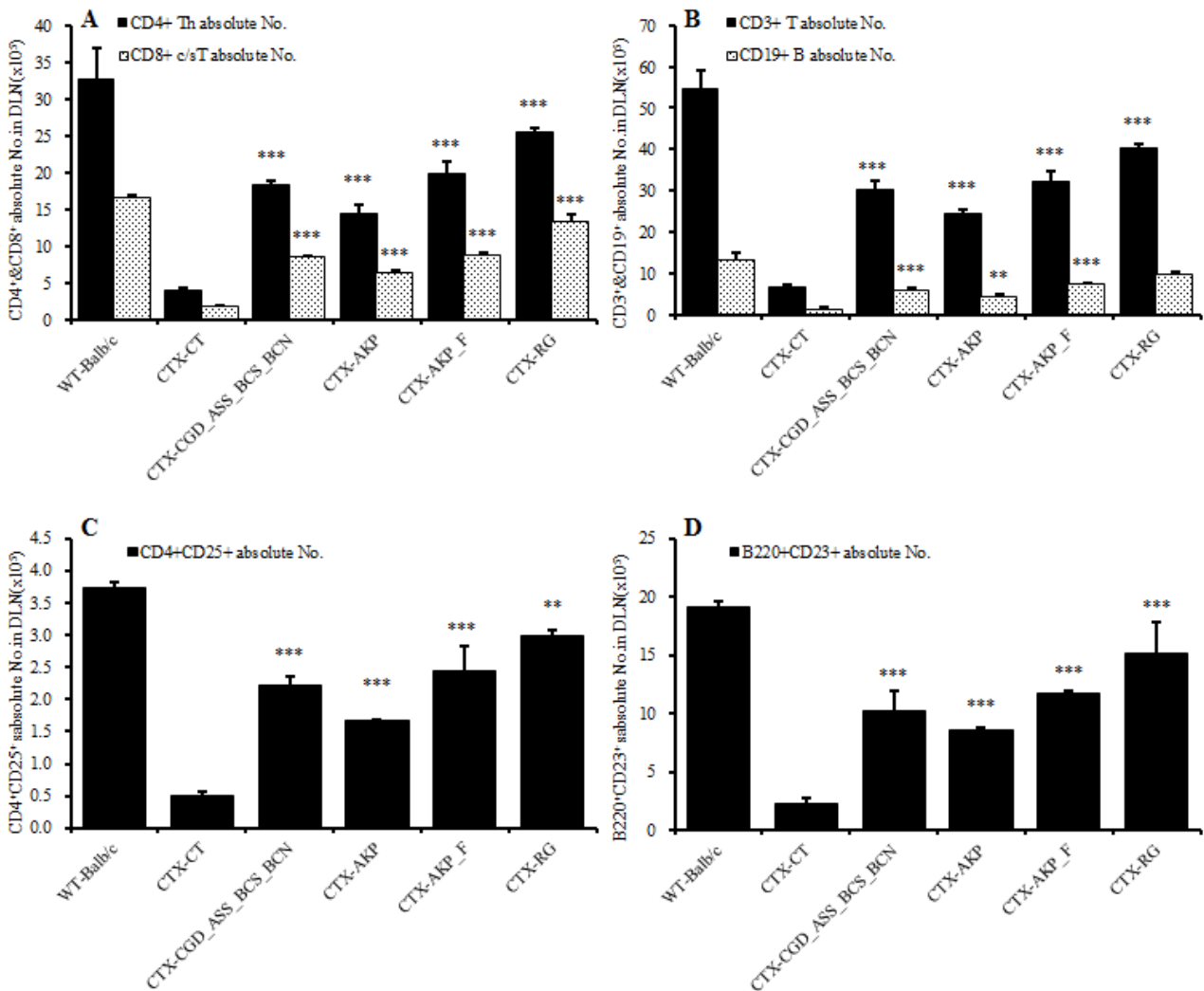
Fig. 60. Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on the changes of total CD4<sup>+</sup> & CD8<sup>+</sup> absolute numbers and total c-kit<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> & CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> absolute numbers in BM in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.

Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p*) for 4 days after 10 days beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, and C57bl/6 mice of BMCs (5x10<sup>5</sup> cells/ml) were isolated, and the BMCs were washed twice and analyzed by flow cytometer. Total absolute number of CD4<sup>+</sup> & CD8<sup>+</sup> (A), c-kit<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> (B), and CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> (C) in bone marrow in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia. Data represent means±E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

(바) 총 DLN세포 측정 및 FACS 분석

Fig. 61에서 보듯이 DLN에서 FACS상의 활성세포에 총DLN세포수를 적용한 DLN내 총 CD4<sup>+</sup> T 세포 & 총CD8<sup>+</sup> c/sT 세포 (Fig. 61A)와 총 CD3e<sup>+</sup> T 세포 & 총CD19<sup>+</sup> B 세포 (Fig. 61B) absolute number는 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 현저하게 감소를 하였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 (p<0.001). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 ALP\_F 투여군의 개선 효과가 좀 더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능 강화의 결과라고 생각된다. 그리고 DLN에서 FACS상의 활성세포에 총골수세포수를 적용한 DLN내 총 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포(Fig. 61C)와 총 B220<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> B 세포(Fig. 61D) absolute number는 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 현저하게 감소를 하였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은

대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 AKP\_F 투여군의 개선 효과가 좀 더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조절증진 효능강화의 결과라고 생각된다.



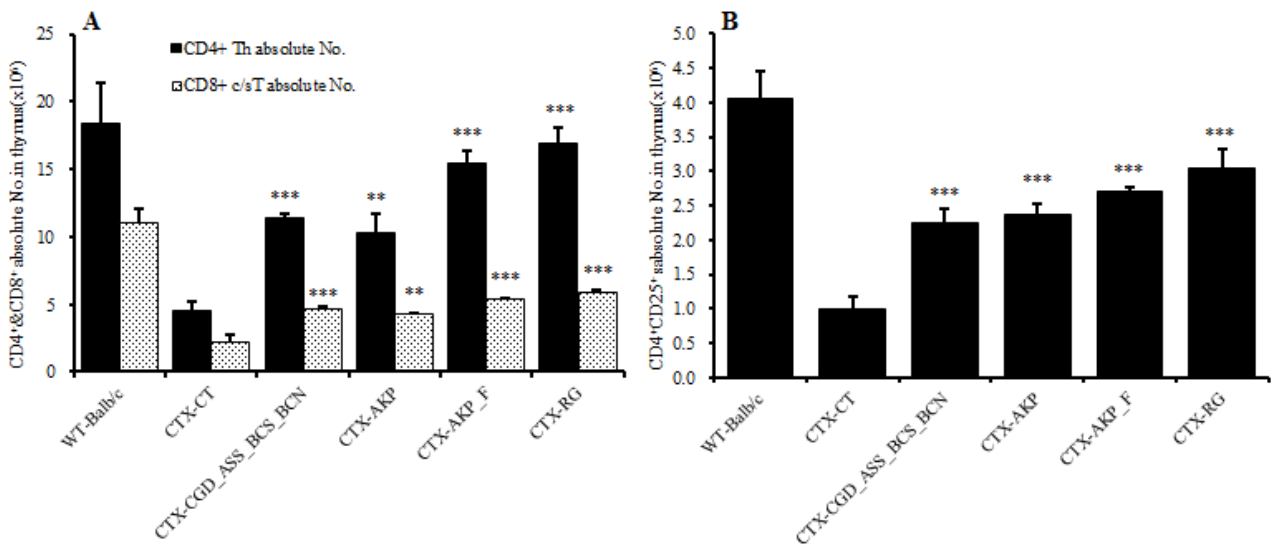
**Fig. 61. Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on the changes of total immune cell absolute numbers in DLN in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.**

Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p.*) for 4 days after 10 days beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, and C57bl/6 mice of DLN cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were isolated, and the DLN cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Total absolute number of CD4<sup>+</sup>&CD8<sup>+</sup> (A), CD3e<sup>+</sup> & CD19<sup>+</sup> (B), CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (C), and B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>(D) in DLN in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia. Data represent means $\pm$ E (N=5). Statistically

significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

(사) 총 흉선세포 측정 및 FACS 분석

Fig. 62에서 보듯이 흉선에서 FACS상의 활성세포에 총흉선세포수를 적용한 흉선내 총 CD4<sup>+</sup> T 세포 & 총CD8<sup>+</sup> c/sT 세포 (Fig. 62A)와 총 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포 (Fig. 62B) absolute number는 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 현저하게 감소를 하였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 (p<0.001). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 ALP\_F 투여군의 개선 효과가 좀 더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능강화의 결과라고 생각된다.



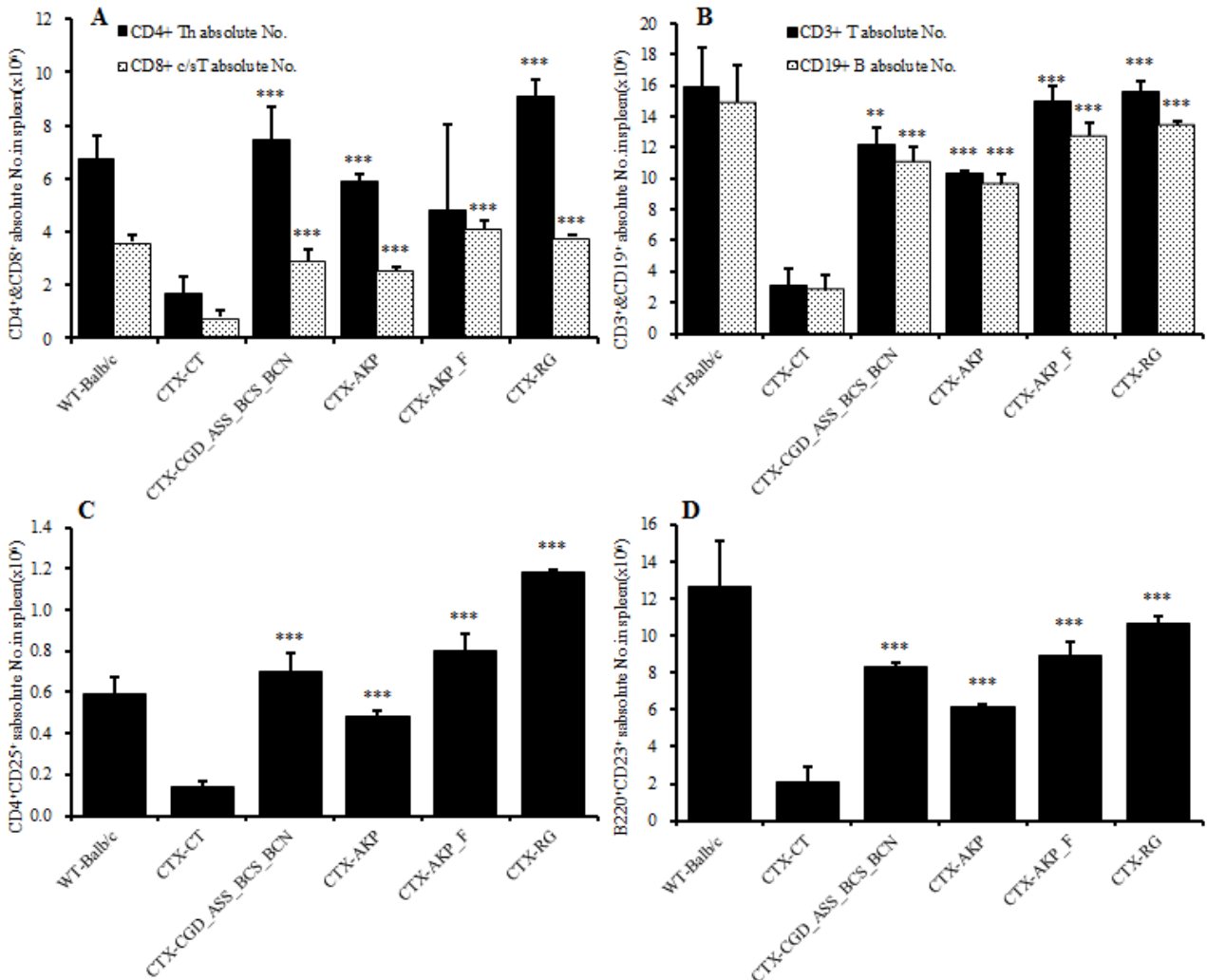
**Fig. 62. Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on the changes of total immune cell absolute numbers in thymus in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.**

Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p*) for 4 days after 10 days beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, , and C57bl/6 mice of DLN cells (5x10<sup>5</sup> cells/ml) were isolated, and the DLN cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Total absolute number of CD4<sup>+</sup>&CD8<sup>+</sup> (A), and CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (B) in thymus in mice with cyclophosphamide- induced leucopenia and thrombocytopenia. Data represent means±E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

(아) 총 비장세포를 측정 및 FACS 분석

Fig. 63에서 보듯이 비장에서 FACS상의 활성세포에 총 비장세포수를 적용한 비장내 총 CD4<sup>+</sup> T 세포 & 총CD8<sup>+</sup> c/sT 세포(Fig. 63A), 총 CD3e<sup>+</sup> T 세포 & 총CD19<sup>+</sup> B 세포(Fig. 63B), 총 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포(Fig. 63C), 그리고 총 B220<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> B 세포

(Fig. 63D) absolute number는 모두 정상군에 비하여 대조군인 CTX 처리군에서 현저하게 감소를 하였고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, 그리고 RG 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 AKP\_F 투여군의 개선 효과가 좀 더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능강화의 결과라고 생각된다.



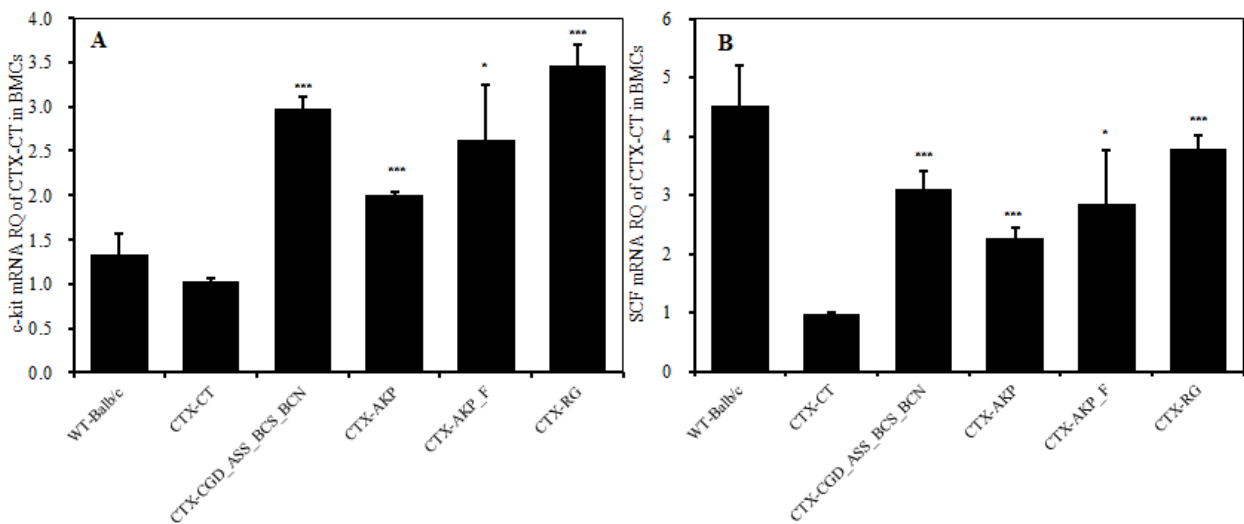
**Fig. 63. Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on the changes of total immune cell absolute numbers in spleen in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.**

Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p*) for 4 days after 10 days beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, , and C57bl/6 mice of spleen cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were isolated, and the spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometer. Total absolute number of CD4<sup>+</sup>&CD8<sup>+</sup> (A), CD3e<sup>+</sup>&CD19<sup>+</sup> (B), CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> (C), and B220<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>(D) in spleen in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia. Data represent means±E (N=5). Statistically

significant value compared with control group data by T test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

(자) 골수세포에서 real-time PCR을 이용한 조혈유전자 c-kit과 SCF의 mRNA 유전자 발현 측정

Fig. 64A에서 보듯이 골수에서 c-kit mRNA의 유전자 발현을 대조군에 대한 상대정량(RQ)값을 측정한 것으로 CTX를 처리한 대조군에 비하여 c-kit mRNA의 유전자 발현(Fig. 64A)은 정상군과 큰 차이가 없었고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN ( $p < 0.001$ ), AKP ( $p < 0.001$ ), AKP\_F ( $p < 0.05$ ), 그리고 RG ( $p < 0.001$ ) 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 2배 이상 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 ALP\_F 투여군의 c-kit mRNA의 유전자 발현이 좀 더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능강화의 결과라고 생각된다. 또한 Fig.39B에서 보듯이 골수에서 SCF mRNA의 유전자 발현을 대조군에 대한 상대정량 (RQ)값을 측정한 것으로 CTX를 처리한 대조군에 비하여 SCF mRNA의 유전자 발현(Fig. 64B)은 정상군에 비하여 현저하게 감소를 나타내었고, CGD\_ASS\_BCS\_BCN ( $p < 0.001$ ), AKP ( $p < 0.001$ ), AKP\_F ( $p < 0.05$ ), 그리고 RG ( $p < 0.001$ ) 추출물 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 2배 이상 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 또한 AKP 추출물 200 mg/kg 투여군보다도 유산균 발효한 ALP\_F 투여군의 c-kit mRNA의 유전자 발현이 좀 더 증가되어 나타났는데, 이러한 결과는 AKP를 유산균 발효한 AKP\_F 투여군이 항암제에 의한 백혈구 감소증 생쥐에서 부작용 개선에 조혈증진 효능강화의 결과라고 생각된다.



**Fig. 64. Effects of CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract on the hematopoietic cytokine mRNA in BMCs in mice with cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia.**

Group of C57BL/6 mice were oral administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract (200 mg/kg) for 14 days, and CTX (100 mg/kg, *i.p*) for 4 days after 10 days beginning on administered with CGD\_ASS\_BCS\_BCN, AKP, AKP\_F, and RG extract, and c-kit (A), and SCF (B) mRNA express were measured real-time PCR in BMCs in mice with



cyclophosphamide-induced leucopenia and thrombocytopenia. The amount of taqman probe was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system Data represent means $\pm$ .E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (\*p<0.05, \*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001).

## 나. 한의학적 암 분류에 따른 맞춤형 처방 개발

### (1) 암 유병자 유형별 분류

항암치료 후 암 유병자의 빠른 회복을 돕고 건강증진 및 건강유지의 목적으로 편리하게 섭취할 수 있는 식품 조성물을 구성하기 위한 접근방법으로는 (주)엔자임바이오가 운영하는 자연치유 건강수련센터(바이오마을)에서 현재까지 15년간 암 유병자를 대상으로 하는 정기 건강수련회에서 축적된 임상자료를 기본 자료로 활용하였다.

바이오마을에서는 암 유병자를 한의학적 원리를 근간으로 하여 혈액암, 근육암, 림프암의 3가지 유형으로 분류하는 접근방식을 취하였다. 이에 따라 간암, 뇌혈류 관련 질병(혈전증, 중풍)을 포함하는 혈액암 유형, 위암, 대장암, 직장암, 담도암, 피부암, 자궁(근종), 신장암을 포함하는 근육암 유형, 그리고 순환계 및 호르몬 계통 관련, 유방암, 임파선 암, 갑상선암, 전립선 암, 자궁(근종)을 포함하는 림프암 유형으로 분류하였다.

### (2) 기본 조성물의 선정과 배합비

암 유병자의 유형별 식품 조성물의 유산균 발효를 위하여 미생물의 탄소원으로 공급할 목적으로 발아현미, 찰흑미, 율무, 마 등 4종의 곡류를 공통으로 하는 조성물의 기본 베이스로 선정하였다. 아울러 연구결과에 따라 조혈, 세포재생 및 면역증진 효능을 기대할 수 있는 작두콩, 다채썩, 유채썩, 오가피를 공통 기본원료로 선정하였다. 기본베이스로 선정한 곡류는 분말형태로 발아현미 70%, 찰흑미 10%, 율무 10%, 마 10%의 비율로 총 100%가 되도록 혼합하여 준비하였다. 공통원료로 선정한 원료는 작두콩 55%, 다채썩 15%, 유채썩 5%, 오가피 5% 분량으로 총 80%가 되도록 혼합비율을 설정하여 암 유병자 유형별로 선정한 원료를 20%가 되도록 혼합한 원료와 다시 혼합하여 100%가 되도록 구성하였다. 전체적으로 유산균 발효를 위한 조성물은 기본베이스로서의 혼합곡류 조성물과 공통원료 및 유병자별 원료를 혼합한 원료와의 비율을 8:2로 하여 최종적으로 배합비를 구성하였다.

Table 14. 암종별 맞춤형 기본 조성물

구 분	곡류 베이스	공통원료	암 유형별 원료
원료 구성	발아현미 70%	작두콩 55%	(근육암) 콩나물, 느릅나무껍질, 양배추, 표고버섯 각 5%
	찰흑미 10%	다채썩 15%	(림프암) 인동꽃, 더덕, 도라지, 생강 각 5%
	율무 10%	유채썩 5%	(혈액암) 연근, 미나리줄기, 돈나물, 메밀썩 각 5%
	마 10%	오가피 5%	
합계	100		100
최종 배합 비율	80		20

(가) 기본곡류베이스

Table 15. 기본곡류베이스 천연물 및 특징

천연물명	특징
현미	<p>수확한 벼를 건조, 탈곡한 후 고무 롤러로 된 기계로 왕겨를 벗긴 쌀 현미의 표준적 화학조성은 수분 15.5%, 단백질 7.4%, 지질(脂質) 3.0%, 당질 71.8%, 섬유 1.0%, 회분 1.3%, 비타민 B1은 100g 중 0.54mg으로 당질(녹말)이 대부분을 차지하고, 단백질이나 지방은 많지 않음. 비타민 B1은 많음. 현미는 백미에 비하여 저장성이 좋고, 충해나 미생물의 해가 적음. 또 현미는 정백으로 인한 영양분의 손실이 없으므로 백미에 비하여 지방, 단백질, 비타민B1·B2가 풍부함. 또 가공으로 인한 양의 감소도 없음(두산백과)</p> <p>현미는 장의 연동운동을 항진하고, 유해물질의 장내 흡수를 막으며, 당질을 에너지로 변화시키며, 자율신경 기능을 조절하고, 혈액의 흐름을 좋게 하고, 뇌와 신경에 필요한 에너지를 공급하고, 온몸의 신경조직과 근육의 작용을 정상으로 유지시키는 역할을 함(우리약초로 지키는 생활한방, 김태정)</p>
울무 (의이인)	<p>몸을 가벼워지게 하고 장기를 막음.(동의보감) 세포에 활력을 주며, 노폐물을 체외로 배출시키고, 감기회복기에 좋은 식품임. 특히 체내의 수분이 제대로 대사되지 못하여 물살이 찢 경우 등 비만치료에 좋음.(우리약초로 지키는 생활한방, 김태정)</p> <p>성질이 약간 차고[微寒](평(平)하다고도 한다) 맛이 달며[甘] 독이 없다. 폐위, 폐기로 피고름[膿血]을 토하고 기침하는 것을 치료함. 또한 풍습비(風濕痺)로 힘줄이 켜기는 것[筋脈攣急]과 건각기, 습각기[乾濕脚氣]를 치료함.</p>
마 (서여)	<p>성질은 따뜻하고[溫](평(平)하다고도 함) 맛이 달며[甘] 독이 없음. 허로로 여윈 것을 보하며 5장을 충실하게 하고 기력을 도와주며 살찌게 하고 힘줄과 뼈를 든든하게 함. 심규[心孔]를 잘 통하게 하고 정신을 안정시키며 의지를 강하게 함.(동의보감)</p> <p>말리는 법[乾法]은 굵고 잘된 것으로 골라 누른 껍질을 버리고 물에 담그되 백반가루를 조금 넣어 두었다가 하룻밤 지난 다음 꺼냄. 침과 같은 것은 흠쳐 버리고 약한 불기운에 말림.(본초강목)</p>

(나) 암종별 천연물

① 혈액암의 유형 및 조성물

혈액암은 간암, 뇌혈류 관련 질병(혈전증, 중풍) 등을 포함하며 혈액암 계통의 유병자를 위한 식품 조성물의 원료로는 바이오마을의 자체 임상자료에 따라 혈액암 계통의 유병자에 효과가 있는 것으로 알려진 연근, 미나리줄기, 돈나물, 메밀싹을 선정하였다. 문헌조사 자료에 의하면 연근은 식물성 섬유가 풍부하여 장내활동을 활발하게 하고 체내 콜레스테롤 수치를 떨어뜨리며, 또한 아스파라긴을 비롯하여 아르기닌, 티로신, 트리코네린 등의 아미노산을 함유하고 있으며, 인지질인 레시틴을 함유하고 있어 혈관벽에 콜레스테롤의 침착을 예방하고 혈관벽을 강화시키는 효과를 갖는다고 보고되어 있다. 미나리 줄기는 혈압강하, 해열, 진정, 변비예방 및 하혈 등에 효과가 있고, 항균작용과 고혈압에도 효과가 있다. 연구결과에 따르면 돈나물의 에틸아세테이트 추출물이 간암세포의 자연사를 유도하여 암세포의 성장을 억제하는 것으로 보고 되었다. 또한 돈나물 줄기의 생즙과 메탄

을 추출물의 경우 알코올 섭취 후 대사를 촉진시키는 효과가 있다고 보고되었다. 메밀씨에 함유된 루틴은 모세혈관을 강화시켜 동맥경화, 고혈압, 뇌출혈과 같은 심혈관계 질환을 예방하고, 당뇨병, 잇몸출혈, 구취제거 등에 효과가 있다고 한다.

이와 같은 자료에 따라 혈액암 유형의 유병자를 위한 식품 조성물로 연근, 미나리줄기, 돌나물, 메밀씨를 각 5% 분량으로 혼합하여 총 20% 분량으로 하고, 공통원료로 선정한 작두콩, 다채씨, 유채씨, 오가피 혼합물 80% 분량과 혼합하여 총 100%로 하고, 이 혼합물 20%를 곡류 기본베이스 80%와 다시 혼합하여 전체 식품조성물로 구성하였다(Table 14).

Table 16. 혈액암용 천연물 및 특징

천연물명	특징
연근 (우즙)	성질이 따뜻하고[溫] 맛은 달며[甘] 독이 없음. 우(藕)란 것은 연뿌리임. 토혈을 멎게 하고 어혈을 삭힘. 생것을 먹으면 곽란 후 허해서 나는 갈증을 멎게 하고 찌서 먹으면 5장을 아주 잘 보하며 하초를 든든하게 함. 연뿌리와 꿀을 함께 먹으면 배에 살이 오르고 여러 가지 충병이 생기지 않음.(동의보감) 옛날 송나라의 고관이 연뿌리의 껍질을 벗기다가 실수하여 양의 피를 받아 놓은 그릇에 떨어뜨렸는데 그 피가 엉키지 않아 이것으로써 연뿌리가 어혈을 해칠[散] 수 있다는 것을 알게 됨(본초강목)
미나리줄기 (수근)	성질이 평(平)하고(차다[寒]고도 함) 맛이 달고[甘] 독이 없음. 번갈을 멎게 하고 정신이 좋아지게 하며 정(精)을 보충해 주고 살찌고 건강해지게 함. 술을 마신 뒤에 생긴 열독을 치료하는데 대소변을 잘 나가게 함. 여자의 붕루, 대하와 어린이가 갑자기 열이 나는 것을 치료함.(동의보감) 일명 수영(水莢)이라고도 하는데 물에서 자람. 잎은 궁궁이(천궁)와 비슷하고 흰 꽃이 피며 씨는 없음. 뿌리도 역시 흰빛이며 김치와 생것이를 만들어 먹거나 삶아서 먹기도 함. 생것으로 먹어도 좋으며, 5가지 황달도 치료함(본초강목) 미나리에는 이소람네틴, 페르시카린, 칼슘, 비타민A,C 등이 주요 성분임. 이소람네틴이 간독성을 해독하는 것으로 알려짐.
돌나물 (석지갑)	간염 치료에 효과가 있는 sarmentosin이 들어 있음. 돌나물은 열량이 낮아 다이어트에 효과적임. 섬유소질이 적고 비타민 C와 인산이 풍부하며 새콤한 신맛도 있어 식욕을 촉진하며 콜레스테롤 수치를 낮춰 성인병을 예방함
메밀씨	메밀은 섬유질이 많아서 변비 치료에 효과가 있으며 피부를 곱게 해 주고, 이뇨 및 노폐물을 몸 밖으로 내보내는 역할이 있어 혈액을 깨끗이 정화함.(우리약초로 지키는 생활한방, 김태정)

## ② 근육암의 유형 및 조성물

앞에서 기술한 바와 같이 (주)엔자임바이오가 운영하는 바이오마을에서 그 동안 축적한 임상자료를 기본으로 접근한 방식에 따라 근육암은 위암, 대장암, 직장암, 담도암, 피부암, 자궁(근종), 신장암 등을 포함하며 이들 유병자를 위한 식품 조성물 원료로 콩나물, 느릅나무껍질, 양배추, 표고버섯을 선정하였다. 여러 가지 자료에 의하면 콩나물에는 우리 몸에 필요한 무기성분과 필수 영양소 등을 함유하고 있으며, 특히 종자에 비해 비타민A와 C의 함량이 월등히 높다. 느릅나무 껍질은 소변이 잘 나오게 하고 부종을 내리며 대변이 잘 통하게 하고 위장의 열을 없애주는 효능이 있으며 양배추는 신장을 보익하고 뼈와 위장을 튼튼하게 하는 효과가 있다. 표고버섯에는 조섬유가 다량 함유되어 있으며,

각종 아미노산, 비타민, 무기질 등의 함량이 높아 영양학적 가치가 높으며 특히 혈압강화에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 근육암 유형의 유병자를 위한 식품 조성물은 콩나물, 느릅나무껍질, 양배추, 표고버섯을 각 5% 분량으로 혼합하여 총 20% 분량으로 하고, 공통원료로 선정한 작두콩, 다채썩, 유채썩, 오가피 혼합물 80% 분량과 혼합하여 총 100%로 하고, 이 혼합물 20%를 곡류 기본베이스 80%와 다시 혼합하여 전체 식품조성물로 구성하였다(Table 14).

Table 17. 근육암용 천연물 및 특징

천연물명	특징
콩나물 (대두)	성질이 평(平)하고 맛이 달며[甘](짜다고도 함) 독이 없음. 5장을 보하고 중초(中焦)와 12경맥을 좋게 하고 중초를 고르게 하며 장위(腸胃)를 따뜻하게 함. 오랫동안 먹으면 몸무게가 늘어남. 대두황권(생콩으로 기른 길금)은 성질이 평(平)하고 맛이 달며[甘] 독이 없음. 오랜 풍습비(風濕痺)로 힘줄이 켁기고 무릎이 아픈 것을 치료함. 5장이나 위 속에 몰린 적취[五藏胃中結聚]를 없앴.(동의보감) 콩나물은 콩이 발아되어 성장하는 과정에서 체내대사가 이루어짐으로써 영양성분이 상당히 달라짐. 콩에는 전혀 없던 비타민C가 다량 생성되고, 지방은 현저히 감소되고 섬유소 및 비타민이 증가함. 또한 뉴크리아제, 우레아제, 아밀라아제등 여러 효소가 많이 함유되어 있음. 특히 뿌리 부분에는 간의 해독 작용을 돕는 아스파라긴산이 많이 함유됨.
느릅나무 껍질(유피)	성질은 평(平)하고 맛이 달며[甘] 독이 없음. 잘 나가게 하는 작용도 있기 때문에 대소변이 통하지 못하는 병에 주로 쓰임. 오줌을 잘 나가게 하고 장위의 사열[腸胃邪熱]을 없애며 부은 것을 가라앉히고 5림을 풀리게[利] 하며 불면증, 후합증을 낫게 함.(동의보감) 산 속 곳곳에 있으며 음력 2월에 뿌리를 캐서 속껍질만을 벗겨 햇볕에 말려서 씹. 3월에 열매를 따서 장을 담가 먹으면 아주 향기롭고 맛있음(본초강목)
양배추	지중해 연안과 소아시아가 원산지임. 잎은 두껍고 털이 없으며 분처럼 흰빛이 돌고 가장자리에 불규칙한 톱니가 있으며 주름이 있어 서로 겹쳐지고 가장 안쪽에 있는 잎은 공처럼 등글며 단단함. 꽃은 5~6월에 노란색으로 피고 2년생 뿌리에서 나온 꽃줄기 끝에 총상꽃차례를 이루며 달림. 꽃받침조각은 4개이고 길이 1cm의 긴 타원 모양이며, 꽃잎은 4개이고 길이 2cm의 달걀을 거꾸로 세운 모양임. 수술은 6개 중 4개가 길고, 암술은 1개임. 열매는 각과이고 짧은 원기둥 모양이며 비스듬히 씹.(두산백과) 저열량, 저지방 식품이며 식이섬유소 함량이 많아 포만감을 주어 식사량을 줄여주므로 다이어트에 좋음. 또한 풍부한 식이섬유소가 장운동을 활발하게 하여 변비를 예방해줌.
표고버섯 (마고)	성질이 평(平)하고 맛이 달며[甘] 독이 없음. 정신이 좋아지게 하고 음식을 잘 먹게 하며 구토와 설사를 멎게 함. 아주 향기롭고 맛이 있음.(동의보감) 표고버섯에는 식이섬유가 풍부함(건조물 중에 48.78%, 생것 중에 6.05%). 암을 억제하는 식이섬유의 일종인 글루칸이 포함되어 제암효과를 기대함. 또한 표고버섯에서 분리된 다당고분자물질(분자량 400만)인 렌티난(lentinan)은 화학발암의 억제효과가 있음. 표고버섯의 특유한 향기성분은 렌티오닌(lenthionine)으로 이것은 수분을 포함한 표고버섯의 효소 작용에 의해서 생성되는데, 혈중의 높은 콜레스테롤 값을 낮추는 작용이 있으므로 혈압강화 작용도 있다. 이밖에 뼈의 발달에 도움이 되는 프로비타민 D2인 에르고스테롤을 많이 포함함. 이 에르고스테롤의 대부분은 유리형으로 표고버섯의 싹갓에 가장 많음. 표고버섯의 포자로부터 항바이러스활성(인플루엔자감염증)이 있는 당단백질이 보고되었음. 균상재배된 표고균사체의 자기소화산물에서 분리된 가용성의 리그닌-당단백질 복합체는 AIDS 바이러스(HIV)에 유효하다는 보고도 있음.

### ③ 림프암의 유형 및 조성물

림프암은 순환계 및 호르몬 계통 관련, 유방암, 임파선 암, 갑상선 암, 전립선 암, 자궁(근종) 등을 포함하며 림프암 계통의 유병자를 위한 식품 조성물의 원료로는 바이오마을의 자체 임상자료에 따라 림프암 계통의 유병자에 효과가 있는 것으로 알려진 인동꽃, 더덕, 도라지, 생강을 선정하였다. 문헌조사 자료에 의하면 인동꽃은 열을 내리고 해독작용을 하는 것으로 알려져 있고, 염증을 삭이고 종기의 고름을 배출시키는 작용을 한다. 더덕은 사포닌, 당질 및 섬유질을 풍부하게 함유하고 있으며, 한방에서는 거담, 배농, 편도선염, 진해약 등에 효과가 있는 약료로 활용하고 있다. 도라지는 섬유질이 풍부하고 칼슘과 철이 풍부한 대표적 알칼리성 식품으로 비타민과 무기질의 훌륭한 공급원이 될 뿐만 아니라 한방에서는 거담, 기관지염, 천식, 배농, 소염, 보혈 및 양혈 등에 사용된다. 또한 생강은 감기로 인한 오한, 발열, 두통, 구토, 해수, 가래를 치료하며 식중독으로 인한 복통설사, 복만에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

이와 같은 자료에 따라 림프암 유형의 유병자를 위한 식품 조성물은 인동꽃, 더덕, 도라지, 생강을 각 5% 분량으로 혼합하여 총 20% 분량으로 하고, 공통원료로 선정한 작두콩, 다채썩, 유채썩, 오가피 혼합물 80% 분량과 혼합하여 총 100%로 하고, 이 혼합물 20%를 곡류 기본베이스 80%와 다시 혼합하여 전체 식품조성물로 구성하였다(Table 14).

Table 18. 림프암용 천연물 및 특징

천연물명	특징
인동꽃	성질은 약간 차고[微寒] 맛이 달며[甘] 독이 없음. 추웠다 열이 나면서 몸이 붓는 것과 열독, 혈리 등에 쓰며 5시(五時)를 치료함.(동의보감) 있에는 Ionicerin, luteolin이 함유되어 있고, 줄기에는 탄닌, 알칼로이드가 함유되어 있음. Luteolin은 평활근에 작용하여 진경, 이뇨 작용을 함.
더덕 (사삼)	성질이 약간 차고[微寒] 맛이 쓰며[苦] 독이 없음. 비위를 보하고 폐기를 보충해 주는데 산기(疝氣)로 음낭이 처진 것을 치료함. 또한 고름을 빨아내고 종독(腫毒)을 삭히며 5장에 있는 풍기(風氣)를 해침.(동의보감) 어느 지방에나 다 있는데 산에 있음. 잎이 구기자와 비슷하면서 뿌리가 허옇고 실한 것이 좋음. 썩이나 뿌리는 채소로 먹음(본초강목) 뿌리에는 사포닌, 이눌린, 잎에는 플라보노이드가 함유되어 있음.
도라지 (길경)	성질이 약간 따뜻하며[微溫](평(平)하다고도 한다) 맛이 매우면서 쓰고[辛苦] 독이 약간 있음. 폐기로 숨이 찬 것을 치료하고 모든 기를 내리며 목구멍이 아픈 것과 가슴, 옆구리가 아픈 것을 낮게 하고 고독을 없앴.(동의보감) 도라지는 모든 약 기운을 끌고 위로 올라가면서 아래로 내려가지 못하게 함. 또한 기혈도 끌어올림. 나뭇배와 같은 역할을 하는 수태음경의 인경약임(본초강목) 사포닌, 이눌린, 파이토스테린, 프라코디딘, 피토스테놀 등의 성분이 풍부해 기관지 계통의 증상에 좋음.
생강	성질이 약간 따뜻하고[微溫] 맛이 매우며[辛] 독이 없음. 오장으로 들어가고 담을 삭히며 기를 내리고 토하는 것을 멎게 함. 또한 풍한사와 습기를 없애고 딸꾹질하며 기운이 치미는 것과 숨이 차고 기침하는 것을 치료함.(동의보감) 이약의 성질은 따뜻하나[溫] 껍질의 성질은 차가움[寒]. 그러므로 반드시 뜨겁게 하려면 껍질을 버려야 하고 차게 하려면 껍질째로 써야 함(본초강목)

(다) 환자용 균형영양식 기준에 부합하는 영양성분 보완

상기와 같이 제조한 발효선식 3종에 대하여 한국식품연구원에 의뢰하여 영양성분 분석을 시행하였다. 비타민과 미네랄 성분 중 한국식품연구원에 의뢰하지 못한 비타민 B1, B2, B6, D, 나이아신, 엽산성분은 식품공전에 정하는 시험기준에 따라 자체 분석한 자료를 활용하였다.

발효선식은 바로 포장하여 시제품으로 제조가 가능할 것으로 판단하였으나, 환자용 균형영양식으로 제품화 하기 위해서는 식품공전에서 정하는 규정에 따라 부족한 영양성분을 첨가하는 방안을 모색하였다.

식품공전 19-5 특수 의료용도 등 식품, 3) 제조·가공기준에 따르면 지방, 탄수화물, 식이섬유 등에 대한 함량에 대한 별다른 규정은 없으며 다만, 비타민과 미네랄 성분에 대하여 “(3) 환자용 균형영양식은 환자의 식사 전부 또는 일부를 대신하기 위하여 제품 1000 kcal당 비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산, 단백질, 칼슘, 철, 아연을 영양소 기준치의 50% 이상 되도록 원료식품을 조합하고 영양소를 첨가하여야 한다”고 규정되어 있다. 또한 4) 식품유형에 “(1) 환자용 균형영양식은 환자에게 필요한 영양소를 균형 있게 제공할 수 있도록 영양성분을 조정하여 제조·가공한 것으로 환자의 식사 일부 또는 전부를 대신할 수 있는 제품을 말하며”라고 명시되어 있다.

따라서 한국식품연구원에 의뢰하여 시행한 영양분석 결과를 근거로 하여 식품공전에서 정하는 규정에 부합할 수 있도록 단백질, 비타민으로서 비타민 A, B1, B2, B6, C, D, E, 나이아신, 엽산, 그리고 무기질로서 칼슘, 철, 아연에 한하여 부족한 양을 첨가하는 방안을 모색하였다.

① 혈액암 유병자를 위한 시제품 영양성분 보완 방안

혈액암 유병자용 발효선식 시제품의 영양분석 결과 Table 19에 나타낸 바와 같이 단백질, 비타민 B1, B2, B6, D, 철, 아연 성분의 함량은 기준에 충분히 부합하였으나, 비타민 A, C, E, 나이아신, 엽산 및 칼슘함량은 식품공전 기준보다 낮아 보충할 필요가 있는 것으로 분석되었다. 따라서 혈액암 유병자를 위한 환자용 균형 영양식의 제조는 발효선식 시제품에 비타민A 134.6 $\mu$ g, C 19.2mg, E 2.1mg, 나이아신 2.9mg, 엽산 76.9 $\mu$ g 및 칼슘 134.6mg을 보충하여 혼합한 후 포장하는 방안을 선택하였다.

㉠ 한국식품연구원 분석자료

혈액암 유병자를 위한 발효선식을 한국식품연구원에 의뢰하여 시행한 영양성분 분석에 대한 자료는 아래와 같다. 비타민과 미네랄 성분 중 한국식품연구원에 분석을 의뢰하지 못한 비타민 B1, B2, B6, D, 나이아신, 엽산성분은 식품공전에 정하는 시험기준에 따라 자체 분석한 자료를 활용하였다.

## 시험 성적서(Certificate)

시료명 (SAMPLE) : 발효선식 A  
의뢰처 (REQUESTED BY) : 애경산업(주)  
주소 (ADDRESS) : 서울시 구로구 구로동 83  
의뢰일자 (DATE REQUESTED) : 2013. 05. 23.  
참고번호 (File No.) : AO2013-06-11-185~01.

항목	분석결과	단위	시험방법
열량*	379	kcal/100g	식품공전(2012) 계산법
수분	4.7	g/100g	식품공전(2012) 상압가열건조법
지방	1.3	g/100g	식품공전(2012) 에테르추출법
단백질	12.6	g/100g	Kjeldahl법
회분	2.1	g/100g	식품공전(2012) 회분시험법
탄수화물	79.3	g/100g	식품공전(2012) 계산법
식이섬유	6.3	g/100g	식품공전(2012) 총식이섬유시험법
비타민 A	0.0	μg/100g	식품공전(2012) 비타민류시험법
비타민 C	1.0	mg/100g	식품공전(2012) 비타민류시험법
비타민 E	0.8	mg/100g	식품공전(2012) 비타민류시험법
Ca	120.0	mg/100g	ICP-AES 측정법
P	248.2	mg/100g	ICP-AES 측정법
Fe	5.1	mg/100g	ICP-AES 측정법
Na	56.4	mg/100g	ICP-AES 측정법
K	611.3	mg/100g	ICP-AES 측정법
Zn	2.2	mg/100g	ICP-AES 측정법

\*열량 : 에트워터 계수를 사용하여 검체 100g중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질 4, 지방 9, 탄수화물 4의 계수를 곱하고 각각의 에너지를 칼로리(kcal)단위로 산출하여 그 총계로 나타낸 값을 말한다.

이 성적서의 전부 또는 일부를 당 연구원의 문서화된 사전 동의 없이 무단으로 법적 소송이나 상품선전 등 기타의 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다. 본 성적서의 재발급은 승인을 받아야 합니다.

### ㉠ 환자용 균형영양식 규정에 따른 시제품의 영양성분 보완

혈액암 유병자를 위한 발효선식 시제품의 영양분석 자료를 기준으로 환자용 균형영양식 규격에 부합할 수 있도록 첨가가 필요한 영양성분 함량을 계산하였다(Table 19).



Table 19. (혈액암)환자용 균형영양식 규격에 부합할 수 있는 추가 영양성분 함량

성분	100g당 함량 (한식연 분석자료)	%영양소 함량			제품보완을 위한 추가 영양성분 함량
		기준값 (1일 권장량)	시제품 함량		
			100g당 %함량 (발효선식)	1,000 kcal 기준* (환자용균형영양 식)	
열량(Kcal)	379			1,000	
수분(g)	4.7				
지질(g)	1.3	51	3	7	
<b>단백질(g)</b>	12.6	55	23	<b>60</b>	<b>부합</b>
탄수화물(g)	79.3	330	24	63	
식이섬유(g)	6.3	25	25	66	
비타민A(μg)	0	700	0	0	134.6
<b>비타민B1(mg)</b>	0.6	1.2	50	<b>132</b>	<b>부합</b>
<b>비타민B2(mg)</b>	0.3	1.4	21	57	<b>부합</b>
<b>비타민B6(mg)</b>	0.3	1.5	20	53	<b>부합</b>
비타민C(mg)	1	100	1	3	19.2
<b>비타민D(μg)</b>	1.2	5	24	63	<b>부합</b>
비타민E(mg)	0.8	11	7	19	2.1
나이아신(mg)	2.3	15	15	40	2.9
엽산(μg)	47.1	400	12	31	76.9
칼슘(mg)	120	700	17	45	134.6
<b>철(mg)</b>	5.1	12	43	112	<b>부합</b>
<b>아연(mg)</b>	2.2	8.5	26	68	<b>부합</b>
인(mg)	248	700	35	93	
칼륨(mg)	611.3	3500	17	46	

\* 시제품 100g에 해당하는 열량이 379 kcal 이므로 환자용 균형영양식 기준 1,000 kcal에 해당하는 영양성분 함량을 계수 2.63을 곱하여 환산하고 반올림하여 정수로 표시하였음

② 근육암 유병자를 위한 시제품 영양성분 보완 방안

㉞ 한국식품연구원 분석 결과

근육암 유병자를 위한 발효선식 시제품의 영양성분에 대한 한국식품연구원의 자료는 아래와 같다. 비타민과 미네랄 성분 중 한국식품연구원에 분석을 의뢰하지 못한 비타민 B1, B2, B6, D, 나이아신, 엽산성분은 식품공전에 정하는 시험기준에 따라

자체 분석한 자료를 활용하였다.



경기도 성남시 분당구 만양관교로 1201 (463-746)  
 전화: 031)780-9241, 9292 전송: 031)780-9280  
 1201, Anyangpangyo-ro, Bundang-gu, Sungnam-si,  
 Gyeonggi-do, 463-746, Republic of Korea  
 TEL. (031)780-9241, 9292 FAX. (031)780-9280

### 시험 성적서(Certificate)

시료명 (SAMPLE) : 발효선식 B  
 의뢰처 (REQUESTED BY) : 애경산업(주)  
 주소 (ADDRESS) : 서울시 구로구 구로동 83  
 의뢰일자 (DATE REQUESTED) : 2013. 05. 23.  
 참고번호 (File No.) : AO2013-06-11-185~02.

항목	분석결과	단위	시험방법
열량*	378	kcal/100g	식품공전(2012) 계산법
수분	5.1	g/100g	식품공전(2012) 상압가열건조법
지방	1.1	g/100g	식품공전(2012) 에테르추출법
단백질	11.8	g/100g	Kjeldahl법
회분	1.8	g/100g	식품공전(2012) 회분시험법
탄수화물	80.2	g/100g	식품공전(2012) 계산법
식이섬유	7.0	g/100g	식품공전(2012) 총식이섬유시험법
비타민 A	0.0	µg/100g	식품공전(2012) 비타민류시험법
비타민 C	0.0	mg/100g	식품공전(2012) 비타민류시험법
비타민 E	0.4	mg/100g	식품공전(2012) 비타민류시험법
Ca	175.1	mg/100g	ICP-AES 측정법
P	222.6	mg/100g	ICP-AES 측정법
Fe	4.6	mg/100g	ICP-AES 측정법
Na	38.2	mg/100g	ICP-AES 측정법
K	486.8	mg/100g	ICP-AES 측정법
Zn	2.0	mg/100g	ICP-AES 측정법

\*열량 : 메트워터 계수를 사용하여 검체 100g중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질 4, 지방 9, 탄수화물 4의 계수를 곱하고 각각의 에너지를 킬로칼로리(kcal)단위로 산출하여 그 총계로 나타낸 값을 말한다.

이 성적서의 전부 또는 일부를 당 연구원의 문서화원 사전 동의 없이 무단으로 법적 소송이나 상품선전 등 기타의 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다. 본 성적서의 재발급은 승인을 받아야 합니다.

#### ㉠ 환자용 균형영양식 규정에 따른 시제품의 영양성분 보완

근육암 유병자용 발효선식 시제품의 영양분석 결과 Table 20에 나타낸 바와 같이 단백질, 비타민 B1, B2, B6, D, 칼슘, 철, 아연 성분의 함량은 기준에 충분히 부합하였으나, 비타민 A, C, E, 나이아신 및 엽산 함량은 식품공전 기준보다 낮아 보충할 필요가 있는 것으로 분석되었다. 따라서 근육암 유병자를 위한 환자용 균형 영양식의 제조는 발효선식 시제품에 비타민 비타민A 134.6µg, C 19.2mg, E 2.1mg, 나이아신 2.9mg, 엽산 76.9µg을 보충하여 혼합한 후 포장하는 방안을 선택하였다.

Table 20. (근육암)환자용 균형영양식 규격에 부합할 수 있는 추가 영양성분 함량

성분	100g당 함량 (한식연 분석자료)	%영양소 함량			제품보완을 위한 추가 영양성분 함량
		기준값 (1일 권장량)	시제품 함량		
			100g당 %함량 (발효선식)	1,000 kcal 기준* (환자용균형영양 식)	
열량(Kcal)	378			1,000	
수분(g)	5.1				
지질(g)	1.1	51	3	6	
<b>단백질(g)</b>	11.8	55	23	<b>57</b>	<b>부합</b>
탄수화물(g)	80.2	330	24	64	
식이섬유(g)	7	25	25	74	
비타민A(μg)	0	700	0	0	134.6
<b>비타민B1(mg)</b>	0.6	1.2	50	<b>132</b>	<b>부합</b>
<b>비타민B2(mg)</b>	0.4	1.4	21	<b>76</b>	<b>부합</b>
<b>비타민B6(mg)</b>	0.3	1.5	20	<b>53</b>	<b>부합</b>
비타민C(mg)	0	100	1	0	19.2
<b>비타민D(μg)</b>	1.1	5	24	<b>58</b>	<b>부합</b>
<b>비타민E(mg)</b>	0.4	11	7	10	2.1
<b>나이아신(mg)</b>	2.4	15	15	42	2.9
엽산(μg)	47.2	400	12	31	76.9
<b>칼슘(mg)</b>	175.1	700	17	<b>66</b>	<b>부합</b>
<b>철(mg)</b>	4.6	12	43	<b>101</b>	<b>부합</b>
<b>아연(mg)</b>	2	8.5	26	<b>62</b>	<b>부합</b>
인(mg)	222.6	700	35		
칼륨(mg)	486.8	3500	17		

\* 시제품 100g에 해당하는 열량이 379 kcal 이므로 환자용 균형영양식 기준 1,000 kcal에 해당하는 영양성분 함량을 계수 2.63을 곱하여 환산하고 반올림하여 정수로 표시하였음

③ 림프암 유병자를 위한 시제품 영양성분 보완 방안

㉔ 한국식품연구원 분석 결과

림프암 유병자를 위한 발효선식 시제품의 영양성분에 대한 한국식품연구원의 자료는 아래와 같다. 비타민과 미네랄 성분 중 한국식품연구원에 분석을 의뢰하지 못한 비타민 B1, B2, B6, D, 나이아신, 엽산성분은 식품공전에 정하는 시험기준에 따라 자체 분석한 자료를 활용하였다.



경기도 성남시 분당구 안양관교로 1201 (463-746)  
 전화: 031)780-9241, 9292 전송: 031)780-9280  
 1201, Anyangpangyo-ro, Bundang-gu, Sungnam-si,  
 Gyeonggi-do, 463-746, Republic of Korea  
 TEL. (031)780-9241, 9292 FAX. (031)780-9280

**시 험 성 적 서(Certificate)**

시 료 명 (SAMPLE) : 발효선식 C  
 의 령 처 (REQUESTED BY) : 애경산업(주)  
 주 소 (ADDRESS) : 서울시 구로구 구로동 83  
 의뢰일자 (DATE REQUESTED) : 2013. 05. 23.  
 참고번호 (File No.) : AO2013-06-11-185~03.

항목	분석결과	단위	시험방법
열량*	379	kcal/100g	식품공전(2012) 계산법
수분	4.8	g/100g	식품공전(2012) 상압가열건조법
지방	1.1	g/100g	식품공전(2012) 에테르추출법
단백질	11.6	g/100g	Kjeldahl법
회분	1.8	g/100g	식품공전(2012) 회분시험법
탄수화물	80.7	g/100g	식품공전(2012) 계산법
식이성유	6.4	g/100g	식품공전(2012) 총식이성유시험법
비타민 A	0.0	µg/100g	식품공전(2012) 비타민류시험법
비타민 C	0.0	mg/100g	식품공전(2012) 비타민류시험법
비타민 E	0.5	mg/100g	식품공전(2012) 비타민류시험법
Ca	93.3	mg/100g	ICP-AES 측정법
P	220.8	mg/100g	ICP-AES 측정법
Fe	4.4	mg/100g	ICP-AES 측정법
Na	41.5	mg/100g	ICP-AES 측정법
K	501.9	mg/100g	ICP-AES 측정법
Zn	2.0	mg/100g	ICP-AES 측정법

\*열 량 : 에트워터 계수를 사용하여 경제 100g중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질 4, 지방 9, 탄수화물 4의 계수를 곱하고 각각의 에너지를 킬로칼로리(kcal)단위로 산출하여 그 총계로 나타낸 값을 말한다.

이 성적서의 전부 또는 일부를 당 연구원의 문서화된 사전 동의 없이 무단으로 법적 소송이나 상품선전 등 기타의 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다. 본 성적서의 재발급은 승인을 받아야 합니다.

㉔ 환자용 균형영양식 규정에 따른 시제품의 영양성분 보완

림프암 유병자용 발효선식 시제품의 영양분석 결과 Table 21에 나타낸 바와 같이 단백질, 비타민 B1, B2, D, 나이아신, 철, 아연 성분의 함량은 기준에 충분히 부합하였으나, 비타민 A, B6, C, E, 나이아신, 엽산 alc 칼슘함량은 식품공전 기준보다 낮아 보충할 필요가 있는 것으로 분석되었다. 따라서 근육암 유병자를 위한 환자용 균형 영양식의 제조는 발효선식 시제품에 비타민 A 134.6 $\mu$ g, B6 0.3 mg, C 19.2mg, E 2.1mg, 엽산 76.9 $\mu$ g 및 칼슘 134.6 mg을 보충하여 혼합한 후 포장하는 방안을 선택하였다.

Table 21. (림프암)환자용 균형영양식 규격에 부합할 수 있는 추가 영양성분 함량

성분	100g당 함량 (한식연 분석자료)	%영양소 함량			제품보완을 위한 추가 영양성분 함량
		기준값 (1일 권장량)	시제품 함량		
			100g당 %함량 (발효선식)	1,000 kcal 기준* (환자용균형영양식)	
열량(Kcal)	379			1,000	
수분(g)	4.8				
지질(g)	1.1	51	2	6	
단백질(g)	11.6	55	21	<b>56</b>	부합
탄수화물(g)	80.7	330	24	65	
식이섬유(g)	6.4	25	26	68	
비타민A( $\mu$ g)	0	700	0	0	134.6
비타민B1(mg)	0.7	1.2	58	<b>154</b>	부합
비타민B2(mg)	0.7	1.4	50	<b>132</b>	부합
비타민B6(mg)	0.2	1.5	13	35	0.3
비타민C(mg)	0	100	0	0	19.2
비타민D( $\mu$ g)	1.4	5	28	<b>74</b>	부합
비타민E(mg)	0.5	11	5	12	2.1
나이아신(mg)	3.9	15	26	<b>69</b>	부합
엽산( $\mu$ g)	52.8	400	13	35	76.9
칼슘(mg)	93.3	700	13	35	134.6
철(mg)	4.4	12	37	<b>97</b>	부합
아연(mg)	2	8.5	24	<b>62</b>	부합
인(mg)	220.8	700	32	83	
칼륨(mg)	501.9	3500	14	38	

\* 시제품 100g에 해당하는 열량이 379 kcal 이므로 환자용 균형영양식 기준 1,000 kcal에 해당하는 영양성분 함량을 계수 2.63을 곱하여 환산하고 반올림하여 정수로 표시하였음

## 제 3 절 천연물 수득 방법의 개선 및 공정 확립

### 1. 연구 방법

#### 가. 천연 소재의 수득 방법 확립

##### (1) 새싹 재배법의 적용

###### (가) 재배 조건 분석

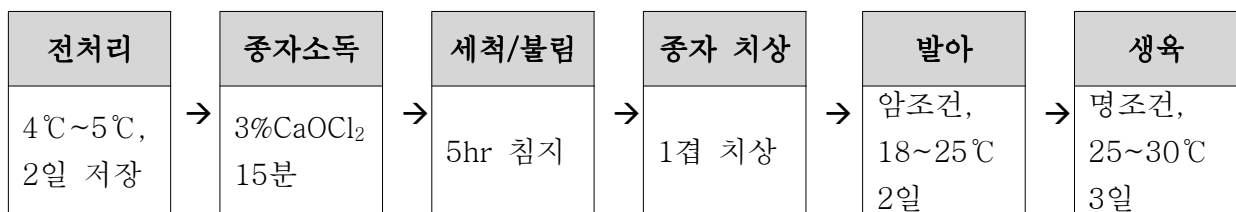
###### ① 종자 발아율의 측정을 위한 처리 조건

조혈 및 면역 효능이 우수한 것으로 평가된 유채 및 다채와 조성물의 원료중 하나로 선정된 메밀을 새싹 원료용 종자로 하여 채반에 치상하기 전에 휴면 타파를 위해서 4℃~5℃ 정도의 냉장온도에서 약 2일 정도 보관하였다. 종자 발아율의 측정은 1g의 종자를 비이커에 담고 10mL의 일반 수도수 또는 3% Calcium hypochloride (CaOCl<sub>2</sub>) 용액으로 달리한 각 처리수로 15분간 침지하여 종자를 소독한 경우와 소독하지 않은 경우로 분리하여 진행하였다. 침지를 끝낸 종자는 살균한 증류수로 세척하고 5시간 침지하여 불림 과정을 거친 후 거즈와 같은 천으로 덮은 채반위에 100립을 치상하여 수도수 또는 지장수를 재배수로 하여 2시간 간격으로 자동분무 되도록 하면서 실온(18~25℃)의 암조건에서 발아시켰다. 재배수로 사용한 지장수는 황토와 미강을 100:8의 비율로 혼합한 후 40℃에서 5일간 숙성하여 맑은 윗물을 여과하여 조제하였다.

###### ② 재배기간에 따른 미생물의 변화 측정

종자를 3% Calcium hypochloride (CaOCl<sub>2</sub>)용액으로 수침하여 소독 처리한 여부에 따른 일반미생물의 오염정도를 식품공전의 미생물 시험법에 준하여 실행하였다.

##### (나) 다채 및 유채 새싹 재배법 설정



##### (다) 발아에 의한 소화흡수 개선 방법 연구

###### ① 새싹 수득 방법

작두콩 1 kg을 준비하여, 새싹 자동재배기(모델명:SC-9000A, 대한민국)에 골고루 퍼지게 놓았다.

새싹 자동재배기 아래에 물을 넣고, 간헐적으로 물이 분사될 수 있도록 스위치를 조작하였다.

새싹 자동재배기에 사용하는 물은 하루에 한 번씩 반드시 교환하였다.

새싹 자동재배기를 인큐베이터(Thermostatically controlled cabinet, 모델명:ET

636)에 넣고, 온도는 23℃로 맞추고, 4일 경과 후, 발아 상태를 확인하여, 발아 싹의 길이가 1~2 cm 가 되면 수득하였다.

## ② 단백질 용출 용이성 확인 방법

용출시험은 대한약전 일반시험법 중 용출시험법 제2법(Paddle method)에 따라 수행하였다. 시험액의 온도는 37±0.5 ℃, 교반속도는 50 rpm에서 실시하였다. 용출액으로는 인공위액(대한약전 일반시험법 중 봉해시험법 제 1액, pH 1.2±0.1)을 사용하였고, 500 mL에서 실험하였다. 각각 제조된 정제를 싱커(sinker)를 사용하여 용출시험액에 넣은 후, 인공위액에서 각각 4시간 동안 시험하였다. 시료 채취 시간은 각각 2시간과 4시간으로 하였으며 시료는 각각 30 mL씩 취하였고, 동량의 액으로 보충한 후, 시료를 1/5로 희석하여 단백질을 정량하였다.

## ③ 단백질 정량 시험 방법

용출된 단백질의 농도는 Advanced Protein Assay Reagent(Cytoskeleton, Denver, USA)를 이용하여 분석하였다. 96 well plate의 각 well에 완충용액 90 μl, 1/5로 희석한 용출용액 10 μl, 1X 농도로 희석한 단백질 정량 시약 100 μl를 넣은 후 microplate reader(SpectraMax 340PC, Molecular Devices, USA)를 이용하여 595 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선(Standard curve)은 용출용액 시료 대신에 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)을 1/2씩 단계희석(serial dilution)한 것을 10 μl 넣어 흡광도를 측정한 결과로 얻었으며, 표준곡선을 이용하여 용출용액 시료의 단백질을 정량하였다. 발아시키지 않은 작두콩과 발아 작두콩의 용출시험 2시간, 4시간 후에 채취한 용출용액의 단백질 함량에 대한 결과는 하기 Fig.20에 나타내었다.

## (2) 발효 제법 확립

### (가) 식품조성물의 발효 조건

#### ① 발효 균주 (유산균)

식품조성물의 발효는 유산균 혼합균주를 활용하여 고체발효 하였다. 발효를 위한 유산균 종균은 배추김치, 물김치, 열무김치, 오이 소배기, 깍두기 등 다양한 김치와 beef jerky 및 Grind Beef 등 육류 및 그 가공품에서 콜레스테롤 저하 및 항균효과에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 활성이 우수한 균을 기준으로 선별하여 본 연구실에서 기 확보하고 있던 균주로서 phenotypic & chemotypic screening methods로 동정한 *Lactobacillus fermentum* HD6, *Lactobacillus brevis* KY721, *Lactobacillus plantarum* KY903 및 *Leuconostoc mesenteroides* HD12 균주를 포함한다.

#### ② 조성물의 고체발효 조건

조성물의 고체발효를 위하여 분말원료는 정해진 배합비율에 따라 현물(생물)상태로 혼합하여 원적외선 건조기에서 수분함량 10~15%정도가 될 때까지 40℃ 조건으로 건조 후 분쇄하여 준비하였다. 분말형태로 전처리하기 어려운 원료는 열수추출하여 액상으로 만든 후 분말원료 대비 30%가 되도록 농축하여 분말원료와 혼합하였다. 이어 혼합한 원료를 121℃, 20분간 멸균하여 약 2.67 X 10<sup>8</sup> CFU/ml 농도로 배양한 유산균(*Lactobacillus* spp.)을 10% 농도로 접종하고 밀폐된 배양기에서 42℃, 7일간 혐기발효 하였다. 조성물의 발효기간에 따른 총균수, 유산균 및 효모 등 미생물의 변화와 pH 및 산도를 식품공전 시험방법에 따라 분석하였다.

(3) 단백질 함량을 증가시킨 버섯 재배법

(가) 콩섬유박(비지) 고체배지 조성물과 재배조건

버섯의 단백질 함량을 증가시킬 목적으로 두부 제조시 폐기처리 되고 있는 콩섬유박(비지)을 수거하여 병재배용 버섯배지 조성물을 설정하였다. 버섯용 고체배지는 콩섬유박(75):미강(25)의 비율로 혼합하여 121℃, 60분간 살균하여 고체배지 50g당 양송이 액체종균 10mL를 접종하였다. 접종한 양송이 자실체 형성을 위해서 25℃에서 균사체를 형성시킨 후, 4℃에서 12시간 동안 방치한 다음 재배조건으로 20℃, 습도 90%의 조건을 적용하였다.



## 2. 연구 결과 및 고찰

### 가. 천연 소재의 수득 방법 확립

#### (1) 재배조건 분석

##### (가) 종자의 소독처리 및 재배수가 발아율에 미치는 영향

유채, 다채 및 메밀 종자의 소독제로서 3% Calcium hypochloride (CaOCl<sub>2</sub>) 용액의 처리여부 및 재배수를 달리한 조건에 따른 발아율을 Table 22에 나타내었다.

**Table 22. 소독제 처리 여부 및 재배수 종류에 따른 발아율**

종자	처리조건		재배기간(h)에 따른 발아율(%)			
			12h	24h	36h	48h
다채	3% CaOCl <sub>2</sub>	수도수	18±6.0	58±3.5	73±2.8	91±0.0
		지장수	23±7.5	63±5.0	77±0.0	92±0.5
	-	수도수	33±4.5	71±4.5	81±2.5	93±1.5
		지장수	38±6.2	72±2.2	79±3.6	90±1.2
유채	3% CaOCl <sub>2</sub>	수도수	4±5.2	18±5.3	48±5.2	81±2.0
		지장수	6±3.5	21±2.5	52±0.5	79±4.5
	-	수도수	11±3.5	28±1.3	58±1.5	83±2.7
		지장수	9±7.5	31±2.0	61±3.2	87±3.4
메밀	3% CaOCl <sub>2</sub>	수도수	18±4.2	48±4.3	72±2.2	89±3.5
		지장수	16±4.5	51±2.5	72±3.5	94±4.0
	-	수도수	21±3.5	58±3.3	78±4.5	93±4.4
		지장수	19±3.7	61±3.0	71±1.2	93±2.7

종자별 발아율은 유채, 다채 및 메밀 종자 모두 초기 발아율이 소독제를 처리한 경우가 처리하지 않은 경우보다 다소 낮은 것으로 나타났으나 최종 발아율은 소독제 처리 여부 및 재배수 종류에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 유채, 다채 및 메밀 종자의 초기 발아율은 재배수의 종류와 관계없이 3% CaOCl<sub>2</sub>로 소독 처리한 경우 처리하지 않은 경우보다 종자 치상 후 1일(24h)까지 다소 저조하긴 하였으나 2일(48h)이 경과하면서 각각 90%, 80% 및 90% 이상 발아하였다. 다채와 메밀 종자는 3% Calcium hypochloride (CaOCl<sub>2</sub>) 용액으로 수침하여 소독 처리한 경우나 처리하지 않은 경우에서 모두 일반 수도수 또는 지장수 등 공급된 재배수와 상관없이 종자 치상 후 2일(48h)이 경과하면서 90% 이상 발아하였으며 유채종자는 같은 조건에서 80% 이상 발아하였다.

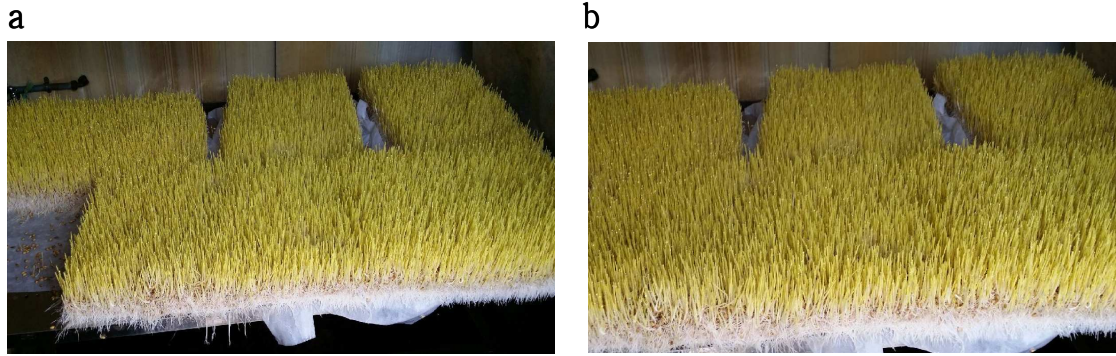


Fig. 65. 유채싹 발아(a.수도수 공급 b.지장수 공급)

(나) 재배기간에 따른 미생물의 변화

다채, 유채 및 메밀 종자를 각각 소독제 처리하여 치상하였을 때 발아하기 전(2일)까지 재배수 종류에 관계없이 소독하지 않은 종자에서 보다 일반세균수가 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 종자가 발아하여 새싹을 수확하기까지(5~7일) 재배기간이 지나면서 소독제 처리 여부에 관계없이 수도수 및 지장수 급수 조건의 경우 모두에서 미생물 군수가 전반적으로 증가하였다(Data not Shown). 이는 종자를 소독할 경우 발아 전 미생물의 오염을 감소시킬 수 있으나 발아 후에 새싹이 성장하는 동안 재배수 및 재배 환경으로부터 직·간접적인 미생물의 오염으로 인한 결과로 예상된다. 따라서 새싹채소의 미생물 오염을 방지하기 위해서는 종자를 소독 처리하는 것도 중요하지만 재배기간 공급되는 재배수의 처리와 재배환경 또한 중요하게 관리하여야 할 것으로 사료된다.

(2) 발아에 의한 소화흡수 개선 방법 연구

용출시험 실시 4시간 후에 발아시키지 않은 작두콩에 비해 발아 작두콩에서 더 많은 단백질이 용출되어, 작두콩의 발아 과정을 통하여 분해가 용이한 형태로 변형된 것을 확인할 수 있었다. 이는 소화흡수가 용이한 형태로 단백질이 변형된 것으로 추측할 수 있다.

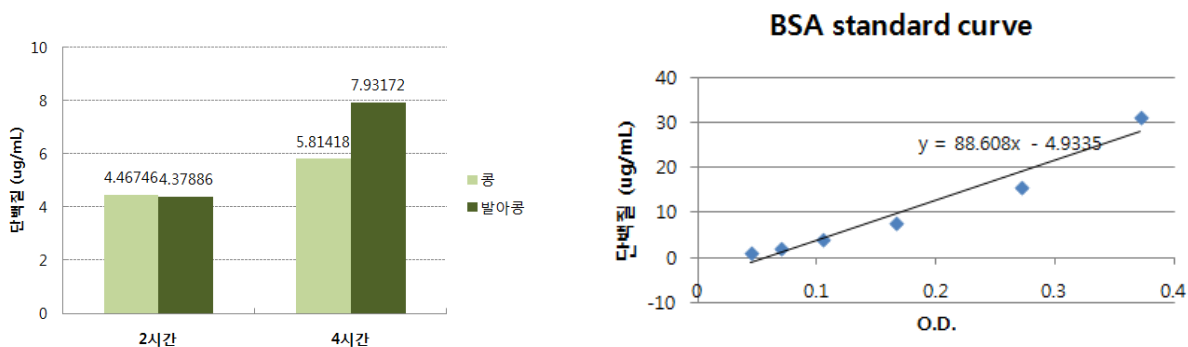


Fig. 66. Protein amount of CGD and CGD sprout extracted from simulated gastric fluid TS after 2 hr and 4 hr.

CGD and CGDsprout were stirred in simulated gastric fluid TS using Paddle method. Extract solutions collected after 2 hr and 4 hr were used to assay protein. By using Protein Assay Reagent, protein amounts of CGD and CGD sprout were obtained. BSA protein was used to obtain standard curve.

## 나. 발효 제법 확립

### (1) 발효에 따른 조성물의 pH 및 산도의 변화

발효기간에 따른 조성물의 pH는 유산균 접종 초기 6.4~6.6에서 발효를 끝낸 7일째에 5.2~5.3으로 감소하였으며, 이에 따라 산도가 서서히 증가하여 7일째에 0.40~0.42%에 도달하였다(Table 23). 일반적으로 김치발효 또는 액상발효의 경우에는 발효기간의 경과함에 따라 유산균의 활발한 증식에 의해 pH 및 산도의 변화가 급격하게 나타나는 경향이 있으나 본 연구에서 시행한 조성물의 발효는 고체상 발효로서 전반적으로 pH 및 산도가 비교적 완만하게 변화하였으며 조성물의 종류에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다.

**Table 23. 발효기간에 따른 식품 조성물의 pH 및 산도의 변화**

발효기간(Day)		0	1	2	3	4	5	6	7
pH	A <sup>*</sup>	6.4	6.0	6.1	5.6	5.6	5.4	5.2	5.2
	B <sup>*</sup>	6.4	6.2	6.1	5.8	5.6	5.5	5.4	5.2
	C <sup>*</sup>	6.6	6.5	6.2	5.8	5.7	5.4	5.2	5.3
산도 (Lactic acid %)	A	0.04	0.12	0.22	0.28	0.32	0.38	0.41	0.42
	B	0.00	0.04	0.18	0.22	0.28	0.32	0.38	0.40
	C	0.00	0.07	0.19	0.24	0.29	0.33	0.40	0.40

\* A : 혈액암 조성물, B : 근육암 조성물, C : 림프암 조성물

### (2) 발효에 따른 조성물의 미생물 생육변화

발효기간이 경과함에 따라 각 조성물의 총 균수의 변화는 큰 차이를 보이지 않았다. 전반적으로 발효기간이 경과함에 따라 총 균수는 서서히 증가하였으며, 발효 7일에 최대 8.4 log CFU/mL까지 도달하는 것으로 분석되었다(Fig. 67). 조성물의 발효에 따른 유산균의 변화는 총 균수의 변화와 거의 유사한 경향을 보였다. 각 조성물에 따른 유산균의 생육변화는 차이가 없는 것으로 나타났으며, 발효기간이 경과함에 따라 유산균의 수는 서서히 증가하여 발효 7일에 최대 8.3 log CFU/mL까지 도달하였다(Fig. 68). 조성물의 발효에 따른 효모의 생육은 미미한 정도로 분석되었다.

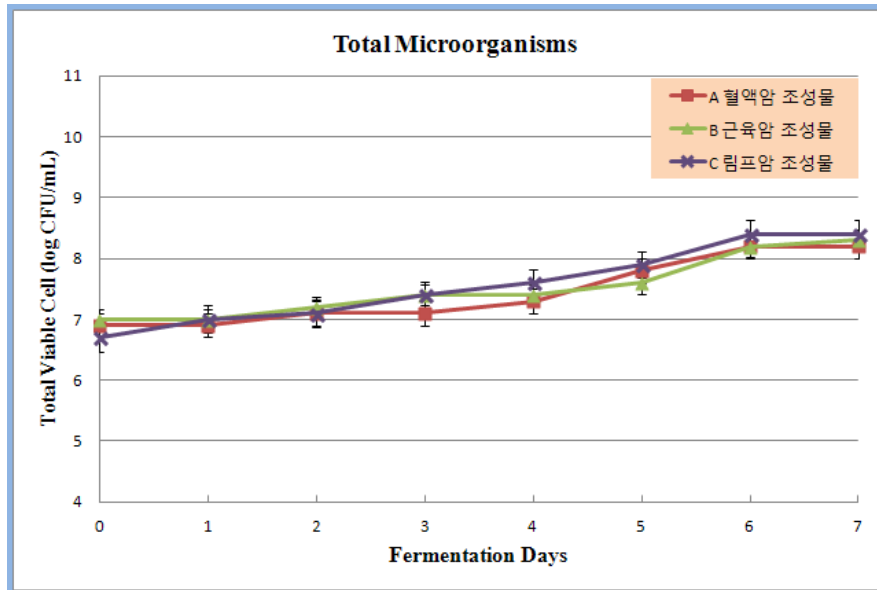


Fig. 67. The growth of total microorganism during fermentation at 42°C for 7 days.

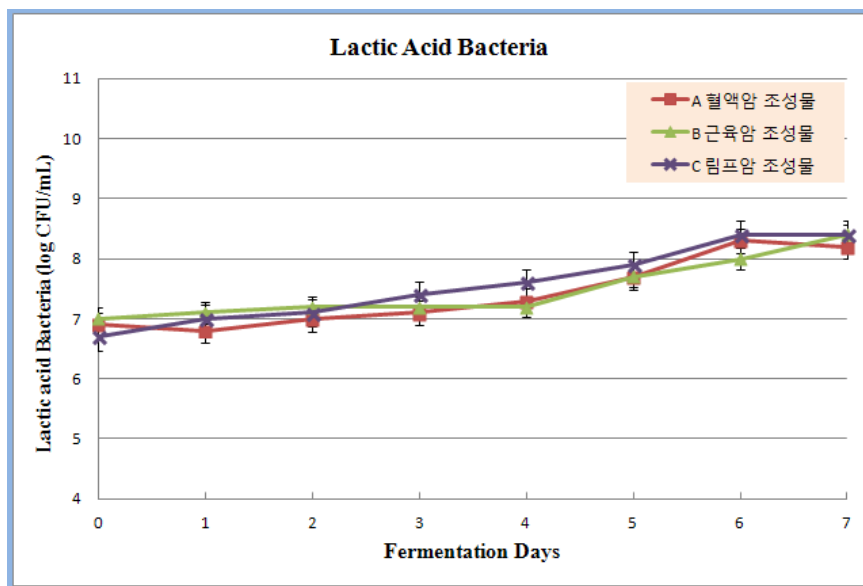


Fig. 68. The growth of lactic acid bacteria during fermentation at 42°C for 7 days.

## 다. 단백질 함량을 증가시킨 버섯 재배법 확립

### (1) 버섯의 생육 및 영양소 변화

버섯의 생육에 필요한 양질의 단백질 급원으로 콩섬유박(비지)를 첨가한 고체영양배지에서 재배한 버섯은 단백질 함량이 증가되어 환자용 고단백 급식 원료로 활용가능하다. 콩섬유박(비지)로 조제한 배지에서 양송이 버섯을 생육한 결과 균사체 및 자실체의 생장속도가 일반배지에서 보다 효율적으로 증가하였다. 재배기간 동안 양송이 자실체의 생장길이는 톱밥을 사용한 일반배지에서 2.7cm/day로 나타난 반면 톱밥을 대신하여 콩섬유박(비지)를 첨가한 배지에서는 3.9 cm/day로 생육기간이 단축되었다. 콩섬유박 고체배지에서 생육한 양송이 버섯의 영양성분 함량을 분석한 결과 Table 2에 나타낸 바와 같이 탄수화물의 함량이 2배 가까이 감소한 반면 조단백 함량은 2배 이상 현저히 증가한 것으로 분석되었다.

Table 24. 고체배지 조건에 따른 양송이 버섯의 영양성분

일반성분	가식부 100g 당						
	시료명	에너지 (kcal)	수분 (g)	조단백 (g)	탄수화물 (g)	조지방 (g)	조섬유 (g)
	일반배지	291	6.2	22.0	64.9	1.0	7.4
콩섬유박 배지	262	5.8	<b>50.6</b>	<b>34.7</b>	1.1	10.7	

무기성분	가식부 100g 당											
	시료명	P (mg)	Mg (mg)	Ca (mg)	Na (mg)	Fe (mg)	K (mg)	Cu (mg)	Zn (mg)	Mn (g)	Mo (mg)	Se (mg)
	일반배지	534.7	146.7	30.1	26.6	11.5	2656.2	1.3	6.1	0.9	0.2	0.5
콩섬유박 배지	913.2	171.3	48.3	5.8	9.4	3197.7	2.0	9.3	1.4	0.3	0.7	

## 라. 제형 개발 및 양산화 공정 확립

### (1) 발효선식

발효선식 제조공정은 원료의 영양성분 손실을 방지하기 위하여 최소 유기가공을 기준으로 설계하였다(Fig. 69). 가급적 열처리를 최소화하고 식품공전에서 정하는 환자용 균형영양식 기준에 부합하도록 부족한 조성물의 영양성분을 첨가하는 것 이외의 보존제, 점도증강 또는 향미 증진제와 같은 여타 식품 첨가물은 첨가하지 않았다.

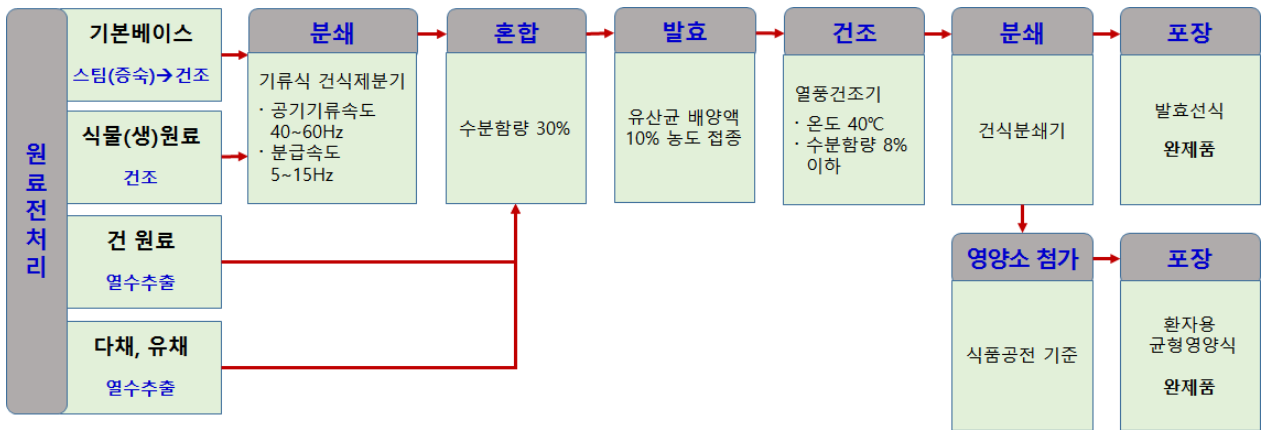



Fig. 69. 발효선식 및 환자용 균형영양식 제조 공정



(가) 원료 전처리

기본적으로 모든 원료는 원적외선 건조기로 40℃에서 수분함량 10~15%정도가 될 때까지 건조하고, 기류식 건식제분기를 이용하여 공기기류속도 40~60Hz, 분급속도 5~15Hz의 제분조건으로 분쇄하여 150~200 mesh 크기의 분말로 준비하였다. 분말형으로 제조하기 어려운 원료들은 열수추출 또는 증탕으로 추출하여 준비하였다.


① 기본 곡류 베이스

<p>발아현미, 찰흑미, 울무 및 마 등 기본(곡류)베이스는 스팀(증숙)→건조→분쇄과정을 거쳐 분말로 준비하였다.</p>	
---	---


② 공통원료

<p>㉠ 오가피 : 분쇄가 어려운 오가피의 경우 원료중량 대비 10배수 물로 열수추출하여 1/10 부피까지 농축하였다.</p>	
<p>㉡ 작두콩, 유채씨, 다체씨 : 작두콩을 일반 수도수에 15시간 이상 수침하여 불린 후 탈수하여 다체씨, 유채씨와 분량 혼합한 후 이중 솥을 이용한 증탕 처리로 수액을 추출하여 준비하였다.</p>	


③ 근육암 유병자용 조성물

<p>㉑ 콩나물(줄기만 사용), 양배추, 표고버섯 : 깨끗이 세척하여 건조한 후 분쇄하여 분말로 준비하였다.</p>	
<p>㉒ 느릅나무껍질 : 원료중량 대비 10배수 물로 열수추출하여 1/10 부피까지 농축하여 사용하였다. 실제 제조과정에서는 정해진 배합비율에 따라 공통원료인 오가피와 함께 열수추출하였다.</p>	

④ 림프암 유병자용 조성물

<p>인동꽃, 더덕, 도라지, 생강 : 깨끗이 세척하여 건조한 후 분쇄하여 분말로 준비하였다.</p>	
--	--

⑤ 혈액암 유병자용 조성물

<p>연근, 미나리줄기, 돈나물, 메밀싹 : 깨끗이 세척하여 건조한 후 분쇄하여 분말로 준비하였다.</p>	
---	---

(나) 조성물의 혼합과 발효

<p>㉓ 조성물의 혼합</p> <p>전처리를 거친 분말원료는 121℃, 20분간 멸균한 후 근육암 조성물의 경우 열수추출하여 준비한 액상원료와 혼합하고 멸균수를 추가하여 수분함량을 30% 이내로 조절하였으며 유산균 배양액을 원료 총 중량 대비 10%농도로 혼합하였다. 림프암 및 혈액암 조성물은 멸균한 분말원료와 멸균수를 혼합하여 수분함량을 30% 이내로 조절하였으며 유산균 배양액을 원료 총 중량 대비 10%농도로 혼합하였다.</p>	
<p>㉔ 유산균 발효</p> <p>조성물의 발효는 유산균 혼합균주를 활용하여 고체발효 하였다. <i>Lactobacillus fermentum</i> HD6, <i>Lactobacillus brevis</i> KY721 및 <i>Lactobacillus plantarum</i> KY903 균주를 포함하는 혼합유산균을 약 <math>2.67 \times 10^8</math> CFU/ml 농도로 배양한 배양액을 원료 총 중량 대비 10% 농도로 접종하였다. 발효 조건은 밀폐된 배양기에서 42℃, 7일간 혐기조건으로 조절하였다.</p>	 

(다) 발효물의 건조와 분쇄(발효선식 최종 완제품)

발효가 끝난 조성물은 하단 송풍식 열풍건조기를 이용하여 40℃ 조건에서 수분함량이 8%이하로 건조한 후 건식분쇄기로 분쇄하여 분말형으로 제조하였다. 발효 후 분말은 발효선식의 최종 제품으로 포장하여 완제품으로 하거나 필요에 따라서 환자용 영양균형식 제품 기준에 부합하도록 부족한 영양성분을 첨가하여 완제품으로 하였다(Fig. 70).

완제품으로 하는 발효선식은 1포를 60g으로 포장하여 식사대용으로 섭취하시거나 식사와 함께 간식으로 섭취할 목적으로 제조 하였으며, 제품을 용기에 부은 후 따뜻한 물, 우유 또는 두유 300~350mL를 넣은 후 잘 저어 섭취하거나 제품을 300~350mL의 물에 혼합하여 약불에서 1~3분간 조리하여 미지근하게 식혀 섭취할 수 있도록 하였다.



Fig. 70. 발효선식의 건조 및 최종 완제품



(라) 영양소 첨가 및 완제품(환자용 균형영양식)

완성된 발효선식은 영양성분에 대한 자체 분석과 수원여대 식품분석실에 영양성분 분석을 의뢰하여 확보한 자료를 토대로 식품공전에서 정하는 기준에 따라 환자용 균형영양식 기준에 부합하도록 부족한 영양성분을 추가하여 완제품을 제조하였다.

완제품은 발효선식과 마찬가지로 1포를 60g으로 포장하여 식사대용으로 섭취하시거나 식사와 함께 간식으로 섭취할 목적으로 따뜻한 물, 우유 또는 두유 300 ~ 350mL와 함께 용기에 넣은 후 잘 저어 섭취하도록 하였다.



(마) 발효선식 제조 공정에 따른 원료 투입량 및 최종 생산량

Table 25. 발효선식 제조 공정에 따른 원료 투입량 및 생산량

원료 전처리(건조→분쇄, 추출농축)				생물중량	전처리 중량	
기본(곡류)베이스	발아현미 (70) 올무 (10)	찰흑미 (10) 마 (10)		8.0 kg	6.5 kg	
공통원료 추출액	작두콩 (55) 유채씨 (5)	다채씨 (15) 오가피 (5)		1.6 kg	1.6 L	
암 종 별 원 료	① 근육암	콩나물 (5) 양배추 (5)	느릅나무껍질 (5) 표고버섯 (5)	0.4 kg	0.03 kg	
	② 림프암	인동꽃 (5) 도라지 (5)	더덕 (5) 생강 (5)	0.4 kg	0.07 kg	
	③ 혈액암	연근 (5) 미나리줄기 (5)	돈나물 (5) 메밀씨 (5)	0.4 kg	0.05 kg	
합 계(원료 투입량)				①근육암	②림프암	③혈액암
				8.13 kg	8.17 kg	8.15 kg



		①근육암	②림프암	③혈액암
혼합	• 물 추가 : 건물원료 총 중량 대비 수분 30% 조절 * 추가 물 소요량 = 총 수분량 - 추출액	0.37 L	0.37 L	0.37 L
	• 유산균 배양액 첨가 : 투입원료 총 중량 대비 10%	0.85 L	0.85 L	0.85 L
	합 계(발효 전 총 중량)	9.35 kg	9.39 kg	9.37 kg



		①근육암	②림프암	③혈액암
발 효		9.35 kg	9.39 kg	9.37 kg



		①근육암	②림프암	③혈액암
건조 → 분쇄		6.5 kg	6.6 kg	6.6 kg



		①근육암	②림프암	③혈액암
포 장		6.5 kg	6.6 kg	6.6 kg

(2) 과립

과립의 제조는 발효선식과 달리 모든 원료를 조성물 구성 비율별로 혼합하여 이중 솜을 이용한 중탕처리로 수액을 추출하고, 추출물을 65 Brix로 농축한 후 유당을 부형제로 하여 추출물의 총 중량 대비 70%를 첨가하여 과립제조기로 제조 하였다.



(3) 환

환의 제조는 상기한 바대로 제조한 발효선식과 참쌀 풀을 부형제로 총 중량 대비 1%를 혼합하여 반죽한 뒤 환 제조기로 제조하였다.



(4) 타블렛

타블렛은 상기한 바대로 제조한 발효선식을 타정기로 제조하였다.



Table 26. 발효선식, 과립, 환 제품의 생산 공정

공정단계	내용	장비	비고
1. 추출	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ 정선된 원재료를 세척 후 추출기에서 추출한다.</li> <li>○소요 시간 : 5~6 시간</li> <li>○사용설비 : 자동 추출기</li> </ul>		*모든 원재료는 엄선된 식품으로 하고 세척을 철저히 한다.
2. 농축	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ 60 Brix 의 당 농도가 될때까지 농축한다.</li> <li>○소요 시간 : 2시간 정도</li> <li>○사용설비 : 자동 농축기</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>*브릭스 농도를 정확히 측정한다.</li> <li>*농축 기준은 시간이 아닌 농도(Brix) 기준이 우선임.</li> </ul>
3. 발효	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ 유산균 락토바실러스로 발효한다.</li> <li>○소요 시간 : 48시간</li> <li>○사용설비 : 자동 발효기</li> </ul>		*발효 시간을 정확히 지킨다.
4. 혼합	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ 발효된 농축된 엑기스 15%와 유당(락토스) 85%의 비율로 배합한다.</li> <li>○소요 시간 : 제품수량에 따라 결정</li> <li>○사용설비 : 자동 배합기</li> </ul>		*엑기스와 유당의 비율을 정확히 지킨다.
5. 과립 /제한	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ 과립 제품인 경우에는 과립으로 가공하고, 환 제품인 경우에는 환으로 가공하는 단계를 거친다.</li> <li>○소요 시간 : 제품 수량에 따라 결정</li> <li>○사용설비 : 과립 제조기 또는 자동 제한기</li> </ul>		*제품 성격에 따라 필요한 과정을 선택하여 진행한다.
6. 건조	<ul style="list-style-type: none"> <li>가공단계를 거친 후 45°C의 온도에 맞춰 건조시킨다.</li> <li>○소요 시간 : 4시간</li> <li>○사용설비 : 열풍 건조기</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>*열풍 건조기의 온도를 정확히 설정한다.</li> <li>*건조 시간을 정확히 준수한다.</li> </ul>
7. 포장	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ 건조 과정을 거친 후 제품 성격에 따라 포장을 한다.</li> <li>○소요 시간 : 제품 수량에 따라 결정</li> <li>○사용설비                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-과립 스틱 자동 포장기</li> <li>-과립 파우치 자동 포장기</li> <li>-액상 스탠딩 파우치 자동 포장기 etc.</li> </ul> </li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>*포장 과정을 관찰한다.</li> <li>*포장 롤, 또는 파우치 포장 등 남은 정도를 수시로 파악한다.</li> <li>*제품에 따라 정확한 량이 유입될 수 있도록 설정한다.</li> </ul>
8. 출하	<ul style="list-style-type: none"> <li>★ 제조일자, 또는 유통기한 등을 날인하여 Box 포장 후 출하 대기한다.</li> <li>○소요 시간 : 제품 수량에 따라 결정</li> <li>○사용설비 : 날인기</li> </ul>		*제품이 완성되면 해당 물류 박스에 포장하여 출하될 수 있도록 한다.

## (5) 발효초

시제품으로 개발한 발효선식과 함께 편리하게 섭취할 수 있는 음료형 제품의 개발을 위하여 암유병자 유형별 조성물 3종의 원료를 활용하여 천연발효식초를 제조하였다. (주)엔자임바이오에서는 자체 운영하는 바이오마을 건강수련회에 참여하는 암 유병자 회원 중 발효선식 시제품의 섭취를 희망하는 대상자를 선정하여 발효선식 시제품을 4주간 제공하고 제품의 기호도 및 섭취 후 느끼는 제품의 효과에 대한 설문평가를 3회 진행한 바 있다. 본 평가를 통하여 다수의 회원들은 발효선식을 우유나 물 등과 함께 섭취하는 대신 수련센터에서 통상적으로 제공하던 중탕처리에 의한 원료의 액상 추출물과 함께 섭취하는 것을 선호하였으며 이를 제공해 줄 것을 요청해 왔다. 아울러 최근에는 식초 건강법에 대한 일반 소비자들의 관심이 증가하면서 음료형 식초시장이 활성화 되고 있으며 그 소비가 증가하는 추세에 있다. 또한 천연발효 식초의 건강증진 및 생리활성기능 향상 효과에 대한 다수의 연구논문이 보고된 바 있으며 언론 및 방송 매체를 통한 홍보로 많은 소비자들은 발효식초를 건강식품의 하나로 인식하고 소비하는 트렌드가 형성되고 있다. 따라서 본 연구에서 개발하는 발효선식을 동일 원료로 발효하여 제조하는 음료형 발효식초와 함께 섭취할 경우 영양성분의 빠른 흡수와 소화를 통한 시너지 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단 하였다. 이와 같은 이유로 암유병자 유형별 조성물의 액상 추출물을 원료로 하는 3종의 음료형 발효식초를 제조하게 되었다.

### (가) 원료 전처리

#### ① 기본(곡류) 베이스

발효선식 제조과정에 준비한 곡류 분말원료를 오가피 및 느릅나무껍질 열수추출물(근육암) 또는 물(혈액암, 림프암)을 약 2배수로 첨가하고 약한 불에서 2~3분간 가열하여 풀을 쭈어 준비하였다.

#### ② 건 원료

오가피와 느릅나무껍질은 상기 발효선식 제조과정에서 기술한 바대로 열수 추출하여 준비하였다.

#### ③ 유형별 식물원료

암 유병자 유형별 식물원료는 정한바대로 혼합하여 5%의 구연산 용액에 30분간 담그어 잡균을 제거하였다. 원료는 수도수로 세척하고 체반에 건져 탈수한 후, 믹서기로 거친 정도로 분쇄하였다. 이때 근육암 원료의 경우에는 건 원료의 열수추출물을 사용하여 분쇄하고, 모자랄 경우 일반 생수를 추가로 사용하였다.

### (나) 1차 발효 : 알콜발효

전처리 한 원료를 모두 혼합하여 10L 과실주 병에 넣고 총 부피 대비 설탕 10%, 효모 1% 농도로 혼합하여 35℃에서 약 15 ~ 20일간 혐기발효 하였다.



(다) 2차 발효 : 초산발효

1차 알콜발효가 끝나면, 고운 천(광목 등)으로 거른 맑은 술을 깨끗한 병에 옮겨 담고 미리 배양하여 준비한 초산균(*Acetobacter acetii* FE29) 배양액(종초)를 총 부피 대비 3% 농도로 접종하여 35℃에서 약 3개월간 호기발효 하였다.



(라) 정제 및 살균

2차 초산발효가 끝나면, 발효액을 초고속 원심분리기로 5,000rpm 30분간 원심분리하여 맑은 상층액을 분리하고 85℃, 30분간 살균 처리하여 상온에서 식힌 후 최종제품인 발효식초로 하였다.

이와 같은 과정으로 제조한 발효식초는 pH 3.0 이하, 산도 6 ~ 7% 를 갖는 양질의 발효식초로 제조 되었다. 발효식초는 기본적으로 첨가물을 첨가하지 않은 형태의 원초 그대로 입병하여 시제품으로 하고, 필요에 따라 꿀, 올리고 당, 설탕 등 감미료를 첨가하여 산도 1% 정도가 되도록 조절하여 딸기, 사과, 복숭아 및 수박 등과 같은 과실 엑기스를 첨가하거나 과실을 원초에 침지하여 일정기간 숙성시킨 후 여과한 것을 음료형 발효식초 형태의 시제품으로 제조하였다.



Fig. 30. 발효초 제품 3종

마. 양산화를 위한 원료 및 제품의 공급과 관리

(1) 원료수급 방안

원료의 안정적 공급을 위해 Table 27과 같이 구입처를 선정하여 안정적 거래방안을 협의하였다.

Table 27. 원료별 가격과 구입처 현황

품명	규격	가격	구입처	비고
밭아현미	kg	9,200	부안라이스(영)	
찰흑미	kg	6,800	부안라이스(영)	전북 부안 소재 영농조합법인
울무	kg	21,200	부안라이스(영)	
마	kg	45,000	부안라이스(영)	
다채종자	12g/봉	2,000	경진상사	새싹 직접 재배 자체공급
유채종자	kg	25,000	경진상사	
메밀종자	kg	14,200	경진상사	
표고버섯	kg	25,000	배근철	버섯농가 의뢰 고단백질 버섯 생산
오가피	kg	24,500	대광약업사	춘천소재 한약재상
느릅나무껍질	600g	17,500	대광약업사	
인동꽃	kg	28,000	대광약업사	
더덕	kg	21,500	경진상사	
콩나물	kg	1400	경진상사	
양배추	kg	2,700	경진상사	
작두콩	kg	41,000	경진상사	춘천농산물 유통센터
도라지	kg	15,600	경진상사	
생강	kg	8,900	경진상사	
연근	kg	5,700	경진상사	
미나리줄기	kg	950	경진상사	
돈나물	kg	11,700	경진상사	

(2) 제품생산비용 산정

제품생산에 투입되는 원료의 소비량과 완제품의 생산량을 기준으로 제품생산에 소요되는 원료를 산정하였다. 제품의 가격은 추후 가공비, 포장비, 관리비, 유통비 등의 제반비용을 포함하여 산정하여야 할 것이다.

Table 28. 생물원료 10kg 기준 원료 소요량과 구매비용

	원료	소요량 (kg)	단가 (원)	가격 (원)	소계 (원)	비고
기본 (곡류) 베이스	발아현미	5.6	9,200	51,520	109,920	
	찰흑미	0.8	6,800	5,440		
	울무	0.8	21,200	16,960		
	마	0.8	45,000	36,000		
공통원료 추출액	작두콩	1.1	41,000	45,100	53,550	
	다채썩	0.3	15,000	4,500		
	유채썩	0.1	15,000	1,500		
	오가피	0.1	24,500	2,450		
근육암	콩나물	0.1	1400	140	4,660	
	느릅나무껍질	0.1	17,500	1,750		
	양배추	0.1	2,700	270		
	표고버섯	0.1	25,000	2,500		
립프암	인동꽃	0.1	28,000	2,800	7,400	
	더덕	0.1	21,500	2,150		
	도라지	0.1	15,600	1,560		
	생강	0.1	8,900	890		
혈액암	연근	0.1	5,700	570	3,785	
	돈나물	0.1	11,700	1,170		
	미나리줄기	0.1	950	95		
	메밀썩	0.1	19,500	1,950		
유산균 배양액		0.85	5,000	4,250	4,250	

(3) 암 유형별 원료 구매비용

원료 구매에 소요되는 총 비용은 기본(곡류)베이스, 공통원료 및 각 유형별 원료재료를 합한 값에 유산균 배양액 가격으로 산정된 값을 더하여 계상하였다. 각 유형별 발효선식은 원료



10kg을 투입하였을 때 최종 완제품으로 생산되는 수득량이 근육암 6.5kg, 림프암 6.6kg, 혈액암 6.6kg이므로 1회 섭취량을 60g/pack으로 포장할 경우 1pack당 소요비용은 근육암 6.5kg, 림프암 6.6kg, 혈액암 6.6kg으로 계상 되었다(Table 29).

**Table 29. 1회(60g/pack) 섭취량 생산에 소요되는 비용**

구분	소요비용(원)		
	근육암	림프암	혈액암
원료소요비용	기본(곡류)베이스	109,920	
	공통원료	53,550	
	유산균 배양액	4,250	
	암 유형별 원료	4,660	7,400
합계	172,380	175,120	171,505
생산량	6.5 kg	6.6 kg	6.6kg
1회 섭취량(60g/pack) 생산에 소요되는 원료비용	1591	1592	1559

## 제 4 절 암 환자의 항암치료 후 회복증진에 대한 인체적용 평가

### 1. 연구 방법

#### 가. 식품조성물 섭취 후 유병자 패널 설문평가

(1) 설문평가용 식품 견본(발효선식)의 제조

(가) 원료배합비

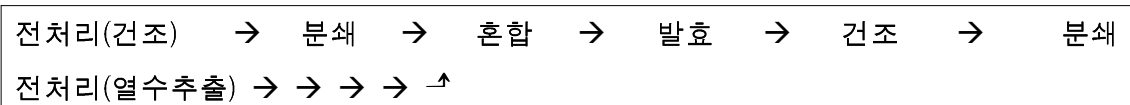
앞서 서술한 바와 같이 설문평가용 식품 견본의 배합비는 다음과 같이 구성하였다.

Table 30. 암종별 맞춤형 기본 조성물

구 분	곡류 베이스	공통원료	암 유형별 원료
원료 구성	발아현미 70%	작두콩 55%	(근육암) 콩나물, 느릅나무껍질, 양배추, 표고버섯 각 5%
	찰흑미 10%	다채쌈 15%	(림프암) 인동꽃, 더덕, 도라지, 생강 각 5%
	율무 10%	유채쌈 5%	(혈액암) 연근, 미나리줄기, 돈나물, 메밀쌈 각 5%
	마 10%	오가피 5%	
합계	100		100
최종 배합 비율	80		20

(나) 제조과정

원료의 영양성분 손실 방지를 위해 최소가공 기준으로 기본설계



① 원료별 전처리 방법의 설정

㉠ 증숙 → 건조 → 분쇄 : 기본베이스(현미, 찰흑미, 율무), 작두콩

㉡ 세척 후 건조 → 분쇄 : 연근, 미나리줄기, 돌나물, 메밀쌈, 콩나물, 양배추, 표고버섯, 인동꽃, 더덕, 도라지, 생강

㉢ 열수추출 : 다채쌈, 유채쌈, 오가피, 느릅나무껍질

② 전처리 원료의 가공

전처리 원료를 혼합하여 유산균으로 발효하고 이를 다시 건조, 분쇄하여 최종 제품으로 포장하였다.

③ 섭취방법의 설정

제품을 용기에 부은 후 따뜻한 물, 우유 또는 두유 300~350mL를 넣은 후 잘 저어

섭취하거나, 300~350mL의 물에 혼합하여 약불에서 1~3분간 조리하여 미지근하게 식혀 섭취하도록 하였다.

#### 나. 설문평가용 식품 견본의 영양성분 분석

식품공전 환자용 특수영양식 기준 영양성분 자가 분석 시험방법에 따라 분석하였다.

#### 다. 한의학적 암종별 유병자 대상 설문 평가 방법

##### (1) 암유병자 패널 모집

(주)엔자임바이오에서 운영하고 있는 “바이오마을”을 통해 참여를 희망하는 암유병자를 암종별로 구분하여 설문평가를 진행하였다.(혈액암(8명), 근육암(28명), 림프암(34명))

##### (2) 연구기간 : 총 4주간 (2주차, 4주차 설문평가 실시)

##### (3) 섭취방법 : 배포된 한의학적 암종별 발효선식 시제품을 1일 1회 온수에 타서 섭취

##### (4) 설문지 양식(총 2 page)

## 식품 설문 조사

<b>설문자 정 보</b>	이 름		성 별	남, 여
	생년월일		연락처	

안녕하십니까?

금번 저희 ㈜엔자임바이오에서는 회원 여러분께 보내드린 발효 선식과 관련한 설문 조사를 진행하고  
자 합니다.

해당자료는 항암치료 후 불편사항의 개선을 위한 식품 개발을 위하여 소중한 자료로 쓰여질 예정이  
오니, 다소 불편하시더라도 본 설문지에 성의껏 답변해 주시길 부탁드립니다.

- 식품의 구성  
분말 제품 : 각 14회 분
- 섭취 방법  
1일 1회 온수에 타서 섭취

### 1. 응답자 기초 정보 조사

1) 암의 종류

- ① 갑상선암 ② 위암 ③ 대장암 ④ 폐암 ⑤ 유방암 ⑥ 간암  
⑦ 전립선암 ⑧ 자궁암 ⑨ 담낭암 ⑩ 기타 ( )

2) 최초 암 진단 후 경과 기간

- ① 1년 미만 ② 1~2년 ③ 3~4년 ④ 5년 이상 ⑤ 기타 ( )

3) 현재 항암치료 차수 및 횟수 현황 (방사선/화학요법)

( )차 ( )회 (진행 중, 완료)

4) 본인에 해당되는 것에 √ 표 하여 주시기 바랍니다.

- ① 원발암 ② 전이암 ③ 재발암 ④ 기타( )

## 2. 식품 섭취 후 개선사항 조사

해당사항에 √표 해 주시기 바랍니다.

	매우 그렇지않다	그렇지않다	보통이다	그렇다	매우그렇다
탈모 증상이 개선되었다					
손/발 저림이 개선되었다					
오심(미식거림) 증상이 개선되었다					
소화기능이 개선되었다					
어지럼증/빈혈 증상이 감소하였다					
피부의 혈색이 개선되었다					
대소변 활동이 원활해 졌다					
전반적으로 근력이 강화되었다					
구강건조증(입마름)이 개선되었다					
가슴두근거림/숨참 현상이 개선되었다					
발의 각질이 감소하였다					
시력이 개선되었다					
기억력이 개선되었다					

## 3. 기타 섭취시의 불편함이나 개선 건의 사항

(

)

<설문에 응해주셔서 진심으로 감사합니다>

## 2. 연구 결과 및 고찰

### 가. 설문평가용 식품 건본의 영양성분 분석

#### (1) 혈액암 유병자용 발효 식품조성물의 영양성분

1회 분량 당(60g)	함량	영양소기준치(%)	환자용 균형영양식 기준
열량 (kcal)	123.5		123.5
단백질 (g)	9.3	15.5	3.7
지질 (g)	0.5	1.1	
탄수화물 (g)	20.5	6.2	
식이섬유 (g)	8.3	33.1	
비타민A (RE)	110.0	15.7	43.2
비타민A ( $\mu\text{g}$ )	672.4		
비타민B1 (mg)	0.2	22.9	0.1
비타민B2 (mg)	0.1	11.3	0.1
나이아신 (mg)	0.9	6.6	0.8
비타민C (mg)	7.3	7.3	6.2
칼슘 (mg)	51.8	7.4	43.2
인 (mg)	134.3	19.2	
철 (mg)	2.0	13.0	0.9
나트륨 (mg)	7.7	0.4	
칼륨 (mg)	530.5	15.2	
비타민D( $\mu\text{g}$ )	0.4	8.0	0.3
비타민E(mg $\alpha$ -TE)	0.6	6.0	0.6
비타민B6(mg)	0.1	6.7	0.1
엽산( $\mu\text{g}$ )	17	6.8	15.4
아연(mg)	1	8.3	0.7

(2) 근육암 유병자용 발효 식품조성물의 영양성분

1회 분량 당(60g)	합계	영양소기준치(%)	환자용균형영양식 기준
열량(kcal)	151.7		151.7
단백질(g)	11.3	18.8	4.6
지질(g)	1.0	1.9	
탄수화물(g)	24.8	7.6	
식이섬유(g)	9.5	37.8	
비타민A(RE)	55.1	2.8	53.1
비타민A( $\mu$ g)	130.9		
비타민B1(mg)	0.3	25.2	0.1
비타민B2(mg)	0.2	17.2	0.1
나이아신(mg)	1.5	11.4	1.0
비타민C(mg)	8.3	4.7	7.6
칼슘(mg)	56.0	8.0	53.1
인(mg)	156.1	22.3	
철(mg)	1.9	12.7	1.1
나트륨(mg)	8.4	0.4	
칼륨(mg)	631.3	18.0	
비타민D( $\mu$ g)	0.5	10.0	0.4
비타민E(mg $\alpha$ -TE)	0.9	9.0	0.8
비타민B6(mg)	0.1	6.7	0.1
엽산( $\mu$ g)	19	7.6	19.0
아연(mg)	1	8.3	0.9

(3) 림프암 유병자용 발효 식품조성물의 영양성분

1회 분량 당(60g)	합계	영양소기준치(%)	환자용균형영양식 기준
열량(kcal)	158.4		158.4
단백질(g)	10.5	17.5	4.8
지질(g)	0.8	1.5	
탄수화물(g)	28.0	8.5	
식이섬유(g)	8.4	33.8	
비타민A(RE)	84.9	12.1	55.4
비타민A( $\mu$ g)	521.9		
비타민B1(mg)	0.3	26.3	0.1
비타민B2(mg)	0.2	20.8	0.1
나이아신(mg)	1.4	10.7	1.0
비타민C(mg)	8.2	6.7	7.9
칼슘(mg)	75.5	10.8	55.4
인(mg)	164.1	23.4	
철(mg)	3.1	20.4	1.2
나트륨(mg)	11.0	0.5	
칼륨(mg)	693.5	19.8	
비타민D( $\mu$ g)	0.5	10.0	0.4
비타민E(mg $\alpha$ -TE)	0.9	9.0	0.8
비타민B6(mg)	0.1	6.7	0.1
엽산( $\mu$ g)	19	7.6	19.8
아연(mg)	1	8.3	1.0

## 나. 한의학적 암종별 유병자 대상 설문 평가

2주차, 4주차에 설문평가를 실시하여 아래와 같은 점수 기준으로 하여 혈액암, 근육암, 림프암 각 암종별 증상개선 정도를 점수로 나타내었다.

※ 5점 scale 분류기준

점수	분류
1	매우 그렇지 않다
2	그렇지 않다
3	보통이다
4	그렇다
5	매우 그렇다

### (1) 혈액암 유병자 설문 결과

소화기능 개선, 어지럼증/빈혈 감소, 피부 혈색 개선에 좋은 결과를 나타내었다.

항목	전체	여	남
탈모 증상 개선	3.00	2.50	3.25
손/발 저림 개선	3.14	2.50	3.40
오식(미식거림) 개선	3.00	2.50	3.25
소화기능 개선	<b>3.57</b>	4.00	3.40
어지럼증/빈혈 감소	<b>3.71</b>	4.00	3.60
피부 혈색 개선	<b>3.71</b>	3.50	3.80
대소변 활동 원활	3.43	3.50	3.40
전반적인 근력 강화	2.50	2.00	2.75
구강건조증 개선	3.00	3.00	3.00
가슴두근거림/숨참 개선	2.43	2.50	2.40
발의 각질 감소	2.29	2.00	2.40
시력 개선	2.86	2.50	3.00
기억력 개선	2.71	2.50	2.80



(2) 근육암 유병자 설문 결과

대소변 활동 원활, 피부 혈색 개선에 우수한 결과를 나타내었으며, 소화기능개선, 근력 강화, 구강 건조증 개선에도 우수한 결과를 나타내었다.

항목	전체	여	남
탈모 증상 개선	3.05	2.88	3.00
손/발 저림 개선	3.13	3.67	2.77
오식(미식거림) 개선	3.09	2.89	3.15
소화기능 개선	<b>3.59</b>	3.33	3.79
어지럼증/빈혈 감소	2.82	2.55	3.20
피부 혈색 개선	<b>3.77</b>	3.45	4.14
대소변 활동 원활	<b>3.81</b>	3.64	3.86
전반적인 근력 강화	<b>3.64</b>	3.36	3.85
구강건조증 개선	<b>3.56</b>	3.20	3.79
가슴두근거림/숨참 개선	3.27	3.22	3.33
발의 각질 감소	3.23	3.22	3.08
시력 개선	2.91	2.80	3.00
기억력 개선	2.83	2.82	2.83

(3) 림프암 유병자 설문 결과

어지럼증/빈혈 감소, 피부 혈색 개선, 대소변 활동 원활에 우수한 결과를 나타내었다.

항목	전체	여	남
탈모 증상 개선	3.14	3.00	4.00
손/발 저림 개선	3.23	3.17	3.67
오식(미식거림) 개선	3.08	2.96	4.00
소화기능 개선	3.43	3.38	3.75
어지럼증/빈혈 감소	<b>3.52</b>	3.52	3.50
피부 혈색 개선	<b>3.78</b>	3.74	4.00
대소변 활동 원활	<b>3.59</b>	3.52	4.00
전반적인 근력 강화	3.31	3.23	3.75
구강건조증 개선	3.38	3.35	3.67
가슴두근거림/숨참 개선	3.15	3.04	3.75
발의 각질 감소	3.27	3.22	3.67
시력 개선	2.88	2.78	3.67
기억력 개선	2.96	2.83	4.00

(4) 전체 유병자 평균

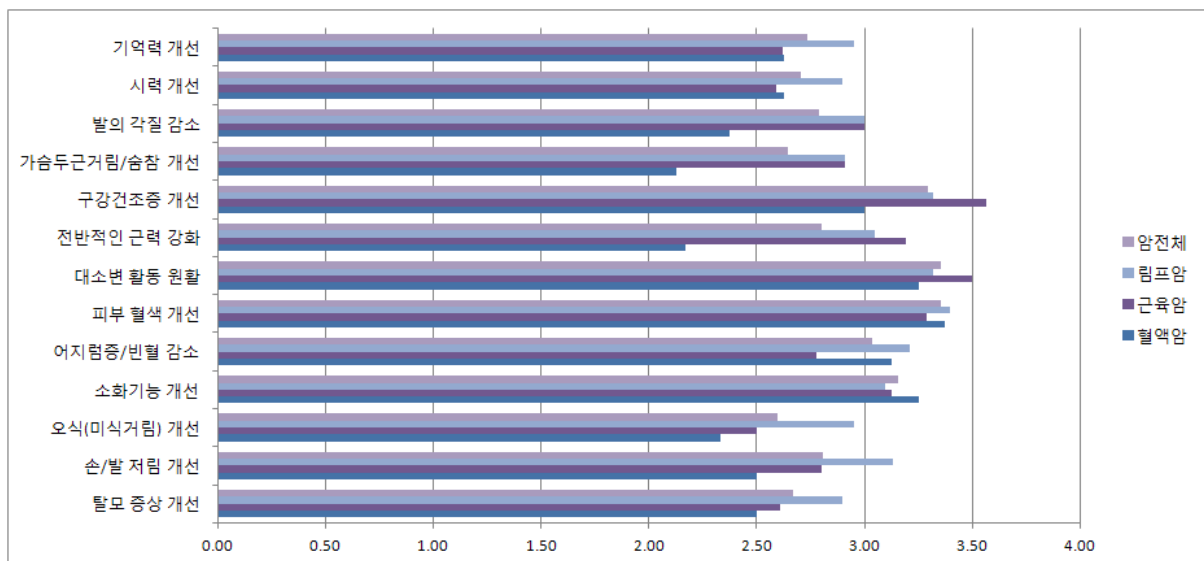
피부 혈색 개선에 가장 우수한 결과를 나타내었으며, 대소변 활동 원활, 소화기능 개선에도 우수한 결과를 나타내었다.

항목	전체	여	남
탈모 증상 개선	3.06	2.79	3.42
손/발 저림 개선	3.17	3.11	3.28
오식(미식거림) 개선	3.05	2.78	3.47
소화기능 개선	<b>3.53</b>	3.57	3.65
어지럼증/빈혈 감소	3.35	3.36	3.43
피부 혈색 개선	<b>3.75</b>	3.56	3.98
대소변 활동 원활	<b>3.61</b>	3.55	3.75
전반적인 근력 강화	3.15	2.86	3.45
구강건조증 개선	3.31	3.18	3.48
가슴두근거림/숨참 개선	2.95	2.92	3.16
발의 각질 감소	2.93	2.81	3.05
시력 개선	2.88	2.69	3.22
기억력 개선	2.84	2.72	3.21

(5) 결과 종합

(가) 2주차(혈액암 8명, 근육암 28명, 림프암 31명)

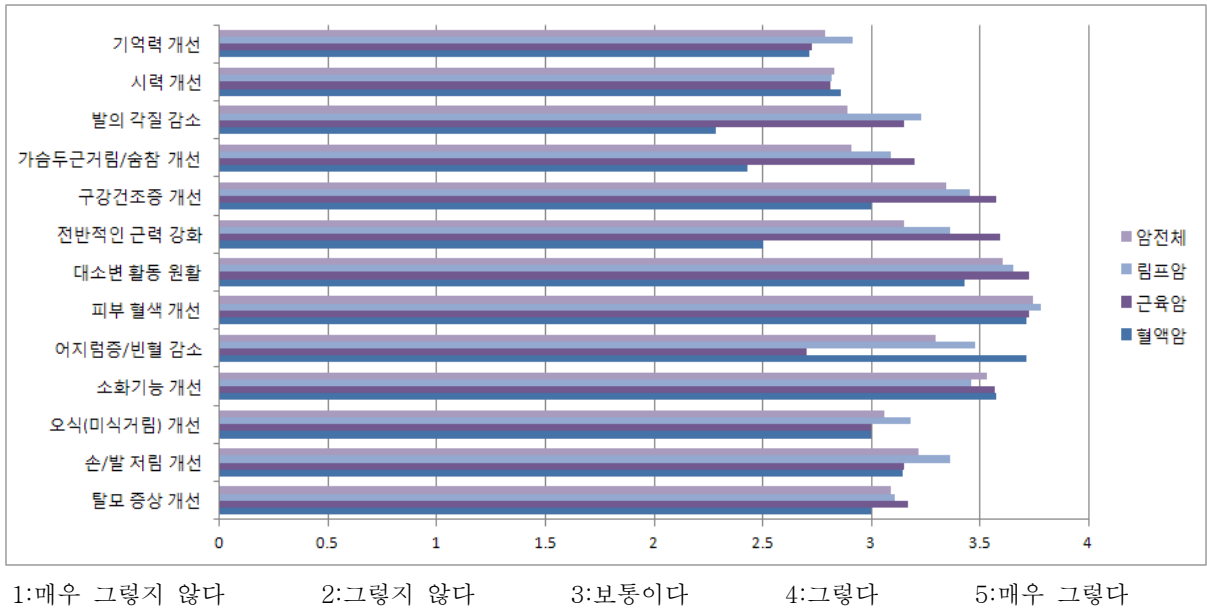
상대적으로 근육암 유병자의 구강건조증 및 대소변활동 원활 항목이 개선됨을 확인하였다.



1:매우 그렇지 않다      2:그렇지 않다      3:보통이다      4:그렇다      5:매우 그렇다

(나) 4주차(혈액암 7명, 근육암 27명, 림프암 28명)

전반적으로 피부혈색, 대소변활동원활, 소화기능 항목이 개선되었으며, 1차 평가 대비 개선 정도가 좋아졌음을 확인하였다.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

#### 1. 연도별 연구목표 및 달성도

구분 (연도)	세부연구목표	달성도	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	세포재생 효능을 가진 천연 식품 소재 개발	100%	HaCaT(human keratinocyte)를 이용한 세포성장 촉진 물질 선정
	조혈증진 효능을 가진 천연식품소재 개발	100%	CTX 투여 후 골수세포에서 조혈증진 검증 - 조혈유전자 분석(EPO, SCF, IL-3, GM-CSF, c-kit) - 골수세포 활성화 분석(CD34 <sup>+</sup> 세포) - 골수세포증식에 미치는 영향 (EZ-Cytotox) - 골수세포의 반고체 집락형성 분석 - 골수세포에서 TPO의 세포내염색분석 (FACS)
	천연식품소재에서 염증유발 사이토카인 조절 효능 검증	100%	- 생쥐대식세포에서 염증유발 사이토카인 유전자 분석 (IL-1, IL-6, TNF-a, NOS-II, COX-2) - 염증사이토카인 ELISA 분석(IL-6, TNF-a, GM-CSF)
	소화흡수율의 검증	100%	- 대한약전 일반시험법 중의 용출시험 실시 - 단백질 정량법에 의한 발아 작두콩의 분석 - 발아 작두콩의 단백질의 함량증가 확인
	확보된 천연 식품소재의 새싹 재배법의 확립	100%	- 작두콩 및 다채의 종자발아 및 새싹의 최적 성장 조건 분석 - 일반 물과 지장수(황토물)가 작두콩 및 다채의 종자발아와 새싹 성장에 미치는 영향 분석
	단백질 버섯 재배방법의 확립	100%	- 비지를 활용한 버섯배지의 제조와 이를 활용하여 단백질 함량이 증가된 양송이 버섯의 생산

구분 (연도)	세부연구목표	달성도	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013)	조혈증진 효능을 가진 천연식품소재 동물 효력검증	100%	- CTX 투여 후 Leucopenia 및 thrombocytopenia 생쥐 유발 1) 조혈모세포(Sca-1 <sup>+</sup> HSC) 배양 및 유전자 분석 2) 조혈모세포(Sca-1 <sup>+</sup> HSC)에서 ELISA 측정 3) 조혈모세포(Sca-1 <sup>+</sup> HSC)에서 반고체 집락형성 분석 4) 골수세포에서 TPO의 세포내염색분석 (FACS)
	면역증진 효능을 가진 천연식품소재 동물 효력검증	100%	- 염증유발 싸이토카인 분석 및 천연식품 조합물에 의한 synergistic 효과 - 천연식품소재 조합에 의한 synergistic 효과 - Cachexia를 유도한 생쥐에서 천연식품소재를 첨가한 정상식이의 효과 1) LPS처리한 생쥐의 body weight와 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)에 미치는 영향 2) Colon26 세포주로 유도된 cachexia 생쥐모델에서 정상식이와 천연식품소재가 cachexia syndrome 억제에 미치는 영향 (종양크기, leptin 생성량, 생명연장곡선)
	세포재생/조혈/면역증진 기본 처방 확립	100%	- 조혈, 면역증진 효능을 갖는 소재를 식품조성물의 기본원료로 설정 - 작두콩, 다채쌈, 유채쌈, 오가피를 공통원료로 선정
	한의학적 암 분류에 따른 맞춤형 처방 개발	100%	- 한의학적 원리를 근간으로 하여 암유병자를 혈액암, 근육암, 림프암 의 3가지 유형으로 분류 - 유형별 암 유병자에 맞는 식품원료 및 배합비율 선정 - 혈액암 : 연근, 미나리줄기, 돌나물, 메밀쌈 - 근육암 : 콩나물, 느릅나무껍질, 양배추, 표고버섯 - 림프암 : 인동꽃, 더덕, 도라지, 생강
	섭취가 용이한 식품 제형 개발	100%	- 유기가공식품 제조공정 기준으로 기본설계 - 식사대용 발효선식 또는 죽의 형태로 제형 설정하여 가공
	최적 영양조성물 설정	100%	- 식품공전상 환자용 특수영양식 기준 영양성분 자가분석 - 한국식품연구원에 영양성분 분석 의뢰
	설문평가	100%	- 유병자별 자율적 패널모집 : 혈액암(4), 근육암(26), 림프암(34) - 설문평가 실시 : 1회 15일간, 총 3회 식이 후 설문평가 분석

구분 (연도)	세부연구목표	달성도	연구개발 수행내용
3차 년도 (2014)	확정된 제형 완제품의 조혈증진 <i>in vivo</i> 동물 효력시험	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제형 완제품 투여 및 CTX 주사</li> <li>- 홍삼추출물을 비교대조군으로 사용</li> <li>- 혈구세포 계수검사</li> <li>- 유세포 형광분석기(flow cytometer)를 이용한 조혈세포 분석</li> <li>- 골수 및 비장 병리조직 검사</li> </ul>
	전통제조법을 이용한 효능 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료 전처리(건조, 중탕)에 따른 영양성분 분석과 최적 전처리 방법 설정</li> <li>- 최적 가공공정 기본설계 확립</li> <li>- 제조설비의 선정과 공정 확립</li> </ul>
	제형 개발 및 안정성 확보	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 조리편의식품 또는 즉석편의식품 형태의 완제품 개발</li> <li>- 죽, 발효선식 및 액상형의 섭취가 용이한 식품제형 개발</li> <li>- 완제품의 식품공전 기준 안정성 검사</li> </ul>
	필수영양소 복합식품 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품공전의 환자용 균형영양식 기준에 부합하는 원료 배합 및 첨가물 설정</li> </ul>
	원료 표준화	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식약청 등재 식품원료를 위주로 선정한 원료의 안전성 자료 확보</li> </ul>
	품질관리 방안 수립	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유산균 종균(<i>Lactobacillus</i> spp.)의 보관방법 확립</li> <li>- 전처리 원료 및 완제품의 저장기간과 유통기한의 설정</li> </ul>
	상품화 준비	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제품별 포장/디자인 개발</li> <li>- 시제품 제작</li> </ul>

## 2. 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

### 가. 연구개발결과의 목표 대비 실적

구분		특허		신품종				유전 자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종 명칭 등록	품종생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표	2							1		
	달성	2							1		
2차년도	목표	2	1						2		
	달성	3							1		
3차년도	목표	2	2					1	1		
	달성	1	3					0	0		
계	목표	6	3					1	4		
	달성	6	3					0	2		

### 나. 평가의 착안점 및 기준 대비 실적

구분	목표	평가기준		
		성과지표	성과 목표치	실적
1년차 (2012년)	• <i>In vitro</i> 평가법 확립	•세포재생 평가법 확립 건수 •조혈기능 촉진 평가법 확립 건수 •면역력 증진 평가법 확립 건수	3건	3건
	•천연유래물질 선정 (세포재생/조혈/면역)	•원료화 가능 천연 물질 선정수	6개	6개
	•재배법 개발	•효능 증진 재배법 개발 건수	1건	1건
2년차 (2013년)	• <i>In vivo</i> 평가법 확립	•평가법 확립 건수	3건	3건
	•맞춤형 처방 개발	•처방 개발 건수	3건	3건
3년차 (2014년)	•전통음식제조법을 활용한 식품제형 개발	•개발 건수	3개	4개
	•시제품 제작	•제작건수	6개	12개

다. 논문게제성과

게제연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	도두의 조혈증진 작용에 관한 연구	김승형 김근희	이영철	지경엽 조인식 김한영	대한본초학회지	27(4)	국내	비SCI
2013	Sca-1 <sup>+</sup> 골수조혈세포에서 JAK2/STAT5/GATA-1 신호전달 경로를 통한 多彩, 刀豆 그리고 두 조합물에 의한 조혈증진 조절에 관한 연구	김근희	이영철	김승형 김한영 조인식 김동선	대한본초학회지	28(4)	국내	비SCI



라. 특허성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원 번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록 번호
2012	발아 작두콩을 포함하는 기능성 식품 및 이의 제조방법	애경산업 (주)	대한민국	10-2012-0076890					
2012	조혈 및 면역증진용 식품 조성물	애경산업 (주)	대한민국	10-2012-0076907	2014	조혈 및 면역증진용 식품 조성물	애경산업 (주)	대한민국	10-1423380
2013	혈액암 또는 간암의 예방 또는 치료용 조성물, 이를 포함하는 건강식품, 이를 제조하는 방법	애경산업 (주)	대한민국	10-2013-0083829	2014	혈액암 또는 간암의 예방 또는 치료용 조성물, 이를 포함하는 건강식품, 이를 제조하는 방법	애경산업 (주)	대한민국	10-1376267
2013	들깨씨 추출물, 유채씨 추출물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 기능성 식품 조성물 및 이의 제조방법	애경산업 (주)	대한민국	10-2013-0084523	2014	들깨씨 추출물, 유채씨 추출물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 기능성 식품 조성물 및 이의 제조방법	애경산업 (주)	대한민국	10-1408214
2013	항암 치료 후 부작용 완화를 위한 기능성 식품 조성물	애경산업 (주)	대한민국	10-2013-0096924					
2014	자생식물의 혼합물을 함유하는 항림프종 및 면역증진 활성용 발효 선식 조성물 및 그의 제조방법	(주)엔자임바이오	대한민국	10-2014-0097896					

마. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
-	25,200,000원	-	25,200,000원

## 제 2 절 관련분야의 기술발전에서의 기여도

- “건강기능식품에 관한 법률”에 따라 건강기능식품 원료인정을 위해 요구되는 기능성 검증시험, 생산공정 표준화 시험 등에 대한 기술을 확보함으로써 향후 다양한 건강기능식품원료 개발을 위한 기반기술 확립에 기여
- 면역증진 또는 조혈증진을 위한 개별인정형 건강기능식품의 인허가 사례가 부족한 현상에서, 본 연구결과를 면역/조혈증진 건강기능식품 원료개발을 위한 생체지표 설정, 생산공정, 기술, 품질관리기준을 위한 기초 연구자료 확보에 기여
- 항암제 투여 후 부작용 개선을 위한 고기능성 천연식품 복합제제 개발을 위한 자료 제공
- in vitro 세포실험 및 in vivo 동물실험을 통하여 면역증진 또는 조혈증진 검증을 위한 생체지표설정 기술 획득 기여
- 다기능 천연식품 복합제제 효능의 검색증명 및 기능성 식품 산업화 모색

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화, 산업화 계획(기술실시 등)

- 개발된 시제품은 조혈 증진 / 면역 강화 / 세포생장 촉진 식품 개발에 활용
  - 항암치료 후 부작용 개선을 위한 간편식 개발에 활용
  - 조혈/면역 기능저하 극복을 위한 식품으로 활용
  - 환자용균형영양식 제품화에 활용

- 자가기술훈을 통한 실용화 추진

### 제 2 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 항 후 조혈/면역 관련 건강기능식품 개별인정형 인증 획득을 위한 후속 연구 추진
  - 원료표준화 및 생산공정 최적화
  - 인체적용시험을 통한 기능성 검증
  - 최적 섭취 용량 연구

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 해외 전시회 입수 정보

#### 1. Hi-Japan / S-tec (2011)

성분명	내용	식물명	업체명	홈피
Salacia	혈당상승억제 (α-glucosidase를 저해하여 장관에서 이당류가 단당류로 분해됨을 막아 흡수 억제)	Salacia	森下仁丹(주)	
건조효모, 효모엑기스, 효모세포벽	순한맛, 맛의 증폭, 수분보존, 유효작용, MSG/핵산/카라멜색소 대체, 천연향미제	맥주, 빵 효모	B-인터내셔널	<a href="http://www.bio-lallemmand.com">www.bio-lallemmand.com</a>
	건강식품용버섯신종개발, 종균배양, 재배, 제품가공 (꽃송이버섯 - 베타글루칸 40% 이상)	버섯(영지, 아가리쿠스, 차가, 상황, 동충하초, 노루궁뎅이, 잎새, 꽃송이)	CHIHAYA	<a href="http://www.chihaya.co.jp">www.chihaya.co.jp</a>
Monacolin K GABA	콜레스테롤 낮춤 혈압강하 혈당상승억제	홍국쌀	GUNZE	<a href="http://www.gunze.co.jp">www.gunze.co.jp</a>
타히보엑기스 (NQ801-napht hoquinone류)	아마존 자생 수목, 항암활성	타히보( <i>Tabebuia Avellanadae</i> , 능소화과)	TAHEEEBO JAPAN	<a href="http://www.taheeb&lt;br/&gt;o.com">www.taheeb o.com</a>
천연녹색소재01	변색이 없는 천연녹차색소	녹차	ZERO ONE	<a href="http://www.zeroonegreeneco.com">www.zeroonegreeneco.com</a>
녹차분말, 페이스 트	변색이 없는 녹차 소재	녹차	syoukakuen	<a href="http://www.syoukakuen.com/">http://www.syoukakuen.com/</a>
식품검사키트	알러젠검사, 식중독균검사, 곰팡이독검사		日本HAM(주)	<a href="http://www.nipponham.co.jp">www.nipponham.co.jp</a>
실크랩타이드	누에고치 단백질 가수분해 아미노산 피부보습, 모발영양공급	누에고치	월드웨이(주)	<a href="http://www.worldway.co.kr">www.worldway.co.kr</a>
지용성천연색소 추출물, Arctigenin	천연소재 안정화, 신소재개발(ex. 향염/미백), 초임계 관련 기술	강황, 유자, 쏘팔메토, 당귀, 마카, 인삼추출물, 우영	GreenTek21	<a href="http://www.greentek21.com">www.greentek21.com</a>
GABA	수면개선, 미용, 항스트레스, 지방간예방, NK세포활성화 감맥대조탕 - 밀쪽정미 (부소맥)-물에 뜨는밀 수면 유도제	대맥(젓산발효)	三和酒類(주)	<a href="http://www.b-fermentation.com">www.b-fermentation.com</a>

우장버섯추출물	폐암, 백혈병에 효과	우장버섯 (牛樟芝)	Joben Bio-Medical	<a href="http://www.jobenbio.com">www.jobenbio.com</a>
			Grand fortune biotech	
Quercea	양파껍질 추출물, UV 방어, 항산화, 항균, 항알러지 효과	양파	INCREASE	
호박종자유	5a-reductase 저해 작용으로 전립선비대증 및 남성형 탈모에 효과	서양계 호박	(주)일본건강식품 연구소	<a href="http://www.nihon-kenko.com">www.nihon-kenko.com</a>
수소음이온 분말, 캡슐, 타블렛	항산화	산호(coral)칼슘+ 수소	Hydride Ion Corporation	<a href="http://www.hic-m.co.jp">www.hic-m.co.jp</a>
D-Fraction Glislin 아미세논	면역증강, apoptosis 유도 인슐린저항성 개선 너지능 활성화	잎새버섯 잎새버섯 노루궁뎅이버섯	Sun Medica	<a href="http://www.d-fraction.co.jp">www.d-fraction.co.jp</a>
복합허브차	미와 건강을 위한 풍부한 영양소를 균형있게	흑생강	Okinawa Golden Farm	<a href="http://www.okinawagoldenfarm.com">www.okinawagoldenfarm.com</a>
Sparkling Tablet	건강식품 수탁제조 업체, 다양한 제형, 발포정 등		FI Corporation	<a href="http://www.fi-co.co.jp/">http://www.fi-co.co.jp/</a>
푸코이단	항균, 면역, 항암, 육모, 피부보습, 점막보호	팽생이모자반	AKKIFOODS	<a href="http://akkifoods.com">akkifoods.com</a>
Comb푸코이단 AgarOligo	U-, F-, G- 푸코이단 배합 한천의 아가로스를 가수분해한 올리고당	한천	TakaraBio	<a href="http://www.takara-bio.co.jp">www.takara-bio.co.jp</a>
유산균 서플리먼트	동맥경화 예방	FK-23 유산균	Nichinichi제약 (주)	<a href="http://www.nichinichi-phar.co.jp">www.nichinichi-phar.co.jp</a>
Fish콜라겐PFA 콜라겐PA	스킨케어, 관절케어	Tilapia(물고기)껍질 돈피	Sunlife	<a href="http://www.sunlife-rm.com">www.sunlife-rm.com</a>
Ornithine Citrulline	간기능개선으로 항피로 효과 혈류개선 및 부종예방	가막조개(바지락) 수박잎	Kyowa Bio	
IDP(면역방어단 백질)	우유의 유청에서 분리한 양이온성단백질 항균, 항염증, 항산화 작용	소 우유 유청	Kanematsu Chemical	<a href="http://www.kccjp.co.jp">www.kccjp.co.jp</a>
효모웹시드NoT ress	효모를 단백질분해효소에 가용화하여 제조 항스트레스, 항피로, 생리통완화	빵, 술용 효모	BHN	<a href="http://www.bhn.co.jp">www.bhn.co.jp</a>
Lemon verbena	항염증, 항산화, 관절증개선효과	Lemon verbena	BHN	<a href="http://www.bhn.co.jp">www.bhn.co.jp</a>

기기명	기기 설명
Seamless Mini-Capsule	일정한 크기의 Bead 제조 장치
Capsugel	캡슐제조 장치
Sparkring Tablet	발포정
Creep meter	Food texture analyzer (식감측정기), 3,000만원
전자 미각 측정기	미각(쓴맛, 단맛, 짠맛, 감칠맛, 신맛, 떫은맛)을 전자센서로 기기적으로 측정
방사능 측정기	다양한 크기의 방사능 측정기가 많이 출품됨. (10 여개 부스), 400~5,000만원
단백질 분석계	식품 시료의 단백질 함량을 간단히 측정하는 기계
Fragrance and flavor analyzer (Shimadzu)	향 및 맛 측정기, 1.5억원
미생물 고속검사장비	배양하지 않고 즉석에서 미생물의 측정이 가능한 기기

## 2. Vitafoods Swiss (2013)

### 가. 주요 트렌드 요약

#### 성분별 주요 특이사항

1. Omega - 3 : 전통적인 성분이지만, 세계적으로 여전히 강세/증가세를 보이고, Omega - 6, 7 등 원료도 일부 소개
2. Probiotics : 유산균에 대한 연구 및 관련 제품의 출시가 여전히 강세를 보이며, 오히려 증가하는 경향을 나타냄
3. Garcinia cambogia : 원료 공급 업체는 일부 있지만, 예상외로 관련 제품의 수는 대폭 감소함 (소제 대체 움직임)
4. Vitamine/Mineral : 비타민 복합제품 및 미네랄 특히 마그네슘 성분의 연구 및 제품 출시 활발히 이루어지고 있음
5. Natural ingredients : 인도, 인도네시아, 아프리카 등의 자생식물 소개 많음 (단, 의외로 중국은 미흡한 수준)

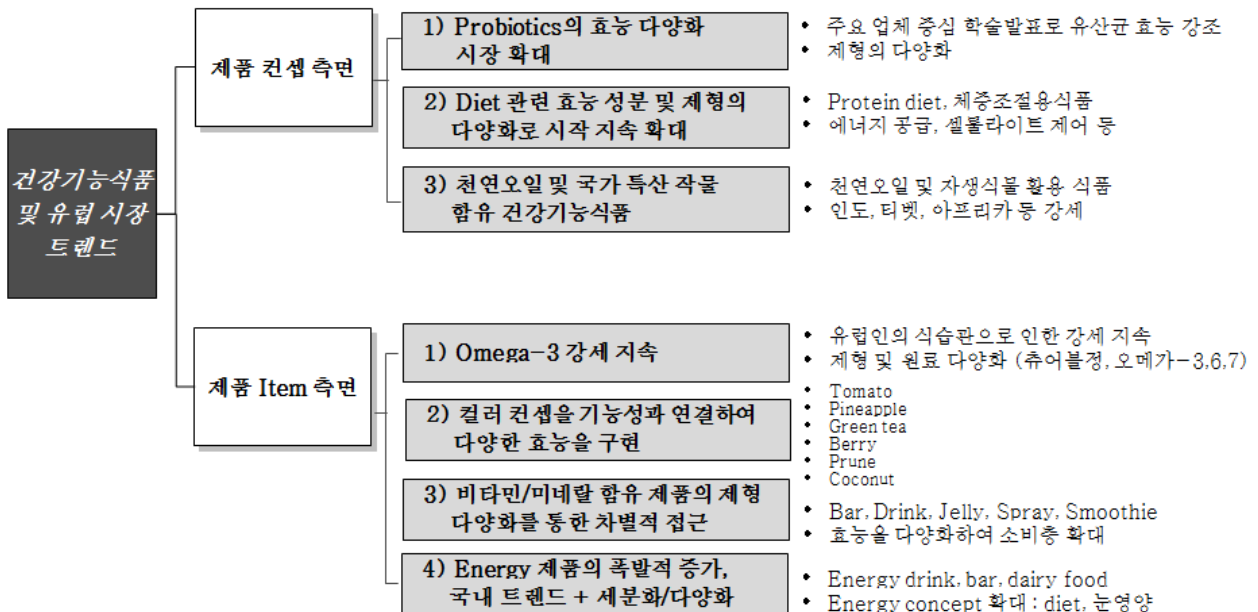
#### 제형/컨셉별 주요 특이사항

1. Omega - 3 : 제형 다양화 활발히 진행중 (Soft capsule + Tablet, Dairy food, Gum, Gumi, Jelly 등)
2. Probiotics : 제형/컨셉 다양화 진행중  
(제형 : Hard capsule, Dairy food + Tablet, Drink, 컨셉 : 연령층/용도 확대)
3. Color concept food : Berry류를 중심으로, Tomato, Pineapple, Prune 등 Color를 기능과 연관시킨 식품 소개
4. Oil 소제 : Chia, Krill 등 oil류의 신규 도입 및 제형 다양화로 소비자에 접근
5. 주요 컨셉 : 다이어트, 에너지 공급, 심혈관계 질병 예방, 관절용, 어린이용 제품 등 소개 많음
6. 기타 제형 : 발포정, 캡슐 제형, Bar, Drink, Dairy food, Spray 등의 제형 다양화가 급속하게 진행

#### 제품군별 주요 특이사항

1. 다이어트 : 가르시니아 하향세 뚜렷, Protein diet, Energy diet, 칼로리 조절 Bar, Drink, Jelly 등 제형 다변화
2. Probiotics : 크리스찬 한센, 다니스코, 모리나가, 셀바이오택 등 유산균 선두업체 주도형 시장 (원료 중심)
3. Vitamine/Mineral : 전통적인 제품에서 컨셉 개발 및 제형 다변화 움직임 뚜렷, 맞춤형, 기능별 구분 제품 강화
4. New concept 도입 : 천연 자생식물을 이용한 natural concept, 원료별 컬러 구분으로 Color concept 강화
5. Omega-3 시장 확대 : 오메가-3의 무궁무진한 효능을 앞세운 마케팅, 제형 다변화 눈길, 고순도 원료 홍보 강화

### 나. 건강기능식품 컨셉/아이템 별 시장분석





## 제 7 장 참고문헌

1. 조성기, 방사선에 대한 생체방호 연구를 기반으로 면역기능조절 생약조성물 헤모힘 개발. Bio인스페셜웹진.2011:22,
2. Li NQ. 1992. Clinical and experimental study on shen-qi injection with chemotherapy in the treatment of malignant tumor of digestive tract. Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih 12: 588-592,
3. Wang Y, Zhu B. 1996. The effect of angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cell. Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih 76: 363-366
4. Torino F, Barnabei A, Paragliola RM, Baldelli R, Appetecchia M, Corsello SM. Thyroid as unintended side effect of anticancer drugs. Thyroid. 2013 ; 1 : 1-5.
5. Slovak ML, Bedell V, Lew D et al. Screening for clonal hematopoiesis as a predictive marker for development of therapy-related myeloid neoplasia(t-MN) following neoadjuvant therapy for breast cancer: a Southwest Oncology Group study (S0012). Breast Cancer Res Treat. 2010 ; 119 : 391-8.
6. Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF. Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment in vitro. Exp Hemtol. 1990 ; 18(7) : 837-42.
7. Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hematopoietic microenvironment. Exp Hematol. 1984 ; 12(7) : 517-21.
8. Halsey C, Tunstall O, Gibson B, Roberts I, Graham G. Role of GATA-1s in early hematopoiesis and differences between alternative splicing in human and murine GATA-1. Blood. 2010 ; 22(115) : 3415-6.
9. Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. PNAS . 2003 ; 22 : 8811-6.
10. Nosaka T, Kitamura T. Janus kinases (JAKs) and signal transducers and activators of transcription(STATs) in hematopoietic cells. Int J Hematol. 2000 ; 71 : 309-19.