

발간등록번호
--------

11-1543000-000991-01
----------------------

산국 Essential 오일을 이용한 혈관질환 치료제의 개발  
(Development of materials and agents for anti-vascular  
diseases using essential oils  
from *Chrysanthemum boreale* Makino)

건국대학교 글로컬산학협력단

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “산국 Essential oil을 이용한 혈관질환 치료제의 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 11월 06일

주관연구기관명 : 건국대학교

글로벌산학협력단

주관연구책임자 : 김보경

세부연구책임자 : 김보경

세부연구책임자 : 원경중

협동연구기관명 : 호서대학교산학협력단

협동연구책임자 : 이환명



# 요 약 문

## I. 제 목: 산국 Esssential oil을 이용한 혈관질환 치료제의 개발

## II. 연구성과 목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래 (이전)	교육 지도	사업 화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표	3	0	3		0	1				5		0	
실적	5	1	5		6	1				7		1	

## III. 연구의 목적 및 필요성

### 1. 목적

본 연구에서는 한국자생 산국의 essential oil (EO)을 이용하여 1) 산국 EO의 개발 및 상용화 2) 산국 EO 및 monoterpene 성분을 이용한 고혈압 치료제/완화제 개발 3) 산국 EO 및 monoterpene 성분을 이용한 동맥경화 치료제/완화제 개발등을 위한 연구를 수행하여 혈관 질환 치료제의 개발을 그 목적으로 함.

### 2. 필요성

- 심혈관 질환은 다양한 연령층에서 발생하며 적기에 치료하지 않으면 심각한 후유증과 더불어 사망에 이르는 질병으로 국내외적으로 사망원인의 수위를 차지하고 있음. 이 중에서도 혈관세포 이상에서 오는 동맥경화는 혈관 및 심장질환의 유발에서 가장 중요한 원인으로 알려져 있음. 우리나라는 노인인구 비중의 증가로 노화에 의해 발생하는 순환기질환, 골관절질환, 퇴행성 신경질환 등 만성질환이 급속히 증가하고 있음. 뿐만 아니라 대사성 질환과 같은 복합질환과 부작용이 심한 고혈압의 발생도 증가하고 있음. 이러한 질환이 서구화된 식생활의 변화 및 생활습관에 의해 가속화 되는 추세이나 아직 완벽한 치료제는 없는 실정임. 그러므로 순환기질환에 대한 새로운 치료약물의 개발은 현대의학의 가장 큰 과제라 할 수 있음.
- 천연물은 예부터 다양한 경험을 통한 치료법으로 이어져 왔기 때문에 친숙한 개념이며 검증된 효능과 낮은 부작용을 특징으로 함. 또한 화학합성물에 비하여 짧은 스크리닝 기간을 통해 연구기간과 비용을 절감하는 동시에 신약에 성공 가능성도 높일 수 있는 장점이 있음. 이렇게 하여 천연물신약은 제약산업의 유망분야로서 국내외에서 천연물에 대한 관심이 고조되고 있음. 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)은 우리나라 각지에 자생하고 있고 그 분포 면적 이 매우 넓어 식물의 확보가 비교적 용이함. 산국 추출물은 항염, 항균 작용 뿐만 아니라 고혈압, 동맥경화, 협심증 및 신경안정 작용 등의 효과가 알려져 있음. 따라서 본 연구과제인 산국을 이용한 혈관질환 완화제의 개발은 천연자원의 발굴과 활용, 새로운 제품 및 치료제의 개발이라는 점에서 기술적, 산업적 및 경제적 효과를 거둘 수

있으므로 산국 EO를 이용한 혈관 질환 치료제의 개발은 본 생명산업기술개발사업의 과제로 매우 적절하다고 사료됨.

#### IV. 연구 내용 및 범위

1. 산국 재배지 확보 및 재배조건 확립
2. 산국 EO 성분의 순수 정제방법 및 수득률의 최적화 확립
3. 산국 EO성분의 혈관기능 개선능 검증
  - 혈관의 수축 및 이완 유도활성 측정, 혈관의 이완 기전 억제활성 검증
  - 신장, 심장, 혈관에 대한 고혈압 지표에 대한 효능 규명
  - 산국 EO 성분의 in vivo 고혈압 활성 검증
4. 산국 EO성분의 동맥경화 개선능 검증
  - VSMC 증식 및 이주 유도활성 측정, 혈관평활근세포(VSMC) 및 혈관내피세포(HUVEC)의 증식 억제활성 검증
  - 신장, 심장, 혈관에 대한 동맥경화 지표에 대한 효능 규명
  - 산국 EO 성분의 in vivo 동맥경화 활성 검증
5. 산국 monoterpene 성분의 효과 검증
  - 산국 monoterpene 성분의 고혈압 지표에 대한 효능 규명/in vivo 고혈압 활성 검증
  - 신장, 심장, 혈관에 대한 동맥경화 지표에 대한 효능 규명
  - 산국 monoterpene 성분의 in vivo 동맥경화 활성 검증
6. 산국 EO성분의 폐성 고혈압 개선능 검증
  - 폐혈관의 수축 및 이완 유도활성 측정, 폐혈관의 이완 기전 억제활성 검증
  - 폐성 고혈압 모델동물의 질환 지표에 대한 효능 규명
  - 산국 EO 성분의 in vivo 폐성 고혈압 활성 검증
7. 산국 EO 및 monoterpene 성분의 안전성 검증
  - EO의 급성독성 연구를 통한 안전성 확보
  - 동물 in vivo 연구를 통한 급성독성/안정성 확보
  - 인체 안전성 검증
8. 산국 EO 및 monoterpene 성분의 혈관질환 개선제 가능성 검증
  - in vitro 혈압, 폐성 고혈압, 동맥경화에 대한 시험
  - in vitro inflammation 유도인자 발현성 확인
  - ex vivo 혈관자극성을 통한 안전성 확인
  - 내과 전문가 의견 및 컨설팅
9. 산국 EO를 함유하는 고혈압 개선 시제품 출시
  - 산국 EO 및 monoterpene 성분을 포함한 제형의 개발 및 시제품 출시
  - 인체 안전성과 효능이 입증된 EO 및 monoterpene 성분을 함유하는 혈관질환 개선제의 제형 및 시제품 개발
10. 산국 EO 성분을 함유하는 동맥경화 개선 시제품 출시
  - 산국 EO 및 monoterpene 성분을 포함한 제형의 개발 및 시제품 출시는 1차적으로 의약품 및 의약외품(스프레이)을 생산할 수 있는 전문기업을 활용하여 시제품을 생산.

## V. 연구 결과

### 1. 동맥경화 관련 혈관기능에 대한 산국추출물 EO의 효과 검증

- EO는 고농도에서 *in vitro* 혈관 평활근세포에 대해 독성을 나타내었으나, 수용성 EO는 어떤 농도에서도 독성을 나타내지 않음. 따라서 수용성 EO의 효과가 검증됨.
- PDGF에 의해 자극된 세포이동은 고농도 EO에 의해 억제경향을 나타내었으나, 수용성 EO에 의해서는 농도 의존적인 억제를 나타냄. PDGF에 의해 자극된 세포증식은 고농도 EO에서만 억제경향을 나타내었으며, 수용성 EO에 의해서는 농도 의존적으로 약화됨. 한편, PDGF로 유도되는 혈관 짝 성장은 수용성 EO에 의해 농도 의존적으로 억제됨.
- 혈관평활근세포의 이동 및 증식과 관련된 신호전달 단백질들(PDGF 수용기 및 MAPK등)의 PDGF에 의한 인산화 증가가 수용성 EO에 의해 억제되는 경향을 나타냄.
- 동맥경화모델의 혈관신생내막 형성이 EO처리에 의해 억제되는 것이 관찰됨.
- 이상의 결과들은 산국추출물 EO는 PDGF-MAPK경로억제를 통한 혈관평활근 세포의 증식 및 이동을 억제해 통해 신생내막형성의 억제를 유도하여 동맥경화 반응을 약화시킬 가능성을 제시함.

### 2. 산국추출물의 고혈압관련 혈관반응에 대한 EO효과 검증

#### (1) 수용성 EO

- 대동맥 혈관평활근 수축/이완능에 미치는 영향: 대동맥 평활근의 안정장력은 수용성 EO 처리에 의해 다소 약화되는 반응을 보임. KCl에 의한 혈관평활근 수축은 수용성 EO 전처리에 의해 내피존재 및 부재조건에서 모두 강력히 억제됨. NE에 의한 혈관수축은 수용성 EO 전처리에 의해 내피부재조건에서 감소하는 경향을 보이지만, 내피존재 하에서는 영향을 나타내지 않음. 한편, 수용성 EO는 acetylcholine (Ach)에 의해 발생하는 내피의존성이완을 다소 억제하는 경향을 나타내었으며, 고농도 KCl 및 norepinephrine (NE)로 발생된 수축을 농도 의존적으로 이완시킴. 그러므로 수용성 EO는 혈관수축을 억제하며, 혈관 이완을 유도할 것으로 예상된다.
- 폐동맥의 수축/이완능에 미치는 영향: 고농도 KCl 및 NE에 의한 내피존재 및 부재의 혈관평활근 수축은 수용성 EO 전처리에 의해 억제되는 것으로 나타남. 수용성 EO는 KCl 및 NE로 유도된 내피 부재의 혈관수축을 농도 의존적으로 감소시킴. 따라서 폐동맥 수축에 대한 수용성 EO의 효과는 대동맥과 비슷한 수축/이완 효과를 나타 낼 가능성이 있음.

#### (2) 지용성 EO

- 혈관 수축/이완능에 대한 효과 : 내피존재 및 부재하의 혈관평활근의 안정장력은 EO처리에 의해 가볍게 약화되는 경향을 나타내었으며, endothelin (ET)-1 및 serotonin (5-HT)에 의한 혈관수축은 EO의 전처리에 의해 억제되는 경향을 나타냄. NE에 의한 혈관수축은 EO 전처리에 의해 크게 억제되는 경향을 나타냄. 한편 NE 및 고농도 KCl 로 유도된 내피존재 및 부재의 혈관수축은 EO 농도 의존적인 이완반응을 나타냄. 따라서 EO에 의한 폐동맥 수축/이완은 수축의 억제 및 이완유도 효과를 가진 성분이 존재할 것으로 사료됨.
- 고혈압모델동물에 EO 을 투여한 바, 혈압을 감소시키는 경향이 관찰됨.
- 이상의 결과들은 산국추출물 EO가 고혈압을 개선시킬 가능성을 가진 물질임을 시사함.

### 3. 심혈관질환 (동맥경화 및 고혈압)관련 factor 들에 대한 EO의 효능 검토

#### (1) 심혈관질환 관련 세포의 반응에 대한 EO효과

-내피세포 성장인자인 VEGF에 의한 혈관내피세포(HUVEC)의 이동/증식 및 혈관썩 생성은 수용성EO처리에 의해 약화되는 경향을 보임. 한편, 염증사이토 카인 (LPS)에 의해 증가된 NO생산 및 NOS의 증가가 수용성EO처리에 의해 감소됨. 따라서 수용성EO는 혈관기능을 보호할 수 있는 유익한 물질일 것으로 사료됨.

-심근세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 apoptosis 및 ROS ( $O_2^-$  및  $H_2O_2$ ) 발생은 수용성EO처리에 의해 감소되는 경향을 나타냄. 한편, Miconazole에 의한 심근세포의beating수 감소는 수용성 EO처리에 의해 회복됨. 이들 결과는 수용성EO가 심장세포에서의 심혈관질환(동맥경화 및 고혈압)과 관련된 apoptosis 및 ROS 발생에 대해 억제효능을 가지며, 심근세포기능에 대해 보호 효능을 나타낼 가능성을 시사함.

-Angiotensin II (Ang II)에 의한 신장세포에서의 전섬유화인자 collagen type 1, fibronetin 1, PAI-1 발현 증가는 수용성EO 처리에 의해 모두 약화되는 경향을 나타냈으며, TGF- $\beta$ 의 발현은 다소 증가됨. 이들 결과들은 수용성EO가 전섬유화인자의 발현을 감소시켜 신장 보호에 효능을 가질 가능성을 시사함.

-결론적으로 수용성 EO는 이들 세포들에서 심혈관질환 관련 반응들에 대해 유익한 효과를 발휘할 수 있는 물질로 사료됨.

#### (2) 산화스트레스연관 단백질 발현에 대한 EO 효과

- 혈관평활근세포에서 PDGF 및 Ang II 에 의한 Ref-1, PRR 및 DJ-1의 발현증가가 수용성 EO의 처리에 의해 대체적으로 감소되는 경향을 나타냄.

- 혈관내피에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 Ref-1, DJ-1 및 PRR 단백질의 발현증가는 수용성EO처리에 의해 감소되는 경향을 나타냄.

- 심근세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 Ref-1, Prx3, DJ-1의 발현증가는 수용성 EO처리로 약화되지만, PRR의 발현에는 억제효과를 나타내지 못하는 것으로 관찰됨.

- 신장세포에서 Ang II의 자극에 의한 전섬유화인자 Collagen type 1, Fibronetin 1, PAI-1의 발현증가는 수용성EO 처리에 의해 모두 약화되나, TGF- $\beta$ 의 발현은 다소 증가하는 경향으로 나타남.

-그러므로, 수용성EO는 심혈관관련 산화스트레스성 관련 단백질의 발현을 억제할 수 있는 능력을 가진 물질일 가능성이 있음.

### 4. 산국 EO로부터 분리된 순수성분의 혈관기능연구

#### (1) 산국 EO로부터 순수성분 분리 및 monoterpine과 single compounds의 확보

- Gas chromatography-mass spectrometry (GS/MS)를 이용하여 EO를 분석한 바, 총 42가지의 성분이 분석되었으며, 이들 중 혈관기능이 명확하지 않은 성분 17가지 (monoterpine, 15종; sesquiterpene, 2종)를 선택하여 본 연구를 수행함. 이 중 일부 성분은 EO로부터 분리 정제하여 사용하였으며, 일부 물질은 구입하여 사용함.

#### (2) 동맥경화 관련 혈관반응에 대한 EO 순수성분의 효과 검증

-EO 순수성분으로 처리된 혈관평활근세포의 안정성 시험에서 80% 이상 생존능을 보인 성분 들은 camphor, camphene, terpinolene, beta-pinene의 monopterpene류 이었음. 이들 순수성분 들 중 camphor 및 terpinolene은 생존능이 거의 100%인 것으로 관찰됨.

- 이들 물질중 terpinolene은 혈관평활근 세포의 증식 및 이동을 보다 효과적으로 억제하는

것으로 관찰됨.

- 동맥경화 모델 동물의 혈관 신생내막형성은 terpinolene에 의해 억제되는 경향을 나타냄.
- 그러므로, monoterpene류의 EO 순수성분인 terpinolene이 동맥경화 개선에 영향을 미칠 유용한 가능성 물질로서의 역할이 예상됨.

### (3) 고혈압관련 혈관반응에 대한 EO 순수성분의 효과 검증

- EO 순수성분들 중 piperitone은 35 mM KCl 및 0.1  $\mu$ M NE에 의한 내피 존재 및 부재의 폐동맥 수축에 대해 이완효과를 나타내었으며, monoterpene류인 piperitone은 가장 효과적인 이완효능을 유발하는 것으로 나타났음.
- Piperitone은 내피존재 및 부재하의폐동맥의 안정장력을 농도 의존적으로 이완시킴.
- Ach에 의해 발생하는 내피의존성이완은 비처리혈관에 비해 Piperitone의 처리군이 더 컸음.
- ET-1에 의한 내피 부재 또는 존재하의 혈관들의 수축증가반응은 EO 순수성분인 piperitone의 전처리에 의해 억제되는 경향을 나타냄.
- Piperitone에 의한 폐동맥이완 효과가 L-NAME 처리에 의해서는 영향이 없었으나, Indomethacin 전처리에 의해서 약간의 억제 경향을 보임.
- 내피 존재 및 부재하의 폐동맥에 있어서 NE로 유도된 수축의 SNP (sodium nitropruside, NO donor)에 의한 이완은 piperitone 처리군 및 비 처리군 사이에 반응차이를 나타내지 않음.
- Piperitone은 혈관 평활근세포의  $Ca^{2+}$  channel을 open을 억제하는 경향을 나타냄.
- 따라서, Piperitone에 의한 혈관수축력의 억제는  $Ca^{2+}$  channel의 억제와 관련 될 가능성이 있을 것으로 사료됨.
- Piperitone은 투여일 의존적으로 고혈압 저하 효과를 나타냄.
- 결론적으로, 이상의 결과는 monoterpene류인 EO 순수성분 piperitone은  $Ca^{2+}$  channel을 억제함으로써 혈압을 저하 시킬 수 있는 물질일 가능성을 제시함.

## 5. 심혈관질환 (동맥경화 및 고혈압)관련 factor 들에 대한 EO 순수성분의 효능 검토

### (1) 혈관평활근세포에서 EO 순수성분의 영향

- 혈관평활근세포에서 ketoconazole 또는 Ang II에 의해 유도되는 ROS 및 apoptosis 발생은 EO 순수성분 중 terpinolene 처리에 의해 억제되는 경향을 나타내었으나, beta-pinene을 처리한 군에서는 ROS 만을 억제하며 apoptosis에는 영향을 주지 않았음.
- 혈관평활근세포에서의 ketoconazole에 의한 DJ-1, 및 Bax의 발현변화는 monoterpene류 terpinolene 및 beta-pinene에 의해 억제되는 경향을 나타냄.
- 이들 결과로부터 terpinolene은 혈관평활근세포에서의 심혈관질환(동맥경화 및 고혈압)과 관련된 factor들의 활성을 억제할 가능성을 소유한 물질로서 예상됨.

### (2) 심근세포에서 EO 순수성분의 영향

- EO순수성분 중 ketoconazole 및 Ang II에 노출된 심근세포에서 유도되는 ROS 발생은 terpinolene 및 beta-pinene에 처리에 의해 다소 약화되는 경향을 보임. 한편, ketoconazole 및 Ang II 처리 후, 발생한 apoptosis는 terpinolene에 의해서만 억제경향을 보이나, beta-pinene의 처리에 의해서는 거의 영향을 받지 않는 것으로 관찰됨.
- Ketoconazole에 노출 된 심근세포에서의 Prx3, DJ-1 및 Bax 의 발현 변화는 monoterpene류인 terpinolene 및 beta-pinene에 처리에 의해 억제되는 경향을 나타내었으며, Ang II에 의

한 DJ-1 및 Bax의 발현 변화는 terpinolene의 처리에 의해 감소되는 것으로 관찰됨.

-이들 결과는 terpinolene은 심근세포에서의 심혈관질환 관련 factor의 능력을 억제시키는데 효과를 발휘할 가능성 물질임을 시사함.

(3) 신장세포에서의 관련 반응에 대한 EO 순수성분의 효능

-Terpinolene은 Ang II로 유도된 신장세포에서의 전섬유화인자 collagen type 1 및 fibronectin 1의 변화를 억제하는 경향을 나타내었으나, PAI-1 및 TGF- $\beta$ 의 발현변화에는 영향이 없는 것으로 나타남.

-이들 결과들로부터, Terpinolene은 전섬유화인자의 발현을 감소시키는데 있어서 효능을 가질 것으로 사료됨.

(4) 폐조직에서 관련 단백질 발현에 대한 EO 순수성분의 효과

-Phellandrene은 ICAM-1, COX2, NF-kb등의 염증관련 factor 및 apoptosis 관련 Bax의 발현 변화에 거의 영향을 주지 않았음. 한편, piperitone은 COX2 및 Bax, NF-kb의 발현에 거의 영향을 주지 않았으나, ICAM-1의 발현을 증가시키는 경향을 나타냄.

-이 결과들은 폐조직에서 piperitone이 염증반응에 대해 이상성을 나타낼 가능성을 제시함.

## 6. 산국화 EO의 안정성 연구

(1) 산국화 EO의 설치류 급성경구독성시험연구

-산국화 EO를 단회 경구 투여 후 14일간 관찰한 바, 산국화 EO은 임상증상, 체중 및 사료 섭취량의 변화 등이 관찰되지 않았고, 관찰기간 종료 후 실시한 육안적 병리검사에서 이상 관찰되지 않음. 또한 관찰종료일까지 사망동물이 관찰되지 않았음. 따라서 경구 노출에 의한 독성이 없는 안전한 물질로 판단되었음.

(2) 산국화 EO의 설치류 급성경피독성시험연구

-산국화 EO를 단회 경피 투여 후 14일간 관찰 한 바, 산국화 EO는 임상증상, 체중 및 사료 섭취량의 변화 등이 관찰되지 않았고, 관찰기간 종료 후 실시한 육안적 병리검사에서 이상이 관찰되지 않음. 또한 관찰종료일까지 사망동물이 관찰되지 않았음. 따라서 경피 노출에 의한 독성이 없는 안전한 물질로 판단되었음.

(3) 산국화 EO의 설치류 반복독성시험연구

-산국화 EO에 대한 14일간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 전신 독성을 확인하여 독성 양상을 확인하고자 시험물질을 1회/일, 14일간 반복적으로 강제 경구 투여하여 시험물질에 대한 독성 정보를 확보하였음. 그 결과, 산국화 EO의 본 제품은 임상증상, 체중 및 사료 섭취량의 변화 등이 관찰되지 않았고, 관찰기간 종료 후 실시한 혈액검사, 노화학치 검사, 부검 후 육안검사 및 장기중량 측정에서 이상이 관찰되지 않았으며, 관찰종료일까지 사망동물이 관찰되지 않았음. 본 시험 조건에서 무독성량은 5 ml/kg bw/day인 것으로 평가되었음.

(4) 산국화 EO의 설치류 급성흡입독성시험연구

-산국화 EO의 100배 희석액 (19,070 ppm) 및 10배 희석액 (190,700 ppm)으로 4시간 노출시킴. 관찰기간 종료 후 육안적 병리검사를 실시한 결과, 노출군 및 음성대조군 모두에서 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았으며, 시험동물들의 폐 및 기타 여러 장기에 이상증상이 나타나지 않았음. 무처리군과 비교하여 체중 및 사료섭취량과 음수량에 큰 차이를 보이지 않았으며, 시험기간 종료일까지 사망동물이 발생하지 않았음. 따라서 산국화 EO의 흡입독성은 아주 안전한 것으로 판단되었음.



## 7. 산국성분을 이용한 혈관질환 치료제/완화제의 시제품개발

(1) 기능연구 결과를 바탕으로 임상시험용 시제품을 개발함

(2) 동맥경화 개선 시제품: 시판되고 있는 기존의 EO 함유 제품들의 액상차의 형태로 응용이 많음을 참고하였으며, 또한 순환기 전문가 및 내과 전문가의 조언을 바탕으로 하여 산국 EO성분 (floral water) 함유한 액상차의 제형으로 개발함. 산국 EO성분의 체내 흡수율이 우수한 배합비를 최종 설정하여 액상차형 (vial)으로 (주)동서제약 웰빙에 주문 제작함.

(3) 고혈압 개선 시제품: 순환기 전문가 및 내과 전문가의 조언을 바탕으로 하여 병태에 효과적인 산국 EO성분을 함유한 스프레이형 (2종)의 제형으로 개발함. 산국 EO성분의 체내 흡수율이 우수한 배합비를 최종 설정하여 액상차형 (vial)으로 (주)동서제약 웰빙에 주문 제작함.

(4) 시제품의 효능 검사

-동맥경화 개선 시제품의 항동맥경화 효능검사: in vivo 동맥경화 모델에서 형성된 신생내막의 형성정도를 시제품과 동일 조건의 수용성EO에 대한 효과를 처리 군과 비처리 군에서 서로 비교 검토함. 그 결과, 수용성EO 처리군은 신생내막 형성이 다소 약화되는 경향을 나타냄. 그러므로, 액상차 시제품은 동맥경화에 중요과정인 신생내막형성의 억제에 효과를 나타낼 가능성이 있는 제품으로 예상됨. 그러나 향후 임상적용 및 시판을 위해서는 보다 장기간 투여시의 효과 등 보다 세밀한 연구 또한 중요할 것으로 사료됨.

-고혈압 개선 시제품의 항고혈압 효능검사 : monocrotaline으로 유도된 폐성고혈압 in vivo 모델동물을 이용하여 폐성 고혈압에 대한 고혈압 개선 시제품의 효능을 검사하기 위하여, 폐성 고혈압의 대표적인 병태 증상인 심장 및 폐동맥의 병태 비교분석함. 시제품과 동일조건의 EO를 폐성 고혈압 모델 동물에 흡입처리 후 처리군과 비처리 군의 조직병태정도를 확인함. 그 결과, monocrotaline으로 유도된 폐성 고혈압 동물의 대표적인 병태인 우심실벽 비대 및 폐동맥벽 비대가 EO처리에 의해 다소 감소되는 경향을 나타내었음. 따라서 고혈압 개선용 시제품은 폐성 고혈압의 중요 병태를 억제 가능한 경향을 나타내는 것으로 관찰됨으로써 폐성고혈압의 개선에 유용한 제품으로서의 역할이 예상됨. 그러나 향후 임상적용 및 시판을 위해서는 보다 장기간 투여시의 효과 등 보다 세밀한 연구 또한 중요할 것으로 사료됨.

-염증 유도관련 단백질 발현에 대한 효과 확인 : 혈관 평활근세포에 시제품 동일조건 및 농도의 EO를 처리 시 염증자극 물질에 의해 유도된 관련 단백질 발현 증가가 약화되며, 인간 유래혈관내피세포 (HUVEC)에서의 염증유도인자 및 caspase 3의 발현 증가가 감소하는 경향으로 관찰됨. 한편, 심근세포에서 ketoconazole로 유도된 세포독성 및 Bax 발현 또한 시제품 동일조건 농도 EO처리에 의해 약화되는 경향을 나타냄. 이상의 결과들은 EO가 혈관평활근 및 내피세포에서의 염증반응의 억제 효과 및 심근세포 기능에 대해 양성효과를 나타낼 가능성을 제시함.

(5) 산국 EO 성분 함유 시제품 인체 간이 임상시험

- 내과 전문의와의 컨설팅을 통해 제작된 임상시험용 시제품의 인체 안정성 검증을 위한 간이 임상시험을 수행하기 위하여 IRB 신청서를 건국대학교 IRB위원회에 제출함 (신청번호: KUCH 2015-09-041; 수행처: 건국대학교충주병원).

## 8. 한국자생식물 산국 EO의 개발

(1) 산국화 재배조건 확립: 야생 산국화를 채취하여, 호서대학교 한방화장품과학과 실습지내 배

수시설 확충 및 배수가 잘 되는 토양을 선택하여 재배지를 3000평 확립하여, 산국화 재배지의 제조작업의 보완을 위해 부직포/비닐 멀칭 설비를 구축하였음. 개화 시기 별 EO 성분의 비교를 위해 재배지에 구역을 나누어 채취시기를 조절하였으며, 산국 EO 구성 성분 중 특이적인 성분의 분리를 위해 지역을 달리하여 채취함으로써 채취 시기 및 지역별 EO 성분 연구를 위한 조건을 확립함.

(2) 산국화 EO의 추출 환경 및 기기의 확립 : 호서대학교 한방화장품과학과 실습지 내 EO 전용 추출 및 분리를 위한 추출실을 확보 및 셋팅 하였음. 기존의 추출기의 단점을 보완한 대용량/고효율의 steam distillation 추출기 2대 및 다양한 한국 자생식물 EO 추출 및 연구에 사용될 간이 추출기 1대를 설치하였으며, 기타 농축기 1대, absolute 추출장비, 압착 추출 장비 등 확보함.

(3) 분리방법의 최적화 확립 : 산국 EO의 분리를 위하여 steam distillation, absolute extraction, 초고압 추출법 및 초임계 추출법을 적용한 바, 산국 EO의 분리 및 정제는 steam distillation 방법이 가장 최적화된 방법임이 확인됨.

(4) 산국화 EO의 성분분석 및 효능검증

(가) 성분분석: 본 연구진은 보유 추출기법(100% 증류수를 이용; 꽃이 피기 직전에 수확)을 활용하여 추출한 산국화 EO를 GC/MS로 분석하여 42개의 성분을 동정하였음. 이중 대부분은 monoterpene 및 sesquiterpene 성분임을 확인함. 한편, 산국화 EO 분리 후 수용액층인 수용성 EO (floral water)의 성분분석을 GC-MS를 활용하여 분석(의뢰: 한국기초과학지원연구원, KBSI, 서울서부센터)하여, 작용이 알려지지 않는 4성분 및 다양한 기능을 가지는 3성분 총 7개 성분이 함유되는 것으로 확인함.

(나) 산국화 EO의 비 심혈관계 효능: 상처치유 및 피부재생효과, 항산화 효능(free radical 소거능), 항비만 효능등을 확인함.

(5) 산국화 essential oil의 수득률 및 성분의 최적화

(가) 개화 시기에 따른 산국화 EO의 수득률, 성분 및 효능검증

① 개화 시기에 따른 산국화 EO의 성분 및 수득률 검증

-개화 전(vegetative), 개화 중(pre-flowering), 개화 후(full-flowering)후로 구분하여 채취한 산국화를 steam distillation 방법을 활용하여 추출된 EO의 수득률을 확인함. 그 결과 개화 중에 수득률이 가장 높게 나타났으며, 개화 후에는 수득률이 감소되는 경향을 보임.

-채취 시기별로 분리된 산국화 EO의 성분 분석을 한국기초과학지원연구원(KBSI, 서울서부센터)에 의뢰하여 GC/MS를 이용하여 분석함. 개화시기에 따른 산국화 EO 성분의 변화는 개화 중에  $\beta$ -thujone, umbellulon,  $\beta$ -phellandrene등을 포함한 7가지 성분이 특이적으로 존재하였음. 개화 전, 개화 중, 개화 후 시기에 모두 monoterpenes의 함량이 높았으며, 특히 개화 중 시기 부터 monoterpenes 성분의 증가와 더불어 sesquiterpene 성분의 감소가 관찰됨. 개화전의 EO성분 중 sesquiterpene 성분의 일부는 꽃이 완전히 개화되고 난 후 상태에서 일부 감소가 관찰됨.

② 채취시기별 산국화 EO의 효능

-개화 중 시기의 EO는 EGF에 비해 높은 keratinocyte 및 fibroblast의 proliferation/migration을 유도하는 것이 확인됨. 반면, 개화전 과 개화 후 시기에 채취한 산국화 EO는 유의한 효과를 나타내지 않음.

-산국화 EO은 채취시기에 따른 항산화 효능의 차이는 나타내지 않았으나, 공통적으로 유사한 항산화 활성을 나타냄.



(나) 채취 지역별 산국화 EO의 수득률, 성분 및 효능검증

① 채취지역에 따른 산국화 EO의 수득률 및 성분 검증 :

- 북부(한계령 정상 인근), 중부(충남 아산), 남부(남해군청 인근)에서 개화 전(pre-flowering) 상태의 산국화를 채취하여 steam distillation 법을 활용하여 얻은 EO의 수득률은 중부-남부-북부 순으로 수득률이 높았음. 따라서, 중부 지역(충남 아산)이 EO 분리용 산국화 재배에 있어서 최적지임을 확인함.

-지역별로 분리된 산국화 EO의 성분 분석은 한국기초과학지원연구원(KBSI, 서울서부센터)에 의뢰하여 GC/MS를 활용하여 분석하여, 총 37개의 성분을 확인함. 북부(강원 설악, 한계령), 중부(충남 아산) 및 남부(경남 남해)에서 모두 monoterpenes의 함량이 높게 나타남. 또한 중부(충남 아산)지역의 산국화 EO 성분에서 monoterpenes 및 sesquiterpenes 성분의 함량이 북부 또는 남부 지역에 비해 높게 나타남.

② 채취지역에 따른 산국화 EO의 효능 검증

-중부(충남 아산)에서 채취한 산국화 EO는 EGF에 비해 유의적인 fibroblast 증식/이주능을 유도한 반면, 북부(강원 설악, 한계령)와 남부(경남 남해)에 채취한 산국화 EO는 증식 및 이주능이 관찰되지 않음.

-산국화 EO는 채취지역에 따른 항산화 효능의 차이는 나타내지 않았으나, 공통적으로 유사한 항산화 활성을 나타냄.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

산국 EO 및 추출물을 혈관질환 개선제로 인정받기 위하여 준비 중에 있음. 이 과정에서 독점권을 가지기 위해 필요한 특허 5편을 출원하였고 1건 등록함. 또한 기술이전 1건을 실시하였으며, 관련 연구결과를 바탕으로 한 5 편의 논문 발표완료 및 추가 투고 준비 중에도 있음. 그 외 다양한 결과의 학회 발표 (6 회)를 통해 연구 우수성을 인정받았으며, 산국 EO를 전시회에 출품/홍보를 통하여 호평을 받았음.

### 2. 활용계획

- 산국 EO 및 추출물을 혈관질환 치료제로 인정 및 상품화가 이루어지도록 참여 기업과 지속적인 정보교환 및 협력체제를 유지할 예정임.
- 본 연구에서 도출된 산국 EO의 효능 및 산출이 최적화된 조건을 활용하여 보다 많은 산국의 대량 재배를 통한 공급의 원활에 기여할 예정임.

## SUMMARY

I. Title : Development of materials and agents for anti-vascular disease using essential oils from *Chrysanthemum boreale* Makino

### II. Comparison between Planning and Accomplishment in Research Achievement

Item	Intellectual property rights		paper		Conference presentation	Technology transfer	Education	Commercialization	Technical certification	Manpower training	Utilization in policy	Exhibition	Others
	Application	Registration	SCI	Non-SCI									
Plan	3	0	3		0	1				5		0	
Achievement	5	1	5		6	1				7		1	

### III. Research Objectives and Importance

#### 1. Objectives

In this project, we aimed to develop essential oil (EO) from *Chrysanthemum boreale* Makino (CBM) and to find materials and agents for anti-vascular disease such as anti-hypertension and anti-atherosclerosis using the EO. Moreover, this purpose was extended to commercialization of the essential oil.

#### 2. Importance

- Cardiovascular disease, which is in top cause group of death globally, occurs in various ages and leads to death with severe complications when it is not treated on time. Atherosclerosis is caused by vascular cell abnormality and is known as the most important risk factor in cardiovascular disease. In Korea, occurrence of chronic disease, including circulatory disease, bone joint disease, and degenerative nerve disease, is rapidly elevated with increase in ratio of aged population. Moreover, people with metabolic disease and hypertension are also elevated in Korea by the westernization of the Korean diet. However these diseases have not been completely treated because there were no perfect medicines or therapeutic methods. Therefore, it is required to develop materials or agents to treat them in current medicinal area.
- Development of natural drugs that were produced with extracts from animals and plants is a promising area in the pharmaceutical industry. Thus natural products have come into the spotlight globally. They have been used as various therapeutic materials and are characterized by proven efficacy and low side effects. Moreover, utilization of natural products has advantage that can heighten success rate of new drug development

and reduce research time and costs through shortening the period of screening test compared with chemical compounds. CBM can be easily get because it is growing across the whole extent of Korea and its distribution area is very wide. Extracts from CBM have various properties including anti-inflammatory and antibacterial effect, as well as anti-hypertension, anti-atherosclerosis, angina, and nerve stabilizing effect. Form our research, we can provide technical, industrial and economic effect through the utilization of natural products and the development of new products and therapeutic materials for anti-vascular disease using CBM EO. Therefore, our research is considered as a very promising project for Bio-industry Technology Development Program.

#### IV. Contents and Scope

1. Establishment of plantation and growing conditions of CBM
2. Finding of the purification method and yield optimization of CBM EO
  - Securement of suitable EO extraction system and apparatus
  - Optimization of CBM harvest time, EO extraction condition and EO purification method
3. Investigation of CBM EO effect on vascular functions
  - Testing of CBM EO effect on vasocontraction and vasorelaxation and finding theirs related mechanisms.
  - Testing of CBM EO effect on hypertension risk factor in kidney, heart, blood vessels.
  - In vivo test of CBM EO effect on hypertension-linked responses
4. Investigation of CBM EO effect on atherosclerosis
  - Testing of CBM EO effect on proliferation and migration in vascular smooth muscle cell (VSMC) and on proliferation in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC).
  - Test of CBM EO effect on atherosclerosis risk factors in kidney, heart, blood vessels
  - In vivo test of CBM EO effect on atherosclerosis-linked events
5. Investigation of substitution effect of monoterpene components from CBM EO
  - Test of monoterpene effect on hypertension risk factors and in vivo hypertension
  - Test of the effects of monoterpenes on atherosclerosis risk factor in kidney, heart, and blood vessels
  - Test of the effects of monoterpenes on atherosclerosis
6. Investigating of CBM EO effect on pulmonary hypertension
  - Testing of CBM EO effect on contraction and relaxation in pulmonary artery and finding of its mechanism
  - Investigation of CBM EO influence in pulmonary hypertension model
  - In vivo test of CBM EO effect on pulmonary hypertension-linked responses
7. Human safety test of CBM EO and its monoterpene components
  - Securement of human safety by acute toxicity test of CBM EO
  - In vivo acute toxicity test of CBM EO in animals
  - Safety securement of CBM EO in animals
8. Investigation of possibility as improvements against vascular disease

- In vitro test on blood pressure, pulmonary hypertension and atherosclerosis
  - In vitro test on inflammatory factor expression
  - Ex vivo test on safety of blood vessel stimulation
  - Internist opinions and consultancy
9. Launching of prototype against hypertension containing CBM EO
- Development of dosage form and launching of prototype containing CBM EO
  - Human safety test on CBM EO-containing prototype
10. Launching of prototype against atherosclerosis containing CBM EO
- Development of dosage form and launching of CBM EO-containing prototype and the prototype will be the first produced in a professional company that can manufacture medicine and non-drug.

## V. Results

### 1. Effects of CBM extracts on atherosclerosis-linked vascular responses

- CBM EO had a toxic activity on VSMCs at high concentration but CBM floral water (FW) did not affect it at any concentration. Thus, we explored the effect of CBM FW on vascular disease-related vascular responses.
- PDGF-induced VSMC migration was inhibited only by treatment with high concentration of CBM EO but was attenuated by CBM FW in dose-dependent manner. Moreover, CBM FW dose-dependently suppressed PDGF-stimulated vascular sprout outgrowth. Therefore, this result implies that CBM FW can have anti-atherosclerosis activity.
- CBM FW attenuated the PDGF-increased the phosphorylation of migration- or proliferation-participating proteins such as PDGF-receptor and MAPKs in VSMCs. Moreover, rat vascular neointima formation was inhibited by administration with CBM FW.
- These results suggest that CBM FW may inhibit neointima formation by suppressing VSMC migration and proliferation mediated by PDGF-receptor-mediated MAPK pathway. Therefore, CBM FW may a promising material for drug development to treat or prevent atherosclerosis.

### 2. Effects of CBM extracts in hypertension-linked vascular responses

#### (1) CBM FW

- Aortic contraction and relaxation: CBM FW weakly inhibited vascular resting tension. KCl-induced contraction in endothelium intact and free aortas was strongly inhibited by pretreatment with CBM FW. However, Norepinephrine (NE)-induced contraction was inhibited by pretreatment with CBM FW in endothelium free aortas but not in endothelium intact aortas. Acetylcholine (Ach)-induced endothelium-dependent relaxation in aorta was weakly attenuated by CBM FW. In addition, CBM FW inhibited 35 mM KCl- and 0.1  $\mu$ M NE-induced contractions in aorta in a dose-dependent manner. These results suggest that CBM FW may have relaxation activity in aortas.
- Contraction and relaxation in pulmonary artery: Pretreatment with CBM FW resulted in

inhibition of KCl- and NE-induced contraction in endothelium-intact or -free pulmonary artery. Moreover, CBM FW dose-dependently attenuated 35 mM KCl- and 0.1  $\mu$ M NE-contractions in pulmonary artery. These results suggest that these responses to CBM FW in pulmonary artery were similar to those in aortas.

## (2) CBM EO

- Contraction and relaxation in pulmonary artery: CBM EO weakly inhibited vascular resting tension under endothelium intact or free conditions. Pretreatment with CBM EO inhibited serotonin-, endothelin (ET)-1, or NE-induced contractions in endothelium intact and free vessels. In addition, CBM EO inhibited 35 mM KCl and 0.1  $\mu$ M NE-induced contractions in aorta in a dose-dependent manner. These results suggest that CBM EO may have components to induce vascular relaxation.

- Administration of CBM EO lowered blood pressure in SHR

- In conclusion, CBM EO may be a useful material source for drug development to improve hypertension.

## 3. Testing of CBM extract effect on various risk factors relative to cardiovascular diseases

### (1) Investigation on cardiovascular diseases-linked responses in various cell types

- HUVECs: VEGF-induced HUVEC migration/proliferation or sprout outgrowth were inhibited by treatment with CBM FW. Lipopolysaccharides (LPS)-stimulated nitric oxide (NO) production and NO synthase (NOS) increase were decreased by CBM FW. Therefore, CBM FW may play a protective role in keeping vascular function.

- Cardiomyocytes: CBM FW decreased TNF $\alpha$ -induced apoptosis and ROS ( $O_2^-$  및  $H_2O_2$ ) generation in cardiomyocytes. Moreover, miconazole-decreased number of beating was recovered by treatment with CBM FW in cardiomyocytes. These results indicate that CBM FW may play a positive activity on responses related to cardiovascular diseases including atherosclerosis and hypertension.

- Kidney cells: Angiotensin II (Ang II) induced increased expressions of collagen type 1, fibronectin 1 and PAI-1 in kidney cells. These responses were attenuated by pretreatment with CBM FW. Moreover, CBM FW increased Ang II-enhanced expression of TGF- $\beta$  in kidney cells. These results imply that CBM FW may exert protecting effect on fibrosis in kidney cells.

- In conclusion, CBM FW may be a potential material to protect cardiovascular diseases-linked cells.

### (2) Investigation on oxidative stress-associated proteins

- In VSMCs, PDGF- or Ang II-increased expressions of Ref-1, PRR and DJ-1 were attenuated by CBM FW.

- In HUVECs, CBM FW decreased TNF-enhanced expressions of Ref-1, DJ-1 and PRR.

- In cardiomyocytes, TNF $\alpha$ -increased expressions of Ref-1 and DJ-1 were inhibited, but not TNF $\alpha$ -increased expression of PRR, by treatment with CBM FW.

- In kidney cells, Ang II-increased expressions of collagen type 1, fibronectin 1, and PAI-1,

but not Ang II-increased expressions of TGF- $\beta$ , were decreased by treatment with CBM FW.

-In conclusion, CBM FW may have positive activity on oxidative stress-associated proteins

#### 4. Testing of the effects of CBM EO components on vascular disease-linked events

##### (1) Composition analysis and single compounds of CBM EO

- CBM EO was analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GS/MS) and contained total 42 compounds. Among these compounds, seventeen compounds that did not have any activity on vascular function was contained 15 monoterpenes and 2 sesquiterpenes. For tests of their activities on vascular disease-linked events, they were purchased or isolated from CBM EO.

##### (2) Effects of CBM EO components in atherosclerosis-linked vascular responses

-Compounds that showed more than 80% in cell viability in VSMCs concluded monoterpenes such as camphor, camphene, terpinolene, and beta-pinene. Among these compounds, camphor and terpinolene did not affect VSMC viability (about 100 %).

- Treatment with terpinolene resulted in prominent inhibition in VSMC proliferation and migration in response to PDGF. Moreover, vascular neointima formation in atherosclerosis model animal was attenuated by terpinolene compared with control.

- In conclusion, these results suggest that terpinolene may ameliorate neointima formation in atherosclerosis.

##### (3) Effects of CBM EO components in hypertension-linked vascular responses

- Among CBM EO components, piperitone exerted predominant inhibitory effect on 35 mM KCl and 0.1  $\mu$ M NE-induced contraction in pulmonary artery in the absence or presence of endothelium.

- Piperitone slightly decreased vascular resting tension and increased Ach-induced endothelium-dependent relaxation compared with control. Moreover, ET-1-induced vasoconstriction in the presence and absence of endothelium was decreased by pretreatment with piperitone.

- Piperitone-increased vascular relaxation was slightly decreased by indomethacin but not L-NAME. Sodium nitropruside-inuced vascular relaxation did not differ between piperitone-treated or untreated groups. Moreover, piperitone inhibited the open of Ca<sup>2+</sup> channel in VSMCs.

- Piperitone-treated SHR lowered its blood pressure.

- In conclusion, these results indicate that piperitone may lower blood pressure by suppressing Ca<sup>2+</sup> channel in VSMCs. Therefore, piperitone may be a promising agent to positively improve hypertension.

#### 5. Testing of CBM EO compound effect on various events relative to cardiovascular diseases

##### (1) Investigation on cardiovascular diseases-linked responses in VSMCs



-Among CBM EO compounds, terpinolene inhibited ketoconazole- or Ang II-increased ROS generation and apoptosis in VSMCs. However, beta-pinene attenuated ketoconazole- or Ang II-increased ROS generation and did not affect ketoconazole- or Ang II-induced apoptosis. Moreover, ketoconazole-induced expression changes in DJ-1 and Bax were inhibited by treatment with terpinolene or beta-pinene. From these results, we suggest that terpinolene may be useful agent to improve abnormal conditions of cardiovascular disease-associated factors.

(2) Investigation on cardiovascular diseases-linked responses in cardiomyocytes

- Among CBM EO compounds, terpinolene or beta-pinene slightly inhibited ketoconazole- and Ang II-increased ROS generation. Ketoconazole- or Ang II-induced apoptosis was attenuated by terpinolene, but not beta-pinene. Moreover, terpinolene and beta-pinene inhibited ketoconazole-induced expression alterations in Prx3, DJ-1 and Bax. Ang II-increased DJ-1 and Bax expression changes were attenuated only by treatment with terpinolene. Therefore, terpinolene may improve abnormal conditions of cardiovascular disease-related factors.

(3) Investigation on cardiovascular diseases-linked responses in kidney cells

- Treatment with terpinolene inhibited Ang II-increased expressions of collagen type 1 and fibronectin 1 but did not affect Ang II-increased PAI-1 and TGF- $\beta$  expression. Therefore, terpinolene may exert protecting effect on fibrosis in kidney cells.

-In conclusion, terpinolene may be a useful agents to protect cardiovascular diseases-linked cells.

(4) Investigation on cardiovascular diseases-linked responses in pulmonary tissue

- Phellandrene did not affect expressions of ICAM-1, COX2, NF-kb, and Bax. However, piperitone slightly increased ICAM-1 expression and did not influence COX2, Bax, and NF-kb expressions. Therefore, piperitone may have dual activity on pulmonary tissue, although further tests will be needed for clarify the dual activity.

## 6. Safety test of CBM EO

(1) Acute oral toxicity test of CBM EO in rodents

- We observed rats for 14 days after oral administration of CBM EO and found that CBM EO did not affect clinical symptoms, body weight and feed intake in the rats. After that, there are no rat deaths and no abnormal changes in gross pathological observation after postmortem of the rats. Therefore, CBM EO was confirmed as non-toxic material in acute oral toxicity test.

(2) Acute dermal toxicity test of CBM EO in rodents

- In observation of rats for 14 days after oral administration of CBM EO, we found that administration of CBM EO did not affect clinical symptoms, body weight and feed intake in the rats. After that, there are no rat deaths and no abnormal changes in gross pathological observation after postmortem of the rats. Therefore, we concluded that CBM EO is non-toxic material in acute dermal toxicity test.

(3) Repeated-dose toxicity test of CBM EO in rodents

- Rats were subjected to repeated oral administration of CBM EO for 14 days (one time/day), and systemic toxicity were observed in the rats. Administration of CBM EO did not affect clinical symptoms, body weight and feed intake in the rats. After that, there are no rat deaths and no changes in blood test, urine chemistry values, inspection, and organ weight measurement were observed after postmortem of the rats. Non-toxic amount of CBM EO in the rats was evaluated as 5 ml/kg bw/day. Therefore, CBM EO was confirmed as non-toxic material in acute repeated-dose toxicity test.

(4) Acute inhalation toxicity test of CBM EO in rodents

Rats exposed for 4 hour with CBM EO that was diluted 100-fold (19,070 ppm) and 10-fold (190,700 ppm). Exposure to CBM EO did not affect body weight and feed intake in the rats. After that, there are no rat deaths. No abnormal changes in lung and other organs in gross pathological examination was observed after postmortem of the rats. Therefore, CBM EO was confirmed as non-toxic material in acute inhalation toxicity test.

7. Development of prototype to improve vascular disease using CBM EO

(1) On the basis of in vitro and in vivo test, we developed CBM EO-containing prototype for clinical test.

(2) Prototype for improvement of atherosclerosis was developed in the dosage of a liquid tea containing CBM FW with reference to products generally available on the market and on the basis of circulatory system specialist or internist opinions and consultancy. This dosage is known to have excellent body absorption. Thus, Mixing ratio of CBM FW to other components to promote proper body absorption was determined and prototype was custom-made by Dong Seo Pharm Well-bing Co LTD in Korea.

(3) Prototype for improvement of hypertension was developed in the dosage of spray containing CBM EO with reference to products generally available on the market and on the basis of circulatory system specialist or internist opinions and consultancy. Mixing ratio of CBM FW to other components to promote proper body absorption was determined and prototype was custom-made by Dong Seo Pharm Well-bing Co LTD in Korea.

(4) Efficiency test of prototypes

a. In vivo test of anti-atherosclerotic activity: Vascular neointima formation in atherosclerosis model animal was inhibited by treatment with CBM FW adjusted to the same conditions with prototype in a liquid tea. Therefore, this result may provide a possibility that prototype in a liquid tea may have anti-atherosclerotic activity by suppressing vascular neointima formation. However, it will be needed to test more detailed conditions for clinical application.

b. In vivo test for anti-hypertensive activity: To test the effect of prototype on hypertension, we used monocrotaline-induced pulmonary hypertension model animal and observed morphological changes of right atrium and pulmonary artery that is known as specific lesions of pulmonary hypertension. Inhalation treatment with CBM EO adjusted to the same



conditions with prototype in spray ameliorated hypertrophy of right atrium and pulmonary artery wall in pulmonary hypertension model animal. These results indicate that prototype in a spray containing CBM EO may improve pulmonary hypertension. However, it will be needed to test more detailed conditions for clinical application

c. Effect on expressions of inflammation-linked proteins: Treatment with CBM EO adjusted to the same conditions with prototype attenuated ICAM-1 and NF-kb expression in VSMCs and caspase 3 and NF-kb expression in HUVECs. Moreover, ketoconazole-increased cytotoxicity and Bax expression were attenuated by treatment with CBM EO adjusted to the same conditions with prototype. Therefore, the prototype may exert protective effect against inflammation in cardiovascular disease-linked cells.

(5) Simple clinical test of CBM EO-containing prototype in human

-CBM EO-containing prototype was made with reference to products generally available on the market and on the basis of circulatory system specialist or internist opinions and consultancy. To get IRB approval for simple human clinical safety test of the prototype, we submitted an application to IRB at Konkuk University Chungju Hospital (IRB application No. KUCH 2015-09-041).

## 8. Development of EO from Korean native CBM

(1) Establishment of CBM cultivation conditions: We created plantation (9900 m<sup>2</sup>) for CBM cultivation in Hoseo University Practice Farm. The plantation was improved by upbuilding of drainage facilities and a well-drained soil, and also by construction of non-woven fabric/plastic mulching equipments to facilitate the weeding. In addition, we established the various conditions for composition analysis of EOs from CBM with different harvesting period and region.

(2) Establishment of extraction environment and equipments: The room for EO extraction and purification from CBM was built in Hoseo University Practice Farm. To investigate EO extraction from various Korean native plants, we secured extractors, such as two steam distillation extractor and one simple extractor, and other equipments, such as concentrator, absolute extractor, and squeezing extractor, in the room.

(3) Optimization of CBM EO isolation method: To isolate or purify EO from CBM, we used extraction methods such as steam distillation, absolute extraction, ultra-high pressure extraction and supercritical extraction, and found that steam distillation method was the most optimized extraction way.

(4) Composition analysis and efficiency investigation of CBM EO

① Components of the CBM EO were confirmed at the Korean Basic Science Institute (KBSI, Seoul, Korea) and identified by GC/MS. Results of GC/MS analysis showed that CBM EO has a total of 42 compounds. Most of these compounds belongs to monoterpenes or sesquiterpenes. Moreover, component analysis of CBM FW showed that CBM FW contained a total seven compounds.

② CBM EO had wound healing, skin regeneration, anti-oxidant, and anti-obesity activities in

non-cardiovascular system.

## (5) Optimization of yield, component and efficiency analysis of CBM EO

### ① Yield, component and efficiency analysis of EO from CBM of different flowing times

#### a. Component analysis

-Flowing times of CMB were divided into vegetative, pre-flowering, full-flowering states and total yield of EO from CBM in different flowing times was compared. Total yield of CBM EO was the highest in pre-flowering time and was decreased at full-flowering time. GC/MS analysis showed that CBM EO obtained at pre-flowering time had seven specific compounds including  $\beta$ -thujone, umbellulon, and  $\beta$ -phellandrene. Moreover, CBM EO had high contents of monoterpenes at all flowing times, and especially increment of monoterpene contents and diminishment of sesquiterpene contents were observed in CBM EO at pre-flowering time and full-flowering time. Several components of sesquiterpenes in CBM EO obtained at vegetative time were decreased in that at full flowering time.

#### b. Efficiency investigation

-CBM EO obtained at pre-flowering time had stronger migration and proliferation activity in keratinocytes or fibroblasts compared with EGF. However, CMB EO obtained at vegetative or full flowering time did not affect the activities in keratinocytes and fibroblasts  
-CBM EO had antioxidant activity that did not differ between harvesting times.

### ② Yield, component and efficiency analysis of EO from CBM of different harvesting regions

#### a. Component analysis

- Harvesting regions of CMB were divided into northern (around top of Hangyeryeong), central (Asan), southern (around Namhae County Office). EO from CBM at pre-flowering time was extracted using distillation methods, and total yield of EO was compared between different harvesting regions. Total yield of CBM EO was the highest in the central region and was the lowest in northern region, indicating that central region (Asan) may be the most optimized point to harvest CBM. GC/MS analysis showed that CBM EO obtained in all regions had a total of 42 compounds and that CBM EO had high contents of monoterpenes at all harvesting regions. CBM EO obtained from central region had higher contents of monoterpenes and sesquiterpenes compared with other regions.

#### b. Efficiency investigation

-CBM EO obtained in central region (Asan) induced stronger migration and proliferation response in fibroblasts compared with EGF. However, CMB EO obtained in other regions did not affect the activities in fibroblasts

-CBM EO exerted antioxidant activity that did not differ between all harvesting regions.

## VI. Achievements and their Application

### 1. Achievements

In this project, the extracts including EO from CBM are preparing to be recognized as an agent of anti-vascular disease. Moreover, we got 5 patent application, 1 patent registration, 1 technical item transfer, and 4 publication of foreign research paper. Furthermore, many

results from our research were presented 6 times in various academic conference and were get recognized as good achievements. We will also submit our other results to foreign academic journal for publishment of research paper.

## 2. Application

- We will set up our collaboration in order that the EO or extract from CBM can get approval as improvements against vascular disease and to be commercialized.
- Moreover, utilization of optimized conditions of the EO efficiency and production from this project will result in smooth supply of the EO through growing of CBM in large quantities.

# CONTENTS

Chapter 1. Overview of the Research and Development

Chapter 2. Current Internal and External Research Trends

Chapter 3. Contents and Results of the Research and Development

Chapter 4. Achievement and Contributiveness

Chapter 5. Achievement and Its Application

Chapter 6. Oversea Scientific Information Collected in Research Progress

Chapter 7. Research Facilities and Apparatuses

Chapter 8. Performance Results of Laboratory Safety Management

Chapter 9. References

<Attachments> Reports on Patent, Research Paper and Market Analysis

# 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적
- 제 9 장 참고문헌

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 제1절 연구개발의 목적

- 심혈관 질환은 심부전, 심근경색증, 협심증 등의 심장질환과 동맥경화, 고혈압, 뇌졸중, 말초혈관질환 등의 혈관질환으로 나누어진다. 심혈관 질환은 다양한 연령층에서 발생하며 적기에 치료하지 않으면 심각한 후유증과 더불어 사망에 이르는 질환임.
- 우리나라는 노인인구 비중의 증가로 노화에 의해 발생하는 순환기질환, 골관절질환, 퇴행성 신경질환 등 만성질환이 급속히 증가하고 있을 뿐 만 아니라 대사성 질환과 같은 복합질환과 부작용이 심한 고혈압의 발생도 증가하고 있음.
- 이러한 질환이 서구화된 식생활의 변화 및 생활습관에 의해 가속화 되는 추세이나 아직 완벽한 치료제는 없는 실정임.
- 순환계 시장은 이미 포화되었다는 분석도 있으나, 다른 치료군에 비하여 환자의 수가 많고 기존 의약품에 대한 불만족도가 높으므로 새로운 약물에 대한 기대도가 크다. 따라서 순환기질환에 대한 새로운 치료약물의 개발은 현대의학의 가장 큰 과제라 할 수 있음.
- 기존의 심혈관 질환을 치료하는 방법으로 그 동안 사용되어 온 것은 약물요법과 수술요법임. 그러나 수많은 심혈관 질환에 대한 연구에도 불구하고 수술요법을 아직도 많이 사용하고 있다는 것은 아직까지 효과적인 치료제가 없음을 시사함. 또한 단순히 수술적인 처치로 해결되지 않는 부분이 아직 산재하여 기술의 취약성과 새로운 개념의 약물개발이 절실함.
- 생물소재 활용의 시장규모는 세계적으로 급증하므로 전세계적인 생물소재 확보가 시급함. 세계 생물소재 시장규모는 2015년 3,980억 달러로 추정되며, BT산업의 기초원자재인 생물소재 확보는 차세대 핵심전략산업으로서 중요한 위치를 차지하고 있음. 생명공학 기초원천 및 산업화 연구는 고부가가치 특화산업으로 육성 그 이익을 창출할 수 있는 분야로 집중적인 연구가 필요함.
- 천연물신약은 동·식물의 천연물에서 추출한 물질을 정제해 만든 것으로 제약산업에서 유망분야로서 국내외에서 천연물에 대한 관심이 고조되고 있음.
- 천연물은 예부터 다양한 경험을 통한 치료법으로 이어져 왔기 때문에 친숙한 개념이며 검증된 효능과 낮은 부작용을 특징으로 함. 또한 화학합성물에 비하여 짧은 스크리닝 기간을 통해 연구기간과 비용을 절감하는 동시에 신약에 성공 가능성도 높일 수 있는 장점이 있음.
- 우리나라의 경우 산국을 포함 약 900여 종의 이용 가능한 약용식물이 분포하고 있으나, essential oil (EO) 및 관련식물에 관한 연구는 대학 연구실 수준에서 진행되고 있음. 대부분의 연구는 유기용매 및 열수 추출을 통한 전성분을 이용하고 있어, 미량으로 존재하는 EO 성분의 분석 및 기능 연구에 한계를 나타냄.
- 이에, 본 연구에서는 다양한 효능을 가진 한국자생 산국으로부터 추출한 EO를 이용하여 1) 산국 EO의 개발 및 상용화 2) 산국 EO 및 monoterpene 성분을 이용한 고혈압 치료제/완화제 개발 3) 산국 EO 및 monoterpene 성분을 이용한 동맥경화 치료제/완화제 개발등을 위한 연구를 수행하여 혈관 질환 치료제의 개발을 목적으로 연구를 수행함.



## 제2절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 배경

○ 심혈관 질환은 심부전, 심근경색증, 협심증 등의 심장질환과 동맥경화, 고혈압, 뇌졸중, 말초혈관질환 등의 혈관질환으로 나누어짐. 심혈관 질환은 다양한 연령층에서 발생하며 적기에 치료하지 않으면 심각한 후유증과 더불어 사망에 이르는 질병임. 이 중에서도 혈관세포 이상에서 오는 동맥경화는 혈관 및 심장질환의 유발에서 가장 중요한 원인으로 알려져 있음 [1, 2].

○ 우리나라는 노인인구(65세 이상) 비중이 2014년 총 인구의 12.7%를 차지하여 본격적인 고령화 사회에 진입했으며, 그 속도는 점점 빨라지고 있음 [3]. 이에 따라 노화에 의해 발생하는 순환기질환, 골관절 질환, 퇴행성 신경질환 등 만성질환이 급속히 증가하고 있음. 뿐만 아니라 대사성 질환과 같은 복합질환과 부작용이 심한 중양이나 고혈압의 발생도 증가하고 있음 [4-6].

○ 문제는 이러한 질환이 서구화된 식생활의 변화 및 생활습관에 의해 고혈압, 동맥경화와 같은 심혈관질환의 발생이 가속화 되는 추세이나 아직 완벽한 치료제는 없는 실정임. 우리나라의 경우 2014년 통계청 자료에 의하면 심혈관질환 (심장질환, 뇌혈관질환)은 국내 3대 사망 원인에 포함되며 인구 10만 명당 각각 약 52.4% 및 48.2 정도로 국내사망원인 수위를 차지하고 있음 [7].

○ 미국의 2014년 WHO 통계에 의하면 ‘세계 10대 사망원인’ 중에 1위로 심혈관질환이 차지하였고, 1년에 1천7백만 명이 사망하고 있음 (그림 1). 또한 전 세계 성인 3명중 1명 이상이 고혈압을 앓고 있으며, 이로 인한 합병증으로 매년 9백만 명이 사망 (관상동맥질환 45%, 뇌졸중 51%) 하고 있음.

○ 순환계 시장은 이미 포화되었다는 분석도 있으나, 다른 치료군에 비하여 환자의 수가 많고 기존 의약품에 대한 불만족도가 높으므로 새로운 약물에 대한 기대도가 큼. 따라서 순환기질환에 대한 새로운 치료약물의 개발은 현대의학의 가장 큰 과제라 할 수 있음.

### 2. 연구개발의 필요성

○ 천연물 의약품 시장에서 가장 중요한 것은 생물자원의 주도권 확보 전쟁임. 최근 유전자원 (실질적 또는 잠재적으로 이용 및 보존가치가 있는 생물자원) 및 전통지식의 보호문제가 WIPO를 비롯하여 WTO, 생물다양성협약(CBD) 등 각종 국제기구에서 활발히 논의되고 있음. 개발도상국들은 유전자원 및 전통지식이 지적재산권으로 인정되어야 하며, 자국의 유전자원 및 전통지식이 미국과 같은 선진국에 의해 약탈되어 특허화, 상품화되고 있기 때문에 이에 관한 국제적인 보호 장치를 마련해야 한다고 주장하고 있음.

○ 전통의약자원 및 이에 관한 브라질 등의 개발도상국들은 유전자원 및 전통지식의 강력한 보호를 주장하며, 출처공개, 사전 동의 및 이익 공유를 반영한 법적 구속력이 있는 국제규범의 도입을 주장하고 있음.

The 10 leading causes of death in the world by percentage

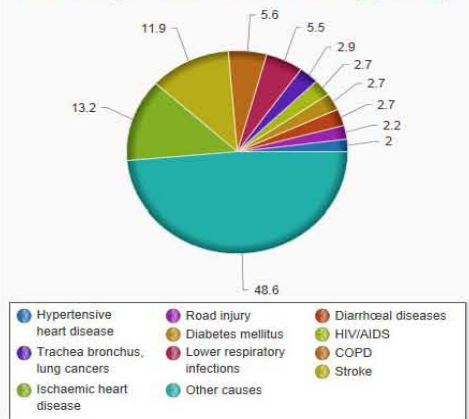


그림 1. 세계 사망원인(2014, WHO 자료)

- 특히 천연물은 동맥경화와 같은 만성질환의 치료에 효과가 있다는 장점이 있음. 이것은 천연물의 약리효과를 보고하는 대표적인 두 저널인 Chinese Medicine과 Journal of Ethnopharmacology의 논문 내용 분석에서도 알 수 있음. 2015년 현재 까지 최근 5년간 Chinese Medicine에서 발표된 총47,208편의 논문 중 4331편(9.17%)이 동맥경화 관련 논문이었으며 총3472편중 276편(7.9%)이 동맥경화 관련 논문이었음. 이는 암과 같은 악성질환 뿐만 아니라 순환기 질환(동맥경화)과 같은 만성질환에서 특히 천연물의 기능성이 발휘될 수 있다는 것을 단적으로 시사함.
- 우리나라는 생물자원의 절대적 빈곤국으로 BT산업 활성화를 위한 기반 형성이 곤란한 실정임. 세계 생물자원은 약175만종이나 국내 생물자원은 약3만종으로 절대적으로 열세를 보이고 있다는 사실이 이를 잘 증명하고 있음. 따라서 적극적으로 외국 천연자원을 확보하여 이를 생물자원 또는 의약자원으로 이용하는 노력이 필요함. 바이오산업의 원천 유용생물 자원의 보고인 외국을 대상으로 해외생물소재 공급시스템을 구축하고 신약개발의 소재로 활용하려는 시도는 시의적절하며 꼭 필요한 사업임.
- 천연물은 예로부터 다양한 경험을 통한 치료법으로 이어져 왔기 때문에 친숙한 개념이며 검증된 효능과 낮은 부작용을 특징으로 함. 또한 화학 합성물에 비하여 짧은 스크리닝 기간을 통해 연구기간 및 비용을 절감하는 동시에 신약에 대한 성공 가능성도 높일 수 있는 장점이 있음.
- 천연물 신약은 동·식물 등 천연물에서 추출한 물질을 정제해 만든 것으로 화장품 및 제약 산업의 미래를 열어갈 유망분야로 주목받고 있음. 현재 국내에서도 대학뿐만 아니라 많은 제약회사, 연구소들에서 생체기능을 조절할 수 있는 화장품 및 신약 개발에 천연물을 이용하고 있음. 국내에는 제약기업들이 한방화장품, 천연물 신약에 대한 임상 승인신청 건수도 매년 2배씩 늘어나는 추세임.
- 우리나라의 경우 약 900여 종의 이용 가능한 약용식물이 분포하고 있으나, EO 및 관련 식물에 관한 연구는 대학 연구실 수준에서 진행되고 있음. 대부분의 연구는 유기용매 및 열수 추출을 통한 전성분을 이용하고 있어, 미량으로 존재하는 EO 성분의 분석 및 기능 연구에 한계를 나타냄.
- 다양한 식물 천연물 중 산국 (*Chrysanthemum boreale* Makino; CBM)은 한반도가 분포 중심지이며, 만주지역까지 분포하고 있음. 대륙의 북녘 땅에 산다는 의미의 라틴어 보레알레(*boreale*)라는 종소명 붙어 있음. 한자명(北野菊, 북야국)은 이것을 번역한 명칭으로 보임. 일본에 분포하는 산국의 선조종(先祖種)은 이끼(壹岐) 섬과 쓰시마(對馬島)에서 유래하며, 이것은 산국의 식물지리학적 원산이 한반도라는 사실을 시사함.
- 산국은 우리나라 각지에 자생하고 있고 그 분포 면적이 매우 넓어 식물의 확보가 비교적 용이하여, 친숙한 개념의 한국적 정서를 내포하는 약초로서 활용이 가능함.
- 국화는 동의보감을 비롯하여 향약집성방, 본초강목 등 한의서에서 상약(上藥) 중에서도 으뜸으로 치는 약초 중 하나임. 그 중 봉래화(산국화)가 약성이 가장 강하다고 기술되어 있음. 특히, 고혈압, 동맥경화, 협심증, 심장질환 등에 효험이 있다고 알려져 있음.
- 그 외, 산국화 잎을 차로 만들어 마시면 효과가 있음 (잎, 줄기, 꽃, 뿌리, 씨앗을 모두 약으로 사용가능하며, 씨앗이 약성이 강하다고 알려짐). 또한 산국 추출물은 항염, 항균작용 뿐만 아니라 가려움증(소양증) 및 치질등 다양한 부분에 효과가 있는 것으로 기록되어 있음 (아래표 참조).



산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)의 효과 및 효능

항균계	순환기계	신경계	항암계	기타
항염, 항균작용 (위염, 위궤양, 장, 장궤양, 치질, 중이염, 축농증, 만성간염)	고혈압, 동맥경화, 협심증	신경안정, 뇌신경보호	뇌종양, 식도암, 허암, 인후암, 갑 상선암, 임파선암	불면증, 기억력 감 퇴, 뇌질환, 부인 병, 생리통, 냉증

○ 상기와 같이 산국에 대한 다양한 효과/효능이 알려져 있으나, 본 연구과제에서 시도하고자 하는 산국을 이용한 혈관질환 및 동맥경화 치료제/완화제의 개발에 대한 연구는 전무함. 따라서 본 연구과제는 천연자원의 발굴과 활용, 새로운 제품 및 치료제/완화제의 개발이라는 측면에서 기술적, 산업적 및 경제적 효과 상향을 기대할 수 있으므로 산국 EO를 이용한 혈관 질환 치료제/완화제의 개발은 본 생명산업기술개발사업의 과제로 매우 적절하다고 사료됨.

### 제3절 연구개발의 범위

구분 (연도)	연구개발의 내용	연구개발의 범위
	산국 essential oil (EO) 성분의 동맥경화 개선능 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 혈관평활근세포(VSMC) 증식 및 이주 유도활성 측정</li> <li>- aortic sprout의 발생과 이에 대한 산국 EO의 억제 효과 검증</li> <li>- 증식, 이주 억제능 연구</li> <li>▷ 혈관내피세포(HUVEC)의 증식 및 이주 억제활성 검증</li> <li>- HUVEC agonist의 증식능에 대한 효능연구</li> <li>▷ 신장/심장에 대한동맥경화 지표에 대한 효능</li> <li>- 신장 profibrotic gene 발현에 대한 산국 EO의 효능 검증</li> <li>- 심장 apoptosis, ROS 발생에 대한 EO의 효능검정</li> <li>▷ essential oil 성분의 in vivo 동맥경화 활성</li> <li>- 산국 EO에 의한 neointima 감소의 기능규명</li> <li>- aortic sprout와의 비교 검토</li> <li>▷ 산국 EO를 GC/MS로 분석하여 얻은 단일 성분을 이용한 ex vivo 분석</li> <li>- carvarol, thymol의 효능 검토와 EO의 비교</li> </ul>
1차년도 (2012)	산국 EO 성분의 혈관기능 개선능 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 혈관의 수축 및 이완 유도활성 측정</li> <li>- NE 처리에 대한 산국 EO의 억제 효과 검증, ACh의 반응에 대한 EO의 효과 검증</li> <li>▷ 혈관의 이완 기전 억제활성 검증</li> <li>- 산국 EO성분에 의한 NO 발생 및 eNOS의 발현에 대한 효과 검증</li> <li>▷ 신장, 심장, 혈관에 대한 고혈압 지표에 대한 효능 규명</li> <li>- DJ-1, PRR, Ref-1 단백질 발현에 대한 EO의 기능 규명</li> <li>▷ 산국 essential oil을 GC/MS로 분석하여 얻은 단일 성분을 이용한 수축 분석</li> <li>- carvarol, thymol의 항고혈압 효능 검토</li> <li>- carvarol, thymol와 EO의 비교</li> </ul>
	산국 재배지 확보 및 재배조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 호서대 실습지 내 산국 재배지 확보</li> <li>- 균일 조건 하에서의 재배 및 관리</li> <li>▷ 최적 재배조건 확립</li> <li>- 동맥경화, 고혈압 성분 screen을 위한 유효성분 추출 조건 점검 및 환경 확립</li> </ul>

구분 연도	연구개발의 내용	연구개발의 범위
2차년도 (2013)	산국 monoterpene 성분의 EO 대체 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 산국 monoterpene 성분의 고혈압 지표에 대한 효능 규명</li> <li>- 대표 monoterpene의 선정</li> <li>- 고혈압 지표 3종에 대한 분석 실시</li> <li>▷ 산국 monoterpene 성분의 in vivo 고혈압 활성 검증</li> <li>- 대표 monoterpene의 항고혈압 능력 검증</li> <li>▷ 신장, 심장, 혈관에 대한 동맥경화 지표에 대한 효능 규명</li> <li>- 동맥경화 지표에 대한 대표 monoterpene의 효능분석</li> <li>▷ 산국 monoterpene 성분의 in vivo 동맥경화 활성검증</li> <li>- 대표 monoterpene의 항동맥경화 능력 검증</li> </ul>
	산국 EO 성분의 폐성 고혈압 개선능 검증 및 치료제 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 폐혈관의 수축 및 이완 유도활성 측정</li> <li>- 폐혈관을 이용한 산국 EO의 억제 효과 검증, ACh의 반응에 대한 EO의 효과 검증</li> <li>▷ 폐성고혈압 모델동물의 지표에 대한 효능</li> <li>- endothelin에 대한 산국EO의 효과</li> <li>▷ 산국 essential oil 성분의 in vivo 폐성 고혈압 활성 검증</li> <li>- SHR에 대한 혈압 강하 효과 검증</li> <li>- 폐 조직에 대한 EO의 효과 검증</li> <li>▷ 산국 essential oil을 GC/MS로 분석하여 얻은 단일 성분을 이용한 폐성고혈압 억제 분석</li> <li>- 대표 monoterpene의 항폐고혈압 능력 검증</li> <li>▷ 혈관질환 치료제의 제형 및 제품 개발</li> </ul>
	산국 EO 성분의 순수 정제방법 및 수득률의 최적화 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 적합한 EO 추출기의 확보</li> <li>▷ 추출조건, 순수 분리/정제 방법 확보</li> <li>- 대표 monoterpene의 확립과 추출조건 개발</li> <li>▷ 다른 향의 오염 및 장기 보관방법의 확립</li> <li>- EO성분 안정성 검사</li> <li>- 보관방법, 안정성유지에 대한 기법 확립</li> </ul>

구분 (연도)	연구개발의 내용	연구개발의 범위
3차년도 (2014)	산국 EO 성분을 함유하는 동맥경화 개선 시제품 출시	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 산국 essential oil 및 monoterpene 성분을 포함한 제형의 개발 및 시제품 출시</li> <li>- 산국 EO 성분을 함유한 항동맥경화 제형의 개발</li> <li>- 1종 시제품의 개발</li> <li>▷ 혈관질환 치료제의 제형 및 시제품 완성</li> <li>- 효능 검정을 바탕으로 한 제품의 개발</li> <li>▷ 산국 성분을 포함한 항 동맥경화 제형의 개발 및 시제품 출시</li> <li>- 산국 EO 및 대표 monoterpene 성분을 함유한 항동맥경화 제형의 개발</li> </ul>
	산국 EO 성분을 함유하는 고혈압 개선 시제품 출시	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ in vitro 혈압, 폐성 고혈압, 동맥경화에 대한 시험</li> <li>- 1과제에서 개발된 제품의 항고혈압능 검정</li> <li>- 1과제에서 개발된 제품의 항동맥경화 검정</li> <li>▷ in vitro inflammation 유도인자 발현성 확인</li> <li>- 개발 제품의 항염증 및 염증 개선능 검정</li> <li>▷ in vivo 혈관자극성을 통한 안전성 확인</li> <li>- 개발 제품의 ex vivo 안전성 검정</li> <li>▷ 내과 전문가 의견 및 컨설팅</li> <li>- 내과의 컨설팅을 통한 개발 제품 효능 및 안전성 확립</li> </ul>
	산국 EO 및 monoterpene 성분의 인체 안전성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ EO의 급성독성 연구를 통한 인체 안전성 확보</li> <li>- EO의 급성 독성 검정</li> <li>- EO의 호흡기 독성 시험</li> <li>▷ 설치류를 활용한 in vivo 연구를 통한 급성독성 확보</li> <li>- 동물에서의 효능 검정 및 독성 시험</li> <li>▷ 설치류를 활용한 in vivo 연구를 통한 안전성 확보</li> <li>- 동물에서의 독성 시험을 통한 안전성 시험</li> <li>▷ 인체 간이 임상 인체 안정성 검증 실시</li> <li>- 정상인 10명에 대한 효능검사, BP</li> </ul>

#### 제4절 연구 성과목표 및 대비 실적

구 분		지식재산권		논문		학 술 발 표	기 술 이 전	교육 지도	시제 품	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	사업 화
		출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표		3		3		0	1		2		5		0	
1차년도	목표	1	0	1		0					0			
	실적	2	0	0		3					2			
2차년도	목표	1	0	1		0			1		2		0	
	실적	2	0	1		2			0		5		1	
3차년도	목표	1	0	1		0	1		1		3			
	실적	1	1	4		1	1		2		0			
합계	목표	3	0	3		0	1		2		5		0	
	실적	5	1	5		6	1		2		7		1	

## 제 2 장    국내외 기술개발 현황

### 제1절    국내외 관련 기술의    현황과 문제점

○ 국내외에서는 다양한 분야에서 동맥경화에 대한 연구에 집중하고 있음. 혈액 지방성분의 조절을 통한 동맥경화 발생의 억제 [8], 혈전 형성 조절을 통한 억제 [9], 동맥경화반내의 산화 반응 조절을 통한 억제 [10, 11] 등이 일반적인 연구임. 또한 동맥경화반에는 혈관내피 및 평활근 세포의 비율이 높으므로 이들 세포의 활성(증식과 이주)을 조절하는 것도 중요한 치료 대상이 됨 [12, 13]. 단적인 예로 stent 시술시 나타나는 혈관의 재협착 restenosis는 5%에 이르나 이는 세포의 증식을 억제하는 약물(항암제) 코팅 stent의 시술로 막을 수 있는데[14], 이는 평활근세포의 증식이 혈관 재협착에 중요하다는 것을 의미함.

#### ○ 동맥경화 약물의 현황

계 열	특 징	시판중 치료제
스타틴 계열	저밀도콜레스테롤저하, 고밀도콜레스테롤증가, 중성지방 감소, 평활근세포 증식억제, 혈소판기능억제, 염증작용억제, 허혈성 뇌졸중 억제 등	아토프바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴, 로수바스타틴
비스타틴계열	중성지방생성 억제, 중성지방의 흡수 증가 혈중중성지방억제, 콜레스테롤 흡수 억제	니아스파노, 오마코, 툴세트라핌(출시에정)

○ 기존의 심혈관 질환 치료제와 문제점 : 심혈관 질환을 치료하는 방법으로 그 동안 사용되어 온 것은 약물요법과 수술요법임. 약물요법은 혈전용해제, 항응고제인 헤파린, 혈소판저해제인 아스피린,  $\beta$ -차단제, Ca 길항제, nitrate, ACE 저해제, 동맥경화치료제 등을 사용하며 [15-17], 수술요법으로는 경피적관동맥성형술(PTCA)과 관동맥우회술(CABG)등이 있음 [18, 19].

○ 그러나 수많은 심혈관 질환에 대한 연구에도 불구하고 PTCA와 CABG 등과 같은 수술요법을 아직도 많이 사용하고 있다는 것은 아직까지 효과적인 치료제가 없음을 시사함. 또한 급성 동맥경화 발병 시에 불안정형 동맥경화반이 다발적으로 발생한다는 점에서 단순히 수술적인 처치로 해결되지 않으며 기술의 취약성과 새로운 개념의 약물개발이 절실히 증명하고 있음.

○ 심혈관계 질환의 치료제 개발은 막대한 양의 의료비 지출을 감소시킬 수 있을 뿐 만 아니라 신약개발로 인한 경제적 가치와 그 파생효과가 매우 높음. 이러한 심장혈관 질환의 정복을 위한 새로운 치료제의 발굴을 위해서 천연소재를 이용하는 것은 그 의미가 큼.

○ 생체기능 조절물질의 발굴은 크게 유기합성에 의한 것과 천연자원으로 부터의 분리로 구분할 수 있음. 합성은 이미 잘 알려진 생리활성 물질의 유도체를 합성하여 단기간 내에 원하는 물질을 만들 수 있다는 장점이 있음. 그러나 이 같은 유기합성에 의한 물질 창출은 구조적인 면에서 모방의 한계를 벗어날 수 없다는 단점을 가지고 있음.

○ 식물이나 미생물 유래의 천연물에서 발견할 수 있는 물질들은 아직까지도 알려져 있지 않은 새로운 구조를 가질 가능성이 있음. 따라서 다양한 유전자 산물에 대응할 수 있는 생물학적 다양성을 확보를 최대한 살려야할 필요가 있음. 천연물은 예부터 다양한 경험을 통한 치료법으

로 이어져 왔기 때문에 친숙한 개념일 수 있음. 검증된 효능 및 효과와 낮은 부작용과 화학합성물에 비하여 짧은 스크리닝 기간을 통해 연구기간과 비용을 획기적으로 절감하는 동시에 신약에 대한 성공 가능성도 높일 수 있는 장점이 있음.

○ 최근 천연물관련 저널들의 인용지수도 크게 상승하고 있음. Phytomedicine은 2006년 IF 1.403에서 2014년은 2.877으로 증가하였으며, Journal of Ethnopharmacology의 경우 2006년 IF 1.625에서 2014년은 2.998로 증가하였음. 이는 천연물을 이용한 신약의 발굴과 의·약학적 활용에 대한 노력이 일어나고 있음을 의미함 (그림 2).

○ 천연물 신약은 동·식물 등 천연물에서 추출한 물질을 정제해 만든 것으로 제약산업의 미래를 열어갈 유망분야로 주목받고 있음. 현재 국내에서도 대학뿐만 아니라 많은 제약회사, 연구소들에서 생체기능을 조절할 수 있는 신약개발의 일환으로 천연물에 대한 관심이 고조되고 있음. 국내에는 제약기업들이 천연물 신약에 대한 임상 승인신청 건수도 매년 2배씩 늘어나는 추세임. 미국 NCI 및 Merck, Schering-Plough, Univera 등 국립 연구기관과 제약회사에서는 새로운 천연물 확보, library화 및 약리 활성 평가 등에 지속적인 투자를 하고 있음.

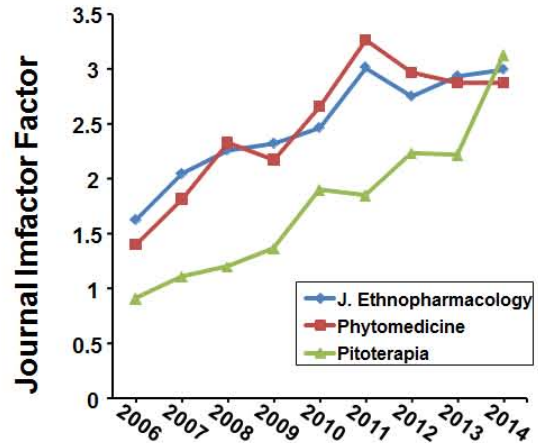


그림 2. 천연물 관련 저널 중요도 상승(SCI IF)

○ 국내 천연물 신약은 최초 성공한 조인스정 이후 지금까지 총 8건이며, 세계적으로 25조원이 상으로 그 규모를 추정하고 있고, 연간 8~10%의 성장률을 기록하고 있음. 판매되는 의약품의 50% 정도가 천연물의약품이거나 천연물에서 유래된 단일물질로, 그 예로 은행잎 추출물이나 항바이러스제로 유명한 타미플루 등이 대표적 천연물 신약임. 국내 개발 천연물 신약들의 최근 까지 누적 매출액은 SK케미칼 조인스정이 1589억원, 스티렌정이 3158억원, 시네츄라시럽이 100억원의 매출을 올려 합성신약보다 두 배 많은 매출액을 올렸음.

국내 천연물신약 임상시험 허가는 ▲2004년 2건 ▲2005년 1건 ▲2006년 7건 ▲2007년 7건 ▲2008년 8건 ▲2009년 13건 ▲2010년 12건 ▲2011년 14건 등으로 해마다 증가 추세에 있음.

○ 생물소재 활용의 시장규모는 세계적으로 급증하므로 전 지구적인 생물소재 확보가 시급함. 세계 생물소재 시장규모는 2015년 3,980억 달러로 추정되며, 연평균 성장률은 9.8%로 고 성장세를 보일 것으로 예측하고 있어 BT산업의 기초원자재인 생물소재 확보는 차세대 핵심전략산업으로서 중요한 위치를 차지하고 있음. 생명공학 기초원천 및 산업화 연구는 고부가가치 특화산업으로 육성 그 이익을 창출할 수 있는 분야로 집중적인 연구가 필요함.

○ 우리나라의 경우 약 900여 종의 이용 가능한 약용식물이 분포하고 있으나, EO 및 관련식물에 관한 연구는 대학 연구실 수준에서 진행되고 있음. 대부분의 연구는 유기용매 및 열수 추출을 통한 전성분을 이용하고 있어, 미량으로 존재하는 EO 성분의 분석 및 기능 연구에 한계를 나타냄.

○ 국내 고유 자생식물 또는 동북아시아를 중심으로 자생하는 식물을 바탕으로 EO 및 대표성분인 monoterpene에 대한 연구의 필요성 및 중요성이 절실히 요구되고 있음. 국내 자생식물



중 EO를 다량 함유하고 있는 식물은 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino, 약재명; 고의), 왕 후박(Japanese white bark magnolia, 약재명; 후박), 목련(*Kobus magnolia*, 약재명; 신이), 산초 나무(Japanese pepper, 약재명; 산초), 향유(*Elsholtzia patrinii*, 약재명; 향유), 꿀꿀(Self heal, 약재명; 하고초) 등이 있음.

○ 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)은 우리나라 각지에 자생하고 있고 그 분포 면적이 매우 넓어 식물의 확보가 비교적 용이함. 한의학 서적(동의보감, 향약집성방, 본초강목)에서 상약(上藥) 중에서 으뜸인 약초로 구별되어 있음. 또한 산국 추출물은 항염, 항균작용 뿐만 아니라 고혈압, 동맥경화, 협심증 및 신경안정 작용 등의 효과가 알려져 있음 [20-22].

○ 천연물 의약품 시장에서 가장 중요한 것은 생물자원의 주도권 확보 전쟁임. 최근 유전자원(실질적 또는 잠재적으로 이용 및 보존가치가 있는 생물자원) 및 전통지식의 보호문제가 WIPO를 비롯하여 WTO, 생물다양성협약(CBD) 등 각종 국제기구에서 활발히 논의되고 있음. 개발도상국들은 유전자원 및 전통지식이 지적재산권으로 인정되어야 하며, 자국의 유전자원 및 전통지식이 미국과 같은 선진국에 의해 약탈되어 특허화, 상품화되고 있기 때문에 이에 관한 국제적인 보호 장치를 마련해야 한다고 주장하고 있음. 전통의약자원 및 이에 관한 브라질 등의 개발도상국들은 유전자원 및 전통지식의 강력한 보호를 주장하며, 출처공개, 사전동의 및 이익공유를 반영한 법적 구속력이 있는 국제규범의 도입을 주장하고 있음.

○ 특히 천연물은 동맥경화와 같은 만성질환의 치료에 효과가 있다는 장점이 있음. 천연물의 약리효과를 보고하는 대표적인 두 저널인 Chinese Medicine과 Journal of Ethnopharmacology의 논문 내용 분석에서도 알 수 있음. 2015년 현재 까지 최근 5년간 Chinese Medicine에서 발표된 총47,208편의 논문 중 4331편(9.17%)이 동맥경화 관련 논문이었으며 Journal of Ethnopharmacology는 총3472편중 276편(7.9%)이 동맥경화 관련 논문이었음. 이는 암과 같은 악성질환 뿐만아니라 순환기 질환(동맥경화)과 같은 만성질환에서 특히 천연물의 기능성이 발휘될 수 있다는 것을 단적으로 시사함.

○ 우리나라는 생물자원의 절대적 빈곤국으로 BT산업 활성화를 위한 기반 형성이 곤란한 실정임. 세계 생물자원은 약175만종이나 국내 생물자원은 약3만종으로 절대적으로 열세를 보이고 있다는 사실이 이를 잘 증명하고 있음. 따라서 적극적으로 외국 천연자원을 확보하여 이를 생물자원 또는 의약자원으로 이용하는 노력이 필요함. 바이오산업의 원천 유용생물자원의 보고인 외국을 대상으로 해외생물소재 공급시스템을 구축하고 신약개발의 소재로 활용하려는 시도는 시의적절하며 꼭 필요한 사업임. 천연물은 예부터 다양한 경험을 통한 치료법으로 이어져 왔기 때문에 친숙한 개념이며 검증된 효능과 낮은 부작용을 특징으로 함 [23]. 또한 화학합성물에 비하여 짧은 스크리닝 기간을 통해 연구기간과 비용을 절감하는 동시에 신약에 대한 성공 가능성도 높일 수 있는 장점이 있음.

○ 천연물 신약은 동·식물 등 천연물에서 추출한 물질을 정제해 만든 것으로 화장품 및 제약산업의 미래를 열어갈 유망분야로 주목받고 있음 [24]. 현재 국내에서도 대학뿐만 아니라 많은 제약회사, 연구소들에서 생체기능을 조절할 수 있는 화장품 및 신약 개발에 천연물을 이용하고 있음. 국내에는 제약기업들이 한방화장품, 천연물 신약에 대한 임상 승인신청 건수도 매년 2배씩 늘어나는 추세임.

○ 본 연구과제에서 시도하고자 하는 산국을 이용한 혈관질환 및 동맥경화 치료제의 개발은 천연자원의 발굴과 활용, 새로운 제품 및 치료제의 개발이라는 점에서 기술적, 산업적 및 경제적 효과를 거둘 수 있음.



○ 국내 고유 자생식물을 활용한 한국형 EO의 개발은 넓은 재배지와 고도의 기술력을 요구하고 있음. 그러나 국내 중소 화장품/제약/식품 기업은 생산금액이 10억 미만인 업체가 전체의 70%로 경제력과 기술력을 가지지 못해 본 연구과제는 생명산업기술개발사업의 과제를 위해 필요한 과제로 사료됨.

구분	식물명(혈관질환 및 동맥경화 관련 천연물; Pub-Med)
Alfalfa	Medicago sativa(Malinow MR. Atheroscler. 1978;30:27-43)
Danshen	Salvia miltiorrhiza(Mashour NH, et al. Arch Intern Med. 1998;158:2225-34)
Ginger	Zingiber officinale(Bhandari U, et al. Ethnopharmacol. 1998;61:167-71)
Garlic	Allium sativum(Siegel G, et al. Atherosclerosis. 2000;150:437-8)
Hawthorne	Crataegus oxycantha(al Makdessi S, et al. Basic Res Cardiol. 1999;94:71-7)
Cayenne, Red pepper	Capsicum frutescens(Kwon MJ, et al. Clin Chim Acta. 2003;332:37-44)
Green tea	Camellia sinensis(Moore RJ, ea al. Br J Nutr. 2009;102:1790-802)
Guggulu	Commiphora mukul(Wang X, et al. Atherosclerosis. 2004;172:239-46)
Hawthorne	Crataegus oxycantha(Rajendran S, et al. Atherosclerosis. 1996;123:235-41)
Tumeric	Curcuma longa(Quiles JL, et al. Thromb Vasc Biol. 2002;22:1225-31)
Ginkgo	Ginkgo biloba(Chen JS, et al. Atherosclerosis. 2011;214:301-9.)
Fo-ti, He-shou-wu	Polygonum multiflorum(Yang PY, et al. J Pharmacol Sci. 2005;99:294-300)
Cynanchum	Cynanchum wilfordii(Choi DH, et al. J Med Food. 2011 Nov14)
Gourka	Garcinia dulcis(Pinkaew D, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Nov4.)
Great Burnet	Sanguisorba officinalis L.(Cho JY, et al. Planta Med. 2006;72:1279-84.)
Pueraria lobata ohwi	Pueraria lobata ohwi(Bebrevska L, et al. J Ethnopharmacol. 2010;127:112-7.)
Wine grape	Vitis vinifera L.(Kalkan Yildirim H, et al. Int J Food Sci Nutr. 2004;55:351-62)
Purple sweet potato	Ipomoea Batatas(Park KH, et al. J Med Food. 2010;13:91-8.)
Tackweed	Tribulus terrestris(Tuncer MA, et al. Acta Histochem. 2009;111(6):488-500)
Zanthoxylum	Zanthoxylum schinifolium(Cao LH, et al. Vascul Pharmacol. 2009;50:200-7)
Mulberry	Morus Alba L(Sugimoto M, et al. Atherosclerosis. 2009;204:388-94.)
Yellow leader	Radix Astragali(Chan JY, et al. BMC Complement Altern Med. 2011;11:32)
Piper	Piper sarmentosum(Ugusman A. et al. BMC Complement Altern Med. 2011;11:31)
Platyclusus	Thuja orientalis(Lee YJ, et al. Phytother Res. 2010;24:1489-95.)
Oenothera	Oenothera paradoxa(Kiss AK, et al. J Agric Food Chem. 2010;58:9960-6)
French maritime pine bark	Pinus maritima Lam(Kimura Y, et al. Photochem Photobiol. 2010;86:955-63)
Cape jasmine	Gardenia jasminoides(Hwang SM, et al. Phytother Res. 2010;24 Suppl 2:S214-9)
Indian Lotus	Nelumbo nucifera GAERTN(Ho HH, et al. Food Chem Toxicol. 2010;48:159-68)
Safflower seed	Carthamus tinctorius(Katsuda S, et al. Hypertens Res. 2009;32:944-9)
Nightshades	Solanum lyratum(Kuo WW, et al. J Vasc Surg. 2009;50:849-60)
Sesame	Sesamum indicum(Visavadiya NP, et al. Food Chem Toxicol. 2009;47:2507-15)
Xue Jie	Draconis Resina(Heo SK, et al. Food Chem Toxicol. 2010;48:1129-36)
Chios mastic gum	Pistacia lentiscus(Loizou S, et al. Exp Biol Med(Maywood). 2009; 234: 553-61)
Strawberry	Fragaria Vesca(Edirisinghe I, et al. J Agric Food Chem. 2008;56:9383-90.)
Olive	Olea europaea(Wang L, et al. Eur J Nutr. 2008;47:235-43)
Rhubarb	Rheum rhabarbarum(Moon MK, et al. Am J Chin Med. 2008;36:555-68)

sword brake fern	<i>Pteris ensiformis</i> (Wei HA, et al. J Agric Food Chem. 2007;55:10579-84.)
chokeberry	<i>Aronia</i> (Naruszewicz M, et al. Atherosclerosis. 2007;194:e179-84)
Red sage	<i>Salvia miltiorrhia</i> (Jin UH, et al. Vascul Pharmacol. 2006;44:345-53)
Japanese Rowan	<i>Sorbus commixta</i> (Sohn EJ, et al. Biol Pharm Bull. 2005;28:1444-9)
Chokeberry	<i>Aronia melanocarpa</i> (Naruszewicz M, et al. Atherosclerosis. 2007;194:e179-84)
Siberian ginseng	<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Ryszawa N, et al. J Physiol Pharmacol. 2006;57:611-26)
Tassel flower	<i>Amaranthus caudatus</i> L.(Kabiri N, et al. Lipids Health Dis. 2011;10:89)
Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Jin S, et al. Food Chem Toxicol. 2011;49:1521-9.)
Paeony	<i>Paeonia lactiflora</i> PallLi J, et al. J Ethnopharmacol. 2011;135:469-75.
Pushkarmool	<i>Inula racemosa</i> (Mangathayaru K, et al. J Pharm Pharmacol. 2009;61:1111-8.)
Safflower	<i>Carthamus tinctorius</i> L.(Koyama N, et al. J Agric Food Chem. 2006;54:4970-6)

- *Salicornia herbacea* L. 'S europeae L.', *Senna obtusifolia*(L.) H. S. Irwin & Barneby), *Tribulus terrestris*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Foeniculum vulgare*, *Euonymus alatus*, *Lycium chinense* MILL, *Citrus junos* SIEB ex TANAKA, *Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi, *Fallopia multiflora*(Thunb. ex Murray) Haraldson var. *multiflora*, *Astragalus membranaceus* Bunge var. *membranaceus*, *Humulus japonica* Sieb. et Zucc.(*H. scandens*(Lour.) Merr.), *Viscum coloratum*(Kom.) Nakai(*V. album* L. var. *coloratum* Ohwi), *Aristolochia Contorta* Bung, *Polygonum lapathifolium* L.(*Persicaria lapathifolia*(L.) S. F. Gray), *Beta vulgaris* L. var. *rapacea* C. Koch., *Gypsophila pacifica* Komarov., *Cimicifuga davurica* Maxim., *Lycototum albo-violaceum*(Kom.) Nakai(*Aconitum albo-violaceum* Kom.), *Rhodiola elongata* Fischer et Meyer, *Thlaspi arvense* L., *Crataegus pinnatifida* Bunge(*C. oxyacantha* L. var. *pinnatifida* Regel). *Potentilla tanacetifolia* Willd. ex Schlecht., *Rosa davurica* Pallas, *Gleditschia horrida* Makino, *Macrocarpium officinale* Sieb. et Zucc.), *Eleuterococcus senticosus* Maxim, *Oxycoccus quadripetala* Gillibert(*O. palustris* Pers.), *Rhododendron aureum* Georgi(*Rh. chrysanthum* Pall.), *Rhododendron dauricum* L, *Rhododendron Fauriei* Franchet, *Rhododendron mucronulatum* Turcz, *Rhododendron Schlippenbachii* Makino, *Siegesbeckia glabrescens* Makino, *Galium aparine* L, *Lonicera chrysantha* Turcz, *Melampyrum roseum* Maxim, *Zostera marina* L, *Triglochin maritimum* L, *Bidens cernua* L, *Diospyrus lotus* L, *Avena sativa* L, *Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Lotus corniculatus* L. var. *japonica* Regel, *Houttuynia cordata* Thunb, *Pinus densiflora* S. et Z, *Sophora japonica* L, *Paeonia suffruticosa* Andr, *Cucurbita moschata* Duchesne, *Sasa albo-marginata*, *Portunus trituberculatus*
- 竹油, オオバコ, トクダミ, そば, ニンニク, 靈芝, 柿葉のお茶, 桂皮のお茶, 枸杞, ユズのお茶 (柚子茶), クズのお茶, ツルドクダミ, アンズの種, ごま, よもぎ, スン플, しそ, 松花の粉, カナムグラ

그림 3. 동맥경화, 고혈압 관련 식물군(특허기준)

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제1절 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	VSMC 증식 및 이주 유도활성 측정	<ul style="list-style-type: none"> <li>• aortic sprout의 발생과 이에 대한 산국 EO(수용성)의 억제 효과 검증 (2개 agonist, 4개 농도)</li> <li>• 증식, 이주 억제능 연구 (2 agonist, 4 농도)</li> </ul>
	HUVEC의 증식 및 이주 억제활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HUVEC agonist의 증식능에 대한 효능연구</li> </ul>
	신장/심장에 대한동맥경화 지표에 대한 효능	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 신장 profibrotic gene 발현에 대한 산국 EO(수용성)의 효능 검증(4개 gene)</li> <li>• 심장 apoptosis, ROS 발생에 대한 EO(수용성)의 효능검정 (tunnel assay, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</li> </ul>
	EO 성분의 in vivo 동맥경화 활성화	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산국 EO(수용성)에 의한 neointima 감소 기능규명</li> <li>• aortic sprout와의 비교 검토 (특허 출원)</li> </ul>
	산국 EO를 GC/MS로 분석하여 얻은 단일 성분을 이용한 ex vivo 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• carvarol, thymol의 효능 검토와 EO(수용성)의 비교</li> </ul>
	혈관의 수축 및 이완 유도활성 측정	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NE 처리에 대한 산국 EO(수용성)의 억제 효과 검증, ACh의 반응에 대한 EO(수용성)의 효과 검증</li> </ul>
	혈관의 이완 기전 억제활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산국 EO(수용성)성분에 의한 NO 발생 및 eNOS의 발현에 대한 효과 검증(2개 단백질, NO)</li> </ul>
	신장, 심장, 혈관에 대한 고혈압 지표에 대한 효능 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DJ-1, PRR, Ref-1 단백질 발현에 대한 EO의 기능 규명 (4개 gene)</li> </ul>
	산국 EO를 GC/MS로 분석하여 얻은 단일 성분을 이용한 수축 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• carvarol, thymol의 항고혈압 효능 검토</li> <li>• carvarol, thymol와 EO의 비교</li> </ul>
	호서대 실습지 내 산국 재배지 3,000평 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 호서대 실습지 확보(3000평)</li> <li>• 균일 조건 하에서의 재배 및 관리</li> </ul>
최적 재배조건의 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 동맥경화, 고혈압 성분 screen을 위한 유효성분 추출 조건 점검 및 환경 확립</li> </ul>	

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013)	산국 monoterpene 성분의 고혈압 지표에 대한 효능 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대표 monoterpene의 선정</li> <li>• 고혈압관련인자인 산화스트레스성 반응 관련지표에 대한 monoterpene류 EO순수성분의 효과 test (ROS, apoptosis, DJ-1, Prx. Bax)</li> </ul>
	산국 monoterpene 성분의 in vivo 고혈압 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대표 monoterpene류 EO순수성분의 항고혈압 능력을 모델동물을 이용하여 검증</li> </ul>
	신장, 심장, 혈관에 대한 동맥경화 지표에 대한 효능 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 동맥경화지표에 대한 대표 monoterpene류 EO순수성분에 의한 신장,심장,혈관세포에서 효과test 및 분석 (profibrotic, apoptosis, ROS)</li> </ul>
	산국 monoterpene 성분의 in vivo 동맥경화 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대표 monoterpene의 항동맥경화능에 대해 모델동물을 이용하여 검증</li> </ul>
	폐혈관의 수축 및 이완 유도 활성 측정	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 폐혈관을 이용한 산국 EO의 억제 효과 검증, ACh의 반응에 대한 EO의 효과 검증</li> </ul>
	폐성고혈압 모델동물의 지표에 대한 효능	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endothelin에 의한 폐동맥 수축능에 대한 산국 EO 및 순수성분의 효과 test</li> </ul>
	산국 EO성분의 in vivo 폐성고혈압 활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EO 및 순수성분의 SHR에 대한 혈압 강하 효과 test</li> <li>• 폐 조직에 대한 EO순수성분의 효과 확인 (COX2, NF-kb, Bax, ICAM-1)</li> </ul>
	산국 EO를 GC/MS로 분석하여 얻은 단일 성분을 이용한 폐성고혈압 억제 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산국floral water성분 및 EO성분의 분석 (monoterpene류선정)</li> <li>• 대표 monoterpene의 항폐고혈압 능력 검증</li> </ul>
	혈관질환 치료제의 제형 및 제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 타겟 EO의 안정성 검증</li> <li>• 기존 강압제와의 mix를 통한 EO 함유 spray 제 작(2종류와 혼화, BP 측정) 설계</li> </ul>
	적합한 EO 추출 방법의 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 원료의 표준화의 근거로 활용하기위한 정유 성분에 대한 분석연구(산지, 재배조건에 따른 정유 성분의 구성 및 함량 변화 등)</li> <li>• 이를 통한 최적 재배조건의 구체적 기준 재확립</li> <li>• 초고압 추출법, 초임계 추출법, 수증기 증류법 등의 연구를 통해 가장 적합한 추출방법 모색</li> </ul>
	추출조건, 순수 분리/정제 방법 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>• charcoal filter, Boiling point 활용, 원심분리 등의 연구를 통해 essential oil의 순수분리 정제 (EO로부터 monoterpene 성분등 추출)</li> </ul>
산국 EO의 상처치유 및 피부 질환 개선능 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 상처치유, 피부재생 및 피부 외용제로서 가능성 연구</li> </ul>	

구분 (연도)	세부연구내용	연구범위
3차 년도 (2014)	산국 EO 및 monoterpene 성분을 포함한 제형의 개발 및 시제품 출시	<ul style="list-style-type: none"> <li>기존 제품과 산국 EO 성분을 함유한 항동맥경화 제형의 개발(특허 출원)</li> <li>산국 EO의 규격 설정</li> <li>1종 시제품의 개발</li> <li>1종 시제품 출시</li> </ul>
	혈관질환 치료제의 제형 및 제품 완성	<ul style="list-style-type: none"> <li>효능 검정을 바탕으로 한 제품의 개발</li> </ul>
	산국 성분을 포함한 항 동맥경화 제형의 개발 및 시제품 출시	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국 EO 및 대표 monoterpene 성분을 함유한 항동맥경화 제형의 개발</li> </ul>
	in vitro 혈압, 폐성 고혈압, 동맥경화에 대한 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>1과제에서 개발된 제품의 항고혈압능 검정</li> <li>1과제에서 개발된 제품의 항동맥경화 검정</li> <li>1종 시제품의 개발</li> </ul>
	in vitro inflammation 유도인자 발현성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>개발 제품의 항염증 및 염증 개선능 검정 (ICAM-1, NF-<math>\kappa</math>B 등)</li> </ul>
	ex vivo 혈관자극성을 통한 안전성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>개발 제품의 ex vivo 안전성 검정</li> </ul>
	내과 전문가 의견 및 컨설팅	<ul style="list-style-type: none"> <li>내과의 컨설팅을 통한 개발 제품 효능 및 안전성 확립</li> </ul>
	EO의 급성독성 연구를 통한 인체 안전성 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>EO의 급성 독성 검정(신장, 간독성)</li> <li>EO의 호흡기 독성 시험</li> </ul>
	실험동물을 활용한 in vivo 연구를 통한 급성독성 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>동물에서의 효능 검정 및 독성 시험</li> </ul>
	실험동물을 활용한 in vivo 연구를 통한 안전성 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>동물에서의 독성 시험을 통한 안전성 시험</li> </ul>
인체 간이 임상 실시	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체에서의 간이 임상 효능 검정(정상인 10명에 대한 안정성 검사, BP)</li> </ul>	

## 제 2절 주요 연구수행 방법

○ 시료의 확보 및 유지: 연구의 수행에 필요한 산국은 실습포장에서 자체적으로 재배, 생산. 시험 중 발생하는 재배 산지(위치) 상의 부적합, 제품생산을 위한 대형산지의 필요 등이 발생 시 적극적으로 검토.

- 산국 정유는 본 연구진이 개발한 방법을 사용하여 수득, 확보된 시료는 분리시기에 따라 Lot No를 정하여 -70℃에 보관하여 관리.

○ 혈압 측정: 혈압은 SHR을 이용하여 측정하거나 경우에 따라서는 DOCA 고혈압 동물모델을 이용함. DOCA 고혈압 동물모델은 대상동물(랫드)을 마취시켜 신장 한쪽을 제거하고, 1주후에 DOCA patch를 어깨 피하에 삽입한 후 봉합(이차 수술) 함. 이차 수술을 한 날부터 쥐들에게 0.9% NaCl, 0.1% KCl R/O수를 먹이며 4주일 후 직접(총경동맥)또는 간접방법(꼬리-cuff 방법)

에 의한 혈압 측정. target 물질은 oral 또는 꼬리정맥으로 투여한 후 혈압변화 측정함.

○ *in vivo* 동맥경화반 형성 실험 (사용동물 및 실험조건에 따른 방법): Wire를 이용한 동맥경화 모델의 작성(마우스 사용 시) - 왼쪽다리의 대퇴부 동맥이 드러나도록 한 후 6-0 silk 봉합선을 사용하여 대퇴부 동맥의 원위부 및 근위부를 임시결찰하고, 대퇴부 동맥의 외측 근육가지 (lateral muscle branch)를 노출시켜 미세절개를 한 후 스프링 wire를 혈관 내로 넣어 안정화 후 wire를 빼냄. 기시부를 완전히 결찰하고 원위부 및 근위부의 임시결찰은 풀어 혈류를 회복시킨 후 봉합하고, 수술 후 실험동물은 2주후에 사용함.

○ 풍선(balloon)를 이용한 동맥경화 모델의 작성: 목의 정중부로 절개를 한 후 좌측 총경동맥, 내경동맥, 외경동맥이 드러나도록 함. 외경동맥의 원위부는 6-0 silk 봉합선으로 완전 결찰, 내경동맥의 근위부는 임시 결찰한 후, 총경동맥의 원위부에 검자를 설치함. 외경동맥 결찰부의 근위부에 미세 절개를 한 후 2Fr의 Fogarty 동맥 색전제거 술용 카테타를 혈관 내로 삽입. 생리식염수로 카테타의 풍선을 부풀리고 감압하는 방식으로 견인과정을 3회정도 반복하여 혈관 내막 손상시킴. 외경동맥의 기시부를 완전 결찰하고, 내경 동맥은 결찰을 해제하며, 총경동맥의 검자를 제거하여 혈류를 회복시킨 후 봉합함. 수술 후 실험동물은 2주 후 사용.

○ 혈관세포 이주능 측정 : 48 well microchemotaxis boyden chamber를 이용하여 측정함. polycarbonate membrane을 rat tail tendon으로부터 유래한 type I collagen으로 코팅한 후, 상온에서 1시간 동안 건조시킴. Lower chamber에 측정하고자 하는 sample을 30  $\mu$ l씩 부가한 후, collagen이 코팅된 polycarbonate membrane을 올린 후 chamber를 조립함. Chamber를 뒤집어 air-bubble의 존재 유무를 check하고 air-bubble이 존재하지 않는 well의 upper chamber에 0.1% BSA가 포함된 배양액에 resuspension되어진 혈관평활근 세포를  $5 \times 10^4$  cells/50 $\mu$ l로 loading함. 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양하고, Diff-Quik solution을 이용하여 membrane에 부착된 세포를 고정하고 염색하고 upper chamber 방향의 migration되지 않은 세포는 제거함. Membrane pore를 통하여 이동하는 세포의 수는 각 well 당 무작위로 선택한 4개의 영역에서 counting함.

○ 혈관세포 증식능 측정

- BrdU incorporation 분석: 96 well multi-well plate는 37 $^{\circ}$ C에 15분 동안 type I collagen으로 코팅시킨 후, trypsin-EDTA를 이용하여 수확된 세포를 배양액 (DMEM)으로 다시 현탁.  $2 \times 10^3$  cells/well의 밀도로 세포를 96 well multi-well plate에서 깔고 12시간 배양 후, 6시간 동안 serum starvation을 유도하고 test sample을 처리.

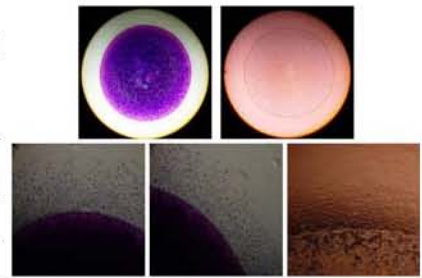
36시간 경과 후, BrdU-labeling 용액을 첨가하고, 이를 anti-BrdU antibody를 이용하여 incorporation 되어진 BrdU를 luminometer를 활용하여 평가함.

- XTT 분석: WelCount cell viability assay kit (WelGENE, Daegu, Korea)을 이용하여 측정.  $2 \times 10^3$  cells/well의 밀도만큼 96 well multi-well plate에 깔고, 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 배양한 후 6시간 동안 serum starvation을 유도하고 test sample을 처리. 48시간이 경과 후 XTT solution을 각 well에 부가하고, 2-4시간 경과후, 450nm에서 enzyme-linked immunosorbent assay reader로 absorbance를 측정.



○ *in Vitro* Sprouting Assay

- 다양한 혈관질환은 대부분이 동맥경화반의 형성이 동반되어 혈관의 치명적인 손상으로 이어지게 됨. 동맥경화반의 형성과정 중 혈관평활근세포의 증식(proliferation)과 이주(migration)의 증가는 필수적인 과정임. 그러나 혈관평활근세포의 증식과 이주 과정을 동시에 고효율(high throughput)로 스크린 하는 기법은 잘 알려져 있지 않음. 본 연구진은 혈관평활근세포의 증식과 이주를 동시에 고효율로 측정할 수 있는 *in Vitro* sprouting assay법을 독자적으로 개발하였음.



- Collagen mixture (Collagen type I; 180  $\mu$ l, 10X DMEM; 20  $\mu$ l, 1N NaOH; 5  $\mu$ l)와 혈관평활근세포 (2.5X10<sup>6</sup> cells/100  $\mu$ l)를 혼합하여, 48 well 또는 96 well multi-well plate에 5  $\mu$ l (1.25X10<sup>5</sup> cells/drop)로 점적함. 점적 후 10-15분간 실온에서 건조 (적절한 건조가 필요함)하고 스크린 할 시료를 처리함. 36-48시간 배양 후 Diff-Quick solution을 활용하여 fixing과 staining 하여 경계면으로부터 증식 및 이주한 세포의 거리를 측정하여 평가함.

○ ROS 생산능 측정: 세포내 reactive oxygen species(ROS)의 축적은 동맥경화반 형성 시 나타나는 현상임. 본 연구진은 green fluorescence probe DCF-DA 및 96 well을 활용하여, 혈관 평활근 세포로부터 생성되는 ROS의 생성량의 측정을 고효율로 측정할 수 있음.

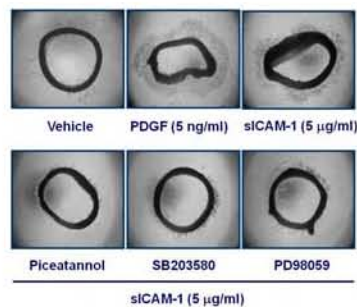
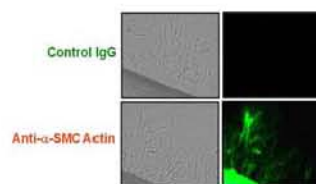
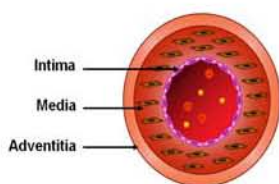
- 혈관평활근 세포를 1X10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 96 well multi-well plate에 넣어준 후, 6시간 배양하고, 측정하고자 하는 test sample(PDGF-BB +, -)을 넣어줌. 일정시간 경과 후 DCF-DA stain(10  $\mu$ M DCF-DA)를 첨가하고 10분간 상온에서 배양하고 fluorometer를 이용하여 ROS의 생성량을 간접적으로 분석함.

○ NO 생산능 측정: 세포 배양 시 분비되는 NO의 양을 배지에서 확인.

- 배양 24시간 starvation시킨 세포를 PBS로 2번 씻은 후, 10  $\mu$ M DAF-2, 500  $\mu$ M L-arginine, 1  $\mu$ M bradykinin 또는 1  $\mu$ M acetylcholin 및 test sample을 포함한 PBS를 부가.

- 일정시간(120분) 배양 후, 상층액(200  $\mu$ l)을 분리하여 black-well microplate로 이동. 상층액을 채운 plate를 형광 측정 범위를 492 nm(excitation) 및 510 nm(emission)로 정해진 Fluorometer에 장착하여 형광정도를 측정.

○ *ex vivo* Aortic ring Assay



- 질병의 원인을 규명하기 위하여 *in vivo*에 가까운 연구기법들이 많이 개발되어지고 있음. 그러나 이들 방법은 매우 복잡하거나 오랜 시간이 소요되는 단점들을 안고 있음. 본 연구진이 개발한 *ex vivo* aortic ring assay는 동맥경화반 형성에 있어 필수적인 혈관평활근조직의 이상 증식과 이주의 과정을 조직 상태에서 고효율로 평가할 수 있는 연구기법임. 이러한 연구기법은 본 연구진에 의해 처음으로 사용되어 현재 많은 연구자들이 사용하고 있는 방법임.

- Matrigel (growth factor reduced, without phenol red)을 48 well plate에 120  $\mu$ l/well로 첨가하고 실온에서 1시간 동안 polymerization하여 Matrigel이 coating된 plate를 준비함. 랫드 대동맥으로부터 혈관평활근 조직의 확보는 첫째, 결체조직, branch vessel 및 불순물 제거하고 둘째, collagenase/elastase solution을 처리하여, Endothelial layer 및 Adventitial fibroblast layer 제거하여 순수한 대동맥 평활근 조직을 확보함. 셋째, 확보된 대동맥 평활근 조직을 1 mm 두께로 잘라 vessel ring을 만들고, 이를 Matrigel이 coating 되어진 plate에 embedding(1 ring/well; Ring이 넘어지지 않게 주의)하고 50  $\mu$ l의 Matrigel을 ring 위에 덮어줌. 테스트할 sample들을 처리하고 3~5일간 배양하여, 평활근 조직으로부터 증식/이동한 세포의 거리 및 밀도를 측정하여 평가함.

○ *ex vivo* 혈관 수축실험 : 대상 동물을 마취시킨 후 흉부대동맥을 절단 적출하여 주위 결체조직을 제거하고 환상 표본을 만든 후 절단된 혈관 환상 표본을 조직 영양액 (physiological salt solution, PSS)이 채워진 micro-easy magnus의 organ bath에 한쪽은 고정되고 다른 한쪽은 force transducer장치에 연결된 훅크에 장착함. 혈관 환상 표본의 초기 장력을 1g로 하여 2시간 평형 시키면서 70 mM KCl을 2-3회 투여하여 수축반응을 검토함. 이후 시료를 처리하여 혈관 조직의 운동성 반응을 관찰하며, 근육 장력의 변화는 physiograph로 기록함. 환상 표본 제작 시 혈관 내피의 제거가 필요한 실험을 위해 포셉을 혈관내강에 넣어 2-3회 회전시켜 내피세포를 제거하여 내피세포 제거표본을 만들고, 내피세포 제거의 유무는 Norepinephrine (NE) 수축반응에 대한 Acetylcholine (ACh)의 이완반응 유무로 판정함. 조직 organ bath는 PSS로 채워 37°C의 항온수조 순환기에 연결하여 일정 온도를 유지시키고, 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>의 혼합가스로 포화시켜 pH 7.4를 유지시킴.

○ Collagen 합성능 검증: 조직의 재생과정 중 type I collagen, type IV collagen의 합성은 필수적인 과정중의 하나임. 산국 EO가 세포 내 type I 또는 IV 콜라젠 합성과 분비에 미치는 효과를 측정하고자 하였음. 96 well microtiter plate에 monoclonal anti-collagen I 또는 IV Ab, (2  $\mu$ g/well/PBS)를 코팅한 후 1시간 동안 blocking하여 plate를 준비. 샘플을 well당 100  $\mu$ L 씩 처리하여 RT에서 90분 동안 반응시키고, polyclonal anti-collagen I 또는 IV Ab를 각 well에 처리하여 RT에서 90분 동안 반응시킨 후, streptavidin-POD(60 min), Supersinal ELISA pico chemiluminescent substrate(10 min)를 반응시키고, ELISA plate reader를 이용하여 세포 내 type I 또는 IV 콜라젠 합성과 분비에 대한 결과를 확보.

○ ABTs radical 소거능 확인: 조직 염증반응 및 손상을 유발하는 free radical 소거능 규명을 통해 산국 에센셜 오일의 효능 검증(DPPH 효능과 비교 검증). 산국 에센셜오일의 ABTs radical 소거 활성에 관한 실험은 7 mM ABTs와 2.45 mM 포타슘 퍼설페이트 (potassium persulfate)를 혼합한 후 상온 암실에서 12시간 이상 반응시킨 후 사용함. 0.1 ~ 40  $\mu$ g/mL의

농도로 희석된 샘플 50  $\mu$ L에 ABTs 100  $\mu$ L를 상온에서 5분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정.

○ 전구지방세포의 분화에 미치는 효과 검증: Caloric homeostasis의 조절 실패에 의한 obesity 진행 과정에서 adipocyte의 분화는 필수적인 과정임. 산국 EO의 adipocyte 분화 억제능을 검증함으로써 항비만 소재로서 활용 가능성을 확인. 마우스 embryo 3T3-L1 전구지방 세포주는 10%의 Newborn Calf Serum이 첨가된 DMEM배지에  $2 \times 10^5$  cells/mL 농도로 부유시켜 48시간 동안 배양하여 융합 상태가 되도록 배양. 분화배지(10% FBS, 5  $\mu$ g/mL 인슐린, 1  $\mu$ M 텍사메타손, 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸잔틴)로 교체하여 2일간 배양하고 배양시 산국 EO를 0.1  $\mu$ g/mL, 0.5  $\mu$ g/mL 그리고 1  $\mu$ g/mL 농도로 같이 처리. 2일간 배양 후, 지방세포로의 분화를 촉진하기 위해, 5  $\mu$ g/mL 인슐린이 포함된 DMEM 배지와 산국 EO를 0.1  $\mu$ g/mL, 0.5  $\mu$ g/mL 그리고 1  $\mu$ g/mL 농도로 같이 처리함. 2일간 배양 후 산국 에센셜 오일만 0.1, 0.5 그리고 1  $\mu$ g/mL 농도로 처리하였고, 2일 후 똑같이 산국 에센셜 오일만 처리. 배양 중에 세포의 모양은 광학현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하고, 3T3-L1 세포의 분화 정도는 Oil-red O를 이용하여 염색. 100% 이소프로필알코올을 이용하여 세포에 염색된 Oil-red O를 탈색한 후 520 nm에서 흡광도를 측정함.

○ 독성 및 간이 임상시험 수행/평가/분석: 호서대학교가 보유하고 있는 안정성 시험센터에서 실험동물의 안정성 시험을 실시함. 단회투여/반복 투여 독성시험(식품의약품안전청 가이드라인 준수) 실시하여 독성 유무를 판단함. 또한 건국대학교 의과대학의 임상(컨설팅)을 통하여 고혈압 환자에서의 안정성 효과를 간이(n=10)로 측정함.

- 반복경구투여독성시험에 의한 신장독성 및 간독성 확인 : 시험물질을 시험동물에 일주일간 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 질적·양적으로 검사하기 위하여 반복투여독성시험을 실시. 각 군별로 암,수 각각 7마리의 특정병원체부재 (specific pathogen free, SPF) SD랫드를 사용. 시험물질투여군은 단회투여독성시험의 결과에 따라 최대내성용량 및 무해용량 등을 포함하여 용량반응관계가 나타날 수 있도록 투여군을 설정. 투여기간 동안 일반증상, 체중, 사료·음수 섭취량을 측정하고 투여 종료 후 부검을 통하여 노화학 검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 병리조직학적 검사로서 신장과 간조직의 병리조직학적 검사를 실시하여 독성의 질적, 양적 강도를 평가. 최종적으로 시험물질의 신장과 간독성 유발 여부를 확인하고 이들 독성의 무독성량 (NOAEL)을 평가.

- 단회경구독성시험 : 시험물질을 시험동물에 단회 경구투여하였을 때 단기간 내에 나타나는 독성을 질적·양적으로 검사하기 위하여 단회독성시험을 실시. 시험동물로는 암,수 각각 5수씩 특정병원체부재 (specific pathogen free, SPF) SD랫드 (대한바이오링크, 충북)를 사용. 시험물질 투여군은 최대 용량을 2,000 mg/kg으로 하고 공비를 2로 하여 1000 mg, 500 mg 용량으로 투여군을 설정. 투여 후 14일간 시험물질에 의하여 나타나는 반응을 관찰함으로써 시험물질의 랫드에서의 반수치사량 (Lethal Dose 50)을 산출하고 경구노출시 독성양상을 확인. 최대 용량군에서 아무런 독성이 관찰되지 않는 경우 그 이하의 용량에 대한 독성 시험은 실시하지 않음.

- 단회경피독성시험 : 시험물질을 시험동물에 단회경피투여하였을 때 단기간 내에 나타나는 독성을 질적·양적으로 검사하기 위하여 단회독성시험을 실시. 실험동물로는 각 군별로 암,수 각각 5마리의 특정병원체부재 (specific pathogen free, SPF) SD랫드 (대한바이오링크, 충북)를 사

용. 시험물질투여군은 최대 용량을 2,000 mg/kg으로 하고 공비를 2로 하여 1000 mg, 500 mg 용량으로 투여군을 설정. 투여 후 14일간 시험물질에 의하여 나타나는 반응을 관찰함으로써 시험물질의 랫드에서의 반수치사량 (Lethal Dose 50)을 산출하고 피부노출시 독성양상을 확인. 최대 용량군에서 아무런 독성도 관찰되지 않는 경우 그 이하의 용량에 대한 독성 시험은 실시하지 않음.

- 급성흡입독성시험 : 에어로졸 상태의 시험물질을 포함하고 있는 공기를 실험동물에 흡입 투여하여 나타나는 독성을 질적·양적으로 검사하기 위하여 시험물질이 정하여진 시간동안 일정하게 분사될 수 있도록 특별히 고안된 비강흡입챔버 (nose only exposure chamber) 를 사용하여 단회투여흡입독성시험을 실시. 군별로 암,수 각각 7마리의 특정병원체부재 (specific pathogen free, SPF) SD랫드를 사용. 동물 수는 각 군당 암·수 각각 7 마리로 하고 2 ml/L를 최대 용량으로 하고 공비를 2로 하여 1 ml/L, 0.5 ml/L 용량으로 투여군을 설정. 노출기간 중 온도, 습도, 산소, 이산화탄소 농도, 시험물질 입자의 크기 분포, 이온농도, 실측농도 등을 확인. 최대 노출군에서 아무런 독성도 관찰되지 않는 경우 그 이하의 농도에 대한 노출 시험은 실시하지 않음.

### 제 3절 세부연구수행 방법 및 결과

#### 1. 산국 추출물의 혈관 기능 연구

##### 가. 산국추출물의 동맥경화 관련 혈관기능 (혈관평활근세포의 이동 및 증식)에 대한 효과

###### (1) Essential oil (EO)

(가) 대동맥 혈관평활근세포의 확보: 신선한 대동맥을 SD rat로 부터 분리하여 collagenase 및 elastase를 이용하여 혈관내피층과 adventitia fibroblast층을 분리하고 평활근세포를  $\alpha$ -smooth muscle-actin (SMA) antibody을 이용하여 확인하였음. 순수 분리된 rat 혈관평활근 및 adventitial층으로부터 collagenase 및 elastase digestion을 통해 혈관평활근세포(VSMC) 및 adventitial fibroblast를 확보하였음.

###### (나) 혈관기능 연구

###### ① 세포독성 효과

- EO (지용성: 0.001-10  $\mu$ g/ml)는 혈관평활근 세포에 대해 10  $\mu$ g/ml 농도에서 만 독성을 나타내었으나, 수용성 EO (열수추출물; 0.001-100  $\mu$ g/ml)는 어떤 농도에서도 독성을 나타내지 않음 (그림 1-1B 및 1-1D). 따라서 세포실험에서 수용성 EO의 효과를 주 타겟으로 함.

###### ② 혈관평활근 세포의 증식 및 이동에 대한 효과

산국 추출물 수용성 EO 및 EO (지용성)을 가지고 흉부 대동맥(aorta)에서 분리한 평활근세포 (RSMCs)를 대표적인 자극제로 알려진 PDGF로 자극 후 발생하는 평활근세포 migration (이동) 및 proliferation(증식)을 비교 측정함.

㉞ 세포이동에 대한 효과: PDGF에 의해 자극된 세포이동은 EO (0.001-10  $\mu$ g/ml) 처리시 10  $\mu$ g/ml 농도에서만 억제경향을 나타냄. 그러나 수용성 EO (0.001-100  $\mu$ g/ml)는 PDGF로 증가된 세포이동을 농도 의존적으로 약화시키는 것으로 나타남 (그림 1-1A, 1-1C).



㉔ 세포증식에 대한 효과: PDGF에 의해 자극된 세포증식은 EO (0.001-10  $\mu\text{g/ml}$ ) 처리시 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서만 억제경향을 나타냄. 그러나 수용성 EO (0.001-100  $\mu\text{g/ml}$ )의 처리시에는 PDGF로 증가된 세포증식을 농도 의존적으로 약화시키는 경향을 보임(그림 1-1B, 1-1D). 이상의 결과들은 수용성 EO는 지용성 EO에 비해 혈관기능에 대해 강하면서도 안정한 유효성분일 가능성을 제시함.

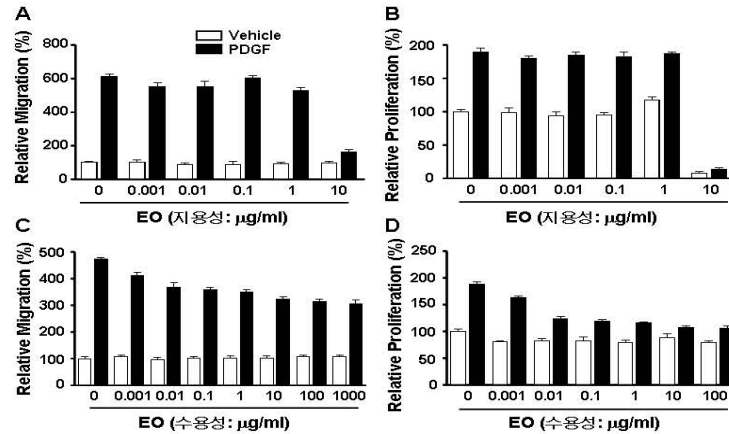


그림 1-1. 산국추출물의 혈관기능에 대한 효과 검증. A 및 B, EO (지용성)의 RASMC migration(A) 및 proliferation (B)에 대한 효과. C 및 D, EO (수용성)의 RASMC migration(C) 및 proliferation (D)에 대한 효과. PDGF농도:10 ng/ml.

㉔ 혈관평활근세포의 이동 및 증식에 관련된 신호전달 단백질의 발현에 미치는 효과

㉔ PDGF 수용기의 발현: 혈관평활근세포의 상기 기능과 관련된 신호전달단백질 발현에 대한 수용성 EO (0.001-100  $\mu\text{g/ml}$ )의 효과를 검토하기 위하여 우선 PDGF수용기의 발현에 미치는 영향을 관찰하였음. 그림 1-2에서처럼 PDGF에 의해 증가된 PDGF 수용기의 발현이 수용성 EO의 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되는 경향이 나타남.

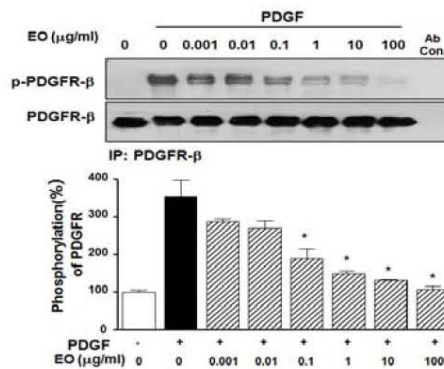


그림 1-2. 혈관평활근세포 PDGFR- $\beta$  인산화발현에 대한 수용성 EO의 처리효과. PDGF농도:10 ng/ml.

㉔ MAPK의 발현: P38MAPK 및 ERK1/2은 혈관평활근세포의 migration 및 proliferation과 중요한 역할을 하는 시그널 단백질로 알려짐. PDGF에 의해 자극으로 증가된 이들 단백질의 인산화가 수용성 EO에 의해 농도 의존적으로 억제되는 경향이 나타남 (그림 1-3).

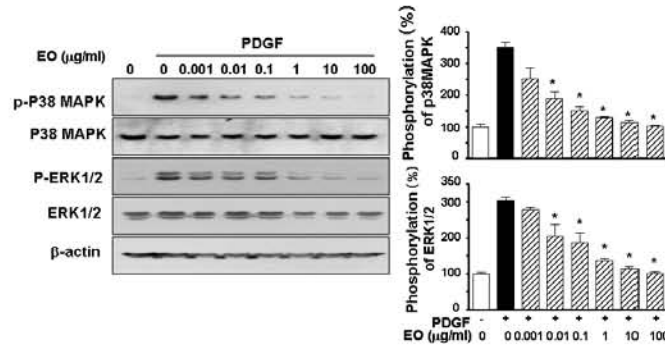


그림 3. 혈관평활근세포 P38MAPK 및 ERK1/2 인산화발현에 대한 수용성 EO의 처리효과. PDGF농도:10 ng/ml.

④ Ex vivo 혈관 싹 성장에 미치는 영향

① 혈관 싹 성장(aortic sprout outgrowth) ex vivo시험은 혈관평활근세포의 migration 및 proliferation를 동시에 확인하는 방법으로 알려져 있음. 이에 상기 발견된 혈관평활근세포의 migration 및 proliferation에 대한 수용성EO의 효과를 확인하기위하여 혈관 싹 성장 시험을 시도함. 그림 1-4에서와 같이 수용성 EO (0.1-100 μg/ml)의 처리는 PDGF로 유도되는 혈관 싹 성장을 농도 의존적으로 억제함.

② 그러므로 이결과는 수용성 EO에의 migration 및 proliferation에 대한 결과를 재확인시킴과 동시에 이물질의 동맥경화 억제능의 가능성을 제시함.

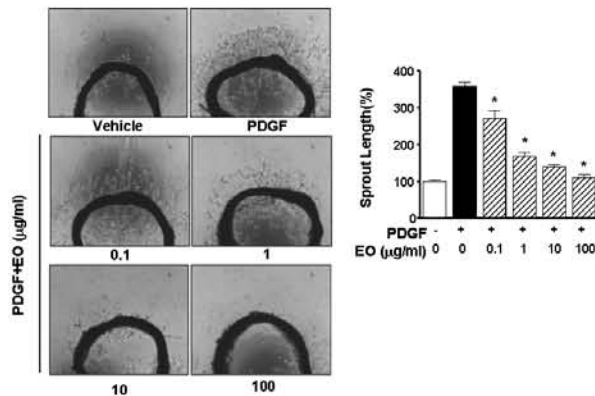


그림 1-4. Ex vivo 혈관싹 성장에 대한 수용성 EO의 처리효과. PDGF농도:10 ng/ml.

⑤ 동맥경화모델을 이용한 in vivo 혈관신생내막 형성에 미치는 영향

① 이상의 수용성 EO의 혈관평활근세포 및 혈관싹 성장 실험으로부터 얻어진 결과는 이 EO가 동맥경화 발생에 영향을 미칠 것으로 예측시킴. 따라서 in vivo 상태로 동맥경화시 발생하는 혈관에서의 동맥경화 neointima (신생내막) 형성정도에 대한 효과를 보다 명확히 확인 하고자, rat경동맥경화 모델에서 형성된 혈관신생내막의 형성정도를 수용성 EO (100 mg/kg BW)처리 군과 비처리 군을 서로 비교하여 검토함.

② 그림 1-5에서 보는 바와 같이 EO처리군의 신생내막 형성은 비 처리군에 비해 약화되는 것으로 확인됨. 이 결과는 수용성 EO가 동맥경화 시 생성되는 neointima의 형성을 억제할 가능성을 제시함.



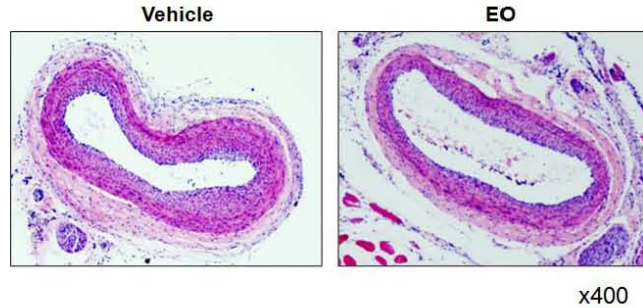


그림 1-5. 동맥경화 모델의 혈관 신생내막의 형성에 대한 수용성 EO의 영향. 확대율: X400

(다) 결론: 이상의 결과들은 산국추출물 EO는 PDGF-MAPK경로억제를 통한 혈관평활근 세포의 증식 및 이동을 억제하여 동맥경화에 중요과정인 신생내막형성을 억제할 가능성을 제시함.

## (2) Carvacrol 및 thymol의 혈관기능연구

### (가) 세포독성 효과

-산국의 monoterpene 성분중의 하나인 carvacrol 및 thymol의 혈관평활근세포의 증식 및 이동에 대한 효과를 관찰하기 위해 우선 carvacrol (0.1-3  $\mu\text{M}$ ) 및 thymol (0.1-3  $\mu\text{M}$ )의 혈관평활근 세포 독성에 대한 효과가 관찰됨. Carvacrol 및 thymol은 모두 어떤 농도에서도 독성을 나타내지 않음 (그림 1-6A, 1-6B).

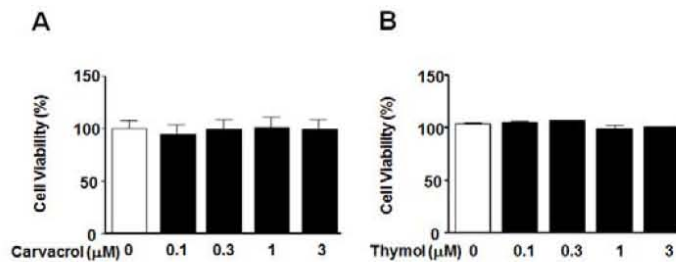


그림 1-6. Carvacrol 및 Thymol의 혈관평활근세포 viability에 대한 효과. A. Carvacrol의 효과. B. Thymol의 효과. XTT assay 이용

### (나) 혈관평활근 세포의 증식 및 이동에 대한 효과

① Carvacrol 및 thymol의 migration 및 proliferation에 대한 효과가 관찰됨.

② 그림 1-7에서처럼 cavacrol (0.1-3  $\mu\text{M}$ ) 및 thymol은 PDGF에 자극된 혈관평활근세포의 이동을 농도 의존적으로 억제하는 경향을 나타냄.

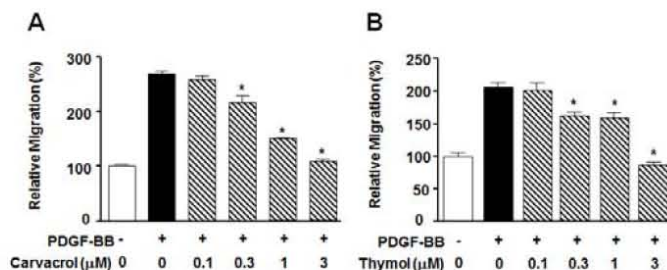


그림 1-7. Carvacrol 및 Thymol의 혈관평활근세포 이동에 대한 효과. A. Carvacrol의 효과. B. Thymol의 효과. PDGF농도:10 ng/ml.

③ PDGF에 의해 증가된 혈관평활근세포 증식은 carvacrol에 의해 농도 의존적으로 억제 되었으나, Thymol에 의해서는 비 유의적인 약한 억제 반응을 나타냄 (그림 1-8).

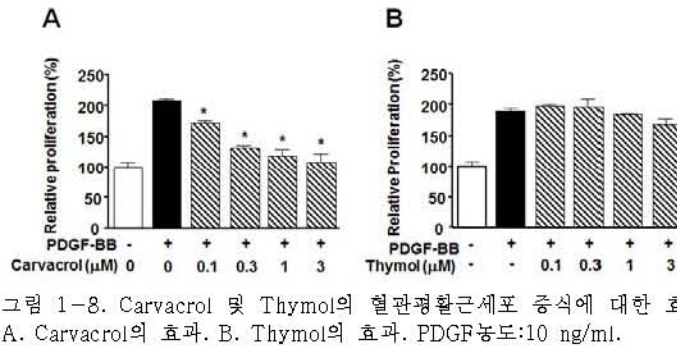


그림 1-8. Carvacrol 및 Thymol의 혈관평활근세포 증식에 대한 효과. A. Carvacrol의 효과. B. Thymol의 효과. PDGF농도:10 ng/ml.

(다) ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)는 혈관평활근세포의 이동을 증가시켰으며, PDGF에 의해 증가된 ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 생산 및 NOX의 activity는 carvacrol의 처리에 의해 억제되었음 (그림 1-9).

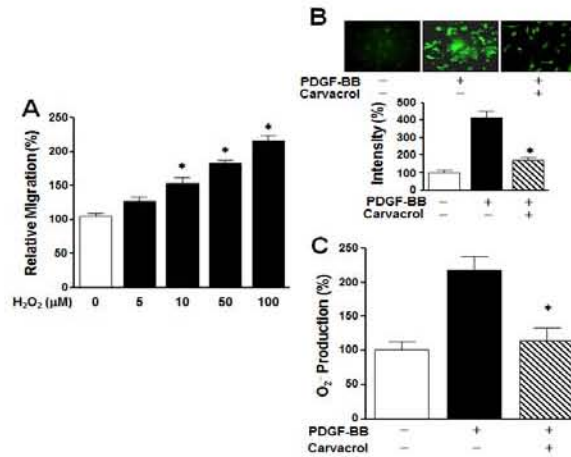


그림 1-9. 혈관평활근세포의 ROS 처리에 의한 migration 증가 및 PDGF에 의해 증가된 ROS대한 carvacrol의 효과. PDGF농도:10 ng/ml.

(라) 혈관평활근세포의 이동 및 증식관련 신호전달 단백질의 발현에 미치는 효과 - P38MAPK 및 ERK1/2은 혈관평활근세포의 migration 및 proliferation과 중요한 역할을 하는 시그널단백질로 알려짐. PDGF에 의해 증가된 이들 단백질의 인산화는 carvacrol의 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되는 경향이 나타남 (그림 1-10).

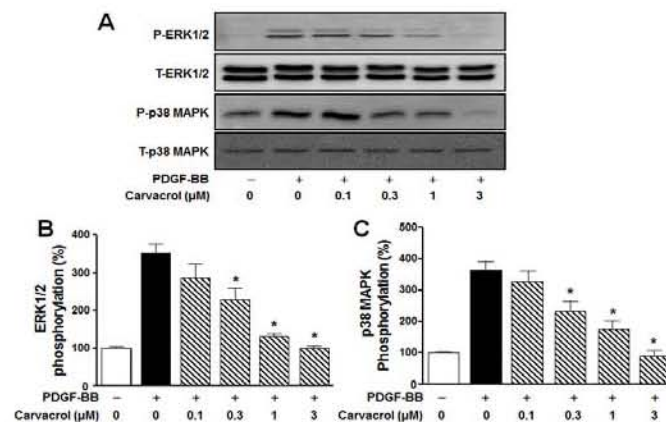


그림 1-10. 혈관평활근세포 MAPK 인산화발현에 대한 Cavacrol의 처리효과. PDGF농도:10 ng/ml.

(마) Ex vivo 혈관 싹 성장에 대한 효과

- ① Carvacrol은 (0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ )의 처리는 PDGF로 유도되는 혈관 싹 성장을 농도 의존적으로 억제함 (그림 1-11).
- ② 따라서, 이결과는 migration 및 proliferation에 대한 carvacrol의 효과를 재확인시킴과 동시에 이물질의 동맥경화 억제능 소유의 가능성을 제시함.

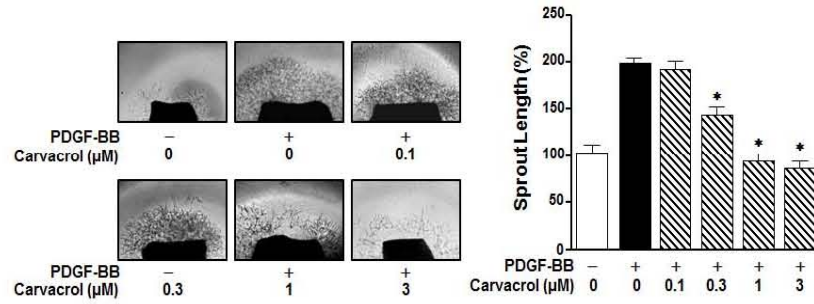


그림 1-11. Ex vivo 혈관싹 성장에 대한 carvacrol의 효과. PDGF농도:10 ng/ml.

(바) 동맥경화모델을 이용한 in vivo 혈관신생내막 형성에 미치는 영향

- ① 혈관평활근세포 및 혈관싹 성장 실험으로부터 얻어진 결과는 이 carvacrol이 동맥경화 발생을 억제할 가능성을 예측시킴. 따라서 동맥경화과정에 중요한 neointima (신생내막) 형성정도에 대한 효과를 in vivo 상태에서 보다 명확히 확인함. rat 동맥경화 모델의 신생내막의 형성정도를 carvacrol처리 군과 비 처리 군에서 비교 검토함.
- ② 그림 1-12A에서 보는 바와 같이 carvacrol (10 mg/kg BW)처리군의 신생내막 형성은 비 처리군보다 약화되었으며, PCNA양성세포의 수가 감소하는 경향을 나타냄 (그림 1-12B).

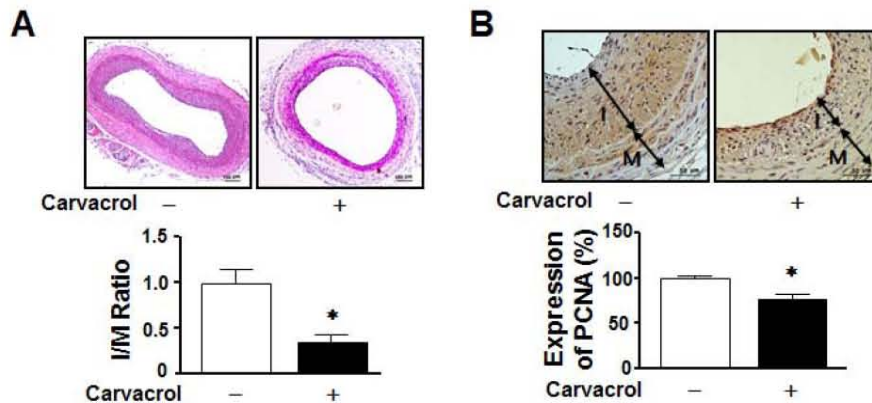


그림 1-12. 동맥경화 모델의 혈관 신생내막의 형성에 대한 carvacrol의 효과 PDGF 농도:10 ng/ml. I/M=intima/media thickness

(사) 결론: 이상의 결과들은 carvacrol이 ROS에 의해 조절되는 MAPK경로억제를 통해 혈관평활근 세포의 증식 및 이동을 억제하여 동맥경화에 신생내막형성을 약화 시킬 가능성을 제시함.



**나. 심혈관질환 관련 기관 세포의 반응에 대한 EO효과**

-혈관평활근 세포의 혈관내피세포, 심장 및 신장은 동맥경화 또는 고혈압등의 심혈관질환과 관련된 주요기관의 세포임. 이에 이들 세포들에 있어서의 심혈관질환 관련반응에 대한 수용성 EO의 효과를 검토함.

**(1) 혈관내피세포의 기능에 미치는 영향**

- 혈관평활근세포와 더불어 혈관기능에 중요한 역할을 하는 세포인 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)의 기능에 대한 수용성 EO의 영향을 관찰함.

(가) Migration(이동) 및 proliferation(증식)에 대한 효과: 그림 1-13에서처럼, 내피세포 성장인자인 VEGF는 HUVECs의 이동 및 증식을 증가시켰으며, 이들 반응은 수용성 EO처리에 의해 억제됨. VEGF 비자극 상태에서의 증식에 대해서도 수용성 EO는 다소 억제효과를 나타냄. 한편, 산국의 monoterpene 성분중의 하나인 carvacrol 또한 이와 비슷한 효과를 나타냄 (그림 1-13).

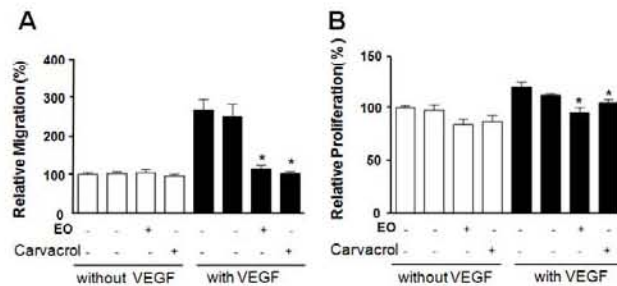


그림 1-13. VEGF로 유도된 혈관내피세포 (HUVEC)의 이동 및 증식에 대한 수용성 EO 및 carvacrol의 효과. A. 이동 (migration)에 대한 효과. B. 증식(proliferation)에 대한 효과.

(나) Ex vivo 혈관썩 성장에 미치는 영향 : 상기 in vitro 결과를 확인하기 위하여 ex vivo 혈관썩 성장 실험을 시도함. 그림1-14에서와 같이 수용성 EO는 VEGF에 의해 유도되는 혈관썩 성장을 약화시키는 경향을 나타냄. Cavacrol 또한 비슷한 억제효과를 나타냄 (그림 1-14). 이들 결과는 수용성 EO가 혈관내피세포의 성장에도 영향을 미친다는 것을 시사함.

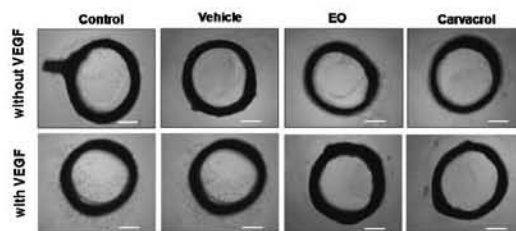


그림 1-14. Ex vivo 혈관썩 성장에 대한 수용성 EO의 처리효과. VEGF농도:10 ng/ml. Scale bar: 500 μm

**(2) 심장세포에 미치는 영향**

- 심혈관질환과 관련된 심장세포 반응(apoptosis, ROS 발생, 세포 beating수)에 대한 수용성 EO의 효과를 검토함.

(가) Apoptosis에 미치는 영향: 신생 rat 심실로부터 분리 배양된 심근세포에서 TNF-α처리에 의해 발생하는 세포내의 apoptosis정도에 대한 수용성 EO처리효과를 관찰함. 이를 위해

TUNNEL assay법을 이용하여 심근세포를 염색한 후 그것의 발광의 정도가 confocal microscope를 이용하여 분석됨. TNF- $\alpha$ 처리에 의해 발생하는 TUNNEL양성반응을 보이는 세포 수는 수용성 EO처리에 의해 감소되는 경향을 나타냄 (그림 1-15).

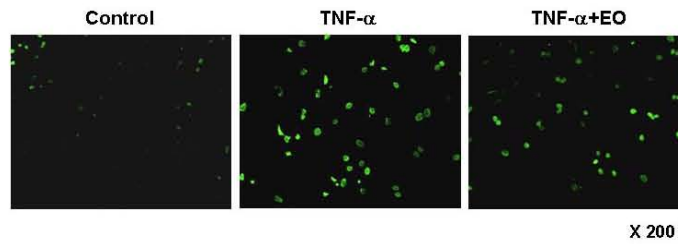


그림 1-15. 심장세포 apoptosis 발생에 대한 수용성 EO처리 효과. 녹색, TUNNEL 양성반응세포.

(나) ROS 발생에 미치는 영향: 분리 배양된 심근세포에서 TNF- $\alpha$ 에 노출에 의해 유도되는  $O_2^-$  및  $H_2O_2$  발생정도에 대한 수용성 EO의 처리효과가 분석됨.  $O_2^-$ 발생은 심근세포의 homogenate에 NADPH와 lucigenin을 첨가한 후 발광정도를 luminescence assay 법을 이용하였으며,  $H_2O_2$  발생은 DCF-DA염색법을 이용하여 관찰됨. 수용성 EO의 처리는 TNF- $\alpha$  노출에 의해 발생하는 심근세포에서의  $O_2^-$  및  $H_2O_2$  발생을 감소시키는 경향을 나타냄 (그림 1-16). 이들 결과는 수용성EO는 심근세포에서의 심혈관질환(동맥경화 및 고혈압)과 관련된 apoptosis 및 ROS 발생에 억제효능을 나타낼 가능성을 시사함.

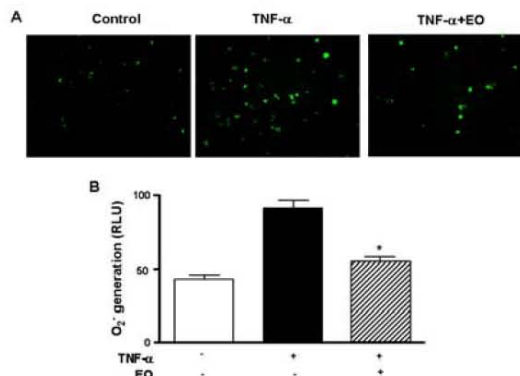


그림 1-16. 심장세포 ROS 발생에 대한 수용성 EO처리 효과. A.  $H_2O_2$  발생에 대한 효과. 녹색: DCF-DA 양성반응세포. B. superoxide anion 발생.

(다) 심근 세포의 beating에 미치는 영향 : 분리 배양된 심근세포의 beating수에 대한 EO의 처리효과가 분석됨. Miconazole에 의해 유도된 심근세포의 beating수 감소는 수용성 EO처리에 의해 회복되는 경향을 나타냄 (그림 1-17). 이들 결과는 수용성 EO는 심근세포 beating에 유의한 효능을 나타낼 가능성을 시사함.

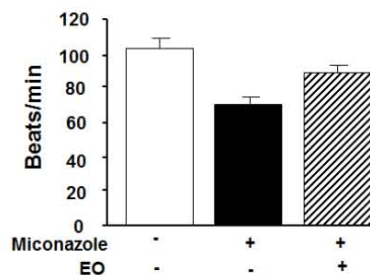


그림 1-17. 심근세포의 beating 수에 대한 수용성 EO의 효과.

### (3) 신장세포에 미치는 영향

- 심혈관질환 (동맥경화 및 고혈압)과 관련된 전섬유화인자 (profibrotic gene)발현에 대한 수용성 EO의 효과를 Real-time PCR법으로 관찰함.
- Angiotensin II로 자극된 신장 세포에서 유도된 전섬유화인자 Collagen type 1, Fibronectin 1, PAI-1의 발현 증가는 수용성 EO 처리에 의해 모두 약화되는 경향을 보였으나, TGF- $\beta$ 의 발현은 다소 증가하는 것으로 나타남 (그림 1-18). 이들 결과들로부터, 수용성 EO는 전섬유화인자의 발현을 감소시키는데 있어서 효능을 가질 것으로 사료됨.

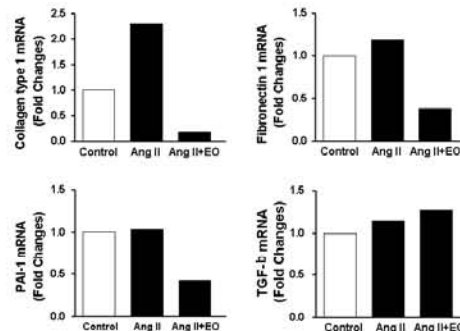


그림 1-18. 신장세포에서의 전섬유화인자 (Collagen type 1, Fibronectin 1, PAI-1, TGF- $\beta$ ) 발현에 대한수용성 EO처리 효과에 대한 Real-time PCR 결과. Ang II, Angiotensin II.

- (4) 결론: 이들 심혈관질환 관련 기관 세포의 반응에 있어서 수용성 EO 효과에 대한 실험결과는 이 EO가 심혈관 질환 병태 관련 세포 반응에 유의한 효능을 발휘하는 것으로 사료됨.

### 다. 산국추출물의 고혈압관련 혈관반응에 대한 효과 검증

위에서 언급된 혈관세포의 proliferation 및 migration에 대한 수용성 EO의 영향은 동맥경화과정에서 동맥경화반 형성을 억제할 가능성과 연관됨을 예상할 수 있음. 이러한 효과는 단지 동맥경화 이외에도 많은 혈관의 병태에 대한 효과 (예 혈압변화와 관련된 혈관 수축이완능에 대한 변화)도 예측시킴. 따라서 혈관기능에 대한 효과검정의 결과를 기본으로 더욱 강한 효과를 나타낸 수용성 EO를 가지고 혈관 평활근에 대한 추가 효과들을 검토하기 위하여 고혈압조절과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 혈관 평활근의 수축 및 이완 정도를 검토함.

#### (1) 혈관 평활근 수축/이완성에 미치는 영향

- 혈관 평활근은 혈관에서 다양한 기능을 나타내는 것으로 알려져 있음. 특히 혈압조절과 관련된 혈관 평활근의 수축성 변화는 혈관내피세포와 밀접한 관련을 가지는 것으로 알려져 있음. 따라서 혈관내피와 관련된 혈관 평활근수축성에 대한 수용성 EO의 효과를 검토하기위하여 rat 으로부터 분리된 내피존제 및 부재 하에서의 신선한 혈관 (대동맥, 폐동맥 등)을 가지고 수축 또는 이완능을 검토함.

(가) 방법: 혈관평활근 수축의 관찰에는 대표적인 혈관 평활근 수축자극제인 NE ( 0.001-10  $\mu$ M or 100  $\mu$ M) 및 고농도 (10-70 mM) KCl을 사용 하였으며, 이완반응 관찰에는 대표적인 내피



의존적 혈관 평활근이완제인 ACh (0.001-1  $\mu$ M)을 사용함. 또한 이들 수축 및 이완반응에 대한 수용성 EO 또는 carvacrol, thymol 처리 효과가 분석됨.

(나) 결과

① 대동맥의 수축 및 이완능에 미치는 영향

㉞ 혈관 안정장력(resting tension)에 대한 효과

분리된 대동맥을 내피 존재 및 부재하에서 혈관평활근 안정장력에 대한 수용성 EO처리 효과를 관찰함. 내피존재 및 부재하의대동맥 평활근의 안정장력은 수용성 EO처리에 의해 가볍게 약화되는 경향을 나타내는 것으로 나타남 (그림 1-19A, 1-19B).

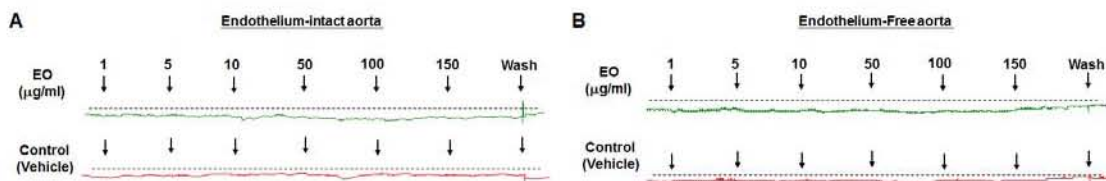


그림 1-19. 대동맥 안정장력에 대한 수용성 EO처리 효과. A, 내피존재하에서의 반응. B, 내피 부재하의 반응.

㉞ 혈관 수축성에 대한 효과

㉞ 우선 고농도(10-70 mM) KCl 또는 NE (0.001-10  $\mu$ M 또는 100  $\mu$ M)으로 자극 후 발생하는 수축에 대한 수용성 EO의 효과를 분석함. 고농도 KCl에 의한 혈관평활근 수축은 수용성 EO 처리에 의해 내피존재 및 부재조건에서 모두 강력히 억제됨 (그림 1-20A). NE에 의한 혈관수축은 수용성 EO처리에 의해 내피부재조건에서 감소하는 경향을 보이지만, 내피존재 하에서는 영향을 나타내지 않음 (그림 1-20B).

㉞ 이들 결과로부터 수용성 EO는 혈관 수축에서 내피의 유무에 관계없이 근원성 수축을 강력히 억제하지만 agonist에 의한 수축은 내피의 유무에 영향을 받는 것으로 시사됨.

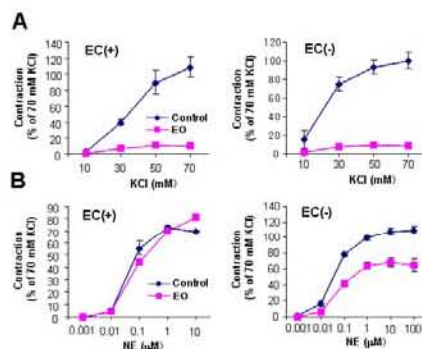


그림 1-20. NE 및 KCl에 의한 대동맥 수축에 미치는 수용성EO처리 효과. A, KCl에 의한 혈관수축. B, NE에 의한 혈관수축. EC(+), 내피존재조건; EC(-), 내피부재조건.

㉞ 한편, 혈관 수축에 대한 Carvacrol의 영향을 관찰 함. 고농도 KCl에 의한 혈관평활근 수축은 Carvacrol에 의해 내피존재 조건에서 억제 경향을 보였으나 내피부재 조건에서는 영향을 보이지 않음 (그림 1-21A). NE에 의한 혈관수축은 Carvacrol처리에 의해 내피부재조건에서 수축을 가볍게 감소시키는 경향을 보이지만, 내피존재하에서는 최대농도에서 약간의 영향을 나타냄 (그림 1-21B).

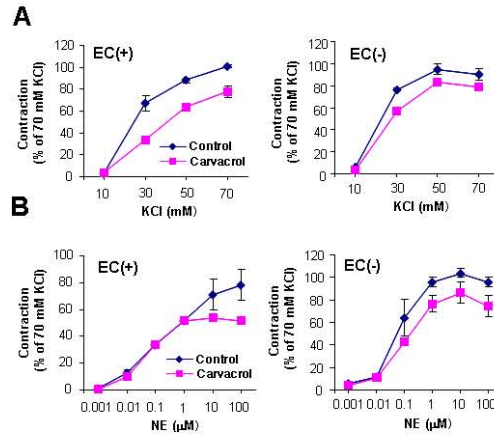


그림 1-21. 대동맥 수축에 미치는 Carvacrol처리 효과. A, KCl에 의한 수축. B, NE에 의한 수축. EC(+), 내피존재조건; EC(-), 내피부재조건.

㉔ 결론: 이들 결과로부터 수용성 EO가 Carvacrol 비해 강한 혈관 수축억제능을 가질 가능성이 시사됨.

② 대동맥 혈관 이완능에 대한 효과.

㉕ 내피존재하에서의 혈관이완에 미치는 영향

㉖ Ach으로 유도되는 내피의존성 혈관이완

- 다음으로, 내피존재조건의 혈관조직에 있어서 NE (0.1  $\mu\text{M}$ ) 자극으로 발생한 수축을 이완제인 Ach (0.001-1  $\mu\text{M}$ )에 의해 유도되는 이완의 정도가 수용성 EO에 의해 영향을 받는지에 대해 검토함.

- 수용성 EO (0.01-1  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리된 혈관에서는 Ach에 의해 발생하는 내피의존성이완이 비처리 혈관에 비해 낮은 농도에서 억제되는 경향을 나타내었음(그림 1-22A). Carvacrol 또한 수용성 EO와 비슷한 효과를 보임 (그림 1-22B).

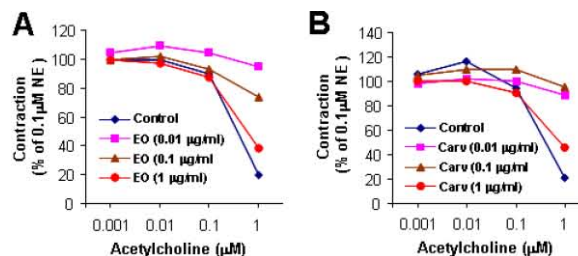


그림 1-22. 대동맥의 Ach에 의해 유도되는 내피의존성 이완에 대한 수용성 EO (A) 및 Carvacrol (B)의 효과.

㉗ 유도된 수축에 대한 수용성 EO의 효과

- 다음으로, 내피존재하의 혈관조직을 NE(0.1  $\mu\text{M}$ ) 및 고농도 KCl (35 mM)로 수축시킨 후, 수용성 EO를 농도별로 직접자극 하여 이완정도를 검토함.

- 수용성 EO는 고농도 KCl 및 NE로 발생된 수축을 농도 의존적으로 이완시킴 (그림 1-23A). 한편, Carvacrol의 효과가 검토됨. Carvacrol은 고농도 KCl로 발생된 수축을 농도 의존적으로 약하게 이완시키나, NE에 의한 수축에는 영향을 주지 않는 것으로 관찰됨 (그림 1-23B). 이상의 결과로 볼 때, 수용성 EO의 내피의존적인 이완에 대한 효과가 Carvacrol 보다 더욱 효과

적인 것으로 시사됨.

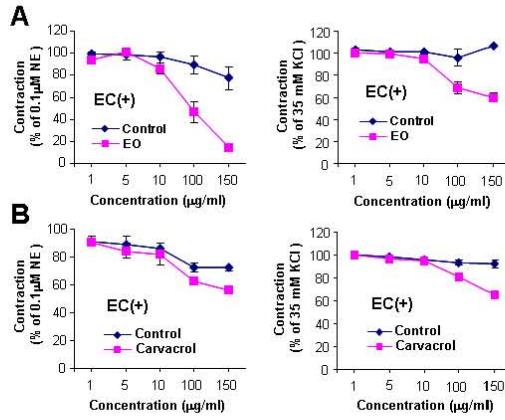


그림 1-23. 내피 의존성 대동맥이완에 대한 수용성 EO (A) 및 Carvacrol (B)의 효과.

㉞ 내피 부재하에서의 혈관이완에 미치는 영향

㉟ 유도된 수축에 대한 수용성 EO의 효과

- 내피가 제거된 혈관조직을 NE(0.1 μM) 및 고농도 KCl (35 mM)로 수축시킨 후, 수용성 EO를 농도별로 직접 자극 하여 이완 정도를 분석함. 수용성 EO는 고농도 KCl 및 NE로 발생된 수축을 농도 의존적으로 이완시킴(그림 1-24A).

- 한편, Carvacrol의 효과가 관찰됨. Carvacrol 또한 KCl 및 NE로 유도된 수축을 농도 의존적으로 이완시키나, 그 반응의 정도는 수용성 EO에 비해 약한 경향을 나타냄(그림 1-24B). 이상의 결과는 수용성 EO의 내피 독립적 이완에 대한 효과가 Carvacrol 보다 효과적이라는 것을 시사함.

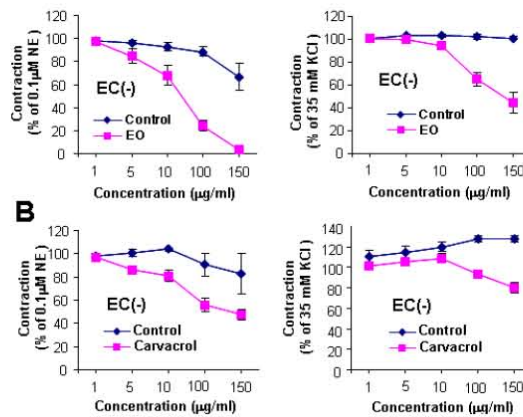


그림 1-24. 내피 독립성 대동맥이완에 대한 수용성 EO (A) 및 Carvacrol (B)의 직접 자극 효과.

㉟ 폐동맥의 수축/이완능에 미치는 영향

㉞ 혈관 수축성에 대한 효과:

㉟ 고농도 (10-70 mM) KCl 또는 NE (0.001-10 μM)에 의해 유도되는 수축에 대한 EO 효과

- 고농도 KCl에 의한 혈관평활근 수축은 수용성 EO 처리에 의해 내피 존재 및 부재하에서 모두 강한 억제효과가 나타남 (그림 1-25A).

- NE에 의해 유도되는 혈관수축은 수용성 EO 노출에 의해 내피 부재 조건에서 억제되는 경향을 보이지만, 내피 존재 하에서는 다소 약화되는 경향을 나타냄(그림 1-25B).



- 이들 결과로부터 폐동맥 수축에 대한 수용성 EO의 효과는 대동맥에서처럼 혈관평활근의 반응성과 비슷한 경향을 나타낼 가능성이 시사됨.

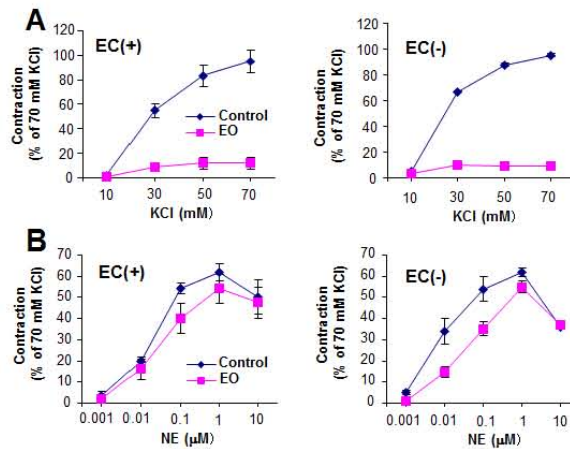


그림 1-25. 폐동맥 수축에 미치는 수용성 EO의 영향. A, KCl에 의한 수축. B, NE에 의한 수축.

㉠ 고농도 KCl 또는 NE 에 의해 유도되는 수축에 대한 carvacrol 효과

- KCl (10-70 mM) 에 의한 혈관평활근 수축은 Carvacrol에 처리에 의해 내피존재조건에서 다소 억제되는 경향을 보였으나 내피부재하에서는 영향을 나타내지 않음 (그림 1-26A).

- Carvacrol처리 후 NE (0.001-10 μM)에 의해 유도된 혈관 수축은 내피부재조건에서 수축을 약간 억제하는 효과를 나타내었으나, 내피존재하에서는 최대농도에서 가벼운 억제경향을 보임(그림 1-26B).

- 이들 결과는 대동맥에서처럼 수용성 EO가 Carvacrol 비해 폐동맥에서도 강한 혈관 수축 억제능을 가질 가능성을 시사함.

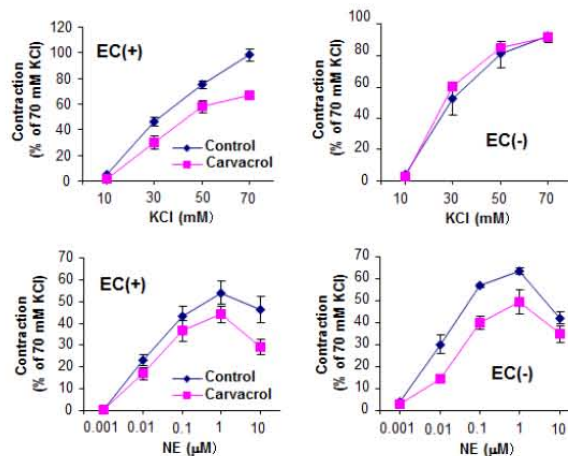


그림 1-26. 폐동맥 수축에 미치는 Carvacrol의 의 영향. A, KCl에 의한 수축. B, NE에 의한 수축.

㉡ 혈관 이완능에 대한 효과.

㉠ ACh으로 유도되는 내피의존성 혈관이완에 미치는 영향: 저농도(0.01-1 μg/ml) 수용성 EO로 처리 한 혈관에서 Ach에 의해 발생하는 내피의존성이완을 검토한 바, 비 처리 혈관에 비해 변화를 나타내지 않음 (그림 1-27).

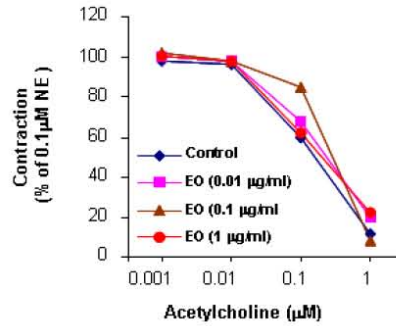


그림 1-27. 폐동맥의 Ach에 의해 유도되는 내피의존성 이완에 대한 수용성 EO의 효과.

㉔ 내피존재하 (내피 의존성)에서의 혈관이완 변화

- 수용성EO는 농도 의존적으로 KCl (35 mM) 및 NE (0.1 μM)에 의해 자극된 수축을 이완시킴 (그림 1-28A).
- 이에 반해, Carvacrol은 KCl로 유도된 수축에 영향을 주지않는 것으로 관찰됨(그림 1-28B).
- 이상의 결과는 수용성 EO는 내피의존적인 이완능 효과가 Carvacrol 보다 더욱 효과적일 가능성을 시사함.

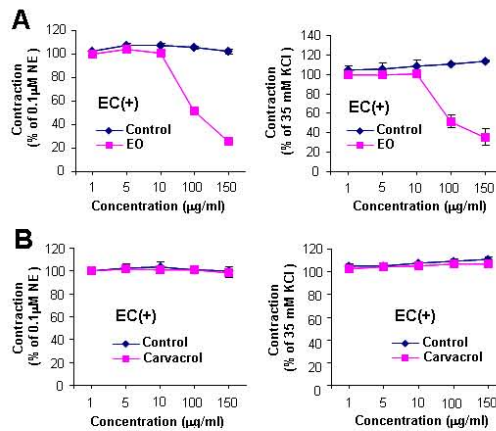


그림 1-28. 내피의존성 폐동맥이완에 대한 수용성 EO (A) 및 Carvacrol (B)의 효과.

㉕ 내피 부재하 (독립성)에서의 혈관이완 변화

- 내피가 제거된 혈관조직을 NE (0.1 μM) 및 KCl (35 mM)로 수축을 유도한 후, 수용성 EO를 농도별로 자극하여 이완정도를 분석함.
- 수용성 EO는 KCl 및 NE로 발생된 수축을 농도 의존적으로 감소시킴 (그림 1-29A).
- 그러나 Carvacrol은 KCl 및 NE로 유도된 수축에 어떤 효과도 나타내지 않음 (그림 1-29B).
- 이상의 결과는 대동맥에서처럼 폐동맥에서의 내피 독립적 이완에 대한 수용성 EO의 효과가 Carvacrol 보다 효과적인 것임을 시사함.

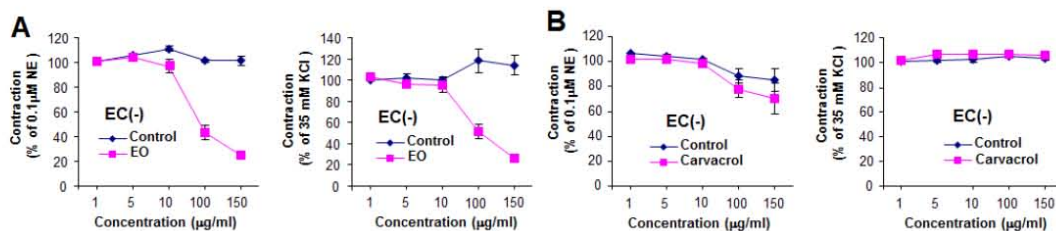


그림 1-29. 내피독립성 폐동맥이완에 대한 수용성 EO (A) 및 Carvacrol (B)의 직접자극 효과.

(3) 혈관의 수축성 및 고혈압 발생에 영향을 주는 인자에 대한 수용성 EO의 효과

(가) 내피세포에서의 NO 생성량 및 NOS 발현에 미치는 영향

① NO 생성에 대한 효과: 그림 29에서처럼, 염증사이토 카인 (TNF-α)에 의해 유도되는 NO생 산이 수용성 EO처리에 의해 감소되는 경향을 나타냄. 또한 Carvacrol 처리는 수용성EO와 비 슷한 효과를 나타냄 (그림 1-30).

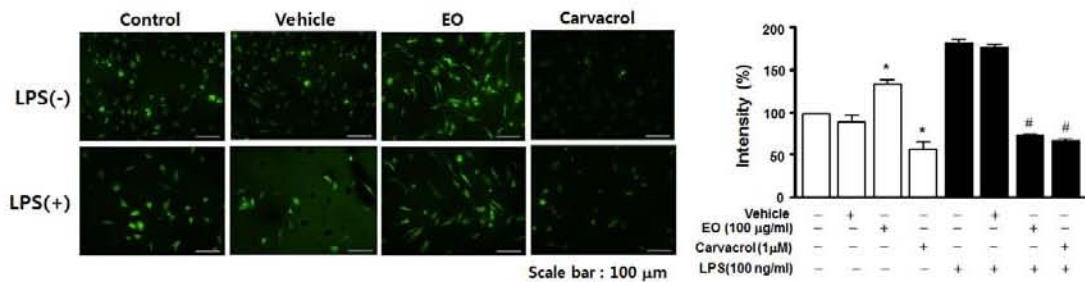


그림 1-30. 혈관 내피세포에서의 NO 생산에 대한 수용성 EO (A) 및 Carvacrol (B)의 효과.

② NOS 발현에 대한 효과: LPS로 유도된 NOS (eNOS, iNOS)의 증가된 발현은 수용성 EO의 처리에 의해 감소되는 경향을 보임 (그림 1-31). 게다가 Carvacrol 처리 또한 비슷하게 NOS발 현을 감소시키는 효과를 나타냄 (그림 1-31).

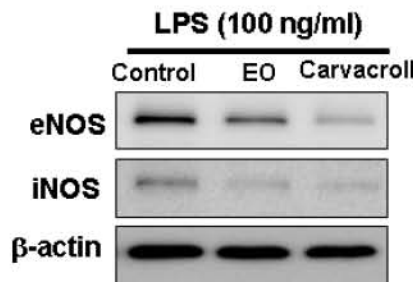


그림1-31. 혈관 내피세포에서의 NOS (eNOS, iNOS)의 발현에 대한 수용성 EO 및 carvacrol의 효과

(나) 심혈관계질환 관련 산화스트레스연관 단백질 발현에 대한 효과

① 혈관내피에서의 연관 단백질 발현에 대한 효과: TNF-α에 의해 유도되는 Ref-1, DJ-1 및 PRR 단백질의 증가된 발현은 수용성EO처리에 의해 감소되는 경향을 나타냄 (그림 1-32A). 이 와 비슷한 반응이 Carvacrol 처리에 의해서도 관찰됨 (그림 1-32A).

② 심근세포에서의 단백질 발현에 대한 효과: TNF-α에 의해 유도되는 Ref-1, Prx3, DJ-1의 발 현증가는 수용성 EO처리로 약화되지만, PRR의 발현에는 억제효과를 나타내지 못하는 것으로 관찰됨 (그림 1-32B). 이와 비슷한 효과가 Carvacrol 처리에 의해서 유도되는 것으로 관찰됨 (그림 1-32B).



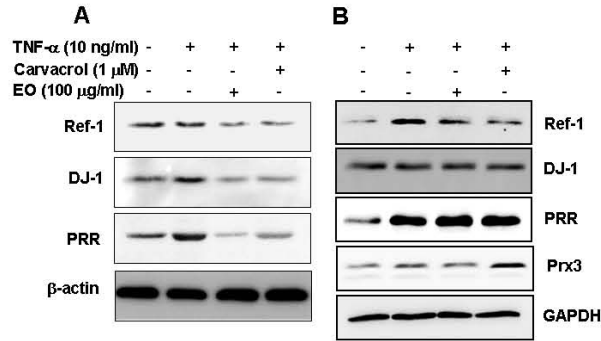


그림 1-32. 내피세포(A) 및 심근세포 (B)에서의 고혈압관련 단백질 발현에 대한 수용성 EO 및 carvacrol의 효과.

③ 신장세포에서의 관련 factor에 대한 효과: 상기에서 관찰된 결과에서처럼 심혈관질환(동맥경화 및 고혈압)과 관련된 전섬유화인자 (profibrotic gene)들인, Collagen type 1, Fibronectin 1, PAI-1의 angiotensin 2 (Ang II)에 로 자극된 신장세포에서 유도된 전섬유화인자 Collagen type 1, Fibronectin 1, PAI-1의 angiotensin 2에 의한 발현증가는 수용성 EO 처리에 의해 모두 약화되나, TGF-β의 발현은 다소 증가하는 경향으로 나타남 (그림 1-18 참조).

④ 혈관평활근세포에서의 관련 단백질 발현에 대한 효과: PDGF 및 Ang II 에 의해 유도되는 Ref-1, PRR 및 DJ-1의 발현증가가 수용성EO의 처리농도 의존적 또는 비의존적인 반응을 보였으나, 대체적으로 농도가 높아짐에 따라 그들의 발현정도가 감소되는 경향을 나타냄(그림 1-33). 그러므로 이들 결과들은 수용성EO는 고혈압관련 단백질의 인자의 발현을 감소시키는 positive 능력을 가질 가능성을 시사함.

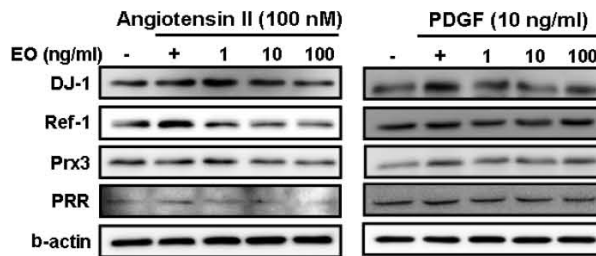


그림 1-33. 혈관평활근세포에서의 고혈압관련 단백질 발현에 대한 수용성EO의 효과.

## 2. 산국 EO로부터 분리된 순수성분의 혈관기능연구

가. 혈관질환 관련기능에 대한 산국 EO로부터 분리된 순수성분의 효과

### (1) 방법

(가) 산국 EO 성분의 순수분리 및 monoterpine과 single compounds의 확보

본 연구진은 예비실험에서 보여진 것처럼 GS/MS를 이용하여 EO를 분석한 바, camphor (17.42%), β-cubebene (16.20%), piperitone (5.72%), β-thujone (5.15%), caryophyllene (4.70%), 1R-α-pinene (4.12%), camphene (3.75%), bicyclo[3.1.1]heptane,6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S) (2.62%), β-mycene (2.06%), and sabinene (1.97%) 등을 포함하여 총 42가지의 성분이 분석됨. 이중 일부 성분은 산국 EO로부터 분리 정제하여 사용하였으며, 또한 일부 물질은 경제성 및 물질의 함량 등을 고려해서 구입하여 사용함. 관련실험을 위해 분석된 성분 중 혈관기능이 명확하지 않은 성분 17가지 (monoterpine, 15종; sesquiterpene, 2종)를 선택하여 본 연구를 수행함

(그림 2-1).

	Compound name	CAS No.	확보방법
1	Camphor	000076-22-2	분리/구입
2	Camphene	000079-92-5	분리/구입
3	Caryophyllene	000087-44-5	구입
4	1-Phellandrene	000099-83-2	구입
5	$\gamma$ -Terpinene	000099-85-4	구입
6	$\alpha$ -Terpinene	000099-86-5	구입
7	$\beta$ -Myrcene	000123-35-3	분리/구입
8	$\alpha$ -Thujone	000546-80-5	분리/구입
9	4-Terpineol	000562-74-3	구입
10	Caryophyllene oxide	001139-30-6	구입
11	Sabinene	003387-41-5	구입
12	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)	018172-67-3	구입
13	Piperitone	000089-81-6	구입
14	Thymol	000089-83-8	분리/구입
15	Cuminic aldehyde	000122-03-2	구입
16	$\alpha$ -Terpinolene	000586-62-9	구입
17	1R- $\alpha$ -Pinene	007785-70-8	구입

그림 2-1. 산국 EO 성분의 순수분리 및 monoterpene과 single compounds 확보 내역

#### (나) 대동맥혈관 평활근 조직 및 세포의 확보

Rat으로 부터 흉부대동맥을 분리한 후 조직 또는 collagenase 및 elastase등의 효소를 이용하여 분리한 혈관 평활근세포를 각 관련실험을 위해 사용함.

#### (2) 결과

##### (가) 동맥경화관련 반응에 대한 산국 EO 순수성분의 효과 검증

준비된 산국 EO성분의 동맥경화관련 반응에 대한 효과를 알아보기 위해 혈관평활근세포를 이용하여 migration (이동) 및 proliferation(증식)등을 포함한 동맥경화발생과 연관된 반응들을 관찰함.

##### ① 혈관평활근세포에 대한 안정성 검정

- 17가지 산국 EO 순수성분의 혈관평활근세포에 대한 안정성검사를 위하여 혈관평활근세포에 산국 EO성분 (농도 1mM)을 처리한 후 세포 생존능 (viability)을 분석함.

- 이들 성분 중 Cuminaldehyde 및 alpha-Pinene은 50% 미만의 생존능이 나타남. 또한 80% 이상 생존능을 보인 성분들은 Camphor, Camphene, Terpinolene, beta-Pinene의 monoterpene류이었음. 이들 순수성분 중 Camphor 및 Terpinolene은 생존능이 거의 100%인 것으로 관찰됨 (그림 2-2).

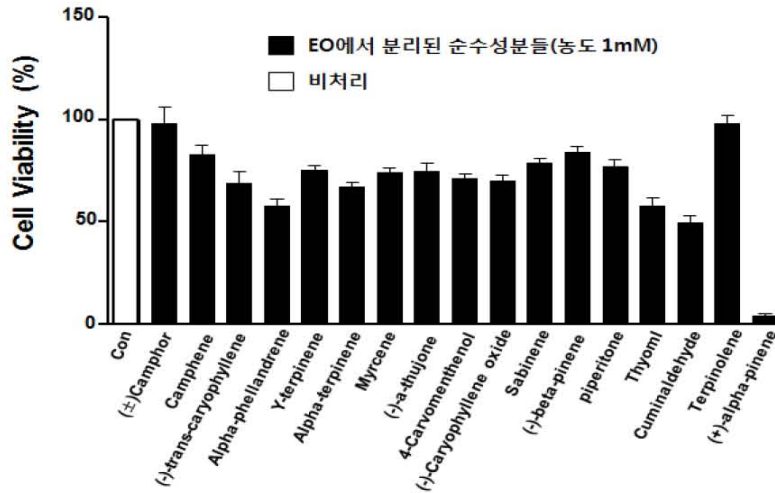


그림 2-2. 산국 EO 순수성분을 처리한 혈관평활근세포의 viability변화 각성분의 처리농도는 1 mM.

② 혈관평활근세포의 증식 및 이동에 대한 산국 EO 순수성분의 효과

- 안정성검사의 결과를 바탕으로 동맥경화 형성과정과 밀접히 관련된 혈관평화근세포의 증식 및 이동에 대한 EO 순수성분 (1 mM)의 영향을 관찰함. 혈관평활근세포의 두반응의 대표적인 자극제로는 PDGF (10 ng/ml)를 사용함.

㉞ 혈관평활근 세포의 증식에 대한 검토

㉞ 80% 이상의 세포생존능 효과를 가진 산국 EO 순수성분의 반응: 80% 이상의 세포생존능을 발휘한 4가지 EO 순수성분 중 Camphor는 PDGF로 유도한 혈관평활근세포의 증식에 영향을 나타내지 않았으나, 나머지 3성분 (camphene, Terpinolene, beta-Pinene)은 모두 PDGF로 자극된 증식을 억제하는 경향을 나타냄. 특히 Terpinolene 및 beta-Pinene은 강한 억제효과를 나타내는 것으로 관찰됨 (그림 2-3).

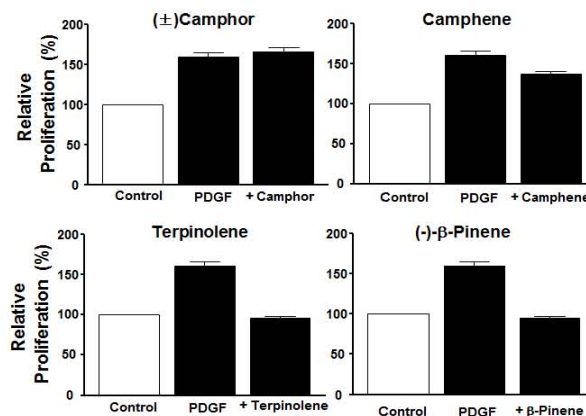


그림 2-3. 80%이상 세포 생존능 효과를 가진 산국 EO 순수성분들의 PDGF 로 발생한 혈관평활근세포 증식에 대한 효과.

㉞ 70% 이상 - 80% 미만 세포생존능 효과를 가진 산국 EO 순수성분의 반응: alpha-Thujone을 제외한 7가지 (trans-Caryophyllene, gamma-Terpene, Myrcene, Carvomenthenol, Caryophyllene oxide, Sabinene, Piperitone) 모든 산국 EO 순수성분은 PDGF로 유도한 혈관평활근세포의 증식에 대해 정도 차이는 있으나 억제효과의 경향을 나타냄. 이들 성분들 중 monoterpene류에

서 Sabinene, Piperitone,  $\gamma$ -Terpinene 및 Myrcene는 비슷한 정도의 강한 억제 효과를 나타내었으며, Sesquiterpene류에서는 Caryophyllen oxide가 가장 큰 억제효과를 발휘하는 것으로 관찰됨 (그림 2-4).

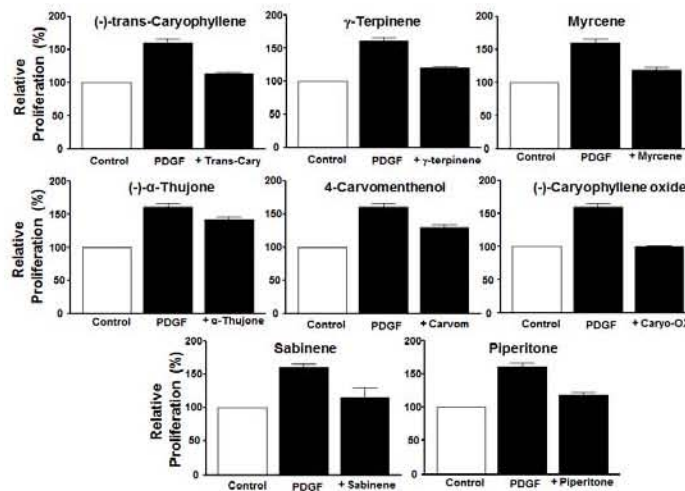


그림 2-4. 70%이상-80%미만의 세포생존능을 가진 산국 EO 순수성분 들의 PDGF로 발생한 혈관평활근세포 증식에 대한 효과.

㉔ 70% 미만 세포생존능 효과를 가진 산국 EO 순수성분의 반응: monoterpene류인 5가지 산국 EO 순수성분(Phellandrene,  $\alpha$ -Terpinene, Thymol, Cuminaldehyde,  $\alpha$ -pinene)은 PDGF로 자극된 평활근세포의 증식을 모두 억제시켰음. 이들 억제효과의 정도는 5가지 모두 비슷한 경향을 나타냄 (그림 2-5).

-이상의 세포독성 및 증식실험 결과로부터 혈관평활근세포에 대한독성이 없으면서도 세포증식을 억제시키는 산국 EO의 순수성분은  $\alpha$ -Terpinen일 것으로 시사됨.

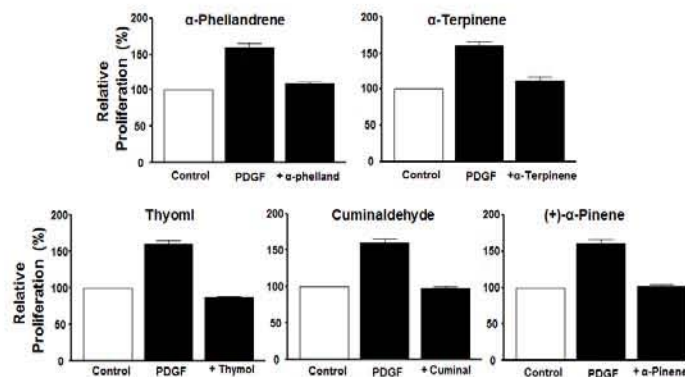


그림 2-5. 70미만의 세포생존능을 가진 산국 EO 순수성분 들의 PDGF로 발생한 혈관평활근세포 증식에 대한 효과.

㉕ 혈관평활근 세포의 이동에 대한 검토

㉕ 80% 이상의 세포생존능 효과를 가진 산국 EO 순수성분의 세포이동에 대한 반응: 80% 이상의 세포생존능을 발휘한 4가지 산국 EO 순수성분 (1 mM)들 중 Camphor 및 Terpinolene이 PDGF (10 ng/ml)로 유도된 혈관평활근세포의 이동을 다소 억제 시키는 경향을 나타내었으며, 다른 성분들은 PDGF에 의해 유발된 증식에 거의 영향을 나타내지 않았음 (그림 2-6).



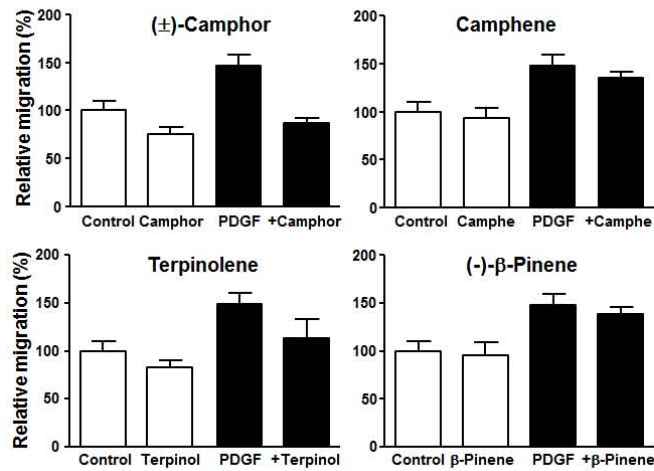


그림 2-6. 80%이상 세포 생존능 효과를 가진 산국 EO 순수성분들의 PDGF로 발생한 혈관평활근세포 이동에 대한 효과.

㉔ 70 이상 - 80%미만 세포생존능효과를 가진 산국 EO 순수성분의 세포이동에 대한 반응: 그림 2-7에서처럼 PDGF (10 ng/ml)에 의해 발생하는 혈관평활근세포 이동은 각 1 mM 농도의 alpha-Thujone, trans-Caryophyllene, gamma-Terpene, 4-Carvomenthenol, Caryophyllene oxide 및 Sabine 등의 처리에 의해 영향을 받지 않았음. 한편, monoterpene류인 Piperitone 및 Myrcene 은 PDGF에 의해 유도되는 혈관평활근세포 이동을 약하게 억제하는 경향을 나타냄 (그림 2-7).

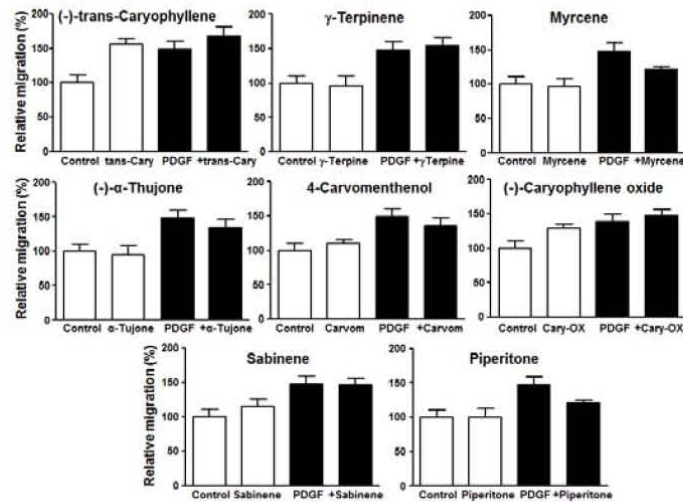


그림 2-7. 70이상-80미만의 세포생존능을 가진 산국 EO 순수성분들의 PDGF로 발생한 혈관평활근세포 이동에 대한 효과.

㉕ 70% 미만 세포생존능 효과를 가진 산국 EO 순수성분의 세포이동에 대한 반응: alpha-Phellandrene, alpha-Terpinene, Thymol, Cuminaldelyde, alpha-pinene등 monoterpene 류의 5가지 산국 EO 순수성분은 PDGF자극에 의해 유도되는 혈관평활근세포의 이동에 영향을 주지 않았음 (그림 2-8).

㉖ 결론 : 이상의 세포이동 실험 결과로부터 PDGF로 자극된 혈관평활근세포의 이동에 억제경향을 나타내는 산국 EO의 순수성분은 Camphor, Terpinolene, Myrcene등의 monoterpene류인

것으로 확인됨.

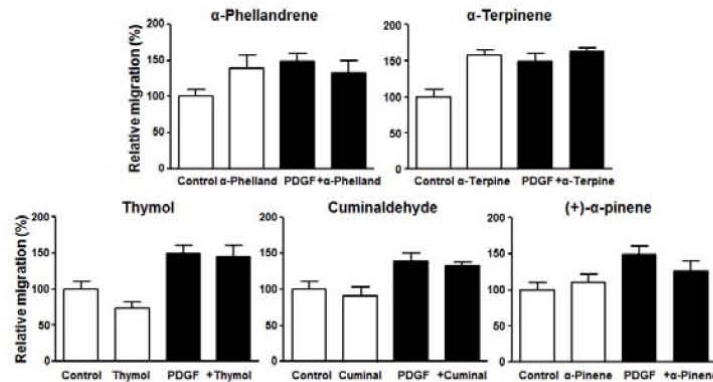


그림 2-8. 70미만의 세포생존율을 가진 산국 EO 순수성분 들의 PDGF로 발생한 혈관평활근세포 이동에 대한 효과.

### ③ 동맥경화 동물모델을 이용한 *in vivo* 혈관신생내막 형성에 대한 산국 EO 순수성분의 효과 검증

- 이상의 혈관평활근세포의 세포생존율, 증식 및 이동의 연구결과를 고려하면, 세포생존율등에 영향을 거의 주지 않고 혈관 평활근세포증식을 강하게 억제시킨 **monoterpene류**의 산국 EO 순수성분인 **Terpinolene**이 동맥경화 활성화에 영향을 미칠 것으로 예측됨.
- 이에, *in vivo* 상태에서 동맥경화활성에 대한 **Terpinolene**의 *in vitro* 효과를 보다 명확하게 확인하기위하여 동맥경화 동물모델을 이용하여 혈관에서의 유발된 동맥경화 **neointima** (신생내막) 형성에 대한 **Terpinolene** 투여 효과를 확인함. 그림 2-9에서 알 수 있듯이, 50 및 100 mg/kg BW/day의 **Terpinolene**을 처리한 동맥경화 모델 동물의 혈관 신생내막형성은 비처리 동맥경화 모델동물에 비해 억제하는 경향을 나타냄 (그림 2-9).

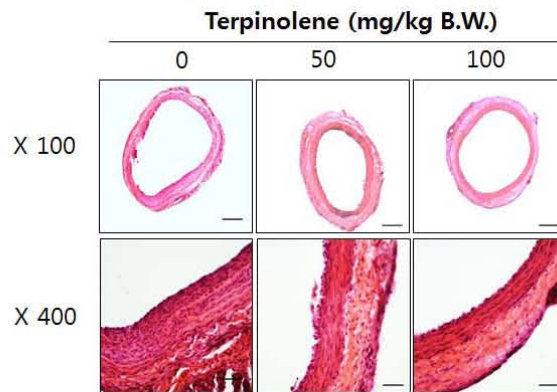


그림 2-9. 동맥경화 동물모델의 혈관 신생내막 형성에 대한 Terpinolene의 효과. Scale bar.=20 μm; 확대율, x100, x400

- 또한, 혈관평활근세포에 세포독성을 유발하고, 혈관혈활근세포의 증식을 약하게 억제하며, 세포이동에 영향을 주지않은 **monoterpene류**인 **Sabinene**은 동맥경화 모델 동물의 혈관 신생내막형성에 영향이 없거나 다소 증가시키는 경향이 관찰됨 (그림 2-10).
- 이들 결과는 산국 EO 성분인 **monoterpene류 Terpinolene**은 동맥경화과정에서 생성되는 **neointima**의 형성을 억제하는 기능을 나타내는 것으로 보아 동맥경화 억제 물질로서의 역할이



예상됨.

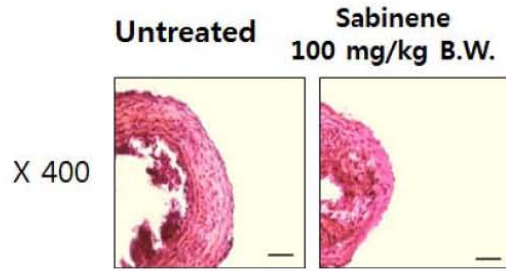


그림 2-10. 동맥경화 동물모델의 혈관 신생내막의 형성에 대한 Sabinene의 영향. Scale bar, 20  $\mu$ m; 확대율, x400

(나) 고혈압관련 혈관반응에 대한 산국 EO 순수성분의 효과 검증

- 상기 산국 EO 순수성분을 이용하여 혈관평활근세포의 proliferation 과 migration 및 동맥경화시의 동맥경화 반 (neointima)에 대한 이들 성분의 효과분석연구를 통해 동맥경화에 대한 영향을 검토하였음. 다음으로 동맥경화 이외에도 중요한 심혈관계 질환인 고혈압에 대한 산국 EO 순수성분의 효과를 검토하기 위하여 고혈압조절과 밀접한 관련이 있는 혈관 평활근의 수축 및 이완의 정도를 분석함.

① 혈관수축/이완능에 대한 산국 EO의 효과 분석

- 혈관평활근은 혈관내피세포와 더불어 혈압조절과 관여하며, 혈관평활근의 수축성 변화는 혈관내피세포와 더불어 혈압조절에 밀접한 관련을 가지는 것으로 알려져 있음. 이에, 폐성 고혈압의 혈관 평활근수축성에 대한 산국 EO 순수성분의 효과를 검토하기 위하여 내피존재 및 부재 하에서의 신선한 혈관 특히 폐동맥 (일부실험에서 대동맥) 조직샘플을 이용하여 혈관의 수축 및 이완능 실험을 수행함. 본 실험을 위하여 대표적인 혈관 평활근 수축자극제인 Endothelin-1 (ET-1), NE, Histamine (5-HT) 및 고농도 Cl을 사용 하였으며, 대표적인 내피 의존적 혈관 평활근이완제인 ACh를 사용하여 혈관의 수축/이완능에 대한 산국 EO 순수성분의 효과를 관찰함.

② 혈관 안정장력(resting tension)에 대한 효과

- 폐로부터 분리된 폐동맥을 내피 존재 및 부재하에서 혈관평활근 안정장력에 대한 산국 EO처리 효과를 관찰함.  
 - 내피존재 및 부재하의 폐동맥 평활근의 안정장력은 산국 EO 처리에 의해 가볍게 약화되는 경향을 나타냈으며, 특히 내피 존재하에서 더욱 약화되는 경향이 관찰됨 (그림 2-11).  
 - 이결과로부터 산국 EO가 혈관내피 존재 시 혈관안정장력을 더 강하게 감소시키는 산국 EO의 순수성분을 포함하고 있을 가능성을 제시함.

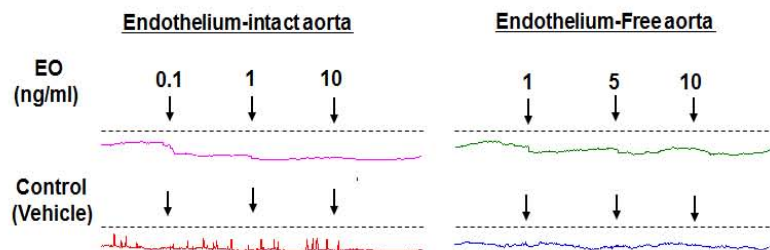


그림 2-11. 폐동맥의 안정장력에 대한 산국 EO 처리 효과. 좌측: 내피존재. 우측: 내피 부재

㉔ 혈관 수축력에 대한 효과

㉔ agonist ET-1 반응: 우선 폐동맥에 있어서 ET-1 (0.001 - 0.1  $\mu\text{M}$ )에 의해 발생하는 혈관수축에 대한 산국 EO의 효과를 분석함. ET-1은 농도 의존적으로 내피 부재 또는 존재하의 혈관수축을 증가시켰으며, 이들 수축은 산국 EO (10 ng/ml)의 처리에 의해 강하게 억제되는 경향을 나타냄 (그림 2-12).

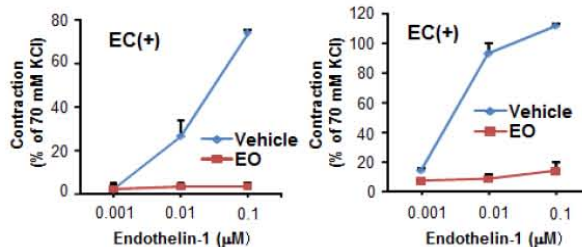


그림 2-12. ET-1에 의한 폐동맥 수축에 미치는 산국 EO의 효과. EC(+), 내피존재; EC(-), 내피부재

㉔ Agonists, NE 및 5-HT 반응: 대동맥에서의 NE (0.001-10  $\mu\text{M}$ ) 및 5-HT (0.001-10  $\mu\text{M}$ )에 의해 발생하는 수축의 정도에 대한 산국 EO의 효과가 분석됨. 5-HT에 의한 내피존재 및 부재하의 혈관수축의 증가는 산국 EO처리에 의해 감소되었으며, NE에 의해 증가된 혈관수축 또한 EO에 의해 크게 억제되는 경향을 나타냄 (그림 2-13).

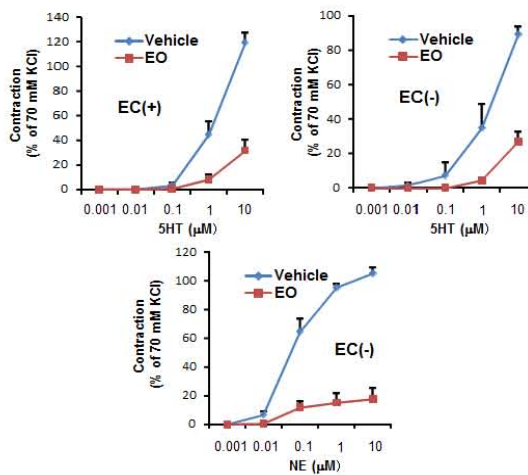


그림 2-13. ET-1에 의한 폐동맥 수축에 미치는 산국 EO의 효과. EC(+), 내피존재; EC(-), 내피부재

㉔ 이들 결과로부터 산국 EO는 혈관 수축에서 agonist에 의한 수축을 내피의 존재/부재와 관계없이 모두 억제하는 기능을 가지며, 이EO의 순수성분에 혈관수축을 억제하는 성분이 존재할 가능성이 제시됨.

㉔ 혈관 이완능에 대한 효과

㉔ ACh에 의한 내피의존성 이완 : 내피존재하의 폐동맥 및 대동맥에서 NE (0.1  $\mu\text{M}$ )를 가지고 수축을 발생 시킨 후 ACh (0.001-1  $\mu\text{M}$ ) 처리에 의해 유도되는 내피 의존성 이완반응에 대한

산국 EO 처리 효과를 분석함. 폐동맥에서는 1  $\mu\text{M}$ 의 ACh에 의한 이완반응이 1 ng/ml 및 10 ng/ml EO처리에 의해 억제되는 경향을 나타냄 (그림 2-14). 대동맥에서는 10 ng/ml EO처리에 의해 억제되는 경향을 보임.

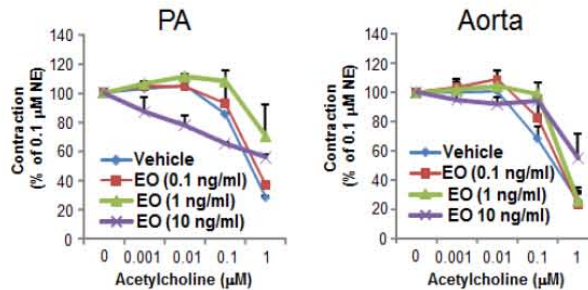


그림 2-14. 폐동맥(PA) 및 대동맥의 ACh에 의한 내피의존성 이완에 대한 산국 EO의 효과.

㉠ 내피의존성 폐동맥 이완능: 내피존재의 폐동맥조직을 NE (0.1  $\mu\text{M}$ ) 및 고농도 KCl (35 mM)로 수축을 유발시킨 후, 각 농도의 산국 EO (0.1-10 ng/ml)를 직접자극 하여 일어나는 이완반응을 분석함. EO는 NE 및 고농도 KCl로 유도된 수축을 농도 의존적으로 이완시킴 (그림 2-15).

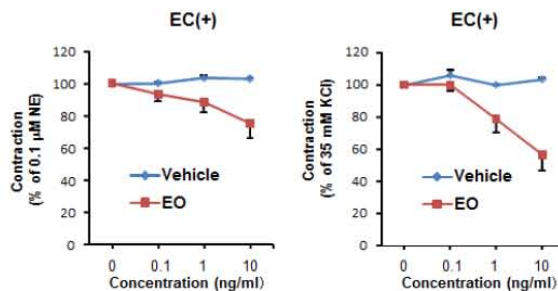


그림 2-15. 내피의존성 폐동맥 이완에 대한 산국 EO의 직접자극 효과. EC(+), 내피존재.

㉡ 내피독립성 폐동맥 이완능: 내피가 제거된 폐동맥조직을 NE (0.1  $\mu\text{M}$ ) 및 고농도 KCl (35 mM)로 수축 유발 후, 산국 EO를 농도별 (0.1-10 ng/ml)로 직접자극 하여 이완변화를 관찰함. 산국 EO는 NE 및 고농도 KCl로 발생된 수축을 농도 의존적으로 이완시킴 (그림 2-16).

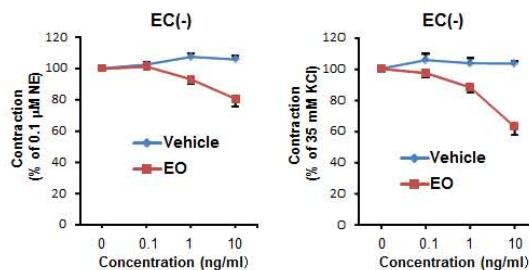


그림 2-16. 내피독립성 폐동맥 이완에 대한 산국 EO의 직접자극의 효과. EC(-), 내피부재

㉢ 상기 두 결과는 산국 EO에 의한 폐동맥 이완은 내피 존재 및 부재 두 조건 모두에서 근원



성 및 agonist성 수축의 이완억제에 영향을 주며, 산국 EO는 이들 반응과 관련된 성분을 포함할 가능성을 제시함.

㉔ 산국 EO 및 산쑥 EO의 혈관 이완능 비교

- 다른식물로부터 분리된 EO와 산국 EO의 혈관이완능정도를 비교하기 위하여 내피존제의 폐동맥에 35 mM KCl 및 0.1 μM NE을 수축시킨 후, 산국 EO (10 ng/ml) 및 산쑥으로부터 분리된 EO (산쑥 EO; 10 ng/ml)를 투여하여 이완의 정도가 비교됨.

- 그 결과, 산국 EO는 산쑥 EO에 비해 증가된 이완 효과를 나타내는 것으로 관찰됨 (그림 2-17)

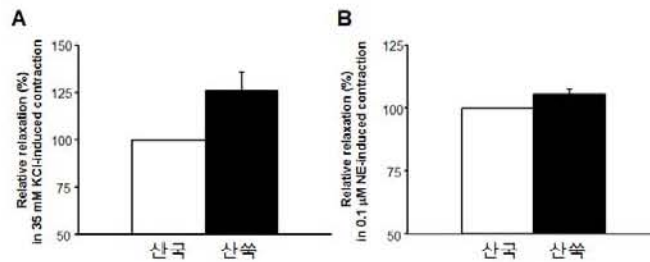


그림 2-17. 내피존제 하에서의 폐동맥 이완에 대한 산국 EO 와 산쑥 EO의 직접자극의 효과. (A) 35 mM KCl의 수축의 이완에 있어서 비교 (B) 0.1μM NE 수축에 대한 이완에 있어서의 비교

㉕ 폐동맥 수축/이완능에 대한 산국 EO 순수성분의 효과 분석

㉕ 내피의존성 및 독립성 이완에 대한 직접적인 효과

- 본 내피의존성 이완능 분석에서는 내피존제의 폐동맥조직을 NE (0.1 μM) 및 고농도 KCl (35 mM)로 수축을 유발시킨 후, 각 농도의 산국 EO 순수성분 (0.1-1000 μM)을 직접자극 하여 이완반응을 관찰하였으며, 내피독립성 이완능 분석에서는 내피가 제거된 폐동맥조직을 NE (0.1 μM) 및 고농도 KCl (35 mM)로 수축유발 후, 산국 EO 순수성분을 농도별 (0.1-1000 μM)로 직접자극 하여 이완변화를 관찰함.

㉕ gamma-Terpinene 및 alpha-Terpinene

- 내피존제하: gamma-Terpinene 및 alpha-Terpinene은 모든 처리농도에서 35 mM KCl의 수축에 대해 거의 영향을 주지 않았음. 0.1 μM NE의 수축 또한 이들 두성분에 의해 거의 영향을 받지 않았으나 1 mM gamma-Terpinene에 의해 약간의 이완효과가 나타남 (그림 2-18좌측).

- 내피부제하: 1 mM의 gamma-Terpinene 및 alpha-Terpinene은 35 mM KCl수축을 약하게 이완시켰으나, 그 외의 농도에서는 효과를 나타나지 않음. 0.1 NE수축에는 두성분이 거의 효과를 나타내지 않음 (그림 2-18우측).

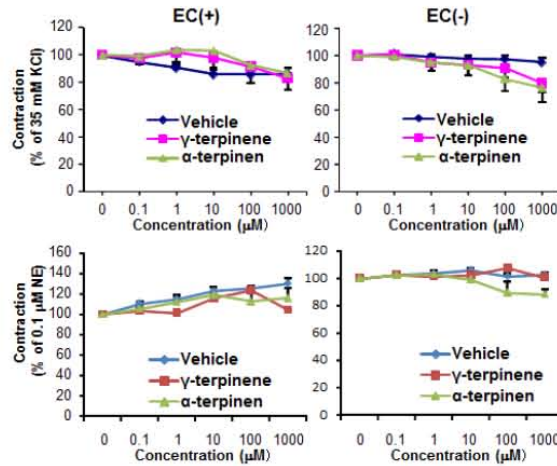


그림 2-18. gamma-Terpene 및 alpha-Terpinene의 내피 의존성 및 독립성이완효과 분석. EC(+), 내피존재: EC(-).내피부재

### ㉠ Caryophyllene oxide 및 Myrcene

- 내피존재하 : Myrcene은 35 mM KCl의 수축에 대해 거의 반응을 나타내지 않았으나, 100 μM 및 1000 μM의 농도의 Caryophyllene oxide는 35 mM KCl의 수축을 크게 이완시키는 경향을 나타냄. 0.1 μM NE수축은 Caryophyllene oxide 및 Myrcene에 의해 거의 영향을 받지 않는 것으로 관찰됨 (그림 2-19좌측).

- 내피부재하: 35 mM KCl수축은 Myrcene의 모든 농도에 의해 영향을 받지 않았으며, Caryophyllene oxide에 의해 농도 의존적으로 이완되는 것이 관찰됨. 0.1 μM NE수축은 Caryophyllene oxide 및 Myrcene의 처리에 의해 영향을 받지 않음 (그림 2-19우측).

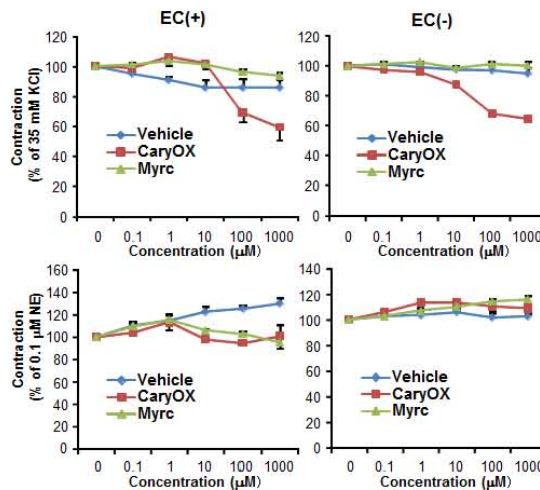


그림 2-19. Caryophyllene oxide (Cary-OX) 및 Myrcene(Myrc)의 내피 의존성 및 독립성이완효과분석. EC(+), 내피존재: EC(-).내피부재

### ㉡ Cuminaldehyde 및 Terpinolene

- 내피존재하: Cuminaldehyde 및 Terpinolene은 모든 농도에서 35 mM KCl의 수축에 대해 거의 영향을 주지 않았음. 0.1 μM NE수축 또한 Cuminaldehyde 및 Terpinolene처리에 의해 변화를 나타내지 않음 (그림 2-20 좌측).

- 내피부재하: Cuminaldehyde 및 Terpinolene은 거의 모든 농도에서 0.1 μM NE 수축 및 35

mM KCl 수축에 대해 거의 영향을 주지 않는 것으로 관찰됨 (그림 2-20 우측).

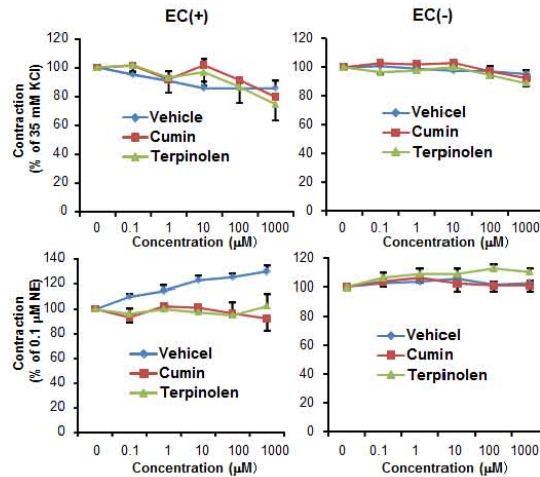


그림 2-20. Cuminaldehyde (Cumin) 및 Terpinolen의 내피 의존성 및 독립성 이완효과 분석. EC(+), 내피존재; EC(-), 내피부재

### ㉔ alpha-Pinene 및 beta-Pinene

- 내피존재하: 35 mM KCl 수축은 alpha-Pinene 및 beta-Pinene에 의해 다소 수축이 발생됨. 0.1 μM NE 수축은 alpha-Pinene 및 beta-Pinene의 처리에 의해 영향을 받지 않았음 (그림 2-21 좌측).
- 내피부재하: 35 mM KCl 수축에 대해 beta-Pinene 은 아니지만 alpha-Pinene은 농도 의존적으로 약간의 이완효과를 나타내었음. 한편, alpha-Pinene 및 beta-Pinene은 거의 모든 농도에서 0.1 μM NE 수축에 대해 더욱 작은 수축을 발생시켰음 (그림 2-21우측).

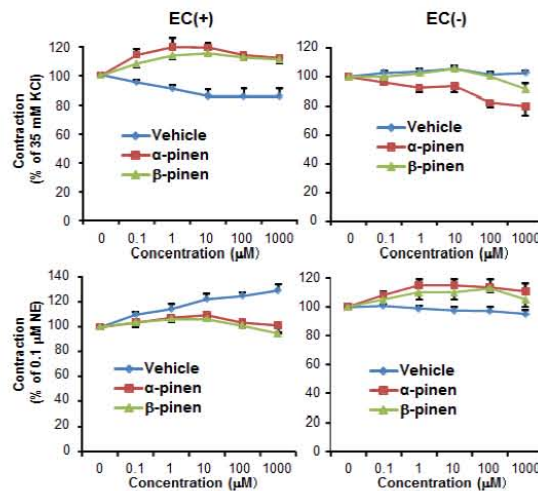


그림 2-21. alpha-Pinene 및 beta-Pinene 의 내피 의존성 및 독립성 이완 효과분석. EC(+), 내피존재; EC(-), 내피부재

### ㉕ alpha-Thujone 및 4-Carvomenthenol

- 내피존재하: alpha-Thujone 및 4-Carvomenthenol은 모든 농도에서 35 mM KCl에 의한 수축 및 0.1 μM NE 수축에 대해 거의 영향을 주지 않았음 (그림 2-22좌측).
- 내피부재하: 35mM KCl 수축에 대해 alpha-Thujone은 거의 영향을 주지 않았으나, 4-Carvomenthenol은 1 mM 농도에서 이완반응을 발생시킴. 0.1 μM NE에 의한 수축은 alpha-Thujone 및 4-Carvomenthenol 의 1 mM 농도에서 약간의 이완 효과를 나타내는 것으로



관찰됨 (그림 2-22우측).

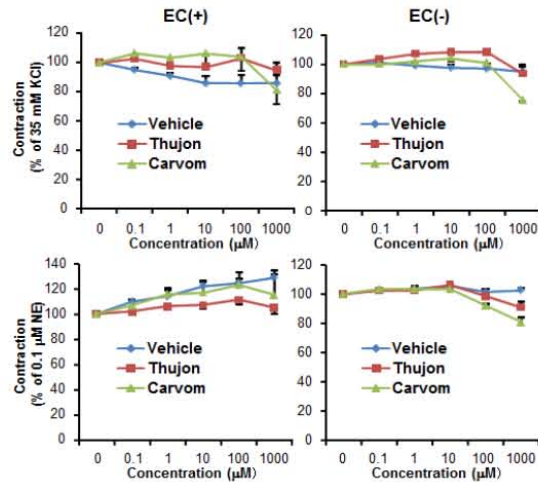


그림 2-22. alpha-Thujone (Thujone) 및 4-Carvomentheneol (Carvom)의 내피 의존성 및 독립성 이완효과분석. EC(+), 내피존재: EC(-), 내피부재

㉠ Sabinene 및 Piperitone

- 내피존재하: Sabinene은 모든 농도에서 35 mM KCl 수축에 거의 영향을 주지 않았고, Piperitone은 1 및 10 μM농도에서 약간의 수축증가를 발생시키며 1 mM 농도에서 강력한 이완효과를 나타냄. 0.1 μM NE수축은 Sabinene에 의해 1 및 10 μM농도에서 약간의 이완효과를 나타내었으며, 1 mM 농도에서 가벼운 수축을 발생시킴. 한편 Piperitone은 1 mM농도에서 다소 큰 이완효과를 나타냄 (그림 2-23좌측).

- 내피부재하: 35 mM KCl수축에서 Sabinene은 효과를 나타내지 않았으며, 1 mM Piperitone만이 이완효과를 나타내었음. 0.1 μM NE에 의한 수축은 Sabinene에 의해 약간의 이완반응이 관찰되었으나, 1 mM Piperitone농도에서는 다소 큰 이완효과를 나타냄 (그림 2-23우측).

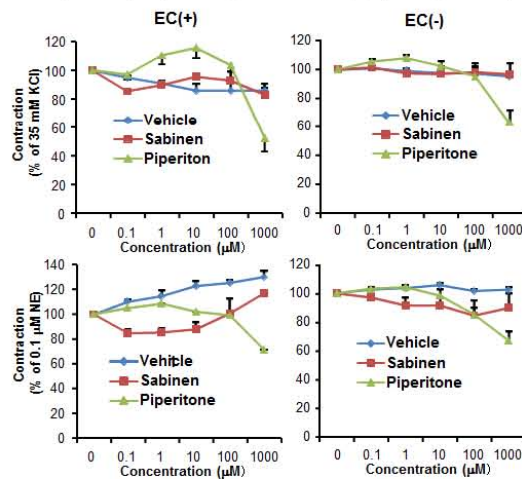


그림 2-23. Sabinene 및 Piperitone의 내피 의존성 및 독립성 이완효과분석. EC(+), 내피존재: EC(-), 내피부재

㉡ alpha-Phellandrene 및 trans-Caryophyllene

- 내피존재하: 35 mM KCl 수축에 대해 trans-Caryophyllene 은 0.1- 10 μM에서 약간의 수축증가를 발생시켰으며, 1 mM 농도에서 작은 이완효과를 나타냄. alpha-Phellandrene은 35 mM KCl 수축을 10-1000 μM농도에서 농도 의존적으로 이완시킴. 0.1 μM NE수축은 1 mM

alpha-Phellandrene에 의해 수축증가나 나타났으며, trans-Caryophyllene에 의해서는 거의 영향을 받지 않았음 (그림 2-24좌측).

- 내피부재하: alpha-Phellandrene 및 trans-Caryophyllene은 35 mM KCl수축을 농도 의존적으로 이완시켰음. 0.1 μM NE에 의한 수축은 alpha-Phellandrene에 의해 거의 영향을 받지 않았으나, trans-Caryophyllene에 의해서는 농도 의존적인 이완반응이 관찰됨(그림 2-24우측).

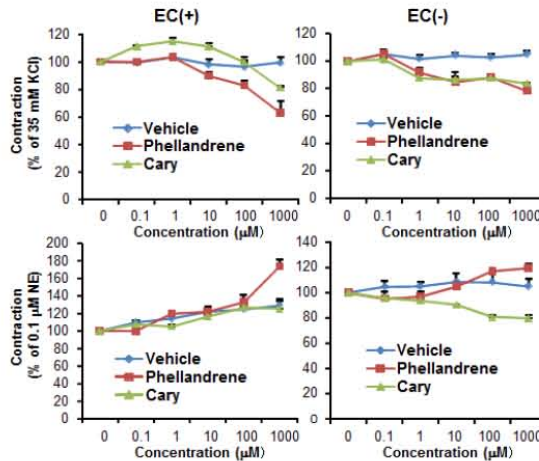


그림 2-24. alpha-Phellandrene (phellanderene) 및 trans-Caryophyllene (Cary)의 내피 의존성 및 독립성 이완 효과분석. EC(+), 내피존재: EC(-).내피부재

### ◎ Camphor 및 Camphene

- 내피존재하: Camphor 및 Camphene은 모든 농도에서 35 mM KCl에 의한 수축에 대해 거의 영향을 주지 않았음. Camphor 및 Camphene은 또한 모든 농도에서 0.1 μM NE수축에 효과를 나타내지 않았음 (그림 2-25좌측).

- 내피부재하: 35 mM KCl수축은 Camphor 및 Camphene은 농도 의존적으로 가벼운 이완을 발생시켰으나, 0.1 μM NE수축은 Camphor 및 Camphene 의해 어떤 영향도 받지 않았음 (그림 2-25우측).

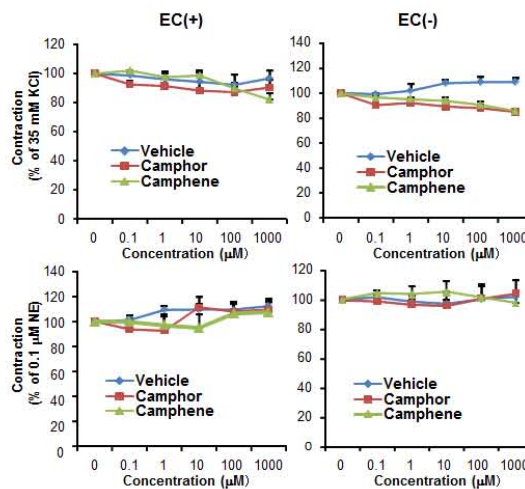


그림 2-25. Camphor 및 Camphene의 내피 의존성 및 독립성 이완효과분석. EC(+), 내피존재: EC(-).내피부재

-이상의 결과를 고려하면, 근원성 (KCl) 및 agonist (NE)에 의한 수축 모두에서 monoterpene류

인 Piperitone은 가장 강력한 이완효과를 유발하는 것으로 나타났으며, alpha-Phellandrene은 근원성 수축에서 내피의존성 및 독립성 이완을 유도하는 것으로 사료됨.

㉔ ACh에 의한 내피의존성 이완에 대한 효과

- 상기 내피의존성 및 독립성이완 연구결과를 통해 Piperitone 및 alpha-Phellandrene이 대표적인 이완효과를 나타내는 물질로 고려된 바, 다음으로 Ach에 의한 내피의존성이완에 대한 이들 두 산국 EO 성분에 대한 효과 및 다른 몇 가지 EO 성분의 효과를 검토함.

㉕ 혈관 안정장력 (resting tension)에 대한 Piperitone 및 alpha-Phellandrene의 효과

- 우선, 상기 연구결과를 바탕으로 내피 존재 또는 부재 하에서 폐로부터 분리된 폐동맥의 안정장력에 대한 monoterpenen류인 EO 순수성분인 Piperitone 및 alpha-Phellandrene의 효과를 관찰함.

- Piperitone은 내피존재 및 부재하의폐동맥의 안정장력을 농도 의존적으로 이완시킴. 한편, alpha-Phellandrene은 내피존재하의 폐동맥의 안정장력을 약하게 이완시켰으나, 내피부재하의 혈관 안정장력에는 거의 영향을 주지 않았음 (그림 2-26).

- 이결과는 Piperitone은 혈관내피부재 및 존재 관련 없이 폐동맥의 안정장력을 감소시키는 산국 EO의 순수성분일 가능성을 내포함.

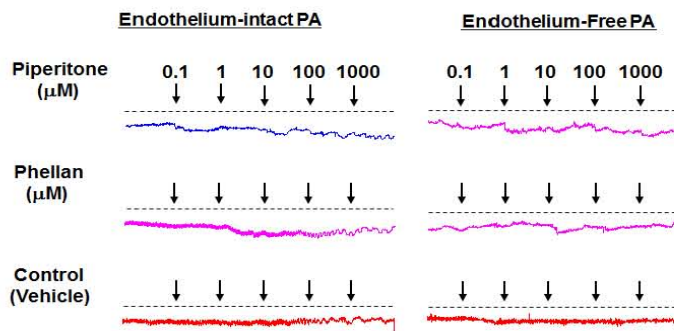


그림 2-26. 폐동맥의 안정장력에 대한 alpha-Phellandrene 및 Piperitone의 효과. PA, 폐동맥

㉖ ACh에 의한 내피의존성 이완에 대한 Piperitone 및 alpha-Phellandrene의 효과

- 1 mM alpha-Phellandrene 및 Piperitone을 처리 후 Ach에 의해 발생하는 0.1 μM NE수축의 내피 의존성 이완을 검토한 바, 1 mM alpha-Phellandrene 처리혈관은 비처리 혈관에 비해 변화를 나타내지 않음 (그림 2-27좌측).

- 반면에 1 mM Piperitone을 처리한 혈관은 ACh에 의해 발생하는 내피의존성이완을 비처리 혈관에 비해 더 큰 이완효과를 나타냄 (그림 2-27우측).

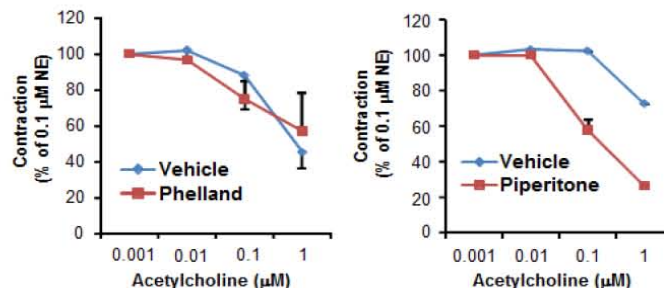


그림 2-27. 폐동맥의 Ach에 의해 유도되는 내피의존성 이완에 대한 alpha-Phellandrene (좌) 및 Piperitone (우)의 효과.



㉔ ACh에 의한 내피의존성 이완에 대한 그 외 일부 EO 순수성분의 효과

- 1 mM 농도의 Caryophyllene oxide, 4-Carvomenthenol, trans-Caryophyllene, Camphene, Camphor, alpha-Thujone, Cuminaldehyde, beta-Pinene 및 Terpinolene 등은 NE수축의 ACh에 의해 발생하는 내피의존성이완을 억제 시키거나, 또는 효과를 나타내지 않는 것으로 관찰됨 (그림 2-28).

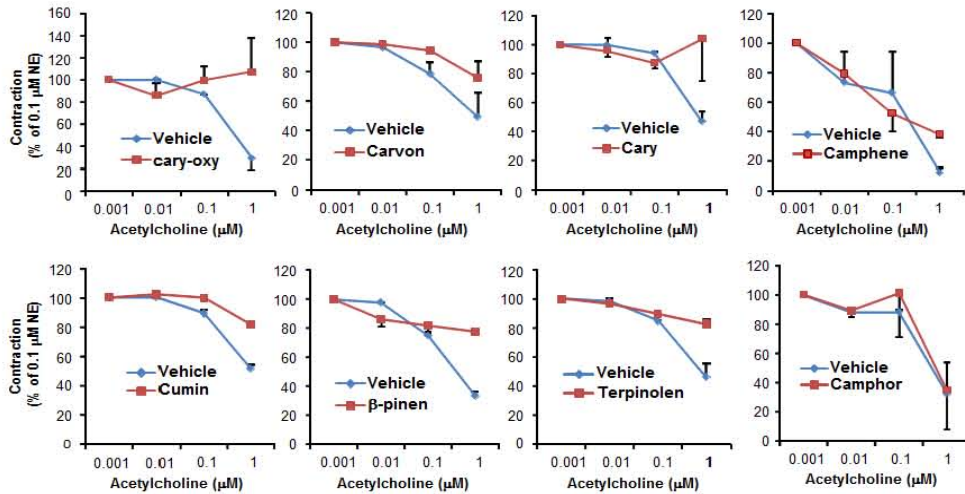


그림 2-28. 폐동맥의 ACh에 의해 유도되는 내피의존성 이완에 대한 몇가지 EO 순수성분의 효과.

㉕ 혈관 수축력에 대한 Piperitone 및 alpha-Phellandrene의 효과

- 다음으로 폐동맥에 있어서 ET-1 (0.001-0.1 μM)에 의해 발생하는 수축에 대한 monoterpen 류인 산국 EO 순수성분 Piperitone 및 alpha-Phellandrene의 효과를 검토함. ET-1은 농도 의존적으로 내피 부재 또는 존재하의 혈관들의 수축을 증가시켰으며, 이들 혈관 수축은 산국 EO 순수성분 1 mM농도의 Piperitone 및 alpha-Phellandrene의 처리에 의해 억제되는 경향을 나타냄 (그림 2-29).

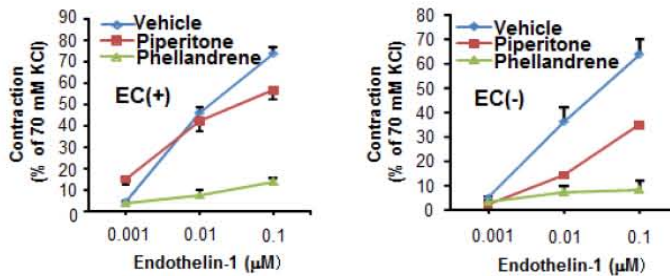


그림 2-29. ET-1에 의한 폐동맥 수축에 미치는 alpha-Phellandrene 및 Piperitone의 효과. EC(+), 내피존재; EC(-), 내피부재

㉖ Piperitone에 의한 혈관이완의 기전연구

㉗ L-NAME and indomethacin의 효과

- Piperitone에 의한 내피존재 혈관 이완에 대한 기전을 알아보기 위하여 NOS inhibitor L-NAME 및 COX inhibitor의 처리 효과를 관찰함.

- 대동맥에 있어서 piperitone에 의한 혈관이완 효과는 L-NAME 및 indomethacin 전처리에 의해 유의적으로 억제 되지 않는 경향을 보임 (그림 2-30).

- 한편, 폐동맥에 있어서는 piperitone에 의한 혈관이완 효과가 L-NAME 처리에 의해서는 영향이 없었으나, indomethacin 전처리에 의해서는 다소 piperitone이완효과를 다소 억제하는 경향을 나타냄 (그림 2-30).
- 그러므로, piperitone에 의한 혈관이완은 대동맥에서는 NOS 및 COX반응과 관련되지 않으나, 폐동맥에서는 COX와 관련될 가능성을 나타냄.

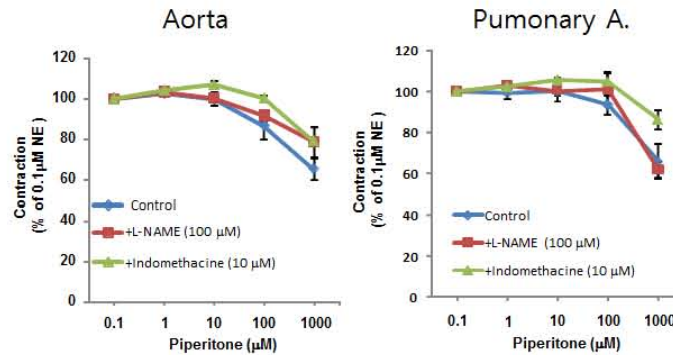


그림 2-30. Piperitone에 의한 혈관 (aorta 및 pulmonary artery)이완 효과에 대한 L-NAME 및 indomethacin의 효과.

### ㉠ SNP 의 효과

- 내피 존재 및 부재하의 폐동맥에 있어서 SNP (sodium nitropruside, NO donor)는 NE에 의해 유도된 폐동맥 수축을 농도 의존적으로 억제하였으면, 이 반응은 piperitone 처리군 및 비처리군 사이에 반응차이를 나타내지 않음 (그림 2-31).
- 그러므로, 본 결과는 piperitone은 혈관 평활근 세포막의 NO에 대한 감수성에는 영향을 주지 않음을 시사함.

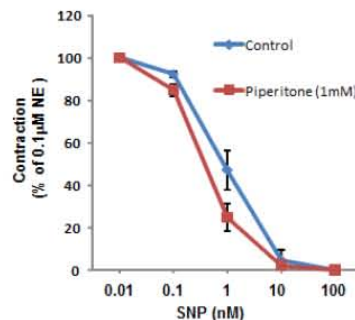


그림 2-31. SNP 의한 pulmonary artery이완에 대한 piperitone의 효과.

### ㉡ 혈관 평활근세포의 Ca<sup>2+</sup> channel에 대한 효과

- 혈관수축/이완에 대한 piperitone의 억제효과의 기전을 알아보기 위하여 patch clamp를 이용하여 Ca<sup>2+</sup> channel에 대한 piperitone의 영향을 관찰함.
- Piperitone은 농도 의존적으로 Ca<sup>2+</sup> channel을 open을 억제하는 경향을 나타냄 (그림 2-33).
- 그러므로, piperitone에 의한 혈관수축력의 억제는 Ca<sup>2+</sup> channel의 억제와 관련 될 가능성이 있을 것으로 사료됨.



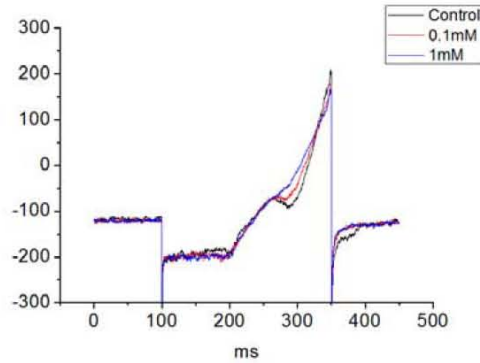


그림 2-32. 혈관 평활근세포의 칼슘이온채널에 대한 Piperitone (청색 및 적색실선) 억제 효과.

㉞ 고혈압에 대한 산국 EO 및 Piperitone의 in vivo효과 분석

- 상기 혈관의 수축/이완능의 결과를 바탕으로 산국 EO 및 monoterpene류인 산국 EO 순수성분 Piperitone과 alpha-Phellandrene이 혈압에 대해 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 고혈압모델동물을 이용하여 산국 EO 및 Piperitone을 고혈압 모델동물로 알려진 SHR에 투여 후 효과를 관찰함.
- 그림 2-32A 에서처럼, 고혈압모델동물에 산국 EO (100 및 300 mg/kg BW/day)을 투여한 바, 300 mg/kg 투여의 경우 혈압을 감소시키는 경향을 관찰 할 수 있었음. 한편 알려진(시판되고 있는) 고혈압제 captopril (300 mg/kg BW/day)은 혈압에 영향을 미치지 않음.
- 또한 산국 EO의 순수성분인 Piperitone 및 alpha-Phellandrene을 100 mg/kg BW/day의 농도로 투여 한 바, Piperitone 투여일 의존적으로 혈압이완 효과를 나타내었으나, alpha-Phyllandrene은 Piperitone보다 약한 혈압이완 효과를 나타냄 (그림 2-33B).
- 이상의 결과는 monoterpene류인 EO 순수성분 Piperitone이 혈압을 저하 시킬 수 있는 유용한 물질로서의 가능성을 제시함.

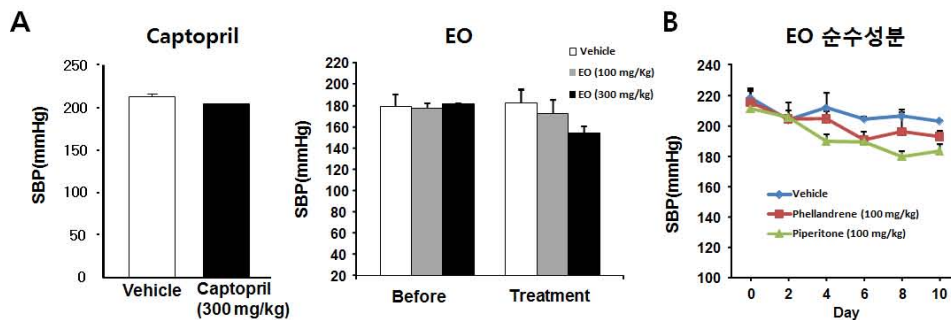


그림 2-33. 혈압에 대한 Captopril (A), 산국 EO (B) 및 산국 EO 순수성분 (C)의 효과. Before, 물질 투여전; Day, 물질 투여일

(라) 심혈관질환 (동맥경화 및 고혈압)관련 반응들에 대한 산국 EO 순수성분의 효능검토

- 혈관평활근 세포를 비롯 심장 및 신장은 동맥경화 및 고혈압등의 심혈관질환과 관련된 주요 기관들로 알려져 있음. 또한 폐조직은 폐성고혈압과 관련될 수 있음. 이에, 관련 세포들을 이용하여 이들 세포들의 심혈관질환, 특히 동맥경화 및 고혈압 관련반응factor에 대한 EO 순수성분의 효능을 검토함.

① 혈관평활근세포에서의 관련반응에 대한 산국 EO 순수성분의 효능

동맥경화질환과 밀접히 관련된 혈관평활근세포반응(apoptosis, ROS 발생)대한 산국 EO순수성분의 효과를 관찰함.

㉞ ROS생성에 대한 효과

- 분리 배양된 혈관평활근세포에서 ROS 자극제인 Ketoconazole (30  $\mu$ M) 및 Angiotensin II (100 nM)에 노출 후 유도되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발생정도에 대한 monoterpene류 EO 순수성분 (Terpinolene [1 mM] 및 beta-Pinene [1 mM])의 효과가 분석됨.

- DCF-DA염색법을 이용한 ROS 발생 분석에서, Terpinolene 및 beta-Pinene을 처리한 혈관평활근세포는 두 자극제에 의해 유도되는 ROS 발생을 억제하는 경향을 나타냄 (그림 2-34).

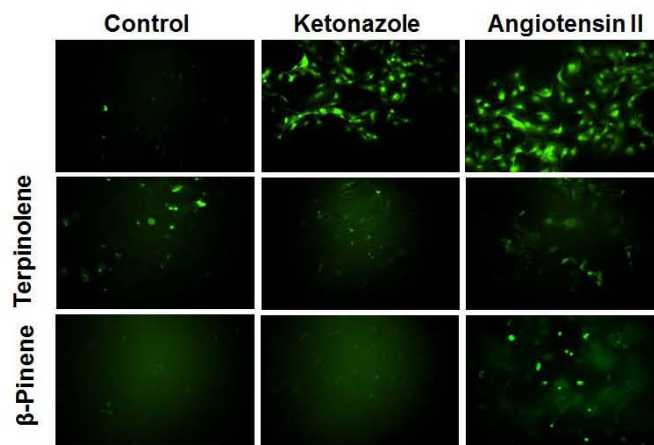


그림 2-34. 혈관평활근세포에서의 ROS 발생에 대한 산국 EO 순수성분 (Terpinolene 및 beta-pinene)의 효과. 녹색: DCF-DA양성반응세포.

㉞ Apoptosis 생성에 대한 효과

- 분리 배양된 혈관평활근세포에 Apoptosis 자극제인 Ketoconazole (30  $\mu$ M) 및 Angiotensin II (100 nM)를 처리하여 생성되는 세포의 apoptosis정도에 대한 monoterpene류 산국 EO 순수성분(Terpinolene [1 mM] 및 beta-Pinene [1 mM])의 효과를 관찰함.

- TUNNEL assay법을 이용하여 분석한 바, Terpinolene은 두 자극제에 의해 발생되는 apoptosis를 모두 억제했지만, beta-Pinene은 두 자극제에 의한 apoptosis를 억제시키지 않는 것으로 관찰됨 (그림 2-35).

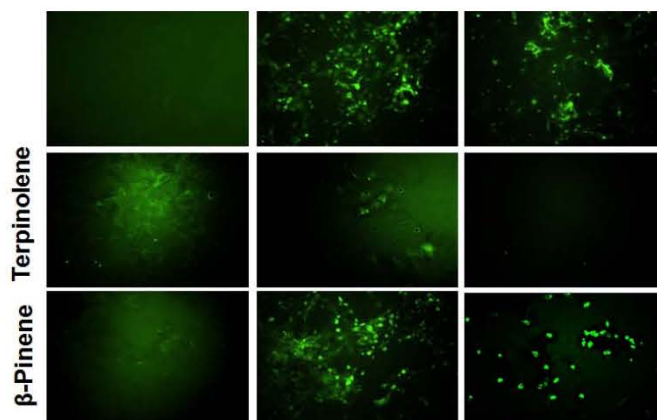


그림 2-35. 혈관평활근세포에서의 apoptosis에 대한 산국 EO 순수성분 (Terpinolene 및 beta-pinene)의 효과. 녹색:TUNNEL양성반응세포.

- 이들 결과로부터 Terpinolene은 혈관평활근세포에서의 심장세심혈관질환(동맥경화 및 고혈압)과 관련된 apoptosis 및 ROS 발생에 대해 억제효능을 나타낼 가능성이 있지만, beta-Pinene은 ROS 발생에만 효능을 발휘할 것으로 시사됨.

② 심근세포에서의 관련 반응에 대한 EO 순수성분의 효능

㉑ ROS발생에 대한 효능

- Ketoconazole(30  $\mu$ M) 및 Angiotensin II (100 nM)에 노출된 심근세포에서 유도되는 ROS 발생에 대한 EO 순수성분의 효과를 분석함.

- DCF-DA염색법을 이용하여 관찰된 두 자극제에 의해 유도된 심장세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>발생은 Terpinolene 및 beta-Pinene에 처리에 의해 다소 약화되는 경향을 보임 (그림 2-36).

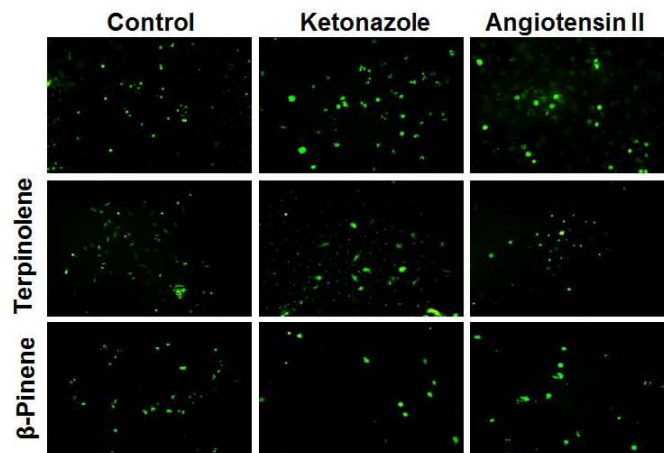


그림 2-36. 심근세포에서의 ROS 발생에 대한 산국 EO 순수성분 (Terpinolen 및 beta-pinene)의 효과. 녹색: DCF-DA양성반응세포.

㉒ Apoptosis에 대한 효능

- 심근세포에 Ketoconazole(30  $\mu$ M) 및 Angiotensin II (100 nM) 처리 후, 발생된 세포의 apoptosis정도를 TUNNEL assay법을 이용하여 분석함. 두 자극제에 의해 발생된 심근세포에서의 TUNNEL양성반응은 Terpinolene (1 mM) 에 의해서만 억제경향을 보이거나, beta-Pinen (1 mM)의 처리에 의해 거의 영향을 받지 않는 것으로 관찰됨 (그림 2-37)

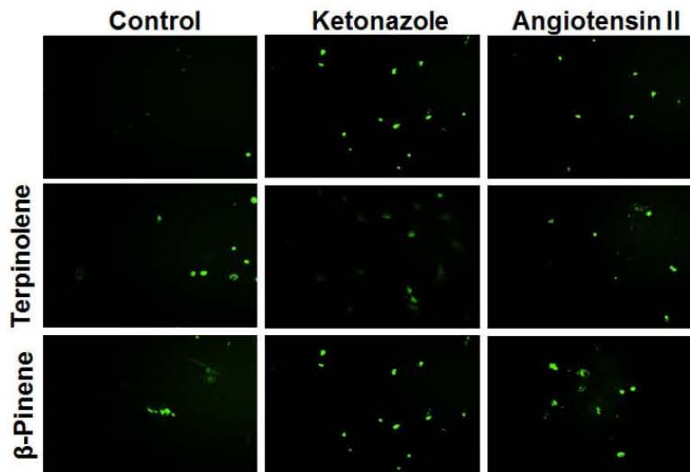


그림 2-37. 심근세포에서의 apoptosis에 대한 산국 EO 순수성분(Terpinolen 및 beta-pinene)의 효과. 녹색:TUNNEL양성반응세포.



㉔ 이들 결과는 Terpinolene은 심근세포에서의 apoptosis 및 ROS 발생의 억제에 영향을 미치나 beta-Pinene은 심근세포에서의 apoptosis 및 ROS 발생에 영향을 주지 않을 가능성을 제시함.

③ 심혈관질환 (동맥경화 및 고혈압) 유도 관련 단백질들의 발현에 대한 효능

㉕ 고혈압 및 동맥경화와 같은 심혈관계질환과 관련된 산화성 스트레스 연관 단백질들 및 apoptosis 연관 단백질 발현에 대한 효과

㉖ 혈관평활근세포에서 관련 단백질 발현에 대한 EO 순수성분의 영향

- Ketoconazole (30  $\mu$ M) 및 Ang II (100 nM)에 노출된 혈관평활근세포에서의 Prx3, DJ-1, 및 Bax의 발현을 관찰한 바, Ketoconazole은 DJ-1 발현을 다소 증가시키는 경향을 나타내었으며, Prx3에는 영향을 주지 않았고, Bax의 발현을 감소시킴. 그러나 이들 단백질의 발현은 monoterpene류 Terpinolene (1 mM) 및 beta-Pinene (1 mM)에 의해 감소되는 경향을 나타냄 (그림 2-38).

- 한편, Angiotensin II는 이들 3 단백질의 발현을 감소시키는 것으로 나타났으며, 이들 감소된 단백질은 두 monoterpene에 의해 회복되는 경향을 보임 (그림 2-38).

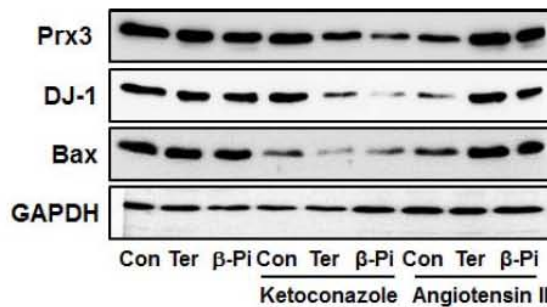


그림 2-38. 혈관세포 산화스트레스성 심혈관질환(고혈압 및 동맥경화) 관련 단백질의 발현에 대한 산국 EO 순수성분의 효과. Con, control; Ter, Terpinolene, b-Pi, beta-Pinene. Prx3, peroxiredoxin 3

㉗ 심근세포에서 관련단백질 발현에 대한 산국 EO 순수성분의 영향

- Ketoconazole (30  $\mu$ M)에 노출된 심근세포는 Prx3 및 DJ-1의 발현을 증가시키는 경향을 나타내지만, Bax의 발현은 다소 감소시키는 경향을 보임. 이들 발현은 monoterpene류인 Terpinolene (1 mM) 및 beta-Pinene(1 mM)에 처리에 의해 감소되는 경향을 나타냄.

- Angiotensin II는 Prx3 발현에 영향을 주지 않았으며, DJ-1의 발현을 증가시키고, Bax의 발현을 감소시키는 것으로 관찰됨. 이들 3 단백질의 발현반응은 Terpinolene의 처리에 의해 감소되는 것으로 관찰됨 (그림 2-39).

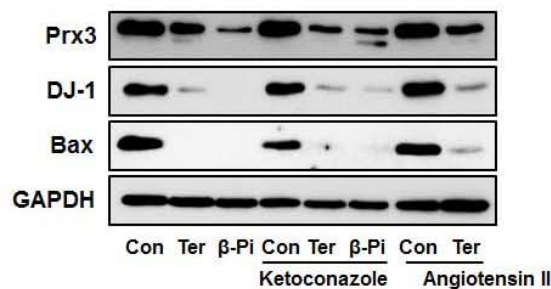


그림 2-39. 심근세포에서의 산화스트레스성 심혈관질환(고혈압 및 동맥경화) 관련 단백질의 발현에 대한 순수성분의 효과. Con, control; Ter, Terpinolene, b-Pi, beta-Pinene Prx3, peroxiredoxin 3

㉔ 신장세포에서의 관련 반응에 대한 EO 순수성분의 효능

- 전섬유화인자 (profibrotic gene) 발현은 심혈관계질환(동맥경화 및 고혈압)과의 관련이 보고되고 있음. 이에 신장세포에서의 전섬유화인자의 발현에 대한 EO 순수성분의 효과를 Real-time PCR법으로 관찰함.

- Angiotensin II (100 nM)로 유도된 신장세포에서의 전섬유화인자 Collagen type 1 및 Fibronectin 1은 monoterpen류인 terpinolene (1 mM)에 의해 감소하는 경향을 나타내었으나, PAI-1 및 TGF-β의 발현은 영향이 없는 것으로 나타남 (그림 2-40).

- 이들 결과들로부터, Terpinolene은 전섬유화인자의 발현을 감소시키는데 있어서 효능을 가질 것으로 사료됨.

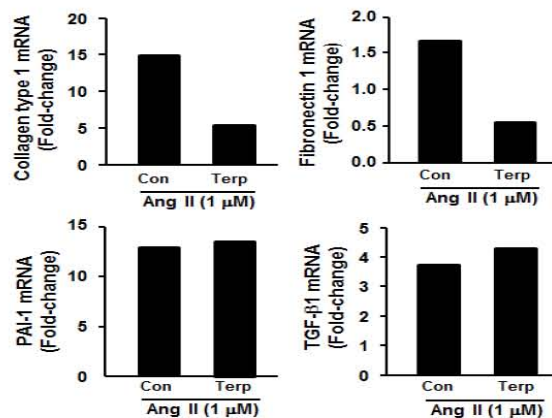


그림 2-40. 신장세포에서의 전섬유화인자 (Collagen type 1, Fibronectin 1, PAI-1, TGF-β) 발현에 대한 수용성 EO처리 효과에 대한 Real-time PCR 결과. Ang II, Angiotensin II.

㉕ 폐조직에서 관련 단백질 발현에 대한 EO 순수성분의 효과

- 폐조직은 심혈관계질환, 특히, 고혈압과 관련될 수 있음. 이에 폐조직을 분리하여 심혈관계질환 관련반응factor에 대한 monoterpen류 EO 순수성분의 영향을 관찰함.

- Phellandrene은 ICAM-1, COX2, NF-kb등의 염증관련 factor 및 apoptosis 관련 Bax의 발현변화에 거의 영향을 주지 않았음 (그림 2-41).

- Piperitone은 COX2 및 Bax, NF-kb의 발현에 거의 영향을 주지 않았으나, ICAM-1의 발현을 증가시키는 경향을 나타냄 (그림 2-41).

- 이들 결과들은 폐조직에서 Piperitone은 이들 반응에 대해 이상성을 나타낼 가능성을 제시함.

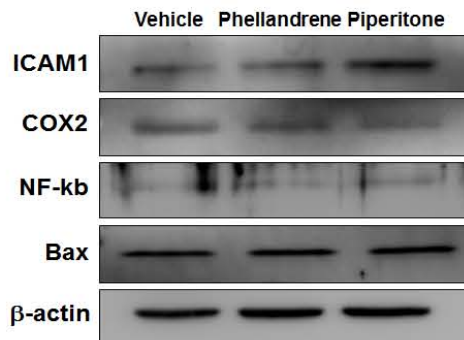


그림 2-41. 폐조직반응관련 단백질 발현에 대한 산국 EO 순수성분의 효과.



### 3. 산국 EO의 안정성 연구

- 산국 EO의 안전성을 확인하기 위하여 호서대학교 안전성평가센터에서 독성평가지험을 실시함. 본 시험은 식품의약품안전청 고시한 독성시험 투여 기준에 의거하여 시험을 수행 하였으며, 호서대학교 안정성 평가 센터의 동물 윤리위원회 (HTRCIACUC)에 의해 승인되었음 (HTRC-15-23).

#### (1) 산국 EO의 설치류 급성경구독성시험연구

- 산국 EO를 단회 경구 투여 후 14일간 관찰함 (그림 3-1).
- 사망동물과 특이한 임상증상, 체중 변화, 사료 섭취량, 음수 섭취량의 변화가 관찰되지 않았으며, 또한 관찰기간 종료 후 실시한 육안적 병리검사에서 이상이 관찰되지 않았으며, 관찰종료일까지 사망동물이 관찰되지 않았음.
- 결론적으로, 산국 EO는 임상증상, 체중 및 사료 섭취량의 변화 등이 관찰되지 않았음. 이상의 결과를 근거로 경구 투여 시 반수치사량 (LD50)은 10 ml/kg BW 보다 높은 양으로, 경구 노출에 의한 독성이 없는 안전한 물질로 판단되었음(그림 3-2).

Dose group	Sex	No. of Animals	Number of death								Mortality(%)
			1	2	3	4	5	6	7	8~14 day	
무처치군	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
VC	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
산국화 Essential Oil (2.5 ml/kg BW)	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
산국화 Essential Oil (5 ml/kg BW)	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
산국화 Essential Oil (10 ml/kg BW)	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)

그림 3-1. 단일 경구투여 후 실험 동물 사망률. VC: Vehicle control (25% Polyoxyethylene Hydrogenated Caster Oil)

#### 산국화 Essential Oil의 설치류 급성경구독성시험결과 의견서

##### I. 개 요

- 물질명: 산국화 Essential oil
- 제 조: 호서대학교 한방화장품학과 이현영 교수 연구팀
- 시험책임자: 호서대학교 임상병리학과 정상희 교수
- 시험수행: 호서대학교 안전성평가센터

##### II. 시험책임자 의견

- 산국화 Essential oil의 단회경구독성을 실시하여 독성강도를 확인하고자 호서대학교 안전성평가센터 SPF 청정실험동물실에서 온도, 습도, 빛, 음수, 사료 등이 모두 GLP 수준으로 관리되는 동물실험실에서 독성시험을 수행하였다.
- 시험은 SPF SD 랫드 암수를 사용하여 산국화 Essential oil을 용량별로 단회 경구 투여한 후 14일간 체중변화 등 임상증상, 음수량, 사료섭취량, 부검조건을 확인하였다.
- 시험결과 최고투여용량인 10 mL/kg bw를 포함하여 모든 용량군에서 어떠한 독성도 관찰되지 않았다.
- 따라서, 산국화 Essential oil의 단회경구독성은 무시할 수 있을 정도로서 독성등급상 실제적 무독성 물질로 평가되었다.

일 시 : 2015년 6월 2일

확 인 : 호서대학교 임상병리학과 교수 정 상 희 (독성시험연구책임자) (인)

*정상희*

그림 3-2. 산국 essential oil의 설치류 급성경구투여 독성시험 결과 의견서

**(2) 산국 EO 의 설치류 급성경피독성시험연구**

- 산국 EO를 단회 경피 투여 후 14일간 관찰 함 (그림 3-3).
- 사망동물과 특이한 임상증상, 체중 변화, 사료 섭취량, 음수 섭취량의 변화가 관찰되지 않았으며, 또한 시험 종료 후 실시한 육안적 병리검사에서도 이상이 관찰되지 않았음.
- 결론적으로 산국 EO은 임상증상, 체중 및 사료 섭취량의 변화 등이 관찰되지 않았고, 관찰 기간 종료 후 실시한 육안적 병리검사에서 이상이 관찰되지 않았으며, 관찰종료일까지 사망동물이 관찰되지 않았음.
- 이를 근거로 경피 투여 시 반수치사량(LD50)은 10 ml/kg BW보다 높은 양으로, 경피 노출에 의한 독성이 없는 안전한 물질로 판단됨 (그림 3-4).

Dose group	Sex	No. of Animals	Number of death								Mortality(%)	
			1	2	3	4	5	6	7	8~14 day		
무처치군	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
VC	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
산국화 Essential Oil (2.5 ml/kg BW)	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
산국화 Essential Oil (5 ml/kg BW)	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
산국화 Essential Oil (10 ml/kg BW)	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)
	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5 (0)

그림 3-3. 단일 경피투여 후 실험동물 사망률. VC: Vehicle control (25% Polyoxyethylene Hydrogenated Caster Oil)

산국화 Essential Oil의  
설치류 급성경피독성시험결과 의견서

I. 개요

- 물질명: 산국화 Essential oil
- 제 조: 호서대학교 한방화장품학과 이환영 교수 연구팀
- 시험책임자: 호서대학교 임상병리학과 정상희 교수
- 시험수행: 호서대학교 안전성평가센터

II. 시험책임자 의견

- 산국화 Essential oil의 단회경피독성을 실시하여 독성강도를 확인하고자 호서대학교 안전성평가센터 SPF 청정실험동물실에서 온도, 습도, 빛, 음수, 사료 등이 모두 GLP 수준으로 관리되는 동물실험실에서 독성시험을 수행하였다.
- 시험은 SPF SD 랫드 알수를 사용하여 산국화 Essential oil을 용량별로 1일간 폐쇄 침포방법으로 경피 투여한 후 14일간 체중변화 등 임상증상, 음수량, 사료섭취량, 부검소견을 확인하였다.
- 시험결과 최고 경피투여용량인 2 mL/kg bw를 포함하여 모든 용량군에서 어떠한 독성도 관찰되지 않았다.
- 따라서, 산국화 Essential oil의 급성경피독성은 무시할 수 있을 정도로서 독성등급 상 실제적 무독성 물질로 평가되었다.

일 시 : 2015년 6월 2일

학 인 : 호서대학교 임상병리학과 교수 정 상 희 (독성시험연구책임자) (인)



그림 3-4. 산국 essential oil의 설치류 급성경피 독성시험 결과 의견서

**(3) 산국화 EO의 설치류 반복독성시험연구**

- 산국화 EO를 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 전신 독성을 확인하여 독성양상을 확인하고 자 암수 SD 랫드에 시험물질을 1회/일, 14일간 반복적으로 강제 경구 투여함 (그림 3-5).
- 임상증상 관찰 시 사망동물과 임상증상, 체중 변화, 사료 섭취량 및 음수섭취량의 변화를 관찰하지 못하였고, 투여 종료 후에 혈액검사, 소변검사, 부검 후 육안검사 및 장기중량 측정 한 결과 이상소견이 관찰되지 않았음.
- 결론적으로 산국화 EO의 본 제품은 임상증상, 체중 및 사료 섭취량의 변화 등이 관찰되지 않았고, 관찰기간 종료 후 실시한 혈액검사, 노화학치 검사, 부검 후 육안검사 및 장기중량 측정에서 이상이 관찰되지 않았으며, 관찰종료일까지 사망동물이 관찰되지 않았음.
- 최고 용량인 5 ml/kg BW/day에서도 아무런 독성이 관찰되지 않았으므로 본 시험 조건에서 무독성량은 5 ml/kg BW/day인 것으로 평가되었음 (그림 3-6).

Dose group	Sex	No. of Animals	Number of death								Mortality(%)	
			1	2	3	4	5	6	7	8~14 day		
무처치군	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
VC	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
산국화 Essential Oil (1.25 mL/kg bw/day)	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
산국화 Essential Oil (2.5 mL/kg BW/day)	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
산국화 Essential Oil (5 mL/kg BW/day)	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)

그림 3-5. 반복경구 투여 후 실험동물 사망률. VC: Vehicle control (25% Polyoxyethylene Hydrogenated Caster Oil)

산국화 Essential Oil의  
설치류 반복경구독성시험결과 의견서

I. 개 요

- 물질명: 산국화 Essential oil
- 제 조: 호서대학교 한방화장품학과 이현영 교수 연구팀
- 시험책임자: 호서대학교 임상병리학과 정상희 교수
- 시험수행: 호서대학교 안전성평가센터

II. 시험책임자 의견

- 산국화 Essential oil의 반복경구독성을 실시하여 독성양상과 무독성량을 확인하고자 호서대학교 안전성평가센터 SPF 청정실험동물실에서 온도, 습도, 빛, 음수, 사료 등과 시험에 이용되는 모든 장비가 GLP 수준으로 관리되는 동물실험실에서 독성시험을 수행하였다.
- 시험은 SPF SD 랫드 암수를 사용하여 산국화 Essential oil을 용량별로 14일간 매일 1회씩 강제경구투여하면서 사망여부, 체중변화 등 임상증상, 음수량, 사료섭취량, 육안부검소견, 노화학치, 혈액화학치, 혈액화학치, 장기중량, 병리조직학적 검사를 실시하였다.
- 시험결과 최고투여용량인 5 mL/kg bw/day 용량군을 포함하여 모든 용량군에서 대조군에 비하여 어떠한 독성도 관찰되지 않았으며 육안적 검사와 조직병리학적 검사에서도 아무런 이상이 확인되지 않았다.
- 따라서, 산국화 Essential oil의 반복경구독성은 무시할 수 있을 정도로서 무독성량은 본 시험의 최고용량인 5 mL/kg bw/day인 것으로 평가되었다.

일 시 : 2015년 6월 2일

학 인 : 호서대학교 임상병리학과 교수 정 상 희 (독성시험연구책임자) (인)

*정상희*

그림 3-6. 산국화 essential oil의 설치류 반복경구 독성시험 결과 의견서



**(4) 산국 EO의 설치류 급성흡입독성시험연구**

- 산국 EO의 100배 희석액(19,070 ppm) 및 10배 희석액(190,700 ppm)으로 4시간 노출시킴 (그림 3-7).
- 관찰기간 종료 후 육안적 병리검사에서 노출군 및 음성대조군 모두에서 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았으며, 시험동물들의 폐 및 기타 여러 장기에 이상증상이 나타나지 않았음. 무처치군과 비교하여 체중 및 사료섭취량과 음수량에 큰 차이를 보이지 않았으며, 시험기간 종료일까지 사망동물이 발생하지 않았음.
- 이러한 결과들로 볼 때, 산국화 essential oil의 흡입독성은 무시 할 정도로 안전한 것으로 판단되어짐 (그림 3-8).

Dose group	Sex	No. of Animals	Number of death								Mortality(%)	
			1	2	3	4	5	6	7	8~14 day		
무처치군	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
VC	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
산국화 Essential Oil (1.25 ml/kg BW/day)	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
산국화 Essential Oil (2.5 ml/kg BW/day)	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
산국화 Essential Oil (5 ml/kg BW/day)	Male	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)
	Female	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7(0)

그림 3-7. 급성흡입 후 실험동물 사망률. VC: Vehicle control (25% Polyoxyethylene Hydrogenated Caster Oil)

산국화 Essential Oil의  
설치류 급성흡입독성 시험결과 의견서

I. 개요

- 물질명: 산국화 Essential oil
- 제 조: 호서대학교 한방화학융합학과 이환영 교수 연구팀
- 시험책임자: 호서대학교 임상병리학과 정상희 교수
- 시험수행: 호서대학교 안전성평가센터

II. 시험책임자 의견

- 산국화 Essential oil의 급성흡입독성을 실시하여 흡입독성양상과 독성강도를 확인하고자 호서대학교 안전성평가센터 SPF 청정실험동물실의 흡입챔버실에서 온도, 습도, 빛, 음수, 사료 등과 시험에 이용되는 모든 장비가 GLP 수준으로 관리되는 동물실험실에서 흡입독성 시험을 수행하였다.
- 시험은 SPF SD 랫드 암수를 사용하여 산국화 Essential oil을 용량별로 에어로졸로 전환하여 4시간동안 비강을 통하여 흡입투여한 후 14일간 사망여부, 체중변화 등 임상증상, 음수량, 사료섭취량, 폐장 등의 육안부검소견에 대한 검사를 실시하였다.
- 시험결과 시험물질의 비강을 통한 흡입투여용량은 324, 2484 mg/L air/hour 로 측정되었으며 이때의 고농도인 2484 mg/L air/hour 은 현실적으로 투여가능한 최고 용량이었다. 모든 시험물질 투여 용량에서 어떠한 독성도 관찰되지 않았고 폐장 등 호흡기 장기의 육안적 검사에서도 아무런 이상이 확인되지 않았다.
- 따라서, 산국화 Essential oil의 급성흡입독성은 투여가능한 최고용량에서 어떠한 독성도 나타나지 않는 안전한 물질로 평가되었다.

일 시 : 2015년 6월 2일

작 인 : 호서대학교 임상병리학과 교수 정 상 희 (독성시험연구책임자) (인)

*정상희*

그림 3-8. 산국 essential oil의 설치류 급성흡입 독성시험 결과 의견서

#### 4. 산국성분을 이용한 혈관질환 치료제/완화제의 시제품개발

- in vivo, in vitro 기능 실험연구 결과를 바탕으로 임상시험용 시제품을 개발함.

가. 동맥경화 개선 시제품

(1) 산국 EO 성분 (수용성 EO, floral water) 함유 시제품의 제형 개발 및 제작

- 순환기 전문가 및 내과 전문가의 조언을 바탕으로 하여 액상 제형 개발.
- 기존의 EO 함유 제품들이 액상차의 형태로 응용되는 것이 많이 볼 수 있음
- 산국 EO 성분의 체내 흡수율이 우수한 배합비를 최종 설정하여 액상차형 (vial)으로 (주)동서 제약 웰빙에 주문 제작함 (그림 4-1).
- 완제품 형태의 포장 및 디자인을 적용 제작함.

(가) 용량; 20 ml

(나) 성분 및 함량

- 산국화 워터 20%
- 정제수 69.969 %
- 프락토올리고당 10%
- 복합황금추출물 0.03%
- 비타민B2 0.001%

(다) 제조방법

- ① 원료의 구입 및 칭량 : 각각의 원료를 공급받아 제조단위에 맞게 칭량함.
- ② 배합 : 배합탱크에 칭량된 원료를 투입하여 80~90℃에서 교반, 균질화하고 98℃에서 20분간 살균 후 배합 가열된 액을 여과기를 거쳐 충전 서비스탱크로 이송함.
- ③ 충전 : 필터를 거쳐 여과한 후 액상 충전기를 이용하여 정해진 내용량에 따라 충전함.
- ④ 포장 및 보관 : 충전 완료된 제품을 검사하여 정상적인 제품만 완포장 하여 보관함.
- ⑤ 검사 및 출하 : 완제품 자가 품질검사 결과 적합한 제품에 한하여 출하 함.



그림 4-1. 동맥경화질환 관련 시제품 사진

나. 고혈압 개선 시제품

(1) 산국 essential oil 성분 함유 시제품의 제형 개발 및 제작

- 순환기 전문가 및 내과 전문가의 조언을 바탕으로 병태에 효율적인 스프레이 제형 개발.
- 산국 essential oil성분의 체내 흡수율이 우수한 배합비를 최종 설정하여 스프레이형 (2종)으로



(주)동서제약 웰빙에 주문 제작함 (그림 4-2).

- 완제품 형태의 포장 및 디자인을 적용 제작함.

(가) 용량; 15 ml, 20 ml

(나) 성분 및 함량

- 산국화 essential oil 0.05%
- 유효제 0.6 %
- 효소처리스테비아 0.05%
- 정제수 99.3%

(다) 제조방법

- ① 원료의 구입 및 칭량 : 각각의 원료를 공급받아 제조단위에 맞게 칭량함.
- ② 배합 : 배합탱크에 칭량된 원료를 투입하여 80~90℃에서 교반, 균질화하고 98℃에서 20분간 살균 후 배합 가열된 액을 여과기를 거쳐 충전 서비스탱크로 이송함.
- ③ 충전 : 필터를 거쳐 여과한 후 액상 충전기를 이용하여 정해진 내용량에 따라 충전함.
- ④ 포장 및 보관 : 충전 완료된 제품을 검사하여 정상적인 제품만 완포장 하여 보관함.
- ⑤ 검사 및 출하 : 완제품 자가품질검사 결과 적합한 제품에 한하여 출하 함.



그림 4-2. 폐성고혈압 질환 관련 시제품 사진

다. 시제품의 효능 검사

(1) 동맥경화 개선 시제품의 항동맥경화능 검사

(가) 방법: in vivo 상태로 동맥경화를 유발한 혈관에서의 동맥경화 neointima (신생내막) 형성 정도에 대한 동맥경화 시제품의 효능을 검사하고자, 랫드 동맥경화 모델에서 형성된 신생내막의 형성정도를 시제품과 동일 조건의 수용성 EO (20%) (100  $\mu$ l/kg BW/1회)를 하루 2회로 수술 전 3일 동안 처리 및 수술 후 14일 동안 처리 한 후, 처리 군과 비 처리 군을 서로 비교 검토함.

(나) 결과: 수용성 EO 처리군에서 신생내막 형성은 비 처리군보다 약화되는 경향을 나타냄 (그림 4-3)

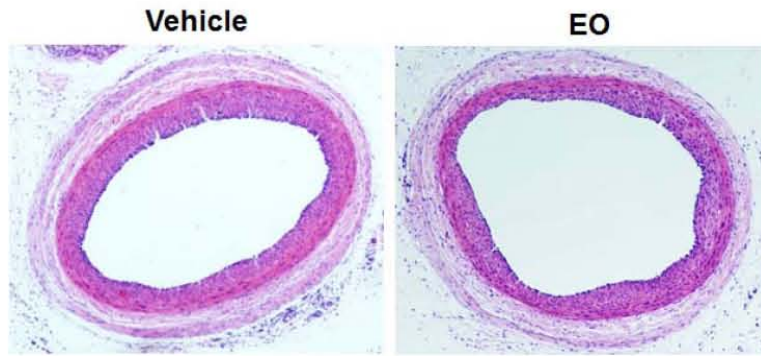


그림 4-3. 동맥경화 모델의 혈관 신생내막의 형성에 대한 액상차 동일 조건의 수용성 EO의 영향. 확대율: X400

(다) 결론: 본 결과는 액상차 시제품은 동맥경화에 중요과정인 신생내막형성에 대해 억제효과를 나타낼 가능성을 제시함. 그러나 향후 보다 장기간 투여시의 효과 관찰은 보다 정확한 임상에서의 효능 검증을 위해 중요할 것으로 사료됨.

## (2) 고혈압 개선 시제품의 항고혈압 효능검사

### (가) 방법

- Monocrotaline (60 mg/kg B.W, IP)으로 유도된 폐성고혈압 모델동물을 이용하여 폐성 고혈압에 대한 고혈압 개선 시제품의 효능을 검사하기위하여, 폐성 고혈압의 대표적인 증상인 심장 및 폐동맥의 병태를 관찰함.
- 시제품과 동일 조건의 EO (0.05%)를 약간의 공기가 순환이 되도록 조절된 밀폐된 유리용기 (7리터)의 바닥에 거즈를 놓고 거즈위에 200  $\mu$ l 씩 점적 한 후, 폐성 고혈압 모델 동물을 하루 30분 동안 향 흡입을 위해 용기 내 방치함 (그림 3-4)
- 상기 과정을 25일 동안 실시 후 처리 군과 비처리 군의 조직관찰을 위해 샘플링 실시함.



그림 4-4. 폐성고혈압모델동물에 대한 시제품 동일 조건의 EO의 영향 관찰

(나) 결과 : Monocrotaline으로 유도된 폐성 고혈압 동물의 대표적인 병태인 우심실 비대 및 폐동맥 비대가 EO처리에 의해 다소 감소되는 경향을 나타내었음 (그림 4-5).

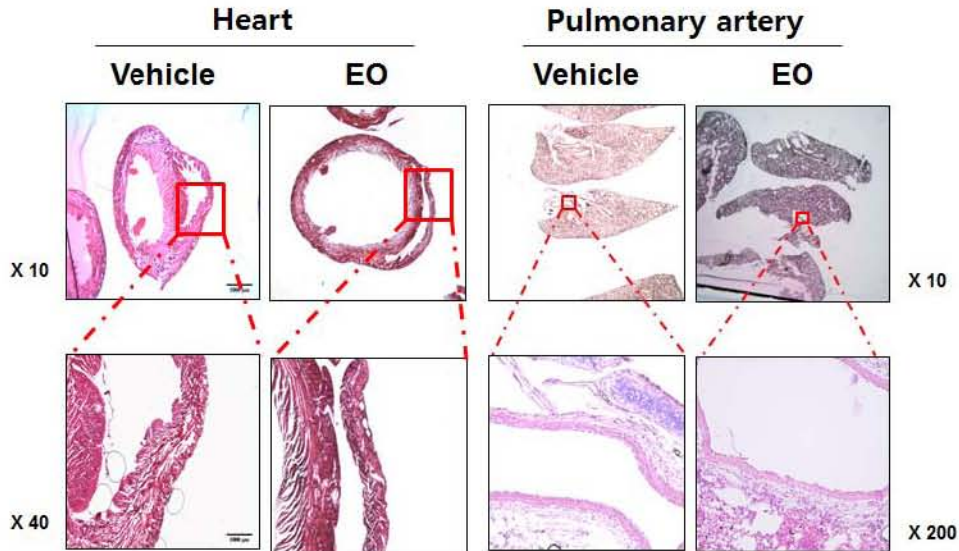


그림 4-5. 폐성 고혈압 모델동물의 우심실 및 폐동맥 병태에 대한 시제품 동일 조건의 산국 EO의 영향 관찰.

(라) 결론 : 본 결과에서 고혈압 개선용 스프레이 시제품은 폐성 고혈압의 중요 병태를 억제하는 경향을 나타내는 것으로 관찰됨. 따라서 본 시제품은 폐성 고혈압의 개선에 긍정적인 영향을 줄 가능성을 제시함. 그러나 향후 보다 장기간 투여시의 효과 관찰은 보다 정확한 임상에서의 효능 검증을 위해 중요할 것으로 사료됨.

### (3) 시제품의 효능검사

#### (가) 염증 유도관련 단백질 발현에 대한 효과 확인

① 방법: 각시제품의 동일 조건으로 작성된 산국 EO에 의한 혈관 평활근세포, 혈관내피세포 (HUVEC) 및 심근세포 (rat에서 분리된 primary cell)에서 염증유도인자 (NF-kB 또는 ICAM-1) 발현 및 apoptosis 관련 인자 (caspase 3)의 영향을 관찰함.

#### ② 결과

##### ① 혈관평활근세포에서의 관련 단백질에 대한 효과

- 혈관 평활근세포에 시제품 동일조건의 산국 EO 처리 시 염증자극 물질에 의해 유도된 관련 단백질 발현 증가가 약화되는 경향이 관찰됨 (그림 4-6).

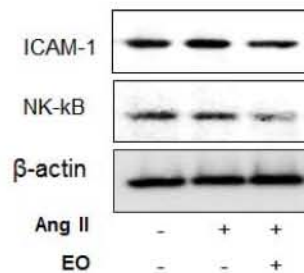


그림 4-6. 혈관평활근세포에서의 염증 관련 단백질 발현에 대한 시제품 동일 조건의 수용성 EO의 영향 관찰.



㉔ 인간유래혈관내피세포 (HUVEC)에서 관련 단백질 발현에 대한 효과

- 혈관내피세포에 시제품 동일조건의 산국 EO를 처리하는 경우 염증자극 물질에 의해 유도된 관련 유도인자증가가 감소하는 경향을 나타냄 (그림 4-7).
- 또한 유도된 caspase 3의 증가된 발현이 시제품 동일조건의 산국 EO에 처리에 의해 가볍게 감소되는 경향으로 관찰됨 (그림 4-7).

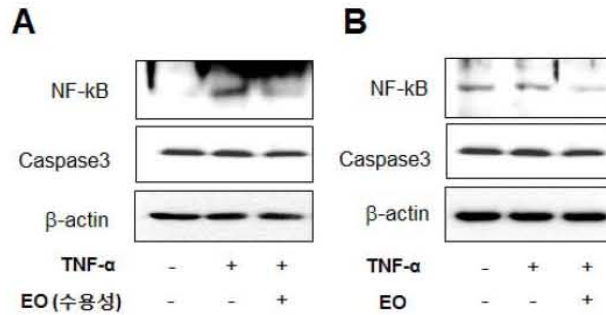


그림 4-7. 인간 유래 혈관내피세포에서의 염증 관련 인자발현에 대한 시제품 동일 조건의 산국 EO에 의한 영향 관찰. A. 동맥경화관련 시제품 동일 조건의 수용성 EO. B. 고혈압관련 시제품 동일조건의 EO.

㉕ 심근세포에서 관련 단백질 발현에 대한 동맥경화 시제품의 효과

- Ketoconazole로 유도된 랫드 심근세포독성은 시제품 동일조건의 산국 EO처리에 의해 약화되는 경향을 나타냄 (그림 4-8A)
- 시제품 동일 조건의 산국 EO 처리는 Ketoconazole에 의해 유도된 랫드 심근세포에서의 Bax의 발현을 감소시키는 효과를 나타냄 (그림 4-8B)

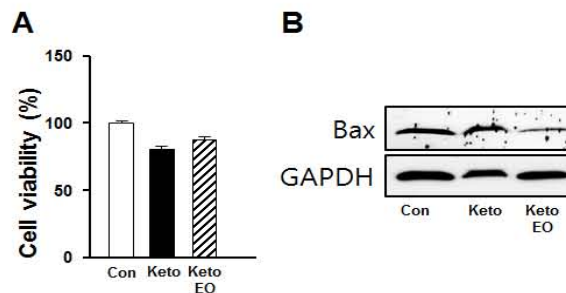


그림 4-8. 심근세포에서의 염증 관련 인자발현에 대한 동맥경화 관련 시제품 동일 조건의 수용성 EO의 영향 관찰.

③ 이상의 결과들은 혈관내피세포에서 이들 시제품이 염증반응을 억제할 가능성을 제시함. 또한 심근세포에 대해 양성효과를 나타낼 가능성이 시사됨.

(나) Ex vivo 혈관 반응자극성 시험

- ① 방법: 시제품의 동일 조건으로 작성된 산국 EO에 의한 혈관 반응자극성을 관찰하기 위하여 rat에서 분리된 폐동맥을 35 mM KCl 또는 0.1 μM NE로 수축을 유도 후 EO에 의한 이완 효과를 관찰함 (그림 4-9).
- ② 결과: 그림 3-9에서 보는 바와 같이, 35 mM KCl 또는 0.1 μM NE에 의해 유도된 폐동맥의 수축은 시제품의 동일 조건으로 작성된 EO에 의해 농도 의존적인 이완 발생이 관찰됨 (그림



4-9).

③ 이상의 결과들은 폐동맥 혈관에서 이들 시제품이 이완반응을 유도할 가능성을 제시함.

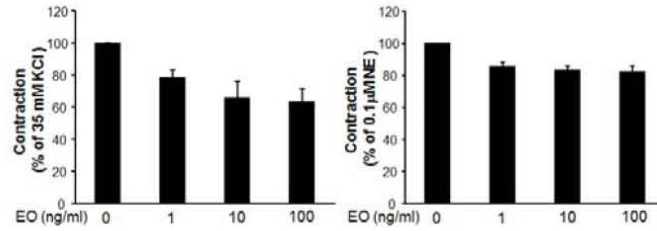


그림 4-9. 시제품 동일 조건의 EO에 따른 폐동맥이완 효과. A, 35 mM KCl 수축에 대한 이완효과; B, 0.1 μM NE 수축에 대한 이완효과

다. 산국 EO 성분 함유한 시제품의 인체 간이 임상시험

- 내과 전문의와의 컨설팅을 통해 제작된 임상시험용 시제품의 인체 안정성 검증을 위한 간이 임상시험을 수행하기 위하여 IRB 신청서를 건국대학교 IRB위원회에 제출함 (그림 4-10).

(가) 신청번호: KUCH 2015-09-041

(나) 간이 임상시험 수행처: 건국대학교충주병원

### 접수 확인서

귀하께서 2015년 09월 07일에 신청한 초기심의의회 신청에 대하여 다음과 같이 접수가 완료되었음을 통지합니다.

과제번호	KUCH 2015-09-041					
연구과제명	산국(essential oil)의 인체에서 간이 안전성 검사					
연구책임자	성명	최 응 길	소속	심장혈관내과	직위	교수
심의대상	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서(신규) <input type="checkbox"/> 연구계획서(시정/보완) <input type="checkbox"/> 연구계획변경 <input type="checkbox"/> 연차지속심의/중간보고 <input type="checkbox"/> 중대한 이상반응 <input type="checkbox"/> 위반/이탈사례 <input type="checkbox"/> 연구(조기)종료/결과보고 <input type="checkbox"/> 기타( )					
심의종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의			<input type="checkbox"/> 신속심의		
접수서류	연구계획서 1부 및 초기심의의회서 1부					
주의사항 및 기타전달내용	정규회의 예정일은 2015년 9월 15일입니다. 참석하여 주시기 바랍니다.					

2015년 09월 07일

건국대학교 충주병원  
 임상시험심사위원장

그림 4-10. 시제품의 인체 안정성 간이 임상 시험을 위한 IRB 신청서

## 5. 한국자생식물 산국 EO의 개발

### 가. 산국화 재배조건 확립

#### (1) 산국화 재배지 확립 및 재배조건 확립

- 본 연구진은 야생 산국화 채취하여, 호서대학교 한방화장품과학과 실습지내 재배지 (약 3000 평)를 확립하여 재배하고 있음.
- 기존의 야생 산국화 재배지는 배수가 안 되어, 장마철 등의 시기에 산국화의 뿌리 썩음이 발생하여 고사하였으나, 현 재배지는 배수시설 확충 및 배수가 잘 되는 토양을 선택하여 재배지를 확립하였음 (그림 5-1).
- 산국화 재배지의 제초작업의 보완을 위해 부직포/비닐 멀칭 설비를 구축하였음.
- 개화 시기 별 EO의 비교를 위해 재배지에 구역을 나누어 채취시기를 조절함.



그림 5-1. 산국화 재배지 확립 및 재배조건 연구

#### (2) 채취 시기 및 지역별 EO 성분연구를 위한 조건 확립

- 개화 시기 별 EO의 비교를 위해 재배지에 구역을 나누어 채취시기를 조절함.
- 산국 EO 구성 성분 중 특이적인 성분의 분리를 위해 지역을 달리하여 채취함 (그림 5-2).
- 본 연구를 통해 산국 EO의 연구결과는 산국 재배 조건에 대한 새로운 판단 기준으로 제공할 수 있을 것이며, 산국 EO의 표준화에 대한 기초 자료로서 활용할 수 있음.



그림 5-2. 지역별 산국화 채취 지역 (경남 남해, 강원 설악(한계령))

나. 산국화 EO 개발 연구 (산국화로부터 EO의 추출)

- 호서대학교 한방화장품과학과 실습지로부터 채취된 야생 산국화로부터 EO를 개발하고자 연구하였음.

(1) 분리 장비 및 환경의 확립

- 호서대학교 한방화장품과학과 실습지 내 EO 전용 추출 및 분리를 위한 추출실을 확보 및 셋팅 하였음 (그림 5-3).
- 기존의 추출기의 단점을 보완한 대용량/고효율의 steam distillation 추출기 2대 및 다양한 한국 자생식물 essential oil 추출 및 연구에 사용될 간이 추출기 1대를 설치하였음.
- 면적; 20평, 대표장비: 대형 추출기 2대, 간이 추출기 1대, 농축기 1대, absolute 추출장비, 압착 추출 장비 등 확보.



그림 5-3. EO 전용 추출/분리실

(2) 분리방법의 최적화 확립

- EO 추출 방법 및 추출조건을 최적화하기 위해 초고압 추출조건, 저온 추출조건, 수증기 추출 조건 등을 진행하였음.
- 산국 EO의 분리를 위하여 steam distillation, absolute extraction, 초고압 추출법 및 초임계 추출법을 적용하였음 (그림 5-4).
- 초고압 추출법 및 초임계 추출법은 시료의 건조 및 분말화 과정이 요구되며, 대량 시료의 추출에는 부적당한 방법임. 또한 EO은 건조하지 않은 시료에서 분리/정제하는 것이 가장 최상의 향과 성분이 존재함.
- Absolute extraction법은 헥산 및 유기용매를 활용하므로 EO 성분 이외에 다른 성분의 오염이 예상됨 (특히, 용매잔류에 의한 독성 유발의 위험이 있음).
- 본 연구에서 산국 EO의 분리 및 정제는 steam distillation 방법이 가장 최적화된 방법으로 사료됨.



그림 5-4. 산국화 꽃으로부터 EO 분리



다. 산국 EO의 성분분석 및 효능검증

(1) GC/MS를 활용한 산국 EO 성분분석

- 본 연구진은 보유 추출기법(100% 증류수를 이용; 꽃이 피기 직전에 수확)을 활용하여 추출한 산국화 EO를 GC/MS로 분석하여 42개의 성분을 동정하였음. 이중 대부분은 monoterpene 및 sesquiterpene 성분임을 확인함 (그림 5-5).
- 분석된 성분을 구입 또는 분리하여 효능검증에 이용함.

Rank	Name	Area	% Rate
1	Camphor	497851777	17.42
2	β-Cubebene	463076398	16.20
3	Piperitone	163712574	5.72
4	β-Thujone	147214602	5.151
5	Caryophyllene	134512463	4.70
6	1R-α-Pinene	117785507	4.12
7	Camphene	107364374	3.75
8	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)	75148177	2.62
9	β-Myrcene	59139189	2.06
10	Sabinene	56575309	1.97
11	bicyclgermacrene	47700817	1.66
12	chrysanthenone	47299395	1.65
13	Levbornyl acetate	46769938	1.63
14	1-Phellandrene	45623682	1.59
15	Thymol	42256726	1.47
16	cis-Ocimene	40449327	1.41
17	α-Thujene	37928293	1.32
18	δ-Cadinene	32275203	1.12
19	α-Cymol	30866567	1.08
20	Zingiberene	23130571	0.80
21	α-Cadinol	20364072	0.71
22	α-Terpinene	18028613	0.63
23	4-Terpineol	16746751	0.58
24	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)	16453448	0.57
25	α-Thujone	15943299	0.55
26	γ-Terpinene	14753307	0.51
27	β-Selinene	14293894	0.50
28	β-Ocimene Y	12695554	0.44
29	Caryophyllene oxide	12048083	0.42
30	3-Cyclohexene-1-methanol, α, α,4-trimethyl-, (S)	10574530	0.37
31	Pinocarvone	10392318	0.36
32	Copaene	10225214	0.35
33	trans-β-Farnesene	10128181	0.35
34	α-Terpinolene	8198084	0.28
35	Cuminic aldehyde	7545810	0.26
36	Palatinol	6895441	0.24
37	Tricyclo[4.4.0.0(2,7)]dec-3-ene-3-methanol, 1-methyl-8-(1-methylethyl)	6347117	0.22
38	Epi-bicyclosesquiphellandrene	5642551	0.19
39	Tricyclene	5642256	0.19
40	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)	5639695	0.19
41	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans	5590440	0.19
42	E,E-α-Farnesene	5201588	0.18

그림 5-5. GC/MS를 활용한 산국 EO의 분석

(2) 산국 EO의 비 심혈관계 효능 검증

- 산국 EO의 심혈관계 이외에서의 응용 및 활용가능성을 타진하기 위하여 부가 연구를 수행함.

(가) 상처치유 및 피부재생에 대한 효과

- 산국화 EO의 표피 및 진피세포에 대한 세포독성을 측정하여 독성이 없는 농도에서 세포증식에 대한 효과를 관찰함.

① 산국화 EO의 keratinocyte 증식에 대한 효과

- 산국화 EO는 EGF (50 ng/ml)에 비해 높은 keratinocyte 증식능을 유발하는 것으로 나타남 (그림 5-6 좌측).
- Akt와 ERK1/2를 인산화 신호전달 과정을 통해 증식이 유도되는 기전을 확인함. 진피세포의 경우에는 표피세포와 반대로 증식을 억제하는 것으로 확인됨 (그림 5-6 우측).
- 그러므로, 산국화 EO는 화학적 구성성분으로 이루어져 있어, 단백질 성분인 EGF에 비해 안정성이 매우 높아 피부재생 및 상처치유제로서의 사용 가능성을 제시함.

② 산국 EO의 type I collagen 및 type IV collagen 합성에 대한 효과

- 산국화 EO는 keratinocyte에서 type IV collagen 합성을 유의하게 유도하는 것으로 확인됨 (그림 5-7).
- 따라서 산국화 EO는 상처조직의 경화를 유도하지 않으면서 상처치유 및 피부재생을 유도할 수 있을 것으로 사료됨.



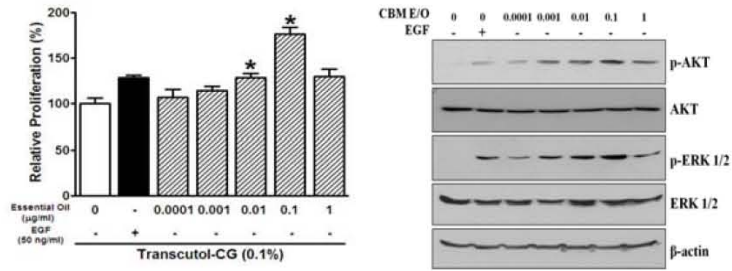


그림 5-6. 산국 EO의 표피 및 진피세포 증식능 확인

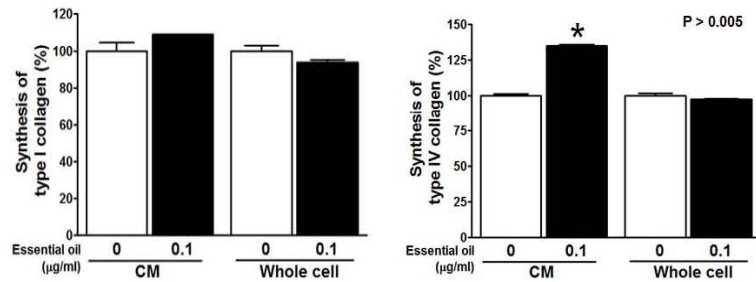


그림 5-7. 산국 EO의 type I 및 type IV collagen 합성변화

③ 산국 EO의 in vivo 상처 치유능

- in vitro 피부세포 증식 및 활성능을 확인하기 위한 in vivo 피부 재생능을 확인함.
- 산국화 EO는 대조군에 비해 유의한 피부재생 활성뿐만 아니라, 상처조직의 경화 억제능을 나타냄 (그림 5-8).

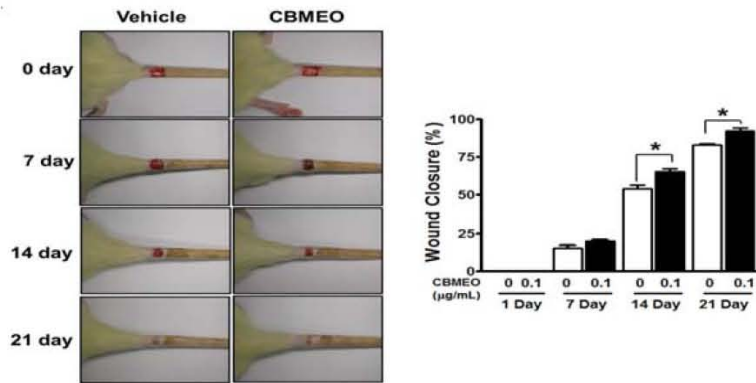


그림 5-8. 산국 EO의 in vivo 상처 치유효과. (A) in vivo 사진 (B) 통계적 데이터

④ 결론: 이상의 결과들은 산국 EO는 상처치유 및 피부재생을 위해 유용한 후보 물질일 가능성을 제시함.

(나) 산국 EO의 free radical 소거능 검사

- 산국화 EO의 항산화 효능(free radical 소거능)을 ABTs activity 및 DPPH activity 확인을 통해 검사됨.
- 산국화 EO은 대조군인 L-ascorbic acid에 비해 20배 이상의 항산화 효능을 나타냄을 확인함

(그림 5-9).

(다) 산국 EO 단일성분의 free radical 소거능 검사

- 산국화 EO을 구성하는 single compounds의 항산화 활성을(free radical 소거능)을 ABTs 및 DPPH activity 검증을 통해 확인하였음. 이 중, eugenol (sc-203043)이 양성 대조군인

L-ascorbic acid에 비해, 매우 우수한 항산화 활성을 나타냄을 확인함 (그림 5-10).

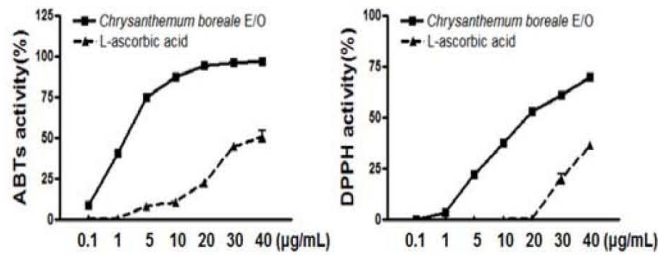


그림 5-9. 산국화 EO의 free radical 소거능

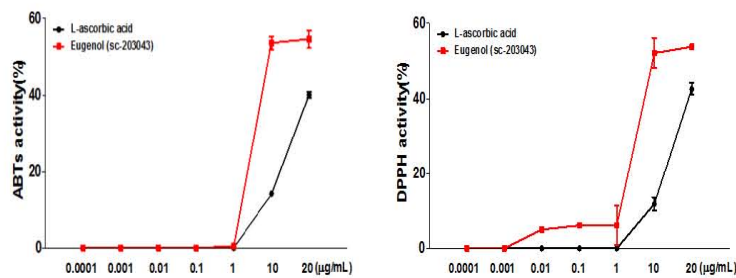


그림 5-10. Eugenol의 free radical 소거능

(라) 산국 EO의 항비만 효능 검사

- 산국화 EO의 항비만 효능은 세포독성이 없는 농도인 0.5 μg/ml 및 1 μg/ml의 농도에서 유의하게 지방전구세포(adipocyte)의 분화를 억제함을 확인함 (그림 5-11).
- 산국 essential oil은 향후 크립 및 경구 투여용 항비만 제재로서 활용가능성을 시사함.

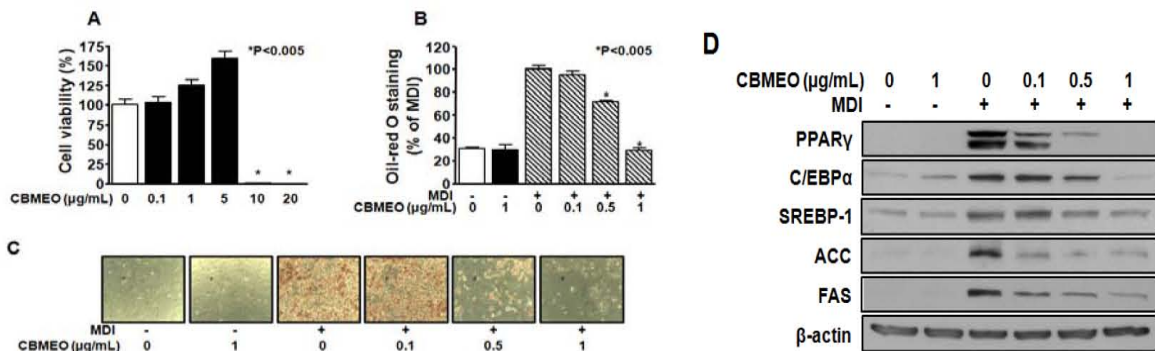


그림 5-11. 산국화 EO의 항비만 효능. (A) 세포독성 (B) 지방분화억제능 (C) 세포사진 (D) 관련 단백질 발현

(마) 결론, 이상의 결과들은 산국 EO가 다양한 효능을 발휘하므로 비 심혈관계에서 응용 및 활용 가능성을 가진 유용한 물질임을 시사함.

라. 산국 수용성 EO 성분분석

- 수용성 EO (산국화 EO 분리 후 수용액층인 floral water)의 성분분석을 GC-MS를 활용하여 분석(의뢰:한국기초과학지원연구원, KBSI, 서울서부센터)하였으며, 각 성분의 함량의 비교와 효능을 비교하였음 (그림 5-12).

No.	Compound	Area (%)	Activity
1	2,4-Pentadienenitrile	0.33	Unknown
2	cis-Carveol	0.35	Unknown
3	Thymol	1.09	Anti-cancer Anti-septic Anti-oxidant Anti-microbial Vasorelaxant effect et al.
4	Eugenol	0.48	Anti-inflammation Anti-cancer Anti-oxidation Anti-microbial Vasorelaxant effect et al.
5	1,2-cis-1,5-trans-2,5-dihydroxy-4-methyl-1-(10hydroxy-1-isopropyl)cyclohex-3-ene	2.14	Unknown
6	cis-4-Hydroxy-2-methyl-5-(1-hydroxy-1-isopropyl)-2-cyclohexen-1-one	1.29	Unknown
7	Methyl Ester of Ricinoleic acid	0.91	Unknown

그림 5-12 산국 수용성 EO성분의 분석

라. 산국 EO의 수득률 및 성분의 최적화

(1) 개화시기에 따른 산국 EO의 성분 변화 비교

(가) 방법

- 개화시기에 따른 산국화 EO 성분을 비교하기 위해, 꽃망울이 맺히기 전(vegetative), 꽃망울이 피기 전(pre-flowering), 꽃이 완전히 개화되고 난 후(full-flowering)의 산국화를 각각 채취하였음.
- 채취 시기별 수득률 및 분리된 산국화 EO의 성분을 분석함.

(나) 결과

① 수득률

- Vegetative, pre-flowering, full-flowering 상태의 산국화(25 kg)에서 steam distillation 방법을 활용하여 각각 EO를 분리하였으며, vegetative(23 ml, 0.092%), pre-flowering(50 ml, 0.2%), full-flowering(40 ml, 0.16%)의 수득률을 나타냄.
- 개화시기에 따른 산국화 EO의 수득률은 꽃망울이 피기 전(pre-flowering) 조건에서 가장 높게 나타났으며, 꽃이 완전히 개화되고 난 후에는 수득률이 감소되는 경향을 보임.

② 성분분석

- 채취 시기별로 분리된 산국화 EO의 성분 분석은 한국기초과학지원연구원(KBSI, 서울서부센터)에 의뢰하여 GC-MS를 이용하여 분석하였으며, 개화시기별 감소하는 성분 (그림 5-13), 개화 전 특이적 구성성분 (그림 5-14), 개화시기별 증가하는 성분 및 각 성분 (그림 5-15) 의 효능을

비교하였음.

- 개화시기에 따른 산국화 EO 성분의 변화는 pre-flowering에서  $\beta$ -thujone, umbellulon,  $\beta$ -phellandrene등을 포함한 7가지 성분이 특이적으로 존재하였음.

③ 결론 : 각 구성성분의 심혈관계 및 피부 기능성 연구를 통해 특이적인 EO 성분의 대량 분리는 각각의 채취시기의 조절이 요구되며, 본 연구결과의 활용 가치가 매우 높을 것임. 또한 Pre-flowering 상태에서 분리된 산국화 EO 성분의 효능은 anti-cancer, anti-inflammatory 효과가 보고되어져 있으나, 대부분 기능이 밝혀지지 않음으로서 향후 기능성 연구가 필요할 것으로 사료됨.

	Compound name	Percentage			Activity
		Vegetative	Pre-flowering	Full-flowering	
1	Germacrene-D	28.83	12.03	9.21	Unknown
2	Caryophyllene	9.95	4.61	4.04	Anti-cancer Anti-nephrotoxicity Anxiolytic-like effect Anti-microbial Anti-fungal Anti-inflammation Anti-oxidant
3	cis-Ocimene	3.06	1.35	1.4	Unknown
4	Camphene	2.82	3.01	4.03	Reduces plasma cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic
5	(-)- $\beta$ -pinene	4.66	2.77	3.06	Unknown
6	$\beta$ -Thujene	3.58	-	2.08	Unknown
7	Zingiberene	3.34	0.83	1.49	Unknown
8	Germacrene B	2.43	-	-	Unknown
9	$\delta$ -Cadinene	1.7	0.85	0.91	Unknown
10	$\beta$ -Cubebene	1.38	-	-	Unknown
11	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	1.23	-	-	Unknown
12	p-Cymol	1.18	1.25	-	Anti-nociceptive activity Anti-inflammation Protective effects in LPS-induced acute lung injury Anti-fungal Anti-microbial
13	$\beta$ -Selinene	1.17	-	-	Unknown
14	1,5,5-Trimethyl	1.13	-	-	Unknown
15	1,3,6-Octatriene,3,7-dimethyl-,(Z)-	1.11	-	-	Unknown
16	t-Muurolol	0.83	-	-	Unknown
17	$\gamma$ -Cadinene	0.78	-	-	Unknown

그림 5-13. 개화 시기별 감소하는 성분 및 효능비교

	Compound name	Percentage			Activity
		Vegetative	Pre-flowering	Full-flowering	
1	$\beta$ -Thujone	-	9.21	-	Anti-inflammatory Anti-tumor
2	Umbellulon	-	5.45	-	Unknown
3	$\beta$ -Phellandrene	-	1.56	-	Unknown
4	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	-	1.22	-	Unknown
5	Bicyclogermacrene	-	1	-	Unknown
6	$\beta$ -Elemene	-	0.73	-	Anti-cancer
7	$\alpha$ -Selinene	-	0.69	-	Unknown

그림 5-14. 개화 전(pre-flowering) 특이적 성분 및 효능비교



	Compound name	Percentage			Activity
		Vegetative	Pre-flowering	Full-flowering	
1	(-)-Camphor	9.64	15.36	19.34	Unknown
2	$\alpha$ -Pinene	3.91	4.84	6.02	Treatment of stress-induced hyperthermia Anti-leukemia Anti-inflammation Anti-metastatic Anti-fungal
3	$\alpha$ -Thujone	3.54	1.34	9.87	Unknown
4	Piperitone	2.76	3.24	2.84	Unknown
5	$\beta$ -Myrcene	2.32	2.17	2.43	Unknown
6	Sabinene	1.85	2.72	3.42	Anti-fungal activity
7	1,8-Cineole	1.79	2.94	4.1	Anti-cancer Anti-microbial Anti-oxidant Anti-inflammation Anti-virus Vasorelaxant Relaxation in airway smooth muscle
8	Thymol	0.86	2.07	2.11	Anti-virus Anti-cancer Anti-oxidant Anti-microbial Anti-fungal Relaxation of smooth muscles Spontaneous contractile activity of the smooth muscles
9	$\alpha$ -Thujene	-	2.49	2.13	Unknown
10	1-Phellandrene	-	1.97	2.24	Anti-microbial Anti-nociceptive
11	Borneol L	-	1.18	1.3	Unknown
12	Levobornyl acetate	-	1.05	1.18	Unknown
13	4-Terpineol	-	0.9	0.94	Anti-microbial Anti-biofilm Anti-fungal Anti-leukemic Anti-tumor Anti-hypertensive effects Anti-inflammation
14	$\gamma$ -Terpinene	-	0.67	0.9	Unknown
15	o-Cymol	-	-	1.53	Unknown
16	Chrysanthenyl acetate	-	-	1.17	Unknown

그림 5-15. 개화 시기별 증가하는 성분 및 효능비교

## (2) 채취시기별 EO 성분의 monoterpene 및 sesquiterpene 함량 비교

### (가) 방법

- 꽃망울이 맺히기 전(vegetative), 꽃망울이 개화되기 전(pre-flowering), 꽃이 완전히 개화되고 난 후(full-flowering)의 산국화를 각각 채취하였으며, 산국화 EO의 개화시기에 따른 monoterpene 및 sesquiterpene 성분의 비교 함

### (나) 결과

- vegetative, pre-flowering 및 full-flowering에서 모두 monoterpene의 함량이 높았으며, 특히 꽃망울이 맺히고 난 후 monoterpene 성분의 증가와 더불어 sesquiterpene 성분의 감소가 관찰됨 (그림 5-16). Pre-flowering 조건의 EO 성분 중 sesquiterpene 성분의 일부는 full-flowering 상태에서 일부 감소가 관찰됨 (그림 5-16).

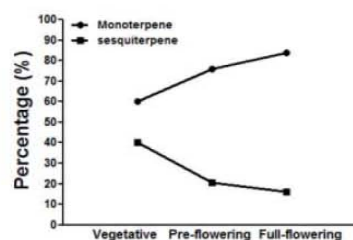


그림 5-16. 채취시기별 EO 성분의 monoterpene 및, sesquiterpene 함량 비교

### (3) 채취시기별 산국 EO의 효능

#### (가) 피부 재생능 확인

- 산국화 채취시기별[개화 전(vegetative), 개화 중(pre-flowering), 개화 후(full-flowering)] EO의 피부재생능을 확인하기 위해 keratinocyte 및 fibroblast 증식/이주능을 확인하였음 (그림 5-17).
- 개화 중(pre-flowering) EO는 EGF에 비해 높은 keratinocyte 및 fibroblast의 proliferation/migration을 유도하는 것이 확인됨. 반면, 개화 전(vegetative)과 개화 후(full-flowering)에 채취한 산국화 EO는 유의한 효과를 나타내지 않음.

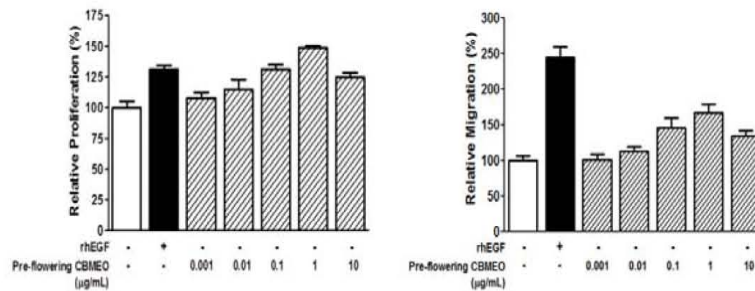


그림 5-17. Pre-flowering 산국 EO의 keratinocyte 재생능

#### (4) 채취시기별 산국 EO의 항산화 효능 확인

- 산국화 채취시기별[개화 전(vegetative), 개화 중(pre-flowering), 개화 후(full-flowering)] EO의 항산화 효능을 확인하기 위해 ABTs, DPPH free radical 소거능을 확인하였음 (그림 5-18).
- 양성 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 산국화 EO은 채취시기에 따른 항산화 효능의 차이는 나타내지 않았으나, 공통적으로 대조군인 L-ascorbic acid와 유사한 항산화 활성을 나타냄.

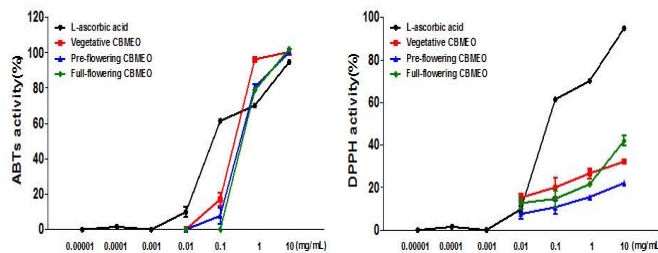


그림 5-18. 채취시기별 산국 EO의 free radical 소거능

### 사. 채취 지역별 산국 EO의 성분 분석 및 효능검증

#### (1) 채취지역에 따른 산국화 EO의 성분 변화 비교

##### (가) 방법

- 산국화 EO의 채취 지역별 성분 변화를 비교하기 위하여 북부(한계령 정상 인근), 중부(충남 아산), 남부(남해군청 인근)에서 개화 전(pre-flowering) 상태의 산국화를 각각 25 kg 채취하였음. 각지역에서 채취한 산국화 EO의 분리는 steam distillation 법을 활용하였으며, 채취 지역별 수득률 및 분리된 산국화 EO의 성분을 분석함.

##### (나) 결과

① 수득률

- 북부에서 3.2 ml (0.17%, 중부에서 50 ml (0.2%), 남부에서 43.7 ml (0.18%)의 수득률이 나타남을 확인하였음. 지역별(북부, 중부, 남부) 산국 EO의 수득률은 중부-남부-북부 순으로 수득률이 높음을 확인 함. 중부 지역(충남 아산)이 가장 높은 수득률을 나타내어 EO 분리용 산국화 재배에 있어서 최적지임을 나타내는 자료를 확보함.

② 성분분석

- 지역별로 분리된 산국화 EO의 성분 분석은 한국기초과학지원연구원(KBSI, 서울서부센터)에 의뢰하여 GC-MS를 활용하여, 각 성분의 함량의 비교와 효능을 비교함 (그림 5-19).

Compound name	Percentage			Activity
	Northern part	Middle part	Southern part	
1 β-Thujone	19.89	9.21	-	Anti-inflammatory Anti-tumor
2 (-)-Camphor	16.18	15.36	-	Unknown
3 Germacrene-D	8.41	12.03	8.64	Unknown
4 α-Pinene	5.22	4.84	3.47	Treatment of stress-induced hyperthermia Anti-leukemia Anti-inflammation Anti-metastatic Anti-fungal Anti-cancer Anti-nephrotoxicity Anxiolytic-like effect
5 Caryophyllene	3.8	4.61	3.49	Anti-microbial Anti-fungal Anti-inflammation Anti-oxidant
6 1,8-Cineole	3.77	2.94	10.6	Anti-cancer Anti-microbial Anti-oxidant Anti-inflammation Anti-virus Vasorelaxant Relaxation in airway smooth muscle
7 α-Thujone	3.61	1.34	10.65	Unknown
8 Camphene	3.27	3.01	3.98	Reduces plasma cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic
9 1-Phellandrene	3.24	1.97	1.34	Anti-microbial Anti-nociceptive
10 Piperitone	2.58	3.24	0.87	Unknown
11 Sabinene	2.54	2.72	3.69	Anti-fungal activity
12 β-Pinene	2.06	-	-	Anti-oxidant
13 Bifolone	1.54	-	3.04	Unknown
14 β-Myrcene	1.39	2.17	2.95	Unknown
15 (E)-Ocimene	1.39	1.35	-	Unknown
16 p-Cymol	1.18	1.25	-	Anti-nociceptive activity Anti-inflammation Anti-fungal Anti-microbial
17 4-Terpineol	1.04	0.9	1.92	Anti-microbial Anti-biofilm Anti-fungal Anti-leukemic Anti-tumor Anti-hypertensive effects Anti-inflammation
18 Borneol L	0.96	1.18	1.56	Unknown
19 L-bornyl acetate	0.86	1.05	1.69	Unknown
20 γ-Terpinene	0.73	0.67	1.06	Unknown
21 Chrysanthenyl acetate	0.66	-	-	Unknown
22 bicyclgermacrene	0.65	1	-	Unknown
23 3-Cyclohexene-1-methanol, α,α,α-trimethyl-	0.63	-	-	Unknown
24 chrysanthenone	0.61	-	1.23	Unknown
25 Thymol	-	2.07	1.99	Anti-virus Anti-cancer Anti-oxidant Anti-microbial Anti-fungal Relaxation of smooth muscles Spontaneous contractile activity of the smooth muscles
26 α-Thujene	-	2.49	1.16	Unknown
27 (-)-β-Pinene	-	2.77	2.31	Unknown
28 Umbellulol	-	5.45	5.91	Unknown
29 E-ocimenone	-	-	0.76	Unknown
30 Camphor	-	-	18.53	Anti-oxidant Anti-tumor
31 α-Selinene	-	0.69	-	Unknown
32 δ-Cadinene	-	0.85	-	Unknown
33 Zingiberene	-	0.83	-	Unknown
34 β-Elemene	-	0.73	-	Anti-cancer
35 Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	-	-	1.54	Unknown
36 β-Phellandrene	-	1.56	-	Unknown
37 Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	-	1.22	-	Unknown

그림 5-19. 개취 지역에 따른 산국화 EO 성분 및 효능비교



(2) 채취지역별 EO 성분의 monoterpene 및 sesquiterpene 함량 비교

(가) 방법

- 산국화 EO의 채취지역을 북부(강원 설악, 한계령), 중부(충남 아산) 및 남부(경남 남해)로 구분하여, 채취지역에 따른 monoterpene 및 sesquiterpene 의 함량을 비교함 (그림 5-20).

(나) 결과

- 북부(강원 설악, 한계령), 중부(충남 아산) 및 남부(경남 남해)에서 모두 monoterpene의 함량이 높게 나타남.
- 또한 중부(충남 아산)지역의 산국화 EO 성분에서 monoterpene 및 sesquiterpene 성분의 함량이 북부 또는 남부 지역에 비해 높게 나타남을 확인함.

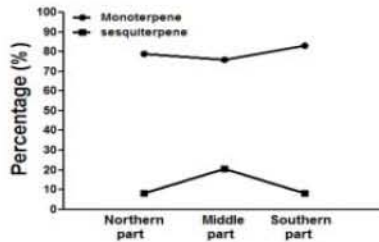


그림 5-20. 채취지역별 EO성분의 monoterpene 및 sesquiterpene 함량 비교.

(3) 채취지역별 산국 EO의 피부 재생능 확인

- 산국 채취지역별[북부(강원 설악, 한계령), 중부(충남 아산) 및 남부(경남 남해)] EO의 피부 재생능을 확인하기 위해 fibroblast 증식/이주능을 확인하였음 (그림 5-21).
- 중부(충남 아산)에서 채취한 산국화 EO는 EGF에 비해 유의한 증식/이주능을 유도한 반면, 북부(강원 설악, 한계령)와 남부(경남 남해)에 채취한 산국화 EO는 증식 및 이주능이 관찰되지 않음.

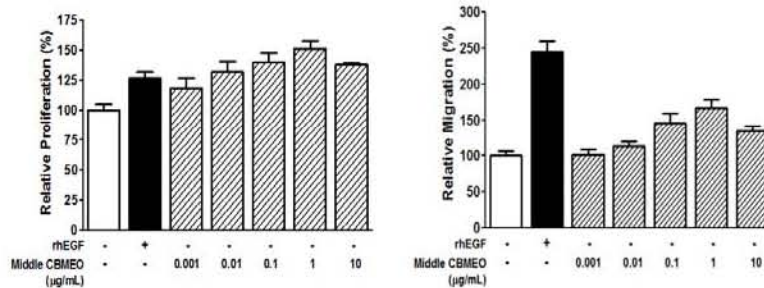


그림 5-21. 채취지역별 산국 EO의 fibroblast 재생능 (중부)

(4) 채취지역별 산국 EO의 항산화 효능 확인

- 우리나라 북부(강원 설악, 한계령), 중부(충남 아산) 및 남부(경남 남해)에서 채취된 산국화 EO의 항산화 효능 (free radical 소거능)을 ABTs 및 DPPH assay를 통해 확인 하였음 (그림 5-22).
- 양성 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 산국화 EO은 채취지역에 따른 항산화 효능의 차이는 나타내지 않았으나, 공통적으로 대조군인 L-ascorbic acid와 유사한 항산화 활성을 나타냄.



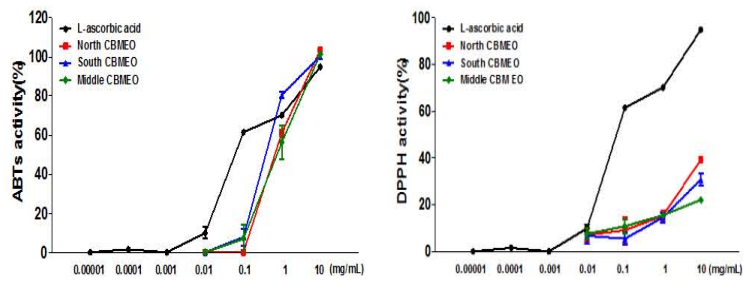


그림 5-22. 채취지역별 산국화 essential oil의 free radical 소거능

## 제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 제1절 목표의 달성도

[종합]

연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1. 산국 재배지 확보	3,000평 확보	100
2. Essential oil의 분리/정제 조건 확립	증류액 2Ton 확보 Essential oil 15L 확보	100
3. 성분의 항 고혈압 기능 연구	효능 분석(5개 실험군)	100
4. 성분의 항 동맥경화 기능 연구	효능 분석(4개 실험군)	100
5. 성분의 안전성 검증	시험분석 완료(인체안전성검증의 IRB신청중)	90
6. Essential oil 함유 제제의 시험	시험분석	100
7. 항 고혈압 기능 시제품(스프레이제)	1 품목 (2 종류)	100
8. 항 동맥경화 시제품	1 품목	100
9. 특허의 출원	5건 출원 (1건 등록)	100
10. SCI 논문의 발간	5편 게재	100

[세부 연구목표 달성도]

1. 1차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
산국 essential oil (EO)성분의 동맥경화 개선능 검증	VSMC 증식 및 이주 유도활성 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>aortic sprout의 발생과 이에 대한 산국 EO(수용성)의 억제 효과 검증 (2개 agonist, 4개 농도)</li> <li>증식, 이주 억제능 연구 (2 agonist, 4 농도)</li> </ul>
	HUVEC의 증식 및 이주 억제활성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>HUVEC agonist의 증식능에 대한 효능연구</li> </ul>
	신장/심장에 대한동맥경화 지표에 대한 효능	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>신장 profibrotic gene 발현에 대한 산국 EO(수용성)의 효능 검증(4개 gene)</li> <li>심장 apoptosis, ROS 발생에 대한 EO(수용성)의 효능검정 (tunnel assay, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</li> </ul>
	EO 성분의 in vivo 동맥경화 활성화	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국 EO(수용성)에 의한 neointima 감소의 기능규명</li> <li>aortic sprout와의 비교 검토 (특허 출원)</li> </ul>
	산국 EO를 GC/MS로 분석하여 얻은 단일 성분을 이용한 ex vivo 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>carvarol, thymol의 효능 검토와 EO(수용성)의 비교</li> </ul>
산국 EO 성분을 이용한 혈관기능 개선능 검증	혈관의 수축 및 이완 유도활성 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>NE 처리에 대한 산국 EO(수용성)의 억제 효과 검증, ACh의 반응에 대한 EO(수용성)의 효과 검증</li> </ul>
	혈관의 이완 기전 억제활성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국 EO(수용성)성분에 의한 NO 발생 및 eNOS의 발현에 대한 효과 검증(2개 단백질, NO)</li> </ul>
	신장, 심장, 혈관에 대한 고혈압 지표에 대한 효능 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>DJ-1, PRR, Ref-1 단백질 발현에 대한 EO의 기능 규명 (4개 gene)</li> </ul>
	산국 EO를 GC/MS로 분석하여 얻은 단일 성분을 이용한 수축 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>carvarol, thymol의 항고혈압 효능 검토</li> <li>carvarol, thymol와 EO의 비교</li> </ul>
산국재배지 확보 및 재배 조건의 확립	호서대 실습지 내 산국 재배지 3,000평 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>호서대 실습지 내 산국 재배지 3000평 확보 및 균일 조건 하에서의 재배지관리</li> </ul>
	최적 재배조건의 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국 재배지의 제조작업을 보완하기 위해 부직포/비닐 멀칭 설비를 구축 및 배수 시설 확충</li> <li>동맥경화, 고혈압 성분 screen을 위한 유효성분 추출 조건 점검/재배 환경 확립.</li> <li>산국화로부터 추출된 EO(지용성 성분)의 성분분석을 실시하여 42가지의 성분을 정성 및 비교 정량.(특허1건 출원)</li> </ul>

2. 2차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
산국 monoterpene 성분의 EO 대체 효과 검증	산국 monoterpene 성분의 고혈압 지표에 대한 효능 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>대표 monoterpene의 선정</li> <li>고혈압관련인자인 산화스트레스성 반응 관련지표에 대한 monoterpene류 EO순수성분의 효과 test (ROS, apoptosis, DJ-1, Prx. Bax)</li> </ul>
	산국 monoterpene 성분의 in vivo 고혈압 활성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>대표 monoterpene류 EO순수성분의 항고혈압능력을 모델동물을 이용하여 검증</li> </ul>
	신장, 심장, 혈관에 대한 동맥경화 지표에 대한 효능 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>동맥경화지표에 대한 대표 monoterpene류 EO순수성분에 의한 신장,심장,혈관세포에서 효과 test 및 분석 (profibrotic, apoptosis, ROS)</li> </ul>
	산국 monoterpene 성분의 in vivo 동맥경화 활성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>대표 monoterpene의 항동맥경화능에 대해 모델동물을 이용하여 검증</li> </ul>
산국 EO 성분을 이용한 폐성고혈압 치료제/완화제 개발	폐혈관의 수축 및 이완 유도활성 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>폐혈관을 이용한 산국 EO의 억제 효과 검증, ACh의 반응에 대한 EO의 효과 검증</li> </ul>
	폐성고혈압 모델동물의 지표에 대한 효능	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Endothelin에 의한 폐동맥 수축능에 대한 산국 EO 및 순수성분의 효과 test</li> </ul>
	산국 EO 성분의 in vivo 폐성 고혈압 활성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>EO 및 순수성분의 SHR에 대한 혈압 강하 효과 test</li> <li>폐 조직에 대한 EO순수성분의 효과 확인 (COX2, NF-kb, Bax, ICAM-1)</li> </ul>
	산국 EO를 GC/MS로 분석하여 얻은 단일 성분을 이용한 폐성고혈압 억제 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국floral water성분 및 EO성분의 분석 (monoterpene류선정)</li> <li>대표 monoterpene의 항폐고혈압 능력 검증</li> </ul>
	혈관질환 치료제의 제형 및 제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>타겟 EO의 안정성 검증</li> <li>기존 강압제와의 mix를 통한 EO 함유 spray 제작(2종류와 혼화, BP 측정) 설계</li> </ul>
산국 EO성분의 순수 정제 방법/수득률의 최적화 확립 및 피부 외용제로서 가능성 연구	최적의 EO 추출 방법의 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국 EO의 표준화에 대한 기초 자료로서 활용하기 위한 성분 분석(산지, 채취 시기 및 재배 조건에 따른 정유 성분의 구성 및 함량 변화 등)</li> <li>이를 통한 최적 재배조건의 구체적 기준 재확립</li> <li>초고압 추출법, 초임계 추출법, 수증기 증류법 등의 연구를 통해 가장 적합한 추출방법 모색</li> </ul>
	추출조건, 순수 분리/정제 방법 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Charcoal filter, boiling point 활용, 원심분리 등의 연구를 통해 EO의 순수분리 정제 (EO로부터 monoterpene 성분등 추출)</li> </ul>
	산국 EO의 상처치유 및 피부 질환 개선능 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>상처치유, 피부재생 및 피부 외용제로서 가능성 연구</li> <li>채취시기, 채취지역별 항산화 및 피부재생관련 효능 변화 연구</li> <li>산국화 EO의 단일 성분을 이용한 효능 연구</li> </ul>



### 3. 3차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도(%)	연구개발 수행 내용
산국 EO성분을 함유하는 동맥경화 개선 시제품 출시	산국 EO 및 monoterpene 성분을 포함한 제형의 개발 및 시제품 출시	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>기존 제품과 산국 EO 성분을 함유한 항동맥경화 제형의 개발(특히 출원)</li> <li>산국 EO의 규격 설정</li> <li>1종 시제품의 개발</li> <li>시제품 출시</li> </ul>
	혈관질환 치료제의 제형 및 제품 완성	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>효능 검정을 바탕으로 한 제품의 개발</li> </ul>
	산국 성분을 포함한 항 동맥경화 제형의 개발 및 시제품 출시	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국 EO 및 대표 monoterpene 성분을 함유한 항동맥경화 제형의 개발</li> </ul>
산국 EO 성분을 함유하는 고혈압개선 시제품 출시	in vitro 혈압, 폐성 고혈압, 동맥경화에 대한 시험	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>1과제에서 개발된 제품의 항고혈압능 검정</li> <li>1과제에서 개발된 제품의 항동맥경화 검정</li> <li>1종 시제품의 개발</li> </ul>
	in vitro inflammation 유도인자 발현성 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>개발 제품의 항염증 및 염증 개선능 검정 (ICAM-1, NF-κB 등)</li> </ul>
	ex vivo 혈관자극성을 통한 안전성 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>개발 제품의 ex vivo 안전성 검정</li> </ul>
	내과 전문가 의견 및 컨설팅	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>내과의 컨설팅을 통한 개발 제품 효능 및 안전성 확립</li> </ul>
산국 EO 및 monoterpene 성분의 안전성 검증	essential oil의 급성독성 연구를 통한 인체 안전성 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국화 EO의 설치류 급성흡입독성시험연구</li> <li>산국화 EO의 설치류 반복독성시험연구</li> </ul>
	실험동물을 활용한 in vivo 연구를 통한 급성독성 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국화 EO의 설치류 급성경피독성시험연구</li> </ul>
	실험동물을 활용한 in vivo 연구를 통한 안전성 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>산국화 EO의 설치류 급성경구독성시험연구</li> </ul>
	인체 간이 임상 실시	90 (IRB 신청 중)	<ul style="list-style-type: none"> <li>인체에서의 효능 검정(정상인 10명에 대한 안전성 효능검사, BP)</li> </ul>

## 제2절 관련분야에의 기여도

### 1. 개괄

- 고효능 EO의 독자적인 개발에 관한 핵심/원천기술의 확보
- 산국 EO의 대량생산 및 상용화를 통한 EO수입대체 효과
- 산국 성분을 이용한 혈관 질환 및 동맥경화 치료제/완화제 개발.

### 2. 기술적 측면

- 현재까지 사용되고 있는 EO의 대부분은 유럽을 중심으로 캐나다, 호주 등의 국가에서 자생

하는 허브식물을 바탕으로 개발이 진행되어져 국내 기술개발은 미약한 실정임. 본 연구를 통한 국내 고유 자생식물을 활용한 EO의 개발은 재료의 정제, 대량화 및 제품화 등의 측면에서 국내 관련분야의 핵심/원천 기술을 확보할 수 있음.

- 산국 EO는 본 연구진에 의해 혈관의 증식 억제효과가 밝혀졌으며, 국내 고유 자생식물을 활용한 EO의 개발은 국내 자생식물의 경제적 가치를 증대 시킬 수 있음. 이를 활용한 순환기질환 치료제/완화제의 개발은 국내 관련 기업의 국제 경쟁력 확보에 기여할 수 있을 것임. 또한 본 시료를 이용하여 다른 분야의 치료제, 예방제로의 응용은 다양한 기술적 문제를 해결할 수 있을 것임.

### 3. 경제·산업적 측면

- 본 연구진이 확보한 연구결과는 제약업계가 활용하여 미국, 유럽 등 선진국과 경쟁할 수 있는 방안을 모색하게 한다. 새로운 동맥경화 치료제로서의 산업화로 경제적인 가치 창출이 가능할 것임.
- 합성 의약품으로 완치가 불가능했던 만성질환, 복합질환을 치료할 수 있는 대안으로 천연물 신약으로 제시함으로써 틈새시장을 차지할 수 있을 것으로 기대됨.
- 과거 천연물 신약의 효과에 대한 의구심으로 말미암아 천연물 연구에 대한 투자가 부족하였으나 합성 의약품과는 차별화된 치료효능을 인정받으면서 관심, 투자, 연구 등을 활발히 하게 되는 효과가 얻어질 것임. 한미 FTA가 발효되면 제네릭 위주의 국내 제약산업은 위기에 직면하게 되어 제약기업이 위험에 빠질 수 있으나 천연물에서 새로운 돌파구를 찾을 수 있음.

### 4. 사회적 측면

- 국내 자생 산국으로부터 분리된 산국 EO의 혈관평활근 및 세포에 대한 약리적 효과 기전을 밝힘으로써 산국 EO에 대한 약리학적 효능에 대한 국민 신뢰도 구축.
- 국내 자생의 천연물을 활용함으로써 국민의 건강 보건 향상 뿐 만 아니라 국민의 정서면에서 자긍심 고취에 일조.
- 국내 자생의 한국형 EO을 활용함으로써 향후 국내 자생 자원의 부가가치 증대 및 한국을 대표할 수 있는 국가 대표 브랜드로서의 성장 가능성의 길을 제공.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제1절 연구개발 성과

#### 1. 연구개발결과의 성과 및 목표 대비실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 이전	교육 지도	시제품	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	사업화
	출원	등록	SCI	비SCI									
최종목표	3		3		0	1				5		0	
1차년도	목표	1	0	1		0				2			
	실적	2	0	0		3				2			
2차년도	목표	1	0	1		0		1		3		0	
	실적	2	0	0		2				5		1	
3차년도	목표	1	0	1		0	1	1					
	실적	1	1	5		1	1	3					
합계	목표	3	0	3		0	1	2		5		0	
	실적	5	1	5		6	1	3		7		1	

#### 2. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	Skin regeneration effect and chemical composition of essential oil from <i>Artemisia Montana</i>	Mi-So Yoon,	Hwan-Myung Lee, Bokyung Kim	Kyung-Jong Won, Do-Yoon Kim, Dae Il Hwang,, Seok-Won Yoon	Natural Product Communication	9(11): 1619-1622	국외	SCI
2015	Carvacrol inhibits atherosclerotic neointima formation by downregulating reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells	Kang-Palee	Kyung Jong Won	Sudjarwo Giftania W Sudjarwo, Seung Hyo Jung, Donghyun Lee, Dong-Young Lee, Gyoung Buom Lee, Suji Baek, Do-Yoon Kim, Hwan-Myung Lee, Bokyung Kim, Seong-Chun Kwon	Atherosclerosis	240(2): 367-733	국외	SCI

계재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2015	<i>Chrysanthemum boreale</i> flower floral water inhibits platelet-derived growth factor-stimulated migration and proliferation in vascular smooth muscle cells	Do-YoonKim	Hwan-Myung Lee, Bokyung Kim	Won, Mi-So Yoon, Ho-Jin Yu, Joo-Hoon Park	Pharmaceutical Biology	53(5): 725-734.	국외	SCI
2015	<i>Chrysanthemum boreale</i> Makino essential oil induces keratinocyte proliferation and skin regeneration.	Do-Yoon Kim	Hwan-Myung Lee, Bokyung Kim	Kyung-Jong Won, Mi-So Yoon, Dae Il Hwang,, Seok-Won Yoon, Joo-Hoon Park	Natural Product Research	29(6): 562-564.	국외	SCI
2015	Potential skin regeneration activity and chemical composition of absolute from <i>Puerariathunbergiana</i> flower	Do-Yoon Kim	Hwan-Myung Lee,	Kyung-Jong Won, Dae Il Hwang, Su Jin Lee, Joo-Hoon Park, Myeong Sik Yoon, Bokyung Kim	Natural Product Communication	In press	국외	SCI

4. 학회발표성과

계재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Steam distillation extract of chrysanthemim boreale makino inhibits pletelet-derived growth factor-sstimulated migration and proliteration in aortic smooth muscle cells	Hee-Dong Im	Hwan-Myung Lee	Do-Yoon kim, Mi-so Yoon, Ho-jin Yu, Joo-Hoon Park, Kyung-Jong Won, Bokyung Kim	The korean journal of physiology and pharmacology	Vol. 16	국내	SCI
2013	Carvacol inhibits neointimal formation by arresting reactive oxygen species-mediated migration and proliferation in rat vascular smooth muscle cells	Giftania W. sudjarwo	Bokyung Kim	Kang Pa Lee, Seung Hyo Jung, Sehyung Pak, Hwan-Myung Lee, Jung hwan Kim, Kyung-Jong Won,	Korean Association of Basic Scientists	21회	국내	비 SCI
2013	Effect of skin regeneration and composition of the essential oil from <i>Artemisiamontan Pampan</i>	Mi-So Yoon	Hwan-Myung Lee	Do-Yoon Kim, Joo-Hoon Park, Kyung-Jong Won, Bokyung Kim	The korean journal of physiology and pharmacology	Vol. 17 Supplement I	국내	SCI



게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Carvacol attenuates neointimal formation by suppressing ROS-mediated responses in rat vascular smooth muscle cells	Giftania W. sudjarwo	Bokyoung Kim	Kang Pa Lee, Seung Hyo Jung, Eun-Seok Park, Hwan-Myung Lee, Junghwan Kim, Kyung-Jong Won	Annual meeting of the Korean society for smooth muscle reaseah	22회	국내	비 SCI
2013	Effect of essential oil extracted from chrysanthemim boreale makino on skin regeneration and wound	Do-Yoon Kim	Hwan-Myung Lee	Mi-so Yoon, Joo-Hoon Park, Kyung-Jong Won, Bokyoung Kim	The korean journal of physiology and pharmacology	Vol. 17 Supplement I	국내	비SCI
2015	Carvacrol attenuates vascular neointima formation by inhibiting reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells	Kang Pa Lee	Bokyoung Kim	Seung Hyo Jung, Donghyen Lee, Dong-Youb Lee, Gyoung Beom Lee, Suji Baek, Hwan Myung Lee, Kyung Jong Won, Young Min Bae	Korean Association of Basic Scientists	Korean Association of Basic Scientists	21회	국내

#### 4. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012	산국 증류액 성분을 포함하는 동맥경화 또는 심혈관질환의 예방 또는 치료용 조성물	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0105062					
2013	산국 에센셜 오일을 유효 성분으로 함유하는 피부재생용 화장료 및 피부외용제 조성물	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0093934	2015	산국 에센셜 오일을 유효 성분으로 함유하는 피부재생용 화장료 및 피부외용제 조성물	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-1550578
2014	산국 에센셜 오일을 유효 성분으로 함유하는 항산화 및 항비만 조성물	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0178162					

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2014	취의 꽃으로부터 추출된 정유를 포함하는 피부 재생용 외용제 및 화장료 조성물	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0026888					
2014	개똥쭉 에센셜 오일을 유효 성분으로 포함하는 피부재생, 항산화 및 항비만용 조성물	호서대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0083533					

## 5. 인력활용/양성 성과

### 가. 인력지원 성과

년도	지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
1차	8	1	4		3	6	2	3		5
2차	10	3	4		3	6	4	4		6
3차	10	3	3	1	3	7	3	4		6

## 6. 홍보/전시

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	한국의 담은 향기 전시회	산국 essential oil	역삼역 (예정갤러리)	2013

## 7. 기타 : EO 전용 추출/분리실 확보 및 장비 셋팅

- EO 전용 추출/분리실을 호서대학교(한방화장품과학과) 실습지내에 확보(약 20평).
- 농축기(1대), 대형추출기 (2대), 간이 추출기(1대), 기타 absolute 추출장비 및 압착 추출장비등을 확보 셋팅 (본문 "4. 산국을 이용한 한국자생식물 EO의 개발" 참조).

## 제2절 성과 활용계획

○ 천연물 신약은 현재 표준으로 사용되는 항동맥경화약에 비해 우수하여 새로운 개념으로 개발된 본 연구 개발결과를 약물로서 응용 가능하다면 기존약물을 대체할 장점을 가지며 제약계

의 새로운 자원으로 활용이 가능할 것으로 기대됨.

○ 본 과제에서 수행된 천연물에 대한 연구는 기능 유전체와 같은 기초 연구에 연결되는 생체 기능연구의 강력한 수단이 될 뿐만 아니라 독창적 신약개발연구에 결정적 기여를 하는 전인차 역할을 할 것임.

○ 관련기업에 기술이전 및 지원을 통한 시제품개발/제품화/상용화를 위한 관련기업과의 협력 연구수행.

- 본 과제에서 추출/연구된 산국 에센셜 오일의 인체 안정성검증을 위한 간이 임상시험에서 인체 안정성에 영향을 주지 않는 결과가 도출 되는 경우 경제적 여건에 따른 임상효능 평가의 시행고려.

- 개발 제품의 효능의 검증 및 품질 신뢰성 조성을 위한 양산된 제품의 품질검사를 통한 품질관리 지원에 활용: 지표물질의 동등성(지표성분 함량) 유지여부 검사지원, 혈관질환에 대한 효능의 유지여부 검사 지원 등에 대한 조언.

- 의약품 및 의약품외 (식품 등) 관련 분야의 제품 업체에 혈관질환 개선에 효능을 보이는 산국 EO 및 추출물 함유 기능성 제품개발을 위한 양질의 R&D 기술 지원/이전 및 교육/지도를 통해 관련 기업과 공동 연구를 위해 활용.

- 제품화/상용화 성공을 위한 관련 전문가의 동원 및 컨설팅 추구: 도출된 결과를 바탕으로 외부의기능성식품, 순환기질환의 전문가와의 관련 분야의 컨설팅의 지속 및 참여기업 및 참여연구원과의 지속적인 협력연계를 유지할 계획임. 이는 혈관질환치료 소재 개발에 필요한 제형, 제제 등에 대한 사업 및 시제품개발/제품화/상용화를 위한 연구/기획 및 정보교류의 좋은 방편이 될 것임.

○ 관련 산업의 성장기반 조성

- 고 소득층의 EO 성분 추출기 개발을 통한 자생식물을 이용한 한국형 EO 개발의 활성화를 위한 기초정보로서 활용.

- 자생 한국형 산국 에센셜 오일의 효능에 대한 기전 규명 및 효능 검증에 의한 개발 제품품질 신뢰성의 조성 및 소비자 신뢰성 구축.

- 이를 기초로 차별화된 경쟁력 확보를 통해 새로운 시장개척 및 제품 매출 증대를 위한 활용.

- 자생 한국형 산국 에센셜 오일의 용도의 다양성 및 우수성의 홍보에 일조

- 산학 연계에 의한 연구개발기술의 공정상에서 발생할 다양한 문제에 대한 대처 및 개선을 통한 양질의 상품 개발에 일조.

- 최근의 소비자 기호성향에 적합한 고기능성 및 안전성을 추구한 제품의 마케팅전략에 일조하기 위하여 본 연구결과를 홍보에 적극 활용.

○ 인력 공급

- 본 연구는 고급 연구기술을 활용함으로써 관련 연구에 필요한 많은 지식 및 기술을 가진 우수한 인력을 양성을 통한 관련 현장에 인력수급에 일조함.

○ 타 분야에서 활용

- 산국 EO의 대량 생산 및 상용화를 통한 화장품, 의약품, 식품의 원료로 활용함.

- 산국 EO 성분을 함유하는 주름개선 화장품 및 상처치유제의 개발이 가능할 것으로 사료됨.

○ 기타(논문, 특허, 타 연구 등)

-본 연구에서 도출된 혈관질환에서의 산국 에센셜 오일 및 추출물의 기능에 대한 더욱 상세한 기전 규명 및 유효성분 기전규명은 신규성이 클 것으로 예상됨. 따라서 저명 SCI급 저널에 좀 더 논문을 게재할 수 있으리라 기대함.

- 부가적으로 도출된 연구결과들은 다각도로 데이터를 검토하고 다듬으면 양질의 특허 출원을 위한 자료로 더욱 활용 할 계획임.

- 혈관질환 뿐 만 아니라 다른 질환대한 효과의 탐색을 위한 추가 연구

- 산국 EO 및 추출물을 이용한 건강 기능성 식품의 개발을 위한 추가연구

- 산국 EO의 생산비용 감축을 위한 추가 연구: 본 연구에서 소요된 산국 EO 생산비 (아래 표 참조)를 제품개발 및 상용화측면에서 기존 관련 타제품과의 가격 경쟁력 우위를 위해 보다 낮추기 위한 추후 연구는 타 관련제품과 산국 EO의 효과의 적절한 평가를 위해 필요할 것으로 사료됨.

적 요		예상액 (원)
필요 산국화 양 (400 kg; 수득률-0.25%)		
필요 재배지 (1322 m <sup>2</sup> )		
산국화 식재비		2,000,000
유기농 퇴비		1,000,000
제초비용		2,000,000
수확비용 (인건비)		2,000,000
에센셜오일 추출/정제비	인건비	2,000,000
	정제비	500,000
에센셜오일 보관/유지비		500,000
<b>총 비용</b>		<b>10,000,000</b>

※산국화 EO 1 liter 생산을 위해 필요한 조건 및 소요예상액



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본과제의 수행과정 중에 문헌분석 및 internet을 활용한 정보 조사 등을 통하여 수집한 해외 과학기술 정보에 의하면, 동·식물 등 천연물에서 추출한 물질을 정제해 만드는 천연물 신약이 제약산업에 있어서 미래의 유망분야로 주목받고 있음을 실감할 수 있었음. 연구개발과정중 수집한 해외과학기술 정보를 개괄적으로 요약하면 다음과 같음. 미국 NCI 및 Merck, Schering-Plough, Univera등 국립 연구 기관과 제약회사에서는 새로운 천연물 확보, library화 및 약리 활성 평가 등에 지속적인 투자등 천연물분야에 관심이 증가하고 있음. 최근 유전자원 (실질적 또는 잠재적으로 이용 및 보존가치가 있는 생물자원) 및 전통지식의 보호문제가 WIPO를 비롯하여 WTO, 생물다양성협약 (CBD) 등 각종 국제기구에서 활발히 논의되고 있고, 브라질 등의 개발도상국들은 전통의약자원 및 이에 관한 유전자원 및 전통지식의 강력한 보호를 주장하며, 출처공개, 사전동의 및 이익 공유를 반영한 법적 구속력이 있는 국제규범의 도입을 주장하고 있는 실정임. 국내 생물자원은 약3만종으로 세계 생물자원이 약175만종이나 되는 것을 고려하면 국내 실정은 절대적으로 열세를 보이고 있음. 현재까지 사용되고 있는 EO의 대부분은 유럽을 중심으로 캐나다, 호주 등의 국가에서 자생하는 허브식물을 바탕으로 개발이 진행되어지고 있으나, 아직 산국EO를 이용한 혈관질환 치료/완화제에 대한 연구는 전무한 상태임. 따라서 본 과제에서 도출한 산국 EO의 혈관질환에 대한 효과는 세계의 관련시장의 선점에 일조할 것으로 기대함. 한편, 한국이 천연물 의약품 시장에서 생물자원의 주도권을 확보하기 위해서는 적극적으로 국내 뿐 만이 아닌 외국 천연자원을 확보하여 이를 생물자원 또는 의약자원으로 이용하는 노력이 필요하며, 바이오산업의 원천 유용생물자원의 보고인 외국을 대상으로 해외생물소재 공급시스템을 구축하고 신약개발의 소재로 활용하는 등의 적극적인 도전이 필요할 것임. 이에 본 연구는 향후 관련 연구를 위해 적용할 수 있는 좋은 정보 자료로서 일조가 기대됨.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

관련 사항 없음.

## 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

- 본 연구자 소속의 대학들은 실험실 안전관리 규정을 제정하여 안전관리에 관련한 심의 위원회를 별도로 두고 있으며, 실험실 안전을 위한 관련 방안을 실행 함.
- 실험실 안전 환경관리 규정 및 이와 관련된 시행세칙을 제정하고 정기적으로 안전점검 침 관련 연구원의 교육훈련을 실시함.
- 실험실은 캠퍼스 안전관리 전담부서에 등록하여 실험실의 위험등급을 지정하고 소속기관장 및 전담 부서의 정기적인 안전점검을 받도록 하고 있으며, 필요할 경우 정밀 안전진단을 실시함.
- 또한 이와 더불어 매년 참여연구원등의 연구 활동종사자의 현황 및 안전관리교육 이수 여부를 점검함.
- 본교는 각 실험실 안전관리에 필요한 비용을 확보하고, 연구 활동종사자의 보험료, 교육훈련, 건강검진 비용, 보호구장비 구입, 안전설비 설치, 유지 및 보수, 안전점검 및 정밀안전진단비로 사용함.
- 또한 연구 활동종사자를 피 보험자 및 수익자로 하는 보험에 가입함. 소속기관장은 인체관련의 위험성에 노출이 의심되는 연구원은 매년 건강검진을 실시함.
- 구체적인 안전관리 이행 실적은 다음과 같음.
- 안전관리등급 기준에 의거 실험실을 적절히 관리하고 있음.

A등급: 45개소	B등급: 30개소	C등급: 27개소	연구활동종사자: 4507명
-----------	-----------	-----------	----------------

※ 관리위험등급의 지정

- A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
- B등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- C등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

■ 또한, 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 명시된 연구활동종사자에 대하여 정기적으로 안전교육 및 일반·특수 건강검진을 시행하고 있음.

구 분	내 용	시행시기	대 상
안전교육	연구활동종사자 안전교육 (반기별 6시간 이상 실시)	연중	연구활동종사자 (4507명)
	연구실 안전환경관리자 지도교육 (주 1회 이상 방문지도 실시)	연중	연구활동종사자 (4507명)
안전점검	연구·실험실 일상점검 (매일 연구활동 시작전 실시)	연중	연구·실험실 (102개소)
	연구·실험실 정밀안전진단	연 1회	연구·실험실 (102개소)
	소방점검	연 1회	연구·실험실 (102개소)
건강검진	건강검진 및 특수건강검진	연 1회	해당 연구활동종사자 (200명)
폐기물관리	연구·실험실 지정폐기물 안전관리	연중	연구·실험실 폐기물(102개소)
보험가입	연구활동종사자 보험가입 (사망/후유장애 1억, 부상 1천만원)	매년 갱신	관련학과 (4507명)

■ 예산확보 및 사용현황

[2012/2013년]

항 목	2011년 사용내역			2012년 계상 내역	
	계 획		사용내역	계 획	
	확보예산 (천원)	산출근거		확보예산 (천원)	산출근거
보험료	20,000	보험료	8,439	20,000	보험료
건강검진비	34,100	일반검진 및 특수검진비	7,629	10,850	일반검진 및 특수검진비
설비의 설치유지 및 보수비	8,910	유지 보수비	8,910	8,910	유지 보수비
정밀안전진단비	10,230	정밀안전진단비	9,408	10,230	정밀안전진단비
계	73,240	.	34,386	49,990	.

[2014]

항 목	2014년 사용내역			2015년 계상 내역	
	계 획		사용내역	계 획	
	확보예산 (천원)	산출근거		확보예산 (천원)	산출근거
보험료	17,325	보험료	15,000	17,325	보험료
건강검진비	21,000	일반검진 및 특수검진비	12,620	20,000	일반검진 및 특수검진비
교육 훈련, 회의비	0	.	0	1,280	회의비
설비의 설치유지 및 보수비	8,910	유지 보수비	8,910	8,910	유지 보수비
보호장비 및 안전용품 구입	45,540	안전용품 구입	45,320	10,000	안전용품 구입
정밀안전진단비	10,000	정밀안전진단비	8,800	10,000	정밀안전진단비
계	92,775	.	81,850	67,515	.



## 제 9 장 참고문헌

1. Nguyen MU, Wallace MJ, Pepe S, Menheniott TR, Moss TJ, Burgner D. Perinatal inflammation: a common factor in the early origins of cardiovascular disease? *Clin Sci (Lond)* 2015;129:769-84.
2. Astrazeneca global : astrazeneca Annual Report and Fro, 20F Information 2006, 16.
3. 대한민국 통계청 보도 자료. 2014년 사망원인 통계.
4. Harman D. Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:1-21.
5. Lameire N, Nelde A, Hoeben H, Vanholder R. Acute renal failure in the elderly. *Geriatr Nephrol Urol* 1999;153-165.
6. Khandelwal P, Chaturvedi S. Carotid Disease Management: Surgery, Stenting, or Medication. *Curr Cardiol Rep* 2015;17:625.
7. 대한민국 통계청 보도 자료. 2014년 사망원인 통계.
8. Ahmadsei M, Lievens D, Weber C, von Hundelshausen P, Gerdes N. Immune-mediated and lipid-mediated platelet function in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2015; 26:438-48.
9. Tang J, Lobatto ME, Hassing L, van der Staay S, van Rijs SM, Calcagno C, Braza MS, Baxter S, Fay F, Sanchez-Gaytan BL, Duivenvoorden R, Sager H, Astudillo YM, Leong W, Ramachandran S, Storm G, Pérez-Medina C, Reiner T, Cormode DP, Strijkers GJ, Stroes ES, Swirski FK, Nahrendorf M, Fisher EA, Fayad ZA, Mulder WJ. Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation. *Sci Adv* 2015;1(3)
10. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
11. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014;237:208-19.
12. Won KJ, Jung SH, Lee CK, Na HR, Lee KP, Lee DY, Park ES, Choi WS, Shim SB, Kim B. DJ-1/park7 protects against neointimal formation via the inhibition of vascular smooth muscle cell growth. *Cardiovasc Res* 2013;97:553-61.
13. Kim DY, Won KJ, Yoon MS, Yu HJ, Park JH, Kim B, Lee HM. Chrysanthemum boreale flower floral water inhibits platelet-derived growth factor-stimulated migration and proliferation in vascular smooth muscle cells. *Pharm Biol* 2015;53:725-34.
14. Wang D, Deuse T, Stubbendorff M, Chernogubova E, Erben RG, Eken SM, Jin H, Li Y, Busch A, Heeger CH, Behnisch B, Reichenspurner H, Robbins RC, Spin JM, Tsao PS, Schrepfer S, Maegdefessel L. Local MicroRNA Modulation Using a Novel Anti-miR-21-Eluting Stent Effectively Prevents Experimental In-Stent Restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:1945-53.
15. 안유배. 심혈관질환의 약물 요법. *임상당뇨병*. 2000, 1:15-23.

16. Handschin A, Henny-Fullin K, Buess D, Dieterle T. Cardiovascular risk stratification and therapeutic implications in arterial hypertension. *Ther Umsch.* 2015;72:361-8.
17. Kintscher U, Mahfoud F. Therapy of hypertension. *Dtsch Med Wochenschr* 2015 ;140:835-42.
18. Lipira AB, Sood RF, Tatman PD, Davis JI, Morrison SD, Ko JH. Complications Within 30 Days of Hand Surgery: An Analysis of 10,646 Patients. *J Hand Surg Am* 2015 ;40:1852-1859.
19. Maldonado Y, Singh S, Augoustides JG, MacKnight B, Zhou E, Gutsche JT, Ramakrishna H. Moderate Aortic Stenosis and Coronary Artery Bypass Grafting: Clinical Update for the Perioperative Echocardiographer. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2015;29:1384-90.
20. Yang MS, Park KH, Jang DS, Choi SU, Nam SH, S Mooto. Cumambrin A in *Chrysanthemum boreale* Makino Prepar. *생약학회지* 1996;27:207-211.
21. Nam SH, Yang MS. Isolation of Cytotoxic Substances from *Chrysanthemum Boreale* M. *Kor Soc Agricultural Chermisty and Biothchnology* 1995;30:273-277.
22. Bensky D, Adrew G. *Chinese Herbal Medicine*, 59. Eastland Press. Seattle.
23. 장일무. 천연물산업의 동향과 약용실물 활용. *한국작물학회* 2002;47:28-37.
24. 한병훈. 천연물 신약개발의 필요성. *약품개발연구지* 2000;9:234-234.

## < 증빙자료 >

### 1. 논문증빙 자료

#### 가. 연구과제 main 논문

- (1) Nat Prod Res. 2015; 29(6): 562-564. (Epub 2014 Aug 28)
- (2) Pharm Biol. 2015May; 53(5): 725-374. (Epub 2014 Oct 21.)
- (3) Atherosclerosis. 2015 Jun; 240(2): 367-373. (Epub 2015 Mar 28.)

#### 나. 연구과제 진행 부속 논문

- (4) Nat ProdCommun. 2014 Nov; 9(11): 1619-1622.
- (5) Nat ProdCommun. 2015 in press

### 2. 학회발표 증빙자료

- 가. 2012, 제64회 대한생리학회 학술대회
- 나. 2013, 제21회 기초의학 학술대회
- 다. 2013, 제65회 대한생리학회 학술대회
- 라. 2013, 제22회 한국평활근학회 학술대회
- 마. 2003, 제66회 대한생리학회 학술대회
- 바. 2015, 제24회 기초의학 학술대회

### 3. 특허 증빙 자료

- 가. 산국화 Essential oil의 피부재생용 화장료 연구를 통한 특허등록
- 나. 산국화 Essential oil의 동맥경화 및 혈관질환 연구를 통한 특허출원
- 다. 산국화 Essential oil의 항비만 연구를 통한 특허출원
- 라. 칩꽃 Essential oil의 피부재생 연구를 통한 특허출원
- 마. 개똥쑥 Essential oil의 피부재생/항산화/항비만 연구를 통한 특허출원

### 4. 기술이전 증빙 자료

### 5. 기타 증빙 자료

#### 가. 전시회 출품

## 1. 논문중빙 자료

가. 연구과제 main 논문

(1) Nat Prod Res. 2015; 29(6): 562-564. (Epub 2014 Aug 28)

Natural Product Research, 2015  
Vol. 29, No. 6, 562–564, <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.952231>



### SHORT COMMUNICATION

#### *Chrysanthemum boreale* Makino essential oil induces keratinocyte proliferation and skin regeneration

Do Yoon Kim<sup>a1</sup>, Kyung-Jong Won<sup>b1</sup>, Mi-So Yoon<sup>a</sup>, Dae Il Hwang<sup>a</sup>, Seok Won Yoon<sup>a</sup>, Joo-Hoon Park<sup>a</sup>, Bokyoung Kim<sup>b</sup> and Hwan Myung Lee<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Cosmetic Science, College of Natural Science, Hoseo University, Asan-City, Chungnam Prefecture 336-795, Republic of Korea; <sup>b</sup>Department of Physiology, School of Medicine, Konkuk University, Chungju-City, Chungbuk Prefecture 380-701, Republic of Korea

(Received 10 July 2014; final version received 4 August 2014)

We investigated the effect of essential oil from the flower of *Chrysanthemum boreale* Makino (CBMEO) on growth of human keratinocytes (HaCaTs) and explored a possible mechanism for this response. CBMEO was extracted using the steam distillation method. CBMEO contained a total of 33 compounds. CBMEO stimulated HaCaT proliferation (EC<sub>50</sub>, 0.028 µg/mL) and also induced phosphorylation of Akt and ERK1/2 in HaCaTs (EC<sub>50</sub>, 0.007 and 0.005 µg/mL, for phosphorylated Akt and ERK1/2, respectively). Moreover, CBMEO promoted wound closure in the dorsal side skin of rat tail. This study demonstrated that CBMEO can stimulate growth of human skin keratinocytes, probably through the Akt and ERK1/2 pathways. Therefore, CBMEO may be helpful in skin regeneration and wound healing in human skin, and may also be a possible cosmetic material for skin beauty.

**Keywords:** *Chrysanthemum boreale* Makino; essential oil; wound healing; keratinocyte; skin

### 1. Introduction

*Chrysanthemum boreale* Makino (CBM), belonging to the Compositae family, is widely distributed in East Asia (Kim et al. 2003, 2010). *C. boreale* species such as CBM have been used as medicinal plants for treatment of a variety of diseases (Kim et al. 2003). *C. boreale* species contain essential oil (EO), flavonoids, polyacetylenes and some components exhibiting biological activity (Kim et al. 2003; Lee et al. 2003). They are well known to have antitumour, anti-inflammatory, anti-angiogenesis, anti-hypertension (Kim et al. 2010) and antibacterial action (Kim et al. 2003). It has been used as an important source of aromatic and flavouring chemicals in food, industrial and pharmaceutical products as medicines in many countries (Charles & Simon 1990). EO from *C. boreale* species has been reported to exhibit diverse biological activities, and the biological functions of its flower EO have been studied in various research areas (Kim et al. 2003). However, no investigation on its skin regeneration and wound-healing activity has been reported. In this study, we extracted an EO from the CBM flower (CBMEO) using the steam distillation method and its chemical compounds were analysed by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). Based on this analysis, we explored the growth effect of CBMEO, as well as its possible related mechanism, in human skin keratinocytes and also investigated the effect of CBMEO on *in vivo* wound healing in rat tail.

\*Corresponding author. Email: [kacsital@hoseo.edu](mailto:kacsital@hoseo.edu)



### 3. Conclusions

This study demonstrated for the first time that CBMEO extracted by steam distillation induced proliferation of HaCaTs. Moreover, CBMEO stimulated phosphorylation of Akt and ERK1/2 in HaCaTs. In the rat tail wound healing assay, CBMEO effectively accelerated cutaneous wound closure. Thus, we can conclude that CBMEO extracted by steam distillation can stimulate the growth of human skin keratinocytes, probably through the Akt and ERK1/2 pathways. Therefore, CBMEO may be helpful in skin regeneration and wound healing in human skin, and may also be a potential cosmetic material for skin beauty. However, further studies will be required for isolation and identification of the main bioactive constituents of CBMEO that exert the proliferation effect in keratinocytes.

### Supplementary material

Experimental details relating to this paper are available online, alongside Table S1 and Figures S1–S3.

### Funding

This study was supported by a grant from the Korea Healthcare Technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea [grant number A103017], [grant number HN12C0054] and this research was supported by the Bio-industry Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

### Note

1. These authors contributed equally to this article.

### References

- Charles DJ, Simon JE. 1990. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *J Am Soc Hortic Sci*. 115:458–462.
- Haase I, Evans R, Pofahl R, Watt FM. 2003. Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci*. 116:3227–3238.
- Kalmes M, Blömeke B. 2012. Impact of eugenol and isoeugenol on AhR translocation, target gene expression, and proliferation in human HaCaT keratinocytes. *J Toxicol Environ Health A*. 75:478–491.
- Kim KJ, Kim YH, Yu HH, Jeong SI, Cha JD, Kil BS, You YO. 2003. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*. *Planta Med*. 69:274–277.
- Kim Y, Sung J, Sung M, Choi Y, Jeong HS, Lee J. 2010. Involvement of heme oxygenase-1 in the anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum boreale* makino extracts on the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 131:550–554.
- Lee JR, Yang MS, Lee J, Hwang SW, Kho YH, Park KH. 2003. New guaianolides from leaves and stems of *Chrysanthemum boreale*. *Planta Med*. 69:880–882.
- Lin XH, Wu YB, Lin S, Zeng JW, Zeng PY, Wu JZ. 2010. Effects of volatile components and ethanolic extract from *Eclipta prostrata* on proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Molecules*. 15:241–250.
- Xue M, Thompson P, Kelso I, Jackson C. 2004. Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res*. 299:119–127.

ORIGINAL ARTICLE

## *Chrysanthemum boreale* flower floral water inhibits platelet-derived growth factor-stimulated migration and proliferation in vascular smooth muscle cells

Do-Yoon Kim<sup>1\*</sup>, Kyung-Jong Won<sup>2\*</sup>, Mi-So Yoon<sup>1</sup>, Ho-Jin Yu<sup>1</sup>, Joo-Hoon Park<sup>1</sup>, Bokyung Kim<sup>2</sup>, and Hwan Myung Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cosmetic Science, College of Natural Science, Hoseo University, Asan, Chungnam Prefecture, Republic of Korea and

<sup>2</sup>Department of Physiology, School of Medicine, Konkuk University, Chungju, Chungbuk Prefecture, Republic of Korea

### Abstract

**Context:** *Chrysanthemum boreale* Makino (Compositae) (CBM) is a traditional medicine that has been used for the prevention or treatment of various disorders; it has various properties including antioxidation, anti-inflammation, and antitumor.

**Objective:** The present study was designed to explore the *in vitro* effect of CBM flower floral water (CBMFF) on atherosclerosis-related responses in rat aortic smooth muscle cells (RASMCs).

**Materials and methods:** CBMFF was extracted from CBM flower by steam distillation and analyzed using gas chromatography–mass spectrometry. The anti-atherosclerosis activity of CBMFF was tested by estimating platelet-derived growth factor (PDGF)-BB (10 ng/mL)-induced proliferation and migration levels and intracellular kinase pathways in RASMCs at CBMFF concentrations of 0.01–100  $\mu$ M and analyzing *ex vivo* aortic ring assay.

**Results:** Gas chromatography–mass spectrometry showed that the CBMFF contained a total of seven components. The CBMFF inhibits PDGF-BB-stimulated RASMC migration and proliferation (IC<sub>50</sub>: 0.010  $\mu$ g/mL). Treatment of RASMCs with PDGF-BB induced PDGFR- $\beta$  phosphorylation and increased the phosphorylations of MAPK p38 and ERK1/2. CBMFF addition prevented PDGF-BB-induced phosphorylation of these kinases (IC<sub>50</sub>: 0.008 and 0.018  $\mu$ g/mL, for p38 MAPK and ERK1/2, respectively), as well as PDGFR- $\beta$  (IC<sub>50</sub>: 0.046  $\mu$ g/mL). Treatment with inhibitors of PDGFR, P38 MAPK, and ERK1/2 decreased PDGF-BB-increased migration and proliferation in RASMCs. Moreover, the CBMFF suppressed PDGF-BB-increased sprout outgrowth of aortic rings (IC<sub>50</sub>: 0.047  $\mu$ g/mL).

**Discussion and conclusion:** These results demonstrate that CBMFF may inhibit PDGF-BB-induced vascular migration and proliferation, most likely through inhibition of the PDGFR- $\beta$ -mediated MAPK pathway; therefore, the CBMFF may be promising candidate for the development of herbal remedies for vascular disorders.

### Keywords

Anti-atherosclerosis, chemotherapy, natural products, vascular disease

### History

Received 9 April 2014

Accepted 2 July 2014

Published online 21 October 2014

### Introduction

Vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation are important in the development progression of vascular neointima in atherosclerosis (Lee et al., 2012; Wang et al., 2012). These events were stimulated by various factors, including proinflammatory cytokines and peptide growth factors (Ross, 1999). Platelet-derived growth factors (PDGF)

are a family of dimeric growth factors that are important to the regulation of VSMC proliferation and migration (Dammanahalli et al., 2012; Jiang et al., 2010; Won et al., 2008). The individual PDGF monomers may be one of four proteins: PDGF-A, B, C, or D (Fredriksson et al., 2004). In their dimeric form, PDGFs bind to and activate a PDGF receptor (PDGFR) that consists of two receptor tyrosine kinase subtypes, PDGFR- $\alpha$  and PDGFR- $\beta$ , localized to the plasma membrane of cells. Once bound to a PDGF, PDGFRs activate diverse signaling molecules and regulatory proteins that contain Src homology 2-domains and thereby elicit various cellular responses like actin reorganization, proliferation, differentiation, or VSMC migration (Jiang et al., 2010; Won et al., 2011).

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are also signaling molecules important for regulating various cellular processes in cells, including proliferation, differentiation, and migration (Kim et al., 2009; Lee et al., 2008a,b).

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Hwan Myung Lee, Assistant Professor, Department of Cosmetic Science, College of Natural Science, Hoseo University, Asan-city, Chungnam Prefecture 336-795, Republic of Korea. Tel: +82 41 540 9551. Fax: +82 41 540 9538. E-mail: kacsital@hoseo.edu  
Bokyung Kim, Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Konkuk University, Chungju-city, Chungbuk Prefecture 380-701, Republic of Korea. Tel: +82 43 840 3726. Fax: +82 43 851 9329. E-mail: bkkin2@kku.ac.kr



PDGF-stimulated activation of PDGFR- $\beta$  participates in MAPK-mediated migration and proliferation in VSMCs.

In the present study, we tested the effect of the CBMFF on PDGF-stimulated PDGFR- $\beta$  activation and found that PDGF-BB increased PDGFR- $\beta$  phosphorylation, and this response was significantly inhibited by treatment with CBMFF in a dose-dependent manner. Therefore, it is possible that CBMFF may inhibit PDGFR- $\beta$  phosphorylation to abolish its downstream signals, probably linked to MAPK pathway, which results in the inhibition of migration and proliferation in VSMCs in response to PDGF-BB, although the mechanism by which the CBMFF inhibits PDGFR- $\beta$  phosphorylation remains to be elucidated.

Many studies have shown that MAPK pathways participate in various cellular functions including proliferation and migration (Stork & Schmitt, 2002). Activation of MAPK in VSMCs is a critical response in stimulating proliferation and migration (Choi et al., 2009) and was involved in PDGF-stimulated migration and proliferation in VSMCs (Bornfeldt et al., 1994; Holycross et al., 1992; Pukac et al., 1988). PDGF increased the phosphorylations of p38 MAPK and ERK1/2, and elevated the migration and proliferation in RASMCs (Lee et al., 2007a). p38 MAPK acts as a mediator in cellular responses, including migration and proliferation in VSMCs (Kavurma & Khachigian, 2003). In our previous and current studies, we demonstrated that PDGF-BB stimulated p38 MAPK phosphorylation and also induced VSMC migration and proliferation that were inhibited by the treatment with p38 MAPK inhibitor (Lee et al., 2007a, 2008a,b), indicating that PDGF-BB-induced migration and proliferation in VSMCs is mediated by p38 MAPK pathway.

Similarly, the present study demonstrated that PDGF-BB stimulated VSMC migration and proliferation, as well as p38 MAPK phosphorylation, and these responses were attenuated by CBMFF. It is reported that the flower extract of *Chrysanthemum indicum* inhibits the activation of MAPKs including p38 MAPK in macrophages (Cheon et al., 2009), although this is a different type of cell. Based on these results, it is possible that CBMFF may exhibit inhibitory activity on RASMC migration and proliferation in response to PDGF-BB, probably via the suppression of p38 MAPK phosphorylation. Similar to p38 MAPK, ERK1/2 is also reported as an important signaling molecule that is involved in PDGF-BB-induced migration and proliferation and was phosphorylated by PDGF-BB stimulation in VSMCs (Kavurma & Khachigian, 2003). These PDGF-BB-stimulated responses in VSMCs were attenuated by ERK1/2 inhibition as demonstrated in our previous study (Won et al., 2008), as well as the present study.

Therefore, these reports suggest that ERK1/2 could be a mediator in PDGF-BB-induced migration and proliferation in VSMCs. Moreover, the flower extract of *Chrysanthemum indicum* is known to suppress ERK1/2 phosphorylation, as well as proliferations, in cancer cells in response to isoproterenol (Yuan et al., 2009). The present study demonstrated that the phosphorylation of ERK1/2 was induced in response to PDGF-BB in VSMCs and this response was decreased by treatment with CBMFF. CBMFF also inhibited VSMC migration and proliferation in response to PDGF-BB. These findings imply that CBMFF evokes the inhibition of

ERK1/2 signal and this event may contribute to the down-regulation of PDGF-BB-stimulated migration and proliferation in VSMCs. Therefore, it can be assumed that the inhibitory activity of CBMFF on PDGF-BB-induced migration and proliferation may occur through a signal pathway mediated by MAPKs, especially p38 MAPK and ERK1/2, although the present study did not directly demonstrate CBMFF-stimulated interactions between activities of two MAPKs and two cellular responses, migration and proliferation, in VSMCs in response to PDGF-BB.

## Conclusions

This study has demonstrated that CBMFF dose dependently inhibited PDGF-BB-increased migration and proliferation in RASMCs. PDGF-BB-induced phosphorylations of PDGF- $\beta$  receptor, p38 MAPK, and ERK1/2 in RASMCs were also decreased by the treatment with the CBMFF. Moreover, the CBMFF also attenuated PDGF-BB-stimulated sprout outgrowth of aortic rings.

Based on these findings, we concluded that CBMFF may inhibit vascular responses, VSMC proliferation, and migration, probably through inhibition of the PDGFR- $\beta$ -mediated MAPK pathway. Therefore, the steam-distilled floral water of CBMFF may be useful as a promising agent candidate with anti-atherosclerotic property. However, further research is required to isolate and identify a key bioactive component with anti-atherosclerotic activity from the extract.

## Declaration of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article. This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (Grant nos. A103017 and HN12C0054) and this research was supported by Bio-industry Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

## References

- Ali SM, Khan AA, Ahmed I, et al. (2005). Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 4:1-7.
- Archana PR, Nageshwar Rao B, Ballal M, Satish Rao BS. (2009). Thymol, a naturally occurring monocyclic dietary phenolic compound protects Chinese hamster lung fibroblasts from radiation-induced cytotoxicity. *Mutat Res* 680:70-7.
- Arita YK, Kihara S, Ouchi N, et al. (2002). Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105: 2893-8.
- Beena, Kumar D, Rawat DS. (2013). Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorg Med Chem Lett* 23:641-5.
- Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, et al. (1994). Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest* 93:1266-74.
- Chen X, Aravindakshan J, Yang Y, et al. (2006). Aberrant expression of PDGF ligands and receptors in the tumor prone ovary of follitropin receptor knockout (FORKO) mouse. *Carcinogenesis* 27:903-15.
- Cheon MS, Yoon T, Lee do Y, et al. (2009). *Chrysanthemum indicum* Linné extract inhibits the inflammatory response by suppressing



## Carvacrol inhibits atherosclerotic neointima formation by downregulating reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells



Kang Pa Lee <sup>a,1</sup>, Giftania W. Sudjarwo <sup>a,1</sup>, Seung Hyo Jung <sup>a</sup>, Donghyen Lee <sup>a</sup>, Dong-Youb Lee <sup>a</sup>, Gyoung Beom Lee <sup>a</sup>, Suji Baek <sup>a</sup>, Do-Yoon Kim <sup>b</sup>, Hwan Myung Lee <sup>b</sup>, Bokyoung Kim <sup>a</sup>, Seong-Chun Kwon <sup>c,\*</sup>, Kyung Jong Won <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology, School of Medicine, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, South Korea

<sup>b</sup> Department of Cosmetic Science, College of Natural Science, Hoseo University, Asa, 336-795, South Korea

<sup>c</sup> Department of Physiology, Catholic Kwandong University College of Medicine, Kangneung 201-701, South Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 November 2014

Received in revised form

1 March 2015

Accepted 21 March 2015

Available online 28 March 2015

#### Keywords:

Carvacrol

Migration

Proliferation

Neointima

Vascular smooth muscle cells

Reactive oxygen species

### ABSTRACT

**Objective:** Carvacrol (2-methyl-5-(1-methylethyl) phenol), a cyclic monoterpene, exerts protective activities in a variety of pathological states including tumor growth, inflammation, and oxidative stress. However, it is unknown whether carvacrol affects events in vascular cells during the development of atherosclerotic neointima. We investigated the effects of carvacrol on the migration and proliferation of rat aortic smooth muscle cells (RASMCs) and on vascular neointima formation.

**Methods and results:** Carvacrol significantly inhibited platelet-derived growth factor (PDGF)-BB-stimulated RASMC migration and proliferation in a concentration-dependent manner. Cell viability was not affected by treatment with carvacrol. Carvacrol attenuated the expression of NADPH oxidase (NOX) 1 and the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in response to PDGF-BB. Moreover, carvacrol suppressed the PDGF-BB-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inhibited the activity of NOX in RASMCs. Treatment with carvacrol inhibited PDGF-BB-induced aortic sprout outgrowth, balloon injury-evoked vascular neointima formation, and expression of proliferating cell nuclear antigen in the neointima.

**Conclusion:** These findings indicate that carvacrol inhibits migration and proliferation of RASMCs by suppressing the reactive oxygen species-mediated MAPK signaling pathway in these cells, thereby attenuating vascular neointimal formation. Carvacrol may be a promising agent for preventing vascular restenosis or atherosclerosis.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation are key processes in the neointima formation that occurs during atherosclerosis [1]. These events are potently stimulated by platelet-derived growth factor (PDGF) [2,3], which is induced in various types of cells including platelets, endothelial cells, and

macrophages under physiological or pathophysiological conditions [4]. PDGF stimulates its receptor, a protein tyrosine kinase, on the plasma membrane of cells, which leads to the initiation of signaling associated with Src homology 2-domain-containing signaling molecules such as Src, phospholipase C $\gamma$ , and phosphatidylinositol 3-kinase [5,6]. Cell signaling by these molecules induces the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, c-Jun N-terminal kinase, and p38 MAPK, to promote various cellular responses including proliferation, differentiation, and migration [5–9]. Reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), are physiological or pathophysiological signaling molecules that participate in many functions and diseases

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [skwon2028@cku.ac.kr](mailto:skwon2028@cku.ac.kr) (S.-C. Kwon), [kjwon@kku.ac.kr](mailto:kjwon@kku.ac.kr) (K.J. Won).

<sup>1</sup> These authors contributed to this work and should be considered co-first authors.



formation in vascular remodeling. We found in the present study that PDGF-BB-stimulated migration was inhibited by carvacrol in VSMCs and that this response reached to a level up to the basal condition without PDGF-BB stimulation. In addition to VSMC migration, the overproliferation of these cells is another important mechanism in the pathogenesis of vascular lesions such as neointima formation [1,30]. The proliferative ability of various cells including VSMCs is closely associated with PCNA expression [31]. Previous reports have shown that PCNA expression increases markedly after balloon injury of the rat carotid artery and is one possible target for regulation of VSMC proliferation under *in vitro* or *in vivo* conditions [31,32]. In the present study, PDGF-BB-induced proliferation was suppressed by treatment with carvacrol, and oral administration of carvacrol reduced the size of vascular neointima and PCNA expression in the neointima of balloon-injured animals compared with the control group. These results imply that carvacrol exerts an inhibitory effect on VSMC proliferation by decreasing PCNA expression, thereby protecting against neointima formation. Our findings suggest that carvacrol can inhibit the formation of vascular neointima, probably through its inhibitory effects on both the proliferation and migration in VSMCs. Therefore, carvacrol may be a potential therapeutic agent for preventing or treating pathological process such as vascular remodeling in restenosis and atherosclerosis. It is well known that carvacrol is involved in physiological functions in diverse cells including hepatocellular carcinoma cells, neutrophils, and mononuclear cells [23,24]. Although carvacrol affects the physiological and pathophysiological functions in other types of cells, no effects on vessel function, including vascular neointima, have been reported previously. To our knowledge, our study provides the first direct evidence of the inhibitory effects of carvacrol on VSMC migration and proliferation and on vascular neointima formation.

Excessive production of ROS, such as  $H_2O_2$ , in response to intracellular oxidative stress is implicated in a variety of diseases [15,33]. Studies have shown that ROS play a major role in vascular pathological changes that can promote cell proliferation and migration [10,12]. ROS are generated by PDGF stimulation and promote the migration and proliferation of VSMCs [14,15,23]. Antioxidants can attenuate vascular neointima formation [34]. As described above, carvacrol possesses diverse pharmacological properties including anticancer and antibacterial effects [35], suggesting that the effects of carvacrol may relate to its antioxidant actions [22]. In the present study, carvacrol suppressed the generation of  $H_2O_2$  in response to PDGF-BB in RASMCs.  $H_2O_2$  significantly stimulates VSMC migration, and antioxidants can reduce the production of  $H_2O_2$  in various types of cells including VSMCs [36–38]. These findings imply that carvacrol is involved in VSMC functions via its antioxidant properties. It is known that  $O_2^-$  produced by NOX is converted to  $H_2O_2$  in a superoxide dismutase-dependent manner [10]. PDGF stimulates ROS generation by increasing NOX activity in VSMCs [3,26]. Our results also showed that carvacrol inhibited the activity of NOX in response to PDGF-BB in VSMCs. Similarly, carvacrol inhibits NOX activity in human monocytes and macrophages [34,39]. Although these are different cell types from VSMCs, it is possible that carvacrol also exerts inhibitory actions on NOX activity in VSMCs. Taken together, previous studies and our study suggest that carvacrol may be a potential antioxidant that can prevent the formation of the pathological lesions of atherosclerosis such as neointima formation.

MAPKs are important signaling molecules in VSMC migration and proliferation in response to PDGF [40,41]. Direct exposure of cells to exogenous  $H_2O_2$  leads to activation of the MAPK pathways in VSMCs [17]. ROS can be produced by PDGF stimulation in VSMCs [14] and participate in the regulation of the activities of MAPKs such as p38 MAPK and ERK1/2 in VSMCs [5]. These reports imply

that PDGF-activated MAPKs is mediated by ROS stimulation. In the present study, we found that treatment with carvacrol suppressed the PDGF-BB-stimulated phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK. Moreover, PDGF-BB increased ROS generation, migration and proliferation in RASMCs, and these effects were inhibited by treatment with carvacrol. We have shown previously that MAPK inhibition decreases aortic sprout outgrowth and VSMC migration and proliferation in response to PDGF-BB [2]. Our findings suggest that carvacrol may contribute to the inhibition of the migration and proliferation of VSMCs in response to PDGF-BB via the attenuation of ROS-mediated activation of the MAPK pathway. The anti-proliferative and antimigratory effects of carvacrol may relate to the decrease in ROS generation, which subsequently downregulates signaling via the MAPK pathway.

In conclusion, the present study demonstrated that carvacrol inhibited RASMC cell migration, proliferation, phosphorylation of MAPK, and NOX1 expression in response to PDGF-BB. Carvacrol also attenuated the elevation of ROS generation in response to PDGF-BB stimulation in RASMCs and inhibited PDGF-BB-induced aortic sprout outgrowth. Administration of carvacrol to animals decreased PCNA expression and the thickness of the neointima formed in arteries subjected to balloon injury. These results suggest that carvacrol may exert inhibitory effects on PDGF-BB-induced VSMC migration and proliferation by inhibiting ROS activation, thereby resulting in the suppression of vascular neointima formation. We suggest that carvacrol may be a promising target for development of agents for preventing restenosis and atherosclerosis.

#### Conflict of interest/disclosure

All the authors declared no competing interests.

#### Source of funding

This research was supported by Bio-industry Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, South Korea.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.038>.

#### References

- [1] R. Ross, The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* 362 (1993) 801–809.
- [2] C.K. Lee, H.M. Lee, H.J. Kim, H.J. Park, K.J. Won, H.Y. Roh, et al., Syk contributes to PDGF-BB-mediated migration of rat aortic smooth muscle cells via MAPK pathways, *Cardiovasc Res.* 74 (2007) 159–168.
- [3] K.J. Won, H.M. Lee, C.K. Lee, H.Y. Lin, H. Na, K.W. Lim, et al., Protein tyrosine phosphatase SHP-2 is positively involved in platelet-derived growth factor-signaling in vascular neointima formation via the reactive oxygen species-related pathway, *J. Pharmacol. Sci.* 115 (2011) 164–175.
- [4] A.C. Newby, A.B. Zaltsman, Molecular mechanisms in intimal hyperplasia, *J. Pathol.* 190 (2000) 300–309.
- [5] G. Pearson, F. Robinson, T. Beers Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, et al., Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr. Rev.* 22 (2001) 153–183.
- [6] L. Konnstrand, C.H. Heldin, Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis, *Int. J. Cancer* 91 (2001) 757–762.
- [7] C. Li, Q. Xu, Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells, *Cell. Signal* 12 (2000) 435–445.
- [8] R.K. Dubey, E.K. Jackson, D.G. Gillespie, L.C. Zacharia, B. Imthurn, P.J. Keller, Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 964–972.
- [9] H.M. Lee, H.J. Kim, H.J. Park, K.J. Won, J. Kim, H.S. Shin, et al., Spleen tyrosine kinase participates in Src-mediated migration and proliferation by PDGF-BB in



## Skin Regeneration Effect and Chemical Composition of Essential Oil from *Artemisia montana*

Mi-So Yoon<sup>a\*</sup>, Kyung-Jong Won<sup>b\*</sup>, Do Yoon Kim<sup>a</sup>, Dae il Hwang<sup>a</sup>, Seok Won Yoon<sup>a</sup>, Bokyung Kim<sup>b</sup> and Hwan Myung Lee<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Cosmetic Science, College of Natural Science, Hoseo University, Asan-city Chungnam Prefecture 336-795, Republic of Korea

<sup>b</sup>Department of Physiology and Medical Science, School of Medicine, Konkuk University, Chungju-city Chungbuk Prefecture 380-701, Republic of Korea

#These two authors contributed equally to this work.

kacsital@hoseo.edu

Received: August 23<sup>rd</sup>, 2014; Accepted: September 10<sup>th</sup>, 2014

*Artemisia montana* Pampan (Compositae) (AMP) contains various compounds, including phenolic acids, alkaloids, and essential oil. It has been widely used in oriental medicine due to a variety of biological effects. However, the biological activity of the essential oil from AMP (AMPEO) on skin has not been investigated. In the present study, AMPEO was evaluated for its composition and its effect on cellular events (migration and proliferation) related to skin regeneration using normal human keratinocytes (HaCats). AMPEO, which was extracted by steam distillation, contained 42 components. AMPEO increased proliferation in HaCats in a dose-dependent manner (EC 50, 8.5 ng/mL) and did not affect migration. AMPEO also enhanced the phosphorylation of Akt and ERK 1/2 and induced the synthesis of type IV collagen, but not type I collagen in HaCats. In addition, AMPEO promoted wound closure in the dorsal side skin of rat tail. These results demonstrated that AMPEO extracted by steam distillation induced proliferation and synthesis of type IV collagen in human skin keratinocytes, and may thereby exert positive effects on skin regeneration and wound healing in human skin.

**Keywords:** *Artemisia montana* Pampan, Essential oil, Wound healing, Keratinocyte.

Skin, the outer covering of the human body, has various functions, including protection of the human body from many risk factors and maintenance of homeostasis in the body from change of external environment [1,2]. The epidermis, which comprises the outermost layer of skin, consists of keratinocytes, melanocytes, Langerhans cells, and Merkel cells [3,4]. The keratinocyte, a main cell of the epidermis, is known to play important roles in skin regeneration, wound healing, and epithelialization, which results from proliferation and migration induced by stimuli, including a variety of cytokines and growth factors [4,5]. Laminin isoforms, fibronectin, and type IV and VII collagen, the major components of all basement membrane, are secreted and synthesized by keratinocytes [6]. In particular, synthesis of collagen type IV stimulates the basement membrane formation of skin [7] and this response also plays an important role in regeneration and wound healing of skin [6]. When an injury to skin occurs by various causes, keratinocytes and fibroblasts proliferate and migrate into the wound area for re-epithelialization, and these processes are mediated by growth factors, cytokines, and components of the extracellular matrix such as collagen, fibronectin, and elastin [8,9]. The prevention and treatment of infection have generally been used to promote wound healing. However, various skin cell responses, including cell migration, proliferation and collagen synthesis, can also play important roles in the complex process of wound healing, as mentioned above. Therefore, development of herbal materials for promoting of the proliferation, migration, and type IV collagen synthesis in keratinocytes may be useful for skin wound healing and regeneration.

The *Artemisia* genus, family Compositae, consists of over 400 species, of which approximately 40 are found in Korea [10]. The genus has long been used in traditional medicine for treatment of cancer, malaria, inflammation, blood disease, and viral infection

[11]. In particular, *A. montana* Pampan (AMP) has been used in folk medicine and has various properties, including antipyretic, anti-diabetic, antihypertensive, and antioxidant effects, which may be induced by its components, such as essential oil, volatile components, caffeic acid, and catechol [10-12]. However, the question of whether AMP, particularly the essential oil from the flower (AMPEO), can affect skin regeneration and wound healing has not been investigated. In this study, we extracted AMPEO using the steam distillation method and its chemical compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). To determine the biological activity of AMPEO in skin regeneration, we tested its effect on proliferation, migration, and collagen synthesis in normal human skin keratinocytes (HaCats) and also confirmed the effect of AMPEO on *in vivo* wound healing in rat tail.

The total yield of AMPEO from 20 kg of flowers, extracted by steam-distillation, was 0.25% (w/v; 50 mL). AMPEO contained 42 compounds, the major ones being  $\beta$ -caryophyllene (12.8%), germacrene D (9.9%), 1,8-cineole (7.9%), and camphor (6.2%) (Table 1). Among the compounds identified, several, including eugenol and terpenoids, have been reported to have a variety of biological activities in various cells, including keratinocytes [13,14]. Therefore, AMPEO may exert biological activity, especially a proliferative and/or migratory effect, on keratinocytes. We thus investigated the effect of AMPEO on proliferation and migration in keratinocytes, HaCats.

AMPEO increased HaCat proliferation in a dose-dependent manner (0.0001–1  $\mu$ g/mL). A significant response was obtained starting at a concentration of 0.001  $\mu$ g/mL (126.5 $\pm$ 4.6% of control), and reached a maximal response at a concentration of 1  $\mu$ g/mL (173.1 $\pm$ 4.1% of control) (Figure 1A; n=8). However, AMPEO (0.0001–1  $\mu$ g/mL)

## Natural Product Communications Acceptance

Westerville, Ohio, August 4, 2015

Dear Prof. Lee,

I am pleased to inform you that your revised manuscript entitled "Potential Skin Regeneration Activity and Chemical Composition of Absolute from *Pueraria thunbergiana* Flower" MS# P905712, has been accepted for publication in *Natural Product Communications*.

You will receive galleys and a Copyright Transfer form directly from publisher within two months.

Yours sincerely,

Dr. Pawan K. Agrawal  
Editor-in-Chief  
Natural Product Communications  
E-mail: agrawal@naturalproduct.us

**NPC**

**Natural Product Communications**

**2015  
Vol. 0  
No. 0  
1 - 2**

### Potential Skin Regeneration Activity and Chemical Composition of Absolute from *Pueraria thunbergiana* Flower

Do-Yoon Kim<sup>af</sup>, Kyung-Jong Won<sup>bf</sup>, Dae-il Hwang<sup>a</sup>, Seok Won Yoon<sup>a</sup>, Su Jin Lee<sup>a</sup>, Joo-Hoon Park<sup>a</sup>, Myeong Sik Yoon<sup>a</sup>, Bokyoung Kim<sup>b</sup> and Hwan Myung Lee<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Division of Bioindustry, College of Life and Health Science, Hoseo University, Asan-city Chungnam Prefecture 336-795, Republic of Korea

<sup>b</sup>Department of Physiology and Medical Science, School of Medicine, Konkuk University, Chungju-city Chungbuk Prefecture 380-701, Republic of Korea

#These two authors contributed equally to this work.

\*kacsital@hoseo.edu

Received: April 8<sup>th</sup>, 2015; Accepted: XX, 2015

The flower of *Pueraria thunbergiana* BENTH (PTBF) contains isoflavonoids, essential oil components. It has many biological and pharmacological activities, including anti-diabetes, anti-oxidants, and weight loss. However, its effect on skin regeneration remains unknown. In the present study, we isolated the absolute extracted from PTBF and determined the role of the absolute extracted from PTBF on skin regeneration-associated responses in human epidermal-keratinocytes (HaCats). The PTBF absolute from PTBF obtained by solvent extraction contained 10 compounds. The PTBF absolute stimulated migration and proliferation in HaCats and increased the phosphorylation of serine/threonine-specific protein kinase and extracellular signal-regulated kinase1/2. The PTBF absolute induced type I and IV collagen synthesis in HaCats. Treatment with PTBF absolute stimulated sprout outgrowth in HaCats. These findings suggest that PTBF absolute may participate in skin regeneration, probably through promotion of migration, proliferation, and collagen synthesis.

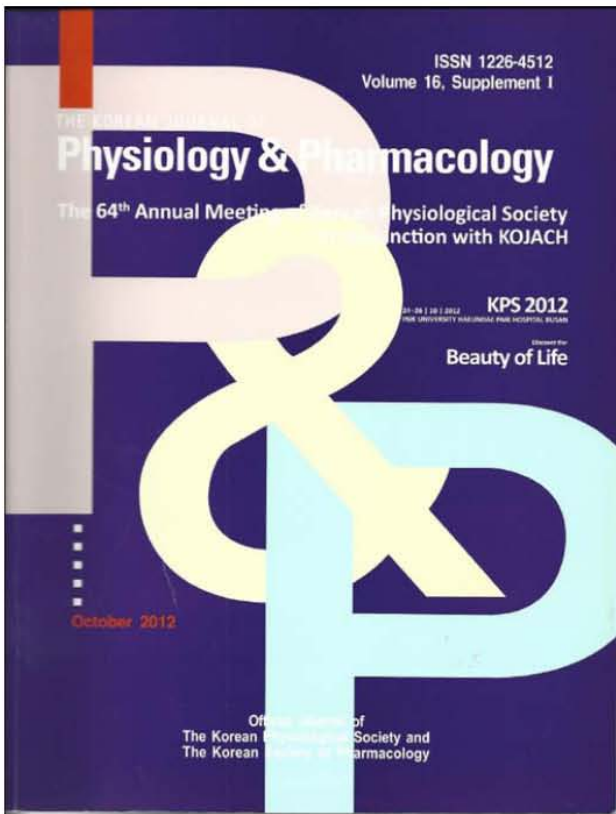
**Keywords:** *Pueraria thunbergiana* BENTH, absolutes, keratinocyte, migration, proliferation, regeneration

Skin regeneration is an essential step in the anti-skin aging and wound healing process [1]. It is associated with growth of skin epidermal-keratinocytes [1, 2]. When skin is injured, epidermal-keratinocytes of skin begin to migrate and proliferate, with simultaneous synthesis of collagen [2-4]. These responses promote skin pro-inflammatory activity and epithelialization, which results in skin regeneration and wound healing [1, 3, 5]. Recently, many researchers have investigated development of cosmetic materials isolated from plants (natural product) [6]. Of the materials, lipid extracts from aromatic plants have been known to contain aroma

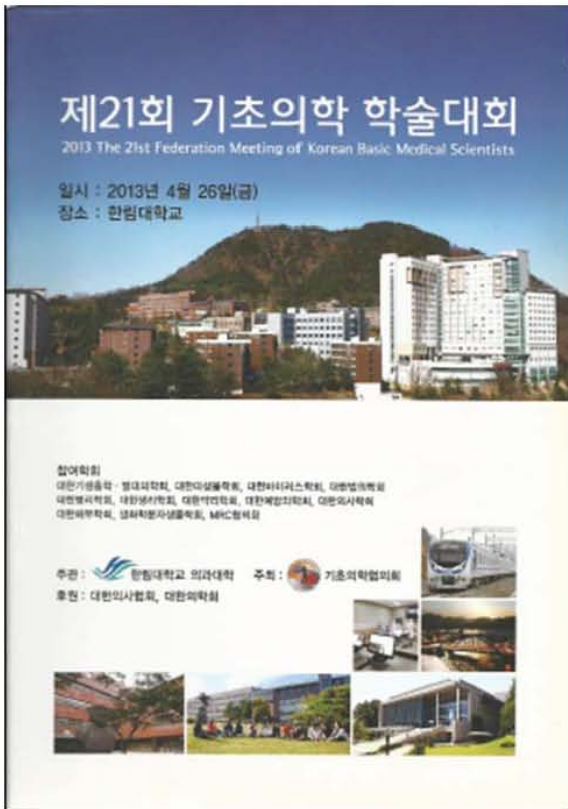
injury, and weight loss [15, 17]. Yagi et al [18] recently reported the characteristic chemical components of the essential oil from *Pueraria Mirifica*, belonging to the same genus (*Pueraria*) with PTB and is only distributed in Thailand, unlike PTBF. However, there is no research on aroma compound extracted from PTBF. Thus, in this study we isolated the absolute from PTBF, which is distributed in Korea, by solvent extraction (the so-called 'Absolute') and tested the effect of PTBF absolute on skin regeneration-associated responses in human epidermal-keratinocytes (HaCats) to explore whether the PTBF absolute affects skin regeneration.

## 2. 학회발표 증빙자료

### 가. 2012, 제64회 대한생리학회 학술대회

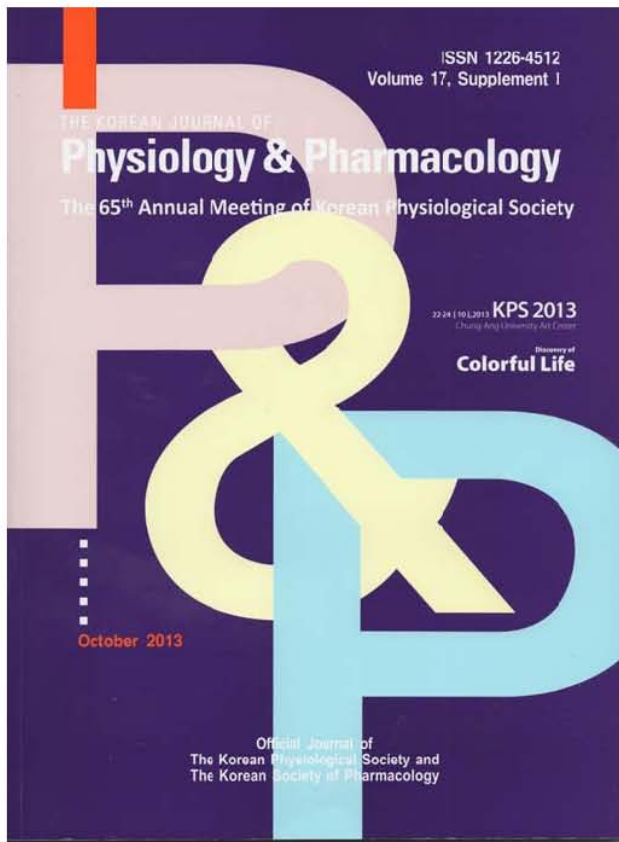


### 나. 2013, 제21회 기초의학 학술대회

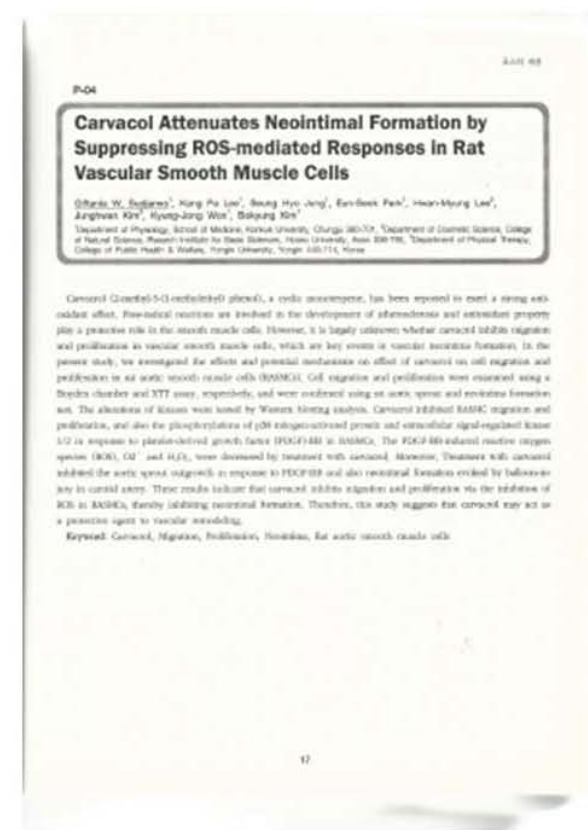




다. 2013, 제65회 대한생리학회 학술대회

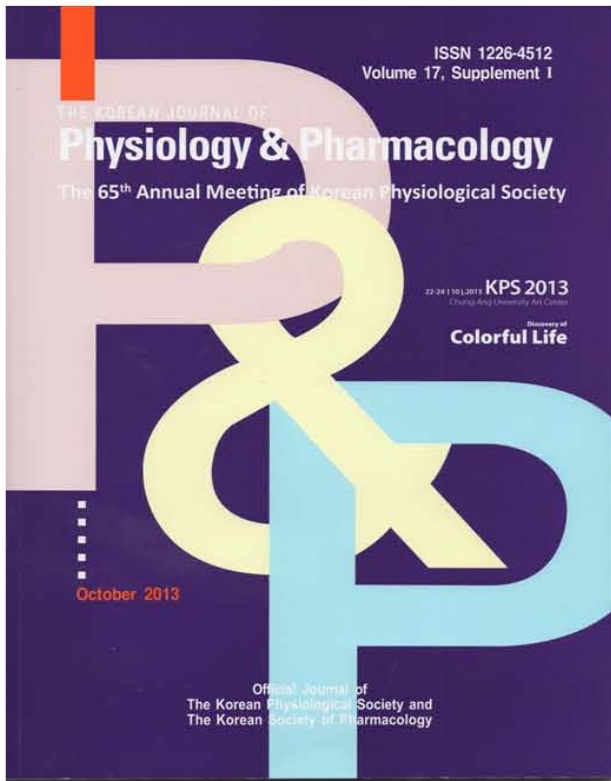


라. 2013, 제22회 한국평활근학회 학술대회

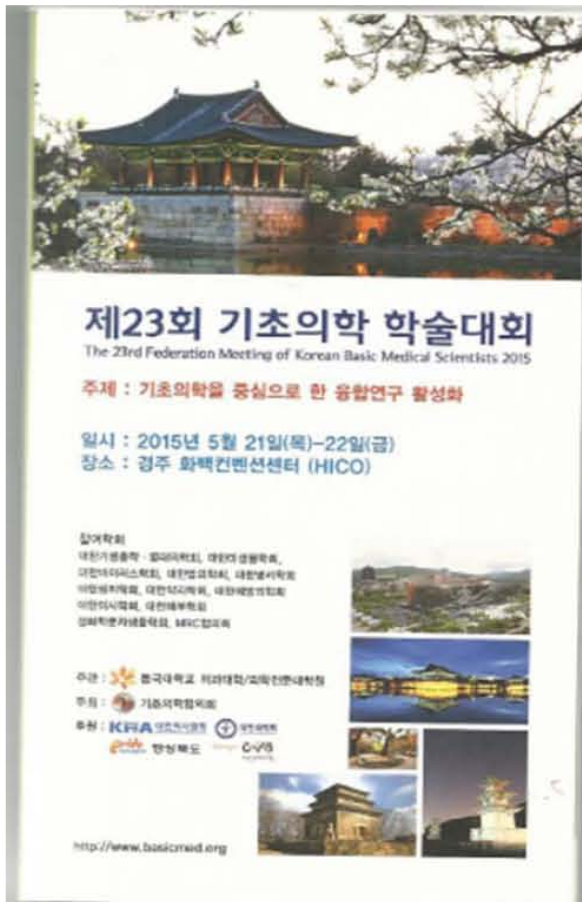




마. 2003, 제66회 대한생리학회 학술대회



마. 2015, 제24회 기초의학 학술대회



### 3. 특허 증빙 자료

가. 산국화 Essential oil의 피부재생용 화장품 연구를 통한 특허등록



발명의 명칭 Title of the Invention

산국 에센셜 오일을 유효성분으로 함유하는 피부 재생용 화장품 및 피부 외용제 조성물

특허권자 Patentee

호서대학교 산학협력단(164871-0\*\*\*\*\*)  
충청남도 아산시 배방읍 호서로79번길 20 (호서대학교)

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2015년 09월 01일

특허청장  
COMMISSIONER,  
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

최동규

나. 산국화 Essential oil의 등맥경화 및 혈관질환 연구를 통한 특허출원

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2012.09.21  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P120341HS)  
출원번호 10-2012-0105062 (접수번호 1-1-2012-0767520-60)  
출원인명칭 호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)  
대리인성명 진천웅(9-1998-000533-6)  
발명자성명 이환명 김보경 박주훈 김도윤 유호진 윤미소 임희동 원경  
중  
발명의명칭 산국 증류액 성분을 포함하는 등맥경화 또는 심혈관질환  
의 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

다. 산국화 Essential oil의 항비만 연구를 통한 특허출원

관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2014.12.11  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2014-0178162 (접수번호 1-1-2014-1204135-94)  
출원인명칭 호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)  
대리인성명 위병갑(9-2004-000155-3)  
발명자성명 이환명 김도윤 황대일 윤석원 이수진  
발명의명칭 산국 에센셜 오일을 유효성분으로 함유하는 항산화 및 항비만 조성물

특 허 청 장



라. 쥐꽃 Essential oil의 피부재생 연구를 통한 특허출원

관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2014.03.07  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P140052HS)  
출원번호 10-2014-0026888 (접수번호 1-1-2014-0222925-34)  
출원인명칭 호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)  
대리인성명 진천웅(9-1998-000533-6)  
발명자성명 이환명 김도윤 윤미소 황대일 윤석원 김보경 원경종  
발명의명칭 침의 꽃으로부터 추출된 정유를 포함하는 피부 재생용 외용제 및 화장료 조성물

특 허 청 장

마. 개똥썩 Essential oil의 피부재생/항산화/항비만 연구를 통한 특허출원

관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2013.03.05  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P130022HS)  
출원번호 10-2013-0023630 (접수번호 1-1-2013-0194246-15)  
출원인명칭 호서대학교 산학협력단(2-2005-025735-0)  
대리인성명 진천웅(9-1998-000533-6)  
발명자성명 이환명 김보경 원경종 김도운 유호진 윤미소 김윤수 송종혁  
발명의명칭 개똥썩 에센셜 오일을 유효성분으로 함유하는 피부 재생용  
화장료 및 피부 외용제 조성물

특 허 청 장

4. 기술이전

# 기술이전 계약서

■ 기술명 : 산국증류액 성분을 활용한 동맥경화 및 심혈관 치료제 개발에 관한 노하우

2015년 10월 13일

계약당사자

“갑”

주 소: 충남 아산시 배방읍 호서로 79번길 20  
기 관: 호서대학교 산학협력단  
사업자등록번호: 312-82-10256  
대 표 자: 산학협력단장 설 용 태

발 명 자: 한방화장품과학 이 환 명

“을”

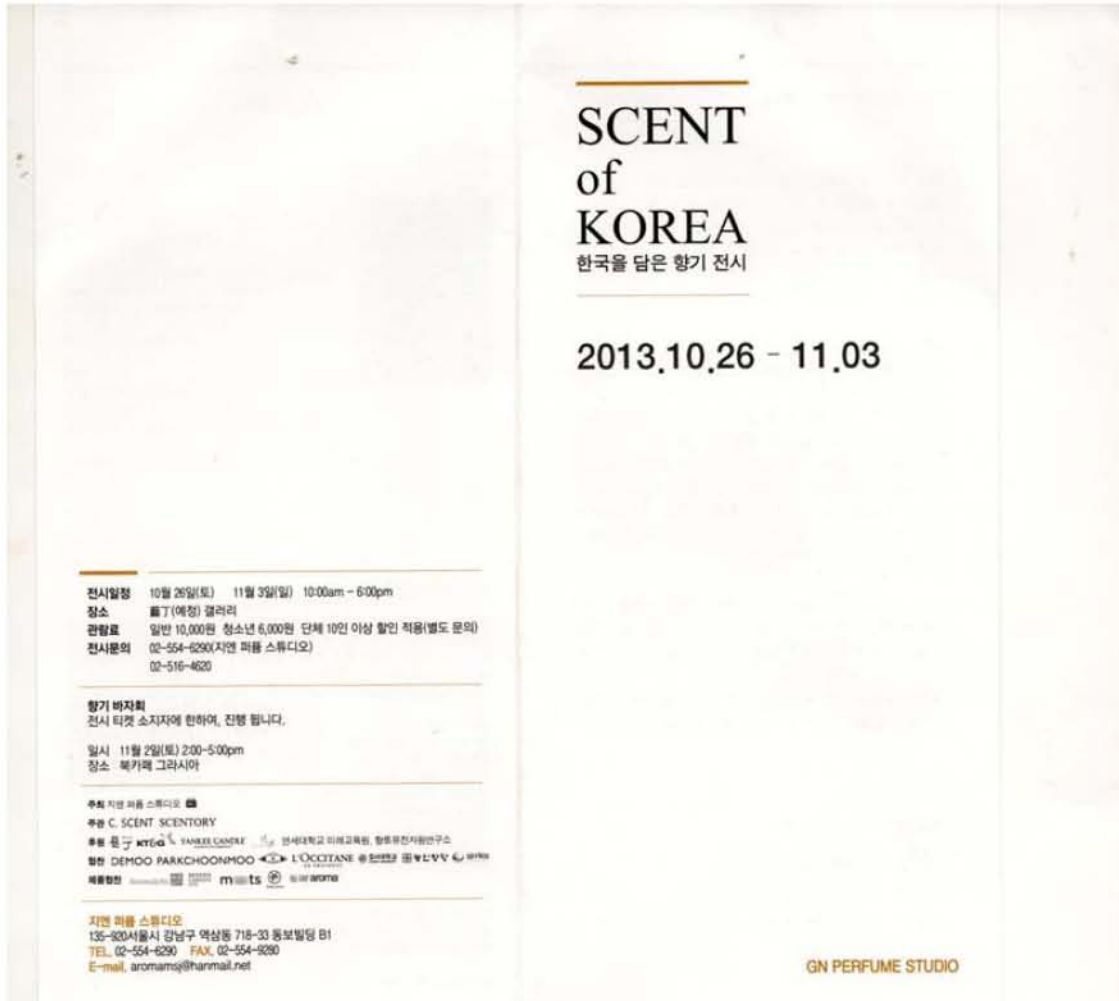
주 소: 서울특별시 송파구 거여동 35-4 한동빌딩 1층  
기 관: 씨에스웰  
사업자등록번호: 215-16-87288  
대 표 자: 대표이사 서 훈 원



## 5. 기타 (전시회 출품)

### 가. 산국화 essential oil의 “한국을 담은 향기 전시회” 출품

- 한국을 담은 향기 전시회가 2013년 10월 26일부터 11월 3일까지 역삼역 인근 예정갤러리에  
서 진행되었음(주관: 지엔퍼퓸 스튜디오). 산국화 essential oil을 출품하여 호평을 받았음.



산국화 essential oil의 “한국을 담은 향기 전시회



<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

## 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

<b>신청과제명</b>	산국 Essential oil을 이용한 혈관질환 치료제의 개발		
<b>주관연구책임자</b>	김보경	<b>주관기관</b>	전국대학교 글로벌산학협력단

### 1. 본 연구관련 국내의 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
산국 essential oil 및 monoterpene 성분을 이용한 항 고혈압제/완화제의 개발	미국	70%	70%	80%	활용범위가 항균/항염 작용에 국한됨
산국 essential oil 및 monoterpene 성분을 이용한 동맥경화 억제/완화제의 개발	미국	70%	70%	80%	본연구의 활용범위와상이함

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

### 2. 특허분석

#### 가. 특허분석 범위

(예시)

<b>대상국가</b>	국내, 미국, 일본, 유럽
<b>특허 DB</b>	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
<b>검색기간</b>	최근 10년간
<b>검색범위</b>	제목 및 초록

#### 나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	산국 essential oil 및 monoterpene 성분을 이용한 항 고혈압제/완화제의 개발	산국 essential oil 및 monoterpene 성분을 이용한 동맥경화 억제/완화제의 개발
Keyword	산국 산국화 C,hrysanthemum boreale	산국 산국화 C,hrysanthemum boreale
검색건수	6 - 14 - 9	6 - 15 - 9
유효특허건수	1	1
핵심특허	특허명 산국의 향취를 재현한 향료 조성물	소량의 항불안제 약물로 사용가능한

및 관련성	보유국	대한민국	산국화 추출물의 제조 방법
	등록년도	국내/10-2010-0044421	대한민국
	관련성(%)	20	출원 국내1020130064276
	유사점	화장료의 사용	동일식물체 사용, 정유추출물 사용
	차이점	정유추출방법, 성분 및 기능성효능	정유추출방법, 유효성분, 효능적 차이

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
소량의 항불안제 약물로 사용가능한 산국화 추출물의 제조 방법	성균관대학교산학협력단	국내/1020130064276
술잎, 산국화 및 감초를 이용한 발효주의 제조방법	서영희	국내/1020090060949
국화수 제조방법 및 이에 따라 제조된 국화수	김광수	국내/1020120035639
COMPOUND COMPRISING EXTRACTS OR FRACTIONS OF CHRYSANTHEMUM BOREALE MAKINO HAVING ANTI-INFLAMMATION ACTIVITY	WOONGJIN COWAY CO	국제/KR-0006651
ANTI-DERMATOPATHY AGENT, AND SKIN CARE PREPARATION FOR EXTERNAL USE CONTAINING THE SAME	KOSE CORP	국제/JP-0049828
국화 농축액에 의한 염색방법	김병희	국내/10-2000-0031235
국화과식물의 꽃부위를 이용한 기능성 분말차의 제조방법	충북대학교산학협력단	국내/10-2009-0035607
기능성 발효 음료 제조방법	김기선	국내/10-2004-0083829
대면적지 녹화용 혼합 종자 자재	박공영	국내/10-2009-0012423
들국화 추출물을 함유하는 피부 세정료	주식회사태평양	국내/10-1991-0013380
라이노바이러스에 대한 항바이러스 조성물	한국생명공학연구원	국내/10-2004-0090898
비뇨기 개선 및 예방을 위한 청정의 조성물	이화길	국내/10-2010-0006235
산국 꽃잎의 열수 추출물로부터 저분자량 엔지오텐신 전환효소 저해제의 제조방법	충남대학교산학협력단	국내/10-2002-0014640
산국의 정유 추출물을 함유하는 향균 및 향진균 조성물 및 약제학적 제제와 그 용도	(주)백텍	국내/10-2002-0023335
산국의 향취를 제현한 향료 조성물	(주)아모레퍼시픽	국내/10-2010-0044421
술잎, 산국화 및 감초를 이용한 발효주의 제조방법	서영희	국내/10-2009-0060949
신경안정 및 항불안 효능을 갖는 산국화 추출물 및 이를 함유하는 조성물	성균관대학교산학협력단	국내/10-2006-0113793
야국 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증 활성을 갖는 조성물	웅진코웨이주식회사	국내/10-2010-0069145
유산균을 이용한 기능성 축산물 발효제조 방법	김기선	국내/10-2005-0062027
쥐눈이 콩 여두청국장분말만두 제조방법	정진욱	국내/10-2008-0060562
치주질환 예방 및 헬리코박터 파이로리균 억제 구강조성물	(주)백텍	국내/10-2002-0055546
큐맘브린 A를 함유하는 혈당강하용 의약 조성물	정상남도	국내/10-2002-0008065
큐맘브린 A의 고혈압 치료제로서의 용도	양민석	국내/10-2000-0006958
화장료 조성물	소석현	국내/10-2007-0115640

### 3. 논문분석

#### 가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 한국과학기술정보연구원 (www.ndsl.kr/index.do)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

#### 나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	산국 essential oil 및 monoterpene 성분을 이용한 항 고혈압/완화제의 개발	산국 essential oil 및 monoterpene 성분을 이용한 동맥경화 억제/완화제의 개발
Keyword	Chrysanthemum boreale Makino, 산국, 산국화	Chrysanthemum boreale Makino, 산국, 산국화
검색건수	국내: 30건 국외:16건	국내: 30건 국외:16건
유효논문건수	국내 및 국외 0 건	국내 및 국외 0 건
핵심논문 및 관련성	논문명	
	학술지명	
	저자	
	게재년도	
	관련성(%)	
	유사점	
	차이점	부분 유기용매 및 열수 추출을 활용한 crude extracts에 한정됨

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

저널명	저자	제목	취약점
Proceedings of the Korean Environmental Sciences Society Conference. 2012;21:553	Lee JR 등	Isolation of New Sesquiterpene lactone and 3-(3-Methylbutanoly)2-(2,4-hexadiyuylidene)-1,6-dioxaspirp[4,5]decane with Cytotoxic Activity from Chrysanthemum boreale Makino	항암효과에 국한
Proceedings of the Korean Environmental Sciences Society	Lee JR 등	A Guaianolides as Apoptosis Inhibitor from flowers of Chrysanthemum boreale Makino	항암효과에 국한

Conference. 2012;21:556			
Proceedings of the Korean Environmental Sciences Society Conference. 2011;20:546	Park MK 등	Isolation of Sesquiterpene Lactones with FTPase Inhibitory Activity from <i>Chrysanthemum boreale</i> Makino Leaves	항암효과에 국한
Fitoterapia. 2009;80:54	Park KH 등	A new cytotoxic guaianolide from <i>Chrysanthemum</i> <i>boreale</i>	항암효과에 국한
Planta Medica. 2001;67:585	Lee JR 등	A new guaianolide as apoptosis inhibitor from <i>Chrysanthemum boreale</i> .	항암효과에 국한
Cytologia. 2008;73:425	Kim JS 등	Analysis of Meiotic Chromosome Behaviour in Diploid Individuals of <i>Chrysanthemum zawadskii</i> and Related Species(Asteraceae)	염색체 배열에 영향
Planta Medica. 2003;69:274	Kim KJ 등	Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of <i>Chrysanthemum boreale</i> .	항균 및 성분에 국한
Plant Pathology. 2008; 57:1176	Choi YJ 등	Downy mildew outbreak on <i>Chrysanthemum boreale</i> caused by <i>Paraperonospora minor</i>	재배연구에 국한
Journal of Applied Polymer Science. 2010;115:2246	Lee YH 등	Dyeing and deodorizing properties of cotton, silk, wool fabrics dyed with Amur Corktree, <i>Dryopteris</i> <i>crassirhizoma</i> , <i>Chrysanthemum boreale</i>	직물염색효과 에 국한
Food Science and Biotechnology. 2005;14:290	Jeon JR 등	Effects of <i>Chrysanthemum boreale</i> M. Water Extract on Serum Liver Enzyme Activities and Kupffer Cells of Carbon Tetrachloride-Induced Rats	간효소, 면역세포효과 에 국한
Agronomy Sustainable Development. 2005;25:205	Lee KD 등	Fertilizer effect on the yield and terpene components from the flowerheads of <i>Chrysanthemum boreale</i> M. (Compositae)	재배연구
Food science and biotechnology. 2005;14:350	Cha JD 등	Induction of Apoptosis in Human Oral Epidermoid Carcinoma Cells by Essential Oil of <i>Chrysanthemum</i> <i>boreale</i> Makino	항암효과에 국한
Journal of Ethnopharmacology. 2010;131:550	Kim Y 등	Involvement of HO-1 in the anti inflammatory activity of <i>Chrysanthemum boreale</i> Makino extracts on the expression of iNOS in RAW264.7	HO-1의 항염증효과
Archives of Pharmacal Research. 1995;18:65	Shin H 등	Isolation of Aldose Reductase Inhibitors from the Flowers of <i>Chrysanthemum boreale</i>	Aldose환원제 억제제분리
Journal of Food Science.2002;68:816	Kim J 등	Isolation of an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Substance from <i>Chrysanthemum boreale</i> Makino	ACE억제제분 리
Archives of Pharmacal Research. 1996;19:406	Kang SS 등	Isolation of Handelin from <i>Chrysanthemum boreale</i>	알콜추출세포 독성
Planta Medica. 2003;69:880	Lee JR 등	New guaianolides from leaves and stems of <i>Chrysanthemum boreale</i> .	잎줄기추출물, 항암효과
Tetrahedron Letters. 1974;15:1885	Matsu o A 등	Two new acetylenic compounds from <i>Chrysanthemum</i> <i>Boreale</i>	에테르 추출성분
Agrochimica. 2006;50:62	Lee KD 등	Soil Amendment Effects on the Yield and Terpene Contents of the Flowerhead of <i>Chrysanthemum</i>	재배연구에 국한



저널명	저자	제목	취약점
한국식품영양과학회지. 2014;43:60	김연숙 등	산국대 추출물의 항산화 활성 및 간세포 보호 효과	항산화
동의생리병리학회지. 2013;27:49	김성훈 등	MPTP에 의해 유도된 생쥐의 신경독성에 대한 산국 추출물의 항산화 작용	신경독성
원예과학기술지. 2012;30:64	김연정 등	포천구절초, 산국, 꽃범의꼬리 및 접시꽃의 생육에 미치는 염스트레스의 영향	재배연구
한국약용작물학회지. 2012;20:20	송홍선 등	산국과 감국의 자생지 환경특성과 식생 비교	재배연구
대한본초학회지. 2011;26:31	유기선 등	산국 꽃의 항염 활성 연구	항염증효과
한국식품영양과학회지. 2009;38	이상훈 등	감국, 산국 및 구절초꽃 분말 차의 항산화활성과 품질특성	항산화효과
생약학회지. 1999;30	김영호 등	감국의 품질 평가	품질연구
원예과학기술지. 2000;18	조연희 등	개미취, 감국 및 털머위 생육에 미치는 양액내 질소원의 영향	재배연구
원예과학기술지. 2002;43	백정애 등	Uniconazole 처리에 따른 산국의 생장과 정유성분 변화	재배 및 성분연구
한국약용작물학회지. 2000;8	임요섭 등	국내 자생 식물의 항산화 및 항미생물 활성 탐색	항산화, 미생물 억제 효과
농산물저장유통학회지. 1997;4	박난영 등	국화 꽃잎의 Carotenoid계 색소의 안정성	색소연구
한국자원식물학회지. 2010;23	우정향 등	국화과 Dendranthema속 식물 3종 80% 에탄올 추출물의 항산화 효과	에탄올 추출, 항산화 효과
한국식품조리과학회지. 2006;22	임성임 등	국화과 허브류인 수입산 캐모마일차와 국내산 국화차의 향기성분 비교	향기효과
대한가정학회지. 2004;42	오화자	국화지 면직물과 견직물에 대한 염색성, 항균성, 소취성에 관한 연구	직물염색효과
한국염색가공학회지. 2000;2	김병희 등	꽃을 이용한 천연염색 연구(II) -국화의 염색성 및 항균.소취성-	천연염색효과
한국약용작물학회지. 2003;11	이경동 등	돈분퇴비 시용이 산국의 질소흡수 및 수량과 유효성분에 미치는 영향	산국재배연구
농산물저장유통학회지. 1998;5	정용진 등	미생물의 생육억제에 대한 국화 에탄올 추출물의 영향	에탄올 추출, 미생물 억제
한국영양학회지. 2001;310	Kim Y 등	Isolation of Anti-hypertensive Substances form Chrysanthemum boreale Makino	항고혈압추출물
한국토양비료학회지. 2002;35	이경동	Effect of Soil Amendment Application on Yields and Effective Components of Chrysanthemum boreale M.	재배연구
한국생명과학회지. 2001;69.	이종록 등	Isolation of Sesquiterpene Lactones from Chrysanthemum boreale Makino	성분분리
한국토양비료학회지. 2002;35	이경동	Effects of Nitrogen Fertilization on the Yield and Effective Components of Chrysanthemum boreale M.	재배연구
식품영양과학회지.	Park	Chemical Composition of Petals of Chrysanthemum spp.	성분분석

1997;2	NY등		
한국원예학회지. 2007;48	Lee HK 등	Growth and Morphological Characteristics of Wild Clones of Chrysanthemum boreale Mak	재배연구
한국응용생명화학학회지. 1996;39	남상해 등	Chrysanthemum속(屬) 식물의 항균성	항균효과
Nutraceuticals and Food.2002;7	Kwon CS	Induction of Quinone Reductase, an Anticarcinogenic Marker Enzyme, by Medicinal Herb Extracts	항암성분

#### 4. 제품 및 시장 분석

##### 가. 생산 및 시장현황

###### 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 2014년 의약품산업분석보고서에 따르면 국내의 혈압강하제는 전년대비 15.5% 성장한 1,1280억원이며, 동맥경화용제의 경우 전년대비 5.1% 증가한 8,233억원으로 계속 증가 추세에 있음.

※연도별 주요 완제의약품 약효군 생산실적

(단위: 10억 원, %)

순위	분류 번호	약효군	2009	2010	2011	2012	2013	전년대비 성장률	CAGR (’08~’12)
1	214	혈압강하제	772.9	847.0	924.1	976.7	1,128.0	15.5	9.9
2	618	주로 그람양성.음성균에 작용하는 것	1,205.0	1,286.7	1,193.0	1,117.9	1,068.2	-4.4	-3.0
3	114	해열.진통.소염제	862.4	899.3	903.0	870.1	886.0	1.8	0.7
4	218	동맥경화용제	661.0	740.8	731.7	783.3	823.3	5.1	5.6

자료 : 2014년 제약산업 분석 보고서, 한국보건산업진흥원

###### 2) 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 2013년 세계 의약품 시장 규모는 9,893억 달러(불변가격 기준)로 전년대비 3.2% 성장을 보임.

※연도별 세계 의약품 시장 규모

(단위: 10억 달러, %)

구분	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
세계시장(불변가격)	601.1	645.5	691.0	739.5	786.7	842.6	889.4	936.9	959.0	989.3
전년대비 성장률	7.8	7.4	7.1	7.0	6.4	7.1	5.5	5.3	2.4	3.2

주 : 2014년 2분기 환율기준

자료 : IMS Health, IMS Market Prognosis, September 2014

○ 2013년 세계 의약품 시장 내에서 특히 항고혈압치료제는 약 496억달러 수준으로 판매량은 전년도 대비 감소 추세이나 상위20개 군중 4번째에 해당하는 높은 판매량을 보여주고 있음. 또한 항콜레스테롤 제제등의 동맥경화 관련 제제 통한 상위 20개군에 포함되는 것으로 보고됨.

2013 RANK	약효군	2012	2013	전년대비 성장률
GLOBAL MARKET		857,710	874,611	4.5
1	항암제(Oncologics)	63,082	67,132	8.5
2	진통제(Pain)	56,230	57,293	4.7
3	당뇨병 치료제(Antidiabetics)	50,352	54,369	10.2
4	항고혈압제(Antihypertensives, Plain & Combo)	52,664	49,609	-1.7
5	항균성 치료제(Antibacterials)	40,244	40,248	2.6
6	정신건강 치료제(Mental Health)	41,214	39,495	-2.6
7	호흡기질환 치료제(Respiratory Agents)	39,357	38,115	-1.8
8	자가면역질환 치료제(Autoimmune Diseases)	27,473	31,080	14.4
9	콜레스테롤 조절제(Lipid Regulators)	33,301	28,938	-10.8
10	외용제(Dermatologics)	24,815	26,778	11.3
11	궤양 치료제(Anti-Ulcerants)	26,022	25,583	1.7
12	항응혈제(Anticoagulant)	25,420	24,076	-2.5
13	위장질환 치료제(GIP roducts)	22,650	23,530	7.4
14	기타 심혈관질환 치료제(Other Cardiovasculars)	21,279	21,943	6.2

주 : 1) 시장규모는 분기별 환율 적용, 2) 전년대비 성장률은 환율변동치를 정규화한 불변가격 성장률임 (LC달러), 3) 처방의약품 및 일부 OTC 포함, 제약기업 및 도소매업의 판매액

자료 : 2014년 제약산업 분석 보고서, 한국보건산업진흥원

## 나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

### (1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)



### 원료수급 현황 및 대책

구 분	원료의 수급	기존 제품과의 혼합성
현황	2011년 부터 산국 Essential oil의 대량 확보 [년 30 L 이상 확보가능]	Essential 에은 다른 물질과의 혼화도가 높음
대책	재배지 확대 및 수득률 향상을 통해 제품 생산이 가능한 원료 확보	제재, 제형 연구를 통한 기존제품과의 혼합을 시도

### 제품개발 계획

범 위	원 료	기 능	제 영
고혈압	- 산국 essential oil - 증류액 내 monoterpene	- 혈압저하	스프레이, 태블릿 (기능성식품)
동맥경화	- 산국 essential oil - 증류액내 monoterpene	- 동맥경화소 억제	액상차, 태블릿 (기능성식품)

## 2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	0	0	0	50	90	140
경제적 파급효과	0	0	0	200	400	600
부가가치 창출액	0	0	0	500	900	1,400
합 계	0	0	0	750	1,390	2,140

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등추정치

## 5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

### 가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

#### (1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 알콜 등 유기용매를 이용한 시료를 이용한 것으로, 본 연구과제에서 추구하는 시료와는 다소 차이가 있으며, 기능면에서도 항고혈압, 동맥경화를 치료/완화하기 위한 것과는 차이가 있음. 따라서 도출 된 결과 및 추후 결과의 보완은 특허 신청 선점에 있어서 유리한 여건이 될 것으로 사료됨.

#### (2) 논문분석 측면

- 기존 논문은 혈관에 대한 정확한 기전 효능연구가 없었으나, 본 연구과제는 일부 관련 반응기전을 규명함. 따라서 더욱 정밀한 기전에 대한 추가 연구는 높은 IF의 논문을 얻을 수 있는 가능성을 높임.



(3) 제품 및 시장분석 측면

○ **[산국 기능의 탁월성을 이용한 혈관질환 치료제의 개발 전략]** 국화 관련 기능성 연구는 대부분 항암/항균/항염 작용에 국한되어 왔으나, 본 연구에서는 순환기 질환의 기능 규명을 통해 기존 연구와 차별화로 연구를 수행 (기존 essential oil의 연구는 세포독성이 없는 적절한 가용화제를 찾지 못해 연구의 한계를 나타내었으나, 본 연구진은 이러한 문제점을 해결하였음).

○ 일부 대학 연구실 및 지자체 TP를 중심으로 에센셜 오일의 추출을 시도하였으나, 기술력의 부족으로 인해 오염 및 유기용매의 사용으로 인해 인체에 적용이 불가능하였으나, 본 연구진은 동물을 이용한 독성시험에서 아무런 영향이 없는 것으로 평가됨에 따라, 인해 인체에 적용가능성을 높이는 결과를 도출함.

○ 인체 안정성 검증을 위한 간이 임상시험에서 인체 안정성에 영향을 주지 않는 결과 도출이 되는 경우 임상효능 평가를 계획하고 있음.

○ 따라서 상기 차별화 전략을 바탕으로 본 과제에서 추출/연구된 산국 에센셜 오일/추출물은 혈관질환치료 소재로 뿐만이 아닌 다른 관련분야에서의 다각도로 활용 시 다양한 제형 및 제품의 개발이 가능할 것으로 사료됨.

○ **[제품화/상용화 성공을 위한 관련 전문가의 동원 및 컨설팅 추구]** 본 연구에서는 순환기 질환 연구의 전문가인 연구책임자를 비롯하여 다양한 전문 인력이 참여/ 협력을 통해 양질의 결과를 도출함. 또한 도출된 결과를 바탕으로 외부의기능성식품, 순환기질환의 전문가와의 관련 분야의 컨설팅의 지속 및 참여기업 및 참여연구원과의 지속적인 협력연계를 유지할 계획임. 이는 혈관질환치료 소재 개발에 필요한 제형, 제제 등에 대한 사업 및 시제품개발/제품화/상용화를 위한 연구/기획 및 정보교류의 방편이 될 것으로 사료됨.

## 주 의

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