

11-1543
000-002
097-01

발간등록번호

11-1543000-002097-01

오미자를 활용한 노인성 질환 개선 기능성 제품 최종보고서

2018

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

오미자를 활용한 노인성
질환 개선 기능성
제품개발

최종보고서

2018. 02. 28.

주관연구기관 / 동의대학교

협동연구기관 / 부산대학교

한국한의학연구원

(주)바이오포트코리아

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “오미자를 활용한 노인성 질환 개선 기능성 제품개발”(개발기간 : 2014.11.28 ~ 2017.11.27)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018.01.11.

주관연구기관명 : 동의대학교 산학협력단 (인)
협동연구기관명 : 부산대학교 산학협력단 (인)
협동연구기관명 : 한국한의학연구원 (인)
협동연구기관명 : (주)바이오포트코리아 (인)

주관연구책임자 : 최 영 현
협동연구책임자 : 최 영 환
협동연구책임자 : 김 호 경
협동연구책임자 : 김 기 영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	314043-03	해당 단계 연구 기간	2016.11.28 ~ 2017.11.27	단계 구분	3/ 3
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	오미자를 활용한 노인성 질환 개선 기능성 제품개발			
연구책임자	최영현	해당단계 참여 연구원 수	총: 17 명 내부: 7 명 외부: 10 명	해당단계 연구개발비	정부: 500,000천원 민간: 166,668천원 계: 666,668천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 35 명 내부: 9 명 외부: 26 명	총연구개발비	정부: 1,500,000천원 민간: 500,004천원 계: 2,000,004천원
연구기관명 및 소속부서명	동의대학교 한의과대학 생화학교실			참여기업명 (주)바이오포트코리아	
위탁연구	연구기관명:	연구책임자:			
<p>요약: • 오미자를 이용한 노인성 질환 개선용 기능성 제품 개발을 위해 퇴행성 관절염, 인지장애 및 혈행장애에 미치는 오미자 추출물의 효능을 평가하였음 • 사업화 성공 가능성 및 참여기업의 의지 등의 분석에 따른 퇴행성 관절염 전 임상연구 결과를 토대로 임상시험 진입용 제형을 제작하여 인체적용시험을 완료하였음 • 인체적용 시험 결과를 기반으로 식품의약품안전처 기능성 식품 개별인증(건강기능성식품 기능성원료) 신청(신청원료: 오미자 추출물, 기능성: 관절 및 연골 건강에 도움을 줌)을 완료하였음 • 학술적 성과: 과제 수행 동안 총 SCI(E)급 학술지 16편을 포함 22편의 논문을 발표하였고, 과제 수행 종료 후 현재 3편의 논문이 추가로 간행되었으며, 학술대회 논문 발표 22건을 수행하였음 • 지적소유권: 총 12건의 지적소유권(특허 출원 9건 + 특허 등록 2건 + PCT 1건)을 확보하였으며, 현재 등록 2건 추가 추진 중임 • 제품개발: 퇴행성 관절염 대상 시제품 1건 및 기타 시제품 3건 이상 제작 완료 • 기타 업적: 총 6회에 걸쳐 과제 진도 보고 및 개별인증 획득 전략 등의 지속적 수립, 교육지도 2건, 5건의 보고서 등을 간행 완료</p>				<p>보고서 면수: 278</p>	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최종목표: <ul style="list-style-type: none"> • 오미자의 수요 증대 및 관련 산업의 진흥을 위한 노인성 질환 개선용 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인증 획득 및 사업화로 오미자 농가 및 식품산업 동반 성장으로 국가 경쟁력 제고 ○ 연구내용: <ul style="list-style-type: none"> • 노인성 질환 개선 기능성 식품 시장 분석을 통한 오미자 제품 연구 개발 전략 수립 • 오미자 및 오미자 복합물 원료 규격 확립, 샘플 공정 및 원료 안전성 평가 • 오미자 및 오미자 복합물 활용 시제품의 제품생산 공정 최적화 및 소재화 기술 개발 • 오미자를 및 오미자 복합물 활용한 노인성 질환 개선 기능성 소재의 임상시험 및 기능성 개별인증 • 노인성 질환 개선 기능성 식품 소재 개별인증 획득에 따른 시장 진입 전략 수립 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오미자 추출물을 이용하여 <i>in vitro</i> 퇴행성 관절염 모델에서 항염증 및 연골보호 효능의 세포 및 분자수준에서 작용기전을 규명하였으며 안전성 입증을 통하여 <i>in vivo</i> 동물모델에 대한 효능을 동시에 제시하였음 ○ 오미자 추출물을 이용한 인지장애 및 혈행장애 효능 검증을 통하여 향후 기능성 인증을 통한 사업화 기반을 구축하였음 ○ 사업화 성공 및 참여기업의 의지 등의 분석에 따른 퇴행성 관절염 전 임상연구 결과를 토대로 인체적용시험을 완료하였으며, 임상시험 진입용 제형을 구현하여 식품의약품안전처 기능성 식품 개별인증 신청을 완료하였음 ○ 연구개발성과: <ul style="list-style-type: none"> • 학술적 성과: 과제 수행 동안 총 22편의 논문을 발표하였고, 과제 수행 종료 후 현재 3편의 논문이 추가로 간행되었음(SCI(E)급 학술지 17편+ 등재지 8편=25편) → 계획 대비 초과 달성한 실적이며, 추가 학술 논문 발표를 지속적으로 할 예정이며, 학술대회 발표 실적은 22건으로 계획대비 11건 초과 달성하였음 • 지적소유권: 총 12건의 지적소유권(특허 출원 9건+ 특허 등록 2건+PCT 1건)을 확보하였음 → 특허 출원의 경우 계획 대비 6건을 초과 달성하였으나, 등록 1건이 미비하지만 현재 추가적으로 2건의 특허를 등록 추진 중에 있음 • 제품개발: 퇴행성 관절염 대상 시제품 1건 및 기타 시제품 3건 이상 제작 완료 • 기타 업적: 총 6회에 걸쳐 과제 진도 보고 및 개별인증 획득 전략 등의 지속적 수립, 교육지도 2건, 5건의 보고서 등을 간행하였음 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 오미자 및 오미자 복합물을 활용한 노인성 질환 개선 기능성 제품 개발뿐 만 아니라 오미자의 노인성 질환 제어 관련 분자생물학적 기전 탐색을 통한 학문적 자료 제공으로 국가 과학 기술 경쟁력 제고에 기여 ○ 오미자 및 오미자 복합물을 이용한 노인성 질환 개선 기능성 식품 개별인증 획득 및 상품화를 통하여 노령화 사회에 따른 노인성 질환의 증가로 인한 막대한 사회경제적 손실의 차단 ○ 국내산 오미자의 우수한 기능성 검증을 통한 고부가가치 상품 개발 및 국내산 원재료 제품의 시장 점유율 확대로 글로벌 경쟁력 향상과 관련 식품산업 기업의 수익율 증대에 기여 ○ 참여기업의 수익증대에 따른 우수 원료 계약 재배로 오미자 농가의 안정적 판로 확보를 통한 농가 매출 및 소득 동반 증대와 오미자의 우수한 기능성 검증과 홍보를 통한 오미자 농가들의 자긍심 고취 ○ 건강기능식품 기능성원료 인증을 통한 원료 판매 및 기능성 제품 판매에 기여 				
중심어 (5개 이내)	오미자	고령화질환	건강기능식품	상품화	항노화

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose & Contents	<p>○ Final goal:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obtaining individual approval for health functional foods for the improvement of geriatric diseases for the increase of demand of Omiza (fruit of <i>Schisandra chinensis</i>) and promotion of related industries <p>○ Research content:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Establishment of R & D strategy for Omija product through analysis of functional food market to improve geriatric diseases • Establishment of raw material specifications for Omija and Omija composite, sample process and raw material safety evaluation • Optimization of production process and development of materialization technology for prototype using Omija and Omija composite materials • Clinical trial and functional individual certification of functional materials for improving geriatric diseases using Omija • Establishment of market entry strategy by acquiring individual recognition of functional food materials for geriatric diseases 				
Results	<p>○ The anti-inflammatory and cartilage protective effects of Omija extract in <i>in vitro</i> degenerative arthritis models was confirmed and safety efficacy was demonstrated simultaneously <i>in vivo</i> animal model efficacy</p> <p>○ Establishment of commercialization base through verification of cognitive disorder and hematological disorder efficacy using Omija extract</p> <p>○ Application of individual food certification at the Korea Food and Drug Administration based on preclinical arthritis results according to analysis of success of commercialization and willingness of participating company</p> <p>○ R & D achievement:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Academic achievement: 25 papers including 17 SCI/E papers and 22 conference papers • Intellectual property rights: 12 intellectual property rights (9 patent applications/2 patent registrations/1 PCT) • Product development: 1 case of degenerative arthritis prototype and 3 cases of other prototype product • Others: project progress report and acquisition of individual certifications for 6 times, 2 training reports, 5 reports 				
Expected Contribution	<p>○ Exploring molecular mechanisms for the development of functional products for the control of geriatric degenerative disease and improvement of elderly disease</p> <p>○ Improvement of geriatric diseases by using Omiza obtaining individual certification of functional foods and merchandising to block socioeconomic losses due to increase of geriatric diseases according to aging society</p> <p>○ Contributing to the improvement of global competitiveness through the development of high value-added products through Omiza's functional verification and expansion of market share of domestic production materials</p> <p>○ Promoting Omiza farmers' self-esteem through income increase, stabilizing farmers' market through good raw material cultivation by increasing profit of participating companies</p> <p>○ Health functional food sales of raw materials and expansion of sales through functional raw material certification</p>				
Keywords	<i>Schisandra chinensis</i>	Degenerative disease	Functional food	Commercialization	Anti-aging

6. 영문목차

1. Outline of Research and Development Task	1
2. Status of Domestic and Overseas Technology Development	20
3. Research Content and Results	25
4. Achievement of Goal and Contribution to Related Field	209
5. Plan for Utilization of Research Results	218
6. Overseas Science and Technology Information Collected during the Research Process	230
7. Security Rating of R & D Achievement	230
8. Research Facilities Registered in National Science and Technology Comprehensive Information System	230
9. Implementation of Safety Measures in Laboratories Based on R&D Tasks	231
10. Representative Research Achievements of R&D Tasks	234
11. Etc	235
12. References	242

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	20
3. 연구수행 내용 및 결과	25
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	209
5. 연구결과의 활용계획 등	218
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	230
7. 연구개발성과의 보안등급	230
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	230
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	231
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	234
11. 기타사항	235
12. 참고문헌	242

1. 연구개발과제의 개요

코드번호 D-03

1-1. 연구개발 목적

(1) 연구개발의 최종 목표

(가) 최종 목표

▶ 오미자의 수요 증대 및 관련 산업의 진흥을 위한 노인성 질환 개선용 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인정 획득 및 사업화로 오미자 농가 및 식품산업 동반 성장으로 국가 경쟁력 제고

(나) 최종 목표 달성을 위한 연구 수행 내용 및 기대 효과 요약

- ① 오미자의 퇴행성 관절염 억제 효능 검증 및 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보
- ② 오미자의 인지장애 개선 효능 검증 및 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보
- ③ 오미자의 혈행장애 개선 효능 검증 및 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보
- ④ 오미자를 이용한 노인성 질환 개선용 시제품 3종 및 건강기능식품 개별인정 획득
- ⑤ 연구 개발 결과의 사업화로 오미자 재배 농가 수익 증대 및 유사 건강 기능성 식품 수입 대체 효과에 기여



(2) 연구개발의 주요내용

(가) 노인성 질환 개선 기능성 식품 시장 분석을 통한 오미자 제품 연구 개발 전략 수립

- ① 노인성 질환 3개 영역(퇴행성 관절염, 인지장애 및 혈행장애) 특화에 따른 오미자 추출물을 소재 선정
- ② 기존 제품과 차별화된 오미자 건강 기능성 제품의 개발을 위한 제품 개발 방향 설정

③ 소비자 니즈 조사에 따른 수요층의 분석에 따른 제품 제형화 기반 방안 수립

(나) 오미자 원료 규격 확립, 샘플 공정 및 원료 안전성 평가(Lab scale)

- ① 식품의약품안전처 기능성 원료의 표준화지침서에 따른 원료 표준화
- ② 오미자의 독성평가 기반 퇴행성 관절염 억제, 인지 및 혈행장애 개선 효능 및 생리 활성 검증
- ③ 기능성 원료 안전성 확보를 위한 공인 시험성적서 확보에 따른 샘플의 안정성 확보
- ④ 오미자의 제품화를 위한 원료 표준화 공정 시스템 구축

(다) 오미자 활용 시제품의 제품생산 공정 최적화 및 소재화 기술 개발(Scale up)

- ① 오미자 단독/복합 원료의 기능성 원료 제조공정의 확립 및 기준규격의 설정
- ② 제품별 최적 제조공정 확립(pilot 및 mass scale) 및 시제품 3종 개발
- ③ 완제품화를 위한 차별화된 소재(액상, 분말, 고형 등) 가공 적성연구 및 제형/포장 연구
- ④ 시제품의 안전성·기능성 검증과 제품의 미생물학적, 화학적, 물리적 품질기준 설정
- ⑤ 완제품 포장개발 연구(유통안정성, 제형 등) 및 참여기업을 통한 제품 대량 생산 공정 수립 및 상품화

(라) 오미자를 활용한 노인성 질환 개선 기능성 소재의 임상시험 및 기능성 개별인증

- ① 임상시험용 시험 및 대조약물 제조와 IRB 승인을 위한 임상시험 protocol과 임상시험자 자료집 작성
- ② 전임상시험을 기초로 한 인체적용시험실시(PI 및 CRC 선정) 최종 결과보고서 획득
- ③ 식품의약품안전처 노인성 질환 개선 기능성 개별인증 신청 및 획득

(마) 노인성 질환 개선 기능성 식품 소재 개별인증 획득에 따른 시장 진입 전략 수립

- ① 소재 기능성 및 안전성 등에 대한 마케팅용 자료(brochure, PPT, story telling) 제작
- ② KOTRA 및 식품의약품안전처 등의 자료취합 및 박람회참가를 통한 시장 반응 조사 근거 시장 진출 준비
- ③ 제품 판매를 통한 기업의 수익 창출을 위한 참여기업의 전략 수립
- ④ 우수 오미자 원료 표준화 및 안정적 농가 소득 증대를 위한 구매 계약 재배로 기업-농가 간 상생협력

1-2. 연구개발의 필요성

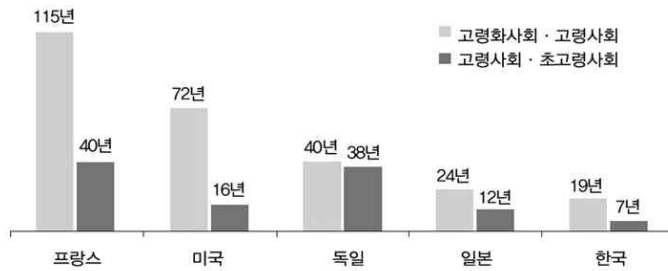
(1) 고령화 인구의 증가에 따른 문제점

- 우리나라를 포함하여 서구의 많은 나라들이 2020년대를 전후로 초고령 사회(65세 이상 인구가 총 인구의 20% 이상 차지)로의 진입이 예상되어, 고령인구의 건강한 삶 유지와 경제적 생산 활동 참여를 가능케 하는 노화 관련 연구를 통하여 얻어진 치료제 개발, 의 료기술 및 삶의 질 향상에 대한 요구가 증대되고 있음

→ 이러한 사회 환경적 변화에 따른 노인성 질환 개선 기능성 제품개발의 필요성과 주제 설정 배경은 다음과 같음

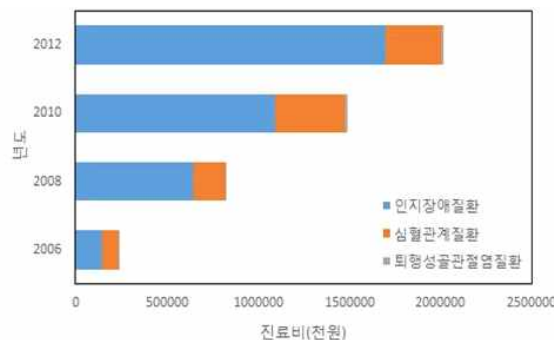
(가) 세계 인구의 고령화에 따른 시장성 변화

- ① 인구의 고령화 추이: 전 세계적으로 노인인구가 급속하게 증가하고 있으며, 2050년에는 총인구 95.5억 명 중 65세 이상 인구가 15.3억 명으로 예상됨
 - 전체인구의 약 16.2% 도달로 심각한 인구 고령화 현상 예상됨
- ② 프랑스, 미국, 독일, 일본 등에 비해 한국의 고령화·초고령화 사회로의 전환 시간이 19년과 7년으로 역사상 가장 빠른 속도로 진행 중에 있음



[도 1. 세계 주요국의 초고령화 사회로의 전환 기간]

- ③ 우리나라 인구의 급속한 고령화: 우리나라는 현재 65세 이상 인구가 전체의 11.3% (약 549만 명)로 세계 역사상 가장 빠른 속도로 고령화가 진행 중이며 연도별 예상되는 초고령 인구는 2030년에 24.3%, 2060년에는 40% 정도 증가할 것으로 전망됨
- ④ 의료비 증가세는 노인성 질환이 주도
 - 2005~2010년 건강보험 진료비 지급 자료를 분석한 결과 2010년 노인성 질환의 진료인원은 111만 2,000명으로 2005년 68만 명에 비해 163% 증가 → 주요 노인성 질환인 치매는 총 진료비 및 진료환자 1인당 진료비가 최고를 기록하는 등 건강보험 진료비 증가에 가장 크게 기여
 - 2005년 대비 연령별 노인성 질환의 진료인원 및 총 진료비의 증가현황을 살펴보면 65세 이상 노인에서의 증가가 두드러졌으며 특히, 85세 이상에서는 ‘치매’와 ‘파킨슨병’의 증가 폭이 큼 → 또한, 65세 미만에서는 50대의 증가가 높게 나타났는데 특히, ‘치매’의 경우 진료인원과 총 진료비의 경우 2005년 대비 증가율이 209.9%와 398.8%로 노인성 질환 중 가장 높은 증가세를 유지



[도 2. 대표적인 노인질환의 진료비 현황(국민건강보험공단, 건강보험통계, 2013년)]

- 고혈압, 퇴행성 관절염, 위염, 알레르기성 비염, 당뇨병은 유병률 순위 5대 만성질환으로서 만성질환자 중 퇴행성 관절염환자는 36.6%이며, 이 중에서 60세 이상이 88% 이상을 차지함

- ▶ 2006년에 대비 2012년도의 노화에 따른 대표 질병인 인지장애, 심혈관계, 퇴행성 관절염에 대한 질병의 만 60세 이상의 진료비가 각각 11.8%, 7.9%, 79.9% 증가함 → 5대 만성질환자(3개월 이상 복용)의 일반의약품 이용률은 퇴행성관절염에서 17.2%로 가장 높고 위염 15.3%, 고혈압 14% 순으로 나타남
- ▶ 이미 고령화 시대에 접어든 우리나라를 비롯한 전 세계적인 고령 인구의 증가 추이로 고령층 삶의 질적 증대를 위한 노화의 예방과 고령화에 따른 다양한 인체 질환의 적극적인 예방과 치료를 위한 노력에 사회적 관심이 증대되고 있음

(나) 노인성 질환 개선 기능성 제품 시장의 급성장

- ① 고령화에 따른 다양한 질환의 제어 목적으로 새로운 건강 기능성 및 식의약 소재의 탐색을 포함하는 노인성 질환 개선 기능성 제품 시장이 급격히 팽창하고 있음
 - 최근 미국의 Transparency Market Research의 보고에 따르면 세계 항노화 시장 규모는 2013년 이후 연평균 7.8% 비율로 성장하고 있으며, 2019년에는 1천 917억 달러 시장을 형성할 것으로 예측하였음
 - 또한 현대사회에서 사용되고 있는 대부분의 치료제들은 화학합성품으로서 제한된 약효, 약제내성 및 고비용 등과 같은 심각한 부작용을 초래하기 때문에 천연물에서 생리활성 물질을 찾아 부작용을 최소화하면서 우수한 치료 및 예방효과를 가지는 신소재에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있음
 - 사회적 측면에서 고령화로 인한 의료비 지출이 계속 증가하여 2020년 국내 의료비 지출 규모는 GDP 대비 7% 이상을 차지할 것으로 예상 → 질병치료를 위한 의료비 증가뿐 만 아니라 Well-being, Well-aging 및 Well-dying과 같은 삶의 질 향상과 연계된 항노화 시장 수요 증가는 더욱 가속화될 것으로 예측됨
- ② 노화 연구의 범위: 2007년 「노화과학기술연구촉진법안」에서 제시한 노화연구의 범주는 크게 다음과 같이 구분되며 본 과제의 수행과 직접 연관된 분야는 ②에 해당함
 - 노화의 기전규명을 위한 생물의학적 연구
 - 건강노화를 유지할 수 있는 생의학적 연구
 - 노화과정에 따른 질병의 예방과 치료를 위한 기전 연구
 - 일상생활의 원활한 수행을 가능하게 하는 신체 정신의 기능을 극대화하는 장수 연구 등
- ③ 노인질환의 정의: 생명공학정책연구센터, 「노화연구 및 활용기술」(2009.4) 보고서에 의한 노인질환의 연구 범위는 다음과 같이 구분됨

세분류	정의 및 내용
근골격계	노화 연관 근골격계질환 발병기전 연구와 예방 및 치료기술을 개발 분야
신경계	노화 연관 신경계질환 발병기전 연구와 예방 및 치료기술을 개발 분야
심혈관계	노화 연관 심혈관계질환 발병기전 연구와 예방 및 치료기술을 개발 분야
종양 및 기타질환	노화 연관 종양 및 기타 질환 발병기전 연구와 예방 및 치료기술을 개발 분야

→ 즉 건강노화를 유지할 수 있는 생의학적 연구는 상기의 범주 내에서 조화롭게 이루어져야 하며 단일 기능성 후보 식품의 상호 복합적 상승효과가 이루어질 수 있는 효능을 지녀

야 함

④ 세계 주요 각국의 기능성 식품 시장 동향

- 유럽의 기능성 식품은 (a) 성장, 발달, 분화에 관한 기능성 식품) 과학, (b) 물질 대사에 관한 기능성 식품 과학, (c) 반응성 산화물질로부터 방어에 관한 기능성 식품 과학, (d) 심장 혈관계에 관한 기능성 식품 과학, (e) 소화관 생리와 기능에 관한 기능성 식품 과학, (f) 행동 및 심리에 관한 기능성 식품 과학의 6가지 항목이 중심이 되어 연구하고 있음
- 독일은 1978년 약용허브와 식물요법의 안전성과 약효를 재평가하기 위한 전문위원회를 설립하였고, 은행잎으로부터 혈액순환 장애 치료제를 개발하여 연간 20억불(약 2조 4천억 원) 이상 매출액을 실현하여 세계시장을 주도 하고 있음
- 중국은 2002년 과학기술부, 국가발전계획위원회, 중의약관리국 등 8개 부처가 “중약현대화발전장요”를 토대로 본격적인 “중약 현대화 프로젝트”를 추진하고 있음 → 또한 국제적 중약표준을 제정하여 국제화과정을 가속화하여 중약제품의 국제경쟁력과 시장점유율 향상을 꾀하고 있음
- 미국은 2002년 미국 국립보건원(National Institutes of Health, NIH) 내에 국립보완대체 의학연구소(National Center for Complementary and Alternative Medicine, NCCAM)를 설립하여 보완대체의학의 안전성과 유효성에 대한 연구를 수행하고 있음 → NCCAM 예산은 1999년 5천만 불에서 2005년 1억 2,300만 불로 증가하였으며, 지속적인 증가를 보임
- 2000년 미국 FDA에서는 “Botanical Drugs Guidance”를 제정하여 전통약물을 이용한 천연물 의약품에 대한 등록허가요건 규정을 적용함으로써 향후 세계 천연물 의약품 시장의 주도권을 장악할 수 있는 토대를 마련함
- 일본은 의료산업 분야에서 썬무라 제약을 중심으로 한약제제 생산과 고품질 한약을 개발하여 세계시장에 진출하고 있음 → 일본의 가장 대표적인 제약회사인 “일본 Sankyo 제약”은 미생물로부터 혈중콜레스테롤저하제 “Compactin (mevastatin)”을 개발하여 연간 1,000억 엔(약 1조 2천억 원) 이상 수출하고 있음
- 국내의 경우 혈액순환개선 효능을 가진 천연물의약품으로 은행엽제제(동방제약 징코민), 산사추출물(동아제약 써큐란) 등이 시판되고 있음 → 그 외, DHA, EPA, 레시틴, 감마리놀린산, 대두추출물, 당귀, 천궁, 숙지황 등의 추출물 혹은 이들의 혼합제품 등 다수의 건강기능식품들이 출시되고 있으나 뚜렷하게 효능이 있는 제품은 없는 실정임

(2) 오미자의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

(가) 오미자의 경제적·산업적 중요성

- 오미자(五味子, Schisandraceae, omicha)는 한국, 일본, 중국북동지방, 남부 사할린, 동러시아의 야생에서 자생하는 식물로서 과육과 껍질은 신맛과 단맛을 내고, 종자는 매운맛, 쓴맛과 짠맛을 내므로 우리나라에서는 5가지의 맛을 내는 과실을 의미함[일본에서는 고미시(gomishi, ごみし), 중국에서는 유웨이지(wu-wei-zi)로 불림

① 오미자는 식의약 공용 한약재(식품 재료 등재 2004년)로 기능성 입증과 입증된 기능성을 제품화하여 산업의 고부가가치화 필요성이 꾸준히 제기되어 왔음

- 따라서 오미자 생산, 가공, 지역 원료 산업 활성화를 통한 산업 진흥 필요성이 증대 되며, 오미자로부터 추출한 생리활성 물질의 건강보조 식품 또는 의약품 개발로 수출을 통한 외화 획득 및 외국으로부터 로열티 확보가 절실히 요구됨
- ② 국내 오미자 재배면적 및 생산량을 살펴보면 1996년도 이전에는 한약재로 사용하면서 재배면적과 소비형태가 한정되어 변화가 미비하였으나, 1996년도부터 새소득 작목으로 인식되어 2007년도 전국 재배 면적이 822 ha이었으며 생산량은 3,040톤이었으나, 점차적으로 증가되어 2010년 현재 재배 면적은 1,735 ha, 생산량 9,535톤으로 증가되었음
- ③ 2011년 오미자 관련 산업은 원료 생산량 약 10,000톤이며 생산액은 약 1,000억 원으로 매년 약 20%씩 성장하고 있는 산업이며, 향후 잠재적인 오미자 농산업 시장규모는 3,000억 원 이상이 될 것으로 추정되고 있음(2012 임산물 생산조사, 산림청 2013) → 그 중 경상북도 문경 지역에서 750 ha, 생산량 4,500톤으로 전국 생산지 제1주산지 임

(나) 지역 특화 산업으로서 문경 오미자 연혁

- ① 지역 특화 산업으로서 문경 오미자의 가치: 경상북도 문경시는 지역 특화 작물로서 오미자의 브랜드 가치를 상승시키기 위하여 다음과 같은 노력을 기울여 왔음



[도 3. 문경시 농업기술센터 내 오미자 가공시설 및 일차 오미자 가공상품들의 예]

- 1996년: 고령 노동력과 휴경지를 활용한 새소득 작목 개발 시범사업으로 동로면에 0.2 ha 최초 재배지 조성
- 2005년: 전국 생산량의 40% 차지하며 오미자 제1주산지로 부상 → 2005~2010년 : 신 활력사업으로 1.2.3차 융합형 산업화
- 2005~2013년: 문경오미자 축제 개최(9회) → 2006년 6월 : 문경오미자 산업 특구 지정 (지식경제부)
- 2006년 11월 : 문경오미자 공동브랜드 “레디엠” 상표 등록(특허청) → 2009년 1월 : 문 경오미자 “지리적 표시 특산물” 등록(산림청)
- 2013년 3월 : 지역경제 활성화 최우수사례 대통령상 수상
- 2008~2014년 : 대한민국대표브랜드(친환경농산물) 대상 7년 연속 수상
- ② 지역 특화 산업으로서 문경 오미자 연차별 성장 현황

구 분	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
재배 면적	178ha	254ha	347ha	455ha	512ha	602ha	752ha	850ha	950 ha
참여농가수	325호	402호	469호	530호	693호	759호	856호	1,050호	1,200호
연간생산량	600톤	1,200톤	1,300톤	1,500톤	2,500톤	3,500톤	4,500톤	4,800톤	5,100톤
농가조수입	40억원	93억원	105억원	132억원	175억원	238억원	357억원	495억원	612억원
가공사업체	1개소	8개소	17개소	26개소	37개소	43개소	48개소	52개소	55개소
가공매출액	1억원	6억원	37억원	83억원	186억원	271억원	350억원	400억원	450억원

(다) 노인성 질환 개선 기능성 제품으로써 오미자 개발의 한의학적 근거

- ① 오미자의 한의학적 성미(性味) 및 귀경(歸經): 5가지의 맛을 내기는 하지만, 신맛(산미(酸味))가 주(主)가 되고 그 성(性)은 온(溫)하되 조(燥)하지 않음. 폐(肺)·심(心)·신(腎) 삼경(三經)에 들어감
- ② 각 고서(古書)에 기록된 효능(效能) 및 주치(主治)의 예
 - 동의보감(東醫寶鑑): 위로는 폐기(肺氣)를 수렴하고 아래로는 신음(腎陰)을 자양(滋養)하며 아울러 삼정지사(澁精止瀉), 생진(生津), 지한(止汗)의 효능이 있어, 구건(口乾), 노상이수(勞傷羸瘦), 몽유활정(夢遺滑精), 도한(盜汗), 구사구리(久瀉久痢), 폐허천해(肺虛喘咳), 자한(自汗) 등을 치료함
 - 신농본초경(神農本草經): 원기(元氣)를 북돋움. 노상(勞傷)으로 여위고 마른 것을 치료하며 부족한 것을 보(補)하고 음정(陰精)을 돋우며 남자의 정(精)을 보익(補益)
 - 명의별록(名醫別錄): 오장(五臟)을 보양(保養)하고 열을 제거하며 음중기(陰中肌)를 생성
 - 일화자제가본초(日華子諸家本草): 시력을 아주 좋게 하고 풍(風)을 다스리고 위로 치밀어 오르는 기를 내리며 체기(滯氣)를 제거, 광란(癡亂), 근육 경련, 반위(反胃) 등을 제거하며 주독(酒毒)을 풀고 근골(筋骨)을 강(強)하게 함
 - 이고(李杲): 진액(津液)을 생성. 원기부족(元氣不足)을 보(補)하며 소모된 기(氣)를 수렴하고 동공이 산대(散大)된 증상을 치료
- ③ 이상을 내용을 종합해보면, 오미자는 오랫동안 실열증(實熱證)이나 외부표사(外部表邪)로 생긴 실증(實證)이나 표증(表證)이 아니라, 허증(虛症)이나 내증(內證)의 치료에 적합함을 알 수 있음 → 나이가 들어가면 오장(五臟)의 기(氣)가 허약해져 병이 들어도 잘 낫지 않고 진액고갈(津液枯渴) 등을 초래하게 되는데 오미자는 이를 치료하는데 도움이 되는 한약재로 노인성 질환에 적합한 소재임

(라) 세 가지 주요 노인성 질환 치료 및 예방제로서 오미자의 가능성

- ① 인지장애: 인지장애에 대해 오미자 단독으로 효과가 증명되지는 않았지만, 오미자가 포함되어 있는 복합처방인 가감총명탕(加減聰明湯)의 경우 쥐에서 허혈성 뇌손상 후 인지 기능의 회복 촉진 및 허혈유발 흰쥐의 학습과 기억 장애에 대한 보호 효과로 치매, 건망증 치료 효과에 대한 보고와 조위승청탕(調胃升淸湯)이 알츠하이머의 인지기능 진행 억제 및 예방 효과를 기대할 수 있다는 연구가 발표되어 있음
 - 치매의 병기(病機)가 간신부족(肝腎不足), 기혈허(氣血虧虛), 기체혈어(氣滯血瘀) 등인

것을 고려하면 오미자 추출물을 이용한 인지장애 개선제 개발 가능성은 충분하다고 여겨 짐

- ② 퇴행성 관절염: 오미자의 물 추출물이 세포독성 없이 RANKL-유발 파골세포 분화를 현저하게 억제하는 연구가 이미 이루어져 있음
 - 오미자의 파골세포 분화 억제능은 퇴행성 관절염, 골다공증, 류마티스 관절염 등의 골 질환 치료에 이용이 기대됨. 특히 오미자는 일화자제가본초(日華子諸家本草) 등에서 근골을 강하게 하는 것으로 알려져 있으나 아직 퇴행성 관절염에 효과적이라는 직접적인 연구가 없으므로 체계적인 연구를 통해 오미자의 효능을 밝히는 것이 시급함
- ③ 혈행개선: 한의학에서 기행혈(氣行血)이라 하며 혈(血)을 움직이게 하는 것은 기(氣)이므로 노화에 의해서 원기(元氣)가 약해지고 기의 흐름이 약해지면 혈액순환 장애를 유발하고 이는 심혈관질환 및 만성 통증의 원인이 됨
 - 오미자는 원기부족(元氣不足)을 보(補)하고, 기(氣)의 상하(上下) 소통에 중요한 역할을 하는 장기인 폐(肺)와 신(腎)에 동시에 영향을 미칠 수 있으므로 혈행순환 개선제로서의 가능성이 탁월하다고 보임
- ④ 현재까지 오미자에 대한 연구는 다양하게 이루어져 왔지만 과학적으로 증명된 결과를 바탕으로 제품으로 생산된 것은 많지 않음. 이번 연구를 통하여 노인성 질환 개선에 대한 오미자의 효능 기전을 밝혀 상품으로 개발된다면 농가의 고부가가치 자원으로 도약할 수 있을 것임



(마) 오미자의 약리 효능에 관한 국내외 최근 연구 현황 요약

- ① 오미자는 전통적으로 차, 화채, 다식, 술 등으로 이용되어 왔으며, 최근에는 젤리, 음료 및 스포츠 드링크로 개발하려는 시도가 있으며, 그 외로 요구르트, 김치, 나박김치, 두부, 고추장, 소스 등에 부원료로서의 이용이 시도되고 있음
- ② 오미자 국내외 현황 고찰: 오미자의 약리작용에 관한 과학적 연구는 간장보호, 알콜해독, 항산화, 혈당강하, 콜레스테롤 저하, 고지혈증 완화, 혈압저하, 중금속 해독, 면역 조절, 항궤양, 항암 및 항종양 등이 보고되어 왔음
- ③ 오미자의 식품 원료로서의 이용은 붉은색과 신맛을 이용하는 것이 대부분인데, 오미자의 붉은색은 anthocyanin에 의한 것이며, 신맛은 구연산을 주성분으로 하는 유기산에 기인하

며, 오미자의 붉은 색소인 anthocyanin의 안정성에 관한 연구 등이 수행된 바 있음 → 현재 약 30여 종의 dibenzo[a,c]cyclooctene 생리활성 유도체가 분리되었는데, 과실과 종자에는 7.2~19.2%, 줄기에는 1.3~10%가 함유되어 있는 것으로 보고되었음

- ④ 최근 오미자 추출물의 약리학 또는 화학적인 측면에서 많은 연구가 수행되고 있으며, 그 결과 오미자로부터 추출한 dibenzocyclooctadiene계 lignan은 항간염(anti hepatitis)작용, 간의 재생 촉진 및 간의 암발생과 지질산화(lipid peroxidation)를 억제하는 것으로 알려져 있음 → 오미자의 이러한 생리활성효과의 검토는 조추출로서도 가능할 것이나, 최종적으로는 순수물질을 분리하여 그 가치를 증대시킬 수 있어야 함. 또한 이러한 효과가 검증되었을 때에 그 물질을 기준으로 하여서 품질을 평가할 수 있는 기준의 설정에 의한 표준화와 규격화는 무엇보다도 시급한 일이라고 할 수 있음
- ⑤ 오미자로부터 분리된 lignans은 (a) 항간세포독성(antihepatitis), (b) 항산화(antioxidant), (c) 독성제거(detoxification), (d) 항간발암성(antihepatocarcinogenesis) 및 (e) 피로회복(physical performance) 등에 효과 높으며, 오미자는 스트레스 조건에서 국소빈혈기관, 국소 재관류, 흥분성, 빛에 의한 대사장해와 산소유리기와 관련된 병의 치료에 유용한 것으로 밝혀졌으며 최근에는 HIV, AIDS 및 인간의 두뇌활성과 신체 활동에도 효과가 높은 것으로 알려짐
- ⑥ 특히, 오미자로부터 추출한 dibenzocyclooctadiene계 lignan 및 추출물은 약용가치가 높고, 식용 가능한 식물이므로 제품개발을 위한 좋은 재료임. 오미자에 관한 연구는 아주 많이 수행되어서 현재 약 30여종의 lignans 물질들이 밝혀져 있지만, 우리나라의 경우에는 6종의 lignan을 추출하여 NFAT (nuclear factor of activated T-cell) transcription 효과를 검증한 정도임(미국, 일본, 중국 등에서도 오미자로부터 물질을 추출하여 항산화, 항간염, 항암 효과 등에 대해서 많은 연구결과를 가지고 있고, 추출물질을 근간으로 하여서 산업화를 위한 연구를 계속하고 있음) → 이에 오미자의 신규 용도에 적용 가능한 신규 화합물을 분리해내고, 화합물 및 용도에 대한 권리를 확보하는 것이 시급한 실정임

▶ 성공적인 본 과제 수행의 결과물은 오미자 부가가치 제고로 오미자 산업체의 성장과 농가소득향상을 통한 동반성장에도 크게 기여할 것임 → 이러한 노력은 지역 특화작물의 식품산업 핵심응용기술 개발지원으로 연계시켜 식품산업의 국제 경쟁력 제고에 일조할 것임

1-3. 연구 개발 범위

(1) 본 과제에서의 연구 개발 범위의 설정

- 상기 분류된 노인질환의 정의 4가지 세분류의 내용 중 종양 예방 및 치료용 기능성 식품은 현실적으로 개발에 많은 한계점을 가지고 있음

▶ 따라서 본 과제에서는 대표적인 노인 삶의 질을 저하시키는 나머지 3개 영역을 대상으로 하여 근골격계 부분에서는 퇴행성 관절염, 신경계 부분에서는 인지장애, 심혈관계 부분에서는 혈행개선 내용을 중심으로 “오미자를 활용한 노인성 질환 개선 기능성 제품개발”을 목표로 설정함

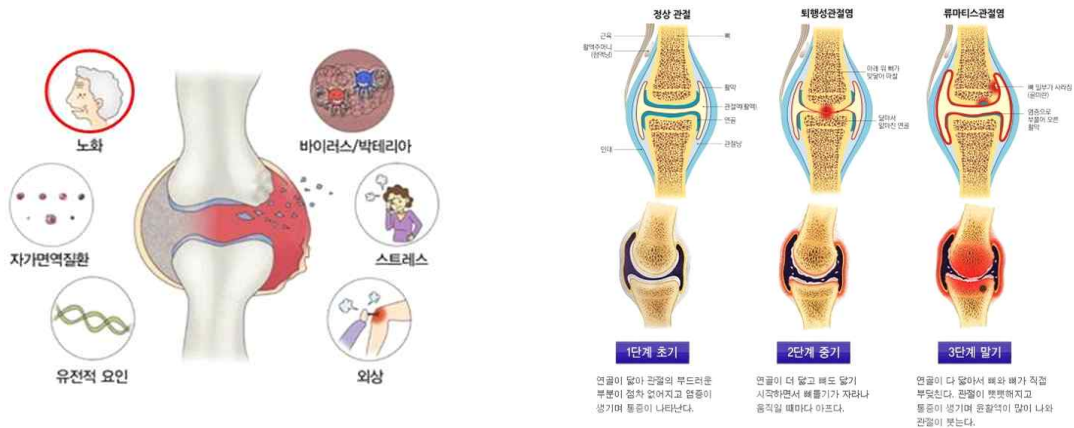
- 이러한 목표의 달성을 위하여 본 과제에서는 동의대학교 한의과대학, 부산대학교 생명자원과학대학/BIT 융합기술 연구소/청정동물실험센터, 한국한의학연구원 한약자원그룹팀, (주)바이오포트코리아 및 문경시 농업기술센터/(사)문경오미자생산자협회 등이 공동 연구 수행을 위한 상호 유기적인 협조를 할 것임
- 임상시험을 위한 위탁기관으로 (주)케이제이파마텍글로벌리서치 및 식품의약품안전처 지정 임상시험센터(동아대학교 병원)가 참여하였음

(2) 노화성 퇴행성 관절염, 인지장애 및 혈행 개선 질환의 연구 동향

(가) 노화성 퇴행성 관절염 영역

① 퇴행성 관절염(Osteoarthritis)은 신체적 노화, 과사용, 외상 등에 의하여 점진적으로 관절 연골이 퇴화되면서 심하게는 연골 하골까지 손상되고, 이차적으로 다른 조직에도 염증이 발생함으로써 신체적 기능 제한을 동반하는 만성질환임

- 우리나라의 퇴행성 관절염의 유병률은 여자가 남자보다 4배 정도 더 높고, 50세 이후 증가하여 60세 이상 노인에서는 25.3%, 70대가 41.5%를 차지하고 있음
- 퇴행성 관절염은 노화와 관련되어 나타나는 특징적인 만성질환으로서 관절의 통증, 강직, 부종 및 일상생활의 움직임에 제한이 있으며, 특히 체중 부하가 관절에 더 크게 영향을 미치며 기능적 제한이 신체적 변화와 함께 삶의 질을 감소시킴
- 류마티스 관절염에 비하여 퇴행성 관절염은 통증과 더불어 일상생활의 활동장애 및 운동장애를 유발하여 삶의 질을 저하시키고 치료 등에 천문학적인 개인적 및 사회적 비용을 소비하는 가장 대표적인 노인성·퇴행성 질환이므로 고령자 뿐만 아니라 비고령자에게서도 노인성 질환의 발생이 높은 폭으로 증가함에 따라 만성질환 중심의 연구 수행 필요



[도 4. 관절염의 원인, 퇴행성 및 류마티스 관절염 발생 단계의 차리]

② 퇴행성 관절염의 시장성

- 퇴행성 관절염 시장의 현황: 전세계 인구의 약 12%가 앓고 있는 질환으로 국내에서도 성인인구 중 31%가 증상을 갖고 있는 질환이며, 전세계 시장규모는 1,190억 달러(2008년 기준)에 이르고 있고, 국내에서만도 4천억 원 대의 시장을 형성하고 있지만, 대부분 글로벌 제약사가 개발한 수입의약품에 의존하고 있음

- 국내 현황: 국내 시장에 출시된 천연물 퇴행성 관절염 치료제는 SK 케미칼의 ‘조인스정’이 대표적이며, 2010년 약 220억 원의 매출액을 달성한 것으로 기대됨
- ③ 퇴행성 관절염 연구의 필요성: 퇴행성 관절염이 생기면 연골이 점차 소실되며 뼈가 돌출되고 관절을 계속 사용하게 되면 통증이 유발됨(이에 비해, 류마티스 관절염은 손가락, 팔꿈치, 무릎 등의 관절이 좌우 대칭적으로 염증을 일으켜 부어서 아프고 굳어지며, 지속될 경우, 관절의 변형과 탈구, 근/건의 구축 및 강직을 일으켜 장애로 정의됨)

	류마티스 관절염	퇴행성 관절염
발병 연령	소아, 중장년기(30-50대)	중년, 노년(60대 이후)
성별	여자 > 남자	여자 > 남자
원인	유전적 소인, 환경적 요인(예: 흡연)	나이, 관절 손상, 비만, 근력 약화
대칭성	대칭적	비대칭적
조조강직	1시간 이상	30분 미만
증상	-관절이 붓고 아프다 -아침에 관절이 뻣뻣하다 -수 주에 걸쳐 서서히 나타남 -전신증상 동반 (피로감, 발열, 쇠약감, 식욕부진 등)	-주로 내측 무릎에 통증 발생. -관절을 사용하면 악화되고 휴식을 취하면 완화됨 -아침보다 밤에 더 아프다 -전신증상 동반되지 않음
신체검진	관절의 부종, 압통, 열감, 운동제한, 류마티스성 결절	관절 운동시 ‘뚜둑’하는 소리(염발음), 국소적 압통, 운동제한
관절 외 증상	혈관염, 심낭염, 신경염, 공막염	관절 외 증상 없음

[도 5. 퇴행성 및 류마티스 관절염의 병변 현상 비교표]

- 노인기에 있어 거동이 불편한 경우 환자 개인의 정신적/육체적 손실 뿐 아니라 가족구성원 및 사회에 미치는 영향이 지대함. 이에 국가적 차원에서 골다공증을 비롯하여 골 건강을 증진시킬 수 있는 기능성 원료의 개발이 필요하며 이를 위해서는 미래원천기술을 조기 확보하고 첨단기술의 고부가가치 원료 개발의 인프라 확충 및 고도화, 원료의 제품화를 위한 유기적 시스템 마련이 절실함 → 이와 더불어 관련된 보건, 의료, 복지에 대한 국가의 전략적 접근이 필요함
- 2014년 8월 현재 건강기능식품의 원료로 개별 인정된 관절 건강에 관련 소재는 글루코사민을 포함하여 총 11건이 인정된 바 있으나 국내 식이 소재의 인정은 매우 제한적임
- 시장에서 가장 큰 비중을 차지하고 있는 글루코사민 소재(염산염 및 황산염)에 대한 효능재평가가 최근 제기되고 있고 의약품에서는 염산염 형태가 제외되는 등 골관절 건강관련 신규 원료에 대한 니즈가 매우 크지만 이에 대한 R&D 부문에 대한 투자 및 지원 미흡으로 기 개발된 해외소재의 국내 유입이 예견되는 바, 국내 원료의 소재화 및 제품화가 필요함

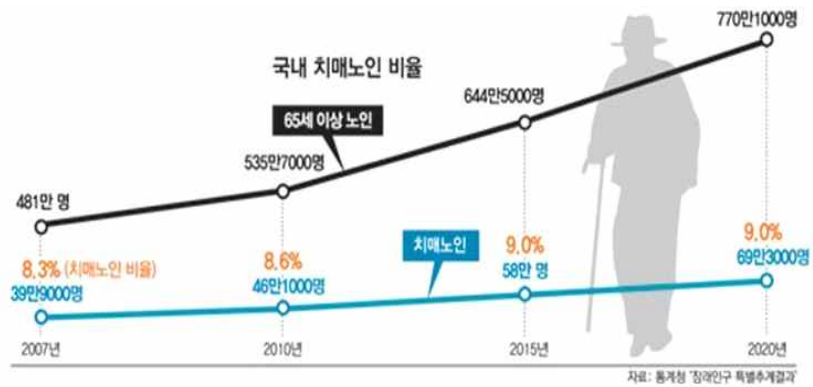
(나) 노화성 인지장애 영역

- ① 인지 장애의 현황: 만성 진행성 퇴행성 뇌질환으로 생기는 치매(dementia)는 최근 고령화가 진행됨에 따라 그 비중이 점점 더 커지고 있으며, 치매로 인하여 기억력 장애 및 지적 능력의 상실이 유발되면 더 이상 정상적인 사회생활 및 대인 관계를 유지 할 수 없기

때문에 사회적, 경제적, 의학적으로 심각한 현안으로 대두 되고 있음. 치매는 초기 발병 3년에서 20년까지 계속적으로 진행되며, 세계적으로 심혈관 질환, 악성 종양, 뇌졸중에 이어 4번째로 높은 노인의 사망원인임 → 이에 따른 예방 및 치료제의 시장 규모는 급성장 추이에 있음

② 인지 장애 증가에 따른 사회적 문제

- 노령 인구 증가율에 따라 2050년에는 세계 인구 중 65세 이상 인구가 11억 이상이 될 것으로 사료되며, 이중 치매 환자 수는 4천만 명이 될 것으로 추정됨 → 국내의 경우 2000년 이후부터 노인성 치매 환자가 꾸준히 늘어 난 것으로 조사되며, 특히 이에 의한 노인성 질환자의 총 진료비가 2000년 이후 192.5% 증가 한 것으로 집계됨



[도 6. 국내 치매 노인 비율의 증가 추세]

- 2000년 이후 질환에 의한 사망 원인 중 최고의 증가율을 보이고 있는 뇌질환의 경우 다른 질환에 비하여 치료와 진단의 기준이 어려워 피해가 심각할 뿐 아니라 치료 시에 환자의 간호에 의한 사회 경제적 비용이 막대하게 필요함
- 노인성 뇌질환에 의한 근로 손실 등의 제반 사항을 고려해 볼 때, 사회적 비용은 약 3조 4000억~4조 4000억 원으로 경제적 부담이 증가하고 있는 실정이며, 미국의 경우 노인성 뇌질환의 치료 및 간병을 위해 소요되는 의료비는 연간 1000~1200억 달러로 추정

③ 인지 장애 발생의 원인

- 치매는 발생 원인에 따라서 Vascular dementia (혈관 치매), Alzheimer's disease (AD, 알츠하이머 병) 및 parkinson's diseases (파킨슨 병) 등으로 분류되며, 전체 치매 환자의 60%는 AD에 의한 것으로 지적능력, 감정 및 행동 변화 및 이후에는 방향 감각의 상실, 실어증, 기억손상 등의 대뇌 피질 기능 장애 증상이 나타게 됨
- 발병 과정의 직접적인 원인은 아직까지는 밝혀지지 않았으나, 분자 유전학적 연구결과를 보면 amyloid beta가 뇌 안에 축적되고, 신경세포에서 tau 단백질이 응집되어 시냅스의 손상을 유발함으로써 신경 기능부전 및 뇌세포의 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있음

④ 인지 장애 치료제의 현황

- 현재 개발된 치매 치료 약물들로는 Lecithin (acetylcholine precursor), RS-86 (receptor agonist) 와 nicotine 등의 acetylcholinesterase inhibitor가 미국 식품의약국 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 승인을 받아 치료제로 사용되고 있으며, 국내에서 Tacrine 와 Aricept 등을 치료제로 사용하고 있으나, 이들의 경우 효과가 일시적이고 간독성과 오심, 구토 등의 부작용이 나타나기 때문에 아직 사용에 있어 많은 논란을

블러 오고 있음 → 이에 대한 대안으로 부작용이 적은 치매 치료로서 천연물 유래의 뇌질환 개선용 천연물 연구가 활발히 진행되고 있으나 상품화되어 있는 것은 제한적임

- AD 환자의 경우 중추신경계 내에 acetylcholine의 수치는 정상인과 비교하여 현저히 낮으며, acetylcholine esterase (AChE)의 발현은 높기 때문에 acetylcholine을 증진시키거나 acetylcholine receptor에 대하여 효능을 나타내거나 또는 AChE 활성 저해 물질을 찾는 데 연구 개발이 진행 되고 있으나, 지금 까지 개발된 치료제의 경우 작용시간이 짧고, 간독성이 많거나 낮은 생체 이용률 등에 의해 AD 환자에게 약 20% 에서만 효과를 나타낸다고 보고됨 → 따라서 최근에는 뇌의 AChE에 선택적으로 작용하면서 부작용이 적은 AChE 저해제 개발에 많은 노력을 기울이고 있음
- 뇌질환 개선을 위해 한의학적으로 응용되는 의약품 또는 기능성 식품 등이 개발되고 있음 → 가장 대표적인 것이 인삼으로서 인삼의 사포닌은 중추신경계의 자극을 통해 기억력 및 뇌 활동 강화 효능을 가지고 있어 의약품 및 기능성 식품 등으로 개발되고 있지만 인삼을 주재료로 하는 제품은 재료 원가의 상승이 문제점임



출처 : Pipeline and commercial insight: Alzheimer (41p), Parkinson's Disease (34p), Datamonitor (2010. 11-12)

[도 7. 주요국의 뇌질환 시장 규모 전망의 예]

⑤ 치료제 개발의 시급성

- 국내·외적으로 인지장애 예방과 치료를 위한 다수의 식의약 건강식품이 개발 및 시판 되고 있으나 이들 대부분이 과학적 검증을 거치지 않은 것이 많으며, 오히려 건강식품 남용의 원인이 되기도 하여 사회적으로 문제가 야기 되고 있음
- 따라서 식품으로 가능성이 있는 천연자원을 이용하여 객관적이며 과학적 검증을 통해 인지장애 예방/치료 효과를 갖는 천연기능성 제품 개발의 필요성이 시급히 요구됨

(다) 노화성 심혈관질환 영역

① 심혈관 질환 사망자의 증가

- 현대인의 과도한 지방 섭취, 영양공급의 과다, 운동부족, 특히 고령화에 의하여 동맥경화증, 심장병, 뇌질환 등과 같은 혈액순환 관련 질환의 발병율이 지속적으로 증가하고 있으며 여러 가지 질환 중 사망 원인의 1위를 차지하고 있음
- 우리 몸속 혈관의 길이는 무려 12만 5,000 km에 이르며, 이 중 어느 한 곳이라도 문제가

생길 가능성에 항상 노출되어 있다고 할 수 있음



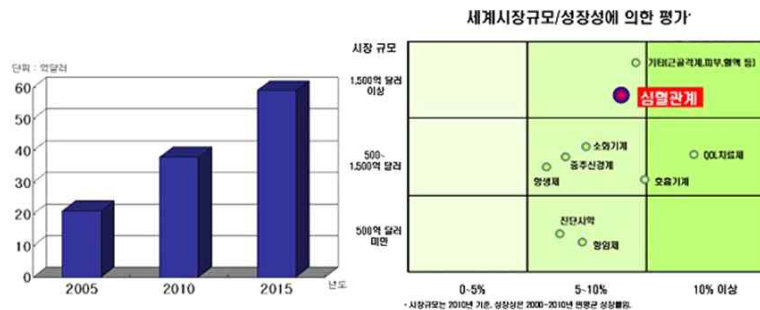
[도 8. 주요국 및 우리나라 사망자중 심혈관 질환의 비중]

② 심혈관 치료의 현황

- 현재 혈액순환관련 다양한 약약들이 출시 및 시판되고 있으나, 심각한 부작용들이 발생하고 있고, 혈관질환의 특성상 복합적인 요소가 많으므로 천연물을 활용한 새로운 소재의 개발이 요구되고 있음
- 심혈관질환 약물로는 혈관 내의 콜레스테롤의 수준을 낮추는 고지혈증 치료제가 있으며, 혈액성분 중 혈전형성에 관여하는 혈소판 억제제가 있음
- 최근의 강력한 고지혈 치료제인 스타틴계열 약물로서 신바스타틴(Synvastatin)은 혈중 콜레스테롤이 250 mg/dL 이상인 경우 사용하면 좋은 효과를 볼 수 있음 → 종래에는 혈소판 억제제로서 아스피린이 많이 사용되었으나 최근에는 새로운 혈소판 억제제로 아스피린보다 강력하며 소화기 장애 등의 부작용이 적은 Reopro 또는 Plavit 등의 약물이 많이 사용되고 있음

③ 심혈관 질환 치료제의 시장성 증가

- 고지혈증치료제 시장은 최근 3년간 연 평균 33.2%의 성장률을 기록할 만큼 시장규모가 날로 커지고 있음 → 고지혈증 환자가 늘고 있는 추세에 리피토(Lipitor)라는 거대품목이 제품력과 아침에 복용할 수 있는 장점을 내세워 리딩 품목으로 시장을 이끌고 있음
- 이외에도 후발제품들이 각각의 강점을 내세워 시장에서 약진하고 있기 때문으로 분석됨 → 현재 고지혈증 시장은 스타틴(Statin) 계열 약제의 꾸준한 상승세가 이어지고 있는 가운데 복합제제(바이토린-카듀엣, Vytorin-Caduet) 시장의 성장과 EPA 제제인 오마코(Omaco) 등의 품목이 틈새시장을 적절히 공략하면서 입지를 다져나가고 있음



심장질환 세계시장 규모 및 전망 (Jain PharmaBiotech Report, 2005)

[도 9. 심혈관질환 세계시장의 규모 증가]

(3) 연구개발 범위 선정을 위한 기관의 구성연구 개발 영역

(가) 세부 및 핵심과제 참여 기관



[도 10. 본 과제 수행을 위한 참여 기관들]

(나) 기관별 연구 영역

▶ 본 과제의 핵심 3대 노화성 질환인 퇴행성 관절염, 인지장애 및 혈행개선에 관한 오미자의 기능성 연구뿐만 아니라 고부가 가치 제품화 및 사업화를 통한 오미자 농가 소득과 관련 식품 산업의 동반 발전을 이루는 선순환적 구조의 혁신적인 선례를 만들 수 있는 팀으로 구성되었음

총괄과제	제1세부과제	퇴행성 관절염 분야 효능 분석 및 제품화지원
동의대학교 / 최영현	동의대학교 / 최영현	
지원기관	제1협동과제	인지 장애 분야 효능 분석 및 제품화지원
	부산대학교 / 최영환	
	제2협동과제	혈행 개선 분야 효능 분석 및 제품화지원
	한국한의학연구원 / 김호경	
문경시 농업기술센터 (사)문경오미자생산자협회 동의한약분석센터 (주)케이제이과마텍글로벌리서치 식약처 지정 임상시험센터	제3협동과제	시제품 제작, 임상시험 및 사업화
	(주)바이오포트코리아 / 김기영	

[도 11. 본 과제 수행을 위한 참여 기관별 주요 연구 영역]

(다) 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

- 상기 연구개발의 최종목표 달성을 위한 주요 연구 내용은 상기의 연구개발 흐름도에 준하여 각 세부 참여 기관별 및 연차별로 제시하였음

① 제1세부: 오미자를 이용한 퇴행성 관절염 치료 효능 검증

1차년 도	오미자 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vitro</i> 모델계 효능 분석
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 퇴행성 관절염 억제 최적 효능 평가를 위한 <i>in vitro</i> 실험 모델계 정립 ○ 오미자 추출물의 퇴행성 관절염 억제 효능 평가 및 관련 기전 연구 수행

2차년도	오미자 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vivo</i> 모델계 효능 분석 ○ Primary culture된 연골세포 모델에서 퇴행성 관절염 억제 효능 및 <i>in vivo</i> 독성평가 ○ 퇴행성 관절염 억제 효능 평가를 위한 <i>in vivo</i> 모델계 정립 및 효능 평가 완료
3차년도	오미자를 이용한 퇴행성 관절염 및 제1, 2협동 결과의 추가 효능 검증을 통한 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보 ○ 퇴행성 관절염 예방 및 치료에 대한 심화연구로 기능성 인증 추가 자료 제공 ○ 오미자를 이용한 기능성 식품 개발을 위한 추가 연구 및 행정적 지원

② 제1협동: 인지장애 개선 효능 검증 및 지표성분의 분석방법

1차년도	오미자 추출물의 인지장애 개선 <i>in vitro</i> 작용기전 규명 및 지표성분의 분석 validation ○ 기 개발된 효능성분의 순수분리 및 구조 동정 : 본 연구팀에서 기 밝힌 인지기능 효능성분의 다량 분리 및 효능성분의 구조 동정 ○ 항산화, 신경세포 보호, 항염증, 등의 탐색시스템 구축 : primary microglia, astrocyte, hippocampal, neuroblastoma cell을 이용한 항산화, 항염증 신경 세포 보호 등의 분자생물학적 신호전달기작 분석
2차년도	오미자 추출물의 인지기능 효능 및 기전 분석 및 공정별 함량 분석 ○ 항산화, 신경세포 보호, 항염증, 등의 탐색시스템 구축 : <i>in vitro</i> 모델에서 항산화, 항염증 신경 세포 보호 등의 분자생물학적 신호전달기작 분석 ○ <i>in vivo</i> 모델에서 혈장과 뇌에 존재하는 오미자 생체 흡수율/안정성 평가, 인지기능개선 효과, 뇌세포 보호 효과 시험 및 기억력 감퇴 모델동물을 이용한 인지기능 향상 효능 평가
3차년도	오미자를 이용한 인지기능 개선용 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보 지원 ○ 인지장애 예방 및 치료에 대한 심화연구로 기능성 인증 추가 자료 제공 ○ 오미자를 이용한 노인성 인지장애 개선 기능성 식품 개발을 위한 기타 지원

③ 제2협동: 오미자를 이용한 노인성 심혈관질환 효능 검증

1차년도	오미자 소재의 <i>in vitro</i> 혈행개선 효능평가 ○ <i>in vitro</i> 혈전모델에서의 효능평가 및 주요 후보성분들에 대한 <i>in vitro</i> 항혈전 효능평가 ○ 추출물 및 지표후보성분들의 인지장애 및 혈행개선 관련 분자적 작용 기전 연구 지원
2차년도	동물모델에서의 오미자 소재의 혈행개선 효능평가 ○ Arterio-Venous(A-V) Shunt 혈전 동물모델에서의 효능평가 ○ Carageenan 유도 혈전 동물모델에서의 효능평가 및 <i>ex vivo</i> 혈전억제 효능평가
3차년도	오미자를 이용한 혈행 개선용 건강기능식품 개별인증을 위한 근거자료 확보 ○ 오미자 소재를 이용한 혈행개선 작용 심화연구로 기능성 인증 추가 자료 제공 ○ 오미자를 이용한 노인성 혈행장애 개선 기능성 식품 개발을 위한 기타 지원

④ 제3협동: 오미자 추출물을 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개발

1차년 도	오미자를 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개발 타당성 도출 및 기반 조성
	○ 문헌조사, 추출법(유기용매, 열수), 용매비율, 여과, 멸균법, 건조법 확립 ○ 성상, 물성, 일반검사(미생물, 잔류농약, 중금속, 영양성분 등)와 안정성 규격 확보
2차년 도	오미자를 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개발 실효성 확보
	○ 제조공정 확립(pilot 및 mass scale), 기준규격확립 및 임상시험용 시험제품 생산 ○ 공인시험성적서 및 공인성적서(지표함량 공인성적서) 확보 ○ GMP시설에서 시험제품/플라세보 제조 : 맛, 색 및 향이 유사한 시험약 제조
3차년 도	오미자를 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개별인증 추진 및 상품화
	○ 전임상시험 기초 인체적용시험실시(PI 및 CRC 선정)로 임상시험 최종결과보고서 획득 ○ 제품화 3종 및 유통기한 설정(식품의 유통기한 설정실험 가이드라인 기준) ○ 제형화 연구를 통한 가공적정성 확립 및 개발된 제품에 대한 시장 진입 전략 수립

(라) 기타 지원 기관의 역할

① 문경시 농업기술센터 및 (사)문경오미자생산자협회

- 오미자 관련 선행 용역 연구 자료 제공
- 시제품의 소비자 만족도 및 제형화 형태 표본 조사 참여
- 오미자 재배 농가의 우수 재배 기술 지속적 지도에 따른 효능 평가 및 제품 생산용 우수 원료 공급

② ㈜동의한약분석센터

- 오미자의 중금속, 농약 등 유해물질 등의 정기적 점검을 통한 안정성 평가 지원 및 성분 분석 지원

③ ㈜케이제이파마텍글로벌리서치 및 식품의약품안전처 지정 임상시험센터

- 임상시험 관련 사항 총체적 자문과 기능성 획득을 위한 행정 및 시험 관련 지원

(4) 연구 개발 내용에 따른 평가의 항목, 지표 및 평가 기준

평가항목	정량적 지표	평가기준		
		1차년도	2차년도	3차년도
오미자 소재 선정	▶ <i>In vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 모델계 결과에 준한 제품화 추진 오미자 소재의 확보	오미자 소재의 확보		
오미자의 기능성 평가	▶ 퇴행성 관절염 개선 연구 결과 도출	SCI 급 논문 투고	특허 및 논문 출원	특허 및 논문 출원
	▶ 인지기능 개선 연구 결과 도출	SCI 급 논문 투고	특허 및 논문 출원	특허 및 논문 출원

	▶ 혈행 개선 연구 결과 도출	SCI 급 논문 투고	특허 및 논문 출원	특허 및 논문 출원
제조공정확립	▶ (1차) lab scale ▶ (2차) pilot scale ▶ (2차) 대량생산공정개발보고서 : 5 lot에서의 제조공정, 지표함량변화, 공인시험성적서	lab scale 생산보고서	piolot, 대량생산 보고서 1건	
기준규격확립	▶ (1차) : 공인시험성적서(1품목 2회 이상) ▶ (2차) 공인시험성적서(5품목 5회)	lab scale 기준규격 제시	대량생산 기준규격 제시	
임상시험	▶ (2차) 시험제품/대조제품의 구별이 적게 제조(맛, 색, 향) ▶ (3차) 탈락율 20% 미만, 피험자 모집율 80% 이상, 유효 biomarker 2개 이상		임상시험 용 시험제품/ 대조제품	임상시험 결과보고 서 1건
건기식 기능성원료 인증	▶ MFDA 기능성원료 인증서			인증서 1건
제품화 3건	▶ 시제품 3품목(단일, 복합물)			시제품 3품목

1-4. 연구개발 결과의 기대 효과

(1) 연구개발결과의 활용방안

- 노인성 질환 개선과 관련된 오미자의 기능성을 과학적으로 검증함으로써 기존의 치료제가 가지는 제한된 약효, 약제내성 및 고비용 등과 같은 부작용을 극복하게 하는 중요한 결과를 도출 할 것으로 사료됨
- 오미자가 유발하는 퇴행성 관절염 억제, 인지 및 혈행장애 개선 기능에 대한 연구는 현재 까지 극히 제한적으로 수행되어 왔지만 오미자의 기능성을 분자수준에서 신호전달을 규명함으로써 노인성 질환 개선 가능성을 지닌 선도물질 확보를 위한 학문적 자료 제공
- 연구 수행을 통하여 얻어진 결과들을 전문 SCI급 논문집에의 게재 및 특허권 조기 설정에 따른 독점적 지위의 확보와 함께 오미자의 기능성을 검증을 통하여 관련 분야 학문발전에 기여할 것임
- 오미자가 유발하는 노인성 질환 개선 관련 기전 연구를 통한 신소재의 발굴로 오미자를 이용한 기능성식품 소재의 개별인증 획득 및 건강기능식품의 제품화를 통하여 국민의 건강 증진에 기여함과 동시에 유사 기능성 제품의 수입 대체 효과 증대
- 대부분 일차 가공 산업의 수준에 머물고 있는 오미자를 이용한 새로운 가공 방안을 제시하고 가공 분야를 개척함으로써 오미자의 수요 증가를 통한 관련 산업체의 성장과 농가소득 향상에 일조할 것임
- 학술대회 결과 발표, 연구 결과 책자 발간, 일반인 대상 강연회 개최, 언론 홍보 등 다양

한 경로를 통한 오미자의 우수성 증대 홍보로 지역 오미자 생산 농가의 자긍심 고취와 지역 경제 활성화에 기여

(2) 연구개발결과의 기대효과

(가) 기술적 측면

- *In vitro* 및 *in vivo* 생리활성 효능평가 인력 양성과 분자생물학 및 생화학 관련 전문 인력을 양성함으로써 첨단 BT 분야의 기술자립과 함께 생명과학산업의 견인차 역할 담당할 것으로 기대됨
- 오미자가 유발하는 퇴행성 관절염 억제, 인지 및 혈행장애 개선 효과를 분자수준에서 신호전달을 규명함으로써 노인성질환 개선 기능성식품 소재로서의 가능성을 지닌 선도물질 확보의 기초실험을 위한 학문적 자료 제공
- 오미자의 퇴행성 관절염 억제, 인지 및 혈행장애 개선 관련 기능성에 대한 작용 기전을 학문적으로 입증함으로써 노인성질환 개선 관련 기술 개발 연구에 있어서 국가 과학 기술 및 의료산업의 국제 경쟁력 증대
- 퇴행성 관절염 억제, 인지 및 혈행장애 개선 효능을 가진 효과적인 오미자 소재의 screening 방법을 확립하고 오미자의 기능성에 대한 작용 기전을 학문적으로 입증함으로써 노인성질환 개선 기능성식품 개별인증 획득 및 상품화를 통하여 사회경제적 손실 차단
- 오미자로부터 생리활성물질의 추출과 제품화에 대한 정보와 고부가가치 기술 축적을 통한 기능성 성분을 기초로 한 품질 표준화 기술 개발 기여
- 본 과제의 수행을 통하여 축적된 독자적인 기술은 기능성 식품소재, 식의약품 및 보조치료제 개발을 위한 기반 마련에 기여할 것임

(나) 경제·산업적 측면

- 독성과 부작용이 거의 없는 것으로 알려진 오미자를 이용한 노인성질환 개선 기능성식품은 기존의 치료제에 비하여 가격이 저렴하므로 막대한 사회경제적 손실을 차단할 수 있을 뿐 만 아니라 의료산업의 국제경쟁력의 확보로 관련 제품 수입 대체 효과 기대 및 향후 수출 증대에 따른 국가 식품산업 향상에 기여할 것임
- 오미자의 기능성을 과학적으로 검증하게 되어 소비자의 신뢰향상으로 인한 소비 촉진으로 인한 종사자들의 소득증대 및 오미자 생산지역의 경제 활성화를 도모에 따른 시장 파급 효과의 증대에 기여할 것이고, 오미자의 새로운 가공 방안을 제시함으로써 상품성이 떨어지는 다른 농산물로의 적용과 이를 통한 원가 절감과 생산성 향상에 기여할 것
- 오미자의 기능성원료 인증을 통한 소비자의 선호도의 향상으로 인하여 주로 1차 산물로 사용되고 있는 오미자의 고부가 가치화가 가능할 것이며, 나아가 오미자 가공 산업의 확대로 관련 기업에로의 파급 효과의 증대가 예상되고, 유사 특작물을 활용한 파급 효과의 증대가 예상됨
- 국내산 오미자의 기능성 검증 및 고부가가치성 오미자 제조 기술의 발전을 촉진시켜 국외에서도 현재 단순 가공 수준에 머물고 있는 기능성 원료의 판매 증대를 통한 국내산 원재료 제품의 시장점유율 확대하고 건강기능식품 제품화 인증을 통한 신규제품 공급과 신규시장개척을 통한 수출확대를 통하여 글로벌 경쟁력을 확보에 기여

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
2-1. 연구개발 대상기술의 국내외 현황	
<p>(1) 생활환경 변화에 따른 시장 환경 변화</p> <ul style="list-style-type: none"> • 산업의 발달 및 고령화와 더불어 삶의 질을 저하시키는 질환은 다양해지고 있음 → 이러한 질환은 90% 이상이 물리적인 환경이나 화학물질에 노출됨으로서 발생하고 있으며, 이러한 요인 중 40%~60%는 식이와 관련되어 있는 것으로 알려지고 있음 → 최근 삶의 질과 의료복지의 향상, "well-being" 붐이 조성됨에 따라 일상에서 섭취하고 있는 생리활성 물질에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있음 • 또한 WTO, DDA 협상 및 FTA 확대 등으로 인해서 외국 농산물 수입의 급증 → 이에 대응하기 위해서는 우리나라 농산물 중 우수한 기능성을 가진 후보물질의 기능성을 평가할 수 있는 기술을 필연적으로 도입하여서 기능성을 바탕으로 근거 중심의 고부가가치 식품 개발의 필연성이 증대되고 있음 • 바이오시장은 세계적으로 급팽창하고 있는데 반하여 우리나라에서 재배하고 있는 약용작물은 점차 감소하여 최근 약용작물의 수입량은 80년대에 비해서 약 14.2배로 증가하였음 → 지구상에 자생하고 있는 자원생물은 수만 종에 이르나 수천 종이 실질적으로 사용되고 있고, 우리나라에는 수백 종의 약용작물이 자생하고 있는 것으로 알려져 있으나 농업적으로 재배되고 종은 사십여 종에 불과한 실정임 • 최근 우리나라의 경우 건강보조식품에 대한 관심이 증가되어 소비가 매년 10% 이상 증가하고 있으며, 시장규모도 약 1조 2,000억 원 정도로 추산됨 → 국내 기업은 물론 다국적 기업인 엘트웰, 허브라이프, SMK, 파마넥스, 한국암웨이 등의 성장이 두드러지고 있고 약용식물은 이용한 바이오산업은 경쟁이 더욱 치열해질 것으로 예상됨 • 식품 업체는 물론 제약 업체에서도 기능성 식품 시장에 계속적으로 진입하고 있으므로 그 수요는 계속적인 증가세를 보일 것으로 예측됨 → 이에 편승하여 최근 국내 바이오 벤처기업의 창업으로 건강보조식품은 더욱 활기를 띠기 시작하였고, 약리성분의 분리 동정, 과학적 근거에 의한 신의약품 개발 등으로 시장 전망은 매우 밝은 편이나 과다 경쟁으로 인하여 특성화된 기술 개발 요구 • BT 산업의 세계적인 활성화, 자생자원의 보호주의 확산과 자원의 보호 및 지적 재산권 협약 등으로 인한 자국 자원의 보호로 유용한 자원의 도입은 점차 어려워지고 있으며, 외국 자원을 개발하여 국내에서 식의약품 개발 시에는 자원에 대한 막대한 royalty를 지불해야 함 → 우리나라는 전통 한의학의 꾸준한 발전과 이를 활용한 노인성 질환 개선 기능성 제품 개발이 지속적으로 발전되고 있으나, 한약재로부터 생리활성 탐색, 천연물 신약, 보건식품 또는 식품첨가제의 개발에 관한 연구는 유럽연합이나 미국 등의 선진국에 비해서 오히려 뒤지고 있음 	
<p>▶ 이러한 문제점의 타결을 위한 국내산 친환경 약용작물에 대한 관심이 고조되고 있으며, 약리효능이 우수한 오미자는 그 수요가 증대되고 있으나 대부분 일차 가공 산업의 수준에 머물고 있음</p>	

(2) 국내 고령층 대상 건강기능식품 claim

- 식품의약품안전처 건강기능식품 사이트(foodnara)에 따르면 대상별에서 노인을 대상으로 한 claim은 5가지로 나눌 수 있음

기능성 항목	인정된 기능성원료	고시형 원료	기능
혈액순환장애	나토 배양물, 은행잎 추출물, 정어리정제어유, 정제 오징어유, 프랑스해안송껍질 추출물, 홍삼농축액, DHA 농축유지	감마리놀렌산 함유 유지, 영지버섯 자실체 추출물	과도한 혈액응고작용을 방해하며, 혈액중의 콜레스테롤이나 중성지방의 수치를 낮추어 원활한 혈액흐름에 도움
관절 및 뼈 건강	가시오갈피 등 복합 추출물, 글루코사민, 로지힙 분말, 지방산복합물, 전칠삼 추출물 등 복합물, 차조기 등 복합 추출물, 초록입홍합 추출 오일, 호프 추출물, 황금 추출물 등 복합물, N-아세틸글루코사민, dimethylsulfone (MSM), 흑효모 배양액 분말, 대두이소플라본	뮤코다당·단백, 비타민 D, 비타민 K, 망간, 칼슘	무기질의 흡수를 증가시켜 체내의 칼슘농도 높임, 관절의 연골세포를 구성하는 성분을 제공, 연골세포의 생성촉진, 관절의 윤택작용을 하는 윤택액 생성 증가, 관절기능이 원활하게 이루어질 수 있도록 도움
고콜레스테롤 혈증	구아바일 추출물, 난소화성 말토텍스트린, 동결건조누에분말, 마주정 추출물, 바나나 추출물, 솔잎증류 농축액, 알부민, 인삼가수분해 농축액, 지각상엽 추출혼합물, 쥐눈이콩 펩타이드 복합물, 콩발효 추출물, 타가토스, 탈지달맞이꽃종자 추출물, 피니톨, 홍경천등 복합 추출물, nopal 추출물	구아검/구아검가수분해물, 귀리, 밀식이섬유, 옥수수겨, 호로과종자, 이눌린/치커리추출물	콜레스테롤과 결합하거나 콜레스테롤의 흡수를 방해하여 콜레스테롤이 변으로 배출됨으로 콜레스테롤의 수치를 낮추는데 도움
고혈압	가짜오부시 올리고 펩타이드, 연어펩타이드, 올리브잎 추출물, 정어리펩타이드, 카제인가수 분해물, 코엔자임Q10, 해태올리고펩티드, L-글루타민산 유래 GABA함유 분말	-	협압을 조절하는 것에 도움. 섭취량 이상으로 섭취하면 유해한 반응이 나타날 가능성이 있음
당뇨병	식이섬유(구아검/구아검가수분해물, 귀리, 난소화성 말토 텍스트린, 대두식이섬유, 밀식이섬유, 옥수수겨, 이눌린/치커리 추출물, 호로과종자), 구아바일 추출물, 바나바 추출물, 솔잎증류 농축액, 알부민, 콩발효 추출물, 탈지달맞이꽃종자주정 추출물, nopal 추출물, 동결건조누에분말	-	혈당이 서서히 상승되도록 도와주어 혈당조절에 도움, 포도당 운반체의 활동을 도와주어 궁극적으로 혈당을 원활하게 쓰에게 하여 식사 후 높아진 혈당을 낮추는데 도움

▶ 상기 5개 기능성 영역 중 당뇨병을 제외한 나머지 영역은 본 과제에서 추구하는 퇴행성 관절염, 인지장애, 혈행 개선과 직접 연관이 있음을 알 수 있음

2-2. 오미자 원료 관련 제품 국내외 현황

(1) 제품 대상으로서 오미자의 사업화 현황

- 최근 들어 국내에서도 생약제를 이용한 식품보조제나 건강식품의 개발에 의한 생물 산업이 활성화되고 있는데, 이에 부응하기 위하여 오미자 산업의 활성화와 추출물질을 이용한 새로운 기능성 제품의 개발은 농가의 소득 작물개발에 필연적인 과제로 부각되고 있으며 이에 대한 근거 자료의 도출이 요구되고 있음

→ 이러한 약리학적인 효과 때문에 지난 10여 년동안 생리활성 약리학과 화학분야에서는 천연물로부터 신약 개발에 관한 돌파구를 찾기 위해서 오미자의 lignan 물질에 관한 연구가 집중되어 왔음

- 오미자를 활용한 노인성질환 기능식품 소재의 개발은 최근 조성되고 있는 well-being 붐에 부응하는 식품첨가제, 의약품 및 기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 예상

→ 따라서 국내외에서 수집한 정보와 축적된 기술을 바탕으로 오미자로부터 고효율 기능성 물질의 동정 및 생리활성 효과를 검증함으로써, 오미자를 원료로 하는 제품의 산업화가 가능할 것이며, 이러한 결과들로부터 오미자의 효용가치는 더욱 높아질 것이므로 예상되어 농가의 신소득 작물로서 자리 매김될 것임



(2) 오미자 관련 국내외 제품화 비교 현황

(가) 국내 제품생산

- 현재 오미자는 제철에는 대부분
 - ① 생오미자로서 소비자에게 판매되고 있거나,
 - ② 한약재의 재료로서 또는 복합한약제품으로 판매되고 있으며,
 - ③ 국내제품으로는 오미자주, 오미자 엑기스, 오미자음료, 오미자첨가 식품 등 단순 2차 가공형태의 식품으로 판매 및 소비되고 있는 실정임

[도 12. 국내 오미자 유통 판매 제품의 예]

제품사진	제품명	제조사	유형
	문경 오미자차	이로하영농조합법인	액상차
	문경 생오미자청	이로하영농조합법인	액상차
	오미자 밥비빔장	문경오미자밸리	소스류

	오미자 식초	대감식품	음료베이스
	오미자 와인	농업회사법인 주식회사 제이엘	주류

- 현재 오미자의 국내 유통 판매는 대부분 가공식품의 형태로 판매되고 있다. 앞서 말했듯이 그 규모는 2012년 400억 원이었으며, 오미자 즙, 오미자환, 오미자 원액, 오미자 식초, 오미자 와인 등의 형태로 가공되고 있음

(나) 국외 제품생산

- 오미자를 원재료로 한 주요국의 제품화 현황은 다음과 같으며, 다수의 제품이 기능성 향상을 표방하고 있음
- 비록 이러한 제품들이 안전성에 기반을 둔 인체 유용한 가공품으로 판매되고 있으나, 인체 기능에 관한 명확한 근거는 미비한 실정임
- 중국: ① Sunever Biology Company: 오미자 추출물로서 schisandrins 2%~9%의 schisandrin A/B1%를 함유한 만성간염치료용 제품으로 판매 중, ② Shaanxi huaqing extracts co. Ltd: Schizandrol A 3%, 5% 및 98% 분말제품, ③ Desjsengwa: Babao desigreen capsule (오미자가 첨가 복합제품), ④ Kalyx: Schisandra fruit powdered (액상제품) 등 시판 중
- 미국: ① Liver formula 2 (400 mg/capsule, 오미자 200mg 함유), ② Wise woman herbals (황기, 당광나무, 오미자 첨가제품), ③ Energy vitality (Gaia, 오미자를 첨가한 복합제품으로 캡슐형), ④ Echinacea goldenseal complex (Hanna's herb shop, 오미자가 소량 함유된 복합제품), ⑤ Schizandra fruit (580 mg), ⑥ Herb pharm schisandra extract-schizandra fruit (health superstore.com) 등 시판 중
- 캐나다: Schizandra de chine Schizandra (numu organics, 건오미자) 등
- 유럽: ① Adaptra (Medicine hunter, 오미자를 첨가한 복합 제품으로 판매), ② Fusion Memory (health food thyme, 오미자를 첨가한 복합제품으로 tablet 형태의 제품으로 판매), ③ Schisandra 200 mg 9% schisandrins (오미자의 쉬잔드란 200 mg 함유된 tablet 제품), ④ Hepa Balans (오미자 35 mg 함유 복합 건기식제품), ⑤ Liver V (International health care, 천심련(730 mg)과 오미자(54 mg) 및 소나무껍질(150 mg) 복합제품) 등
- 오미자의 국외 유통 판매는 단순한 가공식품 보다 정제나 캡슐, tincture의 형태로 이루어지고 있었으며, 그 용도도 herbal supplement, dietary supplement, nutritional supplement, food supplement 등 다양하게 이용되고 있으며, 예는 다음과 같음

[도 13. 국외 오미자 유통 판매 제품의 예]

유통국	제품사진	제품명	제조사	섭취용도
U.S.		Schizandra	Nature's Way	Dietary supplement
U.S.		Schisandra adrenal complex	Planetary herbals	Herbal supplement
유럽 (프랑스)		Schisandra	Nutri Naturel	Dietary supplement
U.S.		Schizandra Berry	Alternative Remedies	Live Herbal Tincture
유럽 (포르투갈)		SchisandraChinensis	Super Smart	nutritional supplement
유럽 (독일)		Schisandrachinensis Kapseln	Allcura	food supplement
대만		五味子芝麻錠	馬來西亞商食益補國際股份 有限公司	건강식품
일본		ユンケル皇帝ゴ" [オ◆オ /	ササカサ◆	보건의약품

▶ 결론적으로, 전 세계적으로 오미자를 원재료로 한 많은 제품이 판매되고 있으나 기능성 인증 관련 제품은 현재까지 시판되지 않는 관계로, 오미자를 활용한 본 과제에 성공적인 수행이 절실히 요구됨

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호 D-05

3-1. 연구개발 추진전략 및 방법

가-1. 접근 방법

(가) 연차별 연구 개발 목표에 따른 연구 수행 내용

① 1차년도 연구 개발 목표에 따른 연구 개발 수행 내용

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
○ 제1세부: 오미자 추출물 및 복합물을 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vitro</i> 모델계 효능 분석	▶ 오미자 및 복합물 소재의 세포 독성 자료 근거와 최적 오미자 및 복합물 소재 도출	<ul style="list-style-type: none"> • 오미자 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 억제 효능 확인 및 기능성 소재 선별 • 복합물 후보로서 상업 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 효능 확인 및 기능성 소재 선별
	▶ 도출 소재의 효능 평가를 위한 <i>in vitro</i> 실험 모델계 정립	• 퇴행성 관절염 억제 최적 효능 평가를 위한 인체 연골세포를 이용한 <i>in vitro</i> 실험 모델계 정립
	▶ 도출 소재의 연골 세포에서 퇴행성 관절염 억제효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 오미자 추출물의 관절염 억제 효능 평가 및 관련 기전 연구 수행 • 복합물 후보로서 상업 추출물의 관절염 억제 효능 평가 및 관련 기전 연구 수행
	▶ 동물 실험 조건 설정 및 기본 실험 모델 확립	• 오미자 투여에 의한 관절염 억제 효능 확인 완료 및 <i>in vivo</i> 실험 모델계 정립
○ 제1협동: 오미자 추출물의 인지장애 개선 <i>in vitro</i> 작용기전 규명 및 지표성분의 분석 validation	▶ 개발된 효능성분의 순수분리 및 구조 동정 → 본 연구팀에서 밝힌 인지기능 효능성분의 다량 분리 및 효능성분의 구조 동정	<ul style="list-style-type: none"> • 오미자 유래 효능 성분의 순수분리 및 지표성분으로서 활용 가능성 도출 • 오미자의 효능성분인 lignan의 HPLC 분석 • 오미자 유효성분 추출을 위한 최적의 추출 조건 설정 • 상업으로부터의 순수 분리된 성분의 구조 동정 수행
	▶ 항산화, 신경세포 보호 및 항염증 등의 탐색 시스템 구축 → 다양한 신경세포를 이용한 항산화, 항염증 신경 세포 보호 등의 분자생물학적 신호전달기작 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 효능성분 또는 추출물의 primary microglial, astrocyte, hippocampal 및 neuroblastoma 세포에서 인지기능 관련 분자적 기전 규명 • 동물 모델에서 plasma와 brain 에 존재하

		는 오미자의 생체 흡수율 평가
○ 제2협동: 오미자 소재의 <i>in vitro</i> 혈행 개선 효능평가	▶ 오미자 복합물 소재 도출 및 추출물 최적화	• 오미자 추출물 및 복합물을 이용한 혈전 억제 최적 기능성 소재 선별
	▶ 오미자 복합물 후보 소재의 <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> 및 <i>in vivo</i> 혈전억제 효능 검증	• 오미자 복합물 후보소재 3종의 <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> 및 <i>in vivo</i> 혈소판응집억제 효능 평가 및 최종 유용 복합물 2종 도출
	▶ 혈전동물모델을 이용한 오미자 복합물의 혈전억제 효능 검증 및 최적비율 선정	• 오미자 투여에 의한 오미자 복합물 2종의 혈전억제 상승효과 확인 및 최적 혼합비율 선별
○ 제3협동: 오미자 및 오미자 복합물을 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개발 타당성 도출 및 기반 조성	▶ Lab scale 제조공정 확립	• 추출조건, 수율, 분말화 조건 확립 보고서 1건 • 공인시험 성적서(1lot: 영양성분, 잔류농약, 중금속, 지표성분)
	▶ 오미자 소재의 문헌 및 특허조사	• 오미자의 특허분석을 통해 도출된 오미자 소재의 특허조사 보고서 1건 • 오미자 및 상업의 제품개발전략보고서1건
	▶ 오미자 추출물의 세포독성 자료 근거에 의한 최적 오미자 소재 도출	• 식품공전에 등재된 원료사용 • 건강기능식품에 사용할 수 있는 주정 및 열수 추출법 이용
	▶ 지표물질의 안정성	• 추출시 지표물질 함량의 균일성확인 • 품질지표 설정을 위한 실험 • 미생물: 대장균

② 2차년도 연구 개발 목표에 따른 연구 개발 수행 내용

세부과제명	세부연구내용	연구범위
○ 제1세부: 오미자 추출물 및 복합물을 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vivo</i> 모델계 효능 분석	▶ Primary culture된 연골세포 모델에서 퇴행성 관절염 억제 효능 및 <i>in vivo</i> 독성평가	• <i>In vivo</i> 모델에서 연골세포를 분리하여 <i>in vitro</i> 실험 모델계 정립
		• Primary culture된 연골세포 에서 후보물질의 관절염 억제 효능 검증
		• <i>In vivo</i> 모델계에서 경구 및 복강 투여를 통한 후보물질의 독성평가 실시
	▶ 퇴행성 관절염 억제 효능 평가를 위한 <i>in vivo</i> 모델계 정립 및 효능 평가 수행	• <i>In vivo</i> 실험동물을 이용한 골관절염 유발 조건 확립 • 관절염 억제 효능 평가를 위한 경구 투여 농도 설정

		<ul style="list-style-type: none"> MIA에 의해 유도된 골관절염 <i>in vivo</i> 모델 계에서 후보물질의 효능 평가 및 기전 규명 	
○ 제1협동: 오미자 추출물 및 복합물의 인지기능 효능 및 기전 분석	▶ 기능성 성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> 추출물 또는 공정별 인지기능 성분 함량 분석 공동 수행 	
	▶ 동물 모델에서 오미자 소재의 인지기능개선 효과	<ul style="list-style-type: none"> 동물 모델에서 후보 소재의 인지기능개선 효과 및 뇌세포 보호 효과 시험 및 관련 기전 규명 기억력 감퇴 모델동물을 이용한 인지기능 향상 효능 평가 및 기전 규명 	
○ 제2협동: 동물모델에서의 오미자 소재 및 복합물의 혈행 개선 효능 평가	▶ Arterio-Venous (A-V) shunt 혈전 동물모델에서의 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> A-V shunt 동물모델에서 1차년도 후보 소재의 혈전억제 효능 검증 후보 소재의 유효 용량 결정 	
	▶ Carageenan 유도 혈전 동물 모델에서의 효능평가 및 <i>ex vivo</i> 혈전억제 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> Carrageenan 유도 동물모델에서 후보 소재의 효능평가 오미자 복합물 투여에 의한 <i>ex-vivo</i> 혈소판응집 억제 효능 평가 혈행 개선 관련 기전 규명 효력검증 및 유효용량 결정 	
○ 제3협동: 오미자 및 오미자 복합물을 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개발 실효성 확보	▶ 대량생산공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> 대량 추출조건, 수율, 분말화조건 등 확립 	
	▶ 기준규격확립	<ul style="list-style-type: none"> 대량 추출물의 영양성분, 잔류농약 등 공인시험 성적서 확보 	
	▶ 임상시험용 제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> 임상시험용 시험식품과 대조식품 제조 	

③ 3차년도 연구 개발 목표에 따른 연구 개발 수행 내용

세부과제명	세부연구내용	연구범위
○ 제1세부: 오미자 추출물의 퇴행성 관절염 예방 및 치료 효능평가의 심화 연구	▶ 오미자 소재를 이용한 퇴행성 관절염 및 제1, 2협동 결과의 추가 효능 검증을 통한 건강기능식품개별인증을 위한 근거자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> 1 및 2차년도 도출데이터 이용한 SCI급 논문 추가 출간을 위한 심화연구 지원
		<ul style="list-style-type: none"> 1 및 2차년도 도출데이터 활용한 특허출원 및 등록에 대한 추가 자료 확보를 위한 심화연구 지원
		<ul style="list-style-type: none"> 오미자 소재를 이용한 퇴행성 관절염 예방

		<p>및 치료에 대한 심화연구로 기능성 인증 추가 자료 제공</p> <ul style="list-style-type: none"> • 오미자 소재를 이용한 노인성 질환 개선 기능성 식품 개발을 위한 행정적 지원
<p>○ 제3협동: 노인성 질환 개선 기능성식품 소재 임상시험 개별인증 획득 및 제형화와 제품화 개발</p>	<p>▶ 오미자 추출물을 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개별인증 추진 및 상품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 임상시험 성공적 완료에 따른 건기식 기능성소재 인증과 시제품 생산 • ICH-KGCP에 따른 인체적용 시험용 protocol, CRF 작성, 시험물질(시험물질, placebo) 제조, 인체적용시험 보험가입으로 IRB 승인 획득 • ICH-GCP 기준에 따라 60 case 이상의 인체적용시험을 통해 대사성질환에 대한 기능성 및 안전성 검증 : MFDA 인증기관에서 인체적용시험을 실시하며 피험자 약 60명을 대상으로 20% 미만의 탈락율과 유효지표 2건 확보를 목표로 성공적인 인체적용시험 실시 • MFDA 건강기능식품 기능성원료 인증 허가에 필요한 서류작성, 신청 및 인증 • 시제품 생산 4품목(단일 추출물을 통한 분말, 액기스, 에이드류 및 건강기능식품)

(나) 연차별 연구 범위 및 연구 수행 방법

① 1차년도 연구 범위에 따른 구체적 수행 내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>○ 제1세부: 오미자 및 복합물 소재의 세포 독성확인 및 <i>in vitro</i> 실험 모델계 정립과 연골세포에서 퇴행성 관절염 억제능 검증</p>	<p>▶ 퇴행성 관절염 <i>in vitro</i> 모델에서 오미자 및 복합물 소재의 세포독성 및 농도 설정 확립</p> <p>▶ 오미자 추출물 및 복합물의 퇴행성 관절염 억제 효능 평가 및 관련 기전 연구 수행</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 퇴행성 관절염 모델인 인체 연골세포 SW1353을 선정하여 MTT assay를 통하여 후보물질 처리에 의한 세포 생존도를 측정으로 적정처리 농도를 설정함 • 인체 연골세포인 SW1353 세포에서 후보물질의 처리에 연골조직 파괴 억제능을 확인하기 위해 조사대상 유전자 발현과 활성변화 정도 및 관련 기전 연구의 수행 완료
<p>○ 제1협동: 오미자 유효성분들인 순수 분리 및 동정과 primary neuronal cells에서의 항염증 및 세포 보호 기작 및 분자적 작용 기전 연구</p>	<p>▶ 오미자에서 유래된 lignan의 분리 및 구조 동정</p> <p>▶ 상업으로부터 순수 분리 성분 구조 동정 수행</p> <p>▶ Lignan 화합물에서 염증 억제능에 관한 조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> • HPLC, GC-MS 및 LC-MS 등을 이용하여 물질의 순수분리정도 확인, LC-MS 등을 이용하여서 물질의 분자량 확인 • IR을 이용한 작용기 확인 및 NMR (1D 또는 2D)을 이용한 물질의 구조 동정 • Microglial cell line 에서 염증 유발을 유도 한 후 염증 매개 물질들의 유전자 발현

		및 활성 변화 정도를 측정하여 관련 메커니즘 규명
○ 제2협동: 오미자 복합물의 <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> 및 <i>in vivo</i> 혈전 억제 효능 검증	▶ 오미자 복합 추출물 후보 소재의 <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> 및 <i>in vivo</i> 혈전억제 효능 검증	• 흰쥐 혈소판을 이용하여 오미자 복합물의 <i>in vitro</i> 혈소판응집 억제 능 및 오미자 복합물 투여에 의한 <i>ex vivo</i> 혈소판응집 억제능 평가, <i>in vivo</i> 혈전 억제 효능을 평가
	▶ 오미자 복합 추출물의 투여에 의한 혈전억제 효능 검증 및 혼합 비율에 따른 효능 비교	• 오미자 복합물의 경구투여에 의한 carrageenan 유도 혈전도물모델에서의 꼬리혈전 생성 억제 효능을 평가, 단독 추출물 대비 상승효과 검증
○ 제3협동: 문헌조사 및 특허 전략 수립과 제품별 제조공정 확립 및 기준규격 설정	▶ 독성, 효능자료, 시장현황 수집 및 분석 등을 통해 도출된 소재의 특허전략 수립	• 오미자 소재의 효능, 시장 현황 자료 수집 및 분석을 통해 제품개발전략보고서 작성과 오미자 소재의 특허현황 분석을 통해 도출된 소재의 특허전략 수립을 위한 특허 전략 보고서 작성
	▶ Lab scale 조건에서 추출 조건 확립 및 성상, 물성, 미생물, 잔류농약, 영양성분 분석을 통한 규격설정	• 오미자 및 상업 소재의 추출조건, 수율, 분말화 조건 확립을 통하여 보고서 작성과 오미자 및 상업 소재의 공인시험 성적서 확보

② 2차년도 연구 범위에 따른 구체적 수행 내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
○ 제1세부: 오미자 추출물 및 복합물을 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vivo</i> 모델계 효능 분석	▶ 오미자 및 복합물 소재에 대한 독성 평가 및 퇴행성 관절염 억제 기전 연구	• 오미자, 상업 추출물 및 복합물의 경구투여에 의한 단회 독성평가 실시 • MIA에 의해 유도된 골관절 유발 모델에서 오미자 추출물 및 복합물에 의한 억제 기전 규명
○ 제1협동: 오미자 추출물의 기능성 성분의 분석	▶ 오미자와 제 3의 소재로부터 기능성 성분의 분리 및 효능 검증	• 오미자로부터 2종의 기능성 성분을 발굴하여 α -iso-cubebenol은 동물실험 완료 및 다른 1종인 gomisnj N 효능 및 작용 기전 규명 • 새로운 소재의 개발 중에 적하수오를 소재로하여 2종의 물질을 순수 분리하여 구조를 동정하였으며, 2종의 물질 효능 및 작용 기전을 규명
○ 제2협동: 오미자 추출물의 <i>in vitro</i> , <i>Ex-vivo</i> 및 <i>in vivo</i> 혈전	▶ 오미자 추출물 후보소재의 <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> 및 <i>in vivo</i> 혈전억제 효능검증	• 흰쥐 혈소판을 이용하여 오미자 추출물의 <i>in vitro</i> 혈소판응집 억제 능 및 오미자 추출물 투여에 의한 <i>ex vivo</i> 혈소판응집 억

억제 효능 검증		제능 평가, <i>in vivo</i> 혈전 억제 효능을 평가
○ 제3협동: 오미자 및 오미자 복합물을 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개발 실효성 확보	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 1차 년도에서 실시한 lab scale의 생산 공정 scale up 하여 생산 공정의 확립 ▶ 대량생산 가능한 제조공정의 확립과 그에 따른 제조공정도의 작성 ▶ 미생물, 잔류농약, 중금속, 영양분석, 지표함량 성적서 작성 ▶ Capsule용 제품을 위한 과립적성점검, tablet을 위한 형태유지 적성점검 및 위약과의 색상, 맛 및 향을 유사하게 제조하기 위한 과정과 원소재의 기능성에 영향을 미치지 않는 부 원료 선정 	<ul style="list-style-type: none"> • Pilot 및 plant scale up 생산 실시 • Scale up 에 따른 추출수율, 성분확인 • 확립된 제조공정에 따른 제조공정도 작성 • 공인시험 성적서 확보 • 제형 결정을 위한 소비자 설문조사 실시 • 임상시험용 식품 제작

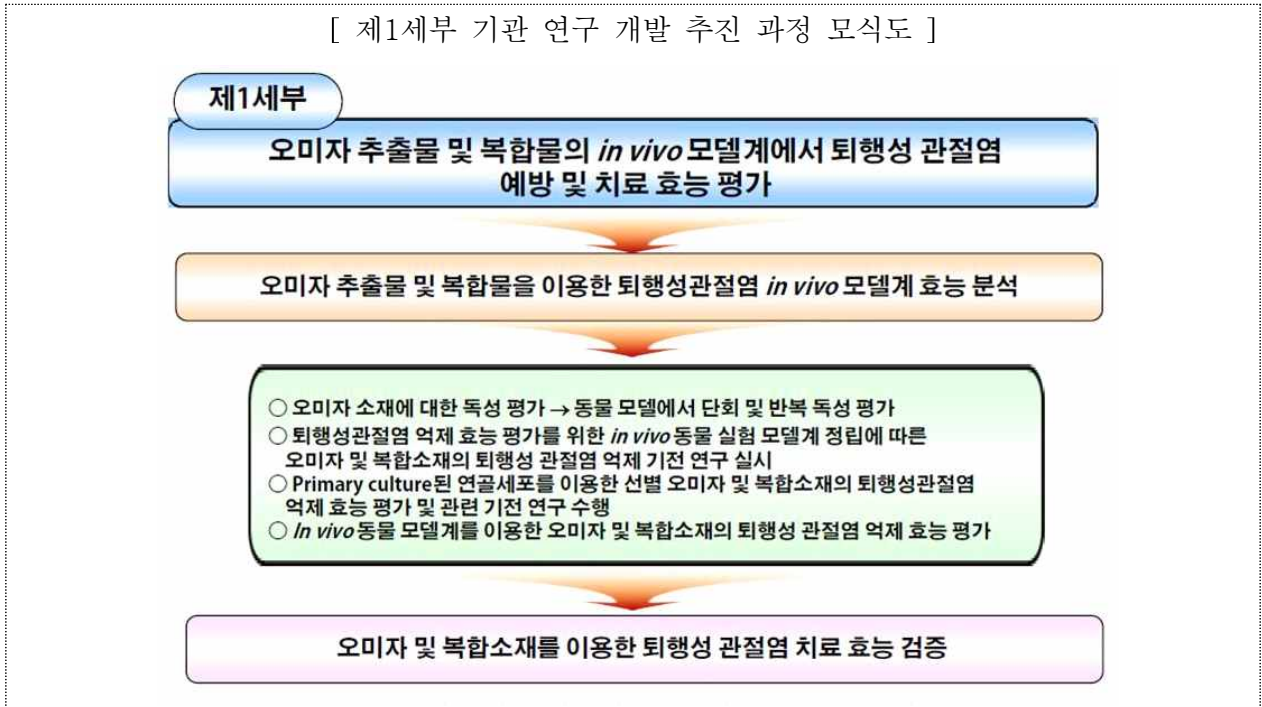
③ 3차년도 연구 범위에 따른 구체적 수행 내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
○ 제1세부: 오미자 추출물의 퇴행성 관절염 예방 및 치료 효능 평가의 심화 연구	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 오미자의 기능성 학술적 근거 제공을 위한 심화 연구 ▶ 식품의약품안전처 개별인증 신청을 위한 학술 자료 추가 보완 	<ul style="list-style-type: none"> • 연구 결과물의 논문 투고에 따른 지속적 심화 연구의 수행 • 추가 특허 출원 및 등록을 위한 보충 실험 지속적 수행 • 오미자 소재를 이용한 노인성 질환 개선 기능성 식품 개발을 위한 행정적 지원
○ 제3협동: 노인성 질환 개선 기능성 식품 소재 임상시험 개별인증 획득 및 제형화와 제품화 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 오미자 추출물을 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개별인증 추진 ▶ 개별인증 취득 대비 사업화를 위한 시장 진입 전략 수립 	<ul style="list-style-type: none"> • 식품의약품안전처 건강기능식품 개별 인증을 위한 임상시험 성공적 완료 • 인체적용시험의 성공적 마무리에 따른 시제품 생산 • 시제품 제형 적성 보고서 작성 • 제품시장 진입 전략 보고서 작성 • 기존제품 효과 비교 보고서 작성 • 제품 생산 3품목(오미자를 통한 분말, 엑기스, 에이드류 및 건강기능식품) • 소재 기능성 및 안전성 등에 대한 마케팅용 자료(brochure, PPT 및 story telling 등) 제작 • KOTRA, MFDA 등의 자료취합 및 박람회 참가를 통한 시장 반응 조사 근거 시장 진출 준비

가-2. 제1 및 2차년도 구체적인 연구 수행 방법 내용

(가) 제1세부 기관(동의대학교)

[제1세부 기관 연구 개발 추진 과정 모식도]



① 오미자 추출물 및 복합물(기타 후보 추출물)의 *in vitro* 모델계에서 관절염 치료 효능 평가 분야

①-1. 연골 세포를 이용한 *in vitro* 관절염 치료효능 평가

- 세포주의 선정 및 세포 생존도 측정: SW1353 인체 연골세포를 선정하여 MTT assay를 통하여 후보물질 및 관절염 유도 주요 cytokine인 interleukin-1 β (IL-1 β)의 단독 및 복합처리에 의한 세포 생존도 측정하였음 → 24시간 배양 후 유의적인 세포 독성이 없는 후보물질 실험 농도의 선정하였음
- Matrix metalloproteinase (MMP)의 활성 분석: 후보물질의 연골조직 파괴 억제능을 확인하기 위해 SW1353 세포에 IL-1 β (40 ng/ml)와 세포 독성을 보이지 않았던 후보물질을 전처리하여 24시간 배양하였음 → 세포 배양 상층액을 취하여 SW1353 세포에서 분비된 다양한 MMP들의 효소활성을 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 측정함 → 즉 IL-1 β 처리에 의하여 증가된 MMPs의 활성 억제 여부의 평가하였음
- 염증성 매개인자의 생성 억제여부 평가: IL-1 β 에 의해 증가된 대표적인 염증성 매개인자인 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin PGE₂ (PGE₂)의 생성에 미치는 후보 물질의 효능을 검증하기 위하여 Griess reagent 분석법 및 ELISA를 수행하였음
- 염증성 cytokine의 생성 억제여부 평가: IL-1 β 에 의해 증가된 대표적인 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor α (TNF- α) 및 interleukin (IL)-1 β 의 생성에 미치는 후보 물질의 효능을 검증하기 위하여 ELISA를 수행하였음

①-2. 조사 대상 산물들의 유전자 발현 변화에 미치는 후보 물질의 영향 조사

- 전사 수준에서의 대상 유전자들의 발현 변화 조사: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통하여 IL-1 β 에 의해 증가된 MMPs, inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), TNF- α , IL-1 β 등의 발현 증가를 후보 물질에 의한 전사 수준에서 억제 여부를 각 해당 유전자들의 primer를 이용하여 조사하였음
- 번역 수준에서의 특정 유전자 발현 변화 조사: 상기 유전자들의 발현 변화를 번역 수준에서 조사하기 위하여 총 단백질을 추출하여 적정 농도의 gel을 이용한 전기영동으로 분리 후, 해당 항체를 이용하여 Western blotting을 실시하였음

①-3. 세포 신호전달계에 미치는 영향 분석

- Nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성화에 미치는 영향 분석: IL-1 β 및 후보 물질과의 단독 및 복합 처리 후 핵 및 세포질 단백질을 추출하여 Western blotting의 실시 및 면역형광염색법에 의한 NF- κ B의 핵 내 이동 여부로의 활성화 평가와 억제 정도 및 관련 기전 연구를 수행하였음
- Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호 경로의 관련성 여부의 조사: IL-1 β 처리에 의하여 활성화된 MAPKs의 신호 경로에 미치는 후보 물질의 효과를 조사하여 이들 신호계의 역할을 규명하기 위하여 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38 MAPK의 인산화 변화 여부와 억제 효능을 조사하였음
- Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt 신호계의 관련성 여부의 조사: 관절염 발병 및 진행 동안 과다 활성화되어 있는 PI3K/Akt 신호계의 제어 효능이 있는지와 이를 통한 관절염 유발과의 연계성을 확인하기 위해 PI3K 및 Akt의 인산화 변화 여부와 억제 효능을 조사하였음

② Primary culture된 연골세포 모델에서 퇴행성 관절염 억제 효능 및 기전 연구

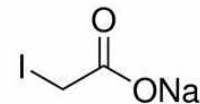
- 연골세포의 분리: 실험동물로서 5주령된 SD rat에서 무릎을 절개한 후 관절연골을 채취하였음 → 2 mg/mL collagenase type II를 첨가하여 shaker에 1,200 rpm, 3시간 동안 처리하였음
- 분리된 연골세포의 배양: 세포 부유액을 70 μ m pore size cell strainer에 여과한 후 1,600 rpm, 10분간 원심분리 하여 얻어진 세포를 PBS로 3회 세척한 후 연골세포를 분리하였음 → DMEM (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)를 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 계대 배양하였음
- 세포 생존도 측정: 분리된 연골세포에 MTT assay를 통하여 후보물질 처리에 의한 세포 생존도를 측정하였음
- MMP-1, -3 및 -13의 활성 분석: 연골기질 분해 억제능을 확인하기 위해 IL-1로 유도시킨 primary culture된 연골세포 모델에서 후보물질을 같이 처리하여 MMP-1, -3 및 -13의 활성을 ELISA kit를 이용하여 측정하였음
- 연골 형성 및 손상 관련 지표 측정: 후보물질의 처리에 따른 연골 형성 및 손상 관련 유전자들의 전사와 번역 수준에서 발현 변화에 대하여 조사하였음
- 기타 관절염 연계 지표 마커 및 관련 기전 연구의 추가적인 수행하였음

③ *In vivo* 실험동물에서 관절염 억제 효능 분석: 골관절염 유발 과정 설정

- 실험동물은 수컷 흰쥐(SD rat)를 선택하여 동물 사육실(온도 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$) 내에서 1주일간 순화 후 실험에 사용하였음
- 실험기간 동안 실험동물의 사육을 위한 사료와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하고 동의대학교 동물실험윤리위원회의 심의 과정을 통한 승인 하에 동의대학교 한의과대학 동물사육실에서 모든 실험의 수행을 실시하였음
- 골관절염 유발을 위한 약물로 monosodium iodoacetate (MIA) 용액은 주사용 생리식염수에 5 mg/ml의 농도로 제조하고, Zoletil (0.5 ml)과 Rompun (0.1 ml)을 이용하여 실험동물을 마취시켰음
- 오른쪽 슬관절 부위를 중심으로 전면을 제모하고 소독하였음 → 슬관절강 내로 각 개체당 MIA 용액(0.9% saline에 희석) 50 μl (개체당 3 mg)을 1 ml Insulin Syringe (0.25 mm \times 8 mm)를 이용하여 무릎연골 중앙부위에 주사하여 퇴행성 관절염 유발 여부를 7일간 지속적으로 관찰하였음

→ 정상군은 실험동물에는 슬관절강 내로 주사용 생리식염수를 동일한 방법으로 주사하여 사용하였음

[관절염 유도를 위해 사용된 MIA의 화학 구조]



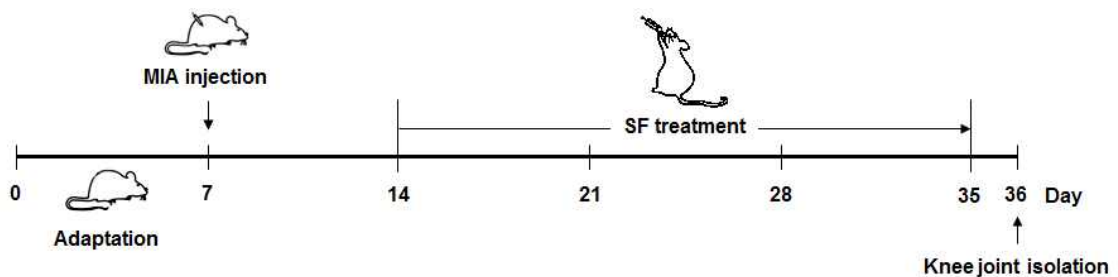
- 실험군의 분류 및 후보물질 경구 투여: MIA 처리에 의해 골관절염을 유발한 7일 후에 각 개체의 체중을 측정하고, 육안 관찰을 통해 체중과 관절염 유발 정도가 고르게 8마리씩 군 배정하였음

- 정상군(normal group)은 실험동물에는 생리식염수(2 mg/kg)만 경구 투여하고, 대조군은 실험동물에는 MIA를 처리한 후 생리식염수를, 양성대조군에는 indomethacin (2 mg/kg)을, 후보물질 처리군은 MIA를 처리한 후 후보물질(100 mg/kg)을 4주간 경구 투여하였음 → 모든 군에서 자유음수와 식이를 실시하였고, 일주일 마다 몸무게 변화를 측정 등 총 5주간 실시하였음

④ *In vivo* 실험동물에서 관절염 억제 효능 분석: MIA에 의하여 유도된 관절염 쥐에 대한 후보 물질의 영향 분석

- 육안적 관찰: 고정된 우측 경골 근위단 관절연골 주변을 깨끗이 정리하여 사진 촬영하고 육안적으로 관절연골표면의 손상정도를 확인하였음
- 식이량 및 음수량 측정: 1 주일에 한번 씩 식이량(g 수) 및 음수량(ml 량)을 측정하며, 식이섭취량은 측정이 이루어지는 날의 일정한 시간에 칭량하여 1일 평균 섭취 식이량을 산출하고, 식이 효율(feed efficiency ratio, FER)은 체중증가량을 식이섭취량으로 나누어서 계산하며, 같은 방법으로 음수량을 측정하였음

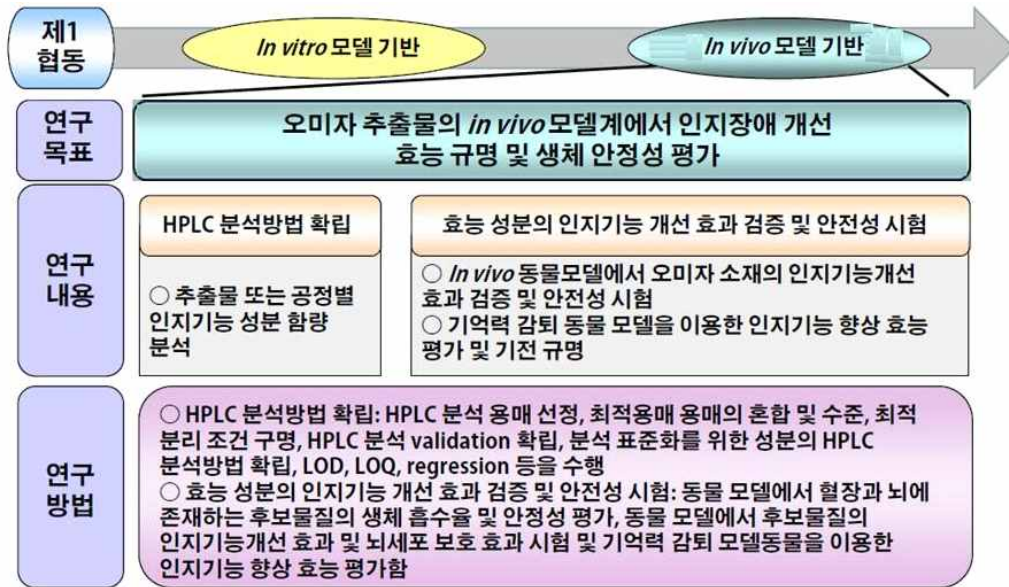
[MIA 투여에 의한 관절염 유도 및 후보물질의 효능 검증을 위한 실험 과정]



- 실험동물처리 및 외과적 처치: 실험 종료일에 모든 개체를 마취시킨 후 심장으로부터 채혈을 하고 원심 분리하여 혈청을 분리하였음 → 심장 채혈 직후에 우측고관절 및 족근관절을 분리하여 슬관절 부위가 손상되지 않도록 적출하며, 적출된 슬관절강 내에 동일 개체에서 분리된 혈청 0.2 ml을 주입하여 세정 후 멸균된 외과용 칼로 슬관절 부위의 피부를 절개하여 슬관절 강을 노출시켰음
- 자체 제작한 원심관을 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세정된 활액(관절액, synovial fluid)을 채취하였음 → 채취된 활액을 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 불순물을 침전시켜 제거하고 상층액을 채취하였음 → 활액을 분리한 후 우측 슬관절을 10% 중성 포르말린액을 이용하여 24시간 고정하고 경골을 분리하여 병리학적 평가를 위하여 사용하였음
- 병리조직학적 평가를 위한 표본 제작 및 염색: 채취한 슬관절 조직을 이용하여 조직 슬라이드를 제작하고 염증성 침윤 정도를 평가하기 위해 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였음
- 연골의 퇴행성 정도를 측정하기 위하여 준비된 조직에 safranin-O fast green (SOFG) 염색을 실시하였음
- 병리조직학적 골관절염 지수의 평가: 조직병리 검경 항목은 연골하골 변화(subchondral bone change), 연골세포 괴사(chondrocyte necrosis), 연골 침식(cartilage erosion), 골극형성(osteophyte formation) 및 연골 갈라짐(cartilage cleft)으로 각 항목당 0-5점까지 총 25점으로 평가함
- 관절염 유발에 따른 골구조 측정: 실험 종료 후 실험군별 실험동물의 골 구조 변화를 측정하기 위해 three-dimensional micro-CT 촬영을 시행하여, 골 부피(bone volume, BV), 골 표면적(bone surface area, BS), 조직 전체 부피(total tissue volume, TV)를 바탕으로 골의 부피와 조직 전체 부피의 비율(BV/TV), 골 표면적과 골부피의 비(BS/BV), 치밀골의 두께(trabecular thickness, Tb.Th.) 등을 측정하여 대조군과 실험군의 골 지표 변화를 분석하였음
- 연골 흡수 지표(MMP-2 및 -9) 활성의 측정: 연골 염증성 인자 중 MMP-2 및 -9의 발현 확인을 위해 쥐에서 분리한 연골을 단백질을 추출하여 ELISA kit를 이용하여 MMP-2 및 -9의 활성을 측정하여 후보물질의 영향을 조사하였음
- 혈중 prostaglandin 농도측정: MIA를 이용한 퇴행성 관절염 동물모델에서 염증 및 통증 유발인자인 prostaglandin의 생성을 억제하는 효능을 측정하기 위해 Prostaglandin ELISA kit를 이용하여 혈중 내 prostaglandin 농도를 측정하여 후보물질의 영향을 조사하였음
- 활액 내 염증성 매개인자(NO 및 PGE₂) 및 사이토카인(TNF- α 및 IL-1 β) 함량의 측정: 슬관절에서 분리한 활액 내 NO, PGE₂, TNF- α 와 IL-1 β 함량은 ELISA kit를 이용하여 측정함으로써 후보물질의 영향을 조사하였음 → 필요에 따라 근조직 단백질을 분리하여 해당 산물의 생성에 관여하는 유전자들의 발현 변화도 추가적으로 후보물질 처리군과 비교 조사하였음
- 기타 필요에 따라 관절염 지표에 해당되는 다양한 항목에 대한 추가 분석 실시하였음

(나) 제1협동 기관(부산대학교)

[제1협동 기관 연구 개발 추진 과정 모식도]



① 오미자 추출물의 *in vitro* 모델계에서 인지장애 개선 효능 규명 및 효능성분 분석법 확립

①-1. 추출물로부터 노인성 질환 효능 성분의 분리 및 구조 동정

- Normal SiO₂, C SiO₂ 및 LH20 등을 이용하여서 분리, Silica gel: Normal, C18, LH20 등 → HPLC나 GC-MS, LC-MS 등을 이용하여 물질의 순수분리정도 확인, LC-MS 등을 이용하여서 물질의 분자량 확인, IR을 이용한 작용기 확인 및 NMR (1D 또는 2D)을 이용한 후보 물질의 구조 동정 실시하였음
- 최적 HPLC 칼럼 선정, 칼럼 종류 2종 이상(C18 column), HPLC 분석 용매 선정, 최적 용매 용매의 혼합 및 수준, 최적 분리조건 구명, HPLC 분석 validation 확립, 분석 표준화를 위한 성분의 HPLC 분석방법 확립, LOD, LOQ, regression 등을 수행 완료하였음
- 오미자의 효능을 증대시킬 수 있는 추출방법 및 성분 분석법 확립: 오미자의 주요 성분인 schisandrin, schisandrin C, gomisin A, gomisin N 및 α-iso-cubebenol의 HPLC 분석 방법 확립 및 주요 성분을 다량 함유할 수 있는 추출방법 확립 완료하였음

①-2. *In vitro* 실험계를 이용한 인지장애 개선 효능 평가

- 1차 소교 세포(Primary microglia), 성장교세포(astrocyte), 해마 교련세포(hippocampal cell) 및 신경아세포종(neuroblastoma cell) 모델을 이용한 후보 물질의 항산화, 신경세포 보호, 항염증 등의 효능 탐색시스템 구축하였음 → Amyloid β, lipoteichoic acid (LTA) 및 lipopolysaccharide (LPS)를 이용한 신경손상 모델 설정하였음
- 각종 염증성 매개인자 및 염증성 cytokine 분비능 및 이들의 생성 조절 유전자들의 발현 비교 분석하였음
- ROS 생성 억제 효능 평가, NF-κB 및 MAPKs 신호계의 역할 평가하였음
- Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) 신호계의 연관성을 조사하였음
- TLR 수용체 관련 분자생물학적 신호전달기작 분석, 세포독성 보호 효과 여부 비교 등 수행하였음

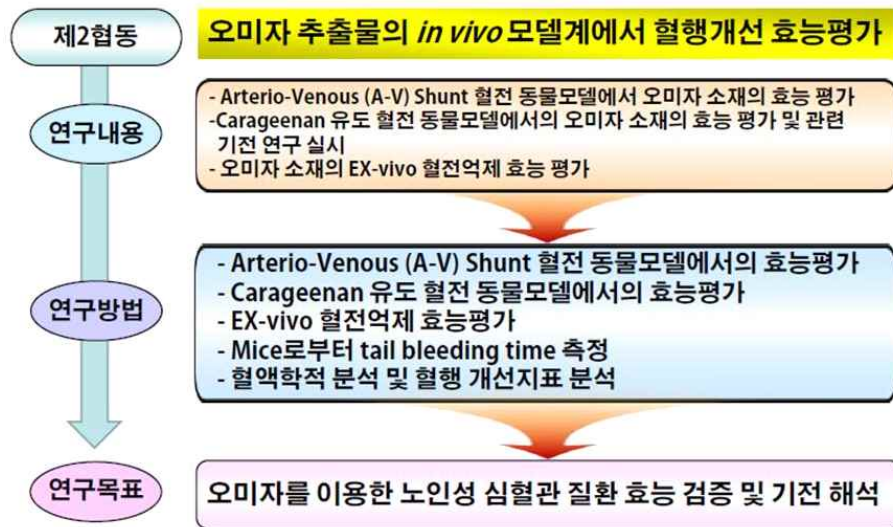
② *In vivo* 실험계를 이용한 인지장애 개선 효능 평가

- 오미자로부터 순수 분리한 α -iso-cubebenol의 *in vivo* 인지 기능 개선 효능 검증: Scopolamine으로 인지기능을 퇴화시킨 mouse에 오미자의 성분을 처리하여 효능을 검증함으로써 인지기능을 개선할 수 있는 후보물질을 발굴
- 수동회피시험(Passive avoidance test), 뇌 조직 단백질을 이용한 인지 기능 개선 관련 단백질 발현 분석, 세포사멸 관련 조절 유전자들의 발현 변화 및 인지기억력 향상효과 관련 신호 전달계 연계성 등의 파악하였음
- 효능 성분의 인지기능 개선 효과 검증 및 안전성 시험: 동물 모델에서 혈장과 뇌에 존재하는 후보물질의 생체 흡수율 및 안정성 평가, 동물 모델에서 후보물질의 인지기능개선 효과, 뇌세포 보호 효과 시험 및 기억력 감퇴 모델동물을 이용한 인지기능 향상 효능 평가를 수행하였음
- 동물실험 조건: 실험동물로 체중 250-280 g 전후의 흰쥐(Sprague Dawley rat) 및 체중 20 - 25 g 전후의 C57BL/6 mouse를 사용하였음 → 사육실 온도는 22 - 24°C 습도 40 - 60%로 유지하며, 조명은 낮 12 h 밤 12 h 주기로 조절하였음 → 적응 기간 및 실험 시간 동안 오미자 추출물 투여는 가루 사료에 10 mg/kg/day에 섞어 물과 함께 자유롭게 식이하도록 하였음
- Acute Toxicity Tests: 마우스와 쥐 각 10마리씩 4군으로 나누어 오미자 추출물을 경구 및 복강 투여를 실시한 후 경구 투여는 2주간 독성 여부를 관찰하였으며, 복강 투여는 24 시간 동안 독성여부를 관찰 하여, 급성 독성 결과를 조사하였음
- 혈장 및 뇌에서의 후보물질 유효 함량 조사: 후보물질을 제조 한 후 lignan 계 화합물의 함량을 조사한 후, young rat (6 months)와 old rat (18 months)에 오미자 추출물(1일 1회 10 mg/kg)을 경구투여 후 혈장과 뇌에 잔존하는 ligands의 함량을 HPLC system를 이용하여 조사하였음 → Amyloid β 의 경우 오미자 추출물 투여 3일 후에 1일 1회 30 mg/kg의 용량으로 경구 투여하였음
- Memory function assay: 수중 미로 테스트인 Morris water maze test와 수조 안에서 플랫폼을 찾는 시간을 측정 하는 Reference memory test 및 플랫폼 제거 후 플랫폼이 있던 위치를 찾는 Probe test 그리고 플랫폼 위치를 매일 바꾸어 주면서 플랫폼을 찾는 Working memory test를 수행하여 인지 기억 기능 평가에 미치는 후보물질의 영향을 조사하였음
- Acetylcholine (ACh), acetylcholinesterase (AChE) 및 cholineacetyltransferase (ChAT) 활성의 분석: Memory function assay를 수행 한 하루 뒤에, hippocampus 및 frontal cortex 부위를 절취하여 sonication을 실시하고 상층액을 채취한 후 ACh, AChE 및 ChAT의 활성여부에 미치는 후보물질의 영향을 조사하였음
- PKA/CAMKIV/RSK2/BDNF/CREB/Nrf-2/HO-1/PI3K/Akt/mTOR/Arc/Arg3.1 연관 신호 전달계의 관련성 조사: Hippocampus와 frontal cortex brain에 존재하는 hippocampus 및 cortex를 분리하여 액체 질소로 파쇄 후, Tissue specific protein extract kit를 이용하여 총 단백질을 분리한 후 Western blotting을 이용하여 관계되는 분자들의 발현 및 세포 내 분포 상을 분석하였음
- Immunofluorescence staining on postnatal rat brain sections: 쥐 또는 마우스를 마취

하고 뇌를 추출한 다음 10% 포르말린으로 고정하여 침수 시킨 후 파라핀 함침으로 가공하였음 → 뇌 조직 단편(5 μm)을 대상으로 단백질의 항체를 이용하여 immunostaining을 수행하고 fluorescence conjugated second antibody로 염색한 후 confocal microscope로 단백질의 발현과 세포 내 위치 변화에 미치는 후보물질의 영향을 조사하였음

(다) 제2협동 기관(한국한의학연구원)

[제2협동 기관 연구 개발 추진 과정 모식도]

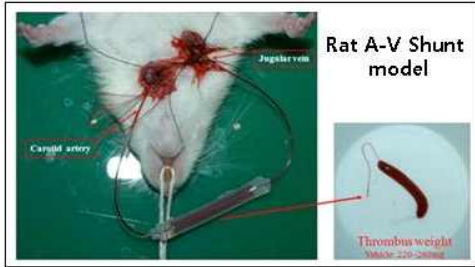


① Arterio-Venous (A-V) Shunt 혈전 동물모델에서의 오미자 복합물 효능평가

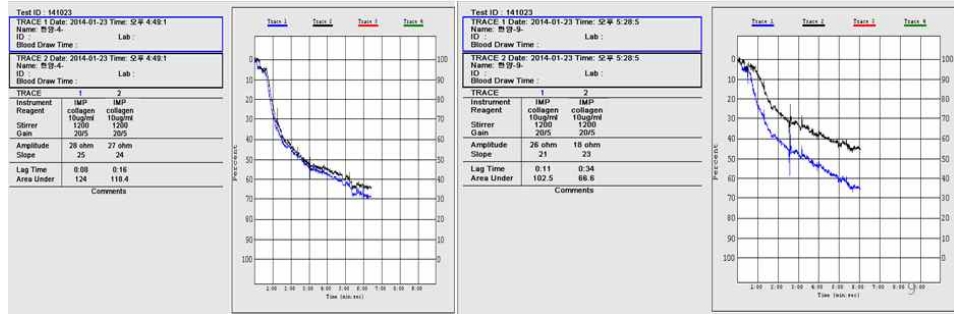
- A-V Shunt model 및 약물 투여 2시간 전에 천연물 유래 혈액개선 후보물질을 녹인 후 350 g의 SD 흰쥐에 500 mg/kg씩 경구 투여함 → 1시간 후 SD rat의 복강에 2 ml 씩 urethane 1.25 g/kg을 주사하여 마취한 후, 마취가 끝나면 Left carotid artery와 Right jugular vein에 PE50 tube로 cannulation 함 → 5 cm silicon tube에 cotton thread을 넣고 saline을 채운 후 artery와 vein에 연결된 tube로 혈액을 흐르게 하여 shear-stress를 유도하여 15분간 thrombus를 생성시킴 → 생성된 thrombus를 건조시켜 무게를 측정하여 anti-platelet efficacy를 평가함
- 흰쥐 혈소판 준비: 준비된 흰쥐(SD rat)를 ethyl ether로 마취하고, 미리 항응고제로서 0.15 M의 구연산나트륨(sodium citrate) 2 ml을 주사기에 넣고 복대동맥으로 부터 11 ml을 채혈하였음
- 상층액의 분리: 5.5 ml의 혈액에 2 ml의 세척완충액(tyroid washing buffer, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)로 2회 세척한 후 2회 반복하였음
- 혈소판의 분리: 모두 모아진 상층액을 500 rpm에서 7분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 침전된 혈소판을 7.7 ml의 현탁완충액(Hepes-tyroid suspension buffer, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)에 현탁시켜 세척 혈소판(washed

platelet)으로 하였음

[A-V 모델, 혈전 형성 실험 예 및 분석의 예]



[분석의 예]



- 혈소판 응집능 측정
 - 혈소판 응집 억제능에 사용한 세척 혈소판(washed platelet)은 세포수 측정기(cell counter, Hema-vet HV950 FS, Drew scientific, USA)를 이용하여 혈소판 수를 측정하고 완충액(buffer, 37 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)으로 희석하여 혈소판이 3×10⁸ platelet/mL이 되도록 조정하였음
- 혈소판 응집 억제능 측정
 - 흰쥐의 혈소판 응집 억제능은 측정계(Aggregometer, Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA. USA)를 이용한 탁도 측정법으로 측정함 → 세척소판(Washed platelet, PRP)을 37°C에서 3분간 인큐베이션(incubation) 시킨 후, platelet-poor plasma (PPP) 400 μl과 Platelet Rich Plasma (PRP) 400 μl을 각각 quartz에 분주하고 stirr bar를 넣은 후 프로그램을 실행하였음
 - 시료 sample (200, 100, 50 μg/ml)을 넣고 2분간 배양한 후 ADP (10 μM) 또는 collagen (2.5 μg/ml)을 첨가하여 혈소판 응집반응을 5분간 측정한 후 억제정도 (inhibition, %)를 계산하였음
- 억제정도(inhibition, %)는 시료를 처리하지 않은 것을 control로 하여, 다음 계산식과 같은 방법으로 구하였음

$$\text{Inhibition (\%)} = (A-B/A) \times 100$$

A : control의 응집능(%), B : 시료처리 시 응집능(%)

② 오미자 추출 복합물의 *ex vivo* 혈전효능을 평가

- 8주령 SD rat을 군당 10마리로 구분하여 1주간 사육실에서 순화 후 천연물복합시료(50, 150, 300 mg/kg), 양성대조군 aspirin (50 mg/kg), 그리고 vehicle은 혈소판분리를 위한 채혈 3일전부터 매일 오전 11시에 경구투여 하였고, 혈소판분리를 위한 채혈 1시간 전에 경구 투여함
- 흰쥐 혈소판 준비 및 혈소판응집능 측정은 상기 방법과 동일하게 적용하였음

③ Carageenan 유도 혈전 동물모델에서의 효능평가

- 생쥐의 꼬리에 혈전을 유도하는 carrageenan 모델을 설정하기 위하여 8주령 ICR 생쥐에 1% carrageenan (type I)을 생리식염수에 녹여 약 40 μ l를 생쥐 오른쪽 뒷다리 발가락 사이에 주사하였음
- 복강주사 후, 시간대별(24시간, 48시간 및 72시간) 꼬리의 혈전 형성 길이(tail thrombosis)를 디지털 버니아 캘리퍼스로 측정 및 사진을 기록함
- 오미자 복합시료(50, 150, 300 mg/kg), 양성대조군 aspirin (50 mg/kg), 그리고 vehicle은 carrageenan 주사 3일전부터 매일 경구 투여하였음
- 대상 실험동물의 혈전 유도 당일에 carrageenan 주사 1시간 전에 분석 대상 시료를 경구투여하였음

→ 그 이후는 carrageenan 주사 후 23시간, 47시간, 71시간에 분석 대상 시료를 경구 투여하였음

- 실험 마지막 날 채취한 혈액으로부터 혈소판을 분리하고 collagen 유도 혈소판 응집능을 측정하였음
- 실험동물로부터 tail bleeding time 측정: Mice tail bleeding time은 Hornstra 법을 수정하여 측정함
- 실험동물에 물, clopidogrel, 오미자 추출물을 농도별로 각각 경구투여하고 마지막 투여 60분 경과 후 ketamin hydrochloride (75 mg/kg)로 마취시키고 mice의 꼬리 끝으로부터 4 mm 되는 부분을 surgical blade로 자르고 꼬리의 나머지 부분을 37°C의 생리식염수에 직각으로 담구었음

→ Bleeding time은 꼬리를 자른 시간부터 측정하여 bleeding이 처음 멈춘 시간까지를 기준으로 하여 측정하며, 300초 이상 bleeding이 된 경우 300초로 기록하였음

- 혈액학적 분석 및 혈행 개선지표 분석

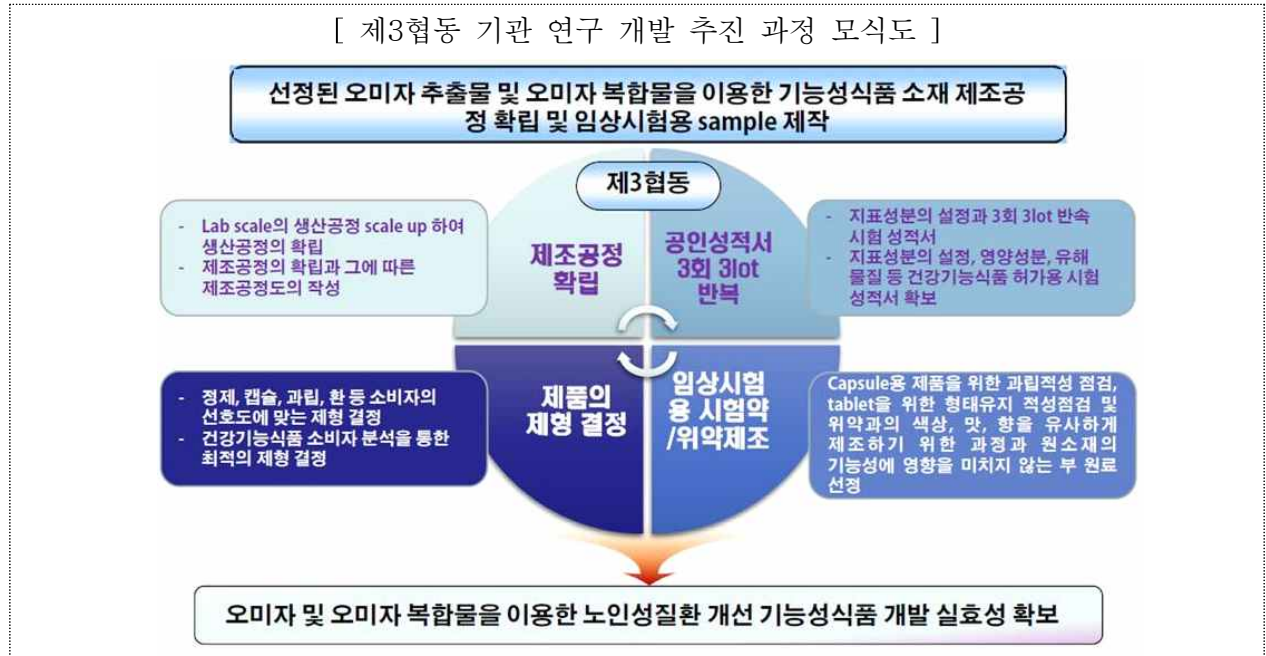
→ 혈액학적 분석 및 platelet activation 측정을 위해 적혈구(RBC) 수, 백혈구(WBC) 수, 헤모글로빈(Hb), 혈소판(PC) 수, 평균 적혈구 용적(MCV), 평균 적혈구 혈색소량(MCH), 평균 적혈구 혈색소 농도(MCHC), 평균 혈소판 용적(MPV), 전혈중 적혈구 비율(HCT)을 측정하였음

→ 분석은 부유성 세포의 가운데를 세포나 입자를 통과시켜 측정하는 방법인 Flow cytometry 법으로 Sysmex사의 XE-2100 장비를 이용하여 측정하였음

- Blood coagulation 관련 지표 분석으로는 prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin time (TT), fibrinogen을 응고법을 이용하여 측정하고, 프랑스 DIAGNOSTICA STAGO에서 구입한 시약을 사용하여 Siemens사의 STA/R-evolution 장비로 측정하였음

(라) 제3협동 기관(주, 바이오포트코리아)

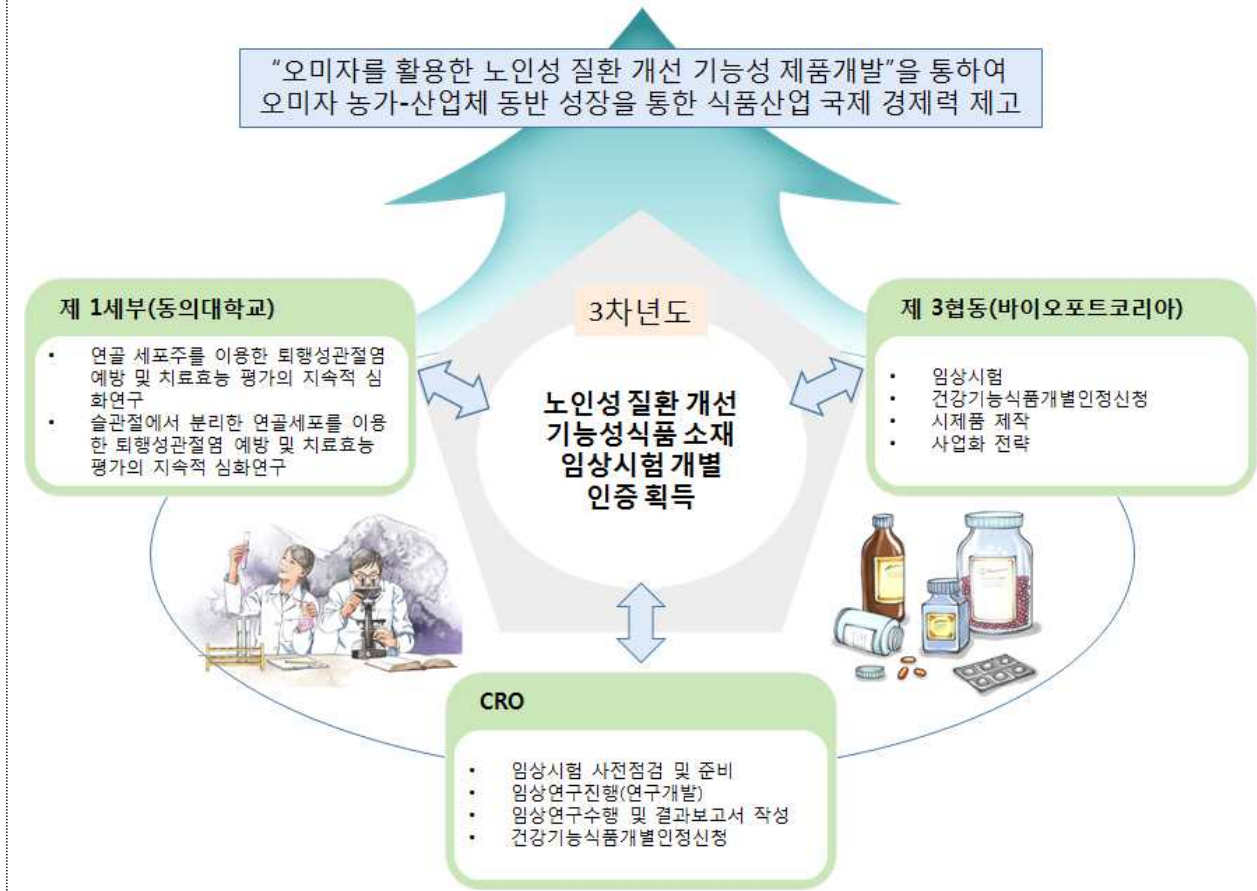
[제3협동 기관 연구 개발 추진 과정 모식도]



- ① 오미자 추출물 및 오미자 복합물을 이용한 기능성식품 소재 개발 및 안정성 확보
 - 선정된 오미자 소재의 특허 출원을 위한 특허 전략 수립
 - 원재료의 처리: 문경에서 재배된 오미자와 한국한의학연구원 등 타 협동 과제팀과의 논의를 통해 선정된 복합물을 구매하여 수세, 정선하여 건조과정을 거쳐 분쇄하여 사용
 - 시료의 용매별 추출방법 검토: 물 추출법과 주정 추출법을 실시하여 지표성분의 차이를 확인하고 각 추출법에 의한 시료는 각 세부 기관에 전달하여 실험에 사용하며 추출방법에 대한 방법을 정립
- ② 물 추출법
 - 상압을 이용한 방법: 시료를 95°C에서 추출하면서 시간 별로 표본 추출하여 유용성분을 확인
 - 가압을 이용한 방법: 시료를 121°C에서 추출하는데, 121°C 유지 시간 별로 추출하여 유용성분 확인
- ③ 주정추출법
 - 추출용매의 시간, 농도 및 온도별 추출법 확인
 - 결정된 농도에서 추출온도에 따른 유용성분 확인
- ④ 분말화 공정 검토: 부산광역시에 소재한 해양생물산업육성센터의 100 L 장비를 이용하여 추출과 농축한 후 기초실험에 사용될 분말화 공정은 동결건조를 통해 실시하고, 산업적인 분말화 공정을 위해 pilot 크기에서 진공건조 및 분무건조를 통해 분말화 공정을 검토
- ⑤ 일반이화학검사: 성상, 물성, 미생물, 잔류농약, 중금속, 영양성분 확인
- ⑥ 지표성분 안정성 확보: 열, 빛, 산/염기에 대한 안정성 검사

가-3. 제3차년도 구체적인 연구 수행 방법 내용

[제3차년도 연구 개발 추진 과정 모식도]



(가) 제1세부 기관(동의대학교)

▶ 오미자 추출물의 퇴행성 관절염 예방 및 치료 효능평가의 심화 연구

① 오미자의 추출물의 퇴행성 관절염 기능성 학술적 근거 제공을 위한 심화 연구

- 연구 결과물의 전문 학술지 논문 투고에 따른 지속적 심화 연구의 수행으로 추가 학술 논문 확보
- 추가 특허 출원 및 등록을 위한 보충 실험 지속적 수행
- 오미자 추출물의 지표물질에 대한 관절염 포함 기능성 확보를 위한 추가적 학술적 자료 도출 수행(슬관절에서 분리한 연골세포 관련 포함)
- 향후 오미자 복합물의 활용성 범위 확대를 위한 후보 추출물들에 대한 기능성 자료 추가 확보
- 기타 오미자 추출물의 활용 방안 확대를 위한 추가 기능성 관련 추가 근거 자료 도출을 위한 실험 수행

② 식품의약품안전처 식품개별인증 신청을 위한 학술 자료 추가 보완

- 제3협동기관과 공조하여 성공적인 인체적용시험의 수행
- 오미자 추출물을 활용한 관절염 사업화를 위한 특허 및 거래활용, 식품의약품안전처 승인 동향 분석에 따른 자료집 발간
- 시제품 개발에 따른 사업화를 위한 시장성 조사 및 마케팅 전략 공동 수립

(나) 제3협동 기관(주, 바이오포트코리아)

▶ 노인성 질환 개선 기능성식품 소재 임상시험 개별인증 획득 및 제형화와 제품화 개발

① 오미자 추출물의 관절염 기능성 인증 취득을 위한 인체적용시험 임상시험

- 임상시험실시 및 기능성 원료 신청: ICH-KGCP에 따른 전임상시험을 기초로 한 인체적용시험용 protocol (PI 및 CRC 선정), CRF 작성, 시험물질(시험물질, placebo) 제조, 인체적용시험 보험가입으로 IRB 승인 획득 → ICH-GCP 기준에 따라 60 case 이상의 인체적용시험을 통해 대사성 질환에 대한 기능성 및 안전성 검증: MFDA 인증기관에서 인체적용시험을 실시하며 피험자 약 70명을 대상으로 20% 미만의 탈락율과 유효지표 2건 확보를 목표로 성공적인 인체적용시험 실시

- 임상 시험자 자료집 작성: 임상시험용 보험가입 → 보험가입을 통한 불의의 사고에 대비 → 모니터링: 임상시험용 protocol에 준한 임상시험 진행 여부 check → Data management (검사항목 결과의 입력, 검토, 확정 및 통계분석) → 임상시험 최종결과보고서 획득

② 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인증 신청

- 오미자 추출물의 관절염 개선의 개별인증 신청을 위한 건강기능식품 기능성원료 인증허가에 필요한 서류 작성

- 임상시험 결과를 토대로 기능성 개별인증 취득을 위한 준비 완료

③ 오미자 추출물을 이용한 제품화 방안

- 시제품제작 예정 안

(a) 오미자 추출물을 단일 소재로 한 엑기스 또는 분말 제품

(b) 오미자 추출물을 첨가한 에이드류의 음료

(c) 고시형/개별인증형 제품에 오미자를 첨가한 건강기능식품

- 제품화 3종 및 유통기한 설정: 각 제품의 가혹실험을 통한 유통기한 설정 : 식품의 유통기한 설정실험 가이드라인(식품의약품안전처 기준)

- 제형화 연구를 통한 가공적정성 확립: 제품형태(tablet 및 capusle 등), 용량(효능 용량, 섭취 횟수에 따른 용량 설정), 포장(PTP 및 bottle 등), 부형제 배합비, 봉해도, 입도시험, 가습실험, 제제 균일성 보고서 작성 등 등

④ 개발된 제품에 대한 시장 진입 전략 수립: 제품 출시 및 제품 출시에 따른 판매 홍보 전략 수립

- 3차년도 과제 종료 및 개별인증 획득 후 노인성 질환(관절 건강기능식품) 제품 판매를 위한 제품 시장 진입전략 보고서 작성

- 사업화 방안

(a) 본 제품의 산업화를 위한 시제품은 연구팀과 참여기업인 (주)바이오포트코리아에서 공동 개발하고, 제품화를 위한 시험은 (주)바이오포트코리아에서 수행하게 될 것임

(b) (주)바이오포트코리아가 산업화를 위한 제품을 생산할 것이며, 제품의 판매는 기 구축된 판매망을 판매할 것임

⑤ 오미자의 건강기능식품 기능성 원료 인증을 통하여 기능성 원료의 판매 증대

- 국내: 참여 기업의 기존 공급처인 롯데헬스원, 광동제약, 보령제약, 유니베라 등 (건강)식품관련 대기업에 원료 공급 계약 체결과 새로운 판로의 지속적 개척

- 국외: 참여 기업의 기존 판매처(미국: Q-rapha Inc, 일본: Muan, HIROBA, 대만: HAHAA518)에 신규 제품 납품과 신규시장개척을 통한 수출 확대
 - 추후 건강기능식품 제품화 인증을 통하여 신제품의 판매(참여기업의 기존 판매처)
 - (a) 국내: 참여 기업의 기존 공급처인 대형 할인점(코스트코, 이마트, 홈플러스, 롯데마트, GS 슈퍼, 메가마트 등), 백화점(현대백화점, 롯데백화점 등) 및 편의점(GS25) 등 기존 판매처를 통한 판매와 판매처의 지속적 확대
 - (b) 해외: 참여 기업의 기존 공급처(미국: Q-rapha Inc, 일본: Muan, HIROBA, 중국: CBP)와 신규시장개척(유럽, 중동, 동남아, 남미)을 통한 수출 확대
 - 오미자의 고부가가치 제품화를 위한 지역 오미자 농가와의 계약 재배 체결로 농가 소득의 증대 및 안정적인 판매망 확립으로 오미자 재배농가와 가공업체간 win-win 전략 구축
- ⑥ 향후 사업화계획(과제 종료 및 제품 개발 후)
- 시장진입을 위한 단계적 전략 (시장진입시기, 현지화 전략 등): 기존의 거래처인 GS리테일(GS25), 홈플러스, 이마트, 코스트코코리아 등의 건강기능식품담당 MD들을 대상으로 제품설명회 개최를 통한 국내 판매망 확보하고 코스트코코리아의 제품추천을 통한 미국코스트코에 제품소개 및 미국 시장개척, 당사의 일본바이어인 히로바를 통한 일본시장 개척지원
 - 대학, 연구소, 협력업체, 대기업 등 외부 네트워크 활용 방안: 전문인력 pool로서는 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터 소속의 유능한 교수와 부산대학교 항노화사업단과 해양생물산업육성센터의 전문인력을 활용하고, 국내 유통대기업인 GS리테일, 홈플러스, 이마트, 코스트코와는 오랜 기간 거래를 하고 있어 당사의 기 보유된 네트워크만 잘 활용해도 문제해결에 어려움이 없을 것으로 예상
 - 사업화를 위한 핵심인력 확보 방안: 당사의 연구원/직원들은 대부분 식품관련 학과를 졸업하였으며, 또한 기능성 식품 개발과 생산에 많은 경험을 보유하고 있다. 따라서 국내외 판매를 위한 마케팅 인력확보는 지역의 우수한 인재를 각 학교로부터 추천을 받아 확보하고자 함
 - 마케팅 등에 대한 추진전략: 전시회 참가, 공급·유통 채널 확보를 통한 판로 개척, 판매전략, Off-Line 홍보 활동 강화 등 수행
- ⑦ 기존제품 효과 및 오미자 추출물 관절염 개선 비교 평가
- 시중에 판매 되고있는 건강기능식품 3종 이상 구입, 오미자 추출물과 효능 비교
- ⑧ 오미자 추출 조건 추가 확립 및 오미자 지표성분 기준규격 확립
- 분쇄한 건 오미자 7kg을 20% 주정 70L를 이용하여 추출 진행, 총 1~10회 실시하여 동결 건조물 회수율을 확인
 - 오미자 추출물의 지표성분인 Schizandrin, Gomisin A, Gomisin N의 단독 분석과 동시 분석 함량을 확인하여 추출물 QC 진행 시 비용 및 분석 시간의 절감 효과를 위해 최적의 분석 조건을 확립
- ⑨ 건강기능식품 GMP 및 오미자 제품화에 대한 교육 실시
- 건강기능식품 제조하기위한 GMP의 대한 설명과 생산 공정 프로세스 및 품질 검사 방법에 대한 교육 실시
 - 오미자에 대한 설명과 시제품으로 생산한 캡슐, 환, 과립, 에이드 제조 방법과 생산 현장 확인

⑩ 오미자 추출물의 관절염 개선 시제품 홍보 전시

- 총 3건의 이상의 홍보 전시 실시 계획

3-2. 연구개발 추진 체계

(1) 추진 체계

(가) 추진 체계 요약

- 본 과제에서는 “오미자를 활용한 노인성 질환 개선 기능성 제품개발”에 관한 연구를 수행하기 위하여 학문의 전문성에 근거한 산·학·연 체제로서 동의대학교 한의과대학(제1세부), 협동과제로서 부산대학교의 생명자원과학대학(제1협동) 및 한국한의학연구원(제2협동), 참여기업인 산업체는 (주)바이오포트코리아(제3협동)가 역할 분담 후 다음과 같은 연구 개발 흐름도 및 추진체계 하에서 연구 개발을 수행하였음

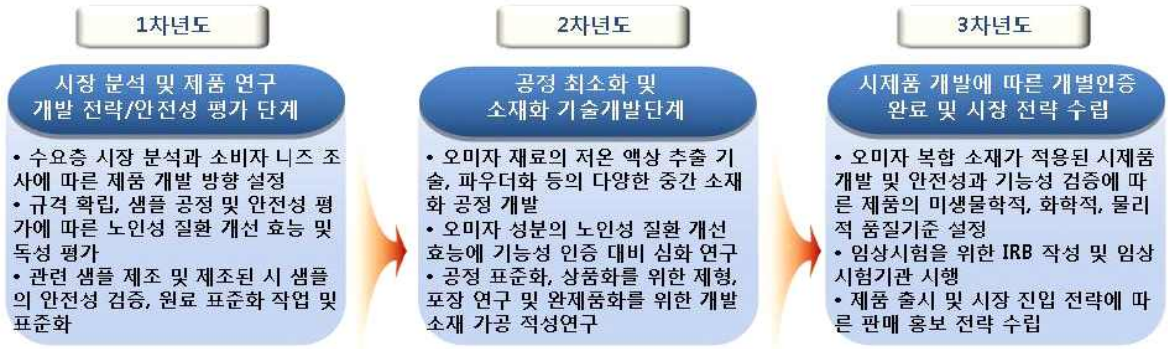
(나) 연구 개발 추진 협력 체계

- 상기 요약한 연구 개발의 추진을 위한 참여 기관들과의 연구 개발 추진 체계는 다음과 같음



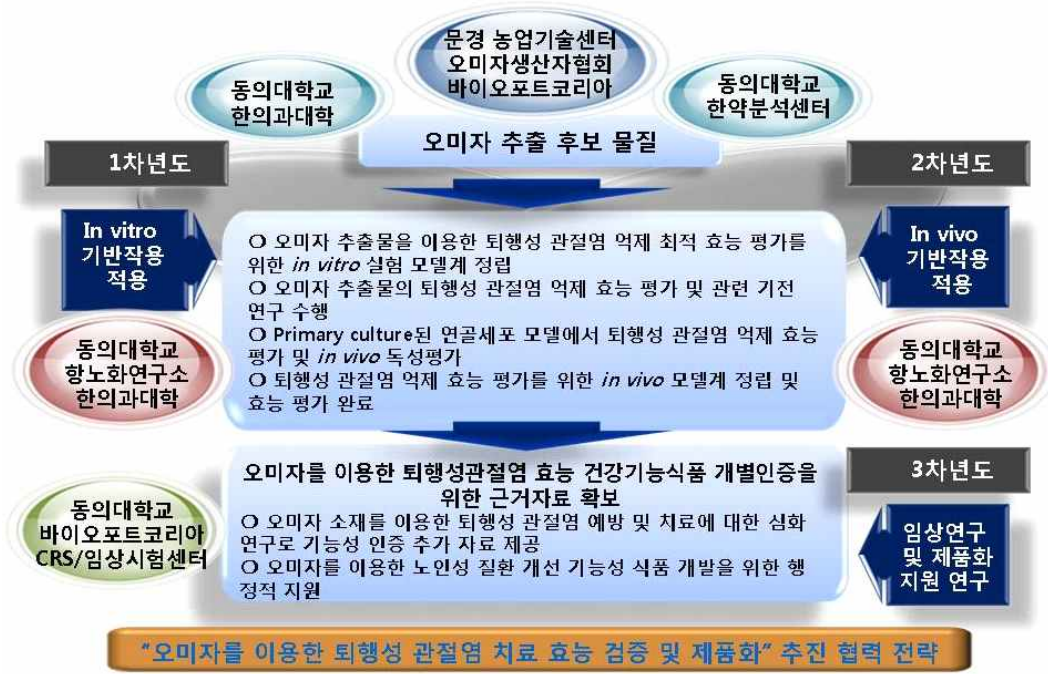
(2) 참여 기관별 추진 전략 체계

- 본 연구 개발의 목표달성을 위한 제1세부 또는 협동 과제별 연계한 연구과제의 영역별 추진전략을 요약하면 다음 도에서 보는 바와 같음
- 이러한 기관별 연구 수행의 추진 전략은 본 과제 연구 기간인 3년 동안의 연차별로 연구 개발 흐름도에 기초하여 수행되었음



(가) 제1세부기관 추진 전략체계(동의대학교)

- ① 기술정보수집: 동의대학교 한의과대학의 선행 연구 기술 개발 자료, 문경 농업기술센터의 용역자료 결과 활용 및 (주)바이오포트코리아와의 사업화에 따른 전반적인 기술정보 교류에 따른 공동 연구 체계를 구성하였음
- ② 전문가확보: 동의대학교의 우수한 연구진 및 한의과대학 및 한의학연구소 교수들의 자문, 동의대학교 블루바이오소재개발센터(지역혁신센터, RIC)의 고가 기자재 활용, 과제 추진의 필요에 따른 동의대학교 향노화연구소 협력 기관의 추가적 협력 체계 구축하였음
- ③ 다른 기관과의 협조방안: 문경 오미자생산자협회의 원자재 공급 및 동의대학교 한약분석센터의 분석에 의한 원자재의 안정성 확보, 협동과제 수행 기관과의 지속적인 연구 결과 공조하며 수행하였음



(나) 제1협동 추진 전략체계(부산대학교)

- ① 기술정보수집: 부산대학교와 부산대학교 BIT 사업단의 선행 연구에서 오미자를 이용한 인지장애 개선에 효과를 나타내는 수편의 논문을 국제 학술지에 게재하고 특허권을 가지고 있으며, 사업화를 수행하고 있는 (주)바이오포트코리아와 전반적인 기술정보 교류에 따

른 공동 체계 구성하였음

- ② 전문가확보: 부산대학교 연구진은 이미 오미자로부터 생리활성 성분의 순수분리 및 구조 동정을 수행하여 이미 40여 편의 논문과 특허권을 확보한 오미자 연구의 전문가로 구성 하였음
- ③ 다른 기관과의 협조방안: 우수 원료 확보를 위해서 문경 오미자생산자협회와 협동과제 수행 기관과의 지속적인 연구 결과 공조하며, 부산대학교 BIT 융합기술 연구소에 구축 되어 있는 고가장비와 식품의약품안전청으로부터 인증 받은 부산대학교 청정동물실험센터를 통해 동물 실험을 수행하였음



(다) 제2협동 추진 전략체계(한국한의학연구원)

- ① 기술정보수집: 본 연구팀은 한약재들의 혈액순환 및 오미자에 대한 연구로 다년간 축적 된 노하우와 기술정보를 활용하여 본 연구를 추진하였음
- ② 전문가확보: 한국한의학연구원의 분야별 전문가들의 연구 참여로 관련 연구 개발을 극대 화하였음
- ③ 다른 기관과의 협조방안 : 제3협동기관인 (주)바이오포트코리아에서 표준화된 추출물을 제공받아 작용기전 및 동물효력시험을 평가하여 임상마커 및 임상용량 등 임상시험설계를 위한 비임상시험 자료 공유하였음



(라) 제3협동 추진 전략체계(주)바이오포트코리아)

- ① 기술정보수집: 문경시 농업기술센터로 부터의 기본 오미자 연구 자료의 취합 및 유사 노인성 질환 개선용 기능성 국내외 식품의 선례 분석과 참여 기관의 연구 결과에 따른 개별

기능성 인증 방향의 설정하였음

- ② 전문가확보: 참여 기관 연구진 및 기능성 인증 추진을 위한 (주)케이제이파마텍글로벌리서치 및 식품의약품안전처 지정 임상시험센터의 전문가들과 지속적인 정보 교류와 사내 식품 개발 전문가들을 적극 활용하였음
- ③ 다른 기관과의 협조방안: 우수한 오미자의 지속적인 공급을 위한 주관기관과 문경시 및 문경시 농업기술센터와의 개발성과품의 홍보 및 마케팅 지원 체계 구축하였음



3-3. 연구개발 추진일정

(1) 연구 개발 추진을 위한 흐름도

- 연구 개발의 추진은 최종적으로 식품의약품안전처 건강기능식품 개별 인증을 위한 임상시험 성공적 완료에 따른 사업화에 기반을 두고 수행되었음



(2) 연차별 추진일정

(가) 1차년도 추진 일정

세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진계획												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
○ 제1세부: 오미자 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vitro</i> 모델계 효능 분석	• 오미자 및 복합물 소재의 세포 독성 자료 근거와 최적 오미자 및 복합물 소재 도출													
	• 도출 소재의 효능 평													

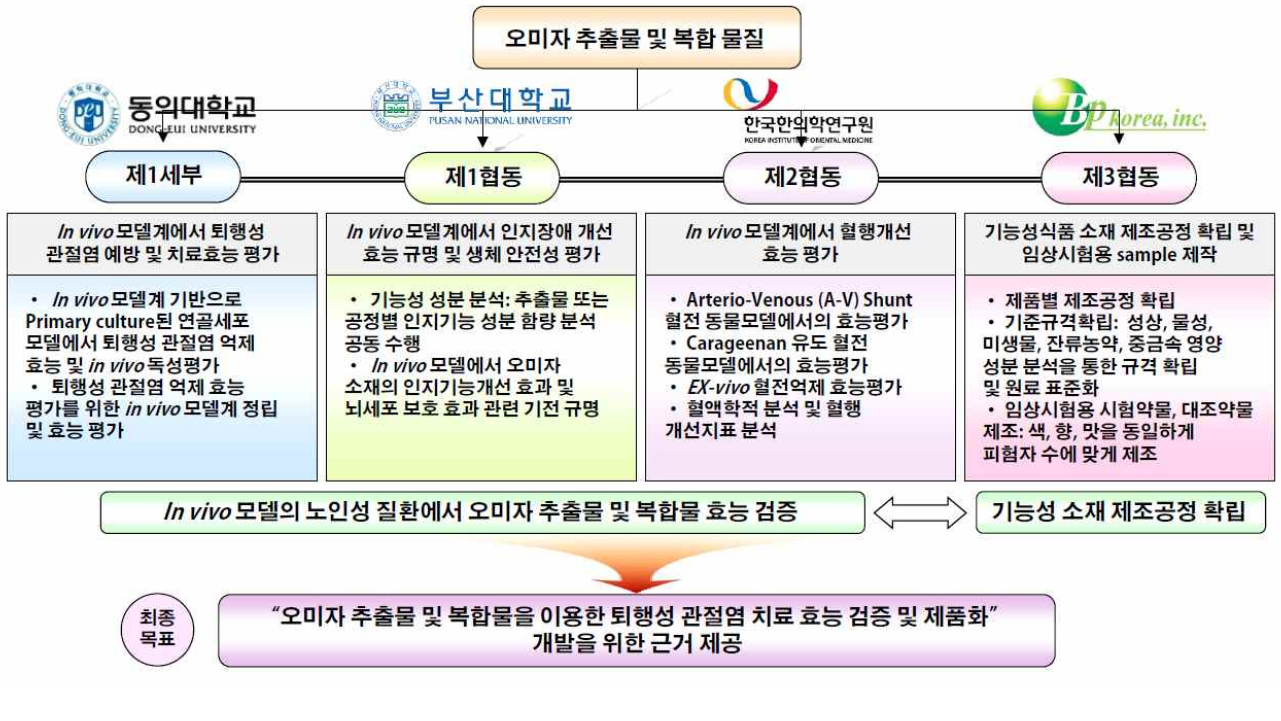
세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진계획											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
○ 제1세부: 오미자 추출물 및 복합물 을 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vivo</i> 모델계 효능 분석	• 분리된 연골세포 <i>in vitro</i> 실험 모델계 정립												
	• 분리된 연골세포에서 관절염 억제 효능 검증												
	• 경구 및 복강 투여에 따른 독성평가 실시												
	• <i>In vivo</i> 실험동물 골 관절염 유발 조건 확립												
	• <i>In vivo</i> 모델에서 효 능 및 기전 규명												
○ 제1협동: 오미자 및 복합물추출물의 인지기능 효능 및 기전 분 석	• 후보 물질의 기능성 성분 분석												
	• 후보 물질의기능성 성 분의 대량분리												
	• 후보 물질의 순수 분 리 성분의 구조분석												
	• 동물 모델에서 인지기 능개선 효과												
	• 효능 성분의 인지기능 개선 효과 검증												
○ 제2협동: 동물모델에서의 오미자 및 복합물소재의 혈행개 선 효능 평가	• A-V Shunt 혈전 동 물모델에서 효능평가												
	• Carrageenan 유도 동 물모델에서 효능평가												
	• <i>Ex-vivo</i> 혈전억제 효 능 평가												
	• 혈행 개선 관련 기전 규명												
	• 효력검증 및 유효용량 결정												
○ 제3협동: 오미자 및 오미자 및 복	• 대량생산 공정 확립												

합물을 이용한 노인성질환 개선 기능성 식품개발 실효성 확보	• 기준 규격 확립												
	• 공인시험성적서 확보												
	• 제품의 제형 결정												
	• 임상 시험용 sample 제작												

(다) 3차년도 추진 일정

세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진계획											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
○ 제1세부: 오미자 추출물을 이용한 건강기능식품 개별인증 취득을 위한 근거 자료 지원	• 연골 세포주를 이용한 퇴행성 관절염 예방 및 치료효능 평가의 지속적 심화연구												
	• 오미자 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 예방 및 치료효능 특허 등록을 위한 심화연구												
	• 슬관절에서 분리한 연골세포를 이용한 퇴행성 관절염 예방 및 치료효능 평가의 지속적 심화연구												
	• 오미자 소재를 이용한 노인성 질환 개선 기능성 식품 개발을 위한 행정적 지원												
○ 제3협동: 오미자를 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개별인증 추진 및 상품화	• 오미자 추출물의 관절염 효능 평가를 위한 임상시험 실시												
	• 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인증 신청												
	• 오미자 추출물의 관절염 억제 시제품 제작												
	• 오미자 추출물의 관절염 제어를 위한 사업화 전략												

(3) 참여 기관별 주요 추진 내용 및 최종 목표 설정 안 모식도



3-4. 연구 개발 성과

(1) 논문 게재 성과

No	논문명	학술지명	주저자명	권(호)	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	Anti-inflammatory effects of <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill fruit through the inactivation of NF-κB and MAPKs signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages	<i>Journal of Cancer Prevention</i>	강영순	19 (4)	대한민국	대한암예방학회	비SCI	2014. 12.31
2	Neuroprotective effects of α-iso-cubebene against glutamate-induced damage in the HT22 hippocampal neuronal cell line	<i>International Journal of Molecular Medicine</i>	박선영	35 (2)	영국	Spandidos Pub.	SCI (2.341)	2015. 02.01
3	Neuroprotective effects of α-iso-cubebenol on glutamate-induced neurotoxicity	<i>Environmental Toxicology and Pharmacology</i>	박선영	40 (2)	미국	Elsevier B.V.	SCI (2.313)	2015. 09.01

4	Cucurbitacins attenuate microglial activation and protect from neuroinflammatory injury through Nrf2/ARE activation and STAT/NF- κ B inhibition	<i>Neuroscience Letters</i>	박선영	609 (1)	미국	Elsevier B.V.	SCI (2.180)	2015. 11.16
5	Schisandrae Fructus inhibits IL-1 β -induced matrix metalloproteinases and inflammatory mediators production in SW1353 human chondrocytes by suppressing NF- κ B and MAPK activation	<i>Drug Development Research</i>	정진우	76 (8)	미국	John Wiley & Sons, Inc.	SCI (1.909)	2015. 12.01
6	Baicalein protects C6 glial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through regulation of the Nrf2 signaling pathway	<i>International Journal of Molecular Medicine</i>	최은옥	37 (3)	영국	Spandidos Pub.	SCI (2.341)	2016. 03.01
7	Mori folium inhibits interleukin-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- κ B and p38 MAPK in SW1353 human chondrocytes	<i>International Journal of Molecular Medicine</i>	정진우	37 (2)	영국	Spandidos Pub.	SCI (2.341)	2016. 02.01
8	Ethanol extract of <i>Prunus mume</i> fruit attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis involving Nrf2/HO-1 activation in C2C12 myoblasts	<i>Revista Brasileira de Farmacognosia</i>	강지숙	26 (2)	미국	Elsevier B.V.	SCI (1.059)	2016. 03.24
9	Fructus sophorae attenuates secretion	<i>General Physiology</i>	최영현	35 (3)	슬로바키아	Slovak Academ	SCI (1.170)	2016. 07.01

	of proinflammatory mediators and cytokines through the modulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages	<i>and Biophysics</i>				y of Sciences		
10	The immunomodulatory activity of Mori folium, the leaf of <i>Morus alba</i> L., in RAW 264.7 macrophages <i>in vitro</i>	<i>Journal of Cancer Prevention</i>	권다혜	21 (3)	대한민국	대한암예방학회	비SCI	2016.09.30
11	Single dose oral toxicity test of ethanol extracts of Schisandrae fructus and Mori folium, and their mixture in ICR mice	생명과학회지	최은옥	26 (10)	대한민국	한국생명과학회	비SCI	2016.10.31
12	Novel compound from <i>Polygonum multiflorum</i> inhibits inflammatory response in LPS-stimulated microglia by upregulating AMPK/Nrf2 pathways	<i>Neurochemistry International</i>	박선영	100 (1)	미국	Elsevier B.V.	SCI (3.262)	2016.11.01
13	Anti-neuroinflammatory Effect of Emodin in LPS-Stimulated Microglia: Involvement of AMPK/Nrf2 Activation	<i>Neurochemical Research</i>	박선영	41 (11)	미국	Springer International Publishing AG	SCI (2.581)	2016.11.01
14	α -isocubebenol alleviates scopolamine-induced cognitive impairment by repressing acetylcholinesterase activity	<i>Neuroscience Letters</i>	송성화	638 (1)	미국	Elsevier B.V.	SCI (2.180)	2017.01.18
15	<i>Schisandra chinensis</i> and <i>Morus alba</i> synergistically inhibit <i>in vivo</i> thrombus formation and platelet	<i>Evidence-Based Complementary and Alternative</i>	김동선	2017	영국	Hindawi Limited	SCI (1.740)	2017.01.19

	aggregation by impairing the glycoprotein VI pathway	<i>Medicine</i>						
16	Morin exerts cytoprotective effects against oxidative stress in C2C12 myoblasts <i>via</i> the upregulation of Nrf2-dependent HO-1 expression and the activation of the ERK pathway	<i>International Journal of Molecular Medicine</i>	이문희	39 (2)	영국	Spandidos Pub.	SCI (2.341)	2017.02.01
17	Schisandrae Fructus ethanol extract ameliorates inflammatory responses and articular cartilage damages in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats	<i>EXCLI Journal</i>	정진우	16	독일	Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors	SCI (1.462)	2017.03.14
18	Inhibitory effects on the production of inflammatory mediators and reactive oxygen species by Mori folium in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and zebrafish	<i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i>	권다혜	89 (1)	브라질	Brazilian Academy of Sciences	SCI (1.100)	2017.05.30
19	Effects of Schisandrae Fructus supplementation on apoptosis and inflammatory response in gastrocnemius muscle of dexamethasone-induced muscle atrophy mice	대한한의약방제학회지	최영현	25 (3)	대한민국	대한한의약방제학회	비SCI	2017.08.31
20	Cytoprotective effects of schisandrin A	생명과학회지	정진우	27 (9)	대한민국	한국생명과학회	비SCI	2017.09.30

	against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SW1353 human chondrocytes							
21	Mori Folium water extract alleviates articular cartilage damages and inflammatory responses in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis rats	<i>Molecular Medicine Reports</i>	정진우	16 (10)	영국	Spandidos Pub.	SCI (1.692)	2017. 10.01
22	Inhibitory effects of Schisandrae Fructus ethanol extract on the production of matrix metalloproteinases in <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> models	생명과학회지	정진우	27 (10)	대한민국	한국생명과학회	비SCI	2017. 10.31
23*	Induction of muscle atrophy by dexamethasone and hydrogen peroxide in differentiated C2C12 myotubes	생명과학회지	정진우	27 (12)	대한민국	한국생명과학회	비SCI	2017. 12.31
24*	Lipolysis effect of eaucosterol isolated from Mulberry (<i>Morus alba</i>) leaves	생명과학회지	Ke Li	27 (12)	대한민국	한국생명과학회	비SCI	2017. 12.31
25*	Schisandrin A suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages by suppressing the NF- κ B, MAPKs, and PI3K/Akt pathways and activating Nrf2/HO-1 signaling	<i>International Journal of Molecular Medicine</i>	권다혜	41 (1)	영국	Spandidos Pub.	SCI	2018. 01.01

*연구 과제 수행 기간 이후 발생한 결과물

(2) 학술대회 발표 실적

No	회의명칭(발표 제목)	주 발표자	발표일시	장소	국명
----	-------------	-------	------	----	----

1	2015 생화학분자생물학회 국제학술대회(Anti-inflammatory effects of <i>Schisandra chinensis</i> Baill fruit through the inactivation of NF- κ B and MAPKs signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages)	정진우	2015.05. 12~14	코엑스, 서울	대한민국
2	Korean Association for Laboratory Animal Science 2015 International Symposium (Schisandrae Fructus inhibits the activation of matrix metalloproteinases in interleukin-1 β -stimulated human W1353 chondrosarcoma cells: potential therapeutics for osteoarthritis)	정진우	2015.08. 12~14	인천 송도 Convensia	대한민국
3	대한약학회 2015 추계국제학술대회(Antithrombotic effects of an herbal mixed extract (KIOM-SC) in a rat model of tail thrombosis)	성윤영	2015.10. 22	대구 인터볼고 엑스코	대한민국
4	2015년도 한국생명과학회 제56회 정기총회 및 국제학술대회(Chondroprotective Role of <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill fruit by Inhibiting MMPs Expression <i>via</i> Retaining NF- κ B Signaling in IL-1 β -stimulated human W1353 chondrosarcoma cells)	정진우	2015.08. 27~28	창원컨벤션 센터	대한민국
5	2015년도 한국생명과학회 제56회 정기총회 및 국제학술대회(Chondroprotective role of Mori Folium in IL-1 β -stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells)	정진우	2015.08. 27~28	창원컨벤션 센터	대한민국
6	2015년도 한국생명과학회 제56회 정기총회 및 국제학술대회(Neuroprotective Eeffects of Novel Compounds from <i>Schisandra chinensis</i> on Glutamate-induced Neurotoxicity)	박순영	2015.08. 27~28	창원컨벤션 센터	대한민국
7	2015 한국환경과학회 정기 학술대회(Comparision of anti-neuroinflammatory potential of novel compounds from <i>Schisandra chinensis</i> in Microglia)	박순영	2015.11. 05	수안보한화 리조트	대한민국
8	2016 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄(The relationship of antioxidant effects and total phenolic contents of <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi, <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. and <i>Coptis chinensis</i> Franch.)	윤정재	2016.04. 20~22	경주화백컨 벤션센터	대한민국
9	KSBMB International Conference 2016 (Anti-inflammatory and chondroprotective effects of <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill fruit against MIA-induced osteoarthritis rats)	정진우	2016.05. 18~20	서울 코엑스	대한민국

10	2016 Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology: The 15th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting (Fructus sophorae attenuates secretion of proinflammatory mediators and cytokines through the inactivation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages)	최영현	2016.06.15~17	대구 라온제나호텔	대한민국
11	2016 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting Program (Synergistic antithrombotic effect of herbal complexes including Schisandra chinensis in AV-Shunt animal model)	김동선	2016.08.18	대구 엑스코	대한민국
12	2016년 한국생명과학회 정기학술대회(Emodin LPS-induced production of inflammatory mediators in the microglia by upregulating AMPK/Nrf2 pathways in microglia)	박순영	2016.08.22	경주 더케이호텔	대한민국
13	2016년 한국생명과학회 정기학술대회(Schizandrin C suppresses the inflammatory response by inhibiting NF- κ B/MAPK and upregulating Nrf2 pathways in microglia)	박순영	2016.08.22	경주 더케이호텔	대한민국
14	41st Annual Conference of the Malaysian Society for Biochemistry & Molecular Biology, Pullman Kuala Lumpur Bangsar Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia (Cytoprotective effect of morin against oxidative stress in C2C12 myoblasts <i>via</i> the upregulation of Nrf2-dependent HO-1 expression and the activation of the ERK pathway)	최영현	2016.08.17~18	Pullman Kuala Lumpur Bangsar Hotel	말레이시아
15	The Zing Conference on "Cell Fate Diversity in Aging" (Berberine hydrochloride protects cells against oxidative stress-induced damage through the induction of Nrf-2-mediated HO-1 expression)	박철	2016.09.25~28	Hotel Croatia Cavtat, Dubrovnik	크루아티아
16	International Conference on the 21st Annual Meeting of the Korean society of Cancer Prevention (Anti-inflammatory effects of mori folium via suppression of crosstalk between the reactive oxygen species and NF- κ B signaling pathway in LPLS-stimulation)	권다혜	2016.12.08	서울 그랜드힐튼호텔	대한민국
17	International Conference on the 21st Annual Meeting of the Korean society of Cancer Prevention (Protective effects of morin against oxidative stress through induction of Nrf-2/HO-1 expression in V79-4 chinese hamster lung fibroblasts)	권다혜	2016.12.08	서울 그랜드힐튼호텔	대한민국

18	2017 생화학분자생물학회 국제학술대회(Schisandrin A suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages via suppressing NF- κ B, MAPKs and PI3K/A)	권다혜	2017.05.18~20	백스코, 부산	대한민국
19	2017년도 한국생명과학회 제58회 정기총회 및 국제학술대회(Mori Folium suppress inflammatory response by inhibition of ROS production and NF- κ B activation in RAW 264.7 macrophages)	권다혜	2017.08.03~04	경주 더케이호텔	대한민국
20	2017년도 한국생명과학회 제58회 정기총회 및 국제학술대회(Suppression of LPS-induced inflammation response and oxidative stress by schisandrin A involving NF- κ B, MAPKs and PI3K/AKT pathway and Nrf2/HO-1 pathway in RAW 264.7 macrophages)	권다혜	2017.08.03~04	경주 더케이호텔	대한민국
21	The 42nd FEBS Congress (Schisandrae Fructus suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation by scavenging ROS generation)	정진우	2017.09.10~14	예루살렘	이스라엘
22	The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods (Schisandrin A suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages by suppressing the NF- κ B, MAPKs, and PI3K/Akt pathways and activating Nrf2/HO-1 signaling)	권다혜	2017.10.22~25	군산 새만금컨벤션센터	대한민국

(3) 특허 성과

(가) 특허 출원

No	특허명	국가	출원인	출원일	출원번호
1	인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	최영환, 황대연, 송성화, 최성미, 최영현	2015.09.21	10-2015-0132973
2	오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 IL-1 β 에 의한 관절염의 예방 또는 개선용 조성물	대한민국	최영현, 정진우, 이기원, 김성구, 김기영, 최영환	2015.10.17	10-2015-0145022
3	상엽 추출물을 유효성분으로 포함하는 IL-1 β 에 의한 관절염의 예방 또는 개선용 조성물	대한민국	최영현, 정진우, 이기원, 김성구, 김기영, 최영환	2015.10.17	10-2015-0145021

4	오미자를 함유하는 복합 추출물을 포함하는 혈액순환 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	김호경, 김동선, 성윤영, 박선행	2016.10.04	10-2016-0127754
5	오미자 추출물을 포함하는 관절염의 예방 또는 개선용 조성물 및 그 제조방법	대한민국	최영현, 정진우, 최은옥, 이기원, 김기영, 김성구, 김석만, 홍수현, 박철	2016.10.24	10-2016-0138711
6	상업 추출물을 포함하는 면역증강용 조성물 및 그 제조방법	대한민국	최영현, 정진우, 권다혜, 이기원, 김기영, 김성구, 김석만, 홍수현, 박철, 황혜진	2017.02.06	10-2017-0016363
7	상업 추출물을 유효 성분으로 포함하는 항염 및 항산화 활성용 조성물	대한민국	최영현, 정진우, 이기원, 김기영, 김성구, 박철	2017.10.31	10-2017-0143992
8	상업 추출물을 유효 성분으로 포함하는 근위축 예방 및 개선용 조성물	대한민국	최영현, 정진우, 박철	2017.10.31	10-2017-0144009
9	상업 추출물을 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 및 개선용 조성물	대한민국	최영현, 정진우, 이해현, 이기원, 김기영, 김성구	2017.10.31	10-2017-0144170

(나) 특허 등록

No	특허명	국가	등록인	등록일	등록번호
1	오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 IL-1 β 에 의한 관절염의 예방 또는 개선용 조성물	대한민국	최영현, 정진우, 이기원, 김성구, 김기영, 최영환	2017.08.14	10-1770036
2	상업 추출물을 유효성분으로 포함하는 IL-1 β 에 의한 관절염의 예방 또는 개선용 조성물	대한민국	최영현, 정진우, 이기원, 김성구, 김기영, 최영환	2017.08.14	10-1770035

(다) PCT 출원

No	특허명	출원인	출원일	국제출원번호
1	오미자를 함유하는 복합 추출물을 포함하는 혈액순환 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물	김호경, 김동선, 성윤영, 박선행	2017.09.29	PCT/KR2017/011049

3-5. 연구 결과

(1) 제1세부 과제 연구 결과

(가) 대식세포 모델에서 오미자 추출물의 항염증 효능 평가

① 연구 수행의 목적

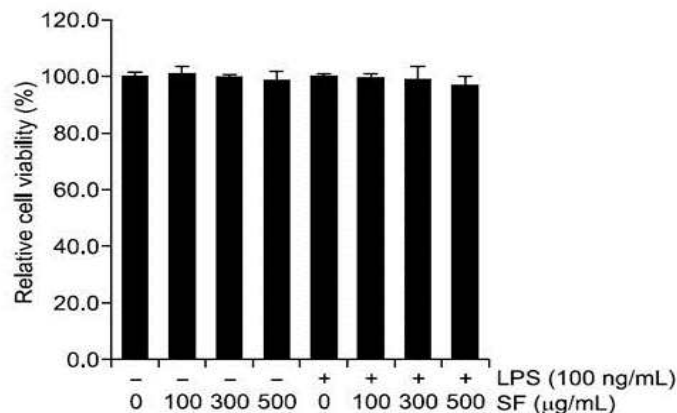
- 본 연구과제의 핵심 재료인 오미자의 생리활성 효능에 대한 검증을 위하여 노인성 질환의 근본 원인 중의 하나인 염증 제어 효능을 확인하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 20% 에탄올 오미자 추출물
- 실험 모델: RAW 264.7 대식세포(murine macrophage)를 대상으로 세균성 지질다당(lipopolysaccharide, LPS)을 이용한 염증 자극 모델을 적용하였음
- 염증 반응 측정 항목: LPS에 의하여 유도된 대표적인 염증성 매개체인 nitric oxide (NO)와 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor α (TNF- α) 및 interleukin (IL)-1 β 의 생성에 미치는 오미자 추출물의 효능을 검증하기 위하여 Griess reagent 분석법 및 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하였음
- 유전자 발현 분석: LPS에 의한 염증 반응 분자들의 조절 유전자들(inducible NO synthase (iNOS), TNF- α 및 IL-1 β)의 발현 증가에 미치는 오미자 추출물의 효능을 mRNA 및 단백질 발현 수준에서 조사하기 위하여 RT-PCR 및 Western blotting을 실시하였음
- 기타 기전 연구 수행: 오미자 추출물에 의한 LPS 매개 염증 반응 억제에 미치는 기전 연구를 수행하기 위하여 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 및 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호 경로의 관련성 여부를 조사하였음

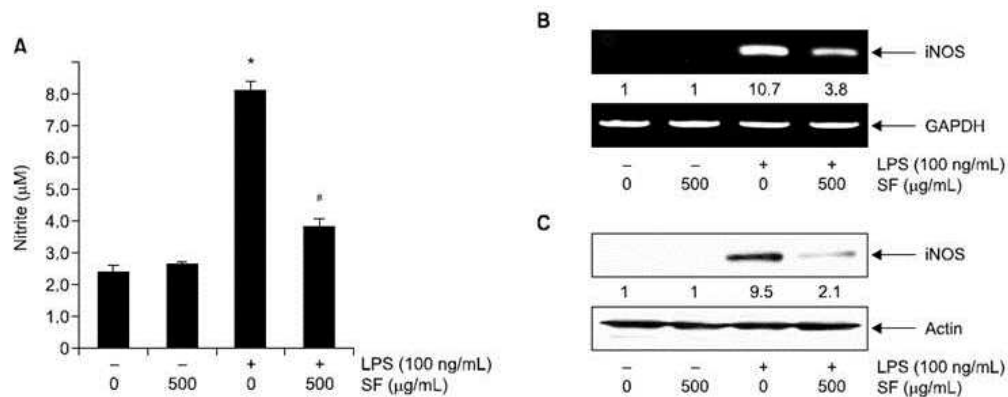
③ 연구 수행 결과

- RAW 264.7 대식세포의 증식에 미치는 오미자 추출물의 영향: 오미자 추출물의 항염증 효능 검증을 위한 처리 농도의 설정을 위하여 다양한 농도의 오미자 추출물(SF)을 단독 처리하거나 세포독성을 보이지 않는 범위의 LPS (100 ng/ml)가 1시간 전처리된 조건에서 농도의 오미자 추출물을 24시간 처리 후 MTT assay를 수행하였음



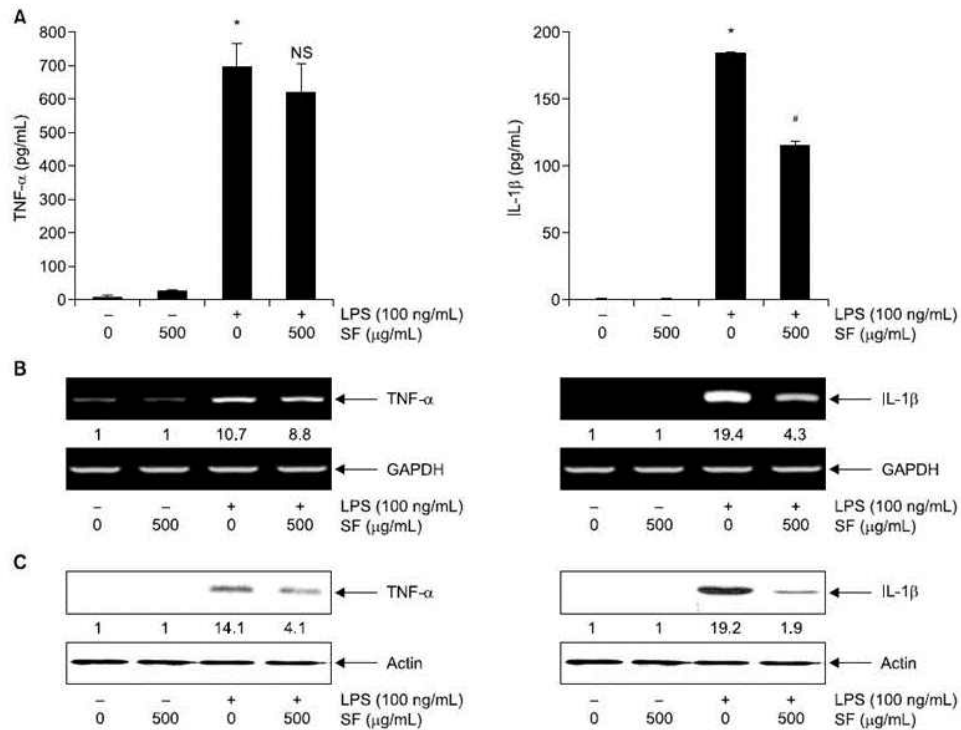
결과 1. RAW 264.7 대식세포의 증식에 미치는 LPS 및 오미자 추출물의 영향

- 오미자 추출물의 단독 또는 LPS와의 복합처리군에서도 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군까지 유의적인 RAW 264.7 대식세포의 세포증식 억제 효과가 관찰되지 않았음(결과 1)
- 따라서 RAW 264.7 대식세포를 이용한 추후 항염증 및 관련 기전 연구에 사용될 유효 오미자 추출물의 최고 농도를 500 $\mu\text{g/ml}$ 으로 설정하였음
- RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 염증성 매개인자 NO의 생성에 미치는 오미자 추출물의 영향: 오미자 추출물의 항염증 효능을 조사하기 위하여 LPS에 의하여 유도된 NO의 생성 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향을 Griess reagent 분석법으로 측정하였으며, iNOS의 전사 및 번역 수준에서의 발현 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향을 RT-PCR 및 Western blotting 법으로 조사하였음
 - LPS의 처리에 의하여 대표적인 염증 매개인자인 NO의 생성이 대조군에 비하여 4배 이상 증가되었고, iNOS의 발현도 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 매우 증가되었으나, 오미자 추출물이 전처리된 조건에서 배양된 RAW 264.7 대식세포에서 NO의 생성 및 iNOS의 mRNA 및 단백질의 발현이 오미자 추출물 처리 농도 의존적으로 유의적으로 차단되었음(결과 2)
 - 따라서 오미자 추출물이 전사수준에서 iNOS의 발현을 억제함으로써 RAW 264.7 대식세포에서의 NO 생성을 억제하였을 것으로 추정됨



결과 2. RAW 264.7 대식세포에서 LPS 처리에 의한 NO 및 iNOS의 발현에 미치는 오미자 추출물의 영향

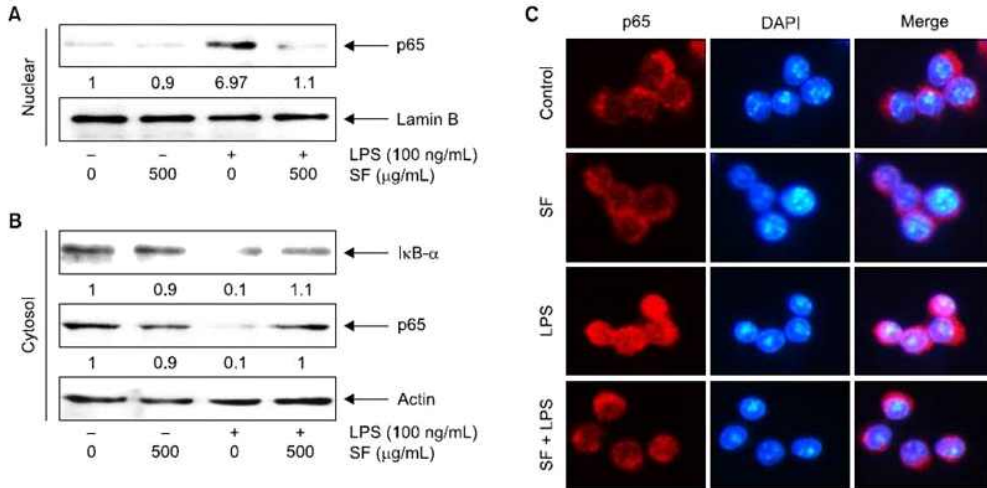
- LPS에 의한 염증성 매개인자 cytokine의 생성에 미치는 오미자 추출물의 영향: LPS에 의하여 유도된 염증성 cytokine의 생성 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향을 ELISA로 조사하였으며, LPS에 의한 cytokine의 발현 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향을 전사 및 번역 수준에서 RT-PCR 및 Western blotting법으로 조사하였음
 - LPS의 처리에 의하여 조사된 두 가지 염증성 cytokine (TNF- α 및 IL-1 β)의 생성 및 발현이 매우 증가 되었으나, 오미자 추출물이 전처리된 조건에서는 이들의 생성과 조절 유전자들의 발현이 유의적으로 차단되었음(결과 3)
 - NO의 생성 억제 결과에서처럼, 오미자 추출물이 전사수준에서 염증성 cytokine의 발현도 억제함으로써 번역 수준에서의 발현이 억제되었고, 그들의 세포 외부로의 유리가 억제되었을 것으로 추정됨



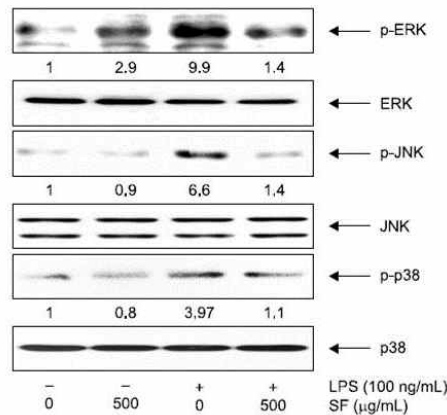
결과 3. RAW 264.7 대식세포에서 LPS 처리에 의한 염증성 사이토카인의 생성 및 발현에 미치는 오미자 추출물의 영향

- LPS에 의한 NF-κB의 활성화에 미치는 오미자 추출물의 영향: NF-κB가 iNOS와 다양한 염증성 cytokine 유전자들의 발현 조절에 핵심적인 인자로 작용하기에, LPS에 의하여 활성화된 NF-κB에 미치는 오미자 추출물의 영향을 조사하기 위하여 NF-κB의 핵으로의 이동과 inhibitory-κB (IκB)-α의 세포질에서의 발현 변화를 조사하였음
 - 핵 및 세포질 단백질을 분리하여 Western blotting을 실시한 결과, RAW 264.7 대식세포에서 LPS의 처리에 의하여 핵으로의 NF-κB 이동 증가는 IκB의 분해와 연계되어 있었지만, 오미자 추출물은 IκB의 분해를 차단하면서 NF-κB의 핵 내 이동을 차단하였음(결과 4A 및 B)
 - 아울러 NF-κB p65 항체를 이용한 형광 면역염색법에 의해서도 LPS에 의한 NF-κB의 핵 내 이동이 차단되었음을 재확인하였음(결과 4C)
 - 이는 LPS에 의한 염증성 매개인자 및 cytokine의 생성 증가를 위한 연관 유전자들의 활성이 오미자 추출물 처리에 의하여 전사 수준에서 억제되었음을 보여 주는 결과임
- LPS에 의한 MAPKs의 활성화에 미치는 오미자 추출물의 영향: MAPKs 역시 염증성 인자 또는 cytokine의 발현 제어에 핵심적인 조절 역할을 하기에 이들의 활성화에 미치는 오미자 추출물의 영향을 Western blotting을 통하여 조사하였음
 - LPS의 처리에 의하여 3가지 종류의 MAPKs (extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38 MAPK)가 모두 인산화되어 활성이 증가되었음을 알 수 있었으나, 오미자 추출물의 처리에 의하여 이들의 인산화가 모두 유의적으로 억제되었음(결과 5)
 - 이는 오미자 추출물이 이들 경로의 활성 억제를 통하여 LPS에 의한 염증성 반응을 억

제하는데 관여함을 의미하는 결과임



결과 4. LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 NF-κB의 활성화에 미치는 오미자 추출물의 영향



결과 5. RAW 264.7 대식세포에서 LPS 처리에 의한 MAPKs의 활성화 경로에 미치는 오미자 추출물의 영향

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 오미자 추출물이 LPS에 의한 NF-κB 및 MAPKs 신호 경로의 활성을 차단함으로써 염증성 매개인자 및 cytokine의 발현을 억제함으로써 그들의 생성이 억제되었음을 의미함
- 이는 오미자 추출물이 염증성 질환의 발생과 진행을 억제함으로써 노화 및 염증 연관 다양한 질환의 제어를 위한 기능성 소재로서 활용성이 높을 수 있음을 보여주는 결과임

(나) 인체 연골세포 모델에서 오미자 추출물의 관절염 억제 효능 평가

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 핵심 재료인 오미자의 관절염 억제 효능에 대한 검증을 위하여 관절염의 발병 원인인 염증성 매개인자 및 연골 기질 분해 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 생성에 미치는 오미자 추출물의 효능을 인체 연골세포를 대상으로 확인하고자

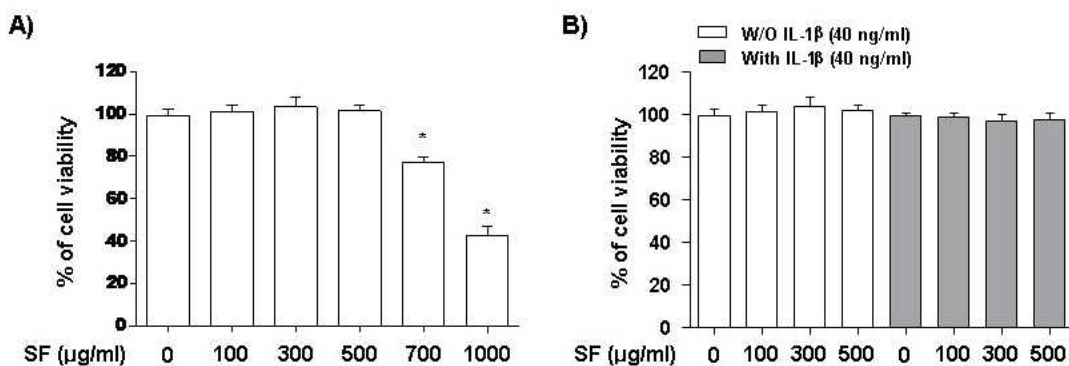
함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 20% 에탄올 오미자 추출물
- 실험 모델: SW1353 인체 연골세포를 대상으로 대표적인 퇴행성 관절염 유발 cytokine인 IL-1 β 를 이용한 관절염 모델을 적용하였음
- 염증 반응 측정 항목: SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 에 의하여 유도된 대표적인 염증성 매개인자인 NO와 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성에 미치는 오미자 추출물의 효능을 검증하기 위하여 Griess reagent 분석법 및 ELISA를 수행하였음
- 연골 기질 분해의 대표적인 효소인 MMPs의 생성 분석: SW1353 인체 연골세포에서 MMPs의 생성에 미치는 오미자 추출물의 효능을 검증하기 위하여 ELISA를 수행함
- 유전자 발현 분석: SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 염증 반응 분자들의 조절 유전자들(iNOS 및 cyclooxygenase-2, COX-2) 및 MMPs의 발현 증가에 미치는 오미자 추출물의 효능을 mRNA 및 단백질 발현 수준에서 조사하기 위하여 RT-PCR 및 Western blotting을 실시하였음
- 기타 기전 연구 수행: SW1353 인체 연골세포에서 오미자 추출물에 의한 IL-1 β 매개 관절염 억제에 미치는 기전 연구를 수행하기 위하여 NF- κ B 및 MAPKs 신호 경로의 관련성 여부를 조사하였음

③ 연구 수행 결과

- SW1353 인체 연골세포의 증식에 미치는 오미자 추출물의 영향: 오미자 추출물의 관절염 억제 효능 검증을 위한 처리 농도의 설정을 위하여 다양한 농도의 오미자 추출물(SF)을 단독 처리하거나 IL-1 β (40 ng/ml)를 1시간 전처리된 조건에서 다양한 농도의 오미자 추출물을 24시간 처리후 MTT assay를 수행하였음
- 오미자 추출물의 단독 처리 결과 500 μ g/ml 처리군까지는 뚜렷한 세포독성을 나타내지 않았지만, 그 이상의 농도 (700 및 1000 μ g/ml)에서는 SW1353 세포의 증식 억제가 관찰되었음(결과 6A) → 그러나 500 μ g/ml 이하의 오미자 추출물과 IL-1 β 를 동시에 처리하였을 경우, 유의적인 세포증식 억제 효과가 관찰되지 않았음(결과 6B)
- 따라서 SW1353 인체 연골세포를 이용한 추후 관절염 억제 관련 효능 검증 실험에서의 유효 오미자 추출물의 최고 농도를 500 μ g/ml으로 설정하였음

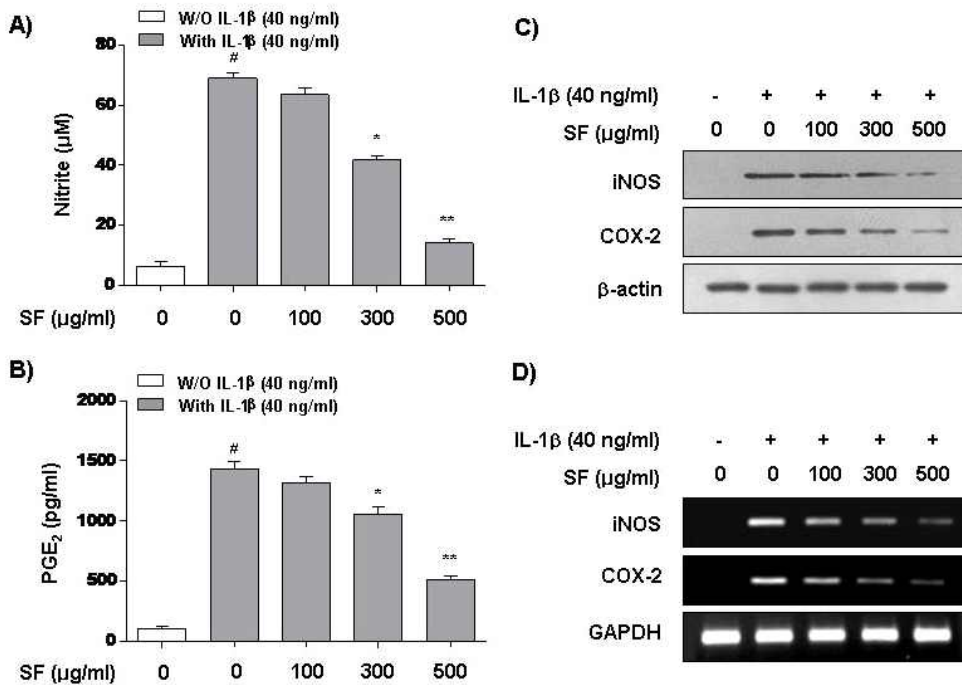


결과 6. SW1353 인체 연골세포의 증식에 미치는 IL-1 β 및 오미자 추출물의 영향

- SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 염증성 매개인자(NO 및 PGE₂)의 생성에 미치는 오미자 추출물의 영향: 퇴행성 관절염의 발병 및 진행 촉진 요인인 염증성 매개인자의 생성 억제에 미치는 오미자 추출물의 효능을 조사하기 위하여 IL-1 β 에 의하여 유도된 NO 및 PGE₂의 생성 증가에 미치는 영향을 Griess reagent 분석법 및 ELISA로 조사하였으며, 그들의 생성 조절 유전자인 iNOS 및 COX-2의 발현 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향을 RT-PCR 및 Western blotting 법으로 조사하였음

→ IL-1 β 의 처리에 의하여 SW1353 인체 연골세포에서 NO 및 PGE₂의 생성이 매우 증가되었고, iNOS 및 COX-2의 발현도 증가되었으나, 오미자 추출물이 전처리된 조건에서 배양된 SW1353 인체 연골세포에서 NO 및 PGE₂의 생성과 iNOS 및 COX-2의 mRNA 및 단백질의 발현이 유의적으로 억제되었음(결과 7)

→ SW1353 인체 연골세포에서 오미자 추출물이 전사수준에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하여 NO와 PGE₂의 생성을 억제하였을 것으로 나타남

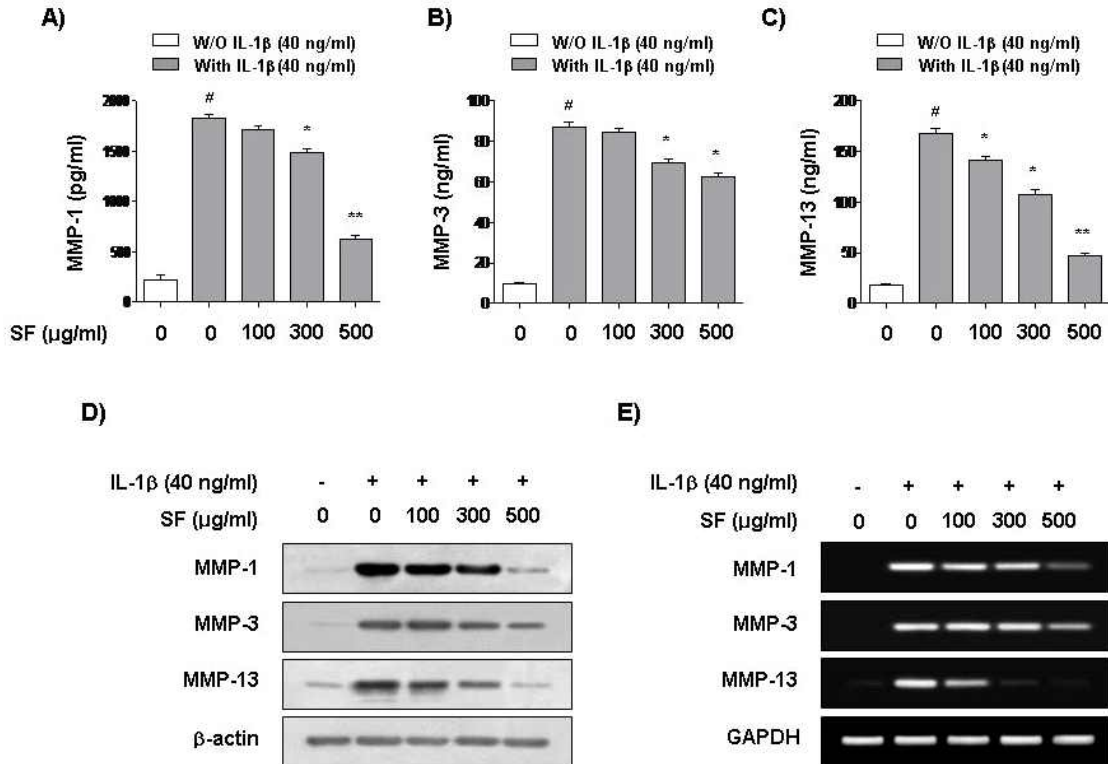


결과 7. SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 염증성 매개인자(NO 및 PGE₂)의 생성 및 조절 유전자들의 발현에 미치는 오미자 추출물의 영향

- SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 MMPs의 생성과 발현에 미치는 오미자 추출물의 영향: 관절염과 연관된 연골 기질 분해에 관여하는 주요 catabolic factor인 MMP-1, MMP-3 및 MMP-13의 생성과 발현에 미치는 오미자 추출물의 효능을 검증하기 위하여 IL-1 β 로 자극된 SW1353 세포의 MMPs 생성과 관련 유전자들의 발현 변화를 ELISA, RT-PCR 및 Western blotting법으로 조사하였음

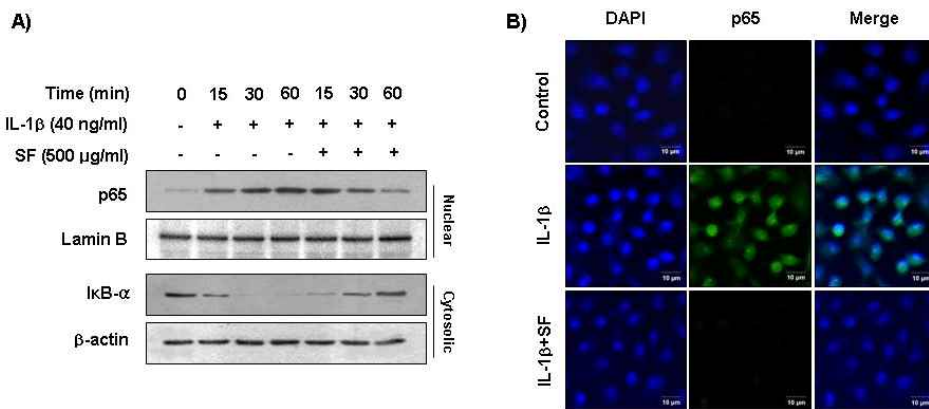
→ SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 의 처리에 의하여 조사된 세 가지 MMPs (MMP-1, MMP-3 및 MMP-13)의 생성 및 발현이 매우 증가 되었으나, 오미자 추출물이 전처리된 조건에서는 이들의 생성과 발현이 유의적으로 차단되었음(결과 8)

→ NO 및 PGE₂의 생성 억제 결과에서처럼, 오미자 추출물이 전사수준에서 이들 MMPs의 mRNA 및 단백질 수준에서 발현을 억제함으로써, 전사 수준에서의 발현 차단에 의한 그들의 세포 외 유리가 감소되었을 것으로 추정됨



결과 8. SW1353 인체 연골세포에서 IL-1β에 의한 MMPS의 생성 및 발현 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향

- IL-1β에 의한 SW1353 인체 연골세포의 NF-κB 활성화에 미치는 오미자 추출물의 영향: NF-κB는 염증성 매개인자 및 사이토카인뿐 만 아니라 다양한 MMPs의 유전자들 발현 조절에 핵심적인 전사 인자로 작용하기에, IL-1β에 의하여 활성화된 NF-κB에 미치는 오미자 추출물의 영향을 조사하였음
 - 이를 위하여 SW1353 인체 연골세포의 핵 및 세포질 단백질을 분리하여 Western blotting을 실시한 결과, IL-1β의 처리에 의하여 핵으로의 NF-κB 이동 증가는 IκB의 분해와 연계되어 있었지만, 오미자 추출물은 처리 농도 의존적으로 IκB의 분해를 차단하면서 NF-κB의 핵 내 이동을 효과적으로 차단하였음(결과 9A)
 - 아울러 NF-κB p65 항체를 이용한 형광 면역 염색법에 의해서도 IL-1β에 의한 NF-κB의 핵 내 이동이 오미자 추출물의 전처리에 의하여 완벽하게 차단되었음을 재확인하였음(결과 9B)
 - 이는 SW1353 인체 연골세포에서 IL-1β에 의한 염증성 매개인자 및 MMPs의 생성 증가를 위한 유전자들의 활성이 오미자 추출물 처리에 의하여 전사 수준에서 억제되었음을 보여 주는 결과로서 NF-κB가 IL-1β에 의한 염증 억제를 위한 핵심 조절인자로서 작용함을 의미하는 결과임



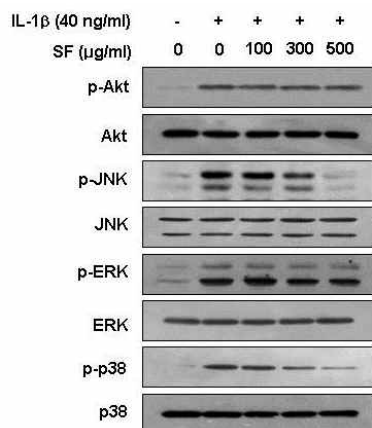
결과 9. IL-1 β 에 의한 SW1353 인체 연골세포의 NF- κ B 활성화 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향

- 오미자 추출물의 항관절염 효능에 미치는 세포신호 전달계의 영향: SW1353 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 catabolic factor 들의 활성화 증가 과정에는 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 및 MAPKs 신호 경로계의 활성화 동반되기 때문에 IL-1 β 에 의한 이들의 활성화에 미치는 오미자 추출물의 어떤 영향을 주는지를 조사하였음

→ 선행 보고 결과들에서처럼, IL-1 β 의 처리에 의하여 Akt 및 3가지 종류의 MAPKs (ERK1/2, JNK 및 p38 MAPK)가 모두 인산화되어 활성화가 증가되었음을 알 수 있었으나, 오미자 추출물의 처리에 의하여 JNK 및 p38 MAPK의 인산화가 모두 유의적으로 억제되었음(결과 10) → 이는 오미자 추출물의 관절염 억제 효능이 PI3K/Akt 경로와는 무관하며, JNK 및 p38 MAPK의 활성을 차단함으로써 이루어지고 있음을 보여주는 결과임

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 오미자 추출물이 IL-1 β 에 의한 NF- κ B, JNK 및 p38 MAPK 신호 경로의 활성을 차단함으로써 염증성 매개인자 및 기질 분해 촉진 효소(MMPs)의 발현을 억제하였음을 보여주는 것임



결과 10. IL-1 β 에 의한 SW1353 인체 연골세포의 PI3K/Akt 및 MAPKs의 활성화에 미치는 오미자 추출물의 영향

- 이상의 결과는 오미자 추출물이 관절염의 억제를 위한 기능성 식품 소재로서의 개발 가능

성이 매우 높음을 보여주는 것으로서, 이를 위한 주요 생리활성 지표의 발굴 및 동물 실험을 통한 효능 검증을 지속적으로 수행하여 관절염 개선 관련 건강기능식품 인정을 위한 자료로 활용할 것임

(다) 인체 연골세포 모델에서 상엽 추출물의 관절염 억제 효능 평가

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 두 번째 핵심 재료인 상엽[뽕나무(*Morus alba* L.)의 잎]의 관절염 억제 효능에 대한 검증을 위하여 퇴행성 관절염의 발병 원인인 염증성 매개인자 및 연골 기질 분해 효소 MMPs의 생성에 미치는 상엽 추출물의 효능을 확인하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 뽕나무(*Morus alba* L.) 잎(상엽, MF)의 열수 추출물
- 실험 모델: SW1353 인체 연골세포를 대상으로 대표적인 퇴행성 관절염 유발 cytokine인 IL-1 β 를 이용한 관절염 모델을 적용하였음
- 염증 반응 측정 항목: IL-1 β 에 의하여 유도된 대표적인 염증성 매개인자인 NO와 PGE₂의 생성에 미치는 상엽 추출물의 효능을 검증하기 위하여 Griess reagent 분석법 및 ELISA를 수행하였음
- 연골 기질 분해의 대표적인 효소인 MMPs의 생성 분석: MMPs의 생성에 미치는 상엽 추출물의 효능을 검증하기 위하여 ELISA를 수행하였음
- 유전자 발현 분석: IL-1 β 에 의한 염증 반응 분자들의 조절 유전자들(iNOS 및 COX-2) 및 MMPs의 발현 증가에 미치는 상엽 추출물의 효능을 mRNA 및 단백질 발현 수준에서 조사하기 위하여 RT-PCR 및 Western blotting을 실시하였음
- 기타 기전 연구 수행: 상엽 추출물에 의한 IL-1 β 매개 관절염 억제에 미치는 기전 연구를 수행하기 위하여 NF- κ B 및 MAPKs 신호 경로의 관련성 여부를 조사하였음

③ 연구 수행 결과

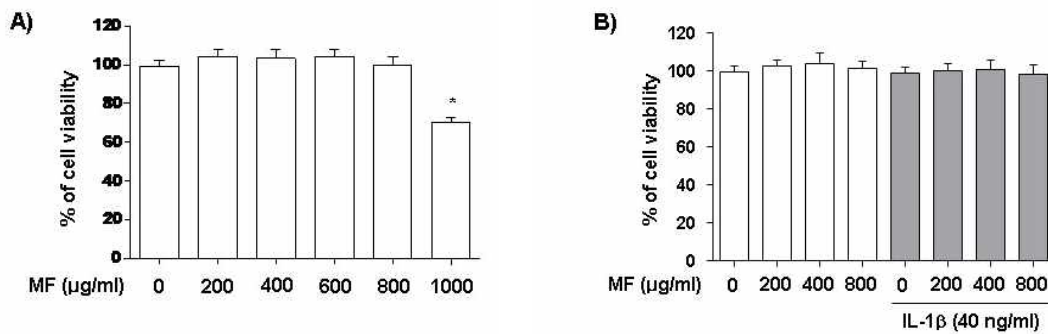
- SW1353 연골세포의 증식에 미치는 상엽 추출물의 영향: 상엽 추출물의 관절염 억제 효능 검증을 위한 처리 농도의 설정을 위하여 다양한 농도의 상엽 추출물(MF)을 단독 처리하거나 IL-1 β (40 ng/ml)가 1시간 전처리된 조건에서 농도의 상엽 추출물을 24시간 처리 후 MTT assay를 수행하였음
 - 상엽 추출물의 단독 처리 결과 800 μ g/ml 처리군까지는 뚜렷한 세포독성을 나타내지 않았지만, 그 이상의 농도 (1000 μ g/ml)에서는 유의적인 SW1353 세포 증식 억제가 관찰되었음(결과 11A)
 - 또한 800 μ g/ml 이하의 상엽 추출물과 IL-1 β 를 동시에 처리하였을 경우, 유의적인 세포증식 억제 효과가 관찰되지 않았음(결과 11B)
 - 따라서 유효 상엽 추출물의 최고 농도를 800 μ g/ml으로 설정하였음
- SW1353 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 MMPs의 생성과 발현에 미치는 상엽 추출물의 영향: 관절염 유발 관련 주요 catabolic factor인 MMPs의 생성과 발현에 미치는 상엽 추출물의 효능을 검증하기 위하여 IL-1 β 로 자극된 SW1353 세포의 MMPs 생성과 관련 유전자들의 발현 변화를 조사하였음
 - SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 의 처리에 의하여 조사된 MMPs 중 collagenase 계

열에 속하는 MMP-1 및 MMP-13의 생성 및 발현이 매우 증가 되었으나, 상업 추출물이 전처리된 조건에서는 이들의 세포 외 유출과 발현이 유의적으로 차단되었음(결과 12 및 13)

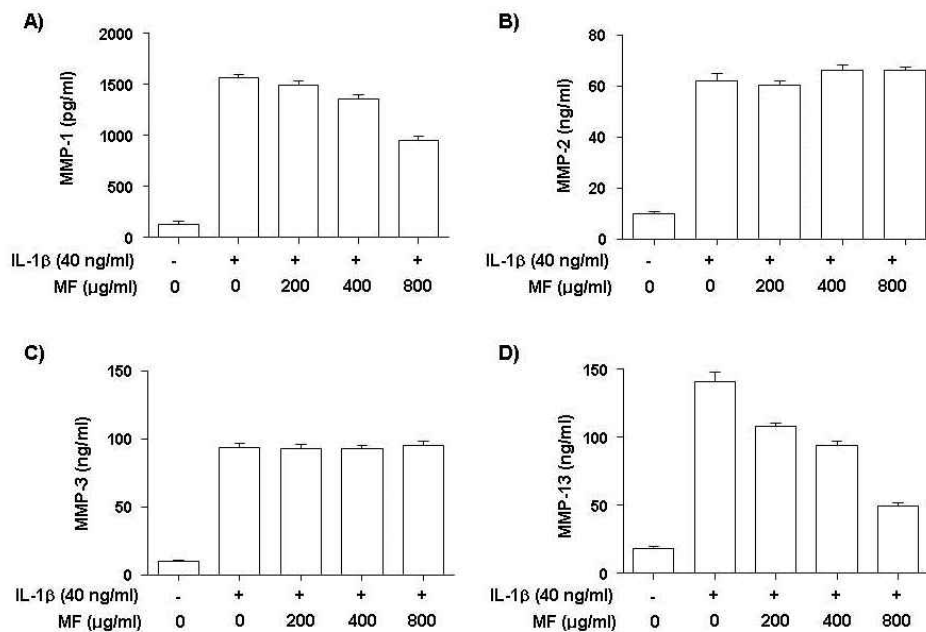
→ SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 의 처리에 의하여 조사된 MMPs 중 collagenase 계열에 속하는 MMP-1 및 MMP-13의 생성 및 발현이 매우 증가 되었으나, 상업 추출물이 전처리된 조건에서는 이들의 세포 외 유출과 발현이 유의적으로 차단되었음(결과 12 및 13)

→ 그러나 SW1353 인체 연골세포 IL-1 β 에 의한 MMP-2 및 MMP-3의 생성 발현에는 유의적인 효능을 나타내지 않았음

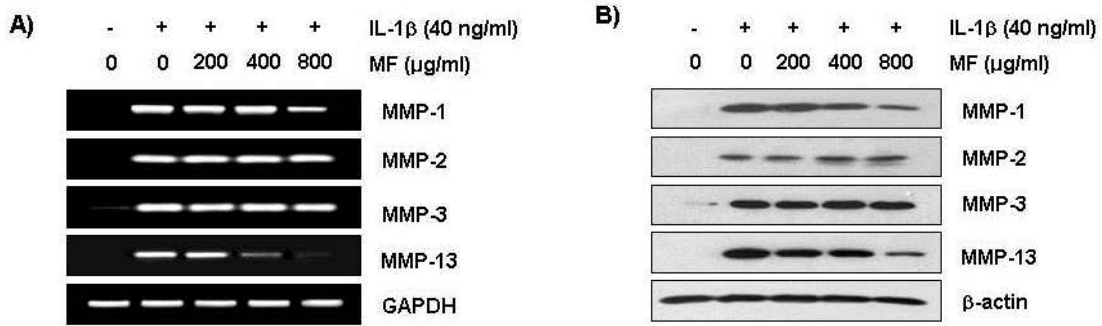
→ 또한 MMP-1 및 MMP-13이 상업 추출물 처리에 의하여 전사수준에서 이들의 발현을 억제하였을 것으로 추정됨



결과 11. SW1353 인체 연골세포의 증식에 미치는 IL-1 β 및 상업 추출물의 영향



결과 12. SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 MMPs의 생성 증가에 미치는 상업 추출물의 영향

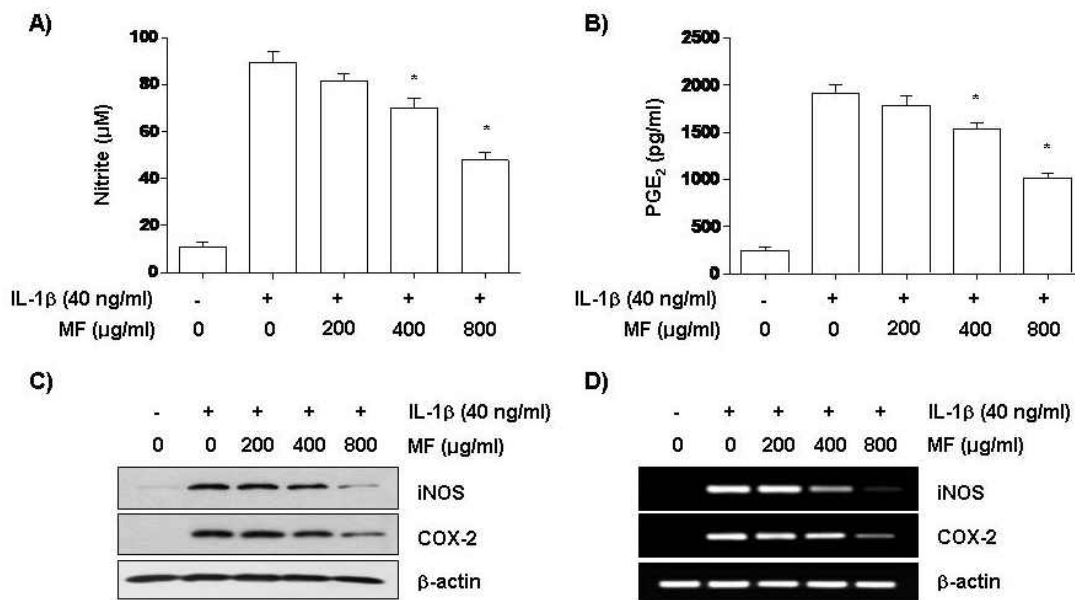


결과 13. SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 MMPs의 발현 증가에 미치는 상엽 추출물의 영향

- SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 염증성 매개인자(NO 및 PGE₂)의 생성에 미치는 상엽 추출물의 영향: 염증성 매개인자의 생성 억제에 미치는 상엽 추출물의 효능을 조사하기 위하여 IL-1 β 에 의하여 유도된 NO 및 PGE₂의 생성 증가에 미치는 영향과 그들의 생성 조절 유전자(iNOS 및 COX-2)의 발현에 미치는 상엽 추출물의 영향을 조사하였음

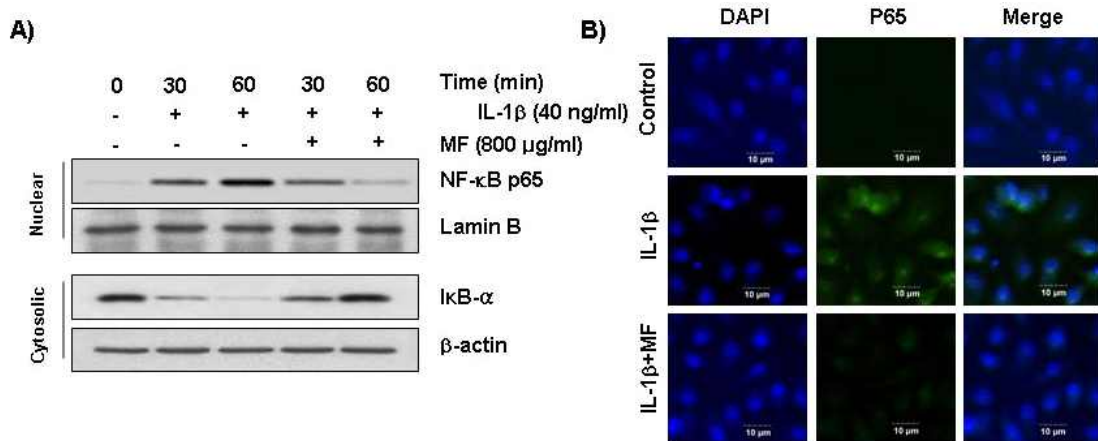
→ SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 의 처리에 의하여 염증성 매개인자인 NO 및 PGE₂의 생성이 매우 증가되었고, iNOS 및 COX-2의 발현도 증가되었으나, 상엽 추출물이 전처리된 조건에서는 NO 및 PGE₂의 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현이 유의적으로 억제되었음 (결과 14)

→ 상엽 추출물이 전사수준에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하여 NO와 PGE₂의 생성을 억제하였음을 의미하는 결과임



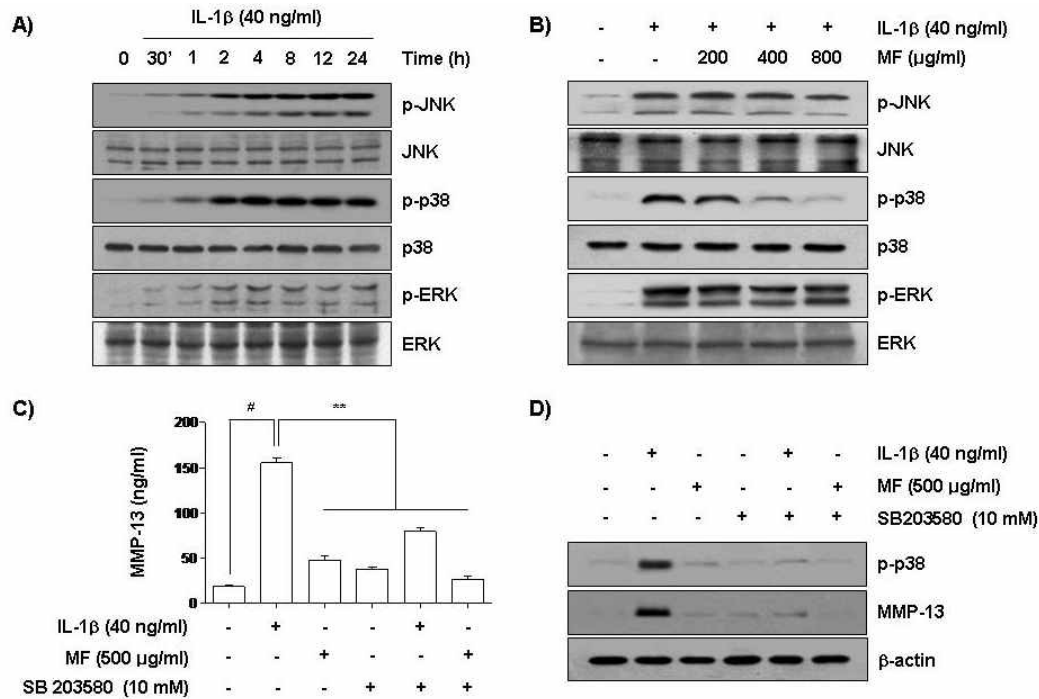
결과 14. SW1353 인체 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 염증성 매개인자(NO 및 PGE₂)의 생성 및 그들의 조절 유전자들 발현에 미치는 상엽 추출물의 영향

- IL-1 β 에 의한 SW1353 연골세포의 NF- κ B 활성화에 미치는 상엽 추출물의 영향: 이를 위하여 IL-1 β 및 상엽 추출물의 단독 및 복합 처리된 조건에서 배양된 SW1353 연골세포의 핵과 세포질 단백질을 분리하여 Western blotting을 실시하였음
 - IL-1 β 의 처리에 의하여 핵으로의 NF- κ B 이동 증가는 I κ B의 분해와 연계되어 있었지만, 상엽 추출물은 처리 농도 의존적으로 I κ B의 분해를 차단하면서 NF- κ B의 핵 내 이동을 차단하였음(결과 15A)
 - 아울러 면역 염색법에 의해서도 IL-1 β 에 의한 NF- κ B의 핵 내 이동이 차단되었음을 재확인하였음(결과 15B) → 이러한 결과는 IL-1 β 에 의한 염증성 매개인자 및 MMPs의 생성 증가를 위한 유전자들의 활성이 상엽 추출물 처리에 의하여 전사 수준에서 억제되었음을 암시하는 것임



결과 15. IL-1 β 에 의한 SW1353 인체 연골세포의 NF- κ B 활성화에 미치는 상엽 추출물의 영향

- 상엽 추출물의 항관절염 효능과 MAPKs 세포신호 전달계의 연관성: SW1353 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 catabolic factor 들의 활성 억제와 MAPKs 신호계의 연관성을 조사한 결과, IL-1 β 의 처리에 의하여 SW1353 세포에서 3가지 종류의 MAPKs (ERK1/2, JNK 및 p38 MAPK)가 상엽 추출물 처리 시간의 증가에 따라 인산화의 정도가 모두 상승하였음(결과 16A)
 - 상엽 추출물의 전처리는 p38 MAPK의 인산화만을 차단시켰으며, JNK 및 ERK의 활성화에는 큰 영향을 주지 못하였음(결과 16B)
 - 상엽 추출물의 항관절염 효능과 p38 MAPK의 관련성을 조사하기 위하여 p38 MAPK 선택적 저해제인 SB203580을 전처리하였을 경우, IL-1 β 처리에 의하여 증가하였던 MMP-13의 생성이 유의적으로 억제되었으며, 상엽 추출물과 SB203580을 동시에 전처리하였을 경우 MMP-13의 생성 억제 효능이 더욱 증가하였음(결과 16C)
 - 또한 IL-1 β 처리에 의한 p38 MAPK의 인산화가 상엽 추출물과 SB203580을 동시에 처리하였을 경우 거의 완벽하게 차단되었음(결과 16D)
 - 이는 상엽 추출물의 관절염 억제 효능이 MAPKs 경로 중 p38 MAPK 경로 선택적 활성 억제를 통하여 이루어지고 있음을 의미하는 결과임



결과 16. IL-1 β 에 의한 SW1353 인체 연골세포의 PI3K/Akt 및 MAPKs의 활성화에 미치는 상엽 추출물의 영향

- 상엽 추출물의 이화학적 성분 함량 검출: 결과표에서 알 수 있듯이 3대 영양소 중, 탄수화물의 함량은 61.8 g/100 g으로 측정되었으며, 단백질과 지방의 함량은 각각 11.2 g/100 g 및 0.2 g/100 g으로 나타났음

- 비타민의 경우 C와 E를 대상으로 조사한 경우 검출이 되지 않았음

- 주요 아미노산의 경우 아스파르산의 함량이 가장 높게 함유되어 있었으며, 글루타민산, 프롤린, 알라닌, 글리신, 스테오닌 및 리신 순서로 높은 함량을 보였음

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 상엽 추출물이 IL-1 β 에 의한 p38 MAPK 신호 경로의 활성을 차단함으로써 염증성 매개인자 및 기질 분해 촉진 효소(MMPs)의 발현을 억제함으로써 그들의 세포외 기질로의 유리를 차단하였음을 보여주는 것임

- 현재까지 상엽에 함유되어있는 강력한 생리활성물질로는 flavonoid계열 물질인 kaempferol을 포함한 kuwanon E, cudraflavone B, and 4'-O-methylkuwanon E과 lectin 계열 물

시료명 : 상엽(분말)		
항목	분석결과	단위
수분	8.4	g/ 100g
지방	0.2	g/ 100g
단백질	11.2	g/ 100g
회분	18.4	g/ 100g
탄수화물	61.8	g/ 100g
식이섬유	8.3	g/ 100g
비타민 C	0.0	mg/ 100g
비타민 E	0.0	mg/ 100g
아스파르트산	1222.2	mg/ 100g
스테오닌	232.3	mg/ 100g
세린	153.0	mg/ 100g
글루타민산	750.0	mg/ 100g
프롤린	572.6	mg/ 100g
글리신	269.3	mg/ 100g
알라닌	288.3	mg/ 100g
발린	172.5	mg/ 100g
메치오닌	8.1	mg/ 100g
이소로이신	94.5	mg/ 100g

질들, chalcone 및 2-arylbenzofuran 유도체 등이 보고되어 지고 있음 → 지표 물질의 발굴과 그에 의한 관절염 억제 효능에 관한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것임

로이신	156.1	mg/ 100g
티로신	93.2	mg/ 100g
페닐알라닌	115.6	mg/ 100g
리신	188.3	mg/ 100g
히스티딘	49.3	mg/ 100g
알기닌	84.0	mg/ 100g

- 이상의 결과는 상업 추출물이 퇴행성 관절염의 억제를 위한 기능성 식품 소재로서의 개발

가능성이 매우 높음을 보여주는 것으로서, 이를 위한 주요 생리활성 지표의 발굴 및 동물 실험을 통한 효능 검증을 수행할 것이며, 관절염 개선 관련 건강기능식품 인정을 위한 기초 자료로 활용할 것임

(라) 오미자, 상업추출물 및 복합물에 대한 *in vivo* 단회 독성평가

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 핵심 재료인 오미자 및 상업 추출물에 대한 퇴행성 관절염 예방 및 억제기전을 검증을 위하여 *in vivo* 모델계에서 독성평가를 수행하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 20% 에탄올 오미자 추출물, 상업 열수추출물, 오미자+ 상업(1:1 비율) 복합물
- 실험 모델: 6주령의 SPF ICR 마우스 이용하였음
- 투여용량 및 투여 방법: 25마리의 실험동물을 5마리씩 무작위로 분리하고 체중을 측정하고, 미국 환경보호청(US environmental protection agency)에서 무해 물질 분류 기준인 5,000 mg/kg을 최고용량으로, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)의 급성독성시험 허용 한계용량인 2,000 mg/kg을 고용량군으로, 1,000 mg/kg을 중용량군으로, 500 mg/kg을 저용량군으로 설정함
- 투여경로: 경구투여법을 사용하였으며 모든 실험동물은 투여 전 18시간 동안 절식시킨 후, 경구투여용 금속제 sonde를 이용하여 위 내로 강제 경구투여를 시행(투여당일의 체중을 기준으로 5 ml/kg을 단회 투여함)
- 일반증상 관찰 및 체중측정: 투여 당일에는 투여 후 6시간까지 매 시간, 투여 후 1일부터 14일까지는 1일 1회 이상씩 일반 상태의 변화, 중독 증상의 발현, 사망 동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험 물질에 의하여 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 관찰하며, 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 후 2일 간격으로 체중 변화를 측정함
- 부검: 실험동물을 희생하기 전날 밤 18시간 절식시키고 마취 후 개복하여 혈액을 채취함. 혈액 채취 및 방혈 후, 주요 내부 장기의 병변을 육안적으로 관찰하고, 간, 심장, 신장, 폐, 비장, 부신, 고환, 흉선, 침샘, 뇌 및 림프절을 적출하여 무게를 측정함
- 혈액학적 검사: 백혈구(white blood cell, WBC), 적혈구(red blood cell, RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), 혈구 hemoglobin 평균 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈구 hemoglobin 농도(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 혈구 hemoglobin 부피(mean corpuscular volume, MCV), 혈소판 농도(platelet, PLT) 등을 혈구분석기(Coulter counter)를 이용하여 측정함
- 혈액 생화학적 검사: 오미자, 상업추출물 및 복합물 처리에 따른 간 기능 포함 독성 평가를 위하여 albumin, 총 bilirubin, alkaline phosphatase (ALP), glutamic oxaloacetic

transaminase (GOT; aspartate aminotransferase, AST), glutamic pyruvic transaminase (GPT; alanine aminotransferase, ALT), glucose, blood urea nitrogen (BUN), 총 cholesterol, triglyceride 등을 자동혈액생화학분석기로 측정함

③ 연구 수행 결과

- 치사율 및 LD₅₀값: ICR 마우스를 대상으로 SF(오미자 추출물), MF (상엽 추출물) 및 MHMIX (복합물)가 유발하는 독성 징후와 사망개체 수를 관찰한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같음
 - 2500 및 5000 mg/kg 용량의 SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여한 실험군과 멸균 생리식염수를 단회 경구 투여한 대조군을 14일 동안 관찰한 결과, 최고 용량 투여군을 포함한 모든 투여군에서 사망동물은 발생되지 않았음
 - 따라서 ICR 마우스에서 SF, MF 및 MHMIX에 의한 독성학적 영향을 받지 않는 최소치사량(minimal lethal dose)은 5,000 mg/kg을 초과하는 것으로 관찰되었으며, 또한 SF, MF 및 MHMIX에 의한 LD₅₀의 경우에도 5,000 mg/kg 이상으로 추정됨
- 체중 변화: 2500 및 5000 mg/kg 용량의 SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여한 실험군과 멸균생리식염수를 단회 경구 투여한 대조군의 체중 변화를 관찰한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같음
 - 경구 투여 후 SF, MF 및 MHMIX 투여군과 대조군 모두 투여 전 체중에 비하여 시간 경과에 따른 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 투여 전과 투여 후 모두 대조군과 모든 실험물질 투여군(SF, MF 및 MHMIX) 사이에 유의적인 체중변화의 차이는 나타나지 않았으므로 SF, MF 및 MHMIX는 독성이 없는 것으로 판단됨

Table 1. Mortality of ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX for 14 days

Group	Days after treatment															LD ₅₀ (mg/kg)	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
CON	0/5*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
SF ₁	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
SF ₂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5000
MF ₁	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	mg/kg
MF ₂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
MHMIX	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

CON; Control group, SF₁; SF 2500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5000 mg/kg (day) medication group

*; Values are expressed as Number of dead animals/ Number of animals examined

- 부검 소견 및 장기무게 변화: 멸균생리식염수를 단회 경구 투여한 대조군과 SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여한 실험군을 대상으로 14일간의 관찰기간 종료 후 모든 ICR 마우스를 부검하여 주요 장기에 대한 육안적 소견을 관찰한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같음
 - 부검 결과 대조군과 실험군 등의 모든 실험동물에서 본 실험물질의 투여에 의하여 이상

이 유발될 것으로 의심되는 주요 내부 장기에 대한 어떠한 육안적 이상소견이나 이상병변도 나타나지 않았음

→ 또한 실험동물의 장기무게 변화를 관찰한 결과 흉선, 폐, 심장, 비장, 간, 신장, 고환, 뇌 모두에서 정상 대조군과 비교하여 실험물질 투여 농도 증가에 따른 유의적인 변화가 나타나지 않았음

Table 2. Body weights change of ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX for 16 days

Group	No. of animals	Body weights (g)								
		0 day	2 day [*]	4 day	6 day	8 day	10 day	12 day	14 day	16 day
CON	5	27.11±0.70	27.95±0.89	29.81±1.38	30.78±1.74	30.95±1.81	32.29±2.26	32.92±2.26	33.47±2.48	33.03±2.50
SF ₁	5	27.15±0.98	27.52±1.53	29.53±2.84	30.61±2.59	30.80±2.86	32.06±2.29	32.56±2.36	33.29±2.30	33.49±1.64
SF ₂	5	27.35±1.30	28.98±1.48	27.96±2.05	29.27±1.39	29.55±1.51	31.47±1.19	31.99±1.86	32.38±1.55	32.90±1.49
MF ₁	5	26.64±0.39	28.26±1.78	28.96±0.32	30.10±0.51	29.93±0.66	31.56±1.22	31.15±1.51	32.98±0.82	33.71±1.38
MF ₂	5	26.81±1.76	28.60±1.36	29.22±1.28	30.21±1.13	30.61±1.45	31.90±1.38	32.62±1.34	33.05±1.60	32.35±1.06
MHMIX	5	27.06±0.51	28.01±0.24	28.78±0.88	29.92±1.07	30.11±1.06	31.89±1.23	32.75±0.89	33.23±1.05	33.66±0.98

CON; Control group, SF₁; SF 2500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5000 mg/kg (day) medication group

The data are presented as mean ± SD.

^{*}; Day of treatment after SF, MF and MHMIX

Table 3. Organ weights of ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX

Group	No. of animals	Organ weights (g)							
		Thymus	Lung	Heart	Spleen	Liver	Kidney	Testis	Brain
CON	5	0.057±0.014	0.188±0.014	0.145±0.012	0.123±0.022	1.770±0.213	0.559±0.047	0.194±0.017	0.470±0.024
SF ₁	5	0.062±0.015	0.186±0.011	0.142±0.011	0.108±0.006	1.880±0.075	0.559±0.106	0.190±0.073	0.466±0.023
SF ₂	5	0.053±0.008	0.174±0.015	0.133±0.011	0.107±0.006	1.778±0.079	0.529±0.065	0.194±0.011	0.467±0.025
MF ₁	5	0.060±0.015	0.183±0.009	0.139±0.008	0.123±0.013	1.805±0.229	0.545±0.078	0.205±0.008	0.491±0.021
MF ₂	5	0.054±0.010	0.180±0.011	0.133±0.005	0.109±0.026	1.678±0.190	0.536±0.038	0.205±0.013	0.464±0.010
MHMIX	5	0.061±0.014	0.180±0.007	0.138±0.010	0.111±0.016	1.872±0.178	0.540±0.079	0.198±0.005	0.462±0.034

CON; Control group, SF₁; SF 2500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5000 mg/kg (day) medication group

The data are presented as mean ± SD.

- 혈액학적 검사: 평균생리식염수, SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여하고 14일 경과 후 혈액학적인 변화를 확인하기 위하여 혈구분석기를 이용하여 WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC 및 PLT를 측정된 결과는 Table 4에 나타난 바와 같음

→ 대조군과 실험군에서 채혈된 전혈을 이용하여 혈액학적 검사를 실시한 결과 PLT의 경우 대조군과 비교하여 SF, MF 및 MHMIX 처리에 의한 약간의 감소현상이 나타났지만 유의성이 없는 것으로 확인되었으며, 그 외의 모든 항목에서도 대조군과 실험군 사이의 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았음

- 혈액 생화학적 검사: 평균생리식염수를 단회 경구 투여한 대조군과 SF, MF 및 MHMIX를 단회 경구 투여한 실험군을 대상으로 14일 경과 후 혈액생화학적 변화를 확인하기 위하여 자동혈액생화학분석기를 이용하여 ALT, AST, BUN, CREA, LDH를 측정된 결과는 Table 5에 나타난 바와 같음

→ 혈청을 이용하여 혈액생화학적 검사를 실시한 결과 SF, MF 및 MHMIX 단회 경구 투여에 의하여 검사 항목에 따른 약간의 변화가 나타나는 것으로 확인되었지만 전체적으로 모든 지표 수치에서 대조군과 실험군 사이의 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았음

Table 4. Levels of hematological analysis in ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX

Group	No. of animals	WBC (10 ³ /μL)	RBC (10 ⁶ /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (10 ³ /μL)
CON	5	2.31±0.74	8.69±1.01	15.18±1.72	58.75±6.54	67.70±2.83	17.45±0.62	25.78±0.83	1442.50 ±385.37
SF ₁	5	2.05±0.62	8.80±0.60	15.33±0.84	57.77±4.57	65.57±0.95	17.40±0.44	26.53±0.65	1471.67 ±144.23
SF ₂	5	2.01±0.30	8.44±0.28	14.50±0.36	55.83±2.02	66.20±2.09	17.23±0.61	26.03±0.40	1267.00 ±219.34
MF ₁	5	2.45±0.12	8.72±0.25	14.85±0.21	58.00±1.27	66.60±0.42	17.10±0.28	25.65±0.21	1461.50 ±154.86
MF ₂	5	2.37±0.18	8.90±0.49	15.33±0.32	58.37±1.91	65.73±3.71	17.27±0.60	26.30±0.98	1362.33 ±97.21
MHMIX	5	2.28±0.86	8.74±0.33	15.37±0.61	57.70±2.86	66.00±0.82	17.53±0.15	26.60±0.44	1340.00 ±213.16

CON; Control group, SF₁; SF 2500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5000 mg/kg (day) medication group
The data are presented as mean ± SD.

Table 5. Levels of serum biochemistry analysis in ICR mice orally treated with SF, MF and MHMIX

Group	No. of animals	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	CREA (mg/dL)	LDH (U/L)
CON	5	33.00±3.39	111.20±21.32	28.30±4.82	0.25±0.04	892.00±39.70
SF ₁	5	34.00±4.75	121.50±13.84	25.30±2.83	0.28±0.00	954.00±30.24
SF ₂	5	26.50±3.54	136.50±9.19	21.30±0.85	0.25±0.04	878.00±25.20
MF ₁	5	32.50±4.95	122.00±11.31	24.05±1.34	0.27±0.04	995.00±25.66
MF ₂	5	24.00±2.83	111.00±12.73	21.15±0.64	0.27±0.01	917.50±35.06
MHMIX	5	34.00±2.56	130.00±10.50	35.40±0.00	0.30±0.00	920.00±15.22

CON; Control group, SF₁; SF 2500 mg/kg (day) medication group, SF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MF₁; MF 2500 mg/kg (day) medication group, MF₂; SF 5000 mg/kg (day) medication group, MHMIX; MHMIX 5000 mg/kg (day) medication group
The data are presented as mean ± SD.

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 오미자, 상업추출물 및 복합물이 실험동물에 대하여 급성 독성이 없다는 것을 제시하는 것으로서 경구투여에 있어 비교적 안전한 물질이라는 것이 판단됨
- 이는 오미자, 상업 추출물 및 복합물이 급성 독성이 없음으로 인해 노화 및 염증 연관 다양한 질환의 제어를 위한 기능성 소재로서 활용성이 매우 높을 수 있음을 보여주는 결과임

(마) *In vivo* 퇴행성 관절염 모델계에서 오미자 추출물의 퇴행성 관절염 예방 및 억제 효능

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 핵심 재료인 오미자의 관절염 억제 효능에 대한 검증을 위하여 MIA로 유도된 *in vivo* 퇴행성 관절염 모델계에서 관절염의 발병 원인인 염증성 매개인자, 연골 기질 분해 효소인 matrix metalloproteinases (MMP-13) 및 연골손상 및 골관절염 유발인자들의 생성에 미치는 오미자 추출물의 효능을 확인하고자 함

② 연구 수행 방법

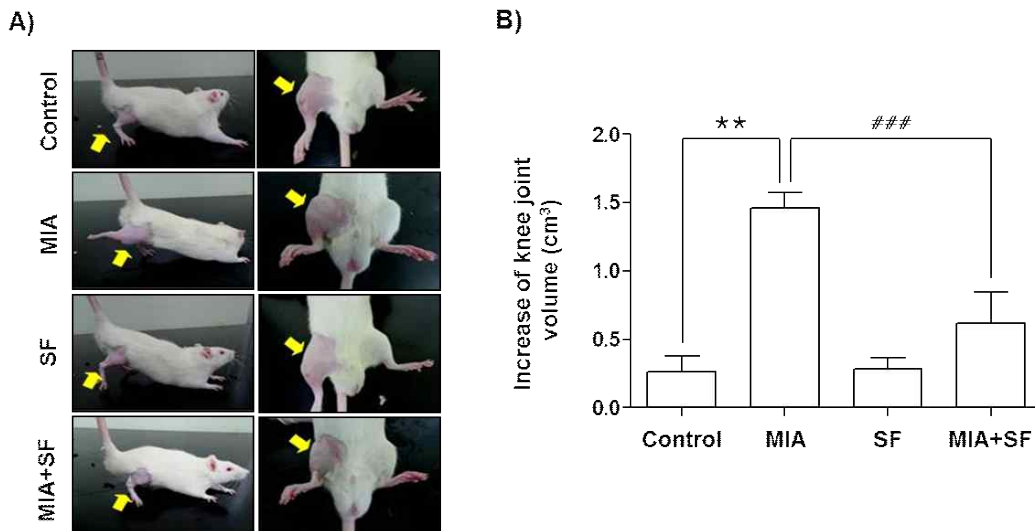
- 연구 재료: 20% 에탄올 오미자 추출물
- 실험 모델: 수컷 6주령의 SD-Rat (170-200 g)
- 사육환경: 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, light-dark cycle
- 관절염 유발: Monosodium iodoacetate (MIA) 용액은 주사용 생리식염수에 5 mg/ml의 농도로 제조하고, 실험동물을 마취시킨 후 오른쪽 슬관절 부위를 중심으로 전면을 제모하고 소독한 후 슬관절 강내로 각 개체당 MIA 용액을 무릎연골 중앙부위에 주사하여 퇴행성 관절염 유발 여부를 7일간 관찰함
 - 정상군은 슬관절 강내로 주사용 생리식염수 동일한 방법으로 주사하여 사용함
- 실험군의 분류 및 경구투여: MIA 유도 골관절염을 유발한 7일 후에 각 개체의 체중을 측정하고, 육안관찰을 통해 체중과 유발정도가 고르게 8마리씩 군 배정함
 - 정상군(normal group)은 물만 경구 투여하고, 대조군은 MIA를 처리한 후 물을, 시료처리군은 MIA를 처리한 후 시료를 2주간 경구 투여함
- 육안 관찰: 고정된 우측 경골 근위단 관절연골 주변을 깨끗이 정리하여 사진촬영하고 육안적으로 관절 연골표면의 손상정도를 확인함
- 병리조직학적 평가를 위한 표본제작 및 염색 : 채취 한 슬 관절조직을 이용하여 조직 슬라이드를 제작하고 염증성 침윤 정도를 평가하기 위해 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하고, 연골의 퇴행성 정도를 측정하기 위하여 safranin-O fast green (SOFG) 염색을 실시함
- 병리조직학적 골관절염 지수의 평가 : 조직병리 검경 항목은 연골하골 변화(Subchondral bone change), 연골세포 괴사(chondrocyte necrosis), 연골 침식(cartilage erosion), 골극형성(osteophyte formation) 및 연골 갈라짐(cartilage cleft)으로 각 항목당 0-5점까지 총 25점으로 평가함
- 연골 흡수 지표(MMP-13) 활성 측정: 연골 염증성 인자 중 MMP-13의 발현 확인을 위해 rat에서 분리한 연골을 단백질을 추출하여 ELISA kit를 이용하여 MMP-13의 활성을 측정함
- 혈중 prostaglandins 농도측정: MIA를 이용한 퇴행성 관절염 동물모델에서 염증 및 통증

유발인자인 prostaglandin의 생성을 억제하는 효능을 측정하기 위해 Prostaglandin ELISA 이용하여 혈중 내 prostaglandins농도를 측정함

- 활액 내 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6) 함량 측정: 슬관절에서 분리한 활액 내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 함량은 ELISA kit 측정함

③ 연구 수행 결과

- MIA에 의한 염증성 부종에 미치는 오미자 추출물의 영향: MIA로 유도된 퇴행성 관절염 모델에서 오미자 추출물에 의한 관절 부종을 확인하였음
→ 정상군에 비해 MIA에 의해 증가되었던 부종과 무릎의 팽창(knee joint swelling)이 오미자 추출물에 의해서 현저히 감소됨을 확인(결과 17)



결과 17. MIA에 의해 유도된 골관절염 모델 동물에서 부종 및 무릎 관절 팽창에 미치는 오미자 추출물의 영향

• 병리조직학적 변화:

- a. Hematoxylin & Eosin 염색: 조직 염색 후 100배 비율로 관찰한 결과, 정상군의 관절은 활막 조직이 정상적으로 위치한 반면, MIA군은 관절 주변에 활막 세포의 과다침투로 인해 연골과 뼈의 침윤으로 활막 조직의 손실이 나타났음

→ 오미자 추출물군은 대조군에서 비해서 연골과 뼈의 침윤 등이 상대적으로 감소하였음 (결과 18A 및 B)

- b. Safranin-O 및 Toluidin blue 염색: 조직 염색 후 100배 비율로 관찰한 결과, 정상군의 관절은 연골조직이 정상적으로 위치하였음

→ MIA군은 관절 주변에 염증세포의 침투가 일어나 붉게 염색된 정상 연골 조직이 MIA에 의해 파괴되어, proteoglycan 조직이 사라진 것을 관찰할 수 있었음

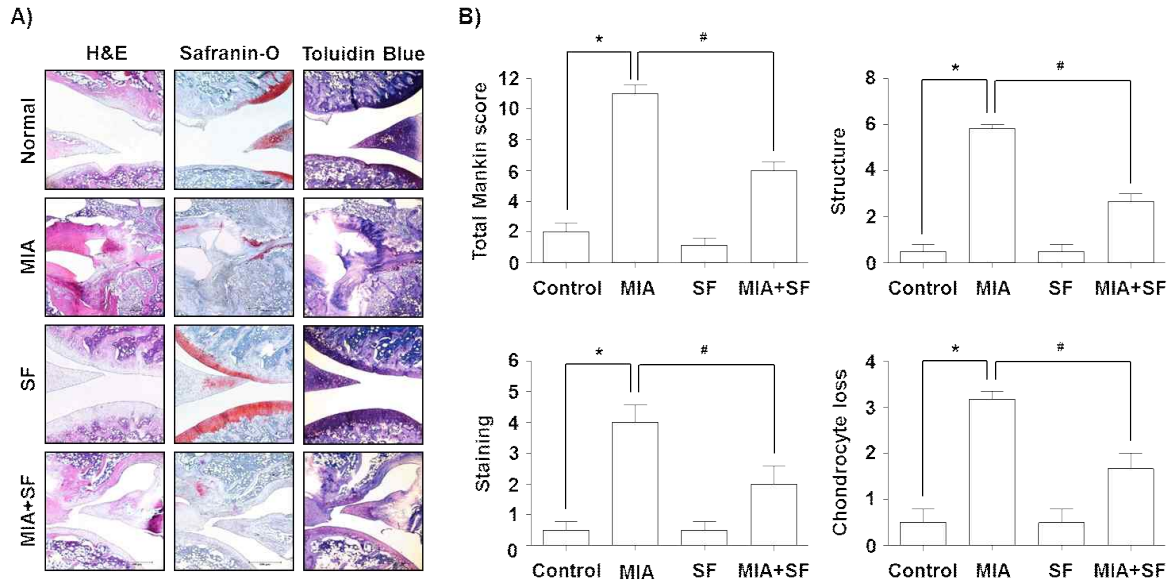
→ 오미자 추출물군은 관절면에 MIA군에서 비해 연골과 뼈의 침윤 등이 적었으며, 붉게 염색된 proteoglycan 조직이 활막 주변에 많이 분포하였음(결과 18A 및 B)

- c. Toluidin blue 염색: 조직 염색 후 100배 비율로 관찰한 결과, 정상군의 관절은 연골조직이 정상적으로 위치하였음

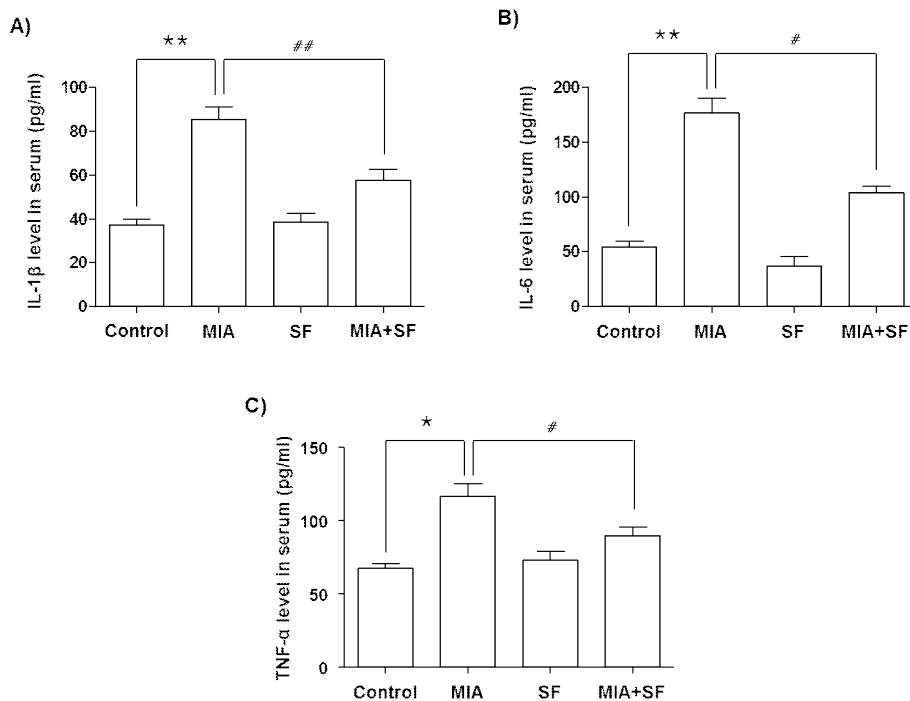
→ MIA군은 관절 주변에 염증세포의 침투가 일어나 보라색으로 염색된 정상 연골세포들이

MIA에 의해 파괴되어, chondrocyte loss가 관찰됨

→ 오미자 추출물군은 관절면에 MIA군에서 비해 연골세포가 많이 분포하고 있음을 확인할 수 있었음(결과 18A 및 B)



결과 18. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물에서 오미자 추출물 투여 후 관절의 조직 병리학적 변화 결과



결과 19. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물의 혈청 내 염증성 사이토카인의 생성 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향

- MIA에 의한 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)의 생성에 미치는 오미자 추출물의 영향: 퇴행성 관절염의 발병 및 진행 촉진 요인인 염증성 사이토카인의 생성 억제에

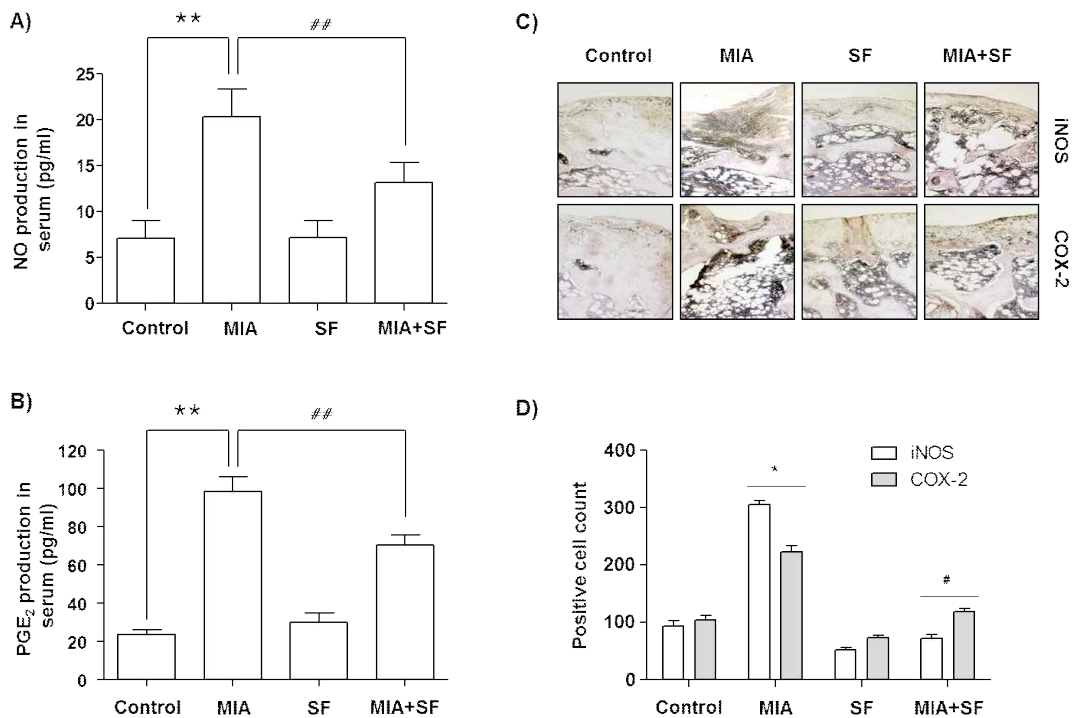
미치는 오미자 추출물의 효능을 조사하기 위하여 MIA에 의하여 유도된 사이토카인의 생성 증가에 미치는 영향을 ELISA로 조사하였음

→ 정상군에 비해 MIA군에서는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성이 모두 매우 증가되었으나, 오미자 추출물이 처리된 조건에서는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성이 유의적으로 억제되었음(결과 19)

- MIA에 의한 염증성 매개인자(NO 및 PGE₂)의 생성에 미치는 오미자 추출물의 영향: 염증성 매개인자의 생성 억제에 미치는 오미자 추출물의 효능을 조사하기 위하여 MIA에 의하여 유도된 NO 및 PGE₂의 생성 증가에 미치는 영향과 그들의 생성 조절 유전자(iNOS 및 COX-2)의 발현에 미치는 오미자 추출물의 영향을 조사하였음

→ 정상군에 비해 MIA군에서 NO 및 PGE₂의 생성이 매우 증가되었고, 조직생화학적염색에서 iNOS 및 COX-2의 발현도 증가되었으나, 오미자 추출물이 처리된 조건에서는 NO 및 PGE₂의 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현이 유의적으로 억제되었음

→ 오미자 추출물이 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하여 NO와 PGE₂의 생성을 억제하였음을 의미하는 결과임(결과 20)

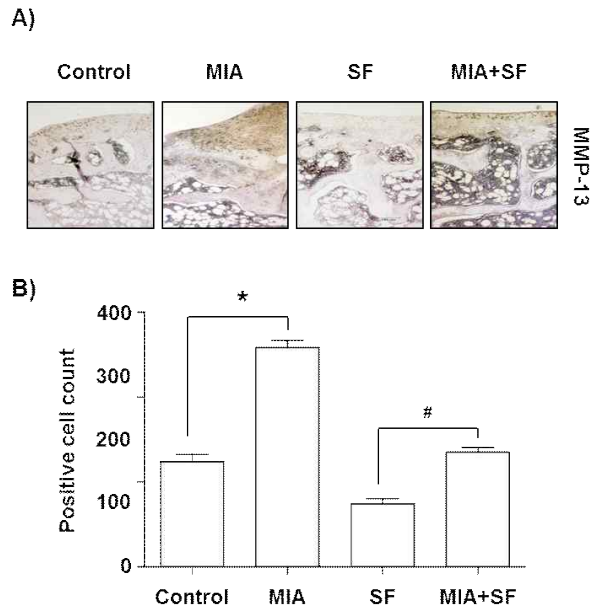


결과 20. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물의 혈청 및 관절 조직에서의 염증성 인자 생성 및 발현 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향

- MIA에 의한 MMP-13의 발현에 미치는 오미자 추출물의 영향: 관절염 유발 관련 주요 catabolic factor인 MMP-13의 발현에 미치는 오미자 추출물의 효능을 검증하기 위하여 MIA로 유도된 Rat의 무릎연골의 MMP-13 발현 변화를 조직생화학적 염색을 통해서 조사하였음

→ 정상군에 비해 MIA군에서 collagenase 계열에 속하는 MMP-13의 발현이 매우 증가되었으나, 오미자 추출물이 처리된 조건에서는 이들의 발현이 유의적으로 차단되었음(결

과 21)

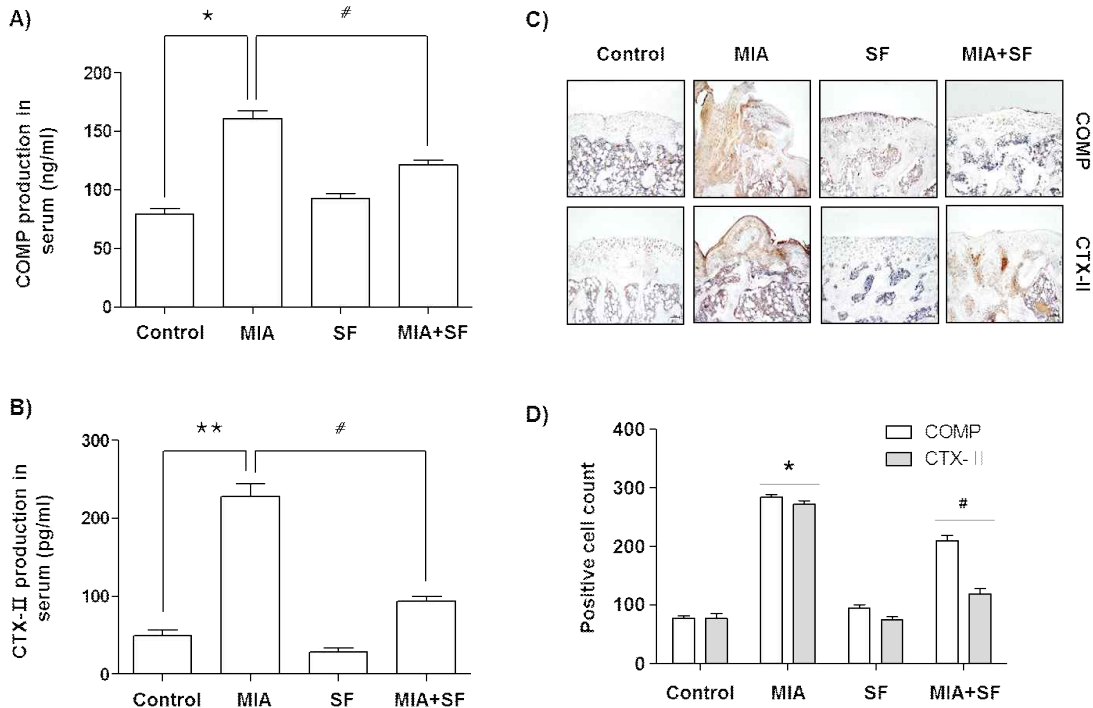


결과 21. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물의 관절 조직에서 MMP-13의 발현 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향

- MIA에 의한 연골손상 및 골관절염 지표에 미치는 오미자 추출물의 영향: 혈액내의 연골손상 및 골관절염 지표에 미치는 오미자 추출물의 효능을 검증하기 위하여 MIA로 유도된 Rat의 혈액에서 COMP (cartilage oligomeric matrix protein) 및 CTX-II (C-telopeptide of type II collagen) 생성 및 발현변화를 조사하였음
 - 정상군에 비해 MIA군에서 COMP 및 CTX-II의 생성 및 발현이 증가되었으나, 오미자 추출물군에서는 이들의 생성 및 발현이 유의적으로 감소되었음(결과 22)
- 몸무게 및 주요 장기 무게의 변화 분석: 비록 대조군의 경우 실험 기간의 증가에 따라 점진적인 몸무게의 증가를 보였지만, MIA처리군에서는 대조군에 비하여 상대적인 몸무게의 증가 정도가 높았음
 - 그러나 오미자 추출물 투여에 의하여 대조군 수준까지는 아니지만 유의적인 감소 현상이 관찰되었음
 - 또한 신장, 비장 및 간의 무게도 MIA 처리군에서 상승하였으나, 오미자 추출물 투여에 의하여 감소되는 경향성을 보였음

MIA에 의하여 유도된 관절염 쥐의 몸무게 및 주요 장기 변화에 미치는 오미자 추출물의 영향

실험군	몸무게 변화(g)					신장(g)	비장(g)	간(g)
	0주차	1주차	2주차	3주차	4주차			
Control	214.25	253.38	288.63	312.13	325.63	2.27	0.73	12.48
MIA	224.38	281.75	332.75	373.38	410.63	2.63	0.81	16.04
SF	216.50	243.13	282.38	330.38	332.63	2.20	0.69	11.29
MIA+ SF	216.38	263.25	323.63	344.63	379.00	2.43	0.72	13.77



결과 22. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물의 혈청 및 관절 조직에서의 COMP 및 CTX-II의 생성 및 발현 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 오미자 추출물이 MIA에 의한 염증성 매개인자 및 기질 분해 촉진 효소 (MMP-13)의 발현을 억제하였으며, 오미자 추출물에 의해 연골손상 및 골관절염 유발인자들을 감소시켜 관절 및 연골 보호에 효능이 있음을 보여주는 것임
- 이상의 결과는 오미자 추출물이 관절염의 억제를 위한 기능성 식품 소재로서의 개발 가능성이 매우 높음을 보여주는 것으로서, 이를 위한 주요 생리활성 지표의 발굴 및 동물 실험을 통한 효능 검증을 지속적으로 수행하여 관절염 개선 관련 건강기능식품 인정을 위한 자료로 활용할 것임

(바) *In vivo* 퇴행성 관절염 모델계에서 상엽 추출물의 퇴행성 관절염 예방 및 억제 효능 평가

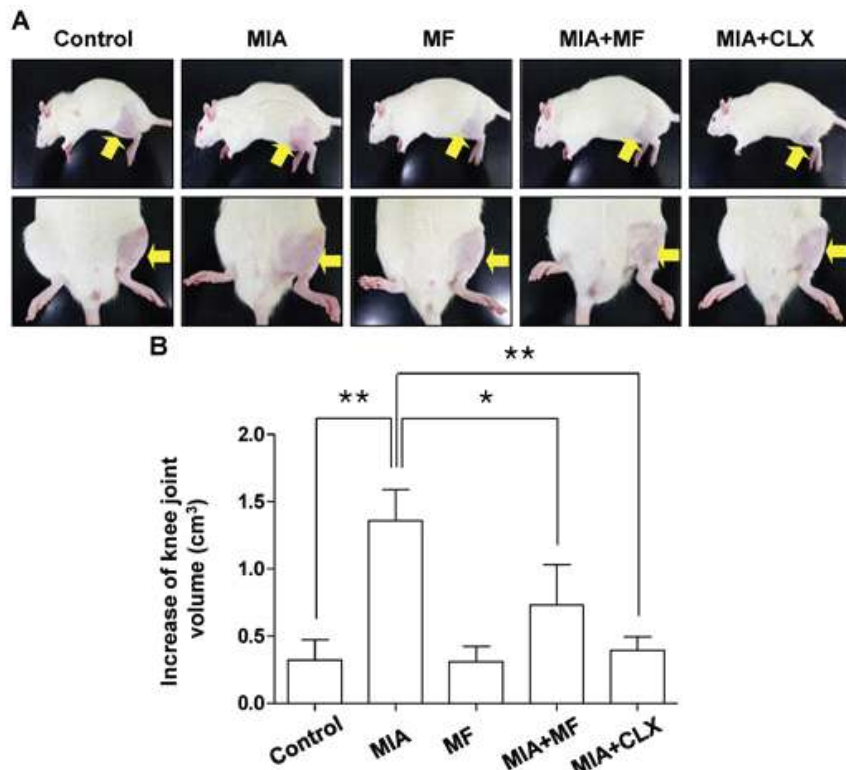
① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 두 번째 핵심 재료인 상엽의 관절염 억제 효능에 대한 검증을 위하여 MIA로 유도된 *in vivo* 퇴행성 관절염 모델계에서 관절염의 발병 원인인 염증성 매개인자, 연골 기질 분해 효소인 matrix metalloproteinases (MMP-13) 및 연골손상 및 골관절염 유발인자들의 생성에 미치는 오미자 추출물의 효능을 확인하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 상엽 열수추출물
- 실험 모델: 수컷 6주령의 SD-Rat (170-200 g)
- 사육환경: 온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 15%, light-dark cycle

- 관절염 유발: Monosodium iodoacetate (MIA) 용액은 주사용 생리식염수에 5 mg/ml의 농도로 제조하고, 실험동물을 마취시킨 후 오른쪽 슬관절 부위를 중심으로 전면을 제모하고 소독 후 슬관절 강내로 각 개체당 MIA 용액을 무릎연골 중앙부위에 주사하여 퇴행성 관절염 유발 여부를 7일간 관찰함(정상군은 슬관절 강내로 주사용 생리식염수 동일한 방법으로 주사하여 사용함)
- 실험군의 분류 및 경구투여: MIA 유도 골관절염을 유발한 7일 후에 각 개체의 체중을 측정하고, 육안관찰을 통해 체중과 유발정도가 고르게 8마리씩 군 배정함 → 정상군(normal group)은 물만 경구 투여하고, 대조군은 MIA를 처리한 후 물을, 시료처리군은 MIA를 처리한 후 시료를 2주간 경구 투여함
- 육안 관찰 : 고정된 우측 경골 근위단 관절연골 주변을 깨끗이 정리하여 사진촬영하고 육안적으로 관절 연골표면의 손상정도를 확인함
- 병리조직학적 평가를 위한 표본제작 및 염색: 채취 한 슬 관절조직을 이용하여 조직 슬라이드를 제작하고 염증성 침윤 정도를 평가하기 위해 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하고, 연골의 퇴행성 정도를 측정하기 위하여 safranin-O fast green (SOFG) 염색을 실시함
- 병리조직학적 골관절염 지수의 평가: 조직병리 검경 항목은 연골하골 변화(Subchondral bone change), 연골세포 괴사(chondrocyte necrosis), 연골 침식(cartilage erosion), 골극형성(osteophyte formation) 및 연골 갈라짐(cartilage cleft)으로 각 항목당 0-5점까지 총 25점으로 평가함

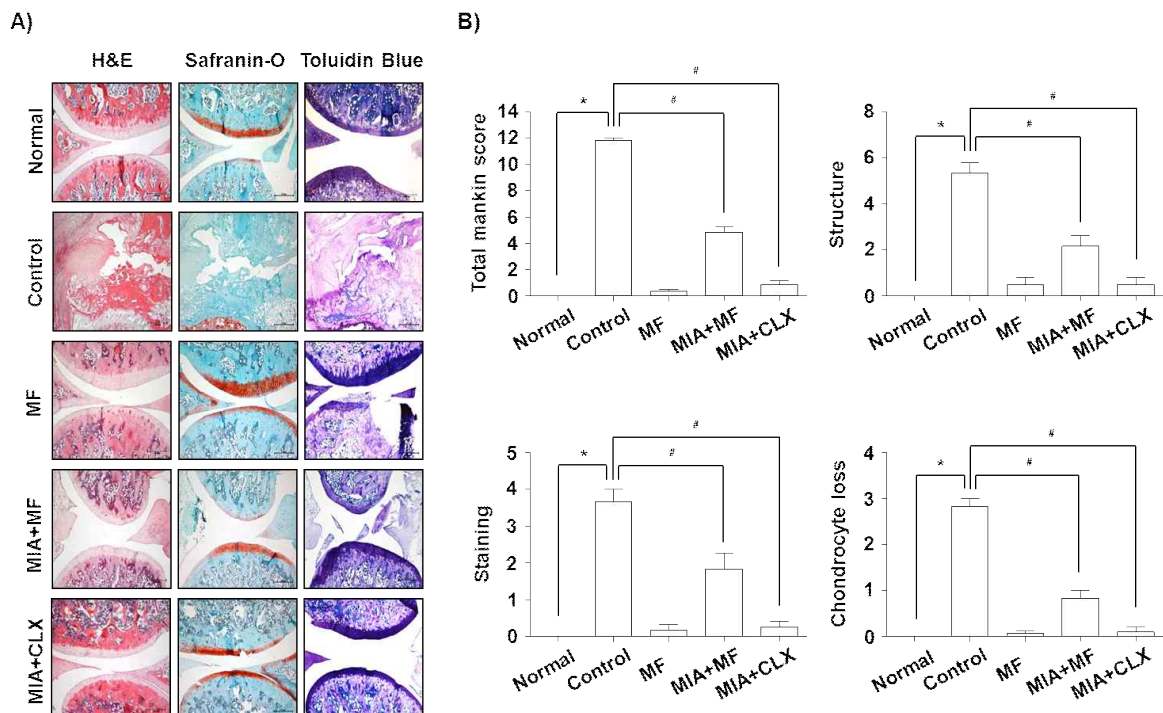


결과 23. MIA에 의해 유도된 골관절염 모델 동물에서 부종 및 무릎 관절 팽창에 미치는 상업 추출물의 영향

- 연골 흡수 지표(MMP-13) 활성 측정: 연골 염증성 인자 중 MMP-13의 발현 확인을 위해 쥐에서 분리한 연골을 단백질을 추출하여 ELISA kit를 이용하여 MMP-13의 활성을 측정함
- 혈중 prostaglandins 농도측정: MIA를 이용한 퇴행성 관절염 동물모델에서 염증 및 통증 유발인자인 prostaglandin의 혈중 농도를 ELISA로 측정
- 활액 내 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6) 함량 측정: 슬관절에서 분리한 활액 내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 함량은 ELISA kit 측정함

③ 연구 수행 결과

- 염증성 부종에 미치는 영향: MIA로 유도된 퇴행성 관절염 모델에서 상업 추출물에 의한 관절 부종을 확인한 결과, 정상군에 비해 MIA에 의해 증가되었던 부종이 염증억제제로 알려진 celecoxib 양성대조군과 동일하게 상업 추출물에 의해서 현저히 감소됨(결과 23)



결과 24. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물에서 상업 추출물 투여 후 관절의 조직 병리학적 변화 결과

• 병리조직학적 변화:

- Hematoxylin & Eosin 염색: 조직 염색 후 100배 비율로 관찰한 결과, 정상군의 관절은 활막 조직이 정상적으로 위치한 반면, MIA군은 관절 주변에 활막 세포의 과다침투로 인해 연골과 뼈의 침윤으로 활막 조직의 손실이 나타났음
→ 양성대조군은 대조군에서 비해서 연골과 뼈의 침윤 등이 상대적으로 감소하였고, 상업 추출물군에서도 연골과 뼈 침윤이 많이 억제되는 것으로 나타남(결과 24)
- Safranin-O 염색: 조직 염색 후 100배 비율로 관찰한 결과, 정상군의 관절은 연골조직이 정상적으로 위치하였고, MIA군은 관절 주변에 염증세포의 침투가 일어나 붉게 염색된 정상 연골 조직이 MIA에 의해 파괴되어, proteoglycan 조직이 사라짐을 확인할 수 있었음

→ 양성대조군과 동일하게 상엽 추출물군은 관절면에 MIA군에서 비해 연골과 뼈의 침윤 등이 적었으며, 붉게 염색된 proteoglycan 조직이 활막 주변에 많이 분포하였을 확인함 (결과 24)

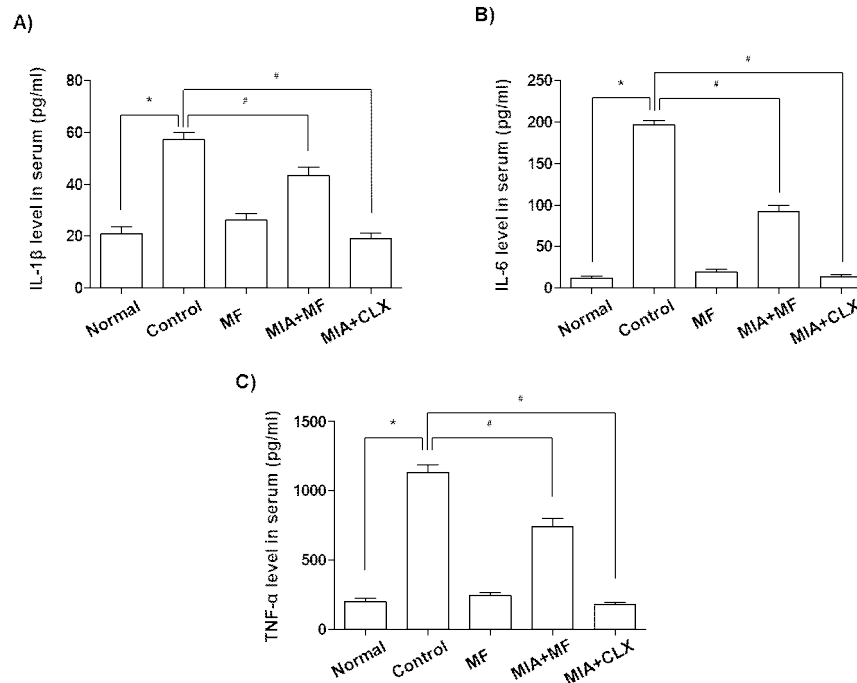
c. Toluidin blue 염색: 조직 염색 후 100배 비율로 관찰한 결과, 정상군의 관절은 연골조직이 정상적으로 위치하였고, MIA군은 관절 주변에 염증세포의 침투가 일어나 보라색으로 염색된 정상 연골세포들이 MIA에 의해 파괴되어, chondrocyte loss가 관찰됨

→ 양성대조군과 동일하게 상엽 추출물군은 관절면에 MIA군에서 비해 연골세포가 많이 분포하고 있음을 확인할 수 있었음(결과 24)

• MIA에 의한 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)의 생성에 미치는 상엽 추출물의 영향: 퇴행성 관절염의 발병 및 진행 촉진 요인인 염증성 사이토카인의 생성 억제에 미치는 상엽 추출물의 효능을 조사하기 위하여 MIA에 의하여 유도된 사이토카인의 생성 증가에 미치는 영향을 ELISA로 조사하였음

→ 정상군에 비해 MIA군에서는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성이 매우 증가되었으나, 양성대조군과 동일하게 상엽 추출물이 처리된 조건에서는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성이 유의적으로 억제되었음

→ 이는 상엽추출물에 의해 염증성 사이토카인의 발현 억제에 따른 생성을 억제시킴을 알 수 있음(결과 25)

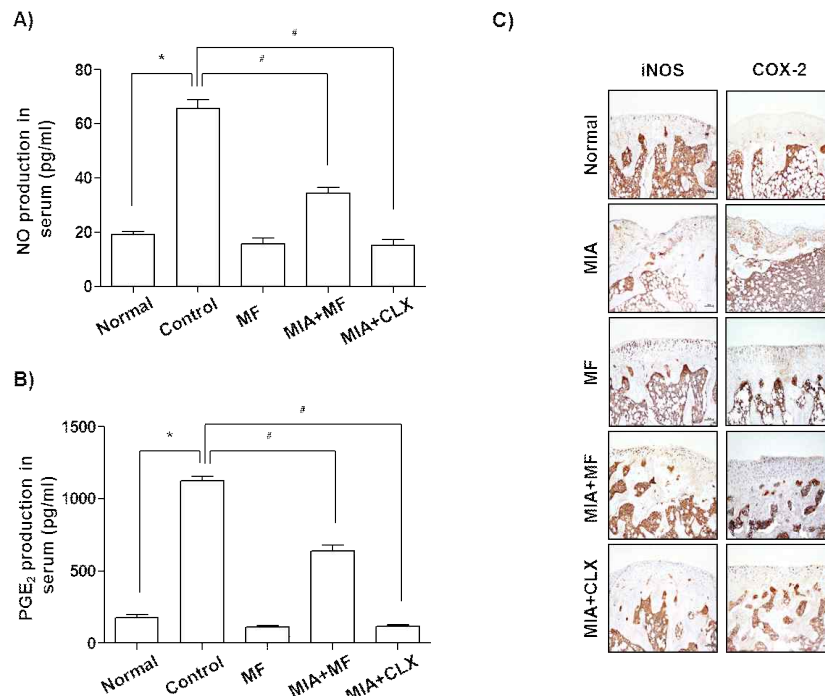


결과 25. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물의 혈청 내 염증성 사이토카인의 생성 증가에 미치는 상엽 추출물의 영향

• MIA에 의한 염증성 매개인자(NO 및 PGE₂)의 생성에 미치는 상엽 추출물의 영향: 염증성 매개인자의 생성 억제에 미치는 상엽 추출물의 효능을 조사하기 위하여 MIA에 의하여 유도된 NO 및 PGE₂의 생성 증가에 미치는 영향과 그들의 생성 조절 유전자(iNOS 및 COX-2)의 발현에 미치는 상엽 추출물의 영향을 조사하였음

→ 정상군에 비해 MIA군에서 NO 및 PGE₂의 생성이 매우 증가되었고, 조직생화학적 염색을 통해서 iNOS 및 COX-2의 발현도 증가되는 것을 확인할 수 있었으나, 상업 추출물이 처리된 조건에서는 양성대조군과 동일하게 NO 및 PGE₂의 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현이 유의적으로 억제되었음

→ 상업 추출물이 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하여 NO와 PGE₂의 생성을 억제하였음을 의미하는 결과임(결과 26)



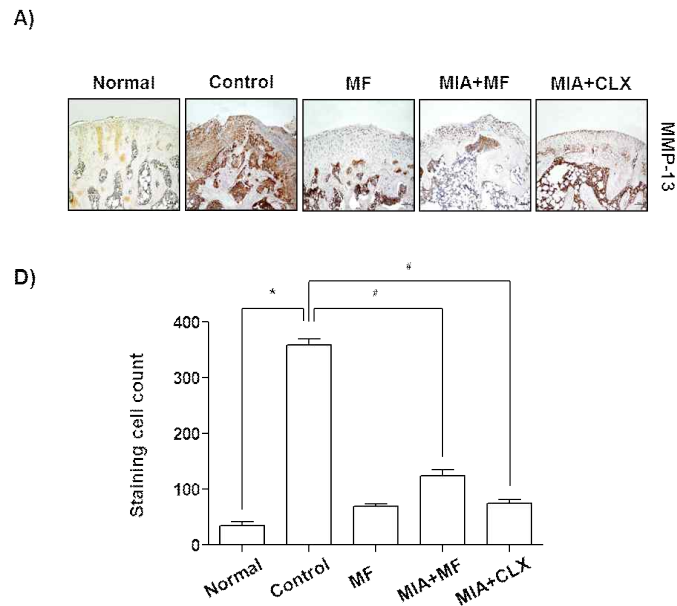
결과 26. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물의 혈청 및 관절 조직에서의 염증성 인자 생성 및 발현 증가에 미치는 상업 추출물의 영향

- MIA에 의한 MMP-13의 발현에 미치는 상업 추출물의 영향: 관절염 유발 관련 주요 catabolic factor인 MMP-13의 발현에 미치는 상업 추출물의 효능을 검증하기 위하여 MIA로 유도된 Rat의 무릎연골의 MMP-13 발현 변화를 조직생화학적 염색을 통해서 조사하였음

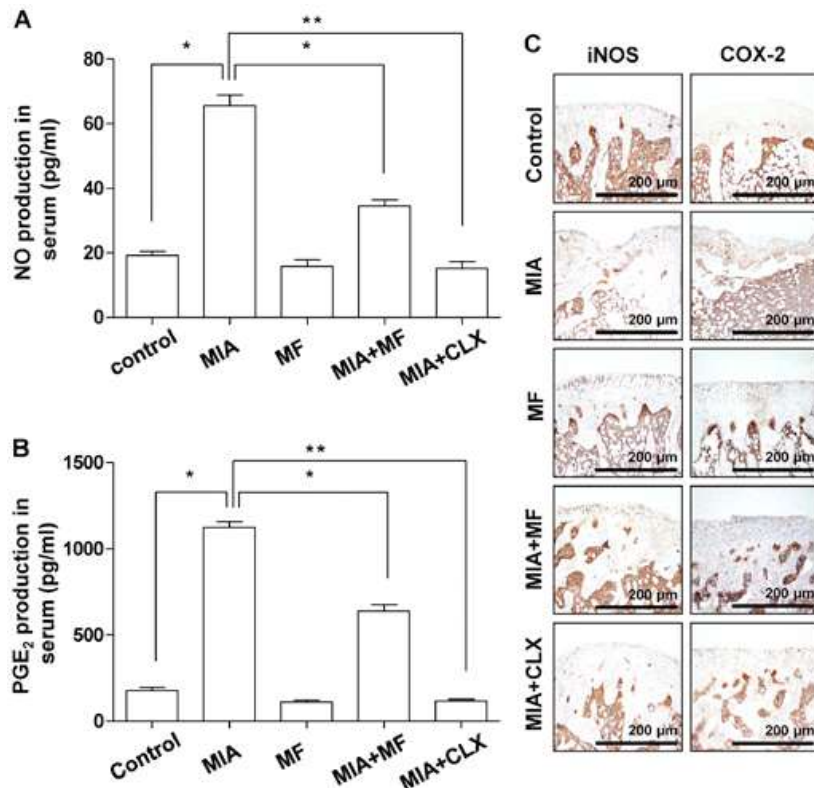
→ 정상군에 비해 MIA군에서 collagenase 계열에 속하는 MMP-13의 발현이 매우 증가되었으나, 양성대조군과 같이 상업 추출물이 처리된 조건에서는 이들의 발현이 현저하게 차단되었음(결과 27)

- MIA에 의한 연골손상 및 골관절염 지표에 미치는 상업 추출물의 영향: 혈액내의 연골손상 및 골관절염 지표에 미치는 상업 추출물의 효능을 검증하기 위하여 MIA로 유도된 Rat의 혈액에서 COMP (cartilage oligomeric matrix protein) 및 CTX-II (C-telopeptide of type II collagen) 생성 및 발현변화를 조사하였음

→ 정상군에 비해 MIA군에서 COMP 및 CTX-II의 생성 및 발현이 증가되었으나, 양성대조군과 같이 상업 추출물군에서 이들의 생성 및 발현이 유의적으로 감소되었음(결과 28)



결과 27. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물의 관절 조직에서 MMP-13의 발현 증가에 미치는 상엽 추출물의 영향



결과 28. MIA에 의해 유도된 퇴행성 관절염 모델 동물의 혈청 및 관절 조직에서의 COMP 및 CTX-II의 생성 및 발현 증가에 미치는 상엽 추출물의 영향

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 상엽 추출물이 MIA에 의한 염증성 매개인자 및 기질 분해 촉진 효소

(MMP-13)의 발현을 억제하였으며, 또한 상엽 추출물에 의해 연골손상 및 골관절염 유발 인자들을 감소시켜 관절 및 연골 보호에 효능이 있음을 보여주는 것임

- 이상의 결과는 상엽 추출물이 관절염의 억제를 위한 기능성 식품 소재로서의 개발 가능성이 매우 높음을 보여주는 것으로서, 이를 위한 주요 생리활성 지표의 발굴 및 동물 실험을 통한 효능 검증을 지속적으로 수행하여 관절염 개선 관련 건강기능식품 인정을 위한 자료로 활용할 것임

(사) *In vitro* 모델계에서 상엽 추출물의 면역증강 효능 평가

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 두 번째 핵심 재료인 상엽[뽕나무(*Morus alba* L.)의 잎]의 면역증강 효능에 대한 검증을 위하여 대식세포에서 면역증강 지표인자들의 생성 및 발현에 미치는 상엽 추출물의 효능을 확인하고자 함

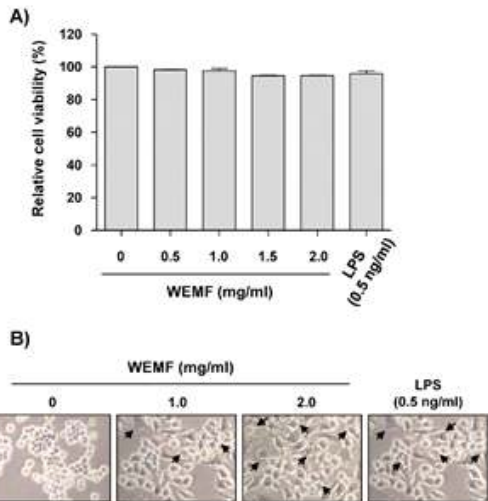
② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 뽕나무(*Morus alba* L.) 잎(상엽, MF)의 열수 추출물
- 실험 모델: RAW 264.7 대식세포를 대상으로 대식세포 활성화인자로 대표적인 LPS를 저농도로 처리하여 양성대조군으로 이용하였음
- 대식세포 활성 측정 항목: LPS에 의하여 유도된 대표적인 대식세포 활성 인자인 NO와 PGE₂의 생성에 미치는 상엽 추출물의 효능을 검증하기 위하여 Griess reagent 분석법 및 ELISA를 수행하였음
- 대식세포 활성 분석: 대식세포 활성화에 미치는 상엽 추출물의 효능을 검증하기 위하여 phagocytosis assay 수행하였음
- 유전자 발현 분석: 면역증강에 관련된 대식세포 분화 촉진 매개인자의 조절 유전자들(iNOS 및 COX-2) 및 사이토카인들의 발현 증가에 미치는 상엽 추출물의 효능을 mRNA 및 단백질 발현 수준에서 조사하기 위하여 RT-PCR 및 Western blotting을 실시하였음

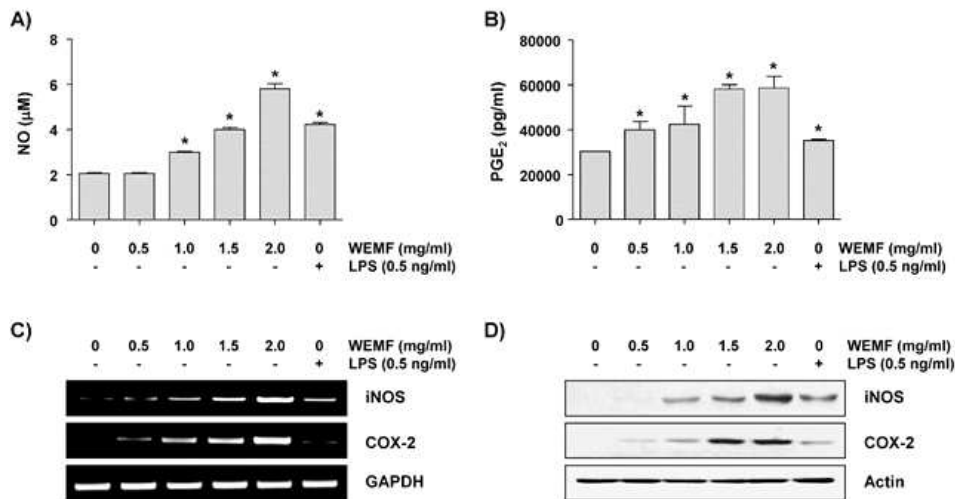
③ 연구 수행 결과

- RAW 264.7 대식세포의 증식 및 분화에 미치는 상엽 추출물의 영향: 상엽 추출물의 면역증강 효능 검증을 위한 처리 농도의 설정을 위하여 다양한 농도의 상엽 추출물(MF)을 24시간 처리 후 MTT assay를 수행하였음
 - 상엽 추출물의 처리 결과 2 mg/ml 처리군까지는 뚜렷한 세포독성을 나타내지 않았으며, 양성대조군인 LPS 0.5 ng/ml 에서도 RAW 264.7 대식세포 증식 억제가 관찰되지 않았음
 - 또한 상엽추출물 농도의존적으로 대식세포 분화가 관찰되었으며, 이는 양성대조군으로 사용한 LPS 0.5 ng/ml에서 관찰된 대식세포 분화보다 더 증가됨을 확인 할 수 있었음
 - 따라서 유효 상엽 추출물의 최고 농도를 2 mg/ml으로 설정하였음(결과 29)
- 상엽 추출물에 의한 면역증강 관련 대식세포 분화촉진 매개인자(NO 및 PGE₂)의 생성에 미치는 영향: 면역증강 관련 대식세포 분화 촉진 매개인자의 생성에 미치는 상엽 추출물의 효능을 조사하기 위하여 양성대조군인 저농도의 LPS에 의하여 유도된 NO 및 PGE₂의 생성 증가를 바탕으로 확인하였으며 그들의 생성 조절 유전자인 iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 상엽 추출물의 영향을 조사하였음

- 양성대조군인 저농도의 LPS 처리에 의하여 NO 및 PGE₂의 생성이 매우 증가되었고, iNOS 및 COX-2의 발현도 증가되었음
- 상엽 추출물 처리에서도 NO 및 PGE₂의 생성과 iNOS 및 COX-2의 발현이 유의적으로 증가되었음
- 이는 상엽 추출물이 전사수준에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 증가하여 NO와 PGE₂의 생성을 증가시켰음을 의미하는 결과임(결과 30)



결과 29. RAW 264.7 대식세포의 증식에 미치는 상엽 추출물 및 LPS의 영향(A)과 그에 따른 세포의 형태 변화



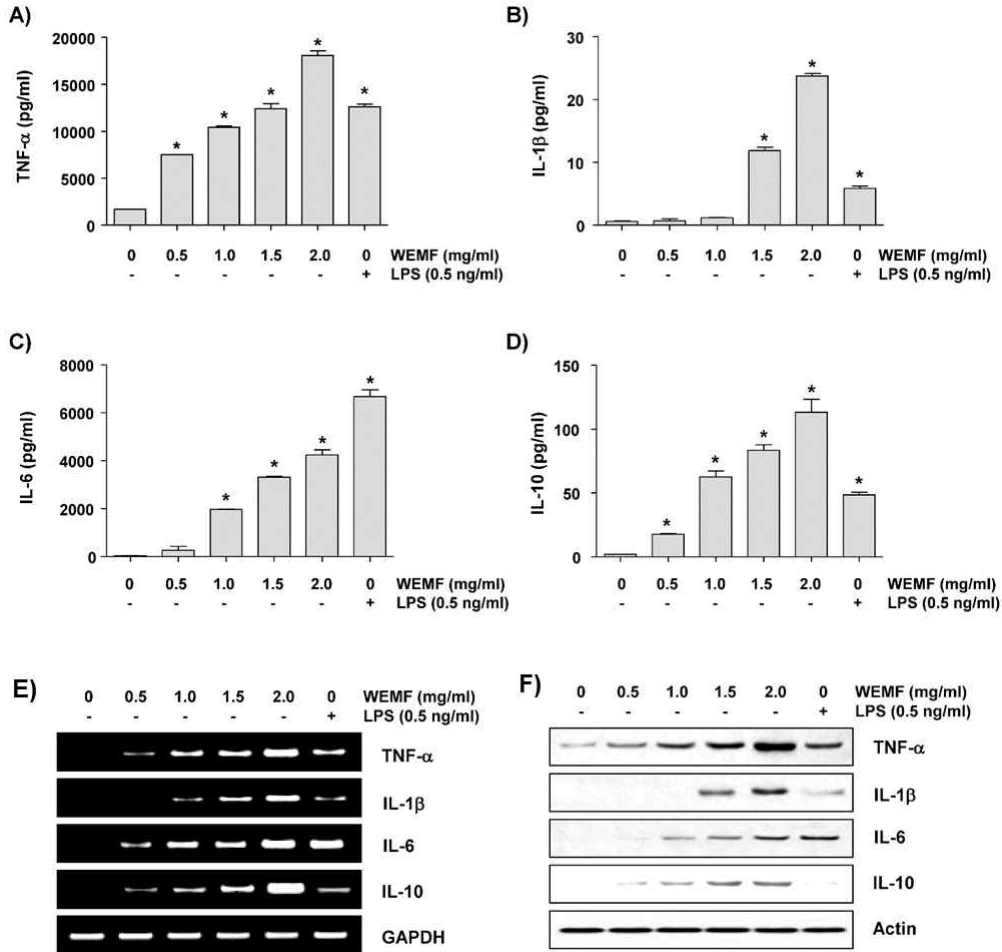
결과 30. RAW 264.7 대식세포에서 NO 및 PGE₂의 생성(A 및 B)과 iNOS 및 COX-2의 발현(C 및 D)에 미치는 상엽 추출물 영향

- 상엽 추출물에 의한 면역증강 관련 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL-10)의 생성 및 발현 변화에 미치는 영향: 대식세포 분화 촉진 요인 중의 하나인 사이토카인의 생성 및 발현 변화에 미치는 상엽 추출물의 효능을 조사하기 위하여 양성대조군인 LPS 처리군을 바탕으로 상엽추출물 처리에 의하여 유도된 사이토카인의 생성 및 발현 증가에 미치는

영향을 ELISA, RT-PCR 및 Western blotting로 조사하였음

→ 양성대조군과 동일하게 상업 추출물이 처리된 조건에서는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL-10의 생성 및 발현이 유의적으로 증가되었음

→ 이는 상업추출물에 의해 사이토카인의 생성 및 발현을 증가시킴을 알 수 있음(결과 31)



결과 31. RAW 264.7 대식세포에서 다양한 사이토카인의 생성(A-D) 및 발현(E 및 F)에 미치는 상업 추출물 영향

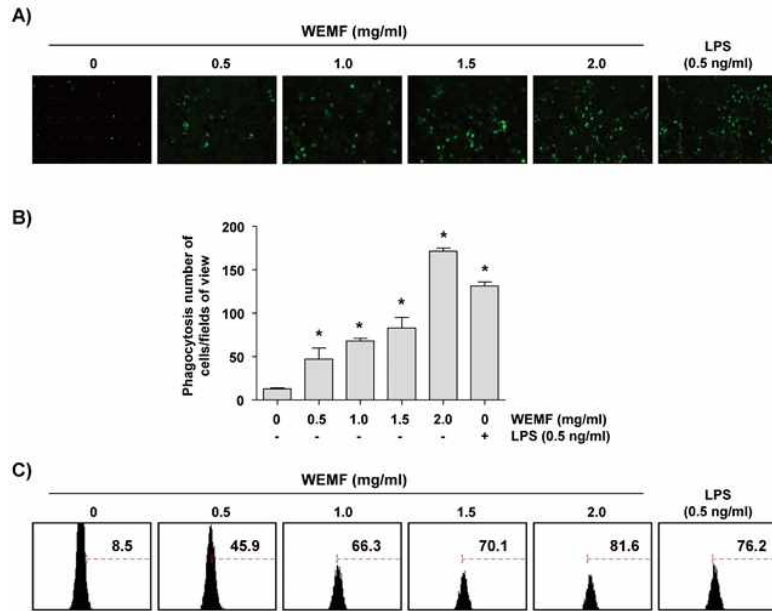
- 상업추출물에 의한 phagocytosis 분화에 미치는 영향 : 대식세포 분화에 미치는 상업 추출물의 효능을 조사하기 위하여 양성대조군인 LPS 처리군을 바탕으로 상업추출물 처리에 의하여 유도된 대식세포 분화 정도를 phagocytosis assay를 통하여 조사하였음

→ 양성대조군과 동일하게 상업 추출물이 처리된 조건에서는 phagocytosis 활성이 유의적으로 증가되었음

→ 이는 상업추출물에 의해 대식세포가 분화되어 phagocytosis 활성을 증가시킴을 알 수 있음(결과 32)

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 상업 추출물이 면역증강 관련 대식세포 분화촉진 인자들의 발현 및 생성을 증가시킴으로서 대식세포 분화를 촉진시켜 phagocytosis 활성을 증가시키는 것으로 판단됨



결과 32. 상엽 추출물에 의한 RAW 264.7 대식세포의 phagocytosis 활성의 증가(A 및 B) 및 ROS 생성의 억제(C)

- 이상의 결과는 상엽 추출물이 퇴행성 관절염의 억제를 위한 기능성 식품 소재로서의 개발 가능성이 매우 높음을 보여주는 것으로서, 이를 위한 주요 생리활성 지표의 발굴 및 동물 실험을 통한 효능 검증을 수행할 것이며, 관절염 개선 관련 건강기능식품 인정을 위한 기초 자료로 활용할 것임

(아) 대식세포 및 zebrafish 모델에서 상엽의 항염증 및 항산화 효능 평가

① 연구 수행의 목적

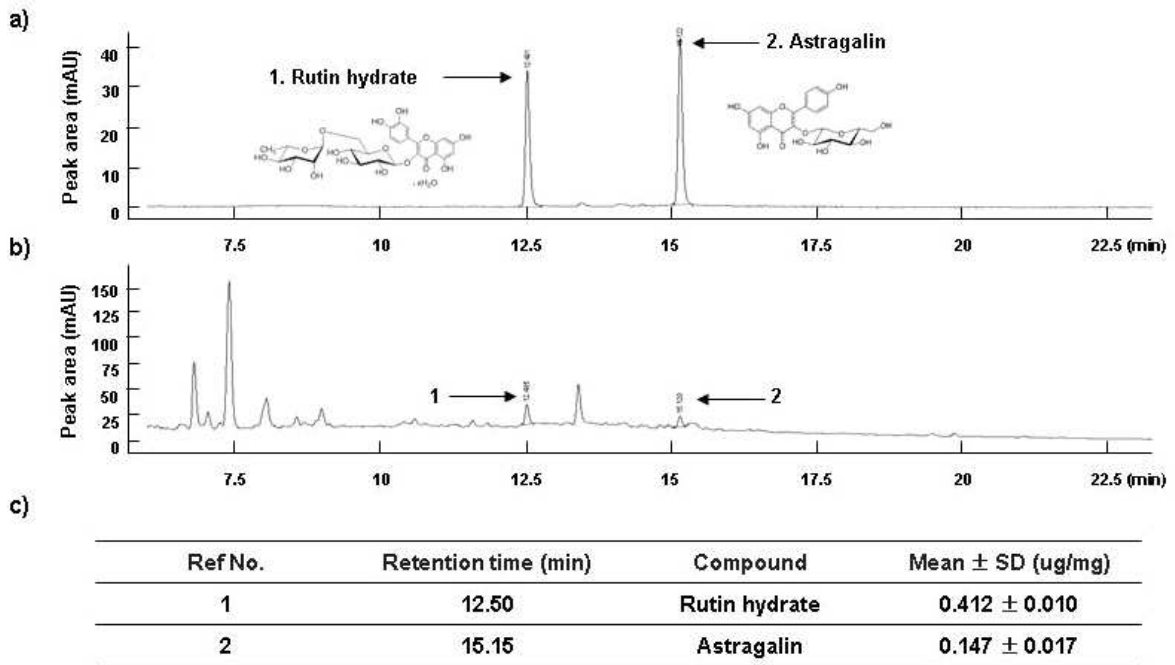
- 상엽[뽕나무(*Morus alba* L.)의 잎] 추출물의 항염증 효능과 항산화 효능을 대식세포 in vitro 모델계 및 in vivo 모델계로 zebrafish에서 확인하고자 하며, 특히 zebrafish 모델 계는 마우스를 이용한 동물 실험 전단계로서 활용 가능성을 평가하고자 함

② 연구 수행 방법

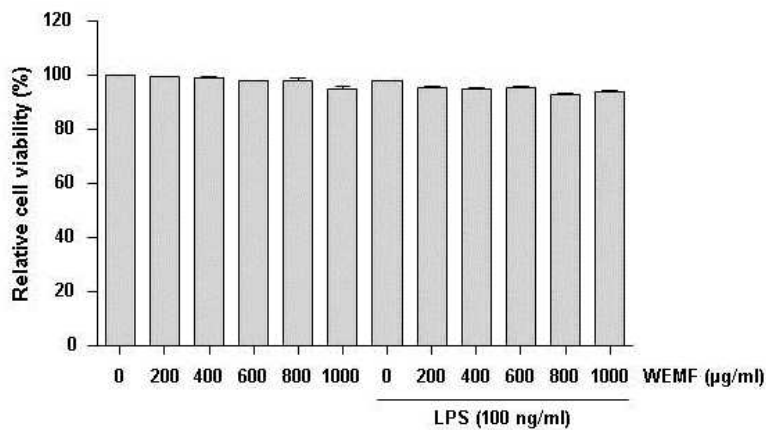
- 연구 재료: 뽕나무(*Morus alba* L.) 잎(상엽, MF)의 열수 추출물
- 상엽 열수 추출물의 지표 물질 설정: 상엽 열수 추출물의 효능 평가 재현성을 위한 지표 물질의 함량 분석을 highperformance liquid chromatography (HPLC, Agilent Technologies)-기반 분석법에 준하여 수행하였음
- RAW 264.7 대식세포에 LPS에 의한 과다 활성의 유발에 따른 처리하여 염증성 매개인자의 생성에 미치는 상엽 추출물의 영향을 조사하였음
- 항염증 효능 평가를 위하여 LPS에 의한 NO와 PGE₂의 과다 생성에 미치는 상엽 추출물의 효능을 검증하기 위하여 Griess reagent 분석법 및 ELISA를 수행하였음
- 세포 내 신호전달계의 활성화에 미치는 영향: LPS에 의한 NF-κB 및 MAPKs의 과다 활성 억제 여부를 조사하였음
- 항산화 효능 평가: 상엽 추출물의 LPS에 의한 ROS 과잉 생산 억제 여부를 평가하였음
- Zebrafish를 이용한 항염증 및 항산화 효능의 평가: Zebrafish larvae를 이용하여 LPS에 의한 NO 및 ROS의 생성에 미치는 상엽 추출물의 영향을 조사하였음

③ 연구 수행 결과

- Fingerprinting 결과: 본 연구에서 사용한 상업 추출물의 지표 성분 함량 분석을 위한 HPLC 분석에 rutin hydrate과 astragaline 두 reference compound를 사용하였으며, chromatogram 정량 분석 결과는 결과 33에 제시하였음
- 상업 추출물이 RAW 264.7 대식세포의 증식에 미치는 영향: 세포독성이 없는 상업 추출물의 농도 설정을 위하여 상업 추출물이나 LPS 단독 또는 동시 처리 24시간 후 MTT assay를 이용하여 세포 생존도를 조사한 결과, 1,000 µg/ml 상업 추출물 단독 및 LPS와의 동시처리에서도 유의적인 독성 효과가 나타나지 않았으나, 본 연구의 수행을 위해서는 상업 추출물의 최고 농도를 800 µg/ml으로 설정하였음(결과 34)



결과 33. HPLC를 이용한 상업 추출물의 fingerprinting 결과(rutin hydrate과 astragaline을 reference compound로 사용하였음)

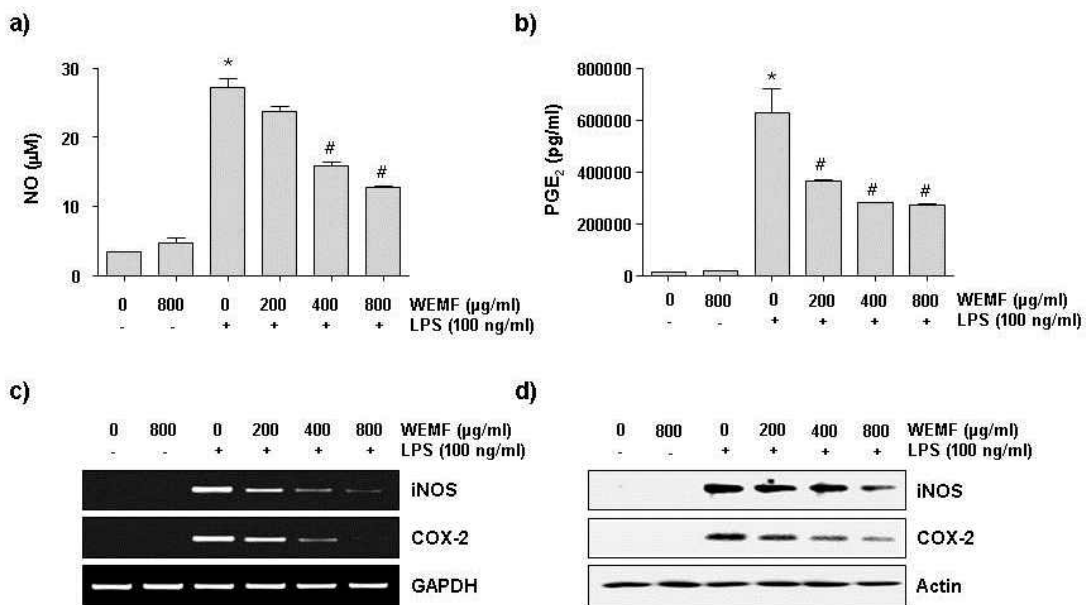


결과 34. RAW 264.7 대식세포의 증식에 미치는 상업 추출물 및 LPS의 영향

- LPS에 의해 유도된 NO 및 PGE2의 생성에 미치는 상업 추출물의 영향: 상업 추출물의

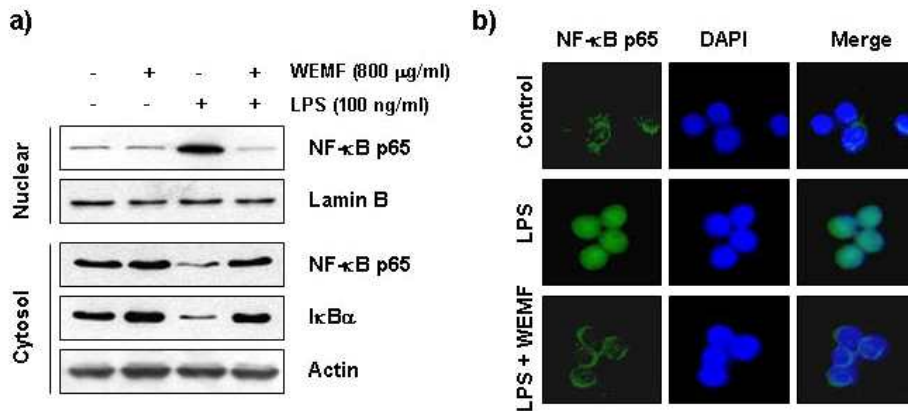
항염증 효능을 평가하기 위하여 대표적인 염증성 매개인자인 NO와 PGE₂의 생성에 미치는 상엽 추출물의 영향을 조사한 결과, LPS 처리에 의하여 증가된 NO와 PGE₂의 양이 상엽 추출물 처리 농도의 증가에 따라 유의적으로 억제되었음(결과 35 A 및 B)

- LPS에 의해 증가된 iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 상엽 추출물의 영향: 상엽 추출물의 처리에 의한 NO와 PGE₂의 생성 억제가 이들을 합성하는 효소인 iNOS 및 COX-2의 발현 변화와 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, LPS 처리에 의하여 증가된 iNOS와 COX-2의 단백질 및 mRNA의 발현이 상엽 추출물 처리 농도 의존적으로 감소되었음(결과 35 C 및 D)

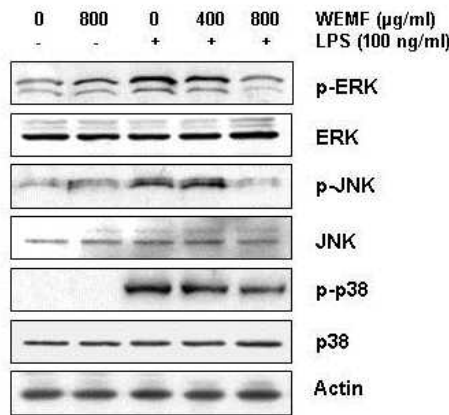


결과 35. RAW 264.7 대식세포에서 LPS 자극에 의한 염증성 매개인자(NO 및 PGE₂)와 iNOS 및 COX-2의 발현 증가에 미치는 상엽 추출물의 영향

- LPS에 의한 NF-κB의 핵 내 전이에 미치는 상엽 추출물의 영향: 이상에서 관찰된 iNOS와 COX-2의 전사활성 억제가 이들 유전자의 핵심 전사조절인자인 NF-κB의 활성 억제에 의한 것인지를 여부를 조사한 결과, LPS의 처리에 의하여 세포질에서 핵으로의 NF-κB 전이가 증가되었으며, 세포질에서의 IκB의 발현은 억제되었으나, 상엽 추출물이 존재한 조건에서 배양된 RAW 264.7 대식세포에서는 이러한 현상이 차단되었으며(결과 36A), 형광현미경을 이용한 관찰에서는 NF-κB의 핵 내로의 이동이 억제되었음을 확인하였음(결과 36B)
- RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 MAPKs의 활성화에 미치는 상엽 추출물의 영향: LPS 처리에 의한 세포 신호계 활성화에 미치는 상엽 추출물의 영향을 조사하기 위하여 MAPKs의 인산화 정도를 평가하였으며, 결과 37에 제시된 바와 같이, LPS가 처리된 배지에서 배양된 RAW 264.7 대식세포에서 조사된 3가지 MAPKs인 ERK, JNK 및 p38 MAPK가 모두 인산화가 증가되어 활성화되었음을 알 수 있었으나, 상엽 추출물이 존재하는 배지에서 배양된 경우 이들의 인산화가 억제되어 활성이 모두 감소되었음을 알 수 있었음



결과 36. LPS에 의한 RAW 264.7 대식세포의 NF-κB 활성화에 미치는 상업 추출물의 영향



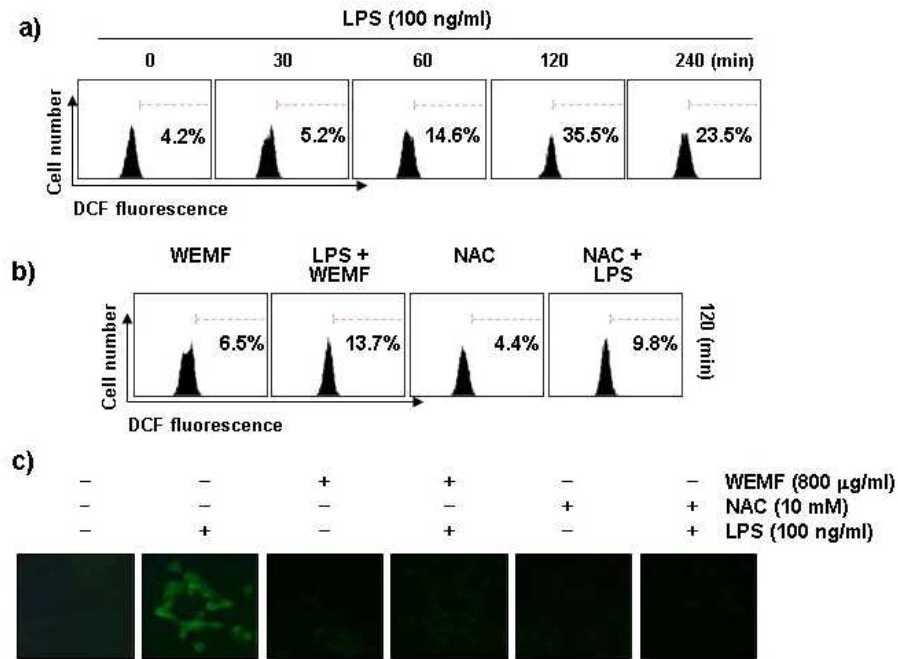
결과 37. RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 MAPKs 활성화에 미치는 상업 추출물의 영향

- RAW 264.7 대식세포에서 상업 추출물의 항산화 활성 평가: LPS에 의한 RAW 264.7 세포의 과대 활성화 과정에는 산화적 스트레스가 동시에 유발되기 때문에 상업 추출물의 항염증 효능이 항산화 효능과 동반되는지의 여부를 조사하기 위하여 ROS이 생성 차단 정도를 조사한 결과, RAW 264.7 대식세포에서 LPS의 처리에 의한 ROS의 과대 생성이 상업 추출물에 의하여 유의적으로 억제되었음을 flow cytometry 및 형광현미경적 관찰을 통하여 확인하였으며, 이는 대표적인 ROS scavenger인 N-acetyl-l-cysteine 처리군에서도 유사하였음(결과 38)
- Zebrafish 모델에서 상업 추출물의 항염증 및 항산화 효능 확인: 이상의 RAW 264.7 대식세포 모델에서 관찰된 상업 추출물의 항염증 및 항산화 효능을 zebrafish larvae 모델에서 재확인한 결과, LPS의 처리에 의하여 증가된 NO가 상업 추출물에 의하여 유의적으로 억제되었으며, ROS 생성 역시 LPS 처리군에서 매우 증가되었으나 상업 추출물 처리에 의하여 유의적으로 억제되어, 항산화 활성 효능이 매우 높음을 알 수 있었음(결과 39)

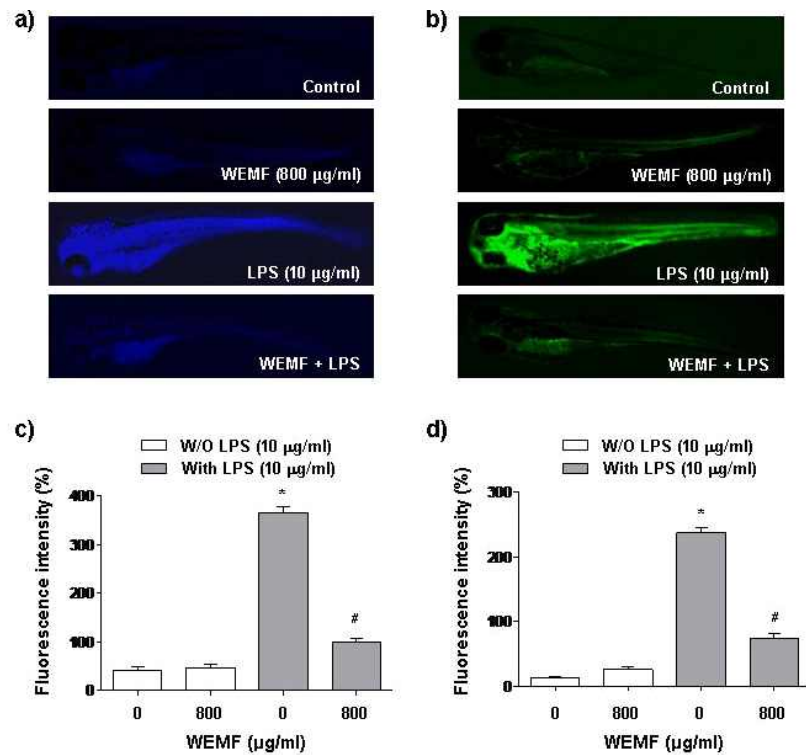
④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과에서는 그동안 다양한 실험을 위하여 사용된 상업 열수 추출물의 지표성분

함량을 제시함으로써 본 시료의 표준화를 위한 자료 제시의 예를 제시하였음



결과 38. RAW 264.7 대식세포에서 LPS 자극에 의한 ROS 생성에 미치는 상엽 추출물의 영향



결과 39. Zebrafish 모델에서 LPS 자극에 의한 NO 및 ROS 생성에 미치는 상엽 추출물의 영향

- 상엽 열수 추출물은 면역 증강 효과뿐 만 아니라 강력한 항염증 및 항산화 효능도 동시에

함유하고 있음을 제시하였으며, 특히 연골세포를 이용한 항염증 효과가 광범위한 실험계에서도 재현됨을 알 수 있었음

- 아울러 Zebrafish 모델에서의 항산화 및 항염증 평가는 설치류를 이용한 *in vivo* 모델계의 검증을 위한 경제적이며 효율적인 실험법으로 활용될 수 있음을 제시하였음

(자) *In vitro* 및 *in vivo* 관절염 모델에서 오미자 에탄올 추출물의 효능 검증 및 지표 성분 분석

① 연구 수행의 목적

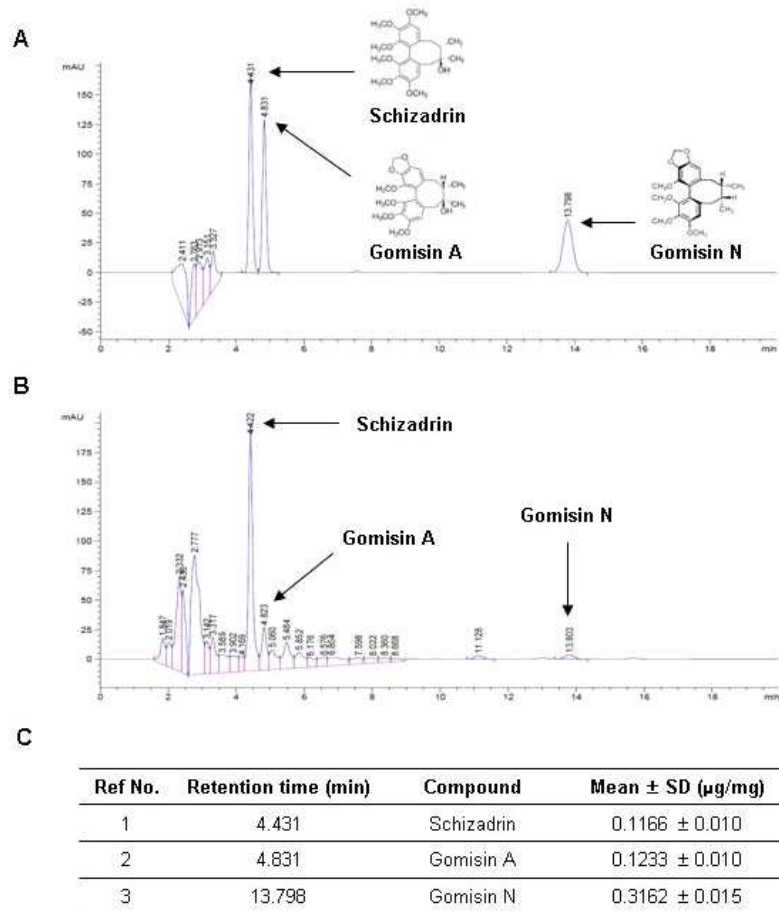
- 본 과제의 수행에서 얻은 오미자 추출물의 결과에 준하여 primary culture된 *in vitro* 연골세포 모델 및 *in vivo* 모델에 미치는 연골 기질 손상에 대한 기전을 추가로 해석하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 20% 에탄올 오미자 추출물
- 지표성분의 HPLC 분석: 오미자 지표성분의 분석을 위하여 schizandrin과 gomisin A 및 gomisin N을 reference compound로 사용하였으며, 준비된 오미자 추출물 500 mg을 20 ml의 MeOH에 녹여 20분간 초음파 추출을 한 다음 0.45 µm membrane filter로 여과하고, 잔류물에 MeOH 20 ml을 넣고 다시 20분간 추출한 다음 0.45 µm membrane filter로 여과하였음
- 연골세포 분리 및 세포배양: 4~6주령(무게 약 160~180 g)의 수컷 Sprague-Dawley (SD) 쥐에서 연골세포의 채취하여 세포의 밀도 조절을 위하여 2~3일에 한 번씩 배지를 갈아주고 약 4~5일에 계대 배양 하였으며 세포의 passage는 5 이하로 실험에 사용하였음
- 오미자 추출물의 세포독성 여부 조사: 분리된 연골세포를 12시간 동안 안정화시킨 후, 오미자 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 MTT assay를 실시하였음
- 관절염 유도 및 RT-PCR에 의한 mRNA 발현 분석: 분리된 연골세포에 퇴행성 관절염 유도를 위하여 20 ng/ml IL-1β과 함께 오미자 추출물을 적정 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였으며, 총 RNA를 추출하여 해당 primer를 이용하여 전사수준에서의 유전자 발현을 RT-PCR로 분석하였음
- MMPs 생성의 정량적 분석: MMPs의 생성에 미치는 오미자 추출물의 영향을 조사하기 위해서 분리된 연골세포로부터 생성되는 MMP-1, -3 및 -13의 양을 세포배양액을 이용하여 ELISA kit를 사용하였음
- *In vivo* 퇴행성 관절염 유발: 수컷 SD 쥐의 무릎 주변을 제모하고 골관절염 유발물질인 MIA를 1 ml 주사기로 왼쪽 무릎 관절강 내에 50 µl (3 mg/kg)씩 주사하여 퇴행성 관절염을 유발하였음
- 실험군 분류 및 경구투여: MIA에 의해 퇴행성 관절염을 유발한 7일 후 각 개체의 체중을 측정하였고, 육안관찰을 통해 체중과 유발 정도가 고르게 8마리씩 실험군을 배정하였음
- 면역조직화학적 검사: Paraffin 포매 후 5 µm 두께로 박절한 관상 절편은 MMP-1 및 MMP-13 단백질 발현을 알아보기 위해 면역조직화학 반응 검사를 실시하였음

③ 연구 수행 결과

- Fingerprinting 결과: 본 연구에서 사용한 오미자 추출물의 지표 성분 함량 분석을 위한 HPLC 분석에 schizandrin과 gomisin A 및 gomisin N 등 세 reference compound를 사용하였으며, chromatogram 정량 분석 결과는 결과 40에 제시하였음
- Primary culture된 연골세포에 대한 오미자 추출물의 세포 독성을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였으며, 결과 41에 제시한 바와 같이, 500 µg/ml 농도까지는 90% 이상의 생존율이 나타났으므로 세포독성이 거의 없는 것으로 판단됨
→ 따라서 500 µg/ml 이하로 한정하기로 함(이는 IL-1β와의 동시 처리 조건에서도 세포독성을 거의 나타내지 않는 농도임을 재확인함)

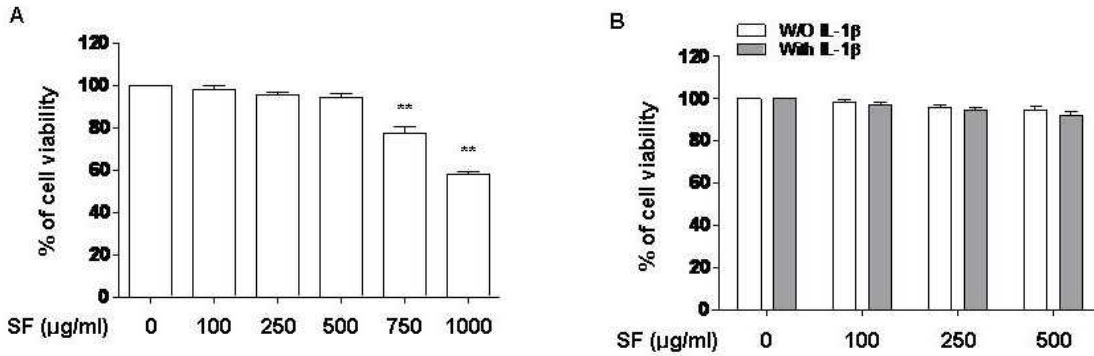


결과 40. HPLC를 이용한 오미자 추출물의 fingerprinting 결과(schizandrin과 gomisin A 및 gomisin N을 reference compound로 사용하였음)

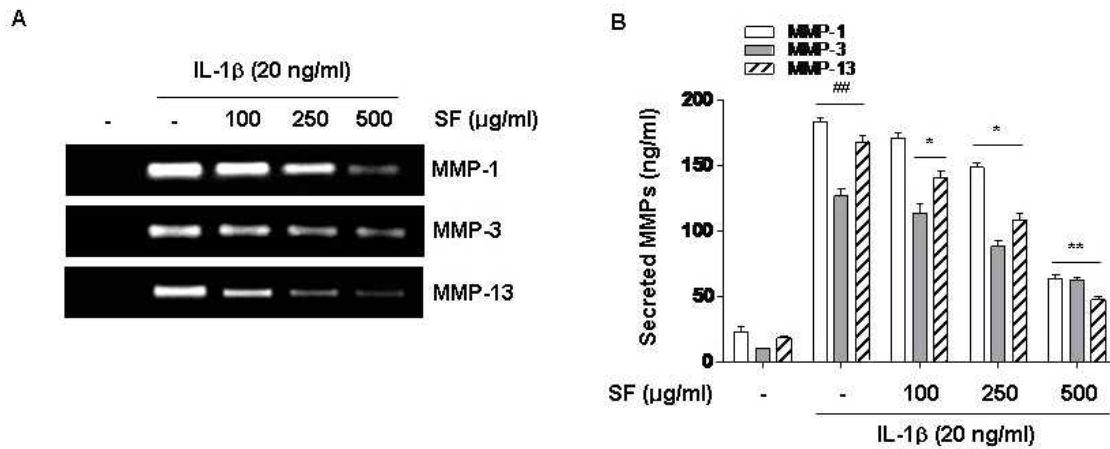
- Primary culture된 연골세포에서 IL-1β에 의한 MMPs의 mRNA 발현 및 효소 활성 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향: 오미자 추출물에 의한 MMPs 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 primary culture된 연골세포에 IL-1β (20 ng/ml) 및 오미자 추출물을 처리함으로써 나타나는 MMP-1, -3 및 -13의 발현 변화를 RT-PCR과 효소면역정량법(ELISA)을 사용하여 확인한 결과, IL-1β가 단독 처리된 연골세포에서는 MMP-1, -3 및 -13의 발현 및 효소 활성이 매우 증가되었음
→ 그러나 오미자 추출물을 처리한 결과 3가지 MMPs의 mRNA 발현이 모두 처리 농도의존적으로 감소되었으며, 이와 일치되게 IL-1β에 의해 증가된 MMP-1, -3 및 -13의 효

소 활성이 오미자 추출물에 의해서 유의적으로 감소되었음

→ 따라서 오미자 추출물이 연골의 세포 외 기질 성분을 분해하는 MMPs의 발현을 전사 수준에서 차단함으로써 연골세포 보호 효과를 가진다는 것을 알 수 있었음(결과 42A 및 B)



결과 41. Primary culture된 연골세포 증식에 미치는 오미자 추출물 및 IL-1β (20 ng/ml)의 영향



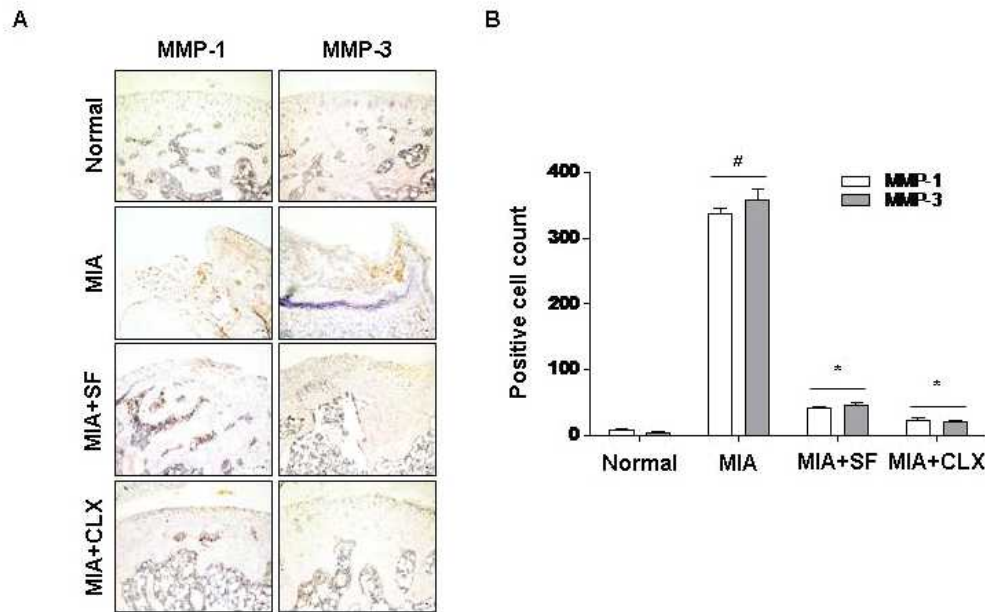
결과 42. *In vitro* 모델에서 IL-1β에 의한 MMPs의 mRNA 발현 및 효소 활성 증가에 미치는 오미자 추출물의 영향

- MIA에 의한 *in vivo* 퇴행성 관절염 유발 모델에서 오미자 추출물 투여에 따른 체중 변화 여부 조사: MIA 유도 관절염 동물모델에서 오미자 추출물의 효능을 검증하기 전 단계로써 MIA 관절염 유도 후 각 개체의 체중을 시료의 경구투여가 시작된 날부터 3주간 측정 한 결과(N=8), 퇴행성 관절염이 유도된 대조군은 정상군에 비하여 시험기간 동안 체중이 유의적으로 낮았음
- MIA 유도 관절염 동물모델에 오미자 추출물(100 mg/kg)이 투여된 경우 실험기간 동안 체중 증가 양상은 대조군에 비해 높고 정상군 및 양성대조군과 유사한 증가 패턴을 보였지만 통계적으로 유의적인 차이는 없었으며, 양성 대조군으로 사용된 celecoxib (CLX, 3 mg/kg) 처리군에서도 오미자 추출물에서와 같이 유사한 경향성을 보여 주었음(표 1).

표 1. MIA에 의하여 유도된 퇴행성 관절염 쥐의 몸무게에 미치는 오미자 추출물과 celecoxib의 영향

Group	Body weights (g)/days			
	D0	D7	D14	D21
Normal	175.2±8.4	202.8±9.2	252.2±10.3	302.1±11.2
MIA	172.1±12.8	182.5±10	198.4±10	224.3±12.3
MIA+SF	176.5±6.6	191.2±8.8	239.7±10.6	288.5±15.1
MIA+CLX	175.7±7.4	198.5±9.5	247.5±12.3	297.3±12.8

Note: Normal group; injected and treated with saline, MIA group; MIA (3 mg/kg) injected and treated with saline, MIA+SF group; MIA injected and treated with SF (100 mg/kg), MIA+CLX group; CLX (3 mg/kg) injected after MIA injected.



결과 43. MIA에 의한 퇴행성 관절염 *In vivo* 모델에서 MMP-1 및 MMP-3의 발현에 미치는 오미자 추출물의 영향

- *In vivo* 모델에서의 MIA에 의한 퇴행성 관절염 유발에 미치는 오미자 추출물의 개선 효능 검증: MIA가 처리된 대조군 조직에서는 정상군에 비하여 MMP-1 및 MMP-3의 발현이 매우 증가됨을 확인할 수가 있었으며, 육안적 관찰에서도 관절염이 유도되었음을 확인하였으나(data not shown) 오미자 추출물(100 mg/kg)을 투여한 군에서는 대조군에 비해 증가되었던 MMP-1 및 MMP-3의 발현이 정상군 수준으로 회복되었음(결과 43)

→ 아울러 동일 조건에서 MMP-13의 발현 억제 양상도 이와 매우 유사하였으므로, 오미자 추출물이 퇴행성 관절염 모델에서 관절염 유도 초기단계에 진행되는 MMP-1과 MMP-3의 효소 활성을 억제하여 연골세포 보호 예방효과가 있는 것으로 추정되며, 러한 결과는 양성 대조군으로 사용된 celecoxib 처리군에서도 동일하게 관찰되어 양성 대조군으로의 결과 활용이 적절함이 입증됨

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구에서는 IL-1 β 및 MIA에 의하여 유발되는 퇴행성 관절염 *in vitro* 및 *in vivo* 모델을 이용하여 오미자 추출물의 효능을 조사하였으며, 오미자 추출물에 의한 MMPs의 효소 활성 감소에서 유의성 있는 결과를 보임에 따라 퇴행성 관절염 초기 및 관절연골 개선에

그 효과가 유의적으로 작용할 것이라 사료되는 근거로서 활용될 것임.

(차) RAW 264.7 대식세포세포에서 schisandrin A의 염증성 및 산화적 스트레스 억제 효능 검증

① 연구 수행의 목적

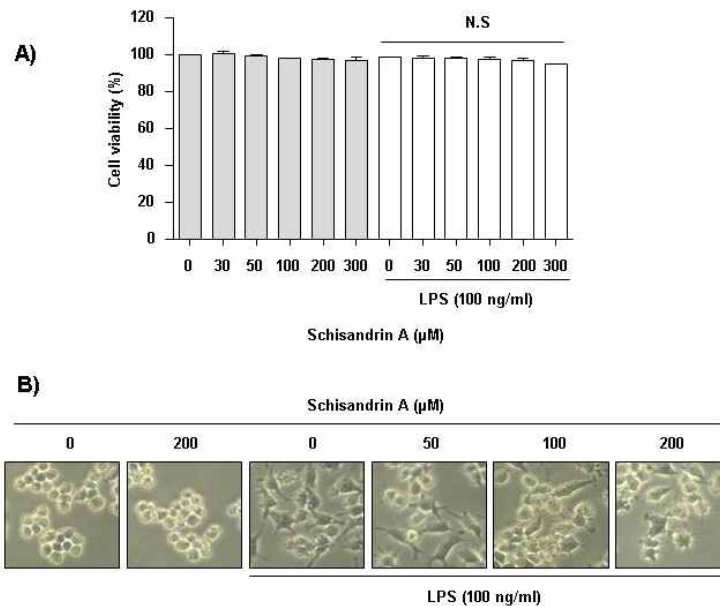
- Schisandrin 속의 과일에서 발견되는 생체 활성 화합물인 schisandrin A는 오미자의 대표적인 생리활성 성분으로 여러 가지 약리학적 작용을 하는 것으로 보고되고 있음
- 본 연구에서는 오미자 추출물의 생리활성 효능과 연관된 심화 연구로서 오미자의 대표적인 생리활성 물질인 schisandrin A의 염증성 및 산화적 스트레스 억제 효능을 RAW 264.7 대식세포 모델에서 검증하였음

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 오미자의 대표적인 지표물질이며 생리활성 성분인 schisandrin A는 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 100 mM로 stock solution을 만든 후 DMEM에 적정 농도로 희석하여 처리하였음
- 세포 생존률 측정: 염증성 및 산화적 자극의 유도를 위하여 LPS를 사용하였으며, 264.7 대식세포에 미치는 세포독성 정도를 평가하기 위하여 LPS 단독(100 ng/ml), schisandrin A 단독(30~300 μ M) 또는 동시 처리한 조건에서 24시간 배양 후 MTT assay를 실시하였음
- 염증성 매개인자(NO 및 PGE2)의 생성 측정: 다양한 농도의 schisandrin A를 1시간 전 처리후, LPS를 처리하고 24시간 배양된 세포의 배지를 이용하여 NO 및 PGE2의 농도를 Griess reaction 및 PGE2 ELISA kit를 이용하여 조사하였음
- 염증성 사이토카인(TNF- α 및 IL-6 β)의 생성 측정: 동일 조건에서 배양된 세포의 배지를 이용하여 TNF- α 및 IL-6 β 의 생성 정도를 cytokine sandwich ELISA kit를 이용하여 측정하였음
- RT-PCR에 의한 mRNA 발현 분석: 다양한 농도의 schisandrin A를 1시간 전 처리후, LPS를 처리하고 24시간 배양된 세포를 모아 총 RNA를 추출하여 해당 primer를 이용하여 전사수준에서의 유전자 발현을 RT-PCR로 분석하였음
- 단백질의 분리 및 Western blot analysis: Schisandrin A의 염증성 및 산화적 스트레스 보호에 따른 특정 유전자들의 발현 변화 관찰을 위하여 준비된 세포에서 단백질을 분리하여 관찰 대상 유전자의 항체를 이용하여 단백질 수준에서의 발현 변화를 조사하였음
- RAW 264.7 대식세포에서 형광 염색을 통한 NF- κ B의 세포 내 분포 양상의 관찰: NF- κ B의 LPS 유도 핵 전좌에 대한 schisandrin A의 영향을 면역염색을 통하여 관찰하기 위하여 LPS로 30분 동안 처리하기 전에 200 μ M schisandrin A와 함께 1시간 동안 배양하고 세포를 고정한 후, NF- κ B p65로 염색을 하고 fluorescein-conjugated anti-rat immunoglobulin G를 이용하여 2차 반응을 일으킨 후 DAPI 염색을 실시하고 형광현미경 하에서 관찰하였음
- ROS 생성변화 측정: 세포 내 ROS의 생성 변화 정도를 확인하기 위하여 준비된 세포들을 fluorescent probe 인 2',7'-di-chlorodihydrofluorescein diacetate (10 μ M)로 20분간 염색 후 flow cytometer를 사용하여 분석을 하였음

③ 연구 수행 결과

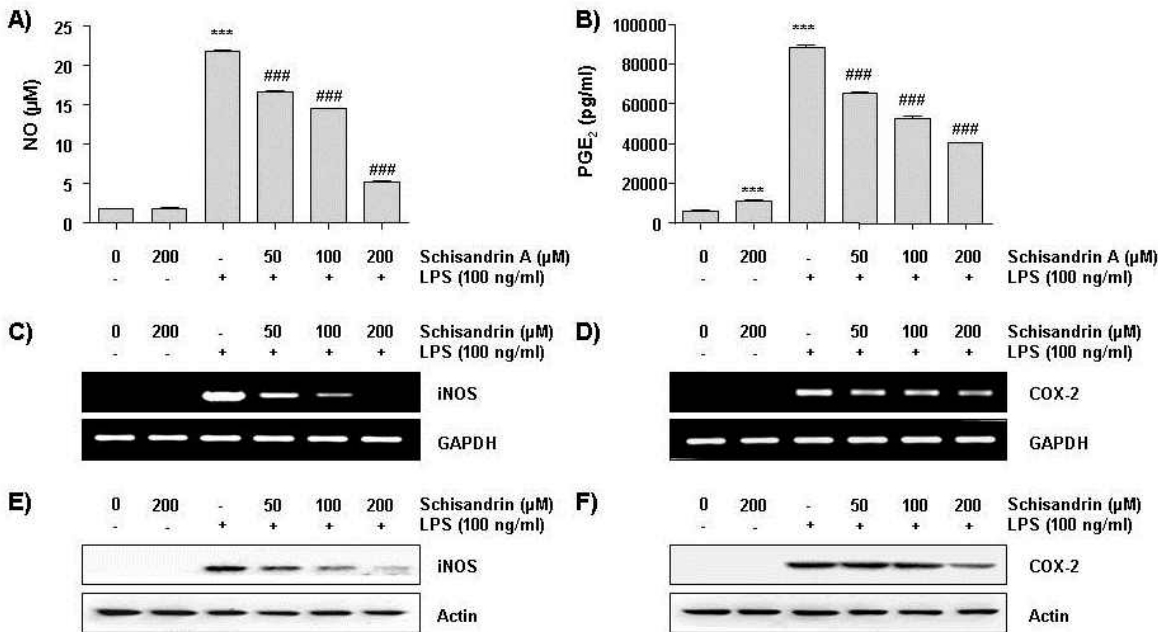
- LPS에 의한 RAW 264.7 대식세포의 증식억제에 미치는 schisandrin A의 영향: RAW 264.7 대식세포 모델에서 LPS 처리에 미치는 schisandrin A의 영향을 조사하기 위한 실험 조건의 설정을 위하여 LPS 및 schisandrin A가 RAW 264.7 대식세포의 생존에 미치는 영향을 MTT assay로 조사하였음
- 결과 44A에 나타낸 바와 같이 LPS가 존재하지 않는 조건에서 300 μ M까지의 schisandrin A가 RAW 264.7 세포의 생존에 유의적인 영향을 미치지 않았으며, LPS 단독으로 처리 한 RAW 264.7 세포의 형태학적 변화는 schisandrin A의 전처리에 의해 다소 완화되었음(결과 44B)
- 따라서, 200 μ M 미만의 농도에서 schisandrin A의 효과를 평가하였음



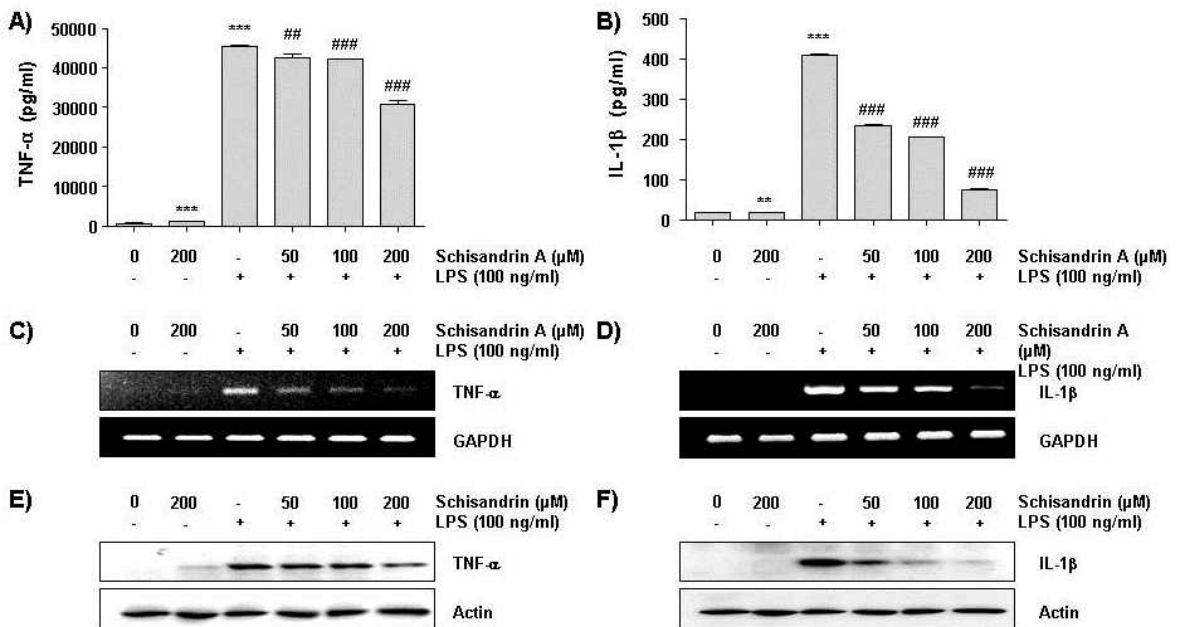
결과 44. LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포의 증식과 형태변화에 미치는 schisandrin A의 영향

- RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 염증성 매개인자의 생성에 미치는 schisandrin A의 영향: RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 대표적인 염증 매개체인 NO와 PGE2의 생성에 schisandrin A가 미치는 영향을 조사하기 위해 RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 schisandrin A를 1시간 동안 전처리한 후 LPS에 24시간 동안 노출시켰음
- 결과 45A 및 B에 나타낸 바와 같이, LPS 처리에 의하여 NO 및 PGE2 농도가 유의적으로 증가하였으며, 이는 schisandrin A의 처리 농도 의존적으로 감소되었음
- RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 iNOS 및 COX-2의 발현 증가에 미치는 schisandrin A의 영향: Schisandrin A에 의한 NO와 PGE2의 생성 억제가 그들의 생성에 관여하는 효소인 iNOS 및 COX-2의 발현 억제와 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, iNOS 뿐만 아니라 COX-2 mRNA 및 단백질 발현 수준이 LPS가 처리된 RAW 264.7 세포에서 현저하게 증가되었으나, schisandrin A는 LPS에 의한 iNOS와 COX-2의 mRNA와 단백질도 농도 의존적으로 감소시켰음(결과 45C-F)
- 이러한 결과는 schisandrin A가 iNOS 뿐만 아니라 COX-2 mRNA와 단백질 수준의 하

항 조절을 통해 NO와 PGE2 생산을 억제한다는 것을 의미함



결과 45. RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 염증성 매개인자의 생성과 그들 조절 유전자들의 발현 증가에 미치는 schisandrin A의 영향



결과 46. RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 염증성 사이토카인의 생성과 발현 증가에 미치는 schisandrin A의 영향

- RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 염증성 사이토카인의 생성 및 발현 증가에 미치는 schisandrin A의 영향: Schisandrin A의 항염증 효능을 추가적으로 평가하기 위하여 동일 조건에서 배양된 세포의 배지를 이용하여, TNF-α와 IL-1β와 같은 염증성 사이토카인

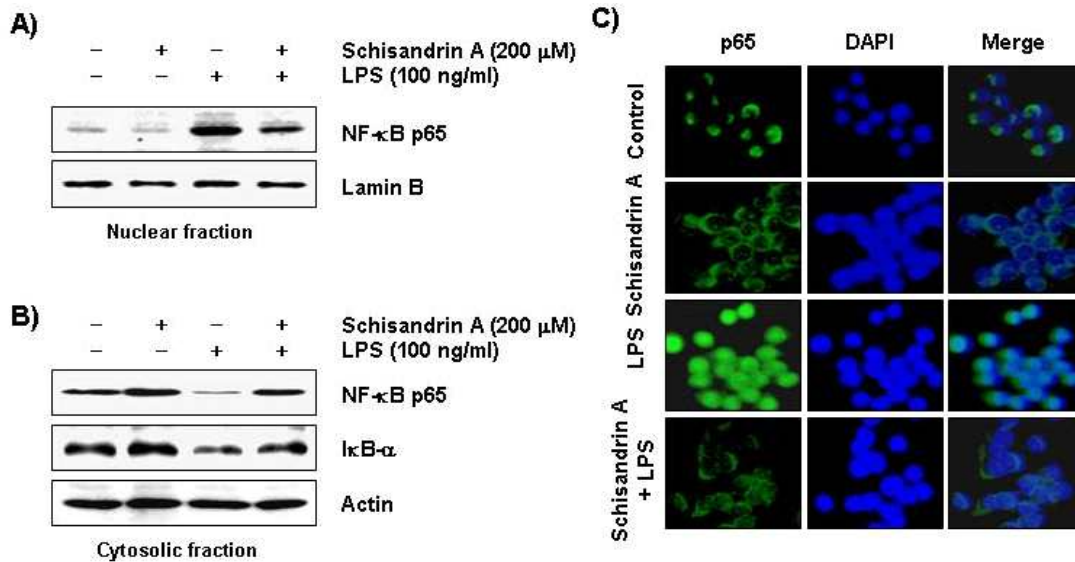
의 생성 억제능을 평가한 결과, LPS 처리에 의하여 증가된 두 염증성 사이토카인의 생성이 schisandrin A에 의하여 유의적으로 감소되었으며(결과 46A 및 B), 이는 TNF- α 와 IL-1 β 의 mRNA 및 단백질 발현의 하향 조절과 관련이 있었음(결과 46C-F)

→ 이러한 결과 역시 schisandrin A가 전사 수준에서 염증성 사이토카인 발현을 차단함을 의미함

- RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 NF- κ B의 핵 전이와 I κ B- α 의 분해에 미치는 schisandrin A의 영향: 전사 조절인자인 NF- κ B의 핵 전이는 염증 과정과 관련된 유전자의 전사활성을 위한 전제 조건으로 간주되기에, schisandrin A가 NF- κ B의 전이를 억제할 수 있는지의 여부를 조사하였음

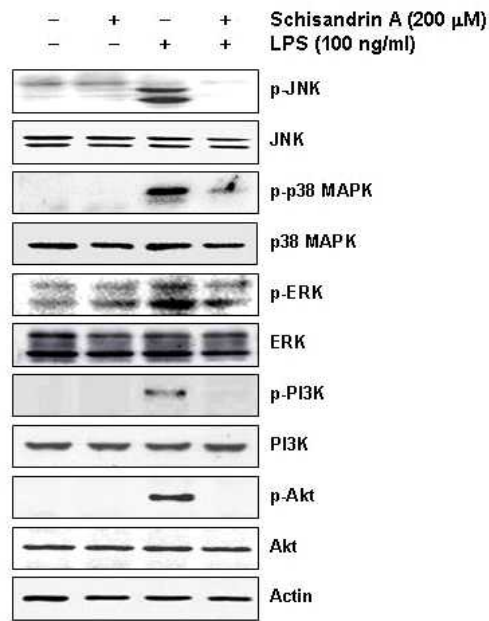
→ 결과 47A 및 B에서 알 수 있듯이, LPS 자극이 I κ B- α 의 발현 감소와 함께 NF- κ B p65의 핵 전이를 현저히 촉진하였으나, schisandrin A는 NF- κ B의 핵으로의 전이를 억제하고 I κ B- α 의 발현을 회복시켰음

→ 또한 LPS는 면역 형광 염색 결과에서 알 수 있듯이, NF- κ B p65의 핵 전이를 촉진시켰으나 schisandrin A 전처리에 의해 효과적으로 감소되었으며(결과 47C), 이는 schisandrin A가 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 자극된 NF- κ B의 활성화를 억제하였음을 보여주는 것임

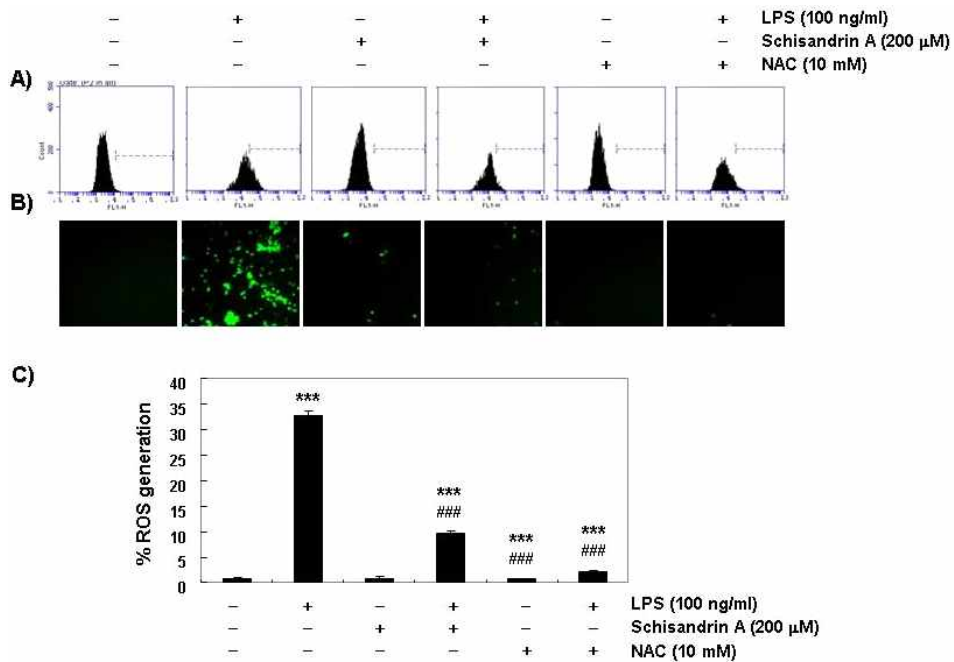


결과 47. RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의한 NF- κ B의 핵 전이와 I κ B- α 의 분해에 미치는 schisandrin A의 영향

- RAW 264.7 대식세포에서 schisandrin A에 의한 MAPKs 및 PI3K/Akt 경로 활성의 차단: 세포 내 대표적인 신호전달계에 해당되는 MAPKs와 PI3K/Akt 신호전달 경로는 대식세포에서 LPS에 의한 염증 유발에 핵심적인 역할을 하기 때문에, schisandrin A의 LPS에 의한 염증반응 억제 효과가 이러한 신호전달 경로 활성 억제와 연관성이 있는지의 여부를 관찰한 결과, LPS 처리가 PI3K와 Akt뿐만 아니라 3개의 MAPKs 구성 kinase인 JNK, p38 MAPK 및 ERK의 인산화를 촉진하였으며, schisandrin A는 LPS 자극에 의한 이들 신호계의 활성을 억제뿐만 아니라 PI3K/Akt 신호 전달 경로 역시 탈인산화를 통한 불활성화시켰음을 알 수 있었음(결과 48)



결과 48. RAW 264.7 대식세포에서 schisandrin A의 LPS에 의한 MAPKs 및 PI3K/Akt 경로 활성의 차단



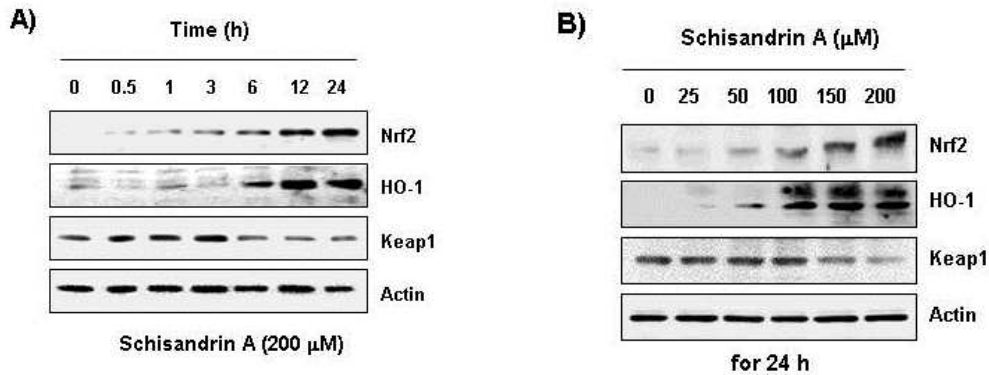
결과 49. RAW 264.7 대식세포에서 schisandrin A에 의한 LPS 매개 ROS 생성의 차단 효과

- RAW 264.7 대식세포에서 schisandrin A에 의한 LPS 매개 ROS 생성의 차단: 염증의 개시와 악화는 산화적 스트레스 요인에 의해 매개되며 LPS에 의해 과다 활성화된 대식세포는 ROS 축적을 증가시키기 때문에 schisandrin A가 이러한 산화적 스트레스를 억제할 수 있는지의 여부를 ROS 생성 차단 효과로 조사하였음

→ 결과 49에서 알 수 있듯이 LPS가 자극된 RAW 264.7 세포에서 세포 내 ROS 형성에 매우 증가되었으나, schisandrin A나 ROS 생성 저해제인 N-acetyl-cysteine (NAC)에

의하며 현저하게 ROS 함량의 감소되었음을 flow cytometry 및 형광현미경적 관찰로 확인하였으며, 이는 schisandrin A의 항염증 효과가 항산화 작용과 관련이 있음을 확인시켜 결과임

- RAW 264.7 대식세포에서 schisandrin A에 의한 nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) 및 heme oxygenase-1 (HO-1) 발현의 유도: Nrf2/HO-1 신호 시스템은 세포 내 대표적인 항산화 시스템이며, schisandrin A의 항산화 효과가 이러한 Nrf2/HO-1 신호계의 활성 증가와 연관성이 있는지의 여부를 조사하였으며, 결과 50에 나타낸 바와 같이, schisandrin A의 처리 기간과 농도의 증가에 따라 Nrf2의 발현이 점차 증가함과 동시에 Nrf2의 negative regulator인 Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1)의 발현은 현저히 감소하였음(결과 50)
- 또한, schisandrin A는 HO-1 발현을 효과적으로 증가 시켰으며, 이는 schisandrin A의 항산화 효과가 Nrf2/HO-1 신호 전달 경로의 활성화와 관련이 있음을 의미함



결과 50. RAW 264.7 대식세포에서 schisandrin A에 의한 Nrf2/HO-1 신호계의 활성화

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 schisandrin A가 염증성 매개인자와 사이토카인의 생성을 억제하고 MAPKs 및 PI3K/Akt 경로의 활성을 감소시킴으로써 NF-κB의 억제를 유발하여 항염증 효과를 나타냄을 보여줌
- 또한 이 과정에서 ROS 축적을 억제함으로써 항산화 효능을 동시에 보여주었으며, 이는 Nrf2/HO-1 신호계의 활성화와 연관성이 있음을 암시하여 주었음
- 본 연구의 결과는 오미자의 주요 생리활성 성분인 schisandrin A가 다중 신호전달 경로를 조절하여 항염증 및 항산화 효능을 발휘함을 보여주는 것이며, 오미자 성분의 효능을 뒷받침하여 주는 주요한 자료로서 활용 가치가 매우 높음을 보여주는 것임

(카) SW1353 인간 연골세포에서 산화적 스트레스에 대한 schisandrin A의 세포 보호 효과

① 연구 수행의 목적

- 활성산소종(ROS)으로 유도되는 연골 세포의 apoptosis는 퇴행성 관절염의 발병 기전에 중요한 역할을 함
- 현재까지 schisandrin A의 유도체들의 항산화 효과에 대해서는 여러 연구가 보고되었지만, schisandrin A의 항산화 효능의 분자 기전은 아직 미해결 상태로 남아 있기에 본 연

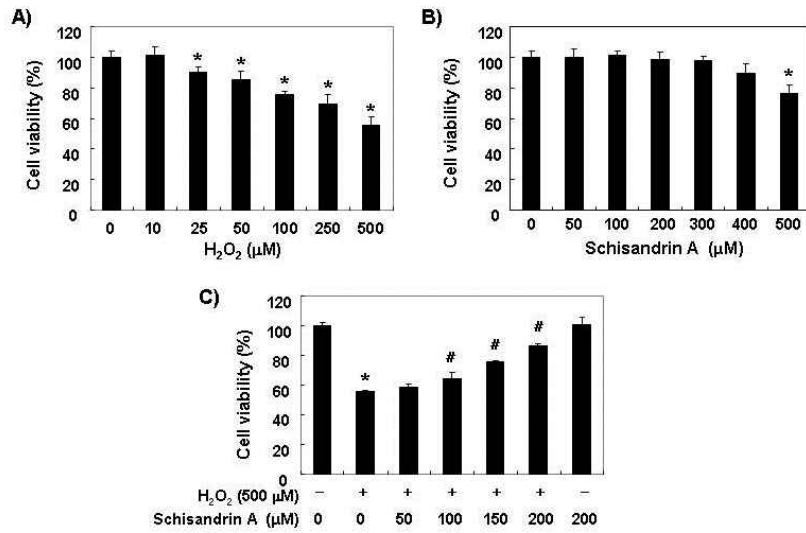
구는 SW1353 인간 연골세포에서 산화적 스트레스(H_2O_2)에 대한 schisandrin A의 세포 보호 여부를 조사하였음

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: Schisandrin A의 stock solution을 DMEM에 적정 농도로 희석하여 처리하였음
- 세포 생존률 측정: 산화적 스트레스에 의한 세포독성에 미치는 schisandrin A의 영향을 조사하기 위하여 SW1353 세포에 적정 농도의 H_2O_2 를 24시간 처리하거나, schisandrin A를 1시간 전처리 후 H_2O_2 를 24시간 처리한 후, MTT assay를 실시하였음
- 핵의 형태 변화 관찰: Apoptosis가 유발된 세포에서 특이적으로 나타나는 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 다양한 조건에서 배양된 세포를 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석된 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 용액으로 상온 암하에서 20분 염색한 후 형광현미경 하에서 핵의 형태를 비교하였음
- 단백질의 분리 및 Western blot analysis: Schisandrin A의 산화적 스트레스 보호에 따른 특정 유전자들의 발현 변화 관찰을 위하여 준비된 세포에서 단백질을 분리하여 관찰 대상 유전자의 항체를 이용하여 단백질 수준에서의 발현 변화를 조사하였음
- DNA flow cytometry에 의한 apoptosis 유도의 정량적 분석: Apoptosis가 유발된 세포의 정량적 분석을 위해 Cycle TEST PLUS DNA REAGENT Kit를 이용한 flow cytometry 분석을 수행하였음
- Mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\psi_m$) 변화의 분석: 미토콘드리아 기능 손상의 여부를 확인하기 위한 MMP 값 변화 정도를 측정하기 위하여 다양한 조건에서 배양된 세포들에 10 μM 의 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1)로 염색 후 flow cytometer에 적용시켜 MMP의 변화를 측정하였음
- ROS 생성변화 측정: 세포 내 ROS의 생성 변화 정도를 확인하기 위하여 준비된 세포들을 DCF-DA로 20분간 염색 후 flow cytometer를 사용하여 분석을 하였음

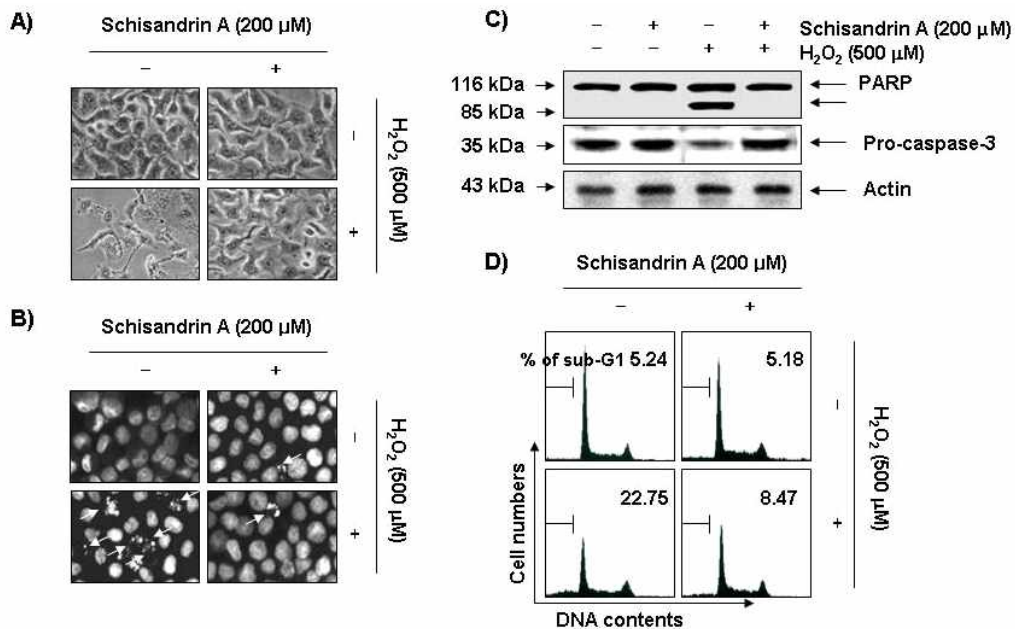
③ 연구 수행 결과

- 산화적 스트레스에 의한 SW1353 연골세포의 증식억제에 미치는 schisandrin A의 영향: SW1353 연골세포 모델에서 산화적 스트레스에 미치는 schisandrin A의 영향을 조사하기 위한 실험 조건의 설정을 위하여 H_2O_2 및 schisandrin A가 SW1353 연골세포의 생존에 미치는 영향을 MTT assay로 조사하였음
 - 결과 51A에 나타낸 바와 같이 H_2O_2 처리 농도의 증가에 따라 SW1353 연골세포의 생존율이 유의적으로 감소되었으며, schisandrin A 단독 24시간 처리 조건에서는 400 μM 이하의 농도에서 유의적인 변화를 보이지는 않았음(결과 51B)
 - 따라서 500 μM 의 H_2O_2 를 산화적 스트레스 조건으로 설정하였으며, 이에 따른 schisandrin A의 세포독성 보호 효과를 조사한 결과, H_2O_2 를 처리하기 1시간 전에 schisandrin A를 노출시켰을 경우, H_2O_2 단독 처리군에 비하여 높은 세포 생존률(100 μM 및 200 μM 의 schisandrin A 동시 처리군에서 약 76% 및 87%)을 보여 schisandrin A는 H_2O_2 처리에 의한 세포 생존율 저하를 향상시켰음
 - 이에 근거하여 후속 실험은 200 μM 의 schisandrin A로 1 시간 전처리 한 후 500 μM 의 H_2O_2 에 24시간 노출시킨 세포를 대상으로 수행하였음



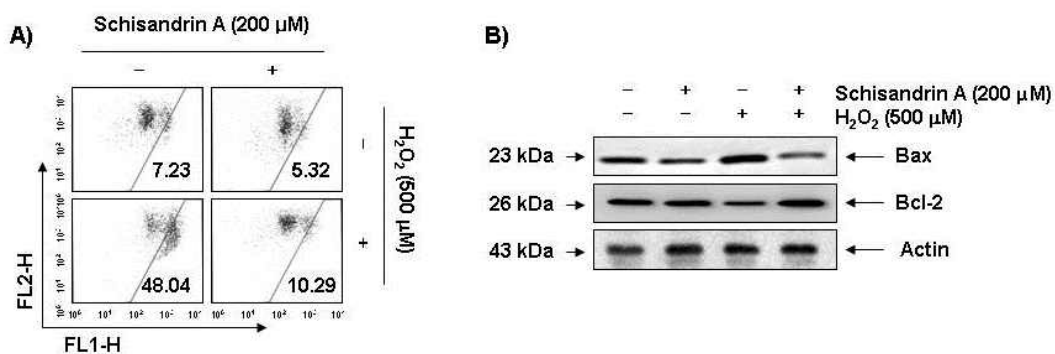
결과 51. H₂O₂가 처리된 SW 1353 세포의 증식에 미치는 schisandrin A의 영향

- 산화적 스트레스에 의한 SW1353 연골세포의 형태적 변화에 미치는 schisandrin A의 영향: Schisandrin A의 산화적 스트레스에 대한 SW1353 연골세포의 보호 효과가 apoptosis 유도 억제와 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 apoptosis가 일어난 세포의 핵에서 특이적으로 관찰되는 chromatin condensation에 따른 apoptotic body의 형성에 미치는 영향을 조사하였음
- 결과 52B에서 알 수 있듯이, H₂O₂ 단독 처리된 SW1353 연골세포에서는 이러한 핵의 형태 변화가 관찰되었으나, schisandrin A 전처리군에서는 이러한 현상이 억제되었으며, 이는 세포의 전체적인 형태 변화가 schisandrin A 전처리에 의하여 거의 대조군 수준으로 유지되었던 결과와 잘 일치되었음(결과 52A).



결과 52. SW 1353 연골세포에서 H₂O₂에 처리에 의한 apoptosis 유도에 미치는 schisandrin A의 영향

- 산화적 스트레스에 의한 SW1353 연골세포의 apoptosis 유도에 미치는 schisandrin A의 영향: 산화적 스트레스에 의한 연골세포의 apoptosis 유도는 caspase 활성화와 연관되어 있으며, caspase 활성화 의존적인 apoptosis 유발에서는 effector caspase의 활성화에 따른 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)와 같은 기질 단백질의 분해가 동반되기에, schisandrin A의 산화적 스트레스 억제 효능이 apoptosis 유발의 억제에 의한 것인지를 확인하기 위하여 PARP의 발현 변화를 관찰한 결과, H₂O₂ 단독 처리된 조건에서 배양된 SW1353 연골세포에서는 PARP 단편화 현상이 관찰되었으며, 이러한 현상이 schisandrin A가 전처리된 조건에서는 대조군 수준으로 억제되었음(결과 52C)
 - 아울러, PARP의 단편화와 연관된 대표적인 effector caspase인 caspase-3의 불활성형 발현도 H₂O₂ 단독 처리군에서는 뚜렷한 감소를 보였으나, schisandrin A의 전처리군에서는 대조군 수준으로 유지되었음(결과 52C)
 - 이러한 schisandrin A의 산화적 스트레스에 의한 SW1353 연골세포의 apoptosis 유도 억제 여부를 정량적으로 분석한 결과에서도 schisandrin A는 H₂O₂에 의한 apoptosis 유도가 억제되었음을 확인하였음(결과 52D)
- 산화적 스트레스에 의한 SW1353 연골세포의 미토콘드리아 기능 손상에 미치는 schisandrin A의 영향: 산화적 스트레스에 따른 연골세포의 apoptosis 유도는 미토콘드리아의 기능적 손상과 연관이 있기에, schisandrin A가 H₂O₂에 의한 미토콘드리아 기능 손상을 차단할 수 있는지의 여부를 MMP 값의 변화로 조사하였음
 - 결과 53A에 나타낸 바와 같이, 대조군과 schisandrin A 단독 처리군에 비하여 H₂O₂가 함유된 배지에서 배양된 SW1353 연골세포에서의 MMP 손상 정도는 48% 정도 나타나 대조군에 비하여 약 7배 증가되었지만, schisandrin A 전처리 조건에서는 10% 정도를 보여 H₂O₂에 의한 미토콘드리아 기능 손상이 억제되었음을 알 수 있었음

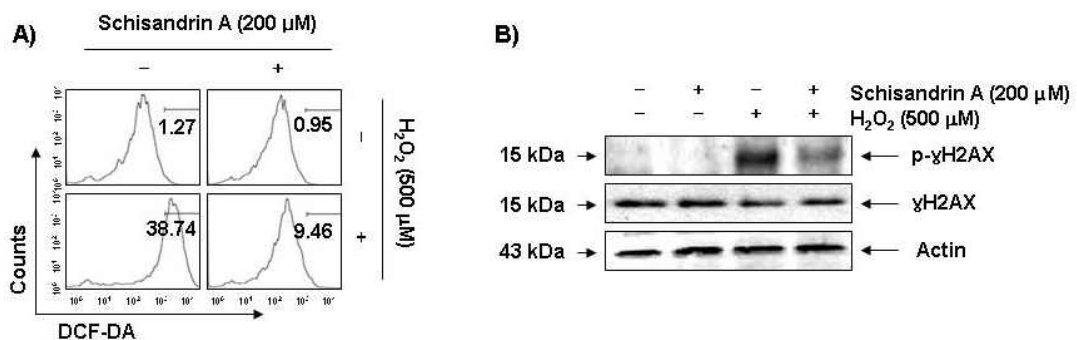


결과 53. SW 1353 연골세포에서 H₂O₂에 처리에 의한 MMP의 소실 및 apoptosis 조절 유전자들의 발현 변화에 미치는 schisandrin A의 영향

- 산화적 스트레스에 의한 SW1353 연골세포에서 Bcl-2 family 유전자들의 발현에 미치는 schisandrin A의 영향: 결과 53B에 제시한 바와 같이, H₂O₂의 처리에 의하여 증가되었던 미토콘드리아 기능 손상을 유발하는 pro-apoptotic Bax의 발현이 증가된 반면에, anti-apoptotic Bcl-2의 발현은 감소되었으나 schisandrin A의 전처리에 의해서는 두 Bcl-2 family 단백질들의 발현이 대조군 수준으로 유지되었음
 - 이는 schisandrin A가 H₂O₂에 의한 apoptosis 조절 핵심 유전자군인 Bcl-2 family 인

자들의 발현 변화를 억제함으로써 미토콘드리아 기능 손상을 차단시켜 apoptosis 유도를 억제하였음을 보여 주는 것임

- 산화적 스트레스에 의한 SW1353 연골세포의 ROS 생성에 미치는 schisandrin A의 영향: Schisandrin A의 산화적 스트레스 방어 효과가 ROS의 생성 및 DNA 손상 억제와 직접적인 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, H₂O₂ 처리 30분 이내에 ROS의 생성이 증가하기 시작하여, 6시간 경과 후 최고치를 나타낸 후 다시 감소되었음
→ 그러나 schisandrin A를 전처리 후 H₂O₂를 6시간 처리하였을 경우 대조군 수준까지는 아니지만 현저하게 감소되어 schisandrin A가 강력한 항산화 효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었음(결과 54A)



결과 54. SW 1353 연골세포에서 H₂O₂에 처리에 의한 ROS 생성의 증가 및 DNA 손상에 미치는 schisandrin A의 영향

- 산화적 스트레스에 의한 SW1353 연골세포의 DNA 손상에 미치는 schisandrin A의 영향: 다음은 schisandrin A의 항산화 효능이 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 차단과의 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 DNA 이중 나선 손상 지표인 γH2AX 단백질의 인산화 (serine 139)에 미치는 schisandrin A의 영향을 조사한 결과, H₂O₂에 노출된 SW1353 연골세포에서 γH2AX 단백질의 전체적인 발현에는 큰 변화 없이 인산화가 매우 증가되었으나, schisandrin A 전처리된 세포에서는 이러한 현상을 관찰할 수 없었음(결과 54B)
→ 따라서 schisandrin A에 의한 DNA 손상의 방어 효과는 ROS 생성의 차단과 직접적인 연관성이 있음을 알 수 있었음

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 다양한 인체 질환의 발병과 악화가 산화적 스트레스 및 염증성 반응을 동반한다는 측면에서 이러한 schisandrin A의 항산화 효능은 항염증 효능과 함께 인체 항상성 유지를 위한 기능성 소재로서의 가치가 매우 높을 수 있음을 의미함
- 향후 다양한 모델에서 schisandrin A의 효능에 대한 추가적인 연구가 필요하지만, 본 연구의 결과는 schisandrin A의 연골세포의 보호 기능은 항산화 효능에 의한 것임을 알 수 있으며, 이는 오미자의 기능성 근거를 위한 심화 연구 자료로 활용될 것임

(타) SW1353 인체 연골세포에서 오미자와 상엽 추출물 복합처리의 관절염 억제 효능

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 핵심 재료인 오미자 추출물과 상엽 추출물의 복합 처리에 의한 관절염 억

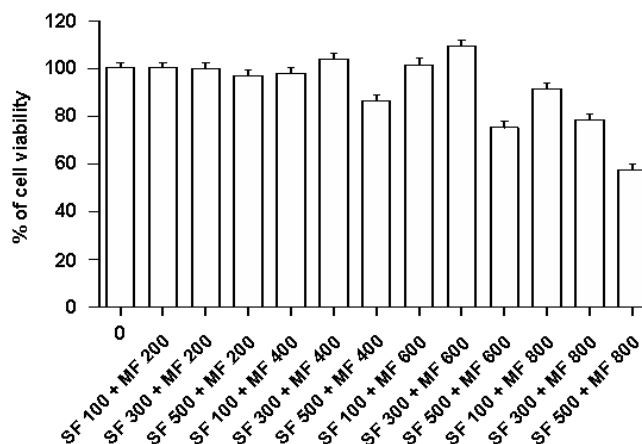
제 효능 증대 가능성을 검증하기 위하여 관절염의 발병원인인 염증성 지표로 NO 생성 억제에 미치는 두 추출물 복합처리에 따른 효능을 평가하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 20% 에탄올 오미자 추출물(SF) 및 상업의 열수 추출물(MF)
- 실험모델: SW1353 인체 연골세포를 대상으로 대표적인 퇴행성 관절염 유발 cytokine인 IL-1 β 를 이용한 관절염 모델을 적용하였음
- 세포 생존도 측정: SW1353 인체 연골세포를 대상으로 MTT assay를 통하여 복합처리에 의한 세포 생존도 측정 → 세포 독성이 없는 실험 농도의 선정
- 염증 반응 측정 항목: IL-1 β 에 의하여 유도된 대표적인 염증성 매개인자인 NO의 생성에 미치는 오미자 및 상업 추출물 복합처리의 효능을 검증하기 위하여 Griess reagent 분석법을 수행하였음

③ 연구 수행 결과

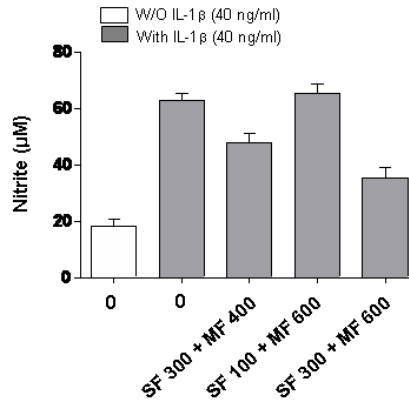
- SW1353 인체 연골세포의 증식에 미치는 오미자 및 상업 추출물 복합처리에 따른 영향: 오미자 및 상업 추출물 복합처리에 따른 관절염 억제 효능 검증을 위한 처리 농도의 설정을 위하여 다양한 농도의 오미자 추출물(SF) 및 상업 추출물(MF)을 24시간 처리 후 MTT assay를 수행하였음 → 오미자 추출물 및 상업 추출물의 복합처리 결과 2:3 비율인 오미자 추출물 300 μ g/ml과 상업추출물 600 μ g/ml 복합 처리군까지는 뚜렷한 세포독성을 나타내지 않았지만, 그 이상의 농도 오미자 500 μ g/ml + 상업 600 μ g/ml 이상에서는 SW1353 세포의 증식 억제가 관찰되었음(결과 55) → 따라서 세포증식 100% 구간 이상 증가된 2:2 (오미자 300 μ g/ml + 상업 400 μ g/ml), 1:3 (오미자 100 μ g/ml + 상업 600 μ g/ml) 및 2:3 (오미자 300 μ g/ml + 상업 600 μ g/ml) 비율의 복합물을 최적농도로 설정하였음



결과 55. SW 1353 연골세포의 증식에 미치는 오미자 및 상업 복합 추출물의 영향

- IL-1 β 에 의한 염증성 매개인자(NO)의 생성에 미치는 오미자 및 상업 추출물 복합처리에 따른 영향: 퇴행성 관절염의 발병 및 진행 촉진 요인인 염증성 매개인자의 생성 억제에 미치는 오미자 추출물의 효능을 조사하기 위하여 IL-1 β 에 의하여 유도된 NO의 생성 증가에 미치는 영향을 Griess reagent 분석법으로 조사하였음 → IL-1 β 의 처리에 의하여

NO의 생성이 매우 증가되었으나, 2:3 (오미자 300 µg/ml + 상엽 600 µg/ml) 및 2:2 (오미자 300 µg/ml + 상엽 400 µg/ml) 비율의 복합물이 전처리된 조건에서 NO의 생성이 유의적으로 억제되었으며 1:3 (오미자 100 µg/ml + 상엽 600 µg/ml) 비율의 복합물 처리에서는 NO 생성 억제 효능이 없음이 관찰되었음(결과 56)



결과 56. SW 1353 연골세포에서 IL-1β에 의한 NO의 생성에 미치는 오미자 및 상엽 복합 추출물의 영향

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 오미자 추출물과 상엽 추출물 복합처리에 따른 IL-1β에 의한 염증성 매개인자의 생성을 억제할 가능성을 보여주는 것임 → 이후 복합처리에 따른 염증성 매개인자들과 연골기질 분해의 대표적인 효소인 MMPs의 생성 및 발현에 미치는 복합물 효능 검증과 관련 기전 해석이 요구됨
- 비록 본 결과가 두 추출물의 복합 처리에 의한 항염증 효능 증대 가능성을 보여주는 것이긴 하지만, 이를 위한 주요 생리활성 지표의 발굴 및 동물 실험을 통한 효능 검증을 지속적으로 수행해야 할 필요 및 사업화에 따른 가치 평가가 이루어져야 할 것임

(과) Primary culture된 연골세포에서 오미자와 상엽 추출물 복합처리의 관절염 억제 효능

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 핵심 재료인 오미자 추출물과 상엽 추출물의 복합 처리에 의한 관절염 억제 효능 증대 가능성을 검증하기 위하여 primary culture된 연골세포 모델에서 퇴행성 관절염에 미치는 두 추출물 복합처리의 효능을 확인하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 20% 에탄올 오미자 추출물 + 열수 상엽 추출물(1:1 비율)
- 실험 모델: Primary culture된 연골세포 모델을 대상으로 대표적인 퇴행성 관절염 유발 cytokine인 IL-1β를 이용한 관절염 모델을 적용하였음
- 염증 반응 측정 항목: IL-1β에 의하여 유도된 대표적인 염증성 매개인자인 NO와 PGE₂의 생성에 미치는 복합물의 효능을 검증하기 위하여 Griess reagent 분석법 및 ELISA를 수행하였음

③ 연구 수행 결과

- IL-1β에 의한 염증성 매개인자(NO)의 생성에 미치는 상엽 추출물의 영향: 염증성 매개인

자의 생성 억제에 미치는 복합물의 효능을 조사하기 위하여 IL-1 β 에 의하여 유도된 NO의 생성 증가에 복합물이 미치는 영향을 조사하였음 \rightarrow IL-1 β 의 처리에 의하여 NO의 생성이 매우 증가되었고, 양성대조군에서 현저히 감소됨을 확인할 수 있음 \rightarrow 또한 오미자 및 상엽 추출물 단독 처리에서 NO생성이 감소하였으나, 복합물에서는 상승효능이 없음을 확인함 \rightarrow 콜비식 = $X + Y - X*Y/100$

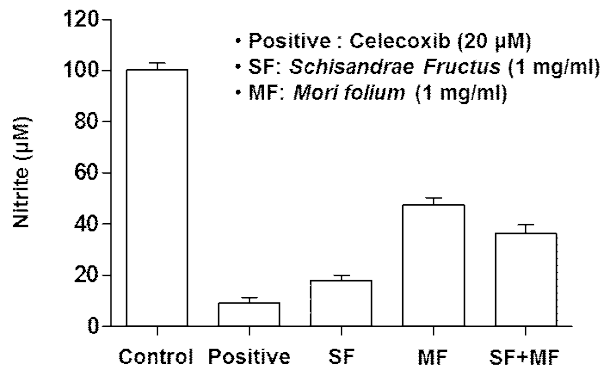
X, Y는 비처리 대조군에 대한 효율

X = 82

Y = 53

E = $82 + 53 - 82*53/100 = 91.54$

\rightarrow 따라서 복합물 처리군에 대한 상승효과 예상 값은 $100 - 91.54 = 8.46\%$, 복합물 실제 값은 36% 이므로 예상 값 보다 높게 나오므로 상승효과는 없음(결과 57)



결과 57. Primary culture된 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 NO의 생성에 미치는 오미자 및 상엽 복합 추출물의 영향

- 콜비식에 따라 복합물의 상승효능이 없는 것으로 판단되어지며, 퇴행성 관절염 억제 효능으로 오미자 추출물의 효능이 뛰어나므로 오미자 추출물로 선정하여 계속 진행하였으며, 상엽 추출물에 대해서는 다양한 실험계를 사용하여 관절염 제어를 위한 후보물질로 응용 가능성이 매우 높음을 제시하였음

(하) 오미자 추출물과의 복합 투여 후보군 발굴 및 연구 범위 확산을 위한 기타 추가적인 심화 연구 결과 요약

① 오미자 추출물과의 복합 투여 후보군 발굴에 따른 연구 결과물

- 괴각(槐角, Sophorae Fructus) 추출물의 염증반응 차단 효과의 규명(Fructus sophorae attenuates secretion of proinflammatory mediators and cytokines through the modulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages): RAW 264.7 대식세포 모델에서 괴각 추출물에 의한 항염증 효능 및 관련 기전연구를 수행하였음

\rightarrow 향후 오미자 추출물과의 복합 처리에 따른 상승 효과 여부에 대한 구체적인 추가 실험이 요구됨

- 매화나무 열매(매실, *Prunus mume* fruit)의 항산화 및 세포 보호 효과 규명(Ethanol

extract of *Prunus mume* fruit attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis involving Nrf2/HO-1 activation in C2C12 myoblasts): C2C12 근관세포(myotube) 모델에서 산화적 스트레스의 방어 효과에 대한 효능과 기전을 밝힘
→ 매실 역시 오미자 추출물과의 복합 처리에 따른 상승 효과 여부에 대한 구체적인 추가 실험이 요구됨

② 복합 투여 후보군의 생리활성 성분에 대한 연구 결과물

- Flavonoid 계열의 일종인 baicalein의 항산화 효능과 관련 기전 연구를 수행하였음 (Baicalein protects C6 glial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through regulation of the Nrf2 signaling pathway): 향후 오미자 추출물에 함유된 flavonoid의 효능 비교를 위한 유용한 자료로서의 활용 가치가 있다고 사료됨
- Flavonoid 계열의 일종인 morin의 항산화 효능과 관련 기전 연구를 수행하였음 (Morin exerts cytoprotective effects against oxidative stress in C2C12 myoblasts via the upregulation of Nrf2-dependent HO-1 expression and the activation of the ERK pathway): 이 결과 역시 향후 오미자 추출물에 함유된 flavonoid의 효능 비교를 위한 유용한 자료로서의 활용 가치가 있다고 생각함

③ 관절염 연계 근기능 향상을 위한 연구 결과물

- C2C12 근관세포(myotube) 모델을 이용한 근위축 연구 조건의 설정 완료 (Induction of muscle atrophy by dexamethasone and hydrogen peroxide in differentiated C2C12 myotubes): Dexamethasone과 과산화수소(H_2O_2)를 이용한 근 분화 유도 후 근위축 유도 모델계의 정립
- 오미자 추출물의 근위축 억제 효능의 평가 및 관련 기전 연구 (Effects of Schisandrae Fructus supplementation on apoptosis and inflammatory response in gastrocnemius muscle of dexamethasone-induced muscle atrophy mice): 상기 설정된 모델 중 dexamethasone에 의한 근위축 현상이 오미자 추출물의 처리에 의하여 유의적으로 차단됨을 밝힘

(2) 제1협동 과제 연구 결과

(가) 오미자 추출물의 지표성분 분석

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 핵심 재료인 오미자의 생리활성 효능에 대한 검증을 위하여 인지장애 개선 효능 검증 및 건강기능식품 개별인정을 위한 근거 자료 확보를 위한 연구 수행

② 연구 수행 방법

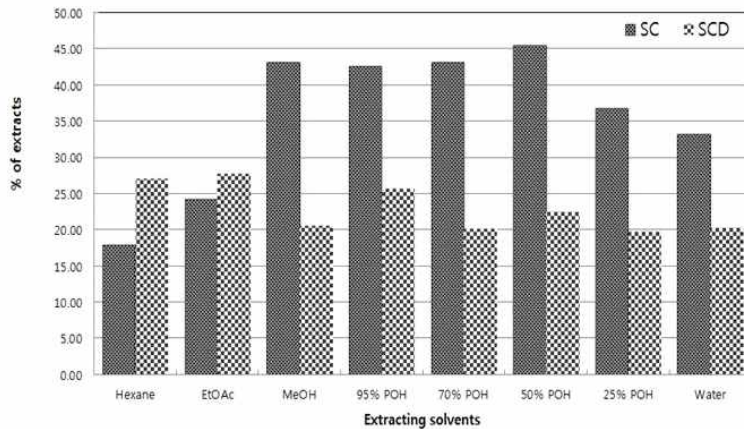
- 연구 재료: 오미자
- 추출 방법: 극성 및 주정의 농도를 95%, 70%, 50%, 25% 및 물 추출물의 함량, 주요 지표성분인 lignan의 함량을 분석하였음
- 추출물의 lignan 분석: 각각의 추출물을 MeOH로 추출하여, HPLC 분석 시료로 사용하였음 → HPLC 분석은 Luna C18 칼럼을 이용하여 증류수와 ACN을 gradient로 하여 분석

하였음

- Lignan의 분석 방법 확립: Schisandrin, schisandrin C, gomisin A 및 gomisin N을 농도 별로 회석하여 회귀직선, 분석농도범위, LOD, LOQ 및 상관 (r^2)값을 구하였음
- 함량분석: 각각의 추출물을 주요 lignan의 회귀 직선식을 이용하여 함량을 분석하였음

③ 연구 수행 결과

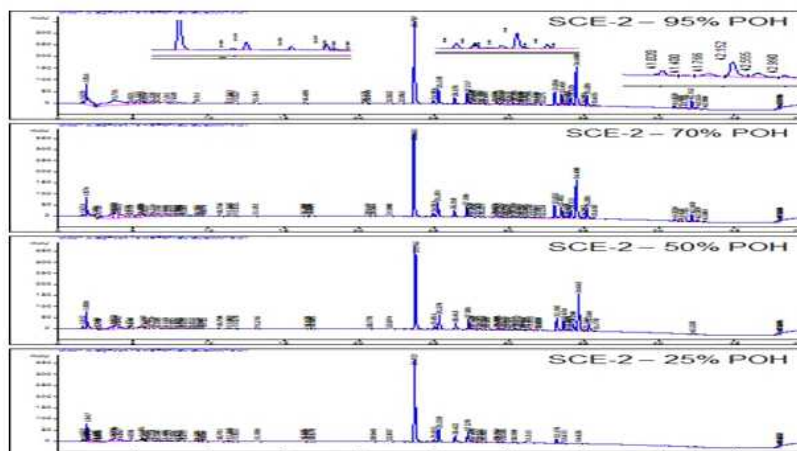
- 오미자의 분말을 hexane, EtOAc, MeOH 및 주정의 농도 95%, 70%, 50%, 25% 및 0%로 조정하여 추출하였음 → 각각의 추출물을 회전 증발기에서 건조하여 함량을 비교한 결과 MeOH 추출물과 주정 95%, 75% 및 50%에서 가장 추출물의 함량이 많았으며, 25% 이하의 주정의 경우 농도가 낮을수록 추출물의 함량이 감소하였으며 EtOAc 추출물의 hexane 추출물에서 보다 높게 나타났음(결과 1)
- 최적 분리 분석 방법 확립: 오미자 주요 성분의 분석 방법을 확립하기 위하여 다양한 용매를 이용하여 최적의 분석방법을 확립하였음 → 그 결과 schisandrin의 retention time (RT)은 17.852, gomisin A는 19.825, gomisin N은 32.297, schisandrin C는 32.254, α -iso-cubebenol은 32.067로서 본 방법이 오미자 주요 lignan을 분리할 수 있는 방법으로 확립하였음(결과 2)



결과 1. 극성 용매별 추출물 함량

- 회귀 직선식 분석: 오미자 주요 성분의 함량을 분석하기 위하여 분석방법에 따른 각 성분의 회귀 직선식은 schisandrin의 경우, $y = 14.35x + 84.61$, gomisin A는 $y = 10.82x + 11.94$, gomisin N은 $y = 11.53x + 5.61$, schisandrin C는 $y = 13.54x + 10.40$ 및 α -iso-cubebenol은 $y = 2.40x + 3.08$ 로 나타났음 → 또한 회귀 직선식에 대한 상관 값은 모두 0.999 이상이였음(표 1)
- 각 용매 추출물의 lignan 함량을 분석: Schisandrin은 hexane, EtOAc 및 MeOH로 추출하였을 때에 극성이 낮을수록 현저하게 감소하였고, MeOH와 95%, 70%, 50%주정으로 추출하였을 경우에는 차이가 거의 없었으며, 25% 이하의 주정농도에서는 주정의 농도가 낮을수록 감소하였음 → 또한 gomisin A, gomisin N 및 α -iso-cubebenol은 서로 유사한 경향으로서 hexane, EtOAc 및 MeOH로 추출하였을 때에 극성이 낮을수록 현저하게 감소하였고, MeOH과 95% 주정은 유사하게 높았으며, 70% 이하의 주정농도에서는 주정의 농도가 낮을수록 감소하였으며, 주요 lignan의 총 함량도 gomisin A 등과 유사한 경향

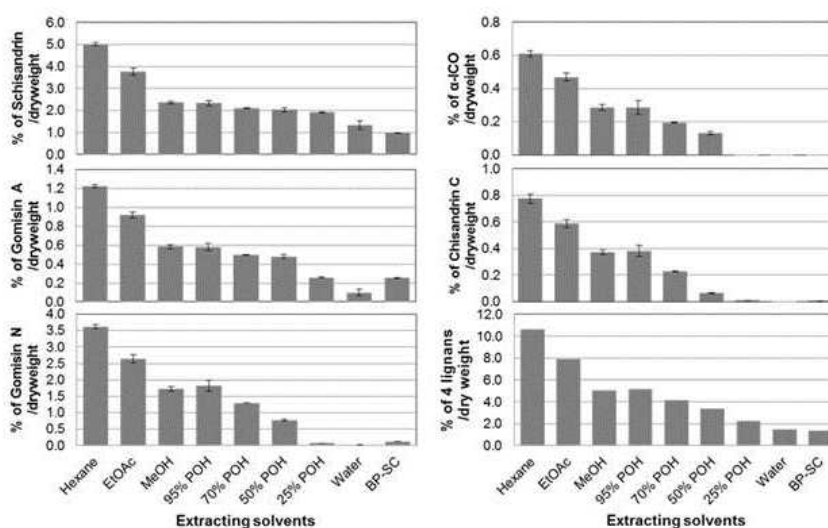
이었음(결과 3)



결과 2. 오미자 용매 추출물의 HPLC 크로마토그램 결과

표 1. 오미자 주요 성분의 회귀 직선식, LOD, LOQ 및 상관 값

Compounds	Regression equation	Linear range (µg/ml)	LOD	LOQ	r ²
Schisandrin	y = 14.35x + 84.61	2.5 - 500	26.04	85.85	0.9987
Gomisin A	y = 10.82x + 11.94	2.5 - 200	39.97	131.91	0.9999
Gomisin N	y = 11.53x + 5.61	2.5 - 200	28.21	93.09	0.9999
Schisandrin C	y = 13.54x + 10.40	2.5 - 200	38.09	125.68	0.9999
α-iso-cubebenol	y = 2.40x + 3.08	5.0 - 200	9.05	29.87	0.9999



결과 3. 오미자 용매 추출물의 리그난 함량 분석 결과

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 오미자 추출물의 주요 lignan을 많이 함유하고 있는 추출물을 얻기 위해

서는 극성이 낮은 용매일수록 함량이 증가하였으며, 오미자 추출물을 건강기능식품으로 개발하기 위해서는 가능한 극성이 낮은 주정을 사용하였을 때에 기능성 성분이 많이 함유되는 것으로 나타나, 제품으로 개발에 경제성 등을 고려하여서 농도를 정하는 것이 중요할 것으로 판단됨

(나) 상업으로부터 순수분리한 성분의 구조 동정

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 핵심 재료인 오미자와의 복합 처리 후보물질인 상업 추출물의 효능 검증을 위하여 인지장애 개선 효능 검증 및 건강기능식품 개별인정을 위한 근거 자료 확보를 연구 수행하기 위함

② 연구 수행 방법 및 결과

- 상업으로부터 순수분리한 성분인 SYFD38IEIAD의 NMR 자료와 spectrum은 아래 표 1의 결과에 나타내었음 → 결과에서 알 수 있듯이 carbon은 14개로서 quaternary carbon 2개, tertiary carbon 8개, secondary carbon 3개, primary carbon 1개 당 작용기가 하나 결합되어 있는 화합물로서 정확한 구조는 생리활성을 검증한 다음 특허를 출원한 후에 보고할 예정임
- 상업으로부터 순수분리한 성분인 MALE134IRIC의 NMR자료와 spectrum은 다음 표 2에 나타내었음 → Carbon은 12개로서 quaternary carbon 2개, tertiary carbon 2개, secondary carbon 1개인 지방산 중의 하나인 것으로 판단되며, 정확한 구조는 생리활성을 검증한 다음 특허를 출원한 후에 보고할 계획임

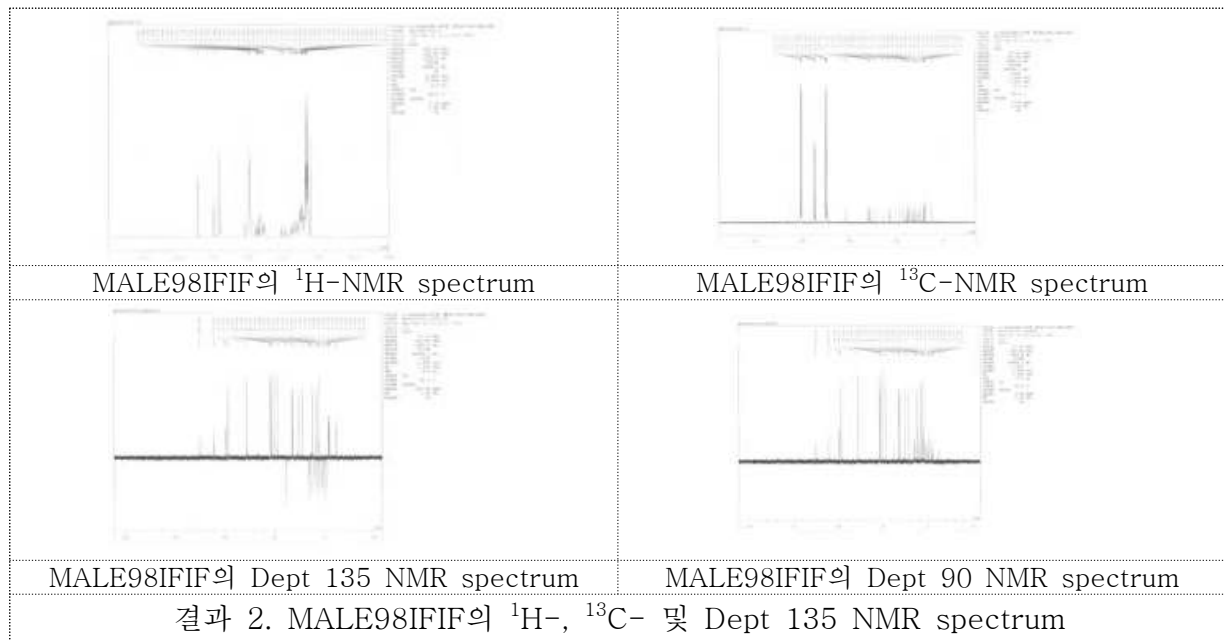
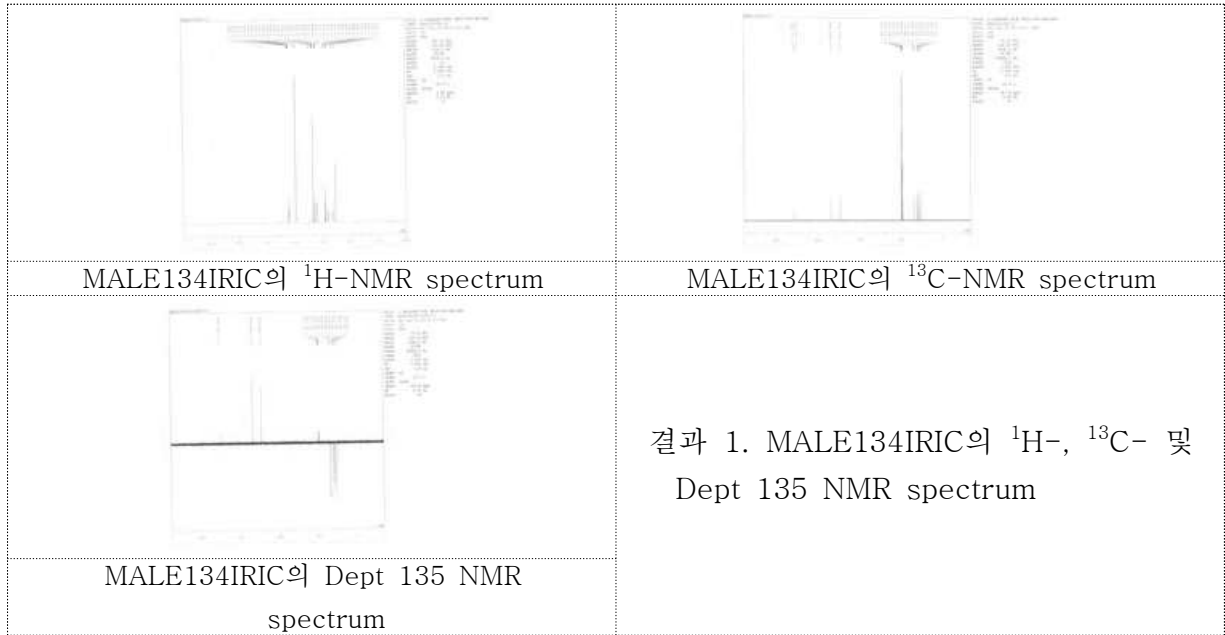
표 1. 상업으로부터 순수 분리한 SYFD38IEIAD의 ¹³C-NMR (75 MHz for carbon and 300 MHz for proton in CD₃OD)

Carbon No	δ_c	
	178.53	
	105.31	
	93.71	CH
	83.66	CH
	79.54	CH
	75.73	CH
	74.51	CH
	74.37	CH
	73.12	CH
	71.37	CH
	64.01	CH ₂
	63.42	CH ₂
	62.21	CH ₂
	22.62	CH ₃

표 2. 상업으로부터 순수 분리한 MALE134IRIC의 ¹³C-NMR (75 MHz for carbon and 300 MHz for proton in CD₃OD)

Position	δ_c	
	177.89	C
	176.09	C
	133.96	CH
	122.61	CH
	35.01	CH ₂
	33.70	CH ₂
	30.34	CH ₂
	30.23	CH ₂
	30.16	CH ₂
	30.08	CH ₂
	28.19	CH ₂
	26.07	CH ₂

- 기타 추가 분리 동정: 위의 순수분리 물질 이외에도 MALE98IFIF 순수 분리 성분을 NMR 자료로 분석 실시



④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 상업 추출물로부터 성분을 순수 분리하여, 구조를 밝히고, 추후에 생리 활성을 검증함으로써 주요 생리활성 지표의 발굴 및 동물 실험을 통한 효능 검증을 수행할 것이며, 다양한 질환 개선 관련 건강기능식품 인정을 위한 기초 자료로 활용할 것임

(다) 추출용매에 따른 오미자 지표성분인 schisandrin 및 α -iso-cubebenol의 함량 분석

① 연구 수행 방법

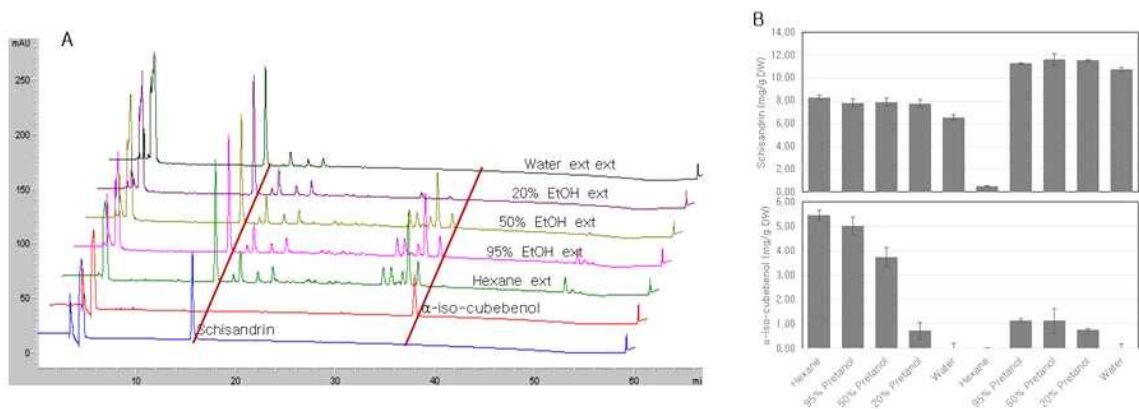
- 건조한 오미자 0.5 g을 각각의 conical tube에 정량하여 넣고 각각의 용매를 10 ml tube에 분주한 다음 1시간 동안 sonicator에서 추출하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 추출하였다. 추출한 용액의 상등액을 취하고 남은 찌꺼기에 다시 9 ml의 용액을 넣어

서 2회 반복하여 추출한 용액을 30 ml로 조정하였다.

- 추출액 5 ml을 채취하여 0.45 μ m syringe filter로 여과한 여액을 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC 분석 및 시료의 추출에 사용한 유기용매는 Fisher Scientific의 HPLC급 용매를 사용하였다. 그 외는 모두 특급시약을 사용하였다.
- HPLC 분석기기는 Agilent사의 system controller, photodiode array detector (PDA), auto sample injector, degasser를 사용하였으며 HPLC column은 Phenomenex사의 Luna C18 column (150 \times 4.6 mm, 5 μ m)을 사용하였다.

② 연구결과

- 건조오미자(문경시 동로면에서 구입)와 협동기관에서 추출한 추출물을 HPLC 후 함량을 비교한 결과, 협동기관의 hexane 추출물은 schisandrin의 함량이 현저히 낮았으며, hexane 추출물을 제외한 95%, 50%, 25% 및 물 추출물은 함량이 많았다(결과 1).
- 그러나 α -iso-cubebenol의 함량은 오미자 건조분말의 경우 극성이 높을수록 현저히 감소하여 20% pretanol로 추출 시에는 1.0 mg/kg dry weight였으며, 협동기관의 추출물에서는 극성이 매우 낮은 hexane과 극성이 매우 높은 물 추출물에서는 α -iso-cubebenol이 검출되지 않았다.



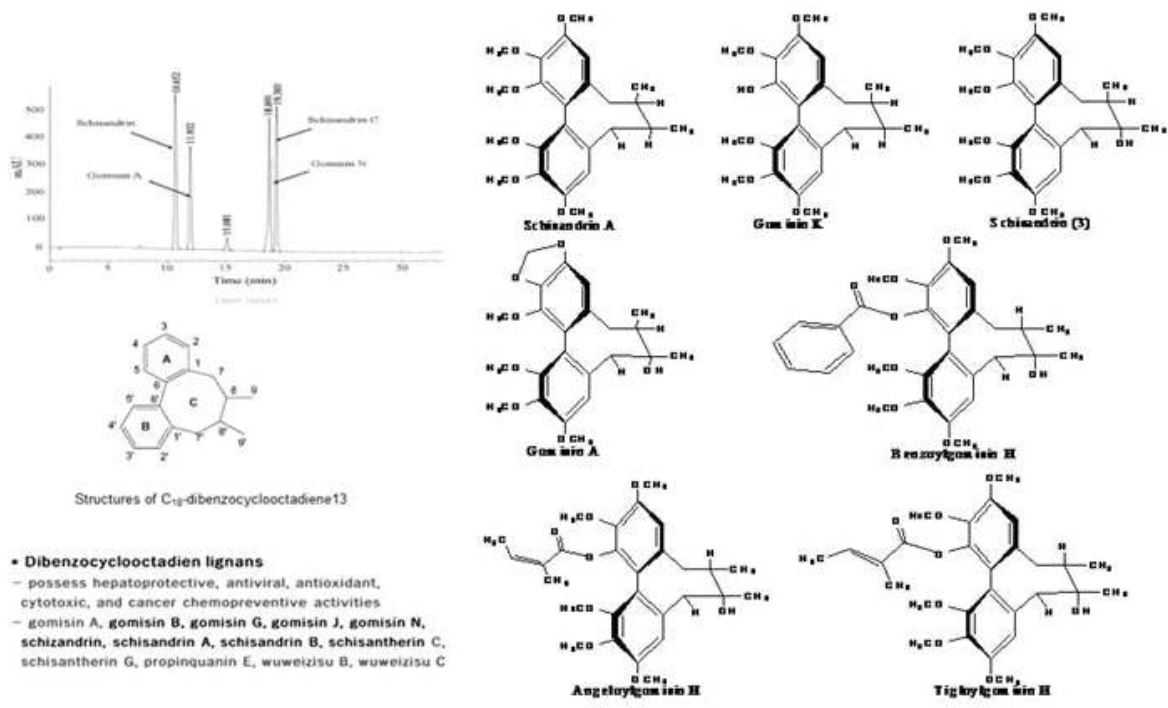
결과 1. Schisandrin과 α -iso-cubebenol의 HPLC의 chromatogram (A) 및 content (B) 비교 결과

③ 연구 결과의 의미

- 이러한 결과는 협동기관의 추출물은 20% EtOH로 추출한 다음 건조한 소재로서 추출물이 hexane에 잘 녹지 않았으며, 극성이 높은 물로 추출할 경우에는 극성이 낮은 α -iso-cubebenol의 추출량이 낮았기 때문에 협동기관의 추출물에 α -iso-cubebenol의 함량이 낮았을 것으로 생각됨

(라) 일차 신경 세포 모델에서 오미자 유래 lignan의 항염증 및 세포 보호 기작 및 분자적 작용 기전 연구

- 오미자 추출물 유래 유효 성분들을 순수 분리 및 동정: 본 연구는 오미자 추출물이 뇌질 환에 있어 어떠한 분자 생물학적 관계를 가지는지를 더욱 구체적이고 체계적으로 연구하기 위해, 오미자 유래 13종 lignan을 분리 동정하였으며(결과 1), 이를 활용한 신경세포 보호 기전에 대한 연구 내용은 다음과 같음



결과 1. 오미자 추출물 유래 유효성분들의 순수 분리에 따른 구조식의 결정 및 동정 결과

② 연구의 목적

- 본 연구는 오미자 유래 lignan계 화합물을 순수 분리 및 검정 및 신규 화합물들을 발견해 내고 상기 화합물이 만성 진행성 퇴행성 뇌질환의 발병과 밀접한 한계가 있는 미세아교세포와 성상교세포의 활성화로 인한 염증물질 생성이 유의하게 억제되는 항염증 효과 및 더불어 다양한 신경세포의 손상과 사멸이 억제 되어 신경세포에 보호 작용을 가지는 것을 *in vitro* 세포 수준에서 조사하고자 하며, *in vivo* 동물 모델을 통해 오미자 유래 lignan계 화합물의 효능을 검증함으로써 만성 뇌질환의 예방 및 치료에 대한 효과를 규명하고자 함

③ 연구 방법

- 오미자 추출물 유래 다양한 lignan계 화합물이 미세아교세포에 독성을 나타내지 않는 조건에서 항신경염증 효능(anti-neuroinflammatory effect)를 조사하기 위해 준비된 오미자 추출물과 lignan계 화합물을 각각 단독 처리하여 LDH 및 MTT assay를 먼저 실시하였으며 독성을 나타내지 않는 농도의 조건에서 anti-neuroinflammatory effect를 조사하였음

④ 연구 결과

- 이상의 설정된 조건에서 amyloid β, LPS 및 LTA 처리에 의하여 활성화된 미세아교세포에서 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들의 anti-neuroinflammatory effect를 조사하였음 → 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들은 미세아교세포에서 amyloid β, LPS 및 LTA에 의하여 유발된 NO 및 PGE₂의 생성을 억제하고 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6 및 IL-1β의 생성도 억제할 뿐만 아니라 단구주화성 인자인 MCP-1의 생성 역시 현저히 억제하였음을 확인함(결과 2)

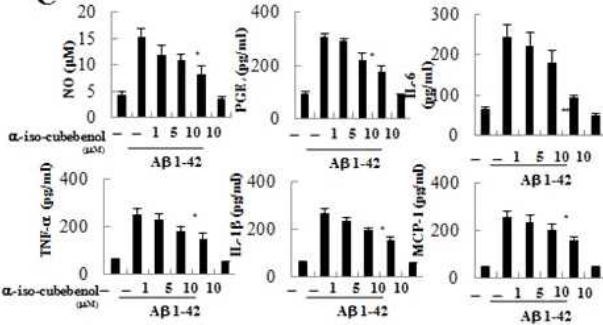
A

	Con	AB1-42	Gomisin A + AB1-42	Gomisin G + AB1-42	Gomisin J + AB1-42	Gomisin N + AB1-42
NO (μM)	4.8 ± 0.6	12.2 ± 1.3	9.1 ± 0.1	6.2 ± 0.3**	5.4 ± 0.5**	5.3 ± 0.5**
PGE ₂ (pg/mL)	22.2 ± 3.3	84.1 ± 5.5	80.6 ± 4.7	50.2 ± 2.0*	37.0 ± 1.3**	25.4 ± 2.8**
TNF-α (pg/mL)	24.3 ± 3.7	149.4 ± 3.2	147.3 ± 5.1	73.7 ± 4.5*	51.4 ± 3.2**	35.2 ± 2.0**
IL-6 (pg/mL)	15.9 ± 2.4	132.2 ± 3.6	123.5 ± 4.9	73.6 ± 4.7*	31.1 ± 5.6**	26.3 ± 3.2**
IL-1β (pg/mL)	28.4 ± 4.1	162.6 ± 2.8	151.2 ± 1.6	77.9 ± 2.7*	47.1 ± 1.9**	32.3 ± 2.9**
MCP-1 (pg/mL)	12.0 ± 0.5	91.9 ± 6.4	84.7 ± 4.5	48.7 ± 3.5*	38.5 ± 0.7*	24.5 ± 4.0**

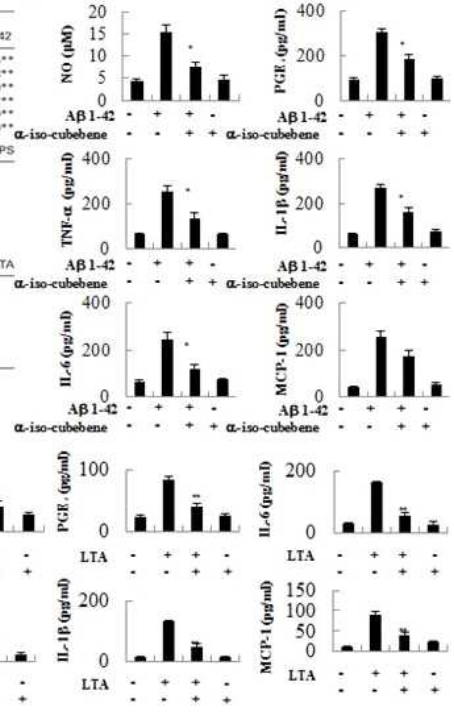
	Con	LPS	Gomisin A + LPS	Gomisin G + LPS	Gomisin J + LPS	Gomisin N + LPS
NO (mM)	4.8 ± 0.6	20.8 ± 1.0	19.6 ± 1.3	8.7 ± 1.2*	6.9 ± 0.4**	5.0 ± 0.5**
PGE ₂ (pg/mL)	22.2 ± 3.3	130.1 ± 5.3	125.4 ± 2.8	79.2 ± 3.3	47.2 ± 5.4**	31.8 ± 6.4**
TNF-α (pg/mL)	24.3 ± 3.7	216.1 ± 7.5	206.4 ± 4.5	78.9 ± 7.7*	47.0 ± 7.3**	42.4 ± 2.9**
IL-6 (pg/mL)	15.9 ± 2.4	186.8 ± 11.4	171.2 ± 7.0	100.5 ± 7.8*	62.6 ± 2.8**	37.2 ± 5.9**
IL-1β (pg/mL)	28.4 ± 4.1	241.2 ± 4.7	215.2 ± 7.6	144.8 ± 9.4*	84.7 ± 4.6**	40.6 ± 1.5**
MCP-1 (pg/mL)	12.0 ± 0.5	160.3 ± 6.9	122.4 ± 4.8	88.4 ± 3.9*	62.4 ± 3.2**	32.0 ± 3.2**

	Con	LTA	Gomisin A + LTA	Gomisin G + LTA	Gomisin J + LTA	Gomisin N + LTA
NO (mM)	4.8 ± 0.6	16.4 ± 0.9	10.2 ± 0.7*	5.9 ± 0.1**	4.5 ± 0.4**	4.5 ± 0.3**
PGE ₂ (pg/mL)	22.2 ± 3.3	111.4 ± 3.2	101.9 ± 3.7	46.1 ± 3.5*	27.5 ± 5.0**	23.5 ± 1.0**
TNF-α (pg/mL)	24.3 ± 3.7	158.2 ± 9.6	103.2 ± 5.0*	63.7 ± 4.5*	39.0 ± 6.2**	33.7 ± 5.5**
IL-6 (pg/mL)	15.9 ± 2.4	131.6 ± 3.8	84.1 ± 5.2*	51.5 ± 3.3*	30.7 ± 2.2**	20.8 ± 0.9**
IL-1β (pg/mL)	28.4 ± 4.1	194.3 ± 5.1	144.2 ± 10.0	73.8 ± 4.6*	45.7 ± 9.7**	31.5 ± 4.4**
MCP-1 (pg/mL)	12.0 ± 0.5	140.5 ± 5.3	126.8 ± 2.0	53.4 ± 5.3*	35.7 ± 9.6**	22.6 ± 1.4**

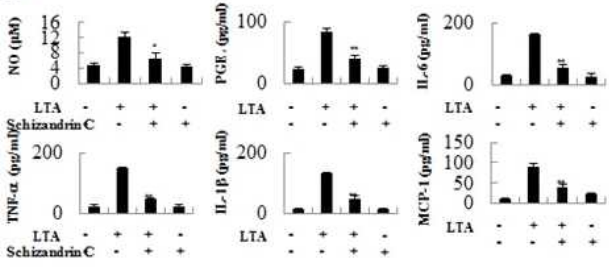
C



B

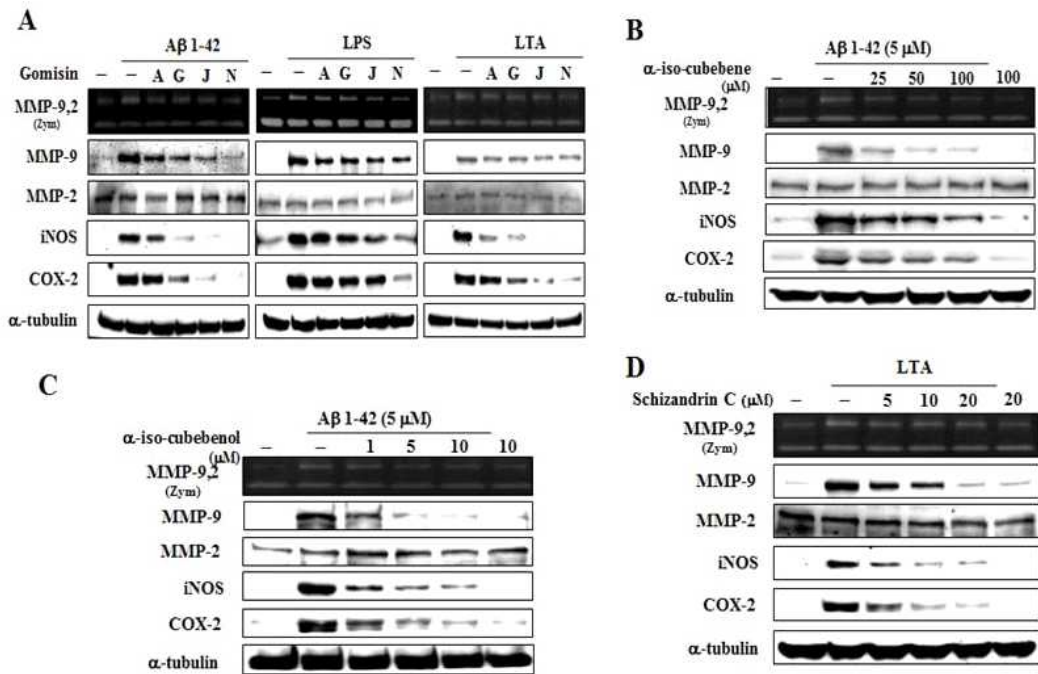


D

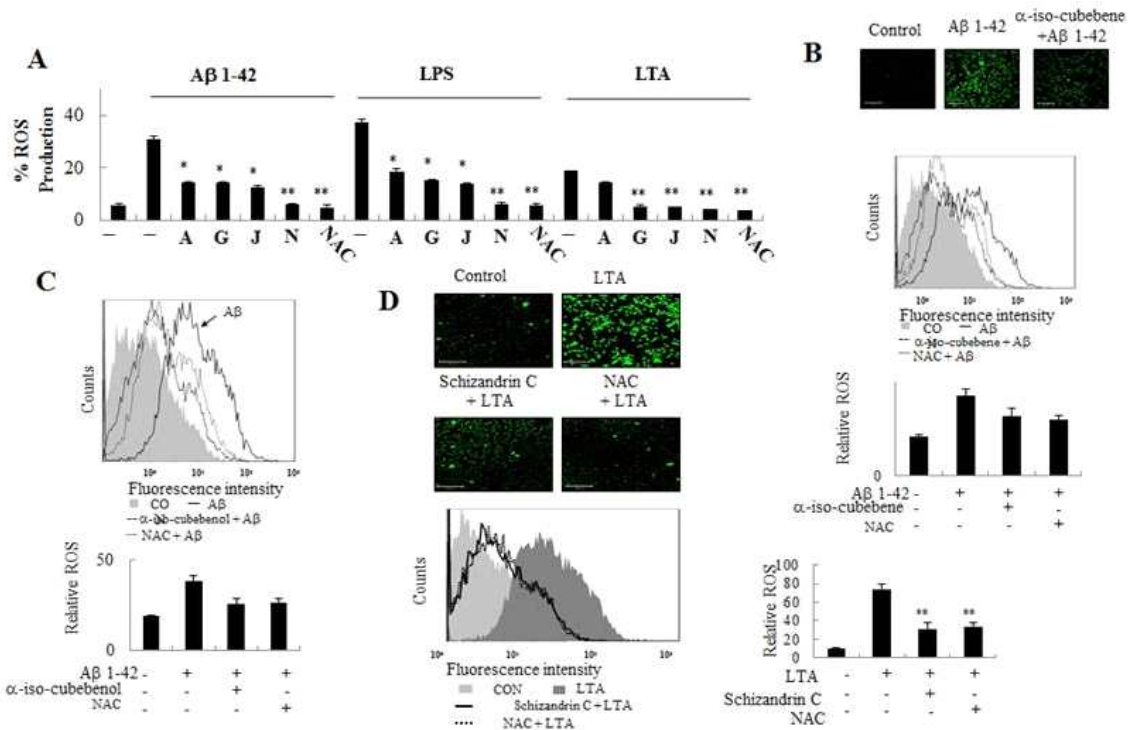


결과 2. TLR2/4 agonist가 처리된 신경교세포에서 오미자 추출물 리그난의 신경 염증성 분자 생성 억제 효과

- 염증성 반응과 연관된 과도한 NO와 PGE₂를 생성하는 효소로서 iNOS 및 COX-2와 MMPs가 중요한 표적 유전자이며 염증 반응을 유도하는 핵심 인자로서 작용하고, 특히 신경교증 및 파킨슨씨 병에서 미세아교세포에서 발현이 동시에 증가 되어있음 → 따라서 미세아교세포가 활성화 되었을 때 iNOS, COX-2 및 MMPs 단백질 발현에 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물이 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들은 미세아교세포에서 amyloid β, LPS 및 LTA에 의하여 과발현된 iNOS, COX-2 및 MMPs 단백질 발현을 저해하였음을 확인함 → 이와 같은 결과를 근거로 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들이 anti-neuroinflammatory effect를 가진다는 것을 확인할 수 있었음(결과 3)
- 활성산소종(ROS)의 생성 억제 효과: 미세아교세포가 과도하게 활성화 될 경우 진행성인 염증반응을 일으켜 ROS를 포함하는 염증매개인자를 배출하게 되며, 이러한 인자들은 미세아교세포 매개 신경 독성을 유발함 → ROS는 산화적 스트레스를 유발하며 신경세포 손상을 일으킬 뿐만 아니라, 신경세포 내 주요 염증 유발 인자를 활성화시킴으로써 염증을 초래함 → 따라서 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들이 미세아교세포에서 ROS의 생성에 미치는 영향을 조사하였음 → 그 결과 미세아교세포에서 amyloid β, LPS 및 LTA에 의하여 과생성된 ROS가 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들에 의해 저해됨을 확인하였음(결과 4) → 이상의 결과로 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들이 강한 항산화 및 항염증 활성을 보유함을 확인하였음

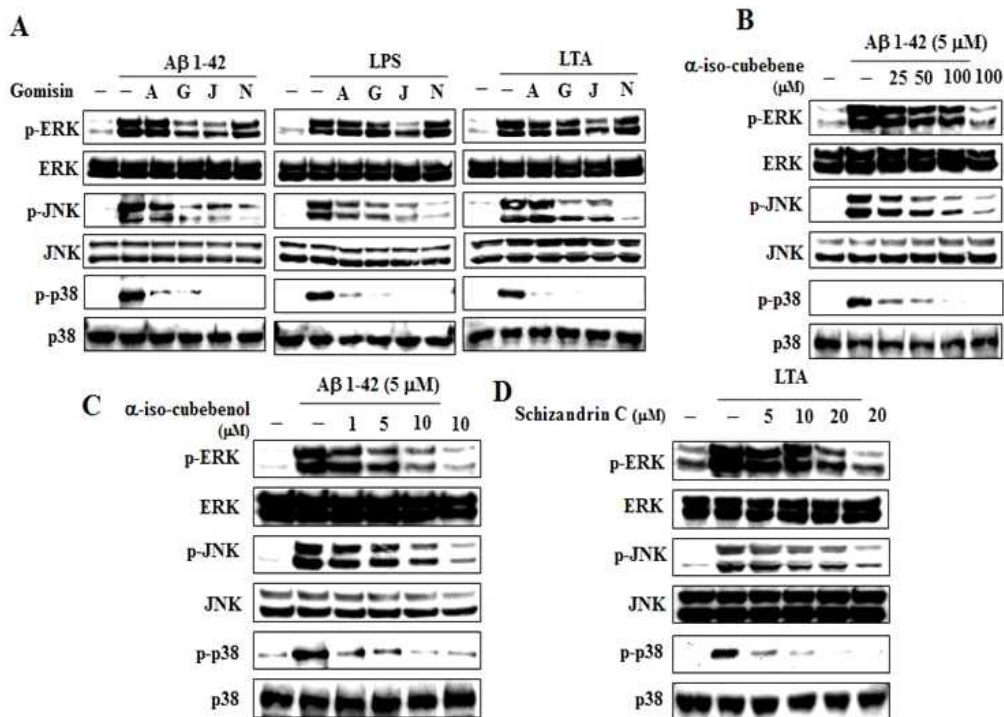


결과 3. TLR2/4 agonist가 처리된 신경교세포에서 오미자 추출물 리그난에 의한 MMP-9, iNOS 및 COX-2의 발현 억제 효과



결과 4. TLR2/4 agonist가 처리된 신경교세포에서 오미자 추출물 리그난에 의한 ROS 생성 억제 효과

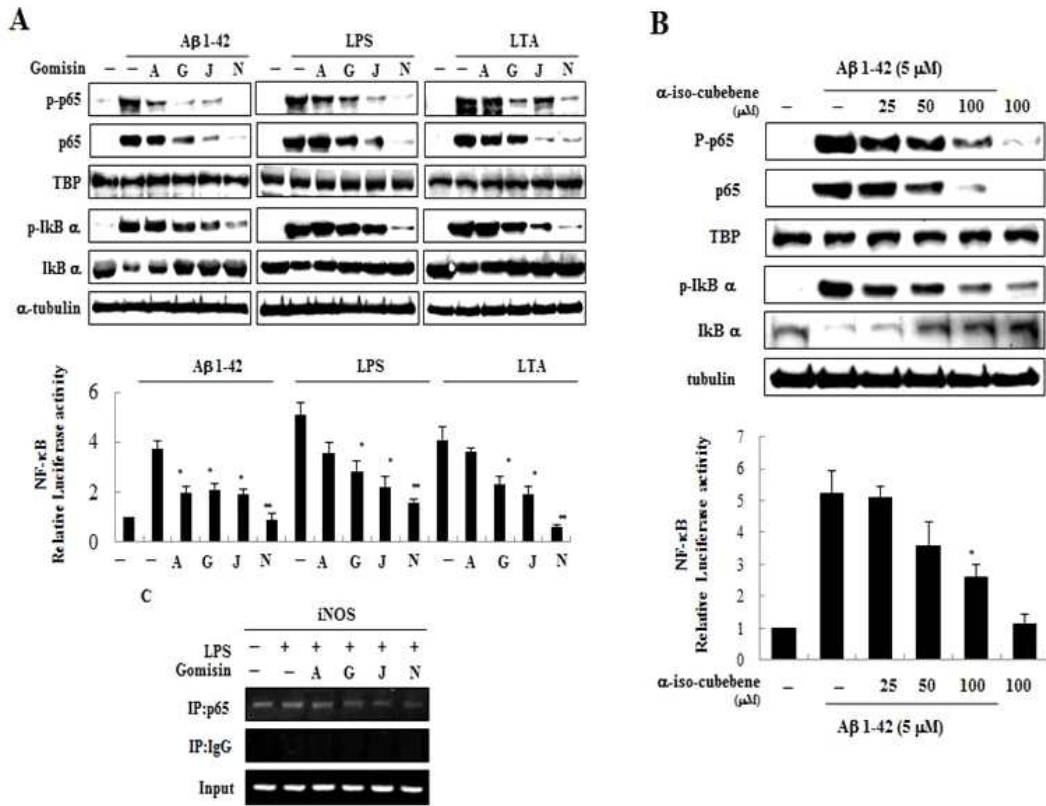
- MAPKs 신호계에 미치는 영향: 미세아교세포는 성장인자, cytokine, hormone, 감염 등 다양한 세포외 자극에 대해 적절히 반응함으로써 세포 특이적인 반응을 나타냄 → 이러한 과정에서 미세아교세포는 몇몇 특정 신호전달계를 활성화시키게 되는데, 이러한 미세아교세포 내 신호전달체계 중에서 중요한 신호계 중의 하나가 MAPKs cascade임 → 현재까지 12종류의 MAPKs 단백질이 알려져 있으며, 성장인자, cytokine, LPS 등에 의해 활성화되는 ERK/MAPK와 열 충격, 자외선, 삼투 충격 등의 stress에 의해 활성화되는 JNK/SAPK로 나누어짐 → 최근 미세아교세포의 면역·염증반응, 스트레스 반응에서 ERK와 JNK의 활성화의 중요성이 강조되고 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있기에, 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들이 미세아교세포에서 MAPKs의 활성화에 미치는 영향을 조사하였음 → 그 결과 미세아교세포에서 amyloid β , LPS 및 LTA에 의하여 활성화된 MAPKs가 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들에 의해 저해됨을 확인하였음(결과 5)



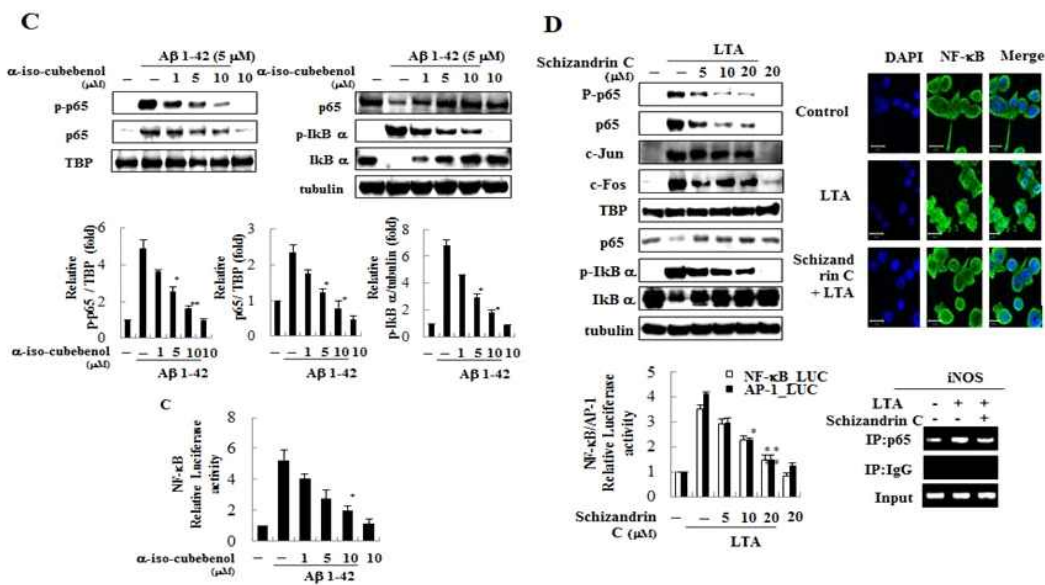
결과 5. 신경교세포에서 TLR2/4 agonist에 의한 MAPKs 신호전달계 활성화에 미치는 오미자 추출물 리그난의 영향

- NF- κ B 경로에 미치는 영향: 신경면역계의 염증 매개인자의 활성화를 위해 위해서 여러 가지 세포내 신호전달(signal transduction) 과정을 거치는데 전사인자로서 NF- κ B가 iNOS, COX-2, MMPs 등의 전사활성을 조절하는 것으로 알려져 있는데 자극이 없을 경우 NF- κ B는 세포질 내에서 inhibitor인 I κ B와 complex를 이루고 있다가 LPS와 같은 자극에 의하여 I κ B가 분리되어 나가고 free한 NF- κ B는 핵으로 이동하여 해당 유전자의 promoter에 결합하여 전사를 개시함 → I κ B가 NF- κ B에서 분리되려면 먼저 I κ B kinase (IKK)에 의해 I κ B가 인산화되고 26S proteasome에 인지되어 분해되어야 함 → 따라서 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들이 미세아교세포에서 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과, 미세아교세포에서 amyloid β , LPS 및 LTA에 의하여 활성화된 NF- κ

B가 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들에 의해 저해됨을 확인하였음(결과 6 및 7)



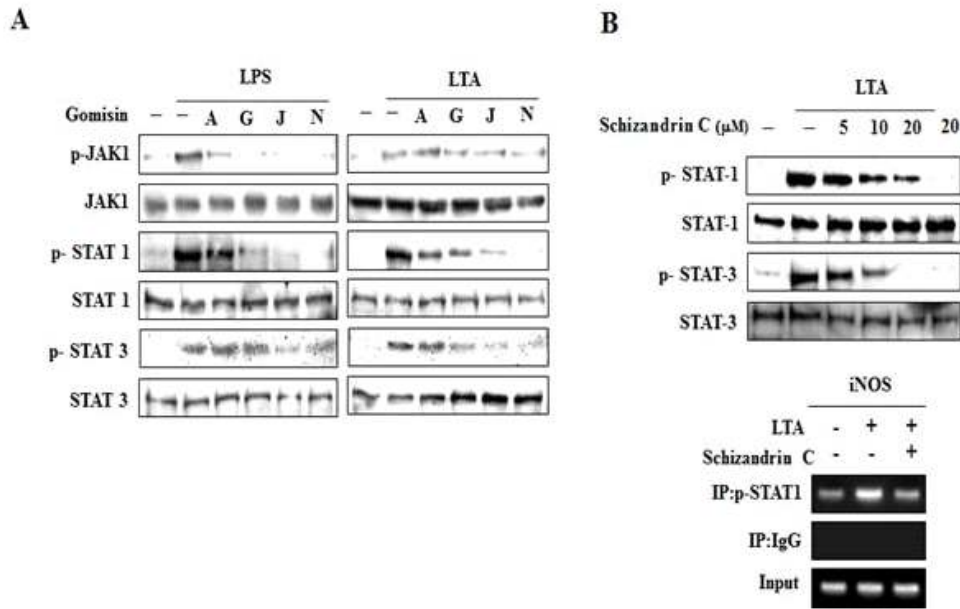
결과 6. 신경교세포에서 TLR2/4 agonist에 의한 NF-κB 신호전달계 활성화에 미치는 오미자 추출물 리그난의 영향-1



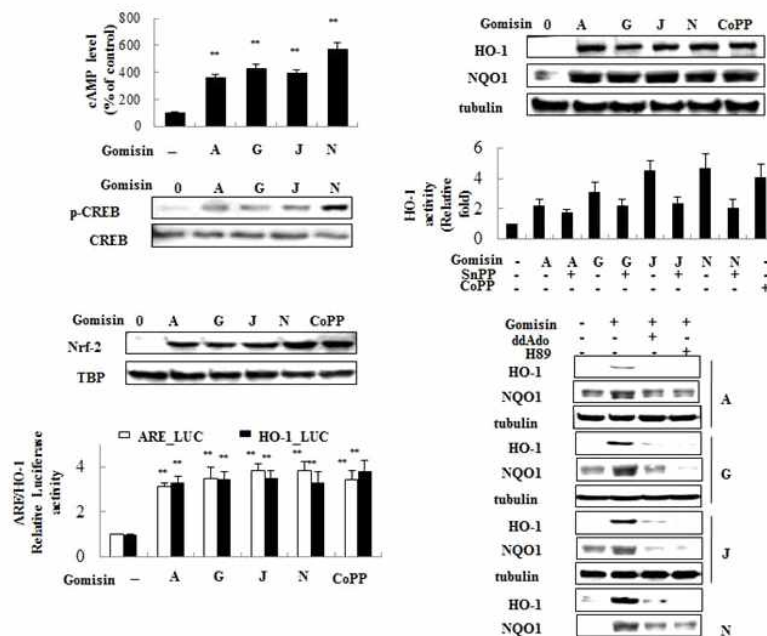
결과 7. 신경교세포에서 TLR2/4 agonist에 의한 NF-κB 신호전달계 활성화에 미치는 오미자 추출물 리그난의 영향-2

- JAK/STAT 신호계의 연관성: JAK/STAT 신호계는 다양한 염증성 매개 인자를 매개하는

중요한 분자로서 작용하여 이들의 신호전달의 활성화로 인하여 여러 면역세포에서 생성되는 다양한 면역반응이 조절됨 → 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들이 미세아교세포에서 JAK/STAT 신호의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과, 미세아교세포에서 amyloid β , LPS 및 LTA에 의하여 활성화된 JAK/STAT 신호계가 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들에 의해 저해됨을 확인하였음(결과 8)

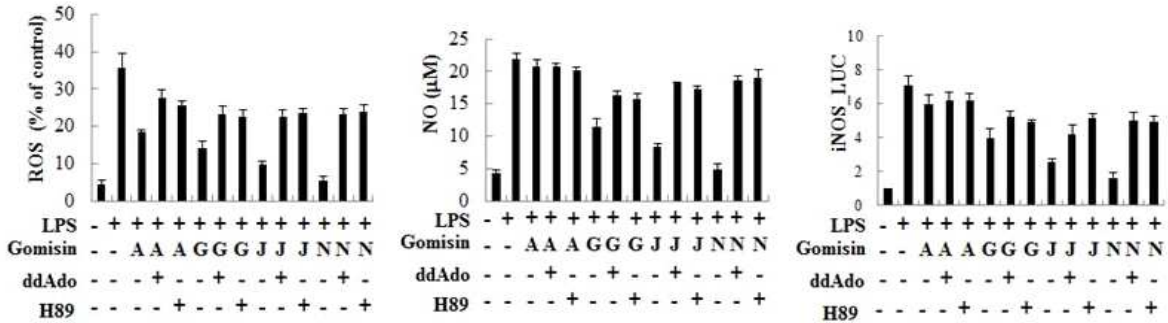


결과 8. 신경교세포에서 TLR2/4 agonist에 의한 JAK-STATs 신호전달계 활성화에 미치는 오미자 추출물 리그난의 영향

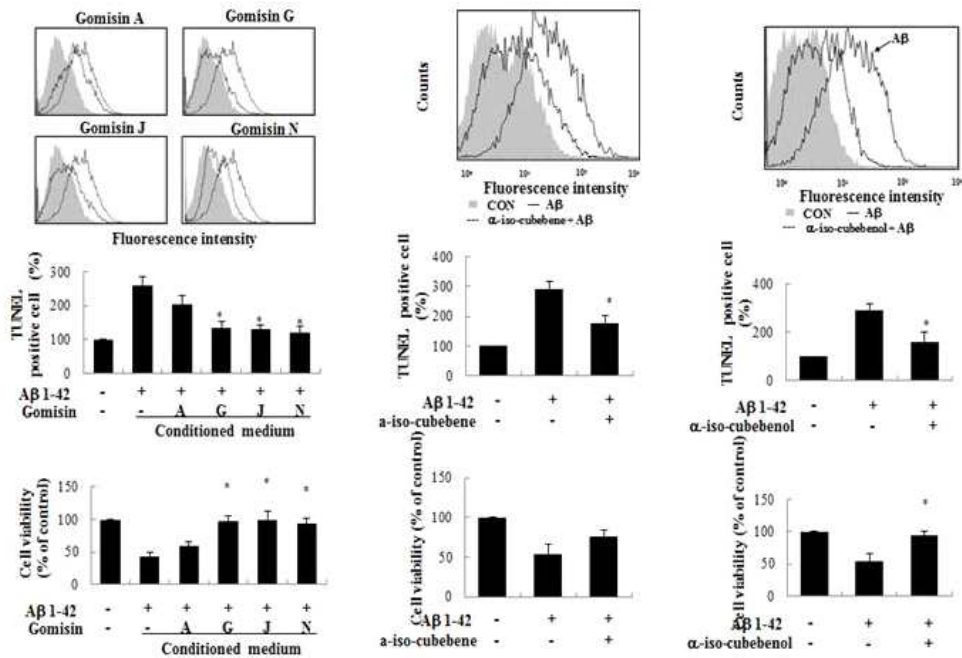


결과 9. 신경교세포에서 TLR2/4 agonist에 의한 cAMP/PKA/CREB/Nrf2 신호전달계 활성화에 미치는 오미자 추출물 리그난의 영향

- Phase II detoxifying/antioxidant enzymes 신호전달계의 역할: Phase II detoxifying/antioxidant enzymes 신호전달 기작이 신경질환 제어기전과 관련되어 있다는 사실이 밝혀짐 → 이들의 상위 신호전달 체계로는 MAPKs, PKC, PI3K, PKA signaling cascade 등을 들 수 있음 → 외부자극에 의해 특정 MAPKs가 인산화를 통해 활성화되어 전사인자의 핵 내 이동을 유도함 → cAMP의 세포 내 농도에 의해 조절되는 PKA signaling cascade는 cAMP의 농도가 증가함에 따라 활성화되어 전사인자인 CREB의 활성화에 관여함
- HO-1 유전자의 promotor에는 Nrf-2와 CREB 등과 같이 산화환원에 민감한 전사인자들의 결합부위가 위치하고 있어, HO-1의 발현 유도에 있어 전사인자들의 역할도 중요하다고 할 수 있음 → Nrf-2는 정상상태에서는 세포질에서 Keap1 단백질과 dimer를 이루고 있으나 외부 신호에 의해 Keap1 단백질과의 연결고리가 끊어지게 되면 핵 안으로 이동하여 항산화 및 항염증 매개체를 coding하고 있는 유전자의 프로모터 부위에 결합하여 이들 매개체의 발현을 개시하게 됨
- CREB는 cAMP의 영향에 의해 조절되어 지는데, 외부자극에 의해 adenylyl cyclase가 활성화되어 ATP가 cAMP로 전환되는데 이것에 의해 PKA가 활성화되고, 표적 전사인자인 CREB를 인산화 함으로써 CREB에 의해 발현되는 유전자들의 전사가 활발히 진행됨 → CREB는 MAPKs의 p38 MAPK와도 관련이 있다는 연구 보고도 있으며, HO-1은 다양한 세포 내 신호 전달 체계를 통하여 발현되며, 항산화·항염증 효소로써 세포 보호 및 방어 기작에 기여함
- 이러한 배경 하에서 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들이 미세아교세포에서 phase II detoxifying/antioxidant enzymes를 유도하는지를 조사하였음 → 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들은 미세아교세포에서 cAMP의 생성 증가와 함께 신경세포의 생존 및 분화에 관여하는 신경보호단백질인 뉴로트로핀(neurotrophin) 생산에 관여하는 전사조절인자인 CREB를 활성화시켰음
- 또 다른 전사조절인자인 Nrf-2의 활성화를 유발함으로써 세포 내 대표적인 항산화 단백질인 HO-1 및 NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO-1)의 발현을 증가시켰음 → 즉, 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들은 미세아교세포에서 phase II detoxifying/antioxidant enzymes signaling pathway를 통하여 신경 염증 억제 효과를 가진다는 것을 확인 할 수 있었음(결과 9 및 10) → 아울러 이러한 과정에서 Nrf-2의 연관성과 ROS 및 NO 생성 억제의 관련성을 확인하였음(결과 11 및 12)
- 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물에 의한 미세아교세포에서 보호 효능: 미세아교세포에서 amyloid-β에 의하여 유발된 세포독성에 미치는 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들의 영향을 조사한 결과, 오미자 추출물 유래 lignan계 화합물들은 과활성화된 미세아교세포의 대사산물에 의한 피질 신경의 생존을 감소 현상을 회복시켰으며, apoptosis 유발을 현저하게 억제하여 신경 보호 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있었음(결과 13)



결과 12. 신경교세포에서 TLR2/4 agonist에 의한 cAMP/PKA/CREB/Nrf2 신호전달계와 연계된 NO 및 ROS의 생성에 미치는 오미자 추출물 리그난의 영향



결과 13. 아밀로이드 베타로 자극된 신경교세포에서 오미자 추출물 리그난의 신경세포 독성 보호 효과

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 오미자 추출물이 염증성 질환의 발생과 진행을 억제함으로써 노화 및 염증 연관 다양한 질환의 제어를 위한 기능성 소재로서 활용성이 매우 높음을 보여주는 것이며, 노인성 질환 개선과 관련된 오미자의 기능성을 과학적으로 검증함으로써 기존의 치료제가 가지는 제한된 약효, 약제내성 및 고비용 등과 같은 부작용을 극복하게 하는 중요한 결과 도출에 활용될 것으로 사료됨

(마) 오미자 유래 순수화합물의 인지기능 장애의 예방 및 개선 효능

① 연구 수행의 목적

- 본 연구는 동물모델을 통한 인지기능 장애에 효과를 나타내는 α-iso-cubebenol (ICO)의 동물실험을 통하여 그 효능을 검증하고자 하였다.

② 연구 수행 방법

- ICO 분리를 위한 오미자는 2014년 11월에 문경의 동로농협에서 열풍 건조한 과실을 구입하였다.
- 문경에서 수집한 건조 오미자 과실을 분쇄기로 완전히 분쇄하였다. 분쇄한 과실 2 kg을 5 L의 삼각플라스틱에 넣고 3 L의 hexane으로 채우고, 2시간 동안 sonication시킨 다음 상등액을 Whatman no. 2 filter paper로 여과하였다.
- hexan 추출물은 위의 방법으로 3회 반복 추출하여 hexane 308 g을 얻었다. 100×10 cm의 컬럼에 hexane에 녹인 실리카겔 1 kg을 충전하였다. 충전한 컬럼 상층에 hexan추출물 (KH) 120 g을 넣은 다음 100% hexan, hexan:EtOAc 및 CHCl₃:MeOH의 용매를 순차적으로 사용하여 38개의 분획을 얻었다.
- 상기 순수분리한 물질의 구조를 밝히기 위하여 1D와 2D NMR 스펙트럼을 이용하여 구조를 동정하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다. 표 1은 신규 화합물의 two dimensional NMR correlations를 정리한 결과이다.

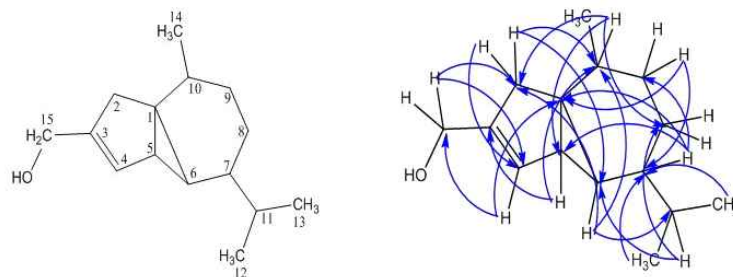
Table 1. Carbon (125 MHz in CDCl₃) and proton (600 MHz in CDCl₃) and HMBC of α -iso-cubebenol

Carbon No.	δ_c	δ_H	HMBC
1	39.5		
2	30.7	2.27, tt 2.21, d, J=6.0	146.0, 118.8, 48.4, 44.9, 146.0, 118.8, 48.4, 44.9, 39.5
3	146.0		
4	118.8	5.53, m	66.0, 39.5, 30.7
5	39.3	2.21, d, J=6.0	146.0, 118.8, 48.4, 44.9, 39.5
6	44.9	1.67, s	48.4, 39.5, 39.3, 32.5, 30.7, 22.0
7	45.3	1.54, m	44.9, 39.5, 39.3, 36.4, 32.5
8	22.0	1.60, d, J=1.5 1.54, m	48.4, 45.3, 44.9 45.3, 44.9, 36.4, 32.5
9	36.4	1.75, m 1.62, t	48.4, 45.3, 39.5, 22.0, 19.3, 48.4, 36.4
10	48.4	1.65, m	39.5, 39.3, 30.7, 22.0, 19.3
11	32.5	1.54, m	45.3, 44.9, 22.0
12	19.5	0.86, d, J=6.5	45.3, 32.5, 19.9,
13	19.9	0.84, d, J=6.5	45.3, 32.5,
14	19.3	0.77, s	48.4, 39.5, 36.4,
15	66.0	3.97, d, J=1.5	146.0, 118.8, 30.7

③ 연구 수행 결과

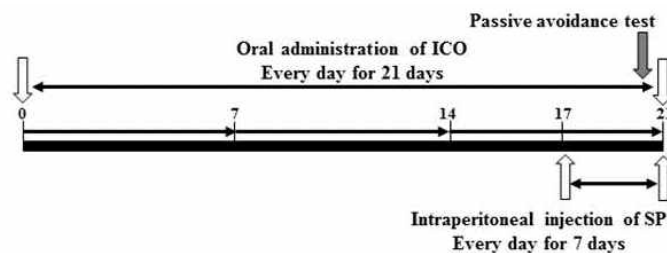
- ICO는 GC-MS의 분자이온 signal은 220이였으며, 분자식은 ¹H, ¹³C 및 Dept NMR의 데이터로부터 C₁₅H₂₄O로 확정하였음 → 분리한 물질은 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) spectrum으로부터 3개의 primary carbon (δ_c 19.3, 19.5, 19.9), 4개의 secondary carbon (δ_c 22.0, 30.7, 36.4, 66.0), 6개의 tertiary carbon (δ_c 32.5, 39.3, 44.9, 45.3, 48.4, 118.8) 및 2개의 quaternary carbon (δ_c 39.5, 146.0)가 있었다. 이러한 데이터로부터 하나의 2중 결합이 있다는 것을 알 수 있었다. 분자식 C₁₅H₂₄O의 구성 원소들을 볼 때 3개의 사이클링 링(tricyclic ring)과 4개의 불포화 결합 및 1개의 double bond가 있음을 알 수 있다. 상기 분리한 물질의 ¹H NMR로부터 1개의 methyl singlet (δ_H 0.77,

14-H), 2개의 methyl doublet (δ_H 0.86 0.84, 12-H 및 13H)이 있다. 또한 1개의 olefinic proton (δ_H 5.53, H-4)이 관찰되었다. 두 개의 cyclopropane proton이 δ_H 1.67 (H-6)과 δ_H 2.21 (H-5)에 관측되었다. 2개의 비정상적인 methylene groups이 δ_H 1.60과 1.54 (2H, H-8)과 δ_H 1.75와 1.62 (2H, H-9)에 나타났다. 이 두개의 high-field proton은 cyclopropane ring system의 anisotropic range에 있음을 증명하는 것이다. 이 두 개의 methylene proton은 서로 인접해 있다는 것을 gCOSY 데이터로서 확인할 수 있었다. 또한 상기 분리한 물질의 구조 결정은 HMBC로서 확정하였다. 그 결과, C-11은 H-12와 H-13에 연결(coupling)되어 있었고, C-7은 H-12, H-13, H-8 및 H-9에 연결되어 있었다. H-9는 methine proton H-10과 methyl doublet인 H-14에 연결되어 있었다. Quaternary carbon인 C-1은 H-2, H-4, H-6, H-9, H-10과 H-14에 연결되어 있으며, 이러한 구조는 전형적인 cubebene sesquiterpene skeleton이었다. 결과적으로, 1D 또는 2D NMR을 종합하면 본 실험에서 순수 분리하여 추출한 물질의 구조는 그림과 같은 구조로서 chemical formula가 $C_{15}H_{24}O$ 이고, 분자량이 220으로서 이미 알려진 ICO로서 확증되었다.



결과 1. Chemical structure and key HMBC of α -iso-cubebenol.

- 동물실험설계: 본 실험에 사용된 수컷 6주령 ICR 마우스는 샘타코 바이오코리아로부터 구매하였으며, 12시간의 조명주기(08:00-20:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 $22 \pm 2^\circ C$, 상대습도 $50 \pm 10\%$)에서 사육하였다.



도 1. 실험 수행 과정 예시

- 모든 마우스는 방사선 조사된 사료를 자유급식 하도록 하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACUC)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인 번호: PNU-2015-082)을 받아 수행되었다. 실험동물은 대조군(Control; Con), 학습과 단기기억에 특별한 영향을 줌으로써 치매를 유발하는 스키폴라민 단독 투여군(Vehicle; Ve), positive control로 스키폴라민과 2 mg/kg 도네페질 투여군(Donepezil; Do), 스키폴

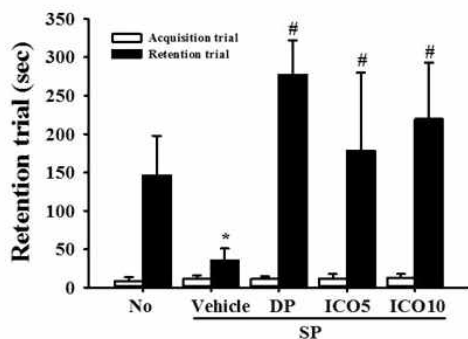
라민과 두 농도(5 및 10 mg/kg)의 시료 투여군(ICO10 및 ICO20)으로 하여 각 군당 15마리씩 사용하였다.

→ 인지기능 향상 검사에 사용한 시료는 21일간 위내 투여하였으며, muscarinic 수용체의 길항제인 스코폴라민 1 mg/Kg을 수동회피시험을 진행하기 30분전에 복강투여 하였다. 투여가 완료된 후 모든 마우스는 이산화탄소를 이용해서 안락사하였고, 혈액과 뇌 조직을 적출하여 분석에 사용하였다.

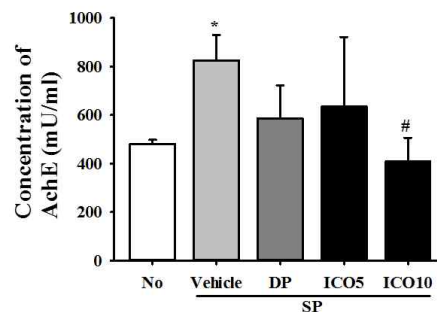
- 수동회피시험(Passive avoidance test): 쥐는 야행성 동물이라 밝은 곳에서 어두운 곳으로 가려는 습성이 있기 때문에 어두운 곳에 전기적 충격이 가하는 장치를 이용하였다. 이상자는 칸막이를 이용하여 두 구획으로 구분하는데 동물이 어두운 구획으로 넘어가는 즉시 0.25 mA의 전류를 바닥의 stainless grid를 통해 1초 동안 흘려 전기충격을 주는 장치이다. 조명이 켜진 구획에 실험동물을 넣은 후 부터 이 동물이 어두운 구획으로 넘어가 입구가 닫힐 때까지의 시간(latency)을 타이머로 측정하였다. 따라서 시험 동물은 어두운 방과 전기충격과의 관계를 기억하게 되며, 24시간 후 다시 서틀박스에 위치시켰을 때 밝은 구획에서 어두운 구획으로 들어가기 망설이게 되며, 이때 어두운 구획으로 들어가기까지의 시간을 측정하였다. 기억력이 좋은 쥐는 이러한 전기적인 충격을 기억하고 있어 어두운 곳으로 들어가는 시간이 지체되어 밝은 곳에 머무르는 시간(latency time)이 길어지고, 이 latency time을 측정하여 인지기능 개선 효능을 측정하였다.

→ 스코폴라민을 투여하여 기억력을 감퇴시킨 쥐를 이용하여 상기 실시 예 1에서 분리한 오미자 유래 ICO이 기억력 손상을 억제하는 효과가 있는지의 여부를 동물의 기억력 측정 장치인 수동회피 측정 장치를 이용하여 측정한 결과, 결과 2에 도시한 바와 같이 대조군(control)의 latency time은 146초이었으며, 인지기능에 손상을 유발하는 스코폴라민 단독투여군(vehicle)의 latency time은 약 35초로 정상 쥐와 비교하였을 때 인지기능(또는 기억력)이 손상되었음을 알 수 있었다.

→ 반면, ICO의 투여에 의하여 인지기능 개선에 효능을 보였으며, 5 mg/kg body weight의 오미자 유래 ICO를 투여하였을 때 latency time (178초)은 치매 치료제로 사용하고 있는 도네페질을 투여하였을 때의 latency time (277초) 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다.



결과 2. 수동회피시험 결과

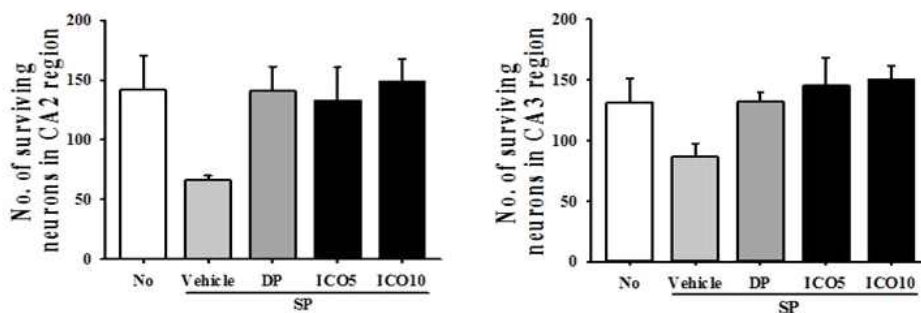
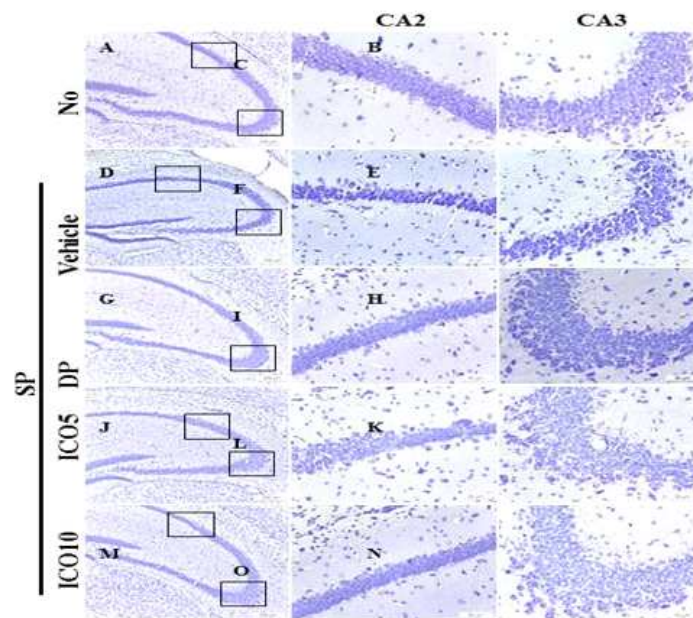


결과 3. AChE 분비 억제 효과 결과

→ 특히, 10 mg/kg body weight의 오미자 유래 ICO를 투여하였을 때의 latency time (219초)를 통해 오미자 유래 ICO의 농도 의존적으로 인지기능 개선에 효능을 보임을 확

인할 수 있었다. Latency time이 길어진다는 것은 스코폴라민으로 유도된 인지기능 손상으로부터 회복, 즉 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 의미하는 것이다.

- AChE 분비 억제 효과: AChE의 효소활성은 AChE에 의해 생성되는 thiocholine을 DTNB와 반응시켜 그 결과 생성되는 5-thio-2-nitrobenzoate를 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 수행하였다. 간단하게, 96 well microplate에 100 μ l의 AChE assay buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.2), 10 μ l의 0.5 U/ml AChE (dissolved in assay buffer containing 10% glycerol) 및 10 μ L의 적당하게 희석된 시료를 가한 후 shaking하면서 상온에서 10분 동안 incubation한 후, 10 μ L의 10 mM DTNB와 5 μ l의 100 mM acetylthiocholine을 가한 후 2분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.



결과 4. 류런 세포의 생존 억제에 미치는 효과 분석

- 스코폴라민을 투여하여 기억력을 감퇴시킨 쥐를 이용하여 상기 실시 예 1에서 분리한 오미자 유래 ICO가 AChE의 분비를 억제하는 효과가 있는지의 여부를 AChE assay를 이용하여 분석한 결과, 결과 3에 나타난 바와 같이 대조군(control)의 AChE 농도는 약 481 mU/ml이었으며, 인지기능에 손상을 유발하는 스코폴라민 단독투여군(vehicle)의 latency time은 약 825 mU/ml로 정상 쥐와 비교하였을 때 AChE의 분비가 증가하였다는 것을

알 수 있었다.

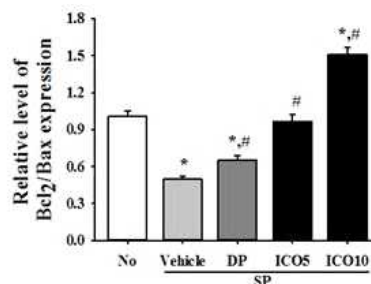
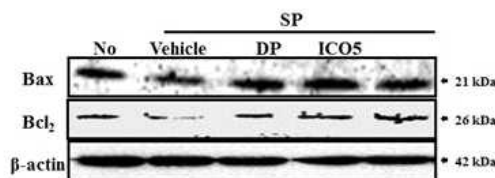
→ 그러나 ICO의 투여에 의해 AChE 분비 억제 효과를 보였으며, 5 mg/kg body weight의 ICO를 투여하였을 때 AChE 농도(약 635 mU/ml)은 치매 치료제로 사용하고 있는 도네페질을 투여하였을 때의 AChE 농도(약 586 mU/ml) 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

→ 특히 10 mg/kg body weight의 ICO를 투여하였을 때의 AChE 농도(약 409 mU/ml)를 통해 거의 정상상태로 회복되는 것을 확인할 수 있었다. Latency time이 길어진다는 것은 스코폴라민으로 유도된 인지기능 손상으로부터 회복, 즉 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 의미하는 것으로, 이는 ICO가 실제로 뇌로 들어가서 뇌의 acetylcholinesterase의 활성을 억제하여, 결과적으로 신경전달물질인 acetylcholine의 작용을 증진시켜주어 학습과 기억력 향상효과를 나타내고 있음을 제시하는 것이다.

• 세포독성 시험: ICO가 인지기억력 향상효과를 갖는 작용 기전 중, 뇌 조직 내 세포사멸사의 단백질 발현에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 apoptosis를 유발하는 Bax 단백질과 apoptosis를 억제하는 Bcl-2 단백질의 발현 정도를 측정하였다(Bcl-2/Bax 값으로 분석). 이를 위하여 마우스의 뇌 조직혼합액은 뇌 조직 100 mg을 PRO-PREP Protein Extraction Solution에 첨가하여 glass homogenizer를 이용하여 분쇄한 후, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 수확하였다.

→ 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit를 이용하여 정량하였으며, 30-60 µg의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 6-14% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동 한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 막에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking을 실시하였다. 단백질이 전이된 막은 Bax, Bcl-2, ERK, p-ERK 등의 1차 항체를 4°C에서 밤새 반응한 후, HRP-conjugated된 secondary antibody를 첨가하고 ECL kit를 이용하여 발현을 확인하였다.

→ 그 결과, 결과 5에 도시한 바와 같이 ICO 그룹에서 스코폴라민 단독투여군(vehicle)과 비교하였을 때 농도 의존적으로 Bcl2/Bax 값이 증가하였을 뿐만 아니라, 특히 도네페질을 투여군과 비교해서 약 2배 정도 유의적으로 증가하였다. 이는 오미자 유래 ICO가 인지장애가 유발된 동물의 해마 조직 내에서 발생하는 apoptosis를 억제하는 매우 우수한 효능을 가짐을 제시하는 것이다.

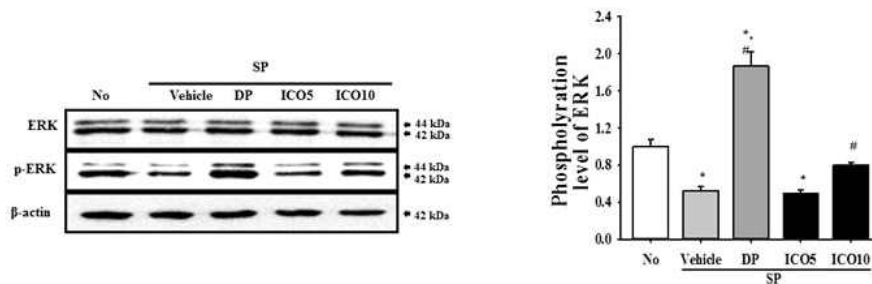


결과 5. Bax 및 Bcl-2의 발현에 미치는 영향

• BDNF의 발현 및 ERK의 인산화 활성화에 미치는 영향: ICO가 인지기억력 향상효과를 갖는 또 다른 작용 기전으로, 신경영양인자(neurotrophic factor) 중 BDNF의 발현 및 ERK의

인산화 활성화에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 6에 도시한 바와 같이, 5 mg/kg body weight의 ICO 그룹의 인산화된 ERK 발현량이 스코폴라민 단독투여군(vehicle)과 비교하여 유의적인 차이가 없었다.

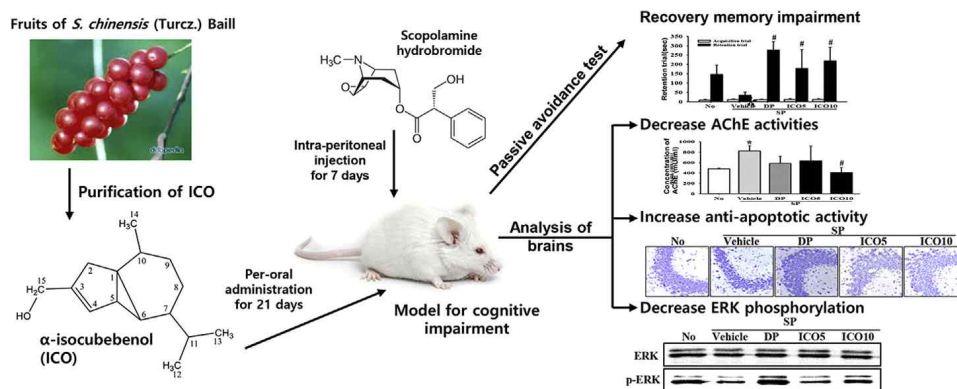
→ 그러나 도네페질 투여군에 비하여 ERK 인산화 정도가 낮음에도 불구하고, 10 mg/kg body weight의 ICO 그룹의 ERK 인산화 정도는 스코폴라민 단독투여군(vehicle)과 비교하여 유의적으로 회복됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 ICO의 투여가 신경영양인자(neurotrophic factor)의 작용을 증진시켜주어 학습과 기억력 향상효과를 나타내고 있음을 나타내는 것이다.



결과 6. ERK의 활성화에 미치는 영향 분석

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 오미자로부터 순수 분리한 ICO의 인지기능 효능을 검증함으로써 주요 생리활성 지표성분의 발굴 및 동물 실험을 통한 인지장애 개선 효능 검증을 수행하였음, 이를 근거로 다양한 질환 개선 관련 건강기능식품 인정을 위한 기초 자료로 활용할 것임



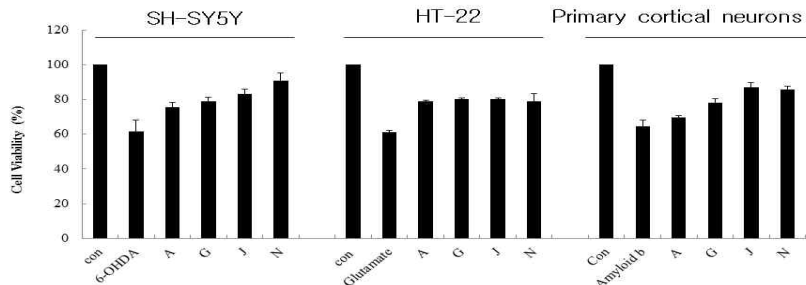
(다) 신경 세포 모델에서 오미자 유래 lignan의 신경세포 보호 기작 및 분자적 작용 기전 연구

① 연구의 목적

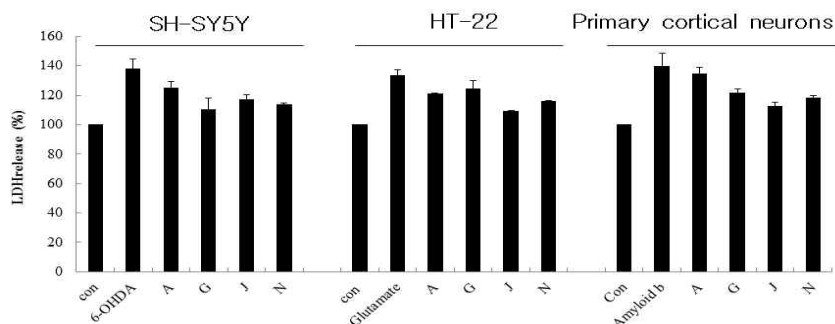
- 본 연구는 오미자 유래 순수 분리된 lignan계 화합물의 신경세포에 보호 작용을 분자생물학적 기법을 통해 검증하고 이를 통해 만성 뇌질환의 예방 및 치료에 대한 효과를 규명하고자 함

② 연구 방법 및 결과

- 오미자 추출물 유래 Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N의 신경세포 보호 효과: 자극제에 의해 유도된 신경세포 사멸에 대한 Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N의 세포보호 효과를 검증하기 위하여, 신경 세포 생존을 검사를 수행하였다. 이를 위하여 마우스의 해마(hippocampal) HT22 세포 및 인간 신경모세포종(human neuroblastoma) SH-SY5Y 세포와 primary cortical neurons에 Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N를 24시간 처리한 후, Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N이 상기 각 신경세포에 유해성이 없음을 확인하였다.
- 그 후, 상기 각 세포에 Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N을 각각 50 μ M 농도로 12시간 처리하였다. HT22 세포에는 신경 세포 손상을 유발하는 자극제 (stimulator)로써 5 μ M 농도의 glutamate 12시간 처리하였고, SH-SY5Y 세포에는 150 μ M 농도의 6-hydroxydopamine (6-OHDA)을 24시간 처리하였고, primary cortical neuron에서는 amyloid β 를 24시간 처리하였다.
- 그 후, 상기 처리된 세포를 4×10^4 cells/well의 농도로 24-well 플레이트에 넣어 배양하고, MTT assay를 수행하였다. 그 결과 Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N이 신경세포를 보호하는 효과를 가짐을 확인하였고, 특히 Gomisin N 생존률이 현저히 상승하는 것을 확인할 수 있었다(결과 1).



결과 1. 오미자 추출물 유래 lignan들의 신경세포 보호 효과

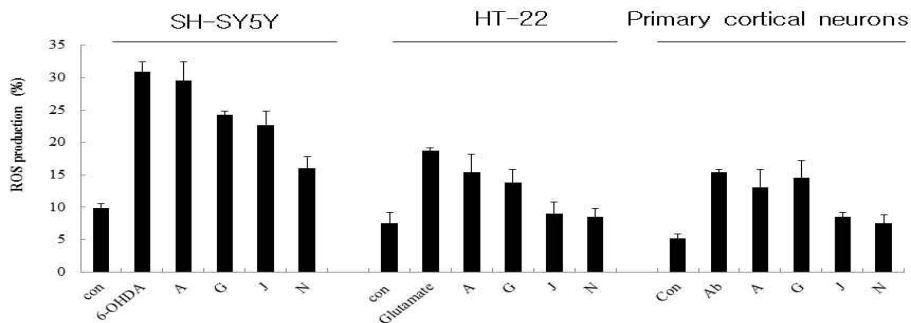


결과 2. 오미자 추출물 유래 lignan들의 LDH 분비 저해 효과 비교

- 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH) 분비 검사: 자극제에 의해 유도된 신경 세포 사멸에 대한 Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N의 세포보호 효과를 검증하기 위하여, LDH 분비 검사를 수행하였다. 세포의 LDH 활성은 상기와 동일 조건에서 배양된 세포 배양액을 대상으로 측정하였다.
- 그 결과, Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N 처리후 신경세포의 젖산탈수

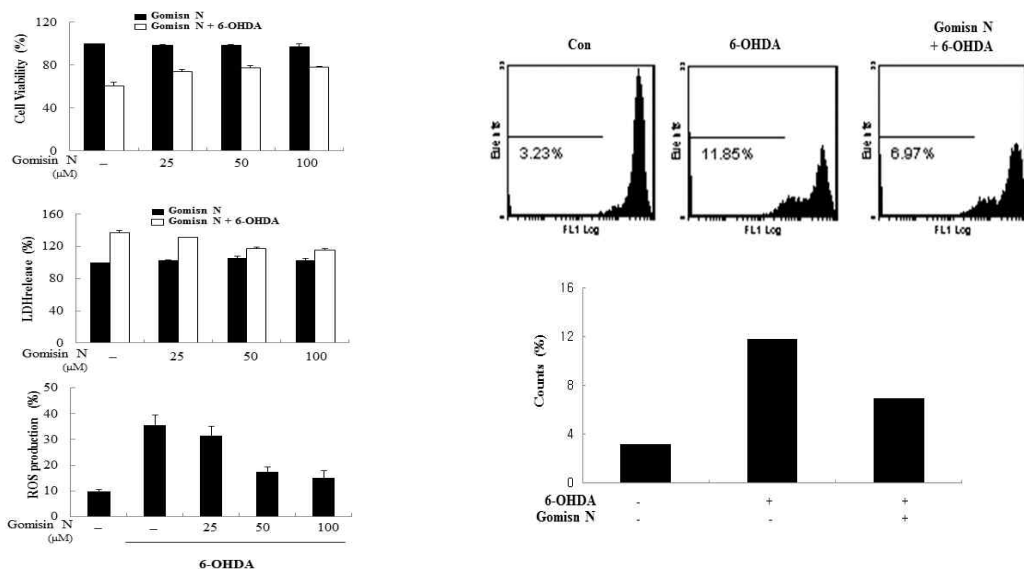
소효소 분비가 유의적으로 저해되었음을 확인하였다. 특히, Gomisin N의 경우부터 젯산 탈수소효소 분비가 유의적으로 저해되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 세포 독성으로부터 신경세포를 보호함을 의미한다(결과 2).

- 세포내의 ROS 축적에 미치는 미자 추출물 유래 Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N의 영향: 자극제에 의해 유도된 신경 세포 사멸에 대한 Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N의 항산화 효능을 검증하기 위하여 세포내의 ROS 축적에 미치는 영향을 조사하였다. 동일 조건에서 배양된 상기 세포에 ROS-민감한 형광 지표인 CM-H2DCFDA 또는 Ca²⁺ 민감한 형광 지표인 Fluo 4-AM을 5% CO₂하에 1시간동안 37°C에서 처리하였다. 상기 세포를 수득하고, PBS로 3회 세척하였다. 형광강도 (fluorescence intensity)는 유세포 분석기로 488 nm의 여기 파장(excitation wavelength) 및 525 nm의 방사 파장(emission wavelength)으로 측정하였다. 데이터 분석은 CXP software 2.0 을 이용하여 수행하였다. Gomisin A, Gomisin G, Gomisin J, Gomisin N 처리후 신경세포내의 ROS production이 감소됨을 확인하였다. 특히, Gomisin N이 ROS production을 감소됨을 확인하였다(결과 3).



결과 3. 세포내의 ROS 축적에 미치는 미자 추출물 유래 lignan들의 영향

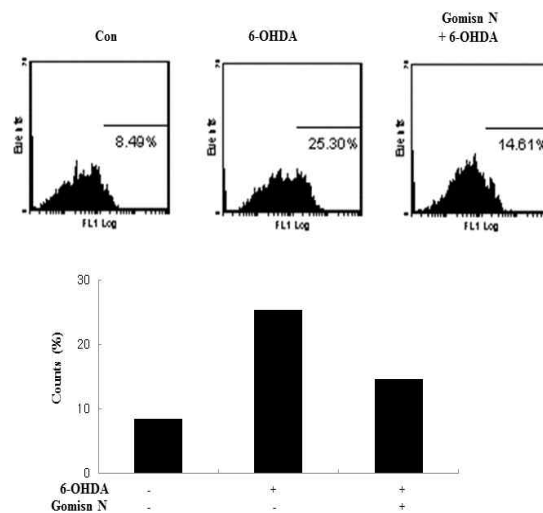
- 특히 Gomisin N이 농도 의존적으로 신경세포의 보호능을 가짐을 MTT, LDH, Calcein assay 와 ROS production 측정을 통하여 재검증하였다.



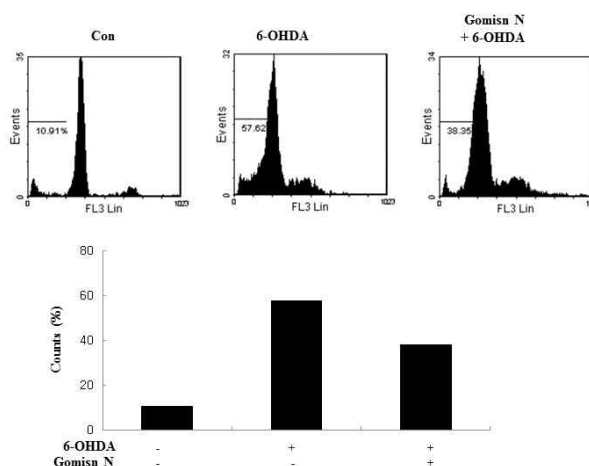
결과 4. Gomisin N의 신경세포의 보호능 검증(MTT, LDH, Calcein assay 와 ROS

production 비교)

- Gomisin N의 신경세포 apoptosis 억제 효능 측정: HT22 세포 및 SH-SY5Y 세포를 대상으로 Gomisin N의 apoptosis 보호 효과를 조사하였다. 이를 위하여 HT22 세포에는 5 μ M 농도의 글루타메이트를 12시간 처리하였고, SH-SY5Y 세포에는 150 μ M 농도의 6-OHDA를 24시간 처리하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척하고, 최종농도 50 μ g/ml인 propidium iodide (PI)를 암조건에 10분간 처리한 후 apoptosis 유발의 정도를 세포주기 sub-G1기 분포도의 분석으로 비교하였다.
- 그 결과, SH-SY5Y 세포를 6-OHDA로 자극하였을 때, 대조군에 비해 sub-G1 소속 세포의 빈도가 증가하였으나, Gomisin N이 전처리된 조건에서는 6-OHDA 로 자극된 SH-SY5Y 세포에서의 apoptosis는 감소함을 확인하였다(결과 5).



결과 5. 세포주기 G1기 세포의 빈도 측정에 의한 Gomisin N의 신경세포 apoptosis 유발 억제능



결과 6. TUNEL assay를 통한 Gomisin N의 신경세포 apoptosis 유발 억제능 확인

- TUNEL assay를 통한 Gomisin N의 신경세포 보호능 검증: SH-SY5Y 세포에 Gomisin

N을 12시간 처리한 후 150 μ M 농도의 6-OHDA를 24시간 처리 후, 세포를 APO-BrdUTM TUNEL 분석 키트를 이용하여 TUNEL 분석하여 측정하였다.

→ 결과 6에서 알 수 있듯이 6-OHDA로 자극된 SH-SY5Y 세포에서의 DNA 분절은 유의적으로 증가됨을 확인하였으나, Gomisin N을 전처리한 후, 6-OHDA로 자극된 SH-SY5Y 세포에서의 DNA 분절은 일반적인 수준임을 확인하였다. 따라서 Gomisin N이 손상된 신경세포의 DNA가 분절되는 것을 방지함으로써 손상된 신경세포의 세포사멸을 방지하여, 신경세포를 보호하는 효과를 가짐을 확인하였다.

③ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구 과제를 통해 오미자 오유래 화합물들의 추출 및 제조 공정을 확립 하여, 추출물 및 활성 성분의 함량 범위, 함유 성분들의 패턴 분석 등을 통해 일정한 제품으로 생산하기 위한 규격화 연구에 본 연구과제가 기반을 될 것으로 생각된다.
- 오미자 유래 화합물들이 *in vitro* 세포 배양 시스템에서의 분자 생물학적 역할을 통한 뇌 신경 보호능 뿐만 아니라, 질환 및 노화 관련 동물 모델에서의 효능 검색을 통해 안정성이 확보될 것으로 사료된다.

(라) Microglia 모델에서 CRPE55IB의 항염증 및 세포 보호 기작 및 분자적 작용 기전 연구

① 연구의 목적

- 본 연구는 CRPE55IB (sargencuneside)의 순수 분리 및 검정 및 신규 화합물들을 발견해 내고 상기 화합물이 만성 진행성 퇴행성 뇌질환의 발병과 밀접한 관계가 있는 미세아교세포와 성상교세포의 활성화로 인한 염증물질 생성이 유의하게 억제되는 항염증 효과 검증함으로써 만성 뇌질환의 예방 및 치료에 대한 효과를 규명하고자 함

② 연구 방법 및 결과

- LPS 처리에 의하여 활성화된 미세아교세포에서 CRPE55IB의 anti-neuroinflammatory effect를 조사하였음

→ CRPE55IB은 미세아교세포에서 LPS에 의하여 유발된 NO 및 PGE₂의 생성을 억제하고 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성도 억제할 뿐만 아니라 단구주화성 인자인 MCP-1의 생성 역시 현저히 억제하였음(결과 1)

- 염증성 반응과 연관된 과도한 NO와 PGE₂를 생성하는 효소로서 iNOS 및 COX-2가 중요한 표적 유전자이며 염증 반응을 유도하는 핵심 인자로서 작용하고, 특히 신경교증 및 파킨슨씨 병에서 미세아교세포에서 발현이 동시에 증가 되어있음

→ 따라서 미세아교세포가 활성화 되었을 때 iNOS, COX-2 단백질 발현에 CRPE55IB 이 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과 CRPE55IB 은 미세아교세포에서 LPS의하여 과발현된 iNOS, COX-2 단백질 발현을 저해하였음을 확인함

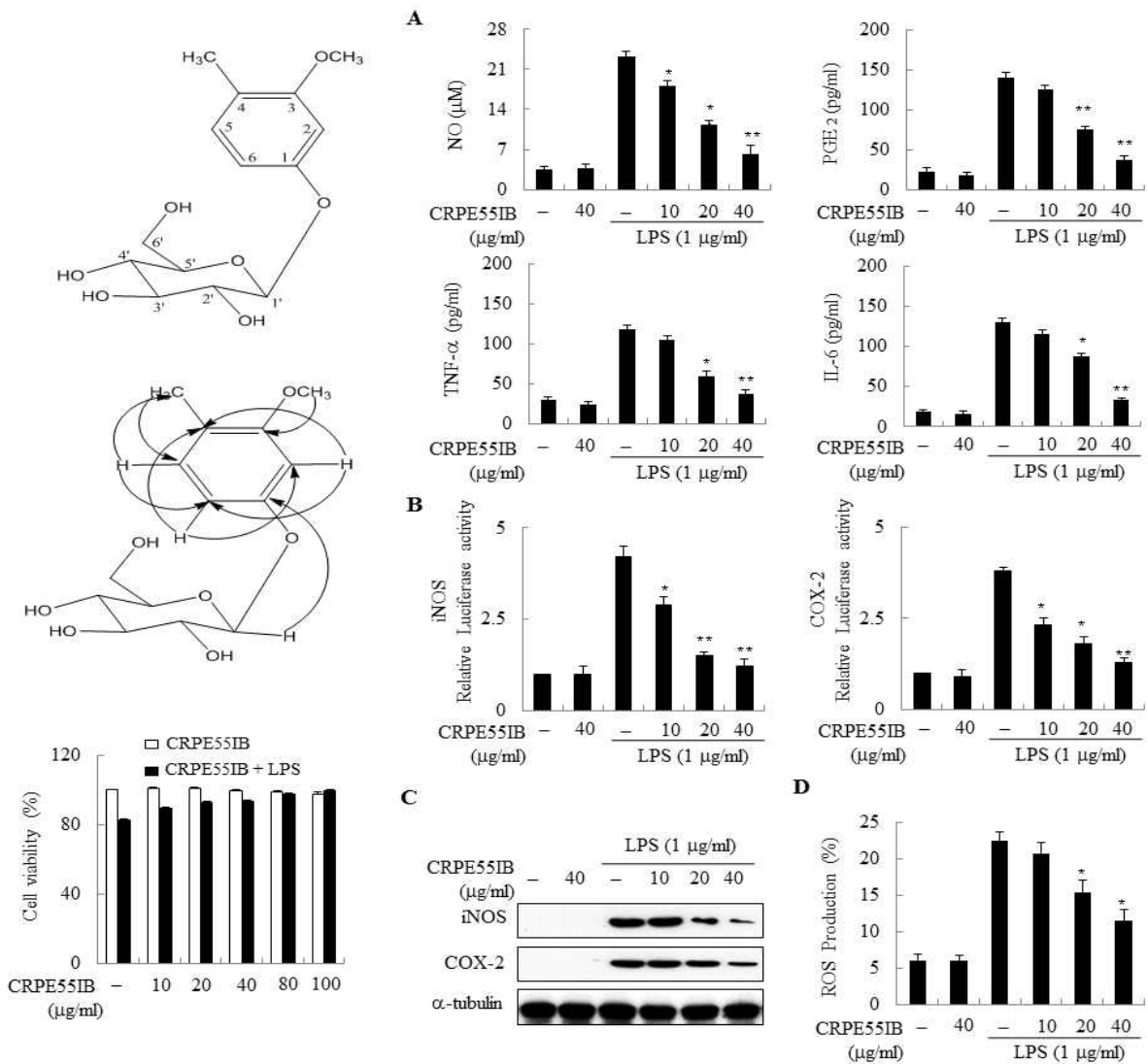
→ 이와 같은 결과를 근거로 CRPE55IB이 anti-neuroinflammatory effect를 가진다는 것을 확인할 수 있었음(결과 1)

- NF- κ B 경로에 미치는 영향: 신경면역계의 염증 매개인자의 활성화를 위해 위해서 여러 가지 세포내 신호전달(signal transduction) 과정을 거치는데 전사인자로서 NF- κ B가 iNOS, COX-2, MMPs 등의 전사활성을 조절하는 것으로 알려져 있는데 자극이 없을 경우 NF- κ B는 세포질 내에서 inhibitor인 I κ B와 complex를 이루고 있다가 LPS와 같은 자

극에 의하여 IκB가 분리되어 나가고 free한 NF-κB는 핵으로 이동하여 해당 유전자의 promoter에 결합하여 전사를 개시함

→ IκB가 NF-κB에서 분리되려면 먼저 IκB kinase (IKK)에 의해 IκB가 인산화되고 26S proteasome에 인지되어 분해되어야 함

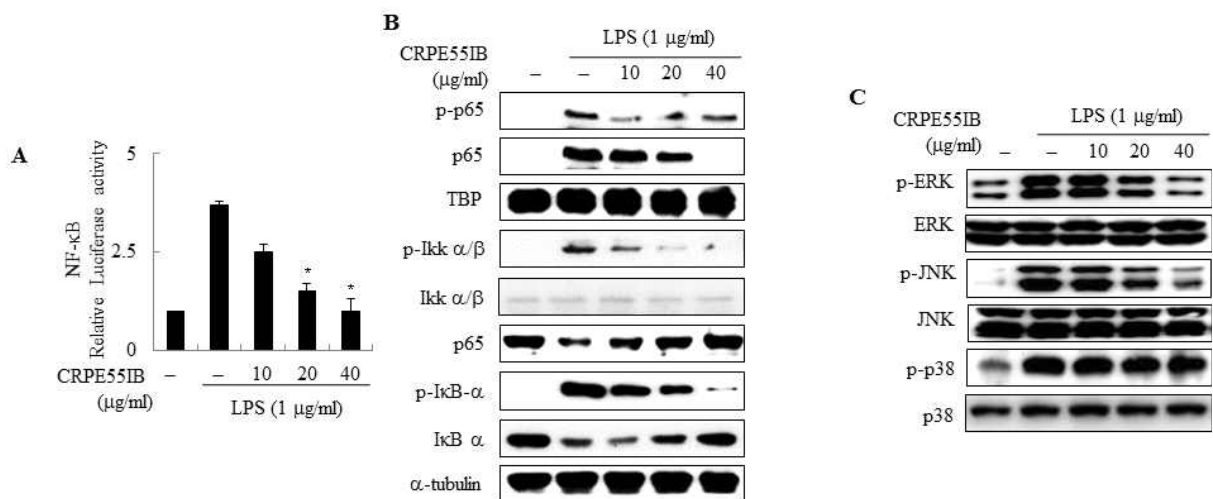
→ 따라서 CRPE55IB가 미세아교세포에서 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과, 미세아교세포에서 LPS에 의하여 활성화된 NF-κB가 CRPE55IB에 의해 저해됨을 확인하였음(결과 2A 및 B)



결과 1. 미세아교세포에서 LPS에 의한 염증성 반응 인자의 생성 및 조절 유전자들의 발현에 미치는 CRPE55IB의 영향

- MAPKs 신호계에 미치는 영향: 미세아교세포는 성장인자, cytokine, hormone, 감염 등 다양한 세포외 자극에 대해 적절히 반응함으로써 세포 특이적인 반응을 나타냄
- 이러한 과정에서 미세아교세포는 몇몇 특정 신호전달계를 활성화시키게 되는데, 이러한

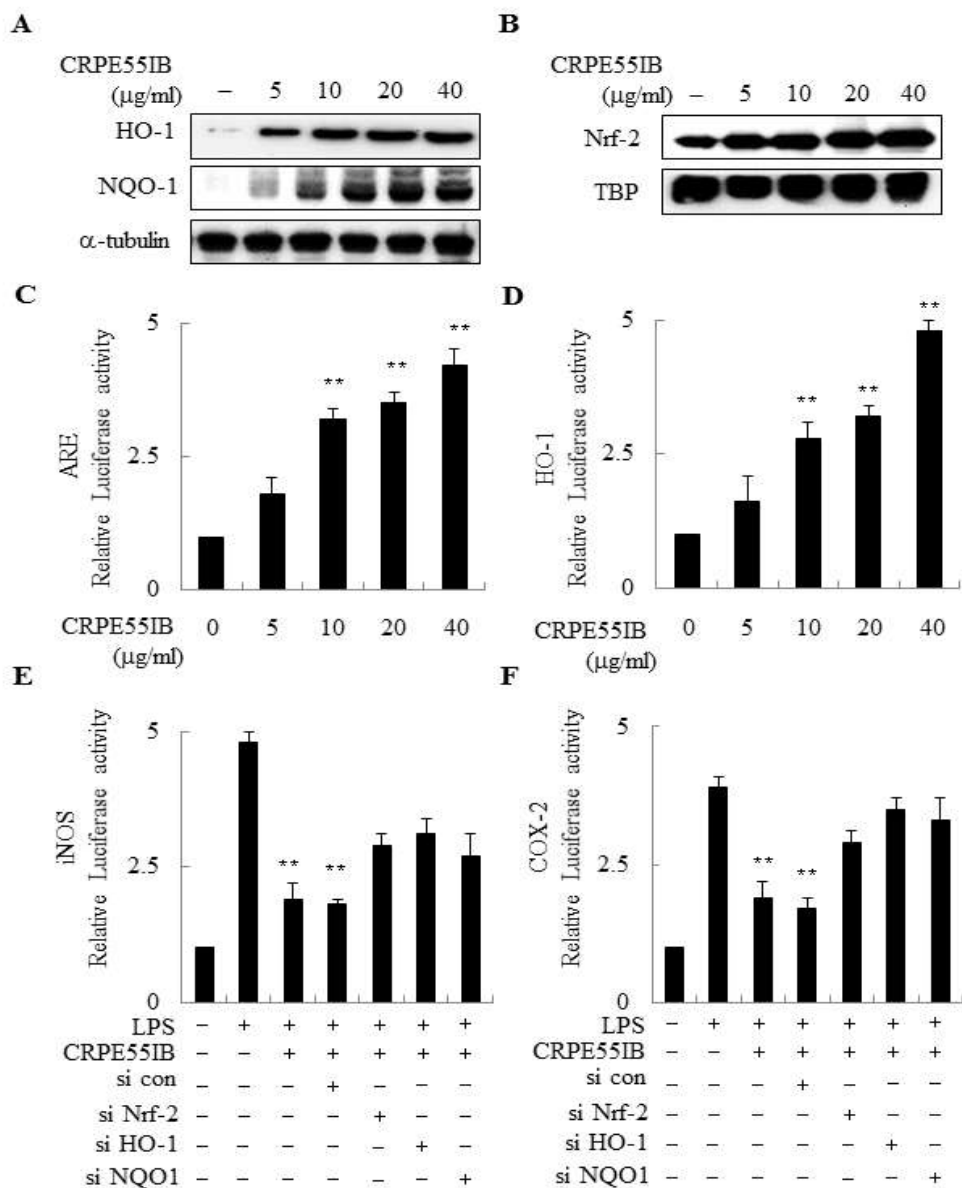
- 미세아교세포 내 신호전달체계 중에서 중요한 신호계 중의 하나가 MAPKs cascade임
- 현재까지 12종류의 MAPKs 단백질이 알려져 있으며, 성장인자, cytokine, LPS 등에 의해 활성화되는 ERK/MAPK와 열 충격, 자외선, 삼투 충격 등의 stress에 의해 활성화되는 JNK/SAPK로 나누어짐
- 최근 미세아교세포의 면역·염증반응, 스트레스 반응에서 ERK와 JNK의 활성화의 중요성이 강조되고 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있기에, CRPE55IB가 미세아교세포에서 MAPKs의 활성화에 미치는 영향을 조사하였음
- 그 결과 미세아교세포에서 LPS에 의하여 활성화 된 MAPKs가 CRPE55IB에 의해 저해됨을 확인하였음(결과 2C)



결과 2. 미세아교세포에서 LPS에 의한 NF-κB 및 MAPKs의 활성화에 미치는 CRPE55IB의 영향

- Phase II detoxifying/antioxidant enzymes 신호전달계의 역할: Phase II detoxifying/antioxidant enzymes 신호전달 기작이 신경질환 제어기전과 관련되어 있다는 사실이 밝혀짐
- 이들의 상위 신호전달 체계로는 MAPKs, PKC, PI3K, PKA signaling cascade 등을 들 수 있으며, HO-1 유전자의 promotor에는 Nrf-2와같이 산화환원에 민감한 전사인자들의 결합부위가 위치하고 있어, HO-1의 발현 유도에 있어 전사인자들의 역할도 중요하다고 할 수 있음
- Nrf-2는 정상상태에서는 세포질에서 Keap1 단백질과 dimer를 이루고 있으나 외부 신호에 의해 Keap1 단백질과의 연결고리가 끊어지게 되면 핵 안으로 이동하여 항산화 및 항염증 매개체를 coding하고 있는 유전자의 프로모터 부위에 결합하여 이들 매개체의 발현을 개시하게 됨. 이러한 배경 하에서 CRPE55IB이 미세아교세포에서 phase II detoxifying/antioxidant enzymes를 유도하는지를 조사하였음
- CRPE55IB은 전사조절인자인 Nrf-2의 활성화를 유발함으로써 세포 내 대표적인 항산화 단백질인 HO-1 및 NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO-1)의 발현을 증가시켰음

→ 즉, CRPE55IB은 미세아교세포에서 phase II detoxifying/antioxidant enzymes signaling pathway를 통하여 신경 염증 억제 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있었음(결과 3)



결과 3. 미세아교세포에서 Nrf2 신호계에 미치는 CRPE55IB의 영향

③ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 CRPE55IB이 미세아교세포에서 LPS에 의한 염증성 반응을 NF-kB 및 MAPKs의 활성 차단을 통하여 이루어지고 있음을 보여 주는 것이며, 동시 CRPE55IB은 산화적 스트레스에 대한 방어 기전으로 Nrf2 신호계의 활성을 증가시킴을 알 수 있었음
- 이러한 결과들은 오미자 추출물의 인지장애 극복에 대한 근거를 제공하여 주는 자료로서 추후 동물실험을 통한 평가가 이루어져야 할 것이며, 이들은 오미자가 인지장애 극복에 긍정적인 효능을 지닐 수 있다는 근거 제공으로 활용될 것임

(마) 오미자 유래 α -iso-cubebene에 의한 해마세포 손상 차단 효과

① 연구 수행의 목적

- 오미자 추출물에서 유래된 α -iso-cubebene의 생리활성 효능에 대한 검증을 위하여 신경 보호효과의 효능을 확인하여 오미자를 이용한 인지 장애 극복 관련 근거 자료를 제공하고 자 함

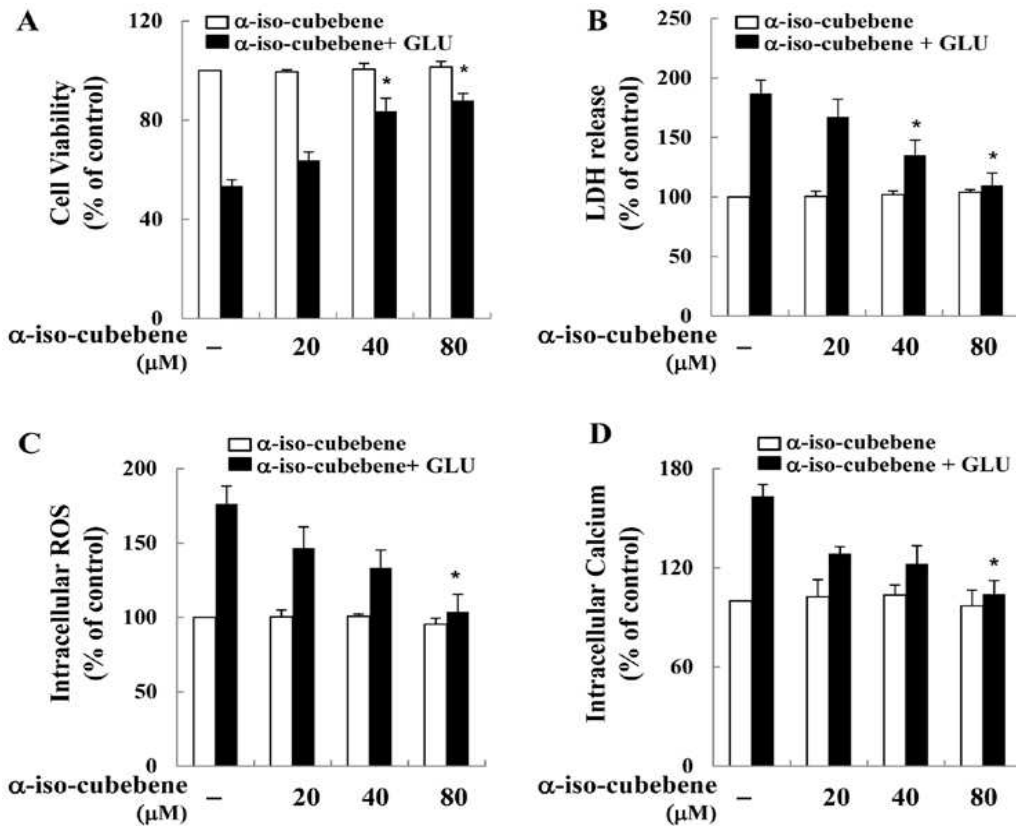
② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 오미자에서 분리된 α -iso-cubebene를 적정 농도로 배지에 희석하여 처리
- 실험 모델: 해마 유래 HT22 세포를 대상으로 glutamate에 의한 신경 세포 사멸을 유도한 신경 세포 손상 모델을 적용하였음
- 세포 독성 및 세포 사멸 측정: Glutamate로 유도한 신경 세포의 손상에 대한 α -iso-cubebene의 보호효과를 검증하기 위하여 MTT, LDH release assay 및 Flow cytometry 분석을 이용하였음
- 세포 내 ROS와 칼슘 생성 측정: Glutamate에 의하여 유도된 세포 내 ROS와 칼슘 생성을 ROS에 민감한 형광지표인 CM-H2DCFDA와 칼슘에 민감한 형광지표인 Fluo-4AM을 이용해 Flow cytometry로 분석하였음
- 유전자 발현 분석: α -iso-cubebene에 의해 glutamate로 유도한 신경 세포 사멸 및 산화적 스트레스에 반응하는 유전자들의 발현을 조사하기 위하여 western blotting과 luciferase assay를 실시하였음
- 기타 기전 연구 수행: 산화적 스트레스로부터 방어하는 기전인 Nrf-2 및 CREB 경로와의 직접적인 연관성을 조사하기 위하여 small interfering RNA(siRNA)를 이용하였으며 MAPKs 신호 경로의 관련성 여부를 조사하였음

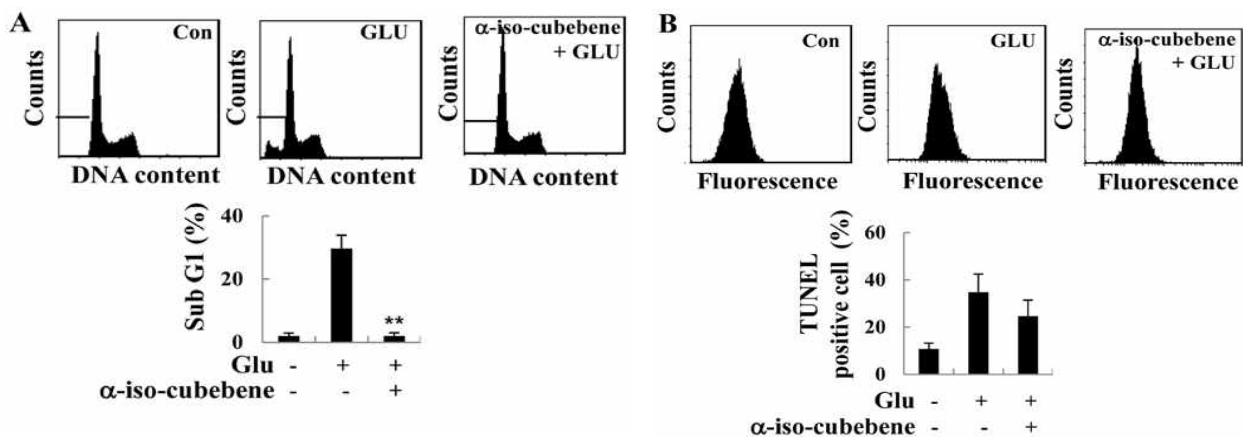
③ 연구 수행 결과

- HT22 세포에서 glutamate로 유도한 cell death, ROS 생성 및 칼슘 축적에 대한 α -iso-cubebene의 영향 : α -iso-cubebene이 신경 보호 효과를 나타내는지 확인하기 위해 HT22 세포에서 glutamate에 의한 세포 사멸에 미치는 영향을 MTT 및 LDH release assay로 조사하였으며 ROS와 칼슘 생성 및 축적에 대해 각각의 형광지표를 처리한 후 flow cytometry로 분석하였음
 - Glutamate에 의해 세포 생존율은 감소하였고 세포 손상의 지표가 되는 LDH 방출이 증가되었으며 ROS 및 칼슘의 축적도 증가되었으나, α -iso-cubebene에 의해 세포의 생존율 및 세포 손상이 회복되었고 ROS 및 칼슘의 축적이 감소되었음(결과 1)
 - α -iso-cubebene이 glutamate로 유도한 신경 세포 손상에 대해 보호 효과를 나타내는 것으로 추정됨
- Glutamate로 유도한 세포사멸에 대한 α -iso-cubebene의 영향 : α -iso-cubebene이 glutamate로 유도한 세포 사멸에 대한 영향을 sub-G1 population과 TUNEL assay로 분석하였음
 - Glutamate에 의해 sub-G1의 population과 TUNEL-positive 세포의 비율이 증가 하였으나 α -iso-cubebene에 의해 감소하였으며(결과 2) α -iso-cubebene이 이러한 glutamate로 유도한 세포사멸을 억제함으로써 신경 세포 보호효과를 나타내었을 것으로

추정됨



결과 1. HT22 세포에서 glutamate에 의한 apoptosis, ROS 생성 및 칼슘 축적에 미치는 α -iso-cubebene의 영향

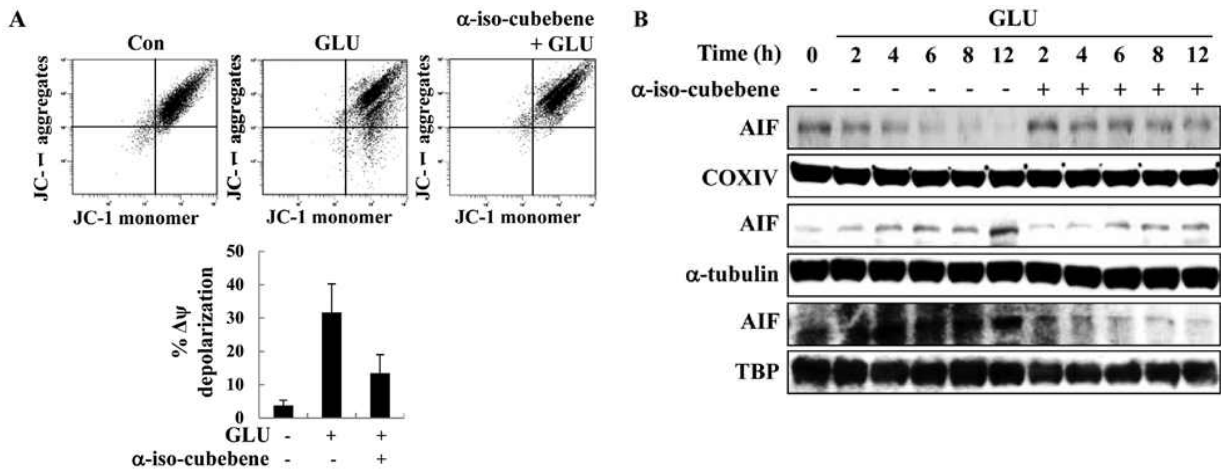


결과 2. HT22 세포에서 glutamate에 의한 apoptotic cell death에 미치는 α -iso-cubebene 영향의 정량적 평가

- Glutamate에 의한 HT22 세포 미토콘드리아의 기능 손상과 세포 사멸 유도 시 세포질로 이동한 AIF에 대해 α -iso-cubebene의 영향을 mitochondrial membrane potentials (MMP) 측정과 미토콘드리아, 세포질과 핵에서의 AIF 발현을 시간에 따라 western

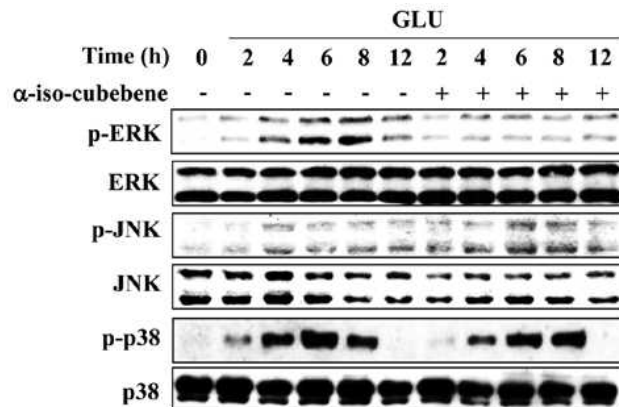
blotting으로 조사하였음

→ Glutamate에 의해 증가된 MMP loss가 α -iso-cubebene에 의해 감소하였으며 AIF의 발현의 경우 glutamate의 처리 시간이 증가함에 따라 미토콘드리아에서의 발현이 감소하였으며 세포질과 핵에서는 증가하였고 α -iso-cubebene을 함께 처리하였을 때는 세포질과 핵에서의 발현이 감소하였기에(결과 3) glutamate에 의해 유도된 MMP loss 및 AIF의 이동을 α -iso-cubebene이 억제시키는 것으로 추정됨



결과 3. HT22 세포에서 glutamate에 의한 MMP 소실과 AIF 발현 변화에 미치는 α -iso-cubebene의 영향

- Glutamate로 유도한 ERK의 활성화에 대한 α -iso-cubebene의 영향 : Glutamate 처리에 따른 MAPK 변화에 미치는 α -iso-cubebene의 영향을 조사하였음
- Glutamate에 의해 p-ERK, p-p38과 p-JNK의 수준이 증가되었으며 p-ERK의 수준이 α -iso-cubebene의 처리에 의해 감소하였기에(결과 4) glutamate에 의해 유도된 ERK의 인산화를 α -iso-cubebene이 감소시키는 것으로 추정됨



결과 4. HT22 세포에서 glutamate에 의한 MAPKs의 활성화에 미치는 α -iso-cubebene의 영향

- PKA/CREB/Nrf2의 활성화 및 HO-1과 NQO1의 발현에 미치는 α -iso-cubebene의 영향

: PKA/CREB/Nrf2의 활성화 및 HO-1과 NQO1에 대하여 α -iso-cubebene의 영향에 대해서 western blotting과 luciferase assay를 통해 조사하였음

→ α -iso-cubebene에 의해 ARE-driven 유전자인 HO-1과 NQO1의 발현이 증가되었고 HO-1 promoter 활성화도 증가되었으며 ARE-driven 유전자와 관련 있는 인산화된 형태의 PKA/CREB의 발현과 Nrf2에 대해 핵으로의 이동이 증가되었으며 ARE와 CRE의 transactivity가 증가되었음(결과 5)

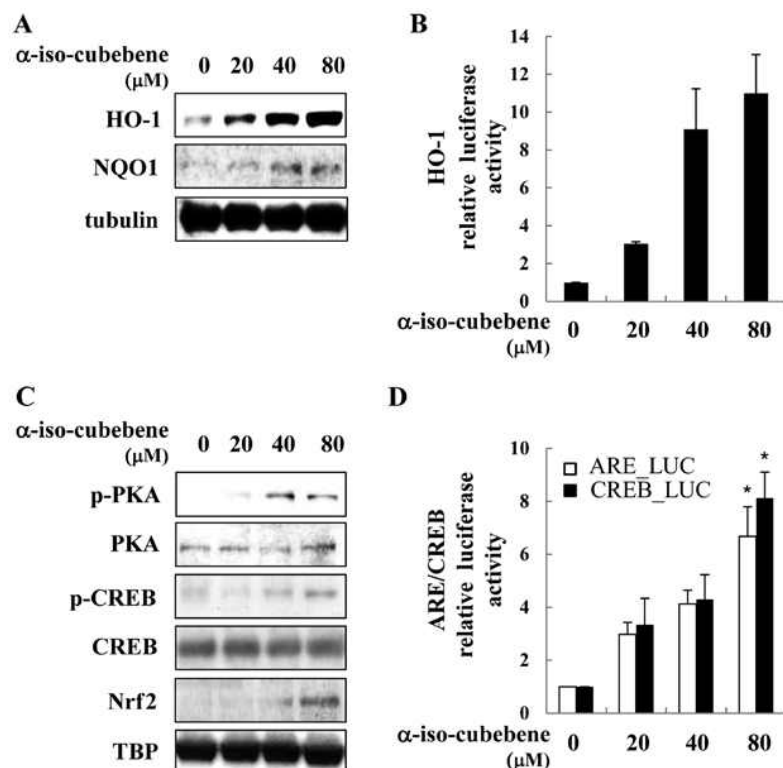
- α -iso-cubebene의 신경보호효과에서 CREB/Nrf2 경로의 역할 : CREB와 Nrf2 siRNA를 통해 CREB와 Nrf2 단백질을 침묵시켜 α -iso-cubebene의 신경보호효과에서 CREB와 Nrf2의 역할을 조사하였음

→ CREB와 Nrf2 단백질을 침묵시키고 glutamate와 α -iso-cubebene을 처리하였을 때 glutamate에 의해 증가된 LDH 방출과 TUNEL positive 세포에 대한 α -iso-cubebene의 억제효과는 CREB와 Nrf2 siRNA에 의해 억제되었음(결과 6)

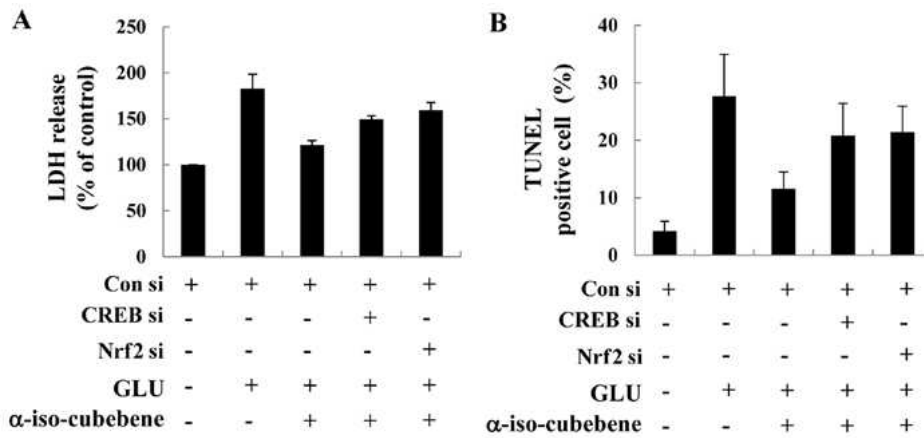
→ 따라서 glutamate에 의해 유도되는 세포 독성에 대해 α -iso-cubebene이 PKA/CREB/Nrf2 경로의 활성화시킴으로서 신경 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 추정 됨

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 α -iso-cubebene이 HT22 세포에서 glutamate로 유도한 세포사멸을 미토콘드리아의 기능적 손상뿐 만 아니라 ROS와 칼슘 생성을 억제하였으며 PKA/CREB/Nrf2의 경로를 통해 HO-1과 NQO1의 발현을 유도함으로써 신경세포 보호 효과를 나타내었음을 의미함



결과 5. HT22 세포에서 PKA 및 Nrf2 신호전달계에 미치는 α -iso-cubebene의 영향



결과 6. HT22 세포에서 CREB 및 Nrf2 전사활성에 미치는 α -iso-cubebene의 영향

- 따라서 이러한 결과들은 오미자 추출물에 의한 인지장애 극복의 효능에 대한 학술적 근거 자료로서 활용될 것임

(3) 제2협동 과제 연구 결과

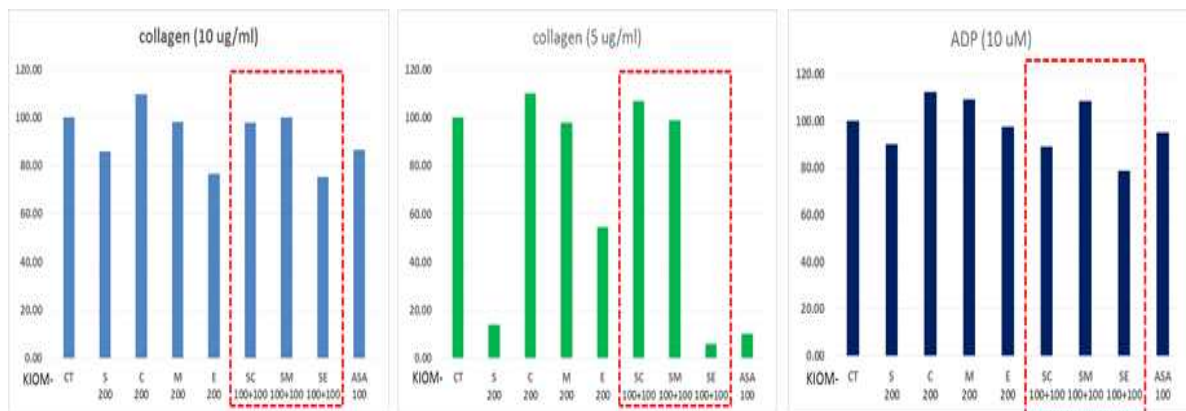
(가) 오미자 복합물 후보소재의 *in vitro*, *ex vivo* 및 *in vivo* 혈행개선 효능평가

① 연구 수행의 목적

- 혈전억제 효능을 보이는 최적의 오미자 복합 추출물을 개발하기 위하여 오미자 추출물과 후보약제 3종의 복합 처리에 의한 오미자 복합 추출물 3종의 *in vitro*, *ex vivo* 및 *in vivo* 혈행개선 효능을 확인하고 최종 유용 복합물을 선정하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 70% 에탄올 오미자 추출물, 오미자 1:1 복합 추출물 3종, 양성대조군 약물 aspirin, ticlopidine 등
- 실험 모델: ligand (collagen, ADP)-유도 *in vitro* 또는 *ex vivo* 혈전모델, carrageenan-유도 꼬리정맥 혈전 동물모델 적용

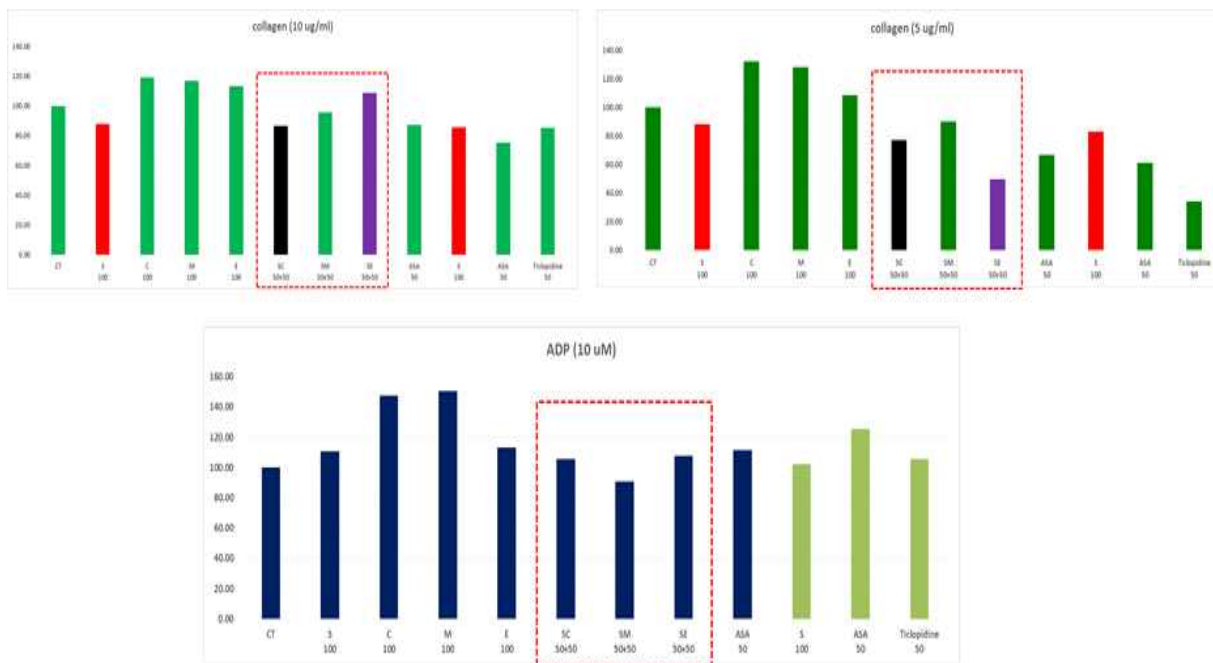


결과 1. 오미자 복합물 3종의 *in vivo* 혈소판 응집 억제 효과

- 측정 항목: 혈소판응집 억제능, 꼬리 혈전 형성길이(tail thrombosis) 억제 효과 측정

③ 연구 수행 결과

- 흰쥐 혈소판을 이용하여 오미자 추출물(KIOM-S)과 후보약재(KIOM-C, KIOM-M, KIOM,E)의 복합 처리에 의한 오미자 복합 추출물 3종(KIOM-SC, KIOM-SM, KIOM-SE)의 collagen (5, 10 µg/ml) 또는 ADP (10 µM) 유도 혈소판응집 억제 효과를 측정하였음 → 오미자 복합 추출물 KIOM-SE는 혈소판응집 억제 효과를 보였음(결과 1)
- 오미자와 오미자 복합 추출물 3종을 흰쥐에 경구투여한 후 분리한 흰쥐 혈소판을 이용하여 오미자 추출물과 오미자 복합 추출물 3종의 collagen (5, 10 µg/ml) 또는 ADP (10 µM) 유도 혈소판응집 억제 효과를 측정하였음 → 오미자 복합 추출물 3종은 collagen 유도 혈소판응집 억제 효과를 보였음(결과 2)

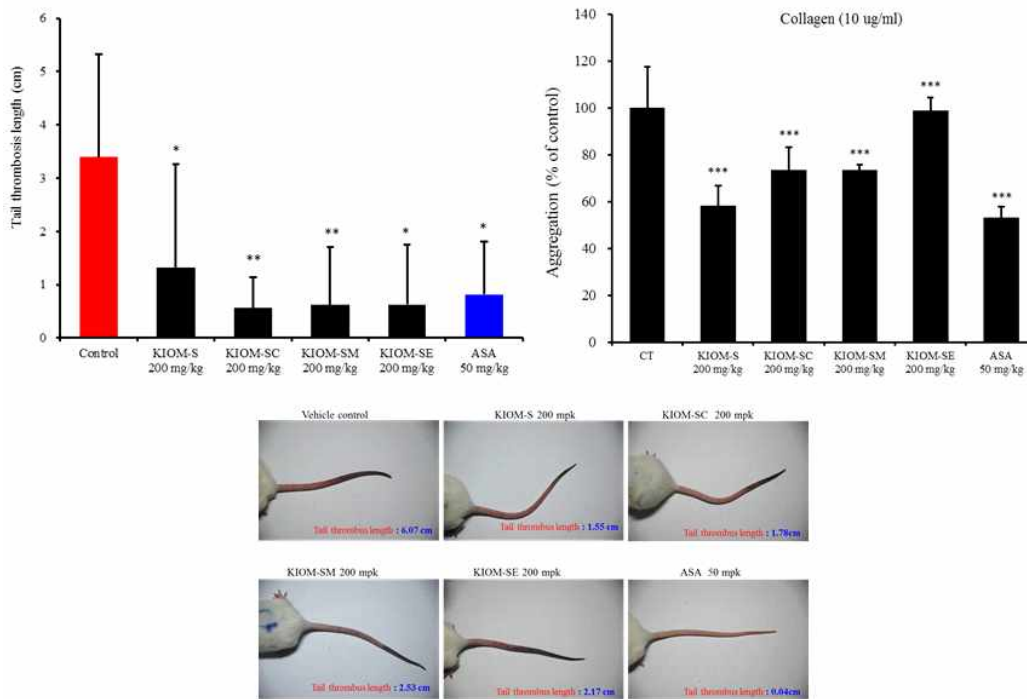


결과 2. 오미자 복합물 3종의 *ex vivo* 혈소판 응집 억제 효과

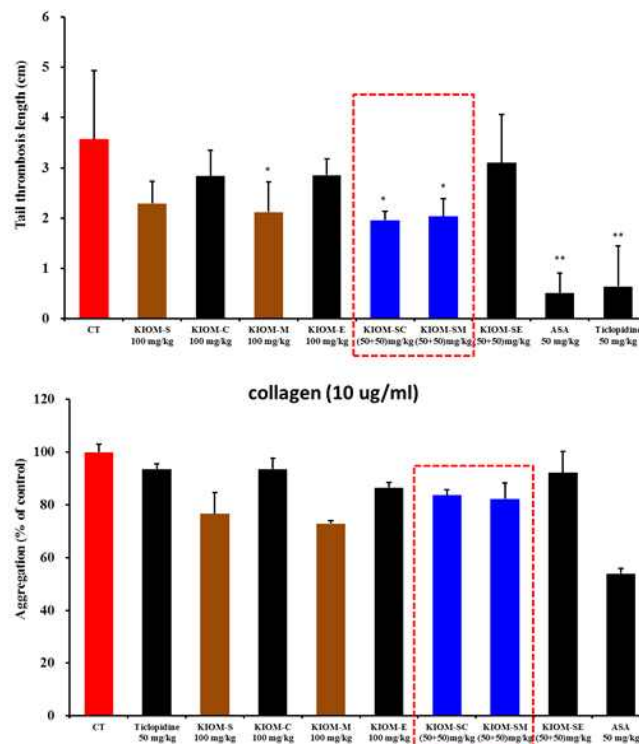
- 오미자와 오미자 복합 추출물 3종을 ICR 마우스에 1주일간 경구투여하고, 생쥐의 꼬리에 혈전을 도하도록 1% carrageenan (type I)을 복강 주사한 다음 72시간 후 꼬리 혈전 형성 길이를 측정하고 분리한 혈액으로부터 혈소판응집 억제능을 측정함 → 오미자 복합 추출물 3종은 200 mg/kg/day 투여농도에서 꼬리 혈전 억제 효능 및 혈소판응집 억제 효능을 보였음(결과 3). 100 mg/kg/day 저농도에서는 KIOM-SC, KIOM-SM 2종이 탁월한 효능을 보였음(결과 4)

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용

- 오미자 복합 추출물 3종은 *in vitro* 및 *ex vivo*에서 collagen 유도 혈소판응집 억제 효과를 보였으며, 동물모델에 오미자 복합물을 경구 투여시 유의적인 꼬리혈전 억제 및 혈소판응집 억제 효능을 나타냈으므로, 이들 오미자 복합 추출물들은 노인성 심혈관 질환 개선을 위한 기능성 소재로 활용할 수 있을 것으로 보임



결과 3. 오미자 복합물 3종(200 mg/kg)의 *in vivo* 혈전 억제 및 혈소판 응집 억제 효과



결과 4. 오미자 복합물 3종(100 mg/kg)의 *in vivo* 혈전 억제 및 혈소판 응집 억제 효과

(나) 오미자 복합물 KIOM-SC의 동물투여에 의한 혈전억제 효능평가 및 최적비율 도출

① 연구 수행의 목적

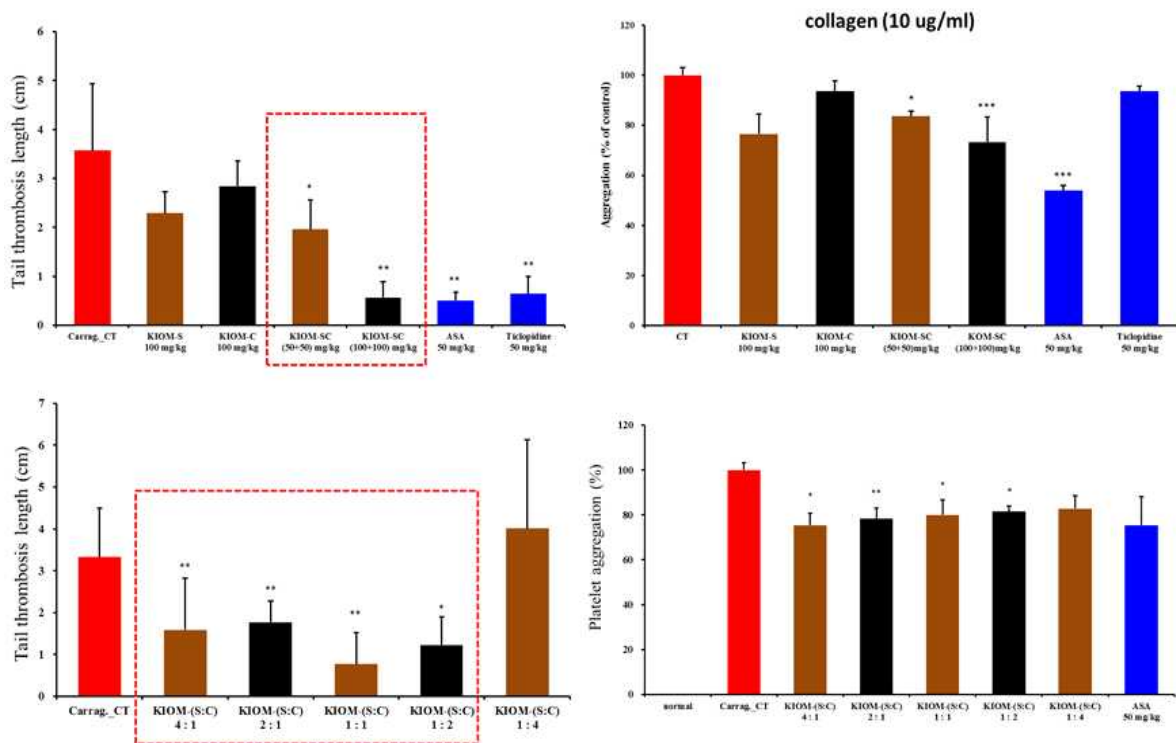
- 오미자 복합 추출물 KIOM-SC의 유효성을 검증하기 위하여 오미자 복합물 투여에 의한 혈전동물모델에서의 혈전억제 효능을 평가하고 비율별 효능검증을 통해 최적의 비율을 도출하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 70% 에탄올 오미자 추출물, 오미자 복합 추출물 KIOM-SC
- 실험 모델: *ex vivo* 혈전모델, carrageenan-유도 꼬리정맥 혈전 동물모델 적용
- 측정 항목: 꼬리 혈전 형성길이(tail thrombosis) 억제 효과, 혈소판응집 억제능 평가

③ 연구 수행 결과

- 오미자 복합 추출물을 ICR 마우스에 1주일간 경구투여하고, 생쥐의 꼬리에 혈전을 도하도록 1% carrageenan (type I)을 복강 주사한 다음 72시간 후 꼬리 혈전 형성 길이를 측정하고 분리한 혈액으로부터 혈소판응집 억제능을 측정함
- 오미자 복합 추출물 KIOM-SC는 200 mg/kg/day 투여농도에서 단독 추출물 KIOM-S, KIOM-C와 비교하여 탁월한 꼬리 혈전 억제 효능 및 혈소판응집 억제 효능을 보였으며, 200 mg/kg/day 농도의 KIOM-S와 KIOM-C의 비율별 실험결과에서는 모든 비율이 항혈전 효능을 보였고 그 중 1:1 혼합 비율에서 가장 탁월한 혈전 억제 효능을 보였음(결과 1)



결과 1. 오미자 복합물 KIOM-SC의 동물 투여에 의한 혈전 억제 및 혈소판 응집 억제 효과

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 복합 추출물 KIOM-SC는 단독 추출물 대비 탁월한 항혈전 효능을 보였으므로 혈전에 의해 발병되는 혈전성 질환의 예방 또는 치료용 기능성 식품 또는 약학 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있을 것으로 보임

(다) 오미자 복합물 KIOM-SM의 *in vivo* 혈전억제 효능평가 및 최적비율 도출

① 연구 수행의 목적

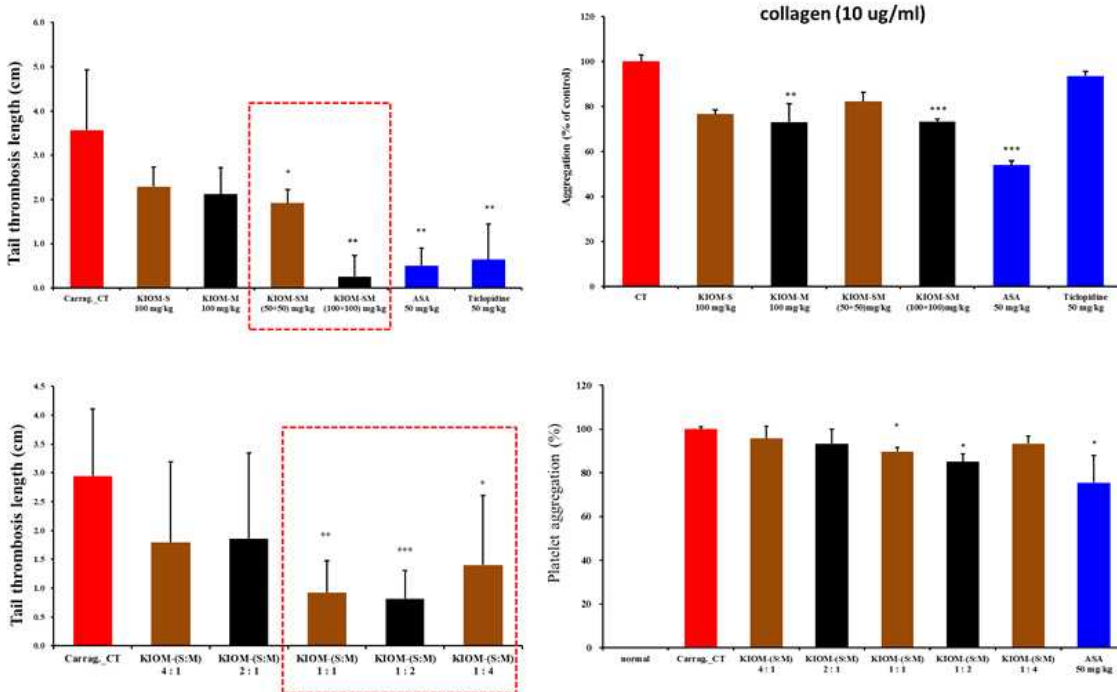
- 오미자 복합 추출물 KIOM-SM의 유효성을 검증하기 위하여 오미자 복합물 투여에 의한 혈전동물모델에서의 혈전억제 효능을 평가하고 비율별 효능검증을 통해 최적의 비율을 도출하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 70% 에탄올 오미자 추출물, 오미자 복합 추출물 KIOM-SM
- 실험 모델: carrageenan-유도 꼬리정맥 혈전 동물모델
- 측정 항목: 꼬리 혈전 형성 길이(tail thrombosis) 억제 효과, 혈소판응집 억제능

③ 연구 수행 결과

- 오미자 복합 추출물을 ICR 마우스에 1주일간 경구투여하고, 생쥐의 꼬리에 혈전을 형성하도록 1% carrageenan (type I)을 복강 주사한 다음 72시간 후 꼬리 혈전 형성 길이를 측정하고 분리한 혈액으로부터 혈소판응집 억제능을 측정함
- 오미자 복합 추출물 KIOM-SM은 200 mg/kg/day 투여농도에서 단독 추출물 KIOM-S, KIOM-M와 비교하여 탁월한 꼬리 혈전 억제 효능 및 혈소판응집 억제 효능을 보였으며, 200 mg/kg/day 농도의 KIOM-S와 KIOM-M의 비율별 실험결과에서는 1:2 혼합 비율에서 가장 탁월한 혈전 억제 효능을 보였음(결과 1)



결과 1. 오미자 복합물 KIOM-SM의 동물 투여에 의한 혈전 억제 및 혈소판 응집 억제 효과

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 복합 추출물 KIOM-SM는 단독 추출물 대비 탁월한 항혈전 효능을 보였으므로 혈전에 의해 발병되는 혈전성 질환의 예방 또는 치료용 기능성 식품 또는 약학 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있을 것으로 보임

(라) 오미자 복합물의 혈전동물모델에서의 혈행 개선 효능평가

① 연구 수행의 목적

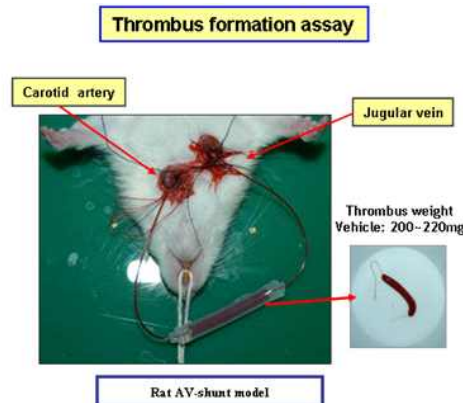
- 오미자 추출물의 혈행 개선 효과를 평가하기 위한 유효 용량의 결정과 Arterio-Venous (A-V) shunt 모델을 이용한 혈전 억제 효능을 평가하고자 함

② 연구 수행 방법

• 연구 재료

- a. 오미자, CE, ME (1 kg)을 15 L의 70% EtOH로 3시간씩 각각 환류추출한 후 여과한 액을 감압 농축하고, 건조하여 오미자 추출물(340 g), CE 추출물 (63 g), ME추출물 (179 g)을 제조하였음
- b. 상기 오미자추출물과 CE 추출물, 오미자와 상향 추출물을 각각 비율별로 혼합하여 오미자와 CE복합물 및 오미자와 ME 복합물들을 제조하였음

- 실험 방법: A-V Shunt model 약물 투여 2시간 전에 천연물 유래 혈액개선 후보물질을 녹인 후 350 g의 SD 흰쥐에 경구 투여함 → 1시간 후 SD rat의 복강에 2 ml 씩 urethane 1.25 g/kg을 주사하여 마취한 후, 마취가 끝나면 Left carotid artery와 Right jugular vein에 PE50 tube로 cannulation 함 → 5 cm silicon tube에 cotton thread을 넣고 saline을 채운 후 artery와 vein에 연결된 tube로 혈액을 흐르게 하여 shear-stress를 유도하여 15분간 thrombus를 생성시킴 → 생성된 thrombus를 건조시켜 무게를 측정하여 anti-platelet efficacy를 평가함(도 1)



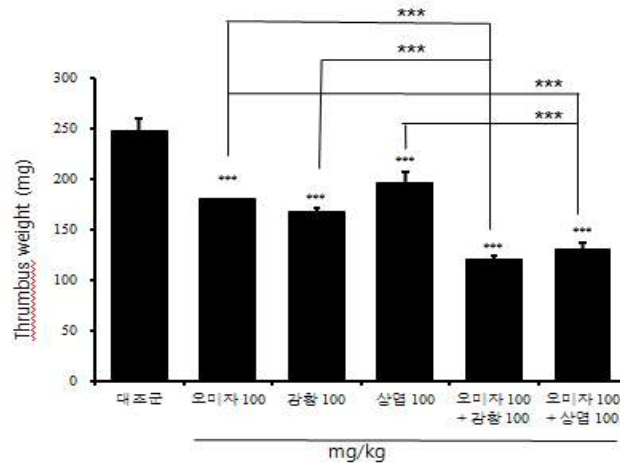
도 1. A-V Shunt model을 이용한 혈전 억제 효능 실시 예

③ 연구 수행 결과

- 오미자-강황 복합물 또는 오미자-상엽 복합 추출물이 오미자, 강황, 또는 상엽 단독 추출물을 투여한 경우보다 현저히 낮은 혈전 중량을 나타내는 것을 확인 함
- 오미자-강황 복합 추출물이 각각의 단독 추출물보다 상승 효과를 가지는지를 확인해 보기 위하여 콜비식으로 계산해 본 결과, 각각의 억제율인 27%, 및 32%를 이용하여 계산한

콜비식 E의 값은 50% $((27+32)-(27 \times 32/100))$ 인데 반해, 오미자-강황 복합 추출물의 실제 억제율은 52%라는 점에서, 본 발명의 오미자-강황 복합 추출물은 단독 추출물이 가지고 있는 효과보다 상승 효과를 나타냄

- 오미자-상엽 복합 추출물이 각각의 단독 추출물보다 상승 효과를 가지는지를 확인해 보기 위하여 콜비식으로 계산해 본 결과, 각각의 억제율인 27%, 및 21%를 이용하여 계산한 콜비식 E의 값은 42% $((27+21)-(27 \times 21/100))$ 인데 반해, 오미자-상엽 복합 추출물의 실제 억제율은 48%라는 점에서, 본 발명의 오미자-상엽 복합 추출물은 단독 추출물이 가지고 있는 효과보다 훨씬 큰 상승 효과를 나타냄



④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용

- 오미자-강황 복합물 및 오미자-상황 복합물은 100 mg/kg/day의 용량에서 시너지 효과를 가지고 우수한 효능을 나타냄
- 본 결과로부터 진보성에 의한 지재권 확보가 가능하며 임상시험시 일일 복용량 설정자료 활용할 수 있음

(마) 오미자 복합물의 Carrageenan 유도 동물모델에서의 효능 및 *ex-vivo* 혈전억제 효능 평가

① 연구 수행의 목적

- 본 연구과제의 핵심 재료인 오미자와 상엽을 이용한 생리활성 효능에 대한 검증을 위하여 혈소판의 약리학적 억제에 의한 혈소판 생성 뿐만 아니라 혈소판 활성을 감소시키는 화합물의 시너지 효과를 입증하여 혈행 개선 효능을 확인하고자 함

② 연구 수행 방법

- 연구 재료: 상엽과 오미자 추출물은 Omniherb Co.(대구)에서 구입하였음 → 건조된 잎을 80°C, 70% 에탄올에서 3시간씩 2번 추출하고, Rotary evaporator로 증발시킨 후 DMSO에 용해시켜 사용함
- 실험모델: 250-260g Dawley 쥐(n=74)를 일주일간 적응기간을 거친 후 실험에 사용함
- AV shunt model: Control, 상엽(MAL)군, 오미자(SCC)군, MAL+SSC군(1:1) (n=6)으로 분류하여 1일 1회 200 mg/kg 3일간 경구투여를 실시하였음

→ 마지막 투여 2시간 후 우레탄 (1.7 g/kg, ip)으로 마취를 시켰고, 좌경동맥과 우경정맥을 절개로 노출 시켜 양단에 shunt를 삽입하였음 → Thread는 제거 한 후 형성된 혈전의 무게를 측정하였음

- κ-Carrageenan으로 유도된 thrombosis-length model: 생체 내 항혈전 활성을 확인하기 위해 control, SSC, MAL, SCC + MAL (200 mg/kg)와 50 mg/kg ASA군으로 분류한 쥐 (n=10)를 1일 1회 7일 동안 경구투여를 실시하였음

→ 4일째, 경구 투여 30분 후 κ-Carrageenan (20 mg/kg, in 생리식염수)을 복강주사 하였음 → 적색, 부종 및 혈전증이 동반된 꼬리를 모니터링하고 3일 동안 치료하였음 → 7일째(κ-Carrageenan 주입 후 3일), 각 그룹의 혈전 길이를 측정하였음



대조군

오미자 추출물 투여군

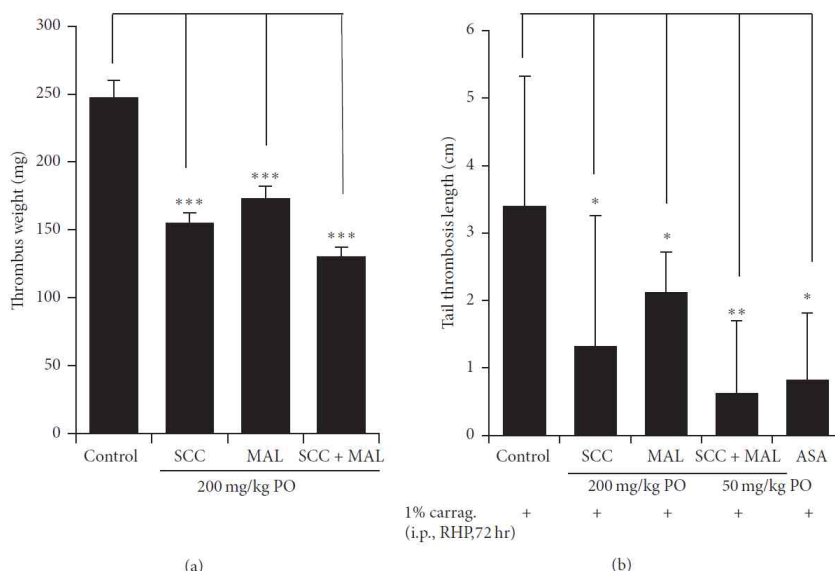
도 1. Carrageenan 유도 동물모델 예시

- 혈소판 준비 및 응집: SD rat에서 전혈을 얻어 항응고제와 반응 시켰음 → 혈소판이 풍부한 혈장은 170 ×g에서 원심분리하고, 350 ×g에서 2번 더 원심 분리하여 혈소판을 분리 시켰음
- 완충액을 첨가하여 3×10^8 /ml 로 혈소판 농도를 조정하여 light transmission aggregometry를 이용하여 혈소판 응집 분석을 진행하였음
- 전자현미경 분석: 응집된 혈소판을 분석 후, 0.5% paraformaldehyde (1차 고정), osmium tetroxide (2차 고정), 에탄올 탈수, 동결건조 과정을 거쳐 측정하였음
- 칼슘 측정: 혈소판을 5 μM Fura-2/AM와 함께 37°C, 1시간에서 예비 배양하고 세척과정을 거친 후, 1 mM CaCl₂ 1분, agonist 2분 동안 반응시킴
- 기록은 분광형광측정기를 사용하였고, Schaeffer와 Blaustein 방법에 의해 계산하였음
- $[Ca^{2+}]_i \text{ in cytosol} = 224nM \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$
- 과립 분비: 세척된 혈소판을 1mM CaCl₂에 2분간 배양 후, agonist로 자극
- 응집 반응이 종결된 혈소판 혼합액을 원심분리한 후 상층액을 얻어, ATP Assay Kit (Biomedical Research Service Center)를 이용해 ATP 분비를 측정하였음
- 유세포 분석: 혈소판에 결합하는 피브리노겐 Alexa Fluor 488을 정량하기 위해 사용
- 실온에서 혈소판을 2분간 세척, 0.1 mM CaCl₂ 5분, agonist 5분, fibrinogen Alexa Fluor 488 (20 μg/ml)에 5분 방치 후, 4°C에서 0.5% paraformaldehyde 30분간 처리하였음
- 혈소판을 3번 세척하고 400 μl PBS에 현탁하였음 → FACS Caliber cytometer를 이용하여 측정, CellQuest software를 이용하여 분석하였음

- 단백질 분석 기법: 혈소판 응집 후, lysis buffer로 현탁하고 원심분리하여 BCA 법에 의해 단백질 농도를 측정하였음
- 총 세포단백질 (35 μ g)은 10% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동하고 PVDF membrane으로 전이시키고 5% skim milk로 비특이적인 단백질 반응을 억제하고, 1차 항체와 그에 따른 2차 항체를 결합시킨 후 ECL solution으로 시각화하였음
- 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC): SSC+MAL에서 Marker Compound를 확인하기 위해 2996-photodiode array detector가 결합된 HPLC로 분석 → 각 화합물은 240 nm 파장에서 피크 면적을 측정함

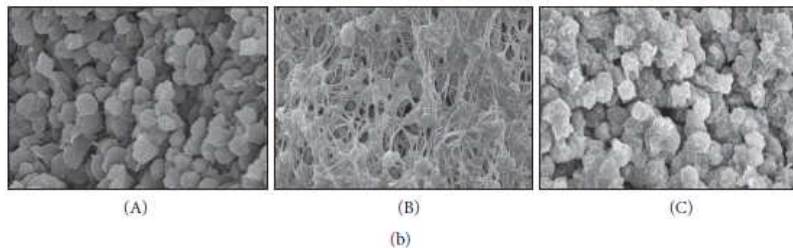
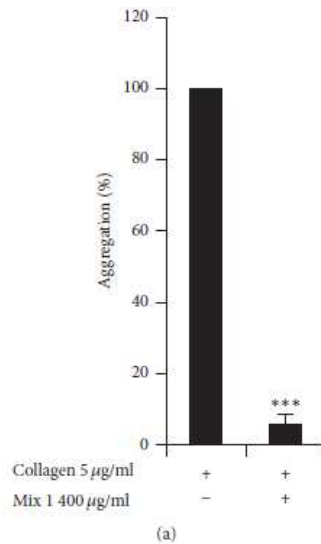
③ 연구 수행 결과

- 혈전 형성 효과: AV shunt model을 이용하여 SCC, MAL 및 SCC+MAL군에 1일 1회 200 mg/kg 3일간 경구투여를 실시하고, 우레탄으로 마취 시킨 후 경동맥과 우경정맥을 절개로 노출 시켜 양단에 shunt를 삽입하여 형성된 혈전 무게를 측정하였음
- AV shunt model에 대한 SCC, MAL 및 SCC+MAL의 효과는 모든 처리군에서 대조군에 비해 동정맥류 분비 혈전 형성이 현저히 감소되었으며, SCC+MAL($47 \pm 2.3\%$)이 SCC($37 \pm 2.3\%$)나 MAL($32 \pm 0.2\%$) 단독 처리한 군 보다 강력한 혈전 감소 효과를 보였음(결과 1a)
- 또한, κ -carrageenan으로 유도된 thrombosis-length model에서 SSC, MAL, SCC+MAL (200 mg/kg)와 50 mg/kg ASA군을 1일 1회 7일 동안 경구투여 한 후, κ -carrageenan (20 mg/kg)을 복강주사 하여 증상을 모니터링하고 혈전 길이를 측정하였음 → κ -carrageenan을 유도한 thrombosis-length model에서는 대조군에서는 κ -carrageenan 유도 후 4-5시간 이내 꼬리에서 붓기와 홍반이 동반되었지만, 약물 처리군에서는 모두 이러한 증상이 관찰되지 않았음 → κ -carrageenan 유도 하고 72 시간 후에 꼬리 혈전 길이를 측정하여 대조군과 비교하였을 때 SSC+MAL군만 항 혈전 길이가 감소하여 κ -carrageenan 유도한 혈전 형성에 복합제제 시너지 효과가 있었음(결과 1b)
- 이는 SSC+MAL이 혈전 형성과 길이를 감소하는데 효과가 있음을 보여주는 결과임



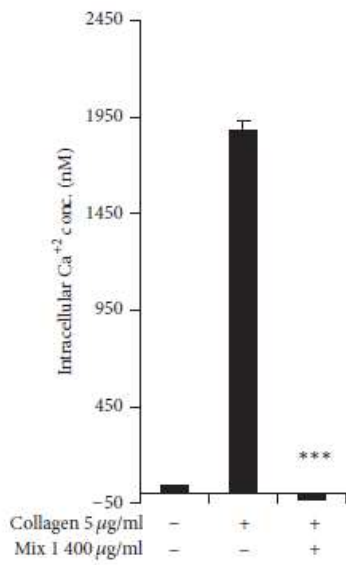
결과 1. 혈전 형성에 미치는 SSC+MAL 복합물의 효과

- 유도된 혈소판 응집에 대한 아고니스트 효과: SSC+MAL의 항 혈소판 활성을 더 확인하기 위해, SD rat에서 전혈에서 혈소판을 분리해서 light transmission aggregometry를 이용하여 혈소판 응집 분석을 진행하였음
- SSC+MAL은 콜라겐 리간드를 사용하여 콜라겐 유도한 혈소판 응집을 억제하는 것을 확인하였음(결과 2)

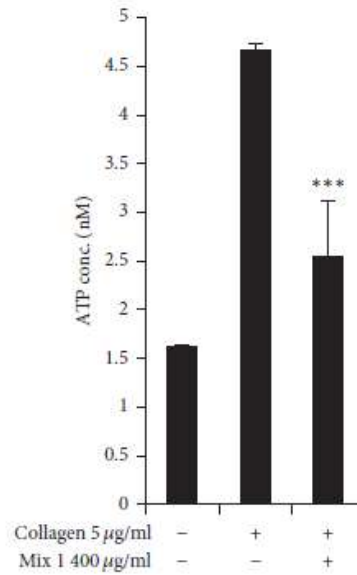


결과 2. Collagen에 의한 혈소판 응집에 미치는 SSC+MAL 복합물의 효과

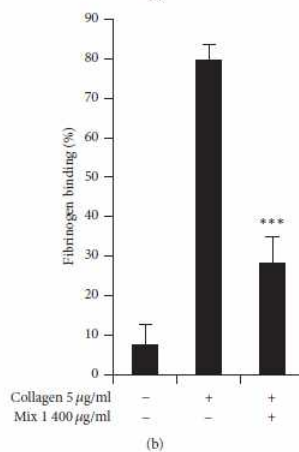
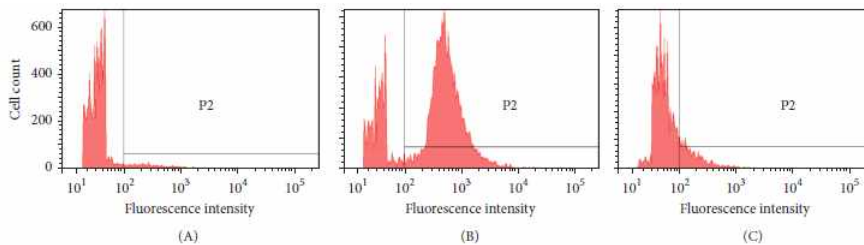
- 칼슘에 대한 영향: 칼슘은 혈소판 응집과 탈 과립에서 혈소판 형성과 기능을 조절하기 때문에 SSC+MAL군이 칼슘을 동원하는지 분광형광측정기를 사용하여 조사한 결과, SSC+MAL군이 완전히 칼슘의 동원(mobilization)을 억제하였음(결과 3)
- 이는 SSC+MAL군이 칼슘의 동원을 억제하여 혈소판 응집을 감소시키고, 혈소판 기능을 조절함을 보여주는 결과임
- ATP 방출에 대한 효과: 응집반응이 완료된 혈소판 혼합액의 상층액을 얻어 ATP Assay Kit로 그 분비를 측정된 결과, α -granules과 같은 과립의 방출은 혈소판 활성화와 세포 내 신호전달을 증가시킴
- SSC+MAL 군이 ATP 방출 또한 유의적으로 억제하였음(결과 4)
- 인테그린 α IIB β 3 매개된 Inside-Out 신호전달 제한: 혈소판은 α 2 β 1 (콜라겐 수용체), α IIB β 3 (피브리노겐 수용체) 및 α V β 1 (피브로넥틴 수용체)과 같은 인테그린을 발현하기 때문에 인테그린 α IIB β 3 에 결합하는 피브리노겐의 양을 유세포 분석을 통해 측정하였음
- SSC+MAL은 인테그린 α IIB β 3에 대한 피브리노겐에 대한 결합을 현저히 감소시켰음(결과 5)



결과 3. Collagen에 의한 칼슘 축적에 미치는 SSC+MAL 복합물의 효과



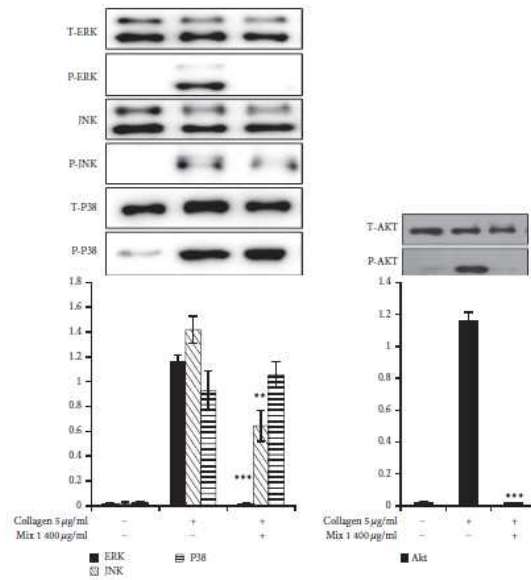
결과 4. Collagen에 의한 ATP 방출에 미치는 SSC+MAL 복합물의 효과



결과 5. 인테그린 αIIbβ3에 피브리노겐의 결합에 미치는 SSC+MAL 복합물의 효과

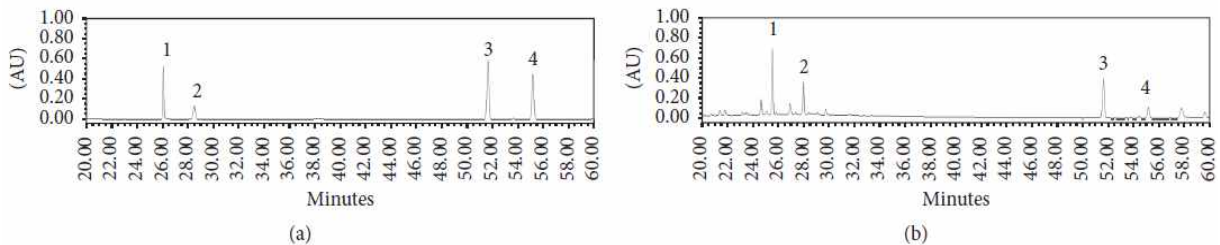
- MAPK 및 PI3K/AKT 인산화에 미치는 영향: PI3K/AKT는 혈소판을 활성화 시키고, MAPK 인산화는 혈소판 활성화 경로를 억제시키기 때문에 SSC+MAL군에 의한 PI3K/AKT 신호전달 경로를 단백질 분석기법을 이용하여 조사하였음
→ SSC+MAL은 이들의 인산화를 완벽히 차단시켜, 혼합물이 MAPK 및 PI3K/Akt 신호 전

달 경로에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었음(결과 6)



결과 6. MAPKs 및 Akt의 활성화에 미치는 SSC+MAL 복합물의 효과

- HPLC 크로마토그래피 분리 : SSC+MAL의 HPLC 분석을 통해 MAL에서 분리된 isoquercitrin, astragalin과 SCC에서 분리된 schizandrol A와 gomisin A를 확인하였음
→ SSC+MAL의 혈소판 응집을 억제하여 나타낸 혈행 개선 효능이 isoquercitrin, astragalin, schizandrol A와 gomisin의 효과 가능성을 보여주는 결과임(결과 7)



결과 7. 본 연구에 사용된 SSC와 MAL 복합물의 HPLC chromatogram 결과

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- SSC+MAL 혼합물은 혈전형성, 아고니스에 의한 응집, 칼슘 이동, 과립 분비 및 MAPK 인산화를 통한 $\alpha IIb\beta 3$ 활성화 및 Akt 인산화 등의 효과를 나타내었음
→ SSC+MAL이 GP VI 하위 신호전달 경로를 억제하여 이 수용체의 길항작용은 항 혈전 제제로 신규 치료요법으로 특성화 할 수 있는 가능성이 높음을 보여주는 결과임
- 따라서 본 연구의 결과는 오미자 추출물의 혈행 개선 효과에 대한 근거 자료와 다양한 천연물의 복합물을 활용한 기능성의 향상 증대 가능성을 보여준 것으로 향후 오미자 복합물을 활용한 혈행 개선제의 개발을 위한 자료로서 활용될 수 있을 것임

(4) 제3협동 과제 연구 결과

(가-1) 오미자 추출물의 추출조건 확립

① 연구수행의 목적

- 본 실험에서는 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려진 오미자를 20% 주정을 사용하여 추출하고 시간에 따른 추출 수율을 확인하여 추출시간에 대한 조건을 확립하고자 함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 표 1 참고

표 1. 실험재료 조성표	
재료	함량 등
오미자	분쇄 건 오미자 7 kg
추출용매 (20% 주정)	프레탄올 A: 14.74 L
	정제수: 55.26 L
여과포	2 ea (3.5 kg × 2 ea = 7 kg)
Silicagel	6 ea
핸들비커	5 L × 2 ea
메스실린더	1 L

- 실험기구: Extraction & Evaporation system (제일기공, Korea), Freeze dryer (PVTFD 30R, 일신랩, Korea), 20 L 회전식감압농축기

• 실험방법

(a) 추출: 분쇄한 건 오미자를 3.5 kg씩 부직포 2개에 정량하여 추출 탱크에 주입 → 프레탄올 A를 희석하여 제조한 20% EtOH 70 L (95% 프레탄올A 14.74 L/정제수 55.26 L)를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 90°C 추출탱크에서 8시간 추출(매 시간마다 추출액을 2 L씩 sampling 함)

(b) 농축: Sampling한 추출액 2 L를 evaporation flask에 담고 농축기에 결합시킴 → Evaporation flask를 water bath에 적절히 하고 60°C로 설정 후 회전속도를 적절히 설정함 → 진공도를 서서히 높여주며 안정화를 시킴 → 1 L까지 농축을 완료하면 압력을 해제하고 농축액을 회수함

(c) 동결건조: 수율 측정용 200 mL와 지표성분 분석용 800 mL의 농축액을 각각 호일 용기와 동결건조용 tray에 부여 deep freezer에서 사전 동결시킴 → 호일용기와 tray에 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구 수행 결과

- 추출수율: 오미자 추출 시간별(1~8hr) 추출액을 2 L 씩 sampling 하고 1 L까지 감압 농축을 수행한 뒤 농축액 200 mL를 동결건조를 통해 건조 후 시료의 무게를 측정하였음 (결과 1) → 건조물의 양(g/200 mL)은 추출액 2 L를 1L 까지 농축하여 그 중 200 ml에 대한 양이므로 5배를 곱해준 뒤 70 L에 대한 양으로 환산하기 위하여 35를 곱해주었음 → 이 양에서 오미자 원물의 양 7000 g으로 나누어 준 뒤 100을 곱하여 추출 수율을 계산하였음 → 추출 시간별 추출 수율을 확인한 결과 4시간동안 추출을 하였을 때 그 수

율이 66.58%로 가장 높은 결과를 나타내었으며, 그 이상의 추출 시간에서는 그 추출 수율이 감소하는 경향을 나타내었음 (결과 2 및 3) → 그러나 실제 오미자 추출물을 생산하기 위한 공정(추출, 농축 및 동결건조) 공정에서 다양한 요인에 의해 손실이 발생하기 때문에 sampling에 의해 측정된 추출 수율을 바탕으로 실제 pilot 단계에서 추출 농축을 수행하고 수율의 확인이 필요할 것으로 판단됨

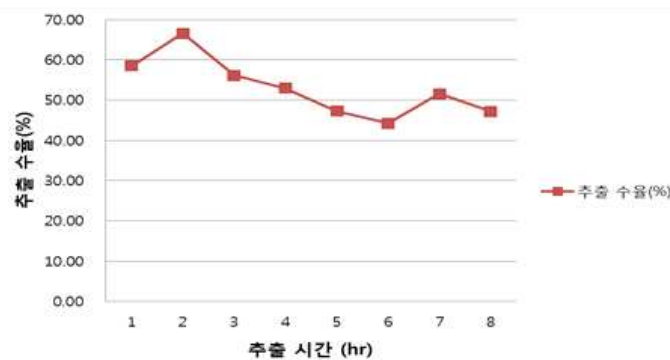
결과 1. 추출 시간별 추출액 및 농축액의 Brix 측정 결과

시간 (hr)	추출액 (2 L)	농축액 (1 L)
1	10.6	10.9
2	10.9	9.6
3	11.1	10.2
4	11.1	13.4
5	10.9	9.8
6	11.0	8.5
7	11.0	9.5
8	11.4	8.9

결과 2. 추출 시간별 건조물 무게 및 추출 수율

시간 (hr)	건조후 총무게 (g)	빈 용기 무게 (g)	건조물 무게 (g/200 mL)	추출 수율 (%)
1	31.96	8.55	23.41	58.53
2	35.20	8.57	26.63	66.58
3	31.04	8.58	22.46	56.15
4	29.75	8.58	21.17	52.93
5	27.46	8.56	18.90	47.25
6	26.26	8.56	17.70	44.25
7	29.24	8.60	20.64	51.60
8	27.46	8.58	18.88	47.20

결과 3. 추출 시간별 오미자 추출 수율



④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 본 연구의 결과는 오미자 추출물의 시간별 추출 수율의 확인으로 최적의 추출조건 설정의 기본 data로 사용됨 → 본 결과를 분석해보았을 때 1~4시간 이내의 추출 수율이 높으며, 이 결과와 지표분석의 결과 및 상품화를 위한 경제성 분석을 통하여 최적 추출조건을 설정할 수 있었음

(가-2) 오미자 추출물의 추출조건 확립

① 연구수행의 목적

- 오미자를 20% 주정을 사용하여 4시간 추출 후 동결건조 방법에 따라 추출물의 분말화를 통해 시간에 따른 추출 수율을 확인하여 추출시간에 대한 조건을 확립하고자 함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 표 1 참고
- 실험기구: Extraction & Evaporation system(제일기공, Korea), Freeze dryer (PVTFD 30R, 일신랩, Korea) 등
- 실험방법

(a) 추출: 분쇄한 건 오미자를 3.5 kg씩 부직포 2개에 정량하여 추출 탱크에 투입 → 프레탄올A를 희석하여 제조한 20% EtOH 70 L (95% 프레탄올A 14.74 L/정제수 55.26 L)를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴

→ 추출탱크 온도를 90°C로 설정, 90°C에 도달하는 시점부터 8시간 추출을 진행 → 추출 후 추출액의 총 무게와 Brix를 측정 및 지표물질(schizandrin)함량 분석용 sample 채취

(b) 농축: 농축탱크 이송 밸브를 개방한 후 추출탱크펌프를 작동하여 추출액을 농축탱크로 이동 → 농축탱크의 온도를 60°C로 설정 농축이 끝나면 농축탱크의 밸브를 개방하고 농축펌프를 작동시켜 농축액을 회수함

→ 농축액의 총 무게와 Brix를 측정하고 지표물질(schizandrin)함량 분석을 위한 sample을 채취함

(c) 동결건조: 오미자 1차, 2차 추출농축액을 10 L씩 동결건조용 tray에 담아 선반에 순서대로 넣어둠 → Sample의 온도가 40°C가 되면 동결건조를 종료하고 자동메뉴와 상단의 진공해제를 클릭하고 진공이 완전히 빠진 후 좌측 중앙의 단힘을 클릭하여 도어를 열어줌 → Tray에 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구수행의 결과

• 추출수율: 분쇄한 건 오미자 7 kg을 20% 주정 70 L로 90°C에서 4시간 동안 1차, 2차 추출을 수행하였음(결과 1) → 추출액의 양은 1차와 2차에서 57.94, 60.24 kg이 확보되어 최초 추출용매 70 L에서 손실이 발생하였음 → 그 이유로는 추출 공정에서 원료 오미자의 부직포에 흡수된 수분으로 인한 것으로 판단되며, 그 양은 1차 추출 및 2차 추출에서 각각 10.66 kg, 10.12 kg인 것으로 확인되었음

→ 추출액의 brix는 1차와 2차에서 각각 10.0, 10.9%로 나타남 → 추출액을 60°C에서 약 3배수로 감압 농축한 결과, 1차 추출액의 농축액량은 19.15 kg, 2차 추출액은 19.90 kg이었으며 brix는 각각 13.3, 12.4로 확인되었음

→ 농축액에 대하여 각각 10 L를 -40~40°C에서 60시간 동안 동결건조를 수행한 결과 건조물의 양은 각각 1.50, 1.48 kg이었으며, 이를 농축액 전체 양에 대한 건조물 무게로 환산 후 사용한 오미자 원료량에 대한 수율을 계산한 결과, 1차와 2차 추출에서 각각 41.11%와 42.13%로 나타났음

→ 따라서 분쇄한 건 오미자를 같은 조건에서 2회 측정된 결과, 수율을 비롯하여 중량, brix 등 측정값들이 비슷한 경향으로 나타나는 것을 확인할 수 있었음

결과 1. 오미자 1차, 2차 추출 조건 및 공정간 중량 및 Brix 측정

	중량 (kg)		Brix (%)		조건
	1차	2차	1차	2차	
분쇄 건 오미자	7	7	-	-	10배수 20% 주정 (70L)
추출	57.94	60.28	10.0	10.9	90℃, 4시간
농축	19.16	19.90	13.3	12.4	60℃, 3배수
동결건조 (10 L)	1.50	1.48	-	-	-40 ~ 40℃, 60시간
추출 수율	41.11%	42.13%	-	-	원료 총 중량 7 kg 기준

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 추출시 추출액과 농축액의 birx 측정을 통하여 농축정도를 확인하고 수율을 확인하였고, 반복 추출 test를 통하여 결과의 재현성을 확인하고 최적 추출조건 설정의 data로 활용이 가능할 것으로 생각됨

(가-3) 오미자 추출물의 추출조건 확립

① 연구수행의 목적

- 오미자를 pilot scale에서 scale up된 plant scale에서 추출을 실시하고 동결건조 방법에 따라 추출물을 건조하여 대량 생산공정에서 추출 수율의 재현성 확인과 시제품 제작 및 항산화 활성, 지표성분 분석을 위한 원료를 확보하고자 함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 표 1 참고

재료	함량 등
오미자	건 오미자 100 kg
추출용매 (20% 주정)	프레탄올 A: 211 L (18 L × 12 ea) 정제수: 789 L
여과포	20 ea (5 kg × 20 ea = 100 kg)
Silicagel	-

- 실험기구(상기와 동일) 및 실험방법

- 추출: 건 오미자 100 kg을 각각 5 kg씩 여과포 20개에 정량 하여 추출 탱크 투입 → 프레탄올A를 희석하여 제조한 20% EtOH 1000 L(95% 프레탄올A 211 L/정제수 289 L)를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 추출탱크 온도를 90℃로 설정하여 8시간 동안 가열 → 추출이 종료 후 농축탱크로 이동시킴
- 농축: 농축탱크의 온도를 60℃로 설정 → 농축탱크로 추출액의 유입이 끝난 후 농축탱크를 완전 밀봉한 후 공진공펌프와 농축탱크가열을 실시 → 농축탱크 내부를 확인하며 유체가 over flow되지 않도록 밸브를 수시로 개방하여 진공을 감소시켜줌 → 농축탱크 내부 유체의 흐름이 안정화에 도달하고 약 3시간 동안 감압농축 → 농축의 끝난 후 농축탱크의 밸브를 개방하고 농축펌프를 작동시켜 농축액을 회수함
- 동결건조: 농축액을 동결건조기(30 kg) Tray에 담고 선반에 순서대로 넣어둠(한 Tray당

최대 2 L의 농축액 건조가능) → Tray의 농축액에 온도 센서를 접촉시킨 후 동결건조 실시 → 동결건조가 끝난 후 Tray에 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

그림 1. 오미자 추출 공정(추출과 동결 건조 과정)



③ 연구수행의 결과

- 추출수율: 분쇄하지 않은 건 오미자 100 kg으로부터 20% 주정 1000 L를 사용하여 90°C에서 8시간 동안 plant scale 추출 후, 60°C에서 약 3시간 동안 감압농축을 수행하였음 → 72시간동안 동결건조를 수행한 결과 최종적으로 23.63 kg의 추출 분말을 회수 하였으며 사용한 원료량(100 kg)을 기준으로 추출 수율은 23.71%였음 → 추출 수율은 pilot scale에서 오미자 평균 추출수율인 20.66%에 비해 약 3%가 증가한 결과였음 → 그러나 높은 brix를 가지는 고 농축액이 동결건조 중 부풀어 오르고 그에 따라 균일한 건조가 이루어지지 않아 많은 건조물 회수에 손실이 발생하였으며, 오미자 건조물의 회수공정에 오랜 작업시간으로 인해 건조되었던 추출물이 수분을 상당히 흡습하여 최종건조물의 무게가 증가한 것으로 판단됨 → 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 추출액의 brix 측정을 통해 농축양을 결정하고 그에 따라 농축을 실시하고 적절한 brix를 가지는 농축액의 동결건조가 이루어져야 할 것임 → 따라서 이러한 문제점들을 보완하여 오미자 추출 및 농축 공정의 확립이 이루어 질수 있을 것으로 판단됨

결과 1. 오미자 추출 수율

원료	원료량 (kg)	회수량 (kg)	추출수율 (%)
건 오미자	100	23.63	23.63

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 추출조건을 7 kg에서 100 kg으로 scale up하여 진행한 결과 추출수율의 20~25%로 동일한 수율이 나왔음 → 이는 scale up에서도 수율이 일정함을 의미하며, 대량 생산 조건의 data 로 활용할 수 있음 → 그러나 scale up시 발생하는 문제도 있었으며, 향후 대량생산을 위해서는 여러 조건을 확인을 해볼 필요가 있을 것으로 생각됨

(나) 오미자 20% 주정 추출을 통한 추출 수율의 확인

① 연구수행의 목적

- 오미자를 20% 주정으로 추출하고 그 추출물의 동결건조를 통하여 추출 수율을 확인하고 지표물질(schizandrin) 분석과 항산화 활성 분석을 위한 원료를 확보하고자 함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 건 오미자 7 kg, 여과포, 프레탄올 A, 지퍼백, silicagel 등
- 실험기구(상기와 동일) 및 실험방법
- (a) 추출: 건 오미자 7 kg을 여과포에 정량 하여 추출 탱크에 투입 → 프레탄올A를 희석하여 제조한 20% EtOH 70 L (10배수 추출)를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 90°C 조건에서 8시간 동안 추출 후 추출액을 농축탱크로 이동시킴
- (b) 농축: 농축탱크의 온도를 60°C로 설정하고 약 3시간동안 감압농축 후 농축탱크의 밸브를 개방하고 농축펌프를 작동시켜 농축액을 회수함
- (c) 동결건조: 농축액을 동결건조 후 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

그림 1. 추출 및 건조 공정 과정



그림 2. 오미자 동결 건조 및 건조물



③ 연구수행의 결과

- 추출수율: 건 오미자 7 kg으로부터 20% 주정 70 L를 사용하여 90°C에서 8시간 동안 추출 후, 60°C에서 약 3시간 동안 감압농축을 수행하였음 → 농축액에 대하여 -40°C에서 70 시간동안 동결건조를 수행한 결과 최종적으로 1.66 kg의 추출 분말을 회수 하였으며 사용한 원료량(7 kg) 기준 추출 수율은 23.71%였음 → 추출 수율은 이전 추출 결과인 17.14%, 21.13%에 비하여 상대적으로 증가하였음 → 3번의 추출실험 결과 평균 추출 수율은 20.66%, 표준편차는 3.31로 나타났음 → 표준편차를 줄이고 추출공정간 일정한 수율을 확보하기 위하여 추가 실험이 요구되는 것으로 판단됨

결과 1. 오미자 추출 수율

원료	원료량 (kg)	회수량 (kg)	추출수율 (%)
오미자	7	1.66	23.71

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 최적의 추출조건을 설정하기 위해서는 일정한 수율이 확보가 되어야 하며, 이를 위해서는 반복시험을 통해서 편차를 줄여야 할 것임 → 건조물의 경우 흡습하는 경우가 많이 때문에 흡습의 문제를 해결하기 위해 실리카겔을 이용하는 등의 방법이 요구됨

(다) 상엽의 추출조건 확립

① 연구수행의 목적

- 오미자 복합물 기능성 후보 소재인 상엽을 대상으로 추출 조건을 확립하고 그 추출물의 동결건조를 통하여 추출 수율의 확인과 후보 지표물질인 카테킨 분석을 위한 원료를 확보하고자 함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 건조된 상엽 7kg, 여과포, 정제수, 지퍼백, silicagel 등
- 실험기구(상기와 동일) 및 실험방법

(a) 추출: 건조된 상엽 7 kg을 여과포에 정량 하여 추출 탱크에 투입 → 정제수 90 L를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 95°C에서 2시간 추출 농축탱크로 이동

(b) 농축: 60°C 농축 탱크기에서 3시간동안 감압농축

(c) 동결건조: 농축액을 동결건조 후 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구수행의 결과

- 추출수율: 건조된 7 kg으로부터 정제수 90 L를 사용하여 95°C에서 2시간 동안 열수 추출 후, 60°C에서 약 3시간 동안 감압농축을 수행하였음 → 농축액에 대하여 -40°C에서 45°C까지 약 72시간동안 동결건조를 수행한 결과 최종적으로 0.73 kg의 추출 분말을 회수하였으며, 상엽 7 kg을 기준으로 그 추출 수율은 10.43 %로 나타났음 → 추출수율의 재현성을 확보를 위한 추가 실험이 요구됨

결과 1. 상엽의 추출 수율

원료	원료량 (kg)	회수량 (kg)	회수율 (%)
상엽	7	0.73	10.43

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 상엽의 최적 추출조건 설정을 위해서 수율을 확인하였고, scale up test 등을 통하여 일정한 수율의 확인이 필요하며, 이는 대량생산으로의 활용이 가능할 것임

(라-1) 오미자 추출물의 지표 성분 분석

① 연구수행의 목적

- 오미자 추출물의 지표성분인 schizandrin 분석을 통해 각 공정별로 그 함량을 알아보기 위함

② 연구수행의 방법

- 분석시료; 오미자 FD 추출물(1), (2), 오미자농축액 (1), schizandrin 표준품(Maker; ; Sigma-Aldrich Chemical Co., 순도 ; 98%) 등
- 표준액 제조: Schizandrin 표준품 10 mg을 준비하여 메탄올로 25 mL 표선 맞춤 → 2 mL를 취한 뒤, 메탄올로 20 mL 표선 맞추고 0.45 μm 필터로 여과함
- 검액 제조: 가루 약 0.5 g을 준비하여 메탄올로 20 mL 표선 한 후, 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여과하고 남은 잔류물에 메탄올 20 mL 표선 한 후, 위와 동일한 방법으로 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여액을 합한 후, 메탄올로 50 mL 표선하고 0.45 μm

필터로 여과함

- 분석 조건: ① 검출기: UV (254 nm), ② Column: C18 4.6 mm X 150mm, 5 μm, ③ 이동상: ACN · 물 · Formic acid (70:30:0.1), ④ 유속: 0.6 mL/분, ⑤ 주입량: 10 μl, ⑥ 온도: 40°C (대한민국약전에는 온도에 대한 조건이 없어 이 온도조건에서 실험)

$$* \text{ 계산식: Schizandrin의 양(mg/g)} = \text{Schizandrin 표준품의 양(mg)} \times \frac{\text{검액피크면적}}{\text{표준액피크면적}} \times \frac{1}{5}$$

③ 연구수행의 결과

- 오미자의 schizandrin 분석의 결과 오미자에는 4.5 ~ 5 mg/g의 schizandrin이 함유되어 있는 것을 확인하였고, 이는 schizandrin이 지표성분으로 활용이 가능하다는 것을 의미함

Schizandrin 함량 (mg/g)		
오미자 FD 추출물(1)	오미자 FD 추출물(2)	오미자 농축액(1)
4.519	5.176	0.402

- 반복 STD, test 및 schizandrin 분석결과 자료: 제3협동 기관에 비치

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 추출물의 건강기능식품 인정을 위한 지표성분으로 설정된 schizandrin에 대한 분석을 실시 → Schizandrin으로 오미자의 지표성분을 선정하게 되면 식품의약품안전처의 이는 이미 공인분석시험법이 존재하기 때문에 지표성분 분석 validation을 생략할 수가 있음
- Schizandrin을 분석하였을 때 standard 분석을 통해 표준품의 RT와 피크의 면적을 통해 함량을 확인하였고, 오미자 추출물의 지표성분의 함량을 확인 할 수 있었으며, 이 결과는 앞으로 건강기능식품 개발을 위하여 제품의 기준규격을 잡는 자료로 활용이 가능할 것임

(라-2) 오미자 추출물의 지표 성분 분석

① 연구수행의 목적

- 오미자 추출물에 함유된 지표성분인 schizandrin 분석을 통해 각 공정별로 그 함량을 알기 위함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: ① 분석시료 ; 오미자 SD 추출물 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, ② Schizandrin 표준품 (Maker, Sigma-Aldrich Chemical Co., 순도 ; 98%)
- 표준액 제조, 검액 제조, 분석 조건 및 계산식: 상기와 동일

Schizandrin 함량 (mg/g)					
SD10 %	SD20 %	SD30 %	SD40 %	SD50 %	SD60 %
0.426	0.788	1.211	1.605	2.204	2.588

③ 연구수행의 결과

- 분석결과를 통해서 오미자 SD 추출물의 schizandrin 함량이 오미자 농축액의 함량 변화에 따라 유의적으로 증가함을 확인함

- 반복 SD, test 및 schizandrin 분석결과 자료: 제3협동 기관에 비치

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 SD 분말의 schizandrin 함량 분석 결과 용량 의존적으로 schizandrin의 함량도 증가하는 것을 확인 하였으며, 이는 오미자의 schizandrin이 일정하게 함유 되어 있으며, 이를 지표성분으로 활용 할 수 있음을 의미함 → 공인분석법이 설정이 되어 있기 때문에 지표성분 분석법으로 향 후 건강기능식품 개발에 기준규격 설정 data로 활용이 가능할 것으로 판단됨

(라-3) 오미자 추출물의 지표 성분 분석

① 연구수행의 목적

- 오미자 추출물에 함유된 지표성분인 schizandrin 분석을 통해 각 공정별로 그 함량을 알기 위함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: ① 분석시료 ; 오미자 원물, 오미자 농축액, ② Schizandrin 표준품 (Maker; Sigma-Aldrich Chemical Co., 순도 ; 98%)
- 표준액 제조, 검액 제조, 분석 조건 및 계산식: 상기와 동일

③ 연구수행의 결과

- 본 시험 분석 결과, 이전에 분석한 오미자 원료의 함량 4.520 mg/g의 80% ~ 120% 사이에 3번 분석결과가 적합이었으며, 오미자 농축액(1) 분석결과 또한, 이전 분석한 0.402 mg/g의 80%~120% 사이에 3번의 분석결과가 모두 적합이었음
- 오미자 원물 및 농축액 분석 자료: 제3협동 기관에 비치

	Schizandrin 함량 (mg/g)	
	오미자 원물	150409 오미자 농축액
1	5.240	0.401
2	4.485	0.419
3	4.541	0.417

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 schizandrin의 함량이 일정함을 확인하기 위하여 재분석을 하였으며, 그 결과로 건강기능식품의 기준규격에서 설정하고 있는 지표성분의 함량 범위 80~120% 범위 내에 적합하였음 → 이는 오미 추출이 일정하고 신뢰성 있게 추출되고 있음을 증명하는 것이며, 건강기능식품 기준규격 설정에 data로 활용할 수 있을 것으로 판단됨

(라-4) 오미자 추출물의 지표 성분 분석

① 연구수행의 목적

- 오미자 추출물에 함유된 지표성분인 schizandrin 분석을 통해 각 공정별로 그 함량을 알기 위함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: ① 분석시료 ; 오미자 추출물, 농축액, 오미자 원물 002, 오미자 FD 추출물, ② Schizandrin 표준품 (Maker; Sigma-Aldrich Chemical Co., 순도 ; 98%)
- 표준액 제조, 검액 제조, 분석 조건 및 계산식: 상기와 동일
- ③ 연구수행의 결과
- 분석 결과, 이전에 분석한 오미자 원료의 함량 4.520 mg/g의 80% ~ 120% 사이에 3번 분석결과가 적합이었음
- E15003(오미자 15003 추출액 시료)의 schizandrin 함량은 평균적으로 0.260 mg/g 인 것으로 확인되었고, 3번의 분석 결과, 표준편차는 0.007, 상대표준편차는 2.706%이므로 오차가 적고 재현성이 있는 결과라고 볼 수 있음

	Schizandrin 함량 (mg/g)			
	E15003	C15003	SC002	FD002
1	0.268	0.611	5.390	4.626
2	0.256	0.624	3.978	4.548
3	0.256	0.629	5.084	3.492
평균	0.260	0.621	4.817	4.222

- ④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도
- C15003 (오미자 15003 농축액 시료)의 schizandrin 함량은 평균적으로 0.621mg/g 있는 것으로 확인되었고, 3번의 분석 결과, 표준편차는 0.009, 상대 표준편차는 1.495%로 오차가 적고 재현성이 있는 결과라고 할 수 있음 → FD002 (오미자 15002 FD 추출물 시료)의 schizandrin 함량은 평균적으로 4.222 mg/g 있는 것으로 확인되었음
- 하지만 3번의 분석결과에의 표준편차가 0.633, 상대 표준편차가 15.002%로 결과의 재현성이 낮음 → 또한 이전의 FD추출물의 함량은 5.877 mg/g, 오미자 15001 FD 추출물의 함량은 6.377 mg/g으로 FD002 함량보다 대체적으로 높았음 → 그러므로 FD002 시료에 대해서도 재분석이 필요하다고 생각함
- 분석결과 자료: 제3협동 기관에 비치

(라-5) 오미자 추출물의 지표 성분 분석

- ① 연구수행의 목적
- Plant scale 1 Lot에 대해 원물에서부터 농축액, FD 추출물의 schizandrin 함량을 파악하기 위함
- ② 연구수행의 방법
- 실험재료: ① 분석시료 ; Lot SD010203FD004의 원물, 농축액, FD 추출물, ② Schizandrin 표준품 (Maker; Sigma-Aldrich Chemical Co., 순도 ; 98%)
- 표준액 제조, 검액 제조, 분석 조건 및 계산식: 상기와 동일
- ③ 연구수행의 결과
- 분석 결과, 이전에 분석한 오미자 원료의 함량 4.52 0mg/g의 80% ~ 120% 사이에 3번 분석결과가 적합이었음

Schizandrin 함량 (mg/g)			
	SC010203	SC010203C004	SC010203FD004
1	4.755	2.000	5.371
2	4.779	1.962	5.593
3	4.541	1.965	5.733
평균	4.691	1.975	1.975

• 분석결과 자료: 제3협동 기관에 비치

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 지표성분의 일정함을 확인하기 위하여, 추출과 분석 작업을 반복 진행해 본 결과, schizandrin 함량은 건강기능식품 기준규격의 80~120% 범위를 만족하였으며, 이 자료를 바탕으로 오미자의 기준규격 설정에 활용 할 수 있을 것으로 판단됨

(마) 지표 물질의 안정성 시험

① 연구수행의 목적

- 오미자 소재의 지표물질의 안정성 시험을 통한 지표물질 함량의 균일성 확인과 품질지표 설정을 위한 실험

② 연구수행의 방법

- 오미자 추출물의 지표물질 지표성분으로 설정된 schizandrin의 1 lot 지표성분 함량 분석 (공인시험기관 성적서)
- 오미자 추출물의 품질지표 설정을 위한 영양성분검사, 미생물 검사 (공인시험기관 성적서)

③ 연구수행의 결과

- 오미자 추출물의 지표성분 함량 stability 확인: 오미자 추출물의 지표성분 함량의 균일성을 확인한 결과 지표성분의 평균함량은 4.92 mg/g이었음 → 건강기능식품 공전의 지표성분 함량범위 80%~120%의 범위는 3.94~5.90 mg/g으로 각 분석의 결과는 함량범위 안에 들어 적합하였음(공인시험 성적서 확보, 첨부 자료 참고)

Schizandrin 함량 (mg/g)	
1 lot	
1	4.85
2	4.97
3	4.94
평균(범위)	4.92 (3.94 ~ 5.90)

- 오미자 추출물의 품질지표 설정 시험: 영양성분, 미생물 검사(대장균, 대장균 군)를 통하여 추출물의 건강기능식품 개별인정 시 필요한 자료를 확보하였음(공인시험 성적서 확보, 첨부 자료 참고)

- 3회 반복 분석결과 시험성적서 자료: 제3협동 기관에 비치

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 추출물의 지표성분이 설정된 추출조건에서 안정성이 있음을 확인하였고, 이 결과는 건강기능식품 개별인정 시 지표성분의 기준규격 설정에 활용될 수 있으며, 영양성분, 미생물검사 자료는 건강기능식품 개별인정 시 유해물질 설정 자료로 활용이 될 수 있으며, 품질관리 지표 설정에 활용 될 수 있을 것임

(바-1) 오미자의 pilot scale 추출 조건 확립

① 연구수행의 목적

- 본 실험에서는 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려진 오미자를 20% 주정을 사용하여 pilot scale 추출 조건을 확립하고자 함 (추출 2회 진행)

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 오미자, 주정, 정제수, 여과포 등
- 실험기구: Extraction & Evaporation system, Freeze dryer, 20 L 회전식감압농축기
- 실험방법

(a) 추출: 분쇄한 건 오미자를 3.5 kg씩 부직포 2개에 정량하여 추출 탱크에 투입 → 주정을 희석하여 제조한 20% 주정 70 L를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 추출탱크 온도를 90°C로 설정, 90°C에 도달하는 시점부터 8시간 추출을 진행 → 추출 후 추출액의 총 무게와 Brix를 측정 및 지표물질(schizandrin)함량 분석용 sample 채취

(b) 농축: 농축탱크 이송 밸브를 개방한 후 추출탱크펌프를 작동하여 추출액을 농축탱크로 이동 → 농축탱크의 온도를 60°C, 압력 62 cm/Hg로 설정 농축이 끝나면 농축탱크의 밸브를 개방하고 농축펌프를 작동시켜 농축액을 회수함 → 농축액의 총 무게와 Brix를 측정하고 유용성분 분석을 위한 sample을 채취함

(c) 동결건조: 오미자 1차, 2차 추출농축액을 10 L씩 동결건조용 tray에 담아 선반에 순서대로 넣어둠 → Sample의 온도가 40°C가 되면 동결건조를 종료하고 자동메뉴와 상단의 진공해제를 클릭하고 진공이 완전히 빠진 후 좌측 중앙의 닫힘을 클릭하여 도어를 열어줌 → Tray에 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구 수행 결과

- 추출수율: 분쇄한 건 오미자 7 kg을 20% 주정 70 L으로 90°C에서 4시간 동안 1차, 2차 추출을 수행하였음(결과 1) → 추출액의 양은 1차와 2차에서 61.25, 60.14 kg이 확보 → 추출액의 brix는 1차와 2차에서 각각 1.1, 0.9 birx로 나타남 → 추출액을 60°C에서 약 3배수로 감압 농축한 결과, 1차 추출액의 농축액량은 19.54 kg, 2차 추출액은 19.11 kg이었으며 brix는 각각 13.3, 12.4로 확인되었음 → 농축액에 대하여 각각 10 L를 -40 ~ 40°C에서 60시간 동안 동결건조를 수행한 결과 건조물의 양은 각각 1.50, 1.48 kg이었으며, 이를 농축액 전체 양에 대한 건조물 무게로 환산 후 사용한 오미자 원료량에 대한 수율을 계산한 결과, 1차와 2차 추출에서 각각 21.11%와 22.13%로 나타났음 → 따라서 분쇄한 건 오미자를 같은 조건에서 2회 측정된 결과, 수율을 비롯하여 중량, brix등 측정값들이 비슷한 경향으로 나타나는 것을 확인할 수 있었음

결과 1. Pilot scale 추출 조건에 따른 추출 수율

원료	원료량(kg)	회수량(kg)	추출수율(%)
오미자 1	7	1.479	21.13
오미자 2	7	1.510	21.53

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 추출시 추출액과 농축액의 birx 측정을 통하여 농축정도를 확인하고 수율을 확인하였고, 반복 추출 test를 통하여 결과의 재현성을 확인하고 최적 추출조건 설정의 data로 활용이 가능할 것으로 생각됨

(바-2) 오미자의 pilot scale 추출조건 확립(농축 brix별 동결건조)

① 연구수행의 목적

- 오미자를 20% 주정을 사용하여 8시간 추출 후 농축정도에 따라 동결건조 추출물의 건조정도를 확인하고 최적 농축 brix를 확립하고자 함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 오미자, 주정, 정제수, 여과포 등
- 실험기구: Extraction & Evaporation system, Freeze dryer 등
- 실험방법

(a) 추출: 분쇄한 건 오미자를 3.5 kg씩 부직포 2개에 정량하여 추출 탱크에 투입 → 주정을 희석하여 제조한 20% 주정 70 L를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 추출탱크 온도를 90°C로 설정, 90°C에 도달하는 시점부터 8시간 추출을 진행 → 추출 후 추출액의 총 무게와 Brix를 측정

(b) 농축: 농축탱크 이송 밸브를 개방한 후 추출탱크펌프를 작동하여 추출액을 농축탱크로 이동 → 농축탱크의 온도를 60°C, 압력 62 cm/Hg로 설정 → 농축액 brix 10, 20, 25, 30, 40 단계별로 샘플 채취 → 농축이 끝나면 농축탱크의 밸브를 개방하고 농축펌프를 작동시켜 최종 농축액을 회수함

(c) 동결건조: 오미자 1차, 2차 추출농축액을 10 L씩 동결건조용 tray에 담아 선반에 순서대로 넣어둠 → Sample의 온도가 40°C가 되면 동결건조를 종료하고 자동메뉴와 상단의 진공해제를 클릭하고 진공이 완전히 빠진 후 좌측 중앙의 단힘을 클릭하여 도어를 열어줌 → Tray에 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구수행의 결과

- 추출수율: 농축 정도에 따라 추출 수율을 확인하였음(결과 1)

결과 1. 농축 정도에 따라 추출 수율

농축액	용량(L)	접시무게	건조후 무게	추출물 무게	환산(kg)	수율
10 brix	100	8.549	18.293	9.744	3.248	23.2
20 brix	30	8.537	42.597	34.06	3.406	24.3
25 brix	13	8.574	85.96	77.386	3.353	24.0
30 brix	11	8.581	99.08	90.499	3.318	23.7
40 brix	10.1		0.46		3.097	22.1

- 추출수율은 농축정도에 따라 차이가 없었으며, 이는 추출수율이 확립이 되었음을 의미함. 농축정도에 따라 동결건조물의 상태를 확인(결과 2)
농축액 10 ~ 25 brix 까지는 동결건조물이 제대로 건조되어 상태가 완만하여 원료로 사용할 수 있었지만, 30 ~ 40 brix 동결건조물은 당류가 많아서 부풀어 올라 동결건조기에 달라 붙어 loss가 많고, 건조가 더 오래 걸리는 것을 확인
- 따라서, 오미자 농축액은 최대 25 brix 정도까지 농축하여 동결건조 하는 것이 가장 좋은 방법으로 판단됨



④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 추출시 농축액의 brix 정도에 따른 수율과 동결건조 상태를 확인 한 결과, 수율은 약 23%로 차이가 없었으며, 25 brix 이하로 동결건조하는 것이 시간, 경제적으로 유리함을 확인(차후 건강기능식품 원료 생산을 위한 data로 활용이 가능 할 것으로 판단)

(바-3) Plant scale에 따른 오미자 추출조건의 확립

① 연구수행의 목적

- 오미자를 pilot scale에서 scale up된 plant scale에서 추출을 실시하고 동결건조 방법에 따라 추출물을 건조하여 대량 생산공정에서 추출 수율의 재현성 확인과 시제품 제작 및 항산화 활성, 지표성분 분석을 위한 원료를 확보하고자 함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 오미자, 주정, 정제수, 여과포 등
- 실험기구(상기와 동일) 및 실험방법

(a) 추출: 건 오미자 100 kg을 각각 5 kg씩 여과포 20개에 정량 하여 추출 탱크 투입 → 주정을 희석하여 제조한 20% 주정 1000 L (95% 주정 211 L/정제수 289 L)를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 추출탱크 온도를 90°C로 설정하여 8시간 동안 가열 → 추출이 종료 후 농축탱크로 이동시킴

(b) 농축: 농축탱크의 온도를 60°C, 압력 62 cm/Hg로 설정 → 농축탱크로 추출액의 유입이 끝난 후 농축탱크를 완전 밀봉한 후 공진공펌프와 농축탱크가열을 실시 → 농축탱크 내부를 확인하며 유체가 over flow되지 않도록 밸브를 수시로 개방하여 진공을 감소시켜줌

→ 농축탱크 내부 유체의 흐름이 안정화에 도달하고 약 3시간 동안 감압농축 → 농축의 끝난 후 농축탱크의 밸브를 개방하고 농축펌프를 작동시켜 농축액을 회수함

(c) 동결건조: 농축액을 동결건조기(30 kg) Tray에 담고 선반에 순서대로 넣어둠(한 Tray당 최대 2 L의 농축액 건조가능) → Tray의 농축액에 온도 센서를 접촉시킨 후 동결건조 실시 → 동결건조가 끝난 후 Tray에 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구수행의 결과

• 추출수율: 분쇄하지 않은 건 오미자 100 kg으로부터 20% 주정 1000 L를 사용하여 90°C에서 8시간 동안 plant scale 추출 후, 60°C에서 약 3시간 동안 감압농축을 수행하였음 → 72시간동안 동결건조를 수행한 결과 최종적으로 22.13 kg의 추출 분말을 회수 하였으며 사용한 원료량(100 kg)을 기준으로 추출 수율은 22.13%였음

원료	원료량(kg)	회수량(kg)	추출수율(%)
오미자	100	22.13	22.13

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

• 오미자 추출조건을 7 kg에서 100 kg으로 scale up하여 진행한 결과 추출수율의 20 ~ 25%로 동일한 수율이 나왔음 → 이는 scale up에서도 수율이 일정함을 의미하며, 대량 생산조건에 data 로 활용할 수 있음

(바-4) Plant scale에 따른 오미자 추출조건에 대한 확립

① 연구수행의 목적

• 오미자를 20% 주정으로 추출하고 그 추출물의 동결건조를 통하여 추출 수율을 확인하고 지표물질(schizandrin) 분석과 항산화 활성 분석을 위한 원료를 확보하고자 함

② 연구수행의 방법

• 실험재료: 오미자, 주정, 정제수, 여과포 등
 • 실험기구(상기와 동일) 및 실험방법

(a) 추출: 건 오미자 100 kg을 각각 5 kg씩 여과포 20개에 정량 하여 추출 탱크 투입 → 주정을 희석하여 제조한 20% 주정 1000 L(95% 주정 211 L/정제수 289 L)를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 추출탱크 온도를 90°C로 설정하여 8시간 동안 가열 → 추출이 종료 후 농축탱크로 이동시킴

(b) 농축: 농축탱크의 온도를 60°C, 압력 62 cm/Hg로 설정 → 농축탱크로 추출액의 유입이 끝난 후 농축탱크를 완전 밀봉한 후 공진공펌프와 농축탱크가열을 실시 → 농축탱크 내부를 확인하며 유체가 over flow되지 않도록 밸브를 수시로 개방하여 진공을 감소시켜줌 → 농축탱크 내부 유체의 흐름이 안정화에 도달하고 약 3시간 동안 감압농축 → 농축의 끝난 후 농축탱크의 밸브를 개방하고 농축펌프를 작동시켜 농축액을 회수함

(c) 동결건조: 농축액을 동결건조기(30 kg) Tray에 담고 선반에 순서대로 넣어둠(한 Tray당 최대 2 L의 농축액 건조가능) → Tray의 농축액에 온도 센서를 접촉시킨 후 동결건조 실시 → 동결건조가 끝난 후 Tray에 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구수행의 결과

- 추출수율: 분쇄하지 않은 건 오미자 100 kg으로부터 20% 주정 1000 L를 사용하여 90°C에서 8시간 동안 plant scale 추출 후, 60°C에서 약 3시간 동안 감압농축을 수행하였음 → 72시간동안 동결건조를 수행한 결과 최종적으로 23.54 kg의 추출 분말을 회수 하였으며 사용한 원료량(100 kg)을 기준으로 추출 수율은 23.54%였음

원료	원료량(kg)	회수량(kg)	추출수율(%)
오미자	100	23.54	23.54

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 추출조건을 7 kg에서 100 kg으로 scale up하여 진행한 결과 추출수율의 20 ~ 25%로 동일한 수율이 나왔음 → 이는 scale up에서도 수율이 일정함을 의미하며, 대량 생산조건에 data 로 활용할 수 있음

(사) 오미자의 기준규격 확립: 추출시간대별 지표성분 함량 확인

① 연구수행의 목적

- 오미자 추출물의 지표성분인 schizandrin 의 시간대별 함량을 확인하여 최적의 시간조건을 확립하기 위함

② 연구수행의 방법

- 분석시료; 오미자 FD 추출물(2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간), schizandrin 표준품 등
- 표준액 제조: Schizandrin 표준품 10 mg을 준비하여 메탄올로 25 mL 표선 맞춤 → 2 mL를 취한 뒤, 메탄올로 20 ml 표선 맞추고 0.45 μm 필터로 여과함
- 검액 제조: 가루 약 0.5 g을 준비하여 메탄올로 20 ml 표선 한 후, 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여과하고 남은 잔류물에 메탄올 20 ml 표선 한 후, 위와 동일한 방법으로 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여액을 합한 후, 메탄올로 50 ml 표선하고 0.45 μm 필터로 여과함
- 분석 조건: ① 검출기: UV (254 nm), ② Column: C18 4.6 mm X 150mm, 5 μm, ③ 이동상: ACN · 물 · Formic acid (70:30:0.1), ④ 유속: 0.6 ml/min, ⑤ 주입량: 10 μl, ⑥ 온도: 40°C (대한민국약전에는 온도에 대한 조건이 없어 이 온도조건에서 실험)

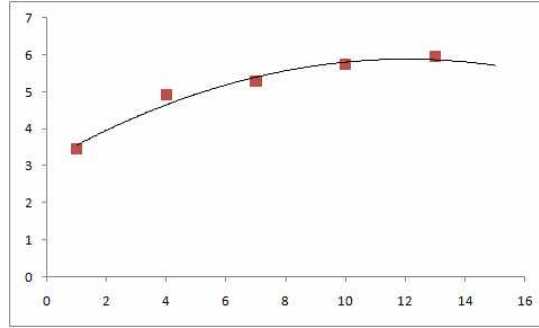
$$* \text{계산식: Schizandrin의 양(mg/g)} \quad \times \frac{\text{검액피크면적}}{\text{표준액피크면적}} \quad \times \frac{1}{5}$$

$$= \text{Schizandrin 표준품의 양(mg)}$$

③ 연구수행의 결과

- 오미자 시간대별 추출물의 schizandrin 분석의 결과 조금씩 증가 하지만 8시간 이후에는 증가폭이 적어져 일정해지는 것으로 판단되어 8시간을 가장 적절한 추출시간으로 설정

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도



[시간대별 쉬잔드린 함량]

- 오미자 추출물의 건강기능식품 인정을 위한 지표성분으로 설정된 schizandrin에 대한 시간대별 함량 분석을 실시 → 시간대별 함량은 증가 추세를 보이나 건강기능식품 기준규격의 80 ~ 120% 범위 내에 들어가므로 기준규격에 지표로 사용가능
- Schizandrin을 분석하였을 때 standard 분석을 통해 표준품의 RT와 피크의 면적을 통해 함량을 확인하였고, 오미자 추출물의 지표성분의 함량을 확인 할 수 있었으며, 이 결과는 앞으로 건강기능식품 개발을 위하여 제품의 기준규격을 잡는 자료로 활용이 가능할 것임
- 분석결과 자료(STDs 및 시간대별 분석 반복 결과): 제3협동 기관에 비치

분석시료	쉬잔드린 함량 (mg/g)			평균	STDEV	%RSD
	1회	2회	3회			
BPK-SC-2h-LOT1	3.438	3.412	3.490	3.447	0.04	1.15
BPK-SC-2h-LOT2	3.430	3.407	3.551	3.463	0.08	2.23
BPK-SC-2h-LOT3	3.411	3.491	3.473	3.458	0.04	1.21

분석시료	쉬잔드린 함량 (mg/g)			평균	STDEV	%RSD
	1회	2회	3회			
BPK-SC-4h-LOT1	5.072	5.069	4.955	5.032	0.07	1.33
BPK-SC-4h-LOT2	5.045	4.038	4.849	4.644	0.53	11.50
BPK-SC-4h-LOT3	5.002	5.090	5.095	5.062	0.05	1.03

분석시료	쉬잔드린 함량 (mg/g)			평균	STDEV	%RSD
	1회	2회	3회			
BPK-SC-8h-LOT1	5.286	5.281	5.285	5.284	0.00	0.05
BPK-SC-8h-LOT2	5.342	5.273	5.333	5.316	0.04	0.71
BPK-SC-8h-LOT3	5.275	5.301	5.176	5.251	0.07	1.26

분석시료	쉬잔드린 함량 (mg/g)			평균	STDEV	%RSD
	1회	2회	3회			
BPK-SC-12h-LOT1	5.643	5.635	5.688	5.655	0.03	0.51
BPK-SC-12h-LOT2	5.450	5.791	5.639	5.627	0.17	3.04
BPK-SC-12h-LOT3	5.747	5.920	6.001	5.889	0.13	2.20

분석시료	쉬잔드린 함량 (mg/g)			평균	STDEV	%RSD
	1회	2회	3회			
BPK-SC-24h-LOT1	5.931	5.974	5.959	5.955	0.02	0.37
BPK-SC-24h-LOT2	6.118	6.198	6.141	6.152	0.04	0.67
BPK-SC-24h-LOT3	4.966	6.038	6.134	5.713	0.65	11.35

(아-1) 상업의 pilot scale 추출 조건 확립

① 연구수행의 목적

- 오미자 복합물 기능성 후보 소재인 상업을 대상으로 대량 추출 조건을 확립하고 그 추출물의 동결건조를 통하여 추출 공정을 확립하고자 함(추출 2회 진행)

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 건조된 상엽 7 kg, 여과포, 정제수, 지퍼백, silicagel 등
- 실험기구(상기와 동일) 및 실험방법
- (a) 추출: 건조된 상엽 7 kg을 여과포에 정량 하여 추출 탱크에 투입 → 정제수 90 L를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 95°C에서 2시간 추출 농축탱크로 이동
- (b) 농축: 60°C, 압력 62 cm/Hg로 농축 탱크기에서 3시간동안 감압농축
- (c) 동결건조: 농축액을 동결건조 후 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구수행의 결과

- 추출수율: 건조된 7 kg으로부터 정제수 90 L를 사용하여 95°C에서 2시간 동안 열수 추출 후, 60°C에서 약 3시간 동안 감압농축을 수행하였음 → 농축액에 대하여 -40°C에서 45°C까지 약 72시간동안 동결건조를 수행한 결과 최종적으로 각각 0.76, 0.71 kg의 추출 분말을 회수하였으며, 상엽 7 kg을 기준으로 그 추출 수율은 10.85, 10.14 %로 나타났음

원료	원료량(kg)	회수량(kg)	추출수율(%)
상엽 1	7	0.76	10.85
상엽 2	7	0.71	10.14

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 상엽의 pilot scale 최적 추출조건 설정을 위해서 수율을 확인하였고, 대량생산공정 data로 활용할 수 있을 것으로 판단 됨

(아-2) 상엽의 pilot scale 추출 조건 확립(농축 brix 설정)

① 연구수행의 목적

- 오미자 복합물 기능성 후보 소재인 상엽을 대상으로 대량 추출 조건을 확립하고 그 추출물의 동결건조를 통하여 추출 공정을 확립하고자 적정 농축정도를 확인

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 건조된 상엽 7kg, 여과포, 정제수, 지퍼백, silicagel 등
- 실험기구(상기와 동일) 및 실험방법
- (a) 추출: 건조된 상엽 7 kg을 여과포에 정량 하여 추출 탱크에 투입 → 정제수 90 L를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 95°C에서 2시간 추출 농축탱크로 이동
- (b) 농축: 60°C, 압력 62 cm/Hg로 농축 탱크기에서 3시간동안 감압농축 하여 농축 정도에 따라 샘플 채취(1, 7, 12 brix)
- (c) 동결건조: 농축액을 동결건조 후 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구수행의 결과

- 추출수율: 건조된 7 kg으로부터 정제수 90 L를 사용하여 95°C에서 2시간 동안 열수 추출 후, 60°C에서 약 3시간 동안 감압농축을 수행하였음 → 농축액에 대하여 -40°C에서 45°C까지 약 72시간동안 동결건조를 수행한 결과 최종적으로 각각 0.75, 0.72, 0.78 kg의 추출 분말을 회수하였으며, 상엽 7 kg을 기준으로 그 추출 수율은 10.71, 10.28,

농축액	용량(L)	접시무게	건조후 무게	추출물 무게	환산(kg)	수율
1 brix	60	8.624	14.144	5.52	0.75	10.71
7 brix	20	8.57	25.09	16.52	0.72	10.28
12 brix	10.1	8.601	41.33	32.729	0.78	11.14

11.14%로 나타났음

- 동결건조 상태: 1, 7, 12 brix 모든 샘플이 동결건조 상태가 양호 하였으며, 향후 대량생산 공정시에 12 brix ~ 25 brix 내에서 동결건조를 진행 할 수 있을 것으로 판단



상업 1브릭스 동결건조 상태



상업 7브릭스 동결건조 상태



상업 12브릭스 동결건조 상태

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 상업의 pilot scale 최적 추출조건 설정을 위해서 농축정도(1, 7 및 12 brix)에 따른 수율을 확인하였고, 동결건조물의 상태를 확인, 이는 대량생산공정 data로 활용할 수 있을 것으로 판단 됨

(아-3) 상업의 추출조건 확립(Plant scale)

① 연구수행의 목적

- 오미자 복합물 기능성 후보 소재인 상업을 대상으로 대량 추출 조건을 확립하고 그 추출물의 동결건조를 통하여 추출 수율의 확인과 후보 지표물질인 카테킨 분석을 위한 원료를 확보하고자 함

② 연구수행의 방법

- 실험재료: 건조된 상업 100 kg, 여과포, 정제수, 지퍼백, silicagel 등
- 실험기구(상기와 동일) 및 실험방법

(a) 추출: 건조된 상업 10 kg을 여과포에 정량 하여 추출 탱크에 투입 → 정제수 900 L를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 95°C에서 2시간 추출 농축탱크로 이동

(b) 농축: 60°C, 압력 62 cm/Hg로 농축 탱크기에서 3시간동안 감압농축

(c) 동결건조: 농축액을 동결건조 후 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구수행의 결과

- 추출수율: 건조된 100 kg으로부터 정제수 900 L를 사용하여 95°C에서 2시간 동안 열수 추출 후, 60°C에서 약 3시간 동안 감압농축을 수행하였음 → 농축액에 대하여 -40°C에서 45°C까지 약 72시간동안 동결건조를 수행한 결과 최종적으로 10.42 kg의 추출 분말을 회수하였으며, 상업 100 kg을 기준으로 그 추출 수율은 10.42 %로 나타났음

원료	원료량(kg)	회수량(kg)	추출수율(%)
상업	100	10.42	10.42

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 상업의 대량 추출조건 설정을 위해서 수율을 확인하였고, pilot scale 및 plant scale에서 수율이 일정함을 확인, 이는 대량생산의 data로 활용이 가능할 것임

(자) 오미자의 유용성분 분석: isocubebenol

① 연구수행의 목적

- 오미자 추출물의 유용성분인 isocubebenol 분석을 통해 각 공정별로 그 함량을 알아보기 위함

② 연구수행의 방법

- 분석시료: 오미자 20% 주정 추출물(1), (2), (3), isocubebenol 표준품(제1협동 제공, 순도; 97%) 등
- 표준액 제조: isocubebenol 표준품 10 mg을 준비하여 메탄올로 25 ml 표선 맞춤 → 2 ml를 취한 뒤, 메탄올로 20 ml 표선 맞추고 0.45 μm 필터로 여과함
- 검액 제조: 가루 약 0.5 g을 준비하여 메탄올로 20 ml 표선 한 후, 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여과하고 남은 잔류물에 메탄올 20 ml 표선 한 후, 위와 동일한 방법으로 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여액을 합한 후, 메탄올로 50 ml 표선하고 0.45 μm 필터로 여과함
- 분석 조건: ① 검출기: UV (254 nm), ② Column: C18 4.6 mm X 150mm, 5 μm, ③ 이동상: ACN : 3% acetic acid (70:30), ④ 유속: 1 ml/min, ⑤ 주입량: 10 μl, ⑥ 온도: 30°C

$$* \text{계산식: isocubebenol의 양(mg/g)} = \text{isocubebenol 표준품의 양(mg)} \times \frac{\text{검액피크면적}}{\text{표준액피크면적}} \times \frac{1}{\text{검액의 농도}}$$

③ 연구수행의 결과

- 오미자의 isocubebenol 분석의 결과 오미자에는 13~18 μg/g의 isocubebenol이 함유되어 있는 것을 확인, 1협동에서 연구 진행한 isocubebenol은 오미자 추출물에 존재하며, 이는 소량으로도 효과가 있는 것이 확인 됨

isocubebenol 함량 (μg/g)		
오미자 20% 주정 FD 추출물(1)	오미자 20% 주정 FD 추출물(2)	오미자 20% 주정 FD 추출물(3)
15	13	18

- 3회 반복 isocubebenol 분석결과, STD 3회 분석 및 Test 자료들: 제3협동 기관에 비치

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 추출물의 유용성분인 isocubebenol에 대한 분석을 실시 → 지표성분으로 설정된 쉬잔드린 외에 유용성분 중 isocubebenol을 기능성분으로 설정하여 과학적인 근거를 추가하여 신뢰를 높일 수 있음
- isocubebenol을 분석하였을 때 standard 분석을 통해 표준품의 RT와 피크의 면적을 통해 함량을 확인하였고, 오미자 추출물의 isocubebenol 함량을 확인 할 수 있었으며, 이 결과

는 앞으로 건강기능식품 개발을 위하여 제품의 기준규격을 잡는 자료로 활용이 가능할 것임

(차-1) 상업의 기준규격 확립: 지표성분 astragalin

① 연구수행의 목적

- 상업 추출물의 유용분인 astragalin 분석을 통해 각 공정별로 그 함량을 알아보고 지표성분으로 설정하기 위함

② 연구수행의 방법

- 분석시료: 상업 추출물(1 ~ 5), 상업농축액 (1 ~ 2), astragalin 표준품 등
- 표준액 제조: astragalin 표준품 10 mg을 준비하여 메탄올로 20 mL 표선 맞춤 → 2 ml를 취한 뒤, 메탄올로 20 ml 표선 맞추고 0.45 μm 필터로 여과함
- 검액 제조: 가루 약 0.5 g을 준비하여 메탄올로 20 ml 표선 한 후, 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여과하고 남은 잔류물에 메탄올 20 ml 표선 한 후, 위와 동일한 방법으로 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여액을 합한 후, 메탄올로 50 ml 표선하고 0.45 μm 필터로 여과함
- 분석 조건: ① 검출기: UV (260 nm), ② Column: C18 4.6 mm X 250mm, 5 μm, ③ 이동상: ACN · 0.1%TFA(60:40), ④ 유속: 1 ml/min, ⑤ 주입량: 10 μl, ⑥ 온도: 40°C

$$* \text{계산식: astragalin 양(mg/g)} \quad \times \frac{\text{검액피크면적}}{\text{표준액피크 면적}} \quad \times \frac{1}{\text{검액의 농도}}$$

$$= \text{astragalin 표준품의 양(mg)}$$

③ 연구수행의 결과

- 상업의 astragalin 분석의 결과 상업에는 4~5 mg/g의 astragalin 이 함유되어 있는 것을 확인하였고, 이는 astragalin 이 지표성분으로 활용이 가능하다는 것을 의미함

Astragalin 함량 (mg/g)				
상업 열수추출물(1)	상업 열수추출물(2)	상업 열수추출물(3)	상업 열수추출물(4)	상업 열수추출물(5)
4.874	4.630	5.353	4.282	4.854

- 5회 반복 astragalin 분석결과, STD 3회 분석 및 Test 자료들: 제3협동 기관에 비치

③ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 상업 추출물의 건강기능식품 인정을 위한 지표성분으로 후보물질 astragalin에 대한 분석을 실시 → astragalin이 4~5 mg/ml로 존재하므로 지표성분으로 설정 가능성이 충분한 것으로 판단됨
- astragalin을 분석하였을 때 standard 분석을 통해 표준품의 RT와 피크의 면적을 통해 함량을 확인하였고, 상업 추출물의 함량을 확인 할 수 있었으며, 이 결과는 앞으로 건강기능식품 개발을 위하여 제품의 기준규격을 잡는 자료로 활용이 가능할 것임

(차-2) 상업의 기준규격 확립: 지표성분 rutin

① 연구수행의 목적

- 상업 추출물의 유용분인 rutin 분석을 통해 각 공정별로 그 함량을 알아보고 지표성분으로 설정하기 위함

② 연구수행의 방법

- 분석시료; 상업 추출물(1~5), 상업농축액 (1~2), rutin 표준품 등
- 표준액 제조: rutin 표준품 10 mg을 준비하여 메탄올로 20 mL 표선 맞춤 → 2 mL를 취한 뒤, 메탄올로 20 ml 표선 맞추고 0.45 μm 필터로 여과함
- 검액 제조: 가루 약 0.5 g을 준비하여 메탄올로 20 ml 표선 한 후, 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여과하고 남은 잔류물에 메탄올 20 ml 표선 한 후, 위와 동일한 방법으로 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여액을 합한 후, 메탄올로 50 ml 표선하고 0.45 μm 필터로 여과함
- 분석 조건: ① 검출기: UV (260 nm), ② Column: C18 4.6 mm X 250mm, 5 μm, ③ 이동상: ACN · 0.1%TFA (60:40), ④ 유속: 1 mL/분, ⑤ 주입량: 10 μl, ⑥ 온도: 40°C

$$* \text{계산식: rutin 양(mg/g)} = \text{rutin 표준품의 양(mg)} \times \frac{\text{검액피크면적}}{\text{표준액피크면적}} \times \frac{1}{\text{검액의 농도}}$$

③ 연구수행의 결과

- 상업의 rutin 분석의 결과 상업에는 16 ~ 23 mg/g의 rutin 이 함유되어 있는 것을 확인하였고, 이는 rutin 이 지표성분으로 활용이 가능하다는 것을 의미함

Rutin 함량 (mg/g)				
상업 열수추출물(1)	상업 열수추출물(2)	상업 열수추출물(3)	상업 열수추출물(4)	상업 열수추출물(5)
19.943	18.630	23.791	16.203	18.818

- 5회 반복 rutin 분석결과, STD 3회 분석 및 Test 자료들: 제3협동 기관에 비치

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 상업 추출물의 건강기능식품 인정을 위한 지표성분으로 후보물질 rutin에 대한 분석을 실시 → rutin 이 16 ~ 23 mg/ml로 존재하므로 지표성분으로 설정 가능성이 충분한 것으로 판단됨.
- rutin을 분석하였을 때 standard 분석을 통해 표준품의 RT와 피크의 면적을 통해 함량을 확인하였고, 상업 추출물의 함량을 확인 할 수 있었으며, 이 결과는 앞으로 건강기능식품 개발을 위하여 제품의 기준규격을 잡는 자료로 활용이 가능할 것임

(카) 기존 출시 제품과 오미자 추출물의 관절염 개선 비교 평가

① 연구 수행의 목적

- 제3협동 과제에서 개발 준비한 오미자 추출물 함유 제품의 관절염 개선효과에 대한 타 제품과의 비교 평가를 함으로서 당사 제품의 수준을 파악하는데 중요한 자료가 될 수 있다

고 판단되어 추가 실험을 진행하였음

② 관절염 치료 관련 기존 제품의 현황

- 현재까지 인정된 기능성원료 중에서 고시형으로는 뮤코다당단백이 있으며, 개별인정원료로는 글루코사민, 로즈힙 분말, 전칠삼 추출물 등 복합물, 차조기 등 복합추출물, 호프 추출물, 황금 추출물 등 복합물, dimethylsulfone (MSM) 등이 있다. 또한, 제조된 경험이 있는 원료제품으로는 가장 최근에 확인된 보스웰리아를 포함하여 175가지 제품이 나와 있음

업소명	품목유형	제품명	분류
주식회사 노바렉스	N-아세틸글루코사민	건강한 관절 효소분해 NAG글루코사민	건기
코스맥스바이오(주)	비타민D	관절업터메릭	건기
주식회사 노바렉스	엠에스엠(MSM, Methyl sulfonylethane, 디메틸설폰)	라이프msm관절	건기
주)팜크로스		관절엔에가데커신골드	건기
네이처퓨어코리아(주)	엠에스엠(MSM, Methyl sulfonylethane, 디메틸설폰)	연골 앤 관절케어	건기
아미코젠(주)	N-아세틸글루코사민	엔바이탈 관절연골튼튼 피부촉촉 NAG	건기
코스맥스바이오(주)		관절유턴	건기
코스맥스바이오(주)		관절의왕(關節之王)	건기
(주)네추럴에프앤피	비타민D	관절 트리플 액션	건기
주식회사 노바렉스		활소 관절 무릎팍	건기
주식회사한미양행	NAG(엔에이지, N-아세틸글루코사민, N-Acetylglucosamine)	관절파워NAG비타민D	건기
(주)남양 F&B	엠에스엠(MSM, Methyl sulfonylethane, 디메틸설폰)	자생관절건강MSM	건기
네이처퓨어코리아(주)	엠에스엠(MSM, Methyl sulfonylethane, 디메틸설폰)	비타민하우스 관절케어 MSM	건기
(주)한국씨엔에스팜	엠에스엠(MSM, Methyl sulfonylethane, 디메틸설폰)	관절탕탕 MSM	건기
(주)한국씨엔에스팜	엠에스엠(MSM, Methyl sulfonylethane, 디메틸설폰)	관절M프리미엄	건기
(주)서흥		관절왕 보스웰리아	건기
(주)허브큐어	엠에스엠(MSM, Methyl sulfonylethane, 디메틸설폰)	관절의신(神) MSM100골드	건기
폴라비엔에이치(주)푸드팜사업부문		인지88관절쌍쌍	건기
광동제약주식회사	강황추출물(제2014-2호)	광동 관절초이스 강황추출물	건기
에스케이내추럴팜(주)		빠르카-관절	건기
코스맥스바이오(주)	비타민D	관절연골엔보스웰리아	건기

- 그 중 3개 제품을 구매하여 실험에 사용하였으며, 제품의 경우는 주된 건강기능식품 원료로는 보스웰리아, MSM, 초록입 홍합 추출 오일 복합물이 포함된 제품을 구매하여 실험에 사용하였음

③ 연구 수행 방법

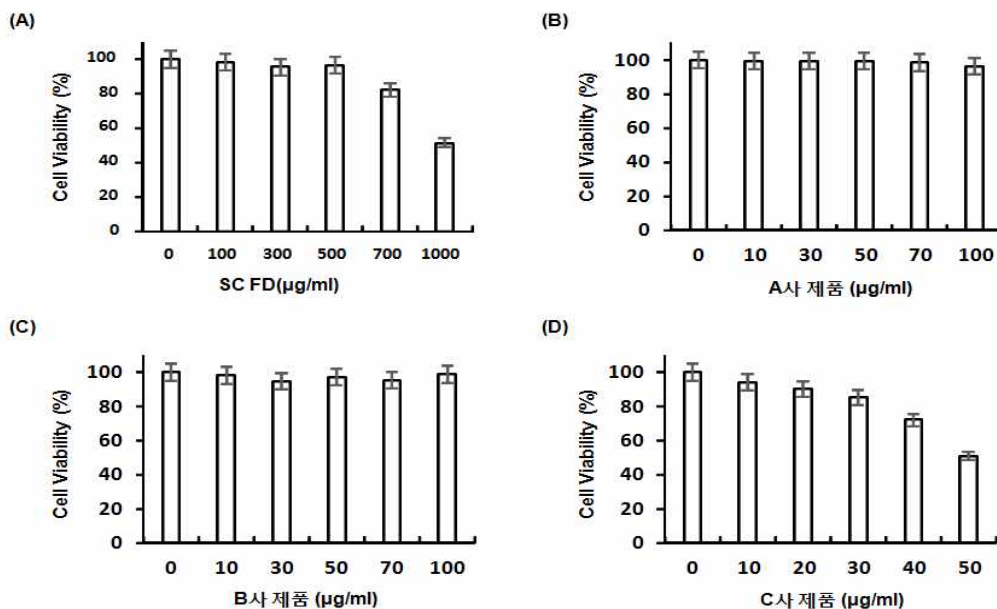
- 세포독성 비교: 실험 조건 설정을 위한 효능 비교 물질들의 세포독성 여부를 확인하기 위해서 SW1353 chondrocytes (3×10^5 cells/well)를 6-well culture plate에 24시간 동안 배양한 후 다양한 농도의 비교 물질을 처리하였음
- 24시간 후 배지를 제거하고 MTT 용액(0.5 mg/ml)을 농도로 첨가하여 2시간 동안 환원 반응을 유도한 후 formazan 결정을 DMSO 용액으로 용해한 후, ELISA를 이용하여 흡

광도(540 nm)를 측정하였으며, 비교 물질이 처리되지 않은 조건에서 배양한 대조군을 기준으로 처리군의 세포생존율(%)을 계산하였음

- NO의 농도 측정: IL-1 β 에 의해 활성화된 SW1353 chondrocytes로부터 생성되는 NO의 농도를 세포 배양액에 존재하는 NO₂-를 인지하는 Griess 시약을 이용하여 검출하였음
→ 이를 위하여 SW1353 chondrocytes를 6-well culture plate에 24시간 동안 배양한 후 다양한 농도의 비교 물질을 1시간 전 처리한 뒤 IL-1 β (40ng/ml) 를 다시 처리하였음
→ 24시간 추가 배양한 뒤 세포 배양액을 수거하고 배양액에 동량의 Griess 시약을 넣어 실온에서 반응시킴
→ 반응액을 microplate reader를 이용하여 540 nm 흡광도에서 측정하였으며, 세포로부터 생성된 NO의 양은 NaNO₂ 표준액의 농도를 기준으로 계산하였음
- PGE₂의 양 측정: IL-1 β 자극에 의하여 SW1353 chondrocytes 로부터 생성되는 PGE₂의 양을 측정하기 위하여 동일한 조건에서 배양된 세포 배양액을 수거하여 PGE₂ enzyme immunoassay (EIA) kit를 이용하여 PGE₂의 생성량을 측정하였으며, 세포 배양액 내 존재하는 PGE₂의 농도(pg/ml)는 표준용액의 농도를 기준으로 환산하여 계산하였음

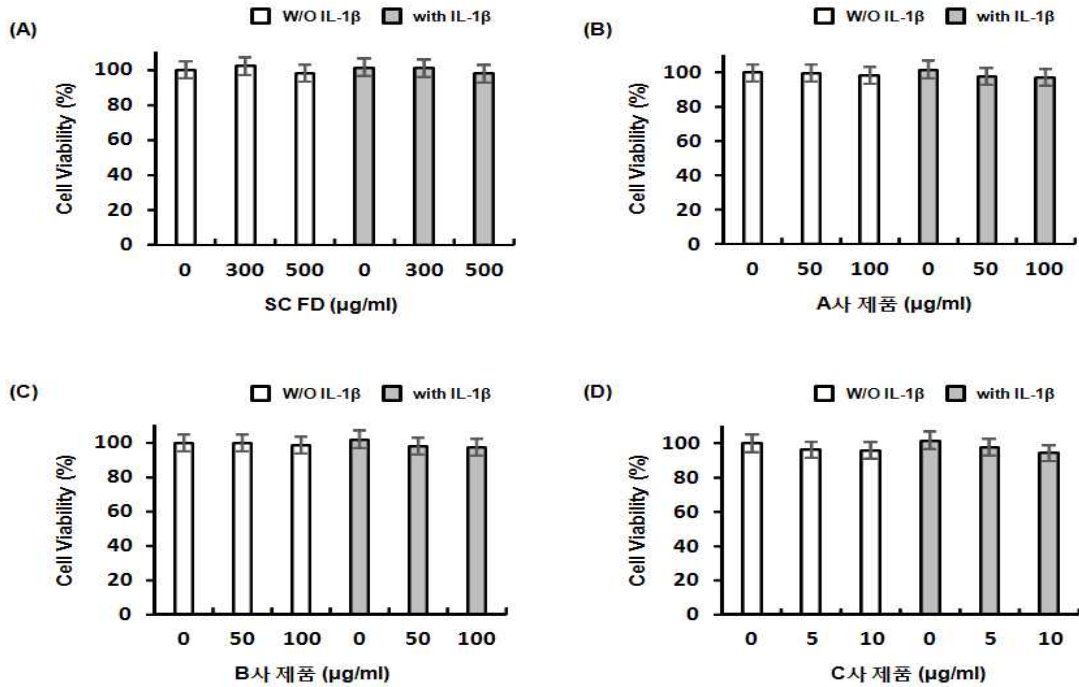
④ 연구 수행 결과

- 본 실험에 사용한 제품 및 오미자 추출물의 세포 독성 비교: 3개사에서 구입한 제품의 처리에 따른 SW1353 세포에 미치는 세포독성 비교에서 A 및 B사에서 구입한 제품의 경우, 100 μ g/ml 처리군까지 유의적인 세포독성을 보이지 않았지만, C사의 제품은 처리 농도의 증가에 따라 세포독성이 관찰되어 50 μ g/ml 처리군에서 50% 전도의 생존도를 보였음(결과 1)

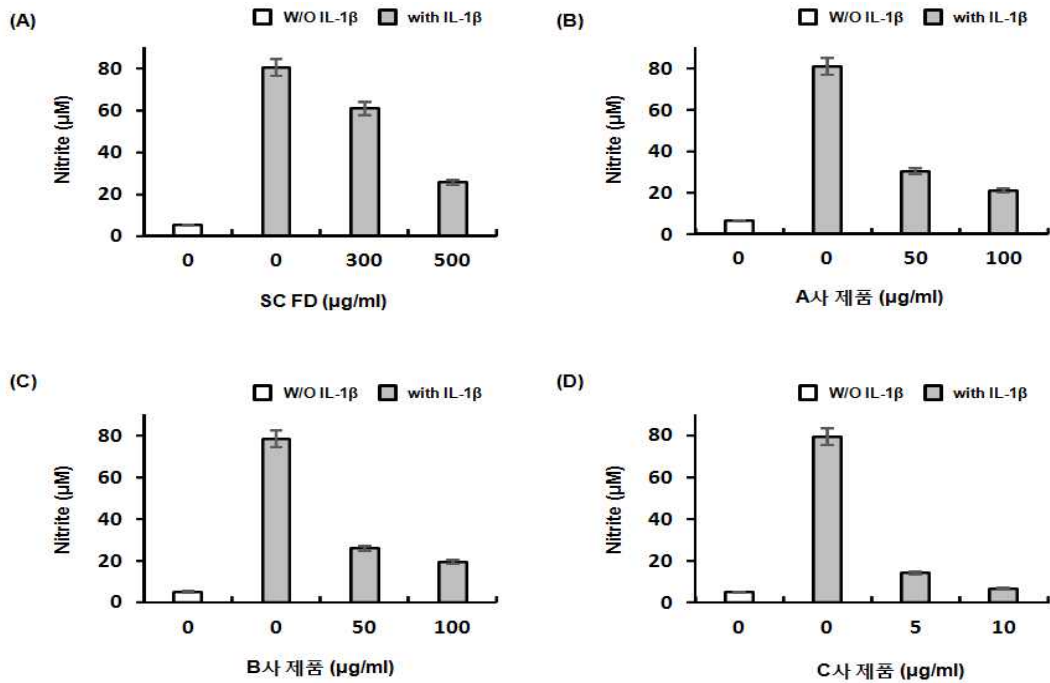


결과 1. 본 실험에 사용한 제품 및 오미자 추출물의 단독 처리에 따른 세포 독성 비교

- 항염증 효능 비교를 위한 IL-1 β 와의 동시 처리에 따른 세포독성 비교: 상기의 결과에 준하여 세포독성이 나타나지 않는 범위의 농도를 선별하여 IL-1 β 와 동시 처리한 경우 모두 유의적인 세포독성이 나타나지 않는 범위의 농도를 설정하였음(결과 2)



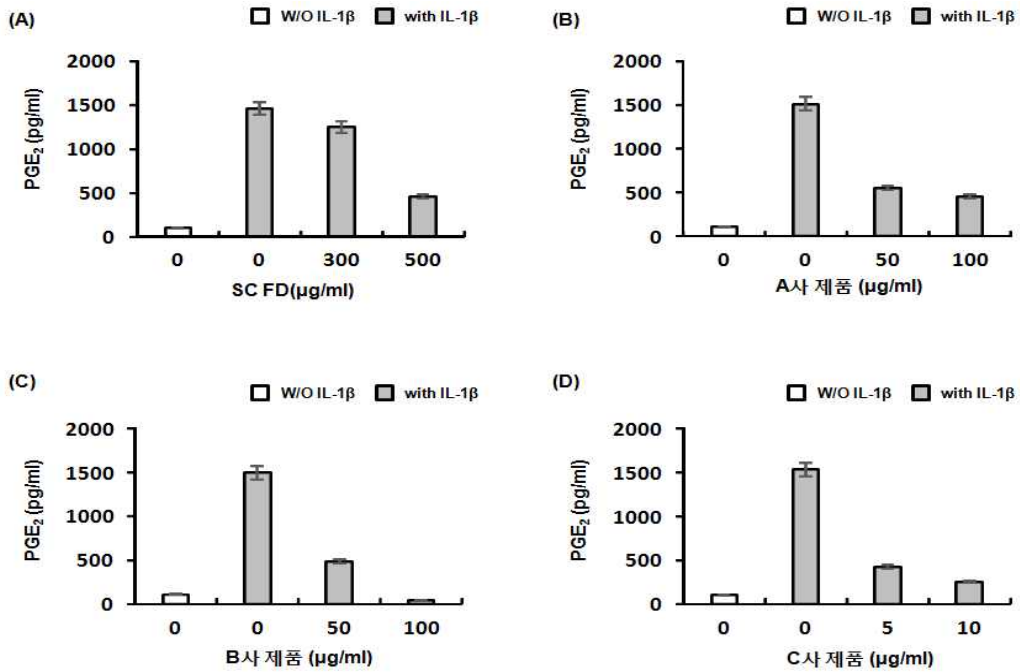
결과 2. 본 실험에 사용한 제품 및 오미자 추출물과 IL-1β과의 독합 처리에 따른 세포 독성 비교



결과 3. IL-1β에 의한 NO 생성에 미치는 비교 제품 및 오미자 추출물의 영향

- NO의 생성이 미치는 비교 제품군의 영향: IL-1β 처리에 따른 SW1353 세포에서의 NO 생성이 미치는 비교 제품군의 영향을 조사한 결과, 대상 제품 모두에서 NO의 생성이 처리 농도 의존적으로 감소되었음(결과 3)
- PGE₂의 생성이 미치는 비교 제품군의 영향: IL-1β 처리에 따른 SW1353 세포에서의 PGE₂ 생성이 미치는 비교 제품군의 영향을 조사한 결과, 대상 제품 모두에서 PGE₂의 생

성이 처리 농도 의존적으로 감소되었음(결과 4)



결과 4. IL-1β에 의한 PGE₂ 생성에 미치는 비교 제품 및 오미자 추출물의 영향

⑤ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 자사제품과 타사 제품의 비교평가에 있어 세포독성을 평가하여 보면 제품의 안전성부분에서 높은 농도에서도 안전하다는 것을 확인할 수 있었으며, MTT assay를 통해서도 그 농도가 높게 나타나서 세포독성이 적은 것을 확인할 수 있었음
- 관절염 유도를 통한 실험결과에서는 타 회사의 제품보다 높은 농도에서 관절개선의 효과가 나타나는 것으로 보이는데 이는 타사의 경우 본래의 원료이외의 효모나 비타민 등이 포함되어 본래의 효과 보다 항산화능이 높게 평가되는 것을 확인할 수 있었으나, 당사 제품의 경우도 추후 제품의 제형 배합부분에 좀 더 신중하게 접근을 한다면, 기존의 제품과 크게 다르지 않는 효과도 나타낼 수 있을 것이라 판단됨

(5) 오미자 추출물 pilot scale 추출 조건 최종 확립 및 기준 규격의 설정

(가) 오미자 추출물 pilot scale 추출 조건 확립

① 연구수행의 목적

- 오미자 추출 조건의 최종 확립
- ② 오미자 추출물의 pilot scale 추출 조건 확립(10회 추출)
 - 실험재료: 오미자, 주정, 정제수, 여과포 등
 - 실험기구: Extraction & Evaporation system, Freeze dryer, 20 L 회전식감압농축기
 - 실험방법

(a) 추출: 분쇄한 건 오미자를 3.5 kg씩 부직포 2개에 정량하여 추출 탱크에 투입 → 주정을 희석하여 제조한 20% 주정 70 L를 추출탱크에 넣어 여과포를 침지시킴 → 추출탱크 온

도를 90°C로 설정, 90°C에 도달하는 시점부터 8시간 추출을 진행 → 추출 후 추출액의 총 무게와 Brix를 측정 및 지표물질(schizandrin)함량 분석용 sample 채취

(b) 농축: 농축탱크 이송 밸브를 개방한 후 추출탱크펌프를 작동하여 추출액을 농축탱크로 이동 → 농축탱크의 온도를 60°C, 압력 62 cm/Hg로 설정 농축이 끝나면 농축탱크의 밸브를 개방하고 농축펌프를 작동시켜 농축액을 회수함 → 농축액의 총 무게와 Brix를 측정하고 유용성분 분석을 위한 sample을 채취함

(c) 동결건조: 오미자 1차, 2차 추출농축액을 10 L씩 동결건조용 tray에 담아 선반에 순서대로 넣어둠 → Sample의 온도가 40°C가 되면 동결건조를 종료하고 자동메뉴와 상단의 진공해제를 클릭하고 진공이 완전히 빠진 후 좌측 중앙의 단힘을 클릭하여 도어를 열어줌 → Tray에 건조된 추출물을 회수하고 무게를 측정하여 추출 수율을 확인함

③ 연구수행의 결과

- 추출수율: 분쇄한 건 오미자 7kg을 20% 주정 70L으로 90°C에서 4시간 동안 1차 ~ 10차 추출을 수행하였음
- 오미자 추출, 농축 및 동결 건조 총 10회 실험 결과 추출액의 birx는 8.1~11.5%, 농축액의 birx는 40.1~58.7%로 나타났으며 오미자 동결건조물의 회수량은 1.70~2.10 kg, 회수율은 24.29 ~ 30.00%로 나타났음 → 평균 값으로 오미자 추출액의 brix는 9.47%, 농축액의 Brix는 46.41%, 동결 건조물의 회수율은 26.9%로 나타났음
- 결과 값

번호	추출 일자/Brix(%)	농축 일자/Brix(%)	동결 건조 회수 일자	동결 건조물 무게(kg) / 회수율(%)
1	7월 18일 / 9.7	7월 18일 / 58.7	7월 24일	약 2.00 kg / 28.57%
2	7월 19일 / 9.9	7월 19일 / 42.8	8월 10일	약 1.84 kg / 26.28%
3	8월 09일 / 8.1	8월 09일 / 40.1	8월 14일	약 1.88 kg / 26.85%
4	8월 10일 / 8.5	8월 10일 / 40.8	8월 17일	약 1.86 kg / 26.57%
5	8월 14일 / 8.9	8월 14일 / 44.2	8월 21일	약 1.78 kg / 25.43%
6	8월 17일 / 9.0	8월 17일 / 43.5	8월 25일	약 1.90 kg / 27.14%
7	8월 24일 / 9.5	8월 24일 / 57.0	8월 28일	약 2.10 kg / 30.00%
8	8월 28일 / 9.6	8월 28일 / 42.6	9월 04일	약 1.70 kg / 24.29%
9	9월 06일 / 11.5	9월 06일 / 46.3	9월 18일	약 1.91 kg / 27.29%
10	9월 08일 / 10.0	9월 08일 / 48.1	9월 18일	약 1.86 kg / 26.57%
평균	9.47 %	46.41 %	-	26.9 %
표준 편차	0.94	6.48	-	1.57
RSD (%)	9.97	13.97	-	5.84

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 총 10회의 추출 결과 birx, 회수율 등 측정 값들이 비슷한 경향으로 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 scale up에서도 수율이 일정함을 의미하고, 대량 생산조건의 data로 활용할 수 있을 것으로 사료됨

(나) 오미자 추출물 지표 성분의 기준 규격 설정

① 연구수행의 목적

- 오미자 지표성분 기준규격 확립 실험
- ② 오미자 추출물의 지표성분 기준 규격 확립(10회 실시)
- 연구수행의 목적: 오미자 추출물의 지표성분인 schizandrin, gomisin A, gomisin N의 단독 분석과 동시 분석 함량을 확인하여 추출물 QC 진행 시 비용 및 분석 시간의 절감 효과를 위해 최적의 분석 조건을 확립하기 위함
- 연구수행에 사용된 분석 시료: 오미자 FD 추출물, Schizandrin, Gomisin A, Gomisin N 표준품

③ 표준액 제조

- 단독분석용: 각각의 표준품 10 mg을 준비하여 메탄올로 25 mL 표선 맞춤 → 2 mL를 취한 뒤, 메탄올로 20 mL 표선 맞추고 0.45 μm 필터로 여과함
- 동시 분석용: 각각의 표준품 10 mg을 준비하여 메탄올로 25 mL 표선 맞춤 → 각각액의 2 mL를 취한 뒤, 한곳으로 메탄올 20 mL 표선 맞추고 0.45 μm 필터로 여과함

- ④ 검액 제조: 가루 약 0.5 g을 준비하여 메탄올로 20 mL 표선 한 후, 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여과하고 남은 잔류물에 메탄올 20 mL 표선 한 후, 위와 동일한 방법으로 20분간 초음파 추출 후 여과함 → 여액을 합한 후, 메탄올로 50 mL 표선하고 0.45 μm 필터로 여과함

- 분석 조건: ① 검출기: UV (254 nm), ② Column: C18 4.6 mm X 150mm, 5 μm, ③ 이동상: ACN · 물 · Formic acid (70:30:0.1), ④ 유속: 0.6 mL/분, ⑤ 주입량: 10 μl, ⑥ 온도: 40°C (대한민국약전에는 온도에 대한 조건이 없어 이 온도조건에서 실험)

* 계산식: Schizandrin의 양(mg/g) = Schizandrin 표준품의 양(mg) $\times \frac{\text{검액피크면적}}{\text{표준액피크면적}} \times \frac{1}{5}$

* 계산식: Gomisin A의 양(mg/g) = Gomisin A 표준품의 양(mg) $\times \frac{\text{검액피크면적}}{\text{표준액피크면적}} \times \frac{1}{5}$

* 계산식: Gomisin N의 양(mg/g) = Gomisin N 표준품의 양(mg) $\times \frac{\text{검액피크면적}}{\text{표준액피크면적}} \times \frac{1}{5}$

⑥ 연구수행의 결과

⑥-1. 오미자 지표성분(Schizandrin, Gomisin A, Gomisin N) 피크 면적 값 확인 및 재현성 확인

- 단독 분석 피크 면적 재현성 확인(상대표준편차 1.5% 이하)

번호	표준액 제조 일자	Schizandrin 면적 값	Gomisin A 면적 값	Gomisin N 면적 값	비고
1	2017년 08월 17일	1247.349	792.434	528.902	1~3회차 분석용 표준액
		1251.763	794.249	529.776	
		1251.156	794.788	530.331	
	평균	1250.089	793.824	529.670	
	표준편차	2.393	1.233	0.720	
	상대 표준편차	<u>0.191</u>	<u>0.155</u>	<u>0.136</u>	
2	2017년 08월	1233.519	784.847	522.437	4~6회차

	31일	1232.160	783.039	521.641	분석용 표준액
		1233.691	783.260	522.136	
	평균	1233.123	783.715	522.071	
	표준편차	0.839	0.986	0.402	
	RSD(%)	<u>0.068</u>	<u>0.125</u>	<u>0.076</u>	
3	2017년 09월 07일	1339.710	917.015	856.572	7회차 분석용 표준액
		1310.818	899.755	856.418	
		1323.084	908.227	859.518	
	평균	1324.537	908.332	857.503	
	표준편차	14.501	8.630	1.747	
	RSD(%)	<u>1.094</u>	<u>0.95</u>	<u>0.203</u>	
4	2017년 09월 12일	1327.282	909.355	863.912	8회차 분석용 표준액
		1415.231	964.143	878.978	
		1374.886	938.342	869.489	
	평균	1372.466	937.280	870.793	
	표준편차	44.024	27.409	7.617	
	RSD(%)	<u>3.207</u>	<u>2.924</u>	<u>0.874</u>	
5	2017년 09월 19일	1270.751	874.349	874.544	9~10회차 분석용 표준액
		1270.910	874.295	874.404	
		1270.594	875.047	874.356	
	평균	1270.752	874.564	874.435	
	표준편차	0.158	0.419	0.098	
	RSD(%)	<u>0.012</u>	<u>0.047</u>	<u>0.011</u>	

- 동시 분석 피크 면적 재현성 확인(상대표준편차 1.5% 이하)

번호	표준액 제조 일자	Schizandrin 면적 값	Gomisin A 면적 값	Gomisin N 면적 값	비고
1	2017년 08월 17일	1247.349	792.434	528.902	1~3회차 분석용 표준액
		1251.763	794.249	529.776	
		1251.156	794.788	530.331	
	평균	1250.089	793.824	529.670	
	표준편차	2.393	1.233	0.720	
	상대 표준편차	<u>0.191</u>	<u>0.155</u>	<u>0.136</u>	
2	2017년 08월 31일	1233.519	784.847	522.437	4~6회차 분석용 표준액
		1232.160	783.039	521.641	
		1233.691	783.260	522.136	

	평균	1233.123	783.715	522.071	
	표준편차	0.839	0.986	0.402	
	RSD(%)	0.068	0.125	0.076	
3	2017년 09월 07일	1339.710	917.015	856.572	7회차 분석용 표준액
		1310.818	899.755	856.418	
		1323.084	908.227	859.518	
	평균	1324.537	908.332	857.503	
	표준편차	14.501	8.630	1.747	
	RSD(%)	1.094	0.95	0.203	
4	2017년 09월 12일	1327.282	909.355	863.912	8회차 분석용 표준액
		1415.231	964.143	878.978	
		1374.886	938.342	869.489	
	평균	1372.466	937.280	870.793	
	표준편차	44.024	27.409	7.617	
	RSD(%)	3.207	2.924	0.874	
5	2017년 09월 19일	1270.751	874.349	874.544	9~10회차 분석용 표준액
		1270.910	874.295	874.404	
		1270.594	875.047	874.356	
	평균	1270.752	874.564	874.435	
	표준편차	0.158	0.419	0.098	
	RSD(%)	0.012	0.047	0.011	

⑥-2. 오미자 지표성분 함량 확인

• Schizandrin 함량

번호	동시 분석 Schizandrin 함량 (mg/g)	단독 분석 Schizandrin 함량 (mg/g)
1	4.211	4.447
2	5.121	5.408
3	4.432	4.681
4	4.103	4.401
5	4.665	4.878
6	5.481	5.731
7	4.788	5.007
8	4.933	5.165
9	5.382	5.409
10	5.71	5.739
평균	4.88	5.09
표준편차	0.54	0.49

RSD(%)	11.15	9.60
--------	-------	------

• Gomisin A 함량

번호	동시 분석 Gomisin A 함량 (mg/g)	단독 분석 Gomisin A 함량 (mg/g)
1	0.824	0.804
2	1.01	0.985
3	0.867	0.846
4	0.78	0.863
5	0.92	0.897
6	1.033	1.008
7	0.92	0.898
8	0.879	0.948
9	0.612	0.636
10	1.019	1.059
평균	<u>0.89</u>	<u>0.89</u>
표준편차	0.13	0.12
RSD(%)	14.45	13.40

• Gomisi N 함량

번호	동시 분석 Gomisin N 함량 (mg/g)	단독 분석 Gomisin N 함량 (mg/g)
1	0.662	0.683
2	0.917	0.945
3	0.619	0.638
4	0.433	0.466
5	0.683	0.704
6	0.748	0.772
7	0.69	0.712
8	0.465	0.494
9	0.482	0.508
10	0.493	0.519
평균	<u>0.62</u>	<u>0.64</u>
표준편차	0.15	0.15
RSD(%)	24.63	23.44

⑥-3. 동시 분석 표준액 피크 분리도 확인(피크 분리도 1.6% 이상)

번호	제조 날짜	Sample	Schizandrin		Gomisin A		피크 분리도
			RT	Width	RT	Width	

							(%)
1	2017년 08월 17일	SCGMSA,N-1	4.475	0.1181	4.886	0.1295	3.32
		SCGMSA,N-2	4.476	0.1182	4.887	0.1295	3.32
		SCGMSA,N-3	4.475	0.1180	4.887	0.1294	3.33
2	2017년 08월 31일	SCGMSA,N-1	4.533	0.1183	4.957	0.1241	3.50
		SCGMSA,N-2	4.535	0.1183	4.958	0.1240	3.49
		SCGMSA,N-3	4.534	0.1184	4.957	0.1240	3.49
3	2017년 09월 07일	SCGMSA,N-1	4.553	0.1190	4.987	0.1309	3.47
		SCGMSA,N-2	4.551	0.1189	4.984	0.1306	3.47
		SCGMSA,N-3	4.552	0.1191	4.986	0.1309	3.47
4	2017년 09월 11일	SCGMSA,N-1	4.581	0.1258	5.029	0.1316	3.48
		SCGMSA,N-2	4.582	0.1260	5.031	0.1318	3.48
		SCGMSA,N-3	4.583	0.1259	5.032	0.1317	3.49
5	2017년 09월 18일	SCGMSA,N-1	4.374	0.1172	4.745	0.1223	3.10
		SCGMSA,N-2	4.374	0.1170	4.744	0.1222	3.09
		SCGMSA,N-3	4.375	0.1170	4.746	0.1223	3.10
평균 값							3.37

⑦ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 오미자 추출 및 농축, 동결건조 10회 실시 후 HPLC 분석을 실시한 결과, 오미자의 지표 성분 Schizandrin, Gomisin A, Gomisin N 피크 면적 재현성 확인 결과 단독 분석과 동시 분석의 지표성분의 피크 면적 값은 조금씩 차이가 있지만 피크 분리도와 표준편차 계산 결과 일정해지는 것으로 판단됨
- 피크 분리도 계산 결과 값은 3.09~3.50으로 나타났으며 평균 값은 3.37로 신뢰성 있는 데이터로 나타났으며, 오미자 지표성분의 함량은 Schizandrin 4.103~5.739 mg/g, Gomisin A 0.78~1.59 mg/g, Gomisin N 0.482~1.059 mg/g으로 나타났음
- 지표성분인 Schizandrin의 함량은 기준규격에서 설정한 4~6mg 사이에 들어 적합으로 판단됨
- 분석의 용이성과 경제성을 위하여 단독분석과 동시분석을 진행한 결과, 결과 값의 차이가 없어 동시분석을 진행해도 될 것으로 사료됨

(5) 교육 지도

① 연구수행 목적

- 건강기능식품 GMP 및 오미자 제품화에 대한 교육 실시

② 교육 일시

- 1차 교육: 2017년 7월 28일
- 2차 교육: 2017년 8월 18일

③ 교육 내용

- 건강기능식품 GMP 교육 내용: 건강기능식품 GMP, 건강기능식품 GMP 생산 공정 프로세스, 건강기능식품 품질 검사 방법 등
- 오미자 제품화에 대한 교육 내용: 오미자 원재료 정보, 오미자 제품 제조 방법(오미자 에이드, 캡슐, 환, 과립), 공장 내부 및 생산 현장 확인 등

3. 연구수행 결과

- 첨부자료 참고: 교육지도보고서 2건

(6) 기준 규격 설정 및 인체 적용 시험 준비 관련

(가) 기준규격 확립: 공인시험 성적서 확보

① 연구수행의 목적

- 오미자 추출물 공인시험 성적서 확보 (3회 3 lot)

② 연구수행의 방법

- 식품의 기준 및 규격에 따라 오미자는 과실류에 속하여 곰팡이 독소 실험 공인성적서 필요 식품의 기준 및 규격에 따라 공인시험 기관에서 시험 실시

③ 연구수행의 결과

[총아플라톡신]

대상 식품	기준(μg/kg)
곡류, 두류, 땅콩, 견과류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	15.0 이하 (단, B ₁ 은 10.0 이하이어야 한다)
곡류가공품 및 두류가공품 (규격의 일반가공식품)	
장류 및 고춧가루 및 카레분	
육두구, 심황(강황), 건조고추, 건조파프리카 및 이를 함유한 천연향신료	
밀가루	
건조과일류	-
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	

[오탁라톡신 A]

대상 식품	기준(μg/kg)
곡류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	5.0 이하
커피콩, 볶은커피	
인스턴트커피	10.0 이하
메주	20 이하
고춧가루	7.0 이하
포도주스, 포도주스농축액(원료용 포함, 농축배수로 환산하여), 포도주	2.0 이하
건조과일류	10.0 이하
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	0.50 이하

항목	실측치 (반복시험,공인기관)	제한 규격
총아플라톡신 (B ₁ ,B ₂ ,G ₁ 및 G ₂ 의 합)	불검출	15.0 µg/kg 이하 (단 B ₁ 은 10.0 이하)
오크라톡신A	불검출	10.0 µg/kg 이하

*기준규격 설정 근거 : 식품공전/식품의 기준 및 규격 곰팡이독소 참조

- 식품의 기준 및 규격에 따라 곰팡이 독소 중 총아플라톡신, 오크라톡신 A 분석 후 제한 규격 설정
- 5회 반복 시험성적서: 제3협동기관에 비치
- ④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도
- 건강기능식품 개별인정 자료로 활용

(나) 기준규격 확정

- ① 연구수행의 목적
 - 오미자 추출물의 기준규격 확정
- ② 연구수행의 방법
 - 1, 2차년도 lab scale, pilot scale, plant scale에서 확립된 최적 제조공정에 따라 추출물의 최종 기준규격 확정
- ③ 연구수행의 결과

제한 기준 및 규격	시험항목	제한 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)		
규격항목	성상	이취·이물이 없고 고유의 향미가 있는 적갈색의 분말	-		
	중금속 (mg/kg)	납	≤ 2.0	0,0749 0,0329 0,0717 0,0668 0,0396 0,0647 0,0725 0,0376 0,0595 평균 : 0,0578	
			총비소	≤ 3.0	0,1446 0,1059 0,1134 0,1460 0,1034 0,1071 0,1369 0,1089 0,1099 평균 : 0,1196
				총수은	≤ 0.2
		카드뮴	≤ 0.3		0,0140 0,0114 0,0150 0,0135 0,0117 0,0152 0,0140 0,0108 0,0143 평균 : 0,0133
	미생물		대장균	음성	음성 (3로트*3회 반복시험)
		대장균군	음성	음성 (3로트*3회 반복시험)	
	규격 미설정 항목	동물용의약품	검사수 : -	-	
		잔류농약 (mg/kg)	59종 ¹⁾	불검출	불검출 (3로트*3회 반복시험)
			Endrin	불검출	
Dieldrin			불검출		
Aldrin			불검출		
미산화황 (g/kg)	≤ 0.01	0,0004 0,0004 0,0004 0,0004 0,0003 0,0004 0,0003 0,0003 0,0003 평균 : 0,0004			

[기준규격]

(다) 제조 공정도 작성

① 연구수행의 목적

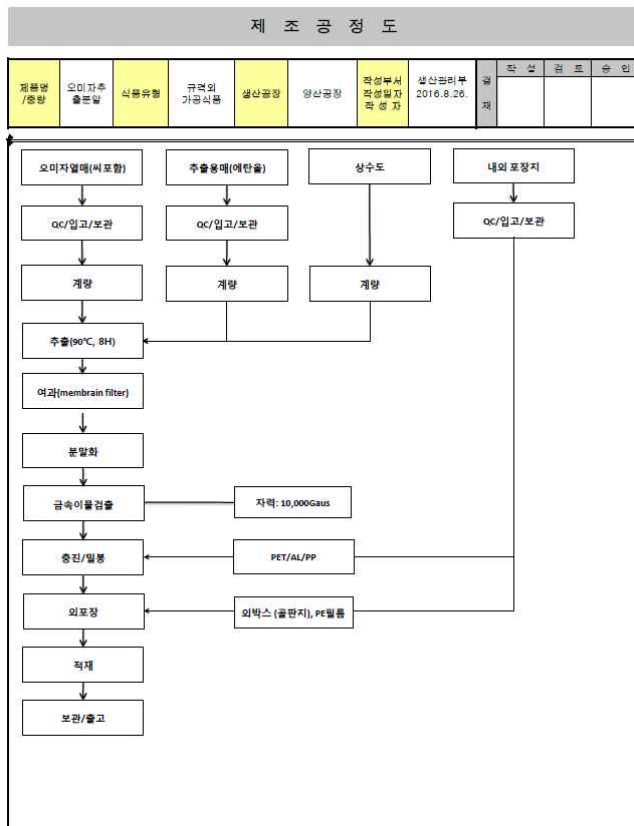
- 오미자 추출물의 제조공정도 작성

② 연구수행의 방법

- Lab scale, pilot scale, plant scale에서 확립된 최적 제조공정에 따라 제조공정도의 작성

③ 연구수행의 결과

- 제조공정도, 제품설명서, 제조공정별가공방법, 원재료 규격서, 포장재 규격서, 완제품 규격서 등 제시



[제조공정도]

제 품 설 명 서

제품명	오미자추출분말	결	작	성	검	토	승	인
식품유형	규격외 가공식품	재						
생산공장	양산공장							
작성일자	2016.8.26	작성부서	품질관리부 2016.8.26					
포장단위	100g, 300g, 500g, 1kg	작성일자	2016.8.26					
제품컨셉 및 특징	건강기능식품 개별인증서 소제							
원재료명 및 성분 (표시기준에 준함)	오미자추출분말 100%							
제조방법	○제조공정도 및 제조공정별 가공방법 참조							
원재료의 규격	구분	법적규격	자사규격					
	성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이며, 이취가 없어야 한다.	고유의 색택과 향미를 가지고 이며, 이취가 없어야 한다.					
	생물학적 항목	세균수: 100CFU/ml이하, 대장균군: 음성						
	화학적 항목	○화학적 규격 : 비소 1.5mg/kg이하, 중금속 50mg/kg이하, 보존료 파라옥시안지소산으로 1.5mg/kg이하						
제품용도 및 섭취방법	물리적 항목	이물 물질수	무량 - 42~48g					
	제품 자체의 고형물의 제외한 이물 물질수							
포장재질 및 포장방법	제품용도	- 건강기능 개별인증서 참조						
	섭취방법	- 오미자추출분말 100g, 300g, 400g, 1kg를 알루미늄 포장지에 넣고 밀봉한다.						
표시사항	포장재질	- 포장재질 : 내포장(PET/AL/PP), 외포장(종이/필름)						
	표시사항	○포장재 표시사항 그림 참조						
	표시사항	○영양성분표시대상 (해당시 O) : 총수용량식품, 영양성분표시식품, 과자류중일부, 면류, 예토르트식품, 음료류						
	표시사항	○GMO 표시 (해당시 O) : 유전자변형물질 포함, 유전자변형물질 포함가능성 있음, 포함가능성 없음						
보관 및 유통상 주의사항	적사광선을 피하고, 서늘한 곳에 보관							
기타사항								

[제품설명서]

완 제 품 규 격 서

제품명/중량	오미자추출분말	식품유형	규격외 가공식품	생산공장	양산공장	작성부서	품질관리부 2016.8.26	결	작	성	검	토	승	인
오미자추출분말	규격외 가공식품	분말	적사광선을 피하고 서늘한 곳에 보관	제조일로부터 24개월	법적 규격항목	자가 규격항목	규격기준	분석의뢰	분석결과	적합여부	첨부문서			
					타르페소	불검출								
					중금속 (mg/kg)	500이하								
					비소 (mg/kg)	1.50이하								
					세균수	100 CFU이하 (ml당)								
					대장균군	음성								
고형분 함량(%)	90.0 ± 2.0	-												
이물	불검출	-												
용량	100g, 300g, 500g, 1kg	-												

[완제품 규격서]

원 재료 규 격 서

제품명/중량	오미자추출분말	식품유형	규격외 가공식품	생산공장	양산공장	작성부서	품질관리부 2016.8.26	결	작	성	검	토	승	인			
원재료	오미자	오미자열매	100.000%	국내산	규격외 가공식품	생선		법적 규격항목	자가 규격항목	규격기준	분석의뢰	분석결과	적합여부	첨부문서			
							광양산물량	0.05%이하	8.80이하	X					공급업체 사용성적서	적합	
							수은	0.50이하	1.0ppm이하							적합	
							비소	1.3ppm이하	1.0ppm이하							적합	
							해당불	성상	고유의 색택, 이물(이취)	고유의 색택, 이물(이취)		관능검사	적합				

[원재료 규격서]

포장재 규격서

제품명/중량	오미자추출분말	식품유형	규격의 기준식품	생산공장	생산공정	작성부서	작성일자	작성인	검토	승인	
포장재	포장재질	법적유형	원산지 및 공급업체	포장재 크기 및 형태	법적 규격항목	자가 규격항목	규격기준	분석의뢰	분석결과	적합여부	첨부서류
내포장지	PET/알루미늄/PP	관성수지	국산(이상산업)	파우치 100mm(가로)×170mm(세로)	납 및 카드뮴 중금속(납)과광안산염 중금속(납) 불용잔류물 불용잔류물 벤조피렌	공통 적용 항목에 준함	100 이하 1.0 이하 10 이하 30 이하 2이하 0.0이하	X	성적서로 대체	적합	
외박스	종이	가공지재	국산(우림 S&P)			공통 적용 항목에 준함					

자가 규격 항목	규격	검사방식	조건	시험및 검사방법	검사주기	비고
수량	거래명세표에 입고 수량(중량)표	전수검사	-	개수검사	일고시마다	
이취	이취가 나지 않아야 함	샘플링검사	-	관능검사	일고시마다	
색상	한도전본(규격)에 준함	샘플링검사	-	육안검사	일고시마다	
이물	이물이 없어야함	샘플링검사	-	육안검사	일고시마다	
규격	한도전본(규격)에 준함	샘플링검사	-	계측검사	일고시마다	
인체상태 및 표기사항	건분비고 및 표기사항점검에 준함	샘플링검사	-	육안검사	일고시마다	
보관	적시왕선을 피하고	체크리스트	-	-	1회/일 이상	

[포장재 규격서]

제조공정별 가공방법

공정명/중량	오미자추출분말	식품유형	규격의 기준식품	생산공장	생산공정	작성부서	작성일자	작성인	검토	승인
공정도 순서	공정명	작업방법 및 조건				주요설비/기구용기	담당자			
1	원/부자재 검사	원/부자재가 규격에 맞게 적합한가 자체검사 및 시험성적서 등을 통해 확인한다.				저울, 당도계, 자 등	생산관리자			
2	입고 및 보관	규격에 적합한 원/부자재를 구획 및 지정된 보관 장소에 보관한다.				원/부자재 보관창고	생산관리자			
3	원료계량	각원료용 처방전에 따라 계량한다.				스텐삼 및 저울	생산관리자			
4	추출	계량된 원료용 조제탱크에 투입하여 90±5℃에서 8시간 가열한다.				추출탱크	생산관리자			
5	여과	200mesh필터, 하우징필터 여과				하우징필터/카트리지필터	생산관리자 품질관리자			
6	고온살균	95도이상 30초간 살균한다.				HTST	생산관리자			
7	건조	동결건조하여 분말화한다.				동결건조기	생산관리자			
8	균속성이물질	자석(10,000가우스)으로 균속성 이물질을 검출하여 제거한다.				균속검출기	생산관리자			
9	충진/밀봉	충진기로 이송된 분말을 지정된 용기에 정해진 용량만큼 충전하고 밀봉한다.				분말충진기	생산관리자			
10	외포장	포장이 불량 제품들은 지정된 골판지 상자에 넣고 테이핑 한다.				반자동 제팩기	생산관리자			
11	보관 및 출하	원재품창고 입고 및 보관/출하					생산관리자			

[제조공정별가공방법]

④ 연구 수행 결과의 의미 및 활용도

- 설정된 제조공정에 따라 건강기능식품 개별인정 이후 제조 가능

(라) 인체적용시험 준비: 적응증 및 제형 결정

① 연구수행의 목적

- 오미자 및 상엽 추출물의 인체적용 시험을 위한 추출물, 제형의 결정

② 연구수행의 방법

- *in vitro* 및 *in vivo* 결과 분석: 1, 2차년도 주관 및 협동의 연구결과 분석
- 적응증 및 제형 수요 조사: 2016년 6월 제4회 항노화 엑스포에서 50대 이상 남녀 60명 대상 설문조사 실시



[제4회 부산국제항노화 엑스포]

조사기관	㈜바이오포트코리아
------	-----------

건강기능식품 신규개발 제품 소비자 수요조사

안녕하십니까?
우선 바쁘신 와중에 귀한 시간을 내주셔서 대단히 감사합니다.
저희 ㈜바이오포트코리아는 급변하는 시장니즈에 맞춰 우수한 건강기능식품의 개발을 위하여 노력하고 있습니다.

본 설문조사는 2017년 개발 될 신규 건강기능식품의 소비자 니즈 조사를 목적으로 진행되고 있습니다. 본 조사의 응답에는 약 5분 정도가 소요되오니 응답자 여러분의 적극적인 관심과 충실한 설문응답을 부탁드립니다.

귀하께서 응답하신 내용은 철저히 비밀이 보장되며 통계법 제13조 및 제14조에 의거하여 통계적인 목적으로만 집계됩니다. 바쁘시더라도 잠시만 시간을 내주셔서 귀중한 의견을 주시면 대단히 감사하겠습니다.

2016년 6월

㈜바이오포트코리아

- 설문응답방법 : e-mail 또는 팩스, 우편 제출
 - 설문관련문의 : 051-722-5895 ㈜바이오포트코리아/기업부설연구소 팀장 이기원
 - 설문 회 신 : e-mail kwlee@bioportkorea.com / fax 051-722-5896
- 우편주소 부산시 기장군 일광면 황계길7 해양생물산업육성센터 207호

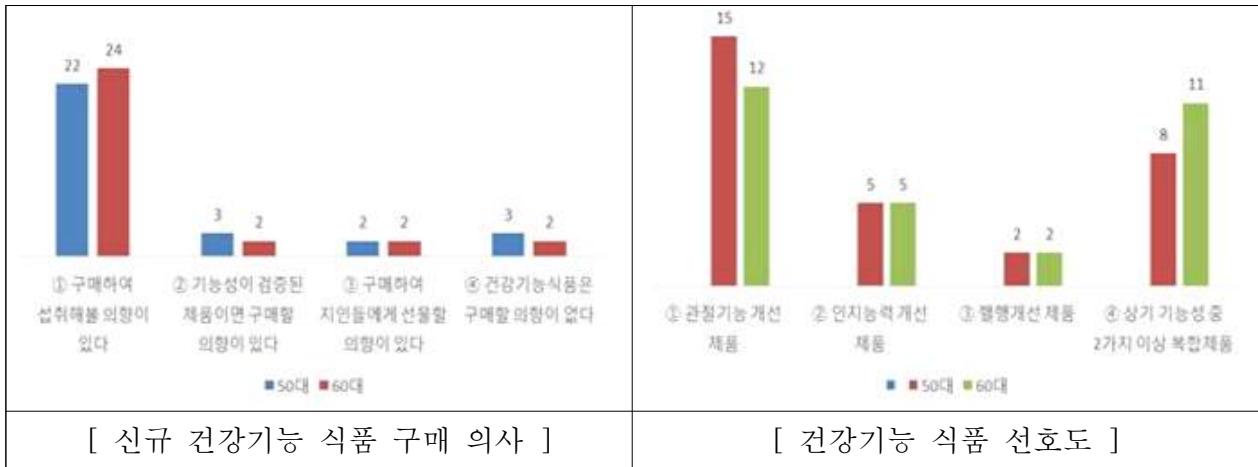
[건강기능식품 신규개발 소비자 수요조사]

③ 연구수행의 결과

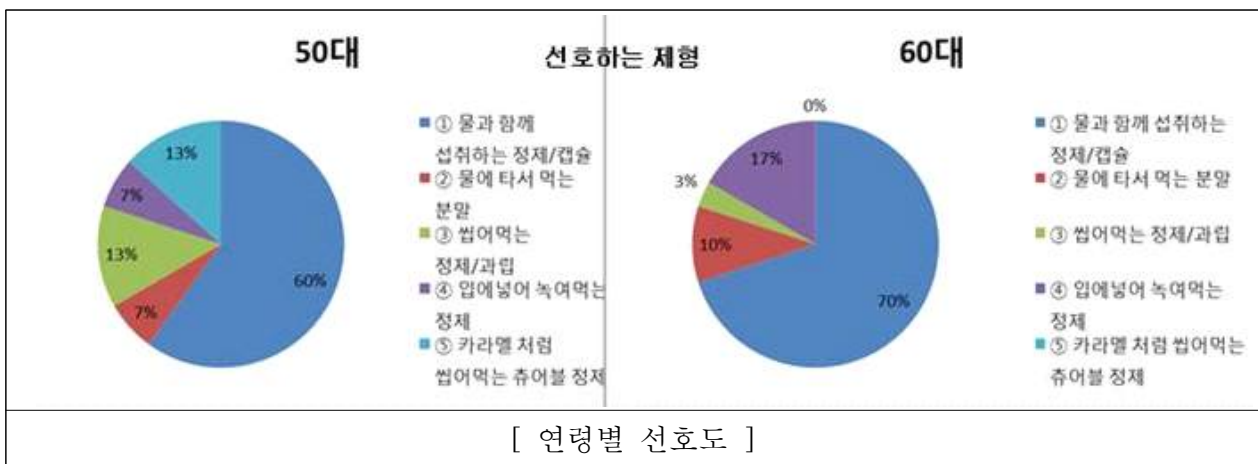
- *in vitro* , *in vivo* 결과 분석: 오미자 및 상엽의 각각의 단독 물질을 사용하였을 시 효과는 있었으나 복합물로 하였을 때 관절염 부분에서는 시너지 효과가 없음
- 복합물의 시너지 효과가 없을 경우 건강기능식품 복합물로 개별인정 불가능, 따라서 효능이 좋은 오미자 추출물 단독으로 결정
- 적응증 및 제형 수요조사 일시: 2016년6월 17일 ~ 19일
- 수요 조사 참여 행사명: 제4회 부산국제 항노화엑스포
- 수행 내용: 과제 성과 전시 및 건강기능식품 설문조사 실시 동시 수행
- 수요조사 대상: 50 ~ 60대 남녀 60명을 대상으로 설문조사를 실시
- 수요조사 결과: 관절 및 복합기능성 신규 건강기능식품에 대한 구매의사가 높았음
- 적정 가격대: 7~10만원대의 브랜드명이 있는 제품에 대한 구매의사가 높았음
- 섭취 방법 관련: 50~60대 모두 물과 함께 섭취할 수 있는 정제 및 캡슐 제품에 대한 선호도가 압도적으로 높았음

④ 수요 조사 결과 통계표

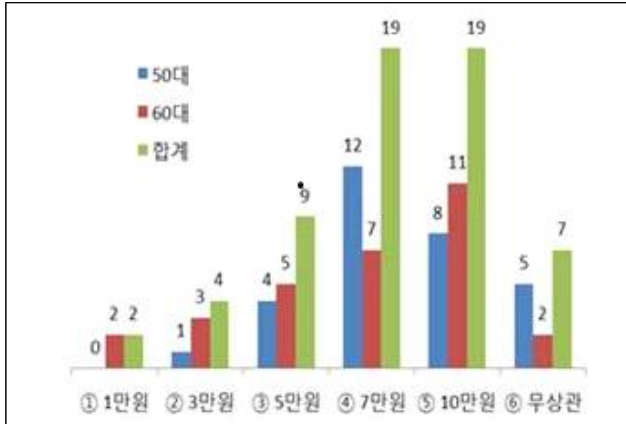
- 신규 건강기능 식품 구매 의사 및 건강기능 식품 선호도 설문 조사 결과



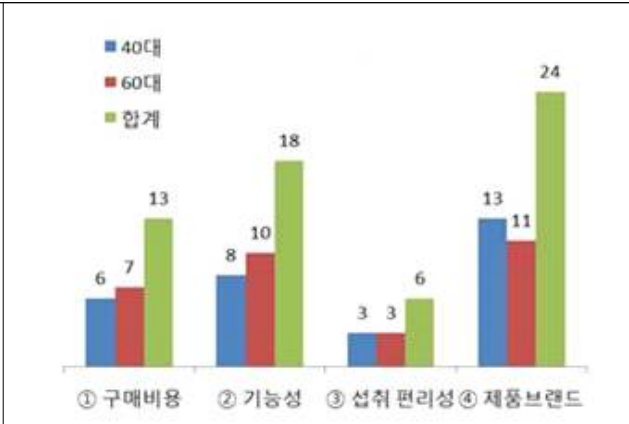
- 제형별 선호도 조사 결과



- 건강기능 식품 구매에 따른 적정 가격 선호도 및 고려 사항 조사 결과



[건강기능 식품 적정 가격 선호도]



[건강기능 식품 구매시 고려 사항]

⑤ 결과 분석에 따른 결론

- 인체적용 시험 기능성 선정: *in vitro* 및 *in vivo* 실험 결과 및 수요조사의 결과를 바탕으로 오미자 단독의 캡슐 제형, 관절염으로 설정함

(6) 인체적용 시험 및 개별인정 관련 진행 관련

(가) 오미자 추출물의 인체적용시험 CRO 진행 경과 요약

과제기간	진행 현황	산출물	
1차년도 (2016.1.1. ~ 2016.11.27.)	2016.04	• 원료 표준화 검토	• 시험자 자료집 반영
	2016.05	• 안전성 평가	• 시험자 자료집 반영
	2016.06	• 기능성 자료 검토	• 시험자 자료집 반영
	2016.09	• Protocol 개발 • CRF 개발 • IRB 서류 작성	• Protocol, CRF, IRB 서류 확보
	2016.10.24	• IRB 승인	• IRB 승인서 확보
	2016.11.03	• 개시모임 진행	• 모니터링 계획서
2차년도 (2016.11.28. ~ 2017.11.27.)	2017.03.31.	• 식품의약품안전처 방문상담	• 회의록
	2017.04.14.	• 대상자 모집 전 최종 변경	• 변경승인서 확보
	2017.06.01.	• 모니터링 진행	• 모니터링 보고서
	2017.07.18.	• 모니터링 진행	• 모니터링 보고서
	2017.07.27	• 식품의약품안전처 방문상담	• 회의록
	2017.09.20.	• 연구종료보고서 작성 후 제출	• 연구종료 승인서 확보

2017.10.08.	• 모니터링 보고서 작성	• 최종 모니터링 보고서
2017.10.25.	• 통계분석 실시	• 통계분석결과 보고서
2017.10.25.	• 임상시험결과 보고서 작성	• 임상시험결과 승인서 확보
2017.11.02	• 개별인정신청	• 개별인정신청 서류

연구계획심의의뢰서					 심의결과 통지서 우 49201 부산광역시 서구 대신공원로 26 ☎051-240-2572,2577 전송 : 051-231-2140					
연구 과제명	(국문) 오미자 추출물의 경구 섭취가 관절 및 연골 건강에 미치는 영향을 분석을 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험 (영문) Clinical study to analyze effects of Schisandra chinensis extract on articulation and cartilage : double-blind, randomized, placebo controlled trial				수신	의뢰기관	㈜박이오토크코리아			
연구책임자	성명	소속	직위	전공분야	교육이수증	연구책임자	소속	가정의학과	성명·직위	한성호 · 부교수
	한성호	가정의학과	부교수		유효함					
	내선번호	051-240-5293	핸드폰							
공동연구자	E-mail	handsomdr@hanmail.net	이력서	최근 이력 사항 확인						
	성명	소속	직위	전공분야	교육이수증					
원내 과제 담당자 (연구 간호사)	성명	소속	직위	전공분야	교육이수증					
	김혜진	임상시험센터	CRC		유효함					
	송진희	임상시험연구센터	연구간호사		유효함					
	김아람	임상시험연구센터	CRC		유효함					
	최지은	임상시험센터	CRC		유효함					
	성민지	임상시험센터	CRC		유효함					
	강남경	임상시험연구센터	CRC		유효함					
관리약사	성명	소속	직위	전공분야	교육이수증					
의뢰기기 관리자	성명	소속기관	전화번호	핸드폰	E-mail					
CRA(Monitor)	성명	소속기관	전화번호	핸드폰	E-mail					
의뢰기관 (Sponsor)	<input checked="" type="radio"/> 유 <input type="radio"/> 무 기관명	㈜박이오토크코리아			대표자	김성구				
	<input type="radio"/> 유 <input checked="" type="radio"/> 무 기관명	없음			대표자	없음				
연구과정요약 연구계획서 Version : 1.5 (오미자추출물_관절_인체적용시험계획서_20161024_ver.1.5.hwp) 연구계획서 체크리스트 연구대상자 설명문 및 동의서 Version : 1.2 (인체적용시험 참여_설명문및동의서_오미자추출물_관절및연골_ver.1.2_20161024.hwp) 연구자용 연구대상자 동의서 체크리스트 중재기록서 Version : 1.2 (중재기록서_오미자추출물_관절_ver.1.2_20160920.hwp) 연구대상자 보상 규약 및 보상에 관한 사항 Version : 1.0 (피해자+보상규약_오미자_관절_ver.1.0_20160921.hwp) 연구비 실행예산서 의약품의 개요						과제번호(IRB No.) DAUHIRB-16-201 연구 과제명 국문 오미자 추출물의 경구 섭취가 관절 및 연골 건강에 미치는 영향을 분석을 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용 시험 영문 Clinical study to analyze effects of Schisandra chinensis extract on articulation and cartilage : double-blind, randomized, placebo controlled trial 연구예정기간 IRB 승인일로부터 ~ 2017년 04월 30일 연구승인유효기간 2017년 04월 30일 심의 구분 ●신속심의 ○정규심의 심의 일자 2016년 10월 24일 지속심의주기 ○3개월 ○6개월 ○1년 ●기타 심의결과 ●승인 ○시정승인 ○보완 후 신속심의 ○보완 후 정기심의 ○반려 ○승인된 임상시험의 중지 또는 보류 심의 의견 시정승인답변 내용을 확인 후 승인합니다. 제출서류 목록 연구계획서요약 연구계획서 Version : 1.5 (오미자추출물_관절_인체적용시험계획서_20161024_ver.1.5.hwp) 연구계획서 체크리스트 연구대상자 설명문 및 동의서 Version : 1.2 (인체적용시험 참여_설명문및동의서_오미자추출물_관절및연골_ver.1.2_20161024.hwp) 연구자용 연구대상자 동의서 체크리스트 중재기록서 Version : 1.2 (중재기록서_오미자추출물_관절_ver.1.2_20160920.hwp) 연구대상자 보상 규약 및 보상에 관한 사항 Version : 1.0 (피해자+보상규약_오미자_관절_ver.1.0_20160921.hwp) 연구비 실행예산서 의약품의 개요				
[IRB 심의 신청서]						[IRB 심의 결과 통지서]				

(나) 인체 시험 초기 자료

인체시험의 개요	
시험제목	오미자(<i>Schisandra chinensis</i>) 추출물의 경구 섭취가 관절 및 연골 건강에 미치는 영향 분석을 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험
시험목적	건강기능식품 기능성원료로서 오미자 추출물의 인체 섭취 시 안전성 및 관절 및 연골 건강에 대한 기능성을 검증하고자 함.
구분	<input checked="" type="checkbox"/> Local <input type="checkbox"/> Multi (<input type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외)

연구책임자	동아대학교병원 가정의학과 부교수 한성호			
시험 종류	건강기능식품 기능성원료 / 국내(MFDS) 허가용			
의뢰자	(주)바이오포트코리아			
시험기간	IRB 승인일로부터 ~ 2017년 04월 30일까지			
인체시험의 설계				
시험디자인	무작위 배정, 이중눈가림, 위약 대조군 비교, 단일기관 인체시험			
시험용 식품	시험식품	오미자 추출물	대조식품	진분
	제형	경질 캡슐		
	복용량	1,000 mg/일 (1일 2회, 각 500 mg), 총 8주		
시험대상자	6개월 이상 무릎관절통증이 있는 만 40세~75세의 성인 남녀로서 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자			
연구대상자 수	총 70명 (시험군; 35명, 대조군; 35명)			
유효성 평가변수	1차	• VAS (Visual Analogue Scale)		
	2차	<ul style="list-style-type: none"> • WOMAC (Western Ontario and Mcmasters Universities) • 항염증 지표 <ul style="list-style-type: none"> -염증성 cytokine 생성 수준(TNF-α, IL-2,) -CRP 농도 -ESR • 관절 조직 및 대사물질 관련 지표 <ul style="list-style-type: none"> -Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) 		
안전성 평가변수	1. 이상반응 2. 생체징후 및 문진에 의한 이상소견 3. 혈액학적/혈액화학적 검사치의 비정상적 변화			

(다) 인체적용 시험 결과

① 연구 수행의 목적

- 오미자 추출물의 관절염 효능 평가를 위한 인체적용 시험 실시

② 연구수행 방법

- 인체적용시험 ICH-GCP 기준에 따라 60 case 이상의 인체적용시험을 통해 대사성질환에 대한 기능성 및 안전성 검증 : MFDS 인정기관에서 인체적용시험을 실시하며 피험자 약 60명을 대상으로 20% 미만의 탈락율과 유효지표 2건 확보를 목표로 성공적인 인체적용시험 실시 → 2017년 7월 31일 인체적용시험 완료

③ 연구 수행 결과

(라) 오미자 추출물의 인체적용시험 시험 내용 및 주요 변경 사항

시험제목	오미자(<i>Schisandra chinensis</i>) 추출물의 경구 섭취가 관절 및 연골 건강에 미치는 영향 분석을 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험			
시험디자인	무작위 배정, 이중눈가림, 위약 대조군 비교, 단일기관 인체시험			
실시기관	동아대학교병원 임상시험연구센터			
시험책임자	동아대학교병원 가정의학과 교수 한성호			
시험의뢰자	(주)바이오포트코리아			
시험용 식품	시험식품	오미자 추출물	대조식품	전분
	제형	250 mg 경질 캡슐		
	복용량	1,000 mg/일 (1일 2회, 각 500 mg), 총 8주		
시험대상자	6개월 이상 무릎관절통증이 있는 만 40세~75세의 성인 남녀로서 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자			
시험대상자 수	총 70명 (시험군; 35명, 대조군; 35명)			
IRB 승인일	주요 변경 사항			
2016.10.24.	<ul style="list-style-type: none"> • 최초 승인 <ul style="list-style-type: none"> - 시험계획서 ver.1.5 / 2016.10.24. - 증례기록서 ver.1.2 / 2016.09.20. - 시험대상자 설명문 및 동의서 ver.1.2 / 2016.10.24. - 연구대상자 보상 규약 및 보상에 관한 사항 ver.1.0 / 2016.09.21. - 연구대상자 모집광고 문안 ver.1.1 / 2016.09.20. 			
2017.04.14.	<ul style="list-style-type: none"> • 연구기간 변경 • 임상실험실 검사항목 중 불필요한 검사항목 삭제 • 식품 사용 기간에 대한 문구 수정 • 임상연구비 실행예산서 변경 • 시험계획서 ver.1.5 → ver.1.6 / 2017.04.04. 			
2017.05.16	<ul style="list-style-type: none"> • 첫 시험대상자 서면동의일, 첫 시험대상자 등록일 			
2017.06.07.	<ul style="list-style-type: none"> • 연구진행보고서(지속심의) 승인 <ul style="list-style-type: none"> - 연구 예정 기간 연장 2016.10.24. ~ 2017.11.30 			
2017.06.22.	<ul style="list-style-type: none"> • 공동연구자 추가 • 대상자 제외기준 변경 			

	<ul style="list-style-type: none"> • 시험계획서 ver.1.6 → ver.1.7 / 2017.05.11.
2017.07.31.	<ul style="list-style-type: none"> • 마지막 대상자 방문 및 시험 종료일 • 총 66명 시험 완료 (시험군 : 33명, 대조군 : 33명, 중도탈락 : 4명)
2017.08.10.	<ul style="list-style-type: none"> • 유효성 평가변수 변경 (일부 삭제) • 시험계획서 ver.1.7 → ver.1.8 / 2017.08.07. • 증례기록서 ver.1.2 → ver.1.3 / 2017.08.07.
2017.09.20	<ul style="list-style-type: none"> • 연구종료보고서 승인
2017.10.25.	<ul style="list-style-type: none"> • 연구결과보고서 승인
2017.11.02.	<ul style="list-style-type: none"> • 식품의약품안전처 개별인정신청

(마) 식품의약품안전처 개별인정 신청 완료

① 연구 수행의 목적

- 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인정 취득을 위함

② 연구수행 방법

- 오미자 추출물의 관절염 개선의 개별인정 신청을 위한 건강기능식품 기능성원료 인정 허가에 필요한 서류작성, 신청 → 2017년 11월 2일 식품의약품안전처 건강기능식품 기능성원료 인정 신청서 접수 완료

<p style="text-align: center;"><i>Confidential</i> <u>㈜바이오포트코리아</u></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>건강기능식품 기능성원료 개별인정 신청자료</p> </div> <p style="text-align: center;">○ 신청원료 : 오미자 추출물 ○ 기 능 성 : 관절 및 연골 건강에 도움</p> <p style="text-align: center;">Ver. 1.0 2017. 10</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; font-size: small;"> <p>본 자료에 포함되어 있는 모든 정보는 관련 법규에서 정하거나 당사가 인정하는 경우를 제외하고는 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">Confidential</p> </div> <p style="text-align: center;">(주)바이오포트코리아</p>	
[건강기능식품 개별인정 신청서]	[건강기능식품 기능성 원료 신청서]

③ 개별인정 신청을 위한 추가 서류 리스트

- 인체적용시험 자료
- 건강기능식품 기능성 원료 신청서
- 기능성 원료 인정을 위한 제출자료
- 오미자 검사서 및 원산지 증명서
- 지표성분 관련 논문: 오미자 추출물의 지표 물질인 lignan에 대한 정량 분석 결과 자료 (Quantitative Determination of Lignan)
- 식품의약품안전처 생약연구과 오미자 관련 자료
- 오미자 추출물 제조지시서: 오미자 추출물 제조지시서 및 장비사용확인서
- 오미자 추출물 분석보고서: 오미자 추출액, 농축액 분석 보고서
- 오미자 추출물 영양성분: 공인시험성적서
- 오미자 추출물 지표성분: 공인시험성적서
- 오미자 추출물 지표성분 시험방법/대한민국약전 의약품 각 조 제2부 오미자
- 오미자 추출물 유해물질(중금속, 이산화황): 공인시험성적서
- 오미자 추출물 유해물질(잔류농약): 공인시험성적서
- 오미자 추출물 유해물질(미생물): 공인시험성적서
- 오미자 추출물 유해물질(곰팡이독소): 공인시험성적서
- 섭취사례-1: 동의보감에서의 오미자의 효능에 대한 문헌 고찰
- 섭취사례-2: 동의보감(국역증보) 중 섭취 사례
- 섭취사례-3: 조선약용식물지1 중 섭취 사례
- 섭취사례-4: 조선약용식물지3 중 섭취사례
- 안전성: 오미자 인체적용시험 관련 논문(운동수행력 및 HSP70에 미치는 영향)
- 기능성 신청원료 관련 근거 논문-1: Cytoprotective Effects of Schisandrin A against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Stress in SW1353 Human Chondrocytes
- 기능성 신청원료 관련 근거 논문-2: Schisandrae Fructus Inhibits IL-1b-Induced Matrix Metallprpteinases and Inflammatory Mediators Production in SW1353 Human Chondrocytes by Suppressing NF-kB and MAPK Activation
- 기능성 신청원료 관련 근거 논문-3: Schisndrae Fructus Ethanol Extract Ameliorates Inflammatory Responses and Articular Cartilage Damage in Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats
- 기능성 관련 근거 참고자료: Aqueous Extract of *Schizandra chinensis* Suppresses Dextran Sulfate Sodium induced Generation of IL-8 and ROS in the Colonic Epithelial Cell Line HT-29
- 기능성 관련 근거 참고자료-1: 오미자의 이화학적 특성 및 항산화 활성
- 기능성 관련 근거 참고자료-2: 추출조건에 따른 오미자 추출물의 항산화 및 혈당 강하에 관한 연구
- 기능성 관련 근거 참고자료-3: 오미자 추출물의 항산화 효과

- 기능성 관련 근거 참고자료-4: *Schisandra chinensis* Inhibits Oxidative DNA Damage and Lipid Peroxidation Via Antioxidant Activity
- 기능성 관련 근거 참고자료-5: 오미자(*Schisandra chinensis* Baillon) 추출물의 생리활성
- 기능성 관련 근거 참고자료-6: 다양한 용매에 의해 추출된 오미자의 항산화능과 항유전독성 효과
- 기능성 관련 근거 참고자료-7: *Schisandra chinensis* Alkaloids Inhibit Lipopolysaccharide- Induced Inflammatory Responses in BV2 Microglial Cells
- 기능성 관련 근거 참고자료-8: Activity-guided Screening of Anti-inflammatory Compounds from the Hexane Extracts of *Schisandra chinensis* Fruit
- 기능성 시놉시스: 시험관시험 분석 결과 요약본-1, 및 -2, 동물시험 분석 결과 요약본 및 인체적용시험 분석 결과 요약본
- 이하 비공개 분야 자료: 첨부 별책 및 별첨 참조

(바) 오미자 추출물의 개별인정 획득을 위한 향후 계획

구분	진행 현황	점검 사항
개별인정 신청 (2017.11.02.)	<ul style="list-style-type: none"> • 통상 120일 검토기간 소요 - working day기준이므로 실제 6개월 소요 	<ul style="list-style-type: none"> • 2018년 5월에 개별인정 획득 가능.
신청자료 1차 보완	<ul style="list-style-type: none"> • 식품의약품안전처 평가원의 영양기능연구팀에서 자체 평가 후 1차 보완사항 요구 - 통상 60일 소요 	<ul style="list-style-type: none"> • 식품의약품안전처 주무부서와의 논의를 통해 12월말~1월초에 보완사항 통보 예정.
	<ul style="list-style-type: none"> • 기업/대학/CRO/전문가 자문을 통한 보완사항 제출. - 별도의 검토기간 없음. 	<ul style="list-style-type: none"> • 식품의약품안전처와 논의해서 이견이 없을시 심의위원회 상정 가능 • 추가자료 요구시 2차 보완 요구 됨.
2차 보완	<ul style="list-style-type: none"> • 2차 보완자료 제출 - 별도의 검토기간 없음. 	<ul style="list-style-type: none"> • 보완사항 확인 후 심의위원회 상정.
건강기능식품 심의위원회 개최	<ul style="list-style-type: none"> • 10명 내외의 영양기능연구팀과 20명 내외에 심의위원으로 구성 • 원료 인정 최종 검토 	<ul style="list-style-type: none"> • 심의위원회에서 보완사항이 발생할 경우 6~12개월 기간 소요.
개별인정 획득	<ul style="list-style-type: none"> • 원료인정 시 식품의약품안전처 내부 결재 후 업체 통보 예정. 	<ul style="list-style-type: none"> • 원료인정에 따른 제품인정 준비.

(7) 시제품 제작 관련

① 관절염 예방 및 치료를 위한 시제품의 제작 완료

- 인체적용 시험의 완료에 따른 식품의약품안전처의 개별 인정 획득과 동시에 사업화를 위한

제품 판매를 위한 준비의 완료

제품명 : 관절엔5미
원료명 및 함량 : 오미자 주정 추출물 (식품의약품안전처 개별인증번호 제00000-00호 국내산), 00.00
섭취량 및 섭취방법 : 1일2회, 매일 아침 식후 30분 저녁 식후 30분에 각각 500mg (250mg X 2캡슐씩) 복용하십시오.
섭취 시 주의사항
 기침이나 발진 등의 초기 증상일 때, 몸에 열이 있는 사람 등은 복용을 피하십시오.
보관시 주의사항 : 뚜껑을 잘 닫은 후 직사광선을 피하고 실온에서 유통보관하시고, 개봉 또는 섭취 시 포장재에 의해 상처를 입을 수 있으니 주의하시기 바랍니다.
영양 및 기능정보
 인체적용시험 결과를 토대로 식품의약품안전처가 승인한 [오미자 주정추출물]
 * 관절기능개선에 도움을 줄 수 있음

부작용 추정사례 신고는 국번없이 1577-2688
 본제품은 엄격한 품질관리를 통해 제조되었으며 공정거래위원회 고시 소비자 분쟁 해결기준에 의거 교환 또는 환불 받으실 수 있습니다. 구입시 유통기한이 경과되었거나 변질 또는 오손된 제품은 구입처에서 교환 또는 환불하여 드립니다.

영양 및 기능정보 (1일 섭취량 4캡슐(1,000mg) 중 30일 분량)
 *1일 섭취량 당 함량 : 열량 3.78 kcal, 탄수화물 0.56g(0%), 단백질 0.12g(0%), 지방 0g(0%), 나트륨 0.48mg(0%), 위민드린 5.01mg *1 캡슐 당 함량 1.25mg(0.125%)에 대한 비율임

제조번호 : 0000000000
 유통기한 : 0000. 00. 00 까지

8 809184 804556

[시제품 : 관절엔5미]

② 기타 시제품 생산(오미자를 통한 분말, 엑기스, 에이드류 및 건강기능식품)

- 오미자 과립, 오미자 환, 오미자 캡슐, 오미자 에이드 시제품 생산

오미자 에이드

오미자 에이드 파우치

오미자 과립

오미자 환

오미자 캡슐

③ 시제품 생산에 따른 사업화 준비

- 시제품 제형 적성 보고서 작성
 - 시제품 생산에 대한 제조방법, 공정도, 봉해시험, 입도시험, 제제균일성 시험 보고서 작성
 - * 첨부 파일: 제형적성 보고서
- 제품시장 진입 전략 보고서 작성
 - 3차년도 과제 종료 및 개별인정 획득 후 노인성 질환(관절 건강기능식품) 제품 판매를 위한 제품 시장 진입전략 보고서 작성
 - * 첨부 파일: 제품 시장 진입 전략 보고서
- 기존제품 효과 비교 보고서
 - 시중에 판매 되고 있는 건강기능식품 3종 구입, 오미자 추출물과 효능을 비교 후 보고서 작성
 - * 첨부 파일: 기존 제품 효과 비교 보고서
- 오미자 추출 조건 확립 및 기준규격 확립 실험
 - 오미자 추출물의 pilot scale 추출 조건 확립(10회 추출) 및 기준 규격 확립(10회 실시) 보고서 작성
 - * 첨부 파일: 오미자 추출 및 기준 규격 확립 실험 보고서

(8) 홍보 및 기타 활용 실적

(가) 전시회 참가

① 제4회 부산국제 향노화 엑스포

- 일정: 2016년 6월 17일(금)~19일(일)
- 장소: 부산시 해운대구 BEXCO, 제1전시장 및 회의실
- 전시 품목: 제3협동기관 (주)바이오포트코리아의 제품(아로니아, 블루베리 등 선물 세트, 파우치 음료 5종) 및 오미자 효능 관련 연구 결과물 전시 포스터(제1세부, 제1및 2 협동 기관의 연구 결과물)

② 제5회 부산국제 향노화 엑스포

- 일정: 2017년 6월 29일(목)~7월 1일(토)
- 장소: 부산시 해운대구 BEXCO, 제1전시장
- 전시 품목: 오미자 추출물의 관절염 개선 시제품 홍보 전시 및 제품 소개

③ 양산 향노화 바이오산업 포럼

- 일정: 2017년 11월 30일(목)
- 장소: 양산시 미래디자인융합센터
- 전시 품목: 오미자 추출물의 관절염 개선 시제품 홍보 전시 및 제품 소개

④ 경남 향노화 산업박람회

- 일정: 2017년 11월 24(목)~26일(일)
- 장소: 창원컨벤션센터
- 전시 품목: 오미자 추출물의 관절염 개선 시제품 홍보 전시 및 제품 소개



제4회 부산국제 항노화 엑스포

제5회 부산국제 항노화 엑스포



양산 항노화 바이오산업 포럼

경남 항노화 산업박람회

[전시회 홍보 증빙 자료]

(나) 워크숍 개최

- 목적: 연구 결과의 교류, 최신 과제 관련 정보 습득 및 오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략의 순차적임 수립을 위한 목적으로 총 6회 실시하였으며, 간단한 수행 내용은 다음과 같음

① 제1차 워크숍

- 주제: 오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략
- 일자: 2015년 1월 6일 화요일
- 장소: 동의대학교 한의과대학 세미나실
- 주최: 농림축산식품부, 농림수산식품기술기획평가원
- 주관: 동의대학교 항노화연구소
- 제1주제: 오미자를 이용한 항노화 산업화 전략/최영현 교수(동의대학교 한의과대학)
- 제2주제: 천연물을 이용한 건강기능식품 산업화전략/최지명 이사((주)케이제이파마텍글로벌리서치)

- 종합 토론: 과제 수행에 따른 참여기관별 역할 분담 및 성공적 수행 도출 방안 모색

② 제2차 워크숍

- 주제: 오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략
- 일자: 2015년 6월 12일 금요일
- 장소: 한국한의학연구원 한의기술표준센터 대회의실
- 주최: 농림축산식품부, 농림수산물기술기획평가원
- 주관: 동의대학교 항노화연구소
- 제1주제: 제1세부 기관(동의대학교) 연구 성과 발표/정진우 연구교수(동의대학교 항노화연구소)
- 제2주제: 제1협동 기관(부산대학교) 연구 성과 발표/최영환 교수(부산대학교 생명자원대학)
- 제3주제: 제2협동 기관(한국한의학연구원) 연구 성과 발표/김동선 박사(한국한의학연구원)
- 제4주제: 제3협동 기관(주)바이오포트코리아) 연구 성과 발표/이기원 팀장(주)바이오포트코리아)
- 제5주제: 개별인정 정책변화와 그에 따른 성공적 과제 수행 방안/최지명 이사(주)케이제이파마텍글로벌리서치)
- 종합 토론: 과제 수행에 따른 중간 연구 결과 발표 및 개별인정 관련 정책 변화에 대한 대응 방안 논의

③ 제3차 워크숍

- 주제: 오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략
- 일자: 2016년 2월 24일 화요일
- 장소: 부산대학교 생명자원대학 세미나실
- 주최: 농림축산식품부, 농림수산물기술기획평가원
- 주관: 동의대학교 항노화연구소
- 제1주제: 제1세부 기관(동의대학교) 연구 성과 발표/최영현 교수(동의대학교 한의과대학)
- 제2주제: 제1협동 기관(부산대학교) 연구 성과 발표/최영환 교수(부산대학교)
- 제3주제: 제2협동 기관(한국한의학연구원) 연구 성과 발표/김동선 박사(한국한의학연구원)
- 제4주제: 제3협동 기관(주)바이오포트코리아) 연구 성과 발표/이기원 팀장(주)바이오포트코리아)
- 제5주제: 2차년도 진도 평가 관리 방안/최지명 이사(주)케이제이파마텍글로벌리서치)
- 종합 토론: 과제 수행에 따른 1차년도 결과 평가 및 2차년도 연구내용 및 진도 관리 논의

④ 제4차 워크숍

- 주제: 오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략: 연구과제 진도관리(진도점검)
- 일자: 2016년 7월 20일 수요일
- 장소: (주)바이오포트코리아 세미나실

- 주최: 농림축산식품부, 농림수산물기술기획평가원
- 주관: 동의대학교 항노화연구소
- 제1주제: 제1세부 기관(동의대학교) 연구 성과 발표/정진우 연구교수(동의대학교 항노화연구소)
- 제2주제: 제1협동 기관(부산대학교) 연구 성과 발표/박선영 박사(부산대학교 BIT 융합기술연구소)
- 제3주제: 제2협동 기관(한국한의학연구원) 연구 성과 발표/김동선 박사(한국한의학연구원)
- 제4주제: 제3협동 기관(주바이오포트코리아) 연구 성과 발표/이기원 팀장(주바이오포트코리아)
- 종합 토론: 과제 수행에 따른 결과 평가 및 보완 사항에 대한 참여기관별 역할 분담과 성공적인 과제 수행을 위한 논의

⑤ 제5차 워크숍

- 주제: 오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략: 연구과제 진도관리(진도점검)
- 일자: 2017년 4월 18일 화요일
- 장소: 동의대학교 한의과대학 세미나실
- 주최: 농림축산식품부, 농림수산물기술기획평가원
- 주관: 동의대학교 항노화연구소
- 제1주제: 제1세부 기관(동의대학교) 연구 진행 사항 발표/정진우 연구교수(동의대학교 항노화연구소)
- 제2주제: 제3협동 기관(주바이오포트코리아) 연구 진행 사항 발표/이기원 팀장(주바이오포트코리아)
- 제3주제: CRO 연구 진행 사항 발표/최지명 이사(주케이제이파마텍글로벌리서치)
- 종합 토론: 개별인정 항목 선정 및 인체적용시험 수행에 따른 개별인정 취득 전략 토의

⑥ 제6차 워크숍

- 주제: 오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략: 연구과제 정보 교류 세미나
- 일자: 2017년 11월 15일 수요일
- 장소: 동의대학교 한의과대학 세미나실
- 주최: 농림축산식품부, 농림수산물기술기획평가원
- 주관: 동의대학교 항노화연구소
- 제1주제: Meroterpinoid-rich fraction from *Sargassum serratifolium* attenuates collagen-induced arthritis through inhibition of NF- κ B signaling pathway/김형락 교수(부경대학교 식품영양학과)
- 제2주제: Effect of *Trichinella spiralis* infection on muscle strength and patterns of cytokine secretion/차희재 교수(고신대학교 의과대학과)
- 종합 토론: 개별인정 수행과 연관된 선행 연구 결과의 참조에 따른 연구 영역의 확대 및 최근 연구 정보 토론

3-6. 사업화 성과 및 매출실적

(1) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-	
			향후 3년간 매출	13 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	-	
			향후 3년간 매출	64 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	-	
			향후 3년간 매출	국내 : 5.2% 국외 : 0.002%	
		관련제품	개발후 현재까지	-	
			향후 3년간 매출	국내 : 2.68% 국외 : 0.002%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			-
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			100위

(2) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3년		
	소요예산(백만원)		700백만원		
	예상 매출규모 (억원)	현재까지		3년후	5년후
		-		13억원	35억원
		시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후
	국내		-	5.2%	17.5%
	국외		-	0.002%	0.01%
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		노인성 질환 개선을 위한 관절 및 근골격계 복합 기능성을 가진 상품화			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		-	-	-
	수 출		-	0.3억원	1.5억원

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

4-1. 목표달성도 측면

(1) 연구 개발 계획서 제시 평가의 착안점 및 기준

(가) 평가의 항목, 지표 및 평가 기준

평가항목	정량적 지표	평가기준		
		1차년도	2차년도	3차년도
오미자 소재 선정	▶ <i>In vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 모델계 결과에 준한 제품화 추진 오미자 소재의 확보	오미자 소재의 확보		
오미자의 기능성 평가	▶ 퇴행성 관절염 개선 연구 결과 도출	SCI 급 논문 투고	특허 및 논문 출원	특허 및 논문 출원
	▶ 인지기능 개선 연구 결과 도출	SCI 급 논문 투고	특허 및 논문 출원	특허 및 논문 출원
	▶ 혈행 개선 연구 결과 도출	SCI 급 논문 투고	특허 및 논문 출원	특허 및 논문 출원
제조공정확립	▶ (1차) lab scale ▶ (2차) pilot scale ▶ (2차) 대량생산공정개발보고서 : 5 lot에서의 제조공정, 지표함량변화, 공인시험성적서	lab scale 생산보고서	pilot scale, 대량생산 보고서 1건	
기준규격확립	▶ (1차) : 공인시험성적서(1품목 2회 이상) ▶ (2차) 공인시험성적서(5품목 5회)	lab scale 기준규격 제시	대량생산 기준규격 제시	
임상시험	▶ (2차) 시험제품/대조제품의 구별이 적게 제조(맛, 색, 향) ▶ (3차) 탈락율 20% 미만, 피험자 모집율 80% 이상, 유효 biomarker 2개 이상		임상시험용 시험제품/대조제품	임상시험 결과보고서 1건
건기식 기능성원료 인증	▶ MFDS 기능성원료 인증서			인증서 1건
제품화 3건	▶ 시제품 3품목(단일, 복합물)			시제품 3품목

(나) 제품화 관련 년차별 세부 평가 항목

① 1차년도

- 제조 공정 확립(lab scale) : 추출조건(용매, 온도, 시간), 수율, 여과조건, 분말화조건 등이 포함된 보고서 및 공인시험성적서(2 lot 이상; lot별 영양분석, 잔류농약, 미생물, 중금속, 단계별 지표 함량)

② 2차년도

- 기준규격확립: 식품공전, 건강기능식품공전, 식품첨가물공전의 규격에 부합하는 성상(색, 형태, 물성 등) 결정 및 공인시험성적서(5 lot; lot별 영양분석, 잔류농약, 미생물, 중금속, 단계별 지표함량)
- 임상시험용 제품 생산: GMP시설에서 생산, 시험제품과 대조제품의 구별을 최소화(맛,

색, 향)

③ 3차년도

- 임상시험완료 및 결과보고서 1건: 탈락율 20% 미만, 피험자 모집율 80%이상, 심각한 이상증상 없이 인체시험 기간 내에 시험완료
- 오미자 추출물의 건강기능식품 기능성소재 인증 : 식약청 건강기능식품 기능성 원료 인증서 1건
- 제품화 3건 : 단일물질 또는 복합물질로 다양한 제형의 제품화 및 유통기한설정(식품의약품안전처(MFDA)의 식품 유통기한 설정실험 가이드라인)

(다) 년차별 세부 평가 항목(년차별 100% 기준)

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2014	○ 오미자 추출물의 세포 독성 자료 근거 최적 오미자 소재 도출	10%	○ 각 추출물의 독성 및 생리활성 등급 설정 근거에 의한 1종 이상 소재 도출
		○ 도출 소재의 연골세포주에서 퇴행성 관절염 억제능 검증	10%	○ 도출소재의 퇴행성 관절염 억제 효능 및 분자 기전 동정
		○ Primary neuronal 및 neuroblastoma 세포 신경 보호능	10%	○ 세포 보호 기작 및 그 분자적 기전 확립
		○ 동물 모델을 이용하여 흡수율 및 안정성 확립	10%	○ 동물 모델 혈장 및 뇌에서 오미자 생체 흡수율 및 안정성 확립 여부
		○ 도출소재의 in vitro 혈전모델에서의 효능평가	10%	○ 도출소재의 혈행 개선 억제 효능 및 분자 기전 동정
		○ Lab scale 제조공정확립	30%	○ 추출조건, 수율, 여과조건, 분말화조건 등이 포함된 보고서 1건, 공인시험성적서(2 lot; lot별 영양분석, 잔류농약, 미생물, 중금속, 단계별 지표함량)
		○ 지표물질안정성	20%	○ 열, 빛, 산염기, 습도 등의 다양한 상태에서의 지표물질 특성/안정성시험실시
2차 년도	2015	○ 도출 소재의 독성 평가	5%	○ 식품소재 독성 평가 가이드라인에 따른 독성평가
		○ 도출 소재의 primary 연골세포에서의 퇴행성 관절염 억제능 검증	5%	○ 도출소재의 연골세포 보호 효능 및 분자 기전 동정
		○ 도출 소재의 동물모델에서의 퇴행성 관절염 억제능 검증	5%	○ 도출소재의 퇴행성 관절염 억제 효능 및 분자 기전 동정
		○ 동물 모델에서의 인지기능개선 효능 검증	5%	○ 동물 모델에서 후보물질의 인지기능개선 효과 및 뇌세포 보호 효과 시험
		○ 질환 동물 모델이용 인지기능개선 효능 검증	5%	○ 기억력 감퇴 모델동물을 이용한 인지 기능 향상 효능 평가 우수성
		○ Arterio-Venous (A-V) Shunt 혈전 동물모델에서의 효능평가	5%	○ A-V shunt 모델에서의 효능결과 및 임상용량 결정 여부
		○ Carageenan 유도 혈전 동물모델에서의 효능평가	5%	○ Carageenan 유도 모델에서의 효능결과 및 임상용량 결정 여부

		○ EX-vivo 혈전억제 효능평가	5%	○ 임상혈액마커 및 분석조건 설정 여부
		○ 대량생산공정 확립	25%	○ 추출조건, 수율, 여과조건, 분말화조건 등이 포함된 보고서 1건 이상
		○ 기준규격 확립	15%	○ 공인시험성적서(5 lot; lot별 영양분석, 잔류농약, 미생물, 중금속, 단계별 지표합량) 완료 여부
		○ 임상시험용제품 생산	20%	○ 시험 제품과 대조 제품의 차이가 거의 없이 제조(맛, 향, 색, 섭취의 편의성) 여부
3차 년도	2016	○ 도출데이터 이용한 SCI급 논문 출간	10%	○ 제시 목표대비 SCI(E)급 논문 출간 여부
		○ 도출데이터 활용한 특허 출원 및 등록	10%	○ 제시 목표대비 특허 출원 및 등록 여부
		○ 오미자 소재를 이용한 심화연구	5%	○ 논문 투고 및 특허 출원을 위한 부가적인 심화연구의 질적 우수성
		○ 성공적 임상시험	30%	○ 탈락율 20% 미만, 피험자 모집율 80% 이상, 심각한 이상증상 없이 인체시험 기간 내에 시험 완료 여부
		○ 건기식 개별인증 획득	20%	○ MFDS 건강기능식품 기능성 원료인정서 채택 여부
		○ 제품화 3품목	25%	○ 시제품 3품목 제시 여부

(2) 연구목표 대비 성과 총괄

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I							논 문 평 균 IF
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	4	3	-	1	-	3	-	-	3	-	1	12	5		11	2	5	-	3	6
연구기간내 달성실적	10*	2	-	1	-	4	-	-	14	-	0	16	6	2.001	22	2	2	-	4	6
달성율	22.5	67		100		133			467		0	133	120		200	100	40		133	100

(%)

* PCT 1건 포함

(3) 연차별 연구 목표 달성도 및 주요 핵심 내용

(가) 1차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도(%)	주요 수행내용
○ 제1세부: 오미자 추출물 및 복합물을 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vitro</i> 모델계 효능 분석	▶ 오미자 및 복합물 소재의 세포 독성 자료 근거와 최적 오미자 및 복합물 소재 도출	100%	• 오미자 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 억제 효능 확인 및 복합물 후보로서 상업 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 효능 확인 완료
	▶ 도출 소재의 효능 평가를 위한 <i>in vitro</i> 실험 모델계 정립	100%	• 인체 관절세포를 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vitro</i> 실험 모델계 정립 완료에 따른 후보 물질의 효능 및 기전 연구 수행 완료
	▶ 도출 소재의 연골 세포에서 퇴행성 관절염 억제효능 검증	100%	• Primary culture 관절 세포에 대한 오미자 추출물의 관절염 억제 효능 평가 수행 완료
	▶ 동물 실험 조건 설정 및 기본 실험 모델 확립	100%	• MIA를 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vivo</i> 실험 모델계 정립 완료에 따른 후보 물질의 효능 및 관련 기전 연구 수행 완료
○ 제1협동: 오미자 추출물의 인지장애 개선 <i>in vitro</i> 작용기전 규명 및 지표성분의 분석 validation	▶ 개발된 효능성분의 순수분리 및 구조 동정 → 본 연구팀에서 밝힌 인지기능 효능성분의 다량 분리 및 효능성분의 구조 동정	100%	• 오미자 유효성분 추출을 위한 최적의 추출 조건 설정에 따른 유래 효능 성분의 순수분리 및 지표성분 도출 완료
	▶ 항산화, 신경세포 보호 및 항염증 등의 탐색 시스템 구축 → 다양한 신경세포를 이용한 항산화, 항염증 신경 세포 보호 등의 분자생물학적 기작 분석	100%	• 다양한 <i>in vitro</i> 세포 및 동물 모델에서 항산화 및 항염증 효능 평가와 연계된 인지기능 관련 분자적 기전 규명 완료
○ 제2협동: 오미자 소재의 <i>in vitro</i> 혈행 개선 효능 평가	▶ 오미자 복합물 소재 도출 및 추출물 최적화	100%	• 오미자 추출물 및 복합물의 혈전 억제 최적 기능성 소재 선별 완료
	▶ 오미자 복합물 후보 소재의 <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> 및 <i>in vivo</i> 혈전 억제 효능 검증	100%	• 오미자 복합물 후보소재 3종의 혈소판응집억제 효능 평가 및 최종 유용 복합물 2종 도출
	▶ 혈전동물모델을 이용한 오미자 복합물의 혈전억제 효능 검증	100%	• 오미자 복합물 2종의 혈전억제 상승효과 확인 및 최적 혼합비율

	증 및 최적비율 선정		선별
○ 제3협동: 오미자 및 오미자 복합물을 이용한 노인성질환 개선 기능성 식품 개발 타당성 도출 및 기반 조성	▶ Lab scale 제조공정 확립	100%	• Lab scale 제조공정 확립에 따른 근거 자료 도출
	▶ 오미자 소재의 문헌 및 특허조사	100%	• 특허조사 보고서 1건 및 제품개발전략보고서 1건 발간
	▶ 오미자 추출물의 세포독성 자료 근거에 의한 최적 오미자 소재 도출	100%	• 건강기능식품에 사용할 수 있는 주정 및 열수 추출법 이용하여 수행하였음
	▶ 지표물질의 안정성	100%	• 추출시 지표물질 함량의 균일성 확인 및 품질지표 설정을 위한 실험 완료

(나) 2차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도(%)	주요 수행내용
○ 제1세부: 오미자 추출물 및 복합물을 이용한 퇴행성 관절염 <i>in vivo</i> 모델계 효능 분석	▶ Primary culture된 연골세포 모델에서 퇴행성 관절염 억제 효능 및 <i>in vivo</i> 독성평가	100%	• 1차년도 성립된 <i>in vitro</i> 모델을 활용한 관절염 억제 효능 평가 심화 연구 수행 및 <i>in vivo</i> 동물 모델에서 후보물질의 독성평가 수행
	▶ 퇴행성 관절염 억제 효능 평가를 위한 <i>in vivo</i> 모델계 정립 및 효능 평가 수행	100%	• MIA에 의해 유도된 골관절염 <i>in vivo</i> 모델계에서 심화연구를 통한 후보물질의 효능 평가 및 기전 규명 완료
○ 제1협동: 오미자 추출물 및 복합물의 인지기능 효능 및 기전 분석	▶ 기능성 성분 분석	100%	• 추출물 또는 공정별 인지기능 성분 함량 분석 수행
	▶ 동물 모델에서 오미자 소재의 인지기능개선 효과	100%	• 동물 모델에서 인지기능개선 효과 및 뇌세포 보호 효과 관련 기전 규명과 기억력 감퇴 동물모델을 이용한 인지기능 향상 효능 평가 및 기전 규명
○ 제2협동: 동물모델에서의 오미자 소재 및 복합물의 혈행개선 효능 평가	▶ Arterio-Venous (A-V) shunt 혈전 동물모델에서의 효능 평가	100%	• A-V shunt 동물모델에서 혈전 억제 효능 검증 및 유효 용량 결정 완료
	▶ Carrageenan 유도 혈전 동물 모델에서의 효능평가 및 <i>ex vivo</i> 혈전억제 효능 평가	100%	• Carrageenan 및 <i>ex-vivo</i> 모델에서 후보 소재의 효능 평가 완료, 혈행 개선 관련 기전 규명 수행 완료
○ 제3협동: 오미자 및 오미자 복합물을 이용한 노인성질환 개선 기능성	▶ 대량생산공정 확립	100%	• 대량 추출조건, 수율, 분말화 조건 등 확립 완료
	▶ 기준규격확립	100%	• 대량 추출물의 영양성분, 잔류농

식품 개발 실효성 확보			약 등 공인시험 성적서 확보
	▶ 임상시험용 제품 생산	100%	• 임상시험용 시험식품과 대조식품 제조

(다) 3차년도

세부과제명	세부연구목표	달성도(%)	주요 수행내용
○ 제1세부: 오미자 추출물의 퇴행성 관절염 예방 및 치료 효능평가의 심화 연구	▶ 오미자 소재를 이용한 퇴행성 관절염 및 제1, 2협동 추가 효능 검증을 통한 건강기능식품개별인증을 위한 근거자료 확보	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 선행 연구 도출 결과 기반 논문 추가 출간과 특허 출원을 위한 심화연구 지속적 수행 • 오미자 추출물의 관절 건강 인체적용시험 및 식품의약품안전처 개별인증 신청을 위한 추가 보완 연구 및 행정적 지원 수행
○ 제3협동: 노인성 질환 개선 기능성식품 소재 임상시험 개별인증 획득 및 제형화와 제품화 개발	▶ 오미자 추출물을 이용한 노인성질환 개선 기능성식품 개별인증 추진 및 상품화	90%	<ul style="list-style-type: none"> • 시험물질 제조, 인체적용 시험용 protocol, IRB 승인, 임상시험 성공적 완료에 따른 개별인증 신청 및 시제품 생산 완료

4-2. 관련분야 기여도 측면

(1) 사업화 지표 측면

(가) 지식 재산권 취득 부분

- ① 특허 출원 현황: 본 과제의 수행 동안 총 1건의 PCT를 포함하여 10건의 특허를 출원하였으며, 이는 연구기간 내 달성 목표치인 4건을 초과 달성한 성과로서 본 과제의 성공적인 수행을 위한 완성도를 높이기 위한 객관적인 근거를 확보하였음
 - ② 특허 등록 현황: 본 과제의 수행 동안 총 2건의 특허가 등록 완료되었으며, 이는 연구기간 내 달성 목표치인 3건에 미비한 실적이지만, 특허 출원과 등록까지의 시간적 소요를 감안할 경우, 추후 추가적인 특허 등록이 완료될 것이라 생각(현재 오미자 관련 특허 2건 중반 대응 완료로 2월 이내 등록 가능할 것으로 예측)하며, 이를 위한 심화 연구가 필요에 따라 추가로 수행될 것임
- 비록 연구수행 기간 이내에 등록의 건수가 1건 미비하지만, 지식 재산권 취득 측면에서 우수한 성과를 충분히 확보하였다고 생각함
 - 오미자 추출물을 이용한 관절염 특허 분야의 독보적 지위 확보로 국내·외 관련 분야 기술 개발 현황 측면에서의 우수성을 확보함

(나) 기술 이전 실시

- ① 본 과제에서 획득된 결과물의 사업화를 위하여 주관 기관인 동의대학교와 제3협동 기관인 참여기업 (㈜바이오포트코리아) 사이의 기술이전계약서(양도용)를 체결하여 사업화 기

반 마련 확보

- ② 오미자 추출물을 포함하는 관절염의 예방 또는 개선용 조성물 및 그 제조방법에 대한 기술이전으로 인해 참여기업이 사업화 예정으로 관절염 개선 및 예방효과를 가지는 기능성 음료를 개발 및 노인성 질환에 대한 다양한 파생상품의 개발이 가능해 짐
- ③ 기능식품 및 일반 음료시장의 확대, 신규 거래처 창출 등을 통해 매출의 증대 효과와 오미자의 고부가가치 창출을 위한 사업화는 오미자 재배 지역산업 발전 및 지역경제 발전에 기여가 기대됨
- 따라서 본 과제의 수행에 따른 기술 이전 실적의 완료를 통한 사업화 기반 측면의 완성도는 우수하다고 생각함

(다) 제품화 성과

- ① 관절염 치료 및 예방을 위한 시제품 “관절엔⑤味” 출시: 오미자 추출물을 이용한 관절염 예방 및 치료를 위한 인체적용 시험의 완료에 따른 시제품의 출시와 식품의약품안전처의 개별 인증 획득과 동시에 성공적인 사업화를 위한 제품 판매를 위한 준비의 완료
- ② 오미자 추출물을 이용한 시제품 생산(오미자를 통한 분말, 엑기스, 에이드류 및 건강기능식품): 오미자 과립, 오미자 환, 오미자 캡슐, 오미자 에이드 시제품 생산 완료로 사업화 기반 확보
- ③ 제품 생산을 위한 제형 적성 보고서를 통해 다양한 시제품 제작을 하여 상품화 가능성을 확인함으로써 기능성 식품이외도 파생 상품들의 가능성을 확보함
- ④ 건강기능식품 소비자 분석을 통한 최적의 제형인 capsule과 액상 음료 제품을 응용하여 매출 증대 기대에 따른 참여기업과 대기업과 전략적 제휴를 통하여 매출의 극대화와 매출의 증대에 따른 고용 효과가 기대됨
- ⑤ 건강기능식품 홈쇼핑 시장 현황을 추가 조사에 따른 자료 수집 및 분석을 통해 관절염 개선의 건강기능식품 사업화 방안 마련을 건고히 하였음
- ⑥ 기존 판매되고 있는 관절염 개선 건강기능식품 효과 비교 보고서를 통해 효능을 확인하였으며 타 제품과 새로운 건강기능식품 시장 창출할 것으로 기대됨
- 건강기능식품 소비자 분석을 통한 최적의 제형인 capsule과 액상 음료 등의 제품을 선정하여 시제품 제막으로 완료하였으며 본 과제의 제품화 부분의 성공도는 매우 우수하다고 생각함

(라) 고용 창출

- 본 과제의 제3협동 기관인 (주)바이오포트코리아에서는 연구기간 내 총 14명의 신규 인력을 채용하여 목표(3명) 대비 초과 달성과 동시에 회사의 역량 확대에 크게 기여하였음
- 추후 개별인정 획득에 따른 사업화 이후 실적 매출의 증가에 따른 고용 증대의 확대에 기여할 것으로 기대됨
- 오미자의 퇴행성 관절염 개선효과를 과학적으로 검증하고, 산지(문경생산자 협회)와 협력을 통해 오미자 수요가 증대가 기대되어 지역산업 발전 및 지역경제 발전에 도움이 될 것으로 기대됨
- 향후 오미자를 활용한 제품 이외의 노인성 질환개선용 건강기능식품 사업화는 관련 식품

산업의 동반 성장에도 도움이 될 것으로 기대됨

(마) 기타 제품화 및 사업화 기반 부분

- 본 과제의 종료에 따른 개별인증의 취득과 사업화를 위한 다양한 정보의 수집과 제품화를 위한 5건의 보고서(특허 조사 보고서, 제품 전략 수립 보고서, 시장진입전략 보고서, 제형 적성 보고서, 관절염 특허 및 거래 활동, 식품의약품안전처 승인 동향 분석 보고서)를 단행본으로 간행하였음

(2) 연구 기반 지표 측면

(가) 학술적 성과 부분

- ① 정량적 지표 관점: 본 과제의 수행 동안 총 22편의 논문(SCI/E급 16편 및 등재지 6편)을 발표하였음: 이는 연구기간 내 달성 목표치(SCI/E급 12편 및 등재지 5편)를 초과 달성한 성과였으며, 과제 종료 현재 SCI/E급 1편 및 등재지 2편이 추가로 발표되어 정량적 목표에 대한 완성도가 매우 높다고 생각함
 - ② 정성적 지표 관점: 본 과제의 수행을 통하여 얻어진 결과 중, 관절염, 인지 기능 및 혈행 개선 관련 핵심 논문들은 모두 SCI/E급 논문에 게재가 완료되었으며, 이로써 오미자 추출물의 기능성 인증을 위한 근거 자료를 도출하였음
 - ③ 전문 학회 주관 학술대회 논문 발표 측면: 본 과제의 수행 동안 총 22건의 논문을 국내외 전문 학술대회에 발표하면서 다수의 수상 등을 통하여 연구 결과의 우수성을 인증 받았으며, 본 과제 참여 연구원들의 연구 결과 발표력 향상에도 기여하였음
 - ④ 관절염 이외 오미자 추출물의 인지능력과 혈행 개선 인체적용시험을 위한 기초데이터 창출하였음
 - ⑤ 오미자 추출물의 성분을 확인하고 제조된 원료의 품질 관리와 비용절감을 위한 지표성분 분석방법 연구(Schisandrin, Gomisins A, Gomisins N 단독 분석 및 동시 분석)를 수행하여 표준화를 확립하여 제조된 원료 품질관리의 기준규격을 확립함
 - ⑥ 오미자 추출물의 관절염 개선 이외에 혈행 개선 및 인지개선 등에 대한 기능성의 과학적 근거를 확보하여 추후 인체적용시험을 위한 기초데이터 제공과 기능성식품으로의 개발 가능성 확보에 기여함
- 이러한 학술적 성과로서 본 과제를 통하여 얻은 오미자 추출물의 관절염 제어 결과들은 국내외 기술개발현황의 학술적 측면에서의 우수성을 인증할 수 있다고 생각함

(나) 교육지도 및 인력 양성

- 본 과제에 참여하는 연구원과 참여기업 사원들의 교육 및 컨설팅을 위하여 2회에 걸친 지도를 실시(건강기능식품 GMP에 대한 교육(기술) 지도 및 오미자 제품화에 대한 교육(기술)지도)하였으며, 특히 참여기업 현장 중심의 교육을 수행하였음
- 기타 본 과제의 연구 개발 기간 동안 연구실 등의 안전 조치를 위한 이행을 충분히 수행하였음

(다) 정책 활용 및 홍보 부분

- 연구기간 내 달성 목표치 3건을 초과 수행(4건)하여 향후 정책 활용과 사업화를 위한 홍보 근거 자료를 창출하였음

(라) 기타 연구 활동

- 본 과제의 수행 기간 동안 총 6회의 워크숍을 개최하였으며, 특히 1 및 2차 년도에는 각 참여기관별로 워크숍을 주관함으로써 연구 개발 수행에 대한 자긍심과 참여도의 향상을 위하여 노력하였음
- 매 워크숍마다 각 참여 기관의 과제 관련 연구개발의 점검, 지속적인 보완 및 전문가의 최근 연구 동향 발표 등에 관한 종합 토론과 전문 CRO의 연구 점검 등을 동시에 수행하여 과제의 성공적인 수행을 위하여 노력하였음
- 각 워크숍을 개최에 따른 결과물을 단행본으로 간행하였으며, 연구 활동자료로 활용하고 있으며, 특히 건강기능식품 개별인정 획득을 위한 연구원들의 인식을 고취시키는데 기여하였음

▶ 오미자 추출물을 이용한 노인성 질환 개선 기능성 제품 개발의 측면에서 퇴행성 관절염 개선의 효능을 다양한 실험 모델에서 확인 후 인체적용시험을 통해 퇴행성 관절염 개선과 오미자 추출물을 이용한 건강기능 식품 개발 가능하도록 하였고, 이를 기반으로 성공적인 인체 적용시험을 완료하여 식품의약품안전처에 개별 기능성 인증 신청을 완료함으로써 노인성 질환 개선용 건강기능식품 사업화 기반을 확보하였음

5. 연구결과의 활용계획

코드번호 D-07

5-1. 추가 연구의 필요성

- 본 연구 과제의 수행 기간 동안 오미자 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 제어, 인지 기능 및 혈행장애 개선의 3가지 주요 노인성 질환 측면에서 연구를 수행하였음
- 이에 근거한 연구 수행의 요약 및 추가 연구의 필요성을 다음과 같이 요약 제시함

(1) 퇴행성 관절염 연구의 측면

연구 수행 결과 요약	추가 연구의 확장성
<ul style="list-style-type: none"> • 오미자 추출물을 이용한 퇴행성 관절염 예방 및 치료의 측면에서 연구의 완성도는 매우 높다고 평가됨 • 기능성 식품 시장 확장성 측면과 소비자의 인지도 및 참여기업의 사업화 의지를 고려하여 우선적으로 퇴행성 관절염에 초점을 맞추어 제품화 및 사업화 전략을 수립함 • 본 과제의 인체적용 시험과 기능성 식품으로서의 개별 인증 취득은 오미자 산업의 발전을 위한 사업화뿐만 아니라 노인성 질환시장 치료제로서의 신약 개발 가능성을 제시하였음 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 오미자를 활용한 노인성 질환 중 퇴행성 관절염 제어를 위한 사업화를 위한 시장 조사 및 소비자 만족도와 판매 전략 등의 수립과 연계된 연구 확대가 필요함 ▶ 오미자 지표물질을 활용한 퇴행성 관절염 예방 및 치료용 천연물 신약 창출을 위한 장기적인 추가 연구는 식의약 소재 개발 측면에서의 활용성 확장에 기여할 것임 ▶ 고령화에 따른 관절염은 보행 장애의 가장 큰 장애 요인이지만, 뼈 건강 및 근 기능 강화와 연계된 총체적 활용 가능성에 관한 연구 개발이 절실히 요구됨

(2) 인지 기능 개선 연구의 측면

연구 수행 결과 요약	추가 연구의 확장성
<ul style="list-style-type: none"> • 오미자 추출물을 이용한 인지 기능 개선 효능에 대한 획득 결과의 우수성으로 추가적인 근거 창출을 위한 연구와 사업화의 가능성이 매우 높음 • 특히 오미자 추출물에 대한 지표 물질들의 효능을 제시함으로써 추가 연구의 영역 확대 필요성을 제시하였음 • 본 과제의 수행을 통하여 얻어진 결과들은 향후 인지 기능 개선을 위한 사업화를 위한 인체적용 시험과 개별 인증 획득을 위한 가능성을 제시하였음 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 이러한 가능성을 기반으로 단순 연구 범주에서 벗어나 알츠하이머병 및 파킨슨병 등을 포함한 포괄적 연구의 수행이 요구됨 ▶ 고령층을 대상으로 한 대뇌 손상 차단을 통한 초기 인지저하 극복을 위한 추가적인 연구는 국가적 치매 예방 극복을 위한 식품 사업의 연계를 위해 요구됨 ▶ 지속적인 인구의 고령화에 따른 인지인 지 기능 관련 시장의 확대에 따른 오미자 사업화를 위한 지속적 근거 축적에 부합될 것임

(3) 혈행장애 개선 연구의 측면

연구 수행 결과 요약

- 오미자 추출물을 이용한 노인성 혈행장애 개선용 기능성 식품 개발 가능성을 다양한 실험법을 통하여 확인하였음
- 오미자와의 복합 추출물을 활용한 혈행 개선 기능성 상승 효과의 근거를 아울러 제시함으로써 복합 추출물의 활용 가능성을 제시하였음
- 오미자 단독 및 복합 추출물을 이용한 인체적용 시험과 기능성 식품으로서의 개별 인증 취득 가능성은 오미자 산업의 발전과 혈행장애 관련 노인성 질환 개선 사업화 가능성을 보여 주는 것임

추가 연구의 확장성

- ▶ 고령화에 따른 혈행장애는 심혈관 질환 측면에서 가장 중요한 부분이며, 이를 극복하기 위한 추가 실험 모델의 대상 실험이 요구됨
- ▶ 아울러 뇌 혈행 개선 부분의 연구는 뇌졸중 및 뇌출혈 관련 인지 장애 영역과 연계된 고령화 질환의 핵심 영역으로 연구의 확장성이 요구됨
- ▶ 오미자 지표물질을 활용한 퇴행성 관절염 예방 및 치료용 천연물 신약 창출을 위한 장기적인 추가 연구는 식의약 소재 개발 측면에서의 활용성 확장에 기여할 것임

5-2. 타 연구에서의 응용

- 생명공학정책연구센터, 「노화연구 및 활용기술」(2009.4) 보고서에 근거한 노인성 질환의 정의에 따른 연구 범위의 영역은 크게 ① 근·골격계, ② 신경계, ③ 심혈관계, ④ 종양 및 기타질환으로 대별됨
- 본 연구 결과에서 획득된 결과의 확장을 위한 주제 관련 연구 분야의 응용 가능성은 다음과 같이 요약될 수 있음

(1) 퇴행성 관절염 연구의 측면

응용 가능성에 대한 근거

- 노인성 질환으로서의 퇴행성 관절염: 노인성 근·골격계 질환에서 가장 핵심적인 부분이며 오미자 추출물의 활용성을 확보함
- 고령화에 따른 보행 장애: 고령화에 따른 삶의 질 저하에 가장 심각한 영향을 주는 것이 보행 장애이며, 이는 퇴행성 관절염을 포함한 근 기능과 뼈 건강의 약화와 연계됨

연구 영역 확대 범위

- ▶ 관절염 제어 측면: 퇴행성 관절염이 주요 관절 관련 노인성 질환이지만, 류마티스 관절염 및 통풍성 관절염 역시 보행 장애 관련 극복해야 할 영역이며 이에 관한 연구 확장에 응용될 수 있음
- ▶ 근기능 강화 측면: 고령화에 따른 근위축 또한 보행 장애 극복의 핵심 영역으로 관절 건강 연계 확장 연구 영역으로 응용성이 매우 높음
- ▶ 뼈 건강 강화 측면: 여성 갱년기 질환의 대표적인 골다공증 예방 및 치료를 위한 골 분화 촉진 및 골 흡수 억제 연계로의 응용이 요구됨

(2) 인지 기능 개선 연구의 측면

응용 가능성에 대한 근거
<ul style="list-style-type: none"> • 고령화에 따른 인지 기능 저하: 인지 기능 향상에 대한 오미자 유래 유효 생리활성물질의 효능을 제시함 • 신경세포 손상과 인지 능력: 인지 기능의 저하는 신경세포의 퇴행성과 연계되어 있으며 신경 세포의 보호는 인지기능 개선의 기본 요구 사항임

연구 영역 확대 범위
<ul style="list-style-type: none"> ▶ 신경계 질환 측면: 신경세포의 염증성 및 산화적 스트레스에 대한 손상 차단에 따른 다양한 신경계 질환은 제어를 위한 연구 영역 확대가 가능함 ▶ 뇌질환 측면: 오미자 유래 유효 생리활성물질 뇌 환경 항상성 유지 효능 검증에 따른 치매 억제 관련 연구로의 응용에 기여할 수 있음 ▶ 통증 제어 및 기억력 향상 측면: 신경계 손상에 따른 통증 억제와 기억력 향상으로의 연구 영역 확대에 따른 신경계 건강성 확보에 응용될 수 있음

(3) 혈행장애 개선 연구의 측면

응용 가능성에 대한 근거
<ul style="list-style-type: none"> • 고령화에 따른 혈행장애 증가: 심혈관계의 핵심 분야인 혈행장애 개선에 대한 근거를 제시함 • 혈행장애와 심혈관계 질환의 연계성: 고령화와 함께 동맥경화증, 심장병, 뇌질환 등과 같은 혈액순환 관련 질환의 발병율이 지속적으로 증가 추세임

연구 영역 확대 범위
<ul style="list-style-type: none"> ▶ 심혈관계 질환 측면: 혈관 내의 콜레스테롤의 수준을 낮추는 고지혈증 또는 고혈압 치료 기능성 소재로서 응용 가능성 확대 ▶ 뇌혈관계 질환 측면: 뇌혈관 손상에 따른 치매 유발 차단 연구의 지속화로 알츠하이머, 파킨슨병 등의 치료제 개발 가능성 확대로의 연계 ▶ 동맥경화 조절제 측면: 근기능 향상성과 연계한 혈관 내피세포 비대 억제 및 항상성 조절로 동맥경화 예방제로의 연구 영역 확대 가능

▶ 향후 오미자 추출물 또는 유효 지표물질을 활용한 고령화 연계 대사성 질환 예방제로서의 가치 평가를 통하여 학술적 진보와 사업화 영역의 확대 분야로의 응용에 기여할 수 있을 것으로 예측됨

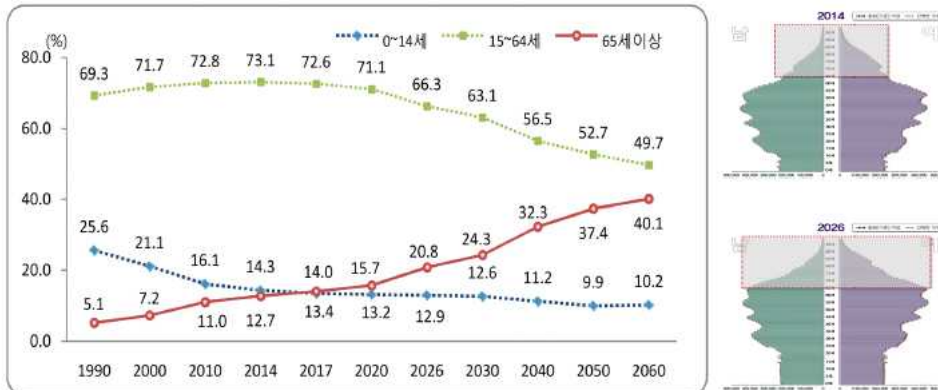
5-3. 사업화 추진 방안

(1) 연구 결과의 사업화를 위한 시장 변화 분석

(가) 고령화 증가에 따른 건강기능식품의 시장 확장성

① 국내 인구의 급속한 고령화 추이

- 고령층 인구 증가: 65세 이상 인구는 1990년 219만5천명(5.1%)에서 지속적으로 증가, 2014년 638만 6천명(12.7%), 2030년 1,269만 1천명(24.3%), 2060년 1,762만 2천명(40.1%) 수준으로 성장
- 성비의 불균형화: 고령자의 성비는 71.3명, 2060년에는 87명으로 높아질 전망
- 고령 인구 비율 증가: 우리나라는 2008년 고령인구 비중이 전체 인구의 10%를 넘어선 후 2026년에 고령인구 비중이 20%에 접어들 전망으로 2020년도에 인구 5명 중 1명이 고령자인 시대 도래할 것으로 예상



[우리나라 인구 연령대 변화 추이/자료 출처: 통계청 2014년 고령자 통계]

② 고령친화 상품의 증가

- : 초고령 사회로 진입하면서 실버산업이 급속하게 성장하고 있으며, 그 중 건강관련 시장은 지속적으로 증가할 것으로 예측
- 노인성 질환관련 제품의 지속적인 요구 증가: 실버산업이 발전하면서 노인성 질환관련 제품에 대한 요구는 지속적으로 증가하고 있으며, 신규제품에 대한 매출도 증가하고 있음



[우리나라 실버산업 시장 규모의 확장성]

- 성공한 시니어의 구매력 증가
 - 기존 실버세대와는 다르게 사회적, 경제적으로 성공한 시니어 세대의 구매력은 건강기능식품 시장에도 큰 자리를 차지할 것으로 예상
- 부모님 세대에 '효도'하고자 하는 전통적 의식
 - 건강기능식품의 매출이 어버이날이 있는 5월에 급등, 자식들이 부모님께 건강을 선물하고자하는 욕구는 지속적으로 증가

기존실버세대	VS	현재의 시니어
완고함, 보수적	삶의태도	은퇴 후에도 경제적인 독립 인생의 도전과 변화중시
자녀에게 의존	독립성	자녀와의 동거 거부
무계획, 자녀 용돈에 의존 한정된 취미생활	자기관리	외모 및 지속적인 건강관리 건강에 고비용 투자
세대간 단절, 변화에 대한 거부	가치관	변화에 개방적, 다른세대와 소통
한정된 주변인과 인간관계	영향력	신뢰와 책임, 사회적 성공에 따른 영향 력이 큼
자녀 의존적인 소비행태 검소하고소박	구매력	가격에 관계없이 원하는 제품 구매

Source: I.G경제연구소, 2010.08 '대한민국의 시니어'

[세대 차이에 따른 구매력 관련 의식 태도의 변화]

③ 2016년 건강기능식품 시장 동향: 관절/뼈 건강 기능성 부분

[2016 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석]

항목	매출액(억원)	비율(%)
건강기능식품 총 매출액	2조 1,260억원	100
관절/뼈 건강 기능성 매출액	2,349.2억원	3.6
개별인정형 총 매출액	3,537.4억원	100
개별인정형 관절/뼈 건강 기능성 매출액	247.7억원	7
초록입 홍합 추출 오일 복합물	145억원	4.09
보스웰리아 추출물	47억원	1.3

- 2016년 건강기능식품 총 매출액은 2조 1,260억원이며, 관절/뼈건강 기능성 매출액은 2,349.2억원, 3.6%를 차지하고 있음
- 개별인정형 총 매출액은 3,537.4억원이며 관절/뼈건강 기능성은 247.7억원이며 7%정도의 비율을 차지하고 있음

④ 2016년 건강기능식품 시장 동향: 관절 기능성 부분

- 관절 기능성 부분 중에서 초록입 홍합 추출 오일 복합물 제품이 판매 1위로 145억원(관절 팔팔 매출액, 124억원)이며, 다음 보스웰리아 추출물은 47억원(퍼펙트조인트 보스웰리아 매출액 37.4억원)으로 나타남

품목	업체명	총 매출액(억원)
초록입홍합추출 오일 복합물	(주)씨스팜 ¹⁾	124.0

	(주)한국인삼공사	15.3
	콜마비엔에이치(주)푸드팜사업부문	3.5
	코스맥스바이오(주)	2.1
	(주)한국씨엔에스팜	0.2
보스웰리아 추출물	코스맥스바이오(주) ¹⁾	37.4
	주식회사 노바렉스	5.5
	한국바이오팜(주)	3.6
	(주)서홍	1.0

1) 홈쇼핑 방송 판매 제품

(나) 건강기능식품 홈쇼핑 판매 현황 조사

① 조사의 목적

- 최근 건강기능식품의 판매에서 홈쇼핑이 차지하는 비율의 급속한 증가에 따른 건강기능식품 홈쇼핑 시장 현황, 자료 수집 및 분석을 통해 관절염 개선의 건강기능식품 사업화 방안 마련하기 위함

② 조사내용

- 조사 기간: 2017년 4월~11월 까지 롯데 홈쇼핑, 현대 홈쇼핑, 홈앤쇼핑, CJ오쇼핑, GS홈쇼핑, NS홈쇼핑 조사 실시
- 건강기능식품 방송 횟수: 1,768회 방송 실시
- 방송 순위 분석: 최다 방송 횟수 제품으로 1위 78회 방송 실시한 울트라 플로 프로바이오틱스(배변 활동 원활, 유해균 억제 및 유산균증식) 제품이며, 2위로 71회 방송 실시한 화애락큐(여성 갱년기 도움), 3위로 68회, 관절팔팔(관절 및 연골 건강에 도움), 4위 64회 방송 실시한 폴리코사놀(혈행 개선에 도움), 5위 58회 방송 실시한 황후의 보이차(체지방 감소에 도움) 등이 상위 위치를 차지하였음
- 기능성 항목 방송 횟수 순위: 최다 690회 방송을 실시한 제품은 면역 개선, 피로개선 기능성으로 나타났으며, 2위로 326회 방송 실시한 체지방 감소 도움이며, 3위 287회 방송 실시한 유산균 증식 및 유해균 억제, 배변 활동 도움, 4위 147회 방송 실시한 관절 및 연골 건강에 도움, 5위 112회 방송 실시한 피부 건강에 도움(보습/주름개선)기능성으로 나타남
- 업체별 현황: 홈쇼핑 방송사별로 건강기능식품 최다 방송한 방송사로 NS 홈쇼핑으로 844 회였으며, GS홈쇼핑 269회, 홈앤쇼핑 222회, CJ오쇼핑 185회, 현대홈쇼핑 155회, 롯데 홈쇼핑이 93회 방송을 실시하였음
- 착안점: 오미자의 관절 개선 건강기능식품의 사업화를 위해서는 소재의 효능뿐만 아니라

- ② 출하 가격 인하를 위한 지속적 전략: 현재의 수출에 대한 가격 경쟁력도 있지만, 이익의 극대화를 위한 추출 및 농축, 건조시의 원료 손실을 최소화 할 수 있는 공정개선 방안 마련을 위한 노력을 개별 인정 획득 이후에도 지속적으로 진행할 계획임
- 이를 위한 참여기업의 오미자 추출물 가격표 및 개별 인정형 제품 가격표의 환산가 근거 자료를 제시함

작업비	원료	사용량(kg)	단가(kg)	금액(원)
		오미자	4,000	
	주정	4,000		-
	정제수	16,000		-
	합계	24,000		-
기기사용료	주름,농축	9 일		-
	동결건조(2000kg)	1 관		-
	분쇄, 포장	1 회		-
	합계			-
포장비	5kg당 3000원	180		-
	합계			-
총합계				
추출물 수율	수율(20%~26%)	900kg~1,170kg		
1kg 당 판매 비용		200,000 원		

[오미자 추출물 가격표]

구분	100g당 원가 (추출물 기준)	1kg 당 원가 (추출물 기준)	발주수량	2,000	비고
1. 원료비	원료비율(%)	추출량(kg)	원료단가(원)	금액(원)	비고
오미자 추출물 분말	230,000	230,000			100mg당
포장비용		175,000	40	1,400,000	
2. 부재료비	기준단위	수량	단가(원)	금액	
인공감미료	EA	200	2,000	400,000	인공
향료	EA	2,000	2,000	4,000	
색소	EA	20,000	2,000	40,000	
PH	EA	20	70,000	1,400,000	
비타민C	EA	5	30,000	150,000	
물분산제	EA	20,000	2,000	400,000	
스타비아	EA	5,000	200,000	1,000,000	
소계				8,440,000	
3. 가공비	기준단위	수량	단가(원)	금액(원)	비고
원료 투입					
정제수 투입	추출량(kg)	2,000	400,000	800,000	
동결건조 비용					
분쇄비용					
포장비용					
가공비 소계				800,000	
합계	금액(원)	수량	단가	비고	
11월당 원가	8,440,000	2,000	4,220		
12월당 원가	8,440,000	2,000	4,220		
1월당 원가	8,440,000	2,000	4,220		
2월당 원가	8,440,000	2,000	4,220		
당기					
합계					

[개별인정형 제품 가격표]

(3) 오프라인 사업화 및 시장진입 및 마케팅 방안

(가) 사업화 방안

- ① 오미자의 건강기능식품 기능성 원료 인증을 통하여 기능성 원료의 판매 증대

- 국내: 참여 기업의 기존 공급처인 롯데 헬스원, 광동제약, 보령제약, 유니베라 등 (건강)식품관련 대기업에 원료 공급 계약 체결과 새로운 판로의 지속적 개척
 - 국외: 참여 기업의 기존 판매처(미국: Q-rapha Inc, 일본: Muan, HIROBA, 대만: HAHAAHA518 등)에 신규 제품 납품과 신규시장개척을 통한 수출 확대
- ② 추후 건강기능식품 제품화 인증을 통하여 신제품의 판매
- 국내: 참여 기업의 기존 공급처인 대형 할인점(코스트코, 이마트, 홈플러스, 롯데마트, GS슈퍼, 메가마트 등), 백화점(현대백화점, 롯데백화점 등) 및 편의점(GS25) 등 참여 기업의 기존 판매처를 통한 판매와 판매처의 지속적 확대
 - 해외: 참여 기업의 기존 공급처(상기 예시)을 통한 수출 확대
 - 기타, 오미자의 고부가가치 제품화를 위한 지역 오미자 농가와의 계약 재배 체결로 농가 소득의 증대 및 안정적인 판매망 확립으로 오미자 재배농가와 가공업체간 win-win 전략 구축과 기존 소재와의 차별성 확보를 위한 노력 지속

[사업화 계획 (5개년도)]

(단위 : 억원)

구 분		사 업 화 년 도				
		2018년	2019년	2020년	2021년	2022년
사업목표		건강기능식품 개별인정 제품 발매	시장 확대	시장 성숙	추가제품 개발	시장 지배적 입지 강화
사업화과제		마케팅강화	대중적인지도 강화 해외수출타진	대중적인지도 강화 해외시장 홍보강화	선도적인 제품으로서 입지강화 수출확대	지속적인 R&D, 홍보 수출안정화
사 업 화 품 목		기능성식품	기능성식품	기능성 식품, 분말 제품	기능성식품	기능성식품
투 자 계 획	인 건 비	0.44	1	1.2	1.5	2
	재료비 및 설비투자비	0.5	1	1.2	3	4
	경상운영비	0.5	1	1.5	5	7
	계	1.44	3	3.9	9.5	13
생 산 계 획		2	10	20	50	80
판 매 계 획	매 출 (억원)	2	3	5	10	15
	수 출 (만불)	-	1	2	5	7
	계	2	4	7	15	22

(나) 시장진입 및 마케팅 방안

① 시장진입을 위한 단계적 전략(시장진입시기, 현지화 전략 등)

- 기존의 거래처인 GS리테일(GS25), 홈플러스, 이마트, 코스트코 코리아 등의 건강기능식품 담당 MD들을 대상으로 제품설명회 개최를 통한 국내 판매망 확보하고 코스트코 코리아의 제품추천을 통한 미국 코스트코에 제품소개 및 미국 시장개척, 당사의 일본바이어인 HIROBA를 통한 일본시장 개척지원
- 참여기업 (주)바이오포트코리아는 2016년 12월 수출 100만불 수출탑 대통령상 수상하였으며 2017년 12월 기준 수출 200만불 달성하였음 → 참여 기업의 수출 경험과 마케팅 전략으로 국내산 오미자를 활용한 건강기능식품을 국내·외 적극적으로 판매할 것임

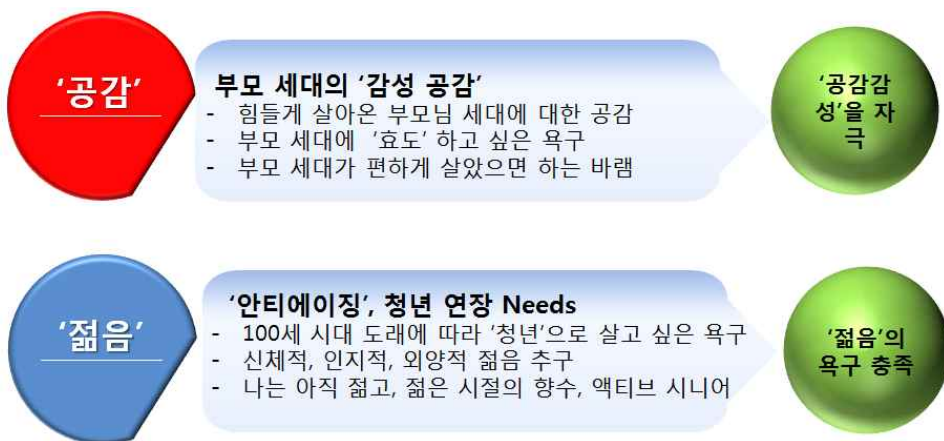
② 전문 인력 확보와 마케팅 전략

- 전문 연구인력 pool로서는 본 과제 참여 기관 및 국내 유수의 대학교, 연구소, 협력업체, 대기업 등의 전문 인력을 활용을 위한 네트워크 구축
- 참여기업의 연구원/직원들을 활용한 기능성 식품 개발과 생산 전문 및 마케팅 인력 확보를 위한 지속적인 교육 및 현장 체험 강화
- 국내외 식품 박람회/전시회 참가, 공급·유통 채널 확보를 통한 판로 개척, 판매전략, Off-Line 홍보 활동 등의 병행 전략 지속적 지원

(4) 홈쇼핑 마케팅 전략

(가) 마케팅 키워드 1: “공감”

- 힘들게 살아온 부모님 세대에 대한 공감
- 부모님 세대에 “효도”하고 싶은 심리 자극
- 부모님이 편하게 살았으면 하는 공감감성 자극



[마케팅 키워드 설정에 따른 마케팅 전략]

(나) 마케팅 키워드 2: “젊음”

- 인생은 60부터가 아니라 이제는 80부터, 내 인생의 2차 출발점

- 새로운 것을 시작할 수 있는 아직 젊은 나이 감성 자극
- 당사의 제품은 젊음을 유지하는데 도움을 줄 수 있다는 공감대 조성

(5) 출시 예상 작품 연계화 방안

① 시제품 제작의 완료

- 인체적용 시험을 위한 시제품의 제작과 1차 상품화 완료



시제품: 관절엔5味

② 시제품 기반 추가 기능성 확대

- “노인의 관절에 활기를 줄 수 있는 제품”에서 “관절 및 근기능개선 복합물 예상 제품 상품화”로의 확대 예정

관절

관절 나이가 들어갈수록 관절이 약해지고 아프다

무릎관절 통증

어깨통증 증가

삶의 질 저하

빠건강 약화

보행문제

마케팅 컨셉

◆ 1st : “아직 젊어” 마케팅

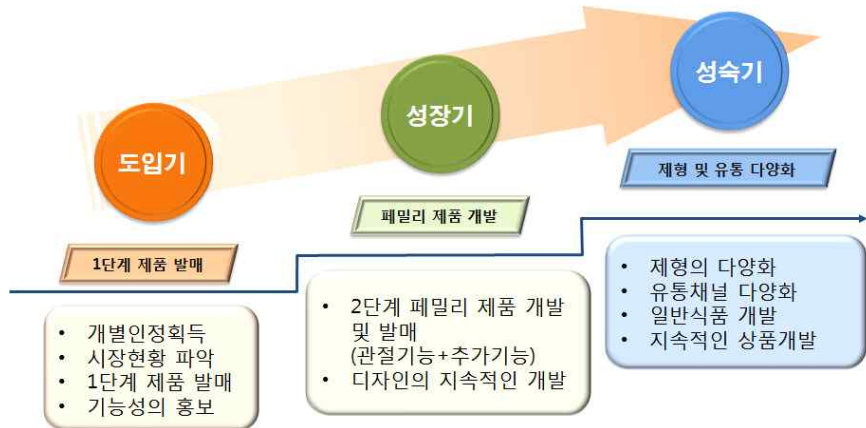
액티브 시니어를 위한 건강기능식품
인생은 60부터, 나는 아직 젊어!

[관절 건강 상품 지향적 마케팅 컨셉]



[향후 관절염+근기능 개선 복합 상품화 전략 예시]

(6) 중장기 사업계획



(가) 도입기

- ① 원료표준화, 제조공정 표준화(3회 3 Lot), 소재 임상시험 수행 등 개별인정 자료 취합 후 개별인정 신청 보완 대비
- ② 건강기능식품 개별인증 허가에 따른 원료생산 및 제품생산과 근기능 향상 기능성 추가
- ③ 제품 홍보: 홈쇼핑 위주의 집중 노출 광고 실시

(나) 성장기

- ① 2단계 family 제품 개발
- ② 복합 기능성의 추가(갱년기 기능성 + 영양보충, 관절개선 등)
- ③ 제품 디자인의 고급화와 다양화 및 홍보 확대(홈쇼핑 + 건기식매장, 약국을 통한 이벤트 진행으로 제품홍보에 주력)

(다) 성숙기

- ① 소비자 구매 만족도 증가를 위한 제형의 다양화(일반적인 캡슐, 정제뿐만 아니라, 젤리, 트로키 제형 등 포함)
- ② 유통채널의 다양화(홈쇼핑 및 온라인 쇼핑몰 등) 유통채널의 다양화로 매출 상승 및 오미자 농가의 소득 증대 기여

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
------	------

특이 사항 없음

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
------	------

일반 과제 : 국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

코드번호	D-10
------	------

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
-------	----------------	-------------	----	--------	---------------	---------------	------------------	----------------

해당 사항 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
9-1. 연구실 안전조치 이행 목적		
<ul style="list-style-type: none"> • 동의대학교 및 각 참여기관에서 정기 실험실 안전 점검 및 정밀 안전 진단 실시에 따른 실험실 위급 상황 사전 대비 • 참여 연구원들의 정기적 안전 교육 참석을 통한 실험실 안전 의식 고취 및 실험실 안전 관련 비품의 조기 구입 및 사용법 숙지 • 참여 연구원들의 참여기관 연구원 등록에 따른 건강보험 가입 및 건강검진 실시 장치 마련하기 위함 • 기타 참여 기관별 기관 안전수행 방침에 의거 안전조치 의무의 수행 		
9-2. 연구실 안전점검 체계 및 실시		
(1) 연구실 안전점검 체계 및 실시		
<p>▶ 실험실 안전점검 체계</p> <ul style="list-style-type: none"> • 동의대학교 실험실의 안전관리를 위하여 안전관리위원회를 설치하여 안전점검을 위한 계획 및 대책의 수립, 안전교육 및 안전점검, 사고발생시 사고 조사 및 원인 분석, 기타 안전사고 예방을 위한 임무를 수행하고 있음 → 안전관리위원회의 위원장은 교학부총장으로 하고, 안전관리위원은 안전관리책임위원, 교무처장, 기획처장, 관리처장, 관리부장으로 구성하며 간사는 관리과장으로 구성되어 있음 • 실험실에서는 책임교수 관리 하에 매일 안전점검을 실시하며, 동의대학교에서 매학기 실시하고 있는 정기 실험실 안전 점검 및 정밀 안전 진단 실시에 따른 실험실 위급 상황 사전 대비 → 매년 6월 및 12월에 학교 및 전담부서에서 실험실 안전점검을 실시함(1년에 2회 시행) • 기타 참여 기관별 기관 안전점검 규정 하에 의무사항 준수 		
(2) 교육 훈련		
<ul style="list-style-type: none"> • 개요: 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구 활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강 • 교육 대상 및 교육 내용 		

교육 과정	교육자	피교육자	교육 시간	교육 내용
정기 교육·훈련	안전관리 담당자	연구 활동 종사자	매월 1시간 이상	<ul style="list-style-type: none"> · 연구실 안전 환경 조성 법령에 관한 사항 · 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 · 안전한 연구개발 활동에 관한 사항 · 물질안전자료에 관한 사항 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항
신규채용 등에 따른 교육·훈련	안전관리 책임위원	신규 채용된 연구 활동 종사자 (계약직 포함)	8시간 이상	<ul style="list-style-type: none"> · 연구실 안전 환경 조성 법령에 관한 사항 · 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 · 보호 장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 · 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 · 안전표지에 관한 사항 · 물질안전자료에 관한 사항 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항
		대학·연구기관 등에 채용된 자 외의 자로서 신규로 연구개발 활동에 참여하는 연구 활동 종사자	2시간 이상	<ul style="list-style-type: none"> · 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 · 안전표지에 관한 사항 · 물질안전자료에 관한 사항 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항
연구내용 변경에 따른 교육·훈련	안전관리 담당자	연구 활동 종사자	2시간 이상	<ul style="list-style-type: none"> · 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 · 안전한 연구개발 활동에 관한 사항 · 물질안전자료에 관한 사항 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항
일일 안전 점검	안전관리 담당자	-	매일	· 시약 및 실험폐기물 관리상태 및 정리정돈 상태 점검
정기점검	안전관리 담당자	-	1개월 마다	· 시약보관 상태, 가스용기 관리상태 보호구 착용 및 관리 상태 점검
정밀안전진단	가스누출 여부	-	6개월 마다	· 가스누출여부, 전기과부하, 접지상태 점검, 화학약품반응위험도

- 참여 연구원들은 상기와 같이 정기적 안전 교육 참석을 통한 실험실 안전 의식 고취 및 실험실 안전 관련 비품의 조기 구입 및 사용법 숙지하였음

(3) 추가이행계획

1) 실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립
2) 유기용매 보관시설 설치 및 액체질소 통합관리	1. 보관창고를 설치하여 통합관리 2. 액체질소를 시약센터에서 통합관리
3) 실험실 환경안전지침 작성	보완 작성
4) 안전보호 장비 시설 보완	안전보호 장비와 안전표지 설치

- 상기 기준에 준하여 과제 참여 연구원들에 대한 안전 조치 교육 및 관련 자료 비치

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI 여부/인용횟 수 등)
1	특허	오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 IL-1 β 에 의한 관절염의 예방 또는 개선용 조성물	동의대 학교		대한민국		2017.08.14	단독사사	특허 등록
2	특허	오미자 추출물을 포함하는 관절염의 예방 또는 개선용 조성물 및 그 제조방법	동의대 학교		대한민국		2016.10.24	단독사사	특허 등록
3	논문	Schisandrae Fructus inhibits IL-1 β -induced matrix metalloproteinases and inflammatory mediators production in SW1353 human chondrocytes by suppressing NF- κ B and MAPK activation	동의대 학교	교신 저자	Drug Developm ent Research /미국	1.909	2015.12.01	중복사사	SCI
4	논문	Mori folium inhibits interleukin-1 β -induc ed expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- κ B and p38 MAPK in SW1353 human chondrocytes	동의대 학교	교신 저자	Internatio nal Journal of Molecular Medicine /영국	2.341	2016.01.02	단독사사	SCI
5	논문	Schisandrae Fructus ethanol extract ameliorates inflammatory responses and articular cartilage damages in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats	동의대 학교	교신 저자	EXCLI Journal /독일	1.462	2017.03.14	단독사사	SCI

11. 기타사항

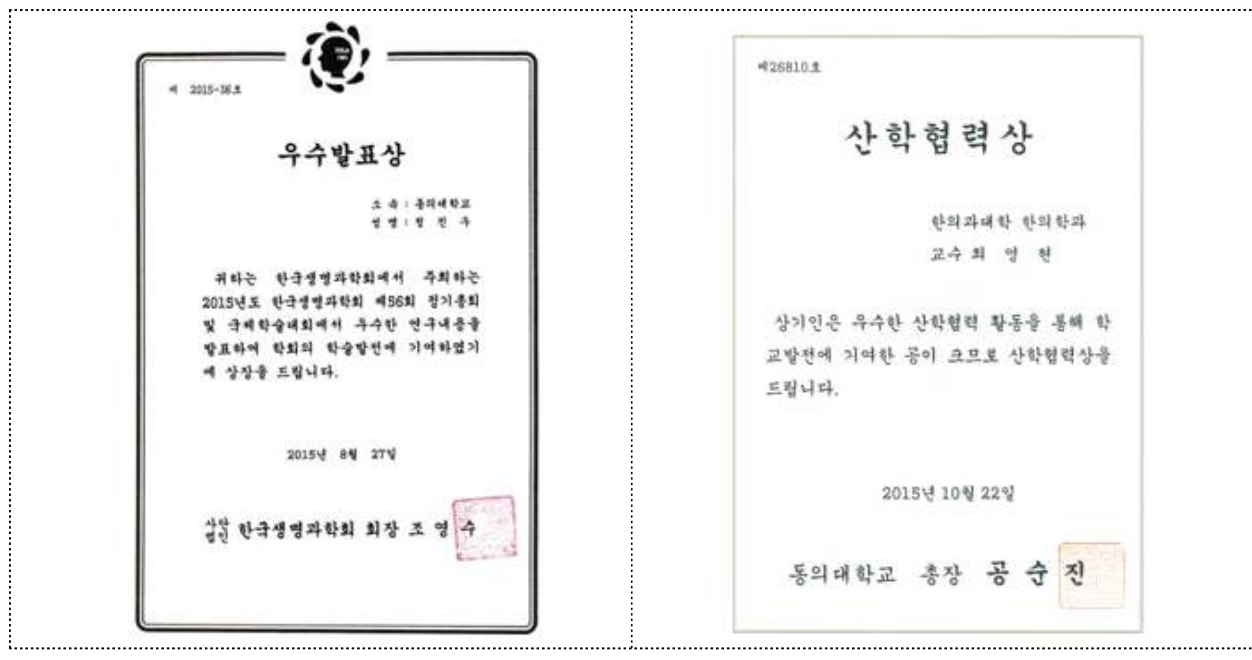
코드번호 D-13

11-1. 수상 및 포상

(1) 수상 및 포상 목록

No	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관
1	수상	우수발표상	오미자 추출물의 관절염 억제 효능에 대한 연구 논문 발표의 우수성과 관련 분야 학술적 발전기여 인증	정진우	2015.08.27	한국생명과학회
2	포상	산학협력상	산학협력 활동 우수성을 인증 받아 동의대학교 2015년 산학협력상을 수여 받음	최영현	2015.10.22	동의대학교
3	수상	우수발표상	연구 논문 발표의 우수성과 관련 분야 학술적 발전기여 인증	최영현	2016.08.18	Malaysian Society for Biochemistry & Molecular Biology
4	수상	Poster Award	오미자 유효 성분인 schisandrin A에 대한 연구 성과의 우수성	권다혜, 최은옥, 황혜진, 김병우, 최영현	2017.10.24	The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods (ISNFF 2017)

(2) 수상 및 포상 증빙 자료





11-2. 워크숍 개최

(1) 워크숍 개최 목록

No	일자	워크숍 주제	기타 사항
1	2015.01.06	오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략 1차 워크숍	발표 자료 단행본 발간
		개최 장소	
2	2015.06.12	오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략 2차 워크숍	발표 자료 단행본 발간
		개최 장소	
3	2016.02.24	오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략 3차 워크숍	발표 자료 단행본 발간
		개최 장소	
4	2016.07.20	오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략(연구과제 진도관리) 4차 워크숍	발표 자료 단행본 발간
		개최 장소	
5	2017.0.418	오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략(연구과제 진도관리) 5차 워크숍	발표 자료 단행본 발간
		개최 장소	
6	2017.11.15	오미자를 이용한 건강기능식품 개별인정 획득 전략(연구과제 정보 교류 세미나) 6차 워크숍	발표 자료 단행본 발간
		개최 장소	

(2) 워크숍 개최 증빙 자료

The image displays 12 workshop posters arranged in a 3x4 grid. Each poster is for a workshop titled '노인성 질환 개선 기능성 제품 개발' (Development of Functional Products for Improving Senescence-Related Diseases). The posters are for the years 2015, 2016, and 2017, with each year having three workshops. Each poster includes a title, a date, a location, and a list of participants. The posters are arranged in three rows and four columns. The first column shows the workshop title and theme, the second column shows the date and location, the third column shows the list of participants, and the fourth column shows the workshop title and theme again.

11-3. 기술 실시

No	일자	실시명	계약명
1	2017.08.10	기술이전계약서(양도용)	오미자 추출물을 포함하는 관절염의 예방 또는 개선용 조성물 및 제조 방법

기술이전계약서(양도용)



■ 계약명 : 오미자 추출물을 포함하는 관절염의 예방 또는 개선용
조성물 및 그 제조방법 (특허 10-2016-0138711, 2016.10.24)

2017년 8월 10일



계약당사자

‘갑’

주소 : 부산광역시 부산진구 가야동 176

기관 : 동의대학교 산학협력단

(사업자등록번호 :)

대표 : 단장 김 선 호 (직인)



‘을’

주소 : 부산광역시 기장군 일광면 황계길 7,
207호 (해양생물산업육성센터)

상호 : (주)바이오포트코리아

(사업자등록번호)

대표 : 김 성 구





11-4. 교육 및 컨설팅 실시

(1) 교육 및 컨설팅 실시 목록

No	단행본 명칭	활용내역
1	건강기능식품 GMP에 대한 교육(기술) 지도	참여기업(제3협동) 연구원들의 건강기능식품 GMP에 대한 이해도 상승
2	오미자 제품화에 대한 교육(기술)지도	오미자 제품 개발 관련 제형별 이해도 상승(캡슐, 환, 에이드, 과립제조 교육 자료)

(2) 교육 및 컨설팅 실시 증빙자료

<p>건강기능식품 GMP에 대한 교육(기술) 지도 보고서</p> <p>(주)바이오포트코리아</p> 	<p>오미자 제품화에 대한 교육(기술) 지도 보고서</p> <p>(주)바이오포트코리아</p> 
<p>[건강기능식품 GMP에 대한 교육(기술) 지도 보고서]</p>	<p>[오미자 제품화에 대한 교육(기술)지도 보고서]</p>

11-5. 기타 단행본 책자 발간

(1) 워크숍 단행본 책자 발간 목록

No	단행본 명칭	활용내역
1	특허 조사 보고서	오미자를 활용한 노인성 질환 개선 기능성 식품 개발을 위한 특허 전략 수립을 위한 자료로 활용
2	제품 전략 수립 보고서	오미자 및 상업의 건강 기능성 식품 개발 관련 현황의 파악과 사업 및 제품화 전략에 활용
3	시장진입전략 보고서	오미자를 활용한 노인성 질환 기능성 식품 시장의 진입을 위한 시장 진입 전략에의 활용
4	제형적성 보고서	오미자를 활용한 노인성 질환 기능성 식품 제조를 위한 시제품 제형 적성 실험 보고서
5	관절염: 특허 및 거래 활동, 식품의약품안전처 승인 동향 분석	관절염 기능성 개별인증 전략 수립 과 이를 활용한 사업화 추진을 위한 동향 분석에의 활용

(2) 각종 보고서 단행본 책자 발간 증빙 자료



(주)바이오프로코리아

특허조사보고서

[오미자를 활용한 노인성질환 개선
기능성 식품 개발을 위한 특허전략]

본 자료에 포함되어 있는 모든 정보는 관련 법규에서 정하거나 당사가 인정하는 경우를 제외하고는 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

Confidential

[특허 조사 보고서]



(주)바이오프로코리아

제품전략수립 보고서

[오미자 및 상업의 건강기능식품 개발]

본 자료에 포함되어 있는 모든 정보는 관련 법규에서 정하거나 당사가 인정하는 경우를 제외하고는 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

Confidential

[제품 전략 수립 보고서]



(주)바이오프로코리아

시장진입전략 보고서

[오미자를 활용한 노인성 질환
기능성 식품 시장 진입 전략]

본 자료에 포함되어 있는 모든 정보는 관련 법규에서 정하거나 당사가 인정하는 경우를 제외하고는 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

Confidential

[시장진입전략 보고서]



(주)바이오프로코리아

제형적성 보고서

[오미자를 활용한 노인성 질환
기능성 식품 시제품 제형 적성 실험]

본 자료에 포함되어 있는 모든 정보는 관련 법규에서 정하거나 당사가 인정하는 경우를 제외하고는 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

Confidential

[제형적성 보고서]

12. 참고문헌

코드번호	D-14
Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. <i>Curr. Rheumatol. Rep.</i> 2001; 3:535-41.	
Amin AR, Dave M, Attur M, Abramson SB. COX-2, NO, and cartilage damage and repair. <i>Curr. Rheumatol. Rep.</i> 2000; 2:447-53.	
Andereya S, Streich N, Schmidt-Rohlfing B, Mumme T, Müller-Rath R, Schneider U. Comparison of modern marker proteins in serum and synovial fluid in patients with advanced osteoarthrosis and rheumatoid arthritis. <i>Rheumatol. Int.</i> 2006; 26:432-8.	
Arakawa T, Katada A, Shigyo H, Kishibe K, Adachi M, Nonaka S, Harabuchi Y. Electrical stimulation prevents apoptosis in denervated skeletal muscle. <i>Neuro. Rehabilitation.</i> 2010; 27:147-54.	
Ba Q, Cui C, Wen L, Feng S, Zhou J, Yang K. Schisandrin B shows neuroprotective effect in 6-OHDA-induced Parkinson's disease via inhibiting the negative modulation of miR-34a on Nrf2 pathway. <i>Biomed. Pharmacother.</i> 2015; 75:165-72.	
Bae H, Kim R, Kim Y, Lee E, Jin Kim H, Pyo Jang Y, Jung SK, Kim J. Effects of <i>Schisandra chinensis</i> Baillon (Schizandraceae) on lipopolysaccharide induced lung inflammation in mice. <i>J. Ethnopharmacol.</i> 2012; 142:41-7.	
Barve RA, Minnerly JC, Weiss DJ, Meyer DM, Aguiar DJ, Sullivan PM, et al. Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. <i>Osteoarthritis Cartilage.</i> 2007; 15:1190-8.	
Bdout L, Pascale F, Bonneau M, Wassef M, Laurent A. <i>In vitro</i> evaluation of (S)-ibuprofen toxicity on joint cells and explants of cartilage and synovial membrane. <i>Toxicol. In Vitro</i> 2011; 25:1944-52.	
Billinghurst RC, Wu W, Ionescu M, Reiner A, Dahlberg L, Chen J, van Wart H, Poole AR. Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. <i>Arthritis Rheum.</i> 2000; 43:664-72.	
Boer TN, Huisman AM, Polak AA, Neihoff AG, Rinsum AC, Saris D, Bijlsma JW, Lafeber FJ, Mastbergen SC. The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: <i>Ex vivo</i> evaluation of human cartilage tissue after <i>in vivo</i> treatment. <i>Osteoarthritis Cartilage.</i> 2009; 17:482-88.	
Boileau C, Martel-Pelletier J, Brunet J, Schrier D, Flory C, Boily M, Pelletier JP. PD-0200347, an alpha2delta ligand of the voltage gated calcium channel, inhibits <i>in vivo</i> activation of the Erk1/2 pathway in osteoarthritic chondrocytes: a	

- PKC α dependent effect. *Ann. Rheum. Dis.* 2006; 65:573–80.
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front. Biosci.* 2006; 11:529–43.
- Cameron M, Chrubasik S. Topical herbal therapies for treating osteoarthritis. *Cochrane. Database Syst. Rev.* 2013; 31:CD010538.
- Carnac G, Ricaud S, Vernus B, Bonniieu A. Myostatin: Biology and clinical relevance. *Mini Rev. Med. Chem.* 2006; 765–70.
- Checker R, Patwardhan RS, Sharma D, Menon J, Thoh M, Bhilwade HN, Konishi T, Sandur SK. Schisandrin B exhibits anti-inflammatory activity through modulation of the redox sensitive transcription factors Nrf2 and NF- κ B. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 53:1421–30.
- Chen B, Zhan H, Chung M, Lin X, Zhang M, Pang J, et al. Chinese herbal bath therapy for the treatment of knee osteoarthritis: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015; 2015:949172.
- Chen JH, Tipoe GL, Liong EC, So HS, Leung KM, Tom WM, Fung PC, Nanji AA. Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 80:742–51.
- Chen WP, Wang YL, Tang JL, Hu PF, Bao JP, Wu LD. Morin inhibits interleukin-1 β -induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production in human chondrocytes. *Int. Immunopharmacol.* 2012; 12:447–52.
- Chen YJ, Tsai KS, Chan DC, Lan KC, Chen CF, Yang RS, Liu SH. Honokiol, a low molecular weight natural product, prevents inflammatory response and cartilage matrix degradation in human osteoarthritis chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 2014; 32:573–80.
- Cheng N, Ren N, Gao H, Lei X, Zheng J, Cao W. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 55:234–40.
- Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensig M, Gineyts E, et al. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone* 2001; 29:209–15.
- Chun JN, Cho M, So I, Jeon JH. The protective effects of *Schisandra chinensis* fruit extract and its lignans against cardiovascular disease: A review of the molecular mechanisms. *Fitoterapia* 2014; 97:224–33.
- Citalingam K, Zareen S, Shaari K, Ahmad S. Effects of *Payena dasyphylla* (Miq.) on hyaluronidase enzyme activity and metalloproteinases protein expressions in interleukin-1 β stimulated human chondrocytes cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 2013; 13:213.
- Cuschieri J, Maier RV. Oxidative stress, lipid rafts, and macrophage reprogramming.

- Antioxid. Redox. Signal. 2007; 9:1485-97.
- Dam AD, Mitchell AS, Rush JW, Quadrilatero J. Elevated skeletal muscle apoptotic signaling following glutathione depletion. *Apoptosis* 2012; 17:48-60.
- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr. 1989. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* 1989; 84:78-85.
- Decker P, Muller S. Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr. Harm. Biotechnol.* 2002; 3:275-83.
- Dhippayom T, Kongkaew C, Chaiyakunapruk N, Dilokthornsakul P, Srumsiri R, Saokaew S, et al. Clinical effects of Thai herbal compress: a systematic review and meta-analysis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015; 2015:942378.
- Dirks-Naylor AJ, Griffiths CL. Glucocorticoid-induced apoptosis and cellular mechanisms of myopathy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2009; 117:1-7.
- Dong Q, Hou H, Wu J, Chen Y. The Nrf2-ARE pathway is associated with Schisandrin b attenuating benzo(a)pyrene-induced HTR cells damages *in vitro*. *Environ. Toxicol.* 2016; 31:1439-49.
- Doss F, Menard J, Hauschild M, Kreutzer HJ, Mittlmeier T, Müller-Steinhardt M, et al. Elevated IL-6 levels in the synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasma cells. *Scand. J. Rheumatol.* 2007; 36:136-9.
- Dubinina EE, Dadali VA. Role of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in cell functions. *Biochemistry (Mosc).* 2010; 75:1069-87.
- Endale M, Park SC, Kim S, Kim SH, Yang Y, Cho JY, Rhee MH. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology.* 2013; 218:1452-67.
- Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002; 39:237-46.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, et al. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain.* 2004; 112:83-93.
- Freeston JE, Garner P, Wakefield RJ, Hensor EM, Conaghan PG, Emery P. Urinary type II collagen C terminal peptide is associated with synovitis and predicts structural bone loss in very early inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70:331-3.
- Gao C, Chen H, Niu C, Hu J, Cao B. Protective effect of Schisandrin B against damage of UVB irradiated skin cells depend on inhibition of inflammatory pathways. *Bioengineered.* 2017; 8:36-44.

- Garner BC, Stoker AM, Kuroki K, Evans R, Cook CR, Cook JL. Using animal models in osteoarthritis biomarker research. *J. Knee Surg.* 2011; 4:251-64.
- Geng Y, Valbracht J, Lotz M. Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. *J. Clin. Invest.* 1996; 98:2425-30.
- Giannelli G, Erriquez R, Iannone F, Marinosci F, Lapadula G, Antonaci S. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2004; 22:335-8.
- Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol. Med.* 2003; 9:344-50.
- Goldring MB, Berenbaum F. Emerging targets in osteoarthritis therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2015; 22:51-63.
- Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2011; 23:471-8.
- Goode AP, Marshall SW, Kraus VB, Renner JB, Stürmer T, Carey TS, et al. Association between serum and urine biomarkers and lumbar spine individual radiographic features: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012; 20:1286-93.
- Guilak F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2011; 25:815-23.
- Gupta AK, Chow M. Prednicarbate (Dermatop): profile of a corticosteroid. *J. Cutan. Med. Surg.* 2004; 8:244-7.
- Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial Joints: An animal model of osteoarthritis. *Toxicol. Pathol.* 2003; 31:619-624.
- Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 390:803-808.
- Hikino H, Kiso Y, Taguchi H, Ikeya Y. Antihepatotoxic actions of lignoids from *Schizandra chinensis* fruits. *Planta Med.* 1984; 50: 213-217.
- Hong SH, Jeong HK, Han MH, Park C, Choi YH. Esculetin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators and cytokines by inhibiting nuclear factor- κ B translocation in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Med. Rep.* 2014; 10:3241-46.
- Hou PW, Fu PK, Hsu HC, Hsieh CL. Traditional Chinese medicine in patients with osteoarthritis of the knee. *J. Tradit. Complement. Med.* 2015; 5:182-96.
- Huang BP, Lin CH, Chen HM, Lin JT, Cheng YF, Kao SH. AMPK activation inhibits expression of pro-inflammatory mediators through downregulation of PI3K/p38 MAPK and NF- κ B signaling in murine macrophages. *DNA Cell Biol.* 2015;

34:133-41.

Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN. The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. *J. Nutr. Biochem.* 2015; 26:1401-13.

Huyke C, Engel K, Simon-Haarhaus B, Quirin KW, Schempp CM: Composition and biological activity of different extracts from *Schisandra sphenanthera* and *Schisandra chinensis*. *Planta Med.* 2007; 73:1116-26.

Hwang HS, Park IY, Kim DW, Choi SY, Jung YO, Kim HA. PEP-1-FK506BP12 inhibits matrix metalloproteinase expression in human articular chondrocytes and in a mouse carrageenan-induced arthritis model. *BMB Rep.* 2015; 48:407-12.

Imamura M, Targino RA, Hsing WT, Imamura S, Azevedo RS, Boas LS, Tozetto-Mendoza TR, Alfieri FM, Filippo TR, Battistella LR. Concentration of cytokines in patients with osteoarthritis of the knee and fibromyalgia. *Clin. Interv. Aging* 2014; 9:939-44.

Isaacs J, Loveland K, Mallu S, Adams S, Wodicka R. The use of anabolic steroids as a strategy in reversing denervation atrophy after delayed nerve repair. *Hand (NY)* 2011; 6:142-8.

Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2004; 287:C834-43.

Jansen NW, Roosendaal G, Lundin B, Heijnen L, Mauser-Bunschoten E, Bijlsma JW, et al. The combination of the biomarkers urinary C-terminal telopeptide of type II collagen, serum cartilage oligomeric matrix protein, and serum chondroitin sulfate 846 reflects cartilage damage in hemophilic arthropathy. *Arthritis Rheumatol.* 2009; 60:290-8.

Jeong JW, Jin CY, Kim GY, Lee JD, Park C, Kim GD, Kim WJ, Jung WK, Seo SK, Choi IW, et al. Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *Int. Immunopharmacol.* 2010; 10:1580-86.

Jeong JW, Kim J, Choi EO, Kwon DH, Kong GM, Choi IW, Kim BH, Kim GY, Lee KW, Kim KY, Kim SG, Choi YW, Hong SH, Park C, Choi YH. *Schisandrae Fructus* ethanol extract ameliorates inflammatory responses and articular cartilage damage in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *EXCLI J.* 2017; 16:265-77.

Jeong JW, Kim JW, Ku SK, Kim SG, Kim KY, Kim GY, et al. Essential oils purified from *Schisandrae semen* inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 activation and migration of human aortic smooth muscle cells. *BMC. Complement Altern. Med.* 2015; 15:7.

Jeong JW, Lee HH, Choi EO, Lee KW, Kim KY, Kim SG, Hong SH, Kim GY, Park C, Kim HK, Choi YW, Choi YH. *Schisandrae Fructus* inhibits IL-1 β -induced matrix metalloproteinases and inflammatory mediators production in SW1353 human

chondrocytes by suppressing NF- κ B and MAPK activation. *Drug Dev. Res.* 2015; 76:474-83.

Jia P, Chen G, Zhou G, Zhong Y, Li R. Fuyuan Decoction inhibits nitric oxide production via inactivation of nuclear factor- κ B in SW1353 chondrosarcoma cells. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 146:853-58.

Jones A, Hwang DJ, Narayanan R, Miller DD, Dalton JT. Effects of a novel selective androgen receptor modulator on dexamethasone-induced and hypogonadism-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 2010; 151:3706-19.

Jotanovic Z, Mihelic R, Sestan B, Dembic Z. Role of interleukin-1 inhibitors in osteoarthritis: an evidencebased review. *Drugs Aging* 2012; 29:343-58.

Jung JS, Choi MJ, Lee YY, Moon BI, Park JS, Kim HS. Suppression of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by morin via MAPK, PI3K/Akt, and PKA/HO-1 signaling pathway modulation. *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65:373-382.

Kanda F, Takatani K, Okuda S, Matsushita T, Chihara K. Preventive effects of insulin like growth factor-I on steroid-induced muscle atrophy. *Muscle Nerve* 1999; 22:213-7.

Kang JS, Han MH, Kim GY, Kim CM, Chung HY, Hwang HJ, Kim BW, Choi YH. Schisandrae semen essential oil attenuates oxidative stress-induced cell damage in C2C12 murine skeletal muscle cells through Nrf2-mediated upregulation of HO-1. *Int. J. Mol. Med.* 2015; 35:453-9.

Kang JS, Han MH, Kim GY, Kim CM, Kim BW, Hwang HJ, et al. Nrf2-mediated HO-1 induction contributes to antioxidant capacity of a Schisandrae Fructus ethanol extract in C2C12 myoblasts. *Nutrients* 2014; 6:5667-78.

Kang KA, Hyun JW. Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance. *Toxicol. Res.* 2017; 33:1-5.

Kang YS, Han MH, Hong SH, Park C, Hwang HJ, Kim BW, Kyoung KH, Choi YW, Kim CM, Choi YH. Anti-inflammatory Effects of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill fruit through the inactivation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinases signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *J. Cancer Prev.* 2014; 19:279-87.

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011; 7:33-42.

Kasahara E, Sekiyama A, Hori M, Hara K, Takahashi N, Konishi M, Sato EF, Matsumoto S, Okamura H, Inoue M. Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. *FEBS Lett.* 2011; 585:2263-8.

Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, Nakamura Y, Nakasa T, Lotz MK, Ochi M. Exosomes from IL-1 β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in

- articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 2014; 16:R163.
- Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death. Differ.* 2012; 19:42–50.
- Kellesarian SV, Al-Kheraif AA, Vohra F, Ghanem A, Malmstrom H, Romanos GE, et al. Cytokine profile in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders: A systematic review. *Cytokine* 2016; 77:98–106.
- Ki SH, Yang JH, Ku SK, Kim SC, Kim YW, Cho IJ. Red ginseng extract protects against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *J. Ginseng Res.* 2013; 37:45–53.
- Kim BH, Oh I, Kim JH, Jeon JE, Jeon B, Shin J, Kim TY. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Astragalus sinicus* L. in cytokine-induced keratinocytes and skin. *Exp. Mol. Med.* 2014; 46:e87.
- Kim CH, Shin JH, Hwang SJ, Choi YH, Kim DS, Kim CM. *Schisandrae fructus* enhances myogenic differentiation and inhibits atrophy through protein synthesis in human myotubes. *Int. J. Nanomedicine.* 2016; 11:2407–15.
- Kim HK. *Adenophora remotiflora* protects human skin keratinocytes against UVB-induced photo-damage by regulating antioxidative activity and MMP-1 expression. *Nutr. Res. Pract.* 2016; 10:371–6.
- Kim J, Kim J, Bae JS. ROS homeostasis and metabolism: A critical liaison for cancer therapy. *Exp. Mol. Med.* 2016; 48:e269.
- Kim JH, Choi YW, Park C, Jin CY, Lee YJ, Park DJ, Kim SG, Kim GY, Choi IW, Hwang WD, Jeong YK, Kim SK, Choi YH. Apoptosis induction of human leukemia U937 cells by gomisin N, a dibenzocyclooctadiene lignan, isolated from *Schizandra chinensis* Baill. *Food Chem. Toxicol.* 2010; 48:807–13.
- Kim JW, Ku SK, Han MH, Kim KY, Kim SG, Kim GY, Hwang HJ, Kim BW, Kim CM, Choi YH. The administration of *Fructus Schisandrae* attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. *Int. J. Mol. Med.* 2015; 36:29–42.
- Kim JW, Ku SK, Kim KY, Kim SG, Han MH, Kim GY, Hwang HJ, Kim BW, Kim CM, Choi YH. *Schisandrae Fructus* supplementation ameliorates sciatic neurectomy-induced muscle atrophy in mice. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015; 2015:872428.
- Kim MS, Kim JE, Yoon YS, Seo JG, Chung MJ, Yum DY. A probiotic preparation alleviates atopic dermatitis-like skin lesions in murine models. *Toxicol. Res.* 2016; 32:149–58.
- Kim SR, Lee MK, Koo KA, Kim SH, Sung SH, Lee NG, Markelonis GJ, Oh TH, Yang JH, Kim YC. Dibenzocyclooctadiene lignans from *Schizandra chinensis* protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced toxicity. *J. Neurosci. Res.* 2004; 76:397–405.

- Klapproth JM, Sasaki M. Bacterial induction of proinflammatory cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2010; 16:2173-9.
- Klatt AR, Paul-Klausch B, Klinger G, K€uhn G, Renno JH, Banerjee M, Malchau G, Wielckens K. A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPs in primary human chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 2009; 27:65-0.
- Komamura K, Shirotani-Ikejima H, Tatsumi R, Tsujita-Kuroda Y, Kitakaze M, Miyatake K, Sunagawa K, Miyata T. Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2003; 17:303-10.
- Kook M, Lee SK, Kim SD, Lee HY, Hwang JS, Choi YW, Bae YS. Anti-septic activity of α -cubebenoate isolated from *Schisandra chinensis*. *BMB Rep.* 2015; 48:336-41.
- Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J. Mol. Med (Berl)*. 2004; 82:434-48.
- Kwon DY, Kim DS, Yang HJ, Park S. The lignan-rich fractions of Fructus Schisandrae improve insulin sensitivity via the PPAR- γ pathways in *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Ethnopharmacol.* 2011; 135:455-62.
- Laine L, White WB, Rostom A, Hochberg M. COX-2 selective inhibitors in the treatment of osteoarthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 2008; 38:165-87.
- Lam PY, Ko KM. Schisandrin B as a hormetic agent for preventing age-related neurodegenerative diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2012; 2012:250825.
- Lee DH, Park JS, Lee YS, Sung SH, Lee YH, Bae SH. The hypertension drug, verapamil, activates Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic Keap1 degradation and prevents acetaminophen-induced cytotoxicity. *BMB Rep.* 2017; 50:91-6.
- Lee H, Pyo MJ, Bae SK, Heo Y, Kim CG, Kang C, Kim E. Improved therapeutic profiles of PLA2-free bee venom prepared by ultrafiltration method. *Toxicol. Res.* 2015; 31:33-40.
- Lee HS, Yang KJ, Shin HD, Park BR, Son CW, Jang HJ, Park DC, Jung YM, Ku SK. Single oral dose toxicity studies of polycan, β -glucan originated from *Aureobasidium* in mice. *Toxicol. Res.* 2005; 21:361-5.
- Lee IC, Lee SM, Ko JW, Park SH, Shin IS, Moon C, Kim SH, Kim JC. Role of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B in 1,3-dichloro-2-propanol-induced hepatic injury. *Lab. Anim. Res.* 2016; 32: 24-33.
- Lee TH, Jung CH, Lee DH. Neuroprotective effects of Schisandrin B against transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* 2012; 50:4239-45.

- Lee TH, Song HK, Jang JY, Kim DY, Park HK, Choi EA, et al. Anti-inflammatory effect of egg white-chalcanthite and purple bamboo salts mixture on arthritis induced by monosodium iodoacetate in Sprague-Dawley rats. *Lab. Anim. Res.* 2016; 32:91-8.
- Lee JH, Fitzgerald JB, Dimicco MA, Grodzinsky AJ. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:2386-95.
- Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: Antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 1156-65.
- Leong PK, Wong HS, Chen J, Chan WM, Leung HY, Ko KM. Differential action between schisandrin A and schisandrin B in eliciting an anti-inflammatory action: The depletion of reduced glutathione and the induction of an antioxidant response. *PLoS One* 2016; 11:e0155879.
- Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1862:576-91.
- Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. *Part I. Clin Otolary.* 1981; 6:145-51.
- Li NG, Shi ZH, Tang YP, Wang ZJ, Song SL, Qian LH, et al. New hope for the treatment of osteoarthritis through selective inhibition of MMP-13. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18:977-1001.
- Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF- α is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF- κ B transcription factors in articular chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 2003; 288:208-17.
- Liang CQ, Luo RH, Yan JM, Li Y, Li XN, Shi YM, Shang SZ, Gao ZH, Yang LM, Zheng YT, et al. Structure and bioactivity of triterpenoids from the stems of *Schisandra sphenanthera*. *Arch. Pharm. Res.* 2014; 37:168-74.
- Lim H, Kim HP. Matrix metalloproteinase-13 expression in IL-1 β -treated chondrocytes by activation of the p38 MAPK/c-Fos/AP-1 and JAK/STAT pathways. *Arch. Pharm. Res.* 2011; 34:109-17.
- Lim JY, Han TR. Effect of electromy stimulation on apoptosis-related factors in denervation and reinnervation of rat skeletal muscles. *Muscle Nerve* 2010; 42:422-30.
- Liu L, Gu H, Liu H, Jiao Y, Li K, Zhao Y, An L, Yang J. Protective effect of resveratrol against IL-1 β -induced inflammatory response on human osteoarthritic chondrocytes partly via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway: an "in vitro study". *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15:6925-940.
- Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system

- in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73:3221-47.
- Loeser RF, Erickson EA, Long DL. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2008; 20:581-86.
- Lu YC, Hsiao G, Lin KH, Hsieh MS, Jayakumar T, Wu TS, Sheu JR. Cinnamophilin isolated from *Cinnamomum philippinense* protects against collagen degradation in human chondrocytes. *Phytother. Res.* 2013; 27:892-99.
- Lucas K, Maes M. Role of the Toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: Possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol. Neurobiol.* 2013; 48:190-204.
- Lv XJ, Zhao LJ, Hao YQ, Su ZZ, Li JY, Du YW, Zhang J. Schisandrin B inhibits the proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells by inducing cycle arrest and apoptosis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8:6926-36.
- Mabey T, Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J. Orthop.* 2015; 6:95-105.
- Makki MS, Haqqi TM. miR-139 modulates MCP1/IL-6 expression and induces apoptosis in human OA chondrocytes. *Exp. Mol. Med.* 2015; 47:e189.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1971; 53:523-37.
- Marker CL, Pomonis JD. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. *Methods Mol. Biol.* 2012; 851:239-48.
- Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Fahmi H, Tardif G, Pelletier JP. New thoughts on the pathophysiology of osteoarthritis: one more step toward new therapeutic targets. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2006; 8:30-6.
- Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin. Arthritis Rheum.* 2003; 33:155-67.
- Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP. 1994. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* 1994; 70:807-15.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 1997; 387:83-90.
- Melhem A, Stern M, Shibolet O, Israeli E, Ackerman Z, Pappo O, Hemed N, Rowe M, Ohana H, Zabrecky G, et al. Treatment of chronic hepatitis C virus infection via antioxidants: Results of a phase I clinical trial. *J. Clin. Gastroenterol.* 2005; 39:737-42.
- Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1

- induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:801-11.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* 2014; 20: 1126-67.
- Mobasheri A. The future of osteoarthritis therapeutics: targeted pharmacological therapy. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2013; 15:364.
- Motterlini R, Foresti R. Heme oxygenase-1 as a target for drug discovery. *Antioxid. Redox Signal.* 2014; 20:1810-26.
- Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer* 2007; 121:2357-63.
- Nakajima S, Kitamura M. Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.* 2013; 65:162-174.
- Nakajima YI, Kuranaga E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell Death Differ.* 2017; 24:1422-30.
- Norberg JK, Sells E, Chang HH, Alla SR, Zhang S, Meillet EJ. Targeting inflammation: Multiple innovative ways to reduce prostaglandin E2. *Pharm. Pat. Anal.* 2013; 2:265-88.
- Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J. Immunol.* 2000; 165: 3402-10.
- Owczarek J, Jasińska M, Orszulak-Michalak D. Drug-induced myopathies. An overview of the possible mechanisms. *Pharmacol. Rep.* 2005; 57:23-34.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007; 87:315-424.
- Panossian A, Wikman G. Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail: an overview of Russian research and uses in medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 118:183-212.
- Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol.* 2006; 119:229-40.
- Park SY, Choi YH, Park G, Choi YW. Neuroprotective effects of α -iso-cubebenol on glutamate-induced neurotoxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015; 40:549-56.
- Park SY, Park SJ, Park TG, Rajasekar S, Lee SJ, Choi YW. Schizandrin C exerts anti-neuroinflammatory effects by upregulating phase II detoxifying/antioxidant enzymes in microglia. *Int. Immunopharmacol.* 2013; 17:415-26.
- Park JH, Kim JH, Kim DH, Mun HC, Lee HJ, Seo SM, Paik KH, Ryu LH, Park JI, Lee HY. Comparison of immuno-stimulatory activities by purification process of

- Schizandra chinensis* Baillon fruits. Kor. J. Med. Crop Sci. 2004; 12:141-8.
- Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S, Cole AA, Lark MW, Grodzinsky AJ. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage *in vitro*: interaction with exogenous cytokines. Arthritis Rheum. 2003; 48:1292-1301.
- Piao T, Ma Z, Li X, Liu J. Taraxasterol inhibits IL-1 β induced inflammatory response in human osteoarthritic chondrocytes. Eur. J. Pharmacol. 2015; 756:38-2
- Piecha D, Weik J, Kheil H, Becher G, Timmermann A, Jaworski A, Burger M, Hofmann MW. Novel selective MMP-13 inhibitors reduce collagen degradation in bovine articular and human osteoarthritis cartilage explants. Inflamm. Res. 2010; 59:379-89.
- Pinzone Fox ML, Sastry MK, Parenti DM, Simon GL. Plasma leptin concentration increases early during highly active antiretroviral therapy for acquired immunodeficiency syndrome, independent of body weight. J. Endocrinol. Invest. 2005; 28:1-3.
- Pittalà V, Salerno L, Romeo G, Modica MN, Siracusa MA. A focus on heme oxygenase-1 (HO-1) inhibitors. Curr. Med. Chem. 2013; 20:3711-32.
- Qun Q, Tang M, Zhang X, Shi Y, Wang D, Gu Y, Li S, Liang X, Wang Z, Wang C. Protection of seven dibenzocyclooctadiene lignans from *Schizandra chinensis* against serum and glucose deprivation injury in SH-SY5Y cells. Cell Biol. Int. 2015; 39:1418-24.
- Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. Bone 2016; 85:81-90.
- Riddle DL, Stratford PW. Knee pain during daily tasks, knee osteoarthritis severity, and widespread pain. Phys. Ther. 2014; 94:490-98.
- Ryter SW, Choi AM. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. Transl. Res. 2016; 167:7-34.
- Ryu B, Qian ZJ, Kim SK. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- κ B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. Chem. Biol. Interact. 2010; 184:413-22.
- Saberi Hosnijeh F, Siebuhr AS, Uitterlinden AG, Oei EH, Hofman A, Karsdal MA, et al. Association between biomarkers of tissue inflammation and progression of osteoarthritis: evidence from the Rotterdam study cohort. Arthritis Res. Ther. 2016; 18:81.
- Salinardi BJ, Roush JK, Schermerhorn T, Mitchell KE. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and synovial fluid of osteoarthritic dogs. Vet. Comp. Orthop. Traumatol. 2006; 19:49-55.

- Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin- fixed paraffin sections. *J. Histochem. Cytochem.* 1993; 41:1599-604.
- Shingleton WD, Ellis AJ, Rowan AD, Cawston TE. Retinoic acid combines with interleukin-1 to promote the degradation of collagen from bovine nasal cartilage: Matrix metalloproteinase-1 and 13 are involved in cartilage breakdown. *J. Cell Biochem.* 2000; 79:519-31.
- Singh R, Ahmed S, Islam N, Goldberg VM, Haqqi TM. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1 β -induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappaB activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappaB. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:2079-086.
- Song F, Zeng K, Liao L, Yu Q, Tu P, Wang X. Schizandrin A inhibits microglia-mediated neuroninflammation through inhibiting TRAF6-NF- κ B and Jak2-Stat3 signaling pathways. *PLoS One* 2016; 11:e0149991.
- Song SH, Choi SM, Kim JE, Sung JE, Lee HA, Choi YH, Bae CJ, Choi YW, Hwang DY. α -isocubebenol alleviates scopolamine-induced cognitive impairment by repressing acetylcholinesterase activity. *Neurosci. Lett.* 2017; 638:121-8.
- Speziali A, Delcogliano M, Tei M, Placella G, Chillemi M, Tiribuzi R, et al. Chondropenia: current concept review. *Musculoskelet. Surg.* 2015; 99:189-200.
- Stratz C, Anakwue J, Bhatia H, Pitz S, Fiebich BL. Anti-inflammatory effects of 5-HT₃ receptor antagonists in interleukin-1 β stimulated primary human chondrocytes. *Int. Immunopharmacol.* 2014; 22:160-66.
- Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: A potential target of therapy. *Clin. Sci (Lond).* 2014; 126:593-612.
- Su YW, Chiou WF, Chao SH, Lee MH, Chen CC, Tsai YC. Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11:1166-72.
- Szopa A, Ekiert R, Ekiert H. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: A review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies. *Phytochem. Rev.* 2017; 16:195-218.
- Takaishi H, Kimura T, Dalal S, Okada Y, D'Armiento J. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008; 9:47-54.
- Tang SH, He RR, Huang T, Wang CZ, Cao YF, Zhang Y, Kurihara H. The protective effect of Schisandra lignans on stress-evoked hepatic metastases of P815 tumor

- cells in restraint mice. *J. Ethnopharmacol.* 2011; 134:141-6.
- Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology* 2008; 47:409-14.
- Thandavarayan RA, Giridharan VV, Arumugam S, Suzuki K, Ko KM, Krishnamurthy P, Watanabe K, Konishi T. Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling. *PLoS One* 2015; 10:e0119214.
- Toegel S, Wu SQ, Otero M, Goldring MB, Leelapornpisid P, Chiari C, Kolb A, Unger FM, Windhager R, Viernstein H. *Caesalpinia sappan* extract inhibits IL1b-mediated overexpression of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. *Genes Nutr.* 2012; 7:307-18.
- Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1824:133-45.
- Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol. Rev.* 2017; 277:76-89.
- Verma P, Dalal K. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker. *J. Orthop. Res.* 2013; 31:999-1006.
- Vilím V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:707-13.
- Wang CP, Li GC, Shi YW, Zhang XC, Li JL, Wang ZW, Ding F, Liang XM. Neuroprotective effect of schizandrin A on oxygen and glucose deprivation/reperfusion-induced cell injury in primary culture of rat cortical neurons. *J. Physiol. Biochem.* 2014; 70:735-47.
- Wang JH, Shih KS, Liou JP, Wu YW, Chang AS, Wang KL, Tsai CL, Yang CR. Anti-arthritic effects of magnolol in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in a rat arthritis model. *PLoS One* 2012; 7:e31368.
- Wang SY, Fu LL, Zhang SY, Tian M, Zhang L, Zheng YX, Wang JH, Huang J, Ouyang L. In silico analysis and experimental validation of active compounds from fructus *Schisandrae chinensis* in protection from hepatic injury. *Cell Prolif.* 2015; 48:86-4.
- Wat E, Ng CF, Wong EC, Koon CM, Lau CP, Cheung DW, Fung KP, Lau CB and Leung PC. The hepatoprotective effect of the combination use of Fructus Schisandrae with statin-A preclinical evaluation. *J. Ethnopharmacol.* 2016; 178:104-14.
- Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators*

- Inflamm. 2014; 2014:561459.
- Xiao WL, Huang SX, Wang RR, Zhong JL, Gao XM, He F, Pu JX, Lu Y, Zheng YT, Zheng QT, et al. Nortriterpenoids and lignans from *Schisandra sphenanthera*. *Phytochemistry* 2008; 69:2862-6.
- Xie W, Du L. Diabetes is an inflammatory disease: evidence from traditional Chinese medicines. *Diabetes Obes, Metab.* 2011; 13:289-01.
- Xie Y, Hao H, Wang H, Guo C, Kang A, Wang G. Reversing effects of lignans on CCl₄-induced hepatic CYP450 down regulation by attenuating oxidative stress. *J, Ethnopharmacol.* 2014; 155:213-21.
- Xing J, Guo Y, Hu H, Qu XL, Sun XZ, Liu, SH, Wang H. A herbal composition of Semen Hoveniae, Radix Puerariae and Fructus Schisandrae shows potent protective effects on acute alcoholic intoxication in rodent models. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012; 2012:638197.
- Xu Y, Dai GJ, Liu Q, Liu ZL, Song ZQ, Li L, Chen WH, Lin N. Sanmiao formula inhibits chondrocyte apoptosis and cartilage matrix degradation in a rat model of osteoarthritis. *Exp. Ther. Med.* 2014; 8:1065-074.
- Yang GY, Taboada S, Liao J. Induced nitric oxide synthase as a major player in the oncogenic transformation of inflamed tissue. *Methods Mol. Biol.* 2009; 512:119-56.
- Ying X, Chen X, Cheng S, Shen Y, Peng L, Xu HZ. Piperine inhibits IL-1 β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. *Int. Immunopharmacol.* 2013; 17:293-99.
- Yip AY, Loo WT, Chow LW. Fructus Schisandrae (Wuweizi) containing compound in modulating human lymphatic system - a Phase I minimization clinical trial. *Biomed. Pharmacother.* 2007; 61:588-90.
- Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects Med.* 2003; 24:281-91.
- Zeng L, Wang W, Rong XF, Zhong Y, Jia P, Zhou GQ, Li RH. Chondroprotective effects and multi-target mechanisms of Icariin in IL-1 β -induced human SW 1353 chondrosarcoma cells and a rat osteoarthritis model. *Int. Immunopharmacol.* 2014; 18:175-81.
- Zhang Y, Zhou ZW, Jin H, Hu C, He ZX, Yu ZL, Ko KM, Yang T, Zhang X, Pan SY, et al. Schisandrin B inhibits cell growth and induces cellular apoptosis and autophagy in mouse hepatocytes and macrophages: implications for its hepatotoxicity. *Drug Des. Devel. Ther.* 2015; 9:2001-027.
- Zhong HM, Ding QH, Chen WP, Luo RB. Vorinostat, a HDAC inhibitor, showed anti-osteoarthritic activities through inhibition of iNOS and MMP expression, p38 and ERK phosphorylation and blocking NF- κ B nuclear translocation. *Int. Immunopharmacol.* 2013; 17:329-35.

Zhu M, Lin KF, Yeung RY, Li RC. Evaluation of the protective effects of *Schizandra chinensis* on phase I drug metabolism using a CCl₄ intoxication model. J. Ethnopharmacol. 2000; 67:928-35.

Zoorob RJ, Cender D. A different look at corticosteroids. Am. Fam. Physician. 1998; 58:443-50.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.