

11-1543000
-002199-01

발간등록번호
11-1543000-002199-01

상지주정
추출 분말의
항산화
효과검증 및
인지기능
개선
개별인정형
제품 개발

최
종
보
고
서

2018

농림축산식품부

고
부
가
가
치
식
품
기
술
개
발
R&D Report

상지주정추출 분말의 항산화 효과검증 및 인지기능개선 개별인정형 제품 개발 최종보고서

2018. 03. 30.

주관연구기관 / (주)에스엘에스
협동연구기관 / 한국산업기술대학교 산학협력단
고려대학교 산학협력단
참여기관명 / (주)파마크로

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “상지주정추출 분말의 향산화 효과검증 및 인지기능개선 개별인정형
제품 개발”(개발기간 : 2014. 08. 01~ 2017. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 03. 30.

주관연구기관명 : (주)에스엘에스 (대표자) 이은수 (인)
협동연구기관명 : 한국산업기술대학교 산학협력단 (대표자) 조진기 (인)
고려대학교 산학협력단 (대표자) 고제상 (인)
참여기관명 : (주)파마크로 (대표자) 김남식 (인)

주관연구책임자 : 이재후
협동연구책임자 : 김정근
임영희
김재홍
참여기관책임자 : 김남식



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114033-3	해당 단계 연구 기간	2014.08.01.~ 2017.12.31	단계 구분	3/3
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	고부가가치식품기술개발			
연구과제명	대과제명	상지주정추출 분말의 항산화 효과검증 및 인지기능 개선 개별인정형 제품 개발			
	세부 과제명				
연구책임자	이재후	해당단계 참여 연구원 수	총: 10명 내부: 9명 외부: 1명	해당단계 연구개발비	정부:220,000천원 민간: 73,334천원 계:293,334천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 26명 내부: 24명 외부: 2명	총 연구개발비	정부:660,000천원 민간:220,002천원 계:880,002천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)에스엘에스			참여기업명: 한국산업기술대학교 고려대학교	
위탁연구	연구기관명: (주)파마크로	연구책임자: 김남식			
Oxyresveratrol을 다량 함유한 국내산 상지를 사용하여 상지주정추출분말을 제조한 후 이의 인지개선, 항치매, 항염증, 면역증강, 활성산소 제거기작 등을 규명하였다. 또한 상지주정추출 분말을 제조하여 인지기능개선 임상시험을 수행하였다.				보고서 면수 : 166	

<국문 요약문>

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>뽕나무 가지인 상지는 오래전부터 당뇨병, 고지혈증, 염증, 스트레스, 기억력 감퇴 등에 치료 효과가 인정되어 사용된 전통 약재이다. 상지는 oxyresveratrol, mulberroside A 등의 스틸벤노이드 물질을 다량 함유하고 있다.</p> <p>본 연구에서는 상지를 주성분으로 추출하여 기능성 성분을 다량 함유한 식품소재로 개발하고 이의 인지기능개선, 항치매, 면역증강, 항산화에 대한 정확한 과학적 근거를 도출하였다. 또한 이를 사용하여 인지기능개선 임상시험을 수행하여 인지기능개선 개별인정형 건강기능식품으로 개발하고자 한다.</p>					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ■ 상지의 품종, 재배 지역, 채집 시기 등 결정. ■ 옥시레스베라트롤 축적을 위한 최적의 숙성시간, 온도, 최적 미생물 등 선정. ■ 상지주정 추출물 제조를 위한 추출의 최적 조건을 채택함. ■ 상지주정추출물을 제조하여 항산화, 수명연장, 항염증, 항치매의 in vitro 및 in vivo 효과 확인. ■ 상지주정 추출물과 임상시료의 안전성 및 안정성 확인. ■ 상지주정 추출물의 인지기능개선 임상시험 실시. 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>상지 주정추출물은 옥시레스베라트롤을 다량 함유하여 항염증, 장관 면역 작용, 활성 산소 제거 효과 등이 뛰어나 식품 및 건강 기능성 식품으로 개발이 기대됨.</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 폐기물로 버려지는 뽕나무 가지의 사용으로 농산자원의 고부가가치화를 도모하여 농가 소득 증진에 기여. ■ 옥시레스베라트롤을 다량 함유하는 천연물 유래 소재로의 연구 확대를 통한 새로운 기능성 식품 소재 및 의약품 개발에 활용. ■ 연구에 참여한 인력의 전문성 향상에 의한 전문 연구 인력의 양성에 기여. ■ 연구에 참여한 기업의 기능성 물질에 대한 산업화로 기업의 가치 향상 및 국내 관련 산업의 활성화에 기여. ■ 연구결과의 학술논문 발표 및 지적재산권 확보 등에 활용함. 					
중심어 (5개 이내)	상지	옥시 레스베라트롤	항산화능	항염증	인지기능개선	

<영문 요약문>

<SUMMARY>

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<p><i>Ramulus mori</i> has traditionally been used as herbal medicine because of its pharmacological activities such as anti-diabetic, anti-hyperlipidemia, anti-inflammation, anti-stress and cognitive enhancing. <i>Ramulus mori</i> contain large amounts of stilbenoids, including oxyresveratrol and mulberroside A. In this study, ethanol extract of <i>Ramulus mori</i> was prepared and evaluated various cognitive relative effects such as antioxidant activity, anti-demensia, anti-inflammation, cognitive-enhancing. The purpose of this study is to develop the health functional food derived from natural products for cognitive-enhancing.</p>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ■ Cultivars, cultivation area, and sampling season of <i>Ramulus mori</i> were determined. ■ Effects of postharvest time, temperature and microorganisms for oxyresveratrol accumulation were investigated. ■ Optimization of the manufacturing process of the extract and mass production process were established. ■ Ethanol extract of <i>Ramulus mori</i> was evaluated cognitive relative effects. <ul style="list-style-type: none"> - antioxidant activity, lifespan, anti-inflammation activity, antidemensia. ■ Confirmation of safety and stability of clinical trial sample. ■ Complete an intervention study to evaluate efficacy on cognitive enhancing of ethanol extract of <i>Ramulus mori</i>. 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ■ Contribution to develop high value-added food sources by using domestic mulberry branches with a low-value utilization. ■ Contribution to develop new functional food sources by expanding research on natural sources containing oxyresveratrol. ■ Contribution to the training of professional researchers involved in the research by improving their practical skills and research ability. ■ Contribution to the enhancement of corporate value of companies participated in the research by production of health products containing effective component of <i>Ramulus mori</i>. ■ Utilization of the results obtained from this study to publish research papers and to acquire intellectual property rights 				
Keywords	<i>Ramulus mori</i>	Oxyresveratrol	Antioxidant	Antiinflammation	Cognitive-enhancing

<영문 목차>

Chapter 1 Overview of Research and Objectives	1
Chapter 2 R&D Status in Domestic and Abroad	5
Chapter 3 Research Contents and Results	6
Chapter 4 Achievement and Contribution	152
Chapter 5 Plans for the Practical Use of Results	153
Chapter 6 Information of International Science and Technology	154
Chapter 7 Security levels of the Research	155
Chapter 8 Facilities and Equipments	155
Chapter 9 Safety Management of Lab	156
Chapter 10 Significant Research outcomes	157
Chapter 11 Others	159
Chapter 12 References	160

<본문 목차>

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	5
3. 연구수행 내용 및 결과	6
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	152
5. 연구결과의 활용계획	153
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	154
7. 연구개발성과의 보안등급	155
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	155
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	156
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	157
11. 기타사항	159
12. 참고문헌	160

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

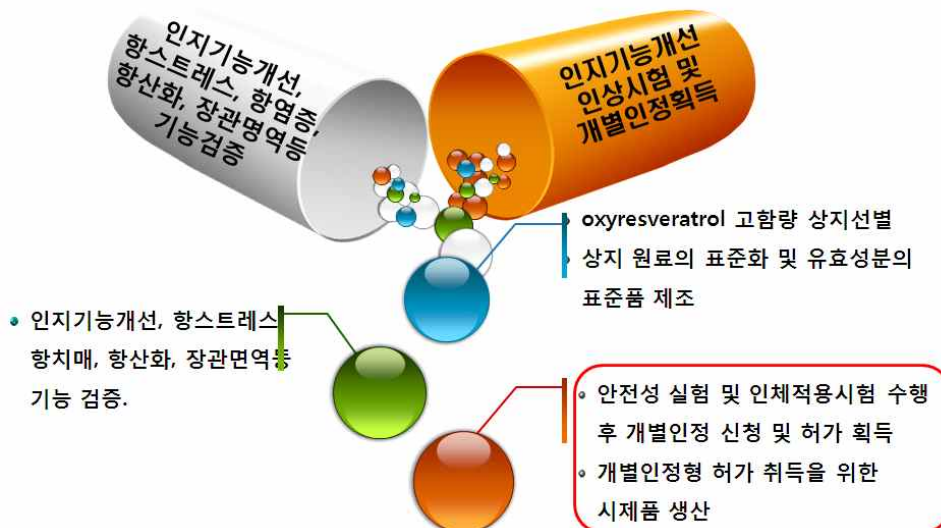
1. 연구개발 목적

뽕나무 가지인 상지는 진해, 소염, 진정, 혈압강하, 항균 등의 약리작용이 알려져 있는 생약재로 대한약전 수제 생약일 뿐만 아니라 식품공전 별표 1에 "식품에 사용할 수 있는 원료"로 등재된 식품원료이다. 상지는 oxyresveratrol, mulberroside A, resveratrol 등의 스틸베계열 물질과 rutin, quercetin 등의 flavonoid 등의 유효 물질 성분을 다량 함유하고 있고 특히 국내산 상지는 oxyresveratrol 함량이 높은 것으로 밝혀져 건강 기능식품으로 개발 가능성 매우 높다.

Oxyresveratrol과 resveratrol은 항암(antitumor), 항바이러스(antiviral), 신경보호(neuroprotective), 항산화(antioxidation), 항염증(antiinflammation), 항당뇨(antidiabetic), 항스트레스(anti-stress), 미백효과 등이 다양한 약리적 효능이 알려져 이들 물질을 다량 함유한 상지를 사용하여 이들 효과를 검증하는 것은 큰 의의가 있다.

Oxyresveratrol은 resveratrol로부터 합성이 가능하지만 경제적이지 않아 뽕나무으로부터 추출하는 것이 거의 유일한 방법이다. 특히 본 연구진은 선행연구를 통하여 뽕나무의 다양한 부위중 가지가 oxyresveratrol 함량이 높은 것을 발견하였으며 또한 잔가지(twig) 보다는 약간 두꺼운 가지(stem)에 다량의 oxyresveratrol을 함유하는 것을 확인하였다.

따라서 본 연구에서는 국내산 뽕나무 가지를 주성으로 추출하여 oxyresveratrol을 다량 함유한 상지 주정추출 분말을 제조한 후 이를 이용하여 인지개선, 항산화, 항치매, 항염증, 면역증강 등의 만성 질환에 대한 과학적인 효과를 연구할 뿐만 아니라 인체 적용 시험을 통하여 인지 기능 개선 개별인정형 건강식품으로 개발하고자 한다.



2. 연구개발의 필요성

복잡한 현대 사회에서 인지기능 저하와 기억력 감소는 청소년에서부터 노인에 이르기까지 중요한 관심 대상이다. 특히, 고령화로 인해 자연적으로 또는 치매 등에 의해 인지기능 저하 및 기억력의 감퇴는 본인뿐만 아니라 주변인들의 생활에 어려움을 초래한다는 점에서 이에 대한 연구의 중요성은 증대되고 있다. 최근 한국은 출산율의 감소 및 평균 수명의 지속적인 증가로 OECD 국가 중 가장 빠르게 고령화되어 고령인구에 나타나는 인지기능 감소, 기억력 저하, 치매, 노인성 스트레스 우울증, 동맥경화증, 당뇨병, 관절염, 암 등 만성·퇴행성 질환은 개인과 국가의 의료비 증가로 사회적 문제가 되고 있다. 따라서 인지기능 및 기억력을 향상시키고 치매, 면역력 저하, 스트레스, 고콜레스테롤, 암 등의 질환을 예방하고 치료할 수 있는 건강기능성 식품의 개발은 매우 시급한 실정이다.

□ 한국 사회의 급속한 인구고령화

- 식생활 개선과 급속히 발전해온 생명과학 덕분에 인간생명은 점점 더 연장되고 있음.
- 65세 이상 인구 비율 변화: 3.8%(1980)→5.1%(1990)→7.2%(2000)→11.0%(2010)→14.0%(2018)→20.8%(2026)로 예상.

□ 고령인구의 증가로 성인병 발생 비율의 증가로 인한 의료비 증가

- 고령인구 증가로 인지기능 저하, 치매, 노인성 스트레스, 동맥경화증, 고지혈증, 암 등 만성·퇴행성 질환 발생 증가.
- 노인성 질환 중 치매(dementia)는 다양한 원인 질환에 의해 야기되는 기능저하를 특징으로 하는 증후군으로 기억력, 사고력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능 장애를 나타내며 전체노인의 약 8.5%에 달함.
- 노화와 더불어 발생하는 성인병 및 만성질환에 의한 의료비 지출이 증가.

□ 인지기능 개선 및 항산화 기능 식품 필요

- 인지능력이란 사물을 분별하여 인지할 수 있는 능력으로 인지능력을 유지하는 것은 기억력이나 집중력을 저하시킬 수 있는 여러 요인을 조절함으로써, 정상적인 뇌의 기능을 유지하는 것임.
- 30세를 넘으면 뇌세포가 감퇴되기 시작하고 지속적인 스트레스와 긴장은 뇌세포의 피로를 촉진시켜 일의 능률을 떨어뜨리고 우울, 초조 등의 심리적인 요인도 지각력을 떨어뜨릴 수 있음. 또한 신체적인 피로와 수면부족, 약물 및 정신자극제, 지나친 알코올 섭취 역시 인지능력을 감소를 촉진 할 수 있으며, 치매 등으로 뇌가 위축되고 뇌신경세포의 파괴가 이루어져 기억력 장애 등이 올 수 있음.
- 신경세포가 손상되면 정상적인 뇌기능을 수행할 수 없게 되며, 특히 뇌세포는 다른 세포와는 달리, 일단 손상되면 다시 만들어지지 않는다고 알려져 있으므로, 건강한 뇌세포를 유지하는 것이 중요함.
- 대뇌피질 특히 해마에서 신경전달물질이 필요한 양만큼 존재해야 뇌세포 간에 신호가 원활히 이루어 질 수 있음. 그러나 인지 능력이 저하된 상태에서는 신경전달물질의 활동이 적어져 이때 신경전달물질을 조절하여 저하된 인지능력을 개선하는데 도움을 줄 수 있음.
- 뇌세포는 다른 세포에 비해 특히 많은 인지질(포스파티딜콜린, 포스파티딜세린 등)은

세포를 보호하는 막을 구성하여, 뇌세포가 그 기능을 원활히 수행할 수 있도록 도와 줌. 따라서 뇌세포의 구성성분을 공급해 주고, 뇌기능에 필요한 효소나 신경전달물질 등의 원료를 공급해 주어 뇌기능 유지에 도움을 줄 수 있음.

- 따라서 천연물로부터 뇌의 신경전달을 조절하는 식품의 개발은 시급한 실정임.

□ 치매 예방 식품의 개발 필요.

- 치매(dementia)는 기억력과 감각, 공간 및 지각능력이 떨어지는 후천적 만성 퇴행성질환으로 혈관성치매(cerebrovascular dementia)와 노인성 치매(Alzheimer type dementia)로 구분됨. 치매환자 중 50~60%는 알츠하이머성형 치매임.
- 알츠하이머병의 근본적인 치료방법은 아직 개발되지 않았지만 증상을 완화시키고 진행을 지연시킬 수 있는 대표적인 약물로 아세틸콜린 분해효소 억제제임. 이 약물은 알츠하이머병 환자의 뇌에서 감소되어 있는 아세틸콜린이라는 신경전달물질의 양을 증가시킴으로써 작용하며 뇌손상이 심하지 않은 경도 및 중증도 환자에 보다 효과적임.
- 현재까지 개발된 기억력 개선약물들에는 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor), 아세틸콜린 분해 억제제(acetylcholine esterase inhibitor)등이 있으나 효과가 미약함.
- 부작용은 최소화되고 효능은 최대화하는 인지기능 개선 및 치매 예방 식품을 찾아내고 효과를 입증하려는 연구 및 노력이 요구됨.

□ 고령 인구의 스트레스 예방 및 저하 식품 개발 필요

- 일반적으로 노인의 11%에서 54%가 주목할 만한 우울 증상을 가지고 있음.
- 지속적인 스트레스와 긴장은 뇌세포의 피로를 촉진시켜 인지능력을 저하시키는 원인이 되므로 스트레스 완화에 대한 가능성을 검토하는 것이 필요함.
- 따라서 노인의 스트레스를 감소시켜 우울증을 예방할 건강기능성 식품의 개발이 절실히 필요함.

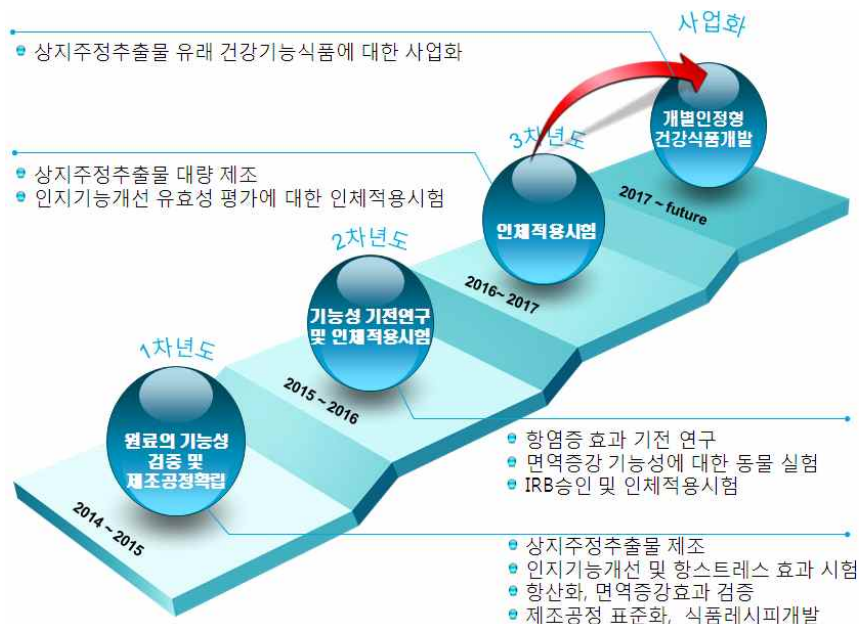
□ 새로운 효과적인 천연물 유래 인지기능개선 건강 기능식품의 개발 필요.

- 현재 국내에서 참당귀뿌리추출물, 테아닌 등 복합추출물, 당귀 등 복합추출물, 녹차추출물, 도라지추출물, 홍삼농축액, 원지추출분말, 인삼/가시오갈피 등 복합추출물, 홍경천추출물, 유단백가수분해물 등이 인지기능개선 혹은 기억력 향상 개별인정형으로 판매 중에 있으나 보다 효능이 좋은 제품의 개발이 필요함.
- 항산화, 뇌신경보호작용, 항바이러스, 항암, 항콜레스테롤 작용이 있다고 알려진 oxyresveratrol, mulberroside A, flavonoid 등을 다량 함유한 국내산 상지를 원료로 한 상지주정 추출물을 이용한 인지기능개선 및 항산화 건강 기능식품 개발에 대한 지원이 필요함.
- 고령인구를 중심으로 증가하고 있는 인지기능 저하를 예방하기 위해, 성인병 예방 효과를 보이는 것으로 알려지고 식용가능 원료로 인정된 상지를 원료로 한 안전성이 확보된 천연물 유래의 건강기능식품 제품개발에 대한 지원이 필요함.

3. 연구개발 범위

본 연구과제의 개발 범위는 아래와 같다.

- 1) 상지 품종 선정, 상지 채집시기, 산지 결정
- 2) 상지 추출 주정 농도, 온도 및 추출시간 결정
- 3) 상지의 숙성에 의한 oxyresveratrol 함량 증진
- 4) 상지 주정추출물 제조공정 표준화 및 품질관리 기준 확립
- 5) 상지주정추출물의 안전성(세포독성, 중금속, 미생물, 유해물질등) 및 안정성 시험(보존온도, 보존 기간, 광선)
- 6) 상지주정추출물의 항산화력, 면역증강, 및 수명연장 효과 확인
- 7) 상지주정추출물의 항염증 효과 확인
- 8) 상지주정추출물의 인지기능개선 및 항치매 효과 in vitro 시험
- 9) 상지주정추출물의 인지기능개선 효과 동물시험
- 10) 인체적용시험 샘플의 레시피(분말 사용량, 부형제 종류, 혼합방법) 및 제형 개발
- 11) 인체적용시험용 상지주정추출물의 제조 및 샘플의 제조
- 12) 인체적용 샘플의 안정성 시험(용해성, 안정성)
- 13) 인지기능개선 인체 적용 시험 수행



년차별 연구개발 내용

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="167 349 1422 521">○ 현재 국내에서 참당귀뿌리추출물, 테아닌 등 복합추출물, 당귀 등 복합추출물, 녹차추출물, 도라지추출물, 홍삼농축액, 원지추출분말, 인삼/가시오갈피 등 복합추출물, 홍경천추출물, 유단백가수분해물 등이 인지기능개선 혹은 기억력 향상 개별인정형으로 판매 중에 있으나 보다 효능이 좋은 천연물 소재 및 제품의 개발이 필요함.<li data-bbox="167 584 1422 663">○ Oxyresveratrol을 사용한 다양한 연구가 세계적으로 이루어지고 있으나 현재 뽕나무 가지를 사용한 연구 사례는 없음.<li data-bbox="167 725 1422 804">○ 상지주정추출물과 oxyresveratrol을 이용한 연구사례(항고지혈증, 장관면역, 항산화, 항염증, 수명연장)는 세계적으로 본 연구 그룹이 가장 많이 수행하였음.	

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

제1장 서론

제1절 서론

1. 뽕나무(*Morus*)

뽕나무는 낙엽수로 북반구의 아열대에서부터 남반구의 열대까지의 넓은 범위와 해수면에서 4000 m까지 넓은 고도에 걸쳐 분포한다. 뽕나무는 *Moraceae*과 *Morus*속으로 30여종이 알려져 있으며 한국에는 백상(*Morus alba*), 산상(*M. bombycis*), 노상(*M. lhou*)의 3종이 주로 재배되고 있는데 이 중에 백상이 가장 많이 재배된다(Table 1). 백상은 3-4 m까지 빠르게 성장하는 특징을 가진 나무로 white mulberry, common mulberry, silkworm mulberry, *M. alba*등으로 불린다. 식품공전에 따르면 백상은 뽕잎, 오디, 상지, 상백피 등의 부위가 식용이 가능하지만 산상과 노상 품종은 잎과 오디만 식용이 가능하다. 뽕나무의 효능으로는 항당뇨, 항고지혈증, 항바이러스, 항진균, 항산화 등에 효과가 알려져 있다. 뽕나무의 주요 약효 성분으로 잎에는 루틴(rutin)과 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin)이 존재하고 α -glucosidase inhibitor로 작용하여 혈당량을 억제하는 효과가 있어 당뇨병 치료제로 사용 가능하다. 또한, 플라바논(flavanone)이 존재하여 항산화 및 항미생물 효과가 있다. 상백피는 뽕나무의 뿌리 껍질을 말린 것으로 고혈압, 진해, 진통, 해열 작용 등의 효능이 있다. 최근 연구 보고에서 상백피 추출물내의 멀베로사이드 A, 아스트라갈린(astragalín), 피세이드 등은 뛰어난 피부 보습 및 미백 효과가 밝혀졌다. 또한 퀘르세틴(querceetin)이 존재하여 세포를 활성 산소로 인한 산화 스트레스로부터 보호한다. 오디에는 비타민 C(ascorbic acid), β -카로틴(β -carotene), 알칼로이드(alkaloid), 카로테노이드(carotenoid), 플라보노이드(flavonoid), 안소사이아닌(anthocyanin)등이 존재하여 항산화, 항염증, 항암, 심혈관 질환에 효과가 알려져 있다. 상지는 옥시레즈베라트롤, 멀베로사이드 A, 레스베라트롤, 피세아탄올 등의 다량 존재하여 항산화, 항염, 항암 등의 효과가 알려져 있다. 또한 뽕나무의 산물 중 옥시레즈베라트롤은 상지에서 가장 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 상백피는 옥시레즈베라트롤보다 배당체인 멀베로사이드 A를 더 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있고, 오디와 뽕잎에는 옥시레즈베라트롤의 함량이 거의 없는 것으로 알려져 있다.

2. 상지(*Ramulus Mori*)

상지는 *M. alba* L.의 어린가지로 0.5~1.5 cm의 지름을 갖는 말린 약재로 바깥 면은 황갈색의 점 모양을 갖는 피목이다. 단단하고 질겨 잘 꺾이지 않고 꺾인 면의 피부는 매우 얇다. 본초강목에 따르면 상지는 풍증, 각기병, 수기 증상을 제거하고 음식을 소화시키며 소변을 원활하게 한다. 또한 입이 마르는 증상, 부스럼, 고혈압, 팔다리 마비증상에 사용하고 지사, 항균, 혈압강하, 장 연동 운동 억제 등의 작용이 있다. 최근 상지 추출물과 관련된 연구에 따르면, 상지 추

출물에는 스틸벤노이드 물질들이 상당량 함유하고 있다. 그 중 옥시레즈베라트롤, 멀베로사이드 A, 레스베라트롤, 피세아탄올 등의 다량 존재하여 뛰어난 피부 보습 및 미백 효과가 밝혀졌다. 옥시레즈베라트롤은 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 티로시나아제를 억제하여 햇빛이나 멜라닌으로 인한 색소 침착 등을 개선하는 효과 또한 탁월한 것으로 보고되었다(1). 또한 스틸벤노이드 물질들은 체내의 활성산소를 제거할 수 있는 높은 항산화 작용을 가지고 있어 활성산소를 원인으로 하는 질환들의 예방 원료로 기대된다.

Table 1. Classification of *Morus alba* L.

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobonta
Superdivision	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Subclass	Hamamelidiae
Order	Urticales
Family	Moraceae
Genus	<i>Morus</i> L.
Species	<i>Morus alba</i> L.

*Source : UCDA, NRCS. 2008. The plants database(<http://plants.usda.gov>, 23 June 2008)

3. 스틸벤노이드(Stilbenoid)

스티벤(stilbene) 물질은 두 개의 방향족 고리를 이중결합으로 연결한 물질로 트랜스(trans)-스티벤 물질과 시스(cis)-스티벤 물질로 나뉜다. 시스-스티벤은 구조적으로 두 개의 방향족 고리 결합을 방해하여 안정성이 트랜스-스티벤보다 불안정하여 자연계에는 주로 트랜스-스티벤의 형태로 존재한다. 스틸벤 구조에 수산기를 갖는 스틸벤 유도체를 스틸벤노이드(stilbenoid)라 한다. 스틸벤노이드는 나무의 심재에서 생성되는 2차 대사물질로 파이토어렉신(phytoalexin)으로 작용한다. 잘 알려진 스틸벤노이드로는 레스베라트롤(resveratrol), 옥시레즈베라트롤(oxyresveratrol), 피세아타놀(piceatannol), 라폰티게닌(rhapontingenin)과 이들의 배당체인 피세이드(piceid), 멀베로사이드(mulberroside A), 아스트리진(astringin), 라폰티신(rhaponticin) 등이 있다. 특히, 최근 옥시레즈베라트롤은 “French paradox” 물질로 알려진 레스베라트롤 보다 약 1.5-2배 높은 항산화력(2), 낮은 세포독성(3), 높은 세포 투과성(4) 등으로 새로운 건강기능식품 소재로 많은 연구가 진행되고 있다.

4. 옥시레즈베라트롤(Oxyresveratrol)

옥시레즈베라트롤은 뽕나무과 식물 중 하나인 *Artocarpus lakoocha*의 심재(heart wood)에서 처음으로 발견된 4개의 -OH기를 갖는 스틸벤노이드이다. 옥시레즈베라트롤은 식물이 외부로부터 물리적 스트레스인 온도, 상처, 자외선, 화학적 스트레스, 생물학적 스트레스인 미

생물의 감염으로부터 자신을 보호하기 위해 생성하는 파이토어렉신이다. 옥시레즈베라트롤의 공식 명칭은 4-[(*E*)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)eth-enyl]-1,3-benzenediol와 *trans*-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene이며 분자량은 244.24 g/mol, 녹는점은 201°C, 끓는점은 523.8°C, 흡수 파장은 329 nm 인 물질이다. 용매에 대한 옥시레즈베라트롤의 용해도는 메탄올에서 406.6 mg/mL, 에탄올에서 355.3 mg/mL, 물에서는 0.64 mg/mL이다. 식물에서 옥시레즈베라트롤의 생합성은 페닐알라닌을 출발점으로 하여 시남산(cinnamic acid), *p*-하이드록시시남산(*p*-hydroxycinnamic acid), *p*-쿠마로일 CoA(*p*-coumaroyl CoA)를 거쳐 3개의 말로닐 CoA(malonyl CoA)와 축합 반응하여 레스베라트롤을 생성한다. 또한 생성된 레스베라트롤은 산화되어 옥시레즈베라트롤로 생성된다(Fig. 1)(5). 옥시레즈베라트롤은 포도과, 뽕나무과, 백합과, 사초과, 청미래덩굴과의 식물의 뿌리, 줄기, 잎 등에서 발견된다(6,7) 이 식물 중 뽕나무는 국내외에서 전통 의약품으로 가장 많이 사용되고 연구되어 왔다. 옥시레즈베라트롤의 배당체인 멀베로사이드 A는 뽕나무 뿌리인 상백피에 다량으로 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 상백피에서 추출된 멀베로사이드 A를 효소로 가수분해하여 옥시레즈베라트롤을 제조하였다는 연구 보고가 있다(8). 옥시레즈베라트롤은 “French paradox”로 알려진 레스베라트롤에 비해 약 1.5-2배 높은 항산화력, 낮은 세포독성, 높은 세포 투과성 등의 특성이 있는 것으로 보고되었다. 옥시레즈베라트롤은 항산화 뿐만 아니라 항염증, 혈중지질 개선, 항당뇨, 항암 등의 효과들이 알려지면서 옥시레즈베라트롤 함유 식물들의 건강기능 식품으로서의 다양한 연구가 진행 중에 있다.

Table 2. Chemical structures of oxyresveratrol, mulberroside A and resveratrol.

Compound	Structure
Oxyresveratrol	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HO} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array} $
Mulberroside A	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O} \quad \text{Glc} \\ \\ \text{HO} \end{array} $
Resveratrol	$ \begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{OH} \end{array} $

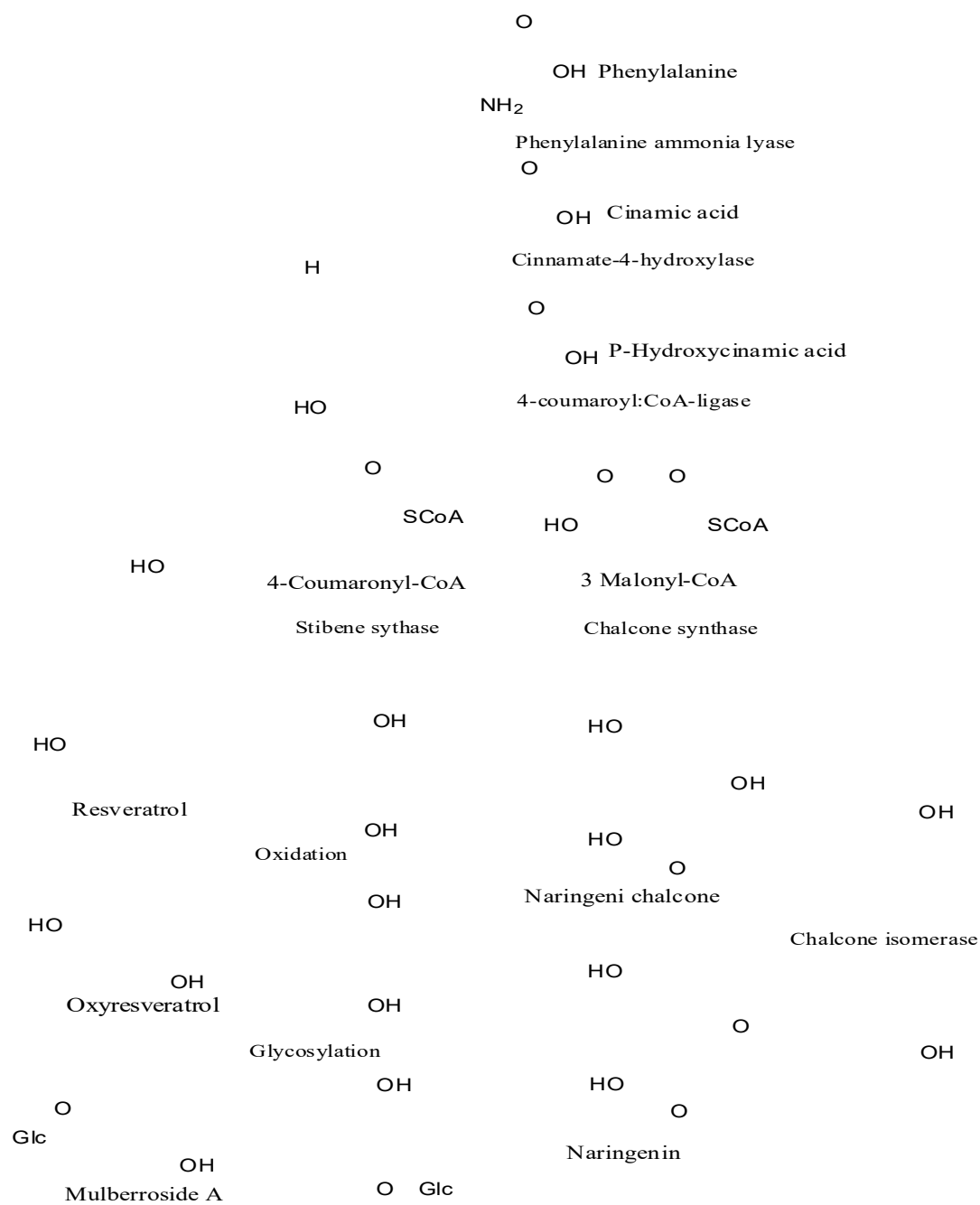


Fig.1. Biosynthesis pathway of stilbenoid and flavonoid(5).

5. 옥시레즈베라트롤의 생물학적 활성

옥시레즈베라트롤은 항산화, 항바이러스, 항염, 항미생물 등의 다양한 생물학적 활성 효과가 있다. DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)법에 의한 항산화 실험 결과, 옥시레즈베라트롤의 자유라디칼 소거능은 레스베라트롤에 비해 약 1.5배 강한 것으로 확인되었다(2). 또한 옥시레즈베라트롤은 Hep G2세포의 타크린(tacrine) 세포독성으로부터 세포를 보호하는 효과를 나타내었다(3). 옥시레즈베라트롤은 뇌 손상 쥐와 비 뇌손상 쥐를 이용한 뇌 장벽 통과율 실험에서 뇌손상 쥐에서 투과율이 6배 높았다(4). 옥시레즈베라트롤의 바이러스 효과 연구에서 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)는 20-100 µg/mL의 농도에서 강한 증식억제를 나타내었다(9). 임상에서 사용되는 약물(Acyclovir)에 내성을 갖는 단순포진바이러스에 옥시레즈베라트롤은 바이러스 복제의 초기 및 후기 단계를 억제하였다. 또한 30% 옥시레즈베라트롤을 함유한 연고를 1일 5회 쥐에 사용한 결과 단순포진바이러스에 의한 피부 손상을 억제하였다(10). 기존 항말라리아제에 대해서 내성을 갖는 *P. falciparum* 3D7을 이용한 실험에서 옥시레즈베라트롤은 IC50 0.05 µg/mL으로 새로운 항말라리아제로서의 가능성을 확인하였다(11). 옥시레즈베라트롤은 염증 반응과 관련이 있는 IL-1β, IL-6, IL-8, NO, TNF-α, COX-2, iNOX의 생성을 저해하였다(12). 또한 MEK/ERK signaling cascade를 저해하여 CXCR4 매개 T 세포의 이동을 감소시켜 항염증 반응을 확인하였다(13). 옥시레즈베라트롤은 쥐에 *Pasteurella multocida*를 감염 유한 후 사망률을 확인한 결과에서 사망률이 낮아졌고, 탄소제거 시험을 통하여 식작용계수(phagocytic index)가 현저히 증가하여 세포매개성 면역 반응을 증진시키는 효과가 있었다(14). 옥시레즈베라트롤의 항당뇨 실험에서 제 2형 당뇨병 쥐를 이용한 고혈당 조절 실험 결과, α-글루코시다아제(α-glucosidase)와 수크라아제(sucrase)의 활성을 억제하여 혈당이 감소하는 것을 확인하였다(15). 항고지혈증 실험에서 옥시레즈베라트롤은 LDL-C(low density lipoprotein cholesterol-C) 감소와 LDL의 산화억제 효과가 확인되었다(16). 고콜레스테롤을 섭취한 쥐에 옥시레즈베라트롤을 투여한 결과, LDL, 총콜레스테롤, 트리글리세리드(triglyceride)는 현저히 감소하였으나 HDL(high density lipoprotein cholesterol)은 증가하였고 간세포를 비교 분석한 결과, 형성되었던 지방구가 거의 사라진 것으로 나타났다(17).

6. 옥시레즈베라트롤의 신경 보호 효과 및 인지기능 개선

신경세포(neuron)의 퇴화에 기인하여 발생된 신경세포퇴행성 질환은 파킨슨병과 같은 운동 장애 질환과 알츠하이머 질환과 같은 실어증(aphasia), 기억상실(amenia), 인지불능증(agnosia), 운동 불능(apraxia) 등의 다기능장애로 나타난다. 조직병리학 연구에 따르면 알츠하이머의 일반적인 특징은 뇌에 tau 단백질과 베타아밀로이드 펩타이드(β-amyloid peptide)의 과도한 축적이다. β-Amyloid의 축적은 amyloid 플라크 형성과 neurofibrillary 엉킴을 유도하여 염증을 일으키고 뇌독성 경로를 활성화하여 뇌세포의 파괴 혹은 기능장애로 나타난다(18). 아직까지 이 질병들은 증상을 완화시키는 것 이외의 확실한 치료법이나 예방법이 개발되지 않아 스틸벤, 플라보노이드, 카테킨 등의 천연물로부터 예방 및 치료제를 개발하기 위한 연구가 집중되고 있다. 뇌경색(cerebral stroke)후의 뇌손상 감소효과를 측정하기 위해 뇌 허혈성 모델(rat middle cerebral artery occlusion)의 쥐에 oxyresveratrol (10 혹은 20

mg/kg)을 복강 내 주입한 결과, 뇌출혈성 경색(brain infarct)의 크기가 54, 63% 각각 감소하였다. 또한 oxyresveratrol의 투여는 세포사멸의 지표인 cytochrome C, caspase3, 그리고 뇌안의 세포사멸 핵수가 현저히 감소하였다(19). 조직 배양된 쥐 cortical neuron을 사용하여 β -amyloid 유발 신 경독성에 대한 oxyresveratrol의 효과를 검토한 결과, oxyresveratrol은 Ca^{2+} 증가를 억제함에 의해 β -amyloid에 의해 유발되는 뇌세 포 손상 억제, ROS (reactive oxygen species) 발생 억제, glutamate 방출 억제 등의 효과를 보여 신경보호 약물로서의 가능성이 최초로 확인되었다(20). 뇌손상이 있는 쥐와 뇌손상이 없는 쥐를 사용하여 oxyresveratrol의 혈액-뇌 장벽 통과율을 조사한 결과, 뇌 손상이 있는 쥐의 oxyresveratrol 투과율이 6배 높게 나타났다. 따라서 oxyresveratrol은 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier) 통과가 가능하여 뇌경색시 산화적인 스트레스에 의해 나타나는 퇴행성 뇌 질환 치료를 위한 상호보완적인 약물이 될 수 있음이 증명되었다(21). Jeon 등(22)은 *S. rhizoma*의 추출물이 β -secretase 저해 활성이 높은 것을 확인하고 이로부터 resveratrol, oxyresveratrol, veraphenol, scirpusin 등의 물질을 분리 정제하였다. 이들 물질 중 oxyresveratrol은 비경쟁적(non-competitively) 억제제로 K_i 5.4×10^6 M, IC_{50} 7.6×10^{-6} M이었으며 resveratrol 보다 약 2배 강한 저해활 성을 나타내었다. Chao 등(23)은 neuron 독성 물질인 6-hydroxydopamine을 neuroblastoma SH-SY5Y 세포에 처리한 후 oxyresveratrol과 resveratrol의 neuron 보호 효과를 비교하였다. 이 실험에서 oxyresveratrol은 resveratrol보다 세포괴괴의 지표 효소인 lactate dehydrogenase와 caspase-3 활성을 현저히 감소시켰고 반면에 SIRT1 함량은 크게 증가시키는 것으로 나타나 oxyresveratrol이 resveratrol보다 파킨슨 질병 치료 물질로 더 가능성이 크다고 보고하였다. Oxyresveratrol, resveratrol, piceatannol 등의 스틸벤류들과 curcumin을 사용하여 β -amyloid 형성 억제에 의한 신경보호효과를 in vitro 모델에서 검토한 결과, ϵ -veniferin glucoside가 93%로 가장 우수하였으며 resveratrol은 63%, oxyresveratrol은 32%, piceatannol은 25%의 순서로 나타나 oxyresveratrol보다 resveratrol이 β amyloid 형성 억제 효과가 우수한 것으로 나타났다(24). Weber 등 (25)은 neuron과 glia를 동시 배양한 in vitro stretch-induced trauma 모델에 glutamate를 높은 농도로 노출시킨 후 oxyresveratrol의 효과를 조사하였다. 앞선 실험에서 외상 후 oxyresveratrol의 처리는 현저한 세포 사멸을 억제한 것으로 나타났으나 높은 농도의 glutamate에 노출 후 oxyresveratrol의 처리는 세포 사멸을 억제하지 못하였다.

7. 옥시레즈베라트롤의 항염증 작용 및 면역증강 작용

다양한 질병과 관련된 염증반응을 저해하는 것은 많은 종류의 질병 치료 및 예방에 도움이 된다. 따라서 우수한 항염증 반응을 보이는 oxyresveratrol에 대한 연구 및 oxyresveratrol을 다량 함유 하고 있는 약용식물 특히 뽕나무 추출물을 이용한 항염증 효과 및 염증반응이 원인이 되는 질병의 치료효과에 대한 결과들이 많이 보고되었다. Oxyresveratrol은 in vivo 실험에서 신경면역성 반응(neuroimmune response)을 감소시키는데 이는 선택적으로 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 생성을 저해하는 효과에 의한 것으로 보고되었다(26). 뽕잎 메탄올 추출물을 이용한 항염증 반응에 대한 연구결과에 의하면 LPS로 유도된 RAW264.7 macrophage 염증모델에서 nitric oxide (NO) 생성을 억제하였으며, TNF- α 와 같은 염증 매

개체들의 생성을 억제하였고, COX-2 및 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 활성 저해 효과를 보여 oxyresveratrol을 유효성분으로 함유하고 있는 뽕잎 추출물이 우수한 항염증 효과를 나타냄을 알 수 있었다(27). 또한 뽕나무과의 *A. heterophyllus*의 추출물로부터 분리한 oxyresveratrol의 경우에도 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시키는 효과가 보고되었다(28). 뽕나무 추출물로부터 분리 정제한 oxyresveratrol을 이용한 in vivo 및 in vitro 항염증 효과 실험의 결과, LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 nitrite 축적을 저해하는 효과를 보였으나 특이적으로 iNOS 효소 활성 저해에는 효과가 없었다. 그러나 oxyresveratrol은 iNOS 발현을 농도 의존적으로 저해 하여 iNOS 효소활성 보다는 발현에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(29). 또한 oxyresveratrol은 LPS에 의한 nuclear factor κ B (NF- κ B)의 핵 내 이동을 저해하고 COX-2 활성을 현저히 저해시키는 효과를 보였다. 따라서 oxyresveratrol은 염증촉진물질인 NF κ B 활성 및 COX-2 활성을 크게 저해함으로써 iNOS 발현을 저해하여 항염증 효과를 보이는 것으로 생각된다. Oxyresveratrol의 또 다른 항염증 기전은 MEK/ERK signaling cascade를 저해함으로써 CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) 매개 T 세포 이동을 감소시켜 항염증 반응을 보이는 것으로 보고되었다(30). 뽕잎 메탄올추출물을 이용한 면역반응에 미치는 실험 결과에서는 추출물 처리에 의해 혈청 내 immunoglobulin 수준이 증가되었으며 마우스에서 병원성균인 *Pasteurella multocida* 감염 유도에 의한 사망률을 저하시키는 결과를 보였다. 또한 탄소제거시험(carbon clearance test)을 통해 macrophage의 이물질 탐식에 미치는 영향을 측정된 결과 phagocytic index가 현저히 증가하였으며 DNA 복제를 저해하는 부작용을 나타내는 항암제인 cyclophosphamide로 유도된 호중구감소증에 대해 보호 효과를 보여 체액성면역(humoral immunity) 뿐만 아니라 세포매개성 면역(cellmediated immunity) 반응도 증가시키는 것으로 보고되었다(31).

8. 옥시레즈베라트롤의 항산화작용

세포내에서 끊임없이 생산되는 반응성이 매우 높은 활성 산소 종(ROS)은 산화스트레스(oxidative stress)를 유발하여 잠재적으로 세포에 해를 주는 물질로 알려져 있다. 따라서 ROS를 제거하기 위한 많은 연구들이 이루어지고 있으며 최근에는 특히 항산화 작용을 보이는 phytochemicals에 대해 관심이 증가하고 있는 추세이며 flavonoids, polyphenols, stilbenes 등에 대한 항산화 활성 연구가 보고되고 있다(32). 스틸벤 물질 중 oxyresveratrol이 resveratrol 보다 강한 항산화력을 보이는 것으로 보고되었다. ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 방법 등을 사용한 자유라디칼 소거능을 보면 oxyresveratrol의 경우가 resveratrol 보다 월등히 높은 활성을 보이는 것으로 나타났다. 또한, DPPH 시험 결과는 oxyresveratrol 및 resveratrol의 IC₅₀ 값이 28.9 μ M, 38.5 μ M을 보였다(33). Oh 등 (34)의 보고에 의하면 oxyresveratrol의 경우 Hep G2 세포의 tacrine 유도 세포독성에 대해 세포보호효과를 보였으며 우수한 DPPH free radical scavenging 효과 (IC₅₀=23.4 \pm 1.5 μ M), superoxide scavenging 효과 (IC₅₀=3.81 \pm 0.5 μ M)를 나타내었다. FeSO₄/H₂O₂에 의한 lipid peroxidation에 대해서도 강한 저해 효과를 보였다(35). Oxyresveratrol은 다양한 기전에 의한 항산화력을 보이는 것으로 보고되고 있는데 ni-

tric oxide synthase의 발현을 저해하는 작용을 하며, heme-induced in vitro oxidation assay에 의해 oxyresveratrol은 resveratrol 보다 더 뛰어난 metal chelation 효과를 보이는 것으로 보고되었다(35). 또한 oxyresveratrol은 riboflavin photoreaction 반응에서 항산화력이 높은 trolox 및 ascorbic acid보다 더 높은 DNA 보호능을 보였다(36). Oxyresveratrol은 4개의 hydroxyl groups에 기인하는 구조적인 특성으로 인해 우수한 항산화력을 보이므로 산화스트레스를 감소시키는데 유용하게 이용될 수 있는 물질로 의약품의 원료로 이용가능성이 매우 높은 물질이다. 항산화제로 널리 알려진 resveratrol에 대한 연구는 다양한 분야에서 연구가 진행된 반면 resveratrol 보다 항산화력이 우수한 oxyresveratrol에 대한 연구는 미흡한 실정으로 앞으로 oxyresveratrol의 항산화 기능에 대한 연구가 활발히 진행된다면 다양한 용도로 이용될 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

9. 숙성(postharvest)

숙성(postharvest)이란 식품의 제조과정에서 풍미, 조직, 혹은 영양분의 불충분한 것을 일정 조건하에서 방지하여 목표로 하는 성질을 갖게 하는 것을 말한다. 숙성 방법으로는 세척, 혼합, 절단, 건조, 포장, 저장 등이 있다. 작물들은 땅으로부터 수확 후에 제품의 품질이 악화되는 것이 일반적인 경향이다. 그러나 일부 작물들은 수확 후 숙성동안 특정 산물이 증가하는 경향을 나타내어 작물의 숙성에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 항산화물질인 폴리페놀 화합물을 생성하는 식물들은 성장 중에 폴리페놀을 생성하지만 수확 이후의 숙성과정에 의해 더 많은 폴리페놀 화합물을 생성한다. 따라서 최근 작물로부터 건강 기능물질인 스틸벤노이드, 플라보노이드, 그 밖의 물질을 증진시킬 목적으로 수확 후 숙성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 지금까지 알려진 숙성 시 폴리페놀 화합물 생성에 영향을 주는 외부 자극 요인으로 건조온도, 탈수, 초음파 처리, 자외선 등의 물리적 스트레스, 오존, 과산화수소, 메틸 자스모네이트(methyl jasmonate), 질소가스, 이산화탄소 등의 화학물질에 의한 스트레스, 곰팡이, 세균 등의 미생물 감염에 의한 생물학적 스트레스 등이 있다.

10. 숙성에 의한 스틸벤노이드 축적

레스베라트롤, 옥시레스베라트롤, 피세아타놀, 라폰티신 등의 스틸벤노이드 물질은 일부 식물 종이 자외선과 같은 물리적인 스트레스, 미생물의 침입에 의한 생물학적 스트레스가 있을시 자신을 보호하기 위해 만드는 파이토어렉신이다. 숙성에 의한 스틸벤노이드 물질의 축적은 포도, 땅콩, 아몬드, 사탕수수 등의 숙성 연구로 증명되었다. 포도주용 포도품종인 나폴레옹을 10일 동안 0℃ 냉장에서 저장 후 분석한 결과, 포도내의 레스베라트롤 양이 2배 증가하였다(37). 탈수량에 따른 포도 표피내의 폴리페놀 물질의 축적을 조사한 연구에서 30% 탈수 시 레스베라트롤 합성효소와 레스베라트롤 양은 크게 증가했으나 카페익산(caffeic acid), 코말릭산(coumaric acid), 갈릭산(gallic acid) 등의 물질은 축적량의 변화가 없었다(38). 포도나무 줄기에서의 레스베라트롤의 축적 효과를 확인한 연구에서 20℃에서 6주간 숙성 시에는 숙성 전보다 약 40배의 레스베라트롤이 증가하였다. 이때 레스베라트롤 최적의 숙성 온도는 15-20℃이었으며 이외의 온도에서는 레스베라트롤 양은 현저히 감소하였다(39). 포도에 자외선을

처리한 결과, 레스베라트롤 생합성 유전자가 발현되어 2품종 모두에서 약 5배의 레스베라트롤이 증가하였다(40). 다양한 파장의 자외선을 포도에 조사한 연구에서 레스베라트롤과 비니페린(viniferin)의 축적에 260-270 nm 파장이 가장 효과적이었다(41). 3품종의 포도에 초음파를 처리한 연구에서 5분간 처리하고 25℃, 6시간 배양 후의 레스베라트롤은 약 1.15-1.53배 증가하였다(42). 또한 포도의 표피와 포도 잎에 5, 15분 초음파 처리 후 6시간 배양 시 레스베라트롤은 약 7.7배 증가하였고 레스베라트롤 합성효소 발현량도 함께 증가하였다(43). 포도에 질소가스를 24시간 처리한 실험에서 레스베라트롤은 급격히 증가하는 것으로 나타났고 6시간 혹은 15시간 질소가스를 처리 시에 생성된 레스베라트롤이 더 오래 보존되었다(44). 사탕수수를 12 mm 크기로 잘라 7일 숙성하였을 시 피세아타놀은 1659 µg/g로 3일 배양시보다 약 55배, 레스베라트롤은 73 µg/g로 약 6배 증가하였으며 총 폴리페놀량과 항산화력도 함께 증가하였다(45). 땅콩에 자외선과 초음파 처리후의 레스베라트롤과 피세이드 축적 실험에서 자외선 처리는 약 6배, 초음파 처리는 약 3~5배 증가하였다(46). 가지치기한 포도 줄기를 숙성한 연구에서 실온에 8개월 보관한 결과, 스틸베노이드의 함량은 4777 mg/kg으로 약 5배 증가하였다(47). 포도 숙성 연구에서 메틸 자스모네이트를 포도에 처리한 후 자외선을 조사하고 20℃, 80% 상대습도에서 4일간 숙성한 실험에서 레스베라트롤은 숙성 전에 비해 약 2.5배 증가하였다(48).

제2장 재료 및 방법

제1절 제1세부 연구 재료 및 방법

(상지주정추출물의 인지기능개선 및 개별인정 임상시험)

1. 상지 주정추출 분말의 항치매 효능평가 (In vitro)

1.1. 베타아밀로이드 응집 억제 효능 평가

베타아밀로이드는 Bachem에서 구입한 펩타이드를 이용하였다. DMSO 에 soluble form 으로 녹인 베타아밀로이드를 96 well fluorescence black plate에서 PBS로 희석하여 25 μ M 농도로 제조하였다. 여기에 시험물질을 첨가한 것과 대조 군으로 부형제(DMSO)를 넣은 시료를 실온에서 1시간 반응하였다. 50 mM glycine buffer에 ThT 용액을 5 μ M로 희석시켜 각각의 시료에 150 μ l씩 첨가하였다. Fluorescence intensity는 microplate reader (SAFIRE)로 excitation 450 nm / emission 480 nm에서 10초 동안 진탕 후 측정하였다.

1.2. 항산화 효능 평가

DPPH 시약을 50% 에탄올에 녹여 0.2 mM로 제조한 후 well당 190 μ l씩 넣고 DMSO로 제조한 시험물질을 10 μ l씩 넣어 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

1.3. 아세틸콜린에스테라아제 억제 효능 평가

아세틸콜린에스테라아제 억제 효능 평가는 Invitrogen사의 Amplex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217) 방법에 따라 측정하였다. 96 well fluorescence black plate에 1X 반응 buffer로 시험물질을 희석하여 well당 50 μ l씩 넣었다. 1X 반응 buffer로 acetylcholinesterase를 0.2 U/ml로 희석하여 well 당 50 μ l씩 넣었다. Working solution을 well당 100 μ l씩 넣고 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 excitation 560 nm / emission 600 nm에서 형광을 측정하였다.

1.4. 베타시크리테아제 (BACE) 활성 억제 효능 평가

Recombinant BACE 단백질과 형광표지가 된 기질을 이용하여 단백질 분해능을 확인하는 조건에서 시험물질을 함께 넣어 억제 정도를 측정하였다. 96 well fluorescence black plate에 50 μ M 농도의 M2465 기질을 10 μ l를 넣고, 양성 대조군 H-4848과 시험군을 각각 10 μ l씩 넣었다. 10 μ g/ml 농도의 Recombinant BACE-IgG 를 well당 80 μ l씩 넣어 반응시켰다.

시험물질의 background를 제거하기 위해 Recombinant BACE를 넣지 않고 기질과 시험물질만을 반응 buffer에 넣어 반응시켰다. 37°C에서 18시간 반응시킨 후 FRET에 의한 형광 정도를 SAFIRE (TECAN) 형광 측정기를 이용하여 excitation 328 nm / emission 393 nm에서 측정하였다.

1.5. 세포 독성 확인

Mouse brain hippocampus cell line인 HT22 세포를 96 well culture plate에 넣고 37°C, CO₂배양기에서 4시간 이상 배양하였다. Serum이 없는 배지로 교체 (100 µl/well)하고 1시간 배양하였다. 양성대조물질과 시험물질을 50% DMSO에 20배의 농도로 희석한 후 5 µl/well씩 넣어 18-20시간 동안 배양하였다. 5 mg/ml의 MTT 용액을 15 µl/well씩 세포에 처리하고 3시간 동안 배양한다. 배지를 모두 제거한 후 DMSO를 150 µl/well 로 넣어 세포를 solubilization 시켰다. Microplate reader인 SUNRISE 기기를 이용하여 570 nm/630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

1.6. 베타아밀로이드 독성 억제 효능 평가 (cell based assay)

Mouse brain hippocampus cell line인 HT22 세포를 96 well culture plate에 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 4시간 이상 배양하였다. Serum이 없는 배지로 교체 (100 µl/well)하고 1시간 배양하였다. 양성대조물질과 시험물질을 50% DMSO에 20배의 농도로 희석한 후 5 µl/well씩 넣어 1시간 배양하였다. Beta amyloid 1-42 peptide를 25 µM 농도로 4일간 실온에서 응집시켜 만든 용액을 1 µM 농도로 세포에 처리한 후 18-20시간 배양하였다. 5 mg/ml의 MTT 용액을 15 µl/well씩 세포에 처리하고 3시간 동안 배양하였다. 배지를 모두 제거한 후 DMSO를 150 µl/well 넣어 세포를 solubilization 시켰다. Microplate reader인 SUNRISE 기기를 이용하여 570 nm/630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 상지 주정추출 분말의 세포독성 및 항산화 효능 평가(In vitro)

2.1. 젓산 탈수소 효소 측정

2.1.1. 시액 조제

가. 대조물질(vehicle): 2016년 6월 7일 제조한 멸균증류수를 전 시험 기간 동안 사용하였다.
나. 시험물질 (상지추출물): 덩어리로 되어있는 분말을 막자 사발을 이용해 곱게 갈아 무게를 잰 후 50 mg/ml 로 멸균증류수에 녹여 냉장(0-8°C) 보관하여 사용하였다.

2.1.2. 시험물질 및 대조물질 준비

냉장 보관한 50 µg/ml 농도의 시험물질을 Serum이 없는 DMEM 배지에 각 시험 농도별로 희석하여 12.5 µg/ml ~ 100 µg/ml 농도로 준비하였다. 양성대조군인 Triton X-100은

Serum이 없는 DMEM 배지에 2% 용액이 되도록 준비하였다.

2.1.3. 젓산탈수소효소 측정 (LDH assay)

Mouse brain hippocampus cell line인 HT22 세포를 96 well culture plate에 붙여 37°C CO₂ 배양기에서 4시간 이상 배양하였다. Serum이 없는 배지에 양성대조물질과 시험물질을 2배의 농도로 희석한 후 100 µl/well씩 넣어 배지를 교체하여 1시간 배양하였다. Serum이 없는 배지에 H₂O₂를 2 µM농도로 희석한 후 100 µl/well씩 첨가한 그룹과 대조물질을 넣은 그룹으로 나누어 처리한 후 18-20시간 동안 배양하였다. 상등액을 100 µl/well씩 취하여 다른 96 well plate에 넣고 LDH 용액을 100 µl/well 넣어 30분간 실온에서 반응시켰다. 세포가 없는 배지만을 넣은 background control도 100 µl/well 넣고 동일하게 LDH 용액을 100 µl/well 넣어 30분간 실온에서 반응시켰다. Microplate reader인 SUNRISE 기기를 이용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2.2. H₂O₂처리 (산화 스트레스)에 대한 항산화 효능 측정

Cytotoxicity (%) = (exp. Value-low control)/(high control-low control) X100

Exp. Value : 상지추출물 농도별 결과

Low control : untreated normal cells

High control : Maximum LDH activity (Triton X-100)

2.3. 상지추출물의 세포 독성 측정

Cytotoxicity (%) = (exp. Value/low control) X100

Exp. Value : 상지추출물 농도별 결과

Low control : untreated normal cells

2.4. 통계 처리

2.4.1. H₂O₂처리 (산화 스트레스)에 대한 항산화 효능 측정

시험결과에 대한 통계처리는 GraphPad Prism 5 프로그램을 이용하였다. One-way ANOVA 를 이용하여 분석 후, Tukey's Multiple Comparison Test를 이용하여 H₂O₂를 처리한 군에 대하여 유의성을 검정하였다. 유의성 인정은 p<0.05로 하였다.

2.4.2. 상지추출물의 세포 독성 측정

시험결과에 대한 통계처리는 GraphPad Prism 5 프로그램을 이용하였다. One-way ANOVA를 이용하여 분석 후, Tukey's Multiple Comparison Test를 이용하여 low control를 처리한 군에 대하여 유의성을 검정하였다. 유의성 인정은 p<0.05로 하였다.

3. 상지 주정추출 분말의 인지기능 개선 효과 (동물 시험)

3.1. 스코폴라민으로 유도된 기억손상모델에서 상지추출물에 의한 회복 효능실험 (Y-maze)

- 가. 정상군, 부형제 투여군 (스코폴라민 투여군), 상지추출물 (50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg) 투여 후 스코폴라민 투여군, 도네페질 투여 후 스코폴라민 투여군 총 7개의 군으로 나누고 각 군당 10마리씩 실험을 진행 하였다.
- 나. 시험물질의 투여는 하루에 한번 총 2회 경구 투여 하였으며, 행동평가 하는 날은 수행 1시간 전에 투여 하였다.
- 다. 정상군을 제외한 스코폴라민 투여군(1 mg/kg)은 행동평가 시작 30분전 스코폴라민을 복강으로 투여 하였다.
- 라. 시험물질의 투여 농도는 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg로 투여 하였고, 도네페질은 5 mg/kg로 투여하였다.
- 마. 시험물질에 대한 부형제는 D.W.를 사용하였다.
- 바. Y maze test 기기는 세개의 arm (길이 42 cm, 넓이 3 cm, 높이 12 cm)으로 구성 되었으며, 동일한 각도로 제작하였다.
- 사. Y maze test에서 % spontaneous alternation 값의 측정은 동물을 미로의 가장 가운데 위치 위치시킨 후 8분 동안 자유롭게 미로내에서 움직이도록 한후, 동물이 각각의 통로에 들어가는 순서를 시각적으로 관찰하였다.

3.2. 스코폴라민으로 유도된 기억손상모델에서 상지추출물에 의한 회복 효능실험 (NOR)

- 가. 정상군, 부형제 투여군 (스코폴라민 투여군), 상지추출물 (50 mg/kg, 100 mg/kg) 투여 후 스코폴라민 투여군, 도네페질 투여 후 스코폴라민 투여군 총 5개의 군으로 나누고 각 군당 10마리씩 실험을 진행 하였다.
- 나. 시험물질의 투여는 하루에 한번 총 3회 경구 투여 하였으며, 행동평가 당일은 평가수행 1시간 전에 시험물질을 투여 하였다
- 다. 정상군을 제외한 스코폴라민 투여군(1 mg/kg)은 행동평가 시작 30분전 스코폴라민을 복강으로 투여 하였다.
- 라. 시험물질의 투여 농도는 상지추출물 50 mg/kg, 100 mg/kg, 도네페질은 5 mg/kg로 투여하였다.
- 마. 시험물질에 대한 부형제는 D.W.를 사용하였다.
- 바. Novel object recognition test 는 정사각형 (길이 40 cm, 넓이 40 cm, 높이 40 cm) 흰색 chamber로 구성하였다.
- 사. Training trial 동안 chamber내에 동일한 물체(고무 혹은 너트)를 놓은 후 동물이 10분 동안 각 물체에 대한 탐색 행동을 시간으로 측정하였다.

3.3. 스코폴라민으로 유도된 기억손상모델에서 상지추출물에 의한 회복 효능실험 (Passive avoidance test)

- 가. 정상군, 스코폴라민 투여군, 상지추출물 투여군 (50 mg/kg, 100 mg/kg) 투여 후 스코폴라민 투여군, 도네페질 투여 후 스코폴라민 투여군 총 5개의 군으로 나누고 각 군당 15마리씩 실험을 진행 하였다.
- 나. 시험물질의 투여는 하루에 한번 총 3회 경구 투여 하였으며, 행동평가 당일은 평가수행 1시간 전에 시험물질을 투여 하였다
- 다. 정상군을 제외한 스코폴라민 투여군(1 mg/kg)은 행동평가 시작 30분전 스코폴라민을 복강으로 투여 하였다.
- 라. 시험물질의 투여 농도는 상지추출물 50 mg/kg, 100 mg/kg, 도네페질은 5 mg/kg로 투여하였다.
- 마. 시험물질에 대한 부형제는 D.W.를 사용하였다.
- 바. Passive avoidance test에서 step-through latency 값은 측정은 training trial과 retention trial로 이틀 동안 진행되었다.
- 사. 첫째 날 (Training trial), 실험시작 1시간 전에 동물실험이 수행되는 방으로 옮기고 약 물을 투여한 후 안정시켰다. 실험동물을 밝은 상자에 넣은 후 passive avoidance apparatus내에서 자유롭게 움직이게 한 후, 어두운 상자를 선택하여 들어가게 되면 바닥의 격자를 통해 동물에게 피할 수 없는 전기적 충격 (0.6 mA, 3초, 한번)을 주고, 10 초 후 자신의 home cage로 옮겼다. 그 후, 24시간 경과 후 (retention trial) 동물을 다시 밝은 상자에 넣은 후 어두운 상자로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다. 앞발과 뒷 발 모두가 어두운 상자로 들어갔을 때의 시간을 측정하였고, 차단시간 (cut off latency) 는 최대 300초로 하였다.

4. 알츠하이머병 acute model 효능평가(동물 시험)

4.1. 알츠하이머병 acute model 효능평가 (Y-maze test)

- 가. 정상군, 부형제 투여군 (Aggregated A β 1-42 투여군+부형제), 상지추출물 투여군 (Aggregated A β 1-42 + 상지추출물), 도네페질 투여군 (Aggregated A β 1-42 + 도네페질), ELND005 투여군 (Aggregated A β 1-42 + ELND005) 총 6개의 그룹으로 나누고, 각 그룹당 10마리씩 실험을 진행하였다.
- 나. 시험물질의 투여는 Aggregated A β 1-42 투여 30분 후에 첫 번째 경구투여를 하였으며, 다음날 동일한 시간에 두 번째 투여를 하여 총 2회를 수행하였다.
- 다. 시험물질의 투여 농도는 상지추출물 50 mg/kg, 100 mg/kg로 경구 투여 하였고, 도네페질은 5 mg/kg, ELND005 10 mg/kg로 경구 투여하였다.
- 라. 시험물질에 대한 부형제는 D.W.를 사용하였다.
- 마. Y maze test 시험은 Aggregated A β 1-42 10 nM i.c.v. injection 2일 경과 후 진행 하였다.
- 바. Y maze test 기기는 세 개의 arm (길이 42 cm, 넓이 3 cm, 높이 12 cm)으로

구성되었으며, 동일한 각도로 제작하였다.

사. Y maze test에서 % Spontaneous alternation 값의 측정은 동물을 미로의 가장 가운데 위치 위치시킨 후 8분 동안 자유롭게 미로 내에서 움직이도록 한 후, 동물이 각각의 통로에 들어가는 순서를 시각적으로 관찰하였다.

4.2. 알츠하이머병 acute model 효능평가 (Passive avoidance test)

가. 정상군, 부형제 투여군 (Aggregated A β 1-42 투여군 + 부형제), 상지추출물 투여군 (Aggregated A β 1-42 + 상지추출물), 도네페질 투여군 (Aggregated A β 1-42 + 도네페질), ELND005 투여군 (Aggregated A β 1-42 + ELND005) 총 6개의 그룹으로 나누고, 각 그룹당 11-15마리씩 실험을 진행하였다.

나. 시험물질(상지추출물)은 Aggregated A β 1-42 투여 30분 후에 첫 번째 경구투여하였으며, 다음날 동일한 시간에 두 번째, 그 다음날 세 번째 투여로 총 3회 수행하였다.

다. 시험물질은 50 mg/kg, 100 mg/kg 양으로 경구 투여하였다.

라. 양성대조물질인 도네페질은 5 mg/kg, ELND005은 10 mg/kg로 경구 투여하였다.

마. 시험물질에 대한 부형제는 D.W.를 사용하였다.

바. Passive avoidance test에서 Step-though latency 값의 측정은 acquisition trial과 retention trial로 이틀 동안 진행하였다.

사. 첫째 날 (acquisition trial), 실험시작 1시간 전에 동물실험 행동관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다. 실험동물을 밝은 상자에 넣은 후 passive avoidance apparatus내에서 자유롭게 움직이게 한 후, 어두운 상자를 선택하여 들어가게 되면 바닥의 격자를 통해 동물에게 피할 수 없는 전기적 충격 (0.6 mA, 3초, 한번)을 주고, 10초 후 자신의 home cage로 옮겼다. 그 후, 24시간 경과 후 (retention trial)동물을 다시 밝은 상자에 넣은 후 어두운 상자로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다. 앞발과 뒷발 모두가 어두운 상자로 들어갔을 때의 시간을 측정하였고, 차단시간(cut off latency)은 최대 300초로 하였다.

5. 상지추출분말의 안전성 검토

5.1. 미생물분석

- 상지 분말의 기준 규격 분석

5.2. 중금속, 잔류농약 및 이산화황 분석

- 중금속4종(납, 비소, 수은, 카드뮴), 잔류농약 6종, 이산화 황

6. 상지주정추출분말의 안정성 검토

6.1. 상지 원료 선정을 위한 상지 채집

1) 상지 채취

최적의 상지 원료를 얻기 위하여 충청도 광천, 충청도 공주, 충남 농업기술원 잠사곤충사업단(16종), 양평 양잠영농조합(8종)등을 채집후 추출하여 HPLC분석하였다.



Fig. 1. 충남 농업기술원 잠사곤충사업단에서 상지 채취.

6.2. 임상시험용 상지 주정추출 분말 제조를 위한 예비 실험

1) 상지 주정 추출 분말 제조

- (1) 상지 채집
- (2) 채집 상지 실온에서 약 1주일 간 보관
- (3) 세척 및 절단
- (4) 숙성 건조 (감압 건조기)
- (5) 유효물질 주정 추출
- (6) 감압 여과 및 감압 농축
- (7) 동결 건조
- (8) oxyresveratrol 함량 측정 및 제품 결정.

2) 상지 주정 추출 분말- 15.4.8. 약 1kg 샘플 접수.

3) 실험 조건과 항목 선정을 위한 예비 실험 계획 진행(~ 5월 말)

- ° 온도(4℃, 25℃, 40℃) 및 항목 설정을 위해 관능 (맛, 색상 등)을 관찰.

6.3. 상지주정추출분말 내 지표물질의 안정성 1차 실험

1) 보존온도, 보존 기간, 광선에서 지표물질의 맛 색상 변화

- (1) 보존온도- 4℃, 25℃, 40℃
- (2) 보존기간 - 11개월간 안정성 추적시험을 실시
- (3) 광선- 차광 및 비차광
- (4) 색상의 변화 - (ΔL , Δa , Δb)

6.4. 건강기능식품 제형 개발 시험

제조된 상지주정추출분말을 이용하여 상지주정추출분말 함량에 따른 제형 개발을 하였다. 건강기능 식품의 제형에는 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바등이 있으나 자사 보유 중인 설비로 가능한 제형인 과립, 캡슐, 정제를 제조하였다. 제형 개발에 사용된 배합비율은 Table 1, 2, 3과 같다. 배합된 상지주정추출분말(25%, 37.5%, 75%)을 유동층 건조기를 사용하여 분말을 제조한 후 이로부터 타정 및 분말과립 제형을 제조하였다.

Table 1. 상지추출분말 75%

배합1	원료명	비(%)
유동층 건조	상지추출분말(80%)	94.00
	덱스트린	5.00
2차	스테아린산마그네슘	1.000
합 계		100

Table 2. 상지추출분말 37.5%

배합1	원료명	비(%)
유동층 건조	상지추출분말(80%)	47.00
	덱스트린	52.00
2차	스테아린산마그네슘	1.00
합 계		100

Table 3. 상지추출분말 25%

배합1	원료명	비(%)
유동층 건조	상지추출분말(80%)	32.00
	덱스트린	67.00
2차	스테아린산마그네슘	1.00
합 계		100



Fig. 2. 유동층건조과립기 및 타정기.



Fig. 3. 상지주정추출분말의 과립, 스틱포장, 정제 정제 PTP포장.

- 유동층 건조과립기와 정제 타정기를 이용한 제조공정 -

원료혼합 및 정립	상지주정추출분말, 부형제 혼합
유동층건조 과립	60℃, 1시간이상 건조
2차원료 혼합	활택제혼합(흐름성개선)
타정	장방형의 정제 타정
포장	스틱 및 PTP 포장

Fig. 4. 과립분말 및 정제 공정.

6.5. 개발된 제형의 안정성 시험

상지 주정추출분말로 제조된 제형중에서 가장 적합한 제형을 선택하기 위해 40℃의 가혹 조건과 25℃의 상온에서 6개월(15년 12월~16년 5월) 동안 보관하면서 수분변화, 색상변화, 지표물질인 oxyresveratrol 변화등을 확인하였다.

1) 수분변화

수분은 건조감량법 (대한약전, 별표-5 일반시험법)에 따라 건조기에 넣어 105℃, 5시간 건조한 후 데시케이터 중에서 약 30분간 식히고 무게를 달아 측정하였다.

2) 색상변화

색상은 Konica Minolta Chroma Meter CR-400(JAPAN)으로 광선의 차광유무에 따라 보관하면서 확인하였다.



Fig. 5. 색차계.

3) Oxyresveratrol 함량 변화

Oxyresveratrol 함량 분석은 1차년에 확립한 분석법을 HPLC(YL9100, 영린기기)를 이용하여 수행하였다. 분석에 사용된 이동상은 CH₃CN(A)과 10 mM H₃PO₄(B)를 기울기 조건으로 사용하였다. A:B (10:90, v/v)으로 분석을 시작하여 10분까지 A:B (25:75, v/v), 30분까지 A:B (50:50, v/v)으로 분석하였다. 컬럼은 Luna C₁₈(5 μm, 4.6×250 mm, phenomenex), 온도는 30℃, 이동속도는 0.7 mL/min, 검출파장은 325 nm를 사용하였다.

7. 임상시험 시료제조 및 안전성, 안정성시험

경기도 양평양잠영농조합법에서 상지를 채취하여 확립된 상지주정추출분말 제조공정에 따라 임상시험용 상지주정추출분말을 제조한 후 안정성 실험을 경시변화 및 oxyresveratrol 함량변화를 조사하였다.

7.1. 임상시험용 상지주정추출분말 제조

1) 상지 채집 및 가공

- 농장 : 양평양잠영농조합법인(132-81-80479, 경기도 양평군 양동면 양서북로)
- 뽕나무품종 : 청일뽕
- 상지채취 작업공정은 다음과 같다.

① 가지치기



Fig. 6. 임상 시료 제조를 위한 상지 채집.

② 세척



Fig. 7. 채집된 상지의 세척.

③ 절단 (직경 ~ 25mm * 두께 ~ 45mm)



Fig. 8. 세척된 상지의 절단.

④ 저온건조



- 건조기 내부 -

- 건조기 외부 -

Fig. 9. 저온 진공 건조기에서 상지 건조(30℃, 5일)

⑤ 수분확인

기준에 도달 때까지 건조 (최종 수분기준; 5% ~ 6.0 %)

2) 상지 주정 추출 분말 제조

- (1) 상지 채집(양평양잠영농조합법인)
- (2) 채집 상지 실온에서 약 1주일 간 보관
- (3) 세척 및 절단
- (4) 숙성 건조 (감압 건조기)
- (5) 유효물질 주정 추출
- (6) 감압 여과 및 감압 농축
- (7) 동결 건조
- (8) oxyresveratrol 함량 측정 및 샘플제조

3) 상지주정추출분말 제조 공정

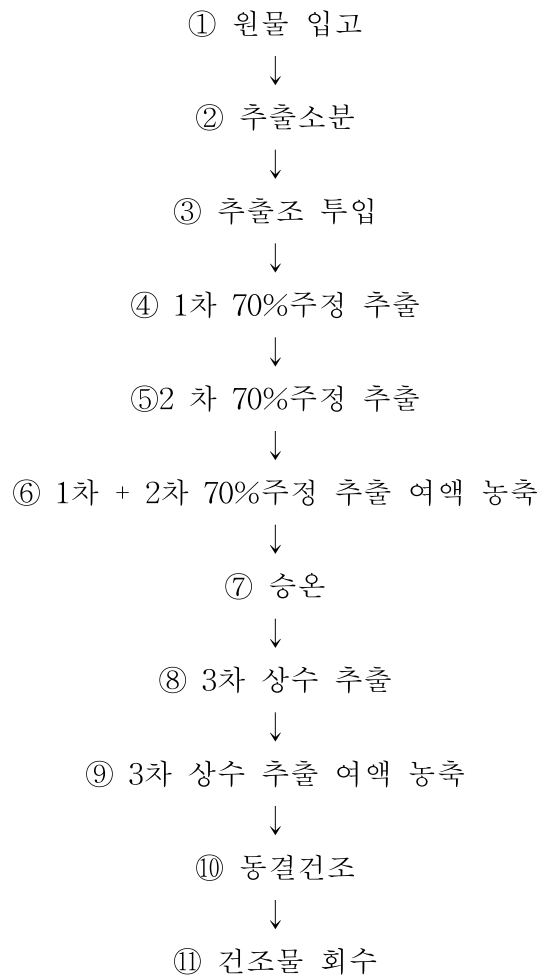


Fig. 10. 상지추출분말 제조공정도.

- 상지주정추출물 제조과정

▷ 원물 입고



Fig. 11. 건조된 상지.

▷ 추출소분



Fig. 12. 추출을 위한 건조 상지의 소분.

▷추출조 투입



Fig. 13. 추출조에 건조 상지의 투입.

▷1차 , 2차 3차 추출 및 농축



Fig. 14. 추출조에서 70% 주정에 의한 추출.

1) 1차 70% 주정 추출 : 추출조에 70.2% 발효주정(원물 대비 7.9배) 투입 후 액온 80~91℃에서 추출

2) 압력 0.4~0.5 kg/cm²의 조건에서 4.0시간 순환(순환펌프 유량 18m³/시간) 추출 -> 액온 60℃ 냉각 -> 50Mesh Bag 필터 -> 75μm * 20" wound 필터 3개 -> 1μm * 20" depth 필터 여과 -> 1차 추출 여액 수기

3) 1차 + 2차 70%주정 추출 여액 농축

4) 승온 : 농축액을 교반기에 투입 후 액온 90~95℃로 진행.

* 3차 상수 추출 : 2차 추출 잔사에(원물 대비 2.5배, 최종 약 24.5% 발효주정을 투입한 후 액온 60~50℃로 올림.

* 상압의 조건에서 순환(순환펌프 유량 18m³/시간) 하며 추출 및 잔사 세척

▷ 동결건조



Fig. 15. 동결건조기에서 동결 농축물 투입.

: 300ℓ RS type 동결건조기의 건조실을 생스팀으로 승온 살균 -> 예비냉동 -> 선반 -39℃까지 10시간 시료 동결 -> 17시간 승화 건조 -> 선반 ~ 40℃이하에서 79시간 건조(총 건조 시간 90시간) * 진공도 ~ 5mTorr



Fig. 16. 동결건조된 상지주정 추출물.

7.2. 임상시험시료의 안전성 분석(한국기능식품연구원 분석 의뢰)

7.2.1. 임상시료 상지주정추출분말의 영양성분 분석

- 상지 주정 추출분말의 9대 영양소 분석

7.2.2. 중금속, 잔류농약 및 이산화황 항목 분석

- 중금속 4종(납, 비소, 수은, 카드뮴)
- 잔류농약 6종(DDT, BHC, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Endosulfan)
- 이산화황

7.2.3. 미생물 분석

- 병원성 및 토양 미생물 독소 항목

7.3. 임상시험시료의 안정성 시험

7.3.1. 상지주정추출분말 임상시험 샘플에 대한 지표물질의 안정성확인 실험

임상시험 용도로 제조한 캡슐 제형의 온도에 따른 지표성분(Oxyresveratrol) 함량변화, 수분변화, 색가 등의 경시변화를 확인하였다.

추가로 스틱포장 제형제품과 캡슐 제형제품과의 품질 비교를 위해 두 제형 제품의 비교 경시변화를 진행하였다.

8. 임상시험

8.1. 임상시험제제 제조

임상시험용 제제 샘플의 제조는 임상 시험자가 먹기 좋게 아래의 처방으로 캡슐로 하여 Placebo와 진약을 제조하였다.

항목	진약		위약		비고
	성분	제품함량 (mg)	성분	제품함량(mg)	
1) 시험군 제품 1캡슐 (535mg)	상지주정추출물 분말	250	분말카라멜	25	
	덱스트린	250	덱스트린	475	
	스테아린산마그네슘	25	스테아린산마그네슘	25	
	이산화규소	10	이산화규소	10	
	합계(총 중량)	525	합계(총 중량)	535	
	2) 총 제조량 (정품 기준)	84,960캡슐 (코코아색 경질캡슐) (2차; 75,240 , 1차; 9,720)		82,520캡슐 (코코아색 경질캡슐)	
3) 포장 규격 (정품 기준)	1인당; 535mg/캡슐 × 280캡슐/bottle × 6 bottles		1인당; 535mg/캡슐 × 280캡슐/bottle × 6 bottles		
	268 bottles (44인)		294 bottles (49인)		
	(bottle 내용; 흰색 플라스틱병, 방습제 포함)				
4) 보관조건	냉장 창고(GMP); 24시간 가동, 상대습도; 50±5%, 온도; 20±2°C				

8.2. 임상시험 업무대행 계약서

본 연구 주관기관인 (주)에스엘에스와 건강기능성식품 CRO인 (주) 파마크로 간의 임상적용시험 대행 계약서.



업무대행계약서

경기도 평택시 팽성읍 주팔산단2길 23에 위치한 (주)에스엘에스를 '甲' 이라 하고, 서울시 서초구 강남대로 275 강남메인타워 11층에 위치한 (주)파마크로를 '乙'이라 하여, 甲, 乙 당사자간에 상지주정 추출물을 이용한 인지기능 개선 기능성 식품 개발 과정의 인체적용시험대행(이하 "업무대행"이라 한다)에 관하여 다음과 같이 계약을 체결한다.

제 1조 (업무대행의 내용, 범위 및 일정)

1) 업무대행의 내용 및 범위는 다음과 같다.

- ① 대행내용: 건강기능식품 인체적용시험과 관련한 아래의 업무대행 포함범위의 업무
- ② 임상목적: 인지기능 개선효과 확인
- ③ 임상방법: 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 위약대조인체적용시험
- ④ 시험책임자: 에이치플러스 양지병원 양지병원 신경과 강석재 MD
- ⑤ 시험대상: 확정된 시험계획서에 따름
- ⑥ 피험자수: 군당 약 40명, 2군, 총 80명(확정된 시험계획서에 따름)
- ⑦ 시험기관: 에이치플러스 양지병원 임상시험센터(수도권 GCP 기관)
- ⑧ 유효성 평가방법: 군간 비교하여 인지기능 유효성/기능성 평가 및 안전성 평가
- ⑨ 보고서 작성

단, 업무대행의 내용 및 범위는 건강기능식품법, 의약품임상시험 실시기준 등 관련법규의 변동 및 법규의 해석에 따라 달라질 수 있으며, 乙은 甲과 함께 확정된 임상시험계획서에 따라 본 업무대행의 내용 및 범위는 달라질 수 있다.

2) 업무대행의 포함 범위:

의뢰자 및 연구자와 협의하여 시험계획서 및 증례기록지 개발, IRB서류 작성, IB자료 작성, IRB심의 접수, 연구자 미팅, 모니터링 5회, 자료입력 및 통계처리, 결과보고서 초안 작성 및 상호 합의된 업무 및 이에 해당하는 비용

3) 불포함 범위: 시험제품 제조, 포장, 라벨, 배송 및 수거, 개시미팅 및 임상시험보험 비용, CRF등 제작 및 운송비용, SAE 보고, IRB변경/지속/연차 심의비, 연구자 접대 비용, 광고비용, 추가 통계분석, 개별인정형 서류작성 등 기타 협의되지 않은 업무 및 비용

제 2조 (업무대행 비용 및 지급)

업무대행비용(시험기관에 지급될 비용 포함)

甲은 乙에게 제1조에 따른 업무대행에 대한 비용과 시험기관(병원) 비용을 합하여 아래와 같이 지급한다.

甲은 乙에게 업무대행의 대가로 총 억삼천만원(W 230,000,000)을 현금으로 지급한다. 지급방법은 계약금 육천만원(W 60,000,000) 중 계약 후 삼천만원(W 30,000,000)을 지급하고, IRB 승인 완료 후 삼천만원(W 30,000,000)을 지급하기로 한다. 단, 乙의 비용 청구서를 받은 날로부터 7일 이내에 지급한다. 중도금 일억삼천만원(W 130,000,000)은 개시미팅 후 대상자

PharmaCRO.
Tel: +82-31-707-1139-40, Fax: +82-31-707-1180
www.PharmaCRO.co.kr



50%모집 후, 乙의 비용 청구서를 받은 날로부터 15일 이내에 지급한다. 잔금 사천만원 (₩ 40,000,000)은 최종결과보고서 수취 후, 乙의 비용 청구서를 받은 날로부터 15일 이내에 지급한다. 단 부가세는 별도로 한다.

제 3조 (비용 및 지급에 관한 추가사항)

- 1) 다음 사유의 경우 甲과 乙이 별도의 추가 계약으로 합의하는 경우에는 업무대행 비용이 재조정될 수 있으며 이의 대금 지급 방법도 조정될 수 있다.
 - ① 업무대행 비용은 업무의 대행 내용과 시험 방법, 시험기간 등에 따라 달라질 수 있으므로 변경될 경우 乙은 사전에 甲의 동의를 득한 후 진행한다.
 - ② 제 1조에서 명기한 항목 이외의 용역에 대하여 甲이 추가로 요청함에 따라 발생하는 경비.
 - ③ 업무대행 중 식품의약품안전처의 지시, 법률의 변동이나 행정조치(식품의약품안전처장 직인으로 발행된 공문)로 인하여 시험계획서의 변경 또는 업무대행 기간이 연장되어 용역의 대가를 재 산정하여야 하는 경우.
- 2) 乙은 본 계약기간 내에 모든 업무대행용역을 완료하여야 하며, 乙이 수행하는 모든 용역은 유효한 약사법, 의약품 임상시험 실시에 관한 관련 규정에 따라 실시되어야 한다. 임상시험 의뢰자로서의 "甲"과 임상시험 수탁기관으로서의 "乙"간의 역할, 기능, 의무 및 책임을 명확히 하기 위하여 "의약품임상시험관리기준(KGCP, 계약 시 유효한 최근 개정본 기준)"을 따름을 甲과 乙이 동의한다.

제 4조 (업무대행 및 결과보고서 제출)

- 1) 乙은 乙이 보유하고 있는 전문 지식을 충분히 활용하여 선량한 관리자의 주의 의무로써 충실하게 업무대행용역을 수행하여야 하며, 용역 수행의 제반 사항에 대해서 甲과 협의하여 진행하여야 한다.
- 2) 乙은 각 시험 종료 후 자료입력 이후 1개월 이내에 세부자료를 포함한 보고서를 甲에게 제출하여야 한다. 甲은 乙이 제출한 보고서에 대해서 수정 또는 보완을 요청할 수 있다.

제 5조 (연구결과의 귀속 및 실시)

본 계약에 의한 산업재산권을 포함한 모든 지적재산권, 자료 및 연구 결과는 甲의 소유로 한다.

제 6조 (피해자보상규약)

- 1) 甲은 乙이 대행하여 시험기관(병원)에서 시행하는 임상시험 중 피험자에게서 명백하게 본 시험용제품의 적용으로 인한 피험자의 신체적인 손상의 피해가 발생한 경우 甲과 시험기관과의 별도 계약에 따라 피해에 대한 보상을 책임진다.

PharmaCRO.
Tel: +82-31-707-1139~40, Fax: +82-31-707-1180
www.PharmaCRO.co.kr

8.3. 임상 적용 시험 계획서

인 체 적 용 시 험 계 획 서

경도인지장애 대상자에서 MAEXT의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한
단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Intervention Study of the
Efficacy and Safety of "MAEXT" in the Mild Cognitive Impairment Subject

시험 계획서 번호 MAEXT-02

버 전 (작 성 일) 1.1(2016.08.17)

인체적용시험의리자 ㈜에스엘에스

인체적용시험수탁기관 ㈜파마크로(PharmaCRO)

기 밀 문 서

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험책임자 및 인체적용시험담당자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용 식품을 복용 받는 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 ㈜에스엘에스 및 ㈜파마크로 (PharmaCRO)의 사전 서면 동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

8.4. 임상시험심사위원회 심사결과 통지서



에이치플러스 양지병원 임상시험심사위원회의
H PLUS YANGJI HOSPITAL INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

[서식14]

심사결과 통지서

과제번호	C16008			
주 소	시험책임자	강석재	직위	과장
	의뢰기관	(주)에스엘에스		
연구과제 명	경도인지장애 대상자에서 MAEXT의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험			
	Protocol NO.	MAEXT-02		
심의 종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의			
회의소집요청일	2016년 07월 21일			
연구정보	평가대상	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 기타		
		성분명	상지주정추출물	
	상품명	미정		
	연구단계	<input type="checkbox"/> 제1상 생물학적동등성시험 <input type="checkbox"/> 제1상 임상시험 <input type="checkbox"/> 제2상 <input type="checkbox"/> 제3상 <input type="checkbox"/> 제4상 <input type="checkbox"/> PMS <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (인체적용시험)		
	연구주도	<input checked="" type="checkbox"/> 의뢰자 주도임상(SIT) <input type="checkbox"/> 연구자 주도 임상 (ITT)		
용도	<input checked="" type="checkbox"/> 학술용 <input type="checkbox"/> 국내허가용(KFDA) <input type="checkbox"/> 해외허가용			
심의일자	2016년 07월 28일			
제출서류목록 및 비전번호	1. 연구계획서 요약 2. 연구계획서 (Ver 1.0) 3. 대상자 설명문 및 동의서 4. 대상자 모집 문건(모집 매체) 5. 중재기록서 6. 피해보상에 관한 규약 7. 보험증 사본(추후제출예정) 8. 임상시험자료집 9. 시험책임자의 최근 이력 또는 기타경력에 관한 문서 10. 연구비 내역서 11. 이해상충 서약서 12. 기타(스크리닝 및 기능성 평가자, 개인정보사용동의서)			
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 중지 또는 보류			
승인일자	2016년 08월 01일			
심의위원	양정선(의장), 이해리(위원), 최원호(위원), 김진리(위원), 홍순재(위원), 최경석(위원), 손경은(위원), 김은희(위원)			
심의의견	예상되는 이상반응에 대한 대비를 철저히 하시어 시험 진행 바랍니다.			
<small>본 임상시험심사위원회는 국제표준화추진회의(ICH), 의약품임상시험관리기준 및 생명윤리및안전에관한법률 등 관련 법규를 준수합니다. 본 시험과 이해상충관계가 있는 위원이 있을 경우 해당 위원은 시험의 심사에서 배제 하였습니다.</small>				

임상시험심사위원회의
에이치플러스양지병원장



Version 2.2 (26 June 2016)

8.5. 임상적용 시험자 자료집

Protocol No.MAEXT-02
Investigator's-Brochure(ver1.1)

CONFIDENTIAL

인체적용시험자자료집

Investigator's Brochure

상지주정추출물(MAEXT)

Ver 1.1

2016. 08. 17

(주)에스엘에스

기밀문서

본 인체적용시험자자료집에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험책임자 및 인체적용시험담당자, 인체적용시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용 식품을 투여 받는 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 ㈜에스엘에스 및 ㈜파마크로의 사전 서면동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

❖ 인체적용시험계획서개요

인 체 적 용 시 험 제 목	경도인지장애 대상자에서 MAEXT의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인 체 적 용 시 험 책 임 자	양지병원 신경과 강석재
실 시 기 관	양지병원, 서울특별시 관악구 남부순환로 1636
인 체 적 용 시 험 의 회 자	(주)에스엘에스
인 체 적 용 시 험 디 자 인	단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조 비교 인체적용시험
인 체 적 용 시 험 기 간	IRB 최초 승인일로부터 약 24개월 예정
인 체 적 용 시 험 대 상	경도인지장애 증상을 가진 문맹자를 제외한 만 40세 이상 80세 미만의 남성 및 여성
대 상 자 수	총 80예 [최종 평가가능 예수 72예, 10% 탈락율 고려 시]
인 체 적 용 시 험 식 품	<ul style="list-style-type: none"> • 시험군: MAEXT 250mg/535mg/cap., 상지주정추출물로 하루 2.25그램 • 위약군: 대조식품(위약) 535mg/cap., 상지주정추출물로 하루 0그램
용 법 용 량 및 투 여 방 법	<ul style="list-style-type: none"> • 시험군: 아침, 점심, 저녁 3캡슐씩 1일 3회, 총 9캡슐 경구 복용 • 위약군: 아침, 점심, 저녁 3캡슐씩 1일 3회, 총 9캡슐 경구 복용
투 여 기 간	총 24주 복용
선 정 기 준	<p>선정기준 (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 문맹자를 제외한 만 40세 이상 80세 미만의 남성 및 여성 2) 경도인지장애 (CERAD-K-NP 중 categorical fluency test, Boston naming test, word list memory test, constructional praxis test, word list recall test, word list recognition test, constructional recall test, trail making A test 총 8개 test 중 중 한 개 이상의 test에서 연령, 성별, 교육수준 대비 1.0 SD 이상 감소한 사람)로 진단된 자 3) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 대상자
제 외 기 준	<p>제외기준</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 의약품, 건강기능식품 등 복용 시 알레르기 등 이상반응을 경험한 대상자 2) 치매, 뇌종양, 수두증을 진단받았거나 방문 1 기준 3개월 이내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 대상자 3) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장 (narrow angle glaucoma), 조절되지 않는 고혈압(혈압강하제의 지속적인 복용에도 불구하고 수축기 혈압이 140 mmHg 이상이고 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 경우) 대상자 또는 폐질환이 있는 대상자 4) 심한 신기능 장애나 간 기능장애가 있는 대상자 (serum creatinine > 2.0

	<p>mg/dl, ALT, AST 중 정상 상한치 2.5배 이상)</p> <p>5) 혈당강하제로 혈당조절이 어려운 경우(혈당강하제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160mg/dl 이상) 또는 혈소판(14만/mm³ 이하) 수치가 비정상인 대상자</p> <p>6) 주요 위장관 질환(위장관 질환으로 인하여 약물을 복용하고 있는 자) 혹은 주요 정신과 질환의 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자(조현병, 간질, 알코올 중독, 거식증, 이상 식욕 항진 등)</p> <p>7) 방문 1 기준 3개월 이내에 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 인지기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 임상시험(인체적용시험)에 참여한 경험이 있는 대상자</p> <p>8) 방문 1 기준 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 뇌기능 개선 목적의 치료 또는 건강기능식품, 남용우려 있는 약물 투여)를 받고 있는 대상자</p> <p>9) 다른 질병에 의한 뇌기능 및 인지기능 저하로 판단되는 대상자</p> <p>10) 임신부, 수유부 및 적절한 피임방법(예를 들면 여성피임약을 제외한 호르몬 이식, 자궁내 기구, 살정제, 콘돔 등)에 동의하지 않은 가임 여성</p> <p>11) 인체적용시험기간 중 병용금지 약물을 복용해야 하는 대상자</p> <p>12) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 본 연구 참여가 부적합하다고 판단되는 대상자</p>												
시 험 방 법	<p>대상자가 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의하면, 계획서에 따라 필요한 검진 및 검사를 실시한 후, 대상자 적합성 평가결과 선정기준에 적절한 대상자에 한하여 무작위 배정된다.</p> <p>무작위 배정된 대상자는 총 24주간 시험식품 또는 대조식품을 복용하게 된다.</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td>방문 1 (-2주~0일)</td> <td>방문 2 0주(0일)</td> <td>방문 3 12주(±5일)</td> <td>방문 4 24주(±5일)</td> </tr> <tr> <td>스크리닝 방문</td> <td>무작위배정방문</td> <td>중간방문</td> <td>종료방문</td> </tr> <tr> <td colspan="4">복 용</td> </tr> </table>	방문 1 (-2주~0일)	방문 2 0주(0일)	방문 3 12주(±5일)	방문 4 24주(±5일)	스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문	복 용			
방문 1 (-2주~0일)	방문 2 0주(0일)	방문 3 12주(±5일)	방문 4 24주(±5일)										
스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문										
복 용													
기 능 성 평 가	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 기능성 평가 변수: <ol style="list-style-type: none"> 1) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 ADAS-Kcog 기억요인 변화량 ADAS-Kcog 기억요인: 단어 회상 과제, 지남력, 단어 재인 과제, 검사 지시 기억 • 2차 기능성 평가 변수: <ul style="list-style-type: none"> - 시험군 및 대조군 12주 비교 1) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량 2) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test): 범주 유창성(Category Fluency) 변화량 3) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 전두엽 기능 검사(Frontal Assessment Battery) 변화량 												

	<p>4) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 노인우울척도(Geriatric Depression Screening Scale-Kr) 변화량</p> <p>- 시험군 및 대조군 24주 비교</p> <p>1) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량</p> <p>2) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test): 범주 유창성(Category Fluency) 변화량</p> <p>3) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 전두엽 기능 검사(Frontal Assessment Battery) 변화량</p> <p>4) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 노인우울척도(Geriatric Depression Screening Scale-Kr) 변화량</p>
<p>안 전 성 평 가</p>	<p>인체적용시험 식품 복용 전과 복용 중, 복용 24주 후에 임상실험실 검사 및 활력징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.</p>
<p>병 용 금 기 약 물</p>	<p>인지기능에 영향을 미칠 수 있는 약물과 혈액희석제제, 약물의 흡수, 대사 또는 배설에 영향을 줄 수 있는 약물 및 침술이나 호르몬요법, 건강기능식품(포스파티딜세린, 참당귀뿌리추출물, 피브로인호소 가수분해물, 원지추출분말, 오메가3, 홍삼 성분 함유 제품 등 인지기능 및 기억력 개선 건강기능식품), 암페타민, 모든 항우울제, 고용량의 항경련제와 수면제, 항세로토닌약, 항정신병약, 아세틸콜린에스테라아제 억제제, NMDA 수용체 길항제, 항파킨슨용제, 항불안제, 콜린성약물, 항전간제 등은 본 시험기간 동안 투약할 수 없다.</p> <p>본 시험기간 중 대상자의 사정에 의해 상기 약물을 복용 하고자 하는 경우 연구자와 상의를 하여야 하며 복용한 경우는 시험을 중단하여야 한다. 단, 연구자 판단에 따라 연구시작 3개월 전부터 연구기간 내내 지속적으로 같은 약을 용량 변동 없이 복용하는 경우는 복용이 가능하며, 치매 치료제 약물(cholinesterase inhibitor, 항산화제, NMDA 수용체 길항제)을 복용하는 경우 시험참여 전 6개월 이상 복용하고 있으며, 4개월 이상 용법, 용량 변동 없이 안정적으로 복용을 유지하는 경우 복용이 가능하다.</p>

8.6. 인체적용시험 진행 일정표

Protocol No. MAEXT-02

Study Protocol Version 1.1(2016.08.17)

CONFIDENTIAL

❖ 인체적용시험 흐름도

시험항목	Screening	Administration			Follow-up ¹⁰ 필요 시
	-2주~0일 Visit 1	0주(0일) Visit 2	12주(±5일) Visit 3	24주(±5일) Visit 4	
대상자 동의서 취득	V				
인구학적 조사	V				
신체검사 ¹	V			V	V
활력징후 ²	V	V	V	V	V
선행/병용약물 조사	V	V	V	V	V
병력 및 동반질환	V				
생활습관 조사 ³		V	V	V	
임상실험실 검사 ⁴	V	V ⁵	V	V	V ¹¹
스크리닝 평가 검사 ⁶	V				
기능성 평가 검사 ⁷		V	V	V	
대상자 적합성 평가	V	V ⁸			
무작위배정		V			
IP 교부 ⁹		V	V		
IP 반납/복약순응도			V	V	
이상반응 확인			V	V	V

1: 신장은 신을 벗고 cm 단위로 측정하며, 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용하여 측정한다. 방문 4에서는 체중만 측정한다.

2: 체온, 혈압, 맥박: 혈압과 맥박수는 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 혈압계를 사용하여 측정한다.

3: 생활습관 조사는 방문 2, 3, 4에서 시행하며, 대상자의 흡연, 음주, 식사, 운동 습관, 카페인 섭취량에 대하여 조사한다.

4: 임상실험실 검사는 매 방문 시 실시한다.

스크리닝 시 임상실험실 결과는 2주 이내 본원에서 실시한 검사 결과를 사용할 수 있다.

방문 전 8시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식을 금기하여 공복 채혈하도록 한다.

혈액학적 검사:	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액화학적 검사:	Total protein, ALT, AST, r-GT, BUN, Creatinine, glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL cholesterol, HDL cholesterol
소변검사:	Protein, Glucose, pH, Specific gravity, WBC, RBC HCG 임신검사(대상자 중 임신가능성이 있는 경우에 한하여 각 방문 시 임신여부를 확인한다)

5: 방문 1 이후 7일 이내에 방문 2를 진행한 경우 방문 2에서 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다.

6: 대상자 선정을 위하여 스크리닝 시 CERAD-K 검사 검사를 실시한다.

*단, 스크리닝 4주전 CERAD-K 검사 평가결과가 있을 경우 해당 검사 결과를 사용할 수 있다.

7: ADAS-Kcog검사, 언어 유행성 검사, 전두엽 기능 검사, 노인우울척도 검사가 시행되며 0주, 12주, 24주에 실시한다

*단, 방문 2에서 언어 유행성 검사 및 구성행동은 스크리닝 시 평가한 검사 결과로 대체할 수 있다.

8: 방문 2에 대한 선정/제외기준을 확인한다.

9: 인체적용시험용 식품 복용은 방문 다음날 아침부터 다음 방문 전날 저녁까지 복용하도록 지시한다.

10: 인체적용시험용 식품을 최종 복용 후 혹은 조기 종료 후 비정상적인 임상실험실 결과, 계속되는 이상반응 등 연구자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우나 필요에 따라 실시한다.

11: 연구자 판단 하에 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 항목만 실시한다.

Confidential

8

8.7. 통계분석 계획

8.7.1. 통계분석 시험대상자 집단의 정의

기능성 평가에 대한 자료는 FAS 분석을 주 분석으로 하고 별도로 PPS 분석을 실시하여 FAS 분석 결과와 차이가 있는지 평가한다. 안전성평가에 대한 자료는 Safety 군에 대해 실시하여 본 인체적용시험용 식품의 안전성을 평가한다.

1) Safety 군

Safety 군은 본 인체적용시험에 참여하여 최소한 1 회 이상 인체적용시험용 제품을 복용한 대상자를 대상으로 한다.

2) FA 군

FA 군은 본 인체적용시험에 무작위 배정되어 인체적용시험용 식품을 1 회 이상 복용한 대상자 중 인체적용시험용 식품 복용 후 일차 유효성 평가 자료가 1 회 이상 수집된 대상자들을 대상으로 한다. 무작위 배정되어 인체적용시험용 제품을 복용한 모든 연구대상자에서 최소한의 정당한 제외사유를 제외한 연구대상자들을 대상으로 한다. 이 경우 무작위 배정된 대상자 중 다음에 한해서는 주 분석에서 제외할 수 있다.

- 중요한 선정 및 제외 기준을 만족하지 못한 대상자 : 중요한 선정 및 제외 기준 분류 기준: 유효성에 영향을 미칠 수 있는 기준을 포함하며, GCP 위반 사항을 제외한다.

- 무작위 배정 이후 자료가 전무한 대상자
- 한번도 시험약을 투여 받지 않은 대상자

3) PP 군

PP 군은 FA 군에 포함되는 대상자 중 인체적용시험계획서에 따라 본 연구를 성공적으로 완료한 대상자를 대상으로 한다. 이 경우 무작위 배정된 대상자 중 다음에 한해서는 PP 분석 시 통계분석에서 제외할 수 있다.

- 아래의 시험계획서를 위반한 대상자 제외
 - 동의서 미 취득
 - 선정기준/제외기준에 위배된 경우
 - 인체적용시험 기간 동안 병용금지약물을 복용한 경우
 - 시험 개시-종료시점의 기능성평가 검사가 누락된 경우
- 전체 복용 순응도 80% 미만인 대상자, 방문기간을 준수하지 않는 대상자

제2절 제1협동 연구 재료 및 방법

(Oxyresveratrol 고함유 상지 주정 추출분말의 제조 및 제조공정 확립)

1. Oxyresveratrol 고함유 상지 주정 추출분말의 제조

1.1. 시약

본 실험에서는 국내에서 체계적으로 뽕나무를 재배중인 충남 농업기술원 잠사곤충연구소와 경기 양평 지역에서 재배된 뽕나무 가지(상지, *Ramulus Mori*)를 사용하였다. 본 연구의 HPLC 분석에서 사용된 acetonitrile, ethanol, methanol은 J. T. Baker사에서 구입하여 사용하였고, oxyresveratrol 표준품은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

1.2. 상지 주정 추출액 제조

상지 주정 추출액의 제조는 1000 mL 둥근 플라스크에 10-20 mm로 절단된 상지 시료 50 g을 넣은 후 70% Pretanol A 400 mL를 첨가하여 95°C 향온수조(J-BS3D, Jisico, Seoul, Korea)에서 2시간 동안 환류 추출하였다. 상지주정추출액은 통계처리를 위하여 각 시료 당 3개를 추출하여 HPLC 분석하였다.

1.3. HPLC 분석 조건

상지주정추출액내의 옥시레즈베라트롤은 HPLC(YL9100 HPLC system, 영린기기)를 이용하여 분석하였다(Table 1). 분석 조건으로 컬럼은 Luna C₁₈ (5 µm, 4.6×250 mm, Phenomenex, USA), 컬럼온도는 35°C, 자외선 검출과장은 325 nm, 유속은 0.7 mL/min, 샘플주입량은 100 µL로 30분 동안 분석하였다. 이동상은 CH₃CN(A):10 mM H₃PO₄(B) 10:90(v/v)을 시작으로 하여 10분까지 A:B=25:75(v/v), 30분까지 A:B=50:50(v/v)의 기울기 조건으로 수행하였다.

1.4. 표준물질 용액의 제조

옥시레즈베라트롤의 직선성, 검출한계, 정량한계를 확인하기 위하여 10 mg 옥시레즈베라트롤을 CH₃CN:10 mM H₃PO₄=35:65(v/v) 용매 100 mL에 녹여 100 µg/mL 농도로 제조하였다. 제조된 표준용액을 2배씩 희석하여 1.56-50 µg/mL의 옥시레즈베라트롤 용액을 만들었다. 그 후 0.2 µm PTFE syringe filter (Chromafil O-20/15 MS, Macherey-Nagel, USA)로 여과하여 HPLC를 수행하였다.

Table 1. HPLC operating condition.

Parameter	Condition
Instrument	HPLC-UV/VIS (YL9100 HPLC system, Younglin Inst. Korea)
Column	Luna C ₁₈ (5 μm, 4.6×250 mm, 100Å, Phenomenex, USA)
Mobile phase	Acetonitrile:10 mM H ₃ PO ₄ (v/v), 0 min, 10:90, 0-10 min, 25:75, 10-30 min, 50:50
Column temperature	35°C
Wavelength	325 nm
Injection volume	100 μL
flow rate	0.7 mL/min

1.5. HPLC에 의한 옥시레즈베라트를 함량 분석

상지 주정 추출액내의 옥시레즈베라트를 함량은 HPLC(YL9100 HPLC system, YL Instruments CO., Ltd, Anyang-si, Korea)를 이용하여 분석하였다. 분석 조건으로 컬럼은 Luna C₁₈ (5 μm, 4.6×250 mm, Phenomenex, USA), 컬럼온도는 30°C, 자외선 검출과장은 325 nm, 유속은 0.7 mL/min, 샘플 주입량은 100 μL로 30분 동안 분석하였다. 이동상은 CH₃CN(A):10 mM H₃PO₄(B) 10:90(v/v)을 시작으로 하여 10분까지 A:B=25:75(v/v), 30분까지 A:B=50:50(v/v)의 기울기 조건으로 수행하였다. HPLC 분석 시 상지 주정 추출액은 CH₃CN:10 mM H₃PO₄=35:65 (v/v) 용매로 10배 희석한 후 0.2 μm PTFE syringe filter (Chromafil O-20/15 MS, Macherey-Nagel, USA)로 여과 후 HPLC를 수행하였다. 상지내의 옥시레즈베라트를 함량(μg/g dry weight) 계산은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{함량}(\mu\text{g/g dry weight}) = \frac{100 \times [(\text{면적} \times \text{회석배수}) - \text{절편}] \times \text{추출량}(mL)}{\text{기울기} \times [\text{샘플량}(g) \times (100 - \text{수분함량}(\%))]}$$

1.6. 수분 함량 분석

상지의 옥시레즈베라트를 함량(μg/g dry weight)을 계산하기 위하여 상지의 수분 함량을 측정하였다. 수분 함량 측정은 적외선 수분측정기(FD-610, KETT, Tokyo, Japan)를 이용하여 약 5 g의 상지 시료를 정확하게 단 후, 120°C에서 2분간 무게의 변화가 없는 조건으로 수분 함량을 측정하였다. 수분 함량 분석은 각 시료 당 3회 실시하였다.

1.7. 상지 절편의 제조 및 건조 방법

1년생(지름 10-25 mm) 상지의 흙과 이물질을 제거하기 위하여 수돗물로 세척 후 2시간 동안 실험실에서 자연 건조하고 이를 전지가위(WS-904, 화신공업)를 사용하여 두께 10-30

mm 크기로 절단하였다. 상지 절편의 건조는 건조기(KDO-150, Kukje Engineering, Goyang-Si, Korea)를 사용하여 2일 간격으로 샘플링하면서 10일 동안 건조하였다.

1.8. 미생물 접종 및 숙성

상지 절편에 사용된 미생물은 Generally Recognized as Safe (GRAS) 균종으로 알려진 *L. acidophilus*, *B. coagulans*, *R. capsulatus*, *S. cerevisiae*, *E. faecium* 등의 5종 균주를 사용하였다. 본 실험에 사용된 미생물 제품의 균수는 *B. coagulans* (1.0×10^9 CFU/g), *S. cerevisiae* (1.0×10^8 CFU/g), *L. acidophilus* (1.0×10^8 CFU/g), *E. faecium* (1.0×10^8 CFU/g), *R. capsulatus* (2.5×10^{10} CFU/g)이었다. 상지의 각각의 미생물 제품 1 g (1.0×10^8 CFU/g ~ 1.0×10^{10} CFU/g)을 멸균수 50 mL에 용해한 후 분무기를 이용하여 500 g 상지에 접종하였다. 미생물에 감염된 각각의 상지 샘플은 30°C 배양기에서 2일 간격으로 샘플링 하면서 10일 동안 건조하였다.

1.9. 상지 채집시기에 따른 숙성

채집시기에 따라 상지내의 옥시레즈베라트롤 량이 다르다는 보고에 따라 1월, 2월, 4월, 8월, 10월, 11월, 12월 상지를 채집하여 채집시기에 따른 상지의 숙성 효과를 확인하였다.

시기에 따라 채집된 상지 샘플은 30°C 배양기에서 7일간 숙성 후 수분측정 및 상지주정추출액을 제조하여 HPLC를 사용하여 옥시레즈베라트롤 량을 분석하였다.

1.10. 대량 상지의 숙성 효과

250 kg의 수원빵 및 청일빵 상지를 채집하여 대량 숙성시의 축적 효과를 확인하였다. 2월 24일 상지를 채집한 후 고압세척기로 세척하고 이를 15-30 mm 길이로 절단하였다. 절단된 상지샘플을 32.5°C 배양기(영농조합 제품명)에서 5일 숙성 후 수분을 측정하고 상지주정추출액을 제조하여 HPLC를 사용하여 옥시레즈베라트롤 량을 분석하였다.

1.11. 통계 처리

SPSS software (version 12.0, SPSS Inc., USA)를 이용하여 t-test 및 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 하였으며 실험군 간의 유의적 차이 검증을 위해 Duncan의 다중범위 시험법(Duncan's multiple range test)을 이용하였다($p < 0.05$).

제3절 제2협동연구 재료 및 방법

(상지주정추출분말의 항산화 및 면역증강 효과검증)

1. 상지추출물의 항산화 효과

1.1. 시약

β -carotene, Ascorbic acid, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Horseradish peroxidase, resveratrol, Quercetin, Sodium hypochlorite, Oxyresveratrol은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, linoleic acid, Taurine, chloroform, Isopropyl alcohol은 DAEJUNG CHEMICALS (한국), BHT(Butylated Hydroxy Toluene), Hydrogen peroxide, Sodium hydroxide, Potassium iodide, DMSO (Dimethyl sulfoxide)는 SAMCHUN PURE CHEMICALS Co. (한국), Tween 40은 DUKSAN PHARMACEUTICAL Co. (한국), PBS(Phosphate buffered saline)은 AMRESCO (USA), Phenol red는 JUNSEI, H2DCF-DA는 Invitrogen, MEM(Minimum essential medium), FBS(Fetal bovine serum), Trypsin EDTA, Penicillin streptomycine, HBSS(Hank's balanced salt solution)는 GE Healthcare Life Science 제품을 사용하였다.

1.2. β -carotene bleaching assay

β -carotene bleaching assay는 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 food chemistry 분야에서 많이 사용되는 방법이다. β -carotene(Fig. 1)은 vitamin A의 전구체로서 π -conjugation structure를 갖고 있는 유기화합물이다. β -carotene은 자유라디칼과 반응하여 π -conjugation structure 내의 C=C 이중결합이 깨지면서 변색되게 되는데 이러한 색의 변화를 통해 항산화능을 측정할 수 있다. 자유라디칼은 Linoleic acid(Fig. 2)의 autoxidation을 통해 생성된다. Linoleic acid는 공기 중의 산소와 반응하여 상온에서 autoxidation을 일으키고 이러한 반응을 통해 lipid radical 또는 lipid peroxy radical ($L\cdot$ or $LOO\cdot$)을 생성한다. 이렇게 생성된 자유라디칼은 β -carotene과 반응하여 변색을 일으키는데 함께 처리된 antioxidant는 이 반응을 저해하고 이러한 변색반응의 저해정도를 Microplate reader를 이용해 470 nm에서 측정된 흡광도를 통해 항산화능을 측정할 수 있다.

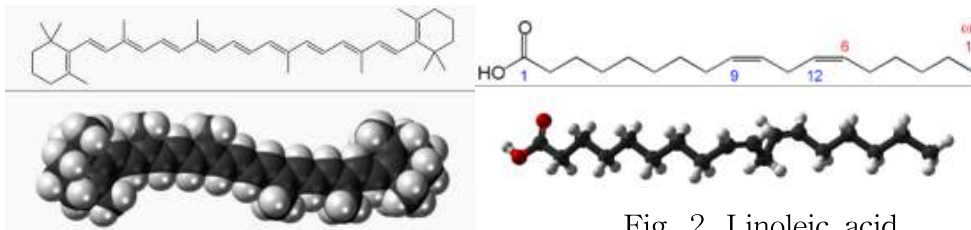
Fig. 1. β -carotene.

Fig. 2. Linoleic acid.

먼저 chloroform에 β -carotene을 1 mg/ml의 농도로 녹인 β -carotene solution을 만든다. 이러한 β -carotene solution 300 μ l에 linoleic acid 22 μ l와 200 μ l의 Tween 40을 첨가하여 β -carotene/linoleic acid mixture를 만든다. 이를 삼각플라스크에 넣고 증류수로 희석(OD : 0.6 ~ 0.7) 한 후 산소와 충분히 반응할 수 있도록 shaking incubator를 통해 saturation 시킨다.

96-well plate에 β -carotene/linoleic acid mixture를 180 μ l씩 분주하였고 methanol에 녹인 상지주정추출물, oxyresveratrol, BHT를 serial dilution 하여 여러 농도로 제조하여 각 농도 별로 20 μ l씩 더하여 총 200 μ l (β -carotene/linoleic acid mixture 180 μ l + sample 20 μ l)로 맞추고 차광하였다. 이를 Microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 45°C에서 5분 간격으로 2시간 동안 470 nm에서 Kinetic assay로 흡광도를 측정했다. 시료의 항산화능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$\text{라디칼소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample } (S_0 - S_2)}{\text{Negative control } (N_0 - N_2)}\right) \times 100$$

처음 측정된 흡광도값(S_0)에서 2시간 후의 흡광도값(S_2)의 차($S_0 - S_2$)를 계산하고 음성대조군에 대해 시료물질이 반응의 50%를 억제한 농도인 IC_{50} (50% Inhibitory concentration)을 사용하였다. 본 실험에서 항산화능을 측정하고자 하는 물질은 상지주정추출물 (oxyresveratrol 함량: 15.3%)과 그 유효 성분인 oxyresveratrol이고 양성 대조군으로 항산화 활성이 있다고 알려진 물질인 BHT(Butylated Hydroxy Toluene)를 사용하였다.

1.3. HRPO assay

HRPO assay는 Horseradish peroxidase-mediated oxidation 반응에 기초한 항산화능 측정 방법이다. Horseradish peroxidase는 서양고추냉이(horseradish)에 함유하고 있는 과산화효소로서 hydrogen peroxide(Fig. 3)의 존재 하에 substrate의 산화를 촉진하는 효소이다. 주로 pH indicator로 사용되고 있는 phenol red(phenolsulfonphthalein)(Fig. 4)는 산화환원 반응에 따라 색이 변하게 되는데 이러한 성질을 이용하면 Horseradish peroxidase-mediated Oxidation의 산화 정도를 측정할 수 있다. 이 때 antioxidant를 함께 처리하면 antioxidant는 hydrogen peroxide를 scavenging하여 phenol red의 산화를 저해하고 이러한 변색반응의 저해 정도를 microplate reader를 이용해 610 nm에서 측정된 흡광도를 통해 항산화능을 측정할 수 있다.

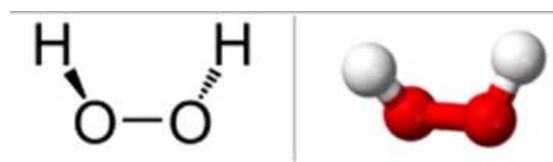


Fig. 3. Hydrogen peroxide.

먼저 96-well plate에 각각 10 μl 의 Hydrogen peroxide와 80 μl 의 PBS (pH 7.4)를 넣고 methanol에 녹인 상지주정추출물, oxyresveratrol, resveratrol, ascorbic acid, trolox를 serial dilution 하여 여러 농도로 제조하여 각 농도별로 10 μl 씩 더하여 총 100 μl 의 (H_2O_2 10 μl + sample 10 μl + PBS (pH 7.4) 80 μl) 반응액을 만들고 37°C에서 15분 동안 방치한다. 이어서 Phenol red (0.4mg/ml) 50 μl 와 HRPO (17 U/ml) 50 μl 를 각각 첨가하여 총 볼륨 200 μl 를 맞추고 15분 동안 반응시킨 후 NaOH (400 mM) 50 μl 를 넣고 차광하였다. 이를 Microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정했다. 시료의 항산화능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$\text{라디칼소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{시료무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

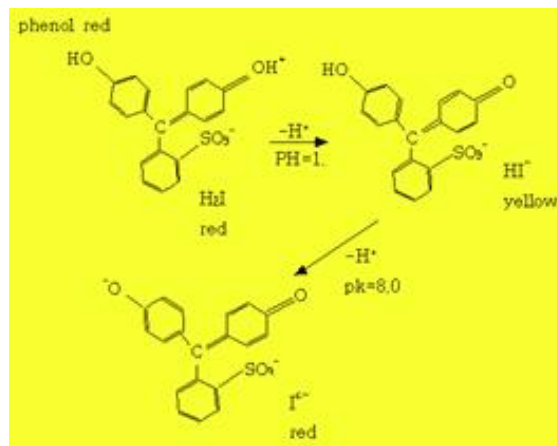


Fig. 4. Phenol Red.

항산화능 지수로는 시료물질이 총 라디칼의 50%를 제거한 농도인 IC_{50} (50% Inhibitory concentration)을 사용하였다. 본 실험에서 항산화능을 측정하고자 하는 물질은 상지주정추출물 (oxyresveratrol 함량: 15.3%)과 그 유효 성분인 oxyresveratrol이고 항산화 활성이 있다고 알려진 ascorbic acid, resveratrol, trolox를 함께 측정하여 비교하였다.

1.4. Taurine Test

Taurine test는 taurine(Fig. 6)과 hypochlorous acid(Fig. 5)의 반응에 기초한 항산화능 측정 방법이다. Taurine은 담즙으로부터 분리된 황 아미노산의 일종으로 다른 아미노산과 구별되는 특이한 화학적, 생물학적 특성을 지니고 있다. Taurine은 생체 내에서 여러 가지 생리 활성 기능을 갖고 있는데 그 중 하나는 염증반응에서 생성되는 HOCl(hypochlorous acid)로부터 세포를 보호하는 기능이다. 염증반응이 일어나게 되면 염증 관련 세포(다형핵호중구, 대식세포, 단세포 등)가 활성화 되고 이로 인해 세포독성이 매우 강한 HOCl의 생성 및 분비가 증가된다. 이때 taurine은 HOCl과 반응하여 taurine chloramine을 형성함으로써 일차적으로 독성이 강한 HOCl을 제거하고 세포를 보호하게 된다. 한편 이렇게 생성된 taurine chloramine은 potassium iodide와 반응하여 350 nm에서 광흡수를 갖고 생성된

taurine chloramine이 많을수록 흡광도 값은 높게 된다. 따라서 antioxidant가 HOCl을 소거하면 taurine chloramine의 생성이 억제되고 potassium iodide와의 반응도 줄어들게 되어 이를 이용하여 항산화능을 측정할 수 있게 된다.

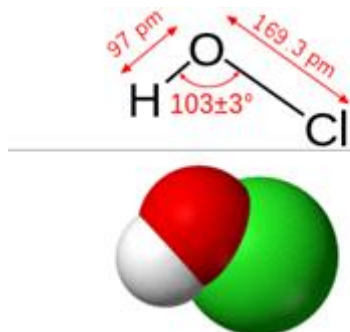


Fig. 5. Hypochlorous acid.

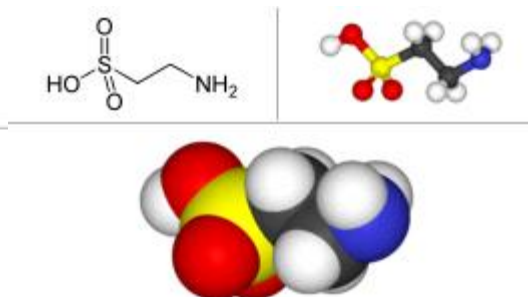


Fig. 6. Taurine.

먼저 96-well plate에 methanol에 녹인 상지주정추출물, oxyresveratrol, resveratrol, ascorbic acid, trolox를 serial dilution 하여 여러 농도로 제조하여 각 농도별로 10 μ l씩 넣고 Taurine(150 mM)을 10 μ l씩 각각 넣어준다. 이어서 sodium hypochlorite(3 mM) 10 μ l와 PBS (pH 7.4) 70 μ l를 더하여 총 100 μ l의 (HOCl 10 μ l + sample 10 μ l + PBS (pH 7.4) 70 μ l) 반응액을 만들고 상온에서 10분 동안 반응시킨다. 이어서 potassium iodide (4 mM) 100 μ l를 넣고 차광하였다. 이를 Microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 350 nm에서 흡광도를 측정했다. 시료의 항산화능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$\text{라디칼소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{시료무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

항산화능 지수로는 시료물질이 총 라디칼의 50%를 제거한 농도인 IC₅₀ (50% Inhibitory concentration)을 사용하였다. 본 실험에서 항산화능을 측정하고자 하는 물질은 상지주정추출물 (oxyresveratrol 함량: 15.3%)과 그 유효 성분인 oxyresveratrol이고 항산화 활성이 있다고 알려진 ascorbic acid, resveratrol, trolox를 함께 측정하여 비교하였다.

1.5. CAA assay

CAA assay는 Cellular Antioxidant Activity assay의 약자로서 cell 내에서의 항산화능을 측정할 수 있는 방법이다. 기존의 *in vitro* 항산화능 측정 방법들은 물질간의 직접적인 반응 (처리한 시료가 ROS와 직접 반응하여 환원)을 통해 항산화능을 측정하는 chemical-based assay였다면 CAA assay는 세포 내에서의 흡수와 반응 등의 bioavailability를 고려한 cellular-based assay라고 할 수 있다.

기본적인 측정원리는 HepG2 cell에 DCFH₂-DA(dichlorofluorescein diacetate)라는 형광

dye를 넣으면 DCFH₂ 형태로 세포막을 통과하고 세포내에 있는 ROS에 의해 DCF 형태로 산화되어 발광하게 된다. ROS의 극대화를 위해서 free radical generator로 AAPH(2,2'-azobis 2-amidino-propane dihydrochloride)를 함께 넣어주는데 AAPH에 의해 생성된 peroxy radical (ROO⁻)로 인해 DCFH₂-DA를 산화시킨다. 이때 함께 넣어준 compound는 세포내로 흡수되어 세포내에 있는 ROS를 소거함에 따라 DCF의 산화를 저해하여 발광량을 줄이게 된다. 줄어든 발광량은 물질의 항산화능과 비례하기 때문에 이를 이용하여 세포내에서 물질의 항산화능을 측정할 수 있다.(Fig. 7)

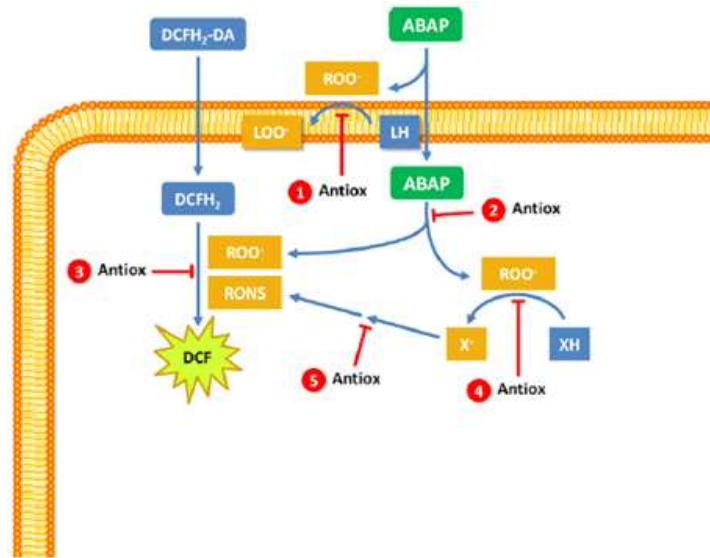


Fig. 7. Cellular antioxidant activity assay 원리.

먼저 96-well plate의 각 well 마다 HepG2 cell을 6×10^4 개만큼 seeding 한 후 24시간 동안 37°C, 5 % CO₂ incubator 안에서 배양시킨다. 이때 배지는 10 % FBS(fetal bovine serum)와 1% P/S (penicillin-streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 사용한다. 24시간 후에 100 μ l PBS로 washing 해주고 다시 100 μ l의 MEM 배지에 25 μ M의 DCFH₂-DA와 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹인 상지주정추출물, oxyresveratrol, quercetin을 serial dilution 하여 여러 농도가 되도록 제조하여 각 well에 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator 안에서 1시간 동안 배양한다. 이때 사용하는 배지는 FBS가 첨가되지 않는 배지를 사용해야 하는데 그 이유는 FBS가 DCFH₂-DA를 산화시키기 때문이다. 1시간 후에 100 μ l PBS로 washing 해주고 HBSS에 녹인 600 μ M의 AAPH를 각 well에 넣어준다. 차광상태에서 Microplate reader (Spectra MAX M5, Molecular Devices)를 이용해 1시간 동안 5분 간격으로 형광 (ex : 485 nm em: 535 nm)을 측정한다. 측정된 fluorescence 값을 시간에 따른 곡선그래프를 그려 각 물질의 처리농도에 따른 AUC(Area under the curve) 값을 구한다. 아래 식을 이용하여 CAA 값을 구한다.

$$CAA \text{ unit} = \left(1 - \frac{\text{시료의 AUC 값}}{\text{대조군의 AUC 값}} \right) \times 100$$

2. Oxyresveratrol에 의한 장내 염증 예방 효과 측정

2.1. Oxyresveratrol의 세포간극 (tight junction)의 안정화 효과 측정 실험방법

2.1.1. Cell viability (MTT assay)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양된 Caco-2 cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.25×10^5 cells/ml로 cell수를 조정 한 후, 96 well 에 200 µl씩 seeding 하였다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 cell 에 oxyresveratrol(10, 20, 30 µg/ml)을 처리하였다. 24 시간 후, 상등액을 제거하고 5 mg/ml stock MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Amresco, USA)를 DMEM 배지에 1/40 배로 희석해서 넣은 후, 37 °C incubator에서 1시간 반응시켰다. 보라색 결정이 생기면 상등액을 제거 한 후 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 100 µl 넣고 microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 540 nm의 파장으로 OD 값을 측정하였다.

2.1.2 Transepithelial electric resistance (TEER)

DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37 °C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양된 Caco-2 cell 이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후 세포수를 7×10^4 cells/ml로 조정하여, Trans 24 well insert에 300 µl 씩 분주하였다. Basolateral에는 media 900 µl를 분주하였다. 2~3일 마다 media를 이용하여 washing하면서 14일간 배양 한 후 모든 well이 600~700 Ω의 값에 도달하면, 실험에 사용하였다. Trans 24 well insert에 cold HBSS(Hank's balanced salt solution)를 270 µl 넣고 900 µl의 cold HBSS가 담겨 있는 새로운 Trans 24 well에 옮겨준다. 30분간 안정화 후, HBSS에 희석시킨 oxyresveratrol(10, 20, 30 µg/ml)을 처리한 후, 4시간 마다 TEER값을 측정하였다.

2.2. Real time PCR

Caco-2 cell은 DMEM배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2×10^5 cells/ml로 cell 수를 조정하였다. 6-well plate에 cell을 seeding 한 후, 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시키고 다음 날 아침 oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 24시간 동안 배양시켰다. 이후, trizol 을

이용하여 RNA를 분리하고, 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 conversion 한 후, DyNamoTMHS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland) 시약으로 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 PCR을 진행하였다. 사용된 primer의 sequence는 GAPDH (Sense: 5' -AAG GGT CAT CAT CTC TGC CC-3', Antisense: 5' -GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT-3'), Claudin-1 (Sense: 5' -CGA TGA GGT GCA GAA GAT GA-3', Antisense: 5' -CCA GTG AAG AGA GCC TGA CC-3'), Occludin (Sense: 5' -TTT GTG GGA CAA GGA ACA CA-3', Antisense: 5' -TCA TTC ACT TTG CCA TTG GA T-3'), ZO-1 (Sense: 5' -TGA GGC AGC TCA CAT AAT GC-3', Antisense: 5' -GGT CTC TGC TGG CTT GTT TC-3')를 사용하였다.

2.3. Western blot

Caco-2 cell은 DMEM 배지에 10 % FBS, 100 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2 × 10⁵ cells/ml로 cell 수를 조정하였다. 60 mm dish에 cell을 seeding 한 후, 37 °C incubator 에서 하루 동안 안정화 시킨다. 다음날 아침 oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 48시간 동안 배양 시켰다. 이후, Pro-prep (intron, Korea)을 이용하여 cell 안의 단백질을 추출하고, Bradford assay를 이용하여 각 sample의 protein loading 양을 조정하였다. 사용된 1차 항체는 GAPDH (Thermo MA5-15738, 1: 5,000), Claudin-1 (GeneTex GTX15098, 1:100), Occludin (GeneTex GTX114949, Zo-1 (GeneTex GTX108592, 1:2,000)이고, 2차 항체는 Anti-mouse (Thermo NCI1430KR, 1:50,000), Anti-rabbit (Thermo NCI1460KR, 1: 10,000)를 이용하였다.

2.4. Immunocytochemistry (ICC)

Caco-2 cell은 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2 × 10⁵ cells/ml로 cell 수를 조정한다. Coverslip을 미리 깔아둔 24 well에 cell을 seeding한후 tight junction이 충분히 이루어 질 때까지 눈으로 관찰 하면서 배양시켰다. 10~14일간 배양 후, oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 5일 동안 배양 시키고 4% Formaldehyde로 고정시킨 후에 Antibody를 이용해 염색하였다. 사용된 1차 항체는 Claudin 1 (GeneTex GTX15098, 1:200) 이고 2차 항체는 Anti-rabbit DyLight 488 conjugate (Thermo 35553 1:1,000)를 사용하였다.

2.5. Paracellular permeability (FITC-dextran flux assay)

DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37 °C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 Caco-2 cell을 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 7×10^4 cells/ml로 cell 수를 조정하여, Trans 24 well insert에 cell 300 µl씩 분주하였다. Basolateral에는 media 900 µl를 분주하였다. 2~3일 마다 media를 이용하여 washing하면서 10~14일간 배양 한 후 모든 well이 600~700 Ω의 값에 도달하면 실험에 사용하였다. Oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 12시간 동안 배양 시킨 후, FITC-dextran 4 kDa (SIGMA 46944) 1 mg/ml을 처리하고 6시간 더 배양 시켰다. Basolateral의 배지를 모아서 투과된 FITC-dextran 4 kDa의 값을 Fluorescence spectrometer로 excitation 490 nm에서 emission 520 nm의 파장으로 측정하였다.

2.6. Oxyresveratrol에 의한 PKC(protein kinase C), MAPK(mitogen-activated protein kinases) 경로 활성화 측정

2.6.1. Real time PCR

Caco-2 cell은 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37 °C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2×10^5 cells/ml로 cell 수를 조정하였다. 6-well plate에 cell을 seeding 한 후, 37°C incubator 에서 하루 동안 안정화한 후 다음날 아침 oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 37°C incubator 에서 배양 시켰다. 이후, trizol을 이용하여 RNA를 분리하고 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 한 후, DyNamoTMHS SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Finland) 시약으로 StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 PCR을 진행하였다. 사용된 primer의 sequence는 *PKC-δ* (Sense: 5' - CCC TTC TGT GCC GTG AAG AT -3', Antisense: 5' - GCC CGC ATT AGC ACA ATC TG -3'), *JNK-α1* (Sense: 5' - GCT TGG AAC ACC ATG TCC TGA -3', Antisense: 5' - GTA CGG GTG TTG GAG AGC TT -3')을 이용하였다.

2.7. PKC inhibitor (GF109203X)에 의한 세포간극 (tight junction) 관련 유전자 및 PKC와 MAPK 경로 유전자의 발현량의 변화

2.7.1. Real time PCR

Caco-2 cell은 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin 및 100 µg/ml

streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2 × 10⁵ cells/ml로 cell 수를 조정하였다. 6-well plate에 cell을 seeding 한 후, 37 °C incubator 에서 하루 동안 안정화 시킨 후 PKC inhibitor (GF109203X) 8 μM을 처리하고 2시간 동안 배양 하였다. 그 후, oxyresveratrol (20 μg/ml)을 처리 하고, 12시간 동안 배양 하였다. 이 후, trizol 이용하여 RNA를 분리하고 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 conversion 한 후, DyNamoTMHS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland) 시약으로 StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 PCR을 진행 하였다. 사용된 primer의 sequence는 *GAPDH* (Sense: 5' - AAG GGT CAT CAT CTC TGC CC -3', Antisense: 5' - GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT -3'), *Claudin-1* (Sense: 5' - CGA TGA GGT GCA GAA GAT GA -3', Antisense: 5' - CCA GTG AAG AGA GCC TGA CC -3'), *Occludin* (Sense: 5' - TTT GTG GGA CAA GGA ACA CA -3', Antisense: 5' - TCA TTC ACT TTG CCA TTG GA T -3'), *ZO-1* (Sense: 5' - TGA GGC AGC TCA CAT AAT GC -3', Antisense: 5' - GGT CTC TGC TGG CTT GTT TC -3'), *PKC-δ* (Sense: 5' - CCC TTC TGT GCC GTG AAG AT -3', Antisense: 5' - GCC CGC ATT AGC ACA ATC TG -3'), *ERK-1* (Sense: 5' - TCA GAC TCC AAA GCC CTT GAC -3', Antisense: 5' - CGT GCT GTC TCC TGG AAG ATG -3'), *JNK-α 1* (Sense: 5' - GCT TGG AAC ACC ATG TCC TGA -3', Antisense: 5' - GTA CGG GTG TTG GAG AGC TT -3')을 이용하였다.

3. 상지주정추출분말의 항비만 효과

3.1. 시약

Oxyresveratrol, NAC(N-Acetyl-L-Cysteine), Oil red O, Insulin, Dexamethasone, IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였고, Isoprophyl alcohol은 DAEJUNG CHEMICALS (한국), Formalin, DMSO(Dimethyl sulfoxide)는 SAMCHUN PURE CHEMICALS Co. (한국), PBS(Phosphate buffered saline)은 AMRESCO (USA), BCS(bovine calf serum)은 WELGENE (한국), EZ-CYTOX kit는 DAEILLAB SERVICE Co. (한국), DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's medium), FBS(Fetal bovine serum), Trypsin EDTA, PS(Penicillin-streptomycine)는 GE Healthcare Life Science 제품을 사용하였다.

3.2. 실험에 사용된 세포

본 실험에 사용된 세포는 3T3-L1 adipocyte(Fig. 8)로 ATCC에서 분양받았다. 3T3-L1 adipocyte는mouse 지방조직 유래의 세포주(cell line)로 지방대사 관련 연구에서 많이 사용되고 있다.

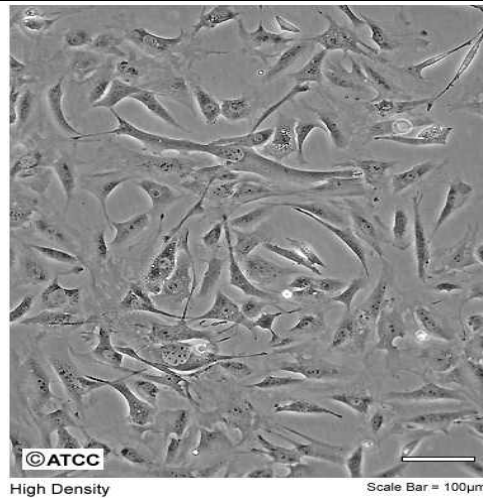


Fig. 8. 3T3-L1 cell line.

3.3. 실험 세포 배양 조건

3T3-L1 세포는 지방전구세포(preadipocyte) 상태의 미분화된 세포이다. 세포 배양 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지에 10% BCS(bovine calf serum)와 1% PS(Penicillin-streptomycine)를 첨가하여 사용하였고 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양한다. FBS(Fetal bovine serum)는 3T3-L1에 분화를 유도 할 수 있기 때문에 BCS serum을 사용하여 미분화 상태를 유지한다.

3.4. 3T3-L1 의 세포독성 측정

3T3-L1 세포에 대한 상지주정추출분말 (oxyresveratrol 함량: 15.3 %)과 oxyresveratrol의 세포독성을 측정하였다. 먼저 96 well plate에 10% BCS(bovine calf serum)와 1% PS(Penicillin-streptomycine)을 포함한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지에서 배양한 3T3-L1 세포를 5×10^4 cells/well seeding하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한다. 24시간 후에 배지를 제거하고 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹인 상지주정추출분말, oxyresveratrol을 serial dilution 하여 여러 농도가 되도록 제조하고 각 well에 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한다. 24시간 후 배지를 제거하고 WST-1 kit의 WST-1 solution을 처리하고 1시간 뒤 Microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정했다.

3.5. 3T3-L1의 분화유도

미분화상태의 3T3-L1 지방전구세포(preadipocyte)는 여러 가지 지방분화 유도물질(differentiation inducer)을 처리하면 지방세포(adipocyte)로 분화된다. 먼저 cell culture dish(60 mm)에 $2 \sim 3 \times 10^5$ 개의 세포를 seeding 한 후 3~4일간 배양하여 100% confluent 상태가 되도록 하고 그 후 2일 동안 더 배양하여 contact inhibition을 유도한다. 1%

PS(Penicillin-streptomycin)와 10% FBS(Fetal bovine serum)를 포함한 DMEM 배지에 3가지 분화유도 물질 ($5 \mu\text{g/ml}$ insulin + $1 \mu\text{M}$ Dexamethasone + 0.5 mM IBMX)과 함께 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹인 상지주정추출분말 (oxyresveratrol 함량: 15.3 %), oxyresveratrol을 serial dilution 하여 여러 농도(상지주정추출분말 : 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$, oxyresveratrol 10, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$)가 되도록 제조하고 각 dish에 처리하여 37°C , 5% CO_2 incubator 안에서 60시간 동안 배양한다. 그 후에 동일한 배지에 $5 \mu\text{g/ml}$ insulin과 시료물질만 포함하여 2일에 한 번씩 배지를 갈아주며 6일 동안 배양한다.(Fig. 9)

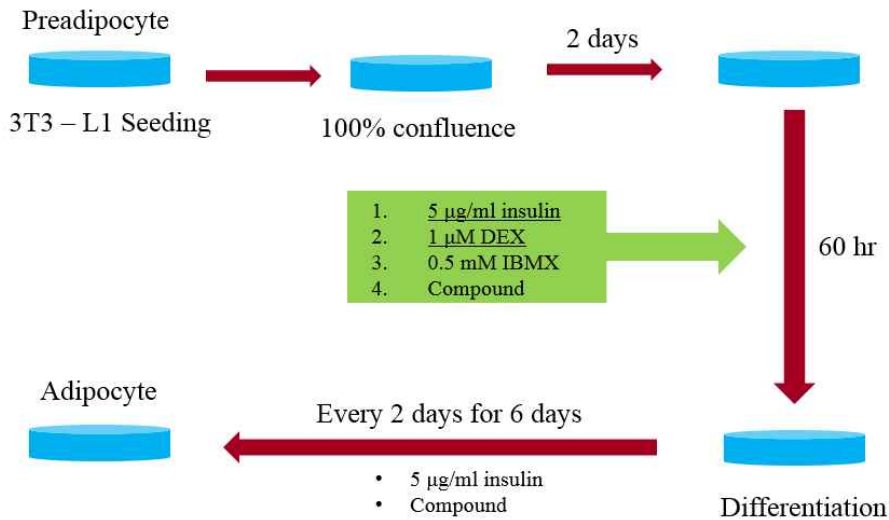


Fig. 9. 3T3-L1 분화유도 과정.

3.6. Oil red O staining

Oil red O(Fig. 10)는 sudan staining의 염색약중 하나로 중성지방(neutral triglycerides)과 지질(lipid)을 염색하는 붉은색 염료이고 500 nm에서 광흡수를 갖는다. Oil red O를 사용하면 3T3-L1 분화과정에서 생성되는 세포 내의 지방구(주로 triglyceride)를 염색할 수 있다. 염색된 지방구에서 Oil red O를 다시 isopropyl alcohol에 녹여 용리시킨 후 흡광도를 측정하면 정량화 할 수 있는데 이를 통해 지방분화(adipogenesis) 억제 효과를 측정할 수 있다.

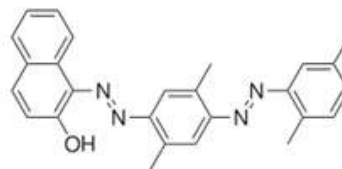


Fig. 10. Oil red O.

3T3-L1 분화 유도를 마친 후 4 ml PBS로 2번 washing한 후 4 ml의 10% formalin을 넣고 상온에 10분간 둔다. formalin을 제거하고 다시 4 ml의 10% formalin을 넣고 최소 한 시간 이상 상온에서 고정시킨다. formalin을 제거하고 4 ml의 증류수로 2번 washing한 후 4 ml의

60% isopropyl alcohol을 넣고 상온에 10분간 둔다. isopropyl alcohol을 제거하고 상온에서 완전히 건조시킨 후 2.5 ml의 Oil red O working solution (in 60 % isopropyl alcohol)을 넣고 상온에서 10분간 염색한다. Oil red O working solution을 제거하고 4 ml의 증류수로 4번 washing한다. 증류수를 제거하고 상온에서 완전히 건조시킨 후 5 ml 100% isopropyl alcohol을 넣고 10분간 살살 흔들며 용리시킨다. 100% isopropyl alcohol을 blank로 하여 Microplate reader를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정한다.

4. Oxyresveratrol에 의한 장내 염증성 질환을 예방 효과 측정

4.1. Oxyresveratrol과 상지주정추출분말의 MUC2 발현량 측정

장에서의 뮤신 분비는 장내세포를 보호하고 염증성 질환을 예방하는 등의 효과가 있다고 알려져 있다. 이번 실험에서는 장에서 뮤신을 생성한다고 알려져 있는 goblet cell-like 세포주인 LS174T cell 을 이용하여 qRT-PCR을 통해 oxyresveratrol과 상지주정추출분말을 처리한 후, 세포 내 MUC2 유전자의 발현량이 어떻게 변화하는지 알아보았다. LS 174T cell은 RPMI-1640 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2.5 × 10⁵ cells/ml로 cell 수를 조정한다. 6-well plate에 cell을 seeding 한 후, 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨다. 다음 날 아침 oxyresveratrol (10, 20 µg/ml)과 상지 (50, 100 µg/ml)를 처리한 후, 48 시간 동안 배양한 후, trizol을 이용하여 RNA를 분리한다. Positive control로 뮤신 분비에 효과가 있다고 밝혀져 있는 propionate를 사용하였다. 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 conversion 한 후, DyNamo™HS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland) 시약으로 Step One Plus™Real-Time PCR System (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) 기계를 사용하여 PCR을 진행하였다. 사용된 primer의 sequence는 GAPDH (Sense: 5' - AAG GGT CAT CAT CTC TGC CC -3', Antisense: 5' - GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT -3')와 MUC-2 (Sense: 5' - ACC CGC ACT ATG TCA CCT TC-3', Antisense: 5' - GGA CAG GAC ACC TTG TCG TT -3')이다. 결과는 아무것도 처리하지 않은 sample (No treatment)의 유전자 발현량을 1로 상대정량 하였다 (2-deltadelta Ct method).

4.2. Oxyresveratrol의 세포간극 (tight junction)의 안정화 효과 측정

4.2.1. qRT-PCR

장 상피세포층의 세포간극 (tight junction)의 개폐는 장관 내부로 식품 allergen의 이동과 관련이 있다. 장 상피세포의 tight junction이 손상을 받으면 장 상피 투과도가 증가된다. 장 투과도가 증가되면 내 독소와 같은 유해물질의 흡수를 증가시켜 '염증반응'을 유발하여 알레르기, 자가 면역 질환 등을 일으키게 된다. 이에 이번 실험에서는 Oxyresveratrol이 tight

junction에 미치는 효과를 알아보기 위하여 human intestinal Caco-2 epithelial cell을 이용하여 tight junction과 관련이 되어 있는 유전자들의 발현량을 알아보았다. Caco-2는 MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2.0 × 10⁵ cells/ml로 cell 수를 조정한다. 6-well plate에 cell을 seeding 한 후, 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨다. 다음날 아침 oxyresveratrol(10, 20, 40 µg/ml)을 처리한 후, 48 시간 동안 배양한 후, trizol 을 이용하여 RNA를 분리한다. 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 conversion 한 후, DyNamo™HS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland) 시약으로 Step One Plus™ Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기계를 사용하여 PCR을 진행하였다. 사용된 primer의 sequence는 *GAPDH* (Sense: 5' - AAG GGT CAT CAT CTC TGC CC -3', Antisense: 5' - GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT -3'), *Occludin*(Sense:5' -TTTGTGGGACAAGGAACACA-3', Antisense:5' -TCATTCACCTTTGCCATTGGAT-3'), *Claudin1*(Sense:5' -CGATGAGGTGCAGAAGATGA-3', Antisense: 5' -CCAGTGAAGAGAGCCTGACC-3')와 *ZO-1* (Sense: 5' - TGA GGC AGC TCA CAT AAT GC-3', Antisense: 5' - GGT CTC TGC TGG CTT GTT TC -3') 이다. 결과는 아무것도 처리하지 않은 sample (No treatment)의 유전자 발현량을 1로 상대정량 하였다 (2-deltadelta Ct method).

4.2.2. Western-blot

샘플 준비과정은 위와 같다. 물질 처리 후 48 시간 이후, Pro-prep (intron, Korea)을 이용하여 cell 안의 단백질을 얻는다. Bradford assay를 이용하여 각 sample의 protein loading 양을 30 µg으로 조정한다. 사용된 1차 Ab는 GAPDH (Thermo MA5-15738, 1: 5,000), Claudin 1 (GeneTex GTX15098, 1:100), Zo-1 (GeneTex GTX108592, 1:2,000)이고, 2차 Ab는 Anti-mouse (Thermo NCI1430KR, 1:50,000), Anti-rabbit (Thermo NCI1460KR, 1: 10,000) 이다.

5. Oxyresveratrol에 의한 *Caenorhabditis elegans*의 수명연장 효과

5.1. 실험동물 배양 및 배지 제조

실험에 사용한 *Caenorhabditis elegans* (예쁜꼬마선충)은 Bristol strain N2 (wild type)로, Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, CGC)로부터 구입하였다. *C. elegans*의 배양 배지로는 NGM (nematode growth medium, US biological)에 Oxyresveratrol (Sigma) 또는 Resveratrol (Sigma)을 0 (DMSO 0.3% v/v), 100 µM, 500 µM, 1000 µM 농도로 첨가하여 이용하였다. 먹이는 *E. coli* OP50을 이용하였고, 모든 실험에서 *C. elegans*는 25°C에서 배양하였다.

5.2. 수명연장 효과 평가

Sodium hypochlorite-sodium hydroxide solution을 이용한 동기화 과정⁽¹⁾을 통해 *C. elegans*의 알을 분리하고, M9 buffer에 16시간 overnight하여 부화하도록 한다. 부화하여 L1 단계가 된 선충을 1200 g에 2분 동안 원심분리하여 상층을 버리고 남은 선충을 NGM plate에 옮겨 L4 단계가 될 때까지 2일 더 배양한다. L4 단계가 된 *C. elegans*를 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR, Sigma) (50 μ M)와 Oxyresveratrol 또는 Resveratrol이 농도별로 첨가된 NGM 배지에 15마리씩 옮기고, 24시간 간격으로 관찰한다. 이때 FUdR은 새로 낳은 알이 부화하지 못하도록 작용⁽²⁾한다. *C. elegans*를 picker로 건드렸을 때 움직임이 없을 때를 죽은 것으로 간주하고, 도망가거나 vulva의 생성으로 인한 죽음 등 비정상적인 죽음은 세지 않는다. 수명연장 효과 평가는 세 번 독립적으로 시행하였고, 총 100마리 이상의 *C. elegans*를 평가하였다. Mean life span (MLS)와 Standard error (SE)는 다음 공식⁽³⁾을 이용하여 계산하였다.

$$SE = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \sum_j \left(\frac{x_j + x_{j+1}}{2} - MLS \right)^2 d_j}$$

(j =age (day), d_j = (x_j, x_{j+1}) 사이에 죽은 선충 수, N =전체 선충 수)

5.3. 유전자 발현 변화 측정

Oxyresveratrol 또는 Resveratrol이 농도별로 첨가된 배지에서 각각 24시간 또는 72시간 배양한 *C. elegans*를 M9 buffer에 모으고, R. D. Burdine과 M. J. Stern의 방법⁽⁴⁾을 따라 Trizol을 이용해 total RNA를 추출한다. Total RNA는 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit를 이용해 cDNA로 conversion한 후, 유전자 발현 변화를 측정하기 위해 SYBR green (KAPA Biosystems, USA)과 StepOnePlus real time PCR system (Applied Biosystems)을 이용해 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 진행하였고, control gene으로는 *act-2*를 이용하였다.

6. 상지의 대장염 마우스 모델에서의 항염증 활성 측정

6.1. 실험동물 조건, 시료의 투여 및 궤양성 대장염 유도

본 실험에 사용한 동물은 7주령 female C57BL/6N (Koatech, Pyeongtaek, Korea) 으로, 체중이 20 g 전후의 것을 사용하였으며, 1주일간 표준사료로 사육하여 적응시킨 후 실험하였다. 구입한 마우스는 12시간 dark-light cycle로 조절된 실험실 내에 설치한 microventilation cage system (온도 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 50 \pm 5%)내에서 물과 사료는 충분한 양을 공급하여 사육하였다. 모든 실험은 고려대학교 동물실험 윤리위원회의 절차를 따라 진행되었다(IRB 승인번호: KUIACUC-2015-92). 실험동물은 1주일 간의 적응기간이 끝난 뒤, 무작위로 각 군당 6마리씩 총 5군으로 나누었다. 경구투여로 각 그룹에 희석된 물질을 3주간 처리하였고, 마지막

일주일 동안 음수를 통해 2% DSS로 대장염을 유발하였다. 상지는 50 mg/ml로 증류수에 녹여 stock으로 만든 뒤, 실험에 맞게 희석하여 본 실험에 사용하였다.

- 그룹 1: 음성대조군 (증류수 음수 + 1 ml/kg/day 증류수)
- 그룹 2: 양성대조군 (2% DSS + 1 ml/kg/day 증류수)
- 그룹 3: 상지추출물 (ERM) 처리그룹 1 (2% DSS + 20 ml/kg/day 상지추출물)
- 그룹 4: 상지추출물 (ERM) 처리그룹 2 (2% DSS + 40 ml/kg/day 상지추출물)
- 그룹 5: 상지추출물 (ERM) 처리그룹 3 (2% DSS + 80 ml/kg/day 상지추출물)

6.2. 몸무게 측정 및 대장염증 지수 (disease activity index, DAI) 측정

실험기간 중 1주일에 한번 씩 동일한 시간에 개체별 체중을 측정하였다. DSS로 염증을 유발한 마지막 일주일 동안에는 매일 체중을 측정하였다. 대장염증 지수 (DAI) 는 Table 1 의 기준에 따라 측정되었다. 자유롭게 배출된 마우스의 변의 무르기와 피의 유무에 따라 점수를 매겼다.

Table 1. 대장염증 지수.

점수	무게 감소량	변의 무르기	피의 유무
0	None	Normal	None
1	1 - 5%		
2	6 - 10%	Loose Stool	Occult bleeding
3	11 - 20%		
4	> 20%	Diarrhea	Gross bleeding

6.3. 혈청 분리 및 대장 길이, 비장무게 측정

실험동물은 희생 12시간 전부터 절식시켰다. 작두를 이용해 마우스를 희생 시킨 후, 전혈을 얻어 실온에서 30분 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻은 후, -80℃에서 분석 전 까지 냉동 보관하였다. 장기는 동물 희생 후, 대장과 비장을 분리하여 생리식염수에 담가 겉에 묻어 있는 혈액과 지방을 제거하고 흡습지에 수분을 제거한 뒤, 대장의 길이와 무게를 측정하였다.

6.4. 조직학적 관찰

조직학적 관찰을 위해, 실험동물의 대장을 적출하여 흐르는 물에 깨끗이 씻어 10% 중성 포르말린 용액에 하루 동안 고정시켰다. 조직학적 평가를 위해 파라핀 조직표본을 제작하여 각 조직표본을 5 µm 두께로 절편 하였다. Hematoxylin & eosin (H&E), Alcian blue 염색을 진행한 뒤, 광학현미경 (Olympus, Waltham, MA, USA)을 이용하여 × 40의 배율에서 관찰하였다.

6.5. 대장조직에서의 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 분석

적출한 대장에서 단백질을 추출하기 위해 1 ml의 pro-prep (Intron, Seoul, Korea)을 조직에 넣고, Taco Prep bead beater (Taco, Taiwan)을 이용하여 homogenization 시킨다. 이 후 10,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 분리하여 단백질을 얻었다. Bradford 단백질 정량법을 이용하여 단백질 농도를 측정하여 30 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE에 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 trans-blot SD semi-dry transfer cell을 이용하여 transfer하였다. PBS-T (PBS with 5% tween 20)에 5%로 희석된 skim milk로 4 °C에서 하루 동안 blocking 시킨 후 다음날 PBS-T로 3번 washing 한 뒤, 1:200로 희석된 anti-iNOS2 항체 (SC-650, Santa Cruze Biotechnology)와 1:2,000로 희석된 anti-COX-2 항체 (NB100-689, Novus Bio)를 이용하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. Endogenous control으로는 1:5,000로 희석된 anti-beta actin antibody (MA5-15739, Thermo Scientific)를 사용하였다. 반응이 끝난 후, PBS-T로 다시 3번 washing 한 뒤, iNOS2, COX2는 1:10,000로 희석된 anti-rabbit IgG로, beta actin은 1: 50,000 로 희석된 anti-mouse IgG로 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 다시 3번 washing하고 WesternBright Sirius western blotting detection kit (Advansta, CA, USA)를 이용하여 밴드를 검출하였다. 이미지는 FluorChem E (Proteinsimple, CA, USA) 장비를 통해 얻었다.

6.6. 혈청에서의 pro-inflammatory cytokines의 농도 측정

혈청에서 cytokine을 측정하기 위해 마우스용 inflammation cytometric bead array kit (CBA)를 이용하였다. Kit manual에 따라 혈청을 반응시킨 후, FACS를 통해 cytokines을 분석하였다.

7. 통계처리

실험의 모든 통계처리는 SPSS version 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 통해 이루어졌다. 모든 값은 평균 ± 표준편차 (mean ± SD) 로 나타내었고, 3번 반복한 뒤 표기하였다. 통계적인 유의성은 Student *t*-test (2 그룹)와 analysis of variance (ANOVA, 3그룹 이상)로 검증하였고, $p < 0.05$ 인 경우 유의적인 차이가 있다고 해석하였다.

제4절 제3협동 연구 재료 및 방법

(상지주정추출분말의 항염증시험)

1. 상지주정추출분말의 항염증시험

1.1. 재료

본 실험에 사용된 상지주정추출물(RME)의 oxyresveratrol 함량은 HPLC 분석 결과 15.3%이었다.¹² Fetal Bovine Serum (FBS) 와 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Life Technologies로부터 구입하였다. AACOCF₃, AA861, Baicalein, Bay11-7082, LY255283, U75302은 Calbiochem으로부터 구입하였다. Lipopolysaccharide, dimethyl sulfoxide 는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 5-lipoxygenase 항체는 BD Biosciences로부터 얻었고, cPLA₂, 12-lipoxygenase, p65 항체는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였다. 그리고 phospho-cPLA₂, phospho-p38, p38, p-IkBalpa, IkBalpa, beta-actin, alpha-tubulin은 Cell Signaling Technology로부터 구입하였다.

1.2. 세포배양

쥐의 대식세포인 Raw264.7 세포는 American Type Culture Collection으로부터 구입하였다. 그리고 Raw264.7 세포는 10% FBS와 Antibiotic-Antimycotic (Life Technologies)가 포함된 DMEM에 37°C 5% CO₂ 상황에서 배양하였다.

1.3. Semiquantitative RT-PCR (유전자 전사 분석)

모든 RNA는 Intron에서 제공된 Easy Blue kit를 이용하여 추출하였다. 샘플당 1.25 µg의 농도로 M-MLV 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 아래의 Primer를 이용하여 RNA의 전사효율을 측정하였다. mouse NOX1 (forward, 5' -AATGCCCAGGATCGAGGT-3' ; reverse, 5' -GATGGAAGCAAAGGGAGTGA-3') ; mouse BLT2 (forward, 5'-CAGCATGTACGCCAGCGTGC-3'; reverse, 5'-CGATGGCGCTCACCAGACG-3') ; mouse IL-6 (forward, 5'-CACGGCCTTCCCTACTTCA-3'; reverse, 5' -TCTGGCTTT GTCTTTC TTGTTATC-3') ; and GAPDH (forward, 5' -CTGCACCACCAACTGCTTAGC-3' ; reverse, 5' -CTTCACCACCTTCTTGATGTC-3').

1.4. Western blot 단백질 발현 분석

세포는 Cold-PBS로 세척 후 Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 % Nonidet P-40, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and protease inhibitors [100 mM

phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 2 μ g/ml leupeptin, and 2 μ g/ml aprotinin])로 세포를 용해한 후 95°C에서 5분간 가열 하여 SDS와 반응시켰다. Sample은 SDS-PAGE로 분리하였고, PVDF membrane으로 90분 동안 100V로 이동시켰다. 그 후 1시간 동안 탈지유로 Blocking 하였고, p-cPLA2, cPLA2, 5-LO, 12-LO, p-p38, p38, p-IkBalpa,, IkBalpa, beta-actin, alpha-tubulin 항체를 이용하여 결합 시켰다. 그리고 Peroxidase-conjugated 2차 항체를 이용하여 반응시키고, ECL 시약을 이용하여 단백질의 양을 측정하였다.

1.5. RNA interference (RNA 간섭을 이용한 유전자 억제)

BLT2- 특이 적 (5'-UCAGCUUAGGAGUAGUUCG-3'), NOX1- 특이 적 (5'-GCUAUGGAGUUUAUCCGCAGGAAUU-3') 그리고 control (scrambled) siRNA는 Bioneer에서 얻었다. siRNA는 Opti-MEM 배지를 이용하여 invitrogen의 Oligofectamine을 이용하여 유전자를 억제시켰다.

1.6. 활성산소측정

세포는 ROS에 민감한 물질인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; 10 μ M)로 20분간 노출 시켰다. 세포내 ROS와의 반응을 통해 유리된 DCF의 양을 FACSCalibur를 이용하여 측정하였다.

1.7. IL-6, LTB₄, 12(S)-HETE 정량

세포에서 얻은 배지를 IL-6 정량 kit (BD Biosciences), LTB₄, 12(S)-HETE 정량 kit (Enzo Life Sciences)를 이용하여 제공해준 실험방법으로 측정하였다.

1.8. cPLA₂ activity 측정

세포에서 얻은 배지를 cPLA₂ assay kit (Cayman Chemical Company)를 이용하여 제공된 실험방법으로 측정하였다.

1.9. 면역형광염색법

세포를 ice-cold PBS로 세척 후, 4% paraformaldehyde로 고정 시켰다. 그리고 0.1% Triton X-100로 세포막의 투과성을 증가시켰다. 그 후 p65 항체로 결합시키고 형광이 붙어있는 2차 항체를 결합시켰다. 그리고 핵은 DAPI를 통해서 염색한다. 그 후 coverslip을 50% glycerine 으로 고정한 후 공초점현미경 (LSM 700; Carl Zeiss) 을 통해서 이미지를 관찰하였다.

제3장 연구결과 및 고찰

제1절 제1세부 연구 결과 및 고찰

1. 상지주정추출물 기능성 시험

1.1. 상지주정추출분말의 세포독성 및 항산화 효능 평가 (In vitro) (젓산 탈수소 효소)

1.1.1. H₂O₂처리 (산화 스트레스)에 대한 항산화 효능 측정

양성 대조 물질인 TritonX-100의 LDH activity를 100으로 계산하고, vehicle을 처리한 음성대조군을 0으로 계산했을 때 H₂O₂를 처리한 세포의 LDH activity는 84.9±8.5%로 나타났다. 상지추출물의 항산화 효능은 25~50ug/ml 농도에서만 나타났고, 그 이하의 농도에서는 효과가 보이지 않았다. 상지추출물 25ug/ml 농도에서 H₂O₂에 의해 나타난 LDH activity를 21.8±13.6% 감소시켰고, 상지추출물 50ug/ml 농도에서는 H₂O₂에 의해 나타난 LDH activity를 20.1±2.3% 감소시켰다. 두 가지 농도 모두 통계적 유의성 (p<0.05)을 보여주었다(Fig. 1).

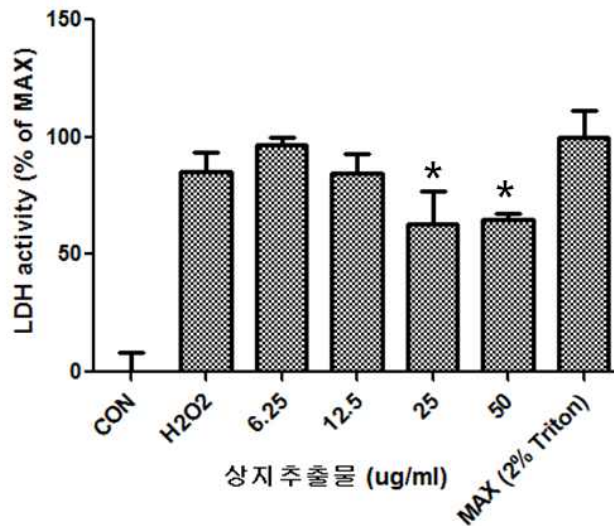


Fig. 1. 상지 추출물의 산화스트레스에 대한 항산화 효능.

1.1.2. 상지 추출물의 세포독성 측정

상지추출물의 세포 독성을 확인하기 위해 6.25~50ug/ml 농도로 HT22 세포에 처리한 후 LDH activity를 측정한 결과 모든 농도에서 세포독성이 유의하게 나타나지는 않았다. 상지추출물의 세포 독성 결과는 Fig. 2에 나타났다. 상지 추출물 농도 변화에 따라 LDH 값은 변화 없이 일정하게 나타났다. 50ug/ml 까지 세포 독성이 없음을 확인하였다. 본 시험에

서는 상지 주정추출 분말의 세포 독성 및 항산화 효과 입증을 위한 젓산탈수소효소 측정 (LDH assay)을 수행 하였다. 상지추출물의 산화스트레스 (H_2O_2)에 대한 항산화 작용은 25ug/ml 과50ug/ml 농도에서 통계적 유의성을 보이며 확인되었다. 상지추출물의 산화스트레스 (H_2O_2)에 대한 항산화 작용은 25ug/ml 이하의 농도에서는 나타나지 않았다. 또한 모든 시험농도에서 상지추출물의 세포 독성은 나타나지 않았다.

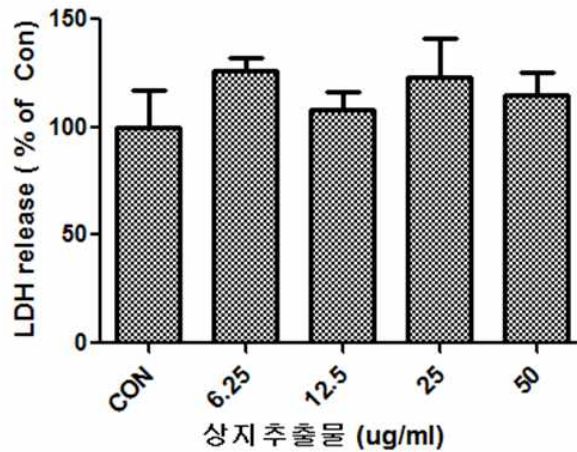


Fig. 2. 상지 추출물의 세포독성 (LDH assay).

1.2. 상지주정추출분말의 항치매 효능평가 (in vitro)

1.2.1. 베타아밀로이드 응집 억제 효능 평가

양성 대조 물질인 quercetin의 베타아밀로이드 응집 저해 효능은 $30 \pm 3.4\%$ 로 나타났고, 상지주정추출분말은 0.1 μ g/ml 부터 100 μ g/ml 농도까지 농도 증가에 따른 베타아밀로이드 응집 저해 효능을 나타냈다(Fig. 3). 상지주정추출분말의 베타아밀로이드 응집 저해를 50% 보이는 IC_{50} 값은 0.7 μ g/ml로 나타났다.

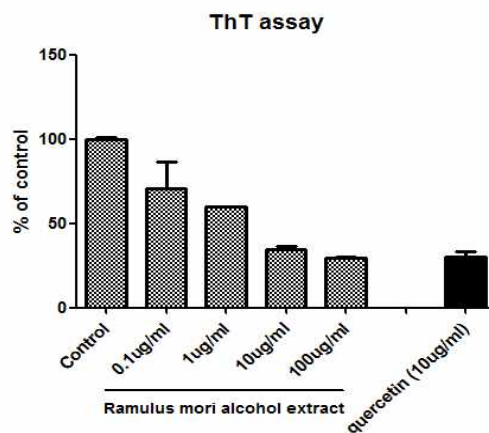


Fig. 3. 베타아밀로이드 응집 효능.

1.2.2. 항산화 효능 평가

양성 대조 물질인 quercetin의 항산화 효능은 $52 \pm 2.5\%$ 로 나타났고, 상지주정추출분말은 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지 농도 증가에 따른 항산화 효능을 나타냈다(Fig. 4). 항산화 효능이 control 대비 50% 보이는 농도를 결정하는 EC_{50} 값은 7.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다.

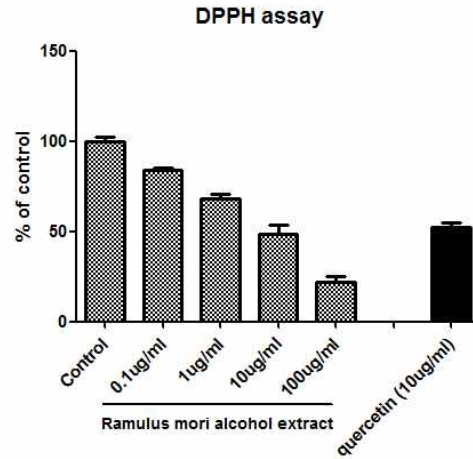


Fig. 4. 항산화 효능.

1.2.3. 아세틸콜린에스테라아제 억제 효능 평가

Invitrogen kit을 이용한 아세틸콜린에스테라아제 억제 효능 측정 방법에 따라 시험물질의 아세틸콜린에스테라아제 억제 효능을 확인 했고, 양성 대조물질인 tacrine의 억제 효능은 $18.6 \pm 0.1\%$ 로 확인되었다(Fig. 5). 상지주정추출분말은 농도 증가에 따른 아세틸콜린에스테라아제 억제 효능이 나타났지만, 최고 농도인 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 50% 이하의 억제 효능이 보이지 않았기 때문에 IC_{50} 값 계산은 하지 못했다.

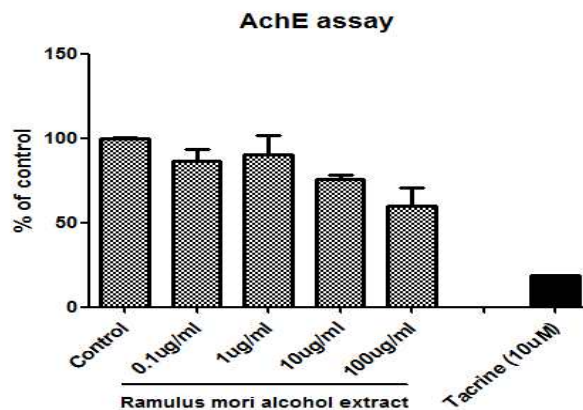


Fig. 5. 아세틸콜린에스테라아제 억제 효능.

1.2.4. 베타시크리테아제 (BACE) 활성 억제 효능 평가

FRET assay를 이용하여 베타시크리테아제 억제 효능을 확인하였다. 양성대조 물질인 H-4848의 베타시크리테아제 억제효능은 $19.6\% \pm 0.1$ 로 확인되었다(Fig. 6). 상지추출물은 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지 모든 농도에서 베타시크리테아제 억제 효능이 나타나지 않았다.

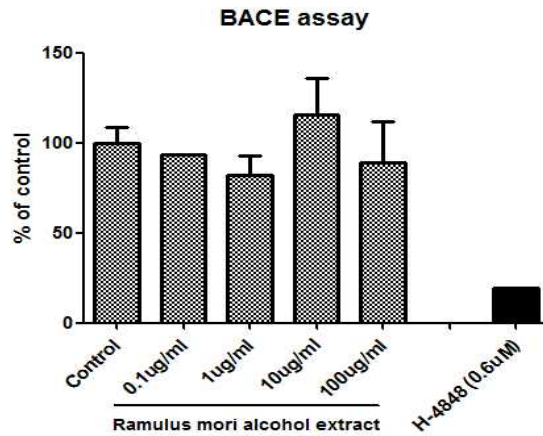


Fig. 6. 베타시크리테아제 활성 억제 효능.

1.2.5. 세포 독성 확인

MTT assay 방법에 따라 세포 독성을 측정하였고, 대조 물질인 quercetin은 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 7). 상지추출분말은 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지는 세포 독성이 나타나지 않았지만, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 농도에 따른 세포 독성이 높게 나타났다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 control 대비 50% 이하로 세포사가 일어나 독성이 매우 높음을 확인했다. 따라서 베타아밀로이드 독성 억제 효능 측정시 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도는 제외하고 진행했다.

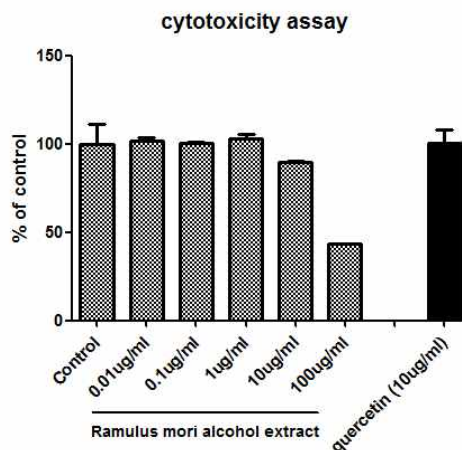


Fig. 7. MTT assay에 의한 세포 독성 확인.

1.2.6. 베타아밀로이드 독성억제 효능 평가 (cell based assay)

MTT assay 방법에 따라 베타아밀로이드의 독성 및 상지주정추출분말의 억제 효능을 측정하였다. 베타아밀로이드 단독 처리군은 control 대비 57.1±0.3% 값을 나타내었다(Fig. 8). 자사의 대조 물질의 경우 73.8±1.8% 값을 나타내어 독성억제 효능을 확인할 수 있었다. 상지주정추출분말은 모든 농도의 처리군이 베타아밀로이드 단독 처리군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 본 시험에서는 상지주정추출분말의 인지기능개선 및 항스트레스 효과 입증을 위한 6가지 in vitro assay를 수행하였다. 상지주정추출분말은 베타아밀로이드 응집 억제, 항산화 작용, 아세틸콜린에스테라아제 억제에 각각 효능이 있음을 확인하였다. 하지만 베타시크리테아제 활성 억제와 베타아밀로이드 독성 저해 효능은 확인하지 못했다. 상지주정추출분말의 세포 독성은 10µg/ml 부터 나타나기 시작하고, 100µg/ml 농도에서는 매우 높은 세포 독성이 있음을 확인했다.

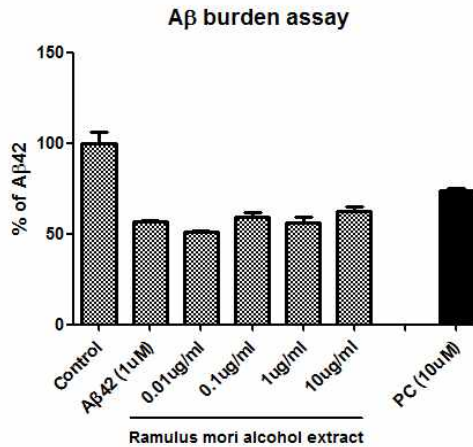


Fig. 8. 베타아밀로이드 독성 억제 효능.

본 시험에서는 상지주정추출분말의 인지기능개선 및 항스트레스 효과 입증을 위한 6가지 in vitro assay를 수행하였다. 상지주정추출분말은 베타아밀로이드 응집 억제, 항산화 작용, 아세틸콜린에스테라아제 억제에 각각 효능이 있음을 확인하였다. 하지만 베타시크리테아제 활성 억제와 베타아밀로이드 독성 저해 효능은 확인하지 못했다. 상지주정추출분말의 세포 독성은 10µg/ml 부터 나타나기 시작하고, 100µg/ml 농도에서는 매우 높은 세포 독성이 있음을 확인했다.

1.3. 알츠하이머병 acute model 효능평가(In vivo)

1.3.1. 알츠하이머병 acute model 효능평가 (Y-maze test)

AD acute model에서 상지주정추출분말에 의한 기억 학습 회복 효능을 측정하기 위해 Y maze test를 진행한 결과, 정상군과 부형제 투여군 (Aggregated Aβ1-42)에서 % Spontaneous alternation 값이 각각 71.3±2.1, 53.4±1.9로 측정 되었으며, 정상군 대비 부형제

투여군에서 통계적으로 유의하게 감소한 결과를 보여주었다($p < 0.01$). 이는 Aggregated A β 1-42에 의한 기억 손상이 잘 유도되었음을 보여주었다. 이러한 모델에서 상지주정추출분말 50mg/kg 투여군, 상지주정추출분말 100mg/kg 투여군의 경우, % Spontaneous alternation 값이 각각 55.6 ± 1.2 , 55.3 ± 1.6 로 측정되었으며 부형제 투여군 대비 통계적으로 유의한 차이를 보여주지 않았다(Fig. 9).

양성대조군으로 사용한 도네페질 5mg/kg 투여군, ELND005 10mg/kg 투여군의 경우, % Spontaneous alternation 값이 59.1 ± 1.9 , 65.1 ± 2.2 으로 각각 측정되었으며, 부형제 투여군 대비 통계적으로 유의한 기억 회복 효능을 보였다. ($p < 0.05$, $p < 0.01$)

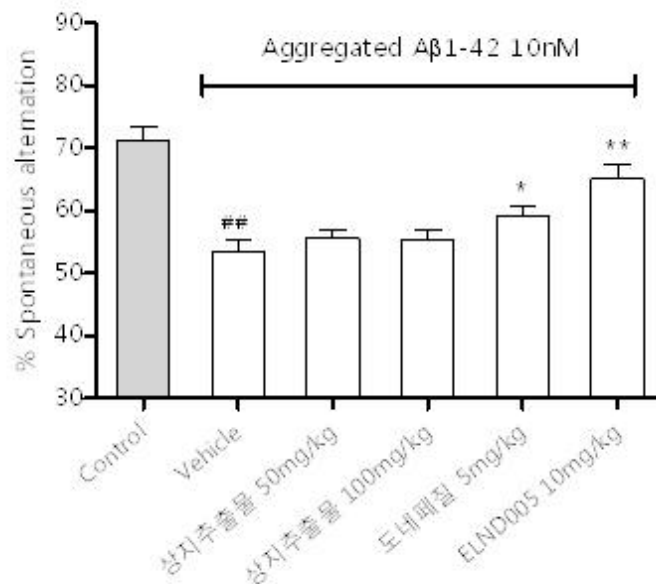


Fig. 9. AD acute model에서 Y maze test에 의한 상지주정추출분말의 기억 학습 회복 효능.

1.3.2. 알츠하이머병 acute model 효능평가 (Passive avoidance test)

ICR 마우스에 상지주정추출분말에 의한 기억 학습 회복 효능을 측정하기 위해 Passive avoidance를 수행하여 step-through latency (sec) 값을 측정하였다. Control (10% DMSO i.c.v. injection)과 부형제 투여군 (aggregated A β 1-42 i.c.v. injection)에서 평균 step-through latency 값이 각각 193.5 ± 30.05 , 57.51 ± 16.9 으로 측정되었으며 Control 대비 Vehicle 투여군 에서 통계적 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.001$). 이는 Aggregated A β 1-42 i.c.v. injection에 의한 memory deficit이 잘 유도되었음을 보여주었다. 또한 이러한 모델에서 상지주정추출분말 50mg/kg 투여군 (aggregated A β 1-42 i.c.v. injection + 상지주정추출분말 50mg/kg), 상지주정추출분말 100mg/kg kg 투여군 (aggregated A β 1-42 i.c.v. injection + 상지주정추출분말 100mg/kg) 의 경우 step-through latency 값이 각각 42.33 ± 11.26 , 108.98 ± 31.48 로 측정되었으며, 부형제 투여군 대비 상지주정추출분말 100mg/kg 투여군 에서 기억 학습 회복 효능이 증가되는 경향을 보였으나, 통계적 유의성은 없었다.

양성대조군으로 사용한 도네페질 투여군 (aggregated A β 1-42 i.c.v. injection + 도네페질

5mg/kg), ELND005 투여군 (aggregated A β 1-42 i.c.v. injection + ELND005 10mg/kg) 의 경우 각각 116.62 \pm 33.26, 152.12 \pm 32.45으로 측정되었으며, ELND005 10mg/kg 투여군에서 부형제 투여군 대비 통계적으로 유의한 기억 학습 회복 효능을 보였다. (p<0.05) 도네페질 5mg/kg 투여군의 경우 기억 학습 회복 효능을 나타내었으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 10).

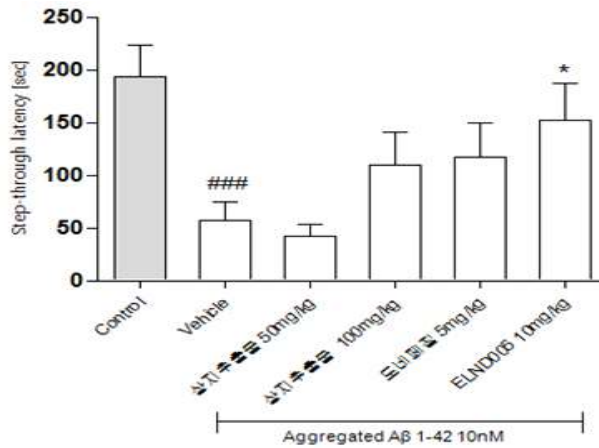


Fig. 10. AD acute model에서 Passive avoidance test에 의한 상지주정추출분말 기억 학습 회복 효능.

본 시험에서는 AD acute model에서 Y-maze test 와 Passive avoidance test를 이용하여 상지주정추출분말에 의한 기억 학습 회복 효능을 평가 하였다. 그 결과, 상지주정추출분말 100mg/kg 투여군에서 부형제 그룹대비 기억 학습 회복 효능의 증가경향을 보이나, 유의한 기억 학습 회복 효능을 보이지 않았다.

1.4. 상지주정추출분말의 인지기능 개선 효과(In vivo)

1.4.1. 스코폴라민으로 유도된 기억손상모델에서 상지주정추출분말에 의한 회복 효능실험 (Y-maze)

스코폴라민으로 유도된 기억 손상 모델에서 상지주정추출분말의 회복 효능을 측정 하기 위하여 Y maze test를 수행 한 결과, 정상군과 부형제 투여군 (스코폴라민 투여군)에서 % Spontaneous alternation 값이 각각 72.9 \pm 1.5 , 48.8 \pm 3.4로 측정되었으며, 정상군 대비 부형제 투여군에서 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)를 보였다. 이는 스코폴라민에 의해 기억 손상이 잘 유도되었음을 보여주었다.

이러한 모델에서 상지주정추출분말 50mg/kg투여군, 상지주정추출분말 100mg/kg투여군, 상지주정추출분말 200mg/kg투여군, 상지주정추출분말 400mg/kg투여군의 경우, % Spontaneous alternation값이 각각 53.9 \pm 2.1, 59.5 \pm 4.3, 56.7 \pm 4.4, 58.4 \pm 1.7 로 측정되었으며, 부형제 투여군 대비 기억 회복 효능을 보이나, 농도의존적인 경향을 보이지 않았으며, 통계적 유의성도 없었다. (Fig. 11) 양성대조물질로 사용한 도네페질 투여군의 경우 %

Spontaneous alternation 값이 62.8 ± 1.8 으로 측정되었으며, 부형제 투여군 대비 통계적으로 유의하게 기억 회복 효능을 보였다. ($p < 0.05$)

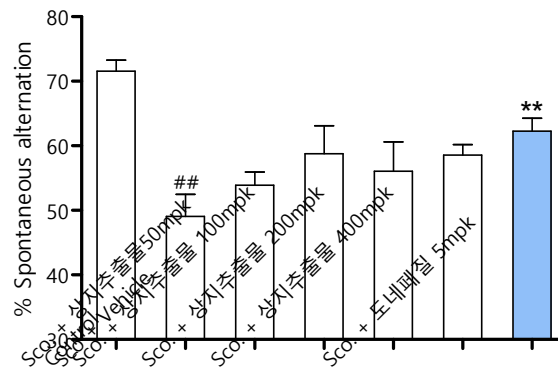


Fig. 11. 스코폴라민으로 유도된 기억 손상 모델에서 Y maze test에 의한 상지주정추출 분말 효능.

1.4.2. 스코폴라민으로 유도된 기억손상모델에서 상지주정추출분말에 의한 회복 효능실험(NOR)

스코폴라민으로 유도된 기억 손상 모델에서 상지주정추출분말의 회복 효능을 측정 하기 위하여 Novel object recognition test 를 수행 한 결과, 정상군과 부형제 투여군 (스코폴라민 투여군)에서 Preference index 값이 각각 0.69 ± 0.05 , 0.50 ± 0.06 로 측정되었으며, 정상군 대비 부형제 투여군에서 통계적으로 유의한 차이 ($p < 0.05$)를 보였다. 이는 스코폴라민에 의해 기억 손상이 잘 유도되었음을 보여주었다.

이러한 모델에서 상지주정추출분말 50mg/kg투여군, 상지주정추출분말 100mg/kg투여군의 경우, % Preference index값이 각각 0.47 ± 0.02 , 0.53 ± 0.02 로 측정되었으며, 부형제 투여군 대비 기억 회복 효능을 보이지 않았으며, 통계적 유의성도 없었다. (Fig. 12) 양성대조물질로 사용한 도네페질 투여군의 경우 % Preference index 값이 0.67 ± 0.01 으로 측정되었으며, 부형제 투여군 대비 통계적으로 유의하게 기억 회복 효능을 보였다. ($p < 0.05$)

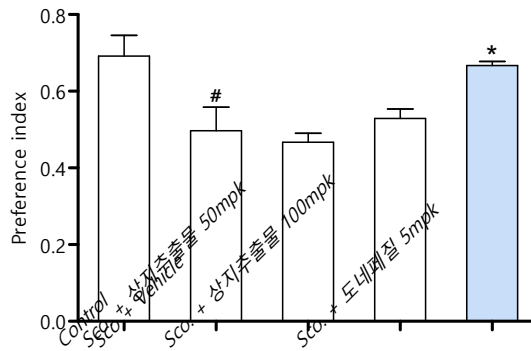


Fig. 12. 스코폴라민으로 유도된 기억 손상 모델에서 Nobel object recognition test에 의한 상지추출분말 효능.

1.4.3. 스코폴라민으로 유도된 기억손상모델에서 상지추출분말에 의한 회복 효능실험 (Passive avoidance test)

상지추출분말을 ICR마우스에 투여하고 한 시간 뒤에 Passive avoidance test (training trial)를 수행하여 step-through latency (sec)값을 측정하였다. 정상군과 부형제 투여군 (스코폴라민 투여군)에서 각각 22.4 ± 5.5 , 25.3 ± 3.5 로 측정되었으며, 두 그룹간 통계적으로 유의한 차이가 없음을 확인하였다. 이러한 모델에서 상지추출분말 50mg/kg투여군, 상지추출분말 100mg/kg투여군의 경우 step-through latency (sec)값이 23.6 ± 4.4 , 25.0 ± 5.5 로 측정되었다. 양성대조물질로 사용한 도네페질 투여군의 경우 step-through latency (sec)값이 24.7 ± 5.2 로 측정되었다. 따라서 training trial에서 step-through latency 측정 결과는 모든 그룹간에 통계적으로 유의한 차이는 없이 비슷한 시간에 어두운 방에 들어갔음을 보여주었다. Retention trial은 training trial 24시간 경과 후 수행하였다. Retention trial 한 시간 전에 부형제 및 상지추출물, 도네페질을 투여하였다.

Step-through latency (sec)값을 측정 한 결과, 정상군과 부형제 투여군 (스코폴라민 투여군)에서 각각 244.5 ± 21.3 , 50.2 ± 5.9 로 측정되었으며, 정상군 대비 부형제 투여군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였다 ($p < 0.01$). 이러한 결과는 스코폴라민에 의해 기억 손상이 잘 유도되었음을 보여주었다.

이러한 모델에서 상지추출분말 50mg/kg투여군, 상지추출분말 100mg/kg투여군의 경우 step-through latency (sec)값이 58.1 ± 6.6 , 56.7 ± 6.6 로 측정되었으며, 부형제 투여군 대비 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. (Fig. 13)

양성대조물질로 사용한 도네페질 투여군의 경우 step-through latency (sec)값이 135.1 ± 26.0

로 측정되었으며, 부형제 투여군 대비 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다. ($p < 0.05$).

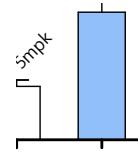


Fig. 13. 스코폴라민으로 유도된 기억 손상 모델에서 Passive avoidance test에 의한 상지주정추출분말 효능.

스코폴라민으로 유도된 기억손상모델에서 3가지 서로 다른 기억학습 동물실험 (Y-maze, Novel object recognition, Passive avoidance test)을 수행하였음. 상지주정추출분말 최고 농도까지 투여하여 실험을 수행했음. 약간의 기억회복능을 보였으나 통계적으로 유의한 기억회복능을 보이지 않음.

1.5. 상지주정추출분말의 인지기능개선, 항스트레스, 항치매 효과 결과 정리

본 시험에서는 상지주정추출분말의 인지기능 회복능을 확인하기 위해 in vitro 와 in vivo 시험을 통해 유효성을 확인하려 하였음.

상지주정추출분말은 in vitro에서 베타아밀로이드 응집 억제능과 항산화능을 가지고 있었으며 알츠하이머병 급성 유도 모델에서 약간의 인지기능 회복능을 보였음.

상지주정추출분말의 인지기능 회복능은 베타아밀로이드 응집 억제와 항산화능으로 인하여 일부 효능을 확인할 수 있었음.

2. 상지주정추출분말의 안전성 검토

- 상지 주정 추출물의 안전성을 보기위하여 미생물, 중금속, 농약 검사를 실시

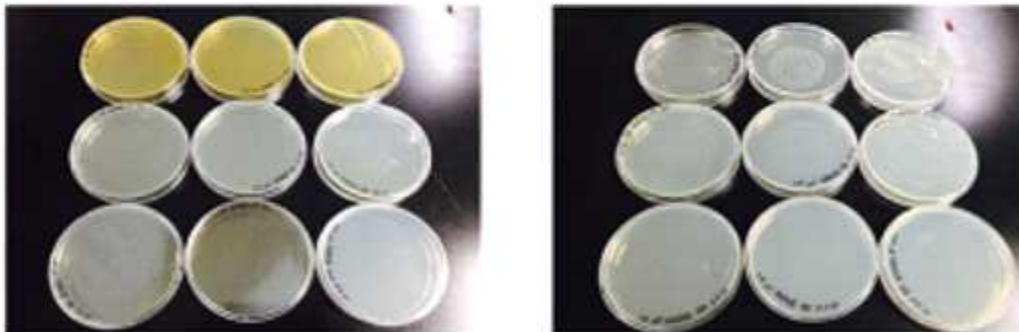
2.1. 미생물 분석

- 상지 분말의 기준 규격은 없지만 1.0×10 (CFU/mL)임.

상지주정추출분말의 세균수 측정.

시료명	n(CFU/mL)			평균 (CFU/mL)	희석배수	세균수 (CFU/mL)
	1	2	3			
상지주정추출분말	1	1	1	1.0	10배	1.0×10

* SPA 배지, 37℃, 48hr 배양.



상지주정추출분말 희석배수에 따른 세균수 측정: $10^0 - 10^2$ (left), $10^4 - 10^6$ (right).

Fig. 14. 상지 주정 추출 분말의 미생물 균수 측정.

2.2. 중금속, 잔류농약 및 이산화황 분석

- 중금속 4종(납,비소,수은,카드뮴) , 잔류농약 6종, 이산화황 기준 규격에 적합

 **시험성적서**
Certificate of Analysis

Page 1 of 1

접수번호 : 004272 의뢰자 : 한국식품연구원 박길곤 주 소 : 경기도 성남시 분당구 영정로1로 101번길 62	접수일자 : 2015. 03. 16. 의뢰목적 : 사전품질관리
검체명 : 생치 의뢰항목 : 중금속(중금속, 잔류농약, 이산화황) 자료번호 : 20150303	시험규격 : 「생규」

시험항목	기준	시험결과	시험자
중금속	1) 중금속 가) 납 : 5 ppm 이하 나) 비소 : 3 ppm 이하 다) 수은 : 0.2 ppm 이하 라) 카드뮴 : 0.3 ppm 이하	가) 0.4 ppm 나) 불검출 다) 0.00 ppm 라) 0.04 ppm	김정민
	2) 잔류농약 가) 총 (C.D) : 0.1 ppm 이하 나) 디알데히드 : 0.01 ppm 이하 다) 총 10종류잔류 : 0.2 ppm 이하 라) 말라톤 : 0.04 ppm 이하 레) 염도살균 : 0.2 ppm 이하 로) 엔트린 : 0.04 ppm 이하	가) 불검출 나) 불검출 다) 불검출 라) 불검출 레) 불검출 로) 불검출	이승민
3) 이산화황 : 30 ppm 이하	불검출	불검출	이승민
검정일 : 2015.04.03	의뢰자 : 한국식품연구원 박길곤		

확인자	신승룡  2015.04.03	박길곤  2015.04.03
-----	--	---

* 참고 : 이 성적서 내용의 정확성 및 신뢰성에 대해 보증을 보증할 수 없습니다.

2015년 04월 03일

한국의약품시험연구원장

서울시 영등포구 여의동길 127 (TEL: 967-7067, FAX: 965-7459)



3. 상지주정추출분말의 안정성 검토

3.1. 상지주정추출분말 내 지표물질의 안정성확인 1차 실험

3.1.1. 실험결과

1) 상지분말원료의 경시변화

(1) 보존기간별 Oxyresveratrol의 함량변화

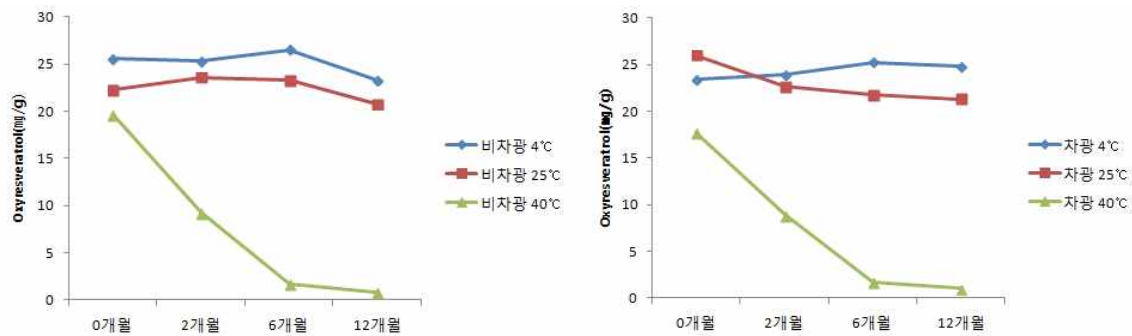


Fig. 15. 보존기간별 oxyresveratrol의 함량변화.

총 12개월 동안 각 온도대(4°C, 25°C, 40°C)와 빛의 차광 유무에 따라 실험을 진행한 결과, 4°C, 25°C에서는 함량의 변화가 크게 없었으나, 40°C에서는 시간이 지남에 따라 함량이 급격하게 떨어지는 경향을 나타내었고, 광선에 의한 함량 변화가 없었다. 40°C의 보관은 oxyresveratrol 함량의 변화에 영향을 주는 것으로 나타내었다.

(2) 건조감량수분의 변화

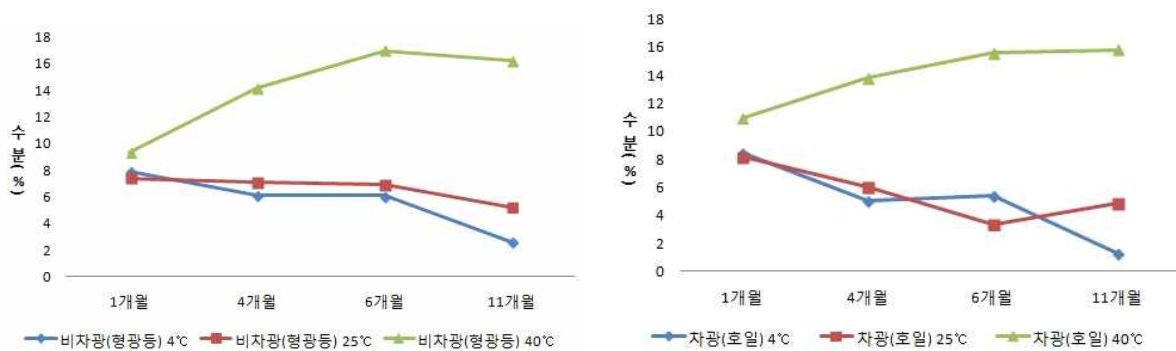


Fig. 16. 보존기간별 건조감량수분의 함량변화.

총 11개월 동안 초기에는 약 2개월 간격으로 각 온도대별(4°C, 25°C, 40°C)과 빛의 차광 유무에 따라 실험을 진행한 결과, 낮은 4°C에서는 수분이 감소하는 경향을 보였고, 높은 40°C에서는 시간이 지남에 따라 흡습이 진행되는 경향을 나타내었다. 빛에 의한 영향은 크지 않았다.

(3) 색상변화

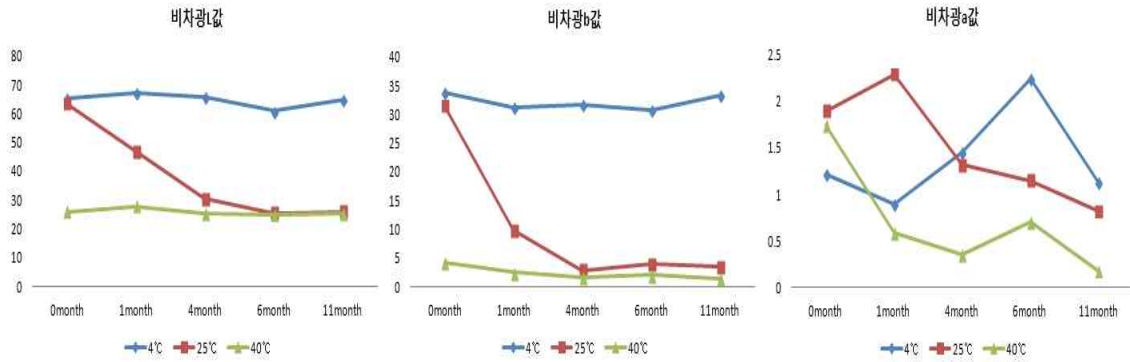


Fig. 17. 비차광 조건하에서 보존기간별 분말의 색상 변화.

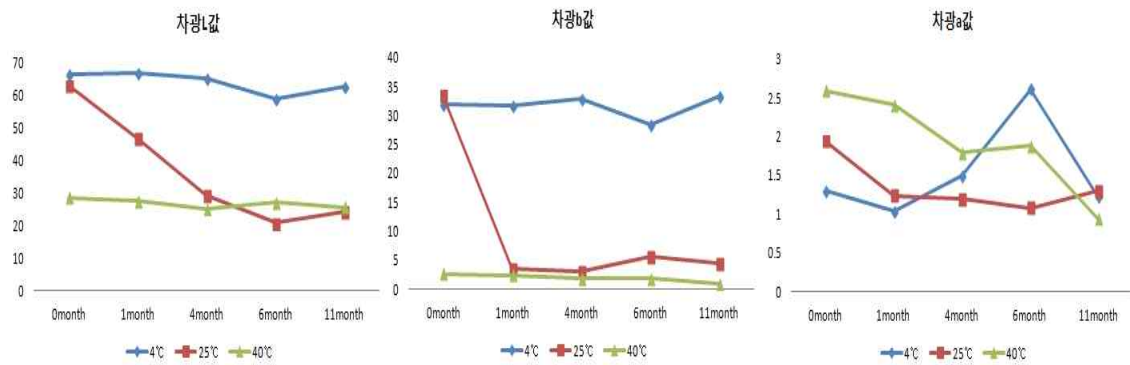


Fig. 18. 차광 조건하에서 보존기간별 분말의 색상 변화.

색차 분석 결과, 4°C 보관조건에서는 비교적 색차가 일정하게 유지되었으나, 1개월 뒤부터 흡습에 의해 25°C, 40°C 보관시료의 흡습에 의해 전체적으로 색이 어두워지면서 25°C에서는 한 달 뒤부터 흡습에 의해 성상이 변하면서, b값(채도)과 a값(색도)이 떨어지기 시작했고, 광선의 차단유무에 상관없이 비슷한 경향을 나타내었다. 40°C에서는 1개월 뒤 a값이 떨어지기 시작하여 변화가 나타나기 시작하여 값이 떨어졌다.

(4) 정상변화확인

상지추출분말의 정상변화를 12개월 동안 광선의 차광 유무와 온도에 따라 보관하며 성상을 확인하였다.



Fig. 19. 경시변화 실험전 상지추출분말



Fig. 20. 12개월 후 상지분말 4°C 비차광, 차광 정상변화.



Fig. 21. 12개월 후 상지분말 25°C 비차광, 차광 정상변화.



Fig. 22. 12개월 후 상지분말 40°C 비차광, 차광 정상변화.

12개월 경시 변화 결과, 저온 4℃에서는 흡습 등에 의한 성장변화는 없었다. 25℃, 40℃에서는 위의 그림에서 처럼 흡습에 의해 성장이 심하게 변화였다. 12개월 경시 변화 결과, 저온 4℃에서는 흡습 등에 의한 성장변화는 없었다. 25℃, 40℃에서는 위의 그림에서 처럼 흡습에 의해 성장이 심하게 변화였다

3.1.2. 결론

상지주정추물의 안정성 확인시험 결과, 4℃의 저온에서는 Oxyresveratrol의 함량이 변화가 없었고, 25℃의 상온에서는 2개월 뒤에 다소 함량이 감소하는 경향을 나타내었고, 40℃의 고온에서는 6개월이후 함량이 급격하게 떨어지는 결과를 보였다. 이는 경시변화에서 나타난 색상변화와 흡습 등에 의한 영향에 의한 것으로 보인다.

따라서, Oxyresveratrol의 함량과 안정성 유지를 위해서는 최종 제품의 주원료인 상지주정추출분말은 저온에서 보관하는 것이 가장 안전 할 것으로 판단된다.

3.2. 분말과립, 정제의 안정성 확인 시험

3.2.1. 실험결과

1) 상지과립의 수분함량

상지과립물을 스틱포장하여 6개월간 각 온도대(40℃,25℃)별로 보관하여 수분함량의 변화를 확인하였다.

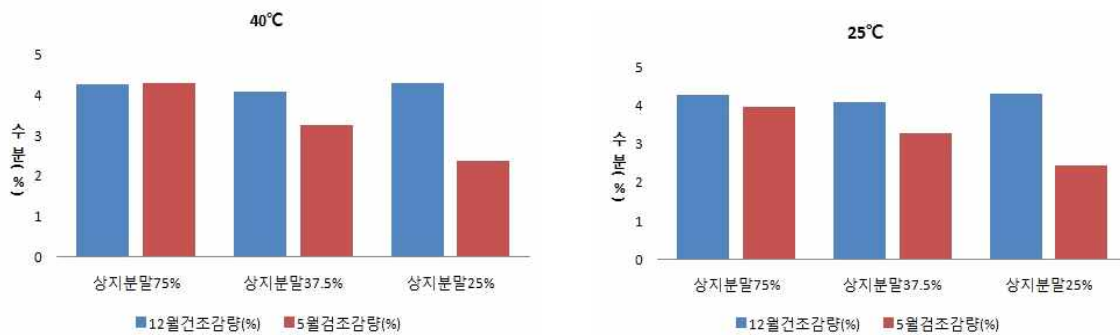


Fig 23. 상지과립의 수분함량.

상지분말75% 제품은 각 온도대별로 큰 변화가 없었으나, 상지분말37.5% 제품은 1%정도 감소하였고, 상지분말25% 제품은 2% 이상 감소하는 경향을 나타내었다.

2) 색가의 변화

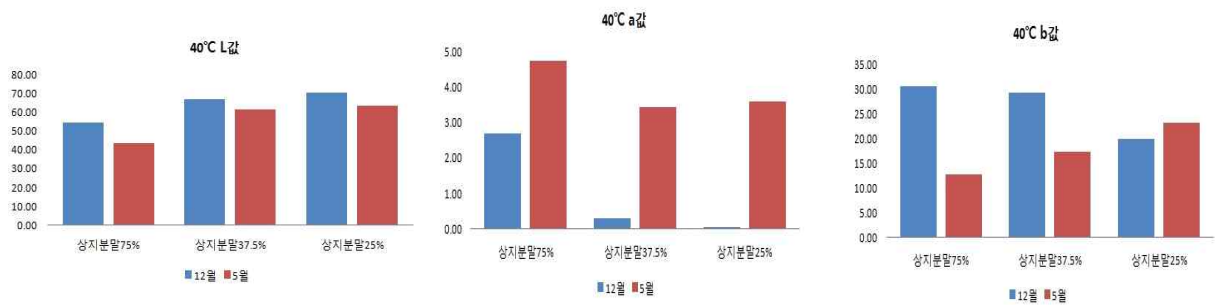


Fig. 24. 40°C 에서 상지 과립 스틱의 색가 변화.

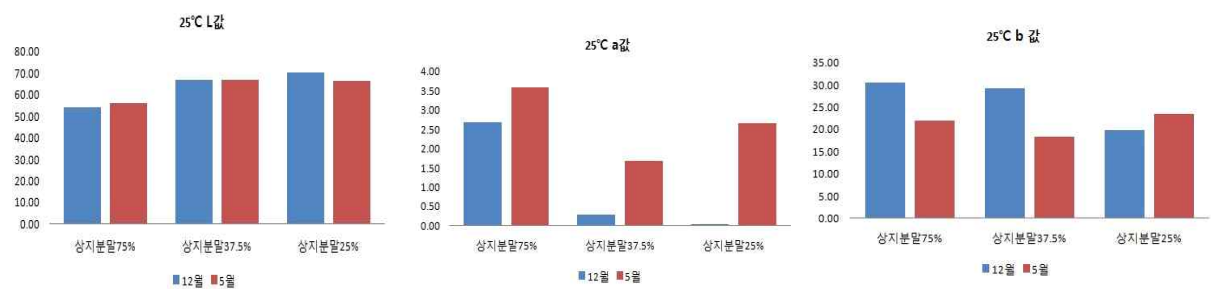


Fig. 25. 25°C 에서 상지 과립 스틱의 색가 변화.

색차 분석 결과, 25°C 보관조건에서는 비교적 L값(명도)이 일정하게 유지되었으나, b값(채도)과 a값(색도)이 떨어졌다. 40°C 보관시료의 L값(명도)이 각 시료별로 떨어졌고, b값(채도)과 a값(색도)도 변화가 심하게 나타났다. 이는 수분 증발에 의해 전체적으로 색상의 변화에 영향을 준 것으로 보인다.

3) 상지과립물의 정상변화



Fig. 26. 25°C 6개월 보관(25%, 37.5%, 75%).



Fig. 27. 40°C 6개월 보관(25%, 37.5%, 75%)

스틱 포장된 과립물을 6개월간 보관 후, 꺼내어 확인 한 결과, 25°C에서는 성상에 큰 변화가 없었고, 40°C에서는 상지추출물 25% 상지추출물 37.5% 시료에서는 약간의 흡습이 있었다.

4) 상지추출분말 정제의 안전성시험

상지추출분말 정제를 PTP 포장하여 6개월간 각 온도대(40°C, 25°C)별로 보관하여 수분함량의 변화를 확인하였다.

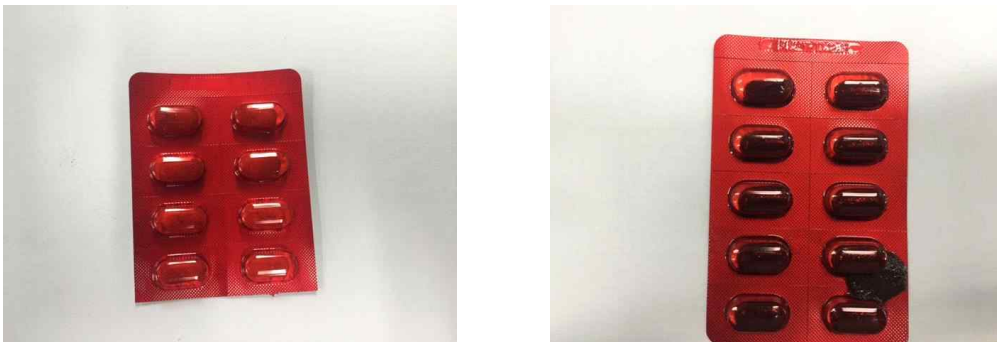


Fig. 28. 25°C, 40°C 상지추출분말 정제 PTP 보관.

40°C의 경우는 한 달 후, 흡습이 심하게 진행되어 실험을 중단하였고, 25°C에서의 시료만 진행하였다.

5) 상지추출분말 정제의 건조감량 수분변화

상지추출분말 정제를 광선의 차광유무에 따라 25°C 상온에서 수분에 의한 변화를 확인하였다.

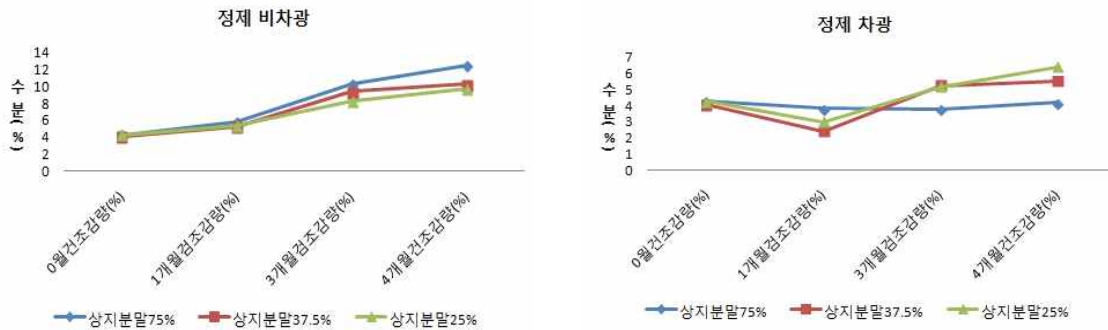


Fig 29. 상지추출분말정제의 25°C에서의 건조감량 수분변화.

4. 임상시험시료제조 및 안전성, 안정성시험

4.1. 임상시험시료용 상지주정추출분말의 영양성분 분석

임상시험시료 제조에 사용된 상지주정추출분말의 열량, 탄수화물, 단백질, 조지방, 트랜스지방산, 콜레스테롤 등의 영양성분을 한국기능식품 연구원에 의뢰하여 분석한 결과는 Table 1. 과 같다. 열량은 392.82 Kcal/100 g, 탄수화물 72.43%, 조단백질 8.00%, 조지방 7.90%로 나타났다. 한편, 포화지방산의 량은 1.19 g/100 g으로 나타났으나 트랜스지방산과 콜레스테롤은 불검출되었다.

4.2. 임상시험시료용 상지주정추출분말의 안전성 분석

임상시험시료 제조에 사용된 상지주정추출분말의 안전성을 보기 위하여 대장균, 중금속, 농약 검사, 총 아플라톡신을 한국기능식품연구원에 의뢰하여 분석한 결과는 Table 2와 같다. 분석한 결과, 대장균은 음성, 총아플라톡신 불검출, 이산화황 불검출, 수은등은 불검출되었고 납, 비소, 카드뮴등은 식품 허용 기준 이하로 나타났다. 또한 DDT, BHC, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Endosulfan 등의 잔류농약도 불검출되었다.

Table 1. 임상시료 상지주정추출분말의 영양성분 분석 (한국기능식품연구원)



제 D2016061498 호			
검 사 성 적 서			
검체명	상지주정추출분말	제조일자 (유통기한)	2016-05-03
의뢰인	업체명	주식회사에스엘에스	
	주 소	경기 평택시 팽성읍 추판산단2길 23	
	성 명	이은수	
제조번호		접수년월일	2016-06-20
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016061498
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 권 회			
시험항목	결과	검사담당자	
열량(Kcal/100g)	392.82Kcal/100g	한아름	
탄수화물(%)	72.43%	한아름	
조단백질(%)	8.00%	김은영	
조지방(%)	7.90%	이선정	
나트륨(mg/100g)	27.72mg/100g	김세미	
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)	359.12mg/g	이지연	
포화지방산(g/100g)	1.19g/100g	김은지	
트랜스지방산(g/100g)	불검출	김은지	
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	이현아	
2016 년 7 월 1 일 한국기능식품연구원			
			
<small>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 031-628-0400 FAX(031)628-0400-1</small>			

Table 2. 임상시험시료 상지주정추출분말의 안전성 분석

제 D2016061410 호				검 사 성 적 서	
검체명	상지주정추출분말	제조일자 (유통기한)	2016-05-03		
의뢰인	업체명	주식회사에스엘에스			
	주 소	경기 평택시 팽성읍 추팔산단2길 23			
	성 명	이은수			
제조번호		검수년월일	2016-06-16		
검사의뢰목적	참고용	검체검수번호	D2016061410		
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 천 회					
시험항목	결과	검사담당자			
심상	이미, 이취가없고 고유의 향미가 있는 갈색의 결정성 분말	김은영			
대장균군	음성	박수인			
납(mg/kg)	0.0598mg/kg	류미진			
비소(mg/kg)	0.0726mg/kg	류미진			
수은(mg/kg)	불검출	조용			
카드뮴(mg/kg)	0.0037mg/kg	류미진			
이산화황(g/kg)	불검출	김은영2			
총아플라톡신($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출	박정덕			
BHC(mg/kg)	불검출	박가화			
DDT(mg/kg)	불검출	박가화			
Aldrin(mg/kg)	불검출	박가화			
Dieldrin(mg/kg)	불검출	박가화			
Endrin(mg/kg)	불검출	박가화			
Endosulfan(mg/kg)	불검출	박가화			
2016년 6월 28일 한국기능식품연구원					
					
<small>(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 http://www.kbsi.re.kr 전화번호 051-3628-0400-1</small>					

4.3 임상시험시료의 안정성 분석

4.3.1. 시험 결과

1) 3종의 상지스틱포장제품 및 캡슐제품의 경시변화

(1) 보존기간별 Oxyresveratrol의 함량변화

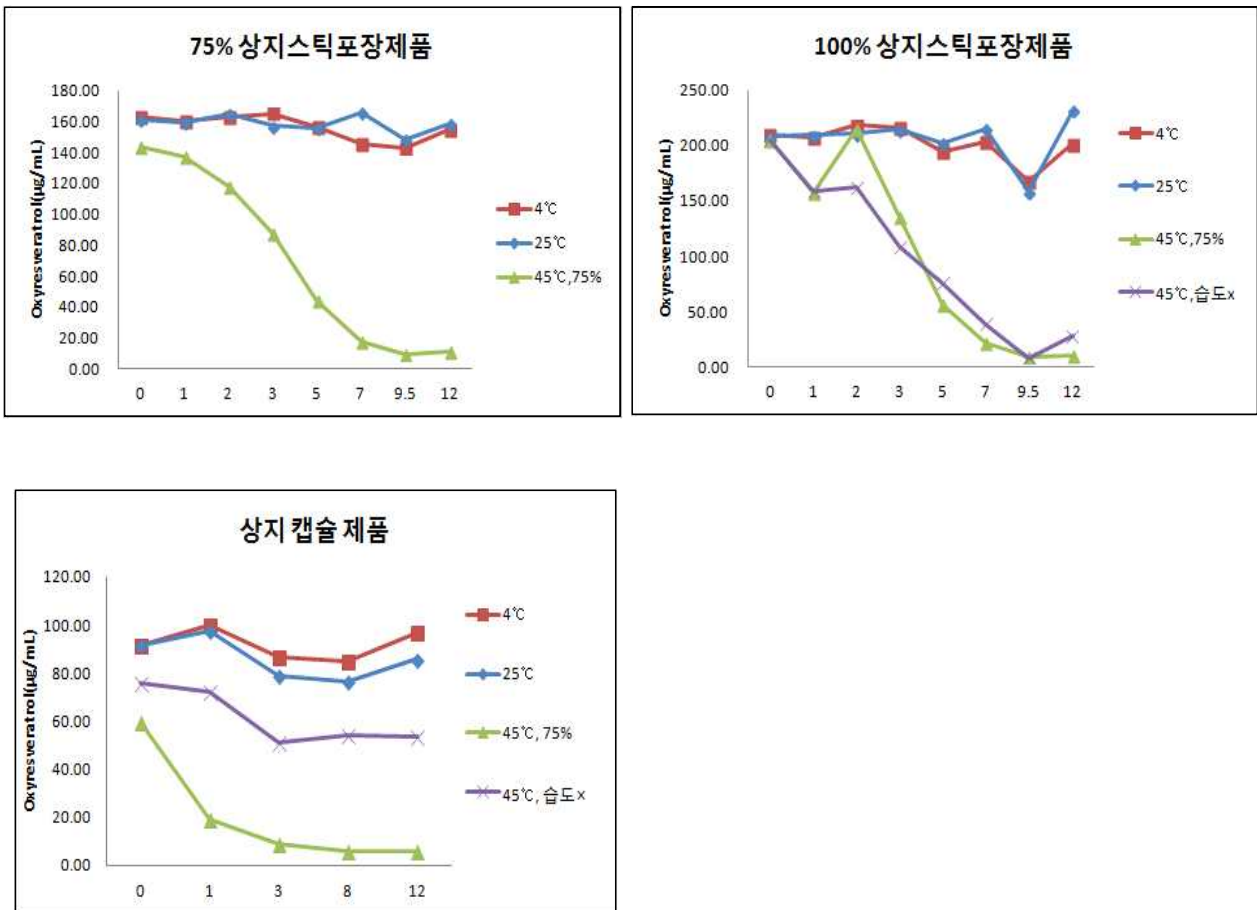


Fig. 30. 보존기간별 oxyresveratrol의 함량변화.

총 12개월 동안 ① 4°C 냉장 조건, ② 25°C 상온조건, ③ 45°C, 75% 습도 조건, ④ 45°C, 無 습도 조건에서 75% 상지스틱포장제품과 100% 상지스틱포장제품에 대한 oxyresveratrol 함량변화를 측정된 결과 4°C 냉장 조건과 25°C 상온조건에서는 큰 함량변화를 나타내지 않았다. 반면에 45°C, 75% 조건에서는 2개월 이후부터 oxyresveratrol 함량이 급격하게 감소하였으며, 45°C, 無습도 조건에서는 1개월 이후부터 급격한 감소경향을 나타냈다.

상지캡슐제품의 경우에도 스틱포장제품과 마찬가지로 4°C 냉장 조건과 25°C 상온조건에서는 큰 함량변화를 나타내지 않은 반면에, 45°C, 75% 조건에서 급격한 oxyresveratrol의 함량

감소를 확인할 수 있었다. 하지만 45°C, 無습도 조건에서는 스틱포장제품에 비하여 oxyresveratrol의 함량이 감소하는 경향을 나타냈으나, 일정 수준을 유지하는 것으로 보아 캡슐 제형이 스틱포장제형보다 온도의 영향으로부터 oxyresveratrol 함량을 유지하는데 더 적합한 제형으로 판단된다.

(2) 건조감량수분의 변화

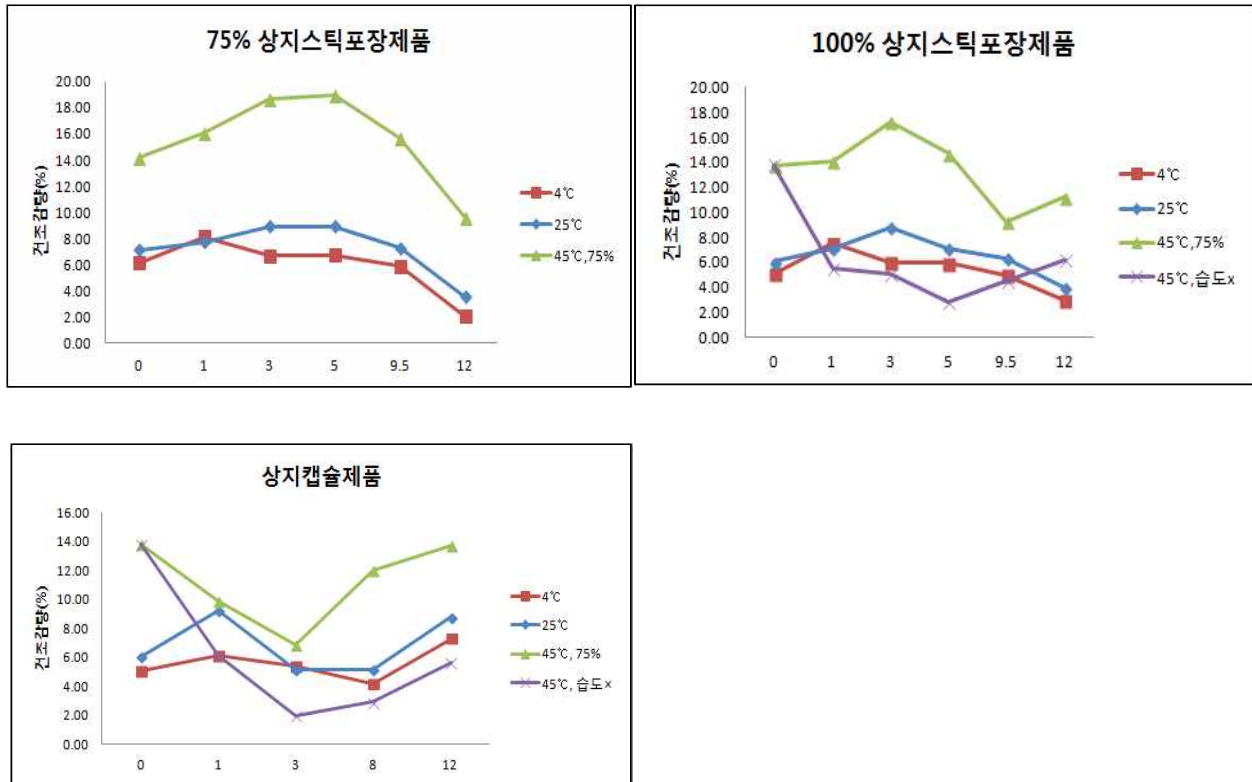


Fig. 31. 보존기간별 건조감량수분의 함량변화.

총 12개월 동안 ① 4°C 냉장 조건, ② 25°C 상온조건, ③ 45°C, 75% 습도 조건, ④ 45°C, 無습도 조건에서 75% 상지스틱포장제품과 100% 상지스틱포장제품에 대한 건조감량수분의 변화를 측정된 결과, 4°C 냉장 조건에서는 75, 100% 상지스틱 두 제품 모두 1개월까지 수분함량이 증가하였고, 그 이후부터 수분이 감소하는 경향을 나타내었다. 25°C 상온조건에서도 두 제품 모두 3개월까지 수분 함량이 증가하다가 3개월 이후부터 수분함량이 감소하는 유사한 경향을 나타내었다. 45°C, 75% 습도 조건에서는 75% 상지스틱포장제품의 경우 5개월까지 수분함량이 증가하다가 5개월 이후부터 점차 수분이 감소하는 경향을 나타냈으며, 100% 상지스틱포장제품은 3개월까지 수분함량이 증가하다가 3개월 이후부터 수분이 감소하는 경향을 나타내어 흡습되는 기간에 대한 다소 차이를 보였다. 그리고 45°C, 無습도 조건에서는 초기 수분이 급격히 감소하다가 5개월 이후부터 흡습이 진행되는 경향을 나타냈다. 캡슐 제품의 경우 4°C 냉장 조건과 25°C 상온조건에서 1개월까지 수분이 증가하다가 그 이후부터 8개월까지 수분이 감소하는 경향을 나타냈으나, 다시 8개월 이후부터 수분 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 45°C, 75% 습도 조건과 45°C, 無습도 조건에서는 3개월까지 수분함량이 감소하는 경향을 보이다가 그 이후부터 다시 수

분이 증가하는 경향을 나타냈다. 캡슐제품의 경우에는 초기 수분이 감소하는 경향을 보이다가 다시 수분이 증가하는 경향을 나타내며, 스틱포장제품과의 수분변화 양상에 차이를 보였다.

(3) 색상변화

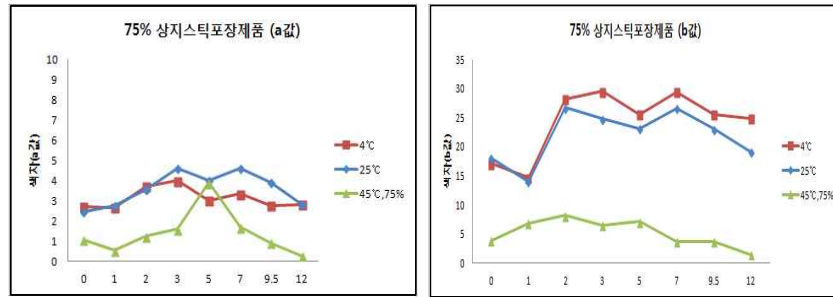


Fig. 32. 75% 상지스틱포장제품의 보존기간별 색상 변화.

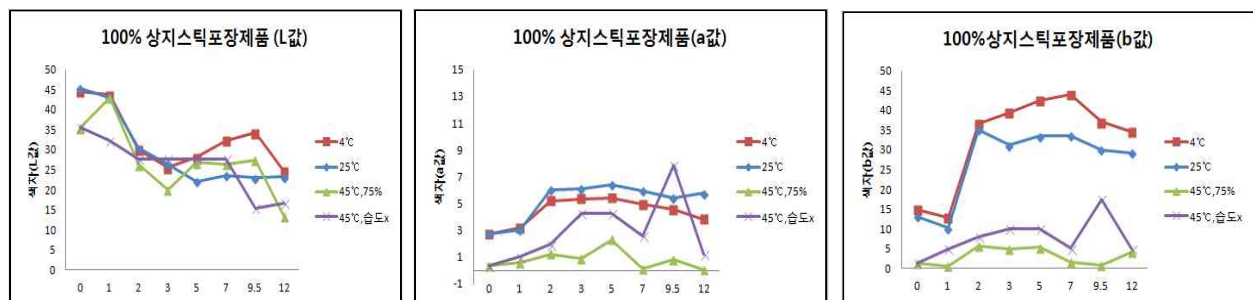


Fig. 33. 100% 상지스틱포장제품의 보존기간별 색상 변화.

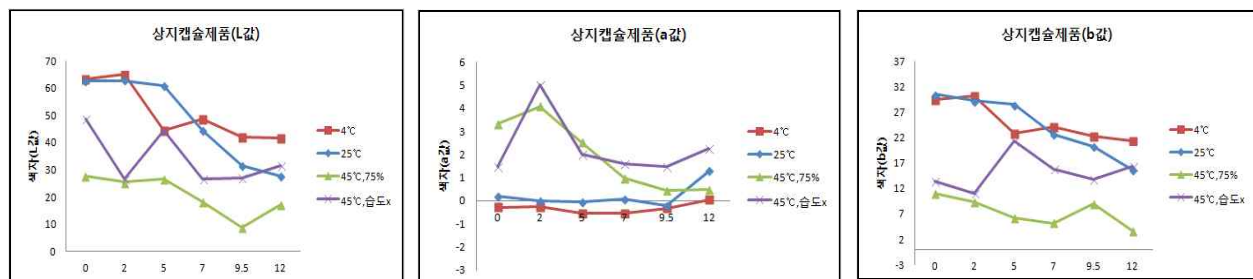


Fig. 34. 상지캡슐제품의 보존기간별 색상 변화.

색차 분석 결과, 75, 100% 상지스틱포장제품은 4°C 냉장 조건, 25°C 상온조건에서 동일하게 명도를 나타내는 L값과 색상을 나타내는 a값, 채도를 나타내는 b값의 변화 패턴이 유사하게 나타났다. 초기 흡수에 의해 수분함량이 높아지면서 전체적으로 L값 낮아졌고, a값은 거의 일정수준을 유지하였고, b값은 급격히 증가했다가 서서히 감소하는 경향을 나타냈다. 45°C, 75% 습도 조건과 45°C, 無습도 조건도 패턴은 유사하게 나타났으나 온도에 의한 성상변화로 인하여, a값과 b값이 대체로 낮은 수준을 유지하여 어두운 색을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

상지캡슐제품은 4°C 냉장 조건과 25°C 상온조건에서 a값은 녹색도가 높은, 짙고 어두운 색깔을 나타냈으며, b값은 대체로 높은 수준을 유지하여, 전체적으로 밝은 노란색을 나타냈으나, 시간이 흐름에 따라 흡수에 의하여 L값이 낮아지면서 어두운 색깔로 변하는 경향을 나타냈다. 그에 반하여, 45°C, 75% 습도 조건과 45°C, 無습도 조건에서는 a값은 높은 수준을 유

지하고, b값 대체로 낮은 수준을 유지하여 암적색을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

3가지 제품 모두 4℃ 냉장 조건과 25℃ 상온조건에서 전체적으로 흡습이 진행됨에 따라 색깔이 밝은 갈색에서 짙은 고동색으로 변화되었으며, 45℃, 75% 습도 조건과 45℃, 無습도 조건에서는 온도의 영향에 의한 색상변화로 암적색에 가깝게 색이 변화되는 경향을 나타냈다.

(4) 색상변화확인

총 12개월 동안 ① 4℃ 냉장 조건, ② 25℃ 상온조건, ③ 45℃, 75% 습도 조건, ④ 45℃, 無습도 조건에서 75% 상지스틱포장제품과 100% 상지스틱포장제품, 상지캡슐제품 3종에 대한 성상을 확인하였다.



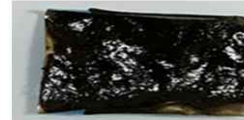






75% 상지스틱포장제품			
구분	4℃	25℃	45℃, 75% 습도
210일			
285일			
360일			

Fig. 35. 75% 상지스틱포장제품의 보존기간별 색상변화.

75% 상지스틱포장제품은 4℃ 냉장 조건과 25℃ 상온조건에서는 12개월간 경시변화를 확인한 결과 흡습에 의해 색깔이 점점 어두워졌다가 수분이 다시 감소함에 따라 색깔이 일부 밝아지는 경향을 확인할 수 있었다. 그 이외에 분말이 결정화되어 덩어리가 생기는 경향은 미미하여 흡습에 대한 영향은 적은 것을 확인할 수 있었다. 하지만 45℃, 75% 습도 조건에서는 온도에 의한 뚜렷한 성상의 변화를 나타내며, 분말이 녹아 끈적끈적한 상태로 확인되어, 스틱포장제품은 높은 온도와 습도의 가혹조건에서 제품에 일부 영향을 줄 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

100% 상지스틱포장제품은 4℃ 냉장 조건에서는 큰 성상의 변화를 나타내지 않았다. 하지만 75% 상지 스틱포장제품과 달리 25℃ 상온조건에서 12개월 경과 시점에서 분말이 뭉쳐져 덩어리가 생기는 것이 확인되었으며, 그 외 45℃, 75% 습도 조건에서는 75% 상지스틱포장제품과 유사한 성상을 보이며, 온도에 따른 색상변화에 영향이 있다는 것을 확인할 수 있었다. 상지캡슐 제품은 4℃ 냉장 조건과 25℃ 상온조건에서 약 10개월 경과 시점에서 일부 덩어리가 확인되었으며, 12개월경과 시점에서는 실온조건에서 완전히 굳어지는 것을 확인할 수 있었다. 이는 건조감량의 결과에서 볼 수 있듯이 약 8개월 시점에서부터 흡습이 진행되어 덩어리가 생성되는 것으로 생각된다.

100% 상지스틱포장제품				
구분	4℃	25℃	45℃, 75% 습도	45℃, 습도 x
210일				
285일				
360일				

Fig. 36. 100% 상지스틱포장제품의 보존기간별 정상변화.

상지캡슐제품				
구분	4℃	25℃	45℃, 75% 습도	45℃, 습도 x
236일				
296일				
360일				

Fig. 37. 상지캡슐제품의 보존기간별 정상변화.

(5) 결론

과립물을 스틱, 캡슐 제제로 포장하였을 때, 4℃ 냉장 조건과 25℃ 상온조건에서 캡슐제품은 10개월경과 시점에서 분말이 뭉쳐져 덩어리지는 현상을 보였지만, 75, 100% 상지스틱포장제품은 12개월경과 시점까지 덩어리지는 현상이 적은 것을 확인할 수 있었다. 이는 스틱포장제품이 캡슐제품에 비하여 흡습에서는 더 뛰어난 안정성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 하지만 Oxyresveratrol 함량을 45℃, 無습도 조건에서 비교한 바와 같이 스틱포장제품의 경우 Oxyresveratrol 함량이 급격히 감소한데 반하여, 캡슐제품은 일부함량 감소는 있었지만 일정하게 유지되는 경향을 나타내어 열과 흡습에 대한 안정성은 스틱포장제품보다 캡슐제품이 더 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

향후 제품화에 있어 과립, 정제 제형 및 포장 형태에 따라 안정성이 다르다는 점을 확인하였으며, 추가 제형에 대한 연구 및 상지 가공 방법에 따라 건강기능식품에서 활용하는 다양한 제형에 대한 실험을 통해 제품의 안정성 강화할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하다고 판단된다

5. 임상시험 결과

5.1. 일차 기능성 평가분석

5.1.1. 방문 2(Baseline) 대비 24 주 후 ADAS-Kcog 기억요인 변화량

Table 2에 요약된 FA 군의 인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 ADAS-Kcog 기억요인 점수는 시험군의 경우 9.00 ± 2.11 , 대조군의 경우 9.46 ± 2.32 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수는 시험군의 경우 5.63 ± 1.72 , 대조군의 경우 6.00 ± 2.69 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p-value = 0.1266, 종료: p-value = 0.3960) 각 군 내 ADAS-Kcog 기억요인 점수 변화량은 시험군의 경우 -3.38 ± 2.27 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -3.53 ± 1.87 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (시험군: p-value = <0.0001, 대조군: p-value = <0.0001) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (p-value = 0.3749)

Table 2. 방문 2(Baseline) 대비 24 주 후 ADAS-Kcog 기억요인 변화량(FA & PP 군).

ADAS-Kcog 기억요인		시험군		대조군		군간 p-value
FA 군		N= 40		N= 39		
Baseline	n	40		39		
	Mean±SD	9.00	2.11	9.46	2.32	0.1266 ^b
	Median	8.50		9.00		
	Min, Max	6.00	16.00	4.00	14.00	
24 weeks	n	40		38		
	Mean±SD	5.63	1.72	6.00	2.69	0.3960 ^b
	Median	5.00		6.00		
	Min, Max	2.00	10.00	2.00	13.00	
Change	n	40		38		
	Mean±SD	-3.38	2.27	-3.53	1.87	0.3749 ^a
	Median	-3.00		-4.00		
	Min, Max	-8.00	1.00	-7.00	0.00	
군내 p-value		<0.0001 ^c		<0.0001 ^c		
PP 군		N= 37		N= 37		
Baseline	n	37		37		
	Mean±SD	9.11	2.16	9.51	2.34	0.1649 ^b
	Median	9.00		9.00		
	Min, Max	6.00	16.00	4.00	14.00	
24 weeks	n	37		37		
	Mean±SD	5.59	1.79	6.00	2.73	0.3878 ^b
	Median	5.00		6.00		
	Min, Max	2.00	10.00	2.00	13.00	
Change	n	37		37		
	Mean±SD	-3.51	2.30	-3.51	1.89	0.5000 ^a
	Median	-3.00		-4.00		
	Min, Max	-8.00	1.00	-7.00	0.00	
군내 p-value		<0.0001 ^c		<0.0001 ^c		

5.2. 이차 기능성 평가분석

5.2.1. 방문 2(Baseline) 대비 12 주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량 (ADAS-Kcog 총점 at V3 - ADAS-Kcog 총점 at V2)의 분석 결과를 Table 3에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군의 경우 13.28 ± 3.23 , 대조군의 경우 14.33 ± 4.01 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군의 경우 10.10 ± 3.12 , 대조군의 경우 10.34 ± 4.08 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(기저: p-value = 0.2460, 종료: p-value = 0.7684). 각 군 내 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 -3.18 ± 2.97 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 -4.05 ± 2.77 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (시험군: p-value = <0.0001, 대조군: p-value = <0.0001) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p-value = 0.1816).

Table 3. 방문 2(Baseline) 대비 12 주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량(FA & PP 군).

ADAS-Kcog 총점		시험군		대조군		군간 p-value
FA 군		N= 40		N= 39		
Baseline	n	40		39		0.2460 ^b
	Mean±SD	13.28	3.23	14.33	4.01	
	Median	13.00		13.00		
	Min, Max	9.00	21.00	6.00	23.00	
12 weeks	n	40		38		0.7684 ^a
	Mean±SD	10.10	3.12	10.34	4.08	
	Median	10.00		10.00		
	Min, Max	4.00	16.00	4.00	18.00	
Change	n	40		38		0.1816 ^a
	Mean±SD	-3.18	2.97	-4.05	2.77	
	Median	-3.00		-4.50		
	Min, Max	-10.00	2.00	-10.00	2.00	
군내 p-value		<0.0001 ^c		<0.0001 ^c		
PP 군		N= 37		N= 37		
Baseline	n	37		37		
	Mean±SD	13.38	3.33	14.38	4.10	
	Median	13.00		13.00		
	Min, Max	9.00	21.00	6.00	23.00	
12 weeks	n	37		37		1.0000 ^a
	Mean±SD	10.27	3.16	10.27	4.11	
	Median	10.00		10.00		
	Min, Max	4.00	16.00	4.00	18.00	
Change	n	37		37		0.1429 ^a
	Mean±SD	-3.11	3.02	-4.11	2.79	
	Median	-3.00		-5.00		
	Min, Max	-10.00	2.00	-10.00	2.00	
군내 p-value		<0.0001 ^c		<0.0001 ^c		

5.2.2. 방문 2(Baseline) 대비 12주후 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test):
범주 유창성(Category Fluency) 변화량

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치 변화량 (언어 유창성 at V3 - 언어 유창성 at V2)의 분석 결과를 Table 4에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치는 시험군의 경우 10.60 ± 2.26 , 대조군의 경우 11.08 ± 2.50 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치는 시험군의 경우 13.05 ± 2.37 , 대조군의 경우 12.76 ± 2.70 으로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(기저: p -value = 0.2245, 종료: p -value = 0.6190). 각 군 내 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 2.45 ± 2.76 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 1.76 ± 2.34 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (시험군: p -value = <0.0001, 대조군: p -value = <0.0001) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. (p -value = 0.2412).

Table 4. 방문 2(Baseline) 대비 12 주 후 언어 유창성 과제: 범주 유창성(Category Fluency) 변화량(FA & PP 군).

언어 유창성 과제: 범주 유창성		시험군		대조군		군간 p -value
FA 군		N= 40		N= 39		
Baseline	n	40		39		0.2245 ^b
	Mean±SD	10.60	2.26	11.08	2.50	
	Median	11.00		12.00		
	Min, Max	7.00	15.00	5.00	14.00	
12 weeks	n	40		38		0.6190 ^a
	Mean±SD	13.05	2.37	12.76	2.70	
	Median	13.00		13.00		
	Min, Max	7.00	18.00	5.00	18.00	
Change	n	40		38		0.2412 ^a
	Mean±SD	2.45	2.76	1.76	2.34	
	Median	2.50		2.00		
	Min, Max	-5.00	9.00	-3.00	6.00	
군내 p -value		<0.0001 ^c		<0.0001 ^c		
PP 군		N= 37		N= 37		
Baseline	n	37		37		
	Mean±SD	10.73	2.26	11.03	2.51	
	Median	11.00		12.00		
	Min, Max	7.00	15.00	5.00	14.00	
12 weeks	n	37		37		0.5891 ^a
	Mean±SD	13.11	2.40	12.78	2.73	
	Median	13.00		13.00		
	Min, Max	7.00	18.00	5.00	18.00	
Change	n	37		37		0.3036 ^a
	Mean±SD	2.38	2.77	1.76	2.37	
	Median	2.00		2.00		
	Min, Max	-5.00	9.00	-3.00	6.00	
군내 p -value		<0.0001 ^c		<0.0001 ^c		

5.2.3. 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 전두엽 기능 검사 (Frontal Assessment Battery) 변화량

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 전두엽 기능 검사 수치 변화량 (전두엽 기능검사 at V3 - 전두엽 기능검사 at V2)의 분석 결과를 Table 5에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 전두엽 기능 검사 수치는 시험군과 대조군 각각 13.13 ± 1.91 과 13.26 ± 1.74 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 전두엽 기능 검사 수치는 시험군과 대조군 각각 14.30 ± 1.86 와 14.11 ± 1.74 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(기저: p-value =0.9920, 종료: p-value =0.5494). 각 군 내 전두엽 기능 검사 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 1.18 ± 1.57 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 0.92 ± 1.85 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (시험군: p-value = <0.0001, 대조군: p-value = 0.0040) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 전두엽 기능 검사 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p-value =0.5206).

Table 5. 방문 2(Baseline) 대비 12 주 후 전두엽 기능 검사 변화량(FA & PP 군).

전두엽 기능검사		시험군		대조군		군간 p-value
FA 군		N= 40		N= 39		
Baseline	n	40		39		0.9920 ^b
	Mean±SD	13.13	1.91	13.26	1.74	
	Median	14.00		13.00		
	Min, Max	8.00	16.00	8.00	16.00	
12 weeks	n	40		38		0.5494 ^b
	Mean±SD	14.30	1.86	14.11	1.74	
	Median	15.00		15.00		
	Min, Max	7.00	17.00	10.00	17.00	
Change	n	40		38		0.5206 ^b
	Mean±SD	1.18	1.57	0.92	1.85	
	Median	1.00		1.00		
	Min, Max	-3.00	5.00	-3.00	6.00	
군내 p-value		<0.0001 ^d		0.0040 ^c		
PP 군		N= 37		N= 37		
Baseline	n	37		37		
	Mean±SD	13.14	1.93	13.19	1.73	
	Median	14.00		13.00		
	Min, Max	8.00	16.00	8.00	16.00	
12 weeks	n	37		37		0.4622 ^b
	Mean±SD	14.30	1.93	14.08	1.75	
	Median	15.00		15.00		
	Min, Max	7.00	17.00	10.00	17.00	
Change	n	37		37		0.4998 ^b
	Mean±SD	1.16	1.55	0.89	1.87	
	Median	1.00		1.00		
	Min, Max	-3.00	5.00	-3.00	6.00	
군내 p-value		<0.0001 ^d		0.0062 ^c		

5.2.4. 방문 2(Baseline) 대비 12 주 후 노인우울척도
(Geriatric Depression Screening Scale-Kr) 변화량

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량 (노인우울척도 at V3 - 노인우울척도 at V2)의 분석 결과를 Table 6에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 노인우울척도(GDS-Kr) 수치는 시험군과 대조군 각각 11.13 ± 6.21 과 10.08 ± 6.73 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 노인우울척도(GDS-Kr) 수치는 시험군과 대조군 각각 9.00 ± 6.03 과 7.47 ± 5.54 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(기저: p-value =0.4148, 종료: p-value =0.2618). 각 군 내 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 -2.13 ± 4.27 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 -2.76 ± 5.05 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (시험군: p-value = 0.0012, 대조군: p-value = 0.0003) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다(p-value =0.7861).

Table 6. 방문 2(Baseline) 대비 12 주 후 노인우울척도 변화량(FA & PP 군).

GDS-Kr		시험군		대조군		군간 p-value
FA 군		N= 40		N= 39		
Baseline	n	40		39		0.4148 ^b
	Mean±SD	11.13	6.21	10.08	6.73	
	Median	11.00		10.00		
	Min, Max	2.00	24.00	0.00	25.00	
12 weeks	n	40		38		0.2618 ^b
	Mean±SD	9.00	6.03	7.47	5.54	
	Median	7.50		6.50		
	Min, Max	1.00	22.00	0.00	23.00	
Change	n	40		38		0.7861 ^b
	Mean±SD	-2.13	4.27	-2.76	5.05	
	Median	-2.00		-1.00		
	Min, Max	-16.00	8.00	-20.00	7.00	
군내 p-value		0.0012 ^d		0.0003 ^d		
PP 군		N= 37		N= 37		군간 p-value
Baseline	n	37		37		
	Mean±SD	11.16	6.11	10.14	6.80	
	Median	11.00		10.00		
	Min, Max	2.00	24.00	0.00	25.00	
12 weeks	n	37		37		0.1721 ^b
	Mean±SD	9.00	5.69	7.30	5.51	
	Median	8.00		6.00		
	Min, Max	1.00	20.00	0.00	23.00	
Change	n	37		37		0.7199 ^b
	Mean±SD	-2.16	4.41	-2.84	5.10	
	Median	-2.00		-1.00		
	Min, Max	-16.00	8.00	-20.00	7.00	
군내 p-value		0.0026 ^d		0.0003 ^d		

^aChange = 12 weeks - Baseline

5.2.5. 방문 2(Baseline) 대비 24 주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량 (ADAS-Kcog 총점 at V4 - ADAS-Kcog 총점 at V2)의 분석 결과를 Table 7에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군과 대조군 각각 13.28 ± 3.23 과 14.33 ± 4.01 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군과 대조군 각각 9.00 ± 3.00 과 9.47 ± 4.30 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(기저: p-value=0.2460, 종료: p-value =0.5760). 각 군 내 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 -4.28 ± 2.93 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 -4.92 ± 2.83 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (시험군: p-value = <0.0001, 대조군: p-value = <0.0001) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의 하지 않았다 (p-value =0.3253).

Table 7. 방문 2(Baseline) 대비 24 주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량(FA & PP 군).

ADAS-Kcog 총점		시험군		대조군		군간 p-value
FA 군		N= 40		N= 39		
n		40		39		
Baseline	Mean±SD	13.28	3.23	14.33	4.01	0.2460 ^b
	Median	13.00		13.00		
	Min, Max	9.00	21.00	6.00	23.00	
n		40		38		
24 weeks	Mean±SD	9.00	3.00	9.47	4.30	0.5760 ^a
	Median	8.50		10.00		
	Min, Max	4.00	16.00	3.00	19.00	
n		40		38		
Change	Mean±SD	-4.28	2.93	-4.92	2.83	0.3253 ^a
	Median	-4.00		-5.00		
	Min, Max	-10.00	2.00	-11.00	2.00	
군내 p-value		<0.0001 ^c		<0.0001 ^c		
PP 군		N= 37		N= 37		
n		37		37		
Baseline	Mean±SD	13.38	3.33	14.38	4.10	0.3274 ^b
	Median	13.00		13.00		
	Min, Max	9.00	21.00	6.00	23.00	
n		37		37		
24 weeks	Mean±SD	8.97	3.08	9.43	4.35	0.6017 ^a
	Median	8.00		10.00		
	Min, Max	4.00	16.00	3.00	19.00	
n		37		37		
Change	Mean±SD	-4.41	2.97	-4.95	2.87	0.4281 ^a
	Median	-4.00		-5.00		
	Min, Max	-10.00	2.00	-11.00	2.00	
군내 p-value		<0.0001 ^c		<0.0001 ^c		

5.2.6. 방문 2(Baseline) 대비 24 주 후 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test):
범주 유창성(Category Fluency) 변화량

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치 변화량 (언어 유창성 at V4 - 언어 유창성 at V2)의 분석 결과를 Table 8에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치는 시험군과 대조군 각각 10.60 ± 2.26 와 11.08 ± 2.50 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치는 시험군과 대조군 각각 13.95 ± 2.65 와 13.39 ± 3.16 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(기저: p-value =0.2245, 종료: p-value =0.4020). 각 군 내 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치의 변화량을 살펴보면, 시험군이 3.35 ± 2.52 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 2.39 ± 2.80 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (시험군: p-value =<0.0001, 대조군: p-value = <0.0001) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다 (p-value =0.1172).

Table 8. 방문 2(Baseline) 대비 24 주 후 언어 유창성 과제: 범주 유창성 변화량(FA & PP 군).

언어 유창성 과제: 범주 유창성	시험군	대조군	군간 p-value
FA 군	N= 40	N= 39	
	n= 40	n= 39	
Baseline	Mean±SD 10.60 2.26	11.08 2.50	0.2245
	Median 11.00	12.00	
	Min, Max 7.00 15.00	5.00 14.00	
24 weeks	Mean±SD 13.95 2.65	13.39 3.16	0.4020
	Median 14.00	13.50	
	Min, Max 9.00 20.00	7.00 19.00	
Change	Mean±SD 3.35 2.52	2.39 2.80	0.1172
	Median 3.00	3.00	
	Min, Max -2.00 8.00	-4.00 8.00	
군내 p-value	<0.0001	<0.0001	
PP 군	N= 37	N= 37	
	n= 37	n= 37	
Baseline	Mean±SD 10.73 2.26	11.03 2.51	0.3727
	Median 11.00	12.00	
	Min, Max 7.00 15.00	5.00 14.00	
24 weeks	Mean±SD 14.05 2.69	13.46 3.18	0.3875
	Median 14.00	14.00	
	Min, Max 9.00 20.00	7.00 19.00	
Change	Mean±SD 3.32 2.51	2.43 2.83	0.1559
	Median 3.00	3.00	
	Min, Max -2.00 8.00	-4.00 8.00	
군내 p-value	<0.0001	<0.0001	

5.2.7. 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 전두엽 기능 검사
(Frontal Assessment Battery) 변화량

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 전두엽 기능 검사 수치 변화량 (전두엽 기능검사 at V4 - 전두엽 기능검사 at V2)의 분석 결과를 Table 9에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 전두엽 기능 검사 수치는 시험군과 대조군 각각 13.13 ± 1.91 와 13.26 ± 1.74 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 전두엽 기능 검사 수치는 시험군과 대조군 각각 14.43 ± 1.34 와 14.58 ± 1.39 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(기저: p-value =0.9920, 종료: p-value =0.4128).

Table 9. 방문 2(Baseline) 대비 24 주 후 전두엽 기능 검사 변화량(FA & PP).

전두엽 기능검사		시험군		대조군		군간 p-value
FA 군		N= 40		N= 39		
	n	40		39		
Baseline	Mean±SD	13.13	1.91	13.26	1.74	0.9920 ^b
	Median	14.00		13.00		
	Min, Max	8.00	16.00	8.00	16.00	
	n	40		38		
24 weeks	Mean±SD	14.43	1.34	14.58	1.39	0.4128 ^b
	Median	15.00		15.00		
	Min, Max	11.00	18.00	12.00	17.00	
	n	40		38		
Change	Mean±SD	1.30	1.34	1.39	1.35	0.6889 ^b
	Median	1.00		1.00		
	Min, Max	-1.00	5.00	-1.00	4.00	
군내 p-value		<0.0001 ^d		<0.0001 ^d		
PP 군		N= 37		N= 37		
	n	37		37		
Baseline	Mean±SD	13.14	1.93	13.19	1.73	0.8470 ^b
	Median	14.00		13.00		
	Min, Max	8.00	16.00	8.00	16.00	
	n	37		37		
24 weeks	Mean±SD	14.43	1.39	14.65	1.34	0.3740 ^b
	Median	15.00		15.00		
	Min, Max	11.00	18.00	12.00	17.00	
	n	37		37		
Change	Mean±SD	1.30	1.31	1.46	1.30	0.5078 ^b
	Median	1.00		1.00		
	Min, Max	-1.00	5.00	-1.00	4.00	
군내 p-value		<0.0001 ^d		<0.0001 ^d		

5.2.8. 방문 2(Baseline) 대비 24 주 후 노인우울척도
(Geriatric Depression Screening Scale-Kr) 변화량

인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량 (노인우울척도 at V4 - 노인우울척도 at V2)의 분석 결과를 Table 10에 정리하였다. FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 노인우울척도(GDS-Kr) 수치는 시험군과 대조군 각각 11.13 ± 6.21 과 10.08 ± 6.73 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 노인우울척도(GDS-Kr) 수치는 시험군과 대조군 각각 7.70 ± 6.58 과 6.89 ± 6.00 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(기저: p-value = <0.0001, 종료: p-value = <0.0001). 각 군 내 노인우울척도(GDS-Kr) 수치의 변화량을 살펴보면, 시험군이 -3.43 ± 4.37 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 -3.34 ± 4.95 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (시험군: p-value = <0.0001, 대조군: p-value = <0.0001) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다(p-value =0.5432).

Table 10. 방문 2(Baseline) 대비 24 주 후 노인우울척도 변화량(FA & PP 군).

전두엽 기능검사		시험군		대조군		군간 p-value
FA 군		N= 40		N= 39		
Baseline	n	40		39		0.9920 ^b
	Mean±SD	13.13	1.91	13.26	1.74	
	Median	14.00		13.00		
	Min, Max	8.00	16.00	8.00	16.00	
24 weeks	n	40		38		0.4128 ^b
	Mean±SD	14.43	1.34	14.58	1.39	
	Median	15.00		15.00		
	Min, Max	11.00	18.00	12.00	17.00	
Change	n	40		38		0.6889 ^b
	Mean±SD	1.30	1.34	1.39	1.35	
	Median	1.00		1.00		
	Min, Max	-1.00	5.00	-1.00	4.00	
군내 p-value		<0.0001 ^d		<0.0001 ^d		
PP 군		N= 37		N= 37		
Baseline	n	37		37		
	Mean±SD	13.14	1.93	13.19	1.73	
	Median	14.00		13.00		
	Min, Max	8.00	16.00	8.00	16.00	
24 weeks	n	37		37		0.3740 ^b
	Mean±SD	14.43	1.39	14.65	1.34	
	Median	15.00		15.00		
	Min, Max	11.00	18.00	12.00	17.00	
Change	n	37		37		0.5078 ^b
	Mean±SD	1.30	1.31	1.46	1.30	
	Median	1.00		1.00		
	Min, Max	-1.00	5.00	-1.00	4.00	
군내 p-value		<0.0001 ^d		<0.0001 ^d		

5.3. 임상시험 결과에 대한 고찰

본 연구는 문맹자를 제외한 만 40세 이상 80세 미만의 남성 및 여성에서 연령, 성별, 교육 수준 대비 CERAD-K-NP 1.0 SD 이상 감소한 경도인지장애 대상자를 대상으로 MAEXT, 상지주정추출물로 하루 2.25그램을 2주간 복용하게 하고 대조식품인 위약과 비교하여 인지 기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험으로 설계하였다.

스크리닝 90명 진행하여 선정제외기준에 부적합 하거나 동의 철회한 10명이 스크리닝 탈락하였고 80명이 시험군 대조군에 40명씩 무작위 배정되어 각 군에서 2명씩 중도탈락하였고 38명씩 인체적용시험을 완료하였다. 본 인체적용시험에 참여한 시험 대상자의 평균 연령은 시험군의 경우 55.18 ± 8.55 세, 대조군의 경우 57.69 ± 10.00 세, 남성 대상자의 비율은 시험군과 대조군 각각 50.00%와 48.72% 이며, 여성 대상자의 비율 또한 각각 50.00%와 51.28%로 연령과 성별 모두 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 또한 평균 신장, 흡연자의 비율, 음주습관, 식사 및 운동습관, 과거병력, 선행 약물력에서 모두 두 군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

본 인체적용시험의 일차 기능성 평가 변수는 인체적용시험용 식품 복용 전 (V2) 대비 복용 24주 (V4) 후 시점에서의 ADAS-Kcog 기억요인 변화량이며, 위약에 비해 시험식품이 우월한지를 입증하는 것이었다. FA 군의 식품 복용 전과 복용 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수 분석 결과를 살펴보면, 복용 전 ADAS-Kcog 기억요인 점수는 시험군의 경우 9.00 ± 2.11 , 대조군의 경우 9.46 ± 2.32 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 복용 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수는 시험군의 경우 5.63 ± 1.72 , 대조군의 경우 6.00 ± 2.69 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 ADAS-Kcog 기억요인 점수 변화량은 시험군의 경우 -3.38 ± 2.27 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -3.53 ± 1.87 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 그러나 식품 복용 전 대비 복용 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. Baseline 대비 24주 후 ADAS-Kcog 기억요인 변화량은 많이 감소하여야 임상적으로 인지기능 개선의 임상적 의미를 부여 할 수 있으며, 대조군과 비교 없이 시험군만 놓고 확인 하였을 경우에는 기억요인 점수 변화량이 -3.38 ± 2.27 로 IP 복용 전과 비교하여 감소하였기 때문에 통계적으로 유의한 차이가 있으나 위약과 비교하여 군간 차이를 보여주지 못하여 우월성을 입증하지 못하였고 PP분석 결과도 같은 양상을 보여 주었다.

식품 복용 전과 12주 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량의 FA 군의 분석 결과, 복용 전 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군의 경우 13.28 ± 3.23 , 대조군의 경우 14.33 ± 4.01 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군의 경우 10.10 ± 3.12 , 대조군의 경우 10.34 ± 4.08 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량에서는 시험군이 -3.18 ± 2.97 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 -4.05 ± 2.77 로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 식품 복용 전과 12주 복용 후 언어 유창성 과제 중 범주 유창성 수치 변화량의 FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 복용 전 시험군의 경우 10.60 ± 2.26 , 대조군의 경우 11.08 ± 2.50 으로 두 군간에 통계적으로 유의

한 차이가 없었고, 복용 후 시험군의 경우 13.05 ± 2.37 , 대조군의 경우 12.76 ± 2.70 으로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내에서 변화량을 살펴보면, 시험군이 2.45 ± 2.76 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 1.76 ± 2.34 로 통계적으로 유의한 차이가 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 언어 유창성 과제 변화량은 수치 증가가 개선 됨을 의미 할 수 있는데 시험군 및 대조군 모두 군내에서 통계적으로 유의한 차이가 있으나 시험군의 증가율이 대조군보다 높은 것을 알 수 있었다. 이는 복용 전 대비 12주 복용 후 및 24주 복용 후에도 같은 양상을 보여 주었다. 12주 복용 후 전두엽 기능 검사 수치 변화량 FA 군의 분석 결과를 살펴보면, 식품 복용 전 시험군과 대조군 각각 13.13 ± 1.91 과 13.26 ± 1.74 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 복용 후 시험군과 대조군 각각 14.30 ± 1.86 와 14.11 ± 1.74 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고 각 군 내 전두엽 기능 검사 수치 변화량에서는 시험군이 1.18 ± 1.57 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 0.92 ± 1.85 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고 시험군이 더 증가 하였으나 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 12주 복용 후 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량 분석 결과, 복용 전 노인우울척도(GDS-Kr) 수치는 시험군과 대조군 각각 11.13 ± 6.21 과 10.08 ± 6.73 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 복용 후 시험군과 대조군 각각 9.00 ± 6.03 과 7.47 ± 5.54 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량은 시험군이 -2.13 ± 4.27 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군도 -2.76 ± 5.05 로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

24주 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량 분석 결과, 복용 전 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군과 대조군 각각 13.28 ± 3.23 과 14.33 ± 4.01 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 인체적용시험용 식품 24주 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군과 대조군 각각 9.00 ± 3.00 과 9.47 ± 4.30 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 -4.28 ± 2.93 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 -4.92 ± 2.83 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 군 간 차이는 통계적으로 유의 하지 않았다.

인체적용시험용 식품 복용 24주 후 언어 유창성 과제 중 범주 유창성 수치 변화량에서 시험 전 시험군과 대조군 각각 10.60 ± 2.26 와 11.08 ± 2.50 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 식품 복용 후 시험군과 대조군 각각 13.95 ± 2.65 와 13.39 ± 3.16 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고 각 군 내 수치의 변화량에서는 시험군이 3.35 ± 2.52 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군도 2.39 ± 2.80 으로 통계적으로 유의한 차이가 있어 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 24주 후 전두엽 기능 검사 수치 변화량에서 식품 복용 전 시험군과 대조군 각각 13.13 ± 1.91 와 13.26 ± 1.74 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 식품 복용 후 전두엽 기능 검사 수치는 시험군과 대조군 각각 14.43 ± 1.34 와 14.58 ± 1.39 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 전두엽 기능 검사 수치의 변화량을 살펴보면, 시험군이 1.30 ± 1.34 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군은 1.39 ± 1.35 로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 복용 전 대비 복용 후 전두엽 기능 검사 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의 하지 않았다. 24주 복용 후 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량도 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보여주지 못하였다.

안전성과 관련하여, 이상반응은 시험군에서 2명 (5.00%)의 대상자에게 총 3건이 발생하였고, 대조군에서 2명 (5.00%)의 대상자에게 총 2건이 발생하였다. 이상반응 발현에 대한 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 약물이상반응을 살펴보면, 군 간 차이는 통계적으로 유의성은 없으나 시험군에서 1명 (2.50%)의 대상자에게 총 1건이 발생하였다. 중대한 이상반응도 시험군에서 1명 (2.50%)의 대상자에게 총 1건이 발생하였으나 군 간 차이는 없었다. 중도 탈락의 원인이 된 이상반응은 시험군에서 1명 (2.50%)의 대상자에게 총 1건이 발생하였고 대조군에서 2명 (5.00%)의 대상자에게 총 2건이 발생하였다. 시험군과 대조군에서 발생한 이상반응 중 이상반응 정도를 살펴보면, 시험군의 경우 경증이 3건, 대조군의 경우 경증 2건으로 보고 되었다. 이상반응 결과를 살펴보면, 시험군의 경우 이상반응 회복/후유증 없음 1건, 이상반응 지속/치료 진행 중 2건으로 보고되었다. 대조군의 경우 모두 후유증 없이 회복으로 보고 되었다. 활력징후 검사 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다. 혈액학 검사 결과 시험군의 군내 비교에서 RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets가 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 군 내 비교에서 Hemoglobin, Hematocrit이 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 혈액화학 검사 중 시험군의 군 내 비교 에서 Total protein, ALT, AST, γ -GT, BUN, Glucose 가 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 군 내 비교에서 Total protein, ALT, γ -GT 가 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 또한, 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 변화량에서 Total protein, Glucose가 통계적으로 유의한 차이가 있었고 이 외에 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 혈액화학 항목은 없었다. 통계적으로 유의한 차이를 보였던 항목들은 모두 정상범위 이내에서의 변화로 임상적인 의미를 부여하기 어려운 것으로 판단되었다. 소변 검사 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다. 혈액학 검사의 정상/비정상 결과 분석에서는 식품 복용 전 두 군간 비교에서 WBC가 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 시험군의 군 내 비교 에서 HDL이 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

뽕나무에 유래하는 상지는 조선시대 의서인 <동의보감> 등을 통해서도 알 수 있듯이 오래 전부터 약용으로 사용되어왔고, 진해, 소염, 진정, 혈압강하, 항균 등의 약리작용이 알려져 있는 생약재이다. 또한 Oxyresveratrol, mulberroside A 및 flavonoid 등의 항산화 물질을 다량 함유하고 있는 상지주정추출분말의 인지기능개선 효과 입증에 위하여 in vitro assay 및 스키폴라민으로 유도된 기억 손상 모델에서 상지주정추출분말의 회복 효능을 측정 하였고 AD acute model에서 상지주정추출분말의 의한 기억 학습 회복 효능을 관찰한 결과 어느 정도 인지기능 개선의 유의한 결과를 보여 주어 인체시험에서 인지기능에 효과를 검증하고자 하였다. 상지주정추출물의 복용이 위약에 비하여 인지기능 개선에서 통계적으로 유의적인 차이는 보여주지 못하였으나 언어 유창성 과제 중 범주 유창성 수치 변화량 및 전두엽 기능 검사 수치 변화량이 다소 증가하고, 12주 복용보다 24주 후의 결과치가 인지기능개선에 더 좋은 영향을 줄 수 있는 것으로 보이지만, 현재 개별인정신청에는 부족하여 명확한 원인 분석과 효과를 증진할 방법에 대한 지속적인 연구를 통하여 인지기능개선에 대한 in vivo 실험과 임상 기능성 평가 기준에서 유의성을 입증할 자료를 보완한 후에 신청이 가능할 것으로 판단된다. 따라서 복용기간을 늘리고 생활습관 및 환경적인 요인을 고려하여 연구를 지속적으로 실시한다면 보다 더 좋은 결과를 기대 할 수 있을 것으로 판단된다.

제2절 제1협동연구 결과 및 고찰

1. 상지주정추출분말의 지표물질인 oxyresveratrol HPLC 분석법 확립

Oxyresveratrol 함량 분석은 HPLC(YL9100, 영린기기)를 이용하여 수행하였다. 분석에 사용된 이동상은 CH₃CN(A)과 10 mM H₃PO₄(B)를 gradient 조건으로 사용하였다. A: B (10:90, v/v)으로 분석을 시작하여 10분까지 A: B (25:75, v/v), 30분까지 A: B (50:50, v/v)으로 분석하였다. 컬럼은 Luna C₁₈(5 µm, 4.6×250 mm, phenomenex), 온도는 30°C, 이동속도는 0.7 mL/min, 검출과장은 325 nm를 사용하였다.

Oxyresveratrol 표준용액은 시료 1 mg을 정확하게 측정하여 CH₃CN:10 mM H₃PO₄ (35:65, v/v) 용액 10 mL 녹여 100 µg/mL를 제조하였다. 2배 단계희석법을 이용하여 표준용액을 1.56-100.00 µg/mL의 농도 범위로 희석하여 정량 분석하였다(Table 1). 분석한 결과, 1.56-50.0 µg/mL의 oxyresveratrol 농도에서 상관계수(r^2)는 0.9984를 나타내었다(Fig. 1). 상지주정추출물을 HPLC 분석한 결과, oxyresveratrol이 주산물로 나타났다(Fig. 2,3).

Table 1. Oxyresveratrol 농도별 HPLC 분석 상관관계.

Compound	Regression equation ^a	$r^{2,b}$	Linear range (µg/mL)	LOD ^c (ng/mL)	LOQ ^d (ng/mL)
Oxyresveratrol	$y=515.19x + 559.43$	0.9984	1.56-50.00	2.34	7.79

^aIn the regression equation $y= ax + b$, x refers to the concentration of the compound(µg/mL), y the peak area.

^b r^2 is the correlation coefficient of the equation.

^cLOD : Limit of detection.

^dLOQ : Limit of quantification.

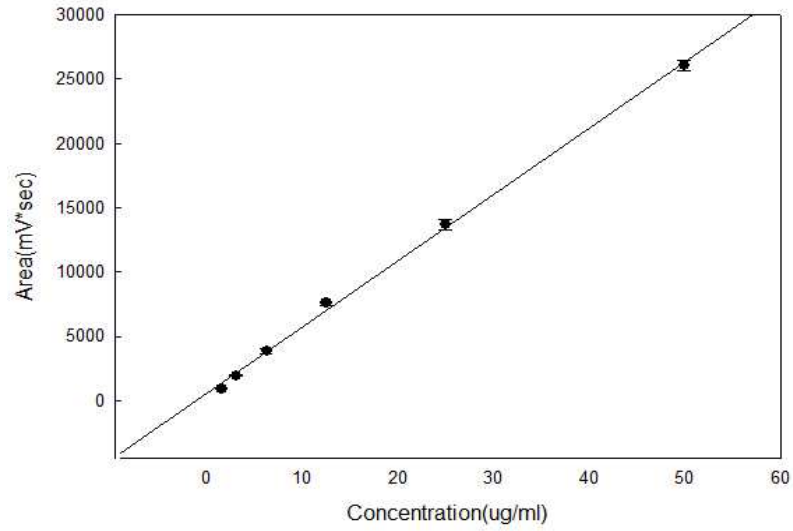


Fig. 1. Oxyresveratrol HPLC 표준 곡선.

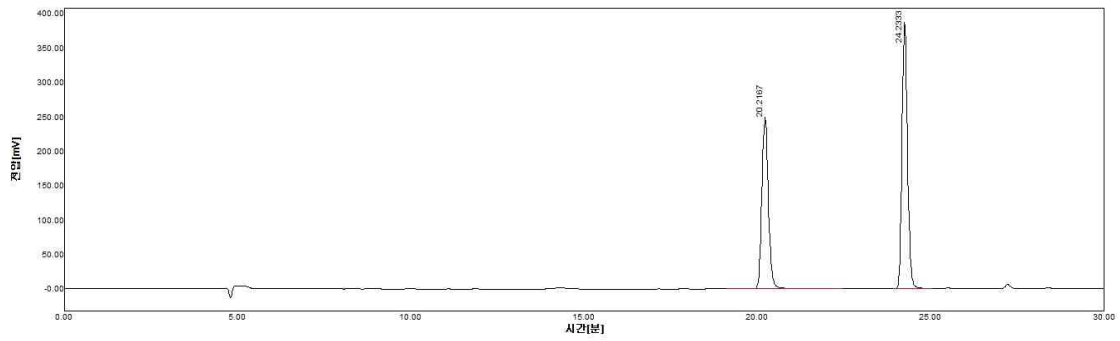


Fig. 2. Oxyresveratrol과 resveratrol 표준 HPLC profile.

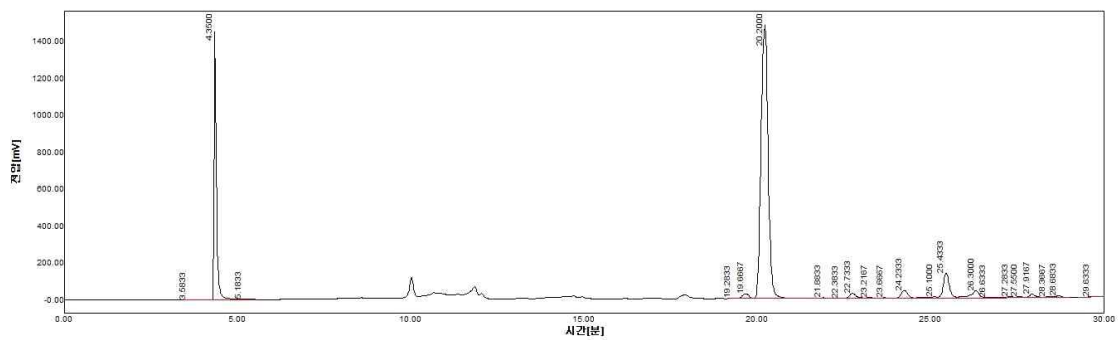


Fig 3. 상지주정추출물의 HPLC profile.

2. 주정농도 및 추출시간에 따른 상지의 oxyresveratrol 추출량 비교

생산시 추출시간을 감소시키기 위한 목적으로 주정이 증발하는 온도보다 높은 온도인 95도씨에서 환류 추출하여 초음파추출시와 oxyresveratrol 추출량을 비교하였다. 6-15 mm 크기의 상지 50 g(수분함량 5.6%)에 증류수, 20%, 40%, 60%, 70%, 80% 주정을 각각 400 mL를 첨가하여 95도씨에서 1, 2, 3, 4 시간 환류 추출된 총 oxyresveratrol의 양을 HPLC를 사용하여 분석하였다(Fig. 4).

실험결과, 80% 주정농도에서 2시간 추출시 oxyresveratrol 양은 3,132 $\mu\text{g/g}$ dry weight, 4시간 추출시 oxyresveratrol 양은 3,795 $\mu\text{g/g}$ dry weight으로 약 21% oxyresveratrol 양이 증가하는 것으로 나타났다. 70% 주정농도에서 4시간 추출시 oxyresveratrol 양은 80% 주정농도의 약 95% 수준이었지만 천연물 추출시 주정농도를 80% 이하로 규정한 식약처 기준에 따라 상지를 추출하기 위한 주정 농도 및 시간은 70%, 4시간으로 결정하였다.

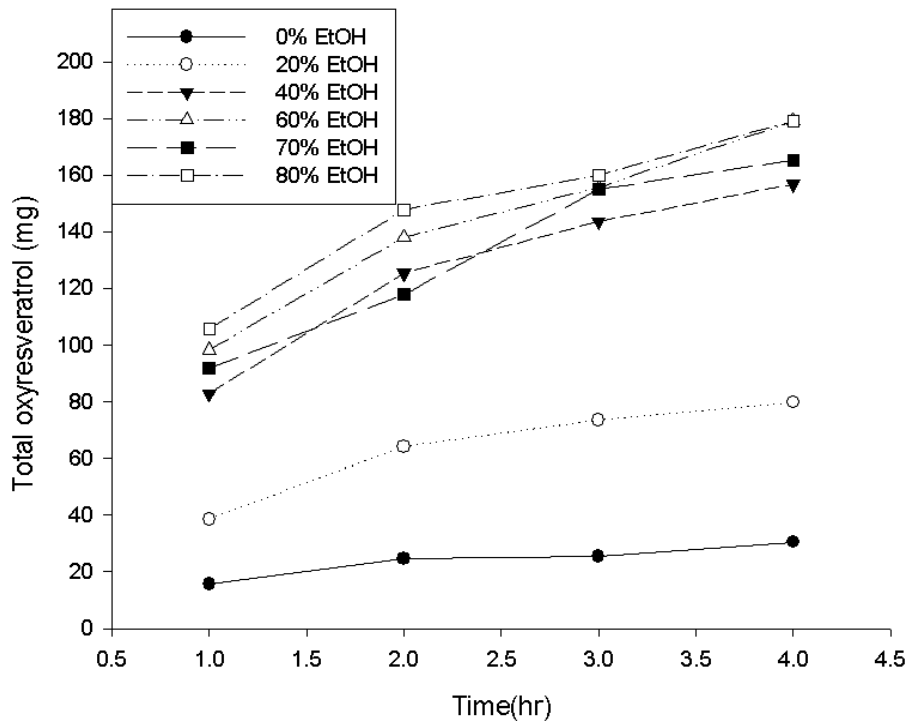


Fig. 4. 주정농도 및 추출시간에 따른 상지로부터 oxyresveratrol 추출량 비교.

3. Oxyresveratrol 고함유 뽕나무 품종 및 생산 산지 선정

천연물 내 polyphenol 함량은 품종, 산지, 생산시기, 기후, 영양 상태, 수분상태, 미생물의 감염 등에 다양한 요인에 의해 영향을 받는다. 1차년 (2014년 11월 26일 채집) 연구 결과에 따르면 국내에서 재배되는 뽕나무 품종중 양평의 수원뽕의 상지내 oxyresveratrol 함량이 가장 높았으며 채집시기도 2월 중순이 좋은 것으로 나타났다. 그러나 상지내 oxyresveratrol의 함량은 수확한 해의 기후, 토지의 영양 상태, 채집시기 등에 따라 oxyresveratrol 량이 차이를 나타낼 수 있다. 따라서 2차년에는 2월 중순 충남 잠사곤충사업장에서 7품종 및 양평 오디 영농조합 사업장에서 2품종을 채집하여 상지내 oxyresveratrol의 함량을 HPLC로 분석하였다(Fig. 5,6). 실험결과, 충남 잠사곤충사업장의 8품종 중에서 대심 (148 ug/g DW), 수성뽕 (122 ug/g DW), 청일뽕 (75 ug/g DW) 품종의 oxyresveratrol 함량이 높은 것으로 나타났다(Table 2). 그러나 이는 양평 오디영농 조합의 수원뽕 (1512 ug/g DW)의 1/10-1/15 수준의 낮은 oxyresveratrol 함량이었다. 또한 양평의 청일뽕(1062 ug/g DW)과 충남 잠사곤충 사업장의 청일뽕 (75 ug/g DW)의 함량은 같은 품종이지만 재배지에 따라 15배의 차이를 나타내어 품종 뿐만 아니라 재배지의 영향도 크다고 사료되었다.



Fig. 5. 충남 잠사곤충사업장(공주).



Fig. 6. 양평 오디 영농조합 농가.

Table 2. 뽕나무 품종 및 채집 지역별 oxyresveratrol 함량 분석.

품종명	채집장소	Oxyresveratrol ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	
		2014. 11. 26 채집	2016. 2.11 채집
수성뽕	충남 잠사곶충사업장	29.7	122.4
수원노상	충남 잠사곶충사업장	8.9	45.1
청일뽕	충남 잠사곶충사업장	128.0	75.5
개량뽕	충남 잠사곶충사업장	88.0	49.0
대심	충남 잠사곶충사업장	130.6	148.1
상천조생	충남 잠사곶충사업장	30.5	58.8
청올뽕	충남 잠사곶충사업장	128.0	55.6
청일뽕	경기 양평 농가	377.1	1,062.1
수원뽕	경기 양평 농가	611.3	1,512.3

4. 채집시기별 상지의 oxyresveratrol 함량 변화

1차년 연구에서 광천 야생종 상지를 이용하여 채집시기별 oxyresveratrol 함량을 분석한 결과, 12월, 2월의 겨울에 높은 것으로 나타났다.

그러나 상지구정 추출물 제조 품종으로 선정된 경기도 양평지역의 수원뽕의 채집시기는 1차년 실험한 야생종과는 다를 것으로 사료되어 1월, 2월, 4월, 8월, 10월, 11월, 12월에 채집하여 oxyresveratrol 함량을 HPLC로 분석하였다(Fig. 7). 실험결과, 수원뽕 상지내의 oxyresveratrol 함량은 봄(4월), 여름(8월), 가을(10월, 11월)보다 겨울(12월, 1월, 2월)이 높은 것으로 나타났다. 특히, 1월 상지는 $1,387.2 \mu\text{g/g}$ dry weight, 2월 상지는 $1,652.0 \mu\text{g/g}$ dry weight, 4월 상지는 $1233.7 \mu\text{g/g}$ dry weight으로 1년 중 2월의 oxyresveratrol 함량이 가장 높게 나타나 수원뽕 상지의 채집시기를 2월말-3월초로 결정하였다. 한편, 여름인 8월 상지는 $47.6 \mu\text{g/g}$ dry weight, 10월 상지는 $27.9 \mu\text{g/g}$ dry weight, 11월 상지는 $184.4 \mu\text{g/g}$ dry weight으로 겨울 상지에 비해 매우 낮은 수준으로 나타났다. 따라서 수원뽕 상지의 oxyresveratrol 함량은 채집시기에 매우 의존적이며 상지내의 oxyresveratrol 함량은 강한 추위를 겪으면서 축적되는 것으로 사료되었다.

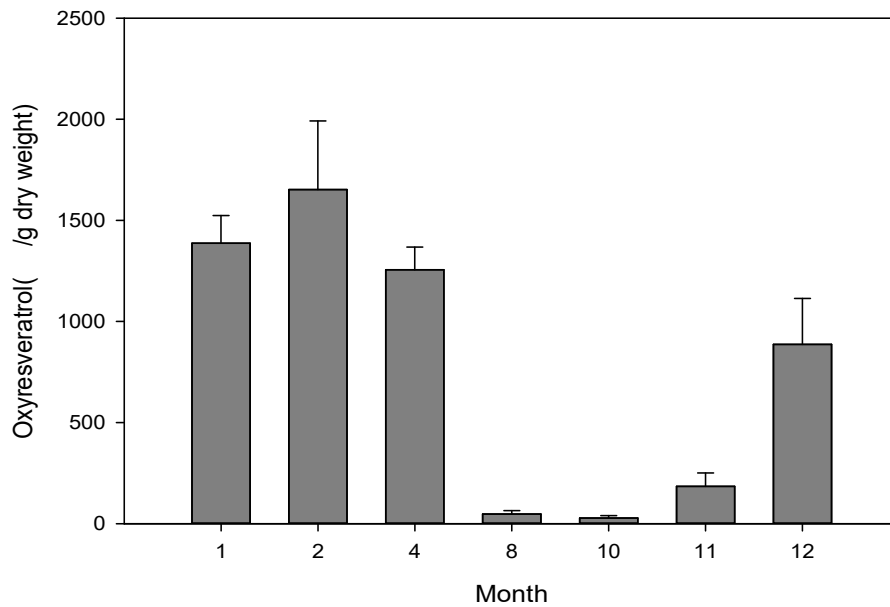


Fig. 7. 상지의 채집시기별 oxyresveratrol의 역가 변화.

5. 뽕나무 품종별 숙성에 의한 상지의 옥시레즈베라트롤 함량 비교

식물 내 스틸벤노이드 함량은 품종, 수확 시기, 영양상태, 숙성 방법, 생산지 등에 따라 크게 다르기 때문에 상지내의 옥시레즈베라트롤 함량도 이들의 영향을 받을 것으로 사료되었다.

충남농업기술원 뽕나무 7품종의 숙성 전(0일) 옥시레즈베라트롤 함량은 수성(122.4 µg/g dry weight)과 대심(148.1 µg/g dry weight) 품종이 높게 나타났다. 한편, 경기도 양평군의 숙성 전(0일) 옥시레즈베라트롤 함량은 청일 품종 79.1 µg/g dry weight, 수원 품종 65.7 µg/g dry weight을 나타내었다(Fig. 8). 30°C, 7일 숙성 후 옥시레즈베라트롤 축적은 충남농업기술원의 대심 품종이 148.1 µg/g dry weight에서 505.1 µg/g dry weight로 약 3.4배 증가하여 가장 큰 숙성 효과를 나타내었다. 그 밖에 수성은 약 1.7배, 수원노상은 약 2.9배, 청일은 약 3.4배, 개량은 3.8배, 상천조생은 약 4.6배, YK-209는 약 2.7배 증가한 것으로 나타났다. 한편, 경기도 양평군 양동면 계정리 농가의 청일은 0일차 79.1 µg/g dry weight에서 7일차 562.3 µg/g dry weight로 약 7배, 수원뽕 품종은 0일차 65.7 µg/g dry weight에서 7일차 632.3 µg/g dry weight로 약 9.6배 증가하여 두 품종 모두 충남농업기술원의 뽕나무 품종들보다 큰 숙성 효과를 나타내었다. Brinker(26)는 사탕수수의 piceatannol 축적 연구에서 품종에 따라 piceatannol 함량과 최적의 숙성 시간이 다르다고 보고하였다. 본 연구결과에서도 이들의 결과와 유사하게 품종과 숙성시간에 따라 옥시레즈베라트롤 함량에 차이가 있음을 확인하였다. 따라서 숙성동안 상지내 옥시레즈베라트롤 함량을 높이기 위해서는 품종 선정, 산지 선정 및 최적의 숙성시간 선정이 필요하다.

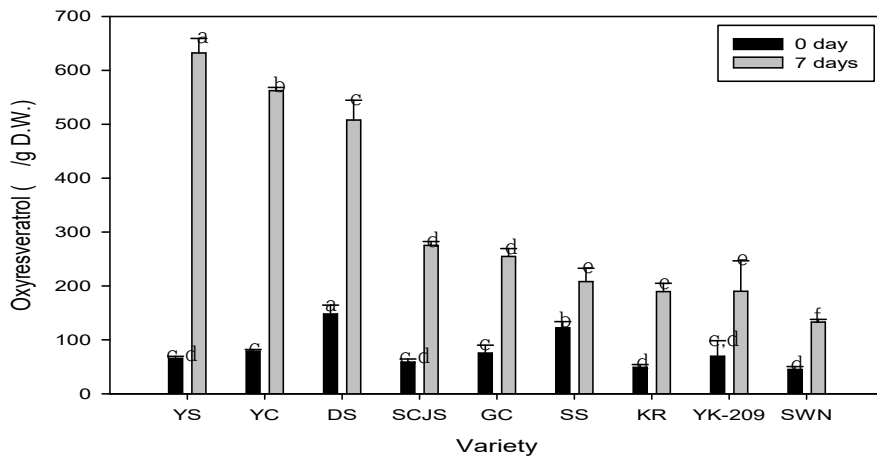


Fig. 8. 상지 품종별 숙성 전후 옥시레즈베라트롤 함량 비교.

YS: Yangpyeong-Suwon, YC: Yangpyeong-Chungil, DS: Daesim, SCJS: Sangcheonjosaeng, GC: Gongju-Cheongil, SS: Suseong, KR: Kaeryang, SWN: Suwon-Nosang. Data represent the mean±SD (n=3). Different letters correspond to significant differences at $p < 0.05$.

6. 숙성 온도에 따른 상지의 옥시레즈베라트롤 함량 변화

숙성에 의한 포도의 레스베라트롤 축적 연구에서 숙성 온도는 레스베라트롤 축적에 중요한 요소이었다(22). 본 실험에 앞서 온도(7, 25, 35, 45, 60°C)에 따른 숙성 온도 효과를 실험한 결과, 옥시레즈베라트롤 축적은 25°C>35°C>45°C>7°C>60°C 순으로 나타났다. 따라서 옥시레즈베라트롤 축적을 위한 최적 온도 결정을 위해 25°C, 30°C, 35°C과 옥시레즈베라트롤 합성 효소의 불활성화를 확인하고자 70°C에서 실험을 행하였다. 25°C 및 30°C에서 4일 숙성 시 옥시레즈베라트롤 함량은 1619.0 µg/g dry weight과 1637.4 µg/g dry weight로 각각 숙성 전 (692.7 µg/g dry weight)보다 약 2.3-2.4배 증가하였고, 35°C에서 4일 숙성 시는 약 1.7배 증가하였다. 반면에 70°C에서 4일 배양 시 상지 절편의 옥시레즈베라트롤 함량은 517.0 µg/g dry weight로 숙성 전보다 감소하였다. 한편, 25°C와 30°C에서 10일 숙성 시 옥시레즈베라트롤 함량은 702 µg/g dry weight와 1336.2 µg/g dry weight로 4일 숙성시보다 옥시레즈베라트롤 함량이 감소하였다(Fig. 9). 본 실험 결과, 상지 내 옥시레즈베라트롤 축적을 위한 최적온도는 30°C, 숙성기간은 6일로 확인되었다. 한편, 70°C의 고온 건조는 상지의 옥시레즈베라트롤 합성 효소의 불활성화로 옥시레즈베라트롤 합성이 억제된 것으로 사료되었다.

Houillé(22)의 포도나무 줄기의 레스베라트롤 축적에 관한 연구에 의하면, 2주의 짧은 숙성동안 레스베라트롤 축적을 위한 최적온도는 28°C이었고 10주의 긴 숙성에서의 최적온도는 15-20°C로 나타났다. Bonghi (25)는 포도 껍질의 탈수량에 따른 폴리페놀 함량 변화에 관한 연구에서 포도 껍질 내 레스베라트롤 함량은 10% 탈수보다 30% 탈수 시에 약 3배 높다고 보고하였다. 또한 30% 탈수 조건일지라도 급격한 수분 감소보다 수분이 서서히 감소될 때 레스베라트롤 함량이 더 높다고 보고하였다. 따라서 상지 내 옥시레즈베라트롤 함량을 증가시키기 위해서는 최적 온도의 선정뿐만 아니라 탈수량 및 탈수 속도에 관한 검토가 필요하다.

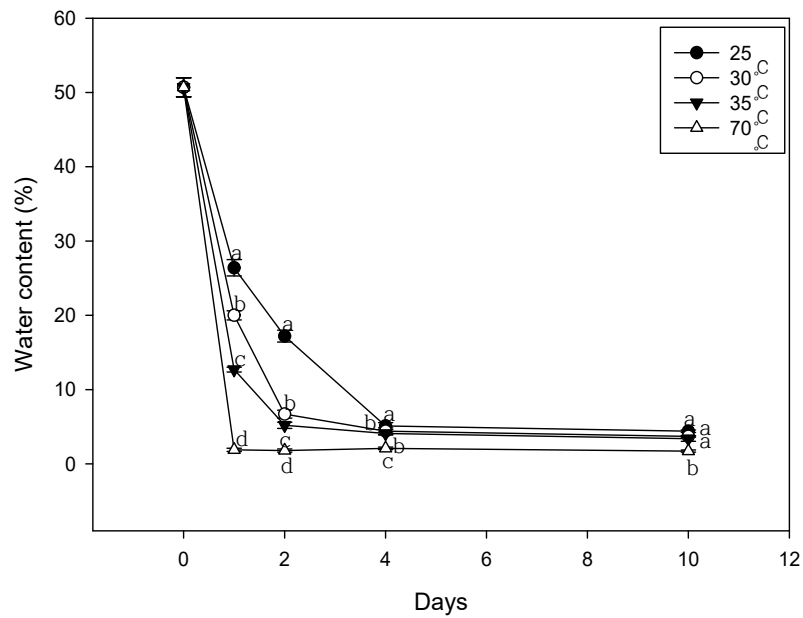
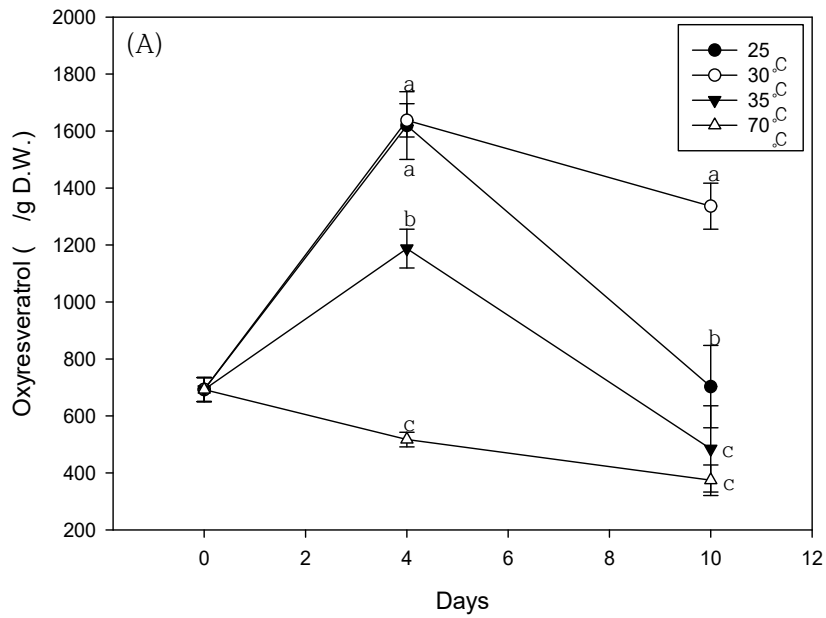


Fig. 9. 숙성 온도에 따른 상지내 옥시레즈베라트롤 축적과 수분 변화.
 (A) 온도에 따른 숙성중 상지내 옥시레즈베라트롤 함량 변화
 (B) 온도에 따른 숙성중 수분함량 변화

7. 숙성 기간에 따른 상지의 옥시레즈베라트롤의 함량 변화

품종 실험에서 옥시레즈베라트롤 축적량이 높게 증가한 수원뽕과 청일뽕 품종의 상지를 사용하여 30°C, 10일간 숙성하면서 숙성 기간에 따른 옥시레즈베라트롤 축적을 조사하였다(Fig. 10).

수원뽕 품종 상지의 옥시레즈베라트롤 함량은 6일 숙성 시 940.6 µg/g dry weight로 숙성 전(65.7 µg/g dry weight)보다 약 14배 증가하였다. 한편, 청일뽕 품종 상지의 옥시레즈베라트롤 함량은 6일 숙성 시 618.1 µg/g dry weight로 숙성 전(79.1 µg/g dry weight) 보다 약 7.8배 증가하였다. 한편, 숙성 기간에 따른 옥시레즈베라트롤 축적 함량은 두 품종 모두 6일 숙성 시 가장 높은 옥시레즈베라트롤 함량을 나타내었고 8일 이후 옥시레즈베라트롤 함량은 감소하였다. Brinker(26)의 배양시간에 따른 사탕수수 내 piceatannol 축적 연구에 의하면, 7일 숙성 시 piceatannol 함량이 가장 높게 나타났고 8일 이후 함량이 감소하기 시작하여 11일에는 최대치 함량의 약 44% 까지 감소하였다. 이 결과는 숙성기간에 따른 상지내 옥시레즈베라트롤 함량 변화와 유사한 경향이였다.

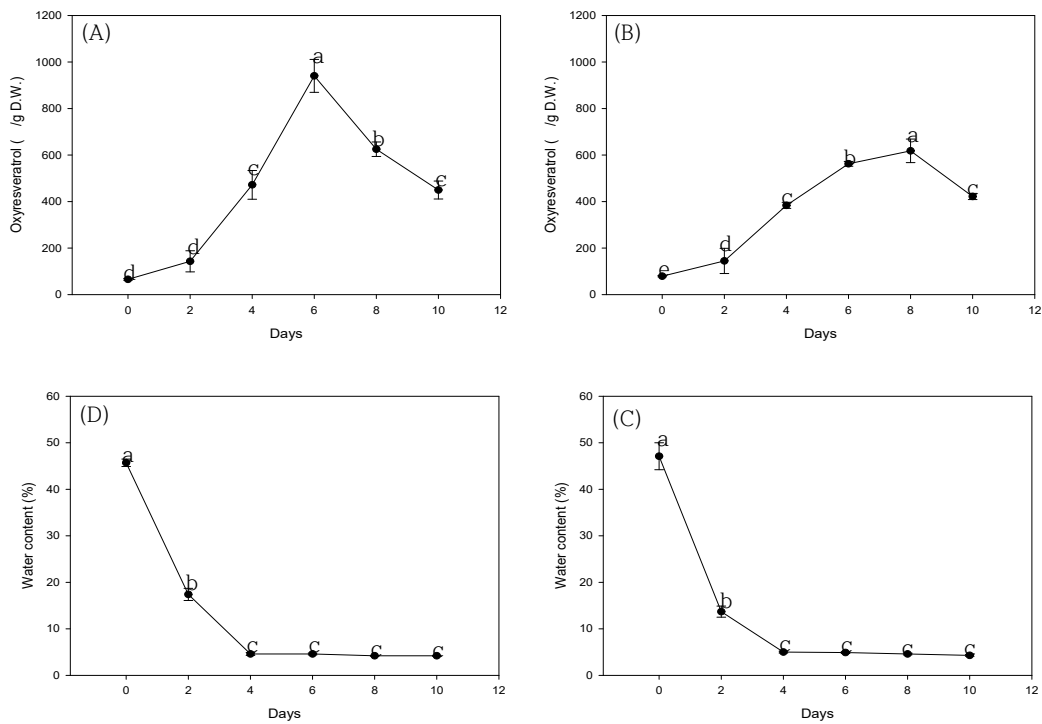


Fig. 10. 숙성 시간에 따른 상지내 옥시레즈베라트롤 함량과 수분 변화.

(A) Amount of oxyresveratrol in Suwon cultivar, (B) amount of oxyresveratrol in Chungil cultivar, (C) water content(%) in Suwon cultivar, (D) water content(%) in Chungil cultivar. Data represent the mean±SD (n=3). Different letters correspond to significant differences at $p < 0.05$.

8. 상지의 절편 크기에 따른 oxyresveratrol 역가 변화

사탕수수의 postharvest 연구논문에 따르면 절편의 크기가 작아질수록 스틸벤물질인 piceatannol 량이 축적이 증가한다고 보고하였다. 따라서 상지를 3가지의 크기(6 mm, 10-15 mm, 20-25 mm)로 자른 후 상지 크기에 따른 oxyresveratrol 역가 변화를 검토하였다(Fig. 11). 6일 숙성시는 6 mm 크기의 상지가 oxyresveratrol 역가가 가장 높게 나타났다. 그러나 상지 크기에 따른 oxyresveratrol 역가의 차이는 크지 않았다. 한편, 12일 숙성시 oxyresveratrol 역가는 20-25 mm 크기의 상지가 가장 높게 나타났다.

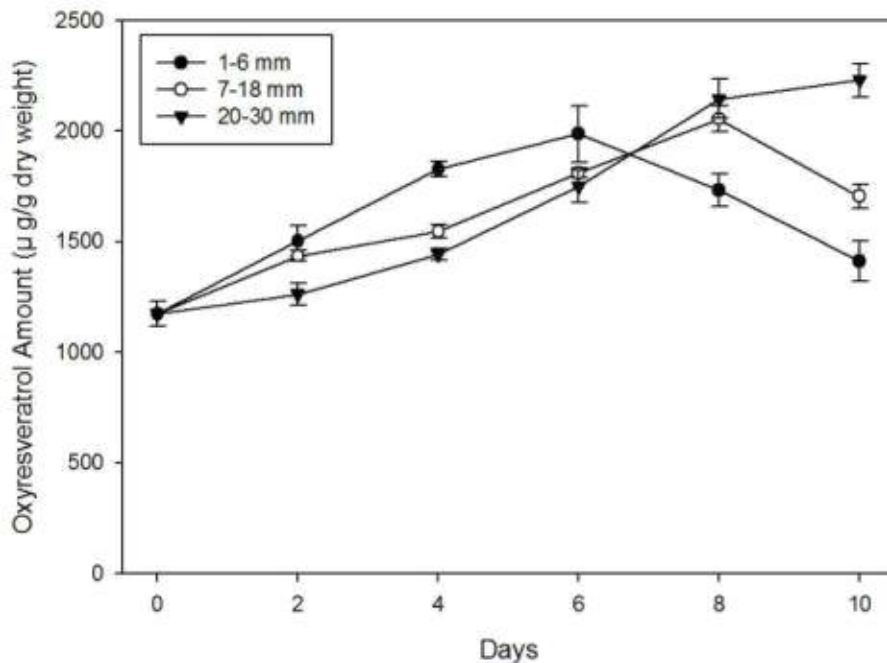


Fig. 11. 상지의 절편 크기에 따른 oxyresveratrol 역가 변화.

9. 미생물 감염에 따른 상지내 옥시레즈베라트롤 함량 변화

옥시레즈베라트롤은 식물들이 스트레스를 받을 때 자신을 보호하기 위해서 생성하는 파이토어릭신이다. 포도와 사탕수수는 세균 및 곰팡이 등의 미생물에 감염되었을 때 레스베라트롤과 piceatannol 등의 스틸벤노이드 물질이 크게 증가한 사례가 있다(25). 따라서 본 실험에서는 상지에 다양한 미생물을 접종한 후 옥시레즈베라트롤 함량 변화를 조사하였다.

그러나 본 연구의 목적이 상지를 산업적 이용 가치가 높은 고부가 가치 식품 소재로서 개발하는 것이기 때문에 *L. acidophilus*, *B. coagulans*, *R. capsulatus*, *S. cerevisiae*, *E. faecium* 등 식품 원료로 판매중인 “일반적으로 안전하다고 인정되는 균주” GRAS 5종을 상지에 접종한 후 숙성 기간에 따른 옥시레즈베라트롤 함량 변화를 조사하였다(Fig. 12).

균주를 접종한 실험군들은 균주 비접종 대조군보다 옥시레즈베라트롤 함량이 약 1.1-4.0 배 증가하였다. 5균종의 7일 배양 시 옥시레즈베라트롤의 축적량은 *B. coagulans*는 1906.4 µg/g

dry weight, *L. acidophilus*는 1146.0 $\mu\text{g/g}$ dry weight, *R. capsulatus*는 1003.2 $\mu\text{g/g}$ dry weight, *E. faecium*는 753.4 $\mu\text{g/g}$ dry weight, *S. cerevisiae*는 530.4 $\mu\text{g/g}$ dry weight로 나타났다. 또한 11일 배양 시 옥시레스베라트롤의 축적량은 *B. coagulans*는 891.5 $\mu\text{g/g}$ dry weight, *L. acidophilus*는 720.3 $\mu\text{g/g}$ dry weight, *R. capsulatus*는 643.7 $\mu\text{g/g}$ dry weight, *E. faecium*은 148.0 $\mu\text{g/g}$ dry weight, *S. cerevisiae*는 111.9 $\mu\text{g/g}$ dry weight를 나타냈다. 특히, 5균주 중에서 *B. coagulans*가 옥시레스베라트롤 축적에 뛰어난 효과를 나타내었으며 이는 균을 접종하지 않은 대조군에 비하여 7일 배양 시 약 4.0배 축적량이 증가하였다.

Brinker(26)는 사탕수수에 곰팡이인 *Collectotrichum falcatum* 포자를 접종한 후 숙성한 결과, 포자를 접종한 사탕수수의 piceatannol 함량은 비접종구에 비해 크게 증가하였다. 숙성시 곰팡이 포자의 접종은 식물 내 스틸벤노이드 함량을 크게 증가시켰지만 병원성과 아플라톡신 등의 독소 물질 생성 가능성 때문에 이 방법을 식품에 적용할 수 없다. 따라서 상지 내 옥시레스베라트롤 함량 증가를 위한 안전한 미생물의 적용은 산업적으로 매우 효과적인 방법이며 앞으로 다양한 천연물의 폴리페놀 증가를 위한 방법으로 활용 가능성이 높다고 판단된다.

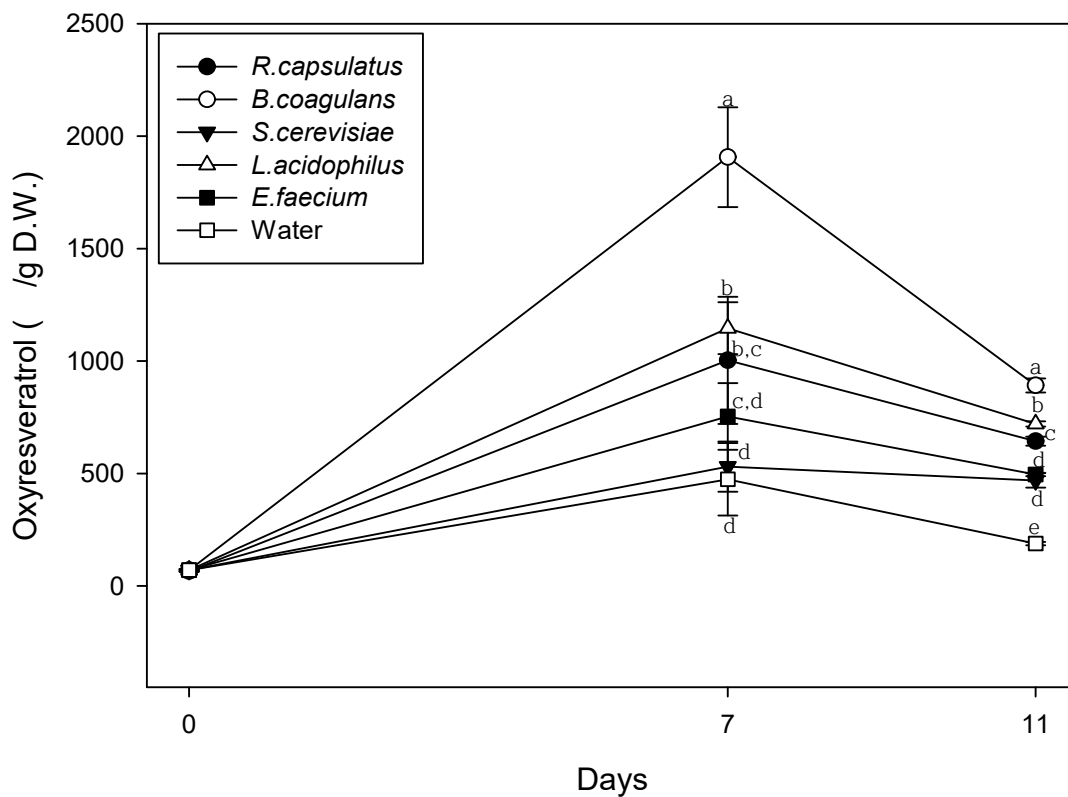


Fig. 12. 미생물 균종에 따른 상지내 옥시레스베라트롤 축적 효과.

Data represent the mean \pm SD (n=3). Different letters correspond to significant differences at $p < 0.05$.

10. UV 조사후 상지 절편의 oxyresveratrol 역가 변화

포도의 껍질에는 resveratrol, piceatannol 등의 스틸벤 물질을 함유하고 있는데 이에 UV를 조사하면 resveratrol, piceatannol 등의 스틸벤 함량이 크게 증가한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 6-15 mm의 크기로 절단된 상지에 UV를 15-120분간 조사한 후 30℃에서 7일, 14일 숙성후 축적된 oxyresveratrol 양을 조사하였다(Fig. 13). 7일 숙성후 축적된 oxyresveratrol을 조사한 결과, UV 조사된 실험구의 oxyresveratrol 양은 조사하지 않은 실험구에 비하여 오히려 감소하였다. 따라서 상지에 UV 조사는 oxyresveratrol 축적에 효과가 없는 것으로 사료되었다.

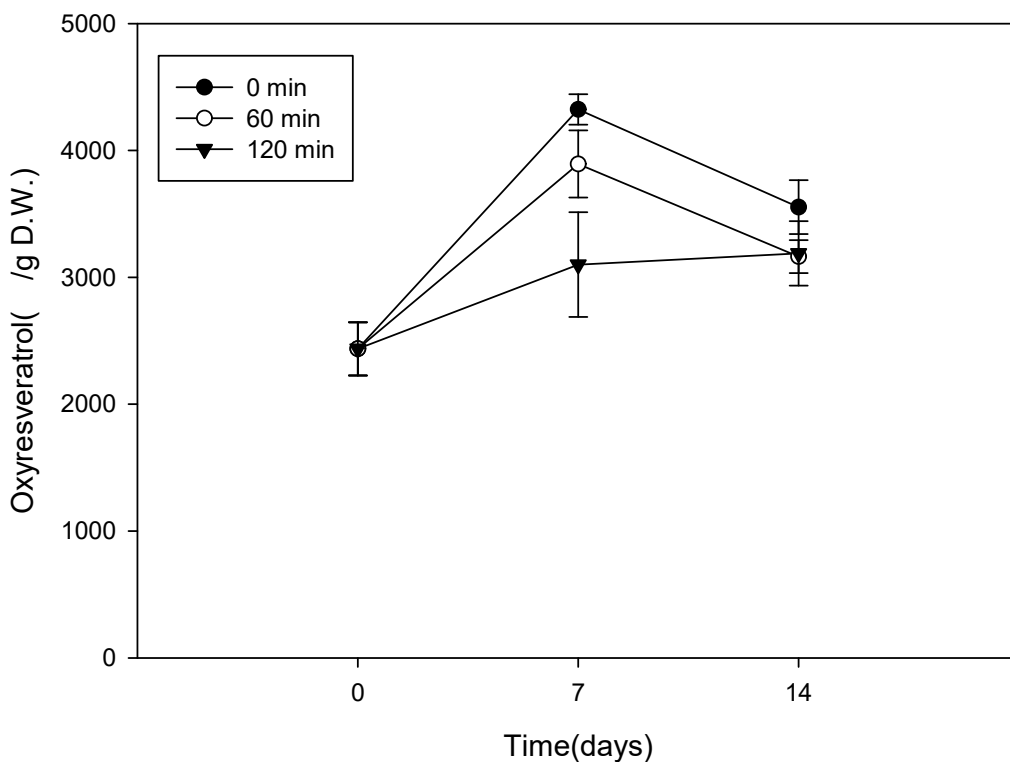


Fig. 13. UV 조사후 상지 절편의 oxyresveratrol 역가 변화.

11. 우수 뽕나무로 선정된 수원뽕과 청일뽕 품종의 oxyresveratrol 함량 비교

Oxyresveratrol 고함유 뽕나무 품종으로 선정된 수원뽕과 청일뽕을 고압 세척기로 세척후 15-30 mm 절단하고 이를 30℃에서 5일 숙성후 축적된 oxyresveratrol과 resveratrol의 양을 비교하였다(Fig. 14). 5일 숙성 후 추출한 수원뽕의 oxyresveratrol 양은 3,450 µg/g dry weight로 청일뽕 1,750 µg/g dry weight 보다 약 2.0배 높게 나타났다. 또한 수원뽕의 resveratrol의 량도 약 2.0배 높게 나타났다.

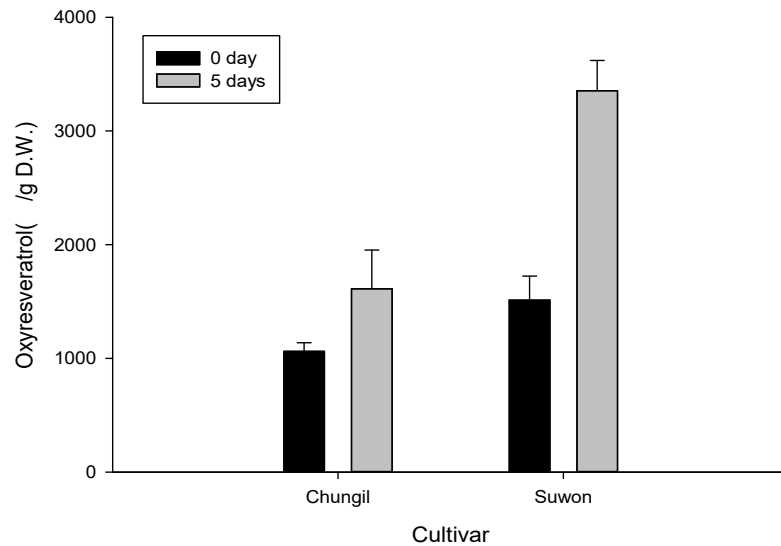


Fig. 14. 수원뽕과 청일뽕 상지의 숙성에 의한 oxyresveratrol 함량 변화.

12. 1 Kg 상지로부터 제조된 상지주정추출분말량과 oxyresveratrol 함량

각각 다른 계절(12월, 2월, 5월)의 건조된 상지 1kg을 70% 주정용 10 L로 추출하여 농축 및 동결건조하여 상지주정추출분말을 제조하였다. 추출한 후의 oxyresveratrol 함량과 농축 및 제조된 상지주정추출분말내의 oxyresveratrol 함량 및 주정추출분말의 무게 등을 비교 분석하였다(Table 3). 12월 상지주정추출물의 oxyresveratrol 함량은 5,845.5 µg/g dry weight로 나타났고, 상지주정추출분말의 oxyresveratrol 함량은 4,867.5 mg, 분말 무게는 31.81 g으로, oxyresveratrol은 전체 무게의 15.30%의 함량으로 나타냈다. 2월 상지주정추출물의 oxyresveratrol 함량은 3,813.9 µg/g dry weight, 상지주정추출분말의 oxyresveratrol 함량은 2,523.7 mg, 분말 무게는 37.89 g으로 6.66%의 함량을 나타냈다. 또한, 5월 상지주정추출물의 oxyresveratrol 함량은 979.7 µg/g dry weight, 상지주정추출분말은 721.4 mg, 분말 무게는 28.40 g으로 2.54%의 함량을 나타내었다.

Table 3. 1 Kg 상지로부터 제조된 상지주정추출분말량과 oxyresveratrol 함량.

계절	Sample (g dry weight)	Oxyresveratrol	Extraction powder (g)	Oxyresveratrol		Oxyresveratrol contents (%)
		µg/g dry weight		µg/g dry weight	mg	
12월	1,000	5,845.5 ± 61.4	31.81	4,867.5 ± 51.8	4,867.5 ± 51.8	15.30
2월	1,000	3,813.9 ± 80.7	37.89	2,523.7 ± 54.8	2,523.7 ± 54.8	6.66
5월	1,000	979.7 ± 59.0	28.40	721.4 ± 4.6	721.4 ± 4.6	2.54

13. 상지주정추출분말 제조공정의 확립

상지주정추출분말의 제조공정은 Fig. 15와 같이 확립하였다.

1. 산지로부터 oxyresveratrol 고함유 상지를 선정한다(0일차 1000 µg/g dry weight 이상). Oxyresveratrol의 역가, 중금속, 잔류농약 등을 분석하여 생산여부를 결정한다.
2. 채집된 상지를 고압세척기를 이용하여 깨끗하게 철저히 세척한다.
3. 세척된 상지는 15-30 mm 크기로 절단기를 이용하여 절단한다.
4. 절단 상지를 저온 감압건조기를 이용하여 30℃에서 5일 숙성 건조한다. 적외선 수분 측정기를 이용하여 수분 함량이 7% 이하가 될 때 까지 건조한다.
5. 숙성 건조된 상지의 무게 대비 약 10배의 70% 주정을 붓고 95℃에서 4시간 환류 추출한다.
6. 주정 추출액을 0.45 µm 필터를 이용하여 여과하여 이물질을 제거한다.
7. 여과된 추출액을 감압농축기에서 50-60℃에서 감압 농축한다. 이때 알콜 측정기를 이용하여 알콜이 1% 이하 까지 농축한다. 동결 건조를 위한 감압 농축된 액을 -30℃ 이하의 냉동고에서 동결한다.
8. 동결건조기의 진동도는 5 mTorr이하, 25℃에서 2일 행한다.
9. 동결 건조된 샘플은 HPLC에 의한 oxyresveratrol 함량 분석, 미생물, 중금속등의 검사를 실시한다.

산지로부터 상지 채집	Oxyresveratrol 1000 ug/g 이상 중금속, 농약 확인
고압세척	수도물 사용, 고압세척
절단(15-30 mm)	
저온 숙성	저온 감압 건조기, 30도씨, 5일
상지 주정 추출	주정농도 70%, 95도, 4시간 추출
여과(0.45 um filter)	세라믹 필터
감압농축	60도씨 농축, 잔존알콜량 확인
동결	-30도씨 동결
동결건조	5 mTorr 이하, 25도씨
품질관리	HPLC 분석, 미생물, 중금속

Fig. 15. 상지주정추출분말의 제조 공정.

14. 연구 결과 요약

1) Oxyresveratrol, resveratrol, quercetin, rutin, chlorogenic acid, caffeic acid등을 동시에 분석할 수 있는 HPLC 분석법을 개발함.

- 분석에 사용된 이동상은 CH₃CN(A)과 10 mM H₃PO₄(B)를 gradient 조건임. 즉, A:B (10:90, v/v)으로 분석을 시작하여 10분까지 A:B (25:75, v/v), 30분까지 A:B (50:50, v/v)으로 분석하였다. 컬럼은 Luna C₁₈(5 μm, 4.6×250 mm, Cosmosil), 온도는 30℃, 이동속도는 0.7 mL/min, 검출파장은 325 nm를 사용하였다.

2) 채집시기에 따라 상지내의 oxyresveratrol 량에 큰 차이를 나타냄. 상지의 oxyresveratrol 량은 겨울이 가장 높게 나타남. 특히, 동계 (12월-1월)의 상지의 채집은 뽕나무의 냉해를 가져올 수 있어 상지의 채집은 2월 중순-말경이 가장 좋다고 사료됨.

3) 다양한 뽕나무 품종을 조사하여 oxyresveratrol 고함유 품종을 선정하였음.

특히, 국내에서 다량 재배되는 뽕나무품종인 청일뽕과 수원뽕 상지로부터 oxyresveratrol을 4,000 μg/g dry weight 얻었음. 이는 1차년 목표대비 약 2.6배의 oxyresveratrol 역가임.

4) 상지의 주정 추출 농도를 검토한 결과, 80%의 주정으로 추출시 oxyresveratrol 량이 가장 높은 것으로 나타났으나 추출시 안전성 등을 고려하여 주정농도 70%, 추출시간 4시간으로 결정하였음.

5) 30℃에서 상지를 5일 숙성한 결과, 비숙성 상지보다 oxyresveratrol 량이 약 2-3배 증가하였음. 앞으로 숙성방법에 대한 연구를 더 진행한다면 상지내 oxyresveratrol 량을 더 증가시킬수 있다고 사료됨.

6) 경제적이고 합리적인 상지주정추출분말 제조 공정을 확립함.

제3절 제2협동연구 결과 및 고찰

1. 상지주정추출분말의 항산화 효과

1.1. β -carotene bleaching 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

β -carotene bleaching assay에 의해 측정된 상지주정추출분말 (oxyresveratrol 함량: 15.3%), oxyresveratrol, BHT의 항산화능은 다음과 같다. 실험 결과, oxyresveratrol의 IC₅₀은 BHT에 비해 약 3.9배로 높았고 항산화력은 BHT의 약 0.3배로 나타났다. 상지주정추출분말의 IC₅₀은 BHT에 비해 약 13.4배로 높았고 항산화력은 BHT의 약 0.08배로 나타났다. β -carotene bleaching assay를 통해 상지주정추출분말의 항산화능, 특히 지질과산화물을 억제하는 효과를 확인할 수 있다. (Table 1)

Table 1. Antioxidant activity of Ramulus mori alcohol extract in Taurine test system.

	IC ₅₀ (μ g/ml)	CV (%)
BHT	1.28 \pm 0.09	7.99
Oxyresveratrol	5.03 \pm 0.13	2.58
상지주정추출분말(oxy 15.3%)	17.17 \pm 1.28	7.47

Note : A lower IC₅₀ value indicates greater antioxidant activity. (Mean \pm SD, n=3)

1.2. HRPO 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

HRPO assay에 의해 측정된 상지주정추출분말, oxyresveratrol, ascorbic acid, resveratrol, trolox의 항산화능은 다음과 같다. 실험 결과, oxyresveratrol의 IC₅₀은 trolox와 ascorbic acid에 비해 각각 약 1.1배와 1.2배로 높았고 H₂O₂ 소거능은 trolox의 약 0.9배, ascorbic acid의 약 0.8배로 나타났다. 상지주정추출분말의 IC₅₀은 trolox와 ascorbic acid에 비해 각각 약 3.8배와 4.2배로 높았고 H₂O₂ 소거능은 trolox의 약 0.3배, ascorbic acid의 약 0.2배로 나타났다.(Table 2)

Table 2. Antioxidant activity of Ramulus mori alcohol extract in HRPO test system.

	IC₅₀ (µg/ml)	CV (%)
Trolox	18.72 ± 0.94	5.00
Ascorbic acid	16.91 ± 0.25	1.47
Oxyresveratrol	21.05 ± 0.56	2.67
Resveratrol	15.43 ± 0.23	1.50
상지주정추출분말(oxy 15.3%)	70.47 ± 0.25	0.36

Note : A lower IC₅₀ value indicates greater antioxidant activity. (Mean ± SD, n=3)

1.3. Taurine 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

Taurine test에 의해 측정된 상지주정추출분말 (oxyresveratrol 함량: 15.3 %), oxyresveratrol, ascorbic acid, resveratrol, trolox의 항산화능은 다음과 같다. 실험 결과, oxyresveratrol의 IC₅₀은 trolox와 ascorbic acid에 비해 각각 약 0.2배와 0.3배로 나왔고 HOCl 소거능은 Trolox의 약 5.0배, ascorbic acid의 약 3.3배로 나타났다.

상지주정추출분말의 IC₅₀은 trolox와 ascorbic acid에 비해 각각 약 0.7배와 0.9배로 나왔고 HOCl 소거능은 trolox의 약 1.4배, ascorbic acid의 약 1.1배로 나타났다. HOCl(치아염소산)은 염증반응 시 생체내의 면역세포인 호중구가 만들어내는 강력한 살균물질이다. 이러한 HOCl 소거능의 측정을 통해 다른 항산화 물질에 비해 우수한 상지주정추출분말의 항염증 효과를 확인할 수 있다.(Table 3)

Table 3. Antioxidant activity of Ramulus mori alcohol extract in Taurine test system.

	IC₅₀ (µg/ml)	CV (%)
Trolox	21.12 ± 0.31	1.46
Ascorbic acid	15.45 ± 0.70	4.52
Oxyresveratrol	4.37 ± 0.14	3.21
Resveratrol	3.31 ± 0.17	5.13
상지주정추출분말(oxy 15.3%)	14.34 ± 0.27	1.86

Note : A lower IC₅₀ value indicates greater antioxidant activity. (Mean ± SD, n=3)

1.4. CAA 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

CAA assay에 의해 측정된 상지주정추출분말 (oxyresveratrol 함량: 15.3 %), oxyresveratrol, quercetin의 항산화능은 다음과 같다. 실험 결과, oxyresveratrol의 EC₅₀은 4.73 ± 0.22 µg/ml이고 상지주정추출분말의 EC₅₀은 47.88 ± 1.97 µg/ml로 나타났다. 이를 양성대조군으로 사용한 quercetin equivalent 값으로 나타내면 oxyresveratrol은 187.24 ± 6.55 mmol of QE/100 g, 상지주정추출분말은 18.55 ± 1.69 mmol of QE/100 g으로 나타났다(Table 4).

Table 4. Antioxidant activity of Ramulus mori alcohol extract in CAA assay system.

	상지주정추출분말 (oxy 15.3%) ($\mu\text{g/ml}$)	Quercetin (μM)	Oxyresveratrol ($\mu\text{g/ml}$)
1	48.43	7.95	4.44
2	45.24	9.31	4.77
3	49.96	9.32	4.96
EC ₅₀	47.88 \pm 1.97	8.86 \pm 0.64	4.73 \pm 0.22
CV (%)	4.10	7.23	4.55
mmol of QE/100g	18.55 \pm 1.69	-	187.24 \pm 6.55

EC₅₀ Values for the inhibition of Peroxyl Radical-induced DCFH₂-DA oxidation by Compounds.(Mean \pm SD, n=3)

2. 상지주정추출분말의 항비만 효과

2.1. 3T3-L1의 세포독성

3T3-L1 분화유도에 사용한 상지주정추출물분말의 농도 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 측정된 viability (Fig. 1, Table 5)는 음성대조군에 비해 각각 96.86 \pm 1.91%, 96.16 \pm 1.75%, 96.16 \pm 2.26% 로 나타나 세포독성이 미미하여 큰 영향이 없을 것으로 사료된다. 또한 oxyresveratrol의 농도 10, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 측정된 viability (Fig. 2, Table 6)는 음성대조군에 비해 각각 103.02%, 101.70%, 102.96% 로 나타나 세포독성이 없었다.

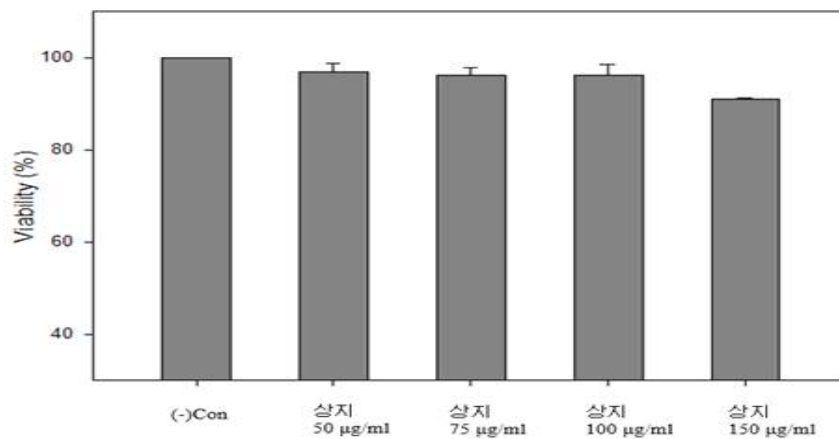


Fig. 1. 상지주정추출물분말에 대한 3T3-L1의 cell viability.

Table 5. Cell viability of 3T3-L1 cell with Ramulus mori alcohol extract.

Toxicant	Viability (%)
(-) Control	100
상지 추출물 50 µg/ml	96.86 ± 1.91
상지 추출물 75 µg/ml	96.16 ± 1.75
상지 추출물 100 µg/ml	96.16 ± 2.26
상지 추출물 150 µg/ml	91.05 ± 0.20

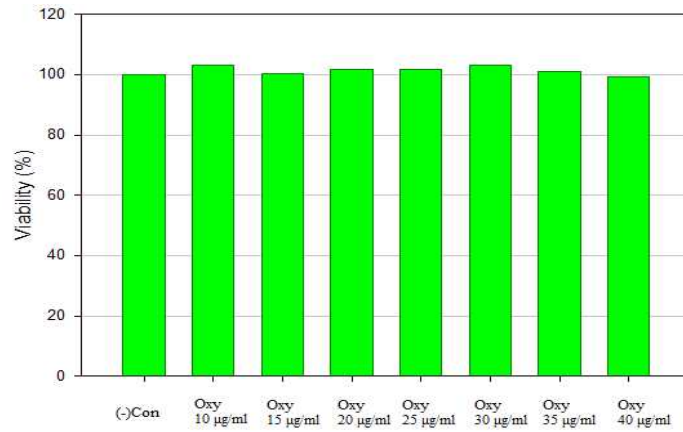


Fig. 2. Oxyresveratrol에 대한 3T3-L1의 cell viability.

Table 6. Cell viability of 3T3-L1 cell with Oxyresveratrol.

Toxicant	Viability (%)
(-) Control	100
Oxyresveratrol 10 µg/ml	103.02
Oxyresveratrol 15 µg/ml	100.19
Oxyresveratrol 20 µg/ml	101.70
Oxyresveratrol 25 µg/ml	101.65
Oxyresveratrol 30 µg/ml	102.96
Oxyresveratrol 35 µg/ml	100.98
Oxyresveratrol 40 µg/ml	99.37

2.2. Oil red O staining을 통한 상지주정추출분말의 지방분화 억제능 분석

3T3-L1 분화유도 과정에서 상지주정추출분말의 농도 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에 따른 분화는 Oil red O staining을 통해 육안으로(Fig. 3), 또한 inverted microscope (Fig. 4)를 통해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 확인하였다. 흡광도를 통해 측정된 lipid accumulation 값(Fig. 5, Table 7) 역시 음성대조군에 비해 각각 $73.77 \pm 2.60\%$, $33.94 \pm 8.95\%$, $17.31 \pm 3.32\%$ 로 나타나 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였다.

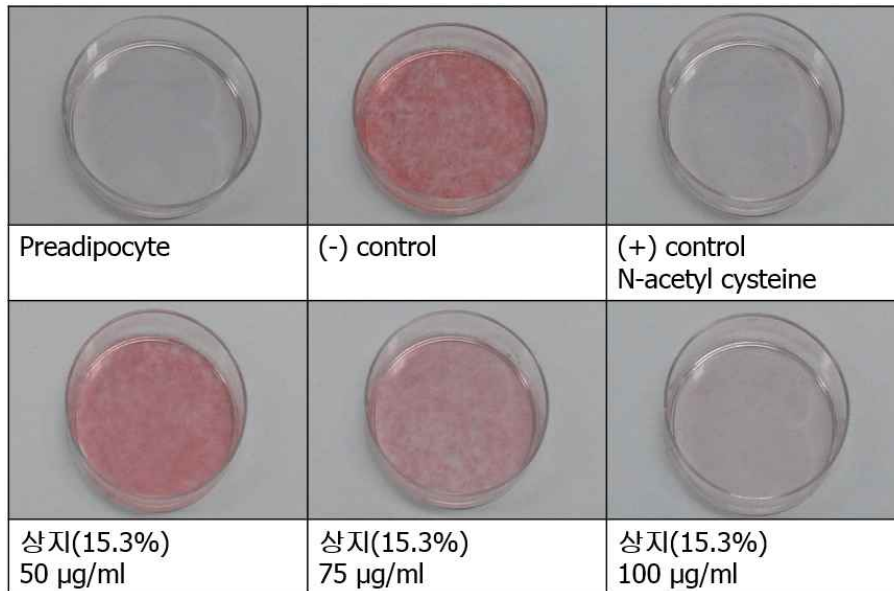


Fig. 3. 상지주정추출분말에 대한 3T3-L1의 Lipid accumulation.

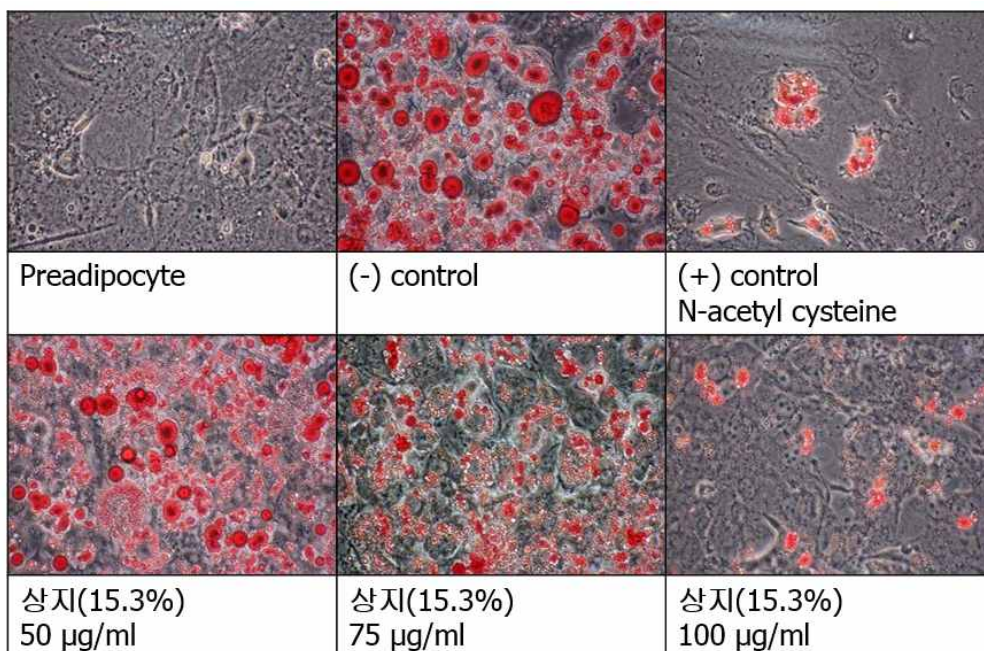


Fig. 4. 3T3-L1의 Lipid accumulation (Phase contrast microscope, 400배).

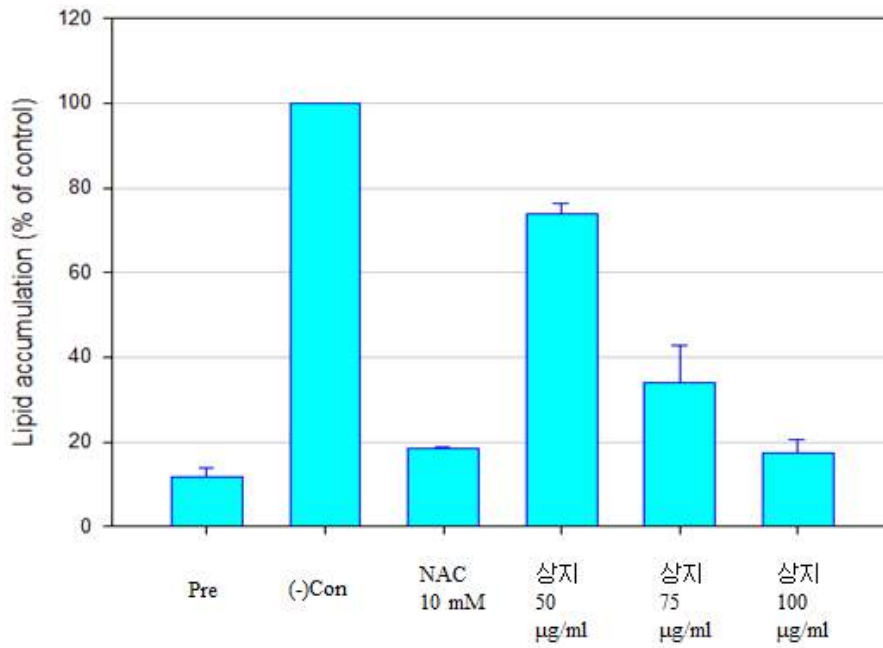


Fig. 5. 3T3-L1의 Lipid accumulation 흡광도.

Table 7. Lipid accumulation of 3T3-L1 cell with Ramulus mori alcohol extract.

Compound	Triglyceride (%)
Preadipocyte	11.56 ± 2.18
(-) control	100
NAC 10 mM	18.32 ± 0.42
상지 50 µg/ml	73.77 ± 2.60
상지 75 µg/ml	33.94 ± 8.95
상지 100 µg/ml	17.31 ± 3.32

O.D. measured at 500 nm (Mean ± SD, n=3)

2.3. Oil red O staining을 통한 Oxyresveratrol의 지방분화 억제능 분석

3T3-L1 분화유도 과정에서 oxyresveratrol의 농도 10, 20, 30 µg/ml에 따른 분화는 Oil red O staining을 통해 inverted microscope (Fig. 6)상에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 확인하였다. 흡광도를 통해 측정된 lipid accumulation 값(Fig. 7, Table 8) 역시 음성대조군에 비해 각각 93.56%, 53.27%, 15.90%로 나타나 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였다.

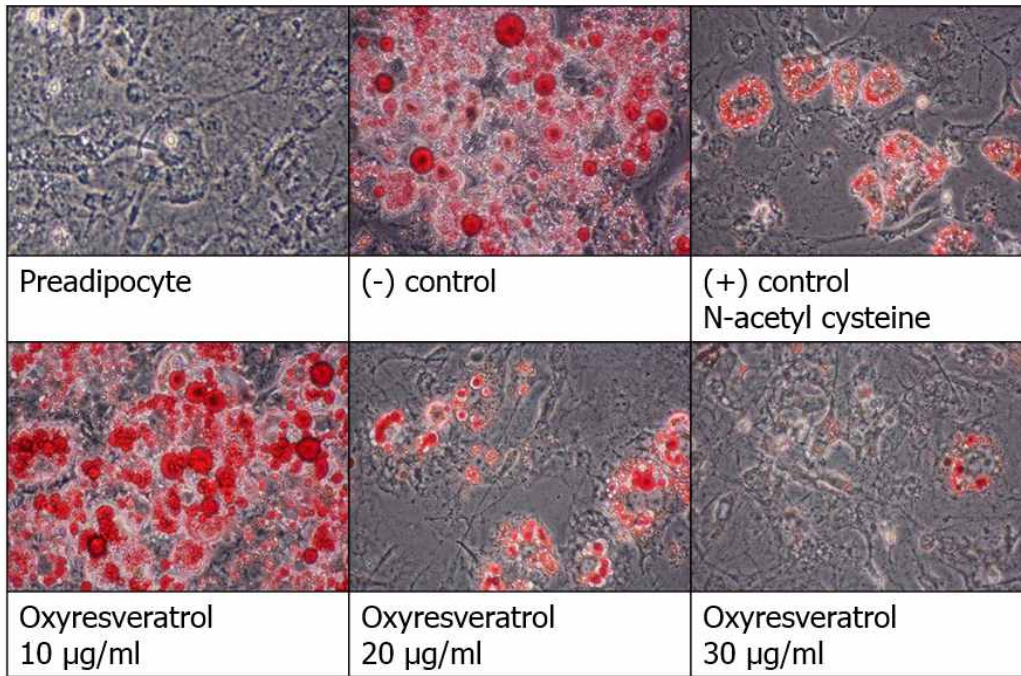


Fig. 6. 3T3-L1의 Lipid accumulation (Phase contrast microscope, 400배).

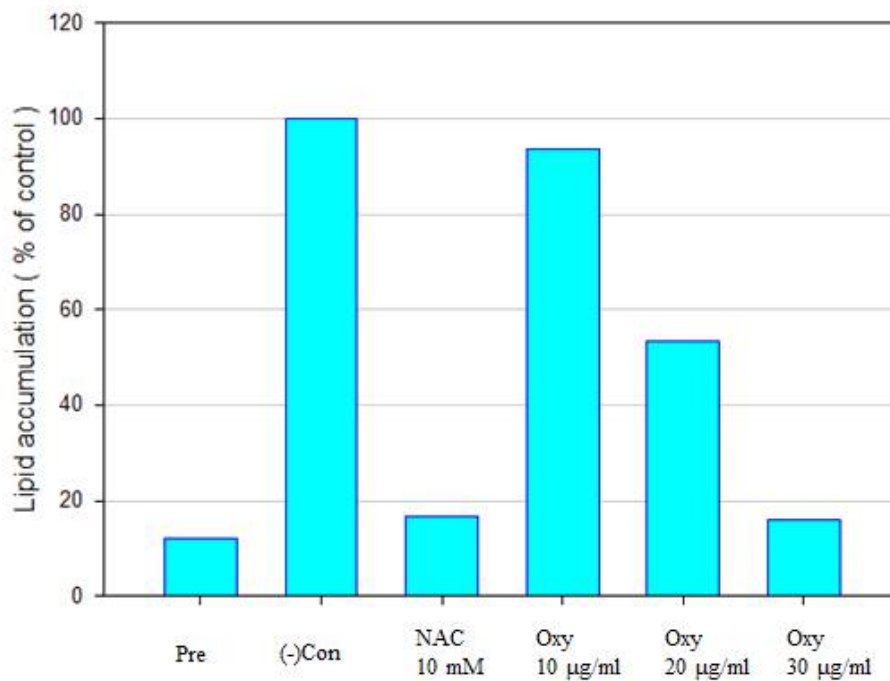


Fig. 7. 3T3-L1의 Lipid accumulation 흡광도.

Table 8. Lipid accumulation of 3T3-L1 cell with oxyresveratrol.

Compound	Triglyceride (%)
Preadipocyte	12.11
(-) control	100.00
NAC 10 mM	16.81
Oxyresveratrol 10 µg/ml	93.56
Oxyresveratrol 20 µg/ml	53.27
Oxyresveratrol 30 µg/ml	15.90

3. Oxyresveratrol에 의한 장내 염증성 질환을 예방 효과 측정

3.1. Oxyresveratrol과 상지주정추출분말의 MUC2 발현량

Oxyresveratrol과 상지주정추출분말은 goblet cell 에서 뮤신 생성을 증가시키는 효과가 있었다 (Fig. 8). 특히 oxyresveratrol 20 µg/ml 처리군 에서는 positive control로 사용된 propionate 1 mM 보다 효과가 좋았고, 아무것도 처리하지 않은 negative control (No treatment)와 t-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의하게 증가하였음을 알 수 있었다.

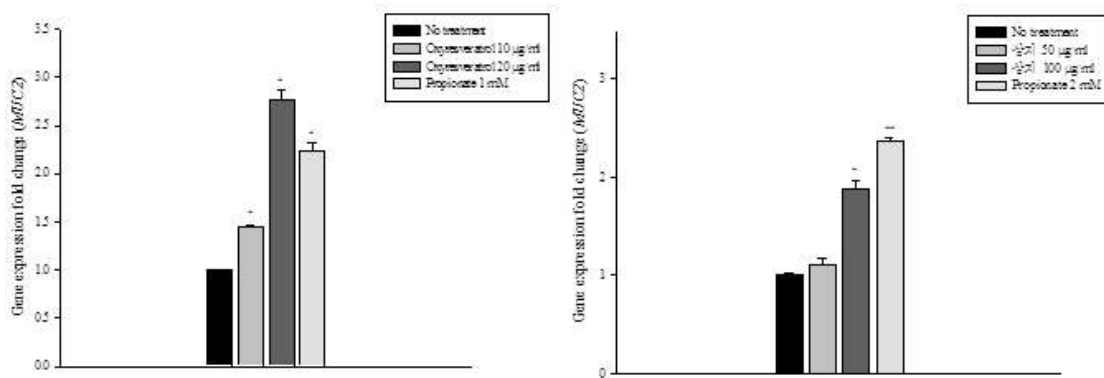


Fig. 8. Oxyresveratrol과 상지주정추출분말의 MUC2 발현량.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.2. Oxyresveratrol의 tight junction 관련 유전자의 발현량 변화

Oxyresveratrol은 tight junction과 관련된 유전자의 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다 (Fig. 9). 특히 oxyresveratrol 40 µg/ml 처리군에서 효과가 가장 좋았고, 아무것도 처리하지 않은 negative control (No treatment)와 t-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의하게 증가하였음을 알 수 있었다.

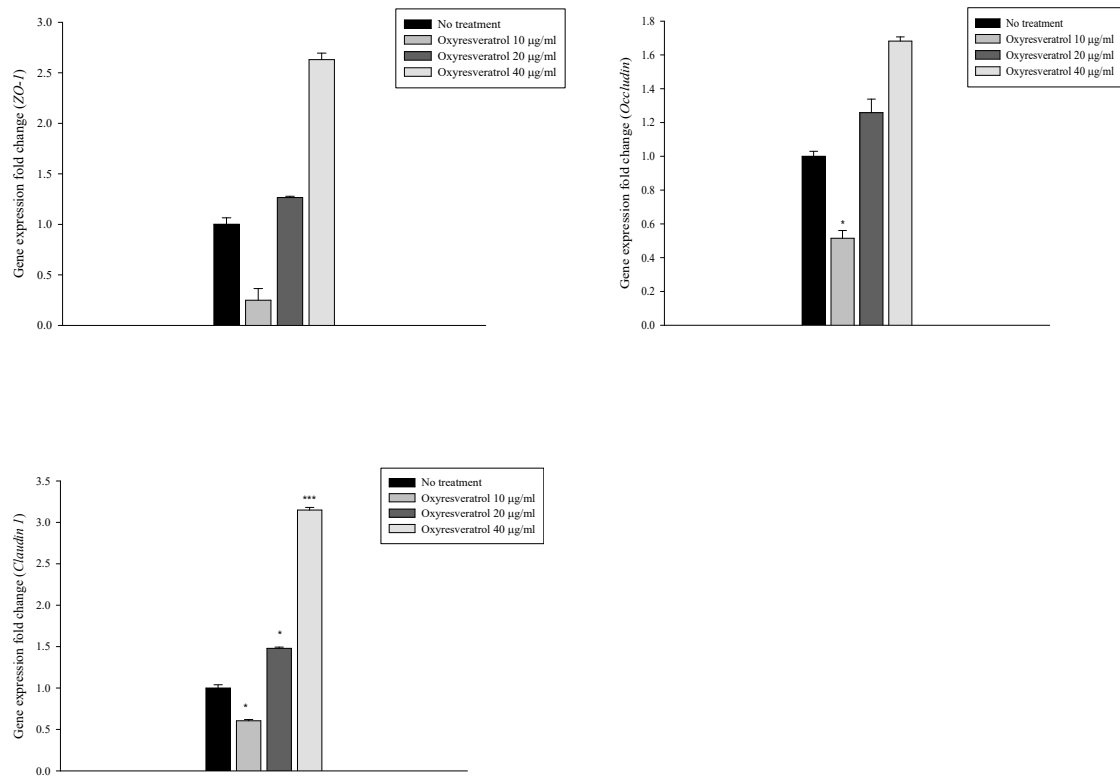


Fig. 9. Oxyresveratrol의 tight junction 관련 유전자의 발현량 변화.

(A), ZO-1; (B), Occludin; (C), Claudin1

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.3. Oxyresveratrol의 tight junction 관련 단백질의 발현량 변화

Oxyresveratrol은 tight junction과 관련된 단백질의 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다 (Fig. 10). 특히 oxyresveratrol 40 µg/ml 처리군에서 단백질의 증가가 눈에 띄게 좋았다.

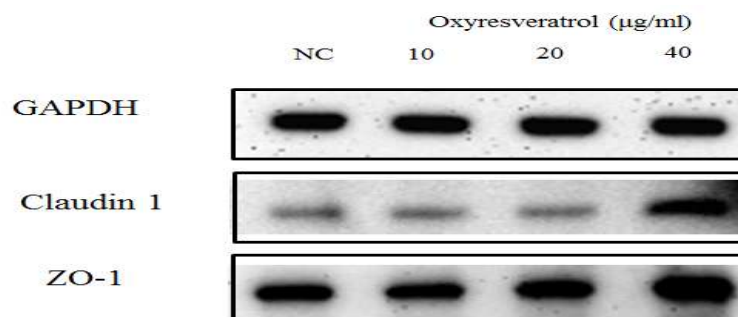


Fig. 10. Oxyresveratrol의 tight junction 관련 단백질 (Claudin 1, ZO-1)의 발현량 변화.

4. Oxyresveratrol에 의한 *Caenorhabditis elegans*의 수명연장 효과

4.1. Oxyresveratrol에 의한 수명 연장 효과

*C. elegans*의 Oxyresveratrol에 의한 수명 연장 효과를 평가한 결과 (Fig. 11), control 배지에서의 평균 수명은 14.0일인 것에 비해 oxyresveratrol이 100 μ M 첨가된 배지에서는 14.7일, 500 μ M이 첨가된 배지에서는 15.7일, 1000 μ M이 첨가된 배지에서는 17.1일로 각각 5%, 12.1%, 22.1% 유의하게 연장된 것을 확인할 수 있었다 (Table 9). 이는 Resveratrol이 100 μ M 첨가된 배지에서는 16.2일, 500 μ M이 첨가된 배지에서는 16.3일로 각각 15.7%, 16.4% 연장된 것에 비해 낮지만, 1000 μ M 첨가된 배지에서 17.3일로 23.6% 연장된 것 (Fig. 12)과 비슷한 정도로 연장 효과를 보였다고 할 수 있다.

Table 9. Oxyresveratrol 및 resveratrol에 의한 수명연장 효과.

	MLS \pm SE (day)
control (0.3% v/v DMSO)	14.0 \pm 0.2
resveratrol 100 μ M	16.2 \pm 0.35 ^{***}
resveratrol 500 μ M	16.3 \pm 0.34 ^{***}
resveratrol 1000 μ M	17.3 \pm 0.32 ^{***}
oxyresveratrol 100 μ M	14.7 \pm 0.28 [*]
oxyresveratrol 500 μ M	15.7 \pm 0.26 ^{***}
oxyresveratrol 1000 μ M	17.1 \pm 0.32 ^{***}

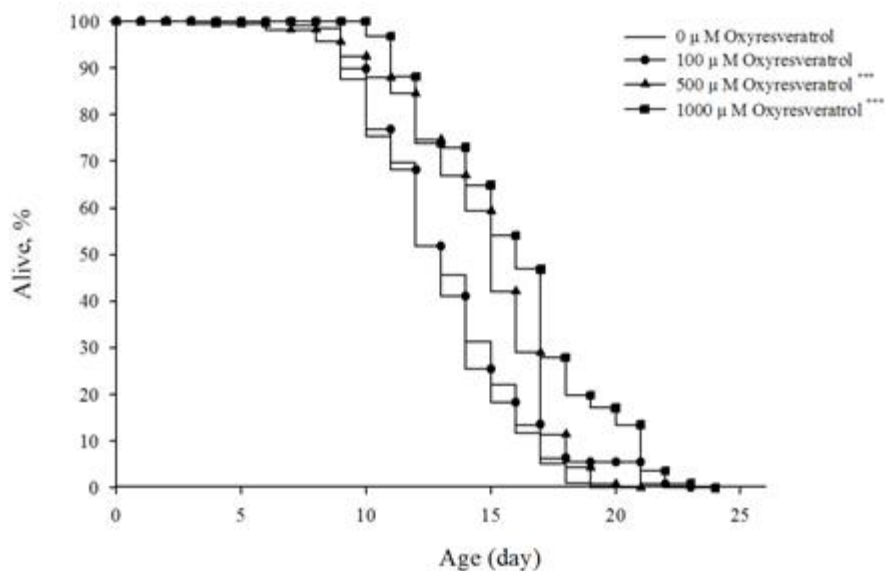


Fig. 11. Oxyresveratrol에 의한 *C. elegans*의 수명연장 효과.
($P^{***} < 0.001$)

Oxyresveratrol이 농도별로 첨가된 배지에서 *C. elegans*를 배양한 결과, control (0.3% v/v DMSO)에 비해 첨가 농도에 따라 유의하게 수명이 연장되었다.

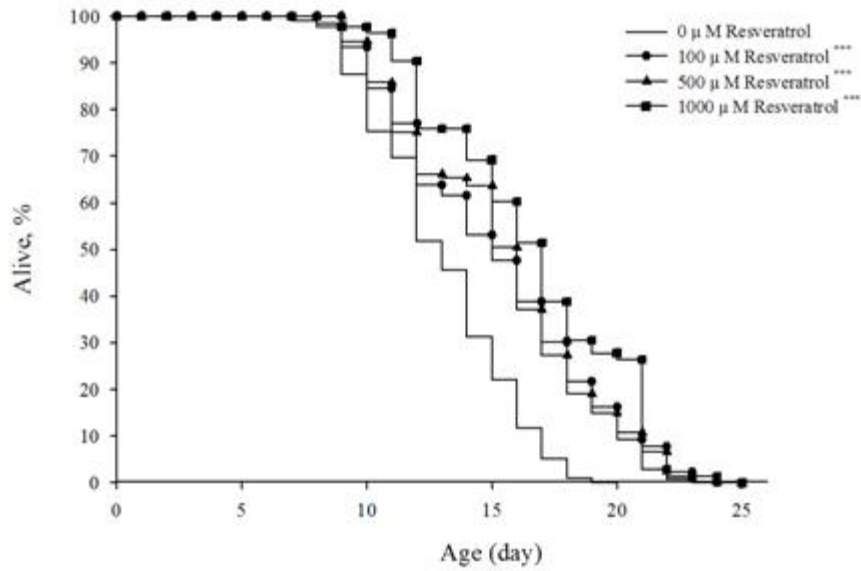


Fig. 12. Resveratrol에 의한 *C. elegans*의 수명연장 효과.
($p^{***} < 0.001$)

Resveratrol이 농도별로 첨가된 배지에서 *C. elegans*를 배양한 결과, control (0.3% v/v DMSO)에 비해 첨가 농도에 따라 유의하게 수명이 연장되었다.

4.2. Oxyresveratrol에 의한 유전자 발현 변화

*C. elegans*의 Oxyresveratrol에 의한 유전자 발현 변화를 평가한 결과, Oxyresveratrol이 첨가된 배지에서 24시간 동안 배양한 *C. elegans*에서는 *sir2.1* (2.9 ± 0.20 fold), *daf-2* (6.9 ± 0.33 fold), *daf-16* (1.3 ± 0.04 fold), *hif-1* (2.0 ± 0.22 fold) 유전자가 유의하게 증가하였다 (Fig. 13A). 또한 72시간 동안 배양했을 때 *sir2.1* (1.9 ± 0.14 fold) 유전자는 유의하게 증가하였으나 다른 유전자들은 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 13C). *sir2.1* 유전자 발현 증가로 인한 수명연장 효과를 보인다고 밝혀진 resveratrol도 이와 유사한 결과를 보였다 (Fig. 13B, D).

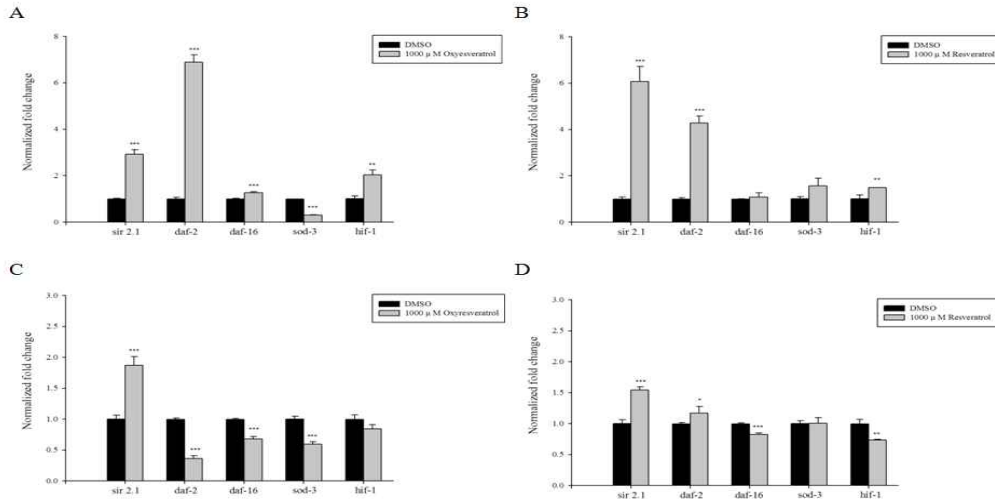


Fig 13. Oxyresveratrol과 Resveratrol에 의한 *C. elegans*의 유전자 발현 변화. ($P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$, $P^{***} < 0.001$)

물질이 첨가된 배지에서 24시간 동안 배양한 결과 (A) Oxyresveratrol이 첨가된 배지에서는 control (0.3% v/v DMSO)에 비해 *sir2.1*, *daf-2*, *daf-16*, *hif-1* 유전자가 유의하게 증가하였으며, (B) Resveratrol이 첨가된 배지에서는 control에 비해 *sir2.1*, *daf-2*, *hif-1* 유전자가 유의하게 증가하였다. 물질이 첨가된 배지에서 72시간 동안 배양한 결과 (C) Oxyresveratrol이 첨가된 배지에서는 control에 비해 *sir2.1* 유전자는 증가하였지만, *daf-2*, *daf-16*, *sod-3*, *hif-1* 유전자가 유의하게 감소하였으며, (D) Resveratrol이 첨가된 배지에서는 control에 비해 *sir2.1*, *daf-2* 유전자는 증가하였지만, *daf-16*, *hif-1* 유전자가 유의하게 감소하였다.

5. Oxyresveratrol에 의한 장내 염증 예방 효과 측정

5.1. Oxyresveratrol의 세포간극 (tight junction)의 안정화 효과

Oxyresveratrol이 Caco-2 cell에 미치는 독성에 대해 알아보기 위해 oxyresveratrol (10, 20, 30 μg/ml)을 농도별로 처리하여 MTT assay를 하였다. Negative control과 비교 했을 때 oxyresveratrol 10, 20, 30 μg/ml의 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다 (Fig. 14). 아무것도 처리하지 않은 negative control (NC)과 t-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의적인 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

Oxyresveratrol의 tight junction 유지 효과에 미치는 영향을 알아보기 위해, 전류를 흘려 세포간극의 저항 값을 측정하였다. 그 결과, oxyresveratrol이 농도의존적으로 tight junction을 유지시켜 주는 효과를 확인할 수 있었는데, 특히 oxyresveratrol 30 μg/ml 처리군에서 tight junction의 유지효과가 눈에 띄게 좋은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 15). 아무것도 처리하지 않은 Negative control (NC)과 t-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의적인 차이가 있음 확인할 수 있었다.

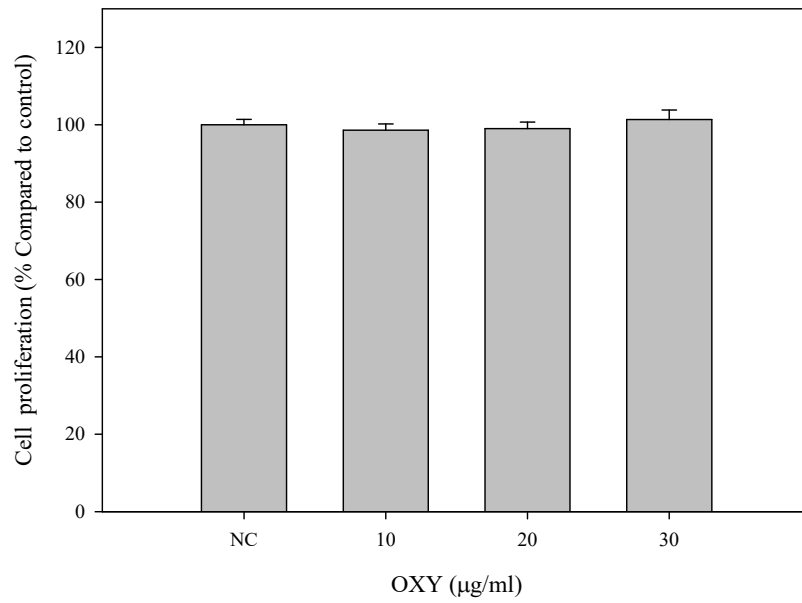


Fig. 14. Caco-2 cell에 대한 Oxyresveratrol의 cell viability.

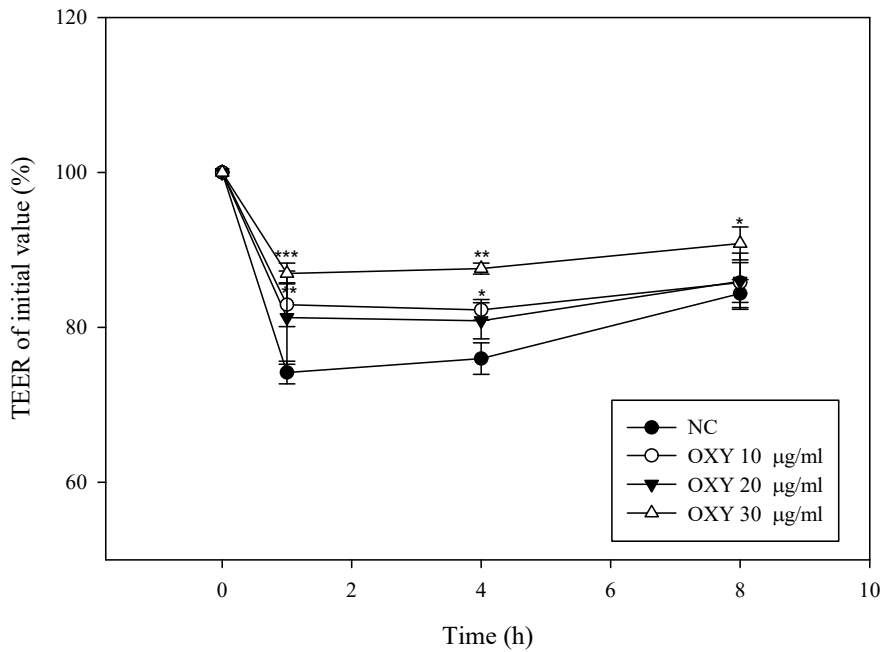


Fig. 15. Oxyresveratrol이 tight junction 유지 효과에 미치는 영향.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Oxyresveratrol은 tight junction과 관련된 유전자의 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다 (Fig. 16). 특히 oxyresveratrol 30 µg/ml 처리군에서 효과가 가장 좋았고, 아무것도 처리하지 않은 Negative control (NC)와 t-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의하게 증가하였음을 확인할 수 있었다.

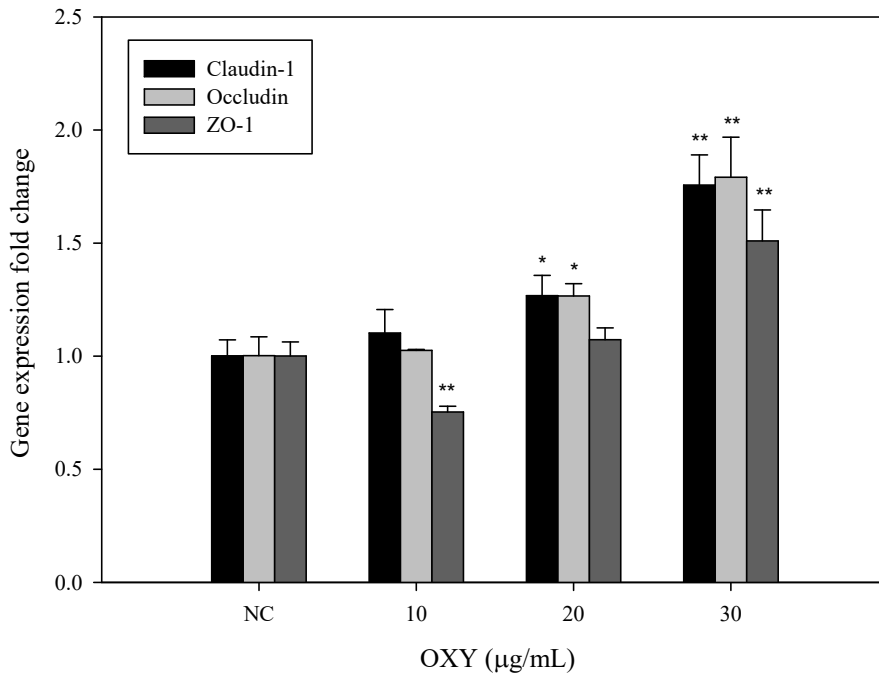


Fig. 16. Oxyresveratrol의 tight junction 관련 유전자 (Claudin-1, Occludin, ZO-1)의 발현량 변화. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Oxyresveratrol은 tight junction과 관련된 단백질의 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다 (Fig. 17). 특히 oxyresveratrol 30 µg/ml 처리군에서 효과가 가장 좋았다.

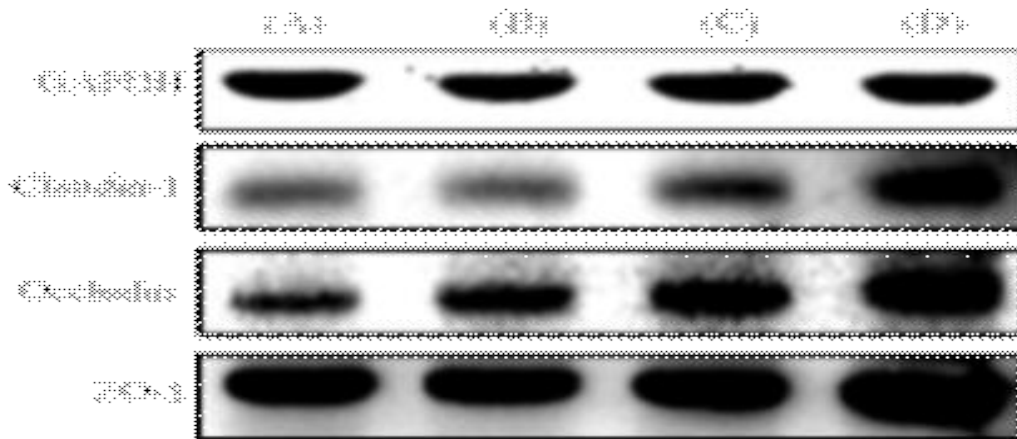


Fig. 17. Oxyresveratrol의 tight junction 관련 단백질 (Claudin-1, Occludin, ZO-1)의 발현량 변화.

(A) Negative control (NC); (B) OXY 10 µg/ml; (C) OXY 20 µg/ml; (D) OXY 30 µg/ml.

Oxyresveratrol이 tight junction 관련 단백질 Claudin-1에 미치는 영향을 Immunocytochemistry을 통해 관찰한 결과, 아무것도 처리하지 않은 Negative control에 비해 농도 의존적으로 Claudin-1이 두껍게 형성되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 18).

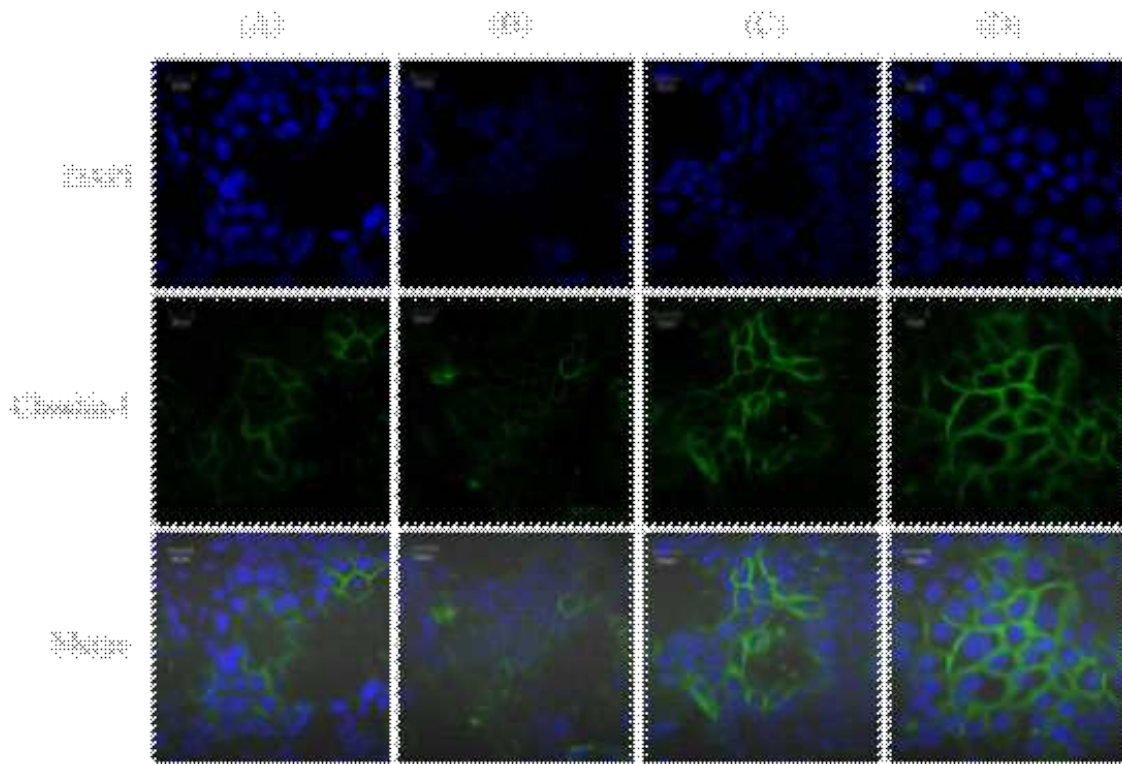


Fig. 18. Tight junction의 면역형광염색.

(A) Negative control (NC); (B) OXY 10 µg/ml; (C) OXY 20 µg/ml; (D) OXY 30 µg/ml.

Oxyresveratrol이 투과성에 미치는 영향을 FITC-dextran 4 kDa를 통해 관찰한 결과, 아무것도 처리하지 않은 negative control (NC)에 비해 농도 의존적으로 투과성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 19). 아무것도 처리하지 않은 Negative control (NC)와 t-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

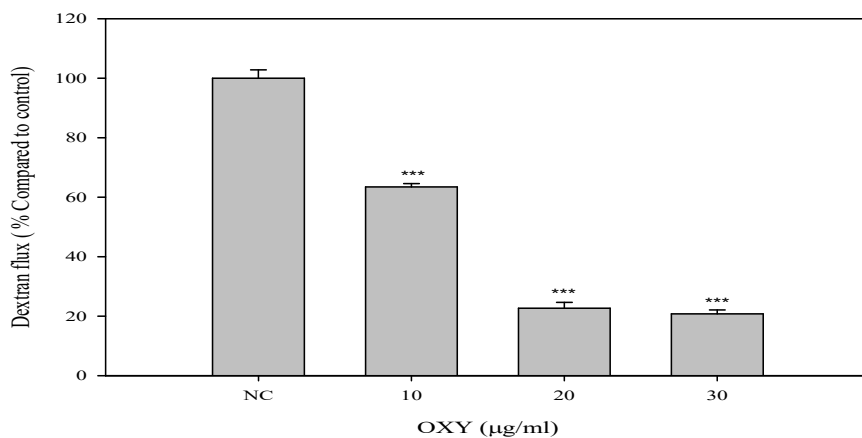


Fig. 19. Oxyresveratrol의 투과성에 미치는 영향. *** $p < 0.001$.

5.2. Oxyresveratrol에 의한 PKC, MAPK 경로 활성화 측정

Oxyresveratrol은 PKC 경로와 관련된 유전자(*PKC- δ*)의 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다 (Fig. 20). 특히 oxyresveratrol 30 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 효과가 가장 좋았다. 이를 통해 oxyresveratrol은 PKC 경로를 활성화 시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

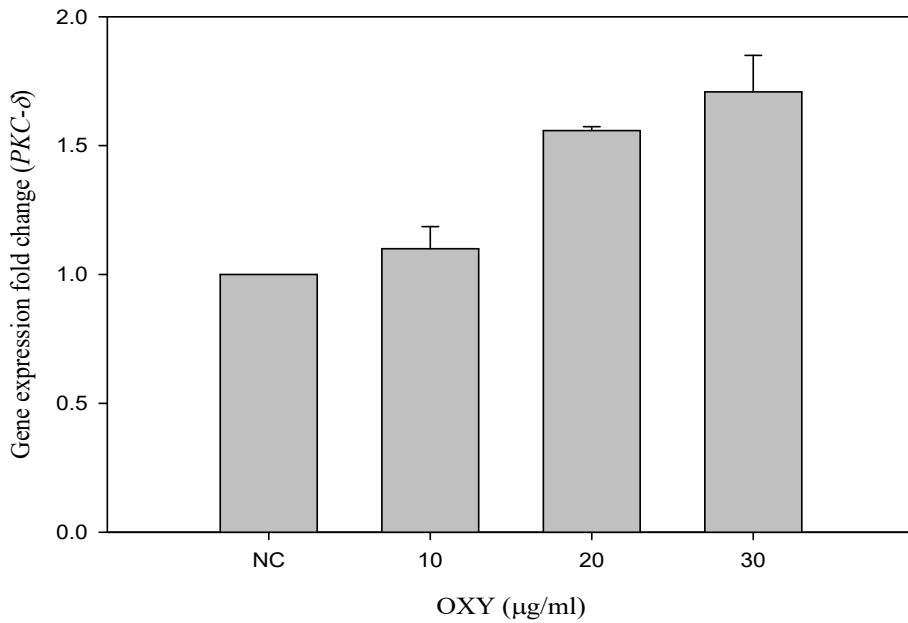


Fig. 20. Oxyresveratrol의 PKC 경로 유전자 (*PKC- δ*)의 발현량 변화.

Oxyresveratrol은 MAPK 경로와 관련된 유전자(*JNK- α 1*)의 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig. 21). 특히 oxyresveratrol 30 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 효과가 가장 좋았다. 이를 통해 oxyresveratrol은 MAPK 경로를 활성화 시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

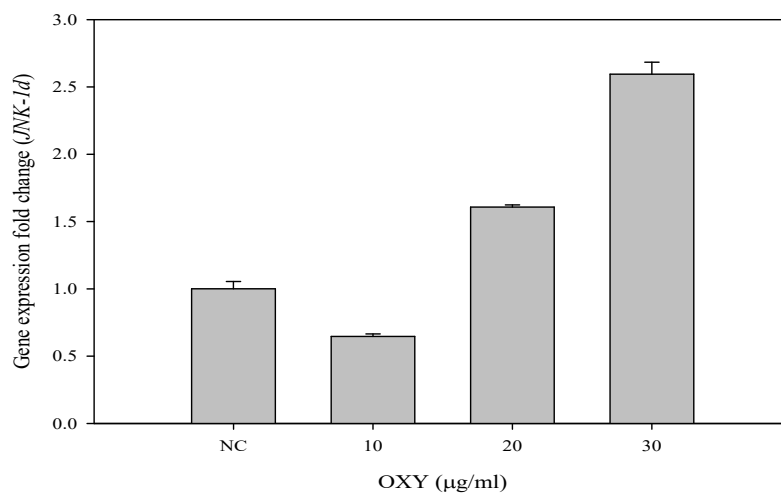


Fig. 21. Oxyresveratrol의 MAPK 경로 유전자 (*JNK- α 1*)의 발현량 변화.

5.3. PKC inhibitor(GF109203X)에 의한 세포간극(tight junction)관련 유전자 및 PKC, MAPK 경로 유전자의 발현량의 변화

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 20 µg/ml를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 20 µg/ml만 처리한 군 보다 세포간극(tight junction)관련 유전자의 발현량이 낮았다(Fig. 22). 특히 PKC inhibitor(GF109203X)만 처리한 군에서 발현량이 가장 낮았다. 이 결과는, oxyresveratrol 에 의한 세포간극 유도는 PKC 경로 활성화에 의해 유도된다는 것을 보여준다. 아무것도 처리하지 않은 Negative control (NC)와 t-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의한 결과를 얻었다.

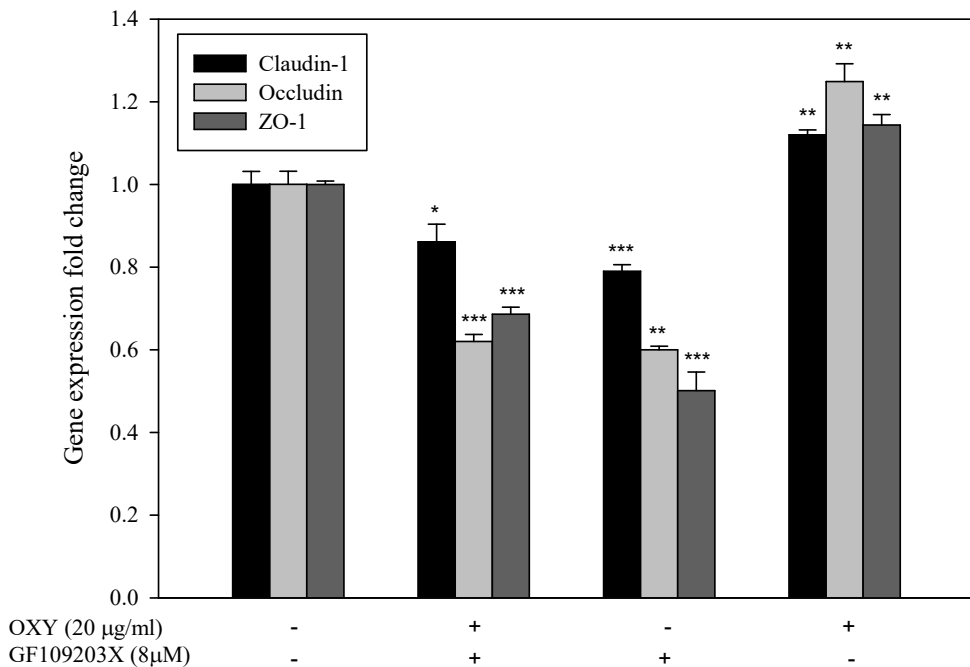


Fig. 22. PKC inhibitor(GF109203X)에 의한 세포간극(tight junction)관련 유전자 발현량 변화. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 20 µg/ml를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 20 µg/ml만 처리한 군 보다 PKC 경로 유전자 관련 유전자의 발현량이 낮았다(Fig. 23). 특히 PKC inhibitor(GF109203X)만 처리한 군에서 발현량이 가장 낮았다.

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 20 µg/ml를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 20 µg/ml만 처리한 군 보다 MAPK 경로 유전자 관련 유전자의 발현량이 낮았다(Fig. 24). 특히 PKC inhibitor(GF109203X)만 처리한 군에서 발현량이 가장 낮았다. 이 결과를 통해 MAPK 경로의 활성화는 PKC 경로에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

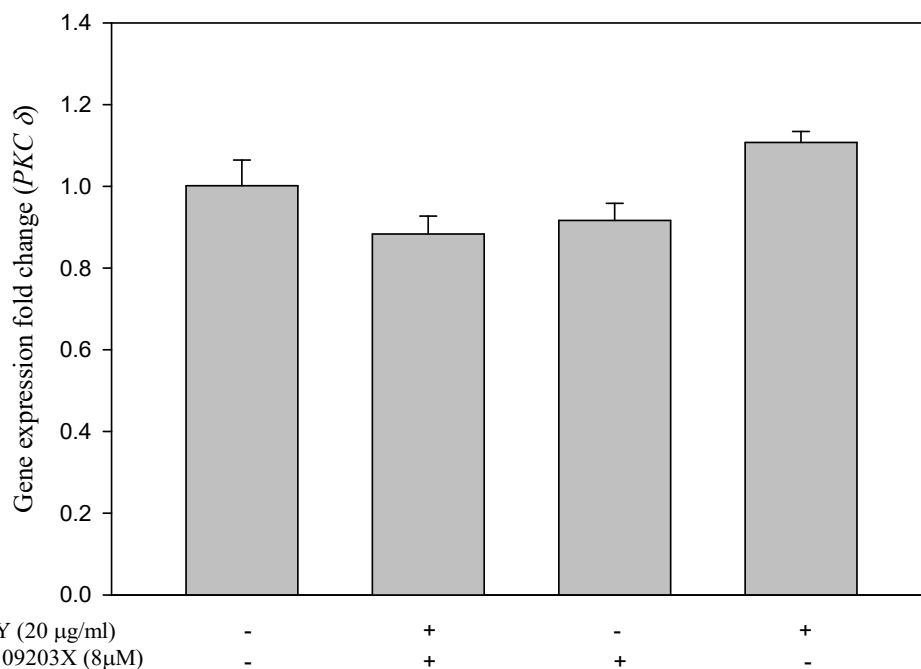


Fig. 23. PKC inhibitor(GF109203X)의 PKC 경로 유전자(*PKC δ*) 발현량 변화.

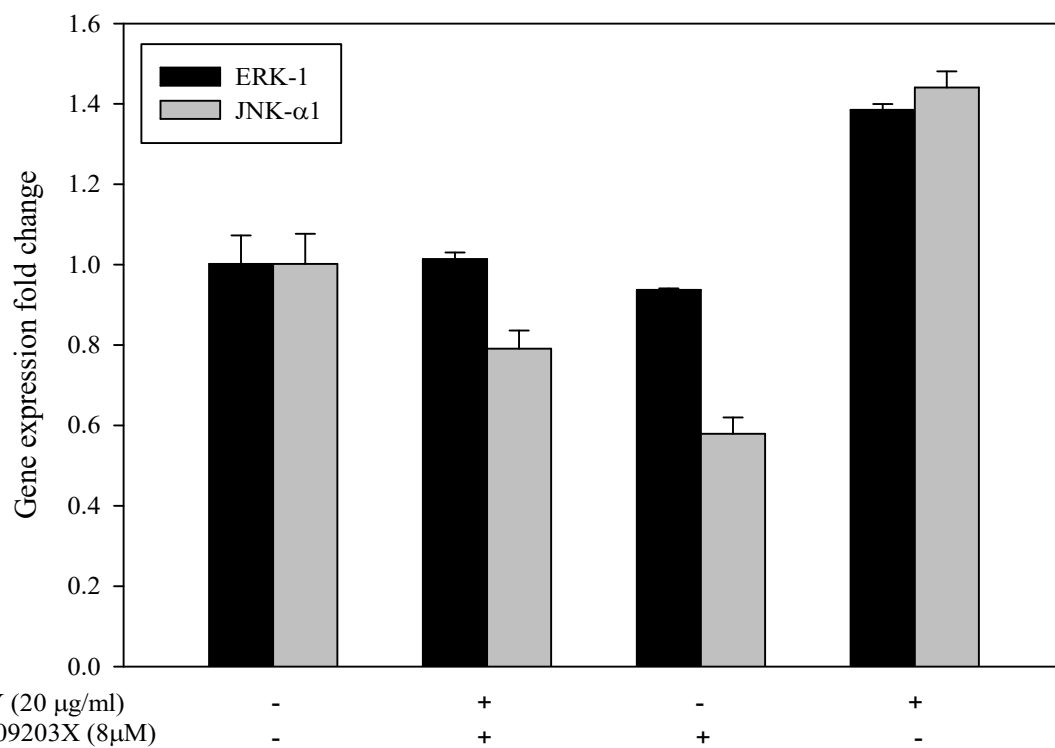


Fig. 24. PKC inhibitor(GF109203X)의 MAPK 경로 유전자(ERK-1, JNK-α1) 발현량 변화.

6. 상지의 대장염 마우스 모델에서의 항염증 활성 측정

6.1. 상지의 대장염 모델에서의 병변 억제 효과

대장염 모델의 병리학적 완화효과를 알아보기 위해 몸무게 변화와 질병의 정도를 Table 1의 기준에 따라 측정하였다. 그 결과, 2% DSS만 공급한 양성대조군 (PC)은 물만 공급한 음성대조군 (NC, 100%)을 기준으로 몸무게가 93.2%로 감소하였지만, 상지추출물 (ERM)을 공급한 그룹은 94.5, 96.2, 97.7% (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM)로 유지되었다 (Fig. 25A). 변의 무르기 정도와 피의 유무를 관찰하여 대장염증지수 (DAI)를 측정한 결과 PC (100%)을 기준으로 ERM을 공급한 그룹은 79.3, 72.4, 58.6%로 감소되었다 (Fig. 25B).

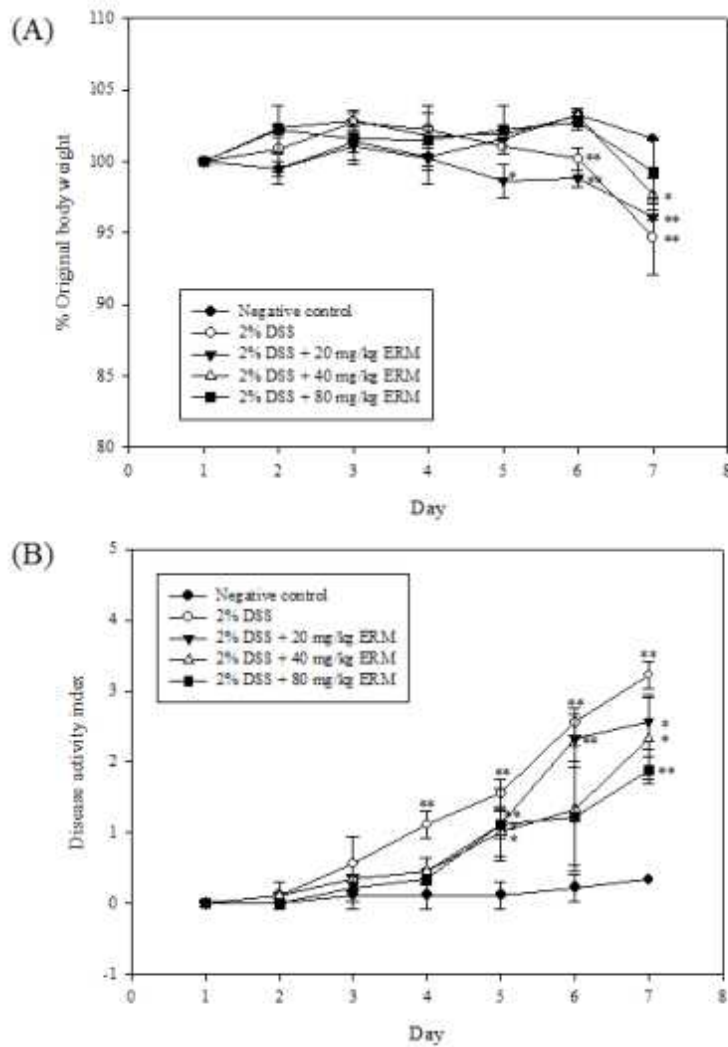


Fig. 25. 대장염 모델에서의 상지추출물의 병변 억제 효과.
몸무게 측정 (A)과 대장염증지수 (B) 측정

6.2. 대장 길이와 비장 무게에 대한 영향

대장염모델의 장 길이를 측정된 결과, NC (96.7 ± 6.1 mm, 100%)에 비해 2% DSS만 공급한 양성대조군 (PC) (69.5 ± 2.3 mm, 71.9%)의 장 길이가 상당히 감소되었다. 하지만 ERM을 처리한 그룹은 각각 76.8 ± 4.9 (79.5%), 80.0 ± 5.8 (82.8%), 81.8 ± 5.4 mm (84.7%) (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM)으로 장 길이가 길게 유지되었다 (Fig. 26A,B). 비장 비대는 염증 정도를 반영한다. 비장 무게를 측정된 결과, NC (2.5 ± 0.2 , 100%)에 비해 PC (6.7 ± 1.6 , 267.7%)로 비장의 무게가 증가하였다 (Fig. 26C,D). 하지만 ERM을 처리한 그룹은 각각 5.3 ± 0.8 (212.1%), 5.2 ± 1.4 (208.1%), 4.7 ± 0.7 (186.3%) (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM) 으로 감소하였다.

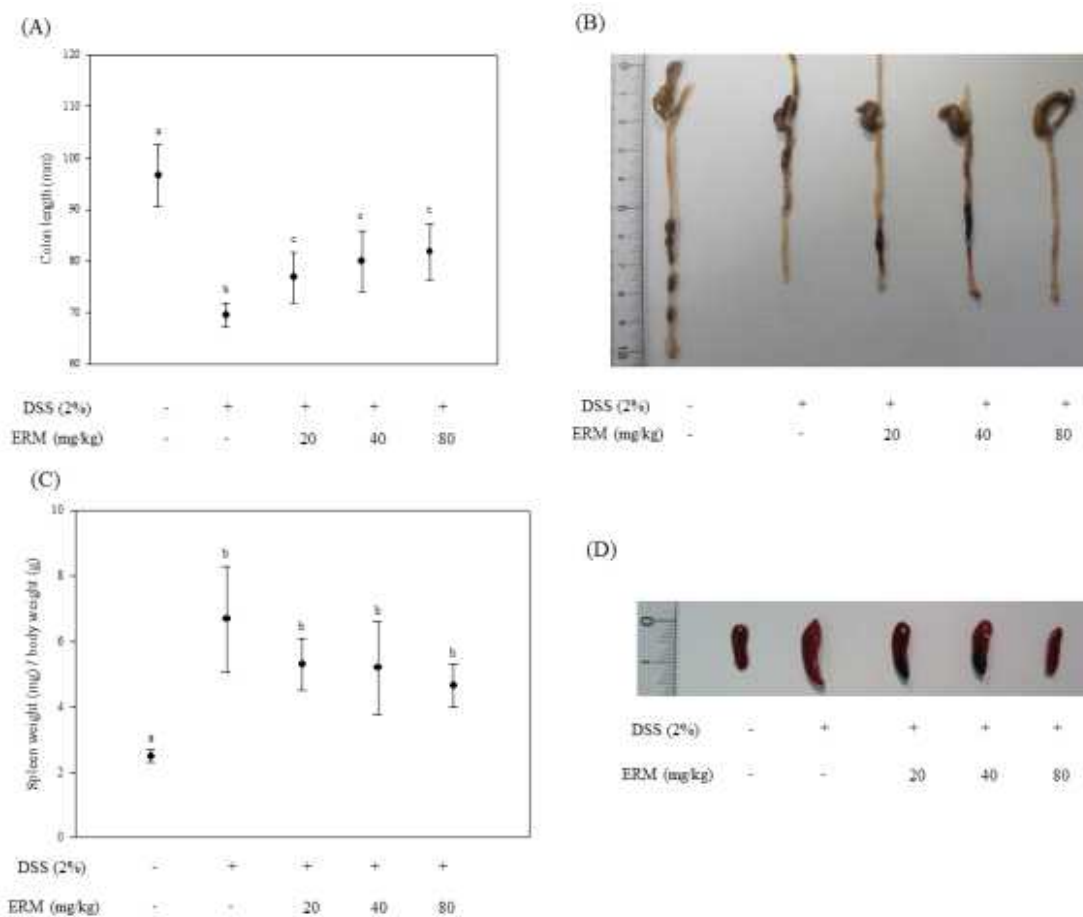


Fig. 26. 상지추출물의 대장염모델의 장 길이와 비장무게 변화효과.
장 길이 변화 (A, B)와 비장무게 변화 (C, D)

6.3. 장 조직에서 iNOS2와 COX-2 발현에 대한 영향

대장염모델에서 염증 매개인자인 COX-2, iNOS2를 측정하였다. 그 결과 COX-2 단백질이 12.4, 25.6, 47.7% (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM)로 감소되었다 (Fig. 27). iNOS2 단백질도 각각 33, 43, 41.1 % (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM)로 감소되었다.

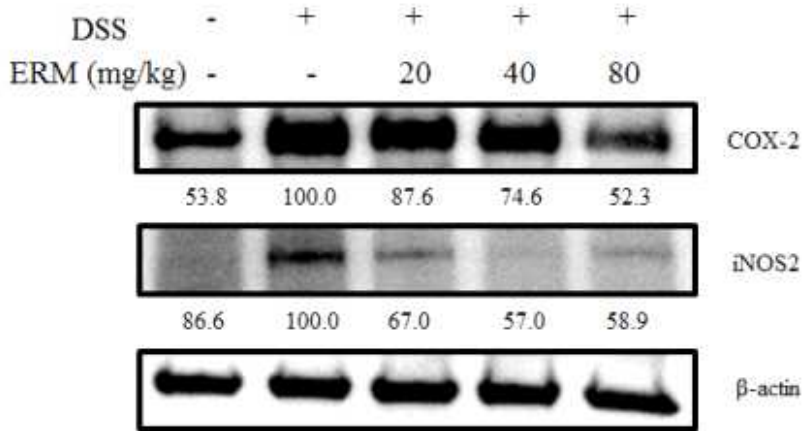


Fig. 27. 대장염모델에서의 상지추출물의 COX-2, iNOS2 억제효과.

6.4. 혈청에서 전 염증성 사이토카인 (IL-6)에 대한 영향

동물의 분리 된 혈청에서 multiplex kit를 이용하여 6개 (IL-6, MCP-1, TNF- α , IL-10, IFN- γ , IL-12p70)의 사이토카인을 측정해보았는데, 그 중 IL-6만이 검출되었다. IL-6 값은 0.21 ± 0.37 (NC), 41.87 ± 8.67 (PC), 28.35 ± 12.37 (20 mg/kg ERM), 27.70 ± 9.6 (40 mg/kg ERM), 17.07 ± 6.30 (80 mg/kg ERM) pg/ml로 ERM 농도 의존적으로 감소되었다 (Fig. 28).

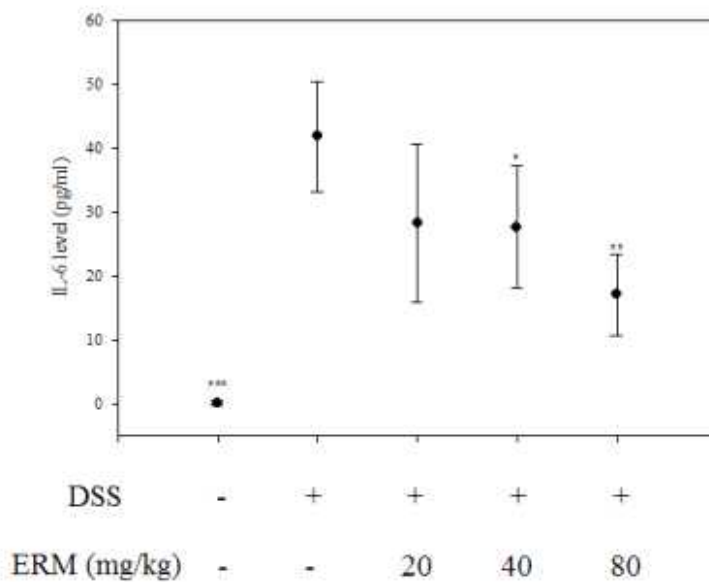


Fig. 28. 대장염모델에서의 상지추출물의 IL-6 억제효과.

6.5. 조직 변화에 대한 영향

대장염 모델에서 뮤신 생성을 측정하기 위해 대장을 분리하여 Alcian blue 염색을 진행하였다 (Fig. 29A). 뮤신 생성을 수치로 표시하기 위해 Metamorph 프로그램을 이용하여 뮤신 생성량을 측정한 결과 PC (85%)은 NC (100%)에 비해 뮤신생성이 15% 감소한 반면, ERM을 공급한 그룹은 88.6, 112, 98.6%로 높게 유지되었다 (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM) (Fig. 29B).

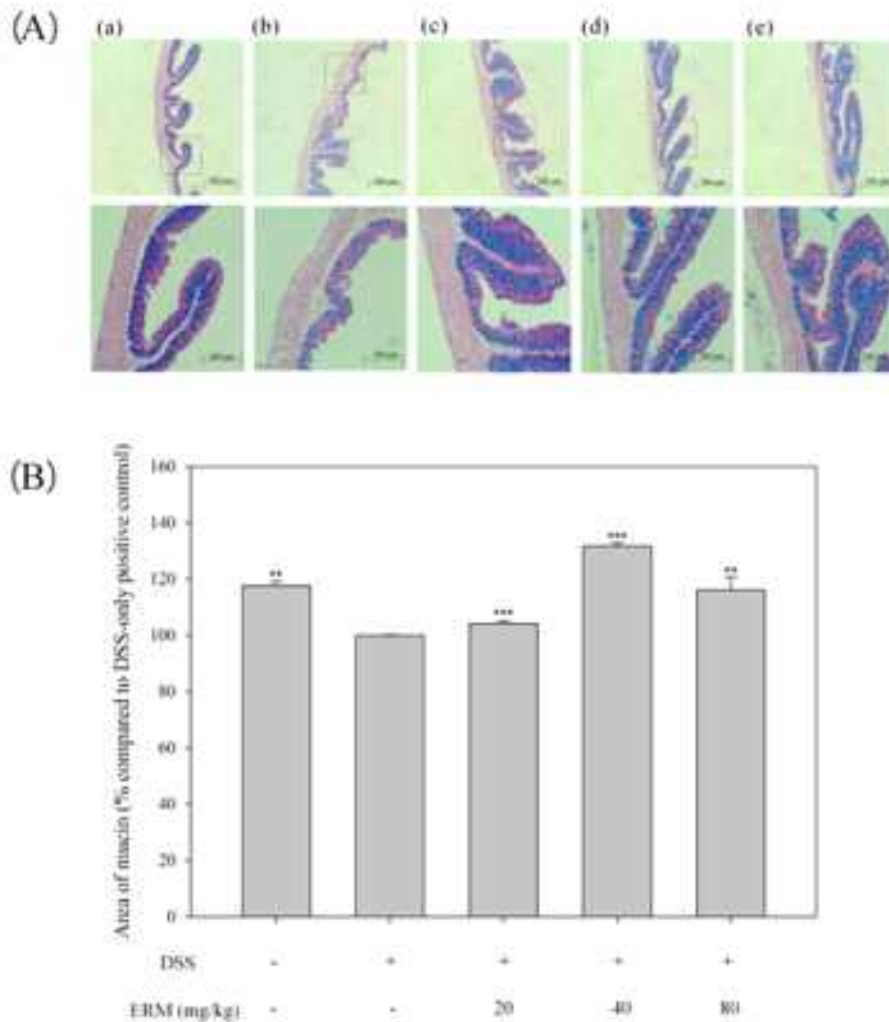


Fig. 29. 대장염모델에서의 상지추출물에 의한 mucin생성 변화 측정.

(A) 대장 조직 Alcian blue 염색, (B) mucin생성 변화량

(a) NC, (b) 2% DSS, (c) 20 mg/kg ERM, (d) 40 mg/kg ERM, (e) 80mg/kg ERM

7. 결과 요약

7.1. 상지주정추출분말의 항산화 효과

상지주정추출분말의 항산화력을 측정한 결과, chemical-based assay인 β -carotene bleaching assay, HRPO assay, Taurine test에서 뚜렷한 항산화 활성을 나타내었고 특히 Taurine test에서 측정한 HOCl 소거능은 trolox, ascorbic acid 보다 각각 1.4 배, 1.1배의 높은 항산화력을 나타내어 우수한 항염증 효과를 확인하였다. 또한 cellular-based assay인 CAA assay에서도 우수한 항산화력을 나타내어, 단순히 시험관 내에서 뿐만 아니라 살아있는 세포내에서의 항산화 효과를 확인하였다.

7.2. 상지주정추출분말의 항비만 효과

3T3-L1을 이용한 세포실험에서 상지주정추출분말의 지방분화 억제능을 측정한 결과, 해당 농도에서의 세포독성은 나타나지 않았고, lipid accumulation은 농도 의존적으로 현저히 감소함을 나타내어 우수한 항비만 효과를 확인하였다.

7.3. Oxyresveratrol에 의한 장내 염증성 질환을 예방 효과 측정

Oxyresveratrol과 상지주정추출분말이 장에 미치는 영향을 알아보기 위해서 크게 두 가지 실험을 진행하였다. 첫 번째로 물질 처리시 뮤신 증가량을 측정하였고, 두 번째로 물질 처리시 장 세포의 tight junction이 어떻게 변화하는지 측정하였다. 그 결과 Oxyresveratrol과 상지주정추출분말은 농도 의존적으로 장내의 뮤신 분비에 효과가 있었다. 또한 oxyresveratrol은 장 세포의 tight junction과 관련된 유전자와 단백질 발현량을 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 그러므로, oxyresveratrol과 상지주정추출분말은 장에 긍정적인 영향이 있음을 알 수 있었다.

7.4. Oxyresveratrol에 의한 *Caenorhabditis elegans*의 수명연장 효과

7.4.1. *C. elegans*를 이용한 oxyresveratrol(100 μ M ~ 1000 μ M)의 수명연장 효과를 측정한 결과 농도 의존적으로 유의하게 수명이 연장되는 것을 확인하였다.

7.4.2. Oxyresveratrol에 의한 수명연장 효과는 식이제한과 관련된 Sir2.1에 의한 효과로 추정된다.

7.5. Oxyresveratrol에 의한 장내 염증 예방 효과 측정

본 실험을 통해, oxyresveratrol은 human intestinal Caco-2 epithelial cell의 세포간극(tight junction) 관련 단백질을 유도시켜 장 투과도를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있

었으며, 이런 효과는 oxyresveratrol이 PKC (protein kinase C) 경로를 활성화 시키고, 활성화된 PKC로 인한 MAPK(mitogen-activated protein kinases) 경로 활성화에 의해 세포간극 유전자 발현 및 단백질 발현을 증가시키는 작용기전에 의해 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

7.6. 상지의 대장염 마우스 모델에서의 항염증 활성 측정

본 실험에서는 상지추출물 (ERM)의 대장염 억제효과를 알아보았다. 유병 완화 효과를 알아보기 위해 대장염 마우스의 몸무게변화를 측정하고 변의 무르기와 피의 유무로 유병지수 점수를 매긴 결과, 상지추출물을 투여한 마우스의 몸무게는 2% DSS 만을 투여한 마우스보다 정상에 가깝게 유지되고 유병지수 또한 낮았다. 또한, 상지추출물을 투여한 마우스의 장의 길이가 2% DSS만 공급한 양성대조군에 비해 정상에 가깝게 유지되었고, 비장의 무게 또한 낮게 유지되었다. 상지추출물의 염증 완화정도를 측정하기 위해 염증매개인자인 COX-2, iNOS2와 pro-cytokine인 IL-6을 측정한 결과, 이 역시 상지추출물을 투여한 마우스에서 낮게 유지되었다. 조직학적 변화에서는 alcian blue 염색을 이용하여, 뮤신생성 변화량을 비교해 보았는데, PC 마우스의 장내 뮤신생성은 NC에 비해 크게 감소된 반면, 상지추출물 투여그룹은 높게 유지되었다. 결론적으로 상지추출물은 여러 가지 염증매개인자를 감소시키고, 뮤신 생성을 증가시킴으로서 대장염을 억제시킴을 알 수 있었다.

제4절 제3협동연구 결과 및 고찰

1. 상지주정추출분말의 항염증시험

1.1. 상지주정추출물의 항염증 효과

상지주정추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해서 마우스의 대식세포 (Macrophage)인 Raw264.7 세포에 그람음성세균의 내독소인 Lipopolysaccharide (LPS)에 의한 염증유발 실험모델에서 상지주정추출물의 처리에 의한 효과를 관찰함.

대식세포주인 Raw264.7 세포에 LPS를 투여 하였을 때 IL-6 사이토카인의 전사되는 발현양이 시간별로 증가함을 확인하였음(Fig. 1).

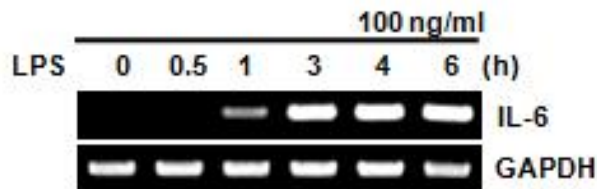


Fig. 1. Raw264.7 대식세포에서 LPS에 의한 IL-6 발현.

상지주정추출물 (Morus alba)과 대조군인 oxyresveratrol은 LPS에 의해 증가하는 IL-6의 전사되는 양과 단백질로 생산되어 세포 밖으로 내뿜어 내는 양이 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었음(Fig. 2).

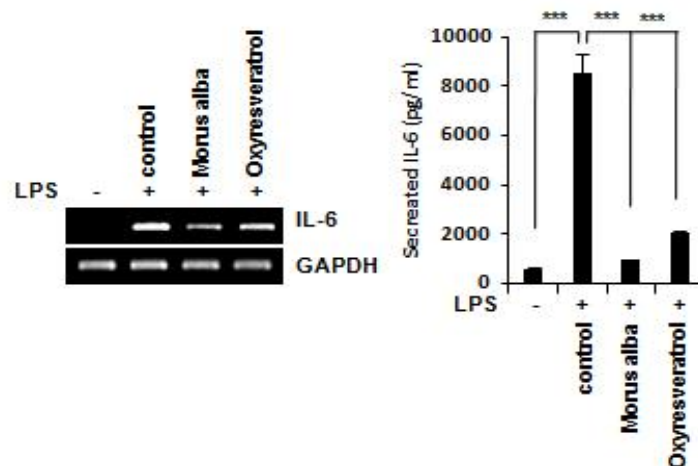


Fig. 2. 상지주정추출물과 oxyresveratrol에 의한 IL-6 감소.

이러한 결과는 LPS로 유도되는 대식세포의 IL-6의 염증반응은 상지주정추출물에 의해 감소되어 상지주정추출물이 항염증 효과가 뛰어난 것을 확인함.

1.2. 상지주정추출물의 항염증 반응에서 BLT2 연관성

기존의 연구를 통해 BLT2는 G-protein coupled receptor로 염증상황에서 발현되어, 여러 염증성 사이토카인의 증가에 관여한다고 알려져 있음. 최근에 보고에 의하면 마우스에서 분리된 복막염증의 대식세포 (peritoneal macrophage)에서 BLT2가 염증반응에 있어 중요한 조절 인자임을 보고하였음. 이에 따라 상지주정추출물이 염증반응의 중요한 단백질인 BLT2와의 연관성을 확인해 보고자 실험하였음.

1.2.1. 염증매개물질인 BLT2와의 연관성을 확인 하기위해 대식세포인 Raw264.7 (macrophage)에 LPS로 IL-6 사이토카인이 증가하는 염증반응 조건에서 상지주정추출물의 BLT2 발현 조절을 확인

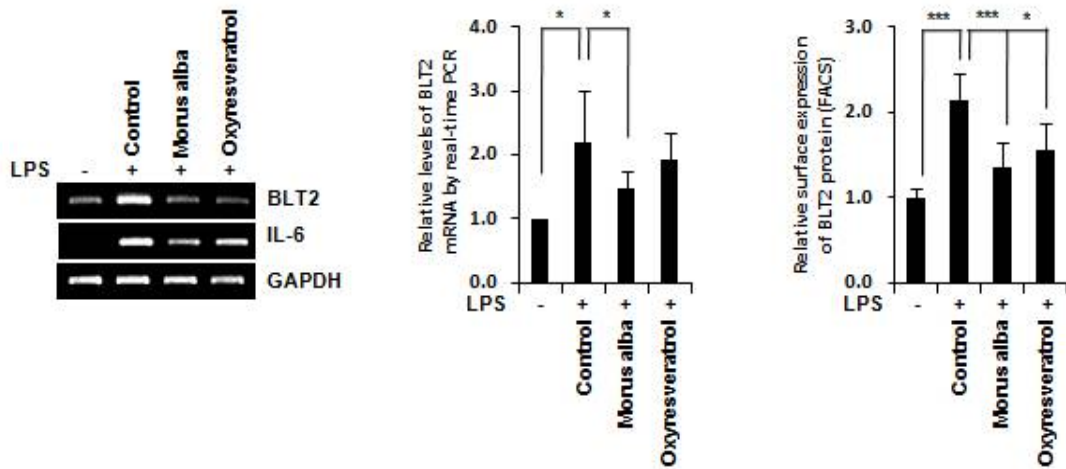


Fig. 3. 상지주정추출물의 BLT2 발현 조절.

대식세포에서 LPS의 처리에 의해서 BLT2의 전사, 단백질 발현 모두 증가되었으나 상지주정추출물 첨가시는 BLT2의 전사발현과 단백질 발현 모두 감소하였음(Fig. 3).

1.2.2. 대식세포에서 LPS로 유도된 BLT2 단백질이 IL-6 사이토카인의 생성에 관여하는지 BLT2의 억제를통해 확인

BLT2를 억제 시키기 위해서 RNAi 방법과 BLT2의 길항제인 LY255283을 사용하였고, LPS로 증가하는 IL-6 사이토카인의 전사 발현이 BLT2 siRNA를 이용한 RNA 간섭을 통해 감소되고 있음을 확인함. 추가적으로 BLT2 길항제인 LY255283에 의한 BLT2의 억제에서도 IL-6 사이토카인의 전사발현과 단백질 발현에서도 감소시키고 있음을 확인함. 하지만 BLT2의 리간드인 LTB4의 동일한 수용체인 BLT1 길항제인 U75302의 경우에는 영향이 없는 것을 확인(Fig. 4). 이것을 통해 BLT2가 LPS에 의한 IL-6 사이토카인 발현에 있어 중요한 조절 인자임을 확인할 수 있었음.

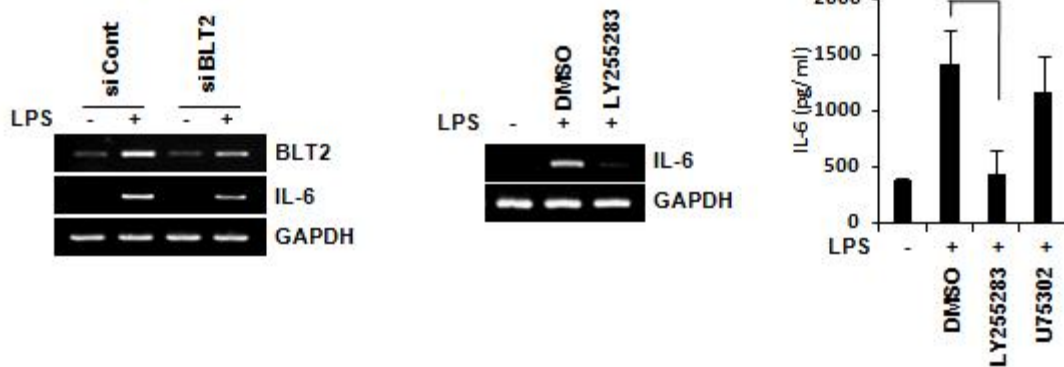


Fig. 4. BLT2에 의해 조절되는 IL-6의 발현.

1.2.3. LPS로 유도되는 마우스 패혈증모델에서 BLT2 억제에 의한 항염증작용 확인

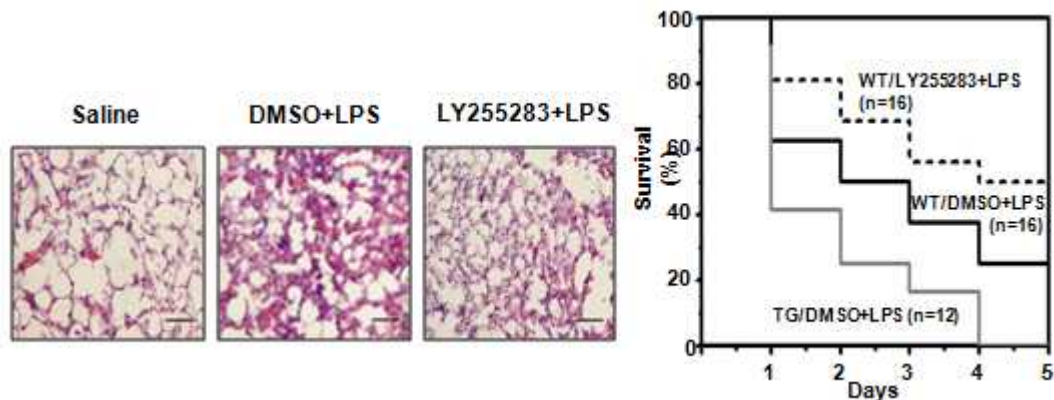


Fig. 5. BLT2 억제에 의한 마우스 패혈증 감소 확인.

BLT2를 억제 시키기 위해 BLT2의 길항제인 LY255283을 마우스의 복강에 투여 하였고, 폐의 염증과 마우스의 생존률을 확인함. 결과에서 BLT2의 억제에 의해서 LPS로 유도된 폐의 염증이 감소됨을 확인함. 그리고 BLT2의 길항제를 처리 한 마우스에서 생존률이 증가함을 확인하였고, BLT2 과발현 마우스 (TG)에서 LPS에 의한 생존률이 더 감소됨을 확인함(Fig. 5).

2. 상지주정추출물의 BLT2-NOX1의 억제를 통한 항산화 작용

기존의 BLT2연구에서 BLT2 단백질은 하위단계에 NOX를 조절한다고 보고되었고, BLT2에 조절된 NOX는 활성 산소 (ROS)를 생성하여, 여러 염증성 현상을 촉진한다고 보고함. 이에 상지주정추출물에 의한 BLT2의 억제에 의한 항염증 작용 메커니즘에 NOX에 의한 ROS가 영향을 받을지 확인함.

2.1. 상지주정추출물의 항산화작용 메커니즘을 확인하기 위해 먼저 상지주정추출물의 항산화 효과를 확인함.

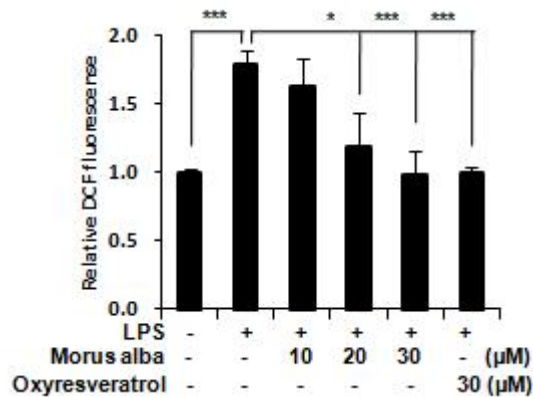


Fig. 6. 상지주정추출물의 항산화 작용.

LPS로 인해 증가한 DCF fluorescence (ROS 생성 지표)가 상지주정추출물을 농도 의존적으로 처리 하였을 때 DCF 형광 값이 감소함을 확인. 상지주정추출물이 뛰어난 항산화작용을 하고있음을 확인함. 그리고 oxyresveratrol과 비슷한 수치의 항산화작용을 하고 있는 것을 확인함(Fig. 6).

2.2. 상지주정추출물에 의해서 감소하는 ROS가 NADPH oxidase 1 (NOX1)에 의한 증가임을 확인함

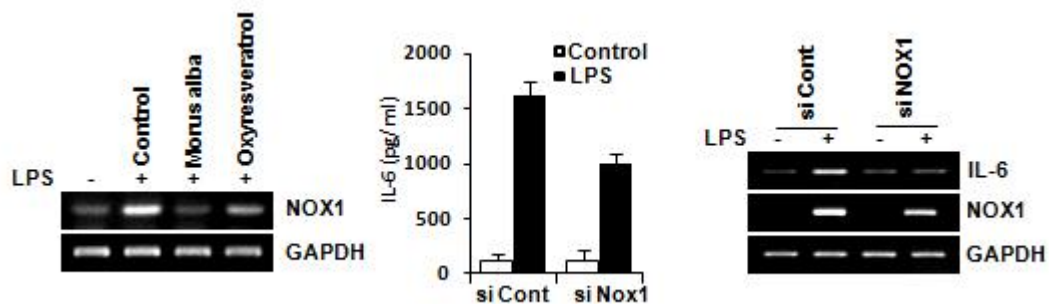


Fig. 7. 상지주정추출물의 NOX1 억제.

LPS에 의해서 증가하는 NOX1 전사단계에서의 발현이 상지주정추출물에 의해서 현저히 감소되는 것을 확립할 수 있었고, 이때 oxyresveratrol 보다 더 많이 감소시킴을 확인함. 추가적으로 NOX1에 의한 활성산소 (ROS)가 IL-6 사이토카인의 발현에 영향을 주는지 NOX1의 siRNA를 이용한 RNA간섭으로 확인해 본 결과 LPS로 증가하는 IL-6 사이토카인의 전사발현, 단백질 발현양이 NOX1의 억제에 의해서 감소시키고 있음을 확인. 이것으로 상지주정추출물의 항산화 작용은 NOX1에 의한 활성산소를 억제하여 나타나는 현상임을 확인함(Fig. 7).

2.3. 활성산소 조절 측정

상지주정추출물에 의해서 억제되는 NOX1에 의한 활성산소가 BLT2에 의해 조절 받는지 확인해 보기 위해서 BLT2의 간섭현상으로 NOX1의 전사발현양을 확인함. 실험결과 BLT2의 억제를 통해 NOX1이 감소되는 것을 확인하였고, 활성산소 (ROS) 도 감소하고 있음을 확인함(Fig. 8). 이 결과를 통해서 상지주정추출물에 의한 항염증 메커니즘에 BLT2-NOX1-ROS-IL-6의 억제에 의한 것임을 확인하였음.

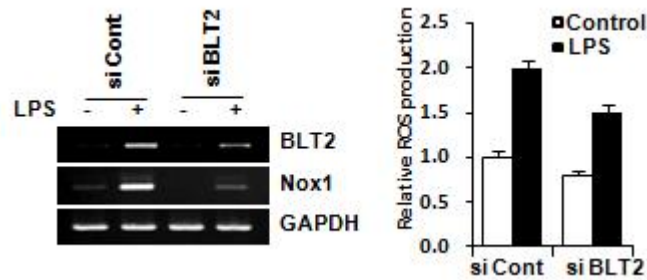


Fig. 8. BLT2에 의한 NOX1-ROS 조절.

3. 상지주정추출물의 세포사멸 억제 작용

LPS로 유도되는 염증반응은 염증성 사이토카인을 증가시키므로 인해 세포의 사멸을 유도한다고 알려져 있다. 이에 근거 하여 상지주정추출물이 염증반응에 의한 세포 사멸에서 억제작용을 확인함.

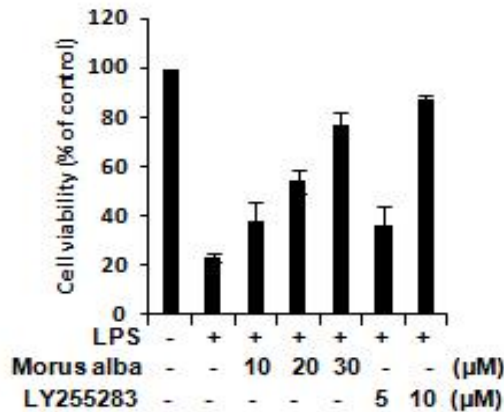


Fig. 9. 상지주정추출물의 세포사멸 억제.

LPS에 의한 염증반응에 의해 48시간 뒤의 대식세포 (macrophage)는 약 80% 정도의 세포사멸이 유도되는 것을 확인함. 이때 상지주정추출물의 처리는 세포사멸을 현저하게 억제시키고 있는 것을 확인 할 수 있었음. 뿐만 아니라 상지주정추출물의 타깃인 BLT2 (염증조절인자)의 길항제 (LY255823)에 의해서도 세포사멸이 감소됨을 확인(Fig. 9).

3.1. 상지주정추출물에 의한 염증성 사이토카인 조절에 있어 활성산소 메커니즘 규명

본 연구팀에서는 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 interleukin-6 (IL-6) 염증반응에서 상지주정추출물의 효능을 검증하였다. IL-6는 염증반응에서 중요한 매개역할을 수행하는 cytokine으로서 그 발현이 대식세포에 의해 유도되는 현상이 밝혀져 왔다¹³. 우리는 LPS에 의한 IL-6 생성을 확인하기 위하여 마우스 대식세포인 Raw264.7 cell을 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 LPS로 유도되는 IL-6의 생성을 확인하기 위하여 시간별로 LPS를 처리 하였을 때 증가되는 IL-6의 양을 ELISA로 정량하였다. Fig. 10의 왼쪽 그래프에서처럼 IL-6의 양이 LPS처리 후 6시간부터 증가하여 12시간에서 가장 많은 증가를 보이는 것을 확인하였다. 이 시간별 실험결과를 토대로 상지주정추출물(RME)과 대조군인 oxyresveratrol(OXY)의 LPS로 유도되는 IL-6 발현 감소효과를 검증하였다.

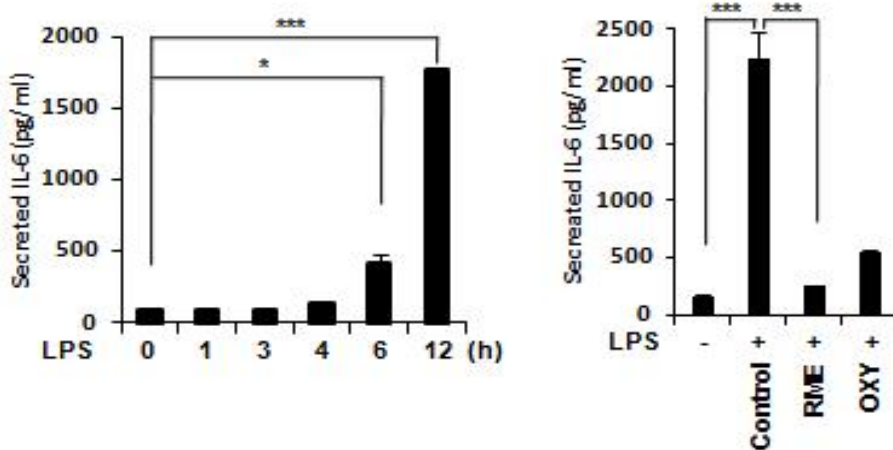


Fig. 10. RME의 LPS로 증가된 염증성 사이토카인 IL-6 억제 효능.

기존의 연구를 통하여 뽕나무추출물은 항산화 효능이 뛰어난 것이 밝혀졌다⁷. 우리는 그중에서도 가지에 해당하는 상지주정추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해서, 활성산소를 측정할 수 있는 DCF-DA를 이용하여 LPS로 유도되는 ROS의 양을 확인하였다. 그 결과, LPS로 유도된 ROS가 상지주정추출물의 처리농도에 의존적인 감소를 보이는 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 11, 왼쪽) 기존의 연구에서 LPS에 의해서 증가하는 ROS는 NADPH oxidase 1 (NOX1)란 효소에 의해 생성되는 것이 보고된 바 있다^{14,15}. 따라서 우리는 RME가 조절하는 ROS가 NOX1의 발현조절에 의한 것인지를 확인하는 실험을 진행하였다. 그 결과 Raw264.7 세포에서 LPS로 증가된 NOX1과 RME 처리에 의해서 NOX1 유전자의 발현이 감소하는 것을 RT-PCR을 통하여 확인할 수 있었다. (Fig. 11, 중앙) 또한 실제로 직접적인 NOX1 억제에 의한 ROS 감소를 확인하였을 때도 siRNA NOX1에 의해서 LPS로 증가된 ROS가 감소함을 확인함으로써 (Fig. 11, 오른쪽) RME가 NOX1의 억제를 통하여 항산화 효과를 보인다는 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 11)

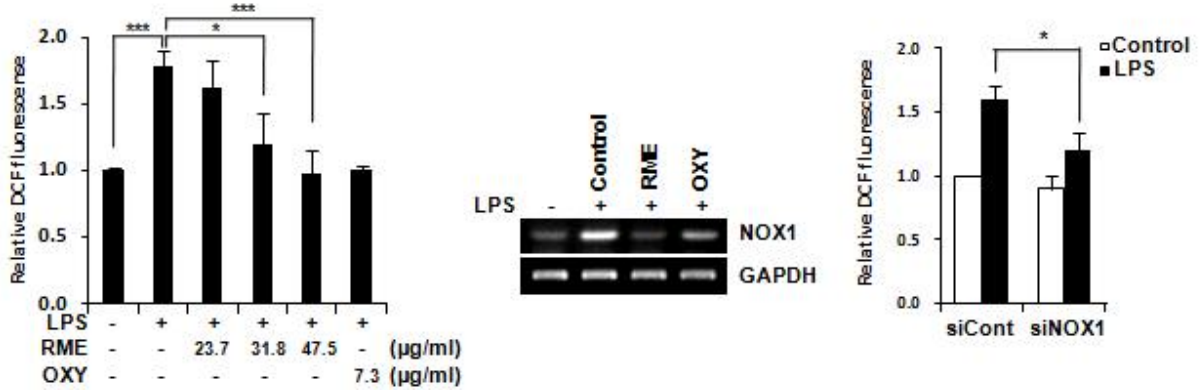


Fig. 11. LPS로 유도되는 NOX1에 의한 ROS가 RME에 의해 억제.

3.1.1. 대식세포주인 Raw264.7에서 NOX1에 의한 ROS생성이 IL-6의 전사인자인 NF-κB에 의해서 조절됨을 확인

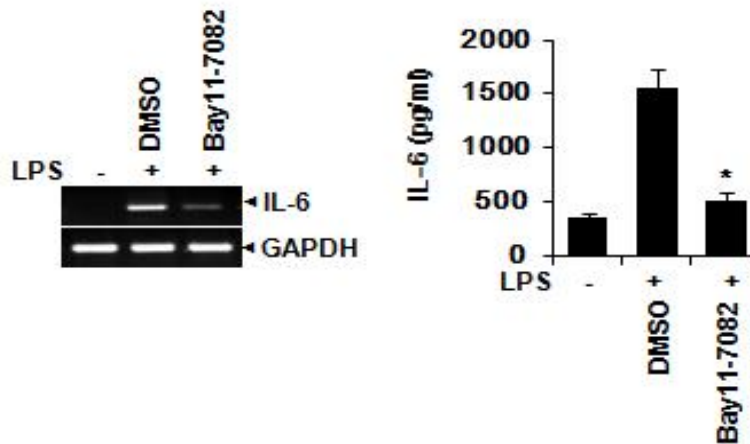


Fig. 12. NF-κB억제와 IL-6의 발현 억제.

NF-κB는 대표적인 IL-6를 증가시키는 기능을 하는 전사인자로 알려져 있다¹⁶. 따라서 실제로 본 실험모델에서도 NF-κB를 억제하였을 때 IL-6 감소가 유도되는지를 확인해 보았다. LPS를 처리한 Raw264.7 세포주에서 NF-κB 억제제로 잘 알려져 있는 Bay11-7082를 처리하였을 때 IL-6 생성이 억제되는 것을 확인하였다. 이 실험을 통하여 LPS에 의한 IL-6 생성이 NF-κB에 의해서 유도됨을 확인하였다(Fig. 12).

3.1.2. NF- κ B와 BLT2 발현의 연관성을 확인하기 위하여, BLT2 억제에 의한 NF- κ B 활성 억제 확인

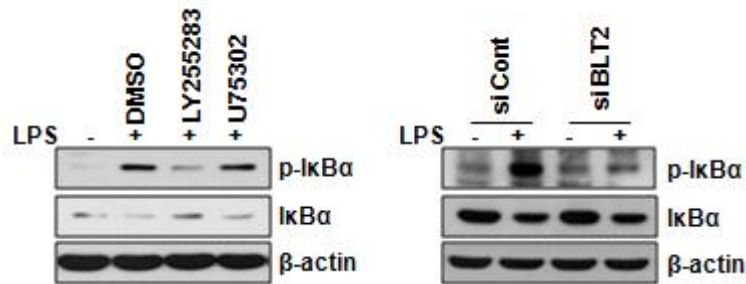


Fig. 13. BLT2 억제에 의한 NF- κ B 활성 억제 확인.

1년차 연구를 통하여 Leukotriene B₄ receptor 2 (BLT2)가 IL-6를 조절하는 현상을 보고하였다. 이 보고와 연관지어 IL-6의 중요한 전사인자인 NF- κ B의 활성 또한 BLT2가 조절하는지에 대한 추가적인 연구를 진행하였다. LPS가 처리된 Raw264.7 세포주에서 BLT2 억제제인 LY255283과 BLT2 RNA 간섭현상을 이용하여, NF- κ B의 활성화에 반드시 필요한 현상인 I κ B의 인산화가 감소되는 것을 확인하였다. 이를 통하여 LPS에 의해 증가한 NF- κ B의 활성이 BLT2에 의해서 조절됨을 확인하였다(Fig. 13).

3.1.3. LPS로 증가하는 NF- κ B 활성화에 대한 NOX1 의존성 여부 확인

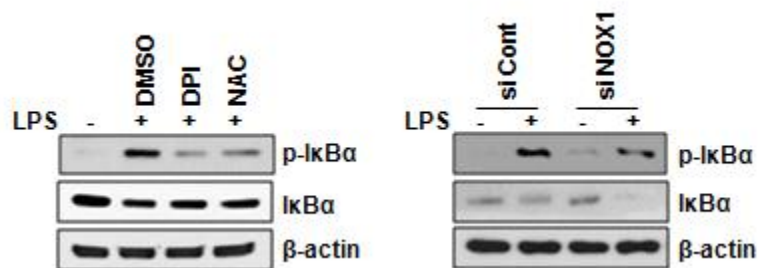


Fig. 14. NOX1의 억제에 의한 NF- κ B 활성 억제 확인.

또 다른 1년차 연구에서 LPS가 BLT2-NOX1을 조절함으로써 IL-6의 발현을 유도하며, RME가 BLT2를 억제함으로써 IL-6를 감소시킨다고 보고한 바 있다. 또한 IL-6 발현에 있어 NF- κ B가 중요한 역할을 수행하는 것을 확인하였다. 이에 따라 BLT2의 하위 신호계인 NOX1의 억제에 의해서 실제 NF- κ B의 활성이 감소하는지를 확인하는 실험을 진행하였다. ROS 억제제인 NAC과 NOX 억제제인 DPI를 처리하였을 때 LPS로 유도되는 NF- κ B의 활성화를 확인한 결과, NF- κ B 활성화에 필수적인 I κ B의 인산화가 억제되는 것을 확인하였고, 또한 NOX1의 RNA 간섭현상을 이용한 유전자 억제에 의해서도 동일하게 I κ B의 인산화가 억제되는 현상을 확인하였다. 이를 통하여 NOX에 의해서 NF- κ B 활성이 조절됨을 검증하였다(Fig. 14).

이러한 결과를 통해 LPS로 유도되는 염증성 사이토카인인 IL-6가 BLT2-NOX1-NF- κ B 신호계에 의해서 그 발현이 조절됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 15).

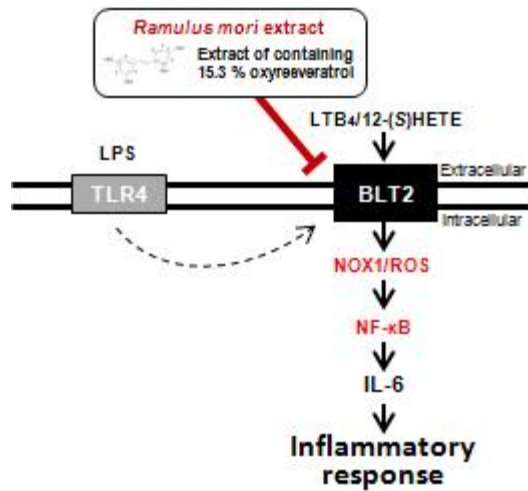


Fig. 15. BLT2-NOX1-NF-κB에 의한 IL-6 사이토카인 분비 모식도.

4. 상지주정추출분말의 BLT2 리간드 억제 메커니즘 규명

상지주정추출물(RME)이 BLT2를 억제함으로써 NOX1-ROS-NF-κB 신호계에 의해서 증가되는 염증성사이토카인인 IL-6를 감소시키는 현상을 밝혔다. G-protein coupled receptor인 BLT2의 특성상 리간드로 작용하는 물질과 결합함으로써 활성화되는 메커니즘을 가지고 있다. 따라서 LPS의 수용체인 toll-like receptor 4 (TLR4)의 활성화과정에서 BLT2 리간드 생성에 상지주정추출물이 미치는 영향을 확인하였다.

4.1. LPS로 인해 증가하는 BLT2 리간드에서 상지주정추출분말의 억제 효과 확인

LTB₄와 12(S)-HETE는 BLT2의 특이적인 리간드로서 BLT2에 결합하여 다양한 세포내 신호전달을 하는 것으로 알려져 있다¹⁷. 따라서 상지주정추출물이 LPS로 증가되는 BLT2 활성화에 중요한 두 종류의 리간드 생성에 미치는 효과를 ELISA를 이용하여 확인하였다.

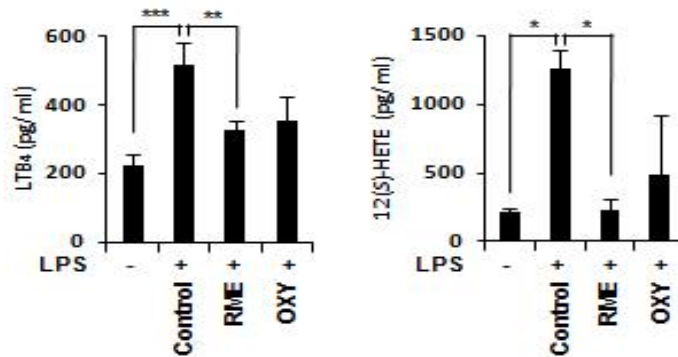


Fig. 16. 상지주정추출물의 BLT2리간드 억제효과 확인.

마우스 대식세포인 Raw264.7 세포에 LPS를 처리하였을 때, 먼저 BLT2의 리간드인 LTB₄와 12(S)-HETE가 증가하는 것을 확인하였다. 이때 LPS의 처리로 증가한 LTB₄와 12(S)-HETE가 RME의 처리에 의해서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 RME의 BLT2 억제현상이 BLT2 리간드인 LTB₄와 12(S)-HETE를 억제함으로써 나타나는 현상임을 확인하였다(Fig. 16)

4.2. BLT2의 리간드 생성에 중요한 효소인 5-lipoxygenase (5-LO)와 12-lipoxygenase (12-LO)의 발현에 미치는 상지주정추출물의 효과 확인

BLT2의 리간드인 LTB₄와 12(S)-HETE의 생성에는 각각 5-lipoxygenase (5-LO)와 12-lipoxygenase (12-LO)란 효소에 의해서 생성되는 것이 보고되었다¹⁸. 따라서 RME가 5-LO와 12-LO의 발현을 조절함으로써 BLT2의 리간드를 조절하는지를 검증하였다.

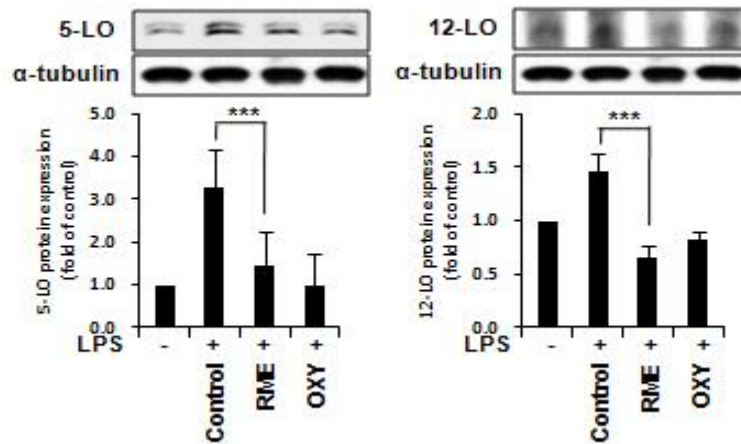


Fig. 17. 상지주정추출물의 5-LO, 12-LO 억제 효과.

먼저 Raw264.7세포에 LPS를 처리하였을 때 5-LO와 12-LO의 단백질발현이 증가하고 있는 것을 Western Blot을 기법을 통하여 확인할 수 있었고, 이때 RME에 의해서 각각의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통하여 상지주정추출물이 5-LO와 12-LO를 감소시킴으로써 BLT2 리간드인 LTB₄와 12(S)-HETE를 감소시켰음을 확인할 수 있었다(Fig. 17)

4.3. 5-LO, 12-LO 생성에 필요한 Cytosolic phospholipases A₂ (cPLA₂)의 활성화에서 상지주정추출물의 효과 확인

LTB₄와 12(S)-HETE가 생성되기 위해서 필요한 5-LO, 12-LO의 상위에서 또 다른 효소인 cPLA₂가 활성화 되어야 한다. cPLA₂는 세포막 인지질로부터 arachidonic acid생성에 중요한 효소로서 염증 반응이나 면역반응에 의해서 활성화되는 것이 보고되었다^{19,20}. 따라서 상지주정추출물이 cPLA₂의 활성화에 관여되는지를 검증해 보았다.

cPLA₂의 활성을 측정하기 위하여 western blot을 활용한 cPLA₂의 인산화와 cPLA₂ 효소활성화 측정kit를 이용하여 확인하였다. LPS를 처리한 Raw264.7 세포에서 cPLA₂의 인산화가 증가하는 것을 확인할 수 있었고, RME에 의해서 cPLA₂의 인산화가 감소하고 있음을 western blot을 통해서 확인

할 수 있었다. 또한 cPLA₂ 효소활성화 측정kit를 사용하였을 때도 cPLA₂의 활성화가 LPS에 의해서 증가하고, RME에 의해서 감소하는 현상을 동일하게 확인할 수 있었다. 따라서 상지주정추출물(RME)에 의해서 cPLA₂의 활성이 감소하고 있음을 확인하였다(Fig. 18)

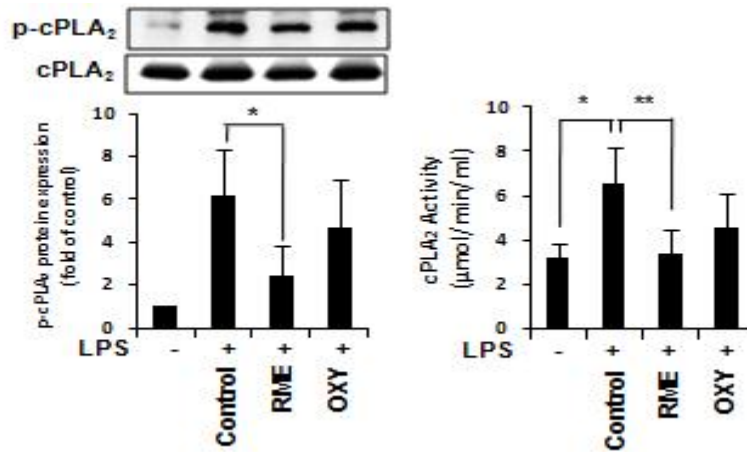


Fig. 18. 상지주정추출물의 cPLA₂ 활성 억제 효과.

4.4. cPLA₂의 인산화에 관여하는 kinase활성에 미치는 상지주정추출물의 효과 확인

cPLA₂는 인산화를 통해서 활성화되는 단백질로, 대표적인 인산화물질로서 p38 kinase가 작용하는 것이 보고되었다²¹. 따라서 cPLA₂의 인산화에 관여되는 대표적인 인산화효소인 p38 kinase의 활성에 상지주정추출물이 관여하는지를 검증해 보았다(Fig. 19).

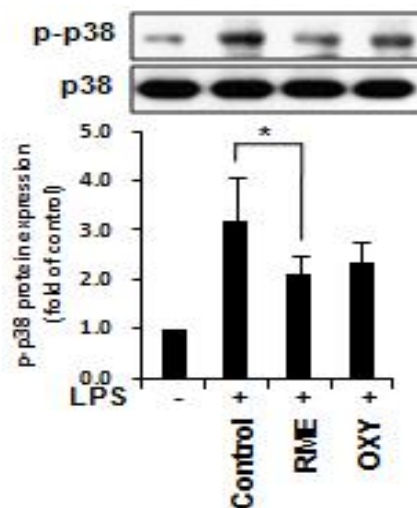


Fig. 19. 상지주정추출물의 p38 활성 억제 효과.

LPS를 처리한 Raw264.7 세포에서 p38 kinase의 활성화 상태를 의미하는 인산화가 증가되어 있음을 확인할 수 있었다. 이때 상지주정추출물(RME)처리에 의한 p38 활성을 확인한 결과 RME에 의해서

인산화가 감소되고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 LPS로 증가된 cPLA₂의 활성이 p38 kinase에 의한 것이며 RME는 바로 이 p38의 인산화를 억제시킴으로써 억제효과를 보이는 결과임을 확인하였다.

4.5. 상지주정추출물에 의해서 조절되는 cPLA₂, 5-LO, 12-LO의 억제에 의한 IL-6 감소 확인

지금까지의 연구를 통해서 상지주정추출물(RME)에 의해서 cPLA₂, 5-LO, 12-LO가 감소되는 것을 확인하였고, 실제로 cPLA₂, 5-LO, 12-LO를 억제하였을 때 염증성 사이토카인인 IL-6가 감소되는지를 확인하는 실험을 진행하였다.

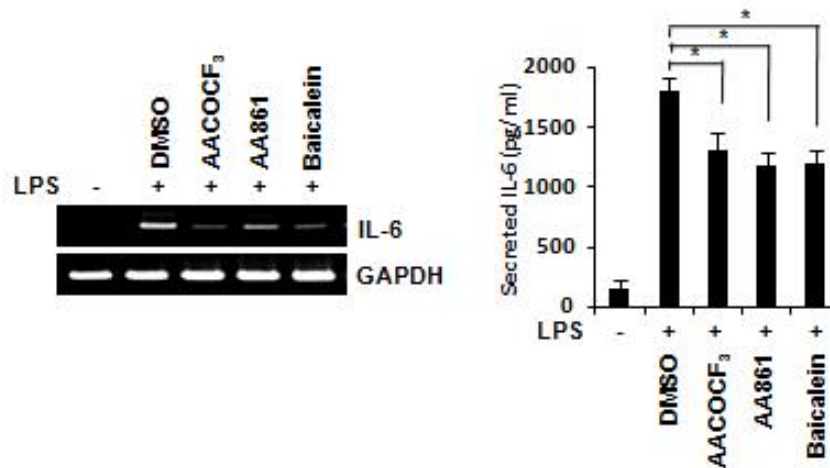


Fig. 20. cPLA₂, 5-LO, 12-LO 억제에 의한 IL-6 발현 확인.

LPS가 처리된 Raw264.7 세포에서 염증성 사이토카인인 IL-6가 증가하는 것을 확인 할 수 있었고, 이때 LPS로 증가된 IL-6의 발현이 cPLA₂의 억제제인 AACOCF₃, 5-LO 억제제인 AA861, 12-LO 억제제인 Baicalein에 의해서 감소되는 것을 RT-PCR 기법과 ELISA 정량을 통해서 확인하였다. 따라서 cPLA₂-5LO/12LO에 의한 BLT2 리간드 증가가 염증성사이토카인인 IL-6의 발현을 증가시키고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 20)

5. 고찰

실험결과들을 통하여 상지주정추출물(RME)이 뛰어난 항산화, 항염증 효과를 보이는 메커니즘을 규명하였다. 위 그림과 같은 LPS에 의한 IL-6 발현의 증가는 염증을 가속화 시키는 중요한 인자이고 이러한 염증 가속화 상황에 있어, RME가 p38 kinase의 활성을 억제하고 cPLA₂-5LO/12LO-LTB₄/12(SHETE)를 억제함으로써 BLT2의 리간드 생성을 억제하는 현상을 확인하였으며, 또한 BLT2가 NOX1-ROS-NF-κB 신호전달계를 통하여 염증성 사이토카인인 IL-6생성을 조절한다는 것을 밝혔다(Fig. 21). 이러한 발견은 기존에 밝혀지지 않았던 RME에 의한 항염증 메커니즘을 밝혔다는 점에서 큰 의의를 둘 수 있다. 더욱이 BLT2 신호계는 천식과 암을 포함하는 염증성질환과의 연관성이 보고되고 있기 때문에 뛰어난 항염증 효능을 갖고 있는 상지추출물이 앞으로 천연물질로서의 가치가 더 중요해질 것이다²²⁻²⁶.

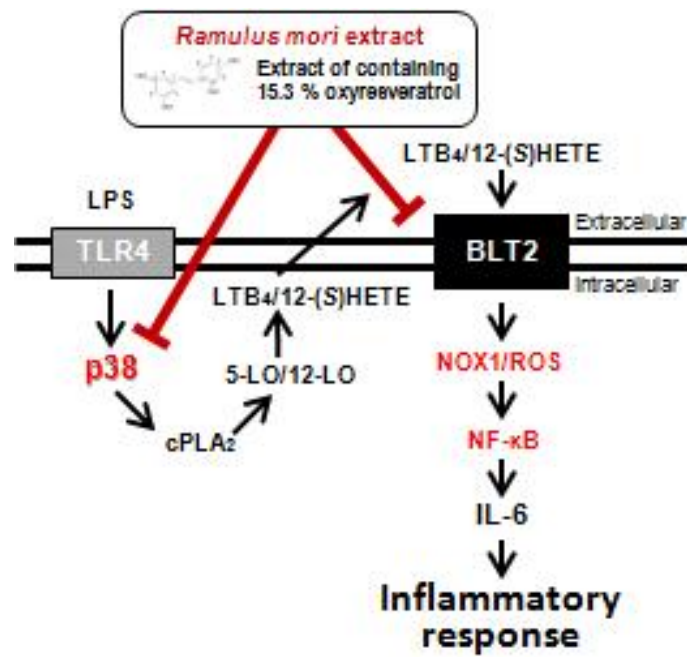


Fig. 21. 상지주정추출물의 함염증 메커니즘 도식표

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과 (해당사항 없음)
- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	해당사항 없음			
	소요예산(백만원)	해당사항 없음			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
			해당사항 없음		
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내		해당사항 없음	
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 지금까지 oxyresveratrol 은 뽕나무 뿌리에 존재하는 것으로 알려졌으나 본 연구를 통하여 상지에 다량 존재함이 최초로 밝혀짐. 따라서 농산 폐기물로 여겨졌던 상지의 식품 및 건강 기능성 소재로의 경제적 가치를 확인하였다. 앞으로 상지를 차 및 주정 추출 분말 등으로 개발하여 국민 건강을 개선하는 다기능성 식품으로 개발이 가능함.. ▪ 상지 내 유효성분인 oxyresveratrol 함량이 품종 및 계절에 따라 변화를 나타냈고, 이 성분을 탈수와 UV등의 물리적 처리와 안전한 미생물 처리에 의한 후숙 효과로 인한 폴리페놀 물질 증진 결과로 판단해 보면, 다양한 천연물의 유효물질 증진과 제품 생산 표준화에 활용하여 제품 개발에 활용할 계획임. ▪ 우수한 개선 효과를 보인 항염증, 장관면역, 수명연장, 항산화 등의 대한 지속적인연구로 새로운 기능성 식품 혹은 의약품으로의 제품개발이 가능할 것으로 생각됨. 			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)		해당사항 없음		
	수 출				

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호

D-06

4-1. 목표달성도

○ 본 연구팀은 다음과 같은 내용으로 성실히 연구를 수행하여 목표를 달성하였음.

■ 주관연구기관((주) 에스엘에스):

- 1) 상지주정추출물의 안전성 및 안정성 시험 수행하였음.
- 2) 임상시험용 제제 처방 및 이의 안정성 시험 수행.
- 3) 위탁기관을 통하여 상지주정 추출물의 인지기능 향상 동물시험(메디프론디비티) 및 인체시험(파마크로) 등을 성실히 수행하였음.

■ 제1협동기관(한국산업기술대학교 교수 김정근):

- 1) 뽕나무중 상지내에 oxyresveratrol이 다량 함유함을 밝혔음.
- 2) 이들 유효성분이 다량 함유된 원료 채집을 위한 품종 선정, 수확 시기, 수확 후 성분 증진을 위한 생산 공정 표준화를 하였음.

■ 제 2협동기관(고려대학교 교수 임영희):

- 1) 상지 주정 추출물의 항산화 능력 측정.
- 2) 면역 증강효과 확인
- 3) 수명연장 효과 등에 대하여 규명.

■ 제 3협동기관 (고려대학교 교수 김재홍):

- 1) 상지 주정 추출물의 항염증 효과 반응 메카니즘을 규명.

4-2. 관련분야 기여도

- 연구결과의 학술 발표로 천연물 분야 발전에 기여 : 5편의 SCI(E)급 논문, 2편의 비SCI 논문, 학회 발표 6건 등으로 천연물 분야 학술 발전에 기여.
- 천연물 전문연구 인력 양성에 기여 : 총 12명의 인력양성 (학사: 5명, 석사: 6명, 박사: 1명)
- 폐기물로 버려지던 상지의 천연물 신소재로의 개발 가능성 제시.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> ■ 본 연구결과 얻은 탈수, 자외선, 미생물 처리 등의 후숙 효과로 인한 폴리페놀 물질 증진 방법은 앞으로 천연물의 유효물질 증진과 제품 생산 표준화에 활용한다면 그 경제적 파급 효과가 크다고 사료됨. ■ 인지기능개선에 대한 인체적용시험 결과, 만족스러운 결과를 얻지 못하였으나 우수한 개선 효과를 보인 항염증, 장관면역, 수명연장, 항산화 등의 인체적용시험을 수행하여 새로운 기능성 식품 혹은 의약품으로의 제품개발이 가능할 것으로 생각됨. ■ 본 연구 수행에 참여한 연구진은 성실히 연구를 수행하여 목표를 충분히 달성하였으며 향후 제품 개발에 본 연구 결과가 활용될 수 있을 것으로 생각됨. ■ 천연물 연구에 있어서 자연적 조건(지형, 온도, 건조 상태, 품종)에 따라 지표물질의 차이가 있음을 확인하였으며 향후 천연물 제품 생산에 활용 가능할 것으로 생각됨. 	

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<p>1) 뇌경색(cerebral stroke)후의 뇌손상 감소효과를 측정하기 위해 뇌 허혈성 모델(rat middle cerebral artery occlusion)의 쥐에 oxyresveratrol (10 혹은 20 mg/kg)을 복강 내 주입한 결과, 뇌출혈성 경색(brain infarct)의 크기가 54, 63% 각각 감소하였다. 또한 oxyresveratrol의 투여는 세포사멸의 지표인 cytochrome C, caspase3, 그리고 뇌 안의 세포사멸 핵수가 현저히 감소하였다.[참고문헌: Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. Brain Res. 1017: 98 - 107 (2004)]</p>	
<p>2) 조직 배양된 쥐 cortical neuron을 사용하여 β-amyloid 유발 신경독성에 대한 oxyresveratrol의 효과를 검토한 결과, oxyresveratrol 은 Ca_2^+ 증가를 억제함에 의해 β-amyloid에 의해 유발되는 뇌세포 손상 억제, ROS (reactive oxygen species) 발생 억제, glutamate 방출 억제 등의 효과를 보여 신경보호 약물로서의 가능성이 최초로 확인되었다. [참고문헌: Ban JY, Jeon SY, Nguyen TTH, Bae KH, Song KS, Seong YH. Neuroprotective effect of oxyresveratrol from <i>Smilacis chiniae</i> Rhizome on Amyloid β Protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. Biol. Pharm. Bull. 29(12): 2419-2424 (2006)]</p>	
<p>3) 뇌손상이 있는 쥐와 뇌손상이 없는 쥐를 사용하여 oxyresveratrol의 혈액-뇌 장벽 통과율을 조사한 결과, 뇌 손상이 있는 쥐의 oxyresveratrol 투과율이 6배 높게 나타났다. 따라서 oxyresveratrol은 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier) 통과가 가능하여 뇌경색시 산화적인 스트레스에 의해 나타나는 퇴행성 뇌 질환 치료를 위한 상호보완적인 약물이 될 수 있음이 증명되었다. [참고문헌 : Breuer C, Wolf G, Andrabi SA, Lorenz P, Horn TFW. Blood - brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol. Neurosci. Lett. 393: 113 - 118 (2006)]</p>	
<p>4) Chao 등은 neuron 독성 물질인 6-hydroxydopamine을 neuroblastoma SH-SY5Y 세포에 처리한 후 oxyresveratrol과 resveratrol의 neuron 보호효과를 비교하였다. 이 실험에서 oxyresveratrol은 resveratrol보다 세포파괴의 지표 효소인 lactate dehydrogenase와 caspase-3 활성을 현저히 감소시켰고 반면에 SIRT1 함량은 크게 증가시키는 것으로 나타나</p>	

oxyresveratrol이 resveratrol보다 파킨슨 질병 치료 물질로 더 가능성이 크다고 보고하였다.

[참고문헌 : Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RCC. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. Free Rad. Biol. Med. 45(7): 1019-1026 (2008)]

5) Weber 등은 neuron과 glia를 동시 배양한 in vitro stretch-induced trauma 모델에 glutamate를 높은 농도로 노출시킨 후 oxyresveratrol의 효과를 조사하였다. 앞선 실험에서 외상 후 oxyresveratrol의 처리는 현저한 세포 사멸을 억제한 것으로 나타났으나 높은 농도의 glutamate에 노출 후 oxyresveratrol의 처리는 세포 사멸을 억제하지 못하였다.

[참고문헌 : Weber JT, Lamont M, Chibrikova L, Fekkes D, Vlug AS, Lorenz P, Kreutzmann P, Slemmer JE. Potential neuroprotective effects of oxyresveratrol against traumatic injury. Eur. J. Pharmacol. 680: 55 - 62 (2012)]

6) 중국 Hong Kong 대학의 Chang박사는 oxyresveratrol를 사용하여 파킨스 질병 치료 가능성 검토하였다. 이들은 파킨스 치료 효과를 확인하기 위해 인간 신경아세포종 [neuroblastoma]인 SH-SY5Y에 oxyresveratrol를 처리한 후 그 효과를 조사하였다. 실험 결과, oxyresveratrol 처리는 αS의 잘못 접힘을 감소시키는 것으로 나타났다. 이 결과로 oxyresveratrol은 endoplasmic reticulum의 스트레스를 감소시켜 뇌신경보호 효과를 나타내는 것으로 예측하였다.[Conference Paper: The effect of oxyresveratrol on endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. Nature and Nurture in Brain Functions, 2016].

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음		

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
○ 해당사항 없음								

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호

D-11

○ 실험실 안전 관리 현황

1. 실험실 안전 관리

(주) 에스엘에스는 실험실 안전 관리 규정에 의하여 연구실이 운영되고 있으며, 일일 점검을 통한 안전관리 일지를 작성하고 주기적으로 안전 교육을 이수하고 있음.

1.1. 실험실 안전 점검

일상안전점검 : 연구활동 종사자 매일 점검.

1.1.1. 정기안전점검 : 연 1회, 4~5월 실시(유자격자 또는 업체 위탁점검)

1) 연구실 일반관리, 소방, 기계, 산업위생, 화학약품, 생물, 전기, 가스

1.1.2. 특별안전점검 : 연구주체의 장이 필요하다고 인정하는 경우 실시

1.2. 실험실 안전교육 및 안전관리 규정

1.2.1. 실험실 안전교육

1) 교육대상자 : 연구활동 종사자(연구원, 학부생, 대학원생)

2) 온라인 안전교육 : 전반기 6시간, 후반기 6시간)

3) 자체교육 : 실험·실습 수업 전 5분 자체 안전교육실시(연구책임자의 지도하에 당해 실험 주의사항)

1.2.2. 상해보험 가입

1) 대상: 연구활동 종사자(연구원, 학부생, 대학원생)

2) 보상기준 및 내용

구분		내용
보상 기준		- 연구실에서 발생한 사고로 연구활동종사자가 부상, 질병, 신체장애, 사망 등 생명 및 신체상의 손해발생시 보상
보상 내용	사망	1인당 1억 원
	후유 장애	1억 원을 한도로 후유장애등급별 정액 보상
	상해 의료비	1천만 원 한도로 1인당 상해등급별 정액 및 실손 보상

1.2.3. 건강검진

1) 대상 : 자연계 연구활동 종사자(연구원, 학부생, 대학원생)

2) 시행 : 매년 3~4월, 지정 병원.

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역 할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	SIR-2.1-dependent lifespan extension of <i>Caenorhabditis elegans</i> by oxyresveratrol and resveratrol	Experimental Biology and Medicine (241: 1757-1763)		미국	2.688	2016.05.10	중복 사사	SCI
2	논문	Anti-inflammatory action of ethanolic extract of <i>Ramulus mori</i> on the BLT2-linked cascade	The Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (49(4): 232-237)		대한 민국	2.49	2016.04.08	중복 사사	SCIE
3	논문	Conditioned medium from LS 174T goblet cells treated with oxyresveratrol strengthens tight junctions in Caco-2 cells	Biomedicine & Pharmacotherapy (85:280-286)		미국	2.759	2016.11.07	중복 사사	SCI
4	논문	Oxyresveratrol improves tight junction integrity through the PKC and MAPK signaling pathways in Caco-2 cells	Food and Chemical Toxicology (108: 203-213)		미국	3.778	2017.08.02.	중복 사사	SCI
5	논문	Oxyreveratrol-containing <i>Ramulus mori</i> ethanol extract attenuates acute colitis by suppressing inflammation and increasing mucin	Journal of Functional Foods (35: 146-158)		네덜 란드	3.144	2017.05.18	중복 사사	SCIE

6	논문	Oxyresveratrol의 식물기원, 생합성, 생물학적 활성 및 약물동력학	한국식품과학회지		대한민국	-	2015.10.30	중복사사	비SCI
7	논문	숙성에 의한 상지내 옥시레스베라트롤 축적	한국식품과학회지		대한민국	-	2018.02.28	중복사사	비SCI
1	학술 발표	Oxyreveratrol-containing Ramulus mori ethanol extract attenuates acute colitis through suppressing inflammation and increasing mucin secretion	2016 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting		대한민국	-	2016.08.17		
2	학술 발표	Anti-inflammatory mechanism of Ramulus mori on the BLT2-linked cascade	2016 한국생화학 분자생물학회		대한민국	-	2016.05.20		
3	학술 발표	Improvement of tight junction integrity in Caco2 cell monolayers by oxyresveratrol	2015 한국미생물학회 연합 국제학술대회		대한민국	-	2015.11.05		
4	학술 발표	Lifespan extension of Caenorhabditis elegans by oxyreveratrol and its mechanism	2015 한국미생물학회 연합 국제학술대회		대한민국	-	2015.11.05		
5	학술 발표	MyD88-BLT2-dependent cascade contributes to LPS-induced interleukin-6 production in mouse macrophage	KSBMB International Conference 2015		대한민국		2015.05.12		

6	학술 발표	Ethanol Extracts of Ramulus mori Show Antioxidant activity and Inhibitory Effect on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells	2015 KoSFoST International Symposium and Annual Meetin		대한민국		2015.06.03		
1	특허	옥시레스베타트롤을 포함하는 상지 추출물 및 이의 제조방법	고려대학교, 한국산업기술대학교, (주)에스엘에스		대한민국		2016.01.11		출원번호 10-2016-0003368
2	특허	BLT2 억제 활성을 갖는 상지 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물	고려대학교		대한민국		2016.03.25		출원번호 10-2016-0036306
3	특허	상지 추출물을 포함하는 인지기능 개선용 건강기능식품 및 약학 조성물	(주)에스엘에스		대한민국		2017.07.12		출원번호 10-2017-00884
4	특허	거품세포 형성 억제 및 혈관 병변형성 억제 활성을 가지는 상지 추출물을 함유하는 혈관질환의 예방또는 치료용 약학적 조성물	고려대학교, 한국산업기술대학교		대한민국		2016-08-01		등록번호 10-2015-0141379

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

12. 참고문헌

코드번호	D-14
제1절 서론 참고문헌	
<ol style="list-style-type: none">1. Shao B, Guo HZ, Cui YJ, Liu AH, Yu HL, Guo H, Xu M, Guo DA. Simultaneous determination of six major stilbenes and flavonoids in <i>Smilax china</i> by high performance liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal. 44(3): 737 - 742 (2007)2. Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, Moon JO. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from <i>Morus alba</i> L. J. Pharm. Pharmacol. 55(12): 1695 - 1700 (2003)3. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. Nitric Oxide 9(2): 64—76 (2003)4. Breuer C, Wolf G, Andrabi SA, Lorenz P, Horn TFW. Blood - brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol. Neurosci. Lett. 393: 113 - 118 (2006)5. Jeandet P, Delaunois B, Conreux A, Donnez D, Nuzzo V, Cordelier S, Clément C, Courot E. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. Biofactors 36(5): 331-341 (2010)6. Ayinampudi SR, Wang YH, Avula B, Smillie TJ, Khan IA. Quantitative analysis of oxyresveratrol in different plant parts of <i>Morus</i> species and related genera by HPTLC and HPLC. J. Planar Chromatogr. 24(2): 129-129 (2011)7. Shao B, Guo HZ, Cui YJ, Liu AH, Yu HL, Guo H, Xu M, Guo DA. Simultaneous determination of six major stilbenes and flavonoids in <i>Smilax china</i> by high performance liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal. 44(3): 737 - 742 (2007)8. Kim JK, Kim MJ, Cho SG, Kim MK, Kim SW, Lim YH. Biotransformation of mulberroside A from <i>Morus alba</i> results in enhancement of tyrosinase inhibition. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37(6): 631-637 (2010)9. Wang WX, Qian JY, Wang XJ, Jiang AP, Jia AQ. Anti-HIV-1 activities of extracts and phenolics from <i>Smilax china</i> L. Pak. J. Pharm. Sci. 27(1): 147-151 (2014)10. Suhartati T, Yandri, Suwandi JF, Hadi S. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> antiplasmodial activity of oxyresveratrol and artonine isolated from two <i>Artocarpus</i> plants in Indonesia. Orient. J. Chem. 26(3): 825-830 (2010)11. Phoolcharoen W, Sooampon S, Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Kuvatanasuchati J, Pavasant P. Anti-periodontal pathogen and anti-inflammatory activities of oxyresveratrol. Nat. Prod. Commun. 8(5): 613-616 (2013)12. Chen YC, Tien YJ, Chen CH, Beltran FN, Amor EC, Wang RJ, Wu DJ, Mettling C, Lin YL, Yang WC. <i>Morus alba</i> and active compound oxyresveratrol exert anti-inflammatory activity via inhibition of leukocyte migration involving MEK/ERK signaling.	

BMC Complement Altern. Med. 13(1): 45 (2013)

13. Bharani SE, Asad M, Dhamanigi SS, Chandrakala GK. Immunomodulatory activity of methanolic extract of *Morus alba* Linn. (mulberry) leaves. Pak. J. Pharm. Sci. 23(1): 63–68 (2010)

14. Jo SP, Kim JK, Lim YH. Antihyperlipidemic effects of stilbenoids isolated from *Morus alba* in rats fed a high-cholesterol diet. Food Chem. Toxicol. 65: 213 - 218 (2014)

15. Likhitwitayawuid K, Chaiwiriya S, Sritularak B, Lipipun V. Antiherpetic flavones from the heartwood of *Artocarpus gomezianus*. Chem. Biodivers. 3(10): 1138 - 1143 (2006)

16. Machii H, Koyama A, Yamanouchi H, Matsumoto K, Kobayashi S, Katagiri K. A list of genetic mulberry resources maintained at National Institute of Sericulture and Entomological Sciences. Misc. Publ. Natl. Seric. Entomol. Sci. 26: 1-77 (1999)

17. Vingtdoux V, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, Marambaud P. Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. BMC Neurosci. 9(2): S6 (2008)

18. Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. Brain Res. 1017: 98 - 107 (2004)

19. Ban JY, Jeon SY, Nguyen TTH, Bae KH, Song KS, Seong YH. Neuroprotective effect of oxyresveratrol from *Smilacis chinae* Rhizome on Amyloid β Protein (25–35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. Biol. Pharm. Bull. 29(12): 2419–2424 (2006) (10) Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. Antiviral Res. 80(1): 62 - 70 (2008)

20. Breuer C, Wolf G, Andrabi SA, Lorenz P, Horn TFW. Blood - brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol. Neurosci. Lett. 393: 113 - 118 (2006)

21. Jeon SY, Kwon SH, Seong YH, Bae K, Hur JM, Lee YY, Suh DY, Song KS. β -secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from *Smilax rhizoma*. Phytomed. 14(6): 403 - 408 (2007)

22. Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RCC. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. Free Rad. Biol. Med. 45(7): 1019–1026 (2008)

23. Richard T, Pawlus AD, Iglésias ML, Pedrot E, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Monti JP. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. Annal. N. Y. Acad. Sci. 1215: 103–108 (2011)

24. Weber JT, Lamont M, Chibrikova L, Fekkes D, Vlug AS, Lorenz P, Kreutzmann P, Slemmer JE. Potential neuroprotective effects of oxyresveratrol against traumatic injury. Eur. J. Pharmacol. 680: 55 - 62 (2012)

25. Mouihate A, Horn TF, Pittman QJ. Oxyresveratrol dampens neuroimmune responses *in vivo*: a selective effect on TNF- α . Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.

291(5): R1215—R1221 (2006)

26. Choi EM, Hwang JK. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E₂ and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia* 76: 608—613 (2005)

27. Fang SC, Hsu CL, Yen GC. Anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the fruits of *Artocarpus heterophyllus*. *J. Agric. Food Chem.* 56(12): 4463—4468 (2008)

28. Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, Moon JO. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 55(12): 1695 - 1700 (2003)

29. Chen YC, Tien YJ, Chen CH, Beltran FN, Amor EC, Wang RJ, Wu DJ, Mettling C, Lin YL, Yang WC. *Morus alba* and active compound oxyresveratrol exert anti-inflammatory activity via inhibition of leukocyte migration involving MEK/ERK signaling. *BMC Complement Altern. Med.* 13: 45 (2013)

30. Bharani SE, Asad M, Dhamanigi SS, Chandrakala GK. Immunomodulatory activity of methanolic extract of *Morus alba* Linn. (mulberry) leaves. *Pak. J. Pharm. Sci.* 23(1): 63—68 (2010)

31. Sureda A, Tejada S, del Mar Bibiloni M, Antoni Tur J, Pons A. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: polyphenol supplementation and exercise-induced oxidative stress and inflammation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15(4): 373—379 (2014)

32. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TFW. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 9(2): 64—76 (2003)

33. Oh H, Ko EK, Jun JY, Oh MH, Park SU, Kang KH, Lee HS, Kim YC. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of prenylflavonoids, coumarin, and stilbene from *Morus alba*. *Planta Med.* 68: 932—934 (2002)

34. Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, Moon JO. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 55(12): 1695 - 1700 (2003)

35. Chatsumpun M, Chuanasa T, Sritularak B, Likhitwitayawuid K. Oxyresveratrol protects against DNA damage induced by photosensitized riboflavin. *Nat. Prod. Commun.* 6(1): 41—44 (2011)

36. Cantos E, García-Viguera C, de Pascual-Teresa S, Tomás-Barberán FA. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J. Agric. Food Chem.* 48(10): 4606–4612 (2000)

37. Bonghi C, Rizzini FM, Gambuti A, Moio L, Chkaiban L, Tonutti P. Phenol compound metabolism and gene expression in the skin of wine grape (*Vitis vinifera* L.) berries subjected to partial postharvest dehydration. *Postharvest Biol. Technol.* 67: 102–109 (2012)

38. Houillé B, Besseau S, Courdavault V, Oudin A, Glévarec G, Delanoue G, Guérin L, Simkin AJ, Papon N, Clastre M, Giglioli-Guivarc'h N, Lanoue A. Biosynthetic origin of E-resveratrol accumulation in grape canes during postharvest storage. *J. Agric. Food Chem.* 63(5): 1631-1638 (2015)
39. Cho YJ, Maeng JS, Kim CT, Pyee J. Enrichment of resveratrol content in harvested grape using modulation of cell metabolism with UV treatment. *J. East Asian Soc. Diet Life* 21: 739-745 (2011)
40. Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33(2): 151-152 (1977)
41. Hasan MM, Yun HK, Kwak EJ, Baek KH. Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits. *Ultrason Sonochem.* 21(2): 729-734 (2014)
42. Hasan MM, Baek KH. Induction of resveratrol biosynthesis in grape skins and leaves by ultrasonication treatment. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31(4): 496-502 (2013)
43. Jimenez JB, Orea JM, Ureña AG, Escribano P, de la Osa PL, Guadarrama A. Short anoxic treatments to enhance trans-resveratrol content in grapes and wine. *Eur. Food Res. Technol.* 224(3): 373-378 (2007)
44. Boue SM, Shih BY, Burow ME, Eggleston G, Lingle S, Pan YB, Bhatnagar D. Postharvest accumulation of resveratrol and piceatannol in sugarcane with enhanced antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 61(35): 8412-8419 (2013)
45. Sales JM, Resurreccion AVA. Maximising resveratrol and piceid contents in UV and ultrasound treated peanuts. *Food Chem.* 117(4): 674-680 (2009)
46. Gorena T, Saez V, Mardones C, Vergara C, Winterhalter P, von Baer D. Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chem.* 155: 256-263 (2014)
47. Fernández Marín MI, Puertas B, Guerrero RF, García Parrilla MC, Cantos Villar E. Preharvest methyl jasmonate and postharvest UVC treatments: increasing stilbenes in wine. *J. Food Sci.* 79(3): C310-C317 (2014)

제4절 제2협동연구 참고문헌

1. Machii, H., Koyama, A. and Yamanouchi, H. (1999) A list of genetic mulberry resources maintained at National Institute of Sericulture and Entomological Sciences. *Misc. Publ. Natl. Seric. Entomol. Sci.* **26**, 1-77.
2. Tutin, T. G., Burges, N. A., Chater, A. O., Edmondson, J. R., Heywood, V. H., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M. and Webb, D. A. (1996) *Flora Europaea*. 2nd ed., 1993, reprinted 1996. Vol 1. Psilotaceae to Platanaceae. Cambridge University Press, xlvii, pp. 38.
3. Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. (2007) Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem.* **102(4)**, 1233-1240.

4. Ercisli, S. and Orhan, E. (2007) Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chem.* **103(4)**, 1380-1384.
5. Ercisli, S. (2002) A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. *Genet. Resour. Crop Evol.* **51**, 419-435.
6. Srivastava, S., Kapoor, R., Thathola, A. and Srivastava, R. P. (2006) Nutritional quality of leaves of some genotypes of mulberry (*Morus alba*). *Int. J. Food Sci. Nutr.* **57(5-6)**, 305-313.
7. Kimura, T., Nakagawa, K., Kubata, H., Kojima, Y., Goto, Y., Yamagishi, K., Oita, S., Oikawa, S. and Miyazawa, T. (2007) Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5869-5874.
8. Kim, S. Y., Gao, J. J., Lee, W. C., Ryu, K. S., Lee, R. R. and Kim, Y. C. (1999) Antioxidative flavonoids from the leaves of *Morus alba*. *Arch. Pharm. Res.* **22**, 81 - 85.
9. Roupe, K. A., Remsberg, C. M., Yanez, J. A. and Davies, N. M. (2006) Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.* **1(1)**, 81-101.
10. Ferrieres, J. (2004) The French paradox : lessons for other countries. *Heart* **90**, 107-111.
11. Constant, J. (1997) Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Clin. Cardiol.* **20**, 420-424.
12. Kopp, P. (1998) Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur. J. Endocrinol.* **138**, 619-620.
13. Hengst, J. A. and Yun, J. K. (2012) Sphingosine kinase: a key to solving the 'French Paradox'? *Br. J. Pharmacol.* **166**, 1603-1604.
14. Bradamante, S., Barenghi, L. and Villa, A. (2004) Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc. Drug Rev.* **22(3)**, 169-188.
15. Chang, C. C., Chang, C. Y., Huang, J. P. and Hung, L. M. (2012) Effect of resveratrol on oxidative and inflammatory stress in liver and spleen of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Chin. J. Physiol.* **55(3)**, 192-201.

제5절 제3협동연구 참고문헌

1. Nomura T (2001) [Chemistry and biosynthesis of prenyl flavonoids]. *Yakugaku Zasshi* 121, 535-556
2. Zhou J, Li SX, Wang W et al. (2013) Variations in the levels of mulberroside A, oxyresveratrol, and resveratrol in mulberries in different seasons and during growth. *ScientificWorldJournal* 2013, 380692
3. Lee HS, Kim DH, Hong JE, Lee JY and Kim EJ (2015) Oxyresveratrol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. *Hum Exp*

Toxicol 34, 808-818

4. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G and Horn TF (2003) Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 9, 64-76
5. Hwang D, Jo S-P, Lee J, Kim J-K, Kim K-H and Lim Y-H (2015) Antihyperlipidaemic effects of oxyresveratrol-containing *Ramulus mori* ethanol extract in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Functional Foods* 19, 353-362
6. Eo HJ, Park JH, Park GH et al. (2014) Anti-inflammatory and anti-cancer activity of mulberry (*Morus alba* L.) root bark. *BMC Complement Altern Med* 14, 200
7. Wang W, Zu Y, Fu Y and Efferth T (2012) In vitro antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *Morus alba* L. leaves, stems and fruits. *Am J Chin Med* 40, 349-356
8. Lim HJ, Jin HG, Woo ER, Lee SK and Kim HP (2013) The root barks of *Morus alba* and the flavonoid constituents inhibit airway inflammation. *J Ethnopharmacol* 149, 169-175
9. Zhang Z, Jin J and Shi L (2008) Protective function of cis-mulberroside A and oxyresveratrol from *Ramulus mori* against ethanol-induced hepatic damage. *Environ Toxicol Pharmacol* 26, 325-330
10. Zhang Z and Shi L (2010) Anti-inflammatory and analgesic properties of cis-mulberroside A from *Ramulus mori*. *Fitoterapia* 81, 214-218
11. Xu L, Yang F, Wang J, Huang H and Huang Y (2015) Anti-diabetic effect mediated by *Ramulus mori* polysaccharides. *Carbohydr Polym* 117, 63-69
12. Hwang D, Jo S-P, Lee J, Kim J-K, Kim K-H and Lim Y-H (2015) Antihyperlipidaemic effects of oxyresveratrol-containing *Ramulus mori* ethanol extract in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Functional Foods* 19, 353-362
13. Kwon DJ, Bae YS, Ju SM, Youn GS, Choi SY and Park J (2014) Salicortin suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses via blockade of NF- κ B and JNK activation in RAW 264.7 macrophages. *BMB Rep* 47, 318-323
14. Maitra U, Singh N, Gan L, Ringwood L and Li L (2009) IRAK-1 contributes to lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species generation in macrophages by inducing NOX-1 transcription and Rac1 activation and suppressing the expression of antioxidative enzymes. *J Biol Chem* 284, 35403-35411
15. Kim JS, Yeo S, Shin DG et al. (2010) Glycogen synthase kinase 3 β and beta-catenin pathway is involved in toll-like receptor 4-mediated NADPH oxidase 1 expression in macrophages. *FEBS J* 277, 2830-2837
16. Andreakos E, Sacre SM, Smith C, Lundberg A, Kiriakidis S, Stonehouse T (2004) Distinct pathways of LPS-induced NF- κ B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* 103, 2229 - 2237.

17. Yokomizo T, Kato K, Hagiya H, Izumi T and Shimizu T (2001) Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. *J Biol Chem* 276, 12454-12459
18. Powell WS, Gravel S, Khanapure SP and Rokach J (1999) Biological inactivation of 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by human platelets. *Blood* 93, 1086-1096
19. Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875
20. Leslie CC (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 272, 16709-16712
21. Qi HY and Shelhamer JH (2005) Toll-like receptor 4 signaling regulates cytosolic phospholipase A2 activation and lipid generation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem* 280, 38969-38975
22. Park GS and Kim JH (2015) Myeloid differentiation primary response gene 88-leukotriene B4 receptor 2 cascade mediates lipopolysaccharide-potentiated invasiveness of breast cancer cells. *Oncotarget* 6, 5749-5759
23. Cho KJ, Seo JM, Lee MG and Kim JH (2010) BLT2 Is upregulated in allergen-stimulated mast cells and mediates the synthesis of Th2 cytokines. *J Immunol* 185, 6329-6337
24. Lee AJ, Cho KJ and Kim JH (2015) MyD88-BLT2-dependent cascade contributes to LPS-induced interleukin-6 production in mouse macrophage. *Exp Mol Med* 47, e156
25. Mathis S, Jala VR and Haribabu B (2007) Role of leukotriene B4 receptors in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 7, 12-17
26. Hoyer FF, Albrecht L, Nickenig G and Muller C (2012) Selective inhibition of leukotriene receptor BLT-2 reduces vascular oxidative stress and improves endothelial function in ApoE^{-/-} mice. *Mol Cell Biochem* 359, 25-31

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.